

溶血性レンサ球菌が保有する病原性機構の解明

北里大学 大村智記念研究所

感染症学研究室

吉田 春乃

目次

第1章 序論	7
第2章 実験材料と方法	11
2-1 実験材料	11
(1) 使用菌株	
(2) 細胞培養	
(3) 実験動物	
(4) DNA, RNA の調製	
2-2 実験方法	14
(1) ゲノム配列決定	
(2) RocA 相補株(MAT101) 及びコントロール株(MAT100) の作製	
(3) トランスジェニックマウスを用いたレンサ球菌感染実験	
(4) 遺伝子発現解析	
(5) ヒアルロン酸の定量	
(6) Western blotting	
(7) SpeB 活性測定	
(8) 溶血活性測定	
(9) 病理学的観察	
(10) 培養細胞への侵入性評価	
(11) <i>Streptococcus canis</i> SCM タイピング	
(12) MLST タイピング	
(13) 薬剤感受性・薬剤耐性遺伝子の有無	
(14) 統計解析	
第3章 髄膜炎患者より分離された <i>Streptococcus pyogenes</i> MTB313 株に見出された転写制御関連因子 <i>rocA</i> 遺伝子変異が病原性に与える影響の解明	26
3-1 実験結果	26

(1) 全ゲノム配列の決定と比較解析による <i>rocA</i> 遺伝子変異の同定	
(2) MTB313,314 株の表現型	
(3) マイクロアレイによる転写産物の発現量比較解析	
(4) リアルタイム PCR による発現量の確認	
(5) MTB313, MTB314 における病原因子の発現と活性	
(6) MTB313, 314 株の <i>in vivo</i> における病原性	
3-2 考察 -----	39
3-3 小括 -----	43
第 4 章 <i>Streptococcus dysgalactiae</i> subspecies <i>equisimilis</i> 感染マウスの病態 -----	48
4-1 実験結果 -----	48
(1) GGS_124 株の <i>in vivo</i> における病原性	
(2) GGS_124 感染マウスの病理学的解析	
(3) RE378 株感染の <i>in vivo</i> における病原性	
(4) RE378 感染マウスの病理学的解析	
4-2 考察 -----	58
4-3 小括 -----	60
第 5 章 伴侶動物より分離された <i>Streptococcus canis</i> の <i>in vitro</i> における病原性と分子特性	61
5-1 実験結果	61
(1) 伴侶動物由来 <i>S.canis</i> の宿主情報	
(2) SCM (M-like protein) アレルタイプ	
(3) ST (sequence type) および CC (clonal complex)	
(4) 抗菌薬感受性および薬剤耐性遺伝子	
(5) <i>in vitro</i> における宿主細胞内在性および溶血活性	
(6) <i>S. canis</i> 分離株の分子特性とヒト細胞内在性および溶血活性の関連	

5-2 考察	68
5-3 小括	71
第6章 総括	75
6-1 背景目的	75
6-2 結果	76
6-3 考察	77
掲載論文	79
参考文献	80
謝辞	95

略号一覽

AMR	Antimicrobial resistance
ANOVA	Analysis of variance
ASI	Abscess severity index
ASS	Arthritis severity score
ATCC	American Type Culture Collection
cDNA	Complementary DNA
CFU	Colony forming unit
CIA	Cell invasion ability
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
HA	Hyaluronic acid / Hemolytic activity
hCD46	Human cluster of differentiation 46
H&E	Haematoxylin and eosin
HRP	Horseradish peroxidase
MIC	Minimum inhibitory concentration
MLST	Multilocus sequence typing
MOF	Multiple organ failure
NCTC	National Collection of Type Cultures
NF	necrotizing fasciitis
O/N	over night
PBS	phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
SCM	<i>S. canis</i> M-like protein

SD Standard deviation

SDSE *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfate -polyacrylamide gel electrophoresis

SLO Streptolysin O

SpeB Streptococcal cysteine protease

ST Sequence type

STSS Streptococcal toxic shock syndrome

THY Todd-Hewitt broth containing 0.2% (wt/vol) yeast extract

TRAP Tartrate-Resistant Acid Phosphatase

第1章 序論

レンサ球菌属 *Streptococcus* はグラム陽性を示し、ヒトに対してその多くが常在菌であるが、病原性を持つものも少なくない[1]。レンサ球菌の分類は一般的に溶血性において α 、 β 、 γ 、あるいは血清学的に Lansfield 分類 A~V 群に分類される。

この中でヒトの感染症において重要とされているのは α 、 β 溶血性、および A, B, C, D, G 群に属する、溶血性レンサ球菌である[2]。

Lansfield 分類 A 群、 β 溶血性を示す *Streptococcus pyogenes* (Group A Streptococcus; GAS) は和名では化膿レンサ球菌と呼ばれ、小児の咽頭炎を起こす事によく知られている。GAS による疾患は多様であり、咽頭炎の他に膿痂疹、丹毒、蜂窩織炎、猩紅熱、菌血症などがある[2]。また、GAS 感染に引き続いて起こるリウマチ熱、リウマチ性心疾患、急性糸球体腎炎などは主に非先進国で年間 50 万人以上の死因となっている[3]。さらに、壊死性筋膜炎、播種性血管内凝固症候群(DIC)、streptococcal toxic shock syndrome (STSS)などを引き起こし、急速に悪化する劇症型レンサ球菌感染症は、致死率が 30% 弱とされており、国内では年間 200 人程度報告されている[4]。

GAS の感染において重要な役割を担っている因子の一つが、表層タンパク質である M protein である[5]。これまでに知られている M protein の主な機能は、食食からの回避と複数の宿主細胞分子への結合である。M protein はペプチドグリカン層に結合する LPXTG 領域を持ち、保存された C 末端側と多様性の比較的低い中央部分、そして多様性の高い N 末端からなる[5]。分子はモジュール的なリピート配列から構成されており、その中の C リピート領域はヒト角化細胞および上皮細胞において表面に発現している CD46

(membrane cofactor protein, MCP)に結合することで感染に重要な役割を果たしていることが知られている[6][7][8]。加えて M protein は細胞外マトリックスを構成する I 型, IV 型 コラーゲンとの結合に重要な役割を担っていることも報告されている[9][10]。一方、最も N 末端側に位置する超可変領域をコードする約 500 bp の塩基配列の多様性を利用した分類は *emm* 型と呼ばれ、現在約 220 種類が米国疾病管理予防センター (Centers for Disease Control and Prevention, CDC, <https://www.cdc.gov/streplab/index.html>) に登録されている。*emm* 型は GAS が引き起こす疾患と関連するものもあり、咽頭炎・扁桃腺炎では *emm12* 型(以降 M12 と表記する), M4 などが多く[11]、侵襲性感染と関連付けられている M1, M3[12][13]、リウマチ熱と関連付けられている M18[14][15]などが知られている。

GAS がヒトの常在菌としての側面を持っていることから[16]、感染が非侵襲的な疾患にとどまるのか侵襲性感染を起こすに至るのか、その病原性発揮のメカニズムを理解することは重要である。現在 GAS が保有する病原因子は接着因子、プロテアーゼ、ヌクレアーゼ、溶血素、スーパー抗原、莢膜ヒアルロン酸合成酵素など多数が同定されており、それらの多くが二成分調節系である CovR/S により制御されていることが知られている[17]。また、CovR あるいは CovS をコードする遺伝子に変異を持つ GAS は高い侵襲性を示すことが報告されている[52]。しかしながら、個々の病原因子が生体内で感染の過程においてどのように作用し、それが宿主と菌にどのような影響を与えるのかは未だ完全には明らかになってはいない。

C, G 群レンサ球菌は動物から分離されることが多く、以前はヒトに対して病原性は低いとみなされていたが、近年、世界的に主に高齢者の中で敗血症等の重症例を含む感染が増えていることが明らかとなった[18][19][20]。*Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* (SDSE) は Lansfield 分類では主に G 群、比較的少ない割合で C 群、そして

稀に A 群に対する因子血清により凝集反応が見られる β 溶血性レンサ球菌である[21]。1996 年に SDSE が *S. dysgalactiae* の亜種と定められて以降、G, C 群レンサ球菌によるヒト感染症の半数以上を SDSE 感染が占めていることが明らかになった[22][23]。

SDSE 感染症の起こす疾患は GAS と同じく多様であるが、いくつかの点で異なっている。日本における疫学的調査では、患者の平均年齢は GAS に比べて SDSE が高い傾向があること、化膿性関節炎が多く見られること等が報告されている[24]。

SDSE の臨床分離株である GGS_124 は、ゲノム解析により GAS と遺伝的に近縁であることが示され、GAS と共通する一部の病原遺伝子がコードされていることが明らかとなっている[25]。前述のように、SDSE 感染の疾患もまた、GAS による疾患と部分的には重なりつつ差異を示すことから、両菌種の病原性の特徴を詳細に理解し、適切に区別することが重要と考えられる。病原性の解明に有用な手段の一つとしてモデル動物を使った研究がある。特に宿主免疫系と病原菌の相互作用、菌が宿主組織に及ぼす影響と疾患の関連、疾患と病原因子の関与などを明らかにするためには動物個体を用いて検討することが必須である。

SDSE 同様、以前はヒトに対する病原性がないとされていた β 溶血性レンサ球菌に *Streptococcus canis* がある。*S. canis* は家畜・伴侶動物等の哺乳類を主たる宿主とし、皮膚、眼部、耳鼻、口腔、泌尿生殖器及び肛門部などから分離される。健康なイヌ・ネコの扁桃腺・肛門ぬぐい液から分離されるレンサ球菌の中では *S. suis*, *S. bovis* と並んで *S. canis* が主要な種であるという報告がある[26]。さらに、病的な伴侶動物から分離される C, G 群レンサ球菌の中では *S. canis* の頻度が最も高いことが明らかとなっており、特に *S. canis* はイヌの感染性心内膜炎より分離される菌種として最も多いという報告もある[27] [28]。

また、*S. canis* によるヒト感染の実態が少しずつ明らかになりつつある。*S. canis* の菌種同定には、詳細な生化学的特徴の解析および 16S rRNA 配列の確認、菌種特異的遺伝子

の増幅等が必要であるため、臨床検査では必ずしも菌種までは確認されずに C, G 群レンサ球菌と同定されることが多く、これまでの過小評価の原因であったと考えられている [29]。 *S. canis* の日本におけるヒト感染例として、伴侶動物由来であると推測されるものが報告されており、住居を共にしていたイヌによる咬傷から感染し菌血症を起こした例、あるいは、きっかけとなる咬傷・引っかき傷がないまま濃厚な接触のみで菌血症に至った例もある [30][31]。

日本における年毎の伴侶動物の飼育数、動物種の内訳、飼育方法について、日本ペットフード協会 (<https://petfood.or.jp/data/chart2020/index.html>) が全国犬猫飼育実態調査を 2004 年から継続的に実施している。それによれば、2020 年度ではイヌ・ネコ共に、完全室内飼育あるいは散歩・外出時以外は室内で飼育すると答えた飼い主が 8 割を超えており、感染機会は増加傾向にあると考えられる。伴侶動物からヒトへの *S. canis* 感染は特に高齢者・基礎疾患患者において重症化が報告されているが、その感染様式を含め、*S. canis* の病原性に関してはほとんど明らかになっていない [32-35]。

本研究では、これまでに述べた背景に基づき、ヒトの病原細菌としての溶血性レンサ球菌感染を制御する端緒として、その病原性発揮機構に着目した。常在・定着菌として振る舞うこともあるレンサ球菌が、どのようにして病的な感染に移行するのかを解明することがレンサ球菌感染を理解する上で重要と考えたからである。

以上より、本研究では、(1) GAS の転写制御関連因子 *rocA* 遺伝子変異が病原性に与える影響の解明、(2) hCD46Tg マウスを用いた SDSE 感染モデルの病態観察および評価、(3) ヒト・伴侶動物由来 *S. canis* 分離株の病原性の *in vitro* における評価と関連する分子特性の解明、の3点を目的とした。

第2章 実験材料と方法

2-1 実験材料

(1) 使用菌株

本研究に使用した溶血性レンサ球菌は以下の通りである。

S. pyogenes MTB313 及び MTB314 は 2012 年、彦根市民病院(滋賀県)において、髄膜炎患者(70 歳, 女性, 日本)の髄液より分離された[36]。血液寒天培地上のコロニー性状においてムコイド型を示したものと非ムコイド型を示したものを更に分離し、それぞれ MTB313, MTB314 とした。

Streptococcus dysgalactiae subspecies *equisimilis* GGS_124 は STSS 患者より[25]、RE378 は多臓器不全の患者よりそれぞれ分離された[37]。

伴侶動物由来 *S. canis* は、2017 年にサンリツセルコバ検査センターがイヌおよびネコ検体より分離した溶血性レンサ球菌のうち、当研究室で 16S rRNA 配列・菌種特異的遺伝子 *cfg* の増幅により *S. canis* であることが同定された 117 株からランダムに 40 株を選択した。40 株に下記のヒト由来株、標準株を加えた 43 株の宿主、性別、年齢、分離都道府県、年、分離検体を表 1(章末)に示す。

S. canis type strain NCTC12191 は、株式会社 KAC(滋賀県)より購入した。

ヒト由来 *S. canis* である TA4 は、2016 年にイヌ咬傷による菌血症患者の血液より分離された。[30]。同じく、ヒト由来 *S. canis* OT1 は 2012 年に菌血症の患者血液より分離された[31]。

菌株の保管はグリセロールを加えた Todd-Hewitt broth containing 0.2% (wt/vol) yeast extract (THY broth, Becton, Dickinson and Company, ニュージャージー州, アメリカ) に懸濁し、-80°C で行った。

菌株の培養は、5%ヒツジ血液寒天培地(コージンバイオ, 埼玉県)に画線塗抹し、37°C O/N 培養したのち、単一コロニーを THY broth に懸濁、37°C, 5% CO₂ で静置して行った。

(2) 細胞培養

HaCaT 細胞は Cell lines Service (Eppelheim, ドイツ) より株式会社コスモバイオを介して購入した。ダルベッコ変法イーグル培地 (DMEM, ナカライテスク, 京都府) に 10% fetal calf serum (FCS, Japan Bioserum, 東京都) を添加し、250 mL 培養フラスコを用いて継代、37°C 5%CO₂ でインキュベートした。細胞の再懸濁は 0.05% EDTA-PBS で洗浄後、同バッファーを加え 10 分間 37°C でインキュベートしたのち 0.25% Trypsin-EDTA を用いて行った。

Caco-2 細胞は理化学研究所 BRC (茨城県) より購入した。アール塩, L-グルタミン, 非必須アミノ酸含有培地 (MEM, ナカライテスク) に 15% FCS (Japan Bioserum, 東京都) を添加し、250 mL 培養フラスコを用いて継代、37°C 5%CO₂ でインキュベートした。細胞の再懸濁は 0.25% Trypsin-EDTA を用いた。

(3) 実験動物

本研究の動物実験は「北里大学における動物実験等に関する規程」に則り行い、すべての動物は北里大学動物実験センター (東京都) にて繁殖・飼育・管理した。

動物実験計画に対する文部科学省の認可番号は、第3章「髄膜炎患者より分離された *Streptococcus pyogenes* MTB313 株に見出された転写制御因子 RocA 遺伝子変異が病原性に与える影響」が 24-2876 及び 29-700。第4章「*Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* 感染マウスの病態」が 24-2876 である。

ヒト CD46 トランスジェニックマウスは、ワシントン大学 (ミズーリ州, アメリカ) J. P. Atkinson 博士より譲渡されたものと [38]、C57BL/6J マウスと 10 代交配させたもの同士を繁殖させ、使用した。

全てのトランスジェニックマウスは尾部より抽出した DNA を鋳型に PCR を用いて CD46 遺伝子の存在を確認した。また、ランダムに選択したトランスジェニックマウスの末梢血より有核細胞を調整し、CD46 発現をフローサイトメーターを用い確認した。

(4) DNA, RNA の調製

リアルタイム PCR, マイクロアレイに用いた *S. pyogenes* MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 株の total RNA;

THY broth 中で 37°C, 5% CO₂ において培養し、OD₆₀₀=0.4~0.6 に達した段階で 3,000 rpm, 5 min 遠心した沈殿を液体窒素で凍結させ、破碎装置クライオプレス(マイクロテック・ニチオン, 千葉県)を用いて破碎処理した。サンプルを RNA Protect Bacteria Reagent(QIAGEN, Hildensheim, ドイツ)で回収したのち、RNeasy mini kit (QIAGEN)で抽出した。

emm, MLST タイピング、SCM タイピングの鋳型として用いた DNA;

フリーズストックをヒツジ血液寒天培地に塗布し、37°C, O/N 培養し、得られた単一コロニーを PBS 100 µL に懸濁、98°C 10 min で抽出し、5,000 rpm, 2 min で遠心分離して上清を DNA 溶液として用いた。

全ゲノム解析に用いた genome DNA;

菌フリーズストックをヒツジ血液寒天培地に塗布し、37°C O/N 培養して得られた単一コロニーを THY broth 100 mL に懸濁し、37°C O/N 培養した。翌朝、新しい THY broth に菌液を一部移し、OD₆₀₀=0.4~0.8 に達した段階で 3,000 rpm, 5 min 遠心し、菌の沈渣を得た。PBS で 2 回洗浄したのち 80°C 10 min に加熱して滅菌した後、菌液 1.5 mL に対し、Lysis buffer (10 mM Tris-HCl pH 7.8, 1 mM EDTA, 5% Lysozyme, milliQ) 1 mL を加え、37°C 1 h で溶解した。菌体破壊のため-20°C凍結と融解を 3 回繰り返したのち、DNeasy Blood and Tissue kit(QIAGEN)を用いて抽出し、得られた溶出液を 1 µL 分取し NanoDrop (Thermo Fisher Scientific, マサチューセッツ州, アメリカ)で吸光度測定し、A₂₆₀/A₂₈₀ 比が 1.8 以上であることを確かめた。

2-2 実験方法

(1) ゲノム配列決定

MTB313, MTB314 の全ゲノム配列決定;

MTB313, MTB314 を THY broth で 37°C 5%CO₂ にて培養し、OD₆₀₀=0.6 付近で 10,000 rpm, 10 min 遠心し、DNase 不活性化のため沈殿を 80°C で 10 分間インキュベートする。

沈殿を表 2 (章末) の Lysis Buffer で懸濁し、37°C, 1 時間反応させた。

インキュベート後の菌懸濁液を -30°C フリーザーにて、凍結融解を 3 回繰り返す、4 μL DNase-free RNase (QIAGEN 100mg/mL) を加え、室温で 2 分間静置した。

50 μL Proteinase K (5 mg/mL) を加えよく混合したものを DNeasy Blood and Tissue kit (QIAGEN) のサンプルとし、キットの手順通りにカラムによる抽出を行なった。

抽出後、NanoDrop で吸光度を測定し、260/280 比が 1.8 以上 2.0 以下であることを確かめた。

全ゲノム配列は 454 GS Junior titanium system (Roche, 454 Life Sciences, コネチカット州, アメリカ) を用いショットガンシーケンスでショートリード配列を得た。

アセンブリには 454 Sequencing System Software の GS *De Novo* Assembler を用いた。

シーケンシングと *de novo assembly* は、金沢医科大学・石垣靖人教授の研究室で行われた。得られた contig 配列の末端にプライマーを作製し、ゲノム DNA を鋳型として PCR を行った。得られた増幅産物を contig 間のギャップ部分とし、サンガーシーケンスで配列を決定した。これらをつなぎ合わせ全ゲノム配列を決定した。

S. canis 臨床分離株のドラフトゲノム配列決定;

ヒト由来 *S. canis* である TA4, OT1 を前述の (1) と同様の方法で培養、ゲノム DNA を抽出した。ライブラリ調製は Nextera XT DNA sample prep kit (Illumina, カリフォルニア州, アメリカ) を用いて行い、Illumina MiSeq benchtop sequencer でリー

ド長 300 bp のペアエンドシーケンシングを行った。得られたリードは CLC Genomics Workbench (version 6.5.1) のデフォルトパラメータでトリミングを行い、同ソフトを用いて *de novo* アセンブリを行った。シーケンシングと *de novo* assembly は、東京農工大学・水谷哲也教授の研究室で行われた。得られた contig 配列を元に DFAST (DDBJ, 国立遺伝学研究所) を用いてアノテーションを行い、配列情報と合わせて DDBJ を通じデータベースに登録した。

Accession no. は以下の通りである。

TA4; BEWZ01000000, OT1; BJOW00000000

(2) RocA 相補株 (MAT101) 及びコントロール株 (MAT100) の作製

MTB314 のゲノム DNA を鋳型とし、*rocA* 遺伝子の 上流と下流に設計したプライマーペア Forward- 5' agctgcagtttatctattacggag 3', Reverse- 5'

gcggatccattttaactctagcttggaa 3' を用いて PCR にて *rocA* 遺伝子断片を得た。プライマー末端にあらかじめ付加させた制限酵素切断配列 PstI, MspHI (下線部) を用い、発現ベクター pLZ12-Km に組み込んで pRocA を作製した。pRocA をエレクトロポレーション法により MTB313 に導入したものを MAT101, pLZ-Km を MTB313 に導入したものを MAT100 とした (図 1A, 章末)。

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 の増殖は、THY broth にて 37°C, 5%CO₂, O/N で静置培養した菌液を 1x10⁶ CFU /mL に調整し、前述の条件で培養し、0, 2, 4, 6, 8, 10, 24 時間後の吸光度 (OD₆₀₀) を測定した。また、各時間において培養液を THY 寒天培地に塗布し、37°C, 5% CO₂ で培養し、コロニー数をカウントして菌数を確認した (図 1B, 章末)。

(3) トランスジェニックマウスを用いたレンサ球菌感染実験

GAS 感染マウスの臓器内生菌数の定量;

MTB313, MTB314 を THY broth で 37°C 5%CO₂ にて培養し、OD₆₀₀=0.6 付近で 10,000 rpm, 10min 遠心し、沈殿を 0.01%ゼラチンを含む PBS で懸濁する。

hCD46Tg マウス 8~10 週齢 10 匹を1群とし、後脚 footpad に 1×10^7 CFU/10 μ L を皮下注射した。感染3日後に安楽死させ、肝臓、脾臓、膝下リンパ節、血液を採取。肝臓、脾臓、膝下リンパ節は、0.01%ゼラチン含 PBS を加え無菌的にすり潰し懸濁液とした。すべての臓器を PBS で希釈し、THY 寒天培地に塗布して 37°C で O/N 培養し、得られたコロニーを数え、臓器(1 匹)あたりの生菌数を計算で求めた。

SDSE 感染マウスの臓器内菌数の定量;

GGs_124 を THY broth で 37°C 5%CO₂ にて培養し、OD₆₀₀=0.6 付近で 10,000 rpm, 10 min 遠心し、沈殿を 0.01%ゼラチンを含む PBS で懸濁する。hCD46Tg マウス 7 週齢 6 匹、WT として 7 週齢 C57BL/6J 雄 6 匹の後脚 footpad に 1×10^7 CFU/10 μ L を皮下注射した。感染3日後に安楽死させ、肝臓、腎臓、脾臓、膝下リンパ節を採取したのち無菌的にすり潰し懸濁液とした。すべての臓器懸濁液を 0.01%ゼラチン PBS で希釈し、THY 寒天培地に塗布して 37°C で O/N 培養し、得られたコロニーを数え、臓器(1 匹)あたりの生菌数を計算で求めた。

RE378 感染は GGS_124 と同様の方法で、7 から 10 週齢の hCD46Tg マウスに感染させ、28 日間の生死を観察した。同様の方法で 7 から 10 週齢の hCD46Tg マウスおよび C57BL/6J (Charles River Japan, 神奈川県, 日本) 各 6 匹を RE378 に感染させ、3 日後に解剖し膝窩リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓を摘出し、GGs_124 と同様の方法で菌数を求めた。

GAS 感染マウス致死率の検討;

hCD46Tg マウス 8-10 週齢オスの後脚 footpad に、上述の条件で調整した MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 株を 1×10^7 CFU/10 μ L に 0.01%ゼラチン-PBS で懸濁し、皮下注射したのち、15 日間にわたり生死を確認した。MTB313 は n=8, MTB314 は n=9, MAT100 は n=9, MAT101 は n=9 で行った。致死曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、log-rank test にて検定を行った。

