

- A. Yoshida, Y. Okamoto, T. Tarukawa, et al. Epidemiological analysis of fluoroquinolone-resistant group B streptococci. 18th ECCMID, Barcelona, 2008

G. 知的所有権の取得状況
該当なし

図1. キノロン耐性菌の年次推移

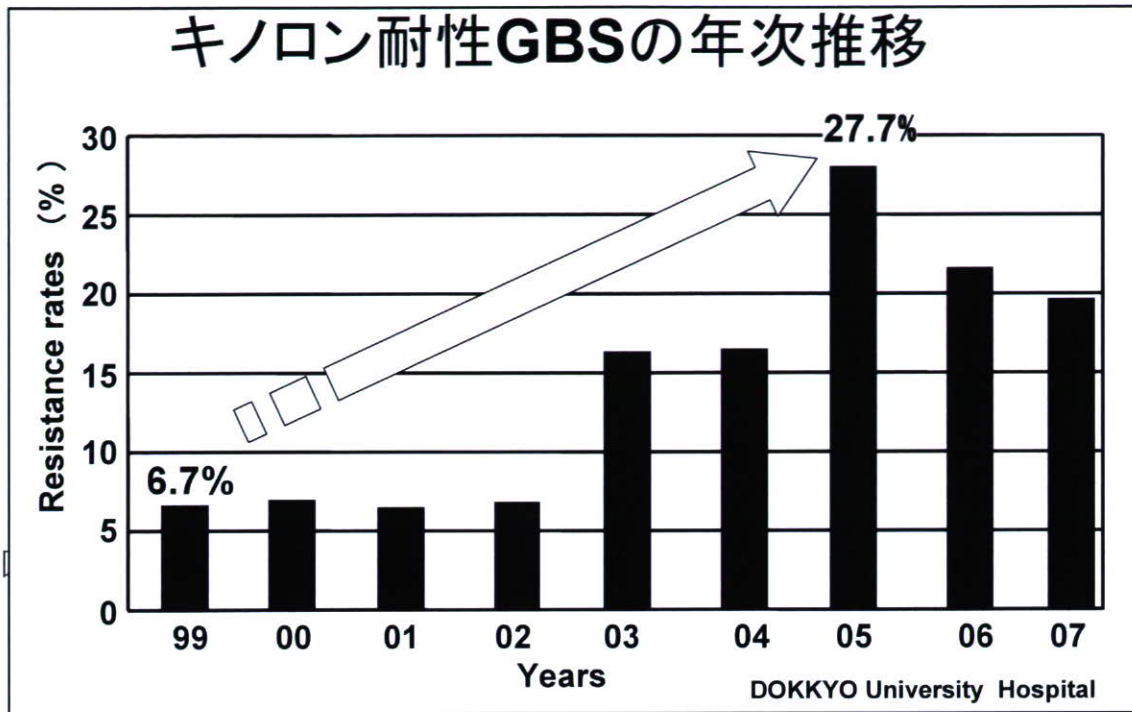


図2. GBSの莢膜型別

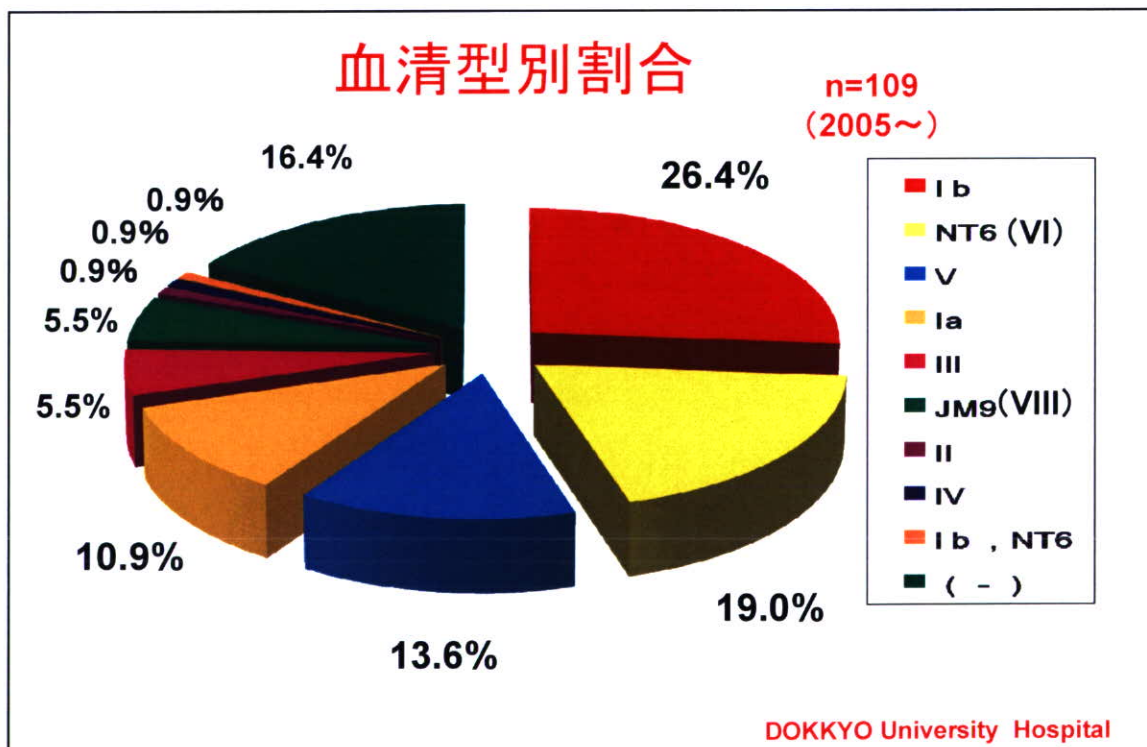
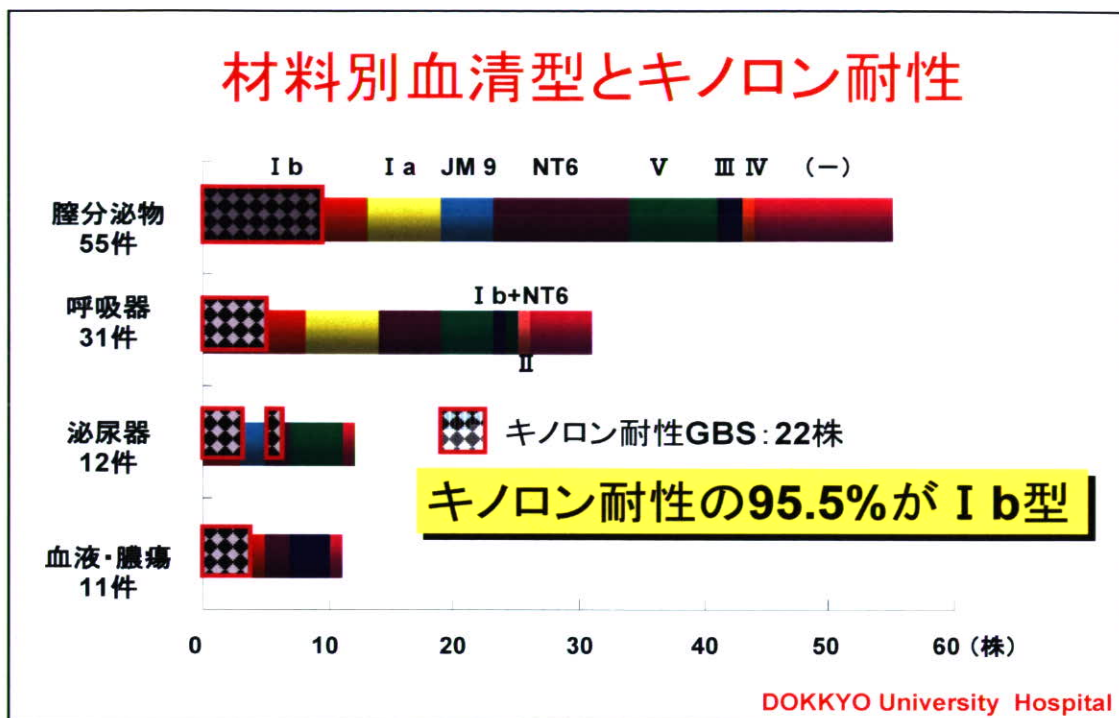


