—原 著—

Streptococcus mitis (Nm-65 株) の代謝物質中に 見いだされたヒト血小板凝集因子に関する研究

大谷 信崇・浅野 伍朗

日本医科大学病理学第2教室

Purification and partial characterization of a novel human platelet
aggregation factor in the extracellular products of
Streptococcus mitis, strain Nm-65

Nobutaka Ohtani and Goro Asano

Department of pathology, Nippon Medical School

In this paper, we report the purification and partial characterization of human platelet aggregation factor from the extracellular products (ECP) of *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) isolated from a patient with Kawasaki disease (KD). Platelet aggregation reaction was carried out using platelet-rich plasma (PRP) and washed platelets suspended in ACD-PBS. The aggregation factor was designated as *S. mitis*-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF). The results obtained were as follows.

1) Sm-hPAF was isolated by chromatography on DEAE-Sepharose CL-6 B, hydroxyapatite and Superdex 75 columns. The purified Sm-hPAF showed a single band upon SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and molecular weight of approximately 66 kDa on SDS-PAGE. The isoelectric point (pI) of Sm-hPAF was 8.5, and Sm-hPAF showed an absorption peak at 278 nm on absorption spectra. When the platelet aggregation activity of the Sm-hPAF was compared with that of ECP, the specific aggregation activity of Sm-hPAF was significantly increased (up to 28-fold). Sugars were not found in Sm-hPAF. The sequence of the first 15 amino-terminal amino acid residues were ¹-Asp-Glu-Gln-Gly-Asn-Arg-Pro-Val-Glu-Thr-Glu-Asn-Ile-Ala-Arg. The platelet aggregation activity of Sm-hPAF was inactivated by heating at 45°C for 10 min.

2) PGE₂ was released from platelets after incubation for 10 min with Sm-hPAF in a dose-dependent fashion. Platelet aggregation by the Sm-hPAF was totally inhibited by either PGE₁ or GRGDS, but these reagents did not inhibit the platelet aggregation by collagen.

3) Histological examination of the rabbit skin sites showing an early reaction revealed increased dilatation of the veins and capillaries with cellular infiltration in the perivascular space of the dermis. Hyperplasia of the endothelial cells was noted. Degeneration of the vascular walls was observed in the later stages of the reaction. Aggregation of red cells in the vascular endothelium was also observed. Sm-hPAF was capable of producing vasculitis.

4) Twenty (76.9%) platelet-rich plasma samples (PRP) derived from 26 healthy human volunteers reacted with Sm-hPAF, but the remaining 6 PRPs were not reactive. Preliminary

study suggests the existence of an inhibitory factor in plasma from nonreactive donors.

Key words: *Streptococcus mitis*, platelet aggregation factor, normal human plasma, Kawasaki disease

緒 言

これまでに急性熱性皮膚粘膜リンパ節症候群 (川崎病) 患児をはじめ, 他の熱性疾患患児などの口腔内より緑色レンサ球菌群 (Viridans group streptococci) を分離し, DNA-DNA hybridization により菌種の同定を行うとともに, 各分離菌株の代謝物質 (extracellular products, ECP) の生物学的, 免疫学的性状についての検討が行われてきた¹⁻⁴⁾。その研究の過程で分離, 同定された *Streptococcus mitis* (*S. mitis*) の一部の菌株の ECP の中に, ヒト血小板を凝集する因子の存在することが見い出された¹⁾。

著者らは, 各種カラムクロマトグラフィーを用いて精製した本凝集因子は SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) での易動度から, 分子量約 66 kDa の物質であることを明らかにし, またコラーゲンなどとは異なった機構により血小板凝集が起こることを示唆した。なお, この血小板凝集因子を *S. mitis* 由来ヒト血小板凝集因子 (*S. mitis* derived-human platelet aggregation factor, Sm-hPAF) と仮称した。

材料および方法

(1) 研究材料

1) 使用菌株

川崎病患児の歯面より分離された *S. mitis*, Nm-65 株¹⁾を使用した。

(2) 研究方法

1) 菌の培養

Nm-65 株を 50 ml の合成培地 (chemically defined medium, CDM)⁵⁾中で, 5 % CO₂存在下で 37°C, 18 時間培養 (subculture) した。発育した菌株はさらに 2 l の CDM に移し, 好気性下で 37°C, 18 時間培養した。その後, 4°C 下で 10,000×g で 30 分間遠心し, 得られた培養上清を 0.45 μm フィルター (Millipore Co., Bedford, MA., USA)

に通し, ついでこの溶液を透析膜 (mol. wt ; 14,000 cut off, 三光純薬, 東京) を用い, 4°C 下で Aquacid II (Carboxy-methyl cellulose, mol. wt ; 500,000, Calbiochem Corp., La Jolla, CA., USA) に対して透析し, 内容物を 100 倍に濃縮後, 再度 0.45 μm フィルターに通し, 蛋白量を測定⁶⁾後, 使用まで -80°C に保存した。本物質を extracellular products (ECP) とした。

2) Sm-hPAF の精製

濃縮した ECP を 10 mM phosphate buffer (PB), pH 6.8 で透析し, 同 PB で平衡化した DEAE-Sepharose CL-6B (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) カラム (2.5×20 cm) に添加し, NaCl 0~0.5 M 濃度勾配下, 流速 18 ml/h で本凝集因子 (Sm-hPAF) の溶出を試みた。各溶出分画について, その吸光度を 280 nm で測定するとともに血小板凝集能の検討 (後述) を行った。得られた本因子を含む分画は, ついで 10 mM PB で平衡化した Hydroxy-apatite (Macu-Prep[®] Ceramic, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA., USA) カラム (1×10 cm) に添加し 10~400 mM phosphate の濃度勾配下, 流速 42 ml/h で溶出を行った。さらに得られた Sm-hPAF を含む分画は 50 mM NaCl を含む 20 mM PB, pH 6.8 で平衡化した Superdex[®] 75 (Pharmacia Biotech) カラム (1.6×100 cm) に添加し, 流速 42 ml/h で同 PB を用いて Sm-hPAF の溶出を試みた。

