

## 分担研究報告書

### 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解明と 治療に係る基礎的研究

研究協力者 松井 英則 北里大学大学院感染制御科学府 病原微生物分子疫学研究室 講師

研究代表者 生方 公子 北里大学大学院感染制御科学府 病原微生物分子疫学研究室 教授

**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 GAS 感染症 (streptococcal toxic shock syndrome, 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  $1 \times 10^7$  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, 同様の感染では生存する。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のみならず大腿骨の壊死 (osteonecrosis) が観察された。そこで, 感染局所の骨と膝下リンパ節から RNA を調製し, リアルタイム RT-PCR 法による各種サイトカインの発現量の変化を解析したところ, RANKL (nuclear factor NF- $\kappa$  B ligand) の発現と感染局所の骨における破骨細胞の発現に強い相関が認められた。

#### 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, 劇症型レンサ球菌感染症に特徴的な壊死性筋膜炎, 敗血症 (sepsis), DIC, MOF の発症機構の解明を目指す。

#### B. 研究の方法

##### 1. 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。non-Tg

と成る C57BL/6J マウスは日本チャールズ・リバー社より入手した。

##### 2. 菌株

STSS の患者の血液より分離された A 群レンサ球菌 (GAS472) は, 当研究室に送付を受けた株である。

##### 3. 病理

GAS472 を hCD46Tg 及び C57BL/6J マウスの footpad より感染させ ( $5 \times 10^6$  CFU/foot), 感染及び非感染のマウスの足の骨を脱灰後作製したパラフィンブロックから切片を切り出し, ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 及び TRAP 染色による解析を行った。

#### 4. リアルタイム RT-PCR

GAS472 を hCD46Tg 及び C57BL/6J マウスの footpad より感染させ ( $5 \times 10^6$  CFU/foot), 感染及び非感染のマウスの膝下リンパ節及び感染局所の骨から RNA を調製し, オステオプロテグリン (osteoprotegrin: OPG), RANKL, RANK, IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-17A, TNF- $\alpha$  の発現をリアルタイム RT-PCR 法にて調べた。

#### (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(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 号及び 21 受文科振第 639 号)。本研究は, 「動物の愛護及び管理に関する法律 (動物愛護法)」, 「研究機関等における動物実験に関する基本指針 (基本指針)」及び「動物実験適正な実施に向けたガイドライン」に準拠した「北里大学における動物実験等に関する規定(動物実験規定)」に従って遂行した。

#### C. 研究成果

##### 1. M1 型 GAS 株感染による壊死の発症

GAS472 ( $1 \times 10^7$  CFU) を hCD46Tg マウスの footpad へ投与すると 72 時間後には, 急激な感染組織 (足) の壊死が認められた。一方, non-Tg マウスの足には, 重篤な壊死は認められなかった (図 1)。組織化学的解析により, hCD46Tg マウスの感染局所では, 骨の輪郭が不鮮明になり, 破骨細胞が多く出現して活発に骨吸収が行われていることが明らかとなった (図 2)。

##### 2. GAS472 感染によるカルシウム濃度と骨密度の変化

hCD46Tg マウスでは GAS472 感染により

海綿骨の骨密度(組織重量当たりの骨量: BV/TV)が低下した (図 3)。感染後には骨吸収の影響と考えられる血中 Ca<sup>2+</sup>濃度の上昇が見られる (図 4)。

#### 3. RANKL と OPG の発現の相関 :

感染マウスの膝下リンパ節と足の骨における各種サイトカインの産生を調べると, RANKL と OPG の発現に相関が認められた。すなわち, 急激な壊死が誘導された hCD46Tg では, 骨における RANKL の発現が励起されたが, 壊死が誘導されない non-Tg マウスでは, 膝下リンパ節での OPG の発現が励起された (図 5)。

#### 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。劇症型レンサ球菌感染症に特徴的な壊死の発症機序はよく分かっていないが, 今回の実験結果から GAS 感染による感染組織のホメオスタシスの攪乱が原因と考えられる (図 6)。

#### E. 結論

本感染モデルは, 劇症型レンサ球菌感染症の病因解明及び診断・治療法の開発に向けて有益な手段である。最近 CD46 における T 細胞の活性化の誘導機能が明らかとなってきた。従って, 単に GAS 感染における受容体としての機能の他に, 免疫系のホメオスタシスに関わる機能を明らかにすることが重要と思われる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Hidenori Matsui, Yukie Sekiya, Tetsufumi Takahashi, Masahiro Nakamura, Ken'ichi Imanishi, Haruno Yoshida, Somay Yamagata Murayama, Takashi Takahashi, Kanji

Tsuchimoto, Takehiko Uchiyama, and Kimiko Ubukata. Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice. *Journal of Medical Microbiology*, 2011, 60 (1), 128-134.

2. 学会発表

- 1) 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, 京都国際会館, 平成 21 年 4 月 5-6 日

G. 知的所有権の取得状況

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

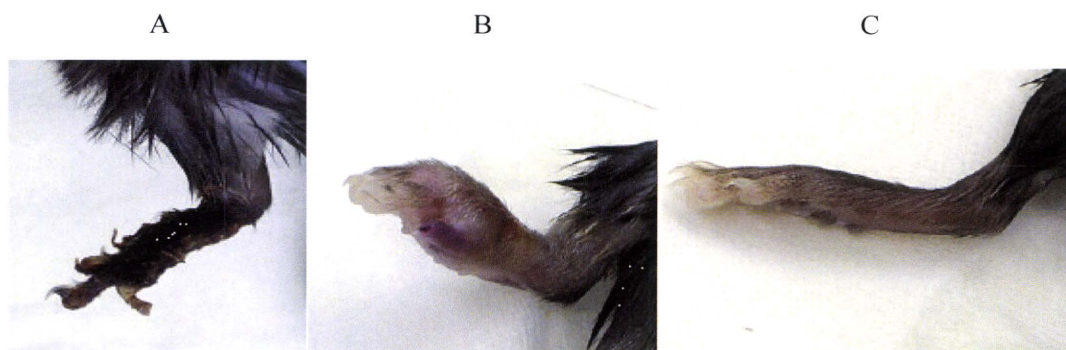


図 1  $5 \times 10^6$  CFU の菌数を hCD46Tg マウスの footpad へ投与した時の 72 時間後の足の状態。A, hCD46Tg マウス, B, non-Tg マウス, C 非感染マウス

