

た. 肺を 1 分間マッサージ後, 注入液を吸引し, 肺胞マクロファージを回収した. 肺胞マクロファージを PBS で洗浄後, 10% FCS 含有 RPMI 1640 液体培地で懸濁し,  $5 \times 10^6$  cell/ml に調製した. 次に GAS を 20% 正常マウス血清含有の RPMI 1640 培地を用いて  $5 \times 10^6$  CFU/ml に調製し, 10 分間 37°C で静置し, 上記肺胞マクロファージ浮遊液へ添加した. 混合液を 37°C, 5% CO<sub>2</sub> 条件下で 30 分間振盪培養後 100  $\mu$ l を血液寒天培地に播種し, 37°C で一夜培養後,  $\beta$ -溶血コロニー数を計測した. また, 上記の GAS 浮遊液を, 同条件で培養し,  $\beta$ -溶血コロニー数を計測し, 肺胞マクロファージ添加前の GAS 数を算定した. 肺胞マクロファージの GAS に対する殺菌率は, (GAS 浮遊液 50  $\mu$ l 中のコロニー数 - 肺胞マクロファージと GAS の浮遊液 100  $\mu$ l 中のコロニー数) / (GAS 浮遊液 50  $\mu$ l 中のコロニー数)  $\times$  100% で算定した.

## 8. 統計学的手法

実験データの有意差検定は, Mann - Whitney U 検定と Kaplan - Meier 法を用いて行い,  $p < 0.05$  を有意差とした.

## C. 研究結果

### 1. インフルエンザワクチン皮下接種における IAV と GAS の連続感染による劇症型 GAS 感染の抑制

マウスに, IAV ワクチン (0.15  $\mu$ g) を 4 週間隔で 2 回皮下接種し, 最終ワクチン接種より 12 日後に IAV (100 FFU) を, さらに 2 日後に GAS ( $10^7$  CFU) をそれぞれ経鼻感染させ,

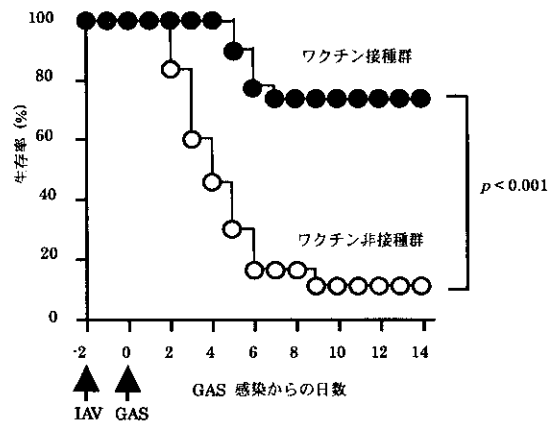


図 1 ワクチン接種による連続感染後のマウス生存率の上昇. IAV の感染日から 40 日前及び 12 日前に, 2 回ワクチン (●;  $n = 33$ ) ないし PBS (○;  $n = 30$ ) を皮下接種し, IAV と GAS を連続感染させ, GAS 感染日から 14 日間のマウスの生死を観察した.

マウスの生死を 2 週間に亘り観察した. その結果, ワクチン非接種群では, 連続感染から 10 日以上生存したマウスの割合がわずか 13% であったのに対してワクチン接種群では, 75% まで増加した ( $p < 0.001$ ) (図 1). また, ワクチン接種による肺での病理組織学的変化を検討するため, 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,

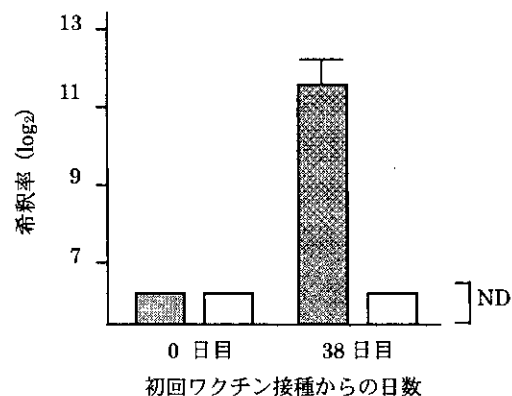


図 2 血清中の抗 IAV 中和抗体価, 抗 GAS 抗体価. ワクチンを 2 回皮下接種した後, 最終接種日より 10 日後に血液を採取し, 血清中の抗 IAV 中和抗体価 (□) 及び抗 GAS 抗体価 (■) の測定を行った. ND; 検出せず.

光学顕微鏡による観察を行った。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ず、肺における炎症の抑制が明らかに認められた。ワクチン接種による連続感染マウスの生存率の上昇及び連続感染後の肺における炎症の抑制メカニズムを検討した。まず、最終ワクチン接種 10 日後の抗体価の測定の結果、血清 IAV 中和抗体価の上昇が認められたが、抗 GAS 抗体価は検出限界値以下であった (図 2)。次に GAS 感染直前の肺における IAV 数は、ワクチン非接種群では、肺において平均  $2.2 \times 10^5$  FFU のインフルエンザウイルスが検出されたのに対して、ワクチン接種群では、全マウスが検出限界値 ( $2 \times 10^2$  FFU) 以下であり、ウイルスの生育が明らかに抑制されたことが示された ( $p < 0.001$ ) (図 3)。

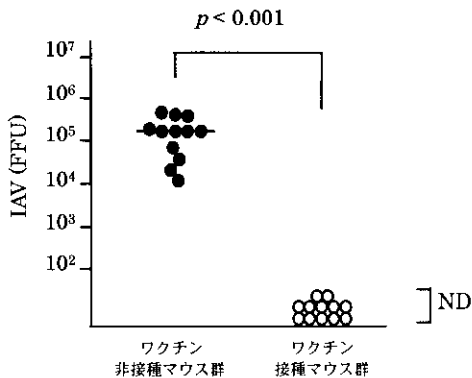


図 3 GAS 感染直前の肺における IAV 数の測定。最終ワクチン接種日より 12 日後に IAV を感染させ、感染から 2 日目にマウスより肺を摘出し、IAV 数を測定した。ND; 検出せず。

