

た。エレクトロエリューションにてゲルから切り出し、これら蛋白質を回収した。回収された蛋白質はさらに逆相クロマトグラフィーにて分離精製した。

C. 研究結果

5%の血液および5%の炭酸ガス存在下において、咽頭炎等から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に対して回復期の血清が反応するような分子量約 60 kDaの菌体蛋白質の存在を確認した。そこで、60 kDa 付近の蛋白質をSDS ポリアクリルアミドゲルから切り出し、エレクトロエリューションにてこれらの蛋白質を回収した。次に、それらの蛋白質を逆相クロマトグラフィーにより分離した。その結果、精製目的蛋白質と考えられるTSLS 患者の回復期の血清に反応する60 kDa 蛋白質が分離された。さらにこの蛋白質の逆相クロマトグラフィーを行ったところ、非常に接近した2つの280 nm の蛋白質のピークが観察された。しかし、精製されてきたこれらの蛋白質は1 μ g以下であり、アミノ酸の一次配列を決定するためには不十分であった。

D. 考察

精製目的蛋白質の菌体含量が非常に微量であるため、さらに精製蛋白質量を増やす必要がある。また、蛋白質は逆相クロマトグラフィーで2本のピークとして分離されたが、このどちらのピークの蛋白質と患者血清が反応するのか調べる必要がある（今回は2本のピークが非常に接近しているために分離ができなかった。）。そのためには2次元電気泳動を行う必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

(共同研究者：村井法之)

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症機序

(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 教授

研究要旨 1992年から1994年にかけて千葉県旭中央病院で見られた劇症 A群 レンサ球菌感染症患者分離菌株について解析した。分離菌株はマウスに対する致死活性、組織侵襲性、SLO 産生が猩紅熱分離菌株よりはるかに高活性であり、スーパー抗原産生性ははるかに低活性であった。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

1992年から1994年にかけて旭中央病院で見られた劇症型 A 群レンサ球菌感染症10症例と同時期地域で見られた猩紅熱患児分離菌10株を比較して解析した。

C. 研究結果

1 マウスに対するLD50値

猩紅熱株はほぼ一様に弱い LD50 値(1×10^8 CFU前後)に対して、劇症型株は LD50 値は 1×10^5 CFUから 1×10^8 CFUまでさまざまであった。

2 マウスにおける組織侵襲性

劇症型株 1×10^8 個を腹腔注射すると3時間後には心臓から 1×10^5 から 1×10^8 個の菌数が回収されるが、猩紅熱菌株では 1×10 前後の菌数が回収された。

3 SLO産生能

劇症型菌株の多くの菌株はSLO 高産生菌であったが、猩紅熱由来菌株はほとんどが低産生菌であった。

4 スーパー抗原性毒素産生能

劇症型株10株のうち7株はスーパー抗原活性低産生能であり、猩紅熱菌株はすべてスーパー抗原高産生菌であった。

5 システイン蛋白分解酵素 Spe B 産生能

劇症型菌株の8株はSpe B 低産生菌であったが、猩紅熱菌株ではすべて高産生菌株であった。

D. 考察と結論

以上の結果から、劇症型 A 群レンサ球菌感染症には組織侵襲性やSLO 産生が主要な病原因子として作用していると考えられる。スーパー抗原や Spe B らは副次的な作用をしていることは考えられる。これから劇症型菌株の致死性と組織侵襲性について解析を行う予定である。

F. 研究発表

- 1) 清水可方ほか：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, 1998
- 2) Shiseki, M. *et al.*: Comparison of pathogenic factors expressed by group A streptococci isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome and scarlet fever. 論文投稿中

(共同研究者：志関雅幸、上芝秀博、根本優子、三和敬史、鈴木潤、関谷加智子、村井貞子、菊地辰夫、山下直哉、大江健二、戸塚恭一、清水可方)

Streptococcal pyrogenic exotoxin-B のマスト細胞に対する作用

(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 教授

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の際に起こるショック病態の誘発因子を明らかにするために、本菌の産生する発熱毒素の一つである Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) のヒト培養マスト細胞、同培養好塩基球並びにヒト末梢白血球からのヒスタミン遊離能について検討し、対照として Streptococcal exotoxin-A (SPE-A) と大腸菌由来 Lipopolysaccharide (LPS) を用いた。その結果、SPE-B は培養マスト細胞、培養好塩基球からヒスタミンを遊離すると共に、末梢白血球層からもヒスタミンが遊離された。この事は、末梢血中に存在する好塩基球からもヒスタミンが遊離されることを示唆する。しかし、SPE-A 並びに LPS には、これら細胞からのヒスタミン遊離は認められなかった。なお SPE-B により細胞からの LDH の放出は認められていない。また、形態学的には SPE-B によってマスト細胞からの脱顆粒が観察された。SPE-B のヒスタミン遊離能は 65°C、30 分の加熱により失活した。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症においては敗血症性ショック病態が惹起されるが、このショック病態が如何なる機序により成立しているかは明らかでない。私共は先に、アナフィラキシーショックにアナロジーを求め、A 群レンサ球菌の産生する SPE-B のヒト培養マスト細胞からのヒスタミン遊離作用について検討し、報告した。今回はヒト培養マスト細胞と共にヒト培養好塩基球ならびにヒト末梢白血球層からのヒスタミン遊離について検討した。

