

転帰	SDSE (n = 22)	GBS (n = 21)
死亡	6 (27.3%)	3 (14.3%)
WBC (/ μ L)	13,400 (7,500 - 14,200)	17,900 (16,900 - 32,400)
PLT (10^4 / μ L)	10.1 (7.4 - 16.3)	7.9 (5.1 - 9.7)
CRP (mg/dL)	6.2 (1.5 - 10.1)	7.9 (7.1 - 10.2)
生存	16 (72.7%)	18 (85.7%)
WBC (/ μ L)	11,750 (8,075 - 17,100)	9,900 (6,300 - 11,650)
PLT (10^4 / μ L)	20.2 (14.9 - 27.3)	20.6 (15.0 - 25.1)
CRP (mg/dL)	2.2 (0.6 - 7.5)	2.8 (0.3 - 4.9)

()内のレンジは検査値の分布の25%(下限)と75%(上限)を示す.

図3 侵襲性レンサ球菌感染症における転帰別の血液検査所見

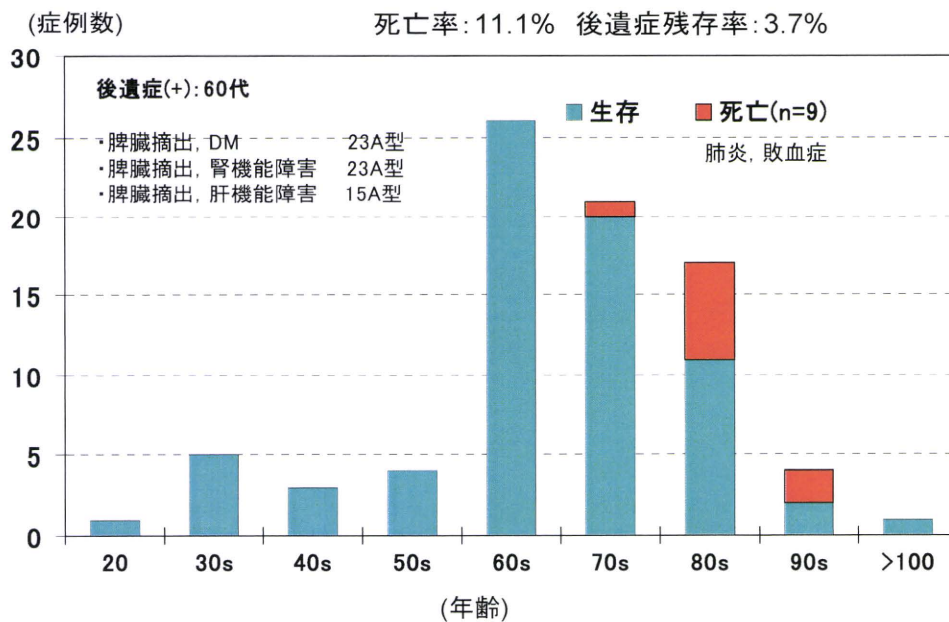


図4 侵襲性肺炎球菌感染症(IPD)の年齢分布

分担研究報告書

北タイにおけるヒト *Streptococcus suis* serotype 2 感染症の臨床細菌学的研究

研究分担者 大石和徳 大阪大学微生物病研究所 特任教授

研究要旨 タイ国内で *Streptococcus suis* (SS)によるヒト症例の後方視的研究を実施し、そのうち 158 例の serotype 2 による侵襲性感染症の病態について検討した。本症は成人のみに発症し、致命率は 9.5%であった。病型の 58.9%は髄膜炎カテゴリー（血液あるいは髄液培養陽性の髄膜炎例）、残り 41.1%は非髄膜炎カテゴリー（敗血症あるいは血液培養陽性の化膿性関節炎等）であった。主要な Sequence typing (ST)である ST1, ST104 株の両方が敗血症を起こしうるのに対し、ST1 のみが髄膜炎を惹起した。また、2010 年より実施しているパヤオ県の全住民ベースの前向き研究において、18 症例中 87.4%の患者が発症直前に豚生製品を摂食しており、その後平均 3 日以内に熱性疾患を発症していた。18 例中のうち、10 例が serotype 2, 5 例が serotype 14 に起因していた。北タイにおける本症の発症様式が明らかになった。

A. 研究目的

*Streptococcus suis*は人獣共通感染菌であり、ブタの上気道に常在し、ブタのみならずヒトに髄膜炎、敗血症を含む侵襲性感染症を惹起する。

本研究の目的は、1) タイ国内で *S. suis* serotype 2 (SS2)が分離同定されたヒト症例の後方視的調査から、SS2分離株と臨床像との関連を明らかにし、また、2) 北タイパヤオ県（人口約50万人）における全住民ベースの前向き臨床疫学調査から、本症の発症病態を明らかにすることにある。

B. 研究方法

1. 臨床研究

1) タイ国内のヒト SS2 症例の後方視的臨床疫学調査

2006年1月から2008年9月までにタイNIHにタイ国内からヒトの血液および髄液由来の連鎖球菌株を収集し、生化学的方法とSS特異的

PCR法により165株のSS 2（1症例あたり1菌株）が同定された。165株に対応する165症例中158症例の症例記録表を回収し、その性別、年齢、診断、臨床像とその予後について調査した。臨床像については、髄膜刺激症候を認め、血液あるいは髄液でSS2が培養陽性例を髄膜炎カテゴリー、それ以外のSS2血液培養陽性例を非髄膜炎カテゴリーと定義した。

2) 北タイパヤオ県の全住民ベースのヒト SS 感染症に関する前向き臨床疫学調査
パヤオ県立病院とチェンカム総合病院、および地域病院に入院した敗血症、髄膜炎疑い症例を対象としてスクリーニングし、ヒトのSS感染症を2010年から前向きに症例登録した。登録症例の臨床記録票を回収し、血液もしくは髄液分離株の血清型について検討した。

2. 分子疫学的方法

分離菌株のシーケンスタイプ(ST)を

MLST解析により決定した。

C. 研究結果

1. タイ国内のヒトSS2症例の後方視的臨床疫学調査

165株中、主要なSTはST1(62.4%)とタイ特有のST104(25.5%)であった。SS2の158症例中、平均年齢は56.6歳で、小児例は1例も認めなかった。致死率は9.5%(15/158例)であったが。また、158例中、髄膜炎カテゴリーは58.9%で、非髄膜炎カテゴリーは41.1%であった。非髄膜炎カテゴリーの内訳は、敗血症が35.4%、化膿性関節炎、感染性心内膜炎などが5.4%であった。臨床カテゴリーとSTとの相関を検討したところ、ST1は髄膜炎カテゴリーと高い相関($P<0.0001$)を示し、ST104は非髄膜炎カテゴリーと高い相関($P<0.0001$)を示した。死亡と有意な相関を示すSTは認められなかった。

