

琉球大学学術リポジトリ

令和2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: ja 出版者: 琉球医学会 公開日: 2022-12-06 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/0002019577

令和2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

糖尿病合併冠動脈疾患患者コホートデータの季節性変動について

比屋定 賢弥 (学籍番号: 184193K)
指導教員: ○岩田 啓芳, 植田 真一郎
琉球大学臨床薬理学講座

【背景と目的】数々の研究で多くの疾患や死亡に関して季節性変動が示されているが慢性疾患罹患患者はより季節性変動の影響を受けやすいと思われる。そこで本研究では心血管リスクの高い糖尿病合併冠動脈疾患患者コホートにおいて、死亡や心血管イベント発生の季節性変動を調べた。【方法】2005年1月から2015年12月の期間に全国76ヶ所の研究協力施設で糖尿病合併冠動脈疾患患者を集めたCHDコホートデータから、月間死亡率及び急性心筋梗塞・脳卒中・心不全の各イベントの月間発生率を求め、それらを結んだ近似曲線で傾向を調べた。①CHDコホートの月間死亡率と全国の死亡率との季節性変動の比較、②CHDコホート内の急性心筋梗塞と脳梗塞の季節性変動の比較、③CHDコホート内の沖縄県と沖縄県外との心血管イベントの季節性変動の比較を行なった。【結果】①全国の死亡率との比較では、両群とも月間死亡率は夏季に低く、冬季に高い傾向がみられた。②急性心筋梗塞と脳梗塞との比較では、夏季に脳梗塞の月間発生率が上昇し、急性心筋梗塞は低下する傾向がみられた。③全体的に年間を通して沖縄県の方が各イベントの月間発生率が高かった。死亡率に関しては全国平均の冬季の値(例:1月約36/10万人/月)とほぼ同様の値を一年中示し夏季でも明らかな低下は認めなかった。このため夏季では全国平均の約1.5倍の値を示した。【考察】①CHDコホートの季節変動は全国と一致していた。②夏季に脳梗塞が増え心筋梗塞が減る理由として血管径・血管分類及び心臓と閉塞部位との位置関係の違いや相対的血流変化により、気温上昇による脱水の影響が異なるからだと考えられた。③沖縄県の年間を通じた疾患発生率の高さは様々な因子が影響していると考えられるがその内の一つに生活習慣に問題があると考えられる。

002

当院の転移性骨腫瘍に対するデノスマブの治療成績

呉屋 絵梨 (学籍番号: 184144B)
指導教員: ○當銘 保則, 大城 裕理, 西田 康太郎
琉球大学大学院医学研究科医学専攻整形外科学講座

背景: 転移性骨腫瘍による骨関連事象 (skeletal-related event: SRE) が起こると、ADL・QOLの低下が起こり、ひいては原発巣の治療が困難になる。SREを防ぐため、早期の骨修飾薬の使用が望まれる。今回は、当院における転移性骨腫瘍に対するデノスマブの治療成績を検討した。方法: 2012年1月～2020年12月の期間でデノスマブを使用した496例より、ゾレドロン酸からデノスマブへ切り替えた症例、血液疾患、骨軟部腫瘍、骨巨細胞腫に対してデノスマブを使用した症例を除外し、3ヵ月以上追跡可能であった症例を対象とした。放射線照射を除くSRE発生の割合、Spinal Instability Neoplastic Score (SINS) やMirel's scoreを用いてSRE発生のリスクを検討した。結果: 対象は322例で、男女比は1.7:1、年齢の中央値は65歳、観察期間の中央値は23ヵ月であった。原発巣の上位3位は、肺癌87例(27.0%)、前立腺癌39例(12.1%)、乳癌35例(10.9%)であり、SREを発症したのは30例(9.3%)であった。その内訳として、脊椎13例(4.0%)、四肢骨13例(4.0%)、骨盤2例(0.6%)、その他2例(0.6%)であった。そのうち手術を行なった症例は、脊椎8例(2.5%)、四肢骨10例(3.1%)の計18例(5.6%)であった。SRE発生例のうち、脊椎13例に対するSINSの平均値は9.4点であった。また四肢骨13例に対するMirel's scoreの平均値は10.2点であった。考察: デノスマブで治療した転移性骨腫瘍の放射線を除くSRE発生率は、メタ解析によると10.5%であったのに対し、当院は9.4%と遜色のない結果となった。原発巣主治医科、整形外科、放射線科との診療科横断的な治療体系の確立が重要と考えられた。

003

Aversive olfactory learning and feeding conditions in nematode *Caenorhabditis elegans*

吉元 琢人 (学籍番号: 184130B)
指導教員: ○丸山 一郎¹⁾, 荻谷 研一²⁾
¹⁾ 沖縄科学技術大学院大学情報処理生物学ユニット
²⁾ 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

The memory of hazardous experiences is vital for organisms to survive in a changing environment. *Caenorhabditis elegans* can serve as a useful model because of its simple nervous system. Most previous experiments of aversive olfactory learning used worms under starvation, which could relate to data variation. Here I have used well-fed worms as follows. 1-propanol (an olfactory attractant) and HCl (a repellent) were used as a conditional stimulus (CS) and an unconditional stimulus (US), respectively. In each aversive conditioning session, 4 days old worms were immersed for one second in a solution containing 1-propanol (1%) alone, HCl (5mM, pH4.0) alone, or combination of them. Before the next session, worms were rested on agar plates containing OP50 strain of *E. coli* for 10 minutes for feeding. After 10 repetitive sessions, worms were subjected to chemotaxis assays. Worms conditioned in combination of 1-propanol plus HCl were not attracted to 1-propanol (5%) anymore. These results indicated that worms learned the CS-US association. As these worms did not obviously avoid 1-propanol, I next subjected 5 days old worms to the same conditioning sessions and chemotaxis assays. Again, the worms were not attracted to 1-propanol but failed to avoid it. In addition, the degree of attraction to 1-propanol of 5-days old worms were less than that of 4-days old worms. Although I could observe the CS-US association reproducibly by using well-fed worms, the reasons for failure of inducing obvious avoidance reaction and reduced attractive reaction of 5-days old worms remains to be clarified.

004

ゲノムワイド相関解析によるAST, ALTの関連領域の同定

大城 匡恭 (学籍番号: 184153A)
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AST, ALT関連ゲノム領域が報告されている (Kanai et al.2018) が沖縄県民を対象としたAST, ALTに関するGWASは行われていない。【目的】 沖縄県民の血清AST値, ALT値に関連するゲノム領域をゲノムワイド相関解析 (GWAS) によって同定し、飲酒との関係調べる。【方法】 沖縄バイオインフォメーションバンク (Obi) に登録されている沖縄県民6,613人について653,092 single nucleotide polymorphisms (SNPs) の遺伝型を決定した。AST, ALTに関するGWASは、それぞれQuality Control (QC) を通過した5,742人、325,152 SNPs (AST)、5,730人、325,135 SNPs (ALT) を用いて行なった。ゲノムワイド水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) の有意差を認めたSNPについては、飲酒頻度を交絡因子に加えた解析、および飲酒の習慣がない対象を用いた解析を行い、結果を比較した。さらに、National Bioscience Database Center (NBDC) に登録されている既報のAST, ALTの日本人GWASデータ (AST:134,154人, ALT:134,182人, Kanai et al.2018) とのメタ解析を行った。【結果】 AST, ALT値とゲノムワイド水準の有意差を示す4つのSNP座が同定された。これらは全て既報の *ALDH2* 近傍に位置していた。そのうちのrs2074356とrs671について、飲酒頻度を交絡因子に加えた解析、および飲酒の習慣がない対象を用いた解析を行った。飲酒頻度を交絡因子に加えた解析ではAST, ALTともに相関が弱くなり、飲酒の習慣がない対象を用いた解析では有意な相関は認められなかった。NBDCデータとのメタ解析の結果、ASTでは3領域 (*EFHD1*, *DFNB31*, *PARVB*)、ALTでは1領域 (*ABCB11*) が新たにゲノムワイド水準の有意差を示した。【結論】 今回、沖縄県民を対象とした解析で同定された *ALDH2* 領域の4つのSNPと肝機能の関連には飲酒の関与が示唆された。メタ解析の結果ASTでは3つ、ALTでは1つの新規肝機能関連ゲノム領域が同定された。

005

アストロサイトへのグリシン除去を担う グリシントランスポーター (GlyT1) の 小脳における発達変化

濱田 麻実 (学籍番号: 184146H)
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、小脳において主要な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、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) や神経終末にある GlyT2 により除去される。小脳における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 GlyT1 の発現変化を調べ、小脳発達との関連を明らかにすることを本研究の目的とし、マウス小脳凍結切片を用いて、GlyT1 の免疫染色を行うとともに、プルキンエ細胞やグリシン作動性神経との関連を検討した。

その結果、小脳皮質 3 層が完成していない胎齢期では、GlyT1 は放射状グリアのマーカーであるネスチン陽性の線維から伸びる短い突起に発現していた。胎齢期の早い時期から、放射状グリアによってグリシンが除去されていると考えられた。プルキンエ細胞のマーカーであるカルビンジンをういて二重染色を行ったところ、生後 0 日では、移動中のプルキンエ細胞の周辺に GlyT1 は発現していた。生後 7 日では、プルキンエ細胞が単層に整列し、小脳皮質 3 層が出来上がった。この時期では、分子層、プルキンエ細胞層、顆粒層全てにおいて GlyT1 が細胞の周囲を埋めるように発現していた。生後 21 日以降、プルキンエ細胞が分子層に樹状突起を広げる時期には、プルキンエ細胞の軸索側や樹状突起の周囲を埋めるように GlyT1 の発現が顕著になった。顆粒層では、顆粒細胞を覆うようにグリシン作動性神経のマーカーとなる GlyT2 が発現し始め、その外側に GlyT1 が発現した。すなわちグリシン作動性神経が形成されるよりも早い段階で、グリシン除去システムは形成されていると考えられた。

006

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

徳元 晋介 (学籍番号: 184183B)
指導教員: ○細川 浩
琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

モルモットの鳴き声を構成する複合音が聴覚皮質上に時空間的にどのように表示されているかを電位感受性色素で可視化して調べた。

モルモットに Ketamin (1mg/kg), Xylazine (0.5mg/kg) で麻酔し、大脳皮質を露出し、電位感受性色素 (RH795) で 1.5 時間染色を行った。実験中、60 分毎に Ketamin (0.25mg/kg) で麻酔を続けた。

周波数バンドの測定のため、純音 0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz (持続時間 100ms, 60dB SPL) の純音を付加し、周波数バンドを推定した。各周波数バンド内の応答を平均化し、バンド応答を算出した。0.5k+1k, 0.5k+2k, 0.5k+4k, 0.5k+8k, 0.5k+16k の複合音 (持続時間 100ms) を付加したときバンド応答がどのように変化するかを調べた。

複合音を聞かせたとき 0.5k+1k, 0.5k+2k, 0.5k+4k, 0.5k+8k の近い音同士の複合音では、各バンド応答は加算的に反応した。0.5k+16k の複合音では、16k バンド応答より他のバンド応答が抑制された。応答が他の領域を抑制した。

複合音を聞かせた時のピーク時の応答は、0.5k+1k において、0.5k と 1k の両方の領域が同時に興奮するような結果が得られ、0.5k+2k, 0.5k+4k, 0.5k+8k も同様の結果が得られた。一方、0.5k+16k の複合音では、16k の純音のみの応答と似たようなピークを形成し、他の領域は抑制された。以上により、複合音を付加すると、各周波数領域で同時平行に音処理をされることがわかった。0.5k+16k のような高低差の大きい音では低周波領域の反応が抑制されることがわかった。

007

溺水による院外心停止における気管挿管と 声門上デバイスによる高度気道管理の比較

福井 幸輝 (学籍番号: 000000000)
指導教員: ○福田 龍将, 兼島 博嗣
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【背景】

溺水の本態は液体が気道を閉塞するため起こる呼吸障害とそれに続く低酸素血症とされている。よってわが国では溺水による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。気管挿管は最も確実な気道確保の方法であるが手技習得にある程度時間を要する。一方声門上デバイスではより速く、簡単に気道確保を行うことができるが確実な気道確保の方法としては気管挿管に劣る。

【目的】

溺水による院外心停止患者の病院前での気管挿管と声門上デバイスによる高度気道管理について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溺水による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。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 か月後の生存とし、副次アウトカムを 1 か月後の神経学的転帰良好 (CPC1 または 2) な生存とした。

【結果】

解析対象は 6027 人で、2171 人 (36.0%) に気管挿管が行われ、3856 人 (64.0%) に声門上デバイスの挿入による気道管理が行われた。全患者のうち 1 か月後も生存していたのは 58 人 (1.0%) で、神経学的転帰が良好であったのは 12 人 (0.2%) であった。気管内挿管と声門上デバイスでは 1 か月後生存に有意な差はなかった (PS マッチング: RR0.95 [95% CI 0.53-1.73])。副次アウトカムにおいても同様の傾向が得られた。

【結論】

溺水による院外心停止において、病院前での気管挿管と声門上デバイスによる高度気道管理で 1 か月後生存、神経学的転帰良好生存に有意な差はなかった。

008

ナノ粒子化玄米機能成分 γ -オリザノールによる マウスの軽度認知機能障害改善効果

小林 裕樹 (学籍番号: 174150B)
指導教員: ○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
(第二内科)

超・超高齢社会に突入した我が国において質の高い健康労働寿命を延伸する鍵として期待されているのが食による脳機能低下の予防・改善である。玄米有効機能成分 γ -オリザノールをマウスに 3 ヶ月間摂取させると、動物性脂肪に対する嗜好性が改善された (Masuzaki H et al. Diabetes 2012, Diabetologia 2017)。さらに 50 週齢を超えた老齢マウスに動物性脂肪食を与えて作製された認知機能障害モデルマウスを用いて、1% γ -オリザノール配合高脂肪食を 4 ヶ月間給餌した結果、認知機能障害の発症を完全に予防できることが明らかになった。一方、 γ -オリザノールは脂溶性が高く腸管吸収効率は極めて低い。

そこで本研究では食品添加物として認可済みであるヒドロキシプロピルセルロース (HPC) によりナノ粒子化した γ -オリザノールを老齢認知機能障害マウスに週 2 回、3 ヶ月間経口投与し継続的に認知機能試験を実施した。通常の γ -オリザノールに比べて 10 倍以上に腸管吸収効率が増強されたナノ粒子化 γ -オリザノールを投与した結果、認知機能障害モデルマウスに比べ投与開始 1 ヶ月において空間作業記憶率及び新規物体場所記憶率など短期記憶の改善傾向が観察された。さらに投与期間を 3 ヶ月まで延長すると、高濃度含有ナノ粒子化 γ -オリザノール投与群では普通食対照群と同等の短期記憶力を維持し、自発行動量も減少しなかった。以上より γ -オリザノールをナノ粒子化する事により、投与期間を 25% 短縮し、投与量を 15% に減量できることが判明した。現在 γ -オリザノールによる認知機能改善効果のターゲットとして、アセチルコリンエステラーゼ発現量に着目し、短期記憶の中核である海馬や中隔野における分子医学的な解析を進めている。

009

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

伊良波 美樹 (学籍番号: 184170A)
指導教員: ○崎浜 秀悟, 加留部 謙之輔
琉球大学細胞病理学講座

日常診断において, DLBCLは免疫組織化学染色 (IHC) 法により予後良好の胚中心 (GCB) 型および予後不良の non-GCB 型に大別される。近年ではゲノム異常に基づきさらに細別され, GCB 型の症例でも, *EZH2* 変異または *BCL2* 転座を有する EZB 型の症例は予後が悪いことが示唆されている。一方, 当講座における DLBCL 292 例の解析では, *STAT6* 変異を持つ GCB 型の症例は EZB 型の症例よりも予後不良である可能性を示す結果が得られた。そこで今回症例を増やし, DLBCL 392 例について *STAT6* 変異に着目して生存解析を行なった。さらに, *STAT6* 変異保有例のうち解析可能であった 20 例については IHC 法だけでなく, 複数遺伝子の発現プロファイルに基づく RT-MLPA 法による病型分類を追加した。リツキシマブ併用化学療法を施行された GCB 型の症例において, *STAT6* 変異保有例は予後不良であった ($P=0.043$)。RT-MLPA 法により GCB 型から non-GCB 型に, non-GCB 型から GCB 型に分類が変わった症例はそれぞれ 5 例と 1 例であった。再解析の結果, *STAT6* 変異保有例は依然として予後不良であった ($P=0.028$)。また, *STAT6* 変異保有例と EZB 型を分けて解析した場合, 有意差はないものの *STAT6* 変異保有例は EZB 型より予後との関連性が強く表れていた。GCB 型において EZB 型は予後不良との報告があるが, 今回の研究では有意差は見られず, *STAT6* の方が予後不良に寄与している可能性が示唆された。しかしながら, GCB 型における *STAT6* 変異を持つ症例は 17 例と少なく, より症例を増やした解析を行う必要がある。また, RT-MLPA 法と IHC 法とで病型判定が異なった症例が 6/20 例 (30%) あり, 今後は病型分類における両手法のいずれがより優れているか, 検討を深める必要がある。

011

沖縄に特徴的なバクテリオファージの探索と性質分析

古田 萌野 (学籍番号: 184160C)
指導教員: 大野 真治
琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【背景と目的】バクテリオファージ (以下, ファージ) は細菌に感染するウイルスであり, 宿主となる細菌に特異的に感染すること, ターゲットの細菌が存在する限り増殖し続けることなどが特徴である。複数のファージを混合させることで変異した菌にも対応できるため, 細菌感染症治療における薬剤耐性を含む変異菌問題解決の糸口として近年注目されている。本研究では沖縄で特徴的な大腸菌ファージを採取し, タンパク質の構成, 物理化学的なストレスへの耐性を調べた。

【方法と結果】①千原池, 医学部中庭の水溜りから採取した水, ヤギ, ネコ, ウサギ, マウス, ラット便の懸濁液をポリエチレングリコールで濃縮し大腸菌 (XL-1blue) に感染させ寒天培地で培養した。ラット便からは 1 種類, 千原池からは 7 種類のブランク (ブランクの大きい方から千, 千, 千, 千, 千, 千, 千とすると) を観察した。一方で, 医学部中庭の水溜り, ヤギ, ネコ, ウサギ, マウスの便からはブランクは出現しなかった。

②ラット便, 千原池由来ファージ計 3 種類を, それぞれ大腸菌で増殖させ, 超遠心により濃縮し SDS-PAGE によってバンドを観察した。

③ 3 種類のファージについて, 常温, 50°C 熱処理, 塩酸, SDS, 70% エタノール混合下で 30 分静置し, ブランク形成能を評価した。3 種類のいずれも常温, 50°C, HCl, エタノール環境下ではブランク数に影響はあまり見られなかったが, SDS 処理によりブランク数が著しく減少した。

【考察】今回沖縄に特徴的なファージの候補として, 千原池から 7 種類が得られた。これは医学部中庭の水溜りに比して周囲の生態系が豊かであるためと推測される。またストレスへの耐性を調べた 3 種類のファージは塩酸に耐性があるため, 経口投与による治療に利用できる可能性がある。本研究では大腸菌を標的とするファージについて調べたが, 今後は皮膚や口腔内の常在菌に感染するファージの探索も興味深い。

010

ヒト内在性レトロウイルス (HERV: Human Endogenous RetroVirus) HML6-c14 の胎盤での発現に GCM1 が及ぼす効果の検討

安田 悠起 (学籍番号: 174154D)
指導教員: 小田 高也
琉球大学医学研究科ゲノム医科学講座

【背景・目的】ヒト DNA の 8% はレトロウイルスが人類の祖先に感染した際生殖細胞に入り込んだ後ゲノムの一部となったヒト内在性レトロウイルス (HERV: Human Endogenous RetroVirus) である。GCM1 は胎盤で発現する転写制御因子で syncytin-1 という HERV の BeWo 細胞での発現への関与が報告されている。本実験では別の HERV である HML6-c14 の BeWo 細胞での発現と GCM1 の関与を調べることを目的とする。

【方法】BeWo 細胞は ATCC から購入後, 10%FCS 加 D-MEM/Ham's F-12 で 37°C 5%CO₂ 存在下で培養する。GBS (GCM1 Binding Site) を含むゲノム領域は HML6-c14 を含む BAC (RP11-605L8) DNA を鋳型とした PCR で増幅させた後, 5'LTR 内にある TATA box を含む 399bp の LTR 領域と共に pGL4.10 の luc2 上流に組み込む。GCM1 発現 Vector は BeWo 細胞から抽出した Total RNA を用いた RT-PCR で増幅後クローニングした。発現解析には Dual-Luciferase Reporter Assay System (Promega) を使用し, GCM1 強制発現の有無での変化を検討した。

【結果】GCM1 に関しては当初の nested PCR では目的のバンドが増幅できなかったが, プライマーデザインの変更により ORF を含む領域が増幅され, pBS にクローニングできた。しかし, 医学研究期間内に発現 Vector への乗せ替えには至らなかった。HML6-c14 の上流 25kb を検索したところ, GBS が複数箇所検出された。また, GBS を含む 817~874bp の領域はクローニングできたが, 最終コンストラクトは未完成となった。

【考察】nested PCR では変更前の 1st 用プライマーの片方が非特異的であったため増幅できなかったと考えられる。更に, 複雑な鋳型対策として使用した 7-deaza dGTP により, 増幅効率の改善も見られた。また, 発熱に伴う自宅待機措置やその他の体調不良の為に 13 日間登校できなかったが, それがなければ assay まで実施できたと考えられ非常に残念である。

012

2 型糖尿病患者における心血管イベントに対する SGLT2 阻害薬の有効性についてのメタアナリシス

鈴木 春南 (学籍番号: 184154J)
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】糖尿病患者では心血管疾患のリスクが高く主な死因の一つとなっているが, 近年開発された 2 型糖尿病治療薬である Sodium-glucose cotransporter-2 (SGLT2) 阻害薬は, 血糖を低下させるだけでなく心血管イベントの発生や死亡率を減少させる可能性が示唆されている。

【目的】2 型糖尿病患者における心血管イベントに対する SGLT2 阻害薬の有効性を評価するために, その効果をプラセボと比較している論文を網羅的に検索し, 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 を用いて [SGLT2 inhibitor, type 2 diabetes, randomized, 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を満たした論文について, Review Manager (解析ソフト) を用いて解析を行った。一次エンドポイントは主要心血管イベント (心血管死, 急性心筋梗塞, 脳卒中), 二次エンドポイントは心血管死, 全死亡, 急性心筋梗塞, 脳卒中に設定した。

【結果および考察】キーワードによる検索で 563 本の論文がヒットし, 最終的に 5 本の研究が選択基準を満たした。解析の結果, SGLT2 阻害薬はプラセボと比較して主要心血管イベント (オッズ比 0.92, 95% 信頼区間 0.86-0.99) を有意に減少させた。二次エンドポイントでは, 心血管死 (オッズ比 0.86, 95% 信頼区間 0.77-0.96), 全死亡 (オッズ比 0.87, 95% 信頼区間 0.80-0.94) に有意差がみられ, 急性心筋梗塞 (オッズ比 0.93, 95% 信頼区間 0.84-1.02) も減少傾向がみられたが, 脳卒中は差を認めなかった (オッズ比 1.04, 95% 信頼区間 0.92-1.18)。以上より, 今回の解析では SGLT2 阻害薬は 2 型糖尿病患者において心血管イベントを減少させる効果があると考えられた。しかしながら新しい薬のため今回の対象となり得た研究数も限られており, 今後研究数の増加に伴い更なる解析が必要と思われる。

013

沖縄県における下肢疲労骨折の疫学調査 (後ろ向き観察研究)

橋本 璃緒 (学籍番号: 184169G)

指導教員: ○上原 史成, 比嘉 浩太郎, 当真 孝, 東 千夏, 西田 康太郎

琉球大学大学院医学研究科整形外科科学講座

【背景】スポーツ活動における疲労骨折は下肢に好発し, それに伴い競技休止期間が数か月にも及ぶ可能性が有る. 疲労骨折の予防のためには疫学調査が出発点となるが, 沖縄県全域での疫学調査の報告はこれまで無く, 競技復帰までの期間をリスク別に比較した疫学調査は少ない.

