

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。劇症型株の培養細胞への付着性が強い株は、マウス致死毒性が低かった。これらの株の遺伝型は同一であり、致死毒性と付着性は直接関連していると考えられた。

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 症例から分離された菌10株と同時期に他の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。実験に使用したマウスの取り扱いには東京女子医大の動物実験倫理規定に基づいた。

C. 研究結果

1 培養細胞への付着性

猩紅熱株の細胞付着性は強弱さまざまであったが、劇症型株はマウス致死毒性の強い株ほど付着性が低かった。

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/ml の菌数が回収されるが、猩紅熱菌株では 1×10^3 前後の菌数が回収され、致死毒性の強弱と相関していた。

3 パルスフィールド電気泳動

Sma I 切断パターンでは、劇症型株のうち致死毒性の高い7株は同じパターンであった。一方、猩紅熱株では致死毒性とパターンの間に相関は認められなかった。

D. E. 考察と結論

以上の結果から、劇症型 株のマウスに対する致死毒性は、これまでの一般的な考え

とは逆に宿主細胞への付着性の低さとよく相関することが分かった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) 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.

2) 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

2. 学会発表

1) 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

(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 のマスト細胞並びに
好塩基球に対する作用

(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 (以下劇症型感染症) 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 並びにヒト末梢白血球からのヒスタミン遊離能について検討した。SPE-B はこれら細胞からヒスタミンを遊離し、劇症型患者血漿中にヒスタミンが高値を示す症例が確認された。SPE-B によるヒスタミン遊離能は cystein proteinase 阻害剤である E64 の添加により抑制された。また、このヒスタミン遊離は Ca 依存性であることを明らかにした。SPE-B は HMC-1 細胞膜に結合することが免疫電顕から観察され、その結合には膜の glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase が関与することが明らかにされた。

A. 研究目的

劇症型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そのアナロジーを求め、A 群レンサ球菌 (以下 A 群菌) 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、報告してきた。今回はこのヒスタミン遊離に関する反応機構を明らかにするための基礎的検討を行った。

B. 研究方法

1) 臍帯血浮遊有核細胞から MACS A 133 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～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 週間以上に亘り同様に培養し、好塩基球を得た。ヒト健康成人の末梢血を EDTA 存在下で採血し、4% Dextran-PBS と混合後、白血球

層を採取した。HMC-1 は 1.2 mM α -thio-glycerol と 10% FCS を含む Iscove's medium で培養した。

2) マスト細胞 (1×10^4)、好塩基球 (1×10^5)、HMC-1 ($1 \sim 5 \times 10^5 \sim 6$) 並びに末梢白血球 (1×10^6) を Tyrode 溶液に浮遊させ、これに精製 SPE-B ($0 \sim 20 \mu\text{g/ml}$)、SPE-A ($0 \sim 20 \mu\text{g/ml}$) ないしは LPS ($10 \mu\text{g/ml}$) 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。

3) SPE-B を 1 mM dithiothreitol (DDT) で処置し、次いで 5 mM E64 を添加し、これを末梢白血球ないしは HMC-1 に加え、SPE-B に対するヒスタミン遊離の阻害効果を検討した。

4) 末梢白血球 (2.5×10^6) と SPE-B ($20 \mu\text{g/ml}$) との反応の際に、5 mM の EGTA を含む Tyrode 溶液ないしは EGTA を含まない Ca free の Tyrode 溶液中で、 37°C 、30 分反応後、遊離するヒスタミンを HPLC で測定した。

5) 培養好塩基球に 2 mM の Fura-2 acetoxy-methyl ester を加え、 37°C 、20 分反応させ、細胞を洗滌後し、SPE-B を添加した。Ca influx は CAF-100-CA-200 system で測定した。

6) SPE-B の HMC-1 に対する結合は間接免疫ペルオキシダーゼ法により、電顕レベルで観察した。

7) HMC-1の細胞膜分画をSDS-PAGE にかけて、PVDF膜に転写後、膜上にて SPE-Bと反応させ、抗SPE-B抗体にてウエスタンブロットを行い、SPE-Bと反応する膜成分に相当するバンドをamino blackで染色されたPVDF膜から切り出し、N-末端アミノ酸配列を検討した。

8) 日本医大多摩永山病院並びに旭中央病院から患与された劇症型感染症患者の血漿を用いて、ヒスタミン濃度をHPLC で測定した。

C. 研究結果

Proteinase阻害剤であるE64の5 mMの添加により、SPE-Bによる末梢白血球からのヒスタミン遊離は50%抑制された。

Tyrode 溶液に浮遊した末梢白血球にSPE-Bを添加したときのヒスタミン遊離は $21.52 \pm 2.98(\%)$ であったが、これに 50 mMのEGTAを添加すると、ヒスタミン遊離は著しく低下 (0.74 ± 0.08)し、対照群 (0.35 ± 0.04)と殆ど変わらなかった。Tyrode溶液からCaをfreeにすると、ヒスタミン遊離は 0.40 ± 0.089 と低下した。また、SPE-Bで刺激した培養好塩基球においてCaの流入が刺激後、2分以内で最大に達した。

