

平成21年4月30日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2006～2008

課題番号：18591112

研究課題名（和文） 劇症型 A 群レンサ球菌感染症の発症メカニズムの解明

研究課題名（英文） The analysis of the mouse model for streptococcal toxic shock-like syndrome

研究代表者

楠原 浩一（KUSUHARA KOICHI）

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号：20243941

研究成果の概要：

A 群レンサ球菌を ddY マウスに筋注すると、感染の急性期から回復し、外見上は一旦健康を取り戻すにもかかわらず、約3週以降に敗血症や軟部組織壊死を伴って突然死亡し始める。研究代表者らはこの死を「遅延死 delayed death」と命名し、劇症型感染症の動物モデルであると考えた。

このモデルを解析した結果、遅延死の病態に最も深く関与しているのはサイトカインストームであることが示唆された。急性死の場合と異なり、炎症性サイトカインのみならず IL-10 に代表される抗炎症性サイトカインも増加しているのが特徴的で、これが免疫機能低下を引き起こし、莖膜発現菌の自由な増殖を許していると考えられた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	900,000	270,000	1,170,000
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,400,000	660,000	4,060,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学、小児科学

キーワード：小児感染症学

1. 研究開始当初の背景

劇症型 A 群レンサ球菌感染症（以下 STSS）は、1992 年以降、我が国でも症例の発生が相次いでいる。この特徴は、健康人が突然発症し、進行が早く、死亡率も 30～80% と非常に高いことである。その中には、レンサ球菌の先行感染が明らかでないこともあり、STSS は感染の急性期がそのまま増悪した病態ではない可能性が高いと考えられる。その発症メカニズムについては依然として不明な点が多く、動物モデルの作成とその解析が急務であった。

平成 12 年、我々は次のような現象を発見した。A 群レンサ球菌（＝化膿レンサ球菌

Streptococcus pyogenes）の臨床分離株 10^7 個を ddY マウスに腹腔内注射（i. p.）、静脈内注射（i. v.）すると、約 1 週間の急性期の期間中に多数のマウスが死亡する。ところが、筋注（i. m.）した場合には、感染の急性期から全てのマウスが回復し、外見上は一旦健康を取り戻すにもかかわらず、約 3 週間経過してそれ以降に突然死亡し始める（図 1 参照）。その後の細菌学的検索により、死亡したマウスの全身主要臓器には、化膿レンサ球菌が播種していることが明らかとなった。また、死亡した一部のマウスは、筋注部位からは離れた場所に軟部組織壊死をきたしていた（図 2 参照）。研究代表者らはこの死を「遅延死 delayed death」と名付けた。このマウスの

「遅延死」は、まさにヒトにおける STSS と酷似しており、これこそが STSS の動物モデルである、と考えた。(Saito M *et al.* *Microbiol Immunol*, 2001)

その後の研究で以下の事実が明らかとなった。

① 接種後感染局所にとどまっている菌が、感染 20 日頃より莢膜を発現して菌血症を起こし始める。

② ヒアルロン酸合成遺伝子 *hasA* をノックアウトした菌は、遅延死を起こさない。

(*Microbiol Immunol* 50:127-30, 2006)

③ 感染後 20 日目に筋組織を挫滅すると、遅延死が有意に早まる。しかし、10 日目に筋組織を挫滅した場合には差は認めない。

④ LPS (lipopolysaccharide) を投与するとマウスの劇症化を早める

⑤ 遅延死直前のマウスの血清中サイトカインを測定すると、急性期に死亡したマウスと比較して、TNF- α 、IFN- γ 、IL-10、IL-12p70 が 100 倍以上の差をもって有意に高値である。この結果はヒトの STSS における血清中サイトカインの動きと酷似している。

以上の事実から、STSS の病態として、何らかのトリガーによって発生した高サイトカイン血症で免疫が破綻し、感染局所に生存していた A 群レンサ球菌が莢膜を発現しながら増殖、全身播種し、サイトカインストームを引き起こして多臓器不全、ショックに至る、という仮説を立てた。