2. 北タイパヤオ県の全住民ベースのヒトSS感染症に関する前向き臨床疫学調査

2010年に登録された18症例のヒトSS症例の解析において、平均年齢50.9歳、致死率0%であった。また、発症直前のブタ生製品の摂取が87.9%に認められた。ブタ生製品の摂取から熱性疾患の発症までの期間は2.8日と短期間であり、発症から入院までも1.9日と短かった。また、18例中から、SS2(ST1)が10例、*S. suis* serotype 14 (ST105) が5例に検出された。

D. 考察

北タイを中心に発生するヒトSS感染症の病態として、その約60%が髄膜炎を発症し、残りは敗血症などであることが明らかになった。また、パヤオ県のヒトSS症例の前向き調査において、約90%の症例に豚肉、生血液の摂取歴があることから、北タイにおける本症の発症様式は経口感染によることが

強く示唆された。

また、ST1と髄膜炎カテゴリーの相関、ST104と非髄膜炎カテゴリーの相関から、ST1は菌血症から血液-CSFバリアを通過し髄膜炎を発症するのに対し、ST104は菌血症を起こしても血液-CSFバリアを通過しにくいことが示唆された。今後、ST1、ST104株の病原性因子の機能比較を含めた検討が必要である。

E. 結論

2006-8年にかけてタイ国内で発生したヒトSS2による158症例を後方視的に調査した。本症は成人のみに散発的に発症し、病型の58.9%は髄膜炎、残りは敗血症などであった。SS2の主要なSTであるST1、ST104のいずれもが敗血症を発症したが、ST1のみが頻繁に髄膜炎を発症した。このことから、菌株の病原性はその病型に関与することが示唆された。また、パヤオにおけるヒトSS症例の前向き調査において、約90%の患者に発症直前の豚生製品の摂取歴が認められ、摂取後平均3日以内に熱性疾患を発症していた。この所見から、北タイのヒトにおける本症が調理不十分な豚製品の経口感染による食中毒として発症している実態が明らかになった(共同研究者：タイNIH, Mr. Anusak Kerdsin, Mrs Surang Desililert)

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K,¹ Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, **Oishi K.**

- Clinical features of *Streptococcus suis* serotype 2 infections in relation to the genotypic profiles of isolates in Thailand. Emerg Infect Dis (in press).
- 2) Nakayama T, Takeuchi D, Akeda Y, **Oishi K**. *Streptococcus suis* infection induces bacterial accumulation in the kidney. Microb Pathog 50:87-93, 2011
 - 3) Ezo H, Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, **Oishi K**. Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice. Vaccine 29:1754-1761, 2011
 - 4) Kawakami K, Ohkusa Y, Kuroki R, Tanaka T, Koyama K, Harada Y, Iwanaga K, Yamaryo T, **Oishi K**. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine in Japan. Vaccine, 28:7063-7069, 2010
 - 5) 竹内 壇, **大石和徳**. *Streptococcus suis* 感染症・新興人獣共通感染症. 化学療法領域. 26:63-68, 2010
 - 6) **大石和徳**, 永井英明. 肺炎球菌ワクチンの複数回接種は必要か? 医学のあゆみ. 234:213-216, 2010.
 - 7) 川上健司, **大石和徳**. 2. 任意接種のワクチン, 4) 肺炎球菌. 臨床検査 54: 1358-1363, 2010.
 - 8) 田村和世, **大石和徳**. 23 価肺炎球菌荚膜多糖体ワクチン (ニューモバックス[®]) の新たなエビデンス. 呼吸 29 : 996-1001, 2010.
 - 9) 川上健司, 大石和徳. 肺炎球菌ワクチンとインフルエンザワクチン. Modern Physician. 30: 704-707, 2010.
 - 10) **大石和徳**. 肺炎球菌ワクチン. 臨床とウイルス. 38(5) : 490-498, 2010
2. 学会発表
- 1) Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K,¹ Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, **Oishi K**. Clinical features of *Streptococcus suis* serotype 2 infections in relation to the genotypic profiles of isolates in Thailand. IDSA 48 th annual meeting. Vancouver, Canada, October 21-24, 2010.
 - 2) Kawakami K, Yamaryo T, **Oishi K**. Effectiveness of pneumococcal polysaccharide vaccine against pneumonia and cost analysis for the elderly who receive seasonal influenza vaccine. IDSA 48 th annual meeting. Vancouver, Canada, October 21-24, 2010.
 - 3) 中山達哉, 明田幸宏, **大石和徳**. タイにおけるブタ連鎖球菌 serotype 2 感染症の臨床像と分子疫学. 第 50 回日本呼吸器学会総会, 京都, 2010 年 4 月 23-25 日.
 - 4) 中山達哉, 竹内壇, 明田幸宏, **大石和徳**. タイにおけるブタ連鎖球菌 serotype 2 のゲノタイプと病型に関する検討. 第 53 回日本感染症学会中日本地方会, 京都. 2010 年 11 月 12-13 日.
 - 5) 竹内 壇, **大石和徳**. 北タイにおける人獣共通感染症: *S. suis* 感染症の実態. 第 51 回日本熱帯医学会大会, 仙台, 2010 年 12 月 3-4 日.
 - 6) 坂東園子, 岩垣明隆, **大石和徳**他. 高齢者介護施設利用者での肺炎の前向き調査と肺炎球菌血清型特異 IgG 濃度の基礎値についての検討. 第 50 回日本呼吸器学会総会, 京都, 2010 年 4 月 23-25 日.

