

博 士 論 文

化膿レンサ球菌の鼻咽頭感染における
自然免疫応答と上皮細胞障害に関する研究

田 中 基 嗣

目 次

	頁
要旨	3
序論	6
目的	14
方法	15
結果	25
1. 化膿レンサ球菌による鼻咽頭感染マウスモデルの確立	25
2. 化膿レンサ球菌と好中球が共局在する部位では粘膜上皮が脱落する	26
3. 好中球除去マウスでは感染初期の粘膜上皮細胞障害が軽減される	28
4. 好中球除去マウスでは感染初期の上顎洞内化膿レンサ球菌数が減少する	30
5. 化膿レンサ球菌と NETs の相互作用と NETs 分解産物による細胞毒性	31
考察	34
引用文献	42
謝辞	53
図表	55

要 旨

化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎では、感染初期に発動する宿主の自然免疫応答に続き、物理的上皮バリアの過剰な破綻が生じ、菌体が組織内に侵入することで増悪することが予想される。しかし、感染により惹起される自然免疫応答の詳細や、上皮細胞の破綻機構に関しては不明なままである。本研究では、マウスを用いた化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の重症化モデルを新規に作製し、感染初期の自然免疫応答と上皮細胞障害の関連について調べた。

化膿レンサ球菌 11434 株の経鼻感染により、顕著なマウス鼻腔粘膜上皮細胞障害が惹起され、TUNEL 染色により上皮細胞アポトーシスが確認された。菌塊を包囲する好中球の近接部位で、上皮細胞障害はより高度であったことから、化膿レンサ球菌と自然免疫細胞との相互作用が、上皮細胞障害に関与している可能性が示唆された。そこで、薬剤により好中球およびマクロファージの除去処理を施したマウスを作出し、化膿レンサ球菌の鼻咽頭感染における自然免疫細胞の役割を精査した。clodronate liposome によってマクロファージを除去したマウスでは、感染局所の生菌数増加が見られたが、抗 Ly-6G 抗体を用いて好中球を除去したマウスでは、感染局所の生菌数減少と、上皮細胞脱落の抑制、お

よび上皮細胞アポトーシスの著減を認め、好中球が感染を助長している可能性があると考えられた。

好中球は、Neutrophil extracellular traps (NETs) を放出し、病原微生物を捕捉して死滅させ、生体の感染防御に寄与している。他方、化膿レンサ球菌は、Deoxyribonuclease (DNase) を分泌して NETs を分解し、好中球による殺菌機序を回避することが報告されている。しかし、化膿レンサ球菌によって NETs が分解されて生じた NETs 分解産物の意義に関する研究はなされていない。そこで、化膿レンサ球菌と NETs を共培養することによって得られた NETs 分解産物の培養細胞株に対する作用を検討した。化膿レンサ球菌の培養上清の添加により、ヒト上皮由来 A549 細胞およびヒト単球由来 THP-1 細胞は中等度の細胞死を起こしたが、化膿レンサ球菌と NETs 由来二本鎖 Deoxyribonucleic acid (NET-DNA) の共培養上清を加えた場合では、より高度の細胞死が惹起された。化膿レンサ球菌と Herring sperm 由来二本鎖 DNA (Herring sperm dsDNA, HS-DNA) の共培養上清を添加した場合でも、細胞死の増加が見られたことから、化膿レンサ球菌は、NET-DNA を分解し、その分解産物によって上皮細胞および単球の細胞死を誘導することが示唆された。

以上の結果から、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の増悪化機序として、従来考えられていた化膿レンサ球菌の分泌する病原因子に起因すると考えられる直接

的な鼻腔粘膜上皮細胞障害のみならず，(1) NET-DNA 分解産物を利用した二次的な上皮細胞障害による物理的上皮バリアの破壊と，(2) NET-DNA 分解産物による感染局所での単球・マクロファージの細胞死誘導による貪食回避，炎症性サイトカイン産生抑制，獲得免疫発動回避が重要であることが示唆された。

序 論

化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) は、直径 2 μm 以下のグラム陽性球菌で、レンサ球菌属の Lancefield 抗原分類の A 群に属する。本菌は、ヒツジ血液含寒天培地上で β 溶血と呼ばれる完全溶血を生じ、臨床医学的に A 群 β 溶血性レンサ球菌 (Group A *Streptococcus*, GAS) とも呼ばれる(1)。

化膿レンサ球菌は、ヒトを宿主とし、健常人の咽頭、消化管および表皮に生息する常在菌の一種であるが、時にヒトに病的感染を成立させ、種々疾患を引き起こす。その臨床像は、咽頭扁桃炎、伝染性膿痂疹などの比較的軽症の感染症から、致死的重症感染症 (invasive GAS disease) である毒素性ショック症候群、壊死性筋膜炎、敗血症まで極めて多様である(2)。続発症では、リウマチ熱・リウマチ性心疾患や溶連菌感染後糸球体腎炎が良く知られており、いずれも重症化すると生命に関わる。世界規模で概算した種々の病原微生物による年間死亡者数では、HIV の約 270 万人を筆頭に、結核の約 160 万人、マラリアの約 130 万人と続くが、化膿レンサ球菌は第 9 位であり、発展途上国を中心に、少なく見積もっても全世界で毎年約 50 万人が死亡している(3)。さらに、死亡者や後遺症を抱える患者の多くが若年者であることから、人類にとって極めて重要な感

染症の一つといえる(3).

化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎は、化膿レンサ球菌感染症の中で最多であり、わが国では、感染症法下における感染症発生動向調査で、4類感染症定点把握疾患に指定されている。生命予後は致死的重症感染症と比較すれば良性だが、世界人口における発症件数は年間6億を超えるとされる(3)。毎年莫大な医療費が投入されており、米国の統計では、学業・就業時間の喪失などの間接的な損失まで含めると、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎による経済的損失は最大で年間5億4千万ドルにも上るとされている(4)。化膿レンサ球菌は、細菌性咽頭扁桃炎の最大の原因菌であり(5)、ウイルス感染を含めたすべての咽頭扁桃炎の中で、化膿レンサ球菌が原因の咽頭扁桃炎は、小児で15~30%、成人で5~10%を占める(6, 7)。鼻腔や口腔からの飛沫感染を主な感染経路とし、2~5日の潜伏期間を経て発症する。診断基準としては、Modified Centor criteriaが提唱されている(8)。咳がないこと、圧痛を伴う頸部リンパ節腫脹、38.0℃以上の発熱、扁桃の腫脹や滲出物、15歳未満、を5つの診断基準として各項目につき1点を加算する(45歳以上の場合は1点を減じる)。これによれば、合計点が1以下では抗菌薬や培養検査は不要であるが、2点または3点の場合には咽頭培養または迅速診断キット検査を行い、4点以上では化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の可能性が51~53%と高まるため、経験的抗菌薬治療を開始するべきとしている(8)。一方で米国感染

症学会は、細菌が証明された場合に限り抗菌薬を用いるべきであると主張している(4)。一般的には、ペニシリン系あるいはセフェム系などの抗菌薬治療によく反応するものの、再発率は高く、学齢期小児の約 20%でキャリア化しているとの報告もある(9)。繰り返す症例では時に扁桃切除を要するが、抗菌薬治療後で手術時には無症状であっても切除扁桃の 30%以上から化膿レンサ球菌が検出される(10)。このようなキャリア化は、続発するリウマチ性心疾患や溶連菌感染後糸球体腎炎の発症と関連している可能性がある。

化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎に関する基礎研究では、化膿レンサ球菌の経鼻感染モデルを鼻咽頭関連リンパ組織 (Nasal-associated lymphoid tissue, NALT) 感染、すなわち咽頭扁桃炎モデルとしたものが多い(11-13)。ヒトは、口蓋扁桃、咽頭扁桃、舌扁桃、耳管扁桃からなるワルダイエル咽頭輪を有し、気道粘膜免疫組織の最初の関門を成している。齧歯類はワルダイエル咽頭輪の代表的組織としての扁桃を持たないが、鼻腔内下部後方に存在するリンパ球集簇である NALT が機能的に扁桃に等しいと考えられている (図 1) (14-17)。NALT には、小腸の集合リンパ小節を代表とする他の粘膜リンパ組織と同じように、M 細胞と呼ばれる外来抗原をエキソサイトーシス機構により内腔へ取り込むために特化した細胞が存在し、抗原特異的 IgA 産生能や炎症サイトカイン産生能を有する(11, 18-20)。Cleary らは、化膿レンサ球菌 90226 株を BALB/c マウスに経鼻感染させ

て、約 1 週間で生体内から細菌が排除される実験モデルを確立した(11)。化膿レンサ球菌は、経鼻投与後 1 日以内に NALT の M 細胞から取り込まれ、M 細胞近傍に存在する樹状細胞に受け渡され、抗原提示を介して T 細胞を活性化する(11)。ovalbumin を発現させた化膿レンサ球菌 90226 株を用いて抗原特異的 T 細胞の動態を追跡した研究では、抗原特異的 T 細胞は感染局所の NALT で感染 3 日後から増加し、5~8 日後には遠隔リンパ組織である頸部リンパ節や脾臓で増加した(12)。著者は、NALT を起点とした獲得免疫系の発動が、約 1 週間で化膿レンサ球菌を排除したと結論している。他方、Kiyono らは、M 細胞が NALT とは解剖学的に異なる鼻腔内および副鼻腔内の鼻甲介上にも多数存在することを見出し、この非 NALT の M 細胞が、経鼻感染させた化膿レンサ球菌 BAA-1064 株を取り込むことを報告している(21)。

好中球は、自然免疫系の中心を担う免疫細胞の一つであり、体内に侵入した細菌を貪食や脱顆粒によって殺菌・分解することが以前から知られていたが(22)、近年、Brinkmann らによって、好中球が NETs とよばれる線維網を細胞外に放出し、細菌を捕捉して死滅させる現象が発見された(23)。NETs は、Elastase や Histone、Myeloperoxidase (MPO) など、種々のタンパク分解酵素や抗微生物活性を持つタンパク質を含み、細菌だけでなく、真菌やウイルス、原生動物に対しても強力な抗微生物活性を発揮する(24-27)。臨床的にも、化膿レンサ球菌、黄色ブド

ウ球菌, 肺炎球菌など DNase を有する細菌の感染症は重症化しやすいことから, 現在では, NETs は重要な生体防御網の一つであると認識されている(28-30).

NETs 形成はその性格上, 病原微生物に対する自然免疫細胞としての好中球の能動的細胞死を思わせ, アポトーシスやネクローシスと区別して NETosis と呼ばれている(31). 現在では, クロマチン DNA を含み細胞死を伴う NETs の他に, ミトコンドリア DNA を主とした細胞死を伴わない NETs も存在することが分かっている(32). また, 好中球以外にも, 好酸球(33)や肥満細胞(34)も類似の構造物を細胞外へ放出することが報告されている. 現在までに, NETs 形成に関わるいくつかの分子生物学的機序が提唱されている (図 2) (35). 第一に, NADPH oxidase による活性酸素種産生が NETs 形成に必要である. NADPH oxidase 欠損を遺伝学的特徴とする慢性肉芽腫症患者および NADPH oxidase 欠損マウス由来の好中球は NETs を形成せず, また健常人由来だが NADPH oxidase 阻害薬である Diphenylene iodonium (DPI) で処理した好中球もまた NETs を放出しない(27, 36, 37). 第二に, オートファジーが NETs 形成に必要である. すなわち, H₂O₂ に代表されるような活性酸素種刺激のみでは NETs は形成されない. fMLP 刺激では活性酸素種産生刺激に加え, PI3K/Akt/mTOR 経路が活性化してオートファジーを抑制するが, 選択的 PI3K 阻害薬である Wortmannin で処理してオートファジーを可能にすると NETs 形成が見られる(36). 第三に, Histone H3 のシトル

リン化が必要である。Cl-amidine によって Histone 修飾酵素である Peptidylarginine deiminase (PAD) 4 を阻害すると、Histone H3 のシトルリン化が抑制され、同様に NETs 形成が見られなくなる(38)。上述のように、NETs 形成の機序として、NADPH oxidase による活性酸素種産生、オートファジー、Histone H3 のシトルリン化の関与が報告されてはいるものの、未だにその詳細は不明である。実験では、NETs 誘導刺激薬物として Phorbol myristate acetate (PMA) や Lipopolysaccharide (LPS) が使用されることが多い (図 2)。

マクロファージは、血液中の単球が血管壁を通り組織内へ入って分化したもので、好中球と双壁を成す重要な自然免疫細胞である(39)。細菌などの異物を貪食して取り込み、リソソームと融合させて加水分解して殺菌するだけでなく、分解された異物の断片を細胞表面に抗原提示することで、獲得免疫系を発動させる。さらに、種々の炎症性サイトカインを産生して、局所の炎症を惹起して感染を制御している(39)。これまで、薬剤でマクロファージを除去したマウスでは、化膿レンサ球菌による敗血症や壊死性筋膜炎モデルにおける生存率低下が報告されている(40, 41)。

化膿レンサ球菌は、宿主免疫を回避する様々な病原因子を有している (図 3)

(2). 化膿レンサ球菌は、細胞外分泌型の DNase である Sda1 や SpnA など、菌株によって異なる複数の DNase を有しており、好中球が放出する NETs の主要構

成要素である DNA を分解することができる(1, 2, 28). Streptolysin O (SLO) や Streptolysin S (SLS) は, 溶血毒素として知られるが, これは食胞に孔を空けて 貪食細胞にアポトーシスを誘導する. また化膿レンサ球菌は, IL-8 protease や C5a peptidase を分泌して, 好中球遊走因子として機能する IL-8 や C5a を分解し, 感染組織中への好中球遊走を阻止することができる. さらに, Streptococcal inhibitor of complement (SIC) は, 抗菌ペプチド (Antimicrobial peptide, AMP) を阻害する. 菌体表面に発現する M タンパクと菌体を覆うヒアルロン莢膜は, 補体成分 C3b の菌体表面への結合を阻害することで補体によるオプソニン化を抑制し, 貪食作用の回避に機能している(42). Streptokinase は, Plasminogen を Plasmin へ変換し, 線溶系を活性化することで, 血液凝固による殺菌機構を阻止する. なお, Streptokinase は, 血栓溶解薬として臨床応用されたが, 効果が持続しないため現在ではその使用頻度は高くない.

化膿レンサ球菌の上気道感染における上皮細胞障害および感染初期に発動する宿主の自然免疫系の重要性に関しては, 未だ十分には解明されていない. 化膿性レンサ球菌は, ヒト上皮系培養細胞株である A549 細胞や HEp-2 細胞をアポトーシスさせることが *in vitro* で報告され, その機序として代表的な病原因子である Streptococcal pyrogenic exotoxin B (SpeB) が重要であることが報告されているが(43, 44), *in vivo* での研究は不足している. また, 主要な自然免疫細胞であ

る好中球とマクロファージによる免疫応答が、感染後のどのタイミングで、個体のどの部位で、どのような機序で惹起され菌体が排除されるのかという自然免疫細胞の動態と作用機序、さらにはこれらの自然免疫制御を回避する化膿レンサ球菌の分子学的機序は未だ不明である。化膿レンサ球菌の鼻咽頭感染初期における鼻腔粘膜上皮細胞障害機序および宿主自然免疫系の動態を明らかにすることは、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎における細菌側の未知の免疫回避機構の解明や、続発する溶連菌感染後糸球体腎炎やリウマチ性心疾患への進展防止、さらに新規治療薬の開発などにつながる可能性がある。

目 的

本研究では、化膿レンサ球菌の鼻咽頭感染マウスモデルを新規に構築し、感染初期防御応答における、自然免疫細胞の感染個体内での時空間的作用動態を解明することを目的とする。薬剤投与により、自然免疫応答を担う主要な細胞群である好中球およびマクロファージ数を減少させた動物を作製し、未処理動物と比較解析することで、感染初期の上皮細胞障害における自然免疫応答の作用を解明する。

方 法

1. 菌株および菌液調製

化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎モデル作製のため、ヒト咽頭由来化膿レンサ球菌 11434 株 (*Streptococcus pyogenes* ATCC® 11434) を使用した。また、菌株による表現型の差異を確認するため、比較対照にヒト血液由来化膿レンサ球菌 90226 株 (米国ミネソタ大学細菌学教室 Cleary P. Patrick 教授より供与) を使用した。化膿レンサ球菌は、Neopeptone 含 Todd-Hewitt Broth (THB-neo 液体培地) を用い、37°C・5% CO₂ の条件下で対数増殖期まで培養し、滅菌グリセロール終濃度 50%、-80°Cにて冷凍保存した。

菌液の調製には、冷凍保存した化膿レンサ球菌をイノキュレーションループで掻き取り、THB-neo 液体培地に投入して、37°C・5% CO₂ の条件下で一夜培養 (12~16 時間) し、得られた菌液を同液体培地で 10 倍希釈して 37°C・5% CO₂ 条件下に培養し、光学濃度 OD₆₀₀ 値が 0.6 に生育した培養液 (前期対数増殖期) を実験に使用した。OD₆₀₀ 値と菌液濃度の関係については、5% ヒツジ血液含寒天培地に線画して OD₆₀₀ 値が 0.6 のとき、 2×10^8 colony forming units (cfu) /mL であることを確認した。OD₆₀₀ 値測定には、NanoDrop 2000c Spectrophotometer

(Thermo Fisher Scientific 社) を使用した.