図 3. 材料別血清型とニューキノロン系薬耐性



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

新規に発生しているレンサ球菌による劇症型感染症の臨床的・細菌学的解析と
診断・治療法に関する研究

肺炎球菌と *Streptococcus suis* による感染症の病態と診断に関する研究

分担研究者 大石和徳 大阪大学微生物病研究所 教授

研究要旨 ベトナムの小児の肺炎患者において鼻腔中で病原性細菌が高濃度（ 10^6 cfu/ml）に検出される頻度は49.4%と最も高く，急性気管支炎では28.%，健常小児では17.1%と低かった。主要な病原性菌は肺炎球菌，インフルエンザ菌であった。鼻咽頭に病原性細菌が高濃度に検出菌数された小児患者では，検出菌数の少ない小児患者に比較して有意に肺炎を発症しやすいことが示された。5歳以下の小児におけるALRI感染症の研究から，上気道に増殖した肺炎球菌は下気道に落下し，細菌性肺炎を惹起することが示唆される。

北タイで流行する新興感染症である *Streptococcus suis* 感染症の発生頻度を調査する目的で，パヤオ県 Public Health Office とパヤオ県立病院，チェンカム病院を中心に Population-based study の体制を構築した。ヒト *S. suis* 感染症に対する迅速診断法の開発と北タイにおける本症の実態の解明が期待される。

A. 研究目的

1) 急性下気道感染症(ALRI)，とりわけ肺炎は5歳以下の小児の主要な死因である。肺炎球菌は小児の肺炎の重要な原因菌であり，しばしば肺炎球菌性肺炎に先行して上気道の菌定着が認められる。従って，この上気道における菌定着は肺炎発症において重要な役割を果たすことが示唆される。本研究では上気道の病原性

菌定着の小児肺炎発症における意義を明らかにする。

2) ブタ連鎖球菌(*Streptococcus suis*)はブタの上気道に定着し，しばしばブタやヒトに劇症型感染症，髄膜炎の重症感染症を惹起する。とりわけ serotype 2 株が主要なブタやヒトにおける感染症の原因菌である。近年，中国や北タイにおいてヒトにおける本症アウトブレイクが認められ，

アジア地域の新興感染症として認識されている。とりわけ、北タイにおける流行はブタの生血や生肉の摂食に起因していると考えられている。しかしながら、本菌の病原性因子や劇症感染症や髄膜炎の病態の詳細は不明である。また、本症の流行地域においては迅速診断法の開発が待望されている。

本研究では、ヒトにおける *Streptococcus suis* 感染症に対する迅速診断系の開発と、北タイパヤオ県におけるヒト *Streptococcus suis* 感染症の発生頻度、臨床病態を明らかにすることを目的とする。

B. 研究方法

1) 肺炎球菌の上気道定着と小児肺炎

ベトナムハノイ市の小児病院において2001年-2002年に小児ALRI患者を登録した。胸部X線で診断した肺炎は91例(平均年齢14.6ヶ月)、急性気管支炎は73例(平均年齢12.4ヶ月)、健常小児は70例(平均年齢15.0ヶ月)であった。全ての症例において鼻咽頭スワブを採取し、定量培養を実施した。定量培養結果を 10^6 cfu/ml以上、それ以下に分け、各群における 10^6 cfu/ml以上の菌数の病原細菌の頻度との相関を検討した。

2) *S. suis* 感染症の研究

1. *S. suis* serotype 2 の莢膜多糖体(CPS)の精製
S. suis serotype 2 の莢膜多糖体(CPS)に対

する単クローン抗体作製のために、ブタ由来強毒株である *S. suis* serotype 2 31533 を増菌させ、洗浄後に菌を回収し、121°C、15分でオートクレーブ処理をした。その後、フェノール処理後の上清を25%エタノールと0.1M CaCl₂を添加し、核酸を除去した。その後、蒸留水で透析し、エタノール沈殿後にCPSを得た。Phenol-sulfuric acidアッセイで確認できた精製CPSの総量は6.6 mgであった。