HMC-1にSPE-Bを添加することにより、濃度依存性にヒスタミンが遊離され、この遊離はE64で阻害された。また、60℃、30分で加熱処理したSPE-BにはHMC-1に対してヒスタミン遊離は認められなかった。

免疫電顕にてSPE-BのHMC-1への反応性を検討すると、SPE-BがHMC-1細胞膜に結合している像が明確に観察された。

HMC-1の細胞膜分画を可溶化後、SDS-PAGEにかけて、次いでPVDF膜に転写後、SPE-Bと反応する分子量約37 kDaに相当するバンドを切り出し、アミノ酸分析の結果、N-末端15残基の配列はH-GKVKVGV-NGFGRIGRLVであることが示され、ホモロジー検索からglyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseであることが明らかにされた。

7例(11検体)の劇症型感染症患者血漿中のヒスタミン濃度を測定した結果、2例、2検

体が著しく高値を示し、患者S.K.は300 pg/ml、患者Y.S.では125 pg/mlであり、また1例で30 pg/mlを示し、その他の患者では全て正常値(20 pg/ml以下)の範囲にあった。

D. 考察

これまでにSPE-Bの刺激によりヒトマスト細胞、同好塩基球並びに末梢白血球(末梢塩基球)からヒスタミンが遊離され、SPE-AやLPSにはかかる遊離能がないことなどを報告してきた。本年度はこれら細胞を用いて、ヒスタミン遊離機構について若干の検討を試みると共に、ヒトマスト細胞腫から樹立された細胞株、HMC-1を用いて、SPE-Bによるヒスタミン遊離実験を試み、併せて劇症型感染症患者血漿中のヒスタミン濃度を測定した。

SPE-Bを1mM DTTで活性化後、proteinase inhibitorであるE64を5mM加え、これを末梢白血球に作用させると、ヒスタミン遊離が50%阻害され、同様にHMC-1からのヒスタミン遊離も阻害された。この阻害は先に報告してのように、SPE-Bを65℃、30分加熱することによっても起こった。この事はSPE-Bによる、これら細胞からのヒスタミン遊離はSPE-Bのproteinase活性を介して惹起されることを示唆している。

末梢白血球とSPE-BとをTyrode溶液中で反応させ、これに5 mM EGTAを添加すると、ヒスタミン遊離は阻止され、Tyrode溶液からCaイオンを除去してもヒスタミン遊離は惹起されなかった。また、培養好塩基球と2 mM Fura-2 acetoxymethyl esterと反応後、SPE-Bを添加すると、2分以内で最大に達する細胞内へのCaの流入が認められた。従って、SPE-Bによる細胞からのヒスタミン遊離はCa依存性であると思われるが、IgEとアレルゲンないしはIgEと抗IgE抗体との反応においては、Caイオンの細胞内への流入は1分以内で最大に達することから、この反応に比して、SPE-Bでの反応はやや遅い様相を示していることから、両者間でのヒスタミン遊離機構には相違があるのいかも知れない。

HMC-1とSPE-Bとを反応後、免疫電顕にてHMC-1細胞膜表面にSPE-Bが結合するか否かを検討したところ、SPE-Bは膜表面全体にわたり明確に結合している像が観察さ

れた。このHMC-1から細胞膜画分を採取し、Triton X100で可溶化後、SDS-PAGEにかけ、PVDF膜に転写した。この膜上にてSPE-Bと反応するバンドを切り出し、そのN-末端アミノ酸配列を検討すると、HGKVKCGVNGFGRIGRLVであった。ホモロジー検索の結果、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenaseであることが明らかにされた。しかし、本物質は多くの細胞膜ないしは原形質に存在しているため、SPE-Bがこれと特異的に反応しているか否かは明らかでなく、このSPE-Bと特異的に反応する膜成分の同定に関してはさらに検討する必要がある。

劇症型感染症患者血漿中のヒスタミン濃度を測定すると、3例が健常者のそれより高値を示し、これら3例はいずれも発病4日から7日で死亡した。これまでに劇症型感染症患者血漿中のヒスタミン濃度を測定した報告はないが、以上の結果はSPE-Bによって遊離するヒスタミンが劇症型感染症におけるショック病態形成の上で関与している可能性があることを示唆している。

E. 結論

- 1) SPE-Bはヒト培養マスト細胞、同培養好塩基球、末梢血白血球（末梢好塩基球）並びにマスト細胞腫由来樹立細胞株、HMC-1と反応することにより、これら細胞からのヒスタミン遊離能をもつ。
- 2) このヒスタミン遊離はCa依存性である。
- 3) SPE-BはHMC-1細胞膜に存在するglyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenaseと反応した。
- 4) 劇症型感染症患者血漿中にヒスタミンが高値を示す症例が存在した。
- 5) 劇症型感染症のショック病態形成の上でヒスタミンが関与する可能性のあることを示唆した。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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。
- 2) 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。

- 3) 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)

2. 学会発表

- 1) 大国寿士、桜田紳策、留目優子：
Streptococcal 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
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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.
- 5) Todome, Y., Ohkuni, H., Sakurada, S., Watanabe, Y., et al: Release of histamine from human mast cell line, HMC-1 stimulated with streptococcal pyrogenic exotoxin-B(SPE-B)/streptococcal cysteine proteinase(SCP). XIVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. New Zealand, October, 1999.