【目的】沖縄県における骨盤及び下肢疲労骨折の発生状況や治療期間を評価すること. 【対象と方法】2018年1月1日から2019年12月31日に沖縄県内中核病院14施設及び整形外科開業医37医院で, 骨盤及び下肢疲労骨折と診断された症例のうち50歳未満のスポーツ活動を行っている437症例(男性244例, 女性193例, 平均年齢16.6±7.0歳)を対象とした. 治療を自己中断したdrop out群128症例は除外し, 治療継続群309症例において発症部位, 原因となったスポーツ, 診断からスポーツ復帰までの期間を評価した. 更に, 発症部位により治癒遅延の高リスク・低リスク疲労骨折の2群に分類し, スポーツ復帰までの期間を評価した. 【結果】発症症例数の上位3部位は脛骨92例, 中足骨85例, 足根骨53例であった. 原因となったスポーツの上位5種目はサッカー64例, バasketボール64例, 陸上44例, 野球43例, ハンドボール24例であった. 診断からスポーツ復帰までの期間は平均7.0±4.2週であった. 高リスク群が71例, 低リスク群が219例. スポーツ復帰までの期間においては高リスク群平均8.2±4.9週, 低リスク群平均6.6±3.9週と, 高リスク群が有意に長かった(p=0.007).

【結論】沖縄県の骨盤及び下肢疲労骨折の疫学調査を行った. 諸家の報告と比べて女性の疲労骨折が多く, 発生部位は脛骨, 中足骨, 足根骨に多く, 原因となったスポーツはサッカー, バasketボール, 陸上が多かった. 高リスク疲労骨折は, 低リスク疲労骨折に比べスポーツ復帰までの期間が長かった.

015

沖縄県民を対象としたゲノムワイド相関解析による血圧関連領域の同定

上原 慶史郎 (学籍番号: 184205G)

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】日本人を対象とした血圧に関するゲノムワイド相関解析 (GWAS) により, 多数の血圧関連ゲノム領域が同定されているが, 沖縄県民のみを対象とした血圧に関するGWASは, まだ行われていない. 【目的】沖縄県民における収縮期血圧 (SBP), および拡張期血圧 (DBP) 関連ゲノム領域を同定する. 【方法】沖縄バイオインフォメーションバンク (OBI) に登録されている沖縄県民6613人を対象として, 653,092 SNPs (single nucleotide polymorphisms) の遺伝型を決定し, 遺伝統計ソフト plink を用いて SBP, DBP との相関を解析した. Quality control を通過したデータ (SBP:324,782 SNPs, n=4,491, DBP:324,782 SNPs, n=4,492) を用いて, 線形回帰分析を行った. NBDC (National Bioscience Database Center) に登録されている既報の SBP, DBP の日本人 GWAS データ (SBP: n=136,597, DBP:n=136,615, Kanai *et al.* 2018) と OBI の GWAS データをメタ解析で統合した. さらに公共データベース GTEx を用いて, eQTL (expression Quantitative Trait Loci) 解析を実施した. 【結果】OBI データのみの GWAS では, SBP, DBP 共にゲノムワイド水準 ($P < 5.0 \times 10^{-8}$) を満たす領域は同定されなかった. OBI および NBDC の GWAS データをメタ解析により統合したところ, SBP では41領域, DBP では27領域がゲノムワイド水準の有意差を示した. このうち DBP と7番染色体の rs56016252 との相関は過去に報告がなく, 新規の領域と考えられた ($P = 4.02 \times 10^{-8}$). リスクアレル (T, アレル頻度=0.22) 保有により DBP が上昇し, eQTL 解析の結果, rs56016252-T アレル保有と近傍に位置する *ADAP1* 発現量との間に負の相関がみられた (大動脈, $p = 0.00039$). 【結論】今回, DBP に関連する新規 SNP 座を同定した. rs56016252-T アレル保有は *ADAP1* 遺伝子発現の低下を介して DBP 上昇のリスクと関連する可能性がある. 今後は, *ADAP1* が, DBP に影響を与える分子機構の解明が必要と考えられる.

014

翻訳速度が低下したりボソームにリクルートされる CNOT3 の翻訳共役的フォールディングにおける役割

上原 萌 (学籍番号: 184137J)

指導教員: ○佐古 博皓¹⁾, 山本 雅²⁾, 荻谷 研一³⁾¹⁾ 沖縄科学技術大学院大学 (OIST) Cell Signal Unit Postdoctoral Scholar²⁾ 沖縄科学技術大学院大学 (OIST) Cell Signal Unit Professor³⁾ 琉球大学大学院医学研究科・医科学講座 教授

CCR4-NOT 複合体は mRNA の安定性を制御するが, 対応する tRNA の多い「最適コドン」に富む mRNA は翻訳速度が高く, かつ安定でもある. 他のグループは, CCR4-NOT 複合体がそのサブユニット CNOT3 を介して翻訳速度の低下したりボソームにリクルートされ「非最適コドン」を含むミスフォールディングされやすい mRNA の監視と分解に働くこと最近報告している. しかし, 翻訳速度の抑制は, 合成中のペプチドの折り畳み (cotranslational folding, CTF, 翻訳共役的フォールディング) を正確に行うための手段でもあり, リクルートされた複合体のこの点における役割は不明である. そこで本研究では囊胞性線維症遺伝子産物中のミスフォールディングされやすい NBD1 部位とリボソームスキップ配列 PA2 を含むレポーター遺伝子 EGFP-NBD1-PA2-mCherry を作成し, CNOT3 の役割を検討した. siRNA で CNOT3 をノックダウンすると EGFP-NBD1 蛋白量が減少して蛍光凝集体が観察されたが, mCherry 蛋白量に変化はなかった. 従って, EGFP-NBD1 がミスフォールディングにより分解・凝集に陥ったが全長 EGFP-NBD1-PA2-mCherry レポーター mRNA の分解は無く, 対照細胞では CCR4-NOT 複合体は EGFP-NBD1 の CTF を支援していたと推測された. なお CNOT3 をノックダウン細胞で mRNA 分解の無い理由については検討の余地が残された.

016

グリシンニューロンの発達について

山里 侑子 (学籍番号: 184209K)

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

グリシンは GABA と共に脳の主要な抑制性神経伝達物質であり, 脳幹や脊髄に存在する. 先行研究により, 脊髄の発達過程において GABA 作動性神経終末はグリシン作動性神経終末より早く発現し, その後 GABA/グリシン共放型に変化し, さらに前角では生後にグリシン作動性神経終末になることが明らかになった. しかし, グリシンニューロンがどこから分化し移動するのかその発生過程には不明な点が多い. 本研究では胎齢 15 日の脳幹におけるグリシンニューロンの局在を明らかにすることを目的とした. そのために, GlyT2-Cre ドライバーマウスと VGAT-stop-tdTomato レポーターマウスを交配し, GlyT2-Cre/VGAT-stop-tdTomato ダブルトランスジェニックマウスを作成した. 胎齢 15 日の胎児を用いて脳幹の切片を作成しグリシンニューロンの局在を調べ, さらに, 胎齢 14 日と 16 日の GAD67-GFP ノックインマウスについて同様に切片を作成し GABA ニューロンの局在を調べ, グリシンニューロンの局在と比較した. その結果, 乳頭脚, 三叉神経主知覚核, 三叉神経脊髄路核, 脊髄前庭神経核ではグリシンニューロンと GABA ニューロンが発現していた. また, 下橋網様体核, 上オリブ核, 三叉神経中脳路核, 舌下神経核, 孤束核ではグリシンニューロンのみ, 中脳, 内側縦束, 外転神経核では GABA ニューロンのみが発現していた. これらのことから, 乳頭脚, 三叉神経主知覚核, 脊髄三叉神経核, 脊髄前庭神経核では GABA/グリシン共放型ニューロンが存在するもしくは GABA ニューロンからグリシンニューロンへの移行期であると考えられる. また, 下橋網様体核, 上オリブ核, 三叉神経中脳路核, 舌下神経核, 孤束核では GABA ニューロンからグリシンニューロンへ移行したと考えられ, 中脳, 内側縦束, 外転神経核では今後 GABA ニューロンから GABA/グリシン共放型ニューロンやグリシンニューロンへ変化する可能性が考えられる.

017

不安様行動・記憶課題における
ラットの性差及び週齢差の比較

野原 海灯 (学籍番号: 184206E)
指導教員: ○上條 中庸, 宮里 実
琉球大学大学院医科学研究科システム生理学講座

【目的】動物実験の行動実験では、月経やホルモン変化による不安定さから雄が用いられることが多い。しかし同じ性や週齢のラットを使うと偏った実験結果になってしまう。そこでラットを用いて性差、週齢差による不安関連行動、自発行動量、空間作業記憶の違いを行動実験によって比較検討した。

【対象】生後 21 日で母子から隔離した SD ラット雄 12 匹, 雌 10 匹

【方法】3 週齢と 9 週齢の時点で(1)(2)を行なった。

(1)高架式十字迷路に 10 分間自由行動させ、不安関連行動評価をした。

(2)Y 字迷路に 8 分間自由行動させ、自発行動と空間作業記憶評価をした。

【結果】

① 3 週齢では 9 週齢より有意に不安様行動が多かった。

② 9 週齢では雄は雌より不安行動が多かった。

③自発行動量は性差がなかったが、3 週齢から 9 週齢になると有意に増加した。

④空間作業記憶は 3 週齢、9 週齢共に有意差はなかった。

【考察】2 週齢で母子分離したラットは行動量が減少しストレス反応が増大するという報告(黒田, 2004)があり、3 週齢で不安様行動が多かった原因として母子分離直後の影響が考えられる。9 週齢雌はエストロゲンの働きで分泌されるセロトニンの抗不安作用(Yamada M et al., 2009)により、雄よりも不安行動が少なくなったと考えられる。自発行動量についてはラット探索行動が雌雄ともに 4~8 週齢に増加したという先行研究(Tanaka K et al., 1984)があり、9 週齢と 3 週齢の差が出た本研究と一致している。この差は好奇心や不安感の違いで生じたと考えられる。

同様の条件下で飼育したラットだとしても性差や週齢差を考慮した上で、動物実験を行う必要がある。

019

アルコール依存を改善する玄米機能成分
 γ -オリザノールの分子メカニズムの探索

岡本 真与 (学籍番号: 184214F)
指導教員: ○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

玄米に含まれる有効機能成分 γ -オリザノールは動物性脂肪に対する嗜好性の改善効果や腸内フローラの改善効果等、多彩な機能を持つことが明らかになっている(Masuzaki H et al. Diabetes 2012, Drug Delivery 2017 他)。最近、我々は γ -オリザノールをアルコール依存マウスに与えるとアルコール嗜好性を緩和することを見出し、その脳内機序の一端を明らかにした(特許出願中)。アルコール依存状態の脳ではアセチルコリンエステラーゼ(AChE)発現が亢進するが、 γ -オリザノールは、転写因子 Egr1 と SP1 を含む核内複合体の形成を促進し、AChE 発現を減弱させることでアルコール依存を改善する。しかし、核内複合体形成を促す γ -オリザノールの分子作用機序は不明である。 γ -オリザノールはポリフェノールの一種であるフェルラ酸と種々の植物ステロールが結合したエステル結合体である。我々は、 γ -オリザノールのエステル結合部位が細胞内で加水分解され、さらにその各構成分子が核内受容体型転写因子に直接結合し、AChE の発現調節に寄与する可能性を検証した。

ヒト神経芽細胞腫 SH-SY5Y に 2 種類のコレステロールエステラーゼ(NCEH1 および LIPA) mRNA の発現を確認し、 γ -オリザノールが細胞内で酵素により切断される可能性が示唆された。さらに、AChE プロモーター領域に植物ステロールが結合できる受容体型転写因子結合部位の探索を進め、肝臓 X 受容体(LXR)およびエストロゲン受容体(ER)予測結合部位が存在することを確認し、現在、 γ -オリザノール添加時における各転写因子の結合活性を ChIP アッセイを用いて検証している。本研究の結果は、 γ -オリザノールによるアルコール依存改善に関する分子メカニズムの解明のみならず、 γ -オリザノールが担う様々な健康増進・疾病予防効果のメカニズム解明につながる事が期待される。

018

溺水における高度気道確保の優位性

玉城 駿 (学籍番号: 154180D)
指導教員: ○福田 龍将, 知念 巧
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、しばしば高度気道確保 Advanced Airway Management (AAM) が行われる。溺水における心停止は呼吸器原性心肺停止であるため、AAM 群と非 AAM 群の成績を比べた場合に AAM 群優位となると考えられる。

【目的】溺水による院外心停止における病院前 AAM と転帰の関係を検討するとともに施行者の違いによる成績の検証を目的とした。

【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溺水による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 AAM の有無による転帰の比較は、傾向スコアマッチング Propensity Score matching (PSM) で検証した。主要評価項目を病院前での心拍再開とした。施行者の違いによる転帰の比較は、医師と救命士の成績を上記と同様の方法で検証した。

【結果】解析対象は 13206 人で、AAM を実施した件数は 6252 人 (50.69%)、医師、救命士が行った件数はそれぞれ 593 人 (4.49%)、5659 人 (45.2%) で、他の 6644 人 (50.31%) に AAM は未実施であった。AAM 群と非 AAM 群では AAM 群の方が心拍再開率は良好であった (PSM : OR1.33 [95% CI1.11-1.59])。救命士による AAM と医師による AAM では医師による AAM の成績が良好であった (PSM : OR1.79 [95% CI1.27-2.51])。

【結論】溺水による院外心停止において、AAM 群は非 AAM 群に比べて病院前心拍再開率は高いことがわかった。また、救命士に比べて医師による AAM の病院前心拍再開率は高いことがわかった。

020

微量ゲノム DNA を用いた Ig/TCR
クローナリティ解析による
クローン判別法の開発

富田 涼路 (学籍番号: 184124G)
指導教員: ○加留部 謙之輔
琉球大学大学院研究科細胞病理学講座

リンパ系腫瘍の診断では、腫瘍細胞の単一増殖を確認し、さらに腫瘍細胞が B 細胞系か T 細胞系かの判別が極めて重要である。その判別法として、B 細胞系では免疫グロブリン重鎖(IGH)、T 細胞系では T 細胞受容体 γ 鎖(TCRG)領域の遺伝子再構成に基づいて確立された PCR 法が現在の標準的な解析方法であるが、腫瘍細胞の割合が少ない場合、偽陰性になりうる。一方、腫瘍細胞の純化のためマイクロダイセクションなどを行うと、核酸量が不十分なことがしばしば起こる。本研究は、近年開発されてきた単一細胞レベルの解析法を応用し、微量ゲノム DNA に適用可能な B/T 細胞性クローンの判別法の開発を目的とした。

B 細胞性細胞株 Raji および T 細胞性細胞株 HUT102 から抽出した DNA を用いて、それぞれ IGH/TCRG のクローナリティ解析を実施した。また、クローナリティ解析手法のスタンダードである BIOMED-2 を参考にした。以下に 3 つの検討内容を示す。①インプット DNA 量 (10ng ~ 10pg) に関する検出感度を評価した。② Reverse primer に対する inner primer を Primer3 ソフトで設計し、Semi-nested PCR を実施、検討した。③全ゲノム増幅(TruePrime 法および PicoPLEX 法)を介した解析法の比較・検討を行った。①評価可能な DNA 量の下限値は、IGH では 100pg、TCRG は 1ng であった。以降の解析では、100pg の DNA 量に焦点を当て、検討を行った。② Semi-nested PCR では、IGH および TCRG ともに目的とする増幅を確認できたが、非特異的な増幅が目立ち評価困難であった。③全ゲノム増幅を介した解析では、IGH は TruePrime 法のみで検出できた。一方、TCRG では両法ともに片アレルの遺伝子再構成を検出することができなかった。全ゲノム増幅過程で生じた増幅バイアスが原因と考えられる。これら①~③の方法の比較検討も含めて発表する予定である。

021

結核菌の病原因子 Zmp1 を標的とする
VHH 抗体の開発 1

岡 夏輝 (学籍番号: 000000000)

指導教員: ○高江洲 義一^{1,2)}, 梅村 正幸^{1,2)}, 松崎 吾朗^{1,2)}¹⁾ 琉球大学熱帯生物圏研究センター²⁾ 琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

【目的】 Zmp1 に結合してその作用を阻害する中和抗体 [抗 Zmp1 VHH 抗体] を開発する。【背景】 マクロファージ (Mφ) レベルでの結核菌の殺菌には Mφ 自身が産生する炎症性サイトカイン IL-1β が重要である。結核菌が産生する zinc metalloprotease1 (Zmp1) は IL-1β の産生を阻害する作用があり、それによって殺菌を回避している。従って、Zmp1 の作用を阻害出来れば新たな結核治療薬の開発につながる可能性がある。【方法】 大腸菌より精製した Zmp1 タンパクを抗原とし、それに結合する variable domain of heavy chain of heavy-chain antibody (VHH) 抗体をファージディスプレイ法によってスクリーニングした。(寄生虫・免疫病病態学講座の村上先生との共同研究)。その結果 5 クローンの VHH 抗体 (A8, D9, G10, H11, H12) が分離でき、抗体遺伝子の塩基配列を解析した結果、D9 以外の 4 クローンは同一であることが判明した。本研究ではクローン A8 の機能評価を免疫沈降 (IP) やウェスタンブロット (WB) を用いて行った。なお、IP および WB に用いた VHH 抗体は、マウス IgG の Fc 領域を融合させた形 (A8-Fc) で 293T 細胞に発現させ、その培養上清から調製した。【結果と考察】 FLAG-Zmp1 を発現する 293T 細胞の細胞抽出液を A8-Fc を用いて WB したところ、分子量から予想される位置にバンドが検出された。したがって、A8 は Zmp1 ポリペプチドを認識できることが分かった。一方で A8-Fc を用いた IP では、ネガティブコントロールの培養上清で IP したのものでも同じ位置にバンドが見られたため、IP した Zmp1 が A8-Fc によるものなのか、培養上清中の未知の物質によるものなのか不明であった。そこで、Zmp1 と His タグを付した A8 (A8-His) を 293T 細胞内で同時に発現させ、抗 His 抗体で IP を行った結果、両者の共沈降が見られた。以上より、今回開発した抗 Zmp1 VHH 抗体のクローン A8 は、変性・非変性いずれの状態の Zmp1 とも会合することが明らかとなった。

022

麻疹ウイルスのリーダー配列が
複製・転写に及ぼす影響の分析

國吉 俊範 (学籍番号: 184180H)

指導教員: 大野 真治

琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【背景と目的】 麻疹ウイルスのゲノムはマイナスの極性の一本鎖 RNA である。リーダー (Le) 配列とトレーラー配列とよばれる蛋白をコードしていない約 50 塩基からなる領域が、3' 末端と 5' 末端それぞれにある。それらはウイルス遺伝子の複製や転写に関与すると考えられているが、具体的にどのように働いているのかよくわかっていない。本研究では Le 配列に変異を入れ、複製・転写に及ぼす影響について調べた。

【方法】 麻疹ウイルスの Le 配列に変異を加えた 6 種類のミニゲノムを作成した。BHK7/9 細胞にミニゲノムとサポートプラスミドをトランスフェクションして、ルシフェラーゼアッセイにより mRNA 合成 (転写) を、逆転写定量 PCR によりゲノム複製を評価した。

【結果】 6 つのうち、二つの変異体ではルシフェラーゼの値が WT と比べて 1% 未満と大幅に減少していたが、ゲノム・アンチゲノム量 WT と同等であった。また、一つの変異体では、ルシフェラーゼの値が WT と同程度であるものの、ゲノム・アンチゲノム量は WT より 1.5 ~ 2 倍増加していた。三つの変異体で、ルシフェラーゼ値は WT と比べて 50 ~ 90% 程度まで低下していたが、ゲノム・アンチゲノム量は WT と比べて 1 ~ 2 倍増加していた。

【結論】 今回作成した 6 つの変異体では、ゲノム・アンチゲノム量は WT と大きな差は見られなかったものの、そのうちの 5 つでルシフェラーゼ値が減少していた。そのため、Le 配列は、ゲノム複製よりも、mRNA を合成する過程に主に関わっていると考えられる。今後は、Le 配列に変異を加えた組換え麻疹ウイルスを作成し、Vero/hSLAM 細胞に感染させて増殖・病原性について評価することが目標である。現在、ウイルスゲノムプラスミドを作成中である。

023

DPP4 阻害薬の心臓への影響

中島 颯 (学籍番号: 184147F)

指導教員: ○岩田 啓芳, 植田 真一郎

琉球大学医学研究科臨床薬理学講座

【背景と目的】 日本では、近年 2 型糖尿病治療薬として DPP4 阻害薬が主流となっているが、DPP4 阻害薬は心不全の入院リスクを増加させるという海外の研究結果が出ている。そこで、①心不全リスクの高い、2 型糖尿病合併冠動脈疾患患者での DPP4 阻害薬処方割合を調査した。また、② DPP4 阻害薬は交感神経刺激を増強させることが指摘されているが、脈拍との関連は未解明である。脈拍の増加は心不全など心血管疾患の予後と関係があるとされており、DPP4 阻害薬と脈拍との関連を解析した。最後に、③ DPP4 阻 M23 害薬服用と心不全発症との関連を解析した。【方法】 2005 年 ~ 2015 年の期間、2 型糖尿病に冠動脈疾患を合併する患者を集めコホートデータを作成し (n=7785)、それぞれ解析を行なった。①各年の糖尿病薬処方数を分類して集計し、割合をグラフに表した。② DPP4 阻害薬服用と脈拍の関連を、多重線形回帰分析を用いて解析した。③ DPP4 阻害薬服用と心不全発症との関連を Kaplan-Meier 曲線で表し、さらに比例ハザードモデルを用いて解析した。【結果】 ① 2009 年以降 DPP4 阻害薬処方率は年々上がり、2015 年には全糖尿病治療薬処方の 39.3% を占めていた。② DPP4 阻害薬は脈拍を有意に上昇させることがわかった ($\beta=1.11$, 95%CI:0.14-2.08, $p=0.02$)。③ DPP4 阻害薬服用と心不全発症に統計学的に有意な関連はなかった (HR=0.96, 95%CI:0.71-1.31, $p=0.82$)。【考察】 DPP4 阻害薬は心血管リスクのより高い 2 型糖尿病患者にも広く普及していることがわかった。また、交感神経刺激の増強が脈拍上昇につながることは当コホートで示された。今回、心不全と関連を示さなかった原因としては、以前の臨床試験と比較して薬剤の違い、血糖のコントロール状況の違いなどが関連しているかもしれない。

024

キーンバック病における骨形態の検討

平良 匡識 (学籍番号: 184179D)

指導教員: 知念 修子, 大久保 宏貴, 西田 康太郎

琉球大学大学院医学研究科医学専攻整形外科講座

【はじめに】 キーンバック病は月状骨の血流障害による無腐性壊死であるが、その成因はいまだ明らかではない。形態学的要因として Ulnar variance (UV) が minus の症例に多いと報告されているが、UV 以外の骨形態も発症に関与している可能性が考えられる。

【目的】 キーンバック病群とコントロール群の X 線学的骨形態を比較・検討することである。

【方法】 2008 ~ 2020 年に当院で診断された 16 歳以上のキーンバック病群 (K 群) 19 例 19 手 (平均 41.6 歳) を対象として、手関節単純 X 線像を後ろ向きに検討した。コントロール群 (C 群) は 2014 ~ 2018 年に他の疾患で手関節単純 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 49 例 86 手 (平均 39.2 歳) とした。UV, Radial inclination (RI), Carpal Height Ratio (CHR), Carpal Ulnar Distance Ratio (CUDR), 月状骨占拠率 (Lunate Covering Ratio: LCR), Volar Tilt (VT), 橈骨関節面の最背側点 - 橈骨最背側点間距離 (Dorsal Distance of Radius: DDR) を測定した。月状骨形態は月状骨 - 有鉤骨間に関節を有さない Type I と有する Type II に、橈骨背側の骨形態は橈骨背側が凸状の形態を Convex type, 平坦な形態を Flat type に分類し、K 群と C 群を比較した。【結果】 UV と VT は K 群で有意に小さく ($p<0.05$)、LCR は K 群で有意に大きかった ($p=0.002$)。RI, CHR, CUDR, DDR は両群で有意差を認めず、K 群と月状骨形態、橈骨背側の骨形態に有意な関連は認めなかった。

【考察】 キーンバック病の発症には UV・VT が低値の骨形態、橈骨関節面に接する月状骨関節面が大きい骨形態に関与している可能性が示唆された。

025

注意欠如多動症 (ADHD) を持つ児童の母親の感情表出と ADHD 症状との関係性に関する研究

野口 瑛伸 (学籍番号: 184151D)

