

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 585 号		学位申請者	今釜 逸美
審査委員	主査	大石 充	学位	博士(医学・歯学・学術)
	副査	金藏 拓郎	副査	垣花 泰之
	副査	西 順一郎	副査	伊藤 隆史
<p>主査および副査の5名は、令和3年2月17日、学位申請者 今釜 逸美 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。</p> <p>質問1) 日本語の論文要旨【材料及び方法】「鹿児島大学院大学医学・歯学部」という記載はおかしい。 (回答) 鹿児島大学作成の動物実験に関するガイドラインはないため、削除する。</p> <p>質問2) 論文中の method, In Vivo experiments 「Kagoshima University Graduate School of Medicine」ではない。 (回答) "Guidelines for proper conduct of Animal Experiments" of Science Council of Japan と訂正する。</p> <p>質問3) 鹿児島大学の実験動物施設のガイドラインはない。 (回答) 鹿児島大学における動物実験に関する規則では、日本学術会議が作成した「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に従うこととなっており、訂正する。</p> <p>質問4) 日本語の論文要旨【材料及び方法】0.9%生理食塩水は非常に薄い整理食塩水となるので、訂正するように。 (回答) 0.9%を削除し、生理食塩水のみの記載とする。</p> <p>質問5) In Vivo 実験で投与した遺伝子組み換えトロンボモジュリン(rhsTM)濃度6mg/kgは、現在の臨床使用量より大変多く、提示された腎臓の論文での5mg/kg、1mg/kg、0.25mg/kgと比較しても多いが、どう考えるか？ (回答) 臨床で使用されているのは0.06mg/kgなので6mg/kgは100倍となる。報告されている rhsTM の実験では6mg/kgが最大投与量で、まずは最大投与量で効果があるかを確認した。</p> <p>質問6) In Vivo の Tarlov score の結果が0または5であった不自然さの理由は何が？ (回答) n が少ないこと、遮断解除7日後の遅発性の評価ではなかったこと、麻痺が連続したことから購入したウサギそのものの影響が原因として考えられた。手技は関係ないと考えている。</p> <p>質問7) In Vitro の機序に関して、TM も属する共通の転写因子である酸化ストレス応答系は何か？ (回答) Kcapi-Nrf2 酸化ストレス応答系。</p> <p>質問8) 大動脈だけでなく、後腸間膜動脈(PMA)を遮断しないと脊髄虚血にならないか？PMA はヒトの下腸間膜動脈(IMA)に該当するか？ (回答) PMA を介した逆行性血流が大動脈内に入るため、PMA の遮断が必要である。PMA はヒトの IMA に該当する。</p> <p>質問9) In Vivo と In Vitro の P 値がかなり違う理由は？ (回答) In Vivo では0または5という結果で、差が大きかった。In Vitro では内皮細胞がないので rhsTM が作用しにくかった可能性と、rhsTM の濃度や低酸素低グルコース負荷(OGD)の時間によっては P 値が小さくなるかもしれない。</p> <p>質問10) ウサギで活性化プロテインC(APC)は作られないのか？APC 以外の作用効果があるということか？ (回答) Mohri らの論文では、ウサギの血漿中にヒトトロンビンとリコモジュリンを添加してもウサギの活性化プロテインCは生成されなかったと報告されている。トロンボモジュリンはウサギ肺の血管内皮細胞から単離されているが今回ウサギの APC は測定していないので、作られないかはわからない。APC 以外の作用効果があると予想する。</p>				

