

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	号	学位申請者	室川 剛廣
審査委員	主査	田川 義晃	学位	博士 (医学)
	副査	小賤 健一郎	副査	堀内 正久
	副査	佐藤 雅美	副査	宮田 篤郎

主査および副査の5名は、令和元年10月16日、学位申請者 室川 剛廣 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) CO 中止に伴い COHb が速やかに低下している理由および CO 投与による溶血性貧血の有無

(回答) 高濃度酸素の存在下では COHb の半減期は短くなる。本実験では 100%酸素投与下での実験であるため、CO 投与中止後に速やかに COHb が低下したと考える。また本実験では溶血性貧血は認めなかった。

質問2) 虚血再灌流後の血液生化学的評価で AST が ALT に比べて高いのはなぜか？ブタの実験では薬剤性肝障害でも AST 優位の上昇パターンになるのか？

(回答) 動物種や臓器により酵素活性が異なり、ブタ肝臓では AST 活性が ALT 活性より高いため、本実験では AST 優位の上昇パターンとなったと推察される。薬剤性肝障害については、ブタにおける D-ガラクトサミン、パラセタモール、アセトアミノフェンによる薬剤性肝不全に関する論文では全て AST 優位の上昇パターンが示されている。

質問3) CO と他の医療ガスの併用の可能性および他の医療ガスの使い分けについて

(回答) CO、NO、H₂S などの医療ガスは、細胞間伝達シグナル分子としてのクロストークから相乗・相加効果の可能性が期待されるが、特に *in vivo* での併用効果については十分な知見が得られていない。また NO はすでに小児や心臓手術周術期の肺高血圧症で臨床応用されているが、各々のガスが具体的にどのような臓器や疾患を対象とすべきかについてもコンセンサスを得るまでには至っていない。

質問4) ヘムオキシゲナーゼ (HO-1) がヘムを分解する際の Hb 以外のヘム含有蛋白質の関与について

(回答) ヘム含有タンパク質の一つであるシトクロムP450が、NADPHシトクロムP450分解酵素によりHO-1に還元力を与えることにより、HO-1が活性化されCO結合ヘムがCO、Biliverdin、Fe²⁺に分解されることが知られている。

質問5) 統計処理と実験頭数の設定と観察期間の設定について

(回答) 生化学やサイトカイン値は、パラメトリック検定の 2-way repeated measure ANOVA による統計処理が n=3 で可能なことに基づき頭数を設定した。また今回の虚血で肝機能は2週以内に正常化し、30日の観察期間とした。

質問6) 病理組織評価において定量化を行わなかった理由について

(回答) 組織形態学的には、2時間の弱拡大像での小葉中心性の肝細胞死と出血は対照群の方が強く、小葉辺縁部位の壊死に陥っていない肝細胞の範囲は CO 群の方が広い例が多かった。2時間の強拡大像では対照群で広範な出血に加え肝細胞死は消失し、ほぼ全ての肝細胞が変性細胞に陥っているが、CO 群では小範囲の出血や変性が軽度の肝細胞が散見されるのみであった。4日目では小葉中心性の類洞の拡大と炎症細胞浸潤を対照群で強く認めた。これらの所見は2時間と4日目ともに、「CO 群の方が虚血性変化は明らかに軽度」という所見を全例で認めたが、病理組織定量的解析に基づく統計学的有意差の検証が望ましいため、今後行いたいと思っている。

質問7) 日本は欧米に比べて心停止ドナーが少ない理由について

(回答) 日本の法律でも心停止ドナーからの臓器移植は認められているが、国民の理解、医療スタッフや臓器提供システムを含めた環境整備の問題も相まって心停止臓器提供は進んでいない。

最終試験の結果の要旨

質問 8) 門脈遮断時の腸管鬱血はブタ特有の現象なのか？

(回答) ヒトでも門脈遮断により腸管鬱血は生ずるが、全身への影響はブタと比較し軽度である。腸管長という解剖学的相違が一因と考えられるが、ヒトでも側副血行路の有無や門脈遮断時間に応じて門脈バイパスが考慮される。