指導教員: ○Gail Tripp¹⁾, 島袋 静香¹⁾, 荻谷 研一²⁾¹⁾ 沖縄科学技術大学院大学発達神経生物学ユニット²⁾ 琉球大学大学院医学研究科医化学講座

背景: 注意欠如多動症 (ADHD) は年齢不相応な不注意および/または多動性・衝動性を持続的に示す行動様式にもとづき診断され, 様々な生活の質に影響するとともに発達妨げとなる。薬物療法と並んで, 家族関係など生活環境の個々の子どもに合った調整が症状を軽減し二次的な行動問題も改善させることが分かっている。

研究目的: 本研究では, 親子の感情的な関わりを指標の1つとして使用される母親の子どもに対する感情表出 (Expressed Emotion, EE) と, 子どもの症状や行動問題との関係について分析する。分析にあたり, 英語版 EE 判定マニュアルを邦訳し, 日本の文化に適応した日本語版マニュアルも作成する。

方法: OIST 子ども研究所がこれまで収集した ADHD を持つ子どもの母親 44 名の EE データと, 現在進行中の国際マルチサイト無作為化比較試験 (RCT) の介入前延べ 240 組の EE データについて, 子どもの ADHD 症状および問題行動との関係性を分析する。EE 判定は, まず 5 分間の EE 音声データの筆記録を読み, マニュアル Manual for coding Expressed Emotion from Revised Five Minute Speech Sample; R-FMSS (Daley, 2001) に沿って, 5 項目について判定する。次いで, 音声データ自体を聴き判定の整合性を確認する。判定結果は量的データに変換され分析される。

成果と今後の計画: これまでに, 45 名の EE 判定を終了し, R-FMSS の邦訳も終了した。今後は, 2020 年 11 月からのリサーチインターンに引き続く 2021 年 4 月から翌 2022 年 3 月までの期間に客員研究学生としてマルチサイト RCT における EE データの 20% の判定を担当する。同時に, 判定基準の日本文化への適応化を行い日本語版 EE 判定マニュアルの完成に貢献する。

027

KCC2 (K⁺-Cl⁻共輸送体) 遺伝子改変マウスにおける脛骨神経損傷後の有髄神経回復過程の形態学的・形態計測学的研究

鈴木 茉月 (学籍番号: 184181F)

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

シナプス後ニューロンの K⁺-Cl⁻共輸送体 (KCC2) の発現が少ないと γ-アミノ酪酸 (GABA) シグナルは興奮性に働く。神経損傷からの回復には GABA が興奮性に働くことが重要であり, KCC2 発現が半減している KCC2 ノックアウトマウスヘテロ接合体では, GABA が興奮性に働きやすく, 神経損傷からの回復が速いことが予想される。この様なヘテロ接合体と野生型マウスの脛骨神経に切断・縫合手術 (神経損傷モデルの一つ) を施して, 後肢運動機能の回復を調べると, ヘテロ接合体の方が速く回復することが明らかになった (安藤博之, 2019 分子解剖学講座修士論文)。

そこで神経損傷後の運動機能の回復と神経組織の回復についての関連を調べるために, 脛骨神経の切断・縫合手術を行い, 損傷部位から遠位部の有髄神経線維について切片 SEM (走査型電子顕微鏡) 観察法を用いて, 定性的な形態学的観察と定量的な有髄線維密度の解析 (形態計測学的解析) を行った。

定性的な神経組織の変化はヘテロ接合体および野生型マウスにおいて基本的に同じであった。術後 7 日では有髄神経線維はほぼ完全に消失した。障害された線維はマクロファージによって処理された。術後 14 日では, マクロファージはかなり高頻度に観察されたものの, 細い有髄線維の数が増加し始めた。術後 21 日から 28 日にかけて, 有髄線維数と直径が増加した。定量的には, ヘテロ接合体の 14 日以降の有髄線維密度の増加が, 野生型のそれを上回る傾向があった。術後 28 日における有髄線維の密度を手術前の密度と比較すると, ヘテロ接合体では約 80% まで, 野生型では約 50% まで回復していた。これらの結果は, ヘテロ接合体の運動機能回復の速さと一致しており, 運動機能の回復と神経組織の回復は密接に関連していることが示唆された。

026

血中脂質に関するゲノムワイド相関解析とゲノム情報を利用した脂質異常症発症予測の試み

竹田 和輝 (学籍番号: 184215D)

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

【目的】沖縄県民に対し, 血中脂質値のゲノムワイド相関解析 (GWAS) を実施するとともに, 遺伝要因の総和である Genetic Risk Score (GRS) を用いた予測モデルを構築し, その精度を評価する。【方法】沖縄県民 6,613 人に対し, 653,092 個の一塩基多型の遺伝型を決定し, 年齢, 性別, BMI, 血中脂質値 (HDL-C, LDL-C, 中性脂肪) の情報を取得し, 各血中脂質値について線形回帰モデルによる GWAS を行った。次に, 集団を訓練データ (80%; HDL-C: 3,908 人, LDL-C: 3,906 人, 中性脂肪: 2,689 人) とテストデータ (20%; HDL-C: 976 人, LDL-C: 976 人, 中性脂肪: 672 人) に分割した。訓練データを用いて Clumping and Thresholding 法による GRS モデルを構築し, 全集団の GRS を算出した。GRS モデル構築に用いるバリエーションは訓練データ内でクロスバリデーションにより最適のものを選択し (HDL-C: 13 個, LDL-C: 1 個, 中性脂肪: 7 個), 血中脂質値を年齢, 性別, BMI, 主成分で予測するモデルと, GRS を加えて予測するモデルを構築した。構築した各モデルによりテストデータの予測値を得た後, 脂質異常症を陽性者として ROC 曲線 (Receiver Operating Characteristic curve) を描出し, その曲線下面積 (Area Under the Curve: AUC) により, 各々の予測モデルの精度を評価した。【結果】沖縄県民を対象とした GWAS により HDL-C で 5 領域 (*LPL*, *APOA5*, *ALDH2*, *LIPC*, *CETP*), LDL-C で 2 領域 (*APOA5*, *APOC1*), 中性脂肪で 3 領域 (*GCKR*, *LPL*, *APOA5*, *APOC3*) がゲノムワイド水準 ($p < 5.0 \times 10^{-8}$) の関連を示した。これらの領域はいずれも既報の領域であるが, 今回沖縄県民において初めて再現された。ROC 曲線の AUC は GRS を加える前後で, HDL-C で 0.780 から 0.808, LDL-C で 0.639 から 0.652, 中性脂肪で 0.686 から 0.713 と上昇した。【結論】沖縄県民において GRS を用いてゲノム情報を利用した良好な脂質異常症発症予測モデルを構築した。

028

モルモットの聴覚野の FM 応答の光学的測定

鶴田 流星 (学籍番号: 184172G)

指導教員: ○細川 浩

琉球大学大学院医学研究科システム生理学講座

純音応答とモルモットの鳴き声に使用される FM 音応答を光学的計測法を用いて測定し, 比較検討した。

モルモットを 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, 純音 (刺激時間 100ms, 音圧 60dB SPL, 周波数 0.5, 1, 2, 4, 8, 16kHz) を付加し, その応答から A1 の周波数バンドとバンド領域を推定した。上行 FM 音 (刺激時間 100ms, 音圧 50, 60, 70dB SPL, 開始周波数 0.5kHz, 終了周波数 1, 2, 4, 8, 16kHz) に対する応答を測定し, 各周波数バンド領域からバンド応答を算出した。

FM 音応答は, 0.5kHz のバンドに現れ, 周波数バンドに沿って活動が広がり, その後上行した周波数のバンド応答が現れた。時間的な広がり純音と比較して FM 音の方が早かった。

FM 音応答を周波数バンド応答で解析すると終了周波数 8k, 16k の音では約 30ms に 1 つ目のピークを示し, 約 110ms に 2 つ目のピークを持つ, 二峰性応答を示した。一方, 終了周波数 4k 以下の音では約 30ms にピークを持つ一峰性応答を示した。開始周波数と終了周波数の差が大きいかほど二峰性になりやすいと考えられる。

これらのことから, モルモットは純音に比べ上向 FM 音への反応性が高く, 早い時間で音に反応することが分かった。

029

小児院外心停止における バイスタンダー種別による 人工呼吸の有無と転帰の関係

當山 貴大 (学籍番号: 184157C)
指導教員: 松平 綾, ○福田 龍将, 久木田 一朗
琉球大学大学院医学研究科救急医学講座

【背景】我が国での成人院外心停止症例において, CPR を行うバイスタンダーが家族であった場合の転帰は非家族の場合と比べ有意に良好であるとの記録があるが, 国内の小児症例における同様の調査の明確な記録は無く, 小児のBCPRの手法方針決定のため検証の必要があると考えられる。

【目的】国内の小児の院外心停止症例でBCPR施行者の属性と人工呼吸施行の有無とを組み合わせ, 各条件の転帰との関係の検討を目的とした。

【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2016年12月までの期間に日本で発生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なった。バイスタンダー種別(家族または非家族)及び人工呼吸の有無を組み合わせ, 転帰の割合を検証し, 交絡の調整には多変量ロジスティック回帰分析を用いた。主要評価項目を心停止から一ヶ月後生存とし, 副次アウトカムを神経学的転帰良好生存とした。

【結果】解析対象は1802人, うち1116人(61.9%)はバイスタンダーが家族であり, うち人工呼吸が行われていたのは419人(23.3%)であった。またバイスタンダーが非家族であった対象は686人(38.1%), うち人工呼吸が行われていたのは289人(16.0%)であった。各条件での生存率はバイスタンダーが非家族かつ人工呼吸を行った場合が最も高く(51.9%), バイスタンダーが家族かつ人工呼吸を行わなかった場合が最も低かった(35.9%)。副次アウトカムにおいても同様の傾向が見られた。

【結論】小児院外心停止において, 家族がBCPRを施行しかつ人工呼吸を実施しなかった症例の1ヶ月後生存率及び神経学的転帰良好生存率が最も低く, 対して非家族がBCPRを施行しかつ人工呼吸を実施した場合の1ヶ月後生存率及び神経学的転帰良好生存率が最も高かった。

030

玄米機能成分 γ -オリザノールによる 転写因子RAR β を介した アセチルコリンエステラーゼ 発現調節機構の解明

島袋 佳穂 (学籍番号: 184136A)
指導教員: ○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

アルコール依存症患者は世界人口の約5.1%(2018 WHO)に及び, 心身の健康や社会・経済活動に多大な影響を及ぼしている。

我々は γ -オリザノール配合飼料を1.5ヶ月間アルコール依存マウスに与え, アルコール嗜好性が有意に改善することを明らかにした。アルコール依存状態の脳ではアセチルコリンエステラーゼ(AChE)発現が約2倍に亢進しているが, γ -オリザノールによりAChE発現が減少し低下していた側坐核におけるドパミン含有量が回復した。さらにヒト神経芽細胞腫SH-SY5Yにおいて, γ -オリザノールは転写因子Egr1とSP1を含む核内タンパク質複合体形成を促進しAChE発現を用量依存性に抑制することを見出した(特許出願中)。しかし, γ -オリザノールによる複合体形成促進の機序は不明であった。

このような背景を踏まえ, ポリフェノールとステロールの結合体である γ -オリザノールが核内転写因子に直接結合する可能性を検証するため, AChEプロモーター領域に予測binding siteが存在する核内受容体型転写因子RAR β に着目し, 免疫沈降法を用いてRAR β がEgr1と結合し核内タンパク質複体内に存在することを明らかにした。AChE発現を亢進するACh受容体アゴニスト添加によりRAR β とEgr1の結合は抑制傾向を示したが, γ -オリザノール添加によりEgr1との結合は有意に増強した。ChIP AssayではRAR β はSH-SY5Y細胞のAChEプロモーター領域における予測binding siteに結合しており, γ -オリザノール添加後も変化しないことが確認された。一方, 複合体を介したEgr1 binding siteにおける結合は減少した。以上より γ -オリザノールはSH-SY5Y細胞内においてRAR β とEgr1の結合を増強するが, Egr1 binding siteに存在する複合体からRAR β を解離させ, AChEプロモーター領域を開く作用を持つ可能性が示唆された。

031

性別鑑定における甲状軟骨の可能性: 沖縄県の法医解剖事例における形態学的検討

片岡 あかり (学籍番号: 184196D)
指導教員: ○二宮 賢司¹⁾, 米本 孝二²⁾
¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科法医学講座
²⁾ 琉球大学大学院保健学研究科生物統計学分野

【目的】身元不明遺体における性別の決定は, 身元特定のプロセスの中で最初の重要な段階の一つであり, この性別鑑定では, 形態学的手法が広く用いられている。これに関し, 甲状軟骨の形態を用いた性別鑑定の報告は散見されるものの, 日本人を対象とした研究は検索されない。そこで本研究では, 沖縄県の法医解剖事例から採取した甲状軟骨を対象に, その形態学的评价が性別鑑定において有効かを検討した。

【方法】2020年12月20日から2021年2月10日の間に, 琉球大学法医学講座において解剖された遺体の中で, 甲状軟骨の破損が見られず, 性別が判明している事例を対象とした。甲状軟骨について計測点を決め, 各部位の長さや角度を計測した。さらに, 各計測項目についてロジスティック回帰分析を行い, 得られた結果からROC曲線を描きAUC値を算出した。また過去の報告との比較のため, 舌骨についても同様の計測を行った。

【結果】例数は男性38例, 女性11例であった。甲状軟骨では各項目についてAUC値が0.9以上であった。また板面の横や縦の長さではAUC値が1.0であり, 今回の対象では100%鑑別が可能であった。舌骨の性別鑑定に関する先行研究で示された数式に, 本研究で計測した舌骨の値を当てはめると, AUCの値は0.96であった。

【考察】各項目のAUCの値や正解割合から, 舌骨より甲状軟骨の方が性別鑑定に有効であることが示唆された。加えて過去の報告によると, 舌骨では複数の計測項目を用いた数式が必要であったが, 甲状軟骨では, 一つの計測項目のみで同等以上の判別能を得られることが示唆された。本研究の限界としては, 例数が少なく, 男女数に差があり, さらに年齢に偏りがあることが挙げられる。今後, 検体数を増やすことで, これらの解決を図りたい。

032

結核菌の病原因子Zmp1を標的とする VHH抗体の開発2

中田 光紀 (学籍番号: 184163H)
指導教員: ○高江洲 義一^{1,2)}, 梅村 正幸^{1,2)}, 松崎 吾朗^{1,2)}
¹⁾ 琉球大学熱帯生物圏研究センター
²⁾ 琉球大学大学院医学研究科生体防御学講座

【背景・目的】結核菌のエフェクタータンパク質zinc metalloprotease 1(Zmp1)は, マクロファージ(M ϕ)からのIL-1 β 産生を阻害し, M ϕ 内での殺菌回避に寄与することが先行研究により示されている。ラクダ科動物由来のvariable domain of heavy chain of heavy-chain antibody(VHH)抗体は分子量が非常に小さく, 医薬品への応用も期待されている。本研究では, 新たな結核治療薬の開発に繋がることを期待し, Zmp1に結合しその作用を阻害できる「抗Zmp1 VHH抗体」の開発を行なった。【方法】大腸菌で発現させて精製したZmp1タンパク質を抗原として認識するVHH抗体をファージディスプレイ法にてスクリーニングした(寄生虫・免疫病因病態学講座の村上明一先生との共同研究)。Mouse-IgG-Fcと融合させたVHH抗体を作製し, 293T細胞で発現させ, その培養上清を用いて免疫沈降実験(IP)とウエスタンブロット(WB)を行い, VHH抗体が非変性/変性Zmp1を認識できるかどうか検証した。【結果・考察】スクリーニングで得られたVHH抗体は5クローンあり, それらの塩基配列を解析した結果, 1つのクローン(D9)が他の4つのクローンと異なることが分かった。FLAG-Zmp1を発現させた293T細胞の細胞抽出液をD9を用いてWBを行った結果, Zmp1の分子量から予想される位置にバンドが確認できた。よって, D9は変性Zmp1を認識することが分かった。一方, D9を用いたIPでは, ネガティブコントロールの293T細胞の培養上清を用いたIPでもバンドが検出されたため, この細胞の培養上清中にZmp1を認識する何かが存在する可能性が示唆された。この問題を回避するために, 細胞内でZmp1とHisタグを付したD9(D9-His)を共発現させ, 抗His抗体を用いてIPを行った結果, Zmp1とD9-Hisの共沈降が認められた。以上より, 本研究で開発した抗Zmp1 VHH抗体(クローンD9)は, 変性・非変性いずれの状態のZmp1も認識できると考えられる。

033

パルボウイルス B19 全ゲノムのクローニングと VLP ワクチンの作成に向けた基礎研究

知花 ひかり (学籍番号: 184198A)
 指導教員: 大野 真治
 琉球大学大学院医学研究科ウイルス学講座

【背景と目的】 ヒトパルボウイルス B19 (PVB19) は赤芽球に感染する 1 本鎖 DNA ウイルスで、伝染性紅斑の原因である。母体への初感染では胎児にも感染し、胎児死亡の原因となる。ワクチンや治療薬が開発されていないため、① PVB19 粒子を形成する VP1、VP2 遺伝子をクローニングし、感染性のないウイルス様粒子 VLP のワクチンとしての可能性を検討する、② 遺伝子組換え PVB19 作製のための全長ゲノムをクローニングすること、を目的とし研究を行った。

【方法】 患者血清中の PVB19 を鋳型とした。NS1 領域を用いて genotype を確認した。次に、VP1・VP2 遺伝子を発現ベクターにクローニングし、発現ベクターを導入した細胞中の各タンパク質の存在をウエスタンブロット法で確認した。血清検体中の PVB19 の全配列のクローニングも試みた。PVB19 の全長ゲノム (5.6kb) を一度の PCR で増幅させることは困難であったため、段階的にクローニングし、塩基配列を確認した。

【結果】 血清中の PVB19 の genotype は 1A であった。そのため、ゲノム配列を比較する対象として、データベース上の同じ genotype の配列を (# NC000883) を用いた。また、VP1、VP2 遺伝子領域をクローニングした発現ベクターを導入した細胞からのタンパク質の発現も確認できた。PVB19 はゲノムの両端に特徴的なヘアピン構造を持ち、起始部と相補鎖をなす部分が複数存在するためクローニングには難渋したが、5' 端の一部と 3' 端の 800bp を残すのみとなった。

【今後の計画】 VP1、VP2 タンパク質の発現が確認できたため、VLP を作製し、マウスへの免疫実験を行い、中和抗体の産生能について評価する。また、緑色蛍光色素 (GFP) タンパク質を組込んだ VLP や、GFP タンパク質を発現する遺伝子組換えウイルスを作成し、動物実験にて感染経路の確認や病原性について評価する。

035

三次元 CT 画像を用いた 腸骨スクリューシミュレーション

—三次元術前計画および三次元実物大モデルによる検証—

佐和田 雄軌 (学籍番号: 184217A)
 指導教員: ○仲宗根 哲, 石原 昌人, 翁長 正道, 西田 康太郎
 琉球大学大学院医学研究科医学専攻整形外科学講座

【はじめに】 股関節手術ナビゲーションでは、正確な精度を得るためには、トラッカーを腸骨スクリューで強固に固定する必要がある。しかし、腸骨の構造は複雑で、スクリューを確実に刺入できるかはわからない。本研究では、2 本の腸骨スクリュー刺入のシミュレーション及び三次元実物大モデルを用いたスクリュー刺入精度の検証を行った。

【対象と方法】 股関節手術を行った 26 例 52 関節で、男性 7 例女性 19 例を対象とした。手術時年齢は平均 65 歳、平均 BMI は 24.9、原疾患は変形性股関節症 10 例、大腿骨頭壊死症 10 例、大腿骨近位部骨折が 6 例である。三次元ソフトウェアで骨盤三次元モデルを作成し、上前腸骨棘より背側 15mm に点 A、30mm に点 B を取り、スクリュー A と B の刺入シミュレーションを行った。スクリューの深さは 50mm を目標に、スクリュー B が A に近づくように刺入した。同ソフトにて各スクリューの外方開角と前方開角を計測後、骨盤三次元モデルのデータを使い、三次元プリンターで三次元実物大モデルを作成した。シミュレーションで算出した角度を入力したアナログデバイス HipPointer を使い、三次元実物大モデルに実際にスクリューを刺入した。

【結果】 シミュレーションでは、合計 104 本のスクリューを刺入できた。各スクリューの平均値は、深さ A51.6mm、B51.5mm、外方開角 AB 共に 131°、前方開角 A42°、B34° であった。三次元実物大モデルでの検証では、全例ともスクリューの逸脱はなかった。術前計画と実験後の差は、外方開角が平均 2.19°、前方開角が平均 2.59° であった。

【考察】 これまでにトラッカー固定の腸骨スクリューについての報告はない。本研究結果から複雑な構造の腸骨に 2 本同時に挿入できるルートがあり、実際にアナログデバイスを用いて刺入できることがわかった。

【結論】 複雑な構造の腸骨にスクリューを刺入できる骨内のルートが 2 つ同時に存在することが分かった。

034

SARS-CoV-2 の細胞内侵入に対する コルヒチンの効果

脇田 夏鈴 (学籍番号: 184203A)
 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】 COVID-19 のパンデミックが世界的規模で生じている現在、その治療薬や重症化予防法の開発が急がれる。コロナウイルスを含む病原体の多くはエンドサイトーシス (Encs) で細胞内に侵入し、感染・増殖する。ヒトコロナウイルスはカベオラ Encs で取り込まれることが報告されているが、COVID-19 原因ウイルス SARS-CoV-2 に関する知見は少ない。我々は SARS-CoV-2 の細胞内侵入経路と、それに対する微小管機能阻害薬コルヒチン (Col) の効果を検討した。

【方法】 分化型ヒト単球系細胞株 THP-1 をガラス上に接着させ、Col ($1 \times 10^{-8} \text{M}$, $1 \times 10^{-6} \text{M}$) または溶媒を一晩処置し、カベオラ Encs を生じるコレラトキシン b (CTb)、またはリコンビナント SARS-CoV-2 スパイクエンベロープ (Cv2SE) を 0.5 or 1 時間暴露後固定し、caveolin-1 (cav1) またはゴルジ (GM130 or Golgin97) と免疫染色し Confocal 顕微鏡にて観察した。

【結果】 [CTb 暴露] 溶媒処置では細胞内で cav1 およびゴルジと共局在していたことからカベオラ Encs を確認した。Col $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 処置は細胞膜上 cav1 発現部位に CTb は共局在しゴルジとは重ならず Encs 減少を認めた。Col $1 \times 10^{-6} \text{M}$ 処置も CTb は主に細胞膜上に分布し cav1 と共局在したが、ゴルジの細胞内局在が細胞内全体に拡散し劇的に変化した。

[Cv2SE 暴露] 溶媒処置でゴルジと共局在を認め Encs を確認した。Col $1 \times 10^{-8} \text{M}$ 処置は共局在が減少しており Encs が抑制されていた。ただし cav1 とは局在せず、カベオラ以外での Encs が示唆された。

【結論】 SARS-CoV-2 は非カベオラ Encs 経路で感染し、Encs を抑制する Col は感染抑制効果を期待できる。

036

The effects of Photoinhibition of Dorsal Raphe Nucleus (DRN) Serotonin Neurons on Sustained Actions for Future Rewards in Mice

Tsukasa MIYAKE (学籍番号: 184184A)
 指導教員: ○Masakazu TAIRA¹⁾, Kenji DOYA¹⁾, Ken-ichi KARIYA²⁾
¹⁾Neural Computation Unit, Okinawa Institute of Science and Technology
²⁾Department of Medical Biochemistry, Grad Sch Med, University of the Ryukyus

Background: The dorsal raphe nucleus (DRN) is a major origin of serotonergic projection to many brain regions. Our previous studies showed that optogenetic activation or pharmacological inhibition of DRN serotonin neurons promote or suppress patience to wait for future rewards, respectively. In contrast, optogenetic activation of DRN serotonin neurons did not change sustained lever-pressing behaviors for future rewards. One possible reason why DRN serotonin activation did not change lever-pressing behavior is that DRN serotonin neurons would be highly activated enough during lever-pressing, which results in no additional change induced by photoactivation. To examine this possibility, in this project, we measured the effects of photoinhibition of serotonin neurons in both waiting and lever-pressing for future rewards in mice.

