

起こしていないことなどから、*speB* の上流に存在したプロモーター領域が、rSPE B/SCP の転写・翻訳のプロモーターとして作用し、nSPE B とほぼ同様な発現形式を経て rSPE B/SCP を菌体外へ分泌させたものと考えられた。

既に私共は、nSPE B/SCP によりヒトマスト細胞、同好塩基球ならびに末梢白血球からヒスタミンが遊離されることを明らかにしてきた。この *in vitro* の作用が *in vivo* でも惹起されるか否かを検討するために、モルモットをモデルとして血管透過性亢進作用について検討した。rSPE B/SCP を投与後一定時間後に Evans Blue を静注し、その色素環を観察したが、その結果、rSPE B/SCP により血管透過性は亢進した。さらに、病理所見的にも赤血球の血管外への漏出、各種炎症性細胞の浸潤が認められると共に浮腫が認められ、また、表皮の剥離が認められた。これらの所見は、DTT の添加によりさらに増強することが明らかとなった。すなわち、cysteine protease としての活性を増強することによりその作用も相関して増強することから、このような生物活性の本体は、rSPE B/SCP が cysteine protease として作用した結果であると推測される。この *in vivo* での現象がヒスタミン遊離を介して起こるか否かは現在のところ必ずしも明らかではなく、さらに検討する必要があるものと考えられる。

E. 結論

- 1) *speB* のプロモーターと予測される領域を含めた PCR 断片をプラスミドベクターに組み換え、発現ベクターを構築し、これを用いて発現誘導を試みた結果、rSPE B/SCP は菌体外に分泌された。
- 2) 得られた rSPE B/SCP には nSPE B/SCP と比較して同等か、あるいはそれ以上の cysteine protease 活性を有していた。
- 3) rSPE B/SCP の最終精製量は 6~9 mg/l であった。

- 4) この cysteine protease は、E64 および Box-LVG-CHN₂ で良好に阻害された。
- 5) rSPE B/SCP をモルモット皮下に投与したところ、血管透過性亢進作用が認められ、この作用は DTT 添加により増強された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Osono, E., Takahashi, M., Kurihara, S., Ohwada, K., Sakurai, Y., Onoda, N., Takeuchi, M., Yoneshima, H., Hayama, N., Iino, Y., Saji, M., Shikita, R., Takahashi, H. and Ohkuni, H.: Effects of "isolationg hemodialysis" on prevention of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* cross-infection in a hemodialysis unit. Clin. Nephrol. 2000; 53: 128-133
- 2) Saji, M., Fujii, K., Ohkuni, H., Irie, N., Osono, E. and Kato, F.: Synergism of the bacterial effects of acrinol and tetracyclin against *Pseudomonas aeruginosa*. J. Infect. Chemother. 2000, 6: 86-92
- 3) Nakamura, M., Watanabe, Y., Ohsono, E., Ohwada, K., Kurihara, S., Toume, K., Yoneshima, H and Ohkuni, H.: Clonotypes of *Staphylococcus aureus* isolated from continuous ambulatory perotpneal dailysis patients: What is vector between nares and infection site? Adv. Perit. Dial. 2000; 16: 248-251
- 4) Morishita, M., Nagashima, M., Yamahatsu, S., Kurai, T., Koyama, T., Yoshino, S. and Ohkuni, H.: Streptococcal toxic shock syndrome in a patient with rheumatoid arthraitis. Clin. Exp. Phematol. 2001; (in press)
- 5) 大国寿士：A 群レンサ球菌感染と川崎病「話題の感染症シリーズ」モダンメディア 2000; 46: 168-177
- 6) 大国寿士：ヒト喰いバクテリア — 劇症型 A 群レンサ球菌感染症 — 「最近話題の感染症：その基礎と

- 臨床」 日本医大誌 2000; 67: 371-374
- 7) 大国寿士：劇症 A 群レンサ球菌感染症（レンサ球菌性トキシックショック症候群）に関する最近の基礎的・臨床的研究「現代医学の焦点」 日本臨床 2001; 59（印刷中）
 - 8) Ohkuni, H., Sakurada, S., Todome, Y., Watanabe, Y., and Saito, H.: Analysis of the role of streptococcal cell wall components on inflammatory responses: NF- κ B activation and production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human peripheral monocytes-derived macrophages. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.), 2000; pp.565-567, Securacopy Book, New Zealand
 - 9) Watanabe, Y., Todome, Y., Sakurada, S., Ohkuni, H. Jones, K.F., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B.: Cloning and expression of *Streptococcus mitis*-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) gene in *Streptococcus gordonii* after chromosomal integration. *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.), 2000; pp.341-343, Securacopy Book, New Zealand
 - 10) Sakurada, S., Ohkuni, H. Y., Todome, Watanabe, Y., Saito, Y., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B.: Release of histamine from human cultured mast cells and basophills by streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B) /streptococcal cysteine proteinase (SCP). *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.), 2000; pp.569-571, Securacopy Book, New Zealand
 - 11) Y., Todome, Ohkuni, H., Sakurada, S., Watanabe, Y., Butterfield, J.H., Fischetti, V.A., and Zabriskie, J.B.: Release of histamine from human mast cell line, HMC-1 stimulated with streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal cysteine proteinase (SCP). *In* "Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium" (eds. Martin R.D, Tagg, J.), 2000; pp.721-723, Securacopy Book, New Zealand
 - 12) 大国寿士：（分担）レンサ球菌関節炎ラット「関節炎モデル」（監 京極方久、編 安部千之、澤井高志）2000; pp. 115-121、日本医学館
 - 13) 大国寿士：（分担）「免疫学辞典」（大沢利昭、小山次郎、奥田研爾、矢田純一 編）2000; 化学同人社（印刷中）
 - 14)（報告書）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（班長：大国寿士）平成 9～11 年度総合研究報告書
2. 学会発表
- 1) 大国寿士：ヒト喰いバクテリア。「近年話題の細菌感染症 —その基礎と臨床」第 10 回日本医大医学界シンポジウム, 2000. 6. 東京
 - 2) 大国寿士：劇症型レンサ球菌感染症の病態解明と治療法の確立。「食品, 創傷を介した新興・再興感染症の現況と対策」, 厚生科学研究研究成果発表公開シンポジウム, 2000. 12. 東京
 - 3) 櫻田紳策、大国寿士、渡邊ユキノ、留目優子：Streptococcal cysteine protease (SCP)のヒトマスト細胞ならびに好塩基球からの脱顆粒, ヒスタミン遊離, 第 74 回日本感染症学会総会, 2000.4.博多
 - 4) 留目優子、櫻田紳策、渡邊ユキノ、大国寿士：Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B)のヒトマスト細

