

学位論文題名

溶血性連鎖球菌感染マウスモデルの
病変形成におけるT細胞の役割について

学位論文内容の要旨

溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*, *S. pyogenes*) はグラム陽性球菌であり、ヒトに感染し扁桃炎、咽頭炎、猩紅熱など種々の急性化膿性感染症を引き起こす他に、リウマチ熱や糸球体腎炎などの続発症を引き起こす。*S. pyogenes* による続発症は免疫反応によって引き起こされる一種のアレルギー疾患と考えられており、リウマチ熱患者には高い抗体産生が認められる。発症に関わる抗原とされるM蛋白は感染防御抗原でもあり、M蛋白特異抗体は速やかな菌の排除と*S. pyogenes* 感染からの回復を促進する一方で、高抗体反応はリウマチ熱を発症する引き金となる可能性がある。治療には抗生剤投与が適当であるが、リウマチ熱は*S. pyogenes* の再感染などにより再発する危険性も高いため、長期に渡る抗生剤の投与が推奨されている。このことは、*S. pyogenes* 初感染時に獲得した免疫が二次感染以降において適切かつ有効に機能していないことを示唆しており、*S. pyogenes* 感染に対する防御機構は必ずしも液性免疫のみで全てを説明できない。さらに、劇症型溶連菌感染は、致死率の高い極めて重篤な疾患であるが、本疾患の場合には幼小児の発症は希であり、本来、防御免疫を有しているはずの成人に多くみられる。このようにヒトの*S. pyogenes* 感染においては宿主側の諸要因が深く関与していることが考えられるが、その感染防御機構には不明な点が多い。また、実験動物を用いて*S. pyogenes* の毒素やスーパー抗原の生物活性や致死活性を調べた研究は多いが、生体レベルでの*S. pyogenes* 感染発症の病態生理についての解析はほとんどなされていない。

本研究では、マウスの*S. pyogenes* 感染防御におけるT細胞の役割を中心に検討した。また、本菌感染マウスにおいては高頻度に関節腫脹が認められたため、マウスの*S. pyogenes* 静脈内感染による関節病変におけるT細胞の役割についても解析を加えた。1群20匹のICRマウスに 1×10^7 CFUの*S. pyogenes* を静脈内投与した場合、菌の投与後8日目までに致死する個体が認められ、60日間の観察期間における致死率は10%であった。一方、菌投与後、感染マウスのうち40%が慢性の関節腫脹を発症した。これらの感染マウスの肝臓、脾臓、腫脹関節について菌の分離を行った結果、各臓器よりコロニー形成能を有する*S. pyogenes* が分離された。肝臓・脾臓では本菌投与後、多くのマウスにおいて比較的速やかに菌が排除される傾向が認められたが、wastingなどの症状を示す一部の感染マウスでは菌投与後5日目以降も菌が分離された。一方、関節腫脹を発症したマウスの関節部においては長期にわたり菌が分離され、症状と菌の分離は100%の相関を示

