

厚生省科学研究費補助金「新興・再興感染症事業」

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構

平成 10 年度研究報告書

平成11年3月

「劇症型 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構」研究班

平成 10 年度研究報告書

目 次

1.	(総括) 研究報告		
	主任研究者	大国 寿士	(日本医科大学老人病研究所免疫部門) ……………1
2.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	山井 志朗	(神奈川県衛生研究所細菌病理部) ……………9
3.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	渡辺 治雄	(国立感染症研究所細菌部) ……………19
4.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	内山 竹彦	(東京女子医科大学微生物学免疫学教室) ……………21
5.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	大国 寿士	(日本医科大学老人病研究所免疫部門) ……………23
6.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	浜田 茂幸	(大阪大学歯学部口腔細菌学教室) ……………27
7.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	赤池 孝章	(熊本大学医学部微生物学教室) ……………29
8.	(分担) 研究報告		
	分担研究者	清水 可方	(国保旭中央病院麻酔科) ……………35

（総括）研究報告書

劇症型A群レンサ球菌感染症の分子発症機構

（主任） 研究者 大国 寿士 日本医科大学 老人病研究所 免疫部門 教授

研究要旨 劇症型から分離されたA群レンサ球菌（以下 GAS）の生化学的性状、パルスフィールド電気泳動によるDNAの切断パターン、発赤毒素遺伝子型（SPE-A, -C）の発現並びに抗生剤に対する感受性に関し、対照菌株（咽頭炎患者、健常学童からの分離株）と比較、検討したが、特に差を認めることは出来なかった。

劇症型患者分離株をブレインハートインフュージョン液体培地に5%羊血球を加え、5%炭酸ガス存在下で培養して得られた菌体から蛋白を抽出し、これを抗原として患者血清とウエスタンブロットを行うと、劇症型患者の回復期血清が分子量約 60 kDa に相当するところで反応し、対照菌株由来の蛋白とは反応しなかった。劇症型分離株は猩紅熱患者分離株に比し、マウスに対する致死作用が強く、マウス生体内における食食にも抵抗性を示し、溶血毒である SLO の産生能も高いことが示された。また、cystein proteinase 活性を持つ SPE-B はヒトマスト細胞や好塩基球を刺激して、これら細胞からのヒスタミン遊離能を持つことが明らかにされた。この SPE-B の活性はニトロソ化した $\alpha 1$ -protein inhibitor ($\alpha 1$ -PI) により抑制されると同時に、 $\alpha 1$ -protein はまた、SLO の溶血作用も阻害し、GAS の増殖を抑制することも明らかにした。一方、菌体表層のフィブロネクチン結合蛋白である FBP に対する抗体が GAS によるマウスの感染死を防御することから、これが血清型に関係なく GAS 感染症のワクチンとして使用される可能性のあることが示唆された。劇症型患者の血清中の抗 C - 多糖体抗体価を測定したところ、対照患者に比して、劇症型患者では低く、抗原である C-多糖体が劇症型患者の血中から検出されることが ELISA 法による検討から明らかにされた。分娩時に発症する劇症型に関し、全国的なアンケート調査を実施し、その実体把握に努めた。

(分担) 研究者:

浜田茂幸	大阪大学歯学部	口腔細菌学教室	教授
山井志朗	神奈川県衛生研究所	細菌病理部	部長
渡辺治雄	国立感染症研究所	細菌部	部長
内山竹彦	東京女子医科大学	微生物学免疫学教室	教授
赤池孝章	熊本大学医学部	微生物学教室	助教授
清水可方	国保旭中央病院	麻酔科	部長

A. 研究目的

劇症型患者分離菌株、対照分離菌株（咽頭炎患者分離菌株並びに健常学童分離菌株）の生化学的、血清学的性状について比較、検討し、劇症型感染症の発症に関わる GAS が特定の、ないしは新たに出現したクローンであるか否かを分子疫学的、分子遺伝学的方法を以て検討し、各菌株間の細菌学的、疫学的特徴を把握する。さらに、劇症型菌株に特異的な新規の病原因子の存在を明らかにし、加えて、菌体代謝物質並びに菌体表層物質の病変成立における意義を明らかにすることを目的とした。また、本症の治療並びに予防法の方策を確立のための基礎的検討も行った。なお、今年度は臨床的研究として分娩時における本症の発症危険因子を明らかにすべく、全国的なアンケート調査を実施した。

B. 研究方法

1) 各菌株の生化学的性状は Rapid32 STREP キットで、血清型別は市販の T 型別抗血清と自家製抗 M 抗体との凝集反応により、発赤毒素遺伝子の解析は PCR により行った。各菌株の染色体 DNA の制限酵素切断断片長多型 (RFLP) 解析はパルスフィールド電気泳動 (PFGE) により行った。菌株の各種抗生剤に対する感受性は最小発育阻止濃度 (MIC) を測定する

ことにより検討した。2) 劇症型菌株並びに対照菌株をハートインフュージョン液体培地に 5% 羊血液を加え、5% 炭酸ガス存在下で培養し、得られた菌体から菌体蛋白を抽出し、これを抗原としてウエスタンブロット法にて劇症型患者回復期血清と反応させた。3) 劇症型由来菌株と猩紅熱由来菌株を用い、 $1 \times 10^{5 \sim 8}$ CFU をマウスに投与し、その致死作用 (LD50) を検討し、経時的に血液を採取し、菌数計算を行った。また、両菌株間における SPE-A, -B, -C と SLO 産生能を比較した。4) GAS 菌体表層のフィブロネクチン結合蛋白 (FBP) である Sfb1, PrtF1, Fbp54 に対する PCR 用特異的プライマーを作製し、血清型の異なる菌株を鋳型にして PCR を行った。GAS ゲノム DNA を鋳型として *fbp54* 遺伝子を増幅し、組み換え蛋白を作製した。この蛋白をマウスに投与し、血中の抗 Fbp54 抗体を ELISA 法で測定すると共に、同マウスに GAS を感染させ、その生存率を検討した。5) ヒト血漿からプロテアーゼインヒビターである $\alpha 1$ -PI を DEAE-Sephrose FF, SP-Sephrose FF, Blue-Sephrose を用いて精製した。この $\alpha 1$ -PI の GAS に対する抗菌活性、SLO に対する活性阻害効果について検討すると共に、SPE-B プロテアーゼ活性の阻害作用について検討した。6) 臍帯血から分離した CD34 陽性細胞を rSCF, rIL-6 存在下で培養し、マスト細胞を、rIL-3 存在下で培養し、好塩基球を得た。これらの細胞を SPE-B で刺激し、遊離するヒスタミン量を HPLC で測定した。また、末梢血白血球を用いて同様な実験を行った。7) 劇症型患者血清の抗 C-多糖体抗体を市販のキットを用いて測定し、併せて血中の C-多糖体抗原の測定をサンドイッチ ELISA 法で測定した。また、分娩時における劇症型について、全国的なアンケート調査を実施し、その発症に関する危険因子についての解析を試みた。