2. 研究の目的

我々の STSS 動物モデルにみられる「遅延死」の機序を明らかにすることで STSS の病態を解明し、有効な予防法、治療法を模索することである。

3. 研究の方法

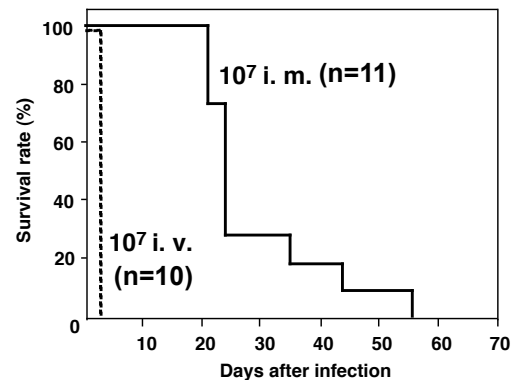
(1) LPS、ヒアルロン酸と遅延死との関係に関する解析

① 我々は、これまでの研究で LPS (lipopolysaccharide) を投与するとマウスの劇症化を早めることを明らかにした。そこで死亡直前の感染マウスの血清 LPS を測定し、LPS と遅延死との関係を調べた。

一方、ヒアルロン酸は A 群レンサ球菌の莢膜成分で、遅延死を引き起こすには必須のものであることを 2004 年に明らかにした。これは莢膜が食菌からエスケープすることが感染の成立には欠かせないためと考えられるが、ヒアルロン酸はヒトの結合組織中にも存在し、筋組織を挫滅することで遅延死が有意に早まることから、遅延死を起こす trigger となっている可能性もある。そこで死亡直前マウスの血清ヒアルロン酸を測定し、ヒアルロン酸と遅延死との関係を調べた。

感染マウスは、ddY マウスに溶連菌を 10^7 i.v. (10 匹)、i.m. (10 匹) した。【図 1】に示すような生存曲線が得られた。すなわち、i.v. では 2 日後に瀕死状態となったため、すべてこの日に採血を行った。i.m. では 21 日～56 日目に瀕死状態となり、死亡直前に採血を行った。

これらのマウス、ならびに溶連菌を感染させていないマウスの血清中 LPS 値を比濁時間分析法で、血清中ヒアルロン酸値を ELISA 法で測定した。



【図 1】

② ヒアルロン酸が LPS と同様に遅延死を誘導するか確認するため、次のような感染実験を行った。

溶連菌 10^7 CFU を ddY マウスに i.m. し、12 日後にヒアルロン酸 $4\mu\text{g}$ を i.v. して、遅延死が早まるかどうか、ヒアルロン酸を i.m. しないマウスと生存曲線を比較した。

これとは別に、ddY マウスにヒアルロン酸 $4\mu\text{g}$ をあらかじめ i.v. して翌日に溶連菌を i.m. し、死亡を誘導するかどうかを調べた。

(2) Toll-like receptor (TLR) 4 と遅延死との関係に関する解析

LPS、ヒアルロン酸ともに STSS の trigger になるとすれば、この両者は、TLR 4 のリガンドになりうるという共通点を有することになる。C3H/HeN とその TLR4 ノックアウトマウスである C3H/HeJ とを用いて感染実験 (溶連菌 5.6×10^7 CFU を i.m.) を行い、両者の遅延死の頻度に差がないか調べた。

(3) 遅延死マウスで見られる高サイトカイン血症に関する解析 (特に TNF- α の影響について)

遅延死マウスで高サイトカイン血症が見られるが、病態を考える上でサイトカインの値が上昇し始めるのは感染後何日目頃からであるか明らかにする必要がある。サイトカインの中でも特に TNF- α はショックの病態

に強く関与していることが知られている。我々の遅延死マウスではショックに類似した状態に陥ることより、TNF- α の関与は最も重要と考えられる。そこで、高 TNF- α 血症の起こる時期、ならびに TNF- α と遅延死との関連を明らかにするため、以下の実験を行った。

