

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 596 号	学位申請者	藤田 愛弓	
審査委員	主査	於保 孝彦	学位	博士 (歯学)
	副査	南 弘之	副査	齋藤 充
	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3年1月21日、学位申請者 藤田 愛弓 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) *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (Aa) は歯周疾患の発症に最も関連が深いとされる菌群である red complex に属さないが、なぜ研究対象をして選んだのか。

(回答) バイオフィルムを分類した Socransky のピラミッドにおいて Aa は green complex に属するが、重篤な歯周組織破壊を伴う侵襲性歯周炎との関連性が報告されており、重要であると考えたため選択した。

質問2) 工業化されて安定して等質のものを確保できると思われる血清などと比べて、成分の日間・日内変動や分泌時の刺激によって影響などがある唾液を使用したことについてはどの様に考えているのか。

(回答) ご指摘の通り、血清と比べると影響は否定できない。しかし本研究では、1人のボランティアの方から同じ日に採取したため、比較的影響は少ないと考えている。

質問3) 唾液中のどの成分がこの実験に影響したと考えているのか。

(回答) バイオフィルム形成試験において、唾液含有培地で培養した菌のバイオフィルム形成量が減少したことを考えると、唾液中の糖蛋白などが影響している可能性が考えられる。

質問4) 歯周病原細菌の遺伝子発現条件の知見は少ないのか。

(回答) 鉄欠乏環境を再現するなど、部分的に検証している報告はあるが本研究のように、多様な条件を設定し、検証している様なものはない。

質問5) 血清培地は仔牛を使用しているが、ヒト血清での検証はしなかったのか。

(回答) ヒト血清は入手が難しく、比較的入手しやすい仔牛血清にて検証した。

質問6) 血清は、ヒト血清ではなく、仔牛血清を用いているが結果に影響はないのか。

(回答) ヒトと仔牛の血清成分のうちアミノ酸について検証した際には、大きく違いはなかった。

そのため、その他も成分に大きな違いがあると考えておらず、影響は少ないものと考えている。

質問7) Omp39 のポーリンの機能とは、鉄イオンの透過もしくは他の物質の透過を行っているのか。

(回答) 機能としては未だ不明な点が多いが、鉄イオンの透過を行っているようなポーリンとは考えていない。イオンチャネルのような親水性物質の透過を行なっていると考えている。

質問8) FecB の機能としてシデロフォアトランスポーターとあるが、それは何か。

(回答) シデロフォアは、生体内など遊離鉄が少ない中で、細菌が宿主側から鉄を奪取するために産生する蛋白である。FecB はシデロフォアと結合した鉄を生体内に取り込む際に必要な蛋白である。

質問9) 各血清型の菌株の特徴はあるのか。また歯周炎の重症度への影響はあるのか。

(回答) 血清型 a は侵襲性歯周炎と慢性歯周炎の患者から分離される。血清型 c は歯周炎患者だけでなく、健康な患者からも分離される。血清型 d は慢性歯周炎の患者から分離される。重症度への影響については

## 最終試験の結果の要旨

不明だが、毒性が一番強いと考えられているのは、血清型 b である。

質問 1 0) 今回の結果を歯周病の予防や重症化予防・薬剤開発・予後の判定など臨床への応用についてはどの様に考えているか。

(回答) 本研究で得られた菌側の生体内を模倣した条件での網羅的な解析結果を用いて、抗菌薬の感受性に関与する因子を調べ、より効果の期待できる抗菌薬の選択に役立つ可能性がある。

質問 1 1) 唾液・血清の条件で 50%含有にしている理由と鉄キレーターの濃度の決め方は何か。

(回答) コントロールの培地が 100%培地なので、等量 (5 ml) の唾液もしくは血清と 2 倍濃縮 AAGM を混合し、100%AAGM と 50%唾液もしくは血清からなる培地として使用した。キレーター濃度に関しては、既報を元に、プレ実験にて検証し、濃度設定した。

質問 1 2) 血清型は a-e の 5 つの型がある中で、a-b の 4 型しか使用していないのは何故か。

(回答) 研究室にて確保でき、入手が容易なため、使用した。

質問 1 3) 菌株間で使用した菌の増殖は、Fig. 1 の増殖曲線と同じ様になるのか。その違いの原因は何が考えられるのか。

(回答) 通常培地における対数増殖期に達するまでの増殖時間は、HK1651 株で 10 時間、Y4 は 5 時間 45 分といったように、菌株間における増殖性も大きく異なっている。増殖性の違いについては、不明な点が多いが、一部には SNP の存在も関係する可能性があるが、その他にも菌株間における異なる代謝活性などの可能性も考えられる。

質問 1 4) 遺伝子発現の検証では対数増殖期における発現を見ているとのことだが、omp の中でも注目している omp100 は終止期において発現上昇している。それでも対数増殖期を選択した理由は何故か。

(回答) ご指摘の通り、omp100 の遺伝子発現は終止期にて遺伝子発現が上昇しているが、本研究では、omp100 以外の遺伝子発現が上昇傾向であった対数増殖期を検証することとした。

質問 1 5) 唾液の採取の際の唾液の種類(刺激唾液/安静時唾液)は何か。

(回答) 基本的に安静時唾液だと考えているが、ご指摘の通り、最終的な採取量 (50 ml) を考えると刺激唾液も含まれている可能性はある。

質問 1 6) バイオフィルム量を測定する時、クリスタルバイオレット染色した後に乾燥させてから計測したとのことだが、それではバイオフィルムの厚みに関して反映はされていないのではないか。

(回答) 今回得られた結果では、バイオフィルムの量自体が厚みのある状態ではなかったため、溶解しての計測の必要性はなかった。

質問 1 7) 生体内環境を模倣した条件で唾液含有培地と血清含有培地の鉄の濃度を同程度としたときの唾液と血清で増殖における動態が異なるのは何故か。

(回答) 両者の鉄結合性タンパクの存在量は、血清中が高く、同量の鉄成分が含まれる培地では鉄結合性蛋白の多い血清中において、より遊離鉄が少ないことが予想される。そのため、血清含有培地で認められた増殖遅延が唾液含有培地では認められなかったと考えられる。

質問 1 8) 固形培地において、ompA2 と lktA はなぜ減少したと考えられるか。

(回答) 今回検証した病原性遺伝子は、寒天培地にて菌体密度の上昇とともに遺伝子発現性が上昇する傾向を認めたが、液体培地において発現上昇した ompA2 と lktA については、発現の調節のためのメカニズムが他とは異なる可能性が考えられる。

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。