

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 684 号	学位申請者	政所 祐太郎
審査委員	主査	橋口 照人	学位 博士 (医学)
	副査	堀内 正久	副査 郡山 千早
	副査	大石 充	副査 中原 真由美

主査および副査の5名は、令和5年1月5日、学位申請者 政所 祐太郎 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) いくつかある敗血症モデルの中で、今回盲腸結紮穿孔 (CLP) モデルを選択した理由は何か。

(回答) 今回は時間経過を重視したため、臨床経過により近いと言われている CLP モデルを選択した。

質問2) 今回の敗血症モデルではどれくらいの時間で菌血症、敗血症になっているのか。

(回答) 処置3時間後程度で全身状態不良が観察されており、その頃から敗血症は起こっていると考えている。

質問3) 処置直後と12時間後を設定した理由は何か。

(回答) 予備実験において処置6時間後に BH_2/BH_4 比が上昇することは確認できた。そのため早期と後期の2群にわけるときに、この6時間を起点とし、6時間前 (0時間: 処置直後) と6時間後 (処置12時間後) を選択した。

質問4) 大動脈の内皮障害など、血管内皮障害そのものを観察したか。

(回答) 血管内皮障害自体は観察していない。今回は困難であったが電子顕微鏡観察などを検討したい。

質問5) eNOS との関連であれば SOD:スーパーオキシドジスムターゼとの関係もあるのではないか。

(回答) 今回は測定していない。今後の実験で測定を検討したい。

質問6) DHFR には多数の遺伝子多型が知られている。DHFR の遺伝子多型と敗血症の悪化については関連があるのか。

(回答) DHFR の遺伝子多型と敗血症増悪の関連については報告がみつけれなかったが、敗血症増悪と遺伝子多型についての報告もなされるようになってきており、今後 DHFR の多型との関連も出てくる可能性もある。

質問7) BH_2 と BH_4 は2分子で働くということか。 BH_4 が2個、 BH_2 が2個、eNOS に結合するという図を示していたが、 BH_4 と BH_2 が一つずつヘテロに結合することはあるのか。その際アンカップリング反応は起こるのか。

(回答) BH_4 が二分子結合することで eNOS は二量体を形成する。 BH_2 がヘテロの形で結合した場合二量体を形成することはできない。 BH_2 と結合した eNOS ではアンカップリングが発生する。

質問8) ポストカラム法はカラムを通した後に蛍光させているようだが、どのような処置を行ったのか。

(回答) 各種プテリジンを含む溶液を酸処理によりタンパク質を除き、HPLC で分離したのちに亜硝酸ナトリウム溶液と反応させることにより還元型プテリジンを蛍光の強い酸化体に変換し、蛍光検出器で測定するという手法である。

質問9) このモデルマウスの死因は？臨床的にも敗血症の死因は何か。

(回答) モデルマウスでは代謝性および呼吸性アシドーシスが混合性アシドーシスを引き起こすため、死因は循環不全と考えている。臨床的には血管内皮機能の破綻に起因する腎障害、心筋症、ARDS などの多臓器不全が死因と考えている。

質問10) 腎障害に関する組織や血清マーカーの確認をしたのか。

(回答) 組織は確認したが障害の差ははっきりせず、血清クレアチニン値の上昇はみられなかった。

質問11) NO だけではなく芳香族アミノ酸と関連があるのか。

(回答) 今回の実験において芳香族アミノ酸は測定していないが、 BH_4 欠乏は高フェニルアラニン血症と関連がある。先天性疾患である高フェニルアラニン血症は BH_4 の欠乏による系もある。また、チロシン代謝によるドーパミン産生やトリプトファン代謝によるセロトニンも敗血症 (循環不全や敗血症性脳症など) の病態に関連していると思われる。

