

厚生科学研究研究費補助金

新興・再興感染症研究事業

劇症型レンサ球菌感染症の病態解明
及び治療法の確立に関する研究

平成13年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浜田茂幸

平成14（2002）年3月

目 次

I. 総括研究報告	
劇症型レンサ球菌感染症の病態解明及び治療法の確立に関する研究-----	1
浜田 茂幸	
II. 分担研究報告	
1. A 群レンサ球菌の新規菌体表層タンパクの分子生物学的解析-----	15
浜田 茂幸	
2. Streptococcal pyrogenic exotoxin-B のモルモット皮膚毛細血管-----	19
透過性亢進作用並びにヒトマスト細胞腫, HMC-1 からのヒ スタミン遊離能に関する研究	
大国 寿士	
3. 非 A 群レンサ球菌による劇症型感染症の発生と新たなスー-----	23
パー抗原の検出	
内山 竹彦	
4. 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-----	27
渡辺 治雄	
5. 劇症型レンサ球菌感染症の全国調査ならびに劇症型レンサ球-----	29
菌感染症を引き起こした G 群, C 群レンサ球菌株の分析	
太田 美智男	
6. 劇症型感染症における GAS プロテアーゼによるアポトーシス-----	33
の抑制療法の検討	
赤池 孝章	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表-----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷-----	41

劇症型レンサ球菌感染症の病態解明及び治療法の確立に関する研究

（主任）研究者 浜田 茂幸 大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子感染制御学講座 教授

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌（GAS）感染症（TSLs）患者から最も高頻度に分離される M1 型の GAS のゲノム遺伝子データベースから、新規菌体表層タンパクに固有のモチーフを検索することにより、新規菌体表層タンパク Fba 及び Lbp を同定し、これらが感染の初期段階における上皮細胞への付着・侵入を促進させる病原因子としての働きを示すことを明らかにした。さらに Fba をマウスに免疫することにより GAS 感染に対する防御効果を示したことから、Fba が GAS 感染に対するワクチンとしての可能性を有することが示唆された。GAS の産生する菌体外毒素の一つである Streptococcal pyrogenic exotoxin-B (SPE-B/SCP) の組換えタンパクをモルモット皮内に投与することで血管透過性の亢進が認められた。さらに、rSPE-B/SCP でヒトのマスト細胞腫 HMC-1 を刺激すると濃度依存的に HMC-1 からヒスタミンが遊離され、形態学的に脱顆粒が観察されることや、ヒスタミン遊離の際における Ca²⁺ イオンの流入が観察された。さらに rSPE-B/SCP の毛細血管透過性亢進作用は、システインプロテアーゼ特異的阻害剤及び抗ヒスタミン剤により抑制された。また、SPE-B/SCP は宿主細胞内の c-IAP1 の分解を介して細胞のアポトーシスを誘導している可能性が示唆された。また、matrix metalloproteinase (MMP) を処理した細胞の培養上清に FasL を検出し、細菌性プロテアーゼによるアポトーシス誘導に MMP の関与が示唆された。さらに、iNOS 欠損マウスへの GAS 感染によって敗血症病態が著明に憎悪し、NO の感染防御作用が示唆された他、この感染による病態に MMP が関与することが示唆された。遺伝学的研究についてみると、1990 年代に増加した M3 型菌と 1980 年以前に分離された菌で差異の認められる DNA 領域の塩基配列を決定したところ、1990 年代の株には、41,796 bp のファージ様断片が挿入されていたことが明らかとなった。さらにこの挿入領域中の ORF から作られるタンパクが新しいスーパー抗原の構造を示した。また疫学的観点から、約 3000 病院施設に劇症型 GAS 感染症の全国アンケートを行い、33 件の新規発症症例の回答を得た。一方、A 群以外レンサ球菌での劇症型発症例が幾例か報告されていることから、これらの細菌における病原因子について検討した。さらに *Streptococcus dysgalactiae* 培養上清中からヒト T 細胞に細胞分裂とインターロイキン 2（IL-2）産生を誘導する新規のタンパク SDM を精製、分離した。SDM は、MHC class II 分子発現抗原提示細胞の存在下にヒト Vβ 1 及び Vβ 23 陽性 T 細胞を活性化させる新しいスーパー抗原であった。

分担研究者：

大国 寿士	メデカ・ジャパン総合研究所 所長
内山 竹彦	東京女子医科大学微生物学免疫学教室 教授
渡辺 治雄	国立感染症研究所細菌部 部長
太田美智男	名古屋大学大学院医学研究科 教授
赤池 孝章	熊本大学医学部 助教授

A. 研究目的

A 群レンサ球菌 (GAS) は、近年、劇症型 A 群レンサ球菌感染症 (TSLs) の起病菌として注目を集めている。TSLs は GAS による重度の敗血症、DIC 様の病態を特徴とし、病態の進行が急激で死亡率も高いため、有効な治療法や予防法の確立が求められている。これまでの研究によって GAS には数多くの病原因子が存在すると示唆されているが、TSLs 発症の機序は不明な点が多い。その理由としては、(1) 未知の病原因子が未だ数多く存在していること (2) 既知の病原因子も環境などの要因によって発現量・機能が変化すること等が挙げられる。本研究では、TSLs 患者分離株及び対照分離株 (咽頭炎患者分離株や実験室株) を用いて、GAS ゲノムデータベースの情報や分子疫学的・分子遺伝学的な手法による病原遺伝子の検索を行う。さらに、産生タンパク質のプロテオーム解析による未知の病原因子の同定、及び菌体成分の病態成立における作用機序を明らかにし、TSLs の発症メカニズムに基づいた適切な治療法・予防法の開発を目的とする。

B. 研究方法

1. GAS ゲノムデータベースからの新規菌体表層タンパクの同定とその機能解析

M1 型 GAS ゲノムデータベースの塩基配列より、グラム陽性菌の菌体表層タンパクに共通の C 末端 LPXTG モチーフ及びリポタンパクに共通の N 末端 XXGC モチーフを有する遺伝子を検索した。相同検索の結果により新規遺伝子と目された *fba* 及び *lbp* 遺伝子の各種レンサ球菌間での分布をササンプロット法で検索した。さらに *fba* 及び *lbp* 遺伝子を TSLs 由来の GAS 臨床分離株 SSI-9 (M1) の染色体 DNA から PCR 法で増幅した後、pGEX-6P-1 プラスミドベクターに組み込み、大腸菌 BL21 株でリコンビナント Fba 及び Lbp (rFba と rLbp) を作製した。抗血清は、rFba ないし rLbp をウサギに免疫して作製した。*fba* 及び *lbp* 遺伝子欠失変異株は、カナマイシン耐性遺伝子を含むプラスミド pSF151 に *fba* 及び *lbp* 遺伝子を組み込み、これらをエレクトロポレーション法で SSI-9 株に導入した後、カナマイシン添加培地中に培養することにより得られた。rFba 免疫マウスへの GAS 感染後の生体防御効果は、BALB/c マウスに rFba (100 µg) を 2 週間毎に 4 回皮下投与したのち、GAS を感染させ、感染後のマウス生存率の観察によって検討した。

