

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 498 号	学位申請者	横山 弥生
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	堀内 正久	副査 石塚 賢治
	副査	宮田 篤郎	副査 松永 明

主査および副査の 5 名は、平成 31 年 2 月 7 日、学位申請者 横山弥生君に面接し、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) 多重比較に Shirley-Williams 検定を用いているのはなぜか。

(回答) DIC スコアや不全臓器数ごとのヒストン H3 値を比較する際に用いた。ノンパラメトリックな手法で各群に順序と方向性があり、用量相関性を検討するためこの方法を用いた。

質問 2) ヒストン H3 の血中での存在様式は、Full length なのか、分解されたものか、また分子量はいくらか。

(回答) ヒストン H3 の分子量 15.3 kDa である。ヒストン H3 の N 末端側を認識する抗体と C 末端側を認識する抗体を用いて検出しているため、分解されていない full-length のものを測定していると考えられる。H4、H2A、H2B、DNA などと複合体を形成しているか、H3 単体かは不明である。

質問 3) cell-free DNA は SYTOX Green で測定しているが、1 本鎖 DNA、2 本鎖 DNA を区別して測定しているのか。

(回答) SYTOX Green は、1 本鎖、2 本鎖 DNA を区別なく測定している。

質問 4) 今回の研究では、多変量解析をしたのか。

(回答) 今回の研究では、単変量解析のみを行った。N 数が少ないため症例を増やし、今後の研究で独立因子の検討を多変量解析で行いたい。

質問 5) ヒストン H3 ノックアウトマウスの表現形は何か。

(回答) 胎生致死である。

質問 6) ヒストン H3 を測定するにあたり、残余検体はどのように保存されているのか。ヒストン、cell-free DNA の安定性は大丈夫なのか。

(回答) 朝 6 時頃に採血した検体は、検査部で検査された後、4℃の冷蔵庫に保管されている。この残余検体を回収し、匿名化した後、採血後 6 時間以内に -80℃のフリーザーに移している。ヒストンや cell-free DNA の安定性は不明だが、予備検討で新鮮な検体と残余検体とで測定値に大きな差はなかった。

質問 7) 同一患者での敗血症になる前、治療や治療後の経過を検討しているのか。

(回答) 今回は解析していないので今後の課題である。

質問 8) ヒストン、cell-free DNA の両方を測定する必要があるのか。どちらを測定する方がより良いのか。

(回答) ヒストンは細胞傷害や臓器不全を引き起こすことが分かっている。cell-free DNA も damage-associated molecular patterns (DAMPs) として、細胞外に放出される。今回のデータでは、予後予測という観点ではヒストンの方が優れていたが、ヒストンと cell-free DNA とでは病態に及ぼす影響は異なるので、状況に応じて測定項目を選択する必要があると考える。今後の研究が必要である。

最終試験の結果の要旨

質問 9) ヒストンと cell-free DNA の血中濃度に相関があるのか。

(回答) Pearson の解析で相関係数 $r = 0.942$ 、Spearman の解析で $r = 0.739$ と相関を認め、ヒストンと cell-free DNA は同じ状況で放出される可能性が考えられる。

質問 10) 敗血症の背景にある合併症や基礎疾患の有無はヒストン濃度に影響しているのか。

(回答) 今回は、疾患、合併症別で個別にヒストン濃度を解析していない。今後の課題である。

質問 11) MOF の進行とともに、ヒストンが放出されるのか。ヒストン濃度が高いことで、MOF が進行するのか。

(回答) 今回、臓器不全の数が多いと、ヒストン H3 濃度も高値を示していた。ヒストン H3、H4 は、細胞傷害活性を示すため、細胞傷害性ヒストンの存在が、MOF の進行に寄与すると考えているが、MOF の結果としてヒストン H3 濃度が高くなっている可能性も否定できない。

質問 12) ヒストンは血栓形成を介して臓器障害を引き起こすのか、直接的に細胞傷害性を示すのか。

(回答) 血栓形成を介して臓器障害を引き起こすことも報告されているが、直接的に細胞傷害性を示すことも報告されている。直接的に細胞を傷害する機序として、細胞膜を傷害することが報告されている。

質問 13) ヒストンの測定値 (Fig. 2) でばらつきが大きく、腎不全がなくても、ヒストンの測定値が高いのは、なぜか。

(回答) 腎不全なし群の中に、凝固不全ありや循環不全ありの症例が入っていて、その影響を受けていると考えられる。また、Sequential Organ Failure Assessment (SOFA) スコアで腎不全を評価することの限界があるかもしれない。

質問 14) 治療後にヒストン濃度が低下するのか。治療反応性など反映するのか。

(回答) ICU 入室後、治療を介入し、治療の影響でヒストンが低下すると考えられるが、今回、治療による反応性などの検討はしていない。今後の研究課題である。

質問 15) CRP が予後予測に役に立たないのはなぜか。

(回答) CRP は、様々な疾患で上昇するため、感染症を示唆しているわけではないと考える。CRP の経時的な変動を追うことは、治療の指標となる可能性はあるが、今回の敗血症の患者では、ステロイドの使用を多く認め、疾患重症度に関わらず CRP が低下している可能性があり、評価に使用できないと考えた。

質問 16) 動脈血と静脈血でヒストン濃度に差があるか。肺で filtration されるか。

(回答) 今回の残余検体には、動脈、静脈で採血された検体が混在している。動脈血、静脈血のヒストン濃度に差はないと考えるが、詳細な検討は行っていない。

質問 17) 実験的にマウスの尾状脈より、ヒストンを投与すると、1 時間以内に死亡するのか。

(回答) ヒストン濃度に応じ、高容量を投与すると、容量依存性に死亡時間も早くなる。

質問 18) 呼吸不全の有無に分けているが、それぞれの群で凝固不全の有無は、どうなっているか。

(回答) 臓器ごとに個別に検定をかけており、呼吸不全がある群にもない群にも、凝固不全を合併した症例と合併していない症例が含まれている。

質問 19) Sepsis に対する循環ヒストン値の特異性とは何か。

(回答) ヒストンが感染以外でも上昇する可能性を意味する。

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) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。