(共同研究者：留目優子、櫻田紳策、渡邊ユキノ)

新規のA群レンサ球菌表層タンパクの分離と性状について

(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(GAS)の菌体表層にはMタンパクをはじめ、数種類のタンパク質性構造物が存在している。これまで報告された表層タンパクはその数も限定されており、その性状も不明なものが多い。本研究では、菌体表層タンパクを抽出し、SDS-PAGEによりいくつかのタンパク質を分離した。そのうち、分子量35kDaのタンパク(Sib35)は免疫グロブリンに結合することが明らかとなった。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ていることが特異的PCR法およびサザンブロット法により示された。さらに、ウサギ抗Sib35タンパク抗体は*in vitro*において多形白血球によるGASの食作用を促進した。以上の結果は、Sib35タンパクがGASに対する新しい免疫原の可能性をもっていることを示唆している。

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A群レンサ球菌感染症 (TSL) を惹起しうることが注目されている。一旦、TSLSの症状を呈すると、その病態進行の急速なこともあり、従来の抗生剤療法が奏功しにくいことが多い。そこで、本菌に対する有望なワクチンが必要であるものの、未だ実用化には至っていない。本研究では、GAS菌体表層から構造タンパクを抽出し、その性状を解析するとともに、新たな感染防御抗原の可能性を探索するものである。

B. 研究方法

1. ヒト免疫グロブリン (Ig) 結合タンパクの分離
GAS, NY-5株を液体培養し、集菌後、8 M尿素を用いて菌体表層物を剥離・抽出した。これをSDS-PAGEに展開し、PVDF膜に転写後、ヒトIgに対する結合をビオチン標識したIgGを用いたオートラジオグラフィによりIg結合タンパクを検出した。ついでPVDF膜をクマシー染色後、目的のバンドを切り出し、アミノ酸シーケンサーにより、N末端アミノ酸配列を決定した。
2. Ig結合タンパクの同定
オクラホマ大学のGASデータベースを用い

て決定したアミノ酸配列の相同性解析を行い、それに相当するORFを決定した。この遺伝子に相当するNY-5株の遺伝子をPCRで増幅し、発現ベクターpGEX-6P-1に組み込んで組換えタンパクを作製した。組換えタンパクをウサギに免疫し、抗血清を得た。このタンパクに対する各種Igの結合をビオチン標識したヒトIgG, IgM, IgA, ウサギIgG, ヒツジIgGを用いて解析した。

3. Ig結合タンパク遺伝子の分布

同遺伝子の特異的プライマーを作製し、M型の異なる菌株のゲノムDNAを鋳型とし、PCRを行った。また、同遺伝子をプローブとしたサザンブロット法も行った。

4. 多形核白血球による食作用

ヒト末梢血にGAS菌体を混和し、一定時間保温後、ギムザ染色し、光学顕微鏡で多形核白血球に取り込まれた菌体数を計測した。

C. 研究結果

8 M尿素抽出した菌体表層物のうち、分子量35kDaにあたるバンドがヒトIgGに結合した (図1)。

このバンドのN末端アミノ酸配列を決定すると、DSFSANQEIRYSEVTPYHVTであった。データベース解析すると、これは機能不明の339 aaのN末端部に100%一致した。

そこで、このタンパクをSib35と命名し、以下の実験に供試した。PCR法およびサザンブロット法の結果、*sib35*遺伝子はA群レンサ球菌のみに認められ、B群、C群、G群レンサ球菌および口腔レンサ球菌にはみられなかった。ウサギ抗血清を用いたGASに対する食作用を検討すると、非免疫ウサギ血清に比べ、有意に多形核白血球による食作用が促進された(図2)。

D. 考察

Sib35タンパクはC末端領域にLPXTGモチーフを有していないことより、膜貫通型の構造ではなく、細胞表層に静電的に吸着していると推定される。これは、培養上清中にも相当量の同タンパクが検出されることから支持される。シグナルペプチドは29アミノ酸残基であり、レンサ球菌でよくみられる切断部位であるアラニンとアスパラギン酸の間で消化された。pIは7.25を示し、レンサ球菌の表層タンパクとしてはやや高めであった。つまり、Sib35はレンサ球菌の表層タンパクの性状を保持していることが明らかとなった。

レンサ球菌や黄色ブドウ球菌のIg結合タンパクはIgG Fc部分に特異的に結合するが、Sib35はIgG F(ab')²およびFc両方に結合した。さらに、ヒトIgG1, IgG2, IgG3, IgG4すべてに結合することから、タイプII型のIgG結合タンパクに分類される。

