

最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 569 号	学位申請者	辻井 利弥
審査委員	主査	於保 孝彦	学位 博士 (歯学)
	副査	松口 徹也	副査 佐藤 友昭
	副査	西谷 佳浩	副査 中村 利明

主査および副査の5名は、令和2年6月23日、学位申請者 辻井 利弥 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) 口腔常在細菌に対する植物抽出物の抗菌効果の評価において、オウバク、ユッカ、ブラックジンジャーを選択した理由は何か。

(回答) 天然由来植物で、過去に抗菌効果や抗炎症作用など様々な作用が報告されているため。

質問2) 植物抽出物の溶解方法は具体的にどのように行ったのか。

(回答) オウバク、ブラックジンジャーは10%エタノールに溶解し、ユッカは滅菌水に溶解することで使用した。

質問3) *S. mutans* の臨床分離株の分離で使用したプライマーは、どの遺伝子領域から設計したのか。

(回答) 過去の論文を参考に、*gfb* の領域から *S. mutans* に特異的なプライマーを設計した。

質問4) 生育条件下の増殖能の評価で、菌接種時と対数増殖期にオウバクを添加した目的は何か。

(回答) 菌接種時と対数増殖期の添加で、菌量の違いがオウバクの効果に影響するか検証するため。

質問5) 生育条件下と非生育条件下で検証を行っている理由は何か。

(回答) 抗菌物質によっては、環境により細菌の感受性が異なるため、両条件で検証した。

質問6) 非生育条件下での生存率の検証で TSA 培地に菌を播種後、2日培養した理由は何か。

(回答) 1日間培養した状態で Colony Forming Unit (CFU) の計測を行うとコロニーの大きさが小さく、カウントしにくいいため、2日間培養することでコロニーを成熟させた。

質問7) ATP リリースアッセイにおいて、10%エタノールのみで検証している理由は何か。

(回答) 本研究ではオウバクを10%エタノールに溶解させているため、10%エタノール単独での ATP のリリースがないか検証するため。

質問8) pH ドロップアッセイで塩化マグネシウムを添加している目的は何か。

(回答) 過去の論文を参考にしており、人工唾液の成分に近似させるために添加した。

質問9) オウバクのグルコシルトランスフェラーゼ (GTF) 遺伝子発現に対する影響を検証しているが、グルカン合成活性に対する作用は検証していないのか。

(回答) 本研究ではグルカン合成活性に対する作用は検証していない。今後の研究課題としたい。

最終試験の結果の要旨

質問 10) 共焦点レーザー顕微鏡によるバイオフィルムの三次元構築の蛍光染色の方法は何か。

(回答) 細胞膜透過性のチアゾールオレンジにより、生菌・死菌を緑に染色し、細胞膜非透過性のプロピジウムイオダイドにより死菌を赤色に染色した。プロピジウムイオダイドは細胞膜が損傷している死菌のみ染色することができる。

質問 11) 口腔常在細菌に対する最小発育阻止濃度 (MIC) の測定で、*S. salivarius* が高い MIC 値を示したのはなぜか。

(回答) 実際に検証はしていないが、*S. mutans* と *S. salivarius* の糖代謝に関与する因子に関して、オウバクに対する感受性が異なることに起因するものと考えられる。

質問 12) オウバクには抗菌効果を示す含有成分としてベルベリンがあるが、*S. mutans* に対する抗菌効果はベルベリンを介した効果か、それともそれ以外の成分の効果なのか。

(回答) オウバクはベルベリンの他に、リモニンやフェノール酸、キナ酸、リグナン、フラボノイドなど様々な成分を含有しており、複合的な作用で抗菌効果を示したと考えている。

質問 13) 抗菌効果を示すベルベリンはどのような作用機序を示すのか明らかになっているか。

(回答) ベルベリンは、殺菌作用により抗菌効果を示すことが分かっているが、その作用機序に関しては未だ明らかにされていない。

質問 14) オウバクを他の抗菌成分と比較した場合の利点は何か。

(回答) 天然由来であり、*S. mutans* の増殖能を抑制して抗菌効果を示すこと、糖代謝を阻害して酸産生能を減少させること、耐酸性を抑制して病原性を低下させることなどが挙げられる。

質問 15) オウバクの他にベルベリンを含む植物との比較検証はしているか。

(回答) ベルベリンを含む植物には他にオウレンなどがあるが、比較検証は行っていない。

質問 16) pH ドロップアッセイで pH 低下の抑制が認められるが、オウバクに含まれる成分が緩衝作用を有する可能性はないか。

(回答) 本研究でオウバク添加により pH 低下の抑制が認められた原因は、酸産生に関与する遺伝子 (*enolase*, *pyruvate kinase*, *lactate dehydrogenase*) 発現が減少したためと考えられる。今回、緩衝能に対する検証は行っていない。今後の研究課題としたい。

質問 17) 不溶性グルカンの形成に関与する酵素 GTF-C について、GTF-B と比較した特徴は何か。

(回答) GTF-C は GTF-D の存在下で不溶性グルカンを産生し、*S. mutans* が歯面に付着する基礎となる。それに続いて GTF-B が大量の不溶性グルカンを産生することで *S. mutans* の歯面への付着を強化する。

質問 18) 歯磨剤や洗口液への臨床応用が検討されているが、オウバクの苦味はどう考えているか。

(回答) オウバクの主成分であるベルベリンやリモニンには苦味があり、歯磨剤や洗口液に臨床応用する際にご指摘の通り味が問題になる可能性がある。そのため、添加する際には味を改善する成分との併用を検討する必要があると考えている。

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。