

厚生労働科学研究費補助金

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

平成14年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 浜田 茂 幸

平成15（2003）年3月

目 次

I. 総括研究報告書	
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. 分担研究報告書	
1. インフルエンザウイルスと A 群レンサ球菌の連続感染による-----15	
実験的劇症型感染症のワクチンによる予防法の検討	
浜田 茂幸	
2. Recombinant streptococcal pyrogenic extoxin-B のヒト末梢リンパ----- 27	
球に対するマイトジェン活性と劇症型レンサ球菌感染症患者の	
血漿中のヒスタミンの定量に関する研究	
大国 寿士	
3. 1) A 群レンサ球菌による <i>in vivo</i> での好中球殺傷, ----- 31	
2) および C/G 群レンサ球菌におけるスーパー抗原と思われる因子の解析	
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----- 37	
渡辺 治雄	
5. 全国調査に基づいた劇症型レンサ球菌感染症の病態に関する研究----- 41	
太田 美智男	
6. 劇症型 A 群レンサ球菌感染症におけるプロテアーゼによる----- 45	
アポトーシス誘導機構とその治療戦略	
赤池 孝章	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- 51	
IV. 研究成果の刊行物・別刷----- 53	

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）
総括研究報告書

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）感染症の詳細なる病態の解明と治療法・予防法の開発をすすめる上で同症発症の動物モデルを作出することは必要不可欠である。劇症型 GAS 感染症は寒冷期に多く報告されていることから、インフルエンザウイルスとの経鼻混合感染による劇症型 GAS 感染症の発症の可能性を検討した。その結果、非致死量の A 型インフルエンザウイルス（IAV）と非致死量の GAS との連続感染によって壊死性筋膜炎を含む劇症型 GAS 感染症を発症することを明らかにした。さらに連続感染による同感染症発症の予防法として、インフルエンザワクチンの投与が効果的であることを明らかにし、この予防法による寒冷期での劇症型 GAS 感染症発症数の減少に寄与する可能性が示唆された。一方、GAS のいくつかの病原因子における劇症型 GAS 感染症発症のメカニズムの解析を行い、新たな知見を得た。まず、streptococcal pyrogenic exotoxin-B/streptococcal cysteine protease（SPEB / SCP）は毛細血管の透過亢進およびマスト細胞並び好塩基球からのヒスタミンを遊離する作用のあることを報告したが、今回この物質には単核球に対して増殖活性を誘導しないことを見出した。また SPEB による組織細胞のアポトーシスの誘導のメカニズムについて解析を行ったところ、SPEB は pro-MMP-9 をゼラチナーゼ活性の有する活性型 MMP-9 に限定分解させ、活性型 MMP-9 によって細胞表面から可溶性 Fas リガンド（L）を放出させることによって細胞のアポトーシスを誘導することが明らかにされた。そして、MMP 阻害剤を IAV-GAS 連続感染マウスに投与することで劇症型 GAS 感染症の発症抑制がみられたことから、同剤の治療薬としての可能性を示唆した。さらに 1990 年代の M3 型の菌株には 41,796 bp からなるファージ様断片が挿入されていることを見出しているが、この挿入領域には発熱毒素である SpeL 以外にヘビ毒の成分であるホスホリパーゼ A₂ と相同性のあるタンパク質をコードする新規の遺伝子（*sla*）が存在し、この遺伝子によって産生される新規タンパク *Sla* が細胞毒性を有することを示唆した。免疫学的研究では、GAS の腹腔内感染によって、本来細菌が腹腔内へ感染するときに腹腔内で増殖し初

期感染防御に重要な役割を果たす好中球のアポトーシスの誘導が認められた。一方、疫学的研究では、劇症型 A 群レンサ球菌感染症の全国アンケートを引き続き行い、高齢者および基礎疾患をもつ人々に高頻度に同症を発症することを明らかにした。また、死亡症例では、生存症例に比べて体温が低く、白血球数の増加が顕著に認められないことから、好中球を中心とする生体防御機構の誘導の有無が予後に重要な役割を果たしていることが示唆された。

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 GAS 感染症の起病因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ことが示唆されているが、劇症型 GAS 感染症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、劇症型 GAS 感染症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、劇症型 GAS 感染症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. マウスへの A 型インフルエンザウイルス (IAV) と GAS の経鼻連続感染とインフルエンザワクチンの接種

BALB/c マウス (雌、8 週齢) に非致死量の IAV (100 FFU) を、その 2 日後に GAS (10^7 CFU) をそれぞれ経鼻感染し、感染後のマウスの生死を観察した。また、IAV 感染の 40 日前および 12 日前にマウスの皮下にインフルエンザワクチン (0.15 μ g) を接種し、連続感染後のマウス致死率の変化を比較検討した。

2. 組換え体 *streptococcal pyrogenic exotoxin-B/streptococcal cysteine protease* (SPEB / SCP) の T 細胞に対するマイトージェン活性

内山らの方法によりヒト末梢血より T 細胞を回収し、ストレプトマイシン (100 μ g / ml)、ペニシリン (100 U / ml)、2ME (5×10^{-5} M)、および 10% FCS 含

有の RPMI 1640 で 1×10^5 個 / ml になるように調製した。96 well のマイクロプレートにその T 細胞浮遊液を 200 μ l 入れ、種々の濃度の組換え体 (r) SPE B / SCP, 陽性対照として TSST-1 を用いて培養後、16 時間、1 μ Ci 3 H-thymidine でパルス後、細胞中の 3 H-thymidine 取り込み量を液体シンチレーションカウンターで測定した。

3. 組換え体 proMMP-9 の作製と MMP 刺激されたヒト大腸がん細胞での可溶性 FasL リガンド放出の有無

ヒト proMMP-9 cDNA をバキュロウイルスベクター pBacPAK9 に組み込み、High Five 昆虫細胞に感染・発現させ、培養上清よりリコンビナント proMMP-9 蛋白を精製した。また、ヒト大腸がん培養細胞株 SW480 細胞を一晩培養後、SPEB 処理した proMMP-9 を培養液中に添加し、12 時間後に培養上清を回収してウエスタンブロット法により上清中の可溶性 FAS リガンド (sFasL) の有無を検討した。