ワクチン接種による IAV 感染マウスの肺胞マクロファージの GAS に対する食食能の変化を検討した。図 4 に示すように IAV 感染によって IAV 非感染マウスに比して、約 45% も低下した食食能が、IAV 感染前のワクチン接種によって、IAV 非感染マウスの約 85% の

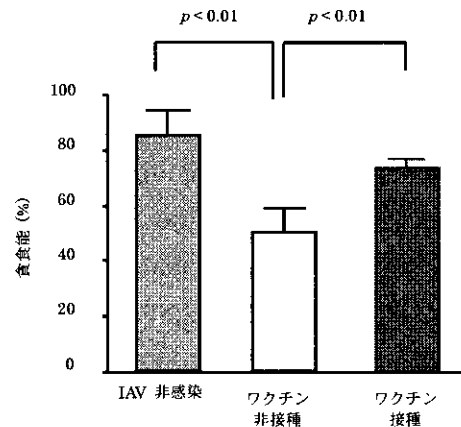


図 4 ワクチン接種による IAV 感染マウスの肺胞マクロファージの GAS に対する食食能の変化。図 1 に示す方法で、ワクチンの皮下接種ないし IAV 感染を行い、IAV 感染 2 日後の肺胞マクロファージを回収した。IAV 非感染マウス、IAV を感染させたワクチン非接種マウス及びワクチン接種マウスより採取した肺胞マクロファージ浮遊液に、GAS を添加し、静置培養後、菌の減少率を食食能として算定した。

水準にまで食食能が回復した。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。ワクチン非接種群では、肺で平均  $9.7 \times 10^7$  CFU、肝臓で平均  $1.2 \times 10^7$  CFU、脾臓で平均  $2.5 \times$

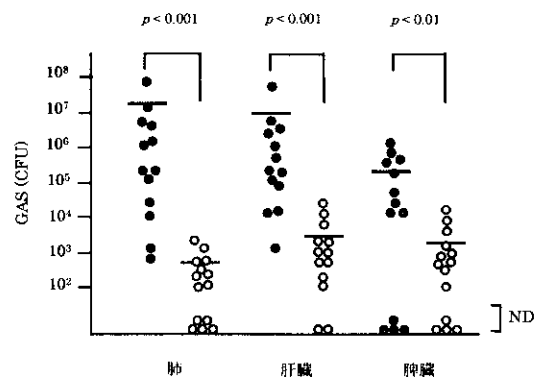


図 5 ワクチン接種による連続感染後の肺、肝臓、脾臓における GAS 数の減少。最終ワクチン接種日より 12 日後に IAV、さらにその 2 日後に GAS を連続感染させ、GAS 感染から 2 日目にワクチン非接種群 (●; n = 13)、ワクチン接種群 (○; n = 14) の肺、肝臓、脾臓を摘出し、各臓器中の GAS 数を計測した。ND; 検出せず。

10<sup>5</sup> 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<sup>2</sup> CFU, 肝臓で平均 2.8 × 10<sup>3</sup> CFU, 脾臓で平均 2.7 × 10<sup>3</sup> CFU 検出され, GAS 数が明らかに減少した (図 5). 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<sup>5</sup> 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 (図 6). ワクチン接種による連続感染マウスの IAV 感染肺胞上皮細胞への GAS の付着の変化を検討するため, 連続感染から 2 日後のマウス肺組織を抗 HA 抗体及び抗 GAS 抗体を用いて二重免疫染色を行い, 共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察した. その結果, 連続感染マウスの肺に見られた IAV 感染細胞の HA 発現が, ワクチン接種によってほとんど抑制され, それに伴って GAS もほとんど観察されなくなった. 以上の結果より, インフルエンザワクチン接種は, IAV

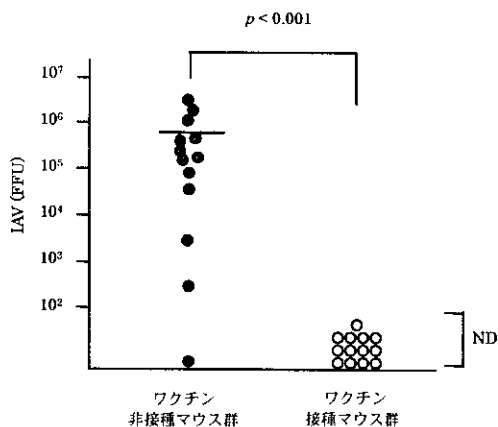


図 6 ワクチン接種による連続感染後の肺における IAV の増殖抑制. 最終ワクチン接種より 12 日目に IAV さらにその 2 日後に GAS を連続感染させ, GAS 感染日から 2 日目にマウスより肺を摘出し, 肺における IAV 数を計測した. ND: 検出せず.

の肺胞上皮細胞への感染を抑制させることにより, 二次的に感染する GAS の肺胞上皮細胞への付着を阻止し, その結果, 肺における GAS の増殖を防御することが示唆された.