質問12) マウス敗血症モデルで AsA 濃度は減っていくのは、細胞に AsA が取り込まれていくということか。

(回答) 敗血症においては炎症を契機に酸化ストレスが発生し、その様々な反応で AsA が消費されていくためと思われる。

質問13) AsA 投与は1回のみか、持続投与は検討しなかったのか。どれくらい時間をかけて投与したのか。ヒトを対象とした臨床研究での投与方法はどうしていたのか。

(回答) 今回は皮下注射単回で実施し、投与速度は $1ml$ を全開投与している。マウスモデルでの持続静脈投与は技術的に困難であった。ヒトの臨床研究では $1.5g$ 6時間ごとに静脈投与を行なっている。

質問14) 早期投与群の中で生存個体と死亡個体での BH_2/BH_4 比やシンデカンなどの差はあったのか。

(回答) 今回用いた IVC からの採血ではマウスが死亡してしまうため、生存個体と死亡個体で血中 BH_4 やシンデカンの比較は行っていない。今後、同一個体で血液検査などができるよう工夫していきたい。

質問15) BH_2 、 BH_4 とシンデカンの発現ピークに時間差があるので検討が難しいと思うが相関はあるのか。

(回答) 前半はシンデカンとパラレルのような部分もあるが、後半の24時間後では BH_2/BH_4 比は増える一方でその時期にシンデカンは減っており相関しない。後半シンデカンが減少することに関しては正確には観察できていないが、グリコカリックスが障害された後再生するまでに時間がかかるので後半の段階でシンデカンは上昇がないのかもしれない。

質問16) 人の BH_2 、 BH_4 の検討はないとのことだが、保存血清で測定できないか。

最終試験の結果の要旨

(684)

(回答) BH_4 を測定する場合、検体保存時にジチオエリトリトール (DTE) という還元剤を血液に混合し保存する必要があり、過去の検体では測定困難であるが、今後測定用に DTE 使用下に保存し、データを収集していく予定である。

質問 17) 早いタイミングでの評価のためにはシンデカンより BH_2/BH_4 比の方がよいのか。

(回答) BH_2/BH_4 比の上昇が先に起こり、シンデカンはグリコカリックスが破綻した結果と考えているので早めの評価では BH_2/BH_4 比が適切と考えている。

質問 18) 糖尿病モデルマウスで敗血症での BH_4 動態をみてみるのはどうか。

(回答) 糖尿病モデルマウスで BH_4 は欠乏しているという報告はあり、その状態に敗血症によりさらに BH_2/BH_4 比の上昇が加わると増悪する可能性があり、糖尿病の方が重症化しやすいというところに関連しているかもしれない。

質問 19) ウエスタンブロッティング定量の解析にだけなぜパラメトリック検定を使用しているのか。

(回答) 母集団では正規性があり t 検定を使用した。論文の全体を通してノンパラメトリックを使用するのが適切であったと思われ、Wilcoxon の順位和検定をしたところ、 $p=0.0059$ と両群間に有意差を認めた。

質問 20) AsA 投与は CLP 直後というのは臨床的には現実的ではない。直後ではなく時間をおいて投与してみたか。

(回答) 3 時間後に AsA 投与を実施したが効果が示せていない。今回は AsA 投与しか治療していないが、抗菌薬や輸液、昇圧剤などの全身管理をしたり、ステロイド、ビタミン B1 などのコンビネーション治療を組み合わせたりすることで発症からしばらく経過しても効果を見込めるかもしれない。今後の実験を計画している。

質問 21) 抗酸化物質の中で、なぜ AsA に注目したのか。

(回答) 抗酸化物質にはビタミン E、グルタチオン、水素などが候補としてはあるが、これまでの報告で AsA が一番臨床データが多い。世界の低所得国でも問題となっている敗血症においては安価でどこでも手に入りやすい AsA が敗血症の治療候補としては適切であると判断した。

質問 22) AsA 濃度を 200mg/kg にした理由は何か。投与量が多い場合の有害事象はないか。

(回答) 投与量に関しても議論がなされている状況であり、これまでの研究においても 120mg/kg、200mg/kg、400mg/kg とバラバラであるが 200mg/kg の報告が最も多い。120mg/kg では効果が示せず、200mg/kg を選択した。AsA が多すぎるとシュウ酸蓄積による腎障害の可能性もあり適切な投与量についても検討が必要である。