B. 研究方法

1) 臍帯血浮遊有核細胞から MACS A133 細胞分離キットを用いて、CD34 陽性細胞を選択的に分離した。これを リコンビナント stem cell factor (SCF, 100 ng/ml) と リコンビナント IL-6 (60 ng/ml) 存在下で、

Iscove's modified Dulbecco's medium で 12 週から 16 週培養後、tryptase 陽性の培養マスト細胞を得た。一方、CD34 陽性細胞を IL-3 (5 ng/ml) 存在下で 5 週間以上にわたり同様に培養し、好塩基球を得た。ヒト健常成人の末梢血を EDTA 存在で採血し、4 % Dextran-PBS と混合後、30 分間放置し、白血球層を採取し、cold PBS で洗浄した。

2) マスト細胞 (1×10^4)、好塩基球 (1×10^5) 並びに末梢血白血球 (1×10^6) を Tyrode buffer に浮遊させ、これに精製 SPE-B (0~20 μ g/ml)、SPE-A (0~20 μ g/ml) ないしは LPS (10 μ g/ml) を加え、37°C、30 分間作用させた後、遠心し、上清中のヒスタミンを HPLC で測定した。

マスト細胞、好塩基球からの脱顆粒の形態学的観察は May-Grunewald Giemsa 染色と Toluidin blue 染色によった。

SPE-B添加後、24時間培養し、上清中のIL-8とTNF- α の産生誘導を、ELISAキットを用いて測定した。

C. 研究結果

Fig. 1a~c に示す如く、SPE-B はヒト培養マスト細胞、好塩基球並びに末梢白血球から濃度依存的にヒスタミン遊離が観察された。しかし、Fig.には示していないが、SPE-A にはヒスタミン遊離能は認められなかった。また、IL-8やTNF- α の産生誘導も観察されなかった。

SPE-B の添加により形態学的にマスト細胞から脱顆粒が観察された。

Table 1 に示すように、このヒスタミン遊離の際にはLDHの放出は認められず、Table 2 に示したように、SPE-B の加熱により、ヒスタミン遊離能は失活し、またLPSもSPE-Aと同様にヒスタミン遊離活性が認められなかった。

D. 考察

劇症型A群レンサ球菌感染症における敗血症性ショックの病態成立の機構は明らかでなく、本菌代謝物質中に存在するスーパー抗原の活性化により、過剰に産生されたサイトカインないしはリンホカインを介して誘起されるのではないかとの想定がなされている。しかし、実際に患者血清中にTNF- α 、IL-1ないしはIL-6などのサイトカインは明確には検出されず、ある特定のV β を持つT細胞の増量も認められず、寧ろT細胞のparalysisないしはdeletionが観察されている。

私共は過去におけるアナフィラキシーショックの研究において、ショック時にヒスタミンやセロトニンなどが血中に増量し、いわゆるchemical mediatorsがショックの成立に重要であることを経験した。成立するメカニズムは異なるけれども、劇症型

A群レンサ球菌感染症におけるショック病態の成立にヒスタミンのようなchemical mediatorsが関与するかを検討することを目的として、in vitroにおいて、ヒト培養マスト細胞、好塩基球並びに末梢白血球を用い、これをA群レンサ球菌代謝物質であるSPE-Bで刺激し、これら細胞から遊離するヒスタミンを測定した。

SPE-Bはcystein proteinaseとしての活性を持ち、IL-1 β 前駆体を活性型IL-1 β に変換し、生体内matrix metalloproteinaseを活性化すると共に、ブラディキニン生成カスケードを活性化してブラディキニンを遊離することが報告されている。このような性状を持つSPE-Bをマスト細胞、好塩基球ないしは末梢白血球に作用させることにより、これら細胞からヒスタミンが濃度依存的に遊離することを明らかにした。培養マスト細胞並びに好塩基球は比較的immatureな細胞であり、immatureであるが故にヒスタミンが遊離してきた可能性もあるが、しかし、末梢白血球からのヒスタミンの遊離はmatureな末梢好塩基球に基ずくことから、SPE-Bのヒスタミン遊離は培養細胞特異的なものではなく、matureなマスト細胞や好塩基球からも遊離されることを明らかにした。

この遊離能はSPE-Bを加熱することにより失活した。また、培養マスト細胞をIgE抗体で感作し、抗IgE抗体と反応させると、ヒスタミン遊離と共に、TNF- β やIL-8が産生されたが、SPE-Bではこれらサイトカインの産生は認められなかった。このことはFc ϵ R1が架橋されて起こる反応とは異なる機構が働いている可能性があるだろう。なお、SPE-Bと異なりSPE-AやLPSにはヒスタミン遊離能は認められなかった。

