

論文審査の結果の要旨

申請者:北村智久(毛呂山キャンパス口腔外科学)

学位申請論文タイトル:ビタミン D および 25(OH)D₃は運動学習機能を向上させる(thesis)

学位審査委員会は 2021(令和 3)年 2 月 5 日に毛呂山キャンパス本部棟地下1(B1)階 第 4 講堂(17:00~18:30)で開催された。学位審査委員会構成員は主査:村上 孝 教授(毛呂山キャンパス微生物学)、副査:門野夕峰 教授(毛呂山キャンパス整形外科学)、金子貴広 准教授(川越キャンパス口腔外科学)、池田和博 准教授(日高キャンパスゲノム応用医学)で、全員が出席した。

はじめに、本人の研究歴、研究業績、論文の倫理審査、等々について審議し、申請資格に問題がないことを確認した。その後、申請者からのプレゼンテーション(約 20 分間)の後、研究内容について質疑応答がなされた。

下記の(主要)質疑事項が出された:

- 1)同週齢による健常食餌のマウスやビタミン D3 欠損マウスとの比較対照データがないため、この動物モデル(ビタミン D3欠乏状態)の評価・判定が困難である。
- 2)このビタミン D・25(OH)D₃補充による数値は機能改善なのか、向上なのか。また中枢神経機能と運動器機能に言及しているが結論が出せるのか。疲労度は考慮しているのか。
- 3)この動物モデルからヒトで社会問題(背景)になっている議論に当てはまらない。
- 4)Rotarod、Beam walking などの実験学上の位置付けを明確にする必要がある。
- 5)この論文自体の記載の仕方も一般的な書き方から外れているものが多く、大幅な修正が必要である。

審査委員会では上記の質疑事項を踏まえ、申請論文の大幅な改善・修正を求めることが望ましいと結論した。審査会の後、各委員からの詳細な指摘事項など取りまとめ、令和 3 年 2 月 10 日付で申請者に修正を求めることとした(下記)。

<審査員#1>

総評

本論文は主として高齢者の転倒・骨折防止を目的としたビタミンD補充が有効出るとする社会背景に注目し、マウスにおける 25(OH)D₃・ビタミンDの運動協調機能や運動学習機能、筋機能に与える影響について検討を行なっている。申請者はビタミンD欠乏モデルマウスを採用しているが、比較すべき健常マウス対照群の結果が提示されないまま実験結果を評価している。このモデルマウスの非生理的な条件が適切に評価されないまま、投与補充されるビタミンD投与量と相関するデータ上昇値の結びつけた解釈がなされている。この弱点を抱えたまま、得られた実験結果の効果が運動器自体よりも運動学習機能に影響すると結論しようとしている。また 25(OH)D₃・ビタミンD補充と運動学習機能に上昇について神経学的考察も少ないままになっている。