SDSE 感染マウス致死率の検討;

hCD46Tg マウス 7 週齢オスあるいは 7 週齢オス C57BL/6J マウスの後脚 footpad に前述の条件で調整した GGS_124 を、hCD46Tg マウス 7-10 週齢オスあるいは 7 週齢オス C57BL/6J マウスの後脚 footpad に前述の条件で調整した RE378 株を 1×10^7 CFU/10 μ L に 0.01%ゼラチン-PBS で懸濁し、皮下注射したのち、GGS_124 は 35 日間、RE378 は 28 日間にわたり生死を確認した。GGS_124 は Tg マウス 12 匹、C57BL/6J マウス 14 匹、RE378 は両群 12 匹を用いた。致死曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、log-rank test にて検定を行った。

(4) 遺伝子発現解析

GAS リアルタイム PCR;

抽出した total RNA 100 μ g を用い、iScript™ cDNA Synthesis Kit (Bio-Ras, カリフォルニア州, アメリカ)を用いて cDNA を合成した。リアルタイム PCR 反応には SYBR green premix Ex Taq II Tli RNaseH plus (タカラバイオ, 滋賀県)で行い、機器は CFX96 system (Bio-Rad)を用いた。定量は、内部標準遺伝子として 16S rRNA, *proS*を用い、 $\Delta \Delta$ Ct 法にて相対的に評価した。

マイクロアレイ;

GAS のリファレンスゲノムとして MTB313, MTB314 と同じ M1 型である MGAS5005 の全ゲノム配列 (CP000017.1, NCBI よりダウンロード) から 1,835 遺伝子、MTB313, MTB314 から 1,994 遺伝子を用い、eArray により tRNA 配列とクロスハイブリが予想される配列を除去したのち 3,039 のプローブ配列を作製した。1 配列あたり 14 スポットを 44K \times 4 のアレイに搭載したカスタムアレイを用い、total RNA 100 ng のサンプルからラベル化 cDNA を作製し、アレイとハイブリダイゼーションさせ、DNA Microarray Scanner を用いてシグナルを検出した。蛍光シグナルの数値化は Feature Extraction ver 10.7.1.1 を用いて行い、アレイ間ノーマライズ、比較解析は GeneSpring GX 14.5 で行った。

試薬、ソフトウェア、機器類は全て Agilent Technologies 社(カリフォルニア州,アメリカ)のものを用い、解析は一般財団法人化学物質評価研究機構(CERI, 埼玉県, 日本)に委託した。アレイ間ノーマライズは 75 percentile を基準にした。

(5) ヒアルロン酸の定量

MTB313, MTB314, MAT101, MAT100 を THY broth 10 mL で 37°C 5%CO₂ にて培養し、滅菌水で 2 回洗浄したものを 0.5 mL の滅菌水に懸濁した。菌体表面からヒアルロン酸を遊離させるため 1 mL クロロフォルムを加え、ボルテックスミキサーでよく混和した。12,000 xg 10 min 遠心分離し、水溶性画分を 25 μL 分取したのち、染色液(20 mg Stains-All (Sigma-Aldrich, ミズーリ州, アメリカ), 60 μL 無水酢酸を 50%ホルムアミドで溶解し 100 mL に合わせた) 100 μL と混合し、640 nm の吸光度を測定した。濃度既知ヒアルロン酸を用いて作製した標準曲線を元に、サンプル中のヒアルロン酸濃度を決定した。濃度測定の手法は[39][40]に従った。

(6) Western blotting

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 を THY broth 10 mL で 37°C 5%CO₂ にて O/N 静置培養した菌液を 5,000 rpm, 15 min 遠心分離し、得られた上清を回収した。10%トリクロロ酢酸を加えて生じた沈殿を 5%トリクロロ酢酸で洗浄したのち、アセトンで 2 度洗浄したものを SDS ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、western blotting に用いた。

SpeB の検出には、一次抗体として polyclonal Abs to 28 kDa SpeB (goat; Santa Cruz Biotechnology Inc., テキサス州, アメリカ) を 1,000 倍希釈し、二次抗体に horseradish peroxidase (HRP) - conjugated donkey anti-goat IgG (Santa Cruz) を 5,000 倍希釈で用いた。

SLO の検出には、抗 49 kDa streptolysin O (SLO) (rabbit; Bio Academia, 大阪府, 日本)を 1,000 倍希釈で、二次抗体は HRP-conjugated goat anti-rabbit IgG (Jackson ImmunoResearch Laboratories Inc., ペンシルバニア州, アメリカ)を 10,000 倍希釈で

用いた。

検出には化学発光試薬 Chemi-Lumi One L (Nacalai Tesque, 京都府, 日本) と ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, イリノイ州, アメリカ)を用いた。

(7) SpeB 活性測定

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 を THY broth 10 mL で 37°C 5%CO₂ にて O/N 静置培養した菌液を 5,000 rpm, 15 min 遠心分離し、得られた上清を回収した。上清 200 μL を等容量の活性化溶液 (1 mM EDTA, 10 mM dithiothreitol, 0.1 M acetic acid-sodium acetate, pH 5.0) と混合し 37°C, 30 分インキュベートする。インキュベート後の培養上清と基質溶液 (2% [wt/vol] azocasein, Sigma-Aldrich) を 400 μL の活性化溶液に溶解) を混合し、さらに 37°C, 30 min インキュベートしたのち、5% (wt/vol) トリクロロ酢酸で沈殿させ、15,000 xg, 5 min 分遠心分離する。得られた上清 300 μL を滅菌水 700 μL と混合し、366 nm の吸光度を測定した。活性測定の手法は[41]に従った。

(8) 溶血活性測定

ヒト血液を用いた GAS 培養上清の溶血活性測定:

ヘパリン処理した健康なヒト血液 (コージンバイオ, 埼玉県, 日本) を PBS (pH 7.4) で 2 回洗浄し、2% 血液溶液を PBS-20 mM DTT を溶媒に調整した。サンプルは MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 を THY broth 10 mL で 37°C 5%CO₂ にて O/N 静置培養した菌液を 5,000 rpm, 15 min 遠心分離し、得られた上清 500 μL に 10 μL の 1 M DTT を加え、室温で 20 分間インキュベートした。96 ウェル U 底プレートに 100 μL の 2% 血液と、100 μL の段階希釈 (0, 2, 4, 6, 8 倍希釈) サンプル液を滴下混合し、37°C, 1.5 時間インキュベートしたのち 4°C で 1 時間静置した。プレートを 1,500 xg で 10 min 遠心し得られた上清を 100 μL 分取して新しい平底プレートに移し、405 nm の吸光度を測定した。活性測定の手法は[42]に従った。

ヒツジ血液を用いた *S. canis* 培養上清の溶血活性測定;

S. canis 分離株および ATCC12394 (SDSE)を THY broth10 mL で 37°Cにて O/N 静置培養した菌液を 2,000 xg, 5 min 遠心分離し、得られた上清 100 μ L をサンプルとして用いた。ヒツジ脱繊維血を 0.5%BSA-PBS で 2 回洗浄し、5%になるよう 0.5%BSA-PBS で希釈した。菌培養上清サンプルと希釈血液を 100 μ L ずつ 96 ウェル U 底プレートに滴下混合し、37°Cで 1 時間インキュベートした。インキュベート後の溶液を 13,000 rpm, 30 sec 遠心し、上清を新しい 96 ウェル平底プレートに移したのち、545 nm で吸光度を測定した。1 株あたり 5 ウェルを作製し、平均値を比較した。活性測定の手法は[43]に従った。

(9) 病理学的観察

GGs_124 感染マウス;

マウス組織は 4%パラホルムアルデヒド-リン酸バッファー (pH 7.4) に浸漬して固定した。骨を含む組織は 0.5 M EDTA に 3 から 5 日間浸漬し、脱灰させた。処理後の組織片をパラフィンに包埋した後、5 μ m の切片を作成し、ガラススライドに貼り付けた。

haematoxylin & eosin (H&E) 染色後の組織観察は、Axiovert135 (Carl Zeiss, テューリンゲン州, ドイツ)を用い、病理学を専門とする医師である中村正彦博士(北里大学 薬学部)の指導のもとで行った。

RE378 感染マウス;

関節組織の摘出、組織切片の作製および H&E 染色は GGS_124 感染マウスと同様の方法で行った。tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 染色は acid phosphatase leukocyte (TRAP) kit (Sigma-Aldorich)を用いた。染色後の組織観察は GGS_124と同様に行った。関節炎の評価は先行研究[44]を参考に、以下の基準で数値化した。

腫張・紅斑共に観察できない; ASS=0

軽度の紅斑が見られる; ASS=1

軽度の腫脹および中程度の紅斑が見られる; ASS=2

重度の腫脹および重度の紅斑が見られる; ASS=3

(10) 培養細胞への侵入性評価

ヒト大腸上皮由来 Caco-2 細胞は、継代と同様 15% FCS 含 MEM で 12 ウェル細胞培養プレートに培養し、 $2\sim 4 \times 10^5$ cells/well の密度で使用した。*S. canis* を THY broth 5 mL で 37°C にて O/N 静置培養し、翌日培養液 450 μ L を新しい THY broth 10mL に移して 37°C 5%CO₂ にて培養した。OD₆₀₀ が 0.4~0.8 に到達した培養液を 3,000 rpm, 5 min 遠心し、沈殿を MEM 培地で希釈し MOI=10 になるよう調整したものを細胞培養ウェルに加えた。37°C, 1 時間インキュベートしたのち、細胞を PBS で 2 回洗浄し、10 U/mL ペニシリン G と 100 μ g/mL ゲンタマイシンを加えた 20% FCS 含 MEM でさらに 1 時間培養する。細胞を PBS で 2 度洗浄したのち、0.05%トリプシン(0.53% EDTA 含) 100 μ L で処理し、剥離した細胞を滅菌した精製水で回収し、ボルテックスミキサーで細胞を完全に破壊した。回収した細胞液を THY broth で 1/10 希釈し、原液と希釈液を 50 μ L ずつ THY 寒天培地に塗布、37°C で培養し、生じたコロニーの数からウェルあたりの細胞内菌数を計算した。

ヒト角化細胞由来 HaCaT 細胞は継代と同様 10%FCS 含 DMEM で 12 ウェル細胞培養プレートに培養し、 $2\sim 4 \times 10^5$ cells/well の密度で使用した。アッセイの方法は前述した Caco-2 細胞の場合と同様であるが、細胞に固有の性質の差異により剥離の方法が異なり、0.05%EDTA-PBS で洗浄したのち同バッファー 1 mL をウェルに加え 37°C, 10 分間インキュベートし、0.05%トリプシン(0.53% EDTA 含) 100 μ L で処理した。以上の手法は[45][46]を参考に、一部を変更した。

(11) *Streptococcus canis* SCM タイピング

菌株より抽出したゲノム DNA を鋳型とし、SCM 遺伝子内に作成された以下のプライマーセットを用いて PCR にて増幅を行った。

Sc_Mprot_F1; 5'-GGTGAAGACAAGCTTTTTAGC-3',
Sc_Mprot_R1; 5'-CGGTGTCATTCATGTACTTAG-3',
M-SCAF2(F); 5'-AGTGGCCTTTCCTTTAGGGTCAT- 3',
M-SCAR3(R); 5'-GAAAGCGGTTAGAATCAGCGT -3',
M-SCAR4 (R) ;5'-TCACGAAAGCCACATCGGTGTCAT- 3'

プライマーの配列及び PCR 条件は既報[47], [48]に従った。

増幅産物の配列を決定し、アミノ酸配列に変換したのち neighbor-joining 法を用いて系統樹を作成し、アレルタイプを決定した。なお SCM type 1 から 9 はグループ I, SCM type 10 から 15 はグループ II に属する。

(12) MLST タイピング

先行研究により、*gki*, *gtr*, *murI*, *mutS*, *recP*, *xpt*, *yqiZ* の 7 遺伝子座に対するプライマーを用いて各遺伝子断片の増幅を行ったのち、精製物を QIAquick PCR Purification kit (QIAGEN) により精製し、対応するプライマーで PCR 産物の塩基配列をシーケンスした。配列を PubMLST (<https://pubmlst.org>) を用いて照合し ST 番号を得た。

ドラフトゲノム配列を既に決定していた株については、contig 配列から 7 遺伝子座の増幅箇所を検索し、得られた配列から ST 番号を得た。

(13) 薬剤感受性・薬剤耐性遺伝子の有無

S. canis 分離株及び NCTC12191 の薬剤感受性は MICroFAST Panel type 7J (Beckman Coulter, カリフォルニア州, アメリカ) を用いた微量液体希釈法により、penicillin G, ampicillin, cefepime, cefotaxime, ceftriaxone, ceftazidime, meropenem, minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin, levofloxacin, vancomycin, chloramphenicol に対する最小発育阻止濃度 (MIC) を求め、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) が定めた CLSI-document M100-S25 (2015) を基準として判定した。

マクロライド系・リンコサミド系に対する薬剤耐性遺伝子の有無は、*erm(A)*, *erm(B)*, *mef(A)*の遺伝子内に作成したプライマーを用いて、分離株より抽出したゲノム DNA を鋳型とし PCR で増幅の有無を確認した。テトラサイクリン系薬剤に対する耐性遺伝子の有無は、*tet(M)*, *tet(O)*, *tet(K)*, *tet(L)*, *tet(S)* 内に作成したプライマーを用い、分離株より抽出したゲノム DNA を鋳型とし PCR にて増幅の有無を確認した。各プライマー配列、PCR 条件は先行研究[49]に従った。

(14) 統計解析

統計解析には以下の方法を用いた。

第3章「髄膜炎患者より分離された *Streptococcus pyogenes* MTB313 株に見出された転写制御因子 RocA 遺伝子変異が病原性に与える影響」及び第4章「*Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* 感染マウスの病態」における数値は算術平均で表記し、標準偏差(SD)でばらつきを示した。有意差検定は、2群間の検定には Student's t-test (両側)を、多群間の検定には analysis of variance (ANOVA)片側を用いた。致死曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、有意差は log rank test により検定した。検定は Prism 6 (GraphPad Software, カリフォルニア州, アメリカ)を用いて行った。

第5章「伴侶動物より分離された *Streptococcus canis* の *in vitro* における病原性と分子特性」における、細胞内在化と SCM type, ST, AMR との群間の比較は Fisher's exact probability test を用いた。細胞内在化と溶血活性の相関は、CORREL 関数(Microsoft Office 2011 Exel, ワシントン州, アメリカ)を用い、両データから相関係数を求め判定した。

表1. ヒトおよび伴侶動物由来 *S. canis* 分離株一覧

Isolate	Host	Sex and age (year-old)	Isolation prefecture	Isolation year	Isolation source
NCTC 12191(T)	Cattle				
TA4	Human	Male and seventy-one	Tokyo	2016	Blood
OT1	Human	Female and ninety-one	Gifu	2012	Blood
FU1	Cat	Male and unknown	Chiba	2017	Open pus
FU3	Dog	Male and unknown	Chiba	2017	Open pus
FU6	Cat	Male and six	Okayama	2017	Open pus
FU7	Cat	Male and unknown	Aichi	2017	Open pus
FU14	Dog	Female and eleven	Tokyo	2017	Cornea
FU15	Dog	Female and fifteen	Tottori	2017	Ear discharge
FU16	Dog	Male and eighteen	Tokyo	2017	Nasal discharge
FU17	Dog	Female and unknown	Chiba	2017	Anal glandular fluid
FU24	Dog	Male and nine	Tokyo	2017	Ear discharge
FU25	Dog	Male and nine	Chiba	2017	Ear discharge
FU29	Dog	Female and six	Kanagawa	2017	Vaginal swab
FU30	Cat	Male and unknown	Chiba	2017	Nasal discharge
FU31	Cat	Male and nineteen	Tokyo	2017	Nasal discharge
FU32	Dog	Female and unknown	Ishikawa	2017	Ear discharge
FU52	Dog	Female and ten	Tokyo	2017	Open pus
FU53	Cat	Female and unknown	Chiba	2017	Nasal discharge
FU57	Dog	Female and fifteen	Aichi	2017	Uterine content
FU58	Dog	Female and unknown	Chiba	2017	Urine
FU63	Dog	Female and thirteen	Chiba	2017	Open pus
FU64	Dog	Male and thirteen	Nagasaki	2017	Ear discharge
FU65	Dog	Male and seven	Gunma	2017	Bladder lavage fluid
FU66	Dog	Female and fourteen	Chiba	2017	Open pus
FU67	Dog	Male and unknown	Chiba	2017	Eye discharge
FU69	Cat	Male and unknown	Saitama	2017	Open pus
FU77	Dog	Female and unknown	Chiba	2017	Urine
FU78	Dog	Male and seven	Chiba	2017	Ear discharge
FU90	Dog	Male and nine	Chiba	2017	Earwax
FU91	Dog	Male and nine	Chiba	2017	Earwax
FU92	Dog	Male and twelve	Tokyo	2017	Urine
FU93	Dog	Female and nine	Chiba	2017	Open pus
FU97	Dog	Male and eleven	Okayama	2017	Open pus
FU100	Cat	Female and twelve	Chiba	2017	Open pus
FU112	Dog	Male and fifteen	Kyoto	2017	Urine
FU113	Cat	Male and unknown	Aichi	2017	Open pus
FU115	Dog	Female and seven	Fukui	2017	Open pus
FU116	Dog	Male and unknown	Chiba	2017	Throat swab
FU120	Dog	Male and eleven	Tokyo	2017	Wound
FU121	Cat	Female and one	Okayama	2017	Intrauterine pus
FU128	Dog	Male and eleven	Chiba	2017	Open pus
FU129	Dog	Male and nine	Niigata	2017	Open pus

表2. レンサ球菌ゲノム DNA 抽出 lysis buffer

表 2. lysis buffer	final conc.	
1 M Tris-HCl (pH 7.8)	10 mM	50 μ L
0.5 M EDTA	1 mM	10 μ L
lysozyme		50 mg
milliQ		4,940 μ L
total vol.	5 mL	

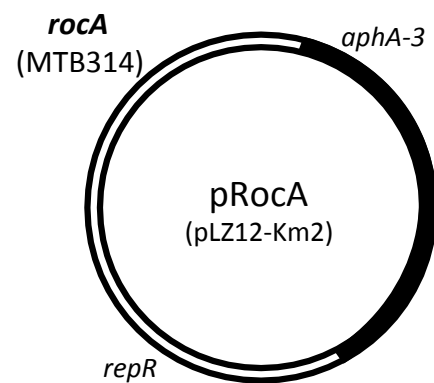


図 1A. RocA 相補ベクター模式図

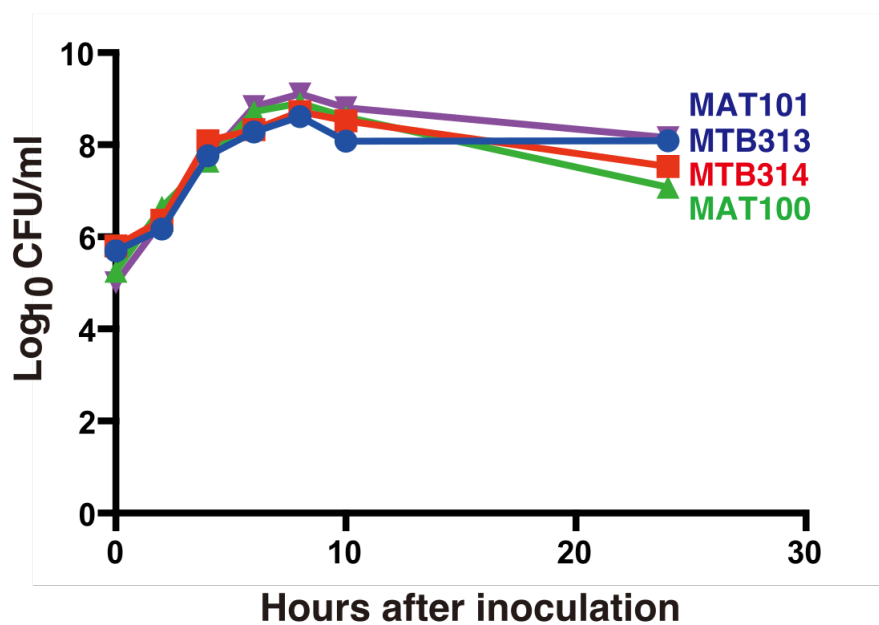


図 1B. MTB313, MTB314, MAT100, MTB101 増殖曲線

第3章 髄膜炎患者より分離された *Streptococcus pyogenes* MTB313 株に見出された転写制御関連因子 *rocA* 遺伝子変異が病原性に与える影響の解明

3-1 実験結果

(1) 全ゲノム配列の決定と比較解析による *rocA* 遺伝子変異の同定

パイロシーケンス法 (454GS Junior) とサンガー法 (ABI3730, Applied Biosystems, マサチューセッツ州, アメリカ) により決定した MTB313, MTB314 のゲノムサイズはそれぞれ 1,745,332 bp と 1,744,827 bp であった。

MTB313, MTB314 及び、両株と同じ M1 型に属する GAS である SF370, MGAS5005, A20, 476 株のゲノムの概要を表 3 にまとめた。

表3. M1型GASにおけるゲノム構造の比較

Strain	SF370	MGAS5005	20	476	MTB313	MTB314
Genome accession	AE004092	AE004092	CP000017	CP003901	AP014572	AP014585
BioProject	PRJNA269	PRJNA13888	PRJNA175952	PRJDB141	RJDB1654	PRJDB1668
BioSample	SAMN 02604089	SAMN 02603500	SAMN 02603640	情報なし	SAMD 00000328	SAMD 00000332
Clinical source	Wound	CSF	Blood	情報なし	CSF	CSF
emm type	1.6	1.0	1.0	情報なし	1.0	1.0
Genome size (bp)	1,852,433	1,838,562	1,837,281	1,813,709	1,745,332	1,744,827
G+C content (%)	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5	38.5
ORF	1,696	1,865	1,828	1,848	1,627	1,562
rRNA	18	18	18	情報なし	18	18
tRNA	60	67	67	57	67	67

CSF; cerebrospinal fluid

MTB313, MTB314 以外の株のゲノム情報は National Center of Biotechnology Information (NCBI, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, メリーランド州, アメリカ) に登録されているデータを用いた。

比較の結果、MTB313, MTB314 は他の株に比べ全ゲノムサイズが小さいことがわかった。さらに詳細に構造を比較すると、他の株に含まれているファージ領域に相当する配列を持っていないことがわかり、ゲノムサイズの減少の原因の一

つと考えられる。

参照株の1つである MGAS5005 のゲノムに MTB313, MTB314 のリード配列を GS reference Mapper application を用いてマッピングさせると、MTB313 の RocA (Regulation of Cov)をコードする *rocA* 遺伝子にのみ G464A の変異があることが明らかとなった。この1塩基変異はトリプトファン→終始コドンの置換を生じるナンセンス変異である(表4)。これにより、MTB313 の RocA は155番目のアミノ酸で翻訳が終了するトランケーション型となることが予想された。

RocA は GAS の主要な二成分制御因子である CovR/S のアクセサリータンパク質である[50]。CovR/S は GAS の全転写の15%程度を通常負に制御していると考えられており、その下流遺伝子には病原遺伝子が多く含まれる[17][51]。このことから、MTB313に見出された *rocA* 遺伝子変異は病原性に影響を与える可能性がある。加えて、後述するように MTB313 は MTB314 に比べ明らかなムコイド型を呈しており、一般的にムコイド型は病原性を高めると考えられており、両株が髄膜炎患者より分離されたことと矛盾がない。以上の点から、MTB313 と MTB314 は異なる病原性を持っている可能性があるとして仮説を立てた。

参照株に用いた MGAS5005 株は *covS* 遺伝子に変異を持っていることが知られている[52]。そこで非侵襲性感染症より分離された SF370(表3参照)の CovR/S と MTB313, MTB314 の配列を比較したところ、表4のような結果となった[53]。

表4. MTB313, MTB314, MGAS5005, SF370 の遺伝子型比較

Strain	accession no.	Gene profiles						
		<i>rocA</i>	<i>covR</i>	<i>covS</i>	<i>rgg (ropB)</i>	<i>emm</i>	<i>hasA</i>	<i>sic</i>
MTB313	AP014572	G464A	intact	A994G	intact	1.0	intact	1.02
MTB314	AP014585	intact	intact	A994G	intact	1.0	intact	1.02
MGAS5005	CP000017	intact	intact	T83frameshift, A994G	intact	1.0	intact	1.01
SF370	AE004092	intact	intact	intact	intact	1.6	intact	1.225

intact配列はSF370株を基準にした

MTB313, MTB314 両株はインタクト配列とされている SF370 の *covS* と比較し、A994G 変異を持つ。これは MGAS5005 にも含まれる置換である。ただし、

