

## 審査の結果の要旨

氏名 仲 上 豪 二 朗

本研究は、現在の医療水準では診断困難な、褥瘡に代表される慢性創傷における感染の新たな診断技術を開発するため、細菌の遺伝子発現機構であるクオラムセンシングの概念に基づき、緑膿菌虚血性創傷感染をモデルとして検討を行った。クオラムセンシングとは、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)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。創傷感染のうち重量な起炎菌である緑膿菌のクオラムセンシング機構では、*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。本研究により、下記の結果を得ている。

1. 緑膿菌による虚血性創傷感染モデルをラットにて確立し、これまで報告のなかった創傷サンプルからの AHL の定量を試みた。結果、*R* 蛋白を過剰発現し、下流に *lacZ* マーカー遺伝子を組み込んだレポーター株を用いることにより、AHL の定量が可能であることを見出した。また、その濃度は組織中緑膿菌数と高い相関を有しており、その定量方法が妥当であることを明らかにした。
2. 次に、クオラムセンシングが虚血性創傷感染を惹き起こすのに重要な要因となり得るかを確認するため、クオラムセンシング関連遺伝子欠損株を用いて検討を行った。本研究では、*las*、*rhl* 両系の *R* 遺伝子または *I* 遺伝子を欠損させた株、それぞれ *lasRrhlR* 破壊株、*lasIrhlI* 破壊株を、上記のラット創傷モデルに使用した。その結果、3 日目の時点で創傷に生じた炎症反応は標準株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、クオラムセンシング破壊株では、バイオフ

ィルム形成が未熟であり、特に *lasRrhIR* 破壊株では集落形成が一切みられず、プランクtonicな状態で存在していた。AHL は標準株のみで定量可能であった。また、創傷面積は *lasRrhIR* 破壊株で著明に拡大していた。*in vitro* で細菌運動性を検討した結果、*lasRrhIR* 破壊株において、運動性が著しく亢進していた。これらから、*lasRrhIR* 破壊株におけるバイオフィルム形成能の著しい阻害および、創傷面積の有意な拡大は、細菌運動性の著しい亢進によるものである可能性が示唆された。また、バイオフィル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クオラムセンシング依存性の病原性であると考えられていることから、AHL が標準株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。

以上、本論文は緑膿菌による虚血性創傷感染にクオラムセンシングが関与していることを明らかにし、クオラムセンシングシグナル定量が感染の診断指標になる可能性を示唆したことにより、今後の新たな感染診断技術の確立に重要な貢献をなすと考えられ、学位の授与に値するものと考えられる。