

は、BHI や TSB without dextrose で培養した時の様なバイオフィルム形成の低下が認められなかった。しかし、K33 $\Delta$ *csrR* 株は、バイオフィルム形成が K33 株よりも有意に低下し菌を接種していない negative control と同程度のバイオフィルム形成量を示した。Collagen をコートすると、K33 のバイオフィルム形成が著しく上昇したが、K33 $\Delta$ *csrS* のバイオフィルム形成は低下するものの K33 株と比べ有意ではなく、K33 $\Delta$ *csrR* 株は著しく低下し菌を接種していない negative control と同程度のバイオフィルム形成量を示した。

TSB without dextrose に 0.125% sucrose を加えた培地に、さらに 1% serum を加えるとどのようになるか検討した。その結果、なにもコートしない場合、K33 株の有意なバイオフィルム形成が認められなくなり、K33 $\Delta$ *csrS* 株も K33 $\Delta$ *csrR* 株も K33 株と同程度であった。Type 1 collagen をコートすると、K33 株は著しくバイオフィルムを形成するようになり、K33 $\Delta$ *csrS* 株でバイオフィルム形成量が K33 株に比較して有意に低下し、さらに K33 $\Delta$ *csrR* 株も著しく低下した。しかし、K33 $\Delta$ *csrR* 株は negative control の程度にまでは低下せず、OD=0.2 程度の有意なバイオフィルムを形成していた。

#### D. 考察

膿由来の 1566 株の場合と同等に、咽喉頭炎由来の K33 株でも CsrRS 2 成分制御系のセンサーキナーゼが *S. pyogenes* のバイオフィルムの制御に関わっていることが明らかとなった。それは、*csrS* よりも *csrR* が顕著に作用していることが考えられた。これは、2 成分制御系における *csrS* と *csrR* の役割の違いが大きく影響していると考えられるが、詳細は明らかになっていない。その理由の一つとして、K33 $\Delta$ *csrS* 株と K33 $\Delta$ *csrR* との間で莢膜の発現量が異なっていることが考えられる。培地成分の違いにより K33 株と K33 $\Delta$ *csrS* 株および K33 $\Delta$ *csrR* 株とのバイオフィルム形成量に違いがあることが明らかとなった。培地成分の差異に影響を受けるバイオフィルム形成因子が存在すると考えられる。その差が特に type 1 collagen をコートするとより顕著になることから、培地中の成分が type 1 collagen に結合する adhesin: collagen binding protein の発現量に影響を与えている可能性が考えられた。それは、1% serum を加えると K33 $\Delta$ *csrR* 株は K33 株に比べバイオフィルム形成が低下するものの、negative control に比べ有意なバイオフィルム形成をしていることなどからも考えられた。

今後、K33 株と K33 $\Delta$ *csrS* 株および K33 $\Delta$ *csrR* 株とのバイオフィルム形成量の差の違いを明らかにするために、莢膜の発現

量を調べるとともに、酵素を用いて莢膜を破壊することなどを行い、バイオフィルム形成がどのように影響されるか検討を行う予定である。1% serum 添加や sucrose 添加が、collagen binding protein のような adhesin の発現量にどのように影響を与えるかなども併せて検討する予定である。

#### E. 結論

CsrRS による莢膜の制御および collagen binding protein などの adhesin の発現は、異なった栄養分に影響を受けながら *S. pyogenes* のバイオフィルム形成に関与していると考えられた。

#### F. 論文および学会発表

泉福英信, 池辺忠義, 河原井武人, 渡辺治雄, *Streptococcus pyogenes* におけるバイオフィルム形成遺伝子の検討, 第82回日本細菌学会総会, 名古屋, 3月12日, 2009年

#### G. 知的所有権の取得状況

特になし

Fig. 1 Biofilm formation of *S. pyogenes* mutants

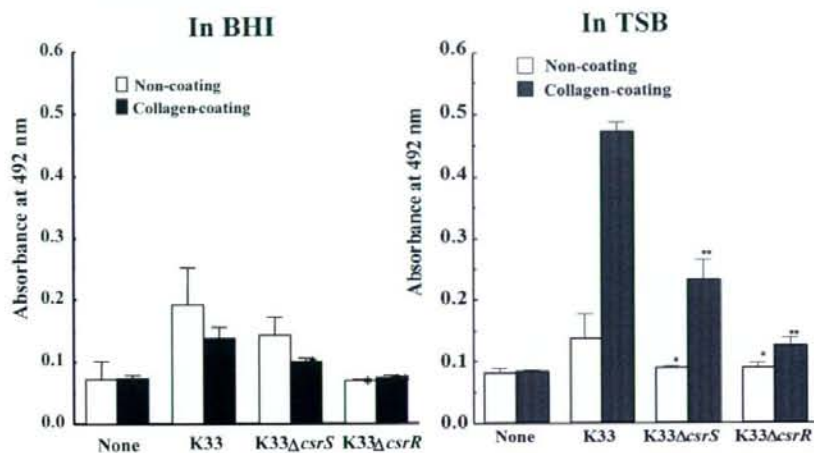
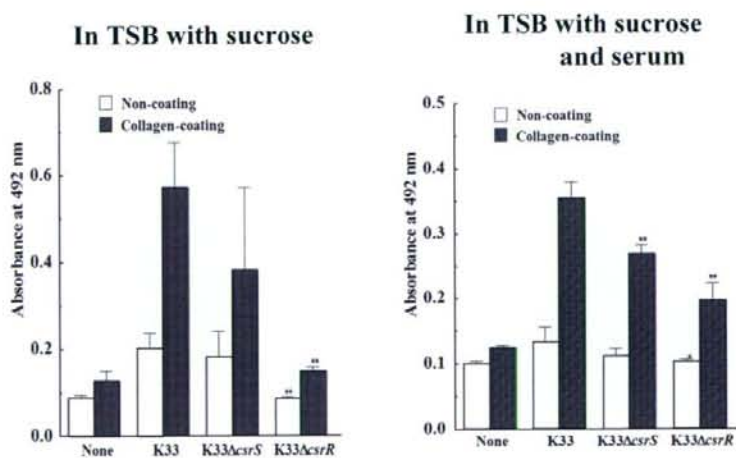


