

平成 28 年 5 月 18 日現在

機関番号：11301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670768

研究課題名(和文) 緑膿菌クオラムセンシング分子による創部MRSA感染制御法の開発

研究課題名(英文) Analysis of inhibition of MRSA infection by quorum sensing molecules from *Pseudomonas aeruginosa*

研究代表者

館 正弘 (Tachi, Masahiro)

東北大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：50312004

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：MRSAの増殖抑制に対する緑膿菌QS分子(3-oxo-C12-HSL、C4-HSL)の影響についてin vitroの系で解析を行った。ポジティブコントロールとしてバンコマイシン(VCM)を用いた。その結果、緑膿菌QS分子の溶媒であるDMSOでは10%以上でMRSA阻害効果を認めしたが、緑膿菌QS分子によるMRSA阻害は認めなかった。VCMのMICは1 µg/mlであった。さらに、3-oxo-C12-HSL、C4-HSLを同時に投与した影響についても解析したが、この刺激においても直接的なMRSA阻害は認めなかった。以上の結果より、緑膿菌QS分子単独ではMRSA阻害効果を有しない可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We addressed the possible involvement of quorum sensing (QS) molecules, 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL, from *Pseudomonas aeruginosa* to inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). We used Vancomycin (VCM) as a positive control. More than 10% Dimethyl sulfoxide (DMSO) had the effect of inhibition of MRSA, but on the other hand QS molecules had not that effect. In addition, the MRSA growth did not affect by the stimulation of 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL at the same time. Minimum inhibitory concentration of VCM showed 1 µg/ml. These results suggest that QS molecules, 3-oxo-C12-HSL and C4-HSL, have not effect to inhibition of MRSA.

研究分野：形成外科学、創傷治癒学

キーワード：緑膿菌 クオラムセンシング分子 MRSA 感染

## 1. 研究開始当初の背景

褥瘡や糖尿病性下腿潰瘍など難治性皮膚潰瘍の約7割が細菌関連疾患であり、また多剤耐性菌の検出割合が高い。その中でもメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) による創感染は治療を困難にするのみならず、院内感染の点からも問題視されている。

現在、感染創の治療は「洗浄」、「デブリードマン」、「抗菌薬入り軟膏」により創部の細菌数減少に主眼が置かれている。しかしながら、現在の治療法は殆どの MRSA に無効であり、加えて、宿主側の免疫応答を活性化させる局所療法は存在しない。また、抗菌薬の使用は多剤耐性菌を出現させる可能性があり、近年では警鐘が鳴らされている。

申請者は感染創に対する新たな対策として菌をもって菌を制する可能性に着目した。MRSA と緑膿菌が同時に感染起因菌となることは稀であり、緑膿菌が MRSA の増殖を抑制するとの報告がある。Cystic fibrosis の患者の検体を用いた臨床データより、緑膿菌と MRSA の感染率が負の相関を示したことが報告され、また実験的にも緑膿菌が MRSA の増殖を抑制することが *in vitro* の研究により示されている。

しかしながら、MRSA 感染創に緑膿菌を投与することは不可能であり、臨床応用には至っていない。緑膿菌が他の菌種に対して抗菌作用を示すことは古くから知られており、これまでに緑膿菌の産生する色素ピオシアニンや低分子の親水性物質 2-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide による抗 MRSA 活性が報告されている。

本研究では、MRSA 感染制御因子として、緑膿菌クオラムセンシング (QS) 分子に着目した。緑膿菌が産生する2種類の QS 分子は、緑膿菌間の情報伝達、病原因子産生、宿主の免疫応答に関与することが明らかになっている。我々はこれまでに、緑膿菌 QS 分子が創部の好中球、マクロファージの免疫応答を高め、創傷治癒促進に関与することを明らかにしている。

本研究は慢性創傷の MRSA 感染制御に対する緑膿菌 QS 分子の効果について、形成外科学と免疫学を融合し学術的に解明する初めての試みであり、独創性がある。さらに、得られた研究成果は創傷以外の分野にも広く応用が可能であり、研究の意義は非常に大きい。

## 2. 研究の目的

褥瘡や難治性皮膚潰瘍、糖尿病性下腿潰瘍

など慢性創傷の創面には複数の細菌が存在することが報告されているが、複数が同時に増殖することは少なく、不思議と感染起因菌は限定されることが多い。

本研究では、治療に難渋する MRSA 感染に対し、緑膿菌 QS 分子による感染制御の可能性を明らかにすることを目的とした。緑膿菌 QS 分子は緑膿菌間の情報伝達分子であり、この QS 分子の濃度に応じて緑膿菌は毒素因子の産生等を決めていることが知られているが、MRSA 間の情報伝達には用いられておらず、MRSA の毒性を高めることはないと考えられる。具体的には、以下の点について検証する。

