

図-7 SDSE 株の emm 型別 : 2010 年度分離株

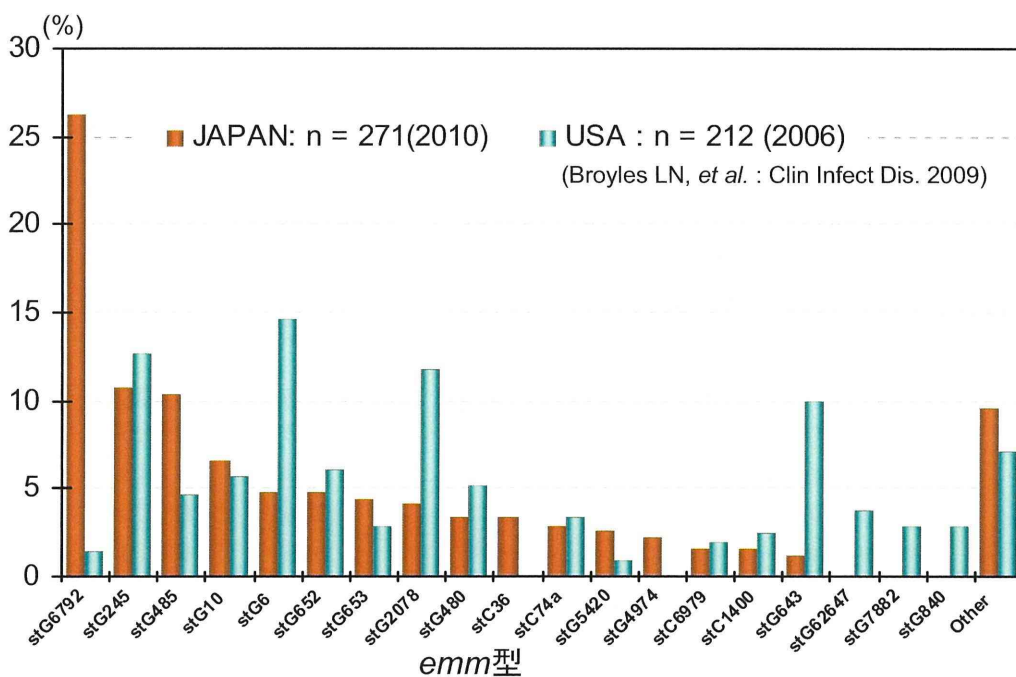


図-8 SDSE 株の emm 型別 : 日本と米国株の比較

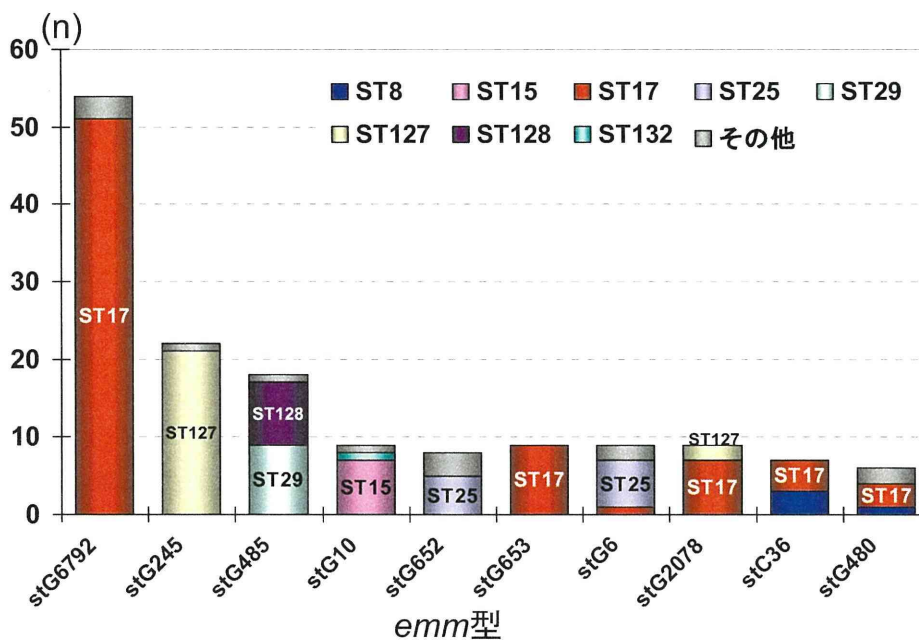


図-9 SDSE 株 : MLST 解析データ

抗菌薬	GAS		SDSE	
	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>	MIC <sub>50</sub>	MIC <sub>90</sub>
<b>経口薬</b>				
penicillinG	0.016	0.016	0.016	0.016
ampicillin	0.016	0.031	0.031	0.031
amoxicillin	0.016	0.031	0.031	0.031
cefdinir	0.008	0.016	0.016	0.016
cefditoren	0.008	0.008	0.016	0.016
<b>注射薬</b>				
cefazolin	0.125	0.125	0.125	0.125
cefotiam	0.063	0.063	0.063	0.125
cefotaxime	0.016	0.016	0.016	0.016
panipenem	0.008	0.008	0.008	0.008
meropenem	0.008	0.008	0.016	0.016
vancomycin	0.5	0.5	0.5	0.5

× 16倍の差

図-10 GAS, SDSE : β-ラクタム系薬, バンコマイシン感受性

## 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 日本大学薬学部分子細胞生物学研究室 准教授

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

**研究要旨**  $\beta$  溶血性レンサ球菌 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) のヒト劇症型感染症由来の RE378 株, GGS\_124 株とブタ由来 L1 株について, A 群溶血性レンサ球菌 (GAS) 等の病原性レンサ球菌との全ゲノム間での詳細な比較を行った。SDSE は GAS が保持する多くの病原遺伝子を保持しているのみでなく, 全ゲノム塩基配列から得られたオルソログ遺伝子の相同性でも 72~81% と GAS ときわめて相同性が高かった。また全 CDS のアミノ酸配列を並べた解析でも, L1 株は GAS と SDSE の共通祖先にヒト由来 SDSE より近かった。Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat の解析から, ヒト由来株はブタ由来株よりファージなどの外来遺伝子の獲得が多かったと推測される。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ファージを介して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結果である。

#### A. 研究目的

*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* (SDSE) は, 人獣に共通にみられるレンサ球菌の一菌種で, 従来グループ G, あるいはグループ C レンサ球菌 (GGS, GCS) と呼称されてきた。ヒトにおいては常在することがあるものの, その病原性は低く感染症起因菌としては問題視されてこなかった。しかし, 近年 A 群溶血性レンサ球菌 (*S. pyogenes*: GAS) と同様の重篤な侵襲性感染症を引き起こし, また 2006 年から 2011 年までの侵襲性レンサ球菌症に関するわれわれの全国的疫学解析では, GAS を上回る頻度で SDSE 感染症が認められる。症例は GAS と同様に基礎疾患を有する壮年期から高齢者に多いが, GAS 症例よりも更に高齢者側にシフトしている。

