琉球大学学術リポジトリ

平成30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: Japanese 出版者: 琉球医学会 公開日: 2020-11-24 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/20.500.12000/0002016917

平成 30 年度

医学科 医科学研究ポスター発表会
抄　録　集

2019 年 4 月 15 日（月）～ 4 月 16 日（火）

琉球大学医学部
医学科 3 年次

001 赤血球型マラリアを感染モデルとしたファージワクチンプラットフォームの開発

仲嶺　澪（学籍番号：164119B）
指導教員：○村上　明一，塚原　成俊，喜友名　しのぶ，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

ワクチンは感染症予防に非常に有効であるが，新たなワクチンの開発や生産に多額の費用と時間を要する．この問題の解決策の一つとして，ファージディスプレイ (PD 法) に着目した．PD 法とは，バクテリオファージの構造タンパク質にペプチドを融合させファージの表面に提示させる技術である．PD 法を活用した抗体作製や機能性ペプチドの探索法はその有効性が広く使用されている技術である．この PD 法を感染防御に有効なワクチン候補ペプチドの分離から効果の検証に至る一連のスクリーニングに応用することを計画した．本研究では，マラリア感染マウスモデルを使用し，①ファージワクチンの有用性評価，② PD 法を活用したワクチンペプチドの探索プラットフォームの開発を最初の目標とした．
マウス赤血球型マラリア原虫である *Plasmodium yoelii* (*P.yoelii*) でワクチン効果が報告されている MSP-1 と AMA-1 に注目し抗原として選択した．*P.yoelii* から PCR 法を用いて抗原遺伝子をクローニングし，ファージの構造タンパク質とペプチドを融合させファージの表面に提示させた．これをファージワクチンとしてマウスの腹腔に d0, d14 に 2 回接種, その後 *P.yoelii* を感染させ，ワクチン効果を確認した．また，*P.yoelii* 感染後に回復したマウス血清から抗体を精製し，作製したファージワクチンが反応するかを確認する予定である．今回，作製したマウス赤血球型マラリア原虫に対するファージワクチンの効果が確認された場合，どの組織に記憶 B 細胞が維持されているか抗原ペプチドを提示させたファージをプローブとして可視化することを試み，されに有効なワクチン投与経路の検索に応用する予定である．

002 CRISPR-Cas9/dCas9 を用いた遺伝子抑制アッセイの確立

中林　夕貴（学籍番号：164143D）
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 Singapore,***
[3] **琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座**

目 的　成人T細胞性白血病（ATL）は human T-lymphotropic virus type-1（HTLV-1）の感染をきっかけとし，30-50 年ほどの期間をかけて発症する．ATL は非常に多くの遺伝子変異，発現異常を伴っている．研修先のラボでは，その中でも ATL の発症により深く関わっている遺伝子を，スーパーエンハンサーの視点から同定する試みを行っている．今回の研究では，遺伝子発現抑制アッセイを用いて，候補遺伝子の細胞への影響を検証することを目的とした．
方法　Cas9, dead Cas9（dCas9）を高発現する安定した細胞株の作成のため，CRISPR-Cas9，CRISPR-dCas9 を含むレンチウイルスをそれぞれ作成し，Cas9 を ATL 細胞株である ATL43 および ATL55 に，dCas9 はそれらに加えて TL-Om1 にそれぞれ導入した．Cas9 はフローサイトメトリーを用いて発現を確認した．dCas9 はピューロマイシンを加えて導入した細胞のみ選択し，ウエスタンブロットで dCas9 の発現を確認した．
結論　導入により，ATL43 の 12.3%，ATL55 の 2.9% の細胞に Cas9 の過剰発現が起きていた．ATL43 の方が ATL55 より Cas9 を導入しやすいといえる．dCas9 の導入結果は，ウイルスを 1 回感染させた ATL43 では発現は高くなかったが，複数回感染を行った TL-Om1 では，dCas9 発現の高い株が得られた．ATL55 は複数回感染によっても dCas9 の導入は困難であった．
結語　Cas9，dCas9 ともに細胞に導入し，安定株の作成が可能ではあるが，細胞種によりその効率は異なる．今回作成した細胞株は，遺伝子抑制の実験系構築という目的を達成するためのツールとして活用できると期待される．

003 神経膠芽腫における AMPA 型受容体のサブユニット GluA2 の転写調節について

金城　みなみ（学籍番号：164121C）
指導教員：○片桐　千秋，高木　博，西村　正彦，土屋　幸男，石内　勝吾
琉球大学医学研究科　琉球大学脳神経外科

神経膠芽腫は最も悪性度の高い脳腫瘍であり，世界的に研究がなされている．AMPA 型グルタミン酸受容体は中枢神経系に広く分布し，リガンドのグルタミン酸を受容することで陽イオンを透過させるイオンチャネル共役型受容体である．GluA1 から 4 までの 4 つのサブユニットがホモもしくはヘテロで 4 量体をなす．その中で GluA2 をサブユニットとして構成する AMPA 型グルタミン酸受容体はカルシウム非透過性になるという特徴的な性質を持つ．神経膠芽腫にはカルシウム透過型を発現するものが多数存在し，悪性度に影響を及ぼしていると考えられる．ゆえにカルシウムの透過性，非透過性を担う GluA2 の転写調節機構の解明は重要である．遺伝子の転写調節機構のひとつに DNA のメチル化がある．これは CpG アイランドという CG の連続配列のシトシン残基がメチル化修飾を受けるものである．特に遺伝子のプロモーター領域にはこの配列がいくつか存在し，その部分の高メチル化は転写因子の DNA への結合をブロックすることで遺伝子発現に対して抑制的に働く．本研究では GluA2 をコードする GRIA2 遺伝子のプロモーター領域と特異的な転写に関わるとされる第一イントロンの DNA のメチル化修飾を調べることにより，神経膠芽腫における GluA2 の転写調節機構を明らかにすることを目的とした．我々は DNA のメチル化解析を行うにあたり，バイサルファイト処理による塩基置換を利用する方法を用いた．DNA 配列中のシトシンをバイサルファイトで処理しウラシルに変換させるが，メチル化されたシトシンは変換されない性質を利用し，シーケンス解析によりメチル化サイトを同定する．しかし，工程が多く煩雑であったため，プロモーター領域 1 クローン, 第一イントロン 11 クローンを得る結果となった．正しい解析結果を得るには少なくとも 30 個以上の配列結果が必要であるため，今後クローン数を増やすことが望まれる．

004 フィラグリン遺伝子の Long PCR-seq 解析系の確立

上原　未琴（学籍番号：154124C）
指導教員：○木村亮介，石田肇，伊佐睦実
琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

フィラグリンは塩基性タンパク質であり，皮膚のバリア機能である角質層の形成をケラチンと共に担っている．また，アトピー性皮膚炎や尋常性魚鱗癬の患者にフィラグリン遺伝子異常が多く見つかっており，フィラグリン遺伝子多型と皮膚形質との関連に興味がもたれる．本研究では，次世代シーケンサーを用いてフィラグリン遺伝子配列のリシーケンシング解析をおこなうために Long PCR-seq の実験系を確立することを目指して，複数のプライマーを設計し，より有用なプライマーセットを選出することを目的とした．フィラグリン遺伝子は 1 番染色体長腕に存在し，3 つのエキソンから成る．PCR に用いるプライマーは，イントロンも含む遺伝子の全長（23,029 塩基）をカバーするように，Primer3 を用いて，フォワード（F）およびリバース（R）プライマーをそれぞれ 6 つ設計した．その他に先行研究により設計されたプライマーセット F0R0 を実験に用いた．プライマーの組み合わせと合成される領域（括弧内の数字 +152,300,000 は 1 番染色体上のポジション）はそれぞれ, F1R1（279..7927), F2R2（5488..13189), F3R3（10822..17533)，F4R4（13780..21392)，F5R5（17505..24053)，F6R6（21367..29517)，F0R0（1960..15928）であり，さらに異なる組み合わせ（F1R2，F2R3，F3R4，F4R5，F5R6，F1R3，F4R6）も試みた．その結果，先行研究のプライマーセット F0R0 は本研究で用いた試料では増幅がみられず，正しく増幅されたと考えられるプライマーの組み合わせは，F4R4，F5R5，F6R6，F4R5，F5R6，F1R3，F4R6 であった．研究の効率上，長距離で増幅される方が有用であるため，F1R3 および F4R6 を用いてフィラグリン遺伝子全体をカバーする Long PCR-seq 解析系を確立し，皮膚形質との関連研究を行う予定である．

005 声区における空気力学的動態についての検討

堤田　夏生（学籍番号：164184B）
指導教員：○李　庸學[1)]，村上　大輔[1)]，澤津橋基広[1)]，中川尚志[1)]，鈴木　幹男[2)]
[1)] 九州大学大学院医学研究院耳鼻咽喉科学講座，
[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

【はじめに】声区は，知覚的，音響的，生理的，および空気力学的根拠に依存する，完全な喉頭における事象であり，地声や裏声などに代表　　される．さらに歌唱者はミックスボイス（中声区）と言われる独自の声区を有することが知られている．このミックスボイスを含めた，声区の　　特徴はまだ明らかになっておらず，歌唱者や発声教師の間で，感覚的に捉えられることが多い．そのため，誤った発声になる機能性発声障害や，声帯結節や声帯ポリープなどの器質的な音声障害の原因にもなり，医学的根拠に基づいた声区研究が求められる．これまでに，喉頭筋電図，EGG，ハイスピードカメラ，音声スペクトルを用いた研究が行われてきたが，空気力学的動態についてはまだ解明されていない．そこで，本研究では各声区について空気力学的検査を行い，声区における空気力学的特徴を明らかにすることを目的とした．
【対象と方法】対象は，耳鼻咽喉科医師が喉頭ストロボスコピーを施行し，喉頭に器質的な異常がないことを確認できた歌唱経験者 5 例（男性　　2 名，女性 3 名）とした．実験は，九州大学病院耳鼻咽喉科音声外来の防音室で行った．方法は，PS-3000（永島医科器械）を用いて，気流阻止法を利用した発声機能検査を行い，発声における空気力学的要素を測定した．発声中は電気喉頭計（electroglottography;EGG）を併用し，波形を記録した．発声タスクは母音 /u/ とし，発声可能なすべての声区を特定の音高ごとに測定した．
【結果／考察】発声機能検査の結果，全例の対象者すべての音高において，呼気圧は，地声で最も高く，呼気流率は，裏声で最も高かった．一方でミックスボイスは，呼気圧の点では裏声同様に低く，呼気流率の点では地声同様に低かった．このことからミックスボイスは，音声生成において，空気力学的に効率の良い発声であることが示唆された．

006 HVA を用いた沖縄県における洪水に対する災害脆弱性評価

相葉　日向子（学籍番号：164170B）
指導教員：久木田　一朗
琉球大学院医学研究科救急医学講座

目的：沖縄本島は台風や豪雨による被害が多い．その主なものとして洪水があるためその災害対策の評価をしようと考えた．沖縄県の洪水発生時の脆弱性を評価することで，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などから Hazard Vulnerability Analysis（HVA）という災害評価基準を用いて災害を 3 つの項目ごとに評価する．Probability は 0 ～ 3 の 4 段階，Risk を 1 ～ 5 の 5 段階，Preparedness を 1 ～ 3 の 3 段階で評価し，この 3 つを掛け合わせた値（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ことを意味する．
結果：Probability:2 Risk:3 Preparedness:2
考察：Probability：沖縄県の河川は，河川流域が小さい，貯留能力が極めて低い，降雨は海に直接流出，河床勾配が急で流路延長が短い，川幅が狭いという特徴があり，豪雨時に水位が上昇しやすく洪水が起こりやすい．また，近年は短時間で大量という降雨特性が顕在化してきている．しかし一方で，河川の整備も進んできている．このことより洪水の発生する可能性はやや高いと考えた．よって，Probability は 2 とした．
Risk：S47 ～ H26 の二級河川整備による浸水戸数の推移を見ると，二級河川の整備と共に浸水戸数が減っている．しかし H26 年時点で約 3 分の 2 の二級河川は整備済みであるが H24 年の台風 16 号では 359 戸の浸水被害が発生している．よって洪水の危険性は低くなく，Risk は 3 とした．
Preparedness：二級河川の整備は進んでいる．また浸水想定区域図の公表，水防法に基づく水位周知河川の指定や浸水想定区域の見直し，水位周知河川における水位通知義務，沖縄県における特別警戒水位の見直しなどの対策を行なっている．一方で河川整備予算が年々減少傾向にあることや，ソフト対策が未だ十分でない点もある．よって Preparedness は 2 とした．

007 前立腺癌患者の血清 IgG レベルの比較と検討

金城　友有（学籍番号：164151E）
指導教員：○須田　哲司，須川　愛，斎藤　誠一
琉球大学大学院医学研究科 腎泌尿器科学講座

膀胱癌患者の尿中 IgG レベルは健常者と比較して有意に上昇することが報告されている．一方，前立腺癌患者の血清中 IgG レベルは健常者と比較して減少する報告と差を認ない報告とがあり，統一見解に至っていない．そこで本研究は，高リスク前立腺癌患者と前立腺肥大症の患者の血清 IgG レベルを比較し，再発リスクとの関連性を明らかにすることを目的とした．
2011 年から 2018 年までに琉球大学医学部付属病院で採取され，研究同意の得られた高リスク前立腺癌患者の血清 30 検体と前立腺肥大症患者の血清 30 検体を対象とした．血清中 IgG は，精製血清を SDS-PAGE で分離し，抗ヒト IgG 抗体を用いた Western Blot にて検出した．約 50kDa バンド蛍光強度を血清蛋白濃度で補正した相対蛍光強度を IgG レベルとし，再発リスク，Clinical Stage，初診時 PSA 値との関連性を解析した．前立腺癌患者群の血清中 IgG レベルは前立腺肥大症患者群と比べ若干低い傾向を示したが，統計的な有意差は認められなかった
．血清中 IgG レベルと Clinical Stage との関連性解析では，cT3 の患者において IgG レベルの低い患者を認めたが，検体数が少ないため統計的解析には至らなかった．血清中 IgG レベルと初診時 PSA 値の関連性解析では，前立腺肥大症患者群および前立腺癌患者群のどちらも相関は認められなかった．以上の結果，高リスク前立腺癌患者と前立腺肥大症患者の血清中 IgG レベルに統計的な差は認められないことが明らかとなった．今後はさらに検体数を増やした解析を行う必要があると考えられた．

008 体外循環時間と止血・凝固因子の変化について

橋本　直毅（学籍番号：164168K）
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】
人工心肺を用いた体外循環下では，循環血液は回路内の異物面との接触や血液希釈といった非生理的環境下におかれるため，血球損傷に加え，様々な生理活性蛋白カスケードの亢進により血小板や凝固因子の消費を来す．本研究では体外循環時間と凝固因子の変化量の相関について検討した．
【対象】
2018 年 12 月から 2019 年 2 月までに行われた開心術連続 15 例で，うち心臓手術が 9 例，大血管手術が 6 例である．
【方法】
術前，体外循環離脱前，術後（術直後，１日目，４日目，７日目，２週目，３週目）の Fib 値，血小板値及び，術前，体外循環離脱前，術後の DD 値，FDP 値を測定した．体外循環条件（体外循環時間，最低体温）における上記測定項目を比較検討した．
【結果】
1．体外循環環境下では Fib 値は体外循環時間と強い負の相関を認めた（$y=-0.0017x+0.7861$, $r=0.7217$, $P<0.01$）．回帰式より Fib の半減時間は体外循環開始 170 分であった．
2．血小板数においては有意な減少を認めたが，体外循環時間とは弱い相関を認めた（$y=-0.0008x+0.5713$, $r=0.21$, $p<0.05$）．血小板は体外循環開始直後に多く消費され，その後は緩やかな低下を示した．
３．体外循環中の温度差（超低体温群 vs 軽度低体温群）による Fib 値，血小板値の減少率に有意差を認めなかった（$p=0.776$）．
４．体外循環中は凝固線溶系の亢進状態にあり DD，FDP が上昇したが，離脱後はすみやかに減少した．
【結語】
体外循環時間と凝固因子の変化量には負の相関を認めた．

009 高齢者の子宮頸癌に対する根治的放射線治療の治療成績と晩期有害事象に関する後ろ向き観察試験

有薗　功一（学籍番号：164195G）
指導教員：○草田　武朗[1]，平安名　常一[2]，村山　貞之[3]
[1] 琉球大学医学部附属病院放射線科，
[2] 琉球大学医学部附属病院放射線部，
[3] 琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

【目的】高齢者の子宮頸癌に対する根治的放射線治療における治療成績および晩期有害事象の実態を後ろ向きに調査し，治療成績の予後良好因子や有害事象の危険因子について明らかにすることを目的とした．【方法】2012 年 1 月～ 2016 年 12 月 31 日までの期間に琉球大学医学部附属病院で根治的放射線治療を施行した 65 歳以上の子宮頸癌症例の 2 年生存率（2y-OS），2 年局所制御率（2y-LC），2 年骨盤内制御率（2y-PC），2 年無病生存率（2y-DFS），晩期有害事象（膀胱炎，直腸炎，腸炎，骨折）の発生状況について後ろ向きに調査した．【対象】対象症例数は 75 人．症例の詳細は，年齢 74（65-90）歳，FIGO stage I/II/III/IV 25/22/20/8 人，扁平上皮癌 / 非扁平上皮癌 63/12 人，化学療法併用 26 人．【結果】2y-OS 80.1%，2y-LC 79.4%，2y-PC 78%，2y-DFS 62.6%．原病死 18 人，他病死 3 人，局所再発 16 人，骨盤内リンパ節転移 3 人，遠隔転移 19 人．CTCAEv5.0 で grade 3 以上に該当する有害事象は 8 人（膀胱炎）．骨折は 17 人．放射線治療の処方線量や抗がん剤併用の有無といった治療因子，年齢や Performance Status といった患者因子，子宮頸癌の病期や組織型といった疾患因子について治療成績と有害事象で多変量解析を行ったところ，扁平上皮癌であることが全ての治療成績における独立した予後良好因子であり，小線源治療の線量が 17Gy 未満であることが grade 3 以上の重篤な有害事象の独立したリスク因子であると判明した．【結語】65 歳以上の子宮頸癌の根治的放射線治療では有害事象の割合は高く，非扁平上皮癌で特に治療成績が低かった．有害事象を予防し治療成績を上げるために小線源治療をより活用することが重要と考えられた．

010 細胞質内ウイルスセンサー分子群 RIG-I like receptor に対する抗体作製と機能解析

宇根　ちさと（学籍番号：164136B）
指導教員：○村上　明一，塚原　成俊，岸本　英博
琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

自然免疫系には病原体を認識する様々な受容体があり，RIG-I like receptor（RLR）は，細胞質において RNA ウイルスの感染を感知するタンパク質である．RIG-I，MDA5，LGP2 は RLR に属し，C 末端領域でウイルス由来 RNA を認識すると活性型となり，転写因子を活性化してインターフェロン産生を促進し，抗ウイルス作用を生み出す．また，RIG-I は細胞死に関連する分子の発現を亢進させ，がん細胞特異的なアポトーシスを誘導する働きも知られている．本研究では RLR に対する抗体を作製し，研究試薬としてのみならず，ウイルス感染やがんなどの治療に役立てることを目標とした．まず，RLR の C 末端領域タンパク質を大腸菌発現系により作製した．これらを抗原として，200 億種類以上の多様性から成る VHH ファージディスプレイライブラリーからパニングを行った．VHH とはラクダ科 H 鎖抗体の可変領域であり，低分子で安定な単ドメイン抗体であることから大腸菌で安価に大量生産でき，細胞内でも機能する．スクリーニングの結果として，RIG-I，MDA5，LGP2 に対する抗体が各々 4 種類，7 種類，2 種類得られた．これらの抗体は ELISA による解析の結果，高い特異性を有していた．また，全長 RLR タンパク質を強制発現させた HEK293T 細胞の細胞破砕液を用いた western blot 法においても特異性が確かめられた．さらにこれらの抗体を EGFP 融合タンパク質として，RLR 発現細胞内に形質導入した結果，RLR 非発現細胞と比べて抗体の分布に偏りが見られたことから，細胞内でも抗体の結合能が維持されていると考えられる．今後，IFN 産生や細胞死に関連する分子の活性化など，抗体が細胞質において RLR に及ぼす影響を詳細に解析していくことによって，ウイルス感染などの治療薬としての応用を検討していく予定である．

011 悪性リンパ腫細胞株における Glutathione Peroxidase 4 の発現の意義 ～ CRISPR Cas9 システムを用いたノックアウト解析～

柱本　まどか（学籍番号：164113B）
指導教員：○山本　浩平，加留部　謙之輔
[1] 東京医科歯科大学医歯学総合研究科包括病理学分野，
[2] 琉球大学医学研究科細胞病理学講座

【背景・目的】
東京医科歯科大学包括病理学講座では悪性リンパ腫と脂質代謝との関連性について研究を進めている．今回，脂質代謝酵素である GPX4 のリンパ腫における意義を確かめるため，CRISPR-CAS9 システムを用いた GPX4 Knockout（KO）リンパ腫細胞株の解析を行った．
【方法】
GPX4 Knockout 株（B 細胞性質リンパ腫細胞の LCL-K,HS Sultan）を用いて，定常状態および抗腫瘍剤（Doxorubicin）投与下での cell viability の測定を行った．LCL-K の GPX4 KO 株は，GPX4 タンパクにおいてそれぞれ翻訳開始点から数えて -11-11, 119-138 の部位に CRISPR CAS9 を用いてフレームシフト変異をおこしたものを 2 種作製した．HS-Sultan は同様の手順で -11-11 の部位にフレームシフト変異をおこしたものを作製した．
【結果】
LCL-K 株：GPX4 119-138 において相対的に細胞増殖が抑制されている傾向が認められた．-11-11 では認められなかった．
HS Sultan 株：GPX4-11-11 で細胞の増殖が抑制された．
これらの結果は，定常状態，薬剤添加時のいずれにおいても同様の結果がみられた．また，GPX4 の発現抑制効果は LCL-K 株で弱かった．
【考察】
GPX4 の抑制によるリンパ腫細胞の増殖抑制効果は，変異点により異なった．Mutation をいれる場所によっては GPX4 の splicing variant のすべてを阻害できなかった可能性を考えている．
【結語】
悪性リンパ腫細胞において，GPX4KO 株では定常状態及び抗腫瘍剤投与下のいずれでも cell viability が低下することがわかった．

012 メチル化解析によるグリオブラストーマにおける GluA2 の転写調節機構の解明

長嶺　一輝（学籍番号：164152C）
指導教員：○片桐　千秋，高木　博，西村　正彦，土田　幸男，石内　勝吾
琉球大学医学研究科　琉球大学脳神経外科

【背景と目的】イオンチャネル型グルタミン酸受容体の 1 つである AMPA 受容体は中枢神経系での速い興奮性神経伝達やシナプスの可塑性に大きく関わっている．AMPA 受容体には 4 つのサブユニット（GluA1，GluA2，GluA3，GluA4）があり，それらがホモ，ヘテロの 4 量体を形成する．このうち GluA2 は Ca2+ 非透過性の性質を持ち，GluA2 をもつ AMPA 受容体は Ca2+ 非透過性となる．グリオブラストーマ（膠芽腫）において GluA2 の発現が抑制され，AMPA 受容体が Ca2+ 透過性を持つことによりがん細胞の遊走を亢進することが知られている．今回は GluA2 のプロモーター領域などのメチル化の程度を調べることでグリオブラストーマでの GluA2 発現が抑制されているのか考察することを目的とした．
【方法】① CGNH の細胞から DNA を抽出．② DNA 中の非メチル化シトシンを Sodium Bisulfite 処理によりウラシルに変換．③処理後 DNA のターゲット領域を PCR 増幅．④増幅産物をベクターに導入，大腸菌を増殖．⑤ DNA が導入できたコロニーからプラスミドの精製．⑥ DNA のシーケンス．⑦アライメント解析．
①～⑥の操作を繰り返し行い，最終的に GluA2 のプロモーター領域およびイントロン 1 領域を各 30 サンプル集めることを目的とした．バイサルファイト処理によりメチル化されていないシトシンはウラシルに変換され，メチル化されたシトシンは変換されない．非メチル化シトシンはもともとの DNA と違う DNA 配列を持つため，シーケンス解析でメチル化した配列が同定できる．
【結果】どの領域も 30 サンプル集めるに及ばず，統計的に必要な数に達しなかったため結果は出なかった．各アライメント結果でメチル化している場所は確認できたので今後多くのサンプルが集まればメチル化の程度を見ることができると思われる．
【考察】RT は海馬体の各領域の NMDA 受容体の機能を抑制するが，HBO によりすべての領域において NMDA 受容体の機能は回復傾向示す．従って，HBO は海馬 CA 1 ,CA3,DG 領域の NMDA 受容体機能の RT に対する保護作用をもつことが示唆された．

013 急性呼吸器感染症後の心筋梗塞の発生率は増加するか？システマティックレビュー

與那嶺　達也（学籍番号：154139B）

目的
インフルエンザや肺炎などの急性感染後に心筋梗塞の発生率が増加するか否か，これまでの報告をレビューする．
方法
呼吸器感染症と心筋梗塞発症の関連に関するシステマティックレビューを行った．
最近の総説及び急性呼吸器感染，インフルエンザ，肺炎，心筋梗塞などのMesh を用いた文献検索を行い，急性呼吸器感染症と心筋梗塞に関連する文献を同定した．
これらの論文について対象患者，デザイン，アウトカム設定などの点について詳細に検討し，統合的解析を行った．

結果，結論
急性感染症，特にウイルス及び細菌性呼吸器感染症と心筋梗塞発症の関連は明らかである．

014 Endoscopic in vivo Ca^{2+} imaging in mouse dorsal raphe nucleus

Nonoka SUZUKI（学籍番号：154141C）
Supervisor：○ Katsuhiko MIYAZAKI[1], Kenji DOYA[1], Ken-ichi KARIYA[2]
[1]***Neural Computation Unit, Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University,***
[2]***Deparment of Medical Biochemistry, University of the Ryukyus.***

Dorsal raphe nucleus (DRN) is located in the ventral periaqueductal gray matter of the midbrain. It innervates a number of regions to affect various brain functions. It is also implicated in brain dysfunctions including depression in humans. Most DRN neurons use serotonin as a transmitter. Recent mouse experiments in our Unit have shown that optogenetic activation (see below) of the DRN serotonin neurons enhances “patience” in waiting for future rewards in a behavioral task. However, few studies have been reported on serotonin neuron activities in mice undergoing a behavioral task.
I have therefore undertaken a project, “recording of the DRN serotonin neuron activities of mice undergoing a behavioral task using an endoscopic in vivo calcium imaging device”. It consisted of the following stepwise goals: (1) stereotaxic injection into DRN of an adeno-associated virus for expression of a fluorescent Ca^{2+} sensor protein GCaMP; (2) surgical insertion into DRN of an endoscope and detection of GCaMP fluorescence changes representing spontaneous neural activities; (3) execution of the detection with free moving mice for ensuring monitoring of mice undergoing behavioral task; (4) execution of the detection with transgenic mice expressing GCaMP as well as the channelrhodopsin-2 (ChR2) specifically in serotonin neurons. ChR2 is a membrane-depolarizing light-sensitive Na^+ channel for optogenetic neural activation. These steps have been completed and data collections are underway for steps 3 and 4. The final step will enable us a simultaneous modulation and monitoring of DRN serotonin neuron activities to confirm that DRN serotonin neurons really affect mouse behavior.