Fig. 2 Biofilm formation of *S. pyogenes* mutants



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

劇症型溶血性レンサ球菌感染症の細菌学的解析および  
重症化に係る病原因子に関する研究

研究分担者 渡辺治雄 国立感染症研究所 細菌第一部

研究分担者 池辺忠義 国立感染症研究所 細菌第一部

研究分担者 阿戸学 国立感染症研究所免疫部第二室長

研究要旨

昨年度の研究において、*emm49*型のA群レンサ球菌による劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株に特異的に*csrS*遺伝子に変異があり、この変異により、病原性因子の発現が上昇し、劇症型感染症を引き起こすことが示唆された。本年度は、この*csrS*遺伝子の変異が、*emm49*型に特異的なのか、それとも、他の*emm*型でも見られることが調べるため、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株のこの遺伝子の変異を調べた。その結果、劇症型感染症患者分離株において、*emm*遺伝子に関係なく、様々な*emm*型で*csrS*遺伝子に変異が起きていることが明らかになった。

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、発病から数十分以内に関心症状、多臓器不全などが起こり、患者を死に至らしめる。STSSの主な原因菌である*S. pyogenes* (GAS)は、抗原性の違いから100以上もの*emm*型に分類される。日本において、STSSは主として*emm1*型のGASによって引き起こされているが、2000年以降、1999年以前にはみられなかった様々な*emm*型が出現しており、その中でも、*emm49*型のGASによるSTSSが増加している。これらの事実より、新たな遺伝

子変異の獲得を獲得したと考えられる*emm49*型のGASについて、STSS患者分離株および非STSS患者分離株を比較した結果、STSS患者分離株では、*csrS*遺伝子に変異が認められた。この変異により、様々な病原性遺伝子の発現量が上昇し、マウスを用いた*in vivo*感染実験において、この変異によりGASの病原性が増強していることが確認された。STSS患者分離株において、この変異が普遍的に認められるか調べた。

## B. 研究方法

### 1. 生物材料と培養方法

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株は、国立感染症研究所と地方衛生研究所からなる衛生微生物技術協議会レファレンスセンターシステムに集められた164株を用いた。劇症型溶血性レンサ球菌感染症の診断基準は、Working Group on Severe Streptococcal Infections (1993) Defining the group A streptococcal toxic shock syndrome. JAMA 269:390-391.に従った。A群溶レン菌の生育には、コロンビア5%羊血液寒天培地(Becton Dickinson)を用いた。

### 2. ゲノムDNAの調製

血液寒天培地に塗末した菌株をTE (pH8.0)に懸たく後、mutanolysin (Sigma)を添加し、37°Cで1時間処理した後、DNA精製キットを用いて精製した。

### 3. 塩基配列の決定

ABI PRISM 3100 Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を決定した。

### 4. *emm*遺伝子型別

CDCのホームページの方法に従い、primer 1 (TATT (C/G) GCTTAGAAAATTA), primer 2 (GCAAGTTCCTCAGCTTGTTT)を用いて、PCRにより増幅する。PCR産物をHigh Pure PCR Product purification kit (Roche)で精製し、*emm seq2* (tattcgcttagaaaattaaaaacagg)プライマーを用いて塩基配列を決定した。決定し

た塩基配列をBlast-*emm*検索サイト

([http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strep\\_blast.htm](http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strep_blast.htm))に入力し、*emm*遺伝子型を決定した。

### 5. *csrS/csrR*遺伝子の塩基配列の決定

*csrS/csrR*遺伝子を含む領域をPCRにより増幅し、塩基配列を決定した。アミノ酸配列の変換は、GENETYX Ver.8遺伝情報処理ソフトウェア(ゼネティックス)を用いた。

## C. 研究結果

### 1. 臨床分離株の*emm*遺伝子型別

1992年から2008年に分離されたSTSS患者分離株164株について*emm*型別を行った。最も多い方は、*emm1*型であり、全体の45%を占めていた。次に*emm3*型が多く、全体の16%を占めていた。これら2つの遺伝子型で全体の60%以上を占めており、欧米と同じような傾向を示すことが明らかとなった。また、年代的にみた場合、*emm1*型は毎年分離されているが、*emm3*型は1994年と2006年をピークに流行性が見られた。

### 2. 臨床分離株の*csrS/csrR*遺伝子の変異率

STSSの確定診断症例から分離された菌株について*csrS*遺伝子の塩基配列を決定した結果、*emm49*型において、60%の株で*csrS*遺伝子に変異が認められた。また、その他の*emm*型でも31%の株に*csrS*遺伝子に変異があることが判明した。また、*csrS*遺伝子の下流に存在し、*CsrS*と二成分制御系を組んでいる*csrR*遺伝子

には、11%の株に変異が見られた。一方、咽頭炎等の非STSS患者分離株の*csrS/csrR*遺伝子には、1.7%の株でのみ変異が見られ、STSS株のほうで有意に変異が起きていることが判明した。

#### D. 考察

STSS患者分離株のうち、42%に*csrS/csrR*遺伝子に変異が起きていることが明らかとなった。また、*csrS/csrR*遺伝子の変異はSTSS患者分離株で有意に見出されることから、本因子がGASの劇症型発症に関与している可能性が強く示唆された。

STSS患者分離株のうち42%は、*csrS*遺伝子に変異が認められたが、残りの58%は変異が認められなかったことから、*csrS*遺伝子以外にも変異が起きている可能性が考えられる。

#### E. 結論

STSS患者分離株の42%に*csrS/csrR*遺伝子に変異が見られた。この変異率は、咽頭炎などの非STSS患者分離株と比較して、有意に高いことが明らかとなった。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Ato, M., Ikebe, T., Kawabata, H., Takemori, T., and Watanabe, H. 2008. Incompetence of neutrophils to invasive group A streptococcus is attributed to induction of plural virulence factors by dysfunction of a regulator. PLoS ONE 3: e3455. 2008.

2. Tanaka, D., Isobe, J., Watahiki, M., Nagai, Y., Katsukawa, C., Kawahara, R., Endoh, M., Okuno, R., Kumagai, N., Matsumoto, M., Morikawa, Y., Ikebe, T., Watanabe, H., and the Working Group for Group A Streptococci in Japan 2008. Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. J. Clin. Microbiol. 46: 1526-1529. 2008.
3. 池辺忠義, 阿戸学, 小林和夫, 渡辺治雄. 2008. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序—菌の特徴と免疫回避機構—. BIO Clinica 北隆館 23 (14): 1321-1326. 2008.