胞株(HMC-1)並びにスナネズミ
(*Mongolian gerbils*, MON/-jms/gbs)
腹腔マスト細胞に対する作用. 第74
回日本感染症学会総会. 2000. 4.
博多

- 5) 留目優子、渡邊ユキノ、櫻田紳策、
大国寿士：Group A *Streptococcus*
(GAS) 産生 cysteine protease のヒト
好塩基球並びにマスト細胞に対す
る影響. 第73回日本細菌学会総会.
2000. 5. 札幌

- 6) 渡邊ユキノ、留目優子、大国寿士：
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病態解明およ
び治療法の確立に関する研究”研
究班 平成12年度研究報告. 2001.
2. 大阪

(共同研究者：留目優子、渡邊ユキノ)

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

M1, M3, M4 および M12 型 A 群レンサ球菌の性状
—劇症型感染症との関連性について—

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

研究要旨 劇症 A 群レンサ球菌(GAS)感染症(STSS)例で高頻度に分離される M1 および M3 型菌と、非 STSS 例で高頻度に分離される M4 および M12 型菌について、それぞれ STSS 例および非 STSS 例由来菌で種々の病原因子について検討した。検討した因子のうち、スーパー抗原量、NAD glycohydrolase 活性、SPE-A および SPE-C 遺伝子の有無などは M 型により大きく異なる事が示された。またマウス致死性の強さは実際の STSS での分離頻度とよく相関した。M3 および M4 においては STSS 由来菌は非 STSS 由来菌に比べ、高 SLO 産生、高マウス致死性、低 SPE-B 産生の性質を持っていた。以上より GAS の病原因子には M 型と密接に関連するものがあること、また種々の病原因子の STSS への関与の度合いは M 型による大きく異なる可能性が示された。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌(GAS)感染症(streptococcal toxic shock syndrome, STSS)の発症機構について原因菌の性質を検討することにより解明を試みた。STSS 起炎菌の疫学調査から、M1 および M3 型 GAS が STSS 全体の 40%以上を占めることが知られている。しかし咽頭炎などの STSS ではない他の GAS 感染症での M 型分布では、M12 や M4 型が大部分を占めている。このことから 1) GAS の種々の病原因子について M 型とリンクした差異の有無、2) 同じ M 型で STSS 由来菌と非 STSS 由来菌間の病原因子の差異の有無、について検討した。

B. 研究方法

1. 菌の収集・構成：STSS 症例からの分離頻度の少ない M4 型菌と M12 型菌、高頻度に分離される M1 型菌と M3 型菌について、STSS 分離菌株と非 STSS 分離菌株を収集した。各 M 型について STSS 分離菌および非 STSS 分離菌をそれぞれ 4 株ずつ計 8 株の構成とし、必要に応じて例数を増やした。

2. LD50 値：種々の量の菌をマウス

に腹腔投与後 7 日間生死観察を行い、各菌量での死亡率より LD50 値を算出した。

3. 溶血毒素産生量：菌の培養上清によるヒツジ赤血球の溶血誘導率から算出した。

4. SPE-A、SPE-C および新規挿入 DNA 配列(AB006751)：近年の M3 型分離株に存在が報告されている DNA 配列(AB006751)および、SPE-A と SPE-C 遺伝子の有無は PCR 法で検討した。

5. SPE-A、B および C 産生量：抗 SPE-A、B または C 抗体を用いた定量的ウエスタンブロッティングにより測定した。

6. 総スーパー抗原性外毒素量：GAS 培養上清によりヒト末梢血リンパ球を刺激することで産生されるインターロイキン 2 (IL-2)量を指標として測定した。

7. NAD glycohydrolase 活性測定：GAS 培養上清による β -NAD の分解を測定した。一定時間反応後に残存する β -NAD の酵素的還元による非直接的分光学的方法で測定した。

(倫理面についての配慮)

動物実験については東京女子医科大学実験動物倫理委員会の審査・承認を受け、その指針に基づいて実施した。個人情報

保護については、菌株とその由来間で連結不可能な匿名化を行った上で、菌株の使用および結果の公表を行った。

C. 研究結果

1. LD50 値：LD50 値は、M4 型分離菌株では STSS 由来と咽頭炎由来を問わず全体として高値（低致死性）であったが、後者は前者より低値であった。M12 と M1 型菌では由来の別なく M4 型菌より低値であった。M3 型菌では、高値を示す菌株から著しく低値を示す菌株まで様々であった。著しい低値を示す菌株は STSS 由来の方が多かった。

2. 溶血毒素産生：SLO 産生については M4 では STSS 由来菌は皆高産生型であったが、非 STSS 由来菌では 1 株のみが高産生型だった。M1 では非常に産生の少ない 1 株を除いて皆低度の産生を示し、STSS 由来株でより高かった。M3 では 2 株を除いて皆中程度の産生を示し、STSS 由来株でより高かった。M12 は 1 株を除いて SLO 産生は非常に低く、また STSS との相関は見いだせなかった。

SLS 産生については M4 では 8 株中すべての STSS 由来株を含む 5 株が低度の産生を示した。M12 では 8 株中 1 株のみで産生を認めた。M1 では STSS 由来の 3 株で産生を認めた。M3 では 1 株を除いてすべての菌株で高い産生が認められた。

3. SPE-A および SPE-C 遺伝子：M4 および M12 のすべての菌は SPE-C 遺伝子のみを保有していた。M1 では STSS 由来菌中 3 株が SPE-A のみを保有しており、他の 5 株は SPE-A および SPE-C 両方を保有していた。M3 は SPE-A のみを保有していた。

