

博士（保健学）学位論文

新生児 B 群レンサ球菌感染症に対する防御免疫における
L-フィコリンと莢膜多糖体特異 IgG の協調作用

Synergy between L-ficolin and Capsular Polysaccharide-Specific IgG
in the Protective Immunity to Neonatal Infection with
Streptococcus agalactiae

2011年

指導教員 高橋 信二 教授

氏 名 藤 枝 弥 生 子
FUJIEDA, Mioko

女 子 栄 養 大 学

目次

要旨	1
緒言	4
材料と方法	8
結果	16
考察	22
謝辞	28
引用文献	29
図	36
表	44

要旨

Streptococcus agalactiae (B群レンサ球菌; GBS) は新生児の重篤な敗血症や髄膜炎の原因である。新生児 GBS 感染症は、生後数時間から 1 週間以内に発症する早発型疾患と、生後 1 週間以後から数ヵ月後までに発症する遅発型疾患に大別される。早発型疾患は主に産道で感染し、敗血症や呼吸窮迫症候群として発症するが、急性致死性で致死率は 10%に達する。一方、遅発型疾患の感染経路は不明なことが多いが、原因菌は血清型 III 型が大部分を占める。遅発型疾患では髄膜炎を発症することが多く、髄膜炎発症例では救命し得てもおおよそ半数に重篤な後遺症を残す。早発型疾患の発症率は分娩時の予防的化学療法によって、近年、明らかに低下してきているが、感染経路が不明な遅発型疾患では有効な予防法が確立しておらず、発症率は不変である。GBS に対する感染防御機構は、補体 C3b や抗体による感染菌のオプソニン化と、それにつづくマクロファージや好中球による貪食殺菌である。母体の GBS 莢膜多糖体に対する IgG (型特異 IgG) が胎盤を経て胎児に移行して GBS に汚染された新生児を保護する。それ故、米国においてワクチンの開発が進められ、現在、主要な血清型の破傷風トキソイド結合-莢膜多糖体ワクチンが臨床応用の前段階に達している。このように型特異 IgG は有効な感染防御抗体とされるが、一方、出産に際し GBS に汚染されながら発症しなかった児でも感染防御に有効とされる水準の型特異 IgG 抗体を欠いている場合が少なくない。このような児における感染防御機構を明らかにすることは、ワクチン接種に応答しない妊婦も少なからず存在する故に重要と考えられる。L-フィコリンが GBS

の莢膜多糖体に結合して補体レクチン経路による C3b 沈着を促すこと、さらに低濃度の型特異 IgG2 の共存下でオプソニン貪食殺菌が増強されることが明らかにされている。L-フィコリンによるレクチン経路の活性化は、母体からの受動免疫が不十分な新生児において、GBS 感染症に対する自然免疫を担う潜在的感染防御機構と考えられるが、これらの研究はいずれも成人血清や成人血清から分離精製した分子を用いて明らかにされたものである。本研究では、早産児および満期産児の臍帯血血清を用いて、より新生児の免疫環境に近い条件下で L-フィコリンと型特異 IgG 抗体が GBS のオプソニン貪食殺菌に果たす役割を解析することを試みた。

血清型 III 型と V 型株では、L-フィコリン結合によるレクチン経路活性化が C3b 沈着を促し、C3b と型特異 IgG が共にオプソニンとして機能して貪食殺菌を促進することが明らかとなった。これらの血清型では L-フィコリンと型特異 IgG に相加的または相乗的オプソニン貪食殺菌効果があると推定された。III 型 GBS 株による早発型疾患発症例と出産時に III 型 GBS 株汚染を受けたが発症しなかった対照例について臍帯血血清中 III 型特異 IgG 濃度を比較し、2~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度範囲では発症例と発症しなかった例が混在することが報告されている。この濃度範囲と、本研究で L-フィコリン濃度との間に相加的または相乗的オプソニン貪食殺菌効果があると推定された型特異 IgG 濃度範囲は近似している。この濃度範囲では L-フィコリン濃度が感染の有無を決定する因子となる可能性が示唆される。血清型 Ia 型, Ib 型, II 型株でも、C3b 沈着率と貪食殺菌率に有意な相関が認められたが、C3b

沈着率は L-フィコリン濃度や型特異 IgG 濃度のいずれとも相関せず、オプソニン貪食殺菌におけるこれらの因子の寄与の程度を明らかにすることはできなかった。但し、型特異 IgG 濃度が低値な条件下では、いずれの血清型でも L-フィコリンによるレクチン経路の活性化が C3b 沈着の主因であると考えられた。L-フィコリンが他の血清型株よりも極めて良く結合する血清型である VI 型と VIII 型株のオプソニン貪食殺菌率は、C3b 沈着率の高低に拘わらず、成人血清でオプソニン化した場合とほぼ同様の殺菌率を示した。

本研究は、より新生児の免疫環境に近い条件下で、型特異 IgG と L-フィコリンとの相互作用が GBS のオプソニン貪食殺菌に影響することを示した最初の報告である。特に遅発型疾患の大部分を占める III 型 GBS 株において、L-フィコリン濃度が低値であることがオプソニン貪食殺菌不全を招きうることを明らかにした点は重要である。今後、本研究の成果が、臍帯血血清 L-フィコリン濃度の測定や、危険因子を有する児への L-フィコリン製剤の投与など、臨床応用へと進展するためには、実際の発症例において原因株と L-フィコリン濃度や型特異 IgG 濃度との相互関係を明らかにする必要がある。

緒言

Streptococcus agalactiae (B群レンサ球菌; GBS) は腸管や腔に常在する細菌で, 新生児や乳児の重篤な敗血症や髄膜炎の最も一般的な原因である¹⁸⁾。GBSは莢膜多糖体の抗原性に基づいて9つの血清型(Ⅰa型, Ⅰb型, Ⅱ~Ⅷ型)に分類される。新生児GBS感染症は, 生後数時間から1週間以内に発症する早発型疾患と, 生後1週間以後から数ヵ月後までに発症する遅発型疾患に大別される¹⁹⁾。早発型疾患は主に産道において本菌を含む分泌物を吸引することで感染し, 敗血症や呼吸窮迫症候群として発症する。しばしば急性致死性で, 数時間で死に至ることが少なくなく, 致死率は10%に達する^{29,30)}。一方, 遅発型疾患の感染源や感染経路は不明なことが多いが, 原因菌は血清型Ⅲ型が大部分を占める。遅発型疾患では敗血症に加えて髄膜炎を発症することが多く, 急性致死性であるが致死率は2~6%と早発型疾患に比較して低い。しかし, 髄膜炎発症例では救命し得てもおおよそ50%に視覚消失, 聴覚消失, 認知障害などの後遺症を残す⁴⁾。早発型疾患の発症率は分娩時の予防的化学療法によって, 近年, 明らかに低下してきているが, 感染源や感染経路が不明な遅発型疾患では有効な予防法が確立しておらず, 発症率は不変である²⁹⁾。

GBSに対する主要な感染防御機構は, 他の化膿性細菌と同様で, 補体C3bやiC3bおよび抗体による感染菌のオプソニン化と, それにつづくマクロファージや好中球による貪食殺菌である。獲得免疫が未成熟の新生児に対して母体血中の移行抗体が受動免疫を付与する。GBS感染においても, 母体のGBS莢膜多糖体に対するIgG(型特異IgG)が胎盤を経て胎児に移行してGBSに汚染

された新生児を保護する⁵⁾。それ故、米国においてワクチンの開発が進められ、現在、主要な血清型（Ia型、Ib型、II型、III型、V型）の破傷風トキソイド結合-莢膜多糖体ワクチンが臨床応用の前段階に達している⁸⁾。III型ワクチンを接種した妊婦の型特異IgG濃度は有意に上昇（平均0.18 µg/mlから平均9.76 µg/ml）し、獲得されたIgGが胎児に移行した結果、新生児の血液中濃度は、出産2ヵ月後にも実験的にオプソニン貪食殺菌に有効とされる濃度（2.1 µg/ml）を維持する。したがって、ワクチン接種は、早発型疾患にも遅発型疾患にも効果が期待される。しかし、ワクチン接種者のワクチンへの応答（型特異IgG獲得率）は、Ib型において低く（80%）、他の型でも完全ではない（93~100%）。

このように型特異IgGは有効な感染防御抗体とされるが、一方、出産に際しGBSに汚染されながら発症しなかった児でも感染防御に有効とされる水準の型特異IgG抗体を欠いている場合が少なくない^{21,22)}。このような児における感染防御機構を明らかにすることは、前述の通りワクチン接種に応答しない妊婦も少なからず存在する故に重要と考えられる。

補体C3bによるGBSのオプソニン化に関与する潜在的分子を図1に示す。GBSの莢膜多糖体は補体第2経路の活性化を阻害することによってC3bとiC3bの細菌表層への沈着を減少させ、GBSをオプソニン貪食殺菌に対して抵抗性にする¹⁰⁾。型特異IgG濃度は好中球によるオプソニン貪食殺菌の効果^{9,11)}、および好中球走化分子補体C5aの産生³⁴⁾と相関する。しかしながら、型特異IgG抗体を欠失する血清であっても、補体経路活性化に必要とされるCa²⁺とMg²⁺の存在下で、有意なオプソニン貪食殺菌¹¹⁾

