

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 460 号		学位申請者	関島 光裕
審査委員	主査	小賤 健一郎	学位	博士 (医学 歯学・学術)
	副査	宮田 篤郎	副査	中川 昌之
	副査	田川 義晃	副査	堀内 正久

主査および副査の5名は、平成30年2月22日、学位申請者 関島光裕 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。

質問1) 実験群を雌に限定した理由は何か？雄を使用した場合と相違はあるか？

(回答) ミニプタを用いたこれまでの我々の実験で、統計学的には未検討であるが雌雄差は認めていない。本研究では背景の統一、および雄では解剖学的に陰茎と創部の位置が近く感染が懸念されることを考慮して雌を用いた。

質問2) 120分虚血再灌流障害モデル (ischemia-reperfusion injury: IRI) に先行研究はあるのか？

(回答) ミニプタを用いた腎 IRI モデル確立に際し、まず90分温虚血による腎障害を評価したところ、術後2日をピークとする軽度クレアチニン (Cr) 上昇 (3.8 mg/dl) を認めた。我々の研究室における腎 IRI 抑制実験は、深刻なドナー不足を克服するために、非常に厳しい条件に置かれた高度温虚血ドナー腎臓の使用を可能にすることが最終目的であるため、ドナーの死戦期 (高度低血圧による臓器血流不全) までをも考慮にいたした腎臓温虚血として、腎臓の温虚血時間120分に延長した評価系に展開した。この結果、本研究に先立つ120分温虚血腎臓 IRI 実験では、再灌流3日目の Cr が 9.2 ± 0.9 mg/dl と極めて高値であった。これは本研究の Group 1 (対照群) 9.5 ± 1.1 mg/dl と同程度の上昇であると同時に、先行報告と本研究の病理組織像や血清サイトカインは同様に推移していることから、120分温虚血モデルが、可逆的でありながらも極めて重篤な腎障害を呈する有用な腎 IRI モデルであると考えられる。

質問3) H₂S の効果として血管拡張作用を挙げているが、その他の血管拡張作用を有する薬剤でも効果はあるか？

(回答) 腎臓では未検討であるものの、我々の研究室では、ある種の強い血管拡張作用を有する薬剤が、肺での IRI 抑制効果を得ることを示している。しかしこの薬剤は全身投与での血圧低下作用が強いことから、今後、我々の研究室で新たに開発した「摘出腎臓を体外で血液灌流し腎機能評価を行う手法」を用いて、この強い血管拡張作用を有する薬剤と H₂S の各々の腎臓 IRI 抑制効果を比較検討することによって、血管拡張作用による腎臓 IRI 抑制効果を明らかにするとともに、H₂S の作用機序としての血管拡張作用の関与について明確にしたい。

質問4) 右腎摘出モデルを採用した理由は何か？

(回答) 本研究では虚血を受けた腎臓単独で、再灌流後の機能評価を行うことを可能とするため、対側の正常腎臓は摘出した。また左腎を用いた理由として、本研究は高度温虚血腎を用いた移植実験への発展を視野に入れており、臨床生体腎移植の多くの症例でドナー左腎を移植する点を考慮に入れて、左腎虚血 (右腎摘出) モデルとした。

質問5) 血清クレアチニン (Cr) 値以外の評価項目について

(回答) これまでの我々の腎移植や IRI 実験で、血清 Cr 推移と病理学的な病態が極めてよく相関するという結果を得ており、本研究では正確な採尿が困難なため、尿検査は行わず、血清 Cr 値を腎障害の指標として用いた。血清 Cr 値以外の指標としては、尿中 NAG、尿蛋白、糸球体濾過率、Cr クリアランス、腎動脈血流などが挙げられるが、新たに我々が開発した「摘出腎臓を体外で血液灌流し腎機能評価を行う手法」では、これらの経時的評価が可能であることを preliminary data として得ており、今後この手法を用いた発展研究の際、評価項目に加える方針である。

質問6) H₂S による起こりうる副作用について

(回答) 副作用として粘膜刺激、めまい、痙攣、呼吸抑制、血圧低下が挙げられる。本研究で用いた投与経路 2.2 mg/kg は文献上の 50%致死量 35.1 mg/kg (マウス) に対し低用量であり、H₂S 投与による副作用は認めなかった。

最終試験の結果の要旨

460

質問 7) H₂S の供与体として硫化ナトリウム (Na₂S) を使用した理由は何か？

(回答) 既に in vitro や小動物実験で H₂S 供与体として広く Na₂S が用いられていること、また Na₂S は水溶性であり一定の投与量や速度で全身あるいは臓器へ薬剤投与を行いやすいことから、供与体である Na₂S 投与を選択した。

