

米子医学会賞

米子医学会では、鳥取大学医学部の大学院生に対し将来の発展を期待し、優秀な研究論文に米子医学会賞を授与することとしています。応募資格は、米子医学会会員で博士課程及び博士後期課程（臨床心理学専攻にあっては修士課程）を当該年度に修了若しくは修了見込の大学院生です。被表彰者には賞状ならびに副賞が授与され、米子医学雑誌に論文要旨を公表することになっております。

受賞者ならびに授賞論文は以下のとおりです。

第17回米子医学会賞受賞者

医学専攻博士課程

1) 寺岡祥吾（鳥取大学医学部附属病院 泌尿器科）

医科学専攻博士後期課程

2) 山崎匡太郎（日本学術振興会特別研究員 DC2）

保健学専攻博士後期課程

3) 長谷川慶幸（鳥取大学医学部成人・老人看護学講座）

抄 録

1) Early effects of adipose-derived stem cell sheets against detrusor underactivity in a rat cryo-injury model

（ラット凍結障害モデルにおける脂肪由来幹細胞シートの排尿筋低活動に対する初期効果）

Teraoka S, Honda M, Makishima K, Shimizu R, Tsounapi P, Yumioka T, Iwamoto H, Li P, Morizane S, Hikita K, Hisatome I, Takenaka A. 令和4年 Life Sciences
doi: 10.1016/j.lfs.2022.120604

膀胱再生における幹細胞の役割に着目した研究では、骨髄由来幹細胞を用いたものがほとんどである。さらに、脂肪由来幹細胞（ASC）シートのラットへの移植、および膀胱内圧測定による生理機能回復の評価、ASCシートの生存率・分化の確認については、これまでの報告で取り上げられたものはない。そこで、本研究では、ラット排尿筋低活動モデルにおいて、ASCシートの効果を検討評価した。

方 法

動物実験および遺伝子組換え実験については、鳥取大学研究推進機構（32-027, 20-Y-23）の承認を得た。ASCシート作製には成熟した雄Lewisラットを使用し、GFP発現ASCシートの作製には全身にGFPを発現する雄Lewisラット[LEW-Tg(CAG-

EGFP)1Ys]を使用した。ラット鼠径皮下脂肪組織からASCを採取し、温度応答性培養皿を用いて細胞シートを作製した。

排尿筋低活動モデルは10週齢の雌Lewisラットに膀胱凍結障害を与えることで作成した。ASCシート移植の3日前に、麻酔下に膀胱を露出してドライアイスで冷却したアルミニウム棒を膀胱前壁に接触させて凍結損傷を与え、モデルラットを作成した。10週齢の雌Lewisラットを8匹ずつ4群にグループ化した。膀胱凍結障害を行った後、ASCシートを同部位に移植する群（凍結障害+ASCシート群）、膀胱凍結障害を行うがASCシート移植を行わない群（凍結障害群）、凍結障害やASCシートの移植は行わないが開腹手術は行う群（偽手術群）、何も処置を行わない群（対照群）である。

ASCシート移植の7日後に膀胱内圧測定を実施し、安楽死させて膀胱を摘出した。摘出した膀胱の組織学的評価およびRT-PCR分析を行った。

さらに、ASCシートの生存率と分化を確認するために、GFP発現ASCシートを使用した。上記の手順に従い、25匹の雌Lewisラットに凍結障害を与え、3日後にGFP発現ASCシートを膀胱凍結障害部位に移植した。移植後3, 7, 14, 21, 28日目に5匹のラットを安楽死させた。安楽死させたラットの膀胱を露出し、蛍光実体顕微鏡で観察し、励起光下でASCシートの蛍光を確認した。その後、膀胱を摘出しGFPとvWFの二重免疫蛍光染色を行って、移植細胞の分化を確認した。

結果

膀胱内圧測定においては、注水量、排尿量は4群間で有意差は認められなかったが、最大膀胱内圧 ($P=0.011$)、残尿量 ($P=0.020$)、排尿効率 ($P=0.020$)、尿溢流率 ($P=0.001$) に有意差が認められた。病理組織学的解析の結果、凍結障害群では急性炎症所見が観察された。一方、凍結障害+ASCシート群では、炎症細胞の浸潤による慢性炎症が観察されたが、組織壊死の程度は低く、創傷治癒過程で生じる肉芽腫形成も確認された。さらに、各群の膀胱組織を抗vWF抗体で染色し、 $4\times$ 視野の毛細血管数の平均値を群間比較した。毛細血管数は、凍結障害+ASCシート群で他の群に比べ有意に多かった。RT-PCRでは、凍結障害+ASCシート群は凍結障害群にVEGFとHGFのmRNA値の有意な上昇が確認出来た(それぞれ $P=0.045$ と $P=0.037$)。