と C5a 産生³⁴⁾ を促す。この抗体非依存性の補体活性化は、Ca²⁺ が存在しない条件下で減少する故に、Ca²⁺ 依存性の C3 転換酵素 C4b2a の役割を示唆している。補体 C4 遺伝子ノックアウトマウスにおいて、GBS 感染症に対する感受性が高まるという結果もまた、この細菌に対する感染防御における C4b2a の役割を示唆している³⁶⁾。近年、Matsushita と Fujita によって、細菌表層の糖鎖を認識する分子によって開始される補体レクチン経路の存在が明らかにされた^{12,13,27)}。血清中には 3 種の糖鎖認識分子、マンノース結合レクチン (mannose-binding lectin; MBL)、L-フィコリン、H-フィコリンが存在する^{15,24,25,31)}。これらは Ca²⁺ の存在下で MBL 関連セリンプロテアーゼ (MBL-associated serine proteases; MASPs) と複合体を形成してレクチン経路活性化複合体となり、C4 と C2 を分解し C3 転換酵素 C4b2a を形成させる。Aoyagi ら²⁾ は、莢膜遺伝子欠失相同変異体を用いることで L-フィコリンが GBSIII 型株の莢膜多糖体に結合してレクチン経路による C3b 沈着を促すこと、さらに低濃度の型特異 IgG2 の共存下でオプソニン貪食殺菌が増強されることを明らかにした。次いで、L-フィコリンが血清型 III 型以外の血清型 (Ib 型, V 型, VI 型, VIII 型) 株に対しても、それらの莢膜多糖体の側鎖非還元末端に共通して存在する N-アセチルノイラミン酸 (NeuNAc) をリガンドとして結合してレクチン経路を活性化すること、また、Ia 型や II 型においては、L-フィコリンの細菌表層への結合性は低いものの、精製した莢膜多糖体には結合し得ることを明らかにした³⁾。

L-フィコリンによるレクチン経路の活性化は、母体からの受動

免疫が不十分な新生児において、GBS 感染症に対する自然免疫を担う潜在的感染防御機構と考えられるが、これらの研究はいずれも成人血清や成人血清から分離精製した分子を用いて明らかにされたものである。新生児の補体分子は成人に比較して量的にも機能的にも低い⁷⁾。また、L-フィコリンは GBS 感染症の危険因子の一つである早産児、および満期産の低体重児において有意に低値である³²⁾。そこで本研究では、早産児および満期産児の臍帯血血清を用いて、より新生児の免疫環境に近い条件下で L-フィコリンと型特異 IgG 抗体が GBS のオプソニン貪食殺菌に果たす役割を解析することを試みた。

材料と方法

供試菌株

供試菌株を表 1 に示す。供試菌株は既に莢膜多糖体の NeuNAc 含有量が明らかな血清型 Ia 型, Ib 型, II 型~VIII 型株の中から, NeuNAc 含有量が高値な株を 1 株ずつ選択した (表 1)。

供試血清および血液

供試臍帯血血清の内, 満期産児血清 (61 血清) は吉田産科婦人科医院において, 早産児血清 (35 血清) は西神戸医療センターにおいて採取した。また対照成人血清 (10 血清) と好中球を分離するための血液は, 女子栄養大学において教職員から採取した。血清採取は香川栄養学園実験研究に関する倫理審査委員会および西神戸医療センター医学倫理審査委員会の承認のもとに実施した。血清は使用するまで -80°C で保存した。

莢膜多糖体の精製

7 つの血清型 (Ia 型, Ib 型, II 型~VIII 型株) の莢膜多糖体の精製は, Chaffin らの方法⁶⁾を改良して行った。後期対数増殖期の培養液 (THB 培地, 4l) から遠心により回収した細胞をリン酸緩衝生理食塩水 (PBS, pH 7.4) で洗浄した後, 20 units/ml の mutanolysin (Sigma) を含む 50%スクロース-10 mM MgCl_2 -20 mM リン酸緩衝液 (pH 6.8) に懸濁し, 37°C で 36 時間, 振盪させながら細胞壁を消化した。プロトプラストを遠心とフィルターろ過により除去した後, 限外ろ過膜 PM30 (Millipore) を用いて濃縮した。この試料を 200 mM NaOH 中で, 37°C で 18 時間, 攪

拌しながら処理して B 群多糖体, リポテイコ酸, 核酸を分解した。試料に等量の 200 mM ホウ酸-200 mM KCl を加えた後, 無水酢酸を 10 mM になるように加えて室温で 1 時間放置して, 莢膜多糖体の NeuNAc を再アセチル化した。試料を遠心式限外ろ過器 Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮し, 50mM Tris-HCl (pH 7.4) に溶解した。この試料を Sephacryl S-300 HR (GE Healthcare) カラム (2.6 × 85 cm) によるゲルろ過と 50mM Tris-HCl (pH 8.6) で平衡化した DEAE-Sepharose CL6B (GE Healthcare) カラム (1.6 × 14 cm) による陰イオン交換クロマトグラフィーによって精製した。精製の各段階における試料中の B 群多糖体の存在はラテックス凝集反応²⁰⁾ (デンカ生研) によって確認した。また, 莢膜多糖体の確認と精製試料の濃度は莢膜多糖体の非還元末端に存在する NeuNAc をチオバルビツール酸法¹⁾ で測定した。

各血清型の莢膜多糖体特異 IgG の精製

7 つの血清型 (Ia 型, Ib 型, II 型 ~ VIII 型) の莢膜多糖体特異 IgG (型特異 IgG) はアフィニティークロマトグラフィーによって静注用ヒト IgG 製剤 (グロベニン-I, Takeda) から精製した。アフィニティー担体は, 精製莢膜多糖体を 100 mM NaOH 中でエポキシ活性化 Sepharose 6B (GE Healthcare) にカップリングして調製した。カップリング後の担体を 100 mM ホウ酸-100 mM KCl に懸濁し, 10 mM 無水酢酸を加えて室温で 1 時間放置して, 莢膜多糖体の NeuNAc を再アセチル化した。10 mM Tris-HCl-150 mM NaCl (TBS, pH7.4) で平衡化した莢膜多糖体-Sepharose 6B カラム (1.6 × 3.5 cm) に 250 ml の 20 mg/ml ヒト免疫グロブリン

ンを添加した。カラムを 1000 ml の同緩衝液で洗浄した後，型特異 IgG を 100 mM glycine-HCl-1.0 M NaCl (pH 2.7) を用いて 1/10 量の 1 M Tris-HCl (pH 9.0) を分注した試験管に溶出した。型特異 IgG 画分を遠心式限外ろ過器 Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮し，PBS に溶解した。精製型特異 IgG 濃度は BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) を用い測定した。

L-フィコリンの精製

L-フィコリンの精製は，ヒト血漿由来 Cohn fraction III (化学及び血清療法研究所から分与) から Matsushita らの方法²⁶⁾を改良して行った。Cohn fraction III を精製水 (200 g/2l) に懸濁し，不溶成分を遠心除去した。ポリエチレングリコール 4000 の 8% (w/v) 画分を 1 l の 20 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-10 mM CaCl₂ (pH7.4) に溶解した。この試料 (1回 250 ml) を同緩衝液で平衡化した GlcNAc-agarose (Sigma) カラム (1.6 x 8 cm) に添加した。カラムを洗浄した後，300 mM mannose-20 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-10 mM CaCl₂ (pH7.4) で MBL を溶出除去し，次いで 300 mM GlcNAc-20 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-10 mM CaCl₂ (pH7.4) を用いて L-フィコリンを分画溶出した。Ultra-15 (Millipore) を用いて濃縮した試料を HiTrap Protein G Purification HP (GE Healthcare) を通過させ共存する IgG を除去した。次いで前述の 20 mM TBS-Ca で平衡化した VI 型精製莢膜多糖体-Sepharose 6B カラム (1.6 x 3.5 cm) に添加した。カラムを洗浄後，300 mM GlcNAc-20 mM Tris-HCl-150 mM NaCl-10 mM CaCl₂ (pH7.4) を用いて L-フィコリンを分画溶出し

た。最終精製は 20 mM Tris-HCl-10 mM CaCl₂ (pH 8.6) で平衡化した RESOURCEQ カラム (GE Healthcare) カラム(6.4 × 31 mm) を用いた陰イオン交換クロマトグラフィーによって行った。精製の各段階における試料中の L-フィコリンの検出は後述する ELISA によって行った。精製試料の精製度は SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により 35 kdal 分子 (L-フィコリン) の存在を確認することで行った。精製試料の L-フィコリン濃度は BCA Protein Assay Reagent Kit (Pierce) で測定した。

血清 L-フィコリン濃度の測定

血清 L-フィコリン濃度は抗 L-フィコリンモノクローナル抗体 (mAb) を固相化した 2 点結合 ELISA 法を用い, 精製 L-フィコリン(12.5~400 ng/ml の 2 倍希釈系列)を標準として測定した。ELISA プレート (アサヒテクノグラス) のウェルに 1 µg/ml 抗 L-フィコリン mAb (GN5, Hycult) (80 µl) を入れ, 4°C で 1 夜放置して固相化した後, 0.1% ヒト血清アルブミン (HSA, Sigma) -TBS-4 mM CaCl₂ (pH 7.4) でブロッキングした。TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で 8% と 4% に希釈した被検血清 (80 µl) をウェルに入れ, 室温で 1 時間放置して, L-フィコリンを固相化 1 次抗体と結合させた。次いで 2 µg/ml ビオチン標識抗 L-フィコリン mAb (2F5, 松下操博士から分与) (80 µl) を加え, 室温で 1 時間放置した後, TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で洗浄した。2 次抗体の検出には 250 ng/ml アルカリフォスファターゼ標識 ExtrAvidin (Sigma) (80 µl) と酵素基質として 4 mg/ml p-ニトロフェニルフォスフェート (Sigma) (80 µl) を用い, 波長 415 nm の吸光

度を測定した。2次抗体のビオチン標識は EZ-Link Sulfo-NHS-Biotinylation Kit (PIERCE) によって行った。

血清型特異 IgG 濃度の測定

血清型特異 IgG 濃度は 7 つの血清型 (Ia 型, Ib 型, II 型 ~ VIII 型) の各莢膜多糖体を固相化した非競合 ELISA 法を用い, 各精製型特異 IgG (1.25 ~ 20 ng/ml の 2 倍希釈系列) を標準として測定した。ELISA プレート (アサヒテクノグラス) のウェルに 1 μ g/ml NeuNAc を含む精製莢膜多糖体 (80 μ l) を入れ, 4°C で 1 夜放置して固相化した後, 0.1% ヒト血清アルブミン (HSA, Sigma) -TBS-4 mM CaCl₂ (pH 7.4) でブロッキングした。TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で 1/40 と 1/400 に希釈した被検血清 (80 μ l) をウェルに入れ, 室温で 1 時間放置して, 型特異抗体を固相化莢膜多糖体に結合させた。次いで 1 μ g/ml ビオチン標識抗ヒト IgG mAb (HP6017, Invitrogen) (80 μ l) を加え, 室温で 1 時間放置した後, TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で洗浄した。2 次抗体の検出には 250 ng/ml アルカリフォスファターゼ標識 ExtrAvidin (Sigma) (80 μ l) と酵素基質として 4 mg/ml p-ニトロフェニルフォスフェート (Sigma) (80 μ l) を用い, 波長 415 nm の吸光度を測定した。

