

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 73/ 号	学位申請者	富宿 小百合
審査委員	主査	浅川 明弘	学位 博士 (医学)
	副査	橋口 照人	副査 田川 義晃
	副査	郡山 千早	副査 横尾 英孝
<p>主査および副査の5名は、令和6年1月10日、学位申請者 富宿 小百合 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) 腹部を押さえて尿を採取しているが、採取量はどのくらいか。 (回答) 尿1滴が 10 μl 程度で、場合によって、1~10 滴程度得られるので、採取尿量は 10 ~100 μl 程度だった。しかし、採取できない場合もあり、その場合は欠損値として取り扱った。</p>			
<p>質問 2) マウスは夜行性であるが、夜である明期にケージを何回も変えられたら、眠ることを邪魔されて怒っている状態とも考えられる。どのように考えるのか。 (回答) その可能性は考えられる。今回の繰り返しケージ交換負荷は、マウスの睡眠時間の明期に行っているため、新規環境の負荷に加えて、指摘されたように睡眠を擾乱した要素もあると考えている。</p>			
<p>質問 3) マウスは必須アミノ酸がヒトと1つだけ違い、それはアルギニンと記憶している。それは正しいことか。アルギニンは、8時の時点と比べると、対照群、ケージ交換群いずれも値が低い。マウスにとってアルギニンは何か特別なアミノ酸と考えられているのか。 (回答) 哺乳動物の必須アミノ酸は基本的には同一で、9種類とされている。指摘されたアルギニンは、幼弱期には必須アミノ酸とされており、動物の種類ではなく成長の時期によって必須とされる唯一のアミノ酸である。今回、絶食負荷によって低値となったのは、糖新生に利用されたと考えられ、特にマウスにおいて特別な働きのあるアミノ酸とは考えられていない。</p>			
<p>質問 4) 繰り返しのケージ交換負荷が、バゾプレッシンを抑制するとのことだが、ヒトでも起こるのか。 (回答) 今回の研究では、尿中クレアチニン濃度を評価し、ケージ交換群で、その値が対照群 (絶食のみ) で、高くなる現象を観察した。この現象にバゾプレッシンが関与し、ヒトにおいても生じる現象と考えている。</p>			
<p>質問 5) エピネフリンが上昇する状況では、血糖上昇が予想される。今回、低下している理由は何か。 (回答) ストレス負荷時では、自律神経系が亢進し、拮抗ホルモンの上昇により血糖値が上昇するとされている。しかし、今回の研究で血糖が低下したのは、血糖上昇の仕組みに加えて、体温の上昇や身体活動量の増加などで、糖の利用が亢進し、結果的に、血糖値が低下したと考えている。</p>			
<p>質問 6) Fig 1 の体温の変化で、対照群で絶食開始 8 時の時点から 10 分後に体温が上がっている。絶食はどのように行ったか。10 時、12 時でもその程度体温が上がるのは、なぜか。 (回答) 絶食は、ケージの給餌部の餌を除くことで実施した。それに反応して、体温が上昇したと考えている。両群の実験を、同じ場所で同じ時間に行ったことや、非接触とはいえ体温測定時に、ケージに体温測定機器を当てる操作を行ったことが影響し、10 時、12 時においても体温が上昇したと考えている。</p>			
<p>質問 7) ケージ交換群で、体温が 39℃まで上がるが、過去の報告でもストレスで体温が 3℃も上昇するのか。 (回答) 同様に、2~3℃の上昇が認められている。体温測定の方法にもよるが、腹腔内に測定器を置くよりも膈甲骨近傍の褐色脂肪組織近くに置いたことで、より大きな変化を観察した可能性を考えている。</p>			
<p>質問 8) 尿中ドーパミンは、どのような生理指標と考えられるのか。どういう目的で測ったのか。 (回答) カテコールアミン類で、ストレス負荷時に、エピネフリンやノルエピネフリンと同様に変化するという報告もあり、ストレス指標として測定を行った。結果としては、他の2つのカテコールアミンとは異なる挙動を示し、自律神経系とは関係が薄く、実際の生理的な意味は不明である。</p>			
<p>質問 9) 栄養因子の変化と心理的所見の関係を明らかにするためには、介入実験をするべき、と記載されている。具体的にどのようなことを計画しているか。 (回答) 今回の研究で変化のあった、分岐鎖アミノ酸とフェニルアラニンをマウスに与え、ケージ交換によって生じたストレス指標の変化を評価することを考えている。</p>			
<p>質問 10) この論文の導入部で、ストレスに対するレジリエンスについての記述があった。個体ごとのレジリエンスの違いを考えると、今回のケージ交換群において、個体間でどれくらいばらつきがあったのか。 (回答) 体重変化においても、バラツキはそれなりに観察された。血糖値が著しく高い個体もあり、外れ値検定で削除の対象となった。確かに指摘の通り、個体間における負荷に対する応答の違いは小さくなく、これから研究を深めていく上で、考慮すべき点と考える。</p>			