## 2. インフルエンザワクチンの経鼻接種における IAV と GAS の経鼻連続感染による劇症型 GAS 感染症発症抑制効果

インフルエンザワクチンの接種方法として, 経鼻噴霧型のワクチン接種が検討されている. そこで, このマウスモデルを用いてワクチン経鼻接種における IAV と GAS の経鼻連続感染による劇症型 GAS 感染症の発症に対する抑制効果を検討した. まず, ワクチン 0.15  $\mu$ g あるいは 0.6  $\mu$ g を 4 週間隔で 2 回経鼻接種し, 最終ワクチン接種から 12 日後に 100 FFU の IAV を, さらにその 2 日後に 10<sup>7</sup> CFU の GAS を

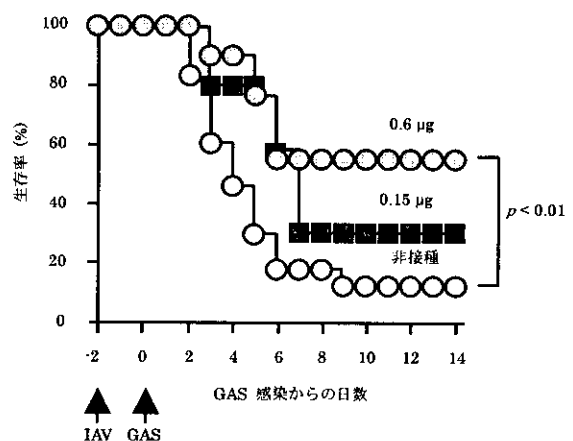


図 7 ワクチン経鼻接種による連続感染における生存率の変化. IAV の感染日から 40 日及び 12 日前に, 2 回ワクチン 0.15  $\mu$ g を経鼻接種 (■; n=10), 0.6  $\mu$ g を経鼻接種 (○; n=20), PBS を皮下接種 (○; n=30) し, IAV と GAS を連続感染させ, GAS 感染から 14 日間のマウスの生死を観察し, 生存率を算定した.

経鼻連続感染させ、マウスの生死を観察した。その結果、ワクチン非接種群における連続感染から 14 日目の生存率がわずか 13% であったことに対して、経鼻接種群では生存率は 23% に過ぎず、明らかな感染防御効果が認められなかった。しかし、経鼻ワクチンの投与量を 0.6  $\mu\text{g}$  に増量することにより生存率が 58% と有意に上昇した ( $p < 0.01$ ) (図 7)。

表 1 ワクチン経鼻接種による血清中の抗 IAV 中和抗体価

マウス番号	血清中の抗 IAV 中和抗体価 希釈率 (× 倍)		
	皮下接種群 (0.15 $\mu\text{g}$ )	経鼻接種群 (0.6 $\mu\text{g}$ )	非接種群
1	2560	160	<20
2	640	160	<20
3	2560	320	<20
4	2560	320	<20
5	1280	160	<20
6	2560	160	<20
7	640	160	<20
8	640	160	<20
9	1280	160	<20
10	10240	20	<20

一群 10 匹のマウスにワクチン 0.15  $\mu\text{g}$  皮下、0.6  $\mu\text{g}$  経鼻接種を 2 回行い、最終ワクチン接種日から 10 日目にマウスより血液を採取し、血清中の抗 IAV 中和抗体価を測定した。

また、ワクチン 0.6  $\mu\text{g}$  の経鼻接種により血清中の抗 IAV 中和抗体価 (平均希釈率  $\pm$  標準誤差 = 178  $\pm$  27 倍) の上昇を認めたが、その値はワクチン皮下接種後にみられる中和抗体価 (2496  $\pm$  902 倍) より明らかに低く有意差が認められた ( $p < 0.001$ ; Mann-Whitney U 検定) (表 1)。つぎにワクチンの経鼻及び皮下接種による、

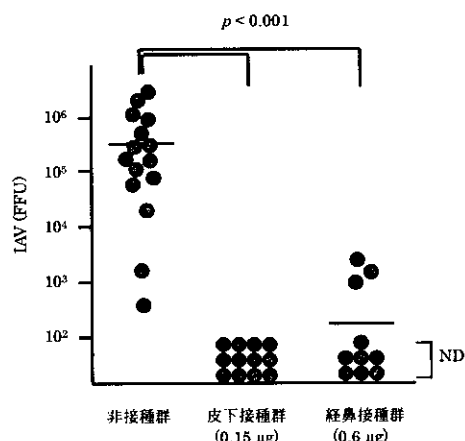


図 8 ワクチン経鼻接種による連続感染後の肺における IAV の増殖抑制。ワクチン経鼻接種後、IAV と GAS を連続感染させ、その 2 日後の肺における IAV 数を計測した。ND: 検出されず。

連続感染後の IAV の増殖抑制効果の差を検討した。ワクチン経鼻接種による IAV 量は、マウス 10 匹中 7 匹までが検出限界値以下であったのに対し、ワクチン皮下接種群では全匹が、IAV の検出限界値以下であり (図 8)、経鼻接種による IAV 増殖抑制効果は、皮下接種の場合と比較して弱いことを示した。さらに、連続感染後の GAS 数においてもワクチン皮下接種群で全匹 GAS 数が検出限界値以下であったのに対して、ワクチン経鼻接種群では 10 匹中 3 匹が検出限界値以上であり、ワクチン接種方法の違いによる IAV 増殖抑制効果の差が、GAS 検出数の差と相関することを示した (図 9)。

#### D. 考察

本研究で用いた IAV と GAS の連続感染マウスは、すべて重度の肺炎を発症し、かつ、肺は IAV と GAS が同時に検出本研究で用いた IAV と GAS の連続感

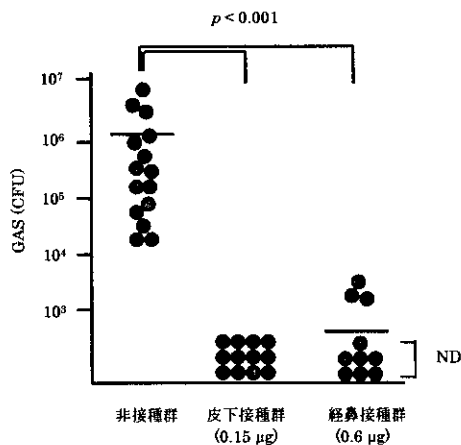


図 9 ワクチン経鼻接種による連続感染後の肺における GAS の数の減少. ワクチン経鼻接種後, IAV と GAS を連続感染させ, その 2 日後の肺における GAS 数を計測した. ND: 検出されず.