MGAS5005 *covS* の変異はフレームシフトの影響が大きく[52]、実際の MGAS5005 *covS* では A994G 置換は意味をなしていない可能性が高い。MTB313, MTB314 はどちらも等しく A994G 置換を有しており、両株共に *covR/S* 系変異の表現型を示す可能性もある。

MTB313, MTB314 においては *rocA*, *covS*, *covR*, *hasA*, *hasB*, *emm* のコード領域及び UTR を PCR にて増幅し、パイロシーケンスで決定した全ゲノム配列をキャピラリーシーケンスでも確認した。

(2) MTB313, MTB314 株の表現型

MTB313 はヒツジ血液寒天培地上で透明な分泌物に覆われたムコイド型コロニーを形成した(図 2A, 章末)。対して MTB314 は通常のレンサ球菌非ムコイド型コロニーを形成した(図 2B, 章末)。

また、THY broth で 37°C O/N 静置培養すると MTB313 と MTB314 では異なる沈殿様式を示した。(図 2C, 章末) この違いは MTB313 に MTB314 の完全型 pRocA プラスミドを導入した相補株である MAT101 とベクターのみを導入したコントロール株 MAT100 を比較しても見られ、*rocA* 変異による表現型であると考えられた。

(3) マイクロアレイによる転写産物の発現量比較解析

MTB313 の *rocA* 変異により遺伝子発現にどのような影響があるかを検討するため、マイクロアレイを用いて網羅的な転写産物の比較解析を行った。アレイ間のシグナル強度を補正したのち、MTB313 において MTB314 に比べて転写量が 2 倍以上に増加している遺伝子、あるいは 1/2 以下に減少している遺伝子をリスト化した。リストを表 5(章末)に示す。

MTB313, MTB314 の遺伝子アノテーションは DNA Data Bank of Japan (DDBJ, 国立遺伝学研究所, 静岡県, 日本) の提供する MiGAP パイプライン(2021 年現在サービス終了)を用いて行った。MiGAP で注釈がつけられなかった遺伝子

については個別に Basic Local Alignment Search (BLAST, NCBI)を用いて相同性検索を行い、既知の遺伝子配列との相同性で判断したが、Identities (BLAST 検索アルゴリズムにおいてアラインメントされた 2 つの配列のうち、同一のアミノ酸を有していると判断できる割合を示す)が 60%以下のものしか存在しないもの、あるいは機能未知配列と高い相同性を示したものは「機能未知タンパク質」と判断した。また、推定されている RocA 機能を考慮し、遺伝子リストを病原遺伝子、転写調節因子、その他に分類した。病原遺伝子の基準は微生物病原因子のデータベースである Virulence Factor Data base (VFDB, Institute of Pathogen Biology, CAMS&PUMC. 北京, 中国 <http://www.mgc.ac.cn/VFs/main.htm>)を用いた。

その結果、MTB313 と MTB314 を比較して 2 倍以上の増減が見られた遺伝子は合計で 89 存在した。

MTB314 に比べて MTB313 で発現量が 2 倍以上増加していた遺伝子のうち、pRocA 相補が認められた遺伝子群を MTB313 における *rocA* 変異の影響下にあると仮定した。その中で病原遺伝子と報告のあったものは 16 遺伝子があり、*hasABC* (ヒアルロン酸合成酵素オペロン) [54] [55], *slo* (Streptolysin O), *spyCEP* (IL-8 protease) など、CovR/S により発現が抑制されると考えられている遺伝子が特に大きな差異を示していた[51][56]。*rocA* 変異の影響下にある遺伝子群には転写調節因子は含まれていなかった。当該群におけるその他の遺伝子には anthranilate phosphoribosyltransferase, *fliH* (flagellar biosynthesis protein FliH), *cydD* (ABC transporter ATP-binding protein)および CRISPR 関連遺伝子である *cas1*, *cas4*, *cas7*, *cas2*, *cas8c* が含まれていた。

MTB313 で発現量が 1/2 以下に減少した遺伝子のうち pRocA によって相補された遺伝子群もあった。そのうち病原因子は、*spi* (streptoapin), *cfa* (CAMP-factor gene), *aid-I* (adhesin AIDA-I), multidrug resistance ABC superfamily ATP binding transporter gene の 4 遺伝子であった。

MTB313 で発現量が低い遺伝子群の特徴は、MTB313 で発現量が高い遺伝

子群と異なり転写調節因子と予測される 8 つの遺伝子が含まれていたことである。その中に *rgg* (regulator gene of glucosyltransferase, RopB と呼ばれる), *yesM* (two-component sensor histidine kinase)があった。その他は分子を特定することができなかったが、転写調節因子に特有のドメインを有しており、何らかの機能を発揮していると考えられる。

MTB313, MTB314 で発現量が 2 倍以上増減した遺伝子 89 のうち、*pRocA* によって相補されなかったものが 23 あり、増減が見られた遺伝子全体の約 26% に相当する。相補されなかった遺伝子群は、MTB313 で発現量が増加した病原遺伝子として *pepO* (endopeptidase), *lysM* domain surface protein を含んでいた。逆に、MTB313 で発現量が低下した病原遺伝子は *speB* (Streptococcal cysteine protease)、その他 3 つの転写調節因子と予測される遺伝子を含んでいた。

(4) リアルタイム PCR による発現量の確認

マイクロアレイによって MTB313, MTB314 間で発現量に差があった遺伝子群の中から、病原因子をコードする遺伝子および転写調節因子を選び、リアルタイム PCR で再現できるか確かめた。プライマーは、マイクロアレイのプローブとは異なる箇所に新たに作製した。

実験の結果、*hasA*, *sic*, *speB* において、MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 間での発現量の比がマイクロアレイと同様の傾向を示すことを確認できた。(図 3)

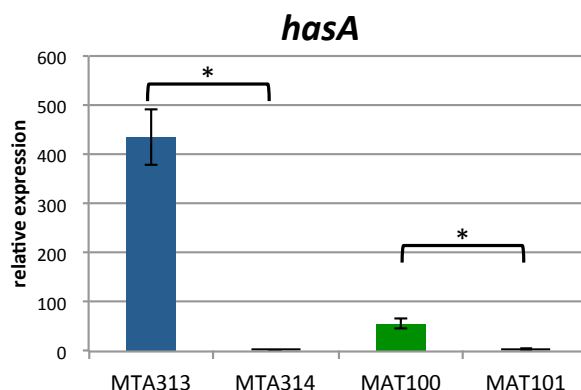


図 3-1. MTB313, MTB314 及び相補株 MAT100, MAT101 における *hasA* mRNA 発現量の比

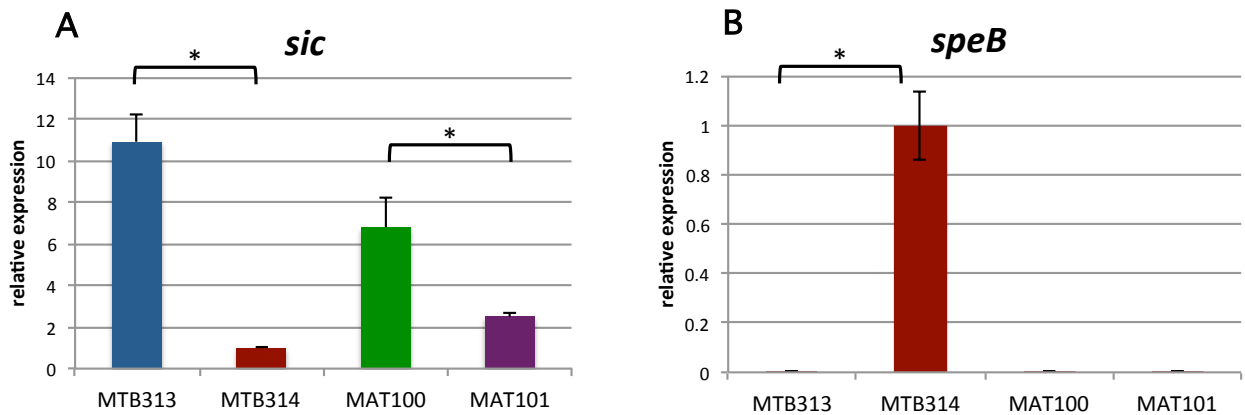


図 3-2 MTB313, MTB314 及び相補株 MAT100, MAT101 における病原遺伝子 mRNA 発現量の比. A *sic* mRNA, B *speB* mRNA

また、転写調節因子 *covR*, *covS*, *rgg*, *rocA* についても同様の結果を得ることができた。

covS の発現量は MTB314 と比較して MTB313 で有意に低下しており、pRocA 相補株 MAT101 とベクターのみの MAT100 を比較した場合も、*rocA* 変異が相補されていない MAT100 の方が低い結果となった。一方で *covR* の発現量は 4 株間で有意な差を示さなかった。*rgg* はマイクロアレイの結果と同様、MTB313 では MTB314 と比較して有意に低く、pRocA によって相補された。

加えて、*rocA* 自身の発現量もリアルタイム PCR では差異が確認され、MTB313 では MTB314 より有意に低く、pRocA により相補の傾向があったが有意差は得られなかった。

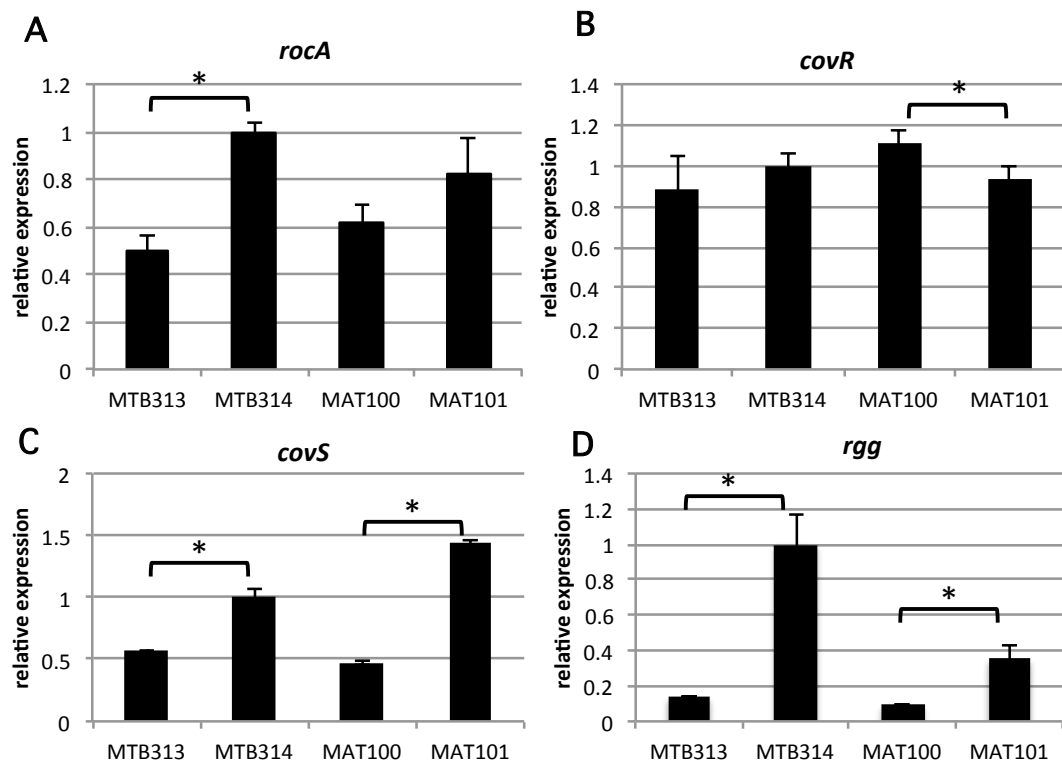


図 3-3 MTB313, MTB314 及び相補株 MAT100, MAT101 における転写調節因子 mRNA 発現量の比. A *rocA* mRNA, B *covR* mRNA, C *covS* mRNA, D *rgg* mRNA

(5) MTB313, MTB314 における病原因子の発現と活性

Streptolysin O (SLO)の発現と活性;

SLO は分泌タンパク質であるため[57]、O/N 培養した菌液の上清をサンプルとした。抗 SLO 抗体を用い、western blot を行ったところ、MTB314 の上清には SLO タンパク質が検出されなかった一方、MTB313 では発現が認められた(図 4A)。しかし、pRocA の導入によっても SLO の分泌タンパク質量は減少しなかった(図 4A, 黒矢印)。

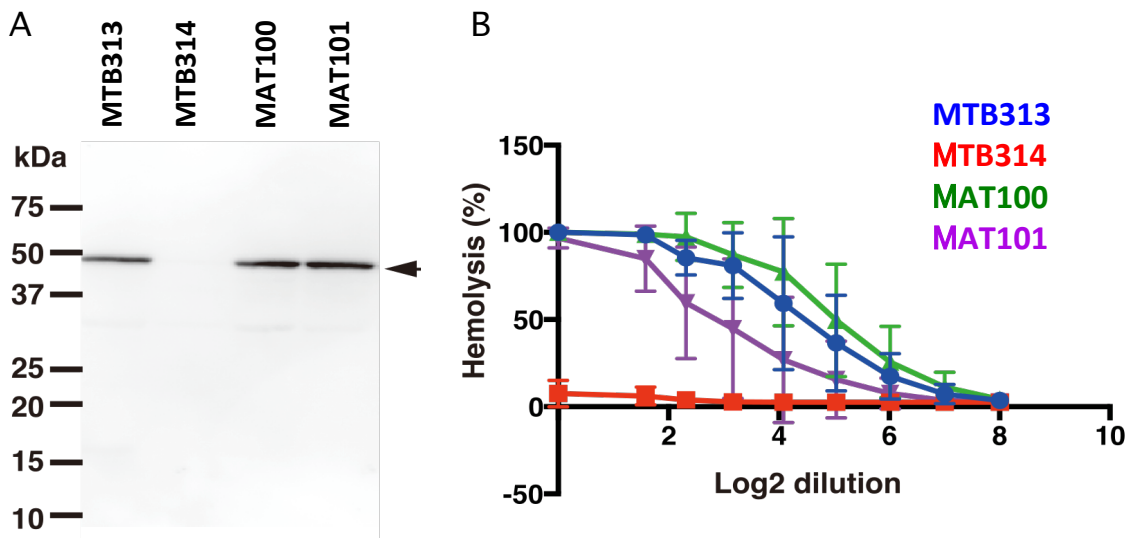


図 4. MTB313, MTB314 及び相補株 MAT100, MAT101 における病原因子 SLO の発現. A SLO タンパク質発現 B ヒト赤血球に対する溶血活性.

MTB313, MTB314 の SLO 活性を評価するため、O/N 培養した菌液上清のヒト赤血球に対する溶血活性を定量した。上清は 2ⁿ 倍に段階希釈してサンプルとした。MTB313 培養上清は希釈濃度依存的な溶血活性を示したが、MTB314 培養上清はいずれの濃度においても活性が見られなかった(図 4B)。

さらに、タンパク質発現量と同様に、MTB313 への pRocA の導入によっても溶血活性は有意には減少しなかった(図 4B)。

SpeB の発現と活性;

O/N 培養した菌液の上清をサンプルとし、抗 SpeB 抗体を用い、western blot を行ったところ MTB314 では見られた成熟 SpeB が MTB313 では観察されなかった。pRocA を導入した MAT101 では発現が確認できていることから、MTB313 では *rocA* 変異の影響で発現が見られない可能性がある。(図 5A, 赤矢印)

さらに、培養上清のプロテアーゼ活性を評価するためアゾカゼイン分解活性を測定した (n=3)。タンパク質発現と同様、MTB313 では MTB314 に比べ有意に低く、pRocA の導入により活性の回復が見られた。(図 5B)

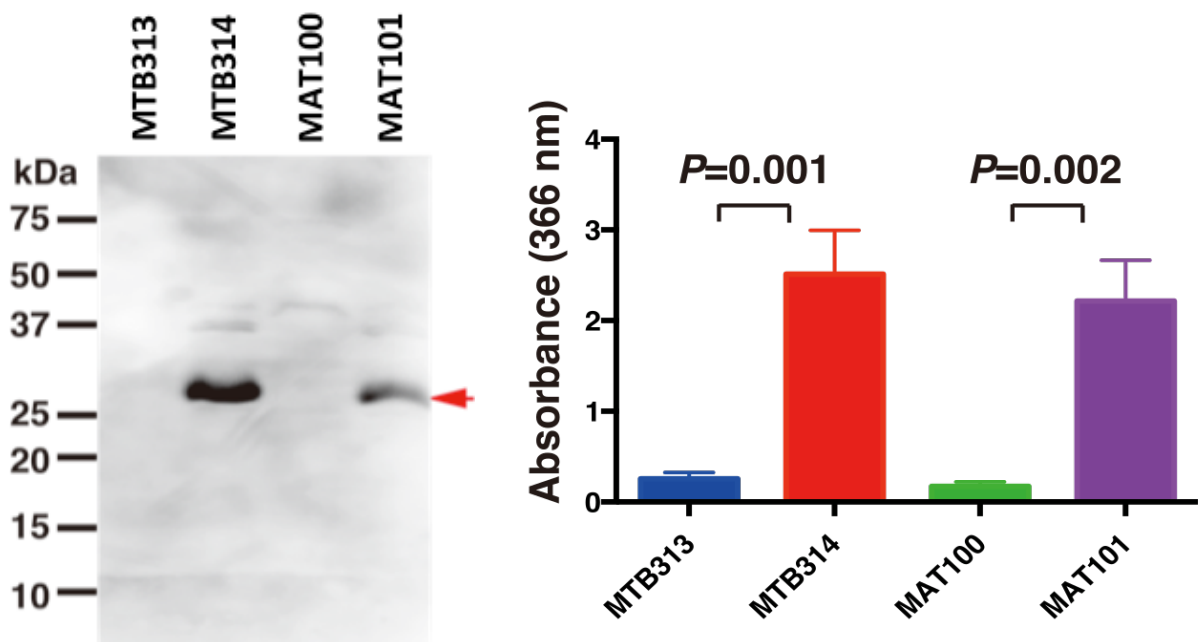


図 5. MTB313, MTB314 及び相補株 MAT100, MAT101 における病原因子 SpeB の発現. A SpeB タンパク質発現, B プロテアーゼ活性.

菌体表面のヒアルロン酸の定量;

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 の最外側にある莢膜を構成するヒアルロン酸をクロロフォルムで抽出し、染色法により定量した。その結果、MTB313 では MTB314 に比べてヒアルロン酸量が有意に多く、これはそれぞれのコロニーが示すムコイド/非ムコイドの表現型と一致している。さらに、pRocA 導入により MAT101 ではヒアルロン酸発現量が MAT100 に比べて有意に低下した。(図 6)

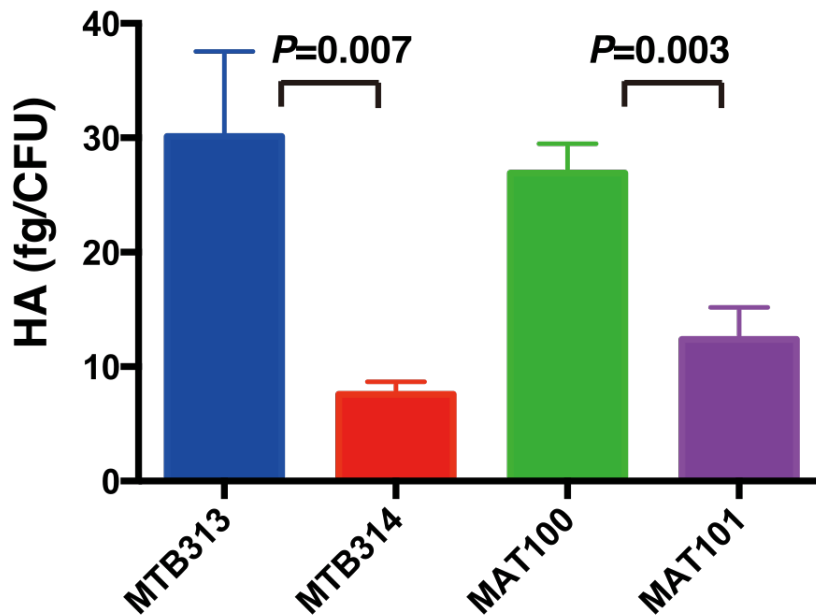


図 6. MTB313, MTB314 及び MAT100, MAT101 菌体表層のヒアルロン酸量

(6) MTB313, MTB314 株の *in vivo* における病原性

一般的に、GAS はヒトに特異的な病原菌と考えられている。そのため、実験動物を用いた感染モデルの構築は容易ではなく、菌液の腹腔内注射や創傷感染を行い致死率および局所的に起こる皮膚炎症の度合いを評価する方法、あるいは菌液を筋肉注射し、壊死性筋膜炎を惹起させるなどの方法が報告されている [58][59][75]。一方で GAS の感染によるヒトの疾患は多様であり、免疫反応による炎症など全身的な病態が含まれる。これに対し、筆者らの研究グループでは以前よりヒト CD46 トランスジェニックマウス (以降 hCD46Tg マウスと表記する) を用い、GAS の侵襲性感染モデルの構築を行ってきた [60]。

CD46 は赤血球等を除くほぼ全てのヒト細胞に発現し、主に補体の結合による破壊から細胞を保護していると考えられている。前述の通り、GAS は表面の M タンパク質 C リpeat領域がこの CD46 に結合することでヒト組織へ感染することが報告されている [6] [7]。Atkinson らにより作出された hCD46Tg マウスは上皮細胞、内皮細胞、グリア細胞、肝細胞、腎臓細胞、副腎、B 細胞、T 細胞、好中球、およびマクロファージにヒトの CD46 分子を発現する [61]。

マウスも CD46 を保有しているが、ヒトの CD46 とはアミノ酸配列で 45% の相同性を示す [62]。発現様式はヒトと異なり、精子細胞に時期特異的に発現するのみとされている [63][64]。本研究では Atkinson 博士に分与を受けた Tg マウスを用い、MTB313, MTB314 の病原性の *in vivo* での比較を行った。

MTB313, MTB314 感染マウスの臓器内生菌数の定量;

MTB313, MTB314 を hCD46Tg マウスの後ろ足裏 (footpad) に皮下注射し、3 日後の膝下リンパ節、血液、脾臓、肝臓の生菌数を比較した (n=10)。(図 7)
感染部に最も近いリンパ節である膝下リンパ節では MTB313 の方が MTB314 に比べて有意に多く生菌が検出された。また、血液、脾臓、肝臓では MTB313 は複数の個体で生菌が検出されたが、MTB314 ではほとんど検出されず、有意に低かった。

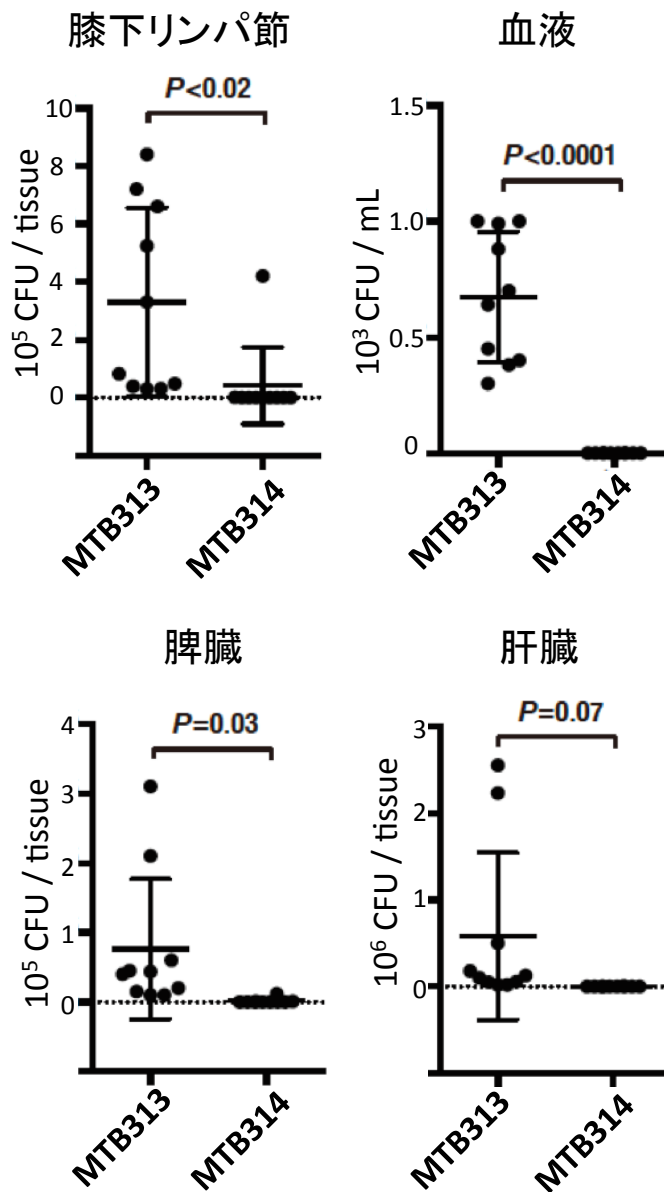


図 7. MTB313, MTB314 感染 hCD46Tg マウスの臓器内生菌数(感染 3 日後)