4. SPE-A および SPE-C 産生量：M4 型菌では、STSS 由来菌で SPE-C 産生量が少なかった。M12 型菌では 1 株以外で SPE-C 産生が認められたが、STSS との相関は認められなかった。M1 型菌では、SPE-A 遺伝子保有菌はすべて SPE-A を産生していた。一方、SPE-A については STSS 由来菌では非 STSS 由来菌に

くらべ、SPE-A 産生が高かった。M3 菌は皆 SPE-A を産生していたが、STSS との相関は認められなかった。

5. 総スーパー抗原性外毒素産生：M4 および M12 では、M1 および M3 に比べ有意に高いスーパー抗原性外毒素産生が認められた。他の M 型に比べ高産生型であった。M1 型では STSS 由来の 3 株は相対的に低産生を示したが、これらの株はすべて SPE-C 遺伝子非保有株であった。

6. SPE-B 産生量：産生量は菌株により大きく異なっていた。M4 型においては STSS 由来株では SPE-B 産生が認められなかった。M12 では STSS 由来株中 2 株で僅かに産生を認めた。M1 では非 STSS 由来株 4 株中 3 株で相対的に高い SPE-B 産生が認められた。M3 では 8 株中 5 株で産生を認め、非 STSS 由来の 2 株が高産生を示した。

7. AB006751 遺伝子：M4 および M3 型とも 8 株中 7 株で本遺伝子が検出され、STSS との相関は認められなかった。M12 および M1 型菌ではこの遺伝子は検出されなかった。

8. NAD glycohydrolase 活性：M4 では 1 菌株を除いて高活性型、M12 では 1 株を除いて低活性型、M1 は中活性型、M3 は高活性型だった。

D. 考察

今回検討した種々の因子は、1) M 型と強く相関するもの、2) M 型と弱い相関を示すもの、3) STSS と相関するもの、4) 菌により大きく異なるもの、の三種に大別できた。

1. M 型と強い相関を示すもの：総スーパー抗原性外毒素量、NAD glycohydrolase 活性、SPE-A 遺伝子、SPE-C 遺伝子および AB006175 配列の存在は M 型と強く相関していた。しかしながら多くの場合例外となる菌が存在することも明らかとなった。

2. M 型と弱い相関を示すもの：LD50 値は M4, M12 および M1 では M 型からある程度推定が可能だったが、M3 は多

様であった。SLO、SLS 産生は M4 および M3 では高い傾向があり M12 では低い傾向があった。

3. STSS と関連するもの：M4 および M3 では LD50 値は STSS 由来株で高かった。また SLO 産生は M4, M1 および M3 の STSS 由来菌で、SLS 産生は M4 および M3 の STSS 由来菌で高かった。SPE-B は M4, M1 および M3 では STSS 由来菌で低かった。

次にそれぞれの因子については

1. LD50：LD50 値を群ごとの平均値で比較してみると、M4(非 STSS 由来)>M3(非 STSS 由来)>M4(STSS 由来)>M12>M3(STSS 由来)>M1 の順であった。これは日本における STSS 症例からの M 型分離頻度と一致している。従って、今回の LD50 比較が少なくとも部分的には実際の STSS 症例を反映する可能性が高い。

2. 溶血毒素：M4、M3 および M1(SLO のみ)では STSS 産生株は高産生を示したが、M12 にはそのような傾向は認められなかった。従って、STSS における溶血毒素の重要性は M 型によって大きく異なる可能性がある。

3. スーパー抗原性外毒素：STSS への SPE-A の関与が示唆されている。今回用いた M1 および M3 は皆、SPE-A 遺伝子を保有していたこと、およびこれらの M 型菌が STSS から高頻度に分離されることを考えると、SPE-A の有無は STSS よりむしろ M 型と強く関連すると考えられる。一方、M1 および M3 は低スーパー抗原性外毒素産生型であった。このことは STSS におけるスーパー抗原性外毒素の関与を否定するものではないが、黄色ブドウ球菌による TSS とは異なり、レンサ球菌のスーパー抗原性外毒素が一義的に STSS の病態に関与するとは考えにくい。

4. SPE-B：M4、M1 および M3 では STSS 由来菌は皆低産生型であった。STSS 由来 M1 型菌では非 STSS 由来菌より SPE-B 産生が少ない傾向があることが報告されており、今回の結果は M4

および M3 でも同様の傾向があることを示している。

5. NAD glycohydrolase および AB006751:前者は M1、後者は M3 型菌で、近年の分離株にのみ見出しされることが報告され、STSS への関与の可能性が考えられたが、我々の用いた菌株では同じ M 型内で大きな違いは認められなかった。従ってこれらの因子を保有する各 M 型 GAS はすでに広範囲に拡散しているものと思われる。

E. 結論

今回、種々の GAS 因子を総合的に検討したが、それらの因子の多くは M 型との相関が認められ、産生状況等は M 型により大きく異なっていた。STSS の病態は GAS 因子の複合によるものと考えられるが、今回の結果は、M 型の違いによりそれぞれの因子の関与の度合いが異なる可能性を強く示唆する。また STSS の発症には菌側因子の他に宿主側因子の関与が重要と考えられているが、M4 および M3 では STSS 菌と非由来菌で LD50 値が異なっていたのに対し、M12 および M1 菌ではその様な傾向が認められなかったことから、後者においてはより宿主側因子の関与が重要な可能性が考えられる。

F. 研究発表

1. W. Fujimaki et al. Functional uncoupling of TCR engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4+ T cells. J. Biol. Chem. 印刷中

2. H. Kobayashi, et al. Gamma-delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. Can. Immunol. Immunother. 印刷中

3. N. Takahashi, et al. Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen. J. Clin. Invest. 106: 1409-1415, 2000.

4. L. Chen, et al. Susceptibility to in vitro anergy induction of four murine T-cell

fractions reactive with staphylococcal enterotoxin A superantigen. J. Tokyo Wom. Med. Univ. 70: 693-701, 2000.

