

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

Streptococcal pyrogenic exotoxin-B のモルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用  
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

(分担) 研究者 大国 寿士 メデカ・ジャパン総合研究所 所長

研究要旨 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の際に起こるショック病態の誘発因子を明らかにし、併せて治療法の確立を目的として、以下の研究が試みられた。その結果、本菌の産生する発熱毒素の一つである Streptococcal pyrogenic exotoxin-B/streptococcal cysteine protease (SPE B/SCP) の組み換え体 (rSPE B/SCP) を作製し、これをモルモットの皮内に注射することにより、毛細血管透過性亢進作用が惹起され、この透過性亢進作用は抗ヒスタミン剤により抑制され、rSPE B/SCP の加熱処理 (65 °C, 30 分) により、また cystein protease 特異的阻害剤である E64 によっても抑制された。一方、rSPE B/SCP をヒトマスト細胞腫から樹立された HMC-1 に作用させることにより、HMC-1 から脱顆粒と共に、濃度依存的にヒスタミンが遊離され、また細胞内への Ca influx が観察された。なお、毛細血管透過性亢進作用は SPE A, SPE C, LPS には認められず、ヒスタミン遊離作用も観察されなかった。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症においては敗血症性ショック病態が惹起されるが、このショック病態が如何なる機序により成立しているかは明らかでない。私共はアナフィラキシーショックにアナロジーを求め、A 群レンサ球菌の産生する SPE B/SCP のヒトマスト細胞腫、HMC-1 に対するヒスタミン遊離作用について rSPE B/SCP を用いて検討し、また、モルモット皮膚に対する毛細血管透過性亢進作用について検討した。

B. 研究方法

1) 組み換え体 SPEB/SPC の作製 :

前年度に報告した方法により、組み換え体 SPE B/SCP (rSPE B/SCP) を作製

し、DEAE-Sephadex CL-6B, Matrix gel Red A 並びに Sephadex G-50 の各種クロマトグラフィーを用いて精製した。

2) cysteine protease 活性の測定 :

1 mM の DTT 存在下、ないしは非存在下で Azocaseine assay により、casein 分解活性から検討した。

3) モルモットに対する血管透過性亢進作用の検討 :

モルモット皮内に天然型 SPE B/SCP (nSPE B/SCP) (16  $\mu$ g/ml) ないしは rSPE B/SCP (4  $\mu$ g/ml) をそれぞれ 0.1 ml 注射し、5 分後に 0.5 % Evans blue を 0.6 ~ 0.8 ml 静注した。30 分後モルモットを心臓刺穿により屠殺し、皮膚を剥離後、裏面より注射部位からの色素の漏出を観察した。対照として市販の SPE A, SPE C, LPS (各 10  $\mu$ g/ml) の

毛細血管透過性亢進作用についても検討した。

また cysteine protease 特異的阻害剤である E64, Box-LVG-CHN2 (各 10 mM) と rSPE B/SCP との混合液を同様に皮内注射し、これら阻害剤の影響を検討した。

4) 抗ヒスタミン剤による血管透過性抑制作用 :

モルモット腹腔に Diphenhydramine-HCl を 1 mg/kg の濃度で投与し、25 分後に nSPE B/SCP (16  $\mu$ g/ml)、rSPE B/SCP (4  $\mu$ g/ml)、histamine (10  $\mu$ g/ml)、bradykinin (10  $\mu$ g/ml) を皮内注射し、5 分後に 0.5 % Evans blue を 0.6~0.8 ml 静注した。30 分後上記したと同様にモルモットを屠殺し、皮膚を剥離後、裏面より注射部位からの色素の漏出を観察した。

5) rSPE B/SCP による HMC-1 からのヒスタミン遊離と脱顆粒 :

ヒトマスト細胞腫より樹立された HMC-1 (Mayo Clinic の Dr. Butterfield より恵与) を 10 % FCS, 1.2 mM alpha thioglycerol を含む Iscove's modified Dulbecco's medium (Sigma) で 5~7 日間、カルチャーボトルで培養し、その後 Tyrode's 溶液で洗滌後、同溶液で  $1 \times 10^6$  cells/ml に調整した。この細胞浮遊液に各種濃度の rSPE B/SCP (2~20  $\mu$ g/ml) を添加し、37  $^{\circ}$ C、20 分反応後遠心、その培養上清中のヒスタミン濃度を ELISA kit を用いて定量した。

6) rSPE B/SCP による HMC-1 からの脱顆粒の形態学的観察 :

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た。

7) rSPE B/SCP による HMC-1 への Ca influx :

rSPE B/SCP で刺激した HMC-1 への Ca influx は fura-2 acetoxymethyl ester を用いて測定した。

## C. 研究結果

nSPE B/SCP に比し、rSPE B/SCP は強い cysteine protease 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、ないしは cysteine protease 特異的阻害剤である E64、Box-LVG-CHN2 により抑制された。なお、SPE A, SPE C 並びに LPS には毛細血管透過性亢進作用は認められなかった。

抗ヒスタミン剤である diphenhydramine 塩酸塩での前処理により 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、cysteine protease 活性が強かったためか、完全には抑制されなかった。

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、濃度依存的ヒスタミンが遊離され、また形態学的に脱顆粒が観察された。なお、SPE A ないしは LPS の刺激によるヒスタミン遊離は観察されなかった。

一方、HMC-1 に rSPE B/SCP を加えると、細胞内への Ca の流入が認められ、この反応もまた濃度依存的であった。

## D. 考察

これまでに私共は菌体の培養上清から精製した nSPE B/SCP はヒト臍帯血から得られた培養マスト細胞、同好塩基球に対しヒスタミン遊離能を持つこと、nSPE B/SCP 並びに新たに作製された rSPE B/SCP にはモルモット皮膚に対し毛細血管透過性亢進作用のあることなどを報告してきた。今回は前年度に引き続き、rSPE B/SCP の毛細血管透過性亢進作用についてさらに検討した。その結果、この反応は cysteine pronase 阻害剤並びに抗ヒスタミン剤に