<Major comments>

1. Page 1, line 4 『タイトル』:同週齢の健常食餌マウスやVDR欠損マウスとの比較対照がないため、このよ

うな一般化したタイトルは受け入れ難いです。実験系やその限界、得られた結果に基づいたタイトルに変更してください。

2. Page 2, lines 1-17 (「要約」部分): この研究の背景というよりは生理的な役割を記載しているにすぎません。論文の要約にもかかわらず、17 行もかけて説明する意義も見出せません。ここではビタミン D 欠乏による病態や特徴について、申請者の動物モデルがいかに適切であるかについても、実質的な研究目的として簡潔に説明すべきです。
3. Page 2, lines 18-20: 健常食餌マウスにビタミン D3 補充を行った研究内容ではありませんので、「ビタミン D 欠乏マウス」であることを明記してください。このことは本論文全体に渡って修正してください。
4. Page 3, lines 1-2: ①ビタミン D 欠乏食で何週後のマウスでしょうか。実験経過がわかるように簡潔に明記してください。②経口投与について投与濃度と投与量の情報を加えてください。
5. Page 3, line 3: Rotarod 試験、Beam walking 試験、握力試験はそれぞれどのような評価をするための試験なのか簡単な修飾語句を添えて説明してください。
6. Page 3, line 16: 「結論」ですが、これも #3 と同様に、正確な記述ではありません。「ビタミン D 欠乏マウス」であることを明記してください。
7. Page 4, lines 7-10: この一文の主語・述語関係が曖昧ですので、明瞭な文に修正してください。また「現在のエビデンス」とは何を指しているのでしょうか。
8. Page 5, line 5: 「機能の上昇が認められない」→これは VDR 欠損マウスについてどのような実験を行った結果なのでしょう。運動器レベルの異常なのか、神経系レベルの異常なのか、区別する記載にしてください(申請論文の位置付けにかかわります)。その上で考察にも反映させてください。
9. Page 5, lines 10-14: 25(OH)D3 の経口摂取した場合、その血中濃度がどの程度まで(何%上昇すると)筋力や歩行スピードが 上昇する ののでしょうか? line 13「改善」とありますが、どのような状態(病態)の人の機能改善なのでしょう。健常人であれば「向上」のはずです。
10. Page 5, line 15: 「骨折や転倒」がビタミン D3 欠乏と関連するのでしょうか。ビタミン D3 欠乏による運動協調機能や学習機能への影響を論じた文献引用により補強が必要です。その上で「高齢化—ビタミン D3 欠乏—運動協調機能・学習機能への影響」を論じた上で、マウスモデル実験実施の妥当性が得られるのではないのでしょうか。この一文は「想定」部分からモデルマウス実験項目の内容が乖離しています。
11. Page 6, 実験動物: 審査会でも疑義がありましたが、18 週齢を使用するに至る経緯(正当性)や動物搬入・馴化の情報も記載してください。
12. Page 8, lines 7-14: μ CT 解析を模式化した図があることが望ましいです。同週齢の健常マウスとビタミン D3 欠乏マウスで筋肉量に差はあったのでしょうか。
13. Page 8, Rotarod の項目: どのような行動を計測するのか簡単な機器説明と作業の模式図が追加されることが望ましいです。また Page 8, line 20: 審査会でも議論になりましたが、「スコア」化の詳細を記載(或いは図示)してください。この測定法に関する引用文献追加もお願いします。
14. Page 9, Beam walking 試験: どのような行動を計測するのか簡単な機器説明と作業の模式図が追加されることが望ましいです。併せてこの測定法に関する引用文献追加もお願いします。
15. Page 10, lines 1-3: 統計解析における「P 値」の説明が抜けています(有意差ありと判断した P 値基準を記す)。ここでは「(*p<0.05···)」は必要ありません。一般的には「(*p<0.05···)」は図版類の説明(Figure legend)部分の終わりに記載します)。

16. Pages10-12, 結果:通常食餌同週齢マウスを用いた正味のコントロール(対照実験)結果が提示されていません(例 Page 10, line6)。テキスト全体に渡って本研究が「ビタミン D3 欠乏マウス」で行われた条件であることを正確に記載してください。特に、通常食餌マウスからビタミン D3 欠乏状態になったこと(モデルの正当性)を担保するデータ(比較参照すべき尺度の指標)が欠落しています。データの追加をお願いします。
17. また有意差が得られた実験結果をどのように解釈すべきか判断できません。それによって、機能の「改善(回復)」なのか、特定条件下での「向上」なのかを文言が変わるのではないのでしょうか(%改善率や%向上率なども考慮できないでしょうか)。
18. Page 11, lines 9-10: 「顕著であった」=有意差検定の結果が必要です。有意差なしならば文言修正をお願いします。
19. Page 12, lines 5-15: 考察でなぜ改めてビタミン D3 代謝を述べる必要はありません。緒言の内容と重複しないようにしてください。現状では意味のない議論であり省くべきです(削除希望)。
また 25(OH)D3 がなぜ注目されているのか、全く意味不明です(疑問は投げているが、その疑問は解決していません)。この部分に意味を持たせたいのであれば、本研究と関連付けに配慮しながら注目点や疑問点を挙げて説明してください。
20. Page 13, lines 1-2:『このことから…予想された』=前文からの論理が理解できません。VDR 欠損マウスはビタミンD3シグナル「ゼロ」で「わずかながら筋繊維が保持されている」ので、ビタミンD3非依存的に運動協調機能は保持されているとの考えでしょうか。或いは VDR 欠損マウスでの運動協調機能評価された報告はあるのでしょうか。ビタミン D3 依存的に運動協調機能を向上させたと考えることに納得がいきません。
21. Page 13, lines 14-15: 根拠資料はお持ちでしょうか。憶測の表現です。せめてコントロールマウスのデータと比較する必要があります。
22. Page 13, lines 16-17: 「メタ解析の結果と合致」とはどのような意味でお使いなのでしょう。(メタ解析がどのような study で得られた結果なのか説明した上で議論すべきでは)。
23. Page 13, lines 17: 高齢マウスの議論は推測です。実験されていないため、この議論は避けるべきです。むしろ、この文言は「このモデルが当初の目的にかなっていない」と受け取れます。表現を変えるかトーンダウンする文言に変えてください。
24. Page 14, line 19, 「本研究の限界」: 申請者の努力や誠実さは評価しますが、現在の内容では不足分が多くなりすぎているため、結果的にこの論文の価値を大きく引き下げています。「本研究から見える展望」など、別の表現をお考えください。
25. Page 15, lines 13-16: 25(OH)D3 による中枢神経の代謝修飾を想定しているなら、mTOR 経路がどのように学習・記憶に与える結果をもう少し詳しく或いは具体的な考察してください。
26. Page 15, lines 19-20: 「理由は明らかでない」=単に肝型 D3 の方が代謝経路上、活性型に近いためではないのでしょうか。それとも独立した効果なのでしょうか。
27. Page 16, line 3: VDR を介さないメカニズムはかなり早い段階でわかっていたはず(VDR 欠損マウスの実験結果の論文を読んでいたはずでは?)。
28. Page 17, lines 1-2: 前述していますが「ビタミン D3 欠乏」マウスであり単なるマウス実験ではありません。正確な記載をお願いします。

