

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K17349

研究課題名(和文) 土壌に潜む致死性アメーバ生息特性解析と新規無細胞培養法の開発

研究課題名(英文) Analysis of soil inhabited by amoebae which causes meningoencephalitis and development of new cell-free culture method

研究代表者

山内 可南子 (Yamanouchi, Kanako)

弘前大学・保健学研究科・助教

研究者番号：80740810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：自由生活性アメーバに分類されるバラムチア・マンドリリスは、ヒトに感染し髄膜脳炎を惹起する。本アメーバの罹患者は、ほぼ100%死に至ることから、早期診断・治療法の確立が急務であるが、既存のバラムチア培養法は非常に複雑な組成で汎用性が低く、環境バラムチアの培養には特に適していない。そこでバラムチアの生息する土壌の解析を通じ、生息特性を明らかにし、新規培養法を開発することを企図した。土壌解析により環境中のバラムチアは、富栄養条件を好み、ミネラルを含んだアルカリ性土壌を好むことが明らかとなった。試作培養液では、土壌に近い電気伝導率を再現することで環境バラムチアの培養に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課題の自由生活性アメーバは、土壌、海水、室内塵などの生活環境下で分離され、世界中でその生息が確認されている。常に人の身近に存在してきた自由生活性アメーバは、長い間無害であると認識されてきた。しかし近年は、ヒトを含む哺乳動物に感染し髄膜脳炎、皮膚アメーバ症や角膜炎などを引き起こすことが確認され、臨床例が世界各国で報告されている。本研究により環境株、臨床株ともに簡便に培養することが可能となれば、アメーバの生態研究や新たな治療・検査法を構築するための研究が活発化すると思われる。世界的に停滞を示す致死性アメーバ感染症研究において、新規培養法の構築は学術的・社会的に意義のある研究と思われる。

研究成果の概要(英文)：Balamcia mandrilaris, which is classified as a free-living amoeba, infects humans and causes meningoencephalitis. Since almost 100% of the affected people of this amoeba die, there is an urgent need to establish an early diagnosis and treatment method. However, the existing balamcia culture method has a very complicated composition and low versatility, and is not particularly suitable for culturing environmental balamcia. Therefore, we aimed to clarify the habitat characteristics and develop a new culture method through the analysis of the soil in which Balamcia inhabits. Soil analysis revealed that Balamcia in the environment prefers eutrophic conditions and prefers mineral-containing alkaline soils. In the prototype culture solution, we succeeded in culturing environmental balamcia by reproducing the electrical conductivity close to that of soil.

研究分野：感染症学

キーワード：アメーバ性髄膜脳炎 土壌解析 無細胞培養

## 1. 研究開始当初の背景

土壌や水など自然環境下に生息する自由生活性アメーバのパラムチア・マンドリラリスは、人に感染し髄膜脳炎を引き起こす。致死率がほぼ 100%におよぶ難治性パラムチア性髄膜脳炎は、その致死的な症状から、早期発見・早期治療が求められているが、現在もその確立には至っていない。ヒトにおけるパラムチア感染症は、1991年に報告され、文献検索サイト PubMed では、パラムチアに関する報告が、1993年から現在まで『239件』ある。その多くは、文献レビューや臨床報告などで占められ環境分離報告は僅か『15件』である。ほとんどの環境分離株は、感染実験に用いられず、いずれの報告者も分離・培養の困難さを考察している。既報の培養法が、環境分離株に適用しないことは明らかで、病原性解析や治療法を確立していくために、培養法を構築することは重要な課題である。

## 2. 研究の目的

パラムチアの環境下からの分離は、米国カルフォルニアやペルー、イランといった暖かい地域に偏在している。また感染者も温暖な地域に報告が多いことから、これまで本感染症は地域的な特異性を持つような解釈がなされてきた。しかしながら、日本国内で尚且つ寒冷地でもある青森県から分離されたことは、本感染症がどのような地域でも発生しうる危険性を示唆する。本研究では、パラムチアの生息する土壌の特性を明らかにし、新規パラムチア培養法の構築へ役立てることを目的としている。