C. 研究結果

劇症型並びに対照群から分離された GAS の生化学的性状、血清型菌株の

PFGE, 発赤毒素遺伝子 (spe - A, - C), 抗菌剤感受性を比較し、その細菌学的、疫学的検討を行った。咽頭炎患者から分離された M1/T1 型の PFGE パターンと発赤毒素遺伝子型においては1981年～1988年の分離菌と1989年～1997年に分離された菌とでは相違し、また、M12/T12型の PFGEパターンと薬剤感受性において1981年～1988年の分離菌と1989年～1997年の分離菌間に相違が認められた。しかし、M3/T3型ではこのような変化は認められず、劇症型患者から分離された菌株の M1/T1型は咽頭炎患者分離株と、M3/T3型では咽頭炎患者並びに健常学童からのそれと区別することが出来なかった。

劇症型患者から分離された菌株を BHI 培地に羊血液を加え、5%炭酸ガス存在下で培養し、得られた全菌体から抽出した蛋白を抗原として劇症患者血清とウエスタンブロットを行うと、劇症患者回復期血清がこの蛋白抗原と分子量約60 kDa に相当するところで反応し、咽頭炎患者分離株ではそのようなバンドは形成されなかった。

菌側の病原因子に関する研究において、猩紅熱患者分離株に比較して、劇症型株ではマウス致死作用が強く、前者の菌に比し、後者の菌はマウス生体内でのクリアランスが遅れ、且つ、SLO の産生能も高いこと、しかし、SPE - A, - B, - C の産生は前者の菌に比し、劇症株では低下していることが示された。

劇症型では敗血症性ショック病態を呈することから、このショックを誘導する因子についての研究がなされた。その結果、ヒト培養マスト細胞、同好塩基球及び末梢白血球（末梢血好塩基球）を SPE - B で刺激すると濃度依存的にこれら細胞からヒスタミンが遊離された。

SPE - B はまた、cystein proteinase としての活性を持ち、組織破壊を来し、菌の組織内への侵入性を容易にし、また、アポトーシスを誘導することが知られていることから、ニトロソ α 1-PI の SPE - B proteinase に対する阻害効果について検討した。その結果、 α 1-PIはこの proteinase 活性を抑制すると共に、SLO

の溶血活性を阻害し、且つ、GAS に対して増殖抑制活性を有することを明らかにした。

GAS の細胞侵入性に関与する菌体表層蛋白 FBP に関連する分子遺伝学的検討において、FBP のうち Fbp54 はすべての GAS 菌株に保有されていることを明らかにし、これをマウスに免疫し、産生される抗体が血清型を越えて感染防御抗体として働きえることを示した。

劇症型患者は対照群に比し、血清中の抗 C - 多糖体抗体価は低く、逆に C - 多糖体抗原そのものが流血中に存在することをサンドイッチ ELISA 法で明らかにした。また、アンケート調査から分娩時における劇症型の発症危険因子として、経産婦で、高齢出産であること、且つ妊娠 35～37週の陣痛発作例に発症し易いことが明らかにされた。

D. 考察

劇症型菌株と対照菌株の生化学的性状、PFGE パターン、発赤毒素遺伝子型、抗菌剤に対する感受性に関する比較、検討において、両菌株間に明瞭な差を見出すことが出来なかった。しかし、PFGE パターンでは対照株と区別出来ない、病原因子の存在が劇症型株に存在する可能性はなお否定出来ず、さらに検討して行かねばならない。事実、菌株をより生体での条件に近い形で培養することにより、劇症型分離菌株から抽出した蛋白（分子量60 kDa）が劇症型患者の回復期血清と反応し、対照菌株の蛋白とは反応しなかったことは、劇症型菌株は培養条件によっては新たな（病原）因子が発現される可能性のあることを示唆している。また、猩紅熱分離菌株との比較において、劇症型菌株は組織侵襲性が強く、SLO 産生能が高いことから、この性状が病態形成に関連する可能性があり、SPE - B の刺激によりマスト細胞や好塩基球からヒスタミンを誘導することから、敗血症ないしは感染局所の場合かようなメディエーターが放出され、これがまた、病態形成の一つの因子として働くことを示している。

生体内プロテアーゼインヒビターとして知られている α 1-PI をニトロソ化し、ニトロソ α 1-PIを作製して、SPE-B proteinase 活性に対する阻害効果を検討したところ、この α 1-PI は本酵素活性を阻害すると共に、SLO の溶血活性を阻害し、且つ、GAS の発育をも抑制した。この事は本物質が劇症型感染症の治療剤として有効であろうことを示唆している。一方、GAS の細胞侵入性にあずかるFBP に対する抗体、特にFbp54 に対する抗体がマウスのGAS 感染死を防御することが明らかにされ、将来この蛋白がワクチンとして利用され得る可能性を示した。

血清学的反応を介して、劇症型患者のC - 多糖体に対する血清抗体価は対照群患者に比し低く、逆に抗原であるC - 多糖体そのものが流血中で検出されることが明らかになり、GAS 成分に対する抗体価の低値が劇症型の発症の上での宿主側の要因の一つであるかもしれないことが示された。

E. 結論

分離菌のPFGE パターン、SPE - A並びにSPE - C の遺伝子解析からは劇症型株と対照群株では相違を認めることは出来なかったが、培養条件を変えることにより、劇症型株で検出される分子量約60 kDaの蛋白が劇症患者回復期血清と特異的に反応した。また、劇症型株は猩紅熱分離株に比し、マウス致死作用、組織侵襲性、並びにSLO 産生能が強い傾向にあった。一方、SPE - Bにはマスト細胞や好塩基球からのヒスタミン遊離能があり、これがショック病態の成立に関連することを示唆し、また、劇症型患者血清中の抗C - 多糖体抗体価は対照群に比し低く、逆にC - 多糖体抗原が流血中から検出された。 α 1-PI はSPE - B の酵素活性並びにSLOの溶血活性を阻害し、GAS の増殖を抑制した。この事は α 1-PI がGAS 感染症の治療剤としての可能性を示すと共に、FBP に対するGAS 抗体がマウスにおいて感染防御抗体として働くことから、ワクチンとして用いる可能性を

示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 清水可方、五十嵐英夫、村井貞子、大国寿士、渡辺治雄、内山竹彦、大江健二：本邦における劇症型A群レンサ球菌感染症の現状と診断基準の提示 感染症学雑誌 72 : 258-265, 1998
- 2) 村井法之、渡辺治雄：劇症型A群レンサ球菌の病原性. 現代医療、30 : 77-86, 1998
- 3) 大国寿士：劇症型溶連菌感染症. 医療 52 : 571-574, 1998
- 4) 丸尾圭志、前田浩、赤池孝章：バクテリア感染とカリクレイン・キニン系. 炎症と免疫. 6 : 490-495, 1998.
- 5) 赤池孝章：敗血症ショック、NO の役割、「敗血症の新しい展開」(舟田久編)、医薬ジャーナル、71-78, 1998
- 6) 大国寿士、留目優子、渡邊ユキノ：レンサ球菌性毒素性ショック症候群。「現代感染症事情」(中山宏明、他編) 16-23, 医歯薬出版、1999
- 7) 感染症、「エマージングディゼイズ」(竹田美文、他編)、1999 近代出版(印刷中)
- 8) 大国寿士：溶血性レンサ球菌感染症、「感染症予防必携」(山崎修道編)、日本公衆衛生協会、1999 (印刷中)
- 9) T. Akaike, M. Suga and H. Maeda: Free radicals in viral pathogenesis: Molecular mechanisms involving superoxide and NO. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 217: 64-73, 1998.
- 10) M. Yoshida, T. Akaike, S. Goto, W. Takahashi, A. Inadome, M. Yono, H. Seshita, H. Maeda and S. Ueda: Effect of the NO scavenger carboxy-PTIO on endothelium-dependent vasorelaxation of