〈Minor comments〉

1. 論文全体にわたる文献提示の仕方を修正してください。読者が文献を参照しやすいようにすべきです。引用順に番号を1からふるもの、もしくは筆頭著者名の最初の文字を alphabet 順にするなど、投稿論文では一般的です。本論文では引用順に並べているように見えますので、「*」など標準的に使用されない形式での文献リスト表現は避けてください。また著者名は全員掲載することを推奨します(参考論文の責任所在やコンセプト提案が推定できますので)。
2. Page 4, line 2: 「27%」はどのような統計に基づいているのでしょうか。引用文献が必要です。
3. Page 4, line 3: 「10%」引用文献が必要です。
4. Page 4, line 4: 「臨床治験研究」引用文献を考慮してください。
5. Page 4, lines 12-14: 「問題になっている」根拠となる引用文献が必要です。
6. Page 4, lines 15-19: ビタミン D 代謝の一般論を記載した引用文献(著書)をお願いします。
7. Page 6, line 7: 「各実験」→「各実験群」
8. Page 6, line11: ビタミン D3 欠乏食(オリエンタル酵母社製)は正式名称と製品番号を記載が望ましいです(確認してください)。
9. Pages 6-10 「材料と方法」: 試薬や使用機器は例を参考に詳細に記載してください。材料は追試に耐えられる品番やロット番号まで要求する Journal もありますので, thesis 論文でも同様の丁寧な記載を求めます。

例) 製品・機器名(メーカー名[品番]、都市名)

①25(OH)D3(calcifediol, DSM ニュートリションジャパン社, 東京)

②TCI 社は spell-out してください。都市名を追加。

③Nano Drop モデル名 (メーカー名, 都市名)

④MCT oil: MCT を spell-out し、(メーカー名, 都市名)を追加。

⑤ゾンデ: 型番追加、プライムテック社の後に都市名を追加。

上記に従って テキスト全体の追加修正をお願いします。

10. Page 7, line 11: 採血量やその後の血清保管状況の記載が抜けています。審査会では 100uL 採血/回とのことでしたが、実験週数後半(特に 3-4週目)にマウスが貧血をきたしていることは無かったのでしょうか。マウスの行動異常への懸念があります。
11. Page 8, lines 1-6: ①LC-MS/MS 法の測定機器名の記載をお願いします。②「除蛋白」→「除タンパク」
③DMEQ-TAD の spell-out・略名称とビタミン D3 誘導体活性測定における有用性を担保する引用文献が望ましいです。
12. Page 10, line7: 「実験…なかった。」は記載不要では？