血清 CH50 の測定

血清 CH50 の測定は血清補体価 CH50 キット (デンカ生研) を用いて行った。

GBS 細胞のオプソニン化

7つの血清型（Ia型，Ib型，II型～VIII型）株を THB 培地で一夜培養し，その 1/20 量を新たな THB 培地に接種し，37°C で 90 分間，振盪しながら増殖させた。この後期対数増殖期細胞をハンクス緩衝食塩水（HBSS，pH 7.4）で 2 回洗浄し，HBSS に 0.60 OD₆₀₀ になるように懸濁した。1 ml の 0.60 OD₆₀₀ の懸濁液は，細胞乾燥重量 168 μg で， 0.4×10^8 から 1.8×10^8 CFU/ml である³⁵⁾。この懸濁液を 20% に血清を含む 350 μl の反応緩衝液（2 mM CaCl₂-1 mM MgCl₂-10 mM HEPES-0.8% HSA-0.05% Triton X-100-150 mM NaCl-HBSS）に 0.12 OD₆₀₀ になるように加え，37°C で 30 分間振盪しながら反応させた。なお，L-フィコリンの結合を阻害する実験では，反応懸濁液に 64 mM NeuNAc を加えた。また，補体第 2 経路のみを活性化させる実験では，反応懸濁液に CaCl₂ を加えず，2 mM MgCl₂ と 4 mM ethylene glycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid (EGTA) を加え血清中の Ca²⁺ をキレート化した。

オプソニン化細胞に沈着した C3b の測定

オプソニン化細胞への C3b 沈着はオプソニン化細胞を固相化した非競合 ELISA 法を用い，同時に成人血清（L-フィコリン濃度 3.26 μg/ml，CH50 37.2，各型特異 IgG 濃度をそれぞれ 10 μg/ml に調製）を用いてオプソニン化した細胞（0.0025～0.02 OD₆₀₀ の 2 倍希釈系列）を標準として測定した。ELISA プレート（アサヒテクノグラス）のウェルに 0.02 OD₆₀₀ オプソニン化細胞（80 μl）を入れ，4°C で 1 夜放置して固相化した後，0.1% ヒト血清ア

ルブミン (HSA, Sigma) -TBS-4 mM CaCl₂ (pH 7.4) でブロッキングした。1 µg/ml 抗 C3d mAb(053A-1149.3.1.4, AbD Serotec, C3b と iC3b に結合する) (80 µl) を加え, 室温で 1 時間放置した後, TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で洗浄した。次いで 1 µg/ml アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗マウス IgG (Zymed) (80 µl) を加え, 室温で 1 時間放置した後, TBS-4 mM CaCl₂-Tween 20 で洗浄した。2 次抗体の検出には酵素基質として 4 mg/ml p-ニトロフェニルフォスフェート (Sigma) (80 µl) を用い, 波長 415 nm の吸光度を測定した。

好中球の調製

好中球は, ヘパリンを加えたヒト新鮮血液から Polymorphprep (Nycomed Pharma) を用いた密度勾配遠心法によって分離した。好中球を含む層を 50% RPMI Medium 1640 (Invitrogen) で 1 回, さらに RPMI Medium 1640 で 1 回洗浄後, 0.4% HSA-10 mM HEPES-RPMI Medium 1640 に 4.6×10^6 cells/ml の濃度に懸濁した。染色性に基づいて 95% 以上の好中球が生存していることを確認した。0.4% HSA-10 mM HEPES-RPMI Medium 1640 に好中球試料の赤血球濃度と等しい濃度の赤血球を懸濁させ, 後述のオプソニン貪食殺菌分析において標準曲線を求めるために用いた。

オプソニン貪食殺菌の測定

細胞のオプソニン貪食殺菌は, Aoyagi らの方法²⁾ に準じて定量した。24 ウエルマイクロプレート (アサヒテクノグラス) に分注したオプソニン化細胞懸濁液 (50 µl) に 4.6×10^6 cells/ml 好

中球試料（350 μ l），または，好中球試料の赤血球濃度と等しい濃度の赤血球試料（350 μ l）を加え，37°Cで60分間，振盪しながら反応させた。各ウエルに THB 培地（1600 μ l）を加えて完全に混和した後，好中球と赤血球を遠心（200 \times g）によって沈殿させた。好中球と反応させたオプソニン化細胞懸濁液は希釈せずに，また赤血球と反応させたオプソニン化細胞懸濁液は THB 培地で2倍希釈系列（100%，50%，25%，12.5%）を調製した。これらの各800 μ lを48ウエルマイクロプレートに移し，37°Cで加温しながら増殖をOD₆₀₀でモニターした。赤血球試料を加えて反応させたオプソニン化細胞懸濁液（100%，50%，25%，12.5%）を標準として，OD値の対数とパーセント濃度の対数との間の回帰式を求めた。この回帰式からオプソニン貪食殺菌後の細菌細胞の生存率を求め，殺菌の程度を次式，殺菌率（%）=100-生存率（%），から求めた。細胞外寄生性細菌であるGBSは，貪食後まもなく殺菌されるため，液相中の生存数は，液相中と好中球中に生存する細菌数の総量とほぼ一致する³⁵⁾。

結果

臍帯血血清の CH50 値, L-フィコリン濃度, 型特異 IgG 濃度
早産児 (在胎週数 36 週以下, 35 人) および満期産児 (在胎週数 37 週以上, 61 人) の臍帯血血清について, CH50 値, L-フィコリン濃度, 型特異 IgG 濃度を測定した。早産児血清の CH50 値 (平均値 16.8, SD 4.0) は成人血清の値 (平均値 38.4, SD 4.92) より統計学的に有意 ($P < 0.01$) に低値であった。在胎週数が延長するにつれて CH50 値は上昇したが, 満期産児血清の CH50 値 (平均値 22.2, SD 4.92) でも成人血清の値より有意 ($P < 0.01$) に低値なままにとどまった (図 2)。なお, 満期産児血清との比較においても早産児血清の CH50 値は有意 ($P < 0.01$) に低値であった。

早産児血清の L-フィコリン濃度 (平均値 0.76, SD 0.49) は成人血清の濃度 (2.82, SD 0.73) より有意 ($P < 0.01$) に低値であった。L-フィコリン濃度は在胎週数 37 週になると急激に上昇して有意 ($P < 0.01$) な違いを示し, 満期産児血清の濃度 (平均値 2.57, SD 1.23) は成人血清の濃度の 91.1% に達した (図 3)。

臍帯血血清の型特異 IgG 濃度はいずれの血清型でも 90% 以上が 8 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下に分布した (図 4)。胎盤通過性の型特異 IgG の濃度は母体血清に由来する受動免疫であり, 母体の GBS 保菌と密接に関係する。したがって, 型特異 IgG 濃度を在胎週数に基づいて単純比較することの意義はそれほど高くはないと考えられるが, VIII 型を除く血清型では早産児血清よりも満期産児血清において高濃度域に分布した。

以上の CH50 値, L-フィコリン濃度, 型特異 IgG 濃度の分布に基づいて, C3b によるオプソニン化と貪食殺菌の測定に用いる臍

帯血血清は、CH50 が満期産児血清の平均値 -2 SD (12.4) 以下と平均値 +2 SD (32.0) 以上の血清を除外した中から選択した。この基準に基づいて除外された血清は低値領域で 3 つの血清 (3.1%)、高値領域で 1 つの血清 (1.0%) であった。L-フィコリン濃度については、満期産児血清の平均値 -1 SD (1.34 $\mu\text{g/ml}$) 以下 (早産児血清の 91.4%がこの範囲に分布)、平均値 (2.57 $\mu\text{g/ml}$) 以下、平均値 +0.5 SD (3.19 $\mu\text{g/ml}$) 未満、平均値 +0.5 SD (3.19 $\mu\text{g/ml}$) 以上の 4 階層に分けた。一方、型特異 IgG 濃度については、8 $\mu\text{g/ml}$ 以上の血清を除外し、L-フィコリンの 4 階層ごとに可能な限り均等に分布するように 4 階層に分けた。次いで、L-フィコリン濃度と型特異 IgG 濃度のそれぞれ 4 階層の計 16 階層の中から血清を 1 つずつ選択し、C3b によるオプソニン化と貪食殺菌の測定に用いた。但し、いずれの血清型においても、完全にこの基準を満たすことはできず、近似する濃度の血清の中からも一部選択せざるを得なかった。

補体 C3b による GBS のオプソニン化に寄与する臍帯血血清中因子の分析

血清型 Ia 型, Ib 型, II 型 ~ VIII 型株をそれぞれ 16 の臍帯血血清でオプソニン化した実験における L-フィコリン濃度, 型特異 IgG 濃度, CH50 値のそれぞれと C3b 沈着率との関係を図 5 に示す。血清型 III 型 ($P < 0.01$), V 型 ($P < 0.05$), VIII 型 ($P < 0.01$) 株をオプソニン化した実験において、C3b 沈着率と L-フィコリン濃度の間に統計学的に有意な相関が認められた。一方、C3b 沈着率と型特異 IgG 濃度の間で、あるいは C3b 沈着率と CH50 値の

間では有意な相関は認められなかった。他の血清型 Ia 型, Ib 型, II 型, VI 型株をオプソニン化した実験においては, L-フィコリン濃度, 型特異 IgG 濃度, CH50 値のいずれも C3b 沈着率との間で有意な相関を認めなかった。