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 感染 hCD46Tg マウスの致死率の検討;

MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 を hCD46Tg マウスの後足裏 (footpad) に皮下注射し、15 日間の生死を観察した。(図 8)

結果をもとに作製した致死曲線より、MTB313 感染マウスの致死率は 75% であるのに対し、MTB314 感染マウスの致死率は 0% であった。MTB313 に pRocA プラスミドを導入した MAT101 感染マウスの致死率は 11.1% であった。pRocA 導入により MTB313 の高い致死率が減弱したと考えられ、MTB313 感染が示す高い致死率が *rocA* 変異に関連していることが示唆された。

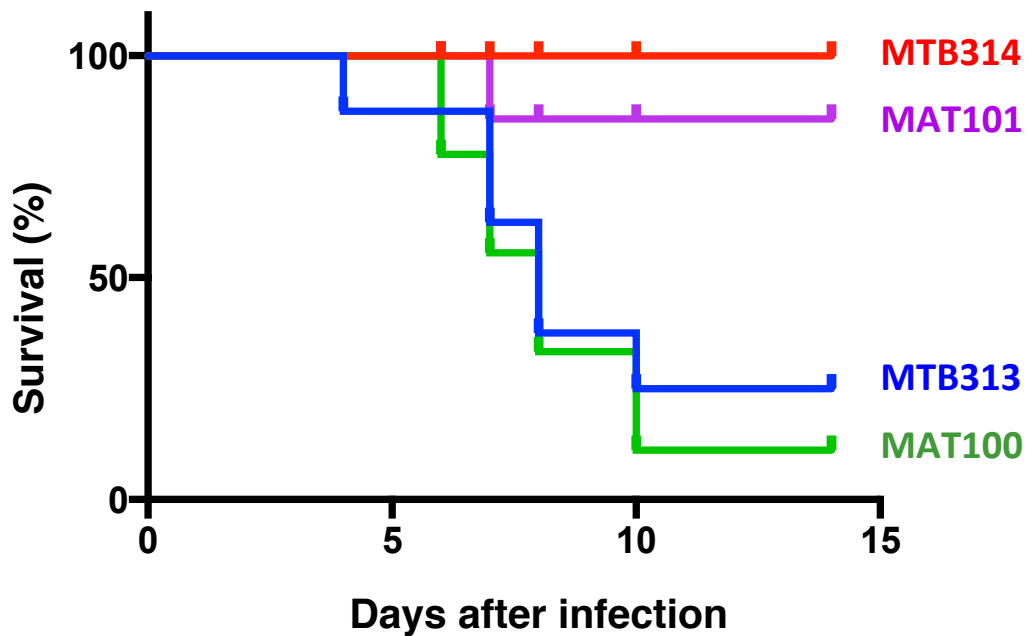


図 8. MTB313, MTB314 および MAT100, MAT101 感染 hCD46Tg マウスの致死率

3-2 考察

RocA は N 末端側に膜貫通ドメインを有しており、その数はアルゴリズムによる予測とアミノ酸置換・ラベル実験により 7 つであると考えられている[65]。C 末端側には HATPase ドメインを有しているが、活性に必須のアミノ酸を欠いていることから偽キナーゼである可能性が高いとされている[50]。RocA は 451 アミノ酸から成るが、膜貫通ドメインは 1 つでも欠けると RocA 機能維持には不十分であり、偽キナーゼと考えられている C 末端側でも、442 番目、443 番目といった極めて末端に近い部位にアミノ酸置換を施すことで RocA 欠損と同等の表現型を示すことが明らかになっている[65]。

RocA 欠損株では CovR のリン酸化が阻害されることが示されており、GAS における CovR/S 系の抑制的制御に関与しているアクセサリ分子であると考えられている[50]。RocA は同じく細胞膜に局在している CovS と結合し、さらに RocA 同士のホモ二量体が形成可能であることが *in vitro* の系で示されている[65]。

CovS はセンサーキナーゼとして働いており、菌が存在する環境の塩濃度、温度、抗菌ペプチドからのシグナル等に応じて、様々な遺伝子の転写を調節していると考えられている。RocA も培養環境の pH 依存的な CovR リン酸化に寄与していることが示されており[66]、CovR/S の調節機能を修飾している可能性が高い。

MTB313, MTB314 のゲノムマッピング及びマイクロアレイのプローブデザインに利用した MGAS5005 株は 1996 年にカナダで侵襲性感染症の髄液検体より分離された M1GAS である。CovS にフレームシフト変異を有しており、下流遺伝子の高発現と、高い病原性が報告されている[52][67]。そのため詳細なゲノム解析が行われており、本研究の参照株に用いた。

RocA, CovR/S の変異体が侵襲性感染から高頻度で分離される傾向については、以前から指摘がなされており、その関係について幾つかの研究がなされている。Feng らは *covR/S*, *rocA* に変異のない MGAS2221 株をマウス 4 匹に皮下注射し、4 日後に回収した全てのマウスの皮膚組織から RocA 変異株を 7 種分離している(この

研究では SseA+, SpeBA+という表現型で回収した GAS 株をスクリーニングしているため、実際の変異株はもっと多い可能性がある) [68]。

また、これまでに臨床分離株より見出された自然発生的な *rocA* 遺伝子変異は本研究の MTB313 を含め複数存在する[69][70] [71][72]。M3GAS と M28 GAS は現在知られている限り、全ての分離株で *rocA* に変異が見られ、M89 GAS では一部の株に *rocA* 変異が見られる[73]。

一方、同様にマウス体内で一定期間培養した GAS を回収し、*covR/S* 変異が高頻度で出現することを示した報告もある[74] [75]。さらに興味深いのは、*CovR/S*, *RocA* いずれの変異も多様な部位に起こっているが、そのなかでも特に多く見られる部位が存在していることである[74]。このことから、*RocA* を含む *CovR/S* 系の変異は他の遺伝子の変異に比べ体内での生き残りに有利に働くことで多く分離される、あるいはさらに積極的に変異率を高める機構の存在等が、今後の検討の対象になると考えられる。

本研究では、同一検体より分離された同一 ST を示す MTB313, MTB314 のうち MTB313 にのみ *rocA* 変異が見られた。他方、患者の同居者(小児)からも M1, ST28 を示す GAS が分離されたがこの株は *rocA* 配列に変異がなかった。*rocA* 遺伝子変異の前述の性質を踏まえ、MTB313 の *rocA* 変異は患者の体内で起こった複数の変異のうちの一つである可能性がある。

hCD46Tg マウス感染の結果、MTB313 は MTB314 に比べ、顕著に高い致死率を示した(図 8)。感染 15 日間でほとんどの Tg マウスが死亡したため、MTB313 がマウス体内でさらなる変異を起こし、弱毒化した可能性については検討することができなかった。また、MTB314 感染マウスの体内で病原性に関わる遺伝子等に新たな変異が生じていた可能性についても確かめられていない。

感染 3 日目の臓器内菌数を測定することで、MTB313 は MTB314 に比してより深部の臓器及び血中に生菌が多量に播種していることが明らかとなった(図 9)。

MTB313 はムコイドコロニーを示し(図 2)、高い *hasABC* の転写レベル(図 3)と、多量

のヒアルロン酸を分泌していることから(図 6)、免疫細胞による貪食を回避する能力が高いと考えられる。また、MTB313 は SLO を発現しており(図 4)、免疫細胞からの脱出・生存に寄与している可能性がある。IL-8 プロテアーゼとされる *spyCEP* 及び補体 C5a ペプチダーゼ *scpA* の RNA レベルでの高発現がマイクロアレイで確認できており(表 5)、これらも免疫回避に影響を及ぼしていると考えられる[76]。

RocA-CovR/S 系制御に関して、MTB313, MTB314 では以下のことが明らかとなった。まず、MTB313 における SLO 発現が RocA に非依存的である、あるいは抑制に十分ではない可能性が示唆された(図 4)。

slo 遺伝子は協調して働くと考えられている *nga* と共に転写され、CovR/S によって抑制的に制御されていると考えられているが、*slo* プロモーターへの直接の結合等は明らかになっていない。2021 年に GAS のペプチド SpoV が SLO 発現を正に制御することが報告された[77]。SpoV は CovR/S 系により直接発現制御を受けること、RocA 変異のある M3GAS で発現量が増加していることから、MTB313 での SLO 発現増加にも SpoV が関与しており、RocA 相補により SLO 発現が減少しなかったのは RocA の下流に幾つかの発現制御ステップが介在していたことが原因である可能性がある。

次に SpeB の発現が *rocA* 変異のある MTB313 で顕著に低下していた(図 5)。*speB* 発現は Rgg によって増殖期依存的に制御されており、対数増殖期から定常期への移行期に発現が増加する[42]。Rgg は DNA 結合能を持ち *speB* プロモーターに結合して正に制御するが、*speB* 遺伝子と Rgg 結合領域の間にリン酸化した CovR が結合することが明らかになっており、これにより *speB* 転写は抑制される[78]。さらに、CovS 変異により *rgg* 発現が抑制されることも報告されている[52]。本研究において、MTB313 ではマイクロアレイ、リアルタイム PCR にて *rgg* mRNA 発現の減少が見られた(図 3)。ただし、*rgg* mRNA は完全に消失してはいなかったが、SpeB は RNA レベル、タンパク質レベルにおいても MTB313 ではほぼ発現が認められなかった。また pRocA による相補は、タンパク質レベルでは見られたが、転写レベルでは見られな

かった。前述のように *speB* の発現は増殖期依存的であり、MTB313 の RNA 抽出を対数増殖期に行ったことで相補が行われなかった可能性がある。MTB313 において発現量が減少している遺伝子は、増加していた遺伝子よりも少なく、*rocA* 変異下においても *Rgg* による発現調節が独立した制御系であることが推測できる。*SpeB* はプロテアーゼとして宿主組織の破壊を引き起こすほか、*GAS* 自身のタンパク質を分解することも知られている。また、分泌型ではない *SpeB* の存在が報告されており、宿主細胞外マトリックスの基底膜を構成するラミニンへの結合能力を有していることが示されている[79]。本研究では培養上清を用い、分泌型 *SpeB* の発現を確かめたが、接着因子としての働きを考慮に入れる必要があるが、対数増殖期において *speB* mRNA を多量に発現している MTB314 はマウス感染において侵襲性感染を起こさなかったことから、その機能は限定されたものである可能性がある。

GAS の病原性には多くの分子が複雑に関与しており、それぞれの働きについて詳細な解析が多くのグループにより行われている。一方で、宿主体内において、それら個々の要因がどのように統合され、感染症としての病態を示すのかには不明な点が多い。本研究では MTB313, MTB314 を用いたマウス感染実験を行い、病原因子の発現の差異と侵襲性との関わりについて明らかにした。

本研究のリアルタイム PCR により、MTB313 では *rocA*、*covS* の発現が低下していることが明らかとなった。また *covR* はいずれの株でも発現量が有意な変化を見せなかった。*rocA*、*covS* の発現量の変化はマイクロアレイでは示されなかったが、これは遺伝子の抽出を“2 倍以上あるいは 1/2 以下”の条件で行ったからと思われる。最後に、*hasABC* が MTB313 で高い発現を示しており、実際にヒアルロン酸の分泌量が高いことが明らかとなった。*has* オペロンは *CovR/S* 系により負に制御されており、*pRocA* により相補されたことから、MTB313 においても *RocA* 変異に依存的であると考えられる。

3-3 小括

髄膜炎患者より分離された MTB313 は *rocA* 遺伝子に G464A 変異を持ち、変異のない MTB314 に比べて CovR/S 系の制御を受ける病原遺伝子群 *hasABC*, *sic*, *sclA*, *slo* 他の発現が増加していた。中でも *hasA* の発現は pRocA により相補される *rocA* 依存的な増加であり、ヒアルロン酸発現量の増加を伴ってムコイド型を起こしていたと考えられる。

MTB313 は hCD46Tg マウス感染において MTB314 に比べ有意に高い致死率を示した。また、MTB313 は MTB314 に比べ感染マウス体内で血液、肝臓、腎臓、膝下リンパ節に広がっており、高い致死率の原因と考えられる。

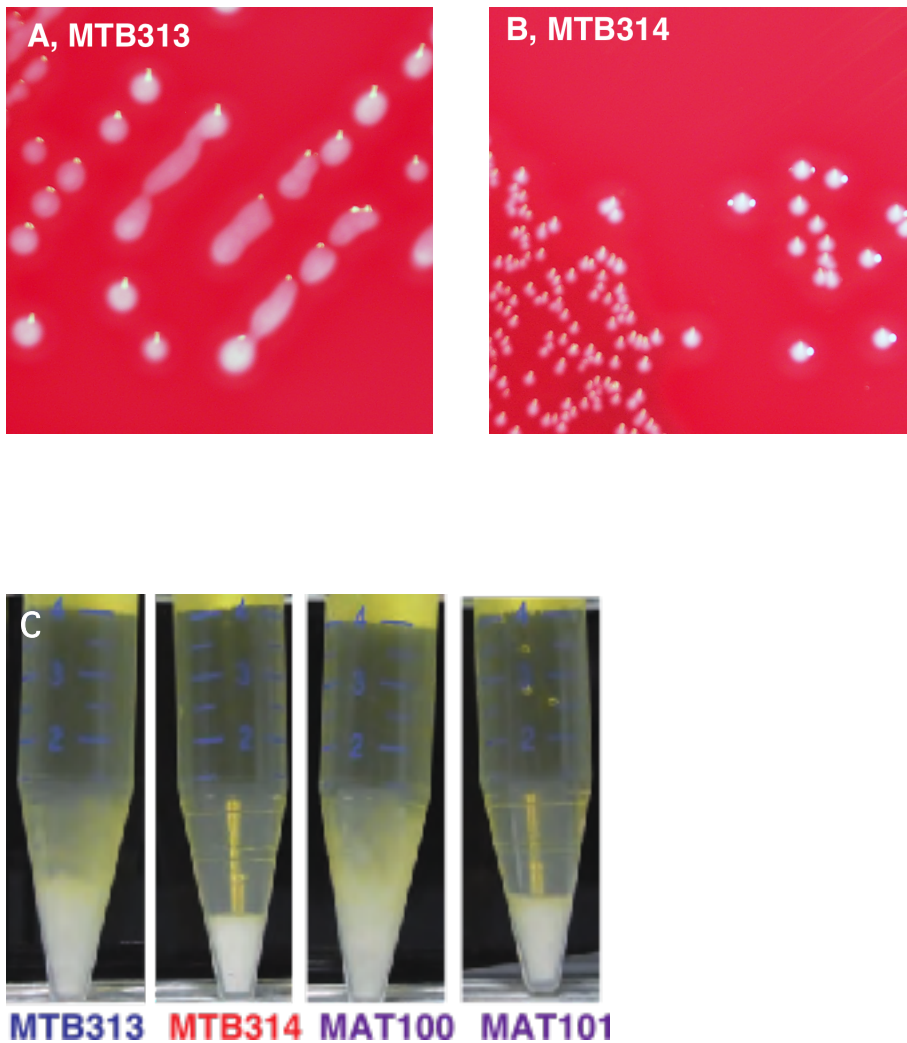


図 2. 血液寒天培地上のコロニー形状. A MTB313(ムコイドコロニー), B MTB314(非ムコイドコロニー), C MTB313, MTB314, MAT100, MAT101 の THY broth O/N 静置培養後の菌の性状

表 5-1. マイクロアレイ結果一覧(次項以降に続く)

Category	Gene	Product	Fold change MTB313/MTB314	Fold change MTB313/MAT101
MTB313 > MTB314 (complemented by <i>rocA</i>)				
	<i>sclA</i>	collagen-like protein	299.892	16.474
	<i>hasC</i>	UTP-glucose-1-phosphate uridylyltransferase	226.428	60.228
	<i>hasA</i>	hyaluronan synthase	171.914	42.030
	<i>hasB</i>	UDP-glucose 6-dehydrogenase	166.057	43.348
	<i>mac-1</i>	igG-degrading protease	55.556	22.727
	<i>spyCEP</i>	chemokine-cleaving protease	40.658	11.907
Virulence genes		alveolysin	35.714	7.692
	<i>slo</i>	streptolysin O	35.239	7.733
	<i>nga</i>	nicotine adenine dinucleotide glycohydrolase	32.258	6.711
	<i>ifs</i>	NAD glycohydrolase inhibitor	32.258	6.623
	<i>spyA</i>	ADP-ribosyltransferase	13.347	3.957
	<i>sic</i>	inhibitor of complement protein	10.065	3.097
	<i>scpA</i>	peptidase C5	7.154	3.084
	<i>ska</i>	streptokinase A	5.602	2.180
	<i>skc</i>	streptokinase C	5.475	2.152
	<i>speJ</i>	exotoxin J	4.065	3.390
		anthranilate phosphoribosyltransferase	199.802	50.956
	<i>fliH</i>	flagellar biosynthesis protein FliH	32.258	12.195
		alpha/beta hydrolase	28.609	8.012
		ADP-ribosyltransferase	13.347	3.953
	<i>cydD</i>	ABC transporter ATP-binding protein	4.851	5.109
	<i>cas1</i>	CRISPR-associated endonuclease Cas1	4.471	2.372
		ABC transporter permease	4.310	5.586
Others	<i>cas4</i>	CRISPR-associated protein Cas4	4.232	2.102
	<i>isdE</i>	heme ABC transporter substrate-binding proteinIsdE	4.187	5.215
	<i>cas7</i>	CRISPR-associated protein Cas7/Csd2	4.073	2.162
	<i>cas2</i>	CRISPR-associated endonuclease Cas2	3.982	2.306
	<i>cas8c</i>	CRISPR-associated protein Cas8c/Csd1	3.781	2.122
		D-alanyl-D-alanine carboxypeptidase	2.924	2.904
	<i>cbiQ</i>	cobalt transporter	2.327	2.270
		histidine triad protein	2.094	3.223
		ABC transporter ATP-binding protein	2.017	2.043

表 5-2. マイクロアレイ結果一覧(次項に続く)

Category	Gene	Product	Fold change MTB313/MTB314	Fold change MTB313/MAT101
MTB313 < MTB314 (complemented by rocA)				
Virulence gene	<i>spi</i>	streptopain	0.007	0.484
	<i>cfa</i>	CAMP factor	0.099	0.299
		multidrug resistance ABC superfamily ATP binding transporter	0.183	0.390
	<i>aid-I</i>	adhesin AIDA-I	0.465	1.105
Transcriptional regulators	<i>rgg</i>	transcriptional regulator	0.142	0.258
		GntR family transcriptional regulator	0.166	0.272
		copper transport negative transcriptional regulator	0.285	1.057
		XRE family transcriptional regulator	0.294	0.261
		PRD domain protein	0.321	0.725
	<i>yesM</i>	two-component sensor histidine kinase	0.411	0.776
		PadR family transcriptional regulator	0.445	0.934
		helix-turn-helix domain-containing protein	0.477	0.912
Others	<i>kupB</i>	Kup system potassium uptake protein	0.100	0.174
		tagatose-6-phosphate ketose peptidase S11	0.130	0.264
		peptidase S11	0.176	0.201
		ABC transporter ATP-binding protein	0.180	0.397
		Transpeptidase	0.181	0.202
		PTS fructose transporter subunit IIC	0.285	0.377
		Phosphotransferase system, fructose-specific IIC component	0.286	0.379
	<i>lmrB</i>	major facilitator superfamily protein	0.298	0.269
		TIGR00266 family protein	0.301	0.790
		large-conductance mechanosensitive channel	0.304	0.430
	<i>lysM</i>	LysM peptidoglycan-binding domain-containing protein	0.387	0.446
		endoribonuclease L-PSP family protein	0.398	0.487
		CHAP domain containing protein	0.400	0.497
		phosphoglycerate mutase family protein	0.400	0.599
	<i>cmk</i>	cytidylate kinase	0.401	0.434
		RidA family protein	0.403	0.494
	reactive intermediate/imine deaminase	0.403	0.494	
	membrane protein	0.415	0.817	
<i>ebsA</i>	pore forming protein	0.451	0.525	
	glycine/betaine ABC transporter permease	0.462	0.490	
<i>groES</i>	co-chaperoninGroES	0.482	0.673	
<i>pepT</i>	peptidase T	0.486	0.568	

表 5-3. マイクロアレイ結果一覧

Category	Gene	Product	Fold change MTB313/MTB314	Fold change MTB313/MAT101
MTB313 > MTB314 (not complemented by rocA)				
Virulence genes	<i>pepO</i>	lysM domain protein endopeptidase	3.036 2.119	1.696 1.170
	<i>mf3</i>	DNA/RNA non-specific endonuclease deoxyribonuclease	4.865 4.825	1.601 1.593
		A/G-specific adenine glycosylase	3.300	1.484
		polysaccharide deacetylase family protein	2.719	1.302
	<i>degV</i>	fatty acid-binding protein	2.345	0.916
Others	<i>ddpA</i>	nickel ABC transporter substrate-binding protein endopeptidase	2.261 2.131	1.273 1.174
	<i>yceD</i>	DUF177 domain-containing protein YceD	2.066	1.464
	<i>dppC</i>	dipeptide ABC transporter membrane subunit DppC	2.066	1.269
	<i>dppD</i>	dipeptide ABC transporter membrane subunit DppD	2.043	1.334
	<i>nikB1</i>	nickel transport system permease	2.025	1.314
MTB313 < MTB314 (not complemented by rocA)				
Virulence gene	<i>speB</i>	cysteine proteinase	0.004	ND
Transcriptional regulators	<i>yesN/araC</i>	two-component system response regulator transcriptional regulator	0.419 0.481	2.236 1.530
		LacI family transcriptional regulator	0.490	1.599
	<i>rgfB</i>	Endo/exonuclease/phosphatase phosphoglycerate mutase family protein	0.378 0.400	ND 0.599
		membrane protein	0.415	0.817
Others	<i>ebsA</i>	pore forming protein	0.451	0.525
	<i>groES</i>	co-chaperoninGroES	0.482	0.673
	<i>pepT</i>	peptidase T	0.486	0.568
		Mg ²⁺ /citrate complex secondary transporter	0.488	2.394

ND = signal not detected

第4章 *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* 感染マウスの病態

4-1 実験結果

(1) GGS_124 株の *in vivo* における病原性

GGG_124 感染マウスの臓器内生菌数の定量;

hCD46Tg マウスの比較対象として、同マウスの遺伝的バックグラウンドである C57BL/6J マウスを用い (non-Tg マウスとする)、 1×10^7 CFU の GGS_124 をマウス後足 (footpad) に皮下注射し、感染 3 日後に膝下リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓の生菌数を測定した (図 9)。

Non-Tg マウスに感染させた結果、感染 3 日後において、膝下リンパ節では生菌が検出された。一方で、肝臓、脾臓、腎臓ではいずれも菌が全く検出されなかった。対称的に hCD46Tg マウスではいずれの部位においても菌が検出された。膝下リンパ節で検出された両群の生菌数には有意な差がなかった ($P=0.4$)。

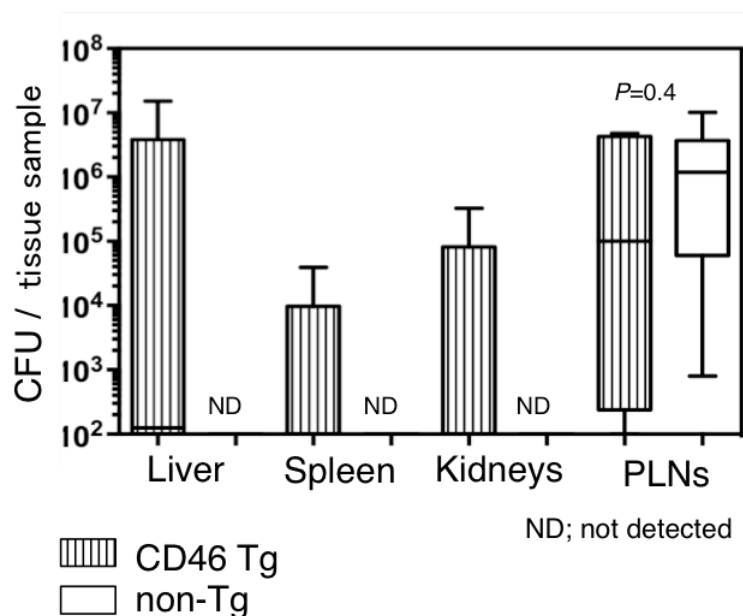


図 9. GGS_124 感染 hCD46Tg マウス及び non-Tg マウスの臓器内生菌数 (感染 3 日後)