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, またワクチン開発を目指してゲノム解析が行われてきたが, SDSE についてはわれわれ (Shimomura *et al*) が世界に先駆けて行った GGS\_124 株のゲノム解析が最初であり, 今回はさらに RE378 株, および L1 株の全ゲノムの詳細な解析を行った。劇症型レンサ球菌症患者由来の GGS\_124 株は *emm* 型: *stG480.0* であり, 一連のマウス感染実験で最も病原性が高かった株である。敗血症により多臓器不全を起こした患者由来の RE378 株は *emm* 型: *stG6792.3* で, この型は本邦で最も分離頻度が高い型である。一方リンパ節炎のブタ由来の L1 株は *emm* 型: *stL2764.0* であった。昨年度までにこれら 3 株の全ゲノム解析を行い, アノテーションまで終了させた。

本年度は, ヒト由来の SDSE 株のヒトへの病原性獲得の進化過程を明らかにすることを目的として, 全ゲノムにわたる詳細な解

析を行った。

## B. 研究方法

### 1. 全ゲノム塩基配列比較

系統樹の解析は Clustal W (DNA databank of Japan, <http://www.ddbj.nig.ac.jp/index-j.html>) を、オルソログ遺伝子の比較は Microbial Genome Database for Comparative Analysis (MBGD) (Uchiyama I, *Nucleic Acids Res.* 35, D343–D346, 2007) を、Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeat (CRISP) の解析は CRISPR Finder (<http://crispr.u-psud.fr/>) を、ゲノム全体の比較は CVTree (<http://tlife.fudan.edu.cn/cvtree/>) を用いた。その他の分子生物学的解析は IMC Genomics (インシリコバイオロジー社) と Vector NTI Advance™ ver. 11 (ライフテクノロジーズジャパン) を用いた。

## C. 研究成果

### 1. ゲノム概要

表1にpyogenic groupレンサ球菌の、完全に塩基配列が決定されたゲノムの概要を記した。SDSEはわれわれの3株を含めて4株、GASでは14株、GBSでは3株、*Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae* (SDSD) 1株がデータベースに記載されている。ゲノムサイズは2Mbp前後であったが、GASは1.81～1.94Mbpとこのグループの中ではやや小さく、SDSEは2.1～2.2MbpとGBSと並んでやや大きかった。SDSEのORF数は約2,000と他の*Streptococcus*属菌種と同様であった。GC%はSDSEが38.5～38.6%、GASは38.4～38.7%、GBSは35.6%であった。

### 2. 16S rRNA 遺伝子および全オルソログ遺伝子の比較

図1に16S rRNA遺伝子の塩基配列を基にした系統樹を記した。SDSEは近縁亜種のSDSDと最も近かったが、次にGBSと相同性

が高い結果を示した。

図2ではゲノム解析されたSDSEの4株と、それ以外のレンサ球菌のオルソログ遺伝子の相同性を比較した。SDSE同士、あるいはSDSDとは79%以上の相同性がある。次に高いのはGASであり、72～81%と高い相同性を有しているが、GBSとは57～64%、肺炎球菌とはわずかに51～59%であった。ゲノムレベルではSDSEはGASに最も近く、GBSとはやや遠い関係にある。先の16SrRNA遺伝子の系統樹とは異なった結果ではあるが、SDSEがGASに似た侵襲性感染症を起こすことを考えると、ゲノムレベルでのGASとの相同性の高さは納得できる。

### 3. CRISPR の解析とファージ侵入領域について

表2に各菌株の保有するCRISPRの数とその性状を記した。

CRISPRはファージやプラスミドに対する獲得免疫機構として機能していることが判明したDNA領域で、同一のリピート配列の間に異なったスペーサー配列がはさまれている。このスペーサー配列と同じ配列を持つファージなどの侵入を妨げるとされている。GASではゲノム内にファージが挿入されていて、このファージ領域に多くの病原性因子が存在している。すなわちファージを選択的に取り込むことにより進化してきた菌種であるといえる。表2から、ヒト由来SDSEはGAS以上にスペーサーの数が多く、ファージをより積極的に取り込み進化してきたことをうかがわせる。しかし、ブタ由来SDSEはCRISPRは認められず、侵入してきた外来性遺伝子は少なかったことをうかがわせる。

このことはブタ由来株がファージの侵入を受けなかったことを示しているわけではなく、ヒト由来株に較べ少なかったであろうことが推測できる。たとえばL1株ではファージ領域と認められる領域がゲノム上に



少なくとも6カ所認められる。そのうちの1つは、integrative and conjugative element (ICE) と呼ばれる部位でGBSの持つICEときわめて相同性があった。この配列はヒト由来 GGS\_124およびRE378株では認められないが、ブタ由来株のV21株あるいは601株では相同性のある領域があった。

#### 4. ブタ由来 SDSE 株とヒト由来 SDSE 株との異同について

昨年報告したように、ブタ由来L1株では、代表的な病原性因子であるMタンパクや溶血性因子のストレプトリジンAは保有するものの、ストレプトリジンO、ストレプトキナーゼ、C5aペプチダーゼを欠いている(表3)。ヒト由来株では臨床分離株では調べた限りこれらの遺伝子は例外なく保持していた。ブタ由来株11菌株(表3では一部のみ記載)のうち9株はL1株と同様にストレプトリジンA以外を持たず、このうち8株は*emm*型が*stL2764.0*株であった(1株は決定不能)。残りの2株のPAGU656、PAGU657株はヒト由来株と同じであり、*emm*型もヒト由来株からも検出される*stC74a*および*stC6979.0*であった。

近年、組換えや修復に関与する*recN*遺伝子は、16S rRNA遺伝子、*sodA*、*groEL*、あるいは*gyrB*などに比較すると菌種間での類似性が低く(平均66.6%)、同定や系統的解析に向いているとされる。そこで、Genbankデータベースに登録されているSDSE(CIP105120)とSDSD(CIP102914)の*recN*遺伝子を比較し、配列の異なっている部分を用いて、SDSEおよびSDSDのそれぞれの*recN*遺伝子に特異的なプライマーを作成した。SDSEに配列を元に作成したプライマーで増幅できたものをSDSE type、SDSDによるものをSDSD typeとし、表3に示した。収集菌株の*recN* typeは、PAGU656およびPAGU657のみSDSE typeと判別され、他の9株は、菌種としてはSDSEにも関わらずSDSD typeと判別された。昨年度報告

した*emm* typeと同様にブタ由来SDSEは、同じSDSEという菌種であるにもかかわらず、ヒト由来株とは大きく異なることが示された。

#### 5. CDS アミノ酸配列の比較

ゲノム全体のCDSをアミノ酸配列で比較して系統樹を描いたものが図3であるが、ブタ由来SDSEはよりGASに近くヒトSDSEの先祖型であることをうかがわせる。SDSEはGASと一番近い距離の近縁の菌種であり、GASのような病原性を持つことは不思議ではない。

#### D. 考察と結論

図4はゲノム解析からみたSDSEと他のレンサ球菌属との進化の推定図である。

はるか遠い昔、レンサ球菌は共通の祖先から出発し、宿主や環境に適応しながら進化してきたと想像される。GASとSDSEは他の菌種に較べ長い間共通の進化をしてきたものの、GASはファージなどから多くの病原性因子を獲得しヒトに適応してきたと推測される。またヒト由来SDSEは、元々動物に存在してきたSDSEが、GASと類似の病原性遺伝子の水平伝播を近年受けて、今日のような侵襲性の病像を示すような病原菌になったと思われる。ブタ由来株はその過程において、取り残されたままで動物に存在していて、ヒト由来株ほど選択圧がなかったのではないかと推測される。