- various blood vessels from rabbits. *Life Sciences*. 62: 203-211, 1998.
- 11) K. Maruo, T. Akaike, T. Ono and H. Maeda: Involvement of bradykinin generation in intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus* and prevention of invasion by a bradykinin antagonist. *Infect. Immun.*, 66: 866-869, 1998.
 - 12) H. Maeda, T. Okamoto and T. Akaike: Human matrix metalloprotease activation by insults of bacterial infection involving proteases and free radicals. *Biol. Chem.*, 379: 193-200, 1998.
 - 13) H. Maeda and T. Akaike: Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 63: 854-865, 1998.
 - 14) M. Yoshida, T. Akaike, A. Inadome, W. Takahashi, H. Seshita, M. Yono, S. Goto, H. Maeda and S. Ueda: The possible effect of nitric oxide in relaxation and noradrenaline release in the isolated rabbit urethra. *Eur. J. Pharmacol.*, 357: 213-219, 1998.
 - 15) S. Fujii, T. Akaike and H. Maeda: Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology* (in press), 1999.
 - 16) H. Maeda, J. Wu, T. Okamoto, K. Maruo and T. Akaike: Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacology* (in press), 1999.
 - 17) T. Akaike and H. Maeda: Nitric oxide in influenza pathogenesis. In *Nitric Oxide and Infection* (ed.F.C.Fang). Plenum Publishing Co., New York, (in press), 1999.
 - 18) Udagawa, H., Oshio, Y. and Shimizu, Y.:

Serious Group A streptococcal infection around Delivery. *Obst. & Gynecol.* (in press), 1999

- 19) Ooe, K., Nakada, H., Udagawa, H. and Shimizu, Y.: Severe pulmonary hemorrhage in patients with serious group A streptococcal infections: report of two cases. *Clin. Infect. Dis.* (in press)

2. 学会発表

- 1) 桜田紳策、留目優子、渡邊ユキノ、大國寿士: Streptococcal pyrogenic exotoxin- B(SPE-B)のヒト培養マスト細胞に対する作用、第80回日本細菌学会関東支部総会、1998.
- 2) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗: 1981~1985年および1991~1998年に分離された *Streptococcus pyogenes* 株の細菌学的性状。第80回日本細菌学会関東支部総会。1998
- 3) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志郎: A群レンサ球菌の分子疫学。第14回細菌の病原性とその分子疫学研究会。1998.
- 4) 桜田紳策、渡邊ユキノ、留目優子、大國寿士、Durasamy Kempuraj、斉藤博久: A群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) 代謝物質によるヒトマスト細胞ならびに好塩基球からのヒスタミン遊離能についての検討。第28回日本免疫学会総会。1998.
- 5) 赤池孝章: 感染とNO (シンポジウム)。第25回日本集中治療医学会総会、1998.
- 6) 井尻須美子、赤池孝章、五十嵐英夫、前田浩: *Streptococcus pyogenes* プロテアーゼによるブラジキニンの分解。第71回日本細菌学会総会、1998.
- 7) 宮本洋一、赤池孝章、井上勝央、桑原

- 英雄、吉田正貴、濱本高義、池辺宗三人、前田 浩：一酸化窒素代謝物の抗菌作用に関する研究。第9回日本生体防御学会総会，1998。
- 8) 赤池孝章、岡本竜哉、宮嶋聖也、菅守隆、前田 浩：細菌性プロテアーゼのマトリックスメタロプロテアーゼの活性化を介した生体侵襲メカニズム。第45回毒素シンポジウム，1998。
- 9) 宮本洋一、赤池孝章、井上勝央、吉田正貴、濱本高義、池辺宗三人、前田 浩： α_1 -プロテアーゼインヒビターのS-ニトロソ化による抗菌活性発現。第71回日本生化学会大会，1998。
- 10) 宮本洋一、赤池孝章、桑原英雄： α_1 -プロテアーゼインヒビターのS-ニトロソ化による抗菌作用の発現。第72回日本細菌学会総会，1999。
- 11) 寺尾 豊、川端重忠、中川一路、浜田茂幸 *Streptococcus pyogenes* Fbp54 DNAおよび組換え Fbp54 による免疫応答の誘導 第72回日本細菌学会総会、1999。
- 12) 桜田紳策、留目優子、渡邊ユキノ、大国寿士：SPE-B のマスト細胞に対する作用。平成10年度「劇症型A群レンサ球菌感染症の分子発症機構」研究班会議1999。
- 13) 大国寿士、桜田紳策、留目優子、渡邊ユキノ：Streptococcal cystein proteinase (SCP) のマスト細胞に対する作用。第73 回日本感染症学会総会。1999。
- 14) H. Maeda and T. Akaike: Involvement of free radicals and microbial proteases for the activation of proMMPs during microbial infection. The second Meeting of the Panel for Acute Respiratory Infections of the US/Japan Cooperative Medical Science, January 12-13, 1998 (Houston, USA).
- 15) S. Miyajima, K. Matsumoto, T. Akaike, T. Okamoto, T. Okuda, S. Miyagawa, H. Maeda and T. Negi: Effects of pseudomonal virulence factors and inflammatory cytokines. ARVO (The Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting, May 10-15, 1998 (Florida, USA).
- 16) Y. Miyamoto, T. Akaike, K. Inoue, M. Yoshida, T. Hamamoto, T. Sawa and H. Maeda: Antimicrobial function of α_1 protease inhibitor through its S-nitrosylation. 3rd. International Conference "Biochemistry and Molecular Biology of Nitric Oxide", July 11-15, 1998 (UCLA, CA, USA)
- 17) T. Akaike: NO and infectious diseases. The 5th. International Symposium on Guanidino Compounds in Biology and Medicine, September 2-3, 1998 (Yokohama, Japan)
- 18) H. Maeda, K. Maruo, J. Wu and T. Akaike: Pathological roles of bradykinin in infection and cancer. The 15th. International Conference on Kinins (KININ '98 NARA), October 19-24, 1998 (Nara, Japan).
- 19) T. Akaike and H. Maeda: Degradation of extracellular matrix and kinin by *Streptococcus pyogenes*-cell associated protease. The 15th. International Conference on Kinins (KININ '98 NARA), October 19-24, 1998 (Nara, Japan).
- 20) Y. Miyamoto, T. Akaike, K. Inoue, M. Yoshida, T. Hamamoto, N. Ikebe and H. Maeda: Antibacterial activity of α_1 protease

inhibitor generated after *S*-nitrosylation. The 15th. International Conference on Kinins (KININ '98 NARA), October 19-24, 1998 (Nara, Japan).

