

最終試験の結果の要旨

報 告 番 号	総 研 第 509 号		学位申請者	井内 寛之
審 査 委 員	主 査	西 順一郎	学 位	博士 (医学)
	副 査	小松澤 均	副 査	橋口 照人
	副 査	金蔵 拓郎	副 査	井上 博雅
<p>主査および副査の5名は、平成31年3月4日、学位申請者 井内 寛之 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) 細菌を繰り返し培養することでホスホリルコリン (PC) 発現は変化しないのか。 (回答) 複数菌株で2回培養しPC発現を測定したが、変化は認めなかった。</p> <p>質問2) 細菌の貪食や補体の活性化とPCに関係はあるか。 (回答) CRPとPCの結合は古典的補体経路を活性化し、オプソニン作用や細胞膜障害性複合体の活性化、好中球やマクロファージなどの貪食細胞の走化性亢進をもたらす、自然免疫系の一つとして生体防御に働く。</p> <p>質問3) PC発現と細菌接着の機序はどのようなものか。また、それは血小板活性化因子 (PAF) 依存性か。 (回答) PCはPAF類似の構造を呈し、上皮細胞上のPAF受容体 (PAF-R) によって認識され結合する。そのため、PAF-R依存性ではなく、PC依存性である。</p> <p>質問4) 細菌のPCを阻害しても完全に接着を抑制できないのはなぜか。 (回答) PCはPAF-R以外の受容体であるasialo-GM1などの受容体と結合するため、PCとPAF-R以外の接着因子が関与すると考える。</p> <p>質問5) PAF-Rの発現に関与する要因は何か。 (回答) アデノウイルスなどのウイルス感染やタバコの煙から抽出したエキスが、PAF-Rの発現を亢進させることが報告されている。</p> <p>質問6) 細菌を接着させると培養細胞の形態変化はみられたか。 (回答) 細菌を細胞に接着または細胞内侵入させた後に光学顕微鏡で確認したが、明らかな細胞の変化は認めなかった。</p> <p>質問7) PCと好中球遊走の関係性はあるか。 (回答) 細菌から遊離されるPCが好中球のPAF-Rに結合して好中球の遊走を阻止することが知られている。</p> <p>質問8) 感染成立の定義は何か。 (回答) 各感染症で異なるが、例えば中耳炎では細菌が細胞に接着すること、菌血症は細菌が流血中に入った時点で感染が成立すると定義されている。</p> <p>質問9) 病原因子としてどのようなものがあるか。 (回答) 今回示した接着因子以外に莢膜や種々の毒素が病原因子と考えられている。</p> <p>質問11) 肺炎球菌の中で細胞内に侵入するR6x株の特徴は何か。 (回答) Detroit cellはhuman polymeric immunoglobulin receptor (hplgR) を有し、R6x株のみがこれを受容体として細胞内侵入できることが報告されている。</p> <p>質問12) サポニンを使った理由は何か。 (回答) 細胞を壊し、細胞に接着した細菌または細胞内に侵入した細菌を検出するためにサポニンを使用した。</p> <p>質問13) <i>in vivo</i> の実験で鼻腔内に投与した試薬の量はいくらか。また、対照は何を使用したか。 (回答) 各試薬を両側鼻腔に計10μl投与し、対照にはPBSを使用した。</p> <p>質問14) 和歌山大学の保富先生から分与された菌はどの部位から分離されたものか。また、分離した部位によって細菌の接着性に違いはなかったか。 (回答) 保富先生から頂いた細菌は小児急性中耳炎症例から分離されたものである。また、分離された部位によって細菌の接着性に差は認めなかった。</p>				

最終試験の結果の要旨

- 質問 15) 正常細胞の PAF-R の発現は検討したか。
 (回答) ヒト鼻粘膜上皮細胞と頬粘膜上皮細胞の PAF-R の発現は Detroit cells と比較して統計学的に有意に高かった
- 質問 16) PC-high group と PC-low group に分けた理由は何か。
 (回答) PC の病原性を確認し、PC 粘膜ワクチンの有効性と安全性を確認するために分けた。
- 質問 17) 細菌の培養条件と時間はどのように設定したか。また、OD 値で確認しているか。
 (回答) 凍結した細菌浮遊液を液体培地で培養し、OD 値が一定になるように確認して実験に使用した。
- 質問 18) 細菌の培養時間によって PC 発現は変化したか。
 (回答) 培養開始 1 時間までは PC 発現は少ないが、時間経過とともに PC 発現が徐々に高くなった。そのため、本研究では late-log phase の細菌を使用した。
- 質問 19) PC 発現を規定している遺伝子は何か。
 (回答) 肺炎球菌では *licA-D* 遺伝子、インフルエンザ菌では *lic1-3* および *lgtC* の 4 つの遺伝子によって規定されている。
- 質問 20) 細菌に発現する PC に抗 PC-IgA は結合するのか。また、各細菌で比較しているか。
 (回答) FACS で測定する時に無処理の細菌でゲートを作成し、抗 PC-IgA で処理した細菌と比較した。いずれも無処理の細菌と比較して、ヒストグラムが有意に右に移動したことから抗 PC-IgA は細菌に結合すると考える。
- 質問 21) 細菌が細胞に接着すると PAF-R から何らかのシグナルが出され、それによって細菌が細胞内に侵入するのか。接着と侵入は一連の動きなのか。
 (回答) PC と PAF-R との結合が誘因になっていると思われるが、そのシグナルカスケードは不明である。
- 質問 22) 肺炎球菌が細胞内に侵入しなかったのはなぜか。
 (回答) 肺炎球菌の細胞内侵入は、肺炎球菌の CbpA と鼻咽頭上皮細胞に発現している pIgR の結合によることが報告されている。今回使用した Detroit cell には pIgR が発現していない可能性があるが、確認できていない。
- 質問 23) 肺炎球菌とインフルエンザ菌の投与量が違うのはなぜか。それは PC 発現と関係しているか。また細胞に接着した菌数は肺炎球菌の方が多いのではなぜか。
 (回答) コロニー数を測定するため、投与細菌数を調整したことによる結果と考える。インフルエンザ菌は PC 発現が高く、それに伴い接着細菌数は肺炎球菌よりむしろ多かった。また、細菌接着率 (接着細菌数/投与した細菌数) はインフルエンザ菌の方が高かった。
- 質問 24) FACS による PAF-R の変動は有意なのか。
 (回答) 輝度を統計学的に処理したところ、対照と比較して有意に PAF-R は発現していた。
- 質問 25) Fig.3 において、肺炎球菌とインフルエンザ菌の阻害効果に違いがあるのはなぜか。
 (回答) PC 以外の接着因子として、肺炎球菌では PsaA や PspC、インフルエンザ菌は pili があり、それによる違いと考える。
- 質問 26) PC-high group でも阻害が十分でないと言えるが、試薬は至適濃度なのか。
 (回答) 各細菌に対して最も阻害可能な試薬の量に調整し使用したので至適濃度と考える。
- 質問 27) 口腔常在菌の PC 発現はどのように確認したか。
 (回答) うがい液から採取された全ての細菌の PC 発現を確認した。細菌の分離同定はしていない。
- 質問 28) 同じ血清型の肺炎球菌で PC 発現に違いはあったか。
 (回答) 血清型が判明している菌で比較すると PC 発現は異なっていた。

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。