3) SDS-PAGE

Laemmli の方法⁷⁾に準拠し, 5 % spacer gel, 10% separating gel を用い, 不連続トリス緩衝液で 40 mA の定電流で, ECP 並びにカラムクロマトグラフィーにより得られた各分画を 2 時間泳動した。分子量マーカーとしては phosphorylase (97.4 kDa), bovine serum albumin (BSA, 66.2 kDa), ovalbumin (45 kDa), soybean trypsin inhibitor (21.5 kDa), lysozyme (14.4 kDa) (Bio-Rad Laboratories, Richmond, CA.) を用

いた。各試料と分子量マーカーは各々sample buffer [2% (wt/vol) SDS, 2% (vol/vol) 2-mercaptoethanol, 30% (vol/vol) glycerol, 0.01% (wt/vol) bromphenolblue] と等量混合し、100°C, 3分間加熱した後、spacer gel上に添加した。泳動終了後ゲルを0.2% Commassie Brilliant Blue-R (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO., USA)で染色し、ついで10% methanol-7% acetic acidで脱色し、出現するバンドを観察した。

4) 特異吸光度の測定

最終的に得られた精製標品 (Sm-hPAF) の吸収スペクトルはUV-160 A スペクトロフォトメーター (島津製作所, 京都) にて、蛋白量として30 $\mu\text{g/ml}$ を用いて測定した。

5. 等電点電気泳動

等電点電気泳動は水平型電気泳動装置, Multi-phor II (Pharmacia Biotech.) を用い, Sm-hPAF 20 μl を Ampholine PAG プレート (pH 3.5~9.5) (Pharmacia Biotech.) 上に添加し, 20 mA, 15分, ついで30 W, 1時間泳動した。泳動終了後ゲルを固定し, ついでCommassie Brilliant Blue-R (Sigma Chemical Co.) で染色後, 脱色し, さらに保護液に入れた後, 乾燥させた。等電点マーカーとしてはbroad pI calibration キット (Pharmacia Biotech) を使用した。

6) N-末端アミノ酸配列の決定

Sm-hPAFのN-末端アミノ酸配列は, Pulse-liquid sequencer (ABI 477 A: Applied Biosystems, Foster, CA.) を用い, 自動エドマン分解 (automated Edman degradation) により行った。また, DEAE-Sephacrose カラムにより得られた凝集活性分画をSDS-PAGEにかけた後, polyvinylidene difluoride膜 (PVDF, Bio-Rad Laboratories) に転写した⁸⁾。転写用緩衝液としては10 mM 3-cyclohexylaminopropanesulfonic acid (CAPS) を含む10% methanol溶液 (pH 11.0) を用い, 60 mA 定電流で3時間泳動した。泳動終了後, 0.1% Commassie Brilliant Blue-R (Sigma Chemical Co.) で5分間染色し, ついで40% methanol-10% acetic acidで脱色後, 蒸留水で洗浄し, 乾燥した。求める染色バンドを切り

出し, そのバンドのN-末端アミノ酸配列を自動エドマン分解法により検討し, カラムクロマトグラフィーにより得られたSm-hPAFのそれと比較した。

7) 糖分析

糖分析はHaseの方法⁹⁾に準じて行った。すなわち, 試料, Sm-hPAF (15 μg) を2 M HCl-2 M trifluoroacetic acid 存在下で100°C 3時間加水分解した後, 減圧下で酸を除去した。残渣を飽和重曹80 μl に溶解し, acetic anhydrideを加えて室温で30分放置し, N-アセチル化 (N-acetylation) した。過剰のNaイオンを除くために, これにDowex 50 W-X 2 (H^+ , 100~200 mesh, Bio-Rad Laboratories) を加えてから小さなカラム管 (0.5×10 cm) に充填し, 蒸留水で洗浄後, 得られた溶液を凍結, 乾燥した。この乾燥試料に7 μl の coupling reagent (2-aminopyridine-acetic acid-methanol) を加え, 90°C, 15分処理した後, 窒素ガス存在下, 60°C, 20分, 150 mmHgで過剰の reagentを除き, ついで10 μl の reducing reagent (borane-dimethylamine complex-acetic acid) を加え90°C, 8時間加熱した。そして過剰の reagentを除くためにtolueneを加え, 窒素ガス存在下40°C, 10分, 150 mmHgで乾燥した。糖分析はHigh-pressure liquid chromatography (HPLC) により行った。乾燥試料を溶解するのに必要な最少量の蒸留水で溶解した後, TSK gel Sugar AXI (0.46×15 cm, 東ソー, 東京) カラムを用い10% acetonitrileを含む0.7 M boric acid, pH 9.0 (流速: 0.3 ml/min) で溶出を試みた。還元ピリジルアミノ化した糖の検出はF-1000 fluorescence spectro-photometer (日立製作所, 東京) を使用し, excitation 310 nm, emission 380 nmで行った。また, 標準糖としてgalactose, mannose, fucose, rhamnose, xylose, ribose, glucose, N-acetylglucosamine, N-acetyl-galactosamineを用いた。

8) 血小板凝集能検査

健常成人26名 (21~56歳, 男性14名, 女性12名) の末梢血より型のごとく血小板濃厚浮遊液 (platelet rich plasma, PRP) を得た。すなわち,