4. 組換え体 Sla の精製と同蛋白質による細胞障害活性試験

シグナルペプチドを除いた領域をコードする DNA 領域を PCR により増幅し、IPTG 誘導型発現ベクターである pGEX6P-1 にクローニングした。これを大量発現した後、グルタチオンセファロース 4B カラムを用いてアフィニティークロマトグラフィーによりグルタチオン-S-トランスフェラーゼ (GST) と Sla 蛋白質の融合蛋白質 (GST-Sla) を精製した。さらに rSla 蛋白質を GST-Sla に Precision protease 処理す

ることにより分離・精製した。マウスの筋肉細胞である C2C12 細胞を用い細胞障害活性試験を行った。細胞障害は細胞が破壊した時に流出される細胞内物質 L-乳酸デヒドロキナーゼ (LDH) の酵素活性を指標として測定した。

5. GAS 投与後の腹腔滲出細胞 (PEC) の観察

$1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$ CFU の GAS をマウスに腹腔内より感染させた後、経時的に PBS にて腹腔内洗浄を行うことで PEC を回収し、同細胞数を算定した。また一部の実験において、GAS 投与と同時に弱毒菌株またはチオグリコレート培地の投与を行った。PEC の形態学的観察をアクリジンオレンジとエチジウムブロマイドによる蛍光組織染色により行った。また、PEC のアポトーシスおよびネクローシス誘導の有無について Annexin V とプロピオジウムヨウダイドを用いたフローサイトメトリー法により検討した。

6. 劇症型 GAS 感染症の全国アンケート

全国約 2000 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 年から平成 14 年に発症した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、発症から入院中までの経過、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。さらにアンケート以外に

も発症の確認がとれた場合には直接その施設に上記のアンケートの依頼を行った。得られたデータに対しては昨年度までに得られたアンケートを含めて統計学的検討を行った。

C. 研究結果

1. IAV と GAS の連続感染による実験的劇症型 GAS 感染症の発症とインフルエンザワクチン接種による同症発症の抑制

マウスに非致死量の IAV と GAS の経鼻連続感染させることで約 90% のマウスが感染後 1 週間以内に死亡した。一方、IAV ワクチンの連続感染前投与により、感染 14 日後でのマウス致死率が 25% まで減少した ($p < 0.001$)。連続感染より 2 日目にマウス肺を摘出して病理組織切片を作製し、光学顕微鏡による観察を行ったところ、ワクチン非接種群マウス肺に見られる重度の炎症像がワクチン接種群ではほとんど見られなかった。さらに、ワクチン接種した連続感染マウスによる各臓器への GAS の分布の変化について検討した。その結果、ワクチン非接種群では、肺で平均 9.7×10^7 CFU、肝臓で平均 1.2×10^7 CFU、脾臓で平均 2.5×10^5 CFU 検出されたのに対し、ワクチン接種群では、肺で平均 5.3×10^2 CFU、肝臓で平均 2.8×10^3 CFU、脾臓で平均 2.7×10^3 CFU 検出され、GAS 数が明らかに減少した。また、肺における IAV の増殖について検討したところ、ワクチン接種群では、肺での検出量が平均 8.5×10^5 FFU であるのに対し、ワクチン接種群では全匹が検出限界値以下 ($p < 0.001$) であり、肺における IAV の増

殖が抑制された。

2. 組換え体 SPEB / SCP の T 細胞に対するマイトージェン活性

rSPE B / SCP は、ヒト T 細胞に対しマイトージェン活性が認められず、その活性は 1 mM の DTT 添加によるシステインプロテアーゼ活性との関連性も認められなかった。一方、陽性対照として用いた TSST-1 は明らかにその活性が認められた。

3. SPEB プロテアーゼ proMMP-9 の活性化と MMP を介したアポトーシスの誘導

SPEB による proMMP-9 の活性化について検討した結果、SPEB により proMMP-9 は限定分解により活性型 MMP-9 となり、ゼラチナーゼ活性を発現することが示された。さらに SPEB プロテアーゼ自身にゼラチナーゼ活性を有することが明らかとなった。これらの結果は、GAS 感染症の劇症化に伴うような組織破壊において、SPEB プロテアーゼが重要な役割を果たしていることを示唆する。また、膜結合型 FasL を高発現している SW480 細胞を SPEB プロテアーゼで活性化した MMP-9 で処理したところ、培養上清中に sFasL が検出された。また、同様にゼラチナーゼ活性を有する SPEB プロテアーゼ単独処理においても、sFasL が検出された。さらに劇症感染モデルマウスの肺組織の TUNEL 染色において、炎症細胞および肺胞上皮細胞に著明なアポトーシス誘導が認められた。同モデルの肺胞洗浄液中には、活性型 MMP-9-2 の発現上昇を認めており、さらに血清 sFasL および TNF- α レベルが顕著に増加していた。

さらに本感染モデルへの MMP 阻害剤の治療実験を行ったところ、MMP 阻害剤 SI-27 は感染マウスの生存率と体重減少を有意に改善させ GAS 劇症化が改善する傾向が認められた。さらに抗インフルエンザ剤および抗生剤の併用療法によって同モデルの致死率が著明に改善された。

4. GAS 新規病原因子 *Sla* の分子遺伝学的解析および細胞障害性の検討

1990 年以降に分離された M3 型に挿入されているファージ様断片（約 42 kb）の中の ORF について BLAST 検索を行った結果、*attR* 側にホスホリパーゼ A₂ と相同性のある蛋白質(*Sla*)が存在した。*Sla* は、特にヘビ毒のホスホリパーゼ A₂ と部分的に高い（46%）相同性を示し、その部位は活性に重要な領域であることが判明した。ヘビ毒のホスホリパーゼ A₂ は細胞を破壊する毒性があることが知られている。そこで、筋肉細胞に対する細胞障害活性を LDH 活性を指標に調べた。その結果、*Sla* 蛋白質の添加量に依存して LDH の活性が上昇し、この *Sla* 蛋白質には細胞障害活性を保有することが示唆された。

5. GAS による 好中球のアポトーシス誘導

マウス腹腔に GAS 弱毒株を投与すると 12 時間をピークとして腹腔への細胞滲出が誘導された。誘導された PEC の形態学的観察を行った結果、その 99% 以上は好中球だった。同様の PEC 誘導は熱処理により死菌化した弱毒株を投与した場合にも観察された。一方 GAS 強毒株を投与すると PEC 誘導は全く観

