

学 位 論 文 題 名

Association of the *prtF1* Gene (Encoding Fibronectin-Binding Protein F1) and the *sic* Gene (Encoding the Streptococcal Inhibitor of Complement) with *emm* Types of Group A Streptococci Isolated from Japanese Children with Pharyngitis.

(日本における小児咽頭炎患者から分離されたA群溶血性連鎖球菌の *emm* 遺伝子型と *prtF1* 遺伝子および *sic* 遺伝子の関連性)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

A 群溶血性連鎖球菌 (GAS) は、咽頭炎から劇症型感染まで様々な病気を引き起こす細菌である。GAS の細胞表面には M 蛋白、T 蛋白が存在し、その抗原性の違いによる血清学的分類は、GAS の病原性や流行性などの研究で利用されてきた。しかし、抗 M 血清が入手困難であることから、それに代わって M 蛋白の N 末端をコードしている *emm* 遺伝子の違いによる遺伝子学的分類が、使用されてきている。これまで、GAS の表面蛋白や分泌産物の中には多くの病原因子の存在することが報告されている。今回、私は、GAS の *emm* 遺伝子型を決定し、従来の血清型と比較検討した。また、GAS の病原因子の中から細胞内へ侵入する働きを持っているとして注目されている *prtF1* 遺伝子と、宿主の免疫応答との関連性が注目されている *sic* 遺伝子の二つ病原因子の存在と *emm* 遺伝子型との関連性について検討を行った。

[対象と方法] 2000 年 8 月から 2001 年 3 月までに北海道内の 8 病院を咽頭炎で受診した 2 歳から 12 歳までの患児から分離した GAS 66 株を対象とした。GAS 66 株の M 型は沈降反応 (25 種類 M 抗血清を使用)、T 型は凝集反応 (27 種類 T 抗血清を使用) により決定した。*emm* 型は PCR 後、PCR 産物の塩基配列を決定し、Centers for Disease Control and Prevention のホームページ (http://www.cdc.gov/ncidod/biotech/infitech_hp.html) でホモロジー検索により型を決定した。*prtF1* 遺伝子は、PCR 法で検出を行った。repeat domain 2 (RD2) の repeat 数は PCR 産物の塩基配列より決定した。*sic* 遺伝子は、PCR 法で検出し、さらに Southern blotting 法で確認した。GAS に対する Azithromycin (AZM) の最小発育阻止濃度 (MIC) は、アガー希釈法により測定した。

【結果】 GAS 66 株は、血清型では 10 種類の T 型と 6 種類の M 型に分類され、28.8%は M 型の分類が不能であった。遺伝子型では 10 種類の *emm* 型が存在し、最も多い型は 12 と 4 型であった。今まで不明であった M 型の松山 2166 型は *emm75* 型、T 型の B3264 型は *emm94* 型と *emm89* 型であった。*prtF1* 遺伝子の保有率は 77.3%であり、*emm4*、12、28、75、77、89、112 型では *prtF1* 遺伝子を保有していたが、*emm1*、2、94 型は保有せず、*prtF1* 遺伝子と *emm* 型の間には密接な関連性が存在していた。RD2 の repeat 数は、*emm4*、75 型以外は一定の repeat 数であった。*sic* 遺伝子の保有率は 72.7%であり、ほぼ全ての *emm* 型の GAS は *sic* 遺伝子を保有していた。AZM 耐性株は *emm4* 型の 3 株 (4.5%)のみであったが、AZM 治療を行った 29 例の中、11 例 (37.9%) は除菌失敗であった。

【考案】 GAS の M 血清型は、現在までに約 100 種報告されている。しかし、特異性の高い抗体の作製が困難であり、入手も困難である。また、培養条件により M 抗原の発現に影響があるため血清型の分類として一般化されるには至っていない。そのため M 血清型に代わって T 血清型が、よく使用されているが、T 抗原による血清型は 27 種であり、GAS の疫学を行う上で不十分である。今回の研究でも、GAS の 28.8%は M 血清型が分類不能で、6 種類に分類されたのみであった。近年、血清型に代わって、M 抗原の N 末端をコードする *emm* 遺伝子型を用いて GAS の疫学が行われてきているが、本邦において *emm* 遺伝子型の報告はない。今回初めて、日本における GAS の *emm* 型を明らかにした。GAS 66 株は 10 種類の *emm* 型に分類され、最も多い型は *emm12* と *emm4* 型であった。今まで日本において仮に命名されていた M 型の松山 2166 型は *emm75* 型、T 型の B3264 型は *emm94* 型と *emm89* 型であることも明らかとなった。

