

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。

4. 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群溶菌菌の生育には、コロンビア5%羊血液寒天培地 (Becton Dickinson) を用いた。

5. 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。

6. 塩基配列の決定

Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzerを用いて、塩基配列を決定した。

7. *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) GCTTAGAAAATTAA), primer 2 (GCAAGTTCTTCAGCTTGTTT)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 (tattcgcttagaaaattaaaacagg)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/strepblast.htm>)に入力し、*emm*遺伝子型を決定した。

8. *csrS/csrR*および*rgg*遺伝子の塩基配列の決定

*csrS/csrR*および*rgg*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。

(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

1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の*emm*遺伝子型別

1992年以降発症した劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)患者から分離された臨床分離株441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、それぞれ全体の10%を占めていた。これら2つの遺伝子型で全体の50%以上を占めており、欧米と同じような傾向を示している。また、2000年以降、それ以前見られなかった*emm*型によるSTSSがみられるようになった。特に*emm49*型の株によるSTSSが増えてきた。(図1)

2. *emm49*型のSTSS株のstreptokinase遺伝子の発現

*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、*CrsS*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。

3. STSS株における *csrS* 遺伝子の変異と遺伝子発現

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。

4. マウス感染モデルにおける *csrS* 変異の影響

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(図2)や肺(図3)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。

5. 臨床分離株の各 *emm* 遺伝子型における *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株のほうが有意に変異が起きていることが判明した。(図4)

6. *csrS/csrR* および *rgg* 遺伝子の変異の *emm* 型による変異率

我々は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、*csrS/csrR* 遺伝子とは別に、遺伝子の発現制御因子をコードする *rgg* 遺伝子に変異がみられることを見出した。そこで、これらの変異が、様々な *emm* 型で見られるか調べるため、各 *emm* 遺伝子型の変異率を調べた。その結果、各 *emm* 遺伝子型で変異率は異なるものの、劇症型溶血性レンサ球菌感染症を引き起こしたすべての *emm* 遺伝子型で変異が存在することが判明した。

D. 考 察

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、日本では、1992年に報告され、それ以降毎年約100例報告があり、致死率が約40%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。まず、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した。また、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、*csrS/csrR* 遺伝子ばかりでなく *rgg* 遺伝子でも各 *emm* 遺伝子型で変異が起きていることが明らかとなった。また、*csrS/csrR* 遺伝子あるいは、*rgg* 遺伝子の変異は劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株で有意に見出されることから、本因子がA群レンサ球菌 (*S. pyogenes*) による劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症に関与している可能性が強く示唆された。

E. 結 論

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株のそれぞれの *emm* 型において、*csrS/csrR*,

あるいは, *rgg*遺伝子に変異が見られた。この変異率は, 咽頭炎などの非劇症型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) 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.* 135: 1227-1229 (2007).
- 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. 65 suppl 3: 255-258 (2007).
- 3) Ato M., Ikebe T., Kawabata H, Takemori T, Watanabe H. 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).
- 4) 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. Genetic features of clinical isolates of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* possessing Lancefield's group A antigen. *J. Clin. Microbiol.* 46: 1526-1529 (2008).
- 5) 池辺忠義, 阿戸 学, 小林和夫, 渡辺治雄. 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).
- 6) 池辺忠義, 阿戸 学, 小林和夫, 渡辺治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序—菌の免疫回避機構と菌の特性—. *感染症学雑誌* 83: 485-489 (2009).
- 7) Matsumoto M, Yamaguchi I, Sasano M, Hori M, Ikezaki K, Shimizu S, Nishiyama Y, Sato N, Tsuchiya H, Suzuki M, Minagawa H, Working Group for Beta-Haemolytic Streptococci in Japan. T serotyping of *Streptococcus pyogenes* in Aichi Prefecture, Japan isolated between 2003 and 2007. *Jpn J Infect Dis.* 62: 168-169 (2009).
- 8) 池辺忠義, 常彬. 豚レンサ球菌感染症. In *ズーノシスハンドブック*. 岸本寿男, 山田章雄監修. *Medical Science* 154-155 (2009).
- 9) Ikebe T., Ato M., Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, Watanabe H. Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog.* In press (2010).
- 10) 池辺忠義. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症. *公衆衛生*. 医学書院. 74 (1): 34-38 (2010).

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.
- 2) 佐藤 俊, 阿部諭史, 関根聡子, 渡邊香奈, 斎藤純平, 石田 卓, 棟方 充, 塚田泰彦, 鈴木栄子, 池辺忠義. 背部痛と喀血で発症した劇症型溶血性連鎖球菌感染症の一例. 第181回日本内科学会東

- 北地方会，宮城，2007
- 3) Ikebe, T., Ato, M., Kobayashi, K., 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. Hanoi. (2008).
 - 4) 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.
 - 5) 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.
 - 6) 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
 - 7) 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
 - 8) 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における *csrS* 変異の解析. 第 82 回日本細菌学会総会，愛知，2009.
 - 9) 阿戸 学, 池辺忠義, 渡辺治雄, 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ジン O および接触依存的にヒト好中球を傷害する. 第 82 回日本細菌学会総会，愛知，2009.
 - 10) 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，愛知，2009.
 - 11) 長野則之，池辺忠義，和田昭仁，長野由紀子，諏訪直生，外山雅美，荒川宜親. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* による初めてのヒト侵襲性感染症例. 第 83 回日本感染症学会総会，東京，2009.
 - 12) 池辺忠義. 劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる病原因子の解明. 第 21 回日本臨床微生物学会総会，東京，2010.
 - 13) 池辺忠義，緒方喜久代，奥野ルミ，嶋智子，大屋日登美，渡辺治雄. 日本における劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の *emm* 遺伝子型と *csrS* 遺伝子の変異頻度. 第 83 回日本細菌学会総会，横浜，2010.
 - 14) 松村隆之，池辺忠義，渡辺治雄，小林和夫，阿戸 学. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロン γ 産生細胞の解析. 第 8 回感染症沖縄フォーラム，沖縄，2010.
 - 15) 阿戸 学，松村隆之，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における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害. 第 8 回感染症沖縄フォーラム，沖縄，2010.
- G. 知的所有権の取得状況
1. 特許取得
該当なし
 2. 実用新案登録
該当なし
 3. その他
該当なし

