

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第	号	学位申請者	山下 剛史
審査委員	主査	於保孝彦	学位	博士 (医学 (歯学) 学術)
	副査	中村典進	副査	松口 徹也
	副査	中村利明	副査	佐藤友昭

主査および副査の5名は、令和元年11月8日、学位申請者 山下 剛史君に面接し、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) *Streptococcus mutans* (Sm) 臨床分離株の分離・同定はどのように行ったか。

(回答) 安静時唾液を採取してう蝕細菌選択培地 (Mitis-Salivarius 寒天培地にバシトラシンとナリジクス酸添加) に播種し、生えてきたコロニーを液体培地にて培養後、菌体から DNA を抽出し、Sm 特異的プライマーにて PCR を行い同定した。

質問2) グリチルレチン酸 (GRA), 3-サクシニルオキシグリチルレチン酸二ナトリウム (GR-SU) 以外の誘導体が抗菌力をもたない理由は何か。

(回答) GRA₅、GR-SU 以外の誘導体は非水溶性の誘導体であり、今回の実験で調整した 2048 µg/ml では完全に溶解しておらず、十分な抗菌力を持たなかったものと思われる。

質問3) 増殖中に GR-SU を加えた場合、2MIC でも増殖するのはなぜか。

(回答) GR-SU を添加した時点は対数増殖期の初めにあたり、既に一定量の菌が増殖していたためと考えられる。

質問4) 増殖を阻害しない濃度の GR-SU でバイオフィルムの形成が阻害される理由はなにか。

(回答) 今回、低濃度の GR-SU がのバイオフィルム形成に重要な働きをしているグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) の発現に与える影響を調べたが、明らかな影響は認められなかった。しかし、今回の実験は詳細を検証していないことから、今後の検討課題としたい。

質問5) GR-SU はバイオフィルム形成のための菌の菌面への初期付着を阻害する可能性は考えられるか。

(回答) GR-SU が菌体表面に付着することで Sm の菌面への初期付着に必要な菌体表層タンパク質の機能を阻害する可能性が考えられる。

質問6) GRA と GR-SU の違いは何か。

(回答) 甘草からの抽出エキスであるグリチルリチン酸を加水分解したものがグリチルレチン酸 (GRA) であり、その誘導体がサクシニルグリチルレチン酸二ナトリウムとなる。

質問7) MIC を解析した臨床分離株 100 株は歯科関係者から分離しているが、一般のものとは比べてバイアスがある可能性があるがそこは問題ないか。

(回答) 歯科関係者から分離はしているが、ミュータンス菌の口腔内への感染は乳幼児期に生じることが多く、歯科関係者の両親や家族が歯科関係者である割合は多くはないと考えられるので問題はないと思われる。

質問8) GR-SU の培地への添加は Sm の増殖を阻害するのに一定時間の作用で菌数に変化がないのはなぜか。

(回答) 培地は栄養成分があるため菌は盛んに分裂を行うが、GR-SU 添加により糖が取り込めず分裂が起こらないため、増殖は阻害された。しかし、一定時間作用させる系ではバッファーを用いているため、菌が増殖できない条件であることから、GR-SU を添加しても変化は認めなかったと考える。

最終試験の結果の要旨

質問 9) 4 MIC の GR-SU 処理で ATP の放出が認められるが生菌数に違いがないのはなぜか

(回答) 通常、溶菌が生じて菌体内から ATP が放出されると、生菌と比較した場合の数百倍から数千倍の ATP が放出される。今回、4 MIC の GR-SU 処理で放出量は 1/4MIC~2MIC の約 2.5 倍程度なので、大多数は溶菌していないことが考えられ、生菌数に違いはなかったと解釈している。