2. 実験動物

実験全般を通じて、6~7 週齢、雄性 C57BL/6 マウスを使用した。また、マウス鼻咽頭感染モデルの構築のため、C57BL/6 マウスの他に 6~7 週齢、雄性 BALB/c マウスおよび雌性 ddY マウスを使用した。マウスはすべて日本エスエルシー社から購入し、飼育は SPF 環境下、通常飼料を用い、自由飲水下にて飼育した。マウスの安楽死処置には、CO₂ 吸入もしくはジエチルエーテル吸入麻醉下心臓穿刺による全採血を用いた。動物の飼育および実験使用については、すべて東京大学動物実験実施マニュアルの規定に従って実施した。

3. マウスの経鼻感染方法

THB-neo 液体培地内で OD₆₀₀ 値が 0.6 となった菌液を、6000xg, 25°C, 10 分間遠心し、PBS で洗浄した後、 5×10^8 cfu/15 μ L となるように生理食塩水で懸濁した。経鼻感染時の麻醉には、ケタミン 80 mg/kg (第一三共プロファーマ社, ケタラール筋注用 500 mg®) およびキシラジン 10 mg/kg (バイエル薬品社, セラクタ

ール 2% 注射液®) 混合液を臀部に筋肉内注射した。十分な麻酔深度に達した後、マウスを仰臥位として、化膿レンサ球菌 5×10^8 cfu/15 μ L を 7.5 μ L ずつ左右の鼻腔へ滴下し、自然吸入させた。

4. マウスからの好中球およびマクロファージの除去

好中球の生体からの除去は、マウスに抗 Ly-6G 抗体 (1A8 clone®, Bio X cell 社) 500 μ g/body を腹腔内投与することにより行った。対照群には、対照 IgG 抗体 (2A3 clone®) 500 μ g/body の投与を行った。

マクロファージは、clodronate liposome® (ClodronateLiposomes.com 社) 10 μ L/g \cdot 体重を静脈内注射することにより除去した。対照群には、等量の対照 liposome 静脈内投与を用いた。

標的細胞の除去効率は、BD FACS Aria を用いたフローサイトメトリー解析により確認した。好中球は Gr-1^{high} CD11b⁺ F4/80⁻ 細胞、マクロファージは F4/80⁺ CD11b^{int} Gr-1⁻ 細胞とそれぞれ定義した(45)。細胞の染色には、直接蛍光標識抗体である抗 CD11b-FITC 抗体 (Rat IgG2b kappa, M1/70 clone, BD Biosciences 社)、抗 Gr-1-PE 抗体 (Rat IgG2b kappa, RB6-8C5 clone, Tonbo biosciences 社) および抗 F4/80-APC 抗体 (Rat IgG2a kappa, BM8.1 clone, Tonbo biosciences 社) をそれ

ぞれ使用した。

5. マウス鼻腔粘膜組織の凍結切片の作製と免疫染色

凍結切片の作製は、以下のように行った。全採血による安楽殺後、70% エタノールを頭部に噴霧し、頭部を切断した。次に頭皮を剥離し、眼球・脳を除去し、続いて鼻尖・前歯、頬骨・頬筋を切離した組織片を PBS で軽く洗浄して、4% パラホルムアルデヒド含 PBS 液に浸漬して 4℃, 24 時間固定し、その後 10% EDTA 液 50 mL (pH 7.4) に 4℃, 5 日間以上連日浸漬液を交換しながら浸漬して骨塩成分を十分に脱灰した。これを OCT コンパウンド (Thermo Fisher Scientific 社) に浸漬 (4℃, 12~16 時間) した後、クリオモルドへ収め、液体窒素に浮かべたアルミ箔上で急速凍結させ、ミクロトーム内で 6 μ m 厚に薄切し、フロスト付きスライドグラスに貼り付けて、使用まで -30℃ で保存した。

免疫染色は、凍結切片を載せたスライドグラスを室温に戻し、PBS で 2 回軽く洗浄した後、4% パラホルムアルデヒド含 PBS 液を用いて室温にて 5 分間浸漬固定した。スライドグラス上にて PBS で 5 分間、3 回洗浄し、0.2% Triton-X100 含 PBS 液を加え、室温で 10 分間静置することによって 易透過処理を行った。電子レンジで加熱した 10 mM クエン酸ナトリウム溶液 (pH 6.0) に 10 分間、2

回浸漬して抗原賦活化処理し, 0.05% Tween20 含 PBS 液で 3 分間, 3 回洗浄した.

ブロッキングは, G Block® (Geno Staff 社) 50 μ L を滴下し, 室温にて 30 分間処理した.

化膿レンサ球菌, 好中球, マクロファージの三者を染色する場合には, 一次抗体として, ヤギ由来抗化膿レンサ球菌抗体 (ab9191, Abcam 社) (50 倍希釈), ウサギ由来抗 MPO 抗体 (ab45977, Abcam 社) (50 倍希釈), ラット由来抗 F4/80 抗体 (Bio-Rad 社) を用い, 37°C で 60 分静置した. PBS で 3 分間, 3 回洗浄の後, 二次抗体として, ロバ由来抗ヤギ IgG-Cy5 抗体 (100 倍希釈) を加えて 37°C で 30 分静置し, PBS で洗浄後, ヤギ由来抗ウサギ IgG-TRITC 抗体 (100 倍希釈), ヤギ由来抗ウサギ IgG-FITC 抗体 (100 倍希釈), および DAPI (1000 倍希釈) を加えて 37°C で 30 分静置した.

B 細胞, T 細胞の染色には, 一次抗体として, ラット由来抗 CD45R/B220 抗体 (RA3-6B2 clone, BD Biosciences 社), または, ラット由来抗 CD4 抗体 (H129.19 clone, BD Biosciences 社) を, 二次抗体として, ウサギ由来抗ラット IgG-FITC 抗体をそれぞれ使用した.

染色後は, PBS で 2 回軽く洗浄し, Vectashield® (Vector Laboratories 社) を用いて封入し, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡 (Carl Zeiss 社, LSM510) で観察し, LSM510 version 3.2 software (Carl Zeiss 社) を用いて解析した.

6. 上皮細胞アポトーシスの定量

アポトーシス細胞の検出には, DeadEnd Fluorometric TUNEL System® (Promega 社) を用いた. 凍結切片を載せたスライドを室温に戻し, PBS で 2 回軽く洗浄後, 4% パラホルムアルデヒド含 PBS 液にて室温で 15 分間固定した後に, PBS で 5 分間, 2 回洗浄した. Proteinase K 20 $\mu\text{L}/\text{mL}$ を 100 μL 加え, 8 分間室温にて静置して易透過処理し, PBS で 5 分間洗浄し, 再び 4% パラホルムアルデヒド含 PBS 液にて 5 分間浸漬固定した. PBS で 5 分間洗浄し, 付属の Equilibration buffer 100 μL を加えて室温で 5 分間静置後, Equilibration buffer 45 μL , Nucleotide Mix 5 μL , recombinant Terminal Deoxynucleotidyl Transferase 1 μL の混合溶液を加えて, 遮光下に 37°C, 60 分間静置した. クエン酸ナトリウム・食塩混合溶液中で 15 分間浸漬後, PBS で 3 回洗浄し, DAPI および Wheat Germ Agglutinin (WGA) Alexa Fluor 555 Conjugate® (Life technologies 社) を 37°C, 60 分間反応させて対比染色を行った.

上皮細胞アポトーシスの定量化は, 共焦点レーザー蛍光顕微鏡および LSM510 version 3.2 software を用いて, 同一の倍率および画像取得条件によって得た画像の上皮層をトレースして総面積 (単位: pixel) を算出し, 次にその範囲内にみられる蛍光強度が 120 以上の TUNEL 陽性細胞数を目視でカウントして, 単位面積あたりの TUNEL 陽性細胞数を比較検討した.

一方、上皮細胞障害範囲の定量化には、共焦点レーザー蛍光顕微鏡および LSM510 version 3.2 software を用いて、同一の倍率および画像取得条件によって得た画像の篩骨洞迷宮内粘膜上皮から 1 サンプルあたり 5 視野を確認し、粘膜上皮周を近似曲線によりトレースし、上皮全長を算出した後、WGA 陽性上皮長をトレースして、上皮全長に対する WGA 陽性上皮長の比を求めた。

7. マウス鼻腔内における化膿レンサ球菌の生菌数の確認

化膿レンサ球菌を感染させたマウスを解剖し、上顎洞粘膜組織を摘出して 40 μm メッシュ上で、注射用 1 mL シリンジのゴム部分を用いて組織を磨り潰し、得られた溶液を適切な希釈倍率で 5% ヒツジ血液含寒天培地に播種して、37°C、5% CO₂ 下に一夜培養した後、コロニー形成数を目視でカウントした。

8. ヒト好中球分離

好中球分離は、Ficoll-Hypaque 混合溶液（DS Pharma Biomedical 社，モノ・ポリ分離溶液®，比重：1.115 \pm 0.002 g/mL）を使用した（図 4）。まず、2 週間以内に投薬を受けていない健常人から血液 10 mL を採取し、EDTA-2Na で抗凝固処

理し，試験管内でモノ・ポリ分離溶液 3 mL に，抗凝固処理した全血 3.5 mL を静かに重層し，400xg，25°C，25 分間遠心分離後，好中球層を別の試験管に移して PBS を加えて洗浄し，300xg，8°C，10 分間遠心分離して上清を除去し，氷冷した滅菌蒸留水 5 mL を加えて 30 秒間ピペッティングにて完全に溶血させた．速やかに PBS を加え，300xg，8°C，10 分間の遠心分離後，上清を吸引して細胞ペレットを 2% ヒト血清含 Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI) 1640 で懸濁した．これを 1×10^6 cells/mL に調製し，冷 100% メタノール 100 μ L で固定した塗抹標本を，10 倍希釈した Giemsa 液® (WAKO 社) にて 15 分間染色して非活性化好中球 90%以上であることを確認し，実験に使用した．

9. NETs の惹起と NET-DNA の確認

好中球 1×10^6 cells/mL に対して，PMA を終濃度 25 nM となるように加え，4 時間後に 6000xg，4°C，5 分間で遠心分離し，その上清を回収した(37)．上清中の NET-DNA 値は，Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay® (Life Technologies 社) により測定した(37)．

10. 培養細胞株

A549 細胞（ヒト・肺胞基底上皮腺癌細胞）の培養には、10% Fetal calf serum (FCS) 含有 Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) を使用した。THP-1 細胞（ヒト・単球性白血病細胞）の培養には、10%FCS 含有 RPMI1640 を使用した。細胞実験には、3 日で約 10 倍に増殖した増殖良好かつ継代間隔が安定した細胞を使用した。

11. 化膿レンサ球菌と NETs の相互作用による細胞毒性の評価

THB-neo 液体培地 10 mL 内で一夜培養して静止期に達した化膿レンサ球菌を RPMI1640 培地に懸濁して、NET-DNA もしくは HS-DNA をそれぞれ終濃度が 100 ng/mL もしくは 4 μ g/mL となるように加え、37°C、5% CO₂ の条件下で 3 時間培養した。その後菌液と DNA の混合溶液を 6000xg、4°C、10 分間で遠心分離し、上清を回収して、化膿レンサ球菌処理 DNA 溶液を得た（図 4）。前述の培養細胞株 1 well あたり 5 x 10⁶ cells の A549 細胞もしくは THP-1 細胞を播種した 12 well plate に、化膿レンサ球菌処理 DNA 溶液 400 μ L を添加し、37°C、5% CO₂ の条件下で 4 時間培養した。接着細胞である A549 細胞は、まず浮遊細胞を回収し、次に PBS 200 μ L で洗浄するとともに細胞を回収し、0.05% Trypsin-EDTA 200

μL を加えて、37°C、5 分間静置して全ての細胞を剥離させてこれを回収した。

浮遊細胞である THP-1 細胞は、全細胞液をピペッティングにより回収した。細胞死の程度は、Trypan blue 染色液® (Sigma 社) により染色される細胞数から算出した。

結 果

1. 化膿レンサ球菌による鼻咽頭感染マウスモデルの確立

マウス鼻腔感染系において、鼻腔内投与量が過多となると、注入菌液が肺へ流入し、肺感染を併発することが想定される。そこで、鼻腔内だけに菌が滞留して局所感染が成立する鼻腔感染系を確立するために、適切な菌液投与量を検討した。Trypan blue 染色液を左右の鼻腔に 7.5 μL ずつ経鼻投与したところ、鼻腔内全域に色素が付着したが、肺への吸入は見られなかった (図 5A・B)。一方、左右の鼻腔に 15 μL または 30 μL ずつ経鼻投与したマウスでは、投与直後から鼻腔外へ Trypan blue 染色液が噴出し (図 5B, 上段)、2 時間後に肺への色素吸入が肉眼的に観察された (図 5B, 下段)。以上の結果から、鼻腔内感染に用いる菌液量は左右各鼻腔へそれぞれ 7.5 μL 、各マウスあたり計 15 μL とした。

次に、化膿レンサ球菌鼻咽頭感染マウスモデルに適したマウス系統および化膿レンサ球菌菌株を選定するために、様々な投与菌数の各種化膿レンサ球菌菌株を、種々マウス系統 (C57BL/6 マウス, BALB/c マウス, ddY マウス) と組み合わせ経鼻投与を行った。その結果、C57BL/6 マウスにヒト咽頭由来化膿レンサ球菌 11434 株を 5×10^8 cfu/15 μL 経鼻投与することで、再現性よく投与後 3

日から6日で致死となる感染条件を見出した(図6)。死亡したマウスは、全て感染2日後から体重減少、シバリングを認めており、死体解剖時には麻痺性イレウスを呈していた(データ未掲載)。

序論で述べたように、これまで化膿レンサ球菌経鼻感染はNALT感染モデルとして頻用されてきた。そこで、今回作製した感染モデルにおける感染部位を同定するために、化膿レンサ球菌経鼻感染マウスの頭部から凍結切片を作製し、その連続切片を用いて菌塊の局在を免疫組織染色で検討した。化膿レンサ球菌感染マウスのNALTでは、B細胞、T細胞ともに陽性を確認した(図7A・B)が、化膿レンサ球菌、好中球、マクロファージのいずれも確認することはできなかった(図7C)。一方で、鼻腔内、篩骨洞迷宮内、上顎洞内において著明に化膿レンサ球菌の増殖が確認された(図8)。このことから、本モデルはNALTでの菌体感染を主とする感染モデルではなく、鼻咽頭感染モデルと捉えるのが妥当であると考えられた。

2. 化膿レンサ球菌と好中球が共局在する部位では粘膜上皮が脱落する

化膿レンサ球菌による鼻腔・副鼻腔内の炎症惹起機序を解明するために、菌体存在部位における上皮細胞および遊走性細胞による炎症像を精査した。感染

マウスの鼻腔粘膜上皮障害を確認するために、非感染および感染マウスの鼻腔粘膜上皮表層を、上皮細胞特異的染色が可能である WGA により染色した（ただし、化膿レンサ球菌も菌体表面に糖鎖を有するため染色陽性となる）。非感染マウスの鼻腔粘膜においては、WGA 陽性の上皮細胞層が一層の平坦な連続層として観察された（図 9A-a）。一方、化膿レンサ球菌の経鼻感染後 12 時間が経過したマウスでは、免疫細胞様の細胞群が取り巻く化膿レンサ球菌菌塊に隣接した鼻腔粘膜上皮の WGA 陽性上皮細胞層は凹凸不整となり、WGA 染色陽性粘膜上皮細胞の脱落が見られた（図 9A-b, 上段）。化膿レンサ球菌の菌塊のみが存在し免疫細胞様の細胞群がみられない部位（図 9A-b, 中段）あるいは、感染マウスであっても菌体が見られない部位（図 9A-b, 下段）では、上皮細胞障害は見られなかった。また、TUNEL 染色により非感染マウスおよび感染マウスの鼻腔粘膜上皮の細胞死を検出したところ、非感染マウス鼻腔粘膜の上皮層では TUNEL 陽性細胞は殆ど確認できない程度であったのに対して、化膿レンサ球菌感染マウスの鼻腔粘膜上皮層には多数の TUNEL 陽性アポトーシス細胞が見られた（図 9B）。以上より、化膿レンサ球菌の経鼻感染によって著しい上皮細胞脱落とアポトーシスが生じることが明らかとなった（図 9C・D）。

感染 12 時間後の組織切片に、好中球およびマクロファージ特異的免疫染色を行った結果、化膿レンサ球菌を取り巻いている免疫細胞の主体は好中球である

ことが判明したが、同部位においてマクロファージは観察されなかった(図 10A)。興味深いことに、感染 24 時間後の組織切片の菌塊中心部では、好中球は観察されたがマクロファージは見られず、マクロファージは菌塊の辺縁に限局していた(図 10B)。以上より、化膿レンサ球菌と好中球の相互作用が鼻腔粘膜上皮細胞障害に関与している可能性と、化膿レンサ球菌が何らかの機序によりマクロファージを菌塊中心部から排除している可能性が示唆された。

さらに、マウス鼻腔内の化膿レンサ球菌の動態を経時的に観察すると、感染 12 時間後には、化膿レンサ球菌は脱落した上皮細胞に挟まれる形で内腔内に留まっていたが、感染 24 時間後には脱落上皮細胞を越え、感染 48 時間後には粘膜下層へ深く侵入していた(図 11A)。粘膜下層に存在する血管床へ侵入した場合には菌血症へ進展することが予想されるため、化膿レンサ球菌感染後の体重減少および菌血症発症の有無を経時的に検討したところ、組織所見に一致して感染 48 時間後から著しい体重減少を認め(図 11B)、感染 72 時間後にはすべてのマウスにおいて菌血症が確認された(図 11C)。

3. 好中球除去マウスでは感染初期の粘膜上皮細胞障害が軽減される

化膿レンサ球菌の鼻腔粘膜上皮細胞障害における好中球およびマクロファ-

ジの関与を調べるために、これらの細胞群を除去したマウスの作出を試みた。マウス全血を用いたフローサイトメトリー解析による検討の結果、抗 Ly-6G 抗体の腹腔内投与により、投与 1 日後に全血好中球の約 86%が除去され、この効果は投与 3 日後には 28%まで減弱することを確認した (図 12A・B)。同様に、clodronate liposome を経静脈注射したマウスでは、全血マクロファージが投与 1 日後に約 87%が除去されたが、この効果は 3 日後には 42%まで低下した。一方、脾臓内のマクロファージは、投与 1 日後および 3 日後に約 75%の除去率であった (図 12B)。

次に、好中球およびマクロファージ除去処理の 24 時間後に化膿レンサ球菌をマウスに感染させ、感染 12 時間後の鼻腔粘膜上皮層を観察した (図 13A)。抗 Ly-6G 抗体投与による好中球除去マウスでは、化膿レンサ球菌感染後の上皮細胞層における WGA 陽性上皮層長は、化膿レンサ球菌が感染した対照 IgG 投与マウスに比して有意に減少しており (図 13B)、好中球除去によって、化膿レンサ球菌感染による上皮細胞の脱落が軽減されることが判明した。また、好中球除去マウスにおいては、IgG 対照マウスと比べて、上皮細胞層における TUNEL 陽性アポトーシス細胞数が著明に減少しており (図 13C)、好中球除去によって、化膿レンサ球菌感染による上皮細胞アポトーシスが抑制されることが判明した。以上の結果から、化膿レンサ球菌感染による鼻腔粘膜上皮細胞障害には、好中

球が関与していることが明らかとなった。

4. 好中球除去マウスでは感染初期の上顎洞内化膿レンサ球菌数が減少する

鼻腔および副鼻腔内での化膿レンサ球菌生菌数における好中球もしくはマクロファージの影響を確認するために、無処置の C57BL/6 マウス，抗 Ly-6G 抗体投与による好中球除去マウス，IgG 対照抗体投与マウス，clodronate liposome によるマクロファージ除去マウス，および対照 liposome 投与マウスに，化膿レンサ球菌を経鼻感染させて両側上顎洞内の生菌数を経時的に解析した（図 14）。すべての群において，化膿レンサ球菌生菌数は感染後から一旦は減少し，12～18 時間後から上昇に転じた。興味深いことに，マクロファージ除去マウスでは，感染 24 時間後の上顎洞内生菌数が対照 liposome 投与マウスよりも有意に増加していたが（ $p<0.001$ ），予想に反して，好中球除去マウスでは，IgG 対照投与マウスと比較して感染 18 時間後に有意な生菌数減少が見られた（ $p<0.001$ ）。これらの結果から，上顎洞内の化膿レンサ球菌生菌数は，マクロファージ除去マウスでは増加する一方で，好中球除去マウスでは減少することが明らかとなった。

5. 化膿レンサ球菌と NETs の相互作用と NETs 分解産物による細胞毒性

生体に侵入した外来病原細菌の殺菌には、好中球による貪食、脱顆粒および、NETs による細菌の捕捉が重要であることが知られている(22)。しかし、上述の結果からは、化膿レンサ球菌が感染した鼻腔粘膜では、本来自然免疫の主力であるべき好中球は十分に殺菌機能を発揮していないと考えられ、化膿レンサ球菌が好中球の殺菌作用を無力化した可能性が示唆された。さらに、菌塊を包囲する好中球の周辺で上皮細胞障害が高度であることや、マクロファージは菌塊の辺縁にのみ局在することから、化膿レンサ球菌は、好中球を無力化するのみならず、好中球周辺の上皮細胞やマクロファージにも何らかの作用を及ぼしていると考えられた。そこで、好中球周辺領域に広く作用を及ぼすことが可能である NETs に着目し、化膿レンサ球菌が NETs を分解するのみならず、上皮細胞やマクロファージに細胞死を誘導するとの仮説を立てた。

そこで、化膿レンサ球菌と NETs の共培養産物による細胞死誘導能を確認するために、以下の実験を行った (図 4)。2 週間以内に投薬を受けていない健常人末梢血から好中球を分離して、Giemsa 染色で好中球の純度が 90%以上であること、および好中球が活性化していないことを確認した (図 15A)。好中球 1×10^6 cells/mL を PMA で 4 時間刺激して NETs を惹起し (図 15B)、活性化して細胞外に放出された NET-DNA を含む上清を遠心分離によって回収し、Quant-iT

PicoGreen dsDNA Assay により NET-DNA 値を測定した結果、過去の報告(37) とほぼ同等の濃度である約 450 ng/mL の NET-DNA を回収し得た (図 4, 図 15C).