- 7) 坂東園子, 岩垣明隆, 大石和徳他. 高齢者における肺炎球菌ワクチン接種後の multiple opsonophagocytic assay による血清オプソニン活性の評価. 第 84 回日本感染症学会総会, 京都, 2010 年 4 月 4-5 日.
- 8) 大石智洋, 羽生政子, 大石和徳. 小児の肺炎球菌敗血症 4 症例における液性免疫能測定の予備的検討. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 東京, 2010 年 12 月 11-12 日.
- 9) 大石和徳, 田村和世, 西順一郎, 中野貴司. 23 価肺炎球菌ワクチン接種後に発症した肺炎球菌性髄膜炎の 2 症例: その血清型特異 IgG 濃度とオプソニン活性の乖離について. 第 14 回日本ワクチン学会学術集会, 東京. 2010 年 12 月 11-12 日.
- 10) 大石和徳. 教育講演 5. 肺炎球菌ワクチンの重要性. 第 55 回日本透析医学会, 神戸. 2010 年 6 月 18-20 日.

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

分担研究報告書

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の解明

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 渡邊 治雄 国立感染症研究所 所長

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 *Streptococcus pyogenes* 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/csrR* 遺伝子, あるいは, *rgg* 遺伝子に変異があり, この変異により, 病原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/csrR* 遺伝子と *rgg* 遺伝子の変異が, 劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において, 病原性にどのような影響を与えているか比較するため, 咽頭炎由来株の *csrS* 遺伝子および *rgg* 遺伝子の変異株を作成し, マウスに対する致死性, および, 病原性遺伝子の発現について調べた。その結果, *csrS* 遺伝子変異株は, *rgg* 遺伝子変異株より多くの病原性遺伝子の発現を上昇させ, マウスに対する致死性も強いことは明らかとなった。

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。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。今年度は, 劇症型感染患者分離株に認められる *rgg* 遺伝子の変異と *csrS* 遺伝子の変異により, どのような病原性遺伝子の発現が上昇しているか, また, 感染マウスモデルにおいて致死性に違いがあるか調べた。

B. 研究方法

1. 菌株および培地

本研究で使用した K33 株は, 咽頭炎患者

から分離された株である。*csrS* および *rgg* 変異株は, pSF152 を用い, 相同組換えにより作製した。変異株であることは, PCR により確認した。菌株は, コロンビア血液寒天培地 (Difco-BBL), および, THY (Todd-Hewitt broth (Difco-BBL) + 0.5% Yeast extract (Difco-BBL)) 培地中で, 37°C, 5% CO₂ の条件下で培養した。抗生物質は, スペクチノマイシン (Sigma) を 50µg/ml の濃度で使用した。

1) RNA の抽出と RT-PCR

S. pyogenes を THY 培地中で 37°C, 5% CO₂ 条件下において, OD600=0.75 まで培養した。RNeasy Mini extraction kit (Qiagen) を用いて, 製品のプロトコールに従って, total RNA を抽出した。RT-PCR は, PrimeScript RT reagent Kit (Perfect Real Time) (TaKaRa)を用い, 製品のプロトコールに従って行った。転写量は,

ABI PRISM Sequence Detection System 7000 (Applied Biosystems)を用いて測定した。

2. 動物実験

S. pyogenes を THY 培地中で 37°C, 5% CO₂ 条件下において, OD 600 = 0.6-0.8 まで培養し, 集菌後, PBS で 2 回洗浄し, PBS に懸濁した。1x10⁷ 個の *S. pyogenes* を腹腔内に 0.5 ml 接種し, 7 日間の生存曲線を調べた。マウスは, 5-6 週齢のオスの ddY マウス(日本 SLC)を用い, 国立感染症研究所動物実験施設において飼育された。

(倫理面への配慮)

本研究で行われた動物実験に関しては, 国立感染症研究所動物実験実施規定に基づき, 国立感染症研究所動物実験委員会の承認を経て取り行われた。

遺伝子組換え実験は, 「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に基づいた国立感染症研究所組換え DNA 実験実施規則に準拠し, 国立感染症研究所組換え DNA 実験安全委員会の承認のもと, 行われた。

C. 研究結果

1. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症でみられる *csrS* および *rgg* 遺伝子変異株における病原性遺伝子の発現

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株でみられた *csrS* 変異および *rgg* 変異における既知の病原性遺伝子の発現を調べるため, 咽頭炎患者分離株 K33 株の *csrS* 変異株 (K33*csrS*) および *rgg* 変異株 (K33*rgg*) を作製し, これらの変異株および親株である K33 から total RNA を抽出し, 定量的 RT-PCR を行った (図 1)。その結果, *csrS* および *rgg* 変異株において, 細胞障害毒素をコードする *nga*, *slo* 遺伝子やストレプトキナーゼをコードする *ska* 遺伝子の発現量が増大していた。一方,

莢膜多糖合成系をコードする *hasA*, C5a peptidase をコードする *scpA* や IL-8 protease をコードする *scpC* などは, *csrS* 変異株でのみ発現の上昇がみられた。このことから, *csrS* 変異株と *rgg* 変異株は, 同じ病原性遺伝子の発現を上昇させているものもあるが, いくつかの病原性遺伝子に関して発現制御が異なることが考えられた。

2. マウスに対する病原性の影響

in vivo での *csrS* 変異および *rgg* 変異による病原性の変化を, マウスに対する致死性を指標として調べた。その結果, *csrS* 変異株では, 1 日目に全てのマウスが死亡していた。また, *rgg* 変異株では, 2 日後までに半分以上のマウスが死亡していたが, 7 日経過後, 約 10% のマウスが生存していた。一方, 変異のない株では, 7 日経過後, 約 80% のマウスが生存していた (図 2)。以上の結果から, 変異株は, 変異のない株よりマウスに対する致死性が高いが, *rgg* 変異株より *csrS* 変異株の方が, マウスに対する致死性が強いことが判明した。

D. 考察

本研究において, *csrS* 変異株は *rgg* 変異株より, 多くの病原性遺伝子の発現を制御しており, かつ, *csrS* 変異株の方が *rgg* 変異株よりマウスに対する致死性が高いことが判明した。劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株の 57.3% の株に *csrS/csrR* 遺伝子や *rgg* 遺伝子に変異がみられるが, これらの変異の頻度は, *csrS/csrR* 変異株の方が *rgg* 変異株より多く分離されている。このことを考えると, *csrS/csrR* 変異株の方が, *rgg* 変異株より病原性が高いことが考えられる。

本研究において, *csrS* と *rgg* の両方の変異株において, *slo*, *nga* および *ska* 遺伝子の発現量が上昇していた。*slo* 遺伝子がコードするストレプトリジン O (SLO) は, 好中球をネ