3.8% sodium citrate 1 容を含む注射器にヒト末梢血 9 容を採取し、これを試験管に移し 20°C で 10 分間遠心 (170×g) 後、得られた上清を PRP とした。凝集反応は Tracer (Model-T 228, 二光バイオサイエンス, 東京) を接続した 2 channel aggregometer (Model PAT-2 A, 二光バイオサイエンス) を用いて行った。PRP 200 μ l に凝集因子として ECP (蛋白量: 850 μ g/ml), カラムクロマトの各溶出分画, あるいは Sm-hPAF (蛋白量: 30 μ g/ml) を 20 μ l 加え, その凝集パターンを観察した。陽性対照としての凝集因子には, Adenosine 5'-diphosphate (1 mM) (ADP, Sigma Chemical Co.), あるいはコラーゲン (30 μ g/ml) (二光バイオサイエンス) 溶液を用い, Sm-hPAF の凝集活性は ADP ないしはコラーゲンの透過度 (light transmission) で Sm-hPAF の透過度を除し, これに 100% を乗じた値 (%) で示した。実験には PRP を ACD 溶液 [2.2% (wt/vol) sodium citrate, 0.8% (wt/vol) citric acid, 2.2% (wt/vol) glucose] で洗浄後, ACD-0.01 M phosphate buffered saline (PBS, pH 7.4) に浮遊した洗浄血小板溶液も使用した。洗浄血小板溶液を用いた際には凝集因子として上記以外にヒツジ抗ヒト IgG 抗体 (Tago Inc., Burlingame, CA.) も用いた。

9) Prostaglandine E₂ (PGE₂) の測定

血小板が凝集, 活性化することにより放出される PGE₂ が radioimmunoassay により測定された。血小板凝集反応用セルに健常成人 YT の PRP (YT-PRP) 500 μ l を入れ, これに種々の濃度の Sm-hPAF ないしはコラーゲン 50 μ l を添加し, 37°C で攪拌しながら 10 分間保温した後, 全量を試験管に移し, さらに 4 倍量の純アルコールを加え, 軽く振った後, 遠心 (10,000×g, 30 分間) し, その上清中に含まれる PGE₂ を [¹²⁵I] assay system キット (Amersham, Buckinghamshire, UK) を用いて, 添付されたマニュアルに従って測定した。対照には Sm-hPAF ないしはコラーゲンの代わりに生理食塩水を添加した。

10) 血小板凝集能抑制試験

Sm-hPAF を 40~60°C, 5~20 分間加熱し, 凝集能に及ぼす影響を検討した。また, 凝集反応の

系に Prostaglandine E₁ (PGE₁, フナコシ, 東京) を 0.01~10 μ M ないしは GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser, ペプチド研究所, 大阪) を 100~5,000 μ M 加え, これら薬剤の凝集反応における影響も検討した。結果は薬剤を添加した時としない時の凝集とを比較し, その抑制を % として示した。

11) 病理組織学的検討

白色ウサギ (雌, 体重 2.5 kg, 三協ラボサービス, 東京) の背部を剃毛した後, 同部位に Sm-hPAF (30 μ g/ml) を 0.1 ml 皮内注射した。一定時間 (3, 6, 24, 48 時間) 後にウサギを心臓穿刺により屠殺し, 注射部位の皮膚組織片を採取して, これを型のごとく 10% ホルマリン液で固定後, Hematoxylin-Eosin (HE) 染色を施し, 光顕的に観察した。

結 果

1. Sm-hPAF の分離

S. mitis (Nm-56 株) の菌体代謝物質である ECP 中に存在する Sm-hPAF の精製を行った。すなわち, 培養上清の濃縮液 20 ml を DEAE-Sephrose CL-6 B カラムに添加し, Sm-hPAF の溶出を試みたところ, NaCl を含まない 10 mM PB での溶出分画, すなわち素通り分画に Sm-hPAF 活性が認められた (Fig. 1)。この分画を DE-F 1 と仮称した。ついで DE-F 1 分画をプールし, これを Hydroxy-apatite カラムに添加し, Sm-hPAF の溶出を行った。その結果, 3 つのピークが出現し, 最も高いピークを示した分画に凝集活性が認められ, この活性分画を HY-F 2 と仮称した (Fig. 2)。さらにプールした HY-E 2 を Superdex 75 のカラムに添加し, 溶出を試みたところ, 2 番目のピーク全体に血小板凝集活性が認められた (Fig. 3, SupD-F 2) が, 特にその前半部分 (Fig. 3, SupD-F 2-1) に強い凝集活性 (透過度: 65~75%) が認められ, 後半部分の活性 (透過度: 40~50%) は弱かった。

このようにして各カラムクロマトグラフィーにより得られた血小板凝集活性化分画を SDS-PAGE にかけて, その染色パターンを観察した (Fig. 4)。Fig. 4 の lane 1 は粗分画である ECP

Fig. 1 DEAE-Sephacrose CL-6 B chromatography of extracellular products (ECP) of *S. mitis* strain Nm-65.

The column (2.5×20 cm) was developed with 10 mM phosphate buffer, pH 6.8, with a NaCl gradient of 0–0.5 M. Presence of human platelet aggregation activity (—) of individual fractions was analyzed with an aggregometer.

Fig. 2 Elution profile of DE-F1 fraction on hydroxyapatite column chromatography.

The column ($\phi 1.0 \times 10$ cm) was developed by a liner gradient of 10 mM — 400 mM, pH 6.8. Presence of human platelet aggregation activity (—) of each fraction was examined using an aggregometer.

Fig. 3 Superdex 75 chromatography of HY-F2 obtained by hydroxyapatite column chromatography

The column (ϕ 1.6 $\times$ 100 cm) was developed with 20 mM PB (pH 7.2) —50 mM NaCl, and fractions were analyzed for the human platelet aggregation activity (—, SupD-F2) with an aggregometer. The platelet aggregation activity of SupD-F2-1 (—) fraction was much stronger than that of other fractions in SupD-F2.