した。しかし、いずれの臓器や組織においても菌数の推移は増殖・排除を示唆するような明らかな経時的変化を示さなかった。抗CD4抗体投与ICRマウス、抗CD8抗体投与ICRマウスおよびICRヌードマウスを用いて同様の感染実験を行った場合、抗CD4抗体投与群、抗CD8抗体投与群、両抗体同時投与群のどの群についても感染7日目までの致死率はコントロール群と比較して有意な差が認められず、臓器内菌数についても差が認められなかった。一方、これらの抗体投与マウスでは関節腫脹の発症が有意に抑制された。ヌードマウス群においても致死率はコントロール群と比較して差が認められず、さらに関節腫脹の発症率は0%であった。これらの結果から、*S. pyogenes* 感染マウスモデルにおいては1) 胸腺由来のT細胞を欠いた場合に致死率の上昇がみられないこと、2) CD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞の減少は*S. pyogenes* 感染早期における致死率、臓器内菌数に影響を与えないことが明らかとなり、*S. pyogenes* 静脈内感染における生体防御は、特に感染早期においてはCD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞が防御上重要ではない可能性が示唆された。また、長期にわたる致死率の検討では、抗CD4抗体投与群のみ致死率の有意な上昇が認められたが、抗CD8抗体の併用により致死率の上昇は抑制された。このような現象が起こる理由は不明であるが、感染マウスの致死機構には、*S. pyogenes* 感染の増悪以外の免疫学的な要素も含まれる可能性が考えられる。本菌感染マウスモデルにおける臓器内菌数の推移については、1) 菌の検出が症状の有無と相関性が高いこと、2) 投与された菌はマウス体内にて比較的速やかに血液寒天培地上におけるコロニー形成能を失っていること、3) 菌数の明らかな経時的変化は認められないことが示され、特に3)の結果から*S. pyogenes* の感染様式は通常感染微生物とは異なっている可能性が示唆された。一方、本菌感染により発症する関節腫脹は、症状と本菌の分離が100%相関しており、理想的な感染病態モデルの様相を呈していた。本実験検討では、ヌードマウスにおける関節腫脹の発症は全く認められず、抗CD4抗体や抗CD8抗体投与により関節炎の発症は有意に抑制された。これらの結果はCD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞が関節部において本菌の病変形成能に深く関与していることを強く示唆するものである。*S. pyogenes* はスーパー抗原を放出し、リンパ球に対しサイトカイン産生を強く誘導する性質をもつことから、本実験ではさらに関節部におけるT細胞の産生するサイトカインの意義を検討するため、インターフェロン γ 遺伝子ノックアウト (IFN- $\gamma^{-/-}$) マウスを用いて感染実験を行った。その結果、菌の投与後致死する個体は全く認められず、関節腫脹の発症もみられなかった。以上の結果から、*S. pyogenes* 感染における致死感染防御および関節部における病態形成にはT細胞の産生するIFN- γ が密接に関与する可能性が考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 皆 川 知 紀
副 査 教 授 小 林 邦 彦
副 査 教 授 有 川 二 郎

学 位 論 文 題 名

溶血性連鎖球菌感染マウスモデルの 病変形成における T細胞の役割について

溶血性連鎖球菌 (*Streptococcus pyogenes*, *S. pyogenes*) はグラム陽性球菌であり、ヒトに感染し扁桃炎、咽頭炎、猩紅熱など種々の急性化膿性感染症を引き起こす他に、リウマチ熱や糸球体腎炎などの続発症を引き起こす。*S. pyogenes* による続発症は免疫反応によって引き起こされる一種のアレルギー疾患と考えられており、リウマチ熱患者には高い抗体産生が認められる。発症に関わる抗原とされるM蛋白は感染防御抗原でもあり、M蛋白特異抗体は速やかな菌の排除と*S. pyogenes* 感染からの回復を促進する一方で、高抗体反応はリウマチ熱を発症する引き金となる可能性がある。治療には抗生剤投与が適当であるが、リウマチ熱は*S. pyogenes* の再感染などにより再発する危険性も高いため、長期に渡る抗生剤の投与が推奨されている。このことは、*S. pyogenes* 初感染時に獲得した免疫が二次感染以降において適切かつ有効に機能していないことを示唆しており、*S. pyogenes* 感染に対する防御機構は必ずしも液性免疫のみで全てを説明できない。さらに、劇症型溶連菌感染は、致死率の高い極めて重篤な疾患であるが、本疾患の場合には幼小児の発症は希であり、本来、防御免疫を有しているはずの成人に多くみられる。このようにヒトの*S. pyogenes* 感染においては宿主側の諸要因が深く関与していることが考えられるが、その感染防御機構には不明な点が多い。また、実験動物を用いて*S. pyogenes* の毒素やスーパー抗原の生物活性や致死活性を調べた研究は多いが、生体レベルでの*S. pyogenes* 感染発症の病態生理についての解析はほとんどなされていない。

本研究では、マウスの*S. pyogenes* 感染防御におけるT細胞の役割を中心に検討した。また、本菌感染マウスにおいては高頻度に関節腫脹が認められたため、マウスの*S. pyogenes* 静脈内感染による関節病変におけるT細胞の役割についても解析を加えた。1群20匹のICRマウスに 1×10^7 CFUの*S. pyogenes* を静脈内投与した場合、菌の投与後8日目までに致死する個体が認められ、60日間の観察期間における致死率は10%であった。一方、菌投与後、感染マウスのうち40%が慢性の関節腫脹を発症した。これらの感染マウスの肝臓、脾臓、腫脹関節について菌の分離を行った結果、各臓器よりコロニー形成能を有する*S. pyogenes* が分離された。肝臓・脾臓では本菌投与後、多くのマウスに