2. リコンビナント SPE-B/SCP (rSPE-B/SCP) によるモルモット血管透過性の測定と rSPE-B/SCP 刺激による HMC-1 からのヒスタミン遊離と脱顆粒の検討

前年度により報告した方法により

rSPE-B/SCP を精製した。血管透過性試験は、モルモットの皮下に rSPE-B/SCP を投与し、さらに 1% Evans Blue を静注することによって Evans Blue の血管からの漏出を観察した。細胞からのヒスタミン遊離の検討は、ヒトのマスト細胞腫である HMC-1 の浮遊液に各種濃度の rSPE-B/SCP を 37 °C、20 分刺激し、その培養上清中のヒスタミン濃度を ELISA 法により定量した。また、HMC-1 からの rSPE-B/SCP による脱顆粒現象は、0.05 % toruidine blue (pH 5.5) による染色により観察し、HMC-1 からの Ca influx は fura-2 acetoxymethyl ester を用いて測定した。

3. SPE-B/SCP によるアポトーシス誘導機構の解析と *S. pyogenes* BK 分解酵素の同定

rSPE-B/SCP や *Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ及び *Pseudomonas aeruginosa* エステラーゼの、ヒト単球様 U937 細胞へのアポトーシス誘導を、エチジウムブロミド/アクリジンオレンジによる染色、及びアネキシン V-FITC とヨウ化プロピディウムを用いたフローサイトメトリーにより検討した。細胞内の Bcl-2 や c-IAP1, hsp70 の発現に及ぼす細菌性プロテアーゼの影響についてウエスタンブロット法により解析した。*S. pyogenes* の *pepA* 遺伝子を用いて PepA の組み換えタンパク (rPepA) を作製し、rPepA の BK, サブスタンス P, アンジオテンシン II の分解特性を LC-MS により解析した。

4. GAS 感染病態における NO 及び MMP の役割の解析

マウスにインフルエンザウイルス (H2N2 熊本株および H3N2 愛知株) を経鼻感染し、その 36 時間後に TSLs 由来の GAS 臨床分離株 SSI-1 を経鼻的に感染することによって TSLs マウスモデルを作製した。さらにこの実験系を用いて、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 欠損マウスと野生型マウスでの生存率、体重変化、及び両病原体の肺内増殖について解析した。さらに MMP の役割を解析するために、混合感染後、1 日おきに計 3 回、MMP 阻害剤である SI-27 を腹腔内投与し、マウス生存率と体重変化に対する効果を検討した。

5. M3 型 TSLs 由来株の新規病原遺伝子の解析

1980 年以前に分離された M3 型株、1990 年代に分離された咽頭炎患者分離株及び TSLs 患者分離株を *Sma*I で染色体 DNA を消化した後、パルスフィールド電気泳動をおこなった。また、*S. pyogenes* NIH1 株のゲノム DNA のライブラリーを作製し、膜に転写後、一次スクリーニングとして K23 株のゲノム DNA 断片を、二次スクリーニングとして NIH1 株のゲノム DNA 断片をプローブとしてプラークハイブリダイゼーションを行い、一次スクリーニングで陰性、二次スクリーニングで陽性となるプラークを選択した。

6. TSLs 全国アンケート

全国約 3000 の救急指定、あるいは特定疾患指定病院に対し、平成 12 年度における TSLs の有無と、性別、生死、臨床症状、治療方法などのアンケート調査を行った。

7. G 群及び C 群レンサ球菌株の分析

菌の同定は、16Sr DNA の解析と rapid ID 32 STREP により同定した。薬剤感受性試験は各株に対する抗生剤の最小発育阻止濃度 (MIC) を微量液体希釈法で調べた。M typing は CDC のホームページに記載されている方法で、スーパー抗原の検出は、PCR 法によって行った。また、レンサ球菌の培養上清からタンパク質を抽出し、IPGphor 法によって一次元、ついで SDS-PAGE で二次元の泳動を行った。

8. スーパー抗原の精製とその性状解析

Streptococcus dysgalactiae 分離株の培養上清からヒト T 細胞の細胞分裂とインターロイキン 2 (IL-2) を産生するタンパクを精製し、その遺伝子クローニングを行い、そのアミノ酸配列を解析した。

9. 倫理面での配慮

実験動物を用いた研究の実施に関しては、国の勧告などに基づいた各所属施設の審査・承認を受け、その指針に則り、動物愛護の精神を損なうことの無きように行った。患者からの材料の取得は、当該施設の規定に従い、患者あるいは家族の承認 (インフォームドコンセプト) を得て行った。患者の個人情報については菌株とその由来間で連結不可能な匿名化をおこなった上で菌株および結果の発表を行い、患者が特定されないように配慮した。実験内容によっては、各所属施設の組み換え DNA 実験指針やラジオアイソトープの取扱いの承認を得て、各実験をおこなっ

た。

C. 研究結果

1. GAS ゲノムデータベースからの新規菌体表層タンパクの同定とその機能解析

GAS ゲノムデータベースから菌体表層タンパクに固有のモチーフを検索することにより、新規菌体表層タンパク Fba (fibronectin-binding protein of group A streptococci : LPXTG モチーフを C 末端に有する) および Lbp (laminin-binding protein of group A streptococci : XXGC モチーフを N 末端に有する) を同定した。fba および lbp 遺伝子は GAS の pathogenicity island である mga regulon の最下流に位置していた。サザンプロット分析の結果、lbp 遺伝子は供試したすべての A 群および B 群レンサ球菌に分布し、fba 遺伝子は M1, 2, 4, 9, 13, 22, 28, 44, 49, 60, 67, 75, 77, 79, 80, 82, 87, 89 型の GAS 菌株に認められた。相同検索の結果、lbp 遺伝子は B 群レンサ球菌のラミニン (Lm) 結合タンパクと 98% の相同性を示し、さらに rLbp が Lm と結合することを示した。一方、推定アミノ酸配列から Fba は 3 回の繰り返し構造を有し、このドメインが *Staphylococcus aureus* のフィブロネクチン (Fn) 結合タンパク FnbpA と約 70% の相同性を示した。そこで rFba を作製し、Fn への結合能を検索したところ、繰り返し領域を介して Fn と結合することが示された。さらに rFba をマウスに免疫することで血清中の Fba 特異的抗体価の上昇が認められ、このマウスにおける致死量の GAS 感染に対する高い感染防御効果を示した。

2. リコンビナント SPE-B/SCP (rSPE-B/SCP) によるモルモット血管透過性の測定と rSPE-B/SCP 刺激による HMC-1 からのヒスタミン遊離と脱顆粒の検討