劇症型A群レンサ球菌感染症においてその病態成立に、SPE-Bのヒスタミン遊離がどのように関連するかは明らかでないが、

最近、私共は旭中央病院から患与され劇症型患者が対照群に比し、血漿中のヒスタミン濃度が高値を示すことを経験しており、この点に関しては症例を増やして、さらに検討したいと考えている。また、SPE-B のヒスタミン遊離能が SPE-B の proteinase 活性と相関する否かも検討しなければならない。

E. 結論

SPE-Bはヒト培養マスト細胞、同好塩基球並びに末梢白血球（末梢好塩基球）に反応して、これら細胞から脱顆粒とヒスタミンの放出を誘導した。しかし、SPE-AやLPSにはかかる作用は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 大国寿士：劇症型溶連菌感染症. 医療. 52, 571-574, 1998.
- 2) 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、多田功、南嶋洋一編）pp16-23,医歯薬出版、1999.

2. 学会発表

- 1) 桜田紳策、留目優子、渡邊ユキノ、大国寿士：Streptococcal pyrogenic exo-toxin-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、平成10年11月25、26日、（東京）
- 2) 桜田紳策、渡邊ユキノ、留目優子、大国寿士、Durasamy Kempuraj, 齊藤博久：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. 平成10年12月2～3日神戸.
- 3) 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 平成11年2月3日. 川崎.

- 4) 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. 平成11年3月30、31日. 東京

(共同研究者：留目優子、桜田紳策、渡邊ユキノ)

Histamine release from cultured human mast cells induced by SPE-B/SCP

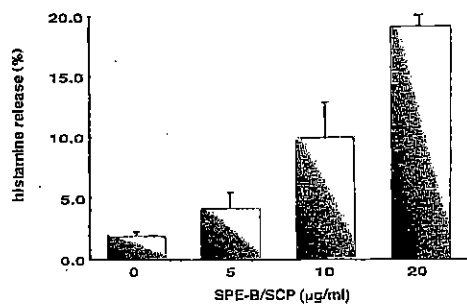


Fig.1a

Histamine release from cultured human basophils induced by SPE-B/SCP

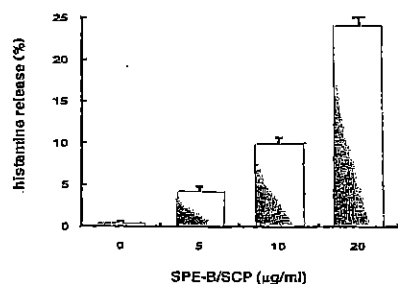


Fig.1b

Histamine release from human peripheral blood leukocytes induced by SPE-B/SCP

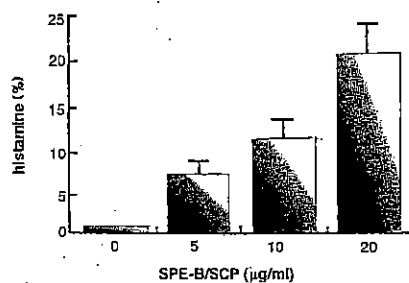


Fig.1c

Release of L- lactate dehydrogenase (LDH) from cultured human mast cells treated with SPE-B/SCP

	Histamine (%)	LDH (%)
Control	1.6 ± 0.1	1.4 ± 0.1
SPE-B/SCP (10 µg/ml)	15.1 ± 1.0	1.7 ± 0.2

n=8

Table 1

Inactivation of SPE-B/SCP by heat at 65 °C for 30 min

	Histamine (%)
Control	2.7
SPE-B/SCP (10 µg/ml)	16.0
Heated SPE-B/SCP (10 µg/ml)	3.9
LPS (10 µg/ml)	3.1

Table 2

n=2

A 群レンサ球菌の表層タンパク抗原 Fbp54 の免疫原性に関する研究

(分担) 研究者 浜田 茂幸 大阪大学 歯学部 口腔細菌学講座 教授

研究要旨 A 群レンサ球菌は菌体表層に数種類のタンパク質性構造物を持っている。これらを免疫原として免疫応答を検討した研究は数多く報告されていない。本研究では菌体表層のフィブロネクチン結合タンパクの菌株間の分布と免疫原性について解析した。

A. 研究目的

A 群レンサ球菌 (GAS) は咽頭炎、リウマチ熱などの原因菌であり、近年、壊死性筋膜炎などの劇症型感染症 (TSLs) を惹起することが注目されている。GAS 表層には細胞侵入に関与する数種類のフィブロネクチン結合タンパク (FBP) が存在している。そこで菌株間での FBP の分布を検討し、さらに FBP の一種である Fbp54 をマウスに投与してその免疫応答を解析した。

