

199900464A

厚生科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の分子発症機構

平成 9 年～平成 11 年度研究報告書

平成 12 年 3 月

主任研究者 大 国 寿 士

目次

| | |
|------------------------------|----|
| 1. 厚生科学研究費補助金総合研究報告書概要 ----- | 1 |
| (平成9年～同11年度) | |
| 2. 総合研究報告書 (平成9年～同11年度) | |
| 主任研究者 大國 寿士 ----- | 5 |
| 分担研究者 山井 志朗 ----- | 11 |
| 同 渡辺 治雄 ----- | 25 |
| 同 内山 竹彦 ----- | 27 |
| 同 浜田 茂幸 ----- | 29 |
| 同 赤池 孝貴 ----- | 35 |
| 同 清水 可方 ----- | 43 |
| 3. 厚生科学研究費補助金総括研究報告書概要 ----- | 49 |
| (平成11年度) | |
| 4. 総括研究報告書 (平成11年度) | |
| 主任研究者 大國 寿士 ----- | 53 |
| 分担研究者 山井 志朗 ----- | 63 |
| 同 渡辺 治雄 ----- | 69 |
| 同 内山 竹彦 ----- | 73 |
| 同 大國 寿士 ----- | 75 |
| 同 浜田 茂幸 ----- | 79 |
| 同 赤池 孝貴 ----- | 83 |
| 同 清水 可方 ----- | 87 |
| 5. 厚生科学研究費補助金研究報告書 ----- | 91 |
| (平成11年度における研究成果の刊行に関する一覧表) | |

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 1969年から1997年の間に分離された*Streptococcus pyogenes* (M1/T1) 49株—劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) 患者由来8株、咽頭炎患者由来34株、猩紅熱患者由来1株、健常学童由来6株—と標準株 (CNCTC 40/58) 中の streptococcal inhibitor of complement (Sci) の発現に関わる*sic* 遺伝子の塩基配列について比較検討したが、標準株との間では各菌株共変異が認められるが、STSS 株特異的な変異は見出すことは出来なかった。また、1992年以降、咽頭炎患者からM3型菌がよく分離されるようになると共に、M3 型菌によるTSLsの発症が認められて来たので、1980年以前のM3菌と1992～1995年に得られたM3菌に遺伝的に相違が存在するか否かをRAPD-PCR法とサザンハイブリダイゼーション法により検討した。TSLs由来株を含めて1990年以降に分離されたM3型株に特異的に増幅される0.4 kbのDNA断片長多型を得、この0.4 kb DNA断片を用い、約27 kbの領域をクローニングし、菌体ゲノムに対するサザンハイブリダイゼーションを行なった。その結果、約8.4 kbの領域が1990年以降の菌株には TSLs、咽頭炎患者由来の如何に関わらず保持されていたが、1980年以前の菌株には存在していないことが明らかにされた。

TSLs 患者から分離された A 群菌と猩紅熱患者から分離された A 群菌のマウス致死作用、マウス線維芽細胞への付着作用と各菌株の*Sma*Iによるパルスフィールド電気泳動パターンを比較検討した。TSLs由来株はマウス致死作用は強かったが、線維芽細胞に対する付着性は弱く、猩紅熱患者由来株は致死作用は弱く、付着性には一定の傾向は認められなかった。パルスフィールド電気泳動パターンではTSLs由来株のうち致死性の高い7株は同じパターンを示した。

A 群菌の産生する発熱毒素、Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) のヒト培養マスト細胞、同好塩基球、マスト細胞腫由来細胞株 (HMC-1)、末梢白血球（好塩基球を含む）に対するヒスタミン遊離能につき検討した所、SPE-Bにはヒスタミン誘導能のあり、この遊離はCa依存性の反応であること、TSLs患者血漿中にヒスタミンが高値を示す症例が存在することを明らかにした。

A群菌菌体表層に従来報告されたことのない分子量35kDaの免疫グロブリン結合タンパク(Sib35)の存在することを明らかにした。このタンパクをコードする*sib35* 遺伝子は、異なるM型菌においても保存され、また、ウサギ抗Sib35抗体は多核白血球による A 群菌の食作用を促進した。従って、抗Sib抗体は A 群菌に対する感染防御抗体として働く可能性がある。

一酸化窒素 (NO) の強力な供与体であるニトロソ α 1-プロテアーゼインヒビター(ニトロソ α 1-PI)がSPE-Bによる単核球由来細胞株、U937に対するアポトーシスを抑制することを明らかにし、ニトロソ α 1-PIが TSLs に対する治療剤として使用される可能性を示した。また、従来報告されている A 群菌の産生する proteinase とは異なる、新規の proteinase (peptidase)を見出し、これが Bradykinin を分解することを明らかにした。

臨床病理学的検討から、TSLs 患者の約 20 % に著名な肺出血が認める症例が確認されたが、TSLsではこれまでにかかる報告はなされていない。TSLs 患者血清中に A 群菌細胞壁 C-多糖体抗原が存在し、TSLs の迅速診断に有用であることを示すと共に、その抗原量と重症度が比較的相関することを明らかにした。また、分娩時におけるTSLs は全国的なアンケート調査から13例に確認され、結果については日本産婦人学会で報告し、妊婦における本症の発症に対し注意を喚起した。

(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 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) 患者分離菌株と対照分離菌株 (咽頭炎患者並びに健常学童からの分離菌株) について分子疫学的、分子遺伝学的検討を行い、両菌株間における遺伝子レベルでの相違を明らかにすると共に、菌体代謝物質並びに菌体成分の病態成立における意義を明らかにし、本症の治療並びに予防法を確立するための基礎的検討を行うことを目的とした。

B. 研究方法

1) Streptococcal inhibitor of complement (Sic)

をコードする遺伝子 (sic) の塩基配列を、P. Mejia らの方法を用いて、TSLs患者並びに対照群から分離したA群レンサ球菌 (GAS)M1型で比較、検討した。また、Sma I 切断後の DNA のパルスフィールド電気泳動(PFGE)パターンについても検討した。

2) 1980年以前に分離されたM3型と1990年以降に分離されたM3型菌の遺伝学的相違について、Random amplified polymorphic DNA (RAPD)-PCR 法を用い、DNA断片長多型の検出を試みた。アニーリング温度は55℃の高温で行ない、プライマー特異的逆反復配列を持つ DNA 領域のみを増幅させた。RAPD-PCRでTSLs 患者由来株に見出された 3 種の DNA 断片をプローブとして、TSLsと対照菌株ゲノムに対しサザンロットハイブリダイゼーションを行ない、ゲノミックウオーキングによりクローニングした DNA 断片をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションも行った。また、RLGS 法を用いて、遺伝子の重複、欠失、挿入等の変異を検討した。

3) TSLs 並びに対照菌株 (猩紅熱由来) の 1×10^8 CFUをマウス腹腔に投与し、継時的に採血し、菌数を測定した。またマウス線維芽細胞に対する付着性も検討した。

4) ヒト培養マスト細胞、同培養好塩基球、ヒトマスト細胞腫由来樹立細胞株(HMC-1)並びにヒト末梢血白血球をTyrode溶液に浮遊させ、これに精製SPE-B (5~20 $\mu\text{g/ml}$) を添加し、これら細胞から遊離するヒスタミンをHPLCで測定した。

Tyrode液からCaイオンを除去あるいはEGTAを添加し、ヒスタミン遊離におけるCaイオンの意義についても検討し、また、SPE-BとHMC-1細胞膜との反応性についても検討した。