2. 2007年の8月15日、10月3日、2008年2月8日に地域医科学局、パヤオ県Public Health Office、パヤオ県立病院、チェンカム病院を訪問し、医療従事者、行政官、研究者、獣医師を交えて会議を開催した。2007年5月に発生したヒト*S. suis*感染症アウトブレイクの実態、地域の食習慣など、本症の背景について理解を深めた。

C. 研究結果

1) 肺炎球菌の上気道定着と小児肺炎

小児の肺炎患者において 10^6 cfu/mlの菌数の病原細菌の頻度は49.4%と最も高く、急性気管支炎では28.%, 健常小児では17.1%と低かった。主要な病原性菌は肺炎球菌、インフルエンザ菌(非莢膜型インフルエンザ菌; NTHi)であった。鼻咽頭の菌数の多かった(10^6 cfu/ml)小児患者では、菌数の少ない小児患者に比較してより有意に肺炎を発症しやすいことが示された(オッズ比4.73, 95% CI: 2.24, 9.96)。

2) *S.suis*感染症の研究

1. *S. suis* serotype 2 CPSの電気泳動とウエスタンブロットによる血清型特異性の確認

S. suis serotype 2 31533 の CPS を SDS-PAGEで展開し, 抗serotype 1 CSP, 抗serotype 2 CPSに対する抗血清 (Serum Institute)を用いてウエスタンブロットを実施した。抗serotype 1 CSP抗血清では反応せず, 抗serotype 2 CPSに対する抗血清で高分子量のバンドを認めた。精製されたCPSが serotype 2 CPSであることが確認された。

2. 北タイパヤオ県のパヤオにおけるヒト *S.suis*感染症調査

パヤオ県Public Health Officeとパヤオ県立病院, チェンカム病院を中心に Population-based surveillanceの体制を構築した。現在, タイ以医科学局への臨床研究実施のための倫理審査申請を準備中である。

D. 考察

1. 本研究で, 小児の鼻咽頭菌数と肺炎発症の有意な相関が示された。5歳以下の小児において肺炎球菌やインフルエンザ菌等の鼻咽頭の肺炎球菌をはじめとした呼吸器病原性菌は下気道に落下し, とりわけ獲得した菌に対する免疫のない宿主において肺炎を発症することが示唆される。本研究に於ける 90%の ALRI 症例には急性上気道炎の先行が認められ, ウイルス感染後の気道上皮細胞における菌

付着の促進が細菌性肺炎の発症を招来すると考えられる。

2. 北タイではブタの生血や生肉の食習慣があることから, パヤオ県におけるヒト *S.suis* 感染症の頻度は高いと考えられる。症例の大多数は成人と考えられ, 敗血症のみならず細菌性髄膜炎の主要な原因となっていると考えられる。また, 本症の原因の大部分を占める *S. suis* serotype 2 に対する迅速診断系の開発が必要である。

E. 結論

1) 5歳以下のベトナム小児における ALRI感染症の研究から, 上気道に増殖した肺炎球菌は下気道に落下し, 細菌性肺炎を惹起することが示唆される。

2) ヒト *S. suis* 感染症に対する迅速診断法の開発と北タイにおける本症の実態の解明が期待される。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Chen M, Hisatomi Y, Furumoto A, Kawakami K, Masaki H, Nagatake T, Sueyoshi Y, Iwanaga T, Aizawa M, **Oishi K**. Comparative immune response of patients with chronic pulmonary diseases

- during the 2-year period after pneumococcal vaccination. Clin. Vac. Immunol 14:139-145, 2007
2. Koyama J, Ahmed K, Zhao J, Saito M, Onizuka S, Oma K, Watanabe K, Watanabe H, **Oishi K**. Strain-specific pulmonary defense achieved after repeated airway immunizations with non-typeable *Haemophilus influenzae* in a mouse model. Tohoku J Exp Med. 211:63-79, 2007
 3. Anh DD, Huong PLT, Watanabe K, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phuong DM, Tanimura S, Ohkusa Y, Nagatake T, Watanabe H, **Oishi K**. Increased rates of intense nasopharyngeal bacterial colonization of Vietnamese Children with radiological pneumonia. Tohoku J Exp Med 213: 167-172,2007.
 4. Watanabe K, Anh DD, Huong PH, Nguyet NT, Anh NTH, Thi NT, Dung NT, Phong DM, Rusizoka OS, Nagatake T, Watanabe H, **Oishi K**. Drug-resistant pneumococci in children with acute lower respiratory infections in Vietnam. Pediatrics International (in press)
 5. Watanabe H, Batuwanthudawe R, Thevanesam V, Kaji C, Qin L, Nishikiori N, Saito W, Saito M, Watanabe K, **Oishi K**, Abeyasinghe N, Kunii O. Possible prevalence and transmission of acute respiratory tract infections caused by *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* among the internally displaced persons in tsunami disaster evacuation camps of Sri Lanka. Intern Med. 46:1395-1402, 2007.
 6. Dimaano E, Saito M, Honda S, Miranda EA, Alonzo MT, Valerio MD, Mapua CD, Inoue S, Kumatori A, Matias R, Natividad FF, **Oishi K**. Lack of efficacy of high dose intravenous immunoglobulin treatment of severe thrombocytopenia in patients with secondary dengue virus infection. Am J Trop Med Hyg 77: 1135-1138, 2007
 7. Yoshii H, Kamiyama H, Amanuma H, **Oishi K**, Yamamoto N. Mechanisms underlying glycosilation-mediated loss of ecotropic receptor function in murine MDTF cells, and its implication for receptor evolution. J Gen Virol 89:297-305,2008
 8. Inoue Y, Trapnell BC, Tazawa R, Arai T, Takada T, Hizawa N, Kasahara Y, Tatsumi K, Hojo M, Ichiwata T, Tanaka N, Yamaguchi E, Eda R, **Oishi K**, Tsuchihashi Y, Kaneko C, Nukiwa T, Sakatani M, Krischer JP, Nakata K. Characteristics of a large cohort of autoimmune pulmonary alveolar proteinosis patients in Japan. Am J Respir Crit Care Med (in press)

9. 川上健司, 大石和徳. 肺炎球菌ワクチンの最新事情と渡航者の接種. 日本医事新報 4366:71-74,2007.
10. 川上健司, 大石和徳. 予防接種の現状と対策2 細菌に対するワクチン治療学 41:18-20,2007.
- 11.大石和徳. 肺炎球菌ワクチン再接種の是非. 日本医事新報, 4354: 98-99, 2007.
12. 大石和徳. 日本内科学会雑誌. 肺炎球菌ワクチン-5年後の再接種の是非-. 日本内科学会雑誌, 2008 (印刷中) .