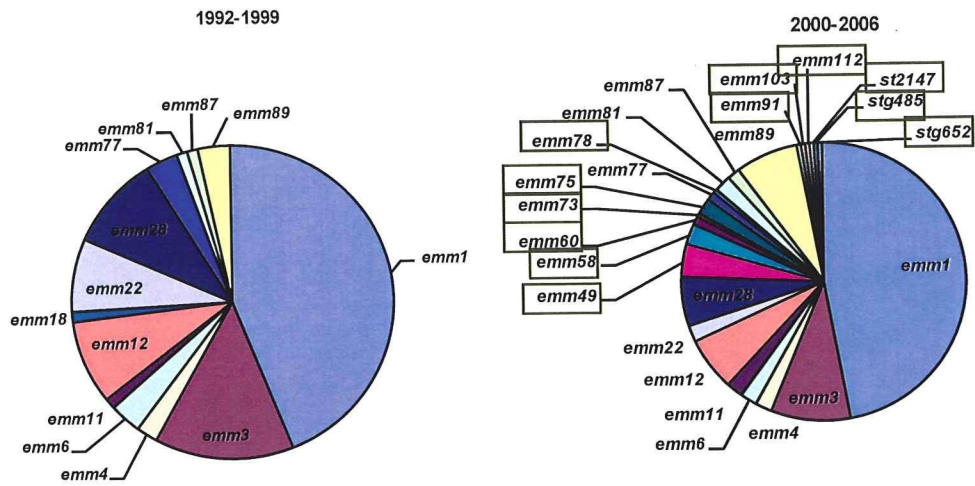


図1 1992年以降に発症した劇症型溶血性レンサ球菌感染症(STSS)患者から分離された臨床分離株441株についてのemm型別

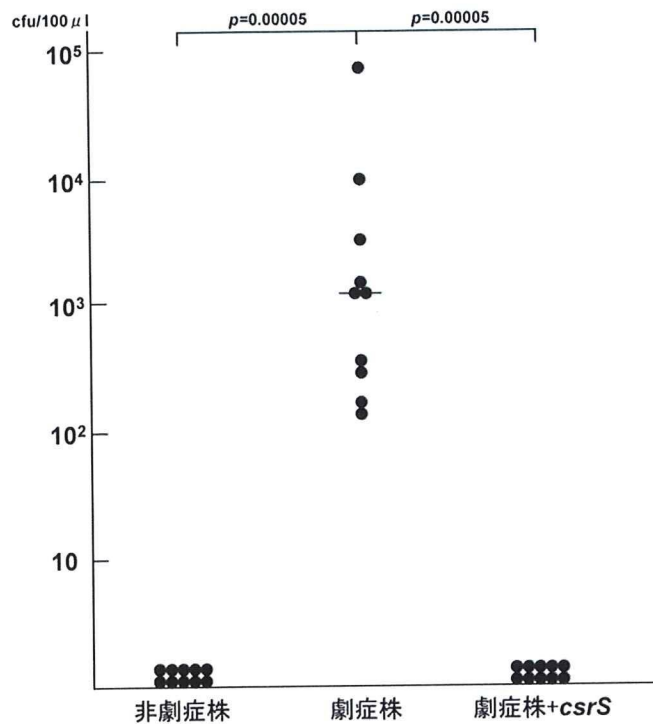
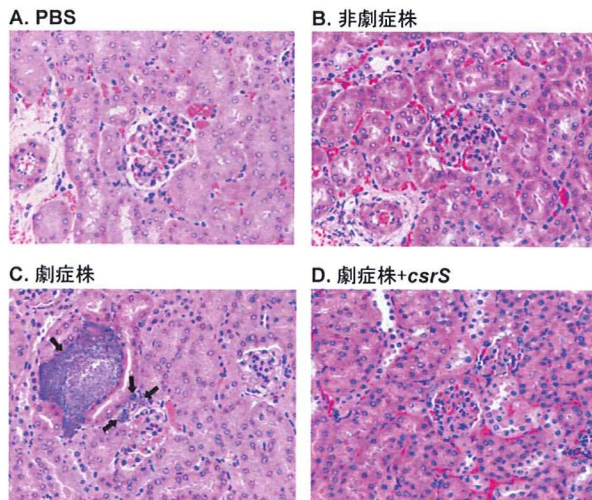