B. 研究方法

FBP である Sfb I, Prt FI, Fbp54 の3種類に対して PCR 用の特異的プライマーを作製し、M 血清型の異なる菌株を鋳型として PCR を行った。

GAS ゲノム DNA を鋳型として *fbp54* 遺伝子を PCR で増幅し、発現ベクターに組み込んで組み換えタンパクを作製した。Fbp54 をウサギに免疫し、抗血清も得た。組み換え Fbp54 を BALB/c マウスに 2週間ごとに4回皮下免疫し、ELISA法により血液中の抗 Fbp54 抗体価を測定した。さらに、最終免疫後、マウス腹腔内へ致死量の GAS 菌体を感染させ、各免疫群ごとの生存率を算定した。

C. 研究結果

PCR 法で *sfb I*, *prt FI* 遺伝子は咽頭炎由来の菌株で数株検出されたが、TSLs 由来株では全く認められなかった。一方、*fbp54* 遺伝子は供試したすべての菌株で検出され、M 血清型による分布の違いはなかった。Fbp54 の投与により血清中に Fbp54 特異的な IgG 抗体が産生された。これは追加免疫によりさらに増強された。GAS の感染実験では、非免疫群 (20%) と比較して Fbp54 投与群が有意に高い生存率 (80%) を示した。

D. 考察

3種類のFBPタンパク中、Fbp54 がすべての GAS 菌株で保持されており、DNA シーケンスの結果、*fbp54* 遺伝子は菌株間で高度 (>95%) に保存されていることが明らかとなった。これより、GAS に対するワクチンとして Fbp54 が適当だと考えられる。Fbp54 タンパクをマウスに皮下投与することで体液性免疫を誘導し、感染に対して効果的に防御を示した。Fbp54 タンパクの抗原決定基を検索し、さらに有効なワクチンにする必要があるだろう。

E. 結論

Mタンパクの型別には関係なく *fbp54* 遺伝

子が存在し、組み換え Fbp54 の皮下接種は感染防御に働いたことから、本タンパクは GAS ワクチンの候補の一つになる。

F. 研究発表

1. 学会発表

- 1) 寺尾 豊、川端重忠、中川一路、浜田 茂幸幸 *Streptococcus pyogenes* Fbp54 DNA および組み換え Fbp54 による免疫応答の誘導 日本細菌学会雑誌、54: 299, 1999.

(共同研究者：川端重忠)

劇症型 A 群レンサ球菌感染症のニトロソ化 α_1 -プロテアーゼインヒビターによる治療の可能性

(分担) 研究者 赤池 孝貴 熊本大学 医学部 微生物学教室 助教授

研究要旨 近年 A 群レンサ球菌由来の SPE-B プロテアーゼによるアポトーシスの誘導が劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症に関与することが指摘されている。そこで今回抗アポトーシス活性のみならず、抗菌活性・臓器保護作用をあわせ持つ一酸化窒素 (NO) の供給剤であるニトロソ化 α_1 -プロテアーゼインヒビター (ニトロソ α_1 -PI) による劇症型 A 群レンサ球菌感染症治療の可能性について検討した。その結果、ニトロソ α_1 -PI がレンサ球菌に対する抗菌活性とともに、SPE-B プロテアーゼや Streptolysin O に対して、強い阻害活性を発現することがわかった。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症は、A 群レンサ球菌 (*S. pyogenes*) による重度の敗血症、DIC 様の病態を特徴とする。*S. pyogenes* は菌体外に放出されるチオールプロテアーゼ (SPE-B プロテアーゼ) と、セリン型プロテアーゼ (streptococcal cell surface protease, SC protease) の少なくとも2種類のプロテアーゼを発現している。近年、SPE-B プロテアーゼがヒトの単核球由来の細胞に対し、アポトーシスをもたらすことが明らかにされている。*S. pyogenes* とアポトーシスに関連して、我々はかつて *S. pyogenes* による重症の敗血症により肺出血および消化管出血を来し、不幸な経過をたどった劇症レンサ球菌感染症の一例を経験した。本症例においては、骨髄と末梢血液像における白血球による著明なレンサ球菌の貪食像と著明な細胞変性効果が認められ、本症例の分離株はヒト好中球のアポトーシスを著明に促進した。

以上の知見は、SPE-B プロテアーゼによる急激なアポトーシスが劇症レンサ球菌感染症の発症要因の一つである可能性を示唆

している。

一方近年、宿主の感染防御の一環として産生される一酸化窒素 (NO) によりアポトーシスが抑制されることが報告されている。これまで我々は、NO の供給剤であるニトロソ化プロテアーゼインヒビター (ニトロソ α_1 -PI) 開発してきた。そこで本年度は、このニトロソ α_1 -PI や NO による劇症レンサ球菌感染症の治療の可能性について検討した。

