

# 琉球大学学術リポジトリ

## 令和元年度医学科医科学研究ポスター発表会抄録集

メタデータ	言語: 出版者: 琉球医学会 公開日: 2021-11-19 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: - メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016927">http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002016927</a>

令和元年度

医学科 医科学研究ポスター発表会  
抄 録 集

琉球大学医学部  
医学科 3 年次



001

## 近赤外分光器を用いた正常皮膚の年齢、部位別特徴の観察

浦崎 花菜 (学籍番号: 174194C)

指導教員: ○内海 大介, 岡本 有香, 高橋 健造  
琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

【背景】近赤外光の波長は約 780 ~ 2500nm である。これはヘモグロビンと水の吸光度が低い波長域と一致し、生体内での吸収率が低い。この性質を利用することで、生体組織の深部の情報を得ることが可能。ヒトの皮膚は部位により表皮や真皮の組織学的特徴が異なり、また同一部位においても加齢とともにその特徴は変化する。

【目的】近赤外分光器を用いて正常皮膚の年齢や部位ごとの特徴を検証する。

【方法】女性 22 名の被験者を二つのグループ Y (20 代前半) とグループ O (20 代後半 ~ 40 代) に分け、正常皮膚 (前腕内側, 手背, 母指球) にハロゲン光源の光を照射し、その反射光の近赤外光 (926 ~ 1656nm) 波長領域を 3 回ずつ測定した。測定された反射光を専用のソフトで解析し、補正したデータの平均をグループ間で比較した。

【結果】正常皮膚の 3 つの部位すべてで、グループ O に比べグループ Y は 1450nm 付近の近赤外光の反射率が低かった。この領域の波長は、水の固有の吸収域と一致する。前腕内側, 手背ではどの波長域においても統計学的な有意差は見られなかったが、母指球では 1450nm 前後の波長域で有意差が見られた。また年齢と 1450nm 付近の反射率の相関は、母指球で最も強く見られた。

【考察】水分量を反映する 1450nm 付近の反射率は、3 つの部位の中で母指球のみで有意差がみられた。これは、皮膚の部位によって年齢に伴う水分量の減少に違いがあり、部位ごとに老化の現れ方は異なる可能性を示している。加齢とともに母指球で特に水分量の減少が見られる原因として、物理的・外的ストレスをより多く受ける部位であるためと考えられる。

002

## 難治性小児てんかんに対する医療大麻の有効性についての調査

大城 光生 (学籍番号: 164174D)

指導教員: ○三輪 宜一, 植田 真一郎  
琉球大学大学院医学研究臨床薬理学講座

【背景および目的】最近難治性小児てんかんの治療薬として医療大麻が注目されているが、その有効性についてはいまだ結論が出ていない。そこで今回は過去の小児てんかんに対する医療大麻 (主にカンナビジオール: cannabidiol, CBD) 使用の報告について調査を行った。

【方法】Pub Med で難治性小児てんかんと医療大麻の有効性について述べている論文を検索した。検出された論文をすべて熟読し、従来の治療と医療大麻を比較している研究を抽出、さらにその試験デザインからエビデンスレベルの高い論文があればメタアナリシスを行う予定とした。

【結果】検索の結果、15 本の論文が検出された。そのうち 7 論文 (6 つ (86%) の文献で試験デザインや治療法は異なるものの、半数以上の患者の発作が改善されていた。しかし、信頼性の高い研究デザインを用いた報告は全く見られず、メタアナリシスを行うことは断念した。代わりに、現在進行中のエビデンスレベルの高い介入研究を調査した。

【結論】今回の調査の結果、医療大麻の難治性小児てんかんに対する有効性についてはランダム化比較試験等のエビデンスレベルの高い研究報告はほとんど見られなかった。現在、小児てんかん治療への大麻の有効性を検討するいくつかの臨床試験が行われており、今後数年で信頼性の高いデータが出てくると思われる。それらのメタアナリシスを行うことで、真の医療大麻の有効性が明らかになると考えられる。

003

## パーキンソン病における運動機能と視覚機能の関連についての検討

徳村 伊織 (学籍番号: 174119F)

指導教員: ○波平 幸裕, 宮城 朋, 崎間 洋邦, 大屋 祐輔  
琉球大学医学部附属病院第三内科

背景: パーキンソン病は主に安静時振戦や無動、筋強剛を含む運動に関する症状を認める疾患である。近年パーキンソン病においては非運動症状にも注目が集まり、視覚探索異常や誤認など視覚機能に関する症状も広く認知されている。

目的: パーキンソン病の視覚機能と運動機能の関連性を明らかにする。対象: Hoehn-Yahr (H&Y) IV 度以下のパーキンソン病と診断されている人を対象とし、認知症のある方や歩行が困難な方は除外した。

方法: Japanese 11-item National Eye Institute Visual Function Questionnaire (VFQ-J11) とランドルト環を用いて視覚機能の評価を行った。Movement Disorder Society Unified Parkinson's Disease Rating Scale (MDS-UPDRS) Part I, Part II, Part III を用いて運動機能の評価し、認知機能を Japanese Version of Montreal Cognitive Assessment (MoCA-J) と Mini-Mental State Examination (MMSE) で評価した。Pearson の積率相関係数により評価した。

結果: パーキンソン病患者 27 名のうち MMSE 18 点未満 2 名を除外した。両目視力 (logMAR) は MDS-UPDRS における歩行とバランス ( $r=.59, p<.05$ )、すくみ ( $r=.57, p<.05$ ) と相関が認められた。VFQ-J11 は両目視力 ( $r=.40, p=.0524$ ) と相関を認めず、MoCA-J の注意に関する項目 ( $r=-.40, p<.05$ ) と関連を認めた。

考察: 今回の結果から両目視力 (logMAR) は歩行やすくみと正の相関を認めた。これは視覚情報が体のバランスを制御するために前庭情報の処理に影響を与えており、運動と姿勢の制御のために視覚情報に依存しているためと考えられる。パーキンソン病においても視覚障害に対する更なる認識と早期発見によって、患者の安全を改善し自立を促して生活の質をより良くすることに繋がる可能性がある。

004

## 新規レポーターマウスを用いた出生後のラセン神経節における Wnt シグナル活性の解析

豊田 亮 (学籍番号: 174112J)

指導教員: ○野田 哲平<sup>1)</sup>, 脇園 貴裕<sup>1)</sup>, 中川 尚志<sup>1)</sup>, 鈴木 幹男<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup>九州大学医学部耳鼻咽喉科  
<sup>2)</sup>琉球大学医学部耳鼻咽喉科

ラセン神経節細胞は一度障害を受けると再生しないため、感音難聴が永続する。ラセン神経節細胞が障害を受けると人工内耳の装用効果は低下する。そのため、ラセン神経節細胞の再生医療開発が望まれている。内耳の初期発生、分化には Wnt シグナルが関与している。Wnt シグナルは分泌タンパクによって伝達され、個体発生、がん発生、幹細胞維持などの生命現象に必要とされている。これまで Wnt シグナルは胎生期に耳胞の背側でのみ活性を持つことが知られており、胎生後期に発生する蝸牛有毛細胞やラセン神経では活性がないと考えられていた。しかし、薬品による Wnt シグナルの亢進によって器官培養した蝸牛の細胞数が増加する報告があることから、蝸牛でも Wnt シグナルが何らかの役割を担っていることが示唆される。最近報告された高感度の新規レポーターマウスを用いることによって、胎生後期から出生後の内耳で Wnt シグナルの検出が可能になれば、細胞増殖を正に制御する Wnt シグナル活性と、ラセン神経節細胞の増殖能になんらかの関連があることがわかるのではないかと考えた。GFP 蛍光を用いて高感度にシグナル活性を検出できる Wnt レポーターマウス WntVIS を用い出生後マウスでの観察を行った。P0, P7, P15 のマウス内耳を取り出し、凍結切片を作成した。GFP 蛍光の検出に加えて、神経マーカー TuJ1, グリア細胞マーカー Sox2 の免疫染色を行った。その結果、P0 および P7 では Wnt シグナル活性がラセン神経節細胞で残存していることがわかった。また P15 ではラセン神経節細胞核での GFP 蛍光を認めず、P7 から P15 の間で Wnt シグナル活性が消失したことが示唆された。ラセン神経節のニューロンは生後 10 日前後に発生が終了し、細胞増殖が停止する。Wnt シグナルは出生直後から 7 日のラセン神経節細胞が増殖能を持つ時期では活性を持つものの、増殖能を失う生後 15 日では活性を失うことが示された。

005

## 体外循環と止血・凝固因子の変化

杉尾 高歩 (学籍番号: 164145A)

指導教員:

<sup>1)</sup> 琉球大学大学院胸部心臓血管外科学講座<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院 ME センター

【目的】開心術において有効な術野止血を得るためには凝固線溶因子の変容を適切に把握する必要がある。

我々はこれまでの研究で、体外循環時間と凝固因子の変化量についてその相関を報告してきたが、症例数が限られていた。本研究では、さらに信頼性の高いデータを得るためその追試を行った。

【対象】2019年12月から2020年2月までに行われた開心術連続19例で、心臓手術13例、大血管手術6例を対象とした。【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、DD値、FDP値を測定した。また術前、体外循環離脱前、術直後のAT-III値を測定した。体外循環諸条件下(体外循環時間、最低体温)における上記測定項目について比較し、その相関を検討した。

【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( $y = -0.0011x + 0.7009$ ,  $r = 0.4306$ ,  $P < 0.01$ )。回帰式よりFibの半減時間はおおよそ体外循環開始180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( $y = -0.001x + 0.5889$ ,  $r = 0.4383$ ,  $p < 0.01$ )。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. 体外循環中の最低温度の相違による(超低体温群 vs 軽度低体温群)Fib値、血小板値の減少率に有意差を認めなかった( $p = 0.925$ )。4. 体外循環中は凝固線溶系の亢進状態にありDD、FDP値が上昇したが、離脱後は上昇無く、以後すみやかに減少した。超低体温群の方が線溶系の亢進を強く認めたため、超低体温環境下ではよりDICが亢進するものと考えられた。

【結語】

体外循環時間と凝固因子の変化量についてその相関を示した。

006

## LCMSを用いたヒゲナミンおよびエフェドリンの測定法の確立

山城 通 (学籍番号: 174195B)

指導教員: ○潮平 英郎<sup>1)</sup>, タヤグ・ホセ・カルロス<sup>2)</sup>, 中村 克徳<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学医学部附属病院薬剤部<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科薬物治療学講座

【背景と目的】

2020年は東京オリンピックが開催されるということもあり、世界中でアンチドーピングへの関心が高まってきている。そのなかでも特に問題となっているのが、禁止物質を含む医薬品等の意図的でない摂取により「うっかりドーピング」をしてしまうことである。漢方薬はこれにつながる代表的な薬物である。本研究では世界アンチドーピング規定2019年禁止表国際基準にて、「β2作動薬」と「精神興奮作用薬」にそれぞれ指定されているヒゲナミンとエフェドリンの液体クロマトグラフ質量分析計(LCMS)での定量分析法を確立することを目的とした。

【方法】ヒゲナミンとエフェドリンをLCMSで分析した。移動相には(A)0.1%ギ酸水溶液と(B)100%アセトニトリルを用いた。まず、内標準物質としてテオフィリンを用いることで内標準法によるヒゲナミンとエフェドリンの検量線をそれぞれ作成した。覚せい剤取締法の規制を受けない1ng/mlのエフェドリン塩酸塩溶液を使用した。エフェドリンとヒゲナミンの希釈溶媒にはどちらにもメタノール:H<sub>2</sub>O:ギ酸=50:50:7の溶液を使用した。また、漢方薬に含まれるヒゲナミンとエフェドリンの濃度を、作成した検量線をもとに分析した。今回ツムラの小青竜湯、呉茱萸湯、当帰四逆加呉茱萸生姜湯、打撲一方、牛車腎気丸を用いた。

【結果・考察】ヒゲナミンの検出限界濃度は0.8ng/mlでエフェドリンの検出限界濃度は31.25ng/mlであった。作成したヒゲナミンの検量線の近似直線は $y = 2.62x + 0$ ,  $R^2 = 0.98301$ であり、エフェドリンは、 $y = 7.63x + 0$ ,  $R^2 = 0.99550$ であった。漢方薬では小青竜湯で高濃度のエフェドリン含有が確認され、少量ではあるがヒゲナミンの含有も確認できた。その他の漢方薬からはエフェドリンは検出されなかったが当帰四逆加呉茱萸生姜湯から最も高いヒゲナミン含有を確認できた。今後はヒゲナミンとエフェドリンを同時に測定するLCMSの条件を確立する予定である。

007

## モルモットの1次聴覚野における純音の複合音に対する応答パターンの分析

長嶺 大和 (学籍番号: 164122B)

指導教員: ○細川 浩, 宮里 実

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

モルモットの聴覚皮質は、同じ特徴の周波数を持ったニューロンがバンド状に配列して周波数バンドを形成している。音情報の処理に伴い、その周波数バンド間でどのような相互作用が行われているかを研究することは興味深い。バンド間相互作用を調べるため、2種類の純音を組み合わせた音を付加したときの1次聴覚野の神経活動を光学的に計測し、その応答パターンを分析した。

モルモットにKetamin (1mg/kg), Xylazin (0.5mg/kg)で麻酔し、聴覚皮質を露出し、電位感受性色素(RH795)で1.5時間染色を行った。実験中、1時間毎にKetamin (0.5mg/kg)で持続的に麻酔を投与し、状態を一定に保った。周波数バンド同定のため、0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz(持続時間100ms, 40dB SPL)の純音を付加した。純音0.5kHzと16kHz、0.5kHz&16kHzの複合音(持続時間100ms, 40dB SPL)と0.5kHz→16kHzへのステップ上昇音、16kHz→0.5kHzへのステップ下降音(持続時間50+50ms, 40dB SPL)を付加し、各周波数バンド応答を比較した。

その結果、1次聴覚野(A1)では前方から後方に、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。

複合音を付加したとき、各領域の潜時を調べたところ、16kHz領域の方が、0.5kHz領域より潜時が早いことが分かった。

別の周波数音の付加直後、ただ0.5kHz、16kHzの音を付加した時に比べて、応答が小さくなることが分かった。また、0.5kHzの音に比べて、16kHzの音の方が他の周波数バンドへの抑制が強いことが分かった。

聴覚野の皮質ニューロンが、刺激に対して興奮→抑制の経過をたどり、周波数バンド間に介在するGABAニューロンによって、別の周波数バンドを抑制していると考えられる。その相互作用は、高周波数バンドから低周波数バンドの流れで優位に抑制していると考えられる。

008

Whether chemotaxis is enhanced in the presence of two attractants in *Caenorhabditis elegans*

垣花 実 (学籍番号: 164176A)

指導教員: 丸山 一郎<sup>1)</sup>, 荏谷 研一<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 沖縄科学技術大学院大学情報処理生物学ユニット<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

A nematode urine cancer testing has begun to be put to practical use, but a drop of urine contains numerous chemicals. Here I have examined how mixtures of two chemo-attractants affect worm behavior. Diacetyl (DA) and pyrazine (PY) stimulate the AWA olfactory neuron, while benzaldehyde stimulates the AWC olfactory neuron. First, the chemotaxis indices for a variety of concentrations of each single attractant were recorded. Second, indices for mixtures of two attractants at appropriate concentrations were examined. To my surprise, the results indicated that the index for a mixture is generally the same as that for only one attractant. I did not see any additive effects when stimulating AWA and AWC simultaneously, either. In AWA, DA and PY receptors eventually open the OSM-9 ion channel. The intracellular mechanism awaits exploration, but information from the two receptors could be integrated into single piece of information to affect OSM-9 opening and chemotaxis. Regarding the integration of information received by AWA and AWC, it was necessary to be aware of modifications in interneurons, which could not be evaluated by chemotaxis, the final outcome. In future experiments, I would focus on AWA excitation using *in vivo* calcium imaging and investigate how the accumulation of second messengers resulting from the stimulation of different receptors affects OSM-9.

009

## 膵臓ランゲルハンス島における GABA 関連分子の局在と糖尿病モデルマウスにおける発現変化

岡田 滋喜 (学籍番号: 124172K)  
 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

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は成熟動物の中樞神経系における抑制性神経伝達物質である。一方、発達期、神経損傷後には興奮性に作用することが知られている。この応答性の違いは、細胞外に  $\text{Cl}^-$  を排出する  $\text{K}^+/\text{Cl}^-$  共輸送体 (KCC2) により調節される細胞内  $\text{Cl}^-$  濃度に依存する。近年、GABA は中枢神経系のみならず、末梢器官においても機能分子として働くことが知られるようになった。膵臓のランゲルハンス島 (ラ氏島) にも、GABA は多く局在する。ラ氏島は、 $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\delta$  3 種類の内分泌細胞で構成され、それぞれ、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチンを分泌して血糖値をコントロールする。しかし、ラ氏島における GABA の働きについて不明な点が多い。そこで、血糖値の調節における GABA の機能を明らかにすることを本研究の目的とした。本研究では、GABA の合成酵素であるグルタミン酸脱炭酸酵素 (GAD)、GABA の作用を抑制性に導く KCC2 の免疫染色を行い、さらに、グルカゴン、インスリン、ソマトスタチンとの二重染色により GAD や KCC2 を発現する細胞の種類を同定した。加えて、ストレプトゾトシン (STZ) を投与し、糖尿病モデルマウスを複製し、コントロールマウスとの違いを解析した。

その結果、GAD はインスリンと、KCC2 はグルカゴンと共存していた。さらに、糖尿病モデルマウスでは、インスリンとともに GAD は著しく減少したが、KCC2 の発現は変化しなかった。これらのことから、GABA は  $\beta$  細胞で生合成・放出され、KCC2 が十分に発現する  $\alpha$  細胞でのグルカゴンの分泌を抑制することが明らかになった。一方、KCC2 の発現が認められなかった  $\beta$  細胞では、GABA は興奮性に働くと考えられた。加えて、糖尿病マウスでは、GABA の減少によりグルカゴンの放出を抑制できないために、血糖値の調節がさらに困難になっていることが示唆された。

011

## IL-1 $\beta$ in tumor microenvironment. 1) How IL-1 $\beta$ secretion is related to melanoma stemness. 2) How NLRP3 mutations affect IL-1 $\beta$ secretion.

Eriko Taira (学籍番号: 174163C)  
 指導教員: Zhai Zili, Mayumi Fujita  
 Department of Dermatology, University of Colorado

**Background:** Melanoma is a type of skin cancer that occurs when pigment producing cells called melanocytes mutate and begin to divide uncontrollably. It is not the most common, but it is the most aggressive skin cancer, with a high propensity for metastasis. Today some treatment are available, however only a small portion of patients respond to the treatment. So, other strategies are still needed to treat melanoma. ALDH1 is a marker of CSCs. Advanced melanoma patients elevated concentrations of IL-1 $\beta$  which is cleaved by the caspase-1 and the NLRP3. So one strategy is targeting both of them to help melanoma treatment.

**Methods:** 1) Human melanoma cells were treated with DEAB for 30 minutes, then treated with 10ng/ml IL-1 $\alpha$  for another 30 minutes. 24 hours later, we tested IL-1 $\beta$  mRNA and secretion and NF- $\kappa$ B translocation. 2) check 11 samples which are combined with IL-1 $\beta$ , caspase-1 and different type of NLRP3 by ELISA and WT.

**Results:** 1) DEAB decreases IL-1 $\alpha$ -induced IL-1 $\beta$  mRNA and secretion. The amount of NF- $\kappa$ B in cytoplasm is higher than in nucleus. ALDH-high cells have more IL-1 $\beta$  expression, production and secretion. 2) Cells with mutant NLRP3 decrease IL-1 $\beta$  secretion when compared to WT. Mutants have more clear increase in the LC3II/LC3I ratio.

**Conclusion:** 1) DEAB inhibits IL-1 $\beta$  secretion and NF- $\kappa$ B nuclear translocation. IL-1Ra inhibits ALDH1 expression and ALDH-expressing cell population. IL-1 $\beta$  and ALDH1 are reciprocally regulated. 2) Mutant NLRP3 increases IL-1 $\beta$  cleavage, but decreases its secretion. Cells with mutant NLRP3 have higher autophagic activity, which promotes cellular IL-1 $\beta$  degradation. Other mechanisms are also involved in the decreased IL-1 $\beta$  secretion in mutant cells.

010

## 脊髄におけるグリシントランスポーター 1 (GlyT1) 局在の発達変化

小橋川 晃広 (学籍番号: 174122F)  
 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

グリシンは脊髄における抑制性伝達物質の一つである。シナプス間隙に放出されたグリシンは、神経終末にあるグリシントランスポーター 2 (GlyT2) 及び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) により除去される。これまで、分子解剖学講座では、GlyT2 は脊髄前角で胎齢 16 日から、後角で生後 0 日から発現することを明らかにしてきた (Sunagawa et al. 2017)。しかし、グリシンの除去システムの構築については不明な点が多い。そこで、本研究ではアストロサイトへのグリシンの取り込みを担う GlyT1 局在の発達変化及びその詳細を明らかにすることを目的とし、免疫組織化学法を用いて GlyT1 の発現が発達によりどのように変化するかを検討した。さらに、詳細な局在を明らかにするため GlyT1 の免疫電顕を行った。

成熟動物の脊髄では、GlyT1 は神経細胞周囲のアストロサイトに強く発現している。免疫電顕を行ったところ、GlyT1 はプレ及びポストシナプスの周囲に局在していることが分かった。胎齢 12 日で GlyT1 は外套層に認められ、胎齢 13 日には前角に、胎齢 16 日には後角へと広がった。放射状グリアのマーカーであるネスチンとの二重染色を行ったところ、胎齢 13 日において、中心管から表層へと伸びるネスチン陽性線維から、GlyT1 陽性の突起が出ていることを見出した。胎齢 16 日の前角の免疫電顕では組織の構造が未分化で成熟動物の像とは大きく異なっていたが、生体膜周囲に GlyT1 が発現していた。これらの結果から、①グリシン作動性神経終末の形成以前にアストロサイトによるグリシン除去システムの構築が始まること、②胎生期には放射状グリアの突起部分でグリシンは取り込まれていること、③発達に伴い、GlyT1 は脊髄全体へと広がっていき、シナプス周囲のアストロサイトでグリシンの取り込みを行うようになることが示唆された。

012

## 心停止時におけるアミオダロンの有用性 についてのシステマティックレビュー

徳原 巨弥 (学籍番号: 174101C)  
 指導教員: ○三輪 宜一, 植田 真一郎  
 琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

(背景) 突然の心停止の発生率は比較的高く、いずれの国においても死因の上位を占めている。心停止の原因となる心室頻拍や心室細動の再発予防には抗不整脈が使用されることが多いが、その有効性に関するデータは限られている。

(目的) 心停止後の生存率と神経学的転帰に対するアミオダロンの有効性を確認するために、その効果を従来から用いられている薬剤やプラセボと比較している論文を網羅的に検索し、その中から信頼度の高い論文を抽出してメタアナリシスを行った。

(方法) Pubmed および Cochrane library を用いて 1940 年から現在までの期間で [Amiodarone, Cardiac arrest, Lidocaine, Placebo] をキーワードに論文検索を行った。その中からあらかじめ設定した選択基準 (比較が明記されている、二重盲検ランダム化比較試験、十分な量の信頼性のあるデータ、結論まで結びついた論文、複製された論文ではない、full text) を満たした論文を、Review Manager (解析ソフト) にデータを入力して解析を行った。

(結果および考察) 最初の検索で 2116 本の論文がヒットし、11 の研究が設定した選択基準を満たした。解析の結果、病院搬送までの生存率はハザード比 1.23 (95%信頼区間 1.09-1.40) とアミオダロンが有意に高いことが示された。また、自発循環の回復はハザード比 1.51 (95%信頼区間 0.92-2.48) 神経学的転帰はハザード比 1.16 (95%信頼区間 0.94-1.44) と統計学的には有意ではないが、アミオダロンが有効である傾向が見られた。一方で 24 時間生存率、退院時の生存率についてはあまり差が見られなかった。以上の結果から、アミオダロンは従来の抗不整脈薬やプラセボと比較し病院搬送までの生存率、自発循環の回復率および神経学的転帰を改善することが示唆された。

013

糸球体肥大による二次性巣状分節性  
糸球体硬化症の発症閾値の検討

当真 結衣 (学籍番号: 174121H)  
指導教員: 座間味 亮, 古波蔵 健太郎  
琉球大学循環器・腎臓・神経内科学

【目的】糸球体肥大は足細胞の剥離を惹起し、二次性巣状糸球体硬化症 (FSGS) を引き起こす事で腎機能障害の増悪に寄与する可能性が報告されている。一方で、腎移植ドナーでは糸球体肥大を認めるものの腎機能障害の進行は稀であるため、腎機能障害を引き起こす糸球体径の閾値が存在する可能性がある。本研究では、慢性腎臓病患者において、二次性 FSGS を発症する糸球体径の閾値を検討した。

【方法】対象は当科で 2016 年 1 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日に腎生検を行い、原発性 FSGS や半月体形成性腎炎などを除いた患者 79 例。糸球体径を (糸球体長軸+糸球体短軸)÷2 と定義し、最大糸球体径と二次性 FSGS との関連を検討した。

【結果】対象者の年齢、血圧、推定糸球体濾過量 (eGFR) の中央値はそれぞれ 53 才、122/70mmHg、65ml/min/1.73m<sup>2</sup> であった。FSGS (-) 群と比較して、FSGS (+) 群では有意に最大糸球体径の高値を認めた。多変量解析において、年齢、性別、BMI、収縮期血圧、糖尿病の有無、eGFR、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、最大糸球体径は FSGS 病変と有意に関連していた。ROC 曲線において、FSGS 病変に関連する最大糸球体径のカットオフ値 (Youden index) は 229 μm であった。

【結語】FSGS 病変と関連する最大糸球体径の閾値は 229 μm であった。

015

体外循環に伴う溶血と腎機能に  
与える影響についての検討

與那覇 智基 (学籍番号: 164165E)  
指導教員: 〇喜瀬 勇也<sup>1)</sup>, 兼城 悠司<sup>2)</sup>, 國吉 幸男<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学大学院胸部心臓血管外科学講座  
<sup>2)</sup> 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 (赤血球破碎) や血小板減少、血漿蛋白変性等を引き起こす。特に溶血によって生じた血漿遊離ヘモグロビン (PF-Hb) は臓器障害を引き起こすことが知られている。本研究では体外循環諸環境 (時間や最低体温) と溶血量の相関について検討した。さらに溶血による術後腎機能への影響についても検討した。【対象】2019 年 12 月から 2020 年 2 月までに行われた開心術連続 19 例。内訳は心臓手術 13 例、大血管手術 6 例であった。【方法】1. 体外循環開始前、開始直後、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<sup>®</sup> を用いて血漿遊離ヘモグロビン (PF-Hb) 値を測定した。2. 術前、術直後、術後 1 日、術後 3 日、術後 5 日、術後 7 日、退院時 (または最終検査結果) の Cre 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。 ( $y = -8E - 07x^2 + 0.0006x + 0.0231$ ,  $R^2 = 0.5754p < 0.01$ ) 2. 超低体温群 (循環停止施行群) は軽度低温群 (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 :  $0.14 \pm 0.138$ mg/dl, 軽度低温群 :  $0.096 \pm 0.103$ mg/dl,  $P = 0.056$ ) 3. 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。術後一時的な腎機能の低下は認められたが、臨床問題となる不可逆的な腎機能障害は示さなかった。

014

ヒトパピローマウイルス 6 型の生活史の  
in vitro 条件下での再現

赤崎 拓海 (学籍番号: 174124B)  
指導教員: 〇池上 太郎, 鈴木 幹男  
琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

ヒトパピローマウイルス 6 型 (HPV-6) は、声帯の扁平上皮細胞に感染し、細胞の分化に合わせてウイルスゲノム DNA の複製およびウイルスタンパク質を発現し、喉頭乳頭腫を形成する。喉頭乳頭腫の根治治療法はなく、腫瘍を切除する対処療法しか現在のところない。このため、HPV-6 の生活史を明らかにすることが治療法開発のために重要である。in vitro で HPV の生活史を再現する手法として、これまで三次元培養法であるラフトカルチャー法が行われてきた。一方、近年、扁平上皮細胞を一次元の培養条件下でも培地中のカルシウム濃度を変化させることで分化を誘導できるようになった。そこで本研究では、HPV-6 の生活史を一元培養条件下で再現させることを最終的なゴールとし、HPV-6 のエピソーム DNA の全長のクローニングし、つづいてカルシウムによる扁平上皮細胞 HaCat の分化誘導条件を確立し、最後に HaCat への遺伝子導入法を確立することを目的とした。HPV-6 の全長エピソーム DNA を inverse PCR で増幅するため、5 箇所の制限酵素サイト (① Hind III, ② Bam H I, ③ Xba I, ④ Bgl- I, ⑤ Mlu I) において Inverse PCR 用のプライマーをデザインし、PCR 行ったところ、②、③および④で予想される 8 kbp のバンドが得られた。つづいて、TOPO-XL-2 kit を用いてクローニングし、プラスミド調製、制限酵素 Eco R I を用いた制限酵素消化し電気泳動で確認したところ、1 クローンで予想されるサイズのバンドが得られた。このサンプルについて DNA シーケンスを行い、BLASTN を用いて塩基配列解析したところ HPV-6 の全長であることが確かめられた。HaCat をカルシウム濃度 0.06mM から 1.8mM へ変化させて 6 日間培養すると、分化マーカー遺伝子である Involucrin と Keratin10 の遺伝子の発現が有意に上昇し、また未分化から分化した細胞形態に変化した。Nucleofector2b 装置を用いて、HaCat にエレクトロポレーションを行って蛍光タンパク質 EGFP の遺伝子を導入したところ、20%以上の細胞で導入ができた。今後、HPV エピソーム DNA を遺伝子導入し、HPV-6 の生活史の再現に取り組んでいく予定である。

016

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) 細胞株  
における JAK-STAT 経路と IFN- $\alpha$  投与後の  
細胞増殖抑制作用との関連

藤堂 美咲 (学籍番号: 174106D)  
指導教員: 崎浜 秀悟<sup>1)</sup>, 森近 一徳<sup>2)</sup>, 〇加留部 謙之輔<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (adult T-cell leukemia/lymphoma, ATL) はヒト T 細胞白血病ウイルス I 型 (human T-cell leukemia virus type I, HTLV-1) 感染が原因となって発症する 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る。リンパ腫型以外の ATL において、インターフェロン (IFN- $\alpha$ ) 投与が良好な治療成績を示したとの報告があり、当講座ではリンパ腫型以外の ATL において STAT3 が活性化 (=リン酸化) している事を発見した。そこで本研究では、リンパ腫型以外の ATL において、STAT3 の活性化と IFN- $\alpha$  投与後の細胞内シグナル伝達機構との間に関連があると仮定し実験を行った。実験には ATL 細胞株の HuT-102 および KK1, ST1 を使用した。実験方法として、STAT3 遺伝子を不活化させる目的で、HuT-102 においては shRNA のレンチウイルスベクターを用いた遺伝子導入を、KK1, ST1 においてはエレクトロポレーションによる CRISPR-Cas9 プラスミド導入を行った。ウイルスベクターをトランスフェクションさせた HuT-102 では、STAT3 遺伝子の発現タンパク量の減少を認める STAT3 抑制株の樹立に成功した。これらに IFN- $\alpha$  を濃度別に投与し、今後 0, 24, 48, 72 時間後の細胞数の変化を実測する予定である。一方 KK1 では、CRISPR-Cas9 プラスミドの導入率が非常に悪く実験を断念した。コントロールプラスミドは 69.94% の導入率である為、Cas9 タンパク発現において細胞に強いストレスがかかり、プラスミドが導入された細胞が死滅したと考察している。ST1 では 18.46% の導入が確認され、蛍光タンパクによるソーティング後にクローニングを行い 8 クローンを得たが、STAT3 遺伝子の発現抑制は見られなかった。遺伝子が導入された細胞は死滅し、導入されていない細胞のみが生育したと考えられる。今回は、HuT-102 の STAT3 抑制株への IFN- $\alpha$  投与後の経時的な細胞数の変化を中心に報告を行う。

017

## 通常食と高脂肪食ラットにおける身体、下部尿路機能変化および酢酸による刺激が膀胱・尿道機能に及ぼす影響

潮平 昭皓 (学籍番号: 164191D)

指導教員: 宮里 実

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

目的: 生活習慣病は、偏った食事、運動不足、飲酒、喫煙、ストレスに起因する。様々な下部尿路機能障害を引き起こすことが明らかとなっているが、その詳細な機序については十分に解明されていない。そこで、通常食と高脂肪食投与ラットの身体、下部尿路機能変化および、酢酸による膀胱刺激後の膀胱・尿道機能に及ぼす影響を比較検討した。

方法と対象: 通常食と高脂肪食を2か月投与したSD雌性ラットを用いた。1) イソフルラン麻酔下で膀胱瘻 (PE-50) を挿入した。ウレタン麻酔に切り替え、膀胱内に生理食塩水を投与 (3ml/h)、連続膀胱内圧測定を行った。2時間後、0.1%酢酸に切り替え同測定を行った。最大膀胱収縮圧、閾値圧、基線圧、収縮間隔、high frequency oscillations、排尿量、残尿量を群間比較、酢酸刺激後の膀胱・尿道機能変化を検討した。2) ペントバルビタール麻酔下、3DマイクロX線CT (Rigaku) を用いて腎下極レベルの内臓脂肪を群間比較した。