図2 マウスの腹腔内接種(5×10^7)1日後の血中の菌数
劇症株から大量の菌が分離され、菌血症を引き起こしていた。

kidney



lung

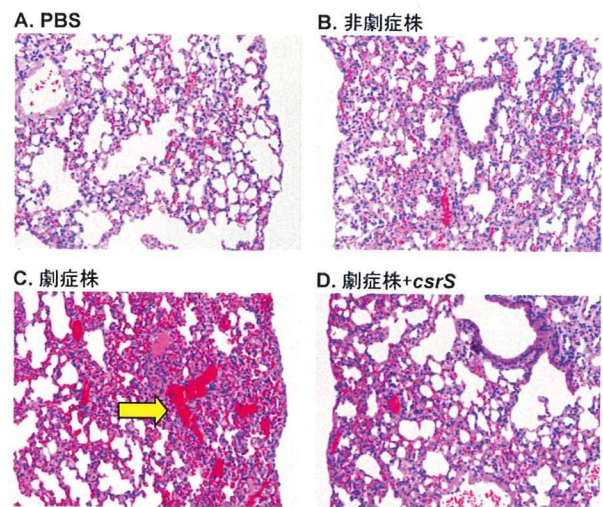


図3 マウスの腹腔内接種(5×10^7)1日後の腎臓と肺の病理
菌塊(→)とうっ血(→)がみられた。菌塊周囲への、好中球の浸潤がみられなかった。

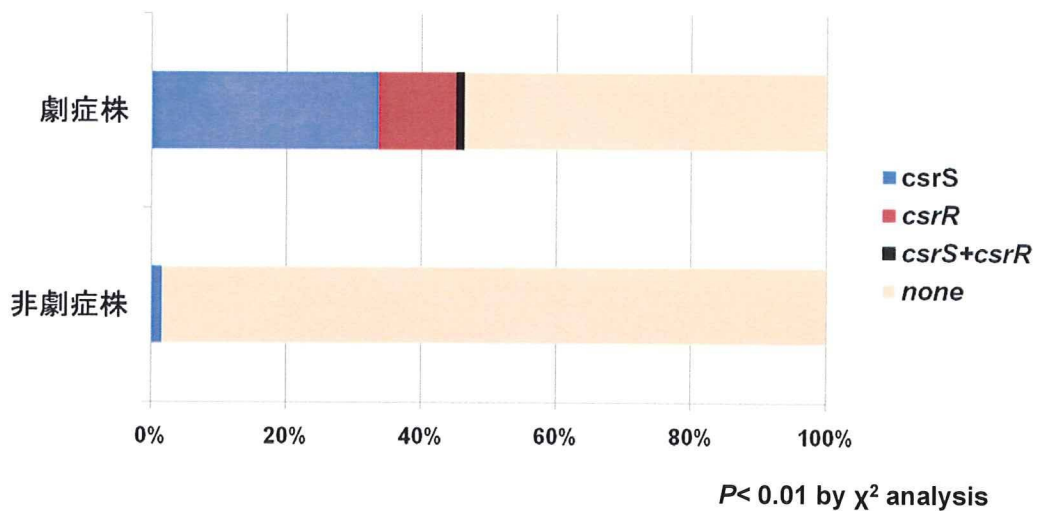


図4 *csrS/csrR* 遺伝子の変異率
STSS株に高頻度で*csrS/csrR* 変異がみられる

劇症型溶連菌感染発症における宿主因子の解析

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 細菌第一部主任研究官）

研究協力者 松村 隆之（国立感染症研究所 免疫部第二室研究員）

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* が宿主防御を障害する機構を解析した。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、好中球膜上の β インテグリンと劇症型分離株膜表面コラーゲン様蛋白が結合することによって、劇症型分離株で高発現している溶血毒ストレプトリシン O が効果的に好中球膜に孔形成し、好中球にネクロシスを誘導することが示唆された。また、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転写制御因子 *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* 感染症では菌の転写制御遺伝子の変異によって、病原因子の発現が増強し、好中球走化抑制と直接障害により宿主防御機構の破綻を招来し、感染部位に好中球浸潤を伴わない特異な病態を形成することが示唆された。また、劇症型感染症病態における宿主因子の役割を探索する目的で、劇症型感染症患者血清および劇症型感染動物モデルのサイトカイン濃度を解析した結果、死亡例でインターフェロン γ とインターロイキン 6 が高濃度で認められた。今後、その役割を解析することにより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、*S. pyogenes* 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

の防御能を分子レベルで詳細に解析し、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。

また、病態あるいは予後に関わる可能性がある宿主因子の同定を目的として、本邦の診断基準に基づいて確定された劇症型レンサ球菌感染症患者から採取された血清中のサイトカインを測定した。

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* に対する殺菌能測定

オプソニン化 *S. pyogenes* と PMN を 37°C 90 分間インキュベートし、細胞を溶解した後、血液寒天培地上の細菌コロニー数によって評価した。

3. 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(IL)-8 濃度測定

S. pyogenes と好中球遊走活性をもつケモカイン IL-8 を 37°C で 60 分培養した後トランスウェルの下室に、上室に PMN を入れ、さらに 37°C で 60 分培養して、下室に遊走した PMN の割合を FACS Calibur フローサイトメトリーを用いて測定した。

で解析した。下室培養液中の IL-8 濃度は ELISA で測定した。

4. 血清サイトカインの測定

患者から採取された血清は、匿名化され解析まで -80°C で保存した。C3H/HeN マウスに 1×10^7 cfu の *S. pyogenes* を腹腔注射にて感染させ、経時的に血清を採取した。サイトカイン濃度は FlowCytoplex と FACS Calibur を用いて測定した。

(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、個人情報削除し匿名化を行った。動物実験については、国立感染症研究所動物実験実施規定に基づき、動物実験委員会の承認を得て行われた。

C. 研究結果

はじめに、*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、*S. pyogenes* に対する

ヒト PMN の殺菌能を解析した。非劇症分離株が PMN に殺菌されるのに対し、劇症分離株は PMN による殺菌を回避した。

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、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、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。一方、PMN 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。SLO は分泌性の毒素であるにもかかわらず、劇症型分離株の培養上清中で好中球ネクロシスは誘導できなかった。このことから、劇症型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 (図 1)。

次に、PMN 傷害を引き起こす劇症型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阻害抗体と酵素処理を用いて解析した。その結果、PMN 側の責任分子として活性型 b2 インテグリンが、また、細菌側の責任分子として *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であることが判明した。さらに、この結合が Ca⁺⁺ 依存的に起こることが判明した (図 2)。

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 PMN 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ことから、劇症分離株は *csrS* の変異により、SLO の発現増強を介したネクロシス、および、ScpC 発現増強を介した IL-8 分解による遊走障害を介して、好中球に

よる殺菌を回避するということが示唆された (図 3)。

我々は、劇症型レンサ球菌感染症の病態において、宿主炎症メディエーターの関与を調べる目的で、劇症型感染患者 20 例より採取された血清中の多種類のサイトカイン産生量を測定した。その結果、劇症型感染生存例と比べて、死亡例において血中インターフェロン(IFN)-g と IL-6 が顕著に上昇していることを見出した (図 4)。一方、IL-1, TNF- α , IL-17 などの他の炎症性サイトカインは、患者血清中にほとんど検出されなかった。

以上の知見を経時的に解析するため、劇症型感染マウスモデルを作成して、感染後の血清中サイトカイン産生の動態を解析した。その結果、非劇症型分離株の感染では、血清中サイトカインの上昇は認められず、劇症型分離株の致死性感染において、IL-6 と IFN-g 血中濃度が上昇するというヒトの致死例と同様の発現パターンが認められた。以上の結果から IFN-g と IL-6 が劇症型感染における宿主主要因である可能性が示唆された。

D. 考 察

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)感染局所で産生される IL-8 に反応して感染局所への遊走、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。劇症型分離株で *csrS* 遺伝子の変異により、*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。一方、ストレプトリジン O の産生が増加した結果、劇症型感染分離株が 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。

