

平成30年 5月31日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19240

研究課題名(和文) 髄膜脳炎を惹起する*B. mandrillaris*の国内棲息状況と感染経路の解明研究課題名(英文) Elucidation of habitat status and infection route of *B. mandrillaris* causing meningoencephalitis

研究代表者

山内 可南子 (YAMANOUCI, KANAKO)

弘前大学・保健学研究科・助手

研究者番号：80740810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題は、ヒトの生活環境下に存在することが示唆されている*B. mandrillaris*の日本における棲息状況、遺伝学的・形態学的分類、純培養と動物への感染実験、さらに早期発見や治療への基礎検討を行う計画である。日本全国の土壌を採取し、培養と土壌DNAにおけるPCRを実施したところ、青森県土壌から1株の*B. mandrillaris*を日本で始めて分離した。豪雪地帯のような寒冷な地域においても、*B. mandrillaris* 性のアメーバ性髄膜脳炎に罹患するリスクがあることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we will clarify the habitat status of *B. mandrillaris* in Japan in the living environment of humans. Then, it plans to conduct genetic and morphological classification, pure culture and infection experiments on animals, and basic examination for early detection and treatment.

Soil collected throughout Japan, PCR on isolated amoebae from soil culture and soil DNA was carried out, and one strain of *B. mandrillaris* was isolated from Aomori Prefecture soil for the first time in Japan. We also clarified that there is a risk of suffering from Balamuthia amoebic meningoencephalitis even in cold areas such as heavy snowy areas.

研究分野：公衆衛生学

キーワード：自由生活性アメーバ *Balamuthia mandrillaris* アメーバ性髄膜脳炎 土壌 日本国内

1. 研究開始当初の背景

原生物であるアメーバ類は形態学的、遺伝子学的に分類されており、病原性・非病原性を含め非常に多くの種類が知られている。なかでも自由生活性のアメーバは我々の生活環境下に存在し、土壌、海水、室内などの多様な環境下から分離され世界中で報告されている(Debra A. Brock *et al. Nature*, 2011)。これら自然環境下に棲息する自由生活性アメーバの多くは長い間非病原性であると考えられてきた。しかし近年、ヒトに感染し髄膜脳炎、皮膚アメーバ症、アカントアメーバ性角膜炎などを惹起する自由生活性アメーバが確認され、これまで我々の研究室でも論文や学会にて報告している(Sakuraba *et al. J Health Sci Res.*, 2011.; 他研究業績欄参照)。これらの疾病のなかでもアメーバ性髄膜脳炎は致死率がほぼ 100%におよぶ難治性の感染症で、その原因となる病原体は『人喰いアメーバ』と呼ばれている。現在においてその感染経路や詳細な病態、治療法は解明されていない。また医療従事者のなかでもアメーバ性髄膜脳炎の認知度が不足しており、それゆえ多くのアメーバ性髄膜脳炎の診断が見逃されているのが現状である。日本国内におけるアメーバ性髄膜脳炎の感染者は9症例(2012年10月現在)報告されており、うち7症例が *Balamuthia mandrillaris* によるものと訂正報告されている。*Balamuthia* 感染者の中には基礎疾患を有しない健常者も確認されており、本疾患の感染経路や病態を解明し、治療法を確立することは急務である。

2. 研究の目的

本研究課題は、ヒトの生活環境下に存在することが示唆されている *B. mandrillaris* の日本における棲息状況、遺伝学的・形態学的分類、純培養と動物への感染実験、さらに早期発見や治療への基礎検討を行う計画である。それらの解析により致死性の高い *B. mandrillaris* 感染症の感染経路の特定や病態の解明を目指す。

3. 研究の方法

1) 青森県土壌中 *B. mandrillaris* の同定と棲息域調査

日本国内各所から様々な種類の土壌検体を採取する。採取した土壌検体から直接 DNA を抽出し、複数の *B. mandrillaris* 特異的 Primer を使用した nested PCR 法により *B. mandrillaris* 検出のスクリーニングを行う。nested PCR によって検出されたフラグメントのクローニングを行い、DNA シークエンス解析によって塩基配列の決定を行う。これまで報告されている *B. mandrillaris* の塩基配列を GeneBank などのデータベースから入手し、相同性解析により *B. mandrillaris* の同定を行う。

2) 土壌中 *B. mandrillaris* の単離と感染経路の

解明

1)により同定された高頻度棲息域の土壌を使用してこれまで我々が開発してきた *Balamuthia* 様アメーバ単離・培養法を行い、*B. mandrillaris* の栄養型及び嚢子(シスト)を形態学的な解析により分類する。加えて、単離・培養した *Balamuthia* 様アメーバから DNA を抽出し、DNA 塩基配列の決定を行い、*B. mandrillaris* であることを確認する。*B. mandrillaris* と同定された栄養型アメーバを培養・回収し、C.B-17/scid のような免疫不全マウスに感染させる。感染は経鼻的、経口的、経皮的、尾静脈注射、腹腔注射などにより行い、数週間～数か月経過観察を行うことにより感染経路の検討を行う。一方、嚢子による感染実験も同様に検討する。経過観察中に異常反射行動などの神経症状が観察された場合にはマウスを解剖し、病理学的な脳組織の異常について詳細に調べる。また、各感染方法やアメーバ感染数による感染率(%)や致死率(%)も調べる。土壌由来 *B. mandrillaris* の系統分類と合わせて、感染性の高い *B. mandrillaris* 系統とその棲息地域の同定も行う。