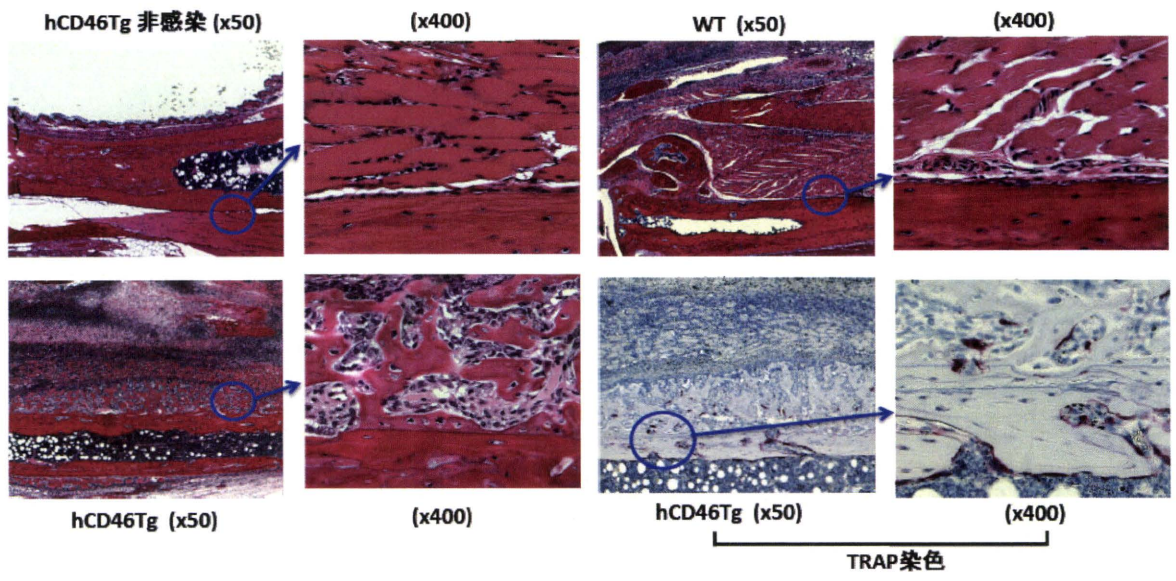


図 2 感染 96 時間後のマウスの足の骨切片の H&E 染色と TRAP 染色

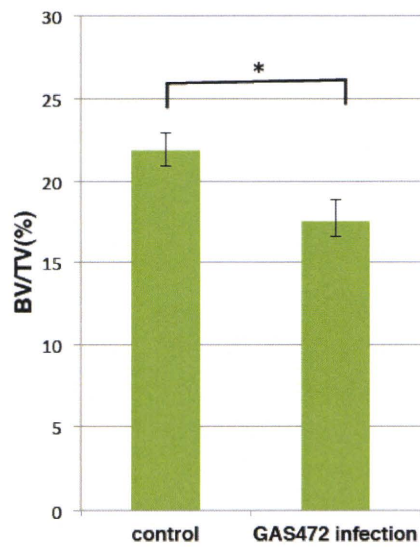


図 3 hCD46Tg マウス感染 96 時間後の骨密度の変化 \* $P=0.011$  (n=3)

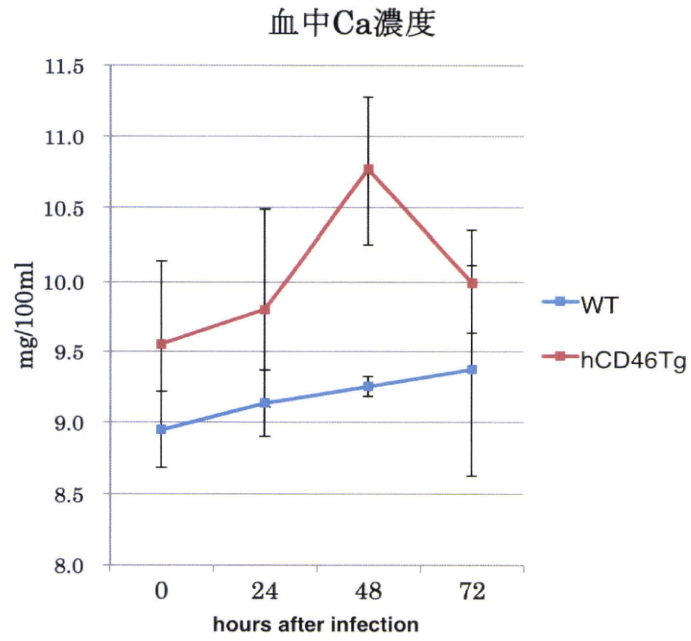


図4 感染マウスの血中のカルシウム濃度の変化 (n=3-7)

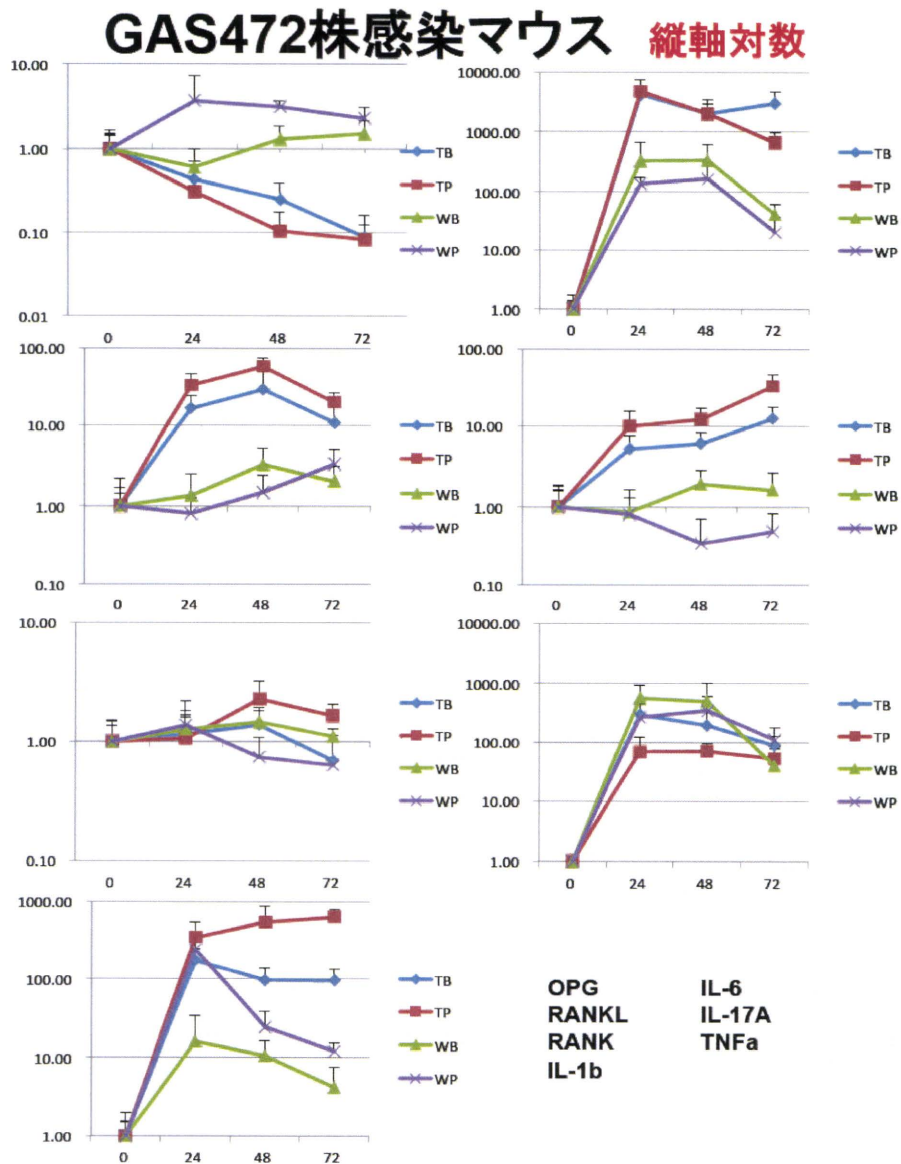


図5 感染後の各種サイトカインの発現量の比較

hCD46Tg (T) あるいは non-Tg (W) マウスの感染 24, 48, 72 時間後の膝下リンパ節(P)あるいは骨(B)から RNA を調製し、リアルタイム RT-PCR 法にて各種サイトカインの発現量を定量した。結果は、各時間における GABDH の発現量を内部標準として相対値をもとめ、非感染(0 h)の値に対する倍率でプロットした。(n=6)