21) K. Maruo, T. Akaike, T. Ono and H.

Maeda: Bradykinin-induced intravascular dissemination of *Vibrio vulnificus*. The 15th. International Conference on Kinins (KININ '98 NARA), October 19-24, 1998 (Nara, Japan).

厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)
(分担) 研究報告書

Streptococcus pyogenes 分離株 (1981~1997年) の細菌学的性状

(分担) 研究者 山井 志朗 神奈川県衛生研究所 細菌病理部長

研究要旨：1981~1997年に分離された劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs)、咽頭炎、および健康学童由来 *Streptococcus pyogenes* 株 (血清型 M1/T1、M3/T3、および M12/T12) についてパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) パターンおよび薬剤感受性試験を行い生物型および発赤毒素遺伝子型と比較検討した。咽頭炎患者由来株のうち、M1/T1 型では PFGE パターンおよび発赤毒素遺伝子型において、また、M12/T12 型では PFGE パターンおよび薬剤感受性において、1981~1988年の分離株と1989~1997年の分離株とのあいだで差異を認めた。一方、M3/T3 型ではこのような変化が認められなかった。TSLs 患者から分離された菌株の生物学的性状および分子遺伝学的性状は、血清型 M1/T1 においては咽頭炎患者由来株と、また、M3/T3 型においては咽頭炎患者および健康学童由来株と区別できなかった。

A. 研究目的

一般に、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) 患者より分離された *Streptococcus pyogenes* 株の血清型は、M1 および M3 が他の型に比べて多いことが知られている。また、TSLs 患者から分離された株のこれらの血清型では、染色体 DNA の制限酵素切断断片長多型 (RFLP) 解析により、それぞれ極めて近縁であることが報告されている (Kiska *et al.* *J. Infect. Dis.* 176: 992, 1997; Musser *et al.* *Infect. Immun.* 63: 994, 1995)。しかしながら、TSLs 患者由来株の RFLP パターンと同一の RFLP パターンを有する菌株が軽症の (TSLs 以外の) *S. pyogenes* 感染症患者からも分離されている (Nakashima *et al.* *Clin. Infect. Dis.* 25: 260, 1997)。そこで本研究では、TSLs および咽頭炎患者から分離された *S. pyogenes* 株ならびに健康学童由来株の RFLP および薬剤感受性を解析し、平成 9 年度の本研究において行われた生物学

的性状の成績と比較検討することを目的とした。

B. 研究方法

供試した *S. pyogenes* 株は、劇症型 A 群レンサ球菌感染症由来 M1/T1 型 8 株 および M3/T3 型 12 株 (Inagaki *et al.* *Epidemiol. Infect.* 119: 41, 1997)、神奈川県感染症サーベイランス事業において県内定点医療機関で収集された検体 (主に咽頭擦過物) から分離された血清型 M1/T1、M3/T3、および T12 の 58 株 (1981-1985年) である。サーベイランス事業において分離された株および健康学童由来株で血清型 T12 の菌株については M 型別を行い、すべて M12 型であることを確認した。

RFLP 解析はパルスフィールドゲル電気泳動 (PFGE) 法により行い、制限酵素として *Sma* I および *Sfi* I を用いた。サザンプ

ロットハイブリダイゼーション解析のため DNA 断片 (C.研究成績参照) ならびに *S. pyogenes* ATCC12351株の *speA* および *S. pyogenes* T18P株 (Dr. Schlievert, Univ. Minnesota より分与)の *speC* 遺伝子それぞれの PCR 増幅 DNA 断片を用いた (*SpeA* および *SpeC* プローブ)。

薬剤感受性試験は、クロラムフェニコール (CP)、アンピシリン (ABPC)、テトラサイクリン (TC)、エリスロマイシン (EM)、およびセファレキシム (CEX) について最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。CP は $MIC \geq 4$ ($\mu\text{g/ml}$) を、TCは ≥ 8 を、また、EM は ≥ 1 をそれぞれ耐性とした (NCCLS, M7-A4, 1997)。ABPC および CEX に対する MIC 値 ($\mu\text{g/ml}$) は、それぞれ $< 0.004 \sim 0.063$ および $0.25 \sim 0.5$ であった。

C. 研究成績

S. pyogenes 染色体 DNA の PFGE パターン

Sma I 切断後のDNAのPFGEパターンより供試株は5つのグループ (I, II, III, IVおよびV型) に大別された (図 1)。I型は160 kbおよび120 kbのDNA バンドを、II型は200 kbおよび100 kb のバンドをそれぞれ有する菌株とした。180、150、110および90 kb を有する株をIII型とした。IV型とV型は130~150 kbのバンドパターンにより分類した。すなわち、130、140 および150 kbのバンドを有するものをIV型、140 kbを欠くものをV型とした。各型に属する株はPFGEパターンによりさらに亜型に細分類された。各型の中で分離頻度の多かった PFGEパターンをそれぞれ Ia, IIa, IIIa, IVa およびIVe、ならびにVaと仮称し、これらのパターンに対して2~6本のバンドの差異を示したパターンにアルファベットの小文字を添えて呼称した。その結果、I型では5種類のパターン (Ia, Ib, Ic, Id, およびIe) に、II型では5種、III型では4種、IV型では9

種、およびV型では6種に細分類された (図 2)。血清型 M3/T3 の1株は上記のI~V型のいずれにも属さなかった (Untypable, UT; 表1)。血清型 M1/T1 株については *Sfi* I 切断パターンについても検討した (図3)。供試73株のうち72株は40~730 kbのあいだに5~6本のバンドを認め、そのパターンにより2つの型 (AおよびB型) に大別された。それぞれの型において最も分離頻度の多かったパターン (それぞれ A1 および B1 と呼称) 対して2~3本のバンドの差異を示したパターンが認められ、A型においてはA1~A5の5種類、またB型についてはB1~B4の4種類に細分類された。1株のPFGEパターンはA、Bいずれの型にも属さなかった (Untypable, UT)。A および B 型に分類された菌株は *Sma* I 切断パターンの I および II 型にそれぞれ属した (表1)。

Sma I 切断 PFGE パターンの軽微な差異に *speA* および *speC* 遺伝子の有無が関与していた。パターンIIa, IIb, IIc および IIdにみられた110 kbのバンドに *SpeA* プローブがハイブリダイズした (図 4A)。パターンIIeを示す株は *speA* 遺伝子を保有せず、また、PFGEパターンで110 kb のバンドを欠いていた。パターンIIbに見られた450 kb および IIdに見られた260 kbのバンドに *SpeC* プローブがハイブリダイズした (図 4B)。これらのパターンとIIaとのあいだの差異はそれぞれ450 および 260 kbのバンドであった。パターンIVbでは110 kbのバンドが認められ、このバンドに *SpeA* プローブがハイブリダイズした (図 4C)。IVaには110 kbのバンドが見られなかった。

IV型およびV型の *Sma* I 切断 PFGE パターンにおいて、240 kb以上に認められた2本のバンドの分子量の合計はほぼ近似した (図 2)。すなわち、これら2つのDNA断片は互いに接しており、*Sma* I 切断部位の変異によりバンドパターンのバリエーシ