よって抑制されることから、透過性亢進作用は pronase 活性を介して惹起され、その亢進作用にはメデイエーターとして、ヒスタミンが関与していることを示唆する。この透過性亢進作用は LPS 並びにスーパー抗原活性を有する SPE A、SPE C に認められず、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 では認めることは出来なかった。

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は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だろう。それ故、マスト細胞ないしは好塩基球膜表面に存在するであろう protease-activated receptor に対する rSPE B/SCP の作用を介しての細胞内 Ca イオンの動きを検討する必要があるだろう。

すでに私共は劇症型レンサ球菌感染症患者血漿中にヒスタミンが増量する症例のあることを観察しており、今回の実験結果を考慮し、その治療に当たっては抗ヒスタミン剤をはじめとする、いわゆるケミカルメデイエーターに対する拮抗剤を投与する必要のあることを示唆していよう。

#### E. 結論

1) rSPE B/SCP のモルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用は cysteine protease 特異的阻害剤並びに抗ヒスタミン剤により抑制された。

2) モルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用は LPS 並びにスーパー抗原活性

を有する SPE A、SPE C には認められなかった。

3) rSPE B/SCP でヒトマスト細胞腫から樹立された 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、また形態学的に脱顆粒が観察された。

4) このヒスタミンの遊離の際には Ca イオンの流入が観察された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Morishita, M., Yamahatsu, S., Yoshino, S., Ohkuni, H. and Nagashima, M.: Streptococcal toxic shock syndrome in a patient with rheumatoid arthritis. Clin. Exp. Rheumatol. 2001; 19: 231-232.

2) Sakurada, S., Katano, H., Sata, T., Ohkuni, H., Watanabe, T. and Mori, S.: Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission. J. Virol. 2001; 75: 7717-7722.

3) 渡邊ユキノ：A 群レンサ球菌の産生する発熱毒素 - B の遺伝子クローニングと組み換え蛋白 (recombinant SPE B/SCP) の発現に関する研究. 日本医大誌. 2001; 68 : 222-232

4) 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: 808-819

5) 大国寿士：A 群レンサ球菌感染症について. Le Depart (ルデパール) 2001; No. 19

6) 大国寿士：(分担) 「免疫学辞典」 第2版 (大沢利昭、小山次郎、奥田研爾、矢田純一 編) 2001; p.79, p.79, p.148, p.468, p.633, p.668, 東京化学同人社

7) 厚生省科学研究費補助金 (新興・再興感染症事業) 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（研究代表者：浜田茂幸）  
平成 12 年度総括・分担研究報告書

## 2. 学会発表

- 1) 渡邊ユキノ、留目優子、加藤晃子、齊藤栄一、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, 6. 岐阜
- 2) 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, 7. 東京
- 3) (特) 大国寿士：溶連菌研究～最近の進展～ 第 253 回日本小児科学会神奈川県地方会. 2001 (横浜)
- 4) (シ) Ohkuni, H., Watanabe, Y., Todome, Y., Takahashi, H., Ohkura, K., Nagamune, H. and Hishina, Y.: Cloning and domain expression of *Streptococcus mitis*-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) gene in *Escherichia coli*. The Seventh International Kawasaki Disease Symposium, 2001 (Hakone, Japan)
- 5) 大国寿士、渡邊ユキノ、留目優子、櫻田紳策、高橋秀実、齊藤博久：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 (大阪)
- 6) 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. 2002 (大阪)
- 7) 宮本洋一、赤池孝章、前田浩、川

端重忠、浜田茂幸、渡邊ユキノ、大国寿士：組み換え GAS ペプチダーゼおよびプロテアーゼの作製とその生物効果の検討. 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)

(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

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パー抗原の検出

分担研究者 内山 竹彦 東京女子医科大学教授

**研究要旨** 劇症型レンサ球菌感染症の起原因菌や A 群以外にも *Streptococcus dysgalactiae* や *Streptococcus canis* が関わっていることを示し、前者より新規のスーパー抗原を発見した。

A. 研究目的

劇症型 A 群レンサ球菌感染症は致死性の高い感染症であり、その克服が待たれている。本研究課題では劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病原因子の検索と発症機序の解明に焦点を当てて解析を進めた。また、A 群レンサ球菌以外のレンサ球菌によっても劇症型感染症が惹起されるので、それらの菌種からの病原因子の検索もおこなった。

B. 研究方法

1) *Streptococcus dysgalactiae* 分離株からのスーパー抗原の精製とスーパー抗原遺伝子のクローニング、2) In vitro 培養系において、A 群レンサ球菌による SLO (streptolysin O) 産生における SpeB (streptococcal pyrogenic exotoxin B) の影響、3) 新規の蛋白質 Protein F-homologous protein (PFHP) の機能解析、4) 劇症型分離菌株ワクチンの開発の試み。

倫理面への配慮

患者症例の解析においては個人の情報の漏出が無いように努めた。

C. 研究結果

1) 新規のスーパー抗原 *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM) の発見：*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) からなる蛋白をコ

ードする。自然 SDM とヒスチジンタグが付いた組み換え体のいずれも、MHC クラス II 分子を表現した抗原提示細胞の存在下にヒト  $\text{V}\beta 1^+$  T 細胞と  $\text{V}\beta 23^+$  T 細胞を活性化する。立体構造は SpeC (streptococcal pyrogenic exotoxin C) と類似しており、分子の中央部分にいくつかの  $\alpha$ -ヘリックス構造と左右の  $\beta$  シート構造から構成されている。ウサギに浸透圧ポンプに封入して投与すれば、致命的に作用する。