ファージによる遺伝子伝達は、肺炎球菌や黄色ブドウ球菌などのグラム陽性球菌では古くから知られたことだが、このようにしてこれからも多くの細菌は進化していくと思われる。その意味でSDSEのゲノム解析は、ヒトに棲息する細菌の進化(病原性獲得)の過程を追うのに良いモデルとなる。

最後に、毎年申し上げることではあるが、SDSEはゲノム上からもGASと変わらぬ病原性因子を持つにも関わらず、その侵襲性疾

患者を正確に捉えている医療関係者は現時点でも少なく、また菌自体の知名度も低いことは憂慮すべきことであり、今後も啓蒙活動の必要性があることを強調したい。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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: 17.2.
- 2) 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.
- 3) 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.
- 4) 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. 2011 Jun; 17(3): 334-40.
- 5) Hasegawa M, Okada T, Sakata H, Nakayama E, Fuchigami T, Inamo Y, Mugishima H, Tajima T, Iwata S, Morozumi M, **Ubukata K**, Watanabe H, Takahashi T. Pandemic (H1N1) 2009-associated pneumonia in children, Japan. Emerg Infect Dis. 2011 Feb; 17(2): 279-82.
- 6) Kishii K, Morozumi M, Chiba N, Ono A, **Ubukata K**. Direct detection by real-time PCR of *ftsI* gene mutations affecting MICs of  $\beta$ -lactam agents for *Haemophilus influenzae* isolates from meningitis. J Infect Chemother. 2011 Oct; 17(5): 671-7.
- 7) **Ubukata K**, Sunaoshi K, Kobayashi R, Okuzumi K. [Large scale questionnaire surveillance concerning invasive infections group C and G Streptococci]. Kansenshogaku Zasshi. 2010 Sep; 84(5 Suppl 1): 7-14.
- 8) Yoshida H, Matsui H, Murayama SY, Takada Y, Matsuo K, Takahashi T, Nakamura M, **Ubukata K**, Takahashi T. A CD46 transgenic mouse model for studying the histopathology of arthritis caused by subcutaneous infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*. J Med Microbiol. 2011 Dec;60(Pt 12):1860-8.
- 9) Chiba N, Morozumi M, **Ubukata K**. Application of the Real-Time PCR Method for Genotypic Identification of  $\beta$ -Lactam Resistance in Isolates from Invasive Pneumococcal Diseases. Microb Drug Resist. 2011 Oct 26.

### 2. 学会発表

- 1) Murayama SY, Sunaoshi K, Miyoshi-Akiyama T, Shimomura Y, Kirikae T, **Ubukata K**, Sunakawa K. Complete genome sequence of *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* strain RE378 isolated from patient with invasive infection. 109<sup>th</sup> ASM General Meeting (Philadelphia, USA), 2009.5.17-21
- 2) Miyoshi-Akiyama T, Okumura K, Shimomura Y, Murayama SY, Yagi J, **Ubukata K**, Kirikae T. Origin of

streptococcal superantigens based on mass genome comparison among *Streptococcus pyogenes* and *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis*. 109<sup>th</sup> ASM General Meeting (Philadelphia, USA), 2009.5.17-21

- 3) 岡田圭祐, 村山琮明, 生方公子. ヒト侵襲性感染症および動物由来 *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性に関与する遺伝子領域の解析. 第58回日本感染症学会東日本地方学会・第56回日本化学療法学会東日本支部総会(東京), 2009.10.30
- 4) 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(東京), 2010.1.31

- 5) 岡田圭祐, 村山琮明, 砂押克彦, 生方公子. ヒト侵襲性感染症およびブタ由来 *S. dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の病原性に関与する遺伝子領域の解析. 第56回日本化学療法学会東日本支部総会, 共催シンポジウム(東京), 2009.10.30
- 6) 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(横浜), 2010.3.27-29

#### F. 知的財産権の出願・登録状況

なし

表 1 pyogenic group レンサ球菌のゲノム概要

Species	Strain	Serotype <i>emm</i> type	Genbank ID	Length (nt)	Completed	CDS	GC content
SDSE	GG5_124	<i>stG480.0</i>	AP010935	2,106,340	2009/7/7	2095	39.6%
	RE378	<i>stG6792.3</i>	AP011114	2,151,145	2009/3/30	2006	39.5%
	L1	<i>stL2764.0</i>	AP011625	2,206,284	2010/1/26	2389	39.5%
	ATCC 12394	<i>stG166b.0</i>	CP002215	2,159,491	2011/3/29	2056	39.5%
SDSD	ATCC 27957	<i>emm6.32</i>	CM001076	2,141,837	2011/2/9	2107	39.4%
SESE	4047		FM204883	2,253,793	2009/3/26	2001	41.3%
SESZ	H70		FM204884	2,149,868	2009/3/26	1869	41.5%
	MGCS10565		CP001129	2,024,171	2008/8/12	1893	41.8%
	ATCC35246		CP002904	2,167,264	2011/9/20	2087	41.6%
GAS	SF370	M1	AE004092	1,852,441	2001/9/19	1696	38.5%
	SSI-1	M3	BA000034	1,894,275	2003/3/10	1859	38.6%
	MGAS10750	M4	CP000262	1,937,111	2006/5/9	1979	38.3%
	MGAS2096	M12	CP000261	1,860,355	2006/5/9	1898	38.7%
	MGAS9429	M12	CP000259	1,836,467	2006/5/9	1877	38.5%
	MGAS5005	M1	CP000017	1,838,554	2005/8/8	1865	38.5%
	MGAS10394	M6	CP000003	1,899,877	2004/8/3	1886	38.7%
	MGAS315	<i>emm3.1</i>	AE014074	1,900,521	2002/7/18	1865	38.6%
	Manfredo	M5	AM295007	1,841,271	2007/2/5	1745	38.6%
	MGAS6180	M18	CP000056	1,897,573	2005/8/8	1894	38.4%
	NZ131	<i>emm49</i>	CP000829	1,815,785	2008/10/16	1700	38.6%
	MGAS10270	M2	CP000260	1,928,252	2006/5/9	1986	38.4%
	MGAS8232	M18	AE009949	1,895,017	2002/1/31	1839	38.5%
	Alab49	<i>emm49</i>	CP003068	1,827,308	2011/10/7	1773	38.6%
	GBS)	A909C	Ia	CP000114	2,127,839	2005/10/3	1996
NEM316		III	AL732656	2,211,485	2002/11/15	2094	35.6%
2603V/R		V	AE009948	2,160,267	2002/8/28	2124	35.6%
<i>S. uberis</i>	0140J		AM946015	1,852,352	2009/1/28	1762	36.6%
<i>S. parauberis</i>	KCTC 11537		CP002471	2,143,887	2011/11/14	1868	35.5%

ゲノム概要は、配列が完全に決まったもののみを記した。

SDSE; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, SDSD; *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *dysgalactiae*, SESE; *Streptococcus equi* subsp. *equi*, SESZ; *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, GAS; *Streptococcus pyogenes*, GBS, *S. agalactiae*