ョンを生じせしめたものと思われた。この仮定は以下の成績により支持された。すなわち、当該 2 断片のいずれか一方に SpeC プローブがハイブリダイズした。ところで、PFGE パターン Va では IV 型には見られない 200 kb のバンドが認められた。この DNA 断片の由来を検討するため PFGE 後のゲルより DNA を抽出しプローブとしたところ、IV 型の PFGE パターンにおける 140 kb のバンドにハイブリダイズした。当該バンドは V 型に認められなかった。したがって、パターン Va に認められた 200 kb のバンドに存在する塩基配列が IV 型の 140 kb のバンドにも存在することが明らかとなった。

PFGE パターンによる分類の成績と血清型、発赤毒素遺伝子型、および生物型との関連を表 1 に示した。なお、血清型 M1 の分離株では 1988～1989 年を境に RFLP 型が大きく変化していると報告されているので (Cleary *et al. Lancet*, 339: 518, 1992)、これを参考に、本研究で用いた菌株についても 1981～1988 年および 1989～1997 年に分離されたものとの間で成績を比較した。

M1/T1 型では 1981～1988 年に分離された 25 株すべてが PFGE パターンで I 型に分類され、また、*speA* 遺伝子を保有したものはなかった。生物型はおもに 3 であったが他の型も認められた。一方、1989～1997 年に分離された 26 株中 24 株は PFGE パターンで II 型に分類され、生物型は 1 であった。そのうち 23 株が *speA* 遺伝子を保有していた。咽頭炎患者由来の血清型 M1/T1 株で 1989～1997 年に分離された 26 株中 19 株は、TSLS 由来株の性状と一致した。血清型 M3/T3 株では 1 株を除くすべての株 (患者および健康学童由来) が PFGE パターン III 型に分類され、*speA* および *speB* 遺伝子を保有し、生物型は 3 であった。とくに、健康学童由来の 21 株中 18 株は TSLS 由来の株の性状と

一致した。M12/T12 型では、1981～1988 年には PFGE パターン V 型が優勢で (15/22 株)、特に Va が 21 株中 13 株を占めた。

S. pyogenes の薬剤感受性

血清型 M1/T1 に属する菌株は CP、TC および EM に対しすべて感受性であった。血清型 M3/T3 では、CP および EM 耐性株が 5 株認められ、うち 3 株が 1981～1988 年に分離された咽頭炎患者由来株で、2 株が健康学童由来であった。これらの株の PFGE パターンはいずれも III d であった。血清型 M12/T12 では、TC および EM 耐性株が 16 株と高頻度に認められ、うち 11 株が 1981～1985 年に分離された咽頭炎患者由来株で、5 株が健康学童由来であった。さらに前者のうち 7 株が、また、後者のうち 1 株が CP にも耐性であった。耐性株には PFGE パターン IV a を示す株は認められなかった。

D. 考察

咽頭炎患者由来 *S. pyogenes* 血清型 M1/T1 および M12/T12 株の性状には 1988～1989 年にかけて変化が見られた。M1/T1 型では 1981～1988 年に分離された株では *speA* 遺伝子を保有していなかったが 1989～1997 年に分離された株ではほとんどに *speA* 遺伝子が認められた。また、このたび観察された PFGE パターンは前者では I 型であるが、後者では II 型と大きく異なっていることから、これらは全く別のクローンであると考えられた。以上の所見が、アメリカ合衆国 ノース・キャロライナにおいて 1989 年に初めて M1 型で *speA* 遺伝子を保有する株が見られたこと (Kiska *et al. J. Infect. Dis.* 176: 992, 1997) および血清型 M1 の分離株では *HindIII* 切断 DNA の RFLP 型が 1988～1989 年を境に大きく変化していること (Cleary *et al. Lancet*, 339: 518, 1992) と一致したのは興味深い。わが国においても、1987～1988 年に

富山県において咽頭炎患者から分離された株と1991～1993年に分離された株では生物型とPFGEパターンが異なっていたことが報告されている(田中ら、感染症誌 70: 283, 1996)。M12/T12型においては1981～1988年に分離された咽頭炎患者由来株のPFGEパターンはV型であったが、1989～1997年に分離された株ではIV型、特にパターンIVa型が主に分離された。さらに、1981～1985年にはTCおよびEMの2剤耐性株が高率に分離されていたが、1991年以降は耐性株が分離されていなかった。薬剤感受性にPFGEパターンIVとVとの差異が関連しているかはこの度の検討のみでは明らかではないが、2つのPFGEパターンの差異は軽微であるのでM1/T1型に見られたような別のクローンとは云い難い。M1/T1型におけるPFGEパターンII型の出現には、この系統(菌株)に対する宿主集団の免疫状態が不十分か若しくは無効であった可能性が考えられる。感染症サーベイランスにおいては、血清型T1は咽頭炎患者における1981～1997年のあいだ経時的に分離されていた(10～30%)。しかしながら分離菌株の性状は1988～1989年前後に大きな変化がみられた。一方、血清型M3/T3の咽頭炎患者由来株では1981～1997年にかけて生物型および分子遺伝学的性状に変化は認められなかった。すなわち、同一のクローンが分離されたと思われた。T3型の流行パターンはT1とは異なり、1985～1986年および1993～1994年頃のみ高分離頻度が高い(25～30%)がその他の期間はきわめて低い。したがって、宿主集団の免疫状態が流行に関与している要因のひとつと仮定するならば、血清型M3/T3に対する隔年的な宿主集団の免疫低下がこのような流行パターンの結果であり、上述のM1/T1における新たなクローンと宿主の関係とは異なると思われた。

この度観察されたPFGEパターンの軽微な差異には発赤毒素遺伝子を伝達するファージの関与が示唆された。PFGEパターンでII型に分類された株は1株を除いてspeAを保有し、110 kbのバンドにSpeAプローブがハイブリダイズした。speA遺伝子を保有しない株はPFGEパターンで110 kbのバンドを欠くが、speA陽性株には認められない70 kbのバンドを有する。speAを保有するファージのDNAは約40 kbとされているので(Johnson *et al.* *Mol. Gen. Genet.* 194: 52, 1984)、このファージDNAにSma I切断部位がないと仮定した場合、バンドの差異はファージの消失が関与した可能性が高い。志賀毒素遺伝子をコードするファージの消失が関与したと思われる軽微なPFGEパターンの変化が志賀毒素産生大腸菌O157においても報告されている(Murase *et al.* *Curr. Microbiol.* 39: 48, 1999)。一方、パターンIIbおよびIIcは、speC遺伝子をコードするファージがパターンIIaを示す菌株に感染した結果生じた可能性が示唆された。同様にパターンIVbは、speA遺伝子をコードするファージがパターンIVaを示す菌株に感染した結果と思われた。

Musserら(*Infect. Immun.* 63: 994, 1995)は、5大陸13カ国(日本を含まない)で分離された血清型M1株についてSfi I切断後のPFGEパターンを検討したところ、TSLsを含むinvasiveな疾患から分離された株のほとんどは一つのクローンに集簇しており、それが全世界的に広がっていることを示した。