5. 内山竹彦 スーパー抗原と感染症 岩波講座・現代医学の基礎 11 感染と生体防御 (竹田美文・渡邊武編) 47-63, 2000.

6. 内山竹彦 スーパー抗原性外毒素による感染症の発症機序の解析 モダンメディア 46: 344-353, 2000.

7. 内山竹彦、張華 スーパー抗原と感染症 - T 細胞の背信行為 化学療法の領域 16: 1365-1373, 2000.

8. 内山竹彦 スーパー抗原と感染症の発症機序 医学のあゆみ 193: 875-879, 2000.

9. 内山竹彦 トキシックショック症候群(TSS)とスーパー抗原 医学のあゆみ 193: 880-882, 2000.

10. 藤巻わかえ、内山竹彦川崎病とスーパー抗原 医学のあゆみ 193: 895-898, 2000.

11. 内山竹彦 スーパー抗原と感染症 新しい眼科 17: 167-173, 2000.

12. 内山竹彦 スーパー抗原と消化器疾患 現代医療 32: 1230-1235, 2000.

13. 三好(秋山徹) 徹、内山竹彦 細菌性スーパー抗原の構造と免疫システムに対する作用機序 「生物間の攻撃と防御の蛋白質」 蛋白質核酸酵素増刊 46: 567-574, 2001.

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

劇症型起炎株の分子疫学と病原因子の分子遺伝学的解析

（分担）研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌部長
共同研究者 池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌部研究員

研究要旨 我が国における A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の疫学的調査から、M3 型が 1993～1994 年をピークに急激に増加するに従い、劇症型レンサ球菌感染症 (TSLS) を示す症例も増加したが、その後同型の咽頭炎由来株数が減少するに伴い M3 型による劇症型レンサ球菌感染症がみられなくなっている。1990 年代に増加した M3 型菌と 1980 年以前に分離された菌との間には明らかな遺伝的差が認められた。この DNA 領域の塩基配列を決定した結果、少なくとも 10 個の ORF の存在が認められた。1 つの ORF を除く 9 つの ORF は、1990 年代に分離された M3 型に共通して存在することが判明した。さらに、この領域は、二本鎖 DNA フェージによりもたらされた可能性を示唆する結果が得られた。以上の結果から、1990 年代の M3 型菌は、2 本鎖 DNA フェージにより新たな遺伝的因子を獲得したことを示唆している。

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、あるいはその両方があるものがあるが、現時点では全く解明されていないのが現状である。

我々は、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、それとともに M3 由来の TSLS 患者の増加が見られるようになったとの結果を明らかにしてきた。近年における新規クローンの発生が劇症型発生に関係していることを想定し、我々は菌側における新規病原因子の存在を調べた結果、1990 年代の株と 1980 年以前の株間に遺伝的差異があるとの結果を得た。そこで、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者由来菌 M3 株 (NIH1) のこの領域の塩基配列を決定し、劇症型 A 群レンサ球菌感染症に関与する特異的な新規病原因子の存在の可能性を調べた。

B. 研究方法

(1) DNA シークエンシング

以前決定した DNA 塩基配列を基に、プライマーを設計した。このプライマーを用いて PCR 法により約 8.0 kb の DNA 領域を増幅し、塩基配列を決定した。PCR の反応条件は、(98℃ 1 分)×1 サイクル、(98℃ 20 秒、55℃ 30 秒、72℃ 10 分)×30 サイクル、(72℃ 10 分)×1 サイクルである。DNA シークエンシングは、chain-termination 法により決定した。相同性検索は BLASTP 検索を用いて行った。

(2) フェージ核酸の調製

5 ml の P 培地(6% proteose peptone, 0.05 M NaCl, 2.5 mM Na₂HPO₄, 1.8 mM CaCl₂, 0.05 M (w/v) glucose, 5% (v/v) horse serum)中で 37℃、1.5 時間培養後、mytomycin C を終濃度 0.2 μg/ml になるように添加した。37℃、3 時間培養後、溶菌して生じた DNA および RNA を分解するため、DNase と RNase を共に終濃度 0.1 μg/ml になるように添加した。遠心後、上清を membrane filter (0.45 μm pore size)でろ過し、PEG8000 (1:4 (v/v) of 20% PEG 8000 and 2.5 M NaCl)でフェージ粒子を沈殿させた。遠心後、得られ

た沈殿物を 100 μ l の 10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解し、フェノール抽出、エタノール沈殿し、10 mM Tris-HCl (pH 8.0) に溶解した。

C. 研究結果

(1) 1990 年代の M3 株に特異的に見られる DNA 断片の塩基配列の決定

NIH1 (M3) 株をテンプレートとして用い、PCR 法により増幅した約 8.0kb の DNA 領域の塩基配列を決定した。その塩基配列の ORF 検索の結果、この領域には、10 個の ORF が同一方向に並んで存在していた。そしてその塩基配列から推定されるアミノ酸のホモロジーを検索したところ、5 つの ORF において、*Streptococcus thermophilus* に溶原化しているバクテリオファージの遺伝子がコードする蛋白質と 27~69% 相同性が認められた。

(2) PCR 法による 1980 年以前と 1990 年代の M3 株における各 ORF の有無の検討

それぞれの ORF が 1990 年代の M3 株に特異的か否かについて各 ORF に特異的なプライマーを用いて PCR により増幅されるかどうかを調べた。その結果、例外はあるものの、1990 年代の咽頭炎由来株、劇症型患者由来株で各 ORF は増幅されたが、調べた限りの全ての 1980 年以前の株においては PCR 産物を確認することはできなかった。

(3) バクテリオファージの誘導

5 つの ORF はバクテリオファージ遺伝子と相同性があったことから、この 1990 年代に分離された菌株に特異的なこの領域はファージによりもたらされたものであるかについて検討した。抽出したファージ核酸をテンプレートとして PCR を行ったところ、塩基配列を決定した領域がすべて増幅されたことから、この領域は二本鎖 DNA ファージによりもたらされたものと考えられる。