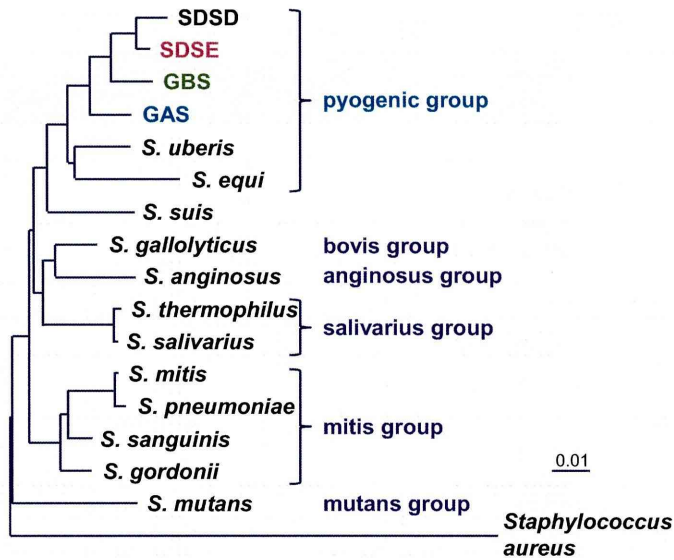


図1 16S rRNA 遺伝子の配列に基づいた系統樹

		SDSE														GAS	
	Species	sdd	378	L1	sde	124	sez	sga	sgo	smb	spn	spy	ssa	ssu	ste	sub	
san	GBS NEM316	62	62	64	62	57	56	54	51	54	53	60	52	52	57	58	
sdd	SDSD ATCC27957	*	84	89	84	79	69	60	58	56	59	78	58	59	61	67	
378	SDSE RE378		*	86	85	82	68	57	57	47	57	79	57	56	61	66	
L1	SDSE L1			*	87	83	72	60	59	54	59	81	58	59	63	68	
sde	SDSE ATCC12394				*	81	69	59	58	43	58	79	58	56	62	66	
124	SDSE GGS_124					*	61	52	50	42	51	72	51	50	55	60	
sez	SESZ MGCS10565						*	54	51	48	53	66	52	52	56	61	
sga	<i>S. gallolyticus</i> UCN34							*	50	51	50	56	51	51	57	54	
sgo	<i>S. gordonii</i> Challis								*	58	58	54	64	52	54	52	
smb	<i>S. mitis</i> B6									*	71	56	59	55	56	54	
spn	<i>S. pneumoniae</i> TIGR4										*	55	58	54	56	53	
spy	GAS SF370											*	55	55	59	63	
ssa	<i>S. sanguinis</i> SK36												*	53	56	53	
ssu	<i>S. suis</i> 05ZYH33													*	54	53	
ste	<i>S. thermophilus</i> LMD-9														*	58	
sub	<i>S. uberis</i> 0140J															*	

図2 オルソログ遺伝子の相同性の平均(%)

>81%をピンクで,>61~<80%を黄色,<60%を水色で表した。

Microbial Genome Database for Comparative Analysis (MBGD)

Uchiyama I, Nucleic Acids Res. 35, D343-D346, 2007.

表2 主な *Streptococcus* 属の CRISPRs

菌種	由来	菌株名	No. of CRISPR	リポート		スペーサー (min-max) (bp)
				No.	Size (bp)	
SDSE	ヒト	GGS_124	1	18	36	30 (30-32)
		RE378	2	7	36	30
				13	32	35 (33-38)
		ATCC12394	2	26	36	30 (29-31)
	ブタ	L1	0			
SDSD	ウシ	ATCC27957	0			
GAS	ヒト	SF370	2	7	36	30
				4	32	34 (33-35)
		NZ131	2	5	36	30 (30-31)
				6	32	35 (33-35)
GBS	ヒト	NEM316	1	14	36	30
		2603V/R	1	25	36	30 (29-31)
		A909	1	15	36	30 (29-31)
<i>S. uberis</i>	ウシ	0140J	0			
SESE	ウマ	4047	0			
SESZ	ウマ	H70	1	19	32	34 (33-37)
	ヒト	MGCS10565	2	10	32	35 (33-35)
				18	36	30

表3 ヒトおよびブタ由来 SDSE の病原性遺伝子の比較

菌種 由来	GAS	SDSE								SDSD
	ヒト	ヒト	ブタ						ブタ	
菌株名	SF370	RE378	PAGU 656	PAGU 657	L1	V21	601	PAGU 787	PAGU 699	603
<i>emm</i> 型	<i>emm1</i>	<i>stG</i> 6792.3	<i>stC</i> 74a	<i>stC</i> 6979.0	<i>stL2764.0</i>				-	-
ストレプトリジン A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
ストレプトリジン O	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
ストレプトキナーゼ	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
C5a ペプチダーゼ	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>recN</i> 型		SDSE	SDSE	SDSE	SDSD	SDSD	SDSD	SDSD	SDSD	SDSD
23S rRNA	GAS	SDSE								SDSD

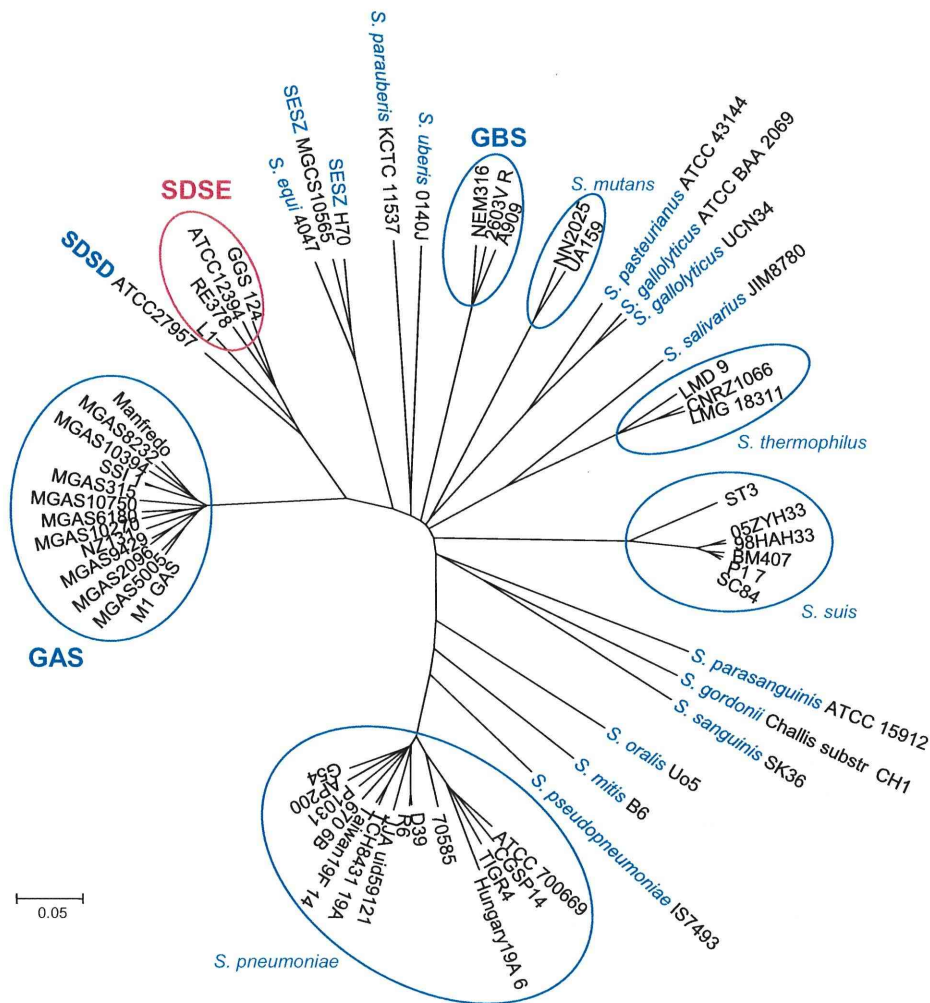


図3 CDS アミノ酸配列による *Streptococcus* 属ゲノムの比較  
 CVTree (<http://tlife.fudan.edu.cn/cvtree/>) により解析