の泳動パターンを示し、多数のバンドが観察された。Lane 2 は DEAE-Sepharose CL-6 B のカラムクロマトにより得られた DE-F 1 の泳動パターンを、lane 3 は DE-F 1 を Hydroxyapatite カラムにかけ、得られた HY-F 2 分画の泳動パターンを示している。Lane 2 では分子量約 66 kDa に相当するところに major なバンドが認められるとともに 25 kDa から 31 kDa にかけて数本の明確なバンドが観察された。また、minor なバンドではあるが高分子物質の存在も認められた。Lane 3 ではまだこの高分子物質が認められるが、25 kDa-31 kDa にかけての比較的低分子の物質の存在は観

Fig. 4 SDS-PAGE patterns of ECP and fraction containing the human platelet aggregation activity eluted from each column chromatography

Lane 1: ECP, lane 2: DE-F 1, lane 3: HY-F 2, lane 4: SupD-F2-1 (Sm-hPAF) lane 5: and arrows: mol wt. maker

察されず、代わって約 55 kDa に相当するバンドが明確に認められるようになった。しかし、lane 4 に示したように、この HY-F 2 を Superdex 75 でゲルろ過することにより得られた強い血小板凝集活性を有する SupD-F 2-1 の泳動パターンでは 66 kDa に相当するところに一本の明確なバンドが認められ、高分子物質や 55 kDa に相当するバンドは観察されなかった。この 66 kDa の分子量を持つ SupD-F 2-1 を *S. mitis* 由来ヒト血小板凝集因子、*S. mitis*-derived human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) と名づけた。精製した Sm-hPAF の回収率は約 0.8% であった。なお、図には示していないが、55 kDa に相当する物質は、Superdex 75 での溶出パターンの上から、2 番目のピークの後半部分に 66 kDa の物質とともに溶出され、この画分にも血小板凝集活性は認められたが、その活性は 55 kDa の物質が検出されなかった SupD-F 2-1 のそれより弱いことから、この 55 kDa の物質が凝集因子として働いているとは考え難く、後半部分に認められる凝集活性は 66

kDa の物質に基づくものと思われた。なお、高分子物質は最初に出現する比較的低いピークを示す分画に溶出されていた。

2. Sm-hPAF の性状

このように最終的にゲルろ過により精製された、分子量約 66 kDa の物質、すなわち Sm-hPAF の特異吸光度を検討すると、278 nm に最大吸収を示し、等電点 (pI) は約 8.5 であった。また、本物質を加水分解後、N-アセチル化し、ついで還元ピリジルアミノ化した後、HPLC により糖分析を

1 5 10
Asp-Glu-Gln-Gly-Asn-Arg-Pro-Val-Glu-Thr-
11 15
Glu-Asn-Ile-Ala-Arg-

Fig. 5 N-terminal sequence of the human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) purified from ECP of *S. mitis*, strain Nm-65. Automated Edman degradation was performed with a pulse liquid sequencer (ABI 477 A; Applied Biosystems).

Fig. 6 Dose-response curve of Sm-hPAF on human platelet aggregation. Aggregation of the reaction mixture of 200 µl of platelet rich plasma (PRP) and 20 µl (containing 3 µg, 1.5 µg, 1.0 µg and 0.5 µg of the protein, respectively) of Sm-hPAF was determined with an aggregometer; 1 mM ADP was used as a reference aggregation agent.

行ったところ、少なくとも galactose, mannose, fucose, rhamnose, xylose, ribose, glucose, *N*-acetylglucosamine, *N*-acetylgalactosamine などの糖ないしはアミノ酸は検出されなかった。

自動エドマン分解法により Sm-hPAF の N-アミノ酸配列(15 残基)を検討した。その結果を Fig. 5 に示した。また、この配列は、DE-F 1 分画を SDS-PAGE にかき、PVDF 膜に転写後、66 kDa に相当するバンドを切り出し、得られた物質のアミノ酸配列を検討した結果と同一であった。

精製 Sm-hPAF の YT-PRP に対する凝集反応パターンを ADP のそれと比較した (Fig. 6)。Sm-hPAF は濃度依存的に凝集活性を示し、30 $\mu\text{g/ml}$ (凝集反应用セルの中では 3 μg) での凝集は ADP (1 mM) とほとんど変わらなかった。これらの反応は反応開始後 10 分以内における観察であるが、さらに 15 分、20 分と時間の経過とともに 5 $\mu\text{g/ml}$ 、10 $\mu\text{g/ml}$ でも弱いながら凝集(15%~25%)が認められるようになった。なお、ECP が ADP、1 mM と同程度の反応を起こすには 850 mg/ml を必要とした。従って、Sm-hPAF は ECP と比較して、その活性は約 28 倍に上昇したことになる。

3. 血小板凝集能の抑制

血小板凝集能における Sm-hPAF の加熱による影響を検討した結果では、Table 1 に示したように 40°C、10 分間の処理では Sm-hPAF の血小板凝集活性はほとんど失活せず、また 45°C、5 分間でも活性はかなり残存していたが、45°C、10 分間では完全に失活した。

コラーゲンによる凝集能を抑制することが知られている PGE₁ と GRGDS が、同様に Sm-hPAF による凝集能も抑制するか否かを検討した。Table 2 に示すように、PGE₁ は 0.1 μM ~10 μM でコラーゲン凝集を 100%抑制したが、Sm-hPAF による凝集はほとんど抑制されず、10 μM ~100 μM の添加でも、6.5%程度の抑制しかみられなかった。一方、GRGDS はコラーゲン凝集を 100 μM で 82.5%、500 μM で 100%抑制したが、Sm-hPAF はこの濃度では抑制されず、1,000 μM で

Table 1 Effect of heating of Sm-hPAF on the human platelet aggregation

Heating °C	min	Aggregation response (%)
non-treated		100.0
40	5	100.0
40	10	95.2
45	5	88.7
45	10	0

Table 2 Effect of PGE₁ and GRGDS on the platelet aggregation induced by collagen and Sm-hPAF¹⁾

Inhibitors (μM)		Inhibition percent (%)	
		Collagen	Sm-hPAF
PGE ₁	10	100	6.5
	1	100	0
	0.1	100	0
	0.01	87.8	0
GRGDS	1,000	100	11.7
	500	100	0
	100	82.5	0

1) : See Materials and Methods.