GASに対する感染防御抗原は数少ない。代表的なものに、Mタンパクが挙げられるが、その血清型による分類は90種以上あり、すべての型別に対応できるワクチンは報告されていない。そこで、分離頻度の高いM型菌のMタンパクの抗原決定基である可変領域のN末端側ペプチドを組み合わせた組換えハイブリッドワクチンの開発が試みられているが成績はあまりよくない。本実験の結果から、Sib35タンパクはひろくGASに分布しており、そのアミノ酸配列も高度に保存されている。抗Sib35抗体は*in vitro*での多形核白血球によるGASの取り込みを有意に促進した。そこで、Sib35の免疫原性をさらに評価するため、マウスを用いた*in vivo*での免疫応答の検索や感染実験を進行中である。

E. 結論

新規の免疫グロブリン結合タンパクを同定した。また、Mタンパクの型別には関係なく*sib35*遺伝子が存在し、抗Sib35抗体は多形核白血球による食作用を促進したことから、本タンパクはGASワクチンの候補の1つになると考える。

F. 研究発表

1. 論文発表

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

学会発表

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

- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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.

(共同研究者: 川端重忠)

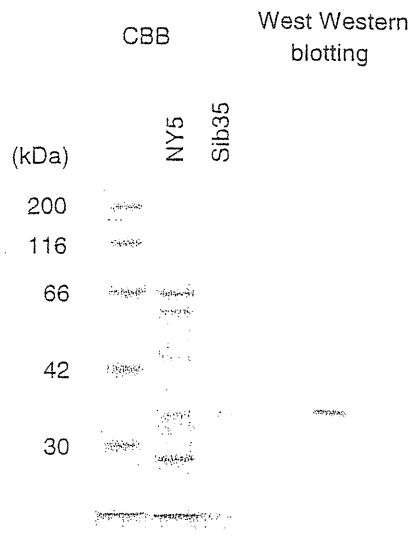


図1. Sib35タンパクと免疫グロブリンとの結合

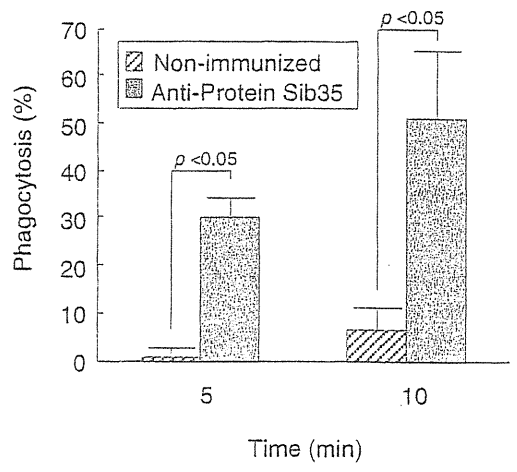


図2. 多形核白血球によるGASの食作用に対する抗Sib35抗血清の影響

A 群レンサ球菌感染症におけるプロテアーゼの役割

(分担) 研究者 赤池 孝章 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。一方、一酸化窒素(NO)が生体内でアポトーシスの制御に関わることが明らかにされている。そこで今回、強力なNOの供与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はSPE-Bプロテアーゼによるアポトーシスの誘導を強く阻害した。この知見は、ニトロソ α_1 -PIの劇症型レンサ球菌感染の治療への応用の可能性を示唆するものである。一方、我々は以前より、A群レンサ球菌由来のbradykinin (BK)分解酵素について報告してきたが、今回さらに、本菌が全く新規なプロテアーゼを産生し、これがBKなどの生理活性ペプチドを速やかに分解不活化することがわかった。従って、A群レンサ球菌感染においては、本菌の産生する複数のプロテアーゼがその病態に関与するものと思われた。

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である菌体表層プロテアーゼ(streptococcal cell surface protease, C5a peptidase)の少なくとも2種類のプロテアーゼを産生している。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*による重度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の供与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)を開発してきた。そこで本年度は昨年度に引き続き、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。あわせて今回、我々が以前より検討してきたA群レンサ球菌由来のbradykinin (BK) 分解酵素について、さらに詳細に解析を進めた。

B. 研究方法

1. 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、血中の主要の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およびSP-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当量(モ

ル比)のdithiothreitolを添加し、室温で2時間放置した後、Sephadex G-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当量(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. SPE-Bプロテアーゼによるアポトーシスの誘導とニトロソ α_1 -PIによる阻害

まず、*S. pyogenes*のNZ amine培養液上清より、陽イオン交換カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過法により、SPE-Bプロテアーゼを分離精製した。次に、ヒト単球様U937細胞のSPE-Bプロテアーゼによるアポトーシス(細胞死)に対する種々のNO化合物の抑制効果を検討した。SPE-B (200 μ g/ml)および種々の濃度のP-NONOate、GSNO、あるいはニトロソ α_1 -PIを、U937細胞培養系(RPMI1640)に添加し、24ないし48時間培養した。培養後一部の細胞をPBSに再浮遊させ、エチジウムブロミドおよびアクリジンオレンジで染色し、緑色の生細胞およびオレンジ色の死細胞をカウントし、その比率を求めた。また、U937細胞を種々の濃度のP-NONOate、GSNOあるいはニトロソ α_1 -PIと37°Cで1時間プレインキュベーションし、化合物を遠心除去した後に、細胞にSPE-B(200 μ g/ml)を含むRPMI1640を添加し、24ないし48時間培養後、同様に細胞の生死を判定した。