〈審査員#2〉

〈Major comments〉

1. 専門家でない人が読んでも分かるように、実験方法については詳細に記載する必要があります。特に Rotarod、Beam walking とともに順化方法について、審査会でのプレゼンしたように、記載をしてください。文言だけでなく、適宜実験器具の写真等も、新たに図として加えてください。また順化方法と実際の実験ではコンディションが異なるようですので、このことについても細かく記載してください。
2. 実験期間中のビタミン D (VD3、25(OH)VD3)の有無が一覧で分かるような、図を作成してください。Wild

control (VD 含有通常食)の実験を加えてやるようであれば、これについても図に盛り込んでください。

3. 上記の図を作成する際に、どの時期でどのような検査をしたのかわかるようにしてください。
4. 数値だけをみると添加するVD量が多いように思います。同時期に実験しないと統計学的に検討はできませんが、少なくとも Wild control ではどの程度なのか正常値を示す必要があります。正常値に基づいて、あまりにも過量投与となっている場合には、かえって病的な状況になっているので検討する意味合いがなくなります。
5. Rotarod、Beam walking で inter-observer error、intra-observer error を評価して妥当性は検討されているのでしょうか？既報があれば引用で構いませんが、なければ自分たちで評価する必要があります。
6. Rotarod から落ちる原因について、運動学習機能の差だけでなく疲労度の差の影響が否定できないと思います。評価はむずかしいとしても、考察をしてください。
7. 本研究は成長したマウスにおいて、VD 欠乏状態から VD を与えることによって運動機能をレスキューできるか否かを見ているものと捉えられます。背景には高齢者の骨折に関する記載がありますが、内容が跳躍しすぎているように思います。無理のない範囲の内容にとどめてください。

<Minor comments>

1. 文献の引用、リスト整理を適切にしてください。
2. CYP についても略語ですので、初出はフル表記してください。
3. 筋量測定において「下腿」→「下肢」に修正してください。

<審査員#3>

本論文は、マウスに 25(OH)D₃あるいはビタミン D₃経口投与を行い、それらの効果を比較検討することによって、ビタミンDの運動協調機能や運動学習機能、筋機能に与える影響について検討が行われている。

<Major comments>

1. 実験内容および手技についての説明や各セクションでの文献引用などが不十分だと思われます。読者に内容が伝わりやすくなるように修正をお願いします。
2. 本研究は、VDRノックアウトマウスを用いているわけではなく、ビタミンD欠乏食飼育マウスをビタミンD欠乏マウスと設定しコントロールとされていますが、その評価がなされないまま研究が進められてしまっています。先日の審査委員会でも議論となりましたが、wild-type マウスのデータなどを組み合わせて検討していただくことが望ましいと思われます。もし、時間的に不可能ならば、データ収集が困難であった背景や理由を Limitation 等に追記する必要があると思われます。
3. 本論文は全体的に、主観的な視点から論理展開されている箇所が多く見受けられます。申請者は本研究モデルから得られた研究成果に基づいて、科学的な視点から Discussion の論理展開を進めてください。本研究モデルで得られた知見のみで、論理展開を行うのならば、Discussion はもっと簡潔な内容にする必要があると思われます。
4. 参考文献の表記は、数字で行っていただくのが一般的だと思われます。

<Minor comments>

1. P6. L9 ビタミンD欠乏食で4週間飼育したマウスをビタミンD欠乏マウスとしたとありますが、このモデルは他の研究で用いられたモデルなのでしょうか。マウスの作製方法において、先行研究を参考にしているならば参考文献の引用をお願いします。
2. P6. L14 投与量の設定において、設定理由等を論文中のどこかで説明したほうがよいのではないでし

ようか。たとえば人体への投与量に換算するなどの説明を加えると実験結果の解析が理解しやすくなると思います。

3. P7. L10 この時点でいきなり順化の内容が入ってきています。順化から採血検査に至までの流れおよび説明方法を検討してください。また、採血方法、採血量の記載がなく、サンプル調整の説明が不十分だと思われます。採血時期の設定理由についても追記していただくことをお勧めします。
4. 今回実施した行動評価(試験)において、どのような機能を反映する試験なのか[Methods]の箇所ですし説明を加えたほうが読者にとって理解しやすいのではないのでしょうか。逆に[Results]の部分では、シンプルに結果を記す形が良いと思われます。
5. [Methods]において、各試験の測定結果の再現性、精度を高めるために工夫された点があれば記載をお願いします。