B. 研究方法

1. ニトロソ α_1 -PI の調製

まずはじめに、ヒトの血漿中に多量に含まれ、血中の主要なプロテアーゼインヒビターとして知られる α_1 -PI を分離精製した。このため、ヒト血漿のポリエチレングリコール沈殿物を DEAE-Sepharose FF のカラムクロマトグラフィーにて分画した後、Blue-Sepharose カラムクロマトグラフィーにより混在するアルブミンを除去した。得られた α_1 -PI 画分に10等量 (モル比) の dithiothreitol (DTT) を添加し、室温で2時間放

置した後、SephadexG-100を用いたゲル濾過により電気泳動的に単一の α_1 -PI を調製した。

2. ニトロソ α_1 -PI の調製

ニトロソ α_1 -PI は α_1 -PI のSH 基に NO を一個結合させたものであり、このため α_1 -PI に10等量 (モル比) の isoamylnitrite を添加し、37°C で30分間反応させた。反応液を Sephadex G-25 に展開し、ニトロソ α_1 -PI を精製した。

3. ニトロソ α_1 -PI の抗菌活性

S. pyogenes (1×10^6 CFU/ml) をグルコース、塩化アンモニウムおよびチアミンを含む生理的塩類溶液に懸濁させ、ニトロソ α_1 -PI あるいはその他の化合物を添加し、96穴プレート中で37°C で培養、濁度の変化を経時的に測定した。濁度上昇の抑制からニトロソ α_1 -PI およびその他の化合物の細菌増殖抑制効果を評価した。

4. NO による SPE-B プロテアーゼ活性の阻害

S. pyogenes S121 を NZ amine にて9時間培養した後、陽イオン交換クロマトグラフィー (SP-Toyopearl) により培養上清から SPE-B を分離した。SPE-B 画分に DTT を添加、活性化した後、Sephadex G-25 を用いたゲル濾過により活性化 SPE-B を分取し、得られた SPE-B に S-ニトロソグルタチオン (GSNO) および NO 放出試薬である NONOate を加え、室温で30分間インキュベートした後、Boc-Gln-Gly-Arg-MCA を添加し、37°C で30分間反応させた。生じた MCA の蛍光強度からプロテアーゼ活性を評価した。

5. ニトロソ α_1 -PI による Streptolysin O (SLO) 活性の阻害

SLO (Sigma 社) を DTT で活性化した後、限外濾過により低分子物質を除去した。得られた活性化 SLO をウシ血清アルブミンを含む phosphate-buffered saline (PBS) にて段階

希釈し、ニトロソ α_1 -PI あるいはその他の化合物を添加、さらにモルモット赤血球を加え、37°C で30分間インキュベートした。遠心により赤血球を除いた後、上清の吸光度 (570 nm) を測定し、溶血反応を定量した。

C. 研究結果

これまで生体内で NO は感染防御因子として抗菌活性は発揮していることが知られている。そこでニトロソ α_1 -PI の *S. pyogenes* に対する抗菌活性を検討したところ、ニトロソ α_1 -PI は数 μ M 程度で bacteriostatic な作用を発揮することがわかった (図1)。また、このニトロソ α_1 -PI の抗菌活性は、*S. pyogenes* を含めたその他の細菌にも普遍的に認められた。

さらに、SPE-B のプロテアーゼ活性と SLO の溶血活性も NO やニトロソ α_1 -PI により強く抑制することがわかった (図2)。

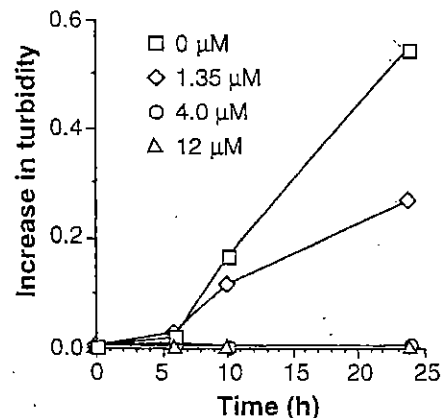


図1. ニトロソ α_1 -PI による *S. pyogenes* の増殖抑制作用

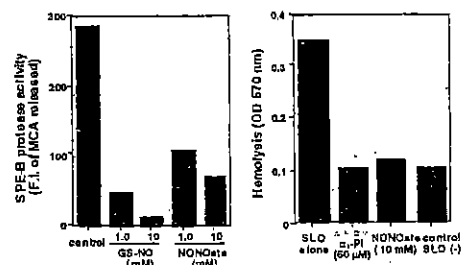


図2. ニトロソ α_1 -PI および NO による SPE-B プロテアーゼと SLO 活性の抑制

D. 考察

SHプロテアーゼであるSPE-Bは、その活性中心にSH基(cysteine)を有しており、NOはそのSH基と反応し、プロテアーゼの触媒活性を阻害しているものと思われる。一方、*S. pyogenes*のhemolysinであるSLOはチオールにより活性化されることから、SLO分子内のSH基もまた、NOやニトロソ α_1 -PIにより修飾を受け、活性を損なわれるものと考えられた。興味あることに、アポトーシスの発現に直接関わっている細胞内のcaspaseもSPE-Bと同様のSHプロテアーゼであり、近年NOがcaspaseを阻害することにより抗アポトーシス作用を発揮することが指摘されている。