菌体と NETs の共培養産物のうち、細胞死誘導活性を有する可能性が考えられる物質の一つとして、DNA 分解産物が挙げられる。化膿レンサ球菌は、後期対数増殖期および静止期に DNase の発現が mRNA レベルで亢進する(46)ことが報告されていることから、化膿レンサ球菌と DNA の共培養実験には、静止期の菌体を使用した (図 4)。静止期の化膿レンサ球菌と NET-DNA あるいは対照 DNA として HS-DNA を 3 時間共培養したところ、NET-DNA の 90%および HS-DNA の 99%が分解された (図 15D)。この溶液を遠心分離して菌体を除去した上清を、ヒト上皮由来 A549 細胞およびヒト単球由来 THP-1 細胞に加えて、4 時間後に Trypan blue 染色により死細胞を検出した。DNA 未添加での化膿レンサ球菌培養上清のみを細胞に加えた場合、A549 細胞および THP-1 細胞のそれぞれ 47%および 51%に細胞死が誘導された (図 15E・F)。しかし、化膿レンサ球菌に NET-DNA を加えた培養上清の添加では、より効率的に細胞死が誘導された (A549 細胞において 100%, THP-1 細胞において 98%; 図 15E・F)。対照 DNA として HS-DNA を化膿レンサ球菌と共培養した培養上清を用いた場合においても、A549 細胞および THP-1 細胞に 95%および 71%の Trypan blue 陽性細胞が生じたことから、細胞障害活性を有する物質は、DNA に由来することが示唆された。なお、DNA の

存在は、化膿レンサ球菌の発育速度に影響を与えなかった (図 15G).

このことから、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の上皮細胞障害機序には、化膿レンサ球菌が細胞外に分泌する病原因子に起因すると考えられる直接的な上皮細胞障害の他に、NETs 分解過程に生じた NET-DNA 分解産物を利用した上皮細胞障害による物理的上皮バリアの破壊と、同分解産物を利用した単球・マクロファージの細胞死誘導が重要であることが示唆された (図 16).

考 察

私は、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の重症化モデルを新規に作製した(図 6)。

これまでに報告されている化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎モデルは、主として獲得免疫に着目した動物モデルであったが(11, 12, 47), 本モデルは、宿主自然免疫のみでは難治性の化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎を想定したものであり、また同時に、徐々に敗血症へ進展する重症化膿レンサ球菌感染症をも標的とするものである。

本モデルがヒトの鼻咽頭感染モデルとして適切な点として、ヒト咽頭由来の化膿レンサ球菌 11434 株を経鼻感染させた実験系であることが挙げられる。化膿レンサ球菌に関する基礎研究では、invasive GAS disease を呈した患者から分離された MIT1 に分類される菌株を用いることが多い。しかし、本研究で比較対照として使用した化膿レンサ球菌 90226 株は、敗血症患者から分離された MIT1 に分類される菌株であるが、経鼻感染による表現型は 11434 株と比して明らかに軽微であった。本研究の結果は、同一宿主に特定の菌種を感染させても菌株によって表現型は全く異なること、同一菌株であっても宿主の違いによって生存率が異なることを示している(図 6)。また、同一菌種であっても各々の

菌株によって適切な感染経路が存在する可能性も考えられる。実際、化膿レンサ球菌を感染させたマウスでは、感染経路により誘導される免疫系細胞群が異なる(47)。化膿レンサ球菌 90226 株の経鼻感染では NALT を含む全身リンパ組織で Th17 細胞の誘導が惹起される一方、静脈内感染および皮下感染では、Th1 細胞が優勢となる(47)。化膿レンサ球菌は、本来ヒトのみを宿主とする細菌であり、無処置の野生型マウスに感染を成立させることは難しい。化膿レンサ球菌 90226 株を C57BL/6 マウスに経鼻感染させた研究では、野生型マウスでは観察期間中(15 日間) 全例が生存したのに対して、Th17 細胞分化誘導不全 IL-6 ノックアウトマウスでは、生存率が約 30%低下した(47)。本モデルは、簡素な実験系でありながら、野生型マウスに化膿レンサ球菌感染が成立したことが特長である。次に、本モデルは、化膿レンサ球菌による粘膜上皮細胞障害を短期間で観察することに適している。化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎の特異度の高い臨床所見の一つに、軟口蓋点状出血があり、粘膜上皮細胞障害の所見と考えられる(8)。化膿レンサ球菌性膿痂疹や壊死性筋膜炎などにおいても、やはり上皮細胞が主要な標的である。加えて本モデルは、本研究で施行した好中球除去およびマクロファージ除去と組み合わせることにより、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎における好中球およびマクロファージの機能や役割について解析することが可能である。一方で、投与菌量が多いこと、短期間に敗血症へ至り致死的事であること、マウ

スには扁桃が存在しないことは本モデルの限界である。

免疫染色を用いた検討によって、鼻腔内の化膿レンサ球菌は、基本的に好中球およびマクロファージと共局在しており、これらの自然免疫細胞が宿主感染防御の最前線へ出動していることが改めて確認された。興味深いことに、好中球が化膿レンサ球菌を取り巻いている部位では、上皮細胞の脱落とアポトーシスが顕著であった（図 9A-D, 図 10）。このことから私は、好中球と化膿レンサ球菌の相互作用が、何らかの機序を介して、上皮細胞の細胞死を誘導していると推察した。また、経鼻感染から 12 時間後、24 時間後、48 時間後の組織を比較検討することにより、時間の経過とともに、化膿レンサ球菌が粘膜下層へ深く侵入していく様が観察された（図 11A）。化膿レンサ球菌感染 3 日後からマウスが死亡することや（図 6）、感染 72 時間後から菌血症が明らかとなることから（図 11C）、本モデルの死因は、化膿レンサ球菌による上皮細胞の直接的破壊と粘膜下層血管床への侵入を介した敗血症死であると考えられた。しかし本研究では、敗血症へ至った後の直接死因の詳細については検討していない。マウスをはじめとする実験動物モデルは、あらゆるヒト疾患の医学・生物学研究に利用されているが、特に疾患の発症機序の解明や臨床応用を目指した橋渡し研究において大きな意義を有している。しかし、最近になって、敗血症、外傷、熱傷や内毒素血症などの炎症性疾患において誘導される遺伝子発現パターンがヒ

トとマウスで異なることが報告され、動物モデルの有用性について改めて議論がなされている(48, 49). 適切な動物モデルを使用するとともに、実験動物から得られた知見の解釈には、慎重な吟味が求められる。

化膿レンサ球菌による上皮細胞障害における自然免疫細胞の役割を明らかにするために、私は薬剤を用いて生体内の好中球およびマクロファージを除去して、これらの細胞機能抑制状態を作出した (図 12A・B). 好中球除去では、抗 Ly-6G 抗体を用いて血液中の好中球を 24 時間以内に 86%除去することに成功した. clodronate liposome によるマクロファージ除去では、24 時間以内に血中マクロファージを 87%除去し得た. 抗 Ly-6G 抗体を用いて血中から好中球を除去したマウスでは、上皮細胞の脱落およびアポトーシスは著明に減少し(図 13A-C), また予想に反して経鼻感染後の局所の化膿レンサ球菌生菌数にも有意な減少がみられた (図 14). このことは、好中球による細菌排除機構が、化膿レンサ球菌によって阻害されたことを示唆するものであった. 一方、マクロファージを除去したマウスでは、感染局所の生菌数が有意に増加しており、マクロファージは化膿レンサ球菌の菌体排除に必要であることが明確に示された(図 14). なお、抗 Ly-6G 抗体あるいは clodronate liposome を投与した非感染マウスでは、上皮細胞の脱落およびアポトーシスは見られなかった (データ未掲載).

活性化した好中球は、NETosis とよばれる能動的細胞死により、核内に存在す

る Histone や DNA, 細胞質内の Elastase や MPO などの抗菌タンパク質等で構成される NETs を細胞外に放出し, 細菌を捕捉して死滅させる(23). NETs が, 化膿レンサ球菌に対して殺菌能力を持ち宿主感染防御に働くのに対して, 化膿レンサ球菌は, 細胞外分泌型 DNase によって NETs を分解し, 好中球からの攻撃を回避することができる(28, 38, 50). これまでに複数の研究グループによって, 化膿レンサ球菌感染症において NETs が宿主感染防御にとって有益であることを示す研究結果が報告されている. 壊死性筋膜炎を想定したマウスモデルにおいて, 野生型化膿レンサ球菌菌株の皮下感染によって生じた皮膚壊死は, DNase 欠失菌株で顕著に縮小し(28, 38, 50), また DNase 阻害薬である G-actin 投与で縮小し(28), DNase 投与によって拡大した(38). さらに, NETs 産生能の欠落した PAD4 欠損マウスおよび PAD4 阻害薬 Cl-amidine を投与したマウスでは, 野生型マウスと比較して, 化膿レンサ球菌に易感染性であり, 局所生菌数の増加および皮膚壊死範囲の拡大がみられた(38). 一方, カニクイザルに化膿レンサ球菌を経鼻感染させた咽頭扁桃炎モデルにおいて, 感染によって生じる咽頭発赤が DNase 欠失菌株では有意に抑制された(50). 本来 NETs は, 細菌を捕獲・殺菌するために重要な自然免疫応答であるが(23), その一方で宿主細胞に対しても細胞障害性を有し, 敗血症モデルにおける血管内皮細胞障害などが報告されている(51). 最近では, 自己免疫疾患との関連も示唆されており, NETs はいわば諸刃

の剣ともいえる自然免疫応答と考えられている(35). 抗好中球細胞質抗体関連血管炎患者の腎生検検体における半月体形成性腎炎に NETs が同定されることや(52), 全身性エリテマトーデス患者では DNase-I 変異を来している者が少なからずみられ, DNase-I 変異による NETs 分解能低下が疾患活動性と相関すること(53), さらに NETs は深部静脈血栓症の発症に関与していること(54, 55), などがその例である. 最近, 黄色ブドウ球菌が自身の持つ *nuc* および *ads* の作用によって NET-DNA を分解し, 産生された deoxyadenosine によってマクロファージをアポトーシスさせることが報告された(29). これを参考にして私は, 化膿レンサ球菌も黄色ブドウ球菌と類似の機序により, NETs を逆手にとって宿主細胞死を誘導することができるのではないかと考えた.

序論で述べたように, 化膿レンサ球菌は, A549 細胞や Hep-2 細胞などの上皮細胞内へ侵入し, アポトーシスを誘導することが報告されている(43, 44). 本研究でも, ヒト上皮細胞系の A549 細胞に化膿レンサ球菌の遠心上清を加えたところ, 化膿レンサ球菌の分泌毒素によると思われる中等度の細胞死が惹起された. また, ヒト単球系の THP-1 細胞においても同様であった. そこで, ヒト好中球を PMA で刺激して NET-DNA を回収し, これを化膿レンサ球菌と共培養することにより, NET-DNA 分解産物を産生させて, A549 細胞および THP-1 細胞に対する細胞障害性を検討した (図 4). その結果, 化膿レンサ球菌の培養上清単独

に暴露させるよりも、NET-DNA 分解産物を含有する上清の方が、より強い細胞障害性を有することが明らかとなった (図 15E・F)。さらに、この反応は化膿レンサ球菌に HS-DNA を加えた場合でも強調され、化膿レンサ球菌による DNA 分解産物が、種々の宿主細胞に対して細胞毒性を有することを見出した (図 15E・F)。このことは、感染マウスの鼻腔内菌塊の辺縁にのみマクロファージが存在した理由が、菌塊中心部分ではマクロファージが細胞死へ誘導されたためであると考えられる。上記 *in vitro* の研究結果は、NETs 構成要素の中でも特に NET-DNA の分解産物が重要であることを示しているが、その一方で、特に THP-1 細胞においては、NET-DNA 分解産物は HS-DNA 分解産物よりも高い毒性を示したことは注意すべきである。NETs は、Elastase や MPO など、種々の細胞障害性顆粒を含有しているため、NETs 分解によって、これらの細胞障害性顆粒が遊出し、相加的に細胞毒性を発揮した可能性がある。化膿レンサ球菌は、黄色ブドウ球菌と同様に DNase を持つものの、黄色ブドウ球菌の有する *ads* の存在は未だに確認されていない。従って、化膿レンサ球菌がどのような反応経路で NET-DNA を分解し、どのような分解産物を以て宿主細胞死を誘導したかについては、今後さらに研究を進める必要がある。

細菌感染を受けて活性化した好中球が、細菌の捕捉および殺菌を意図して NETs を放出する。これに抵抗するために、一部の細菌が分泌型 DNase を獲得し

NETs を分解して自身を守るのみならず、逆に NETs を利用して宿主へ逆襲する能力を獲得したとするならば、この宿主と病原微生物の間における駆け引きは、生物学的進化の面から大変興味深く、また NETs 分解産物の有する細胞毒性が、ヒトの疾患にどのように関与しているのかを研究することは、今後の免疫生物学の進歩に必ずや寄与するものと信ずる。

本研究では、マウスモデルを用いた化膿レンサ球菌鼻咽頭感染モデルを作製し、好中球の放出する NETs に注目して、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎における宿主自然免疫応答と上皮細胞障害の関連について新たな知見を加えた。化膿レンサ球菌は、自身の分泌する細胞毒性トキシンによる直接的な上皮細胞障害の他に、NET-DNA 分解産物の細胞毒性を介した上皮細胞障害、さらには感染局所の単球・マクロファージをも細胞死へ誘導することによって宿主の感染初期自然免疫応答から逃れ、獲得免疫の発動さえも抑制して、感染を拡大すると考えられた (図 16)。化膿レンサ球菌による DNA 分解産物および反応経路の同定、細胞障害性の確認、さらには化膿レンサ球菌の変異株を用いた実験により、化膿レンサ球菌性咽頭扁桃炎における細菌側の未知の免疫回避機構の全容を解明することが、今後の研究課題である。

引用文献

1. M. W. Cunningham, Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev* **13**, 470-511 (2000).
2. J. N. Cole, T. C. Barnett, V. Nizet, M. J. Walker, Molecular insight into invasive group A streptococcal disease. *Nat Rev Microbiol* **9**, 724-736 (2011).
3. J. R. Carapetis, A. C. Steer, E. K. Mulholland, M. Weber, The global burden of group A streptococcal diseases. *Lancet Infect Dis* **5**, 685-694 (2005).
4. S. T. Shulman, A. L. Bisno, H. W. Clegg, M. A. Gerber, E. L. Kaplan, G. Lee, J. M. Martin, C. Van Beneden, I. D. S. o. America, Clinical practice guideline for the diagnosis and management of group A streptococcal pharyngitis: 2012 update by the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* **55**, e86-102 (2012).
5. A. L. Bisno, Acute pharyngitis. *N Engl J Med* **344**, 205-211 (2001).
6. R. M. Poses, R. D. Cebul, M. Collins, S. S. Fager, The accuracy of experienced physicians' probability estimates for patients with sore throats. Implications for decision making. *JAMA* **254**, 925-929 (1985).

