

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 433 号		学位申請者	養毛 博文
審査委員	主査	橋口 照人	学位	博士 (医学・歯学・学術)
	副査	垣花 泰之	副査	原 博満
	副査	谷本 昭英	副査	浅川 明弘
<p>主査および副査の5名は、平成29年7月18日、学位申請者 養毛 博文 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。</p> <p>質問1) ヒトの敗血症では人種差の原因としてTLR4の遺伝子多型が問題となっているが、ヒトとサルの間でもそのような問題はあるか。 (回答) サルにおいてもLPSに反応しない個体が存在し、おそらくTLR4の遺伝子多型がサルにおいても存在し個体差につながっていると考えている。</p> <p>質問2) ヒトの敗血症では臓器障害を伴うが、今回のサルモデルではどの臓器が障害されていたか。 (回答) ALT やクレアチニンの上昇がみられており、肝臓や腎臓に何らかの障害があったと考えられるが、病理組織学的検査で検出できるような臓器障害はみられなかった。</p> <p>質問3) 今回のモデルにおける血圧や乳酸はどのような結果であったか。 (回答) 心拍数は投与中上昇していたが血圧に変化はなく、乳酸は測定していない。</p> <p>質問4) 血小板減少の原因を好中球との複合体形成と考察しているが、ヒトではNeutrophil extracellular traps (NETs) という現象がみられる。サルにおいても同様の現象が起こっているのか。 (回答) 血小板、好中球、単球が減少しており、サルにおいてもNETsの現象が起こっていると考えているが、実験的に証明はしていない。</p> <p>質問5) 病理組織学的検査でみられた血管拡張の原因を血管内皮細胞の障害と考察しているが、一般的に障害の初期段階ではNOが産生され血管拡張が起こるが、障害が進むと血管が収縮し臓器障害へと進む。今回の実験結果はどのように考察しているか。 (回答) 今回の実験で作製したモデルは血管内皮細胞の初期段階を観察したのみであり、臓器障害まで進んでいない軽度なモデルであったと考察している。そのため、初期段階の血管拡張が病理像でみられたと推察している。</p> <p>質問6) リコンビナントトロンボモジュリン (rhTM) の併用投与によりPlasminogen activator inhibitor-1 (PAI-1) の上昇抑制がみられなかった原因は何か。 (回答) rhTMの作用は、炎症性サイトカインによるPAI-1の誘導抑制ではなく、不活化する作用であると考えており今回の実験では、炎症性サイトカインによる誘導を抑制できなかったと考えている。</p> <p>質問7) いくつかの用語で初出時に略称が記載されていなかった。また、10^1 が 10^{-1} となっている記載があった。 (回答) ご指摘いただいた通りであり、今後同様の誤りがないよう注意する所存である。</p> <p>質問8) rhTM以外の血栓領域の薬剤もラットに効かないのか。 (回答) 本研究の中では他の薬剤については検証していない。しかしながら、Karlら (Thromb J.; 6:16, 2008) の報告では、ラット動脈血栓モデルにAPCを投与したが抗凝固作用はみられておらず、rhTM以外でも同様な現象は報告されている。</p> <p>質問9) 齧長類とげっ歯類で交差性の問題で薬効を示さない報告は他にもあるのか。 (回答) 血栓領域の薬剤に限らず新薬開発において抗体医薬やタンパク製剤の開発が増えている中で、げっ歯類に交差しないため齧長類を使用しなければならないケースは増えてきている。</p> <p>質問10) 凝固系に種差はあるのか。 (回答) プロトロンビン時間はヒトでは性差・個人差はほとんどないがラットでは明確な性差があり、ラットの雄では倍以上の個体差がある。また、イヌのプロトロンビン時間、活性化部分トロンボプラスチン時間はヒトよりも短く、サルのデータはヒトに近い。</p> <p>質問11) Fig. 2の結果でラットのPBMCはほとんどLPSに反応していないのか。 (回答) 反応はしており、ラットで誘導されたTNF-αのレベルは他論文と大きな差はない。しかしながら、TNF-αの誘導レベルがサルやヒトと比べると極端に低いためFig. 2では反応していないように見えている。</p> <p>質問12) In vitroの実験結果で、敗血症患者の血中LPS濃度付近では、ヒトとサルの反応性は同様であったが、今回のIn vivoの実験におけるサルの血中LPS濃度はどの程度であったか。 (回答) サルの血中LPS濃度は測定していない。投与量を考えるとそこまで敗血症患者と大きな乖離はないと考えている。</p> <p>質問13) サルのLPSに対する反応性が良いため、今回のモデルにおけるLPS投与量は多すぎたのではないのか。今回、反応性の良いLPSを使用してモデル作製を行っているが、むしろ反応性の低いLPSを使用した方がモデルコントロールしやすかったのではないのか。 (回答) ご指摘いただいた可能性はあると考えるが、今後検討したい。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 1 4) 今後サルモデルを使用して実験しなければならないのか。動物種の使い分けはどうか。