天然型 SPE-B/SCP (nSPE-B/SCP) と比し、rSPE-B/SCP は強いシステインプロテアーゼ活性を示した。また、モルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用においても rSPE-B/SCP は強い活性を示し、この活性は加熱処理ないし同酵素の特異的阻害剤である E 64, Box-LVG-CHN2 により抑制された。また、上記活性について SPE-A, SPE-C, LPS に認めることができなかつた。抗ヒスタミン剤である diphenhydramine 塩酸塩での前処理によって nSPE-B/SCP, histamine, bradykinin の毛細血管透過性亢進作用は完全に抑制され、rSPE-B/SCP の毛細血管透過性も抑制されたが、システインプロテアーゼ活性が強かつたためか完全には抑制されなかつた。ヒトマスト細胞腫から樹立された HMC-1 に rSPE-B/SCP を添加すると、濃度依存的にヒスタミンが遊離され、形態学的な脱顆粒が観察された。また細胞内への Ca の流入が添加した rSPE-B/SCP 濃度依存的に認められた。

3. SPE-B/SCP によるアポトーシス誘導機構の解析と *S. pyogenes* BK 分解酵素の同定

rSPE-B/SCP は、ヒト単球由来 U937 細胞に caspase-3 活性の上昇をもたらし、アポトーシスを誘導した。同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* エステラーゼにおいても認められ、細胞内の Bcl-2 のレベルに変動がなかつたもの

の、c-IAP1 タンパクのレベルがプロテアーゼ処理後 3 - 4 時間後より著明に減少した。また、活性型 MMP が細胞からの FasL や TNF- α を遊離させ、アポトーシスを促進することが指摘されているが、今回、MMP を処理した細胞の培養上清に FasL を検出したことから、細菌性プロテアーゼによるアポトーシス誘導に MMP の関与が示唆された。これまで GAS 由来の BK 分解酵素の同定について、GAS 由来の metalloendopeptidase (PepA) の組み換えタンパク (rPepA) を作製し、同酵素による BK ならびにその他の生理活性ペプチドの分解活性を解析した。その結果、BK のみならず、サブスタンス P やアジオテンシン II の Phe などの疎水性アミノ酸の C 末端側を切断して、不活化していることが明らかになった。PepA は、ほとんどの GAS 臨床分離株に発現が認められ、菌の増殖期に関係なく一定の発現量が維持されていたのに対し、SPE-B/SCP は対数増殖期の後期から定常期にかけて発現されることがわかつた。

4. GAS 感染病態における NO 及び MMP の役割の解析

iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて劇症型 GAS 感染症の病態を解析したところ、iNOS 欠損マウスでは野生型マウスと比較して敗血症病態が著明に憎悪した。また、この感染系での一次感染病巣である肺組織において MMP の発現が強く誘導していた。そこで MMP 阻害剤である SI-27 を腹腔内に投与し、マウス生存率と体重減少に与える影響について検討したところ、SI-27 は

GAS 劇症感染を改善させる傾向が認められた。

5. M3 型 TSLs 由来株の新規病原遺伝子の解析

1980 年以前に分離された M3 型の 3 株, 1990 年代に分離された咽頭炎患者分離株 2 株および TSLs 患者分離株 13 株について *Sma*I で染色体 DNA を消化後, パルスフィールド電気泳動 (PFGE) を行った。検討した 1990 年代の株では, PFGE のパターンに違いがみられず, 1980 年以前の株を持つ 260 kb の断片が 40-45 kb 伸長しているというデータを得た。この領域の塩基配列について検討したところ, 1990 年代の菌株には, 新たに *attL-attR* には含まれる 41,796 bp からなる DNA 断片が挿入されており, 多くの ORF はファージ由来遺伝子と相同性をもっていた。また, この領域の一端に発熱毒素である *speC* と 48%, *smez-2* と 46% 相同性のある ORF (*speL*) が存在していた。*speL* は, スーパー抗原間で保存されているアミノ酸残基を保有し, スーパー抗原が MHC class II と結合する時に媒介する Zn の結合部位も保存され, 検討した全ての 1990 年代に分離された M3 株に存在することが判明した。また, SPE-L は, 馬に対して病原性を示す *Streptococcus equi* のもつ ORF とアミノ酸配列になおして 98% の相同性があった。

6. TSLs 全国アンケート

全国で男性 21 人, 女性 12 人の発症を認め, そのうち, 男性 7 人 (33%), 女性 4 人 (33%) が死亡症例であった。発症年齢では 60 歳台が最も多い 10 人であり, 60 歳以上で

は死亡率が 50% に達し, 加齢に伴い致死率が高いことが認められた。診断基準の項目に関しては, 血圧低下, 腎障害, 凝固障害, 肝障害, ARDS, 中枢神経症状が死亡例で生存例に比して高頻度に認められた。診断基準を満たした症例で行われた治療法を解析したところ, ペニシリン系抗生物質とクリンダマイシンを使用した施設が多かったが, 以前に提唱された治療方針を採用している施設は少なかった。

7. G 群及び C 群レンサ球菌株の解析

TSLs を引き起こした G 群ならびに C 群レンサ球菌 13 株のうち, 12 株は *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, 1 株は, *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* と同定した。13 株のうち, 2 株がエリスロマイシン耐性, 1 株はクリンダマイシン耐性, 2 株がクラリスロマイシン耐性, 7 株がテトラサイクリンに耐性であった。決定された M 型は, stg2078 (2 株), stg485 (2 株), stc839 (1 株) などの他, 新規の M 型 2 株も存在した。また, 1 株は, PCR による M タンパク質遺伝子の増幅がみられなかった。スーパー抗原の検出については, *speA, B, C, F* 遺伝子の増幅がみられなかったものの, *speG* とホモロジーのある *speGG* が認められた。二次元電気泳動でのタンパクの分布については, 総じて酸性側に多くのタンパク質のスポットがみられた。

8. スーパー抗原の精製とその性状解析

Streptococcus dysgalactiae 培養上清にヒト T 細胞に細胞分裂とインター

ロイキン 2 (IL-2) 産生を誘導する因子 *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM) が検出された。その遺伝子クローニングにより、*sdm* 遺伝子は 238 個のアミノ酸 (212 個のアミノ酸からなる成熟 SDM とシグナルペプチドから構成される) からなるタンパクをコードしていた。天然 SDM とヒスチジンタグが付いた組換え体のいずれも MHC class II 分子を表現した抗原提示細胞の存在下にヒト V β 1 及び V β 23 陽性 T 細胞を活性化させた。立体構造は、SPE-C と類似しており、分子の中央部分にいくつかの α ヘリックス構造と左右の β シート構造から構成されていた。ウサギに浸透圧ポンプを封入して SDM を投与すると致死的に作用した。