2) 犬咬症後の *Streptococcus canis* による敗血症の臨床報告：犬に咬まれた後、敗血症になった患者解析したところ、*Streptococcus canis* が起炎菌として同定された。

3) SpeC の SLO 産生におよぼす影響：これまでの A 群レンサ球菌分離株の SLO 産生の解析において、われわれは、培養液中の SLO 濃度が高い菌株は低 SpeB 産生であり、SLO 濃度が低いときは逆に高 SpeB 産生株であることに気づいた。他の毒素、たとえば SpeA や SpeC の濃度は SpeB の濃度と相関は見られなかった。SpeB は蛋白分解酵素であり、産生された SLO を選択的に破壊していると思われる。

4) 新規の蛋白質 Protein F-homologous protein (PFHP)：現在 PFHP の機能については解析を続行中である。

5) A 群レンサ球菌のワクチンの開発：各種分離菌株をマウスに免疫して、ワクチンとして最も有効な菌株を検索中である。

D. 考察

来年度には病原性因子のより明確な同定と、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菌株の分布を解析しなければならない。

#### G. 研究発表

##### 論文発表

1. 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, 2001.
2. 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<sup>+</sup> T cells. *J. Biol. Chem.* 276: 17455, 2001.
3. 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, 2001.
4. 張華、藤巻わかえ、今西健一、内山竹彦 ヒト末梢血の CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup> 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 *東京女子医大誌* 71:29, 2001.
5. H. Kato, N. Takahashi, Y. Arimura, K. Imanishi, H. Nishida, and T. Uchiyama. Superantigen-reactive Vβ2<sup>+</sup> T cells exhibit a significant reduction before their massive increase in some acute phase patients with TSS-like exanthematous disease. *J. Infect. Chemother.* 印刷中。
6. Y. Arimura, H. Kato, U. Dianzani, T. Okamoto, S. Kamekura, D. Buonfiglio, T. Miyoshi-Akiyama, T. Uchiyama, and J. Yagi. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in Th cells and regulates their responses. *Int. Immunol.* 印刷中
7. L. Chen, M. K. Imanishi, Koyanagi,

K. Fukada, J. Yagi, H. Kato, T. Miyoshi-Akiyama, K. Miwa, R. Zhang, and T. Uchiyama. Continuous exposure of mice to superantigenic toxins induces a high-level protracted expansion and an immunological memory in the toxin-reactive CD4<sup>+</sup> T cells. *J. Immunol.* 印刷中

##### 総説論文

- 1 三好(秋山)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. 蛋白質 核酸 酵素 「生物間の攻撃と防御の蛋白質」(内山竹彦他編) 46:567, 2001.
- 2 内山竹彦 スーパー抗原性細菌毒素と疾患. *最新医学* 56: 2468, 2001.
- 3 内山竹彦 トキシックショック症候群とスーパー抗原性細菌毒素. *エンドトキシン研究* 4: 13, 2001.
- 4 内山竹彦、高橋尚人、今西健一、仁志田博司. 新生児の MRSA 感染症;新生児 TSS 様発疹症 (NTED) とスーパー抗原. *感染 炎症 免疫* 31: 34, 2001.
- 5 内山竹彦 微生物由来スーパー抗原と感染症の発症 - T 細胞に生体障害を強いる抗原. *科学と生物* 39: 434, 2001.
- 6 内山竹彦 細菌性スーパー抗原とトキシックショック症候群 - T 細胞活性化作用と利用した研究室での早期診断 *ICU と CCU* 25: 323, 2001.
- 7 内山竹彦 スーパー抗原の病原性についての新しい動き. *クローン病とインスリン依存性糖尿病の発症機序にスーパー抗原が関与するか.* *医学のあゆみ* 印刷中
- 8 内山竹彦 黄色ブドウ球菌由来スーパー抗原性毒素 - 毒素性ショック症候群とエンテロトキシン. *細菌毒素ハンドブック* (櫻井純他編) 印刷中

##### 学会発表

1. 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マイ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 (平成 13 年 4 月 2-4 日) *日本細菌学雑誌* 56: 147, 2001

2. 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、およびそれらの劇症型 A 群連鎖球菌感染症における役割 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56: 152, 2001.
3. 陳露秋、今西健一、小柳円、加藤秀人、八木淳二、秋山徹、三和敬史、内山竹彦 マウスにスーパー抗原の連続投与は応答性 T 細胞に免疫記憶を惹起する。 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56: 179, 2001.
4. 藤巻わかえ、八木淳二、今西健一、内山竹彦 細菌性スーパー抗原によるヒト T 細胞活性化におけるシグナル伝達機構、 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56: 204, 2001.
5. 今西健一、小柳円、加藤秀人、内山竹彦 ヒト胸腺細胞に対する抗体の作成 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56: 211, 2001.
6. 加藤秀人、今西健一、菊池賢、三和敬史、戸塚恭一、内山竹彦 MRSA による新興感染症 NTED の発症機序、国内発生状況、起炎菌の国内分布 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56: 212, 2001.
7. 小柳円、今西健一、八木淳二、内山竹彦 マウス個体の成熟に伴う CD4-single positive T 細胞の細菌性スーパー抗原応答性の変化 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56:304, 2001.
8. 有村裕、加藤秀人、内山竹彦、八木淳二 T 細胞の活性化における H4/ICOS の役割 第 7 4 回日本細菌学会総会(平成 13 年 4 月 2-4 日) 日本細菌学雑誌 56:304, 2001.
9. 岡本俊宏、八木淳二、斎藤聖二、山中寿、戸松泰介、鎌谷直之、今西健一、有村裕、深田健治、扇内秀樹、内山竹彦 活性化 T 細胞 co-stimulator H4/ICOS の慢性関節リウマチ患者における発現および機能の解析 第 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 55, 2001.
10. 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 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 135, 2001.
11. 張華、藤巻わかえ、今西健一、内山竹彦 ヒト末梢の CD4<sup>+</sup>T 細胞と CD8<sup>+</sup>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 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 135, 2001.
12. 今西健一、加藤秀人、小柳円、瀬尾和宏、今井康晴、内山竹彦 ヒト胸腺内の CD4 シングル・ポジティブ T 細胞のサブセットの解析 第 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 154, 2001.
13. 陳露秋、今西健一、八木淳二、小柳円、加藤秀人、三好(秋山) 徹、三和敬史、内山竹彦 マウスに持続的にスーパー抗原を投与すると、応答性 T 細胞は持続的な増幅と免疫記憶(Th2 タイプ)を誘導する 第 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 250, 2001.
14. 有村裕、加藤秀人、小柳円、内山竹彦、八木淳二 T 細胞補助受容体 ICOS/H4 からのシグナルの機能解析 第 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 299, 2001.
15. 八木淳二、有村裕、加藤秀人、岡本俊宏、秋山徹、内山竹彦 活性化 T 細胞補助シグナル分子 H4/ICOS とマウス Th 細胞分化 第 3 1 回日本免疫学会総会・学術集会(平成 13 年 12 月 11-13 日) 日本免疫学会総会・学術集会記録 31: 299, 2001.
16. 陳露秋、今西健一、八木淳二、小柳円、加藤秀人、三好(秋山) 徹、三和敬史、