結果: 1) 高脂肪食ラットは、最大膀胱収縮圧が低下、収縮間隔が延長、high frequency oscillationsの増強がみられた ( $p < 0.05$ )。酢酸投与後、両群とともに最大膀胱収縮圧の増加、収縮間隔の短縮が見られた。2) 高脂肪食ラットは、通常食と比較して体重が増加 (350g vs 300g)、内臓脂肪が増加していた (18.3% vs 14.9%)。

考察: 当研究で、高脂肪食ラットでは最大膀胱収縮圧が低下、収縮間隔が延長したことから排尿筋低活動を呈していると考えられた。高脂肪食は体重・内臓脂肪の増加をもたらしたことから、骨盤内動脈硬化は排尿筋低活動を引き起こすことが報告されていることから、当研究でも高脂肪食は同様な現象で低活動膀胱を引き起こしていることが示唆される。酢酸投与後、排尿回数、膀胱収縮圧が増加したのは、化学刺激により膀胱求心路のC線維が活性化したためと思われる。

018

## ストレス条件下での群居行動が検討可能な動物モデルの確立とそのメカニズム

松原 洋夏 (学籍番号: 174141B)

指導教員: ○福光 甘齋<sup>1)</sup>、黒田 公美<sup>1)</sup>、菊谷 研一<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 理化学研究所脳・神経科学研究センター<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

動物は捕食者からの防衛、保温、効率的な狩りなどのため群れを作り、群居行動 (huddle) と呼ばれる。特に、恐怖や不安を感じさせる刺激に対し体を寄せ合い接触する群居行動は、Defensive huddle と呼ばれる。これは多くの動物で見られ、恐怖を感じさせる要素としては、天敵の匂い (恐怖臭) や光刺激などが知られる。ラットにおいても、光刺激や恐怖臭で恐怖や不安を感じた場合に Defensive huddle が見られ、オキシトシンが関係している可能性が示唆されている。われわれの先行実験でも、マウスにおいて光刺激による Defensive huddle の実験モデルを検討し、光刺激に対して感受性の強い BALB/c マウスと感受性の低い B6J マウスの差を見出している (Inoue et al. 2018)。今回の実験では、まず (1) 光刺激に対して Defensive huddle を起こさない B6J マウスが、恐怖臭に対して Defensive huddle を起こすか否か検討した。ラットやマウスの恐怖臭実験では、従来ネコの毛 (Cat fur) やキツネの分泌物 TMT (2,4,5-トリメチル-3-チアゾリン) がよく用いられてきたが、今回は TMT より強い恐怖を再現性よく誘発する人工恐怖臭 2-MT (2-メチル-2-チアゾリン) を用いた。また、(2) Defensive huddle のメカニズムについて、マウスにおいてもラットと同様にオキシトシンが関わっているのではないかと考え、マウスの脳を免疫染色してオキシトシンの分布変化を検討した。結果、(1) 2-MT 曝露により体を寄せ合い接触する社会的接触の合計時間と平均時間がどちらも有意に増加したことから、B6J マウスにおいて恐怖臭によって Defensive huddle が誘発されることが判明した。また、(2) オキシトシン前駆体のプレプロオキシトシンに含まれる運搬タンパク質ニューロフィジン 1 (NP1) を免疫染色したところ、2-MT 曝露により染色パターンに変化が見られたことから、恐怖臭によるマウスの Defensive huddle にオキシトシンの分布変化が関与していることが示唆された。

019

## 潰瘍性大腸炎関連大腸癌の全大腸切除における浸潤リンパ球の検討

福嶺 康大 (学籍番号: 174103K)

指導教員: ○松崎 晶子、高松 玲佳、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] 潰瘍性大腸炎 (Ulcerative colitis; UC) は長期経過例で大腸癌を合併する (UC 関連大腸癌と呼ばれる) ことが知られている。今回、UC 関連大腸癌に対して琉球大学附属病院で全大腸切除を行なった7症例に対して、炎症はあるが腫瘍はない部分、dysplasia 部分、癌の部分の三つに対する浸潤炎症細胞の種類や量の比較を行うことを計画した。炎症細胞の種類や量が UC 非腫瘍性病変と UC 関連大腸癌病変で異なっていれば、診断の一助になることが期待され、また、UC から UC 大腸癌発症機序の解明の一助にもなるのではと期待される。

[対象と方法] 琉球大学附属病院で全大腸切除された症例の大腸から、三つの混同がないように切片を作った。その切片を免疫染色したのち、whol slide imaging (WSI) 画像を製作した。定量的組織分析のための画像解析プラットフォームを使ってその WSI 画像上での解析を行った。

[結果] 7症例すべてにおいて一貫した炎症細胞浸潤のパターンを見つけることはできなかった。しかし、それぞれの症例において癌の部分、dysplasia の部分、正常部分を比較してみるとそれぞれ分布に特徴が見られた。症例 2, 6 では癌の部分において炎症細胞浸潤が明らかに多かった。症例 3 では dysplasia の部分において炎症細胞浸潤が明らかに多く見られた。症例 4, 5 では正常部分において炎症細胞浸潤が多く、dysplasia や癌では逆に減少していた。症例 1, 7 では炎症細胞浸潤はまばらに見られた。

[考察] プレドニンを使用した記録のない症例 1, 7 において炎症細胞の浸潤がまばらで、プレドニンの使用したそれ以外の症例において炎症細胞浸潤にある一定の偏りが見られたことはプレドニンが TILs になんらかの影響を与えたのではないかと考えられる。また、決まった炎症細胞浸潤のパターンは見つけられなかったが、炎症細胞浸潤に偏りは実際にあるため、今後は症例数を増やしてさらに検討を続けたいと考える。

020

## 培養下垂体前葉細胞 LβT2 細胞における GnRH 受容体刺激後の細胞内シグナル伝達機構と遺伝子発現

友近 寧孝 (学籍番号: 164190F)

指導教員: ○山本 秀幸、澳津 志帆、仲嶺 三代美、鳥原 英嗣

琉球大学大学院医学研究科生化学講座

ゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) は、視床下部の GnRH ニューロンから分泌され、下垂体前葉のゴナドトロピン産生細胞に働いてゴナドトロピンの産生と放出を促進させる。GnRH 受容体は、ゴナドトロピン産生細胞に加えて GnRH ニューロンにも発現している。生化学講座では、マウスの GnRH ニューロンの培養細胞株 (GT1-7 細胞) を用いて、GnRH 受容体刺激により protein kinase D (PKD) が活性化され、MAP キナーゼの中の ERK (extracellular signal-regulated kinase) の活性化に関与することを見出している。私は培養ゴナドトロピン産生細胞の LβT2 細胞を用いて GnRH 受容体刺激後の細胞内シグナル伝達機構を検討した。マイクロアレイ解析で GnRH 処理により発現が変動する遺伝子を網羅的に検討したところ、Fos, JunB, Egr1 の遺伝子発現の上昇が認められた。これらの遺伝子の発現上昇は、RT-PCR により確認された。次に、PKD に着目した。PKD は PKC により活性化されるセリン/トレオニンキナーゼであり、PKD1, PKD2, PKD3 の3種類が知られている。RT-PCR 法と免疫プロット法により GT1-7 細胞では PKD1 の発現が顕著であるが、LβT2 細胞では PKD3 のみ発現していることが明らかになった。次に、ERK の活性化への、PKC と PKD の関与について検討した。PKC の阻害薬 (bisindolylmaleimide 1) と PKD 阻害薬 (CRT0066101) は GnRH 処理による ERK の活性化を抑制した。以上の結果より LβT2 細胞でも GT1-7 細胞と同じく GnRH 受容体刺激後に PKC と PKD を介した ERK の活性化経路が存在することが明らかになった。さらに、活性化された PKD3 は核内に移行し、遺伝子発現に関与する可能性が考えられる。



021

## 沖縄における中心性漿液性脈絡網膜症の臨床的特徴および危険因子

与那嶺 克 (学籍番号: 174200B)

指導教員: ○寺尾 信宏, 今永 直也, 古泉 英貴  
琉球大学大学院医学研究科眼科学講座

【目的】 中心性漿液性脈絡網膜症 (CSC) は、中高年の男性に好発する黄斑部の漿液性網膜剥離を特徴とする疾患である。発症の原因は解明されていないが、その臨床的特徴および危険因子は多数報告されている。我々は hospital-based で沖縄県の CSC の臨床的特徴および危険因子を調査した。

【対象と方法】 2019年12月から2020年3月までに当科を受診した CSC 症例 78 例 95 眼 (初診時平均 53.5 ± 12.4 歳)。臨床的特徴として発症年齢、性別、初診時視力、発症眼 (片眼、両眼)、病期 (急性、慢性)、眼軸長、中心窩下脈絡膜厚 (SCT)、脈絡膜血管透過性亢進 (CVH) の有無、網膜色素上皮剥離 (PED) の有無、descending tract (DT) の有無を検討した。さらに危険因子としてステロイド薬使用歴、ストレス (visual analogue scale: VAS, 0-10 点)、A 型行動パターン、睡眠障害、喫煙歴、アルコール依存、シフトワーカー、CSC 発症に関する全身疾患について検討した。両眼 CSC について、発症年齢は初発眼、他の項目は右眼を検討対象とした。

【結果】 臨床的特徴として、発症年齢は 51.1 歳、性別は男性 59 例女性 19 例、初診時視力は 0.23 (logMAR)、両眼 CSC は 17 例、慢性 CSC は 52 例、眼軸は平均 23.56mm、SCT は平均 378 μm、CVH は 67 例、PED は 9 例、DT は 13 例に認めた。危険因子として、ステロイド薬使用歴は 17 例、ストレスは VAS スコア平均 5.9 点、A 型行動パターンは 37 例、睡眠障害は 28 例、喫煙歴は 40 例、アルコール依存は 37 例、シフトワーカーは 23 例、CSC に関与する全身疾患として高血圧は 30 例、自己免疫疾患は 4 例、腎疾患は 4 例、臓器移植は 2 例、向精神薬内服は 3 例に認めた。

【結論】 沖縄県における CSC の臨床的特徴、危険因子は本邦および海外との既報とほぼ同様の傾向であった。

022

## 抗がん薬の心毒性発現機序の細胞分化度からの検討

新里 康太 (学籍番号: 174128E)

指導教員: ○松下 (武藤) 明子, 植田 真一郎  
琉球大学大学院 医学研究科臨床薬理学講座

【目的】 抗がん薬の中には心毒性を示すものがあり、その毒性発現の機序や予防・治療に関する知見は少ない。高度に分化した増殖性を持たない心筋が蓄積的に障害を受けることから、本研究では増殖性未分化細胞と、それを分化させた非増殖性細胞を比較し、抗がん薬の心毒性発現機序を検討した。

【方法と結果】 単球系細胞株 THP-1 の増殖期と、ホルボールエステルにて非増殖接着細胞に分化したものを使用した。今回の研究で発表者新里は未分化型の実験を担当し、分化型は共同研究者が行った。薬物としてドキシソルピシン、ビンブラスチン、パクリタキセル、コルヒチンを用い、20 時間作用した後、生存の用量反応、ウエスタンブロットでの炎症・生存関連シグナルを評価した。生存-用量反応はすべての薬物で未分化型での感受性が約 10 ~ 20% 強かった。NFκB 経路はどちらの細胞でも薬物による変化は見られなかったが、生存シグナルの p44/p42 リン酸化は未分化型では  $1 \times 10^{-10}$ M から、分化型ではより高濃度 ( $1 \times 10^{-6} \sim 1 \times 10^{-5}$ M) で亢進しており、下流の STAT3 は Ser727 リン酸化が、変化のない分化型でのドキシソルピシンとコルヒチンを除き、p44/p42 に対応して亢進していた。上流経路の探索として生存率 6 割程度のドキシソルピシン (未分化  $1 \times 10^{-8}$ M, 分化  $1 \times 10^{-7}$ M) 処置時の小分子 G タンパク質の局在を染色したところ、Rac1 の細胞膜移行が観察された。またドキシソルピシン  $1 \times 10^{-6}$ M 処置での細胞内取り込み量を 2 および 20 時間で蛍光により定量すると、未分化型での取り込み量は分化型のそれぞれ 4.1 倍、1.6 倍と高い一方、取り込み増加率は未分化型 106%、分化型 424% と未分化型で低かった。

【結論】 細胞の分化の程度の違いにより、抗がん薬による生存系シグナルへの影響、細胞内取り込みや取り込み増加率が異なることが心毒性発現に関与することが示唆された。

023

## SafeCT を用いた逐次近似画像再構成法による、急性期脳梗塞の early CT sign の描出改善の検討

赤嶺 洋哉 (学籍番号: 174152H)

指導教員: 與儀 彰  
琉球大学病院放射線部

【目的】 急性期脳梗塞の CT 所見である early CT sign (皮髄境界の不明瞭化、基底核の不明瞭化) は、通常の CT では検出が難しい。そこで我々は、SafeCT® (MedicVisin, Israel) の逐次近似画像再構成法を用いて画像の雑音を除去することで、early CT sign の描出が改善するかどうか、後方視的に検討した。【対象と方法】 頭部 CT、拡散強調画像 (DWI) が施行された 35 個の急性期脳梗塞を選択した。CT データから厚さ 0.625mm、5mm の画像 (それぞれ thin-slice 群、5mm-slice 群)、SafeCT® で thin-slice 群の雑音を除去した画像 (SafeCT 群) の 3 種類の画像を作成した。1 名の診断専門医と 2 名の後期研修医が、これらの画像で early CT sign を基に急性期脳梗塞の範囲を盲検的に評価した。DWI による拡散制限域を reference standard として CT 評価の結果を比較し、範囲の一致率を以下の通りに評価した: 1 (検出不可)、2 (一部一致した)、3 (一致した)。Friedman 検定を用いて 3 群間の一致率を比較し、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。【結果】 診断専門医の一致率の平均は 5mm-slice 群、thin-slice 群、SafeCT 群でそれぞれ 1.5、1.7、1.9 と、SafeCT 群が最も高値だった ( $p < 0.03$ )。後期研修医 2 名の一致率の平均はそれぞれ 1.5、1.5、1.5 と、1.2、1.5、1.2 で、両者とも各群で一致率に差は認めなかった ( $p < 0.12$ )。【考察】 SafeCT 群が高い一致率を呈し、early CT sign の検出が改善された。SafeCT® は急性期脳梗塞患者の診療に寄与する可能性がある。診断専門医と後期研修医で結果に差が生じたのは画像所見の機序に対する理解の差が一因と考えられる。

024

## 犬の飼育は心血管疾患のリスクを低下させるのか？ システマティックレビュー

屋良 俊太郎 (学籍番号: 174135H)

指導教員: 花城 和彦, ○中村 幸志  
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】 ペットのいる家庭は珍しくない。特に犬は人間の精神的ストレス緩和に関わっていることが示唆されている。本研究では、犬の飼育が精神的健康のみならず、身体的健康にも寄与しているのではないかと仮説の下、日本人の死亡原因の上位である心血管疾患に注目し、犬の飼育と心血管疾患の罹患・死亡についてシステマティックレビューを行った。

【方法】 PubMed と医中誌を用いて原著論文を検索した。PubMed 検索では以下の MeSH 用語を用いた ((("Cardiovascular Diseases" [Mesh]) OR cardiovascular)) AND ((("Pets" [Mesh]) OR companion animal OR dog) (抽出数 91140 件)。また、医中誌では以下の TH を用いた (ペット / TH or ペット or 犬) and (心血管 / TH or 心血管) (抽出数 118 件)。

【結果】 目的に該当する論文 6 件中、犬を飼うことと心血管疾患の罹患・死亡に負の関連がみられた論文は 2 件、関連がみられなかった論文が 4 件であった。「負の関連あり」の論文では、飼育期間や 1 日の接触時間が長いほど、犬所有時の年齢が若いほどリスク低下がみられた。また、飼い主が単身世帯の場合にリスク低下がみられた。

【考察・結論】 該当論文の結論が一致していなかった原因としては、関連因子の考慮に違いがあったからだと推察される。「関連なし」の論文では、犬種や犬所有時の年齢、飼育期間、1 日での接触時間、飼い主の社会的財政状況、居住地域、家族構成が考慮されていなかった。複数世帯よりも単身世帯の対象者は犬を散歩させる機会が多かった結果を鑑みると、総じて犬との接触時間が長いほどリスク低下が大きくなると思われる。

025

## 開心術での体温と酸素消費量についての検討

新城 柝清 (学籍番号: 174111A)

指導教員: 喜瀬 勇也<sup>1)</sup>, 兼城 悠司<sup>2)</sup>, 國吉 幸男<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院胸部心臓血管外科科学講座<sup>2)</sup> 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】2019年12月～2020年2月の間、開心術15例を対象とし、31～33度の軽度低体温群(n=10)と20度の超低体温群(n=5)の2群に分けた。

【方法】完全体外循環中は下記①～④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<sub>2</sub>-SvO<sub>2</sub>)・灌流量(L/min)……(A) ①灌流量(L/min):人工心肺送血量 ②血中ヘモグロビン濃度 g/dl (HGB) ③動脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 % (SaO<sub>2</sub>):送血管 SaO<sub>2</sub> ④静脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 % (SvO<sub>2</sub>):脱血管 SvO<sub>2</sub> また、部分体外循環中は呼吸による酸素消費量を併せて測定する必要があり、下記の①～③項目を測定し、呼吸による酸素消費量を(B)式より算出した。

酸素消費量 (mL/min)=(O<sub>2in</sub>-O<sub>2out</sub>)・MV(L/min)・1000……(B) ①吸入酸素濃度 % (O<sub>2in</sub>) ②呼気中酸素濃度 % (O<sub>2out</sub>) ③ MV: 分時換気量 L/min 部分体外循環中の各体温に応じた酸素消費量は(A)式と(B)式の和より求めた。

【結果】1. 軽度低体温群、超低体温群とも体温(低下/上昇)と酸素消費量(低下/上昇)に正の相関傾向を認めた。2. 酸素消費量の平均値を比較すると、軽度低体温群では最低体温時には元の30%まで酸素消費量が低減し、超低体温群では酸素消費量は元の10%まで低減した。3.

軽度低体温群、超低体温群において、体温変化と酸素消費量に強い正の相関を認めた。4. 冷却時と加温時において、酸素消費量を比較すると、加温時より冷却時の方が若干の酸素消費量の低下を認めた。

【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。

027

## 連続聴効果におけるモルモットの聴覚野の応答

原國 睦 (学籍番号: 174133B)

指導教員: 〇細川 浩

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

音の間に無音区間を作り、そこに雑音をいれるとその音が滑らかに聞こえる錯聴(連続聴効果)のメカニズムを光学的計測法で調べた。

モルモットにKetamin (1ml/kg), Xylazin (0.5ml/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、60分毎にKetamin (0.5ml/kg)で持続的に麻酔を投与した。

周波数バンドを測定するため、刺激時間100ms、音圧75dB SPLで周波数が0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHzの純音を付加した。

連続聴効果を測定するため、刺激時間100ms、音圧75dB SPLの純音(0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz)の開始後40msに白色雑音を10, 20, 30ms挿入した合成音に対する各周波数バンドでの応答を測定した。

応答は、純音と雑音の2相性の応答を示し、そのピーク比を比較した。

その結果、純音後の雑音応答は平均的に100%以下であった。

連続聴効果が起きるためには、100%に近づかなければいけないので、雑音が入られる音より強い必要があると考えられる。

また、A1において、純音の4000Hzの刺激を受けた後の雑音は、他の周波数と比べて抑制されておらず、DCでは1000Hzにおいて雑音があまり抑制されていないことが分かった。16000HzではAIとDCどちらも最も抑制されていた。このことから、間に入れる雑音は高周波より低周波の方が連続聴効果を起こしやすいことが示唆される。

026

## 精巣に発生するリンパ腫の臨床病理学的、免疫学的、統合的遺伝子解析

慶田 かのん (学籍番号: 174117K)

指導教員: 〇カレラスエステバンジュアキム<sup>1)</sup>, 菊池イアール幸江<sup>1)</sup>,中村 直哉<sup>1)</sup>, 加留部 謙之輔<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 東海大学医学部病理診断学<sup>2)</sup> 琉球大学医学研究科細胞病理学

【背景と目的】血液精巣関門が存在するため、リンパ球などの免疫細胞は精巣に入らないとされるが、実際には精巣からもリンパ腫が発生し、精巣に発生する悪性リンパ腫の90%以上は、びまん性大細胞型B細胞リンパ腫(Diffuse large B-cell lymphoma, DLBCL)という、B細胞に由来する腫瘍である。DLBCLはリンパ節、リンパ節以外の臓器(節外性臓器)いずれからも発生する。少なくとも40%は節外性であり、発生する臓器により特徴や予後が異なる。精巣に発生するDLBCLはまれであり、その特徴や予後を調べるために臨床病理学的、遺伝子学的な解析を行う。

【材料と方法】サンプルは精巣腫瘍として除手術が施行され、摘出された組織から精巣原発のDLBCLと診断された10例でホルマリン固定され、病理診断用にパラフィン固定材料として保存されているものを用いた。臨床情報解析、病理組織学的所見と免疫組織化学的所見の解析を行った。また、遺伝子解析としてゲノム増幅欠失解析、BCL2, BCL6, MYC 遺伝子 FISH 解析、ネクストジェネレーションシーケンスを行った。

【結果と考察】精巣原発のDLBCLはCD20+, CD5-, BCL2+, BCL6-, MUM1+, EBV-でNon-GCBの特徴がある。1q, 2q, chr.3, chr.7, 11q, chr.12, 18q, 19qでCopy Number, CN gainが、6qでCN lossが顕著に見られた。DLBCL Not Otherwise Specified, NOSと比較すると、精巣原発のDLBCLでは2q, 19qでCN gainが見られ、1p, 17pでCN lossが見られなかった。BCL2, BCL6, MYCの遺伝子転座は認められなかった。PIMI(100%), CD79B(78%), MYD88(78%) and PARP2(56%)で遺伝子変異が多く見られた。この変異はDLBCL NOSではあまり見られなかった。以上のように精巣原発のDLBCLは、他の臓器に発生するDLBCLとは遺伝子変異や転座、発現の特徴が異なるDLBCLであるということがわかった。今後、症例数を増やして、予後を考察することが必要と考える。

028

## ニューログラニン欠損マウスの行動表現型解析

船坂 哲平 (学籍番号: 174165K)

指導教員: 〇中島 龍一<sup>1)</sup>, 服部 聡子<sup>1)</sup>, 宮川 剛<sup>1)</sup>, 荻谷 研一<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 藤田医科大学総合医科学研究科システム医学研究部門<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科・医化学講座

【背景】

ニューログラニン(Nrgn)は記憶・学習に関わるとされており、Nrgn欠損マウスの先行研究では多動や記憶障害などの行動異常や海馬歯状回神経細胞の未成熟状態(idG)など精神疾患との関連を示唆する所見が得られている。今回は、Nrgn欠損マウス海馬歯状回顆粒細胞の樹状突起スパインの形状解明の前段階として、Nrgn欠損マウスの行動表現型の再現性の確認を目的とし、行動解析実験を行った。

【方法】

対照としての野生型(WT)マウス13匹とNrgn欠損マウス16匹の29匹を用いて、4つの行動解析テストを行った。ホームケージ活動量テストでは、慣れた環境下での活動量や概日リズム、オープンフィールド試験では、新奇環境での活動量や情動性、T字型迷路では作業記憶、社会的行動測定テストでは、マウスの社会性を測定した。

【結果】

Nrgn欠損マウスはWTマウスに比べ、ホームケージ活動量テストでは活動量や概日リズムに異常はなかった。しかしオープンフィールド試験の最初の1時間で、移動量・立ち上がり行動回数の増加、フィールド中央での滞在時間や情動行動の減少が見られた。T字型迷路では遂行時間が有意に短かったが、左右選択の正答率に差はなかった。社会的行動測定テストでは社会性の有為な低下が見られた。

【考察】

Nrgn欠損マウスにおいて社会的行動の減少、新奇環境における活動量の亢進、不安様行動の増加など、統合失調症との関連が示唆される行動表現型が確認された。現在、同マウスにおいて超解像顕微鏡を用いた樹状突起スパインの形状解析を進めている。

029

## インフルエンザシーズン中での早期のワクチン効果 (VE) の算出するための指標の検証

浦崎 達貴 (学籍番号: 164171K)

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

【背景】海外ではインフルエンザシーズン中に暫定的な VE に関する情報が発信されているが、国内ではシーズンの終了後に VE に関する情報が報告されている。

【目的】日本国内における、シーズン中での暫定的な VE を算出するための指標を検討する。

【方法】対象は 2018 年第 44 週から 2019 年第 12 週までの期間で、沖縄県内某離島の主要医療機関を受診し、インフルエンザの迅速診断検査を行った生後 6 か月から 5 歳の患者 419 人である。症例対照研究を研究デザインとした。対象のうち、調査期間中に主要医療機関を受診し体温が 38 度以上あり、インフルエンザ迅速診断検査にて A 型陽性であった者を症例とした。一方、対象のうち調査期間中に主要医療機関を受診し、体温が 38 度以上あり、インフルエンザ迅速診断検査にて陰性であった者を対照とした。インフルエンザ感染とワクチン接種歴の関連をオッズ比 (OR) として表した。VE=(1-OR)×100%として算出し、95%信頼区間下限が、0 より大きい値であれば統計学的に有意とした。上記の解析を 4 週間毎に行い各分析期間における VE を算出した。有意な VE が一定して得られるようになる指標の検討を行った。

【結果/考察】同地域における定点あたり報告数が 10 を超えて最初の 4 週間の分析でその後大きく変化しない有意な VE が得られ、そのシーズン全体の VE を推定できると思われた。

【結論】その地域における、定点当たり報告数 10 を超えた週から 4 週間の分析が、シーズン中での早期の VE を算出するための指標となることが示唆されたが、他のシーズンやほかの地域にも適応可能かどうか、今後のシーズンでの検証が必要である。

031

## 培養神経細胞における FIP200 の生理機能と Pyk2 との相互作用の研究

宮城 恰奈 (学籍番号: 174108A)

指導教員: ○仲嶺 三代美, 澳津 志帆, 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<sub>q/11</sub> タンパク質と共役する受容体は多岐にわたり、様々な細胞機能の制御に関与している。生化学講座では、マウスの視床下部由来の培養神経細胞 (GT1-7 細胞) を用いて、上記受容体に属するゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) 受容体刺激による proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の活性化反応について検討してきた。今回私は、FAK family-interacting protein of 200kDa (FIP200) に焦点をあて、Pyk2 とその下流の extracellular signal-regulated kinase (ERK) の活性化への関与、および Pyk2 との相互作用について検討した。

GT1-7 細胞へ FIP200 に対する siRNA を導入し、GnRH 受容体刺激後に免疫プロットを行なった。その結果、FIP200 のノックダウンにより、Pyk2 と ERK の活性化が抑制された。さらに、Pyk2 のタンパク質量も減少し、FIP200 は Pyk2 の活性化と安定化に働くことが示唆された。次に、FLAG-Pyk2 を発現させ、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降実験を行った。この実験により、FIP200 と FLAG-Pyk2 との結合が確認された。一方、Pyk2 と同じファミリーに属する FAK に対する抗体を用いた免疫沈降実験では、FIP200 との結合は見られなかった。最後に、FIP200 の C 末端領域 (230 または 466 アミノ酸) を発現する二つの変異体を作成した。これらの変異体を発現させ、抗 FIP200 抗体による免疫沈降実験を行なった。その結果、Pyk2 と両変異体との結合が見られ、FIP200 の C 末端が Pyk2 との結合に重要であることが示唆された。今後は、GnRH 受容体刺激後の FIP200 変異体のリン酸化と、リン酸化の Pyk2 との結合への影響について検討する予定である。

030

## AI による乳がんデジタル病理画像の腫瘍領域認識とその精度評価

佐藤 亘 (学籍番号: 174120K)

指導教員: ○松本 裕文<sup>1)</sup>, 吉見 直己<sup>1)</sup>, 平良 日向子<sup>2)</sup>,  
宮田 龍太<sup>3)</sup>, 倉田 耕浩<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座<sup>2)</sup> 琉球大学大学院理工学研究科機械システム工学専攻<sup>3)</sup> 琉球大学工学部工学科エネルギー環境工学コース

緒言: 昨今の深層学習による画像識別・認識の発展は著しく、医療分野ではとりわけ診断における応用が期待されている。病理診断においては、診断の精度向上を実現することで、将来的に診断の補助として活用できる可能性が大いにある。本研究では、腫瘍の病理画像を AI に学習させ、腫瘍領域の認識精度を評価した。

対象: 2018 ~ 2019 年にかけて、中頭病院で浸潤性乳がんと診断された患者から針生検で採取した乳腺組織の連続するデジタル病理画像 (HE 染色・対物 20 倍撮影) 全 218 症例を用いた。認識精度の評価には HER2 陽性乳がんの任意のデジタル病理画像 10 症例 (腫瘍浸潤リンパ球; Tumor Infiltrating Lymphocytes; TILs の多い 5 症例と少ない 5 症例) を用いた。方法: AI 搭載のソフト (HALO-AI®) を用い、病理画像の腫瘍領域と間質領域とを認識させるため、対象の病理画像 218 症例の任意の領域を目視で 6575 箇所マスキングし、深層学習させた。その後、未学習の 10 症例について任意の各 3 領域を HALO-AI® に認識させ、認識精度を評価した。評価は、連続切片のサイトケラチン染色病理画像とのピクセル毎の比較を、混同行列を用いて行なった。

結果: 適合率の最大値は 0.942、中央値は 0.684、最小値は 0.417 で四分位範囲は 0.207 であった。再現率の最大値は 0.993、中央値は 0.767、最小値は 0.385 で四分位範囲は 0.299 であった。F 値の最大値は 0.893、中央値は 0.731、最小値は 0.432 で四分位範囲は 0.230 であった。

考察: 精度評価の条件においては、AI はリンパ球や形質細胞が密在する領域を腫瘍として誤認する傾向にあり、また淡明で広い細胞質をもつ腫瘍細胞を間質と誤認する傾向にあり、これが正解率に寄与していると考えられる。学習で使用する病理画像の撮影倍率を大きくする、より多種の症例を学習に用いる等で精度の改善が期待できると考えられる。

032

## 法医解剖例における流動血および凝血塊中薬物濃度の比較

中村 彩乃 (学籍番号: 174126J)

指導教員: ○池松 夏紀<sup>1)</sup>, 米本 孝二<sup>2)</sup>, 深沢 真希<sup>1)</sup>,  
川上 由香<sup>1)</sup>, 二宮賢司<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科法医学講座<sup>2)</sup> 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・目的】法医解剖において、血中薬物濃度の正確な測定は、死因の決定や死者および関係者の法的責任の判断のため重要な意義を持つ。

しかし、法医解剖で得られる試料は死後変化の影響を受けることが知られており、これを避けるため、測定に用いる血液の採取部位については様々な検討がなされている。一方で、死亡までの経過によって流動血に加え軟凝血塊や豚脂様凝血塊が見られることがあるが、薬物濃度の測定対象とされるのは流動血であり、死体血の性状による差異について検討した文献は検索されない。そこで本研究では、エタノールとカフェインを対象として、同一部位から採取された流動血および凝血塊における濃度を測定し、その差異について比較検討した。

【材料・方法】2019 年 12 月 21 日から 2020 年 1 月 31 日までに琉球大学法医学講座にて行われた解剖例のうち、同一の採取部位にて流動血と凝血塊が得られたものを対象とした。ガスクロマトグラフ水素炎イオン化検出器により血中エタノール濃度を、液体クロマトグラフタンデム質量分析装置により血中カフェイン濃度を測定し、凝血塊中濃度の流動血中濃度への、回帰直線における傾斜の 95% 信頼区間を求めた。

【結果・考察】対象期間中の解剖例は 47 例で、条件を満たす 36 試料を得た。血中エタノール濃度は流動血と比較し、軟凝血塊で約 0.8-0.9 倍、豚脂様凝血塊で約 0.6-1.1 倍となること、血中カフェイン濃度は流動血と比較し、軟凝血塊で約 0.7-0.8 倍、豚脂様凝血塊で約 1.1-1.2 倍となると推定された。以上から、同じ血液であっても、流動血と凝血塊では薬物濃度に差があること、またその差は薬物の種類によって異なること、さらに凝血塊の性状、すなわち軟凝血塊か豚脂様凝血塊かによっても異なる場合があり得ることが示された。よって、今後例数を増やし、さらに対象物質を広げてより包括的な検討をする必要があると考えられる。

033

## 骨軟部腫瘍における FDG-PET 検査の SUVmax 値と良悪性の相関関係

仲間 大河 (学籍番号: 164132J)  
指導教員: 當銘 保則  
琉球大学附属病院整形外科科学講座

【目的】近年, FDG-PET により早期がんの発見や病期分類が可能となり, 各がん種においてその有用性が報告されている。しかし, 骨軟部腫瘍は種類が多く, 良悪性の鑑別も含めて FDG-PET による画像診断の研究報告が少ない。今回, 我々は FDG-PET 検査で示される SUVmax 値を用いて, 骨軟部腫瘍における良悪性鑑別の有用性を検討した。

【対象と方法】骨軟部腫瘍に対して PET 検査後に, 組織学的に診断が確定した 227 例 (軟部腫瘍 143 例, 骨腫瘍 84 例) を良性腫瘍と中間悪性腫瘍 (軟部腫瘍: デスマイト, 異形脂肪腫様腫瘍, 腱巨細胞腫等, 骨腫瘍: 骨巨細胞腫等), 悪性腫瘍とに分け, 軟部腫瘍と骨腫瘍それぞれで SUVmax 値を比較し, cut-off 値を算出した。