察されなかったが、死菌化した場合には PEC 誘導が認められた。さらにチオグリコレート培地投与と同時に 2×10^4 CFU の各種 GAS 菌株をマウスに感染させた場合には、投与した病原性の異なる 9 菌株のうち最も病原性の高い菌株でのみ抑制効果が認められた。しかし、 3×10^6 CFU の菌株を感染させた場合には最も病原性の弱い 1 菌株を除いてすべての菌株が誘導抑制効果を示した。チオグリコレート培地と GAS 強毒株の同時投与時に回収された PEC にはエチジウムブロマイド染色陽性の多量の死細胞が含まれていた。さらにストレプトリジン S (SLS) を欠損させることで *in vivo* での PEC 誘導抑制能が有意に低下した。

6. 劇症型 GAS 感染症の全国アンケート

全国で男性 35 人、女性 25 人、不明 1 名の詳細な臨床データを得た。A 群レンサ球菌による症例数が 55、B 群が 2、G 群による症例が 4 であった。A 群のうち 27 例（49%）が死亡症例であり、B 群は全例死亡、G 群は全例生存症例であった。男女比では、男性 18 人（51%）、女性 11 人（44%）、総数では 29 人（48%）が死亡症例であった。発症年齢では 60 歳台が最も多い 19 人であり、70 歳以上も 15 人と合わせて 56% を占め、かつその死亡率はそれぞれ 12 人（63%）、9 人（60%）とそのほかの年齢分布に比して総数、死亡率とも顕著に高くこの疾患が高齢者にとって非常に危険な疾患であることが示された。生存症例に使用された抗生物質はペニシリン系抗生物質、クリンダマイシンの

大量併用療法を行った症例が多かったが、同じ組み合わせで亡くなった症例も認められた。

D. 考察

我々は、IAV と GAS の連続感染による実験的劇症型 GAS 感染症発症マウスモデルを作出した。同モデルは、劇症型 GAS 感染症の発症メカニズムを解明するだけでなく、IAV の感染によっておこる細菌性肺炎の発症メカニズムを解明する上でもきわめて有用であると考えられる。また、インフルエンザワクチンの連続感染前での接種により同症の発症が有意に抑制された。以上の結果から、インフルエンザワクチンが寒冷期における劇症型 GAS 感染症の発症に対する有効な予防法のひとつに成り得ることが考えられる。また同様の現象は、IAV の感染後に、*Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Hemophilus influenzae* などの二次的細菌感染に起因する肺炎についても適応できる可能性を示唆するものといえよう。

GAS 菌体の培養上清から精製した SPEB / 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ち、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を報告した。また、この透過性亢進作用はプロテアーゼ活性と関連すること、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してきた。本症の成立にスーパー抗原活性を介して過剰に産生されたサイトカインが関与するとの想

定もなされていることから、rSPEB / SCP にもスーパー抗原活性があるか否かの検討を試みた。1 mM DTT での活性化の如何にか関わらず、種々の濃度の rSPEB / SCP を添加してもスーパー抗原活性を認めることはできなかった。

今回、本研究において GAS プロテアーゼが MMP の活性化を介してアポトーシス誘導するという新規な経路が存在することが示された。このようなアポトーシス誘導機構は、これまでの報告してきた細菌性プロテアーゼによる宿主細胞内の c-IAP1 の分解とともに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。さらに今回、上記 MMP の活性化ならびに sFasL や TNF- α の放出が劇症モデルマウスにおいて生体内で証明された。また MMP 阻害剤が 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強く関与することを示唆している。また、最近 Fas がアポトーシスのシグナル伝達以外にネクロシス誘導や炎症促進にも関与していることが明らかにされつつある。従って、GAS 劇症感染症における広範な壊死が、SPEB による MMP の活性化や sFasL, TNF- α による過剰なアポトーシスのみならず、ネクロシス誘導による可能性も考えられる。以上の知見は抗アポトーシス作用を持つニトロソ α_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製剤の劇症型 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。

sla 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ている。さらに Sla は、細胞に対して毒性を示した。しかしながら、A 群溶血性レンサ球菌での *sla* 遺伝子の分布について、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者から M3 型とともによく分離される M1 型ではこの遺伝子が保有されていないことから、軟部組織壊死を引き起こすために Sla 蛋白質は必須ではないことが示唆された。

GAS 投与により誘導された好中球の腹腔滲出は、死菌化菌体投与時にも認められたことから、同菌の構成成分（菌体表層の糖蛋白質や多糖体など）によるものと考えられた。一方、強毒株投与やより多量の菌投与時に観察されたチオグリコレート培地による好中球滲出の抑制には同菌の SLS による好中球に対するアポトーシス誘導が重要な役割を果たしている可能性が高い。劇症型 GAS 感染症患者において末梢血白血球数の減少が観察されており、GAS による好中球殺傷はヒトの感染症、特に劇症型 GAS 感染症の発症に重要な役割を果たしている可能性が考えられる。

今回行ったアンケート調査によって劇症型 GAS 感染症の死亡率が約半数に達することを明らかにした。さらに高齢者および基礎疾患のある人で同症発症数、死亡率がともに高く、これまでの働き盛りの基礎疾患のない人が突然発症するとの報告と異なることが明らかになった。前駆症状も一般の感冒様症状で発症している例が多く、この疾患が死亡率の高いことを考えると高齢者に対して感冒と考えられる症例に

対してペニシリン系の抗生物質を予防的に投与することが望ましい。予後因子として注目すべき知見は白血球数の差である。可能性として菌に対する好中球を中心とする生体防御機構が弱い人が亡くなった可能性と、菌自体の防御機構阻止能力が予後を決定した可能性がある。事実末梢血液所見のみでなく筋壊死組織、肺の病変など一般の細菌感染症で認められる白血球浸潤がない症例もあり、菌が白血球の遊走を阻止している可能性が大いに考えられる。また抗生物質使用に今なお多くの問題が存在しており、最も効果的な抗生物質の使用法のさらなる検討とその啓蒙に努める必要がある。