劇症型感染の発症危険因子の一つである

糖尿病では、好中球機能低下が認められる。すなわち、レンサ球菌の病原性と宿主防御能の力関係が、劇症型感染の発症を規定している可能性を示唆する。

劇症型感染症の予後不良に関与する宿主因子として、炎症性サイトカイン TNF- α , IL-1, IL-6 が高値になるという報告があり、本感染症における血漿交換療法の有効性に関する根拠の一つと考えられていた。しかし、我々の解析結果では、他の敗血症の報告と比較して、TNF- α および IL-1 の上昇はごく軽度であった。一方、血清中 IL-6 と IFN-g は、劇症型感染症において、死亡例で著しく上昇しており、致死性感染マウスモデルでも上昇が認められたことから、劇症型レンサ球菌感染症において、これらが重要なサイトカインである可能性が高い。今後、好中球を傷害する機構と、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。

E. 結 論

劇症型レンサ球菌感染症より分離された菌が、好中球機能を傷害することによって、劇症型感染の特異な病態が形成されることが考えられた。炎症性サイトカインである IFN-g と IL-6 が、劇症型レンサ球菌感染症における宿主因子である可能性が示唆された。

F. 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) **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.
- 3) 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.
 - 4) **阿戸 学**, **池辺忠義**, 2009 話題 「劇症型 A 群レンサ球菌感染症における好中球傷害の機序」臨床免疫・アレルギー科, 51:(4) 406-413
 - 5) **池辺忠義**, **阿戸 学**, 小林和夫, **渡辺治雄**, 2009 感染症学雑誌「劇症型溶血性レンサ球菌感染症の発症機序—菌の免疫回避機構と菌の特性—」 83: 485-489.
 - 6) **Ikebe T**, **Ato M**, Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, **Watanabe H**. 2010 Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates. *PLoS Pathog*. In press
- ## 2. 学会発表
- 1) **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 年 12 月
 - 2) **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, 北谷町, 2008 年 2 月
 - 3) **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 年 12 月
 - 4) **Ato M**, Escape mechanisms of severe invasive group A streptococcus from killing by neutrophils. 4th International Infection Control Conference of Theodor Bilharz Research Institute, ギザ, エジプト, 2008 年
 - 5) **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 年 12 月
 - 6) 松村隆之, **池辺忠義**, 小林和夫, **渡辺治雄**, **阿戸 学** 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株に由来す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 年 2 月
 - 7) **阿戸 学**, **池辺忠義**, **渡辺治雄**, 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 年 3 月
 - 8) Matsumura T., **Ikebe T.**, **Watanabe H.**, Kobayashi K., **Ato M**. 2009 Involvement of IFN-g and IL-6 in severe invasive group A streptococcus infection. 17th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophage, Kanazawa, July 2009.
 - 9) **阿戸 学**: 2009 劇症型レンサ球菌感染症の重篤化に関わる宿主要因の解明 第 58 回日本感染症学会東日本地方会 第 56 回日本化学療法学会東日本支部総会合同学会, 東京 2009 年 10 月
 - 10) **阿戸 学**, 松村 隆之, 小林 和夫:2009 劇症型溶血性レンサ球菌感染症分離株の分泌毒素による接触依存性好中球傷害 第 39 回日本免疫学会総会, 大阪 2009 年 12 月
 - 11) Matsumura T, Kobayashi K, and **Ato**

- M:2009 Severe invasive group A streptococcus infection induces production of IFN- γ in monocytes 第39回日本免疫学会総会, 大阪 2009年12月
- 12) Ato M:2010 Incompetence of neutrophils in invasive infections. Symposium on infection and immunity and translational medicine. Khon Kaen & Chaing Mai, Thailand 2010年1月
- 13) 阿戸 学, 松村隆之, 池辺忠義, 渡辺治雄, 小林和夫:2010 劇症型溶血性レンサ球菌感染症における遺伝子発現調節因子の変異と好中球傷害. 第8回感染症沖縄フォーラム, 宜野湾 2010年2月
- 14) 松村隆之, 池辺忠義, 渡辺治雄, 小林和夫, 阿戸 学:2010 劇症型溶血性レンサ球菌感染症におけるインターフェロン γ 産生細胞の解析 第8回感染症沖縄フォーラム 宜野湾 2010年2月