において比較的速やかに菌が排除される傾向が認められたが、wastingなどの症状を示す一部の感染マウスでは菌投与後5日目以降も菌が分離された。一方、関節腫脹を発症したマウスの関節部においては長期にわたり菌が分離され、症状と菌の分離は100%の相関を示した。しかし、いずれの臓器や組織においても菌数の推移は増殖・排除を示唆するような明らかな経時的変化を示さなかった。抗CD4抗体投与ICRマウス、抗CD8抗体投与ICRマウスおよびICRヌードマウスを用いて同様の感染実験を行った場合、抗CD4抗体投与群、抗CD8抗体投与群、両抗体同時投与群のどの群についても感染7日目までの致死率はコントロール群と比較して有意な差が認められず、臓器内菌数についても差が認められなかった。一方、これらの抗体投与マウスでは関節腫脹の発症が有意に抑制された。ヌードマウス群においても致死率はコントロール群と比較して差が認められず、さらに関節腫脹の発症率は0%であった。これらの結果から、*S. pyogenes* 感染マウスモデルにおいては1) 胸腺由来のT細胞を欠いた場合に致死率の上昇がみられないこと、2) CD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞の減少は*S. pyogenes* 感染早期における致死率、臓器内菌数に影響を与えないことが明らかとなり、*S. pyogenes* 静脈内感染における生体防御は、特に感染早期においてはCD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞が防御上重要ではない可能性が示唆された。また、長期にわたる致死率の検討では、抗CD4抗体投与群のみ致死率の有意な上昇が認められたが、抗CD8抗体の併用により致死率の上昇は抑制された。このような現象が起こる理由は不明であるが、感染マウスの致死機構には、*S. pyogenes* 感染の増悪以外の免疫学的な要素も含まれる可能性が考えられる。本菌感染マウスモデルにおける臓器内菌数の推移については、1) 菌の検出が症状の有無と相関性が高いこと、2) 投与された菌はマウス体内にて比較的速やかに血液寒天培地上におけるコロニー形成能を失っていること、3) 菌数の明らかな経時的変化は認められないことが示され、特に3)の結果から*S. pyogenes* の感染様式は通常感染微生物とは異なっている可能性が示唆された。一方、本菌感染により発症する関節腫脹は、症状と本菌の分離が100%相関しており、理想的な感染病態モデルの様相を呈していた。本実験検討では、ヌードマウスにおける関節腫脹の発症は全く認められず、抗CD4抗体や抗CD8抗体投与により関節炎の発症は有意に抑制された。これらの結果はCD4陽性T細胞やCD8陽性T細胞が関節部において本菌の病変形成能に深く関与していることを強く示唆するものである。*S. pyogenes* はスーパー抗原を放出し、リンパ球に対しサイトカイン産生を強く誘導する性質をもつことから、本実験ではさらに関節部におけるT細胞の産生するサイトカインの意義を検討するため、インターフェロン γ 遺伝子ノックアウト (IFN- $\gamma^{-/-}$) マウスを用いて感染実験を行った。その結果、菌の投与後致死する個体は全く認められず、関節腫脹の発症もみられなかった。以上の結果から、*S. pyogenes* 感染における致死感染防御および関節部における病態形成にはT細胞の産生するIFN- γ が密接に関与する可能性が考えられた。

口頭発表後、副査有川教授より、10%程度に認められる致死マウスの原因について、関節腫脹の有無を決めているのは何か。副査小林教授からは、本研究の現象は極めて興味深いものがある。病理組織から細菌の再活性化の様子はどうか。免疫不全では細菌感染は増悪するのが普通であるが、どのように考察するのか。などの質問があり、さらに主査皆川より、結核などの慢性感染と肉芽腫の関係を想像させるが、溶連菌によってもそのような病態生理が認められるのか。これらの質問に対して申請者は文献的考察を加え適格

に解答した。

本研究の成果は、臨床感染症学との関係のもとにさらなる研究が期待され、溶連菌感染の予防および治療に貢献する事が期待された。審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位をうけるに十分な資格を有するものと判定した。