4. 研究成果

1) 土壌 DNA を用いた *Balamuthia* 特異的 PCR

北海道から沖縄までの土壌 103 件から土壌 DNA を採取し、*Balamuthia* 特異的 PCR により *B. mandrillaris* 生息土壌のスクリーニングを実施した。103 件のうち 5 件の土壌から *B. mandrillaris* 遺伝情報の配列を確認した。増幅産物は TA クローニング後にシークエンス解析に用い、近隣結合法により既存の *B. mandrillaris* 遺伝情報とともに neighbor-joining tree を作成した (Fig. 1)。土壌から検出された約 230bp の増幅産物は、*B. mandrillaris* 16S rRNA 領域と 98~99% の高い相同性を示し、また NJ tree でもすべての配列は *B. mandrillaris* クラスタに含まれた。

B. mandrillaris の 16S rRNA 領域は保存性が高く NJ tree の結果からも世界各国の *B. mandrillaris* は大陸間の差がなく、変異の少

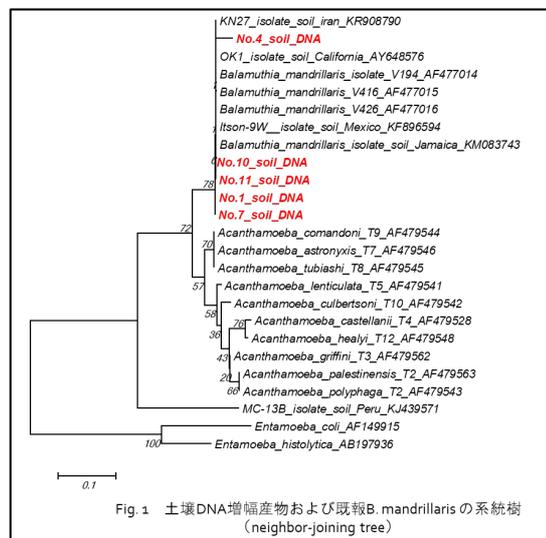


Fig. 1 土壌DNA増幅産物および既報 *B. mandrillaris* の系統樹 (neighbor-joining tree)

ない種であると思われる。しかしながら、本研究で検出された土壌由来 *B. mandrillaris* の 16S rRNA 領域は 230bp と短く、全ての配列で 2% 以内の変異率ではあったが、今後長鎖における配列情報を解析することにより、同種間内にも遺伝的変異が明らかになるかもしれない。

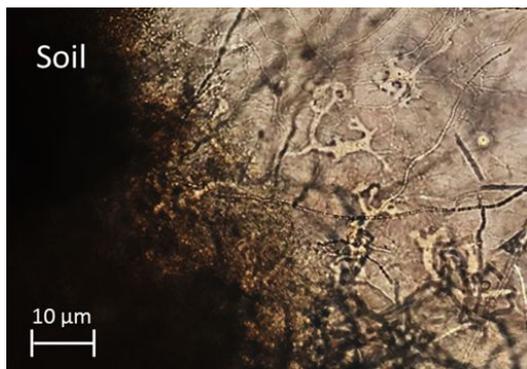
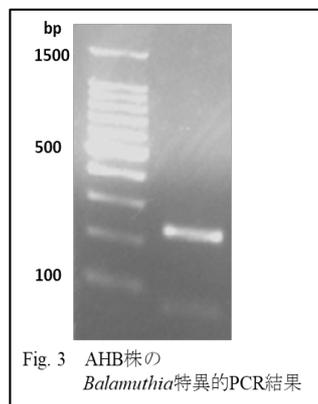


Fig. 2 土壌から出現した大型アメーバ

2) 土壌培養による *B. mandrillaris* の単離

1)にて実施したスクリーニングの結果、*B. mandrillaris* の生息が期待された土壌を含めた、採取土壌 103 件の土壌全てを培養し、*B. mandrillaris* 様大型アメーバ (ALB) の分離培養を行った。30 インキュベーター内で 1.5% NN (No nutrition) 寒天培地上で培養した土壌からは、おおよそ 5 日 ~ 10 日で大型アメーバが出現した (Fig. 2)。出現した ALB は、培地切り出し法により複数回の培地交換を実施し、クローニングを行った。クローニングに成功した 6 株の ALB に対し、*Balamuthia* 特異的 PCR を実施したところ、青森県内土壌から分離した 1 株で遺伝子増幅を確認した (Fig. 3)。