## 3. 研究の方法

本研究は、環境下におけるパラムチアの生息特性を明らかにし、新たな培養法を構築する研究である。これまで報告されるパラムチア培養法は、グルコースを主な栄養成分とする BM-3 や接着細胞を足場とした細胞培養法 (RPMI 1640) がある。共に富栄養の培地で、細菌が共生する環境由来パラムチアは、細菌有意の増殖により死滅する。そこで本研究では、土壌中に生息するパラムチアの生息特性を調査し、新たな無細胞液体培地の開発を実施した。各実験課題は以下の方法で実施した。

### 生息特性解析

#### 課題 1) 日本国内土壌 DNA の解析 (パラムチア生息土壌の選定)

日本全国各所から様々な種類の土壌検体を採取し、パラムチア 16S rRNA 領域を使用した遺伝子の検出を行った。DNA 検出と並行し新たな環境パラムチアの分離を行い、土壌 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った。その後、パラムチア生息土壌と未検出土壌を選定し、土壌解析を実施した。

#### 課題 2) パラムチア生息土壌解析 (土種・土性・養分分析)

課題 1) により同定されたパラムチア生息土壌を使用し、土壌 pH・電解質量の解析を行った。土種・土性の決定は土壌乾燥密度解析と土壌粒径分析により明らかにした。

### 培地開発

#### 課題 3) 環境パラムチア共生細菌の証明と同定

環境分離パラムチアは長期間細菌が除菌されることはない。共生細菌の存在を証明するため、無栄養寒天培地上で 1 か月以上培養し、アメーバ内外の細菌を LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (thermo Fisher) で染色し、共焦点顕微鏡で観察した。アメーバから DNA を採取し、細菌用ユニバーサル Primer : 8UA と 1485B によって細菌の 18S rRNA 領域を解読し共生細菌の同定を行った。

#### 課題 4) 無細胞液体培地の開発

課題 2) で明らかになったパラムチア生息特性から、養分や pH、栄養分を選択し、無細胞培地を試作する。生死判定や世代時間を検証した。課題 3) により明らかになった共生細菌に感受性を示す抗生物質を選択し、アメーバの発育を観察した。

## 4. 研究成果

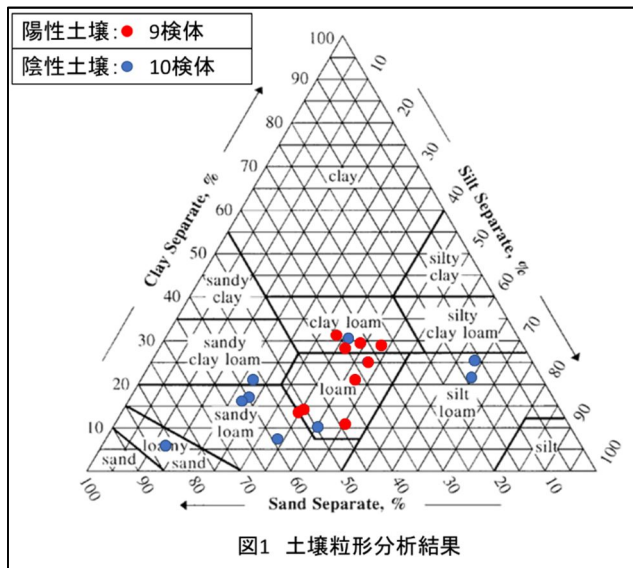
### 生息特性解析

全国各地から土壌を採取し、土壌 DNA を抽出後、パラムチア遺伝子の検出を試みた。41 検体中 9 件の土壌からパラムチア 16s rRNA 遺伝子を検出し、同時に培養では 2 種の環境分離パラムチアを得ることができた。パラムチア生息土壌 9 検体、未検出土壌 10 検体について土壌の化学・物理分析を実施した。その結果、パラムチア生息土壌の pH は 7.5 程度の中性を示すものが多く、