7. A. L. Komaroff, T. M. Pass, M. D. Aronson, C. T. Ervin, S. Cretin, R. N. Winickoff, W. T. Branch, The prediction of streptococcal pharyngitis in adults. *J Gen Intern Med* **1**, 1-7 (1986).
8. B. A. Choby, Diagnosis and treatment of streptococcal pharyngitis. *Am Fam Physician* **79**, 383-390 (2009).
9. E. L. Kaplan, B. B. Huew, The sensitivity and specificity of an agglutination test for antibodies to streptococcal extracellular antigens: a quantitative analysis and comparison of the Streptozyme test with the anti-streptolysin O and anti-deoxyribonuclease B tests. *J Pediatr* **96**, 367-373 (1980).
10. A. L. Roberts, K. L. Connolly, D. J. Kirse, A. K. Evans, K. A. Poehling, T. R. Peters, S. D. Reid, Detection of group A Streptococcus in tonsils from pediatric patients reveals high rate of asymptomatic streptococcal carriage. *BMC Pediatr* **12**, 3 (2012).
11. H. S. Park, K. P. Francis, J. Yu, P. P. Cleary, Membranous cells in nasal-associated lymphoid tissue: a portal of entry for the respiratory mucosal pathogen group A streptococcus. *J Immunol* **171**, 2532-2537 (2003).
12. H. S. Park, M. Costalonga, R. L. Reinhardt, P. E. Dombek, M. K. Jenkins, P. P. Cleary, Primary induction of CD4 T cell responses in nasal associated lymphoid

- tissue during group A streptococcal infection. *Eur J Immunol* **34**, 2843-2853 (2004).
13. K. A. Hyland, R. Brennan, S. B. Olmsted, E. Rojas, E. Murphy, B. Wang, P. P. Cleary, The early interferon response of nasal-associated lymphoid tissue to *Streptococcus pyogenes* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol* **55**, 422-431 (2009).
 14. M. R. McDermott, A. D. Befus, J. Bienenstock, The structural basis for immunity in the respiratory tract. *Int Rev Exp Pathol* **23**, 47-112 (1982).
 15. T. S. Mair, E. H. Batten, C. R. Stokes, F. J. Bourne, The histological features of the immune system of the equine respiratory tract. *J Comp Pathol* **97**, 575-586 (1987).
 16. H. Asanuma, A. H. Thompson, T. Iwasaki, Y. Sato, Y. Inaba, C. Aizawa, T. Kurata, S. Tamura, Isolation and characterization of mouse nasal-associated lymphoid tissue. *J Immunol Methods* **202**, 123-131 (1997).
 17. A. Jacob, R. A. Chole, Survey anatomy of the paranasal sinuses in the normal mouse. *Laryngoscope* **116**, 558-563 (2006).
 18. D. Velin, G. Fotopoulos, F. Luthi, J. P. Kraehenbuhl, The nasal-associated lymphoid tissue of adult mice acts as an entry site for the mouse mammary

- tumor retrovirus. *J Exp Med* **185**, 1871-1876 (1997).
19. S. Tamura, T. Iwasaki, A. H. Thompson, H. Asanuma, Z. Chen, Y. Suzuki, C. Aizawa, T. Kurata, Antibody-forming cells in the nasal-associated lymphoid tissue during primary influenza virus infection. *J Gen Virol* **79** (Pt 2), 291-299 (1998).
 20. I. Watanabe, Y. Hagiwara, S. E. Kadowaki, T. Yoshikawa, K. Komase, C. Aizawa, H. Kiyono, Y. Takeda, J. R. McGhee, J. Chiba, T. Sata, T. Kurata, S. Tamura, Characterization of protective immune responses induced by nasal influenza vaccine containing mutant cholera toxin as a safe adjuvant (CT112K). *Vaccine* **20**, 3443-3455 (2002).
 21. D. Y. Kim, A. Sato, S. Fukuyama, H. Sagara, T. Nagatake, I. G. Kong, K. Goda, T. Nochi, J. Kunisawa, S. Sato, Y. Yokota, C. H. Lee, H. Kiyono, The airway antigen sampling system: respiratory M cells as an alternative gateway for inhaled antigens. *J Immunol* **186**, 4253-4262 (2011).
 22. B. Amulic, C. Cazalet, G. L. Hayes, K. D. Metzler, A. Zychlinsky, Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol* **30**, 459-489 (2012).
 23. V. Brinkmann, U. Reichard, C. Goosmann, B. Fauler, Y. Uhlemann, D. S. Weiss, Y. Weinrauch, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*

- 303**, 1532-1535 (2004).
24. C. F. Urban, U. Reichard, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Neutrophil extracellular traps capture and kill *Candida albicans* yeast and hyphal forms. *Cell Microbiol* **8**, 668-676 (2006).
 25. T. Saitoh, J. Komano, Y. Saitoh, T. Misawa, M. Takahama, T. Kozaki, T. Uehata, H. Iwasaki, H. Omori, S. Yamaoka, N. Yamamoto, S. Akira, Neutrophil extracellular traps mediate a host defense response to human immunodeficiency virus-1. *Cell Host Microbe* **12**, 109-116 (2012).
 26. A. B. Guimarães-Costa, M. T. Nascimento, G. S. Froment, R. P. Soares, F. N. Morgado, F. Conceição-Silva, E. M. Saraiva, *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 6748-6753 (2009).
 27. M. Röhm, M. J. Grimm, A. C. D'Auria, N. G. Almyroudis, B. H. Segal, C. F. Urban, NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infect Immun* **82**, 1766-1777 (2014).
 28. J. T. Buchanan, A. J. Simpson, R. K. Aziz, G. Y. Liu, S. A. Kristian, M. Kotb, J. Feramisco, V. Nizet, DNase expression allows the pathogen group A *Streptococcus* to escape killing in neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**,

- 396-400 (2006).
29. V. Thammavongsa, D. M. Missiakas, O. Schneewind, *Staphylococcus aureus* degrades neutrophil extracellular traps to promote immune cell death. *Science* **342**, 863-866 (2013).
 30. K. Beiter, F. Wartha, B. Albiger, S. Normark, A. Zychlinsky, B. Henriques-Normark, An endonuclease allows *Streptococcus pneumoniae* to escape from neutrophil extracellular traps. *Curr Biol* **16**, 401-407 (2006).
 31. B. E. Steinberg, S. Grinstein, Unconventional roles of the NADPH oxidase: signaling, ion homeostasis, and cell death. *Sci STKE* **2007**, pe11 (2007).
 32. S. Yousefi, C. Mihalache, E. Kozlowski, I. Schmid, H. U. Simon, Viable neutrophils release mitochondrial DNA to form neutrophil extracellular traps. *Cell Death Differ* **16**, 1438-1444 (2009).
 33. S. Yousefi, J. A. Gold, N. Andina, J. J. Lee, A. M. Kelly, E. Kozlowski, I. Schmid, A. Straumann, J. Reichenbach, G. J. Gleich, H. U. Simon, Catapult-like release of mitochondrial DNA by eosinophils contributes to antibacterial defense. *Nat Med* **14**, 949-953 (2008).
 34. M. von Köckritz-Blickwede, O. Goldmann, P. Thulin, K. Heinemann, A. Norrby-Teglund, M. Rohde, E. Medina, Phagocytosis-independent antimicrobial

- activity of mast cells by means of extracellular trap formation. *Blood* **111**, 3070-3080 (2008).
35. Q. Remijsen, T. W. Kuijpers, E. Wirawan, S. Lippens, P. Vandenabeele, T. Vanden Berghe, Dying for a cause: NETosis, mechanisms behind an antimicrobial cell death modality. *Cell Death Differ* **18**, 581-588 (2011).
36. Q. Remijsen, T. Vanden Berghe, E. Wirawan, B. Asselbergh, E. Parthoens, R. De Rycke, S. Noppen, M. Delforge, J. Willems, P. Vandenabeele, Neutrophil extracellular trap cell death requires both autophagy and superoxide generation. *Cell Res* **21**, 290-304 (2011).
37. T. A. Fuchs, U. Abed, C. Goosmann, R. Hurwitz, I. Schulze, V. Wahn, Y. Weinrauch, V. Brinkmann, A. Zychlinsky, Novel cell death program leads to neutrophil extracellular traps. *J Cell Biol* **176**, 231-241 (2007).
38. P. Li, M. Li, M. R. Lindberg, M. J. Kennett, N. Xiong, Y. Wang, PAD4 is essential for antibacterial innate immunity mediated by neutrophil extracellular traps. *J Exp Med* **207**, 1853-1862 (2010).
39. P. J. Murray, T. A. Wynn, Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat Rev Immunol* **11**, 723-737 (2011).
40. O. Goldmann, M. Rohde, G. S. Chhatwal, E. Medina, Role of macrophages in

- host resistance to group A streptococci. *Infect Immun* **72**, 2956-2963 (2004).
41. I. Mishalian, M. Ordan, A. Peled, A. Maly, M. B. Eichenbaum, M. Ravins, T. Aychek, S. Jung, E. Hanski, Recruited macrophages control dissemination of group A Streptococcus from infected soft tissues. *J Immunol* **187**, 6022-6031 (2011).
 42. J. B. Dale, R. G. Washburn, M. B. Marques, M. R. Wessels, Hyaluronate capsule and surface M protein in resistance to opsonization of group A streptococci. *Infect Immun* **64**, 1495-1501 (1996).
 43. P. J. Tsai, Y. S. Lin, C. F. Kuo, H. Y. Lei, J. J. Wu, Group A Streptococcus induces apoptosis in human epithelial cells. *Infect Immun* **67**, 4334-4339 (1999).
 44. W. H. Tsai, C. W. Chang, W. J. Chuang, Y. S. Lin, J. J. Wu, C. C. Liu, W. T. Chang, M. T. Lin, Streptococcal pyrogenic exotoxin B-induced apoptosis in a549 cells is mediated by a receptor- and mitochondrion-dependent pathway. *Infect Immun* **72**, 7055-7062 (2004).
 45. P. Wenzel, M. Knorr, S. Kossmann, J. Stratmann, M. Hausding, S. Schuhmacher, S. H. Karbach, M. Schwenk, N. Yogev, E. Schulz, M. Oelze, S. Grabbe, H. Jonuleit, C. Becker, A. Daiber, A. Waisman, T. Münzel, Lysozyme M-positive monocytes mediate angiotensin II-induced arterial hypertension and vascular

- dysfunction. *Circulation* **124**, 1370-1381 (2011).
46. M. Unnikrishnan, J. Cohen, S. Sriskandan, Growth-phase-dependent expression of virulence factors in an MIT1 clinical isolate of *Streptococcus pyogenes*. *Infect Immun* **67**, 5495-5499 (1999).
47. T. Dileepan, J. L. Linehan, J. J. Moon, M. Pepper, M. K. Jenkins, P. P. Cleary, Robust antigen specific th17 T cell response to group A *Streptococcus* is dependent on IL-6 and intranasal route of infection. *PLoS Pathog* **7**, e1002252 (2011).
48. Of men, not mice. *Nat Med* **19**, 379 (2013).
49. J. Seok, H. S. Warren, A. G. Cuenca, M. N. Mindrinos, H. V. Baker, W. Xu, D. R. Richards, G. P. McDonald-Smith, H. Gao, L. Hennessy, C. C. Finnerty, C. M. López, S. Honari, E. E. Moore, J. P. Minei, J. Cuschieri, P. E. Bankey, J. L. Johnson, J. Sperry, A. B. Nathens, T. R. Billiar, M. A. West, M. G. Jeschke, M. B. Klein, R. L. Gamelli, N. S. Gibran, B. H. Brownstein, C. Miller-Graziano, S. E. Calvano, P. H. Mason, J. P. Cobb, L. G. Rahme, S. F. Lowry, R. V. Maier, L. L. Moldawer, D. N. Herndon, R. W. Davis, W. Xiao, R. G. Tompkins, L. r. S. C. R. P. Inflammation and Host Response to Injury, Genomic responses in mouse models poorly mimic human inflammatory diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*

- 110**, 3507-3512 (2013).
50. P. Sumbay, K. D. Barbian, D. J. Gardner, A. R. Whitney, D. M. Welty, R. D. Long, J. R. Bailey, M. J. Parnell, N. P. Hoe, G. G. Adams, F. R. Deleo, J. M. Musser, Extracellular deoxyribonuclease made by group A Streptococcus assists pathogenesis by enhancing evasion of the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 1679-1684 (2005).
51. S. R. Clark, A. C. Ma, S. A. Tavener, B. McDonald, Z. Goodarzi, M. M. Kelly, K. D. Patel, S. Chakrabarti, E. McAvoy, G. D. Sinclair, E. M. Keys, E. Allen-Vercoe, R. Devinney, C. J. Doig, F. H. Green, P. Kubes, Platelet TLR4 activates neutrophil extracellular traps to ensnare bacteria in septic blood. *Nat Med* **13**, 463-469 (2007).
52. K. Kessenbrock, M. Krumbholz, U. Schönemarck, W. Back, W. L. Gross, Z. Werb, H. J. Gröne, V. Brinkmann, D. E. Jenne, Netting neutrophils in autoimmune small-vessel vasculitis. *Nat Med* **15**, 623-625 (2009).
53. A. Hakkim, B. G. Fürnrohr, K. Amann, B. Laube, U. A. Abed, V. Brinkmann, M. Herrmann, R. E. Voll, A. Zychlinsky, Impairment of neutrophil extracellular trap degradation is associated with lupus nephritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 9813-9818 (2010).

54. T. A. Fuchs, A. Brill, D. Duerschmied, D. Schatzberg, M. Monestier, D. D. Myers, S. K. Wroblewski, T. W. Wakefield, J. H. Hartwig, D. D. Wagner, Extracellular DNA traps promote thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 15880-15885 (2010).
55. M. Demers, D. S. Krause, D. Schatzberg, K. Martinod, J. R. Voorhees, T. A. Fuchs, D. T. Scadden, D. D. Wagner, Cancers predispose neutrophils to release extracellular DNA traps that contribute to cancer-associated thrombosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**, 13076-13081 (2012).

謝 辞

本博士論文は、筆者が東京大学大学院医学系研究科内科学専攻（医学博士課程）在学中に、学内研究指導委託の下、東京大学医科学研究所感染症国際研究センター細菌学分野において行った研究をまとめたものです。此処に謹んで、御指導を賜りました諸先生方へ感謝の所思を申し述べます。

本研究の指導教員として、御指導を賜りました東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科 南学 正臣 教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究の実質的指導者として、実験基本操作から長時間にわたる討議まで徹頭徹尾、熱意を以て導いて下さった東京大学医科学研究所感染症国際研究センター細菌学分野 三室 仁美 准教授に厚く御礼を申し上げます。

本研究の実施において、御指導を賜り、研究指導委託の架け橋となって下さった慶應義塾大学病院血液浄化・透析センター 平橋 淳一 専任講師（前 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科助教）に厚く御礼を申し上げます。

本研究を通じて、御指導や御協力を賜りました東京大学医科学研究所感染症国際研究センター細菌学分野 真田 貴人 特任助教，氣駕 恒太朗 特任助教，飯田 真珠子 氏，Zhu Bo 氏，Nyström Sanna 氏，黒田 英介 氏，蛭川 沙也加 氏，

熊谷 來美 氏，ならびに前 東京大学医学部附属病院腎臓・内分泌内科血管免疫
研究室 大久保 光修 氏，黒澤 美穂 氏に感謝致します。

本研究に使用した化膿レンサ球菌 90226 株を供与して下さった，米国ミネソ
タ大学細菌学教室 Cleary P. Patrick 教授に感謝致します。

本博士論文の審査において，適切かつ有益な御指導と御意見を賜りました東
京大学医科学研究所副所長・人癌病因遺伝子分野 村上 善則 教授，東京大学大
学院医学系研究科国際保健学専攻生物医化学教室 北 潔 教授，東京大学医科学
研究所寄付部門・連携部門再生基礎医科学 渡邊 すみ子 特任教授，東京大学大
学院医学系研究科生体防御感染症学 四柳 宏 准教授，東京大学医学部附属病院
アレルギーリウマチ内科免疫療法管理学 神田 浩子 特任准教授に感謝致しま
す。

最後に，私の研究活動をいつも応援してくれた最愛の家族と，全ての友人・
恩師に心より感謝致します。

平成 27 年 2 月 23 日

田中基嗣

图 表

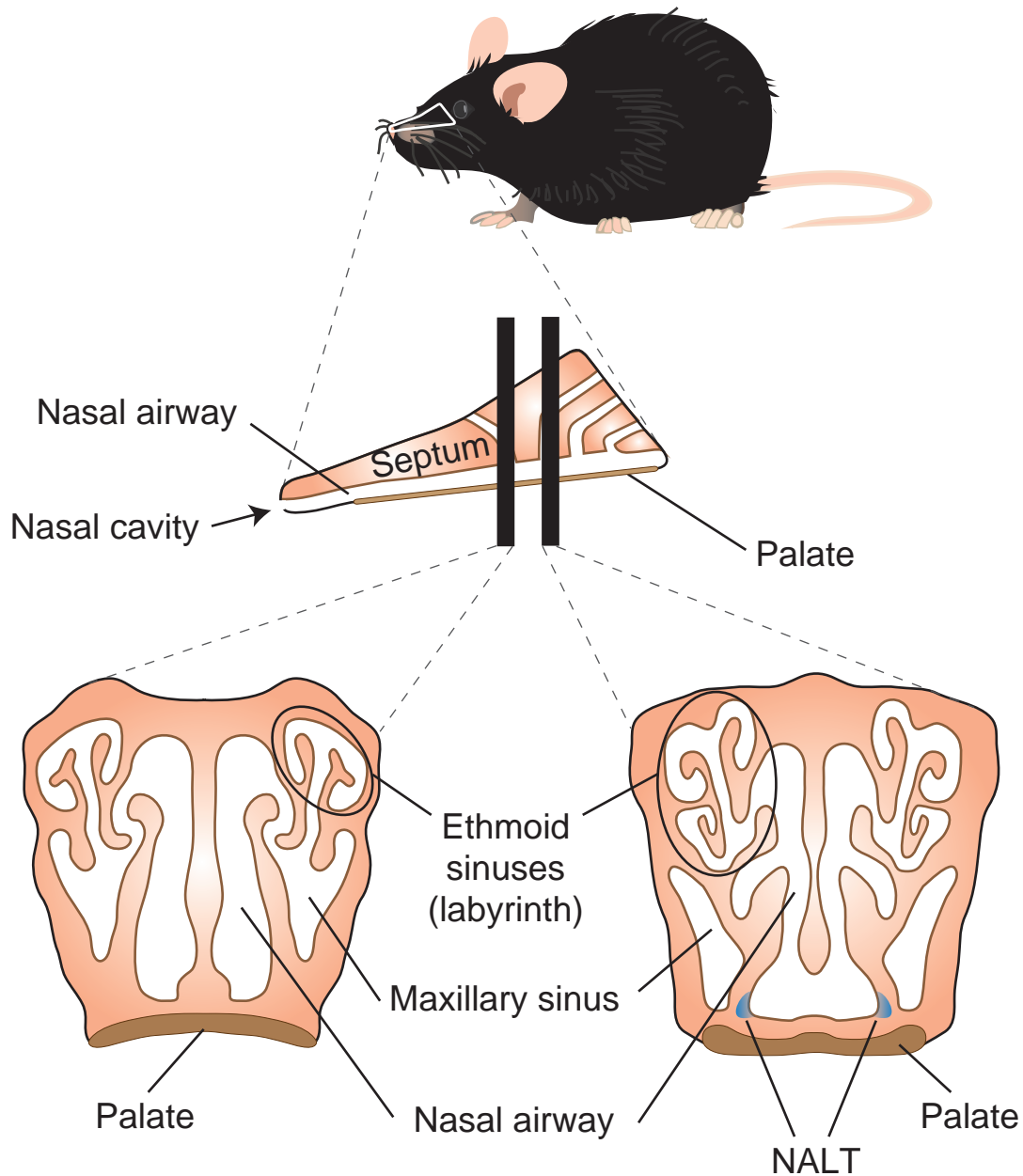


図1. マウス鼻腔解剖図解 (文献17より改変). 鼻腔 (Nasal cavity) に続いて、鼻中隔 (Septum) によって左右に隔てられた鼻腔 (Nasal airway) 内を辿ると、鼻腔は副鼻腔である上顎洞 (Maxillary sinus) と篩骨洞 (Ethmoid sinuses) に連続する. 副鼻腔は複雑に入り組み、特に篩骨洞では篩骨洞迷路 (Ethmoid labyrinth) を形成している. 鼻腔後方では鼻中隔が短く、両鼻腔は開通している. 鼻腔下部後方の口蓋壁 (Palate) 裏面には Nasal-associated lymphoid tissue (NALT) が存在する.

