

学位請求論文の内容の要旨

領 域	医療生命科学領域	分 野	生体機能科学
氏 名	山内 可南子		
北日本地域におけるバラムチアマンドリラリスの初めての土壌分離報告			
主 査	高見 秀樹		
副 査	木田 和幸		
副 査	伊藤 巧一		
副 査	敦賀 英知		
<p style="text-align: center;">【背景】</p> <p>原生生物であるアメーバ類は形態・遺伝子学的に分類されており、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。病原性を示す自由生活性アメーバは、<i>Acanthamoeba</i> spp.や<i>Naegleria fowleri</i>、<i>Balamuthia mandrillaris</i>が知られており、寄生と自然界の両方で生活史を営むことから両生アメーバと称される。常に人の身近に潜んできたこれらの自由生活性アメーバは、近年、ヒトを含む哺乳動物に感染し髄膜脳炎(granulomatous amoebic encephalitis: GAE)、皮膚アメーバ症やアメーバ性角膜炎(<i>Acanthamoeba</i> keratitis: AK)などを引き起こす。これら病原性アメーバの中でも<i>B. mandrillaris</i> は、最も近年に発見されたアメーバで、罹患者の90 %以上が死に至る高い致死性を持つことで知られる。<i>B. mandrillaris</i>は、カルフォルニア国立公園で脳炎により死亡したマンドリルから発見された。その後、ヒトへの感染例が次々と明らかになり、2007年までの世界各国の<i>B. mandrillaris</i> 感染者報告は200例を超える。日本国内<i>Balamuthia</i>感染例は我々が確認できたものだけで、9症例に上り、2014年にも感染報告がなされている。国内感染者の中には特質すべき既往歴のない罹患者も確認されており、誰しもが感染しうる感染症である。本研究では、日本国内自然環境下における<i>B. mandrillaris</i>生息状況を明らかにするため、日本本州最北端である青森県の土壌を用い、培養法により<i>B. mandrillaris</i>の分離を試みた。また<i>B. mandrillaris</i>の環境下からの分離培養は非常に煩雑で、困難であることが知られているため、培養法に加え、土壌抽出DNAによる<i>Balamuthia</i> 16S rRNA遺伝子の検出を試みた。</p>			

(注) 論文題目が外国語の場合は、和訳を付すこと。

【方法】

土壌の採取は日本国内、本州最北の青森県で行った。採取地域は、青森県内の八戸市、弘前市である。土壌は、一般家庭の敷地内、牧場、田畑で行い、計13検体を解析に用いた。採取後は4度冷蔵庫内で保存し、3か月以内に培養とDNA抽出に用いた。土壌の培養には、当研究室で保有する *Acanthamoeba* II 型 MK株を熱処理し(Heated treatment MK株)、1.5 % non-nutrient (NN)寒天培地上に展開し使用した。1.5 %NN 寒天培地中央部に塗布し、30 °Cで10日間培養した。1日1回培地を確認し、樹枝状の大型アメーバを確認した培地は、寒天ごと切り出し新たな培地に移植した。単離に至った大型アメーバは、QIAamp DNA Mini Kit(QIAamp, USA)を用い、DNAを精製後、5'Balspec16S (5'-CGCATGTATGAAAGAAGACCA-3') と Balspec16Sr610 (5'-CCCC TTTTAACTCTAGTCATATAGT-3')の両プライマーにて *Balamuthia*-specific-PCR を行った。土壌からのDNA採取は、本研究室で構築したプロトコルにて抽出し、上記プライマーにてPCRを実施した。単離アメーバ及び土壌DNAにおいて、増幅を確認したPCR産物は、TAクローニングによるシーケンス解析に用いた。単離に至った環境下分離 *B. mandrillaris* は、約1075bp伸長可能な5'Balspec16S (5'-CGCATGTATGAAG AAGACCA-3') と 3' Balspec 16S (5'-TTACCTATATAATTGTCGATACCA-3')にてPCRを実施し、同様に遺伝子解読に用いた。