D. 考察

宿主に感染した GAS は菌体表層の M タンパク、Fba, FBP54, Lbp などの働きで咽頭上皮などの細胞に付着・侵入し、全身に伝播すると考えられている。そこで、感染の初期段階の付着・侵入を阻害するために Fba, Lbp に着目し、感染防御抗原としての可能性を検索した。マウスを用いた実験で、Fba は特異的抗体を誘導し、その後の GAS 感染に対し、コントロール群に比して高い生存率を示したことから、GAS の感染初期に働く Fn 結合タンパク Fba は将来のワクチンとしての可能性を有することが示唆された。

天然 SPE-B/SCP (nSPE-B/SCP) は、ヒトのマスト細胞や好塩基球に対しヒスタミン遊離能をもつこと、nSPE-B/SCP, rSPE-B/SCP にはモルモット毛細血管透過性亢進作用があることを報告してきた。そして、今回、

rSPE-B/SCP の毛細血管透過性亢進作用のさらなる解析を行った。その結果、この反応はシステインプロテアーゼ阻害剤ならび抗ヒスタミン剤によって抑制されることから、透過性亢進作用はプロテアーゼ活性を介して惹起され、その亢進作用にメディエーターとしてヒスタミンが関与していることを示唆した。この透過性亢進作用は、LPS ならびスーパー抗原活性を有する SPE-A, SPE-C には認められず、SPE-B/SCP 特異的であるように思われた。

ヒトマスト細胞腫から樹立された HMC-1 に rSPE-B/SCP を添加することにより、脱顆粒と共にヒスタミンが濃度依存的に遊離し、この反応もまた、SPE-A や LPS では認めることができなかった。また、rSPE-B/SCP の濃度に依存して HMC-1 への細胞外からの Ca の流入が観察された。従って、rSPE-B/SCP の作用により HMC-1 からの脱顆粒ないし、ヒスタミンの遊離には、Ca イオンの流入が必須と思われるが、同時に細胞内に貯蔵されている Ca の働きも考慮する必要がある。

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これまで不明であったが、今回の知見から、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 活性の上昇をもたらされることにより、アポトーシスが誘導される全く新しい可能性が示唆された。また、今回、ヒト組み換え MMP-9 により処理した細胞培養上清に FasL を検出したことから、GAS プロテアーゼによる MMP の活性化を介したアポトーシス誘導の機序が考えられた。また、BK をすみやかに分解し、不

活化する PepA が GAS に広く発現していることが明らかになった。PepA は増殖期に依存せず、常に発現が維持されたのに対し、SPE-B は増殖の後期でのみ発現された。このことは、GAS が PepA および SPE-B の発現バランスにより、感染局所での宿主 BK の生成と分解を調節し、菌の定着、血行性播腫に関与している可能性を示唆している。

種々の細菌感染病態において、NO の抗アポトーシス作用が感染防御に重要であることが明らかとなっている。今回、iNOS 欠損マウスにおいて敗血症病態が著明に憎悪したことから、GAS 劇症感染においても NO が重要な感染防御作用を有していることが示された。このことは、NO 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からも裏付けられる。さらに、MMP 阻害剤である SI-27 が GAS 劇症感染モデルにおいて病態を改善させたことは、GAS プロテアーゼによる MMP の活性化、さらにはアポトーシス誘導が本劇症感染症の病態に大きく関与することを示唆している。

今回の研究によって新しく発見された *speL* 遺伝子は、1990 年代に流行した A 群レンサ球菌感染症患者から分離された M3 株に共通して保有され、この遺伝子はテンプレートファージ上にコードしていた。また、他の M 型の A 群レンサ球菌群には、この遺伝子を見出すことができなかった。しかし、SF370 (M1 型) のなかにもテンプレートファージ様の遺伝子が存在し、そのファージの末端に *speL* とは異なるが機能的に類似

する遺伝子が存在する。このことを考えると、*speL* のような遺伝子を保有するファージの導入により、1990 年代からみられるようになった劇症型 A 群レンサ球菌感染症のような新たな病態が引き起こされるようになったという可能性も考えられる。

今回の劇症型レンサ球菌感染症全国アンケートによっても劇症型 A 群レンサ球菌感染症の致死率は依然として高く、その早期診断と適切な治療法の確立の必要性が改めて確認された。抗生物質の早期からの大量使用により救命し得た症例もあったが、必ずしも過去に出された治療指針に則った治療法がなされているわけではなく、やはり、いまだに試行錯誤的に治療が行われているというのが現状である。

TSLS を引き起こした G 群および C 群レンサ球菌株の分析は、A 群レンサ球菌との比較により病態の解明の一助となると考えられる。ひとつには、A 群レンサ球菌で見出されるスーパー抗原遺伝子がほとんど認められないことである。いまだにゲノム情報が得られていないため、分泌タンパク質の同定は進んでいないが、*speG* と類似の遺伝子や A 群レンサ球菌には存在しない新たなスーパー抗原 SDM が見出されたことから、これらが病態に関連している可能性も考えられる。スーパー抗原性毒素については、より広い範囲から菌を集めて毒素産生株の分布を解析しなければならない。

E. 結論

1. GAS 全ゲノムデータベースから得られた新規菌体表層タンパク Fba および Lbp は、各々、フィブロネクチ

ンおよびラミニンに結合し、宿主細胞への付着・侵入に関与することが示された。

2. Fba は、A 群レンサ球菌感染に対する防御抗原と成り得ることが示された。

3. rSPE-B/SCP による毛細血管血管亢進作用は、プロテアーゼ活性を介して惹起され、その亢進作用にメディエーターとしてヒスタミンが関与していることを示唆した。

4. 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として、c-IAP1 の分解および MMP の活性化が示唆された。

5. *S. pyogenes* の新規ペプチダーゼである PepA が GAS に広く発現していることを確認した。

6. TSLs マウスモデルを用いて、MMP の病態形成への関与と感染防御における NO の必要性を示唆した。

7. 1990 年代の M3 株は、ファージ様 DNA 断片を獲得し、その中にスーパー抗原 SPE-L が存在した。

8. 日本における劇症型 GAS 感染症の治療方針を早急に確立し、それを全国に啓蒙していくために、劇症型レンサ球菌感染症の継続的な疫学的調査の必要性を示した。

9. A 群レンサ球菌以外のレンサ球菌から新たなスーパー抗原を見出した。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Nakagawa, M. Nakata, S. Kawabata and S. Hamada.: Cytochrome *c*-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. **Cell. Microbiol.** 3: 395-405, 2001.
- 2) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, J. Murakami, I. Nakagawa and S. Hamada.: Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. **Mol. Microbiol.** 42: 75-86, 2001.
- 3) S. Okamoto, S. Kawabata, I. Nakagawa and S. Hamada.: Administration of superantigens protects mice from lethal *Listeria monocytogenes* infection by enhancing cytotoxic T cells. **Infect. Immun.** 69: 6633-6642, 2001.
- 4) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, I. Nakagawa and S. Hamada.: Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells. **Infect. Immun.** 70: 993-997, 2002.
- 5) M. Morishima, S. Yamahatsu, S. Yoshino, H. Ohkuni and M. Nagashima.: Streptococcal toxic shock syndrome in a patient with rheumatoid arthritis. **Clin. Exp. Rheumatol.** 19: 231-232, 2001.
- 6) S. Sakurada, H. Katano, T. Sata, H. Ohkuni, T. Watanabe and S. Mori.: Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein

