

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 628 号	学位申請者	新納 彩子
審査委員	主査	中村 典史	学位 博士 (医学・ <u>歯学</u> ・学術)
	副査	後藤 哲哉	副査 松永 明
	副査	佐藤 友昭	副査 栗原 崇

主査および副査の5名は、令和3年12月10日、学位申請者 新納 彩子 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)本研究を行う臨床的なきっかけは何か。

(回答)日常臨床で鎮痛薬を使用する機会が多いが、痛みの昼夜差まで考慮はしていない。しかし、鎮痛薬の効きにくい時間帯があることを訴える患者もいることから、痛みの日内変動を把握し、必要時に必要量を処方することで、より効果的な疼痛コントロールができるのではないかと考え、本研究を計画した。

質問2)体内時計にはリズムがあり、ヒトでは、朝方にコルチゾールの分泌が増えるとのことだが、コルチゾールには抗炎症作用があるため、朝の方が痛がりにくくなるのではないのか。

(回答)マウスにおけるコルチゾールの分泌は休息期(朝方)に低く、活動期にむけて徐々に増加してZT10頃にピークを迎え、その後再び減少することが知られている。そのためマウスでは、確かに夜間でのコルチゾールの分泌が多く抗炎症作用も強いいため、痛がりにくいという仮説も成り立つが、実際には夜間で痛がりやすいという結果になった。考察でも述べたが、痛みが表出されるまでには様々な因子が関連してくるため、コルチゾールの分泌も含め、引き続き検討を続けたいと考えている。

質問3)ホルマリンテストで5%ホルマリンを使用しているが、どのように決定したのか。また、濃度を上げると今回とは違った結果になるのか。

(回答)今回の濃度はマウスの顔面領域におけるホルマリンテストの先行研究に倣って決定した。また、別の先行研究によると、ホルマリンをある一定の濃度以上にするると観察される疼痛関連行動に変化が認められなくなることが確認されている。

質問4)今回上口唇にホルマリンを投与したということだが、実際の手技としてはどのように行ったのか。

(回答)体内時計に影響を与えると考えられる麻酔薬は使用せず、マウスの体をタオルで巻いて保定した上で、左手でマウスの頭部を固定し、右手で上口唇にホルマリンを注射した。

質問5)ホルマリンを投与したマウスではTRPA1の発現は観察していないのか。

(回答)今回は何の介入もしていないマウスを用いて、TRPA1の発現の昼夜差を検討した。

質問6)疼痛関連行動の観察で計測者は何人いたか。また結果にばらつきは認められなかったか。

(回答)計測は3人で行った。計測前に疼痛関連行動についてビデオで見本を示し、行動開始でタイマーをオンに、行動終了時にタイマーをオフにするよう指示した。また、結果に大きなばらつきは認められなかった。

質問7)Phase Iに関して、3分間という時間は短いように感じるが、本研究でその分け方にした理由は何か。

(回答)先行研究では、観察した45分間を3分間あるいは5分間ごとにブロック分けしているものが多かったが、今回は3分間ごとのブロックに分けて観察したため、最初の3分間をPhase Iと定義した。

## 最終試験の結果の要旨

質問 8) 末梢組織には TRPA1 の他にも TRPV1 があり、痛みに関与していると考えられているが、今回 TRPA1 に着目した理由は何か。

(回答) TRPV1 も痛みの受容に関与しているが、主にカプサイシンなどで活性化されることが知られている。本研究ではホルマリンテストを行ったことから、ホルマリンで活性化される TRPA1 が標的として最適であると考えた。

質問 9) c-Fos の発現数のカウントはどのように行ったか。複数人で行った場合、ばらつきはなかったのか。

(回答) カウントは 3 人で行った。免疫染色を行った後、バーチャルスライドスキャナーを使用し、染色された細胞に焦点を合わせて切片の写真を撮影した。次に写真をパソコンに取り込み、染色された細胞に画像上で点をうち、個数をカウントした。また、結果に大きなばらつきは無かった。

質問 10) phase I でも有意差が出て良いように思うが、今回は有意差が出てない。なぜ、有意差が出なかったのか。

(回答) 今回は標準誤差が大きいことから、個体差が大きかったと考えている。よって、もう少し N 数が増えれば有意差がつくのではないかと考えている。

質問 11) 今回の結果は活動期に痛みが増強しているが、活動期は敵から逃げる必要があり、防衛本能の観点から考えると痛みは減少するのではないか。今回の結果とは逆であるが、その点に関してはどう考えているか。

(回答) 活動期に痛みを感じやすくすることで、痛みの原因を素早く回避できるだけでなく、安静にすることで治癒を促すことにつながる。また、休息期にはしっかり休息できるよう痛みが抑えられていると考えることもできる。

質問 12) c-Fos の発現数では有意差を認める一方で、行動レベルでは有意差が認められないようだが、その原因をどう考えているのか。

(回答) 三叉神経脊髄路核尾側亜核の細胞レベルでは痛みを受容しているが、行動レベルまで表出されないものがあるのではないかと考えている。

質問 13) なぜ、結論の図で TRPA1 には ? マークがついているのか。

(回答) 今回はウェスタンブロットや免疫染色を行っていないため、末梢組織での TRPA1 タンパクの発現はみていない。そのため、結論の図には ? マークを使用した。

質問 14) TRPA1 がヒトでも夜間増加しているとしたら、どのような臨床応用を考えるか。

(回答) 現在は鎮痛薬を投与する際に痛みの昼夜差を考慮していないが、TRPA1 が夜間増加していた場合、TRPA1 による炎症反応が増強する可能性があるため、夜間に多めの消炎鎮痛薬を処方することなどを検討する。

質問 15) TRPA1 の昼夜差の原因は何か。時計遺伝子が関与しているのか。

(回答) これまでに TRPA1 の日内変動の原因に関する報告はされていないが、神経成長因子 (NGF) が TRPA1 の調整に関与するという先行研究や、NGF には日内変動が認められるという報告がある。これらを踏まえると、NGF が TRPA1 の昼夜差にも関与している可能性が考えられる。

質問 16) 本研究のノイエスはなにか。

(回答) 動物を用いた基礎研究において、三叉神経支配領域における痛覚の日内変動を初めて示し、またそのメカニズムについても言及したことである。

質問 17) TRPA1 の増加に自律神経系は関与していないのか。

(回答) 自律神経系は、体内時計の中枢である視交叉上核とも密接に関係していることから、TRPA1 の増減にも何らかの経路を介して関与している可能性は十分に考えられる。

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 (歯学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。