5) GAS, NY-5株の菌体を8M尿素で処理し、可溶化、抽出された菌体表層物質をSDS-PAGEで展開後、PVDF膜に転写し、膜上でヒトIgGとの結合性を検討し、反応するバンドを切り出し、N-末端アミノ酸配列を決定した。このタンパクに相当する遺伝子をPCRで増幅し、発現ベクターに組み込み、組換えタンパクを作製した。この遺伝子の特異的プライマーを作製し、M型の異なる菌株を鋳型として、PCR反応を行なうと共に、同遺伝子をプライマーとしてサザンブロットも行った。このIgG結合タンパクをウサギに免疫して抗体を作製した。ヒト末梢白血球によるGASの食作用を貪食した菌数から検討した。

6) ヒト血漿から各種カラムクロマトグラフィーを用いて α_1 -PIを精製した。これにisoamyl nitrileを加え、ニトロソ α_1 -PIを作製した。SPE-BによるU937細胞のアポトーシスはエチジウムブロミドおよびアクリジンオレンジによる染色性により決定した。U937細胞にニトロソ α_1 -PIを添加し、一定時間作用させた後、SPE-Bを加え、ニトロソ α_1 -PIによるアポトーシスの阻害効果を検討した。菌体をトリプシンで処理し、遠心により得られたトリプシン抽出物とBradykinin (BK)とを反応させ、残存するBK量(ELISA法)からその分解活性を測定した。

7) TSLs患者血清中のC-多糖体抗原の測定は、血清をPBSで希釈後、加熱し、血清タンパクを除去後、抗C-多糖体抗体を用いたサンドウィッチELISA法で行った。2例のTSLs患者の病理解剖が行われた。また、分娩時に本症の発症が認められることがあることから、患者並びに妊婦血清中の抗C-多糖体抗体の測定を市販のASPキット(協和薬品工業)を用いて行った。

(倫理面への配慮)

菌株を分離した患者並びに健常保菌者の住所、氏名、病気の経過、予後、転帰等については公表しない。分離菌株は番号を付して取り扱い、患者、保菌者のプライバシーは保護する。

患者の病理解剖は家族の了解の下に行われた。各患者症例から得られた血漿ないしは血清は診断、治療に必要な検査後、残存したものを頂き、本研究に使用した。妊婦からの採血は一般検査以外に、その一部が本研究にも使用することの承諾を得た。また、TSLs患者のご家族からの咽頭培養検査も、その主旨を理解した上で任意に協力して頂いた。

C. 研究結果

TSLs由来並びに対照群由来菌株50株の*sic*の塩基配列において、1塩基以上の変異が39ヶ所で認められ、そのうち27ヶ所はすでに報告された変異と一致したが、他の12ヶ所についてはこれまでに報告のないもので、18株に認められ、26のコドンにおいて各1ヶ所の塩基置換を認めた。また、1のコドンでは2塩基の置換が認められた。これら27個のコドンにうち、26コドンでアミノ酸置換を伴い、*sic*に変異を認めた49株全てにおいて、474, 479, 506, 650, 691番目の塩基に同じ塩基置換が認められた。6から123bpに及ぶinsertion並びにdeletionが12ヶ所で確認され、全てがin-frameであった。26の異なる*sic*アレル(*sci1*~*sic26*)が49株に認められ、咽頭炎患者由来株7株に*sic2*が、3株に*sic1*が確認され、TSLs患者由来株3株が*sic1*であった。PFGEパターンとアレル間には一定の関係は認められていない。

1980年以前に咽頭炎患者から分離された菌株と1990年以降に咽頭炎患者ならびにTSLs患者から分離された菌株とのDNA断片長多型の比較をRAPD-PCR法で検討した。1990年以降のM3型分離菌のみに増幅される0.4kbのDNA断片長多型を、M1型菌では1.5kbと3.5kbのDNA断片長多型を見出した。この0.4kbの領域をプローブとして、M3型菌について1980年以前と1990年以降の分離株を用いて、サザンブロットを行うと0.4kb断片は1980年以前の分離株は全て相同性を持たなかったが、1990年以降の分離菌

株は咽頭炎、TSLsの如何に関わらず反応した。0.4kbのDNA断片を含む領域のゲノミックウオーキングを行い、TSLs由来株の全長約2.7kbをクローニングした。これを制限酵素で11種に切断し、これらをサザンハイブリダイゼーションのプローブとして相同性を検討した。8.4kbの断片 (A,D,E,F,G)は1990年以降の咽頭炎、TSLs患者由来株に認められ、1980年以前の株には認められなかった。10kbの断片 (I, J, K) は全ての株に見出された。プローブG領域を含む約2kbpの塩基配列に存在する遺伝子の検討を行ったところ、*Streptococcus mutans* に存在する機能不明の遺伝子と35%の相同性を示した。菌株 DNA を *Bgl*II, *Bam*HI, *Hind*III, *Pst*Iの制限酵素を用い、二次元電気泳動を行った結果、約460のDNAスポットが観察され、TSLs 特異的 DNAスポットは7個に、1980年以前の株に特異的なスポットは3個に認められた。

猩紅熱患者由来菌株とTSLs患者由来菌株をそれぞれマウス腹腔に投与し、経時的に心臓穿刺により得られた血液中の菌数を計算すると、猩紅熱由来株に比し、TSLs由来株が生体内においてよく増殖する傾向にあったが、TSLs株は培養線維芽細胞に対する付着性は低かった。

ヒト培養マスト細胞や好塩基球あるいは末梢血白血球層 (好塩基球) に SPE-B を作用させると、濃度依存的にヒスタミンが遊離され、この遊離は Ca 依存性の反応であった。proteinase inhibitor である E64 の添加により、この遊離が抑制された。また、SPE-B はマスト細胞樹立細胞株、HMC-1 の細胞膜表層に反応することが免疫電顕から明らかに認められた。

8M尿素で抽出した GAS 菌体表層物質のうち、分子量35kDaに相当するバンドがヒト IgG と結合し、その N-末端アミノ酸配列は DSFSANQEIRYSEVTPYHVT であった。データベース解析から機能不明の339aa の N-末端部と100% と一致した。この遺伝子 (*sib35*) を PCR で増幅し、発現ベクターに組み込み、組換えタンパクを作製した。*sib35* 遺伝子は A 群のみに認められ、B 群、C 群、G 群レンサ球菌並びに口腔レンサ球菌には認められなかった。ウサギ抗 *Sib35* 抗体は GAS の多核白血球による食作用を促進し

た。

SPE-B はプロテアーゼ活性を持ち、U937 細胞に対し強いアポトーシスを誘導した。この際、ニトロソ α_1 -PI をこの細胞培養系に添加すると、アポトーシスはほぼ完全に抑制され、その他の NO 供与剤である P-NONOate や ニトログルタチオン (GSNO) よりも著名であった。一方、NO が付加されていない native α_1 -PI には抗アポトーシス活性は確認されなかった。GAS のトリプシン処理により得られた分画に C5a peptidase には作用しないが、BK に作用して、これを分解する活性を持つプロテアーゼないしはペプチダーゼの存在するを見出した。