染マウスは, すべて重度の肺炎を発症し, かつ, 肺は IAV と GAS が同時に検出される唯一の臓器であり, 感染後, GAS が最も早く, かつ多数検出された. 共焦点レーザー顕微鏡を用いて病理組織学的観察を行ったところ, IAV 感染肺胞上皮細胞から発現する IAV の HA と GAS の局在がよく一致していた. 連続感染に先立って, インフルエンザウイルスワクチンで前処理すると, 肺胞上皮細胞上での HA の発現が抑制され, そのため GAS の付着が阻止され, その結果マウスの致死率の低下が誘導された (図 1). これらの結果は, IAV 感染肺胞上皮細胞への GAS の付着・侵入が, 連続感染に際して見られる実験的劇症型 GAS 感染症発症メカニズムを説明するものであることを示している. しかしながら, IAV 感染細胞への GAS の付着・侵入の増強に関与する GAS 及び IAV の化学的実体は未だ明らかではない. IAV 感染上皮細胞は, 表層に HA を発現する. HA は, 上皮細胞表層のシアル酸と結合し, 細胞への感染に関与

することが報告されており, GAS 表層のシアル酸と HA の結合が付着・侵入に何らかの役割を果たしていることが考えられる. GAS の上皮細胞への付着・侵入に関与する因子として, M タンパクや, 莢膜, フィブロネクチン結合タンパクなどが存在する. これらの因子が IAV 感染による細胞表層での発現が増強された CD46, CD44, インテグリンなどと結合する可能性もまた考えられるが, 今後のさらなる検討が必要である. 一方, IAV 不活化ワクチンの投与方法による感染防御能について調べたところ, 皮下接種の方が経鼻接種より連続感染による劇症型 GAS 感染症の発症抑制効果が明らかに高いことが示された (図 1, 7). IAV ワクチン 0.15  $\mu\text{g}$  を皮下接種したマウス血清中の抗ウイルス中和抗体価は, 同じワクチンの 0.6  $\mu\text{g}$  を経鼻接種したマウスのそれより数倍以上も高く (表 1), それに伴って二次的な GAS 感染による劇症型感染症の抑制率が大きく左右されている (図 7-9). Tamura らによれば, インフルエンザワクチンは, コレラトキシン や大腸菌易熱性毒素などのアジュバンドを経鼻的に併用すると, より強力な中和抗体の産生が誘導される他, 粘膜局所の分泌型 IgA の産生も誘導されるとされる. このことは, 経鼻接種における適切なアジュバントの併用が, 連続感染での劇症型 GAS 感染症の発症に対するより強い防御効果を誘導することが予想され, この系での連続感染による感染防御効果の可能性について検討する必要がある. 疫学的調査によれば, 北半球においては 10 月から 4 月までの期間が GAS 及び IAV 感染症の流行の最大のピークを呈している. また, カ

ナダでは 1990 ~ 1991 年において 12 月から 3 月までの期間における劇症型 GAS 感染症の患者数が、全体の約 80% を占めている。日本においても 1993 ~ 1994 年の調査で同時期にピークを認め、全体の約 75% (東京都立衛生研究所) を占めることから、この時期に劇症型 GAS 感染症も多く発症することが考えられる。IAV 感染への二次的な細菌感染による肺炎が死亡原因の多くを占めることより、ヒトにおいても IAV と GAS との連続感染が劇症型 GAS 感染症の発症原因の一つになりうる事が考えられる。しかし、現在、劇症型 GAS 感染症発症における IAV の因果関係について臨床的に検討した症例報告は全くなく、上記の可能性の検討が今後の課題になるものと思われる。

#### E. 結論

本研究は、IAV と GAS の連続感染によって劇症型 GAS 感染症を発症するマウスモデルを利用し、実験的劇症型 GAS 感染が、IAV 感染肺胞上皮細胞への GAS の付着増強によることを明らかにした。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接種により産生された抗 IAV 抗体は、肺胞上皮細胞への IAV 感染を抑制した。そのため、GAS の肺胞上皮細胞への付着・侵入が阻止され、結果として、劇症型 GAS 感染症の発症が有意に抑制された。同様の現象は、IAV の感染後に、*S. pneumoniae*, *S. aureus*, *S. agalactiae*,

*H. 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。

#### 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 (2): 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) .

## 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, 黒川顕, 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.



厚生労働科学研究費補助金 (新興・再興感染症研究事業)  
(分担) 研究報告書

Recombinant streptococcal pyrogenic exotoxin-B の  
ヒト末梢リンパ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

(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機構を明らかにし、併せて治療法の確立を目的とした。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、精製し、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のあること、マスト細胞並びに好塩基球からヒスタミンを遊離する作用のあることを報告して来たが、本年度は新たに作製した rSPE B/SCP にモルモット皮膚に対する毛細血管透過性亢進作用のあることを再確認すると共に、rSPE B/SCP のヒト末梢血単核球に対するマイトジェン活性につき検討した結果、1 mM DTT の添加、非添加に関係なく、また  $10^{-7}$ ~ $10^{-9}$  pg/ml の濃度において、いずれもマイトジェン活性は認められず、これがスーパー抗原として働く可能性のないことを示唆した。また、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血漿のヒスタミン濃度を測定したところ、7 例、11 検体中、4 検体に高値を認め、うち 2 例は死亡例であったが、健常値を示した例でも死亡が認められた。これらの結果は本劇症型感染症の治療においては、いわゆるケミカルメデイエーターに対する拮抗薬の投与の必要性を示唆する。

