




報告番号

香大医博乙 第 288号

学位論文審査の結果の要旨

令和 元年 6月 7日

審査委員	主査	伊藤 淳司 
	副主査	葉地 一 
	副主査	窪田 泰夫 
申請者	谷山 多美子	
論文題目	L-histidine augments the oxidative damage against Gram-negative bacteria by hydrogen peroxide	
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〕

カルバペネム耐性腸内細菌科細菌の出現など、グラム陰性桿菌の多剤耐性化が大きな問題となっている。近年、 H_2O_2 の消毒剤としての有効性が再認識され、サーファクタントの添加や蒸気化により殺菌能が増強することが報告されている。本学位論文では、L-histidineが H_2O_2 の各種細菌に対する殺菌効果を増強するか否かを検討し、以下の結果を得た。

- 大腸菌標準株 (MG1655) は1% L-histidineの添加に関わらず好気培養、嫌気培養ともに増殖したが、*recA*欠損大腸菌株は好気条件下における増殖が1% L-histidineの添加により抑制された。この抑制作用は嫌気条件下では認められなかった。
- 大腸菌MG1655株を1% L-histidine存在下で10 mM H_2O_2 に暴露すると、 H_2O_2 単独暴露に比較して*recA*遺伝子の発現量が約7倍増加した。
- 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下で H_2O_2 に暴露すると、 H_2O_2 単独暴露に比較して染色体DNAの細断化がより顕著となった。
- 大腸菌MG1655株を1% L-histidine 存在下で H_2O_2 に暴露すると、 H_2O_2 単独暴露に比較して菌体内での活性酸素種の生成量が有意に増加した。
- ESR解析の結果、1% L-histidineと H_2O_2 処理によって大腸菌内にhydroxyl radicalが発生することが明らかとなった。
- 1% L-histidineはグラム陽性菌 (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌およびバンコマイシン耐性腸球菌) に対する H_2O_2 の殺菌効果を増強しなかったが、グラム陰性桿菌 (多剤耐性緑膿菌および基質拡張型βラクタマーゼ産生大腸菌) に対する殺菌効果を増強した。

以上の結果から、L-histidineは H_2O_2 によるグラム陰性菌細胞内でのhydroxyl radicalの発生量を増加させることにより、殺菌効果を増強すると考えられた。そのメカニズムとして、L-histidineがグラム陰性菌細胞内への H_2O_2 もしくは遷移金属イオンの移行を促進する可能性が考えられた。

令和元年6月7日に行われた公開学位論文審査会において、以下に示す様々な質疑が行われた。

1. 大腸菌を好気条件下で培養しない理由は何か。大腸菌を好気条件下で培養した場合、どのような結果になったと考えるか。
→H₂O₂ 暴露の影響をより明瞭に観察するため試験菌株は嫌気条件下で培養した。好気条件下で培養した場合は、酸化ストレス応答が誘導され H₂O₂ に対する感受性が低下すると予想される。
2. JM109 と DH5α の 2 株を選んだ理由は何か。
→大腸菌の *recA* 欠損株として実験室でよく用いられるため、この 2 株を使用した。
3. JM109 と DH5α では増殖曲線に違いがみられるがその理由をどのように考えるか。
→十分には検討できていないが、両菌株の遺伝的系統の違いに起因すると考えられる。
4. ESR 解析での検出スペクトルから生成活性酸素種が hydroxyl radical と判断した根拠は何か。また、ベースラインのノイズが激しいように思うが、通常この程度のノイズが検出されるのか。
→スペクトルパターンがコントロールの DMPO-OH と類似していたため、hydroxyl radical と判断した。Hydroxyl radical の生成量が少ないこと、また生体試料を用いているので、ノイズの混入は避けられないと考える。
5. 皮膚表面はカタラーゼが多いため過酸化水素を分解してしまうのではないかとと思うが、皮膚消毒への応用は可能であるのか。
→L-histidine が H₂O₂ と錯体を形成し、カタラーゼによる分解から保護するとの報告があり、濃度条件によっては皮膚表面での分解を遅らせることが可能かもしれないので、今後検討したい。
6. ESR 解析では 100 mM H₂O₂ と 100 mM L-histidine に暴露させている。これまでのデータは全て 1% L-histidine で取得しているの、1%に設定すべきではないのか。
→ESR スペクトルを明確に得るための濃度設定の結果、100 mM となった。
7. 殺菌試験において H₂O₂ の濃度依存性は調べなかったのか。
→L-histidine と H₂O₂ の組合せでの濃度依存性は確認できていない。試験菌株の H₂O₂ に対する濃度依存的な感受性は確認している。その上で、L-histidine の殺菌増強作用を明確に観察するため、生菌数を 1-2 log 減少させる H₂O₂ 濃度を設定した。
8. *recA* 遺伝子が DNA 傷害を修復すると考えてよいか。
→DNA 損傷が起きた場合に *recA* 遺伝子の発現が誘導され、DNA 損傷の修復が起きる。
9. 臨床では MRSA 感染は依然大きな問題であるが、今回の結果では MRSA への効果は期待できない。L-histidine 併用の臨床面でメリットはあるのか。
→グラム陰性菌に対してのみ増強作用を示すので、発酵食品製造などグラム陽性菌に対する影響を低減する必要性のある場合にのみ適用が想定される。
10. L-histidine が H₂O₂ の細胞内への移行を促進する可能性と遷移金属の菌体内移行を促進する可能性を述べたが、今後どのようにして検証するのか。
→大腸菌の L-histidine transporter 遺伝子の knockout 株を作製し、検討する予定である。
11. L-histidine 以外のアミノ酸や D-histidine については検討しているか。
→今回は検討できていないので、今後検討したい。
12. H₂O₂ の殺菌力を増強する物質が種々報告されているようだが、これらに共通する物理化学特性を解析することで H₂O₂ のプロモーターが設計できるのではないか。
→文献情報から H₂O₂ のプロモーターをデザインする試みは行っていない。今後の研究を進展させる上で重要なコメントであり、検討したい。

本論文では、L-histidineがH₂O₂による菌体内hydroxyl radicalの生成量を増加させることによりDNA損傷を誘導し、H₂O₂の殺菌力を増強することを種々の実験から示した。その内容は学術的意義が高く、酸化剤の殺菌力増強技術の開発に有用な情報を与えるものと考えられる。よって、本審査委員会では審査員全員一致して申請論文が博士（医学）論文に相応しいものと判断し、合格とした。

掲 載 誌 名	INTERNATIONAL JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE 第 41 巻, 第 5 号		
(公表予定) 掲 載 年 月	2018年 5月	出版社 (等) 名	Spandidos Publications

(備考) 要旨は、1, 500字以内にまとめてください。