GGs_124 感染 hCD46Tg マウスの致死率の検討;

GGs_124 を footpad に皮下注射し、感染 35 日間の生死をカウントしたデータをもとに致死曲線を作製した。(図 10)

その結果、致死率は hCD46Tg マウスでは 33.3%、一方で non-Tg マウスでは 0%であり、両群の致死率の間に有意な差が見られた ($P=0.02$)。

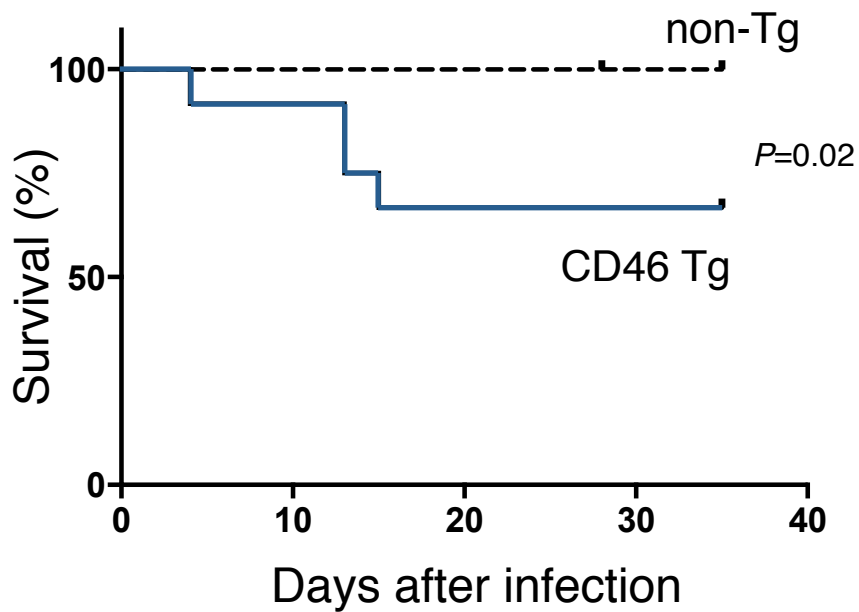


図 10. GGS_124 感染 Tg マウス、non-Tg マウスの致死率

(2) GGS_124 感染マウスの病理学的解析

GGs_124 を感染させた hCD46Tg マウスのうち 35 日後に生存していたマウスを観察すると、すべての個体において非感染側の足に異常は見られなかった(図 11A)のに対し、感染側の足首に腫脹と発赤が生じ、一部の個体では歩行に異常をきたしている様子が観察された(図 11B)。

一方、non-Tg マウスの感染側の足では感染 35 日後の時点で腫脹、発赤のいずれも見られなかった(図 11C)。

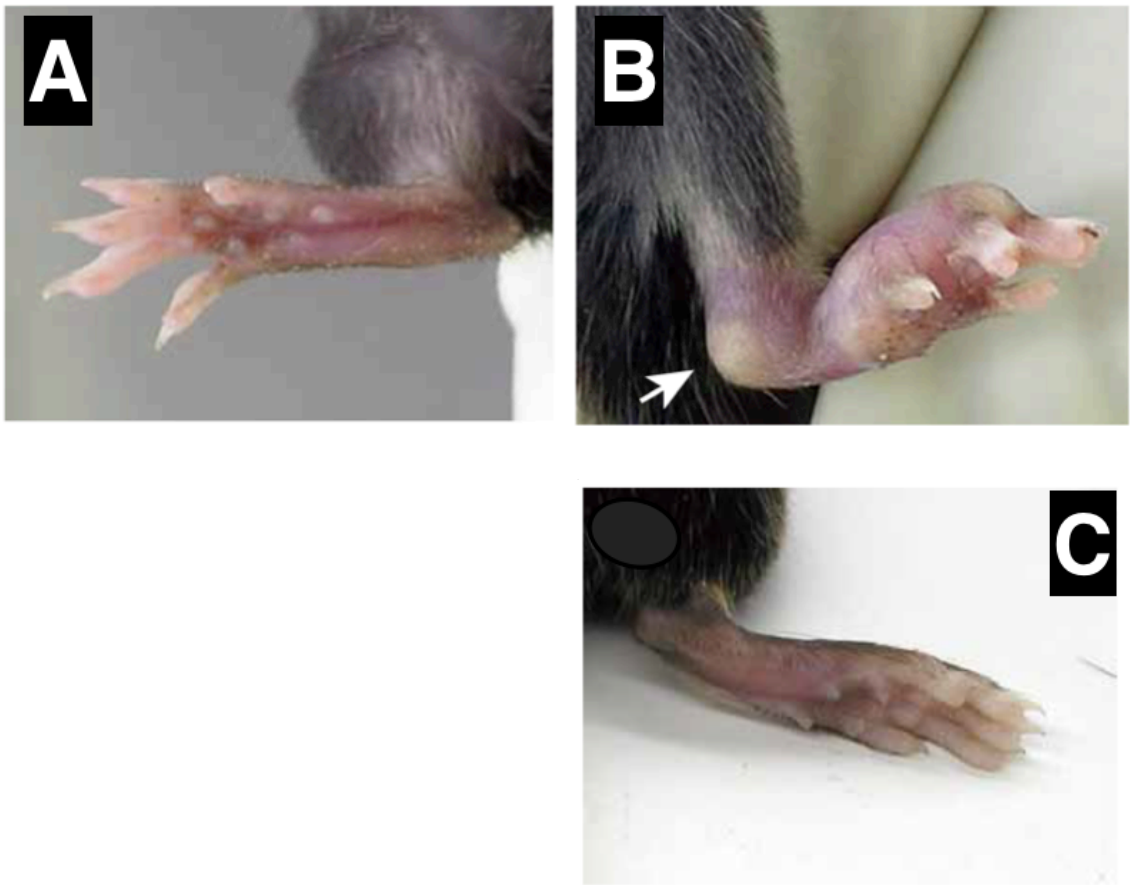


図 11A-C. GGS_124 感染におけるマウスの 35 日後の足の病態. A hCD46Tg マウス非感染側足, B hCD46Tg マウス感染側足, C non-Tg マウス感染側足

関節の病態を詳しく確認するため、足首関節を 4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋したのち切片を作製、H&E 染色して組織を観察した。

その結果、hCD46Tg マウスの非感染側の足首関節は正常な関節組織を保っていた(図 11D)。一方で、同マウスの感染側の足首関節では、滑膜組織の増殖により生じたパヌス(synovial pannus, 図中では黒い矢印下に青く染色された不定形の細胞群として見られる)が関節腔内に入り込んでいる様子が見られ、それに伴い骨組織・軟骨組織のいずれもが変形していた(図 11E)。

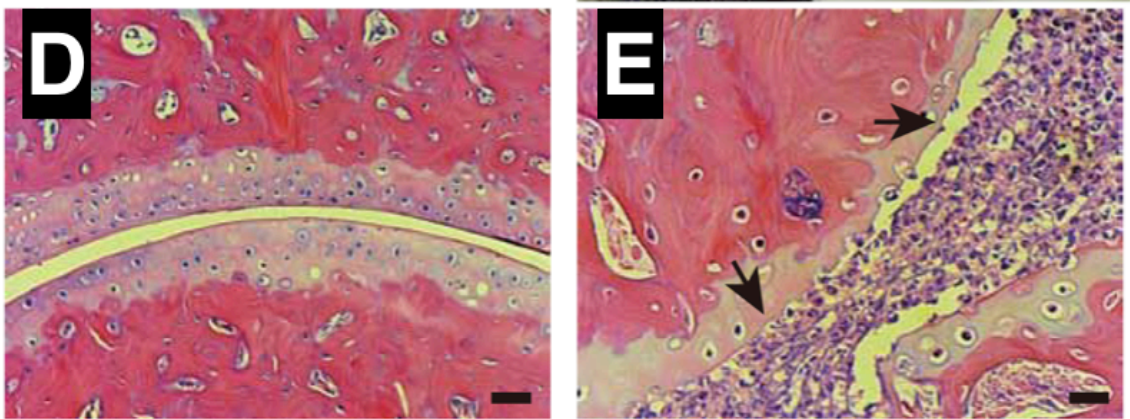


図 11D, E. GGS_124 感染 hCD46Tg マウス関節顕微鏡写真. D hCD46Tg マウス非感染側足首関節, E hCD46Tg マウス感染側足首関節 (H&E 染色, scale bar = 200 μ m)

hCD46Tg マウスでは GGS_124 感染後 6 日から、目視できる大きさの膿瘍を形成している個体が複数見られた。その中の 1 匹は感染 15 日後に左前足の付け根部分が大きく膨らみ(図 12A)、24 日後には胸部全体が大きく腫れた(図 12B)。死亡後に腫れの内容物を吸引したところ、クリーム色の膿状の粘液で満たされており、膿瘍であると考えられた。組織片と内容物をスライドガラスに塗抹・固定し、H&E 染色を行ったところ皮下膿瘍と確認された(図 12C, 黒矢印は膿性滲出物)。non-Tg マウスでは、皮下注射の直後に注射部位が腫大し、化膿した個体が認められたが注射部位の傷とともに回復した。

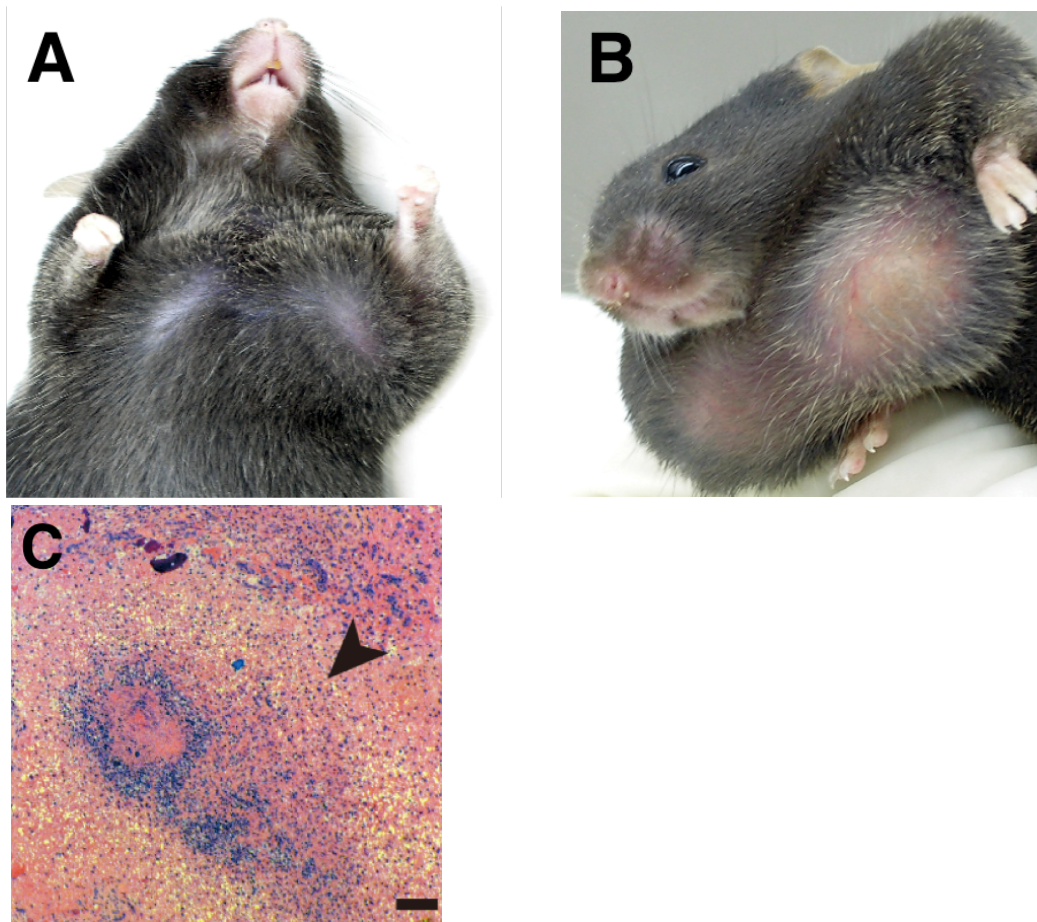


図 12. GGS_124 感染 24 日後に死亡した hCD46Tg マウスの病態. A 感染 15 日後の左足付根, B 感染 24 日後の胸部, C 感染 24 日後の胸部膿瘍内容物塗抹標本(H&E 染色、Scale bar=100 μ m)

感染 24 日後に死亡した hCD46Tg マウスの死因を特定するため、解剖を行った。肝臓に出血斑が散在し、腎臓には変色と腫脹を認めたため、これらの臓器を摘出し、4%パラホルムアルデヒドで固定、パラフィン切片を作製後、H&E 染色で顕微鏡観察を行った。

その結果、非感染マウスの腎臓(図 13A)と比べ、死亡 Tg マウスの腎臓には皮質領域の広範な壊死巣が見られた(図 13B, C, 黒矢印が、上部壊死組織と下部正常組織の境界)。さらに、非感染マウスの肝臓(図 13D)と比較し、死亡 Tg マウスの肝臓には門脈域に好中球等の炎症性細胞の浸潤及び肝細胞の壊死を伴う微小膿瘍(micro-abscess)が複数観察された(図 13E, F 黄色矢印)。

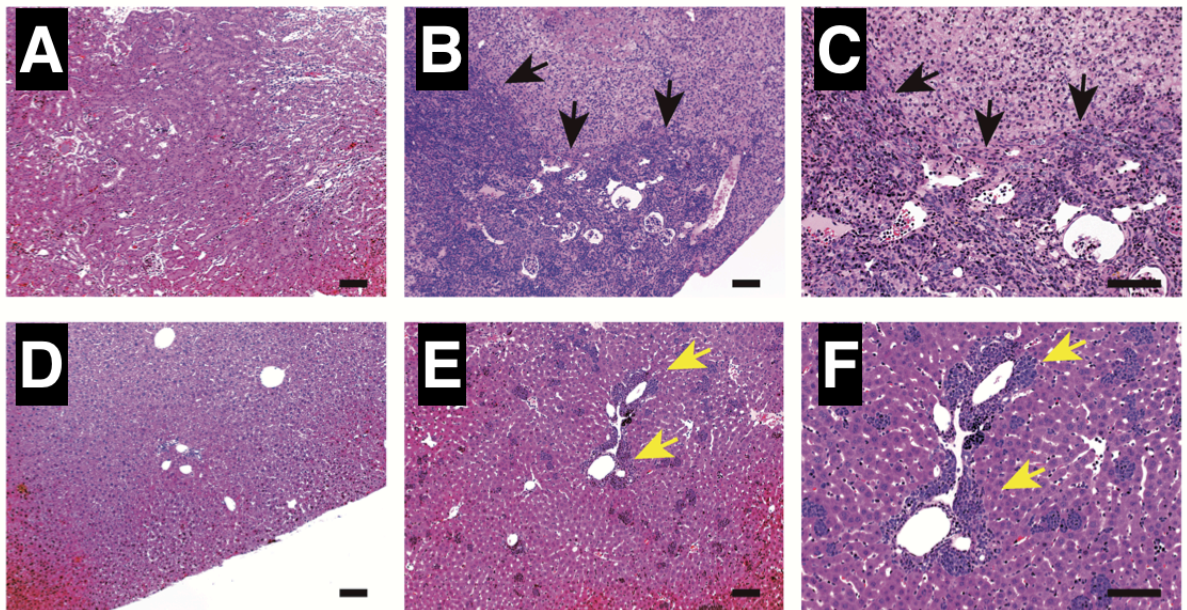


図 13. GGS_124 感染死亡 Tg マウス及び非感染 Tg マウスの組織像. A 非感染 hCD46Tg マウス腎臓, B GGS_124 感染 hCD46Tg マウス腎臓, C B の拡大像, D 非感染 hCD46Tg マウス肝臓, E GGS_124 感染 hCD46Tg マウス肝臓, F E の拡大像. (H&E 染色、Scale bar=100 μ m)

(3) RE378 株感染の *in vivo* における病原性

RE378 感染マウスの臓器内生菌数の定量;

hCD46Tg マウスと non-Tg マウスを用い、 1×10^7 CFU の RE378 を footpad に皮下注射し、感染 3 日後に肝臓、脾臓、腎臓、膝下リンパ節の生菌数を測定した (図 14)。

Non-Tg マウス感染3日後において、膝下リンパ節(D)では生菌が検出されが、肝臓(A)、脾臓(B)、腎臓(C)ではいずれも菌が検出されなかった。

一方 hCD46Tg マウスでは、各臓器において菌が検出される個体があった。膝下リンパ節(D)で検出された両群の生菌数に有意差はなかった ($P=0.163$)。

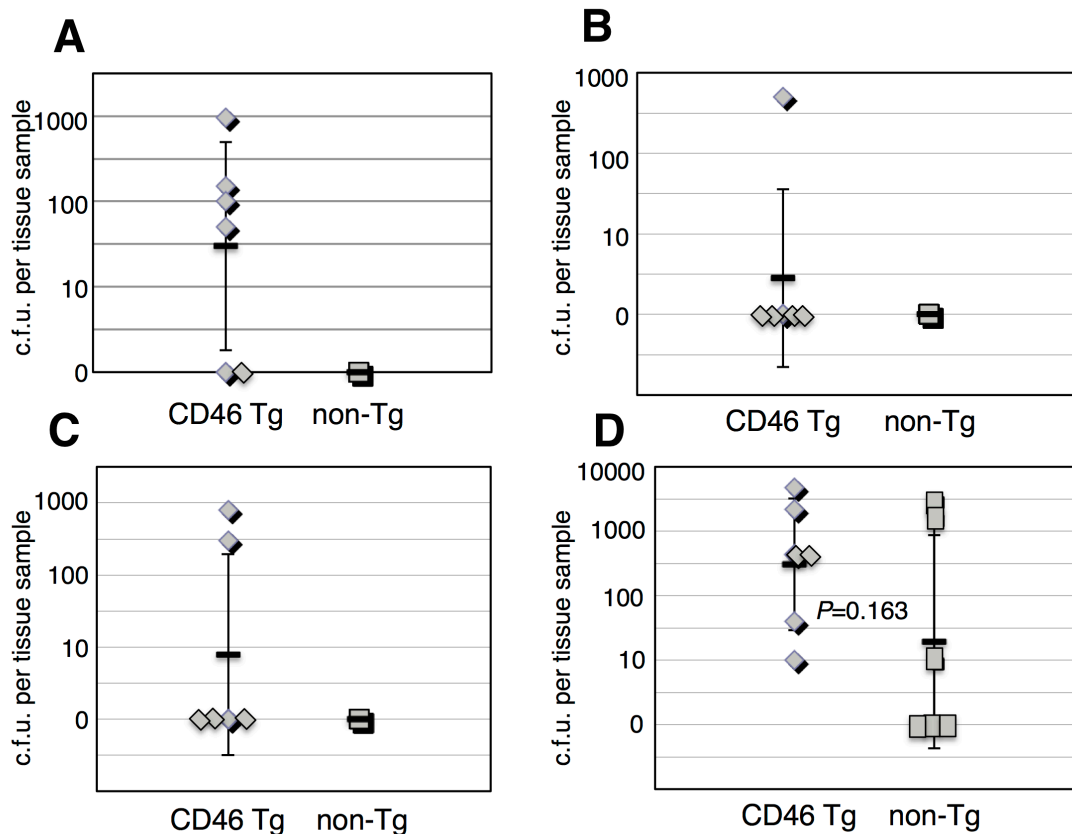


図 14. RE378 感染 hCD46Tg および non-Tg マウスの臓器内生菌数(感染 3 日後)
A 肝臓あたりの生菌数, B 脾臓あたりの生菌数, C 腎臓1組あたりの生菌数, D
膝下リンパ節1組あたりの生菌数

RE378 感染 hCD46Tg マウスの致死率の検討;

RE378 を hCD46Tg マウス、non-Tg マウス各 12 匹の footpad に皮下注射し、感染 28 日間の生死を観察した。しかし、期間中両群のマウスに死亡例はなく、致死率は hCD46Tg マウス、Non-Tg マウス共に 0%であった。

(4) RE378 感染マウスの病理学的解析

感染 28 日後、hCD46Tg マウス、non-Tg マウス共に全ての個体が生存していたが、感染側の足首の外観に関して差が見られたので、arthritis severity scor (ASS)を元に関節炎度を 0 から 3 の間でスコア化し、感染 28 日後に測定したところ、hCD46Tg マウス群では 2.9 ± 0.3 であったのに対し、non-Tg マウスでは 0.1 ± 0.3 であった(図 15)。

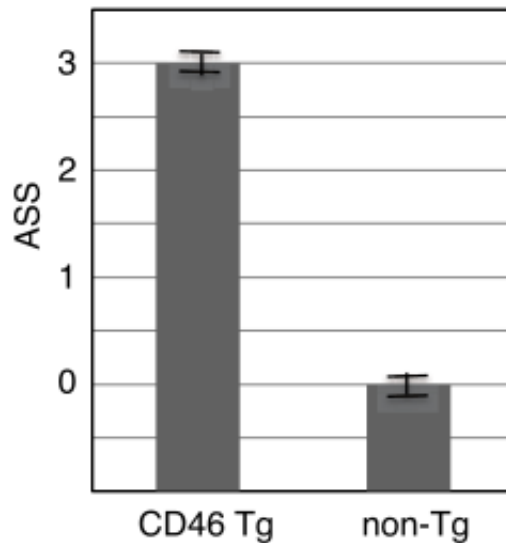


図 15. RE378 感染 hCD46Tg マウスおよび non-Tg マウスの ASS 値の比較

さらに RE378 感染 hCD46Tg マウスの足首を病理組織学的に解析したところ、非感染 Tg マウス(図 16A)、非感染 non-Tg マウス(図 16B)あるいは感染 non-Tg マウス(図 16D)と比較して、RE378 感染 Tg マウスでは関節腔に炎症性細胞の浸潤が見られ(図 16C、黒矢印)、滑膜の増殖によるパンヌスの形成が見られた(白矢頭)。

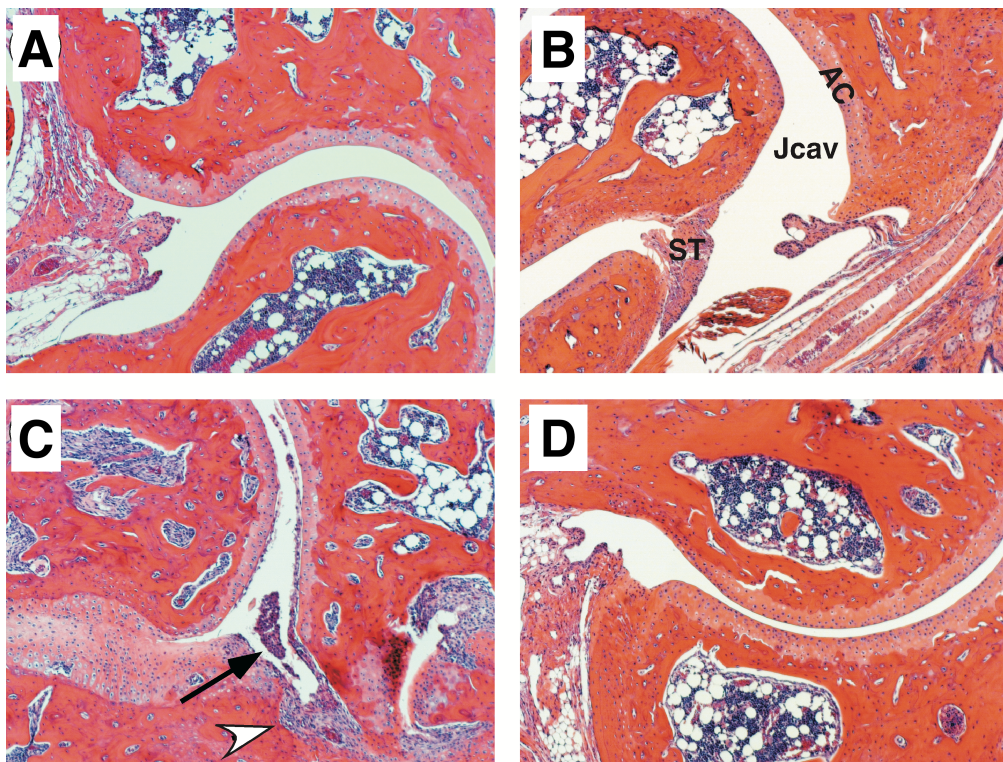


図 16. RE378 感染 hCD46Tg 及び non-Tg マウスの関節の組織像. A 非感染 hCD46Tg マウス足首関節, B 非感染 non-Tg マウス足首関節, C RE378 感染 hCD46Tg マウス足首関節, D RE378 感染 non-Tg マウス足首関節 (H&E 染色)