- endothelial cells by cell-mediated transmission. **J. Virol.** 75: 7717-7722, 2001.
- 7) N. Takeda, K. Kikuchi, R. Asano, T. Harada, K. Totsuka, T. Sumiyoshi, T. Uchiyama and S. Hosoda.: Recurrent septicemia caused by *Streptococcus canis* after a dog bite. **Scand. J. Infect. Dis.** 33: 927-928, 2001.
- 8) W. Fujimaki, M. Iwashima, J. Yagi, H. Zhang, H. Yagi, K. Seo, Y. Imai, K. Imanishi and T. Uchiyama.: Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4⁺ T cells. **J. Biol. Chem.** 276: 17455-17460, 2001.
- 9) H. Kobayashi, Y. Tanaka, J. Yagi, H. Toma and T. Uchiyama.: Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma. **Cancer Immunol. Immunother.** 50: 115-124, 2001.
- 10) T. Akaike.: Role of free radical in viral pathogenesis and mutation. **Rev. Med. Virol.** 11: 87-101, 2001.
- 11) S. Miyajima, T. Akaike, K. Matsumoto, T. Okamoto, J. Yoshitake, K. Hayashida, A. Negi and H. Maeda.: Matrix metalloproteinases induction by pseudomonas virulence factors and inflammatory cytokines *in vitro*. **Microb. Pathog.** 31: 271-281, 2001.
- 12) T. Okamoto, T. Akaike, T. Sawa, Y. Miyamoto, A. van der Vliet and H. Maeda.: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation. **J. Biol. Chem.** 276: 29596-29602, 2001.
- 13) S. Satoh, K. Oishi, A. Iwagaki, M. Senba, T. Akaike, M. Akiyama, N. Mukaida, K. Matsushima, and T. Nagatake.: Dexamethasone impairs pulmonary defence against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. **Clin. Exp. Immunol.** 126: 266-273, 2001.
- 14) J. Wu, T. Akaike, K. Hayashida, T. Okamoto, A. Okuyama and H. Maeda.: Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases. **Jpn. J. Cancer Res.** 92: 439-451, 2001.
- 15) R. Uwatoku, T. Akaike, K. Yamaguchi, T. Kawasaki, M. Ando and K. Matsuno.: Asialoglycoprotein receptors on rat dendritic cells: possible roles for binding with Kupffer cells and ingesting virus particles. **Arch. Histol. Cytol.** 64: 223-232, 2001.
2. 学会発表
- 1) 寺尾豊, 川端重忠, 中川一路, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌新規菌体表層タンパクの感染防御抗原としての可能性. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
- 2) 村上旬平, 川端重忠, 中川一路, 天野敦雄, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌の細胞付着と侵入に関する形態学的観察: 唾液 PRP の影響. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
- 3) 富安祐介, 中川一路, 中田匡宣,

- 川端重忠, 浜田茂幸: EGFP 高発現 A 群レンサ球菌を用いた宿主細胞への付着・侵入能の解析. 第 74 回日本細菌学会総会. 2001 年 4 月 2-4 日, 岡山.
- 4) 岡本成史, 川端重忠, 中川一路, 奥野良信, 浜田茂幸: インフルエンザウイルス及び A 群レンサ球菌混合感染による引き起こされる劇症型感染症の発症とそのメカニズム. 第 49 回日本ウイルス学会総会. 2001 年 11 月 18-20 日, 大阪.
 - 5) S. Kawabata, Y. Terao, I. Nakagawa, S. Hamada.: Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein, Fba, of *Streptococcus pyogenes*. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20-24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 6) I. Nakagawa, M. Nakata, S. Kawabata, S. Hamada. : Cytochrome *c*-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes* infected epithelial cells. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20-24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 7) M. Nakata, I. Nakagawa, S. Kawabata, S. Hamada. : Overexpression of Bcl-2 can protect *S. pyogenes*-infected epithelial cells from apoptotic cell death. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20-24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 8) 渡邊ユキノ, 留目優子, 加藤晃子, 斉藤栄一, 小澤寿子, 高橋秀実, 大国寿士: 組み換え型レンサ球菌発熱毒素 - B (rSPE B/SCP) の生物学的性状に関する研究. 第 10 回ランスフィールドレンサ球菌研究会, 2001 年 6 月 30 日, 岐阜.
 - 9) 大国寿士, 留目優子, 加藤晃子, 高橋秀実: 組み換え型レンサ球菌発熱毒素 - B (SPE B) の作製とその性状. 第 22 回日本炎症・再生医学会. 2001 年 7 月, 東京.
 - 10) 大国寿士, 渡邊ユキノ, 留目優子, 櫻田紳策, 高橋秀実, 斉藤博久: 組み換え型 Streptococcal pyrogenic exotoxin B (rSPE B) の性状に関する研究—マスト細胞からのヒスタミン遊離能—. 第 31 回日本免疫学会総会 学術集会. 2001 年 12 月 11-13 日, 大阪.
 - 11) 大国寿士, 留目優子, 渡邊ユキノ: Recombinant SPE B/SCP のモルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用に関する検討. 平成 13 年度厚生科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業) 劇症型レンサ球菌感染症の病態解明及び治療法の確立に関する研究 班会議. 2001, 大阪.
 - 12) 秋山徹, 趙吉子, 加藤秀人, 内山竹彦: 非 A 群連鎖球菌株由来のミトジェン活性を持つ産物の精製およびその性質. 第 74 回日本細菌学会総会. 2001 年 4 月 2-4 日, 岡山.
 - 13) 趙吉子, 秋山徹, 遠藤美代子, 鈴木理恵子, 山井志朗, 内山竹彦: A 群連鎖球菌の病原因子の M 型間での比較, およびそれらの激症型 A 群連鎖球菌感染症における役割. 第 74 回日本細菌