誌上発表された彼らのSfi I切断パターンと同一と思われるパターン(B1)がTSLs由来6株に認められたが、健康学童由来株にはみられなかった。このことは、彼等の成績を支持するものであるが、このたび解析した咽頭炎患者由来株18株のSfi I切断パターンもB1であった。このパターンB1を示

す菌株の *Sma* I 切断パターンは IIa であるが、興味深いことに、このパターン IIa は誌上発表されたアメリカおよび欧州の TSLs 患者由来株の PFGE パターン (Kiska *et al. J. Clin. Microbiol.* 33: 2850, 1995) と同一と思われた。血清型 M3/T3 においても、TSLs 由来と同じ PFGE パターン、発熱毒素遺伝子型および生物型が咽頭炎由来22株のうち16株で、また、健康学童由来21株のうち18株でも認められた。

すなわち、生物型および分子遺伝学的性状と病原性との間に明瞭な関係は見出されなかった。この点について、2つの可能性が考えられた。第一に、TSLs の発症は特定の菌株に対する宿主の感受性と深い関係があると思われた。たとえば、M 蛋白や発熱毒素のような病原因子に対し宿主があらかじめ備えている抵抗性が臨床症状を決定しているという考え方 (Stevens *et al. Emerg. Infect. Dis.* 1: 69, 1995) や感受性のあるヒトに invasive な感染を引き起こしうる株のレゼルボアとして咽頭炎患者が存在しているという考え方 (Kiska *et al. J. Infect. Dis.* 176: 992, 1997) が発表されている。第二には、PFGE パターンなどでは区別できないが、健康者由来株には存在しない新しい病原因子が TSLs 由来株には存在している可能性がある。最近、明らかに単一のクローンと思われた血清型 M1 株の特定の遺伝子にかなりの変異があったことが報告されている (Stockbeuer *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 3128, 1998)。したがって、明らかに同じ性状を示す菌株においてさらなる型別を行うことで TSLs を含む *S. pyogenes* 感染症の病態解明に寄与する可能性がある。

血清型 M3/T3 では、CP および TC の2剤耐性が咽頭炎患者由来3株で、健康学童由来2株で認められた。これらの株では PFGE パターンが一致していたことは興味深い。血清型 M12/T12 では、TC および EM の2剤

耐性が咽頭炎患者由来11株で、健康学童由来5株で認められ、いずれの菌株も1981～1985年に分離された。一般に *S. pyogenes* 分離菌株における薬剤耐性株には TC、CP およびマクロライド系の EM に対する単独または2剤もしくは3剤耐性が含まれる。病原微生物検出情報によれば、耐性株に占める TC、CP およびオレアンドマイシン (マクロライド系) の3剤耐性株の分離割合は1981年に40数%であったが、以降急速に減少し1991年には分離されていない。TC、CP 2剤耐性株も同様に1982年以降減少し、1991年には1株であった。しかし、TC 単独耐性株の減少はみられず1991年において33%が耐性であり、そのほとんどが T4 および T12型であった。最近のフィンランドでの動向 (Seppala *et al. N. Eng. J. Med.* 337:441, 1997) によれば、EM 耐性菌株の占める割合は1992年に16.5%であったが1996年には8.6%に減少し、それは1992年以降マクロライド系抗生物質の使用量が大きく減少したことと関係しているという。TSLs の治療には化学療法が伴われるため、本症の発生が増加した場合には使用薬剤の把握と耐性菌株の監視が必要と思われる。

E. 結論

咽頭炎患者より分離された *S. pyogenes* のうち、血清型 M1/T1 および M12/T12型では1981～1988年と1989～1997年の分離株では生物学的性状および分子遺伝学的性状に差異を認めた。すなわち、M1/T1型では PFGE パターンおよび発熱毒素遺伝子型が、また、M12/T12型では PFGE パターンおよび薬剤感受性が変化した。これに対し、M3/T3型ではこのような変化が認められなかった。TSLs 患者から分離された菌株の PFGE パターン、発熱毒素遺伝子型、生物型および薬剤感受性は、M1/T1 においては咽頭炎患者由来株と、また、M3/T3型にお

いては咽頭炎患者および健康学童由来株と
区別できなかつた。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Murase, T., Suzuki, R., Osawa, R. and Yamai S: Phenotypic and molecular characteristics of *Streptococcus pyogenes* serotypes M1 and M3 isolates from patients in Japan during the period 1981 to 1997.

(投稿中)

- 2) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗:

Streptococcus pyogenes の分子疫学.

(投稿中)

2. 学会発表

- 1) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗:

1981~1985年および1991~1998年に分離された *Streptococcus pyogenes* 株の細菌学的性状. 第80回日本細菌学会関東支部総会.東京. 1998.

- 2) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗: A

群レンサ球菌の分子疫学.

第14回細菌の病原性とその分子疫学研究会. 滋賀. 1998

(共同研究者: 鈴木理恵子、村瀬敏之)

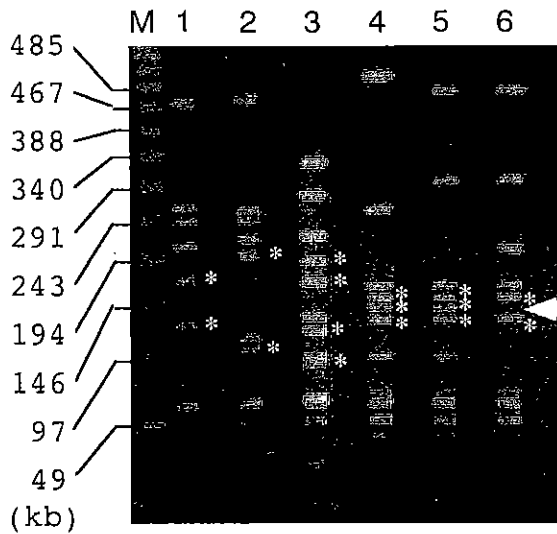


図1. *S. pyogenes*にみられた代表的なPFGEパターン。レーン1~6はそれぞれパターンIa、IIa、IIIa、IVa、IVe、およびVaを示す。レーンMは分子量マーカ。アスタリスクは各I~V型に共通するバンド（本文参照）。矢頭はIVには存在するがV型には存在しない140kbのバンドを示す。