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

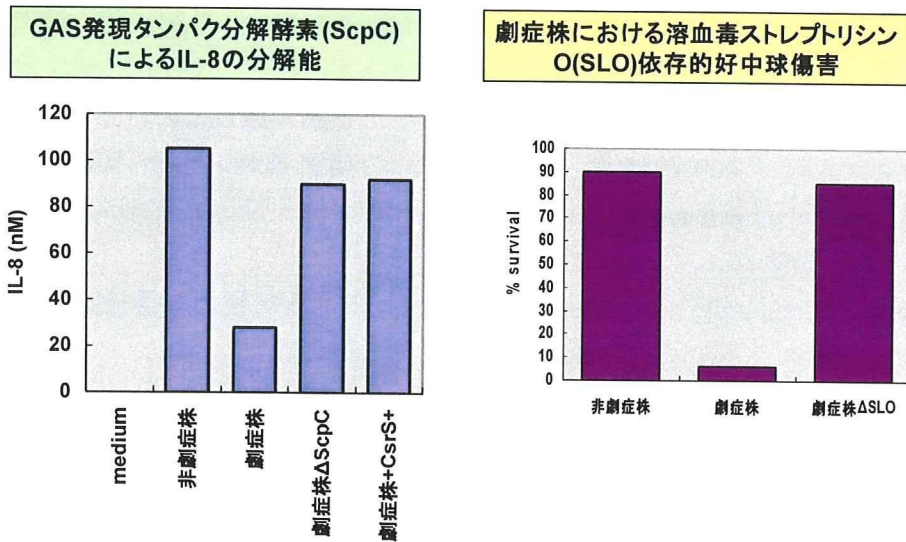


図 1

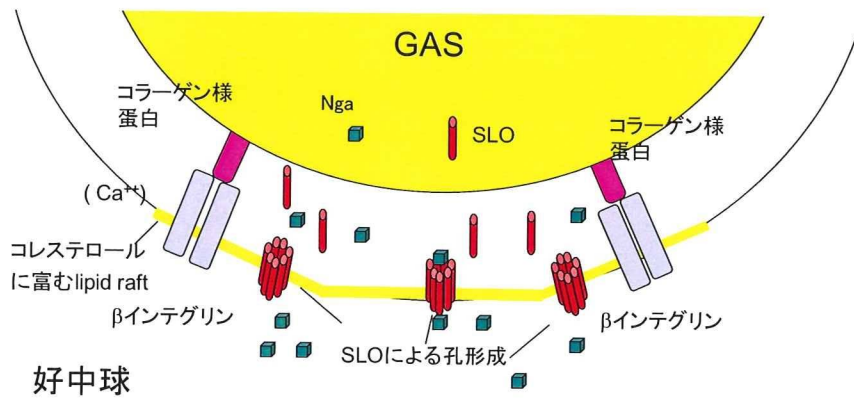


図 2 劇症型感染分離株による SLO 依存性好中球ネクロシスの分子機構

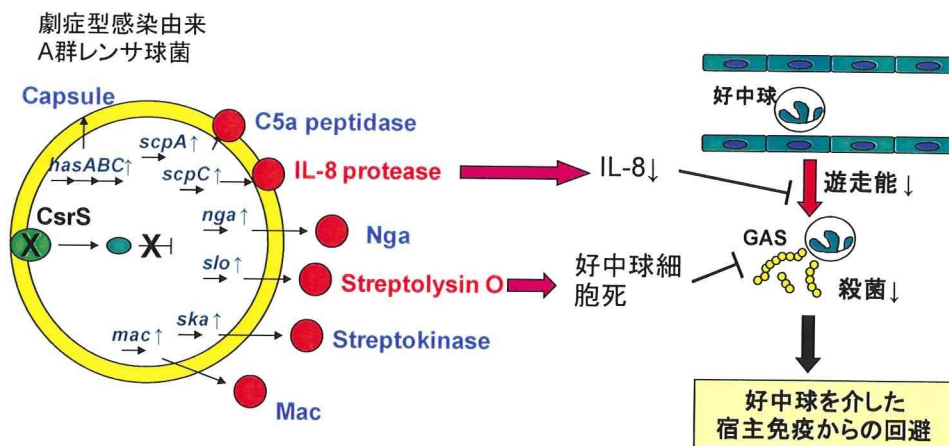


図 3 劇症型レンサ球菌による好中球機能傷害機構

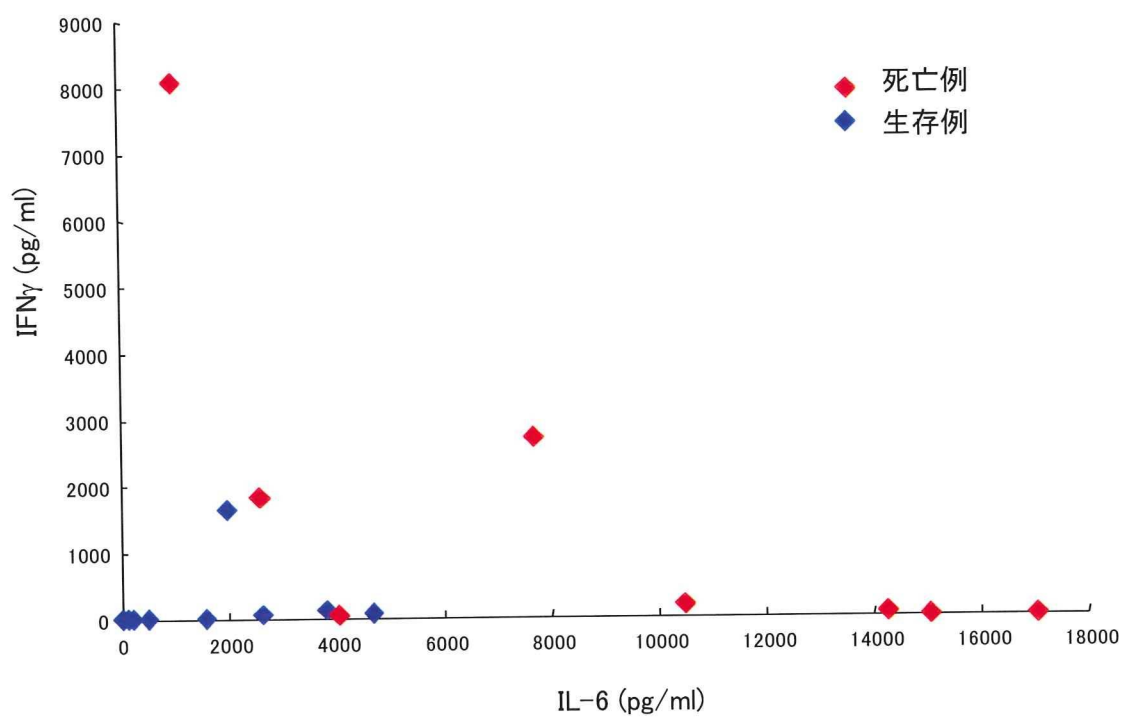


図 4 劇症型レンサ球菌感染症患者血清中のサイトカイン産生

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 A群レンサ球菌 (group A streptococci, GAS) のM蛋白質の受容体であるヒトCD46を発現させたトランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いて、劇症型GAS感染症 (streptococcal toxic shock syndrome, STSS) の感染モデルを構築した。STSSの患者血液から分離された血清型M1のGAS472株をhCD46Tgマウスの後肢足蹠部 (footpad) へ 1×10^7 CFU投与すると、敗血症 (sepsis) を生じ、播種性血管内凝固症候群 (disseminated intravascular coagulation, DIC) 及び多臓器不全 (multi organ failure, MOF) により投与後7日以内に全てのhCD46Tgマウスは死亡した。一方non-Tgマウスは同様の投与では生存する。hCD46Tgマウスの感染局所では、横紋筋融解症 (rhabdomyolysis) を伴った重篤な壊死性筋膜炎 (necrotizing fasciitis, NF) の発症が認められた。更には皮膚及び軟部組織壊死 (skin and soft tissue necrosis) のみならず大腿骨の壊死 (osteonecrosis) が観察された。また、感染初期に肥満細胞 (mast cell, MC) の脱顆粒現象 (degranulation) およびマクロファージ (macrophage) による壊死細胞の貪食 (phagocytosis) が観察された。そこで、MCsの感染防御作用を解析するため、MC欠損 (WBB6F1-*W/W^u*, *W/W^u*) マウスとその対象となる (WBB6F1^{+/+}, +/+) マウスのfootpadへGAS472を投与し、病態を比較した。*W/W^u*マウスは+/+マウスに比較して、感染72時間後において感染局所の重症化が観察された。更に、膝下リンパ節 (popliteal lymph node, PLN), 脾臓 (spleen), 肝臓 (liver) において有意に多くの感染菌数が検出された。次に、hCD46TgマウスのMCを移入した*W/W^u*マウスとC57BL/6JマウスのMCを移入した*W/W^u*マウスのfootpadへGAS472を投与し、致死性を比較したが、両マウスにおける生存曲線に顕著な差は認められなかった。従って、MCは皮膚感染の場合、局所の感染防御効果を有するが、致死性には影響しないと考えられた。また、ヒトCD46は、MCの感染防御に関与しないと考えられた。一方、GAS472は、各種遺伝子の発現調節因子である*csrRS*遺伝子の変異が無いにもかかわらず、hCD46依存的にストレプトリジンS (streptolysin S, SLS) の高発現が認められた。従って、hCD46TgマウスにおけるSTSS発症には、菌の溶血活性が関与していると推測できた。本感染モデルは、組織壊死やショックを伴うSTSSに非常に類似した症状を示した。従って、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なモデルであると言える。

A. 研究目的

ヒトに特異的な病原細菌であるA群レンサ球菌 (group A streptococci, 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。マウスのCD46は、GASのM蛋白質の受容体にはならない。そこでヒトCD46を発現させたトランスジェニック (hCD46Tg) マウスを用いて、GASの皮下感染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

1. マウス

hCD46Tg マウス (H2b haplotype) は、J. P. Atkinson 教授 (米国ワシントン大学) より分与された。対照となるマウスとして C57BL/6J マウス (H2b haplotype) を日本チャールズ・リバー社より入手した。W/W^u マウスと+/+ マウスは日本エスエルシー社より入手した。