Method: We used 4 Tph2-ArchT transgenic mice. This mice strain selectively expressed ArchT, light sensitive proton pump, in serotonin neurons and yellow or blue light stimulation could be used to inhibit or not to inhibit serotonin neural activities via ArchT. We trained the mice for behavioral tasks required to tolerate delay (waiting task) or active motor response (lever-pressing task) to obtain future rewards and tested the effect of photoinhibition on sustained actions for future rewards.

Results: Photoinhibition decreased waiting duration in the waiting task. On the other hand, photoinhibition did not change the number of lever-presses and vigorosity of response in the lever-pressing task.

Conclusion: The results of this experiment suggest that patience to wait and patience to act for future rewards would be regulated by different neuronal mechanisms.

037

AP39の培養液添加による分離膵島の アポトーシス抑制と膵島移植成績の向上

新里 美咲 (学籍番号: 184120D)
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】膵島移植において、臓器保存中、膵島分離中及び移植後に膵島の多くを失ってしまうことが報告されている。一方、臓器移植の際に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_2S) が注目されており、 H_2S の供給源として AP39 が多くの研究で用いられている。今回我々は膵島分離後の膵島の培養液に AP39 を加えることによる効果を検証した。

【方法】ブタ膵臓を摘出し膵島分離後、培養液に AP39 を添加し培養を行った。膵島の評価系として培養後の細胞減少量、アポトーシス率、stimulation index, ATP 量、マウスへの膵島移植を行った。

【結果】膵島分離後の培養において、AP39 添加群では細胞減少量は有意に抑制された。また AP39 添加群で、アポトーシスが有意に抑制された。また 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 12 頭中 7 頭 (58.3%) が血糖正常化したのに対し、非添加群では 12 頭全てが血糖正常化に至らなかった。また IPGTT 試験でも AP39 添加群のうち血糖が改善したマウスは正常マウスと同様の血糖動態を示した。

【結語】AP39 を培養液に加えることにより、膵島のアポトーシスを抑制し、膵島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障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_2S を供給し保護することで、膵島において抗アポトーシス効果が得られたと考えられた。

038

アレルギーマウスモデルを用いた 経口免疫寛容の研究

照屋 悠介 (学籍番号: 184122A)
指導教員: 山下 弘高
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

【背景と目的】現在日本では、食物アレルギー患者が増加している。食物アレルギーは、食物タンパク質への免疫寛容が破綻することによって引き起こされる。そこで我々は、経口免疫寛容のメカニズムを明らかにすることが食物アレルギー治療の一助になると考えた。これまで我々は、卵白アルブミン (OVA) によるマウス食物アレルギーモデルを作製した。また、事前に OVA を経口摂取させることで経口免疫寛容を誘導し、アレルギーを抑制できることを見出した。そして、経口免疫寛容の獲得を阻害する大きな原因の一つとして、食品添加物の摂取が関与すると仮説をたて評価したところ、人工甘味料のサッカリン (Sac) の摂取により、経口免疫寛容の誘導が破綻することが分かった。加えて、腸管膜リンパ節のマイクロアレイ解析において、経口免疫誘導群にカリクレイン様タンパク質 (KLKs) の発現が増加していることがわかった。今回の研究で、アプロチニン (Apr: セリンプロテアーゼ阻害剤) を用いて経口免疫寛容の獲得機序を調べることを目的として実験を行った。

【方法】メスの BALB/c マウスに、1mg OVA または PBS を 5 日間経口投与した。1 週間後に、OVA/Alum or PBS/Alum 2 回腹腔内投与し感作した。その 1 週間後に食物アレルギー反応を引き起こすために、10mg OVA を隔日に 4 回経口投与した。その 1 週間後に 50mg OVA の経口投与により、アナフィラキシーを誘発した。Sac は経口免疫寛容を破綻させる目的で 1mg OVA と共に投与し、Apr は KLKs を阻害する目的で 1mg OVA の投与 30 分前に腹腔内投与した。食物アレルギーの指標として、体温の低下と下痢を評価し、血中の OVA 特異的 IgE 値を ELISA で評価した。

【結果】1mg OVA と Sac を投与した群と、Apr を注射し Sac を投与した 2 群において食物アレルギー誘導群と同等の反応が見られた。Apr を投与することにより、経口免疫寛容の獲得には影響を及ぼさなかった。

【考察】今回の実験では、KLKs が経口免疫寛容獲得に関連しているかと仮定し、実験を行っていたが、その仮定を証明する結果は得られなかった。Apr は非特異的にセリンプロテアーゼを阻害するため、特異的な KLK 阻害剤を用いたさらなる検討が必要である。

039

試験管内での血中グルコース濃度上昇による 血小板凝集への影響

山城 ゆりか (学籍番号: 184194H)
指導教員: ○中村 真理子, 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: 糖尿病患者では血栓症の合併が危惧されるが、血糖値と血小板凝集能の直接的な関係はよくわかっていない。本研究は、家兔の血液にグルコースを添加後、血小板凝集能の変化を観察した。添加するグルコース濃度による血小板凝集の変化を観察し、グルコースが血液成分である血小板および赤血球のいずれに影響を及ぼしているのか考察した。

方法: 家兔の耳介静脈からクエン酸ナトリウムを用いて血液を採取し、PRP (多血小板血漿)、PPP (乏血小板血漿) を作製した。グルコース濃度は、低濃度 12.5mg/ml、高濃度 100-200mg/ml に溶液を調整した。1) PRP: グルコース溶液を 9:1 に混和し、30 分間反応させた。2) 全血: グルコース溶液を 9:1 に混和し、30 分間反応させ、PRP を採取した。1), 2) を用いて、惹起物 ADP を用いて、血小板凝集能 (凝集率) を測定した。次いで、全血: グルコース溶液を 9:1 に混和し、30 分間反応させた後、細胞固定液で固定し、PBS で 2000 倍に希釈後、顕微鏡下で赤血球の形態を観察した。

結果と考察: PRP (血小板) にグルコース添加の実験では、グルコース濃度による血小板最大凝集率の変化は見られなかった。全血にグルコース添加の実験では、グルコース濃度が上昇するにつれて最大凝集率の上昇がみられた。また、ADP 添加 10 分後の凝集率は、PRP および全血のいずれもグルコース濃度依存性に凝集上昇、すなわち、凝集持続がみられた。その程度は、PRP に比較して、赤血球を含む全血が強い傾向を示した。さらに、顕微鏡下では、グルコース濃度が高いと形の崩れた赤血球が増加した。この結果から、血中グルコース濃度上昇は、浸透圧を上昇させ、血小板ではなく、赤血球に直接影響をおよぼしたと思われる。その変形した赤血球から放出した内容物が血小板凝集を持続させた可能性が考えられる。

040

混合性うつ病の定義の違いにおける 自殺関連行動の比較

厨 菜々映 (学籍番号: 184103D)
指導教員: ○座間味 優, 近藤 毅
琉球大学精神病態医学講座

【目的】混合性うつ病は閾値未満の躁・軽躁症状を伴う大うつ病エピソードであり、自殺リスクの一つとして注目されている。この概念には複数の定義が存在し、代表的なものに DSM-5 の「混合性の特徴 (mixed features specifier: MF)」と Benazzi による「混合性うつ病 (mixed depression: MD)」がある。MF は「注意散漫、易怒性、精神運動性の焦燥」を非特異的的症状として除外しているのに対し、MD はこれらの症状を定義の一部として加えておりより広範囲な症状を包括している。今回この二つの定義で、自殺関連行動の違いがあるかを検討した。

【方法】大うつ病エピソードのため琉球大学医学部附属病院を受診した 191 名の連続症例 (男性: 72 名, 女性: 119 名) を対象とした。自殺関連行動には、明確な自殺企図以外に、リストカットや過量服薬などの自傷行為も含めた、受診前後 1 ヶ月の自殺関連行動をカルテレビューした。MD, MF は診断基準に従い二人の経験豊富な精神科医により診断した。MD vs non-MD, MF vs non-MF でカイ二乗検定、フィッシャーの正確確率検定を行なった。統計的解析は SPSS を用いた。P 値 < 0.05 を有意差ありとした。

【結果】大うつ病エピソード 191 名中、MD は 43 名、MF は 7 名であった。自殺関連行動は 16 名で認められた。MD vs non MD はカイ二乗検定にて $P=0.006$ と有意差を認めたのに対し、MF vs non MF ではフィッシャーの正確確率検定にて $P=0.464$ と有意差を認めなかった。

【結論】受診前後 1 ヶ月の自殺関連行動の予測因子として、MF よりも MD の方が、臨床的意義があると考えられた。

041

生分解性不織布シートを用いた人工肝臓シートの作成

岡田 雅海 (学籍番号: 184108E)
指導教員: ○角南 寛, 清水 雄介
琉球大学医学研究科形成外科学講座

【背景と目的】肝臓移植までの橋渡しとして人工肝臓の開発が進められているが、現在までに実用化された人工肝臓は存在しない。近年、注目を集めているのが、肝機能の改善に寄与すると期待される細胞を移植投与する細胞治療である。我々は、こういった細胞治療と生分解性の足場を組み合わせ、新たな埋込み型人工肝臓の開発を目指している。本研究では、まず、HepG2細胞を、生分解性の足場で6日間培養して細胞シートを作製した。このとき、培養上清液をサンプリングしながら肝機能を調べた。また、肝機能に大きく寄与するとされる細胞の接着形態を共焦点顕微鏡により観察した。

【方法と材料】生分解性のφ20mmの円形の不織布上にHepG2を 3.0×10^4 cells/cmの密度で播種し、培養を開始した(37°C, 5% CO₂)。この不織布は、ORTHORIBERTHと共同開発されたものであり、PLGA:HAP (1:1)で作製されたものである。培養24時間、48時間、72時間、6日間で培養上清液を回収し、これらに含まれるアルブミンをELISAで、尿素をUREA assay kitを用いて測定した。また、培養されたHepG2細胞は不織布ごと固定化され、共焦点レーザー走査型顕微鏡で形態観察された。

【結果と考察】HepG2は、不織布上での増殖速度がカバーガラス上と比べて遅い事が分かった。培養上清液中のアルブミン量は不織布上とカバーガラス上で大きな差は観られなかったが、尿素量はいずれの培養期間においても不織布上のものがカバーガラス上のものを上回った。共焦点レーザー走査型顕微鏡像において、不織布上で培養されたものは、不織布の繊維に沿って細胞が接着しており、細胞凝集塊の大きさも、カバーガラス上よりも小ぶり、サイズ制御されている様子が観られた。このような細胞の接着および凝集状態が肝機能に影響していると考えられる。

042

色情報を用いた死斑の色調と血液成分の相関に関する検討

野中 秋穂 (学籍番号: 184126C)
指導教員: ○二宮 賢司¹⁾, 米本 孝二²⁾
¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科法医学講座
²⁾ 琉球大学大学院保健学研究科生物統計学分野

【はじめに】死斑とは死後に起こる血液就下のため、皮膚変色が生じる早期死体現象のことである。死斑はCO中毒であれば鮮紅色になり、失血では薄くなるなど死因の推定の一助ともなるが、色調の判定は常に主観による。そのため今回は画像解析ソフトを用いた客観的な死斑の色調の判定と、血液成分の解析によって、その関連性を調査した。

【対象及び方法】2020年12月19日～2021年2月12日に琉大法医学講座で扱った解剖事例のうち、20歳以上で沖縄在住の日本人かつ、死後変化が進行していないものを対象とした。死斑の発現した皮膚と白色板を撮影し、Just color pickerにてRGB値を計測し、より人間の色覚に近いCIE-L*a*b*系に変換した。この際白色板の数値を用いた変換式で、撮影環境による色の違いを補正した。また、心臓より採取された血液量、Hb値、O₂Hb値、COHb値、Ht、体重を測定し、死斑の色調との関連を調べた。その他に死斑の形成条件として、出血、凝血塊、死斑転移の有無も調査した。それぞれの項目を回帰分析し、βエラーを小さくするため有意水準は0.1とした。

【結果及び考察】出血・凝血塊の有無は死斑の色調に影響しなかったが、死斑転移の有無はL*,a*,b*それぞれの値に影響を与えた。死斑転移のない事例において、採取血液量、体重は明度L*と相関がみられた。このため体内の循環血液量が、明度L*に影響を与えていると推察された。Ht値、Hb量、O₂Hbの割合は、色相のうち青みを示すb*と相関がみられた。赤みを示すa*と関連しなかった理由は不明だが、体内血液量が明度に影響を与え、色素量が色相に影響を与えるため、死斑色調の評価は体内血液量や色素量を推定できる可能性が示唆された。また、死斑転移の影響を加味すると、死斑の評価により死後の体位変換や人為的移動などを判別できる可能性が示唆された。

043

沖縄県における滲出型加齢黄斑変性の臨床的特徴および危険因子

渡邊 那津子 (学籍番号: 184111E)
指導教員: ○寺尾 信宏, 玉城 環, 湧川 空子, 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】加齢黄斑変性(AMD)は網膜の加齢変化により様々な器質的、機能的障害を生じる疾患である。AMDは環境因子と遺伝因子が発病に関与している多因子疾患であり、沖縄では紫外線暴露などの環境因子の違いから、本土のAMDとは異なる表現型、特徴を呈する可能性がある。我々は沖縄での滲出型AMDの臨床的特徴および危険因子を調査した。

【対象と方法】2020年7月から2021年2月までに琉球大学病院を受診した沖縄県出身の滲出型AMD患者107例134眼。カルテ録から臨床的特徴として年齢、性別、初診時視力(logMAR)、発症眼(両眼、片眼)、サブタイプを検討した。サブタイプは典型AMD(tAMD)、ポリープ状脈絡膜血管症(PCV)、網膜血管腫状増殖(RAP)に分類した。アンケートからBody mass index(BMI)、既往歴、内服薬、眼科疾患既往歴、紫外線暴露、嗜好歴、AMD家族歴の有無を調査した。

【結果】臨床的特徴について、平均年齢75.7歳、男性72%、初診時logMAR視力 0.58 ± 0.51 、両眼AMD15.9%、サブタイプ分類tAMD49.5%、PCV40.2%、RAP10.3%であった。危険因子について、BMI ≥ 30 が14.0%、既往歴は高血圧が60.7%、内服薬は降圧薬使用が59.8%、眼科疾患既往歴は白内障手術既往が63.6%と頻度が高かった。紫外線暴露は日光暴露有りが42.1%、日光予防有りが73.8%、嗜好歴は喫煙歴有り54.2%、アルコール依存有り9.3%、AMD家族歴有り5.6%であった。さらにサブタイプ間ではtAMD、PCVはRAPに比較して喫煙歴を有する症例が多かった(P=0.018)。他の危険因子はサブタイプ間に有意差はなかった。【結論】沖縄県の滲出型AMDは本土と比較してtAMD、視力不良例の頻度が高かった。危険因子として特に頻度が高かった高血圧、喫煙歴、日光暴露などと関連している可能性がある。

044

ノックアウト細胞株を用いたSSEA-4とシグナル伝達との関連性解析

山本 洋介 (学籍番号: 000000000)
指導教員: ○須田 哲司, 齋藤 誠一
琉球大学大学院医学研究科腎泌尿器外科学講座

ES細胞や初期胚に発現するStage-specific embryonic antigen-4(SSEA-4)は糖転写酵素ST3Gal2によって合成され、乳癌や腎癌などの種々の癌で高発現する。これまでに我々は、SSEA-4の高発現が前立腺癌の悪性度と相関することを明らかにしてきた。しかし、細胞内におけるSSEA-4の生物学的機序は未だ明らかになっていない。そこで今回、我々が樹立したST3Gal2のKO細胞株を用いて、SSEA-4と細胞増殖や分化に関わるシグナル伝達との関連を解析した。

まず、KO細胞株では親株と比較してST3Gal2 mRNAレベルが減少していることをqRT-PCRにより確認した。次に、我々が作製したSSEA-4を認識する抗体を用いた薄層クロマトグラフィーを行い、KO細胞株ではSSEA-4の発現が認められないことを明らかにした。そこでこの細胞株を用いて、細胞の増殖や分化に関わる2つのシグナル経路に着目し、qRT-PCRとウエスタンブロット解析を行った。その結果、1つの経路では親株とKO細胞株とに大きな違いは認められなかった。しかし、もう1つの経路ではKO細胞株において減少するmRNAやタンパクを認め、SSEA-4の当該シグナル経路に関与する可能性が示唆された。また、ST3Gal2のKOによる細胞増殖への影響についても解析したが、明らかな違いは認められなかった。

本結果から、SSEA-4はシグナル伝達に関与する可能性が示唆された。今後、更なる解析によりSSEA-4およびその関連分子の制御による治療応用が期待される。

045

SARS-CoV2 (COVID-19) に対する トシリズマブの有効性についての システマティックレビュー

與那嶺 達輝 (学籍番号: 184173E)
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) SARS-CoV2 (COVID-19) の感染拡大は世界中の人々の健康を脅かし緊急を要しているが, その重症化の一部にインターロイキン6 (IL-6) を介したサイトカインストームが関与しているとの報告がある。
(目的) COVID-19 に対する抗 IL-6 受容体抗体であるトシリズマブの有効性を, これまで報告された論文のメタ解析を行うことにより確認する。
(方法) PubMedおよびCochrane libraryで「COVID-19, tocilizumab」をキーワードに論文検索を行い, あらかじめ設定した選択基準を満たした論文を選択した。プライマリーエンドポイントを死亡と機械的換気の複合エンドポイント, セカンダリーエンドポイントを死亡, 機械的換気とした。抽出したデータを解析ソフトウェア (Review Manager) に入力してそれぞれのエンドポイントについての解析を行った。
(結果および考察) 最初の検索で 878 本の論文がヒットし, 9 本の研究が設定した選択基準を満たした。解析の結果, トシリズマブ治療群は対象治療群と比較してプライマリーエンドポイントの発生率を有意に減少させた (オッズ比 0.44, 95% 信頼区間 0.27-0.73)。セカンダリーエンドポイントでは死亡において有意差が認められた (オッズ比 0.52, 95% 信頼区間 0.27-0.99)。機械的換気は有意差が認められなかったが改善傾向がみられた (オッズ比 0.48, 95% 信頼区間 0.21-1.07)。ランダム化比較試験のみを用いたプライマリーエンドポイントも有意差は認めなかったが改善傾向がみられた (オッズ比 0.71, 95% 信頼区間 0.48-1.05)。以上の結果から, トシリズマブは COVID-19 の予後を改善することが示唆された。今回選択した論文のうち後ろ向きコホート研究の論文が約半数を占めているため, 今後さらなるランダム化比較試験の結果を利用したメタ解析によるエビデンスの確立が望まれる。

047

アルコール依存症者のネガティブな感情に対する 対処的な飲酒と混合状態の関連研究

長尾 英樹 (学籍番号: 174102B)
指導教員: 栗原 雄大
精神科神経科助教

【目的】
アルコール依存症と気分障害は並存しやすく重複障害と呼ばれる。これまでの研究ではうつ病や双極性障害の重複障害研究は多数あるが, 躁とうつが混じっている混合状態に着目した研究は数少ない。また, アルコール依存症者はネガティブな感情に対して対処的な飲酒を行うことが知られているが, 混合状態との関連を調べた研究はない。今回は, アルコール依存症者の混合状態と対処的な飲酒の関連を明らかにすることを目的としている。
【方法】
2018年3月から2020年3月にかけて国立病院機構琉球病院を受診した232人 (男性187名, 女性45名) のアルコール依存症者を対象に, DMX-12 (混合状態の評価), QIDS-SR (うつ状態の評価), TEMPS-MPT (病前気質の評価), DBP-20 (飲酒行動パターンの評価) を行い, 重回帰分析および共分散構造分析を行った。
【結果】
重回帰分析の結果より, 混合状態と対処的な飲酒への関連が示唆された。共分散構造分析からは, 対処的な飲酒への寄与としては, うつ状態よりも混合状態の寄与率が高いことが分かった。また, 双極性障害に関連する循環気質, 焦燥気質との関連があることが明らかになった。
【結論】
アルコール依存症者の対処的な飲酒は混合状態と関連している。今後は, 単なるうつ状態だけでなく混合状態との併存も視野にいたれた治療を行う必要があるかもしれない。

046

GT1-7細胞およびゼブラフィッシュでの FIP200のオートファジーへの影響

與儀 萌香 (学籍番号: 184135B)
指導教員: ○仲嶺 三代美, 鳥原 英嗣, 山本 秀幸
琉球大学大学院医学研究科生化学講座

FAK family interacting protein of 200 kDa (FIP200) と UNC-51 like kinase 1 (ULK1) はオートファジー関連蛋白質として知られている。生化学講座では, 培養神経細胞 (GT1-7細胞) で, FIP200のノックダウン (KD) によりオートファジーが抑制されることを見出している。また, ULK1は蛋白質リン酸化酵素であるが, その基質は不明である。私は, GT1-7細胞を用いてFIP200がULK1の基質である可能性を検討した。次に, ゼブラフィッシュを用いて個体レベルでのFIP200のオートファジーへの関与について検討した。
GT1-7細胞をアミノ酸飢餓で2時間培養すると, オートファジーのマーカータンパク質であるLC3-IIが2倍に増加した。ULK1阻害薬 (SBI-0206965: SBI) の存在下では濃度依存的にLC3-IIが減少した。次に, FIP200に対するSBIの効果を検討した。SBI存在下ではFIP200の蛋白質量が67%に減少することが明らかになった。さらに, 免疫沈降後のphos-tag法では, SBI存在下でFIP200のリン酸化が51%に減少した。以上より, FIP200の蛋白質量とリン酸化にULK1が関与することが示唆された。
ゼブラフィッシュを用いた研究では, アンチセンスオリゴを用いてFIP200KD胚 (KD胚) を作成した。全RNAを抽出してRT-PCRを行なうと, KD胚ではスプライシング異常による不完全なmRNAの産生が確認され, 脳や目の発育遅滞も観察された。また, 野生胚とKD胚をパフィロマイシンA1で処理すると, 両胚において恒常的なオートファジーによるLC3-IIの蓄積が認められた。さらにKD胚ではLC3-IIの減少が確認された。これらの結果から, FIP200がオートファジーで重要な機能を果たすことが示唆された。

048

膵臓保存液へのAlvelestat添加による, ブタ膵臓分離の収量増加と膵臓移植成績の向上

大塚 琉世 (学籍番号: 184119A)
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が多く喪失することが課題とされており, その原因として好中球エラスターゼ (NE) があげられている。NEは炎症にさらされた好中球から放出され, エラスチンやコラーゲンなどの細胞外マトリックス成分を分解し, 内皮細胞傷害による臓器損傷を引き起こす。Alvelestatは新規のNE阻害剤であり, 肺における抗炎症作用が確認されている。今回, 膵臓分離前の膵臓の保存液にAlvelestat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, Alvelestat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量の測定とマウスへの膵臓移植を行った。
【結果】純化前の膵臓収量がAlvelestat添加群では755657±108699 IE, 非添加群では435934±39984 IEと有意差が見られた。純化後の収量においてもAlvelestat添加群が558715±109384 IE, 非添加群が307904±27110 IEと有意差が見られた。また, 培養後の細胞減少もAlvelestat添加群において抑制され, stimulation indexおよびATP量においてもAlvelestat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Alvelestat添加群では55%が血糖正常化したのに対し, 非添加群では5%のみが血糖正常化に至った。
【結語】膵臓保存液にAlvelestatを加えることにより, 膵臓収量や分離膵臓の質が向上し, 膵臓移植成績も改善した。すでに肺で確認されたAlvelestatのNE阻害による抗炎症作用が膵臓でも得られたものと考えられる。

049

CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウスに見られた代謝症候群

岡 大智 (学籍番号: 184166B)
指導教員: ○伊波 幸紀, 筒井 正人
琉球大学大学院医学研究科薬理学講座

I. 背景 ヒトの体内で産生されるガス状生理活性物質には一酸化窒素, 一酸化炭素, 硫化水素 (H₂S) などがあり生体内で様々な生理活性を有する。中でも, 硫化水素は cystathionine β-synthase (CBS), cystathionine γ-lyase (CSE), 3-mercaptopyruvate sulfurtransferase (3MST) の3つの酵素から合成されることが知られているが, これらは H₂S だけでなく, 他の活性イオウ分子種も合成することが報告された。しかし, 生体内における活性イオウ分子種合成酵素系 (CBS/CSE/3MST 系) の意義は不明である。薬理学教室では, 最近, CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウスの開発に世界で初めて成功した。薬理学教室で行われた先行研究において, このマウスは体重増加, ホモシステイン血症, 空腹時高血糖, 高血圧の傾向がみられることが分かった。