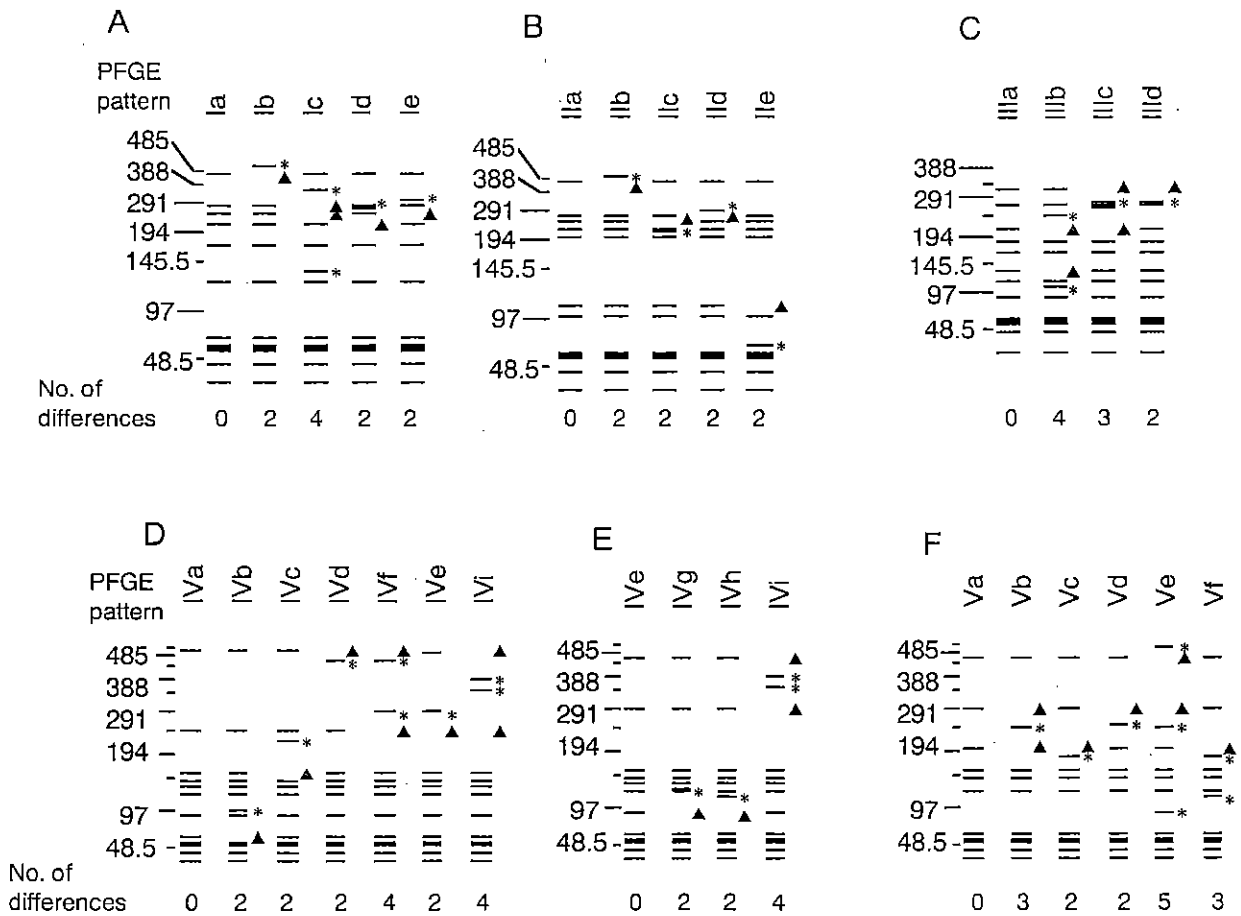


図2. PFGEパターンI~Vにおける亜型（模式図）。I~V型の中で優勢にみられたパターン（Ia、IIa、IIIa、IVaおよびIVe、ならびにVa）に対して異なるバンド数をそれぞれのパターンの下に示した。▲は、優勢にみられたパターンに存在するがそれ以外のパターンには存在しないバンドを示す。*は、優勢にみられたパターンには存在しないがそれ以外のパターンに存在するバンドを示す。

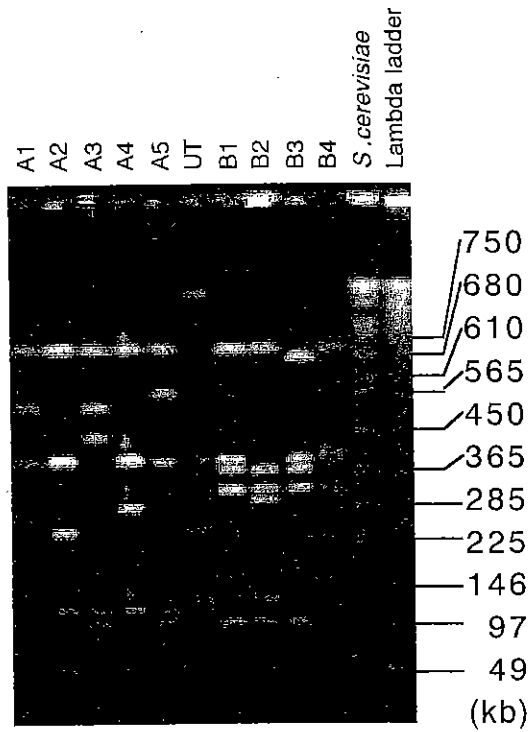


図3. *S. pyogenes* M1/T1の *Sfi*I切断パターン。
各レーン上部にPFGEパターン名を記した。

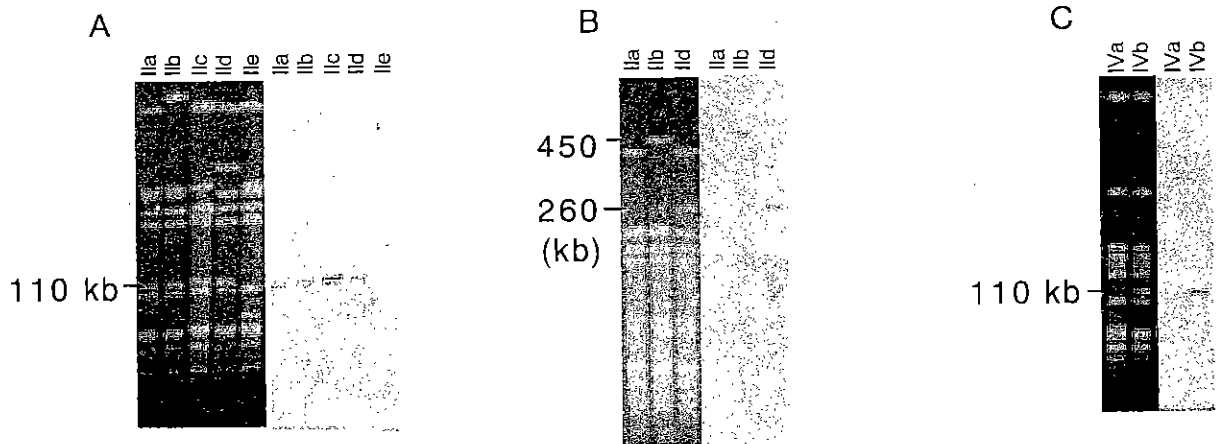


図4. *Smal*切断パターンおよびサザンハイブリダイゼーションの成績。
AおよびC、*SpeA*プローブ；B、*SpeC*プローブ。各レーン上部にPFGEパターン名を記した。