D. 考察

1990 年代に分離された M3 株に特異

的な約 8.0 kb の DNA 領域には、少なくとも 10 個の ORF が確認された。そのうち 9 個の ORF は、今回検討した 1990 年代に分離された M3 株すべてにおいて確認された。これらの ORF は、1980 年以前の M3 株では確認されなかった。このことは、1990 年代の株は、少なくとも 9 個の遺伝子を新たに獲得したことを示唆している。1980 年以前には劇症型 A 群レンサ球菌感染症を示す例は報告されていない。このことを考えると、このような新たな遺伝子の獲得により劇症型 A 群レンサ球菌感染症が引き起こされる可能性も考えられる。また、今回塩基配列を決定した領域は、2 本鎖 DNA ファージによりもたらされた可能性が示唆された。ファージにより新たな病原性因子を獲得した例として、*Vibrio cholerae* があげられる。*V. cholerae* は、CTX ファージが溶原化することで病原性因子を獲得した。このことを考えると、劇症型 A 群レンサ球菌感染症を引き起こす菌株も 1980 年以降から 1990 年代にかけてファージが溶原化して病原性を獲得した可能性も考えられる。今後、ファージによりもたらされたと考えられる全領域の塩基配列を決定し、劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症にかかわる因子を持つかどうかを確認する必要がある。

1990 年代の菌株間では、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者由来であろうとも、咽頭炎患者由来であろうともゲノム全体での DNA レベルで明らかな差を確認することができなかった。1990 年代に M3 型の菌株による感染が急激に増加したが、これは単一のクローンに由来していることを強く示唆している。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 A 群レンサ球菌感染症を引き起こすかそれとも軽症の感染症でとどまるかは、宿主側の因子が強く絡んでいることが考えられる。このことは、劇症型 A 群レンサ球菌感染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区別のつかない菌株が家族の咽頭からも分離されたが、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
も推測される。

E. 結論

1990年代に流行している M3 株は、
1980年以前の流行株と比べて、少なく
とも新たに9個の遺伝子を獲得している
ことが判明した。この遺伝子の中に、劇
症型 A 群レンサ球菌感染症の発症に関
与する因子がある可能性が考えられるが、
その詳細は今後の課題である。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Inagaki, Y., Myouga, F., Kawabata, H.,
Yamai, S. and Watanabe, H. Genetic
differences in *Streptococcus pyogenes*
serotype M3 between recent isolates
associated with toxic shock-like syndrome
and past clinical isolates. *J. Infect. Dis.* 181:
975-983, 2000.

2) 池辺忠義、渡辺治雄。人食いバクテ
リア：劇症型 A 群レンサ球菌感染症。
HACCP. 6: 54-60, 2000。

2. 学会発表

1) 稲垣善茂、川端寛樹、山井志郎、渡
辺治雄。劇症型 A 群レンサ球菌感染症
の M3 型臨床分離株と標準株の間で見
い出された DNA 断片長多形の解析。第
73 回日本細菌学会総会、2000 年 5 月、
札幌。(日本細菌学会雑誌、第 55 巻第 2
号、p186、2000 年)。

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

A群レンサ球菌の迅速高度検出法の開発及び症候分類別プロテオーム解析、
特に SpeF 毒素について

分担研究者 太田美智男 名古屋大学大学院医学研究科
分子病原細菌学講座 教授

研究要旨 劇症型A群レンサ球菌感染症の発症機序の解明に向けて、分泌蛋白質に注目し、種々の症候を示した臨床分離株に二次元電気泳動法を適用し解析を行った。SpeF など既知の分泌蛋白質以外に、今まで未報告の病原性に関与すると考えられる蛋白質の同定に成功した。さらに臨床分離株の研究利用のためのシステム作りを行った。

A. 研究目的

近年、A群レンサ球菌感染症においては劇症型の感染の出現が認められるようになってきているが、その発症機序についてはまだ不明な点が多い。現在まで報告されている病原性との関連が示唆されている蛋白質については単独で病像を説明できるものはない。複数の病原因子の生物学的機能と環境に対する応答による発現量の変化が関与していると考えられる。また未知の病原因子も多く存在していることが示唆されるため、これらをできるだけ明らかにし、生体の応答を研究することが劇症型感染症の発症メカニズムを解明し、適切な治療法を確立する上で不可欠なことである。本研究においては菌体外分泌蛋白質に注目し、劇症型感染症を引き起こす頻度の高い血清型M1、M3を中心に臨床分離株に二次元電気泳動法を適用して、分泌蛋白質の定性を試みるとともに、未知の病原因子を探索し、その生物学的機能を解析した。さらに現状では臨床分離株の入手、利用が困難な状況であるため新たな菌のバンクの設立の開始を試みた。

B. 研究方法

1. 劇症型A群レンサ球菌臨床分離株を培養し、一定時間後の培養上清から菌体外分泌蛋白質を抽出し、その発現状況を二次元電気泳動法により解析した。二

次元電気泳動法にて検出されたスポットは、N末端のアミノ酸分析を行い、データバンクからその蛋白質を同定した。また同定された蛋白質について、今まで報告されていない場合はそのアミノ酸配列からDNA配列を推定し、PCRにてクローニングした。クローニングした遺伝子は蛋白質発現ベクターに組み込みリコンビナント蛋白質を合成し、その生物学的機能解析を行った。

2. 平成12年度、発生した劇症型A群レンサ球菌臨床分離菌を今後の解析の目的で収集を開始した。

C. 研究結果

1. 二次元電気泳動法を用いて劇症型感染症を引き起こした臨床分離株から培養上清中に分泌される菌体外蛋白質の解析を行い、SpeB、SpeF、ストレプトリジンOをはじめ既知の分泌蛋白質のほか、多くの未報告の蛋白質が検出された。SpeFに関してはN末端のアミノ酸の配列の異なる二種類のスポットが同定された。検出された蛋白質の発現パターンはA群レンサ球菌のMタイプに多くは依存しているが、同じMタイプ、引き起こした病像の違う株間でも差が見られた。未報告の蛋白質のうち、アミノ酸配列から遺伝子バンクのデータとの比較により、いくつかの酵素活性を持つ新たな病原性に関連すると考えられる蛋白質の同定に成功