TSLs 患者血清中に存在する GAS 由来の C-多糖体抗原の検出を試み、予後不良例の患者では本抗原量は 100 ng/ml 以上であり、生存例では 10 ng/ml 以下であった。健常妊婦血清中の抗 C-多糖体抗体の測定を行ったところ、1:2~1:256 の値を示したが、TSLs 患者では全例が 1:8 以下であった。分担研究者の一人、清水らは本年度に 3 例の TSLs を経験し、分離された菌型はいずれも T1/M1 型であった。2 例の TSLs 患者の病理解剖所見では肺出血が著名であり、末梢血の溶血も著明であった。

D. 考察

補体抑制活性因子として知られる Sic タンパクの発現に関わる遺伝子、*sic* の塩基配列は TSLs や対照菌株において極めて多様性に富み、同一のアレルが様々な疾患で認められ、疾患に特定の *sic* アレルが関連しているとは云い難く、疾患特異的な配列を見出すことは出来なかった。しかし、*sic* の多様性が疫学的にどのような意義を持つかは更に検討する必要がある。

劇症型、非劇症型の如何に関わらず、1990年以降に分離された菌株 (M3) から特異的に増幅される 0.4kb の DNA 断片長多型を得、これを用いて約 27kb の領域をクローニングし、菌体ゲノムに対するサザンブロットハイブリダイゼーションの結果、約 8.4kb の領域は 1990年以降の分離菌株には存在し、1980年以前の菌株には存在していないことを明らかにした。この事は、1990年以降における M3 型は基本的には単一のクローンであることを強く示唆しているが、

TSLsに特異的でなく、今後、8.4kbの全長を決定することにより、より確かな情報が得られる可能性がある。また、ゲノムDNAの二次元電気泳動からTSLs由来株に特異的なスポットが7個存在していることを明らかにしているため、これらに関しても今後検討していかなければならない。

TSLs患者から分離された菌株はマウス培養線維芽細胞に対する付着性が低い菌株はマウス生体内での増殖性（致死性）は強く、付着性の強い菌株は増殖性が低く、両者の間で逆相関を認めた。猩紅熱患者由来の菌株は付着性に関しては一定の傾向が認められなかったが、生体内増殖性は弱かった。

SPE-Bはマスト細胞や好塩基球に作用して、これら細胞からヒスタミンを遊離した。この事は、TSLsにおける病態形成の上でヒスタミンが関与することを示唆しており、事実、TSLs患者血漿中にヒスタミンが高濃度に存在している症例のあることも明らかにされた。

一方、GAS感染症の治療並びに予防のための方策も検討された。GAS菌体表層より分離された新規のタンパク-Sic35タンパクに対する抗体はGASの多核白血球による食食を促進することが明らかとなり、しかもこのタンパクはGASに特異的に存在し、この抗体は菌型の如何に関わらず食食を促進することから、GASの感染防御抗体として機能し、Sicタンパクをワクチンとして使用しうる可能性が示された。

SPE-Bは単核球由来細胞株、U937 に対しアポトーシスを誘導するが、この実験系にニトロソ α -PI を添加すると、このアポトーシスが阻害することから、ニトロソ α -PI による TSLs 治療への応用が期待される。GAS のトリプシン処理により得られた画分に BK 分解活性のあることを明らかにしたが、今後はこの BK 不活化を誘導する成分を精製、同定し、TSLs における役割を明らかにする必要がある。

TSLs 患者血清の C-多糖体抗原を測定し、その抗原価が疾患の重症度ないしは予後と相関した。この反応は抗体をあらかじめプレートに吸着しておけば、約 3 時間で終了することから、迅速診断ないしは早期診断の上で参考になろう。健常者(健常妊婦)の

抗 C-多糖体抗体価に比し、TSLs のそれは著しく低値を示した。

TSLs 患者の病理解剖所見では約 20% の症例に肺出血像が認められ、かかる所見に関してはこれまでに報告されていないが、肺出血の機序に関しては明らかでない。

E. 結論

TSLs 患者並びに対照群から分離された GAS にそれぞれ特異的な塩基配列をもった *sic* 遺伝子の存在は認められなかった。

1980 年以降に分離された菌株には存在せず、1990 年以降に分離された菌株に新規の DNA が存在することを明らかにしたが、これは 1990 年以降に得た TSLs と対照群にそれぞれ存在し、TSLs 特異的ではなかった。

TSLs 由来菌株のマウスに対する生体内増殖性ないしは致死性と培養線維芽細胞への付着性とは逆相関を示した。

SPE-B はヒトマスト細胞並びに好塩基球に作用して、ヒスタミンを遊離し、この反応は Ca 依存性であった。

GAS 菌体表層から新規の免疫結合性タンパクを同定し、M 型別に関係なく GAS に *sib35* 遺伝子が存在し、抗 Sic タンパク抗体は GAS の多核白血球の食食を促進した。

ニトロソ α -PI は SPE-B による U937 培養細胞のアポトーシスを抑制した。また、GAS に BK を分解する新規のプロテアーゼの存在を示唆した。

TSLs 患者の病理解剖所見において、肺出血が比較的特徴ある所見として観察された。TSLs 患者血清中に C-多糖体抗原の存在することを明らかにし、その価が疾患の予後ないしは重症度と相関した。また、TSLs 患者血清中に抗 C-多糖体抗体を測定したところ、健常者に比し、低い値を示した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗：
Streptococcus pyogenes の分子疫学 細菌学雑誌 54:617-629, 1999.
- 2) Murase, T., Suzuki, R., Osawa, R. and Yamai, S. : Characteristics of *Streptococcus pyogenes* serotypes M1 and M3 isolates from patients in Japan from 1981 to 1997. J. Clin. Microbiol. 37:4131-4134, 1999.