##### 2. 学会発表

1. Ikebe, T., Ato, M., Kobayashi, K., and Watanabe, H. Impairment of global regulatory network of *Streptococcus pyogenes* virulence genes provokes neutrophil incompetence and subsequent streptococcal toxic shock-like syndrome. Forum of the network of research centers on infectious diseases. 2008. Hanoi, Vietnam.
2. 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序. 第82回日本感染症学会総会, 島根, 2008.
3. 池辺忠義, 阿戸学, 川端寛樹, 小林和夫,

- 渡辺治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株でみられる *csrS* 変異の病原性への影響. 第 81 回日本細菌学会総会, 京都, 2008.
4. 阿戸学, 池辺忠義, 竹森利忠, 渡辺治雄. 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, 沖縄, 2008.
5. 阿戸学, 池辺忠義, 渡辺治雄, 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.

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

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 (3)

研究分担者 阿戸 学 国立感染症研究所免疫部 第二室長

研究分担者 池辺 忠義 国立感染症研究所細菌 第一部

研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所細菌 第一部

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* が宿主生体防御を傷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、劇症型分離株において高発現している分泌型溶血毒であ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判明した。さらに、この好中球ネクロシスは、劇症型 *S. pyogenes* と好中球の接触依存性であり、その機序として、好中球上の接着分子であるβインテグリンと *S. pyogenes* の膜表面コラーゲン様蛋白がカルシウム依存的に結合することによって、ストレプトリシン O がより効果的に好中球膜孔形成を誘導することが示唆された。以上より、*S. pyogenes* が劇症型感染を惹起する要因となる好中球傷害の分子機構が明らかとなり、今後の診断および治療に対する応用が期待される。

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、それらに対する好中球の防御能を解析した。その結果、昨年度までに、劇症型患者分離株が、分泌型溶血毒であるストレプトリシン O の発現を亢進させ、好中球をネクロシスに陥らせることが、劇症型感染において重要であることを報告した。



本年度はこの好中球傷害の分子機構を詳細に解析し、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) *S. pyogenes* による PMN のネクローシス

*S. pyogenes*  $3 \times 10^6$  cfu は、好中球遊走活性をもつケモカイン IL-8 と 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、好中球  $3 \times 10^5$  を上室に入れ、さらに 37°C で 60 分インキュベートして、下室に遊走した好中球の割合をフローサイトメトリーで解析した。好中球の生死は propidium iodide の細胞内取り込みによって判定した。実験によっては、トランスウェル下室に、抗体および各種酵素の添加、またはアッセイ前に酵素処理等を行った。

### (倫理面への配慮)

保存される検体試料、ボランティアからの採血に関しては、国立感染症研究所人を対象とする医学研究倫理審査委員会の承認のもと、個人情報情報を削除し匿名化を行った。

## C. 研究結果

*S. pyogenes* に対するヒト好中球の機能修飾を解析する目的で、23 歳から 53 歳までの、男女混合の健康人ボランティア (9 名) より好中球を精製し、*S. pyogenes* の局所感染モデルとして、IL-8 と細菌をインキュベートした後、好中球を遊走させて測定した。その結果、劇症分離株と IL-8 に反応して遊走した好中球がネクローシスに陥ることが判明した。また、*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ーシスは、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。

一方、SLO は分泌性の毒素であるにもかかわらず、上記実験に用いられた劇症型 *S. pyogenes* 分離株の培養上清の SLO 活性を測定した結果、好中球傷害を誘導する閾値以下であり、実際に好中球をインキュベートしても好中球ネクローシスは誘導できなかった。このことから、劇症型 *S. pyogenes* 分離株は接触依存的に好中球を傷害する可能性が示唆された。

好中球傷害を引き起こす劇症型 *S. pyogenes* 分離株との相互作用がいかなる分子機構によって起こるかを解析する目的で、各種表面分子に対する抗体によるブロッキング、および各種酵素による処理を行った。その結果、好中球表面分子に対する抗体のうち、□1 インテグリンに対する抗体と、活性型 □2 インテグリンに対する抗体により、好中球傷害が部分的に阻害された。一方、劇症型 *S. pyogenes* 分離株をコラゲナーゼで処理することにより、好中球傷害が完全に阻害されたことから、*S. pyogenes* 表面に発現するコラーゲン様蛋白が好中球傷害に必要なことが判明した。さらに、Ca<sup>++</sup> のキレート剤である EGTA の系への添加により好中球傷害が阻害されたことから、この結合が Ca<sup>++</sup> 依存的に起こることが判明した。

## D. 考察

劇症型レンサ球菌感染症は、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。

好中球は、全白血球の 60-70% を占め、細菌

や真菌の急性感染に対する第一線の宿主防御細胞である。劇症型レンサ球菌感染症はきわめて短時間に感染が進行し、かつ感染局所に好中球浸潤が乏しいことから、上記に示した好中球機能の何らかの傷害が起こっていると想定されている。事実、ヒトの劇症型レンサ球菌感染症例では、非劇症型感染と比較して有意に好中球数の減少が認められることが報告されている。また、劇症型感染において末梢血好中球減少が認められる患者は、減少が認められない患者と比べて予後不良である。さらに劇症型レンサ球菌感染症の危険因子である糖尿病、心臓病、肝硬変患者では、遊走能などの好中球機能の低下が報告されている。すなわち、体内に侵入したレンサ球菌の病原性と宿主、中でも好中球の防御機能のバランスが、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が考えられる。

昨年度の本研究において、*emm49* 劇症型分離株が、1) *ScpC* による好中球遊走因子 IL-8 の分解を介した好中球遊走傷害、2) SLO による好中球の直接傷害によって、感染局所から好中球を排除する機構を報告した。

本年度は、劇症型感染分離株が、好中球に接触して、キラー細胞と類似の機構を用いて効果的に、好中球を傷害する機構を明らかにした。これらの機構に含まれる分子を標的にすることにより、劇症型感染に対する早期診断法、および治療法の新規開発に具体的に貢献することを来年度以降の研究において目指す。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1) Ato M, Ikebe T, Kawabata H, Takemori T,

Watanabe H. 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. *PLoS ONE*. 2008;3(10):e3455.