GAS は、今まで 40 種以上の病原因子があると推測されている。細胞への接着、侵入、組織への拡散に重要な分子としては、M 蛋白、Fibronectin-binding proteinF1 (*PrtF1*)、Streptolysins、Streptokinases などが知られ、宿主の免疫システムから逃れるために重要な分子としては、M 蛋白、Streptococcal inhibitor of complement (*Sic*)、Leukocidins、莢膜などが知られている。*PrtF1* 蛋白は、菌体が宿主の細胞と接着し、細胞内へ侵入する重要な働きを持っている。この蛋白をコードしている *prtF1* 遺伝子の保有率に関しては 30%~75%と様々に報告されているが、今回の結果から日本における保有率は欧米と比較してやや高目であった。また、*prtF1* 遺伝子の保有菌株と *emm* 型の間には密接な関連性が存在していることも明らかとなった。*prtF1* 遺伝子は、二つの fibronectin-binding domain である RD2 repeats と UFBD (upstream fibronectin-binding domain)が含まれている。RD2 は、fibronectin との結合や細胞内への侵入などに関して研究が進んでいるが、repeat 数と病原性に関

してはまだ明らかではない。今回の結果、RD2 repeat 数は、多くの emm 型で一定の数を示していた。prtF1 遺伝子の存在と抗生剤による除菌失敗との関連性を示す報告があるが、本研究の結果は、除菌失敗と AZM の MIC, prtF1 遺伝子の存在との間には関連性は見出せなかった。sic 遺伝子から翻訳された Sic 蛋白は、in vitro において、C5b から C9 の補体複合体による膜障害性の細胞融解を抑制するとされている。これまでの報告では、M1 と M57 型の GAS にのみ、その存在が確認されている。また、sic 遺伝子は、M1 型の GAS の検索において 300 以上のアレルが存在し、宿主の免疫応答との関連性が報告されている。本研究の結果は、日本において sic 遺伝子は、殆どの emm 型の GAS に存在することが明らかとなった。sic 遺伝子の保有率が予想外に高いことは、この遺伝子の horizontal gene transfer が日本で起こっていると考えられる。

今回、私は日本において GAS 菌種の血清型と遺伝子型の比較、および二つの病原因子遺伝子との関連性について検討した。この研究は日本の GAS の病原性や流行性、また治療などの理解に役立つと考えられる。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀

副 査 教 授 福 田 諭

副 査 教 授 小 林 邦 彦

学位論文題名

Association of the *prtF1* Gene (Encoding Fibronectin-Binding Protein F1) and the *sic* Gene (Encoding the Streptococcal Inhibitor of Complement) with *emm* Types of Group A Streptococci Isolated from Japanese Children with Pharyngitis.

(日本における小児咽頭炎患者から分離されたA群溶血性連鎖球菌の *emm* 遺伝子型と *prtF1* 遺伝子および *sic* 遺伝子の関連性)

A 群溶血性連鎖球菌(GAS)は、咽頭炎から劇症型感染まで様々な病気を引き起こす細菌である。GASの細胞表面に存在しているM蛋白、T蛋白の抗原性の違いによる血清学的分類は、GASの病原性や流行性などの研究で利用されてきた。しかし、抗M血清が入手困難であることから、それに代わってM蛋白のN末端をコードしている *emm* 遺伝子の違いによる遺伝子学的分類が、使用されて来ている。これまで、GASの表面蛋白や分泌産物の中には多くの病原因子の存在することが報告されている。今回申請者は、GASの *emm* 遺伝子型を決定し、従来の血清型と比較検討した。また、二つ病原因子 *prtF1* 遺伝子及び *sic* 遺伝子の存在、*emm* 遺伝子型との関連性について検討した。対象は北海道内の8病院を咽頭炎で受診した2歳から12歳までの患児から分離したGAS 66株である。血清型分類はM型は沈降反応、T型は凝集反応により決定した。*emm* 型はPCR後、PCR産物の塩基配列を決定し、Centers for Disease Control and Preventionのホームページでホモロジー検索により型を決定した。*prtF1* 遺伝子は、PCR法で検出を行って、repeat domain 2 (RD2)リピート数はPCR産物の塩基配列より決定した。*sic* 遺伝子は、PCR法で検出し、さらにSouthern blotting法で確認した。GASに対するAzithromycin (AZM)の最小発育阻止濃度(MIC)は、アガー希釈法により測定した。GAS 66株は、10種類のT型と6種類のM型に分類され、28.8%はM型の分類が不能であった。*emm* 型では10種類の *emm* 型が存在し、最も多い型は12と4型であった。今まで分類が明らかにされていなかったM型の松山2166型は *emm75* 型、T型のB3264型は *emm94* 型と *emm89* 型であった。*prtF1* 遺伝子の保有率は77.3%であり、*prtF1* 遺伝子と *emm* 型の間には密接な関連性が存在していた。RD2のリピート数は、*emm4*、75型以外の型では一定の値を示していた。*sic* 遺伝子の保有率は72.7%であり、ほぼ全ての *emm* 型のGASは *sic* 遺伝子を保有していた。AZM耐性株は *emm4* 型の3株(4.5%)のみであった。