AC; Articular cartilage, 関節軟骨組織

Jcav; Joint cavity, 関節腔

ST; Sinovial tissue, 滑膜組織

次に関節炎の評価として、同組織の破骨細胞の活性化が誘導されているかどうかを調べるために、破骨細胞マーカーである酒石酸抵抗性酸性ホスファターゼ (Tartrate-Resistant Acid Phosphatase; TRAP) 染色を行なった。結果、非感染 Tg (A)、非感染 non-Tg (B)、感染 non-Tg (D) マウスの関節と比較し、RE378 を感染させた Tg マウスでは骨端部に赤色の TRAP 陽性の多核細胞 (破骨細胞) が観察され、関節炎の進行による骨破壊が起こりつつあることが示唆された (図 17C, E 黒矢印)。

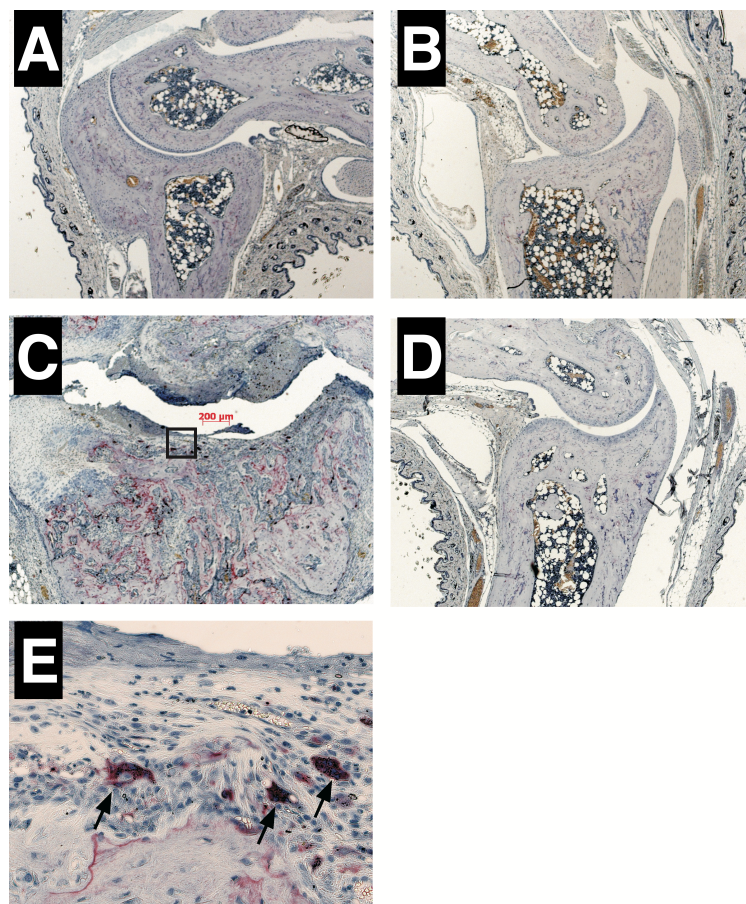


図 17. RE378 感染 hCD46Tg 及び non-Tg マウスの関節の組織像. A 非感染 hCD46Tg マウス足首関節, B 非感染 non-Tg マウス足首関節, C RE378 感染 hCD46Tg マウス足首関節, D, RE378 感染 non-Tg マウス足首関節, E C の黒四角部の拡大像 (全て TRAP 染色)

4-2 考察

ヒトの C,G 群レンサ球菌感染症の原因は、その大半を SDSE が占めていると考えられている[80]。SDSE 感染と GAS 感染の臨床的特徴を詳しく比較すると両者は異なっている。2006-2007 年の SDSE 感染症の臨床的特徴に関する全国 147 での医療施設への調査による GAS, 及び GBS (*Streptococcus agalactiae*) の比較報告において、SDSE 感染患者の年齢の中央値は 75 歳と他の 2 菌種より高く、脳卒中を起こした患者の割合、関節炎を呈した割合が他の 2 菌種より有意に高い結果が得られている[81]。また、2005 年に全国 193 医療施設の細菌検査室を対象に実施したアンケート調査では、G 群レンサ球菌を分離した患者 167 例の疾患内訳において、閉鎖性化膿疾患、菌血症・敗血症に次いで化膿性関節炎が多い(28 例, 約 16%)ことが示されている[23]。

GGs_124 感染 hCD46Tg マウスは、約 3 割が感染により死亡し(図 10)、そのうち 1 匹は腎臓に壊死を認めた(図 13)。また、肝臓にも微小膿瘍が見られ、多臓器不全に近い症状を起こして死亡したのではないかと推測され、ヒトの敗血症に近い病態であることが示唆された[87]。また、感染 35 日後に生存していた全ての個体で関節炎が観察された。組織切片の観察から滑膜の炎症によるパンヌスと骨・軟骨の組織破壊が見られた(図 11)。

hCD46Tg マウスに SDSE RE378 を感染させた場合においても、同様に関節炎が惹起された。関節の病理像は GGS_124 感染と同様、パンヌス形成を示しており(図 16)、TRAP 染色から骨端部の破骨細胞が活性化していることが明らかとなった(図 17)。炎症については、感染 0, 7, 15, 25 日目に関節組織から楔状骨と足中骨を摘出し、抽出した total RNA をもとに IL-6, IL17A, IL-1 β , TNF- α の発現をリアルタイム PCR により定量したところ、hCD46Tg マウスでは non-Tg マウスに比べ 25 日後の発現量が多い傾向が見られた[83]。同時に破骨細胞分化因子とその受容体である receptor activator of nuclear factor-kappa B (RANK) ligand

(RANKL)と破骨細胞分化抑制因子 osteoprotegerin (OPG)の発現量も同様の方法で確かめたところ、RANKL mRNA 発現が感染 15, 25 日目で Tg マウスのみ上昇していることがわかった。ここから、今回モデル構築を試みた SDSE 感染 Tg マウスの関節炎では炎症が骨組織に及んでいることが示唆された。

一般的に、増殖したパルプからプロテアーゼが分泌され、炎症が破骨細胞の活性化を促すことで軟骨および骨組織が破壊されてゆく過程はリウマチ性関節炎によく見られる[84][85]。また、GAS で見られる急性リウマチ熱の症状の一つに多発性関節炎があるが、これは関節組織の破壊を伴わないとされている。レンサ球菌と同じグラム陽性球菌である *Staphylococcus aureus* を C57BL/6J に感染させると、炎症、パルプ形成、骨破壊を伴う重度の敗血症性関節炎を引き起こすという報告があり[86]、本研究の結果と類似性が見られる。前段落にあげた生方らのアンケート調査では G 群レンサ球菌による関節炎は化膿性関節炎であるとしており、hCD46Tg マウスの関節炎をより詳細に評価するためには関節内の菌の有無を明らかにする必要がある[87]。

本研究では、hCD46Tg マウスに SDSE, GGS_124 株および RE378 株を感染させた。GGS_124 は STSS の患者より分離された株である[25]。分離したグループによる全ゲノム配列の解析結果によれば、GGS_124 は GAS の主要な病原因子の一部に相同性の高い配列を有している。溶血因子である *sagA*, *slo* (アミノ酸レベルでの相同性; BLAST 解析により GAS MGAS315 との Identities% がそれぞれ 88.68%, 98.77%), スーパー抗原 *speG* (79.49%), プロテアーゼ *ska* (88.18%), *scpA* (SDSE では *scpB*, 95.38%), 接着因子の *lmb* (99.67%) 等である。一方、GGS_124 は GAS の劇症型感染症に重要な役割を果たしていると考えられているスーパー抗原 *speA*, *speC* [88] を保有しておらず、プロテアーゼ *speB*, 莢膜ヒアルロン合成酵素群 *hasABC* オペロンも存在しない。第 3 章で hCD46Tg マウスに感染させた MTB313, MTB 314 は髄膜炎患者より分離された侵襲性 GAS であるが、GGS_124 で見られた関節炎、胸部の膿瘍は観察できなかった(腎臓の壊死、

肝臓の微小膿瘍については、MTB313, MTB314 で病理観察を行わなかったため比較することができない)。同じトランスジェニックマウスを用いて GAS 分離株と SDSE 分離株で異なる病態を示すことが明らかとなった。hCD46Tg マウスを用いた溶血性レンサ球菌マウス感染モデルは、ヒト感染における病原性の解明に有用なツールであると考ええる。

4-3 小括

hCD46Tg マウスに GGS_124 を感染させたとき 35 日間の致死率は 33.3%であったのに対し、WT マウスの致死率は 0%であった。Tg マウスでは感染3日後に肝臓、脾臓、腎臓、膝下リンパ節、から生菌が分離されたが、WT マウスでは膝下リンパ節からしか菌が検出されなかった。hCD46Tg マウス感染後死亡例からは組織の壊死が観察された。

以上の結果より、hCD46Tg マウスは GGS_124 感染による侵襲性感染を起こしやすいと考えられる。加えて、hCD46Tg マウスでは GGS_124 感染により関節炎が観察された。RE378 感染では Tg マウスの死亡は 0%であったが GGS_124 と同様に関節に腫脹・紅斑を示し、関節の骨端部では破骨細胞の活性化が見られ、関節炎が生じていた。以上の結果より、hCD46Tg マウスはヒトの SDSE 感染症のモデルとして有用と考えられる。

第5章 伴侶動物より分離された *Streptococcus canis* の *in vitro* における病原性と分子特性

5-1 実験結果

(1) 伴侶動物由来 *S. canis* の宿主情報

本研究に用いた *S. canis* 43 株 (伴侶動物由来 40 株、ヒト由来 2 株、基準株 1 株) の宿主・患者の動物種、性別、年齢、都道府県、分離年、分離検体を表 1 (第 2 章) にまとめた。

伴侶動物由来株の分離地域は、千葉県 18 株、東京都 7 株、愛知県・岡山県 3 株、以下、福井県、群馬県、石川県、神奈川県、京都府、長崎県、新潟県、埼玉県、鳥取県がそれぞれ 1 株ずつだった。

分離検体別では、解放膿が 16 株、耳鼻咽喉科領域の検体由来が 13 株、泌尿器系検体由来が 6 株、子宮由来 2 株、眼部由来 2 株、肛門腺由来 1 株であった。動物種はイヌ由来が 30 株、ネコ由来が 10 株で、年齢の平均値は 10.7 歳 (1 歳から 19 歳に分布)、雄が 24、雌が 16 で、性別の比率は 3:2 を示した。

(2) SCM (M-like protein) アレルタイプ

使用した *S. canis* 43 株の SCM アレルタイプを表 6 (次項) に示した。

グループ I に属する SCM タイプを有する株は 24 あり、そのうち最も多かったのは、type1 の 16 株であった。グループ II に属する SCM タイプを有する株は 19 株あり、その中では type10 SCM を有する株が 9 株で最も多く、次いで、type11 の 4 株であった。

表 6. ヒト・伴侶動物由来 *S. canis* 分離株の分子特性 (SCM type, ST, AMR)

Isolate	SCM allele type (allele group)	ST (clonal complex)	AMR phenotype ¹⁾	AMR genotype
NCTC 12191(T)	1 (I)	9 (9)	None	None
TA4	1 (I)	9 (9)	None	None
OT1	1 (I)	9 (9)	None	None
FU1	11 (II)	41	None	None
FU3	4 (I)	14 (14)	Minocycline, azithromycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(O)</i>
FU6	1 (I)	9 (9)	None	None
FU7	10 (II)	21	Minocycline	<i>tet(O)</i>
FU14	2 (I)	46 (46)	Minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(O)</i>
FU15	1 (I)	9 (9)	None	None
FU16	11 (II)	41	None	None
FU17	11 (II)	41	None	None
FU24	1 (I)	9 (9)	None	None
FU25	12 (II)	47	None	None
FU29	5 (I)	44	None	None
FU30	11 (II)	41	None	None
FU31	1 (I)	48	None	<i>tet(O)</i>
FU32	10 (II)	21	Minocycline	<i>tet(S)</i>
FU52	1 (I)	3 (9)	Minocycline	<i>tet(O)</i>
FU53	10 (II)	21	None	None
FU57	1 (I)	2 (46)	None	None
FU58	14 (II)	49	None	None
FU63	2 (I)	46 (46)	Minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(O)</i>
FU64	3 (I)	13 (14)	Minocycline	<i>tet(M)</i>
FU65	15 (II)	50	None	None
FU66	1 (I)	9 (9)	None	None
FU67	1 (I)	9 (9)	None	None
FU69	13 (II)	51	Minocycline	<i>tet(M)</i>
FU77	1 (I)	9 (9)	None	None
FU78	10 (II)	21	None	<i>tet(O)</i>
FU90	6 (I)	27	Minocycline	<i>tet(O)</i>
FU91	10 (II)	21	None	<i>tet(S)</i>
FU92	4 (I)	11	None	None
FU93	10 (II)	21	Minocycline	<i>tet(S)</i>
FU97	4 (I)	14 (14)	Erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i>
FU100	14 (II)	5	None	None
FU112	1 (I)	48	Minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(O)</i>
FU113	10 (II)	21	Minocycline	<i>tet(O)</i>
FU115	1 (I)	30 (9)	None	None
FU116	14 (II)	49	Minocycline	<i>tet(M)</i>
FU120	1 (I)	48	Minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(M)</i>
FU121	10 (II)	21	None	<i>tet(O)</i>
FU128	1 (I)	3 (9)	Minocycline	<i>mef(A)</i> , <i>tet(O)</i>
FU129	10 (II)	21	Minocycline, erythromycin, azithromycin, clindamycin	<i>erm(B)</i> , <i>tet(O)</i>

(薬剤耐性は微量液体希釈法により得た MIC 値と CLST document M100-S22 を元に判定した)

(3) ST(sequence type) および CC (clonal complex) 情報

使用した *S. canis* 43 株の ST および CC を決定し、表 6(前項)に示した。その結果、ST9(9 株)、ST3(2 株)、ST30(1 株)を含む CC9 に属する分離株が 12 株存在した。また、ST21(9 株)と ST41(4 株)は CC を形成こそしていないものの、今回調べた菌株の中では最も近縁同士となり、一つのグループを形成していると考えられた。

(4) 抗菌薬感受性および薬剤耐性遺伝子

使用した *S. canis* 43 株の、テトラサイクリン系、マクロライド系、リンコサミド系抗菌薬感受性および薬剤耐性遺伝子の有無を決定し、表 6(前項)に示した。テトラサイクリン系、マクロライド系、リンコサミド系に対する耐性を示した株の割合は 39.5%だった。また、薬剤耐性遺伝子を有していた株は全体の 48.8%だった。レボフロキサシン、βラクタム系薬に対する耐性を示した株はなかった。

(5) *in vitro* における宿主細胞内在性および溶血活性

ヒト大腸上皮由来株化細胞 Caco-2 に対し *S. canis* が示す内在化能を定量した結果を図 18(次項)に示した。内在化は、100 細胞あたりの菌数として求めたものを、ATCC12394 を基準として相対値で表した。全体の値から求めた平均値である 200 を超えた値を示した株を「高内在性」としたところ、高内在性株は 19 株、低内在性株は 24 株であった。

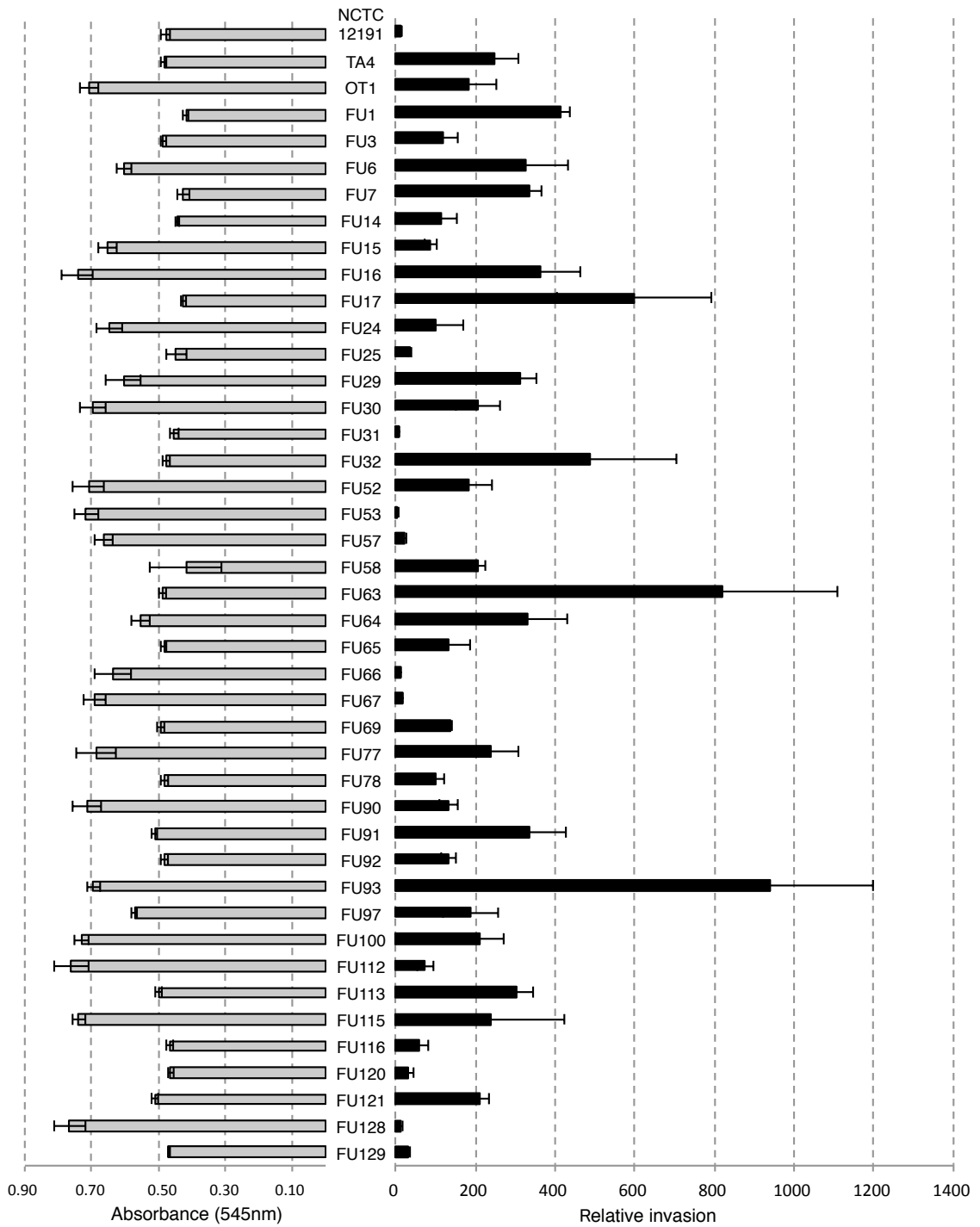


図 18. *S. canis* 分離株の溶血活性(左)および Caco-2 細胞に対する内在性(右)

次に、皮膚からの感染を想定してヒト角化細胞由来株化細胞である HaCaT を用いて同様の実験を行なった。Caco-2 細胞を用いた内在性試験にて高内在性を示した株 5 株と、顕著な低内在性を示した株を用いた結果を図 19 に示した。Caco-2 細胞での結果と HaCaT 細胞での結果を比較したところ、Caco-2 細胞にて高内在性を示した株、低内在性を示した株は、HaCaT 細胞においても同様の傾向を示した。

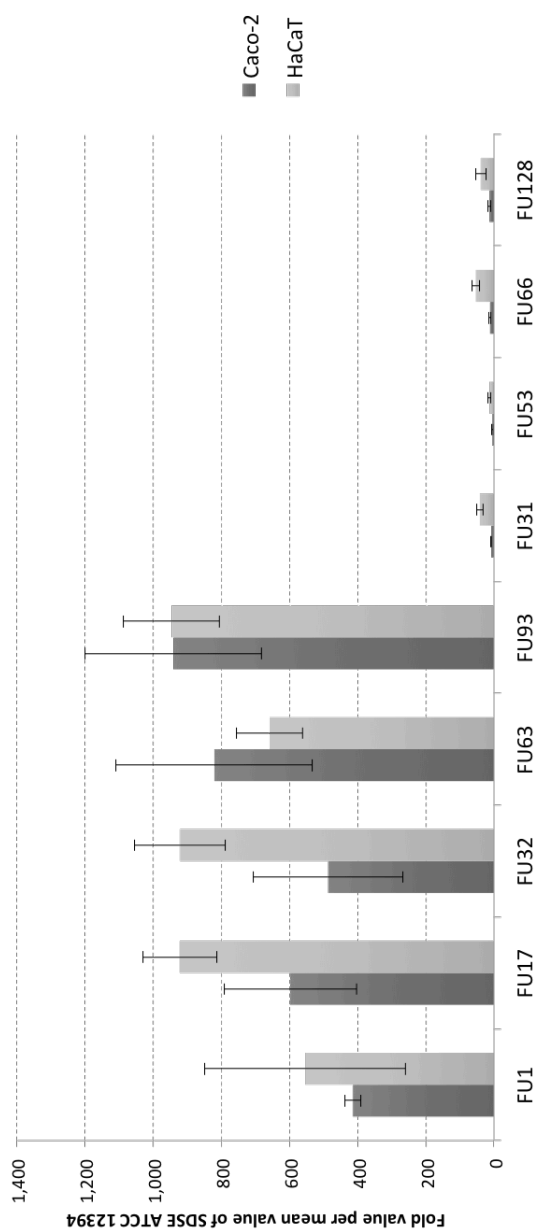


図 19. *S. canis* 分離株の Caco-2 細胞, HaCaT 細胞への内在性比較

in vitro での病原性評価の一端として、ヒツジ赤血球の溶血活性を測定した。細胞内在性の評価を行った43株の *S. canis* を THY broth 10 mL で 37°C にて O/N 静置培養し、得られた培養上清をサンプルとした。

その結果、545 nm の吸光度が 0.5 以上を示す高溶血活性株と 0.5 以下を示す低溶血活性株に大別された(図 18, 20)。高溶血活性株が 24 株であったのに対し、低溶血活性株は 19 株だった。

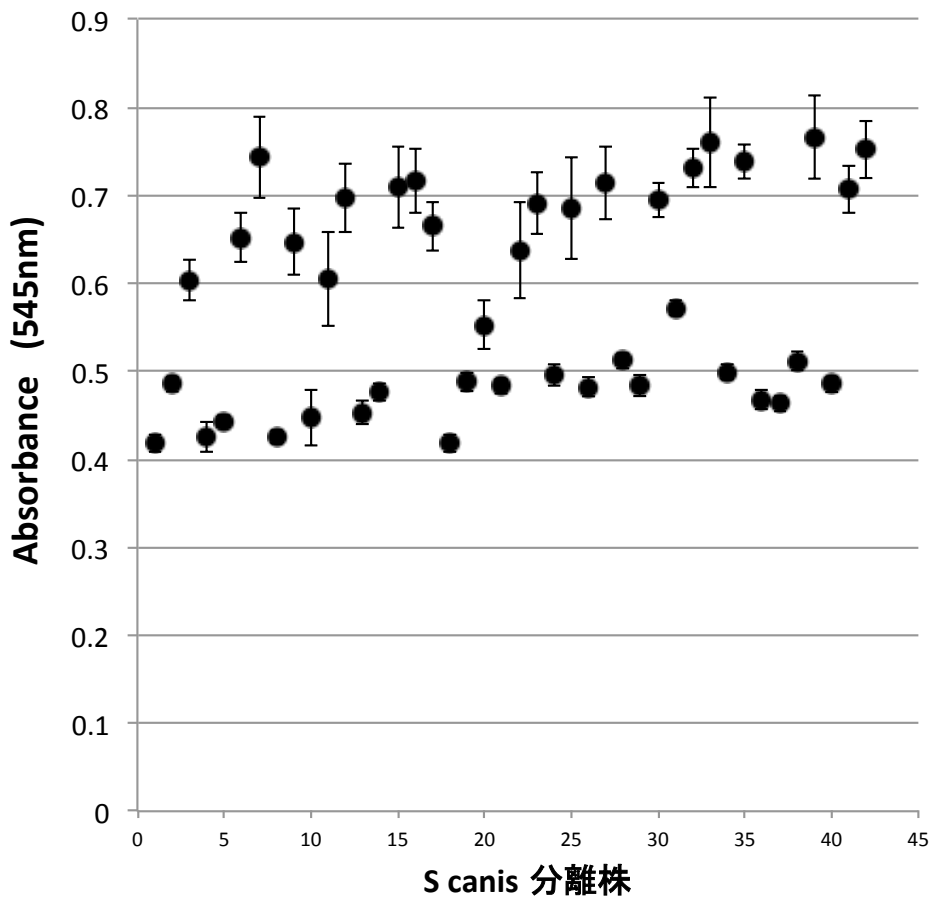


図 20. *S. canis* 分離株のヒツジ赤血球に対する溶血活性 (n=5)