Table 3 Release of PGE₂ from human platelets stimulated with Sm-hPAF and collagen

Sample ($\mu\text{g/ml}$)	PGE ₂ (pg/ml)
Sm-hPAF 30	16,500
15	10,400
6	4,600
Collagen 30	2,470
10	1,420
5	574
Control —	48

PGE₂ released from platelets stimulating with Sm-hPAF was measured by RIA according to the Amersham Instruction Manual. The reaction mixture consisting 500 μl of a healthy adult YT-PRP and 50 μl of various concentrations of Sm-hPAF or collagen was incubated at 37°C for 10 min. The reaction mixture was transferred to the tube and 4 volume of alcohol (100%) was added to the reaction mixture. After centrifugation, PGE₂ in the supernatant fluid was measured.

11.7%程度しか抑制されなかった。

4. PGE₂の放出

YT-PRP に種々の濃度の Sm-hPAF を添加し、

血小板の活性化にともなう放出されるメディエーターの一つである PGE_2 を測定した (Table 3). PGE_2 は Sm-hPAF の濃度に依存して放出され、コラーゲンよりもややその活性は強いように思われた。

5. 病理組織学的検討

Sm-hPAF をウサギ皮内に投与し、その組織変化を経時的に観察すると (Fig. 7A, B, C), 投与

後3時間では毛細血管内腔に多核白血球や赤血球の凝集と一部血管外への浸出が見られ、血管周囲はやや浮腫状であった (Fig. 7A). 6時間後では拡張した毛細血管の内腔には血漿成分の鬱滞と多核白血球や赤血球が血管壁に膠着し、多核白血球の壁外への浸出が観察され、また血管内皮細胞の膨化が認められた (Fig. 7B). 24時間後では拡張した細動脈の内腔に赤血球の凝集、内皮細胞の膨化とともに、壁細胞の融解、消失が見られ、血管外間質には少数の多核白血球の浸潤が認められた (Fig. 7C). そして48時間後には血管周囲間質にリンパ球や形質細胞の浸潤と線維芽細胞の増生が認められた。

6. ECP 並びに Sm-hPAF に対するヒト PRP の反応性

このような性状をもつ Sm-hPAF を用いて26名の健常ヒト PRP との反応性について検討した。その結果、Table 4 に示されるように成人26名のうち8名 (30.7%) のみが粗凝集因子である ECP と反応し、18名 (69.2%) には反応が見られなかった。しかし、精製した凝集因子である Sm-hPAF との反応では20名 (76.9%) に反応がみら

Fig. 7 Histological changes in rabbit skin 3 to 24h after intradermal injection of a Sm-hPAF.

A: Note cellular infiltration in the intravascular space as well as the perivascular space, and the agglutination of blood cells. The tissue specimens were obtained 3h after injection (H and E stain; $\times 280$).
B: Note dilatation of the capillaries and cellular infiltration in the perivascular space, composed mainly of neutrophils, exudation of plasma components, neutrophils and red cells in the intravascular space. The tissue specimens were obtained 6 h after injection (H and E stain; $\times 280$).
C: Note dilatation of the capillaries with the agglutination of red cells in the intravascular space and degeneration of vascular walls. Hyperplasia of the endothelial cells was also noted. The tissue specimens were obtained 24 h after injection. (H and E stain; $\times 280$).

Table 4 Human adult platelet aggregation by ECP and Sm-hPAF

Donor	Sex	Age	Aggregation response (%) ¹⁾	
			ECP	Sm-hPAF
	m	35	75.5	91.9
	f	36	69.6	82.3
	m	27	76.5	82.4
	m	30	0	80.8
	m	27	0	75.9
	m	32	0	34.4
	m	37	0	90.7
	m	26	74.2	98.5
	m	41	0	0
	m	56	0	68.6
	f	47	0	0
	f	52	85.0	89.0
	m	27	0	0
	m	32	84.8	100
	f	38	0	85.0
	f	21	0	74.0
	m	21	0	0
	f	27	0	71.3
	f	31	0	0
	m	32	65.8	91.1
	m	26	0	83.8
	f	23	0	90.0
	f	23	0	0
	m	48	53.5	67.4
	f	22	0	61.4
	f	28	0	32.0
Total			8/26 (30.7%)	20/26 (76.9%)

1) : The aggregation response (a light transmission) of ADP was calculated as 100%, and the aggregation response of each donor was expressed in comparable with that of ADP.

れた。以上から ECP と Sm-hPAF のいずれとも反応しなかった。PRP は 26 名中 6 名、すなわち 23.0% であった。ECP と Sm-hPAF のいずれとも反応しなかったヒト PRP (MM-PRP) から洗浄血小板溶液を作製し、これに ECP または Sm-hPAF を添加すると凝集が観察された (Table 5)。また、この MM-PRP から血漿を採取し、これを ECP と Sm-hPAF に反応した YT-PRP に添加すると、濃度依存的に YT-PRP の凝集反応が阻害され、かつこの血漿を透析しても阻害効果は低下しなかった (Table 6)。さらに YT 由来の洗浄血小板溶液は ECP とは反応するが、抗ヒト IgG 抗体

Table 5 Aggregation response of washed platelets

Donor (MM) ¹⁾	Aggregation response (%) ³⁾			
	ADP	Collagen	ECP	Sm-hPAF
PRP	82	85	0	0
Washed platelets ²⁾	0	0	60	63

1) : A donor MM-PRP did not react with both ECP and Sm-hPRP, 2) : Washed platelets were suspended in ACD-0.01 M PBS, pH 7.4, 3) : % of light transmission.