<審査員#4>

<Major comments>

1. 2 頁の背景について、ビタミン D 物質そのものについての背景は記載されているが、運動協調機能、運動学習機能、筋機能について、ならびにこれらとビタミン D との関係についての記載は無く、背景が十分に説明されていない。4~5 頁の緒言ではこの点について触れられているものの、最小限に留まっている。これらの他にも、ビタミン D が筋肉に良好な作用を示す報告は一定程度存在している。ビタミン D の筋肉における作用についてより説明すると背景を理解し易いと思います。
2. 12~14 頁の考察について、動物実験とヒトから得られたデータ・知見とを行ったり戻ったりしながら考察しているが、説明の方向性を分かり易くすることが必要と思われる。

<Minor comments>

1. ビタミン D、ビタミン D2、ビタミン D3、ビタミン D 誘導体、25(OH)D3、 $1\alpha,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ 、ビタミン D 製剤など、ビタミン D を表す用語が多く使われているが、どの物質を示しているか判断し易く、また統一性などについて確認してほしい。化学名や一般名を書くなら全ての物質に統一性をもって記載することが望ましい。D2 や D3 の 2 や 3 を下付きにするか、付図説明の文章とも統一してほしい。
2. 2 頁 4 行目「・・・ビタミン D2 と D3 の効力は同じである (IU=0.025 μg)」には引用文献が必要
3. 4 頁 7 行目「無症候性」は何に対する無症候かはっきりしない。
4. 6 頁 3 行目「C57BL/6」は N か J か。
5. 6 頁 10 行目「MF 食」は何の略か。略語を使用する際は初出でフルスペルを示す。
6. 6 頁 10 行目「MF 食をベースにビタミン D を取り除いたビタミン D 欠乏食」の商品名またはカタログ番号があれば記載する。
7. 7 頁 1 行目「MCT oil」は何の略か。入手先も記載するのが望ましい。
8. 6~10 頁・材料および方法について、各試験法の詳述は後半にすることとして、はじめに経時的な実験の流れ(全体のスケジュール)を説明すると分かり易い。いつを”Week 0”としたか明示する。
9. 10 頁 10 行目「8.0 mg/dL に低下した」は比較対象のデータが示されていないので低下したかどうかは判断できない。ここでは「8.0 mg/dL 以下であった」等の記載が相応しい。
10. 10 頁 11 行目「実験開始時」について、この時点で既に欠乏食を投与しており実験は開始しているので、「ビタミン D 投与開始前(Week 0)」などのような表現の方が分かり易いのではないか。以下同様に修正を検討していただきたい。

11. 10 頁 14 行目「検出限界以下」について、検出限界以下となる値を記し、その後の統計解析で用いた値（検出限界以下となる値そのもの、もしくはその 1/2）を記す必要がある。図 2 の該当する棒グラフの位置に「ND」（ND: not detected）等と記すと分かり易い。
12. 10 頁 16-17 行目「測定で得られた 25(OH)D3 の一部が体内で産生されたものであることの確認のために血清 24,25(OH)2D3 濃度の測定も行なった」は、主旨が伝わりにくいため、分かり易い説明が必要です。
13. 10 頁 19-20 行目「各検体で 25(OH)D3 と 24,25(OH)2D3 濃度の増減は一致しており、それぞれが体内で産生された 24,25(OH)2D3 の測定値と考えられた」は、主旨が伝わりにくいため、分かり易い説明が必要です。
14. 13 頁 12 行目「筋量の増大に」は、単に「筋量に」もしくは「体積に」が望ましい。筋量は増大していないので。
15. 引用文献のスタイルを投稿規定に合わせる必要がある。出版日は多くの場合不要ことが多い。PMID は必要か。論文タイトルが欠けているものもあります。「*」は必要かなど。

上記について、申請者から令和 3 年 3 月 4 日に追加実験データとともに修正論文と指摘事項への回答書が提出された。同日審査委員は修正論文の内容についてメール審議を開始した。その結果、修正がまだ不十分であり、当該実験の限界点、誤植等々、改善の余地があることが指摘されたため、令和 3 年 3 月 8 日付で再度申請者に修正を求めた（下記は審査員からの指摘事項）。

<総評>

審査員からのコメントをお届けします。初稿からの修正と追加データにより改善がなされていますが、まだ十分に対応できていない箇所が指摘されています。特に審査員#2 (Major comments #4)からは、追加データから明らかになった重要なコメントが寄せられています（本論文の科学的意義に関わる limitation 記載）。また追加データによる 図版類に統一感がない（図1、Fig.1、Suppl Fig.1）ものになっているため、統一する方向で修正をお願いします。