## 骨代謝制御系とhCD46

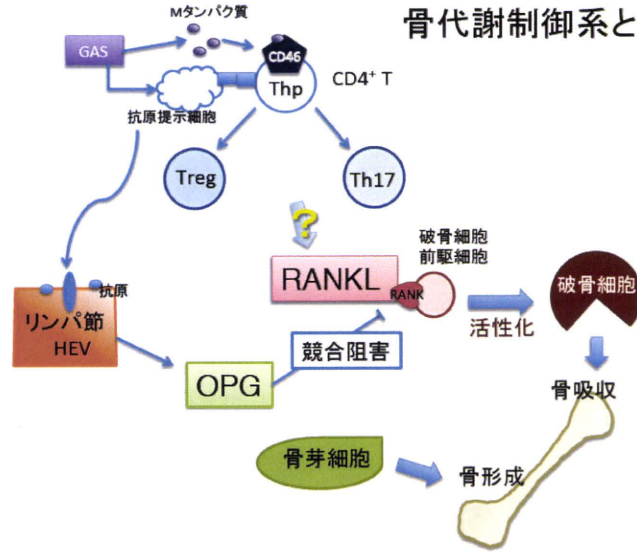


図 6 劇症型レンサ球菌感染症による急激な壊死発症のスキーム

## 分担研究報告書

### *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE)の全ゲノム解析

研究代表者 生方 公子 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 教授  
研究協力者 村山 琮明 北里大学大学院感染制御科学府&北里生命科学研究所 講師  
研究協力者 岡田 圭祐 北里大学大学院感染制御科学府 修士2年

**研究要旨** ヒト劇症型感染症由来の溶血レンサ球菌の1種である *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) RE378 株とブタ由来 L1 株について、昨年度までに全ゲノム解析を行い、アノテーションまで完成させた。本年度は、A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) や B 群溶血性レンサ球菌 (GBS) 等の保持する病原遺伝子やゲノム構造に重点をおいて解析した。また、動物由来株を 11 株収集し、ヒト由来株と比較解析した。その結果は、本来動物に由来する SDSE が、ヒト生体内において GAS やその他のレンサ球菌との間に遺伝子の水平伝播が生じ、今日の GAS に近い SDSE が形成されたというわれわれの推定を確認するものであり、動物由来株は、同じ SDSE 菌種でありながら、ヒト由来株と大きく違うと考えられ、おそらく SDSE の起源に近いと推定される。また動物由来株の中にも少数ながらヒト由来株と同タイプが認められ、ヒトと動物の接点という意味で重要である

#### A. 研究目的

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) は、従来グループ G、あるいはグループ C レンサ球菌 (GGS, GCS) と呼称され、人獣に共通にみられるレンサ球菌のひとつである。ヒトにおいてはその病原性は低いとされてきた。しかし、近年 A 群溶血性レンサ球菌 (*S. pyogenes*: GAS) と同様の敗血症性ショック病態を始めとする重篤な侵襲性感染症を引き起こし、また症例数も GAS と同等以上に急速に増加してきている。症例は基礎疾患を有する壮年期から高齢者に多いのが特徴である。SDSE 感染症は、GAS 以上に特に高齢者側にシフトしているのが特徴である。このことは、継続された本事業による 2010 年度の疫学解析でも、確認された。ピークは 2010 年度の解析では 80

歳代であった。

SDSE は従来動物に常在していた菌であり、ヒトに対する病原性に乏しいとされていた。しかし近年になり、ヒトにおいて SDSE 感染症が多く報告されるようになり、ヒト由来 SDSE の解析が進められる中で、GAS と共通した病原性因子の存在が明らかとなってきた。GAS や B 群溶血性レンサ球菌 (*S. agalactiae*: GBS) については病原因子解析のために数株ずつのゲノム解析がなされているが、SDSE についてのゲノム解析は、私どもが報告した GGS\_124 のみであった。動物から分離された SDSE については詳細な研究が進められていない。そこで、動物由来の SDSE のゲノム解析とともに、11 株の動物由来株を収集し、ヒト由来 SDSE や GAS、あるいはその他近縁のレンサ球菌と比較を



することで、SDSE がヒトに対してどのように適応してきたのかを推定することを目的とした。

## B. 研究方法

### 1. *emm* 型別と病原性因子の有無の解析

*emm* 型別は、増幅した PCR 産物の N 末側 220 bp のデータを CDC の *Streptococcus pyogenes emm* sequence database (<http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/strep/strepblast.htm>) へ送付し、*emm* 遺伝子の相同性を検索した。解析結果は電子メールにて返却され、シグナルシーケンスを除いた 180 bp の相同性に基づき *emm* 型を決定した。

病原性遺伝子は遺伝子を PCR 法にて増幅し、有無を確認した。比較解析用のソフトウェアとして、*in silico* Molecular Cloning (インシリコバイオロジー(株))および Vector NTI Advance10 (ライフテクノロジーズジャパン(株))を主に使用した。

## C. 研究成果

### 1. 近縁レンサ球菌のゲノムとの比較

ブタ由来 L1 株と、ヒト由来 GGS\_124 および近縁レンサ球菌のゲノム全体を比較するために、L1 株および RE378 株と、*GAS*、*S. uberis*、および *S. zooepidemicus* とを比較し、ゲノム再配置マップを作成した(図 1)。SDSE と最も相同性の高い菌種は *GAS* であるが、2 菌種間では大きな逆位がみられる。SDSE と *S. uberis* では、その相同性は *GAS* より低いものの、大きな組み換え領域がなく、全体的な遺伝子の並びはよく似ている。

ゲノムをブロック単位で相同性を比較するソフトウェアである Mauve (Genome Evolution

Laboratory(<http://asap.ahabs.wisc.edu/>))を用いて、再配置マップを作成し、これらの菌種の遺伝子の並びを比較した(図 2)。SDSE および *S. uberis* は、*GAS* と比べ、図の赤丸で示

した Region A および青丸で示した Region B のブロックの位置が大きく入れ替わっていた。SDSE の Region A 内部には、調節遺伝子の *mgrC* が存在し、M タンパクを支配する *emm* 遺伝子などが存在している。Region B 内部には、ヒト由来 SDSE にはストレプトリジン O を支配する *slo* 遺伝子が、ブタ由来 SDSE には *emm-like* 遺伝子などが存在する領域である。このように、病原性に関与する遺伝子が含まれている領域が、*GAS* と SDSE では大きく入れ替わっている。また、ヒト由来 SDSE とブタ由来 SDSE では、それらの病原性遺伝子のある領域が大きく異なり、ヒト由来 SDSE はむしろ *GAS* と似ている構造を示していた。

### 2. ブタ由来 SDSE における病原性遺伝子の有無

ブタ由来 11 株の病原性遺伝子の有無を表 1 に示した。対象とした病原性遺伝子は、付着因子であり、かつ型別による疫学解析としても用いられる M タンパクをコードする *emm* 遺伝子、溶血毒素ストレプトリジン S をコードする *sagA* 遺伝子、溶血毒素ストレプトリジン O をコードする *slo* 遺伝子、菌の伝播に関わるストレプトキナーゼをコードする *skg* 遺伝子および補体成分分解酵素の C5a ペプチダーゼをコードする *scp* 遺伝子である。*emm* 遺伝子は *emm* 型別で表した。

いずれの菌株でも、溶血毒素であるストレプトリジン S の構造遺伝子である *sagA* の存在が確認できた。羊血液寒天培地上で溶血環が確認できたことから、ストレプトリジン S の産生に関わる一連の遺伝子群は正常に機能していると考えられた。

*slo*、*skg*、*scp* の 3 つの遺伝子は、PAGU656 株および PAGU657 株でのみ存在が確認でき、他の 9 株では確認できなかった。9 株のうち 8 株の *emm* 型は、*stL2764.0* と同一であった。一方、*slo*、*skg*、*scp* を確認できた PAGU656