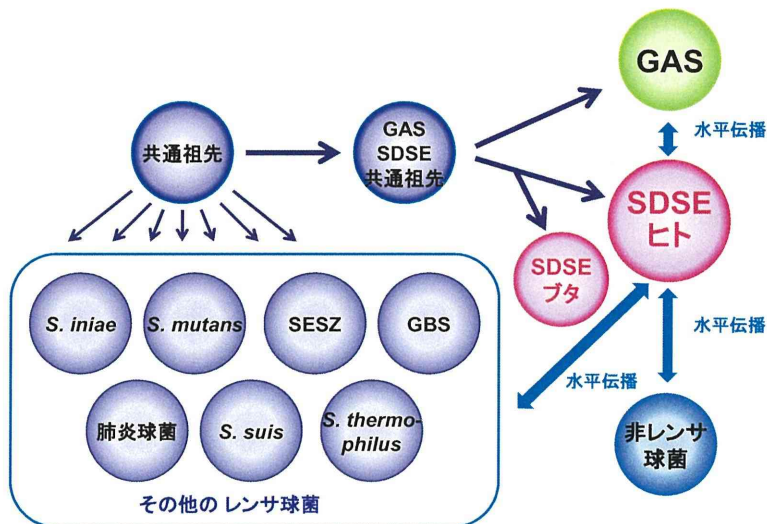


図4 SDSE と他の *Streptococcus* 属菌種の進化 (推定図)

## 分担研究報告書

### 劇症型溶血性レンサ球菌感染症発症における宿主要因の解析

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、病態における宿主因子の役割を探索する目的で、劇症型 A 群レンサ球菌感染症患者血清および、劇症型感染マウスモデルの血清においてインターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 産生が高い濃度で認められ、このサイトカインが病態あるいは予後に関わる可能性がある可能性が示唆された。本年度の研究で、劇症型感染動物モデルにおいて認められるこの早期の IFN- $\gamma$  産生が、従来考えられてきたレンサ球菌スーパー抗原で活性化された T 細胞から産生されるのではなく、新規に見いだされた骨髄系細胞から生じることが明らかとなった。さらに、この細胞群は劇症型感染に対して防御的に働くことが判明した。以上より、重篤な劇症型レンサ球菌感染で産生される宿主防御に係るサイトカインとその産生細胞が明らかとなり、今後、その詳細な機序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。集団発症が極めてまれで、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。これまでの研究で、本邦において、診断基準に基づいて診断された劇症型A群レンサ球菌感染症患者20名から採取された血清中のサイトカインを測定した結果、インターフェロン- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) が産生される主要なサイトカインであることが判明した。また、ヒトで得られた知見を確認する目的で、劇症感染患者より分離された *S. pyogenes* 株のマウス感染モデルおよび非劇症感染患者分離株をそれぞれマウスに感染させ、血清中のサイトカイン発現パターン

を解析したところ、ヒトと同様のサイトカイン発現パターンを示し、IFN- $\gamma$  が病態あるいは予後に関わる可能性がある因子であることが判明した。そのため、その役割および産生細胞を本研究で同定し、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. 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群レンサ球菌の生育に



は、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地(Becton, Dickinson and Company社)、液体培地としてTodd Hewitt Broth(Becton, Dickinson and Company社)を用いた。

## 2. 劇症型感染マウスモデルとサイトカイン濃度の測定

C3H/HeN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 $3 \times 10^7$ cfuの*emm3*型*S. pyogenes* 劇症型感染臨床分離株(NIH34)、および咽頭炎分離株(K33)を腹腔注射にて感染させ、系時的に致死率、血清中のサイトカイン濃度をFlowCytoplex (eBioscience社)とフローサイトメトリーFACS Calibur(Becton, Dickinson and Company社)を用いて測定した。

## 3. 劇症型感染マウスモデルにおけるIFN- $\gamma$ 産生細胞の同定

マウス感染後42時間後にモネンシン100  $\mu$ g (Sigma社)を投与し、その6時間後に各臓器を取り出して細胞表面マーカーに対する抗体、およびアロフィコシアニン標識抗IFN- $\gamma$ 抗体(eBioscience社)で染色した後、フローサイトメトリーで解析した。

## 4. IFN- $\gamma$ 産生細胞の感染マウスへの移入

感染48時間後のマウス脾臓細胞を細胞表面マーカーに対する抗体で染色後、産生細胞分画をフローサイトメトリーFACS Aria (Becton, Dickinson and Company社)を用いて精製した。 $3 \times 10^6$ 個のIFN- $\gamma$ 産生細胞またはIFN- $\gamma$  10  $\mu$ gを、レシピエントマウスの静脈内に移入後、レシピエントマウスに*S. pyogenes* NIH34劇症型分離株を致死感染させ、経時的に死亡率の測定を行った。また、血液中の生菌数は、感染24時間後のマウス血液20  $\mu$ Lを羊血液寒天培地上(Becton, Dickinson and Company社)で培養し、得られたコロニーを数えることによって評価した。

## (倫理面への配慮)

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

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が関与していることが示唆されてきたが、その詳細は未だ不明である。しかし、散発的に発生する患者臨床検体を用いた詳細な解析は困難である。そのため、劇症型レンサ球菌感染症マウスモデルを作成して、一度に多数のサイトカイン濃度を測定できるFlowCytoplexを用いて、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、非劇症型感染分離株の感染では、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、感染36時間後よりIFN- $\gamma$ 血中濃度が上昇し、他のサイトカインの産生上昇はほとんど認められないというパターンが認められた(図1)。以上の結果からIFN- $\gamma$ が劇症型感染における宿主要因である可能性が示唆された。

次に、IFN- $\gamma$ 産生細胞を同定するため、感染マウスの脾臓より細胞を単離し、各細胞分画特異的マーカーと細胞内IFN- $\gamma$ を染色し、フローサイトメトリーで解析した。その結果、劇症型感染マウスにおけるIFN- $\gamma$ 産生は、これまで主要なIFN- $\gamma$ 産生細胞と考えられてきた、T細胞、NK細胞、NKT細胞からは全く認められず、顆粒球マーカーであるGr-1 (Ly-6G)と単球マーカーであるF4/80を共発現する新規骨髄系細胞から産生されることが判明した(図2)。

この新規細胞亜群が生体内で果たす役割を解析するために、感染マウスから精製したIFN- $\gamma$ 産生骨髄系細胞、またはIFN- $\gamma$ をマウスに投与し、直ちに劇症型感染分離株を致死感染させ、感染経過と血液中の菌数