以下の各審査員からのコメントを参照し、論文の修正をお願いします。尚、前回と同様にどこをどのように修正したのかが判るようにお願いします（初回修正の文字色は変えてください）。

<審査員#1>

修正論文は全て指摘事項について概ね納得できる対応がなされています。しかし、修正に伴う誤植や引用文献による補強が望ましい箇所がありますので、それらへの対応をお願いします。

<Major comments>

1. Page 18, line 8, 「8.0 mg/dL 以下」: 実験データが得られなかったことは理解しました。しかし、論文として、この値の解釈が抜けています。健常マウスの血清カルシウム値を引用文献でカバーしてください。特に動物種によって基準が異なりますので、(軽度?) 低カルシウム血症の範疇に入るのかどうか気になります。ここでは「8.0 mg/dL 以下」をビタミン D 欠乏マウスの基準(実験条件)とする案もあります。ご検討ください。
2. Page 19, line 17-19(前回の「Major comments #18」への回答): せっかく検定(P<0.01)を行っていますの

で、価値のあるデータと考えます。ここでは『(Dunnett 法での多重比較検定:P<0.01)』を「%の向上」の部分に加えることを推奨します。

3. Page 20, line 14, 「実験における誤差について」:このサブタイトルは好ましくありません。いかなる実験結果も誤差はつきものです。あえて言及する必要は全くありません(この論文の価値を下げています)。例えば、「マウスにおける行動評価系」とか「マウス行動評価系とその解釈」など、前向きなものをご検討ください。

<Minor comments>

1. Page 10, line 9: 「…た」→「…た。」句読点
2. 原稿全体(テキスト)に渡り「Supplymentary Fig」の誤植。→「Supplementary」(or 「Supplemental」):原稿全体の確認と修正をお願いします。
3. Page 16, lines 3 & 5: 図4、図5 「Beamwalking」→「Beam walking」(スペース)。こちらも原稿全体の確認と修正をお願いします。
4. Page 19, line 18:「Reteintion」→「Retention」
5. Page 21, line 10: 「³²⁾」→「³²⁾」
6. Page 33, line 20: 「Rtarod」→「Rotarod」
7. Supple Fig 1 & Fig 2: 図中の「緑色」のバー(green bar)が 2w でしょうか。図中の 1w と 2w の色表記が対応していません。修正をお願いします。

<審査員#2>

<Major comments>

1. 「方法」の記載方法について

実験動物、食餌の項でいきなり実験1、実験2と出てきます。実験の説明をしてない状況では理解できません。食餌以外の項目についても同様です。

- ① 共通項の説明
- ② 実験1とは？および実験1に関する方法
- ③ 実験2とは？および実験2に関する方法

の順に記載してください。上記の構成順序の問題はありますが、Rotarod、Beam walking などの説明を含む内容は適切に修正されています。

2. ビタミンDの図表について適切に作成されていますが、挿入部分を検討してください。
3. タイムスケジュールについての記載は適切にされています。
4. ビタミンDの投与量が通常食で 0.34 nmol/day であるのに対して、実験で与えた量が 0.65 nmol、6.5 nmol、65 nmol と極端に多い印象です。選考論文など妥当性を担保するものはないのでしょうか？ 実験2で実際に 6.5 nmol、65 nmol 投与したマウスでは、通常食マウスの値(Supple Fig 2)をはるかに超えており、正常に近づくというよりは高ビタミンD血症の状態になっています。生理的意義がない状態での検討になっていますので、これらマウスの実験結果を解釈するにははっきりと limitation として記載する必要があります。またページ数の制限があるわけではないので Supple Figure でなく通常の Figure として組み込んだ上で、構成を見直して下さい。
5. Rotarod、Beam walking の妥当性については、文献引用をしたので修正されたものと判断します。
6. 疲労度について、追加記載がなされたので修正されたものと判断します。

7. 高齢者に関する記載が削除されたので修正されたものと判断します。

<Minor comments>

1. 文献リストについて、著者名の体裁が統一されていません。PubMed 表記に準じたものにしてください。
例えば、文献3では「Al-Amin MM, Sullivan RKP, Kurniawan ND, Burne THJ」になると思います。
2. 適切に修正されています。
3. 適切に修正されています。

