

最 終 試 験 の 結 果 の 要 旨

神奈川歯科大学 特任講師 牧 野 莉 帆 に対する最終試験は、
主査 山 本 龍 生 教授、副査 浜 田 信 城 教授、
副査 向 井 義 晴 教授により、論文内容ならびに関連事項につき口頭試問を
もって行われた。

また、外国語の試験は、主査 山 本 龍 生 教授によって、英語の文献読解力に
ついて口頭試問により行われた。

その結果、合格と認めた。

主 査 山 本 龍 生 教授

副 査 浜 田 信 城 教授

副 査 向 井 義 晴 教授

論 文 審 査 要 旨

The inhibitory effects of toothpaste and mouthwash ingredients on the interaction between the SARS-CoV-2 spike protein and ACE2, and the protease activity of TMPRSS2 *in vitro*

神奈川歯科大学

特任講師 牧野 莉帆

(指 導：槻木 恵一 教授)

主 査 山本 龍生 教授

副 査 浜田 信城 教授

副 査 向井 義晴 教授

論文審査要旨

学位申請論文である「The inhibitory effects of toothpaste and mouthwash ingredients on the interaction between the SARS-CoV-2 spike protein and ACE2, and the protease activity of TMPRSS2 *in vitro*」は、歯磨剤および洗口剤に含まれる一部の成分が、重症急性呼吸器症候群コロナウイルス 2 (SARS-CoV-2) の spike タンパク質とヒト細胞のアンジオテンシン変換酵素 2 (ACE2) との結合を阻害すること、およびヒト細胞の II 型膜貫通型セリンプロテアーゼ (TMPRSS2) のプロテアーゼ活性を阻害することを示した論文である。

新型コロナウイルス感染症 (COVID-19) の原因となる SARS-CoV-2 は、口腔内から感染する可能性が報告されている。SARS-CoV-2 の感染機序は、ウイルス表面の spike タンパク質がヒト細胞の ACE2 と結合後、ヒト細胞の TMPRSS2 のプロテアーゼ活性により spike タンパク質が切断されることで、ウイルスが細胞内へと侵入することが報告されている。ACE2 と TMPRSS2 は口腔内の舌、歯肉および唾液腺上皮に発現しているため、口腔が SARS-CoV-2 の感染の入口となっている可能性が高く、口腔内での感染防止は COVID-19 の予防にとって重要である。本論文は、これらの SARS-CoV-2 感染機序に対するオーラルケア製品の阻害効果を検証することを目的に、市販の歯磨剤および洗口剤に含まれる成分の ACE2、TMPRSS2 に対する阻害作用を *in vitro* 系により評価したものである。歯磨剤や洗口剤は口腔内の清潔を保つために使用されるが、これらの成分が COVID-19 の予防に効果があるか否かはほとんど知られていない。本論文は、上記の背景から新規性があり、かつ重要な論文テーマであると評価した。

研究方法の概略は以下のとおりである。市販の歯磨剤・洗口剤に汎用的に含まれる成分 30 種をリン酸緩衝液に溶解 (最終濃度 1%) し、spike タンパク質-ACE2 結合阻害作用を ELISA 法、TMPRSS2 活性阻害作用を酵素活性評価法により評価した。また、阻害作用が認められた成分のメカニズム検証を目的に、ACE2、TMPRSS2 の阻害剤結合領域に対する各成分の結合状態を分子ドッキングシミュレーション (*in silico*) により評価した。これらの方法は既存の方法に基づき、さらに最先端のシミュレーション手法を用いており妥当なものである。なお、本研究はヒトや動物からのサンプルはなく、化学的な *in vitro* 研究であり、またシミュレーションを用いた研究であるために倫理的問題はない。

結果として spike タンパク質-ACE2 結合および TMPRSS2 活性を阻害する成分として、ラウリル硫酸ナトリウム、テトラデセンシルホン酸ナトリウム、ラウロイルメチルタウリンナトリウムおよびラウロイルサルコシナトリウムのアニオン界面活性剤 4 種、およびグルコン酸銅の 5 成分を見出した。また、これら成分は唾液共存下においても同様の阻害作用を示した。さらに、分子ドッキングシミュレーションの結果、これらの 5 成分は ACE2 の阻害剤結合領域に単分子で結合し、ACE2 と spike タンパク質の結合を阻害する可能性が示された。また、グルコン酸銅については、TMPRSS2 の阻害剤結合領域にも単分子で結合し、TMPRSS2 の活性を阻害する可能性が認められた。

歯磨剤や洗口剤に含まれる成分による SARS-CoV-2 への作用については、当該ウイルスを直接不活化させる作用については先行研究が存在するものの、感染機序への阻害作用については不明であった。本論文では、4種類のアニオン界面活性剤とグルコン酸銅が SARS-CoV-2 の感染機序を阻害するという、新しい知見を提供した点は高く評価できる。また、これらの研究成果によって COVID-19 の予防におけるオーラルケアの重要性が示され、オーラルケアの普及に大きく貢献すると考える。さらに、本論文で用いられた分子ドッキングシミュレーションによる研究は、様々なオーラルケア製品と COVID-19 以外の感染症との関連の検索にも応用でき、その波及効果と発展性が期待できる。

本審査委員会は、論文内容および関連事項に関して、口頭試問を行った。特に、歯磨剤と洗口剤の成分のスクリーニングデータにおいてマイナスの値が出た場合の確認方法、阻害実験におけるインキュベーション時間の考察、ラウリル硫酸ナトリウムのデータにおけるシグモイド曲線からのばらつきの解釈、分子ドッキングシミュレーションの原理と応用方法、ラウリル硫酸ナトリウムの細胞毒性、塩化セチルピリジニウムおよびグルコン酸銅の結果の解釈と考察等に対して回答を求めた。その結果十分な回答が得られることを確認した。そこで、本審査委員会は申請者が博士（歯学）の学位に十分値するものと認めた。