E. 結論

1. 非致死量の IAV と GAS との連続感染によって壊死性筋膜炎を含む劇症型 GAS 感染症の発症マウスモデルを作出した。
2. 連続感染による劇症型 GAS 感染症発症の予防法として、インフルエンザワクチンの投与が効果的である。
3. SPEB / SCP には単核球に対して増殖活性を誘導しない。
4. SPEB は pro-MMP-9 を活性型 MMP-9 に限定分解させ、活性型 MMP-9 によって細胞表面から可溶性 FasL を放出させることで細胞のアポトーシスを誘導する。
5. MMP 阻害剤を IAV-GAS 連続感染マウスに投与することで劇症型 GAS 感

染症の発症抑制がみられた。

6. 1990年代の M3 型の菌株のファージ様断片中の新規の遺伝子より産生される新規タンパク Sla が細胞毒性を有する。

7. GAS の腹腔感染によって好中球のアポトーシスの誘導し、PEC 細胞の増殖抑制が認められた。

8. 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の全国アンケート結果から、高齢者および基礎疾患をもつ人々に高頻度に同感染症を発症することを明らかにした。

9. 劇症型 GAS 感染症の予後に好中球を中心とする生体防御機構の誘導の有無が重要な役割を果たしていることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Kawabata, S., Tamura, Y., Murakami, J., Terao, Y., Nakagawa, I. and Hamada, S. 2002. A novel, anchorless streptococcal surface protein that binds to human immunoglobulin. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** 296: 1329-1333.
2. Terao, Y., Kawabata, S., Nakata, M., Nakagawa, I. and Hamada, S. 2002. Molecular characterization of a novel fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes* strains isolated from toxic shock-like syndrome patients. **J. Biol. Chem.** 277: 47428-47435.
3. Okahashi, N., Sakurai, A., Nakagawa, I., Fujiwara, T., Kawabata, S., Amano, A. and Hamada, S. 2003. Infection by *Streptococcus pyogenes* induces the receptor activator of NF-kappaB ligand expression in mouse osteoblastic cells. **Infect. Immun.** 71: 948-955.
4. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Okuno, Y., Goto, T., Sano, K. and Hamada, S. 2003. Influenza A virus-infected hosts boost an invasive type of *Streptococcus pyogenes* infection in mice. **J. Virol.** 77: 4104-4112.
5. Nakagawa, I., Kurokawa, K., Nakata, M., Yamashita, A., Tomiyasu, Y., Okahashi, N., Kawabata, S., Yamazaki, K., Shiba, T., Hattori, M., Hayashi, H. and Hamada, S. 2003. Genome sequence of an M3 strain of *Streptococcus pyogenes* reveals a large-scale genomic rearrangement in invasive strains and new insights into phage evolution. **Genome Res.** (印刷中) .
6. Watanabe, Y., Todome, Y., Ohkuni, H., Sakurada, S., Ishikawa, T., Yutsudo, T., Fischetti, V. A. and Zabriskie, J. B. 2002. Cysteine protease activity and histamine release from the human mast cell line HMC-1 stimulated by recombinant streptococcal pyrogenic exotoxin B/streptococcal cysteine protease. **Infect. Immun.** 70: 3944-3947.
7. Chen, L., Koyanagi, M., Fukada, K., Imanishi, K., Yagi, J., Kato, H., Miyoshi-Akiyama, T., Zhang, R., Miwa, K. and Uchiyama, T. 2002.

- Continuous exposure of mice to superantigenic toxins induces a high-level protracted expansion and an immunological memory in the toxin-reactive CD4⁺ T cells. **J. Immunol.** 168: 3817-3824.
8. Kato, H., Takahashi, N., Arimura, Y., Imanishi, K., Nishida, H. and Uchiyama, T. 2002 The percentage of superantigen-reactive T cells in peripheral blood significantly decreases before massively increasing in patients with neonatal TSS-like exanthematous disease in the early acute phase. **J. Infect. Chemother.** 8: 111-114.
 9. Arimura, Y., Kato, H., Dianzani, U., Okamoto, T., Kamekura, S., Buonfiglio, D., Miyoshi-Akiyama, T., Uchiyama, T. and Yagi, J. 2002. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. **Int. Immunol.** 14: 555-566.
 10. Okamoto, T., Saito, S., Yamanaka, H., Arimura, Y., Tomatsu, T., Kamatani, N., Ogiuchi, H., Uchiyama, T. and Yagi, J. 2003. Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on the activated T cells of rheumatoid arthritis patients. **J. Rheumatol.** (印刷中) .
 11. Matsuda, Y., Kato, H., Yamada, R., Okano, H., Ohta, H., Imanishi, K., Kikuchi, K., Totsuka, K. and Uchiyama, T. 2003. Early diagnosis of toxic shock syndrome by detection of T-cell-receptor V β 2-positive T cells. **Emerg. Infect. Dis.** (印刷中) .
 12. Monze, M., Imanishi, K., Kato, H., Hayashi, T., Miyoshi-Akiyama, T. and Uchiyama, T. 2003. Species specific responses to bacterial superantigen. **J. Tokyo Wom. Med. Univ.** (印刷中) .
 13. Miyoshi-Akiyama, T., Zhao, J., Kato, H., Kikuchi, K., Totsuka, K., Kataoka, Y., Katsumi, M. and Uchiyama, T. 2003. *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM), a novel bacterial superantigen. Characterization of its biological activity and predicted tertiary structure. **Mol. Microbiol.** (印刷中) .
 14. Miyoshi-Akiyama, T., Zhao, J., Kikuchi, K., Kato, K., Suzuki, R., Endoh, M. and Uchiyama, T. 2003. Quantitative and qualitative comparison of virulence traits including murine lethality among *emm*-type group A streptococci. **J. Infect. Dis.** (印刷中) .
 15. Ikebe, T., Wada, A., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., Tamaru, A., Fujinaga, Y., Abe Y., Shimizu Y., Watanabe, H. and the Working Group for Group A Streptococci in Japan. 2002. Dissemination of the phage-associated novel superantigen gene *speL* in recent invasive and noninvasive *Streptococcus pyogenes* M3/T3 isolates in Japan. **Infect. Immun.** 70: 3227-3233.
 16. Ikebe, T., Murai, N., Endo, M., Okuno, R., Murayama, S., Saitoh, K., Yamai, S., Suzuki R., Isobe, J., Tanaka, D., Katsukawa, C., Tamaru, A., Katayama,