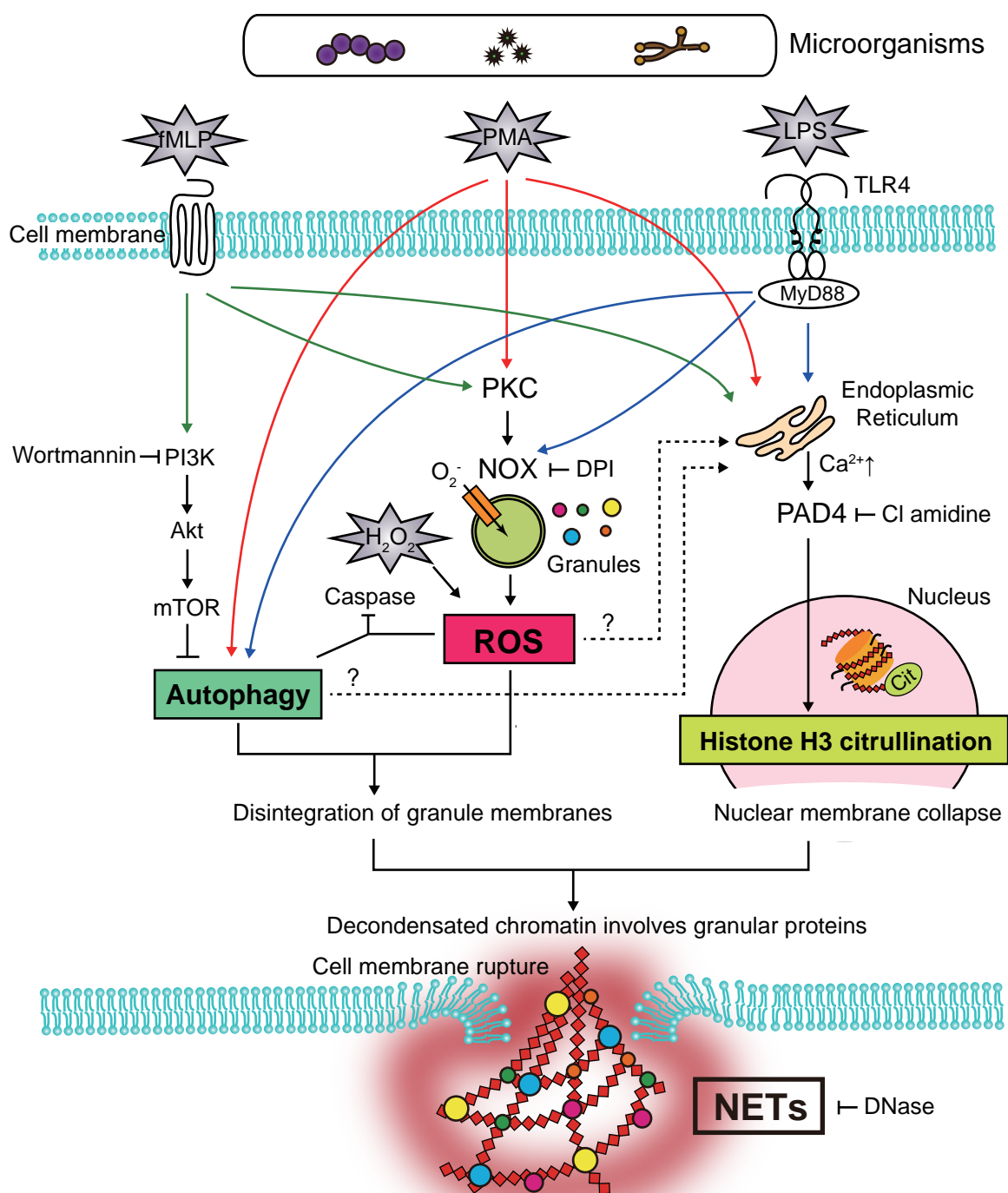


図2. NETsの形成機序 (文献35より改変) . NETs形成には, 活性酸素種 (Reactive oxygen species, ROS) , オートファジー (Autophagy) , ヒストン H3のシトルリン化 (Histone H3 citrullination) が必要である. Phorbol myristate acetate (PMA) やLipopolysaccharide (LPS) は, これらの経路をいずれも活性化するNETs誘導刺激薬剤である. H_2O_2 による刺激のみでは, 好中球はアポトーシスする. またfMLP刺激は, PI3K/Akt/mTOR経路を活性化してオートファジーを抑制するため, NETs形成は起こらないが, PI3K阻害薬であるWortmanninで処理するとNETsを生じる. NADPH oxidase (NOX) 阻害薬であるDiphenylene iodonium (DPI) やPeptidylarginine deiminase (PAD) 4 阻害薬であるCl-amidineで処理した好中球はNETsを生じない.

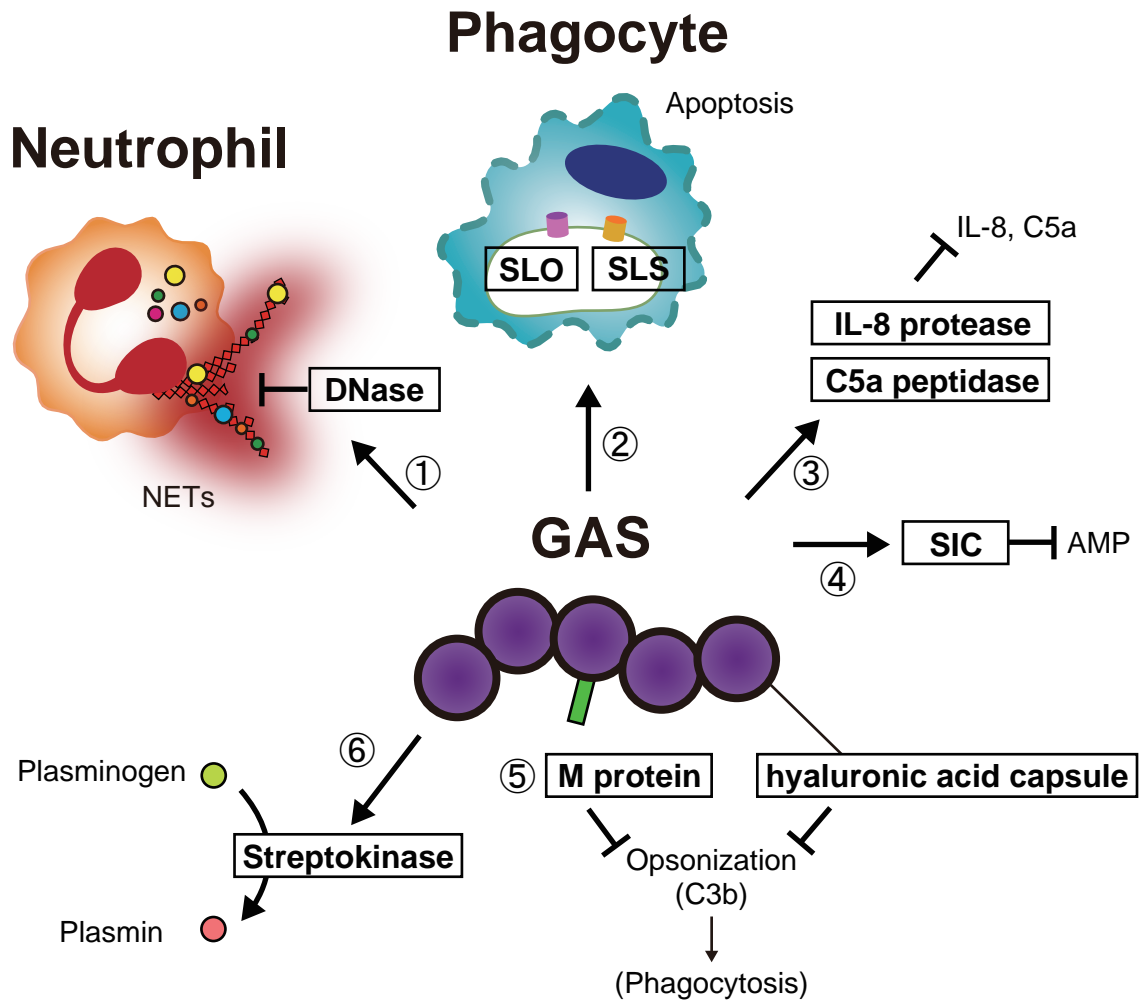


図3. 化膿レンサ球菌の自然免疫回避機構（文献2より改変）. ① DNaseが、Neutrophil extracellular traps (NETs) を溶解する. ② Streptolysin O (SLO) , Streptolysin S (SLS) が、食胞に孔を開け、食細胞をアポトーシスさせる. ③ IL-8 proteaseとC5a peptidaseが、好中球遊走因子であるインターロイキン8とC5aをそれぞれ分解する. ④ Streptococcal inhibitor of complement (SIC) が、抗菌ペプチド (Antimicrobial peptide, AMP) を阻害する. ⑤ Mタンパクおよびヒアルロン酸莢膜が、C3bによるオプソニン化を阻害する. ⑥ Streptokinaseが血清中のPlasminogenをPlasminへ変換し線溶系を活性化する.

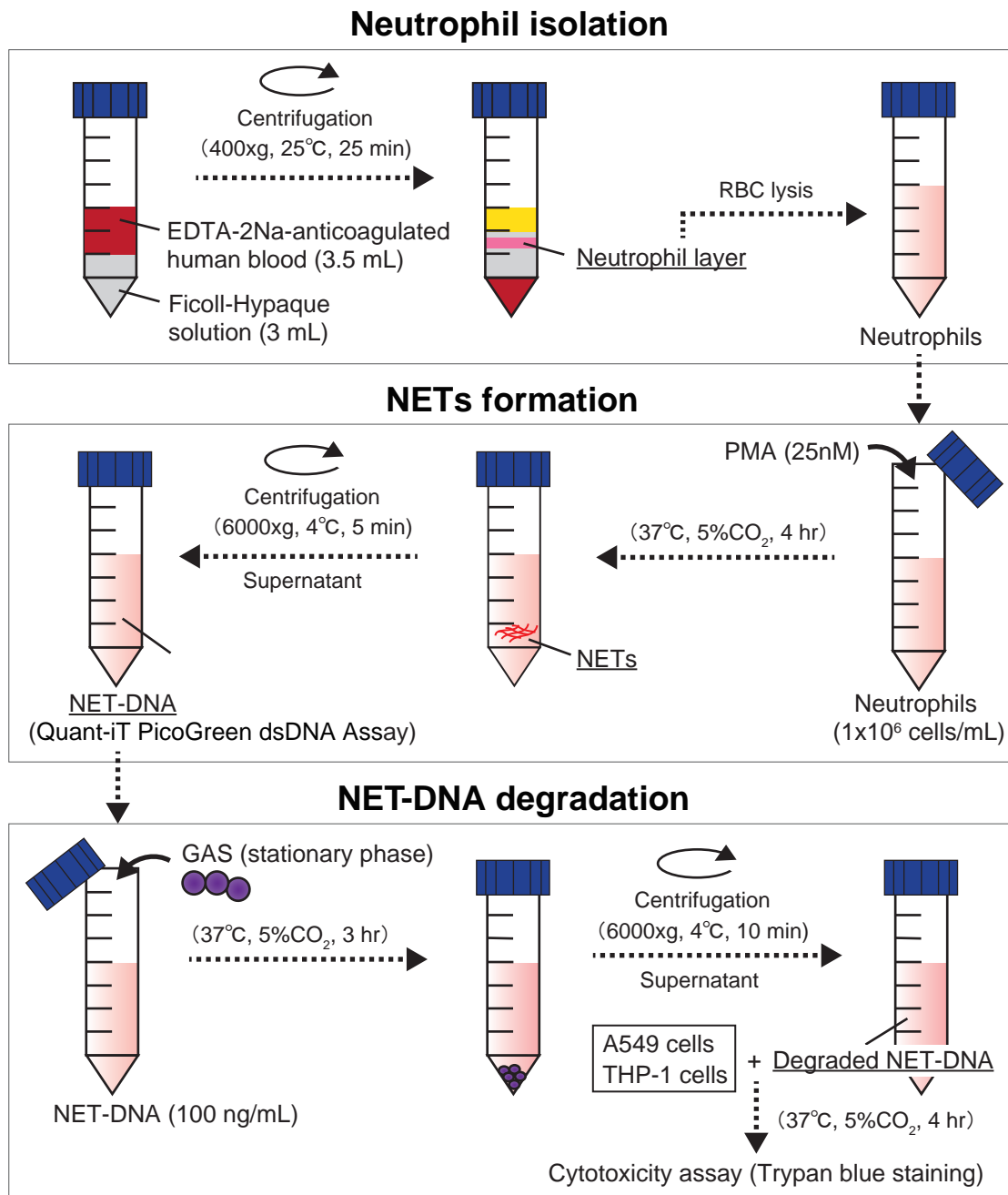


図4. 好中球分離～NETs 惹起, NET-DNA 分解産物の細胞毒性の評価方法. 抗凝固処理した全血を Ficoll-Hypaque 溶液に重層し, 400xg, 25°C, 25 分間の遠心分離後, 好中球層を取り出し. 赤血球溶血処置を加えて洗浄し, 好中球 1×10^6 cells/mL に調製した. PMA を終濃度 25nM で加え, 37°C, 5% CO₂, 4 時間静置後に, 6000xg, 4°C で 5 分間遠心分離し, 上清中の NET-DNA 値を, Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay で測定した. 静止期の化膿レンサ球菌を NET-DNA 上清へ加えて 37°C, 5% CO₂, 3 時間培養し, 6000xg, 4°C, 10 分間遠心分離し, 上清を回収して Degraded NET-DNA 溶液を得た. 培養細胞株 A549 細胞もしくは THP-1 細胞を播種した 12 well plate に, この溶液 400 μ L を加え, 37°C, 5% CO₂, 4 時間培養し, Trypan blue 染色により死細胞の割合を測定した. NET-DNA の対照には, Herring sperm dsDNA を用いた.

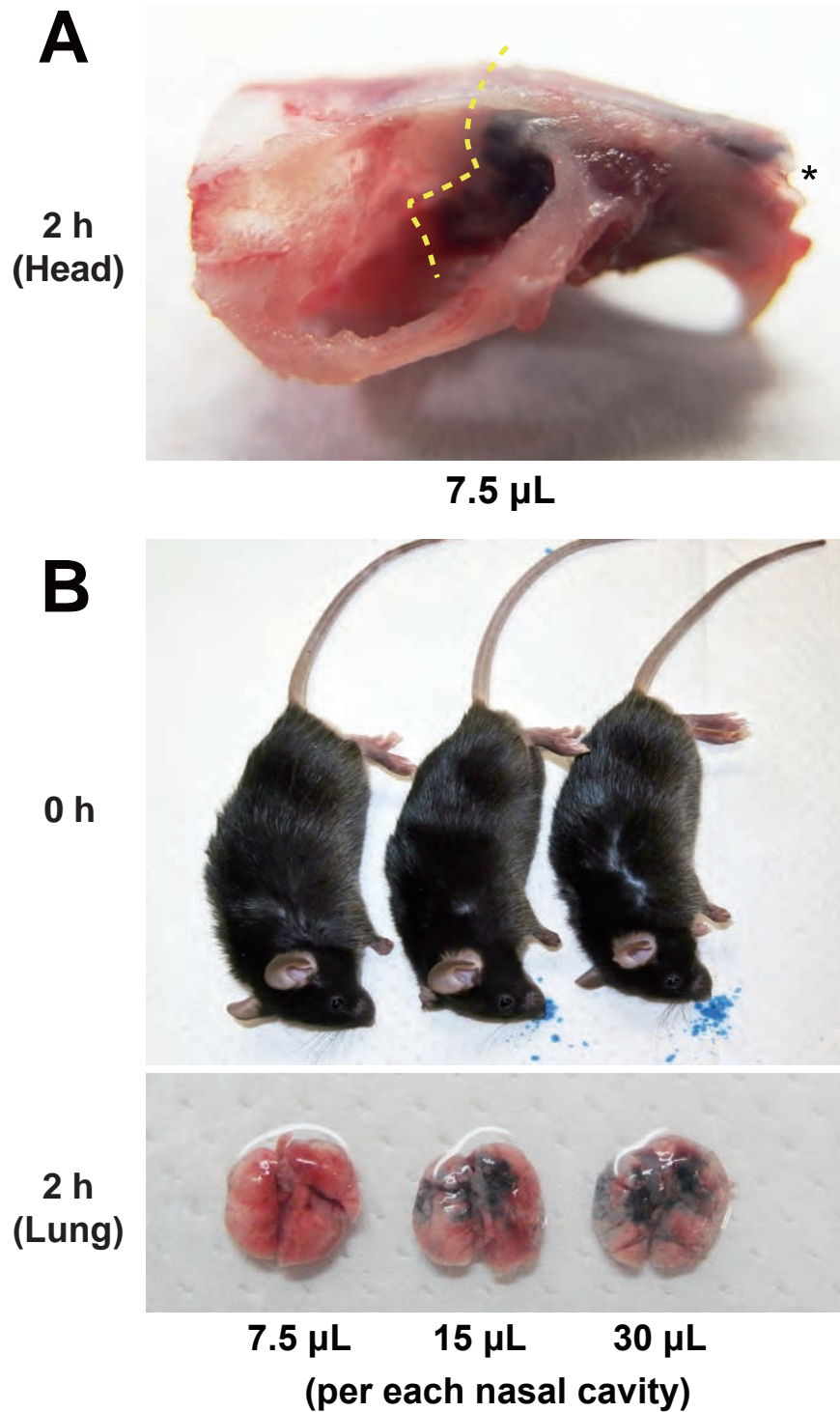


図5. 経鼻投与時の吸入範囲の検討. (A) Trypan blue溶液を左右の各鼻腔に7.5 μ Lずつ経鼻投与して2時間後のマウス頭部写真. 黄色点線部は, Trypan blue染色境界を示す. *印は鼻腔を指す. (B, 上段) 記載した Trypan blue溶液量を左右の鼻腔に経鼻投与した直後のマウス頭部写真, および (B, 下段) 経鼻投与2時間後の肺組織.