① ddY マウス 50 匹に溶連菌を 4.2×10^6 i.m. し、以後 2~3 日毎に 2 匹ずつ全採血を行い、血清 TNF- α 値を ELISA 法で測定した。マウスの採血は実験開始前にあらかじめ決めておいた番号順に行い、50 日目までに未採血のまま死亡したマウスは解析から除外した。

② 溶連菌感染後 20 日目から連日 TNF- α を静注した。TNF- α を静注していないマウスコントロールとして、生存曲線を比較した。観察継続期間は 80 日間とした。

③ 溶連菌感染後 20 日後、34 日後に抗 TNF α 抗体を静注した。抗 TNF- α 抗体を静注していないマウスをコントロールとして、生存曲線を比較した。観察継続期間は 80 日間とした。

(4) TNF- α の溶連菌の増殖に与える影響

TNF- α が溶連菌の増殖促進に直接影響していないか調べるため、溶連菌 SP2 株を液体培地に接種し、これにマウス TNF α を添加した場合と添加しない場合とで培地の OD の変化を調べた。

(5) 遅延死を引き起こす *S. agalactiae* に関する細菌学的検討

ddY マウスに *S. agalactiae* 10^7 CFU を i.m. したところ、溶連菌と同様にマウスに遅延死を引き起こす株が 4 株見つかった。

これらの株が、溶連菌と共通の病原遺伝子を保有していないか、特に最も注目されている溶連菌のスーパー抗原遺伝子 (*speA*, *speB*, *spec*, *speG*, *smez2*) について、PCR 法を用いて解析を行った。

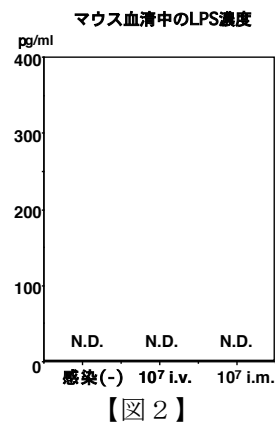
4. 研究成果

<結果>

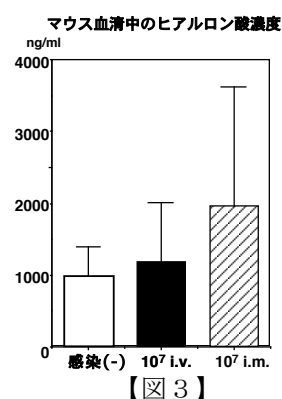
(1) LPS、ヒアルロン酸と遅延死との関係に関する解析

ddY マウスに溶連菌を 10^7 i.v. して急性期に死亡したマウス (10 匹) と、 10^7 i.m. して遅延したマウス (10 匹) の血清中 LPS 濃度を測定した【図 2】。

いずれの群においても LPS は検出感度以下であった。

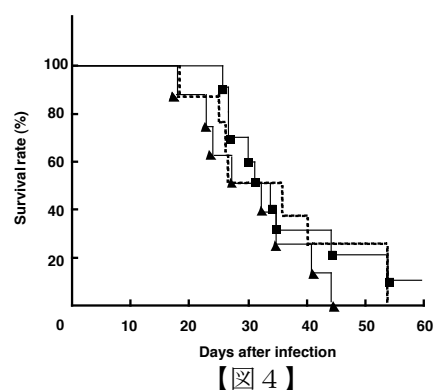


次に、同じ血清でヒアルロン酸値を測定した【図 3】。



i.m. した群でヒアルロン酸値が最も高かったが、有意差はなかった。

ヒアルロン酸が LPS と同様に遅延死を誘導するか確認するかどうか、感染実験を行った【図 4】。



点線：溶連菌 10^7 CFU を i.m. した時の生存曲線。

▲：溶連菌 i.m. 12 日後にヒアルロン酸 $4 \mu\text{g}$ を i.v. した時の生存曲線。

■：ヒアルロン酸 $4 \mu\text{g}$ を i.v. し翌日に溶連菌を i.m. した時の生存曲線。

ヒアルロン酸はLPSと異なり、溶連菌感染マウスに死亡を誘導しなかった。

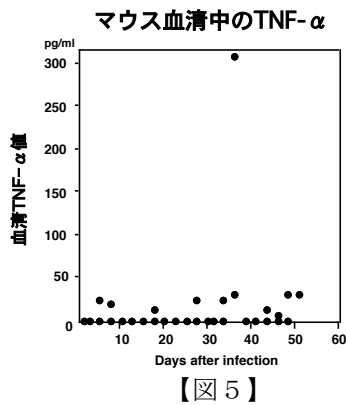
(2) Toll-like receptor (TLR) 4 と遅延死との関係に関する解析

