







学位論文審査の結果の要旨

審査区分 ①・論	第597号	氏名	大谷 哲史
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志 	
	副査氏名	宮崎 英士 	
	副査氏名	鈴木 正志 	
論文題目 Sub-minimum Inhibitory Concentrations of Ceftazidime Inhibit <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Biofilm Formation (最小発育阻止濃度以下の濃度のセフトアジジムが緑膿菌のバイオフィルム形成を阻害する)			
論文掲載雑誌名 Journal of Infection and Chemotherapy			
論文要旨 <p>緑膿菌の難治性慢性感染に菌体のバイオフィルム形成能が重要であることが知られている。近年、最小発育阻止濃度以下(sub-MIC)の抗菌薬が緑膿菌のバイオフィルム形成を抑制することが報告されているが、β-ラクタム系抗菌薬であるセフトアジジム(CAZ)の作用は不明である。そこでsub-MICのCAZが、緑色蛍光タンパク質で標識した緑膿菌 PAO1 株および twitching motility を欠いた pilHIJK 欠損株のバイオフィルム形成に及ぼす影響について検討した。Sub-MICのCAZ作用群、非作用群において、クリスタルバイオレット(CV)法を用いてバイオフィルム量を定量的に測定したところ、1/4MICのCAZ作用群でバイオフィルム量が有意に減少していた。また、flow chamber内に形成したバイオフィルムの形態を共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CAZ非作用群は均一に広がる中で一部マッシュルーム型に隆起したバイオフィルムが形成されていたが、1/4MICのCAZ作用群ではバイオフィルムの広がり粗造化がみられ、マッシュルーム構造も不完全で、その構造は pilHIJK 欠損株で形成されたバイオフィルム構造と類似していた。緑膿菌付着後のマイクロコロニー形成に重要な twitching motility を LB agar プレートに形成される菌の広がり度で評価したところ、1/16MICのCAZ作用群においてもCAZ非作用群と比較して有意に抑制され、その効果は濃度依存性に増加していた。さらに、菌の付着や菌体外多糖類の産生にかかわる遺伝子である lec A, lec B, pel A, psl A について定量的逆転写PCR法を用いて、それぞれの mRNA 量を測定したところ、CAZ非作用群と比較して1/4MICのCAZ作用群において遺伝子発現が有意に抑制され、1/8MICのCAZ群でも lec A を除き有意な遺伝子発現抑制効果が認められた。sub-MICのCAZはこれら遺伝子の発現や twitching motility を抑制することで、緑膿菌の付着、マイクロコロニー形成、菌体外多糖類の産生という一連のバイオフィルム形成の過程に影響を及ぼしているものと考えられる。</p> <p>本研究は、Sub-MICのCAZが緑膿菌のバイオフィルム形成を抑制することを示したものであり、緑膿菌の慢性感染症に対する新たな治療戦略の発展につながる重要な基盤的研究である。このため、審査員の合議により本論文は学位論文に値するものと判断した。</p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第597号	氏名	大谷 哲史
審査委員会委員	主査氏名	小林 隆志 	
	副査氏名	皇崎 菜士 	
	副査氏名	鈴木 正志 	
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について以下の質問を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 緑膿菌による慢性感染症に対するバイオフィルムの意義、役割は何か？ 2. 抗菌薬はstress-responseにより緑膿菌からのバイオフィルム産生を促進するのか？ 3. バイオフィルム形成後、それが壊れて再び浮遊菌となる過程のトリガーとなるものは何か？ 4. 緑膿菌の急性感染症でもバイオフィルムは形成されるか？ 5. 抗菌薬としてCAZを選択した背景、理由は何か？ 6. バイオフィルムと莢膜との違いは何か？ 7. バイオフィルム形成する細菌に対する宿主免疫応答にどのようなものが知られているか？ 8. lec A, lec B, pel A, psl Aの遺伝子発現の低下を示しているが、その表現型、形質はどうであったか？また、lec A, lec B, pel A, psl A以外に対照群となる遺伝子は検討したか？ 9. Sub-MICのCAZが、レクチン産生、TM、菌体外多糖産生を同時に抑制したと考えられるか？ 10. Pili欠損株でも種々の濃度のCAZを作用させた実験は行ったか？それによりバイオフィルム形成に関わる因子の程度割合が分かり、機序解明につながるのではないか？ 11. Sub-MICのCAZによるバイオフィルム抑制では増殖抑制がなかったことは確認したか？ 12. CAZがペプチドグリカンの合成阻害をするので、位置的に近い部位に存在するLec A, Lec B, Pel A, Psl Aも阻害するのではないかという考察をしているが、これらの遺伝子発現が抑制された結果を示していることと整合性がないのではないか？ 13. 考察でc-di-GMPのことに触れているが、最小発育阻止濃度の抗菌薬でのバイオフィルム形成抑制における位置付けは何か？ 14. Sub-MICのCAZのバイオフィルム抑制機序を具体的にどのように臨床応用するのか？ 15. バイオフィルム産生に関わる遺伝子、遺伝子産物をターゲットとする治療戦略は検討されているのか？ 16. バイオフィルムを形成するPelやPslを分解する酵素は知られているのか？ <p>これらの質疑に対して、申請者は概ね適切に回答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。