内山竹彦 マウスに持続的にスーパー抗原を投与すると応答性 T 細胞は持続的な増幅と免疫記憶 (Th2 タイプ) を誘導する 第 8 4 回日本細菌学会関東支部総会 講演抄録集 4 3

17. 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 8 4 回日本細菌学会関東支部総会 講演抄録集 4 5

18. 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 2 1 回川崎病研究会 (平成 13 年 9 月 14-15 日) 抄録集 3 5

19. 内山竹彦 細菌性スーパー抗原による感染症の発症機序とその早期発見 第 2 9 回日本救急医学会ランチョンセミナー平成 13 年 11 月 7 日

20. 加藤秀人、三木瑞香、伊地知律子、高橋尚人、上野英樹、斎藤理恵、戸塚恭一、仁志田博司、太田博明、内山竹彦 第 4 6 回ブドウ球菌研究会 (平成 13 年 9 月 6-7 日) プログラム・講演抄録集

21. 内山竹彦 MRSA 小児感染症とスーパー抗原性毒素 第 5 回東海小児感染症研究会 (平成 13 年 10 月 20 日) 特別講演

22. 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.

23. K. Imanishi, H. Kato, K. Seo, M. Koyanagi, Y. Imai, and T. Uchiyama. Study of post-thymic development of human CD4<sup>+</sup> T cells by using TSST-1 as an antigen. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001. Abstracts for Thursday 24.

24. T. Uchiyama, N. Takahashi, H. Kato, K. Imanishi, K. Miwa, S. Yamanami, and 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. Abstracts for Thursday 43 25. L. Chen, K. Imanishi, M. Koyanagi, J. Yagi, and T. Uchiyama. Induction of protracted expansion and memory-type responses in superantigen SEA-reactive CD4<sup>+</sup> T cells in mice continuously exposed with SEA for a long period. Eleventh Internat. Cong. Immunol. 22-27 July, 2001. Abstracts for Thursday 44.



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  
協力研究者 池辺 忠義, 和田 昭仁

**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。我々は、TSLS のみられなかった 1980 年以前の株と TSLS のみられるようになった 1990 年代の株の染色体 DNA について比較検討した結果、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ることが判明した。この挿入領域には、発熱毒素である SpeC の C 末と 48% の相同性のある ORF (SpeL) が存在することが判明した。蛋白質の一次構造を比較した結果、SpeL はスーパー抗原であることが考えられた。

A. 研究目的

我が国では、1990 年代前半から *Streptococcus pyogenes* により引き起こされる致死性の高い劇症型溶血性レンサ球菌感染症 (TSLS) が注目されている。我が国における *S. pyogenes* の疫学調査的調査によると、TSLS は主として M1 型ならびに M3 型によって引き起こされ、1993 年から 1994 年に咽頭炎由来の M3 型が急激に増加するに伴い、TSLS 症例も増加したことが示されている。M1 型の病原性に関する知見は多く蓄積されてきたが、M3 型に関する情報は限られている。我々は、TSLS のみられなかった 1980 年以前に分離された M3 型株と 1990 年代に増加した M3 型株との間の遺伝的変化について検討した。

B. 研究方法

1. パルスフィールド電気泳動

制限酵素として *SmaI* を用いた。対象菌株は、1980 年以前に分離された M3 型株 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 株である。

2. differential hybridization

*S. pyogenes* NIH1 株のゲノム DNA を *Sau3AI* で切断後、 $\lambda$ DashII の *BamHI* 部位にクローニングし、ライブラリーを製作した。このライブラリーを膜に転写し、一次スクリーニングとして、K23 株のゲノム DNA を *SmaI* 消化したときに生ずる 260 kb の DNA 断片を、二次スクリーニングとして、NIH1 株のゲノム DNA を *SmaI* 消化したときに生ずる 300 kb の DNA 断片をプローブとしてブランクハイブリダイゼーションを行った。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ブランクを選択した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用した菌株から分離された患者の個人名はもちろん、生年月日の月日、市町村レベルの居住地、診察した医療機関、詳細な臨床データ等の情報は一切存在せず、連結不可能匿名化がなされている。