(6) *S. canis* 分離株の分子特性とヒト細胞内在性および溶血活性の関連

(1)から(5)で明らかになった *S. canis* 分離株の性質に関連が見られるかを Fisher の直接確率検定により検討した。

S. canis 分離株における宿主・患者の動物種、性別、年齢、都道府県、分離年、分離検体と、ヒト細胞内在性および溶血活性との関連は見られなかった。

使用した *S. canis* 43 株の SCM アレルタイプとヒト細胞内在性の関連を検討したところ、グループ II SCM に属する type10,11 とヒト細胞への高内在性株に有意な関連が見出された ($P<0.05$)。SCM アレルタイプと溶血活性との関連は見られなかった。

使用した *S. canis* 43 株の ST および CC と、ヒト細胞内在性の関連を検討したところ、ST21/41 とヒト細胞への高内在性株に有意な関連が見出された ($p<0.01$)。その他の ST および CC とヒト細胞内在性、あるいは溶血活性との間に関連は見られなかった。

使用した *S. canis* 43 株の、テトラサイクリン系、マクロライド系、リンコサミド系抗菌薬感受性および薬剤耐性遺伝子の有無とヒト細胞内在性あるいは溶血活性との関連を検討したところ、両者の間に有意な関連は見られなかった。

最後に、ヒト細胞内在性と溶血活性に関連があるかを検定したところ、ヒト細胞内在性の高いグループ/低いグループと、溶血活性の高いグループ/低いグループ、それぞれに属する株は異なり、関連は見られなかった。

5-2 考察

溶血性レンサ球菌の中で、最も病原性の研究が進んでいるのは前述の通り GAS であり、細胞への感染の第一段階である細胞表面への接着、それに続く侵入・内在化に関して多くの報告がある。

細胞への接着に対しては M protein[89]、fibronectin-binding proteins (FBPs) [90]の関与が示されている。GAS の細胞内在化は *emm1* がコードする M1 型で高頻度に起こることが示されており、抗 M1 抗体により阻害される[89]。また、M3 タンパク質が内皮細胞への内在化に寄与していることも報告されている[91]。さらに、M49 タンパク質が宿主プラスミノゲン/プラスミンに結合し、インテグリンを介した細胞内在化に関与しているという報告もなされている[92]。このことから、多くの *emm* 型において、GAS 表面の M タンパク質が細胞内在化に関与していることが示唆される。*S. canis* において同定されている SCM は、GAS をはじめとしたレンサ球菌の M タンパク質に類似した M-like protein であり、宿主のプラスミノゲンに結合することが報告されている[93]。宿主の細胞外マトリックス構成分子などへの結合能は不明であるが、M protein との構造的な類似が見られることから *S. canis* の宿主への感染に際し、細胞への接着・内在化に関与している可能性がある。

本研究では、日本国内で収集したイヌ、ネコ由来の *S. canis* 40 株とヒト由来 2 株について、それぞれが保有する SCM をアミノ酸配列に基づき分類した。SCM は構造上大きく 2 グループに分類される[48][94]。比較的長いペプチド鎖からなるグループ I と、グループ I に比べて短いものが多く、多様性が大きいグループ II に分子機能としての差異があるかどうかは未だ明らかになっていない。本研究で高い内在性と関連が見いだされた SCM type10/11 はグループ II に属している。高内在性という表現型にグループ II の特徴を持つ SCM 分子が影響を及ぼしているかは、今後明らかにしていく必要がある。

本研究では SCM type の他に、MLST により ST21/41 に分類される株と高い内在

性に関連を見出した。MLST は細菌ゲノム中に離れて存在する7つのハウスキーピング遺伝子の塩基配列に基づいたタイピングであり、その意義は特定の病原因子の配列に基づいた *emm* typing, *sic* typing 等とは異なり、ゲノムの系統的な分類である。従って、系統的に近いと推定される ST21/41 に共通する未知の病原因子が何らかの機能を発揮している可能性がある。筆者らは、伴侶動物由来 *S. canis* 7株とヒト由来 *S. canis* 2株のドラフトゲノム配列を決定している(表7, 章末)[95-97]。contig 配列のアノテーション(DFAST, DDBJ, 国立遺伝学研究所, <https://dfast.ddbj.nig.ac.jp>)の結果、fibronectin-binding protein 等、宿主細胞成分結合分子に相同性のある配列が複数含まれていることを確認しており、*S. canis* のヒト細胞への内在化に関与する分子の候補と考えられる。

レンサ球菌はゲノム内にファージ領域をコードすることが多く、GAS, SDSE 等では複数の病原遺伝子がファージ由来の領域にコードされていることが知られている[98][25]。今回解析した *S. canis* 分離株のドラフトゲノム配列は、いずれも複数のファージ配列を含んでおり、GAS, *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *dysgalactiae* 等で既に配列が同定されているファージ領域と相同性が高い。また、TA4 ゲノムには、レンサ球菌で広く保有されている II-A, I-C 型の CRISPR 領域があり、当時唯一ドラフトゲノム配列が NCBI 上で明らかになっていた FSL Z3-227 株にも、同型の CRISPR が存在していた(表8, 章末)。さらに、PCR によって伴侶動物由来分離株でも両座位が保存されていることを確認した(図21, 章末) [99]。これら、*S. canis* CRISPR が有しているスペーサー配列を解析すると、その多くが GAS 他溶血性レンサ球菌の保有するファージ領域など移動性エレメントの配列と同一であることがわかった。

この現象は GAS, SDSE でも報告されている。考察として、レンサ球菌において種間で病原因子・薬剤耐性遺伝子を含むファージが水平伝播する可能性とともに、その取り込みを菌自体がある程度制御しているのではないかと考えられており、現在も研究がなされている[100][25]。本研究により、*S. canis* も恐らく GAS, SDSE

と同様に、病原性について考える際、ファージ等を介した遺伝子の水平伝播を考慮に入れる必要があると思われる。

今回の解析では、細胞内在化と菌株情報の検討が十分にできなかった。動物種、性別、年齢、分離検体、分離年月日、分離都道府県などについて十分な比較検討が可能なサンプル数に達していない。加えて、症状、治療履歴、予後については情報を得ることができなかった。ヒト由来株2株については、感染元である動物由来の菌株を入手することで、より詳細な解析が可能になると考える。

SCM 10/11 と ST21/41 は、同一の菌株群であることが示されており(表 6)、解析株を増やすことで、SCM type と ST の関連を明らかにすることも今後必要である。

宿主上皮・角化細胞への内在化は、最も研究が進んでいる GAS においても、感染の成立と進行上、菌にとってどのようなメリット、あるいはデメリットがあるのかについて結論付けるには至っていない。

本研究で、*S. canis* においても *in vitro* で宿主上皮・角化細胞へ内在化することを示したが、それが実際の宿主への感染にどのような役割を果たしているのかを今後明らかにする必要がある。

細胞への接着と内在化は異なる現象であり、それぞれが発生する要件は異なると考えられる。レンサ球菌の宿主細胞への接着は主に GAS において研究が進んでおり、前述の M protein の他に Sfb1(PrtF1)をはじめとする fibronectin-binding protein, collagen-binding protein, laminin-binding protein 等多様な接着因子が同定されている[101]。

一方で内在化はエンドサイトーシスあるいはカベオラ構造を介した細胞による取り込みが主たるメカニズムであることが報告されている[57][102]。*S. canis* のどのような分子機能が内在化に関与しているかを明らかにすることも今後の課題であると考えられる。

5-3 小括

S. canis 分離株のヒト上皮細胞への内在性を 40 株調べた結果、その値に株による差異があることが明らかとなった。ヒト細胞 Caco-2 へ高い内在性を示す株は SCM type 10/11 および ST21/41 の分子特性を持つグループに多いことを示した。

表7. *S. canis* ヒト・動物由来分離株 ドラフトゲノム概要

Strain [host/sex/age (year-old)/area/source]	Genome size (bp)	No. of contigs [avg coverage (x)]	N50 (bp)	No. of CDSs ^a /rRNAs ^a /tRNAs ^a /CRISPRs ^b	%G+C content	%Coding ratio	GenBank / SRA accession no.
FU1 [cat/M ^c /unknown/Chiba/open pus]	2,061,753	39 [196]	172,821	1,910/47/4/3	39.6	84.6	BLIS000000000 / DRR200335
FU6 [cat/M/6/Okayama/open pus]	2,203,489	65 [400]	91,090	2,138/32/3/3	39.5	83.7	BLIT000000000 / DRR200263
FU29 [dog/F ^c /6/Kanagawa/vaginal swab]	2,029,450	41 [457]	118,261	1,892/39/3/3	39.8	84.9	BLKN000000000 / DRR205307
FU53 [cat/F/unknown/Chiba/nasal discharge]	1,901,156	23 [695]	218,664	1,766/42/4/3	39.8	85	BLKO000000000 / DRR205308
FU93 [dog/F/9/Chiba/open pus]	2,042,355	38 [373]	117,656	1,906/38/3/2	39.6	84.7	BLKP000000000 / DRR205309
FU97 [dog/M/11/Okayama/open pus]	2,032,437	37 [614]	114,881	1,898/30/3/2	39.5	84.9	BLKQ000000000 / DRR205310
FU129 [dog/M/9/Niigata/open pus]	2,028,761	37 [433]	125,448	1,878/41/4/2	39.5	84.6	BLIU000000000 / DRR200336
TA4 [human/M/71/Tokyo/blood]	2,129,080	60 [181]	95,904	2,040/38/3	39.7	84.6	BEWZ000000000 / DRR200334
OT1 [human/F/91/Gifu/blood]	2,030,366	48 [427]	137,776	1,931/38/3	39.7	84.5	BJOW000000000 / DRR182664

表8. *S. canis* FSL Z3-277, TA4のCRISPR

Strain	CRISPR array start (nucleotide position)	CRISPR array end (nucleotide position)	Direct repeat sequence including terminal repeat sequence	Number of spacers	CRISPR -Cas gene type	<i>cas</i> detected
FSL Z3-277	289368	291062	ATTTCAATCCACTCACCCATGAA GGGTGAGAC	25	I-C	<i>Cas2, Cas1, Cas4, Cas7, Cas8c, Cas5, Cas3</i>
	7393	7560	GTTTTGGGACCATTCAAAAACAAC ATAGCTCTAAAAC*	2	II-A	<i>Csn2, Cas2, Cas1, Cas9</i>
TA4	17028	17327	ATTTCAATCCACTCACCCATGAA GGGTGAGAC	4	I-C	<i>Cas2, Cas1, Cas4, Cas7, Cas8c, Cas5, Cas3</i>
	21375	21872	GTTTTAGAGCTATGTTGTTTTGAA TGGTCCCAAAAC*	7	II-A	<i>Csn2, Cas2, Cas1, Cas9</i>

* Both sequences are complementary.

		Spacer																							Strain				
genogroup		24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1				
B													2i		2g	2f	2e						1y	1x	1w	1v	1u	1t	FU14
		2p	2o	2n	2m	2l	1z	2j	2i	2h	2g	2f	2e						1y	1x	1w	1v	1u	1t	1s	FU13			
													2d	2c	2b	2a	1z	1y	1x	1w	1v	1u	1t	1s	FU8				
A													1p		1l	1m	1l	1r	1j	1i	1q	1g	1f				1b	1a	FU17
		1p	1o	1n				1m	1l	1k	1j	1i	1h	1g	1f	1e	1d	1c	1b	1a				FU16					
		1p	1o	1n				1m	1l	1r	1j	1i	1h	1g	1f							FU1							
C																2z	2y	2x	2w	2v	2u	2t	2s	2r	2q	FU6			
													3c			2z	2w				2s	2r	FU10						
													3c	3b	3a	2z	2w				2s	2r	TA4						
		24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1				
E																									FU20				
																									FU19				
																									FU18				
																									Only one repeat, without spacers				
																									FU15				
																									FU11				
																								FU4					
		24	23	22	21	20	19	18	17	16	15	14	13	12	11	10	9	8	7	6	5	4	3	2	1				
D													3n	3m	3l	3k	3j	3j	3i	3h	3g	3f	3e	3d	FU12				

上部に記した数字はスペーサー配列が CRISPR 座位に挿入された順(5'側に追加されていくため)を示す。数字とアルファベットの組み合わせで配列の同一性を示している。同一の表記は同一のスペーサー配列であることを意味する。

図 21. *S. canis* 分離株の II-A CRISPR スペーサー配列による分類

第6章 総括

6-1 背景・目的

β 溶血性レンサ球菌である GAS, SDSE, *S. canis* は、いずれもヒトの病原菌とされており、ときに命を脅かす侵襲性感染症を引き起こす。GAS、は非先進国においては未だ深刻な脅威であり、SDSE, *S. canis* は先進国の高齢化に伴い増加傾向にあるとともに、人獣共通感染症として適切なコントロールが必要である。

しかし、他方で β 溶血性レンサ球菌は強い溶血性を示し多くの病原因子を持ちながら、ヒト・動物に常在菌として定着する。このことから、病原性発揮の機構を明らかにすることが重要であると考えられ、これまでに多くの研究がなされ、病原性に関与する分子メカニズムが解析されてきた。

本研究では、 β 溶血性レンサ球菌の感染レセプターを発現するヒト CD46Tg マウスを用いて、GAS および SDSE の侵襲性感染を再現し、感染が宿主に及ぼす影響を明らかにすることを目的とした。また、*S. canis* に関しては、ヒトへの感染が明らかになっているものの、関与する病原因子、病原性と分子特性の関係等の基礎的な情報が他の β 溶血性レンサ球菌と比べ、明らかにされていないことから、ヒト細胞を用いて病原性の評価を行い、病原性と分子特性の関連を明らかにすることを目的とした。

6-2 結果

(1) 髄膜炎患者より分離された *Streptococcus pyogenes* MTB313 株に見出された転写制御関連因子 *rocA* 遺伝子変異が病原性に与える影響の解明

髄膜炎患者より分離された GAS であるムコイド型株 MTB313 は全ゲノム解析の結果、同検体から分離された非ムコイド型株 MTB314 にはない *rocA* 遺伝子 G464A ナンセンス変異を有していた。MTB313 は CovR/S 系の影響を受けるとされている遺伝子群の発現が増加しており、病原性に関わる SLO, ヒアルロン酸の分泌が増加していた。一方で Rgg による制御を受ける SpeB 発現は低下していた。

hCD46Tg マウスへの感染の結果、MTB313 は MTB314 に比べ有意に高い致死率を示した。また、MTB313 は MTB314 に比べ感染マウス体内で血液、肝臓、腎臓、膝下リンパ節に広がっていることが明らかとなった。

(2) *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis* 感染マウスの病態の観察

STSS 由来 GGS_124、多臓器不全由来 RE378、2 株の SDSE をそれぞれ hCD46Tg マウスに footpad 皮下注射により感染させ、致死率を評価した。GGS_124 は感染 35 日間で 33.3% (non-Tg は 0%) を、RE378 は感染 28 日間で 0% (non-Tg も 0%) の致死率を示した。

GGS-124 感染により死亡したマウスは胸部膿瘍、腎臓の壊死、肝臓の微小膿瘍といった症状を示していた。GGS_124, RE378 感染は観察期間中最後まで生存したマウスに関節炎を起こした。病理解析により、関節腔にパンヌスを生じていることが明らかとなり、RE378 感染において関節部で破骨細胞の活性化が起きていることが確認された。

(3) ヒト・伴侶動物より分離された *Streptococcus canis* の *in vitro* における病原性と分子特性

ヒト・伴侶動物より分離された *S. canis* 40 株を用い、ヒト大腸上皮由来細胞 Caco-2 への内在化による病原性の評価を行なった結果、高い内在性を示す株、低い内在性を示す株が存在することが明らかとなった。一部の株はヒト角化細胞 HaCaT において同様の評価を行い、Caco-2 細胞と同様の傾向を示した。

さらに、ヒツジ血液に対する溶血性を比較したところ、高溶血性/低溶血性に大別でき、分離株により溶血性に違いが見られた。次に、これらの表現型が、分離株の分子特性と関連するかを検討するため、分離株の SCM type, ST(CC), AMR phenotype, AMR genotype を明らかにした。

細胞内在性・溶血活性と分子特性の間の関連を検定した結果、SCM type 10/11 および ST21/41 がヒト細胞への高内在性と関連することが明らかとなった。一方、溶血活性とはいずれの分子特性も関連がなかった。

6-3 考察

MTB313 は *rocA* ナンセンス変異により CovR/S によって制御される多くの遺伝子の発現量が変化していた。その中には病原因子と考えられるものが含まれていたが、代表的な病原因子の一つである SpeB はむしろ *rocA* 変異株ではほぼ発現が見られなくなっていた。この MTB313 を hCD46Tg マウスに感染させると、SpeB の不在にも関わらず菌は体内に播種され、マウスは侵襲性感染を起こし 75%が死亡した。このことから、侵襲性感染の惹起には SpeB 活性は必ずしも必要ではなく、むしろ宿主免疫回避能力が重要である可能性がある。

hCD46Tg を用いた感染モデルを SDSE 2 株に応用した結果、いずれも MTB313 で見られた GAS 侵襲性株感染とは異なる病態を見せることが明らかとなった。致死率は MTB313 と比べて低いが、GGs_124 において、感染 3 日後の臓器内の菌数は致死率の差に関連していると考えられる。GGs_124, RE378 いずれの感染において

も hCD46Tg マウスでは特徴的な関節炎が観察された。関節内部ではいずれの株においても滑膜炎によるパンヌス形成が見られ、同一の機構が引き起こしたものであるか検討することで SDSE 感染が宿主に与える影響を詳細に明らかにすることができると思われる。

S. canis は GAS や SDSE と同様に、ヒト上皮細胞・角化細胞へ内在化することが明らかとなった。レンサ球菌の上皮細胞・角化細胞への内在化は菌を分解する細胞の働きと考えられるが、GAS で示されているように SLO 等の病原因子によって細胞内部で生存することが可能であれば、むしろ宿主免疫や薬剤による殺滅から逃れる手段となりうる。*S. canis* において細胞内在性がどのような意味を持つのか、今後明らかにされる必要がある。

S. canis 分離株のうち、高いヒト細胞内在性と関連があったのはヒト由来株ではなく、SCM type 10/11 および ST21/41 の分子特性を示す株であった。特定の遺伝的バックグラウンドに共通する因子の影響が予想され、その探索が *S. canis* のヒト感染機構解明の足がかりになると考える。

掲載論文

本博士論文は、以下の原著論文 3 報を中心にまとめた。

1) **A naturally occurring point mutation in the *rocA* gene of *Streptococcus pyogenes* confers the highly virulent phenotype.**

Journal of Infection and Chemotherapy, Volume 27, Issue 4, April 2021, Pages 578-584

Haruno Yoshida, Takashi Takahashi and Hidenori Matsui

2) **A highly susceptible CD46 transgenic mouse model of subcutaneous infection with *Streptococcus dysgalactiae* subspecies *equisimilis*.**

Journal of Infection and Chemotherapy, Volume 22, Issue 4, April 2016, Pages 229-234

Haruno Yoshida, Tetsufumi Takahashi, Masahiko Nakamura, Anders Overby, Takashi Takahashi, Kimiko Ubukata and Hidenori Matsui

3) **Intracellular Invasion Ability and Associated Microbiological Characteristics of *Streptococcus canis* Isolates from Japan.**

Japanese Journal of Infectious Diseases, Volume 74, No 2, March 2021, Pages 129-136

Haruno Yoshida, Mieko Goto, Yasuto Fukushima, Takahiro Maeda, Yuzo Tsuyuki, and Takashi Takahashi

参考文献

- [1] Glajzner P, Szewczyk E M, Szemraj M . Pathogenicity and drug resistance of animal Streptococci responsible for human infections. J Med Microbiol. 2021;70.
- [2] 松本哲哉. 臨床微生物学 2017年2月15日 医歯薬出版株式会社
- [3] Vekemans J, Gouvea-Reis F, Kim J H, Excler J L, Smeesters P R, O'Brien K L, Beneden C A V, Steer A C, Carapetis J R, Kaslow D C. The Path to Group A Streptococcus Vaccines: World Health Organization Research and Development Technology Roadmap and Preferred Product Characteristics. Clinical Infectious Diseases, 2019; 69: 877–883.
- [4] 国立感染症研究所感染症疫学センター. わが国における劇症型溶血性レンサ球菌感染症の疫学. Infectious Agents Surveillance Report 2015; 36 :153-4.
- [5] Smeesters P R, McMillan D J, Sriprakash K S. The Streptococcal M protein: a highly versatile molecule. Trends Microbiol, 2010; 18: 275-282.
- [6] Okada N, Liszewski M K, Atkinson J P, Caparon M. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A *Streptococcus*. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995; 92: 2489-93.
- [7] Perez-Casal J, Okada N, Caparon M G, Scott J R. Role of the conserved C-repeat region of the M protein of *Streptococcus pyogenes*. Mol Microbiol. 1995; 15: 907-16.
- [8] Rezcallah M S, Hodges K, Gill D B, Atkinson J P, Wang B, Cleary P P. Engagement of CD46 and alpha5beta1 integrin by group A Streptococci is required for efficient invasion of epithelial cells. Cell Microbiol. 2005; 7: 645-53.
- [9] Bober M, Mörgelin M, Olin A I, Pawel-Rammingen U V, Collin M. The membrane bound LRR lipoprotein Slr, and the cell wall-anchored M1 protein from *Streptococcus pyogenes* both interact with type I collagen. PLoS One. 2011; 6: e20345.

- [10] Dinkla K, Rohde M, Jansen W T M, Kaplan E L, Chhatwal G S, Talay S R. Rheumatic fever-associated *Streptococcus pyogenes* isolates aggregate collagen. J Clin Invest. 2003;111:1905-12.
- [11] Liang Y, Liu X, Chang H, Ji L, Huang G, Fu Z, Zheng Y, Wang L, Li C, Shen Y, Yu S, Yao K, Ma L, Shen X, Yang Y. Epidemiological and molecular characteristics of clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* collected between 2005 and 2008 from Chinese children. J Med Microbiol. 2012; 61: 975-983.
- [12] Musser J M, Kapur V, Szeto J, Pan X, Swanson D S, Martin D R. Genetic diversity and relationships among *Streptococcus pyogenes* strains expressing serotype M1 protein: recent intercontinental spread of a subclone causing episodes of invasive disease. Infect. Immun. 1995; 63: 994-1003.
- [13] Stollerman G H, Dale J B. The importance of the group A *Streptococcus* capsule in the pathogenesis of human infections: a historical perspective. Clin Infect Dis. 2008; 46 :1038-45.
- [14] Gaibani P, Scaltriti E, Foschi C, Baggio E, Tamburini M V, Creti R, Pascucci M G, Fagioni M, Ambretti S, Comandatore F , Pongolini S, Landini M P. Matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight and comparative genomic analysis of M-18 group a *Streptococcus* strains associated with an acute rheumatic fever outbreak in northeast Italy in 2012 and 2013. J Clin Microbiol. 2015; 53: 1562-72.
- [15] Smoot J C, Korgenski E K, Daly J A, Veasy L G, Musser J M. Molecular analysis of group A *Streptococcus* type emm18 isolates temporally associated with acute rheumatic fever outbreaks in Salt Lake City, Utah. J Clin Microbiol. 2002; 40 :1805-10.
- [16] Oliver J, Wadu E M, Pierse N, Moreland N J, Williamson D A, Baker M G. Group A *Streptococcus* pharyngitis and pharyngeal carriage: A meta-analysis. PLoS Negl Trop Dis. 2018; 12 :e0006335.