<審査員#3>

<Major comments>

1. P2. 「背景」について

本研究ではビタミンD欠乏状態が高齢者における転倒・骨折の発生に影響を与える因子であり、それらに対するビタミンD補給の有効性を検討することが主な目的になると思います。そのため、その病態の説明としては、本研究で取り上げられている各運動機能や筋力、筋量の維持などの関連性をメインに説明されたほうが、本研究の目的が理解しやすいと思われます。

2. P4-6. 「緒言」について

P2. の「背景」の内容と同様に、本論文の主な検討内容は、「ビタミンD欠乏状態の病態におけるビタミンD補給の有効性について」ということだと思います。そのため、このセクションにおいては、ビタミンD欠乏状態における病態の特徴や問題点、そして、ヒトを対象とした先行研究から得られている知見(ビタミンD補給による骨折予防や転倒リスクの減少に対する効果など)について紹介を行い、さらに、それらを動物実験に置き換えた際の先行研究の内容や現在までの Limitationなどを述べた上で、本研究ではどのような実験モデル(ビタミンD欠乏モデルとしての特徴)を使い、どのような評価方法(運動協調機能、運動学習機能、筋機能(各評価法の簡単な説明あるいは意味付けなどが必要と思われます))を用いてビタミンD補充療法の有用性について検証を行うのか、本研究の目的について読者にわかりやすいように、論理的に記述される必要があると思われます。

今回の「緒言」では、筋量、運動機能、運動学習機能および神経学的知見について記述が追加されていますが、論点が不明瞭となっている印象を受けます。指導教員とよく相談されたうえで、修正を加えていただくことをお勧めします。

<Minor comments>

1. 文献の引用について

同一箇所に複数文献を引用する場合は、「(3) 18) 19) ←P7. L3」と記載するのではなく、一般的に3, 18, 19)と表記すると思われます。また、(17) 18) 19)などは17-19)です。22.)のピリオドは不要です。

さらに、引用文献の著者名の表記が統一化されていないようです。PubMed等の記載を参考に修正されることをお勧めします。

2. 作業の模式図内における書体(フォント)は、テキストと同様の書体にするのが良いと思われます。

<審査員#4>

指摘点に対して対応はされているものの、以下の点で十分でないと考えます。また、返答に書かれている内容が本文・図表では反映されていない箇所も見受けられます。

1. D2 や D3 の 2 や 3 の下付きに関して、付図説明の文章では修正・統一されていません。
2. MCT oil の略として「Midium Chain Trilcerides」と記載されていますが、「Medium Chain Triglycerides」

のことでしょうか。

- Fig. 2 の検出限界以下である値の取扱いについて、「検出限界が明確に数字で表現できない」とのことですが、値が無いものとの比較をどうやって統計検定したのかの説明が必要です。また、図 2 の該当する棒グラフの位置に ND 等は示されておらず、返答と一致していません。
- 18 頁 19 行目「測定で得られた 25(OH)D₃がすべて体内で産生されたものであることの確認のために」の部分の趣旨が理解しにくいです。何が懸念されることなのか、もしくは何の可能性を否定するために行っているのかを直接明記(追記)することをお勧めします。
- 引用文献のスタイルが統一されていません。投稿規程に沿うよう注意深く再度確認して下さい。

上記について、申請者から令和 3 年 3 月 11 日に修正論文と指摘事項への回答書が提出された。同日に提出内容についてメール審議を開始したが、論文修正に伴う不備や誤植が目立っていた。受理には抵抗があるとして、令和 3 年 3 月 13 日付で再々度申請者に修正を求めた(下記は審査員からの指摘事項)。

<総評>

再修正により改善が見られていますが、審査員からの指摘に対応して修正された箇所に関連して、未修正・誤植が多く見受けられています。修正・訂正をお願い致します。また前回指摘された点として図版類の統一がありましたが、論文全体の流れやバランスにも配慮をお願いします。審査員1-3 の意見にあります。図版類の体裁は投稿論文でも整然と並べるべき点ですので、意見を参照して統一を図ってください。また審査員#2 は当該論文の位置付けにかかわる重要な意見を述べていますので、然るべき修正・対応をお願い致します。

