

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 9 日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590511

研究課題名(和文) 腸アメーバ症発症の一因としての腸内細菌産生物質の解析

研究課題名(英文) Analyses of enteric bacterial products as a causative agent for the onset of intestinal amoebiasis

研究代表者

小林 正規 (KOBAYASHI, Seiki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号：70112688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：偏性嫌気性菌である *Bacteroides fragilis* 培養上清に赤痢アメーバ増殖促進効果と、赤痢アメーバ或いは *Tritrichomonas foetus* の盲腸粘膜への持続感染を容易に成立させることを見出した。培養上清解析からは赤痢アメーバの GalGalNAc レクチンに対応する糖鎖が顕著に増加すること、及びペルオキシダーゼの不活化作用もみられた。このような細菌代謝物は多様な病態を示す赤痢アメーバ症(不顕性～劇症型感染)の発症にも影響する可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：Promoting effects for the growth of *Entamoeba histolytica*, and for both persistent infections of *E. histolytica* and *Tritrichomonas foetus* to the cecum of CBA mouse were found in the culture supernatant of obligate anaerobic *Bacteroides fragilis*. Increase of corresponding sugar chains for GalGalNAc lectin of *E. histolytica* and inhibition of peroxidase activity were found by analyses of the culture supernatant. These bacterial metabolites have a possibility to affect to the onset of amoebiasis that has various conditions from latent to fulminant type.

研究分野：寄生虫学；腸管寄生原虫の培養

キーワード：赤痢アメーバ *Bacteroides fragilis* 腸持続感染 GalGalNAc レクチン ペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 腸赤痢アメーバ症の発症率は 10%程度と推定され、自然治癒例もみられる。宿主側の発症要因としては糖尿病、アルコール中毒などの疾患の関与が疫学的調査から明らかにされている。また急激に重症化する劇症型アメーバ症ではステロイド投与後に発症し易いことが知られていた。

(2) 腸内細菌のアメーバ症発症への影響は研究開始当初から現時点に至るまで、重要性は指摘されているものの、病原細菌との重複感染によるアメーバの組織侵入力の助長や細菌叢の異常と免疫脳の低下というような漠然とした捉え方に留まり、特定の腸内細菌が腸粘膜への侵入と発症へ関与するメカニズムについては不明な点が多く、赤痢アメーバの組織侵入に関与する腸内細菌の因子についても明確に同定・解析された報告は見いだせなかった。

2. 研究の目的

(1) 腸赤痢アメーバ症の発症要因のひとつとして特定の腸内細菌の関与を考え、その候補として腸内寄生アメーバの増殖促進効果を有し、赤痢アメーバの実験的なマウス持続感染を容易にし、更に赤痢アメーバと同様、腸粘膜に接着し増殖する嫌気性菌の *acteroides fragilis* を標的とし本研究を計画した。最終的には赤痢アメーバ腸持続感染モデルにおいて *B.fragilis* がどのようなメカニズムで赤痢アメーバ感染の成立とアメーバ症発症を助長するかを追究する。

(2) (1)の結果をもとにマウス赤痢アメーバ持続感染モデルの腸粘膜への感染促進と発症に関与する因子の同定を試みる。

3. 研究の方法

(1) CBA マウス盲腸に 20-24 回感染と分離無菌培養を繰り返し、無菌的に培養維持することで virulence を獲得維持した赤痢アメーバ標準株(HM-1:IMSScl6)を作製した。アメーバは分離培養後 3 ヶ月以内の virulent 株を CBA マウス盲腸への感染実験とシリアンゴールデンハムスター肝臓への感染実験に用いた。

(2) *B. fragilis* は GAM 培地(ニッスイ)で培養維持し、その培養上清について、主に赤痢アメーバ増殖活性と赤痢アメーバ感染の促進活性を解析した。