015 2018/19 シーズンにおける全国インフルエンザ流行レベルマップの作成・分析と沖縄県内離島におけるインフルエンザ強化サーベイランス

安座間　陽輝（学籍番号：164160D）
指導教員:○砂川　富正[1]，土橋　酉紀[1]，高橋　琢理[1]，山城　哲[2]
[1] 国立感染症研究所感染症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

インフルエンザは，日本においては例年冬季にかけて流行する急性の呼吸器感染症である．5 類感染症に指定されており，全国約 5,000 の定点医療機関から週ごとに患者数等が把握されている．私が，今回関わった活動は全国のインフルエンザの流行情報を迅速に提供するインフルエンザ流行レベルマップの作成と，沖縄県内離島におけるインフルエンザ強化サーベイランスである．インフルエンザ流行レベルマップでは，週ごとに国立感染症研究所内にて作成された基本データからホームページ掲載用のコメント案を作成した．また，これらのデータを集約し，今シーズン（2018/2019 シーズン第 7 週まで）のインフルエンザ流行の特徴を分析した．今シーズンは，2018 年第 49 週に全国の定点当たり報告数が 1 を超え流行入りし，2019 年第 2~4 週にピークを迎え，その後急激に減少している．推計受診者数も同様にピークを迎え，年齢群別にみると小児（15 歳未満）以下で 41% を占めた．入院患者数では 60 歳以上の高齢者が 5~6 割を占めており，高齢者はインフルエンザへの感染が重症につながりやすいと考えられる．ウイルスの検出情報は，流行初期は AH1pdm09 が優位であったが，ピークになるにつれ AH3 亜型が増加し，累積ではこの二種の混合流行となった．沖縄県内の離島（人口約 5 万人）におけるインフルエンザ強化サーベイランスでは，週ごとに同地域保健所から送られてくる主だった医療機関のデータを入力し解析した．同島でのインフルエンザ流行は全国とほぼ一致しており，検査陽性率は陽性数が増えるにつれ大きくなった．また，解析疫学としてワクチン効果の検証を行い，全年齢におけるオッズ比は 0.64（95% 信頼区間 0.28-0.75），有効率は 35.7% となり有意であった．特に，インフルエンザが重症化しやすいといわれる乳幼児・高齢者における有効率がそれぞれ 54%・91% と有効であったことから，インフルエンワクチンの接種が推奨される結果となった．

016 チロシンキナーゼ Pyk2 の活性化機構についての変異体を用いた解析

間　妃向子（学籍番号：164102G）
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

G 蛋白質共役型受容体（GPCR）刺激後のシグナル伝達機構を解明することは，新しい分子標的薬の開発に貢献すると考えられる．ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）受容体は，GPCR の一つであり $G_{q/11}$ タンパク質に共役する．非受容体型チロシンキナーゼである proline-rich tyrosine kinase2（Pyk2）は中枢神経系に多量に発現しており，シナプス機能に関与することが報告されている．生化学講座では，マウス視床下部由来の培養神経細胞（GT1-7 細胞）を用いて，GnRH 受容体刺激後に，Pyk2 の 402，579，580 番目のチロシン残基（Y402，Y579，Y580）がリン酸化されて活性化されることを見出している．今回私は，これらのリン酸化の分子機構について検討した．まず，これまでに作成されていた Flag 融合型の Pyk2（Y579/580F）から，Pyk2（KD:Y579/580F）を作成した．この変異体は K457 をアラニン残基に置換したもので，ATP 結合能を欠損している．次に，GT1-7 細胞に Pyk2（Y402F）を過剰発現させ，抗 Flag 抗体を用いた共免疫沈降実験を行った．その結果，変異体と，Y402 がリン酸化された内在性の Pyk2 との結合が認められ，Pyk2 が多量体を形成することが明らかになった．次に，Pyk2（KD:Y579/580F）のみの過剰発現では Y402 と Y579/580 のリン酸化は認められなかったのに対し，Pyk2（Y402F）との共発現では，これらのリン酸化が強く認められた．さらに，共免疫沈降実験により，Pyk2 と Fyn との結合が検出された．以上の結果から，多量体を形成した Pyk2 間で Y402 がリン酸化され，そのリン酸化 Y402 に Fyn が結合し，Fyn により Y579/580 がリン酸化されることが強く示唆された．

017 沖縄県における地震に対する Hazard Vulnerability Analysis

友利　大希（学籍番号：164147G）
指導教員：○久木田　一朗
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

Hazard Vulnerability Analysis（以下 HVA）とは，災害が起こる以前の対策として，あらかじめその地域における災害への脆弱性を定量的に評価しておくものである．HVA は，災害の種類を自然災害，科学技術災害，人為災害の 3 つに分け，それぞれ Probability（可能性）を 4 段階（3,2,1,0），Risk（危険度）を 5 段階（5,4,3,2,1），Preparedness（準備）を 3 段階（3,2,1）で点数付けを行う．この 3 種類の点数を掛け合わせた総得点が高いほど，その地域の災害に対する脆弱性が大きいと評価される．今回は，沖縄県における地震に対する災害脆弱性評価を行った．その結果と，結果に対する根拠を以下に示す．

Probability:2　Risk:5　Preparedness:3　Total:30

Probability に関して，最大震度 5 弱～ 5 強の地震は過去 30 年で 17 回起こっており，また，県庁前において今後 30 年以内に震度 6 弱以上の揺れに見舞われる確率は 40.3% であると予測される．これらより，甚大な被害が予測される地震が起こる可能性は決して低くはないと考えられる．
Risk に関して，地形的に孤立している沖縄県は，震災時に他県からの物資や人員の支援が遅れ，どちらも長時間不足することが予測され，危険度は極めて高いと思われる．
Preparedness に関して，県内建築物の耐震診断等の実施実績はほとんどなく，建物の耐震化については老朽化による建て替え等により行われているのが現状である．また，沖縄県における地震保険の世帯加入率は全国で最も低い．このことから，県レベルから住民レベルまで，地震に対する準備が不十分であると考える．

018 前立腺癌細胞株における SSEA-4/MSGb5 と細胞増殖の関連性の解析

有川　拳就（学籍番号：164187F）
指導教員：○須田　哲司，須川　愛，斎藤　誠一
琉球大学大学院医学研究科 腎泌尿器外科学講座

幹細胞マーカーとして知られる Stage-specific embryonic antigen 4/Monosialosyl globopentaosylceramide（SSEA-4/MSGb5）は，糖転移酵素 β-galactoside　α2,3-Sialyltransferase（ST3Gal2）によって合成される．SSEA-4/MSGb5 および ST3Gal2 は腎癌や膠芽腫，化学療法抵抗性となった乳癌において高発現し，癌の悪性進展との関連性が示唆されている．しかし，SSEA-4/MSGb5 の生物学的機能の多くは未だ明らかとなっていない．そこで本研究は SSEA-4/MSGb5 の増殖への関与を明らかにするため，siRNA による ST3Gal2 のノックダウンを試みた．まず，前立腺癌細胞株 DU145 を用いて，4 種類の ST3Gal2 siRNA のノックダウン効率を解析した．その結果，全ての siRNA において同程度のノックダウン効率を示し，任意に選択した 2 種類の siRNA を以降の解析に使用した．増殖試験は，前立腺癌細胞株 4 株に 2 種類の ST3Gal2 siRNA をトランスフェクションし，経時的な細胞数を測定した．その結果，どの細胞株も ST3Gal2 の阻害による細胞数への影響は認められなかった．ST3Gal2 の阻害により SSEA-4/MSGb5 の合成も抑制されたのか明らかにするため，SSEA-4/MSGb5 認識抗体 RM1 を用いた薄層クロマトグラフィー免疫染色を行ったが，ST3Gal2 siRNA による SSEA-4/MSGb5 の減少は限定的であった．本解析から，ST3Gal2 の阻害による増殖への影響は少ないことが推察されたが，siRNA によるノックダウン効果は限定的であり，細胞増殖との関連性を結論付けるに至らなかった．今後はノックアウトによる解析および増殖以外の機能解析が必要と考えられた．

019 静止期 CD4 陽性 T 細胞における細胞質 SAMHD1 の生化学的動態解析

山城　真人（学籍番号：164167B）
指導教員：○寺原　和孝 [1]，高橋　宜聖 [1]，岸本　英博 [2]
[1] 国立感染症研究所 免疫部
[2] 琉球大学大学院医学研究科 寄生虫・免疫病因病態学講座

背景：ヒトの細胞は後天性免疫不全ウイルス（HIV）に対する抑制因子を複数持っている．その中で SAMHD1 と呼ばれるタンパク質は核内で dNTP 濃度を下げる事で HIV の逆転写を阻害し感染を防ぐ機能を持つ事が報告されている．これには核移行シグナル（NLS）が存在することから核タンパクとして研究されてきたが，細胞質にも一定数存在する事が知られていた．

目的：本研究の目的は Resting CD4T が HIV に高い感染抵抗性を持つ原因が細胞質 SAMHD1（cSAMHD1）にあるか否かを評価するために，まず cSAMHD1 がどの様な振る舞いをするのか，明らかにする事である．

方法・結果：凍結した細胞から Resting CD4T にエンリッチし Naïve, CM, EM に分化段階ごとに分画して免疫染色により cSAMHD1 の発現している細胞の割合（発現頻度）を評価したところ，Naïve では高率に発現している一方，EM では有意差を持って低頻度（$p<0.01$）であった．cSAMHD1 は培養時間依存的に発現が低下し，その減少機構の一つとして ubiquitin-proteasome 系が関与している事が示唆された．生体内の細胞で同様の方法で cSAMHD1 の発現を検討したところ凍結細胞に比べて発現頻度は大きく減少したため，凍結による影響を調べた．すると 1 週間凍結するだけで多くの細胞で発現するようになった．また，凍結の有無にかかわらず発現は Naïve＞CM＞EM（＞Active）と分化段階依存的に減少する傾向が見られた．

考察：cSAMHD1 の発現は細胞の代謝状態を反映するように鋭敏に発現頻度が変化する．同じ Resting CD4T でも分化依存的に cSAMHD1 の発現は低下したことから，HIV 感染抵抗性に cSAMHD1 も何らかの形で寄与する可能性がある．また cSAMHD1 はそのまま存在するのではなく細胞質で分解を受ける可能性も示唆された．

020 びまん性大細胞型 B 細胞性リンパ腫（DLBCL）の遺伝子異常と予後の関連性について

砂川　旺広（学籍番号：134139B）
指導教員：○崎浜　秀悟 [1]，森近　一穂 [2]，加留部　謙之輔 [1]
[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

DLBCL は我が国の非ホジキンリンパ腫の 30~40% を占めており，最も発生頻度の高い病型である．これまで DLBCL は遺伝子発現の違いにより，予後良好の「胚中心」タイプと予後不良の「活性化 B 細胞」タイプの大きく 2 つに分けられていたが，近年のゲノム解析技術の進歩は DLBCL における新たなゲノム異常を次々に明らかにしている．一方でそれらの臨床病理学的意義については不明な点が多い．今回の研究では，DLBCL の発症に関わる遺伝子異常として注目されている *EZH2* と *CD79B* の変異解析を行い，以前調べた *MYD88*，*STAT6*，*BCL2*，*MYC* 各遺伝子の解析結果と比較した．
実験方法としては，まず標的配列をターゲットとするプライマーを複数用いて PCR 増幅を行い，電気泳動で最も明瞭なバンドとして認識できる組み合わせを決定した．その後，反応産物の精製を行い，次世代シークエンスに向けた Index 配列付加のための 2 回目の PCR を行った．反応産物の精製を行い，各アンプリコンの濃度を統一した形で混合したのちに，次世代シーケンサー（Miseq）による解析を行った．
抄録提出時，解析はまだ途中であるが，146 例の解析を行った結果，*CD79B* の変異の頻度は約 17% で海外での報告とほぼ同じであったが，*EZH2* の変異の頻度は約 3% で海外での報告に比べ大幅に下回っていた．これは我が国の DLBCL の変異プロファイルが海外と異なる可能性を示す．今回の医科学研究期間で解析した *EZH2*，*CD79B* の変異状態と以前調べてある *MYD88*，*STAT6*，*BCL2*，*MYC* の異常との関連性，及び臨床病理学的意義について，現在データをまとめている段階である．ポスターではこれらを整理した状態で発表したい．

021 メラノーマ細胞内で AAT の影響を受ける遺伝子の確認

川合　将生（学籍番号：164156F）
指導教員：Jenny Mae Samson[1], Dinoop Ravindran Menon[1], Mayumi Fujita[1), 2)]
Department of [1)]Dermatology, University of Colorado Denver SOM, Aurora, Colorado; [2)]Denver Veterans Affairs Medical Center, Denver, Colorado

（背景・目的）
AAT はセリンプロテアーゼインヒビターで炎症の抑制作用があると考えられている．炎症とがんの成長は深く関連しているので AAT を用いることでメラノーマに対する新たな治療手段を確立することが期待されている．今回の実験は AAT がメラノーマ細胞のどの遺伝子にどのような発現変化を与えるのかを調べ，マウスを用いた動物実験につなげることが目的である．
（方法）1205Lu,A375,WM164,sk-mel-28 にコントロールと 100μg/ml の AAT を加えたマイクロアレイ結果を p 値と遺伝子発現の変化量を使って解析し，AAT の影響を強く受けていると思われる遺伝子を 10 つに絞り込んだ．コントロールと 100μg/ml の AAT を添加した 1205Lu,A375,WM164,sk-mel-28 とマイクロアレイより絞り込んだ１０つの遺伝子を用いてマイクロアレイの解析結果が正しいことを qPCR により確認する．
（結果・考察）
候補として挙げられた１０つの遺伝子の発現傾向がマイクロアレイのデータと qPCR のデーターで一致しなかった．原因としては使用した AAT の保存中の変化が考えられる．

022 顔の動きにおける脳活動 － functional　MRI　を用いた検討 －

知名　凜朔（学籍番号：164159A）
指導教員：〇喜友名　朝則，鈴木　幹男
琉球大学医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科講座

1. 導入　functional MRI（fMRI）は近年発達してきた脳機能画像の一つであり，神経活動に伴って賦活する脳部位を客観的に描出できる検査である．fMRI は神経細胞の活動増加から生じる局所的な酸素消費量の増加，それに伴う脳血流量増加，静脈血中の oxy-Hb 濃度の増加によるわずかな MR 信号の増加を捉えることで課題遂行時の脳の賦活の様子を観察できる低侵襲かつ簡便な方法である．2. 目的　顔の動きタスク施行時の脳の賦活部位を同定し，それがブロードマンのどの領域に該当するかを確認し，その機能を調べる．3. 実験方法　今回 fMRI を用いて私自身が被検者となり顔の動きにおける脳活動に関して検討を行った．対象は顔の動きが正常な 27 歳男性で，精神疾患，神経疾患などの既往はなく，右利きであった．実験は静磁場強度 3T の MRI を用いて Blood Oxygen Level Dependent（BOLD）法を用いて行った．タスクは ON として「イー」と左右の口角を挙上する動きであり，顔を動かさないのを OFF としてその差分で顔の動きにおける脳活動を測定した．刺激は動画による視覚刺激にて行い，ON と OFF はランダムに施行した．デザインは Sparce sampling 法を用い，解析は SPM8 を用いた．4. 実験結果　実験の結果から，中心前回（BA4），中心後回（BA3,1），運動前野（BA6），中側頭回（BA21,22），小脳で強い賦活が認められ，全て両側性であった．両側中心前回（BA4）の賦活部位は外側下方に位置していた．5. 考察　両側中心前回の外側下方といえば第一次運動野における体部位局在において顔面や唇，下顎を示す部分である．また，運動前野（BA6）は体の広い領域の共同的運動を調節し，小脳は筋の緊張や姿勢の制御，運動を想像したりする機能がある．さらに，中側頭回（BA21,22）は距離の認知，顔の認知，単語の認知などに関わる．今回の実験でこれらの領域が互いに強いネットワークを形成し上述のタスクを遂行していることがわかった．

023 ゲノムワイド関連解析による緑内障の疾患感受性ゲノム領域の探索

木下　陽樹（学籍番号：164101J）
指導教員：松波　雅俊，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

【背景と目的】過去の双子研究の結果から原発開放隅角緑内障発症における遺伝要因の関与は約 13％と推定されている．
【目的】ゲノムワイド関連解析（GWAS）により日本人における緑内障の疾患感受性ゲノム領域の探索を行う．
【方法】国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベースセンター（NBDC Research ID:hum0014.v4）より，緑内障群 195 人，対照群 6,613 人について 273,775 single nucleotide polymorphisms（SNPs）のアレル頻度データを取得した．Quality control（QC）を通過した，141,074SNPs について Cochran-Armitage 検定を用いて case-control 関連解析を行った．Regional Plot 解析には locus zoom program を用いた．また GTEx Portal を用いてデータベース上にある全組織を対象に expression quantitative trait loci（eQTL）解析を行なった．
【結果】日本人緑内障とゲノムワイド水準（$P<5.0\times10^{-8}$）の関連を示す SNP は同定されなかったが，$P<1.0\times10^{-4}$ を満たす新規疾患関連ゲノム領域候補が 14 領域認められた．最も強い関連を認めた SNP は 16 番染色体の rs2269789 で，$P=2.59\times10^{-5}$，リスクアレル辺り odds 比 2.01，95% 信頼区間は 1.44-2.79 であった．eQTL 解析の結果，rs2269789 のリスクアレルと脊髄における *ITPRIPL2* の発現量との間に正の相関（$P=0.026$）を認めた．2 番目に強い関連を認めた SNP は 6 番染色体の rs211217 で，$P=2.67\times10^{-5}$，リスクアレル辺り odds 比 1.58，95% 信頼区間は 1.28-1.95 であった．
【結論】日本人における緑内障疾患感受性ゲノム領域候補を複数同定した．いずれもゲノムワイド水準を満たしていないため，独立した集団を用いたさらなる検証の必要がある．

024 健常者の口腔擦過細胞における口腔癌関連 miR-196a/196b の発現解析

山田　綾太郎（学籍番号：144134F）
指導教員：〇丸山　哲昇[2)]，丸山 修幸[1, 3)]，新崎 章[1)]，西原 一秀[1, 2)]
[1)] 琉球大学医学研究科 顎顔面口腔機能再建学講座，
[2)] 同医学部附属病院 歯科口腔外科，
[3)] 日本学術振興会 特別研究員

緒言と目的：口腔癌は生命予後が悪い腫瘍として知られている．口腔擦過細胞診の歴史は古く，口腔粘膜上皮細胞をブラシなどで擦過し，病理学的に評価する目的がある．近年，診断ではなく予測・予後マーカーとしての口腔擦過細胞が注目され始めている．マイクロ RNA（以下，miR）は非翻訳性の RNA であり，微量の組織や細胞からも検出できるメリットがある．また，口腔癌を制御する miR も多く報告されている．今回われわれは，健常者の同細胞において，同細胞の研究試料としての可能性を評価したいと考えた．
対象と方法：当学部の協力者 25 名を対象とした．口腔粘膜を擦過して得られた細胞に対し，全 RNA の抽出，逆転写，qPCR による miR の発現解析を行った．miR には miR-196a/196b を選択した．同時にアンケート調査を行い，既知の報告から口腔癌と関連する環境因子など（飲食物，嗜好物，生活習慣，歯科疾患の有無など）を中心とした質問の回答を得た．発現解析により得られた数値と，アンケート結果との相関を統計解析した．なお，本研究は本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いる（承認番号：1396）．
結果と考察：統計解析の結果，miR の発現とアンケート項目とに，一部有意な知見がみられた．
結語：口腔擦過細胞を用いた研究は大変簡便で，痛みを伴わない手法である．続研究の計画に繋げてゆきたいと考える．

025 体外循環下における体温と酸素消費量についての検討

花田　裕也（学籍番号：1614130B）
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】
開心術中は臓器の酸素消費量を低減させる目的で，33 度の軽度低体温もしくは 20 度の超低体温としている．本研究では開心術中の体温変化と酸素消費量の相関を明らかにし体温管理の重要性を示す．
【対象】
開心術 18 例を 28 ～ 33 度の軽度低体温群（MH 群：n=8）と 20 度の超低体温群（DH 群：n=10）の 2 群に分けた．
【方法】
体外循環下大動脈遮断中に下記①～⑤項目を測定し，各鼓膜温に応じた酸素消費量を（A）式より算出した．
酸素消費量（ml/min）=1.34（ml/g）・HGB（g/dl）・（SaO_2-SvO_2）・灌流量（L/min）…（A）
① 鼓膜温℃
② 灌流量（L/min）：人工心肺送血量
③ 血中ヘモグロビン濃度 g/dl（HGB）
④ 動脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 %（SaO_2）：送血管 SaO2
⑤ 静脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 %（SvO_2）：脱血菅 SvO2
【結果】
軽度低体温群（MH 群），超低体温群（DH 群）とも体温（低下／上昇）と酸素消費量（低下／上昇）に正の相関傾向を示した．
【結語】
体外循環下体温変化による酸素消費量の変化について検討した．体温と酸素消費量には強い正の相関を認めた．

026 退院前に試験外出・試験外泊を行った心不全患者における再入院に影響する因子の検討

和氣諒（学籍番号：164181G）
指導教員：池宮城　秀一，山里　正演，石田　明夫，大屋　祐輔
琉球大学医学部附属病院第三内科

【背景】心不全患者は入退院を繰り返すことが多く，入院のたびに徐々に心機能が低下し，病状が悪化すると言われている．症例によっては退院直後に症状が悪化し，再入院する者もいる．心不全の診療で，NT-proBNP 値が心不全の重症度，予後の推定，治療効果の判定に利用されており，試験外出および試験外泊後に NT-proBNP 値が上昇する症例には，退院を延期して治療を強化することも考慮される．しかしながら外出・外泊前後の NT-proBNP 値が治療効果判定に有用かはわかっていない．今回退院前に試験外出・試験外泊を行った心不全患者における再入院に影響する因子を検討した．【方法】2013 年 4 月から 2018 年 3 月に心不全の診断で当科に入院した患者で，退院前に試験外出または試験外泊を行った 57 名を対象とした．入院カルテより病歴，内服薬の有無および，入院時，試験外出・試験外泊前後，退院時のバイタルや検査データを記録した．退院後一年目まで予後を追跡し，外出・外泊前後の血漿 NT-proBNP の上昇の有無や NT-proBNP 値と再入院の相関，退院後の再入院の有無と相関する因子を検討した．【結果】患者背景は平均年齢 68 歳，男性 75%，心不全の原因疾患は虚血性心疾患 36%, 心筋症 28%, 弁膜症 20%, 不整脈 10%, 高血圧疾患 6% であった．外出・外泊前後の血漿 NT-proBNP 値の上昇と再入院に相関は見られなかった．再入院と相関する因子の中で最も強い相関が見られたのは，退院時心エコーの三尖弁収縮期圧較差（TRPG）であり，年齢，性別，慢性閉塞性肺疾患の既往で調整しても有意な相関が見られた（P 値＜0.01）．【考察】今回の検討では NT-proBNP 値と再入院の間に有意な相関は見られなかったが，退院時心エコーの TRPG と再入院に有意な相関を認めた．TRPG が十分に下がるまで加療することで，心不全患者の再入院を予防できる可能性がある．

027 リポポリサッカライドによる刺激によりRAW264.7 細胞が産生するサイトカインの測定

塩田　朋哉（学籍番号：164180J）
指導教員：○木村 彰宏[1]，岸本 英博[2]
[1] 国立国際医療研究センター肝炎・免疫研究センター免疫病理研究部，
[2] 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

活性化したマクロファージは，サイトカインを産生して炎症を惹起するなど，自然免疫において重要な役割を果たす．今回の医科学研究においては，グラム陰性菌の細胞壁を構成する成分であるリポポリサッカライド（LPS）による刺激によりマウス由来マクロファージ様細胞（RAW264.7 細胞）を活性化させ，特定のサイトカインの産生の有無，およびその濃度を ELISA 法により確認した．
実験の結果，IL-6 と TNFαの産生を確認できた．また，IL-10 および IFNγの産生は確認されなかった．
なお，従来の研究により，マクロファージは LPS 刺激により IFNγを産生すると報告されている．今回の実験に使用した細胞（RAW264.7 細胞）が細胞株ではなく，プライマリ細胞であれば IFNγも検出できたのではないかと考える．

028 ATL 細胞株に対する crisper-cas9 プラスミドの導入に関する研究

魚住　尚宏（学籍番号：164205H）
指導教員：崎浜　秀悟[1]　森近　一穂　○加留部　謙之輔[1]
[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

成人 T 細胞白血病（Adult T-cell leukemia/lymphoma, ATL）は HTLV-1（Human T-cell leukemia virus type Ⅰ）感染が原因となる予後不良な 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 つの病型に分類されている．リンパ腫型以外の ATL ではインターフェロン（IFN-α）投与が良好な治療成績を示したとの報告があるが，その機序は不明であり，インターフェロン投与後の細胞内シグナル伝達機構の解明の必要があった．これまでの細胞病理学講座の研究で，リンパ腫型以外の ATL において STAT3 の活性化が確認されており，このことがインターフェロンの治療効果と関連性があるとの仮説のもと，細胞株を用いた実験を行なった．
実験では T 細胞性腫瘍由来の jurkat,HUT102, MT2 の三種の細胞に対して STAT3 遺伝子を不活化する目的で，crisper-cas9 プラスミドの導入を行った．jurkat では crisper-cas9 プラスミドの導入により，STAT3 遺伝子の切断と発現タンパク量の減少が確認され，STAT3 抑制株の作成に成功した．一方，HUT102 では crisper-cas9 プラスミドを導入する事により細胞が多数死滅し，遺伝子の導入を断念した．この現象はコントロールプラスミドでは見られないものであり，cas9 蛋白発現による細胞へのストレスなどが細胞死滅の原因と考察している．MT2 では crisper-cas9 プラスミドの導入が確認され，*STAT3* 不活化 MT2 細胞の単離・樹立に向け現在も実験が継続中である．今回は *STAT3* 不活化に向けて行われた一連の遺伝子導入実験の結果について報告を行う．

029 テスカルシンの神経突起伸長メカニズムの検討：ナトリウムイオン・水素イオン交換輸送体との相互作用

辺土名　瑞貴（学籍番号：164177）
指導教員：○高松　岳矢，松下　正之
琉球大学大学院医学研究科　分子・細胞生理学講座

背景：テスカルシン（Tesc）は，心臓や脳に多く発現しているカルシウム結合蛋白質であり，脳やニューロンでの具体的な役目は分かっていない．先行研究により Tesc をマウス海馬初代培養細胞に過剰発現させるとニューロンの神経突起が伸長し，分岐が増えることが分かっているが，その分子メカニズムは不明である．一方，Tesc はナトリウムイオン・水素イオン交換輸送体（NHE1）と結合することが報告されており，Tesc と NHE1 が相互に作用し，神経突起の伸長に関与している可能性がある．本実習では NHE1 阻害剤であるカリポライドを Tesc 強制発現ニューロンに添加し，そのニューロンの形態変化を検討した．
実験方法：胎生 18-19 日目のマウス胎仔から海馬を摘出し初代培養神経細胞を作成し，培養 3 日目に mTesc/EGFP-N1 のトランスフェクションと 1 μM のカリポライドの添加を行った．培養 7 日目にホルムアルデヒドで固定し，α-GFP を使用して免疫細胞染色を行った．共焦点顕微鏡を使用し神経突起を撮影し, Image J/Neuron J を使用し神経突起長, 分岐数を解析した．
結果：EGFP 強制発現ニューロンと比較して Tesc-EGFP を強制発現させたニューロンでは神経突起長の伸長傾向がみられた．しかし，Tesc-EGFP 強制発現ニューロンでは NHE1 阻害剤の添加の有無による神経突起の伸長に明らかな差は観察されなかった．
考察：テスカルシンの突起伸長メカニズムの検討として NHE1 の働きを阻害した．しかしテスカルシンによる突起の伸長に明らかな阻害はみられず，実験結果は仮説と一致しなかった．予測した結果が得られなかった原因として，立てた仮説が正確でなかった，本実習期間中に扱える実験数が少なかった，実験手技に不慣れ等が考えられた．今後の課題として実験数を増やす等の詳細な検討が必要である．