C3H/HeN とその TLR4 ノックアウトマウスである C3H/HeJ とに、溶連菌 5.6×10^7 CFU を i. m.) を行い、両者の生存を比較した。

その結果、C3H/HeJ でも同様に遅延死が起こり、C3H/HeN との有意差は認められなかった。このことより、LPS で遅延死が誘導されるものの、TLR4 を介する機序ではないことが示唆された。

(3) 遅延死マウスで見られる高サイトカイン血症に関する解析 (特に TNF- α の影響について)

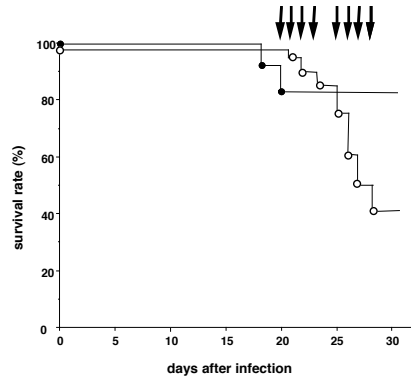
TNF- α の上昇がいつ頃起こるのかを調べるためにマウスを経時的に採血し、TNF- α の値を測定した【図5】。



36日目に1匹高値を呈したマウスがあったが、これは採血時体動が著しく低下していた(死亡直前であった可能性が高い)。この1匹以外は血清 TNF- α 値が高値を呈したものはなかった。

このことより、血清 TNF- α 値の上昇は死亡直前にのみ起こることが示唆された。

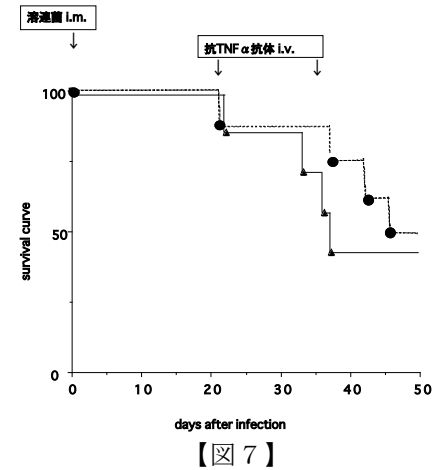
次に、溶連菌感染後連日 TNF- α を静注し、死亡を誘導するか調べた。TNF- α により死亡時期が早くなり、死亡率も高くなる傾向が見られた。【図6】。



●: 溶連菌 10^7 CFU を i. m. した ddY マウスの生存曲線。

○: 溶連菌を i. m. して 20 日後にマウス TNF- α を連日 i. v. した ddY マウスの生存曲線。

一方、溶連菌感染後 20 日後、34 日後に抗 TNF- α 抗体を静注し、遅延死を抑制できるかどうか調べた【図7】。



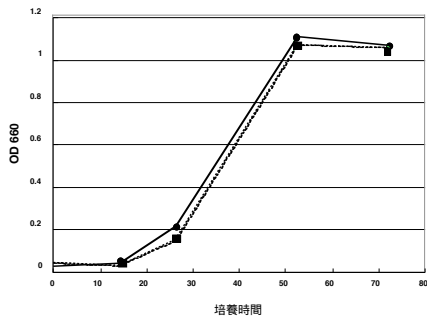
● (点線): 溶連菌 10^7 CFU を i. m. した ddY マウスの生存曲線。

▲: 溶連菌を i. m. して 20 日後、34 日後に抗 TNF- α 抗体を i. v. した ddY マウスの生存曲線。

抗 TNF- α 抗体により遅延死は阻止できなかった。

(4) TNF- α の溶連菌の増殖に与える影響

TNF- α が溶連菌の増殖促進に直接影響していないか調べるため、溶連菌 SP2 株を液体培地に接種し、これにマウス TNF- α を添加した場合と添加しない場合とで培地の OD の変化を調べた【図8】。