II. 目的 本研究では「CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウスに見られた代謝症候群の発症機序には過食が関与している」という仮説を検討した。

III. 方法 代謝ケージを用いて, CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウス (8週齢, 24週齢) と野生型マウス (8週齢, 24週齢) の24時間の食事量, 飲水量, 便量, 尿量を測定した。

IV. 結果 生後8週齢, 24週齢ともに食事量, 便量, 飲水量, 尿量のすべてにおいて CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウスのほうが高い値を示した。そのうち8週齢では食事量, 飲水量, 便量で有意差が見られ, 24週齢では飲水量, 便量, 尿量で有意差が見られた。

VI. 結論 CBS/CSE/3MST トリプル欠損マウスにおける代謝症候群の発症機序には過食が関与していることが示唆された。

050

統合失調症の原因候補遺伝子 MKL1 の核局在の解析

川原 大輝 (学籍番号: 184106J)
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: 統合失調症のより良い治療法の開発が望まれている。統合失調症の発症には遺伝的な要因が関与していることが確認されている。しかしながら, 発症に大きな影響をもつ遺伝子変異とメカニズムはほとんどわかっていない。そこで本研究は, 統合失調症の遺伝的要因を明らかにすることを目的に, 統合失調症患者のゲノムを解析して見出した遺伝子変異の機能を検討する。実験方法: ①過去の当講座でのゲノム解析で絞り込んだ候補遺伝子変異を扱った。②候補遺伝子に関する先行研究を調べた。③プラスミドの DNA 配列を読み, ①で特定した遺伝子変異と一致することを確認した。④プラスミドを HeLa 細胞に Transfection し, 表現型を野生型と変異型と比較した。結果: python を用いて様々な条件でフィルタリングし, 原因候補遺伝子 MKL1 の妥当性を確認した。MKL1 遺伝子の先行研究を調べたところ, この遺伝子は核内で actin の産生に関与していることが分かった。MKL1 遺伝子を HeLa 細胞に Transfection し, 野生型と変異型で表現型を比較したところ, MKL1-EGFP 融合蛋白質が細胞質に局在している細胞の割合は, 野生型で 15.4%, 変異型で 21.0% であった。また, MKL1-EGFP 融合蛋白質が核に局在している細胞の割合は野生型で 84.6%, 変異型で 79.2% であった。考察: MKL1 を Transfection した HeLa 細胞において, 野生型・変異型どちらも8割前後が核に局在していた。MKL1 は核に入り, actin の産生を介して, 統合失調症の病態に関係する可能性がある。一方で今回の実験では野生型・変異型の核局在に差を示すことはできなかった。核内での actin の産生量において差があるのかもしれない。さらなる検討が必要である。

051

病原性レプトスピラによる細胞間接着装置の破壊の解明と阻止

本永 宙 (学籍番号: 184167A)
指導教員: トーマ・クラウディア, 山城 哲
琉球大学大学院医学研究科細菌学講座

【背景・目的】細胞間接着装置は細胞同士の接着に必要であり, 上皮細胞のバリアと臓器機能の維持に重要である。その接着には, 細胞表面に存在する E-cadherin (Ecad) や Occludin (Ocd) などに関与している。病原性レプトスピラ (*L. interrogans*) は血管から近位尿管上皮細胞に移行し, その細胞間接着装置を破壊する特徴を持つ。そこで本菌の細胞間接着装置の破壊の仕方とその阻止方法を突き止める。

【方法・材料】RPTEC (Renal Proximal Tubule Epithelial Cells) は, 極性を持った上皮細胞として Transwell にて 14 日間分化させ, 基底膜側から *L. interrogans* または非病原性レプトスピラ (*L. biflexa*) で感染させた。感染 24 時間後に上皮細胞のバリア機能を TEER (経上皮抵抗値) と蛍光免疫染色にて評価した。またエンドサイトーシス阻害剤 (Dynasore, Pitstop2, MβCD など) で処理した感染細胞の細胞間接着装置破壊への影響を調べた。

【結果】*L. interrogans* は TEER を 80% 減少させ, Ecad と Ocd の膜局在を低下させた。一方, Ecad のエンドサイトーシス阻害剤である Dynasore と Pitstop2 を用いた感染実験では TEER の値が高く維持され, Ecad と Ocd が細胞膜に局在したことから, 細胞間接着装置の破壊を阻止したことがわかった。また, Ocd のエンドサイトーシス阻害剤である MβCD は破壊を防げなかった。その他の阻害剤は, RPTEC に対して細胞毒性を示したため, 本実験系で使用できなかった。

【結論・考察】*L. interrogans* は Ecad のエンドサイトーシスを引き金として細胞間接着装置を破壊することがわかった。さらに, Ecad と Ocd は細胞骨格によって繋がっており, Ecad のエンドサイトーシスが, Ocd の取り込みを誘導することが考えられた。したがって, Ecad のエンドサイトーシスを阻止することによって, *L. interrogans* の破壊を食い止め, 尿管への移行を遮断できることが示唆された。

052

当院における腎臓内科紹介患者の予後の検討

金城 未来 (学籍番号: 184159k)
指導教員: ○中村 卓人, 石田 明夫, 大屋 祐輔
琉球大学病院循環器・腎臓・神経内科学

背景・目的: 入院中に急性腎障害 (AKI) や電解質異常を合併した患者は生命予後が悪い事が報告されている。当院で入院中に第三内科腎臓・高血圧グループに紹介された患者の紹介理由と入院中の転機を調べる目的でデータベースを作成し解析を行う。

方法: 2015 年 4 月から 2020 年 3 月までに腎臓内科に紹介された入院患者を電子カルテよりリストアップし, 年齢, 性別, 入院日, 入院目的, 紹介年月日, 紹介目的, 退院日, 退院時転帰, 主病名を収集し解析した。

結果: 5 年間の腎臓内科への紹介人数は計 588 人で退院時転機が死亡であった症例は 44 人であった。腎臓内科への他科からの紹介目的は, 慢性腎不全が 28% と最多で, ついで急性腎不全が多く 27% であった。院内死亡患者のうち 53% が急性腎不全を合併していた。急性腎不全の紹介元は心臓血管外科 18%, 消化器内科 17% であった。紹介目的別の死亡率は, 尿量異常が 17% と最多でついで急性腎不全 15% であった。電解質異常で紹介となった症例の死亡率は 10% であった。また, 尿量異常全 12 症例のうち 11 症例が尿量低下であった。

考察: 急性腎不全, 尿量異常で紹介された症例の死亡率が高かったことから過去の報告と同様に当院でも急性腎障害の合併は入院中の死亡率が高いと考えられた。急性腎不全の紹介は心臓血管外科からの紹介が最も多かった。心臓血管外科は人工心肺などによる血行動態変化など急性腎障害発症リスクが高い症例を多く扱うことから心臓血管外科から急性腎障害の紹介が多かったと考える。今後は急性腎障害発症のリスク因子等を明らかにするためのデータベース構築が必要と考える。

結論: 当院でも入院患者の急性腎障害の合併は生命予後の悪化に繋がる可能性が考えられた。

053

VHH 抗体の迅速かつ簡便な新規親和性向上法の開発研究

赤嶺 佐月 (学籍番号: 184140J)

指導教員: ○村上 明一, 塚原 成俊, 喜友名 しのぶ, 岸本 英博
琉球大学大学院医学研究科免疫学・寄生虫学講座

ラクダ科動物特有の H 鎖抗体の抗原結合ドメインである VHH 抗体は、安価大量生産ができ、また安定性に富む等、多くの利点があり、近年医薬品開発が注目されている。

当研究室では、400 億以上の多様性を有する VHH 抗体ライブラリーを構築し、多種多様な標的抗原に対して、迅速に抗体を作製できるシステムを保有している。このシステムを用いて、既に 50 種以上の標的抗原に特異的に結合する VHH 抗体を取得しているが、標的抗原によって得られる抗体の親和性にばらつきがある。よって、迅速かつ簡便に VHH 抗体の親和性を改善する方法を開発したい。本研究では、VHH 抗体の N 末端に数残基のペプチドを付加させるのみで、新たな抗原結合部位を生み出し、抗体の親和性を向上させるシステムの構築を試みた。HER2 (浸潤性乳癌の一部に過剰発現するヒト EGFR 関連物質) と cTnT (心筋壊死に特異的な血中マーカー) に特異的に結合する既得の VHH 抗体の N 末端にペプチドを付加させたライブラリーを作製し、スクリーニングを実施した結果、親和性の向上したクローンが多数得られた。その抗体の遺伝子解析によると、抗 cTnT VHH では、主に疎水性や負電荷を持つ、6 ~ 8 アミノ酸残基の付加により親和性が上昇していることが判明した。すなわち、VHH 抗体の迅速かつ簡便な抗体の高性能化システムとして N 末ペプチド付加法は有効であった。一方、抗 HER2 VHH ではアミノ酸残基の付加に加えて、VHH ダイマーが有効に働いていた。これは、PCR 時のエラーにより出現した副産物であると考えられるが、VHH の二量体化法も有効な手段であると判明した。以上より、N 末ペプチド付加法や二量体化法は、今後、VHH 抗体の高性能化システムとしての活用が期待される。

055

コルヒチンはウイルス感染による白血球細胞外トラップ生成を抑制する

金城 衣良 (学籍番号: 184148D)

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】 現在世界中で猛威を振るっている COVID-19 は呼吸器症状のみならず、血栓症を合併し臓器障害を引き起こす。血栓の形成には様々な要因が存在するが、COVID-19 での血栓の原因の一つに、活性化した白血球が細胞外に自身の DNA を放出する細胞外トラップ生成がある。我々は過剰な細胞外トラップ生成の抑制が、血栓による臓器不全を防止できると考え、白血球活性化を抑制するコルヒチンの白血球細胞外トラップ生成に対する効果を検討した。【方法】 単球系細胞株 THP-1 をホルボールエステルによりマクロファージ様細胞 (Diff.THP-1) に、またはリンパ球様細胞株 HL-60 を DMSO で好中球様細胞 (Diff.HL-60) に分化させたものを使用した。刺激として TLR9 リガンド作用を有するウイルス由来 DNA モチーフ、LPS または TNF α を用い、刺激 4 時間での核酸染色試薬 Sytox Green の蛍光により細胞外トラップ生成を、刺激 1 時間での western blotting により NF κ B p65 リン酸化と I κ B- α 発現をみることで細胞内炎症シグナルを、コルヒチン前処置 (1x10⁻⁵M, 1x10⁻⁶M) の有無で評価した。【結果】 Diff.THP-1 においてコルヒチン 1x10⁻⁶M 前処置は TLR9 リガンド、TNF α 刺激による細胞外トラップ生成を抑制する傾向がみられ、TLR9 リガンド、LPS 刺激による炎症シグナル亢進を抑制した。Diff.HL-60 において TLR9 リガンド刺激で同様の結果だった (他の刺激は未実施)。また、コルヒチン 1x10⁻⁶M 前処置にはこれらの抑制効果がなかった。【結論】 コルヒチンは適切な濃度で NF κ B 経路活性化および細胞外トラップ生成を抑制する。これは COVID-19 の血栓形成による重症化予防にコルヒチンが有効であることを示唆する。

054

開心術における体温変化と酸素消費量についての検討

比嘉 祐一郎 (学籍番号: 184211B)

指導教員: ○喜瀬 勇也¹⁾, 兼城 悠司²⁾, 古川 浩二郎¹⁾¹⁾ 琉球大学大学院胸部心臓血管外科学講座、²⁾ 琉球大学病院 ME センター

【目的】 心内操作を行う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。その際、主要臓器の酸素消費量を低減する目的で 33 度の軽度低体温もしくは 25 度の高度低体温としている。本研究では、麻酔導入後から執刀開始、部分体外循環および完全体外循環下の全手術時間を通じて酸素消費量を算出し、開心術中の体温変化と酸素消費量の相関を明らかにする。

【対象】 2020 年 12 月 ~ 2021 年 2 月の間、開心術を行った 18 例を対象とし、32-35 度の軽度低体温群 (MH 群: n=8) と 20-28 度の高度低体温群 (SH 群: n=6) 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。

$$\text{酸素消費量 (ml/min)} = 1.34 \text{ (ml/g)} \cdot \text{HGB (g/dl)} \cdot (\text{SaO}_2 - \text{SvO}_2) \cdot \text{灌流量 (L/min)} \cdot \dots \cdot (\text{A})$$

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 % (SaO₂): 送血管 SaO₂ ④ 静脈血中ヘモグロビン酸素飽和度 % (SvO₂): 脱血管 SvO₂

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る。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_{2in} - O_{2out}) · MV (L/min) · 1000 · · · (B)

① 吸入酸素濃度 % (O_{2in}) ② 呼気中酸素濃度 % (O_{2out}) ③ MV: 分時換気量 L/min

【結果】 1. 開心術時の体温と酸素消費量には強い正の相関を認めた。

2. 軽度低体温時 (33 度) には酸素消費量は約 35%、高度低体温時 (25 度) では約 3.5% まで酸素消費量の低減を認めた。3. 両群の帰帰式の傾きより、通常体温から数度の体温低下における酸素消費量の低下は大きく、その後は緩やかな低下傾向を示した。4. 高度低体温群では、同一体温において、加温時に比べ、冷却時の酸素消費量は低下していた。これは血液冷却によって、酸素解離曲線の左方移動が起こり、組織でのヘモグロビンの酸素遊離が低下した為だと考えられた。

【結語】 開心術下の体温変化に伴う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。

056

ゼブラフィッシュと培養細胞を用いた RPS19 が関与するオートファジーの解析

豊里 仁菜 (学籍番号: 184186G)

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

リボソームは 4 種類の RNA と 79 種類のリボソームタンパク質 (RP) からなるタンパク質合成装置である。RP の発現に異常が生じると、細胞周期停止やアポトーシスが誘導される。RP の一つである RPS19 は、先天性疾患であるダイヤモンド・ブラックファン貧血 (DBA) の責任遺伝子である。DBA の発症機序として細胞周期停止やアポトーシスとの関連が報告されているが、その詳細は不明である。最近、DBA の発症にオートファジーが関与する可能性が報告された。今回、RPS19 とオートファジーの関連について着目し、検討を行った。

はじめに、胎児ヒト腎細胞 (HEK293T) を用いて、siRNA による RPS19 のノックダウン実験を行った。24 時間培養後、アミノ酸飢餓培地に置換し、バフィロマイシン A1 (BafA1) を加えた。BafA1 で 2 時間処理後、タンパク質を回収し、サンプルを調製した。Western blot 法によりオートファジーの指標となる LC3- II の検出を行うと、アミノ酸飢餓による LC3- II の増加が確認された。興味深いことに LC3- II の増加は、RPS19 のノックダウンにより抑制された。次に、rps19 ノックアウトゼブラフィッシュを用いて個体レベルでの検討を行った。成魚を 3 日間絶食させた後、脳と腸管を採取した。どちらの臓器でも、野生型に比べ、rps19 ノックアウトでは、絶食による LC3-II の増加が抑制された。次に、ゼブラフィッシュ受精卵に、rps19 に対するモルフォリンアンチセンスオリゴを微量注入し、発現を抑制した後、BafA1 に 18 時間暴露した。この実験では、恒常的なオートファジーと BafA1 による LC3- II の増加が抑制された。

これらの結果は、RPS19 がオートファジーに必要であることを示唆している。今後は、ゼブラフィッシュの系を用いて、オートファジーと DBA との関連を検討していく予定である。

057

新型コロナウイルス流行期における 他の呼吸器ウイルスの流行状況の検討

玉城 太成 (学籍番号: 184202B)

指導教員: ○上 若生, 新垣 若子, 平井 潤, 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】 SARS-CoV-2 (新型コロナウイルス) の世界的な流行が続いているが、SARS-CoV-2 感染が疑われた患者でも、検査結果が陰性であった患者は多数存在している。冬期はインフルエンザなどの流行も懸念されており、SARS-CoV-2 と他呼吸器ウイルスの鑑別が重要視されている。今回、SARS-CoV-2 の流行期に他の呼吸器ウイルスの流行があったかどうかを検討した。

【方法】 2020/11/1 ~ 2020/11/30 の期間に新型コロナウイルス感染が疑われた患者の凍結保存された 127 検体 (鼻咽頭ぬぐい液、喀痰など) を用い、SARS-CoV-2 以外の呼吸器ウイルス遺伝子検査を行った。核酸の抽出には全自動抽出機 MagLEAD を使用した。また、遺伝子検査には Seegene® Allplex™ RV Essential Assay (Seegene 社) を使用した。これはアデノウイルス (Adv)、インフルエンザウイルス A 型/B 型 (Flu A/B)、パラインフルエンザウイルス (PIV)、ヒトメタニューモウイルス (MPV)、ライノウイルス (HRV)、RS ウイルス (RSV) が 1 回の遺伝子検査で同時に検出できる検査キットである。【結果】 他呼吸器ウイルスは陽性が 30、陰性が 97 で検出率は 23.6% となった。また、検出されたウイルスは Adv が 1、Flu A が 0、Flu B が 0、PIV が 0、MPV が 0、HRV が 4、RSV が 19、Coinfection が 6 となった。【結論】 RSV の検出割合は高く、流行期にあったと考えられる。また、Flu の検出がなく流行していなかったと考えられる。今回の検討から、手洗い、マスク着用、ソーシャルディスタンスの徹底や人の流れが極端に減ったことが、呼吸器ウイルス流行現象に一定の効果があったのではないかと考えられる。

058

良性組織迷入を用いた 口腔がん関連マイクロ RNA の探索

丸山 哲昇 (学籍番号: 184213H)

指導教員: 丸山 修幸¹⁾, ○中村 博幸^{1,2)}¹⁾ 琉球大学医学部附属病院歯科口腔外科;²⁾ 同医学研究科顎顔面口腔機能再建学講座

緒言と目的: 口腔がん患者において、稀ではあるが頸部リンパ節に良性組織迷入 (BI) が出現する。BI と後発頸部リンパ節転移との関連は未だ解明されていない。そこで、BI を対象とした発現解析により、口腔がんに関わる新たなマイクロ RNA (miR) を選定し、更にその標的遺伝子を探索することを目的とした。

対象と方法: BI (ホルマリン浸漬パラフィン包埋) 試料を用いた miR マイクロアレイ解析結果を基に、BI に有意に発現した miR を選定し、同 miR の標的遺伝子を *in silico* で選定し、選定 miR を導入/抑制した口腔がん細胞を用いて遺伝子の発現解析 (ウェスタンブロットティング法ならびに定量 PCR 法) を行った。

結果と考察: アレイ解析より miR-67xx を選定した。更にその標的遺伝子として遺伝子 Y を選択した。同遺伝子は上記 *in vitro* 発現解析において期待される発現を認めた。

結語: 口腔がんにおいて miR-67xx ならびに遺伝子 Y は何らかの制御を行うことが示唆された。

059

COVID19 患者に対する ファビピラビル使用時の副作用調査

奥村 悠 (学籍番号: 184134D)

指導教員: ○潮平 英郎¹⁾, 中村 克徳^{1,2)}¹⁾ 琉球大学病院薬剤部²⁾ 琉球大学大学院医学研究科薬物治療学講座

【背景】 2019 年 12 月、中華人民共和国で肺炎患者の集団感染が報告されたことを端緒に新型コロナウイルス感染症 (COVID19) が世界的に流行している。現在、日本国内においてはレムデシビル、デキサメタゾンの 2 剤が COVID19 治療薬として承認され使用される一方で、様々な薬剤の臨床研究・承認申請が並行して行われている。それらの薬剤の一つとしてファビピラビル (商品名: アビガン) がある。ファビピラビルは、新型インフルエンザが発生し、かつ、既存薬の効果が期待されない場合に使用することを想定した薬剤であったために実臨床における使用経験がなく、副作用に関する情報が少ないのが現状である。

【目的】 COVID19 患者に対してファビピラビル使用時の副作用と効果に関する指標を調査することを目的とする。本研究は琉球大学人を対象とする医学系研究倫理審査委員会の承認を得て行った (承認番号: 1742)。

【方法】 琉球大学病院において、ファビピラビルにより治療がおこなわれた COVID19 患者群について、副作用および効果に関連した情報を診療録より抽出する。その後、ファビピラビルで既に報告されている副作用項目を中心に副作用発現状況を検討する。

【結果と考察】 AST, ALT, eGFR, 尿酸値について統計的に評価を行った。その結果、AST, eGFR の変動は生理的な変動の範囲内であった。一方、ALT は有意に増加し、投薬開始 1 日目と 7 日目頃の検査値を比較すると平均して約 34U/L の増加が認められた。尿酸値では、有意差は認められなかったが、投薬開始後 1 回目と 7 日目頃の検査値を比較すると平均して約 2 mg/dL 増加が認められた。これらの結果から、ファビピラビルは腎機能に影響しないが、肝機能悪化、尿酸値増加を引き起こす可能性が示唆された。COVID19 治療の際にファビピラビルを用いる際はこれらの項目に関して十分な検討をする必要があると考えられる。

060

ヒトパピローマウイルス (HPV)-6 の *in vitro* での生活史の再現を目指して

岳原 斗夢 (学籍番号: 174170F)

指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男

琉球大学大学院医科学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

HPV は扁平上皮細胞に感染し、細胞の分化に依存した生活史を送っている。そのため、HPV の生活史を *in vitro* で再現するためには、培養条件下で細胞を分化させる必要がある。近年、扁平上皮細胞を 3 次元に培養しなくても、培地中のカルシウム濃度を変化させることで 1 次元でも細胞を自由に分化させられる方法が開発された。そこで本研究では、1) 扁平上皮細胞 HaCat を培地中のカルシウム濃度を変化させて、未分化から分化させる条件を確立し、2) HaCat への遺伝子導入法を確立する。つづいて、遺伝子導入の際に HPV-6 の全長 DNA が必要なことから、3) HPV-6 の全長クローニングをすることを目的とした。

まず、HaCat を Ca²⁺ 濃度の異なる KGM 培地上で培養し、蛍光顕微鏡による観察と Involucrin, Keratin10, Keratin14 をマーカーとしたリアルタイム PCR を行った。観察の結果 Ca²⁺ 濃度 0.06mM では細胞は未分化の形態を示しており、1.8mM では分化した形態を示した。またリアルタイム PCR でも 1.8mM で KRT10 及び INV は有意に上昇しており、Ca²⁺ 濃度で細胞分化を誘導できることがわかった。

遺伝子導入法に関しては HaCat を 0.06mM of Ca²⁺ KGM で培養したのちに、Ca²⁺ 濃度の異なる 2 種類の KGM で培養を続けた場合と、DMEM で培養した後にそのまま DMEM で培養を続けた場合、DMEM から Ca²⁺ 濃度の異なる 2 種類の KGM に移した場合のそれぞれに導入を試みた。すると最初に KGM で培養していたものの方が最初に DMEM で培養していたものより導入効率が優れていた。

HPV-6 の全長クローニングについては、Bgl-I のプライマーセットを用いた Inverse PCR で成功した。

以上を踏まえ、今後 *in vitro* で HPV-6 のライフサイクルの再現に取り組んでいく予定である。

061

01 コレラ菌における VBNC (Viable But Not Culturable: 生きているが培養できない菌) への変換と生物型等による違い

金岡 優志 (学籍番号: 184149B)
指導教員: ○荒木 かほる, 許 駿, 山城 哲
琉球大学医学研究科細菌学講座

【背景】 *Vibrio cholerae* には多くの血清群があるが、O1 または O139 血清群のうちコレラ毒素を産生するものがコレラの原因となる。O1 群はさらに生物型 classical (Cla) と El Tor (ET) に分類される。コレラ菌には Viable But Not Culturable (VBNC) という生きているが培養できない状態が存在し不利な環境下における防衛戦略とされている。

【目的】 ① O1 コレラ菌の Cla (臨床株), ET (臨床株), ET (環境株) を用い、VBNC 状態への移行の違いを検査する。② 迅速に VBNC に誘導する方法を模索する、を目的とする。

【材料と方法】 O1 コレラ菌 classical 臨床株として 569B, CL8; El Tor として臨床株 N16961, AL4260; 環境株 AJ2, AJ4 を用いた。