L-フィコリン結合による補体レクチン経路の活性化が C3b 沈着に寄与するか否かを明らかにするため, 実験に用いた血清のうち, 型特異 IgG 濃度が最も低値 (1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下) で, 且つ L-フィコリン濃度が, 血清選択基準の上位 3 階層に入る血清について, オプソニン化反応懸濁液に過剰の NeuNAc (GBS の莢膜多糖体における L-フィコリンのリガンド) を加えて L-フィコリン結合の阻害実験を行った。その結果, 前述の通り C3b 沈着率と L-フィコリン濃度間に有意な相関がみられた血清型 III 型, V 型, VIII 型株はもちろん, 両者に相関が認められなかった他の血清型株においても, C3b 沈着は, NeuNAc の添加によってほぼ完全に阻害された (図 6)。すなわち, 少なくとも型特異 IgG 濃度が低値な条件下では, いずれの血清型でも L-フィコリンによる補体レクチン経路の活性化が C3b 沈着の主因であると考えられた。

型特異 IgG は補体第 2 経路の増幅ループの活性化を促すとされている¹¹⁾。臍帯血血清中の型特異 IgG が補体第 2 経路の活性化の促進に寄与するか否かを明らかにするため, L-フィコリン濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下で, 且つ型特異 IgG 濃度が最も高値な血清について補体第 2 経路のみの活性化による C3b 沈着を測定した。すなわち, オプソニン化反応懸濁液に EGTA を加え補体古典経路やレクチン経路の活性化に要求される Ca^{2+} イオンをキレート化し, 補体第 2 経路のみが活性化可能な Mg^{2+} イオンのみ存在する条件

下でオプソニン化を行った。その結果、いずれの血清型株でも EGTA を加えた場合の C3b 沈着率は EGTA を加えない場合の 20% 以下であった (図 7)。すなわち、いずれの血清型株においても、型特異 IgG 6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では、型特異 IgG が補体第 2 経路を活性化し、十分に C3b 沈着を促すことはなかった。

好中球による GBS のオプソニン貪食殺菌に寄与する臍帯血血清中因子の分析

血清型 Ia 型, Ib 型, II 型 ~ VIII 型株をそれぞれ 16 の臍帯血血清でオプソニン化した後、成人の末梢血から分離した好中球を用いて貪食殺菌した実験における C3b 沈着率および型特異 IgG 濃度のそれぞれと殺菌率との関係を図 8 に示す。前述の通り C3b 沈着率と L-フィコリン濃度に有意な相関が認められた血清型 III 型と V 型では、オプソニン貪食殺菌率と C3b 沈着率の間で有意 ($P < 0.05$) な相関が認められた。これらの血清型株では L-フィコリン結合による補体レクチン経路活性化が C3b 沈着に寄与し、延いては、好中球による貪食殺菌を促進していると考えられた。

血清型 III 型株では、貪食殺菌率と型特異 IgG 濃度の間でも有意な相関 ($P < 0.01$) が認められた。このことは、前述の通り C3b 沈着率と型特異 IgG 濃度の間で相関が認められない故に、型特異 IgG がオプソニンとして機能して貪食殺菌を促進していることを示唆している。血清型 V 型でも統計学的に有意ではない ($P < 0.10$) もの、型特異 IgG 濃度の増加に伴う殺菌率の上昇が認められ、III 型と同様に型特異 IgG がオプソニンとして機能している可能性が示唆される。

これらの血清型についてオプソニン貪食殺菌における L-フィコリンと型特異 IgG の相互関係を解析する目的で、L-フィコリン濃度、型特異 IgG 濃度、オプソニン貪食殺菌率の相互関係を図 9 に示す。L-フィコリン濃度と型特異 IgG 濃度のいずれでも濃度依存的に貪食殺菌率は上昇したが、両者が中程度の濃度領域では、L-フィコリンと型特異 IgG 間に協調作用が認められた。すなわち、暫定的に対照成人血清によりオプソニン化した場合の貪食殺菌率（III 型 76.8%、V 型 79.5%）の 50%以上の殺菌率（III 型 38.4%以上、V 型 39.8%以上）が得られる L-フィコリン濃度と型特異 IgG 濃度に注目すると、血清型 III 型では、型特異 IgG 濃度が約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では、L-フィコリン濃度は約 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を必要とし、一方、L-フィコリン濃度が約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では型特異 IgG 濃度が約 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を必要とした。血清型 V 型でも同様に、型特異 IgG 濃度が約 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下では、L-フィコリン濃度は約 3.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を必要とし、一方、L-フィコリン濃度が約 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ では型特異 IgG 濃度が約 4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以上を必要とした。すなわち、血清型 III 型では、L-フィコリン濃度 1~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、型特異 IgG 濃度 1~6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の領域の内、推定殺菌率が 50%を超える領域で、また、V 型では、L-フィコリン濃度 2~4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、型特異 IgG 濃度 0~5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の領域の内、推定殺菌率が 50%を超える領域では両者に相加的または相乗的オプソニン貪食殺菌効果があると推定された。

血清型 Ia 型、Ib 型、II 型でも、C3b 沈着率と貪食殺菌率に有意 ($P < 0.01$) な相関が認められた。血清型 Ib 型では、貪食殺菌率と型特異 IgG との間にも有意 ($P < 0.05$) な相関が認められ、III 型や V 型と同様に型特異 IgG がオプソニンとして機能していると

考えられた。

血清型 VI 型と VIII 型のオプソニン貪食殺菌率は、C3b 沈着率と相関せず、一方、型特異 IgG と有意（前者 $P < 0.05$ 、後者 $P < 0.01$ ）に相関した。しかし、これらの血清型では、VI 型株の 1 血清を除いて、対照成人血清でオプソニン化した場合とほぼ同様の殺菌率を示した。なお、これらの血清型株でも、オプソニン化しなかった場合には全く貪食殺菌を生じない（成績を示していない）ことから、貪食殺菌に C3b か IgG によるオプソニン化を必要とする点では他の血清型株と同様であった。

考察

本研究では、好中球を成人末梢血に依存したことを除いて、より新生児の免疫環境に近い条件下で L-フィコリンと型特異 IgG 抗体が GBS のオプソニン貪食殺菌に果たす役割を解析することを試みた。

血清型 III 型と V 型株では、L-フィコリン結合による補体レクチン経路活性化が C3b 沈着を促し、C3b と型特異 IgG が共にオプソニンとして機能して貪食殺菌を促進していると考えられた。これらの血清型では、成人血清によりオプソニン化した場合の 50%以上の殺菌率が得られる L-フィコリン濃度と型特異 IgG 濃度を指標とすると、血清型 III 型では L-フィコリン濃度 1~4 $\mu\text{g/ml}$ で、且つ型特異 IgG 濃度 1~6 $\mu\text{g/ml}$ の領域で、また、V 型では L-フィコリン濃度 2~4 $\mu\text{g/ml}$ で、且つ型特異 IgG 濃度 0~5 $\mu\text{g/ml}$ の領域で、両者に相加的または相乗的オプソニン貪食殺菌効果があると推定された。Lin ら²²⁾ は、III 型 GBS 株による早発型疾患発症例と出産時に III 型 GBS 株汚染を受けたが発症しなかった対照例について臍帯血血清中 III 型特異 IgG 濃度を比較し、型特異 IgG 濃度が 2 $\mu\text{g/ml}$ から 6 $\mu\text{g/ml}$ 以上に上昇するにつれて発症リスクは低下するものの、この濃度範囲では発症例と発症しなかった例が混在することを報告している。この発症例と非発症例が混在する型特異 IgG の濃度範囲と、本研究で L-フィコリン濃度との間に相加的または相乗的オプソニン貪食殺菌効果があると推定された型特異 IgG 濃度範囲は近似している。この濃度範囲では L-フィコリン濃度が感染の有無を決定する因子となる可能性が示唆される。

一方、これらの血清型株において、型特異 IgG がオプソニンとして機能するという点は、これまでの報告と異なった。GBS 型特異 IgG のサブクラスの大部分は IgG2 である¹⁴⁾。Aoyagi ら²⁾ は、レクチン経路と第 2 経路を順次活性化させた実験で、III 型特異 IgG2 を第 2 経路の活性化前にオプソニン反応懸濁液に加えた際に、L-フィコリンによって開始されるオプソニン貪食殺菌は有意に促進され、一方、第 2 経路活性化後に型特異 IgG2 を加えた際に殺菌は増強されなかったことから、型特異 IgG2 が好中球の IgG 受容体 FcR との相互作用によってではなく、第 2 経路活性の促進によって貪食殺菌を増強させると報告している。好中球に発現する IgG 受容体 FcγRIIIa の遺伝子 *FcγRIIIA* には 1 塩基多形があり、131 番目のアミノ酸がヒスチジンの FcγRIIIa には IgG1 と IgG3 に加えて IgG2 も弱く結合できるが、アルギニンの FcγRIIIa に結合しない^{16,17)}。また、FcγRIIIb に IgG2 は結合しない。FcRII と FcRIII のそれぞれに特異的なモノクローナル抗体を用いて、それらの機能を阻害することで III 型 GBS 株のオプソニン貪食殺菌における両者の役割が明らかにされている²⁸⁾。III 型 GBS 株を IgG 単独でオプソニン化した場合、主に FcRII が貪食に関与し、FcRIII の役割は限定的である。一方、補体の存在下でオプソニン化した場合には、FcRII と FcRIII の両方ともオプソニン貪食に必要とされない。成人血清を用いてオプソニン化を行った Aoyagi らの実験では、貪食に型特異 IgG を必要としない程度に C3b 沈着が生じ、一方、臍帯血血清を用いた本研究では、型特異 IgG によるオプソニン化を必要とした可能性がある。実際、本研究では、血清型 III 型株の C3b 沈着率は、1 つの臍帯血血清を除いて成人血清の 60%