030 急性虫垂炎における保存的治療法と外科的治療の比較

栗山　悠（学籍番号：164109D）
指導教員：徳重　明央，植田　真一郎
琉球大学臨床薬理学講座

背景：急性虫垂炎において，現在外科的治療が治療の第一選択となっている．大腸憩室などその他の腹部内の炎症には主に抗生物質による医療が第一選択とされている．
目的：急性虫垂炎において保存的治療法が第一選択とされてない理由，外科的治療法とのメリット，デメリットについて調査した．
方法：急性虫垂炎の外科的治療法と保存的治療法の比較研究について "Appendectomy" AND "Appendicitis/drug therapy" のキーワードを用いて Pubmed で Systematic Review と Meta-Analysis に絞りこみ論文検索を行い，見つかった 7 つの論文を比較し急性虫垂炎に対する，保存的治療，外科的治療の有効性，安全性についてレビューを行った．
結果：メタ解析を行っていた論文が 5 編，システマティックレビューのみを行っていた論文が 2 編であった．全ての研究において対象は 18 歳以上の患者であり，一つの研究を除いては 75 歳以上の患者は対象外としていた．全て急性虫垂炎に置ける保存的治療法と外科的治療法のランダム化比較試験であった．保存的治療法 / 抗生物質による治療は，外科的治療法に比べ合併症は有意に少ないが，再発率は外科的治療法はゼロであるのに対し，抗生物質による治療では 22.4% ～ 27.4% であった．入院期間に関しては統計的に有意な差はなかった．
考察：抗生物質による急性虫垂炎の治療は，合併症のリスクを抑えるという点では優れているが，再発率が外科手術に比べると有意に高かった．このようなことから，状態が安定した急性虫垂炎の治療においては抗生物質による治療を患者の状況などに応じて初期治療の選択肢として患者に提示するのは良いが，基本的には外科的治療を第一選択として問題ないと考えられる．

031 眼球形態と頭蓋顔面骨形態の関連

西村　怜美（学籍番号：164126D）
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】近視の一因として，眼軸が長くなる事に加え，眼球が変形して網膜や視神経が伸ばされたり歪んだりする事が挙げられる．また，近視は欧米人に比べ，アジア人に多いことが知られている．そこで本研究では，顔面の骨形態が眼球形態に与える影響について検討した．さらに，先行研究（Cheng et al., 2013）において同定された眼軸長に関連する遺伝子多型と，眼球や顔面骨形態との関連を調べた．
【試料と方法】対象者は琉球大学医学部附属病院で PET 検査を受けた患者 699 名で，インフォームドコンセントのもとで画像，患者情報および試料を取得した．PET-CT 画像を用い，眼球長，眼球幅，眼球高を計測した．また，眼球長／((眼球幅 + 眼球高)÷ 2) を眼球示数として算出した．さらに，PET-CT 画像にランドマークを発生させて，主成分分析を行うことにより顔面骨形態を解析し，PC1 ～ PC10 の形態成分を得た．SNP（rs11073058, rs9811920, rs994767, rs4074961）のタイピングは TaqMan 法（Applied Biosystems 社）および KASP 法（LGC Genomics 社）を用いて行った．眼球形態と顔面骨形態との関連，SNP と眼球形態や顔面骨形態との関連を調べるため，重回帰分析を行った．
【結果と考察】眼球長は，年齢と負の関連，身長や顔面サイズと正の関連を示した．また，PC10 や PC6 といった顔面骨形態成分は眼窩周辺の平坦性と関連するが，それぞれ眼球長，眼球示数と関連した．このことから，眼窩周辺の骨形状が前突すると相対的に眼球長が大きくなると考えられた．また，眼球示数は，眼窩口のサイズを表す成分（PC9）とも関連していた．先行研究で示された眼軸伸長型アリルは，本研究において眼球長との正の関連は再現されなかった．その理由としては，先行研究に比べサンプル数が少なかったことや光学的に計測する眼軸長と CT 画像における眼球長の違いが一因であると考えられた．

032 漢方薬に含まれる禁止薬物ヒゲナミンの分析法確立

江口　真理奈（学籍番号：164198B）
指導教員：◯潮平　英郎 [1]，中村　克徳 [1, 2]
[1] 琉球大学医学部附属病院薬剤部
[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】
近年，本邦のアンチ・ドーピングへの関心は高まる一方で，禁止物質を含む医薬品や栄養補助食品の意図的でない摂取による「うっかりドーピング」が問題となっている．本研究では，世界アンチ・ドーピング規定 2018 年禁止表国際基準にて，「β_2 作用薬」の 1 種として指定されているヒゲナミンに着目し，その HPLC での定量的分析法の確立を目的とした．
【方法】
ヒゲナミンは UV 285nm に吸収極大を有することから，分析には UV 検出器を用いた．移動相には，(A) 蒸留水：酢酸=1:0.0034 の溶液と (B) 100% アセトニトリルを用い，(B) の濃度を次第に上げるグラジエントモードで行った．内部標準物質（IS）として，ヒゲナミンに類似した吸収極大を有する医薬品を探索した結果，カルバマゼピンとテオフィリンがそれぞれ 285［nm］, 272［nm］で検出されることから，これらの比較検討を行った．0.05 ,0.1 ,0.2 ,0.3 ,0.4 ,0.5 ,1.0 ,5.0 ,10 ,50［μg/mL］のヒゲナミン試料を分析してヒゲナミンの検出限界濃度を求めた．また，検出可能な濃度のヒゲナミン試料で 3 点ずつプロットし検量線を作成した．
【結果と考察】
保持時間（min）はヒゲナミンが 8.9，テオフィリンが 5.9，カルバマゼピンが 14.7 であり，ヒゲナミンとのピーク分離，夾雑ピークの有無及び分析時間短縮などの観点からヒゲナミンと保持時間がより近いテオフィリンを IS として採用した．検出限界濃度は 0.2[μg/mL] であった．作成した検量線の近似直線は $y=0.174x-0.0065$，$R^2=0.99714$ であり，0.2 から 50［μg/mL］の間で良好な直線性が得られた．今後さらに検出感度を向上させる予定である．

033 Aversive associative learning and memory in *Caenorhabditis elegans*

篠原　瑠璃（学籍番号：164173F）
指導教員：○丸山　一郎[1)]，苅谷　研一[2)]
[1)] 沖縄科学技術大学院大学情報処理生物学ユニット
[2)] 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

Learning and memory of threatening environment is important for animal survival. For elucidation of mechanisms underlying such processes, nematode *Caenorhabditis elegans* could serve as a useful model because of its simple nervous system. Here, I have developed protocols for classical aversive conditioning and analyzed aversive associative memories in *C. elegans*.
Sodium chloride is as an attractant for the worms. In a chemotaxis assay before training, worms were attracted to higher concentration of NaCl. For aversive conditioning, worms were grown on agar plates containing 25mM NaCl and then transferred to plates containing 100 mM NaCl, on which they were given "nose touch"（manual poking with a fine-tipped apparatus）. Thus, NaCl and the nose touch were presented as a conditioned stimulus（CS）and an unconditioned stimulus（US）, respectively. After training, worms avoided 100 mM NaCl in a test chemotaxis assay. These results indicated that worms learned the CS-US association. The retention time of the memory was 6 hours. Next, to ask whether NaCl concentration of the growth plate affects learning, worms were grown on plates containing 50 mM NaCl before training. In addition, instead of nose touch, electric shocks were applied to worms' nose tip, as a more quantitative US. Worms avoided 100 mM NaCl after training, but the retention time was only 10 minutes. These results suggested that formation or retention of the memory required appropriate degree of difference in NaCl concentrations between the growth and the training plates, although the different nature of the employed US complicated interpretation.
These experiments demonstrated that *C. elegans* is useful for studies of aversive learning, which will potentially help us to understand mental problems such as post traumatic stress disorder（PTSD）.

034 3MP に対する血管反応性の検討

沖本　信太朗（学籍番号：154143K）
指導教員：筒井　正人，○國吉　佳奈子
琉球大学大学院医学研究科　薬理学講座

［背景と目的］3- メルカプトピルビン酸サルファートランスフェラーゼ（3MST）は, 3- メルカプトピルビン酸（3MP）を基質として硫化水素（H_2S）を合成する酵素として知られている．3MST が生体内でどのような役割を果たしているかは未だ不明な点が多い．これまでの薬理学講座での研究にて，3MST ノックアウト（3MST-KO）マウスは野生型マウスと比較して高血圧になることが示唆されている．また，3MST-KO マウスでは野生型マウスと比較して 3MP が高濃度になっていることから，その高血圧は 3MP 依存的に起こっている可能性が考えられた．そこで今回の実験では 3MP に対する血管反応性を検討してみることにした．15-20 週齢の 3MST-KO マウスと野生型マウスの上腸間膜動脈の第 1 枝をオーガンチャンバーにセットして血管反応性を観察する実験を行なった．実験 1 では，3MST-KO マウスと野生型マウスの動脈に 3MP を濃度依存的に添加して血管反応性の変化を観察した．すると，3MST-KO マウスの動脈が 3MP に対して濃度依存的に収縮するという結果が得られた．実験 2 では，3MST-KO マウスと野生型マウスの内皮細胞を取り除いた動脈も準備して実験 1 と同様の手順で観察した．すると，内皮細胞を残した 3MST-KO マウスの動脈のみ 3MP に対して濃度依存的に収縮するという結果が得られた．実験 3 では，実験 1 と実験 2 で見られた血管収縮の機序を探るため，その血管反応性に影響を与える可能性がある薬剤を 3MST-KO マウスの動脈に添加し，実験 1 と同様の手順で観察した．すると，アンジオテンシンⅡ受容体拮抗薬であるロサルタンを添加したものは血管収縮が抑制されるという結果が得られた．以上の実験結果より，3MST-KO マウスで見られる高血圧は 3MP 依存的に起こるものであり，その機序に内皮細胞，また血管平滑筋のアンジオテンシンⅡ受容体が関与することが考えられた．
以上より，Triple CBS/CSE/3MST-KO マウスでは野生型マウスに比べ，肥満傾向であることが分かった．また今回，有意差は認められなかったが，空腹時血糖値 , 最高血圧 , 平均血圧 , 心拍数において Triple CBS/CSE/3MST-KO マウスは高い傾向が確認できたので，今後の課題として例数を増やし，コレステロール値なども比較・検討する必要があると考えられる．

035 宮古地区の急性脳卒中患者における微小脳出血と蛋白尿の関連

松尾　紀美年（学籍番号：164215E）
指導教員：○國場　和仁，山里　正演，石田　明夫，中村　卓人，崎間　洋邦，奥村　耕一郎，大屋　祐輔
琉球大学大学院医学研究科循環器・腎臓・神経内科講座

【背景】長期の高血圧罹患は動脈硬化の原因の一つである．微小脳出血（Cerebral microbleeds：CMBs）は脳深部における高血圧性細動脈硬化を反映し，脳血管障害や認知症発症との関係が指摘されている．一方，蛋白尿は腎臓における高血圧性腎硬化症などによる腎障害を反映する因子の一つである．現在，当医局で登録作業中の宮古地区での疫学研究データを用いて CMBs と蛋白尿との関係を検討した．
【方法】2012 年 4 月 1 日から 2015 年 3 月 31 日までの期間に宮古島徳洲会病院と沖縄県立宮古病院で急性期脳卒中の診断で入院が確認できている 388 例のうち，頭部 MRI で T2* 強調画像が撮影されている初回脳卒中症例から外傷性の 1 例，尿蛋白測定が困難な透析例 4 例，画像上，明らかにアミロイドアンギオパチーと推定される 1 例を除外した 180 例を対象に CMBs の有無と，他の細動脈硬化関連因子の評価を行った．
【結果】調査対象の年齢は中央値 74 歳（59 歳－ 84.25 歳）で女性は 78 例（43.3%）であった．CMBs は 53 例（29.4%），尿蛋白は 60 例（33.3%）に認めた．CMBs を目的変数として説明変数を発症年齢, 性別, 尿蛋白の有無, 降圧薬内服の有無，Cre，HbA1c とし多変量解析を行った．CMBs 有無と有意に相関のあった項目は尿蛋白（正の相関 p=0.0112）と降圧薬内服（負の相関 p=0.0140）であった．
【結語】脳の細動脈硬化である CMBs と腎臓における細動脈硬化を反映している尿蛋白とは相関がみられた．また，降圧薬内服群では CMB は少ないことも示され，血圧の管理状況との関連が示唆された．

036 9.4TMRI によるガドリニウム造影剤の収容内動態の可視化

塙　史帆（学籍番号：164189B）
指導教員：○山口　雅之[1)]，藤井　博史[1)]，岸本　英博[2)]
[1)] 国立がん研究センター東病院 臨床開発センター 機能診断開発分野，
[2)] 琉球大学大学院医学研究科寄生虫講座

背景　MRI（Magnestic Resonance Imaging）は水プロトンの「緩和」と呼ばれる現象がその強弱を決定づけている．描出困難な組織の検出を目的として使用されている造影剤もこの緩和を変化させることで画像強度を上げている．その機能を評価する値として緩和率（r1）が用いられている．
目的　Gd-DTPA（Magnevist）及び Gd-DO3A（Gadovist）の r1 を比較するとともに，9.4TMRI を使用して実験乳癌内のガドリニウムの動態を画像評価する．
方法　5 mM Gd-DTPA を最終濃度 0.01, 0.025, 0.035, 0.05 mM, 10 mM Gd-BT-DO3A を最終濃度 0.02, 0.05, 0.07, 0.10 mM となるよう 1% 生理食塩水（saline），マウス血清（serum）で希釈して r1 測定．乳癌細胞を皮下注射したマウスの尾静脈からカテーテルにより造影剤を投与し DCEMRI にて撮影し腫瘍内の造影剤動態を見る．
結果　serum 中の Gd-DO3A では有意に r1 が高かった．腫瘍辺縁と腫瘍中心における T1 値減少率を比較すると辺縁においては Gd-DO3A が，中心部においては Gd-DTPA が高い減少率を示した．また，腫瘍辺縁と中心では造影剤濃度の時間変化が異なると判明した．
結論　Gd-DTPA 及び Gd-DO3A どちらも細胞外液腔に分布し，細胞内に取り込まれない造影剤であり，特に Gd-DO3A は血漿中で 2 量体を形成し緩和能が高くなることが知られ，本研究においても同様の結果が得られた．腫瘍辺縁と中心部では造影剤の濃度差が大きく，動態が異なったのは腫瘍内の組織的な違いにより生じると予想され現在病理標本と対比検討中である．腫瘍中心部において高い T1 値減少率を示した Gd-DTPA は，2 量体を形成し高分子化する Gd-DO3A に対して比較的小さい Gd-DTPA の方が腫瘍中心部に集積しやすいためと思われる．

037 濾胞性リンパ腫の初発および再発時における遺伝子変異について

伊礼　由佳（学籍番号：164217B）
指導教員：○ Ko Yong-Hyeh[1)]，加留部　謙之介[2)]
[1)]*Samsung Medical Center, Department of Pathology*（韓国），
[2)] 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

濾胞性リンパ腫（FL）はB細胞が腫瘍化する血液疾患の一つである．形態学的特徴からlow gradeとhigh gradeに分類される．悪性リンパ腫の中では比較的進行が緩慢であるとされているが，しばしばびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫（DLBCL）に形質転換し予後不良となる．FLの発症および形質転換の背景にはがん関連遺伝子異常の存在が疑われるが，未だ不明な点は多い．本研究ではFLにおけるがん遺伝子変異について調べるため，14名のFL患者の組織生検を用いてゲノムのターゲットシークエンス解析を行った．初発時および再発時検体をそれぞれprimary，recurと定義した．ターゲットシーケンス解析の結果，CREBBPとBCL2の変異が65%以上と高頻度であり，この2遺伝子がFLの発症に深く関わる事が示唆された．primaryでは次いでEZH2，HIST1H1E，CARD11の変異が多かったが，recurではそのような傾向は認められなかった．また，recurに特徴的な変異は特定できなかった．DLBCLへと移行した1症例では1つのprimary検体と4つのrecur検体の遺伝子異常の特徴を調べる事ができた．興味深いことに，primaryとrecurで遺伝子変異のプロファイルが異なっており，しかも生検時期や病変部に関わらず4つのrecurでは類似性が高く，recurは全て同一系統の腫瘍である事が示唆された．またrecurでは，FISH解析により予後不良因子であるMYC領域の転座が認められた．共通する遺伝子変異も複数ある事から，この症例のprimaryとrecurはもともと同一の腫瘍細胞から派生した可能性が高い．primaryの腫瘍細胞は治療によって消失したが，悪性度の高い遺伝子変異を獲得した腫瘍細胞は治療後も残存し，それがrecurの源となって様々な箇所で腫瘍を形成したと考えられる．

038 EPA/DHAは心血管イベントを改善するか？システマティックレビュー

宮里　駿也（学籍番号：164201E）
指導教員：◯植田　真一郎
臨床薬理学講座

目的
EPA/DHAは心血管イベントを抑制するか否か，これまでの報告をレビューする．
方法
EPAあるいはEPA/DHAの心血管イベント抑制を評価する臨床試験論文を検索し，研究デザイン，対象患者，アウトカム設定などについて批判的に質を評価し，結果について統合的解析を行った．
結果，結論
2018年までのバイアスリスクの少ない二重盲検ランダム化比較試験ではEPA/DHAによる心血管イベント減少は認められず，本邦での非盲検試験ではいわゆるソフトエンドポイントにおいては，リスク減少が認められているが，強くは推奨できないと考えられた．しかし2019年に報告されたREDUCE IT研究では25%の心血管イベント減少が認められており，本システマティックレビューではこの結果の非整合性についても考察した．

039 皮膚関連遺伝子 *POU2F3* の多型が皮膚形質に与える影響

新垣　香乃（学籍番号：164199K）
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：*POU2F3* 遺伝子は，ネアンデルタール人由来のハプロタイプがアジア人の約66％に受け継がれていることが知られている．*POU2F3* は皮膚で多く発現することから，本研究では，*POU2F3* の3ヶ所の一塩基多型（SNP）について遺伝子型判定を行い，各遺伝子型と皮膚形質との関連を調べることを目的とした．
方法：同意を得た男女249人を対象とした．被験者に対して皮膚形質（皮膚の水分量，油分量，ポルフィリン量，皮膚色）の測定，唾液の採取を行い，唾液からDNAを抽出した（2015-2017年）．Kompetitive Allele Specific PCR（KASP）ジェノタイピングアッセイにより，*POU2F3* 遺伝子領域のSNP（rs744983，rs17123792，rs11217806）の遺伝子型を判定した．測定した皮膚形質を目的変数とし，SNPの遺伝子型を説明変数，性別，年齢，出身地を共変数とした重回帰分析を行った．さらに，3つのSNPにおけるハプロタイプを推定し，皮膚形質との関連を調べた．
結果と考察：ネアンデルタール人由来のハプロタイプは，調べた3つのSNPが共に祖先型であり，本研究においてそのようなハプロタイプの頻度は62.7%であった．rs17123792において派生型アレルAをもつ個体は祖先型アレルGをもつ個体と比較して額のポルフィリン量が少なかった．ポルフィリンは皮膚常在菌であるアクネ菌の分解産物であり，ポルフィリン量はアクネ菌の量を反映していると考えられる．rs17123792の派生型アレルAはオセアニア地域に多く分布しており，低緯度地域での適応である可能性が示唆された．また，rs744893において，ヨーロッパに多くみられる派生型アレルAは，額の水分量の低下と関連していた．このことから，*POU2F3* においてアジアで多くみられるネアンデルタール由来ハプロタイプは，ヨーロッパで多くみられるハプロタイプと比べ，皮膚の水分量を増加させる効果があることが示唆された．

040 電位感受性色素を用いたモルモットの1次聴覚野（A1）におけるMissing Fundamentalの表示の確認

佐藤　圭（学籍番号：164124H）
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

基音を除く複数の倍音を聞いた時に基音が聞こえているように感じられる錯聴（Missing Fundamental，以下，MF）が，モルモットの聴覚皮質上に表示されうるのかを電位感受性色素による光学的測定法で調べた．
モルモットにKetamin（1㎎/kg），Xylazin（0.5mg/kg）で麻酔し，大脳皮質を露出し，電位感受性色素（RH795）で1.5時間染色を行った．実験中，30分毎にKetamin（0.25 mg/kg）で麻酔を持続した．
0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 8, 16 kHz（持続時間100ms, 70dBSPL）の純音を付加して，周波数バンドを測定した．MFの測定のため，1.5, 3, 5kHzをそれぞれ基音とする3組の基音，2倍音，3倍音の複合音と，基音を含まない2倍音と3倍音のみの複合音を持続時間100ms，70dBSPLで付加した．
その結果，従来の報告通り，1次聴覚野（A1）では前方から後方に，低周波数から高周波数のバンド構造が見られた．
純音刺激すると，活動スポットが出現し，バンド状に広がった．この軌跡を基にバンドを推定し，各バンド応答を求めた．
複合音を聞かせた時の基音，2倍音，3倍音のバンド応答の強さを時間的に解析すると，基音を欠く複合音において，低い周波数（1.5kHz）を基音とする複合音では倍音間の反応の強度および時間的分離が見られず，基音の周波数が高くなるにつれて時間的，強度的な分離が見られた．聴覚野における興奮の伝播による成分を補正すると，MFの表示を示す有意差はなかった．
このことより，今回の実験ではMFの大脳皮質での表示は確認できなかった．また，低周波数を基音とする複合音でバンドに差がないのは，今回の実験条件では，複合音の各バンド間の距離に大きく依存していると示唆される．

041 ゲノムワイド関連解析による日本人の子宮内膜症疾患関連ゲノム領域の同定

桑山　祥子（学籍番号：164105B）
指導教員：松波　雅俊，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】子宮内膜症は有経女性の約 9% に認められる．発症に対する遺伝要因の関与は約 50％ , 発症要因全体の 24% はありふれた多型によると推定され，現在までに 10 ヶ所の疾患関連ゲノム領域が Genome-Wide Association Study（GWAS）により同定されている．【目的】日本人子宮内膜症患者の疾患関連ゲノム領域を GWAS により同定する．【方法】国立研究開発法人科学技術振興機構バイオサイエンスデータベース（NBDC Research ID:hum0014.v4）より子宮内膜症患者 195 人（case），子宮内膜症以外の 34 疾患の患者 6,613 人（control）について 273,775 single nucleotide polymorphism（SNP）のアレル頻度情報を得た．Quality Control（QC）を通過した 131,451SNPs について case-control 関連解析を Cochran-Armitage 検定で行った（主解析）．Regional Plot 解析は Locus zoom，子宮，卵巣における expression quantitative trait loci（eQTL）解析は GTEx database を用いた．女性が多数を占める 5 疾患を control（975 人）としたサブ解析も行った．【結果】関連解析の結果，ゲノムワイド水準（$P<5.0\times10^{-8}$）を満たす SNP は得られなかった．$P<1.0\times10^{-4}$ を満たす疾患関連領域候補は , 主解析で 17 領域，サブ解析で 11 領域認められ，うち 5 領域は両解析で認められた．最も関連の強い SNP は主解析では 16 番染色体の rs7202124［$P=1.77\times10^{-5}$, オッズ比（OR）=1.76, 95% 信頼区間（CI）1.36-2.29］，サブ解析では 8 番染色体の rs16885738［$P=3.43\times10^{-6}$, OR=1.74, 95%CI 0.45-0.73］であった．これら 2 領域では eQTL で有意な相関を認める遺伝子は存在しなかった．サブ解析で 2 番目に関連の強い rs2042235［$P=3.26\times10^{-5}$, OR=1.82, 95%CI 1.37-2.42］領域の卵巣での eQTL 解析では rs2042235 の risk allele 保有者の *ANXA6* の発現が有意に高かった（$P=0.026$）．【結論】今回の GWAS により子宮内膜症の疾患関連ゲノム領域候補が複数同定された．いずれもゲノムワイド水準に達しておらず，独立した集団を用いた更なる検証が必要である．

042 超高精細 CT による頭蓋内小動脈の描出能の検討

佐本　奈々江（学籍番号：164111F）
指導教員：與儀　彰
琉球大学大学院医学研究科放射線講座

【目的】脳動脈瘤などの中枢神経疾患を診断・治療する上で，頭蓋内小動脈の正確な評価は重要である．しかし現在の CT angiography（以下，CTA）では，それら小動脈の描出が難しいことも多い．2017 年 10 月から，当院で超高精細 CT（Aquilion Precision, Canon Medical Systems, Tokyo, Japan）（以下，Precision）が稼働した．そこで我々は，Precision が従来 CT 装置（Aquilion ONE, Canon Medical Systems, Tokyo, Japan）（以下，ONE）よりも明瞭に頭蓋内小動脈を描出できるか検討した．【対象と方法】当院で 2016 ～ 2018 年に，ONE と Precision の両方で頭部 CTA が撮影された患者 10 人（男性 8 人，女性 2 人；年齢 22.5 ～ 69.7 歳（平均 55.2 歳）；神経膠腫 4 例，髄膜腫 3 例，くも膜下出血 1 例，三叉神経痛 1 例，動脈瘤 1 例；CT 撮影の間隔 0.3 か月～ 30.3 か月（平均 14.1 か月））を後ろ向きに選択した．動脈硬化や血管炎を来たしている症例は含めなかった．各症例の CTA 画像を ONE 群と Precision 群に分け，両群において眼動脈（以下, OpthA），前脈絡動脈（以下, AchoA），レンズ核線条体動脈（以下，LSA），内側線条体動脈（以下，MSA）を対象に，起始部の形態および末梢枝の描出精度を視覚的に 5 段階で評価した．両群から得られた結果は Wilcoxon の符号順位検定で解析した．$p<0.05$ を有意な差とした．【結果】両側 OpthA，両側 AchoA，右 LSA の起始部および末梢枝の描出の評価は，Precision で高値だった（p *values* ≦ 0.04）．一方, 左 LSA と両側 MSA では，起始部および末梢枝の描出の評価に差はなかった（p *values* ≧ 0.09）．【考察】Precision は ONE よりも良好に，眼動脈，前脈絡叢動脈の起始部，末梢枝を描出した．これは Precision の高分解能による描出改善による影響と考えられる．一方で LSA と MSA の描出に差がみられなかったのは，なおも動脈径が細すぎて両装置とも良好に描出できなかったためと考えられる．

043 沖縄県における台風における災害脆弱性評価

松田　紘幸（学籍番号：164206F）
指導教員：久木田　一朗
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