2. 学会発表

1. 陳 蒙, 黒木麗喜, 吉嶺裕之, 有吉紅也, 大石和徳: HIV 感染成人による肺炎球菌コンジュゲートワクチンによる血清中オプソニン活性と増強効果. 第55回日本化学療法学会西日本支部総会, 神戸, 2007年10月29-31日.
2. 古本朗嗣, 大日康史, 大石和徳: 慢性肺疾患患者における急性増悪びに対する肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチンの相加的効果. 第11回日本ワクチン学会, 横浜, 2007年12月8-9日.
3. 大石和徳, 高橋俊司. アナライザーワークショップ: β 溶血性連鎖球菌. 第19回に本臨床微生物学会総会, 東京, 2008年1月26-28日.
- 4.Oishi K. Antibiotic resistance of pneumococci and other respiratory bacteria in Asian countries: 12th International Conference on Emerging Infectious Diseases in the Pacific Rim

4-6 December 2007, Haikou, Hainan, China

5.Oishi K., Oma K, Jizi Zhao, Ryuichi Uchida. Nasal immunization with recombinant pneumococcal surface protein A with mucosal adjuvants, such as pFL or TLR ligand, provide protective immunity against pneumococcal pneumonia in mice. US-Japan Cooperative Medical Science Program Acute Respiratory Infection Panel.25-26, February, 2008, Bethesda, Maryland, USA.

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得: なし
2. 実用新案登録: なし
3. その他: なし

劇症型レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係る宿主要因の
解明についての研究 (1)

分担研究者 渡辺 治雄 国立感染症研究所 細菌第一部 副所長

協力研究者 池辺 忠義 国立感染症研究所 細菌第一部

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、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、*emm49* 型が 2000 年から増加し始めている。これらの株は、ストレプトキナーゼ遺伝子の発現量が増加しており、その原因は、二成分制御系のセンサー蛋白をコードする *csrS* 遺伝子に変異が生じていることが判明した。病原性遺伝子の発現を調べた結果、この変異により、様々な病原性遺伝子の発現が増強していた。*in vivo* での *csrS* 変異による病原性の変化を、マウスの致死性、血中の菌数、臓器障害を指標として調べた結果、*csrS* の変異により *S. pyogenes* の病原性が上昇していることが確認された。以上の結果から、*csrS* が *S. pyogenes* の病原性に強く関与していること、また *csrS* 変異は STSS 患者分離株でのみ見出されることから、本因子が *S. pyogenes* の劇症型化に関与している可能性が強く考えられた。

A. 研究目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)は、病状の進行が急激かつ劇的で、発病から数十時間以内にショック症状、多臓器不全などが起こり、患者を死に至らしめる可能性が高いことが知られている。STSS の主な原因菌である *S. pyogenes* は、抗原性の違いから 100 以上もの *emm* 型に分類される。この中で、STSS は主として *emm1* 型の *S. pyogenes* によって引き起こされる。近年、日本において、この *emm1* 型が減少し、様々な *emm* 型が流行している。この中で、2000 年以降、日本において *emm49* 型の *S. pyogenes* による STSS が増加している。本研究は、*emm49* 型の *S. pyogenes* が STSS を引き起こすようになったかを検討した。

B. 研究方法

1. ストレプトキナーゼ遺伝子(*ska*)の発現量

プロモーターレスの *phoZ* 遺伝子の upstream にストレプトキナーゼ遺伝子のプロモーター領域を導入し、アルカリ性ホスファターゼの活性を指標として、ストレプトキナーゼ遺伝子の発現量を測定した。*p*-nitrophenyl phosphate を基質として用い、室温で反応後、405 nm で吸光度を測定した。

2. RNA の抽出と RT-PCR

S. pyogenes を THY 培地で 37°C で OD600 = 0.75 まで培養し、RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) を用いて、total RNA を抽出した。RT-PCR は、One Step RNA PCR Kit (AMV)

(TaKaRa Shuzo)を用いて行った。

3. 動物実験

様々な濃度の *S. pyogenes* を腹腔内に 0.5 ml 接種し、7 日後の LD50 値を測定した。臓器の摘出は、 5×10^7 の菌接種 1 日後行い、病理検査に用いた。同様に 1 日後の血液を採取し、100 μ l あたりの血中の菌数を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた動物実験は、国立感染症研究所動物実験実施規程に従って、行われた。

C. 研究結果

emm49 型の STSS は、腎不全がまず見られることが特徴である。腎機能に、ストレプトキナーゼが影響を与えることが知られていることから、*ska* 遺伝子の発現量を調べた結果、STSS 患者分離株では、*ska* 遺伝子の発現量が、非 STSS 患者分離株のそれより有意に高いことが判明した。*ska* 遺伝子は、FasBCA、*sagA*、*CsrRS* によって制御されていることが知られていることから、これらの遺伝子の変異株を作製し、*ska* 遺伝子の発現量の影響を調べた。その結果、*CsrS* の変異下で非 STSS 株の発現量が上昇し、STSS 株の発現量は変化しなかった。しかがって、STSS 株で見られた *ska* 遺伝子の発現量の上昇は *CsrSR* を介していることが判明した。STSS 株、非 STSS 株の *csrRS* 遺伝子の塩基配列を調べた結果、STSS 患者分離株においてのみ、*csrS* に変異が生じていることが判明した。病原性遺伝子の発現を調べた結果、この変異により、*scpA*、*nga*、*slo*、*scpC*、*hasA* など様々な病原性遺伝子の発現が増強していた。*in vivo* での *csrS* 変異による病原性の変化を、マウスの致死性、血中の菌数、臓器障害を指標として調べた結果、*csrS* の変