- A., Fujinaga, Y., Hoashi, K., Ishikawa, J., Watanabe, H. and The Working Group for Group A Streptococci in Japan. 2003. Changing prevalent T serotypes and *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock-like syndrome (TSLs) patients in Japan. **Epidemiol. Infect.** (印刷中) .
17. Hasegawa, T., Torii, K., Hashikawa, S., Iinuma, Y. and Ohta, M. 2002. Cloning and characterization of the deoxyribonuclease *sda* gene from *Streptococcus pyogenes*. **Curr. Microbiol.** 45: 13-17.
 18. Hasegawa, T., Torii, K., Hashikawa, S., Iinuma, Y. and Ohta, M. 2002. Cloning and characterization of two novel DNases from *Streptococcus pyogenes*. **Arch. Microbiol.** 177: 451-456.
 19. Alam, M. S., Akaike, T., Miyamoto, Y., Okamoto, S., Kubota, T., Tamura, F. and Maeda, H. 2002. Role of nitric oxide in host defense in murine salmonellosis as a function of its antibacterial and antiapoptotic activities. **Infect. Immun.** 70: 3130-3142.
 20. Okamoto, T., Valacchi, G., Gohil, K., Akaike, T. and van der Vliet, A. 2002. S-Nitrosothiols inhibit cytokine-mediated induction of MMP-9 in airway epithelial cells. **Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.** 27: 463-473.
 21. Akaike, T., Okamoto, S., Sawa, T., Yoshitake, J., Tamura, F., Ichimori, K., Miyazaki, K., Sasamoto, K. and Maeda, H. 2003. 8-Nitroguanosine formation in viral pneumonia and its implication for pathogenesis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 100: 685-690.
2. 学会発表
1. Kawabata, S., Terao, Y., Nakagawa, I. and Hamada, S. A novel laminin-binding protein of group A streptococci is involved in adhesion to human epithelial cells. 102nd General Meeting of American Society for Microbiology. May 19-23, 2002. Salt Lake City, UT, USA.
 2. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Goto, T., Sano, K., Okuno, Y. and Hamada, S. Influenza A virus-infected hosts boost the outbreak of invasive group A *Streptococcus* infections in mice. 102nd General Meeting of American Society for Microbiology. May 19-23, 2002. Salt Lake City, UT, USA.
 3. Kawabata, S., Terao, Y., Nakagawa, I. and Hamada, S. Molecular characterization of a laminin-binding protein (Lbp) of group A streptococci on adhesion to human epithelial cells. 10th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology. July 27-August 1, 2002. Paris, France.
 4. Okamoto, S., Kawabata, S., Nakagawa, I., Goto, T., Sano, K., Okuno, Y. and Hamada, S. Influenza A virus-infected hosts boost the outbreak of invasive group A *Streptococcus* infections in mice. 2nd Awaji International Forum on Infection and Immunity. August 24-

- 27, 2002. Awaji Island, Hyogo, Japan.
5. Kawabata, S., Tamura, Y., Murakami, J., Okamoto, S., Terao, Y., Nakagawa, I. and Hamada, S. Characterization of a novel immunoglobulin-binding protein, Sib38, from group A *Streptococcus*. 15th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. October 6-11, 2002. Goa, India.
 6. Nakata, M., Nakagawa, I., Kawabata, S. and Hamada, S. Overexpression of Bcl-2 can protect *S. pyogenes*-infected epithelial cells from apoptotic cell death. 15th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. October 6-11, 2002. Goa, India.
 7. 寺尾豊, 川端重忠, 中川一路, 浜田茂幸: 感染防御抗原としての A 群レンサ球菌表層タンパク Fba の性状と機能. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 8. 村上旬平, 川端重忠, 寺尾豊, 中川一路, 天野敦雄, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌シャペロンタンパク GrpE の菌体表層での局在. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 9. 岡橋暢夫, 桜井敦朗, 中川一路, 藤原卓, 川端重忠, 天野敦雄, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌感染による培養骨芽細胞 RANKL 発現. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 10. 中川一路, 黒川頭, 中田匡宣, 富安祐介, 岡橋暢夫, 川端重忠, 浜田茂幸: 劇症型 A 群レンサ球菌 SSI-1 株の全ゲノム解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 11. 富安祐介, 中川一路, 岡橋暢夫, 川端重忠, 浜田茂幸: 全ゲノム PCR スキャニングを用いた A 群レンサ球菌の遺伝子バリエーションの解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 12. 岡本成史, 川端重忠, 藤高英晃, 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惹起される肺炎の発症のメカニズム. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 13. 藤高英晃, 岡本成史, 川端重忠, 奥野良信, 浜田茂幸: インフルエンザワクチン接種による実験的劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症抑制効果. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 14. 宮本洋一, 赤池孝章, 芥照夫, 吉武淳, 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 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 15. 桜井敦朗, 岡橋暢夫, 中川一路, 川端重忠, 大嶋隆, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌感染による感染性関節炎の誘発とその病態の解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 16. 中川一路, 中田匡宣, 富安祐介, 川端重忠, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌による上皮細胞死誘導機構の解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.