- 菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
- 14) 三好(秋山)徹, 趙吉子, 加藤秀人, 内山竹彦: C群レンサ球菌の産生するマイトジェン活性物質の精製およびその遺伝子クローニング. 第31回日本免疫学会総会・学術集会. 2001年12月11-13日, 大阪.
 - 15) 張華, 藤巻わかえ, 今西健一, 内山竹彦: ヒト末梢のCD4⁺T細胞とCD8⁺T細胞における細菌性スーパー抗原に対する反応性の相違. 第31回日本免疫学会総会・学術集会. 2001年12月11-13日, 大阪.
 - 16) 三好(秋山)徹, 趙吉子, 加藤秀人, 内山竹彦: C群レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* より分離された新規マイトジェン活性蛋白質 (*S. dysgalactiae*-derived mitogen, SDM) の構造. 第84回日本細菌学会関東支部総会. 2001年11月, 横浜.
 - 17) 三木瑞香, 羽根田, 加藤秀人, 内山竹彦: 重症の新生児 TSS 様発疹症で冠動脈の一過性拡張が認められた一例. 第21回川崎病研究会. 2001年9月14, 15日.
 - 18) Y. Arimura, H. Kato, T. Okamoto, T. Miyoshi-Akiyama, D. Buonfiglio, U. Dianzani, T. Uchiyama, J. Yagi.: ICOS/H4 provides the different signals from CD28 in T cells. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001. Abstracts for Monday 33.
 - 19) K. Imanishi, H. Kato, K. Seo, M. Koyanagi, Y. Imai, T. Uchiyama.: Study of post-thymic development of human CD4⁺ T cells by using TSST-1 as an antigen. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001.
 - 20) T. Uchiyama, N. Takahashi, H. Kato, K. Imanishi, K. Miwa, S. Yamanami, H. Nishida.: Immunologic events in an emerging disease caused by a bacterial superantigen, neonatal TSS-like exanthematous disease (NTED) - the fate of the superantigen-reactive T cells and factors blocking the development of NTED. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001.
 - 21) L. Chen, K. Imanishi, M. Koyanagi, J. Yagi, T. Uchiyama.: Induction of protracted expansion and memory-type responses in superantigen SEA-reactive CD4⁺ T cells in mice continuously exposed with SEA for a long period. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001.
 - 22) 池辺忠義, 和田昭仁, 稲垣善茂, 鈴木理恵子, 山井志朗, 渡辺治雄: 近年分離された *Streptococcus pyogenes* M3 型株がもつファージ様 DNA 断片の解析. 第84回日本細菌学会関東支部総会. 2001年11月, 横浜.
 - 23) 長谷川忠男, 山篠貴史, 鳥居啓三, 太田美智男: 二次元電気泳動法により新たに同定されたA群レンサ球菌DNA分解酵素の解析. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 24) 橋川真之介, 古下学, 飯沼由嗣, 鳥居啓三, 長谷川忠男, 太田美智男: 劇症型レンサ球菌感染症を引き起こしたG群ならびにC

- 群レンサ球菌株の分析. 第 38 回日本細菌学会中部支部総会. 2001 年 10 月, 金沢.
- 25) S. Okamoto, T. Akaike, J. Yoshitake, T. Sawa, M. Suga, M. Ando, H. Maeda.: Nitric oxide-induced lung injury in virus-induced pneumonia evaluated by using iNOS-deficient mice. 2001 ALA/ATS International Conference, May 18-23, 2001. San Francisco, CA, USA.
- 26) T. Sawa, T. Akaike, T. Okamoto, H. Maeda.: Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite. 3rd International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, May 27-31, 2001. Monterey, CA, USA.
- 27) T. Akaike.: Activation of matrix metallo-proteinases in oxidative tissue injury and inflammation. Lectures on Free Radical Biology, University of Alabama at Birmingham, September 27, 2001. Birmingham, AL, USA.
- 28) Y. Miyamoto, T. Akaike, T. Akuta, S. Kawabata, S. Hamada, H. Maeda.: Degradation of bradykinin by a metalloproteinase produced by *Streptococcus pyogenes*. IPS/ICPI 2001, November 1-4, 2001. Munich, Germany.
- 29) T. Akaike, S. Shiva, R. P. Patel, P. S. Brookes, V. M. Darley-Usmar.: Glutathione nitroso-sulfoxide: A potential reaction product of glutathione and peroxynitrite. 8th Annual Meeting of the Oxygen Society, November 15-19, 2001. Research Triangle Park, NC, USA.
- 30) 田村文雄, 赤池孝章, Mohammad Samiul Alam, 菅 守隆, 安藤正幸, 前田 浩: 細菌性プロテアーゼによるアポトーシスの誘導. 第 74 回日本細菌学会総会. 2001 年 4 月 2-4 日, 岡山.
- 31) 田村文雄, 赤池孝章, Mohammad Samiul Alam, 菅 守隆, 安藤正幸, 前田 浩: NO およびニトロソチオール抗アポトーシス作用を介する感染防御メカニズム. 第 1 回日本 NO 学会学術集会. 2001 年 5 月 26, 27 日, 福岡.
- 32) 岡本真一郎, 赤池孝章, 前田浩.: インフルエンザウイルスおよび A 群レンサ球菌複合気道感染における NO の役割. 第 10 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2001 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 岐阜.
- 33) 田村文雄, 赤池孝章, 前田 浩.: A 群レンサ球菌プロテアーゼによるアポトーシス誘導メカニズム. 第 10 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2001 年 6 月 30 日-7 月 1 日, 岐阜.
- 34) 田村文雄, 赤池孝章, 菅 守隆, 前田 浩: 細菌性プロテアーゼによるアポトーシス誘導とそのメカニズム. 第 6 回病態と治療におけるプロテアーゼとインヒビター研究会. 2001 年 8 月 13, 14 日, 宮崎.
- 35) 田村文雄, 赤池孝章, 菅 守隆, 前田 浩: 細菌性プロテアーゼによるアポトーシス誘導とそのメカニズム. 第 74 回日本生化学会大会, 2001 年 10 月 25-28 日, 京都.
- 36) 田村文雄, 赤池孝章, 菅 守隆, 前田 浩: A 群レンサ球菌の劇

症化におけるアポトーシスの役割. 第71回日本感染症学会西日本地方会総会, 2001年11月29, 30日, 岡山.

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群レンサ球菌の新規菌体表層タンパクの分子生物学的解析

(分担) 研究者 浜田 茂幸 大阪大学大学院歯学研究科
口腔分子感染制御学講座 教授

研究要旨 劇症型A群レンサ球菌感染症により、注目を集めるA群レンサ球菌 (GAS) は感染初期段階において、菌体表層の各種タンパクの働きにより咽頭上皮などの細胞に付着・侵入し、その後、血流を介し全身に伝播すると考えられている。本研究ではGASゲノムデータベースから菌体表層タンパクに固有のモチーフを検索することにより、新規菌体表層タンパクFbaおよびLbpを同定し、感染の初期段階の付着・侵入を阻害する感染防御抗原としての可能性を検索した。fbaおよびlbp遺伝子はGASのpathogenicity islandとして知られるmga regulonの最下流に位置し、共にヒト上皮細胞由来のHEp-2株に対して付着因子として機能した。さらに、Fbaは侵入素としても働くことが明らかとなった。マウスを用いた実験においてFbaは特異的抗体を誘導し、その後のGAS感染に対して防御効果を示し生存率を高めたことから、GAS感染に対するワクチンとしての可能性を有することが示唆された。