クローシスさせる重要な病原因子であることを我々は以前報告した。*nga* 遺伝子がコードする Nucleosidase (NADase)は、侵襲性感染症に重要な役割をしていることが Bricker らにより報告されている。*ska* 遺伝子がコードするストレプトキナーゼは、プラスミノゲンに作用し、*S. pyogenes* の侵襲性感染に重要な役割をしていることが、Sun らにより報告されている。*csrS* や *rgg* 遺伝子に変異がみられる劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、これらの病原性遺伝子は共通して遺伝子の発現が上昇している。このことから、これらの因子は変異株において大量産生することで、その病原性を上昇させ、劇症型感染症を引き起こすのに重要な役割をしていることが考えられる。

E. 結論

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株でみられた *csrS/csrR* 遺伝子と *rgg* 遺伝子の変異株を比較した結果、*csrS* 遺伝子変異株は *rgg* 遺伝子変異株より、多くの既知の病原性遺伝子の発現を上昇させており、マウスに対する病原性も強いことが明らかとなった。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. **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 6 (4): e1000832 (2010).
2. **Ikebe T, Wada A, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Watanabe H.** The Working Group for β -hemolytic Streptococci in Japan. Emergence of clindamycin-resistant *Streptococcus pyogenes* isolates obtained

from patients with severe invasive infections in Japan. Jpn J Infect Dis. 63 (4): 304-305 (2010).

3. **Ikebe T, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Tada Y, Okabe N, Watanabe H,** The Working Group for β -hemolytic Streptococci in Japan. Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections during 2002–2008 in Japan. Jpn J Infect Dis. 63 (5): 372-375 (2010).
4. Yamada T, Yamada T, Yamamura MK, Katabami K, Hayakawa M, Tomaru U, Shimada S, Morikawa M, Seki T, Ariga S, Ishikawa K, **Ikebe T,** Gando S, Minakami H. Invasive group A streptococcal infection in pregnancy. J Infect. 60 (6): 417-424 (2010).
5. **池辺忠義.** 劇症型溶血性連鎖球菌感染症の病原因子. 化学療法の領域 医薬ジャーナル社 26 (8): 1601-1607 (2010).

2. 学会発表

1. **池辺忠義, 阿戸学,** 松村隆之, 長谷川秀樹, 小黒祐子, 嶋 智子, 奥野ルミ, 大屋日登美, 勝川千尋, 富永 潔, 緒方喜久代, 佐多徹太郎, 小林和夫, 大西 真, **渡邊治雄.** 劇症型溶レン菌感染症臨床分離株で高頻度でみられる負の転写制御因子の変異. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会, 東京, 2010 年 6 月.
2. 外山雅美, 長野則之, 長野由紀子, **池辺忠義,** 和田昭仁, 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 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会, 東京, 2010 年 6 月.
3. 松村隆之, **池辺忠義,** 大西 真, **渡邊治**

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環状核骨髄系細胞の保護的役割. 第9回感染症沖縄フォーラム, 沖縄, 2011年2月.

4. Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The defensive role of interferon- γ produced by myeloid cells in invasive group A Streptococcus infection. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 熊本, 2010年5月.
5. Matsumura T, Ikebe T, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. Identification of

IFN-gamma producing cells in severe invasive group A streptococcal infection. 14th International Congress of Immunology, 神戸, 2010年8月