【結果】軟部腫瘍群における SUVmax 値は良性腫瘍, 中間悪性腫瘍, 悪性腫瘍はそれぞれ  $3.99 \pm 2.54$ ,  $5.13 \pm 3.73$ ,  $10.05 \pm 9.25$ , であり, 中間悪性腫瘍や悪性腫瘍は良性腫瘍と比較して有意に SUVmax 値が高いが (各々  $P=0.03$ ,  $P<0.01$ ), 悪性腫瘍と中間悪性腫瘍は有意な差が認められなかった。骨腫瘍群における SUVmax 値はそれぞれ  $3.58 \pm 2.66$ ,  $11.01 \pm 3.83$ ,  $11.89 \pm 10.35$  であり, 中間悪性腫瘍や悪性腫瘍は良性腫瘍と比較して有意に SUVmax 値が高いが (各々  $P=0.01$ ,  $P<0.01$ ), 悪性腫瘍と中間悪性腫瘍は有意な差が認められなかった。中間悪性腫瘍を除いた ROC 曲線から求められる軟部腫瘍の悪性腫瘍と良性腫瘍の cut-off 値は 5.98 (感度 55%, 特異度 89%) であった。骨腫瘍における悪性腫瘍と良性腫瘍の cut-off 値は 6.03 (感度 75%, 特異度 92%) であった。

【まとめ】軟部腫瘍での悪性腫瘍の cut-off 値は 5.98 で感度 55%, 特異度 89% であった。骨腫瘍での悪性腫瘍の cut-off 値は 6.03 で感度 75%, 特異度 92% であった。骨軟部腫瘍において FDG-PET 検査は良・悪性の鑑別に有用であった。軟部腫瘍と骨腫瘍において悪性腫瘍と中間悪性腫瘍との鑑別は困難であった。

034

## 前立腺癌の小線源併用 IMRT における SpaceOAR® の初期経験

本永 圭吾 (学籍番号: 174173A)  
指導教員: ○草田 武朗<sup>1)</sup>, 山形 航<sup>1)</sup>, 平安名 常一<sup>2)</sup>, 村山 貞之<sup>3)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学医学部附属病院放射線科  
<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院放射線科  
<sup>3)</sup> 琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

【背景】SpaceOAR® は直腸と前立腺の間隙に刺入するハイドロゲルスペースラーであり, 前立腺癌の根治的放射線治療の際に使用すると直腸線量が低減できる。SpaceOAR® は刺入 13 週以降から体内に吸収され始めると考えられている。【目的】琉球大学病院での前立腺癌に対する小線源併用 IMRT における SpaceOAR® の初期経験として, SpaceOAR® の経時変化と直腸線量の変化および直腸線量低減効果の有効期間について検証することを目的とした。【方法】2019 年 3 月以降に琉球大学病院で小線源併用 IMRT を施行した前立腺癌 3 症例を対象とした。SpaceOAR® の厚さおよび体積を刺入翌日, IMRT 計画時, IMRT 最終日のそれぞれで測定した。また, 小線源治療時の直腸 D2cc を SpaceOAR® 刺入前, 刺入後で計算し, IMRT 時の直腸 V90% を IMRT 計画時, IMRT 最終日で算出した。【結果】SpaceOAR® の厚さは症例 A/B/C で, 刺入翌日 13.7/16.4/11.7mm, IMRT 計画時 15.5/18.2/11.4mm, IMRT 最終日 13.6/12.8/9.9mm であった。体積は刺入翌日 10.1/9.9/10.2cc, IMRT 計画時 9.4/9.8/9.8cc, IMRT 最終日 8.7/8.7/9.3 cc であった。小線源治療時の直腸 D2cc は SpaceOAR® 刺入前 86.0/85.9/73.6Gy, 刺入後 39.0/42.2/46.7Gy, IMRT の直腸 V90% は IMRT 計画時 0.02/0.11/0.16cc, IMRT 最終日 0.00/0.20/11.33cc であった。症例 C では IMRT 最終日に直腸内ガス貯留が見られた。【結論】SpaceOAR® の経時変化は少なく, 放射線治療期間中の直腸線量低減効果は維持されると考えられた。

035

## 末梢血メタボロームデータを活用した うつと肥満症・2 型糖尿病の病態連関に関する臨床研究 ~久米島デジタルヘルスプロジェクトのコホート解析から~

町田 香菜子 (学籍番号: 174177C)  
指導教員: ○山城 清人, 上間 次己, 岡本 士毅, 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 2 内科)

【背景】ライフスタイルの悪化により世界に冠する健康長寿地域であった沖縄県の健康崩壊が深刻化している (沖縄クライシス: 琉球大学 第二内科が命名)。現在, 医学研究科の数講座が連携し, 沖縄本島よりも肥満症や糖尿病が深刻な久米島の住民を対象に, 生活習慣病の増悪・防御因子を探索する久米島デジタルヘルス研究が進行中である。

【目的】海外の末梢血メタボローム解析結果から分岐鎖アミノ酸濃度の上昇が 2 型糖尿病の発症を 10 年以上前から予測出来る超早期マーカーの可能性が着目されている。一方, うつは 2 型糖尿病・肥満症のリスク因子であり病態基盤の一つに脳内セロトニン合成の低下が示唆されている。脳内セロトニン合成には循環血から供給されるトリプトファンが必須であることから末梢血アミノ酸存在比率の指標, トリプトファン比 (Trp Ratio) (トリプトファン/3 種の分岐鎖アミノ酸+2 種の芳香族アミノ酸) とうつ尺度 (QIDS-J)・インスリン抵抗性との関連性を解析した。

【方法】久米島デジタルヘルス研究の参加者 153 名を対象に, 年一回の末梢血メタボローム, 75g 経口ブドウ糖負荷試験, 一連のスコア化アンケート (QIDS-J, 食行動質問票, MOCA-J, FFQg5) の結果を解析した。

【結果】女性のみで Trp Ratio とうつスコア QIDS-J との間に有意な負の相関を認めた ( $r=0.25$ ,  $p=0.030$ )。また Trp ratio と BMI との間に有意な負の相関 ( $r=-0.34$ ,  $p=0.024$ )。Trp ratio とインスリン感受性指標 Matsuda Index との間に有意な正の相関 ( $r=0.30$ ,  $p=0.0092$ ) を認めた。【考察】末梢血中のトリプトファン, 分岐鎖アミノ酸, 芳香族アミノ酸は共通のトランスポーター LAT-1 を競合的に利用して脳内移行する。特に, 女性において うつ の病態と負の相関性を示す Trp Ratio が肥満・インスリン抵抗性指標とも関連性を示したことはうつと肥満症・2 型糖尿病の病態連関を臨床的に考察する上で示唆に富む結果と言える。

036

## 院外心停止患者における人工呼吸についての検討

大嶺 拓海 (学籍番号: 174155B)  
指導教員: ○福田 龍将  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【背景】2010 年の救急蘇生ガイドライン改定以降, 院外心停止患者に対する人工呼吸は必須項目から除外され, 口対口人工呼吸を行わない Hands-only CPR が積極的に容認されるようになった。しかしながら, 近年の院外心停止患者のデータを用いた, 従来の CPR (Conventional CPR) と Hands-only CPR の効果を比較したランダム化試験は存在しない。

【目的】2010 年のガイドライン改定後の院外心停止患者の人工呼吸と転帰の関係を検討することを目的とした。

【方法】総務省消防庁の救急蘇生統計データを用い, 2011 年から 2017 年に日本で発生した院外心停止を対象に, 全国規模の集団ベース後ろ向きコホート研究を行った。人工呼吸の有無による転帰の比較には, 1:1 マッチングによる Propensity Score (PS) 法を用いた。主要評価項目を心停止から 1 ヶ月後の良好な神経学的転帰 (CPC1 または 2) とし, 副次アウトカムを 1 ヶ月後の生存とした。

【結果】解析対象は 187,022 人で, 34,040 人 (18.2%) に対して人工呼吸ありの Conventional CPR が行われ, 152,982 人 (81.8%) に人工呼吸なしの Hands-only CPR が行われた。全体のうち, 1 ヶ月後に生存したのは 13,732 人 (7.3%) で, 神経学的転帰が良好であったのは 9,313 人 (5.0%) であった。交絡調整後の比較では, 有意差はないものの, Conventional CPR 群は Hands-only CPR 群に対し, 1 ヶ月後の神経学的良好生存率は僅かながら高かった (PS マッチング: RR 1.05 [95%CI 0.99-1.11])。1 ヶ月生存は, Conventional CPR 群で有意に高かった (PS マッチング: RR 1.05 [95%CI 1.00-1.11])。

【結論】院外心停止患者において, 人工呼吸ありの Conventional CPR は人工呼吸なしの Hands-only CPR に比べて, 1 ヶ月後の神経学的転帰良好生存が増加する傾向がみられた。

037

### 3次元的な臓器再生を目指した チューブ型組織モデルの造形

玉城 義仁 (学籍番号: 154108B)

指導教員: ○辻村 有紀<sup>1)</sup>, 山澤 建二<sup>2)</sup>, 横田 秀夫<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> 理化学研究所光量子工学研究センター技術基盤支援チーム<sup>3)</sup> 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

日本の臓器移植待機者は約14,000人いるが、移植を受けられるのは年間400人である。臓器不足の解決策として人為的に臓器をつくるのが考えられている。3次元的な臓器再生の研究においてオルガノイド(細胞凝集塊)の研究が進められてきたが、つくられた組織は数ミリ程度の大きさにとどまっている。

本研究では3Dプリンティング技術と温度応答性ゾルゲル転移材料を組み合わせることで、チューブ型組織モデルを造形した。課題として、チューブ型組織モデルの高さが約5ミリと小さいことがあった。

チューブ型組織モデル作成方法: PBSに溶かしたPluronic F127(温度応答性ゾルゲル転移材料)をシリンジに入れ、3Dプリンターにセットし鋳型を造形する。Pluronic F127は15℃以上でゾル化し、15℃以下でゲル化する。次に細胞培養用コラーゲン「セルマトリックス Type I-A」に架橋剤としてフィブリノゲンを加え、mCherry-NLS 定常発現 NIH 3T3細胞を混濁し鋳型に流し込む。細胞培養条件下(37℃, 5%CO<sub>2</sub>)でコラーゲンをゲル化したのち、氷冷培地をかけ、鋳型をゾル化し除去する。

鋳型造形過程において、すでに報告されている溶媒によるゾルゲル転移の違いおよび温度による粘度の変移と吐出圧の組み合わせを検討し、35℃, 0.085MPaを基本的な吐出条件とした。造形プログラムで1層の積層高さ(mm)を0.15, 0.16, 0.162, 0.163, 0.164, 0.165, 0.17, 0.2, 0.225, 0.25と検討した結果、0.163で最も高く造形できた。一晚培養後、共焦点レーザー顕微鏡カルツァイス LSM710で3次元的に細胞が生きている様子を観察できた。

今回の研究で鋳型の高さを5mm→9mmと改善できた。鋳型造形技術と細胞培養条件(コラーゲンゲルと架橋剤)の更なる検討により、作成できる組織モデルの自由度を高められると期待している。

038

### 中年女性の飲酒率とその要因に関する 生態学的研究

前原 陸 (学籍番号: 174113G)

指導教員: 花城 和彦, ○中村 幸志

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】本邦では健康志向の高まりにより、総じていえばアルコール消費量が減少傾向である。しかし、女性、特に中年女性の飲酒率の増加がしばしば問題として挙げられ、その原因について議論されているものの、原因を明らかにする研究はほとんど見あたらない。そこで、中年女性の飲酒率増加の原因候補として「女性の社会進出」、「リキュールの販売量」に注目し、これらと中年女性の飲酒率との関連について、官民の調査機関による既存調査結果を利用する生態学的研究を実施した。

【対象と方法】対象は30～59歳の女性とした。習慣的飲酒者の割合には厚生労働省の国民健康栄養調査を利用した。就業率は総務省の労働力調査および人口推計の結果、リキュールの販売量は国税庁の酒税調査の結果、好きなお酒はNHK放送文化研究所世論調査部「日本人の好きなもの」(2008年)とマイボイスコム株式会社のアンケート調査の結果を利用した。ExcelおよびJMP pro 15を用いて、データ解析を行った。

【結果】就業率(女性)と習慣的飲酒者割合(女性)はどちらも増加傾向にあり、両者には正の相関がみられた(相関係数: 0.55, p=0.0010)。また、リキュール販売量と習慣的飲酒者割合(女性)の間にも正の相関がみられた(相関係数: 0.58, p=0.0020)。さらに、好きなお酒に関して、2018年にはサワーがビールよりも好まれていた。

【考察・結論】今回の研究により、中年女性の社会進出と習慣的飲酒に有意な正の相関があること、近年では中年女性がリキュールをより好むようになり、リキュール販売量増加と合わせて考えると、女性での消費量が増加している可能性があり、習慣的飲酒との正の関連も示唆される。中年女性のアルコール対策として、職域での低リスク飲酒の啓発活動、健康診断受診勧奨、高リスク飲酒者への個別保健指導などの推進が重要であるとする。

039

### 病原性コレラ菌 (*Vibrio cholerae* O1 biotype ElTor) に対する紅麹菌由来 抽出物の抗菌活性の検討

佐久川 寛子 (学籍番号: 174104H)

指導教員: 比嘉 直美<sup>1)</sup>, ○山城 哲<sup>1)</sup>, 新垣 梨乃<sup>2)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院細菌学講座<sup>2)</sup> 同農学研究科修士課程1年次

【背景・目的】*Vibrio cholerae* はグラム陰性桿菌でO抗原による分類がなされており、O1又はO139群のうち、毒素産生性のものをコレラ菌と呼ぶ。一方、食用糸状菌である紅麹菌は有用微生物として知られ、古くから発酵食品等に用いられてきた。抗菌作用があるとの報告はあるが詳細は不明である。本研究では、紅麹菌抽出物がコレラ菌に対して抗菌活性を持つかどうかを検討した。

【方法】紅麹菌培養液の内、酢酸エチルおよびメタノールにて抽出した分画それぞれ11標品、合計22標品を検討した。被検菌としてコレラ菌 N16961 (*V. cholerae* O1 biotype El Tor) を用いた。抗菌活性の指標として、標品処理後のATPを測定する手法(BacTiter-Glo™ キット)および菌数計算法を用いた。コレラ菌数、標品とコレラ菌の反応時間を中心に、ATP測定試験の至適条件を検討した。22標品を対象にコントロール群に対する標品処理群のATP値の比を算出し、ATPを50%以上抑制する標品を選抜した。選抜した標品に関して菌数計算を行った。

【結果】ATP測定試験の至適条件は、コレラ菌数約10<sup>5</sup>CFU/mL、標品一菌反応時間6時間とした。全22標品の内、3標品(B-3-1-31, B-3-1-51, NBRC4502)がコントロールと比較してATPを63-75%抑制した。これらの標品は全て酢酸エチル抽出分画であった。選抜した3標品に関する菌数計算の結果、上記3標品の内2標品(B3-1-51, NBRC4502)にコントロールと比較してコロニー数の優位な低下が見られた。

【結論】紅麹菌抽出物のうち3標品がコレラ菌のATP産生を抑制すること、そのうち2標品がコレラ菌に対して有意な抗菌活性を有することが示された。しかし標品が示したATP抑制の割合と抗菌活性の程度との間には若干の乖離が見られた。

040

### 沖縄で肥満手術を受けた高度肥満の 日本人患者における、非アルコール性脂肪肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis) の有病率

多賀 智哉 (学籍番号: 174186B)

指導教員: ○青山 肇<sup>1)</sup>, 稲嶺 進<sup>2)</sup>, 吉見 直己<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座<sup>2)</sup> 大浜第一病院内視鏡外科部長

背景

NASHとは非アルコール性脂肪肝炎(non-alcoholic steatohepatitis)の略語であり、非アルコール性脂肪性肝疾患(non-alcoholic fatty liver disease: NAFLD)のうち肝機能障害を呈し、炎症細胞の浸潤や線維化を呈する進行性の疾患であり、その背景のひとつに肥満が指摘されている。今回は2014年の保険適応後の沖縄で減量手術を受けた高度肥満患者(大浜第一病院)において、NASH有病率や組織学的評価を行った。

対象と方法

肥満手術を受ける高度肥満患者の肝臓組織学的状態を調べるため、腹腔鏡での手術時に肝生検が行われた131症例を対象とした。肝生検の組織学的評価は、Brunt分類(壊死性炎症gradingや線維化staging)、DavidらによるNASスコア等を評価した。なお、大浜第一病院内臨床研究倫理委員会により承認を受けている。

結果

検討された131症例において、NAFLD有病率は73.3%(96人)およびNASH有病率は71.0%(93人)であった。NASH内の組織学的評価では、Brunt Grade 0/1/2/3はそれぞれ2/10/69/12、Brunt Stage 0/1/2/3/4はそれぞれ0/1/44/48/0であり、NASスコアの平均値は4.67であった。各組織評価の関連性としては、脂肪変性の度合いが33%より高くなるとballooning変性のスコアが高い傾向がグラフから見られた。

考察

先行研究での本土症例に比べ、沖縄のNASH患者では壊死性炎症や線維化が強いことから、食生活による悪影響の可能性が考えられた。また海外の研究と比較すると、日本人の高度肥満患者のNASH有病率や糖尿病患者の割合は高いようである。

041

## マイコバクテリア感染肺における IL-17A 産生細胞の分離法の最適化

山田 昇太 (学籍番号: 174156A)

指導教員: ○梅村 正幸<sup>1,2)</sup>, 高江洲 義一<sup>1,2)</sup>, 松崎 吾朗<sup>1,2)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学熱帯生物圏研究センター感染生物学部門分子感染防御学分野<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

近年、結核菌感染肺由来の T 細胞抗原レセプター (TcR)  $\gamma\delta$  T 細胞が結核菌体刺激により IL-17A 産生の増強を示すことが解ってきた。しかし、その産生増強メカニズムに関して不明瞭な点が多い。TcR  $\gamma\delta$  T 細胞を含む IL-17A 産生細胞の IL-17A 産生メカニズムを検討するためには IL-17A 産生細胞の高純度な分離精製が必要不可欠である。今回、結核菌感染肺より IL-17A 産生細胞を高純度で分離する方法の最適化を検討した。

C57BL/6 マウスに *Mycobacterium tuberculosis* variant BCG を気管挿管法により経気道感染させ、感染 5~7 日後の肺組織を採取した。自動組織分散・破碎装置 (gentleMACS)、パーコール密度勾配遠心法、自動磁気細胞分離装置 (AutoMACS) ならびに自動細胞分取分析装置 (BD FACSAriaII) を駆使して TcR  $\gamma\delta$  T 細胞の調整を試みた。まず感染肺からのリンパ球画分をパーコールにて分離したのちに BD FACSAriaII を用いて解析したところ、(Thy1.2<sup>+</sup>) TcR  $\beta^-$  の細胞集団が多く TcR  $\gamma\delta$  T 細胞の詳細な解析は困難であった。次に AutoMACS を用いて全 T 細胞を Thy1.2<sup>+</sup> 細胞として事前に調整したところ、非 T 細胞集団は除去された。さらに、非造血系細胞の混在が多くみられたことから、パーコール濃度を変えたところ (36% → 45/62.5%)、それらの混在問題も解消できた。最終的にソーティングした Thy1.2<sup>+</sup> TcR  $\beta^-$  細胞を抗 TcR  $\gamma\delta$  抗体で染色して確認したところ、自然免疫リンパ球様細胞 (ILC) が多く存在していた。今後、この方法で分離される 3 つの IL-17A 産生細胞候補である TcR  $\alpha\beta$  T 細胞、TcR  $\gamma\delta$  T 細胞および ILC について詳細な解析が可能になった。

043

## 整形外科領域における三次元モデル製作の実際

知念 佳奈 (学籍番号: 174144G)

指導教員: ○仲宗根 哲, 西田 康太郎

琉球大学大学院 整形外科学講座

【はじめに】近年、三次元造形技術による三次元モデルの需要が高まり、整形外科領域では術前の手術シミュレーションに応用されることがある。しかし、三次元空間に複雑な構造をプリントし、造形物にするためにはそれらを支えるサポート材の角度や積層のピッチによっては形状が保てない可能性がある。今回、複雑な構造を有する骨盤モデルを用いて三次元モデル製作における注意点を検討した。

【対象と方法】正常大骨盤モデル (sawbone 社, USA, Washington) を木製の固定台に固定し、CT 撮影を行った。得られた Dicom データからコンピュータ上で三次元骨盤モデルを 1/64 に縮小した。この骨盤モデルを三次元プリンターで製作する際にサポート材の角度 (10°, 40°, 80°) と積層ピッチ (0.1, 0.2, 0.35mm) を変化させて造形物作成における作業時間、重さ、表面の形状について検討した。

【結果】1/64 の骨盤モデルを 10 個作成した。作業時間は平均 5.1 時間であった。サポート材の角度を最小の 10° にすると土台が崩れ形状が保てなかった。サポート材を最大にし、0.1mm 積層ピッチで製作するとモデルの表面は綺麗であったが、作成時間は平均よりも 6.0 時間延長した。積層ピッチを変化させると表面は少し粗くなったが、作成時間は短くなった。

【考察】本研究では、サポート材を多くし、細かい積層ピッチだと質の高い造形物ができたが、作業時間は長くなった。実際には造形物のサポート材の除去に時間もかかり、完成するまではさらに時間を要した。整形外科手術の対象の大きさは、骨盤から手指の骨までさまざまである。三次元プリンターを応用する際は、製作したいレベルの造形物を考え、サポート材の量や積層ピッチを考える必要があると思われた。

042

## アルツハイマーモデルマウスでのんかん様応答と アルツハイマー治療薬及び エクササイズの効果について

大城 哲朗 (学籍番号: 174125A)

指導教員: 高木 博, 片桐 千秋, 西村 正彦, 上 薫, 宮城 安代,

宮城 智央, 石内 勝吾

琉球大学医学研究科, 琉球大学脳神経外科

【背景・目的】

アルツハイマー型認知症の患者の病理所見では、アミロイド  $\beta$  タンパク質 (A $\beta$ ) の蓄積が観察される。そのため、A $\beta$  の除去を目的とする治療方法が選択されてきたが、十分な治療成績が得られていない。そのため、当科では A $\beta$  の蓄積の前段階に疾患の原因があるのではないかと考え、先進的な研究を行ってきた。そして、アルツハイマーモデルのマウスの海馬において、AMPA 受容体の Ca 透過性が上昇しているのが確認された。さらに、memantine (アルツハイマー治療薬) 投与やエクササイズ負荷によってその透過性が抑えられるという治験が得られている。本研究では、アルツハイマー型認知症の患者ではてんかん発症のリスクが高まることから、両疾患とも AMPA 受容体の変異に原因があるのではないかと仮説を提唱し、本研究では認知症の治療薬として臨床の場で使われている memantine (メマリー) やエクササイズ負荷法によっててんかん発作が抑えられるかについて検討した。

【結果・考察】

アルツハイマー型認知症のモデルマウスに運動をさせたり、memantine を投与したりすることで、海馬体 (CA1 領域, CA3 領域, DG 領域) におけるてんかん様活動が有意に ( $p < 0.001$ ) 抑えられた。このことからアルツハイマー型認知症の患者に、運動療法を施したり、memantine を投与したりすることでてんかんの発症リスクを下げるができるのではないかと考えられた。

044

## 傍隔壁型肺気腫の気腫壁肥厚 : 米国 COPD Gene スタディデータを用いた 胸部 CT での評価および背景因子等との対比

伊禮 朱音 (学籍番号: 174204D)

指導教員: 山城 恒雄<sup>1)</sup>, Raul San Jose Estepar<sup>2)</sup>, 村山 貞之<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座<sup>2)</sup> Applied Chest Imaging Laboratory, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School

【目的】傍隔壁型肺気腫を有する患者において、胸部 CT にて気腫壁の肥厚がある患者と肥厚のない患者の違いを比較し検証する。

【方法】米国 COPD Gene スタディの登録患者 (全例が喫煙歴あり) のうち、胸部 CT にて傍隔壁型肺気腫の存在をソフトウェアが自動検出した症例をまず抽出した。それらの症例の胸部 CT を観察し、傍隔壁型肺気腫の気腫壁の肥厚の有無を判定した。気腫壁の肥厚群、非肥厚群の背景因子や臨床所見の差異を、カイ二乗検定及びマンホイットニー検定を用いて検証した。

【結果】傍隔壁型肺気腫の気腫壁肥厚群 (97 例) では、非肥厚群 (570 例) に比して有意に男性が多かった ( $p < 0.001$ )。また、肥厚群では非肥厚群に比して現在の喫煙者 (症例登録時点で禁煙していない者) がより多く見られた ( $p < 0.0001$ )。さらに、肥厚群では非肥厚群より全肺での肺気腫パーセンテージ ( $< -950$  Hounsfield Unit) が有意に低く ( $p < 0.0001$ )、1 秒量予測値が有意に高かった ( $p < 0.001$ )。

【結論】傍隔壁型肺気腫を有する患者においては、気腫壁の肥厚の有無で背景因子や臨床所見に差異があると考えられる。

045

## フローサイトメトリーを用いた ATL 患者由来腫瘍細胞における Program Death Ligand 1 と Human Leukocyte Antigen の発現解析系の構築

座 覇 理子 (学籍番号: 174189G)

指導教員: ○森島 聡子, 西 由希子, 玉城 啓太, 益崎 裕章  
琉球大学大学院医学研究科内分泌代謝・血液・膠原病内科学講座 (第二内科)

【背景】がん細胞に発現する Programmed Death Ligand 1 (PD-L1) は T 細胞の免疫応答を抑制する。Human Leukocyte Antigen (HLA) は T 細胞の免疫応答を誘導するために必須の分子であり、がん細胞における HLA の欠失や発現低下は免疫回避と関連する (McGranahan N et al. Cell. 2017)。難治性の血液がんである成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) では PD-L1 遺伝子 3'-untranslated region の構造異常などにより PD-L1 の発現増強が認められる (Kataoka K et al. Nature 2015)。本研究は、ATL 細胞における PD-L1 と HLA の発現様式が有用なバイオマーカーとなる可能性を検索するため、フローサイトメトリーで定量的に測定する系を構築した。【方法】ATL 急性型 11 例、慢性型 5 例の末梢血より単核細胞を分離し、蛍光色素で標識した抗 CD3, CD4, CD7, CADM-1, PD-L1, HLA class I, 抗体と反応させ、フローサイトメーターで解析した。CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD7<sup>-</sup>CADM-1<sup>+</sup>分画を ATL 細胞、CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>CD7<sup>+</sup>CADM1<sup>-</sup>分画を非 ATL 細胞として、両分画における HLA と PD-L1 の発現を比較した。ATL と非 ATL 細胞の平均蛍光強度 (MFI) の比を算出し、ATL 細胞における HLA の発現減弱を検討した。【結果】ATL 細胞における PD-L1 発現は急性型 2 例に認め、慢性型では認めなかった。急性型では ATL 細胞/非 ATL 細胞の MFI 比が 1 を境界に明確に二つのグループに分かれたこと、HLA class I 遺伝子異常を認めた症例はすべて MFI 比 < 1 となっていたこと (未発表データ) を踏まえ、MFI 比 < 1 を HLA 発現低下群に分類した。HLA class I の発現減弱は急性型で 5 例、慢性型で 1 例に認めた。【考察】ATL 患者由来腫瘍細胞における PD-L1 の発現と HLA の発現強度を定量化する評価系を確立することが出来た。HLA の発現減弱と PD-L1 発現の顕在化は急性型 ATL に多く認められ、病期の進行と関連する可能性が示唆された。二つの分子の発現様式が、ATL のバイオマーカーとして利用できる可能性がある。

046

## 転移性大腸がんにおける RHEB 過剰発現の影響

加藤 耕資 (学籍番号: 000000000)

指導教員: ○藤下 晃章<sup>1)</sup>, 青木 正博<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 愛知県がんセンター研究所がん病態生理学分野  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

本邦における大腸がんの罹患数は第一位となっており、特に他臓器への転移は患者の予後を大きく悪化させる要因となっている。大腸がんの転移に対する有効な治療法は未だ確立されていないことから、転移に関わる新たな治療標的分子の発見や治療方法の開発が必要とされている。mRNA の翻訳や細胞成長を調節する mTORC1 経路の活性化が大腸がんの発生から浸潤に関与することが報告されている。本研究では、mTORC1 経路の上流に位置する RHEB の過剰発現大腸がん細胞株を作成し、マウス脾臓肝転移モデルにより、RHEB が大腸がんの肝転移を促進するか検証を行った。in vitro において RHEB の過剰発現は大腸がん細胞株の mTORC1 経路を活性化させず、細胞増殖にも影響を与えなかった。また in vivo においても RHEB 過剰発現は大腸がん細胞の肝転移形成に影響を与えなかった。

047

## 新たな CAR-T 療法の開発 —免疫チェックポイント分子阻害を加えて—

久高 蓮 (学籍番号: 154171E)

指導教員: ○村上 明一, 塚原 成俊, 喜友名 しのぶ, 與那嶺 周平,  
岸本 英博  
琉球大学大学院医学系研究科寄生虫・免疫病因病態学講座

がんの 3 大療法は手術療法、化学療法、放射線療法であるが、近年第 4 の治療としてがん免疫療法が注目されている。その一つであるキメラ抗原受容体 T 細胞療法 (CAR-T 療法) は、患者の T 細胞表面に腫瘍特異性の高い CAR を発現させ再び患者の体内へ戻す治療法である。CAR-T 療法は難治性の造血器腫瘍において高い有効性が示されている一方、肺癌などの固形癌に対する治療成績は十分な効果が認められていない。その原因として、免疫チェックポイント分子 PD-1 による免疫抑制作用が挙げられる。PD-1 はリガンドである PD-L1/L2 と結合する事で T 細胞の免疫応答にブレーキをかける。これは自己炎症反応を抑制する仕組みとして非常に重要であるが、一部の腫瘍細胞は PD-L1/L2 を発現させて T 細胞からの攻撃を回避し、治療抵抗性を示す。よって CAR-T 療法をはじめとする免疫細胞療法の効果を高めるためにはオプジーボ等の免疫チェックポイント阻害薬が有効と考えられるが、過剰な免疫反応による副作用が問題となる。そこで本研究では PD-L1/L2 の両方に結合する二重特異性 B 細胞レセプター (BCR) 様分子を CAR と共発現させることで、免疫チェックポイントの阻害を行い且つ抗腫瘍効果を発揮できる CAR-T 細胞の作製を考えた。この BCR 様分子は低分子量で加工が容易なラクダ科由来の単ドメイン抗体 (VHH) を使用する事でより安定に阻害且つ二重特異性を発揮させるよう構築した。まず、抗 PD-L1/L2 抗体の VHH 遺伝子を、PCR 法を用いて 2 量体化した。その 2 量体化 VHH-Fc 融合タンパク質を HEK293T 細胞で強制発現させたところ、PD-L1/L2 への二重特異性を持つことが確認できた。そこで、細胞表面に提示できるよう細胞内ドメインを欠損させたヒト BCR を 2 量体化 VHH と融合したところ細胞表面への発現が確認できた。現在、CAR と当該分子を恒常的に発現する T 細胞株の樹立を進めており、CAR-T の作用が高まるか検討する予定である。

048

## スギ, ヒノキ, ブタクサ花粉由来抗原を用いた花粉症モデルマウスの作出

廣田 和佳 (学籍番号: 174174J)

指導教員: ○森田 直樹, 新藏 礼子  
東京大学定量生命科学研究所免疫・感染制御研究分野  
(琉球大学皮膚科高橋健造先生のご紹介で実習させていただきました)

【背景】花粉症は IgE 抗体が原因と考えられるが、根治治療法は未だ開発されていない。本邦においてはスギ, ヒノキ, ブタクサの 3 種の花粉由来抗原が花粉症の主たる原因として知られているが、それらの抗原を用いた花粉症モデルマウスの作成および検討は非常に限られている。これらの花粉由来抗原を用いたモデルマウスの作成は花粉症に対する新たな治療法の確立に大きく資するものと考えられ、分子レベルでの花粉症に対する新たな病態メカニズムの解明が期待される。【方法】BALB/c (5 ~ 6 週齢) マウスに花粉抗原をアラムアジュバントと共に腹腔注射し、花粉抗原に対する 2 型免疫応答を誘導した。免疫誘導後、花粉抗原を経鼻的に投与することで、鼻腔および気管支特異的な免疫応答を惹起した。経鼻的投与後における鼻かき行動とくしゃみ様反応の回数を数え、花粉症様の症状が誘導されているかを観察した。また肺胞洗浄液中の免疫細胞数を定量することで気管支部に浸潤する免疫細胞数を評価した。肺胞洗浄液中および血清中の総 IgE, IgG1, IgA 抗体濃度、それぞれの抗原特異的な抗体濃度を ELISA 法にて計測した。免疫細胞の肺組織中への浸潤を肺組織切片の観察により評価した。【結果】経鼻的な抗原投与後の鼻かき行動の回数はいずれの群も大差はなかったが、くしゃみ様反応はブタクサ抗原感作群で多く見られた。いずれの抗原感作群においても肺胞洗浄液中に免疫細胞の浸潤が確認された。コントロール群と比較して抗原感作群は肺胞洗浄液中および血清中における総 IgE および IgG1 濃度が上昇しており、2 型免疫応答の誘導が確認された。また花粉抗原特異的な抗体産生も確認された。肺組織切片の観察により抗原感作群では細胞の浸潤が見られた。【結論】3 種類の花粉抗原を用いた花粉症モデルの作出に成功した。とりわけブタクサ抗原は他の抗原と比較してより高い 2 型免疫応答の誘導能を持つことが明らかになった。