GFP発現ASCシートを用いた研究においては、移植後14日目までは全ラット (100%)、21日目には5匹中4匹 (80%)、移植後28日目には5匹中1匹 (20%) のラットに励起光下で移植部位での緑色蛍光が観察された。どの時点でも、緑色蛍光は膀胱の移植部位のみに限定され、他の臓器では確認できなかった。摘出した膀胱の免疫染色では、ASCシート移植部位に多数のGFP陽性細胞が認められた。3日目時点での二重免疫蛍光染色では、GFP陽

性細胞はvWF陽性細胞と一致しなかったが、シート移植7日以降には、GFP陽性細胞とvWF陽性細胞が一致し、ASCの一部が血管内皮細胞に分化していることが確認出来た。

考察

本研究では凍結障害後の膀胱にASCシートを移植することで、比較的早い段階で膀胱収縮機能が回復することが確認出来た。幹細胞の創傷治癒には、分化、ホーミング、免疫調節などいくつかのメカニズムが提唱されているが、ASCの組織修復や創傷治癒には新生血管の誘導が強く関わっていることを示す報告が多数存在する。本研究においてもGFPでマーキングしたASCが血管内皮細胞に分化し、移植後最大28日間生存していることが確認出来た。さらに、ASC自体が血管新生因子であるVEGFやHGFを分泌することで、損傷した膀胱壁への安定した血液灌流が供給され、損傷した膀胱の機能を比較的早期に回復させた可能性が示唆された。

結論

凍結障害によるラット排尿筋低活動モデルに移植したASCシートは、移植7日後に一部が血管内皮細胞に分化するとともに、膀胱の収縮機能を早期から回復させた。

抄録

2) Simultaneous loading of PCR-based multiple fragments on mouse artificial chromosome vectors in DT40 cell for gene delivery

(DT40細胞が保持するマウス人工染色体上へ遺伝子搭載を行うための複数PCR断片同時搭載法)

Yamazaki K, Matsuo K, Okada A, Uno N, Suzuki T, Abe S, Hamamichi S, Kishima N, Togai S, Tomizuka K, Kazuki Y

令和4年 Scientific Reports 12巻 21790

生命現象の解明、疾患原因の探索、治療法の開発などにおいて、遺伝子改変細胞・動物を用いる方法は非常に有用である。マウス/ヒト人工染色体ベクター (MAC/HAC) は、従来法では作製が難しい長大なゲノム領域・複数の遺伝子を搭載可能で、宿主の発現制御に従うという特徴を持つこ

とから、遺伝子改変細胞・動物の作製において大きな役割を果たしてきた。一方で、MAC/HACに遺伝子やゲノム領域を搭載する過程において、1遺伝子を搭載するごとに細胞の単離・解析が必要、同時に搭載できる遺伝子数が3つまで、専用のベクターへのクローニングが必要、という課題が残されていた。そこで本研究では、迅速かつ簡便にMAC/HACへ複数断片の搭載を可能とする、相同組換え修復を介した複数断片同時搭載 (simHDR) 法を開発した。相同組換え修復効率が高いニトリB細胞株DT40細胞と、標的部位への相同組換えによるノックイン頻度を高めるCRISPR/Cas9を用いることで、simHDR法はこれまでの上限であった3断片以上を同時に搭載可能であり、それぞれの断片はPCRで調製が可能であることが示された。simHDR法によって、MAC/HACを用いた遺伝子改変細胞・動物の作製が高速化することで、