従って今回の我々の知見より、ニトロソ α_1 -PIを、劇症A群レンサ球菌感染症の治療薬として応用することにより、抗アポトーシス作用、抗菌活性、SPE-BプロテアーゼやSLOの阻害作用、さらには末梢循環不全や多臓器不全の改善作用などが期待される。また、SLO/SLSなどによりもたらされる溶血反応に伴って血管内に漏出したヘモグロビンが、内因性のNO、特に血管内皮細胞から産生されて血流維持に働いているNOを消去することにより全身の血管収縮をもたらし、これにより臓器循環不全がさらに増悪することが予想される。ニトロソ α_1 -PIは、この点にも作用し病態を改善させることが期待できるものと思われる(図3)。

今後さらに、ニトロソ α_1 -PIの*S. pyogenes*感染症における抗アポトーシス作用や*S. pyogenes*敗血症モデルを用いた*in vivo*の系における薬理作用などについて検討を行うてゆく予定である。

E. 結論

ニトロソ α_1 -PIを劇症A群レンサ球菌

感染症の治療に応用できる可能性が示唆された。

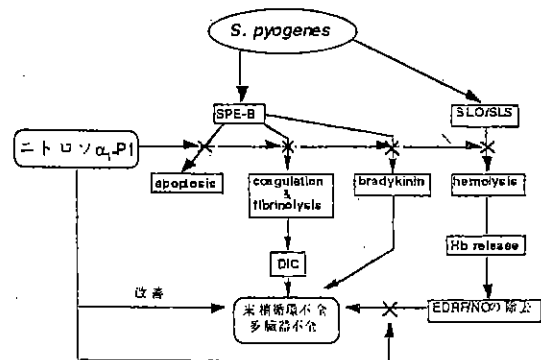


図3. 激症A群レンサ球菌感染症におけるニトロソ α_1 -PI作用のメカニズム(仮説)

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) 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).

- 5) H. Maeda and T. Akaike: Nitric oxide and oxygen radicals in infection, inflammation, and cancer. *Biochemistry (Moscow)*, 63: 854-865 (1998).
- 6) 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).
- 7) S. Fujii, T. Akaike and H. Maeda: Role of nitric oxide in pathogenesis of herpes simplex virus encephalitis in rats. *Virology* (in press) (1999).
- 8) H. Maeda, J. Wu, T. Okamoto, K. Maruo and T. Akaike: Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacology* (in press) (1999).
- 9) 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).
- 10) 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).
- 11) 赤池孝章：5. 敗血症の病態生理, 4) 敗血症ショック, NOの役割, 「敗血症の新しい展開」(舟田久編), (株) 医薬ジャーナル社(東京) p.71-78 (1998).

2. 学会発表

- 1) 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).

- 2) 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).
- 3) 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)
- 4) T. Akaike: NO and infectious diseases. The 5th. International Symposium on Guanidino Compounds in Biology and Medicine, September 2-3, 1998 (Yokohama, Japan)
- 5) H. Maeda, K. Maruo, J. Wu and T. Akaike: Pathological roles of bradykinins in infection and cancer. The 15th. International Conference on Kinins (KININ '98 NARA), October 19-24, 1998 (Nara, Japan).
- 6) 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).
- 7) 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).
- 8) 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).

- 9) 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，平成10年3月5日～7日（東京）．
- 10) 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，平成10年4月2日～4日，（長野）．
- 11) 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，平成10年7月20日～21日（横浜）．
- 12) 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，平成10年7月29日～31日（長野）．
- 13) 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，平成10年10月14日～17日（名古屋）．
- 14) 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，平成11年3月24日～26日（東京）．

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構

（分担）研究者 清水 可方 総合病院国保旭中央病院 麻酔科

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の症例では、①血中抗 C-多糖体抗体力価が低く、②血中の C 多糖体量が高いことが判明した。抗 C-多糖体抗体力価の測定は本疾患発症の機序を考える上でも、また発病危険度の予測及び診断基準に有益と考えられる。分娩時に発症する本疾患についてアンケート調査を行ったところ、①経産婦、②高齢分娩であり、また③妊娠35～37週の陣痛発症例が多かった。これらは本疾患の危険因子と考えられる。

病理学的に本疾患症例では特異な肺出血を合併し、これが直接死因となった可能性があるが、その機序は不明で、かつ他の疾患には見られない本疾患に独特の所見である。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症(以下、STSS) の発症機序を主として宿主側から検索する。また従来調査で発見されていた、分娩時に発症した本疾患(仮称、劇症型産褥症)について捕捉に努め基礎因子を検討する。