049

## 現代人の歯石 DNA による食物解析

上原 麗 (学籍番号: 164118C)

指導教員: ○澤藤 りかい, 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

歯石とは、歯の表面に付着した歯垢が唾液中のミネラルと結合し、石灰化したものである。近年、古代人の歯石から抽出した DNA を用いて、摂取した食物を解析することが可能となった。しかし、予備的研究がまだ十分には行われておらず、解析の精度が不透明な状況である。古代人と異なり、現代人は被験者本人から摂取した食物の情報を得ることができるため、歯石を解析することで摂取した食物を再現しうるのか調査ができる。本研究では、歯石 DNA を用いた食物解析の技術的精度と限界を明らかにするために、24 人の現代人から採取した歯石から DNA を抽出し、植物を対象として食物解析を行った。PCR 増幅は、葉緑体の *trnL* 遺伝子配列をターゲットとしてアダプター配列を付加したプライマーを設計し、2-step PCR で行った。イルミナ社 MiSeq よりシーケンスを行い、歯石に含まれる植物の DNA 配列を Blastn および MEGAN を用いて分類した。解析の結果、多くの被験者からイネ科やコムギ上連などの穀物の DNA 配列が検出された。イネ科の配列が検出されなかったサンプルの多くは、解析された総リード数が少ないサンプルであることも分かった。また、マメ科、キャベツなどが含まれるアブラナ科、キュウリやカボチャなどが含まれるウリ科の配列もほとんどの被験者から検出された。しかしながら、解析結果を被験者から得た日常的に摂取する食物に関するアンケートの回答と照らし合わせたところ、相関関係を見出すことはできなかった。本研究では、多くの植物分類群が検出されたが、ターゲット配列が短すぎることやデータベースの情報不足などの理由により、種や属のレベルまで分類を絞り込むことができなかった。今後データベースの充実や手法の改良を重ねることにより、より解析の精度を高めていく必要がある。

051

## ゼブラフィッシュによるリボソームタンパク質 S19 のリン酸化を介した赤血球造血機構の解析

栗國 結愛 (学籍番号: 174137D)

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

ダイヤモンド・ブラックファン貧血は、赤血球造血が特に障害される先天性疾患である。患者の約 25% でリボソームタンパク質遺伝子 RPS19 の変異が見出され、特に 52 番目から 62 番目のアミノ酸配列領域の変異が高頻度に報告されている。生化学講座では *in vitro* での解析により、59 番目のセリン残基 (Ser59) がリン酸化を受けやすいことを見出した。さらにゼブラフィッシュを用いた個体レベルでの解析により、Ser59 の可逆的なリン酸化が赤血球造血に重要であることが明らかになった。

今回、*rps19* のリン酸化の赤血球造血に対する影響をより詳細に調べるため、赤血球特異的に発現する *gata1* プロモーターの下流に *mRFP* 遺伝子を接続した遺伝子改変ゼブラフィッシュを用いた解析を試みた。まず、セルソーターを使って受精後 22 時間胚から *mRFP* 陽性細胞を分取した。赤血球特異的に発現する *gata1*, *hbbe1*, *hbbe3* の 3 遺伝子は、分取した *mRFP* 陽性細胞にのみ発現していた。さらに、*rps19* を標的としたモルフォリノアンチオリゴを受精卵に注入すると、*mRFP* 陽性細胞では *rps19* に加えて、*gata1*, *hbbe1*, *hbbe3* の発現量が減少した。次に、*in vitro* 合成した *rps19* の mRNA によってレスキュー実験を行うと、Ser59 をアスパラギン酸残基に置換したレスキュー胚の *mRFP* 陽性細胞では、*rps19* 発現量は正常胚の約 9 割まで回復した。しかし、*hbbe1* と *hbbe3* の回復は約 6 割にとどまったことから、*rps19* のリン酸化状態が赤血球細胞レベルにおいて造血に影響を及ぼすことが示唆された。興味深いことに、*mRFP* 陽性細胞と胚全体では、他の因子においても発現パターンが異なっていた。今後は、*rps19* のリン酸化が関与する造血機構について、さらに解析を進めていく予定である。

050

## マイコバクテリア感染肺における IL-17A 産生細胞集団の同定

眞壁 知花 (学籍番号: 174198F)

指導教員: ○梅村 正幸<sup>1,2)</sup>, 高江洲 義一<sup>1,2)</sup>, 松崎 吾朗<sup>1,2)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学熱帯生物圏研究センター感染生物学部門分子感染防御学分野  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

多くの細胞外寄生性細菌は炎症誘導性サイトカイン interleukin (IL) -17A によって誘導される好中球により速やかに排除される。一方、結核菌を含む細胞内寄生性細菌感染に対しても重要な役割を果たしていることが報告されているが、その防御機構に関しては不明瞭な点が多い。これまで我々はマイコバクテリアのマウス肺感染モデルを用いて、主な IL-17A 産生細胞は T 細胞抗原レセプター (TCR) の V 領域遺伝子 V $\gamma$ 4 あるいは V $\gamma$ 6 を発現した TCR  $\gamma\delta$  T 細胞であることを報告してきた。その IL-17A 産生 TCR  $\gamma\delta$  T 細胞の防御能を調べる目的で TCR V $\gamma$ 4/6 遺伝子欠損 (KO) マウスに結核菌を感染させ生存率を観察したところ、野生型マウスと有意な差がないことが明らかになった。そこで本研究では、マイコバクテリア感染において誘導される TCR  $\gamma\delta$  T 細胞以外の IL-17A 産生細胞の表現型を明確にするるとともに、その感染防御における役割について考察した。

マイコバクテリア感染肺に誘導される IL-17A 産生細胞として、TCR  $\gamma\delta$  T 細胞が最大の集団であり、またその IL-17A の発現レベルも高いため、個々の細胞の IL-17A 産生量も多いと考えられた。一方、IL-17A の陽性率と発現レベルは低いが、TCR  $\alpha\beta$  T 細胞、3 型リンパ球様細胞 (ILC3) にも、明瞭な IL-17A 産生が認められた。このうち、TCR  $\alpha\beta$  T 細胞の IL-17A 産生は、マイコバクテリア抗原刺激で増強しないことから、病原体抗原特異的 Th17 細胞ではなく、自律的に分化する naturally occurring (n) Th17 細胞と推定された。以上の結果から、マイコバクテリア感染における TCR  $\gamma\delta$  T 細胞以外の IL-17A 産生細胞が nTh17 細胞と NKp46<sup>+</sup> ILC3 であることが明らかになり、これらの IL-17A 産生細胞集団も感染防御に一定の役割を担うものと推定された。今後、それらの細胞の感染防御における役割についてより詳細な検討を進めていく必要がある。

052

## 胚芽異形成性神経上皮腫瘍 (DNT) における てんかん源生に関する病理学的考察

波平 息吹 (学籍番号: 174136F)

指導教員: ○菅原 健一, 外間 洋平, 長嶺 英樹, 上 薫, 宮城 安代,  
○石内 勝吾  
琉球大学医学研究科琉球大学脳神経外科

【背景・目的】

胚芽異形成性神経上皮腫瘍 (DNT; dysembryoplastic neuroepithelial tumor) は全例で難治性のものでんかんにより発症する良性的膠細胞性神経細胞腫瘍である。病理学的には OLC (oligodendroglia like cell), floating neuron を特徴とし、これらは neuron progenitor 由来と言われているが未だに controversial である。また、先行研究により、動物実験においてイオン型グルタミン酸受容体の GluR2 受容体の未編集型・変異型 (RNA 編集) ではカルシウム透過性を示すようになり、このことがてんかんや脳虚血に関わることと、その編集には ADAR2 が関わっていることが知られている。本研究では以下の 2 つについて考察した。1. 免疫染色を用いて、OLC, floating neuron の由来を考察する。2. dipole 解析によりてんかん発作の焦点を特定し、その Q/R 編集解析により未編集型 GluR2 受容体の偏在を調べ、その結果を踏まえて、てんかん源生の原因細胞を特定した。

【結果・考察】

- 免疫染色の結果、OLC はグリア系マーカーである Olig2 陽性、floating neuron は非神経細胞で発現する REST 陽性となり、本症においては、グリア系の性格を持っていることが分かった。
- dipole 解析の結果、てんかん発作の焦点は内側腫瘍にあり、Q/R 編集の結果からも内側腫瘍において著明に未編集型の Q/R 部位が多いことから、てんかんの焦点は内側腫瘍であり、ADAR2, GluR2 が floating neuron で陽性となっていたことから、てんかん源生の原因細胞は、floating neuron であると考えられた。



053

20歳未満の統合失調症関連障害患者において、  
顕在発症に関わる精神病症状

田代 凌大 (学籍番号: 174105F)  
指導教員: ○石橋 孝勇, 近藤 毅  
琉球大学大学院医学研究科精神神経医学講座

【目的】思春期は、精神病性障害を含む多彩な精神疾患の好発時期である。特に、統合失調症は、顕在発症前の早期介入の重要性が示唆されている。本邦では、中安が初期統合失調症の概念を提唱し、自身体験、気づき亢進、緊迫困感気分ないし対他緊張を、診断に有用な高頻度初期統合失調症症状として、その診断についての相関を見出している。本研究では思春期における精神病症状と顕在発症との関連について検討する。

【方法】2012年1月から2017年12月までの6年間に琉球大学附属病院を受診した20歳未満の患者の内、診療録より以下の語(統合失調症・精神病・At risk mental state・精神病様症状体験)を含む症例を抽出した。該当した45例の患者の臨床背景、初診時所見、顕在発症について分析した。特に精神症状について、「自身体験」「気づき亢進」「緊迫困感気分ないし対他緊張とその関連症状」と合致する症状の有無についてフィッシャーの正確性検定とマンホイットニーのU検定、ロジスティック回帰分析を行った。

【結果】性別は、男性16名、女性49名、初診時年齢は平均14.03歳であった。患者背景において、顕在発症と関連を示したものはなかった。高頻度初期統合失調症症状の内、明確に顕在発症との関連を示したのは「緊迫困感気分ないし対他緊張」のみであり、「自身体験」と「気づき亢進」は顕在発症との関連を示さなかった。

【結論】本研究の結果では、20歳未満の患者45例について、統合失調症の顕在発症への影響について、高頻度初期統合失調症症状の内、「緊迫困感気分ないし対他緊張」のみが相関を示した。初診時において「緊迫困感気分ないし対他緊張」を有する場合、顕在発症はオッズ比5倍であるため、顕在発症リスクを予測するのに有用であると思われる。

054

フッ化ピリミジン系抗がん剤のチトクローム  
P450 遺伝子発現量に対する影響の検討

玉城 優里華 (学籍番号: 144197D)  
指導教員: 福永 航也<sup>1)</sup>, 薮田 泰誠<sup>1)</sup>, 中村 克徳<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 国立研究開発法人理化学研究所生命医科学研究センターファーマコゲノミクス研究チーム  
<sup>2)</sup> 琉球大学医学部附属病院薬剤科, 琉球大学大学院医学研究科薬物治療学講座

【背景と目的】

フッ化ピリミジン系抗がん剤との併用により、抗凝固薬ワルファリンや抗てんかん薬フェニトインの血中薬物濃度が上昇した結果、出血や嘔吐やふらつき等が問題となっている。そのメカニズムとしてチトクロームP450(CYP)2C9の発現量の低下が原因である事が示唆されているが、メカニズムは明らかになっていない。本研究では5-フルオロウラシル(5-FU)の主要な薬物動態関連遺伝子のmRNA発現量に対する影響を明らかにすることを目的とする。

【方法】

ヒト肝臓由来細胞株であるHepG2細胞とHepaRG細胞のRNA-Seqを行い、薬物代謝酵素関連遺伝子のmRNA発現量を調べた。HepaRG細胞に5-FU(0.1, 1, 10 µg/mL)を96時間曝露した。陽性対照としてCYP3A4誘導剤リファンピシン(RIF)を用いた。各細胞からtotal RNAを抽出し、qRT-PCRを用いてmRNA発現量を測定した。

【結果と考察】

RNA-Seq解析の結果、HepG2細胞には主要な薬物代謝酵素がほとんど発現していなかったがHepaRG細胞には発現していることが判明した。そこで、以後の試験にはHepaRG細胞を使用し、また、完全長cDNAが検出された10遺伝子を測定対象とした。RIFに96時間曝露した場合、CYP3A4のmRNA発現量は264.5%に増加した。10 µg/mLの5-FUに96時間曝露した場合、CYP2C9のmRNA発現量は変化しなかったが、種々のCYPやP-glycoproteinの発現を誘導する転写因子として知られているNR112(PXR)のmRNA発現量が32.1~42.8%に減少した。5-FUによりNR112発現量が減少したことより、さらに長時間の5-FU曝露によってCYP2C9の発現量も減少する可能性が示唆された。また、CYP2B6やCYP3A4で代謝される薬物と5-FUとの相互作用の可能性が示唆された。

055

小児院外心停止における通信指令員による  
バイスタンダー CPR の口頭指導についての検討

明石 光太郎 (学籍番号: 174181B)  
指導教員: ○福田 龍将  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【背景】小児の院外心停止(OHCA)において、心肺蘇生術(CPR)の実施の有無が患者の予後にどう関係しているのだろうか。

成人においては、現在では胸骨圧迫のみのCPR(Compression Only CPR: COCPR)が推奨されており、従来行われていたCPR(胸骨圧迫と人工呼吸を30:2)よりも転帰が良好にある傾向が示されている。その中で、通信指令員による口頭指導のあるバイスタンダーCPR(Dispatcher assisted CPR: DACPR)と口頭指導のないバイスタンダーCPRの転帰比較の研究も数多く行われている。しかし、推奨されているCPRの方法が異なる小児(幼児では片手のCPR、乳児では二本指のCPR)における上記の比較検討は少ない。

【目的】小児院外心停止において、バイスタンダーCPRにおける通信指令員による口頭指導の有無と転帰の関係を検討することを目的とした。

【方法】総務省消防庁の救急蘇生統計データを用い、2011年1月から2017年12月に日本で発した小児院外心停止を対象に、全国規模の集団ベース後ろ向きコホート研究を行った。0歳から18歳未満を対象とした。DACPRありとDACPRなしの転帰の比較には、1:1マッチングによるPropensity Score(PS)法を用いた。主要評価項目を心停止から1か月後の生存と神経学的転帰(CPC1から5)とした。

【結果】解析対象者は4901人で、4088人(83.4%)にDACPRが行われ、813人(16.6%)でDACPRはなかった。4088人中2596人で通報からCPRの一回目の圧迫が2分未満で行われたが、1か月生存率は17%(695人)であり、1か月後の神経学的転帰が良好(CPC1, 2)であったのは370人(9.1%)であった。交絡調整後の比較では、DACPRあり群とDACPRなし群における1か月生存率と1か月後の神経学的転帰良好率に有意差は見られなかった(PSマッチング: P=0.1821とP=0.1411(有意水準0.05))。

【結論】小児OHCAにおいて、DACPRの有無と1か月生存および1か月後の神経学的転帰に関連は見られなかった。

056

胎盤で特異的に発現するヒト内在性  
レトロウイルスのプロモーターの解析

大庭 千穂 (学籍番号: 174140D)  
指導教員: ○小田 高也  
琉球大学大学院医学研究科ゲノム医学講座

【背景・目的】

ヒトDNAの2%は蛋白をコードする遺伝子だとされ、また8%はレトロウイルス様の配列を持つDNAであることがわかっている。これらの配列はヒト内在性レトロウイルス(HERV: Human Endogenous RetroVirus)と呼ばれ、祖先の生殖細胞に入り込み、今はゲノムの一部となっている。本研究では、ヒト胎盤に特異的に発現しているHERV-HML6-c14のプロモーター領域の解析を目的とした。

【方法】

HERV-HML6-c14の転写開始点から上流約1.5kbをPCRで増幅し、ルシフェラーゼ遺伝子の5'に挿入した上で、絨毛癌由来の細胞株BeWoに導入した。種類の異なるルシフェラーゼを同時に導入して、補正に使用した。

【結果】

HERV-HML6-c14に隣接する上流約1.2kbのゲノム配列は、プロモーター活性を有することが明らかとなった。この領域には、GATAやCREといった主要な転写因子の結合部位に加え、他のHERVであるSyncytinのBeWoでの発現に強く関与するGCMa/1の結合部位も予測された。

【考察】

-1,083(±4nt)のGCMa/1の結合部位が、BeWoでのHERV-HML6-c14の転写活性におよぼす影響を調べるために作成した欠損コンストラクトでは、 $p=0.0382$ の有意差で活性が低下していた。更なる検証には結合部位のみを欠損させたコンストラクトを用いることや、GCMa/1の強制発現下での転写活性を調べる必要がある。

057

電子タバコと喘息の関連についての  
システマティックレビュー

砂川 大輔 (学籍番号: 174159E)  
指導教員: 花城 和彦, ○中村 幸志  
琉球大学大学院医学研究科衛生学・公衆衛生学講座

【背景】2020年4月より改正健康増進法が全面施行されることになり益々禁煙の意識が高まっている。一方、一般的に紙巻きタバコよりも健康影響が少ないと認識されている加熱式タバコ (iQOS, glo など) や電子タバコ (ベイブ) が売り上げを徐々に伸ばしている。

【目的】電子タバコの使用と喘息の罹患に関連性があるのか否かを調べた。  
【方法】PubMed や医中誌のオンライン検索によるシステマティックレビューを行った。PubMed では ((asthma) OR "Respiratory Sounds" [Mesh]) OR Wheezing AND ((e-cigarettes) OR "Electronic Nicotine Delivery Systems" [Mesh]) で検索し、73 件を抽出した。医中誌では (電子タバコ/TH or 電子タバコ/AL) and ((喘息/TH or 喘息/AL) or (呼吸音/TH or 喘鳴/AL) or (気管支炎/TH or 気管支炎/AL)) で検索し、5 件を抽出した。計 78 件のタイトル、抄録および本文を吟味し、目的に該当すると判断した 9 件の論文を精査した。

【結果】電子タバコの使用と喘息の罹患に関連があった論文が 7 件、関連がなかった論文が 2 件であった。電子タバコの利用者では、非喫煙者との比較では喘息などによる呼吸器症状出現のオッズ比が高かったが、紙巻タバコ喫煙者との比較ではオッズ比は小さかった。

【考察・結論】概ね、電子タバコ使用と喘息罹患には関連があった。関連がなかった論文ではいずれも紙巻タバコの使用を考慮しなかったため、電子タバコ非利用者に紙巻タバコ使用者が含まれたことで電子タバコ非利用者の喘息罹患リスクが高かったからであると考えられた。また、日本からの研究報告は 1 つもなかった。日本と海外では電子タバコの成分が異なるので、日本からの研究報告が待たれる。

058

次世代シーケンサーを用いた  
フィラグリン遺伝子変異の解および  
皮膚形質との関連解析

知念 春佳 (学籍番号: 174171D)  
指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇  
琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

【目的・背景】本研究では、フィラグリン遺伝子配列のリシーケンシング解析を行い、フィラグリンに関する新たな遺伝子変異の同定とその皮膚形質との関連を調べることを目的とした。

【方法】研究参加に同意を得られた 249 人を対象とした。被験者から皮膚形質 (皮膚の水分量, 油分量, ポルフィリン量, 皮膚色) について計測を行い、DNA 抽出のために唾液を、また、皮膚細菌叢解析のために額、鼻脇、腕および胸部から綿棒を用いて皮膚のスワブを採取した。唾液から得た DNA よりフィラグリン遺伝子の Long PCR amplicon を増幅し、Nextera kit を用いてライブラリーを作成、次世代シーケンシングを行った。得られたデータから In silico 解析によりフィラグリン遺伝子上の SNP を検出した。皮膚スワブから抽出した DNA は 16S rRNA の PCR amplicon に基づいて細菌叢解析を行った。測定した各項目を目的変数とし、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。

【結果】フィラグリン遺伝子上に 72 個の SNP (MAF>0.05) を確認した。これらの SNP と皮膚形質との関連解析の結果、ひとつの SNP が腕の油分量と、また別の SNP が上腕の皮膚の赤みと有意に関連することが示された。さらに、3 つの SNP が鼻翼における特定の細菌の割合と関連することも示された。

【考察】解析結果より、フィラグリンにおいて 5 つの SNP が皮膚形質や細菌叢中の細菌の割合と関連することが示された。ヨーロッパ人でみられるフィラグリン機能損失多型である rs61816761 (R501X) や rs558269317 (2282del4) は、日本人を対象とした今回の研究では観察されなかった。今後は、本研究で皮膚形質との関連が示された SNP が、どのような機能的変化を及ぼすのか調べる必要がある。

059

マイコバクテリア感染肺由来 T 細胞の  
抗原特異的 IL-17A 産生メカニズムの解明

与那覇 碩輝 (学籍番号: 174205B)  
指導教員: ○梅村 正幸<sup>1,2)</sup>, 高江洲 義一<sup>1,2)</sup>, 松崎 吾朗<sup>1,2)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学熱帯生物圏研究センター感染生物学部門分子感染防御学分野  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

結核菌感染における免疫応答では、IFN- $\gamma$ 産生を主体とする Th1 細胞が最も重要な役割を担っていることが知られている一方で、炎症性サイトカインである interleukin (IL) -17A が結核菌感染防御においても重要である。近年、我々は結核菌感染組織由来の TcR  $\gamma\delta$  T 細胞が抗原特異的な刺激において IL-17A 産生を増強することを見出している。しかしながら、その産生増強メカニズムは未だ不明瞭な点が多い。本研究では、結核菌感染肺由来 T 細胞がどのような機序により IL-17A を産生誘導するのか検討した。

*Mycobacterium tuberculosis* variant BCG (BCG) 感染肺において IL-17A 産生 T 細胞が認められ、結核菌精製抗原 (PPD) との共培養により IL-17A 産生の顕著な増強がみられた。事前研究で肺リンパ球と抗原提示細胞 (APC) の非接触型共培養の条件下においても、PPD 刺激により IL-17A の産生増強が認められていた。これに関与する培養上清中の液性因子を調べるために IL-1 $\beta$  および IL-23 を抗体で中和したところ、IL-17A 産生は著しく減少した。また、この IL-17A 産生誘導には IL-23 は必須ではないことが IL-23p19 遺伝子欠損マウスを用いた解析から示唆された。このことから、BCG 感染において T 細胞が PPD に反応して IL-17A を産生するのは、IL-1 $\beta$  が必須であることが示唆された。一方で、抗原提示細胞を除いた肺リンパ球に直接 PPD を加えた培養系においても IL-17A 産生の増強が認められ、肺リンパ球の抗原レセプターまたはパターン認識受容体 (PRR) からの直接的なシグナル伝達が IL-17A 産生を誘導する可能性も認められた。

060

ATL 関連抗原 - CADM1 - に対する  
新規モノクローナル抗体作製の試み

當山 晃平 (学籍番号: 174109J)  
指導教員: ○高橋 良明, 水口 真理子, 田中 礼子, 田中 勇悦  
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

CADM1 (Cell Adhesion Molecule 1) は免疫グロブリンスーパーファミリーに属する細胞間接着分子であり、非小細胞肺癌や上皮の多くの癌では癌抑制に働くが、成人 T 細胞白血病 (ATL) の CD4 陽性 T リンパ球では病期の進行に伴い発現の上昇が見られる。本研究では診断や治療に応用可能な CADM1 に対する新規モノクローナル抗体の作製を試みた。

組換え CADM1 タンパクを免疫したラット脾細胞からハイブリドーマを複製し、フローサイトメトリー (FCM), ELISA, ウェスタンブロット (WB) により候補抗体のスクリーニングを行った。陽性を示したハイブリドーマをクローニングしヌードマウスに移植、得られた腹水から精製した抗体を FITC 標識し、CADM1 陽性・陰性細胞株を使って染色して FCM 解析を行った。FCM スクリーニングの結果、ハイブリドーマ・クローン X と Y が選択され、それぞれ強陽性と弱陽性を示した。そのうちクローン Y は ELISA, WB のどちらにも特異的反応を見せなかった。確認 FCM 試験においてクローン X は、CADM1 陽性細胞株に特異的に反応することを示唆した。1,660 のハイブリドーマのうち目的の抗体を産生すると考えられるのはクローン X のみだった。今回免疫に使用した大腸菌由来タンパクがナチュラルなヒト型と異なっていた可能性があることから、今後はよりヒト型の CADM1 に近い抗原で検討したい。クローン Y は ELISA にて反応を示さなかった事から、FCM の弱陽性反応は非特異的反応だと考えられる。また、クローン X と Y が WB で特異的バンドを確認できなかったのは、得られた抗体が抗原の立体構造を認識する抗体であるからだと考えられる。今後、クローン X の詳細な認識エピトープ解析や ADCC 活性の検討が必要である。クローン X 抗体は臨床診断への活用や、ヒト化により治療への応用も期待される。

061

## アルツハイマー病モデルマウスの海馬体での AMPA 受容体の Ca 透過性の上昇について

大城 悠渡 (学籍番号: 174157J)

指導教員: 高木 博, 片桐 千秋, 西村 正彦, 上 薫, 宮城 安代, 石内 勝吾

琉球大学医学研究科, 琉球大学脳神経外科

【目的】当科の先行研究で正常なマウスの脳に比べアルツハイマー型のマウスの海馬体で AMPA 受容体の Ca 透過性が上がった点に特に着目し, 追試験を行い, NLGF モデル (アルツハイマー型) のマウスに対して, 認知症の治療に用いられる, 運動 (エクササイズ) 負荷, メマンチン投与, 運動 (エクササイズ) 負荷+メマンチン投与を行なったマウスを用意し, それぞれの動物から海馬スライスを作製し共焦点顕微鏡で観察し AMPA 受容体の Ca 透過性が抑えられているかについて Ca 蛍光色素 (Fluo3) を使って調べ, 認知機能の低下と AMPA 受容体の Ca 透過性の上昇との関連を調べるところを目指した。

【方法】マウスを control 群, mema 群, exe 群, mema+exe 群に分け, それぞれの群のマウスの海馬切片 (400 ミクロン) を取り出し, Ca イメージングを行なった。

【結果】海馬体の各領域において AMPA 受容体による Ca 濃度上昇について, control 群と比較すると (片側 t 検定), exe 群が CA3・DG 領域で, mema 群が CA1 領域で, mema+exe 群が DG 領域において有意な減少が見られた。

【考察】認知症の一つであるアルツハイマー病のモデルマウス NLGF の海馬体では AMPA 受容体の Ca 透過性が野生種に比べて大きく上昇することが確認された。今回の実験でアルツハイマーモデル (NLGF) のマウスの海馬では Ca の透過性が上昇し, 認知症の治療法である運動療法, メマンチン投与によって Ca の透過性が抑えられる傾向にあった。しかし, NL マウスの同様の実験の結果と比較すると, 有意に抑えられていないように思えた。今後はその原因を追求したいことに加え, AMPA 受容体の拮抗薬である Fycompa をモデル動物に投与して認知症が改善されるか検討したい。

062

## 口腔扁平上皮癌患者における $^{18}\text{F}$ -FDG PET の腫瘍代謝因子を用いた予後予測

亀山 南奈 (学籍番号: 174179K)

指導教員: 〇加藤 大貴<sup>1)</sup>, 仲宗根 敏幸<sup>2)</sup>, 中村 博幸<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科顎顔面口腔再建学講座<sup>2)</sup> 琉球大学病院歯科口腔外科

【緒言】口腔癌診療において  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT 検査はおもに頸部リンパ節転移, 遠隔転移の評価に用いられている。近年, 原発腫瘍の評価にもその有用性が報告されるようになってきた。しかし,  $^{18}\text{F}$ -FDG/CT による予後予測に関する研究は少なく, 特に原発巣を評価した予後予測に関する研究は少ない。そこで今回, Imaging Biomarker としての  $^{18}\text{F}$ -FDG/CT の予後予測に有用な parameter を明らかにするために検討を行った。

【対象・方法】2013年3月から2019年6月までに琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科 (以下, 当科) で標準的治療を行った口腔扁平上皮癌一次症例 157 例を対象とした。予後予測因子の parameter と性別, TNM 分類, YK 分類, SUVmax, SUVmean, Metabolic tumor volume (MTV), Total lesion glycolysis (TLG), とし, 予後評価は, 全生存率 (OS), 無病生存率 (DFS) を用いた。ROC 曲線解析にて各々の parameter の Cutoff value を算出し, OS, DFS を Kaplan-Meier 法を用いて算出し, Log-rank 検定を行った。多変量解析には Cox 比例ハザードモデルで解析した。

【結果】OS, DFS とともに, 高い SUVmax, TLG を示した患者では予後不良であった。SUVmax, TLG での患者の生死を評価するカットオフ値ではともに有意差が見られた。特に, SUVmax では大きな有意差が出た。

また, SUVmax での転移, 再発を評価するカットオフ値では OS, DFS とともに有意差は見られなかったが, TLG ではともに有意差が見られた。

【結語】口腔扁平上皮癌の原発巣の評価において,  $^{18}\text{F}$ -FDG PET/CT の予後予測因子 parameter として, SUVmax, TLG が有用と思われた。

063

## 古典的ホジキンリンパ腫における PLAA の発現異常に関する分子生物学的検討

照屋 貴寛 (学籍番号: 164125F)

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

脂質は生体膜としてのほたけのみならず, シグナル伝達にも関与し, 細胞機能に多彩な影響を及ぼす。先行研究において, 質量顕微鏡を用いて古典的ホジキンリンパ腫 (classical Hodgkin lymphoma: 以下 cHL) を解析したところ, Reed-Sternberg 細胞 (以下 HRS 細胞) においてリン脂質の一種である Phosphatidyl Inositol (以下 PI) に異常をきたしていることを突き止めた。さらに詳細な検討の結果, cHL 組織において PI の生化学的経路に関与する  $\text{PLA}_2$  activating protein (以下 PLAA) の相対的な発現低下が確認できた。

PLAA は子宮頸がん細胞株において, 薬剤により誘導されるアポトーシスを介在し, 感受性を向上させるとの報告もある。一方, cHL には大型の HRS 細胞が少量散在性に増殖するという組織学的特徴がある。そこで, cHL の特徴的な組織像と PLAA の関連性を検討するため, PLAA をノックダウンした cHL 細胞株及び過剰発現させた cHL 細胞株を培養し, 細胞増殖, 抗がん剤ドキシソルピシン (以下 Dox) による細胞死誘導への感受性を分子生物学的手法を用いて解析し, 細胞形態に与える影響をフローサイトメトリーを用いて観察した。観察の結果, PLAA の発現量は 1) 細胞増殖と正に相関し, 2) Dox による細胞死誘導と正に相関し, 3) 細胞の大きさと負に相関している傾向が見られた。cHL では大型の HRS 細胞が少量散在性に増殖する組織型を呈するが, 1) 及び 3) から PLAA の発現低下がこの特徴的なパターンに関与している可能性が考えられる。2) について, PLAA の発現低下は, 腫瘍の生存に有利にはたかっている可能性があり, 薬剤耐性にも関与している可能性が考えられる。また PLAA を薬剤と同時に投与することにより薬剤感受性を高めるという新たな治療法が cHL に対して奏功する可能性も考えられる。

064

## 新規シナプスタンパク質 A の解析

吉田 智史 (学籍番号: 174172B)

指導教員: 〇貝塚 剛志<sup>1)</sup>, 内匠 透<sup>1)</sup>, 2), 高橋 健造<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 理化学研究所脳神経科学研究センター精神生物学研究チーム<sup>2)</sup> 神戸大学大学院医学研究科<sup>3)</sup> 琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

【背景と目的】樹状突起スパインに存在するシナプス後肥厚 (postsynaptic density; PSD) はシナプス伝達を行うタンパク質が集積したタンパク質複合体である。当研究室での先行研究において, PSD に含まれるタンパク質を同定したデータセットのメタ分析を行った所, 度々同定されているがその機能はほとんど解明されていないタンパク質 A が見つかった。さらに, タンパク質 A は樹状突起スパインに局在し, 液滴状構造を形成する液-液相分離をすることがわかった。そこで, タンパク質 A と同様に液-液相分離をする RNA 結合タンパク質の TLS/FUS (translated in liposarcoma/ fused in sarcoma) と FMRP (fragile X mental retardation protein) との関係に着目した。

【方法と結果】Human Embryonic Kidney cells 293T (HEK293T) に蛍光タンパク質を付けたタンパク質 A と FUS, またはタンパク質 A と FMRP を遺伝子導入し, 共焦点レーザー走査型顕微鏡 (FV3000) で観察したところ, タンパク質 A の液滴は FUS, FMRP の液滴と接して存在していた。次に, タンパク質間相互作用をみるため, FLAG と GFP でタグ付けしたタンパク質 A と FUS, FMRP を抗 FLAG 抗体で免疫沈降した。ウェスタンブロッティングによって免疫沈降したタンパク質を確認したが, FUS と FMRP のいずれも免疫沈降されていなかった。最後に, タンパク質 A を HEK293T に遺伝子導入し, 臭化エチジウムで細胞内の RNA を染色した。FV3000 での観察では, 一部のタンパク質 A の液滴が RNA を含む液滴と共局在していた。

【考察】以上の結果はタンパク質 A が PSD において RNA の貯蔵や輸送に関与している可能性及び FUS と FMRP と共同してこの働きを果たしていることを示唆する。

065

## The effect of ethanol and ALDH2 in human melanocyte

Eri Ishihara (学籍番号: 174127G)

指導教員: Mayumi Fujita<sup>1)</sup>, Takeshi Yamauchi<sup>1)</sup>, Kenzo Takahashi<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Department of Dermatology, University of Colorado<sup>2)</sup>Department of Dermatology, University of Ryukyus

Melanocytes are melanin-producing cells and located in the basal layer of the epidermis. Melanocytes deliver melanin to keratinocytes to protect from UV radiation. Acetaldehyde dehydrogenase 2 (ALDH2) is crucial for alcohol metabolism and a primary enzyme involved in the metabolism of toxic acetaldehyde. In Asian countries, about 40% of the people have the mutation of ALDH2. The mutation leads to the accumulation of acetaldehyde, which causes damage to the liver and abnormal reaction of our body like facial flushing.