G. 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

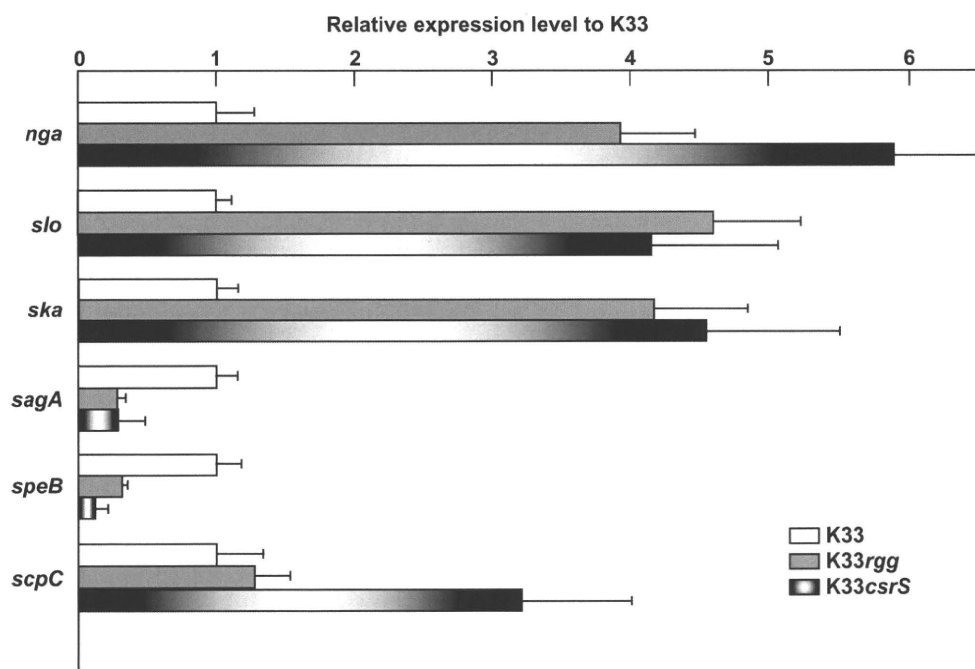


図1 *csrS* および *rgg* 遺伝子変異株における病原性遺伝子の発現

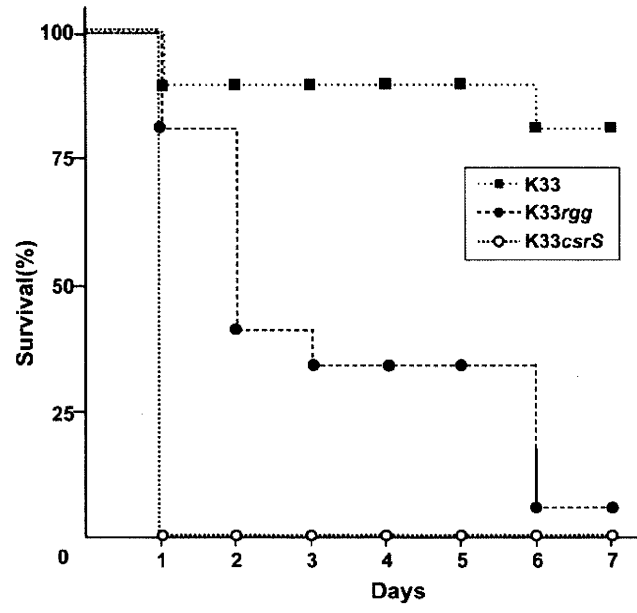


図2 マウスに対する病原性の影響

分担研究報告書

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
研究分担者 渡邊 治雄 国立感染症研究所 所長
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は急速進行性であり、血圧低下などショック症状、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。感染部位に好中球浸潤が乏しい症例と、好中球浸潤を認める症例が存在するが、感染起因菌である *S. pyogenes* がそれぞれの病態で、どのように宿主防御を障害するか詳細は不明である。これまでの我々の研究で、劇症型感染患者分離株のみに認められる、遺伝子発現調節因子をコードする *csrS* 遺伝子の変異によって、好中球への直接傷害を増強することと感染局所への好中球走化を抑制することが明らかになった。今年度は、劇症型感染患者分離株のみに認められる、別の遺伝子発現調節因子をコードする *rgg* 遺伝子の変異の好中球機能に及ぼす影響と、感染マウスモデルにおける病理学的所見を解析した。その結果、*rgg* 遺伝子に変異が認められた劇症型臨床分離株および、非劇症分離株に *rgg* 遺伝子を欠損させた株において、好中球傷害は起こるが、遊走は抑制しないことが明らかになった。また、劇症型感染マウスモデルにおいて、*rgg* 変異株の感染組織では、好中球を主とする炎症細胞の浸潤と菌の蓄積が共に認められた。以上より、劇症型レンサ球菌感染症起因菌の遺伝子変化によって、病原因子発現パターンが異なり、感染局所での好中球防御能を様々に障害する結果、感染部位での特異な病態を伴う劇症型感染を惹起する可能性が示唆された。

A. 研究目的

劇症型レンサ球菌感染症(5類全数把握感染症)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、宿主因子の関与が示唆されているが、その詳細な機序は不明である。これまでの先行研究で、劇症型感染患者分離株のみに認められる、遺伝子発現調節因子を

コードする *csrS* 遺伝子の変異によって、病原因子である溶血毒素ストレプトリシン O(SLO)や、好中球の主要な走化因子 interleukin 8 (IL-8) を分解するセリンプロテイナーゼ ScpC の発現が増強し、好中球への直接傷害を増強することと感染局所への好中球走化を抑制することが明らかになった。

本年度の研究では、本邦において診断基準に基づいて診断された劇症型患者および非劇症型患者臨床分離株のうち、*emm3* 型の *S. pyogenes* について、劇症型感染患者分離株の

みに認められる,別の遺伝子発現調節因子をコードする *rgg* 遺伝子の変異の好中球機能に及ぼす影響と,感染マウスモデルにおける病理学的所見を解析した。以上により,劇症型レンサ球菌感染症の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

健常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* 感染における PMN 機能解析

本邦において,1994 年以降収集されている劇症型患者および非劇症型患者臨床分離株のうち,*emm3* 型の *S. pyogenes*, 劇症感染分離株および非劇症感染分離株を使用した。*S. pyogenes* 3×10^6 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 (Corning 社) の下室に,好中球 3×10^5 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 iodine の細胞内取り込みによって判定した。好中球の殺菌能は,好中球を *S. pyogenes* と 2 時間インキュベートし,培養液中の細菌を抗生剤で殺菌した後,細胞を融解させて,血液寒天培地で培養し,細胞内で生存している菌数を計測することによって測定した。

(3) 劇症型感染マウスモデルとサイトカインの作成

ddY マウスは日本 SLC より購入し,国立感染症研究所動物実験施設において飼育された。マウスに 1×10^7 cfu の *S. pyogenes* を腹腔注射にて感染させ,感染 24 時間後に臓器を摘出して,10%ホルマリン/PBS 内で固定,パラフィン包埋,切片作成後,ヘマトキシリ

ン-エオジン染色を行った。

(倫理面への配慮)

保存される検体試料に関しては,国立感染症研究所ヒト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。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執り行われた。

C. 研究結果

S. pyogenes の局所感染モデルとして,IL-8 と *S. pyogenes* をインキュベートした後,健常ヒト好中球を遊走させ,遊走能と細胞障害活性を測定した。その結果,*rgg* 遺伝子に変異が認められた *emm3* 型の劇症型臨床分離株,および非劇症分離株に *rgg* 遺伝子を欠損させた株において,好中球傷害は起こるが,IL-8 に対する遊走は抑制しないことが明らかになった。正常 *rgg* 遺伝子を持つ非劇症型感染分離株および正常 *rgg* 遺伝子を導入した劇症株分離株においては,好中球障害活性は認められなかった(図 1, 2)。劇症分離株の病原因子欠損株の好中球機能傷害を検索した結果,*rgg* 変異株における好中球障害は CsrS 変異株と同様に,ストレプトリジン O(SLO)と NAD グリコシダーゼ(Nga)依存的に起こることが明らかになった。また,*rgg* 変異株に対する好中球の殺菌能の著しい低下が認められ(図 3),好中球殺菌能の低下と好中球傷害が極めてよく相関することが明らかになった。

次に,劇症型感染マウスモデルを用いて病理学的に解析した結果,*rgg* 変異株の感染腎臓では,感染後 24 時間後に好中球を主とする炎症細胞の浸潤と菌の蓄積が共に認められた(図 4)。一方,正常 *rgg* 遺伝子を持つ非劇症型感染分離株および正常 *rgg* 遺伝子を導入した劇症株分離株においては,明らかな病理所見が認められなかった。

D. 考察

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。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。

これまでの研究において、*csrS* 変異劇症型感染分離株が、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明らかにしている。一方 *rgg* 変異劇症型感染分離株においては、SLO による好中球直接傷害のみが認められ、遊走傷害は認められなかった。*in vivo* 感染モデルにおいても、感染局所に好中球浸潤が認められることから、劇症型レンサ球菌感染症発症には、好中球遊走傷害は増悪因子であっても、必須の条件ではないことが判明した。むしろ、感染局所において、劇症型起因株が好中球傷害による殺菌能の著しい低下を引き起こすことによって、感染の急速な悪化を引き起こす可能性が考えられた。以上のことから、劇症型レンサ球菌感染症起因菌の遺伝子変化によって、病原因子発現パターンが異なり、感染局所での好中球防御能を様々に障害する結果、感染部位での特異な病態を伴う劇症型感染を惹起する可能

