

## 最終試験の結果の要旨

報告番号	総研第 277号	学位申請者	玉井 真理子
審査委員	主査	河野 嘉文	学位 博士 (医学・歯学・学術)
	副査	小松澤 均	副査 橋口 照人
	副査	松藤 凡	副査 速見 浩士
<p>主査および副査の5名は、平成26年1月30日、学位申請者 玉井 真理子 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) バイオフィルムが形成されたことの確認はどう行ったか。レビテーションによる処理で、バイオフィルムが減少したことは肉眼で見えたか。</p> <p>(回答) バイオフィルムは、コラーゲン膜が黄色のスライム状に見える菌塊で覆われていることを肉眼的に確認し、さらに表面を洗浄する処置を行い、容易に脱落することなく十分に接着していることを確認した。また、処理によるスライム状の菌塊の減少は肉眼的に観察できた。</p> <p>質問2) 実際の臨床応用では、水槽に創部を浸すのか。</p> <p>(回答) 創のある部位を直接水槽内に浸す。</p> <p>質問3) 感染創に対しては有効か。</p> <p>(回答) 今回検討していないが、感染創の表面の菌量を減少させる効果はあるものと思われる。しかし、組織の深部に浸透している菌に対しては超音波、銀イオン、オゾンは浸透しないと推測する。</p> <p>質問4) 内視鏡などオートクレーブ滅菌できないものに応用することは可能か。</p> <p>(回答) 本来そうした目的で開発された機器で、ゴム手袋や紙コップにも使用されている。内視鏡などへの使用も可能である。</p> <p>質問5) コラーゲン膜に浸透した MRSA に対するレビテーションと銀イオンの処理で、5分では減少がなく10分後から減少した原因はどう考えるか。</p> <p>(回答) 装置の電源を入れてから銀イオンが溶出し始めるため、5分の段階では銀濃度が低かったことが原因と考える。</p> <p>質問6) 相加作用、相乗作用の定義は何か。研究の結果においてはどうか判断したか。</p> <p>(回答) 相加作用は、複数の要因のそれぞれ単独の効果の和と同じ作用、相乗作用は、個々の要因の和以上の効果を生じる作用のこと、と定義されている。本研究の結果においては、コラーゲン膜に浸透した条件では、レビテーションと銀イオン、オゾンによる相加作用、バイオフィルムを形成した条件では、相乗作用が得られたと判断した。</p> <p>質問7) 銀イオンとオゾンは細胞壁、細胞膜の破壊という類似した作用点であるが、それらを組み合わせることで効果が高まるのはなぜか。</p> <p>(回答) 実際に検証は行っていないが、銀イオンは細胞壁のペプチドグリカン、オゾンは細胞壁のリン脂質膜や細胞膜に優位に作用する、と考察している報告があるため、菌に対する主な作用点が異なることにより相加効果が得られたのではないかと考える。</p> <p>質問8) 正常皮膚に常在するブドウ球菌の量はどれくらいか。</p> <p>(回答) 日本人の健常皮膚上のブドウ球菌数を測定した報告では、<math>10^{0.1}/\text{cm}^2</math>であった。</p> <p>質問9) マウスの潰瘍に接種した菌量は、一般的な実験で使用されている菌量か。</p> <p>(回答) 今回使用した method は、同じ C57BL/6 マウスの潰瘍に黄色ブドウ球菌のバイオフィルムを形成した論文から引用したが、接種した菌量についての記載がなかったため、独自に菌量の希釈系列を作り潰瘍に接種し、3日後の菌の定量を行い、増殖かつ定着していることを確認した。</p>			

## 最終試験の結果の要旨

質問 10) バイオフィルムの quorum sensing system は、細菌にとってどのようなメリットがあるか。

(回答) Quorum sensing は、細菌がコロニー内の菌体密度を感知し、特定の遺伝子発現を制御するシステムで、細菌は生存に最適な菌数(密度)を維持しながら、また、一定の十分な菌数が確保された時点で病原性を発現することで環境中での生存や増殖を有利にするという利点を有している。