17. 川端重忠, 寺尾豊, 村上旬平, 中川一路, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌の細胞付着・侵入因子の同定. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
18. 桜井敦朗, 岡橋暢夫, 中川一路, 川端重忠, 浜田茂幸: A 群レンサ球菌感染による関節炎の誘発と RANKL の関与. 第 55 回日本細菌学会関西支部総会. 2002 年 11 月 9 日, 大阪.
19. 藤高英晃, 岡本成史, 川端重忠, 寺尾豊, 奥野良信, 浜田茂幸: 実験的劇症型 A 群レンサ球菌感染症における同菌莢膜の関与. 第 55 回日本細菌学会関西支部総会. 2002 年 11 月 9 日, 大阪.
20. Ohkuni, H., Todome, Y., Watanabe, Y., Takahashi, H., Fishetti, V. A., and Zabriskie, J. B. Studies of recombinant streptococcal pyrogenic exotoxin B/cysteine protease (rSPE B/SCP) in the skin of guinea pigs and the release of histamine from cultured mast cells and basophilic leukocytes. 15th Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases. October 6-11, 2002. Goa, India.
21. 趙吉子, 秋山徹, 内山竹彦: A 群レンサ球菌溶血毒素 streptolysin O と劇症型 A 群レンサ球菌感染との関係. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
22. 脇坂直樹, 秋山徹, 趙吉子, 内山竹彦: M1 型 A 群レンサ球菌に存在する Protein F 相同蛋白質について. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
23. 秋山徹, 趙吉子, 加藤秀人, 菊池賢, 内山竹彦: C 群レンサ球菌由来マイトジェン(SDM)遺伝子のクローニング, 構造及び SDM の分布. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
24. 三好(秋山)徹, 脇坂直樹, 趙吉子, 内山竹彦: M1 型 A 群レンサ球菌における Protein F 相同性蛋白質 (PFHP) の同定とその性質. 第 11 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2002 年 6 月 1-2 日, 徳島.
25. 趙吉子, 三好(秋山)徹, 内山竹彦: M4T4 型 A 群レンサ球菌感染症における SPE-B と streptolysin O との関係. 第 11 回 Lancefield レンサ球菌研究会. 2002 年 6 月 1-2 日, 徳島.
26. 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産物の精製及びその遺伝子のクローニング. 第 32 回日本免疫学会総会・学術集会. 2002 年 12 月 4-6 日, 東京.
27. Ikebe, T., Miyoshi-Akiyama, T., Wada, A., Kato, H., Inagaki, Y., Sugama, K., Suzuki, R., Tanaka, D., Tamaru, A., Fujinaga, Y., Abe, Y., Shimizu, Y., Uchiyama, T. and Watanabe, H. The dissemination of the novel superantigen gene *speL* in M3/T3 *Streptococcus pyogenes* isolates in Japan. 6th ASM Conference on Streptococcal Genetics. April 14-17, 2002. Asheville, NC, USA.
28. 池辺忠義, 山井志朗, 鈴木理恵子, 磯部順子, 田中大祐, 田丸亜貴,

- 片山淳, 藤永良博, 帆足喜久雄, 渡辺治雄: 日本における A 群溶血レンサ球菌サーベイランス, 1996-2000. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
29. 長谷川忠男, 橋川真之介, 鳥居啓三, 太田美智男: A 群レンサ球菌の二次元電気泳動法により同定した蛋白質分解酵素, アミラーゼ様酵素の解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 30. 中村匡宏, 長谷川忠男, 橋川真之介, 鳥居啓三, 太田美智男: *S. pyogenes* における二成分制御系遺伝子欠損株を用いた病原因子発現調節の解析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 31. 橋川真之介, 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起こした G 群ならびに C 群レンサ球菌株の分析. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日, 横浜.
 32. 長谷川忠男 シンポジウム 細菌毒素の多彩な構造・機能とその生体への応用 A 群レンサ球菌における毒素蛋白質の環境ストレスによる発現の変化と transcription termination の関与. 第 39 回日本細菌学会中部支部総会. 2002 年 10 月 24-25 日, 愛知.
 33. 太田美智男, 飯沼由嗣, 馬場尚志, 橋川真之介, 横田美紀, 長谷川忠男, 鳥居啓三, 川村久美子: 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の病態に関する考察. 第 39 回日本細菌学会中部支部総会. 2002 年 10 月 24-25 日, 愛知.
 34. 橋川真之介, 飯沼由嗣, 鳥居啓三, 長谷川忠男, 太田美智男: 愛知県で STSS を起こした A 群レンサ球菌 M1 株の分析. 第 39 回日本細菌学会中部支部総会. 2002 年 10 月 24-25 日, 愛知.
 35. 松本昌門, 山崎貢, 松井博範, 鈴木康元, 鳥居啓三, 長谷川忠男, 太田美智男: 臨床分離 A 群レンサ球菌のテトラサイクリン耐性保有状況. 第 14 回日本臨床微生物学会総会. 2003 年 1 月 31 日-2 月 2 日, 名古屋.
 36. 長谷川忠男: 人喰いバクテリア感染 (劇症型レンサ球菌感染症) について. 市民公開講座: 新興・再興感染症. 第 14 回日本臨床微生物学会総会. 2003 年 1 月 31 日-2 月 2 日, 名古屋.
 37. Maeda, H., Hayashida, K., Akta, T., and Akaike, T. Vascular permeability enhancement in solid tumor by activation of pro-MMP and bradykinin generation. KININ 2002, The 16 th International Conference, May 16-31, 2002. Charleston, SC, USA.
 38. Miyamoto, Y., Akaike, T., Akuta, T., Kawabata, S., Hamada, S. and Maeda, H. Bradykinin degradation by a metalloproteinase from *Streptococcus pyogenes*. KININ 2002, The 16 th International Conference, May 16-31, 2002. Charleston, SC, USA.
 39. 岡本真一郎, 吉武淳, 赤池孝章, 宮本洋一, 菅守隆, 前田浩: インフルエンザおよび A 群レンサ球菌複合感染病態における NO の役割. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002

年 4 月 4-6 日，横浜.

40. 田村文雄，赤池孝章，宮本洋一，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病態発現メカニズム. 第 75 回日本細菌学会総会. 2002 年 4 月 4-6 日，横浜.