In our previous study, ALDH2 knockout mice which consumed alcohol for 10 weeks showed skin hyperpigmentation on the soles of their paws, tails, ears and genital areas and increased the number of melanocyte in their skin. In this study, We investigated that ethanol also increased the activity of melanin production in human melanocytes derived from Caucasian and African American.

After 0.1% ethanol stimulation, Melanocytes elongated their dendrites and increased the amount of cAMP and tyrosinase (TYR) activity. Both of melanocytes stimulated by ethanol increased the intracellular melanin and extracellular melanin. The expressions of Melanin production-related proteins (MITF and TYR) were increased by ethanol stimulation in ALDH2 inhibited melanocytes. These data suggested that ethanol promoted the activity of melanin production. When alcohol is metabolized to acetic acid, reactive oxygen species (ROS) is generated by CYP2E1. After ethanol stimulation, ALDH2 inhibited melanocytes increased more ROS than control. This data showed that ethanol might stimulate MAPK/ERK signaling and promote to develop melanoma under ALDH2 dysfunction.

067

## 尿中 Na/K 比と血漿レニン活性は 高血圧患者の臓器障害と関連するか

大城 彩 (学籍番号: 174148K)

指導教員: 石田 明夫

琉球大学医学部第三内科 循環器・腎臓・神経内科学講座

【背景・目的】原発性アルドステロン症 (PA) は本態性高血圧と比べ臓器障害の頻度が高い。アルドステロンの過剰が臓器障害に関連している。アルドステロンによる Na の再吸収と K の排泄促進作用のため、「PA では血漿アルドステロン濃度 (PAC) が高いほど尿中 Na/K が低下し臓器障害が進行するが、非アルドステロン症 (non-PA) では食塩摂取量が多いほど尿中 Na/K が増加し臓器障害が進行する」と考えられる。また、「食塩過剰摂取やアルドステロン過剰状態では、PA や non-PA にかかわらず体液過剰により血漿レニン活性 (PRA) が低下し臓器障害が進行する」と考えられる。本研究では上記の仮説を検証した。

【方法】2013-2020 年に、高血圧の原因精査のため紹介された新患および外来スクリーニング検査で二次性高血圧を疑われ入院精査を受けた患者 55 人を対象とした。臓器障害は左室肥大、蛋白尿、腎障害を評価した。尿中 Na/K は随時尿で評価し、尿中 Na 排泄量は蓄尿と随時尿 (田中法) で推定した。カプトプリル負荷検査陽性者を PA と診断した。

【結果】平均年齢は 52.7 歳で女性は 27 人、平均血圧は 137/83mmHg であった。23 人が PA と診断された。PA は non-PA と比べ PRA が低く、PAC/PRA 比と重炭酸イオンが有意に高値を示したが、血清 K、PAC、尿中 Na/K は差がなかった。左室肥大、蛋白尿、腎障害はそれぞれ 27 人、9 人、10 人に認め、PA と non-PA で有病率は差はなかった。PAC と尿中 Na/K は負の関連を示したが、PA では関連はなかった。non-PA では、尿中 Na 排泄量と尿中 Na/K は相関した。しかし、尿中 Na/K と血圧や臓器障害は相関がなかった。PAC、PRA は臓器障害とは関連しなかった。

【考察】今回の解析で、仮説と異なる結果になったのは、解析症例数が少なかったこと、若年層のデータが少なく、PA 疑い症例数が多かったためレニン活性の高い患者のデータが少なかったことなどが考えられる。

066

## 特発性尺骨突き上げ症候群における 骨形態の検討

眞弓 愛 (学籍番号: 174160J)

指導教員: ○大久保 宏貴, 知念 修子, 大中 敬子, 仲宗根 素子,

金城 政樹, 西田 康太郎

琉球大学整形外科

目的: 手関節尺側部痛を来す代表的な疾患である特発性尺骨突き上げ症候群は手関節の繰り返す動作で発症し、尺骨が橈骨に比べ長い症例に多いと報告されている。しかし尺骨が橈骨と同じ高さまたは短い症例でも本疾患が発症することが報告され、他の要素も関連していると考えられる。本研究の目的は、特発性尺骨突き上げ症候群における骨形態を比較・検討することである。

対象と方法: 2009 ~ 2018 年の 10 年間、当院で診断された 20 歳以上の特発性尺骨突き上げ症候群 (A 群) 46 例 48 手 (男性 19 手, 女性 29 手, 平均 41.0 歳) を対象として、手関節正面単純 X 線像を後ろ向きに検討した。コントロール (C 群) は 2014 ~ 2018 年の 5 年間に他の疾患で手関節正面 X 線像を撮像し、骨折・関節リウマチ・変形性手関節症を除外し、骨性異常を認めないと判断した 157 例 260 手 (男性 126 手, 女性 134 手, 平均 53.2 歳) とした。尺骨関節面と橈骨関節面との距離 (UV), 尺骨頭最遠位 - 小窩部間距離 (UTFD), 有頭骨 - 三角骨間距離, 橈骨切痕掌側点 - 月状骨最尺側点間距離, 月状骨占拠率 (月状骨関節面に対する橈骨関節面の占拠率) を測定した。月状骨形態は月状骨 - 有頭骨間に関節を有さない Type I と有する Type II に分類し、A 群と C 群を比較した。統計学的検討は unpaired T-test を、月状骨形態についてはカイ二乗検定を用い  $p < .05$  を有意差ありとした。

結果: UV と UTFD は A 群が有意に大きく、A 群で月状骨形態 Type II が C 群で Type I が有意に多かった。その他の項目では両群間に有意差を認めなかった。まとめ: 特発性尺骨突き上げ症候群の発症には尺骨が橈骨よりも高いだけでなく、尺骨頭と小窩部の距離が大きな尺骨頭の形態、月状骨が有頭骨間に関節を有する形態が関与している可能性が示唆された。

068

## ゲノムワイド関連解析による日本人の 間質性肺炎・特発性肺線維症疾患感受性遺伝子領域の探索

札本 彩夏 (学籍番号: 174114E)

指導教員: 今村 美菜子, 松波 雅俊, 前田 士郎

琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座

【背景と目的】過去の特発性間質性肺炎 (IPF) に関するゲノムワイド関連解析 (GWAS) より IPF 疾患感受性と関連する遺伝的シグナルが複数報告されているが、これらは IPF の遺伝的リスクの全てを説明することはできない。本研究では更なる IPF 疾患感受性遺伝子領域を同定するために日本人集団を対象に GWAS を行った。【方法】National Bioscience Database Center が公開しているデータ [Research ID: hum0014.v18] より間質性肺炎・特発性肺線維症患者 194 人 (case), それ以外の疾患の患者 6,418 人 (control) の High-density oligonucleotide arrays (Perlegen Science 社) により決定された遺伝型、アレル頻度等のデータを得た。Quality Control (QC) として Hardy-Weinberg 平衡試験の P 値が  $1.0 \times 10^{-6}$  未満、call rate が 0.95 未満、16 疾患以上データがない SNPs, suspicious SNPs を除外した。更に control においてマイナーアレル頻度が 0.05 未満の SNPs を除外した。QC 後の SNP 数は 184,370 であった。Cochran-Armitage 検定を用いて case-control 解析を、GTEX Portal を用いて expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析を実施した。次にサブ解析として control より間質性肺炎を合併する可能性の高い疾患と肺疾患の計 5 疾患を除き、再度上記の解析を行った。【結果】GWAS の結果、ゲノムワイド水準 ( $p < 5.0 \times 10^{-8}$ ) を満たす SNP は得られなかった。主解析, サブ解析共に最も関連の強い SNP は 4 番染色体上の rs6853596 で、主解析では  $P$  値 =  $1.78 \times 10^{-5}$ , odds 比 = 1.57, 95% 信頼区間 1.28-1.93。サブ解析では  $P$  値 =  $2.31 \times 10^{-5}$ , odds 比 = 1.56, 95% 信頼区間 1.27-1.92 であった。eQTL 解析の結果、rs6853596 近傍の遺伝子 *LINC00290* の大脳基底核での発現量がリスクアレルと正の相関 ( $p = 4.8 \times 10^{-4}$ ) を示したが有意水準 ( $P < 3.4 \times 10^{-5}$ ) には達しなかった。【結論】IPF 疾患感受性候補 SNPs を複数同定した。ゲノムワイド水準の IPF 疾患感受性 SNP は検出されなかったため、独立した IPF 集団を用いた検証を行う必要がある。

069

### Multiplex PCR 法による 薬剤耐性菌スクリーニングの検討

前田 妃奈 (学籍番号: 174161G)

指導教員: 西山 直哉, 上 若生, 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 (第一内科)

【目的】 薬剤耐性菌のスクリーニング法として選択培地を用いた培養法や PCR 法による遺伝子検査法がある。日本では培養法が主流であるが、迅速性や培養困難な耐性菌の検出には遺伝子検査法が優れるとされる。今回、便の薬剤耐性菌スクリーニング検査において、培養法と PCR 法を実施し、遺伝子検査の有用性と培養法から遺伝子検査法へ代替可能であるかを検証した。

【方法】 便検体 172 検体を対象に培養法と multiplex PCR 法の二つの方法でスクリーニング検査を行い、結果を比較した。培養法では、各種選択培地を用いてカルバペネマーゼ産生菌 (CPO)、基質特異性拡張型  $\beta$ -ラクタマーゼ産生菌 (ESBL)、バンコマイシン耐性腸球菌 (VRE) を分離し、薬剤感受性検査により耐性機序を推定した。multiplex PCR 法では、便より DNA 抽出を行い、各種薬剤耐性遺伝子 (IMP, VIM, KPC, NDM, OXA-48, CTX-M, VanA, VanB) が検出可能である Entero-DR kit (Seegene, Korea) を用いて実施した。

【結果】 培養法の結果を基準とした、全 172 検体の陽性一致率は 93.3%、陰性一致率は 91.5%、全体一致率は 91.9% であった。CTX-M 遺伝子陽性と培養法による ESBL 産生菌遺伝子の同定に関しては、陽性一致率 93.3%、陰性一致率 91.5%、全体一致率 91.9% であった。CRO に関しては、VIM 遺伝子陽性を 1 検体で認め、培養法でも同定された。VRE に関しては、VanB 遺伝子陽性を 1 検体認めたが、培養法では検出できなかった。

【結論】 PCR 法と培養法の結果は完全には一致していなかった。特に、ESBL 産生菌のスクリーニングに関しては、培養のみ陽性が 2 検体、PCR のみ陽性が 12 検体と結果の解離を認めた。培養法の代替として PCR 法を用いる場合には、検査結果の解釈には注意が必要である。

070

### 成人 T 細胞白血病/リンパ腫における CARD11 遺伝子欠損の臨床的意義

在塚 涼音 (学籍番号: 174146C)

指導教員: 崎浜 秀悟, 加留部 謙之輔  
琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

成人 T 細胞白血病/リンパ腫 (ATL) は HTLV-1 ウイルスが病因となる予後不良な末梢性 T 細胞腫瘍であり、九州、沖縄で多くみられる。Kataoka らによる研究により、ATL における T 細胞受容体/NF- $\kappa$ B シグナル伝達経路に強く集積した遺伝子異常が多数明らかになった。このうち機能獲得型変異である PRKCB と CARD11 の遺伝子異常が共存する例が有意に多く両者に機能的関連が示唆された。よって本研究では、ATL 症例における CARD11 遺伝子内の自己抑制に関与する inhibitory domain の欠損を PCR 法で検査し統計解析を行うことにより、CARD 11 の欠損と PRKCB の変異、CARD 11 の変異それぞれの関連について検討した。検査した 88 検体のうち CARD 11 の欠損がみられたのは 20 症例で、全体の 22.7% を占めていた。CARD 11 の欠損の有無において Kaplan Meier 法で生存率を比較したところ、有意な差は見られなかった。また CARD11 の変異や PRKCB の変異についても Kaplan Meier 法や Fisher の正確確率検定での比較において関連はみられなかった。Inhibitory domain の欠損による CARD 11 の恒常的発現により TCR/NF- $\kappa$ B 経路が活性化すると考えられたが、生存率に影響がみられなかったことより inhibitory domain が単独で CARD11 を不活性化していない、または CARD 11 の活性化による影響が小さいと考えられる。また今回の研究では inhibitory domain 全体の欠損について検査したため、各検体の欠損部位などは不明である。Inhibitory domain 内には 4 つの抑制要素が含まれており共同で活性する。これらそれぞれの欠損による影響や生理的機能、他の domain との関連を明らかにする必要がある。加えて PRKCB との関連を検証する上で、TCR/NF  $\kappa$ B 経路における CARD11 との具体的な関与が不明なままである。これを明らかにすることで、機能獲得変異や欠損による影響が説明できると考えられ、さらなる研究が必要である。

071

### 癌細胞における Tescalcin と低酸素応答の関係

安田 良久 (学籍番号: 164141H)

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: 癌にとって低酸素応答は増殖や浸潤に関与する非常に重要な機構であるが、そのメカニズムは完全には分かっていない。Tescalcin (TESC) は心臓に多く発現するカルシウム結合タンパク質であるが、一方で多くの癌に TESC が発現しており、癌において細胞増殖に関与すると考えられている。興味深いことに TESC の心臓における機能を研究している大阪医大の若林博士らは、低酸素条件のマウス心筋で TESC の発現減少を報告しており、低酸素応答と TESC と何らかの関連が示唆される。しかし、癌細胞においてはまだ報告がない。そこで本実習では、ヒト子宮頸癌由来の HeLa 細胞を使用し、低酸素応答と TESC 発現の関係を検討した。

実験方法: HeLa 細胞を低酸素下及び HIF1 $\alpha$ 過剰発現下で培養し、TESC タンパク質と mRNA の発現変化を観察した。

結果: 1%O<sub>2</sub> 下にて TESC タンパク質発現量が大气圧下条件 (コントロール) に比べ予想外に増加した。5%O<sub>2</sub> 下と HIF1 $\alpha$ 過剰発現下にて TESC mRNA 発現量はコントロールに比べどちらも減少となったが、5%O<sub>2</sub> 下の方が減少率が大きかった。また、低酸素下において HIF1 $\alpha$ タンパク質発現量増加も観察した。

考察: 5%O<sub>2</sub> 下において、HIF1 $\alpha$ を介した TESC 発現量減少の経路が考えられる。また、5%O<sub>2</sub> 下の方が HIF1 $\alpha$ 過剰発現下にて比べ減少率が大きかったことより、HIF1 $\alpha$ を介さない TESC 発現量減少の経路も考えられる。また、1%O<sub>2</sub> 下では予想外に TESC タンパク質発現量が増加したことから、癌細胞は心筋と異なり、強い低酸素で TESC 発現量上昇の機構をもつのかもかもしれない。しかし、本実習では実験数が少なかつたため、今後は実験回数を増やすなどの検討が必要である。

072

### Endoscopic *in vivo* Ca<sup>2+</sup> imaging analysis of dorsal raphe nucleus neurons in free-moving mice

Shota ZAYASU (学籍番号: 174209E)

指導教員: ○ Katsuhiko MIYAZAKI<sup>1)</sup>, Kenji DOYA<sup>1)</sup>,  
Ken-ichi KARIYA<sup>2)</sup><sup>1)</sup>Neural Computation Unit, Okinawa Institute of Science and Technology<sup>2)</sup>Department of Medical Biochemistry, Grad Sch Med, University of the Ryukyus

The dorsal raphe nucleus (DRN) is a major center of serotonergic transmission in the brain. It projects to many areas and is implicated in depression and Alzheimer's disease. Recent experiments in our Unit have shown that optogenetic activation of DRN serotonin neurons enables mice to wait longer for future reward. However, few studies have reported DRN neuron activities of mice during behavioral tests. We chose to carry out *in vivo* calcium imaging with an adeno-associated virus for neuron-specific expression of a fluorescent Ca<sup>2+</sup> sensor GCaMP. I undertook the part of and succeed in establishing techniques for virus injection into DRN. Anaesthetized shaved mice were mounted on a stereotaxic apparatus. An incision was made to expose the skull, and the bregma, the junction of the sagittal and coronal sutures, was marked. After craniotomy and dura removal at 6.1mm posterior to bregma, a house-made capillary needle was inserted diagonally forward into the target area: 5.3mm posterior and 3.2mm inferior to the bregma. Lens implantation, microscope attachment, and recording were performed according to the manufacturer's instructions (Inscopix, USA). Neuronal activities were detected during free moving, food consumption and in response to tail grabbing. However, signals were weaker than expected, and possible reasons are under investigation.

073

TFEB 転座型腎細胞癌における  
臨床病理学的特徴に関する後ろ向き観察研究

大内 久実 (学籍番号: 174217F)

指導教員: ○松本 裕文, 石井 朗子, 高松 玲佳, 吉見 直己  
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

TFEB 転座型腎細胞癌 (TFEB RCC) は染色体 6p21 上に存在する TFEB 遺伝子と 11q12 上に存在する Alpha 遺伝子に融合がみられる腎細胞癌で、腎細胞癌の 1% 未満といわれる。若年発症が多く比較的予後が良いとされ、組織学的に大型腫瘍細胞と小型腫瘍細胞からなる two cell pattern を呈し、小型腫瘍細胞が基底膜様物質を取り囲むロゼット様構造が特徴的と考えられてきた。しかし、TFEB RCC は新しい概念であり、two cell pattern が無い症例、淡明細胞癌や嫌色性腎癌などと類似した形態や、高齢発症、予後不良症例も存在することが分かってきており、その臨床病理学的データが乏しいのが現状である。そこで、2019 年 1 月から 10 月までの琉球大学医学部附属病院における腎癌 28 症例を集め、TFEB 転座の有無、病理組織像、免疫染色などを確認し、TFEB RCC の臨床病理学的特徴を明らかにすることを本研究の目的とした。まず、腎癌症例の病理検体から組織マイクロアレイを作製し、HE 染色、免疫染色、FISH を行った。FISH にて split signal 陽性例は全 28 例中 1 例であった。この症例は 60 歳代、papillary renal cell carcinoma と診断されており、従来言われている TFEB RCC に特徴的な組織像を欠く非典型的な臨床病理学的背景を有していた。また、TFEB split signal 頻度と TFEB 免疫染色および年齢との有意な関連はなかった。TFEB RCC の病理診断はこれまで、年齢および組織像からそれが疑われる症例について免疫染色、FISH にて確定してきたが、この診断アルゴリズムでは、それとして非典型的な臨床病理学的背景を有する症例では追加検索が施行されない可能性がある点、TFEB 免疫染色の診断的有用性について問題点が示唆された。

074

## 神経系の再生と GABA 伝達の関係

伊藤 駿 (学籍番号: 174131E)

指導教員: ○小林 しおり, 高山 千利  
琉球大学大学院医学研究科分子解剖学講座

$\gamma$ -アミノ酪酸 (GABA) は抑制性の神経伝達物質である。しかし、未熟期・神経損傷後の変性・再生期にはニューロンに興奮性に作用し、神経の発達・再生に寄与すると推測されている。しかしながら、その機能を裏付ける証拠は示されていない。この GABA の応答性は細胞内と細胞外の塩化物イオン濃度の差により制御されており、この変化のメカニズムには細胞内の塩化物イオン排出を担う  $K^+$ - $Cl^-$  cotransporter2 (KCC2) の発現が関与していると考えられる。そこで、KCC2 野生型マウス (WT) と KCC2 の発現量が WT のおよそ半分である KCC2 欠損ヘテロマウス (ヘテロ) の舌下神経を切断・縫合したモデルを作製し、両者の回復経過を免疫組織化学法を用いて比較することにより、上記の仮説を証明することを目的として本研究を行った。

トルイジンブルー染色では WT、ヘテロ両者で舌下神経のニューロンに形態的な差は無かった。アセチルコリンの合成酵素であり運動ニューロン機能のマーカーとなるコリンアセチルトランスフェラーゼ (ChAT) の免疫染色では、WT は術後 21 日目に、ヘテロは術後 14 日目に、陽性のニューロンの健常側に対する損傷側の割合が 100% になった。カルシトニン遺伝子関連ペプチド (CGRP) の免疫染色では、WT は術後 21 日目に、ヘテロでは術後 14 日目に、陽性のニューロンの数が最も多かった。また Galanin の免疫染色では術後 7、14、21 日目いずれも両者でニューロン数に有意な差は認められなかった。以上よりヘテロの方がより早く神経損傷から回復する傾向があり、KCC2 の低下、すなわち GABA の興奮性作用が神経損傷後の変性・再生を促進することが示唆された。

075

マウス坐骨神経結紮損傷モデルにおける、  
有髄神経線維の形態学的・形態計測学的研究

松田 小弥太 (学籍番号: 174138B)

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

分子解剖学講座では、マウス坐骨神経損傷モデルを用いて下肢運動機能と神経形態の回復過程について研究している。本研究では、損傷モデルの一つである坐骨神経結紮モデルについて、有髄神経線維の変性・再生過程を解析した。坐骨神経結紮損傷モデルを作成し、損傷部位より遠位部の神経線維を、ウラン・鉛染色を施したエポキシ切片において反射電子モードの SEM (走査型電子顕微鏡) を用いて観察した。観察で得られた画像データを基に、無料ソフトウェア ImageJ/Fiji を用いて、有髄神経線維の密度を計測した。

結紮後 7 日では、有髄神経線維はほぼ消失し、術後 14 日では、完全に消失した。障害された線維はマクロファージで処理されていた。術後 28 日では、マクロファージはかなり高頻度に観察されていた一方で、細い有髄線維の数が大幅に増加した。術後 56 日では、有髄線維の直径は 28 日より太くなり、線維数も増加した。術後 28 日以降に、神経外膜に有髄神経線維を観察した。有髄線維密度の変化は、7 日で著しく減少し、14 日には 0 になった後、28 日目には増加し、56 日目には未損傷神経の密度と変わらない程度までに回復した。

本研究の結紮損傷モデルには、別の損傷モデルである切断・縫合モデル (水谷 2019 医科学研究) と比較して、次の様な特徴が見いだされた: 1) 有髄線維密度が 0 になる術後日数は、結紮損傷モデルでは 14 日であったが、切断・縫合損傷モデルでは 7 日であり、結紮の比較的小さな損傷が影響出現を遅延させる可能性がある; 2) 損傷後伸長する有髄線維の中に神経外膜を通過するものが結紮モデルにだけ認められ、神経束の結紮狭窄の影響が示唆された。この様に神経損傷モデルには特異的な性質があり、神経損傷モデル実験を計画するときには損傷モデルの特徴を把握する必要がある。

076

サイトメガロウイルス性皮膚潰瘍における  
検査法の検討

奥山 奈津子 (学籍番号: 174201K)

指導教員: 山口 さやか, 高橋 健造  
琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

[背景] サイトメガロウイルス (ヒトヘルペスウイルス 5 型) は、 $\beta$ ヘルペス亜科に属する DNA ウイルスである。主に幼小児期に不顕性感染した後、潜伏感染する。免疫不全患者において再活性化し、骨髄抑制、脳炎、肺炎、胃腸炎、肝炎、網膜炎、皮膚潰瘍など様々な臓器障害を生じる。感染初期の徴候が皮膚潰瘍であることが多く、早期の治療介入のため、皮膚症状からサイトメガロウイルス感染症を疑うことが重要である。

[目的] 日本ではサイトメガロウイルス感染の検出に、アンチゲネミア法を用いる。しかし、臨床所見や治療経過から、サイトメガロウイルス感染症と診断しても、アンチゲネミア陰性例があり、感度に問題があることが指摘されてきた。そこで、今回、琉球大学皮膚科にてサイトメガロウイルス感染症を疑った症例について、アンチゲネミア法、病変部皮膚組織の免疫染色法、DNA-PCR 法と Nested-PCR 法を行い、感度を比較検証した。

[方法] 抗 CMV 抗体 (MO854, monoclonal DAKO) にて免疫染色を行った。病変部のパラフィン包埋切片や凍結組織から DNA を抽出し、PCR を行った。[結果] 免疫染色はアンチゲネミア法と感度は同等であった。病変部組織由来 DNA の PCR は感度が低かった。Nested-PCR ではアンチゲネミア法と感度は同等であった。

[考察] 免疫染色法では陽性細胞数のばらつきが激しく、切り取った切片によって、陽性率が変化的と考えられた。末梢血液中の感染細胞を検出するアンチゲネミア検査よりも、病変部から直接 DNA を証明する DNA-PCR 法が、より感度が高いと予測していたが、結果は同等であった。臨床診断と検査結果に乖離があり、今後より感度、特異度の高い検査法の開発が望まれる。

077

### 健康成人における男性と女性の静止時及び 歩行時の足底圧の評価 ～ In shoe system を用いた解析～

宮平 桐佑 (学籍番号: 174182K)

指導教員: 山本 哲也<sup>1)</sup>, 星野 祐一<sup>1)</sup>, 神崎 至幸<sup>1)</sup>, 山田 真<sup>2)</sup>,  
長宗 高樹<sup>2)</sup>, 長井 寛斗<sup>1)</sup>, 荒木 大輔<sup>1)</sup>, 松下 雄彦<sup>1)</sup>,  
黒田 良祐<sup>1)</sup>, 東 千夏<sup>3)</sup>, 西田 康太郎<sup>3)</sup><sup>1)</sup> 神戸大学大学院整形外科, <sup>2)</sup> 福井大学工学部知能システム工学科<sup>3)</sup> 琉球大学大学院整形外科

【目的】歩行や走行時における足底の荷重条件を検討することは、バランスの改善やスポーツ時の怪我の予防につながるため臨床的に重要である。本研究において、我々は自然な運動時の足底圧の測定に適切なインソール型 In-shoe system を用いて健康成人の足底圧を計測したので報告する。

【方法】健康成人ボランティア 100 例 200 足 (男: 50, 女: 50, 平均 33.5 歳) を対象とした。シート厚 1mm, 重量 17g, センサー 10 個, 計測速度 200Hz のインソール型 In-shoe system を使用した。シート及び運動靴を 4 サイズ (23 ~ 28cm) 準備した。センサーは前足部に 7 個, 中足部に 2 個, 後足部に 1 個を内外側に均等に配置した。足底全体における足底圧中心 (COP) の移動を計測した。また、静止時及び歩行時の最大荷重を前後方向、内外側方向に分けて解析した。男女比較は体重を 50kg 換算して解析した。

【結果】歩行時の COP の移動は、後足部から中足部を通り第 1 足趾へ移動した。静止時及び歩行時における前足部 (toe, forefoot), inside, 第 1 足趾, 第 1 足趾 MTP 関節の足底圧が男性に比べ女性の方が有意に高かった。

【考察】得られた足底圧の推移を波形にすると、いずれも同様のパターンを示していた。女性の方が男性に比べ骨盤前傾角度が大きく、重心が前方に傾いていることが前足部の peak pressure に影響していると考えられた。また、女性は中殿筋の筋力が男性と比較すると弱いため歩行時に knee-in が起こり inside の peak pressure が高くなったと考えられた。治療用器具との併用も可能であり、外反母趾・扁平足などの疾患で手術や器具の治療効果判定への応用が見込まれる。

078

### 大動脈弁狭窄症患者でリポプロテイン (a) は 虚血性心疾患の独立した危険因子になるか

西銘 亮 (学籍番号: 000000000)

指導教員: 當間 裕一郎, 大屋 祐輔  
琉球大学循環器・腎臓・神経内科学

【背景・目的】近年、リポプロテイン (a) (Lp (a)) は血中濃度が遺伝的に規定され、性、年齢、食事、その他の環境因子などの影響をほとんど受けることのない、冠動脈疾患の新しい、独立した危険因子として注目されるようになった。また、Lp (a) が大動脈弁狭窄症 (AS) 患者の弁の石灰化に関与しているとする論文が発表されている。ただ AS 患者で Lp (a) が虚血性心疾患 (IHD) のリスク因子であるという報告はまだされていない。このことから今回の研究では、AS と IHD を併発している患者は、そうでない患者よりも Lp (a) の検査値が上昇しているのではないかとすることを調べた。

【対象と方法】AS 患者 203 名 (平均年齢 85.4 歳, 男性 78 名, 女性 125 名) を対象に、経カテーテル大動脈弁留置術 (TAVI) 前の検査入院時の冠疾患リスク因子が IHD との関連があるかどうかを調べた。冠疾患リスク因子として喫煙、高血圧、糖尿病、脂質異常の有無や HbA1c, LDL-C, HDL-C, T-cho, TG, Lp (a) などを調べた。

統計学的検討は t 検定と  $\chi^2$  検定で行った。

【結果】IHD は糖尿病 ( $p < 0.001$ ), 脂質異常症 ( $p < 0.001$ ) がある群で有意に多かった。IHD を持つ患者では有意に HbA1c は高値であり、HDL-C は低値であった。(それぞれ  $p = 0.009$ ,  $p = 0.001$ )

Lp (a) は IHD と関連がなかった。(  $p = 0.5844$ ) (IHD あり: 最大値 90, 平均値 26.4, 最小値 0 IHD なし: 最大値 131, 平均値 23.9, 最小値 0 単位は mg/dl)

その一方で、Lp (a) は LDL-C と正の相関があり ( $p = 0.02$ ,  $R = 0.2$ ), また Lp (a) はスタチンを服用している患者の方が高値だった。(  $p = 0.042$ )

【結論】今回の研究では、Lp (a) は IHD の有無では有意差は認めなかった。

079

### 沖縄県民の遺伝的背景の違いの検証と ゲノムワイド関連解析による BMI 関連領域の同定

赤迫 初美 (学籍番号: 174203F)

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】 Genome-wide association studies (GWAS) により多数の Body Mass Index (BMI) 関連ゲノム領域が報告されている。沖縄県民の遺伝背景は他の地域とは異なることが知られているが (Yamaguchi et al. (2008)), 沖縄県民を対象とした BMI に関する GWAS は行われていない。【目的】沖縄県民の遺伝的背景を検証するとともに新規 BMI 関連ゲノム領域を同定する。【方法】沖縄県民 5,214 人について 653,092 single nucleotide polymorphisms (SNPs) の遺伝型を決定し、BMI、年齢、性別および祖父母の出生地情報を取得した。遺伝背景検討のため主成分分析 (PCA) を Quality Control (QC) を通過した 5,205 検体の 511,629 SNPs データを用いて実施した。BMI に関する GWAS は、QC を通過した 4,681 検体の 406,242 SNPs データを用いて Logistic 回帰分析により行った。更に、Regional plot 解析, expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析を実施した。【結果】PCA の結果、沖縄と本土のみならず、県内でも地域により遺伝的背景が異なっていた。GWAS では rs10946384 と最も強い相関が認められたが ( $p = 4.3 \times 10^{-7}$ ), ゲノムワイド水準 ( $P < 5.0 \times 10^{-8}$ ) を満たす SNP は得られなかった。そこで候補 SNPs ( $P < 1.0 \times 10^{-4}$ ) を既報の日本人 GWAS データ (Akiyama et al. (2017)) と統合し、メタ解析を行った。その結果、既報の *FTO* 領域 (rs12149832,  $P = 2.8 \times 10^{-72}$ ) に加え *RET* のイントロン内の rs2435357 ( $P = 9.7 \times 10^{-7}$ ) との相関が認められた。T allele (allele frequency = 0.411) は BMI の増加と相関を認め、eQTL 解析の結果、皮下脂肪において *RET* 発現と強い負の相関を認めた ( $p = 8.9 \times 10^{-14}$ )。【結論】今回、沖縄県内における詳細な遺伝的背景の違いがはじめて明らかになった。また、*RET* のイントロンにある rs2435357 を有力な BMI 関連ゲノム領域候補として特定した。今後、更なる検証を行う予定である。

080

### 沖縄県内の肺非結核性抗酸菌症患者から分離された *Mycobacteroides abscessus complex* の 亜種分布および薬剤感受性の検討

城戸 龍之助 (学籍番号: 174180C)

指導教員: 上 若生, 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・消化器内科学講座  
(第一内科)

【背景、目的】 *Mycobacteroides abscessus complex* (MABC) は非結核性抗酸菌 (NTM) のうち迅速発育菌 (Rapidly growing mycobacteria: RGM) に分類される。MABC は肺や皮膚感染症を引き起こすが、抗結核薬を含む多くの抗菌薬に耐性であり難治性である。MABC には 3 つの亜種 (*M. abscessus subsp. massiliense*, *M. abscessus subsp. abscessus* と *M. abscessus subsp. bollettii*) が存在し、亜種によってキードラックであるマクロライド系抗菌薬に対する薬剤感受性が異なる。したがって抗菌薬の選択において亜種同定が重要であるが、亜種同定ができる施設は限られており、日常診療では亜種レベルまでの同定は行われていないのが現状である。したがって、MABC の亜種分布に関する情報は限られており、沖縄県における疫学調査はこれまで行われていない。本研究では、沖縄県内の肺 NTM 症患者から分離された MABC 菌株の薬剤感受性を調べ、その結果を基に亜種推定を行う。【方法】MABC 臨床分離株 30 株の薬剤感受性、耐性誘導の有無をブロスミック RGM (極東製薬工業株式会社) を用いて調べた。【結果】30 株中、検査結果が得られたのは 24 株であった。全ての株が CAM に感受性 (3 日目) であったが、6 株 (25%) は 14 日目に誘導耐性を認めた。これより、CAM 誘導耐性を認めた 6 株の亜種は *M. abscessus* か *M. bollettii*、CAM 誘導耐性を認めなかった 18 株 (75%) は *M. massiliense* と推定された。また、全ての株で AZM の MIC 値は CAM よりも高かった。また CAM 誘導耐性を認めた 6 株は、AZM も同様に誘導耐性を認めた。他の薬剤に対する感受性は、LZD 4.2%, AMK 95.8% であったが、それ以外は 0.0% であった。【考察】沖縄県内における MABC の薬剤感受性、亜種割合の推定を行うことができた。今後、MABC の亜種同定で治療効果の向上や治療成績が予測できる可能性が高いと思われる。