以下であった。FcγRIIIa は膜貫通型タンパク質で、また FcγRIIIb は GPI (グリコシルホスファチジルイノシトール) アンカータンパク質である^{16,17)}。好中球における FcγRIIIa の発現は FcγRIIIb の 10 分の 1 程度であるが、細胞内に免疫レセプターチロシン含有活性化モチーフ (ITAM) をもち、細胞内シグナル伝達経路を活性化できるため、FcγRIIIa が抗原-IgG 複合体によって架橋されると好中球が活性化されて貪食が亢進する。C3b 沈着が不十分な臍帯血血清においては、成人血清によるオプソニン貪食とは異なり、型特異 IgG が好中球の活性化の役割を果たしていることが示唆される。

血清型 Ia 型, Ib 型, II 型株でも, C3b 沈着率と貪食殺菌率に有意な相関が認められたが, C3b 沈着率は L-フィコリン濃度や型特異 IgG 濃度のいずれとも相関せず, オプソニン貪食殺菌におけるこれらの因子の寄与の程度を明らかにすることはできなかった。但し, 型特異 IgG 濃度が低値な条件下では, NeuNAc の添加によりほとんど完全に C3b 沈着が抑制されたことから, いずれの血清型でも L-フィコリンによる補体レクチン経路の活性化が C3b 沈着の主因であると考えられた。Ia 型と II 型株は, 精製莢膜多糖体には L-フィコリンが結合するが, 細胞では明瞭な結合が観察されない (30%以下) 血清型である³⁾。本研究の結果は, わずかな結合でも L-フィコリンがレクチン経路の活性化分子として機能し得ることを示している。一方, いずれの血清型株においても, 型特異 IgG が補体第 2 経路を活性化し, 十分に C3b 沈着を促すことはなかった。これらの血清型株では, 補体や型特異 IgG に加えて, 血清中の未知の因子が C3b 沈着に関与している可能

性がある。L-フィコリン以外のレクチン経路活性化分子である MBL は GBS に結合しない³⁾故に、そのような因子としては莢膜多糖体以外の細胞構造に対する IgG の存在が考えられる。実際、C タンパク質の α と β 構造, Rib, Sip, C5a ペプチダーゼなどのタンパク質細胞構造に対する抗体が感染防御抗体として役立つ可能性が指摘され、成分ワクチンの候補に挙げられている¹⁸⁾。なお、血清型 Ib 型株では、貪食殺菌率と型特異 IgG との間にも有意な相関が認められ、III 型や V 型株と同様に型特異 IgG がオプソニンとして機能していると考えられた。

血清型 VI 型と VIII 型株のオプソニン貪食殺菌率は、C3b 沈着率の高低に拘わらず、成人血清でオプソニン化した場合とほぼ同様の殺菌率を示した。VIII 型株では C3b 沈着率が L-フィコリン濃度と相関し、また VI 型株でも、型特異 IgG 濃度が低値な条件下では、L-フィコリンによる補体レクチン経路の活性化が C3b 沈着の主因であると考えられた。さらに、VI 型と VIII 型株共に貪食殺菌率は型特異 IgG 濃度との間でも有意に相関したが、貪食殺菌率に大差は認められなかった。但し、これらの血清型株でもオプソニン化しない場合には好中球による貪食殺菌は生じないことから、貪食殺菌に C3b あるいは型特異 IgG によるオプソニン化を必要とする点で他の血清型株と同様であった。VI 型と VIII 型株は L-フィコリンのリガンドとなる NeuNAc 量の多少に拘わらず、L-フィコリンが他の血清型株よりも極めて良く結合する血清型株である³⁾。本研究では臍帯血血清による C3b 沈着を成人血清による C3b 沈着との相対量として求めた。臍帯血血清による C3b 沈着は、成人血清による場合に比較して明らかに低値である

が、絶対量としてはオプソニンとして機能するのに十分であった可能性がある。

本研究は、より新生児の免疫環境に近い条件下で、型特異 IgG と L-フィコリンとの相互作用が GBS のオプソニン貪食殺菌に影響することを示した最初の報告である。特に遅発型疾患の大部分を占める III 型 GBS 株において、L-フィコリン濃度が低値であることがオプソニン貪食殺菌不全を招きうることを明らかにした点は重要である。早発型疾患の発症率は分娩時の予防的化学療法によって、近年、明らかに低下してきているが、感染源や感染経路が不明な遅発型疾患では有効な予防法が確立しておらず、発症率は不変である¹⁸⁾。米国において破傷風トキソイド結合-莢膜多糖体ワクチンが臨床応用の前段階に達し⁸⁾、早発型疾患にも遅発型疾患にも効果が期待されている。しかし、ワクチン接種者のワクチンに対する応答は完全ではない。加えて、血清型 III 型株に対するワクチンを接種した妊婦から生まれた児において生後 2 カ月の時点で維持される型特異 IgG 濃度 (2.1 µg/ml) における III 型 GBS 株のオプソニン貪食殺菌は L-フィコリン濃度に依存する。一方、感染症は病原体の病原力と宿主の感染防御能の相互関係の帰結である。Takahashi ら³³⁾によって、GBS の中でも病原力が強いとされる血清型 III 型に高病原性株 (RDPIII-3 型, ST17 型) が存在することが提唱され、米国における広範な疫学研究によって立証されている²³⁾。今後、本研究の成果が、臍帯血血清 L-フィコリン濃度の測定や、危険因子を有する児への L-フィコリン製剤の投与など、臨床応用へと進展するためには、実際の発症例において原因株と L-フィコリン濃度や型特異 IgG 濃度との相

互関係を明らかにする必要がある。しかし、新生児 GBS 感染症は発症頻度が低く、コホート研究を簡単には実施し得ない疾患である。症例の蓄積による患者-対照研究も必要と考える。

謝辞

本研究を行うにあたり、終始温かいご指導とご鞭撻をいただきました女子栄養大学微生物学研究室教授高橋信二博士、ならびに専任講師青柳祐子博士に衷心よりお礼申し上げます。

本研究の要となる臍帯血について種々ご教示下さいました教授藤巻わかえ博士、ならびに臍帯血を供与して下さいました吉田産科婦人科医院医院長吉田良一博士、副委員長吉田智子博士、西神戸医療センター小児科医長松原康策博士に厚くお礼申しあげます。

また公私に亘って研究活動を支えて下さいました大学院研究科長 教授佐久間慶子博士、研究室委員会委員長 教授安原安代博士ならびに準教授柴田圭子博士に感謝申し上げます。

引用文献

1. Aminoff, D. 1961. Methods for the quantitative estimation of N-acetylneuraminic acid and their application to hydrolysates of sialomucoids. *Biochem. J.* 81: 384-391.
2. Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Min, J. G., Matsushita, M., Fujita, T., Takahashi, S., Okuwaki, Y., and Bohnsack, J. F. 2005. Role of L-ficolin/MASP complexes in the opsonophagocytosis of type III group B Streptococci. *J. Immunol.* 174:418-425.
3. Aoyagi, Y., Adderson, E., Rubens, C., Bohnsack, J., Min, J-G., Matsushita, M., Fujita, T., Okuwaki, Y., and Takahashi, S. 2008. L-ficolin/mannose-binding lectin-associated serine protease complexes bind to group B streptococci primarily through N-acetylneuraminic acid of capsular polysaccharide and activate the complement pathway. *Infect. Immun.* 76:179-188.
4. Baker, C. J. 2000. Group B streptococcal infections, p. 222-237. *In* D. L. Stevens and E. L. Kaplan (ed.), Streptococcal infections. Clinical aspects, microbiology, and molecular pathogenesis. *Oxford University Press*, New York.
5. Baker, C. J., Kasper, D. L., 1976. Correlation of maternal antibody deficiency with susceptibility to neonatal group B streptococcal infection. *N. Eng. J. Med.* 294: 753-756.
6. Chaffin, D. O., Mentele, L. M., Rubens, C. E. 2005

- Sialylation of Group B Streptococcal capsular polysaccharide is mediated by cpsK and is required for optimal capsule polymerization and expression. *J Bacteriol.* 187:4615-4626.
7. Drossou, V., Kanakoudi, F., Diamanti, E., Tzimouli, V., Konstantinidis, T., Germenis, A., Kremenopoulos, G., Katsougiannopoulos, V. 1995. Concentrations of main serum opsonins in early infancy. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 72:F172-175.
 8. Edwards, M. S. 2008. Group B streptococcal conjugate vaccine: a timely concept for which the time has come. *Hum Vaccin.* 4:444-448.
 9. Edwards, M. S., Baker, C. J., Kasper, D. L. 1979. Opsonic specificity of human antibody to the type III polysaccharide of group B streptococcus. *J. Infect. Dis.* 140: 1004-1008.
 10. Edwards, M. S., Kasper, D. L., Jennings, H. J., Baker, C. J., Nicholson-Weller, A. 1982. Capsular sialic acid prevents activation of the alternative complement pathway by type III, group B streptococci. *J. Immunol.* 128:1278-1283.
 11. Edwards, M. S., Nicholson-Weller, A., Baker, C. J., Kasper, D. L. 1980. The role of specific antibody in alternative complement pathway-mediated opsonophagocytosis of type III, group B streptococcus. *J. Exp. Med.* 151:1275-1287.
 12. Fujita, T. 2002. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. *Nat. Rev. Immunol.*

- 2:346-53.
13. Fujita, T., Matsushita, M., Endo, Y. 2004. The lectin-complement pathway - its role in innate immunity and evolution. *Immunol. Rev.* 198:185-202.
 14. Givner, L. B., Baker, C. J., Edwards, M. S. 1987. Type III group B Streptococcus: functional interaction with IgG subclass antibodies. *J Infect Dis.* 155:532-9.
 15. Ikeda, K., Sannoh, T., Kawasaki, N., Kawasaki, T., Yamashina, I. 1987. Serum lectin with known structure activates complement through the classical pathway. *J. Biol. Chem.* 262:7451-7454.
 16. Jefferis, R., Lund, J. 2002. Interaction sites on human IgG-Fc for FcγR: current models. *Immunol Lett.* 82:57-65.
 17. Jefferis, R., Lund, J., Pound, J. D. 1998. IgG-Fc-mediated effector functions: molecular definition of interaction sites for effector ligands and the role of glycosylation. *Immunol Rev.* 163:59-76.
 18. Johri, A. K., Paoletti, L. C., Glaser, P., Dua, M., Sharma, P. K., Grandi, G., Rappuoli, R., 2006. Group B Streptococcus: global incidence and vaccine development. *Nat. Rev. Microbiol.* 4:932-942.
 19. Koenig, J. M., Keenan, W. J., 2009. Group B streptococcus and early-onset sepsis in the era of maternal prophylaxis. *Pediatr. Clin. North. Am.* 56:689-708.