(3) *B.fragilis* 培養上清は赤痢アメーバの接着因子(GalGalNAc レクチン)と対応する糖鎖の存在と量的解析を目的として、BlotGlyco キット(住友ベークライト)で培養上清中のラベル化した糖鎖を MALDI-TOF MS で測定解析した。また、培養上清のペルオキシダーゼ阻害活性の評価は西洋ワサビとヒト好中球由来のミエロペルオキシダーゼ(フナコ

シ;R&D)について、定量的に測定解析した。

(4) *B. fragilis* 培養上清の HM-1:IMSScl6 増殖促進効果と実験動物への感染促進効果は 0.22 μ m 径のミリポアフィルターで濾過滅菌した培養上清を用いて解析した。

(5) HM-1:IMSScl6 を盲腸に持続感染させた CBA マウスに、従来マウスには感染が知られていない牛と豚に寄生する *Tritrichomonas foetus*(2×10^6)経口及び尾静脈投与、及び *T.foetus* を *B.fragilis* 培養 3 日目の菌体懸濁液(0.3ml)と混和し CBA マウス盲腸内に直接接種を行った。

4. 研究成果

(1) *B. fragilis* 培養 3 日目の菌体懸濁液(0.3ml)と濾過滅菌した *B. fragilis* 培養上清(10%)を加えた無菌培養培地(YIMDHA-S)で培養維持した HM-1:IMSScl6(2×10^6)を CBA マウス盲腸に接種すると、従来困難であった持続的感染が容易に成立し、その病変は盲腸全域に及んだ。また、ハムスター肝臓に同赤痢アメーバ株を、投与数を変えて YIMDHA-S(0.1ml)に懸濁して接種すると 1×10^4 と少数のアメーバでも肝臓瘍形成がみられた反面、 2×10^5 以上のアメーバ数では好中球遊走性の炎症反応が惹起され、膿瘍形成が阻止される現象が見られた。*B.fragilis* 培養上清を加えて、或いは加えず培養したアメーバ 1×10^5 をマウス腹腔に接種すると加えたものでは 2 時間後には 5.7×10^6 /ml の好中球が誘導されたのに対し、加えなかった場合では 9×10^5 /ml と誘導数に 6.3 倍程度の差がみられた。

(2) *B.fragilis* 培養懸濁液の分画成分について検討を試みた結果、菌体成分を除いた培養上清にも CBA 盲腸感染助長因子が含まれることが確認された。また、amicon により分画した培養清の分子量が 10,000 以下の上清成分に、精製に伴い活性は低下したが、接着を伴う増殖促進活性と virulence 維持効果が確認された。

(3) *B. fragilis* 培養上清に含まれる糖鎖を MALDI-TOF MS で測定解析した結果、*B.fragilis* に、赤痢アメーバの接着因子(Adhesin)(GalGalNAc reku tin)に対応する糖鎖(GalGalNAc)と同等の分子量の糖鎖(Hex)₂ と(HexNAc)2(Sulph)1 に顕著な量の増加がみられた(図 1)。

また、培養上清中に西洋ワサビ由来のペルオキシダーゼを直接的に不活化する物質を見いだした。この不活化活性は培地に含まれるシステインの量に依存性が見られ、嫌気的条件下では活性は安定して維持されたが、好気的条件下では速やかに低下した(図 2)。また、ヒト好中球由来のミエロペルオキシダーゼ活性の阻害効果も確認された。

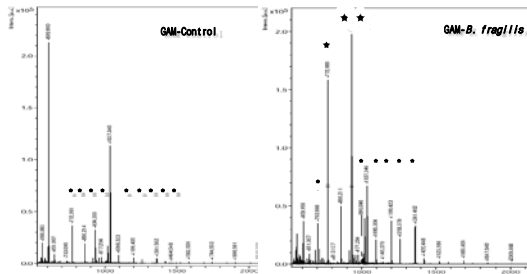


図1 *B. fragilis* 培養上清に含まれる糖鎖解析 (MALDI-TOF MS)