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、これまでに 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<sup>1)</sup>、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てきた。今回は新たに作製した rSPE B/SCP を用いて、モルモット皮膚における毛細血管透過性亢進作用を再確認し、ヒト T 細

胞に対する rSPE B/SCP のマイトージェン活性について検討し、併せて劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血漿中のヒスタミン濃度を測定した。

## B. 研究方法

### 1) 組み換え体 SPEB/SCP 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<sup>1)</sup>。

### 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、caseine 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 rSPE B/SCP (4  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) を 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。

### 4) T 細胞に対するマイトージェン活性 :

内山ら<sup>2)</sup>の方法によりヒト末梢血より T 細胞をえた。96 well のマイクロプレートにストレプトマイシン 100  $\mu\text{g}$ 、ペニシリン 100U、10% FCS、 $5 \times 10^5$  2ME を含む RPMI 1640 に浮遊した  $1 \times 10^5/\text{ml}$  の T 細胞を 200  $\mu\text{l}$  入れ、種々の濃度の rSPE B/SCP、陽性対照として TSST-1 を用いて培養後、16 時間、 $1 \mu\text{Ci}$   $^3\text{H}$ -thymidine でパルス後、細胞を集め、液体シンチレー

ションカウンターで測定した。

### 5) 患者血漿中のヒスタミンの測定 :

旭中央病院、日本医大多摩永山病院から恵与された劇症 A 群レンサ球菌感染症患者の血漿中のヒスタミン濃度は ELISA 法で測定した。

## C. 研究結果

今回作製、精製した rSPE B/SCP もこれまでと同様に強い cysteine protease 活性を示し、また、強いモルモット皮膚毛細血管透亢進作用を示した。

rSPE B/SCP のマイトージェン活性に関しては Fig. 1 に示すように、

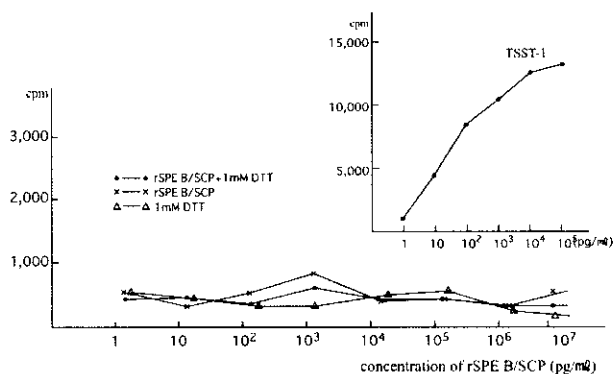


Fig. 1 Proliferation of Human T-cells Stimulated with rSPE B/SCP

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 cysteine protease 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。

劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血漿中のヒスタミン濃度は Fig. 2 に示したように 7 症例、11 検体中、4 例が高値を示し、高値を示した 2 例 (SK と KA) は亡くなられたが、正常値を示した例 (SH) でも死亡した症例が認

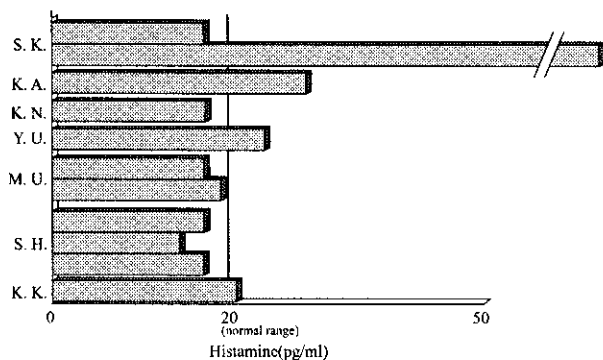


Fig. 2 Histamine Levels in the Plasma of Patients with STSS and Normal Subjects

められた。

#### 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。また、この透過性亢進作用は cysteine protease 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 protenase 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。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 に認められなかった。

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、rSPE B/SCP にもスーパー抗原活性があるか否かの検討を試みた。1mM DTT での活性化の如何にかかわらず、種々の濃度の rSPE B/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。

また、劇症型レンサ球菌感染症患者血漿中にヒスタミン濃度を測定した結果、極めて高い値を示す症例が認められたが、死亡例においても正常値を示す例もあり、必ずしもヒスタミン濃度と重篤度が相関するか否かは明らかでない。血漿採取のタイミングの問題もあり、さらに詳細な検討を必要としようが、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があることを示唆しよう。

#### E. 結論

- 1) 今回、新たに作製した rSPE B/SCP はモルモット皮膚毛細血管透過性亢進作用と共に、cysteine protease 活性を有していた。
- 2) rSPE B/SCP にはマイトージェン活性は認められなかった。
- 3) 劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血漿中にヒスタミン濃度の高い症例が認められた。

#### F. 文献

- 1) Watanabe, Y., Todome, Y., Ohkuni, H., Sakurada, S., Ishikawa, T., Yutsudo, T., Fischetti, V. A. and Zabriskie, J. B.: Cysteine protease activity and histamine release from the human mast cell line HMC-1 stimulated by recombinant streptococcal pyrogenic B/streptococcal cysteine protease. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 3944-3947.

- 2) Uchiyama, T., Miyoshi-Akiyama, T., Kato, H., Fujimaki, W., Imanishi, K. and Yan, X-J.: Superantigenic properties of a novel mitogenic substance produced by *Yersinia pseudotuberculosis* isolated from patients manifesting acute and systemic syndrome. *J. Immunol.*, 1993; 151: 4407-4413.