目的：
内地出身の私が、沖縄に来て印象的であったことの一つに猛烈な台風があげられる。沖縄気象台が発表しているデータによると、去年は特に沖縄県那覇市に台風は 9 回接近しており、台風の接近回数が非常に多い年であった。台風による停電、断水などによる被害は未だに記憶に新しい。また、日本観測至上最大風速 83.5 を記録したのも沖縄県宮古島でである。
故に、沖縄県における台風の脆弱性について、定量的に評価する必要性を感じ、以下に記した方法によりそれを行った。
方法：
災害時における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により防災対策に役立つ指針となる評価方法である、Hazard Vulnerability Analysis（以下、HVA）を用いた。可能性を示す Probability を 0 から 3 の 4 つの段階に , 危険性を示す Risk を 1 から 5 の 5 つの段階に , 準備を示す Preparedness を 1 から 3 の 3 つの段階に分けて、各々の点数を確定し、更にそれを掛け合わせた総得点の点数（0 ～ 45）の大小により、その地域における災害の脆弱性を決定する。
結果：
Probability: 3
Risk: 3
Preparedness: 1
Total: 9
考察：
Probability について、気象庁予報部予防課予防アジア太平洋気象防災センターが測定した、気象台が発表している 1951 年から 2018 年までの過去のデータによると、平均して一年間に 3.5 回ほど那覇に台風が接近している。（接近とは台風の中心が沖縄気象台から 300km 以内に含まれる事を意味する。）
また、5 月から 11 月にかけて接近する事が多く、特に 9 月と 10 月に集中している。この事から台風が沖縄に接近する可能性は非常に高く、probability は 3 と決定した。
Risk について、沖縄県における台風の風速や回数は、例えば内地のそれと比較すると圧倒的に大きくそして、多い。故に、沖縄で生活を送る上で台風は非常に脅威となる。しかし、以下の Preparedness の点で述べるように沖縄県民の台風に対する慣れには目を見張るものがある。これらを総合的に踏まえて、Risk を 3 と決定した。
Preparedness について、沖縄県民は、台風接近の予報を受けて
窓ガラスや、玄関の戸をテープなどを用い補強する。
屋外に設置しているものを固定、またはそれを屋内にそれを収納する。
断水に備えて浴槽に水を貯めておく。
台風数日前に食料品の買い出しを行っておく。
などと、台風接近の際の準備がとても早い。
総じて台風に対する慣れがあると認める事ができる。
更に防風林なども一部の地域に存在しており、行政の台風に対する予防策も認めることができる。
故に Preparedness は 1 と決定した。

044 ミニゲノム実験系を用いた日本脳炎ウイルスのゲノム複製に関わる遺伝子領域の決定

那須　寛生（学籍番号：164139F）
指導教員：玉城　和美，只野　昌之，〇大野　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）はフラビウイルス科に属する RNA ウイルスであり，主にコガタアカイエカによって媒介される．JEV のゲノムは非翻訳領域・構造タンパク領域・非構造タンパク領域で構成される．今回の実験では，ゲノム複製に関与していると考えられている非構造タンパク領域の NS1，NS2A，NS2B，NS3，NS4A，NS4B，NS5，さらに構造タンパクの C 遺伝子の中からゲノム複製に関わる遺伝子を特定することを目的に，ミニゲノム実験系の構築を試みた．
【実験方法】ミニゲノムとは，ゲノムの遺伝子領域を取り除き，そこに Luciferase などのレポーター遺伝子を組み込んだウイルスゲノムのことである．ミニゲノムを用いることで，発光強度によってゲノムの発現量を測定することができる．目的遺伝子を発現するプラスミドとミニゲノムを同時に細胞へ導入することで，目的遺伝子がゲノム複製にどの程度影響しているのかを評価することができる．ウイルスが産生されないため，ウイルスゲノムの複製を安全に評価することが可能となる．
今回は，発現プラスミドの作成，プラスミドとミニゲノムの機能性の評価を行った．
【結果と考察】発現プラスミドを 293T 細胞へ transfection したのち，ウエスタンブロット法で遺伝子の発現を評価したが，発現が見られたのは NS3，NS4A，NS5 のみだった．発現プロモーターの変更や細胞のプロテアーゼの阻害を検討する必要がある．ウイルス感染させた HOS 細胞にミニゲノムを transfection したのち，リアルタイム PCR で検討したが非特異的な増幅が多く，ミニゲノムの複製を評価できなかった．また，タンパク質としての発現もなかったため，ミニゲノムが機能していないと考えられた．ミニゲノムのデザインから見直すべきであり，改善方法として IRES 遺伝子の導入やレプリコンへの変更などが挙げられる．

045 患者腫瘍を移植したマウスモデル（Patient–Derived Xenograft, PDX）は，ヒト胃がん原発巣組織の組織形態と遺伝子変異を反映するか

齊藤　玄己（学籍番号：164182E）
指導教員：○桑田　健[1)]　岸本　英博[2)]
[1)] 国立がん研究センター東病院　病理・臨床検査科
[2)] 琉球大学医学部　寄生虫・免疫病因病態学

背景：Patient-derived Xenograft（PDX）はマウスに患者のがん細胞を移植した腫瘍再現モデルである．PDX はがん組織構造を有し，がん細胞株より薬剤感受性等をより正確に判定できるとされている．一方，樹立された PDX と原発巣の間での組織形態や遺伝子の異同について詳細はまだ十分明らかになっていない．
目的：①胃がん患者から樹立した PDX，細胞株について分化度を指標に原発巣，PDX および細胞株での異同を明らかにする．②原発巣，PDX，細胞株間での分化度の違いと遺伝子変異の相関を明らかにする．③ PDX 樹立に成功した胃がん原発巣における特徴的遺伝子変異特徴を明らかにする．
方法：PDX および細胞株をマウスに移植した腫瘍（CDX）について，分化度および遺伝子変異プロファイルを取得した．原発巣に比して細胞株で分化度が下がった症例とそうでない症例の遺伝子プロファイルを比較した．また PDX が樹立された症例の原発巣における遺伝子変異を既報と比較した．
結果：①分化度が変わらなかった症例は PDX で 87％，細胞株で 67％で PDX の方が分化度が保持されていた．② ARID2 の遺伝子変異頻度は分化度下がった症例に多く，SMAD4 の遺伝子変異頻度は分化度が変わらなかった症例に多かった．③ PDX，細胞株両方が樹立された症例の原発巣における遺伝子変異は既報（TCGA 295 症例）と比べて KRAS，SMAD4，APC，ARID2 などの変異が多かった．
考察：① PDX，細胞株で分化度の違いが生じる症例数は PDX の方が少なく，細胞株より原発巣の形態における特性を維持できているといえる．② ARID2 が胃癌の分化度に関わっている可能性がある．③ TCGA に比べて変異頻度が異なっていた，KRAS，SMAD4，APC，ARID2 の遺伝子変異が，PDX 樹立に関わっている可能性がある．

046 パイロシークエンス法を用いた DNA のメチル化解析による，マントル細胞リンパ腫の分子的・臨床的分類

大嶺　幹（学籍番号：164211B）
指導教員：○ Marta Kulis[1)] , Iñaki Martín-Subero[1)] , Elias Campo[1)] , 加留部　謙之輔[2)]
[1)]*Institut d'Investigacions Biomediques August Pi i Sunyer,*（バルセロナ大学）
[2)] 琉球大学医学科細胞病理講座

【背景】非ホジキンリンパ腫のひとつであるマントル細胞リンパ腫（MCL）は，リンパ節への浸潤を主体とする classical type と，末梢血への浸潤を主体とする non-nodal type の２つのサブタイプに分けられる．これらは予後が有意に異なるため，正確に区別することは治療選択においても重要であり，分子学的な診断手法の開発が望まれている．
【目的】本研究では，特定の DNA 領域（CpG アイランド）のメチル化の有無を調べ，エピジェネティックな視点で MCL の二つのサブタイプの正確な分類法を開発し，予後の予測など臨床的な応用を目指す．すでに先行研究の解析により特定された，両サブタイプで最もメチル化状態の差が大きかった３つの DNA の CpG 領域のメチル化解析を行う．対象 MCL サンプルには凍結組織と，今後の臨床応用も見据えて，室温で長期保存でき扱いが簡便なホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織も用いる．臨床への応用として，より簡便で正確，信頼性の高い MCL の診断を目標にする．
【方法】DNA の抽出，バイサルファイト処理を行った．バイサルファイト処理された DNA をターゲットとした PCR に用いるプライマーを設計し，細胞株とコントロール DNA を使用して PCR 条件の最適化を行った．PCR 産物が得られたら，電気泳動と高速シークエンス法であるパイロシークエンス用い，各サンプルのメチル化頻度を調べた．
【結果】今回の研究期間において，使用するプライマーの設計を行い，電気泳動とパイロシークエンスの実行を通して，最適な PCR 条件とこのメチル化解析に適した細胞株コントロールを設定することできた．

047 膵臓癌治療におけるゲムシタビンの有効性，そして今後の化学療法について

杉江　翼（学籍番号：164153B）
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

膵臓癌による年間死亡者数は増加の傾向にあり，2017 年のがん情報センターによると，癌で死亡した人のうち死亡原因として膵臓癌が男性では第５位，女性では第 3 位，そして全体でみると第 4 位に入っている．増加傾向にある膵臓癌であるが，発見された際にはすでに手術不可能な状態となっていることが多く，その割合は 8 割近くに達している．このような状況を踏まえると，膵臓癌における治療では外科的な手技が大切であることはもちろんのことであるが，化学療法も極めて重要な役割を果たしており，化学療法の進歩は膵臓癌を罹患した患者の予後を改善する重要な要素の 1 つである．
そこで今回の医科学研究では，膵臓癌の治療に実際に使われている「ゲムシタビン」という薬剤を中心にして，その有効性を検証することを目的に研究を行った．具体的な方法としては，Pubmed や Google Scholar などで論文検索を行い，ゲムシタビンに関連するランダム化比較試験等を行った論文をピックアップし，エクセルでまとめていくという方法をとった．またこの際, 全生存率（overall survival, OS）や無増悪生存期間（progression free survival，PFS）などの生存に関わる項目を評価の中心とした．

048 幾何学的形態測定学を用いた三次元顔面形態の解析と遺伝率推定

宮平　由佳子（学籍番号：164131A）
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
共同研究者：安藤寿康（慶應義塾大学），今西規（東海大学）

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，一卵性双生児と二卵性双生児，および兄弟・姉妹の顔面形状を幾何学的形態測定学の手法を用いて解析し，主成分分析により得られた各主成分における遺伝率を求めることを目的とした．
方法：一卵性双生児 51 組，同性の二卵性双生児・兄弟・姉妹 39 組を研究対象とした．三次元デジタルスキャナーを用いて顔面の三次元画像データを得た後，23 個の特徴点を手動で点打ちした．さらに，各個体の顔面データを 2596 点のセミランドマークからなるポリゴンモデルを用いて相同モデル化し，プロクラステス解析によりサイズ補正および位置合わせを行った．セミランドマークの座標値から主成分分析を行い，上位 10 の主成分を得た．一卵性双生児，二卵性双生児・兄弟・姉妹それぞれにおける相関係数を重心サイズ（CS）と主成分ごとに求め，ファルコナーの式を用いて遺伝率，共有環境，非共有環境の割合をそれぞれ求めた．さらに，CS と上位 10 の主成分を目的変数，性別，年齢，身長，BMI を説明変数として重回帰分析を行った．
結果：CS および上位 10 の主成分の遺伝率は 0.116 ～ 0.747 となった．遺伝率の高い項目としては CS，PC1（顔面の縦の長さ），PC3（顎の突出）などがあった．一方，共有環境の寄与の大きい項目として PC2（顔面の横幅），PC6，PC10 などがあった．PC6 および PC10 は性別と関連する成分だった．
考察：PC2 は BMI との関連が示唆されており，そのため環境要因の影響が強いと考えられた．PC6，PC10 については性別との関連が示唆されており，性別が共有環境として現れたものと考えられた．また，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（PC4，PC7 など）については，遺伝要因の効果が加法的でない可能性や，統計上の誤差が原因だと考えられた．

049 モルモットの１次聴覚野（A1）における純音と複合音に対する応答パターンの分析

中谷　宏哉（学籍番号：164123K）
指導教員：○細川　浩
琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

モルモットの鳴き声を構成する純音のうち，2 種類の異なる純音と複合音が聴覚皮質上に時空間的にどのように表示されているかを電位感受性色素で可視化して調べた．
モルモットに Ketamin（1mg/kg）,Xylazin（0.5mg/kg）で麻酔し，大脳皮質を露出し，電位感受性色素（RH795）で 1.5 時間，染色を行った．実験中，30 分毎に Ketamin（0.25mg/kg）で麻酔を持続した．
周波数バンドの測定のため，0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz（持続時間 100ms，70dBSPL）の純音を付加した．純音 2kHz，16kHz（持続時間 100ms，70dBSPL）と，2kHz と 16kHz の複合音（持続時間 100ms，70dBSPL）を用いた．
その結果，従来の報告のとおり，１次聴覚野（A1）では前方から後方に，低周波から高周波のバンド構造が見られた．後背側野（DC）では後方から前方に，低周波から高周波のバンド構造が見られた．
純音のみを聞かせた場合，対応するバンド上に活動スポットが出頭し，周辺に活動が広がった．
複合音を聞かせた場合，16kHz のバンド上でスポットが見られた後，2kHz バンド上にスポットが見られた．
また，複合音を聞かせたときの各領域の応答開始時間と応答の大きさを調べたところ，16kHz 領域の方が，2kHz 領域よりも有意に応答開始時間が早いことが分かった．2kHz 領域の応答の大きさは，2kHz 純音を聞かせたときの応答の大きさよりも小さくなった．
聴覚野の皮質ニューロンが，刺激に対して興奮→抑制の経過をたどることは過去の研究で分かっているが，これらのことから，モルモットは A1 部位において，16kHz バンドにおける応答は 2kHz バンドよりも立ち上がり時間が早く，2kHz における応答が 16kHz における応答により抑制されるために，純音刺激よりも応答が小さくなると考えられる．

050 ゲノムワイド関連解析による日本人の心筋梗塞疾患関連遺伝子座の同定

長嶺　匠悟（学籍番号：164104C）
指導教員：松波　雅俊，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】心筋梗塞（Myocardial Infarction:MI）は生活習慣病の一つであるが，その発症には環境要因に加え遺伝要因が関与する．これまでに複数の疾患感受性領域がゲノムワイド関連解析（Genome Wide Association Study:GWAS）により同定されているが，遺伝要因の約 90％は未だ解明されていない．
【目的】GWAS により日本人 MI 疾患感受性遺伝子領域を探索する．
【方法】国立技術研究開発法人バイオサイエンスデータベースセンター（NBDC Research ID:hum0014.v4）のデータを使用し，MI 患者を疾患群（194 人），それ以外の登録されている 34 疾患罹患者を対象群（6,614 人）として解析を行った．QC（Quality Control）を通過した 143,791 SNPs についてケースコントロール関連解析を Cochran-Armitage 検定を用いて行った．さらに公共データベース（GTEx）を用いて冠状動脈組織における expression Quantitative Trait loci（eQTL）解析を実施した．
【結果】関連解析の結果，ゲノムワイド水準 $P<5.0\times10^{-8}$ を満たす SNP は得られなかった．疾患関連候補として $P<1.0\times10^{-4}$ である 15SNPs を調査した．最も関連の強い SNP は 12 番染色体に存在する rs10849915（T>C, リスクアレル C，$P=9.38\times10^{-6}$，オッズ比 1.63，95％信頼区間 1.31-3.38）であった．15SNPs それぞれについて，上流下流 500kb に存在する遺伝子の冠状動脈組織における eQTL 解析を行ったところ，rs10849915 のリスクアレル保有と *RAD9B* 発現との正の相関が認められた（$P=0.049$）．その他 5 つの SNPs に関しても 7 遺伝子の発現量との有意な相関が観察された．
【総括】GWAS により日本人 MI 感受性遺伝子領域候補が複数同定された．しかしながら，いずれもゲノムワイド水準を満たしていないため独立した MI 集団を用いて，さらなる検証を行う必要がある．

051 ブタ膵島分離における膵島純化溶液の検討

桑江　一穂（学籍番号：164157D）
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

［目的］膵島移植は重症 1 型糖尿病患者への治療として治療として注目されている．移植は手順シンプルで比較的容易であるのに対し，膵島分離は高い技術を要し，高品質な組織を得るべく更なる研究が期待されている．中でも，膵島分離における膵島純化は，移植する組織量を減少させ門脈塞栓などのリスクを減少させることが可能となる為，非常に重要な工程である．今回我々は過去の研究結果に基づき，純化溶液として，IU 溶液と IK 溶液の比較をボトル純化法により検討した．
［方法］IU 溶液は UW 溶液に iodixanol を加えて作製，IK 溶液は modified ETK 溶液（MK 溶液 :ETK 溶液に ulinastatin を添加したもの）に iodixanol を加えて作製した．膵島純化前に組織比重を測定後，iodixanol で高比重純化溶液の比重を変化させ純化を行なった．純化膵島の評価系として Stimulation Index，ATP 量，マウスへの膵島移植を行った．
［結果］5 回のブタ膵島分離を行い，純化前の平均膵島数は 651,661 ± 157,719IE．消化組織を 2 つに分け，IU 溶液及び IK 溶液で純化を行ったところ, IU 溶液で 276,719 ± 64,342IE（純化効率 85.1 ± 4.3%），IK 溶液で 271,875 ± 47,910IE（純化効率 89.5 ± 7.8%）が回収された．in vitro，in vivo アッセイでは，両群間に有意差は認められなかった．
［結論］IU 溶液と IK 溶液に有意差はなく，純化溶液として同等に使用できると考えられた．我々は過去に，膵島分離前の膵保存にて，UW 溶液よりも MK 溶液の方が優れていることを報告している．MK 溶液の利点はトリプシン抑制剤が入っていること，コラゲナーゼ抑制効果が少ないことが挙げられるが，膵島純化での MK 溶液の使用において，コラゲナーゼ抑制効果が少ないことは利点とならない．又，純化の短時間のみ組織が純化溶液に接している為，保存液としての影響は少ないと考えられる．このことが両者に差が認められなかった原因と考えられる．

052 小児期逆境体験が統合失調症の気質傾向に及ぼす影響

松本　英之（学籍番号：154194D）
指導教員：○甲田　宗良・近藤　毅
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【問題と目的】統合失調症（Schizophrenia: Sc）の発症には，遺伝と環境の双方が関与する（Paula et al., 2016）．遺伝要因の一つである病前の気質傾向の把握は，患者の特性理解や治療反応予測に有用である．しかし，Sc の気質特性を検討した研究は少ない．さらに, 小児期の逆境体験（Advanced childhood experience: ACE）が様々な精神疾患の発症リスクとされ（Dong et al., 2004），Sc もその可能性は十分想定される．
そこで本研究では，① Sc 患者の気質傾向の評価，② ACE の有無による Sc の気質傾向の違いを検討した．
【方法】1．指標　気質・性格評価は，TEMPS-A/MPT（Matsumoto et al., 2005）を用いた．また，ACE の評価基準として ACE 質問紙（Felitti et al., 1998; Edwards et al., 2001）の内容を参考にした．
2．対象者　Sc 患者 35 名（平均年齢=36.6 ± 2.2，男性 12 名，女性 23 名，ACE あり 9 名，ACE なし 26 名）を対象とした．健常対照群（Control）は，Sc 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】指標の得点について，ACE あり－なし－Control の 3 群比較（分散分析）を行った．その結果，Sc 患者は ACE の有無にかかわらず循環・抑うつ気質が高い，ACE のない Sc 患者は Control に比べて発揚気質が低い，ACE のある Sc 患者はない患者よりもさらに循環気質が高いことが示された．Sc 患者は，気分の不安定性や抑うつのリスクを抱えており，気分の問題への対処も重要な治療戦略とすべきである．とくに，小児期に過酷な経験をしている患者の気分不安定性は，いっそう注意を払うべきである．

053 沖縄県内の医療機関で発生したヒトメタニューモウイルス（hMPV）アウトブレイクサンプルを用いた分子系統解析

江田　肖（学籍番号：164216C）
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

背景：ヒトメタニューモウイルス（hMPV）は 2001 年にオランダの研究グループに新たに発見されたニューモウイルス科に属する非分節マイナス極性の一本鎖 RNA ウイルスである．hMPV は F（fusion）と G（attachment）遺伝子の違いによって，二つの遺伝子型（A 型と B 型）に分けられる．
目的：本研究の目的は，沖縄県内の医療機関で発生した hMPV アウトブレイクの際に検出した hMPV 株の分子系統学的特徴を明らかにすることである．
材料：2018 年 8 月に沖縄県 A 病院で採取した 8 名の上気道感染症例（鼻腔拭い液）の hMPV 陽性検体を研究材料とした．
方法：hMPV 陽性検体から RNA を抽出した後（QIAmp MinElute Virus Spin Kit, QIAGEN），RT-PCR により cDNA を作成した（SuperScript III First-strand synthesis system for RT-PCR, Invitrogen）．次に，F と G 遺伝子にそれぞれ特異的なプライマーを用いた PCR を行った（F 遺伝子：BF-100 および BF-101，G 遺伝子：SH-7 および SH-8）．増幅産物をマイクロチップ電気泳動（MultiNA, SHIMADZU）で確認し，増幅が不十分な検体に対し nested PCR を行った（F 遺伝子：BF-103 および BF-104，G 遺伝子：前述のプライマー）．増幅産物の塩基配列をダイレクトシーケンス法により決定した後，分子系統解析を実施した．
結果：8 名の HMPV 陽性検体のうち，十分な増幅を認められた検体は F 遺伝子と G 遺伝子それぞれ 2 検体（25%）と 7 検体（87.5%）であった．そのうちダイレクトシーケンス法より塩基配列が得られたのは 2 検体（F 遺伝子）であった．この 2 検体の F 遺伝子塩基配列を用いて，分子系統解析を行い，hMPV の分子系統樹を作成した．

054 透明化処理を施した生体試料の観察・撮影方法として 3 次元内部構造顕微鏡を適用することに，現行の観察・撮影方法に対する優位性はあるか

佐藤　樹（学籍番号：164207D）
指導教員：横田　秀夫 [1]，中村　佐紀子 [1]，岸本　英博 [2]
[1] 理化学研究所　光量子工学研究センター　画像情報処理研究チーム
[2] 琉球大学医学部　寄生虫・免疫病因病態学

背景：近年，3 次元的な観察をより容易に，そしてより多様にする新しい透明化手法が幾つも開発された．透明化した試料の観察システムとしては多光子顕微鏡や光シート顕微鏡が主流であるが，試料の外部から試料の内部のシグナルを観察するため，光量の絶対値には必然的に差異が生じ，また深さに応じてレーザー出力を変化させる必要があるため，定量的な観察であるとは言い難い．透明化技法そのものだけでなく，用途に応じた様々な観察システムを開発することが求められている．
目的:①多光子顕微鏡および3次元内部構造顕微鏡による透明化試料の観察・撮影方法の特性を明らかにする．②微細な構造を広い視野で観察する必要があり，構造と機能が関連している大きな組織である脳を対象とし，透明化試料に対する 3 次元内部構造の適用について考察する．
方法：半割したマウスの脳を透明化するとともに細胞核を染色し，これを多光子顕微鏡および 3 次元内部構造顕微鏡を用いて観察・撮影する．撮影して得られたデータを解析して比較する．
結果：それぞれの撮影データとラインプロットが得られた．多光子顕微鏡の撮影データは脳の浅部では明瞭に細胞核を捉えていたが，深部に向かうにつれて不明瞭となっていった．3 次元内部構造顕微鏡は深さによる影響を受けずに撮影可能だが，全体像と細胞核の詳細像を両立できず，詳細像においては切り屑や不完全な凍結の影響を受け明瞭さを欠いた．
考察：多光子顕微鏡は，脳の全体像を，深さを取りながら撮影するような目的での使用には難点がある．3 次元内部構造顕微鏡は，全体を通して定量的に観察・撮影を行えるが，その強みを活用するためには，今後，包埋・凍結の方法や，耐凍材となる透明化技法・試薬などを工夫していく必要がある．また，全体像と詳細像の両立のためには，撮影システムそのものの性能向上を行うことも考慮しなくてはならない．

055 グリオブラストーマにおける GluA2 の転写調節機構の解明

臼井　俊揮（学籍番号：164154K）
指導教員：○片桐　千秋，高木　博，西村　正彦，土田　幸男，石内　勝吾
琉球大学医学研究科　琉球大学脳神経外科

グリオーマ（神経膠腫）の中でも最も悪性度の高いものがグリオブラストーマであり，効果的な治療法の開発が待たれている．GluA2 は，グルタミン酸受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体の 4 つのサブユニットのうちの 1 つで，特にグリオーマとの関連性が高いとされている．本研究では，グリオブラストーマにおける GluA2 のメチル化を解析し，転写調節機構を解明することを目的とした．まずグリオブラストーマ患者の摘出腫瘍より構築された細胞株から DNA を抽出する．抽出した DNA をバイサルファイト処理にかけたあと，ターゲット領域を PCR 増幅する．バイサルファイト処理とは，DNA をバイサルファイト（亜硫酸水素塩）で処理し，構成する塩基を化学的に修飾する方法である．この処理によってメチル化されていないシトシンはウラシルに変換されメチル化されたシトシンは処理の影響を受けず，そのまま残る．バイサルファイト処理した DNA の配列と未処理の DNA の配列の差異から，メチル化・非メチル化を特定することができる．その後，PCR 増幅したターゲット領域を電気泳動にかけてターゲット領域をゲルから切り出す．切り出したターゲット領域の DNA を大腸菌に組み込ませてサブクローニングする．1 晩おいて培養したコロニーからプラスミド精製し最後にシーケンス解析を行う．イントロン領域である Intron1 は 11 サンプル解析することができた．Intron1 領域の中に 15 の CpG サイトが存在し 11 サンプルのデータのうちいくつかはメチル化されている結果となったが，統計的にはメチル化している CpG は 0 であった．プロモーター領域は 1 サンプルしか解析することができなかった．解析できたサンプルの絶対数が不足したため，統計的処理することができなかった．今後，より多くのシーケンス解析を行っていく必要がある．

056 皮膚 T 細胞リンパ腫における腫瘍特異抗原の探索

中石　祐木（学籍番号：164164G）
指導教員：○大嶺　卓也，内海　大介，高橋　健造
琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

【背景】皮膚原発の成人 T 細胞リンパ腫（Adult T-cell Leukemia: ATL）と未分化大細胞リンパ腫（Anaplastic Large Cell Lymphoma: ALCL）はしばしば病理組織学的鑑別が困難な症例が存在し，診断に難渋する．
【目的】皮膚原発 ATL と ALCL の鑑別に有用な腫瘍抗原を探すこと
【方法】①公開されているデータベースより ATL と ALCL 病変部の次世代シークエンス（NGS）データを入手し，プログラミングによる統計解析手法（主成分スコアプロット，因子負荷プロット）を用いて ATL と比べて ALCL で強く発現している遺伝子を抽出した．
②抽出した遺伝子のうち，腫瘍特異抗原となり得る遺伝子について ATL，ALCL それぞれの皮膚病変組織を用いて免疫組織染色を行なった．
【結果】
①主成分分析において ATL と ALCL のサンプルデータは両疾患で明確にクラスタリングされた．因子負荷プロットにより ALCL により多く発現している遺伝子として CCL21，CCL19，CXCL12，MMP2，POSTN，CD90，UBD などの遺伝子を抽出した．
② NGS データで ALCL に多く発現していたタンパクについて免疫染色を行ったが，ATL と ALCL の鑑別に用いる腫瘍特異抗原となり得るような染色の差は確認できなかった．
【考察】
今回，腫瘍特異抗原の候補として NGS データで抽出した遺伝子，タンパクの発現が免疫染色で差が出なかった理由として，両疾患のデータベース上にリンパ節病変と皮膚病変のデータが混在していることが挙げられる．NGS データを取り扱う際はそのサンプル毎の組織背景，細胞系統などを考慮し，NGS データのみで結論を出すのではなく，免疫染色などを用いてその結果を検証することが重要であると考えた．