緑膿菌 QS 分子が MRSA 感染を制御する可能性の検証：MRSA と緑膿菌 QS 分子 (N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) と N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL) を共培養し、細菌数、MRSA の virulence factor (-hemolysin, Panton-Valentine leukocidin)、に与える影響の解析

## 3. 研究の方法

本研究では、MRSA に対し、緑膿菌クオラムセンシング (QS) 分子が MRSA 抑制効果を有するか否かを明らかにする。

*in vitro* の系で MRSA に対する緑膿菌 QS 分子の効果について検証する。

- (1) 細菌：メチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) 臨床分離株
  - ・-80 でストックしていた菌液を普通寒天培地上でコロニー化 (37、18h)
  - ・コロニー20個を M-H 液に添加し増菌 (37、18h)
  - ・OD 0.1 の菌液を M-H 液 10ml に添加し、インキュベーション (37、2h)
  - ・2h 後の OD 値を測定
- (2) 緑膿菌 QS 分子：
  - N-(3-oxododecanoyl)-L-homoserine lactone (3-oxo-C12-HSL) および
  - N-butanoyl-L-homoserine lactone (C4-HSL)
- (3) 刺激：96 well プレートに菌液 5 $\mu$ l と以下の試薬 100 $\mu$ l を加え、インキュベーション (37、20h)
  - 3-oxo-C12-HSL: 1 mM, 500 $\mu$ M, 250 $\mu$ M, 125 $\mu$ M, 62.5 $\mu$ M, 31.25 $\mu$ M, 16.0 $\mu$ M, 8.0 $\mu$ M, 4.0 $\mu$ M, 2.0 $\mu$ M, 1.0 $\mu$ M, 0.5 $\mu$ M

C<sub>4</sub>-HSL: 1 mM, 500µM, 250µM, 125µM, 62.5µM, 31.25µM, 16.0µM, 8.0µM, 4.0µM, 2.0µM, 1.0µM, 0.5µM  
HSLの希釈溶媒であるジメチルスルホキシド(DMSO): 10%, 5%, 2.5%, 1.25%, 0.62%, 0.31%, 0.16%, 0.08%, 0.04%, 0.02%, 0.01%, 0.005%  
MRSA に対し抗菌作用を有するバンコマイシン (VCM) : 128 ug/ml, 64 ug/ml, 32 ug/ml, 16 ug/ml, 8 ug/ml, 4 ug/ml, 2 ug/ml, 1 ug/ml, 0.5 ug/ml, 0.25 ug/ml, 0.125 ug/ml, 0.0625 ug/ml

得られた結果は当該分野の国内・国外学会にて発表すると共に、論文として公表し臨床応用を目指す。また、適宜ホームページ上で公開し、社会に還元する。

#### 4 . 研究成果

MRSA 臨床分離株を用いて、in vitro の系でMRSA に対する緑膿菌 QS 分子の阻害効果を検証した。

その結果、緑膿菌 QS 分子の溶媒である DMSO では 10%以上でMRSA 阻害効果を確認したが、緑膿菌 QS 分子(3-oxo-C12-HSL と C<sub>4</sub>-HSL) による直接的なMRSA 阻害は認めなかった。VCMの MIC は 1µg/ml であった。さらに、3-oxo-C<sub>12</sub>-HSL、C<sub>4</sub>-HSL を同時に投与した影響についても解析したが、この刺激においても直接的なMRSA 阻害は認めなかった。

以上の結果より、緑膿菌 QS 分子単独ではMRSA 阻害効果を有しない可能性が示唆された。

緑膿菌 QS 分子は、直接的に好中球の集積促進や炎症性サイトカイン産生誘導に関与することが報告されているため、白血球の活性化を介してMRSA 阻害に働く可能性がある。またLPS など緑膿菌が有する他の毒素因子がMRSA 阻害に働く可能性もあり、この点について今後検証していく必要があると考える。

#### 5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計6件)

Kanno E, Tanno H, Suzuki A, Kamimatsuno R, Tachi M:  
Reconsideration of Iodine in Wound Irrigation: The Effects on

Pseudomonas Aeruginosa Biofilm Formation. Journal of Wound Care, in press. 2016. 査読有

Tanno H, Kawakami K, Ritsu M, Kanno E, Suzuki A, Kamimatsuno R, Takagi N, Miyasaka T, Ishii K, Imai Y, Maruyama R, Tachi M: Contribution of invariant natural killer T cells to skin wound healing. Am J Pathol, 185(12): 3248-3257, 2015. 査読有

