

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 499 号		学位申請者	阿部 正治
審査委員	主査	柴田 昌宏	学位	博士 (医学)
	副査	宮田 篤郎	副査	浅川 明弘
	副査	田川 義晃	副査	柏谷 英樹

主査および副査の5名は、平成31年2月5日、学位申請者 阿部正治 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) 留置したくも膜下腔カテーテルはどれぐらいの期間実験に使用できるか。

(回答) 研究中に確認できたのは21日間ですが、実験終了後の剖検時に回収したカテーテル内部の閉塞やカテーテル先端の位置のずれはなかったことから、1か月以上の長期実験が可能と考えます。

質問2) 留置するのにかかる時間はどれくらいか。

(回答) 術者の技量にもよりますが、慣れていれば30分間程度です。

質問3) 穿刺を行う場所は、外からみて判断する目印があるか。

(回答) 腰椎棘突起が触診で判断でき目印となり、その部位より2横指程度尾側から穿刺が行えます。

質問4) 本法では1mL程度のCSFを採取したと報告しているが、何mLまで採取可能か。

(回答) 自然滴下での採取の為、採取量が増えると時間はかかりますが、2mL程度までは滴下速度が遅くなるのが無かったため採取可能と考えます。また獣医神経病学会のガイドラインでは0.2mL/kg未満を推奨しています。

質問5) ヒトでは脳脊髄液漏出症が報告されているが、ブタではCSF採取による副作用は認めなかったか。

(回答) 今回、CSF採取時に採血も同時に行ったため、CSF採取のみの副作用は不明ですが、CSF採取および採血後に活動性低下などの明らかな一般状態の悪化はありませんでした。

質問6) 血漿中メラトニンが朝9時の時点で高いが、既報との検討でどう解釈しているか。

(回答) 一般的には夜間にメラトニンのピークを認めますが、点灯2時間後の採血のため、暗期の内に分泌されたメラトニンが血中に残存していた可能性があると考えます。

質問7) 本法を睡眠や認知症、慢性疲労症候群の研究に利用する場合、測定する物質は何か。また、その際に本法を用いる場合にさらに改善する点はあるか。

(回答) 睡眠はアデノシン、認知症はアミロイドβ、慢性疲労症候群ではTGF-βなどがCSF中の関連物質として報告されています。本法の利用には、カテーテルの長期開存性や生体適合性に関して詳細な検討が必要と考えます。

質問8) 一般的にマイクロミニピッグの寿命は、どの程度か。

(回答) マイクロミニピッグの寿命に関する報告はありませんが、12歳時点で生存している個体を確認できています。

質問9) 本試験に用いた2歳齢の個体はヒトの寿命に換算すると、何歳ぐらいに相当するか。

(回答) 寿命から単純に計算すると10歳程度に相当しますが、性成熟が6ヶ月程度であり、4歳齢ぐらいまで繁殖に用いられること、成長曲線は18ヶ月でプラトーになることを考慮すると、青年期に相当すると考えています。

質問10) 雌を実験に用いているが、性周期がメラトニンの実験結果に影響した可能性はないか。

(回答) ヒトにおいて、性周期とメラトニン濃度については一定の見解が得られていません。CSF中のメラトニン濃度を評価できる本モデルにおいて、将来的に検討できればと考えています。

最終試験の結果の要旨

質問 11) ミニブタの実験では 1 日 1 回の給餌法は一般的な方法か、また食べ終わるまでの時間は。

(回答) ミニブタの動物実験においては一般的な給餌法です。いずれの個体も 10 分以内に完食します。

質問 12) day 21 における CSF の測定結果は、既報の正常な CSF の結果とどの程度の違いがあるか。

(回答) ブタにおける正常な CSF の結果は不明ですが、ヒトやイヌの報告と比較すると LDH は若干高値でした。その他の項目は全て正常範囲です。

質問 13) day 1 と day 3 で CSF 中のメラトニンレベルがだいぶ異なるが、その理由は何か。

(回答) day 3 は day 1 に比べて、血中・CSF 中において低値を示しました。基本的にメラトニンは光によって松果体からの分泌が調節されると考えられていますが、種々のストレスや性周期により分泌や代謝が変化する可能性も報告されています。今回は、採血の影響で体温が上昇していることから、day 1 の採血の影響と、性周期の影響の 2 つの可能性を考えています。

質問 14) 本モデル動物を、慢性疲労症候群研究にどのように用いるのか。

(回答) 「慢性の疲労状態」によって生じる CSF 変化がどのようなものかを解析し、疲労における物質変化を検討できればと思います。

質問 15) day 1 と day 3 の血清メラトニンに再現性が無く、本法で CSF 中のメラトニンレベルの評価は本当に可能か。

(回答) 実験に用いた個体数は少ない為、再現性などの検討は今後必要と思います。

質問 16) カテーテル内部のフラッシュを行わなくても、閉塞しなかったか。

(回答) 週 2 回カテーテル内部を 0.5 mL 程度自然排液した後に、生理食塩水 0.5 mL でフラッシュを行っていました。

質問 17) ブタにおいて、脳室と大槽で CSF 中のメラトニンレベルの違いに関する報告はあるか。

(回答) ブタの CSF 中のメラトニンに関する報告はありませんでしたが、他の動物において、脳室内で大槽より高濃度のメラトニンを認めたことが報告されていました。

質問 18) 血漿よりも CSF においてメラトニンが高値を認める理由は何か。脳脊髄液中のメラトニンの役割は何か。

(回答) 松果体で産生されたメラトニンは血中への分泌以外に、第三脳室内に直接放出されることから、脳室内 CSF において血中より高値を認めることが報告されています。CSF 中のメラトニンにはフリーラジカルのスカベンジャーとしての役割があり、酸化ストレスから脳脊髄組織を保護している可能性が考えられています。

質問 19) ミニブタの実験において、実験に用いる頭数が少ないことによる個体差への対処はどうすれば良いか。

(回答) ばらつきの少ない同腹子を用いたり、個体の介入前後の変化量を評価したりすることで、個体差の影響を小さくできればと考えています。

質問 20) 馬尾の位置は個体の大きさや週齢で変わってくるのか。

(回答) 剖検を行った個体では馬尾は腰仙椎間隙レベルに認めました。大きく成長しない動物であることから、週齢を経てもあまり位置関係は変わらないと考えます。今回、若齢・小型の動物で大きな差はありませんでした。

質問 21) 大槽に留置したカテーテルは動物の運動により、位置がずれることがあるか。

(回答) 剖検時にカテーテル先端位置は、大槽からずれていなかったため、大きくずれることはないと考えます。

質問 22) マイクロミニピッグの遺伝情報は分かっているか。

(回答) フルゲノム解析が既に行われています。

質問 23) カテーテル留置をした際の出血部位はどこか分かっているか。留置後の麻痺などは認めなかったか。

(回答) 出血部位の特定はできておりませんが、刺入部の脊髄～硬膜周囲からの血液混入が疑われます。カテーテル留置後に明らかな麻痺などの神経症状は認めませんでした。

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。