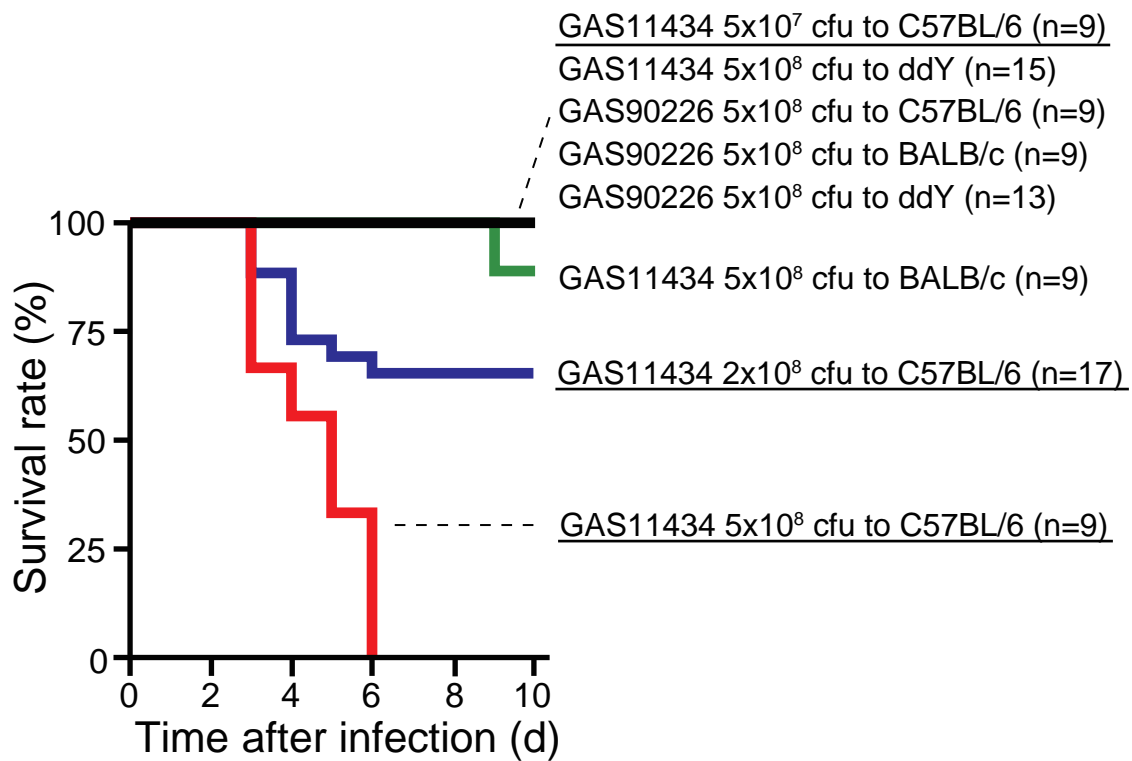


図6. 化膿レンサ球菌のマウス鼻腔感染における生存曲線. 6~7週齢の雄性C57BL/6マウス, 雄性BALB/cマウス, 雌性ddYマウスに, 化膿レンサ球菌11434株あるいは90226株を経鼻感染させて生存曲線を示した(各群, 少なくとも9匹以上で検討). C57BL/6マウスに化膿レンサ球菌11434株を感染させた群(下線)は, 菌量に依存した致死率を示した(log-rank test; <0.0001).

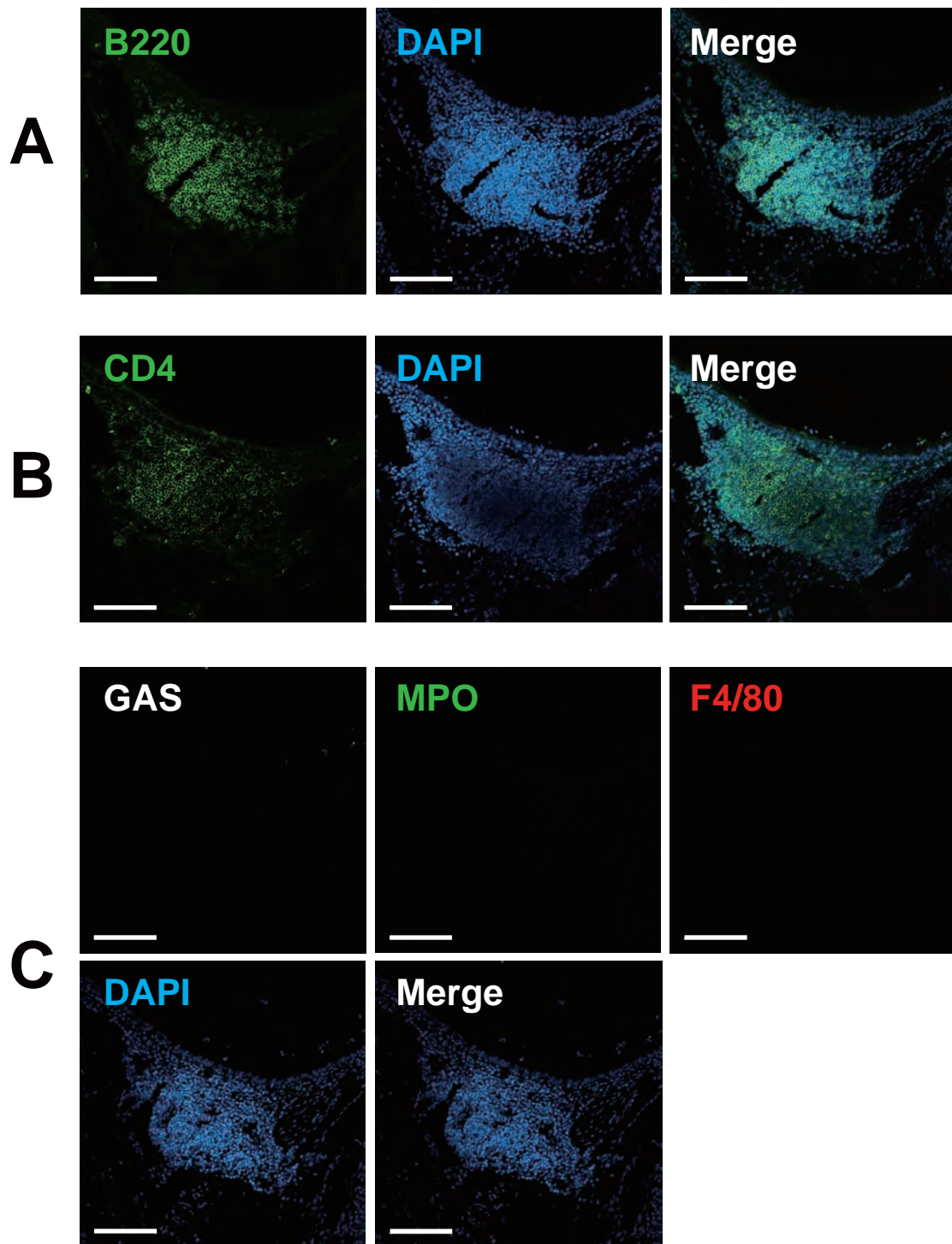
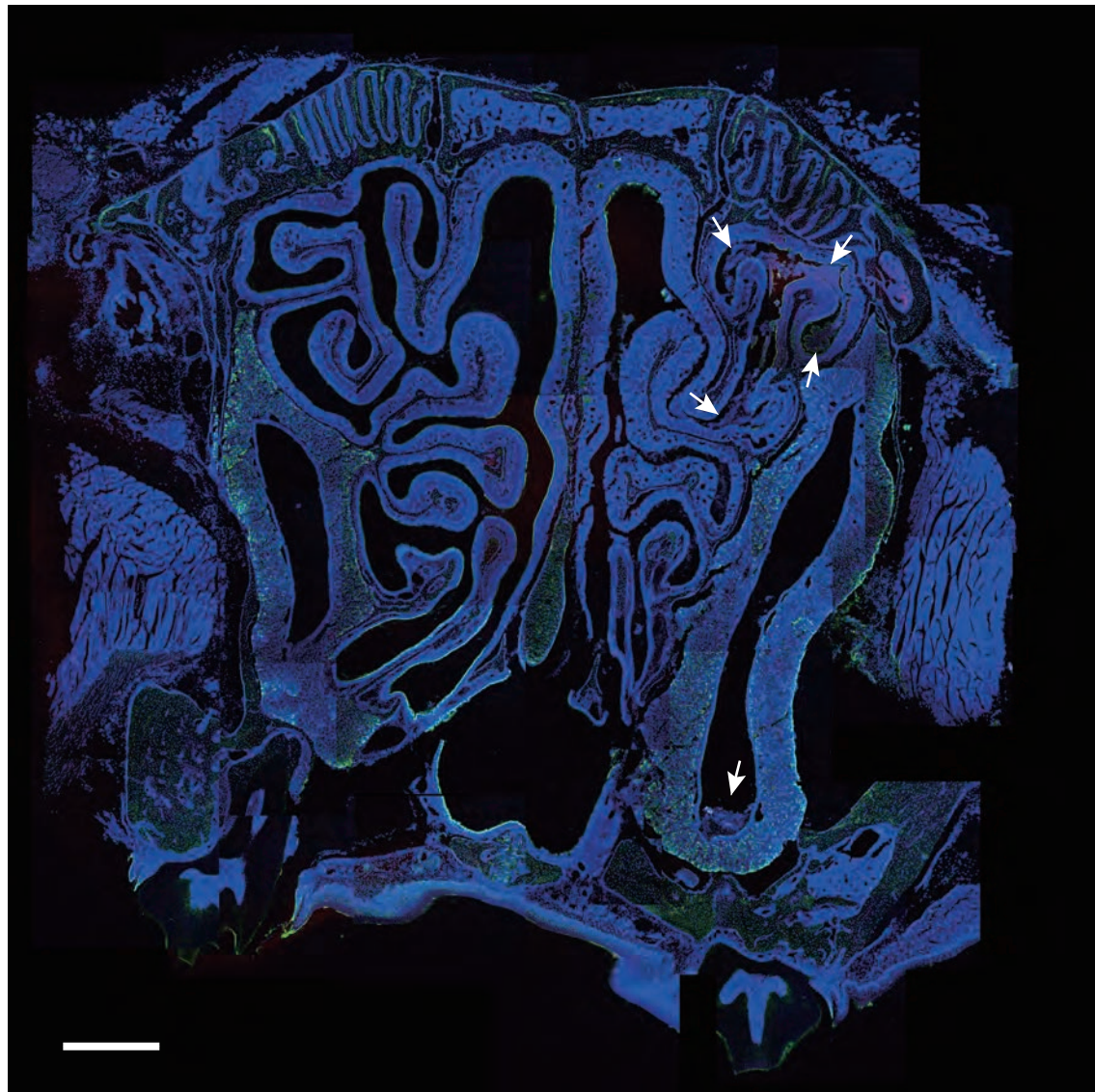
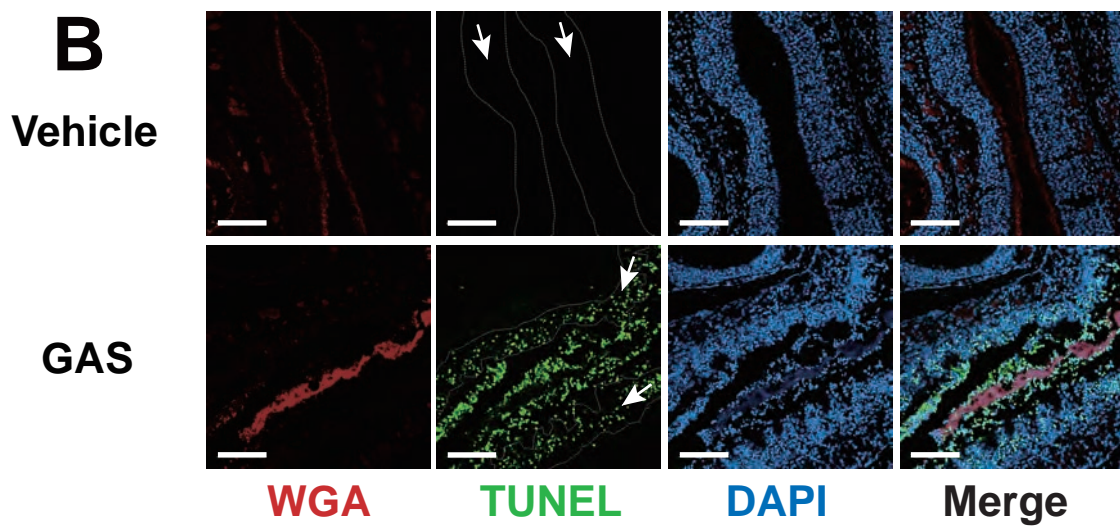
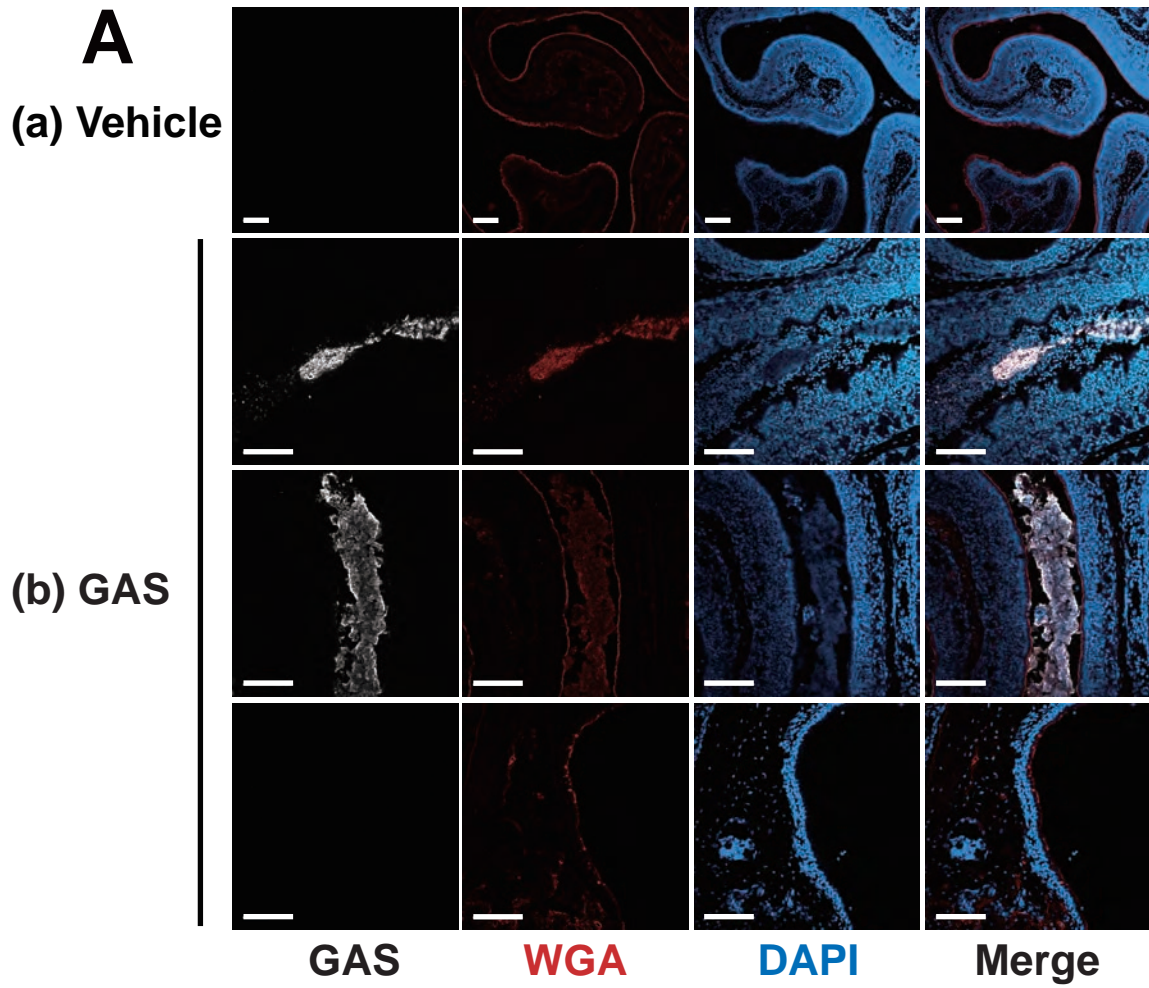


図7. 化膿レンサ球菌感染後のNALT免疫染色. 化膿レンサ球菌 11434 株 5×10^8 cfu 感染 12 時間後のマウス NALT 連続切片の免疫染色. (A) B 細胞 (抗 B220 抗体, 緑色), (B) T 細胞 (抗 CD4 抗体, 緑色), (C) 化膿レンサ球菌 (抗化膿レンサ球菌抗体, 白色), 好中球 (抗 MPO 抗体, 緑色), マクロファージ (抗 F4/80 抗体, 赤色). 青色は DNA (DAPI 染色) を示す. バーは 100 μ m を示す.



DAPI **GAS** **WGA**

図 8. 化膿レンサ球菌感染後の鼻咽頭免疫染色. 化膿レンサ球菌 11434 株 5×10^8 cfu 感染 12 時間後のマウスの鼻咽頭免疫染色像 (Merge 像). 青は DNA (DAPI), 白は化膿レンサ球菌 (抗化膿レンサ球菌抗体), 緑は WGA を示す. 菌塊は鼻腔内, 篩骨洞内, 上顎洞内にみられた. 白色矢印は細菌が充満した篩骨洞および上顎洞を示す. バーは 200 μ m.



