

## 最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第	558 号	学位申請者	清 永 夏 絵
審 査 委 員	主 査	垣 花 泰 之	学 位	博 士 (医 学)
	副 査	井 上 博 雅	副 査	奥 野 浩 行
	副 査	橋 口 照 人	副 査	榎 田 英 樹

主査および副査の5名は、令和2年1月27日、学位申請者 清永夏絵 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) LPSを静注するとどの細胞や組織からどのようなサイトカインや物質が産生されるのか。

(回答) LPSを認識する Tofl-like receptor (TLR) 4は全身の上皮、内皮、免疫細胞に発現しており、特に心臓、肺、腎臓に発現が多い。LPSは血管内皮細胞でも障害を引き起こす。TLR4からのシグナル伝達により、TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IL-8などのケモカイン、NO合成酵素、シクロオキシゲナーゼ、リポキシゲナーゼ等が産生される。

質問2) 動物実験では、他の時間での評価や、他のサイトカインの影響は考えなくてよいのか。

(回答) 今回は6時間の実験であったため、急性炎症反応促進において特に重要と考えられる TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6について、そのピークに達する時間に着目して3・6時間で測定を行った。

質問3) 腎組織像については過去に今回と異なる報告があるが、LPS投与量やTNF- $\alpha$ 値との因果関係はどうか。

(回答) 過去の多くの報告は、動物種、LPSの投与量や経路、血液採取時間が様々であり、LPS投与量やTNF- $\alpha$ の値と腎組織像との因果関係は不明である。急性尿細管壊死と心拍出量・腎血流量との因果関係の報告がある。

質問4) LPS自体が腎細胞に与える影響は調べていないのか。

(回答) HEK293細胞はTLRを発現しておらず、In vitro 実験はTNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6を直接添加して行った。ヒト腎尿細管細胞ではTLRが発現しており、LPSの刺激でTNF- $\alpha$ 等の炎症性サイトカインが産生される。

質問5) 動物実験、In vitro 実験において、Landiolol使用量の妥当性はどうか。

(回答) 動物実験では臨床使用量の10倍、In vitro 実験では臨床上の血中濃度の約2倍でラットの血中濃度の約1/5量である。ラットへの投与量は過去の論文を参考に決定した。どちらの使用量も認容の範囲内と考える。

質問6) 動物実験とIn vitro 実験を同じ時間経過で評価することは可能か。

(回答) 動物実験では6時間以上の経過で低血圧に陥る可能性がある。HEK293細胞はwellに接着するのに数時間かかる。同じ時間経過での実験は難しいと思われる。

質問7) TNF- $\alpha$  0.5 nM添加群で、ミトコンドリア呼吸が増加しているがATP産生が増加していないのはなぜか。

(回答) TNF- $\alpha$ によるミトコンドリア機能障害のためと考えられる。

質問8) Landiololの作用機序に関して、 $\beta$ 1受容体を発現していない細胞を使用して実験を行ってはどうか。

(回答)  $\beta$ 1受容体の発現のない細胞で実験を行い $\beta$ 1受容体の関与の有無について検討するのがよいと考える。

質問9) 論文のIntroductionでNOの敗血症における作用について述べているが、そのことについて詳細はどうか。

(回答) 炎症性サイトカインはNO合成酵素を誘導する。高濃度のNOはスーパーオキシドと反応してペルオキシナイトライト(ONOO $^-$ )となり、ミトコンドリア膜タンパクを変化させミトコンドリア機能障害を引き起こす。

質問10) 動物実験でLPSの投与量は致死量か。Landiololは今回の実験でのラットの生命予後を改善し得るか。

(回答) 投与したLPSは致死量である。Landiololにより多少生存時間が延長しても救命には至らないと考えられる。

## 最終試験の結果の要旨

質問 1 1) 腎組織で微小血栓は観察されたか。

(回答) 観察されていない。敗血症性急性腎障害において血栓の関与は乏しいとの報告もある。

質問 1 2) NADPH オキシダーゼ (NOX) について考察を行ったか。

(回答) NOX4 は TLR4 シグナルや TNF- $\alpha$  により活性化する。細胞内の ROS 産生の首座はミトコンドリア電子伝達系と考えられるが、NOX も重要である。今回の実験では ROS の発生源を特定できていない。