異により、マウスに対する致死性の増加、血中の菌数の増加、腎臓や肺に障害が見られ、*S. pyogenes* の病原性が上昇していることが確認された。

D. 考察

劇症型溶レン菌感染症は、日本では、1992 年に報告され、それ以降毎年 50-100 例報告があり、致死率が 40-50% と非常に高い感染症である。その原因菌である *S. pyogenes* は、咽頭炎等を引き起こす病原体であるが、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こす株と咽頭炎等を引き起こす株との違いは明らかでなかった。本研究で、劇症型感染症を引き起こす株は、*csrS* 遺伝子に変異があり、この変異により、様々な病原性遺伝子の発現が上昇し、血中で生存し、臓器障害を引き起こすことが明らかになった。このことから、*csrS* が *S. pyogenes* の病原性に強く関与していること、また *csrS* 変異は STSS 患者分離株でのみ見出されることから、本因子が *S. pyogenes* の劇症型化に関与している可能性が強く考えられた。

E. 結論

- 1) *emm49* 型の劇症型/重症溶レン菌感染症患者分離株は、*csrS* 遺伝子に変異が起きており、その結果、様々な病原性遺伝子の発現量が増大していた。
- 2) *csrS* 遺伝子に変異をもつ劇症型/重症溶レン菌感染症患者分離株は、致死性が増大し、様々な臓器に障害を与えることが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ikebe, T., Hirasawa, K., Suzuki, R., Ohya,

H., Isobe, J., Tanaka, D., Katsukawa, C., Kawahara, R., Tomita, M., Ogata, K., Endoh, M., Okuno, R., Tada, Y., Okabe, N., **Watanabe, H.** and the Working Group for Beta-hemolytic Streptococci in Japan. Distribution of *emm* genotypes among group A streptococcus isolates from patients with severe invasive streptococcal infections in Japan, 2001-2005. *Epidemiol. Infect.* 2007; 135: 1227-1229.

2. 池辺忠義, 渡辺治雄. 劇症型溶血性レ

ンサ球菌感染症. In 新感染症学(下) - 新時代の基礎・臨床研究-. 日本臨床増刊号. 2007; **65 suppl 3**: 255-258.

2. 学会発表

1. 常彬, 和田昭仁, 池辺忠義, 大西真, 渡辺治雄. 日本国内で患者より分離された *Streptococcus suis* の性状. 第80回日本細菌学会総会, 大阪, 2007.

劇症型レンサ球菌感染症の細菌学的解析および重症化に係る
宿主要因の解明について研究 (2)

分担研究者 渡邊 治雄 国立感染症研究所細菌第一部長，副所長
協力研究者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部主任研究官

研究要旨 劇症型溶血性レンサ球菌感染症において、起因菌である *S. pyogenes* が宿主生体防御を障害する機構を解析する目的で、劇症感染患者分離株および非劇症感染患者分離株を収集し、それらに対する好中球の防御能を解析した。その結果、非劇症型分離株に比べて、劇症型分離株は好中球の殺菌に抵抗性を示すことが判明した。この機序として、劇症型分離株において高発現しているストレプトリシン O が、好中球にネクロシスを誘導することが原因と考えられた。好中球の直接障害に加えて、劇症株では、好中球の走化因子インターロイキン 8 を分解する ScpC の発現が増強し、非劇症株と比べて、好中球遊走を抑制することが判明した。さらに、これらの病原性因子の発現増強は、劇症型感染分離株のみに認められる遺伝子発現調節因子 *csrS* の変異によって生じていることが判明した。以上の結果から、劇症型 *S. pyogenes* 感染症では *csrS* の変異によって、病原因子ストレプトリシン O や ScpC の発現が増強し、感染局所への好中球走化抑制と好中球障害により、感染部位に好中球浸潤を伴わない特異な病態による宿主防御機構の破綻を招来し、劇症型感染を惹起する可能性が示唆された。

A. 研究目的

劇症型重症レンサ球菌感染症は、いったん発病すると急速に進行し、ショック症状、多臓器不全などを伴う、致死率の高い重篤な感染症である。集団発生が極めてまれで、高齢男性や生活習慣病などの危険因子があり、感染部位に炎症細胞浸潤が乏しいという特徴から、劇症型感染起因菌である *S. pyogenes* が宿主生体防御を障害することが示唆されているが、その詳細な機序は不明である。また、レンサ球菌急性感染において宿主防御機構の中心的役割を担う細胞群

は、好中球であることが知られている。本研究は、本邦において、2000 年以降、劇症型感染起因菌として増加している *emm49* 型の *S. pyogenes* について、劇症感染患者分離株および非劇症感染患者分離株を収集し、それらに対するヒト好中球の防御能を解析して、病態解明と治療法の開発につながる知見を獲得することを目的とした。

B. 研究方法

(1) ヒト末梢血多核白血球の分離
健康人ボランティアの血液より末梢血多

核白血球(PMN)をパーコール密度勾配遠心法により精製した。

(2) PMN の *S. pyogenes* に対する貪食能測定

S. pyogenes を 50%ヒト血漿と 37°Cで 30 分間インキュベートしてオプソニン化したのち、蛍光色素 Alexa-488 で GAS を標識し、PMN 3×10^5 と MOI 10 の条件下で 60 分間インキュベートし、フローサイトメトリーで解析した。

(3) PMN の *S. pyogenes* に対する殺菌能測定

オプソニン化 *S. pyogenes* を MOI 10 の条件下で PMN 3×10^5 と 37°Cで 90 分間インキュベートし、細胞を 0.1%サポニンで溶解した後、細胞内で生存している細菌を血液寒天培地で一晚培養し、コロニー数によって評価した。

(4) PMN の *S. pyogenes* に対する遊走能および培養液中インターロイキン 8(IL-8)濃度測定

S. pyogenes 3×10^6 cfu と好中球遊走活性をもつケモカイン IL-8 37°Cで 60 分インキュベートした後、トランスウェル 3415 の下室に、上室に PMN 3×10^5 を入れ、さらに 37°Cで 60 分インキュベートして、下室に遊走した PMN の割合をフローサイトメトリーで解析した。下室培養液中の IL-8 濃度は ELISA で測定した。

(倫理面への配慮)