### C. 研究結果

1980 年以前に分離された M3 型株 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 年以前の株の持つ 260 kb の断片が、40-45 kb 伸長しているというデータを得た。この領域を differential hybridization によりクローニングした。この領域の塩基配列を決定した結果、1990 年代の菌株には、新たに *attL-attR* にはさまれる 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持っていた。また、この領域の一端に、発熱毒素である *SpeC* の C 末端側とアミノ酸配列で 48%、スーパー抗原である *SmeZ-2* と 46% 相同性のある ORF が存在していた。この ORF は、既知の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、さらに、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ていた。この *speL* は、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、*SpeL* は、馬に対して病原性を示す *Streptococcus equi* の持つ ORF とアミノ酸配列になおして 98% の相同性があり、この菌から水平伝播された可能性が考えられた。

### D. 考察

*speL* 遺伝子は、1990 年代に流行した A 群溶血性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 template phage 上にコードされていた。A 群溶血レンサ球菌での *speL* 遺伝子の分布を調べたところ、他の M 型にはこの遺伝子を見出すことはできなかった。しかしながら、全塩基配列が決定されている SF370 (M1 型) のなかにも、template phage 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 年代から見られるようになった劇症型溶血性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。

### E. 結論

- 1) 1990 年代の M3 株は、41,796 bp のファージ様 DNA 断片を獲得していた。
- 2) この中には、発熱毒素である *SpeC* と相同性のある ORF (*SpeL*) が存在する。

### F. 研究発表

#### 学会発表

- 1) 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。

#### 論文発表

- 1) Ikebe, T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., Tamura, A., Fujinaga, Y., Abe, Y., Shimizu, Y., Watanabe, H., and The working group for group A streptococci in Japan. Dissemination of the phage-associated novel superantigen-like gene *speL* in recent T3/M3 *Streptococcus pyogenes* isolates in Japan. (submitted)

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菌感染症を引き起こしたG群、C群レンサ球菌株の分析

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** 約3000病院施設に劇症型レンサ球菌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。男21名、女12名で、年齢は6ヶ月から86歳まで広い範囲にわたり、うち18例については詳細な臨床データを得て、解析を行い、最新の日本における劇症型レンサ球菌感染症の臨床像が得られた。生存症例で行われた治療は、今後の治療指針に役立つものであると考えられた。劇症型感染症を引き起こした、今まで分類が未確定であったG群、C群レンサ球菌を入手し、過去において報告のある株とあわせて臨床学的、細菌学的検討を行った。一つの症例は *S. equi* subsp. *zooepidemicus* による劇症型感染症であり、これは世界で初めての症例であった。またG群、C群レンサ球菌においてはA群レンサ球菌において見出されているスーパー抗原がほとんど検出できず、劇症型感染症の発症メカニズムの新たな可能性を示唆した。

A. 研究目的

劇症型レンサ球菌感染症(toxic shock-like syndrome, T S L S)は、数時間～数日という極短期間のうちに病状が悪化するため治療が遅れ、死亡率が30～40%と高く、また、運良く生存しても慢性腎不全などの重い後遺症を残すことが多い。この疾患の早期診断と適切な治療法の開発が望まれているがいまだ十分なものは存在しない。現在の日本におけるこの疾患の発生状況を把握し、さらにそこで行われた診断、治療を検証し、今までの診断基準、治療指針の改善に努めることは重要なことである。そこで全国の基幹病院に劇症型レンサ球菌感染症のアンケートを実施した。さらに劇症型レンサ球菌感染症の原因菌としてA群レンサ球菌が知られているが、近年それ以外のレンサ球菌でも同じような病態を示す症例が報告されている。今回、T S L Sを引き起こしたG群ならびにC群レンサ球菌について、菌の同定ならびに薬剤感受性試験、M typing、PCRによるスーパー抗原の検出、パルスフィールドゲル電気泳動(P F G E)、二次元電気泳動による分泌タ

ンパク質の分析を行い、A群レンサ球菌との比較も含めて劇症型レンサ球菌感染症発生のメカニズムを検討した。

B. 研究方法

1. 劇症型レンサ球菌感染症全国アンケート

全国約3000の救急指定、あるいは特定疾患指定病院に往復はがきにより、平成12年度における劇症型レンサ球菌感染症の有無と、患者の年齢、性別、死亡・生存、臨床症状の概略のアンケートを実施した。感染症有りとの返答を得た施設に対してはさらに詳細なアンケート、即ち、患者の既往歴、前駆症状、発症から入院までの経過、血液データ、抗生物質の種類、量を含めた治療方法のアンケートを行った。一部には平成13年度の発症例も存在したが、まとめて解析することとした。

2. G群ならびにC群レンサ球菌株の分析

菌の同定：16S rDNAの分析とrapid ID 32 STREP (bioMérieux)により同定した。薬剤感受性試験：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 (MicroScan; DADE BEHRING) で調べた。M typing : CDC のホームページに記載されている方法で行った。スーパー抗原の検出 : *speA, B, C, F, H, I, J, mf-2, mf-3, smeZ, spegg* に対するプライマーを用い、PCR で各スーパー抗原の検出を行った。P F G E制限酵素に *SmaI* を用い、Gene Navigator Pulsed Field System(Amersham Pharmacia Biotech)で行った。二次元電気泳動 : 羊血液寒天培地で 37°C 一晚培養した後、Yeast extract を 0.3% 添加したブレインハートインフュージョン培地 50ml に 1 コロニー接種し、37°C で 16 時間振とう培養した。培養上清からタンパク質を抽出し、IPGphor 法 (IPGphor Isoelectric Focusing system) を用いて一次元目の泳動を行い、SDS-PAGE で二次元目の泳動を行った。

### C. 研究結果

#### 1. 劇症型レンサ球菌感染症全国アンケート

全国で男性 21 人、女性 12 人の発症を認めた。そのうちそれぞれ 7 人 (33%)、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 歳以上では死亡数が半数 (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の低下、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指針を採用している施設は少なかった。

#### 2. G 群ならび C 群レンサ球菌株の分析

菌の同定 : 13 株のうち 12 株は *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*、1 株は *S. equi* subsp. *zooepidemicus* と同定した。薬剤感受性試験 : 13 株のうち 2 株が、エリスロマイシンに 1 株がクリンダマイシン、2 株がクラリスロマイシンに耐性で