20. Ouchterlony, O. 1962. Diffusion-in-gel methods for immunological analysis. II. *Prog. Allergy*. 6:30-154.
21. Lin, F-Y. C., Philips, J. B. 3rd, Azimi, P. H., Weisman, L. E., Clark, P., Rhoads, G. G., Regan, J., Concepcion, N. F., Frasch, C. E., Troendle, J., Brenner, R. A., Gray, B. M., Bhushan, R., Fitzgerald, G., Moyer, P., Clemens, J. D. 2001. Level of maternal antibody required to protect neonates against early-onset disease caused by group B Streptococcus type Ia: a multicenter, seroepidemiology study. *J. Infect. Dis.* 184:1022-1028.
22. Lin, F-Y. C., Weisman, L. E., Azimi, P. H., Philips, J. B. 3rd., Clark, P., Regan, J., Rhoads, G. G., Frasch, C. E., Gray, B. M., Troendle, J., Brenner, R. A., Moyer, P., Clemens, J. D. 2004. Level of maternal IgG anti-group B streptococcus type III antibody correlated with protection of neonates against early-onset disease caused by this pathogen. *J. Infect. Dis.* 190:928-934.
23. Lin, F-Y. C., Whiting, A., Adderson, E., Takahashi, S., Dunn, D., Weiss, R., Azimi, P., Philips, J. 3rd., Weisman, L., Regan, J., Clark, P., Rhoads, G., Frasch, C., Troendle, J., Moyer, P., Bohnsack, J. 2006. Phylogenetic lineages of invasive and colonizing strains of serotype III group B Streptococci from neonates: A multi center prospective study. *J. Clin. Microbiol.* 44:1257-1261.
24. Matsushita M, Endo Y, Fujita T. 2000. Cutting edge:

- Complement-activating complex of ficolin and mannose-binding lectin-associated serine protease. *J. Immunol.* 164:2281-2284.
25. Matsushita, M., Endo, Y., Taira, S., Sato, Y., Fujita, T., Ichikawa, N., Nakata, M., Mizuochi, T. 1996. A novel human serum lectin with collagen- and fibrinogen-like domains that functions as an opsonin. *J. Biol. Chem.* 271:2448-2454.
26. Matsushita, M., Fujita, T. 2002. The role of ficolins in innate immunity. *Immunobiology* 205:490-497.
27. Matsushita, M., Kuraya, M., Hamasaki, N., Tsujimura, M., Shiraki, H., Fujita, T. 2002. Activation of the lectin complement pathway by H-ficolin (Hakata antigen). *J. Immunol.* 168:3502-3506.
28. Noya, F. J. D., Baker, C. J., Edwards, M. S. 1993. Neutrophil Fc receptor participation in phagocytosis of type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 61: 1415-1420.
29. Schrag, S. J., Zywicki, S., Farley, M. M., Reingold, A. L., Harrison, L. H., Lefkowitz, L. B., Hadler, J. L., Danila, R., Cieslak, P. R., Schuchat, A. 2000. Group B streptococcal disease in the era of intrapartum antibiotic prophylaxis. *N. Engl. J. Med.* 342:15-20.
30. Schuchat, A. 1998. Epidemiology of group B streptococcal disease in the United States: Shifting paradigms. *Clin. Microbiol. Rev.* 11:497-513.

31. Sugimoto, R., Yae, Y., Akaiwa, M., Kitajima, S., Shibata, Y., Sato, H., Hirata, J., Okochi, K., Izuhara, K., Hamasaki, N. 1998. Cloning and characterization of the Hakata antigen, a member of the ficolin/opsonin p35 lectin family. *J. Biol. Chem.* 273:20721-20727.
32. Swierzko, A. S., Atkinson, A. P., Cedzynski, M., Macdonald, S. L., Szala, A., Domzalska-Popadiuk, I., Borkowska-Klos, M., Jopek, A., Szczapa, J., Matsushita, M., Szemraj, J., Turner, M. L., Kilpatrick, D. C. 2009. Two factors of the lectin pathway of complement, L-ficolin and mannan-binding lectin, and their associations with prematurity, low birthweight and infections in a large cohort of Polish neonates. *Mol. Immunol.* 46:551-558.
33. Takahashi, S., Adderson, E. E., Nagano, Y., Nagano, N., Briesacher, M. R., Bohnsack, J. F. 1998. Identification of a highly encapsulated, genetically related group of invasive type III group B streptococci. *J. Infect. Dis.* 177:1116-1119.
34. Takahashi, S., Aoyagi, Y., Adderson, E. E., Okuwaki, Y., Bohnsack J. F. 1999. Capsular sialic acid limits C5a production on type III group B streptococci. *Infect. Immun.* 67:1866-1870.
35. Takahashi, S., Nagano, Y., Nagano, N., Hayashi, O., Taguchi, F., Okuwaki, Y. 1995. Role of C5a-ase in group B streptococcal resistance to opsonophagocytic killing. *Infect. Immun.* 63:4764-4769.

36. Wessels, M. R., Butko, P., Ma, M., Warren, H. B., Lage, A. L., Carroll, M. C. 1995. Studies of group B streptococcal infection in mice deficient in complement component C3 or C4 demonstrate an essential role for complement in both innate and acquired immunity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 92:11490-11494.

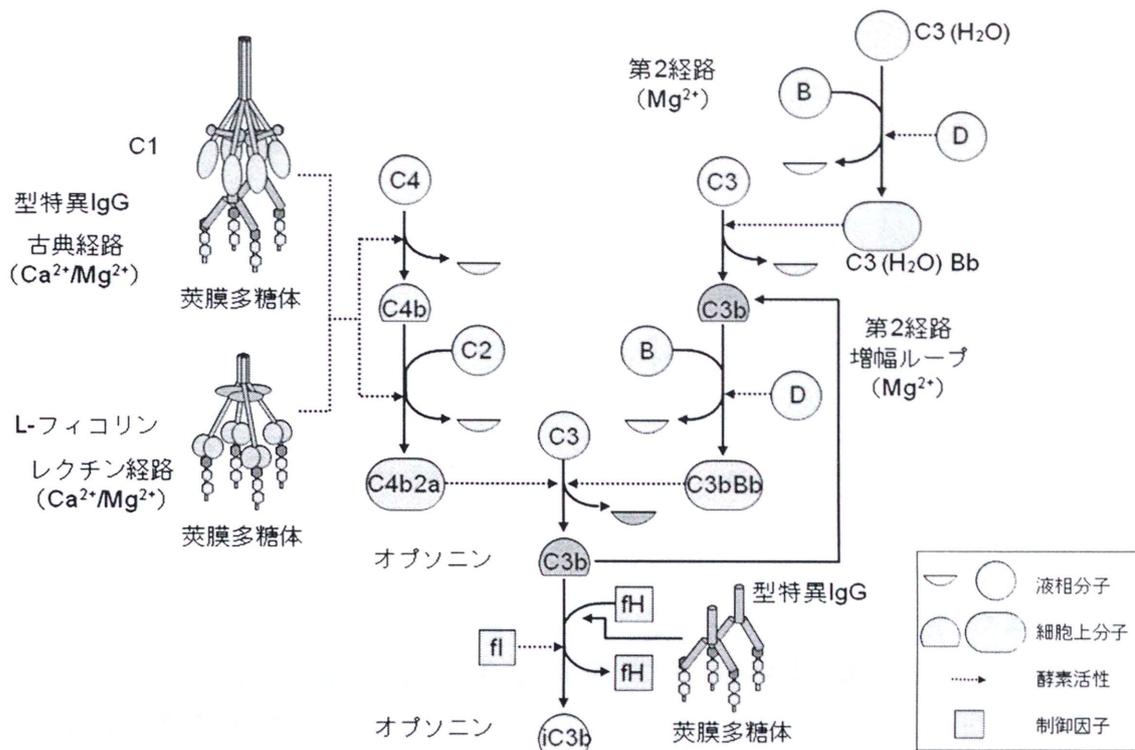


図1. 補体C3bによるGBSのオプソニン化に関与する潜在的分子。GBS細胞における補体活性化は、3つの分子の結合で開始され得る。1) 莢膜多糖体に結合した複数の型特異IgGへのC1の結合（古典経路）、2) 莢膜多糖体のN-アセチルノイラミン酸へのL-フィコリンの結合（レクチン経路）、3) 液相中でC3分子が水分子の衝突を受け生ずるC3(H₂O)BbによるC3bの結合（第2経路）。第2経路にはこれらの経路を経て沈着したC3bを増幅させる働き（増幅ループ）があるが、GBS細胞上では、C3bがH因子を補助因子としてI因子によって分解されiC3bとなるため、増幅ループが抑制される。型特異IgGにはH因子の結合を阻害して、増幅ループを活性化させる働きもある。