2) Chanchamroen S, Kewcharoenwong C, Susaengrat W, Ato M, Lertmemongkolchai G. Human polymorphonuclear neutrophil responses to *Burkholderia pseudomallei* in healthy and diabetic subjects. *Infection and Immunity*. 2009; 77:456-63.

### 2. 学会発表

1) Ato M. Escape mechanisms of severe invasive group A streptococcus from killing by neutrophils. The 4th International Infection Control Conference of Theodor Bilharz Research Institute, ギザ, エジプト, 2008.

2) 阿戸 学, 小林和夫. 劇症型溶血性レンサ球菌の好中球障害機構. 第 38 回日本免疫学会総会・学術集会, 京都, 2008.

3) 松村隆之, 池辺忠義, 小林和夫, 渡邊治雄, 阿戸 学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株によるヒト好中球ネクロシス誘導機構の解析 第 7 回感染症沖縄フォーラム, 那覇, 2009.

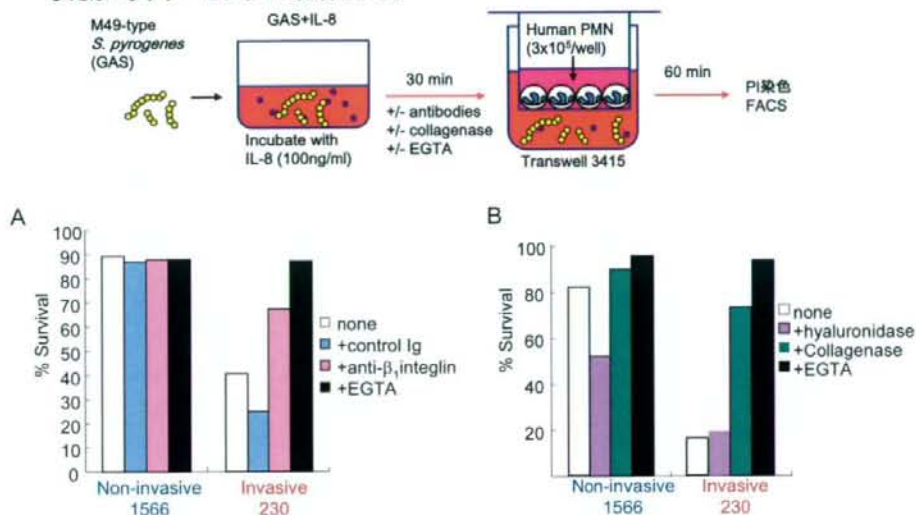
4) 阿戸 学, 池辺忠義, 渡邊治雄, 小林和夫. 劇症型感染分離溶血性レンサ球菌株はストレプトリシン O および接触依存的にヒト好中球を障害する 第 82 回日本細菌学会総会, 名古屋, 2009.03

## 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 なし
3. その他 なし

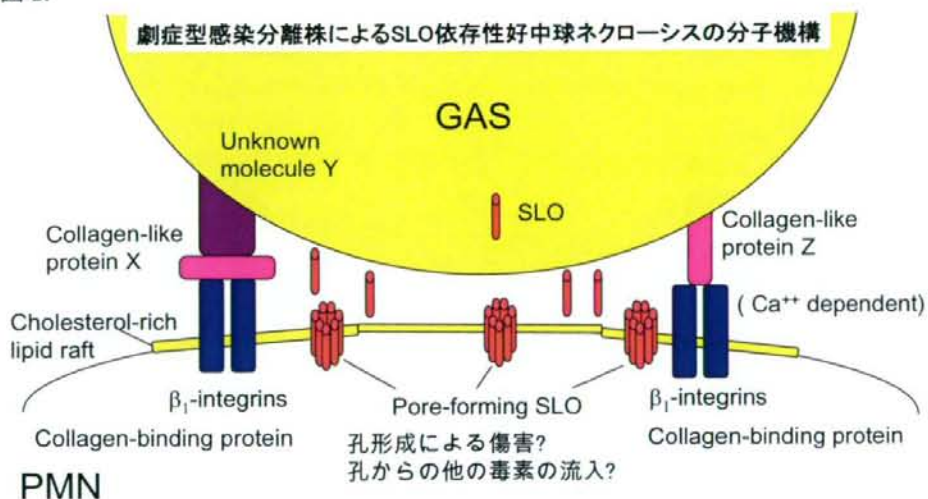
図 1.

劇症株による好中球ネクローシスは、抗 $\beta_1$ -インテグリン抗体、 $Ca^{++}$ キレート剤、またはコラゲナーゼによって阻害される。



トランスウェルの下層にIL-8と抗CD29( $\beta_1$ -インテグリン)抗体(25 $\mu$ g/ml)、EGTA(1mM)、ヒアルロニダーゼ(100U/ml)、コラゲナーゼD(1mg/ml)、またはコントロール抗体を、非劇症株(1566)、劇症株(NIH230)と共に入れ好中球の生存を解析した。

図 2.



好中球細胞表面の $\beta_1$ -インテグリンなどのコラーゲン結合蛋白質が、劇症株のコラーゲン様蛋白質と、 $Ca^{++}$ 依存的に結合することが好中球傷害に必要である。GASと好中球の結合によって、SLOの膜表面孔形成が効果的に高まり、好中球を速やかなネクローシスに陥らせる可能性が示唆された。

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・治療に関する研究

動物実験モデルによるレンサ球菌感染症発症のメカニズムの解明と治療に係る基礎的研究

研究分担者 松井 英則 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所・  
病原微生物分子疫学研究室 講師

### 研究要旨

ヒト CD46 発現トランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いて、A 群レンサ球菌 (group A streptococci, GAS) の感染モデルを構築した。劇症型患者の血液から分離された GAS472 株を hCD46Tg マウスの後肢足趾部 (footpad) へ  $1 \times 10^7$  CFU 投与すると、感染部位に壊死性筋膜炎 (necrotizing fasciitis, NF) が誘発された。同時に播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC)、多臓器不全 (multi organ failure, MOF)、敗血症 (sepsis) が惹起され、投与後 7 日以内に死亡した。対照マウスにおいても同じ投与量で、下肢の壊死が誘発されたが生存した。従って、本菌の footpad への感染後に誘発される NF は、致死性には直接関与しないと考えられる。組織の損傷は皮下組織及び真皮から表皮に進行した。一方、感染局所の真皮の肥満細胞は致死性には関与していなかった。本感染モデルは、組織壊死やショックを伴う劇症型 GAS 感染症 (streptococcal toxic shock syndrome: STSS) に非常に類似した症状を示すため、レンサ球菌による劇症型感染症の細菌学的解析と診断・治療法の開発に有益であると結論された。