保存される検体試料や研究データに対しては個人情報情報を削除し匿名化を行った。ボランティアには十分な研究内容の説明を口頭と文書の両方で伝え、承諾を確認した。

C. 研究結果

S. pyogenes に対するヒト PMN の機能修飾を解析する目的で、23 歳から 53 歳までの、男女混合の健常人ボランティア (9 名) より PMN を精製し、はじめに *S. pyogenes* に対する貪食能の検討を行った。その結果、蛍光標識したオプソニン化 *S. pyogenes* に対する好中球の貪食能は、劇症分離株、非劇症分離株間で有意な差が認められなかった。

次に、*S. pyogenes* に対するヒト PMN の殺菌能を解析した。用いた非劇症分離株が PMN に殺菌されるのに対し、使用した全ての劇症分離株が PMN による殺菌に抵抗性を示した。以上より、劇症分離株は PMN の殺菌から逃避するということが示唆された。

S. pyogenes が IL-8 に対するヒト PMN の遊走能に影響を及ぼすか否かを調べる目的で、IL-8 と細菌をインキュベートした後、PMN の遊走を測定した。その結果、劇症分離株と IL-8 に反応して遊走した PMN 数は、非劇症分離株と比べて著しく減少していた。さらに、劇症分離株と接触した PMN がネクロシスに陥ることが判明した。

この現象の分子機構を解明するため、*S. pyogenes* が発現する種々の病原因子に対する抗体や、病原因子欠損劇症分離株を用いて解析を行った。その結果、遊走した好中球のネクロシスは、溶血毒素ストレプトリジン O(SLO)によって起こることが明らかになった。さらに、PMN 遊走障害はセリンプロテイナーゼ ScpC が IL-8 を分解することによって起こることが判明した。また、これら 2 つの因子はそれぞれ独立に作用することが明らかとなった。加えて、非劇症分離株由来の転写調節因子 CsrS を導入し

た劇症分離株においては、親株に認められた好中球のネクロシス、IL-8 分解、PMN 殺菌に対する抵抗性のいずれも認められなかった。以上のことから、*emm49 S. pyogenes* 劇症分離株は *csrS* の変異により、SLO の発現増強を介した PMN のネクロシス誘導、および、*ScpC* 発現増強を介した IL-8 分解による PMN 遊走阻害を介して、好中球による殺菌を回避するということが示唆された。

D. 考察

劇症型レンサ球菌感染症は、本邦では 1990 年代に突如発生したことから、レンサ球菌の遺伝子変異による病原性の増大が発症の原因と考えられ、多数の候補因子がこれまで検討されてきた。しかし、今日まで単一因子で一方、集団感染やアウトブレイクがほとんどなく、成人男性、特に生活習慣病患者が危険因子となるという疫学的事実、また、劇症型レンサ球菌感染局所における、宿主白血球の欠如という特徴的な病理学的所見から、当感染症において宿主因子が発症に寄与していることが考えられる。

好中球が感染局所に侵入した細菌を排除するためには、1)炎症反応に伴って感染局所で産生される IL-8 の濃度勾配に従い血管内から感染局所への遊走、2)細菌の貪食、3)好中球内での殺菌という、3つの段階が必要である。本研究は、同一血清型の *S. pyogenes* 非劇症臨床分離株、劇症分離株をそれぞれ多数収集し、好中球とレンサ球菌の相互関係を解析した。*emm49* 劇症型分離株において、変異した *csrS* 遺伝子の機能的欠損により、*ScpC* 発現が増強した結果、IL-8 の分解を亢進させ PMN 遊走の障害が生じ

ると考えられる。一方、ストレプトリジン O の産生が増加した結果、PMN の細胞膜を障害し、PMN を死に至らしめることにより、感染局所から排除する。これらのエスケープ機構により、感染局所での菌の急速で著しい増殖を可能にするとともに、劇症型感染にみられる好中球浸潤を伴わない特異な病態が形成されることが示唆された。

劇症型感染の危険因子の一つである糖尿病患者では、PMN 遊走能の低下が報告されている。また、糖尿病患者の抗 SLO 抗体は、糖の付着によって、抗体力価が低下することが報告されている。すなわち、レンサ球菌の病原性と宿主防御能の力関係が、劇症型感染の発症、もしくは、将来の劇症型感染につながるレンサ球菌の潜伏感染を規定している可能性を示唆する。

今後、これらの因子による好中球からのエスケープ機構と、臨床研究から得られる宿主危険因子との関係を明らかにすることにより、早期診断法、および治療法の新規開発に具体的に貢献することを目指す。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Manabu Ato, Tadayoshi ikebe, Hiroki Kawabata, Toshitada Takemori, Haruo Watanabe, Incompetence of neutrophils to severe invasive group A streptococcus isolates is attributed to enhancing expression of plural virulence factors by null-function of a

regulatory gene.

論文投稿中

2. 学会発表

阿戸 学, 竹森利忠 Invasive group A Streptococci evade host defense by enhanced secretion of streptolysin O and serine proteinase ScpC, which affect neutrophils survival and chemotaxis.第37回日本免疫学会総会, 東京, 2007

阿戸 学, 池辺忠義, 竹森利忠, 渡邊治雄 劇症型溶血性レンサ球菌は好中球機能障害を介して宿主防御からエスケープする 第6回感染症沖縄フォーラム, 北谷町, 2008

阿戸 学, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小林和夫 劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株による好中球機能障害を介する宿主防御修飾機構 第81回日本細菌学会総会, 京都, 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案
なし
3. その他
なし

患者由来*Streptococcus suis* の細菌学的研究

分担研究者 渡邊 治雄 国立感染症研究所副所長 細菌第一部部長
協力研究者 常 彬 国立感染症研究所細菌第一部

研究要旨 *Streptococcus suis* はブタの肺炎，敗血症の起因菌で，ヒトに髄膜炎や敗血症など全身感染を引き起こすことが知られている。当該研究は日本国内患者から分離された *S. suis* の PFGE 型別と ST 解析を行い，他の疫学情報とも併せて総合的に分析し，日本国内でヒトへの感染を防ぐ方策について考察した。また，これら患者から分離された菌株の virulence markers の保有状況，マウス由来マクロファージ系細胞 J774 や Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) への感染力，細胞毒性および細胞内生存力などについて調べた。その結果，日本国内患者から分離された菌株の PFGE 型別と ST 解析により 2 つのグループに分けることができ，病原性マーカーの一つの Suilysin（溶血毒素）の保有状況の違いも見られた。しかし，グループ間の培養細胞への感染力および細胞内生存力などについては差がみられなかった。