- 4134, 1999.
- 3) Murase, T., Kameoka, Y., Suzuki, R., and Yamai, S. : Variation in *sic* gene encoding complement-inhibiting protein of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 isolates in Japan. (投稿中)
 - 4) Murase, T., Suzuki, R., Watanabe, Y., and Yamai, S. : Erythromycin resistance genes in *Streptococcus pyogenes* isolates in Kanagawa, Japan. (投稿中)
 - 5) Inagaki, Y., Myouga, F., Kawabata, H., Yamai, S. and Watanabe, H.: Genetic difference of M3-serotyped *Streptococcus pyogenes* between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 181: (in press) 2000.
 - 6) Shiseki, M. *et al.* : Comparison of pathogenic factors expressed by group A streptococci isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome and scarlet fever. *Microbiol. Pathogen.* 27:243, 1999.
 - 7) 三好 (秋山) 徹、内山竹彦 : 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症機序について。臨床病理 印刷中
 - 8) 大国寿士 : 劇症型 A 群レンサ球菌感染症「エマージングディーズ」(竹田美文、他編) pp16-23、近代出版、1999.
 - 9) 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、他編) pp340-352、(財)日本公衆衛生協会、1999.
 - 10) Osono, E., Takahashi, M. *et al.*: Effect of "isolating hemodialysis" on prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cross-infection in a hemodialysis unit. *Clin. Nephrol.* 53. 2000 (in press)
 - 11) S. Kawabata, H. Kuwata, I. Nakagawa, S. Morimatsu, K. Sano, and S. Hamada: Capsular hyaluronic acid of group A streptococci hampers their invasion into human pharyngeal epithelial cells. *Microbial Pathogenesis* 1999: 27: 71-80.
 - 12) S. Kawabata, Y. Terao, T. Fujiwara, I. Nakagawa, and S. Hamada: Targeted salivary gland immunization with plasmid DNA elicits specific salivary IgA and IgG and serum IgG antibodies in mice. *Infect. Immun.* 67 : 5863-5868. 1999.
 - 13) S. Kawabata, H. Kuwata, Y. Terao, E. Kunitomo, I. Nakagawa, and S. Hamada: The role of capsular hyaluronic acid of group A streptococci on their invasion into human pharyngeal epithelial cells. Submitted.
 - 14) S. Kawabata, E. Kunitomo, Y. Terao, I. Nakagawa, and S. Hamada: Protective immune responses to 54 kDa recombinant protein encoding fibronectin binding protein FBP54 of *Streptococcus pyogenes*. In preparation.
 - 15) K. Inoue, T. Akaike, Y. Miyamoto, T. Okamoto, T. Sawa, M. Otagiri, S. Suzuki, T. Yoshimura and H. Maeda: Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin: Implication for cytoprotective mechanism *in vivo*. *J. Biol. Chem.*, 274: 27069-27075 1999.
 - 16) H. Maeda, J. Wu, T. Okamoto, K. Maruo and T. Akaike: Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacol.* 43: 115-128 1999.
 - 17) T. Akaike and H. Maeda: Nitric oxide in influenza. In *Nitric Oxide and Infection* (ed. F.C. Fang), Kluwer Academic/Plenum Publishing Co., New York, p. 397-415 1999.
 - 18) T. Akaike: Nitric oxide in infectious diseases. In *Guanidino Compounds* (eds. M. Mori, M. Ishida and J.F. Clark), Blackwell Science Asia, Tokyo, p. 175-179, 1999.
 - 19) T. Akaike, S. Fujii, A. Kato, J. Yoshitake, Y. Miyamoto, T. Sawa, S. Okamoto, M. Suga, M. Asakawa, Y. Nagai and H. Maeda: Viral mutation accelerated by nitric oxide production during infection *in vivo*. *FASEB J.*, (in press) 2000.
 - 20) Y. Miyamoto, T. Akaike and H. Maeda: S-Nitrosylated human α 1-protease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, (in press) 2000.
 - 21) Y. Miyamoto, T. Akaike, M. Samiul Alam, K. Inoue, T. Hamamoto, N. Ikebe, J. Yoshitake, T. Okamoto and H. Maeda: Novel functions of human α 1-protease inhibitor after S-nitrosylation: Inhibition of cysteine protease and antibacterial activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (in press) 2000.

- 22) T. Akaike and H. Maeda : Pathophysiological effects of high-output production of nitric oxide. In Nitric Oxide (ed. L.J. Ignarro), Academic Press, San Diego, (in press) 2000.
- 23) N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, M. Ogawa and H. Maeda: Protective effect of S-nitroso-a1-protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. In The Biology of Nitric Oxide Part 7 (Proceedings of the 6th International Meeting on the Biology of Nitric Oxide) (eds. S. Moncada, L. Gustafsson, P. Wiklund and E.A. Higgs), Portland Press Ltd., London, (in press) 2000.
- 24) 赤池孝章、前田 浩 : NOの生理 (1) 感染, 炎症, 免疫とNO. 臨床消化器内科, 14: 671-680 1999.
- 25) 岡本竜哉、赤池孝章、前田 浩 : マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)の活性化機構. 生化学, 71:1387-1401 (1999).
- 26) 赤池孝章 : 炎症とNO : その功罪. 「NOの多彩な機能に迫る」 (谷口直之、鈴木敬一郎 編), (株)羊土社 (東京), p. 54-63., 2000.
- 27) 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. 28:1317-1319. 1999
- 28) Udagawa, H., Oshio, H and Shimizu, Y.: Serious Group A streptococcal infection around delivery. Obst. Gynecol. 94: 153-157. 1999.
- 29) Shimizu, Y.: Group A streptococcal toxic shock syndrome: Ethiology in Japan. Internal Med. (in press)
- 30) 大江健二 : レンサ球菌(2) 劇症型A群レンサ球菌. 小児科臨床 52(4):599-602. 1999
- 31) 大江健二 : 劇症型レンサ球菌感染症の疫学と病因. 日本医事新報 3934:114. 1999
- 32) 大江健二 : 劇症型A群レンサ球菌感染症の診断基準・重症度 内科 (印刷中)
- 33) 宇田川秀雄、押尾好浩、清水可方 : 劇症型A群レンサ球菌感染症「分娩型」の臨床像. 日本産婦人科学誌 51: 1141-1149. 1999
- 34) 清水可方、大江健二 : 劇症型A群レン

- サ球菌感染症 日本臨床. 領域別症候群シリーズ 23, p115-118. 1999
- 35) 清水可方 : 劇症型A群レンサ球菌. 救急医学 急性疾患とエマージェンシー 23 : 1474-1477. 1999
2. 学会発表
- 1) 村瀬敏之、亀岡洋祐、鈴木理恵子、山井志朗 : *Streptococcus pyogenes* 血清型 M1分離株における Complement-inhibiting protein of *Streptococcus* (Sic)の多様性. 第8回レンサ球菌談話会、大阪、1999.
- 2) 村瀬敏之、鈴木理恵子、渡辺祐子、山井志朗 : *Streptococcus pyogenes*分離株におけるエリスロマイシン耐性遺伝子. 第32回レンサ球菌研究会、金沢、1999.
- 3) Murase, T., Suzuki, R., and Yamai, S. : Characteristics of *Streptococcus pyogenes* Isolates from Patients in Japan Between 1981 to 1997. XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Auckland, 1999.
- 4) 内山竹彦 : 劇症型A群レンサ球菌感染症の発症機序について、第46回日本臨床病理学会総会 1999
- 5) 大国寿士、桜田紳策、留目優子 : Styreptococcal pyrogenic exotoxin-Bによるヒトマスト細胞、好塩基球からのヒスタミン遊離に関する検討. 第20回日本炎症学会、1999年 7月
- 6) Watanabe, Y., Todome, Y., Sakurada, S., Ohkuni, H. et al: Cloning and expression of *Streptococcus mitis*- derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) gene in *Streptococcus gordonii* after chromosomal integration. XIVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. New Zealand, October, 1999.
- 7) Sakurada, S., Ohkuni, H., Todome, Y., Watanabe, Y., et al: Release of histamine from human cultured mast cells and basophils by streptococcal exotoxin-B (SPE-B/streptococcal cysteine proteinase (SCP). XIVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. New Zealand, October, 1999.
- 8) Ohkuni, H., Sakurada, S., Todome, Y., Watanabe, Y., et al: Analysis of the role of streptococcal cell wall components on

inflammation response: NF- κ B activation and production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human peripheral monocytes-derived macrophages. XIVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. New Zealand, October, 1999.

- 9) Todome, Y., Ohkuni, H., Sakurada, S., Watanabe, Y., et al: Release of histamine from human mast cell line, HMC-1 stimulated with streptococcal pyrogenic exo-toxin-B/streptococcal cystain proteinase. XIVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. New Zealand, October, 1999.
- 10) 桑田啓貴, 川端重忠, 中川一路, 浜田茂幸: A群レンサ球菌の咽頭部上皮細胞HEp2への付着・侵入とヒアルロン酸の関与. 第72回日本細菌学会総会. 1999年3月24-26日, 東京.
- 11) 村上旬平, 寺尾豊, 菊地賢, 戸塚恭一, 中川一路, 川端重忠, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes*臨床分離株のM遺伝子型とスーパー抗原遺伝子との相関. 第72回日本細菌学会総会. 1999年3月24-26日, 東京.
- 12) 寺尾豊, 川端重忠, 西川弘一, 国友栄治, 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年3月24-26日, 東京.
- 13) Nakagawa, K. R. Kimura, M. Nakata, H. Kuwata, S. Kawabata and S. Hamada: Effects of receptor-globulins on invasive group A streptococcal infection. 14th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. October 10-13, 1999. Auckland, New Zealand.
- 14) S. Kawabata, J. Murakami, Y. Terao, I. Nakagawa, and S. Hamada: Distribution of *Streptococcus pyogenes* superantigens is associated with clinical status. 14th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases.