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Watanabe, Y., Todome, Y., Ohkuni, H., Sakurada, S., Ishikawa, T., Yutsudo, T., Fischetti, V. A. and Zabriskie, J. B.: Cysteine protease activity and histamine release from the human mast cell line HMC-1 stimulated by recombinant streptococcal pyrogenic B/streptococcal cysteine protease. *Infect. Immun.*, 2002; 70: 3944-3947.
- 2) 大国寿士：(分担) レンサ球菌属.  
「病原微生物学」(矢野郁也、内山竹彦、熊沢義雄 編) 2002 ; pp 101-104、東京化学同人
- 3) 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 13 年度総括・分担研究報告書
- 4) 大国寿士、留目優子、渡邊ユキノ：  
(分担) STSS レンサ球菌性毒素性ショック症候群。「現代感染症事情」改訂版、(中山宏明、多田功、

南嶋洋一 編) 2003; 印刷中. 医歯薬出版

##### 2. 学会発表

- 1) 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. XVth Lancefield International Symposium on Streptococci and Streptococcal Diseases, 2002 (Goa, India)

(マイトジェン活性の測定にご協力頂いた東京女子医大内山教授並びに加藤博士に深謝致します)

(共同研究者：留目優子、渡邊ユキノ)

厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症研究事業）  
分担研究報告書

- 1) A 群レンサ球菌による *in vivo* での好中球殺傷、
- 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

分担研究者 内山竹彦 東京女子医科大学微生物学免疫学教室 教授

研究要旨

1) 劇症型 A 群レンサ球菌(GAS)感染症(STSS)のモデルとなる GAS マウス腹腔投与モデルを用いて、その初期感染防御に重要な役割を果たすと考えられる腹腔への滲出細胞(PEC)の動態を検討した。弱毒菌投与時は PEC(形態学的には 99%が好中球)が誘導され、この誘導は死菌投与時にも観察された。一方、強毒菌投与時には PEC はほとんど誘導されなかった。両菌同時投与では PEC は誘導されなかった。そこで強毒菌による PEC 誘導抑制について、弱毒菌の代替として好中球誘導物質による PEC 誘導系を用いて検討した。PEC 誘導抑制作用は GAS 投与菌量依存性で、強毒菌固有の現象ではなかった。好中球誘導物質と強毒菌同時投与時には腹腔細胞の多数が死細胞だった。これらの PEC の誘導抑制作用は GAS の溶血毒素であるストレプトリジン S(SLS)の遺伝子を欠損させると解除された。PEC に *in vitro* で強毒株を作用させるとアポトーシスが誘導され、SLS 欠損株ではこのアポトーシス誘導作用は減少していた。以上から GAS は SLS を介して感染局所に遊走した好中球にアポトーシスを誘導することで生体の初期感染防御を回避している可能性が示唆された。

2) 近年 GAS 以外の C/G 群レンサ球菌(GCS、GGS)による STSS 症例が増加している。そこで STSS 発症に関わると考えられるスーパー抗原(様)因子のうち *spegg* について、これらの菌で検討した。*spegg* は検討した 40 菌株中 11 菌株で検出された。*spegg* の推定アミノ酸配列には多型が認められ、分子発生的解析ではヒト由来菌の *spegg* と動物由来の *spegg* はそれぞれ別個の群に集約された。以上からヒト由来菌に保持される特定の型の *spegg* が、同菌の病原性に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

A. 研究目的

1) 劇症 A 群レンサ球菌(GAS)感染症(STSS)では発症後ごく短期間に原因菌の急速な全身への拡散が起きる。この様な

獲得免疫の成立していない段階での感染防御には好中球などによる初期感染防御機構が重要な役割を果たすと考えられる。今回、この GAS の拡散機構について

検討のため、GAS 腹腔投与によるマウスの感染モデルで、感染局所である腹腔に滲出する細胞(PEC)の動態を観察した。

2) 近年、GAS 以外の C/G 群レンサ球菌(*S. dysgalactiae* など)による STSS 症例が散見されている。STSS の発症においては原因菌の産生するスーパー抗原が重要な役割を果たす可能性が指摘されている。しかし *S. dysgalactiae* でのスーパー抗原の分布状況やその分子レベルの解析はほとんど行われていない。そこですでにデータベースには登録されていたがまだ解析が行われていない *S. dysgalactiae* に存在するスーパー抗原様産物をコードする遺伝子 *spegg* について、その分布および塩基配列の解析を行い、同菌による疾患との関係について検討した。

## B. 研究方法

1. 菌株：GAS 菌株として STSS 症例より高頻度に分離され、マウスモデルにて LD50 値から病原性を解析済みである M3 型菌の臨床分離株を用いた。C/G 群レンサ球菌(GCS/GGS)としてヒトおよび動物由来の *S. dysgalactiae* 菌株を用いた。

2. GAS 投与後の PEC の観察：必要に応じて  $1 \times 10^8 \sim 1 \times 10^4$  CFU/マウスの GAS をマウスに腹腔投与した後、経時的に PBS にて腹腔内洗浄を行い、回収された PEC の数を顕微鏡的に算定した。GAS による PEC 誘導抑制実験では GAS 投与と同時に弱毒菌株またはチオグリコレート培地(好中球誘導物質)を投与し、12 時間後に観察した。PEC の形態観察は、アクリジンオレンジとエチジウムブロマイドでの染色後に蛍光顕微鏡

により行った。PEC のアポトーシスおよびネクローシス誘導の有無は AnnexinV とプロピオジウムヨウダイドによる二重染色後にフローサイトメーターにより解析した。

3. *spegg* の塩基配列解析：PCR により *spegg* のコード領域を含む断片を増幅し、直接シーケンス法により塩基配列を決定した。

(倫理面についての配慮)