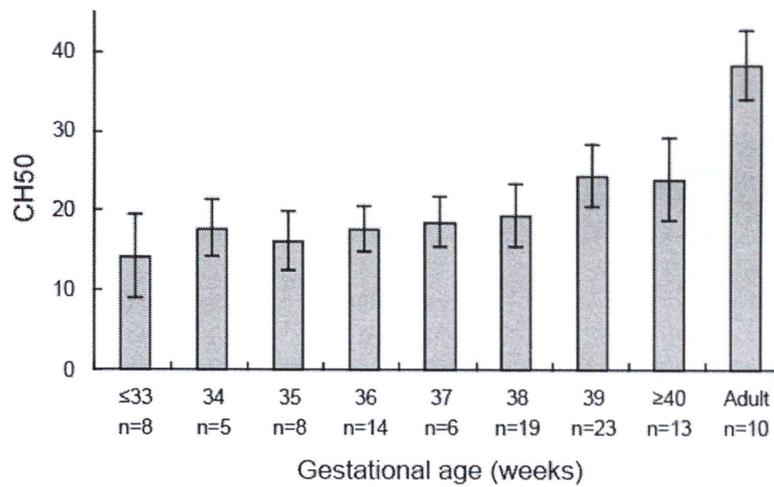


図 2. 臍帯血血清の CH50 値と在胎週数。測定は個々の血清について 1 回ずつ実施し，在胎週数ごとの平均値と ± 1 SD を示す。対照として成人末梢血の CH50 を示す。

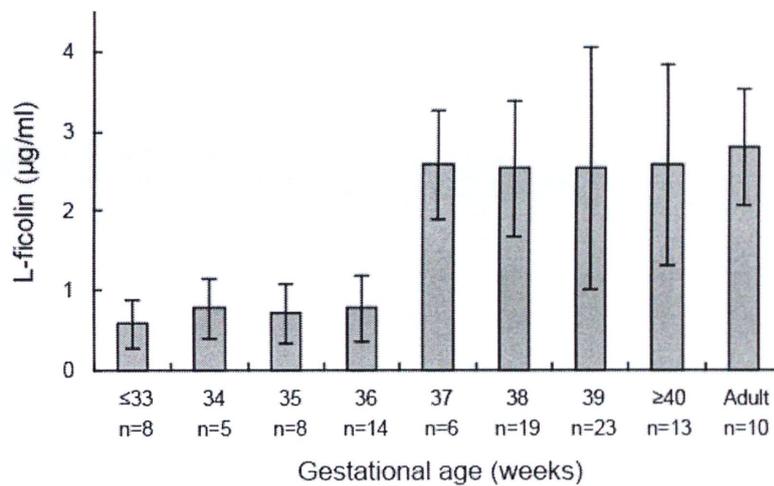


図 3. 臍帯血血清の L-フィコリン濃度と在胎週数。測定は個々の血清について 3 回ずつ実施し，在胎週数ごとの平均値と ± 1 SD を示す。対照として同一プレート上で測定した成人末梢血の L-フィコリン濃度を示す。

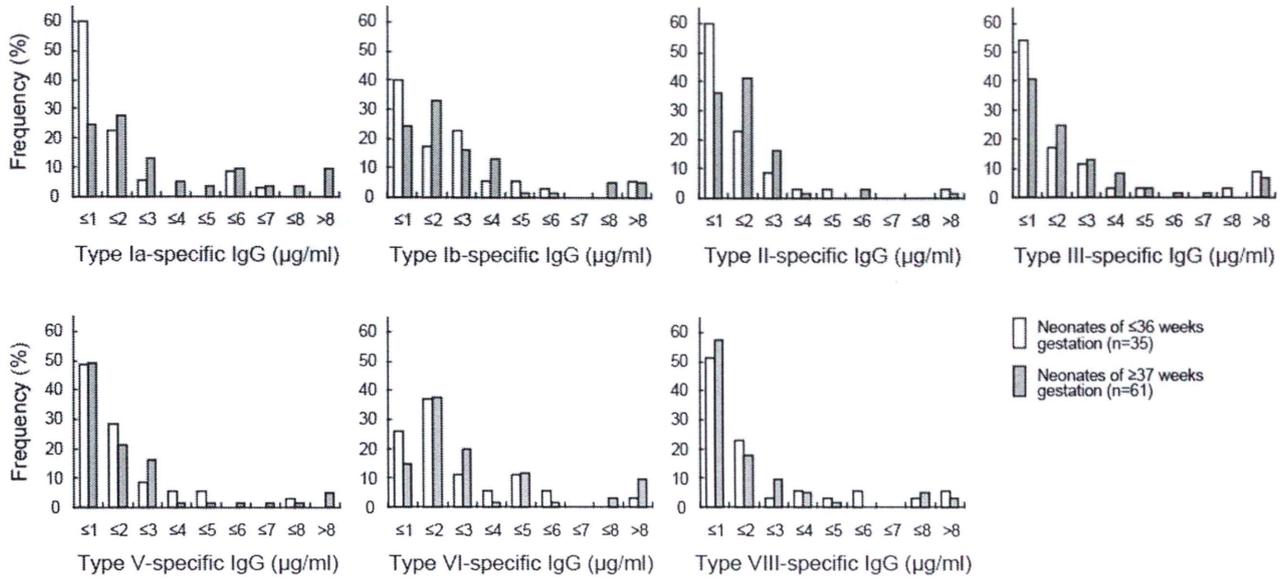


図 4. 臍帯血血清の型特異 IgG 濃度の分布。早産児と満期産児ごとに頻度を百分率で示す。測定は個々の血清について 3 回ずつ実施した。

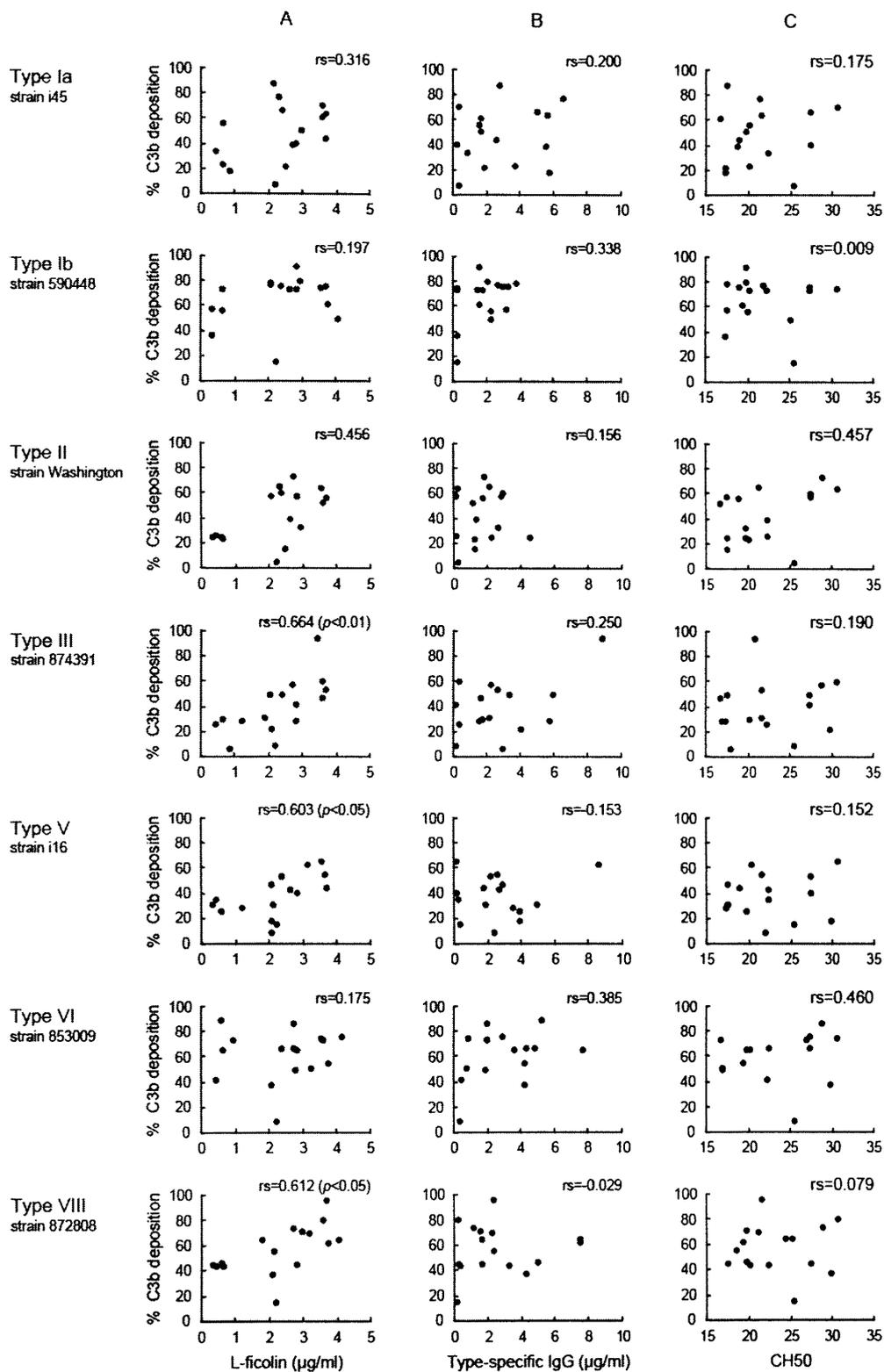


図 5. 血清型 Ia, Ib, II~VIII 型株を臍帯血血清でオプソニン化した際の C3b 沈着率と血清 L-フィコリン濃度の関係 (A), C3b 沈着率と型特異 IgG 濃度の関係 (B), C3b 沈着率と CH50 値の関係 (C)。C3b 沈着率は 2 回ずつ測定し, その平均値を示す。相関は Spearman の順位相関係数 (rs) で示す。