あった。また半数以上の 7 株がテトラサイクリンに耐性であった。M typing : 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見られなかった。スーパー抗原の検出 : *speA, B, C, F* 遺伝子など A 群レンサ球菌でしばしば見出されるの増幅は見られなかった。しかし *speG* とホモロジーのある *spegg* が認められた。P F G E : 解析した 8 株のうち 2 株が同じ泳動パターンを示した。二次元電気泳動 : 多くのタンパク質スポットのパターンを示す株もある一方、スポットの数、量とも少量のパターンを示す株もあった。しかし、総じて酸性側に多くのタンパク質のスポットが見られた。また P F G E で同一のパターンを示した株のパターンは酷似していた。

### D. 考察

今回の全国調査によっても劇症型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。ひとつには過去に提唱された治療指針が十分に啓蒙されていない可能性が考えられる。

我々の G 群ならびに C 群レンサ球菌株の分析はその存在そのものもあまり知られていない病態であるが、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。一つには A 群レンサ球菌で見出されるいわゆるスーパー抗原の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* と類似の遺伝子が見出されたことより、A 群レンサ球菌と類似し PCR には同定しえなかったスーパー抗原遺伝子が存在し、病態に関連している可能性

も考えられる。

#### E. 結論

今年度実施したアンケートに加えて、来年度さらにはその後の継続的な調査により日本における劇症型レンサ球菌感染症の確固たる治療指針を確立し、それを全国に啓蒙していくことが、実験室レベルの研究に加えて、この極めて重篤な感染症に対する有効な手段ということができよう。また我々のG群ならびにC群レンサ球菌の研究により新たな劇症型レンサ球菌感染症の病態解明への示唆が与えられた。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) Hasegawa, T., Torii, K., Hashikawa, S., Iinuma, Y. and Ohta, M. Cloning and characterization of the deoxyribonuclease *sdx* gene from *Streptococcus pyogenes*. *Curr. Microbiol.* in press.

2) Hasegawa, T., Torii, K., Hashikawa, S., Iinuma, Y. and Ohta, M. Cloning and characterization of two novel DNases from *Streptococcus pyogenes*. *Arch. Microbiol.* in press.

##### 2. 学会発表

1) 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 岡山 平成13年4月

2) 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 金沢 平成13年10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

劇症型感染症における GAS プロテアーゼによるアポトーシスの抑制療法の検討

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、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した。さらに、誘導型 NO 合成酵素 (iNOS) 欠損マウスを用いて劇症 A 群レンサ球菌感染症モデルを作製し、感染病態における NO の役割を解析した。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 細胞にアポトーシスを誘導した。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することを示唆する。また、iNOS 欠損マウスで、敗血症病態が著明に増悪したことから、NO の感染防御作用が示唆された。さらに、本劇症感染モデルの病態に matrix metalloproteinase が関与することが示唆された。一方、*S. pyogenes* は BK 分解酵素を恒常的に発現していることが分った。

A. 研究目的

劇症 A 群レンサ球菌 (GAS) 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。我々が経験した劇症レンサ球菌感染症の一例において、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。

これらの知見は、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。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その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するとともに、劇症感染モデルを作製し、特に、NO および matrix metalloproteinase (MMP) に注目して病態の解析を行った。

一方、SPE-B は宿主のブラジキニン (BK) 産生を促進することが知られてい

るが、我々は、*S. pyogenes* が逆に強力な BK 分解活性を有していることを報告してきた。そこで今回、レンサ球菌性 BK 分解酵素についても、その組み換えタンパクおよびその抗体を作製した。

## B. 研究方法

### 1. GAS プロテアーゼによるアポトーシス誘導機構の解析

GAS プロテアーゼとして、組み換え SPE-B プロテアーゼを用いて、同プロテアーゼによるアポトーシス誘導機構を解析検討した。渡邊、大国先生(日本医大)より供与いただいた pSK-SPC を用いて SPE-B cDNA を調製、発現ベクターを作製した。さらに SPE-B や *Serratia marcescens* 56 kDa プロテアーゼ、および *Pseudomonas aeruginosa* エラスターゼによりヒト単球様 U937 細胞にアポトーシス(細胞死)を誘導した。また、アポトーシス誘導機序解明のため、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、hsp70 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 blot 法により解析した。

### 2. BK 分解酵素の同定

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構造を持つ *S. pyogenes* 遺伝子(PepA)の発現ベクターを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いただき、組み換え蛋白(rPepA)を大量調製した。rPepA の BK 分解特性について、LC-MSにより解析した。また、rPepA によるサブスタンス P およびアンジオテンシン II の分解も同様に検討した。さらに、rPepA をウサギに免疫し、抗 PepA ポリクローナル抗体を取得した。同抗体を用いた Western blot 法により、種々の *S. pyogenes* 株における PepA 発現の有無を検討した。

### 3. GAS 感染病態における NO および MMP の役割の解析

大阪大学の川端、浜田先生らの報告に準じ、インフルエンザウイルス(H2N2 熊本株および H3N2 愛知株)と GAS SSI1 株(東邦大、村井教授より分与)を用いて劇症感染モデルを作製し、感染防御と病態形成における NO と MMP の役割について検討した。まず、NO の役割について解析するため、誘導型 NO 合成酵素(iNOS)欠損マウスおよび野生型マウスにインフルエンザウイルスを経鼻感染させた後、36 時間後に GAS を経鼻感染させる複合気道感染によって劇症感染病態モデルを作製し、体重変化、生存率および両病原体の肺内増殖について解析した。

さらに、MMP の役割について解析するために、同劇症感染病態モデルに、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、マウスの生存率と体重減少に対する効果について検討した。