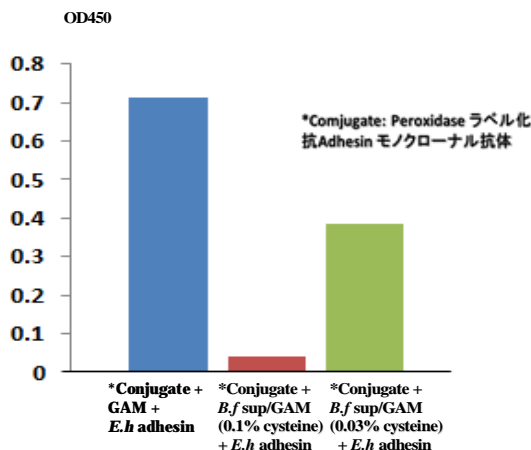


図2 赤痢アメーバ Adhesin(GalGalNAc lectin)検出 ELISA キットにおける *B. fragilis* 培養上清のペルオキシダーゼ活性阻害作用(開栓後直ちに濾過滅菌後阻害実験に使用)

(4) *B. fragilis* 培養3日後、嫌気条件で遠沈し、CBA マウス盲腸を外科的に露出させ、接種直前に速やかに濾過滅菌して、その培養上清と HM-1:IMSScl6 (2×10^6)を混和し、速やかに盲腸内に注入した。その結果菌体を含んだ場合と同様 80%以上の高い確率で感染が成立した。但し、接種までの時間が20分を越えると感染率の低下がみられ、ペルオキシダーゼ阻害効果との関連性が示唆された。

(5) HM-1:IMSScl6 を盲腸に持続感染させた CBA マウスに *T. foetus* を経口、及び尾静脈投与するか、或いは健常な CBA マウス盲腸内に *B. fragilis* と混合し直接接種すると、*T. foetus* の感染の成立が確認されたが、いずれの場合も盲腸腔内でのみ増殖が確認され、尾静脈接種した場合でも組織内での増殖は確認できなかった(図3)。

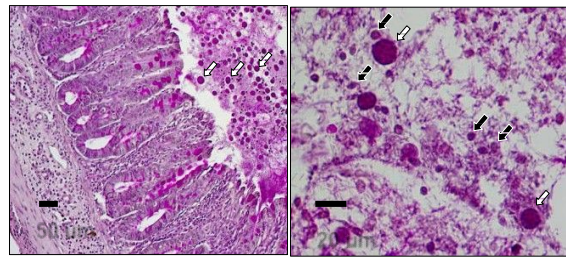


図3 赤痢アメーバと共感染した *Trichostrongylus axei* 感染 CBA マウス盲腸。HM-1:IMSScl6: ◁◁ ; *T. foetus*: ◀

<引用文献>

Kobayashi S, Imai E, Haghghi A, Khalifa SA, Tachibana H, Takeuchi T. Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* in newly designed yeast extract-iron-gluconic acid-dihydroxyacetone-serum medium. *J Parasitol.* 2005. 91. 1-4. PMID: 15856863

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計12件)

Doleoer S, Nakamura R, Mi-ichi F, Adachi K, Kobayashi S, Hamano S. Mouse models of amoebiasis and culture methods of amoeba. *Parasitol.Int.* 査読有,2016,in press.

Tuda J, Peng M, Imada M, Kobayashi S, Cheng Xunjia, Tachibana H. Identification of *Entamoeba polecki* with unique 18S rRNA gene sequences from Celebes crested macaques and pigs in Tangkoko nature reserve, north Sulawesi, Indonesia. *J. Eukaryot. Microbiol.* 査読有, 2016; 0: 1-6. doi: 10.1292/jvms.15-0644

佐々木優,吉田哲也,鈴木淳,小林正規,佐藤友隆. *Entamoeba histolytica* による大腸炎から人工肛門周囲に皮膚潰瘍を併発した1例. *感染症学雑誌*, 査読有, 2016; 90: 73-76. PMID: 27032177

doi: 10.1016/j.parint.2016.03.012.