株の *emm* 型は *stC74a*, PAGU657 株のそれは *stC6979.0* と異なっていた。

ブタ由来 SDSE の *emm* 型である *stL2764.0* と、ヒト由来株の *emm* 型のそれぞれの M タンパクの進化的距離を調べるために、まずヒト由来 SDSE および GAS の *emm* 遺伝子の全配列を決定した。変換したアミノ酸配列から、M タンパクの無根系統樹を作成し、図 3 に示した。

ヒト由来 SDSE および GAS の M タンパクは 1 つの大きなクラスターを形成していた。ブタ由来の *stL2764.0* は、系統的に明らかに遠い位置にあった。また、ブタ由来株である PAGU657 株と同一の *emm* 型であるヒト由来 RE17 株の *stC6979.0* は、ヒト由来 SDSE および GAS のクラスターから遠く外れ、*stL2764.0* に近い位置に存在していた。*emm* 型 *stC6979.0* のアミノ酸配列を詳細に解析すると、中間部はブタ由来の *stL2764.0* にきわめて相同性が高く、C 末領域はヒト由来株に相同性があった。ヒトおよび動物由来の株の接点を考える上で興味深い。

### 3. CRISPR 領域の比較

Clustered regulatory interspaced short palindromic repeat (CRISPR) とは、短いリピート配列の間に、ウィルスや侵入した遺伝因子から捕獲された短い配列(スペーサー)が位置する構造をとっているもので、外来遺伝子の挿入歴を示している。CRISPR の数が多い場合、外来遺伝子の挿入が過去に多かったことになる。CRISPR は、スペーサーとして組み込まれた外来遺伝子を一本鎖の RNA として転写することで、RNAi のような構造をとり、同じ遺伝子の再度の挿入を防ぐとされている。

L1 株の CRISPR の数を、GGs\_124 株および RE378 株と比較して表 2 に示した。GGs\_124 株には 1 つ、RE378 株には 2 つ CRISPR が存在しているのに対し、L1 株に

は CRISPR は存在していなかった。

### D. 考察と結論

ブタ由来株 11 株の病原性遺伝子の検索結果において、ブタ由来 SDSE は大きく 2 種類に分けることができた。1 つは、PAGU656 株および PAGU657 株に見られるヒト SDSE と同じタイプである。2 つめは、その他の 9 株に共通していた *emm* 型が *stL2764.0* のブタ由来 SDSE に特異的なタイプである。ヒト由来 SDSE では当研究室で 2006 年に決定した 231 株、本研究で決定した 165 株、米国で決定された 212 株の中では、*stL2764.0* に分類される株は存在しなかった。このことより、当該タイプは動物特有の型であるといえる。

CRISPR 配列より、ブタ由来株よりヒト由来株の方が明らかに外来遺伝子の獲得が多く、SDSE がいかに外来遺伝子を獲得しヒトに適応して病原性を獲得してきたかということの一証拠である。

以上のことから、レンサ球菌属においては、菌種間で遺伝子の水平伝播や、大きな DNA 領域の組み換え、あるいは突然変異の集積により、現在みられる菌種の形になっていると考えられる(図 4)。より詳細に調べるためには、SDSD など他の近縁レンサ球菌種に対しても全ゲノム配列を決定し、解析する必要があると考えられる。

SDSE のゲノム解析は、本菌種が GAS と同様の劇症型感染症を起こすような因子を獲得保持していることを示し、高齢化が進む日本で、SDSE 感染症はさらに重要になると思われる SDSE の病原性についてさらに研究を進める必要がある。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Matsui H, Sekiya Y, Takahashi T, Nakamura M, Imanishi K, Yoshida H, Murayama SY, Takahashi T, Tsuchimoto K,

- Uchiyama T, **Ubukata K**. Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus pyogenes* in mice. J Med Microbiol. 2011 Jan;60(Pt 1):128-34.
2. Sakai F, Chiba N, Ono A, Yamagata Murayama S, **Ubukata K**, Sunakawa K, Takahashi T. Molecular epidemiologic characteristics of *Streptococcus pneumoniae* isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009. J Infect Chemother. 2010 Dec 15. PubMed PMID: 21161561.
  3. Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, 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 Jan 11;12:17.
  4. Suzuki K, Kurono Y, Kobayashi T, Nishimura T, Baba S, Harabuchi Y, Fujisawa T, Yamanaka N, **Ubukata K**, Ikeda F. [Mutant prevention concentrations of garenoxacin against *Streptococcus pneumoniae* isolates from otorhinolaryngological infections]. Jpn J Antibiot. 2010 Aug;63(4):312-8.
  5. Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, **Ubukata K**. Nonhemolytic *Streptococcus pyogenes* isolates that lack large regions of the sag operon mediating streptolysin S production. J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):635-8.
  6. Takahashi T, Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, **Ubukata K**. Clinical aspects of invasive infection with *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in elderly patients. J Infect Chemother. 2010 Feb;16(1):68-71.
  7. Asami R, Okada K, Chiba N, **Ubukata K**, Takahashi T. [Molecular features of beta-hemolytic streptococci isolated from blood in adult invasive infection and the clinical background factors]. Kansenshogaku Zasshi. 2010 May;84(3):285-91.
  8. Takahashi T, **Ubukata K**, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: characteristics of strains and clinical features. J Infect Chemother. 2011 Feb;17(1):1-10.
  9. Yamaoka S, Ogihara T, Yasui M, Hasegawa M, Hira S, Oue S, **Ubukata K**, Watanabe H, Takahashi T. Neonatal streptococcal toxic shock syndrome caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. Pediatr Infect Dis J. 2010
2. 学会発表
    1. 岡田圭祐, 村山琮明, 切替照雄, 生方 公子 : ヒトおよびブタ由来のレンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* のゲノム解析とその比較。第 59 回日本感染症学会東日本地方会学術集会(東京), 2010.10.21-22
    2. 村山 琮明 : ゲノム解析からみた *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性。第 21 回日本臨床微生物学会総会, シンポジウム III, 2010.01.31
    3. 村山 琮明, 秋山 徹, 下村 有美, 切替 照雄, 岡田 圭祐, 生方 公子 : Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain RE378. 第 83 回日本細菌学会総会, 2010.3.27-29
- G. 知的財産権の出願・登録状況**  
該当なし