質問 11) 実験にアテロコラーゲン膜を使用した理由はなぜか。

(回答) アテロコラーゲン膜は I 型コラーゲンで構成されており、真皮は約 80%が同じ I 型コラーゲンであるため、皮膚組織のモデルとして使用した。

質問 12) 蛍光抗体の SYTO9 は何を染色しているのか。

(回答) SYTO9 は核酸染色剤であり、膜透過性を持つため、生菌の核酸に結合する。死菌の核酸にも結合するが、死菌の核酸には PI、SYTO9 とともに結合し、PI の赤色の方が発色が強いいため、死菌は赤に見える。

質問 13) メスを用いてマウスの皮膚に作成した潰瘍は、皮膚科学的に潰瘍の定義に当てはまるのか。

(回答) 潰瘍の定義は、真皮までの欠損であるため、定義通りである。

質問 14) 感染創において創傷治癒が遅延する機序は何か。

(回答) 細菌数の増加により創傷治癒が遅延する状態を臨界保菌状態といい、その機序はまだ全て解明されていないが、この状態の肉芽組織では、interleukin (IL)-6, 8, 10, matrix metalloproteinase (MMP)-3,7, macrophage inflammatory protein (MIP)-1 $\alpha$  といった炎症性サイトカイン、蛋白分解酵素などが増加していることが報告されている。この炎症性サイトカインや蛋白分解酵素により、創治癒過程の細胞増殖期における細胞外マトリックスの成熟の阻害や線維芽細胞や表皮細胞の増殖抑制が起こることにより創傷治癒が遅延するとされている。

質問 15) 処理後、水槽の水に残存した菌の viability の確認は行ったか。

(回答) コラーゲン膜に浸透した MRSA に対して、レビテーションに銀イオンとオゾンを用いた処理を行った後、水槽内の水を培養したがコロニーは認めなかった。

質問 16) 超音波の効果でブドウ球菌のクラスターが分離してコロニー数に影響するか検討したか。

(回答) その点については今後検討する予定である。

質問 17) 処理後に、水槽内や創面に菌が残存していることに対してはどうか対応するか。

(回答) 今後、銀イオンとオゾン濃度や処理時間を調整したりする必要があると考える。さらに、創面に対する処理を繰り返すことで段階的に菌量を減らすことで治癒に導くことができるのではないかと考える。

質問 18) バイオフィルムを形成させた条件で、6 株のうち A 株に対する効果がより高いのはなぜか。6 株で、接着に関わる遺伝子型の違いはあったか。

(回答) 6 株全てで有意に減少しているが、特に A 株の減少率が高い原因については、使用した水道水の水温ではないかと考えている。実際に、A 株とそれ以外の株の実験を行った時期は半年の期間があいているため、水温の違いにより銀イオンとオゾンの溶存濃度が異なった可能性があると考えている。接着因子については、コラーゲン接着遺伝子が B 株でのみ陽性であったが、殺菌効果は他株と違いは認めなかった。その他、フィブロネクチン結合タンパク、フィブリノーゲン結合蛋白、intercellular adhesion A,D はいずれも全ての株で陽性であった。

質問 19) 水槽内の銀イオン濃度を上げることは可能か。

(回答) 銀電極板に流す電流を調節することができるため、銀イオン濃度の調節は可能である。

質問 20) レビテーション単独での処理で、コラーゲン膜に浸透した条件では菌の減少がなく、バイオフィルムを形成した条件で減少が見られたのはなぜか。

(回答) バイオフィルムは 3 次元構造で高さがあるため、コラーゲン膜の表面に露出している部分はレビテーションの摩擦洗浄作用を受けやすく、バイオフィルムの脆弱化や脱落による菌の減少が見られたものと考えている。それに対し、菌がコラーゲン膜の内部に浸透した条件では、レビテーションの作用が十分に働かなかったのではないかと考える。

質問 21) バイオフィルムを形成させた条件で、レビテーション単独での処理群と銀イオン、またはオゾンを用いた群で有意差はあったか。

(回答) 有意差検定を行い、どちらも有意差があることを確認した。

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。