動物実験については東京女子医科大学実験動物倫理委員会の審査・承認を受け、その指針に基づいて実施した。個人情報保護については、菌株とその由来間で連結不可能な匿名化を行った上で、菌株の使用および結果の公表を行った。

## C. 研究結果

1. 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。誘導された滲出細胞(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。強毒株と弱毒株を同時投与した場合には、PEC の誘導は認められなかった。以上の観察から強毒株による PEC 誘導抑制に着目し、GAS 弱毒株の代替として好中球誘導物質として知られるチオグリコレート培地を用いた PEC 誘導系で、以下の解析を進めた。

まず投与菌量と PEC 誘導抑制の関係について検討した。チオグリコレート培地投与と同時に  $2 \times 10^4$  CFU/マウスの菌を

投与し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のみ抑制効果が認められたが、 $3 \times 10^6$ CFU/マウスの投与量の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おり、GAS による PEC 誘導抑制は、誘導された PEC が GAS により殺傷されている可能性が考えられた。そこで GAS の宿主細胞傷害因子の一つであるストレプトリジン S(SLS)を欠損させた強毒株の変異株を作成し、その影響を検討した。SLS 欠損株は野生株に比べて *in vivo* での PEC 誘導抑制能が有意に低下していた。*in vitro* において野生株はチオグリコレート培地誘導好中球に対して強い殺傷作用を示し、この際好中球にはアポトーシスが誘導されていたが、SLS 欠損株では殺傷作用は有意に減少しており、またアポトーシス誘導能も野生株に比べ低下していた。

2. GCS および GGS に属するヒトおよび動物由来の *S. dysgalactiae* 菌株を40菌株収集し、それらの菌株での *spegg* の有無を PCR 法およびサザンハイブリダイゼーションにより検討した。ヒト由来、動物由来に関わらず、PCR 法で11菌株に *spegg* が検出され、サザンハイブリダイゼーションでも同様の結果を得た。*spegg* の保有の有無とパルスフィールドゲル電気泳動パターンおよび *emm* 遺伝子の塩基配列解析による菌株の型別の間には相関は認められなかった。*spegg* 陽性だった菌株の *spegg* のオープンリーディングフレーム全域の塩基配列を決定

し、各 *spegg* 間で比較した。*spegg* 間ではそれぞれの *spegg* のコードする蛋白質の推定アミノ酸の中には約10か所の互いに異なるアミノ酸への置換が認められ、多型ともいえる変異体がコードされていることが明らかとなった。*spegg* のコードする蛋白質のアミノ酸配列を分子発生学的に検討したところ、ヒト由来菌と動物由来菌は異なる群に分類された。

#### D. 考察

1. 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。STSS 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 STSS の発症に重要な役割を果たしているかも知れない。

2. GCS および GGS には僅かにアミノ酸配列の異なる *spegg* が一定頻度で分布しており、それらの型はヒト由来株と動物由来株で異なる事が明らかとなった。

#### E. 結論

1. GAS による好中球殺傷は、GAS の病原性、特に STSS の発症時の GAS の全身への拡散に重要な役割を果たしている可能性が示唆された。この殺傷機構に SLS 以外の因子がどの程度関与しているかを見極めた上で、SLS の機能抑制法を

検討することは STSS の発症抑制に重要と思われる。

2. ヒト由来菌の *spegg* 型が動物由来のそれと異なる事から特定の型の *spegg* がヒト感染症において重要な役割を果たしている可能性がある。そのため *spegg* のスーパー抗原性の詳細な解析が急務と考えられる。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Kikuchi K, Kato K, Suzuki R, Endoh M, Uchiyama T. Quantitative and qualitative comparison of virulence traits including murine lethality among *emm*-type group A streptococci J. Infect. Dis 2003 in press
2. Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Kato H, Kikuchi K, Totsuka K, Kataoka Y, Katsumi M, Uchiyama T. *Streptococcus dysgalactiae*-derived mitogen (SDM), a novel bacterial superantigen. Characterization of its biological activity and predicted tertiary structure. Mol Microbiol. 2003 in press.
3. Monze M, Imanishi K, Kato H, Hayashi T, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T. Species specific responses to bacterial superantigen. J. Tokyo Wom. Med. Univ. 2003. in press.
4. Matsuda Y, Kato H, Yamada R, Okano H, Ohta H, Imanishi K, Kikuchi K, Totsuka K, Uchiyama T. Early diagnosis of toxic shock syndrome by detection of T-cell-receptor V $\beta$ 2-positive T cells. Emerg. Infect. Dis. 2003. in press.
5. Okamoto T, Saito S, Yamanaka H, Arimura Y, Tomatsu T, Kamatani N, Ogiuchi H, Uchiyama T, Yagi J. Expression and function of the co-stimulator H4/ICOS on the activated T cells of rheumatoid arthritis patients. J. Rheumatol. 2003. in press.
6. Arimura Y, Kato H, Dianzani U, Okamoto T, Kamekura S, Buonfiglio D, Miyoshi-Akiyama T, Uchiyama T, Yagi J. A co-stimulatory molecule on activated T cells, H4/ICOS, delivers specific signals in T(h) cells and regulates their responses. Int. Immunol. 2002 Jun;14(6):555-66.
7. Kato H, Takahashi N, Arimura Y, Imanishi K, Nishida H, Uchiyama T. 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. 2002 Mar;8(1):111-4.
8. Chen L, Koyanagi M, Fukada K, Imanishi K, Yagi J, Kato H, Miyoshi-Akiyama T, Zhang R, Miwa K, Uchiyama T. 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. 2002 Apr 15;168(8):3817-24.
9. Takeda N, Kikuchi K, Asano R, Harada T, Totsuka K, Sumiyoshi T, Uchiyama T, Hosoda S. Recurrent septicemia caused by *Streptococcus canis* after a dog bite. Scand J Infect Dis. 2001;33(12):927-8.