質問 1 3) 過去の抗 TNF- $\alpha$  薬を使用した研究では、良い結果が得られていない。その理由について考察をしたか。

(回答) 敗血症では TNF- $\alpha$  以外にも様々なメディエーターが関与しているためと考えられる。

質問 1 4) ATP とインフラマソームについて考察をしたか。

(回答) IL-1 $\beta$  産生には、TLR や TNF- $\alpha$  受容体からの刺激と、ATP 等の Damage-associated molecular patterns (DAMPs) や ROS 等の刺激によるインフラマソーム活性化が必要である。動物実験で、Landiolol 投与は IL-1 $\beta$  産生を抑制しなかった。Landiolol が TNF- $\alpha$  産生や細胞死、酸化ストレスを抑制していないことが要因ではないかと推察される。

質問 1 5) 動物実験では測定されたサイトカイン濃度のデータの幅が広いがなぜか。過去の報告でも同様なのか。

(回答) 過去の報告と比べてサイトカイン濃度のデータの幅は広い傾向にある。実験手技は同様に行っており、個体差の影響と考えているが、その他の原因は不明である。

質問 1 6) LPS 投与後に Landiolol を投与した実験は行わなかったのか。

(回答) 行っていない。LPS 投与後に Landiolol を投与する方がより臨床的状況に近いと検討した方がよかった。

質問 1 7) 採尿は導尿によるものか。実験動物はなぜ雄を使用しているのか。

(回答) 採尿は下腹部小切開、膀胱穿刺にて行った。動物実験は雌で行うと性周期によるホルモン値の変動により薬物代謝に影響が出る可能性が否定できないことから慣例的に雄を使用することが多い。

質問 1 8) Landiolol により、In vitro 実験で ROS が低下し、動物実験で尿中 8-OHdG が低下していないのはなぜか。

(回答) In vitro 実験は特定の細胞と試薬を用いたものである。一方、ラットの尿中 8-OHdG は全身の状況を反映するため、必ずしも同様の結果とならないと考えられる。

質問 1 9) ラットの実験で尿量測定は可能か。

(回答) 手技の向上により可能かもしれないが、失禁や膀胱損傷により正確に測定できない可能性がある。

質問 2 0) 動物実験で、Landiolol により乳酸値は低下しているが、サイトカイン値は差がでないのはなぜか。

(回答) Landiolol 投与群で、早くピーク値を迎える TNF $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  の値が高く、後に上昇する IL-6 が低い傾向にある。Landiolol は TNF $\alpha$ ・IL-1 $\beta$  産生を抑制せず、その後何らかの形で作用して IL-6 産生を抑制すると考えられる。

質問 2 1)  $\beta$  刺激薬を使用すると悪化するのか。

(回答) 敗血症患者は血中のカテコラミンレベルが増加している。 $\beta$  受容体刺激の持続は敗血症患者の全身状態を増悪させる可能性がある。

質問 2 2)  $\beta$ 1 選択性の低い  $\beta$  遮断薬や、 $\beta$ 2 受容体遮断薬でも同様の結果がでると考えられるか。

(回答)  $\beta$ 2 刺激は炎症性サイトカインを減少させ抗炎症性サイトカインを増加させるとの報告がある。腎尿細管細胞には  $\beta$ 2 受容体が発現しており抗炎症作用に関与するとの報告もある。よって異なる結果となる可能性がある。

質問 2 3) 腎におけるフロセミドと Landiolol の作用の違いは何か。

(回答) フロセミドはヘンレループの上行脚で Na/K/2Cl 共輸送体を抑制する。Landiolol はレニン分泌を抑制することで間接的に集合管での Na-K-ATPase の作用を抑制する。どちらも能動的電解質輸送を抑制し ATP 消費量が減少することで酸素消費量が低下する可能性がある。腎臓での Landiolol のその他の作用機序は不明である。

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。