Table 6 Effect of donor MM-plasma on ECP-induced YT-platelet aggregation

Volume (%) of MM-plasma ¹⁾ added in YT-PRP ²⁾	Inhibitory effect (%) of YT-PRP aggregation
1.0	25.6
5.0	46.6
7.5	90.7
10.0	100.0
10.0 ³⁾	100.0

1) : MM-PRP did not react with ECP of *S. mitis*, 2) : YT-PRP was reacted with ECP of *S. mitis*, 3) : MM-plasma was dialyzed against 0.01 M PBS at 4°C over night.

Table 7 Aggregation response of washed platelets¹⁾

Platelets	Aggregation response (%) ²⁾			
	ADP	ECP	Goat anti-human IgG	Goat IgG
Washed platelets	0	62	2	0

1) : Washed platelet were suspended in ACD-0.01 M PBS, pH 7.4, 2) : % of light transmission, Twenty μ l of ADP (1 mM), ECP (800 μ g/ml), goat anti human IgG (1 mg/ml) and goat IgG (1 mg/ml), respectively was added to the washed platelets (YT) suspended in ACD-0.01 M PBS., and aggregation was measured by aggregometer.

は反応しなかった (Table 7)。

考 察

川崎病の原因を明らかにしていく研究の一環として、川崎病患者の歯面や咽頭などより細菌の分離、同定を試み、特に緑色レンサ球菌群を中心に、これら菌群の代謝物質の生物学的、免疫学的性状についての検討を行ってきたが¹⁻⁴⁾、この研

究の過程で分離された *S. mitis* ないしは *S. oralis* の一部の菌株の代謝物質中にヒト血小板を凝集する因子の存在することが明らかにされた¹⁾。

一般に緑色レンサ球菌群は感染性心内膜炎 (infective endocarditis) の起炎菌として知られ, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. oralis*, あるいは *S. salivarius* などが病巣局所や流血中から分離されるが^{10,11)}, これら緑色レンサ球菌代謝物質の生物活性についての研究は必ずしも多くはない。感染性心内膜炎の患者から分離された *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. mutans*, *S. salivarius* や *S. MG intermedius* の培養上清中にプロテアーゼ (protease) が存在すること^{12,13)}, またこの心内膜炎患者から分離された *S. sanguis* によってノイラミニターゼ (neuraminidase) が産生されることが報告され¹⁴⁾, さらに *S. mitis*, *S. sanguis*, *S. oralis* の代謝物質として IgA 1 分解酵素の存在が指摘された¹⁵⁾。一方, 感染性心内膜炎の際に血小板やフィブリンからなる疣贅 (verruca) が観察されることから, 上記した緑色レンサ球菌の全菌体がヒトの血小板を凝集, 活性化するか否かが検討された。特に Herzberg らのグループは *S. sanguis* の全菌体とヒト血小板との反応性について検討し, 血小板凝集, 活性化因子が菌体表層に存在し, I 型, III 型コラーゲンと免疫学的に交叉反応する蛋白質で, 血小板と相互反応する一次構造としてのアミノ酸配列は Pro-Gly-Glu-Gln-Gly-Pro-Lys であることを明らかにし, 血小板と反応するコラーゲンドメインの構造的モチーフと相同性のあることを明らかにした¹⁶⁻¹⁹⁾。Sm-hPAF の一次構造としての全アミノ酸配列は明らかでないが, コラーゲン凝集を阻害する薬剤では Sm-hPAF による凝集は阻害されないことから, その血小板凝集反応機構にはコラーゲンと相違のあることが推定され, また健康成人 (26 名) の PRP は全例がコラーゲンと反応したが, Sm-hPAF とは反応しない PRP が存在しており, このことは Sm-hPAF が菌体表層に存在するコラーゲン様蛋白質とは異なるものであることを示唆している。そしてこれら緑色レンサ球菌の全菌体による血小板凝集反応には, 血漿成分の存在が必要であることが指摘されている

が^{20,21)}, Sullam ら²²⁾は *S. sanguis* や *S. salivarius* の全菌体による血小板凝集反応には IgG 分画の存在が必要であることを報告した。しかし, Sm-hPAF による血小板凝集反応は, ヒト YT の PRP から血漿を除去し, ACD-PBS 溶液に浮遊した洗浄血小板でも起こるので, この凝集反応に血漿成分が積極的に参加しているとは思われず, 従って菌体表層に存在する凝集因子と Sm-hPAF とは異なる物質であることが強く示唆される。

グラム陽性球菌の菌体や代謝物質に一般的に認められる糖ないしは多糖体は Sm-hPAF からは検出されず 278 nm に特異吸光度をもち, pI = 8.5, 分子量約 66 kDa の易熱性の蛋白質と考えられる。また, N-末端アミノ酸残基の配列の上で 50%以上の相同性を持つ既知の蛋白質は知られていない。従って, この *S. mitis*, Nm-65 株の培養上清から得られた血小板凝集因子である Sm-hPAF は従来報告のない新しい血小板凝集因子と思われ, 現在, 遺伝子クローニングからその塩基配列の検討と Sm-hPAF の酵素処理によって得られたペプチドフラグメントの各 N-末端アミノ酸配列の検討を併せて行っており, 一次構造のレベルで全アミノ酸配列決定のための検索を行っている。

ヒト YT の PRP に Sm-hPAF を添加することにより, コラーゲン添加の場合と同様に, PGE₂ が血小板から放出されており, このことは Sm-hPAF により血小板が凝集, 活性化され, 血小板から各種のメディエーターが放出されていることを示していると思われる。一方, 細胞内 cyclic AMP 濃度を認めることにより, コラーゲン凝集を抑制することが知られている PGE₂²³⁾ や血小板膜の GPIIb/GPIIIa 複合体へのフィブリノーゲンの結合を阻害することにより, コラーゲン凝集を抑制する GRGDS²⁴⁻²⁶⁾ では, Sm-hPAF による凝集は殆ど抑制されていないことから, Sm-hPAF による凝集にはコラーゲン凝集とは異なった機構が介在しているものと思われるが, その反応機構の詳細は明らかではない。