生命現象の解明、疾患原因の探索、治療法の開発など、さまざまな分野への波及効果が期待される。

方法

マウス10番染色体から作製されたMAC (10MAC2) を保持するDT40細胞を用いて以下3実験を行うことでsimHDR法のコンセプトおよび応用例を示した。全ての実験で、HDRドナーをPCRで調製し、DT40細胞へエレクトロポレーションで導入した。同時に10MAC2上の標的部位に2本鎖切断を起こすcrRNA-Cas9複合体を導入し、蛍光マーカーと薬剤選抜によって細胞を単離した。単離した細胞からゲノムDNAを抽出し、PCRによる解析、組換え部位の配列解析に供した。また、単離した細胞から染色体標本を作製し、染色体解析に供した。1) 複数のPCR断片を一度の操作で10MAC2上へ搭載可能かを検討するために、1~4断片を調製し搭載した。2) simHDR法において相同組換えに必要な相同配列長を検討するために、相同配列長が622-bp、300-bp、60-bpである断片を搭載した。3) ゲノム領域を大腸菌などの組換え生物を介したクローニングを経由せずに10MAC2上へ搭載することが可能か検討するために、ヒトHepG2細胞のゲノムDNAからHLA-A領域をPCRで増幅し、10MAC2へ搭載した。

結果

方法に示した1), 2), 3) に対応する以下の結果を得た。1) 1断片から4断片までの全ての条件から目的配列が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列から想定外の変異は見出されず、染色体解析から10MAC2以外の領域へのHDRドナーのランダム挿入は検出されなかった。2) 相同配列長を変えた全ての条件から目的配列が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列から想定外の変異は見出されず、simHDR法において60-bpの相同配列で十分に正

確な搭載が可能であることが示された。3) ゲノムDNAから調製したHLA-A遺伝子およびその上流下流に存在する発現制御領域が10MAC2へ搭載された細胞を単離した。組換え部位の配列解析、染色体解析、mRNAおよびタンパク質の発現解析により、HLA-Aのゲノム領域が想定通りに10MAC2上へ搭載されていることを示した。

考察

今回の研究では10MAC2で検証を行なったが、最適なcrRNAの設計と相同配列を用いることでこれ以外のMAC/HACにも応用が期待できる汎用的な手法である。当初断片数が増えるに従って得られるクローン数は減少すると予想したが、4断片と1断片の条件の間に有意差は認められなかった。これは設計上、断片数が増えるに伴い断片の配列長が短くなるため、各断片の導入効率と全断片が導入される効率の総和が同程度になることが原因と考えられる。さらに長い断片、多くの断片をsimHDR法で搭載する際、導入効率、組換え効率の向上は重要な検討項目である。単離した細胞のjunctionを解析した際、目的通りの組換え体が得られる効率は、1断片よりも複数断片で高い傾向にあった。これは組換え部位を蛍光マーカーや薬剤耐性遺伝子にすることで、ランダム挿入のクローンが得られにくくなっていることが示唆され、simHDR法を用いる際の重要な指針となる。

結論

本研究では、MAC/HACに複数断片を同時搭載可能なsimHDR法を開発することに成功した。本技術は、搭載に必要な工程の短縮、同時搭載可能な上限、という従来法の課題を解決し、染色体工学技術の発展に寄与した。さらには、遺伝子改変細胞・動物の作製迅速化にも貢献しさまざまな分野への波及効果が見込める。

抄 録

3) Bystanders' willingness to perform basic life support and its relationship with facilitative and obstructive factors: A nationwide survey in Japan

(バイスタンダーの BLS 実施意志とそれに関連する促進・抑制要因：日本における全国調査)

Hasegawa Y, Hanaki K.

令和5年 Yonago Acta Medica

Doi: 10.33160/yam.2023.02.008

院外心停止傷病者へbasic life support(BLS)が行われた場合、救命率が大幅に向上するとされているが、実施率が低いことが問題になっている。本研究ではBLS実施意志の強さとその促進要因、抑制要因との関係を明らかにし、通りすがりの人(バイスタンダー)によるBLS実施率を高めるための示唆を得ることを目的とした。

方 法

日本に居住し、研究参加に同意した15歳～65歳の男女で、BLSの実施経験がない1000人と経験がある101人を参加者とした。BLSアルゴリズムの主要な3行動〔i) 状況を確認する, ii) 援助を要請する, iii) 救命処置をする〕より採用した質問項目を用いて、BLS実施意志の強さを4件法で評価した。社会心理学において人助けの心理状況に用いられる援助行動理論に基づいて設定した実施意志の促進要因候補 (A: BLS実施の能力・経験の充足, B: 自分のメリット, C: 傷病者のメリット, D: 個人の行動基準となる価値観, E: 傷病者との心理的距離の近さ, F: BLSについての正のイメージ) と抑制要因候補 (a: BLS実施の能力・経験の不足, b: 自分のデメリット, c: 傷病者のデメリット, d: 無関心, e: 傷病者との心理的距離の遠さ, f: BLSについての負のイメージ) への適合度を評価し、BLS実施意志への関連を解析した。2群間の比較にはBonferroni補正を用いたMann-WhitneyのU検定、多変量の解析にはロジスティック回帰分析を用いた。p < 0.05を統計学的有意とした。