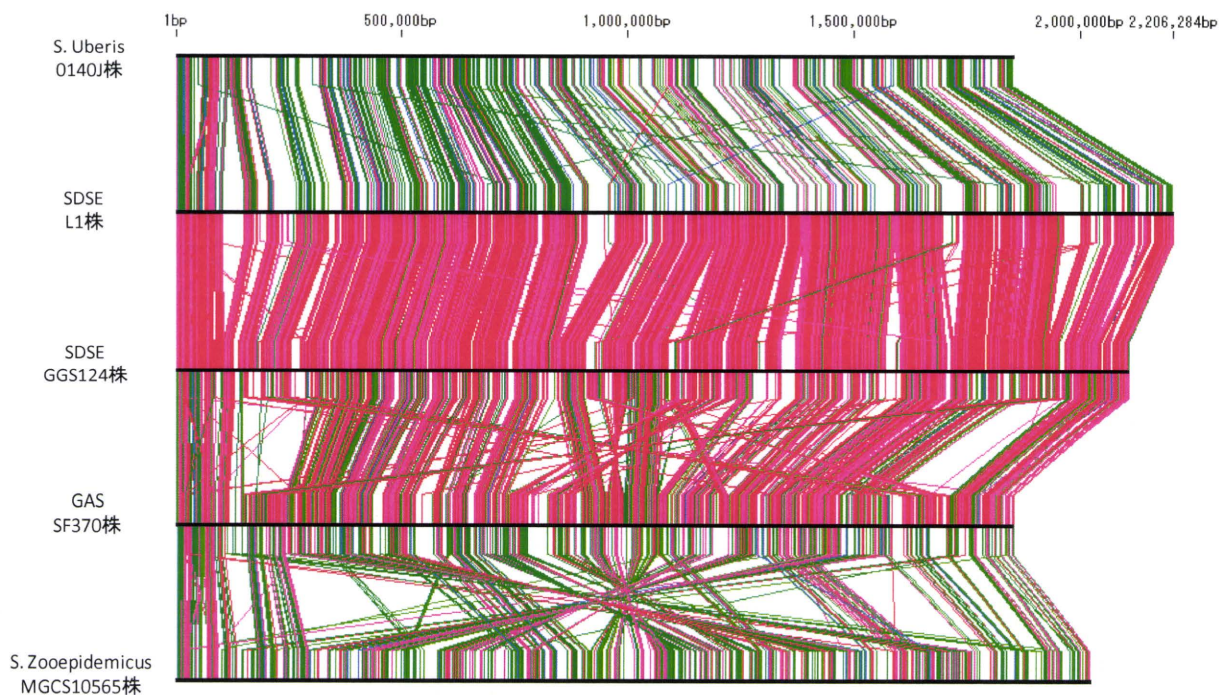


図1 in silico molecular cloning によるゲノム再配置マップ

相同性が90%以上を赤，70%以上をピンク，40%以上を緑で示している。

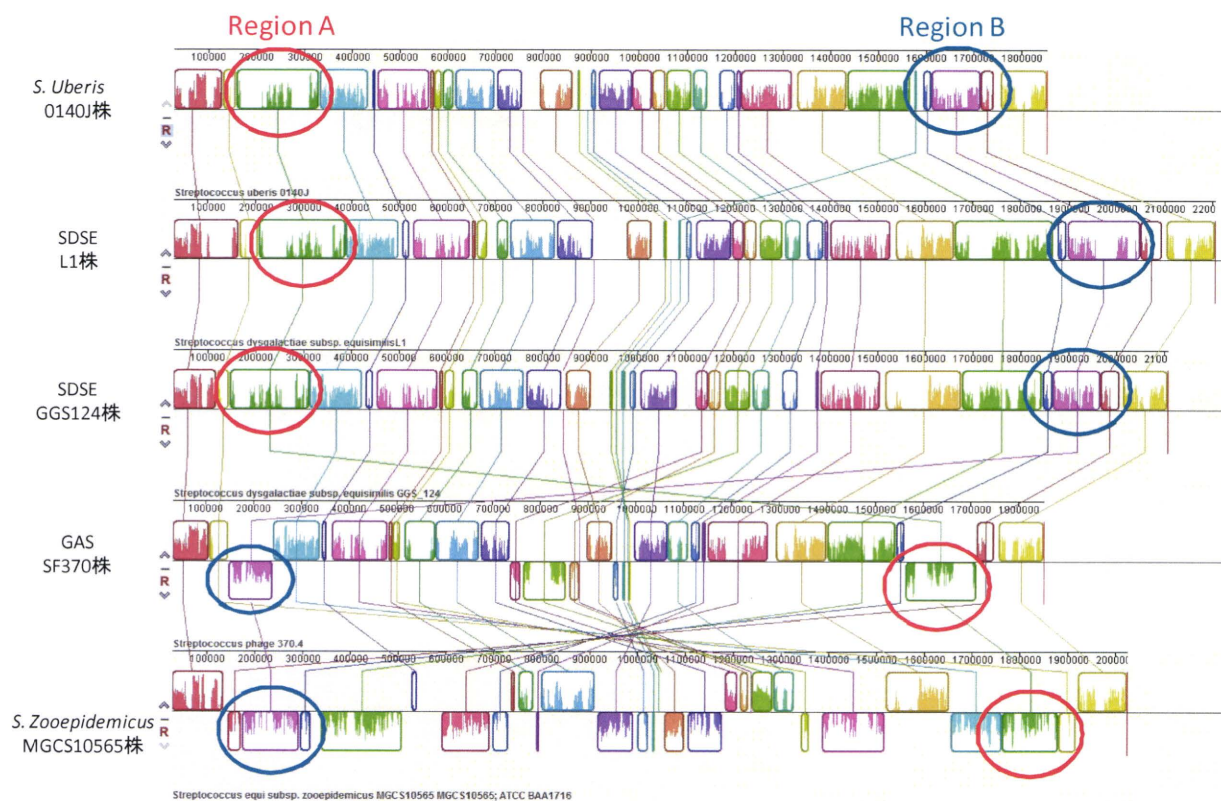


図2 Mauve によるゲノム再配置マップ

ブロック数28個，最小ブロックサイズ1,081bp

表1 ブタ由来 SDSE における病原性遺伝子の有無

Origin	Strain	Disease	emm type	Virulence genes			
				<i>sagA</i>	<i>slo</i>	<i>skg</i>	<i>scp</i>
ヒト	RE378	STSS	<i>stG6792.3</i>	+	+	+	+
	PAGU656	Endocarditis	<i>stC74a</i> *	+	+	+	+
	PAGU657	Endocarditis	<i>stC6979.0</i> *	+	+	+	+
ブタ	L1	Lymphadenitis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	V21	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	601	Nodular lesion	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	PAGU699	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	PAGU787	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	eNo.61	Endocarditis	-	+	-	-	-
	eNo.65	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	eNo.118	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-
	eNo.125	Endocarditis	<i>stL2764.0</i>	+	-	-	-

