

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 393 号		学位申請者	大山 健太郎
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (医学・ <del>歯学</del> ・学術)
	副査	西 順一郎	副査	杉浦 剛
	副査	佐藤 友昭	副査	犬童 寛子

主査および副査の5名は、平成28年12月15日、学位申請者 大山 健太郎君に面接し、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) グリチルレチン酸誘導物質のバイオフィルムへの影響はどうか。

(回答) ミュータンス菌でバイオフィルムへの影響を検証した際には、著明な効果は認められなかった。

質問2) 今回の研究で用いたもの以外にも、グリチルレチン酸誘導物質はあるのか。

(回答) グリチルレチン酸誘導物質製剤として最も有名である強力ネオミノファーゲンCは、グリチルリチン酸モノアンモニウムをその主成分としており、これがあげられる。

質問3) 栄養要求度試験におけるグリチルレチン酸の濃度は静菌作用を示す時のものか、殺菌作用を示す時のものか。

(回答) 静菌作用を示す時のものを用いて評価を行っている。

質問4) グリチルレチン酸誘導物質における抗菌作用とRNAIII発現抑制との間に何か関連性はあるのか。

(回答) 黄色ブドウ球菌においては、その増殖と比例してRNAIII発現が亢進し、これが菌のクオラムセンシング機構に関与していると考えられている。従って、グリチルレチン酸誘導物質により黄色ブドウ球菌の増殖が抑制されれば、同時にRNAIII発現も抑制され、その結果、菌の病原性因子発現の低下を生じることとなる。

質問5) 今回抗菌作用を示したグリチルレチン酸誘導物質の濃度は、臨床応用されている強力ネオミノファーゲンCに含まれる濃度と比較してどうなのか。

(回答) 今回抗菌作用を示した濃度は、強力ネオミノファーゲンCに含まれる濃度と比較して、低濃度である。

質問6) グリチルレチン酸誘導物質の長期連用による偽アルドステロン症等の副作用発生の可能性はないのか。

(回答) 現在臨床応用されている強力ネオミノファーゲンCでは、副作用として偽アルドステロン症が挙げられているものの、その発生頻度は極めて低いとの報告がある。

質問7) ゲンタマイシンとの相乗効果の機序をどう考えるか。

(回答) ゲンタマイシンは細菌のタンパク合成阻害剤であり、菌体内に浸透することによりその効力を発揮する。従って、グリチルレチン酸誘導物質により菌の膜透過性に何らかの変化が生じ、その結果ゲンタマイシンの浸透性が上昇して相乗効果を示しているのではないかと推測している。

質問8) グリチルレチン酸誘導物質により一部病原性因子の発現亢進が認められるが、これをどう考えるか。

(回答) 発現上昇を認めている病原性因子は、いずれも菌の付着に関与するものであり、付着因子は感染の初期等、菌が生育に不利な環境にある際に発現が亢進する因子であるため、グリチルレチン酸誘導物質により菌の増殖抑制が生じている環境下において発現亢進が認められるのは、理論的に矛盾はないと考える。

質問9) 実験によってMRSA及びMSSAの双方を被験菌としているものとMRSA単独を被験菌としているものがあるが、実験としてその評価の仕方で普遍性が有るといえるのか。

## 最終試験の結果の要旨

(回答) MIC および増殖曲線において、MRSA・MSSA 双方とも同様の傾向を示したことから、厳密な意味での普遍性はないかもしれないが、MRSA 単独での実験結果も MSSA において同様の傾向を示すことが推測される。また、マイクロアレイに関しては菌のゲノム配列が判明している菌株という意味で、MW2 株を被験菌として用いている。

質問 1 0) 実験によってグリチルレチン酸の濃度が異なるがその訳は。

(回答) 全実験を通して基本的な理念としては、1 MIC 濃度及び sub-MIC 濃度での効能を検証したいというものが根底にあり、当初は 1MIC 及び 1/4MIC 濃度での検証で統一していたが、1/4MIC で良好な実験結果が得られなかったため、一部 1/2MIC で sub-MIC 濃度の評価を行うこととなった。

質問 1 1) 生育環境下と非生育環境下との違いは何か。

(回答) 生育環境下とは、いわゆる培地のことで細菌の増殖に必要な栄養素が含まれていることをいう。

質問 1 2) グリチルレチン酸誘導物質の菌の付着・凝集能への影響はあるか。

(回答) GRA では菌液中にこれを添加すると沈殿物を生じることから、凝集を生じている可能性は考えられる。

質問 1 3) MIC において MRSA・MSSA に差はなかったとあるが、どのような検定方法でこれを示しているのか。

(回答) MIC に関して MRSA と MSSA との間で検定は行っていない。同様の傾向にあることを示したのみである。

質問 1 4) Fig. 2、Fig. 3 中の矢印の意味は何か。

(回答) グリチルレチン酸誘導物質を添加した時点を示している。

質問 1 5) グリチルレチン酸が栄養代謝に影響を及ぼすとあるが、それらの代謝産物についての検討は行ったのか。

(回答) 代謝産物についても、これから検証していくこととしたい。

質問 1 6) Fig. 2 ではデータのばらつきに SD を、Fig. 5 では SE を用いて表しているが、その違いはなにか。

(回答) Fig. 5 のデータの分布が正規分布から外れており、標本平均で母平均を推測すると推測誤差を生じると考えられたことから、標準誤差での表記となった。

質問 1 7) マイクロアレイの結果で adaptation to atypical condition が上昇しているが、これについてどう考えるか。

(回答) グリチルレチン酸誘導物質の作用により環境変化への適応を生じている可能性があり、長期連用すれば将来的には耐性を生じてくる可能性も考えられる。

質問 1 8) 今回用いた黄色ブドウ球菌臨床分離株 50 株の中で、バンコマイシン耐性株はあるのか。

(回答) バンコマイシンに対しての MIC を測定していないので確かなことは言えないが、バンコマイシン低感受性株であれば含まれている可能性はある。

質問 1 9) マイクロアレイでファージ関連遺伝子が上昇していることから、グリチルレチン酸誘導物質の抗菌効果は、溶菌作用と考えると良いのか。

(回答) マイクロアレイで用いたグリチルレチン酸誘導物質の濃度は静菌作用を示す 1 MIC 濃度であるため、溶菌作用とは別の機序によるものと考えられる。

質問 2 0) グリチルレチン酸に今回注目した理由は。

(回答) 種々の抗菌薬耐性菌が問題となっている現在において、これまでの作用機序とは異なる抗菌効果を有する物質の模索を行う中で、抗ウイルス作用を示すグリチルレチン酸に着目した。

質問 2 1) 薬剤作用後 8 時間までしか観察していないが、それ以上の時間が経過するとどのようになると考えるか。

(回答) グリチルレチン酸誘導物質によって菌には静菌作用が認められていることから、8 時間以降時間が経過しても菌の増殖が生じることはないと考えている。

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。