実験①菌を低温飢餓状態にして生菌数を測定して生菌数が 0 になった時点で生菌を緑、死菌を赤に染色する live/dead 染色を行う。実験②迅速にコレラ菌を VBNC 状態にするため、3.0% 過酸化水素でコレラ菌を 2 時間処理して、生菌数計算、live/dead 染色を行った。VBNC の条件として、1) 普通寒天培地上で培養できない、2) live/dead 染色で緑色に染まる、3) ビルビン酸入り培地で菌が蘇生すること、とした

【結果と考察】 実験①について、VBNC に移行したと考えられた日数は、培養開始後、Cla (臨床株) は 25 ~ 35 日、ET (臨床株) は 35 日、ET (環境株) は 14 日であった。以上より ET (環境株)、Cla (臨床株)、ET (臨床株) の順に VBNC に移行しやすい傾向が見られた。一方、生物型の違いとは別に、環境株が VBNC に移行しやすく、臨床株がしにくいという解釈が可能であった。実験②については VBNC における 1)、2) の条件は満たすものの、3) は確認できず、蘇生法等新たな検討が必要だと思われた。

062

腎生検検体を用いて作成した糸球体径予測式の精度の検証

石井 慶美 (学籍番号: 184161B)
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

【背景】 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を引き起こすことで腎障害の進展に寄与する可能性が報告されている。糸球体肥大は病理学的にしか評価できないため、腎生検を一般的には行わない多くの慢性腎臓病患者において糸球体肥大の評価は困難である。本研究では、腎生検検体を用いて臨床指標による糸球体径予測式を作成し、その精度を検証した。

【方法】 対象は 2016 年 1 月 1 日から 2017 年 12 月 31 日に腎生検を行い、管内増殖性糸球体腎炎や間質性腎炎などを除いた患者 94 人。糸球体径に関連する因子をステップワイズ法により変数を選択し、重回帰分析にて糸球体最大径の予測式を作成した。更に、2018 年内の腎生検標本を用いて実測糸球体最大径と予測式との相関を検証した。

【結果】 糸球体径に関連する因子として、年齢、性別、平均血圧 (MAP)、体格指数 (BMI)、HbA1c、尿酸、LDL- コレステロール、HDL- コレステロール、中性脂肪、体格補正無し eGFR を変数としてステップワイズ法を行ったところ、性別、MAP、BMI、HbA1c、体格補正無し eGFR の 5 つが選択され、予測式を作成した ($R^2=0.45$)。2018 年腎生検標本で計測した糸球体最大径と予測式の関連を検証したところ、有意な相関関係を認めた ($r=0.36$, $p=0.005$)。

【結語】 本研究で作成した糸球体最大径予測式により病理学的に評価した糸球体最大径をある程度予測できることが示唆された。今後、病理学的な糸球体肥大に関連した既報の知見と予測式を用いた知見を比較し臨床的な妥当性を検討する必要がある。

063

アフリカ豚熱 (ASF) に有効なサブユニットワクチン候補蛋白質の検証

山城 美羽 (学籍番号: 184107G)
指導教員: ○村上 明一, 喜友名 しのぶ, 塚原 成俊, 中島 雄介, 岸本 英博
琉球大学大学院医学研究科免疫学・寄生虫学講座

アフリカ豚熱ウイルス (ASFV) は、2 本鎖 DNA をゲノムにもつアスファウイルス科アスフィウイルス属の唯一のウイルスである。豚やイノシシを宿主とし経口・経鼻感染、あるいはダニによる経皮感染により発熱や全身の出血症状を呈し、アフリカ豚熱 (ASF) を発症する。世界中で流行している株の致死率はほぼ 100% であり畜産業界への影響は甚大であるが、未だ有効なワクチンや治療法はない。その理由としてウイルスタンパク質の機能や細胞への感染機序について不明な点が多いことが挙げられる。そこで ASFV のタンパク質の中で病原性やマクロファージへの接着に関与しており、ウイルス表面に発現して感染に関わる可能性のある p54 と i177L に注目した。本研究では、これらのタンパク質を発現・精製し、免疫原性の評価を行うことで、安価で大量生産が可能なサブユニットワクチンに適しているかを検証した。

まず、大腸菌のコドンに最適化した p54 と i177L の合成遺伝子を作製し、タンパク質発現ベクター pET-22b(+) に組み込んだ。発現用大腸菌 BL21 (DE3) 株を用いて C 末に 6×His タグを有する p54, i177L の抗原タンパク質を発現させ、Ni-NTA を使用したアフィニティ精製により抗原タンパク質を取得した。SDS-PAGE, ウェスタンブロッティングにより目的のタンパク質の発現及び精製度を確認後、Alum 又は CpG-ODN をアジュバントとして混合してマウスに皮下投与で免疫を行った。初回免疫から 14 日目に追加免疫を行い、初回免疫から 7 日後、14 日後、21 日後にマウスの血清を採取し ELISA で免疫原性を評価した。その結果、共に免疫原性が確認できた。今後、免疫により生産された抗体が中和活性を有しているか等を確認し、これらの抗原タンパク質がサブユニットワクチンとして利用可能であるかの検証をさらに進めていく予定である。

064

トランサミン投与による体外循環中の DIC 予防効果

桃原 望菜 (学籍番号: 184174C)
指導教員: ○喜瀬 勇也¹⁾, 兼城 悠司²⁾, 古川 浩二郎¹⁾
¹⁾ 琉球大学胸部心臓血管外科科学講座
²⁾ 琉球大学病院 ME センター

【目的】 体外循環を用いた開心術において、有効な術野止血を得るためには術中の凝固・線溶因子の変化を適切に把握する必要がある。我々はこれまでに開心術時の体外循環時間と DIC (播種性血管内凝固症候群) 進行の相関について明らかにしてきた。本年度から術中 DIC 予防目的にトランネキサム酸 (トランサミン®) 投与を開始しており、本研究ではその DIC 効果を検証する。

【対象】 トランネキサム酸 (以下 TXA) 投与群は 2020 年 12 月から 2021 年 2 月までに行われた開心術連続 19 例を対象とした。TXA 非投与群ではデータ採取が可能であった昨年度と一昨年度に行われた開心術 35 例を対照群とした。

【方法】 TXA 投与方法は 1.0 ~ 2.0g を術直前 (胸骨切開 1 ~ 2 分前) に静注投与し以後、体外循環中 1 時間毎に 0.15 ~ 0.20g を持続静注を行った。TXA 投与群、非投与群とも術前、体外循環前、術後 (術直後、1 日目、4 日目、7 日目、2 週目、3 週目) の Fib 値、DD 値、FDP 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、その相関を検証した。

【結果】 1. TXA 非投与群では術中の D ダイマー値は、術前の約 13 倍に、FDP 値は 16 倍まで上昇していたが、TXA 投与群では D ダイマー、FDP とも有意な上昇を認めず、DIC の予防効果が確認された。2. 両群とも Fib 値は体外循環時間と強い負の相関を認めた (TXA 投与群: $y = -0.002x + 0.96$, $R^2 = 0.687$, TXA 非投与群: $y = -0.002x + 0.95$, $R^2 = 0.71$)。回帰式より Fib の半減時間は TXA 投与群の方が若干長く (非投与群: 215 分、投与群: 232 分)、Fib 消費が抑えられる傾向にあった。

【結語】 トランサミン投与によって体外循環中の DIC 進行を抑え得る可能性が示された。

065

深層学習を用いた人工知能 (AI) による 色素細胞画像判定器の開発

砂川 武博 (学籍番号: 184131K)
指導教員: ○内海 大介
琉球大学大学院医学研究科皮膚科学講座

背景: 皮膚の病理組織像において正常メラノサイト, 悪性黒色腫, 色素性母斑の判別が困難である場合がある。特に悪性腫瘍である悪性黒色腫の診断にあたっては, 過剰診断, 過剰診断のいずれの場合も患者に多くの損害を与える可能性があるが, 正確な鑑別を行うには鑑別点を十分に把握しておくことが必要であるため, 鑑別精度は皮膚科医の熟練度によって大きく異なる。そのため, 医師の熟練度に依存しない定量的な新たな鑑別手法が求められている。

目的: 正常メラノサイト, 悪性黒色腫, 色素性母斑の細胞画像を, 深層学習を用いた人工知能 (AI) に学習させることによって, 細胞の種類を判別する判定器を作成する。

方法: 正常メラノサイト (10 症例), 悪性黒色腫 (10 症例), 色素性母斑 (10 症例) の病理画像から 50×50 ピクセルのサイズで各細胞画像を 500 枚ずつ収集し, 収集した病理細胞画像を AI に学習させ, 細胞の種類を予測可能な判定器を作成した。別途に準備した細胞画像テストデータを用い, 判定器の精度確認を行った。

結果: 収集データに関して各細胞の判定精度は正常メラノサイト (100%), 色素性母斑 (93%), 悪性黒色腫 (100%) となり正常メラノサイトと悪性黒色腫は高確率で判定可能。一方で色素性母斑は悪性黒色腫と誤診する場合があった。

その後, 別途に準備した組織の細胞画像データを判定し, その精度の確認を行い, 特に悪性黒色腫と色素性母斑の細胞の判定を行ったところ, 色素性母斑 (41.7%) 悪性黒色腫 (96.7%) となり悪性黒色腫は高確率で判定可能だが色素性母斑は悪性黒色腫と誤診する確率が高かった。

考察: 深層学習を用いた AI による病理細胞画像の判定において, その精度は学習させた細胞画像のデータ量に左右され, 特に母斑細胞は形態の多様性が高い可能性が考えられることから, 判定精度を向上させるには, より多くの学習データが必要となると考えられた。

067

新型コロナウイルス陽性検体を対象とした イギリス変異種の検出

大城 慶将 (学籍番号: 184199J)
指導教員: 上 若生, 新垣 若子, 平井 潤, 金城 武士,
藤田 次郎
感染症・呼吸器・消化器内科学講座 (第一内科)

【背景・目的】 現在, 日々メディアで新型コロナウイルスの情報について報道されており, その中でもイギリス変異種 (B.1.1.7) が 2020 年 12 月末に日本国内で初めて検出されたとのことは人々の注目も集めた。従来種より 30~70% 高いとされる感染力と, 約 30% 高い致死率が推測されるイギリス変異種は 10 月に初めてイギリスで確認され, 2021 年 3/2 現在, 日本を含め 106 の幅広い国と地域に広がっている。2021 年 1 月現在, 沖縄県内でイギリス変異種の感染が確認された事例はまだないが, 日本国内の中でも沖縄県は国内外からの観光客の往来が多く, 県内にもイギリス変異種の感染者がいる可能性, また実際に国内で初めて検出された 12 月末以前に県内に既に流入している可能性は否定できない。本研究では新型コロナウイルス陽性検体を用いてイギリス変異種の検出を目的としたマルチプレックス PCR を行い 2020 年 11 月から 2021 年 1 月下旬にかけて県内でその流行があったかを確認した。

【方法】 琉球大学病院で 2020 11/4 - 2021 1/27 に採取された新型コロナウイルス陽性の 21 検体 (凍結保存された咽頭ぬぐい液) を使用した。全自動核酸抽出システム (magLEAD 12gC PSS 社) を用いて検体から核酸を抽出した。抽出した核酸を Novaplex™ SARS-CoV-2/UK Variant Assay (Seegene 製) を用いて RdRP gene と HV69-70del を標的としたマルチプレックス PCR を行い, イギリス変異種の有無を検索した。

【結果】 検索した新型コロナウイルス陽性の 21 検体からイギリス変異種は認めなかった。

【考察】 今回の検討より, 沖縄県でイギリス変異種が 12 月下旬以前に流行している可能性は低いことがわかった。しかし, 本研究で用いた検体は琉球大学病院のみで採取されたものであり, 沖縄県全域の感染状況を反映しているとは言えない。このことからすでにイギリス変異種が県内に流入している可能性や, 1 月下旬以降に広がる可能性があるためその流行に対策が必要である。

066

FIP200 のリン酸化による Pyk2 活性化の制御

嘉陽田 朝暉 (学籍番号: 184168J)
指導教員: ○澳津 志帆, 仲嶺 三代美, 鳥原 英嗣, 山本 秀幸
琉球大学大学院医学研究科生化学講座

Proline-rich tyrosine kinase 2 (Pyk2) は FAK ファミリーのひとつであり, 中枢神経細胞に多量に発現している。FAK family-interacting protein of 200 kDa (FIP200) は質量 200 kDa のタンパク質で, Pyk2 と結合し, 酵素活性を阻害することが知られている。これまで生化学講座では, 培養神経細胞 (GT1-7 細胞) を用いて, CaM kinase II が Pyk2 を活性化することを見出し報告した。さらに, Pyk2 の活性化に CaM kinase II による FIP200 のリン酸化が関与する可能性を検討してきた。今回, 大腸菌の発現系を用いて FIP200 の C 末端側 466 アミノ酸からなる GST-FIP200 (466) を精製し, CaM kinase II によるリン酸化と Pyk2 との結合を検討した。pGEX4T-1 ベクターの GST 遺伝子の下流に FIP200 (466) cDNA を組み込み, 大腸菌 BL21 を形質転換して発現プラスミドをクローニングした。次に, GST-FIP200 (466) を精製して, CaM kinase II によるリン酸化を検討した。リン酸化は, Western-blot 後のビオチン化 Phos-tag 法により検出した。その結果, GST-FIP200 (466) が Ca²⁺/CaM 依存性に CaM kinase II によりリン酸化されることが明らかになった。最後に, GT1-7 細胞に FLAG-Pyk2 を発現させ, 抗 FLAG 抗体による免疫沈降後, GST-FIP200 (466) を添加して遠心法により Pyk2 と GST-FIP200 (466) との結合を検討した。その結果, GST-FIP 200 (466) と Pyk2 との結合が確認された。これらの結果は, 今回作成した GST-FIP200 (466) が CaM kinase II によるリン酸化と Pyk2 との結合の検討に極めて有用であることを示唆している。

068

子宮頸癌の画像誘導小線源治療における 経口腸管造影剤の少量投与の有効性を 評価する後方視的観察研究

小倉 匠登 (学籍番号: 184191C)
指導教員: ○前本 均, 草田 武朗, 有賀 拓郎, 平安名 常一,
村山 貞之
琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

【背景・目的】 子宮頸癌に対する根治的放射線治療は外部照射と腔内照射からなる。腔内照射 (画像誘導小線源治療) の治療計画 CT 撮影時に経口腸管造影剤を用いると小腸と子宮の輪郭の把握が容易になる。造影剤の添付文書等では下部小腸の造影に 250-300ml の投与を推奨しているが, 癌治療の影響で消化器症状を有する患者にとって 250-300ml の内服は負担になり, 琉球大学病院では 50ml を投与している。本研究ではこの少量経口腸管造影剤投与の有効性を評価することを目的とした。

【方法】 2017 年から 2019 年の間に琉球大学病院で根治的放射線治療を受けた 148 名の子宮頸癌患者のうち, 腔内照射時に 50ml (濃度 3-4%) の経口腸管造影剤を投与された 137 名に対する全 422 件の腔内照射を対象とし, 電子カルテや治療計画 CT 画像から情報を収集した。子宮や付属器に接する部分で, 小腸の造影効果があるものを有効と判定した。

【結果】 全 422 件中 287 件 (68.0%) が有効と判定された。無効例 135 件の内訳として, 撮影範囲内の小腸の造影効果なしが 36 件, 小腸と子宮・付属器の接触なしが 34 件, 小腸の造影効果が確認されて子宮や付属器に接する小腸もあるものの, 接する部分に造影効果がないものが 65 件存在した。この 65 件中 41 件では盲腸に造影効果が認められた。盲腸の造影効果の有無は本研究における有効/無効と有意に関係があり (P<0.0001), また盲腸の造影効果がなかった群はあった群よりも内服から撮影までの時間が有意に短かった (129 分 vs. 163 分, P<0.0001)。

【考察】 経口腸管造影剤の少量投与は 68.0% の症例で有効であった。有効率の向上を図るには内服から撮影までの時間を十分に確保することが重要と思われた。一方で造影剤が盲腸まで到達しており内服タイミングには問題がないものの無効となる例もあった。これらに有効とするためには, 投与量を 50ml より増やすことを検討する必要もあると思われた。

069

顔面における骨形態の三次元解析と
ゲノムワイド関連解析

富田 千晶 (学籍番号: 184192B)
指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇
琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

【背景・目的】ヒトの顔はコミュニケーションを行うのに重要な部位であり、個人ごとに違いが存在する。これまでにヒトの顔面形態を対象としたゲノムワイド関連解析が行われてきたが、骨形態を用いた研究は多くなかった。骨形態は軟組織の表面形態とくらべて環境要因の影響が少ないと考えられる。そこで本研究では、頭部 CT 画像をもとに、骨形態を用いたゲノムワイド関連解析を行うことでヒトの顔面形態に関連する遺伝子多型を同定することを目的とした。

【方法】琉球大学病院で PET-CT 検査を受けた患者 780 名を対象とし、インフォームドコンセントのもと、データと試料を取得した。CT 画像を用いて下顎を除いた頭蓋顔面にセミランドマークを発生させ、幾何学的形態測定法を用いた形態解析を行った。プロクラステス解析による重ね合わせののち、顔面領域のセミランドマークのみを抽出して、主成分分析を行なった。形態を表す主成分 (PC1 から PC10 まで) を目的変数、年齢、性別、身長、体重、ゲノムの主成分分析で得られた主成分 (gPC1, gPC2) を共変数としてゲノムワイド関連解析を行った。

【結果】いずれの形態成分においてもゲノムワイド有意水準 ($P < 5 \times 10^{-8}$) を満たす SNP はみられなかった。 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ を満たす SNP について近傍の遺伝子を調べたところ、KRT23 (PC3), LYCAT (PC5), WRNIP1 (PC8), CEP104 及び COL27A1 (PC10) などの骨や軟骨の形成に関与する遺伝子がみられた。

【考察】ゲノムワイド有意水準を満たす SNP がみられなかった原因として、サンプル数の不足が考えられるため、さらにサンプル数を増やして関連解析を行っていく必要がある。また、出身地域ごとに顔面形態に関連する多型が異なる可能性もあり、地域ごとの解析が必要となるが、そのためにもサンプル数の増加が必要である。

071

紅麹菌発酵抽出物のコレラ毒素に対する
宿主細胞の感受性への影響及びコレラ毒素の
生物活性に対する影響について

宮里 尚志 (学籍番号: 184121B)
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

【目的】 *Vibrio cholerae* はグラム陰性桿菌であり 200 種類以上ある血清群の中で O1 と O139 がコレラの発症に関与する。一方、紅麹菌 (*Monascus* 属) は有用微生物として知られ、古くから発酵飲食品、天然色素の製造に用いられている。本研究では、①紅麹菌発酵抽出物 (標品) が宿主細胞のコレラ毒素 (CTx) に対する感受性を抑制するか、②標品が CTx の生物活性そのものを抑制するか、という仮説を検証した。

【方法】 Modified AKI-SW method を用いて *V. cholerae* O1 biotype El Tor N16961 から CTx を誘導後、精製・濃縮し、最終濃度 200ng/ml で使用した。紅麹菌発酵抽出物 B-3-1-51 (標品) を使用した。CTx 活性の指標として CTx 添加による伸長変形した CHO 細胞の割合 (CCI: 変形細胞数/全細胞数) を用い、標品前処理により CCI が低下するかどうかを観察した。実験 1) 標品による CHO 細胞前処理実験: 2×10^4 cell/ml に調整した CHO 細胞を細胞培養用プレートに撒き、最終濃度 0.1%、0.5% に調整した標品で CHO 細胞をそれぞれ 5 分、30 分、60 分間前処理した後 CTx を添加し CCI を測定した。実験 2) 標品による CTx 前処理実験: 1) と同様の CHO 細胞に、最終濃度 0.1%、0.5% に調整した標品で一晩前処理した CTx を添加し CCI を測定した。標品溶解に用いた 1% EtOH をコントロールとした。

【結果・考察】実験 1) において、0.5% 標品で 30 分間または 60 分間 CHO 細胞を前処理すると、コントロールと比較して CCI は約 56% に低下した。それ以外の条件では抑制効果は認められなかった。実験 2) において、0.5% 標品で CTx を処理すると、コントロールと比較して CCI は約 46% に低下した。それ以外の条件では抑制効果は認められなかった。以上より、標品処理により CHO 細胞等宿主細胞の CTx に対する感受性を抑制し、同時に CTx の生物活性を抑制する可能性が示唆された。

070

喉頭乳頭腫におけるヒトパピローマ
ウイルス 6 型 E4 の機能の解明

黒田 尚希 (学籍番号: 184197B)
指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男
琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

喉頭乳頭腫 (LP) は、声帯にできる良性腫瘍で、難治性・再発性であり有効な治療法はない。腫瘍の形成にはヒトパピローマウイルス (HPV) -6 型または 11 型が関係しているが、現状では HPV が LP に与える影響について詳細な仕組みはわかっていない。HPV-6 および HPV-11 は 9 つの遺伝子から構成されており、当科の先行研究により、LP において 9 つの遺伝子の中で E4 の発現が約 65% を占めており、E4 がウイルス感染時の宿主の免疫抑制、例えば Toll-like receptor (TLR) の発現抑制などにも関わっている可能性が考えられた。TLR は自然免疫においてウイルスを認識して、インターフェロンや炎症性サイトカイン産生の誘導を行う。HPV は DNA ウイルスであることから、特に一本鎖 RNA や DNA を認識する TLR7, 8, 9 の発現に関与すると推測された。そこで、本研究では HPV-6E4 遺伝子を HEK293T (293T) 細胞にトランスフェクションし、HPV-6E4 の TLR 遺伝子の発現への影響を明らかにすることを目的とした。

まず HPV-6E4 遺伝子を発現 Vector でサブクローニングした。ついで E4 発現 Vector または空 Vector を 293T 細胞へ導入した。その後、TLR 遺伝子の発現をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。

TLR8 および TLR9 遺伝子の発現は E4 発現細胞においてコントロール群に比し有意に減少していた。TLR8 および TLR9 は一本鎖 RNA、非メチル化 CpG DNA を認識することから、E4 はウイルス由来の DNA と mRNA の認識の阻害に関与することが示唆された。さらに TLR5 遺伝子の発現も E4 の発現により有意に減少した。有意差は見られなかったが、TLR3 および TLR4 遺伝子の発現においても E4 の発現により減少する傾向が見られた。以上より E4 はインターフェロンやサイトカインなどの自然免疫に関わるシグナル全てを阻害する可能性が示唆された。

072

側脳室周囲白質病変と深部皮質下白質病変の
危険因子の違いについて

宮城 真尋 (学籍番号: 184138G)
指導教員: ○宮城 朋, 崎間 洋邦, 石田 明夫, 大屋 祐輔
琉球大学病院第三内科

背景・目的: 大脳白質病変は脳卒中や死亡の独立した危険因子であり、認知機能にも関連すると言われている。大脳白質病変は部位により側脳室周囲病変 (PVH) と深部皮質下白質病変 (DSWMH) に分けられる。側脳室周囲白質は脈絡叢動脈の分枝で支配されており灌流不全に弱いと考えられている。これに対し、深部皮質下白質は中大脳動脈皮質枝である髄質動脈に支配され脳小血管病と強い関連があるとされている。PVH と DSWMH は解剖学的に異なっており背景因子にも違いがあると考えられるが明らかになっていないため検証した。

方法: 2013 年 4 月 1 日から 2019 年 3 月 31 日の期間に一般財団法人沖縄県健康づくり財団の脳ドックを受診した 8187 人のうち初回受診の 6194 人を対象とした。

結果: PVH のみ保有群、DSWMH のみ保有群、両者保有群、大脳白質病変非保有群に分類し解析を行った。大脳白質病変非保有群をコントロール群とし他の 3 群と Dunnett 検定を用い比較した。PVH のみ保有群では年齢、血圧、eGFR に、DSWMH のみ保有群では年齢、BMI、血圧、LDL-C、HbA1c、血糖、eGFR に、両者保有群では年齢、収縮期血圧、HbA1c、血糖、eGFR に有意差を認めた。さらに PVH のみ群とコントロール群で多変量解析を行い、PVH のみ保有群は有意に年齢が高く ($P < 0.0001$)、LDL-C が有意に低かった ($P = 0.0142$)。同様に DSWMH では DSWMH のみ保有群は女性 ($P = 0.0168$) に多く、年齢と拡張期血圧が有意に高かった ($P < 0.0001$)。さらに PVH のみ保有群は DSWMH のみ保有群に比し年齢が有意に高く ($P = 0.0059$)、LDL-C 値が有意に低かった ($P = 0.0216$)。