を解析した。その結果、IFN- $\gamma$  産生細胞、およびIFN- $\gamma$  の投与により、感染24時間後のマウス血液中の菌数は有意に低下し、IFN- $\gamma$  が、菌のクリアランスに有効な因子であることが判明した。IFN- $\gamma$  産生細胞移入マウスは、致死感染に対して全例が生存したのに対して、IFN- $\gamma$  投与マウスは、感染に対して生存率の延長を認めなかった(図3)。以上のことから、IFN- $\gamma$  産生細胞は劇症型感染に対して防御的に働くのに対し、IFN- $\gamma$  投与は、菌数を低下させることができるが、感染宿主の生存を延長できないことが明らかになった。

#### D. 考察

劇症型レンサ球菌感染症の発症および予後に関与する宿主因子として、免疫不全などのリスク要因とは別に、特定のヒト主要組織適合抗原の関与が指摘されている。また、劇症型感染に伴う激しい炎症(全身性炎症反応性症候群: SIRS)の誘因物質として、炎症性サイトカイン、特にTNF- $\alpha$ 、IL-1が高値になるという報告がある。事実、いくつかの劇症型感染症例報告においては、劇症型レンサ球菌感染症の臨床経過中に感染局所や血清中のTNF- $\alpha$ 、IL-1濃度の上昇が認められ、劇症型レンサ球菌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、TNF- $\alpha$  およびIL-1の上昇は他の敗血症の報告と比較して、ほとんど認められないことから、これまでの既報告とは異なり、TNF- $\alpha$  やIL-1の病態への影響は少ないということが示唆された。一方、IFN- $\gamma$  は炎症細胞を活性化させる機能があり、そのレンサ球菌感染症関与については、*S. pyogenes*の産生する種々のスーパー抗原が、T細胞を抗原非特異的に活性化させるため起こり、患者にはショックを誘導することで悪影響を及ぼすということが通説であった。本研究で、

感染早期における主要なIFN- $\gamma$  産生細胞が、好中球と単球の両方の表面マーカーを発現する未熟骨髄由来細胞であること、かつ、これらの細胞から産生されるIFN- $\gamma$  が、劇症型感染において宿主防御因子として働いている可能性が示唆された。しかし、IFN- $\gamma$  のみの投与では、感染を改善することはできるが宿主の生存には効果がないことから、この細胞が感染局所において制御されたIFN- $\gamma$  産生を行い、食細胞の活性化を担っているか、別な防御因子の産生を介して宿主防御に貢献している可能性がある。今後、更なる防御分子機構を解析するとともに、実際の劇症型レンサ球菌感染症患者における同様の細胞を探索して、当感染症の防御因子の同定と新規治療法に役立つ知見の蓄積を目指す。

#### E. 結論

劇症型レンサ球菌感染症マウスで、IFN- $\gamma$  産生の著しい上昇が認められた。この感染早期におけるIFN- $\gamma$  産生細胞は、好中球と単球の両者の性質を持つ新規未熟骨髄系細胞であり、この移入によって生存率の改善を認めることから、この細胞が劇症型感染に対する防御因子であることが示唆された。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Matsumura T, **Ato M**, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections. *Nature Communications*. 2012 Feb; 3: 678.

##### 2. 学会発表

- 1) **阿戸 学**, 松村隆之, 池辺忠義, 大西真, 渡邊治雄, 小林和夫. 劇症型レンサ



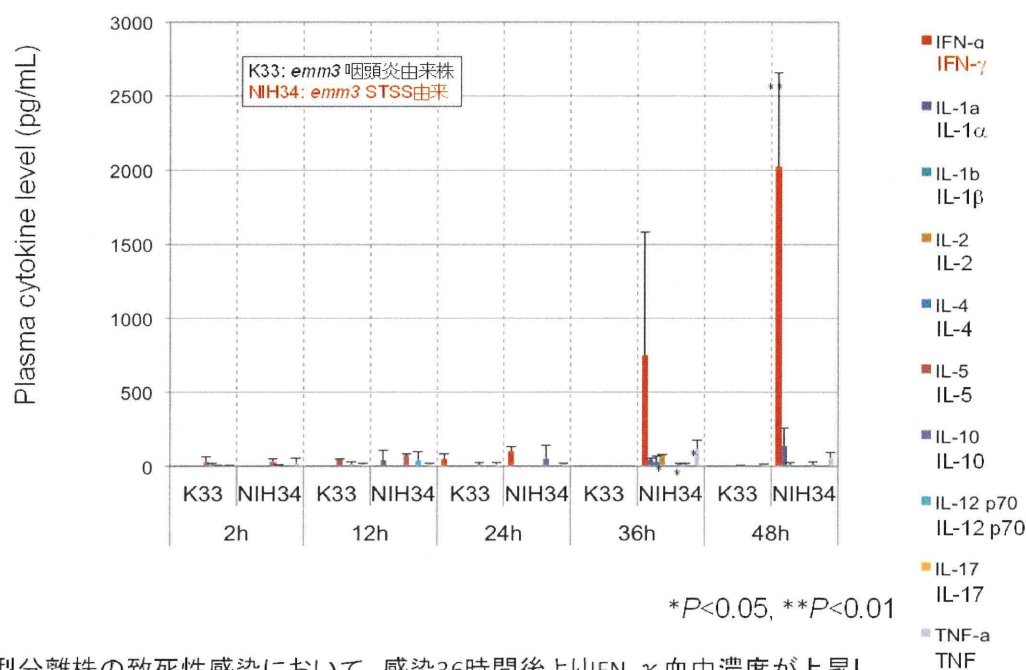
球菌感染症分離株による好中球ネクロシス誘導分子機構. 感染症若手フォーラム(長崎), 2012.2

- 2) Matsumura T., Kobayashi K., **Ato M.** IFN- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections in mice. 第40回日本免疫学会学術集会(千葉), 2011.12
- 3) **Ato M.** Regulatory genes of multiple virulence factors involved in severe invasive group A streptococcus infection. Singapore-Japan Joint Forum in Emerging Concepts in Microbiology (Singapore), 2011.11
- 4) **Ato M.**, Ikebe T, Matsumura T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Contact with group A *Streptococcus* isolated from severe invasive infections induces rapid necrosis of human neutrophils. International Union of