October 10-13, 1998. Auckland, New Zealand.

- 15) Y. Terao, S. Kawabata, I. Nakagawa, S. Hamada: immunization of mice with streptococcal fibronectin binding protein. 14th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. October 10-13, 1999. Auckland, New Zealand.
- 16) H. Maeda, T. Akaike and T. Okamoto: Events behind the silent dissemination of *Streptococcus pyogenes*: Activation of kinin generation by its thiol protease accompanying activation of matrix metalloproteinase (MMPs) and inactivation of chemotaxis by its C5a peptidase. Gordon Research Conferences on Kallikrein & Kinins, January 17-22, 1999 (Ventura, USA).
- 17) Y. Miyamoto, T. Akaike, K. Inoue, M. Yoshida, M. Samiul Akam, N. Ikebe, T. Hamamoto and H. Maeda: Antibacterial action and vasodilatory effect of α 1-protease inhibitor: Novel functions generated by S-nitrosylation. 6th. CGGH Symposium 1999 "Biological Roles of Proteolysis in Health and Disease", May 19-21, 1999 (Naruto, Japan).
- 18) N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, M. Ogawa and H. Maeda: Protective effect of an S-nitroso protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. The 6th. International Meeting on the Biology of Nitric Oxide, 1999, September 5-8, 1999 (Stockholm, Sweden).
- 19) Y. Miyamoto, T. Akaike, K. Inoue, M. Yoshida, M. Samiul Alam, N. Ikebe, T. Hamamoto and H. Maeda: Antibacterial action and vasodilatory effect of α 1-protease inhibitor (α 1-PI): Novel functions generated by S-nitrosylation of α 1-PI. International Proteolysis Society, September 25-30, 1999 (Michigan, USA).
- 20) 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)
- 21) 池辺宗三人、赤池孝章、宮本洋一、吉田正貴、濱本高義、小川道雄、前田浩: 肝虚血再灌流障害モデルにおけるニトロソ化 α 1-プロテアーゼインヒビターの臓器保護作用. 第72回日本生化学会大会, 平成11年10月6日~9日 (横

浜)

22) 宇田川秀雄：劇症型A群レンサ球菌感染症の臨床像 日本産婦人科学会関東連合. 1999年6月27日 (つくば市)

Streptococcus pyogenes 血清型M1分離株における*sic*遺伝子の多様性

(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：1969～1997年に分離された*Streptococcus pyogenes* 血清型M1/T1の49株（劇症型A群レンサ球菌感染症（TSLs）患者由来8株、咽頭炎由来34株、猩紅熱由来1株および健康学童由来6株）における*sic*遺伝子の塩基配列を比較検討した。参照株と比較して1塩基以上の変異がすべての株で認められ、39箇所の変異が明らかとなった。27箇所の塩基置換のうち26がアミノ酸置換を伴っていた。6～123 bpに及ぶinsertion及びdeletionは、すべてin-frameであった。供試した49株において26の*sic*アレルが認められた。同一のパルスフィールドゲル電気泳動パターン、タイプIa及びIIaを示す16株及び25株において、それぞれ9及び14の*sic*アレルが認められた。一方、各PFGEタイプに共通した変異が認められた。各疾患に共通する特徴的な変異は無かった。

A. 研究目的

Streptococcus pyogenes (Group A *Streptococcus*)は、ヒトに対し咽頭炎から劇症型レンサ球菌感染症(TSLs)に代表されるinvasiveな疾患までさまざまな症状を引き起こす。本菌はその表層に存在するM蛋白により血清型別が行われており、TSLs患者からのM1型の分離頻度が高いとされている。血清型M1株は、1989年頃を境にその生物学的性状及び遺伝学的性状が大きく変わっていること、また、TSLs患者由来株と咽頭炎由来株のパルスフィールドゲル電気泳動(PFGE)パターンには差異が認められないことが明らかにされた(Murase T *et al.*, J. Clin. Microbiol. 38: 4131-4, 1999.)。近年、補体活性を抑制することで病原性に関与すると考えられる菌体外蛋白のStreptococcal inhibitor of complement (Sic) が血清型M1株で見い出された(Akesson *et al.*, J. Biol. Chem. 271: 1081-1088, 1996)。加えて、本蛋白をコードする遺伝子(*sic*)はきわめて多様性に富むこと、すなわち、同じPFGEパターンに属する菌株のなかで*sic*の多型が報告されている(Stockbauer *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95: 3128-3133, 1999)。そ

こで、TSLs患者および咽頭炎患者由来株について*sic*の塩基配列を比較し、各疾患に共通した*sic*の変異が認められるか、また、分離年或いは分離地域により特徴的な*sic*の変異が認められるかを検討した。

B. 研究方法

1992年から1997年にTSLs患者から分離された血清型M1の8株(国立感染症研究所より分与)及び1969年から1997年に咽頭炎、猩紅熱、及び糸球体腎炎患者並びに健康保菌者から分離された33株並びに参照株CNCTC 40/58株を供試した。*sic*の塩基配列はPerea Mejiaら(J. Clin. Microbiol. 35: 3220-4, 1997)の方法に基づいて決定し、発表された配列(Akesson *et al.*, 1996)と比較した。また、*Sma* I切断後のDNAのPFGEパターンを検討し既報(Murase T *et al.*, 1999)により分類した。

C. 研究成績

供試した51株のうち、CNCTC 40/58株を除く49株の*sic*において、Akessonら(1996)が発表した塩基配列と比較して1塩基以上の変異が39箇所で認められた(図1)。図2に示したように、そのうち27箇所はすでに

報告された変異(Perea Mejia *et al.*, 1997; Stockbauer *et al.*, 1998; Hoe *et al.*, *Emerg. Infect. Dis.* 5:254-63, 1999)と一致した。残りの12箇所はこれまでに報告がない変異で、18株に認められた。26のコドンにおいて、18株に認められた。26のコドンにおいて各1箇所の塩基置換を認めた。さらに、1つのコドンでは2塩基の置換がみられた。これら27個のコドンのうち26コドンでアミノ酸置換を伴っていた。*sic*に変異を認めた49株すべてにおいて、第474, 479, 506, 650, 及び691塩基に、それぞれ、全く同じ塩基置換が認められた。6 から123bp に及ぶinsertionおよびdeletionが12箇所で確認され、そのすべてがin-frameであった。1株では第492塩基において87 bp のinsertionが2回連続していた。最終的に、26の異なる*sic*アレル(便宜上*sic1*~*sic26*と標記)が49株で認められた結果となった。もっとも多くみられたアレル(*sic2*)は咽頭炎患者由来7株で確認された。これに続き、*sic1*が咽頭炎患者由来3株及びTSLs患者由来3株の計6株でみられた。