### A. 研究目的

ヒトに特異的な病原細菌である GAS は、菌体表層の M 蛋白質がヒトの細胞表層の CD46 に結合することにより感染が成立すると考えられている。そこで hCD46Tg マウスを用いて、レンサ球菌による劇症型感染症の感染モデルを構築し、組織化学・病理学的解析により、発症機構の解明を目指した。

### B. 研究方法

#### マウス:

hCD46Tg マウスは、J. P. Atkinson 教授 (米国ワシントン大学) より分与された。対照となる 57BL/6 マウス及び B6C3F1 マウスは日本チャールズ・リバー社より入手した。全身の肥満細

胞を欠損する WBB6F1-*W/W<sup>v</sup>* (*W/W<sup>v</sup>*) マウスとその対照となる WBB6F1<sup>+/+</sup> (+/+) マウスは日本エスエルシー社より入手した。

#### 菌株:

劇症型ならびに侵襲性を含む M1 型 GAS (11 株) は、生方公子教授 (北里大学, 北里生命科学研究所, 病原微生物分子疫学研究室) より分与された。

#### 肥満細胞の移入実験:

hCD46Tg 及び C57BL/6 マウスの骨髄細胞から分化・増殖させた培養肥満細胞を、放射線を照射した *W/W<sup>v</sup>* マウスへ移入した。また *W/W<sup>v</sup>* マウスより調製した骨髄細胞から T 細胞を除去し、同時に移入した。

## 感染実験:

GAS を footpad より感染させ、致死率の算定や血液中の Fibrin/fibrinogen degradation products (FDP)、D-ダイマー (D-dimer) の濃度及び血小板 (PLT) 数の測定を行った。また組織切片は、各種抗体を用いた免疫染色もしくは、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 及びトルイジンブルー (TB) による染色後、病理学的解析を行った。

## (倫理面への配慮)

本研究を開始するにあたり、遺伝子組換え実験の安全確保に係わる第二種使用等拡散防止措置確認申請書を提出し、文部科学大臣の確認を得た。また、北里大学実験動物委員会規程および北里大学バイオセイフティ安全管理規定に準じて研究を遂行した。

## C. 研究成果

1. hCD46Tg マウスの footpad へ  $1 \times 10^7$  CFU の M1 型 GAS (11 株) を投与後のマウスの致死性は、菌の病原性を反映した (図 1)。特に高病原性株である GAS472 (STSS 患者の血液から分離)、GAS467 (髄膜炎患者の髄液から分離)、RE335 (関節炎患者の血液から分離) の 3 株について、hCD46Tg マウスと対照 (C57BL/6 及び B6C3F1) マウスの footpad へ投与後、両者のマウスの致死性に顕著な差が認められた (図 2)。

2. hCD46Tg マウスは、感染後 72 時間経過時点で、下肢の重篤な壊死が認められた。一方、対照マウスでも、感染後 72 時間経過時点で、部分的な壊死が認められた。その後壊死が進行し、336 時間 (2 週間) 経過時点では、対照マウスの下肢は壊死により完全に欠損した (図 3)。hCD46Tg マウスの footpad の皮膚の組織化学的解析により、急激な壊死の進行に伴った好中球などの炎症細胞浸潤、出血、浮腫、表皮の剥離、凝血塊、筋膜の断絶などが経時的に観

察された (図 4)。

3. 感染 hCD46Tg マウスの footpad の表皮の免疫組織化学的解析により、表皮のヒト CD46 発現細胞及び角化細胞への GAS の付着が明らかとなった (図 5)。

4. 感染 hCD46Tg マウスの footpad の真皮において肥満細胞の脱顆粒が観察された (図 6)。しかし、(1)  $W/W^e$  マウス、(2)  $+/+$  マウス、(3) hCD46Tg マウス由来由来の肥満細胞を移入した  $W/W^e$  マウス、(4) C57BL/6 マウス由来の肥満細胞を移入した  $W/W^e$  マウスの 4 種のマウスへ  $1 \times 10^7$  CFU の GAS472 を footpad へ投与後の致死性に差は認められなかった (図 7)。従って、肥満細胞は GAS 感染に対して何ら役割を持たないと考えられる。

5. 感染 48 時間後の血液及び各組織における GAS472 の菌数は、hCD46Tg マウスの方が対照マウスより有意に多い。更に感染 48 時間から 72 時間までの 24 時間における肝臓での菌数の増加は hCD46Tg マウスが 90 倍に対して対照マウスは、7 倍にすぎなかった (図 8)。また感染 72 時間後の hCD46Tg マウスの肝臓では腫瘍が認められ、細胞骨格の収縮が確認された (図 9)。従ってヒト CD46 に依存した GAS の増殖により、MOF や sepsis を誘発しマウスを死に至らしめると考えられる。

6. hCD46Tg マウスへ GAS472 を footpad へ投与後、血液中の FDP と D-dimer の濃度の顕著な増加及び PLT 数の減少が観察された (図 10)。従って、GAS472 の感染により hCD46Tg マウスに DIC が誘発されたと考えられる。

## D. 考察

本研究に用いた、hCD46Tg マウスはヒト CD46 遺伝子の全長を含み、各組織においてヒトと同

じ発現パターンを示す。本年度の研究において、hCD46Tg マウスを用いることで、皮膚感染による劇症型 A 群レンサ球菌感染症に類似した感染モデルの構築に成功した。hCD46Tg マウスの感染局所は、腫脹し、血疱、びらんが広範囲に出現し急速に壊死に陥った。対照マウスにおいては、広範囲に渡り緩やかに壊死に陥り、感染2週間後には下肢が欠損した。一方、hCD46Tg マウスの網内系組織における感染 48 時間後からの急激な菌の増殖が死の転帰と考えられる。従って感染後 48 時間(2 日)までの適切な処置が劇症型 A 群レンサ球菌感染症にとって重要と考えられる。