また粒形分析では、土種 Clay loam, Loam を示した(図1)。Clay loam, Loam 土壌は、土壌粒子が均一に含まれ、また栄養分も他の土壌に比べ富栄養条件を示す。環境下で生活を営むバラムチアは、栄養分の富む土壌を好む傾向が明らかとなった。

### 培地開発

培地開発にあたって、環境由来バラムチアに共生する細菌を明らかにした。分離に成功した2種のバラムチアを2か月無栄養培地上で培養し、アメーバ内外の細菌を LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit(thermo Fisher)で染色し、共焦点顕微鏡で観察した結果、アメーバシスト内に、多数の生存最近の存在が明らかとなった(図2)。この生存細菌の純培養は困難であったことから、18s rRNA 領域を用いたクローンライブラリー法で細菌種を同定した。その結果、*Chitinophaga* 属、*Inquilinus* 属、*Brevundimonas* 属などの色素産生最近の共生を明らかとした。色素産生細菌は、生体の凍結、紫外線及び電離放射線などによる DNA ダメージへの耐性を持つことで知られ、アメーバが過酷な自然環境下でこれら細菌の特性を利用し、シスト形成後の生存に利用している可能性が示された。



次に行った無細胞培養液の試作では、土壌解析の結果と同様に pH は 7.2~7.5 の中性付近、電気伝導率(ミネラル類含有量の指標)は、129  $\mu\text{S}/\text{cm}$  の培地内で世代時間 60~75 時間と長いものの死滅することなく発育させることに成功した。しかしながら、複数の抗生剤を低濃度でも添加すると、すべてのアメーバが死滅に至った。今後は、アメーバの発育に影響を与えない抗菌薬の再検証が必要である。また臨床株、環境株ともに恒常性を担保し、大量に培養を可能とする培地の開発を継続していく。

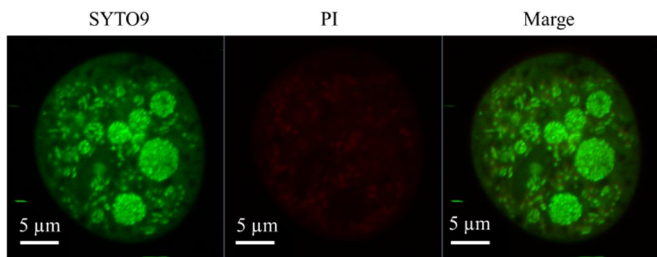


図2 共焦点顕微鏡下における細菌の共生の様子

薬の再検証が必要である。また臨床株、環境株ともに恒常性を担保し、大量に培養を可能とする培地の開発を継続していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yamanouchi K, Arima H, Sakamoto Y, Kanto K, Kasai K, Ito K, Inaba T	4. 巻 117
2. 論文標題 First report of the isolation of Balamuthia mandrillaris in the northern region of Japan	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasitology research	6. 最初と最後の頁 2895-2900
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00436-018-5980-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 KanaoYamanouchi, MasahiroTakeuchi, HiroakiArima, TakakiyoTsujiuchi	4. 巻 3
2. 論文標題 Development of a method to extract protozoan DNA from black soil	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Parasite Epidemiol Control	6. 最初と最後の頁 e00081
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.parepi.2018.e00081	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山内可南子、辻口貴清、坂本瑞生
2. 発表標題 自由生活性アメーバ Balamuthia mandrillaris. は新たな病原体ベクターか？
3. 学会等名 第78回日本公衆衛生学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤真帆, 山屋理樹, 坂本倭, 山内可南子
2. 発表標題 環境由来 Balamuthia mandrillaris に内在する細菌の同定
3. 学会等名 平成30年度 日臨技北日本支部医学検査学会（第7回）
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------