

学位授与番号：甲 1 0 1 2 号

氏 名：千葉 明生

学位の種類：博士（医学）

学位授与日付：平成 28 年 3 月 23 日

学位論文名：

迅速かつ非侵襲的な細胞外マトリクス抽出法の開発

主論文名：

A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability.

（迅速かつ非侵襲的な細胞外マトリクス抽出法の開発）

学位審査委員長：教授 嘉糠洋陸

学位審査委員：教授 高田耕司 教授 桑野和善

論 文 要 旨

論文提出者名	千葉 明生	指導教授名	水之江義充
<p>主論文題名: A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability (迅速かつ非侵襲的な細胞外マトリクス抽出法の開発) Chiba Akio, Sugimoto Shinya, Sato Fumiya, Hori Seiji, Mizunoe Yoshimitsu Microbial Biotechnology、2015年 ; 8巻 : p392~403</p> <p>バイオフィーム形成細菌は、タンパク質、細胞外多糖、DNA で構成される細胞外マトリクス (ECM) に覆われていることで、宿主の免疫系や抗菌物質に対して高い抵抗性を獲得する。そのため、バイオフィームに関連した感染症は難治性となる。バイオフィームは菌種のみならず菌株でその形質が異なる。個々のバイオフィームの性質に合わせた柔軟なバイオフィーム感染症対策を図るには、信頼性の高い ECM 成分の解析が必須である。本研究では、黄色ブドウ球菌を含むバイオフィーム感染症の起原菌から効率的に ECM を抽出する方法を検討した。</p> <p>黄色ブドウ球菌臨床分離株のうち、ECM の主要成分がタンパク質、多糖、DNA のいずれかである 3 株を選択し、塩類 (NaCl など)、界面活性剤 (SDS など) を用いて ECM を抽出した。ECM 中のタンパク質と多糖は、SDS-PAGE により、DNA についてはアガロースゲル電気泳動により解析し、顕微鏡観察により ECM が抽出されていることを視覚的にも確認した。さらに NaCl による抽出が細菌の生存へ与える影響を生死菌染色や生菌数測定により評価した。また、黄色ブドウ球菌以外の細菌として表皮ブドウ球菌、大腸菌、緑膿菌を各 1 株ずつ用いて NaCl による抽出の有効性を検討した。</p> <p>1.5 M NaCl を用いた数分間の処理により、ECM 中のタンパク質のみならず、多糖や DNA も効率的に抽出することができ、菌の生存に影響を与えないことがわかった。LiCl は NaCl と同等の抽出が可能であったが、SDS はバイオフィーム内部の菌の大多数を死滅させ、溶菌に伴う細胞内タンパク質の漏出を引き起こした。以上より、1.5 M の NaCl 処理が最も安価で細胞毒性が低く、細胞内タンパク質の漏出を伴わずに ECM 成分を正確に評価できる最適な手法であることが判明した。また、黄色ブドウ球菌以外の細菌でも 1.5 M NaCl により ECM を抽出することができ、本手法の適用範囲の広さが示された。</p>			

論文審査の結果の要旨

千葉明生氏の学位申請論文は、主論文1冊1編より成ります。主論文の英語題名は「A refined technique for extraction of extracellular matrices from bacterial biofilms and its applicability」、日本語題名は「迅速かつ非侵襲的な細胞外マトリクス抽出法の開発」と題するもので、英文誌 *Microbial Biotechnology* 誌(2015年 IF: 3.081)に掲載されたものです。指導教授は、細菌学講座の水之江義充教授です。以下、この論文に基づく thesis の要旨と論文審査委員会の結果をご報告申し上げます。

バイオフィーム形成細菌は、タンパク質、細胞外多糖、DNA で構成される細胞外マトリクス (ECM) に覆われていることで、宿主の免疫系や抗菌物質に対して高い抵抗性を獲得します。そのため、バイオフィームに関連した感染症は難治性となることが知られています。バイオフィームは菌種のみならず菌株でその形質が異なり、個々のバイオフィームの性質に合わせた柔軟なバイオフィーム感染症対策を図るには、信頼性の高い ECM 成分の解析が必須です。本研究は、黄色ブドウ球菌を含むバイオフィーム感染症の起因菌から効率的に ECM を抽出する方法を検討しています。黄色ブドウ球菌臨床分離株のうち、ECM の主要成分がタンパク質、多糖、DNA のいずれかである3株を選択し、塩類 (NaCl など)、界面活性剤 (SDS など) を用いて ECM を抽出しました。ECM 中のタンパク質と多糖は、SDS-PAGE により、DNA についてはアガロースゲル電気泳動により解析し、顕微鏡観察により ECM が抽出されていることを視覚的にも確認しました。1.5 M NaCl を用いた数分間の処理により、ECM 中のタンパク質のみならず、多糖や DNA も効率的に抽出することができ、菌の生存に影響を与えないことが明らかとなりました。LiCl は NaCl と同等の抽出が可能であったが、SDS はバイオフィーム内部の菌の大多数を死滅させ、溶菌に伴う細胞内タンパク質の漏出を引き起こしました。以上の結果から、1.5 M の NaCl 処理が最も安価で細胞毒性が低く、細胞内タンパク質の漏出を伴わずに ECM 成分を正確に評価できる最適な手法であることが判明しました。また、黄色ブドウ球菌以外の細菌でも 1.5 M NaCl により ECM を抽出することができ、本手法の適用範囲の広さが示されました。

公開学位審査会は去る平成28年3月3日、審査委員として桑野和善、高田耕司両教授ご臨席のもと開催されました。席上、各教授から、バイオフィームの菌体外成分は臨床検体と人為的な培養後では異なるのではないかと、菌体外成分に含まれる RNA の機能は何だと推定されるか、既存の方法と比べて本法の改良および最適化で最も重要視した点はどれか、臨床応用へ向けた問題点は何か、など、多数の質問・指摘があり、千葉氏は、これらの質問に対して未発表の実験データも活用し、的確な回答をしました。よって、学位審査委員会は慎重審議の結果、本論文を学位申請論文として十分価値があるものと認めた次第です。

以上、ご審議のほどよろしくお願い申し上げます。