081

生分解性不織布シートを用いた再生治療用  
間葉系幹細胞シートの開発

新村 駿 (学籍番号: 174139A)

指導教員:

琉球大学大学院医学研究科形成外科学講座

琉球大学では培養脂肪幹細胞を用いた第二種再生医療を実施し、一定の有効性と安全性を確認している。我々は再生医療用の幹細胞源として、脂肪組織だけでなく滑膜組織や骨髄組織、骨髄液、歯髄組織、臍帯組織、臍帯血などにも着目している。現在、こういった各組織から、幹細胞を迅速かつ大量に抽出培養する技術を開発中である。今回、三次元的な培養基材を用いて滑膜組織から幹細胞を抽出培養すると同時に、細胞シートの作製を試みたので報告する。なお、本研究で用いられた三次元的な培養基材は、生分解性不織布(組成: PLGA/HAp)を円形のシート状(厚さ: 217  $\mu\text{m}$ , 24 ウェル用  $\phi$  14mm, 6 ウェル用  $\phi$  30mm)に加工したものである。

まず、被験者の同意を得て採取された滑膜組織をハサミで切断し、細胞非接着性のウェルプレートに播種した。播種量は、24 ウェルプレート 1 ウェルあたり 0.05g, 6 ウェルプレート 1 ウェルあたり 0.10g であった。滑膜組織を播種した各ウェルに、ウェル径に近いサイズの不織布シートもしくはコントロールのカバーガラスを上から被せ、重しとしてテフロン製の皿を置いて培養を開始した(培地: ADSC-GM (LONZA), 37°C, 5%CO<sub>2</sub>)。培養 9 日目, 19 日目, 23 日目に WST-1 アッセイを行い、不織布シート上とカバーガラス上の細胞の増殖能を比較したところ、不織布シート上の方が高いことが分かった。更に、細胞シートを構成する細胞をフローサイトメトリーにより調べたところ、間葉系細胞の性質を有していることが確認されたので、その結果も併せて報告する。

082

細胞内 pH 制御因子テスカルシンの  
癌細胞への過剰発現実験

小林 洸貴 (学籍番号: 164194J)

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: 癌は生存や増殖に有利になるよう細胞内 pH を制御する機構をもつ。その機構の理解は新たな治療標的になる可能性があり重要である。

多くの癌に発現しているテスカルシン (TESC) は、Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 交換輸送体 NHE1 と結合し細胞内 pH を制御すると考えられている。TESC の役割は未だ不明な点が多いが、これまでに癌細胞の TESC を抑制すると NHE1 がダウンレギュレートされ、細胞内 pH が低下し、癌の増殖・転移が阻害されることが報告されている。しかし TESC を過剰発現させ細胞内 pH を検証した先行研究は見当たらなかった。そこで、TESC を過剰発現させ、細胞内 pH を調べることにした。TESC を過剰発現させると NHE1 が活性化し細胞内の H<sup>+</sup> イオンが細胞外に出て行き、細胞内 pH が上がると考えられる。また、NHE1 を阻害すると細胞内 pH が低下すると考えられる。

方法: 96well plate で細胞を培養し、翌日 BCECF を添加し蛍光強度を測定。細胞内 pH を計算して、HeLa 細胞と Tesc-HeLa 細胞 (TESC 過剰発現株) の細胞内 pH を比較した。その後、NHE1 阻害剤を入れて同様に細胞内 pH を測定し変化を見た。

結果: Tesc-HeLa 細胞の pH が HeLa 細胞の pH よりも低くなり予想の逆になった。そして、NHE1 阻害剤を入れた Tesc-HeLa 細胞では pH が著しく低下した。

考察: Tesc-HeLa 細胞で予想と反して細胞内 pH が低下していた。また NHE1 とは異なる何らかの機序で細胞内 pH が低下している可能性が考えられた。これは新たな発見かもしれないが、実験数が少なかったことや HeLa 細胞のみで実験したことから、今後の課題として複数の細胞でも TESC 過剰発現で細胞内 pH が低下するのかわかめること、NHE1 に依らない細胞内 pH を下げる機序を解明すること等が挙げられる。

083

哺乳類細胞における RNF219 による  
RAB21 発現量制御を介した  
細胞増殖制御の仕組みについて

佐戸 優希 (学籍番号: 174216H)

指導教員: ○添田 翔<sup>1)</sup>, 山本 雅<sup>2)</sup>, 菊谷 研<sup>1,3)</sup><sup>1)</sup> 沖縄科学技術大学院大学細胞シグナルユニット<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

RNF219 は mRNA の安定性に関わる CCR4-NOT 複合体に結合するタンパク質として同定された。RNF219 はそれ自身が細胞増殖を抑制することが先行実験からわかっており、癌抑制機構における役割が示唆される。本研究では、RNF219 をノックダウンすると発現上昇するタンパク質の一つで細胞の基質接着や癌転移に関わる RAB21 に着目し、RNF219 が RAB21 を発現抑制する分子機構について検討した。RNF219 は RING ドメインを持つ E3 ユビキチンリガーゼであることから、ユビキチンプロテアソーム系の関与が予測されたが、試験管内ユビキチン化実験では RNF219 による RAB21 ユビキチン化は確認できなかった。これらのことから、RNF219 は RAB21 をユビキチン化しない、もしくは RNF219 による RAB21 のユビキチン化には両者の物理的相互作用を媒介する足場環境が必要である、という二つの可能性が考えられた。そこで、後者の可能性を検証するため、以下の三つの実験を進めている。まず、*E. coli* から精製した RNF219 と RAB21 を用いて、これらが試験管内で直接相互作用するか否かを検討した。次に、HEK293T 細胞に Flag-RNF219 を発現させ、免疫沈降法によって細胞内環境での RNF219 と RAB21 の相互作用を検討した。最後に、RNF219 ノックダウン細胞に RNF219 $\Delta$ RING (ユビキチンリガーゼ不活性型 RNF219) を導入し、RNF219 のユビキチン化活性が RAB21 の発現抑制に必要かを検証した。現時点では RNF219 による RAB21 発現抑制にはユビキチン化活性が不必要であることが示唆されているが、未だ全ての実験を完遂できておらず結論を述べるにはさらなる検証が必要である。

084

ヒト頭蓋のサイズおよび形態の  
ゲノムワイド関連解析

座間味 夏帆 (学籍番号: 174202H)

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: 瀧 靖之, 竹内 光, Benjamin Thyreau (東北大学), 今西 規 (東海大学)

ヒトの頭の形やサイズは集団ごとに大きな差があることが知られている。また、同じ集団においても数世代の間に短頭化や長頭化することが知られており、環境要因が大きいことが示唆される。しかしながら、ヒト頭部形態において正常範囲内で個人差をもたらす遺伝的要因は明らかになっていない。本研究では、頭部 MRI 画像と遺伝子情報をもとにヒトの頭の形やサイズと関連する遺伝的多型をゲノムワイド関連解析 (GWAS) により探索することを目的とした。頭部 MRI 画像の解析では、リファレンス画像に設定した 4mm 間隔のグリッドを各サンプル画像にワーブすることによりその座標値を得て、プロクラステス分析による画像の重ね合わせの後、主成分分析を行った。ゲノムワイド SNP タイピングを行い、画像解析で得られた重心サイズや第一主成分 (PC1) に着目しながら、1524 人を対象とした GWAS を行った。PC1 は長頭・短頭の指標であり、PC1 がマイナスだと短頭、プラスだと長頭であることを意味する。CS と PC1 それぞれに関連のある遺伝子変異をゲノムワイドで調べたところ、有意水準となる  $P < 5 \times 10^{-8}$  を示す SNP はみられなかった。しかしながら、PC1 において最も P 値が低かった rs202060415 は、下顎の突出・後退に関与していることが知られる MYO1H 上に存在するなど、いくつかの関連多型の候補が示された。さらに、先行の GWAS において顔形態に影響を与えることが報告されている SNP を抽出し、CS および PC1 との関連の結果を調べたところ、CS は rs11738462 と、PC1 は rs11738462, rs1982862, rs7559271 と  $P < 0.05$  水準で有意な関連があることが再現された。本研究において強い関連多型がみられなかったことは、頭部形態には環境要因が大きく働いていることを反映しているものと考えられる。今後、効果の弱い遺伝的要因を同定するためには、さらなるサンプルセットを用意し、再現解析を行う必要がある。



085

### ミトコンドリア DNA 解析による 先島諸島の古代人と現代人の系統分析

大城 亜伶 (学籍番号: 174207J)  
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: 神澤 秀明 (国立科学博物館)

先島諸島の歴史は、沖縄本島における貝塚時代に相当する時代には、下田原文化期に続いて無土器文化期時代へと断続的に変遷していき、グスク時代から沖縄本島との文化的統一が起こったとされる。下田原文化および無土器文化の担い手と由来は未だ謎に包まれており、グスク時代よりも前と以降の時代に先島諸島で生活していたヒトの系統的繋がりが未だにわかっていない。本研究では先島諸島の石垣島石垣市にある白保竿根田原洞穴遺跡から出土した古人骨と現代人のミトコンドリア DNA を比較解析することで、その系統的繋がりを調べることを目的とした。古代人のサンプルとして、国立科学博物館神澤秀明博士より提供された古人骨 2 体 (SIG1003 および SID1006) のシーケンスデータを対象とした。SIG1003 は無土器文化期 (年代測定 2312 ± 58BP)、SID1006 はグスク時代初期 (998 ± 61BP) の古人骨である。本研究では、現代人のサンプルとして 249 人を対象とし、Long-PCRseq の手法を用いてミトコンドリアゲノム配列を決定した。得られた配列に対し、MEGAX を用いて最尤系統樹を作成し、haplogrep2 を用いてハプログループに分類した。ミトコンドリア DNA のハプログループは SIG1003 が M9a1a1a, SIG1006 が M7a1a となった。古代および現代の全 251 サンプルのうち、SIG1006 とそれと同じ枝に属する一つの現代人ミトコンドリア DNA においてのみ 4596A という変異が見られた。プライベートな変異を共有していることからこの二個体が比較的最近祖先を共有していることが示された。一方で、SIG1003 と同じ M9a1a1a に分類された現代人配列においてはプライベートな変異の共有は見られなかった。従って本研究では、現代琉球人とグスク時代初期の古代人 (SIG1006) との間には直接の繋がりを示す痕跡が示されたが、約 2000 年前の無土器文化期石垣島の古代人 (SIG1003) との間には示されなかった。

086

### 培養神経細胞での FIP200 と Pyk2 による オートファジーの制御機構の研究

伊波 雅人 (学籍番号: 174130G)  
指導教員: ○仲嶺 三代美, 島原 英嗣, 山本 秀幸  
琉球大学大学院医学研究科生化学講座

神経細胞におけるオートファジーの制御機構を解明することは、凝集タンパク質の蓄積を伴う神経変性疾患の発症機序の解明および治療法の開発に重要である。FIP200 (FAK family-interacting protein of 200 kDa) はオートファジーに必要なタンパク質として知られている。一方で、非受容体型チロシンキナーゼである proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) の阻害タンパク質としても知られている。私は、マウス視床下部由来の培養神経細胞 (GT1-7 細胞) を用いて、Pyk2、および ERK の活性化への FIP200 の関与を検討した。次に、GT1-7 細胞にてオートファジーを検出する系を確立し、FIP200 と Pyk2 のオートファジーへの関与について検討した。GT1-7 細胞へ FIP200 に対する siRNA を導入し、FIP200 をノックダウン (KD) すると、Pyk2 のタンパク量が僅かに減少した。また、ゴナドトロピン放出ホルモンによる Pyk2 と ERK の活性化も抑制された。次に、DAPGreen 蛍光色素を用いて、アミノ酸欠損培地でオートファジー誘導細胞を蛍光顕微鏡で観察すると、FIP200 の KD 細胞では蛍光が減少した。さらに、ウエスタンブロット法では、アミノ酸欠損培地でオートファジーのマーカーである LC3-II が減少した。一方で、Pyk2 の KD および Pyk2 阻害薬 (PF431396) の存在下では、LC3-II が増加した。さらに、Pyk2 の過剰発現では、LC3-II が減少した。以上の結果より、GT1-7 細胞においても、FIP200 はオートファジーを促進させることが確認された。一方、Pyk2 はオートファジーを抑制することが初めて明らかになった。これらの結果は、神経細胞に FIP200 と Pyk2 によるオートファジーの制御機構が存在することを示唆している。

087

### Loss of Phf2 attenuates PanIN formation in a Kras driven mouse model.

Daisuke Kurihara (学籍番号: 174212e)  
指導教員: ○Taisuke Baba<sup>1)</sup>, Thomas Hank<sup>1)</sup>, Andrew Liss<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup> Department of Surgery, Massachusetts General Hospital/  
Harvard Medical school

**Background** Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is highly lethal disease with a 5-year survival rate of less than 5%. Kras mutation is a major driving force of PDAC carcinogenesis, and a Kras driven mouse combined with pancreatic injury is a well-established model of PDAC carcinogenesis through pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) formation. Since our previous epigenetic regulator screening indicated that Plant homeodomain finger 2 (Phf2), a histone demethylase, is a key protein in the PDAC proliferation, we investigated the role of Phf2 in the PanIN formation using a Kras driven mouse model with Phf2 knockout. **Methods** The knockout of Phf2 and activation of KrasG12D mutation were induced by Cre-loxP system. Three strains of genetically engineered mice (Phf2<sup>-/-</sup>, KrasG12D<sup>+/+</sup>, KrasG12D<sup>+/+</sup>; Phf2<sup>-/-</sup>) were euthanized at time points of 1, 3, 6 months and their pancreata were analyzed by H&E staining, Alcian blue staining and immunohistochemistry (Phf2 and amylase).

**Results** Phf2<sup>-/-</sup> mice exhibited normal histology up to 6 months after injury. KrasG12D<sup>+/+</sup> mice exhibited abundant PanIN formation. Acinar cells were left in only 13.5% of pancreas at 1 months, and it was decreased to almost 0% by 6 months. In contrast, KrasG12D<sup>+/+</sup>; Phf2<sup>-/-</sup> strain exhibited significantly smaller PanIN lesion (0.396%, p<0.000) with a larger acinar cell area (49.3%, p<0.000) at 1 month and this tendency was observed up to 6 months time point.

**Conclusion** Loss of Phf2 significantly attenuated PanIN formation in a Kras driven mouse model. Phf2 can be a novel treatment target of PDAC carcinogenesis.

088

### 特発性側弯症手術における術中 CT を用いた 椎弓根スクリュー逸脱率の検討

平良 有弥野 (学籍番号: 174199D)  
指導教員: ○島袋 孝尚, 山川 慶, 金城 英雄, 西田 康太郎  
琉球大学整形外科科学講座

**【目的】** 側弯症手術において、椎弓根スクリュー (Pedicule Screw: 以下 PS) を刺入する矯正固定が行われ良好な成績をもたらしている。しかし PS 刺入にはスクリューの椎弓根からの逸脱による脊髄・神経根障害、血管損傷などの危険が伴う。本研究の目的は特発性側弯症手術に対して術中 CT 支援下に刺入した PS の逸脱を検討することである。

**【対象と方法】** 2014 年 3 月から 2019 年 12 月の間に後方矯正固定術を施行した胸椎カーブを主カーブとした特発性側弯症 20 例を対象とした。男性 1 例、女性 19 例、平均年齢は 15.7 (12 ~ 21) 歳、胸椎 Cobb 角は平均 49.4 (43 ~ 80)° であった。術中 CT 支援下に刺入した PS は第 2 胸椎から第 3 腰椎に位置し合計 386 本であった。検討項目は① PS 逸脱率、② PS 刺入レベルと逸脱本数、③カーブ別の逸脱本数、④術前の椎弓根径、PS・椎弓根径比、⑤合併症とした。計測は OsiriX を用いて手術前後 CT データを Multiplanar Reconstruction (MPR) 法で椎体ごとに行った。

**【結果】** PS は Rao 分類 grade0 (逸脱なし) が 355 本、grade1 (2mm 未満の逸脱) が 21 本、grade2 (2 ~ 4mm の逸脱) が 5 本、grade3 (4mm 以上) が 5 本で、逸脱率は 8.0% であった。胸椎の凹側に逸脱が多かった。椎弓根径は、逸脱なし群が 5.2 ± 1.6mm、逸脱群が 3.9 ± 1.2mm で、逸脱群に細い傾向があった。また、スクリュー・椎弓根径比は、逸脱なし群は 1.1 ± 0.6、逸脱群は 1.4 ± 0.5 で、逸脱群が大きい傾向であった。PS 逸脱にまつわる合併症は認めなかった。

**【考察】** 側弯後方矯正固定術において術中 CT 支援下の PS 刺入は精度が高く有用であった。特発性側弯症の頂椎付近凹側は回旋も大きく椎弓根が細いため PS 刺入の際は注意が必要である。

089

## 当院ダウン症候群患者における合併症別成長曲線の検討

菅谷 美優紀 (学籍番号: 174115C)

指導教員: ○兼次 拓也, 金城 紀子, 知念 安紹, 中西 浩一  
琉球大学大学院医学研究科育成医学講座

【背景】ダウン症候群(以下ダウン症)の合併症は、心疾患、甲状腺疾患、消化管閉鎖が多い。またこれらの合併症児への発育の影響を検討した報告は少ない。【目的】本研究の目的は、ダウン症小児の合併症の発育への影響を検討するため、合併症の有無により区別し、成長曲線を作成することである。【方法】対象は1989年から2019年に出生し、当院に通院歴のあるダウン症患者158人(男子75人、女子83人)で、先天性心疾患(CHD)、甲状腺疾患ありと合併症なしの3群に分け、足立らと同様の方法で成長曲線を作成した。また、乳児期、小児期、思春期の各分岐点となる4歳、14歳での身長を比較した。【結果】総数158人中、CHD合併例は53例、内訳は動脈管開存、心房/心室中隔欠損であった。甲状腺疾患合併は20例、内訳は甲状腺機能低下症、慢性甲状腺炎であった。4歳時点でのCHD、甲状腺疾患合併ダウン症患者、ダウン症全体の平均身長/体重はそれぞれ90.0cm、13.3kg、91.3cm、13.3kg、91.6cm、13.8kgと差はなく、今回足立らが報告した最終身長に近い14歳時点でも同様の結果であった。

【考察】黒木らは、CHDを有するダウン症の乳幼児期は発達障害がより高度であることを報告している。我々の検討では差は認めず、その理由としてチアノーゼ性心疾患等の重症例がないことが考えられた。また、甲状腺疾患の有無でも4歳時点での身長に差はなく、その理由として、甲状腺疾患に対する早期介入によるものと推測された。ダウン症の身体発達パターンには特徴があり、合併症の有無によっても異なる可能性がある。さらに症例を蓄積しダウン症児の発育曲線を作成することが重要である。【結論】合併症の有無に関わらず、ダウン症小児の成長曲線は同様であった。ダウン症小児の管理において、その成長特性を十分に理解し、合併症の程度に配慮する必要がある。

090

## ゲノムワイド関連解析による2型糖尿病の疾患感受性ゲノム領域の同定

田中 利明 (学籍番号: 174214B)

指導教員: 今村 美菜子, 松波 雅俊, 前田 士郎  
琉球大学大学院医学研究科先進ゲノム検査医学講座

【背景と目的】2型糖尿病(Type 2 diabetes: T2D)の発症には遺伝要因と環境要因が関与する。本研究では日本人集団におけるゲノムワイド関連解析(GWAS)により、T2Dの疾患感受性ゲノム領域の探索を行った。

【方法】(1) National Bioscience Database Center が公開している研究データ「Research ID: hum0014.v18」より T2D 194 人 (case), その他の疾患を持つ患者 6,418 人 (control) の High-density oligonucleotide arrays (Perlegen 社) により決定された遺伝型やアレル頻度などのデータを得た。Quality Control (QC) として、① suspicious SNPs, ② Hardy-Weinberg 平衡試験の P 値が  $1.0 \times 10^{-6}$  未満の SNPs, ③ call rate が 0.95 未満の SNPs, ④ 16 疾患以上のデータがない SNPs を除外した。さらに⑤マイナーアレル頻度が control 集団で 0.05 未満の SNPs を除外した。QC 後の SNP 数は 184,370 だった。cochrane-Armitage 検定を用いて case-control 解析を行い、Locus zoom を用いて Regional plot を作成した(2) GTEX Portal を用いて expression Quantitative Trait Loci (eQTL) 解析を行った。

【結果】(1) GWAS の結果、ゲノムワイド水準 ( $P=5.0 \times 10^{-8}$ ) を満たす SNPs はなかったため、P 値が  $1.0 \times 10^{-4}$  未満の 10SNPs を T2D 関連候補 SNPs とした。最も関連が強かった SNP は 11 番染色体上の rs17257677 で risk allele は G,  $P=1.31 \times 10^{-7}$ , odds 比=2.26, 95% 信頼区間 1.66 ~ 3.07 であった。(2) eQTL 解析の結果、上流下流 1Mbp の領域内では精巣における TRIM49 の発現が rs17257677 と最も強い相関を示した。しかし、最も近傍の遺伝子である DISC1FP1 を含めたいずれの遺伝子発現も rs17257677 との統計学的に有意な相関はみられなかった。

【結論】T2D に関連する 10 か所の候補領域を同定した。いずれもゲノムワイド水準を超えるものではなく、そのため、サンプル数を増やす、control 群に健常者を追加するなどの検証が必要である。

091

## 沖縄県内の医療機関で2019年に検出された Human rhinovirus の遺伝子解析

仲地 咲 (学籍番号: 174196K)

指導教員: 西山 直哉, 上 若生, 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(第一内科)

【目的】

第一内科では、呼吸器感染症の原因微生物の同定目的に呼吸器系ウイルスを標的とした multiplex PCR を実施している。2019年には琉球大学病院を含めた沖縄県内の病院から提出された324検体で検査を行い、うち、human rhinovirus (HRV) が最多の34検体(10.4%)で認められ、influenzavirus A が次いで13検体(4%)であった。本研究では、当研究室で認めたHRVの遺伝子型別を行い、沖縄県での呼吸器感染症におけるHRVの傾向を検討することを目的とした。

【方法】

呼吸器臨床検体から QIAamp MinElute Virus Spin Kit (QIAGEN) を用いて核酸を抽出し Anyplex RV16 (Seegene, Korea) を用いて multiplex PCR を行い、HRV が陽性となった 32 検体を対象とした。SuperScript III First-Strand (Invitrogen, CA) により cDNA 合成と、HRV VP4-2 遺伝子を標的としたプライマーを用いた PCR (two-step RT-PCT 法) を実施し、得られた PCR 産物をサンガー法によるシーケンスにより塩基配列を決定し、BLAST 解析による遺伝子型別と系統樹を作成した。

【結果】

実験に用いた 35 検体のうち 29 検体で遺伝子型別可能であった。BLAST の相同検索をした結果、31 検体中 26 検体が human rhinovirus C15 strain HRV/C Buenos Aires/Arg/001/2017 と相同性が高かった。他には A31 型、C17 型、C 型(型別不明)をそれぞれ 1 検体ずつ認めた。

【結論】

今回検討した HRV 陽性検体のうち、最も多い遺伝子型は C15 型であった。HRV-C は、近年の疫学研究で HRV-A と並んで多く検出され、呼吸器疾患増悪に関連していることが報告されている。

092

## 門脈域外縁における形質細胞関連マーカー陽性細胞の分布解析を用いた AIH の診断サポート法の開発

山崎 郁夫 (学籍番号: 174215K)

指導教員: 小無田 美菜<sup>1)</sup>, 加留部 謙之輔<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Hepato-Biliary-Pancreas pathology Service d'Anatomie pathologique Cliniques universitaires Saint-Luc,<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学

AIH (auto immune hepatitis) は中年女性に好発し肝障害をきたす疾患である。AIH の機序は自己免疫の関与が想定されている。AIH の多くの症例ではステロイド投与が著効し、早期治療により予後良好が望める。しかし、診断項目の1つである肝生検において、AIH の病理学的所見を正確に同定するためには、専門医としての高い技術が必要となるため、一般病理医・臨床医にも容易に同定できる方法の開発が望まれてきた。

AIH では形質細胞やその前駆細胞が門脈域外縁に局在する傾向が見られる。そこで、それらを同定できる免疫染色を用いて、門脈域外縁における免疫染色陽性細胞の分布を基に AIH の診断サポートの有用性を調べることを本研究の目的とした。臨床データは Saint-Luc 大学病院の 49 症例 (AIH 確診断 21 症例, AIH 疑診 15 症例, 対照例 13 症例) を用いた。

実験 1 では、免疫染色に MUM-1, CD79a, CD20, Kapper & Lambda を用いて門脈域外縁におけるこれら形質細胞関連マーカーの分布を基に典型像、ボーダーライン、非典型像に分類した。典型像とボーダーラインを病理学的 AIH、非典型像は非 AIH として解析し、どの免疫染色が最適であるのかを調べた。各マーカーを比較した結果、MUM-1 染色を用いた分類が感度、特異度共に高い値を示した。

実験 2 では、線維化のない急性肝炎などを主体とした F0 の症例と、慢性肝炎などで線維化の進行した F1 ~ 4 の症例とに分けて MUM-1 染色を用いて分類した。F0 の症例では感度 100%、特異度 100% であるのに対して、F1 ~ 4 の症例では感度 88%、特異度 83% であった。

また、実験 2 において、対照例である原発性胆汁性肝硬変 (PBC) の 2 症例が典型像に分類された。PBC と AIH は、両疾患がオーバーラップすることもあり、鑑別や診断が困難な場合も多い。本結果がオーバーラップを示唆するものなのか、偽陽性であるのかの追試、検証が必要である。

093

## 癌進行調節因子 TESC のシグナル伝達の検証

岸本 恵門 (学籍番号: 174123D)  
 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】テスカリン (TESC) は EF ハンドカルシウム結合蛋白質である。多くの癌で TESC が発現し、発現量と癌の予後との関連が報告されており、TESC は癌の進行を調節する因子と想定されている。しかし、TESC の働きはまだ不明なことが多い。先行研究で TESC は GSK3 $\beta$  の 9 番目のセリン (S9) のリン酸化を抑制し GSK3 $\beta$  を活性化することが示されたが、Akt/GSK3 $\beta$  やその他の経路において一貫した結果はまだ得られておらず、今回 HeLa 細胞 (ヒト子宮頸癌細胞) に TESC を恒常的に過剰発現させた TESC-HeLa 細胞株を使い、TESC の細胞内シグナル伝達を調べてみることにした。

【実験方法】① TESC-HeLa 細胞と HeLa 細胞の数を MTS を用いた比色定量分析で時間経過ごとに調べ、増殖能の違いを調べた。② TESC-HeLa 細胞、HeLa 細胞の撒かれたディッシュに同じ太さでスクラッチをして、継時観察し、それぞれの細胞の遊走能を調べた。③ TESC-HeLa 細胞と HeLa 細胞のタンパク質を回収し、ウェスタンブロットでシグナル伝達の解析をした。(GSK3b, Akt, S6Kinase) ④ GSK3b 阻害剤を入れた TESC-HeLa 細胞と HeLa 細胞の細胞遊走の違いを調べた。

【結果】TESC-HeLa 細胞は HeLa 細胞に比べて増殖能、遊走能共に高く、TESC の過剰発現により GSK3 $\beta$  (S9) のリン酸化量の低下、Akt (S473) のリン酸化の増加が起きていた。GSK3 $\beta$  阻害剤を TESC-HeLa に入れると遊走能が低下した。

【考察】結果から TESC-HeLa では遊走能が上昇することと GSK3 $\beta$  阻害により部分的に遊走能が低下することから、TESC-HeLa は GSK3 $\beta$  を一つの因子として TESC が遊走能に関わっている可能性が示唆された。TESC が GSK3 $\beta$  や Akt を介して癌進行に関わっていることが示唆された。

094

## 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 Viable but not culturable (VBNC) 状態への移行に関する検討

谷垣 親禾文 (学籍番号: 174191J)  
 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 年に都市河川の A 川から *Vibrio cholerae* O1 (生物型 EI Tor) (AJ 株) 12 株が分離され、その内 5 株からコレラトキシン (CT) の産生が確認された。2019 年夏に A 川においてコレラ菌の分離を試みた処コレラ菌は分離できなかった。細菌には「生存するが培養不可能 (Viable But Not Culturable ; VBNC) の状態が存在する。そこで腸炎ピブリオの VBNC 移行に関する論文を参考に、コレラ菌を VBNC 状態に移行できるか、また O1 コレラ菌の生物型、臨床・環境分離株、CT 産生性等の差により、VBNC 導入効率に差があるかを検討した。さらに VBNC 状態の O1 コレラ菌から直接病原性遺伝子が検出できるかを検討した。

【材料・方法】被検コレラ菌株として、標準株である N16961 (*V. cholerae* O1, 生物型 EI Tor) 株、CT 産生性 AJ 株、および生物型、臨床分離 / 環境分離、CT 産生の有無で 3 群に分けた O1 コレラ菌 6 株を用いた。それぞれの株を栄養の限定された培地 (飢餓培地) で 33-46 日間培養し、普通寒天培地 (NA) で培養陰性かつ栄養素を補填した 0.1% ビルビン酸-NA で培養陽性となった場合を VBNC であるとした。被検菌株の VBNC 導入効率を検討した。また VBNC 株において、*OmpW*, *ctxA*, *O1* の各遺伝子が検出できるかを PCR 法で検討した。

【結果と考察】飢餓培地を用いると、N16961 株は 46 日間で VBNC 状態に導入できた。CT 産生性 AJ 株も VBNC に導入可能であり所要日数は N16961 株の約半分であった。比較した 3 群間において VBNC 導入効率に明瞭な差は認められなかった。安謝川の土壌には VBNC 状態の O1 コレラ菌が存在する可能性は否定できず、PCR を用いた病原遺伝子の検出は試みる価値があるものと思われた。

095

## 麻疹ウイルスの RNA 合成における C, P 蛋白質の関係

渡辺 ひかる (学籍番号: 164178G)  
 指導教員: 大野 真治  
 琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【目的】

麻疹ウイルスの C 蛋白質はウイルス RNA の転写・複製を制御するとされている。麻疹ウイルスの P 遺伝子からは P 蛋白質だけでなく、C 蛋白質も産生される。RNA 合成における両蛋白質の関係を調べるため、ミニゲノム法を用いた実験を試みた。

【方法と結果】

蛋白質の発現と分子量を調べるため、ウェスタンブロット法を行ない、感染細胞中での P, C 蛋白質の発現を確認した。次に蛋白質の局在を調べるため、蛍光免疫染色を行った。これによって、ウイルス感染により多核巨細胞が形成され、P 蛋白質と C 蛋白質が細胞質内の同じ場所に局在していることが分かった。さらに、ミニゲノム法とルシフェラーゼアッセイを組み合わせることで、麻疹ウイルス RNA の転写・複製を評価した。ミニゲノム法とはウイルス増殖に必須の N, L, P 蛋白質と複製に必要な部分を残し、大部分をルシフェラーゼなどの遺伝子に置き換えたミニゲノムを用いてウイルス RNA の転写・複製を評価する実験法である。また、ルシフェラーゼアッセイとはルシフェラーゼ遺伝子産物による化学発光を測定することで、遺伝子の発現量を知る実験法である。その結果、P, C 両蛋白質が産生される Pwt が P 蛋白質のみ産生される P $\Delta$ C の発光量を上回った。

【考察】

以上の結果より、C 蛋白質が麻疹ウイルスの RNA 合成に対してプラスに関与している可能性が示唆された。しかし、これを結論づけるには反復した実験を行うことが不可欠である。

096

## ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染細胞における OX40L および OX40 の役割

宮城 遥 (学籍番号: 174145E)  
 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)

【背景・目的】TNF 受容体 OX40 は活性化 T 細胞に発現する。その下流シグナルは転写因子 NF- $\kappa$ B を活性化し、細胞増殖に関わる遺伝子の発現を誘導する。成人 T 細胞白血病 (ATL) は、ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) 感染に起因する極めて悪性度の高い白血病である。ATL 細胞では OX40 遺伝子の発現が上昇し、また HTLV-1 形質転換細胞上にはその抗原 OX40L が発現していることから、OX40 シグナルの活性化は ATL 細胞の増殖に関与することが示唆される。本研究では、HTLV-1 感染細胞における OX40 および OX40L のノックダウンシステムを構築し、OX40 シグナルが細胞増殖関連遺伝子の発現に与える影響を解析した。

【方法】健康人 Treg 由来 HTLV-1 感染細胞株 YT#1、および ATL 患者由来細胞株 026i へ OX40 および OX40L に対する siRNA を導入し、48 時間後のノックダウン効果をフローサイトメトリーで解析した。さらに細胞増殖関連遺伝子の発現を半定量 RT-PCR により解析した。