Sm-hPAF のウサギ皮内投与によって起こる組織変化を経時的に検討すると, 投与後比較的早い

時期では、間質の浮腫、拡張した毛細血管内腔における血漿成分のうっ滞、多核白血球の浸潤ないしは赤血球との膠着像などとともに多核白血球の壁外への浸潤を認め、また血管内皮細胞の膨化も観察された。時間の経過とともに拡張した血管内腔に血球の凝集、内皮細胞の膨化、壁細胞の融解、消失も観察された。このような病変は必ずしも強い組織変化とは思われないが、明らかに血管炎の所見を示しているものと思われる。この病変の成立に血小板の活性化が如何に関わっているかは明らかでないが、電顕レベルでの観察からこれを同定することは可能であろう。

YT-PRP から血漿成分を free にした洗浄血小板溶液が ECP と反応したことは、この凝集反応の成立が Sm-hPAF と、その対応する抗体との反応に基づくものでないことを示していよう。また、YT から得た血小板は抗ヒト IgG 抗体とも反応しなかったことは、血小板膜上にも抗 Sm-hPAF 抗体が結合していなかったことを示唆しているように思われる (Table 7)。

一方、26 名の健常ヒト PRP の ECP ないしは Sm-hPAF に対する反応については、Table 1 に示したように、ECP とは 8 名の PRP が反応し (30.7%)、18 名の PRP が反応しなかった (69.2%)。しかし、精製した凝集因子である Sm-hPAF を用いることにより 20 名の PRP が反応し (76.9%)、ECP と Sm-hPAF のいずれとも反応しなかった PRP は 6 名、23% であった。この反応の陽性頻度は凝集因子を精製することにより上がるが、それでもなお反応のみられない PRP が存在したことから、この凝集反応の阻害機構についての検討が行われた。ECP と Sm-hPAF のいずれとも反応しなかった MM-PRP から血漿成分を free にした洗浄血小板溶液を作成し、これに ECP または Sm-hPAF を添加すると凝集が起こり (Table 5)、また MM-PRP から得た血漿を、ECP と Sm-hPAF とに反応した YT-PRP に添加すると、濃度依存的に YT-PRP の凝集反応が阻害された (Table 6) ことから、MM の血漿中に、この反応を阻害する因子が含まれていること、そしてこの因子は透析膜を通過しえない分子量 10 kDa

以上の物質と associate しているように思われるが、Sm-hPAF に対する抗体が阻害因子として働くか否かは明らかでない。極く最近、留目ら²⁷⁾はこの阻害因子は γ -グロブリン分画には認められず、電気泳動的に α から β -グロブリンにかけての易動度をもつ物質と associate して存在していることを示唆している。

このように、ヒト血漿中にかかる凝集反応を阻害する因子を有するヒトと、そうでないヒトが存在することは極めて興味深く、その阻害因子の“物”としての同定と、その定量法を開発することが必要であろう。

結 論

S. mitis, N-65 株を合成培地で培養し、その培養上清からヒト血小板凝集因子の精製を試み、以下のごとき結果を得た。

1) 培養上清を出発材料にして、DEAE-Sephrose CL-6 B, Hydroxyapatite, Superdex 75 の各種クロマトグラフィーにより精製を試みたところ、SDS-PAGE で分子量約 66 kDa に相当するところに 1 本のバンドを示す標品が得られ、この標品に強い血小板凝集反応が認められたことから、これを *S. mitis* derived-human platelet aggregation factor (Sm-hPAF) と名付けた。

2) Sm-hPAF の特異吸光度は 278 nm、等電点 8.5 であり、糖は検出されなかった。

3) Sm-hPAF による血小板凝集反応は、Sm-hPAF を 45°C 10 分間加熱することにより、その凝集活性は失活した。

4) Sm-hPAF の N-末端アミノ酸 (15 残基) 配列は^H-Asp-Glu-Gln-Gly-Asn-Arg-Pro-Val-Glu-Thr-Glu-Asn-Ile-Ala-Arg であった。

5) Sm-hPAF は血小板と反応することにより、濃度依存的に血小板から PGE₂ が放出された。

6) Sm-hPAF による血小板凝集反応はコラーゲン凝集とは異なり、PGE₁ ならびに GRGDS の添加により阻害されなかった。

7) Sm-hPAF のウサギ皮内注射によって起こる組織変化を観察すると、注射 2～6 時間後では間質の浮腫、毛細血管の拡張、血管外への多核白

血球の浸潤,あるいは内皮細胞の膨化などが認められ,時間の経過とともに拡張した血管内腔に血球の凝集や血管壁細胞の融解,消失などが観察された。

8) ヒト PRP を用いた Sm-hPAF による凝集反応には免疫学的機序が関与しているとは思われなかった。また,この反応を起こす PRP と起こさない PRP が存在したが,反応が起きないのは,その血漿中に反応を阻害する因子が存在することに基づくであろうことが示唆された。

本研究の遂行に当たり,ご協力頂いた本学老人病研究所免疫部門大國寿士教授,留目優子講師に深甚なる謝意を表するとともに病理学第2教室教室員各位のご支援に感謝致します。