結 果

BLS実施意志あり群の割合は、経験なし群、あり群の両方で、行動ii) 援助を要請する、行動i) 状況を確認する、行動iii) 救命処置をするの順に低

下した。説明変数として促進要因候補 (A～F) の適合度スコア、目的変数として行動i), ii), iii) の実施意志の強さを設定し、経験なし群、あり群別にロジスティック回帰分析を行った。経験なし群では、行動i) は「A: BLS実施の能力・経験の充足」, 「B: 自分のメリット」, 「D: 個人の行動基準となる価値観」, 「E: 傷病者との心理的距離の近さ」, 行動ii) は「A: BLS実施の能力・経験の充足」, 「B: 自分のメリット」, 「D: 個人の行動基準となる価値観」, 行動iii) は「D: 個人の行動基準となる価値観」と有意に関連していた。経験あり群では、行動i), ii), iii) 全てと「D: 個人の行動基準となる価値観」が有意に関連していた。経験なし群とあり群の両方で、すべての実施意志と有意に関連していた促進要因候補は「D: 個人の行動基準となる価値観」のみであった。同様に説明変数として抑制要因候補 (a～f) への適合度スコア、目的変数として行動i), ii), iii) の実施意志の強さを設定し、経験なし群、あり群別にロジスティック回帰分析を行った。経験なし群では、実施意志と有意な関連を示す抑制要因は認めなかった。また経験あり群ではサンプル数が少ないため、同解析を実施しなかった。

考 察

BLS実施意志の強さは、傷病者への介入の度合いが高くなるほど低下することが明らかとなった。またBLSの実施能力や成功体験があると感じることは実施意志の促進要因であった。感情を揺さぶられる体験をすること、体験後に誰かと振り返ることがこの要因を強化するとされており、講習会では現場の状況を疑似体験することにより参加者の感情を揺さぶること、家族や友人と参加し一緒に振り返る場を提供することが有効であると考えられる。自分のメリットも促進要因であった。講習会では、BLS実施により表彰された記事を提示するなど、参加者がBLS実施のメリットを認識することが有効であると考えられる。また個人の行動基準となる価値観も、実施意志の促進要因であった。自身のコミュニティでBLSについて話し合う、BLSの体験談を聞く、BLSを疑似体験する等がこの要因の育成に有効である可能性が考えられる。特に院外心停止傷病者の救命に有効とされる傷病者への介入の度合いが高い行動の実施には個人の行動基準となる価値観が必要なことが本研

究で明らかとなったので，個人の行動基準となる価値観を高めることは講習会の最終的目標と言える。傷病者との心理的距離の近さ，特に傷病者への恐れがないことも促進要因であった。バイスタンダーが感じるであろう傷病者への恐怖心や嫌悪感の原因について科学的根拠に基づいて説明し，誤解や偏見を解くことが重要であると考えられる。

結 論

BLS実施意志の強さは，傷病者への介入の度合いが高くなるほど低値であった。BLS実施意志の促進要因として，BLS実施の能力・経験の充足，自分のメリット，個人の行動基準となる価値観，傷病者との心理的距離の近さが明らかとなり，効果的なBLS講習会実施への示唆を得ることができた。

米子医学雑誌優秀論文賞

米子医学会では，当該年度に米子医学雑誌に掲載されたものの中から優秀論文（原著論文1編，症例報告1編）を選考し米子医学雑誌優秀論文賞を授与することになっています。被表彰者には賞状ならびに副賞が授与されます。

受賞者ならびに授賞論文は以下のとおりです。

米子医学雑誌優秀論文賞受賞者（令和5年3月2日表彰）

☆原著論文

橋田勇紀（鳥取大学医学部附属病院 リハビリテーション部）

鳥取県米子市におけるフレイル対策事業の短期効果：介入プログラム開発のための予備的調査
(Vol.73, No.1・2・3 2022)