4. BK分解酵素の同定

S. pyogenes NY-5株(野生型)およびhomologous recombinationによりC5a peptidase遺伝子を欠損させたTMC4株は、大阪大学歯学部口腔細菌学講座・川端重忠、浜田茂幸先生より供与された。NY-5およびTMC4菌体をPBSに再浮遊させ、トリプシンにて37°Cで90分間処理した後に、遠心上清に0.6 mg/ml 大豆トリプシンインヒビター(SBTI)を加え、トリプシン抽出物を得た。さらに、ヒトリコンピナントC5aを*S. pyogenes* NY-5およびTMC4のトリプシン抽出物と37°Cで30分間反応させた後、C5aの

活性をボイデンチャンバーを用いてモルモット腹腔滲出好中球に対する走化性により評価した。また、BKをトリプシン抽出物と37°Cで30分間反応させた後、残存するBKをenzyme immunoassayにより定量した。

C. 研究結果

SPE-Bプロテアーゼは、U937細胞に対して強いアポトーシス誘導をもたらした。この際、ニトロソ α_1 -PIを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、この阻害はその他のNO供与剤であるP-NONOateやニトロソグルタチオン(GSNO)よりも著明であった(図1)。一方、NOが付加されていないnative α_1 -PIには、このような抗アポトーシス活性は確認されず、ニトロソ α_1 -PIがNOドナーとして作用することにより、アポトーシス抑制がもたらされるものと思われた。

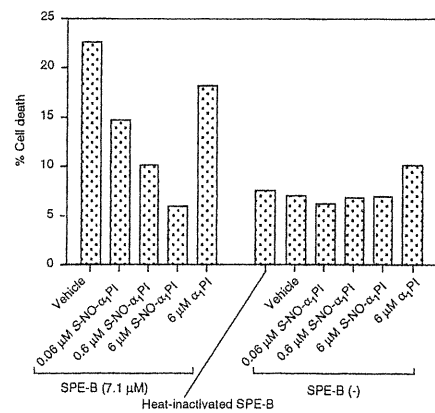


図1. ニトロソ α_1 -PI (S-NO- α_1 -PI)によるSPE-Bプロテアーゼ誘発性アポトーシスの抑制

2. A群レンサ球菌由来のBK分解酵素の同定
我々は以前、A群レンサ球菌がC5aのみならず、BKを分解するプロテアーゼ(あるいはペプチダーゼ)を産生することを報告したが、本酵素とC5a peptidaseの異同については不明のままであった。そこで今回、C5a peptidase欠損株を用いて、BK分解について検討した。その結果、野生株から得られたトリプシン抽出物は、C5aに対してもBKに対しても分解能を示した。興味あることに、C5a peptidase欠損株からの抽出物は、C5aの分解活性は消失していたが、BKに対しては、非常に強い分解能を示した(図2)。このことは、A群レンサ球菌が、C5a peptidase以外にBKなどの生理活性ペプチドを分解するプロテアーゼ(ペプチダー

ゼ)を産生することを示している。

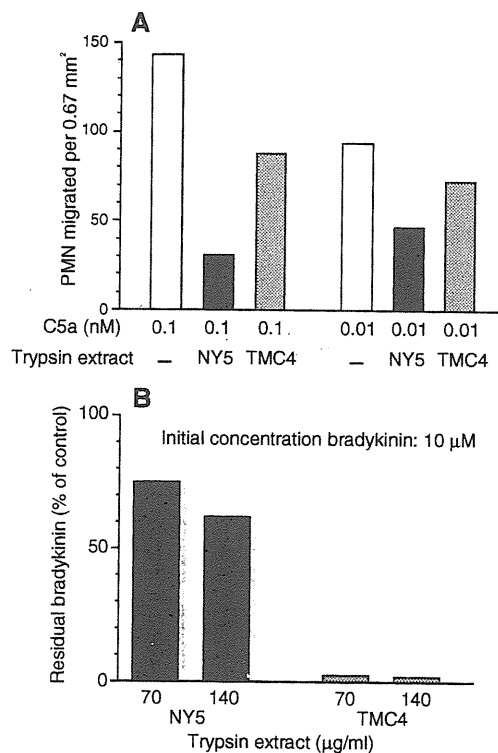


図2. *S. pyogenes* 菌体抽出物の C5a peptidase (A) および BK 分解活性 (B)

D. 考察

これまで、SPE-Bプロテアーゼがアポトーシス誘導活性を有していることが報告されている。SPE-Bプロテアーゼによるアポトーシス誘導のメカニズムは未だ不明であるが、最終的には、アポトーシス発現のカスケードの最下流にあるcaspaseの活性化がもたらされる。caspaseはその活性中心にSH基(cysteine)を有するチオールプロテアーゼであるが、最近、このSH基がNOにより修飾(ニトロソ化)されることにより、caspase活性が阻害され、その結果、NOが抗アポトーシス活性を発揮することが示されている。