インフルエンザウイルスと A 群レンサ球菌の連続感染による 実験的劇症型感染症のワクチンによる予防法の検討

主任研究者 浜田 茂幸 大阪大学大学院歯学研究科 教授

研究要旨 壊死性筋膜炎、多臓器不全や毒素ショック症候群などを伴う致死的な劇症型 A 群レンサ球菌（GAS）感染症が、1980 年代より広く世界各国で報告されている。本研究においては、マウスに対して非致死量炎が発症するモデル疾患系を用いて、劇症型 GAS 感染症の予防法について検討した。BALB/c マウスに IAV（100 フォーカス形成単位）、経鼻感染の 2 日後に GAS（ 1×10^7 コロニー形成単位）を連続経鼻感染させると、IAV 感染肺胞上皮細胞に対し GAS の著しい付着亢進が認められた。あらかじめ、不活化インフルエンザワクチンを投与すると抗 IAV 抗体が誘導され、肺胞上皮細胞への IAV 感染を著しく抑制し、併せて GAS の付着も低下した。その結果、ワクチンの A 型インフルエンザウイルス（IAV）と非致死量の GAS を経鼻連続感染させると、大部分のマウスが死に到り、死亡マウスの約 10% に壊死性筋膜炎前処理マウスでは、肺炎の誘発が抑制され、感染後のマウスの生存率も著しく上昇した。また、ワクチンの投与は、皮下接種の方が経鼻接種に比してより強力な防御効果が得られた。以上の結果は、IAV と GAS の連続感染マウスにおいて、IAV 感染肺胞上皮細胞への GAS の付着の増強が、劇症型 GAS 感染症を誘導することを明らかにすると共に、同症に対する予防法としてインフルエンザワクチンの皮下接種が有効であることが示唆された。

A. 研究目的

A 群レンサ球菌（group A streptococci : GAS）は、咽頭部や皮膚から感染しヒトに対して咽頭炎、扁桃炎、膿痂疹などの急性局所性の化膿性炎や猩紅熱、急性糸球体腎炎、リウマチ熱などの全身性疾患を引き起こす。さらに、1980 年代後半以降、北米、欧州諸国、日本などを中心に GAS 感染症に起因する軟部組織及び筋組織の壊死や毒素ショック症状を呈する症例が相次いで報告

されている。このような症例は、劇症型 GAS 感染症と呼称され、国内では、1992 から 1999 年末までに 197 例、2000 年および 2001 年の両年ともに年間 40 例以上が報告されている。劇症型 GAS 感染症は、発熱や咽頭痛、四肢の疼痛の後、血圧低下、播種性血管内血液凝固症候群、多臓器不全などを引き起こし、急速に死に至る疾患であり、死亡率は 40% を超えるとされ、劇症型 GAS 感染症に対する診断基準はあるものの、

その治療法については未だ確立されていない。また、その予防法については、GAS 感染症に対するワクチンの開発がすすめられてはいるが、実用化には至っていない。

GAS の病原因子として M タンパク、フィブロンectin結合タンパク、莢膜などの菌体表層成分、システインプロテアーゼである レンサ球菌発熱毒素 B、発赤毒素、ストレプトリジン O、ストレプトリジン S などの溶血毒素、スーパー抗原である レンサ球菌発熱毒素 A などの分泌型タンパクが報告され、これらの病原因子と劇症型 GAS 感染症との関連について検討されている。しかしながら、現在まで劇症型 GAS 感染症の発症とこれらの病原因子との関連は明らかにされていない。その理由のひとつとして、適切な劇症型 GAS 感染症の発症動物モデルが構築されていないことが挙げられる。

GAS は上気道あるいは皮膚の創傷部から侵入することから、劇症型 GAS 感染症の発症機序を探る上で、GAS の経皮および経咽頭感染による同症発症マウスモデルを確立することは必要不可欠である。Ashbaugh らは、大腿部の皮下に GAS を接種することで壊死性筋膜炎を発症するマウスモデルを報告している。一方、水痘ウイルス感染による壊死性水痘に GAS の二次的感染が生じると、足部に壊死性筋膜炎を発症する臨症例から、ウイルスと GAS の経咽頭への連続感染によって、GAS 感染症の重症化を惹起す可能性が考えられた。

GAS 感染症は、寒冷期に多く報告されている。また、インフルエンザウイルス感染症も北半球の国々においては、12

月から 3 月に流行することが多い。さらに、インフルエンザウイルスの単独感染による死亡例は稀であり、細菌などの二次感染による肺炎が死亡例の多くを占めるとされる。これらの事実に基いて Okamoto らは、非致死量の A 型インフルエンザウイルス（以下 IAV）と非致死量の GAS を経鼻連続感染させる方法を用いることにより劇症型 GAS 感染症マウスモデルの確立に成功した。本研究では、同マウスモデルを用いて IAV 及び GAS の連続経咽頭感染による劇症型 GAS 感染症の発症機序のさらなる解明と、本症に対するワクチンによる予防法の検討を行った。

B. 研究方法

1. 生物材料と培養方法

毒素ショック症候群（TSLs）由来臨床分離株である GAS SSI-1 株（M 3 型）は、東邦大学医学部 村井貞子博士より分与された。GAS の生育には Todd - Hewitt プロス（THB; Becton Dickinson, Sparks, MD, USA）に 0.2% (w/v) の酵母エキス（Becton Dickinson）を添加した THY 培地を用いた。IAV A/FM/1/47 株（H1N1）は、大阪府立公衆衛生研究所 奥野良信博士より供与された。また、A/FM/1/47 株不活化インフルエンザワクチン（全粒子型）は、財団法人 阪大微生物病研究会より供与された。

イヌ腎臓上皮由来の MDCK 細胞の培養は、MEM 培地（Sigma, St. Louis, MO, USA）に、10% (v/v) ウシ胎児血清（FBS）、50 µg/ml のゲンタマイシン、10 U/ml のペニシリン G を添加した培地を用いて 37℃、5% CO₂ 条件下で

行った。

2. IAV と GAS のマウスへの連続感染

BALB/c マウス (メス, 7 ~ 8 週齢; 日本チャールス・リバー, 横浜) にジエチルエーテル麻酔下でインフルエンザウイルスの浮遊液 (25 μ l, 100 フォーカス形成単位; FFU) をマイクロピペットを用いて鼻腔より感染させた。さらにその 2 日後にマウスを麻酔下で GAS 菌体の浮遊液 (25 μ l, 1×10^7 コロニー形成単位; CFU) を同様に感染させ、その後 14 日間にわたりマウスの生死を観察した。

3. マウスへのインフルエンザワクチンの接種と連続感染

マウスの皮下あるいは鼻腔にインフルエンザワクチンを 4 週間間隔で 2 回接種した。最終接種から 12 日後に IAV (100 FFU) を、14 日後に GAS (1×10^7 CFU) を経鼻感染し、感染後のマウスの生死を観察した。皮下接種は、インフルエンザワクチン (0.15 μ g/200 μ l) を注射針 (25 ゲージ; テルモ, 東京) を用いて行い、経鼻接種は、麻酔下でインフルエンザワクチン (0.15 μ g/25 μ l あるいは 0.6 μ g/25 μ l) をマイクロピペットを用いて行った。また、ワクチン非接種群については、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) を皮下および鼻腔より偽接種した。