質問 9) 肝移植では肝臓への神経支配が失われるが、移植時の虚血再灌流障害に対してその影響はありうるか？

(回答) 自律神経により肝血流量や糖代謝の調節が行われるため神経離断による恒常性への影響や虚血再灌流障害に対する影響もあると考えるが、その影響の評価や機序についてはまだ解明されていない。

質問 10) 移植後機能不全の原因鑑別 (虚血再灌流障害か超急性拒絶反応か)、および虚血再灌流障害による移植後機能不全の発生頻度と肝臓に対する遷延性の影響について

(回答) 臨床肝移植では超急性拒絶の頻度は非常に稀であり、温虚血時間が長い場合はまず虚血再灌流障害を考える。温虚血が長い心停止ドナーでの移植後機能不全の頻度は 10%前後と言われ、この場合は肝機能発現の遅延や、難治性の多発性虚血性胆管炎を引き起こす可能性があり、再移植を余儀なくされるケースが多いことも報告される。

質問 11) TUNEL 染色陽性細胞の領域と HE 染色での細胞死の領域に一致性はみられるか？

(回答) 肝小葉中心性に TUNEL 陽性細胞を認め、HE 染色で認めた細胞死の領域とほぼ一致して認められた。TUNEL 陽性細胞の頻度と分布からは、今回の虚血再灌流障害による肝細胞変性・アポトーシスが主体であると考えられた。なお論文に記載していないが、典型例での TUNEL 染色陽性細胞数は、対照群対 CO 群で、500 以上対 40 個/LPF (2 時間)、50 対 10 個/LPF (4 日) と明らかな差を認めた。

質問 12) Kupffer 細胞の染色や Ki-67 などの免疫染色は行っていないのか？

(回答) 血液生化学、血清サイトカイン検査や病理組織の評価で、CO 群で有効性を確認したためこれらの免疫染色は行わなかった。今後の実験では、ブタ組織を染色しうる抗体を用いて、より詳細な免疫病理学的解析を行いたい。

質問 13) 血清 TNF- α が抑制される機序について

(回答) 文献的には肝虚血再灌流障害では Kupffer 細胞の活性化と、Kupffer 細胞から産生される TNF- α が障害進展の中心的役割を果たすと報告される。本実験からはそれを直接示す所見を得ていないが、CO が Kupffer 細胞の活性化を抑制することが TNF- α の低値をもたらす可能性を推察する。

質問 14) 虚血時間と再灌流後の病理評価時期の設定について

(回答) 温虚血時間は、心停止下ドナー利用に関する米国ガイドラインの許容温虚血時間 30 分を参考に、より障害を強化した 45 分温虚血を設けた。再灌流後の病理評価の時期は、当教室での腎臓、肺の虚血再灌流障害実験での論文報告および全身麻酔下に安全に生検を行いうる時期として、再灌流後 2 時間目、4 日目、14 日目を設定した。

質問 15) 虚血再灌流後にインドシアニンググリーン (ICG) で肝血流の評価は実施したか？

(回答) ICG 検査は行っていない。臨床では肝機能を評価する重要な検査であり、今後は検討したい。

質問 16) 低用量の CO 吸入による神経系の障害および本実験での脳の病理検討について

(回答) 低濃度 CO 吸入でも頭痛、めまい、嘔吐などの神経系を中心とする症状が生じうるが、今回は術後経過ではこれらを示唆する異常行動や摂食障害、嘔吐などの症状を認めなかったため、脳の病理検討は行っていない。

質問 17) CO のグラフトへの投与方法に関する今後の展開について

(回答) グラフトへの CO 投与方法については、CO ガスの臓器保存液への添加や、肝臓を体外で機械灌流保存を行う際に回路内に投与方法が動物実験モデルで報告されており、これらの手法を応用することを考えている。

質問 18) MHC 確立クラウン系ミニブタを使用した理由について

(回答) 今回の実験結果に基づいて移植実験へと展開することを想定していたため、本実験においても移植実験の際に有用な遺伝背景の均一化が得られる MHC 確立クラウン系ミニブタを使用した。

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。