実際、今回の研究により、ニトロソ α_1 -PIが、SPE-Bプロテアーゼによるアポトーシスの発現を強く抑制することが判った。

興味あることに、その阻害活性は、その他のNO供与剤よりはるかに優れたものであり、ニトロソ α_1 -PIが強力な抗アポトーシス剤であることが示唆された。昨年までの研究成果より、ニトロソ α_1 -PIは、このような抗アポトーシス作用に加えて、抗菌活性、SPE-BプロテアーゼおよびSLO阻害作用、細胞・臓器保護作用を有していることが明らかになっている。これらの知見は、ニトロソ α_1 -PIの劇症A群レンサ球菌感染症治療への応用の可能性を示唆している。

さらに今回、*S. pyogenes*がC5a peptidaseとは異なる新規なプロテアーゼ(ペプチダーゼ)を産生し、これがBKを速やかに分解不活化することが明らかとなった。本酵素の生化学的特性の詳細は不明であり、今後これを精製し、その特性を解析する予定であるが、この知見は*S. pyogenes*がこれまで知られているSPE-Bプロテアーゼ、C5a peptidaseなどの複数のプロテアーゼを産生し、これらのプロテアーゼが本菌による劇症感染の発症病態に深く関与することを示唆するものである。

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。また、*S. pyogenes*の新規プロテアーゼの存在が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) H. Maeda, J. Wu, T. Okamoto, K. Maruo and T. Akaike: Kallikrein-kinin in infection and cancer. *Immunopharmacol.* 43: 115-128 1999.
- 3) 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.
- 4) 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).

- 5) 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.
- 6) Y. Miyamoto, T. Akaike and H. Maeda: S-Nitrosylated human α 1-protease inhibitor. Biochim. Biophys. Acta, (in press) 2000.
- 7) 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.
- 8) 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.
- 9) N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, M. Ogawa and H. Maeda: Protective effect of S-nitroso- α 1-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.
- 10) 赤池孝章、前田 浩：NOの生理活性 (1) 感染, 炎症, 免疫とNO. 臨床消化器内科, 14: 671-680 1999.
- 11) 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).
- 12) 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.

2. 学会発表

- 1) 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).
- 2) 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).

- 3) 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).
- 4) 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).
- 5) 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)
- 6) 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)

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に特異と考えられる症状として、著明な肺出血が約20%の症例で確認された。これは従来A群レンサ球菌感染症および劇症型を含めて未報告の所見である。自験例2例の肺出血症例を病理学的に検索したが、肺出血の機序は不明である。早期診断の客観的方法として患者血清中のA群レンサ球菌C多糖体抗原量を迅速に測定する方法を開発した。本方法では約15分で劇症型A群レンサ球菌感染症の診断が可能である。昨年来の調査で分娩時に発症した劇症型A群レンサ球菌感染症の15例を確認した。また宿主側の危険因子として血中抗A群レンサ球菌C多糖体抗体価の低値を考慮し、本院産婦人科の妊婦について抗体価を測定した。8倍以下の症例については厳重な監視を行い、その結果低抗体価症例も無事に出産をすませることができた。

A. 研究目的

①劇症型A群レンサ球菌感染症(以下、本疾患)の病態解明を臨床および病理学的に行った。今回は著明な肺出血を合併することが判明したので、自験例について病理学的に検討した。②早期診断の客観的指標として、症例の血中抗A群レンサ球菌C多糖体抗原量を迅速に測定する方法を開発する。③本疾患発症の危険因子として血中A群レンサ球菌C多糖体抗体価に注目し、妊産婦を対照に分布形式および本疾患症例の抗体価を測定した。④本疾患発症機序解明として、本疾患症例から分離された菌株と本院診療圏における流行菌株との比較を行った。本疾患症例の感染経路を同定するため、症例の同居者、近親者等の咽頭培養を施行した。

B. 研究方法

(1)本疾患に合併する肺出血の病理学的検討：自験例で著明な肺出血を合併して死亡した2症例を対象として臨床および病理学的な検討を行った。症例は6才女児および分娩中に本疾患が発症した42才女性である。
(2)早期診断客観的基準としての血中C-多

糖体抗原量の迅速診断法の開発：検体血清をpH 7.4リン酸緩衝液添加下で加熱除蛋白を行った後に、抗C多糖体抗体感作ラテックス(デンカ生研、AストレプトAD生研キット)と反応させ、凝集により測定を行った。

(3)本疾患発症危険因子としての血中抗C多糖体抗体価の評価：本院産婦人科を1998年6月から1999年10月までに受診した妊婦839例を対象とした。初診時に採決を行い、市販の測定キット(協和薬品工業、ASPキット)を用いて血中抗C多糖体抗体価を測定し、分布形式を求めた。

(4)本院で1998年3月から1999年12月までに遭遇した本疾患3例について、分離菌のM型、T型および産生毒素の同定を行った。また症例と接触した近親者について可及的に咽頭培養を行い、A群レンサ球菌検出頻度を調査した。

(倫理面への配慮)

