

論文の内容の要旨

論文題目 Investigation of the role of the quorum sensing system on the establishment of pressure-induced ischemic wound infection by *Pseudomonas aeruginosa*

和訳 緑膿菌による虚血性創傷感染成立にクオラムセンシングが果たす役割の解明

指導教員 真田弘美教授
東京大学大学院医学系研究科
平成 18 年 4 月進学
博士後期課程
健康科学・看護学専攻
仲上豪二郎

褥瘡は一度発生すると QOL の低下や医療コストの増大をもたらすため、効果的な予防、治療策が講じられる必要がある。感染は、これらを阻害する最も重要な合併症の一つであり、治癒を遅らせるばかりでなく、敗血症などの致死性合併症のリスクも高める。したがって、早期に褥瘡感染を診断し、感染に対する適切な治療を行う必要がある。しかしながら、現状では褥瘡感染を適切に診断することが困難であり、そのために早期に行うべき治療が遅れている現状がある。

褥瘡感染の診断は通常、創部の細菌培養結果と臨床症候に基づいて行われる。細菌培養は創面のスワブ培養を行うのが一般的であるが、褥瘡などの開放創では常に外界からの細菌曝露を受けているため、結果の解釈が困難である。また、宿主の免疫力低下により典型的な臨床症候が出ないといった問題により、適切な臨床的判断ができない。以上より、褥瘡感染の診断は現状では困難であり、客観的かつ信頼性のある新たな診断指標の確立が早急に求められている。

感染は宿主の抵抗力と細菌の病原性とのバランスの不均衡により生じることが広く受け入れられている。そこで、本学位申請者は、細菌の病原性を客観的にアセスメントすることによって感染の診断が可能になるのではないかと考え、その客観的指標として、近年明らかになりつつある細菌の遺伝子制御機構であるクオラムセンシング(QS)機構に注目した。QS とは、密度依存的遺伝子制御機構であり、シグナルの濃度を感知することによって互いの密度を把握し、一定のレベル(クオラム、法律用語で「定足数」を意味する)を超えた際に、下流にコ

ードされている遺伝子の転写活性を上昇させるシステムである。グラム陰性桿菌でよく研究されており、特に重要な日和見病原菌であり、また、褥瘡感染の重要な細菌である緑膿菌において広く研究が進んでいる。緑膿菌 QS 機構では、I 遺伝子から産生される I タンパク質によってクオラムセンシングシグナルであるアシル化ホモセリンラクトン(AHL)が合成され、環境中の AHL の濃度がクオラムを越えると、R 遺伝子から産生される R タンパク質と AHL の複合体が形成され、制御下にあるプロモーター以下の遺伝子発現が活性化する。緑膿菌の QS 機構には主に、*las* 系および *rhl* 系の 2 種類が報告されている。*las* 系の AHL は *N*-(3-oxododecanoyl)-homoserine lactone (3OC12-HSL) であり、*rhl* 系の AHL は *N*-butyryl-HSL (C4-HSL) である。*las* 系はエラスターゼ、alkaline protease、Las B プロテアーゼ、exotoxin A、ピオシアニン、pyoverdine、hemolysin などほとんどの病原因子を制御しており、*rhl* 系は *las* 系に制御される病原因子のいくつかの発現を調節している。緑膿菌 AHL は生物膜透過性が高いため細胞壁を自由に行き来することが可能であり、環境中の AHL 濃度がクオラムを超えると病原性遺伝子の発現が活性化されることによる組織破壊、すなわち感染が起こると考えられる。

これまでに、QS に関する様々な研究が行われているが、そのほとんどが *in vitro* であり、*in vivo* での検証はほとんど行われていない。特に、褥瘡などの慢性創傷を対象とした研究は皆無であり、実際に AHL の定量が感染の診断指標になりうるかは不明である。そこで、本学位請求論文では以下の二点に関して検討を行った。1. 創傷組織からの AHL 定量方法の確立、2. 褥瘡感染に緑膿菌 QS が与える影響の検討。

まず、創傷組織から AHL が定量できるかどうかを検証するために、緑膿菌感染褥瘡モデルの作成を行った。褥瘡モデルは Sugama らの方法を参考に作成し、圧迫前後に緑膿菌標準株 PAO-1 を接種した。コントロールには PBS を注入した。創作成後、3、7 日目に組織を採取し、細菌数定量、病理学的所見の評価および AHL の定量を行った。結果、緑膿菌接種群において、肉眼的、細菌学的、病理学的に感染が確認され、緑膿菌感染褥瘡モデルができたことを確認した。創傷部の AHL も定量可能であった。コントロールでは AHL は定量されなかった。これらの結果から、緑膿菌感染の際に、AHL が定量されることが明らかになり、褥瘡感染の診断の指標になりうる可能性が示唆された。

そこで、次に、本技術を応用し、QS 欠損株を用いて緑膿菌褥瘡感染に QS が果たす役割を検討した。QS 欠損の種類は各種報告されており、いずれも *in vivo* での病原性が低下することが知られている。しかし、褥瘡などの慢性創傷での報告はない。本実験で使用した細菌は、PAO-1、*las**IrhlI* 破壊株である PAO-MW1、*las**RrhlR* 破壊株である PAO1-MP3 であり、コントロールには PB を用いた。これ

らを同様の褥瘡モデルに圧迫後接種し、3日目の組織反応を評価した。結果、3日目の時点では創傷に生じた炎症反応は PAO-1 においても各種破壊株においても同程度に重度であることが明らかになった。しかし、QS 破壊株では、バイオフィーム形成が未熟であり、また、PAO-1 のみで AHL が定量可能であった。バイオフィームは宿主の免疫力から回避する能力が高く、持続的な感染には必須の QS 依存性の病原性であると考えられていることから、AHL が PAO-1 のみで定量されたことは、AHL 定量が褥瘡感染の診断指標になりうる可能性を示しているものと考えられた。今後、緑膿菌による褥瘡感染の診断指標になりうるかを検討するためには、経時的な経過を追う必要がある。

以上より、本学位請求論文において、褥瘡感染における緑膿菌 QS の役割の一端が初めて明らかにされ、AHL 定量による創傷感染診断の可能性が見出されたといえる。今後の研究により、明確な感染診断指標の提唱が可能となると考えている。