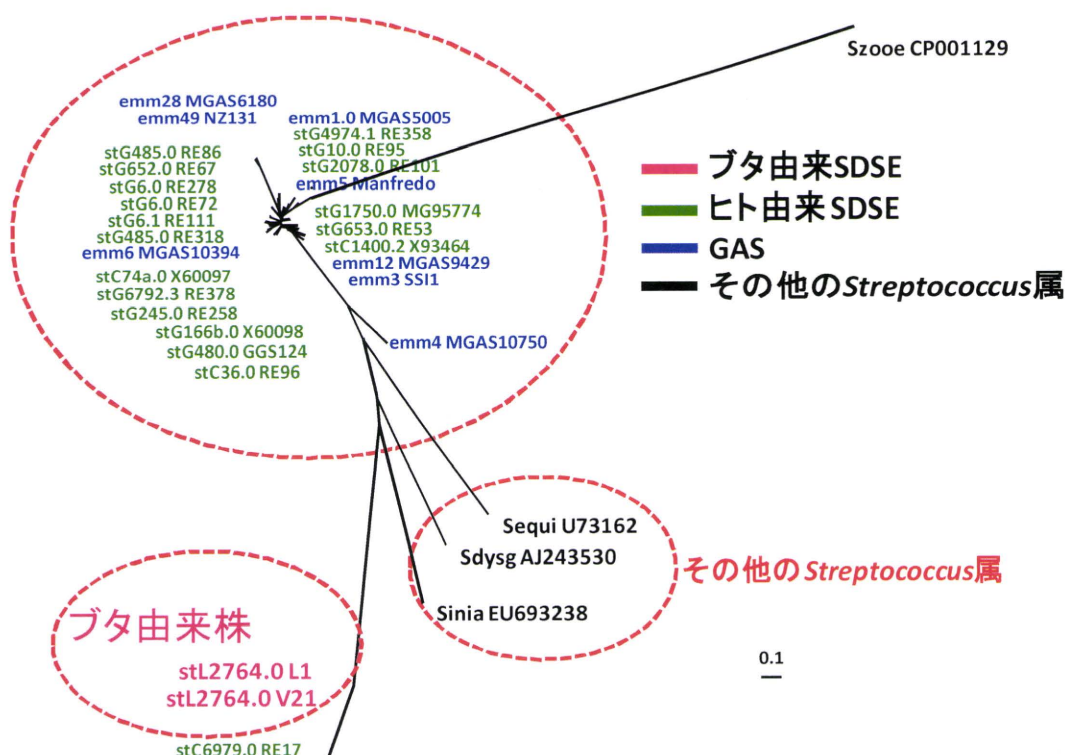


図3 アミノ酸配列より作成したMタンパクの系統樹

表 2 SDSE3 株の CRISPR

Strain	Nb of CRISPR loci	Number of Repeat	Size (bp)	Spacer size (min-max)	Typical repeat sequence
GGS_124	1	18	36	30 bp (30-32)	GTTTTAGAGCTATGTTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC
		1*	24	60 bp	AGACGAGGAGCCTGCTCAAGAGGA
		1*	26	45 bp	AAAAACCCAATTTTTTTTCGTCTTAT
RE378	2	7	36	30 bp	GTTTTAGAGCTATGTTGTTTTGAATGGTCCCAAAAC
		13	32	35 bp (33-38)	GACTCACCTTCGCGGGTGAGTGGATTGAAAT
		1*	40	44 bp	CAACACCCGAAGGCCAATCAACGCCTGAAGTTGAC GAAGT
		1*	25	26 bp	AGCAACTGATACTTGTTTAACATCA
L1	0	1*	32	34 bp	GTTTTAGAGCTATGCTGTTTTGAATGGTCCCA
		1*	26	26 bp	GTTCACTGAACGTACCACTCACTCTT

\*: questionable CRISPR : CRISPR 構造をとっているが、リピートが1つであるため、スペーサーが存在していない

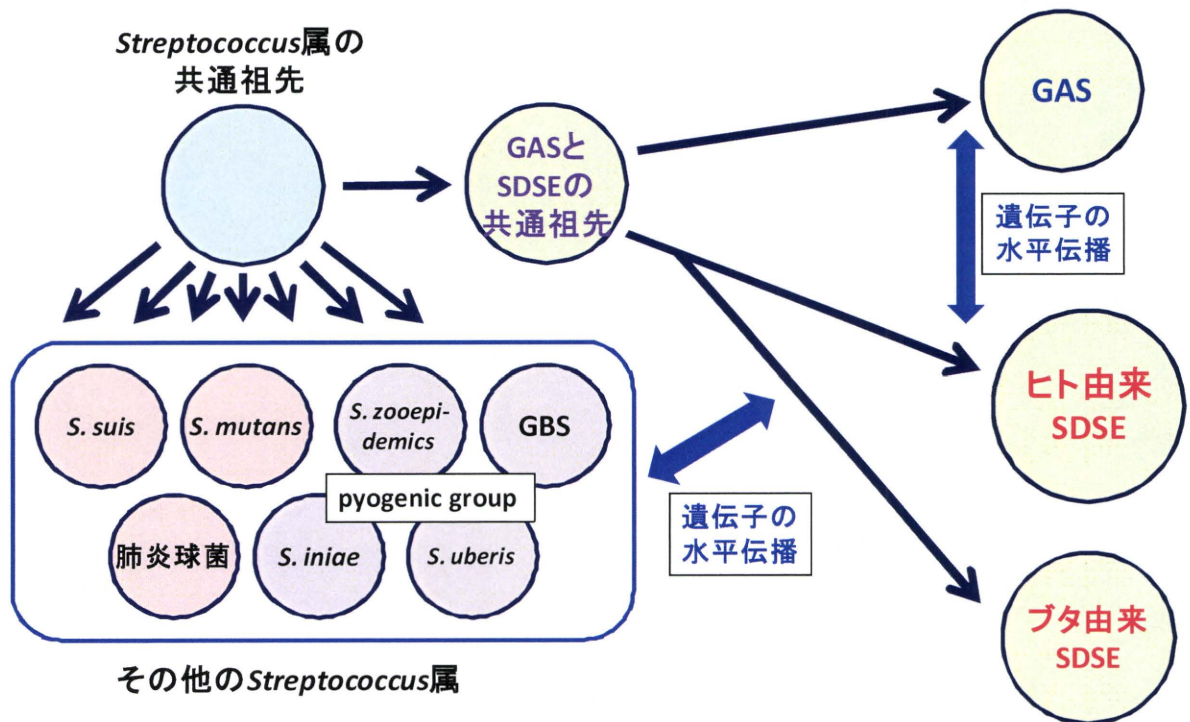


図 4 SDSE の推察される進化過程

## 研究成果の刊行に関する一覧表

### 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
藤島清太郎	IV 治療 1.抗菌療法 B.経験的治療 (初期選択, de-escalationなど)	志馬伸朗	人工呼吸器関連肺炎のすべて:エビデンスに基づく予防・診断・治療	南江堂	東京	2010	182-191
藤島清太郎, 葉季久雄, 宮木 大, 相川直樹.	VII. 各領域別のMRSA保菌者対策とMRSA感染症の診断・治療 13. ICU領域	河野 茂	MRSA: 基礎・臨床・対策 改訂版.	医薬ジャーナル社	東京	2010	295-310
中野 泰, 藤島清太郎	ALI/ARDSとサイトカイン	石井芳樹,	医学の歩み	医歯薬出版	東京	2010	32-37
藤島清太郎, 関根和彦, 林田 敬, 宮木 大, 葉季久雄, 佐々木淳一, 相川直樹, 堀 進悟	重症患者 lipopolysaccharide (LPS) 高感受性機序の解明: IL-18 の免疫修飾作用.	池田寿昭, 谷 徹, 嶋田 紘	エンドトキシン研究	医学図書出版	東京	2010	41-45