結論: PVH と DSWMH ではリスクが異なる可能性が示唆された。

073

糞線虫の経皮感染経路の可視化

大城 貴哉 (学籍番号: 184152B)

指導教員: 岸本 英博¹⁾, 當眞 弘¹⁾, 横田 秀夫²⁾, 高山 千利³⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科 免疫学・寄生虫学講座²⁾ 理化学研究所 光量子工学研究センター³⁾ 琉球大学大学院医学研究科 分子解剖学講座

【背景と目的】 沖縄や九州南部の高齢者に未だ感染がみられる糞線虫は主に経皮感染することが知られているが、感染幼虫であるフィラリア (F) 型が表皮のどこからどのように侵入するのかが分かっていない。本研究ではこれらを明らかにし、寄生虫に対する免疫応答の機序の解明を目的としている。

【方法と結果】 ベネズエラ糞線虫 (*Strongyloides venezuelensis*) の経皮感染能力を調べるために以下の実験を行った。糞線虫を含む液をろ紙の上に垂らし、その上にマウスを一晩放置した。7日後に糞便検査を行ったところ、虫卵を確認できたことから、この実験系で感染が成立することが確認された。次に糞線虫が、皮膚のどこから侵入するかを調べるためにマウス2匹を用意し、上記のように糞線虫を含むろ紙の上に乗せた後 (マウス1は5分、マウス2は10分)、安楽死させた。前・後足を切断しホルマリン固定してHE染色にて組織学的な解析を行ったが虫体を確認することはできなかった。続いて糞線虫を色素 (CellTracker™ Red CMTPX) を用いて青色に染色し、除毛した腹部の皮膚に虫の入ったゲルを乗せ、顕微鏡で観察した。しかし糞線虫が皮膚の上で活発に動く様子は認められたものの、皮膚から侵入する様子を確認することができなかった。染色した糞線虫の感染能力を確認するため、未染色糞線虫の感染実験と同様の方法で感染実験を行った7日後に糞便検査を行ったが虫卵を認めなかった。また7日後にはマウスの解剖も行い、大腸を含む腸管を観察したが、成虫を認めなかった。

【考察】 染色により経皮での感染能力が失われることが分かった。色素が何らかの影響を及ぼし経皮感染のメカニズムを阻害していると考えられた。感染能を保ったまま染色できる色素を模索する必要がある。

074

体外循環の使用に伴う溶血と腎機能への影響について

葛原 伶 (学籍番号: 184129H)

指導教員: ○喜瀬 勇也¹⁾, 兼城 悠司²⁾, 古川 浩二郎¹⁾¹⁾ 琉球大学大学院胸部心臓血管外科²⁾ 琉球大学病院 ME センター

【目的】 開心術時には人工心肺による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機械的溶血をきたし、遊離したヘモグロビン (PH-HG) が各種臓器、特に腎機能障害を来すことが危惧される。本研究では体外循環時間と溶血量の相関、溶血による術後腎機能への影響について検討した。

【対象】 2020年12月から2021年2月までに行われた開心術15例および、2018年12月から2019年2月、2019年12月から2020年2月までに行われた開心術32例を検討した。

【方法】 体外循環開始前、開始直後、以後およそ60分毎、人工心肺離脱直後に血液検体を採取し、Hemocue社製 Plasma/Low Hemoglobin® を用いて血漿遊離ヘモグロビン (PF-Hb) 値を測定した。また術前、術直後、術後1日、3日、5日、7日後および退院時 (もしくは最終検査結果) の Cre 値と eGFR 値を測定し、腎機能への影響について検討した。

【結果】

1. 体外循環時間と溶血量の間に強い正の相関を認めた ($y = -8.2077E-07x2 + 0.000662133x + 0.01605292$, $R^2 = 0.572$)。

2. 溶血量 $> 0.1 \text{ mg/dl}$ の群ではそれ以下の群と比較して、術後一過性に腎機能悪化傾向を示したが、退院時には術前値まで復し遷延性の腎機能障害は示さなかった。

3. 術前腎機能低下症例 (eGFR < 60) においても、術中溶血量が多い群 (> 0.1) では術後 Cre 値の上昇率が高かったが、退院時には術前値まで復した。

【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低下は認めるが、不可逆的な腎機能障害は認められなかった。一方、術前腎機能低下症例では、溶血による腎機能への影響は受けやすい傾向を示した。

075

皮膚の近赤外光測定

大久保 優樹 (学籍番号: 184200F)

指導教員: ○内海 大介

琉球大学皮膚科学教室

目的

可視光よりも波長の長い光である赤外線、その中で波長が短く可視光に近い光は近赤外光と呼ばれる。皮下組織や筋層にまで透過するという近赤外光の特徴を用いて、可視光は透過しない皮膚の深層の状態を調べることができる。今回は近赤外光をほくろとその周辺の正常皮膚に照射した際の反射率を計測し、そこからほくろと正常皮膚、そして年代、性別による皮膚の状態の違いを調べる。

方法

学生や職員50人のほくろ、またその周辺皮膚の撮影、比較 (通常、ダーモスコプ)、そしてそれぞれの近赤外光反射率を測定し、そこから作成したグラフをもとにその違い、および年代、性別による違いを調べる。

結果

20代、30代、40代以上のそれぞれの近赤外光反射率の平均値を比較した結果、1450nm 付近の波長において40代以上、30代、20代の順で反射率が高くなった。男女間で近赤外光反射率の平均値を比較した結果、1450nm 付近の波長において男性の方が反射率が高くなった。

ほくろと正常皮膚の近赤外光反射率の平均値を比較した結果、大きな違いが見られなかった。そのため波長ごとの差をグラフ化して比較した結果一定の規則性が見られた。

考察

1450nm 付近の波長の光を水分がよく吸収するため皮膚の水分含有量が低いほどその波長の反射率が高くなる。よって年代が上がるほど皮膚の水分量が減り、男性より女性の方が皮膚の水分量が多いのではないかと考えられた。ほくろと正常皮膚の近赤外光反射率の波長ごとの差における規則性として、まず波長が短くなるにつれて差が広がるのが見られた。これはほくろに多く含まれるメラニンの吸光度によるものだと考えた。そして1200nm 付近から1400nm 付近への差の広がりや、1450nm から1700nm 付近への差の広がりにはコラーゲンやエラスチン、線維芽細胞などの吸光度の影響が考えられた。

076

GT1-7細胞におけるオートファジーへのULK1の関与

恩河 朝光 (学籍番号: 184188C)

指導教員: ○仲嶺 三代美, 鳥原 英嗣, 山本 秀幸

琉球大学大学院医学研究科生化学講座

UNC-51 like autophagy activating kinase 1 (ULK1) はタンパク質リソソーム酸化酵素であり、オートファジーに関与することが知られている。しかし、その生理的に重要な基質は不明である。これまでの生化学講座での研究から、FAK family-interacting protein of 200 kDa (FIP200) がオートファジーに関与することが示唆されている。今回、マウス視床下部由来の培養神経細胞 (GT1-7細胞) を用いて、ULK1の基質としてFIP200の可能性を検討した。

細胞をアミノ酸欠損培地で2時間培養すると、オートファジーのマーカーであるLC3-IIが増加し、オートファジーの誘導が示された。次に、ULK1阻害薬 (SBI-0206965; SBI) とULK1 siRNAのオートファジーへの影響を検討した。その結果、SBI及びsiRNAによってオートファジーが抑制された。さらに、興味深いことにULK1はアミノ酸欠損で増加することがわかった。時間的変化の検討では、アミノ酸欠損3時間でULK1のタンパク質量が約1.4倍に増加した。また、RT-PCR法によりmRNAの発現量は変わらないことが確認された。これらより、アミノ酸欠損では、ULK1タンパク質の分解が抑制されることが示唆された。最後に、オートファジーによるFIP200のリソソーム酸化の変化を検討した。抗FIP200抗体による免疫沈降実験より、FIP200のタンパク質量はSBI存在下では61%に減少することがわかった。免疫沈降後に、Phos-tag法にてFIP200のリソソーム酸化を検討すると、SBI存在下ではFIP200のリソソーム酸化が55%に減少した。以上の結果より、アミノ酸欠損でULK1が増加し、これによりFIP200のリソソーム酸化が増加することが示唆された。本研究は、凝集性タンパク質の分解機構の研究に貢献することが期待される。

077

臨床学的に神経梅毒と診断された
症例 29 例に対する髄液 PCR の検討

大城 健嗣 (学籍番号: 184176K)

指導教員: ○新垣 若子, 平井 潤, 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 (第一内科)

近年, 本邦の梅毒感染者数は増加傾向で 2018 年には戦後最大の約 7,000 人/年と報告された。梅毒はスピロヘータ属の *Treponema pallidum* による感染症で, 梅毒罹患後 25 ~ 60% が中枢神経に侵入し神経梅毒を合併する。しかしその多くは無症候性で (約 95%), 培養での診断も不可能である。よって髄液中の抗体検査 (FTA-ABS 陽性など) で神経梅毒合併と推定することしかできず, 臨床現場では病歴や経過から総合的に判断している。また神経梅毒とその他の梅毒では治療法が異なるため, 確定診断を行うことは重要である。2019 年より病変から採取された検体の梅毒 PCR 検査が追加されたが, 神経梅毒における髄液 PCR 検査の先行研究は少なく, その有用性については不明である。今回我々は髄液の梅毒 PCR 検査を行い臨床情報と合わせてその有用性について検討した。対象は 2009 年 4 月 ~ 2021 年 2 月に臨床的に神経梅毒と診断された髄液検体 29 例。方法は DNA 抽出を全自動核酸抽出システム (magLEAD 12gC, PSS 社), PCR を DNA Polymerase (Takara Ex Taq) と *Treponema pallidum* 47kDa 遺伝子を標的としたプライマーを用いて行い, 増幅された遺伝子産物を電気泳動で確認した。結果は FTA-ABS 陽性 22 例中 PCR 陽性は 1 例 (4.5%) のみで, FTA-ABS 陰性 5 例中 1 例 (20%) は PCR 陽性であった。今回の結果から, 臨床診断での神経梅毒は真の神経梅毒ではない可能性があり, また髄液の FTA-ABS 陰性でも神経梅毒は否定できないことが示唆された。検討の限界として, 神経症状を呈していた症例が 3 例と少なく, 19 例 (66%) は 5 年以上経過した保存検体であったことなどが挙げられる。今後前向きに研究を行い, 髄液 PCR の有用性を再検討していく予定である。

078

軟膜下モルヒネ投与の鎮痛効果：
熱刺激逃避反応による評価

中村 智哉 (学籍番号: 184216B)

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】新たな鎮痛薬の投与経路として脊髄軟膜下投与法が検討されている。これまで塩酸モルヒネの軟膜下投与は, 化学刺激に対して有意な鎮痛効果をもつことが示唆されているが, 熱刺激に対しては未だ不明である。本研究は, 熱刺激を利用した疼痛モデル動物において, 塩酸モルヒネの軟膜下投与の鎮痛効果に関して軟膜上投与と比較検討した。

【方法】雄性 SD ラット (300-350g) を使用した。1.0-2.5% イソフルランによる全身麻酔下で椎弓切除術を施行し, 硬膜を除去することで脊髄を露出した。軟膜下投与群 (n=6) では, 34G 注入針を用いて軟膜下に薬剤 10 μ L (塩酸モルヒネ 0.01 μ g/mL) を投与した。軟膜上投与群 (n=5) では, 軟膜上に薬剤を投与した。1.3% イソフルランを 15 分間吸入させた群を対照群とした (n=6)。鎮痛効果の判定は, 全身麻酔覚醒後にプランター式鎮痛効果測定装置 (UGO BASILE 社) で行なった。測定は全て右後肢足底で行い, 逃避反応の潜時を 5 分毎に 75 分間計測した。そして 3 群 (軟膜下, 軟膜上, 対照群) における潜時の変化を評価した。統計解析は一元配置分散分析で行い, post-hoc 解析は Bonferroni による補正を行なった t 検定を用いた。

【結果】3 群間における潜時推移に有意差がみられた ($p=0.001$)。軟膜下, 軟膜上, どちらの群においても対照群と比較して, 潜時平均値の有意な延長がみられた ($p<0.025$)。薬剤投与後 35 分以降において, 軟膜上投与群では時間の経過とともに潜時の減衰がみられたが, 軟膜下投与群ではみられなかった。

【考察】塩酸モルヒネの軟膜下投与は, 軟膜上投与と比較して熱刺激に対して鎮痛効果が持続すると考えられる。鎮痛効果の持続には軟膜の物質透過性が関わっていることが示唆された。鎮痛効果の持続に伴い副作用が出現しないか今後, 検討する必要がある。

079

頭蓋形態を対象としたゲノムワイド
関連解析についてのメタ解析

阿波連 ゆい (学籍番号: 184133F)

指導教員: ○木村 亮介, 石田 肇
琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

【背景・目的】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, 例えば日本人においては, この百年の間に長頭化してきたことがわかっている。そのため, 頭蓋形態には環境要因が強く関わっていることが推測されるが, 遺伝要因の有無は明らかになっていない。本研究では, 形態解析およびゲノムワイド関連解析 (GWAS) により頭蓋形態に関連する一塩基多型 (SNP) を同定することを目的とした。

【方法】研究の対象は, 琉球大学病院で PET-CT 検査を受けた 780 名 (男性: 480, 女性: 300) と東北大学で MRI 検査を受けた 1569 名 (男性: 905, 女性: 664) である。サンプルセットごとに頭蓋部の画像から取得したセミランドマークの座標をプロクラテス解析および主成分分析によって重心サイズ (CS) および形態を表す主成分 (PC) を得た。両サンプルセットに共通して PC1 が長頭・短頭を, PC2 が左右のゆがみを表す成分であった。各サンプルセットにおいて, 遺伝統計解析ソフト Plink を用いて CS と PC1・PC2 については絶対値 (ゆがみの大きさ) を対象として GWAS を実施した。次いで, それぞれの GWAS 結果を用いてメタ解析を行った。

【結果】メタ解析の結果, ゲノムワイド有意水準 ($P<5.0\times 10^{-8}$) を満たす SNP は見つからなかった。 $P<1.0\times 10^{-6}$ を満たす SNP の近傍遺伝子を調べたところ, PC2 の絶対値と関連する SNP の近傍に小頭症の発症に関わる CDK5RAP2 遺伝子が見出された。

【考察】CDK5RAP2 は神経細胞分裂に重要な遺伝子であり, 脳の発達に関与することがわかっている。本研究では CDK5RAP2 近傍の多型が頭蓋のゆがみに関連する可能性が示唆された。メタ解析で統計的に有意な SNP が検出できなかった理由として, 1) 頭蓋形態には環境要因の影響が大きいこと, 2) サンプルサイズが小さかったことが考えられる。頭蓋形態に関連する多型の同定には, より大規模な研究を行うことが必要である。

080

喉頭乳頭腫: HPV6 E5a および
E5b の機能の解明

仲村 真愛美 (学籍番号: 184118B)

指導教員: ○池上 太郎, 鈴木 幹男
琉球大学大学院医学研究科耳鼻咽喉・頭頸部外科学講座

喉頭乳頭腫 (LP) はヒトパピローマウイルス 6 型 (HPV-6) または HPV-11 が喉頭に感染することで形成される良性腫瘍であり, 有効な治療法はない。HPV-6 および HPV-11 は 9 つの遺伝子 (E6, E7, E2, E4, E5a, E5b, L2, L1) を持つ。当科の先行研究において E4, E5a, E5b の 3 遺伝子の発現は HPV 全遺伝子発現の 96% を占め, 乳頭腫内で同期して発現していた。さらに, 自然免疫にかかわる Toll-like receptor (TLR) の発現量が LP において正常喉頭に比べ減少傾向があり, また E5a mRNA 量と, TLR3 および TLR8 の mRNA 量には負の相関があった。そこで本研究では HPV-6 に焦点を当て, E5a および E5b の宿主免疫機構への影響を明らかにすることを目的とした。まず E5a および E5b の発現ベクターを複製し, HEK293T 細胞に E5a または E5b を遺伝子導入した。また Negative コントロールとして, 空 Vector を導入したものと未導入細胞も含めた。2 日間培養後, RNA 抽出, cDNA 複製を行い, TLR 遺伝子の発現量をリアルタイム PCR 法を用いて定量した。TLR3 の発現は E5a および E5b 導入細胞で, また TLR4, TLR7 および TLR8 の発現は E5b 導入細胞のみで空 Vector 導入細胞と比べ減少傾向を示した。また本実験と別に行なった E4 遺伝子の導入実験では TLR5, 8, 9 遺伝子の発現を有意に減少させた。以上より, E5 (E5a, E5b) は E4 と協調して一部の TLR の発現を抑え, 宿主免疫からの回避を成功させているのかもしれない。今後, E4, E5a および E5b の 3 遺伝子を同時に細胞に導入することでこの仮説を検証していきたい。

081

聴神経鞘腫手術における3D、VRを用いたシミュレーションの有用性について

照屋 菜々子 (学籍番号: 184187E)

指導教員: ○石内 勝吾, 外間 洋平, 宮城 智央, 西村 正彦, 上 薫

琉球大学脳神経外科講座

【背景】外科治療では病変と重要な神経、血管などの組織が近接しているため、術前に立体構造を把握し、適切な手術到達法を選択することが重要である。三次元融合画像は、脳神経外科領域の手術時においてアプローチ法を決定し、解剖を理解するのに助けになり、治療成績や安全性の向上に役立つ。症例を交えて報告する。

【症例】70代女性。動揺感と左耳の難聴を主訴に来院。小脳橋角部に最大25mm径の腫瘍。内耳道拡大をみとめたため、聴神経鞘腫と診断された。X年11月から体がふらつき、左耳の難聴を自覚。11月下旬ごろから動揺感が悪化。12月には転倒あり。

320列CT、3TのMRIで取得したデータをコンピュータに統合、医療専用ソフトウェア(VINCENT)にて3DCGを作成し、脳神経、腫瘍、脳、動静脈、頭蓋骨を描出した。術前検討や術中ナビゲーションシステムに応用した。【結果】術前には静脈洞の位置をシミュレーションで同定、外側後頭開頭で摘出術を行った。予定通り安全に腫瘍を摘出することができた。可能な範囲で腫瘍は摘出し、減圧は得られた。顔面神経と脳幹に沿った部分の腫瘍は、機能的温存を優先して意図的に残存させた。術後合併症はなく経過。

【考察と結語】聴神経鞘腫の手術においては、3Dシミュレーションは有用であり、安全性や確実性を高めることができる。また、VRは手術での医学学生への教育目的での使用が有用である。

しかし顔面神経や内耳神経をうまく特定できない場合もあり、今後確実な描出方法を検討していく必要がある。

082

沖縄県における肺高血圧症の患者背景に関する検討

玉城 裕大 (学籍番号: 184189B)

指導教員: ○池宮城 秀一, 石田 明夫, 山里 正演
琉球大学大学院医学研究科循環器・腎臓・神経内科学 (第三内科)

【背景】肺高血圧症は近年治療の進歩により積極的に診断されるようになり、患者数が増えてきている。肺高血圧症は原因により5つの臨床分類群に分類されるが、それぞれ治療法が異なるため鑑別が重要である。肺高血圧症の臨床分類1群(肺動脈性肺高血圧)と4群(慢性血栓性肺高血圧症)は厚生労働省の特定疾患に指定されており、特定疾患医療受給者証交付件数は、日本全体では1群と4群は同程度であるが、沖縄では1群が4群よりも明らかに多くなっている。これまで沖縄県における肺高血圧症の患者背景に関して検討された報告はない。【目的】琉球大学病院で肺高血圧症と診断された患者を対象に実態調査を行い、その調査結果をもとに沖縄県の肺高血圧症の患者背景を明らかにする。【方法】2012年1月1日～2020年12月31日の期間に当院で右心カテーテル検査を施行し、平均肺動脈圧が25mmHg以上であった肺高血圧症例を抽出し、今回の研究の対象とした。対象者の肺高血圧症の臨床分類、病歴、血液検査や右心カテーテル検査など検査データを入院カルテで確認してデータベースを作成し、これをもとに当院での肺高血圧症の患者背景を検討した。【結果】症例数は106名で平均年齢は59歳、女性が52%であった。臨床分類ごとの割合は1群が32%、2群が30%、3群が5%、4群が26%、5群が4%であり、特定疾患医療受給者証交付件数ほどの差はみられなかった。また1群の原因疾患は膠原病が最多で、膠原病の中では強皮症、混合性結合組織病、SLE、シェーグレン症候群が多く、全国と同様の傾向であった。【結論】今回の研究では、沖縄県の肺高血圧症の患者背景は全国と大きな差はみられなかった。沖縄県で特定疾患医療受給者証交付件数において1群の受給者数が4群に比べて多かった理由として、沖縄では2つの鑑別に必須の検査である肺血流シンチグラフィが施行できる病院に限られているため、正確に鑑別できていない可能性が考えられた。

083

リンパ系腫瘍の診断における Multiplex PCR を用いたクローナリティ解析の活用

近藤 雄高 (学籍番号: 184117D)

指導教員: 富田 真理子, ○和田 直樹
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

【背景】リンパ球は多様な抗原に反応する為に免疫グロブリン(Ig)遺伝子やT細胞受容体(TCR)遺伝子の再構成により多様性を獲得する。リンパ系腫瘍と鑑別が困難なリンパ球の反応性増殖では種々のIg遺伝子もしくはTCR遺伝子の再構成パターンを持つリンパ球がポリクローナルに増殖しているのに対し、リンパ系腫瘍では特定の遺伝子再構成パターンを示す腫瘍細胞がクローナルに増殖していることが多い。従ってリンパ球の出自を表す指紋とも言えるIgやTCR遺伝子のクローナリティ解析はリンパ系腫瘍と反応性増殖との鑑別に役立つと考えられている。

【目的】病理組織検査で皮膚のびまん性大細胞型B細胞リンパ腫と診断された患者の病巣とリンパ節浸潤を疑わせる病巣を用いてリンパ節浸潤の有無を判断するために、形態学・免疫組織学的検索とともにクローナリティ解析を行った。また骨髄に浸潤がないことの確認も行った。

【方法】患者検体のホルマリン固定パラフィン包埋切片からゲノムDNAを抽出し、Ig重鎖遺伝子を蛍光標識したプライマーを用いた Multiplex PCR法で増幅し、キャピラリー電気泳動法でPCR産物の長さを解析した。また、同一検体の形態学・免疫組織学的所見と比較した。

【結果と考察】クローナリティ解析の結果、骨髄ではクローナルな増殖を認めず、リンパ節転移が疑われる検体では皮膚病巣と一致したクローナルな増殖を示すピークが検出された。形態学・免疫組織学的所見と比較検討したところ、皮膚で認められたびまん性大細胞型B細胞リンパ腫細胞がリンパ節へも浸潤している可能性を考えた病理診断の妥当性が補強された。今回の検索結果から形態学・免疫組織学的検索とクローナリティ解析を組み合わせると総合的に診断を行うことの意義を実感できた。

【謝辞】今回の検索では、細胞病理学講座の加留部謙之輔先生、高鳥光徳先生にもご協力いただいた。

084

少量飲酒と健康

細川 陽平 (学籍番号: 184158B)

指導教員: 中村 幸志
琉球大学衛生学・公衆衛生学講座

【目的】自分は成人してから飲酒の機会が増え、お酒も好きなので、飲酒に関して調べてみたいと考えた。座学の臨床科目で少量飲酒は悪いことだけではないことを学んだので、少量飲酒と健康についてシステマティックレビューを行った。

【方法】PubMedを用いて、以下のMeSH用語に基づく検索式を立て、原著論文を検索した「((drinking [MeSH Major Topic]) OR (alcohol [MeSH Major Topic])) AND ((mortality [MeSH Major Topic]) OR (death [MeSH Major Topic]))」。アウトカムは、死と直結する重篤疾患に絞り、死に至らない軽症疾患に注目しないこととした。

【結果】検索にて抽出された論文のタイトル、抄録、本文から内容を吟味し、目的に該当する論文を選んで精読した。一般集団における飲酒量と死因との関連に関して、飲酒量に比例してリスクが上がる疾患と、飲酒量に比例しない、すなわち今回自分が調べたかった少量飲酒が健康に良い影響を与える疾患に大別できた。食道癌、咽頭癌、肝癌は、飲酒量に比例して、それによる死亡リスクが高かった。しかし、心血管疾患については、毎日アルコール10g前後の飲酒をしている男性と女性では飲まない者と比べるとそれによる死亡リスクが約20%低く、高齢者でも、若者と同じように適度な飲酒は心血管疾患死亡リスクの低下と関連していた。また、脳梗塞についても、アルコール摂取が日本酒換算で1日1合未満の者では時々飲む人と比べるとそれによる死亡リスクが約40%低かった。