057 GSK3 β阻害薬リチウムを用いたテスカルシンの神経幹細胞分化制御機構の検証

村林　直樹（学籍番号：164166C）
指導教員：高松　岳矢，松下　正之
琉球大学大学院医科学研究科　分子・細胞生理学講座

【背景･目的】テスカルシン（TESC）は脳と心臓で特異的に発現する蛋白質で，神経細胞の分化・増殖や，アルツハイマー型認知症の病態への関与が疑われている．心筋細胞で TESC は GSK3 βのリン酸化を阻害し，GSK3 β活性を高めることが分かっているが，神経細胞での TESC と GSK3 βの関係は未だ不明である．GSK3 βシグナル経路は神経発達・新生に関与することから，TESC は神経幹細胞の分化を GSK3 βの活性を調節することで制御する働きがあるのではないかと考えた．本実習では，神経幹細胞分化における TESC の GSK3 β調節機能の影響を明らかにするため，TESC ノックアウトマウス海馬由来の TESC 欠損神経幹細胞を用いて実験を行った．【方法】TESC ノックアウトマウスの胎仔から摘出した海馬細胞由来の神経幹細胞を，GSK3 βの阻害薬であるリチウムを加えて培養し，リチウム濃度と分化した神経細胞及びアストロサイトの数の相関を検証した．またリチウムによる細胞毒性および GSK3 βの活性に関わる S9 のリン酸化の評価並びに PCR による実験結果のダブルチェックを行った．【結果】TESC 欠損神経幹細胞にリチウムを加え培養すると，神経細胞分化は 1mM までは野生型に比べて緩やかな促進がみられ，3mM で抑制がみられた．またアストロサイト分化は 3mM までの範囲において常に野生型より強く抑制されていた．【考察・結論】神経幹細胞を用いた先行研究では，リチウム濃度が≦ 3mM でアストロサイト分化抑制かつ神経分化促進，5mM ≦でアストロサイト分化抑制かつ神経分化抑制が起こることが報告されており，これと実験の結果から TESC は GSK3 βの活性を維持することで神経幹細胞が神経細胞やアストロサイトに分化するのを促進する働きがあるのではないかと考えられた．TESC が神経幹細胞分化に GSK3 β活性調節機能を経て関与している可能性が示唆された．

058 ストレスホルモンであるアドレナリンがT細胞に及ぼす影響

玉城　智聡（学籍番号：164107H）
指導教員：田中　礼子，高橋　良明，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】病は気から，などと言われるように神経系と免疫系が密に関連していることが古くから言われてきた．白血球の表面には β2 アドレナリン受容体が存在し，アドレナリンの結合により免疫系が調節されることが知られているが，アドレナリンがヒト T 細胞に及ぼす効果については未だに不明な点も多い．そこで，本研究では，in vitro においてアドレナリンが，正常ヒトTリンパ球の活性化，およびヒトT細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）感染 T 細胞株のウイルス抗原発現にどのような影響を与えるのかを解明することを目的とした．
【方法】正常人末梢血単核球を種々のT細胞分化誘導サイトカイン（IL-12，IL-4，IL-10 や TGF- β）の存在下，固相化抗 CD3 抗体（OKT-3）と可溶性抗 CD28 抗体でT細胞を選択的に刺激する系にアドレナリンを添加（あるいは無添加）した．活性化後の表現型をフローサイトメトリー（FCM）で，サイトカイン産生を ELISA で調べた．HTLV-1 感染 T 細胞株ではウイルス抗原発現を FCM 解析した．
【結果と考察】種々のT細胞分化誘導系にアドレナリンを作用させたが，T細胞活性化マーカーである CD25 や CD134 の発現には顕著な差はなかった．Th2 誘導 IL-4 の共存下にアドレナリンを添加した場合，pro-inflammatory cytokine である IFN- γ，TNF- α，IL-6 の産生量が顕著に減少した．IL-2 依存性 HTLV-1 感染細胞株にアドレナリンを添加すると，Tax 抗原及び gp46 抗原を発現する細胞の数が増加した．
【結論】IL-4 存在下での正常T細胞の活性化において，アドレナリンが pro-inflammatory cytokine 産生を顕著に抑制すること，HTLV-1 感染 T 細胞株の HTLV-1 抗原発現を増強することが明らかにされた．今後，それらのメカニズムの解明が課題である．

059 PURE-LAMP 法を用いたマラリア原虫寄生率定量精度の検証

平田　幹（学籍番号：164183C）
指導教員：駒木（安田）　加奈子 [1)]，中津　雅美 [1)]，狩野　繁之 [1)]，
山城　哲 [2)]，岩下　華子 [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

【背景と目的】マラリアの感染拡大の防止には，迅速で簡便な感度の高い診断方法の確立が求められる．PURE-LAMP 法とは新鮮血あるいは患者ろ紙血から PURE 法によって簡単に DNA を抽出でき，LAMP 法によって高感度で標的遺伝子を増幅できる方法で，顕微鏡診断のような熟練した技術を必要とせず，また PCR 法のように高価な装置も不要であり，途上国での導入が期待される新たな診断法である．今回この PURE-LAMP 法にリアルタイム濁度計を導入し，副産物であるピロリン酸マグネシウムによる白濁精製を増幅反応中にリアルタイムで計測して結果に定量性があるかどうかを調べ，またその定量性から原虫寄生率を特定できるかどうかを検証した．
【材料と方法】サンプルは熱帯熱マラリア原虫を ring stage に同調後，健康なヒト全血に希釈して寄生率 10^{-7} ～ 10^{-2}%に調整したろ紙血と，NCGM を受診した患者の全血から作成したろ紙血を用いた．PURE-LAMP 法は栄研化学の PURE DNA 抽出キット，Loopamp™ MALARIA Pf Detection Kit, Loopamp™ EXIA（リアルタイム濁度計）を用いた．また，ろ紙血の定量性を確認するための参考実験として，Promega の Maxwell® RSC DNA FFPE Kit-PKK, Custom と Maxwell RSC を用いたリアルタイム定量 PCR 法を行った．
【結果と考察】濁度計を用いた PURE-LAMP 法では，寄生率 10^{-4} ～ 10^{-2}%においては常に寄生率と Tt 値の間に強い相関関係が見られたが，Tt 値は実験毎にばらつきがあった．これはろ紙血の染まり方の問題と，LAMP 法の反応が一定温度で進行することによる影響が考えられる．また臨床検体の寄生率を正確に特定することはできず，原因はサンプルが古いために DNA の状態が悪かったこと，そしてろ紙への血液の染まり方が均一でなかったことが考えられ，今後さらなる検討が必要だと考えられる．

060 CRISPR/Cas9 システムを用いた *pim-1* ノックアウトゼブラフィッシュの作成と解析

中野　友貴（学籍番号：164127B）
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生化学講座

ダイアモンド・ブラックファン貧血は，主に乳幼児期に発症し，特に赤血球分化が障害される先天性疾患である．患者の半数以上に，リボソームタンパク質（*RP*）遺伝子の変異が確認されている．中でも，*RPS19* の変異は患者全体の約 25％と最も多く，特にその 52 番目から 62 番目のアミノ酸残基に高頻度の変異が報告されている．当講座では，59 番目のセリン残基が Pim-1 によりリン酸化を受けることを *in vitro* において見出した．さらに個体レベルでの解析のために，モルフォリノアンチセンスオリゴを用いた *pim-1* ノックダウンゼブラフィッシュを作成した．作成した個体で，赤血球数の減少が確認された．そこで本研究では，より詳細な解析のために，CRISPR/Cas9 システムを用い，*pim-1* ノックアウトゼブラフィッシュを作成した．まず，*pim-1* を標的とする CRISPR/Cas9 リボヌクレオタンパク質を受精卵に微量注入し，F0 胚を作成した．受精後 24 時間胚のゲノム DNA を抽出し，ヘテロ二本鎖移動度解析およびサンガーシーケンス法により変異の存在を確認した．このとき，F0 胚において胸部の膨らみや眼の縮小などの形態異常が観察された．次に，F0 と野生型（WT）を交配して得た F1 胚の *pim-1* 遺伝子を解析したところ，8 塩基対の欠失を持つヘテロ変異体であることが明らかになった．さらに，F2 世代でホモ変異体を得，リアルタイム PCR により初期胚における造血関連因子の発現量を検討した．変異体では，WT に比べ *pim-1* の発現量が減少し，赤血球造血マーカー *gata-1* の発現量が増加した．また，ヘモグロビン染色により赤血球数の減少が確認され，pim-1 が赤血球分化に関与していることが示唆された．今後は，得られた pim-1 変異体を用いて，rps19 のリン酸化と赤血球分化の関連について検討していく予定である．

061 体外循環に伴う溶血についての検討

白石　美登里（学籍番号：164204K）
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】開心術では人工心肺を用いた体外循環を確立する必要がある．体外循環中，血液は非生理的な環境下に曝されるため溶血が引き起こされる．本研究では体外循環と溶血量の相関について検討した．
【対象】2018 年 12 月から 2019 年 2 月までに行われた開心術連続 16 例．
【方法】1．体外循環開始前，体外循環開始 30 分後，以後 60 分ごとに人工肺出口からサンプル血を採取し，3,000rpm で 10 分間の遠心分離を行い，分離血漿を専用スピッツに吸引後，AMCO 社製 Hemocue Plasma/Low Hemoglobin® を用いて血漿遊離ヘモグロビン（PF-Hb）値を測定した．
2．体外循環終了前に生化学採血にて LDH 値を測定した．
3．術前，術直後，術後 1 日，術後 2 日，術後 3 日，術後 7 日，退院時（または最終検査結果）の Cre 値および eGFR 値を測定した．
【結果】1．体外循環（人工心肺）時間と溶血量に強い正の相関を認めた．（$y=7.744E\text{-}9\ x^3-3.818E-6\ x^2+0.001x+0.012$, $R^2=0.468$, $p<0.01$）
2．超低体温群（循環停止施行群）は軽度低体温群（循環停止非施行群）と比較し，溶血が進みやすい傾向を示した．（PF-HG 平均値 ± SD：超低体温群：0.28 ± 0.17mg/dl, 軽度低体温群：0.14 ± 0.09mg/dl, P=0.055）
3．血漿 LDH 値増加量と溶血量に正の相関を認めた．（$y=0.0004x+0.0532$, $r=0.7347$, $p<0.05$）
4．術後一過性に腎機能は悪化するが，術中溶血量と退院時腎機能に相関を認めなかった．本対象群で検討した溶血の程度では，臨床上問題となる不可逆的な腎機能障害は示さなかった．
【結語】体外循環時間と溶血量に強い相関を認めた．

062 マウス脛骨神経損傷モデルにおける神経組織の形態学的，形態計測学的研究

水谷　ゆうな（学籍番号：164175B）
指導教員：○大倉　信彦，高山　千利
琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

これまで分子解剖学講座では，マウス脛骨神経の切断・縫合損傷モデルを用いて下肢運動機能障害の回復過程を研究してきた．しかし損傷を受けた有髄神経の形態的回復については未だ評価できていない．そこで本研究では，先行研究と同じ脛骨神経損傷モデルを用いて，損傷部位から遠位部の有髄神経線維の回復過程を明らかにする目的で，切片 SEM（走査型電子顕微鏡）観察法を用いて神経組織の形態学的観察と形態計測学的解析を行った．切片 SEM 観察法は，ウラン･鉛染色を施したエポン切片を反射電子モードの SEM で観察する方法で，切片全体を広範囲に，光学顕微鏡よりも高解像度で観察できる特徴を持つ，形態計測に適した方法である．
損傷手術後 7 日では，有髄神経線維は消失し，障害された線維はマクロファージで処理された．術後 14 日では，薄い髄鞘を持つ細い有髄線維が少数出現した．術後 28 日では，細い有髄線維の数が著しく増加し，髄鞘厚も増加した．術後 56 日では，有髄線維の数の増加は僅かであったが，直径が大きくなった．形態計測による解析では，有髄軸索密度は術後 14 日から 28 日にかけて損傷前の約 80% にまで急速に回復し，軸索直径は術後 28 日から 56 日にかけて増加することが示された．軸索直径と髄鞘厚の相関は，軸索が少数出現する術後 14 日には失われるが，術後 28 日および 56 日には正の相関が回復した．
これらの結果から，損傷後消失した有髄神経線維は，まず損傷手術後 14 日から 28 日にかけて細い有髄軸索の数が増加し，続いて術後 56 日にかけてそれら軸索の直径が増加するという回復過程をたどることが示唆される．損傷後 28 日以降には髄鞘厚が増し，有髄神経としての機能回復が示唆される．これらのことから，術後 56 日には運動神経としての機能はかなり回復していることが推測される．

063 パターン分離能に関与するヒト海馬の sub-region 解析

江原　稔（学籍番号：164188D）
指導教員：○西村　正彦，片桐　千秋，高木　博，土田　幸男，石内　勝吾
琉球大学脳神経外科学講座

【目的】ヒトの記憶において，似ているが異なる 2 つの事柄（エピソード，視覚情報等）を弁別するパターン分離能は重要である．本研究では，機能的磁気共鳴画像を用い，パターン分離能に関与する海馬の活動領域について検討した．
【方法】被験者：健常者 6 名（男 5 名，女 1 名）．平均年齢 24.0 ± 4.0 歳．手続き：被験者は記憶課題中の脳活動を 3-T MRI スキャナー（Discovery MR750, GE Medical Systems）にて撮像された．被験者は，ゴーグルディスプレイに順次提示される画像を 3 種類，「新規の画像（New）」，「既出画像に似ているが若干異なる画像（Lure）」および「既出画像と同一画像（Same）」に分類し，手元のボタンで回答するよう指示された．刺激提示および回答の記録，正誤判定は PC を用いて Neurobehavioral Systems, Inc. の Presentation® ソフトウェアで行った．脳機能画像解析には MathWorks 社の Matlab 上で動作する SPM12 を用いた．
【結果と考察】各課題の正答率は，New 刺激が平均 93.2 ± 10.3%，Lure 刺激が平均 64.6 ± 12.2%，Same 刺激は平均 84.3 ± 11.7% であった．被検者 6 名の機能画像は 1-sample *t*-test（$p<.01$）を用いて，各課題中の有意な信号変化を示した領域を検討した．3 種の刺激全てに共通して反応がみられた領域は，左・右紡錘状回，右 CA1/CA2，右海馬傍回，右脳弓脚であった．一方，嗅周野と海馬歯状回体部は Lure 刺激にのみ活動が確認された．以上より，嗅周野と海馬歯状回体部はパターン分離能に関与する可能性が示唆された．

064 腸管 IgA 抗体が結合する細菌由来抗原 SHMT ペプチドに対するマウスの抗体産生反応の解析

堺田　ひかる（学籍番号：164179E）
指導教員：○孫　安生[1)]，新藏　礼子[1)]
[1)] 東京大学定量生命科学研究所免疫・感染分野研究室を琉球大学皮膚科の高橋健造先生よりご紹介頂きました

【背景・目的】腸内細菌叢の乱れは炎症性腸疾患のみならず，糖尿病，アレルギー，自閉症など様々な疾病の原因となる．腸管分泌型 IgA 抗体はこの腸内環境を正常に保つために重要な役割を持つ．我々の実験室で腸管 IgA 抗体は細菌の SHMT（セリンヒドロキシメチルトランスフェラーゼ）という酵素分子内エピトープ配列を認識し，細菌を区別して結合することで腸内細菌叢を制御することを明らかにした．本研究で SHMT ペプチドにより免疫したマウスを作製し，免疫応答を調べることで SHMT ペプチドを介する腸内細菌叢制御機構の解明への足掛かりとする．
【方法】10-16 週齢の Balb/c AJc1 マウス♀ 11 匹．それぞれ SHMT ペプチド（n=4），OVA（卵白アルブミン）（n=4），PBS（n=3）による免疫を行った．免疫は感作として day 0, 7 に腹腔内投与，惹起として day 14, 15, 16 に鼻腔内投与．Day 0, 7, 14, 17 に血液および糞便を採取．血液は凝固させた後，血清を回収．糞便は PBS に溶かして上清を回収．Day 17 は更に BALF（肺胞洗浄液）を回収した．回収したサンプルはそれぞれサンドイッチ ELISA 法により免疫グロブリン IgG，IgE，IgA の濃度を測定した．
【結果・考察】血清中 IgG 濃度は 1 度目の腹腔内投与後（day 7）から OVA 免疫群，SHMT ペプチド免疫群で上昇したが，PBS 群では上昇しなかった．このことから抗原感作により全身性に免疫が働いていることが確認された．BALF 中の IgG，IgE，IgA のいずれの濃度も OVA 免疫群，SHMT ペプチド免疫群の両方で上昇し，鼻腔からの免疫により局所粘膜免疫が働いていることが確認できた．便溶液中の IgA 濃度は OVA 免疫群と PBS 群で免疫前と有意な変化が見られなかった一方で，SHMT ペプチド免疫群では 1 度目の腹腔内投与後（day 7）より IgA 濃度が著明に減少した．このことから細菌由来の SHMT ペプチドが腸管 IgA の分泌を抑制していることが示唆された．

065 Purification of lipid biosensors to distinct the mechanism of lipid transfer

島袋　裕大（学籍番号：164158B）
指導教員：○ Yasunori Saheki[1)]，Bilge Ercan[1)]，Masayuki Matsushita[2)]
[1)]*Molecular Neuroscience Laboratory, Lee Kong Chian School of Medicine*
[2)]*Department of Molecular and Cellular Physiology, University of the Ryukyus*

In eukaryotic cells, the steady-state composition of lipids varies in each organelle membranes. This distinct lipid composition is achieved through vesicular and non-vesicular（via proteins）transport from the main site of lipid biosynthesis, the endoplasmic reticulum（ER）, to the destination organelles. Much of the work has been done to elucidate the mechanism of vesicular trafficking of lipids. On the other hand, the proteins mediate non-vesicular transport of lipids have recently started to be identified. The fluorescence resonance energy transfer（FRET）-based in vitro lipid transfer experiments are established techniques to test the lipid transport property of the candidate proteins. To use in this technique, we overexpressed and purified P4C domain from SidC of *Legionella pneumophila*, PH domain from PLCD1 of *Homo sapiens* and C2 domain from Lactadherin of *Bos taurus*, which bind phosphatidylinositol-4-phosphate（PI(4)P）, phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate（PI(4,5)P_2）and phosphatidylserine（PS）, respectively. We also generated EGFP-tagged versions of P4C and PH, and further optimized purification conditions of these lipid biosensors. The lipid biosensors purified in this study will be used to identify PI(4)P, PI(4,5)P_2, and PS transport proteins.

066 HTLV-1 感染症研究における ウサギモデルの構築へ向けて ：抗ヒト CD25 抗体のウサギ HTLV-1 感染細胞 T 細胞株への交差反応とその応用

池間　知里（学籍番号：164133G）
指導教員：田中　礼子，高橋　良明，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】IL-2 受容体α鎖（CD25）は，リンパ球の活性化に伴って発現し細胞の増殖分化に関与する．成人 T 細胞白血病（ATL）の原因ウイルス（HTLV-1）感染 T 細胞は，CD25 を構成的に発現する．ATL 患者においては血中の可溶性 CD25（sCD25, sIL-2R）値が異常に高い．ウサギは HTLV-1 感染に高い感受性を持ち，HTLV-1 感染実験モデルの有用性が示されているが，市販のウサギ細胞特異的抗体の種類が少なく，研究が余り進んでいない．本研究では，HTLV-1 感染症研究におけるウサギモデルの構築へ向けて，ウサギ sIL-2R の定量 ELISA を作出することを目的とした．
【方法】抗ヒト CD25 抗体（H-48）および市販の抗ウサギ CD25 抗体（Kei-α）の反応性を HTLV-1 感染で不死化したヒト T 細胞株（YT#1）とウサギ T 細胞株（NZW#0）を用いてフローサイトメトリー解析をした．ウサギ sIL-2R-ELISA 構築には検体に前述細胞株の培養上清を用いた．抗体アフィニティークロマトグラフィーでウサギ CD25 を精製し，ウエスタンブロットによる同定を試みた．
【結果と考察】HTLV-1 感染 T 細胞株のフローサイトメトリー解析で，H-48 のウサギとヒトへの交差反応，および Kei-αのウサギのみの特異的反応が観察され，これら 2 つの抗体が認識するウサギ CD25 エピトープが違うことが明らかとなった．そこで，これらの抗体でサンドイッチ ELISA の構築を試み，ウサギ sIL-2R の定量系構築に成功した．NZW#0 培養上清から H-48 セファローズ 4B カラムで分子量約 50kDa のウサギ CD25 を精製した．
【結論】今回作出したウサギ CD25 サンドイッチ ELISA は，ウサギを用いた HTLV-1 感染症研究に多いに役立つことが期待される．

067 AI を用いた乳がんデジタル病理画像の 腫瘍領域認識の方法とその精度について

松本　耕司（学籍番号：164149C）
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・目的：近年 Deep Learning 技術を用いた AI（Artificial Intelligence）の発展が著しく，医療にもその応用が期待されている．病理画像を AI に学習・分析させることで，将来的には病理診断の補助として活用できる可能性がある．そこで，腫瘍の病理画像を AI に学習させ，腫瘍領域認識の精度を評価した．
対象：2009 ～ 2016 年にかけて，那覇西クリニックおよび中頭病院の HER2 陽性乳がん患者から針生検で採取した乳腺組織のデジタル病理画像を任意に選出した．
方法：（1）AI 搭載のソフト（HALO-AI®）に腫瘍領域と間質領域とを認識させるため，デジタル病理画像（HE 染色）4 症例 400 箇所の両領域を目視でマーキングし，HALO-AI® の良好な学習条件（トレーニング回数，解像度，確率マップ）を探った．各条件における腫瘍認識領域の評価は目視で行った．さらに症例数とマーキング箇所を 20 症例 2000 箇所に増加させ，得られた良好な条件で学習させた．（2）別の未学習の 20 症例の代表的な領域（0.25mm^2）について，AI に腫瘍領域を認識させ面積を求めた．さらにその精度の評価のために，連続切片であるサイトケラチン染色陽性領域（CK 陽性領域）の面積を求め，相関係数を用いて評価した．
結果：（1）良好な学習条件は，トレーニング回数 60000 回，解像度 0.25（μm/px），確率マップ 70% となった．（2）AI の腫瘍認識領域と CK 陽性領域の相関係数は 0.874，p 値＜0.001 となった．また，19 症例において AI の腫瘍認識領域の面積が CK 染色陽性領域の面積を上回った．
考察：AI による腫瘍領域認識は概ね良好であった．ただし本検討の条件では，AI は小型の腫瘍胞巣が密在する症例において，介在する狭小な間質を腫瘍として認識する傾向があり，これが腫瘍認識領域の面積の増大に寄与している可能性があると考えられる．

068 培養神経細胞での FIP200 による Pyk2 の制御機構とゼブラフィッシュでの FIP200 の生理機能の解析

新川　慎之助（学籍番号：164203B）
指導教員：○仲嶺　三代美，鳥原　英嗣，山本　秀幸
琉球大学大学院医科学研究科生化学講座

G タンパク質共役型受容体の多くが $G_{q/11}$ タンパク質と共役している．$G_{q/11}$ タンパク質の活性化によりチロシンキナーゼ系が活性化されることが，様々な細胞系で報告されているが，その詳細な分子機構は不明である．生化学講座では，マウス視床下部由来の培養細胞である GT1-7 細胞を用いて，ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）受容体刺激後の細胞内情報伝達機構について検討してきた．これまでに，受容体刺激後に $G_{q/11}$ タンパク質を介して，非受容体型チロシンキナーゼである proline-rich tyrosine kinase 2（Pyk2）が活性化されることを見出した．Pyk2 は主に中枢神経系に発現し，シナプス機能に関与している．さらに，Pyk2 の活性化には，二種類のセリン・トレオニンキナーゼが関与することが明らかになった．現在，この二種類のキナーゼの基質タンパク質が FIP200 である可能性を検討している．私は，GT1-7 細胞とゼブラフィッシュを用いて，FIP200 の生理機能について検討した．
はじめに，GT1-7 細胞に FIP200 を過剰発現させると，GnRH 受容体刺激による Pyk2 の 402 番目のチロシン残基の自己リン酸化が抑制され，Pyk2 の活性化が阻害された．次に，FIP200 と Pyk2 の過剰発現後に共免疫沈降実験を行なった．本実験で両者の結合が認められ，この結合は GnRH 受容体刺激によって抑制された．次に，FIP200 を標的とするアンチセンスオリゴをゼブラフィッシュの受精卵に微量注入し，FIP200 の発現を抑制したノックダウン胚を作製した．受精後 80 時間のノックダウン胚では形態形成および運動機能に異常が認められた．これらの結果は，FIP200 が Pyk2 の活性制御に関与しており，ゼブラフィッシュでも重要な生理機能を有していることを強く示唆している．

069 小児肘関節周囲骨折における受傷前肘関節アライメントが骨折型に与える影響

Predisposing effect of elbow alignment on the elbow fracture type in children.