【図 8】

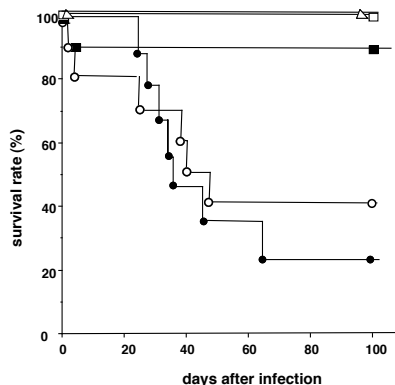
- : 溶連菌 SP2 株を液体培地 (BHI broth) 中で培養したときの培地の OD の変化。
- (点線) : 液体培地中にマウス TNF α を添加した場合の培地の OD の変化。

いずれの培養の OD 変化に差はなく、stationary phase の OD についても有意差は認められなかった。

以上より、TNF α は溶連菌の増殖に直接影響を与えないことがわかった。

(5) 遅延死を引き起こす *S. agalactiae* に関する細菌学的検討

S. agalactiae によって溶連菌と同様の劇症型感染症が起こることが知られている。ddY マウスにいろいろな *S. agalactiae* 株 10^7 CFU を i. m. したところ、マウスに遅延死を引き起こす株が 4 株 (2 株 ; STSS 由来株、2 株 ; 臍由来株) 見つかった【図 9】。



【図 9】

S. agalactiae 10^7 CFU を i. m. した ddY マウスの生存曲線。

- : control (溶連菌 SP2 株)
- : *S. agalactiae* (SA7 株、STSS 由来) 10^7 CFU
- : *S. agalactiae* (SA8 株、STSS 由来) 10^7 CFU
- : *S. agalactiae* (SA11 株、臍分離株) 10^7 CFU
- △ : *S. agalactiae* (SA12 株、臍分離株) 10^7 CFU

これらの *S. agalactiae* 株が溶連菌と共通の病原遺伝子を保有していれば、その遺伝子が STSS の病体に深く関わっている可能性が高いと言える。

そこで、溶連菌の病原遺伝子のうち、特に最も注目されているスーパー抗原遺伝子 (*speA*, *speB*, *spec*, *speG*, *smez2*) について、PCR 法を用いて解析を行った。しかしながら、遅延死を起こす *S. agalactiae* 4 株はいずれもスーパー抗原遺伝子 (*speA*, *speB*, *spec*, *speG*, *smez2*) を保有していなかった。

< 考察と総括 >

本研究で明らかとなった点は以下の通りである。

- (1) 溶連菌を筋注して遅延死したマウスの血清中に LPS は検出されなかった。LPS は溶連菌感染マウスの死亡を誘導するが、遅延死を引き起こすのに必須ではない。
- (2) 溶連菌の莢膜成分であるヒアルロン酸は、遅延死を誘導せず、また遅延死マウスの血清中濃度上昇は認められなかった。
- (3) TLR4 ノックアウトマウスである C3H/HeJ においても遅延死が認められた。遅延死は TLR4 を介していないといえる。
- (4) 遅延死マウスは死亡直前に TNF- α が急激に上昇している可能性が高い。
- (5) 溶連菌感染マウスにおいて、TNF α により死亡時期が早まり、死亡率も増加した。
- (6) 溶連菌感染マウスにおいて、抗 TNF α 抗体によって遅延死は阻止できなかった。
- (7) TNF α は溶連菌の増殖促進因子ではない。
- (8) 溶連菌と同様にマウスに遅延死を引き起こす *S. agalactiae* 株が 4 株見つかった。これらの株について遺伝学的検討を行ったが、4 株はいずれもスーパー抗原遺伝子 (*speA*, *speB*, *speC*, *speG*, *smez2*) を保有していなかった。