## 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、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。

最近、活性型 MMP が細胞からの FasL や TNF- $\alpha$  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。

## 2. *S. pyogenes* BK 分解酵素の同定

これまで GAS 由来の BK 分解酵素の同定を行ってきた。GAS 由来の metalloendopeptidase (PepA) の組み換え蛋白 (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 やアニジオテンシン 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分かった。

さらに、本酵素に対するウサギポリクローナル抗体の作製を行い、各種 GAS 株による発現を検討した結果、PepA はほとんどの GAS 臨床分離株 (劇症感染の有無に関係なく) に発現が認められた。また、PepA は growth phase に関係なく、一定の発現量が維持されたのに対し、SPE-B は late log から stationary phase にかけて発現されることが分かった (図 1)。今後さらに、GAS 感染病巣における PepA の活性発現について、以下の、マウス劇症感染モデルを用いて解析する予定である。

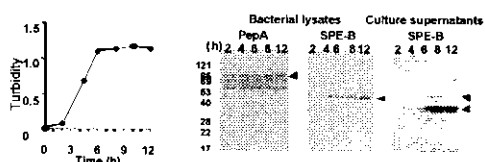


図 1. *S. pyogenes* SSI1 株の各増殖段階における PepA および SPE-B の発現

## 3. GAS 感染病態における NO と MMP の役割

iNOS 欠損マウスおよび野生型マウスを用いて、劇症 GAS 感染病態を解析したところ、iNOS 欠損マウスでは、野生型マウスに比較して、敗血症病態が著明に増悪した。このことは、NO が GAS

劇症感染において大変重要な感染防御作用を有していること示している。

さらに、予備的な知見ではあるが、本モデルの GAS の一次感染病巣である肺組織において MMP の発現が強く誘導されていた。そこで、MMP 阻害剤である SI-27 を腹腔内投与し、マウスの生存率と体重減少に与える効果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、本劇症感染モデルの病態に MMP が関与することが示唆された。

## 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これまで不明であったが、今回の我々の知見から、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。

また、ある種の MMP が細胞からの FasL や TNF- $\alpha$  の遊離を促進することが指摘されている。以前より我々は、SPE-B プロテアーゼその他の細菌性プロテアーゼが MMP を活性化することを確認していたが、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。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。

これまでの我々の研究から、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増悪したことから、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、昨年度までに報告してきたように、NO 供与剤であるニトロソ化 $\alpha_1$ -プロテアーゼインヒビター（ニトロソ $\alpha_1$ -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。

以上の知見は、抗アポトーシス作用を持つニトロソ $\alpha_1$ -PI などの NO 供与体ならびに E-64 や MMP 阻害剤などの抗プロテアーゼの劇症 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、炎症のメディエーターである BK をすみやかに分解不活化する PepA が GAS に広く発現していることが明らかとなった。興味あることに、PepA は growth phase に依存せず、常に発現が維持されたのに対し、BK 産生を促し、炎症を惹起すると考えられる SPE-B は late log から stationary phase 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、菌の定着および血行性播種に参与している可能性を示唆している。今後さらに、PepA 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

本年度の研究により、SPE-B プロテアーゼによるアポトーシス誘導メカニズムとして、c-IAP1 の分解および MMP の活性化が示唆された。マウスの劇症 A 群レンサ球菌感染モデルにおいても MMP の病態形成への関与が示唆された。また、*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。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) T. Akaike. Free Radical in viral pathogenesis and mutation. *Rev. Med. Virol.*, 11: 87-101 (2001).
- 2) 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).
- 3) 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).
- 4) S. Satoh, K. Oishi, A. Iwagaki, M. Senba, T. Akaike, M. Akiyama, N. Mukaida, K. Matsushima, and T. Nagatake. Dexamethazone impairs pulmonary defense against *Pseudomonas aeruginosa* through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 126: 266-273 (2001).
- 5) 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).
- 6) 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).
- 7) 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. 内山竹彦, 中嶋暉躬, 名取俊二, 正木春彦 編. 生物間の攻撃と防御の蛋白質 (蛋白質 核酸 酵素) vol. 46, 共立出版 (株) (東京) p. 162-165 (2001).
  - 8) 赤池孝章. 一酸化窒素 (NO) による感染防御と病態形成に関する研究. *日本細菌学会誌*, 56: 503-411 (2001)
  - 9) 赤池孝章. 感染症における NO 代謝制御. 吉川敏一編. 酸化ストレス: フリーラジカル医学生物学の最前線 (医学のあゆみ 別冊) 医歯薬出版 (株) (東京) p. 162-165 (2001).
  - 10) J. Wu, T. Akaike, K. Hayashida, Y. Miyamoto, T. Nakagawa, K. Miyakawa, W. Müller-Esterl and H. Maeda. Identification of bradykinin receptors in clinical cancer specimens and murine tumor tissues. *International J. Cancer* 98: 29-35 (2002).
  - 11) M. S. Alam, T. Akaike, S. Okamoto, T. Kubota, J. Yoshitake, T. Sawa, Y. Miyamoto, and H. Maeda. Host defense role of nitric oxide in murine salmonellosis as a function of its potent antibacterial and antiapoptotic activities. *Infect. Immun.* in press (2002).
  - 12) J. Fang, T. Sawa, T. Akaike and H. Maeda. Tumor-targeted delivery of PEG-conjugated D-amino acid oxidase for antitumor therapy via enzymatic generation of hydrogen peroxide. *Cancer Res.* 62: in press (2002)
2. 学会発表
    - 1) S. Okamoto, T. Akaike, J. Yoshitake, T. Sawa, M. Suga, M. Ando, and 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, U.S.A.).
    - 2) T. Akaike, and T. Ichinose. NO-induced oxidative stress in airway inflammation caused by viral infection. 3<sup>rd</sup> International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, May 27-31, 2001 (Monterey, CA, U.S.A.).
    - 3) T. Sawa, T. Akaike, T. Okamoto, and H. Maeda. Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite. 3<sup>rd</sup> International Conference on Peroxynitrite and Reactive Nitrogen Species in Biology and Medicine, May 27-31, 2001 (Monterey, CA, U.S.A.).
    - 4) T. Akaike. Activation of matrix metalloproteinases in oxidative tissue injury and inflammation. Lectures on Free Radical Biology, University of Alabama at Birmingham, September 27, 2001 (Birmingham, AL, U.S.A.)
    - 5) T. Okamoto, T. Sawa, T. Akaike, and H. Maeda. Mechanism of Zn-Cys switch opening by sulfoxy disulfide formation with peroxynitrite. IPS/ICPI 2001, November 1-4, 2001 (Munich, Germany)
    - 6) Y. Miyamoto, T. Akaike, T. Akuta, S. Kawabata, S. Hamada, and H. Maeda. Degradation of bradykinin by a metalloproteinase produced by *Streptococcus pyogenes*. IPS/ICPI 2001, November 1-4, 2001 (Munich, Germany)