【結果・考察】YT#1 細胞において OX40 および OX40L の発現を抑制すると、アポトーシス関連遺伝子である Bcl-xL, Survivin, Bax および細胞周期関連遺伝子である p53 および p21 の発現が低下した。一方、026i 細胞において OX40 および OX40L の発現を抑制しても、これらの遺伝子発現に差は見られなかった。今回解析した遺伝子は、転写因子 NF- $\kappa$ B により発現を制御されていることが報告されており、YT#1 細胞では OX40 シグナルが NF- $\kappa$ B を活性化することが示唆された。

097

## 神経膠芽腫の細胞系譜学的解析

金城 宏武 (学籍番号: 174162E)  
 指導教員: 菅原 健一, 外間 洋平, 長嶺 英樹, ○石内 勝吾  
 琉球大学医学研究科脳神経外科学講座

神経膠芽腫 (GBM: glioblastoma multiforme) は、全身のがんの中で最も悪性度が高い腫瘍の一つであり、効果的な治療法の開発が待たれている。同じ脳悪性腫瘍の中で、比較的予後良好な神経膠腫が高分化したグリアの腫瘍であるのに対して、GBM はより未分化なグリアが腫瘍化することが示唆されている。本研究では、免疫染色を用いて GBM を細胞系譜学的に解析し、その起源細胞の分化段階を同定、及び増殖能を明らかにすることを試み、興味深い知見を得ることに成功した。

まず各分化段階に特異的なマーカーとして、グリアのマーカーである GFAP、ニューロンのマーカーである doublecortin (dcx)、幹細胞のマーカーである nestin を用意し、GBM 患者から採取した腫瘍の連続切片をそれぞれ染色し比較した。その結果、GFAP 陽性となる細胞群と、dcx 陽性となる細胞群がそれぞれ境界明瞭に分かれて存在している様子が認められた。さらに、nestin は両領域で陽性となり、GBM を構成している細胞はグリアだけでなくニューロン及び神経幹細胞を含むことがわかった。

次にこれら分化段階の異なる各細胞群について増殖能に違いがあるか調べた。MIB-1 は細胞の増殖能を示す有用なマーカーである。この染色を前述した 2 領域に対して行い、それぞれの増殖能を全体に対する MIB-1 陽性細胞の割合として数値化した。その結果、グリア系領域で 10.8%、ニューロン系領域で 31.7% となり、約 3 倍の有意差が認められた。

これらの結果から、グリア系腫瘍と定義される GBM は、グリアだけでなくその上流の神経幹細胞も変異し、そこから分化するニューロンも腫瘍細胞として含む可能性があり、その悪性度はむしろニューロンの方が高いと考えられる。これは GBM 腫瘍の細胞構成と予後の関連性、さらには新たな治療法を検討する手がかりとなりうる。

098

## 第 3 相試験登録可能および不可能な抗凝固薬服用中の非弁膜症性心房細動患者におけるアウトカムの差

仲榮真 諒太 (学籍番号: 174129C)  
 指導教員: ○三輪 宜一, 植田 真一郎  
 琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

【背景・目的】

直接経口抗凝固薬 (DOACs) は非弁膜症性心房細動患者における第 3 相試験で有効性、安全性で非劣性を示し、本邦でも薬事承認された。しかし薬事承認のための臨床試験は問題の起こりにくい患者を選択して行われることが多く、必ずしも実際の診療で遭遇する患者を反映していない可能性がある。本研究は 2013 年の時点でワルファリンを服用している非弁膜症性心房細動患者を連続登録しコホート研究を行い、DOACs 第 3 相試験に登録可能な患者と除外される患者の予後を比較した。

【方法】

研究分担施設において 8400 名の 2013 年の時点でワルファリンを服用している非弁膜症性心房細動患者を連続登録し、4 年間のフォローアップを行い、経過中に発生した重篤な出血 (主要エンドポイント) 脳卒中および全身塞栓症、心筋梗塞、死亡についてのデータを収集した。登録時データと各 DOACs の第 3 相試験の選択除外基準から登録可能患者と不可能患者に分けた。生存解析は Kaplan-Meier 法、ログランクテストで行い、Cox の比例ハザードモデルで多変量解析を行い、登録可能患者と不可能患者の予後の比較を行った。

【結果】

重篤な出血、心筋梗塞、脳卒中、および全身塞栓症では登録可能患者と不可能患者に優位な差は見られなかった。しかし、死亡には優位な差が見られた。

099

## 当科におけるダウン症候群患者の成長曲線作成の試み

足立 達哉 (学籍番号: 174211G)  
 指導教員: ○兼次 拓也, 金城 紀子, 知念 安紹, 中西 浩一  
 琉球大学大学院医学研究科育成医学講座

【背景】ダウン症候群 (以下ダウン症) は、染色体異常中最多で、様々な合併症を有する。乳幼児期は成長発達がやや遅れ、思春期以降は低身長で肥満傾向となる。そのため、保健指導介入のための独自の成長曲線が重要となる。我が国では、藤田や黒木らのダウン症成長曲線の報告などが散見されるのみである。そのため、臨床的なダウン症小児の体格評価は難しいのが現状である。【目的】本研究の目的は、当院におけるダウン症児の身長・体重データを用いて、臨床現場で使用可能な成長曲線を作成し、標準成長曲線と比較することでダウン症の低身長や肥満の問題解決の指標を検討することである。【方法】対象は 1989 年から 2019 年に出生し、琉球大学医学部附属病院に通院歴のあるダウン症患者 158 人 (男子 75 人, 女子 83 人) で、カルテを用いて後方視的に検討した。受診日の身長と体重のデータを年齢ごとに収集し平均値を算出した。その値を 2000 年度版日本人小児標準成長曲線上に点描し、縦断的成長曲線を作成した。【結果】男女共に乳幼児期から学童期にかけて標準成長曲線上-2SD 前後にて推移し、15 歳頃に最終身長 (-3SD 以下) に到達した。また、思春期のスパートは標準より 1~2 年早い傾向が見られた (男子 10.5 歳, 女子 8 歳)。一方、体重増加は標準曲線-1SD に沿って断続的に増加するため、相対的に肥満が顕在化した。【考察】当科におけるダウン症は、乳幼児期から学童期にかけて標準成長曲線上-2SD 前後にて推移し、15 歳までに最終身長に到達した。この結果は、過去の報告と同様であった。一方、15 歳以降も体重増加が持続し、身長および体重のスパートが一致せず、思春期完了後の肥満に対する介入の必要性を確認した。【結語】当科におけるダウン症の成長曲線は、過去の報告と同様であった。ダウン症成長曲線を用いる事により、肥満予防防止のための適切な介入が可能と考えられる。

100

## ブタ臍島分離における臓器保存液 : MHL 溶液の検討

與那覇 茉祐子 (学籍番号: 164202C)  
 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】臍島移植において、臓器保存中の臍臓へのダメージがそれに続く臍島分離の成績悪化へ影響を及ぼすことがわかっている。University of Wisconsin (UW) 溶液は臍臓保存において広く使われている保存液であるが、コラゲナーゼ抑制などの欠点がある。一方で、Modified-Kyoto (MK) 溶液はコラゲナーゼ抑制効果が低く、トリプシン抑制効果もあることから臍島分離前の臍臓保存に適していることを、我々は過去に報告している。本研究では modified HL (MHL) 溶液を用いて臍臓保存を行ったのち、ブタ臍島分離を行い、UW 溶液および MK 溶液との比較を行った。

【方法】MHL 溶液は HL 溶液に ulinastatin (トリプシン抑制剤) を加えて作製、MK 溶液は ETK 溶液に ulinastatin を加えて作製した。臍臓を摘出後、すぐに主幹管にカニューレを挿入し、保存溶液を注入した。臍臓は、臍島分離が行われるまでおよそ 18 時間の間 4°C で保存された。臍島分離の手順は、Edmonton 法に基づいて行った。

【結果】UW 保存群と MHL 保存群の比較では、MHL 保存群の方が有意に臍島収量は多かった。また、分離臍島の細胞内 ATP 濃度が MHL 保存群の方が有意に高かった。さらに、糖尿病モデルマウスへの移植において、MHL 保存群の方が UW 保存群と比べて有意に血糖改善率が高かった。一方、MK 保存群と MHL 保存群の比較では、臍島収量、細胞内 ATP 濃度、血糖改善率のいずれも有意差は認められなかった。

【結語】ブタ臍島移植において MHL 溶液は UW 溶液よりも優れた保存液であると考えられた。一方で、MK 溶液と MHL 溶液との比較では有意差は認められず、同等の効果であると考えられた。

101

### 単一細胞レベルでの網羅的遺伝子発現解析による ヒト記憶型病原性 Th2 細胞の同定および 分化経路の検討

池間 瑛人 (学籍番号: 174147B)

指導教員: ○木内 政宏<sup>2)</sup>, 柳生 洋行<sup>2)</sup>, 小久保 幸太<sup>2)</sup>, 平原 潔<sup>2)</sup>,  
中山 俊憲<sup>2)</sup> 岸本 英博<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 琉球大学医学部寄生虫・免疫病因病態学<sup>2)</sup> 千葉大学医学部免疫発生学

好酸球性副鼻腔炎 (ECRS) は難治性の慢性副鼻腔炎であり, 鼻腔ポリープの形成や副鼻腔粘膜への顕著な好酸球の浸潤を特徴とする。ポリープは鼻孔から飛び出るほど肥大することもあり手術によって除去できるが, 術後のステロイド内服を中断すると再発することが多い。患者数は増加傾向にあり, 病態の解明と治療薬の開発が望まれている。近年の研究から ECRS 患者のポリープ中に好酸球を誘導する IL-5 を高産生する記憶型病原性 2 型ヘルパー T 細胞 (Tpath2) が多く浸潤し, 病態形成に深く関与していることが明らかになった。本研究では細胞 1 つ 1 つの遺伝子発現を網羅的に解析することができる Single Cell RNA-sequence (sc RNA-seq) を用いて Tpath2 の形成機構を調べた。まず ECRS 患者のポリープ病変および末梢血から白血球のみを単離し, sc RNA-seq を用いて細胞 1 つ 1 つの遺伝子発現を網羅的に解析した。解析したデータを多変量解析の一つである主成分分析法 (UMAP) を用いて, 単一細胞ごとの全遺伝子発現パターンを 2 次元に射影し, 全白血球細胞の遺伝子発現プロファイルを明らかにした。また, 各白血球細胞集団に特徴的な遺伝子の発現を解析し各種細胞集団を同定した。次に CD4 陽性 T 細胞集団を抽出・再解析することで各ヘルパー T 細胞 (Th) サブセットを同定した。そして Th2 集団の中に IL1RL1 (ST2) および IL-5, 13 などの Th2 サイトカインを高発現する Tpath2 集団を同定した。最後に Th2 の集団について, 細胞の連続性 (系譜) を解析する手法である偽時系列解析を使い遺伝子発現プロファイルから Tpath2 の分化経路の検討を行なった結果, ポリープ中の Th2 において遺伝子発現変化の連続性 (系譜) が示された。系譜の終端に ST2 陽性の細胞集団を認めたことから, Tpath2 集団が ST2 陰性 Th2 集団より分化することが示唆された。今後は Tpath2 分化を誘導する因子の同定および分化に関わる分子メカニズムの解析を進める予定である。

103

### 溶血とトランサミンが 家兎血小板凝集能に与える影響

新垣 基 (学籍番号: 174158G)

指導教員: ○中村 真理子, 貴島 ちあき, 高松 岳矢, 片桐 千秋,  
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

【背景と目的】血小板凝集に影響を与える因子として, 温度や溶血, 薬剤や病態などがある。本研究は, ウサギ (日本白色) の血液を用いて, 溶血血漿 (以下, 溶血) とトランサミンの血小板への影響について検討した。【方法】抗凝固剤 (クエン酸ナトリウム) を用いて, ウサギ耳弁静脈から血液を採取し, 多血小板血漿 (PRP) と乏血小板血漿 (PPP) を作製した。血小板凝集能はヘマトレーサーにて測定した。惹起物は, コラーゲンと ADP を用いた。惹起物濃度は, 各種濃度の凝集程度を観察し決定した。形態観察は, LeicaTCS SP5 を使用した。【実験 1】溶血は, ホモゲナイザーを用いて, 血液を 5 回, 20 回と細碎し作製した。その溶血を PRP に添加し, 凝集能を測定した。【実験 2】各種濃度のトランサミンを PRP に添加し, 凝集能を測定した。各実験のコントロールには, 生理的食塩水を用いた。【結果と考察】【実験 1】溶血と凝集能: 溶血添加後の血小板凝集能は増強した。形態学的観察から溶血のみ添加で, 血小板凝集が観られた。文献的考察から, 溶血に含まれる赤血球内 ADP が凝集能の増強に影響していると考えられる。【実験 2】トランサミンと凝集能: トランサミンの濃度依存性に血小板凝集能は減少した。トランサミンの血小板への作用を分析する目的で, 血小板活性化時に血小板膜表面に出現する P-セレクチンと血小板粘着に関与する GPIb $\alpha$  を免疫染色し観察した。トランサミンの有無で血小板膜上 GPIb $\alpha$  に差はなかった。一方, トランサミン添加時, P-セレクチンは, 血小板膜に多く観察された。これらの事から, 血小板はトランサミン (0.4mg/mL) により活性化され, GPIb $\alpha$  以外の血小板膜受容体が損傷し, 惹起物への反応性が低下したと推察される。その為, トランサミン添加後の凝集能は減少したと考えられる。

102

### Investigating the Role of Testis-expressed Protein 2 in Lipid Transfer at Membrane Contact Sites

Soh Unten (学籍番号: 174210J)

指導教員: ○Y Saheki<sup>1)</sup>, T Naito<sup>1)</sup>Recommendation: M Matsushita<sup>2)</sup><sup>1)</sup> Cell Biol & Mol Neuro Lab, LKC School of Medicine, Nanyang Technological University, Singapore.<sup>2)</sup> Dep of Mol & Cell Physiol, University of the Ryukyus, Okinawa, Japan

Membrane contact sites (MCSs) form between different cellular compartments and play important roles in cell physiology, including lipid transfer and cell signaling. Recent studies have revealed that synaptotagmin-like mitochondrial-lipid-binding (SMP) domain-containing proteins are involved in non-vesicular lipid transfer at MCSs by the ability of their SMP domains to bind and transport a wide variety of lipid species. Yeast Nvj2 protein is one of such SMP domain-containing proteins. Nvj2 tethers the endoplasmic reticulum (ER) to the Golgi apparatus and plays a role in non-vesicular lipid trafficking that occur between these cellular structures. The mammalian homologue of Nvj2 is testis-expressed protein 2 (TEX2). The cellular functions of TEX2 are currently unknown. To gain further insights into the evolutionarily conserved functions of Nvj2/TEX2-family proteins, I used CRISPR/Cas9 system to generate HeLa cells lacking TEX2 for the analysis of TEX2 function in mammalian cells. First I designed the single guide RNA (sgRNA) sequences that target the SMP domain of TEX2 and tested the efficiency of these sgRNAs to induce double-stranded DNA break by surveyor assay. Then, plasmids encoding sgRNAs were transfected in HeLa cells to generate TEX2 KO cells. KO was confirmed by genomic PCR followed by Sanger sequencing. Finally, I observed TEX2 KO cells via spinning disc confocal microscopy and found that phosphoinositide PI4P accumulated around the Golgi apparatus in these cells. These results suggest that TEX2 may have a role in PI4P transfer at ER-Golgi contacts.

104

### マラリア原虫の small subunit ribosomal (SSUr) RNA 遺伝子を標的としたリアルタイム PCR 法を用いた診断

波平 有貴 (学籍番号: 174192G)

指導教員: 中津 雅美<sup>1)</sup>, 安田 (駒木) 加奈子<sup>1)</sup>, 山城 哲<sup>2)</sup>,  
狩野 繁之<sup>1)</sup><sup>1)</sup> 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<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景】マラリアは地球規模で, 年間 2 億人以上の患者を数え, 死者は 40 万人以上に上る。ヒトに感染するマラリア原虫には *Plasmodium falciparum* (熱帯熱マラリア原虫), *P. vivax* (三日熱マラリア原虫), *P. malariae* (四日熱マラリア原虫) に加えて少数ながら *P. ovale curtisi*, *P. ovale walliker* (いずれも卵形マラリア原虫) がある。東南アジアでは *P. knowlesi* というサルマラリア原虫のヒト感染例も報告されている。中でも *P. falciparum* は高度の原虫血症, 脳マラリア等の重症マラリアを引き起こし, 患者を死に至らしめる。そこで, 迅速にマラリア原虫の検出やその種類を特定することが重要である。現在, 国立国際医療研究センター (NCGM)・研究所で運用されている nested PCR では, PCR 産物の確認にアガロースゲル電気泳動法を用いており, 一度に多量のサンプルを診断することは難しい。

【目的】リアルタイム PCR 法は増幅の過程を直接測定できるため, 電気泳動の過程がいらす一度に多量のサンプルを扱うことができる。そこで, リアルタイム PCR 法を用いてマラリア原虫の検出やその種類を特定することが可能かどうか調べた。

【方法】SYBR Green を用いてリアルタイム PCR を行い, 上記 6 種類のマラリア原虫のプライマーの特異性を調べた。その中の *P. falciparum*, *P. vivax* に関しては検出限界を調べた。

【結果と考察】各種特異的なプライマーを用いたリアルタイム PCR でそれぞれのマラリア原虫の検出, 種の同定をすることが出来た。 *P. falciparum*, *P. vivax* の検出限界はそれぞれ  $5.64 \times 10^2$  コピー,  $5.00 \times 10$  コピーだった。しかし, *P. ovale curtisi*, *P. ovale walliker* の二種は遺伝的には異なる亜種であるが, それぞれに特異的なプライマー間で, クロス反応があった。

105

## Epstein-Barr ウイルスの gL タンパク質は T 細胞の表面に結合するか？

島袋 希真 (学籍番号: 174185D)  
指導教員: ○大野 真治  
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【背景】 Epstein-Barr (EB) ウイルスは、B 細胞に感染すると、伝染性単核症を引き起こし、悪性リンパ腫の原因ともなる。上皮細胞や T 細胞にも感染し、悪性腫瘍を引き起こす。B 細胞に感染するときは MHC class II を、上皮細胞に感染するときは Ephrin A を介することがわかっている。しかし、T 細胞に感染する際の受容体は不明である。先行研究で、ウイルス表面の gL タンパク質が上皮細胞への結合に重要な役割を担っていることが報告されているが、T 細胞についてはよくわかっていない。

【目的】 gL タンパク質と抗体の Fc 部分を繋げた gL-Fc が、胎児腎由来の 293T 細胞に結合することは発表されている。今回は、T 細胞への感染メカニズムを解明するために、gL-Fc が T 細胞株に結合するか調べる。

【方法】 ①ハイブリドーマから、ネガティブコントロールとして使用するモノクローナル抗体 (mAb) を回収する。② gL-Fc の発現プラスミドを大腸菌から回収し、293T 細胞に遺伝子導入する。培養上清中の gL-Fc をプロテイン A アガロースカラムで精製する。③ mAb と gL-Fc が、293T 細胞と 2 種類の T 細胞由来細胞株に結合するかを FACS で調べる。

【結果】 FACS の結果から、mAb は 293T 細胞にも、いずれの T 細胞にも結合しなかった。一方、gL-Fc は 293T 細胞にも 2 種類の T 細胞にも少し結合していた。

【考察】 gL-Fc は 293T 細胞にも T 細胞にも結合し、mAb は 293T 細胞にも T 細胞にも結合しなかったことから、gL-Fc は Fc 部分ではなく、gL 部分で細胞に結合していることが示唆された。しかし、FACS での右へのシフトが小さいため、細胞表面の gL が結合する分子は少ないと思われる。また、293T 細胞、T 細胞において gL と結合している分子が同じかどうかは不明であるので、今後調べる必要がある。

106

## ヒト T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) のがん遺伝子産物 Tax 抗原を定量する ELISA 法の開発とその応用 : 可溶性 Tax 抗原と Tax 抗原誘導

山城 菜裕子 (学籍番号: 174164B)  
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

HTLV-1 感染者は九州と沖縄地方に多く認められ、ATL などの原因となるウイルスである。HTLV-1 がコードするがん遺伝子産物 Tax 抗原は、癌化メカニズムに重要な役割をもつ。しかしこれまで Tax 抗原を定量するための方法は確立されていない。そこで、本研究はサンドイッチ ELISA 法による Tax 定量法の確立とその応用を目的とした。異なるエピトープを認識する 2 つの単クローン抗体を選別して確立した ELISA の感度は  $>3\text{ng/ml}$  であったが、チラミン増感法では 15 倍の  $>0.2\text{ng/ml}$  であった。本 ELISA 法を用いることにより HTLV-1 感染細胞株の細胞内及び細胞培養上清中の Tax 抗原の定量が可能となった。PGE<sub>2</sub> は HTLV-1 感染細胞株の Tax 抗原の発現を増加させるが、調べたどの HTLV-1 感染細胞株で上清中に可溶性 Tax 抗原を定量できた。PGE<sub>2</sub> の主要なレセプターである EP1,2,3,4 のアンタゴニストを用いて調べると HTLV-1 感染細胞株 YT#1 において EP3 のアンタゴニストを加えた際に PGE<sub>2</sub> による Tax 抗原発現促進が抑制されたことから、この細胞株では EP3 が PGE<sub>2</sub> シグナル伝達に関与していると考えられる。YT#1 細胞株で 2 種類の cAMP 類似物 (8-Bromo-cAMP sodium salt: PKA アクチベーター及び 8-pCPT-2-O-Me-cAMP-AM: Epac アクチベーター) を作用させると後者において PGE<sub>2</sub> と同様な Tax 抗原発現誘導が観察された。このことから PGE<sub>2</sub> を介するシグナルは cAMP と Epac を介して tax の転写誘導に働くと考えられる。近年、可溶性 Tax 抗原が細胞外のエキソソームに含まれていると報告されているが本研究では確認できなかった。本研究で確立された Tax 抗原の定量 ELISA 法を用いることにより今後さらなる Tax 抗原の研究が進むと期待される。

107

## AMPA 型グルタミン酸受容体阻害薬の高脂肪食摂取マウスへの影響

金城 日向子 (学籍番号: 174167F)  
指導教員: ○片桐 千秋, ○宮城 安代, 高木 博, 西村 正彦,  
上 薫, 石内 勝吾  
琉球大学医学研究科脳神経外科

近年、欧米食の普及によって脂質の多い食事が認知機能に影響を及ぼすという示唆があるが実際には不明である。脳神経外科の先行研究において高脂肪食摂取によりマウス海馬の神経活動が過活動になることが示されている。海馬における神経活動には、シナプス伝達効率やシナプス可塑性に関わるイオンチャネル型受容体である AMPA 型グルタミン酸受容体 (AMPA) が大きく関係している。本研究は、高脂肪食摂取と認知機能への影響について AMPA に着目し、その阻害薬であるペランパネル (PER) が過剰な神経細胞の興奮を抑え、保護することで認知機能の低下を防げるのではないかと仮説から、マウスを用いて高脂肪食と PER を併用し認知機能評価として行動解析を行った。

高脂肪食を 12 週間摂取させたマウス (HFD 群)、高脂肪食と PER 併用した群 (HFD+PER 群)、対照群として普通食の群 (ND 群) を用いた。行動解析は情動行動を示唆するオープンフィールドテスト、高架式十字迷路、記憶評価として新規物体認識テスト、恐怖条件付けテスト、運動能力への影響を回転ケージで解析した。結果、高脂肪食摂取の運動能力への影響は認められず、高所に対する不安様行動にも影響を与えないことが示された。しかし、オープンフィールドテストにおいて、高脂肪食摂取群、両群ともに中央区画滞在時間が減少したことから高脂肪食摂取は開放的な場所に対する不安感を増大させると考えられる。新規物体認識テストでは高脂肪食摂取により物体認識記憶が減弱し、PER による記憶障害の抑制効果は見られなかった。恐怖条件付けテストでは、HFD 群の記憶の指標であるすくみ時間は低下したが HFD+PER 群では記憶を保持していた。以上の結果から、高脂肪食の摂取により認知機能の低下や不安感が増強される傾向が示され、AMPA の活性阻害は認知機能低下防止や不安感の減弱に有効である可能性が示唆された。

108

## 抗がん薬の非増殖性細胞に対する毒性の分子機序

大久 周人 (学籍番号: 174132C)  
指導教員: ○松下 (武藤) 明子, 植田 真一郎  
琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

【目的】 高度に分化し増殖性を持たない心筋では、ある種の抗がん薬が短期では障害しないが蓄積性に毒性を発現する。我々は増殖性の未分化細胞と、それを分化させた非増殖性細胞を用い、抗がん薬の毒性と分子機序を比較することで心毒性発現機序の糸口が得られるかを試みた。【方法】 細胞は単球系細胞株 THP-1 の増殖期と、ホルボールエステルを作用して非増殖細胞に分化したものを使用した。薬物としてドキシソルピシン、ピンブラスチン、パクリタキセル、コルヒチンを用い、20 時間作用した後、生存用量反応、ウエスタンブロット、免疫蛍光染色で炎症・生存シグナルを評価し、ドキシソルピシンについては 2 および 20 時間処置後の細胞内取り込みを定量した。発表者大久は分化型の実験を主に担当し、未分化型は共同研究者が行った。【結果】 生存一用量反応はすべての薬物で未分化型での感受性が約 10 ~ 20% 強かった。NFκB 経路は両細胞で薬物による変化は見られなかった。生存経路の p44/p42 リン酸化は未分化型では  $1\text{x}10^{-10}\text{M}$  から、分化型ではより高濃度 ( $1\text{x}10^{-6} \sim 1\text{x}10^{-5}\text{M}$ ) で亢進しており、下流の STAT3 Ser727 リン酸化が、分化型でのドキシソルピシンとコルヒチンを除き、p44/p42 に対応して亢進していた。上流の検討として生存率 6 割前後のドキシソルピシン (未分化  $1\text{x}10^{-8}\text{M}$ , 分化  $1\text{x}10^{-7}\text{M}$ ) 処置時の小分子 G タンパク質を染色したところ、Rac1 の細胞膜移行が観察された。また 2 および 20 時間のドキシソルピシン  $1\text{x}10^{-6}\text{M}$  処置での細胞内取り込みを蛍光により定量すると、分化型での取り込み量は未分化型のそれぞれ 25%、63% と低かったが、取り込み増加率は分化型で 424% と未分化型の 106% よりも大きかった。【結論】 抗がん薬の生存系シグナル、細胞内取り込みへの影響は分化の程度によって異なることが心毒性発現に関与する可能性がある。

109

## The analysis of glomerular Galactose-deficient IgA1 staining for the pediatric cases

Momoka Yoshimura (学籍番号: 174107B)  
 指導教員: ○ Shinya Ishiko<sup>1)</sup>, Kandai Nozu<sup>1)</sup>, Kazumoto Iijima<sup>1)</sup>  
 Koichi Nakanishi<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Department of Pediatrics, Kobe University Graduate School of Medicine,

<sup>2)</sup>Department of Child Health and Welfare, Graduate School of Medicine, University of the Ryukyus

**Introduction** Galactose-deficient IgA1 (Gd-IgA1) has been identified as the key molecule of the pathogenesis of IgA Nephropathy (IgAN). Recent study using Gd-IgA1 specific antibody (KM55) revealed that Gd-IgA1 deposit was detected only in IgAN and IgA vasculitis with nephritis (IgAV-N). However, there has been no analysis for pediatric cases. We examined the specificity of glomerular Gd-IgA1 deposit in children.

**Method** We performed double immunostaining of IgA and Gd-IgA1 using 33 cases with glomerular diseases.

**Results** Both IgA and Gd-IgA1 were positive not only in cases with IgAN (12 cases) and IgAV-N (6 cases), but also with lupus nephritis (LN, 4 cases) and membranous nephropathy (MN, 1 case). For other glomerular diseases with IgA deposit, Gd-IgA1 was negative in all cases with minimal change nephrotic syndrome (MCNS, 2 cases), oligomeganephronia (OMN, 2 cases), poststreptococcal acute glomerulonephritis (1 case) and Alport syndrome (1 case). Both IgA and Gd-IgA1 were negative in MCNS (2 cases), OMN (1 case) and hemolytic uremic syndrome (1 case).

**Discussion** The positivity of Gd-IgA1 in LN and MN was not consistent with the previous report. We speculate this is because Gd-IgA1 may be involved in the pathogenicity of LN and MN, or KM55 recognize immune complex nonspecifically. On the other hand, KM55 can distinguish incidental IgA deposit.

**Conclusion** Glomerular Gd-IgA1 deposit was observed not only in case with IgAN and IgAV-N, but also in LN and MN. However, KM55 may help detecting incidental IgA deposit in other glomerular diseases.

110

## ブタ膵島分離における 11R-p38I<sub>110</sub> を加えた臓器保存溶液の検討

與那覇 匡 (学籍番号: 174153F)  
 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1型糖尿病の治療法として期待されている。しかし、膵島分離の際のストレスにより、アポトーシスを誘導する mitogen-activated protein kinase (MAPK) p38 の活性等が問題となり膵島移植の成功を阻んでいる。我々は過去に p38 の活性を抑えるペプチドである 11R-p38I<sub>110</sub> を開発し、その効果を実証した。今回、11R-p38I<sub>110</sub> を含む保存液 (EP) と、EP 溶液と同じ組成で 11R-p38I<sub>110</sub> を含まない保存液 (EP-P) と、一般によく用いられる University of Wisconsin (UW) 溶液の3種類の保存液を比較した。

**【方法】** EP 溶液は UW 溶液と比べて、高 Na、低 K の組成で粘度を低く調製した。摘出後のブタの膵臓の主膵管に保存液を注入し、18時間、4℃で保存した。18時間保存後の膵島分離は一般的な Ricordi 法に基づき行われた。純化後の膵組織の Phospho-p38、p38 の活性を Western blotting により評価した。培養後の膵島細胞の In Vitro、In Vivo の評価を行った。

**【結果】** 純化前後の膵島細胞の収量において、EP 保存群の方が UW 保存群に比べて、有意に膵島収量が多かった。In Vitro の評価では ATP 量において EP 保存群の方が有意に高値を示した。In Vivo の評価では、EP 保存群の方が、有意に血糖改善率が高かった。EP 保存群と EP-P 保存群の比較において、In Vitro の評価では ATP 量に有意差がみられた。In Vivo の評価では EP-P 保存群に比べて EP 保存群の方が、有意に血糖改善率が高かった。Western blotting の結果から、EP 保存群において phospho-p38 の活性が抑制されていた。

**【考察】** 今回の結果から、臓器保存液においても 11R-p38I<sub>110</sub> は有効であり、その作用は 18 時間保存後の膵島分離の後でも維持され、膵島収量、機能を改善させると考えられた。

111

## 敗血症マウスに対する硫化水素の有効性 —リポポリサッカライド腹腔内投与モデルにおける検討—

崎山 大輝 (学籍番号: 174118H)  
 指導教員: 垣花 学, 神里 興太  
 琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座

**【はじめに】** グラム陰性菌細胞壁に存在する糖脂質リポポリサッカライド (LPS) 上昇は、IL-6 や TNF- $\alpha$  などの炎症性サイトカインの過剰産生が生じるとされ、敗血症の一因であり、その制御は生命予後に関わる。

**【目的】** 硫化水素 H<sub>2</sub>S の抗炎症作用がマウス敗血症モデルの予後改善を助けるか検討することを目的とする。

**【方法】** 8-11w 雄性 C57/BL6-J に LPS を 10mg/kg 腹腔内投与するマウス敗血症モデルを用いて検討した。

<マウス敗血症モデルに対する H<sub>2</sub>S の効果>

LPS 投与 60 分後から H<sub>2</sub>S 吸入 (60ppm, 4時間) を行い (H<sub>2</sub>S 吸入群 n=7), LPS 投与後 72 時間の生存を確認する。対照として LPS10mg/kg 投与後空気吸入群 (対照群 n=6) に関して検討した。

<血中 IL-6 濃度測定および肺組織中 IL-6 遺伝子発現>

LPS 投与 60 分後から H<sub>2</sub>S 吸入を行い、LPS 投与後 5 時間の時点でサンプル (血液および肺) を採取した。血中 IL-6 濃度 (ELISA) および肺組織 IL-6 遺伝子発現 (PCR) を測定した。対照として LPS 投与後空気投与群、LPS 投与なし H<sub>2</sub>S 投与群および野生型に関して検討した。(各群 n=3)

**【結果】** 1) H<sub>2</sub>S 吸入は生存率を改善させた。

2) LPS 投与により IL-6 mRNA は著しく上昇した。H<sub>2</sub>S 吸入群では mRNA の上昇が抑制された。(mRNAratio H<sub>2</sub>S : Air : Wild=45 : 100 : 0.1)

3) LPS 投与では血中 IL-6 は 4298pg/ml に上昇したが、H<sub>2</sub>S 吸入群では 8130pg/ml と有意に高かった。

**【考察】** H<sub>2</sub>S 吸入は肺組織における IL-6 mRNA 発現を減少させたため、肺における局所炎症は抑制されている可能性がある。一方で血中 IL-6 が H<sub>2</sub>S 群で上昇していたことから、H<sub>2</sub>S 吸入では全身の炎症反応は制御できていない可能性が考えられた。今後経時的変化の検討が必要である。

112

## OPG 欠損マウスを用いた胸腺髄質形成機構の研究

高森 ゆうみ (学籍番号: 174190A)  
 指導教員: ○新田 剛<sup>1)</sup>, 高柳 広<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 東京大学大学院医学系研究科免疫学講座  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科 寄生虫・免疫病因病態学講座