本疾患症例からの採血は治療に必要な検体の余剰分を今回の研究目的に使用し、不要な採血または手術は施行しなかった。本疾患症例近親者には、従来の調査により本疾患の二次的発症、または集団発症は確認されていないことを十分に

説明した上で任意に咽頭培養を依頼し、た。本院妊産婦についても、本疾患が分娩時に発症することは極めて稀であること、しかし発症すると予後は不良であることを告げた。その上で初診時にルーチンに施行している採血検体の一部を本研究に供する旨の承諾を得た。

C. 研究結果

(1)本疾患に合併する肺出血の病理学的検討：①生前の気管内視鏡検査で、出血原は気管・肺領域であり、他の臓器からの出血を誤飲したものではないことが確認された。②対象とした2例とも溶血が著明であった。菌血症が高度であり、末梢血の塗抹標本でレンサ球菌が確認された。③起因菌は発熱毒素(SPE-B)のB毒素を産生した。④剖検標本では、窒息に至る肺出血の機序を解明することはできなかった。

(2)早期診断客観的基準としての血中C多糖体抗原量の迅速測定法の開発：従来の研究により、本疾患の予後不良例は血中C多糖体抗原量が100 ng/ml以上であり、生存例では10 ng/ml以下であった。今回開発した方法では、血中C多糖体抗原量を10～100 ng/mlの範囲において迅速かつ簡便に測定することが可能である。また、臨床応用には十分な特異性を得られた。

(3)本疾患発症危険因子としての血中抗C多糖体抗体価の評価：本院妊産婦を対象とした測定では、抗C多糖体抗体価は2倍希釈から256倍希釈の範囲において、32倍希釈を中央値として、ほぼ正規分布をなすことが判明した。自験例の本疾患では、全例が8倍希釈以下の抗体価であった。

(4)本院における本疾患分離菌と本院診療圏におけるA群レンサ球菌検出株との比較：本年度では3例の本疾患に遭遇したが、分離菌は3例全例でM1、T1型株であった。本院診療圏では、本年度において咽頭炎症例の26.1%からA群レンサ球菌が検出されており、これは分離細菌中で最多である。T型としてはT1型およびT12型が約30%であり、この両型株が全分離A群レンサ球菌の過半数を占める。T4型株は約15%でこれらに次いだ。昨年度と比較して、A群レンサ球菌の検出率が増加し、*H. influenzae*を抜いた。またT1型株が増加した。T3型株は

1%未満であった。

D. 考察

本疾患において著明な肺出血を合併する症例が約20%で見られた。これは諸家の報告でも記載されていない。また、肺出血を合併した症例の予後は不良であり、治療上で重要な所見であるが、出血の機序は病理学的な検討を行っても不明である。

自験例の本疾患は突然に発症し、急速に進行して重篤なショックおよび多臓器不全に陥る。救命のためには早期の診断が不可欠である。従来は採血を行い培養を施行していたが、培養結果を待つ時間的余裕はない。また、末梢血の塗抹標本の検鏡によってもレンサ球菌を確認できるが、標本の作成および検鏡までに1時間程度の時間を要した。従来の研究で、血中A群レンサ球菌C多糖体抗原量と予後には明らかな相関が認められた。C多糖体抗原量の測定は、本来 antibody sandwich ELISA法を用いるもので、約3時間の時間と専門設備が必要であった。今回我々はA群レンサ球菌迅速検査キットを改良して、迅速(約15分)かつ市中の医療施設でも測定が可能な簡便法を開発した。本方法により、本疾患を早期かつ客観的に診断することが可能と考える。

従来の調査では分娩時に本疾患が発症した例が本邦において13例確認されている。分娩時に本疾患が発症すると、予後は極めて不良であり、胎児および母体の双方の生命が失われる。従来の研究では本疾患の予後不良例は血中抗C多糖体抗体価は8倍以下であった。これは本疾患の誘因か、または敗血症病態により抗体が消耗された結果であるかは不明である。今回我々は管理可能な妊産婦を対象として血中抗C多糖体抗体価の測定を行い、分布形式について知見を得た。その結果、血中抗C多糖体抗体価が8倍以下の妊産婦を検出し、これらの妊婦については感染兆候の有無について厳重な観察を行い、全例が無事に出産を行うことができた。

本年度は、本院診療圏においてA群レンサ球菌性咽頭炎が増加した。これらの咽頭から分離された菌株は昨年度に比較してT1型株が増加し、T12型株とほぼ同率となった。従来から本疾患には、T1、M1型菌株お

よびT3, M3型菌株の関与が報告されている。本年度に本院で3例の本疾患に遭遇したが、これは1993年度の7例に次いで多い症例数である。本疾患の発症には地域のT1型およびT3型株の流行が関与していることを改めて示唆する所見である。