した。現在すでにその中の4種の遺伝子に関してDNAクローニングが終了し塩基配列の決定、リコンビナント蛋白質の作製を行い、未報告のDNA分解酵素であることを確認した。

2. 一例としてemm89タイプの臨床分離菌を収集した。臨床経過が非常に特異な症例であり、細菌学的には二次元電気泳動の蛋白質の定性ではその他のM1,M3タイプとは異なるものであった。

D. 考察

二次元電気泳動法は現時点で考えられる一回の分離操作で数千の蛋白質の分離が同時に可能な技術である。我々の結果からも二次元電気泳動法は菌体外分泌蛋白質の病原性における役割を研究する上で非常に有用であると考えられた。今日A群レンサ球菌もゲノム情報の利用が可能であり、この技術を併用することにより新たな毒素、病原性に関連すると考えられる蛋白質の同定が可能であり、事実我々はいくつかの新たな蛋白質の同定に成功した。今後はこれら未知の蛋白質の劇症型感染症への関与、二種類のSpeFの生物学的意義を研究するとともに、最近明らかとなった宿主細胞への関与を研究する予定である。

E. 結論

二次元電気泳動法を用いてA群レンサ球菌の菌体外蛋白質の解析を行った。この方法は臨床分離株の病原性を推測する極めて有効な手段である可能性が示唆され、新たな蛋白質の同定は今後の劇症型感染症発症機序解明への大きな前進である。今後はこの研究班を中心に臨床分離株を収集し、全国の研究者が容易に研究をすすめる体制を整える予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yokota, M, Hasegawa, T., Ohta, M., and Satake, T. Fatal rapidly progressing Streptococcal toxic shock-like syndrome; case report. *Jpn. J. Infect. Dis.* 53: 81-82,

2000.

2. 学会発表

①長谷川忠男、松本昌門、河野廉、山篠貴史、堀井俊伸、渡辺治雄、太田美智男 ワークショップ4：劇症A群レンサ球菌感染症の発症要因、二次元電気泳動法を用いたA群レンサ球菌菌体外蛋白質のpost genome解析。第73回日本細菌学会総会 札幌 平成12年5月

②長谷川忠男、松本昌門、河野廉、山篠貴史、太田美智男 二次元電気泳動法を用いたA群レンサ球菌菌体外蛋白質のpost genome解析。第9回Lancefieldレンサ球菌研究会 伊香保 平成12年7月

③松本昌門、横山佳子、渡辺治雄、鈴木康元、山篠貴史、長谷川忠男、太田美智男 A群レンサ球菌の産生する発赤毒素F(SPEF)の遺伝子解析。第37回日本細菌学会中部支部総会 岐阜 平成12年9月

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

劇症 A 群レンサ球菌感染症におけるプロテアーゼの
病原性発現機構の解析と治療法の開発

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：劇症 A 群レンサ球菌感染症は、A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) による致死率の高い重度の敗血症と DIC 様の病態を特徴とする。A 群レンサ球菌は、菌体外に放出されるチオールプロテアーゼ (streptococcal pyrogenic exotoxin B, SPE-B) とセリン型プロテアーゼである菌体表層プロテアーゼ (C5a-ペプチダーゼ) の少なくとも 2 種類のプロテアーゼを産生しており、これらのプロテアーゼにより本菌の強い血管侵襲と組織破壊能が発現されるものと思われる。そこで本年度は、まず、劇症 A 群レンサ球菌感染症の病態発現に関与することが示唆されている SPE-B によるアポトーシスの誘導について解析を行った。あわせて、*S. pyogenes* 菌体に強く発現されているブラジキニン (BK) 分解酵素の本態について検討した。SPE-B は、ヒト単核球由来 U937 細胞に caspase-3 活性の上昇をもたらしてアポトーシスを誘導した。興味あることに、この様なアポトーシス誘導は、*Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼなどのその他の細菌性プロテアーゼにおいても同様に認められ、この際、細胞内の c-IAP (inhibitor of apoptosis) 1 蛋白が消失していた。このことは、細菌性プロテアーゼが、宿主細胞内の c-IAP1 の分解を介してアポトーシスを誘導している可能性を示唆している。一方、*S. pyogenes* が、C5a-ペプチダーゼとは全く異なる、強力な BK 分解酵素を発現していることがわかった。

A. 研究目的

劇症 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-ペプチダーゼ) 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とし、不幸な経過をたどった激症レン

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激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。細菌感染症におけるアポトーシスの誘導メカニズムの解明は、A 群レンサ球菌感染症のみならずその他の細菌感染病態を理解する上でも重要である。そこで、本年度は、SPE-B プロテアーゼおよび他の細菌性プロテアーゼによる U937 細胞のアポトーシスの誘導とその機序について検討した。

一方、*S. pyogenes* は、C5a-ペプチダーゼとは異なるもう一つのペプチダーゼを産生することが知られており、これが、ブラジキニン (BK) 分解活性を有していることが示唆されている。そこで今回、レンサ球菌性 BK 分解酵素についても解析を進めた。

B. 研究方法

1. SPE-B プロテアーゼの調製とアポトーシス誘導機構の解析

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 プロテアーゼや *Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼによるアポトーシス (細胞死) 誘導を、エチジウムブロミド/アクリジンオレンジで染色法、および、annexin V-FITC と propidium iodide を用いた flow cytometry により検討した。また、アポトーシス誘導に伴った caspase-3 活性の上昇をペプチド合成基質である MOCAc-Asp-Glu-Val-Asp-Ala-Pro-Lys(Dnp)-NH₂ により蛍光分光学的に測定した。この際、caspase 阻害剤として Ac-DMQD-CHO (caspase-3) や Z-VAD-FMK、および、SPE-B プロテアーゼ阻害剤として E-64 などを使って阻害実験を行った。

あわせて、細胞内抗アポトーシス蛋白質である Bcl-2 や c-IAP (inhibitor of apoptosis) 1 の発現におよぼす細菌性プロテアーゼの影響について Western blotting により解析した。