## E. 結論

hCD46Tg マウスを用いた GAS の皮下感染は、ヒト劇症型レンサ球菌感染症に極めて類似した症状を呈した。従って、今後本感染モデルは、劇症型レンサ球菌感染症の発症機序の解明及び診断・治療法の開発に向けて有益な手段であると考えられる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

(1) CD46 transgenic mouse model of necrotizing skin and soft tissue infections with *Streptococcus pyogenes*. Matsui, H., et al. 投稿中

## 2. 学会発表

- (1) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Masahiko Nakamura, Somay Murayama, Takehiko Uchiyama, Keisuke Sunakawa, and Kimiko Ubukata: Murine models of group A *Streptococcus pyogenes* infection. The 8th Awaji International Forum on Infection and Immunity, Awaji Yumebutai International Conference Center on Awaji Island, 2008年9月.
- (2) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Masahiko Nakamura, Somay Y Murayama, Ken'ichi Imanishi, Junji Yagi, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata: CD46 transgenic mouse model of necrotizing skin infections with group A streptococcus. 第82回日本細菌学会総会, 名古屋国際会議場, 2009年3月

## G. 知的所有権の取得状況

1. 取得特許  
無し
2. 実用新案登録  
無し
3. その他  
無し

図 1. hCD46Tg マウスの footpad へ臨床分離 GAS (11 株) を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の致死性の比較  
(n = 6-12)

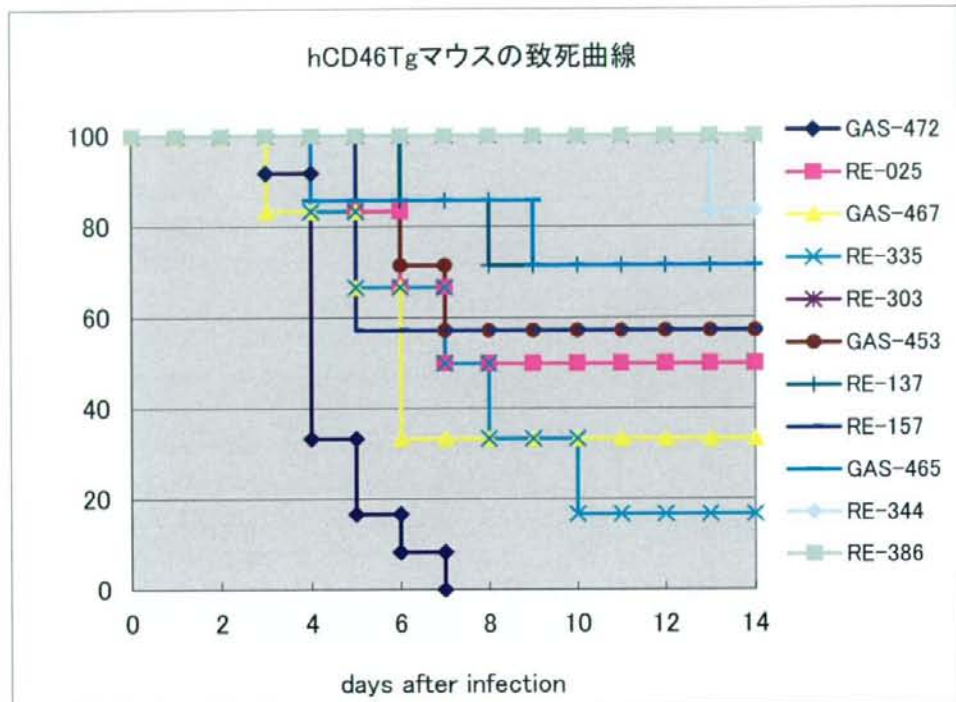


図 2. hCD46Tg 及び対照マウスの footpad へ GAS472 (A), GAS467 (B), RE335 (C) を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の致死性 (●, hCD46Tg マウス; ■, C57BL/6 マウス; ▲, B6C3F1 マウス; n=10-12).

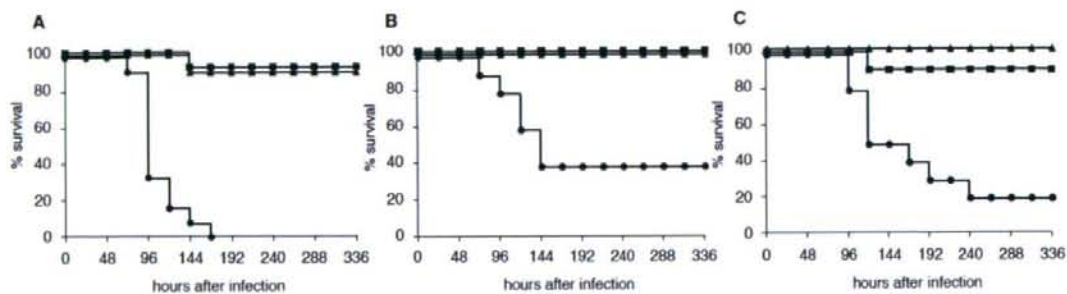


図 3. hCD46Tg 及び C57BL/6 マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の下肢の比較

(A, 非感染 hCD46Tg マウス; B, GAS472 感染後 72 時間経過の hCD46Tg マウス -下肢全体に重篤な壊死が認められる-; C, GAS472 感染後 72 時間経過の C57BL/6 マウス -footpad 付近に壊死が認められ, 下肢全体の腫れが認められる-; D, GAS472 感染後 336 時間経過の C57BL/6 マウス -下肢の欠損が認められる-).