A. 研究目的

劇症型A群レンサ球菌感染症 (TSLs) は、近年、日本を含め世界規模で発症が認められるが、発症機構はもとより予防法・治療法が確立されていない再興感染症のひとつである。したがって、その発症に関する病原因子およびメカニズムの解析、ならびに予防・治療手段としてのワクチン抗原の検索は急務と言える。本研究では、既知の生化学的手法による菌体表層タンパクの同定法ではなく、ゲノム情報に基づく同定法で新規菌体表層タンパクを検索し、*in silico*, *in vivo*, *in vitro*の各種方法により病態に及ぼす影響と感染防御抗原としての可能性を精査した。

B. 研究方法

1. GASゲノム情報に基づく新規菌体表層タンパクの同定

MI型GASゲノムデータベースからグ

ラム陽性球菌の菌体表層タンパクに共通のC末端LPXTGモチーフおよびリポタンパクに共通のN末端XXGCモチーフを有する遺伝子を検索した。相同検索の結果により新規遺伝子と目されたfbaおよびlbp遺伝子の各種レンサ球菌感での分布をサザンブロット法で検索した。また、GASに関しては各菌株のDNA塩基配列を決定し比較した。

2. リコンビナントタンパクおよび抗血清の作製

TSLs由来のSSI-9株 (MI型) の染色体DNAからfbaおよびlbp遺伝子をPCR法で増幅した後、組換えタンパク発現用pGEX-6P-1プラスミドに組み込み、大腸菌BL21株でリコンビナントFbaおよびLbp (rFbaおよびrLbp) を作製した。さらにrFbaおよびrLbpを家兎に免疫し、それぞれの特異的抗血清を得た。

3. fbaおよびlbp遺伝子欠失変異株の作製
カナマイシン耐性遺伝子を含むプラス

ミドpSF151に*fba*および*lbp*遺伝子の一部を組み込み遺伝子欠失変異株作製用プラスミドを構築した。これらをエレクトロポレーション法でGAS SSI-9株に導入した後、カナマイシン添加培地で変異株を選択した。

4. rFbaを用いたマウス免疫実験

6週齢のメスのBALB/cマウスに2週間毎に4回rFba 100 μgを皮下接種した。さらに、最終免疫日から2週間後に致死量のGASを感染させ生存率を算定した。また、2週間毎に血清を採取しELISA法でFba特異的IgG抗体価を測定した。

C. 研究結果

GASゲノムデータベースから菌体表層タンパクに固有のモチーフを検索することにより、新規菌体表層タンパクFba (fibronectin-binding protein of group A streptococci : LPXTG モチーフをC末端に有する) およびLbp (laminin-binding protein of group A streptococci : XXGC モチーフをN末端に有する) を同定した。*fba*および*lbp*遺伝子はGASのpathogenicity islandである*mga* regulonの最下流に位置していた。サザンプロット分析の結果、*lbp*遺伝子は供試した全てのGAS菌株ならびB群レンサ球菌に分布することが明らかとなった。一方、*fba*遺伝子はM型に依存してGASにのみ分布し、M1, 2, 4, 9, 13, 22, 28, 44, 49, 60, 67, 75, 77, 79, 80, 82, 87, 89型で認められた。

相同検索の結果、*lbp*遺伝子はB群レンサ球菌のラミニン (Lm) 結合タンパクと98%の相同性を示した。そこで、リコンビナントLbp (rLb) 発現プラスミドを構築し、GSTアフィニティークラムで精製しビオチン標識したLmとの結合能を検索した。その結果、rLbpはLmと結合することが示された (図1)。また、GAS 8 M尿素抽出菌体表層画分にも親株でのみLmと結合するLbpの分子量に相当するタンパクが認められ、*lbp*遺伝子欠失変異株では認められ

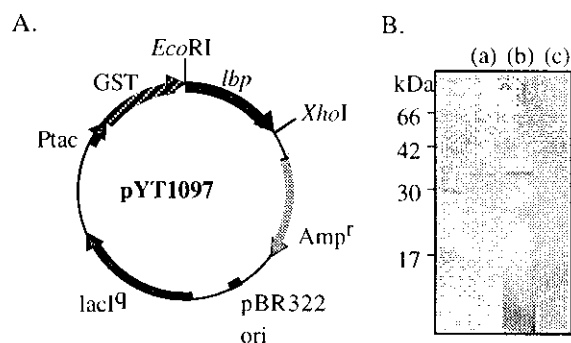


図1 A. rLbp 発現プラスミド. B. rLbpのLm結合能. (a) クマシー染色. (b) ビオチン標識Lmとの反応後、ECL試薬で検出. (c) ECL試薬のみ.

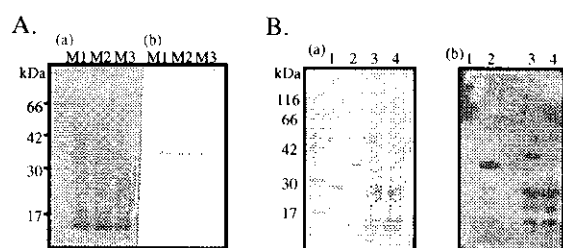


図2 A. 各M型GASの8 M尿素抽出菌体表層画分のウエスタンブロット. (a) クマシー染色. (b) 抗Lbp抗体によるウエスタンブロット. B. レーン1: rGST, レーン2: rLbp, レーン3: SSI-9株の8 M尿素抽出菌体表層画分, レーン4: Δ*lbp*株の8 M尿素抽出菌体表層画分. (a) クマシー染色. (b) ビオチン標識Lmとの反応後、ECL試薬で検出.

なかった (図2A)。さらに、LbpがGAS菌体表層タンパクであることを8 M尿素抽出菌体表層画分との抗Lbp血清を用いたウエスタンブロットで示した (図2B)。

一方、推定アミノ酸配列からFbaは3回の繰り返し構造を有し、このドメインが*Staphylococcus aureus*のフィブロネクチン (Fn) 結合タンパクFnbpAと約70%の相同性を示すことが明らかとなった。全長ならびに各種Fbaドメインのリコンビナントタンパクを構築しFn結合能を検索したところ、繰り返し領域を介してFnと結合することが示された。

さらに、これら各種Fbaドメインを用いたマウス免疫実験 (6週齢、メス、BALB/cマウス:n=10) を行ったところ、Fba全長およびFn結合機能ドメイン

免疫群で有意に血清中のFba特異的抗体価の上昇が認められた(図3A)。さらに、引き続き行った致死量のGAS接種に対しても、これらの免疫群はGST免疫コントロール群に比して高い感染防御効果を示した(図3B)。