性が示唆された。今後、臨床患者における分離菌の遺伝子変異、病理学的知見と予後の相関を解析し、劇症型感染の重症度診断に役立つ知見の獲得を目指す。

E. 結論

ヒトの劇症型レンサ球菌感染症より分離された菌の一部に *rgg* 遺伝子変異が認められ、変異株は SLO 依存的に好中球を傷害する結果、劇症型感染を引き起こすことが示唆されるとともに、変異の違いによって好中球傷害の程度に差が認められ、様々な病型を示すことが示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 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.* 6:e1000832.
2. Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata H, Ato M, Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S and Ohashi K. Molecular detection of *Anaplasma phagocytophilum* in cattle and *Ixodes persulcatus* ticks. *Vet. Microbiol.*, in press

2. 学会発表

1. 池辺忠義, 阿戸 学, 松村隆之, 長谷川秀樹, 小黒祐子, 嶋 智子, 奥野ルミ, 大屋日登美, 勝川千尋, 富永 潔, 緒方喜久代, 佐多徹太郎, 小林和夫, 大西 真, 渡邊治雄. 劇症型溶レン菌感染症臨床分離株で高頻度でみられる負の転写制御因子の変異. 第 19 回 Lancefield レンサ球菌研究会および第 42 回レンサ球菌感染症研究会合同学会, 東京, 2010 年 6 月.

2. Matsumura, T., T. Ikebe, H. Watanabe, K. Kobayashi, and **M. Ato**. The defensive role of interferon- γ produced by myeloid cells in invasive group A Streptococcus infection. 18th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages, 熊本, 2010年5月).
3. Matsumura, T., T. Ikebe, H. Watanabe, K. Kobayashi, and **M. Ato**. Identification of IFN-gamma producing cells in severe invasive group A streptococcal infection. 14th International Congress of Immunology (神戸, 2010年8月)
4. **Ato, M.** Neutrophil dysfunctions by pathogenic bacteria. Symposium on High Throughput

Approaches in Infection & Immunity (Hua Hin, タイ王国, 2010年12月)

5. 松村隆之, 池辺忠義, 大西 真, 渡邊治雄, 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環状核骨髄系細胞の保護的役割. 第9回感染症沖縄フォーラム (沖縄, 2011年2月)

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

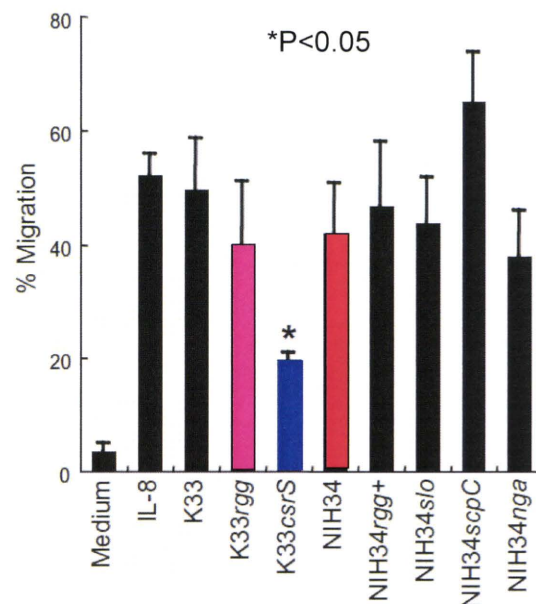


図1 *rgg* 遺伝子変異における好中球の遊走能に対する影響

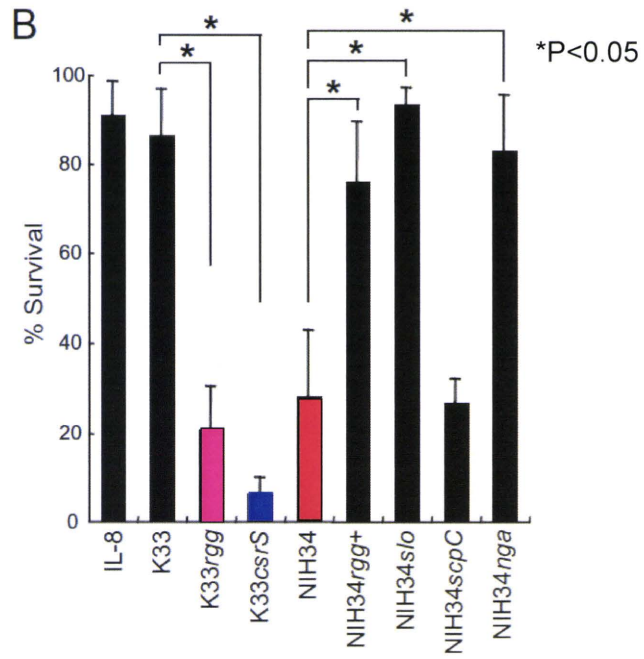


図 2 *rgg* 遺伝子変異における好中球傷害に対する影響

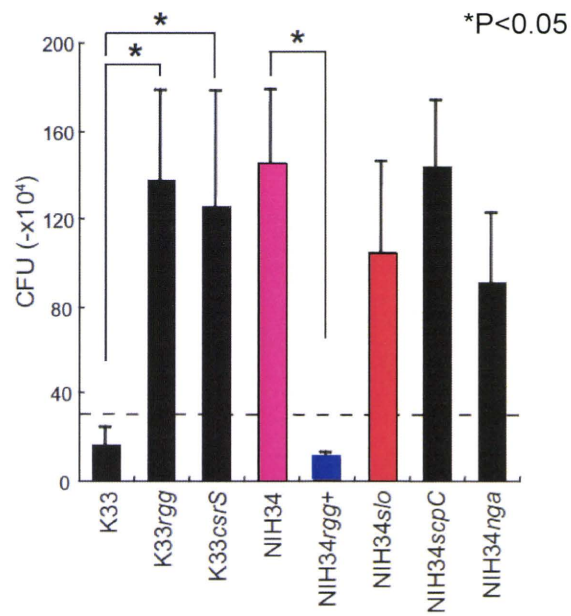
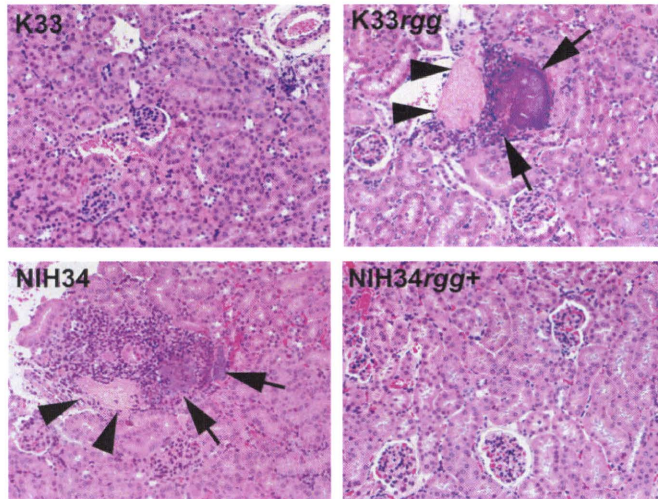