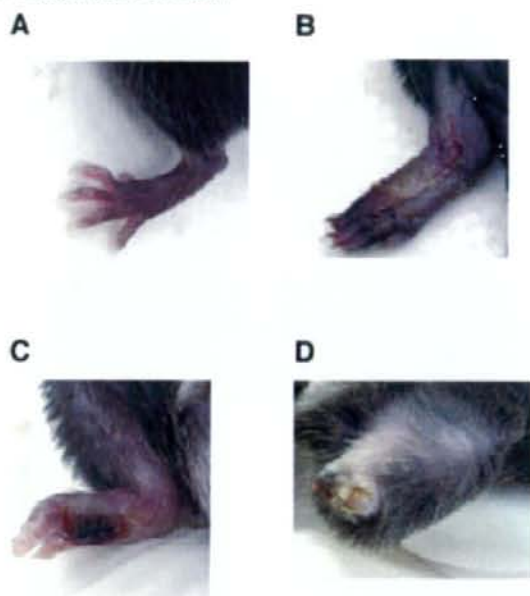


図 4. hCD46Tg 及び C57BL/6 マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の footpad の皮膚の HE 染色による比較 (6h, 両マウスの皮下及び真皮に好中球の浸潤が認められる; 24h, 両マウスに表皮の剥離が認められ, hCD46Tg マウスに浮腫及び出血が認められる; 48h, hCD46Tg マウスに凝血塊及び筋膜の断絶が認められる; E, epidermis; D, dermis, HD, hypodermis. original magnification x100).

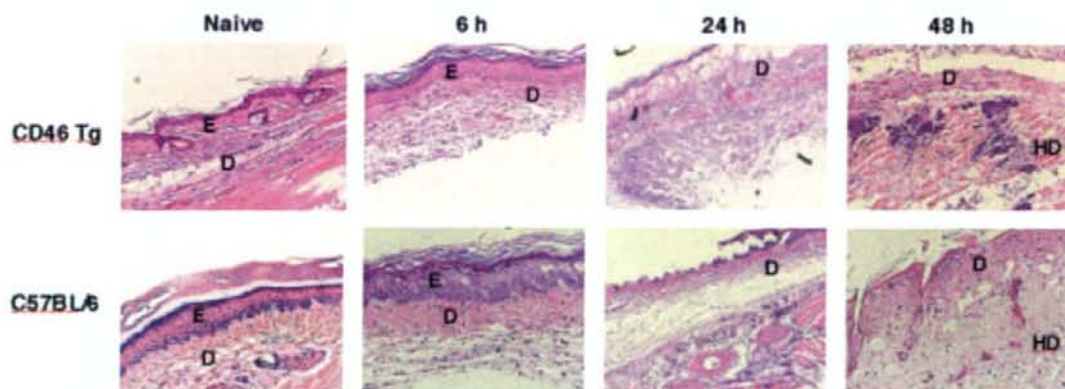




図 5. hCD46Tg マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後 24 時間経過の皮膚の免疫組織化学 (A, anti-human CD46 (緑), anti-GAS (赤); B, anti-human epidermal keratin (緑), anti-GAS (赤); original magnification  $\times 800$ ).

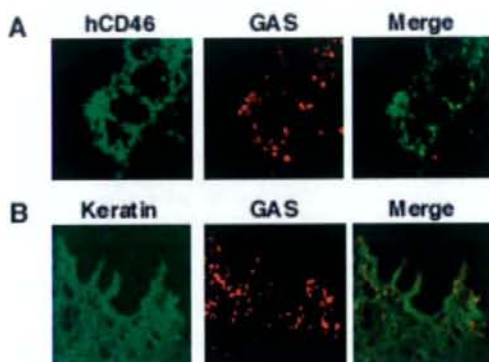


図 6. hCD46Tg マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後 24 時間経過の皮膚の TB 染色 (A, 非感染 original magnification  $\times 200$ ; B, 感染真皮 original magnification  $\times 100$ ; C, 感染真皮 original magnification  $\times 400$ ; 矢印は肥満細胞を示す).

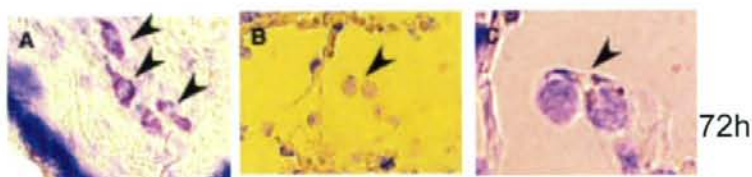


図 7. 各種マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の致死性(●,  $W/W^h$  マウス  $n=12$ ; ○,  $+/+$  マウス  $n=12$ ; ■, hCD46Tg マウスの骨髄から調製した肥満細胞を移入した  $W/W^h$  マウス  $n=4$ ; □, C57BL/6 マウスの骨髄から調製した肥満細胞を移入した  $W/W^h$  マウス  $n=6$ ).

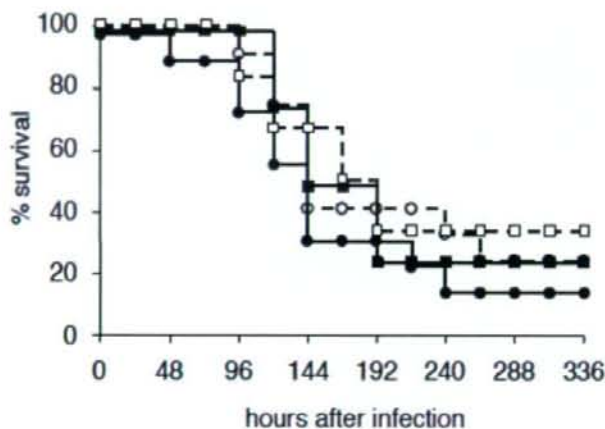


図 8. hCD46Tg 及び C57BL/6 マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後 48 時間経過時点と 72 時間経過時点の血液(A), 脾臓(B), 肝臓(C)における菌数の比較(●, hCD46Tg マウス; ○, C57BL/6 マウス; \*1,  $P=0.001$ ; \*2,  $P=0.02$ ; \*3,  $P=0.001$ ; \*4,  $P=0.008$ ; \*5,  $P=0.000009$ ; \*6,  $P=0.0000003$  hCD46Tg vs. C57BL/6,  $n=10$ ).