- 7) S. Okamoto, T. Akaike, H. Nishino, Y. Miyamoto, M. Suga, and H. Maeda. Quantification of protein-bound nitrotyrosine using new HPLC analysis coupled with electrochemical detection. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oxygen Society, November 15-19, 2001 (Research Triangle Park, NC, U.S.A.)
- 8) T. Akaike, S. Shiva, R. P. Patel, P. S. Brookes, V. M. Darley-Usmar. Glutathione nitroso-sulfoxide: A potential reaction product of glutathione and peroxyxynitrite. 8<sup>th</sup> Annual Meeting of the Oxygen Society, November 15-19, 2001 (Research Triangle Park, NC, U.S.A.)
- 9) 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, 平成13年4月2~4日 (岡山)
- 10) 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の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, 平成13年5月26, 27日 (福岡)
- 11) 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. 平成13年6月30日~7月1日 (岐阜)
- 12) 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. 平成13年6月30日~7月1日 (岐阜)
- 13) 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. 平成13年8月13, 14日 (宮崎)
- 14) 田村文雄, 赤池孝章, 菅 守隆, 前田 浩. NOおよびニトロソチオールの抗アポトーシス作用を介する感染防御. 第12回生体防御学会総会. 平成13年8月24, 25日 (京都)
- 15) 田村文雄, 赤池孝章, Mohammad Samiul Alam, 宮本洋一, 前田 浩. 細菌性プロテアーゼによるアポトーシス誘導機序. 第54回日本細菌学会九州支部総会, 平成13年9月7, 8日 (北九州)
- 16) 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, 平成13年10月25~28日 (京都)
- 17) 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, 平成13年11月29, 30日 (岡山)

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
I. Nakagawa, et al.	Cytochrome <i>c</i> -mediated caspase-9 activation triggers apoptosis in <i>Streptococcus pyogenes</i> -infected epithelial cells	Cell. Microbiol.	3・6	395-405	2001
Y. Terao, et al.	Fba, a novel fibronectin-binding protein from <i>Streptococcus pyogenes</i> , promotes bacterial entry into epithelial cells, and <i>fba</i> gene is positively transcribed under the Mga regulator	Mol. Microbiol.	42・1	75-86	2001
S. Okamoto, et al.	Administration of superantigens protects mice from lethal <i>Listeria monocytogenes</i> infection by enhancing cytotoxic T cells	Infect. Immun.	69・11	6633-6642	2001
Y. Terao, et al.	Novel laminin-binding protein of <i>Streptococcus pyogenes</i> , Lbp, is involved in adhesion to epithelial cells	Infect. Immun.	70・2	993-997	2002
M. Morishima, et al.	Streptococcal toxic shock syndrome in a patient with rheumatoid arthritis	Clin. Exp. Rheumatol.	19・2	231-232	2001
S. Sakurada, et al.	Effective human herpesvirus 8 infection of human umbilical vein endothelial cells by cell-mediated transmission	J. Virol.	75・16	7717-7722	2001
N. Takeda, et al.	Recurrent septicemia caused by <i>Streptococcus canis</i> after a dog bite	Scand. J. Infect. Dis.	33・12	927-928	2001
W. Fujimaki, et al.	Functional uncoupling of T-cell receptor engagement and Lck activation in anergic human thymic CD4 <sup>+</sup> T cells	J. Biol. Chem.	276・20	17455-17460	2001
H. Kobayashi, et al.	Gamma/delta T cells provide innate immunity against renal cell carcinoma	Cancer Immunol. Immunother.	50・3	115-124	2001
T. Akaike	Role of free radicals in viral pathogenesis and mutation	Rev. Med. Virol.	11・2	87-101	2001
S. Miyajima, et al.	Matrix metalloproteinases induction by pseudomonal virulence factors and inflammatory cytokines <i>in vitro</i>	Microb. Pathog.	31・6	271-281	2001
T. Okamoto, et al.	Activation of matrix metalloproteinases by peroxynitrite-induced protein S-glutathiolation via disulfide S-oxide formation	J. Biol. Chem.	276・31	29596-29602	2001
S. Satoh, et al.	Dexamethasone impairs pulmonary defence against <i>Pseudomonas aeruginosa</i> through suppressing iNOS gene expression and peroxynitrite production in mice	Clin. Exp. Immunol.	126・2	266-273	2001
J. Wu, et al.	Enhanced vascular permeability in solid tumor involving peroxynitrite and matrix metalloproteinases	Jpn. J. Cancer Res.	92・4	439-451	2001
R. Uwatoku, et al.	Asialoglycoprotein receptors on rat dendritic cells: possible roles for binding with Kupffer cells and ingesting virus particles	Arch. Histol. Cytol.	64・2	223-232	2001