図 3 *rgg* 遺伝子変異における好中球の殺菌能に対する影響



*rgg*変異株感染群において菌塊(→)と好中球の蓄積(▶)がみられた。

図4 *rgg*欠損株マウス腹腔内接種(5×10^7)1日後の腎臓の病理

分担研究報告書

***Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)を中心としたレンサ球菌劇症型感染モデルの構築および分子基盤に関する研究**

分担研究者 秋山 徹 (独)国立国際医療研究センター・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 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)の感染症のマウスモデルを用いた分子レベルでの研究を行う。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。本研究では、これまでに、糖尿病マウスモデルの感染実験で SDSE 感受性が増加していること、その際の宿主側因子網羅発現解析で、SDSE 特異的な炎症関連遺伝子発現が高進していることを明らかにした。本年度は、SDSE 感染時の糖尿病マウスの炎症性応答に關与する液性因子を特定するため、28種類の因子の血清レベルを測定した。その結果、遺伝子発現解析の結果と同様に、SDSE に特異的な液性因子の放出パターンを特定できた。これらの結果より、糖尿病時の SDSE 感染時の劇症化の宿主側における分子基盤が明らかとなり、治療法確立への方策を提供するものと考えられる。

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り、最近の調査では A 群レンサ球菌(GAS)以外に G 群レンサ球菌および C 群レンサ球菌、特に *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)による症例が増加している。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、今後の日本の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 SDSE 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 SDSE 分離株 16 株の病原性をマウスモデルで比較し、SDSE 研究のための菌株選定を行い、さらに 1 型お

および 2 型糖尿病のマウスでは、非糖尿病マウスと比較して SDSE 感染への感受性が有意に増加していることを明らかにした。また全ゲノム情報が利用可能でなかった SDSE GGS_124 株の全ゲノム配列を世界に先駆けて明らかにした。

さらに、日本人に頻発する 2 型糖尿病のマウスモデルを用いて、選定された SDSE 株を感染させた場合のマウス遺伝子の発現変化の網羅的解析を実施することで、宿主側の SDSE 感染劇症化に影響する因子の探索を試み、糖尿病マウスに特異的で、かつ SDSE 感染に特異的な炎症反応が発生することを明らかにした。以上の知見に鑑み、本年度は、28 種類の液性因子の血清レベルを同時に測定することで、因子放出パターンを網羅的に解析するシステムバイオロジー的アプローチにより、SDSE 感染時の糖尿病マウスの炎症性応答に關与する液性因子の特定と背景

にある炎症発生の機構の解明を試みた。

B. 研究方法

1. 共試菌株

SDSE 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。増菌は、凍結保存されているレンサ球菌をブレイン・ハートインフュージョン培地に植菌し、CO₂ インキュベーター内で37℃、5%で一晩培養することで行った。マウス感染実験時の対照菌株として *Staphylococcus aureus* N315 株を使用した。

2. SDSE のマウス感染実験

菌を一晩培養後、3100rpm, 10min 遠心、培地を除き 1×PBS(-)5ml に懸濁した後、ボルテックス処理を 30 秒間行った。ボルテックス後の菌液を 1×PBS(-)で 0.5ml 投与時に LD50 の 5 倍となるように希釈し、マウスに腹腔内投与した。2 型糖尿病モデルとして糖尿病自然発症型マウスである db/db マウスを使用し、対照として糖尿病非発症型である db/m+ マウスを使用した。

3. マウスの血清中液性因子の網羅的解析

SDSE または *S. aureus* N315 株を投与した 2 型糖尿病マウスから 8 時間後に心臓血を採取し、定法に従って血清を分離した。液性因子の網羅的同時測定は MILLIPLEX MAP Multiplex Immunoassay Kit を用いたマルチプレックス測定を、Luminex100(Luminex)を使用して実施した。

4. SDSE 刺激マウス脾臓細胞での液性因子産生の網羅的解析

マウス脾臓細胞を定法に従って調整し、2 x 10⁵/well となるように 96 穴マイクロプレートに播種した。これらの細胞培養物に 10 倍量の培養 SDSE 菌体を添加し、一定時間後に

培養上清を回収して、上述のマルチプレックス測定 of 検体とした。

(倫理面への配慮)

動物実験については独立行政法人・国立国際医療研究センター研究所動物実験委員会にて計画の審査・承認を受けて実施した。本計画で使用した菌株は感染症法の対象となる病原体ではないが、所内バイオセーフティ委員会による使用の承認を受けて実施した。

C. 研究結果

2 型糖尿病マウスである db/db マウス、およびその対照非糖尿病マウスである db/m+ マウスを使用し、菌投与無し、黄色ブドウ球菌投与、そして SDSE 投与の総計 6 種類の組み合わせで、マウスの血清中液性因子の網羅的産生解析を行った。ブドウ球菌投与の実験を加えることで、SDSE 特異的な宿主応答の解析が可能な実験系とした。

液性因子として、IL-20, IL-23, IL-27, IL-33, MDC, TIMP-1, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, CXCL10, CXCL1, MCP-1, MIP-1α, RANTES, および TNFα の 28 項目の測定を行った。

SDSE を投与した糖尿病マウス血清中には、非糖尿病マウスまたは黄色ブドウ球菌投与糖尿病マウスと比較して、G-CSF, IFN-γ, IL-13, IL-1α, IL-6, CXCL10, CXCL1, MCP-1, RANTES, MDC および TIMP-1 が高レベルに存在していた。炎症性サイトカインとして知られる IL-1β, TNFα などは検出されなかった。遺伝子発現の網羅的解析の結果から示唆されていたように、SDSE 投与糖尿病マウスでは T 細胞の活性化を示唆する IL-2 や IL-4 の産生はまったく認められなかった。