- [17] Churchward G. The two faces of Janus: virulence gene regulation by CovR/S in group A streptococci. *Mol Microbiol.* 2007; 64 :34-41.
- [18] Takahashi T, Ubukata K, Watanabe H. Invasive infection caused by *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*: Characteristics of strains and clinical features. *J Infect. Chemotherapy* 2011; 17:1-10.
- [19] Bruun T, Kittang B R, Hoog B J, Aardal S, Flaatten H K, Langeland N, Mylvaganam H, Vindenes H A, Skrede S. Necrotizing soft tissue infections caused by *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* of groups C and G in western Norway. *Clin Microbiol Infect.* 2013;19: E545-50.
- [20] Loubinoux J, Plainvert C, Collobert G, Touak G, Bouvet A, Poyart, C, CNR-Strep Network. Adult invasive and noninvasive infections due to *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* in France from 2006 to 2010. *J Clin Microbiol.* 2013; 51: 2724-7.
- [21] Chochua S, Rivers J, Mathis S, Li Z, Velusamy S, McGee L, Beneden C V, Li Y, Metcalf B J, Beall B. Emergent Invasive Group A *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis*, United States, 2015-2018. *Emerg Infect Dis.* 2019; 25: 1543-1547.
- [22] Broyles L N, Beneden C V, Beall B, Facklam R, Shewmaker P L, Malpiedi P, Daily P, Reingold A, Farley M M. Population-based study of invasive disease due to beta-hemolytic Streptococci of groups other than A and B. *Clin Infect Dis.* 2009; 48: 706-12.
- [23] 生方公子, 砂押克彦, 小林玲子, 奥住捷子. C 群および G 群溶血性レンサ球菌による侵襲性感染症についてのアンケート調査. *感染症誌* 2006; 80:480-487.

- [24] Takahashi T, Sunaoshi K, Sunakawa K, Fujishima S, Watanabe H, Ubukata K. Clinical aspects of invasive infections with *Streptococcus dysgalactiae* ssp. *equisimilis* in Japan: differences with respect to *Streptococcus pyogenes* and *Streptococcus agalactiae* infections. *Clin Microbiol Infect*. 2010; 16: 1097-1103.
- [25] 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; 12: 17.
- [26] Devriese L A, Cruz Colque J I, Herdt P D, Haesebrouck F. Identification and composition of the tonsillar and anal enterococcal and Streptococcal flora of dogs and cats. *J Appl Bacteriol*. 1992; 73: 421-5.
- [27] Tsuyuki Y, Kurita G, Murata Y, Goto M, Takahashi T. Identification of Group G Streptococcal Isolates from Companion Animals in Japan and Their Antimicrobial Resistance Patterns. *Jpn J Infect Dis*. 2017; 70: 394-398.
- [28] Sykes J E, Kittleson M D, Pesavento P A, Byrne B A, MacDonald K A, Chomel B B. Evaluation of the relationship between causative organisms and clinical characteristics of infective endocarditis in dogs: 71 cases (1992-2005). *J Am Vet Med Assoc*. 2006; 228: 1723-34.
- [29] Galpérine T, Cazorla C, Blanchard E, Boineau F, Ragnaud J M, Neau D. *Streptococcus canis* infections in humans: retrospective study of 54 patients. *J Infect*. 2007; 55: 23-6.
- [30] Taniyama D , Abe Y, Sakai T, Kikuchi T, Takahashi T. Human case of bacteremia caused by *Streptococcus canis* sequence type 9 harboring the scm gene. *IDCases*. 2017; 7: 48-52.

- [31] Ohtaki H, Ohkusu K, Ohta H, Miyazaki T, Yonetamari J, Usui T, Mori I, Ito H, Ishizuka T, Seishima S. A case of sepsis caused by *Streptococcus canis* in a dog owner: a first case report of sepsis without dog bite in Japan. *J Infect Chemother*. 2013; 19: 1206-9.
- [32] Cheong B M K, Lim A Y. Sharing a microbe with man's best friend: A case of canine streptococcal infection in a diabetic patient. *Med J Malaysia*. 2015; 70: 318-9.
- [33] Takeda N, Kikuchi K, Asano R, Harada T, Totsuka K, Sumiyoshi T, Uchiyama T, Hosoda S. Recurrent septicemia caused by *Streptococcus canis* after a dog bite. *Scand J Infect Dis*. 2001; 33: 927-8.
- [34] Mališová B, Šantavý P, Lovečková Y, Hladký B, Kotásková I, Pol J, Lonský V, Němec P, Freiburger T. Human native endocarditis caused by *Streptococcus canis* -a case report. *APMIS*. 2019; 127: 41-44.
- [35] Zaidi S M H, Eranki A. *Streptococcus canis* Bacteremia in a Renal Transplant Recipient. *J Investig Med High Impact Case Rep*. 2019; 7: 2324709619834592.
- [36] Yoshida H, Ishigaki Y, Takizawa A, Moro K, Kishi Y, Takahashi T, Matsui H. Comparative Genomics of the Mucoid and Nonmucoid Strains of *Streptococcus pyogenes*, Isolated from the Same Patient with Streptococcal Meningitis. *Genome Announc*. 2015; 3: e00221-15.
- [37] Okumura K, Shimomura Y, Murayama S Y, Yagi J, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Evolutionary paths of streptococcal and staphylococcal superantigens. *BMC Genomics*. 2012; 13: 404.
- [38] White D J 1 , Oglesby T, Liszewski M K, Tedja I, Hourcade D, Wang M W, Wright L, Wallwork J, Atkinson J P. Expression of human decay accelerating factor or membrane cofactor protein genes on mouse cells inhibits lysis by human complement. *Transpl Int*.

- 1992; 5 Suppl 1:S648-50.
- [39] Moses A E, Wessels M R, Zalcman K, Albertí S, Natanson-Yaron S, Menes T, Hanski E. Relative contributions of hyaluronic acid capsule and M protein to virulence in a mucoid strain of the group A *Streptococcus*. *Infect Immun*. 1997; 65 :64-71.
- [40] Miyoshi-Akiyama T, Zhao J, Kikuchi K, Kato H, Suzuki R, Endoh M, Uchiyama T. Quantitative and qualitative comparison of virulence traits, including murine lethality, among different M types of group A streptococci. *J Infect Dis*. 2003; 187: 1876-87.
- [41] Nyberg P, Rasmussen M, Pawel-Rammingen U V, Björck L. SpeB modulates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by efficient proteolysis of cell-wall-anchored protein F1. *Microbiology* 2004; 150(Pt 5):1559-1569.
- [42] Hollands A, Aziz R K, Kansal R, Kotb M, Nizet V, Walker MJ. A naturally occurring mutation in *ropB* suppresses SpeB expression and reduces M1T1 group A streptococcal systemic virulence. *PLoS One*. 2008; 3 :e4102.
- [43] Watanabe S, Shimomura Y, Ubukata K, Kirikae T, Miyoshi-Akiyama T. Concomitant regulation of host tissue-destroying virulence factors and carbohydrate metabolism during invasive diseases induced by group G Streptococci. *Infect Dis*. 2013; 208 :1482-93.
- [44] Sakurai A, Okahashi N, Nakagawa I, Kawabata S, Amano A, Ooshima T, Hamada S. *Streptococcus pyogenes* Infection Induces Septic Arthritis with Increased Production of the Receptor Activator of the NF- κ B Ligand. *Infect Immun*. 2003; 71: 6019–6026.
- [45] Kawabata S, Kuwata H, Nakagawa I, Morimatsu S, Sano K, Hamada S. Capsular hyaluronic acid of group A streptococci hampers their invasion into human pharyngeal

epithelial cells. *Microb Pathog.* 1999; 27: 71-80.

- [46] Ohri M, Parashar S, Pai V S, Ghosh S, Chakraborti A. A cytosol derived factor of Group B *Streptococcus* prevent its invasion into human epithelial cells. *World J Microbiol Biotechnol.* 2018; 34: 45.
- [47] Pinho M D, Foster G, Pomba C, Machado M P, Baily J L, Kuiken T, Melo-Cristino J, Ramirez M. *Streptococcus canis* Are a Single Population Infecting Multiple Animal Hosts Despite the Diversity of the Universally Present M-Like Protein SCM. *Front Microbiol.* 2019; 10: 631.
- [48] Timoney J F, Velineni S, Blanchard P. Biotypes and ScM types of isolates of *Streptococcus canis* from diseased and healthy cats. *Vet Rec* 2017; 180: 358
- [49] Fukushima Y, Tsuyuki Y, Goto M, Yoshida H, Takahashi T. Species Identification of β -Hemolytic Streptococci from Diseased Companion Animals and Their Antimicrobial Resistance Data in Japan (2017). *Jpn J Infect Dis.* 2017;70: 394-8.
- [50] Jain I, Miller E W, Danger J L, Pflughoeft K J, Sumby P. RocA Is an Accessory Protein to the Virulence-Regulating CovRS Two-Component System in Group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 2017; 85: e00274-17.
- [51] Federle M J, McIver K S, Scott J R. A response regulator that represses transcription of several virulence operons in the group A *Streptococcus*. *Bacteriol.* 1999; 181: 3649-57.
- [52] Sumby P, Whitney A R, Graviss E A, DeLeo F R, Musser J M. Genome-Wide Analysis of Group A Streptococci Reveals a Mutation That Modulates Global Phenotype and Disease Specificity. *PLoS pathog.* 2006; 2 : e5.

- [53] Okamoto A, Yamada K. Proteome driven re-evaluation and functional annotation of the *Streptococcus pyogenes* SF370 genome. BMC Microbiol. 2011; 11: 249.
- [54] Falaleeva M, Zurek O W, Watkins R L, Reed R W, Ali H , Sumbly P, Voyich J M, Korotkova N. Transcription of the *Streptococcus pyogenes* hyaluronic acid capsule biosynthesis operon is regulated by previously unknown upstream elements. Inect Immun. 2014; 82: 5293-307.
- [55] Federle M J, Scott J R. Identification of binding sites for the group A streptococcal global regulator CovR. Mol. Microbiol. 2002; 43: 1161-72.
- [56] Graham M R, Smoot L M, Migliaccio C A L, Virtaneva K, Sturdevant D E, Porcella S F, Federle M J, Adams G J, Scott J R, Musser J M. Virulence control in group A *Streptococcus* by a two-component gene regulatory system: global expression profiling and in vivo infection modeling. Proc Natl Acad Sci U S A. 2002; 99: 13855-60.
- [57] Velarde J J, O'Seaghdha M, Baddal B, Bastiat-Sempe B, Wessels M R. Binding of NAD⁺-Glycohydrolase to Streptolysin O Stabilizes Both Toxins and Promotes Virulence of Group A *Streptococcus*. mBio. 2017; 8: e01382-17.
- [58] Pandey M, Good M F. A Superficial Skin Scarification Method in Mice to Mimic *Streptococcus pyogenes* Skin Infection in Humans. Methods Mol Biol. 2020; 2136: 287-301.
- [59] Lu S G, Tsai C Y, Luo Y H, Kuo C F, Lin W C, Chang Y Z, Wu J J, Chuang W J, Liu C C, Chao L, Chao J, Lin Y S. Kallistatin modulates immune cells and confers anti-inflammatory response to protect mice from group A streptococcal infection. Antimicrob Agents Chemother. 2013; 57: 5366-72.

- [60] Matsui H, Sekiya Y, Nakamura M, Yamagata Murayama S, Yoshida H, Takahashi T, Imanishi K, Tsuchimoto K, Uchiyama T, Sunakawa K, Ubukata K. CD46 transgenic mouse model of necrotizing fasciitis caused by *Streptococcus pyogenes* infection. *Infect Immun.* 2009; 77: 4806-14.
- [61] Kemper C, Leung M, Stephensen C B, Pinkert C A, Liszewski M K, Cattaneo R, Atkinson J P. Membrane cofactor protein (MCP; CD46) expression in transgenic mice. *Clin Exp Immunol.* 2001; 124: 180-9.
- [62] Tsujimura A, Shida K, Kitamura M, Nomura M, Takeda J, Tanaka H, Matsumoto M, Matsumiya K, Okuyama A, Nishimune Y, Okabe M, Seya T. Molecular cloning of a murine homologue of membrane cofactor protein (CD46): preferential expression in testicular germ cells. *Biochem J.* 1998; 330 (Pt 1): 163-8.
- [63] Miwa T, Nonaka M, Okada N, Wakana S, Shiroishi T, Okada H. Molecular cloning of rat and mouse membrane cofactor protein (MCP, CD46): preferential expression in testis and close linkage between the mouse *Mcp* and *Cr2* genes on distal chromosome 1. *Immunogenetics.* 1998; 48: 363-71.
- [64] Inoue N, Ikawa M, Nakanishi T, Matsumoto M, Nomura M, Seya T, Okabe M. Disruption of mouse CD46 causes an accelerated spontaneous acrosome reaction in sperm. *Mol Cell Biol.* 2003; 23: 2614-22.
- [65] Bernard P E, Duarte A, Bogdanov M, Musser J M, Olsen R J. Single Amino Acid Replacements in RocA Disrupt Protein-Protein Interactions To Alter the Molecular Pathogenesis of Group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 2020; 88: e00386-20.
- [66] Chiang-Ni C, Chiou H J, Tseng H C, Hsu C Y 4 , Chiu C H. RocA Regulates

Phosphatase Activity of Virulence Sensor CovS of Group A *Streptococcus* in Growth Phase- and pH-Dependent Manners. *mSphere*. 2020; 5: e00361-20.

- [67] Sumby P, Porcella S F, Madrigal A G, Barbian K D, Virtaneva K, Ricklefs S M, Sturdevant D E, Graham M R, Vuopio-Varkila J, Hoe N P, Musser J M. Evolutionary origin and emergence of a highly successful clone of serotype M1 group A *Streptococcus* involved multiple horizontal gene transfer events. *J Infect Dis* 2005; 192:771-82.
- [68] Feng W, Minor D, Liu M, Li J, Ishaq S L, Yeoman C, Lei B. Null Mutations of Group A *Streptococcus* Orphan Kinase RocA: Selection in Mouse Infection and Comparison with CovS Mutations in Alteration of In Vitro and In Vivo Protease SpeB Expression and Virulence. *Infect Immun*. 2016; 85: e00790-16.
- [69] Lynskey N N, Goulding D, Gierula M 1 , Turner C E, Dougan G, Edwards R J, Sriskandan S. RocA truncation underpins hyper-encapsulation, carriage longevity and transmissibility of serotype M18 group A streptococci. *PLoS Pathog*. 2013; 9: e1003842.
- [70] Lynskey N N, Turner C E , Heng L S, Sriskandan S. A truncation in the regulator RocA underlies heightened capsule expression in serotype M3 group A streptococci. *Infect Immun*. 2015; 83: 1732-3.
- [71] Miller E W, Danger J L, Ramalinga A B, Horstmann N , Shelburne S A, Sumby P. Regulatory rewiring confers serotype-specific hyper-virulence in the human pathogen group A *Streptococcus*. *Mol Microbiol*. 2015; 98: 473-89.
- [72] Ikebe T, Matsumura T, Nihonmatsu H, Ohya H, Okuno R, Mitsui C, Kawahara R,

Kameyama M, Sasaki M, Shimada N, Ato M, Ohnishi M. Spontaneous mutations in *Streptococcus pyogenes* isolates from streptococcal toxic shock syndrome patients play roles in virulence. *Sci Rep.* 2016; 6: 28761.

[73] Bernard P E, Kachroo P, Zhu L, Beres S B, Eraso J M, Kajani Z, Long S W, Musser J M, Olsen R J. RocA Has Serotype-Specific Gene Regulatory and Pathogenesis Activities in Serotype M28 Group A *Streptococcus*. *Infect Immun.* 2018; 86: e00467-18.

[74] Mayfield J A, Liang Z, Agrahari G, Lee S W, Donahue D L, Ploplis V A, Castellino F J. Mutations in the control of virulence sensor gene from *Streptococcus pyogenes* after infection in mice lead to clonal bacterial variants with altered gene regulatory activity and virulence. *PLoS One.* 2014 ; 9: e100698.

[75] Otsuji K, Fukuda K, Maruoka T, Ogawa M, Saito M. Acquisition of genetic mutations in Group A Streptococci at infection site and subsequent systemic dissemination of the mutants with lethal mutations in a streptococcal toxic shock syndrome mouse model. *Microbial Pathogenesis*, 2020; 143: 104116.

[76] Laabei M, Ermert D. Catch Me if You Can: *Streptococcus pyogenes* Complement Evasion Strategies. *J Innate Immun.* 2019; 11: 3-12.

[77] Herrera A L, Callegari E A, Chaussee M S. The *Streptococcus pyogenes* Signaling Peptide SpoV Regulates Streptolysin O and Enhances Survival in Murine Blood. *J Bacteriol.* 2021; 203: e00586-20.

[78] Miller A A, Engleberg N C, DiRita V J. Repression of virulence genes by phosphorylation-dependent oligomerization of CsrR at target promoters in *S. pyogenes*.

Mol Microbiol. 2001; 40: 976-90.

- [79] Hytönen J, Haataja S, Gerlach D, Podbielski A, Finne J. The SpeB virulence factor of *Streptococcus pyogenes*, a multifunctional secreted and cell surface molecule with streptadhesin, laminin-binding and cysteine protease activity. Mol Microbiol. 2001; 39: 512-9.
- [80] 砂押 克彦, 油橋 宏美, 小林 玲子, 山本 芳尚, 奥住 捷子, 吉田 敦, 三澤 慶樹, 安達 桂子, 生方 公子. *Streptococcus dysgalactiae* subsp. *equisimilis* の遺伝子解析による *emm* 型別と経口抗菌薬感受性. 感染症誌, 2006; 80: 488-495.
- [81] 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; 16: 68-71.
- [82] Cecconi M, Evans L, Levy M, Rhodes A. Sepsis and septic shock. Lancet. 2018; 392: 75-87.
- [83] Yoshida H, Matsui H, Yamagata Murayama S, 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;60: 1860-1868.
- [84] Scott D L, Wolfe F, Huizinga T W J. Rheumatoid arthritis. Lancet. 2010; 376: 1094-108.
- [85] Mousavi M J, Karami J, Aslani S, Tahmasebi M N, Vaziri A S, Jamshidi A, Farhadi E, Mahmoudi M. Transformation of fibroblast-like synoviocytes in rheumatoid arthritis; from a friend to foe. Auto Immun Highlights. 2021; 12: 3.

- [86] Colavite P M, Watanabe Ishikawa L L, Zorzella-Pezavento S F G, Oliveira L R C, França T G D, Rosa L C, Chiuso-Minicucci F, Vieira A E, Francisconi C F, Cunha M L R S, Garlet G P, Sartori A. Cloxacillin control of experimental arthritis induced by SEC(+) *Staphylococcus aureus* is associated with downmodulation of local and systemic cytokines. *Cell Microbiol.* 2016; 18: 998-1008.
- [87] 大曲 貴夫, 藤田 崇. G 群溶血性レンサ球菌による多発性化膿性関節炎・椎体椎間板炎・腸腰筋膿瘍・菌血症の一例. *感染症誌*, 2010; 84: 付録.
- [88] Barnett T C, Cole J N, Rivera-Hernandez T, Henningham A, Paton J C, Nizet V, Walker M J. Streptococcal toxins: role in pathogenesis and disease. *Cell Microbiol.* 2015; 17: 1721-41.
- [89] Dombek P E, Cue D, Sedgewick J, Lam H, Ruschkowski S, Finlay B B, Cleary P P. High-frequency intracellular invasion of epithelial cells by serotype M1 group A streptococci: M1 protein-mediated invasion and cytoskeletal rearrangements. *Mol Microbiol.* 1999; 31: 859-70.
- [90] Molinari G, Talay S R, Valentin-Weigand P, Rohde M, Chhatwal G S. The fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, SfbI, is involved in the internalization of group A streptococci by epithelial cells. *Infect Immun.* 1997; 65: 1357-63.
- [91] Nerlich A, Rohde M, Talay S R, Genth H, Just I, Chhatwal G S. Invasion of endothelial cells by tissue-invasive M3 type group A streptococci requires Src kinase and activation of Rac1 by a phosphatidylinositol 3-kinase-independent mechanism. *J Biol Chem.* 2009; 284: 20319-28.
- [92] Siemens N, Patenge N, Otto J, Fiedler T, Kreikemeyer B. *Streptococcus pyogenes* M49

plasminogen/plasmin binding facilitates keratinocyte invasion via integrin-integrin-linked kinase (ILK) pathways and protects from macrophage killing. J Biol Chem. 2011; 286: 21612-22.

- [93] Fulde M, Rohde M, Hitzmann A, Preissner K T, Nitsche-Schmitz D P, Nerlich A, Chhatwal G S, Bergmann S. SCM, a novel M-like protein from *Streptococcus canis*, binds (mini)-plasminogen with high affinity and facilitates bacterial transmigration. Biochem J. 2011; 434: 523-35.
- [94] Fukushima Y, Yoshida H, Goto M, Tsuyuki Y, Takahashi T. Prevalence and diversity of M-like protein (SCM) gene in *Streptococcus canis* isolates from diseased companion animals in Japan: Implication of SCM allele. Vet Microbiol. 2018; 225: 120-124.
- [95] Yoshida H, Katayama Y, Fukushima Y, Taniyama D, Murata Y, Mizutani T, Takahashi T. Draft Genome Sequence of *Streptococcus canis* Clinical Strain TA4, Harboring the M-Like Protein Gene and Isolated in Japan from a Patient with Bacteremia. Genome Announc. 2018; 6: e01469-17.
- [96] Yoshida H, Katayama Y, Fukushima Y, Ohtaki H, Ohkusu K, Mizutani T, Takahashi T. Draft Genome Sequence of *Streptococcus canis* Clinical Strain OT1, Isolated from a Dog Owner with Invasive Infection without a Dog Bite in Japan. Microbiol Resour Announc. 2019; 8: e00770-19.
- [97] Yoshida H, Fukushima Y, Katayama Y, Tsuyuki Y, Mizutani T, Takahashi T. Draft Genome Sequences of Seven *Streptococcus canis* Strains Isolated from Diseased Companion Animals in Japan. Microbiol Resour Announc. 2020; 9: e00123-20.
- [98] Nguyen S V, McShan W M. Chromosomal islands of *Streptococcus pyogenes* and

related streptococci: molecular switches for survival and virulence. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014; 4: 109.

[99] Yoshida H, Fukushima Y, Goto M, Tsuyuki Y, Takahashi T. Analysis of the Type II-A CRISPR-Cas System in *Streptococcus canis* Isolated from Diseased Companion Animals and One Human Patient in Japan. *Jpn J Infect Dis.* 2019; 72: 261-265.

[100] Yamada S, Shibasaki M, Murase K, Watanabe T, Aikawa C, Nozawa T, Nakagawa I. Phylogenetic relationship of prophages is affected by CRISPR selection in Group A *Streptococcus*. *BMC Microbiol.* 2019; 19: 24.

[101] Brouwer S, Barnett T C, Rivera-Hernandez T, Rohde M, Walker M J. *Streptococcus pyogenes* adhesion and colonization. *FEBS Lett.* 2016; 590: 3739-3757.

[102] Toh H, Lin C Y, Nakajima S, Aikawa C, Nozawa T, Nakagawa I. Group A *Streptococcus* NAD-Glycohydrolase Inhibits Caveolin 1-Mediated Internalization Into Human Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol.* 2019; 9 :398.

謝辞

本論文を作成、発表するにあたり、ご指導を賜りました北里大学薬学部 微生物学教室
岡田信彦教授に心より御礼を申し上げます。

本論文にまとめた研究は、北里大学大村智記念研究所 感染症学研究室、および北里
大学大学院 感染制御科学府 感染症学 高橋孝教授のご指導のもとに行われたもので
あり、深く感謝を申し上げます。

本研究を遂行するにあたり、多くのご指導を賜りました、北里大学大村智記念研究所
感染症学研究室および北里大学大学院 感染制御科学府 感染症学 松井英則博士に
深く感謝申し上げます。

本研究にあたり、多くのご助言とご協力をいただきました、北里大学 大村智記念研究
所 実験動物センター 平久治氏、佐々木健氏、北里大学 大村智記念研究所 中村正
彦博士、奥住捷子氏、後藤美江子氏、金沢医科大学 総合医学研究所 石垣靖人教授、
東京農工大学 農学部附属国際家畜感染症防疫研究教育センター 水谷哲也教授、片
山幸枝氏、北里大学大学院 感染制御科学府 福島康仁氏、前田貴広氏、栗田吾郎氏、
そして同学府を修了された的場時代氏に心より感謝申し上げます。

本研究に使用した菌株を分与くださいました、株式会社サンリツセルコバ検査センター
露木勇三博士、慶応義塾大学 医学部 総合診療教育センター 生方公子博士に心より
感謝申し上げます。

最後に、本研究を支えてくれた夫 吉田太郎と息子 吉田響に深く感謝します。