最終試験の結果の要旨

質問 1 1) rhsTM で出血コントロール困難があり、臨床で利用できるフェーズをどのように考えているか？

(回答) 患者の状態や瘤の解剖学的条件、緊急手術に関係なく投与できる静脈投与で、出血の問題から半減期を考慮すると術前投与がよい。

質問 1 2) パラメーターの pO_2 だが、 PaO_2 と PvO_2 の区別をつけ、検体数も記載するように。(回答) 訂正する。

質問 1 3) In Vitro 実験で、非 OGD 群と比較したか？今回の評価はコントロール群を 100 としているのか？

(回答) 今回非 OGD とはしていない。非 OGD 群との比較は今後の課題とする。コントロール群を 100 とした。

質問 1 4) In Vitro で rhsTM が働く機序は？細胞が壊れて出た High Mobility Group Box-1 (HMGB-1) なのか？

(回答) 今回は HMGB-1 の存在や細胞死がアポトーシスなのかという評価は行っていないが、Kikuchi らがラット脳梗塞モデルと PC12 細胞を用いてフリーラジカスカルベンジャーの Edaravone の効果に関して、OGD とした PC12 細胞において培養上清に HMGB-1 が細胞外へ放出されること、HMGB-1 刺激によって PC12 細胞のアポトーシスが起ることが確認された。この論文から、OGD で放出された HMGB-1 によるアポトーシスを rhsTM が抑えていることが予想される。

質問 1 5) 肝腎に rhsTM が効いたというのは臨床的にはどんなものか？

(回答) 肝切除や肝移植に関する実験報告で、実際臨床では使用されてはいない。

質問 1 6) 論文 Discussion の前に将来大動脈手術でヘパリンと併用、と記載されている理由は？

(回答) 現在大動脈手術では抗凝固薬としてヘパリンを手術中に使用している。抗凝固作用に併せて抗炎症作用をもつ rhsTM をヘパリン代替としたいが、半減期 20 時間程度のため困難で、ヘパリン併用での使用となる。

質問 1 7) 日本語の論文要旨【材料及び方法】抗生剤としてアンホテリシン、と記載されているが、抗生剤ではない。

(回答) 削除する。

質問 1 8) Tarlov score は 0 または 5 というびつな分布であった、今後 n を増やしたら同じ結果になるか？

(回答) n を増やすだけでは同様の結果が予想される。遅発性対麻痺も考慮し、再灌流開始後から下肢運動機能評価までの時間を 7 日間程度とすること、薬剤投与量や遮断時間を変更することで異なる結果となる可能性もある。

質問 1 9) 今回の結果は麻痺のある、なしに分かれており、カイ二乗検定とすることが考えられるのでは？

(回答) カイ二乗検定では、 $\chi^2 = 6.8$ 、 $P=0.01$ という結果で有意差があった。

質問 2 0) OGD でどれくらい死ぬのか、というデータが提出されていない。rhsTM 投与群で Cell Viability が高値であった理由は、細胞死の抑制か、細胞増殖の促進か。MTT アッセイする前に OGD による細胞死を顕微鏡で評価したか？

(回答) 非 OGD 群は評価していない、また OGD 後の細胞を顕微鏡でカウントしておらず、OGD による細胞死を評価できていない。今後の課題とする。

質問 2 1) 細胞死を抑えているか、細胞を増やしているか、どちらか？

(回答) Kikuchi らの論文から、細胞死を抑えていると予想する。

質問 2 2) 脊髄虚血モデルはウサギが多いのか？

(回答) ラットの脊髄虚血モデルもある。当科ではウサギ脊髄虚血モデルでの対麻痺予防の研究をしており、大動脈へのカニューレーションを行うこともあり、ウサギより小さい動物では困難でウサギを選択している。

質問 2 3) 大動脈瘤は動脈硬化がひどく、内皮の機能はかなり落ちている状態と思われるが、TM がどれくらい効くか？

(回答) 内皮機能が落ちて、内皮上に発現する TM が減少すると、活性化プロテイン C (APC) が結合する血管内皮の endothelial PC receptor (EPCR) も減少、プロテアーゼ活性化受容体 (protease-activated receptor-1: PAR-1) 活性化による抗炎症効果・細胞保護効果も低下すると予想される。rhsTM 投与によって、低下した TM の作用を補うことが期待されるが、その程度は不明で作用機序の解明とともに今後の研究の課題と考える。

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。