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-ペプチダーゼ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して頂いた。C5a-ペプチダーゼ欠損株を用いて、BK 分解酵素の分離精製を行った。BK 分解酵素活性は、合成 BK ペプチドを各種 *S. pyogenes* 菌体抽出分画と反応させ、その分

解を薄相クロマトグラフィーにより検出した。BK 分解酵素の分離精製のため、超音波破碎装置により *S. pyogenes* 菌体のホモジネートを作成し、その可溶性分画から、疎水性カラムクロマトグラフィーおよびゲル濾過クロマトグラフィーを用いて、BK 分解酵素を分離した。さらに、B 群レンサ球菌、*Streptococcus pneumoniae*、*Streptococcus parasanguis* などの金属依存性ペプチダーゼファミリーに属すると思われる遺伝子構造を持つ、ペプチダーゼ遺伝子を用いて作成された組み換え蛋白質を、上記川端先生より分与頂き、その生化学的特性、特に、BK 分解特性について、LC-MS により解析し、これを C5a-ペプチダーゼ 欠損株由来のペプチダーゼと比較検討した。

C. 研究結果

1. SPE-B プロテアーゼによるアポトーシス誘導機構

SPE-B プロテアーゼは、ヒト単核球由来 U937 細胞に caspase-3 活性の上昇をもたらしたアポトーシスを誘導した。この際、各種 caspase 阻害剤や E-64 により、細胞死はコントロールレベルまで減少した。興味あることに、このようなアポトーシス誘導は、*Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼなどのその他の細菌性プロテアーゼにおいても同様に認められ、この際、細胞内の Bcl-2 のレベルには変動がなかったが、c-IAP1 蛋白質はプロテアーゼ処理後 3-4 時間後より著明に減少していた。このことは、細菌性プロテアーゼが、宿主細胞内の c-IAP1 の分解を介してアポトーシスを誘導している可能性を示唆している。

2. *S. pyogenes* BK 分解酵素の同定

我々は以前、A 群レンサ球菌が C5a-ペプチダーゼのみならず、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-ペプチダーゼと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、C5a-ペプチダーゼ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。このことは、A 群レンサ球菌が、C5a-ペプチダーゼ以外に 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。また、分離した BK 分解酵素は、C5a-ペプチダーゼ活性を有せず、BK のみを強く分解した。その BK 分解酵素活性は、金属キレート剤である、*o*-phenanthroline により完全に抑制され、Co あるいは Mn を添加することにより回復した。このことは本酵素が金属依存型ペプチダーゼであることを示している。また、*S. pyogenes* の組み換えペプチダーゼも全く同様の金属依存性を示し、さらに、LC-MC による BK 分解産物を解析したところ、BK は、本ペプチダーゼにより図 1 に示す部位で特異的に切断されていた。

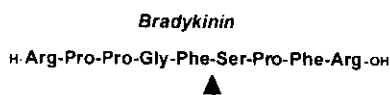


図 1. *S. pyogenes* ペプチダーゼによる BK 分解

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今だ不明であるが、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 基が一酸化窒素 (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、これまで我々は、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) が、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することを報

告してきた。さらに、今回の我々の知見より、SPE-B プロテアーゼによる c-IAP1 発現の抑制を介して相対的な caspase 活性の上昇がもたらされることにより、アポトーシスが誘導される可能性が示唆された。細菌性プロテアーゼによる宿主細胞内の c-IAP1 の分解は、細菌感染によるアポトーシス誘導の新たな機序と考えられる。

これらの知見は、ニトロソ α_1 -PI や E-64 などを抗プロテアーゼや抗アポトーシス剤の劇症 A 群レンサ球菌感染病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-ペプチダーゼ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 をすみ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、組み換え BK ペプチダーゼを用いて、その生化学的・病態生理学的特性を解析していく予定である。

E. 結論

本年度研究により、SPE-B プロテアーゼによるアポトーシス誘導メカニズムの解明のための新たな糸口を見出した。また、*S. pyogenes* の新規ペプチダーゼを同定した。今後さらに、劇症 A 群レンサ球菌感染モデルを用いてこの様なプロテアーゼの関わる病原性発現の分子メカニズムの解明と劇症感染症の治療法の開発を試みる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表
 - 1) 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.*, **267**: 918-923 (2000).
 - 2) 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.*, **14**: 1447-1454 (2000).
- 3) Y. Miyamoto, T. Akaike and H. Maeda: S-Nitrosylated human α_1 -protease inhibitor. *Biochim. Biophys. Acta*, **1477**: 90-97 (2000).
- 4) H. Kuwahara, Y. Miyamoto, T. Akaike, T. Kubota, T. Sawa, S. Okamoto and H. Maeda: *Helicobacter pylori* urease suppresses bactericidal activity of peroxynitrite viacarbon dioxide production. *Infect. Immun.*, **68**: 4378-4383 (2000).
- 5) T. Sawa, T. Akaike and H. Maeda: Tyrosine nitration by peroxynitrite formed from nitric oxide and superoxide generated by xanthine oxidase. *J. Biol. Chem.*, **275**: 32467-32474 (2000).
- 6) E. Akizuki, T. Akaike, S. Okamoto, S. Fujii, Y. Yamaguchi, M. Ogawa and H. Maeda: Role of nitric oxide and superoxide in acute cardiac allograft rejection in rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **225**: 151-159 (2000).
- 7) N. Ikebe, T. Akaike, Y. Miyamoto, K. Hayashida, J. Yoshitake, M. Ogawa and H. Maeda: Protective effect of S-nitroso- α_1 -protease inhibitor on hepatic ischemia-reperfusion injury. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **295**: 904-911 (2000).
- 8) T. Akaike, and H. Maeda: Nitric oxide and virus infection. *Immunology*, **101**: 300-308 (2000).
- 9) T. Akaike: The mechanisms of biological S-nitrosation and its measurement cells and tissues. *Free Rad. Res.*, **33**: 461-469 (2000).
- 10) 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, p.733-745 (2000).
- 11) 赤池孝章、前田 浩：炎症と酸化ストレス感染と炎症におけるフリーラジカルの産生. 「バイオサイエンスの新世紀 第5巻 酸化ストレス・レドックスの生化学 (日本生化学会編集)」 (谷口直之、淀井淳司 編), 共立出版 (株) p. 137-145 (2000).
- 12) 赤池孝章、岡本竜哉、前田 浩：細菌性プロテアーゼによる生体内プロテアーゼの活性化と生体制御の破綻. 「生物間の攻撃と防御の蛋白質」 (内山竹彦, 中嶋暉躬, 名取俊二, 正木春彦 編), 蛋白質 核酸 酵素, **46**: 524-531 (2000).
2. 学会発表
- 1) T. Akaike, S. Fujii, S. Okamoto and H. Maeda: NO-dependent viral pathogenesis in herpes simplex virus-induced encephalitis in mice. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
- 2) Y. Miyamoto, M. Samuel Alam, T. Akaike, H. Hamamoto and H. Maeda: Antiapoptotic activity of S-nitrosylated α_1 -protease inhibitor. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
- 3) T. Sawa, T. Akaike, J. Fang and H. Maeda: Formation of 8-nitroguanosine triggers oxygen radical generation via cytochrome P-450 reductase system. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
- 4) T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y. Miyamoto, M. Suga, M. Ando and H. Maeda: S-Nitroglutathione produced from peroxynitrite and glutathione activates matrix metalloproteinase (MMP) through unique sulfhydryl modification of MMP. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).