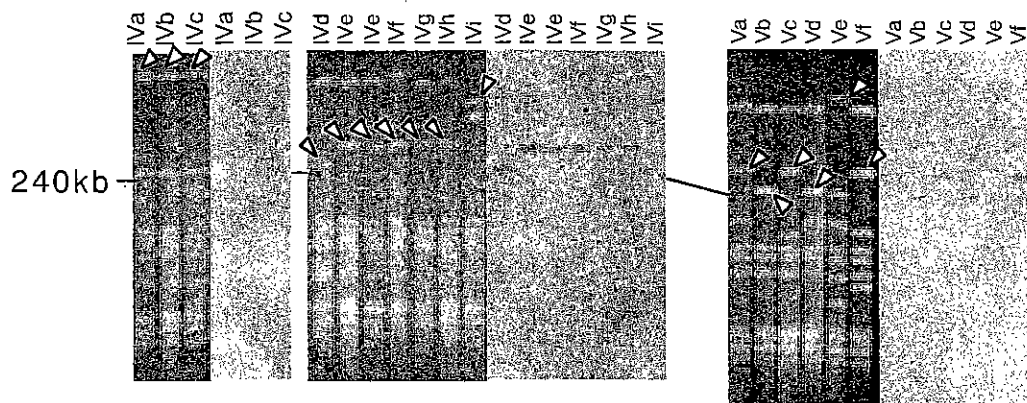


図5. *Sma*I切断パターンおよびSpeCプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションの成績。240kb以上にみられた2本のバンドのうちいずれかにSpeCプローブがハイブリダイズした（矢頭）。各レーン上部にPFGEパターン名を記した。

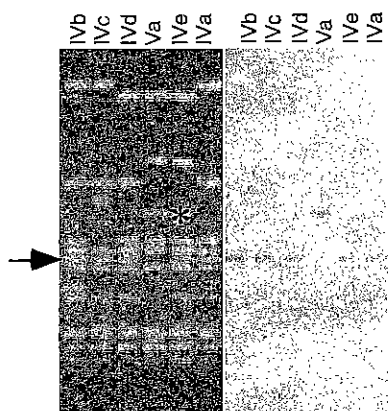


図6. PFGEパターンVaにみられた200kbのバンドをプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション。PFGEパターンIV型にみられた140kb（矢印）のバンドにシグナルが認められた。アスタリスクは200kbのバンドを示す。各レーン上部にPFGEパターン名を記した。

表 1. 供試株のPFGEパターン、血清型、発赤毒素遺伝子型、および生物型との関連

PFGE パターン		発赤毒素			1981-1988		1989-1997	
<i>Sma</i> I	<i>Sfi</i> II	血清型	遺伝子型	生物型	健康学童	咽頭炎	咽頭炎	TSLs
Ia	A1	M1/T1	B	1	1	4		
Ia	A1	M1/T1	B	3	9	10		
Ia	A1	M1/T1	B	4	2	1	1	
Ia	A1	M1/T1	B	8		1		
Ia	A1	M1/T1	B	UT		1		
Ia	A2	M1/T1	B	1	2			
Ia	A2	M1/T1	B	3		2		
Ib	A3	M1/T1	B	1		1		
Ic	A1	M1/T1	B	3		1		
Id	A4	M1/T1	BC	1		1		
Id	A5	M1/T1	BC	3		1	1	
Id	A5	M1/T1	BC	8		1		
Ie	UT	M1/T1	B	UT		1		
IIa	B1	M1/T1	AB	1			18	6
IIa	B1	M1/T1	AB	UT				1
IIb	B2	M1/T1	ABC	1			1	1
IIc	B3	M1/T1	AB	1			1	
IId	B4	M1/T1	ABC	1			3	
IIe	B3	M1/T1	B	1			1	
IIIa	ND	M3/T3	AB	3	15	7	7	5
IIIa	ND	M3/T3	AB	4	3			6
IIIa	ND	M3/T3	AB	8		1		
IIIa	ND	M3/T3	AB	UT		1		
IIIb	ND	M3/T3	AB	3			2	1
IIIc	ND	M3/T3	AB	3	1			
IIId	ND	M3/T3	AB	3		1		
IIId	ND	M3/T3	AB	UT	2	2		
IVa	ND ^a	M12/T12	BC	3		1	13	
IVa	ND	M12/T12	BC	4			1	
IVe	ND	M12/T12	BC	3	8	3	1	
IVe	ND	M12/T12	BC	UT	9			
IVb	ND	M12/T12	ABC	3			1	
IVc	ND	M12/T12	BC	3			1	
IVd	ND	M12/T12	B	3			1	
IVd	ND	M12/T12	BC	3		2	1	
IVf	ND	M12/T12	BC	3	1			
IVg	ND	M12/T12	BC	3	1			
IVh	ND	M12/T12	BC	3		1	1	
IVi	ND	M12/T12	BC	3			1	
Va	ND	M12/T12	BC	3	3	10		
Va	ND	M12/T12	BC	8		1		
Vb	ND	M12/T12	BC	3		1		
Vb	ND	M12/T12	BC	8		1		
Vc	ND	M12/T12	BC	3		1		
Ve	ND	M12/T12	BC	3		1		
Vd	ND	M12/T12	BC	UT	1			
Vf	ND	M12/T12	BC	UT			1	
UT	ND	M3/T3	BC	1			1	

ND^a: 実施せず

劇症 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構

(分担) 研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌部長

研究要旨 TSLS 患者の回復期の血清には病原因子に対する抗体が産生されている可能性が高いという考えから、ウェスタンブロッティングにより、TSLS 患者の回復期の血清に TSLS 患者分離株または非劇症株（咽頭炎患者分離株など）の菌体全蛋白質を反応させ、TSLS 患者分離株に特異的に発現している菌体蛋白質の探索および精製を試みた。その結果、5%の血液および5%の炭酸ガス存在下において、咽頭炎などかた分離された菌体には反応せず、TSLS の患者より分離された菌体に反応するような分子量 60 kDa の菌体蛋白質の存在を確認した。さらにその精製を試みたが、非常に微量であるため、アミノ酸の一次配列決定に必要な蛋白質量を確保するには至らなかった。

A. 研究目的

現状では劇症型A群レンサ球菌感染症 (TSLS) 発症メカニズムは、世界的に依然として不明のままである。この感染症の発症には菌側および宿主側の因子が関係していると考えられるが、我々は、劇症型を起こすような新規病原因子がこれまでの A 群連鎖球菌に加わった可能性があると考え、その因子の探索を目的とした。

B. 研究方法

(1) TSLS 患者血清に反応する蛋白質の解析

A 群連鎖球菌が血液に侵入しやすいことに注目し、血液中に近い条件において発現する劇症型A群レンサ球菌感染症 (TSLS) 患者分離株に特異的な蛋白質を探索し、それが劇症型を起こす要因となっているかどうか検討した。具体的には TSLS 患者の回復期の血清には病原因子に対する抗体が産生されている可能性が高

いという考えから、ウェスタンブロッティングにより、TSLS 患者の回復期の血清に TSLS 患者分離株または非劇症株（咽頭炎由来患者分離株など）の菌体蛋白質を反応させた。菌体の培養条件としては、(1) ハートインフュージョン液体培地 (HIB)、(2) HIB+5%羊血液、(3) HIB+5%炭酸ガス、(4) HIB+5%羊血液+5%炭酸ガスの4条件で行った。これらから調製した菌体抽出液を SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動により分離した後、TSLS 患者の回復期の血清を用いてウェスタンブロッティングを行い、TSLS 患者分離株特異的に発現している蛋白質の探索を行った。

(2) TSLS 患者血清に反応する蛋白質の精製

SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動にて TSLS 患者血清に反応する約 60 kDa 付近の蛋白質を分離後、ゲルより切り出し