B. 研究方法

①宿主側の因子に関する研究。

方法：STSS 症例について、(1) 抗 C-多糖体抗体力価、(2) 抗ストレプトリジン O (ASO) 力価、(3) 血中 C-多糖体濃度、および(4) A 群レンサ球菌の A 型外毒素 (SPE A) の測定を行った。抗 C-多糖体抗体力価は、ヒツジ赤血球を用いた受身赤血球凝集反応による ASP キットを利用した。ASO 測定は、ASO 感作ラテックス反応を用いた。

血中 C-多糖体濃度は、マイクロプレートによる Antibody sandwich ELISA 法で行い、一次抗体には affinity chromatography

で精製されたウサギ由来のポリクローナル抗 A 群レンサ球菌 C-多糖抗体を用い、二次抗体として同抗体を horseradish peroxidase で標識したものをを用いた。なお C-多糖体の精製標品は本研究班、主任研究員である日本医科大学老人病研究所、大国寿士教授より提供を受けた。

SPE A の測定は ELISA 法により行った。これらの測定を、厚生省診断基準案該当 STSS 症例、CDC 診断基準案に該当する STSS 症例、および厚生省診断基準案または CDC 診断基準案にも該当しない A 群レンサ球菌性疾患(非 STSS 症例)についても測定を行った。

②分娩時に発症する STSS に関する調査。

国保旭中央病院では分娩時に発症した STSS (劇症型産褥症と仮称) 3 例を経験し、これらは酷似した臨床経過を辿っている。同様の病態の本邦での発症状況を把握するため、アンケート調査を実施し

た。アンケートは日本産婦人科学会周産期登録施設 265 箇所を対象とし、本院で経験した臨床経過の概略を記載した依頼状を返信用葉書を添付して郵送し、劇症型産褥症に遭遇した経験の有無を問い合わせた。劇症型産褥症を疑う症例に遭遇した旨の返信があった施設には、その臨床経過、検査結果および検体について主治医に問い合わせを行った。

③病理学的検索。STSS は多彩な臨床経過および病理所見を来す。特に著明な咯血が直接死因となる症例を経験し、この病理所見について検討した。

C. 研究結果

①宿主側の因子に関する研究。

(1) 抗 C-多糖体抗体力価

CDC 診断基準案に該当する STSS 症例 4 例について、C-多糖体抗体力価は 256 倍以上が 1 例、4 倍が 2 例、2 倍以下が 1 例であった。非 STSS 症例の 7 例では、8 倍が 1 例、16 倍が 4 例、32 倍が 1 例、64 倍が 1 例であった。

(2) ASO 価は非 STSS 症例の 2 例が 166 Todd 単位以上であったが、他の STSS 症例および非 STSS 症例は 166 Todd 単位以下であった。

(3) 血中 C-多糖体濃度。

前述した方法の予備実験により、0.1~100 ng/ml の範囲内で直線的な検量直線が得られた。

STSS 症例の 4 例では、9 ng/ml, 120 ng/ml, 140 ng/ml および 195 ng/ml であった。特に 100 ng/ml 以上の 3 例は入院直後に死亡した。9 ng/ml の 1 例は救命が可能であった。

非 STSS 症例の 7 例では、5 ng/ml, 3.5 ng/ml, 2.5 ng/ml, 3.3 ng/ml, 8.4 ng/ml, 4.8 ng/ml, 47 ng/ml であった。非 STSS 症例の 1 例は、分泌物気道閉塞により死亡したが、他は救命が可能であった。

(4) 血中 SPE-A 濃度は STSS 症例でもかなり広範な値を示し、一定の傾向は認められなかった。

②分娩時に発症する STSS に関する調査。

アンケート調査により 265 施設中 210 施設より回答を得た (回答率 79%)。この調査で 10 施設より 12 症例の疑い例が報告され、これらを調査した結果、2 例を劇症型産褥症と判定した (他の症例中の 2 例は A 群レンサ球菌が検出されたが、多臓器不全を合併しなかった。3 例は黄色ブドウ球菌による毒素症候群と判定し、残る 5 例は判定が保留されている。)

これまでの調査で捕捉された症例 14 例と今回発見された 2 例の計 16 例について、臨床的経過および背景を調査すると下記のことが判明した。

16 例全例が経産婦であった (経産 1 回が 9 例、2 回が 3 例、3 回が 3 例、4 回が 1 例)。母体の平均年齢は 33.4 才 (27~41 才) で、発症時の平均妊娠週は 29.6 週 (8~40 週) であった。

母体 16 例中 12 例が死亡した (母体死亡率 75%)。1 例は分娩後 20 日で死亡しているが、他の 15 例は分娩後平均 6.8 時間で死亡している。

1 例は双胎であり、17 例胎児中 10 例が死亡している (胎児死亡率 57%)。また胎児死亡例は全例が分娩時に心停止状態であった。

③病理学的検索結果。

本院で遭遇した STSS 症例中の 2 例 (6 才女性、42 才女性) は経過中に著明な咯血を来し、これによる窒息が直接死因となった。これらの症例の病理学的検索を行ったが、大量の肺出血を惹起する原因は解明できなかった。症例に共通する因子として下記が認められた。