遅延死の病態に最も深く関与しているのはサイトカインストームだと考えられる。急性死の場合と異なり、炎症性サイトカインのみならず IL-10 に代表される抗炎症性サイトカインも増加しているのが特徴的で、これが免疫機能低下を引き起こし、莢膜発現菌の自由な増殖を許している可能性が示唆された。また、死亡直前に TNF α が急激に増加することでショックをはじめとする特徴的な症状を形成し、また死亡に直接関与している可能性が高い。

しかしながら、TNF α 血症を引き起こすメカニズムは明らかにできなかった。また、抗 TNF α 抗体による治療の有効性は証明できなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 11 件)

① 齋藤光正, 梶原英子, 吉田眞一:

劇症型 A 群レンサ球菌感染症のマウスモデルによる病態解明

福岡医学雑誌 **97**: 203-4, 2006.

② Iida K, Seki M, Saito M, Kawamura Y, Kajiwar H, Nakayama H, Yoshida S:

Capsule of *Streptococcus pyogenes* is essential for delayed death of mice in an animal model of streptococcal toxic shock syndrome.

Microbiol Immunol **50**:127-30, 2006.

③ Sasaki Y, Kusuhara K, Saito M, Hikino S, Murayama Y, Yamashita H, Matsumoto N, Kukita J, Kinukawa N, Hara T:

Serum immunoglobulin levels do not affect antibody responses to influenza HA vaccine in preterm infants.

Vaccine **24**:2208-12, 2006.

④ Sakai Y, Kira R, Torisu H, Yasumoto S, Saito M, Kusuhara K, Hara T:

Benign convulsion with mild gastroenteritis and benign familial infantile seizure.

Epilepsy Res **68**:269-71, 2006.

⑤ Saito M, Seki M, Iida K, Nakayama H, Yoshida SI:

A novel agar medium to detect hydrogen peroxide-producing bacteria based on the Prussian blue-forming reaction.

Microbiol Immunol **51**: 889-92, 2007.

⑥ Kusuhara K, Nakao F, Saito M, Nakamura K, Ieiri S, Taguchi T, Hara T:

Pyogenic splenic abscess in an infant with serological evidence of cat scratch disease.

Eur J Pediatr **166**:1289-91, 2007.

⑦ Khajooe V, Saito M, Takada H, Nomura A, Kusuhara K, Yoshida S, Yoshikai Y, Hara T:

Novel roles of osteopontin and CXCL12 chemokine ligand 7 in the defense against mycobacterial infection.

Clin Exp Immunol **143**: 260-8, 2007.

⑧ Hoshina T, Kusuhara K, Ikeda K, Mizuno Y, Saito M, Hara T:

High mobility group box 1 (HMGB1) and macrophage migration inhibitory factor (MIF) in Kawasaki disease.

Scand J Rheumatol. **37**:445-9, 2008

⑨ Tanihara H, Iida K, Seki M, Saito M, Shiota S, Nakayama H, Yoshida S:

Concerted action of lactate oxidase and pyruvate oxidase in aerobic growth of *Streptococcus pneumoniae*: role of lactate as an energy source.

J Bacteriol **190**:3572-9, 2008.

⑩ Kusuhara K, Saito M, Sasaki Y, Hikino S, Taguchi T, Suita S, Hayashi J, Wakatsuki K, Hara T:

An echovirus type 18 outbreak in a neonatal intensive care unit.

Eur J Pediatr **167**:587-9, 2008.

⑪ Seki M, Saito M, Iida K, Tanihara H, Soejima T, Nakayama H, Yoshida SI:

Onset of streptococcal toxic shock syndrome is accelerated by bruising in a mouse model.

Microbial Pathogenesis **44**:339-43, 2008

6. 研究組織

(1) 研究代表者

<平成 18~19 年度>

齋藤 光正 (SAITO MITSUMASA)

九州大学・大学院医学研究院・助教

研究者番号: 00315087

<平成 20 年度>

楠原 浩一 (KUSUHARA KOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20243941

(2) 研究分担者

<平成 18~19 年度>

楠原 浩一 (KUSUHARA KOICHI)

九州大学・大学院医学研究院・准教授

研究者番号: 20243941

<平成 20 年度>

なし