




学位論文審査の結果の要旨

平成 28 年 2 月 15 日

審査委員	主 査	星川 元史			
	副 主 査	徳田 雅明			
	副 主 査	村尾 孝児			
願 出 者	専攻	分子情報制御医学	部門	分子腫瘍学	
	学籍 番号	12D738		氏名	多田 彩乃
論 文 題 目	Cleansing effect of acidic L-arginine on human oral biofilm				
学位論文の審査結果	<input checked="" type="radio"/> 合格 <input type="radio"/> 不合格 (該当するものを○で囲むこと。)				

〔 要 旨 〕

【目的】塩基性アミノ酸であるL-arginineが、口腔内pHの低下を防ぎ、う蝕予防に有効であることが報告されている。一方、L-arginineはタンパク質の可溶化作用を示すことも知られている。本研究では、ヒト唾液中細菌由来バイオフィームに対するL-arginineの洗浄効果を検討した。

【方法】*Streptococcus mutans* GS5株を含むBHI+1% sucrose培地とL-arginine溶液を混合し、バイオフィームアッセイを行った。健常者の唾液をBHI+1% sucrose培地へ20%量添加してバイオフィームを形成させ、各々0.5 MのL-arginine、L-lysine、L-alanineまたはL-glycineで洗浄し、残存バイオフィーム量を比較した。う蝕原性バイオフィームとして唾液中に*S. mutans* GS5を混合したバイオフィームに対する効果も調べた。ディスク上の唾液由来バイオフィームをL-arginineで洗浄後、洗浄液を回収した。ディスクは生理食塩水で洗浄後、超音波処理により付着菌を遊離させた。それぞれの分画に含まれる細菌群を16S rDNA遺伝子を標的としたIlluminaシーケンスによって解析した。

【結果】L-arginineの*S. mutans*バイオフィームに対する効果は、pH3.5で有意に高かった。0.5 MのL-arginine、L-lysine、L-alanineまたはL-glycineを検討した結果、pH3.5に調整したL-arginineのバイオフィーム洗浄効果が最も高かった。0.5 MのL-arginine (pH3.5)はクエン酸緩衝液と比較して、唾液由来バイオフィームの除去効果が高かった。*S. mutans*を混合したう蝕原性バイオフィームに対しても、L-arginineは高い洗浄効果を示したが、クエン酸緩衝液にも同様に洗浄効果を認めた。唾液由来バイオフィームを洗浄後、ディスク上に残存した細菌群とディスクより剥離した細菌群を解析した結果、クエン酸緩衝液は*Streptococcus*属により高い洗浄効果を示し、酸性化L-arginineは非特異的にバイオフィームを構成する細菌群を除去した。

【考察および展望】以上の結果より、酸性化L-arginineによる洗浄は、生理食塩水、クエン酸緩衝液や他のアミノ酸溶液による洗浄と比較し、唾液由来バイオフィームを有意に除去した。酸性化L-arginine溶液は、洗口剤などの効果を高める添加剤としての応用が期待できる。

平成28年2月5日に行われた学位論文審査委員会においては、以下に示す様々な質疑が行われた。

1. *S. mutans*を培養する時に、一般的にBHI培地が使われているのか。→ 一般的である。
2. 試験液を洗口剤として用いた場合、口腔の正常細菌叢には影響がないと考えていいのか。
→ 明らかな殺菌性はないため、口腔細菌叢のバランスを破壊させないと考えている。
3. Arginine deiminaseは悪性黒色腫や肝癌の増殖を抑えるという報告があるが、今後L-arginineの口腔内悪性腫瘍の増殖抑制効果を研究する予定はあるか。→ 今後検討したい。
4. バイオフィーム抑制効果を調べた実験では0.25 MのL-arginineを使っているが、0.5 Mでも同じような結果となるのか。→ 0.5 Mでは浸透圧の影響が否定できないが、今後検討したい。
5. L-arginineが洗口後に口腔内に残留することで口腔細菌の増殖を抑える効果はないのか。
→ 残留したL-arginineに対する口腔細菌のarginine deiminase系の作用により、口腔内pHが上昇し、酸耐性である細菌の増殖を抑える可能性はある。
6. L-lysineでも効果があるようだが、それよりもL-arginineの効果が高いという理由は何か。
→ 酸性条件下でのL-arginineの陽性荷電がL-lysineよりも強いためと考えている。
7. L-arginineは5分間の接触では殺菌性がないようだが、洗口剤としての効果はあるのか。
→ L-arginineは細菌同士の付着に関わるタンパク質相互作用を抑制するので、デンタルプラークを歯面から除去しやすくする効果があると考えている。
8. 被検者4名の唾液中の細菌叢を次世代シーケンサーで解析しているが、被検者間で差がないと考えていいのか。
→ 主要な口腔細菌が検出されており、菌組成には大きな差がないと考えている。
9. 糖尿病と歯周病との関連が報告されているが、L-arginineは歯周病原菌にも効果があるか。
→ 今後、歯肉下バイオフィームに対する効果についても検討していきたい。
10. L-arginineの効果がpH3.5という酸性条件で高いということと、L-arginineのう蝕予防効果が口腔細菌の代謝による口腔内pHの上昇に起因することとはどのように関係しているのか。
→ L-arginineは酸性条件下で既に形成されたバイオフィームを除去し、残留したL-arginineが代謝されることでpHを上昇させ、新たなバイオフィーム形成を抑える可能性がある。
11. 口腔内pHが酸性になることで、ある特定の細菌が増殖しづらいということはないのか。
→ 口腔内には酸性条件下で増殖しにくい細菌も存在する。
12. *S. mutans*混合バイオフィームではクエン酸単独でも効果があるようだが、どのように作用しているのか。→ *S. mutans*が*Lactobacillus*と共凝集する際にカルシウムイオンが必要であるため、クエン酸のキレート効果により単独でも除去効果を示したと考えている。
13. *S. mutans*が多い人ではクエン酸を使用し、それ以外の人にはL-arginineを使うなど今後の展開はどのように考えているか。→ 口腔内細菌叢に応じて個人に適した口腔ケア製品を選択することでより効率的にプラークを除去できると考えている。
14. さまざまな口腔洗浄剤があるが、その中でもL-arginineが有用である点は何か。
→ 口腔細菌叢に影響を及ぼすことなく、バイオフィームを除去できる点が他の洗浄剤よりも有用であると考えている。

申請者はいずれの質問に対しても明確に回答し、医学博士の学位授与に値する十分な見識と能力を有することが認められた。

本論文は、酸性化L-arginineが既に形成された口腔バイオフィームを効率的に洗浄除去することを示し、重症患者や高齢者の口腔ケアのための洗口剤として応用できる可能性を示唆した。

本研究成果は新たな口腔ケア剤の開発に寄与するものであり、審査員全員一致して博士（医学）論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲載誌名	BMC Oral Health		第 巻, 第 号
(公表予定) 掲載年月	平成27年12月 掲載受理	出版社(等)名	BioMed Central

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。