4. 抗 IAV 及び抗 GAS 抗体価の測定

インフルエンザワクチン接種の直前及びワクチン最終接種から 10 日後にマウスより採血し、血清中の抗 IAV 中和抗体価及び抗 GAS 抗体価を測定した。抗 IAV 中和抗体価は、ペルオキシダーゼ・抗ペルオキシダーゼ (PAP) 法を用いた中和活性測定法によって行った。

まず、マウス血清を二倍希釈法により希釈し、希釈血清 25 μ l を 100 FFU/25 μ l に調製したウイルス浮遊液へ添加した。ウイルスと血清の浮遊液を 37 $^{\circ}$ C, 1 時間静置することで抗 IAV 中和反応を行った後、懸濁液 25 μ l を 96 穴マイクロプレート (Nagle Nunc International, Rochester, NY, USA) に単層培養された MDCK 細胞に添加した。プレートを 35 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で 1 時間静置後、トリプシン (2 μ g/ml) 含有 MEM 培地を各穴に 100 μ l ずつ添加し、37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂ 条件下で 16 時間培養した。培養後 PBS で洗浄し、10 分間エタノールにより固定・乾燥後、マウス IgG 抗インフルエンザウイルス核蛋白質 (NP) モノクローナル抗体 (C43, 10 μ g/ml) を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた。PBS で洗浄後、ウサギ抗マウス IgG 抗体の 1000 倍希釈液を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、再度 PBS で洗浄し、ヤギ抗ウサギ IgG 抗体の 1000 倍希釈液を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間保温した。PBS で洗浄後、ペルオキシダーゼ複合体の 1000 倍希釈液を 37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させ、抗体と反応した細胞を 0.01% H₂O₂ 及び 0.3 mg/ml 3,3 - ジアミノベンジジン四塩酸 (和光純薬, 大阪) 含有の PBS 溶液を用いて発色させた。その後、PBS で洗浄・乾燥させ、発色した IAV 感染細胞のフォーカス数を計測し、フォーカス数が血清非添加群の 50% になる時点の血清希釈率を中和抗体価として算定した。また、抗 GAS 抗体価は、ELISA 法を用いて測定した。まず、GAS の 10⁶ CFU/100 μ l を 96 穴 ELISA プレート (Nagle Nunc International) へ添加し 4 $^{\circ}$ C, 一

夜培養後、ブロックエース(大日本製薬, 大阪)を添加し 37℃, 1 時間ブロッキングを行った. 0.05% Tween-20 (Sigma) 含有 Tris 緩衝生理食塩水 (TBS) 溶液 (TBS/T) でプレートを洗浄後, マウス血清を添加し 37℃, 1 時間反応させた. TBS/T で洗浄後, HRP 標識ヤギ抗ウサギ IgG 抗体の 2000 倍希釈液を添加し 37℃, 1 時間保温し, TBS/T で洗浄後, 3, 3', 5, 5'・テトラメチルベンジジン・TBS 溶液を用いて 15 分間発色させた. ついで, 1 M リン酸溶液 (H₃PO₄) を添加し反応を停止させマイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いて A₄₅₀ で計測し, 吸光度が 0.1 以下になる時点の血清希釈率を抗 GAS 抗体価として算定した.

5. GAS 及び IAV 数の計測

肺, 肝臓, 脾臓, 腎臓における GAS 数は, マウス諸臓器を RPMI-1640 培地 (Sigma) 存在下で磨砕し, その希釈液を血液寒天培地へ播種し, 24 時間培養後の β -溶血コロニー数を計測することによって算定した. 肺における IAV 数の計測は, フォーカス測定法により行った. 上記の肺組織磨砕液を 10 倍連続希釈し, 各希釈液 25 μ l を 96 穴マイクロプレートに単層培養した MDCK 細胞へ添加し, 35℃, 5% CO₂ 条件下で 1 時間静置した. さらに, トリプシン (2 μ g/ml) 含有 MEM 培地を添加し, 37℃, 5% CO₂ 条件下で 16 時間培養した. エタノールにて細胞を固定後, 前述の中和抗体価の測定法と同様, PAP 法により IAV 感染細胞を発色させ, IAV 感染細胞のフォーカス数を計測することによって IAV 数を算

定した.

6. 病理組織学的観察

GAS 感染から 2, 及び 4 日後にマウスより肺を摘出し, 7.5% 中性緩衝ホルマリン (pH7.2) にて固定後, パラフィンにて包埋した. 作成した肺組織切片は, ヘマトキシリン・エオジン染色あるいは, 抗 GAS 抗体及び抗 IAV ヘマグルチニン (HA) 抗体による二重免疫染色を行った. まず切片を脱キシレン, 脱エタノール処理を行い, PBS にて洗浄し, 切片にブロッキング剤 [1% (w/v) ウシ血清アルブミン, 5% (v/v) FBS, 10% (v/v) ブロックエース, 5% (v/v) ヤギ血清 (Chemicon International, Temecula, CA, USA)] を 100 μ l 滴下し, 4℃, 100% 湿度下で一晩静置後, PBS で洗浄し, 250 倍希釈したウサギ抗 GAS 抗体を 100 μ l 組織切片に滴下し, 室温で 1 時間静置した. PBS 洗浄後, FITC 標識のヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (0.5 μ g/50 μ l) 及び AlexaFluor568 標識のマウス HA 抗体 (0.5 μ g/50 μ l) の混合液を組織切片に滴下し, 室温で 1 時間静置した. PBS にて洗浄後 VECTASHIELD (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を一滴滴下した後, カバーガラスで切片を封入し, 同試料を共焦点レーザー顕微鏡 (LSM 510; Carl Zeiss, Oberkochen, Germany) にて観察した.

7. 肺胞マクロファージによる GAS 殺菌能試験

マウスをネンブタール (大日本製薬) 麻酔下でマウスの気管を露出させ, 20 ゲージの留置針を気管内へ挿入し, 0.1% EDTA 含有 PBS を 1 ml 注入し