中谷　太（学籍番号：164197C）
指導教員：大久保　宏貴，金谷　文則
琉球大学　整形外科

［はじめに］肘関節周囲骨折は小児骨折の中で最も頻度の高い骨折の一つで，その 90% 以上は転倒・転落で手をついて受傷する．受傷時の肘関節アライメントの程度によって肘関節に伝わる外力の方向が変化し，特定の骨折型を来す可能性がある．骨折型別のアライメントを比較した．
［対象と方法］2015 ～ 2017 年の 3 年間，15 歳以下，沖縄県内 10 病院にて上腕骨外側顆骨折（L 群），上腕骨顆上骨折（S 群），橈骨頚部骨折（R 群）と診断され，受傷時に正確な健側肘関節レントゲン 2 方向を撮像された 291 例を対象にした．各群の年齢，性別，健側 carrying angle（CA），健側 tilting angle（TA）を比較した．また年齢と性別の影響を最小限にするために，S 群から L 群・R 群の症例数・年齢・性別を case-match させ，CA，TA を比較した．3 群間比較には Bonferroni-Dunn 法を，2 群間比較には unpaired T-test を用い，p 値 0.05 未満を有意差ありとした．
［結果］L 群（95 例），S 群（173 例），R 群（23 例）の平均年齢は，各々，6.4 ± 2.7 歳，6.3 ± 3.0 歳，8.3 ± 2.7 歳で R 群が他の 2 群と比べて有意に高く，性別は R 群で有意に女児の割合が高かった．L 群，S 群，R 群の健側 CA は各々，13.6 ± 4.3°，15.4 ± 4.3°，17.6 ± 4.5° で L 群は他の 2 群に比べて有意に小さく，R 群は L 群より有意に大きかった．健側 TA は 3 群間に有意差を認めなかった．case-match study では S 群と比べて CA は R 群が有意に大きく，（17.6 ± 4.5° vs.14.9 ± 3.4°）L 群は有意に小さかった．（15.6 ± 2.1° vs.13.6 ± 4.3°）TA に有意差は認められなかった
［考察］肘関節アライメントにおいて肘外偏角（CA）は小児の肘関節骨折型に影響する因子の一つと考えられた．転倒・転落による受傷において外偏角が大きいと橈骨頚部骨折を，小さいと上腕骨外側顆骨折を来しやすいことが示唆された．

070 腸内細菌叢（糞便）移植の心筋梗塞予防作用の機序の解明

宮城　郁（学籍番号：1634142F）
指導教員：○平良　雄司，筒井　正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学

【背景】近年，腸内細菌叢の異常が様々な病気の成因に関与していること，および，正常な腸内細菌叢（糞便）の移植が病気の治療に有効であることが報告されている．マウスは糞便を食べる習性があり，異なる系統のマウスを同一ケージで飼育（co-housing）することで，腸内細菌叢（糞便）移植の作用を検討することが出来る．私達は，心筋梗塞を発症する 2/3 腎摘トリプル一酸化窒素合成酵素欠損（NX-TKO）マウスと正常な野生型（WT）マウスを co-housing すると，NX-TKO マウスの心筋梗塞による突然死が抑制されることを見出した．この結果から，腸内細菌叢（糞便）移植が心筋梗塞の予防に有効である可能性が示唆される．
【目的】本研究では，「腸内細菌叢（糞便）移植の心筋梗塞予防作用の機序には便中の短鎖脂肪酸が関与している」という仮説を検討した．
【方法と結果】WT マウスだけで飼育した群，NX-TKO マウスだけで飼育した群，および NX-TKO マウスと WT マウスを co-housing した群において，便中の 8 種類の短鎖脂肪酸（酢酸，酪酸，プロピオン酸など）の濃度を測定した．WT マウスだけ飼育した群と比較して，NX-TKO マウスだけ飼育した群において，酢酸の濃度だけが有意に低下していた．重要なことに，WT マウスと co-housing した NX-TKO マウスではその低下は抑制されていた．この結果を踏まえて，次に，酢酸の冠危険因子における作用を検討した．酢酸（0.1mM および 0.35mM）2 週間経口投与は，NX-TKO マウスの血圧値と空腹時血糖値を低下させる傾向を示した．一方，総コレステロール値については低下作用は示さなかった．
【結論】NX-TKO マウスにおける腸内細菌叢（糞便）移植の急筋梗塞予防作用の機序には，便中の酢酸が関与している可能性が示唆された．

071 脊髄におけるグリシンのアストロサイトによる除去システムの発達

友寄　竜司（学籍番号：144124J）
指導教員：○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

グリシンは，GABA と共に脊髄における主要な抑制性伝達物質である．神経終末からシナプス間隙に放出されたグリシン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）又は神経終末にある GlyT2 により除去される．これまで，分子解剖学講座では発達期の脊髄において，GlyT2，GABA 生合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素（GAD），GABA をアストロサイトに取り込む GABA トランスポーター 3（GAT-3）の発現変化を解析してきた．その結果，GABA 作動性神経が，グリシン作動性神経へと変化することや，初期には GABA が放射状グリアに取り込まれることを明らかにしてきた．しかし，グリシンの除去システムの構築過程については不明な点が多い．そこで，本研究ではグリシンのアストロサイトにおける除去システムの形成過程を調べ，GABA・グリシン作動性神経や GABA 除去システムの構築との時間的，空間的関係を解明することを目的とし，脊髄における GlyT1 の発達変化を，免疫組織化学法により検討し，さらに GAD，GlyT2，GAT-3 との 2 重染色を行った．
胎齢 12 日では GlyT1 は外套層全体で認められたが，GAT-3 は前索にわずかに認められるのみであった．胎齢 14 日には GlyT1 は，前角全体に広がり，放射状グリアから飛び出した突起に局在していた．一方 GAT-3 は放射状グリアの幹の部分に認められた．胎齢 18 日以降，脊髄全体で，GlyT1 は GAT-3 と同じアストロサイト上に局在していた．前角において，胎齢 12 日から GlyT1 と GAD は既に発現していたが，GlyT2 の発現は GlyT1 よりも遅れて胎齢 16 日で認められた．これらの結果から，①グリシン作動性神経終末の出現以前に，グリシンの除去システムの形成が開始される，②胎齢 12-14 日では，グリシンと GABA は放射状グリア上の異なる場所で取り込まれる，③発達に伴い，グリシンと GABA はアストロサイトの同じ場所から除去されるようになることが示唆された．

072 高気圧酸素療法（HBO）による放射線治療（RT）からの海馬機能の保護効果について検討

仲里　光平（学籍番号：164208B）
指導教員：○高木　博，片桐　千秋，土田　幸男，西村　正彦，石内　勝吾
琉球大学医学研究科　琉球大学脳神経外科

目的
脳腫瘍患者に放射線治療（RT）を行うことが，有効であるが，治療後に患者の認知機能障害を引き起こし，患者の QOL を下げることが問題視されている．脳神経外科学講座の先行研究で高気圧酸素療法（HBO）は海馬歯状回（DG）において RT からの神経保護作用が示されている．NMDA 受容体は，神経回路の可塑性に重要な働きをしている．今回，動物モデルを用いて HBO による海馬依存的な認知機能への保護効果について NMDA 受容体の機能を指標にして解析を行った．海馬の解剖学的位置を明瞭化するために神経細胞に YFP を発現したマウス（YFP マウス）を実験に用いた．
方法
YFP マウスを非照射群（3 匹），RT 群（2 匹），HBO＋RT 群（2 匹）に分け，RT 群は 2Gy の放射線照射を 5 日間，HBO＋RT 群は 2.5atm100% 酸素で 40 分間飼育した後，RT 群 2Gy の放射線照射を 5 日間行った．マウスの海馬体より厚さ 300 μm の海馬スライス標本を作成した．Rhod4 をカルシウム蛍光色素として Ca イメージングを用い，NMDA（50 μM）を 5 分間還流投与した．海馬の層構造を明らかにすることを考え，DAPI（5 μM）を同様に海馬スライス標本に導入した．
結果と考察
Ca イメージング解析において，海馬 CA1，CA3，DG 領域で，NMDA 応答による Ca 濃度の上昇は Control- RT 間で統計学的な有意差が見られたが，Control-HBO＋RT 間及び，HBO＋RT-RT 間では有意差は見られなかった．これらの結果より，NMDA による Ca 濃度の上昇が RT 条件では有意に抑制されるが，HBO 処理による回復傾向を示唆していると考えられる．

073 The effects of BET bromodomain inhibitor treatment on cancer associated fibroblasts in pancreatic ductal adenocarcinoma

徳田　春花（学籍番号：164186H）
指導教員：○ Andrew S. Liss, Kim Honselmann, Mari Mino-Kenudson
Department of Surgery, Massachusetts General Hospital, Boston, MA
推薦：高橋健造先生（琉球大学皮膚科）

The overall five-year survival for pancreatic ductal
Adenocarcinoma (PDAC) is only 6%, nearly two-thirds lower than most of other cancers. PDAC is extraordinary chemoresistant and the abundant stromal content of these tumors contribute to the ineffective treatment of this disease. Current approaches for the treatment of PDAC utilize drugs that target just either the neoplastic cells or the stroma.
Bromodomain extra-terminal (BET) family of chromatin adapters contribute to PDAC cell growth by regulating multiple key pathways (MYC, GLI, SHH) of this disease.
In this study, we examined the effects of BET inhibitors (BETi) on the cancer associated fibroblast (CAF) content of patient-derived xenograft tumors. We performed
immunohistochemistry using antibodies specific for smooth muscle actin (SMA), a marker which stains CAFs, and analyzed the quantitation of the stained area. The results show 4.7% lower CAF contents on BETi treated tumors comparing to the positive control.
The study shows that therapeutic inhibition of BET proteins provides a unique opportunity to simultaneously target both stromal and neoplastic cells.

074 フェニルアラニン tRNA メチル化酵素 FTSJ1 の機能喪失による精神遅滞発症の分子機構の解明

上里　美也子（学籍番号：164137K）
指導教員:○中條　岳志 [1]，魏　范研 [1]，高松　岳矢 [2]，富澤　一仁 [1]，松下正之 [2]
[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】熊本大学大学院生命科学研究部分子生理学分野では，精神遅滞の原因遺伝子である FTSJ 1 の機能喪失により精神遅滞が発症する分子機構を解明してきた（未発表データ）．これまでに Ftsj1 が Phe, Leu, Val 等の tRNA のメチル化酵素であること，Ftsj1KO により Phe と Leu の tRNA による翻訳が遅れ，KO マウスの空間学習や記憶などの神経機能を低下させることがわかっている．特に Phe-tRNA は，Ftsj1KO マウスの脳で tRNA 量の減少と tRNA 分解産物の増加が見られたことから，野生型（WT）マウスでは tRNA のメチル化が未知の酵素による tRNA の分解を抑えることが示唆された．しかしながら，Phe-tRNA を切断する酵素と Phe-tRNA 切断の詳細な分子メカニズム，Ftsj1 KO で影響を受ける臓器は脳だけなのかは不明である．そこで本研究では，Phe-tRNA の切断酵素を同定することと Ftsj1 KO の影響は脳以外の臓器でも見られるかを明らかにすることを目的とした．【方法】定量的逆転写 PCR（qRT-PCR）により候補酵素（RNase1 ～ 8）の mRNA の発現量を評価することで，候補酵素を絞りこんだ．次に，WT または FTSJ1KO HEK293 細胞でこれら酵素をノックダウンし，Phe-tRNA とその分解産物をノザンブロットで観察した．また，マウスの複数の臓器の Phe-tRNA でもノザンブロットを行い比較した．
【結果】qRT-PCR により RNase2 ～ 5 が Phe-tRNA 切断酵素であることが示唆された．ノザンブロットでは，いずれのノックダウンでも Phe-tRNA の分解の抑制は見られなかったが，マウスの脳では Ftsj1 KO の tRNA 量は WT よりも少なく，tRNA 分解産物は多かった．また，Phe-tRNA の量は各臓器によって異なっていた．　【考察】脳のみで Ftsj1 KO における tRNA の分解により tRNA 量が低下している可能性が示唆された．また，tRNA 切断酵素をノックダウンし，tRNA の分解を抑えようと試みたがうまくいかなかったため，今後さらなる検証が必要である．

075 ヒト T 細胞白血病ウイルス（HTLV-1）臨床株における広域中和エピトープの保存

小宮山　真代（学籍番号：164135C）
指導教員：田中　礼子，高橋　良明，○水口　真理子，田中　勇悦
琉球大学大学院医学科研究科免疫学講座

【目的】成人 T 細胞白血病（ATL）は，ヒト T 細胞白血病ウイルス 1 型（HTLV-1）の感染により引き起こされる．日本では九州と沖縄に HTLV-1 キャリアが多い．これまでに我々の研究室では，HTLV-1 が持つエンベロープタンパク gp46 に対する種々の抗体を樹立した（Tanaka Y. et al., J. Immunol, 1991）．中でも LAT-27 は，HTLV-1 感染細胞と非感染細胞の細胞融合を阻害する中和抗体であり，将来 HTLV-1 感染阻害薬となることが期待できる．本研究では，沖縄県在住の HTLV-1 感染者から樹立された野生型 HTLV-1 感染細胞株について，LAT-27 が認識する中和エピトープ（gp46 アミノ酸 191-196 番目）が保存されているかを解析することを目的とした．
【方法】HTLV-1 感染細胞株よりゲノム DNA を抽出し，LAT-27 が認識するプロウイルスの gp46 中和エピトープ領域の塩基配列を DNA シークエンスにて解析した．また，実際の中和反応を確認するために HTLV-1 感染細胞と非感染細胞株（CEM）の共培養液中に LAT-27 を添加後，24 時間培養し合胞体の形成阻害を解析した．
【結果と考察】調べた 8 株全ての HTLV-1 において，LAT-27 が認識する gp46 中和エピトープ領域の塩基配列に欠失，挿入および変異はなかった．HTLV-1 感染細胞株 ATL-299i または ATL-307i と CEM の共培養では合胞体が形成されたが，LAT-27 を添加すると合胞体の形成が阻害された．
【結論】沖縄における野生型 HTLV-1 株には LAT-27 が認識する中和エピトープが広く保存されていることが明らかとなり，LAT-27 が HTLV-1 感染拡大を阻止できる抗体医薬の候補の一つであることが示唆された．

076 光学的計測法を用いたモルモットの聴覚野における音刺激に対する応答パターン分析

新垣　廉（学籍番号：164128A）
指導教員：○細川　浩
琉球大学大学院医学科システム生理学講座

モルモットの大脳皮質聴覚野での音情報の処理過程を調べるため，光学的計測法を用いてモルモットに純音，雑音含んだ音を付加し，その時の音刺激に対するそれぞれの応答パターンとその差異を時空間的に解析した．
モルモットに Ketamin（1mg/kg）と Xylazin（0.5mg/kg）で麻酔をして手術を行い，大脳皮質聴覚野を露出させ，電位感受性色素（RH795）で 1.5 時間染色した．周波数バンドを測定するための純音刺激として，持続時間 100ms で周波数 0.5,1,2,4,8,16kHz の純音を付加した．雑音区間を含む音は，周波数 8kHz の純音に持続時間 100ms の途中の 40ms の時点に長さが 5,10,20ms の雑音をそれぞれに挿入したものを用いた．
純音を付加した時の音に対する皮質の活動をマップにすると，一次聴覚野において低周波の純音は吻側に，高周波の純音は尾側で活動を示す周波数バンドが形成されていた．8kHz の純音刺激では 8kHz のバンドの背側で活動が始まり，そこからバンドに沿って腹側に活動が広がっていった．雑音を含む音を付加すると，始めは純音刺激と同様に 8kHz のバンド上の背側から腹側へと活動の広がりが見られ，雑音区間に入ると腹側から皮質全体へと広がりが見られた．この時雑音を含む音は雑音区間の反応が終わると抑制が強くなり，純音の反応で見られた off 応答が見られなかった．また雑音に対し特に強く反応する領域での応答は，雑音区間の長さを変えても応答の始まる時間と応答の強さに大きな差は見られなかった．以上の結果から雑音に対する応答の時間と強さが雑音区間の長さに依存しないこと，雑音の on 応答後に皮質全体に抑制が働きそれ以降の反応が観察されないことがわかった．これは聴覚野が音の周波数の変化に敏感に反応を示すことを示唆している．

077 輸入農産物を介して国内に流入した薬剤耐性 *Aspergillus fumigatus* の表現型および遺伝子解析

土屋　伸生（学籍番号：164193A）
指導教員：○田代　将人[1)]，浦野　凌[1)]，西村　圭太郎[1)]，中野　裕一郎[1)]，高園　貴弘[1)]，宮崎　泰可[1)]，泉川　公一[1)]
[1)] 長崎大学大学院医歯薬学総合研究科　臨床感染症学分野
[2)] 琉球大学医学部医学科

【背景】アスペルギルス症は致死的な深在性真菌症であり，代表的な日和見感染症の１つである．近年，薬剤耐性アスペルギルスの世界的拡散が危惧されている中，我々は輸入農産物に付着して海外の薬剤耐性アスペルギルスが日本国内に流入している事実を見出している．そこで，これらの輸入された薬剤耐性アスペルギルスが国内で拡散する危険性を検討するために，我々が発見した薬剤耐性 *Aspergillus fumigatus* の表現型および遺伝子学的解析を行い，*A. fumigatus* の野生株と比較を行った．
【方法】輸入農産物より得られた耐性株 13 株の他，国内で得られた環境由来耐性株，臨床分離耐性株を対象とし，種々の環境由来野生株および臨床由来野生株を比較対象とした．表現型は，growth assay および biomass assay による増殖能の評価，crystal violet biofilm assay によるバイオフィルム形成能の評価を行った．遺伝子学的解析は既に主要な耐性機構である CYP51A 変異の解析が終了しており，さらに新たな耐性機構として報告されている Hmg1 および Erg6 のシークエンスによる変異検索を行った．
【結果】いずれの結果も環境由来耐性株と感性株の間に表現型に有意差を認めなかった．ほとんどの環境耐性株の Hmg1 に共通して S212P/Y564H の変異を認め，一部には E105K や S541G といった変異が加わっていた．Erg6 には F272L や A291T などの変異が認められた．
【考察】微生物の薬剤耐性能の獲得は fitness cost の上昇につながることが多く，自然環境下では野生株との生存競争で劣るが多い．しかし，今回の研究結果は，環境由来耐性株の fitness cost は低く保たれており，野生株に遜色ない生存能力があることを示した．
【結語】環境由来耐性株は自然界において淘汰される可能性は低いと思われた．また環境由来耐性株には Hmg1 および Erg6 の両者に変異の存在が確認された．

078 あなたは日本の刑務所についてどのくらい知っていますか？
～琉球大学医学部医学科学生を対象とした質問票調査から～

上江洲　諒（学籍番号：164192B）
指導教員：○花城　和彦，青木　一雄
琉球大学大学院医学研究科　衛生学・公衆衛生学講座

【背景】矯正施設（刑務所）では，少子高齢化の進行や貧困問題・社会格差の問題などを背景として，一般社会に比較して急速に受刑者の高齢化が進んでいる．また，矯正施設には特有の疾病構造があり，受刑者を対象とした「矯正医療」は，施設内の安全・衛生の確保や受刑者の社会復帰後の二次感染を予防するなど，一般社会の国民生活にも直結した重要な役割を担う．しかしながら，一般的に矯正医療に対する医学生の関心は低く，矯正医官を志す医学生も少ないのが現状である．【目的】琉球大学医学部医学科の１・２年生を対象にした質問票調査を行ない，「刑務所に関する知識の程度」や「刑罰に対しての考え方」を明らかにすることにより，「矯正医療」に対する医学生の関心向上を目的とした情報発信のための基礎資料を得る．【対象と方法】琉球大学の「人を対象とする研究倫理審査委員会」の承認を得て実施された．琉球大学医学部医学科の１・２年生（計 253 名）を対象に講義終了後の休憩時間を利用して集合調査法を用いた自記式質問票調査を行い，MS-Excel，JMP Pro 13 を用いて回答内容を分析した．【結果】計 208 件の回答が得られた（回収率 82.2%：１年生 105 件（回収率 86.1%），２年生 103 件（同 78.6%））．「受刑者の医療費はどのくらい自己負担しているか」の問いに対する正答率は 40.4%，「受刑者の再入所率は近年どのくらいだと思うか」の問いに対する正答率は 15.9% であった．刑務所に関する知識を問う全13問中11問において正答率は50%未満であった．一方，「刑事裁判の判決に関心を持った事がある」と回答した者は，64% と過半数を超えていた．【考察】医学生の多くが刑務所の実態を正しく把握していなかったが，日常のマスメディアから発信される刑事事件・裁判に対する関心は高いことがわかった．矯正医官の仕事の重要性をもっと多くの医学生に理解してもらい，矯正医療の充実につなげることが重要であると思われた．

079 大腸がん手術検体での核酸保存状況の解析

平尾　未来（学籍番号：164162A）
指導教員：○吉見　直己，高松　玲佳
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

【背景・目的】がんの治療において，Precision Medicine が注目されており，その中心は病理組織検体によるゲノム解析である．本研究の目的は，がんゲノム医療を行う上で，本院における大腸がん病理組織ブロック（FFPE）の核酸の品質の評価である．
【方法】琉大病院にて作製された大腸がん手術検体の FFPE のうち，2014 年，2016 年，2018 年の各年 5 症例をランダムに選び，その腫瘍最大割面から作製された FFPE を 10 μm で薄切して，Maxwell（Promega 社）の RSC DNA FFPE Kit（AS1450）を利用して DNA を抽出した．DNA は濃度測定と共に，TapeStation（Agilent 社）を用いて，DNA integrity number（DIN）値を測定し，DNA の分解度で核酸品質を数値化した．また対照群として内視鏡的摘出検体の FFPE に対しても同様に各年 3 症例を検討した．各年群に対して，一元配置分散分析，t- 検定を利用し，統計学的検討を行なった．
【結果】DIN 値の平均値は 2018 年から順に 2.04 ± 0.12，1.80 ± 0.07，1.38 ± 0.09 と経年的に低下した（$p<0.05$）．一方，内視鏡的摘出検体の DIN 値の平均値は手術検体に対し，統計学的に有意差はみられなかった．
【考察】FFPE から抽出された DNA は経年的に劣化することが確認された．次世代シーケンサー（NGS）用のライブラリー作製に必要とされる DIN 値は 2.3 以上が望ましく，作製後 3 年以内の FFPE の使用が推奨されているが，今回の保存状態は同様の結果が得られた．しかしながら，比較的保存状態が良いと予想された内視鏡的摘出検体の DIN 値の平均値は手術検体との有意差が確認できなかった．今後の課題として，より多くの継続的な DIN 値の計測と，摘出後の時間・温度管理，ホルマリン固定の時間等，DNA の品質に影響を与える要素が検体の取扱い規定に準じているかの調査が必要と考えられる．

080 仰臥位 THA における機能的骨盤基準面を参照した術中カップ支援デバイス “HipPointer” の有用性
Utility of mechanical cup alignment device “HipPointer” reference to functional pelvic plane in supine THA

衛藤　勇斗（学籍番号：164200G）
指導教員：仲宗根　哲，金谷　文則
琉球大学大学院医学研究科医学専攻整形外科学講座

【はじめに】人工股関節置換術（Total Hip Arthroplasty: THA）においては，カップの正確な設置は重要である．しかし，術中操作による骨盤の傾斜は，カップの不良設置をきたす可能性がある．今回，THA におけるカップ設置支援デバイス（以下 “HipPointer”）を用いたカップ設置精度を検討した．
【対象と方法】2014 年 12 月～ 2018 年 12 月に THA において “HipPointer” を用いてカップを設置した 151 例 176 関節（男性 50 例 62 関節，女性 101 例 114 関節），平均 62.1 歳（21 ～ 90 歳）を対象とした．3 次元術前計画では，カップは単純レントゲン画像の評価である Radiographic 定義を用いて，外方開角（矢状面から見た外側への角度）を 40° とし，前方開角（冠状面から見た前方への角度）は大腿骨前捻に応じて，10°，15°，20° とした．“HipPointer” は本体と左右の中空の脚からなるコの字状のデバイスで，2.0mmk-wire を通した左右の上前腸骨棘（ASIS）へ脚の中空に通して設置する．水平器を用いて “HipPointer” と手術台を平行に補正し，アライメントガイドに従ってカップを設置，固定する．カップ設置精度は 3 次元術前計画と術後 CT を用いて絶対値誤差を比較した．【結果】カップの外方開角（平均± SD）は 40.4° ± 3.3，前方開角は 16.1° ± 3.9 であった．カップ設置誤差は，外方開角では 2.5° ± 2.2，前方開角では 2.7° ± 2.4 であった．術後ピン刺入部感染や皮膚トラブルはなかった．【考察・結論】本研究結果から，“HipPointer” のカップ設置精度は外方開角，前方開角共に 3° 以内と良好であった．“HipPointer” は，シンプルな構造で簡単に骨盤に設置することができ，術中に骨盤傾斜を補正することで良好な精度が得られ，THA において有用なデバイスと思われた．

081 高気圧酸素療法（HBO）による放射線照射（RT）からの海馬 DG 領域保護作用について

玉城　開地（学籍番号：164212A）
指導教員：○高木　博，片桐　千秋，西村　正彦，土田　幸男，石内　勝吾
琉球大学医学研究科　琉球大学脳神経外科

【背景】脳腫瘍には放射線治療が有効であるが，放射線治療の副作用として認知機能の低下を伴う場合がある．認知機能の低下は海馬における神経新生の低下が原因であることから，海馬を放射線照射から保護することが必須であると考えられている．
【目的】HBO により神経可塑性誘導に重要な働きを持つ海馬 DG 領域の NMDA 受容体機能の RT からの保護作用が脳神経外科講座の先行研究より示されている．本研究では引き続き，Ca イメージング法を用い動物モデル（control 群，RT 群，RT＋HBO 群）の海馬における Ca 濃度を測定し，HBO による海馬体の各領域（CA1, CA3, DG）における NMDA 受容体機能の保護作用を解析した．
【方法】マウスを control 群，RT 群，HBO＋RT 群に分け RT 群は 2Gy の放射線照射を 5 日間 ,HBO＋RT 群は 2.5atm100% 酸素で 40 分間飼育後，2Gy の放射線照射を 5 日間行った．処理後のマウスの海馬体スライスに Rhod-4 を導入し，NMDA（50 μM）を 5 分間還流投与し Ca イメージング法を用いて海馬体の各領域における Ca 濃度を測定した．
【結果】海馬体の各領域において NMDA による Ca 濃度上昇について，RT 群間では control 群に比べて統計的に有意な減少が見られたが，Control-RT 群＋HBO 群間及び RT-RT 群＋HBO 群間ではすべての領域で有意差は見られなかった．
【考察】RT は海馬体の各領域の NMDA 受容体の機能を抑制するが，HBO によりすべての領域において NMDA 受容体の機能は回復傾向示す．従って，HBO は海馬 CA 1 , CA3, DG 領域の NMDA 受容体機能の RT に対する保護作用をもつことが示唆された．

082 沖縄由来の精製物質が，ヒトの皮膚に与える効能についての研究

久高　美南子（学籍番号：164196E）
指導教員：○大嶺　卓也，高橋　健造
琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

【背景】シークァーサーなどの沖縄に自生する植物や果物に含まれる成分は，これまでの研究から様々な効能が見出されており，メタボリックシンドロームや動脈硬化の改善に有用であるとされている．このシークァーサー以外にも，沖縄には大量精製が可能な多彩な特有の植物産品が豊富に存在する．
【目的】沖縄に自生する植物から抽出した 20 種類以上の有効成分を用いて，これらがヒトの皮膚に与える影響を研究すること．
【方法】
①皮膚を構成する表皮角化細胞，線維芽細胞，色素細胞の培養液中に，植物精製物を個別に添加，一定時間負荷し，細胞から RNA を抽出した．
②抽出した RNA を用いてマイクロアレイ実験を行い，それぞれの細胞の遺伝子発現を網羅的に解析した．
【結果】
シークァーサー抽出成分であるノビレチンやタンゲレチンを一定時間負荷することにより，表皮角化細胞の天然保湿因子であるフィラグリン遺伝子の発現が上昇していた．一方，いくつかの植物成分は表皮角化細胞間の接着因子の発現を低下させ，バリア機能を低下させ，異常角化を誘導することを発見した．
【結論】
ノビレチンやタンゲレチンを経口摂取また皮膚へ塗布することで，皮膚のバリア機能を向上させうる可能性を示唆する．一方，いくつかの植物成分は表皮角化細胞間の接着因子の発現を低下させ，バリア機能を低下させ，異常角化を誘導することを発見した．これらの負荷により各種のヒトの皮膚病モデルマウスとなりうることが期待される

083 The mechanism of lipids transportation between plasma membrane (PM) and endoplasmic membrane (ER)

Karin Asanuma（Student ID：164110H）
Supervisors：○ Darshini Jeyasimman[1], Saheki Yasunori[1], Masayuki Matsushita[2]
[1]*Lee Kong Chian School of Medicine, Singapore*
[2]*Department of Molecular & Cellular Physiology, University of the Ryukyus*

During cell division, plasma membrane (PM) undergoes massive expansion. This process requires rapid and efficient delivery of lipids to the PM, the fundamental building blocks of this bilayer. The majority of membrane lipids are synthesized in the endoplasmic reticulum (ER) and transported to other organelles and the PM. Recent studies have shown that non-vesicular lipid transport via membrane contact sites between the ER and, other organelles and the PM play an important role in maintaining cellular lipid homeostasis. Defects in lipid homeostasis lead to neurodegenerative diseases such as Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) and Alzheimer's disease. However, the physiological functions of membrane contact sites remain elusive. There are many lipid transport proteins, including SMP (synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding protein) domain proteins, which localize to membrane contact sites. We hypothesize that SMP domain proteins might have a critical role in maintaining cellular lipid homeostasis during cell division. The Saheki lab's goal is to elucidate the molecular mechanisms underlying the dynamics of intracellular lipid transport between the ER and other membranous organelles as well as the PM, focusing on non-vesicular transport that occurs at membrane contact sites. As one of the model systems, we use *C. elegans* to visualize the localization of fluorescent-tagged SMP domain proteins and take advantage of various fluorescent probes for detecting the dynamics of lipids and Ca^{2+}.