PFGEパターンIaに分類された16株において9つの異なるアレル(*sic16*~*sic24*)が認められた。PFGEパターンIIaに分類された25株では14の異なるアレル(*sic1*~*sic14*)が認められた。一方、第161, 212, 及び244塩基の置換並びに第165塩基以降45 bp のdeletionはPFGEパターンIaを示す菌株にみられたが、PFGEパターンIIaを示す菌株にはみられなかった。反対に第659及び721塩基の置換並びに第141塩基後の15 bp及び第648塩基後の9 bpのinsertionはPFGEパターンIIaを示す菌株にのみ存在した。

D. 考察

この度の検討結果から、同一のPFGEパターンを示す分離株であっても、各菌株の*sic*の塩基配列は極めて多様性に富むことが示され、これまでの報告(Stockbauer *et al.*, 1998)と一致する所見である。このような現象についてStockbauerら(1998)は、単なる突然変異の結果ではなく自然淘汰の結果であると考察している。さらに、Hoeら(*Nat. Med.* 8:924-9, 1999)はそのような状況が粘膜上で生じていることをマウスの感染実験系において指摘した。すなわち、*sic1.01*を保有する株をマウスに鼻腔から感染・定着さ

せたところ、5匹中4匹のマウスから分離した菌株の74 %で*sic*のPCR産物の大きさが変化しており、そのうち20株について塩基配列を検討したところ、変異を認めたとしている。

CNCTC40/58の*sic*の塩基配列は、Akessonら(1996)が決定した塩基配列と同一であった。実際、彼らが用いた株(40/58)はCNCTC40/58に他ならない。Stockbauerら(1998)は、複数の研究者が保有している参照株SF130の*sic*の塩基配列を検討したところ同一であったと報告している。また、継代に伴う変異も認められていない(Remra Mejia *et al.*, 1997)。したがって、継代や保存は*sic*の塩基配列に影響を及ぼさないと考えられた。

本研究で供試したTSLs患者由来3株および咽頭炎患者由来3株の塩基配列(*sic1*)は、メキシコの小児の咽頭炎患者から分離された株で多く見られたもの(Perea Mejia *et al.*, 1997)と一致していた。また、本研究で供試した咽頭炎患者由来株の*sic18*及び*sic23*は、メキシコにおけるリウマチ熱患者から分離された菌株の*sic*の塩基配列と一致した。このように、同一のアレルが様々な疾患において認められていることから、個々の疾患に特定の*sic*アレルが関連しているとは言い難い。

ところが、*sic*における特定の変異に限られたPFGEパターンを示す菌株と関連していることが示唆された。すなわち、パターンIaを示す菌株には存在するがパターンIIaを示す菌株には存在しない変異を認めた。この逆の場合も確認された。分担研究者らはこれまでに、わが国で分離された*S. pyogenes* 血清型M1T1株は、1989年頃を境にPFGEパターンIaからIIaに置き換わっていること、この2つのパターンを示す菌株はまったく別個のクローンであること、そしてパターンIIaはこれまで専門誌に発表された各国の*S. pyogenes* 血清型M1分離株のPFGEパターンと同一と思われることを報告した(Murase *et al.*, 1999)。本研究の結果から、パターンIIaに共通して生じた新しい*sic*の変異が、このクローンを優勢とさせた要因のひとつと考えることもできよう。同様に、Hoeら(*Nat. Med.*, 1999)も*Sic*蛋白のバリエーションのうちマウスで示したような選択を受け

た結果、新たな流行株となる可能性を指摘している。実際、この度もっとも多くの株で認められたアレルのひとつ(*sic1*)は、Hoeら(Emerg. Infect. Dis., 1999)が14カ国で分離した菌株が保有する*sic*と全く同じ塩基配列である。したがって、*sic1*を有する株はPFGEパターンIIaを示す株の祖先のような位置付け(ancestral position, Hoe *et al.*, Emerg. Infect. Dis., 1999)にあるとも解釈できる。

Sic蛋白の生物活性(補体抑制効果)については、バリエーションのごく一部が検討されているに過ぎない(Hoe *et al.*, Nat. Med., 1999)。したがって、遺伝子上のどの部分が本蛋白の活性に重要であるかも明らかにされていない。一方、わが国の分離株における*sic*の多様性が疫学的にどのような意義もつのかを解明するために、より多くの株を検討する必要がある。

E. 結論

様々な症状の患者及び保菌者から分離された*S. pyogenes*血清型M1の49株について、*sic*の塩基配列を検討した。同一のPFGEパターンを有する菌株のあいだで多くの変異が認められたが、各疾患に共通する*sic*の変異は確認されなかった。一方、特定の変異とPFGEパターンの関連が認められた。*sic*の変異に関する生物学的及び疫学的意義については今後の検討課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 村瀬敏之、鈴木理恵子、山井志朗：
*Streptococcus pyogenes*の分子疫学。細菌学雑誌 54:617-629, 1999.
- 2) Murase, T., Suzuki, R., Osawa, R. and Yamai S. : Characteristics of *Streptococcus pyogenes* serotypes M1 and M3 isolates from patients in Japan from 1981 to 1997. J. Clin. Microbiol. 37:4131-4134, 1999.
- 3) Murase, T., Kameoka, Y., Suzuki, R., and Yamai, S. : Variation in *sic* gene encoding complement-inhibiting protein of *Streptococcus pyogenes* serotype M1 isolates in Japan. (投稿中)
- 4) Murase, T., Suzuki, R., Watanabe, Y., and Yamai, S. : Erythromycin resistance genes

in *Streptococcus pyogenes* isolates in Kanagawa, Japan. (投稿中)

- 5) Inagaki, Y., Myouga, F., Kawabata, H., Yamai, S. and Watanabe, H.: Genetic difference of M3-serotyped *Streptococcus pyogenes* between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates. J. Infect. Dis. 181: (in press) 2000.

2. 学会発表

- 1) 村瀬敏之、亀岡洋祐、鈴木理恵子、山井志朗：*Streptococcus pyogenes*血清型M1分離株におけるComplement-inhibiting protein of *Streptococcus* (Sic)の多様性。第8回レンサ球菌談話会、大阪、1999.
- 2) 村瀬敏之、鈴木理恵子、渡辺祐子、山井志朗：*Streptococcus pyogenes*分離株におけるエリスロマイシン耐性遺伝子。第32回レンサ球菌研究会、金沢、1999.
- 3) Murase, T., Suzuki, R., and Yamai, S. : Characteristics of *Streptococcus pyogenes* Isolates from Patients in Japan Between 1981 to 1997. XIV Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. Auckland, 1999.