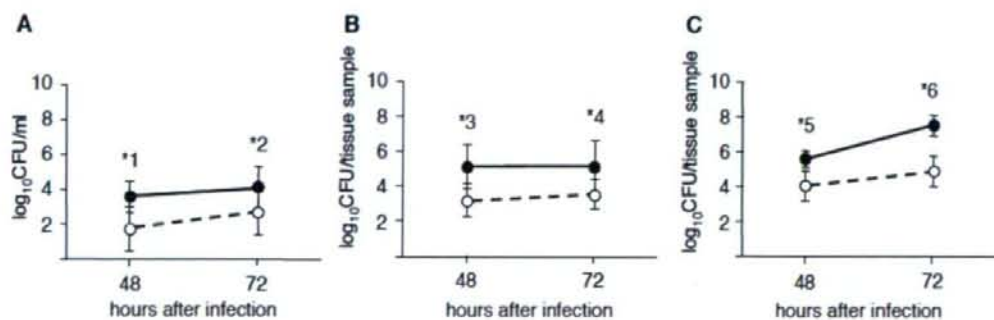


図 9. hCD46Tg マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後 72 時間経過の肝臓(A, マクロ観察, 矢印は腫瘤を示す; B, 蛍光ファロイジン染色の非感染マウス肝臓; C, 蛍光ファロイジン染色の投与後 72 時間経過のマウス肝臓 -細胞骨格の収縮が認められる-).

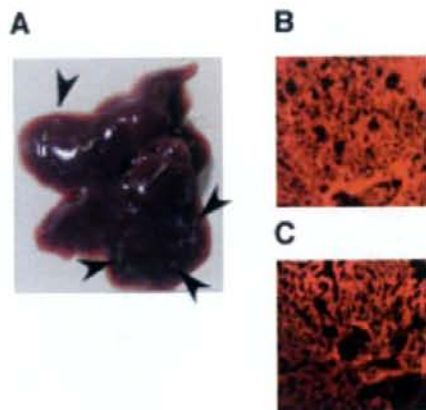
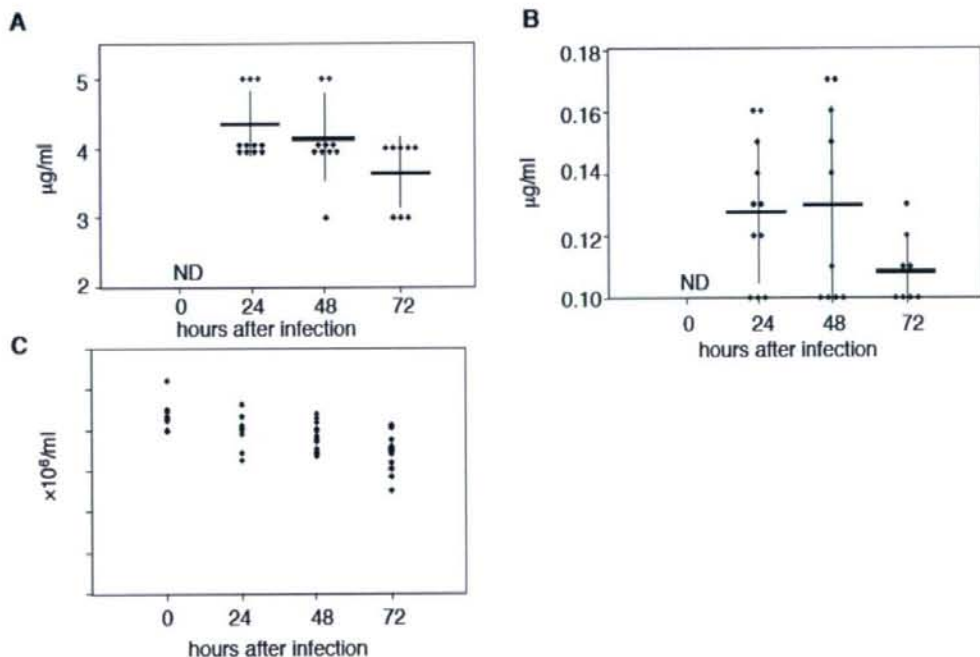


図 10. hCD46Tg マウスの footpad へ GAS472 を  $1 \times 10^7$  CFU 投与後の FDP (A), D-dimer (B), PLT (C) の濃度の変動(n=8-15)。



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

G群レンサ球菌による劇症型感染症のモデル構築および分子基盤に関する研究

研究分担者 秋山徹 国立国際医療センター・研究所感染症制御研究部 室長

研究要旨

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・治療に関する研究を行うため、起因菌であるG群(C群)レンサ球菌(GGS, GCS(ここではGGSとする))のうち昨年度選定した高病原性株を用いて同菌感染症のマウスモデルの構築を行った。同菌感染症の疫学調査結果から、発症者には悪性新生物や糖尿病などの基礎疾患が高頻度に存在することが明らかとなっている。そこで、糖尿病マウスモデルで同菌の感受性を比較したところ、1型糖尿病モデル、2型糖尿病モデルとも糖尿病非発症の対照マウスと比較して、GGS感受性が増加していることが明らかとなった。また、主任研究者等と共同して、まだゲノム情報が明らかにならなかったGGSの全ゲノム配列を決定した。

A. 研究目的

劇症型レンサ球菌感染症(STSS)は致死率が50%にも及ぶ感染症である。最近の調査ではA群レンサ球菌(GAS)以外にG群レンサ球菌(GGS)およびC群レンサ球菌(GCS)、特に*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*による症例が増加している。GGS劇症型感染症はGAS劇症型感染症とは異なり、高齢者および糖尿病などの基礎疾患保有患者で明瞭に高頻度であり、今後の日本社会状況を考える場合、その対策は重要である。

しかしながら、GASの場合と異なりGGSやGCSの研究は進んでいない。筆者等はすでにGASをマウスに腹腔投与するモデルが、GASによるSTSS症例の疫学データと一致するという結果を報告している。

本研究では昨年度までにSTSS症例および動物由来の*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* 分離株16株の病原性をマウスモデ

ルと比較し、GGS研究のための菌株選定を行った。本年度は選定された菌株を使用し、ヒト症例のマウスモデルを構築するため、糖尿病をモデルとしてGGS感受性の検討を行った。また主任研究者等と共同して、まだゲノム情報が明らかとなっていなかったGGSの全ゲノム配列解析を行い、その全ゲノム配列を決定した。

B. 研究方法

供試菌株:

GGSおよびGCS菌株は東京女子医科大学・微生物学免疫学教室および北里大学・生命科学研究所・病原微生物分子疫学研究室より分与を受けた。使用した株は表1にまとめた。

GGSおよびGCSの培養:

ブレイン・ハートインフュージョン培地に凍結保存されているレンサ球菌を植菌し、CO<sub>2</sub>インキュベーター内で37℃、5%で一晩培養した。