Microbiological Societies Congresses (札幌), 2011.9

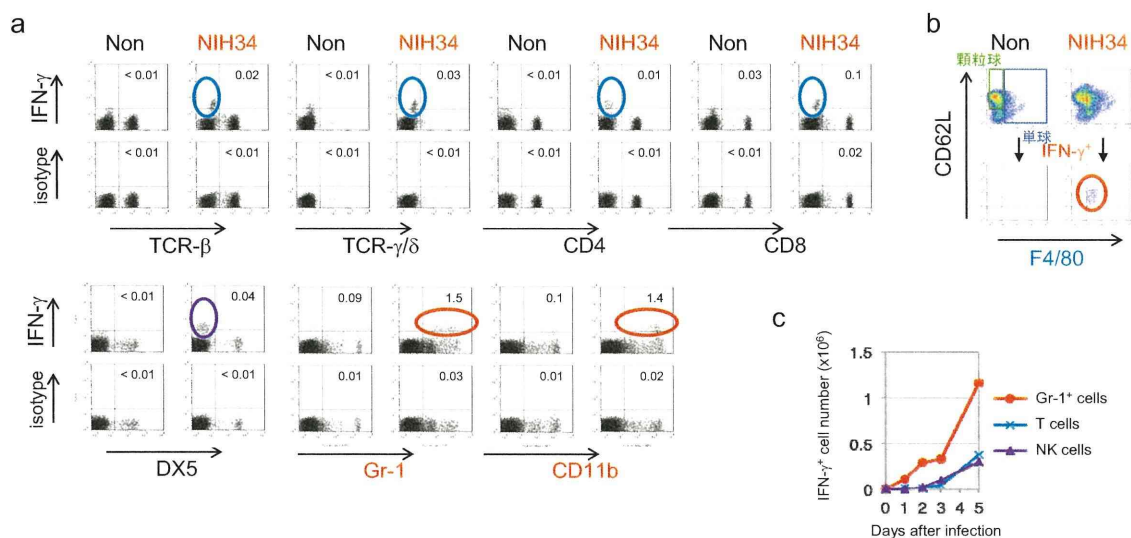
- 5) Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, **Ato M.** The protective role of a novel population of IFN-g-producing cells in severe invasive group A streptococcal infections. XVIII Lancefield International Symposium (Palermo, Italy), 2011.9
- 6) Matsumura T, Ikebe T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, **Ato M.** A novel IFN-g-producing subpopulations of immature myeloid cells confers protection from severe invasive group A *Streptococcus* infections. 19th International Symposium on Molecular Cell Biology of Macrophages (泉佐野), 2011.5

#### G. 知的財産権の出願・登録状況 なし



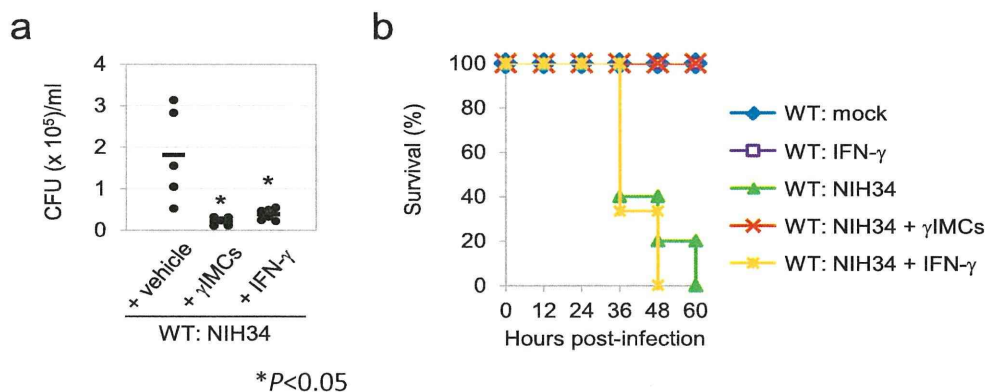
劇症型分離株の致死性感染において、感染36時間後よりIFN- $\gamma$ 血中濃度が上昇し、他のサイトカインの産生上昇はほとんど認められない。

図1 劇症型レンサ球菌感染マウスモデルにおける血漿中サイトカイン濃度



a. 感染後2日の脾臓におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞。T細胞、NK細胞マーカーを発現しない骨髄系細胞である。  
 b. IFN- $\gamma$ 産生細胞は、単球マーカーと顆粒球マーカーを発現する新規細胞群である。  
 c. 感染経過中の脾臓内IFN- $\gamma$ 産生細胞の種類と細胞数。IFN- $\gamma$ 産生T細胞やNK細胞が感染後期に出現するのに対し、骨髄系細胞は早期から出現し、細胞数も多いことがわかる。

図2 劇症型レンサ球菌感染マウス脾臓におけるIFN- $\gamma$ 産生細胞の同定



IFN- $\gamma$ 投与またはIFN- $\gamma$ 産生細胞の劇症型感染マウス移入におけるa.血液中菌数およびb.移入マウスの生存曲線。IFN- $\gamma$ 産生細胞は劇症型感染を改善するが、IFN- $\gamma$ の投与は菌数を減少させるものの、生存率の改善は認められない。

図3 IFN- $\gamma$ 産生の劇症型レンサ球菌感染に対する保護的役割



## 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、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の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臨床分離株において、*csrR/csrS* 遺伝子以外に、*rgg* 遺伝子のような毒素遺伝子の発現を負に制御する制御因子に変異が起きており、この変異は、劇症型溶血性レンサ球菌感染症臨床分離株の約 45% でみられた。一方、咽頭炎などの非侵襲性感染臨床分離株では、1.7% しかこれら遺伝子に変異が見られなかった。劇症型感染症患者分離株のうち、ムコイド型のコロニーを形成するものがある。多くは、*csrS/csrR* 遺伝子に変異が見られる。しかしながら、一部の株において、*csrS/csrR* 遺伝子に変異がないが、ムコイド型のコロニーを形成するものが存在する。このうち、1 株において転写制御因子である *rocA* 遺伝子に変異があるものを見いだした。この変異株は、好中球の遊走能を阻害し、また、好中球殺傷能を増大することが明らかとなった。

#### A. 研究目的

劇症型溶血性レンサ球菌感染症は、発病からの病状の進行が急激かつ劇的で、死に至る可能性の高いことが知られている。その主な原因菌は、A群レンサ球菌である *Streptococcus pyogenes* であり、小児に咽頭炎などを引き起こすありふれた病原体である。最近の我々の研究(Ikebe et al., 2010)で、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において、病原因子の発現を抑制している制御因子(*CsrS/CsrR*, *Rgg*)をコードする遺伝子に変異が見られ、この変異により、好中球の機能障害を引き起こし、劇症型溶血性レンサ球菌感染症の様な重篤な症状を引き起こすことを見いだした。しかしながら、我々は、これらの変異がなくても、好中球に障害を与える劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株が存在することを見いだした。その臨

床分離株は、ムコイドといわれる粘液状のコロニーを形成していた。本研究では、ムコイドとなった株の原因遺伝子を解明し、劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株にどのくらいの頻度この原因遺伝子に変異があるか調べることを目的とした。

#### 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群レンサ球菌の生育

には、固形培地としてコロンビア5%羊血液寒天培地 (Becton Dickinson), 液体培地としてTodd Hewitt Broth (Becton Dickinson) を用いた。スペクチノマイシンは, sigmaより購入し, 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で使用した。

## 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)に懸濁後, 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

Applied Biosystems 3130xl 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 (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* (tattcgcttagaaaataaaacagg)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。

## 5. 好中球遊走試験

*S. pyogenes*  $3 \times 10^6$ cfuを, 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, また, 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 (Becton Dickinson社)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。

## 6. *rocA*遺伝子の塩基配列の決定

*rocA*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.11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, 執り行われた。

## C. 研究結果

### 1. コロニー形態の観察

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株のうち約47%の株に*csrS/csrR*, あるいは*rgg*遺伝子に変異が見られた。これらの多くは, *emm3*, *emm28*, *emm49*などの型で, それぞれの型で約80%の株で見られた。しかしながら, 最も分離頻度の高い*emm1*型では, 約40%の株でしか変異が見られなかった。そこで, *csrS/csrR*変異株で見られるムコイド型コロニーに注目してコロニー形態を調べた結果, 3株において*csrS/csrR*遺伝子に変異がないにもかかわらず, ムコイド型のコロニーを形成するものが存在した。