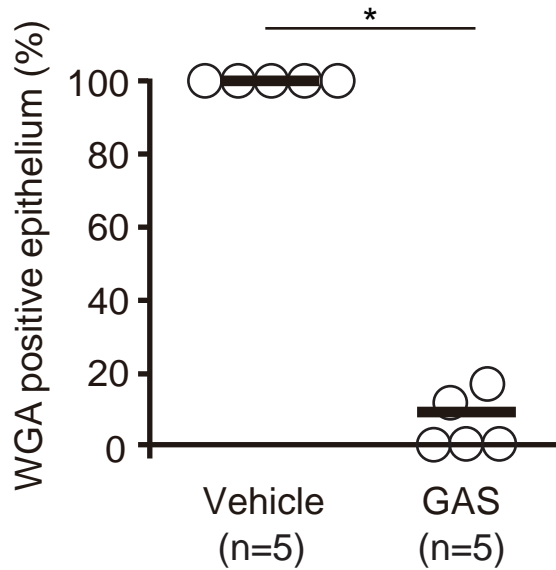
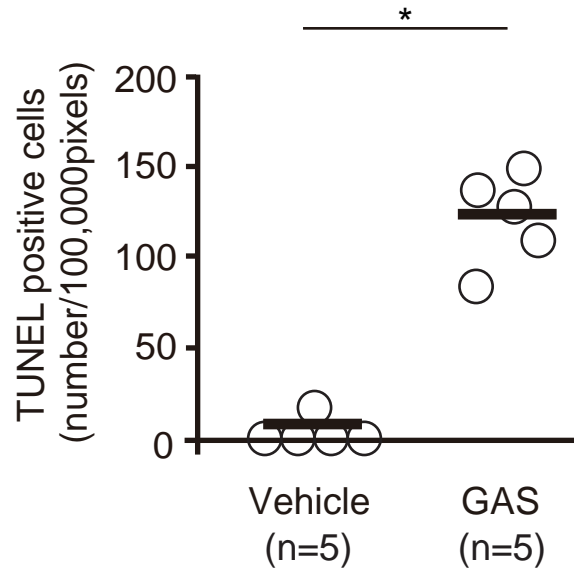
C**D**

図9. 化膿レンサ球菌感染によるマウス鼻腔粘膜免疫染色像の変化. 化膿レンサ球菌 11434 株 5×10^8 cfu 感染 12 時間後の切片に抗化膿レンサ球菌抗体 (白色), WGA (赤色), および DAPI 染色 (青色) を施した. (A-a) 非感染マウス (Vehicle), (A-b) 感染マウス (GAS) の鼻腔粘膜上皮. バーは 100 μ m を示す. (B) 非感染マウスおよび感染マウスの上皮細胞 (WGA, 赤) およびアポトーシス細胞 (TUNEL, 緑) 免疫染色像. 点線に囲まれた領域 (矢印) は上皮層を示す. バーは 100 μ m を示す. (C, D) 丸印は各サンプルを示し, バーは平均値を示す. * $p < 0.001$ (Student's t-test).

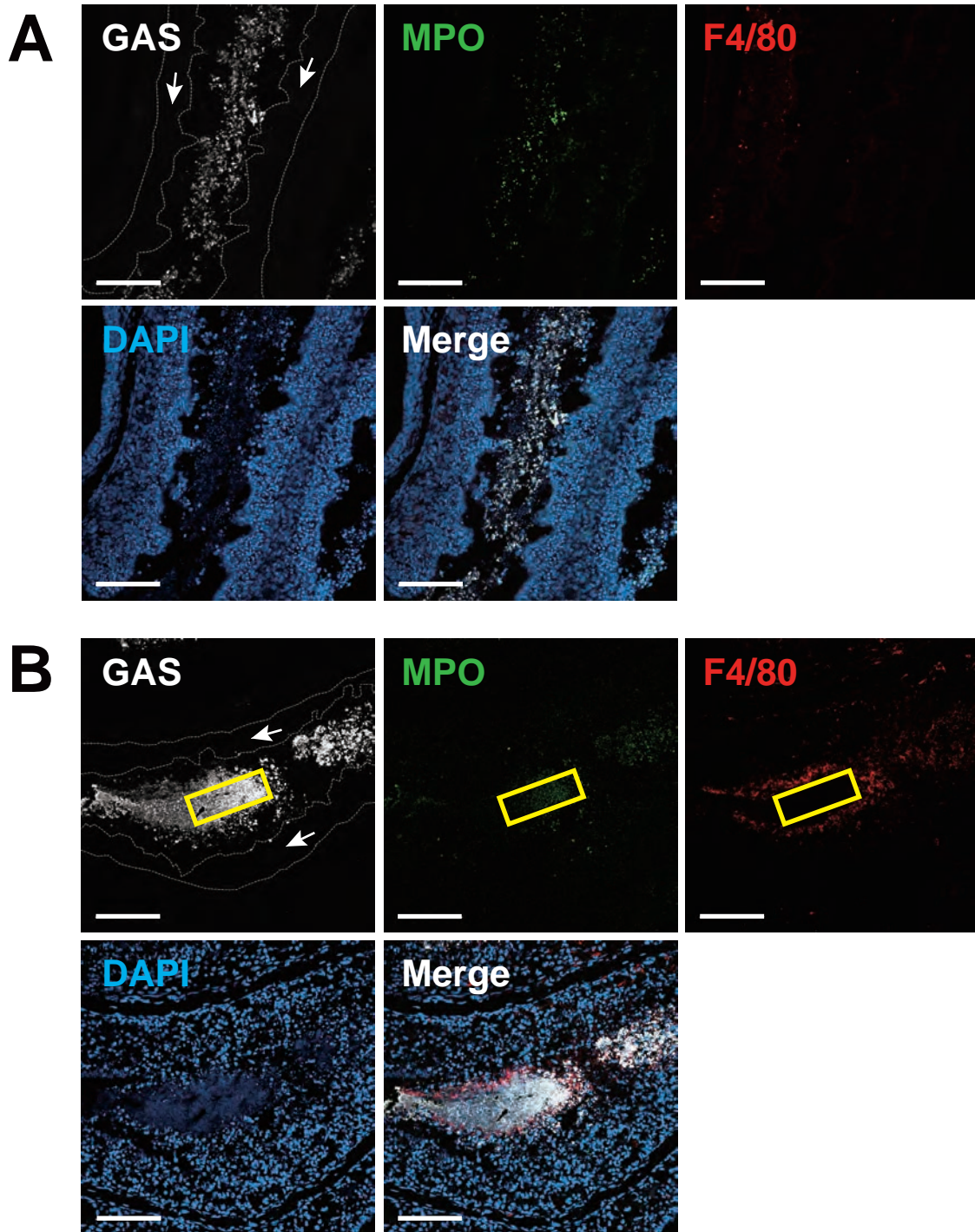
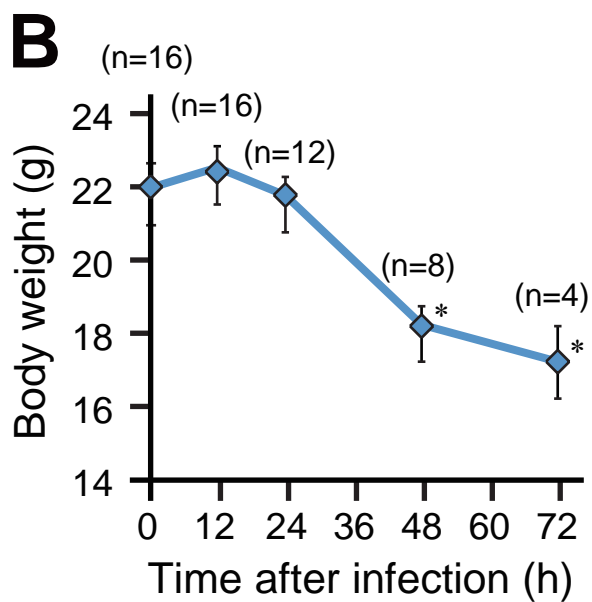
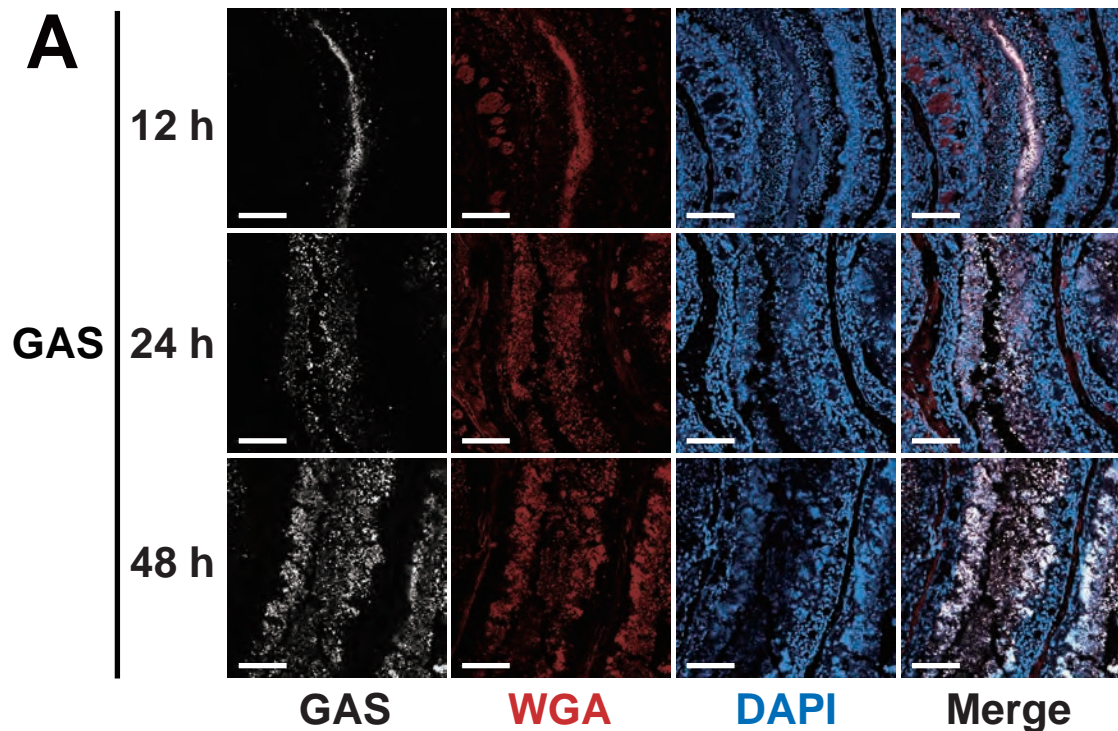


図 10. 化膿レンサ球菌の感染から (A) 12 時間後, (B) 24 時間後の感染局所の好中球およびマクロファージ. 抗化膿レンサ球菌抗体による染色 (白色), 抗 MPO 抗体による好中球染色 (緑色), 抗 F4/80 抗体によるマクロファージ染色 (赤色), DAPI 染色 (青色) を施した. 黄線で囲んだ領域は菌塊中央部を示し, 白色点線に囲まれた領域 (矢印) は上皮層を指す. バーは 100 μm である.



C

Time (h)	Bacteremia
12	0/4
24	0/4
48	0/4
72	4/4

図 11. 化膿レンサ球菌感染後のマウス鼻腔粘膜免疫染色像の経時的変化と敗血症の関連. (A) 化膿レンサ球菌 11434 株 5×10^8 cfu 感染後 12 時間, 24 時間, 48 時間の組織切片に, 抗化膿レンサ球菌抗体 (白色), WGA (赤色), および DAPI 染色 (青色) を施した. バーは 100 μ m を示す. (B) 化膿レンサ球菌感染後のマウスの体重変化. 統計検定は Time 0 (h) との比較である. * $p < 0.001$ (Student's t-test). (C) 化膿レンサ球菌感染後の菌血症マウスの割合 (各群 n=4).

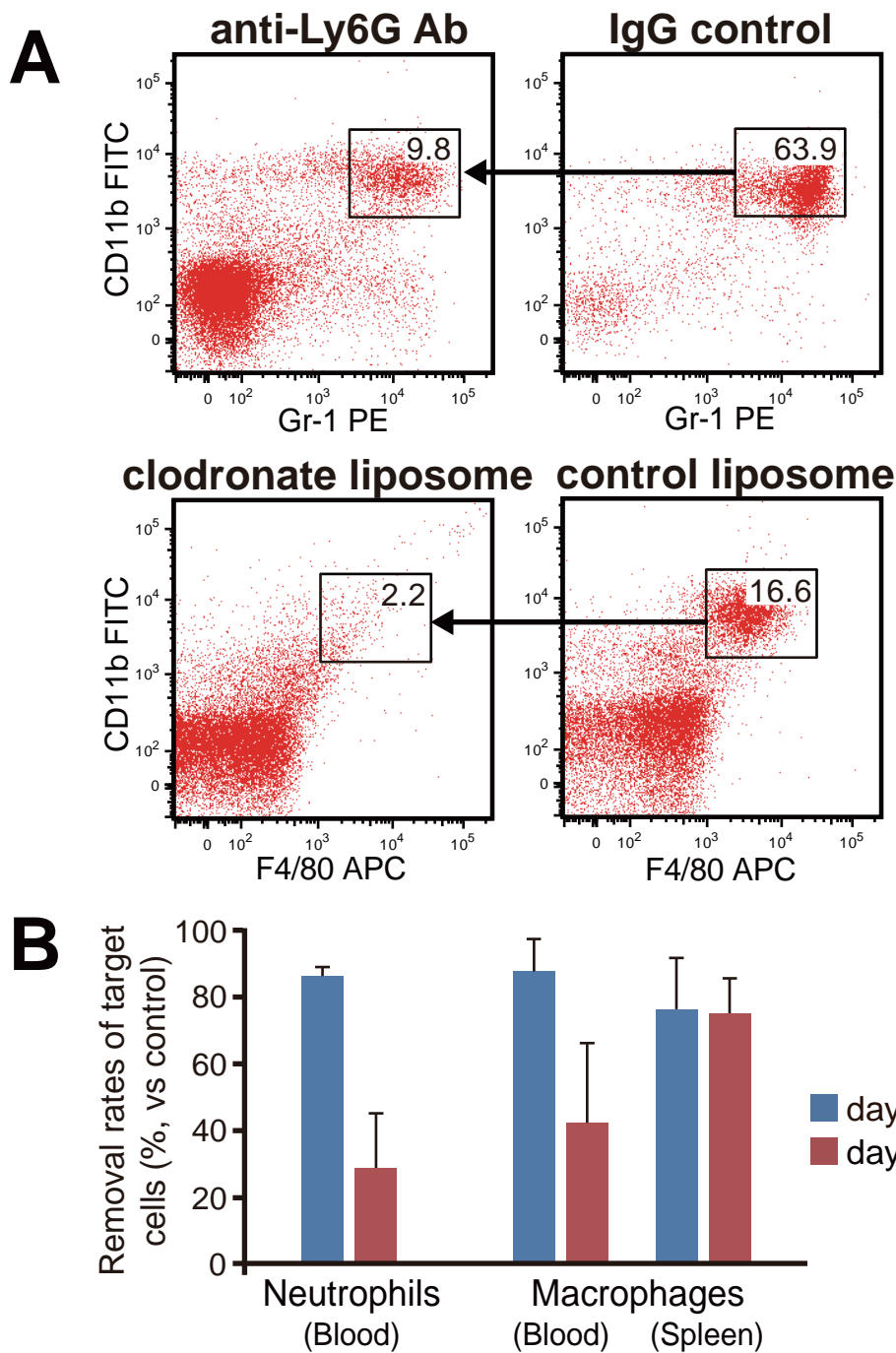


図12. 抗Ly-6G抗体, clodronate liposome単回投与による血球除去の確認. 抗Ly-6G抗体 (anti-Ly6G Ab), 対照IgG (IgG control), clodronate liposome, 対照liposome (control liposome) をマウスに投与1日後 (day 1) および3日後 (day 3) のマウス末梢血 (Blood) 中の好中球 (Neutrophils) およびマクロファージ (Macrophages), 脾臓 (Spleen) 内のマクロファージ数をフローサイトメトリー解析を用いて計測した. (A) 典型的な解析結果. (B) 標的細胞除去率. 独立した3回のフローサイトメトリー解析結果を集計した (n=3). 各々の値は, 処置群での細胞数を同じ処置日数における対照群での細胞数で割ったものを1から引いてパーセントで表記した.

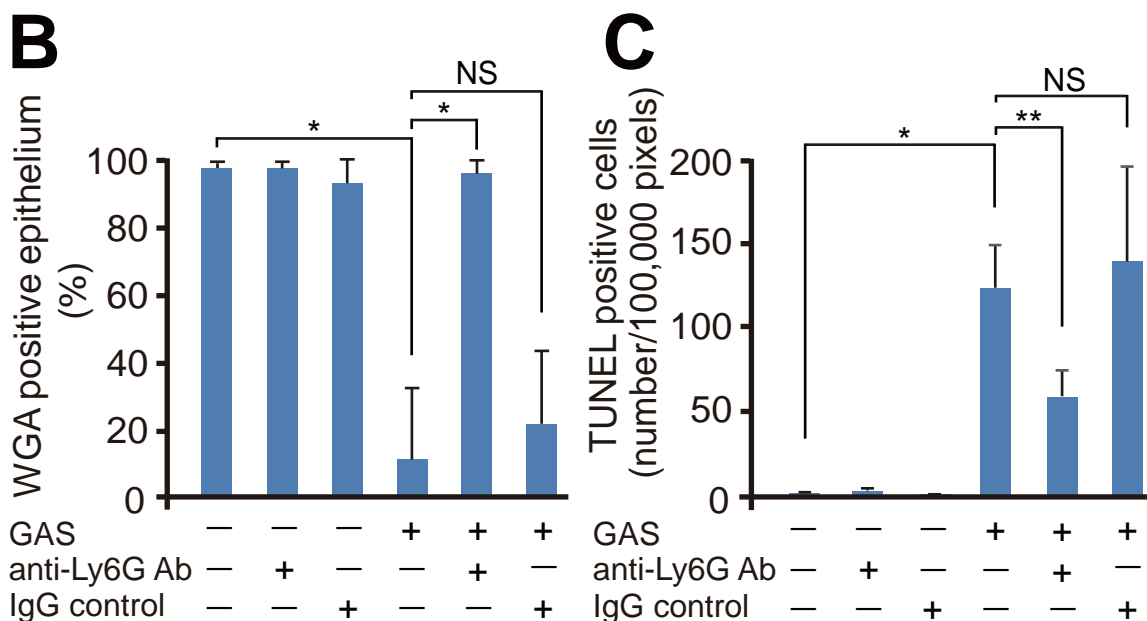
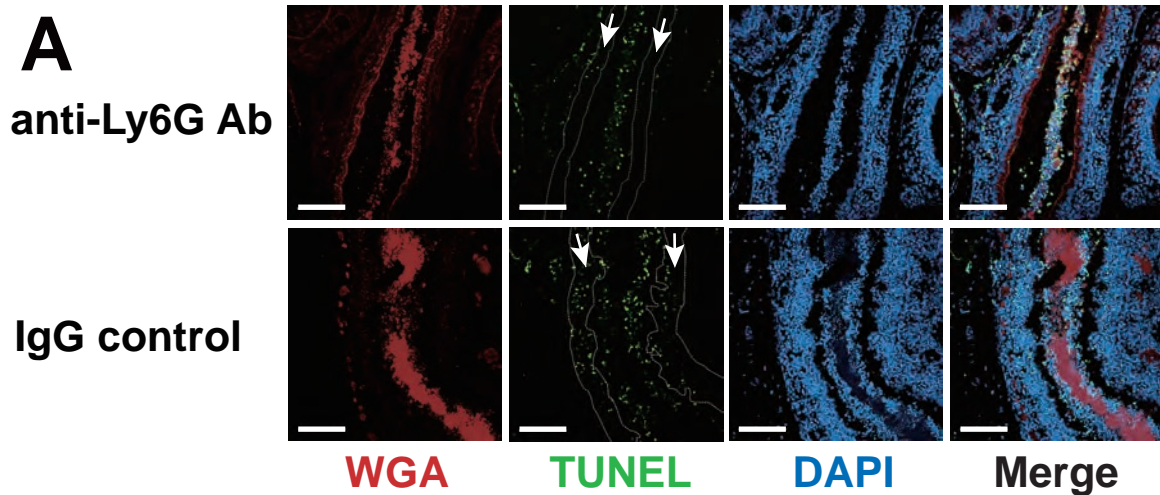


図 13. 好中球除去マウスにおける化膿レンサ球菌による鼻腔粘膜障害に関する検討. 抗 Ly-6G 抗体を投与した好中球除去マウス (anti-Ly6G Ab) と対照 IgG を投与したマウス (IgG control) に, 化膿レンサ球菌 11434 株 5×10^8 cfu を感染させた 12 時間後の鼻腔粘膜上皮層における (A) 免疫染色像. バーは 100 μ m を示す. (B) WGA 陽性上皮層の割合, (C) 単位面積あたりのアポトーシス細胞数. 点線に囲まれた領域 (矢印) は上皮層を示す. (B, C) * $p < 0.001$, ** $p = 0.001$, NS : 有意差なし (いずれも Student's t-test による).