2. 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) より分与された。

3. MCs の移入実験

hCD46Tg 及び C57BL/6 マウスの骨髄細胞 (bone marrow cell, BMC) から分化・増殖させた MC を、放射線照射 (4.5 Gy x 2 回) 後の W/W^u マウスへ移入した。また W/W^u 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。

4. 感染実験

THY 培地で一夜培養した GAS を footpad より感染させ、致死率や各組織の菌数を算定した。一方、病理学的解析のため、感染組織から凍結切片を調製し、各種抗体を用いた免疫染色を行った。また、一部の感染組織は、ホルマリンで固定後切片を調製し、ヘマトキシリン・エオジン (HE)、ギムザ(G)及びトリジンブルー (TB) により染色した。骨は脱灰後、HE 染色あるいは酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (TRAP) 染色を行った。

5. 転写活性の測定

hCD46Tg あるいは C57BL/6J マウスの血液

と GAS472 の菌液を 1:1 で混合し、CO₂ インキュベーターに設置後経時的に GAS の mRNA を調製し、各種遺伝子 (16S rRNA, *sagA*, *emm*, *scpA*, *scpC*, *ska*, *speB*, *csrS*) の発現量の変化をリアルタイム RT-PCR 法にて調べた。

6. 遺伝子配列の決定

GAS472, GAS467(以上、強毒株), RE386, RE344 (以上、弱毒株) について *csrRS* 領域の塩基配列を決定した。

(倫理面等への配慮)

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 (第二種使用等の名称: ヒトCD46遺伝子発現トランスジェニックマウスを用いたレンサ球菌劇症型感染症の感染モデルの構築)、文部科学大臣の承認を得た (19校文科振第84号, 承認日: 平成19年9月18日)。また、北里大学実験動物委員会規程、北里大学バイオセーフティ安全管理規定及び北里大学研究倫理規程に従って研究を遂行した。

C. 研究結果

1. 菌株間による病原性の差

当該研究に用いた菌株を Table 1 に列挙した。1x10⁷ CFU の菌数を hCD46Tg マウスの footpad へ投与後の致死曲線を図1に示す。STSS の患者から分離された GAS472 が最も致死性が高かった。等量の菌数を C57BL/6J マウスの footpad へ投与してもマウスは生存した。同時に感染72時間後の感染局所の状態を図2に示すが、高い致死性を示す株において感染局所の皮膚及び軟部組織の壊死 (skin and soft tissue necrosis) が認められた。特に GAS472 投与 hCD46Tg マウスの足は、病理学的解析により、rhabdomyolysis を伴った典型的な NF の症状を呈していた (図3)。

2. 骨壊死 (osteonecrosis)

致死性の低い株を、hCD46Tgマウスのfootpadに投与すると2週間後にマウスは生存するが、大腿部から下は壊死により完全に消失した(図4)。そこで感染7日後に足の骨の標本をHE染色とTRAP/ALP染色で観察したところ、破骨細胞(osteoclast)と骨芽細胞(osteoblast)の著しい増加と血管と骨の破壊が確認された。

3. MCの感染防御効果

GAS472感染初期にMCのdegranulationおよびマクロファージによる壊死細胞の貪食が認められた。更にGAS472による感染72時間後での各組織の菌数は、*W/W^u*マウスの方が+/+マウスに比較して有意に多かった。また、感染72時間後の感染局所の病態においても顕著な差が認められた。このことは、MCが感染防御に関わっていることを証明するものである。しかし、*W/W^u*マウスと+/+マウスにおいてGAS472感染後の生存率に差は認められなかった。更にMCを移入した*W/W^u*マウスにおいて、ヒトCD46に依存した生存率の変化は認められなかった。

4. DIC, MOFの発症

hCD46TgマウスのfootpadへGAS472を 1×10^7 CFU投与後、感染局所のNFと同時にliver, spleen, 腎臓(kidney), 心臓(heart)に多くの結節(nodule)が認められ、各臓器の壊死が観察された(図5)。また血液中のフィブリンの分解産物(fibrin degradation products: FDP), Dダイマー(D-dimer)の増加及び血小板数(PLT)の減少が観察されることから(図6), DICを合併したMOFの発症が示唆された。