084 成人 T 細胞白血病における各ゲノム異常の臨床的意義

中山　真悟（学籍番号：164146J）
指導教員：○加留部　謙之輔，森近　一穂，崎浜　秀悟
琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

成人 T 細胞白血病／リンパ腫（ATL）は HTLV-1 が病因となり日本の九州・沖縄地方に多くみられる予後不良な末梢性 T 細胞腫瘍である．本研究では県内の病院から収集した ATL の症例について臨床データや治療成績，遺伝子変異等の関連を検討し考察を試みた．
ATL の症例の臨床データは県内 5 病院から計 82 例を集めそのうち ATL に有意にみられる遺伝子変異 50 個の解析が済んでいる 71 例を基に，統計解析ソフト STATA，解析手法としてカイ二乗検定，Fisher の正確確率検定および Kaplan Meier 法を用い，臨床データの検査値等については初診時の検査結果で解析し頻度の差を比較した．
ATL の予後予測モデルである ATL-PI を解析した結果，有意に生存率と相関した（P=0.0045）．また変異遺伝子の頻度を解析した結果，特に PLCG1, PRKCB, TP53, GATA3, CCR4, CARD11 等が多くみられた．これらは過去の報告と合致した．一方，同種造血幹細胞移植を受けなかった群を CCR4 陽性 ATL の治療薬に承認されている Mogamulizumab を治療に使用した群と未使用の群に分け解析した結果，予後に有意差はみられずこれは過去の報告とは合致しなかった．また，臨床病型による変異遺伝子の頻度に有意差はみられなかった．
多くみられた変異遺伝子の中でも特に CARD11 と PRKCB の遺伝子変異が共存する症例が有意に多く（P<0.001），どちらも T 細胞受容体 /NF-κB シグナル伝達経路に関わることから両者に機能的な関連があることが示唆された．また，どちらも女性に有意に多かった（PRKCB: P=0.051, CARD11: P=0.017）．さらに PRKCB と CARD11 が共存する症例も P=0.005 と有意に女性に多くみられたことから，ATL に関わる特定の変異遺伝子の頻度には性別が関連しているという仮説が立てられた．

085 慢性腎臓病患者における肥満と糸球体密度及び糸球体腫大との関連

徳力　さくら（学籍番号：154160K）
指導教員：座間味　亮
琉球大学　循環器・腎臓・神経内科学

【目的】肥満合併慢性腎臓病患者（CKD）では，糸球体高血圧を介して腎機能障害を増悪させることが知られている．本研究では，慢性腎臓病患者において，総糸球体数を反映する糸球体密度および糸球体高血圧を反映する糸球体腫大と肥満との関連を検討した．
【方法】対象は当科で 2016 年 1 月から 2017 年 6 月に腎生検を行った患者 76 例．体格指数（BMI）≧ 25kg/m^2 を肥満と定義し，肥満の有無別に糸球体密度および糸球体径を評価した．
【結果】対象者の年齢，血圧，BMI，クレアチニンクリアランス（CCr）の中央値はそれぞれ 51 才，123/70mmHg，25kg/m^2，70ml/ 分であった．肥満群（BMI ≧ 25kg/m^2）は非肥満群（BMI＜25kg/m^2）と比較して，CCr は両群間で差を認めなかったにも関らず（70ml/ 分 vs.62ml/ 分 p=0.85），肥満群で糸球体密度が低く（2.2/μm^2 vs. 2.8/μm^{2}p=0.027），最大糸球体径は大きかった（251μm vs. 208μm p＜0.001）．多変量解析では，年齢，性別，収縮期血圧，糖尿病の有無，CCr，レニン –アンジオテンシン –アルドステロン系阻害薬内服の有無とは独立して，BMI は最大糸球体径と有意に関連していた．
【結論】CKD 患者において，肥満は糸球体密度低下を伴う糸球体腫大と関連した．肥満患者では非肥満患者と比較して，CCr は同程度も糸球体数は潜在的に減少している可能性が示唆された．

086 沖縄県の高齢者施設を対象とした急患発生時の対応状況に関する調査

垣花　学（学籍番号：164116G）
指導教員：○花城　和彦、青木　一雄
琉球大学大学院医学研究科　衛生学・公衆衛生学講座

【背景と目的】我が国では高齢者人口が増加しており，高齢者施設で余生を過ごす高齢者の割合もさらに増加していくと思われる．一方，救急車出動回数は年々増加傾向にあり，その一因として高齢急病者の増加があげられる．本研究では，沖縄県における高齢者施設の救急車利用状況を調査し，施設職員の救急対応知識・トリアージ能力の向上や救急車の適正利用の促進のための基礎資料を得ることを目的とする．【対象と方法】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．沖縄県の公式ホームページ記載の高齢者入所施設（712 施設）を対象として郵送法による質問紙調査を行い，MS-Excel および JMP Pro 13 を用いて回答内容を分析した．【結果】質問票の回収率は 48.6%（346 件）であった．救急要請された全件数（1655 件）のうち入院となった件数は 1320 件（79.8%）であった．また，救急車要請理由（複数回答）として「生命に関わる状態（となる）と認識」されての要請は全体の 51.6%であった．発熱，意識障害が要請時の症状（複数回答）の 35.5%を占めており，呼吸器症状（22.7%）による要請が多かった．70%以上の施設で救命講習会の受講歴があった．施設職員が救急車に同乗すると回答した施設は約 60%であった．救急隊への情報提供カードを用意している施設は 86.3%であったが，施設独自の様式を用いている施設が 76.8%に上った．【考察】沖縄県の救急搬送高齢者の入院率は 58%と報告されているが，今回の高齢者施設の調査では 79.8%とさらに高値を示した．その原因として発熱，呼吸器症状が多くみられたことから，インフルエンザや肺炎球菌のワクチン接種率を向上させる必要があると考えられた．また，救命講習会受講率の向上を介してトリアージ力を向上させ，救急隊への情報提供カードの様式を吟味統一し，スムーズな搬送体制を構築すべきと思われた．

087 Extra virgin olive oil (EVOO) and Flaxseed oil (FO) prevent metabolic dysfunction and dysbiosis upon exposure to high fat lard diet in mice

Higa Moeko（学籍番号：164103E）
指導教員：○ Shiki Okamoto, Jasmine Millman, Chie Horiguchi, Hiroaki Masuzaki
Division of Endocrinology, Diabetes and Metabolism, Hematology, Rheumatology, Second Department of Internal Medicine Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

Background Consumption of Extra virgin olive oil (EVOO) or Flaxseed oil (FO) have been shown to assist with body weight management and blood glucose control. Recent studies undertaken in our lab have also revealed that ingestion of either EVOO or FO for a period of 10 weeks can also contribute to beneficial changes in gut microbiota and possibly can improve gut barrier protection and defense. We therefore aimed to assess whether prior consumption of EVOO or FO for 10 weeks could prevent gut dysbiosis and metabolic dysfunction when mice were then exposed to a 6-week high fat lard diet challenge. **Methods** Mice were divided into 4 groups and fed one of four diets for 10 weeks (low fat (LF), high fat lard (HF), high fat-EVOO (EVOO) or high-fat FO (FO)) (n=40). After the 10 weeks, half of the mice were sacrificed. The remaining mice were exposed to a 6-week HF lard diet challenge (n=20). After both the 10- and 6-weeks periods, a number of samples were collected including stool and liver samples with gut microbiota assessment undertaken using 16S rRNA sequencing and qPCR to evaluate the expression of mRNA involved bacterial infiltration and gut barrier integrity. **Results** A significant difference in body weight was observed between mice previously fed HF and LF throughout the 6 weeks, as well as a significant difference between mice formerly fed HF and EVOO from weeks 1 to 5. Mice previously fed HF showed a tendency of elevated blood glucose level compared to the other groups. Mice previously fed EVOO and FO also showed a significant reduction in the Firmicute to Bacteroidetes ratio compared to HF mice. qPCR data revealed that the mRNA level for Lipopolysaccharide binding protein (LBP), a marker of bacterial infiltration, was significantly lower in mice fed EVOO and FO compared to mice formerly fed LF diet. A variety of gut barrier markers including those from Occludin, Claudin and Zonulin families, were significantly elevated in the proximal colon of mice previously fed either EVOO or FO compared with LF or HF fed mice. Notably, mRNA expression of Occludin and ZO-1 were significantly elevated in mice formerly fed FO in comparison to and LF. mRNA expression level of Claudin-5 was significantly higher in mice previously fed EVOO compared to all the other groups. **Conclusion** Our data show that prior consumption of EVOO and FO might help to prevent metabolic dysfunction and dysbiosis, strengthening gut barrier following exposure to high fat lard diet in mice.

088 ヒト骨肉腫由来 143B 細胞のヌードマウス脛骨移植モデルにおける水素ガス含有蒸気混合ガスによる抗腫瘍効果の検討

尾茂田　眞榮（学籍番号：164213J）
指導教員：喜友名　翼，前原　博樹，當銘　保則，金谷　文則
琉球大学大学院医学系研究科医学専攻整形外科学講座

【1. 導入】骨肉腫は原発性悪性骨腫瘍の中で最も多く，肺転移は予後を左右する．標準治療は手術と化学療法の併用だが，いずれも侵襲が大きいため，低侵襲な治療法の開発が望まれる．所で，近年では活性酸素が種々の疾患を引き起こす原因と言われ，水素投与が活性酸素を除去し，予防効果が報告されている．【2. 目的】当研究室の前原らが，先行研究でヌードマウス（以下マウス）へのヒト骨肉腫由来 143B 細胞株（以下 143B）の移植後の腫瘍形成後に素ガス含有蒸気混合ガス（以下 XEN）吸入治療を行い，肺転移の抑制傾向を確認した．本研究の目的は同様な骨肉腫移植モデルに対して，移植直後からの XEN 吸入治療による抗腫瘍効果の検討を行うことである．【3. 実験材料と実験方法】ヒト骨肉腫由来 143B 細胞株（以下 143B）使用して蛍光顕微鏡観察，細胞増殖曲線の作成，マウスの脛骨近位部への 143B 移植を行い，腫瘍細胞移植直後から，無作為に 6 群に分け，治療を開始した．各群毎日 6 時間 XEN（以下 X 群），酸素（O 群），室内気（R 群）吸入による治療を 7 週間行なった．腫瘍移植群はそれぞれ TX, TO, TR とし，腫瘍非移植群も NX，NO，NR を設定し，計 6 群とした．膝関節周囲径計測，体重測定，肺転移測定により評価と，sa-crifice 後に脛骨病変及び肺転移を傾向顕微鏡により評価・定量を行なった．【4. 結果】In vitro の蛍光顕微鏡観察では，143B 培養での倍加時間は約 30 時間であった．in vivo では，移植後の脛骨に腫瘍細胞の蛍光を全マウスで確認した．体重は全 6 群で有意差は認めなかった．膝の健側比に関しては 3 群の中で有意差は認めないが TX 群で低い傾向を認め，同様に肺転移数の定量でも TX 群で低い傾向を認めた．【5. 結論】Xen による治療は骨肉腫への抗腫瘍効果を示す可能性があり，骨肉腫への低侵襲な全身療法の選択肢の一つになる潜在性が示唆された．

089 非翻訳性ヒト内在性レトロウイルス遺伝子の胎盤栄養膜細胞における合胞体形成に係る役割の研究

鈴木　宏祐（学籍番号：164148E）
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

[背景・目的] ヒトゲノムの約半数は，機能タンパク質の一次構造などといったユニークな情報をコードせずに，類似の配列を繰り返す「反復配列」が占めている．「反復配列」の大部分は機能が未解明であるが，今回はその配列群の 1 つである「内在性レトロウイルス」に属する HERV-HML6-c14 に着目した．
HERV-HML6-c14 は 14 番染色体上に存在し，胎盤絨毛の栄養膜細胞で特異的に発現している．また，タンパク質に翻訳はされていないことが示唆されているため，非翻訳 RNA 遺伝子である可能性が高い．一方，合胞体形成モデルとされるヒト妊娠性絨毛癌由来の BeWo 細胞は forskolin（FSK）により細胞融合が促進される．その際，HERV-HML6-c14 の発現亢進が観察されたため，HERV-HML6-c14 発現と細胞融合との間に因果関係があるとの仮説を立てた．そこで，その因果関係を検証する手始めとして，HERV-HML6-c14 の転写物を特異的に阻害した細胞を作製する．
[方法] スプライス型及び非スプライス型の両方を阻害するために，下流の exon をターゲットとして shRNA を 2 ヶ所（#4093, #4102）にデザインした．shRNA と GFP を共発現するようなプラスミドを作成して BeWo 細胞に導入し，クローニングした．阻害の程度に関しては，FSK 添加後に得た total RNA を用いた RT-PCR で確認する．
[結果] GFP シグナルを指標としてスクリーニングした結果，#4102 ではコントロールと共に独立クローンが複数得られた．発現解析に関しては，拡大培養中であるため未施行となった．
[考察・今後の展望] スクリーニングの過程で GFP のシグナル強度にクローン間で差が見られたため，shRNA による阻害効果もクローン毎に異なることが予想される．従って，RT-PCR による発現解析で阻害の程度を検証した上で，細胞融合実験に進む必要がある．

090 「小児患者における手根骨長標準チャート作成」

宮里　綾（学籍番号：164150G）
指導教員：〇兼次　拓也 [1]，金城　紀子 [1]，米本　孝二 [2]，中西　浩一 [1]
[1] 琉球大学大学院医学研究科育成医学講座，
[2] 琉球大学医学部保健学科基礎看護学講座生物統計学分野

【背景】小児手根骨長は，年齢や化骨状態に関係なく標準回帰直線に対する標準偏差により骨破壊の評価が可能であることを，1978 年に Poznanski らは提唱した．また，手根骨長は，関節障害を的確に評価でき，若年性特発性関節炎の関節破壊の診断に有用である事が報告されている．その後，1999 年に稲毛らが日本人小児手根骨長標準チャートを作成した．【目的】日本の健康小児における手根骨長標準チャートは稲毛らの報告以降，追加研究がない．そこで我々は，成長ホルモン分泌不全のない低身長を呈する小児の手根骨長チャートを作成し，最新の標準回帰直線を作成する事を目的とした．【対象】琉球大学医学部附属病院小児科にて低身長を主訴とし，手の単純レントゲン撮影を行った小児のうち，成長ホルモン分泌不全のない患者．【方法】手単純 X 線写真から以下の距離を測定し，手根骨長回帰直線を作成した．① Radiometacarpal length（RM）：橈骨骨端線中点より第 3 中手骨底部までの距離② 2nd metacarpal length（M2）：第 2 中手骨長【結果】対象は 112 人，年齢は平均 6 歳 5 か月，男児 64 人，女児 48 人であった．手根骨長標準回帰直線について，RM と M2 の相関関係は，男子 RM=10.335＋0.4592 M2 mm（回帰係数 0.4592，95% CI: 0.412 ～ 0.506，切片 10.335，95% CI: 8.537 ～ 12.13），女子 RM=12.158＋0.3764 M2mm（回帰係数 0.3764，95%CI: 0.326 ～ 0.427，切片 12.158，95%CI: 10.206 ～ 14.110）であった．【考察】稲毛らは，男子 RM=12.97＋0.4202 M2 mm，女子 RM=13.19＋0.357 M2 mm と報告した．それと比較すると，我々のデータは，男女共に回帰係数が大きく，切片が小さかった．また，男子の切片において有意差を認めた．【結語】小児手根骨長について，沖縄の集団で新しく回帰直線を求めた．その結果は既報と比較し，男子では有意差が観測された．

091 「本医科学研究で作成した小児手根骨長チャートの臨床応用について」～若年性特発性関節炎（Juvenile idiopathic arthritis:JIA）における疾患活動性評価～

仲田　そら（学籍番号：164185K）
指導教員：〇金城　紀子 [1]，兼次　拓也 [1]，米本　孝二 [2]，中西　浩一 [1]
[1] 琉球大学大学院医学研究科育成医学講座，
[2] 琉球大学医学部保健学科基礎看護学講座生物統計学分野

【背景】化骨化していない小児の関節において，手根骨長測定は若年性特発性関節炎（JIA）の関節軟骨の障害を早期に的確に判断するのに有用である．1978 年に Poznanski らによる小児手根骨長標準チャート，本邦では 1999 年に稲毛らの日本人小児手根骨長標準チャートが報告されている．JIA の治療は生物学的製剤の開発により進歩しているが，関節破壊の評価法として手根骨長評価は，簡便で重要な検査である．今回，医科学研究において宮里らは，沖縄の集団における小児手根骨長チャートを作成し，既報の標準チャートと比較検討した．
【目的】今回，宮里らが作成した小児手根骨チャートを利用し，JIA 患者の Radiometacarpal length（RM）と 2nd metacarpal length（M2）の計測値から疾患活動性を評価し，本チャートの有用性を検討する．
【症例】現在 18 歳女性で，12 歳時に両側手・手指関節腫脹が出現し JIA を発症した．両手単純レントゲンでは，MP 関節裂隙の狭小化・骨萎縮を認めた．RF 陽性多関節型 JIA と診断し，イブプロフェン，メソトレキセート，プレドニゾロンで治療開始したが，関節炎のコントロールに難渋した．X-6 年より抗 TNFα阻害薬皮下注射，X-4 年は抗 IL-6 モノクローナル抗体の点滴静注療法が開始された．
【結果・考察】治療経過中に撮影された RM/M2（mm）は，53.8/28,12，56.0/23.98，56.6/24.70，56.1/24.28 であり，M2 に比較して RM の短縮を認め関節破壊の持続が認められた．本症例の手根骨長は，宮里らが作成した手根骨長回帰分析における 95% 信頼区間を経時的に大きく下回り，治療にも関わらず軟骨・骨破壊が持続していると考えられた．
【結語】本医科学研究で宮里らが作成した小児手根骨チャートは，JIA 患者における関節破壊評価に有用であった．

092 悪性黒色腫の PD-L1 発現におけるテモダールが及ぼす影響

加藤　奏（学籍番号：164129J）
指導教員：〇藤田　真由美
所属：コロラド大学皮膚科
（琉球大学皮膚科高橋健造教授のご紹介で実習させていただきました）

悪性黒色腫は欧米では癌の中でも発症率が高く，アメリカでの皮膚ガン死亡原因の第一位を占めている．最近話題となっている免疫療法の一つである抗 PD-1/PD-L1 抗体薬のオプジーボが悪性黒色腫の治療に本邦でも承認されるなど注目が集まっている．またオプジーボは様々の治療法との併用が研究されており，アメリカで脳腫瘍や転移のある悪性黒色腫の治療で使われているテモダールもその一つである．またテモダールはヒトの悪性黒色腫における IL-1βの分泌を促進し，IL-1βの分泌により PD-L1 の発現を制御していることが確認されている．そこでテモダールが悪性黒色腫の炎症系サイトカインやその経路にどのような影響をもたらしているか調べるため研究を行った．実験手法は，ヒトメラノーマ細胞株の 1205Lu と HS294T を培養し，temozolomide（100μM），IL-1Ra（インターロイキン 1 レセプターアンタゴニスト）（10μg/ml）で一晩ないし二晩治療を行い mRNA を取り出し，cDNA に逆転写する．それを各遺伝子のプライマーを用い RT-PCR で mRNA 発現量の定量を行った．PD-L1 の発現経路の一つである JAK/STAT 経路（IFN-γ→ IFN-γR → JAK1/2 → STAT1 → IRF1 → PD-L1）の各遺伝子（JAK1/2, STAT1, IRF1）の発現について調べたところ，2 つの細胞株両方でテモダールを投与すると各遺伝子の発現量が増加した．またテモダールと IL-1Ra の両方を投与した場合，テモダールにより増加した各遺伝子の発現量が IL-1Ra により抑制されることが確認できた．よってテモダールは IL-1βの分泌を通して JAK/STAT 経路に働きかけメラノーマの PD-L1 の発現を刺激すると考えられる．PD-L1 は T 細胞の細胞傷害性を抑制するため，このことが腫瘍のテモダール耐性の一助になっている可能性もある．よってオプジーボとの併用によりテモダールとオプジーボの奏功率をあげることができるのではないかと考える．

093 社交不安障害と家族歴との関係性について －気質傾向の比較から－

森谷　健慈（学籍番号：164144B）
指導教員：○甲田　宗良・近藤　毅
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【問題と目的】社交不安障害（Social Anxiety Disorder: SAD）は，社会的状況における強い恐怖と極端な回避行動を特徴とする．そのため，高い不安気質を有すると考えられるが，これを検証した研究はない．また，SAD には家族歴の影響が指摘されているが，遺伝要因なのか，家族の行動を模倣した結果なのか明瞭ではない．本研究では，① SAD 患者の気質傾向の評価，②家族歴の有無による SAD の気質傾向の違いを検討した．
【方法】1．対象者　SAD 患者 20 名（平均年齢=29.2 歳，男性 13 名，女性 7 名）を対象とした．Control 群は，SAD 患者と年齢・性別を適合させたサンプルを抽出した．診断は DSM-IV-TR（APA, 2000）に基づき，家族歴の有無はカルテより抽出した．
2．指標　気質・性格評価は，TEMPS-A/MPT（Matsumoto et al., 2005）を用いた．
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】指標の得点について，SAD と Control を比較した結果，SAD は循環・スキゾイド気質が高く，発揚気質が低かった．つまり，SAD 患者における病前の不安気質の高さは認められず，SAD 患者の恐怖や回避は，後天的に形成される可能性が強いと考えられた．
次に，家族歴あり－なし－Control の 3 群比較を行った結果，家族歴を有する SAD 患者は，Control よりも循環・スキゾイド・メランコリー気質が高く，メランコリー気質については家族歴のない群よりも高かった．つまり，家族歴を有する SAD 患者の特徴は，メランコリー気質の高さであり，彼らは思考や行動の柔軟性がより低下していると考えられる．治療においては不安の低減に加えて，思考・行動パターンの変容に重きを置いた介入や，家族支援も重要になるだろう．

094 結核菌エフェクター分子 Zmp1 の宿主側標的候補分子 E3 はインフラマソームの最大活性化に必要である

大見謝　望（学籍番号：164209A）
指導教員：○高江洲　義一，梅村　正幸，松﨑　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〉結核菌が産生するエフェクタータンパク質 Zmp1 は，マクロファージ（Mø）からの IL-1βの産生を阻害し，Mø 内での殺菌回避に寄与することが知られている．しかしながら，その分子機序は未解明である．これまでに所属先研究室では，出芽酵母を用いて Zmp1 と結合する宿主分子 E3 を分離・同定しているが，IL-1βの産生に E3 が関与するかは不明である．そこで本研究では，Zmp1 による IL-1 β産生阻害の分子機序の解明を目的として，Zmp1 が宿主 E3 を標的として IL-1 β産生阻害に関与するとの仮説を立て，IL-1β産生制御における E3 の役割を検討した．
〈方法〉初めに免疫沈降法を用いて，ヒト培養細胞内でも Zmp1 と E3 が結合することを確認した．次に CRISPR/Cas9 法を用いて，マウス Mø 細胞株 J774.1 の E3 遺伝子の破壊を試み，限界希釈法で樹立したクローンの中から，E3 タンパクの発現消失を指標に E3 欠損細胞（5E11）を得た．この細胞を用い以後の実験を行った．成熟型 IL-1βの産生，IL-1βの mRNA 発現，IL-1β成熟化に関わるインフラマソーム関連タンパク質の発現，IL-1β遺伝子発現制御に関与する NF-κB 経路の活性化を，それぞれ，ELISA 法，RT-qPCR 法，Western blotting，免疫染色法を用いて調べた．
〈結果〉J774.1 の元株（WT）と比較して 5E11 では成熟型 IL-1 βの有意な産生低下を認め，インフラマソーム活性化の抑制も確認できた．IL-1 βの mRNA 発現量や IκBαのリン酸化・分解，NF-κB の核内移行に関しては WT と 5E11 で差は認められなかった．
〈考察〉以上の結果から，E3 は IL-1β産生制御機構のうち，pro-IL-1βの発現制御には関与していないが，インフラマソーム活性化の最大化に寄与していると考えられる．今後は，詳細な E3 の作用機序を解明し，さらに，Zmp1 がどのように E3 の機能に干渉するか明らかにすることが課題である．

095 SGLT2 阻害剤による Adult T-cell leukemia/lymphoma(ATL) における抗腫瘍効果の可能性

富浜　真美子（学籍番号：164106K）
指導教員：○仲地　佐和子，野村　育美，岡本　士毅，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）

【目的】がん細胞の糖代謝は有酸素下でも ATP 産生効率の悪い解糖系に依存するため（Warburg 効果），細胞の糖の取り込みが亢進する．最近，尿細管での糖再吸収抑制を作用機序とする血糖降下薬 Sodium-glucose transporter 2（SGLT2）阻害剤がマウス実験において膵臓がん，大腸がん，肺がんの増殖を抑制し，肝細胞がんの発生予防効果を有することが報告された（Scafoglio C. *et al*. PNAS 2015；Saito T. *et al*. Endocr. j. 2015；Scafoglio C. *et al*. Sci Transl Med. 2018；Obara K. *et al*. Oncotarget. 2017）．そこで我々は沖縄県に多発し，極めて予後不良な成人 T 細胞白血病リンパ腫（ATL）に対する SGLT2 阻害剤の抗腫瘍効果を検討した．ATL 細胞株における SGLT2 遺伝子の発現と SGLT2 阻害剤添加による ATL 細胞株の増殖抑制効果を既に確認していることを踏まえ，本研究では ATL 患者由来腫瘍細胞を用い SGLT2 阻害剤の細胞増殖抑制効果を検証した．
【方法】ATL 急性型 1 例，健常人 3 例の末梢血より単核球分離を行い，一部は RNA 抽出後に SGLT2mRNA の発現を Realtime-PCR にて確認した．分離した単核球に有糸分裂促進物質 ConcanavalinA（0, 4, 10μg/ml）と SGLT2 阻害剤（Luseogliflozin 0, 50, 100μM）を添加し，48 時間培養後の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いた WST 法にて評価した．
【結果】健常人と比べ ATL 患者由来腫瘍細胞において SGLT2 mRNA の発現上昇が確認出来た．健常人，患者由来 ATL 細胞のいずれにおいても Concanavalin A の濃度依存的に細胞増殖が認められ，SGLT2 阻害剤の添加により，健常人由来細胞における細胞増殖抑制効果は観察されなかったが，患者由来 ATL 細胞では SGLT2 阻害剤添加により細胞増殖の抑制傾向が認められた．
【結論】SGLT2 遺伝子発現を認めた患者由来 ATL 細胞において SGLT2 阻害剤による腫瘍増殖抑制効果が確認出来た．ATL に代表される難治性血液悪性腫瘍に対する SGLT2 阻害剤の併用療法の可能性が期待される．

096 沖縄県内の子宮頸部細胞診異常検体セルブロックを用いた HPV（human papillomavirus）ジェノタイプ判定と検討

比嘉　真凡（学籍番号：164163J）
指導教員：○吉見　直己，高松　玲佳
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