A. 研究目的

近年，*S. suis* による集団感染が中国やタイにおいて報告されている。日本においてもブタに関連した職業に就いている人における散発感染症例が報告されている。本研究は日本国内で患者から分離されたブタレンサ球菌疫学情報および病原性に関する研究結果を総合的に分析し，集団感染を防ぐ方策を立てることを目的とした。

B. 研究方法

患者より分離された *S. suis* (10株)はヒツジ血液寒天で一晩培養した。血清型別は莢膜膨潤法にて決定した。

PFGE及び MLSTは既出の方法により検

査を行った。virulence markersをコードする遺伝子 (*mrp*, *epf*, *sly*) は PCRにて検出を行った。

また，Todd-Hewitt broth で培養した*S. suis* を用いて，マウス由来マクロファージ系細胞 J774 および Human brain microvascular endothelial cells (HBMEC) 細胞への感染力および細胞内生存力 (Vanier et al., 2004) を調べた。CytoTox96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega) を用いて，これらの*S. suis* の HBMEC 細胞への細胞毒性を調べた。

mrp: encode for muramidase-released protein

epf: encode for extracellular factor

sly: encode for hemolysin (Suilysin)

C. 研究結果

患者由来株のすべては血清型2型であった。分離された10株中8株は分離場所や分離時間が違うにもかかわらず、MLSTでは同じくST1に属し、PFGEパターンも非常に類似していた。残った2株はST28に属し、PFGEパターンも類似していたが、他の8株と異なるPFGEパターンを示した。また、virulence markers をコードする遺伝子の保有状況を調べた結果、ST1に属する8株中7株は*mrp*, *epf*および*sly*遺伝子を有していた。1株は*epf*と*sly*遺伝子を保有していたが、*mrp*遺伝子を有していなかった。ST28に属する2株は*mrp*遺伝子しか有していなかった。以上の結果によりこれらの10株*S. suis*は2つのグループに分けることができた。

さらに、2つのグループ間の病原性の違いの有無について調べた。これらの株のJ774およびHBMEC細胞への感染力および細胞内生存力などについては差がみられなかった。しかし、*sly*遺伝子を有する*S. suis*はHBMEC細胞へ強い細胞毒性を示したが、*sly*遺伝子を有しない株の細胞毒性が弱かった。日本国内患者から分離された*S. suis*株はMLST, PFGE型別およびvirulence markers を保有状況により2つのグループに分けることができた。しかし、グループ間の培養細胞への感染力および細胞内生存力への関与が見られなかった。

S. suis が産生する溶血毒素 Suilysin は本菌のヒトの培養細胞への細胞毒性に関与するが明らかになった。

E. 結論

*S. suis*はブタの咽頭、消化管の常在菌である一方、ブタやヒトに全身性感染症を引き起こす。近年、中国やタイにおいて死亡率は高い集団発生が報告されている。本邦においても散発感染症例が報告されている。本菌のブタやヒトに病原性を示し、感染または集団感染を引き起こす原因がまだはっきりと分かっていない。*S. suis* および宿主両側にその原因を解明する研究が必須である。

F. 健康危険情報

無し

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

S. pyogenes におけるバイオフィーム形成の検討

分担研究者：渡辺治雄 国立感染症研究所 副所長

研究協力者：泉福英信（国立感染症研究所細菌第一部・室長）

研究協力者：池辺忠義（国立感染症研究所細菌第一部・主任研究官）

研究協力者：河原井武人（国立感染症研究所細菌第一部・協力研究員）

要約：咽頭炎から分離された *Streptococcus pyogenes* K22, K23, K32, K33 と膿から分離された 1566, この株の *csrS* 遺伝子を変異させた 1566*csrS* 株を用いて、96 穴プレートを用いたバイオフィーム形成およびニトロセルロース膜を用いた付着実験を行った。その結果、K22 - 33 株は、バイオフィーム形成能が高く 1566 株は低いことが明らかとなった。またそのバイオフィーム形成は、唾液コートにより阻害された。K32 株は collagen を固着した膜に付着し、1566 株は fibronectin を固着した膜に付着した。K 株は collagen を 96 穴プレートにコートするとバイオフィーム形成量が上昇し、1566 株は fibronectin をコートするとバイオフィーム形成量が上昇した。それらの傾向は、培地に血清を加えると顕著になった。1566*csrS* 株は、1566 株よりもバイオフィーム形成能が低かった。以上の結果から分離された菌株は、疾患状態の違いでバイオフィーム形成能および相互作用する蛋白質に違いがあることが明らかとなった。また血清は *S. pyogenes* の蛋白質を介するバイオフィーム形成能を活性化させることも明らかとなった。CsrRS による莢膜の制御は、*S. pyogenes* のバイオフィーム形成に関与している可能性が考えられた。これらの作用は、*S. pyogenes* の病原性に関与している可能性が考えられた。

A 目的：

一般的に劇症型溶血性レンサ球菌感染症は A 群に分類される *Streptococcus pyogenes* によって発症することが多く、本菌により咽頭炎、敗血症、壊死性筋膜炎、播種性血管内凝固症候群（DIC）、ショック、多臓器不全などの全身感染症が励起され、症状は急速に進行し、死亡に至ることも多々ある。

S. pyogenes は、多くの表層抗原因子が知られており、その中で M 蛋白質が宿主細胞への付着や抗貧食作用をもつ病原因子の一つである。莢膜も生育段階によりそ

の発現を変化させ、細胞への付着と侵入を制御している病原因子の一つであることが示唆されている。

一般的に菌体が宿主からの攻撃に耐えるためにバイオフィームを介して集落を形成し、その結果持続的感染が起こることが考えられている。*S. pyogenes* も、咽頭および扁桃上において生き残るために上皮細胞と相互作用しながら付着や集落を形成する可能性が考えられる。それがある時期に、劇症型へ変異し急性疾患を誘発するきっかけになるかもしれない。*S. pyogenes* のバイオフィーム形成に

