



Title	Epidemiological Characterization and Molecular Analyses of Streptococcus pyogenes Isolated from Patients with Recurrent Pharyngitis
Author(s)	小川, 泰治
Citation	大阪大学, 2011, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/58463">https://hdl.handle.net/11094/58463</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、<a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">大阪大学の博士論文について</a>をご参照ください。

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏 名	小 川 泰 治
博士の専攻分野の名称	博士（歯学）
学 位 記 番 号	第 24478 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 23 年 3 月 25 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 歯学研究科統合機能口腔科学専攻
学 位 論 文 名	Epidemiological Characterization and Molecular Analyses of <i>Streptococcus pyogenes</i> Isolated from Patients with Recurrent Pharyngitis (咽頭炎反復症例より分離した化膿レンサ球菌の疫学的・遺伝学的解析)
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 前田 芳信 (副査) 教 授 川端 重忠 準教授 仲野 道代 講 師 野杣由一郎

#### 論 文 内 容 の 要 旨

【目的】化膿レンサ球菌 (*Streptococcus pyogenes*) はヒトに多彩な感染症を引き起こす病原菌であり、最も頻度高く報告される疾患が咽頭炎である。化膿レンサ球菌性咽頭炎の治療にはペニシリン等の化学療法薬が用いられるが、再発率が 5~30%にも及ぶ。本研究では、*S. pyogenes* 感染による咽頭炎の再発メカニズムの解明ならびに疫学的・遺伝学的解析に基づいた新規治療法の提案を目的とし、再発性咽頭炎患者より分離した *S. pyogenes* の性状解析を行った。

【方法】2005~2010 年に日本国内の 6 医療機関において、咽頭スワブ培養検査により再発性化膿レンサ球菌性咽頭炎と診断された患者由来の *S. pyogenes* 150 株を入手し、実験に供試した。はじめに、DNA シークエンサーを用いて *emm* 遺伝子の可変領域の塩基配列を決定し、それぞれの菌株の *emm* 遺伝子型別を行った。次に、96 穴ポリスチレンプレート底面にバイオフィルムを形成させ、各菌株のバイオフィルム形成能の評価と比較を行った。各菌株のうち、高いバイオフィルム形成能を示した菌株を用いて、カバガラス上に形成させたバイオフィルムに化学療法薬を添加し、Live/Dead 染色後、共焦点蛍光レーザー顕微鏡による観察を行った。また、同じ菌株のバイオフィルムに種々の化学療法薬もしくはヒト抗菌ペプチドを添加し、Live/Dead 染色後に蛍光顕微鏡により

観察した。さらに、走査型電子顕微鏡を用いてバイオフィルム構造の観察も行った。次いで、ヒト上皮細胞 HeLa 株への細胞侵入能を調べた。さらに、初発時と再発時の各菌株の *emm* 遺伝子型を比較し、両者の *emm* 遺伝子型が一致したものについては *speA*, *speB*, *speC* 遺伝子転写の有無を RT-PCR 法を用いて比較し、遺伝子の転写が確認された場合は、それぞれの遺伝子型別を DNA シークエンサーにより決定した。また、近年耐性化が進んでいるマクロライド系化学療法薬に対する供試菌株の最小発育阻止濃度 (MIC) を測定した。

【結果】再発性咽頭炎患者由来の *S. pyogenes* 150 株の *emm* 型を決定した結果、*emm12*, *emm1*, *emm28* の順に多かった。これらのうち *emm6* 株のバイオフィルム形成能が、他の *emm* 遺伝子型に比べ有意に高かった。そこで、*emm6* 株の形成したバイオフィルムに 100 µg/mL のゲンタマイシンを添加したところ、バイオフィルム表層の菌は死滅したが、バイオフィルム内部では 24 時間後でも菌が生存していた。一方、浮遊条件下で培養した *S. pyogenes* は 1.0 µg/mL の濃度で死滅した。また、*emm6* 株のバイオフィルムに種々の薬剤を添加し、蛍光顕微鏡による観察を行ったところ、バイオフィルム内部の *S. pyogenes* は、種々の化学療法薬（ペニシリン、エリスロマイシン、クリンダマイシン）を MIC の 10 倍以上の濃度で添加しても死滅しなかった。一方、抗菌ペプチド LL-37 は MIC 以下であっても、バイオフィルムを形成した *S. pyogenes* に奏効した。また、同じバイオフィルムを走査型電子顕微鏡により観察したところ、LL-37 を添加することによりバイオフィルムの菌が著明に減少した。さらに、ヒト上皮細胞への細胞侵入能を調べた結果、*emm1*, *emm12*, *emm28* 株が高い侵入率を示した。細胞に侵入した *S. pyogenes* は、培養液中に化学療法薬を添加しても細胞内で生存し、培養液から化学療法薬を除去すると再び上清に移行し生育した。しかしながら、化学療法薬を組み合わせて添加することで生育する菌の割合が低下した。特に、ペニシリンとクリンダマイシンを組み合わせて添加した場合に菌の生育率が最も低かった。また、初発時と再発時で菌の *emm* 型を比較したところ、49 症例のうち 11 症例で *emm* 型が異なっていた。さらに、*speA*, *speB*, *speC* 遺伝子転写の有無および遺伝子型の異なる症例が 16 例認められた。マクロライド系化学療法薬の一種であるエリスロマイシンに対する耐性試験では、141 株のうち 82 株 (58.2%) が耐性 (MIC > 1.0 µg/mL) を示した。

【考察】*S. pyogenes* *emm6* 株の形成したバイオフィルムは高濃度の化学療法薬に対して抵抗性を示したが、同株のバイオフィルムは LL-37 により破壊された。また、上皮細胞

に侵入した *S. pyogenes* は培養液中に高濃度の化学療法薬を添加しても細胞内で生存し、培養液から化学療法薬を除去すると再び上清に移行し生育することが示された。さらに、ペニシリンとクリンダマイシンの組み合わせ投与が除菌に有効であることも明らかになった。また、初発時と再発時で菌の遺伝子型の異なる症例が散見されたことから (55.1%)、臨床的に再発と診断された症例の中には、異なる株が再感染した症例も含まれている可能性が示された。以上の結果から、*S. pyogenes* は *emm* 型により異なる性状を呈し、バイオフィルム形成や細胞侵入等の複数の機序により化学療法を回避し、咽頭炎を再発させている可能性が示された。マクロライド系化学療法薬に対する耐性株の割合が高かったことを勘案すると、菌の性状解析に基づいた治療法の選択が重要であると示唆された。

#### 論文審査の結果の要旨

本研究は、*Streptococcus pyogenes* が引き起こす咽頭炎の再発メカニズムに関して、臨床分離株を用いて疫学的・分子生物学的に解析したものである。分析に際しては、生化学的および分子生物学的手法ならびにバイオイメージング技術を用いた。その結果、*S. pyogenes* が遺伝子型により異なる性状と咽頭炎再発機序を有することを明らかにした。さらに、再発性咽頭炎患者より分離された各遺伝子型の *S. pyogenes* に対して、それぞれの除菌に適した制御法についても検索を進め、バイオフィルム高産生性の *emm6* 型菌には抗菌ペプチド投与が有効であること、細胞侵入性の高い *emm1*, *emm12*, *emm28* 型菌には抗菌剤（もしくは化学療法剤）の組み合わせが適切であることを示した。

以上より、本研究は博士（歯学）の学位に値するものであると認める。