一方、AZM 治療を行った 29 例中、11 例(37.9%)は除菌失敗であったが、失敗例と耐性株との間には関係はなかった。GAS の M 血清型は、現在までに約 100 種報告されている。しかし、特異性の高い抗体の作製が困難であり、入手も困難である。また、培養条件により M 抗原の発現に影響があるため血清型の分類として一般化されるには至っていない。近年、血清型に代わって、*emm* 遺伝子型を用いて GAS の疫学が行われてきているが、本邦において *emm* 遺伝子型の報告はない。今回初めて、日本における GAS の *emm* 型を明らかにし、最も多い型は *emm12* と *emm4* 型であった。今まで日本において仮に命名されていた M 型の松山 2166 型は *emm75* 型、T 型の B3264 型は *emm94* 型と *emm89* 型であることも明らかとなった。GAS は、今まで 40 種以上の病原因子があると推測されている。Prf1 蛋白は、菌体が宿主の細胞と接着し、細胞内へ侵入する重要な働きを持っている。*prf1* 遺伝子の保有率に関しては 30%~75%と様々に報告されているが、今回の結果から日本における保有率は欧米と比較してやや高目であった。*prf1* 遺伝子は、二つの fibronectin-binding domain である RD2 repeats と UFBD (upstream fibronectin-binding domain)が含まれている。RD2 は、fibronectin との結合や細胞内への侵入などに関して研究が進んでいるが、リピート数と病原性に関してはまだ明らかではない。今回の結果、RD2 リピート数は、多くの *emm* 型で一定の数を示していた。*prf1* 遺伝子の存在と抗生剤による除菌失敗との関連性を示す報告があるが、本研究の結果は、除菌失敗と AZM の MIC、*prf1* 遺伝子の存在との間には関連性は見出せなかった。Sic 蛋白は、*in vitro*において、C5b から C9 の補体複合体による膜障害性の細胞融解を抑制し、宿主の免疫応答との関連性が報告されている。これまでの報告では、M1 と M57 型の GAS にのみ、その存在が確認されている。本研究の結果は、*sic* 遺伝子は、殆どの *emm* 型の GAS に存在することが明らかとなった。*sic* 遺伝子の保有率が予想外に高いことは、この遺伝子の horizontal gene transfer が日本で起こっていると考えられる。

公開発表の際し、副査の福田教授から、二つ病原因子遺伝子と臨床像及びペニシリンの除菌失敗との関連性、また遺伝子検査が咽頭炎治療に参考になるかの質問があった。ついで、副査の小林教授から、*prf1* 遺伝子の RD2 リピート数と臨床像の関連性、*sic* 遺伝子の異常に高い保有率は日本だけの特徴なのかの質問があった。最後に、主査の皆川教授から、劇症型レンサ球菌感染症と *emm* 型の関連性、*sic* 遺伝子の horizontal gene transfer の世界と日本における頻度の比較、また今後の研究方向についての質問があった。申請者は何れの質問に対しても、自らの実験結果と文献を引用し、ほぼ妥当な答えを起った。

本研究は、初めて日本の GAS の *emm* 遺伝子型、二つ病原因子遺伝子の保有率及び *emm* 型との関連を明らかにし、日本の GAS の病原性や流行性、また治療などの理解に役立つと期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ審査者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。