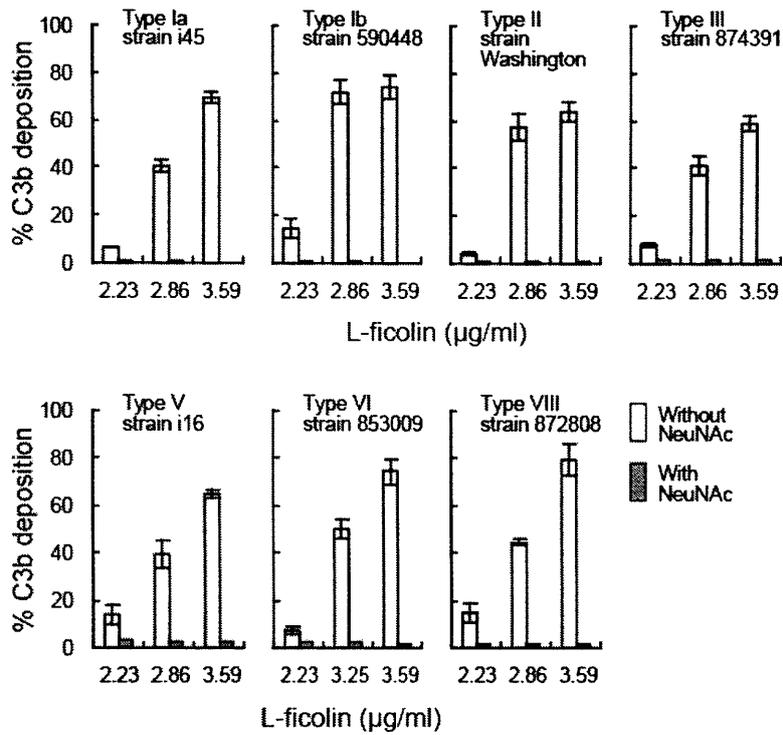


図 6. 血清型 Ia, Ib, II~VIII 型株をそれぞれの血清型特異 IgG 濃度が 1 µg/ml 以下の臍帯血血清でオプソニン化した際の C3b 沈着率と同一血清に NeuNAc を加えオプソニン化した際の C3b 沈着率。NeuNAc を加えない場合の C3b 沈着率は 2 回測定の平均値 (誤差線は測定値) を示し, NeuNAc を加えた場合の C3b 沈着率は 1 回の測定値を示す。

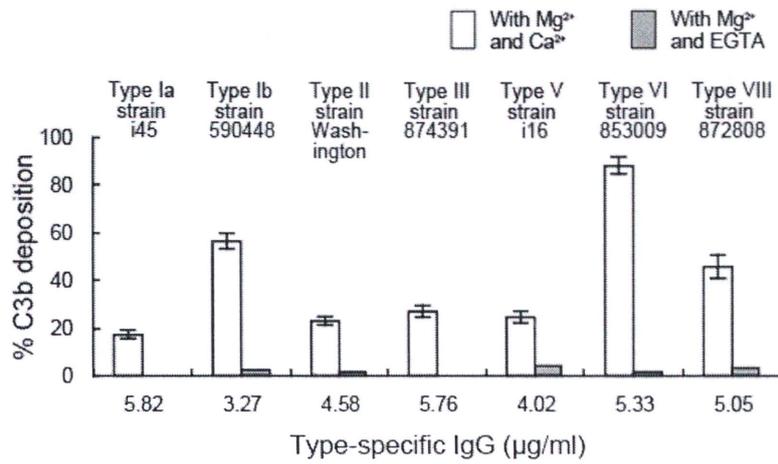


図 7. 血清型株 Ia, Ib, II~VIII 型株を L-フィコリン濃度が 1 µg/ml 以下の臍帯血血清でオプソニン化した際の C3b 沈着率と同一血清に EGTA を加えオプソニン化した際の C3b 沈着率。EGTA を加えない場合の C3b 沈着率は 2 回測定の前平均値 (誤差線は測定値) を示し, EGTA を加えた場合の C3b 沈着率は 1 回の測定値を示す。

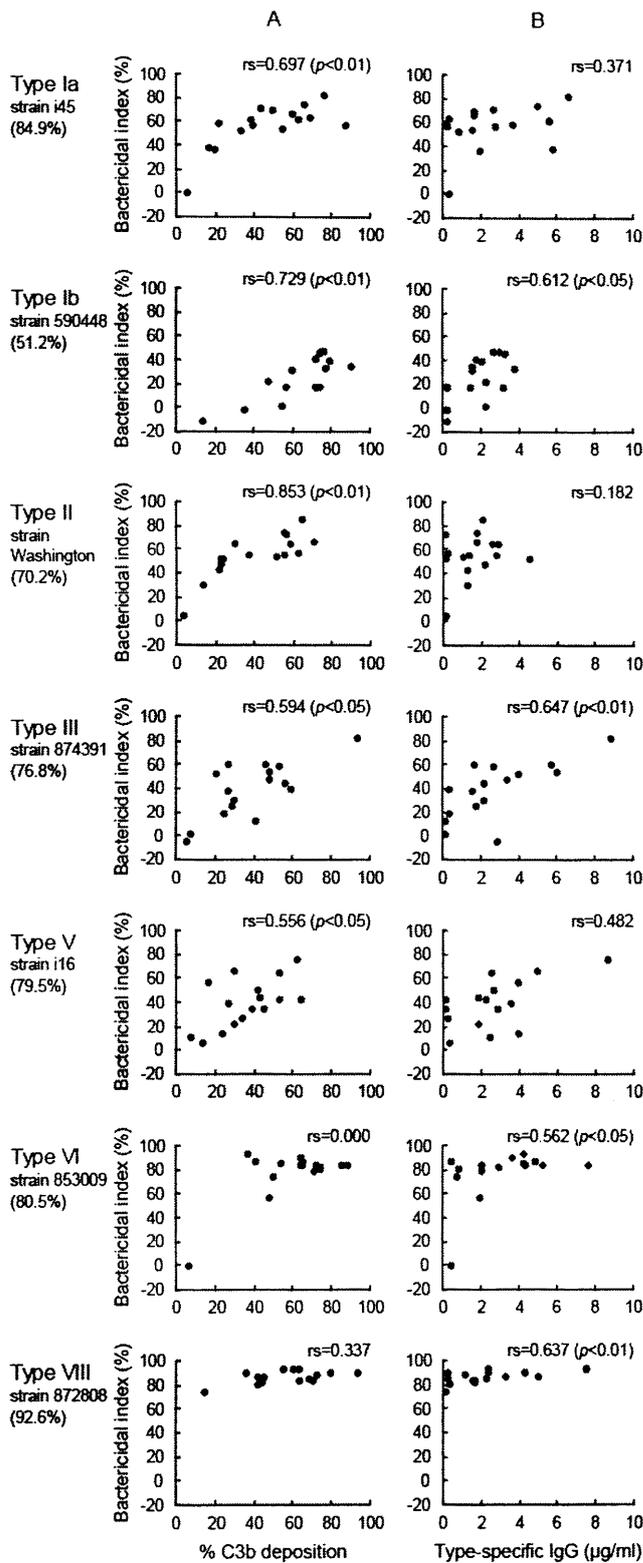


図 8. 血清型 Ia, Ib, II ~ VIII 型株を臍帯血血清でオプソニン化した後, 成人末梢血から分離した好中球で貪食殺菌した際の殺菌率と C3b 沈着率との関係 (A), 殺菌率と型特異 IgG 濃度との関係 (B)。殺菌率は血清型ごとに同時に同一好中球試料を用いて 2 回ずつ測定した値の平均値を示す。相関は Spearman の順位相関係数 (rs) で示す。対照として成人血清を用いオプソニン化した後, 臍帯血血清の測定と同時に同一好中球試料を用いて測定した殺菌率を左端に示す。

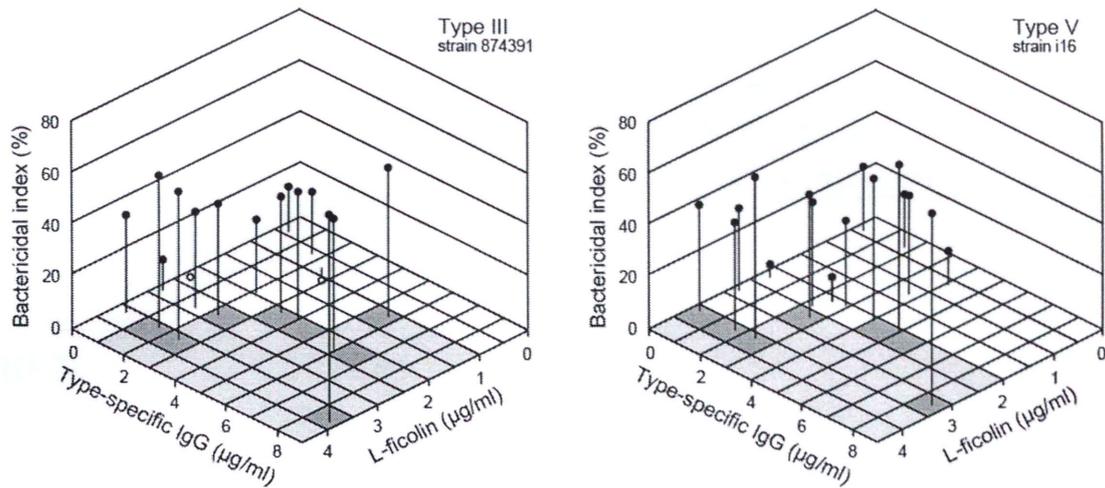


図 9. 血清型 III 型と V 型株を臍帯血血清でオプソニン化した後，成人末梢血から分離した好中球で貪食殺菌した際の貪食殺菌率，血清 L-フィコリン濃度，型特異 IgG 濃度の相互関係（測定値は図 7 と同一）。L-フィコリン濃度と型特異 IgG 濃度を示す底面から引いた縦線の長さが殺菌率を示す。白○は殺菌率が（-）値であったことを示す。底面が白色の領域は，殺菌率が，対照成人血清によりオプソニン化した場合の殺菌率の 50%（III 型 38.4%，V 型 39.8%）以上であると推定される領域を示す。殺菌率が 50%以上の測定点よりも高濃度の L-フィコリンや型特異 IgG を含む血清でオプソニン化した領域の殺菌率は 50%以上であるという仮定の基に推定した。

表 1 供試菌株

血清型	株	NeuNA 濃度 ³⁾ (nmol/ml of 0.6 OD ₆₀₀ bacterial suspension)
Ia 型	i45	15.4
Ib 型	590448	6.7
II 型	Washington	8.7
III 型	874391	7.0
V 型	i16	8.9
VI 型	853009	6.4
VIII 型	872808	4.2