なお,本論文の要旨は第67回(1994年3月29日),第68回(1995年3月26日)日本細菌学会総会にて発表した。

文 献

- Ohkuni, H., Todome, Y., Mizuse, M., Ohtani, N., Suzuki, H., Igarashi, H., Hashimoto, Y., Ezaki, T., Harada, K., Imada, Y., Ohkawa, S., and Kotani, S.: Biologically active extracellular products of oral viridans streptococci and the aetiology of Kawasaki disease. *J. Med. Microbiol.*, **39**, 352~362, 1993.
- Takada, H., Kawabata, Y., Tamura, M., Matsushita, K., Igarashi, H., Ohkuni, H., Todome, Y., Uchiyama, T., and Kotani, S.: Cytokine induction by extracellular products of oral viridans group streptococci. *Infect. Immun.*, **61**, 5252~5260, 1993.
- Todome, Y., Ohkuni, H., Mizuse, M., Okibayashi, F., Ohtani, N., Suzuki, H., Song, C., Igarashi, H., Harada, K., Sakurai, S., and Kotani, S.: Superantigenic exotoxin production by isolates of *Streptococcus aureus* from the Kawasaki syndrome patients and age-matched control children. *J. Med. Microbiol.*, **42**, 91~95, 1995.
- Matsushita, K., Fujimaki, W., Kato H., Uchiyama, T., Igarashi, H., Ohkuni, H., Nagaoka, S., Kawagoe, M., Kotani, S., and Takada, H.: Immunopathological activities of extracellular products of *Streptococcus mitis*, particularly a superantigenic fraction. *Infect. Immun.*, **63**, 785~793, 1995.
- van de Rijn, I., and Kessler, R.E.: Growth characteristics of group A streptococci in a new chemically defined medium. *Infect. Immun.*, **27**, 444~448, 1980.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J.: Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, **193**, 265~275, 1951.
- Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680~685, 1970.
- Matsudaira, P.: Sequence from picomole quantities of proteins electroblotted onto polyvinylidene difluoride membranes. *J. Biol. Chem.*, **262**, 10035~10038, 1987.
- Hase, S., Hatanaka, K., and Shimizu, H.: Improved method for the component sugar analysis of glycoprotein by pyridylamino sugars purified with immobilized boronic acid. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**, 1676~1677, 1992.
- Bayliss, R., Clarke, C., and Oaklen, C.M.: The microbiology and pathogenesis of infective endocarditis. *Br. Heart. J.*, **50**, 513~519, 1983.
- Knox, K.W., and Hunter, N.: The role of oral bacteria in the pathogenesis of infective endocarditis. *Aust. Dent. J.*, **36**, 286~292, 1991.
- Straus, D.C., Mattingly, S.J., and Milligan, T.W.: Production of extracellular material by streptococci associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.*, **17**, 148~156, 1977.
- Straus, D.C.: Protease production by *Streptococcus sanguis* associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.*, **38**, 1037~1045, 1982.
- Straus, D.C., and Portnoy-Duran, C.: Neuraminidase production by *Streptococcus sanguis* strain associated with subacute bacterial endocarditis. *Infect. Immun.*, **41**, 507~515, 1983.
- Reinholdt, J., Tomana, M., Mortensen, S.B., and Kilian, M.: Molecular aspect of immunoglobulin A1 degradation by oral streptococci. *Infect. Immun.*, **58**, 1986~1994, 1990.
- Herzberg, M.C., MacFarland, G.D., and Delzer, P. R.: *Streptococcus sanguis* interactions with human platelets. In: Mergenhagen, S.E., and Rosan, B. (eds) Molecular basis of oral microbial adhesion. p. 53~60, American Society for Microbiology, Washington, D.C., 1985.
- Erickson, P.R., and Herzberg, M.C.: A collagen-like immunodeterminant on the surface of *Streptococcus sanguis* induced platelet aggregation. *J. Immunol.*, **138**, 2360~2366, 1987.
- Erickson, P.R., Herzberg, M.C., and Tireney, G.: Cross-reactive immunodeterminants on *Streptococcus sanguis* and collagen. Predicting a structural motif of platelet-interactive domains. *J. Biol. Chem.*, **267**, 10018~10023, 1992.

- 19) Erickson, P.R., and Herzberg, M.C.: The *Streptococcus sanguis* platelet aggregation-associated protein. Identification and characterization of the minimal platelet-interactive domain. J. Biol. Chem., **268**, 1646~1649, 1993.
- 20) Herzberg, M.C., Brintzenhofe, K.L., and Clawson, C. C.: Affregation of human platelets and adhesion of *Streptococcus sanguis*. Infect. Immun., **39**, 1457~1469, 1983.
- 21) Sullam, P.M., Valone, F.H., and Millis, J.: Mechanisms of platelet aggregation by viridans group streptococci. Infect. Immun., **55**, 1743~1750, 1987.
- 22) Sullam, P.M., Jarvis, G.A., and Valone, F.H.: Role of Immunoglobulin G in platelet aggregation by viridans group streptococci. Infect. Immun., **56**, 2907~2911, 1988.
- 23) Haslam, R.J., Davidson, M.M., Fox, J.E., and Lynham, J.A.: Cyclic nucleotides in platelet function. Thromb. Haemost., **40**, 232~249, 1978.
- 24) Plow, E.F., Pierschbacher, M.D., Rouslahti, E., Marguerie, G., and Ginsberg, M.H.: The effect of Arg-Gly-Asp containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. Proc. Natl. Sci. USA, **82**, 8057~8061, 1985.
- 25) Haverstick, D.M., Cowan, J.F., Yamada, K.M., and Santro, S.A.: Inhibition of Inhibition of platelet adhesion to fibrinectin, fibrinogen and von Willebrand factor substrates by a synthetic tetrapeptide derived from the cell-binding domain of fibrinectin. Blood, **66**, 946~952, 1985.
- 26) Farrell, D.H., Thiagarajan, P., Chung, D.W., and Davie, E.W.: Role of fibrinogen α and γ chain sites in platelet aggregation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **89**, 10729~10732, 1992.
- 27) 留目優子, 大國寿士, 沖林文規, 渡邊ユキノ, 長谷川幸雄: *Streptococcus mitis* の産生する血小板凝集因子の作用を阻害する血漿成分についての検討. 日細誌(抄録), **51**, 137, 1996.

(受付: 1996年7月15日)