- 5) Mohammad S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda: Role of inducible nitric oxide synthase in host defense against *Salmonella* infection. 1st Int'l Conference on Biology, Chemistry and Therapeutic Applications of Nitric Oxide, June 3-7, 2000 (San Francisco, U.S.A.).
- 6) Mohammad S. Alam, T. Akaike, Y. Miyamoto and H. Maeda: Host-defense function of inducible nitric oxide synthase in *Salmonella* infection. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000), October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan).
- 7) T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa, Y. Miyamoto and H. Maeda: Peroxynitrite activates matrix metalloproteinases through formation of *S*-nitroglutathione. 10th Biennial Meeting of the International Society for Free Radical Research (SFRR 2000), October 16-20, 2000 (Kyoto, Japan).
- 8) T. Akaike, T. Okamoto, T. Sawa and H. Maeda: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite. 7th Annual Meeting of the Oxygen Society, November 16-20, 2000 (San Diego, U.S.A.).
- 9) H. Maeda and T. Akaike: Microbial infection and consequence of host response in view of NO production and accelerated mutagenic potentials. British Society for Immunology Congress 2000, December 5-8, 2000 (Harrogate, England).
- 10) Mohammad Samiul Alam, 赤池孝章, 宮本洋一, 前田 浩: Streptococcal pyrogenic exotoxin Bによって誘導されるアポトーシスのニトロソチオールによる阻害. 第73回日本細菌学会総会, 平成12年5月29日~5月31日(札幌).
- 11) 宮本洋一, 赤池孝章, 川端重忠, 浜田茂幸, 前田 浩: *Streptococcus pyogenes* 由来のブラジキニン分解酵

素. 第73回日本細菌学会総会, 平成12年5月29日~5月31日(札幌).

研究成果の刊行に関する一覧表
書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
S. Kawabata, et al.	Distribution of <i>Streptococcus pyogenes</i> superantigens is associated with clinical status	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	175-178
Y. Terao, et al.	Immunization of mice with streptococcal fibronectin binding protein	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	451-453
I. Nakagawa, et al.	Effects of receptor-globulins on invasive group A streptococcal infection	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	595-599
H. Ohkuni, et al.	Analysis of the role of streptococcal cell wall components on inflammatory responses: NF- κ B activation and production of macrophage migration inhibitory factor (MIF) in human peripheral monocytes-derived macrophages	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	565-567
Y. Watanabe, et al.	Cloning and expression of <i>Streptococcus mitis</i> -derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) gene in <i>Streptococcus gordonii</i> after chromosomal integration	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	341-343
S. Sakurada, et al.	Release of histamine from human cultured mast cells and basophils by streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B)/ streptococcal cysteine proteinase (SCP)	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	569-571
Y. Todome, et al.	Release of histamine from human mast cell line, HMC-1 stimulated with streptococcal pyrogenic exotoxin-B / streptococcal cysteine proteinase (SCP)	Martin R. D., Tagg, J. R.	Streptococci and Streptococcal Diseases, Entering the New Millennium	Securacopy Book	New Zealand	2000	721-723

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻名	ページ	出版年
S. Kawabata, et al.	Systemic and mucosal immunization with fibronectin-binding protein FBP54 induce protective immune responses against <i>Streptococcus pyogenes</i> challenge in mice	Infect. Immun.	69	924-930	2001
大国 寿士	ヒト喰いバクテリア – 劇症型 A 群レンサ球菌感染症 – 「最近話題の感染症：その基礎と臨床」	日本医大誌	67	371-374	2000
N. Takahashi, et al.	Immunopathophysiological aspects of an emerging neonatal infectious disease induced by a bacterial superantigen	J. Clin. Invest.	106	1409-1415	2000
内山 竹彦	スーパー抗原性外毒素による感染症の発症機序の解析	モダンメディア	46	344-353	2000
Y. Inagaki, et al.	Genetic differences in <i>Streptococcus pyogenes</i> serotype M3 between recent isolates associated with toxic shock-like syndrome and past clinical isolates	J. Infect. Dis.	181	975-983	2000
M. Yokota, et al.	Fatal rapidly progressing Streptococcal toxic shock-like syndrome; case report	Jpn. J. Infect. Dis.	53	81-82	2000
Y. Miyamoto, et al.	Novel functions of human α 1-protease inhibitor after S-nitrosylation: inhibition of cysteine protease and antibacterial activity	Biochem. Biophys. Res. Commun.	267	918-923	2000
赤池 孝章 他	細菌性プロテアーゼによる生体内プロテアーゼの活性化と生体制御の破綻	蛋白質 核酸 酵素	46	524-531	2000

20000521

以降のページは雑誌/図書等に掲載された論文となりますので、
「研究成果の刊行に関する一覧表」をご参照ください。