関わる分子および遺伝子等はあまり明らかになっていない。それは、細胞への侵入という観点から研究を進められてきた背景からであろう。しかし、細菌の特性として宿主の防御および低栄養下において生存する能力としてのバイオフィーム形成能は重要である。

そこで本研究では、膿および咽頭炎から分離された *S. pyogenes* の臨床分離株を利用して、バイオフィーム形成能について検討を行った。また、莢膜産生や毒素因子発現を制御している CsrRS のミュータント株を作成して、そのバイオフィーム形成における役割を検討した。

研究期間：平成19年4月1日から平成20年3月31日まで

B 研究方法：

1) 使用菌株；

S. pyogenes K22 (1970年代臨床分離株：咽頭炎由来)

S. pyogenes K23 (1970年代臨床分離株：咽頭炎由来)

S. pyogenes K32 (1994年臨床分離株：咽頭炎由来、ファージ保持)

S. pyogenes K33 (1994年臨床分離株：咽頭炎由来、ファージ保持)

S. pyogenes 1566 (非劇症型株：膿由来)

S. pyogenes 1566*csrS* (非劇症型株：1566株の*csrS*変異株)

csrS:CsrRS 二成分制御系のセンサーキナーゼをコードする。本システムは、莢膜産生や毒性因子発現を制御している。本遺伝子の欠損株は莢膜や毒性因子生産が増加する (Heath A, *et al.*, (1999) *Infect. Immun.*, 67:5298-5305)。

2) *S. pyogenes* の生育及に及ぼす培地の影響

菌株を BHI broth、37°C、一晚、前培養を行い、PBS にて洗浄後、菌液を PBS にて $A_{550}=0.5$ に調整する。180 μ l の BHI と TSB without dextrose with 0.25% sucrose にそれぞれ 20 μ l の菌液を 96 穴プレート入れ、37 度 5%CO₂ 下で培養する。4 時間おきに OD=620 で吸光値を測定する。

3) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす唾液コートの影響；

96 穴マイクロタイタープレートにフィルター滅菌した刺激全唾液を 50 μ l 入れる。37°C、30 分間処理し PBS にて 2 回洗浄する。菌株を BHI broth、37°C、一晚、前培養を行い、PBS にて洗浄後、菌液を PBS にて $A_{550}=0.5$ に調整する。180 μ l の BHI と TSB without dextrose with 0.25% sucrose にそれぞれ 20 μ l の菌液を 96 穴プレート入れ、37 度 5%CO₂ 下で培養する。37°C、16 時間培養し、菌浮遊液を捨てる。PBS にて 2 回洗浄後、乾燥、0.25% サフラニンで染色する。DW にて洗浄、乾燥後、OD=492 で吸光値を測定する。唾液コートした場合としない場合で結果を比較する。

4) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす albumin、collagen、fibronectin コートの影響；

96 穴マイクロタイタープレートにフィルター滅菌した human serum albumin (SIGMA)、fibronectin from human plasma (SIGMA)、collagen from bovin achilles tendon (Type I: SIGMA)、12.5 μ g/ml を 100 μ l 入れる。4°C、一昼夜処理し PBS にて 2 回洗浄する。菌株を BHI broth、37°C、一晚、前培養を行い、PBS にて洗浄

後、菌液を PBS にて $A_{550}=0.5$ に調整する。180 μ l の SDM と TSB without dextrose with 0.125% sucrose にそれぞれ 20 μ l の菌液を 96 穴プレート入れ、37 度 5%CO₂ 下で培養する。37°C、16 時間培養し、菌浮遊液を捨てる。PBS にて 2 回洗浄後、乾燥、0.25%サフラニンで染色する。DW にて洗浄、乾燥後、OD=492 で吸光値を測定する。albumin、collagen、fibronectin コートした場合としない場合で結果を比較する。

5) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす血清の影響；

上述した *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす albumin、collagen、fibronectin コートの実験において培地に 5%の牛血清を入れた場合と入れない場合のバイオフィーム形成を比較する。一方、上述の何もコートしないバイオフィーム形成実験に培地を RPMI1640 に 10%の牛血清を入れた場合と入れない場合とのバイオフィーム形成を比較する。

6) 様々なタンパク質への *S. pyogenes* の付着試験

albumin、collagen、fibronectin をニトロセルロースメンブレンにプロットする。1%BSA にてブロッキング後、FITC にてラベルした菌液をメンブレンに添加する。PBS にて洗浄後、イメージアナライザーにて蛍光観察を行う。

C 研究結果

1) *S. pyogenes* の生育に及ぼす培地の影響(Fig. 1)；

- *S. pyogenes* 1566, 1566*csrS* 株は、K 株に比較して生育が遅かった。

- TSB w/o +suc 培地に比較し、BHI 培地のほうが最高値が高かった。

- K 株は 8 時間で最高値に達し、1566 株は 12 時間で最高値に達した。この点は培地による差が無かった。

- *S. pyogenes* 1566, 1566*csrS* 株は、K 株に比較して生育が遅かった。

2) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす唾液コートの影響(Fig. 2)；

- BHI と TSB におけるバイオフィーム形成量の差は殆どの株で見られなかった。

(K33 株は、BHI 培地でのバイオフィーム形成量が低かった)

- 1566 株に比較し、K 株のほうがバイオフィーム形成量が多かった。(ポリスチレン担体上：白バー)

- K 株は、唾液コートによりバイオフィーム形成量が低下したが、1566 株は大きな変化が認められなかった。

(唾液コート：黒バー)

3) *S. pyogenes* のバイオフィーム形成に及ぼす albumin、collagen、fibronectin コートの影響(Fig. 3, Fig. 4)；

- TSB + 0.125% sucrose におけるバイオフィーム形成量が SDM よりも高かった(Fig. 3)。

- 各培地とも K 株の方が 1566 株よりもバイオフィーム形成量が高かった(Fig. 3)。

- TSB において、1566 の方が 1566*csrS* 株よりもバイオフィーム形成量が増加していた(Fig. 3)。

- Albumin をコートすると K23 を除く各菌株でバイオフィーム形成量が若干低下していた(Fig. 4)。

- Collagen をコートすると K32 を除く K