Kanno E, Kawakami K, Miyairi S, Tanno H, Suzuki A, Kamimatsuno R, Takagi N, Miyasaka T, Ishii K, Gotoh N, Maruyama R, Tachi M: Promotion of acute-phase skin wound healing by Pseudomonas aeruginosa C<sub>4</sub>-HSL. Int Wound J, in press. 査読有

Baba A, Tachi M, Maruyama Y, Kazama I. Olopatadine inhibits exocytosis in rat peritoneal mast cells by counteracting membrane surface deformation. Cell Physiol Biochem. 35(1):386-396, 2015. 査読有

菅野恵美: 創傷治癒における微生物負荷の意義. 基礎科学をもとにした Co-Medical 研究会雑誌, 3(1): 16-21, 2015. 査読有

菅野恵美: 創傷における細菌コントロールの意義. 東北大学保健学科紀要, 24(1): 15-18, 2015. 査読有

後藤孝浩, 館正弘: 褥瘡の褥瘡の保存的治療と外科的治療. PEPARS, 88: 78-87, 2014. 査読無

澁谷暢人, 館正弘: 新しい創傷管理: 陰圧閉鎖療法. 感染症, 44(4): 8-11, 2014. 査読無

[学会発表](計5件)

上松野りな, 鈴木愛子, 菅野恵美, 丹野寛大, 高木尚之, 石井恵子, 原博満, 丸山良子, 川上和義, 館正弘: マウス創傷治癒過程におけるCARD9 遺伝子欠損の影響. 第26回日本生体防御学会, 台東区生涯学習センター(東京), 2015年7月10-12日

SUZUKI Aiko, KANNO Emi, TANNO Hiromasa, KAMIMATSUNO Rina, ISHII Keiko, HARA Hiromitsu, KAWAKAMI Kazuyoshi: Effect of CARD9-deficiency on the wound healing process in skin. 第43回日本免疫学会学術集会, 国立京都国際会館(京都市), 2014年12月10-12日

鈴木愛子, 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大,

上松野りな, 高木尚之, 石井恵子, 丸山良子,  
館正弘: マウス皮膚創傷治癒過程における  
CARD9 遺伝子欠損の影響. 第 44 回日本創傷  
治癒学会, メトロポリタン仙台 (仙台市),  
2014 年 12 月 2, 3 日

Aiko Suzuki, Emi Kanno, Kazuyoshi  
Kawakami, Hiromasa Tanno, Keiko Ishii,  
Ryoko Maruyama, Masahiro Tachi: CARD9  
DOES NOT AFFECT ACUTE WOUND  
HEALING. The Wound Healing Society's  
2014 Annual Meeting/The Symposium of  
Advanced Wound Care (Orland, USA),  
April 23-27, 2014.

鈴木愛子, 菅野恵美, 川上和義, 丹野寛大,  
上松野りな, 石井恵子, 丸山良子, 館正弘:  
皮膚創傷治癒過程における CARD9 遺伝子欠  
損の影響に関する研究. 第 43 回日本創傷治  
癒学会, 別府湾ロイヤルホテル (大分市),  
2013 年 11 月 14, 15 日

〔図書〕(計 5 件)

菅野恵美, 館正弘: 創傷治癒と湿潤環境理  
論. 貝谷敏子企画編集, WOC Nursing. 医学  
出版, 3(10): 7-14, 2015.

菅野恵美, 館正弘: 総論・湿潤環境療法と感  
染症, クリティカルコロナイゼーションとバ  
イオフィルム. 館正弘企画編集, WOC  
Nursing. 医学出版, 3(9): 7-14, 2015.

菅野恵美, 館正弘: 治療薬は外用薬だけ  
ではない ドレッシング材の活用, 使い分け. 宮  
地良樹編集, 間違いだらけの褥瘡・フットケ  
ア 変容する創傷管理の常識. 中山書店,  
35-45, 2014.

菅野恵美, 館正弘: ドレッシング材の選び  
方と使い分け. 宮地良樹編集, まるわかり  
創傷治療のキホン. 南山堂, 151-159, 2014.

菅野恵美, 館正弘: 下肢感染症の評価と栄  
養管理. 小林修三企画編集, WOC Nursing.  
医学出版, 58-65, 2014.

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等  
東北大学形成外科学分野  
<http://www.prs.med.tohoku.ac.jp/>  
東北大学看護アセスメント学分野  
<http://www.snp.med.tohoku.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

館正弘 (TACHI, Masahiro)  
東北大学・医学系研究科・教授  
研究者番号 : 50312004

(2) 研究分担者

菅野恵美 (KANNO, Emi)  
東北大学・医学系研究科・講師  
研究者番号 : 10431595

武田 睦 (TAKEDA, Atsushi)  
東北大学・医学系研究科・助教  
研究者番号 : 30333800

(3) 連携研究者