### 2. 好中球への影響

*csrS/csrR*制御系へ影響を与えるならば, 最近の我々の研究(Ikebe et al., 2010)で見られたような好中球の遊走能を阻害することや好中球を殺傷することが考えられる。好中球の遊走能阻害実験を行った。その結果, 3株とも, 遊走能の強い阻害が認められた(図1)。また, 好中球への殺傷能を調べた結果, 3株とも, 好中球を強く殺傷することが明らかとなった(図2)。このことから, これら3株は, 少な

くとも莢膜多糖の合成系, 好中球遊走阻害, 好中球殺傷に影響を与えていることが明らかとなった。

### 3. 責任遺伝子の同定

Biswas and Scott (2003) はトランスポゾンによるランダムミュータジェネシスにより少なくとも4つの遺伝子のいずれかの変異でムコイド株になることを見いだした。ムコイド株を示した3株について, これら4つの遺伝子の塩基配列を決定した結果, 1株において, *rocA* 遺伝子に変異があることが判明した。この株の変異部位は, 開始コドンのAを1とした場合の379番目のTが欠失していた。この1塩基が欠失したことにより, このムコイド株はRocAのC末側が欠失したものになった。次に, *rocA* 遺伝子が責任遺伝子であるか調べた。非侵襲性感染患者分離株の*rocA*を破壊した結果, ムコイド型コロニーを形成し, 好中球の機能障害を引き起こした(図3, 4)。また, *rocA*変異を持った劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株にインタクトの*rocA* 遺伝子を導入した結果, 非侵襲性患者分離株同様ムコイド株ではなくなり, 好中球の機能障害が減少した(図3, 4)。このことから, *rocA* 遺伝子の変異が原因であることが証明された。しかしながら, 残りの2株は, 4つの遺伝子はインタクトであった。

### D. 考察

*csrS/csrR*制御系は, 直接, 莢膜多糖の合成系等の病原性遺伝子を負に制御することが知られている。3株とも, *csrS/csrR*変異株と同様, ムコイド型を示し, 好中球の機能障害を起こすことから, *rocA* 遺伝子を含む上記の3株の変異遺伝子は, *csrS/csrR* 遺伝子の発現に何らかの影響を与えていることが考えられる。今回見いだした*rocA* 遺伝子は, *csrR* 遺伝子の発現を正に制御する発現制御因子として同定された。残りの株についても, 同様の

phenotypeを示すことから, *csrS/csrR*二成分制御系に直接的, あるいは, 間接的に影響を与えていることが考えられる。これらの2株の変異部位の同定, および, *csrS/csrR*, *rocA*との関連性については, 今後の課題である。

### E. 結論

劇症型溶血性レンサ球菌感染症患者分離株において, 新たに*rocA* 遺伝子に変異がある株を見いだした。この株は, 莢膜多糖を大量産生し, 好中球の機能障害を引き起こすことが判明した。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Matsumura T, Ato M, **Ikebe T**, Ohnishi M, Watanabe H, Kazuo Kobayashi. Interferon- $\gamma$ -producing immature myeloid cells confer protection against severe invasive group A *Streptococcus* infections. Nat. Commun. 2012; 3: 678 doi: 10.1038/ncomms1677.

#### 2. 学会発表

- 1) **池辺忠義**. 溶血性レンサ球菌による劇症型感染症の細菌学的解析. 平成23年度第21回学会賞受賞者特別講演会(東京), 2012.1.27
- 2) **池辺忠義**. 劇症型A群レンサ球菌感染症臨床分離株における遺伝子発現制御因子の変異. 第94回日本細菌学会関東支部総会-若手対象ワークショップ:細菌学の新たな潮流-(東京), 2011.10.6-7.
- 3) **池辺忠義**, 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, 大西真, 渡邊治雄. 劇症型溶血性レンサ球菌感染症分離株でみられたクリンダマイシン耐性株の増加. 第20回Lancefieldレンサ球菌研究会および第43回レンサ球菌感染症研究会合同学会(愛知), 2011.6.17-18
- 4) **Ikebe T**, Katsukawa C, Ohya H, Suzuki R,

- Oguro Y, Tominaga K, Shima T, Isobe J, Ogata K, Okuno R, Fujimoto T, Tada Y, Okabe N, Ohnishi M, Watanabe H, The Working Group for  $\beta$ -hemolytic Streptococci in Japan. Molecular Epidemiology of group A *Streptococcus* isolated from patients with severe invasive infections in Japan during 2004–2010. XVIII Lancefield International Symposium (Italy, Palermo), 2011 September 4–8
- 5) Matsumura T, **Ikebe T**, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. The protective role of a novel population of interferon- $\gamma$  producing cells in severe invasive Group A streptococcal infections. XVIII Lancefield International Symposium (Italy, Palermo), 2011 September 4–8
- 6) Ato M, **Ikebe T**, Matsumura T, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K. Contact with group A *Streptococcus* isolated from severe invasive infections induces rapid necrosis of human neutrophils. International Union of Microbiological Societies 2011 Congress (Sapporo), 2011 September 6–16
- 7) Matsumura T, **Ikebe T**, Ohnishi M, Watanabe H, Kobayashi K, Ato M. A novel interferon- $\gamma$ -producing subpopulations of immature myeloid cells confers protection from severe invasive group A *Streptococcus* infections. The Joint International Meeting of The 76<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Society for Interferon and Cytokine Research, and The 19<sup>th</sup> International Symposium of Macrophage Molecular and Cell Biology 2011 (Osaka), 2011 May 25–27
- 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**  
H23 (2011).4.22 北里柴三郎記念学術奨励賞受賞

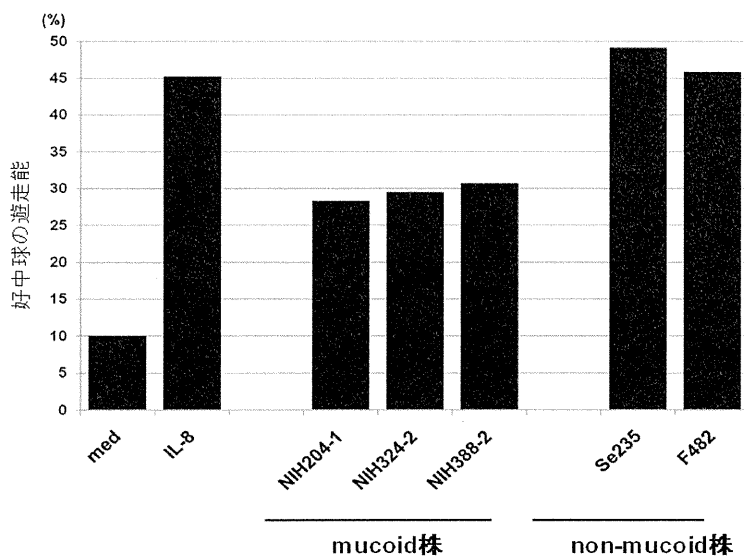


図1 mucoid株における好中球の遊走能阻害