E. 結論

①本疾患では著明な肺出血が約20%の症例で合併する。これらの症例は溶血および敗血症も著明であり、予後は不良である。

②今回開発した血中C多糖体抗原量の迅速測定法は、早期診断に有用である。

③抗C多糖体抗体価の低値は、本疾患発症の一部と考えられる。

④分娩時に本疾患が発症した症例は、本邦で13例が確認されている。本院では妊産婦についてC多糖体抗体価を測定し、低値症例について厳重な監視を行い、本疾患発症の予防を行った。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 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
- 2) Udagawa, H., Oshio, H and Shimizu, Y.: Serious Group A streptococcal infection around delivery. Obst. Gynecol. 94:153-157. 1999.
- 3) 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
- 4) 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
- 5) 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)
- 6) 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
- 7) 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
- 8) 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

9) Shimizu, Y.: Group A streptococcal toxic shock syndrome: Ethiology in Japan. Internal Med. (in press)

2. 学会発表

- 1) 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会. 1999年6月27日 (つくば市)

(共同研究者：大江健二、宇田川秀雄)

研究成果の刊行に関する一覧表

刊行書籍又は雑誌名（雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名）	刊行年月日	刊 行 書 店 名	執筆者氏名
日本細菌学雑誌、54 <i>Streptococcus pyogenes</i> の分子疫学	1999年		村瀬敏之 他
J. Clin. Microbiol. 37 Characterization of <i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M1 and MM3 isolates from patients in Japan from 1981 to 1999	1999年		Murase, T. et al.
Variation in sic gene encoding complement-inhibiting protein of <i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M1 isolates in Japan	2000年 (in submitted)		Murase, T. et al.
Erythromycin resistance genes in Kanagawa, Japan	2000年 (in submitted)		Murase, T. et al.
J. Infect. Dis. Genetic difference of M3-serotype <i>Streptococcus pyogenes</i> between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates	2000年 (in press)		Inagaki, Y. et al.
Microbiol. Path. 27 Comparison of pathogenic factors expressed by group A streptococci isolated from patients with streptococcal toxic shock syndrome and scarlet fever	1999年		Shiseki, M. et al.

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
臨床病理 劇症型A群レンサ球菌感染症の 発症機序について	2000年 (印刷中)		三好(秋山)徹他
「現代感染症事情」(分担) レンサ球菌性毒素性ショック 症候群	1999年	医歯薬出版	大国寿士、他
「エマージングディゼイズ」 (分担) 劇症型A群レンサ球菌感染症	1999年	近代出版	大国寿士
「感染症予防必携」(分担) 溶血性レンサ球菌感染症	1999年	日本公衆衛生協会	大国寿士
Effect of "isolating hemodialysis" on prevention of methicillin-resistant <i>Staphylococcus aureus</i> cross-infection in a hemodialysis unit	2000年 (in press)		Osono, E. et al
Microbiol. Path. 27 Capsular hyaluronic acid of group A streptococci hampers their invasion into human pharyngeal epithelial cells	1999年		Kawabata, S. et al
Infect. Immun. 67 Targeted salivary gland immuni- zation with plasmid DNA elicits specific salivary IgA and IgG and serum IgG antibodies in mice	1999年		Kawabata, S. et al
J. Biol. Chem. 274 Nitrosothiol formation catalyzed by ceruloplasmin: Implication for cytoprotective mechanism in vitro	1999年		Inoue, K. et al.
Immunopharmacol. 43 Kallikrein-kinin in infection and cancer	1999年		Maeda, H. et al.
"Nitro Oxide and Infection" Nitric oxide in influenza	1999年	Academic/Plenum Publishing Co.	Akaike, T. et al.
"Guanidino Compounds" Nitric oxide in infections	1999年	Blackwell Science Asia, Tokyo	Akaike, T. et al.
臨床消化器内科、14 NOの生理(I): 感染、 炎症、免疫とNO	1999年		赤池孝章 他

刊行書籍又は雑誌名 (雑誌のときは雑誌名、巻号数、論文名)	刊行年月日	刊行書店名	執筆者氏名
生化学、71 マトリックスメタロプロテアーゼ (MM) の活性機構	1999年		岡本竜哉 他
「NOの多彩な機能に迫る」 (分担) 炎症とNO: その功罪	2000年	羊土社	赤池孝章 他
Obst. Gynecol. 94 al. Serious group A streptococcal infection around delivery.	1999年		Udagawa, H., et
Clin. Infect. Dis. 28 Several pulmonary hemorrhage in patients with serious group A streptococcal infection: Report of two cases.	1999年		Ooe, K., et al.
Internal Med. Group A streptococcal toxic shock syndrome: Etiology in Japan	2000年 (in press)		Shimizu, Y. et al
小児科臨床、52 レンサ球菌 (2): 劇症型A群レンサ球菌	1999年		大江健二
日本医事新報、3934 劇症型レンサ球菌の疫学と病因	1999年		大江健二
内科 劇症型A群レンサ球菌感染症の診断基準、重症度	2000年 (印刷中)		大江健二
日本産婦人科学誌、51 劇症型A群レンサ球菌感染症「分娩型」の臨床像	1999年		宇田川秀雄
日本臨床、23 領域別症候群シリーズ: 劇症型A群レンサ球菌感染症	1999年		清水可方 他
救急医学、23 急性疾患とエマージェンシー: 劇症型A群レンサ球菌	1999年		清水可方