最終試験の結果の要旨

73/

- 質問 11) 今回のストレスマーカーの指標は、ヒトと同じか。今回のマーカーは、ヒトでも測定可能か。
 (回答) ストレス応答の神経内分泌指標として、カテコールアミン類と副腎皮質ホルモンを測定し、それらは、ヒトのストレス指標と同一である。しかし、血液ではなく尿を用いて測定しており、ある一定の時間の平均的な指標と考えている。もちろん、ヒトでも測定可能であるが、副腎皮質ホルモンに関しては、マウスではコルチコステロン、ヒトではコルチゾールと対象物質が異なることが知られている。
- 質問 12) 今回のストレスの与え方は、心理社会的ストレスとして良いのか。
 (回答) 今回のストレスは、飲水や行動の自由が維持された緩やかな実験条件下でのケージ交換という新規環境への曝露のストレスである。また睡眠時の負荷は覚醒時よりも負荷の程度は強まると考えられ、心理社会的ストレスのモデルと解釈している。
- 質問 13) ケージ交換は、1 回目は新しいケージ、2 回目以降は別のマウスが居住したケージを利用しているが、ケージ交換だけがストレスでなく、別のマウスの匂いなどが残っていることもストレスではないか。
 (回答) ケージを交換することが新規環境への曝露というストレスになると考えている。今回のストレスモデルで実験をするにあたり、予備実験として、床敷ありのケージを使って、マウスを別のマウスのケージに移動させる実験も行った。体温変化は空ケージほど大きくなかったため、前のマウスの匂いに対するストレスもあるが、空ケージの方がより強いストレスとなると考えている。
- 質問 14) ストレス応答を緩和する栄養因子があるとして、毎日摂取することがいいのか。ストレスを受けた後でも、栄養因子を変えることでストレス予防につながると考えているのか。
 (回答) 前もって摂取するなど、対象となる栄養因子をマウスに摂取させる方法を変えることで、治療・予防の条件を実験的に検討したいと考えている。
- 質問 15) 心理社会的ストレスに対して、雌の方が敏感だとされているが、性差が生じる理由は何か。
 (回答) 雌は性周期があり、エストロゲンが心理社会的ストレス応答に影響している可能性が報告されている。
- 質問 16) 2 時間ごと 4 回ケージ交換を実施する条件は、どのように決めたのか。
 (回答) 予備実験や既報で、体温変化が 2 時間程度で元の状態に回復することが確認できたので、2 時間の間隔をベースに、4 回の実施を定めた。
- 質問 17) ストレスは肥満とも関係があるが、肥満や高脂肪食モデルマウスを使用した場合、結果がどうなるかと考えるか。
 (回答) 高脂肪食によって生じた肥満モデルでは、内分泌因子の変化を介して、心理社会的ストレス応答の脆弱性が報告されているので、今回のモデルでも同様の結果が得られる可能性を考えている。
- 質問 18) 採血はどの部位から行ったのか。
 (回答) 麻酔下にて胸腔穿刺を行い、心臓から採血した。
- 質問 19) 血糖値は下がり、HOMA-IR は変わらない。インスリン感受性評価のためにインスリン負荷試験が必要と考えるが実施したか。
 (回答) 実施していない。交感神経系の亢進を認めるが、短期的な応答なので、インスリン感受性には影響が生じないと考えている。
- 質問 20) ケージ交換時、マウスを別のケージに移す作業をしているが、対照群に対しても同様の作業をしているか。今回の新規環境ストレスは、それら作業を含めた新規環境負荷ということか。
 (回答) 対照群に対して尾をつかんで上げて戻すという作業は行わなかった。今回の新規環境負荷は、それら作業も含めた負荷と考えている。
- 質問 21) 16 時における低血糖について、ヒトではストレスで血糖が上がるはずだが、経時的な変化の観点も含めてどのように考えるか。
 (回答) 16 時に低血糖だったのは、体温上昇や身体活動増加により、グルコースを利用したためと考えている。今回、10 時、12 時時点の測定は行っていないが、血糖が上昇していた可能性が考えられる。
- 質問 22) 今回は明期にケージ交換負荷を行っているが、暗期でも同様の結果が得られると考えるか。
 (回答) 暗期に行った場合は、身体活動の差が生じにくいことから、体重変化量はやや小さくなることが予想される。実際に新規環境の負荷を評価するために必要な実験であり、検討すべき点と考える。
- 質問 23) 1 か月間以上の長期間の継続的な負荷を実施した場合、マウスには負荷に対する耐性が生じると考えられる。ストレスに対するレジリエンス (耐性) という観点から、長期負荷についてはどのような結果を予想しているか。
 (回答) 長期のケージ交換負荷で慣れが生じ、今回得られたようなストレス反応は出にくくなることが予想される。次の研究では、その耐性の機構を栄養面で解析できればと考えている。
- 質問 24) 心臓、肝臓の重量は、どのように測定したのか。
 (回答) 麻酔後、解剖時に臓器を採取し、湿重量を測定した。

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。