質問 10) バイオフィームは細菌が身を守るために形成すると認識しているが、GR-SU 作用時にバイオフィーム量が減少するのはなぜか。

(回答) ミュータンス菌のバイオフィームは「菌体そのもの」と「菌体外多糖であるグルカン」の 2 つが主な構成要素となる。今回は GR-SU の作用により糖の取り込みが抑制されることで「菌数の増加」と「菌から産生されるグルカン」の両方が抑制された結果、バイオフィームの減少につながったものと考えられる。

質問 11) GR-SU はグリチルレチン酸の誘導体だが、グリチルレチン酸に抗菌力はあるのか。

(回答) グリチルレチン酸は水に溶けにくいのが、過去の報告で黄色ブドウ球菌に対する抗菌力があることが報告されている。

質問 12) GRA、GR-SU の抗菌力は同程度だが、GR-SU に着目した理由はなにか。

(回答) GR-SU は GRA に比較し水溶性が高かったこと、かつ今回データは示していないが GRA と比較すると GR-SU の方が MIC 値が低い菌株が多かったことがその理由となる。

質問 13) 256 $\mu\text{g/ml}$ の GR-SU は、生体に用いても問題ない濃度なのか。

(回答) 粘膜に使用する点眼薬として、グリチルリチン酸二カリウムが 2 mg/mL の濃度で使用されているものもあるので、口腔内に用いる濃度として 256 $\mu\text{g/ml}$ は問題ないと思われる。

質問 14) 糖取り込み阻害を実験的に解析していないのはなぜか。

(回答) 糖の取り込みを検証する実験としては、糖に放射活性などをラベリングして定量する方法などが考えられるが、今回は行えなかったため、今後の検討課題としたい。

質問 15) GR-SU は甘草中に含まれるのか。

(回答) 含まれない。含まれているのはグリチルリチン酸で、グリチルリチン酸を加水分解したものがグリチルレチン酸であり、その誘導体が GR-SU となる。

質問 16) GR-SU を洗口剤として用いる場合、長期間の使用が想定されるが副作用はないか。

(回答) グリチルリチン酸はステロイドと構造が似ているため副作用として「偽アルドステロン症」と「低カリウム血症」の可能性が考えられるが、これらの副作用は内服した場合に限られるため、GR-SU を洗口剤 (= 含漱剤) の成分として用いたとしても同様の副作用が生じる可能性は低いのではないかと考える。

質問 17) GR-SU には抗炎症効果と抗菌効果があるが作用の違いはなにか。

(回答) GRA の構造はステロイドホルモンの 1 種であるコルチゾンに類似しており、炎症性のサイトカインの発現を抑制して抗炎症効果を示す、という報告がある。また抗菌効果は GR-SU が菌体表面にある表層タンパクに作用することで糖の取り込みを抑え、菌の増殖を抑制することで抗菌効果を発揮すると考える。

質問 18) GR-SU の Sm に対する作用点は何か？

(回答) GR-SU は菌体表面や表層タンパク質へ付着し、細胞膜上に存在する糖の取り込みに関与するトランスポーターに作用することで、糖の取り込みを抑制し抗菌作用を発揮すると思われる。

質問 19) 他の天然由来抗菌性物質と比較した際の GR-SU の利点は何か。

(回答) 抗菌作用を持つことだけでなく、皮膚や粘膜に対する抗炎症作用を併せ持つことである。歯肉炎や歯周炎に対して抗菌力とともに、抗炎症作用を有する点が利点であると考えられる。

質問 20) GR-SU は抗菌効果と抗炎症効果を併せ持つが、口腔内におけるそれらの具体的な知見はあるのか。

(回答) GR-SU では具体的な知見はない。

質問 21) GR-SU の長期使用は耐性菌を出現させる可能性はあるか。

(回答) GR-SU の抗菌効果は抗菌薬のように細菌のある特定の部位に作用して抗菌作用を発揮する、というのではなく、「菌体表面に付着することで糖の取り込みに関する因子を阻害することで、抗菌作用を示す」ことが考えられるので、耐性菌の出現の可能性は低いと考える。

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。