(回答) 必ずしもサルを使用する必要はなく、評価対象物質の交差性を事前に確認し、反応する動物種を選択すべきである。

質問 1 5) DIC の基礎疾患として大動脈瘤を挙げているが本当か。

(回答) 中村ら (日心外会誌 41 巻 3 号, 2012) の報告や大動脈瘤・大動脈解離診断ガイドライン (2011 年改訂版) においても大動脈瘤で DIC が発症すると記載されている。大動脈解離の偽腔内で大量の血栓が形成された場合に生じることが多いと記載されている。

質問 1 6) 肝臓の病理組織学的検査で Brown pigment が類洞内にみられたと報告されているが所見名は Brown pigment で問題ないか。

(回答) Eosinophilic material と記載すべきであった。

質問 1 7) 免疫染色によるフィブリン血栓の同定は行ったか。

(回答) 本実験では行っていない。

質問 1 8) なぜ肝臓、腎臓、肺のみしか病理組織学的検査を行っていないのか。

(回答) ラットの報告に合わせて肝臓と腎臓の検査を実施した。また、肺は毛細血管が多いためフィブリン血栓がみられる可能性があったので実施した。サルモデルの有意性を評価するためには全臓器検証すべきであった。

質問 1 9) LPS 投与後、単球の減少がみられており、その原因は LPS を処理するためと考察しているが、処理した単球はどうなるのか。

(回答) LPS と複合体を形成し、脾臓にトラップされる。

質問 2 0) 脾臓の臓器重量は増えていなかったか。

(回答) 本実験では増えていなかった。

質問 2 1) LPS のロット間差の原因は何か。

(回答) LPS は一定以上の活性を持つ事が出荷時の規格となっているが、活性値の基準に上限はなく、一定の範囲に制御されていないため、ロット間差の原因となっていると考えている。

質問 2 2) ヒトの血液を使用しているが、同意書は得ているのか。

(回答) 同意書を得て実験を行っている。

質問 2 3) LPS の投与開始時間はおおよそ決めて行ったのか。

(回答) ほとんど同時刻に投与開始している。

質問 2 4) 投与時間を 2 時間に設定した根拠は何か。

(回答) 事前検討で bolus 投与を行っており、顕著な変化が認められなかったため、投与時間を延長し、各マーカーの変化があった 2 時間を投与時間に設定した。

質問 2 5) 臨床を想定した際に、LPS 投与を最終採血の 8 時間まで継続するというのは難しいのか。

(回答) LPS を 5 mg/kg 投与すると動物は死亡してしまうため、もう少し低濃度の LPS を 8 時間かけて投与すれば、より重篤なモデルを作製できるかもしれない。

質問 2 6) なぜ LPS と rhTM を同時投与したのか。

(回答) 事前検討で LPS 投与後に rhTM を投与したが、rhTM による改善効果がみられなかった。LPS 投与後は既に凝固カスケードは活性化された状態にあり、その時点では rhTM を投与しても改善効果が確認できなかったと推察している。また、他の報告でも LPS 誘発 DIC モデルでは併用投与を行っており、LPS によるモデル作成後の rhTM 投与による薬効評価は難しいと考えている。これらの結果は、臨床において早期に rhTM を投与しなければ治療効果が低いという報告と関連していると考えている。

質問 2 7) rhTM 投与群では、LPS と rhTM をそれぞれ異なる腕から投与しているが、対照群においても両腕から媒体投与を行っているか。

(回答) 対照群では片腕からしか投与を行っていない。

質問 2 8) 投与開始後 8 時間に臓器採取を行っているがその時間の根拠は何か。

(回答) 事前検討で 24 時間に採取を行っているが病理組織学的に変化がなかった。そのため、8 時間に短縮し採取を行った。

質問 2 9) IL-6 も優先順位の高いサイトカインだと考えられる。IL-1 β を選択した理由は何か。

(回答) TNF- α と IL-1 β が LPS 誘発 DIC モデル作製のトリガーになっているという報告が多数あるため、測定項目として選択した。

質問 3 0) ラットが 11 週齢と若い結果に影響はしないか。また、11 週齢を選択した根拠は何か。

(回答) 11 週齢を使用したのは入手しやすいからであり、今回の実験結果では顕著な変化がみられているため、週齢による影響で評価が変わるようなことはないと考えている。

質問 3 1) サルの rhTM への反応性をみると、rhTM の投与量をより低くしても薬効は評価できるのではないか。

(回答) ご指摘の可能性はあると考える。

質問 3 2) 本モデルでは出血傾向はなかったか？

(回答) 出血傾向はなかった。

質問 3 3) rhTM 以外にヘパリン等の薬剤を使用して薬効評価は考えていないのか。

(回答) 今後、他の薬剤についても検討する予定である。

質問 3 4) rhTM はどこに存在しているトロンビンに対して抗凝固活性を示すのか。

(回答) 循環血中を循環しているトロンビンと血栓形成部位のトロンビンに対して抗凝固活性を示していると考えている。

以上の結果から、5名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者としての学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学博士) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。