(共同研究者：鈴木理恵子、村瀬敏之)

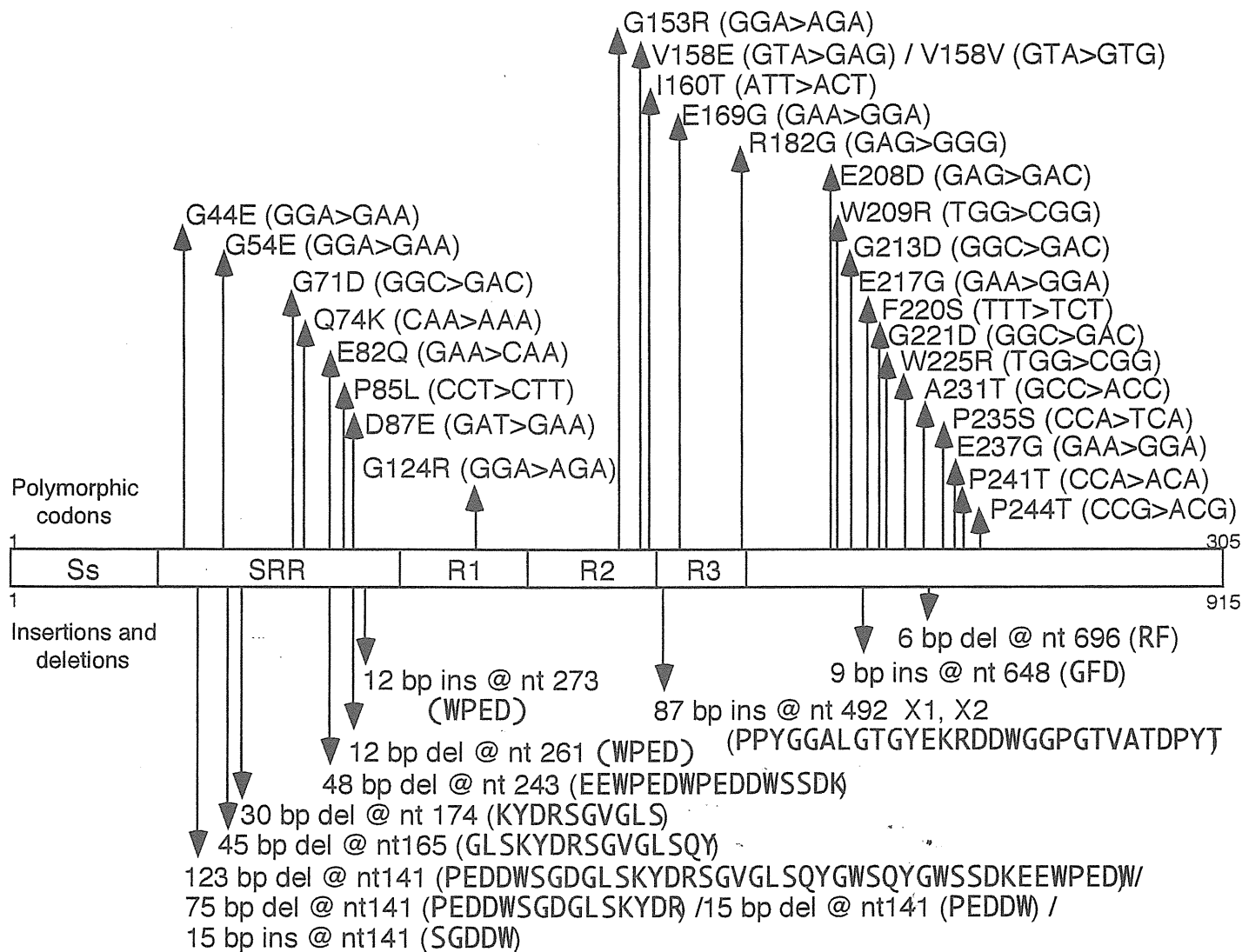


図1 供試49株の *Streptococcus pyogenes* 血清型M1における *sic* 遺伝子及びSic蛋白の変異

劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症機構に関する研究

(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 我が国におけるレンサ球菌の疫学的調査から、M3型の急激なる増加と共にM3型によるTSLs患者の増加が見られたとの解析結果が得られている。特異的な菌がTSLs発症に関与している可能性が示唆されたので、急激に増加した菌と過去に分離された菌との間には、何か遺伝学的差があるのではあるとの想定に基づき、RGLSおよびRAPD-PCR法を用いて検討を行った。その結果、1990年以降に増加した菌と、1980年代以前に分離された菌との間には明らかな遺伝学的差が認められた。一方、1990年代に増加したM3型菌において、TSLs発症患者由来菌と咽頭炎由来菌との間には、明らかな差が認められなかった。これらの結果は、1990年代に急激に流行した菌には、TSLs発症に関与する要因を含んでいるが、それは感染したヒトすべてに現れるわけではないことを示している。

A. 研究目的

TSLsの発症機序に関しては、A群レンサ球菌の突然変異や新種の病原因子の存在を考えるものと、宿主側の原因を考えるもの、あるいはその両方を考えるものがあるが、現時点では全く解明されていないのが現状である。

疫学的調査により、我が国で1990年代にM3型菌が急激に増加し、それと共にM3型由来のTSLs患者の増加が見られるようになったとの結果が得られている。新規クローンの発生を想定し、我々は、菌側における新規病原因子の存在を仮定した。その遺伝子工学的なアプローチとして劇症型A群レンサ球菌感染症患者由来菌株と非劇症型(標準株および咽頭炎患者由来株)の染色体DNA上での差異をRAPD-PCR法、サザンハイブリダイゼーション法やRLGS法などを用い比較検討を行い、劇症型A群レンサ球菌感染症菌株特異的な新規病原因子の獲得を試みた。

B. 研究方法

(1) 非劇症型株と劇症型感染症患者由来菌株間でのRAPD-PCR法による多型の検出

一般に、RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA)-PCR法は、1種類のランダムなプライマーを使い、試料のゲノムDNA上に存在しているプライマー固有の逆反復配列に囲まれたDNA断片を増幅させることにより個体識別を行う方法である。このために通常低いアニーリング温度(36℃)が設定されており、結果として、電気泳動パターンはスメアでテーリングしたものとなりやすい。そこで、我々は非常に高いアニーリング温度(55℃)でRAPD-PCRを行い、プライマー特異的な逆反復配列を持つDNA領域のみを増幅させようと試みた。ランダムプライマー(10 mer)は、オペロン社のランダムプライマーキットを用いた。プライマー30種類について非劇症型(標準株および咽頭炎患者由来菌株)と、劇症型感染症患者由来菌株間でのDNA断片長多型の検出を試みた。

(2) 劇症型感染症患者由来菌株特異的なDNA断片を用いての劇症および非劇症菌株のゲノムのサザンハイブリダイゼーション

RAPD-PCR法にて劇症型感染症患者由来菌株にのみ見いだされた3種のDNA断片

を精製し、プローブとして用い、劇症および非劇症株ゲノムに対しサザンブロットハイブリダイゼーションを行った。プローブはジゴキシゲニンでラベルし、検出はプローブはジゴキシゲニンでラベルし、検出はCDP-Star (Tropix, USA) を基質とし、抗ジゴキシゲニン-アルカリホスファターゼ Fab fragment (二次抗体) により行った。

(3) ゲノミックウォーキング

Inverted-PCR及びプラークハイブリダイゼーションにより、DNA断片長多型(プローブA)の両端方向にM3型劇症型感染症患者由来菌株のゲノミックウォーキングを行った。Inverted-PCRの反応条件は、(92°C 2分)×1サイクル、(92°C 10秒、55°C 20秒、68°C 15分)×15サイクル、92°C 10秒、55°C 20秒、68°C 15分(auto extension 20秒)×10サイクル、(68°C 7分)×1サイクルである。ベクターには、pGEMTM-T vector system (Promega)を用い、PCR増幅産物をインサートに持つプラスミドを作製した。また、Inverted-PCRで増幅できない場合には、プラークハイブリダイゼーションを行った。クローニングベクターにはLamda GEM-11 Genomic Cloning Vector System (Promega)を用い、*Bgl* IIで消化した劇症型菌株ゲノミックDNAを40%から10%のショ糖密度勾配(1 M NaCl, 20 mM Tris-HCl pH 7.1, 20 mM EDTA, 0.3% Sarkosyl (SIGMA))遠心法により分画精製し、Lamda GEM-11の*Bam* HIサイトにクローニングした。得られたクローンは、さらにpBluescript SK プラスミドにサブクローニングした。