胸腺は T 細胞の分化に必須の器官である。その内部構造は皮質と髄質に分けられ、様々なストロマ細胞が T 細胞の分化と選択を制御している。特に胸腺髄質は免疫寛容を確立するための重要な場であり、髄質上皮細胞 (medullary thymic epithelial cell, mTEC) は、組織特異的な自己抗原を発現することで自己反応性 T 細胞の排除を誘導する。そのため mTEC の分化機構や機能の解明は、免疫学における重要な課題であると言える。

mTEC の分化はサイトカイン RANKL とその受容体 RANK を介するシグナルによって誘導され、mTEC は RANKL 阻害因子 osteoprotegerin (OPG) を産生し、RANKL-RANK シグナルに対し負の制御を行う。そのため OPG 欠損マウスでは mTEC の数が顕著に増加した。胸腺において OPG は mTEC と一部の線維芽細胞に発現する。どちらの OPG 発現細胞が胸腺髄質形成に重要であるかを明確化するために、各々の細胞で特異的に OPG を欠損させたコンディショナルノックアウトマウスを Cre-loxP システムを用いて作製し、OPG 発現量および TEC 数の解析を行った。

線維芽細胞特異的に OPG を欠損させたマウスでは胸腺全体での OPG 量にも細胞数にも変化は見られなかった。TEC 特異的に OPG 欠損マウスでは胸腺全体で OPG 発現量が約 20% に減少し胸腺重量当たりの OPG タンパク質量は検出限界以下であったが、欠損マウスで認められたような mTEC 数の著明な増加は認められなかった。

以上のことから線維芽細胞と TEC の片方だけの OPG 欠損ではもう一方あるいは他の部位で発現した OPG が役割を補完する可能性が考えられる。

113

### 糞便移植が2/3腎摘トリプル一酸化窒素合成酵素欠損(NX-TKO)マウスの冠危険因子に与える影響

金城 ちあき(学籍番号:174184F)  
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】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。我々は、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マウスの生存率が改善することを見出した。【目的】本研究では、腸内細菌叢(糞便)移植が心筋梗塞の予防に有効であることを確かめるために、co-housingによる糞便移植がNX-TKOマウスの冠危険因子に与える影響を検討した。【方法】7週齢でTKOマウスの左腎臓を1/3摘出し、8週齢で右腎臓の全摘を行ってNX-TKOマウスを作成した後、9週齢から2週間co-housingを行った。そして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、収縮期血圧値(テールカフ法)、空腹時血糖値(血糖測定器)、および総コレステロール値(富士ドライケム)を測定した。【結果】co-housingしないNX-TKOマウスと比較してWTマウスとco-housingしたNX-TKOマウスにおいて、収縮期血圧、空腹時血糖、総コレステロール値の改善は見られなかった。【結論】本研究の結果から、2週間のco-housingによる糞便移植はNX-TKOマウスの冠危険因子を改善しないことが示唆された。なお、今回検討したマウスの匹数が2~4匹と少なかったことやco-housingの期間が2週間と短かったことが結果に影響している可能性があり、今後さらなる検討が必要であると考えられた。

115

### HTLV-1エンベロープgp46に対するヒト化中和単クローン抗体hu-LAT-27によるHTLV-1感染制御

照屋 彩音(学籍番号:174206A)  
指導教員:田中 礼子, 水口 真理子, 高橋 良明, ○田中 勇悦  
琉球大学大学院医学研究科免疫学講座

HTLV-1は、悪性白血病である成人T細胞白血病(ATL)の原因ウイルスとして30年前に同定された。その後病理や疫学を含めた基礎研究が精力的に成されてきたが、HTLV-1感染予防ワクチンやATL治療薬は未だ開発されていない。21世紀は抗体医薬の時代と言われているが、ヒト化単クローン抗体hu-LAT-27は、HTLV-1エンベロープgp46に対するラット由来の単クローン抗体(LAT-27)をヒト化した抗体であり、HTLV-1感染中和能および抗体依存性細胞傷害(ADCC)能を有するため、HTLV-1感染制御抗体医薬として利用できる可能性を持つ抗体である。そこで、本研究ではhu-LAT-27の認識するエピトープとADCC活性について詳細な検討を行った。まず、hu-LAT-27の中和活性を確認するため、HTLV-1感染細胞と非感染細胞を混合培養し、合体体形成の阻害を観察した。次に、合成ペプチドを用いたELISAを行い、hu-LAT-27の認識するエピトープはHTLV-1 gp46抗原のアミノ酸192-196番と推定した。この部位はラットのLAT-27が認識する191-196よりも短い。さらに、NK細胞を含む末梢血単核球(PBMC)や培養NK細胞と自家HTLV-1(CD25陽性、HTLV-1 Tax抗原陽性)とを混合培養する系にhu-LAT-27を添加すると、有意なHTLV-1感染細胞株の減少とHTLV-1ウイルス産生抑制を観察した。以上の結果はhu-LAT-27がHTLV-1の非感染細胞への侵入をエピトープアミノ酸192-196番への結合により中和すること、さらに感染細胞に対しては、ADCC活性により細胞傷害性を発揮することで二重に感染を防御することを示唆している。

114

### 宮古島型ヒトヘルペスウイルス8のタンパク質の細胞内局在

鴨澤 眞麟(学籍番号:174193E)  
指導教員:玉城 和美, ○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】ヒトヘルペスウイルス8(Human herpesvirus 8:HHV-8)は1994年にカポジ肉腫細胞から見つかったため、カポジ肉腫関連ヘルペスウイルスとも呼ばれる。カポジ肉腫には古典型、アフリカ型、医原性型、AIDS型があり、沖縄県宮古島では古典型が多発することが知られている。宮古島のHHV-8には他の地域には見られないアミノ酸変化を伴った遺伝子変異が報告されているが、宮古島で古典型のカポジ肉腫が多発することとの関連はよく分かっていない。今回の実験では、宮古島のHHV-8のみに見られる遺伝子変異がタンパク質の細胞内局在に影響を及ぼしているか調べることが目的とした。【実験方法】宮古島の遺伝子変異のうち、ORF26, ORF70, ORF72に着目した。これら遺伝子を組み込んだ発現プラスミドを用意し、HeLa細胞にトランスフェクションしてウェスタンブロット法で発現を確認した。次に、プラスミドから産生されたFLAGタグ付きのタンパク質が、細胞のどの部位に局在するか、蛍光免疫染色法を用いて確認した。【結果と考察】ウェスタンブロット法では、ORF70が変異の有無に関わらず検出できなかった。これは蛍光免疫染色後の観察で遺伝子を発現している細胞がごく少数であったことが原因だと考えられる。蛍光免疫染色法では、遺伝子変異の有無で細胞の局在に違いは見られないことが分かった。ただし、ORF26は細胞全体にタンパク質が分布していたが、ORF70は核の周囲への集積、ORF72は核内にドット上の局在が認められた。この結果から、ORF70, ORF72のタンパク質がある特定の細胞内小器官に局在する可能性が示唆された。また、今回の実験では3つの遺伝子変異について調べたが、宮古島に特有の遺伝子変異は他に5種が知られているため、これらについても調べる必要がある。

116

### 高脂肪食摂取マウスの認知機能とAMPA型グルタミン酸受容体阻害薬の効果

新里 萌(学籍番号:174197H)  
指導教員:○片桐 千秋, ○宮城 安代, 高木 博, 西村 正彦,  
石内 勝吾  
琉球大学医学研究科脳神経外科

欧米流の脂肪過多の食事は肥満症を招くが、高脂肪食摂取による認知機能への影響は不明である。認知機能は脳における神経細胞の活動が正しく行われることで判断や記憶が形成される。神経細胞には様々な受容体が発現しているが、AMPA型グルタミン酸受容体(AMPA受容体)は神経活動において重要なカルシウムイオンの透過に寄与している。脳神経外科の先行研究では高脂肪食摂取したマウス海馬はAMPAによる神経細胞応答が過剰に起こることが示されている。本研究では高脂肪食による認知機能への影響をAMPA受容体に着目し、AMPA受容体拮抗薬(ペランパネル, PER)を用いて実験した。マウスを3群に分け、対照群として普通食(n=7)、高脂肪食(n=8)、高脂肪食+PER(n=8)、を餌として3ヶ月飼育後、行動解析、MRIを用い脳の重さを計測、組織標本で解析を行った。PER投与による餌の摂食量および体重増加率への影響はなかった。新規環境での短期的運動行動、回転ケージを利用した長期的運動行動を解析した結果、運動能力は高脂肪食摂取による影響を受けなかったことが明らかとなった。物体の認識と空間配置の記憶を新規物体認識テストで解析した。普通食群は新規物体に興味を示した時間が既存物体より増加傾向であったのに対し、脂肪食群(両群)では新規物体と既存物体を区別できないことが明らかとなった。海馬依存的記憶テストである恐怖条件づけテストにおいて、高脂肪食群は記憶の指標であるすくみ時間が普通食群より短い傾向を示したが、高脂肪食+PER群は高脂肪食群と比較してすくみ時間が優位に増加し、高脂肪食摂取による記憶減弱がPER投与により普通食群と同じまでに回復した。以上の結果から高脂肪食摂取は海馬におけるAMPA受容体の過剰な活性化をもたらす、海馬依存的な記憶を低下させる傾向にあること、PER投与により活性化を抑制することで記憶能力が回復することが示された。



117

### 冠動脈疾患を有する糖尿病患者の 実臨床データにおけるβ遮断薬の 心血管イベント予防効果の解析

三枝 好聖 (学籍番号: 174213C)  
指導教員: ○植田 真一郎  
琉球大学大学院医学研究科臨床薬理学講座

#### 【背景・目的】

β遮断薬は心不全や高血圧等に適応があり、心臓を保護し心血管イベントを予防する目的で使用されている。また心筋梗塞後の死亡率を低下させることが知られている。様々な集団でのβ遮断薬の有効性が検証されているが、冠動脈に狭窄のある糖尿病患者集団での有効性は知られていない。本研究の目的は冠動脈疾患を有する糖尿病患者のコホートにおけるβ遮断薬使用群と非使用群を心筋梗塞、脳卒中、心不全、死亡リスクについて比較することである。

#### 【方法】

2型糖尿病合併冠動脈疾患患者 7782名を冠動脈造影の記録と診療録から連続登録した。もともとβ遮断薬の適応を有する経皮的冠動脈形成術(PCI)、冠動脈バイパス術(CABG)の既往のある患者は除外した。β遮断薬の使用は追跡開始時の使用とした。3.7年間の追跡で追跡開始時点の患者背景を比較することで、アウトカムの比較可能性を検討した。主たるアウトカムは死亡、急性心筋梗塞(AMI)、脳卒中(Apo)、とその三点のいずれかの発生をイベント発生とする心血管複合イベント(C3)とし、そのほかC3に心不全(HF)を加えた心血管複合イベント(C4)、それぞれのイベントとした。カプランマイヤー法、ログランクテストによる生存解析、COX比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行った。

#### 【結果】

ログランクテストではC3C4HFは使用群で多かった。多変量解析ではC4のみ使用群で有意にリスクが高かった。明らかな適応を有する患者を除いた2型糖尿病合併冠動脈疾患患者コホートの解析ではベータ遮断薬の有効性を示唆する結果は得られなかった。

119

### 膵臓保存液へのAP39添加による、 ブタ膵臓分離後のアポトーシスの抑制と 膵臓移植成績の向上

西銘 開 (学籍番号: 174183H)  
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】膵臓移植において、臓器保存中、膵臓分離中及び移植後に膵臓の多くを失ってしまうことが報告されている。一方、臓器移植においてアポトーシスの原因の一つとなるのが虚血再灌流障害(IRI)であることが報告されている。近年、腎臓、心臓においてIRIから細胞を保護する物質として硫化水素(H<sub>2</sub>S)が注目されており、H<sub>2</sub>Sの供給源としてAP39が多くの研究で用いられている。今回我々は膵臓分離前の膵臓の保存液にAP39を加えることによる効果を検証した。

【方法】ブタ膵臓を摘出し、AP39を添加した保存液を主膵管から逆行性に注入後、臓器保存を行った。膵臓分離後、膵臓の評価系として膵臓収量、培養後の細胞減少量、stimulation index、ATP量、マウスへの膵臓移植を行った。

【結果】純化前の膵臓収量がAP39添加群では710738 ± 83721 IE、非添加群では363943 ± 57629 IEと有意差が見られた。純化後の収量においてもAP39添加群が515847 ± 67886 IE、非添加群が269823 ± 42108 IEと有意差が見られた。また、培養後の細胞減少量もAP39添加群において抑制され、ATP量、stimulation indexにおいてもAP39添加群が有意に高い結果を得た。マウスへの移植においてはAP39添加群では24頭中16頭(66.7%)が血糖正常化したのに対し、非添加群では24頭全てが血糖正常化に至らなかった。

【結語】膵臓保存液にAP39を加えることにより、膵臓のアポトーシスを抑制し、膵臓移植成績を改善することが可能であった。IRIではミトコンドリア機能の傷害によりアポトーシスが誘導されることが報告されているが、AP39はミトコンドリアを標的とするH<sub>2</sub>Sの供給源であり、膵臓において他の臓器と同様に抗アポトーシス効果が得られたものと考えられた。

118

### 去勢抵抗性前立腺癌患者血清中における Stage-specific embryonic antigen-4の検出

十枝 あゆみ (学籍番号: 174110B)  
指導教員: ○須田 哲司, 斎藤 誠一  
琉球大学大学院医学研究科泌尿器外科学講座

前立腺癌のマーカーとして知られるProstate-Specific Antigen (PSA)は、前立腺癌のみならず、前立腺肥大症や前立腺炎でも増加することが知られている。また、去勢抵抗性前立腺癌(CRPC)ではPSA値と腫瘍の進展とが相関しない症例も認められ、必ずしも悪性を反映するわけではない。そのため、これらの欠点を補う新しい血中マーカーが必要とされている。

これまでに、斎藤らにより作製された糖鎖抗体RM1はStage-specific embryonic antigen-4 (SSEA-4)を認識することが報告されている。SSEA-4は初期胚に発現する幹細胞マーカーとして知られ、腎癌、膠芽腫などにおいて高発現することが報告されている。また、化学療法抵抗性となった乳癌組織ではSSEA-4陽性細胞が増加し、癌の悪性進展との関連性が示唆されている。RM1抗体を用いた解析においても、腎癌、前立腺癌において高発現することを明らかにしており、さらに近年、SSEA-4の高発現が前立腺癌の悪性と予後に相関することを明らかにした。

これらの報告から、SSEA-4が前立腺癌の増殖・進展に関与していると考えられるが、未だ血中での検出ならびにその機能についての報告は無い。そこで本研究は、前立腺癌患者血清SSEA-4の検出系を樹立し、前立腺癌の進展との関連性を明らかにすることを目的とし、RM1抗体を用いた検出方法について検討したので、その詳細を報告する。

120

### 次世代シーケンサーを用いた ヒト腸内フローラの経時的メタゲノム解析

並河 由華 (学籍番号: 174168D)  
指導教員: ○藤本 康介<sup>1)</sup>, 植松 智<sup>1)</sup>, 岸本 英博<sup>2)</sup>  
<sup>1)</sup> 大阪市立大学大学院医学系研究科・医学部・ゲノム免疫学  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科 寄生虫・免疫 病因病態学

近年、生活習慣病や精神疾患などの発症・進行と腸内細菌叢の乱れとの関係性が見出されている。今回の医科学研究では、病態の原因や憎悪に関わる腸内細菌の同定を行うための16S解析と次世代シーケンサーについて理解を深めるため、自身の糞便をサンプルとして腸内細菌叢の構成を調べた。サンプルは週に一回8週連続で採取した。

まず、自身の便からベレットを作成した。ベレットからPowerSoil Kitを用いてDNAの抽出を行った。その後16S解析として、1<sup>st</sup> PCR → Beads selection → 2<sup>nd</sup> PCR → Beads purification → MultiNAでの電気泳動を行い、ライブラリーを作成した。これを次世代シーケンサーにて解読することで腸内細菌のゲノム解析を行った。

結果としては、沖縄から大阪に住まいが変わったことと一人暮らしから実家暮らしに変わったことによる生活環境の変化が腸内細菌叢の変化に現れた。沖縄から来たばかりの1週目の腸内細菌叢ではBacteroidetesが61.589%, Firmicutesが31.204%でありF/B比(Firmicutes/Bacteroidetes比)は0.507である。一方、8週目ではBacteroidetesが45.336%, Firmicutesが43.251%でありF/B比は0.954となった。

生活習慣を含めた生活環境の変化が腸内細菌叢の変化を引き起こし疾患発症につながる可能性が考えられ、現在世界中で研究が展開されている。その中で、糖代謝遺伝子を多く有するFirmicutesが腸内において増加し、糖代謝活性が増大すると肥満につながる可能性が示唆されている。

今回の医科学研究で生活環境が変わったことでFirmicutesが増加したと考えられる。食生活としても沖縄では野菜と鶏肉中心の自炊で炭水化物は控えめだったが、大阪に来てからは名物のお好み焼きや串カツ、またうどんやパンなどの炭水化物も摂取していた。このような変化が腸内細菌叢の変化をもたらしたと考えられる。

121

## 通常食と高脂肪食ラットにおける身体、下部尿路機能変化およびトラマドールの膀胱・尿道機能に及ぼす影響

平良 俊樹 (学籍番号: 174166H)  
指導教員: 宮里 実  
琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

【目的】生活習慣病は、様々な下部尿路機能障害を引き起こすことが明らかとなっている。しかし、その詳細な機序については解明されていない。そこで、通常食と高脂肪食投与ラットの身体、下部尿路機能変化および、私たちの先行研究で膀胱求心路の抑制、尿道収縮の増強を介して蓄尿に関与することが明らかとなっているトラマドールの下部尿路機能に及ぼす影響を比較検討した。

【方法と対象】通常食と高脂肪食を2か月投与したSD雌性ラットを用いた。1) イソフルラン麻酔下に膀胱瘻 (PE-50)、内頸静脈カテーテル (PE-10) を挿入した。ウレタン麻酔に切り替え、膀胱内に生理食塩水投与 (3 ml/h)、連続膀胱内圧測定を行った。最大膀胱収縮圧、閾値圧、基線圧、収縮間隔、high frequency oscillations、排尿量、残尿量を群間比較した。膀胱収縮が安定した状態でトラマドール (1 mg/kg) を静脈内投与し、膀胱機能変化を検討した。2) ペントバルビタール麻酔下、3DマイクロX線CT (Rigaku) を用いて腎下極レベルの内臓脂肪を群間比較した。

【結果】1) 高脂肪食ラットは、通常食と比較して膀胱収縮間隔が短縮 ( $p < 0.05$ )、無抑制収縮もみられ排尿筋過活動を呈していた。最大膀胱収縮圧は差がなかった。トラマドール投与後、通常食ラットでは残尿の増加がみられた。2) 高脂肪食ラットは、通常食と比較して内臓脂肪が増加していた (18.3% vs 14.9%)。

【考察】当研究で、高脂肪食は内臓脂肪の増加をもたらしたことから、骨盤内動脈硬化は排尿筋過活動を引き起こすことが報告されていることから、当研究でも高脂肪食は同様な現象で過活動膀胱を引き起こしていることが示唆される。トラマドール投与後、高脂肪食では残尿の増加が見られなかったことは、尿道機能の変化が減弱していることが示唆された。

122

## 法医学解剖例におけるアルコール関連屋外死の実情

佐野 惟吹 (学籍番号: 174178B)  
指導教員: 川上 由香, 深沢 真希, 池松 夏紀, 〇二宮 賢司  
琉球大学大学院医学研究科法医学講座

【背景・目的】アルコールは法医学解剖における屋外死事例でもしばしば検出され、時に死因などの関連が問題となり、裁判医学的にも重要な検討対象である。しかし現在、飲酒といわゆる路上寝や屋外死との関係の実態について十分に検討されているとは言い難い。本研究では、その一端を明らかにするため、沖縄の法医学解剖例における、アルコール関連屋外死について検討を行う。【材料・方法】琉球大学法医学講座において、2014年1月1日から2018年12月31日までの5年間に取り扱った、屋外死亡の解剖例を対象とした。これらのうちで自殺を除き、血中アルコール濃度が0.1 mg/ml以上検出された事例を、アルコール関連屋外死とした。【結果・考察】期間中のアルコール関連屋外死の解剖数は全体の9.2%を占める70件で、男性が63件 (90%)、女性が7件 (10%) であった。アルコール関連屋外死の解剖例の年齢構成は17-88歳 (中央値60歳) で、50歳代が22件 (22%)、60歳代が33件 (32%) と著しく多かった。死因は、溺死が29件 (41%) で最も多く、外傷は計28件 (40%) で転倒 (9件)、転落 (9件) や交通事故 (10件) が多かった。また心疾患が7件 (10%) あり、内因性疾患全9件の大部分を占めていた。爽快期から強度酩酊において溺死が一貫してみられ、中等度酩酊から昏睡期において外傷死が増加した。いわゆる路上寝の状態から死亡に至った事例は6件 (9%) で、交通事故5件、低体温症1件であった。血中アルコール濃度の最頻値は酩酊期に相当していた。今回の結果から、自力歩行可能な程度に酩酊した中高年男性が屋外を歩き回ることにより、海へ落ちるなどして溺死する、あるいは階段 (自宅への帰路) での転倒などによって外傷死に至るのが、沖縄におけるアルコール関連屋外死の典型と考えられた。今回見られた外因死はいずれも防ぎえる死であり、そのリスクについて周知されるべきと考えられる。

123

## 交通外傷性院外心停止における病院前高度気道管理についての検討

平田 大介 (学籍番号: 174169B)  
指導教員: 〇福田 龍将  
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【背景】我が国では院外心停止において、しばしば病院前高度気道管理が行われる。しかし交通外傷性心停止の場合、顎顔面外傷や口腔内出血等により操作が難しいため誤挿管や気管を傷害する可能性があり、病院前高度気道管理の有用性は明らかではない。

【目的】交通外傷性院外心停止における病院前高度気道管理と転帰の関係を検討することを目的とした。

【方法】総務省消防庁の救急蘇生統計データを用い、2014年1月から2017年12月に日本で発生した交通外傷性院外心停止を対象に、全国規模の集団ベース後ろ向きコホート研究を行った。病院前高度気道管理の有無による転帰の比較には、1:1 マッチングによるPropensity Score (PS) 法を用いた。主要評価項目を心停止から1ヶ月後の神経学的転帰良好 (CPC1 または2) な生存とし、副次アウトカムを1ヶ月後生存とした。

【結果】解析対象は7,694人で、2,590人 (33.7%) に病院前高度気道管理が行われ、5,104人 (66.3%) にバグバルブマスク (BVM) による通常の呼吸管理が行われた。全体のうち、42人 (0.5%) は1ヶ月後の神経学的転帰が良好であった。高度気道管理群と通常呼吸管理群では高度気道管理群の方が転帰不良であった (PS マッチング: RR 0.12 [95%CI 0.03-0.51])。副次アウトカムにおいても同様の傾向が見られた。

【結論】交通外傷性院外心停止において、病院前高度気道管理は通常の呼吸管理 (BVM 換気) と比べ、1ヶ月後の神経学的転帰良好生存、1ヶ月後生存の減少と関連があった。

124

## 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科における口腔悪性腫瘍患者の臨床統計的検討

宮城 遥 (学籍番号: 174175G)  
指導教員: 〇加藤 大貴<sup>1)</sup>, 仲宗根 敏幸<sup>2)</sup>, 中村 博幸<sup>1)</sup>  
<sup>1)</sup> 琉球大学大学院医学研究科顎顔面口腔再建学講座  
<sup>2)</sup> 琉球大学病院歯科口腔外科

【緒言】口腔・咽頭領域に発生する悪性腫瘍は、全癌の約2%とされており、さらに沖縄県は口腔・咽頭がん好発地域だと考えられている。また、近年高齢化に伴いその発生率は年々増加している。今回、沖縄県における口腔癌の実態を把握するために臨床統計を行った。【対象及び方法】1985年4月から2018年12月の33年間に琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科で加療した口腔悪性腫瘍患者1029例を対象とした。評価項目として、性別、年齢分布、地域分布、発生部位、組織型等について検討し、各治療期における5年生存率を求めた。【結果】性別は男性646例 (62.8%)、女性383例 (37.2%)、年齢分布は13歳から100歳 (平均63.4 ± 14.5歳)、60歳代が最も多く全体の25.5%であった。地域分布は南部424例 (41.2%)、中部393例 (38.2%)、北部112例 (10.9%)、その他離島等100例 (9.7%)。発生部位は舌が最も多く485例 (47.0%)、組織型は扁平上皮が最も多く964例 (93.7%) を占めた。【考察】今回扁平上皮癌は60歳代、性別は男性に多く、発生部位は舌に多かった。また、男性では60歳代が最多であったのに対し、女性は70歳代が最も多かった。また、歯肉癌は高齢者で多いとされており、今回も10代から50代では歯肉癌が占める割合は14.7%であったのに対し、60代から100代では25.8%であった。唾液腺癌は粘表皮および腺様嚢胞癌が大部分を占めるとされており、今回も5例中4例は腺様嚢胞癌であった。顎口腔領域の骨肉腫の好発年齢は20~40歳代とされており、四肢原発症例と比較高齢であった。今回骨肉腫3例の平均年齢は61歳と高齢での発症であった。人口の高齢化に伴い今後さらに高齢の患者が増えると考えられ、今まで以上にQOLを考慮した治療プランを考えていくことが重要だと思われる。

125

## 気質がうつ病の病理に与える影響 抑うつ性混合状態に着目して

篠川 千絵 (学籍番号: 174134K)  
指導教員: ○新里 輔鷹, 近藤 毅  
琉球大学大学院医学研究科精神病態医学講座

【はじめに】 Akiskal HS は 100 例の神経症うつ病の数年後の転機を検討し、その 40% が内因性うつ病や躁病に移行した結果を端緒として「循環気質、発揚気質を持つ場合には双極性の範囲で考えるべき」との理論を展開するなど、多様化する気分障害の診断・治療に対応するため、病前気質の評価が注目されている。一方で「抑うつ性混合状態」とは、うつ状態に躁的な活動成分が一過性に混在したものであるが、その病像は極めて不安定で純粋な躁またはうつ状態よりも衝動性を孕むことが多く、気分障害の症状や経過に悪影響を及ぼすことが知られている。この移ろいやすい混合性うつ病を速やかに評価・診断し治療にあたることは、気分障害の治療帰結や予後を良好なものにするために重要であるが、その病前気質に着目した研究は少ない。

【方法】

1. 指標: 気質・性格評価は、TEMPS-A/MPT (Matsumoto et al., 2005)、混合状態の重症度評価として我々が独自に開発した DMX-12 を用いた。
2. 対象者: うつ病エピソードにて琉球大学附属病院を受診した 154 名の連続症例
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】

発揚気質、メランコリー気質は従来のカテゴリカル診断である混合性うつ病 (Benazzi) 混合性病像を伴うもの (DSM-5) と一定の関連を示した。DMX-12 で示される混合状態の重症度には焦燥気質が影響する可能性が示唆された。特に焦燥気質の影響は破壊的感情/行動の下位項目において有意であった。焦燥気質を持つものには危険行為や易刺激性に留意する必要がある。

127

## 軟膜下投与法を用いた中枢神経系への 脂肪組織由来幹細胞移植

宮城 紀孝 (学籍番号: 144106A)  
指導教員: ○神里 興太, 垣花 学  
琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座

【背景】 脂肪組織由来幹細胞は、脂肪組織から採取することができる細胞で、iPS 細胞などと比較して腫瘍化しにくい安全性が高い細胞である。

【目的】 ラット脂肪組織由来幹細胞が、同種脊髄軟膜下細胞移植後に生着できるか。7-9w 雄性 SD 系ラット (250-300g) を用い検討する。

【方法】

(脂肪幹細胞採取)

- ①全身麻酔下に脂肪組織を後頭骨一肩甲骨間より採取する。
  - ②コラゲナーゼにより精製したのち、基本培地で幹細胞を培養する。
  - ③1 度継代した後に細胞懸濁液を作成する。(8.0x10<sup>6</sup>/100 μL)
- (細胞移植)
- ①脊椎固定器により腰椎膨大部付近の椎体 (Th13-L1) を固定する。
  - ②顕微鏡下に椎弓切除後、硬膜を切開し、脊髄を露出する。
  - ③軟膜を軟膜切開刀 (27G 針) で切開、軟膜下注入鈍針を挿入する。
  - ④軟膜下に脂肪組織由来幹細胞を注入する。
  - ⑤術後 3 日間、FK506 (0.02mg/kg/d) による免疫抑制を行う。
  - ⑥術後 4 週後、脊髄を取り出し、脂肪組織由来幹細胞に発現する CD44 を標的として蛍光免疫染色を行い、細胞の有無を観察する。

【結果】 今回、脂肪組織由来幹細胞の生着は確認できなかった。

【考察】 脂肪組織由来幹細胞の生着が確認されなかった理由として以下のことが考えられた。

- ①細胞注入用鈍針による脊髄軟膜下細胞注入の失敗、②短めに設定した免疫抑制の問題 (3days) で、脂肪組織由来幹細胞が免疫系により拒絶、③移植細胞に対する抗 CD44 抗体の反応性。今回の結果から、培養系による抗体反応性の検討や手術手技の向上さらには免疫系の評価が必要であると考えられた。

126

## 病原性レプトスピラによる 近位尿管上皮細胞への感染機構の解明

川上 祐太 (学籍番号: 174116B)  
指導教員: ○トーマ・クラウディア, Isabel Sebastian, 山城 哲  
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【目的】 病原性レプトスピラ (*L. interrogans*) は、人獣共通感染症であるレプトスピラ症の原因菌である。本菌は、未知の分子機構によって血管から近位尿管に移行し、宿主の防御機構を回避する。本研究では、レプトスピラが近位尿管上皮細胞 (renal proximal tubule epithelial cell, RPTEC) を通過する分子機構を明らかにすることを目的とした。

【方法】 RPTEC を Transwell で培養し、人工的に近位尿管の管腔を再現した。 *L. interrogans* 又は、 *L. biflexa* (非病原性レプトスピラ) で RPTEC の basolateral 側から感染させ、48 時間後に apical 側へと移行した細菌を qPCR で定量化した。次に、細胞接着装置 (tight junction, TJ) および菌の細胞への付着を蛍光免疫染色にて精査し、上皮バリア機能を経上皮抵抗値 (TEER) で評価した。最後に、TJ の形成に関与している AMPK の活性化 (pAMPK) を Western Blot と蛍光免疫染色にて調べた。

【結果】 *L. interrogans* で感染させた細胞では感染 24 時間後には TEER の減少とともに、菌の basolateral 側から apical 側への移行を認めた。また、レプトスピラ、occludin と cingulin の蛍光免疫染色にて多くの菌が付着している *L. interrogans* 感染細胞では TJ の破壊を認めた。AMPK のリン酸化は *L. interrogans* で感染させた RPTEC では、 *L. biflexa* で感染させた RPTEC や非感染細胞よりも上昇していることが明らかになった。

【考察】 TJ は複数の膜タンパク質と cingulin などのアダプタータンパク質から構成されている。さらに、cingulin のリン酸化状態とそのリン酸化に関わる AMPK の活性化が TJ の構造を制御している。本研究の結果は、 *L. interrogans* は pAMPK の上昇を維持する機構を備えているため、cingulin の平衡バランスをアクチンと結合できない状態に傾けるため TJ が破壊され、菌の管腔側への移行が可能となると唆した。

128

## 慢性骨髄性白血病患者における dasatinib 治療関連の原発性滲出性リンパ腫の 1 例

宮城 大一 (学籍番号: 174151K)  
指導教員:  
<sup>1)</sup> Department of Pathology, Chi-Mei Medical Center, Tainan, Taiwan  
<sup>2)</sup> 琉球大学大学院医学研究科細胞病理学講座

【背景】 近年、チロシンキナーゼ阻害剤 (TKI) は慢性骨髄性白血病治療の主流となっている。TKI のひとつである dasatinib は副作用として胸水が数多く報告されているが、稀に原発性滲出性リンパ腫 (PEL) を引き起こす。今回は台湾で発生した 1 例を報告・考察する。

【症例】 56 歳、台湾人女性。2014 年 9 月に慢性骨髄性白血病と診断され dasatinib の投与を開始した。2018 年 12 月胸水の罹患、経口プレドニゾンにより治癒した。2019 年 7 月に胸水を再発、細胞診により異型大型リンパ球が認められ滲出性原発性リンパ腫と診断された。翌 8 月に行われた免疫染色で HHV8 は陰性であった。胸腔穿刺とプレドニゾンにより胸水は治癒し、TKI の使用は中止された。

【病理所見】 2019 年 7 月、8 月の細胞診では大型異型リンパ球が認められ、更に IGH 遺伝子の再構成が認められ、クローナルな腫瘍であることが確認された。

【過去の症例との比較】 dasatinib 治療後に PEL を発症した症例は 2017 年に 1 件のみ報告されている。本例と過去の 1 例の相違点がいくつかあり、dasatinib 投与開始から PEL 発症までの期間、胸水に対するステロイドの有効性などに違いがあった。

【考察】 リンパ腫の WHO 分類によると、通常 PEL は HIV 感染などの免疫低下患者において、HHV8 に関連して発症する。しかし本例のように免疫機能が正常で、かつ HHV8 陰性で PEL を発症する例もある。HHV8 陽性の例はそうでないものに比べて、MYC 転座を有することが少ないなどの相違点も多くある。dasatinib の薬理機序に PEL 発症のヒントがある可能性があるとともに、HHV8 陽性の PEL を “type I” または “classic”、PEL 陰性の PEL を “type II” のように区別して両者の違いを明確にすることが更なる PEL への理解と治療の発展につながると考えられる。