【考察・結論】少量のアルコールは血管になんらかの作用を及ぼすことで心血管疾患と脳梗塞のリスクを低下させている可能性がある。

085

MRIによる新生児脳障害と脳発達の 総合的評価（城所スコア）の有用性について ～超早産児の脳サイズと重症度評価に 影響を与える臨床的指標の検討～

大城 一輝（学籍番号：184128K）

指導教員：○吉田 朝秀¹⁾，呉屋 英樹¹⁾，知念 安紹¹⁾，
中西 浩一¹⁾，新垣 真弓²⁾，崎山 秀樹²⁾¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科育成医学講座²⁾ 同周産母子センター

【背景】在胎週数 22～25 週出生の超早産児は生育限界に近く、正期産児と比較し脳発達に障害を及ぼすリスクが高いことが知られている。医科学研究において東らは、早産児群に比べ超早産児群は城所スコアが悪いことや城所スコアが脳発達評価に有用であることを明らかにした。【目的】超早産児の脳発達と脳障害の重症度評価に影響を与える臨床的指標を検討すること。【方法】対象は 2015 年～2019 年に当院で出生した超早産児 26 名。カルテを用いて後方視的に検討した。脳 MRI 画像の評価は城所スコアを用いて点数化と重症度分類を行ない、脳サイズと臨床的指標との関連を解析した。【結果】重症度分類の結果、正常 7 名（27%）、軽症 14 名（54%）、中～重症 5 名（19%）となった。正常群に比較して異常群では、脳室径は大きく、脳梁膝、大脳横径、深部灰白質容積、小脳横径が小さく、脳萎縮（白質信号異常、脳室、大脳横径、小脳横径）の点数が高かった。脳サイズと各臨床的指標の多変量相関分析の結果、深部灰白質容積は、出生体重との間に正の相関、挿管日数との間に負の相関が見られた。これらにより最小 2 乗法モデルを作成したところ深部灰白質容積を出生体重と挿管日数によって説明できた ($R^2=0.456$, $p=0.002$)。経静脈栄養日数と深部灰白質容積との間には単相関は認められず、出生体重と挿管日数と合わせてモデルを作成したところ寄与率は下がり、経静脈栄養日数は深部灰白質容積に関与しないことが示唆された。【結論】超早産児では脳発達障害をもつ割合が約 73%と高く、出生時体重や挿管日数が脳発達、重症度分類に影響を与えることが明らかとなった。城所スコアは、超早産児における脳 MRI 画像の定量的評価、脳発達の検討に有用であり、臨床的指標と合わせて解析することで脳発達に影響を及ぼす臨床的因子の検討が可能であることがわかった。

086

生体肝移植周術期の腸内細菌層の解析と その臨床応用

玉城 広子（学籍番号：184177H）

指導教員：○川俣 太，大野 慎一郎，石野 信一郎，高槻 光寿
琉球大学大学院医学研究科消化器・腫瘍外科学講座

【背景・目的】ヒトの腸管には多種多様な腸内細菌が生息し、生体の恒常性維持に重要な役割を担っている。近年、腸内細菌叢の異常が肝移植後の急性拒絶に影響を与えることが報告されている。本研究では生体肝移植周術期の腸内細菌叢の解析を行った。

【方法】2020 年に琉球大学病院で行われた生体肝移植 3 症例のドナー (D) とレシピエント (R) の糞便検体:合計 15 検体(術前 :D and R, 術後 1 週間 :R, 術後 2 週間 :R, 術後 1 か月 :R) を 16S rRNA を用いた遺伝子解析を施行し、腸内細菌叢の変化と術後経過を検討した。

【結果】レシピエントの背景疾患はアルコール性肝硬変が 1 例、自己免疫性肝炎が 1 例、原発性胆汁性肝硬変と自己免疫性肝炎の合併が 1 例であった。レシピエントはドナーと比較し、術前より腸内細菌の多様性の低下を認め ($p=0.019$)、レシピエントでは悪玉菌の Enterobacteriaceae, Lactobacillaceae が、ドナーでは善玉菌の Lachnospiraceae, Veillonellaceae が優勢な腸内細菌であった。術後合併症は胆汁瘻を 2 例に認めたが、急性拒絶症例は無かった。術後合併症を認めなかった症例のレシピエントではドナーの腸内細菌叢に多く存在した Lachnospiraceae が増加し、ドナーの腸内細菌叢に近づいた(術後 1 か月)。胆汁瘻を発症した症例は長期間の広域抗生剤治療を要した。抗生剤加療後は腸内細菌叢の多様性が失われ、悪玉菌の Enterococcaceae の比率が有意に高くなった(術後 2 週間)。

【結論】生体肝移植後に抗生剤を長期使用する合併症が生じた際は、腸内細菌叢の多様性が低下し、悪玉菌が優勢となる。悪玉菌が急性拒絶に影響を与える可能性を鑑みると、腸内細菌叢を改善させる腸内細菌移植は、移植成績を向上させる新規治療戦略となる可能性がある。

087

創傷治癒における硫化水素の役割

高橋 裕花（学籍番号：184141G）

指導教員：新海 良祐，垣花 学

琉球大学大学院医学研究科麻酔科学講座

【背景】古来より、様々な炎症性皮膚疾患に対し、湯治療法は有効と考えられており、中でも硫化水素ガスは重要な役割を担っていると考えられる。硫化水素は新規ガスメディエーターとして知られ、抗炎症作用、抗アポトーシス作用、抗酸化作用などの生理作用を有し、かつ様々な酵素活性に関与していることが報告されている。一方で、細胞外マトリクスの調節は初期の創傷治癒過程において必要不可欠な因子と知られている。以上より、本研究では硫化水素が細胞外マトリクス調節因子である MMP2 を介して創傷治癒過程に寄与するかを検討した。

【方法】糖尿病モデルマウスとして知られる ob/ob マウスを用い、剃毛した皮膚に 8mm の創傷を形成し、モデルマウスとした。本モデルマウスに対し 1ppm の硫化水素ガスを吸入させることで硫化水素吸入療法とした。また、ヒト由来表皮角化細胞に対し、徐放性硫化水素ドナーである GYY4137 を用い、scratch assay した。さらに培養上清ならびに、モデルマウスより採取した創部皮膚をサンプルとし、western blot 法に従い、MMP2 の発現量の評価検討を行った。

【結果/考察】創傷治癒モデルマウスに対し、硫化水素ガス 1ppm を吸入させた結果、空気吸入群（対照群）と比較して治癒過程に有意な促進効果を認めた。また、スクラッチアッセイにおいても硫化水素ドナーの処置により、有意な細胞浸潤・遊走効果を認めた。培養上清、組織の western blot 法による評価では MMP2 の発現変動がみられた。

以上より、ob/ob マウスといった創傷治癒遅延モデルマウスにおいて硫化水素ガス吸入療法が創傷治癒促進効果を有している可能性が示唆された。そしてその創傷治癒促進効果は、硫化水素による MMP2 をはじめとする細胞外マトリクス調節因子の発現変動に寄与するものである可能性が示唆された。

088

ヒト胸部形態のゲノムワイド関連解析

平 彩佳（学籍番号：184142E）

共同研究者：阿波連 ゆい，富田 千晶

指導教員：○木村 亮介，石田 肇

琉球大学大学院医学研究科人体解剖学講座

【背景・目的】先行研究において、現生人類と比較して、ネアンデルタール人の胸部は、低く、広く、深いことが知られ、両者の胸部形態の違いは出生時に既に存在すること、ネアンデルタール人の胸部形態が祖先的であり、現生人類の胸部形態は比較的バリエーションが大きいことが示されている。本研究では、現代の成人における胸部形態を調べ、関連する遺伝子多型をゲノムワイドに探索することを目的とした。

【方法】琉球大学病院にて PET-CT 検査を受けた 482 名を対象とした。CT 画像を用いて肋骨上にランドマークをプロットし、肋骨の弦の長さや胸部の幅を求めた。また、ランドマークの座標を用いて幾何学的形態測定法を用いた形態解析を行った。プロクラステス解析および主成分分析によって得られた重心サイズ (CS) と第一主成分 (PC1) に着目してゲノムワイド関連解析を行った。

【結果】PC1 は肋骨の側面と正面の形状に関連する成分であることが分かった。PC1 の値は、負になるにつれて胸部は浅く下部が狭まり、正になるにつれて胸部は深く下部が広がることを意味した。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、有意水準である $P < 5.0 \times 10^{-8}$ となる SNP は検出できなかった。 $P < 1.0 \times 10^{-6}$ の閾値で関連のある SNP を調べたが、機能的に関係がありそうな遺伝子を見出すことはできなかった。

【考察】本研究において幾何学的形態測定法によって、ヒトの胸部形態変異を数値化することができた。ヒトの胸部形態変異の一部は、ネアンデルタール人からの遺伝子移入によって説明できる可能性も考えられる。本研究では、ヒト胸部形態の変化に強い影響を与える SNP を特定できなかったが、今後はサンプル数を増やして、ネアンデルタール人由来ハプロタイプとの関連も含め、解析を重ねる必要がある。

089

クローナリティ解析を用いたリンパ腫の病理診断

西村 喬博 (学籍番号: 184182D)
指導教員: 富田 真理子, ○和田 直樹
琉球大学大学院医学研究科腫瘍病理学講座

【背景】リンパ球はあらゆる外来抗原に対応するために、免疫グロブリン(Ig) 遺伝子やT細胞受容体(TCR) 遺伝子の再構成により多様性を獲得する。リンパ腫と鑑別が困難な反応性病変では、種々のリンパ球がポリクローナルに増殖している。一方、リンパ腫では腫瘍化したリンパ球がクローナルに増殖し、ほぼ単一の細胞集団を形成する。クローナリティ解析では、TCR/Ig 遺伝子の再構成パターンを調べることでリンパ球のクローナルな増殖を検出し、より詳細なリンパ腫の診断を行うことができると考えられている。

【目的】リンパ腫の再発、再々発が疑われる患者検体を用いて、腫瘍性増殖か否かを判断するために、形態学・免疫組織学的検索とともにクローナリティ解析を行った。また、同一検体の形態学・免疫組織学的検索結果と比較検討した。

【結果と考察】Ig 重鎖遺伝子のクローナリティ解析では、いずれの検体でもポリクローナルな増殖を示した。一方、TCR γ 鎖遺伝子では、原発巣と再発が疑われる検体でクローナルな増殖を認めたが、再々発が疑われる検体ではポリクローナルな増殖を示した。形態学・免疫組織学的所見と比較検討した結果、再発が疑われる検体は原発巣の再発である可能性が高く、いずれも anaplastic large cell lymphoma を考える所見であったが、再々発が疑われる検体は原発巣と遺伝子再構成パターンの類似性が乏しく、anaplastic large cell lymphoma 再々発とは断言できなかった。リンパ腫の病理診断では、クローナリティ解析を組み合わせることで、より精度の高い診断が可能となると考えられた。

【謝辞】クローナリティ解析は、細胞病理学講座の加留部謙之輔先生と高島光徳先生にもご協力いただいた。

090

サウナ浴が血圧に与える影響について

我那覇 海 (学籍番号: 184112C)
指導教員: 中村 幸志
琉球大学衛生学・公衆衛生学講座

【目的】私自身サウナ浴が好きでよく行いが、一般的にサウナ浴には様々な健康効果があるといわれている。今回は血圧に注目し、主に重篤な疾患を持たない健康な若～中年層の人のサウナ浴前後における血圧変動についてシステマティックレビューをおこなった。

【方法】PubMed を用いて、MeSH 用語に基づく「(blood pressure OR hypertension) AND (sauna)」という検索式を立て、原著論文を検索した。抽出された 159 編のうち、目的に該当する論文は 5 編であった。

【結果】脂質異常症などの心血管危険因子を持つ無症候の男女を対象にしたサウナ浴の前後における血圧変動については、入浴直後男女ともに同じ方向に収縮期血圧は-4.3% 拡張期血圧は-8.7%の変化があり、入浴後は男女ともに血圧が低いままであった。健康な平均年齢 22 歳の若年層と 68 歳の高齢層を対象にしたサウナ浴の前後における血圧変動については、若年層では入浴の前後で収縮期および拡張期血圧の有意な変化はなかったものの、高齢層では入浴直後に短時間の血圧低下があった。健康な 20 歳代男性を対象にしたサウナの温度や湿度と血圧変動の相関については、38℃～45℃、63%～100%の間ではいずれに条件でも血圧の有意な変化はなかったが、活動レベルの低い 20 歳代男性を対象に 4 回連続してサウナ浴を促して血圧変動を調べたところ、入浴から最後まで連続した血圧の上昇がみられた。慢性の影響として、血圧が正常の中年男性を対象にしたサウナ浴頻度と高血圧発症との関連については、1 週間あたりのサウナ浴の頻度が増えるほど高血圧発症リスクが少なかった。

【考察/結論】注目したサウナ入浴と血圧の関係について、概して健康な若年の男女にとってはサウナ浴に害はなく、血圧を上昇させる可能性が低いことが示唆されたが、調べた範囲で結果が一致していない理由の一つは、対象者の特性やサウナの条件が同じでないことだろうと考えた。

091

高粘度流体におけるコレラ菌の運動性

又吉 晃平 (学籍番号: 184132H)
指導教員: ○許 駿, 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】*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。本研究では、生理条件と同様の高粘度、高浸透圧環境中のコレラ菌の運動性の直接測定を目的とした。

【材料・方法】本研究ではコレラ菌 (*V. cholerae* El Tor O1 N16961) を用いて実験を行った。二次培養したコレラ菌にメチルセルロース (非ニュートン流体) と Ficoll (ニュートン流体) 及び塩化カリウム (KCl) をそれぞれ加えて粘度、浸透圧を生理条件と同様に調整する。生理条件に近い高粘度・高浸透圧流体におけるコレラ菌の運動性を評価した。

【結果】コレラ菌は、粘度が上昇すると運動細胞の割合及び、遊泳速度が減少するという粘度依存性が見られた。一方で、MSD は粘度の上昇に関わらず大きな変化は見られなかった。よって、遊泳速度の減少に関わらず遊泳運動の方向の一致性に変化は見られなかった。また、高浸透圧下では一定の浸透圧には耐性を持つが、ある値を超えると運動性が減少することが示唆された。

【考察】コレラ菌は、生理条件 (粘度・浸透圧) に近い環境中では低速かつ方向性的な運動を示す可能性が示唆された。今後の課題として高粘度の状況での形態やべん毛モーターの回転の変化や、べん毛モーター遺伝子の粘度や浸透圧による発現の変化を調べる。

092

MRI による新生児脳障害と脳発達の総合的評価 (城所スコア) の有用性について ~ 在胎 22-25 週群と在胎 32-33 週群の比較による検討 ~

東 映月 (学籍番号: 184207C)
指導教員: ○吉田 朝秀¹⁾, 呉屋 英樹¹⁾, 知念 安紹¹⁾, 中西 浩一¹⁾, 新垣 真弓²⁾, 崎山 秀樹²⁾

¹⁾ 琉球大学大学院医学研究科育成医学講座
²⁾ 同周産母子センター

【目的】新生児脳障害と脳発達の指標である城所スコアを用いて在胎 22-25 週の超早産児と在胎 32-33 週の早産児の 2 群について比較検討しその有用性を評価した。【方法】対象は 2015 年 1 月から 2019 年 12 月に琉球大学病院周産母子センターに入院した胎 22-25 週の超早産児群 (n=17, 在胎 24.2 ± 1.9 週, 出生体重 706 ± 276g, MRI 撮像時受胎後日数: 254-273 日), 在胎 32-33 週の早産児群 (n=17, 同: 32.1 ± 0.5 週, 1853 ± 433g, 251-263 日) である。MRI 画像より脳白質障害、髄鞘化遅延、脳梁形成、側脳室サイズ、脳萎縮、皮質灰白質信号などを点数化し重症度分類を行い比較した。臨床的背景はカルテにより後方視的に調査した。【結果】超早産児群と早産児群の重症度分類 (正常, 軽度異常, 中等度-重度異常) は超早産児群で順に 29%, 41%, 29%, 早産児群で 65%, 29%, 6% であった。脳白質信号異常 (超早産児群 1.1 ± 2.4 点, 早産児群 0.1 ± 0.9, p=0.003), 大脳横径 (超早産児群 70.9 ± 8.6mm, 早産児群 74.2 ± 6.3mm, p=0.029), 深部灰白質容積 (超早産児群平均値 10.1 ± 1.2cm², 早産児群 11.2 ± 1.2cm², p<0.001), 小脳横径 (超早産児群 46.5 ± 4.1mm, 早産児群 49.3 ± 3.7mm, p<0.001, および城所スコア合計点数 (超早産児群 5.9 ± 5.7 点, 早産児群 3.2 ± 3.0 点, p=0.005) に有意差を認めた。【結論】早産児の脳障害は MRI の信号異常として定性的に検出してきた。城所スコアは脳萎縮や白質障害, 灰白質・小脳, 深部灰白質の信号異常に加え脳のダメージを容積変化として検出できる。城所スコアを用いることによって超早産児を含む新生児脳障害や脳発達の総合的かつ詳細な定量的評価が可能である。

093

琉球大学病院における心筋 T1mapping の検討 基準値と診断能について

林 渚生 (学籍番号: 184143C)

指導教員: ○土屋 奈々絵, 村山 貞之

琉球大学大学院医学研究科放射線診断治療学講座

【目的】MRIを用いた心筋性状評価として遅延造影(LGE)の他に定量評価が可能なT1mappingがある。T1mappingの指標であるT1native値は機器毎に基準値が異なるが、Extra-cellular volume (ECV)は数値の差が少ない。本研究では当院におけるT1native値、ECVの基準値と診断能を評価することを目的とする。

【方法】①当院で心臓造影MRIを実施した患者26名(男性21名 女性6名)の画像を後向きに調査し、LGEの有無、T1native値、ECVを評価した。T1native値とECVの相関関係を調べ、ECV30%のT1native値を求めた。LGEの有無で2群に分類し、T1native値、ECVの比較を行った。T1native値およびECVのLGE有無の診断能をROC解析で検証した。②健康者5名(男性4名 女性1名)のT1native値を計測し、平均値、標準偏差、信頼区間を求めた。

【結果】①T1native値とECVに正の相関を認め($\rho=0.82$, $p<0.0001$)、ECV30%でのT1native値は1328msであった。LGE陽性群のT1native値、ECVは、LGE陰性群より有意に高値であった($p=0.002$, $p=0.0002$)。LGE陽性診断能はT1native値:感度89%,特異度56%,カットオフ値1343ms。ECV値:感度71%,特異度76%,カットオフ値36%であった。

②健康者のT1native値は 1288 ± 46 ms, 95%信頼区間は1230~1345msであった。

【結語】当院のT1nativeの基準値は1230~1345ms程度で、T1native値が1343ms以上で異常心筋が疑われる。T1mappingで得られる指標であるT1native値、ECV共に、LGEの有無すなわち異常心筋を判定するのに有用である。

095

3D-CGとバーチャルリアリティを用いた 聴神経鞘腫の手術シミュレーションの検討

大城 絵理 (学籍番号: 184171J)

指導教員: ○石内 勝吾, 外間 洋平, 宮城 智央, 西村 正彦, 上 薫

琉球大学病院脳神経外科学講座

【背景】神経鞘腫は小脳橋角部に好発し、その摘出過程において神経や血管の走行を事前に確認することは、適切な摘出経路をとり、損傷回避するために重要である。2次元の画像だけでなく、3D画像やバーチャルリアリティ(VR)を利用することで立体構造を把握することができ、術式の選択やリスク回避に役立てられる。今回、聴神経鞘腫の手術シミュレーションにおける3D-CGとVRの有用性を検討した。

【症例】70代男性 現病歴:動揺感が出現し程度が進行。左顔面感覚異常、左難聴、嚥下困難も伴っていた。脳幹変位を伴う左小脳橋角部病変を指摘され当科紹介。巨大聴神経鞘腫が最も疑われ、一旦の救命、摘出減圧と診断目的に手術を計画した。

【方法】320列CT、3.0TeslaのMRIで取得したデータをコンピュータ(SYNAPSE VINCENT, FUJIFILM)で統合して3D-CGを作成した。VRは、琉球大学病院脳神経外科で開発したプログラムを用いた。

【結果】手術では腫瘍を可及的に露出させ、粘稠性の腫瘍被膜を開放し、モニタリング下に摘除した。術後の経過も良好であった。

作成した3Dシミュレーション画像は、骨を透過して静脈洞や腫瘍の位置を立体的に把握し、開頭に役立てることができた。また、開頭後の術野や、腫瘍径のサイズ感もより詳細に確認することができた。よって、脳神経や、腫瘍と血管の位置関係を3D画像で描出することは術前シミュレーションに有用であることが判明した。VRでの手術シミュレーションは複雑で平面図では理解しづらい脳の、解剖構造の立体的な把握に役立ち、医学生の学習において有用であった。

【結語】術前の脳構造の把握に3Dシミュレーションは有用である。VRは学生の解剖構造の学習などに有用である。術後合併症の予防に重要な顔面・蝸牛神経の走行がMRIで特定できない場合もあり、今後確実な描出法を研究していく必要があるだろう。

094

プロバイオティクス製剤の投与が免疫チェック ポイント阻害薬の副作用であるirAE発症に 及ぼす影響に関する研究

菅原 康佑 (学籍番号: 184115H)

指導教員: ○石井岳夫¹⁾, 潮平英郎¹⁾, 中村克徳^{1,2)}¹⁾ 琉球大学病院薬剤部²⁾ 琉球大学大学院医学研究科薬物治療学講座

【背景と目的】

免疫チェックポイント阻害薬(ICI)による治療効果は、免疫関連の副作用(irAE)が発症した患者の方が高いことが知られている。また、ICIの治療効果には、腸内細菌叢が影響を及ぼすこともわかってきている。プロバイオティクス製剤の投与は、腸内細菌叢の正常化をもたらす。その結果、ICIの治療効果やirAEの発症頻度をあげる可能性があると考えられる。この点について、プロバイオティクス製剤の投与と治療効果との関係については報告が存在するが、プロバイオティクス製剤の投与がirAE発症に対してどのような影響を及ぼすかについての報告はほとんど見られない。本研究では、プロバイオティクス製剤の投与がirAE発症に与える影響を統計的に分析した。

【方法】

本学において免疫チェックポイント阻害薬が投与された患者集団を抽出し、免疫チェックポイント阻害薬投与と同年にプロバイオティクス製剤の投与している患者と投与していない患者の副作用(irAE)の有無の違いを評価する。後ろ向きコホート研究。2014年10月24日~2020年12月31日を対象期間とする。

【結果】

カルテ調査を行った結果、247名が調査対象となった。そのうち、プロバイオティクス製剤使用群が111名、未使用群が136名であった。前者のうちirAEを発症したのが75名、発症しなかったのが36名であり、後者のうちirAEを発症したのが97名、発症しなかったのが39名であった。プロバイオティクス製剤使用群と未使用群でカイ2乗分析を行った結果、 $p=0.52$ となり、両者の間に統計学的有意差は認められなかった。

096

がん登録データ SEER を用いた 口腔領域重複がんの解析

安井 航生 (学籍番号: 184178F)

指導教員: 丸山 哲昇¹⁾, ○中村 博幸^{2,3)}¹⁾ 琉球大学医学部医学科²⁾ 同医学部附属病院歯科口腔外科³⁾ 同医学研究科顎顔面口腔機能再建学講座

緒言と目的: 重複がん(MPM)は、がん患者に新たながんが発症する病態である。がん患者の生命予後の改善のために、MPMの早期発見が望ましい。口腔は侵襲なく直接がんを探索できる部位であるが、MPMとしての口腔がん発症の施設単位での解析には限界がある。そのため、アメリカのがん登録データ(SEER)を用いて、口腔MPMについて解析し、その特質を調査することにした。

対象と方法: SEERのソフトウェアを用い、当講座でこれまで稀少と報告した部位を対象に、口腔MPMの発症しやすさ等を解析した。

結果と考察: 一部の臓器部位において、口腔MPMを長期的に合併しやすいことが示唆された。

結語: 口腔は、全身の中でも侵襲なく観察できる数少ない部位である。そのため、がん患者における口腔診察は、長期的に行うことが推奨される。