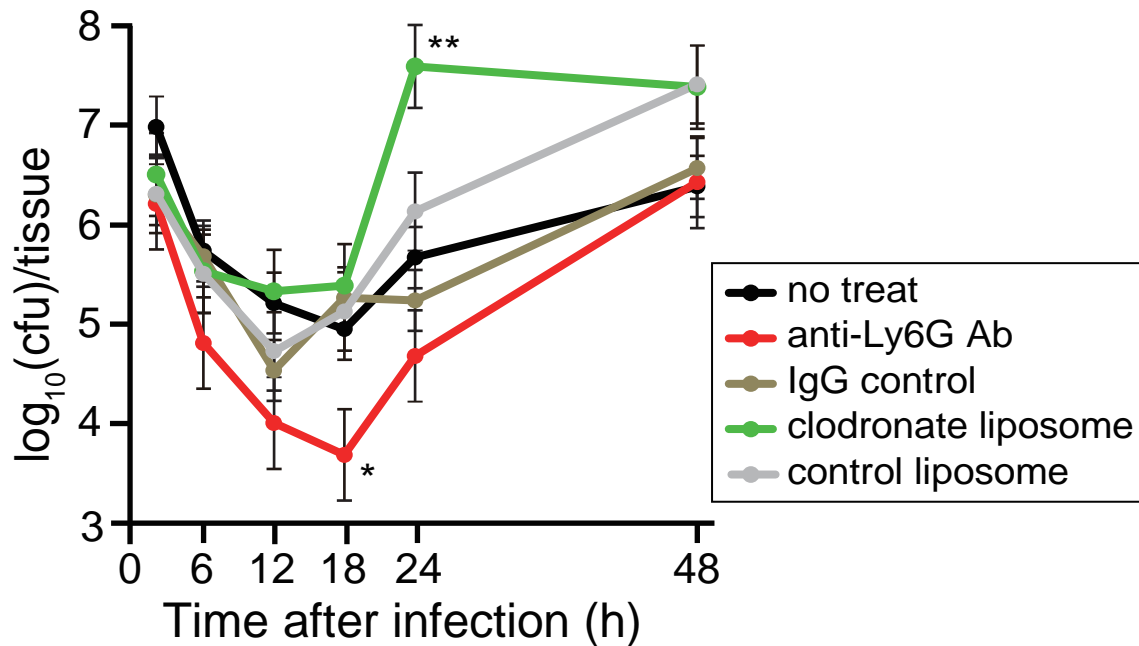
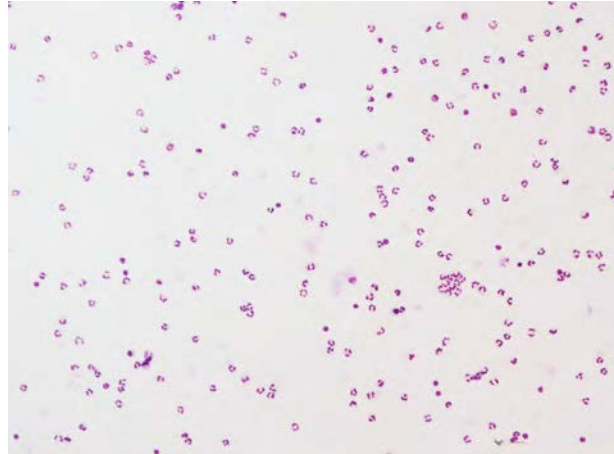
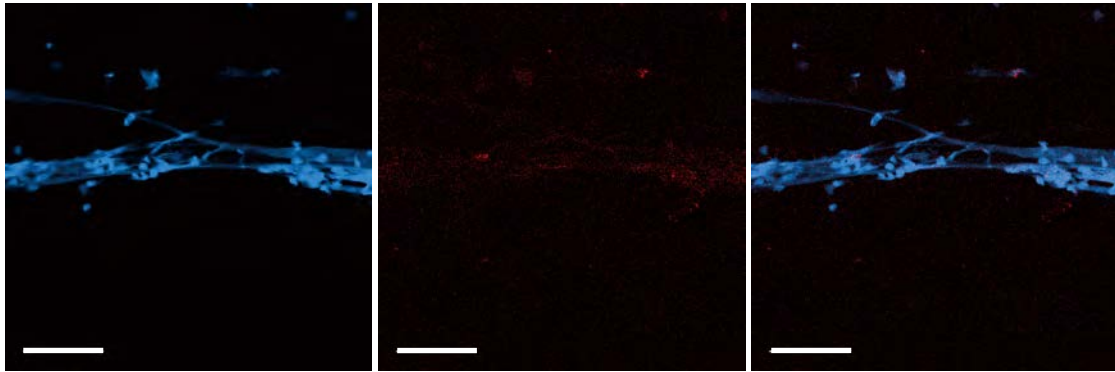


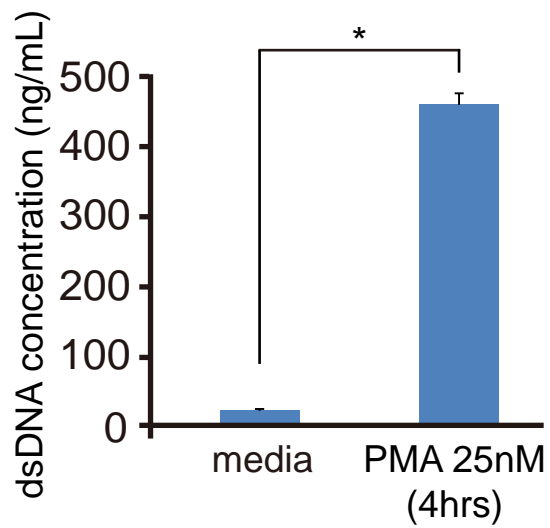
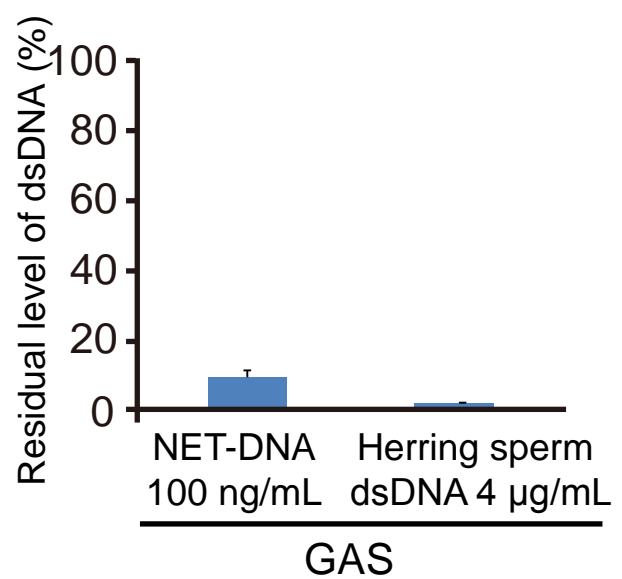
図 14. 化膿レンサ球菌経鼻感染後の上顎洞内生菌数の経時的解析. 無処置 C57BL/6 マウス (no treat), 抗 Ly-6G 抗体投与マウス (anti-Ly6G Ab), clodronate liposome 投与マウス (clodronate liposome), 対照 IgG 抗体投与マウス (IgG control), control liposome 投与マウス (control liposome) の計 5 群に, 化膿レンサ球菌 11434×10^8 cfu を経鼻感染させ, 感染後 2 時間, 6 時間, 12 時間, 18 時間, 24 時間, 48 時間後の上顎洞内生菌数を血液寒天培地へ播種することにより測定した. * $p < 0.01$ (Student's t-test ; vs IgG control), ** $p < 0.01$ (Student's t-test ; vs control liposome).

A**B**

DAPI

MPO

Merge

C**D**

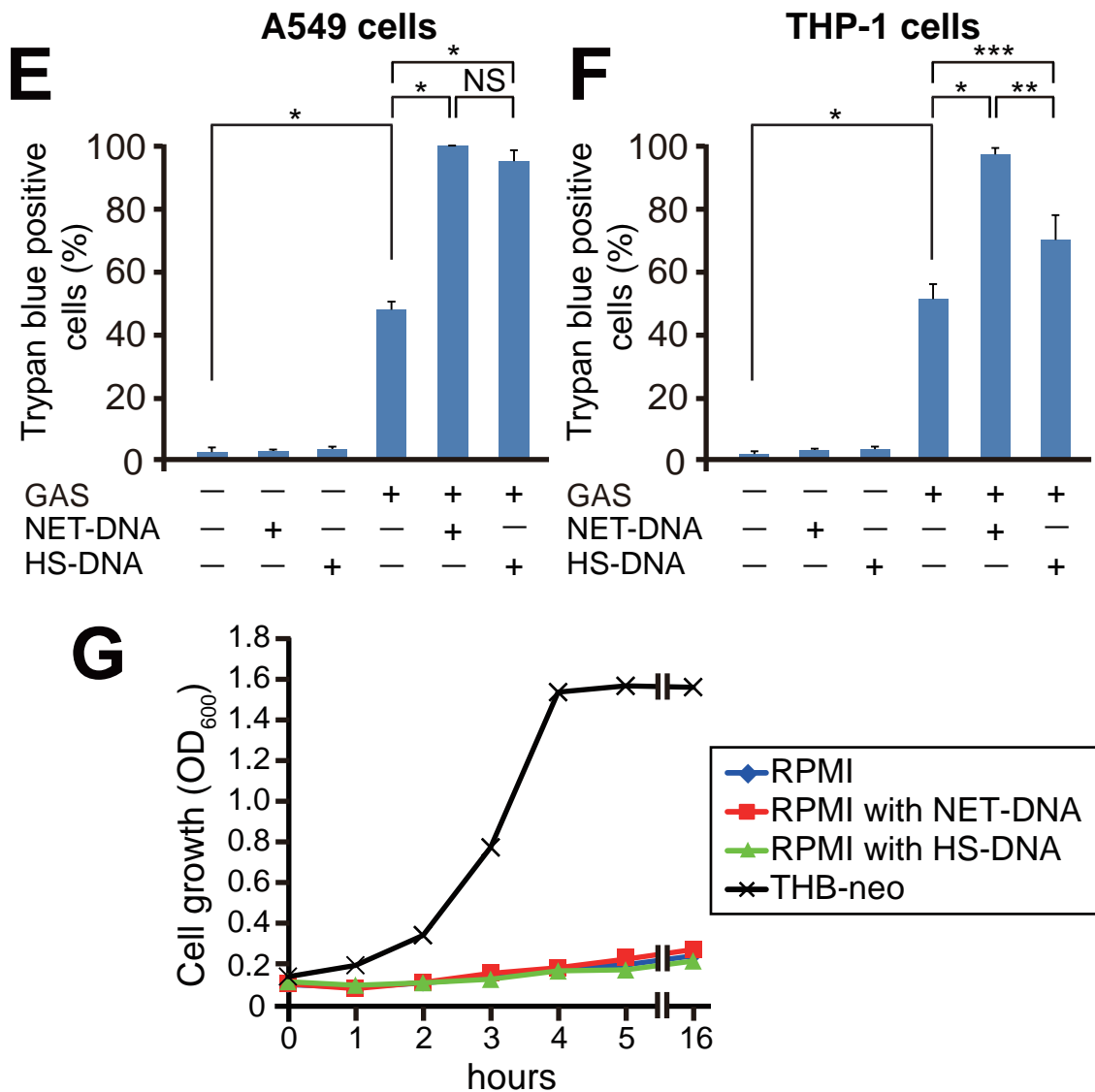


図 15. (A) ヒト末梢血好中球, (B) NETs 免疫染色, (C) PMA 刺激による NET-DNA, (D) 化膿レンサ球菌による NET-DNA 分解, (E・F) 化膿レンサ球菌と NETs の相互作用による (E) A549 細胞に対する細胞毒性と (F) THP-1 細胞に対する細胞毒性, (G) NET-DNA が化膿レンサ球菌の発育に与える影響. (A) 分離した好中球は, 分葉核を呈し, Giemsa 染色で赤紫色に染まる. 好中球の純度が 90% 以上で実験に供した. (B) 好中球 1×10^6 cells に PMA 25 nM を加え, 240 分後に遠心分離した細胞ペレットを, 抗 MPO 抗体および DAPI にて染色した. バーは 100 μm . (C) 遠心分離した上清中の NET-DNA 値を Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay で測定した. 8°C で同時間保存した非刺激好中球を比較対照とした. (D) 化膿レンサ球菌と NET-DNA あるいは HS-DNA を 3 時間共培養した溶液の上清中の dsDNA 値を測定した. (E・F) 化膿レンサ球菌と NET-DNA あるいは HS-DNA を 3 時間共培養した溶液の上清を A549 細胞および THP-1 細胞に加えて, 4 時間後に Trypan blue 染色を行い, 染色陽性細胞をカウントして全細胞数に対する割合を算出した. * $p < 0.001$, ** $p = 0.009$, *** $p = 0.04$, NS: 有意差なし (いずれも Student's t-test による). (G) 一夜培養した菌液を 10 倍希釈し, NET-DNA 100 ng/mL または HS-DNA 100 ng/mL を加えて 37°C, 5%CO₂ 下で培養し, 経時的に OD 値を測定した.

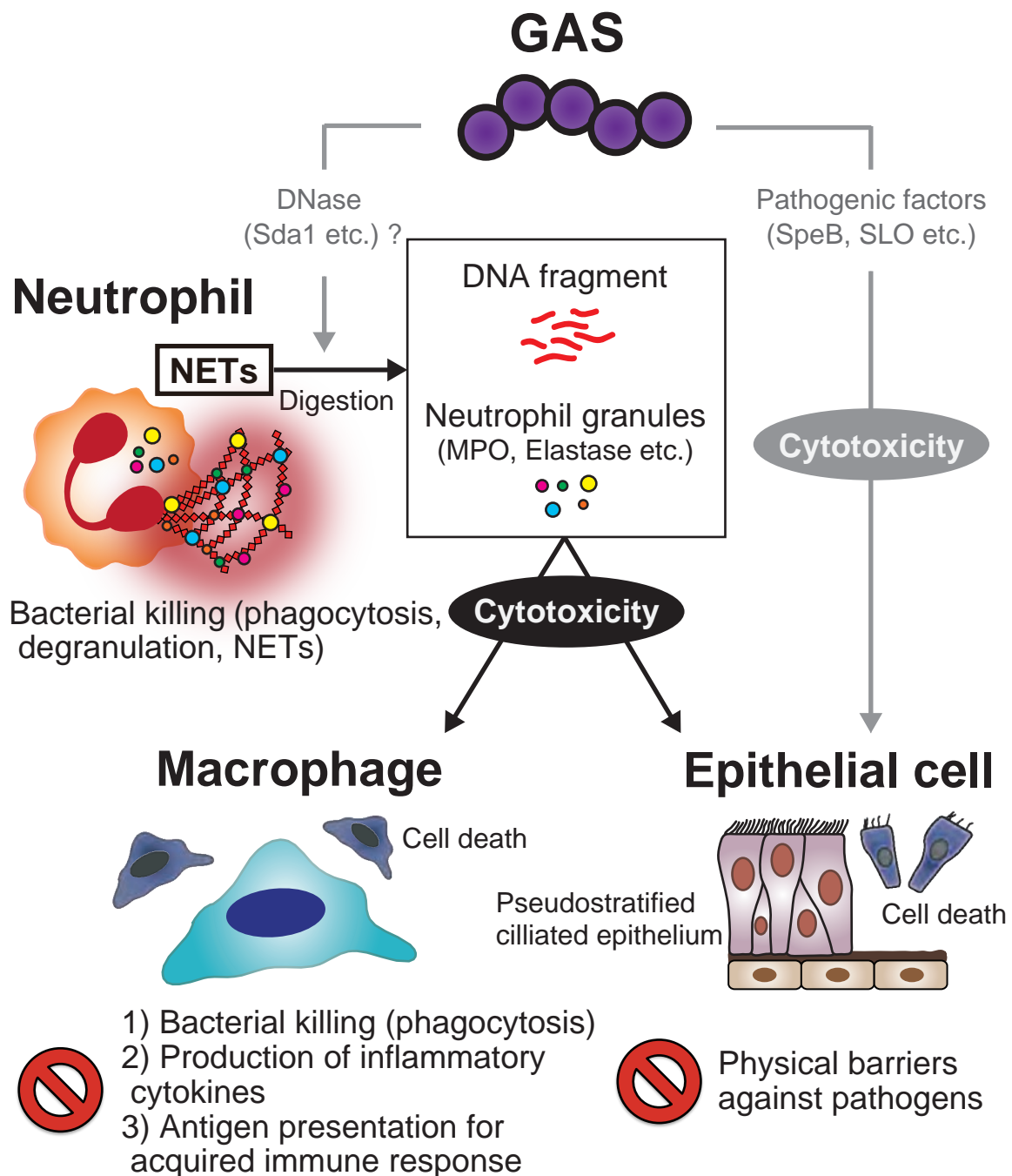


図 16. 本研究のまとめ. 過去の研究によって, 化膿レンサ球菌が, 自身の分泌する SpeB や SLO をはじめとする細胞毒性トキシンによって生体の物理的バリアを形成する粘膜上皮細胞を破壊することや, 宿主自然免疫細胞である好中球の NETs を DNase によって分解し, 好中球による殺菌を回避することなどが分かっていた. しかし本研究の結果, 化膿レンサ球菌は, NETs の分解産物の細胞毒性を介した上皮細胞障害を誘導し, さらに感染局所の単球・マクロファージをも細胞死へ誘導することによって同細胞群による貪食から逃れ, 炎症性サイトカイン産生を抑制し, 獲得免疫発動をも抑制して感染を拡大することが示唆された.