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Matsui H, Sekiya Y, Takahashi T, Nakamura M, Murayama SY, Takahashi T, Uchiyama T, <b>Ubukata K.</b>	Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with <i>Streptococcus pyogenes</i> in mice.	J Med Microbiol.	60	128-134	2011
Sakai F, Chiba N, Yamagata Murayama SY, <b>Ubukata K.</b> , Sunakawa K, Takahashi T.	Molecular epidemiologic characteristics of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009.	J Infect Chemother.	17	PMID: 21161561.	2010
Shimomura Y, Okumura K, Murayama SY, Yagi J, <b>Ubukata K.</b> , Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T.	Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> strain causing streptococcal toxic shock syndrome.	BMC Genomics	11	12-17	2011
Suzuki K, Kurono Y, Kobayashi T, Nishimura T, Baba S, Harabuchi Y, Fujisawa T, Yamanaka N, <b>Ubukata K.</b> , Ikeda F.	Mutant prevention concentrations of garenoxacin against <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates from otorhinolaryngological infections.	Jpn J Antibiot	63	312-318	2010
Yoshino M, Murayama SY, Sunaoshi K, Wajima T, Takahashi M, Masaki J, Kurokawa I, <b>Ubukata K.</b>	Nonhemolytic <i>Streptococcus pyogenes</i> isolates that lack large regions of the sag operon mediating streptolysin S production.	J Clin Microbiol.	48	635-638	2010
Takahashi T, Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, <b>Ubukata K.</b>	Clinical aspects of invasive infection with <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> in elderly patients.	J Infect Chemother.	16	68-71	2010
Asami R, Okada K, Chiba N, <b>Ubukata K.</b> , Takahashi T.	Molecular features of beta-hemolytic streptococci isolated from blood in adult invasive infection and the clinical background factors.	感染症学雑誌	84	285-291	2010
Takahashi T, <b>Ubukata K.</b> , Watanabe H	Invasive infection caused by <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> : characteristics of strains and clinical features.	J Infect Chemother.	17	1-10	2011
Yamaoka S, Ogihara T, Yasui M, Hasegawa M, Hira S, Oue S, <b>Ubukata K.</b> , Watanabe H, Takahashi T.	Neonatal streptococcal toxic shock syndrome caused by <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> .	Pediatr Infect Dis J			2010
坂田 宏	小児の細菌性呼吸器感染症に対する amoxicillin, cefcapene-pivoxil および faropenem の多施設共同無作為比較試験.	日本化学療法学会雑誌	58	239-247	2010
<b>Sakata H.</b> , Sato Y, Nonoyama M, Haruta T, Ouchi K, Yamaguchi S, Sunakawa K	Results of a multicenter survey of diagnosis and treatment for bacterial meningitis in Japan.	J Infect Chemother	16	396-406	2010
Goto T, Ishizaka A, Katayama M, Kohno M, Tasaka S, <b>Fujishima S.</b> , Kobayashi K, Nomori H	Involvement of E-cadherin cleavage in reperfusion injury.	Eur J Cardiothorac Surg	37	426-431	2010
Katayama M, Ishizaka A, Sakamoto M, <b>Fujishima S.</b> , Sekiguchi K, Asano K, Betsuyaku T, Kotani T, Sato N, Ware LB, Matthay MA, Hashimoto S	Laminin $\gamma 2$ fragments are increased in the circulation of patients with early-phase acute lung injury.	Intensive Care Med	36	479-486	2010
<b>Fujishima S.</b> , Shiomi T, Yamashita S, Yogo Y, Nakano Y, Inoue T, Nakamura M, Tasaka S, Hasegawa N, Aikawa N, Ishizaka A, Okada Y.	Production and activation of matrix metalloproteinase-7 in idiopathic pulmonary fibrosis.	Arch Pathol Lab Med	134	1136-1142	2010



発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
多村知剛, <b>藤島清太郎</b>	Sepsisの細菌学的診断	救急医学	34	267-273	2010
<b>藤島清太郎</b>	<i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> 感染症	化学療法の領域	26	1622-30	2010
安倍晋也, 佐々木淳一, <b>藤島清太郎</b>	高齢者における皮膚軟部組織感染症 (下肢)	Geriatric Medicine	48	1351-1355	2010
中野 泰, <b>藤島清太郎</b>	ALI/ARDS 68の謎を解く 原疾患編 Q35. サイトカイン・ストームによるALI/ARDSの特徴は?	救急・集中治療	22	1172-1176	2010
<b>藤島清太郎</b>	急性肺損傷(ALI), 急性呼吸促進症候群(ARDS)の病態と診療	日救急医学会誌	21	819-827	2010
<b>藤島清太郎</b>	Sepsis診断におけるプロカルシトニンの意義	化学療法の領域	27	134-141	2011
<b>Takahashi T</b> , Sunaoshi K, Sunakawa K, Fujishima S, Watanabe H, Ubukata K	Clinical aspects of invasive infections with <i>Streptococcus dysgalactiae</i> ssp. <i>equisimilis</i> in Japan: differences with respect to <i>Streptococcus pyogenes</i> and <i>Streptococcus agalactiae</i>	<i>Clin Microbiol Infect</i>	16	1097-1103	2010
<b>Takahashi T</b> , Asami R, Tanabe K, Hirono Y, Nozawa Y, Chiba N, Ubukata K	Clinical aspects of invasive infection in elderly patients with <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>J Infect Chemother</i>	16	68-71	2010
Yamaoka S, Ogihara T, Yasui M, Hasegawa M, Hira S, Oue S, Ubukata K, Watanabe H, <b>Takahashi T</b>	Neonatal streptococcal toxic shock syndrome caused by <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i>	<i>Pediatr Infect Dis J</i>	29	979-981	2010
<b>Takahashi T</b> , Ubukata K, Watanabe H	Invasive infection caused by <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> : characteristics of strains and clinical features	<i>J Infect Chemother</i>	17	1-10	2011
Matsui H, Sekiya Y, Takahashi T, Nakamura M, Imanishi K, Yoshida H, Murayama SY, <b>Takahashi T</b> , Tsuchimoto K, Uchiyama T, Ubukata K	Dermal mast cells reduce progressive tissue necrosis caused by subcutaneous infection with <i>Streptococcus pyogenes</i> in mice	<i>J Med Microbiol</i>	60	128-134	2011
Sakai F, Chiba N, Ono A, Murayama SY, Ubukata K, Sunakawa K, <b>Takahashi T</b>	Molecular epidemiologic characteristics of <i>Streptococcus pneumoniae</i> isolates from children with meningitis in Japan from 2007 through 2009	<i>J Infect Chemother</i>		DOI: 10.1007/s10156-010-0180-3	
浅見諒子, 岡田圭祐, 千葉菜穂子, 生方公子, <b>高橋 孝</b>	成人の血液培養由来β溶血性レンサ球菌の疫学的性状と症例における背景因子の特徴	日感染学誌	84	285-291	2010
<b>高橋 孝</b> , 生方公子	レンサ球菌の分子疫学	化学療法の領域	26	1578-1587	2010
<b>高橋 孝</b> , 村山琮明, 生方公子	高齢者市中肺炎におけるRSウイルスと肺炎球菌の混合感染	Medical Practice	27	1409	2010
浅見諒子, <b>高橋 孝</b> , 生方公子	高齢者におけるG群レンサ球菌感染症	Medical Practice	27	2140	2010
Kerdsin A, Dejsirilert S, Puangpatra P, Sripakdee S, Chumla K, <sup>1</sup> Boonkerd N, Polwichai P, Tanimura S, Takeuchi D, Nakayama T, Nakamura S, Akeda Y, Gottschalk M, Sawanpanyalert P, <b>Oishi K</b> .	Clinical features of <i>Streptococcus suis</i> serotype 2 infections in relation to the genotypic profiles of isolates in Thailand	Emerg Infect Dis		(in press)	2011
Nakayama T, Takeuchi D, Akeda Y, <b>Oishi K</b> .	<i>Streptococcus suis</i> infection induces bacterial accumulation in the kidney.	Microb Pathog.	50	87-93	2011