## 2. 学会発表

1. 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(会議録) 趙吉子(東京女子医科大学 微生物免疫), 秋山徹, 内山竹彦日本細菌学雑誌 (0021-4930) 57 巻 1 号 Page146(2002.02)
2. 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(会議録). 脇坂直樹(東京女子医科大学 微生物免疫), 秋山徹, 趙吉子, 内山竹彦日本細菌学雑誌 (0021-4930) 57 巻 1 号 Page198(2002.02)
3. 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(会議録)秋山徹(東京女子医科大学 微生物免疫), 趙吉子, 加藤秀人, 菊池賢, 内山竹彦日本細菌学雑誌 (0021-4930) 57 巻 1 号 Page238(2002.02)
4. 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. 三好(秋山) 徹、脇坂直樹、趙吉子、内山竹彦.第11回Lancefieldレンサ球菌研究会(2002)
5. 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. 趙吉子、三好(秋山) 徹、内山竹彦. 11回Lancefieldレンサ球菌研究会(2002)
6. 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(会議録). 三好徹[秋山](東京女子医科大学 微生物免疫), 趙吉子, 加藤秀人, 内山竹彦. 日本免疫学会総会・学術集会記録(0919-1984) 31 巻 Page135(2001.12)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

なし

厚生労働科学研究費補助金（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 細菌第一部部長  
共同研究者： 池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌第一部研究員

**研究要旨** 我が国における A 群レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) の疫学的調査から、M3 型が 1993～1994 年をピークに急激に増加するに従い、劇症型溶血性レンサ球菌感染症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 型による劇症型溶血性レンサ球菌感染症がみられなくなっている。昨年度の研究で、1990 年代の株には、新たに 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た。この挿入領域について調べた結果、発熱毒素である SpeL のほか、その下流にヘビ毒の成分である phospholipase A<sub>2</sub> と相同性のある蛋白質をコードする遺伝子 (*sla*) が存在していた。この遺伝子産物を解析した結果、この蛋白質は細胞毒性を示す結果を得た。

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 (Streptococcal toxic shock-like syndrome) 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、劇症型溶血性レンサ球菌感染症は主として 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 型分離株が急激に増加するに伴い、劇症型溶血性レンサ球菌感染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、1990 年代に分離された M3 型株には、41,796 bp のファージ様 DNA 断片が挿入されていることを見出した。本研究は、この領域

に存在する既知の病原蛋白質と相同性のある遺伝子産物の機能について検討した。

B. 研究方法

1. recombinant Sla (rSla) 蛋白質の精製

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。これを大量発現することで、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) が産生される。この蛋白質を大量発現させた後、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精製した。rSla 蛋白質は、GST-Sla に Precision protease を作用させて精製した。

## 2. phospholipase A<sub>2</sub> の定性実験

TLC 法により、phospholipase A<sub>2</sub> 活性の有無を調べた。基質は、L-3-phosphatidylcholine,

1-stearoyl-2-[1-<sup>14</sup>C] arachidonyl を用いた。基質と recombinant Sla 蛋白質を 37°C、30 分間培養後、TLC で分画した。

## 3. recombinant Sla 蛋白質による細胞障害活性試験

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 Lactate dehydrogenase の酵素活性を指標として測定した。

## C. 研究結果

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 42kb) の中の ORF について BLAST 検索を行った結果、*attR* 側に phospholipase A<sub>2</sub> と相同性のある蛋白質 (Sla) が存在した。Sla は、活性ドメイン及びカルシウム結合ドメインを保存していることから、phospholipase A<sub>2</sub> 活性を保有しているものと考えられた。まず、この蛋白質が phospholipase A<sub>2</sub> 活性を保有しているかを調べた。TLC 法により、その活性を調べた結果、この蛋白質は、phospholipase A<sub>2</sub> 活性を有することが判明した。

BLAST 検索の結果、この phospholipase A<sub>2</sub> は、特にヘビ毒の phospholipase A<sub>2</sub> 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 phospholipase A<sub>2</sub> は、壊死毒、出血毒、神経毒として機能しており、細胞を破壊する毒性があることが知られている。そこで、まず、劇症型溶血性レンサ球菌感

染症の特徴の一つである軟部組織壊死がこの蛋白質によるものかを調べるため、筋肉細胞に対する細胞障害活性を Lactate dehydrogenase (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 の活性が上昇することから、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。

## D. 考察

*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。A 群溶血性レンサ球菌での *sla* 遺伝子の分布を調べたところ、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を PCR により確認した。このことは、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を示唆している。これらの型により引き起こされた患者の臨床診断について調べたところ、軟部組織壊死 (壊死性筋膜炎を含む) を引き起こした患者の割合は、M1 型は 65.1%、M3 型は 81.8% と M3 型のほうが M1 型より有意に高い。このことを考えると、壊死性筋膜炎を引き起こすには、Sla は必須ではないが、その重症化あるいはそれ以外の重要な機能を有していることが考えられる。

## E. 結論

- 1) 1990 年代の M3 型株に存在するファージ様 DNA 断片内には、ヘビ毒の phospholipase A<sub>2</sub> と相同性のある蛋白質をコードする遺伝子が存在する。
- 2) この蛋白質は、筋肉細胞に対して、細胞障害活性を保有する。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 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. 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 (2002).
2. 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. Changing prevalent T serotypes and *emm* genotypes of *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock-like syndrome (TSLS) patients in Japan. *Epidemiol. Infect.*, in press.

### 2. 学会発表

1. 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, Asheville, 2002.

2. 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. 日本細菌学会総会、横浜、2002.