質問 23) 臨床研究で敗血症への AsA 投与が効果があったのは投与タイミングがよかったということなのか。

(回答) お示した Marik らの研究は単施設の before after study であり、多施設の RCT の介入群と比較すると投与タイミングは早かったと思われるが、詳細なデータがないので不明である。重症度が高い群であったため、その辺りも関係があるかもしれない。

質問 24) 今後、人の臨床研究に活かすにはどのような研究デザインを考えているか。

(回答) ER 症例を対象とした研究でも発症時期～ER 受診には個人差があるため、効果が示せない可能性がある。院内発症で発熱やバイタル変化など感染発症のトリガーが掴みやすいタイミングの早期に AsA 投与介入が効果的な可能性があり、そのような症例を研究対象としていくことを考えている。

質問 25) 普段からビタミン C を投与/内服していれば敗血症の重症度が低くなるという報告はあるのか。

(回答) LPS モデルに対して AsA をプレ投与をしている研究においては生存率を改善するという報告はある (200mg/kg 腹腔内注射投与。機序としては、 BH_4 の酸化ではなく HMGBI 関連と考察している。Biochem Pharmacol. 2016)。しかし、発症直前投与の実験であり、日常的にビタミン C をしっかり摂取していれば重症化しないという報告はない。ビタミン C は水溶性ビタミンであり、体内に蓄積はできないので、多量に摂取しても体内の濃度には上限がある。重症化すれば一気にビタミン C は枯渇するので、多く取っていれば重症化しにくいという補償はないと考える。逆に摂取不足の低栄養の状態は重症化しやすいといえる。

質問 26) 医療の進歩している現代においても敗血症の数が増え、多くの死者が出ているのはなぜか。

(回答) 日本においては高齢化による免疫状態の増悪。世界ではアフリカ、東南アジア等低所得国での死亡率が高く、やはり免疫と栄養の不十分さが原因となっている可能性がある。

質問 27) サイトカインの測定はしていないのか。

(回答) IL6 は今回の CLP モデルで上昇したことを確認できていたが、早期 AsA 投与群でのデータは収集していなかった。今後サイトカインについても測定し、 BH_2/BH_4 比との関連について調べていきたい。

質問 28) 炎症による respiratory burst の中でスーパーオキシドが発生し、NO も常に発生している。その過程で O_2^- と NO が過剰産生されるピークはどこなのか？内皮障害が起こり eNOS の発現が低下し、NO の産生が低下すると、ONOO⁻ の産生も低下するのではないか。

(回答) ラジカルの上昇自体は炎症直後から 6 時間後にかけて増加していると思うが、プレ実験で NO の産生は 12-18 時間後に起こっており、 BH_2/BH_4 比の上昇も 6-12 時間後に起こっているため、NO 産生のピークは 12 時間あたりと思われる。NO 産生は eNOS だけでなく、炎症によりマクロファージから誘導される iNOS との反応でも発生する。NO 産生とスーパーオキシド産生が同時に起こるのが敗血症と慢性疾患 (BH_4 の欠乏、NO 産生低下) における動態との違いであると考えている。

質問 29) 血管内皮細胞における O_2^- の発生は NADPH オキシダーゼによる O_2^- 発生がメインではないのか。

(回答) ご指摘のように通常 NADPH オキシダーゼが関与する O_2^- がラジカル発生としては主であるが、今回アンカッピングによる O_2^- が細胞障害性と強く関連していると挙げた理由は、障害の対象となる血管内皮細胞近傍において、eNOS から産生される NO とアンカッピングで産生される O_2^- が物理的に近い状況で同じタイミングで存在しているからである。その両者が細胞近傍で結合することで ONOO⁻ が産生され、血管内皮細胞障害の主な原因となるため、NADPH オキシダーゼが関与する O_2^- よりもアンカッピングにより発生する O_2^- の方が血管内皮細胞障害に最も影響していると考えた。

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。