このフラグメントに対し 16S rRNA 領域シーケンス解析を実施したところ、既報 *B. mandrillaris* と同様の配列を含み、相同率 98 ~ 100% であった。AHB 株は、アメリカ・カルフォルニア州の土壌から分離された KO1 株やジャマイカの泥風呂より分離された KM083743 株などと高い相同性を示し、土壌 DNA における配列解析と同様に、遺伝的変異度は世界的に非常に小さいことが明らかとなった。そして、AHB 株は、日本で初めて分離された土壌由来 *B. mandrillaris* (Strain AHB) であることが明らかとなった。

3) AHB 株の継代・大量培養

AHB 株の形態学的特徴を確認し、生体への感染力および免疫機能を解析するため、AHB 株の大量培養を企図した。*Balamuthia* 用液体培地として最も用いられる BM-3 培地を作成し、環境由来 AHB 株の培養を試みたが、アメーバは移植後すぐに委縮し死滅してしまった。そのため新たな培地の開発に着手した。土壌の懸濁液を主成分とした新たな培地を作成したが、一時的な培養は可能となっても、長期的な栄養形の保持は難しい状況であった。培養初期に確認した、栄養形・シストの形態を Fig. 4 に示す。

感染力および免疫動態の解析には、アメーバの継続的な培養が不可欠であることから、新規液体培地の開発が必要である。

本事業では感染力・免疫動態の解析は困難であったが、治療法・検査法の確立を目指し、新規液体培養法の構築へ向けて、今後も継続して取り組んでいく。

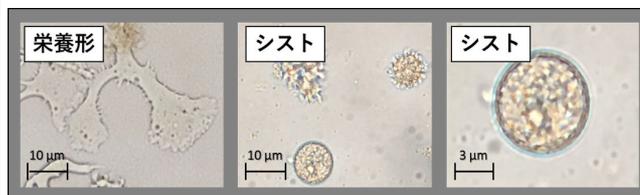


Fig. 4 AHB株液体培地中の形態変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

K. Yamanouchi, H. Arima, Y. Sakamoto, K. Kanto, K. Kasai, K. Ito, T. Inaba. First report of the isolation of *Balamuthia mandrillaris* in the northern region of Japan, *Parasitol Res*, in press.(査読あり)

有馬弘晃, **山内可南子**, 葛西宏介, 伊藤巧一, 稲葉孝志. 青森県内土壌からの *B. mandrillaris* 16S rRNA 遺伝子の検出. 臨床検査教育, Vol.8, 112-114, (2016) (査読あり)

〔学会発表〕(計 8 件)

山内可南子, 坂本 倭, 辻口 貴清, 稲葉 孝志. 自由生活性アメーバ *Balamuthia mandrillaris* の土壌環境における生息特性. 第 87 回 日本寄生虫学会. (2018)

坂本 倭, **山内可南子**, 喜多見 彩, 渡邊 マリア, 細田 正洋, 葛西 宏介, 伊藤 巧一, 稲葉 孝志. 土壌調査からみる自由生活性アメーバ *Balamuthia mandrillaris* の生息特性. 第 12 回日本臨床検査学教育学会学術大会. (2017)

山内可南子, 坂本 倭, 関東和樹, 有馬弘晃, 稲葉孝志. 土壌分析による *Balamuthia mandrillaris* 生息特性の解析. 第 62 回 日本

寄生虫学会・日本衛生動物学会 北日本支部
合同大会. (2016)

山内可南子, 木田和幸, 髄膜脳炎を引き起
こす自由生活性アメーバ *Balamuthia*
mandrillaris の青森県内生息調査. 第 75 回日
本公衆衛生学会総会(2016)

Kanako Yamanouchi, Hiroaki Arima, Kosuke
Kasai , Takakiyo Tsujiguchi, Ryo Saga, Koichi
Ito, Takashi Inaba. Isolation from soil and
development of culture methods for *Balamuthia*
mandrillaris, a meningoencephalitis-causing, The
32nd World Congress of Biomedical Laboratory
Science. (2016)

Hiroaki Arima, **Kanako Yamanouchi**, Koichi
Ito, Kazuki Kanto, Yamato Sakamoto, Takashi
Inaba. Development of a soil DNA extraction
method and detection of *Balamuthia mandrillaris*
genetic material, The 32nd World Congress of
Biomedical Laboratory Science. (2016)

坂本倭、**山内 可南子**、有馬弘晃、関東和
樹、伊藤巧一、稲葉孝志. 自由生活性アメー
バ: *Balamuthia mandrillaris* の青森県内生息分
布と 16S rRNA 領域の比較. 第 11 回日本臨床
検査技師教育学会学術大会. (2016)

関東和樹、**山内 可南子**、有馬弘晃、坂本
倭、伊藤巧一、稲葉孝志. 髄膜脳炎を惹起す
る *Balamuthia mandrillaris* の生息土壌環境の
分析. 第 11 回日本臨床検査技師教育学会学
術大会. (2016)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

研究者番号：80740810

山内 可南子 (YAMANOUCHI, Kanako)