(4) RLGS法

RLGS法は、ゲノムDNAを制限酵素にて切断した後、その末端を $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dATP}$ 、 $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dGTP}$ で標識し、二次元電気泳動によりDNAの断片をスポットとして検出する方法である。泳動したスポットの位置を比較することにより、遺伝子の重複、欠失、挿入といった変異をスポットの量的・位置的变化として検出できる。

M3型標準菌株と劇症型菌株とのゲノムDNAの変異の程度をこのRLGS法により解析した。制限酵素は一次元目は*Bgl* Iまたは*Bam* HI、二次元目は*Pst* Iまたは*Hind* IIIを使用した。電気泳動は一次元目に0.8%アガロースゲル電気泳動 [Seakem GTG agarose

(Bio-Rad)、1%ショ糖]、二次元目には5%アクリルアミドゲル電気泳動により泳動を行った。

C. 研究結果

(1) RAPD-PCR法による非劇症型株(標準株および咽頭炎患者由来菌株)と劇症型感染症患者由来菌株とのDNA断片長多型の比較

60種類のランダムプライマーを用い、M3型の1980年以前の分離株と、1990年以降の分離株のゲノムDNAをテンプレートとしてPCRを行った。その結果、M3型の1990年以降の由来菌株のみに増幅される、0.4 kbのDNA断片長多型を得た。M1型菌について同様の実験を行ったところ、1.5 kbと3.5 kbの断片長多型を見いだした。

(2) DNA断片長多型をプローブに用いたサザンハイブリダイゼーション解析

M3型における0.4 kbのDNA断片領域をプローブとして、M3型の1980年代以前の分離株、1990年以降の咽頭炎由来株、1990年以降の劇症型患者由来株を用いてサザンブロットティングを行った。その結果、0.4 kb断片は、1980年代以前の株(15株)にはすべて相同性を持たなかったが、1990年代以降の株には、咽頭炎由来株であろうとも劇症型患者由来株であろうとも反応が認められた。

(3) ゲノミックウォーキングによりクローニングしたDNA断片をプローブとして用いてのサザンハイブリダイゼーション

0.4 kbのDNA断片を含む領域のゲノミックウォーキングを行い、劇症型患者由来株の全長約27 kbをクローニングした。クローニングした27 kbのDNA断片を適当な制限酵素で11種類の断片に切断し、これらをジゴキシゲニンラベルしたものをサザンハイブリダイゼーションのプローブ(プローブA~K、プローブAはゲノミックウォーキングのプローブとして用いた0.4 kbの断片である)として相同性を検討した。その結果、A, D, E, F, Gの約8.4 kbの断片は、1990年代の咽頭炎由来株、および劇症由来株には認められたが、1980年代由来株には認められなかった。I, J, Kの約10 kbの断片は、すべての株に認められた。つまり、A, D, E, F, Gの約8.4 kbの断片は、すべての株に認められるI, J, K断片の片側に新規に挿入し、そ

の結果1990年代の株として誕生したことが推察された。

(4) プローブG領域のDNAの塩基配列の解析

多型性の部分の塩基配列を決めるため、まずはプローブG領域を含む約2 kbpの塩基配列に存在する未知の遺伝子の決定を行った。その塩基配列のORF検索の結果、約400 bpのサイズのORFの存在が認められた。そしてその塩基配列から推定されるアミノ酸配列のホモロジーを検索したところ、*Streptococcus mutans*に存在する機能不明の遺伝子との相同性 (35%) が認められた。

(5) RLGS法による劇症型感染症菌株特異的なゲノムDNA領域の探索

M3型標準株と劇症型感染症由来株のゲノムDNAを *Bgl* I, *Bam* HI, *Hind* III, *Pst* Iの4種類の制限酵素を用い、各々を組み合わせで二次元電気泳動を行った。その結果、*Bgl* I-*Hind* IIIの組み合わせで切断した場合に、両菌株のゲノムDNAは約460のDNAのスポットに分離され、このうち劇症型感染症由来菌株 (1990年代の分離株) 特異的に観察されたDNAスポットは7スポット、逆に1980年代以前の分離株に特異的に観察されたスポットは3つであった。

D. 考察

PCRのアニーリング温度を55℃に設定し、ランダムなプライマーによる非特異的なアニーリングを抑えたことにより、劇症型感染症株を含む1990年代以降に分離された株に特異的に増幅される0.4 kbのDNA断片長多型 (M3型) を得ることができた。この0.4 kbのDNA断片を用い、約27 kbの領域をクローニングし、それを用いて菌体ゲノムに対するサザンブロットハイブリダイゼーションをした結果、約8.4 kbの領域が、1990年代以降の菌株に保持されているが、1980年代以前の株には存在していないことが明らかになった。1990年代以降の株間では、劇症型患者由来株であろうとも、咽頭炎患者由来株であろうとも差を認めることができなかった。これらの結果から、1990年代にM3型の菌による感染が急激に増加したが、それは単一のクローンによる菌であることが強く示唆された。そのクローンの菌には、劇症を起こす能力があるが、

劇症型になるのかそれとも軽症で済むのかは、宿主側因子が強く絡んでいると思われる。そのことは、劇症患者が発生した家族を調べると、劇症患者から分離される菌株と遺伝的に全く区別のつかない菌株が家族の咽頭から分離されるが、その家族は無症状であるケースが多く見られることから推察される。

1970-1980年には劇症型を示す例は報告されていない。しかし、1990年代になると我が国でも劇症を示す患者の数が急激に増加した。このことは、菌株の変化が発症の変化に絡んでいる可能性がある。1980年代以前に分離された菌株と1990年代以降に分離された菌株に遺伝学的に明らかな差、つまり少なくとも約8.4 kbのDNAの付加が見られることから、現在流行している株は外来遺伝子を獲得してきた可能性が考えられる。その付加DNAのなかに、劇症発症のための菌側因子が存在する可能性がある。現在までに決定した塩基配列のなかには、既知の病原因子と相同性のあるものは見いだされていない。今後8.4 kbの全長を決定することにより、もっと確かな情報が得られるであろう。

一方、ゲノムDNAの二次元電気泳動を行ったRLGS法であるが、M3型の標準株と劇症型感染症由来菌株のゲノムDNAを *Bgl* I-*Hind* IIIの組み合わせで切断した場合に、劇症型感染症由来菌株特異的なDNAスポットが7スポット観察された。このことは、1980年代以前の株と劇症型株の間には、ゲノムDNA上に今回見いだした断片以外にもいくつかの違いがあることを示唆している。これらが劇症発症に関与する因子を持つのかどうかは今後の課題である。

E. 結論

1990年代に流行している株は、1980年以前の流行株と遺伝学的に明らかに異なり、新規のDNAを獲得していることを明らかにした。そのDNAの中に、劇症の発症に関与する因子があることが想定されるが、その詳細は今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Inagaki, Y., Myouga, F., Kawabata, H., Yamai, S. and Watanabe, H.: Genetic difference of M3-serotyped *Streptococcus pyogenes* between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 181: (in press) 2000.