

# 緑色レンサ球菌群の産生するヒト血小板凝集因子について—*S.mitis*の代謝物質中に存在する凝集因子— (分担研究：川崎病のサーベイランスに関する研究)

大国 寿士、留目 優子、水瀬 学

要約：川崎病患児から分離された*S.mitis* (Nm-65株)の代謝産物にヒト血小板凝集因子が存在することを明らかにした。健常成人25例中8例、健常小児10例中4例の血小板が本凝集因子により反応したが、川崎病患児並びに同既応児6例中5例の血小板がこの因子と反応した。本因子による血小板凝集には個体差のあることが確認された。川崎病患児、同既応児の血小板が高頻度に反応することから、本症の発症に宿主側要因を想定する時、この反応はその要因解明の1つの糸口になるかも知れない。

見出し語：川崎病、*Streptococcus mitis*、菌体代謝物質、血小板凝集

私共はこれまでに川崎病患児並びに他の熱性疾患患児の咽頭、歯面より得た細菌群のうち、特に緑色レンサ球菌群を中心として、菌の分離、同定を試み、これらの菌の産生する代謝物質の生物学的性状につき検討してきた。その研究の過程で川崎病や対照患児より分離、同定(Type strainとのDNA-DNA hybridizationによる)された*S.mitis*の一部並びに現在なお菌種の同定が不能な緑色レンサ球菌(unknown-strain)の一部の代謝物質中にヒト(YT)の血小板を凝集する活性因子が存在することを明かにしてきた。

今回は川崎病患児、対照の健常小児並びに健常成人から得た血小板の本凝集因子に対する反応性につき検討することを目的とした。

[方法] 1) 川崎病患児の歯面より分離された*S.mitis*, Nm-65株を合成培地で培養し、その培養上清(extracellular products, ECP)を100倍に濃縮(蛋白量:0.8mg/ml)したものを血小板凝集因子として用いた。

2) ヒト血小板は川崎病患児3名(発症3~4日目、10カ月~1才9カ月)、過去に川崎病の既応のある小児3名(11~12才)、川崎病の既応のない健常小児10名(1~13才)、それに健常成人25名(21~56才)の末梢血より、型の如く血小板濃厚浮遊液(platelet rich plasma, PRP)を得た。

3) 健常成人(YT)の血小板はACD溶液(0.8% w/v citric acid-2.2% w/v sodium citrate-2.2% w/v glucose)で十分に洗浄した後、ACD-0.01M phosphate buffered saline(PBS, pH8.5)に浮遊させ、

血小板凝集反応の実験に供した。

4) PRPないしは洗浄血小板浮遊液200 $\mu$ lにECP 20 $\mu$ lを添加し、Aggregometer (Nikko Bioscience)にて、その凝集を観察し、透過度 (light transmission)の%として凝集活性を表示した。なお標準血小板凝集因子としてAdenosine 5'-diphosphate (ADP, SigmaChemical Co.)(10<sup>-3</sup>M)を用いた。またヒツジ抗ヒトIgG抗体

(Tago, Inc., Burlingame, Ca) 正常ヒツジIgG (Chemical International Inc., Temecula, Ca)による凝集活性についても検討された。

[結果] Fig.1に示すようにdonor YTのPRPはECPと反応し、その血小板凝集は70%の透過度を示し、ADPとはほぼ同程度に凝集する。このYTの洗浄血小板は血漿成分freeの状態でもECPと反応 (Table 1)するが、抗ヒトIgG抗体とは反応しない。健常成人25例のPRPとECPとの反応を見ると8例のヒトのPRPがECPと反応し、17例のPRPは反応しない (Table 2)。一方、健常小児10例のうち4例のPRPがECPと反応したが、川崎病罹患患児3例 (T.M, R.F, N.O)並びに川崎病既応児3例 (K.T., N.O., T.H)、計6例のうち5例のPRPが反応した (Table 3)。

[考察] *S.mitis*(Nm-65株)由来の粗分画であるECP中にはヒト血小板を凝集する因子が存在し、この反応は血漿成分freeの状態でも起こることから、ECPとこれに対する抗体とによる反応を介しての凝集とは思われず、また抗ヒトIgG抗体とも反応しなかったことはこの凝集が血小板膜上に結合しているかも知れない抗体との反応によるものではないことを示唆している。それ故ECPと血小板との反応は、ECP中に含まれる血小板凝集因子と血小板との直接的な反応である可能性が高い。