【結果】

いくつかの土壌から、培養5日目には大型の樹枝状アメーバが出現した(Fig. 1-A)。それらからアメーバの単離を試み、6検体(6/13)の土壌から各1株ずつ6種の樹枝状大型アメーバを分離した。これらアメーバの *Balamuthia*-specific-PCRを実施したところ、土壌No.1(八戸、馬牧場)から分離されたアメーバで *Balamuthia* PCR陽性となった。このアメーバをAHB株(Aomori-Hachinohe-*Balamuthia*, Fig. 1-B-1,2,3)とし、異なる1075bp伸長PCR Primerにおいても遺伝子の増幅を認め、既報の *B. mandrillaris* と99%の相同性を確認した(アクセッション番号 : LC348995)。本研究では、13検体の土壌を培養し、6種の大型アメーバを得たが、そのうち *Balamuthia* PCR陽性を示したのは1株、AHB株だけであった。そのため、13検体の土壌DNAに対し *Balamuthia* 特異的PCRを実施したところ、3つの土壌でPCR増副産物を確認した。これらをシーケンス解析に用いたところ、いずれも既報の *B. mandrillaris* と99%の相同性を示した(アクセッション番号 : LC349292, LC349293, LC349294)。

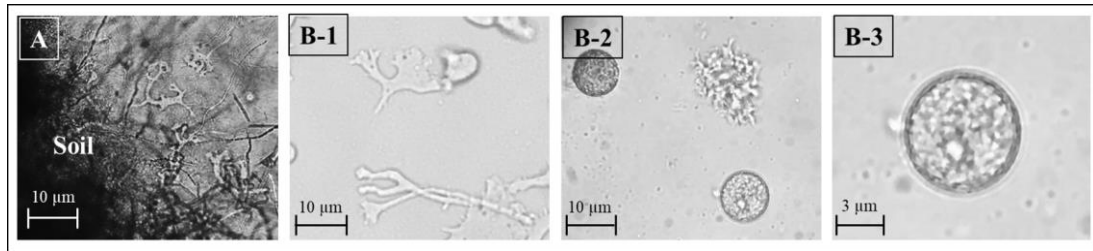


Fig. 1 土壌から出現した大型アメーバ(A)

分離に至ったAHB株の栄養形とシスト形(B-1, 2, 3)

【考察】

*Balamuthia mandrillaris*は、1986年にはじめて発見された比較的新しい病原体であり、世界各国で報告される*B. mandrillaris*によって引き起こされるGAE患者は2007年までに200例を超えている。感染者の多くは、農業に従事するヒスパニック系人種に多いとされており、土壌などの自然環境との接触が感染機会となっていると示唆されている。そのため、2000年代から環境試料をターゲットにした、*B. mandrillaris*の分離報告が散見されるようになってきた。現在までに、自然環境下からの分離はアメリカの植木鉢から2例、イランの土壌や都市の粉塵から2例、ギニアビサウの井戸水から1例、ペルーの土壌から1例、メキシコの水から1例、ジャマイカの泥風呂から1例の計8例である。以上のような環境分離報告は、温暖な気候区分を有する地域に集積してきた。また罹患者報告も同様に、温暖な気候区分に集中する傾向を示している。しかしながら、本研究では日本国内の豪雪地域においても、*B. mandrillaris*が生息していることを明らかにし、気候の差異に関わらず多様な環境下で*B. mandrillaris*感染症が起りうる可能性を示唆した。

*B. mandrillaris*の生息域は、これまでの分離報告に加え、本研究の成果により気候の差異にかかわらず広域である可能性が示された。*B. mandrillaris*感染は、幼児や中高年者、HIVなどの基礎疾患を持つ者に発生しやすく、免疫力低下との結びつきを強く示す感染症である。高齢者の増加が進む日本国内では、このような感染症が今後、頻繁に起こらないとも限らない。これまでの温暖な気候区分の感染症であるという認識を改め、誰しもが感染リスクを抱えていることを認識しなければならない。

学位論文のもととなる研究成果としての筆頭著者原著

論文題目	First report of the isolation of <i>Balamuthia mandrillaris</i> in the northern region of Japan
著者名	Kanako Yamanouchi, Hiroaki Arima, Yamato Sakamoto, Kazuki Kanto, Kosuke Kasai, Koichi Ito, Takashi Inaba
掲載学術誌名	Parasitology Research
巻, 号, 項	Online, DOI: 10.1007/s00436-018-5980-x
掲載年月日	2018 年 6 月 30 日