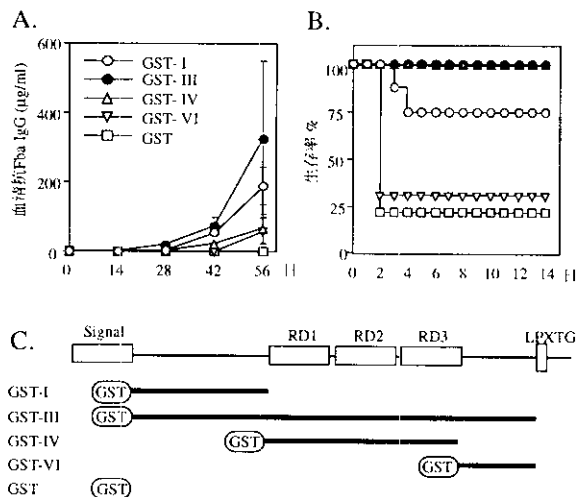


図3 A. 各種Fba領域免疫マウスの血清IgG抗体価の変動。B. 各種Fba領域免疫マウスへのGAS感染後の生存率。C. 各種Fba領域の作製。

D. 考察

既報のGASのFnおよびLm結合タンパクは宿主細胞への付着・侵入に関与することが報告されていることから、Fba, Lbpの欠失株を作製しヒト咽頭上皮由来のHEp-2細胞への付着・侵入率を測定した。その結果、FbaおよびLbp欠失株は親株に比して有意に付着率が低下した。また、侵入率に関してもFba欠失株は親株より有意に低い値を示した(図4)。

宿主に感染したGASは、菌体表層のMタンパク, Fba, FBP54, Lbpなどの働きで咽頭上皮などの細胞に付着・侵入し、全身に伝播すると考えられる。そこで、感染の初期段階の付着・侵入を阻害するために、Fba, Lbpに着目し感染防御抗原としての可能性を検索した。マウスを用いた実験で、Fbaは特異的抗体を誘導し、その後のGAS感染に対しコントロール群に比して高い生

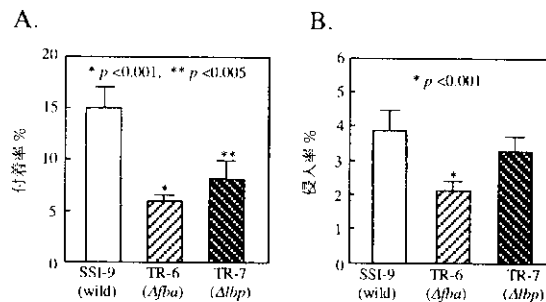


図4 A. 各種遺伝子欠失株のヒト咽頭上皮細胞HEp-2株への付着率。B. 各種遺伝子欠失株のHEp-2細胞への侵入率。

存率を示したことから、GASの感染初期に働くFn結合タンパクFbaは将来のワクチンとしての可能性を有することが示唆された。

E. 結論

ラミニン(Lm)結合タンパクLbpは細胞外マトリックスタンパク(ECM)のLmと結合し、宿主細胞への付着に関与することが示された。

また、フィブロンectin(Fn)結合タンパクFbaは繰り返し領域でECMのFnと結合し、上皮細胞への付着と侵入を亢進することが明らかとなった。さらに、FbaはA群レンサ球菌感染に対して防御抗原として機能し得ることがマウス実験モデルで示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) I. Nakagawa, M. Nakata, S. Kawabata, and S. Hamada: Cytochrome *c*-mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes*-infected epithelial cells. **Cell Microbiol.** 3: 395-405. 2001.
- 2) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, J. Murakami, I. Nakagawa, and S. Hamada: Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells, and *fba* gene is positively transcribed under the Mga regulator. **Mol Microbiol.** 42: 75-86. 2001.

- 3) S. Okamoto, S. Kawabata, I. Nakagawa, and S. Hamada: Administration of superantigens protects mice from lethal *Listeria monocytogenes* infection by enhancing cytotoxic T cells. **Infect Immun.** 69: 6633-6642. 2001.
 - 4) Y. Terao, S. Kawabata, E. Kunitomo, I. Nakagawa, and S. Hamada: Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells. **Infect Immun.** 70: 993-997. 2002.
 - 5) J. Murakami, S. Kawabata, Y. Terao, K. Kikuchi, K. Totsuka, A. Tamaru, C. Katsukawa, K. Moriya, I. Nakagawa, I. Morisaki, and S. Hamada: Distribution of *emm* genotypes and superantigen genes of *Streptococcus pyogenes* isolated in Japan from 1994 to 1999. **Epidemiol Infect.** (印刷中)
2. 学会発表
- 1) S. Kawabata, Y. Terao, I. Nakagawa, and S. Hamada: Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein, Fba, of *Streptococcus pyogenes*. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20+24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 2) I. Nakagawa, M. Nakata, S. Kawabata, and S. Hamada: Cytochrome c mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in *Streptococcus pyogenes* infected epithelial cells. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20-24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 3) M. Nakata, I. Nakagawa, S. Kawabata, and S. Hamada: Overexpression of Bcl-2 can protect *Streptococcus pyogenes* infected epithelial cells from apoptotic cell death. 101th General Meeting of American Society for Microbiology. May 20-24, 2001. Orlando, FL, USA.
 - 4) Y. Terao, S. Kawabata, I. Nakagawa, and S. Hamada: Fba, a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus pyogenes*, promotes bacterial entry into epithelial cells. 1st Awaji International Forum on Infection and Immunity. August 19-21, 2001. Awaji Island, Hyogo, Japan.
 - 5) 寺尾豊, 川端重忠, 中川一路, 浜田茂幸: A群レンサ球菌新規菌体表層タンパクの感染防御抗原としての可能性. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 6) 村上旬平, 川端重忠, 中川一路, 天野敦雄, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes* の細胞付着・侵入における唾液成分PRPの促進作用. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 7) 田村康治, 村上旬平, 川端重忠, 浜田茂幸: A群レンサ球菌の免疫グロブリン結合タンパクSib38の性状および免疫応答. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 8) 富安祐介, 中川一路, 中田匡宣, 川端重忠, 浜田茂幸: EGFP高発現A群レンサ球菌を用いた宿主細胞への付着・侵入能の解析. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 9) 赤池孝章, 宮本洋一, 川端重忠, 浜田茂幸, 前田浩. A群レンサ球菌のブラジキニン分解酵素. 第74回日本細菌学会総会. 2001年4月2-4日, 岡山.
 - 10) 岡本成史, 川端重忠, 中川一路, 奥野良信, 浜田茂幸: インフルエンザウイルスおよびA群レンサ球菌混合感染により引き起こされる劇症型感染症発症のメカニズム. 第10回レンサ球菌研究会. 2001年6月30-7月1日, 岐阜.
 - 11) 村上旬平, 川端重忠, 中川一路, 天野敦雄, 浜田茂幸: *Streptococcus pyogenes*のPRP結合タンパクの同定. 第54回日本細菌学会関西支部総会. 2001年10月27-28日, 津.
 - 12) 岡本成史, 川端重忠, 中川一路, 奥野良信, 浜田茂幸: インフルエンザウイルス及びA群レンサ球菌混合感染により引き起こされる劇症型感染症発症とそのメカニズム. 第49回日本ウイルス学会. 2001年11月18-20日, 大阪.