5. 病原遺伝子の発現

強毒株(GAS472, GAS467)と弱毒株(RE386, RE344)の*csrRS*(二成分系発現調節遺伝子)の配列をM1型GAS標準株(MGAS5005)と比

較したが、*csrRS*のcoding領域内の配列は4株とも標準株と同じであった。次にヒトCD46に依存した病原遺伝子の発現を調べたところ、2時間のインキュベーションで*sagA*(SLS)遺伝子の発現が認められた(図7)。しかし他の病原遺伝子(*emm*, *scpA*, *scpC*, *ska*, *speB*, *csrS*)の発現は認められなかった。

D. 考察

1. 当該研究により構築したマウス感染モデルは、ヒトの皮膚感染に起因した劇症型GAS感染症に類似しており、有用な感染モデルと言える。本感染モデルでは、skin and soft tissue necrosisはもとよりosteonecrosisも発症する。臨床報告においてもGAS感染後のosteonecrosisは報告されており(Pediatrics 1999; 104:967-969), 治療のガイドラインが示されている。
2. STSSの患者から分離されたGAS472には、*csrRS*の変異は認められず、強毒化の機構は不明である。
3. 表皮MCは、皮膚感染細菌に対してnetを形成して感染防御に働いている。しかし当該研究においては、MCは致死性には影響を及ぼさなかったことから、MCによる感染防御は、感染局所の殺菌作用に限られていると思われる。

E. 結論

皮膚感染後に発症する急激なnecrosisは、hCD46を介したGAS感染により細胞の恒常性が損なわれ、過激な増殖と破壊によると推察される(図8)。一方、感染局所のNFと併行して、sepsisの進行によりDICを合併したMOFが発症し、その結果死に至ると想定できる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) **Hidenori Matsui**, Yukie Sekiya, Masahiro Nakamura, Somay Yamagata Murayama,

Haruno Yoshida, Tetsufumi Takahashi, Ken'ichi Imanishi, Kanji Tsuchimoto, Takehiko Uchiyama, Keinosuke Sunakawa, and Kimiko Ubukata. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infection and Immunity*, 2009, 77 (11), 4806-4814.

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, Hyogo, Japan. September 7-11, 2008.
- 2) 関谷幸江, 村山琮明, 生方公子, **松井英則**. ヒト CD46 発現トランスジェニックマウスを用いた劇症型レンサ球菌感染モデルの構築. 第 81 回日本細菌学会総会, 国立京都国際会館, 平成 20 年 3 月 24~26 日. *日本細菌学雑誌*, 63 (1), 77, 2008.
- 3) **Hidenori Matsui**, Yukie Sekiya, Masahiko Nakamura, Somay 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, 平成 21 年 3 月 12~14 日. *日本細菌学雑誌*, 64 (1), 228, 2009.
- 4) **松井英則**, 関谷幸江, 中村正彦, 高橋哲史, 村山琮明, 内山竹彦, 砂川慶介, 生方公子. ヒト CD46 発現マウスを用いた実験的劇症型 A 群溶血性レンサ球菌感染症の解析. 第 83 回日本感染症学会総会, 京王プラザホテル, 平成 21 年 4 月 23~24 日. *感染症学雑誌*, 83 (臨時増刊), 258, 2009.
- 5) Haruno Yoshida, **Hidenori Matsui**, Yukie Sekiya, Ken'ichi Imanishi, Tetsufumi Takahashi, Somay Murayama, Masahiko Nakamura, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata. Protective roles of skin mast cells in mouse models of necrotizing fasciitis caused by GAS infection. 第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜, 平成 22 年 3 月 27-29 日. *日本細菌学雑誌*, 65 (1), 148, 2010.
- 6) Keisuke Okada, **Hidenori Matsui**, Haruno Yoshida, Somay Murayama, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Toru Akiyama, Teruo Kirikae, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata. Experimental model of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* infection in CD46 transgenic mice. 第 83 回日本細菌学会総会, パシフィコ横浜, 平成 22 年 3 月 27~29 日. *日本細菌学雑誌*, 65 (1), 148, 2010.
- 7) **松井英則**, 吉田春乃, 岡田圭祐, 村山琮明, 生方公子. CD46 トランスジェニックマウスを用いた *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) 感染モデルの構築. 第 84 回日本感染症学会総会, 国立京都国際会館, 平成 22 年 4 月 5~6 日. *感染症学雑誌*, 84 (臨時増刊), 361, 2010.

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

Table 1 List of 11 clinical isolates of GAS serotype M-1

Strain	Age	Sex*	Disease	Source	Alive or death
GAS472	38	M	STSS	Blood	Death
				Cerebrospinal	
GAS467	57	M	Meningitis, sepsis	fluid	Death
RE335	6	F	Pyogenic arthritis	Blood	Alive
RE025	76	M	NF	Pus	Death
GAS465	7	F	Pharyngitis	Pharyngeal swab	Alive
RE386	62	F	Pharyngitis, sinusitis	Blood	Alive
				Cerebrospinal	
RE137	72	M	Meningitis	fluid	Death
			Sepsis	Subendocardial	
RE303	52	M	(chronic renal failure)	abscess	Death
RE157	75	M	Facial cellulitis	Blood	Alive
			Pyogenic cervical		
GAS453	9	M	adenitis	Pharyngeal swab	Alive
			Sepsis		
RE344	40	F	(acute hepatitis)	Blood	Alive

*M, male; F, female.