Tachibana H, Yanagi T, Feng M, Bandara KB, Kobayashi S, Cheng X, Hirayama K, Rajapakse RP. Isolation and Molecular Characterization of *Entamoeba nuttalli* Strains Showing Novel Isoenzyme Patterns from Wild Taque Macaques in Sri Lanka. *J Eukaryot Microbiol.* 査読有, 2016 ;63(2):171-80. doi: 10.1111/jeu.12265.

Suzuki J, Kobayashi S, Osuka H, Kawahata D, Oishi T, Sekiguchi K, Hamada A, Iwata S. Characterization of a human isolate of *Trichostrongylus axei* (cattle/swine genotype) infected by a zoonotic opportunistic infection. *J Vet Med Sci.* 査読有, 2016;78:633-640. doi: 10.1292/jvms.15-0644.

小林正規,柳川泰昭,渡辺恒二:劇症型ア

メーバ症の診断および治療日本集中治療医学会雑誌, 査読有, 2015; 22: 184-5.

doi: 10.3918/jsicm.

小林正規 : 赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) 臨床検査増刊号, 査読無、2014; 58(11): 1427-1429.

小林正規 : 赤痢アメーバの鑑別ポイントは? *Medical Technology*, 査読無、2014; 42(8): 828-829.

Tachibana H, Yanagi T, Lama C, Pandey K, Feng M, Kobayashi S, Sherchand JB. Prevalence of *Entamoeba nuttalli* infection in wild rhesus macaques in Nepal and characterization of the parasite isolates. *Parasitol Int*. 査読有, 2013; 62: 230-235.

doi: 10.1016/j.parint.2013.01.004.

Shimokawa C, Culleton R, Imai T, Suzue K, Hirai M, Taniguchi T, Kobayashi S, Hisaeda H, Sobuz SU, Hamano S. Species-specific immunity induced by infection with *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba moshkovskii* in mice. *Plos One*.

査読有, 2013; Volume 29 issue: 5 pages.

doi: 10.1371/journal.pone.0082025. eCollection 2013.

Makioka A, Kumagai M, Hiranuka K, Kobayashi S, Takeuchi T. Expression analysis of *Entamoeba invadens* profilins in encystation and excystation. *Parasitol Res*. 査読有, 2012; 110(6): 2095-2104.

doi: 10.1007/s00436-011-2735-3.

Shimokawa C, Kabir M, Taniuchi M, Mondal D, Kobayashi S, Ali IK, Sobuz SU, Senba M, Houpt E, Haque R, Petri WA Jr, Hamano S. *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice. *J Infect Dis*. 査読有, 2012 Sep 1; 206(5): 744-51.

doi: 10.1093/infdis/jis414.

〔学会発表〕(計3件)

橘裕司, 馮萌, Kosuwin Rattiporn, 小林正規, 柳哲雄, Mon Hla Myat, Putaporntip Chaturong, Jongwuliwes Somchai. ミャンマーに生息するアカゲザルからの *Entamoeba nuttalli* の分離とその遺伝子多型解析, 第84回日本寄生虫学会, 2015.3.21-22; 杏林大学三鷹キャンパス(東京都三鷹市)

橘裕司, 柳哲雄, 王女亭, 河田寿子, 馮萌, 小林正規, 平山謙二, Pattanawong Urassaya, Putaporntip Chaturong, Jongwutiwes Somchai. タイ中央部における野生カニクイザルからの *Entamoeba nuttalli* の分離とその性状解析. 第82回日本寄生虫学会, 2013.3.29-4.1; 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都文京区) 下川周子, 小林正規, 千馬正敬, 鈴江一友, 平井誠, 今井孝, 谷口委 Double-edged effects of IFN- γ in amoeba infection of mice.

第82回日本寄生虫学会, 2013.3.29-4.1; 東京医科歯科大学湯島キャンパス(東京都文京区)

〔図書〕(計1件)

小林正規, 津久井久美子, 野崎智義: 赤痢アメーバ分離培養株の樹立寄生虫学研究: 材料と方法 2014年度版, 日本寄生虫学会編, 三恵社.

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林 正規 (KOBAYASHI, Seiki)

慶應義塾大学・医学部・講師

研究者番号: 70112688