質問 8) 本研究では糸球体病変は生じないのか？

(回答) 腎臓 IRI に伴う病理学的変化は一般に尿細管障害を主体として生じ、本研究での 120 分温虚血による腎 IRI モデルでも糸球体所見は乏しいことを、日本医科大学解析人体病理学教室・清水章教授の指導のもとに確認した。

質問 9) TUNEL 陽性細胞、PCNA 陽性細胞の定量的評価は行ったか？

(回答) 本研究では盲検的に日本医科大学清水教授に TUNEL 染色、PCNA 染色に関する病理診断を依頼した結果をもとに論文記載し、高い信頼度を有するものとする。しかし、より客観性を高めるという観点から、今後同様の検討を行う際には定量的評価を加えたい。

質問 10) 空胞変性細胞と TUNEL 陽性細胞、PCNA 陽性細胞の分布について

(回答) 腎 IRI の主な組織変化は近位尿細管上皮に起こり、上皮細胞の変性から壊死に進展し、その過程で壊死領域にアポトーシス細胞の出現と上皮再生を認める。本研究の術後 2 日目の生検組織においても尿細管上皮細胞の空胞変性、TUNEL 陽性アポトーシス細胞、PCNA 陽性再生細胞の分布はほぼ同一領域に認められている。

質問 11) 検討したサイトカインは評価項目として十分か？

(回答) 本研究では、これまでのミニブタ肺/腎臓等の実験を通じて当研究室で測定手法が確立し、かつ血清での推移や組織での mRNA 発現に関する経時的な動態について多くのデータを得ている炎症性サイトカインとして IL-1β、IL-6、TNF-α および HMGB1 に焦点を当てて評価を行った。今後の発展研究においては抗炎症性サイトカインやケモカインなどについても評価を加えることで更に詳細な機序解明につなげたい。

質問 12) サイトカイン産生に関する統計処理について

(回答) 異なる投与法を用いた H₂S 投与 2 群間での血清・組織中のサイトカイン産生比較 (Group 2 vs. Group 3) については、ANOVA 解析を用いて統計処理を行った。

質問 13) 冷虚血 (保存) に対する H₂S 投与の効果について

(回答) 本研究では、ドナー死戦期までも考慮にいれた 120 分間腎温虚血を想定し、血流再開直後から生ずる腎 IRI に対して、血液再灌流前後に H₂S を投与することの有効性を示している。冷虚血が加わっても血液の再灌流時に生ずる IRI に対して、抗炎症や抗アポトーシス効果に基づく再灌流時の H₂S 投与の有効性は十分に期待する。今後、本研究の発展研究と位置付ける「高度温虚血障害腎を用いた移植成績の改善を目指す前臨床移植実験」では、移植前に冷保存時間を設定した群での H₂S 投与効果の評価を行い、冷虚血に対する H₂S の効果を明確にしたい。

質問 14) Na₂S の代謝経路と IRI に伴う内因性 H₂S の動態について

(回答) Na₂S は血中投与時の pH 変化により速やかに H₂S に代謝され効果を発揮すると考えられ、産生された H₂S の血中半減期は数秒から 150 秒前後と報告される。一方、生体内で種々のシグナル情報伝達に関与する内因性 H₂S であるが、腎 IRI の際に内因性 H₂S 産生が亢進し細胞保護を示しうるかは明らかにされていない。H₂S 濃度は、遊離 H₂S に加え、細胞内硫黄プールとして貯蔵される H₂S (酸不安定型硫黄と結合型硫黄) に依存するが、即時的に血中や組織で H₂S 濃度を検出するだけの安定した濃度測定法が現時点では確立していないことが生体内での H₂S 動態解明を困難にする一因と考えられており、今後、濃度測定法の開発・改良に伴う H₂S の動態解明が期待される。

質問 15) 全身投与と臓器選択的投与の効果発現の相違は局所に到達する H₂S の量の違いを反映しているのでは？

(回答) 現時点では組織や血中 H₂S 濃度測定方法は確立しておらず、投与法の違いがどの程度 H₂S の局所濃度に反映され、治療効果に関与するのかを直接検討することは困難である。しかし本研究で得た最も重要な点は、全身投与での投与量増量により IRI 抑制効果の増強をはかるという副作用が懸念される方法ではなく、より安全性が高い局所投与法によって至適投与濃度や量の検討を行うことの意義を示した点にあると考える。今後「摘出腎臓を体外で血液灌流し腎機能評価を行う手法」を用い、研究を進展させ、腎移植に最適な投与法の確立につなげたい。

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) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。