(1) 末梢血の塗抹標本で遊離または白血球に貪食された A 群レンサ球菌が確認された。

- (2) 高度な血管内溶血が認められた。
(3) 分離された A 群レンサ球菌は、*in vitro* で B 型発赤毒素(SPE- B)を産生した。

D. 考察

① 宿主側の因子に関する研究。

病態初期に血中抗 C-多糖体抗体力価が4倍以下ではSTSSに進行し、8倍以上ではSTSSの発症が見られないと推測される。今回の対象症例中のSTSS 1例は、力価が256倍であったが、本症例を検討するに、ヒツジ赤血球による吸収試験で抗体価が著明に低下し、ELISA法による検査で低力価群に相当する吸光度が認められた。これらから、本症例ではヒツジ赤血球に対する非特異的反応による擬陽性反応が起こっていたものと推測された。

また病態初期の血中C-多糖体量が100 ng/mlを超した症例は全例が死亡している。

これらの所見から、病態初期に血中の抗C-多糖体抗体力価および血中C-多糖体量を測定することにより下記の諸事項が可能となると推測される。

(1) STSS 症例の早期診断が可能となる。血中の抗 C-多糖体抗体力価が8倍未満でおよび血中C多糖体量が100 ng/ml の症例は予後が不良である。これらの検査を数時間内に施行できれば、早期の段階で STSS の診断が可能となり、集中治療により救命率向上が期待できる。

(2) STSS に対する危険率の予測。

健常者の血中抗 C-多糖体抗体力価を測定すると100倍台を中心に、正規分布が見られる。また年齢別には新生児から20才までは緩徐に上昇し、20才以降は徐々に減少する。各年齢層について健常者の血中抗 C-多糖体抗体力価の正常範囲を計測すれば、STSS 罹患の危険群が予想可能となる。特に妊産婦では必要性が高いと考えられる。

(3) STSS の客観的診断基準への導入。

STSS の診断基準は臨床所見に負う部分が多く、客観的指標は敗血症病態のみであ

る。今回我々は A 群レンサ球菌感染症による敗血症症例でショック病態を来した症例で、多臓器不全を来さなかった症例を非 STSS 群として扱った。これら非 STSS 群では、血中抗 C-多糖体抗体力価は健常者と同値で、また血中 C-多糖体量も少なかった。これらから血中抗 C-多糖体抗体力価および血中 C-多糖体量が STSS の診断基準に加えられる可能性がある。

(4) STSS 発症機序に関して。

C-多糖体の生物学的な意義および宿主への影響については現在のところ未知である。しかし今回の研究で、宿主のC-多糖体への抗体形成が何らかの防御機能に関与していると推測される。C-多糖体抗体の欠損が STSS 発症の1機序である可能性が高い。

(5) STSS の治療について。

現在 STSS 症例の治療について決定的な方法は検証されていない。免疫グロブリン製剤の効果が指摘されているが、この機序として、発赤毒素の中和機能が考えられている。

今回の研究ではSTSS 症例の血中 SPE-A の濃度は一定の傾向を見いだせなかった。これらから免疫グロブリン製剤の投与は抗 C-多糖体抗体の補充が関与している可能性が考えられる。抗 C-多糖体分画の濃縮製剤の投与がSTSSの治療に有効である可能性が考えられる。

②分娩時に発症する STSS。

STSS は多彩な臨床経過および病理所見を呈するが、分娩に合併する本病態は、(1) 陣痛発生後に突然胎児心音の消失と死産、(2) 分娩直後の母体のショック、(3) 著明な溶血とDIC、(4) 弛緩出血など共通する臨床所見が見られる。このため STSS とは別個に「劇症型産褥症」と仮称して考察する必要があると考えられる。

今回の調査で劇症型産褥症を発症する危険因子として下記が推測された。

- (1) 経産婦、(2) 高齢妊娠、(3) 27~30週の

早期における陣痛発生。

これらの症例については血中抗 C-多糖体抗体の測定を行い、発症予防に努めるべきであると考ええる。

E. 結論

- (1) STSS発症にはC-多糖体抗体形成が関与していると推測される。
- (2) 経産婦、高齢妊娠、早期陣痛発症では分娩時に STSS は発症する危険性が高い。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1)Udagawa, H., Oshio, Y.and Shimizu, Y. Serious Group A streptococcal infection around Delivary. Obst. & Gynecol. (in press)
- 2)Ooe, K., Nakada, H., Udagawa, H. and Shimizu, Y. Severe pulmonary hemmorrhage in patients with serious group A streptococcal infections: report of two cases. Clin. Infect. Dis. (in press)

(共同研究者：大江健二)