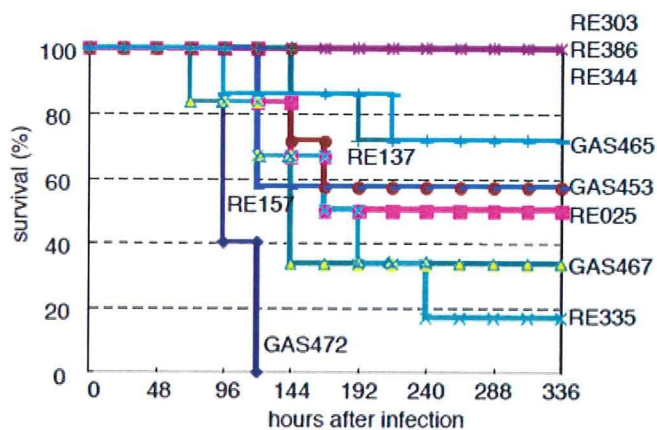


図1 1×10^7 CFUのGASをhCD46Tgマウスのfootpadへ投与後の致死様式の比較

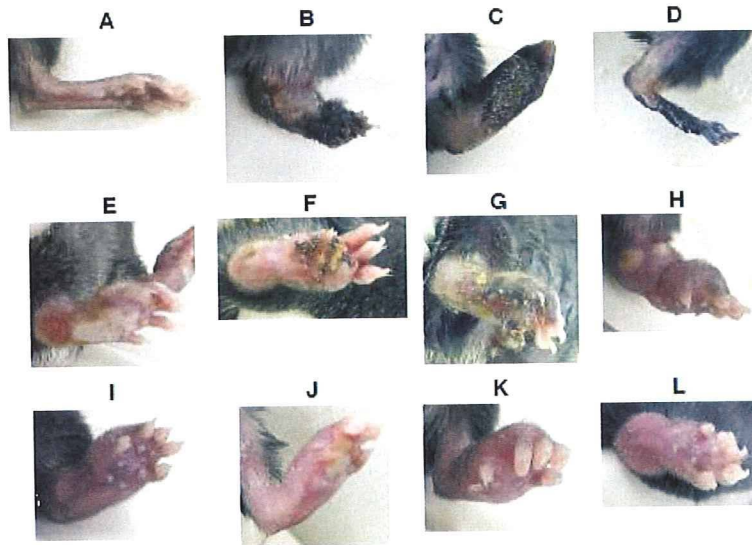


図2 1×10^7 CFUのGAS投与72時間後のhCD46Tgマウスの足の状態。

A, 非感染; B, GAS472; C, GAS467; D, RE025; E, RE335; F, GAS465;
G, GAS453; H, RE303; I, RE386; J, RE137; K, RE157; L, RE344。

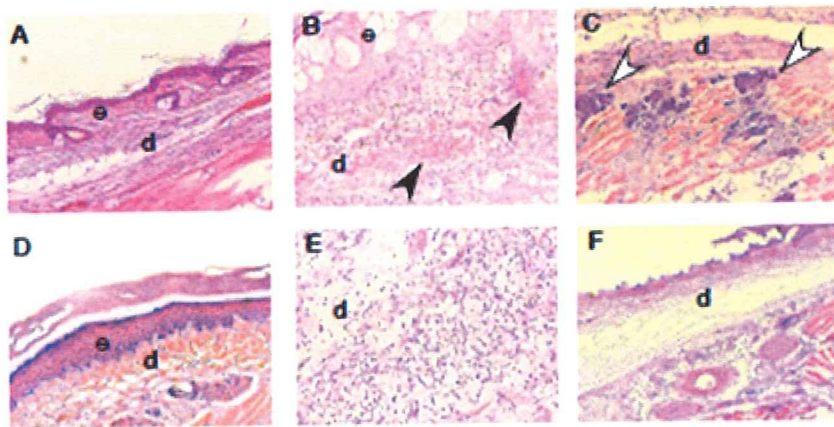


図3 1×10^7 CFU のGAS472をfootpadへ投与後の足の皮膚の組織化学 (HE染色)

A, B, C, hCD46Tgマウス。D, E, F, C57BL/6Jマウス。A, D, 非感染 (x100)。B, E, 感染
24時間後 (x200)。C, F, 感染48時間後 (x200)。黒と白矢印は、出血と壊死を示す。
e, 表皮 (epidermis) ; d, 真皮 (dermis)。



図4 1×10^7 CFUのGAS453をfootpadへ投与14日目のhCD46Tgマウス
両足が壊死により完全に欠損したが、生存した。

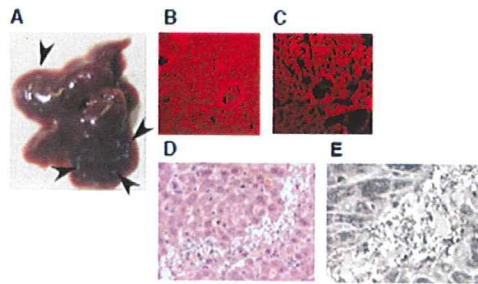


図5 臓器の各種染色

A, 1×10^7 CFUのGAS472投与72時間後の肝臓。B, 非感染のliver切片。C, D, E, 感染72時間後のliver切片。B, C, 蛍光ファロイジン染色 (x100)。D, HE染色 (x200)。E, G染色 (x400)。黒矢印は, nodulesを示す。

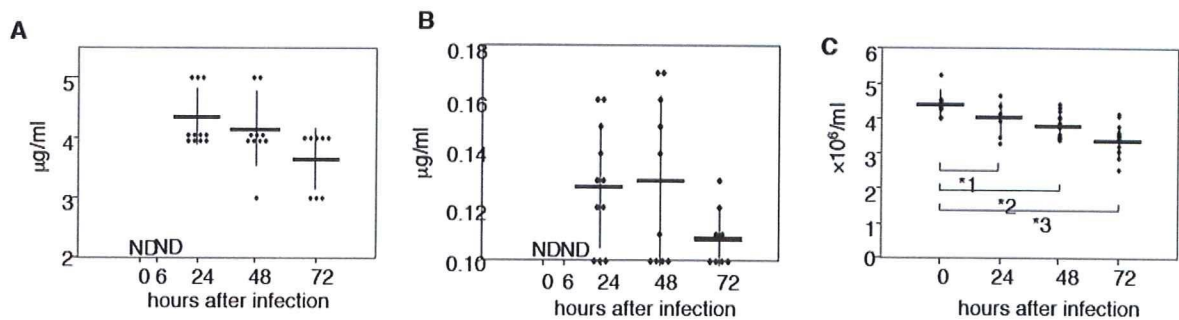


図6 1×10^7 CFUのGAS472をhCD46Tgマウスのfootpadへ投与後のFDP (A), D-dimer (B), PLT (C)の値の変化

*1, $P=0.06$; *2, $P=0.0009$; *3, $P=0.00002$. ND, not detected.