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Ezoe H Akeda Y, Piao Z, Aoshi T, Koyama S, Tanimoto T, Ishii KJ, <b><u>Oishi K.</u></b>	Intranasal vaccination with pneumococcal surface protein A plus poly(I:C) protects against secondary pneumococcal pneumonia in mice.	Vaccine	29	1754-1761	2011
Kawakami K, Ohkusa Y, Kuroki R, Tanaka T, Koyama K, Harada Y, Iwanaga K, Yamaryo T, <b><u>Oishi K.</u></b>	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
竹内 壇, <b><u>大石和徳</u></b>	<i>Streptococcus suis</i> 感染症・新興人獣共通感染症.	化学療法の領域.	26	63-68	2010
<b><u>大石和徳</u></b> , 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
川上健司, <b><u>大石和徳</u></b>	2.任意接種のワクチン, 4)肺炎球菌.	臨床検査.	54	1358-1363	2010
田村和世, <b><u>大石和徳</u></b>	23価肺炎球菌莢膜多糖体ワクチン(ニューモバックス <sup>R</sup> )の新たなエビデンス.	呼吸	29	996-1001	2010
川上健司, <b><u>大石和徳</u></b>	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
<b><u>大石和徳</u></b>	肺炎球菌ワクチン	臨床とウイルス	38	490-498	2010
<b><u>Ikebe T, Ato M,</u></b> Matsumura T, Hasegawa H, Sata T, Kobayashi K, <b><u>Watanabe H.</u></b>	Highly frequent mutations in negative regulators of multiple virulence genes in group A streptococcal toxic shock syndrome isolates.	PLoS Pathog	6	e1000832	2010
<b><u>Ikebe T,</u></b> Wada A, Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, <b><u>Watanabe H,</u></b> The Working Group for $\beta$ -hemolytic Streptococci in Japan	Emergence of clindamycin-resistant <i>Streptococcus pyogenes</i> isolates obtained from patients with severe invasive infections in Japan.	Jpn J Infect Dis.	63	304-305	2010
<b><u>Ikebe T,</u></b> Oguro Y, Ogata K, Katsukawa C, Isobe J, Shima T, Suzuki R, Ohya H, Tominaga K, Okuno R, Uchitani Y, Tada Y, Okabe N, <b><u>Watanabe H,</u></b> The Working Group for $\beta$ -hemolytic Streptococci in Japan.	Surveillance of severe invasive group G streptococcal infections during 2002-2008 in Japan	Jpn J Infect Dis	63	372-375	2010
Yamada T, Yamada T, Yamamura MK, Katabami K, Hayakawa M, Tomaru U, Shimada S, Morikawa M, Seki T, Ariga S, Ishikawa K, <b><u>Ikebe T,</u></b> Gando S, Minakami H.	Invasive group A streptococcal infection in pregnancy.	J Infect.	60	417-424	2010
<b><u>池辺忠義</u></b>	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	26	1601-1607	2010
Murase Y, Konnai S, Hidano A, Githaka W.N, Ito T, Takano A, Kawabata H, <b><u>Ato M,</u></b> Tajima T, Tajima M, Onuma M, Murata S, Ohashi K.	Molecular detection of <i>Anaplasma phagocytophilum</i> in cattle and <i>Ixodes persulcatus</i> ticks	Vet. Microbiol.		in press	2011
Shimomura Y., Okumura K., Murayama S. Y., Yagi J., Ubukata K., Kirikae T., <b><u>Mivoshi-Akiyama T</u></b>	Complete genome sequencing and analysis of a Lancefield group G <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subsp. <i>equisimilis</i> strain causing streptococcal toxic shock syndrome (STSS).	BMC Genomics.	11		2011

## 附 (ホームページ作成報告書)

啓発活動を目的として、本研究事業では初年度にホームページ(HP)を作成することを第一の目標とした。2010年9月末日に完成し、公開した。HPのアクセス用アドレスは、<http://strep.umin.jp/> である。

報告書の【附】としてHPの全容を収載する。

公開後における1ヶ月間のアクセス数は以下の通りであるが、HPへの訪問者は医療関係者だけでなく、一般市民も予想以上に多くアクセスしている。一般的な関心は、「肺炎球菌ワクチン」であった。

期間	2010/9/29	～	2010/10/29
<b>主要な指標</b>			
ページビュー数			9,542
訪問者数(ユニークユーザ数)			2,330
訪問回数(セッション)			2,582
ページビュー/訪問者数=1人が見たページ数			4.10
日別訪問者数			75
<b>閲覧ページ</b>			
閲覧ページ	ページビュー数	訪問者数	
トップページ	2,729	1,801	
肺炎球菌: 6. 肺炎球菌ワクチン	839	652	
肺炎球菌: 1. 肺炎球菌とは	635	470	
収集菌株と協力医療機関	536	360	
β溶血性レンサ球菌とは	456	316	
肺炎球菌: 4. 薬剤耐性メカニズム	436	301	
参加施設一覧	401	329	
肺炎球菌: 2. 検査	356	254	
肺炎球菌: 5. 薬剤感受性(phenotype)と遺伝子型	338	220	
肺炎球菌: 3. 発症例の背景解析	333	240	
β溶血性レンサ球菌とは: 2. β溶血性レンサ球菌感染症例の疫学	324	210	
2010年度(9月)・疫学情報	303	219	
分担者	303	236	
参考文献	292	186	
β溶血性レンサ球菌とは: 7. 細菌検査	269	209	
β溶血性レンサ球菌とは: 3. 症例提示	268	194	
β溶血性レンサ球菌とは: 6. 抗菌薬感受性	215	175	
β溶血性レンサ球菌とは: 8. 病原性因子	185	132	
β溶血性レンサ球菌とは: 5. 病原性に関わるMタンパクと莢膜の分子疫学	166	120	
β溶血性レンサ球菌とは: 4. 病原性に関わる菌の表層物質	153	116	

HOME

最新疫学情報

総論

肺炎球菌

$\beta$  溶血性レンサ球菌

参加施設・分担者・参考文献

このホームページに関するお問合せ

〒108-8541

東京都港区白金5-9-1

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

FAX: 03-5791-6408

e-mail: [shinko13@isci.kitasato-u.ac.jp](mailto:shinko13@isci.kitasato-u.ac.jp)

## ご挨拶

21世紀の到来とともに、再び肺炎球菌や $\beta$ 溶血性レンサ球菌といった細菌による重症型の侵襲性感染症が増加しています。この背景には、急速に変貌しつつある我が国特有の社会的背景が存在しています。すなわち、急速な少子・高齢化社会の到来と、生活習慣病等の基礎疾患を有する人口の著しい増加があります。平成22年度の総務省統計調査によれば、総人口に占める65歳以上のヒトの割合は23%に達しています。

私達の研究事業は、このような市中型細菌感染症の社会的重要性に着目し、基礎系研究者と臨床系研究者とが連携して、原因菌の中でも症例数の最も多い肺炎球菌と $\beta$ 溶血性レンサ球菌に焦点を当てております。主たる研究目標は、我が国におけるi)発症例の背景因子の解析、ii)分離菌の分子疫学解析、iii)迅速診断法の確立や最適な治療法の確立、iv)菌の病原性について明らかにすることですが、さらにはv)医療関係者あるいは一般の方々への啓発活動も事業目的のひとつに加えています。

平成22年度より、「研究課題:重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析、その診断・治療に関する研究」にて新たな研究が開始されておりますが、この度今までの研究成果をホームページ上で広く公開することに致しました。

ホームページには、先ず平成19年度から21年度に行なわれた初回研究事業の大規模疫学研究に関する成績を中心に、我が国における当該感染症の現状を記載致します。

このホームページが小児科・内科系診療科のみならず、救命救急や整形外科領域の先生方、あるいは臨床検査技師の方々を含むコメディカルのお立場の方にもお役に立てれば幸いです。

今後、皆様方のご意見をもとに、より一層充実したホームページにバージョンアップして行きたいと考えております。ご意見等ございましたら左記までご連絡下さいませようお願い申し上げます。

2010年9月

厚生労働省新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業

「重症型のレンサ球菌・肺炎球菌感染症に対するサーベイランスの構築と病因解析、その診断・治療に関する研究」

- 平成19～21年度 研究代表者 砂川 慶介  
(北里大学北里生命科学研究所特別研究部門教授, (前)日本感染症学会理事長,  
(前)日本臨床微生物学会理事長)
- 平成22年度～ 研究代表者 生方 公子  
(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 教授)

## お知らせ

● 2010年11月10日

最新疫学情報「2010年度(10月)肺炎球菌疫学情報」を掲載いたしました。

● 2010年9月29日

ホームページを公開いたしました。