この凝集因子と血小板との反応には個体差が存在することが示唆され、健常成人では25例中8例(32%)、健常小児では10例中4例(40%)の血小板

が反応するのに対し、川崎病罹患患児、川崎病既応児6例中1例を除いて他の5例(83%)が全て反応した。反応しなかった1例(川崎病既応者)が採血前に抗炎症剤等の薬剤を服用していたか否かの確認をしていないので、再検を必要とする。この1例を除けば川崎病患児ないしはその既応者の血小板はECPと高頻度に反応する傾向にあり、川崎病の発症に宿主側の要因を想定する時、この凝集因子に対する血小板レセプターないしは血漿中に存在するかも知れない、この反応を抑制する抑制因子の存在の有無という面から、その要因解明の1つの糸口が得られるかも知れない。現在私共は症例を増やしてさらに検討すると共にECPからの凝集因子の精製を試みている。

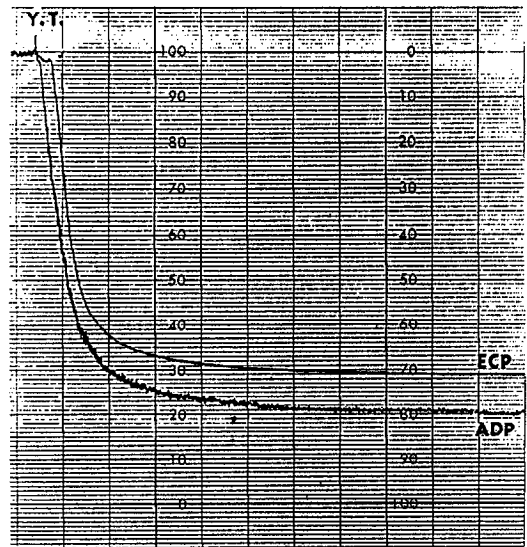


Fig.1

Table 1  
Aggregation of Washed Platelets

	ADP	ECP	aggregation response (%) <sup>#</sup> goat anti-human IgG	goat IgG
washed platelets	0	60	2	0

<sup>#</sup>% of light transmission

Table 2

Human Adult Platelet Aggregation by ECP of *S.mitis*

Donor	Sex	Age	Aggregation response (%) <sup>#</sup>	
			ECP	
H.S.	m	35	++	75.7
Y.M.	f	36	++	69.6
F.K.	m	40	-	0
N.H.	m	32	-	0
E.T.	f	27	++	75.7
K.T.	m	30	-	0
K.S.	m	29	-	0
T.H.	m	25	++	55.0
H.I.	m	27	-	0
A.S.	m	32	-	0
H.M.	m	37	-	0
E.N.	m	26	++	70.0
S.J.	m	41	-	0
H.O.	m	56	-	0
A.K.	f	47	-	0
Y.T.	f	52	++	90.0
M.M.	m	27	-	0
H.K.	m	32	++	84.8
S.E.	f	38	-	0
T.T.	f	21	-	0
Y.I.	m	21	-	0
M.O.	f	27	-	0
M.W.	f	31	-	0
T.N.	m	32	++	65.8
T.A.	m	26	-	0
Total			8/25 (32%)	

<sup>#</sup>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.

Table 3

Platelet Aggregation of Patients with Kawasaki Disease and Healthy Children

Donor	Sex	Age	Aggregation response (%)	
			ECP	
KD:				
K.T.	m	11		104.8
N.O.	f	12		0
T.H.	m	12		73.7
-----				
T.M.	m	1.9		79.5
R.F.	f	1		120.0
N.O.	m	0 (10M)		98.5
Total			5/6	
Cont:				
N.T.	m	4		74.3
T.M.	m	13		0
R.I.	m	4		78.2
N.O.	m	10		0
T.Y.	m	1		0
K.M.	m	1		0
H.S.	f	5		0
T.O.	m	9		76.6
N.T.	m	11		64.7
T.N.	m	8		0
Total			4/10	



**検索用テキスト** OCR(光学的文字認識)ソフト使用  
論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



要約:川崎病患児から分離された S.mitis(Nm-65 株)の代謝産物にヒト血小板凝集因子が存在することを明らかにした。健常成人 25 例中 8 例、健常小児 10 例中 4 例の血小板が本凝集因子により反応したが、川崎病患児並びに同既応児 6 例中 5 例の血小板がこの因子と反応した。本因子による血小板凝集には個体差のあることが確認された。川崎病患児、同既応児の血小板が高頻度に反応することから、本症の発症に宿主側要因を想定する時、この反応はその要因解明の 1 つの糸口になるかも知れない。