［**背景**］HPV の感染は子宮頸癌発生に大きく関わる．HPV はジェノタイプにより細胞異型度の進展，子宮頸癌への進展に関わる度合いが異なるといわれている．そのためどのジェノタイプの HPV に感染しているかを知ることは子宮頸癌のリスクを知るために重要であると考えられる．以上を踏まえ，①沖縄県における子宮頸部細胞診異常検体の HPV 陽性率についての調査②細胞診診断結果と HPV ジェノタイプの検討を行った．
［**材料・方法**］沖縄県中部地区医師会検診センターの細胞診残検体から作成したセルブロック 45 検体（ASC-US 以上，異型細胞あり，2016~2018 年度）を用いた．Maxwell RSC DNA FFPE Kit-PKK, Custom（AX2500），Promega を用いて DNA 抽出を行った．抽出した DNA について Anyplex™ Ⅱ HPV28 Detection, Seegene を用いてジェノタイプ判定を行った．
［結果］① HPV 陽性率は 83% であった．HPV ジェノタイプ別の陽性検体数は HPV16（17 件），HPV52（8 件），HPV58（4 件）の順に多かった．② HPV の陽性率は SCC＞HSIL＞LSIL＞ASC-H，ASC-US であった．特に HPV16 の陽性率は SCC＞ASC-H＞HSIL＞ASC-US であった．
［**考察**］①沖縄県の多くの子宮頸部細胞診異常検体において HPV の感染があると考えられる．また沖縄県においては HPV16 の他，HPV52・HPV58 の感染が多いと考えられた．② HPV の感染が細胞異形成の状態から子宮頸癌に進展するリスクを高めると考えられたが，特に HPV16 の感染は異型度の進展や子宮頸癌に進展する大きなリスクと考えられた．
［**結語**］本研究では，HPV16 が異型度の進展や子宮頸癌への進行に大きく関わっていることが確認できた．今後，陽性率が高かった HPV16，52，58 に関して，さらに“異形成の出現，子宮頸癌への進展”への関与について研究していくことで沖縄における子宮頸癌の対策に役立てられると思われた．

097 Triple CBS/CSE/3MST-KO マウスを用いた表現形質の観察

沖山　真帆（学籍番号：164155H）
指導教員：筒井　正人，○松崎　俊博
琉球大学大学院医学研究科　薬理学講座

【背景と目的】最近，一酸化窒素（NO），一酸化炭素（CO）と共に第３のガス状神経伝達物質として硫化水素（H_2S）が注目されている．その H_2S の合成酵素として cystathionine β-synthase（CBS），cystathionine γ-lyase（CSE），3-mercaptopyruvate surfurtransferase（3MST）の３つが知られている．これらの酵素は血圧制御を始めとする多彩な生理作用に関与することが示唆されている．今回我々は世界で初めてこれら３つの合成酵素の完全欠損マウス（tKO）を作成した．しかし，mouse CBS（mCBS）の欠損マウスでは胎生致死や成長障害が見られることがわかり，これを改善する方法として mCBS の代りとして亜鉛投与により human CBS（hCBS）の発現を制御できるトランスジェニックマウスが開発された．亜鉛投与によって誘導発現された hCBS は mCBS の欠失を機能的に補完し，hCBS の発現は亜鉛投与を中止することで抑制されることがわかっている．
今回，この tKO マウスを用いて基本的な形質を観察するため，血圧や血糖値，体重を測定した．
【方法】動物は，出生後 16 週齢の tKO マウス７匹と野生型マウス８匹を使用した．血圧・心拍数はテールカフ法，空腹時血糖はグルコース測定装置（ダイアセンサー）を用いて，慣れさせるため 12 週前後から測定を開始した．PCR 法により CBS/CSE/3MST 遺伝子欠損の確認を行い，hCBS 蛋白の消失は，肝臓を用いたウエスタンブロッティング法で確認した．
【結果と結論】体重の平均値は野生型マウスと比較して tKO マウスにおいて高値となり，有意な差が認められた．空腹時血糖値，最高血圧，平均血圧，心拍数では有意な差が見られなかったが，tKO マウスにおいて高い傾向が見られた．また hCBS の発現が見られた２例を加えた結果では，これらの差が減少したことより，CBS は CSE/3MST 欠損による血圧上昇傾向を改善することが考えられる．
以上より，Triple CBS/CSE/3MST-KO マウスでは野生型マウスに比べ，肥満傾向であることが分かった．また今回，有意差は認められなかったが，空腹時血糖値，最高血圧，平均血圧，心拍数において Triple CBS/CSE/3MST-KO マウスは高い傾向が確認できたので，今後の課題として例数を増やし，コレステロール値なども比較・検討する必要があると考えられる．

098 血液培養より分離した ESBL 産生大腸菌の ESBL 遺伝子型についての検討

徳永　征久（学籍番号：154213D）
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

【目的】日本で検出される ESBL 遺伝子型は CTX-M 型が多いとされているが地域や施設によって検出率や遺伝子型が異なるため，その疫学的なデータを基に地域や施設ごとに感染防止対策を講じることが重要である．今回，我々は琉球大学医学部附属病院にて血液培養陽性患者から分離した ESBL 産生 *E. coli* を対象に，ESBL の遺伝子型について，その動向を把握するため調査を行ったので報告する．
【方法】シガジーニアス®ESBL 遺伝子型検出キットを使った PCR 法により TEM 型，SHV 型，CTX-M-1 group，CTX-M-2 group，CTX-M-8 group，CTX-M-9 group の遺伝子型の検出を行った．また，シガジーニアス®分子疫学解析 POT キットを使った PCR-based ORF（open reading frame）Typing 法（POT 法）により，検出された遺伝子の保有パターンから菌株識別を行った．
【結果】2016 年から 2018 年までに血液培養陽性患者から検出された ESBL 産生 *E. coli* では，50 株中 CTX-M-9 group が 25 株（50.0%）と最も多く，次いで CTX-M-9 group＋TEM 型が９株（18.0%），CTX-M-1 group＋TEM 型が７株（14.0%），CTX-M-1 group が６株（12.0%），SHV 型が１株（2.0%），CTX-M-8 group が１株（2.0%）であった．POT 法を用いた結果，ESBL 産生 *E. coli* 50 株中 30 株が ST（Sequence Type）131 と推定された．
【結論】今回の検討において検出された *E. coli* の ESBL 遺伝子型は，CTX-M 型のなかでも特に CTX-M-9 group が多く，次いで CTX － M-1 group，CTX-M-8 group の順であり，これまでの日本における報告と同様の傾向であった．世界的には CTX-M-1 group に属する CTX-M-15 を保有する *E. coli* O25：H4-ST131 株が流行しているとの報告があり，多剤耐性傾向を示すことが問題となっている．当院でも ST131 型が半数以上を占めており今後の動向に引き続き注意が必要である．

099 Motor-neuronal death in adult mice induced by AAV9-mediated overexpression of mutated human SOD1 (A4V): A pilot study

Hitomi Sato（学籍番号：164115J）
指導教員：○ Takahiro Tadokoro[1, 2], Manabu Kakinohana[1],
Martin Marsala[2]
[1] 琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座
[2]Neuroregeneration Laboratory, Department of Anesthesiology, UCSD

Introduction: Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) is the disease mainly involving motorneuronal death. SOD1 mutation is the most frequent in the familial ALS, and A4V is identified as a gene related to the SOD1 mutation. We developed a novel gene delivery technique covers an entire spinal cord in adult mice. We hypothesized that subpially injection of scAAV9-UBC-hSOD1(A4V) in lumbar enlargement can produce overexpressed mutated SOD1 protein and develop ALS-like phenotype in mice.
Method: Wild-type mice (C57BL/6, 2-4 months old) received a lumbar subpial injection (SP) of 10 µl of scAAV9-UBC-hSOD1(A4V) vector and/or received an intramuscular injection (IM) into their hindlimbs. Animals were tested for grip strength and BMS scoring. After 20-months survival, animals were performed EMG recording, and then terminated. For postmortem analysis, immunofluorescence staining (IF) and immunofluorescence in situ hybridization (FISH) were performed.
Results: Animals received the combined injection (SP+IM) showed significantly less grip strength in hindlims. Furthermore, IF showed highly expressed misfolding hSOD1 in ventral horn and a loss of ChAT-positive neurons in animals received SP+IM. FISH showed potent induction of hSOD1 in throughout the gray matter of the lumbar spinal cord in the animals received SP.
Conclusion: The present study shows that overexpression of misfolding hSOD1 (A4V) at lumbar spinal cord by using a combination of SP and IM leads motorneuronal death and motor dysfunction in hindlimbs.

100 固相抽出法を用いた小青竜湯含有ヒゲナミンの定性分析

井東　虎太朗（学籍番号：164114A）
指導教員：◯潮平英郎 [1]，中村克徳 [1, 2]
[1] 琉球大学医学部附属病院薬剤部
[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】
2017 年に世界アンチドーピング機構により，ヒゲナミンが β2 作動薬として禁止薬物に指定された．ヒゲナミンはいくつかの生薬に含まれるため，アスリートの無意識な摂取（通称うっかりドーピング）が予想される．本研究では，ヒゲナミンを含む漢方薬の代表例である小青竜湯を固相抽出し，含有ヒゲナミンの定性分析を行うことと共に江口との共同研究である『漢方薬に含まれる禁止薬物ヒゲナミンの分析法の確立』の HPLC 分析法の実用性を確かめることを目的とした．
【方法】
固相抽出は以下の方法に従った．ヒゲナミン標準品溶液（1mg/ml）0.3ml に１％蟻酸水 5.7ml と，IS としてテオフィリン（50 μg/ml）0.3ml を混合し，50mg/ml のヒゲナミン試料を調製した．固相抽出カラムは Bond Elut Plexa C18 を用いた．固相抽出カラムは 100% メタノール 1ml，続いて 100％蒸留水 1ml を遠心分離により通過させコンディショニングした後，ヒゲナミン試料 1ml をアプライし遠心分離により吸着させた．さらに 100% メタノール 1ml をアプライし，遠心分離により抽出サンプルを得た．抽出サンプルを HPLC で分析し，ヒゲナミン及び IS の抽出効率を算出した．市販されている小青竜湯（ツムラ）の 1mg/ml 水溶液を調製し，確立した固相抽出法を用いて小青竜湯含有ヒゲナミンを分析した．
【結果】
固相抽出法によるヒゲナミンの抽出効率は 76.9％であった．小青竜湯 1mg/ml 溶液の固相抽出サンプルではヒゲナミンのピークを検出できなかった．そこで，小青竜湯 1mg/ml 溶液のアプライ量を 10 倍に増やして濃縮を行ったところ，ヒゲナミン由来と思われるピークが検出された．今後，確立した HPLC 分析法も含め，検出感度向上が必要である．

101 E3 遺伝子欠損細胞を用いた結核菌エフェクタータンパク質 Zmp1 の作用機序の解明

伊良波　拓海（学籍番号：164140K）
指導教員：○高江洲　義一，梅村　正幸，松﨑　吾朗
琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

結核菌のエフェクタータンパク質 Zmp1 は，マクロファージ（Mø）からの IL-1β産生を阻害し，Mø 内での殺菌回避に寄与することが先行研究により示されている．しかし，Zmp1 による IL-1β産生阻害の分子機序は不明である．本研究ではそれを解明するため，所属研究室において同定済みの新規 Zmp1 結合タンパク質 E3 に着目し，その機能解析を行った．
初めに，ヒト 293 細胞内での Zmp1 と E3 の結合を免疫沈降法で確認した．次に，CRISPR/Cas9 法を用いて E3 遺伝子を破壊した J774.1 マウス Mø 細胞株（KO）を作製した．この細胞を使って，LPS と ATP 刺激で誘導される成熟型 IL-1β及び IL-6 の産生量を ELISA 法で調べたところ，いずれも野生型（WT）に比べて KO の方が有意に低下していた．一方，同時に行った LDH release assay では，WT と KO で有意差がなかった．さらに pro-IL-1βと Caspase-1 のタンパク量をウエスタンブロット法で調べた結果，KO において pro-IL-1βの発現が低下している一方，Caspase-1 の活性化は僅かに減弱が認められる程度であった．これらの結果から，E3 は主に IL-1β及び IL-6 の遺伝子発現の制御に関与する可能性があると考えた．そこで，RT-qPCR 法を用いてこれらの mRNA 発現量を調べた結果，WT に比べ KO では IL-1βと IL-6 いずれの遺伝子発現にも著明な減弱が認められた．従って，E3 はこの両方の遺伝子発現に関わる転写因子の活性化を制御することが示唆される．そのような転写因子の一つである NF-κB の活性化を，IκBαタンパク質のリン酸化・分解と NF-κB p65 の核移行を指標に検証したところ，いずれも WT と KO で差が認められなかった．
以上より，E3 は IL-1βと IL-6 の発現を転写レベルで正に制御しており，その機序としては，NF-κB の核移行より後のプロセス，すなわち標的遺伝子のプロモーター領域への NF-κB の結合を制御する可能性，または NF-κB 以外の転写因子を制御する可能性が考えられる．

102 モノクローナル抗体を用いた日本脳炎ウイルスの Escape mutant 作成

宮城　崚希（学籍番号：164117E）
指導教員：玉城　和美，○只野　昌之，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・目的】ウイルス感染症において感染・免疫機構の解明は感染症の予防，治療その他で重要となる．本研究では日本脳炎ウイルス（JEV）に対するマウスモノクローナル抗体（MAb）について次の三点を目的とする．(1) 血清学的試験を行いエンベロープ蛋白に対する抗体で特に中和抗体価の高い MAb を選び（2）これら Mab の中和から免れる変異ウイルス（Escape mutant）の出現を誘導し（3）Escape mutant の遺伝子解析により中和抗体結合部位（epitope）を特定することを目的とする．**【方法】**Mab 及び抗**血清類：**15 種の抗 JEV − Mab 及び抗 JEV ウサギ高度免疫血清を用いた．**細胞：**ハムスター腎由来 BHK-21 細胞を中和試験に，アフリカミドリザル腎由来 Vero 細胞及びヒトスジシマカ由来 C6/36 細胞を Escape mutant 誘導に用いた．**血清学的試験：**Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay（ELISA）はホルマリン固定精製日本脳炎ウイルスを固相抗原とする間接法で行った．中和試験は 48well 培養プレートを用いる 50% フォーカス減少法で行った．**Escape mutant の誘導：**中和活性の非常に高い MAb（26C1 及び 22A4）存在下で JEV 感染細胞を培養し続け中和から免れる変異ウイルスの誘導を行った．**【結果】**中和試験では特に 3 種類の MAb に中和活性が認められた．それぞれ中和抗体価は 22A4 が 18000，26C1 が推定 1000000，であった．Escape mutant の誘導実験では，間接免疫染色法で 26C1 と反応しない変異ウイルスが得られた．現在 Escape mutant が得られたことを確認するため精査を行っている．**【考察】**得られた Escape mutant のアミノ酸配列の解析までは行えなかった．今後は得られた変異ウイルスの解析を行うことが課題となる．免疫沈降で 22A4 及び 26C1 は E 蛋白に，101A5 は NS5 に対する MAb と判明している．101A5 が中和活性をもつ理由は恐らく使用した BHK と何らかの反応性をもつと考えている．

103 沖縄県内の医療機関で発生した原因不明呼吸器感染症の原因ウイルス調査および遺伝子解析の報告

武島　義一（学籍番号：154164B）
指導教員：Gretchen Parrott，西山　直哉，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

平成 30 年 12 月，沖縄県内の医療機関において入院患者及び職員のあいだで呼吸器感染症のアウトブレイクが発生した．インフルエンザ迅速検査は陰性であり原因不明とのことで当科に調査依頼がきた．平成 30 年 12 月 19 日に当該医療機関を訪ね，入院患者及び職員計 16 名の咽頭ぬぐい液を採取した．
当科が所有する Multiplex PCR を用い，原因となった病原体の検査を行った．その結果，16 検体中 14 検体で Rhinovirus 陽性であり，Rhinovirus によるアウトブレイクであると判断した．今回の原因となった Rhinovirus には A 型・B 型・C 型の 3 種類があることから，今回のアウトブレイクを引き起こした Rhinovirus がどの型であったのか解析した．尚，C 型は非常にまれであることから，A 型か B 型かの解析を行った．
Rhinovirus の型解析には，まず cDNA 作成のために TaqMan のプロトコールを用いて PCR を行い，TaKaRa Taq のプロトコールに従って PCR 産物を増幅した．なお，PCR 産物の増幅における鋳型となるプライマーには北海道システム・サイエンス株式会社の合成 DNA を用いた．この結果，Rhinovirus 陽性であった 14 検体中 3 検体で A 型が陽性であったことから，今回のアウトブレイクを引き起こした Rhinovirus は A 型であると判断した．

104 組換えワクシニアウイルスワクチンを用いた HTLV-1 に対する新規中和抗体の作出

赤嶺　宏太（学籍番号：154206B）
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】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）のキャリア数は九州・沖縄を中心に国内でおよそ 100 万人と推定されている．キャリアの約 5%が ATL を発症するが現段階で有効なワクチンや治療法はない．HTLV-1 感染拡大を予防するために受動免疫として利用できる HTLV-1 中和単クロン抗体は作製されているものの，感染防御効果を高めるために複数のエピトープを認識する抗体ライブラリーの作出が求められている．そこで本研究では，新規の HTLV-1 中和単クロン抗体を作製することを目的とした．
【方法】HTLV-1 エンベロープ発現型組換えワクシニアウイルスを接種した WKAH/Hkm ラットの脾細胞とマウスミエローマ細胞を HVJ 細胞融合法で融合し，HAT 培地でハイブリドーマを選択培養した．産生抗体のスクリーニングには，HTLV-1 感染細胞株（MT-2）と非感染細胞株（Molt-4）の混合液を使ったフローサイトメトリーを用いた．選択された抗体の抗原特異性についてウエスタンブロットで，中和能については合胞体形成阻止試験で調べた．
【結果と考察】HAT 選択された 864 個のハイブリドーマのうち，MT-2 細胞に特異的に反応する抗体を産生しているものは 26 個であった．その中で W-5D12 と命名されたハイブリドーマ抗体だけが強い中和活性を持つことがわかった．ウエスタンブロットでは，W-5D12 抗体は HTLV-1 エンベロープ gp46 抗原と反応した．今回作出されたハイブリドーマ抗体で中和活性を持つものは 1 つのみだったが，今後，免疫動物の種類やアジュバンドの併用等により多種類の中和抗体群の作出が可能と考えられる．
【結論】本研究により，組換えワクシニアウイルスワクチンを接種した WKAH/Hkm ラットから抗 HTLV-1gp46 中和抗体が作出できた．

105 哺乳類細胞における CCR4-NOT 複合体の Cnot11 サブユニットの機能的役割について

諸見川　愛華（学籍番号：164108F）
指導教員：○西島　さおり[1)]，石田　莉彩[1)]，山本　雅[2)]，
苅谷　研一[3)]
[1)] 沖縄科学技術大学院大学（OIST）Cell Signal Unit Technician
[2)] 沖縄科学技術大学院大学（OIST）Cell Signal Unit Professor
[3)] 琉球大学大学院医科学研究科・医科学講座　教授

CCR4-NOT 複合体はデアデニレース活性を介して mRNA の転写後調節に関わるタンパク複合体で，哺乳類では 8 つのサブユニットから成ることが知られている．その中で Cnot11 は最後に発見されたサブユニットであり，Cnot11 ノックアウトマウスは胎生致死になることから，個体発生に重要であると推測されるが，未だ不明な点が多い．そこで本研究では，子宮頸がん細胞株（HeLa 細胞）と正常胎性肺線維芽細胞株（IMR-90）を用いて Cnot11 の発現抑制および過剰発現実験を行い，その機能的役割について検討した．HeLa 細胞への siRNA 導入による Cnot11 の発現抑制実験では，細胞質に多数の小胞が観察された．Western blotting では Autophagy marker である LC3 や p38 が増強し，CCR4-NOT 複合体の Cnot6 が減弱した．一方，IMR-90 へ pCMV-Flag Cnot11 vector を遺伝子導入して Cnot11 を過剰発現したところ，死細胞の増加と細胞凝集が観察され，細胞塊の周囲の細胞は脱落していた．Western blotting では Apoptosis marker である cleaved caspase3 や cleaved PARP が増強し，MAPK 経路の ERK や MEK が減弱した．免疫沈降法による CCR4-NOT 複合体サブユニットの発現比較では，Cnot11 の過剰発現により Cnot7 と Cnot10 が増強した．以上のことから，Cnot11 は Autophagy と Apoptosis の双方に影響を与えていることが示唆された．また，Cnot11 の増減に伴なって CCR4-NOT 複合体のサブユニット発現にも変動が見られたことから，Cnot11 が CCR4-NOT デアデニレース活性に影響を及ぼしている可能性がある．

106 喉頭乳頭腫における HPV-6 および HPV-11 の E5b 遺伝子の発現細胞の同定

江川　愛祐美（学籍番号：164138H）
指導教員：○池上　太郎，鈴木　幹男
琉球大学医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科講座

喉頭乳頭腫（LP）は，ヒトパピローマウイルス 6 型または 11 型（HPV-6，HPV-11）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-6 および HPV-11 は 9 つの遺伝子（E6,E7,E2,E4,E5a,E5b,L2,L1）を持つ。当科では HPV-6 および HPV-11 感染・LP においてこの 9 つの遺伝子発現をリアルタイム PCR 法で定量してきた。その結果，E4，E5b，E5a の順に発現しており，この 3 つの遺伝子の発現は HPV 全遺伝子発現の 96% を占めた。このことから，E4，E5 および E5b が LP の形成や維持に重要な働きをしていることが推測されるが，LP においてその機能はわかっていない。先行研究で，HPV-6 および HPV-11 感染 LP の E4 は RNA *in situ* hybridization（RNA-ISH）法によって有棘細胞の上層から顆粒細胞で特異的に発現していることが明らかとなっている。一方，E5b および E5a の発現細胞はわかっていなかった。そこで本研究では，LP 形成における E5b の機能を明らかにする一歩として，HPV-6 および HPV-11 感染 LP の E5b 発現細胞を RNA-ISH 法により同定した。
まず，HPV-6 および HPV-11 に感染している LP のパラフィン包埋ブロックを選別し，ミクロトームで厚さ 4 μm の組織切片を作製した。さらに，HPV-6 および HPV-11 の E5b 遺伝子領域それぞれを組み込んだ PGEM-T Easy Vector プラスミドを切断酵素 *Nco* I で切断し，SP6 RNA polymerase と DIG RNA Labelling mix を用いて，HPV-6 および HPV-11 の E5b mRNA の anti-sense probe を作製し，作製した組織切片に RNA-ISH を行なった。その結果，E5b mRNA は有棘細胞の上層から顆粒細胞に限局して発現していた。このことから，E5b は有棘細胞の上層から顆粒細胞にかけて働くことが示唆された。今後 LP における E5b の機能を明らかにしていく予定である。

107 腫瘍抗原特異的なラクダ科由来 VHH 抗体を用いたキメラ抗原受容体の作製と評価

細川　典裕（学籍番号：164112D）
指導教員：○村上　明一，塚原　成俊，岸本　英博
琉球大学大学院医学研究科　寄生虫・免疫病因病態学講座

がん免疫療法は標準的な治療法と作用機序が異なることから，第四のがん治療として期待されており，中でもキメラ抗原受容体 T 細胞（CAR-T 細胞）療法の高い効果が注目を浴びている．CAR-T 細胞療法は，抗体の抗原結合部位と T 細胞活性化領域を遺伝子組み換え技術によって結合させたキメラ抗原受容体（CAR）を T 細胞に導入することで，標的抗原発現細胞に対する特異的かつ強力な免疫反応を誘導する．
これまでの CAR の抗原結合部位は通常，抗体の H 鎖と L 鎖の可変領域をペプチド鎖で結合した一本鎖抗体（scFv）が用いらているが，安定性の面で懸念があった．そこで今回私達は，より安定的な CAR の構築を目指し，単ドメイン抗体である VHH の利用を考え，その有用性評価を行うことにした．また，様々な標的抗原に対する VHH 抗体を容易に入れ替え可能なカセットベクターの構築を目指し，抗体挿入部の下流にヒンジ・細胞膜貫通領域として CD8α鎖，共刺激領域として 4-1BB 分子，さらに T 細胞活性化領域である CD3ζ鎖の遺伝子断片を連結した CAR をデザインした．各遺伝子はヒト末梢血単核球由来の RNA を元に RT-PCR 法で調製し，Overlap PCR 法により連結した．これを哺乳類細胞発現ベクターに挿入後，既存の 3 種の抗 HER2-VHH 抗体遺伝子を組み込んだ．抗 HER2-CAR の細胞表面への発現を HEK293T 細胞株を用い FACS で解析した結果，全ての抗 HER2-CAR の発現を確認することができた．現在，これら抗 HER2-CAR を恒常的に発現する T 細胞 Jurkat 株の樹立を進めており，HER2 強制発現 CHO 細胞との共培養による T 細胞の活性化やシグナル伝達の強度，細胞障害活性などを詳細に解析し，安定化 CAR の有用性評価を進める予定である．

108 1980 年に沖縄県那覇近郊の都市河川より分離されたコレラ菌の産生するコレラ毒素の生物活性の検討

妹尾　隆星（学籍番号：164134E）
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 年に那覇市近郊の安謝川から *Vibrio cholerae* O1 生物型 El Tor 血清型 Inaba（AJ 株）13 株が分離された．当時，この内 12 株について標準法でコレラ毒素（CT）の誘導を試みたが，CT の産生は認められなかった．近年，AJ 株 12 株の内 5 株を選択し，全ゲノム塩基配列を決定し，代表的コレラ菌株との比較を行った．すると，AJ 株 5 株の内 2 株がバングラデシュの臨床由来株の遺伝的背景に近似する事が判明した．よって当講座で開発した AKI switch（AKI-SW）法で AJ 株 11 株を培養すると 5 株から CT の産生が確認された．これを踏まえ本研究では AJ 株の産生する CT が本来の CT 生物活性を有するかを検討した．
【方法】AKI-SW 法を用いて AJ 株の CT 産生を誘導し，CT の精製・濃縮を行った．逆受身ラテックス凝集反応法，Western blotting（WB）法，CBB 染色にて CT の毒素構造，分子量，抗原性，精製･濃縮程度等の評価を行った．AJ 株の CT 生物活性の有無の検証のため，典型的な CT が誘導する CHO 細胞の伸長変形細胞数割合（CCEI）を算出し，陽性コントロール CT と比較した．さらに，特異的に CT 生物活性を阻害する BFA（リン酸化阻害剤）および抗 -CT 抗体を用いて CT 生物活性の抑制試験を行った．
【結果と考察】AKI-SW 法により誘導すると，AJ 株 11 株中 5 株において CT が 50-400ng/ml の範囲で培養上清中に産生され，x4-x20 倍に濃縮された AJ 株 CT 標品が 5 標品得られた．それぞれの標品は，典型的な分子量，抗原性を有する A および B サブユニットで構成される CT である事が確認された．陽性コントロール CT と同様に，5 つの AJ 株 CT 標品は CHO 細胞を CCEI ≧ 50% で伸長変形し，さらに，代表的 AJ 株 CT 標品を用いた検討では，その変形は BFA および抗 -CT 抗体により特異的に抑制された．以上より，安謝川から分離されたコレラ菌の産生する CT は，典型的な CT 生物活性を有することが示唆された．