<審査員#1>

- 修正論文は全て指摘事項について概ね納得できる対応がなされています。しかし、修正に伴う誤植や未修正部分が多く混在していますので、テキスト全体に渡り修正をお願いします(悪目立ち)。特に Fig1 から Fig6 部分は「図」から「Fig」への修正に伴う変更がテキスト内に残ったまま、対応していません(「材料および方法」のセクション:未修正箇所が多すぎます)。また Fig7 以降を独立させている構図になっていますが、Fig1-6 にならってテキスト内に統一するのか、Fig7 以降に合わせて独立させるのか、どちらかに体裁を整えてください。後者に揃えて独立させる場合は Fig1-6 の説明文にも配慮してください(簡潔に記載)。

<審査員#2>

*当該審査員からのコメントは前回からの審査評に基づいています。

<Major comments>

#1と2については適切に修正されていると考えます。

#4:limitation についての記載ですが、0.65 nmol、6.5 nmol の投与は正常目的値に近い濃度であることは分かりやすくなったと思います。ただ逆に言えば、生理的意義は乏しいことの記載がありますが、「65 nmol が必要量のオーダーを超えての過剰投与」ということが目立たなくなっていますので、明記すべきと考えます。後々の研究者がこのオーダーの投与をしないようにするために重要です。

また高用量となっていることは実験1, 2を比較すれば十分にわかることですので、無理にヒトの研究結果(文献 36)を引用する必要はありません。本学位論文の中の考察では、行った実験に沿って、極力マウ

スに限った内容に絞るべきと考えます。

Suppl Fig を通常の Fig に昇格したのですから、出てくる順番にそってナンバー付けを入れかえてください。Fig11 からナンバーを付けるのはおかしいです。具体的には p19、5 行目で Fig7A、Fig11B と出てきますが、一般的には図表を並べるので Fig.7、Fig.8 の対応になるかと思えます。以下、すべてを適切に修正してください。

<Minor comments>

#8 概ね適切に修正されていますが、誤字脱字が多いです。修正してください。

- ・文献 7: 厚労省の英語表記で la-bour とハイフンが入っています。
- ・文献 17: 雑誌名は Allegol Int だと思います。
- ・文献 19: 論文名は Clinical utility…です。
- ・文献 21: 論文名は… coordination…です。
- ・文献 24: 同じく coordination のスペルが違います。
- ・文献 25: 著者名で Takamatsu です。
- ・文献 26: 論文名は In search…です。
- ・文献 31: 論文名をすべて大文字表記にしなくて結構です。また falling の前のスペースが2つになっています。
- ・文献 35: 著者名と論文名の間スペースが入っていません。

<審査員#3>

- 1) 図版類は、図なら表、Figure なら Table を用いた方が論文の体裁がより整う気がします。
- 2) 細かい指摘で申し訳ありませんが、句読点は「、および。」でよろしいのでしょうか。一般的には「、および。」が用いられていますので、最後に投稿規定を確認されることをお勧めします。
- 3) P4. L14 「20ng/mL 以下 30ng/mL 未満」は、「20ng/mL 以上 30ng/mL 未満」ではないでしょうか。
- 4) P5. L2 「と知られている^{9,10)}が、」は、「と知られているが^{9,10)}、」で良いと思われます。
- 5) P5. L14 および L16 著者名「Al-Amin MMら」は「Al-Amin ら」、「Seldeen LKら」は「Seldeen ら」と表記するのが正しいと思われます。
- 6) P10. L3 「試験溶液の作成」の「作成」は「作製」あるいは「調製」が良いのではないのでしょうか。他にも「作成」の表現が用いられています。
- 7) P15-18 テキスト内の(図*)の表記と実際の Fig 表示が統一化されていないようです。
- 8) Fig.7-9 において、記載文字と数値が重なって見にくい箇所があります。
- 9) P20. L3 (Fig.11B)は(Fig.12B)ではないのでしょうか。

令和 3 年 3 月 15 日に 3 回目の査読結果を反映した修正 thesis 論文が提出された。再び主査・副査全員による迅速メール審議を行った。その結果、全ての項目について誠意を持って適切に対応されていることが確認された。当該 thesis 論文は、ビタミン D 欠乏状態から、その補充が運動学習機能に影響しうること、及びその限界を記載している点を評価した。また申請者の学力、研究能力、態度及び人格等を総合的に評価し、本審査委員会は、全員一致で、令和 3 年 3 月 15 日付で当該提出論文を適格と判断した。