次に、SDSE 投与糖尿病マウスと、黄色ブドウ球菌投与糖尿病マウスおよび非糖尿病マウスの液性因子産生の差異を分子レベル

で検討するための基盤を得るために、上述の液性因子産生の差異を細胞レベルで再現可能かどうかを、マウス脾臓細胞で検討した。その結果、*in vivo* では産生の認められなかった TNF α の産生を認めたものの、基本的に *in vivo* と同様の液性因子産生パターンが認められた。

D. 考察

これまでに実施した 2 型糖尿病マウスモデルへの SDSE 投与時の宿主遺伝子発現の網羅的解析の結果、および本年度実施した 2 型糖尿病マウスモデルを用いた SDSE の感染時の宿主側因子の網羅的液性因子産生測定に黄色ブドウ球菌の投与実験の結果から、SDSE 感染時に特異的に発生する宿主側応答の様相が明らかとなった。即ち糖尿病マウスでは、非糖尿病マウスと比較して、SDSE 投与により非常に強い炎症反応が発生し、正常な免疫応答がほとんど起きないことが示された。さらに、SDSE 感染糖尿病マウスでは炎症性サイトカインとして知られる TNF α がほとんど産生されないという、特徴的な炎症性サイトカイン産生パターンを示すことが明らかになった。糖尿病時には生体では弱い炎症状態が継続しており、これらが種々の臓器障害の原因となっていることが示されている。SDSE はブドウ球菌とは異なり、この生体の状況をさらに増悪させると考えられる。そのため SDSE の糖尿病時の感染の劇症化は、SDSE による炎症状態の急激な悪化が寄与していると考えられる。今回同定された SDSE により発現が増加する炎症性液性因子の発現増加の程度は極めて高く、これらを早期に検出する系を構築して、SDSE 感染に対する早期対策を行うことで、SDSE

感染症の劇症化を未然に防ぐことが可能となるかもしれない。

SDSE がどのように特異的に宿主側の糖尿病時の炎症状態を増悪させているかの機構は現時点では明らかではないが、今回、液性因子の産生パターンを網羅的解析によるシステムバイオロジー的アプローチで明らかにしたことで、パスウェイ解析により、増悪機構が明らかになると考えられ、現在実施中である。

E. 結論

SDSE の糖尿病マウスへの投与モデルを利用した宿主側液性因子の産生の網羅的解析で、SDSE による劇症型感染症の重症化の機構に、糖尿病背景での炎症反応の増悪が関与することが強く示唆された。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Shimomura Y., Okumura K., Murayama S. Y., Yagi J., Ubukata K., Kirikae T., **Miyoshi-Akiyama T.** Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS). BMC Genomics. 2011, 11;12:17.
- 2) Okumura K., Shimomura Y., Yamagata Murayama S., Yagi J., Ubukata K., Kirikae T., and Miyoshi-Akiyama T. Evolutionary path of streptococcal and staphylococcal superantigens. (Submitted)

H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

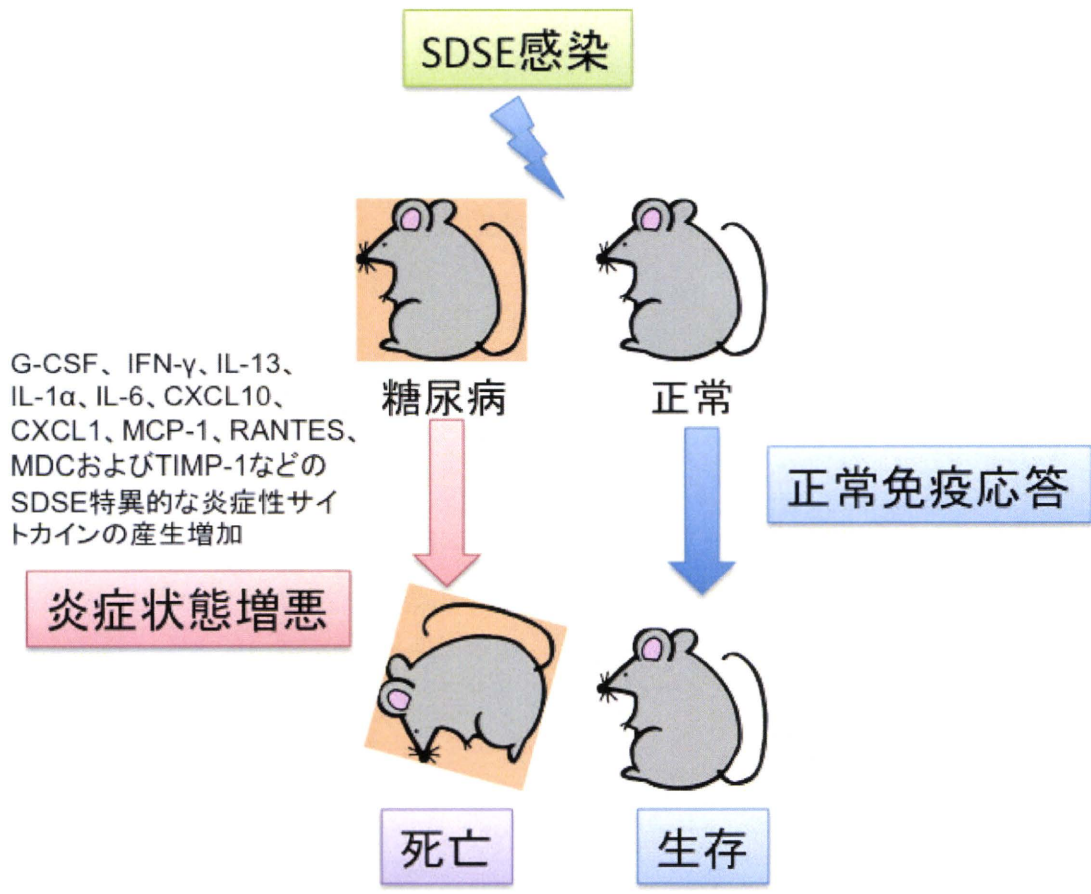


図1 SDSE感染症の糖尿病状態での劇症化機構