

学位論文題名

Novel *Parachlamydia acanthamoebae* quantification method based on coculture with amoebae

(パラクラミジア・アカンソアメーバの新規生菌数算定法の確立)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】 偏性細胞内寄生性細菌 *Parachlamydia acanthamoebae* は、呼吸器感染症に関与する新興感染症起因菌の一つである。*P. acanthamoebae* は、自由生活性アメーバの共生細菌として、土壌や水系など自然界に幅広く分布し、何らかの伝播様式によりヒトに感染するものと考えられている。

クラミジア目に属する *P. acanthamoebae* は、*Chlamydomphila pneumoniae* あるいは *Chlamydia trachomatis* と同様に宿主細胞内において、基本小体から網様体へと形態を変化させ増殖する。しかしながら *P. acanthamoebae* は、*C. pneumoniae* や *C. trachomatis* とは異なり、その増殖過程において大型の封入体を形成しない。そのため *P. acanthamoebae* の生菌数算定には、*C. pneumoniae* や *C. trachomatis* で広く用いられている封入体を指標とした菌数算定方法 (IFU 法) を用いることができず、*P. acanthamoebae* の宿主細胞内における生存・増殖様式は明らかにはされていない。

そこで本研究では、*P. acanthamoebae* の新規生菌数算定方法を確立し、アメーバならびに哺乳細胞内における本菌の生存ならびに増殖様式について検討を行った。

【材料と方法】

菌株：*P. acanthamoebae* Bn<sub>9</sub> (ATCC VR-1476)を用いた。

アメーバ株ならびに哺乳細胞株：アメーバは標準株である *Acanthamoeba castellanii* C3 (ATCC 50739)に加え、札幌市内の土壌および河川水より分離した遺伝子型 (T2、T4、T6、T13) の異なる *Acanthamoeba* spp.計 8 株を用いた。また哺乳細胞として、上皮系細胞株である HEP-2 ならびに Vero 細胞を用いた。

*P. acanthamoebae* との共培養系の構築：*P. acanthamoebae* は、アメーバまたは哺乳細胞に MOI 1 または 10 の割合で添加し、遠心吸着法 (450×g、60 分、25°C) による感染後、10 日間培養を行った。アメーバとの共培養には PYG (proteose peptone-yeast extract-glucose) 培養液を、哺乳細胞との共培養には 10% FCS 加 DMEM 培養液を用いた。アメーバは 30°C の湿潤条件下で、哺乳細胞は 37°C、5% CO<sub>2</sub> 条件下で培養した。共培養系より継日的に培養液を採取し、以下の方法に従い生菌数算定を行った。

生菌数算定方法：*P. acanthamoebae* を含む溶液を希釈し、アメーバと共に、cycloheximide を含む PYG 培養液にて培養した。培養 2 日後、DAPI 染色により希釈系列に応じた感染アメーバ率を算出した。希釈倍数 (x) とそれに対応したアメーバ感染率 (y) を  $y = 100/[1+(x/AID_{50})^{slope}]$  に当てはめ、シグモイド曲線をコンピュータ上で描き、50%のアメーバ感染率を示す希釈倍率(AID<sub>50</sub>)より、生菌数を算定した。生菌数は Amoeba-Infectious Unit (AIU) として表記し、本法を AIU 法と命名した。

**FISH 法** : Alexa Fluor 350 で標識した *P. acanthamoebae* 16S rRNA 特異的プローブ (5'-TCC GTT TTC TCC GCC TAC-3')、および Alexa Fluor 488 で標識した真核生物 18S rRNA 特異的プローブ (5'-ACC AGA CTT GCC CTC C-3') を用いた。ハイブリダイゼーションは、46°C で 90 分間行い、蛍光顕微鏡にて蛍光シグナルを観察した。

**透過型電子顕微鏡** : アメーバならびに哺乳細胞と共培養系した溶液は、3% グルタルアルデヒドで固定し、Epon 813 で包埋した後、透過型電子顕微鏡にて形態観察を行った。

**【結果】** DAPI 染色により、*P. acanthamoebae* 感染アメーバと非感染アメーバは容易に区別された。蛍光シグナルの特異性は FISH 法にて確認した。*P. acanthamoebae* 感染アメーバ率は、菌液希釈倍率に従い減少し、シグモイド曲線上にプロットされた。また初期菌液濃度に依存してシグモイド曲線は左右に移動した。これらのことより、AIU 法により得られる値は、*P. acanthamoebae* 菌数を正確に表しているものと考えられた。

そこで確立した方法を用いて、アメーバ内 *P. acanthamoebae* 生菌数のモニタリングを行った。その結果、共培養開始から 4 日目の時点で生菌数は約 1,000 倍にまで増加した。また *P. acanthamoebae* の増殖は、アメーバの遺伝子型には影響されなかった。一方、哺乳細胞内では、いずれの細胞株においても *P. acanthamoebae* は培養期間中一定の菌数で推移し、明らかな菌数増加は認められなかった。電子顕微鏡観察を行ったところ、アメーバ内には *P. acanthamoebae* の増殖像が認められ、小さな封入体様構造物の中に多数の典型的な基本小体あるいは二分増殖をする網様体が観察された。しかしながら、哺乳細胞内においては、そのような菌体や封入体を観察することができなかった。

**【考察】** *P. acanthamoebae* の生菌数は、まず検体の希釈倍数に応じた本菌のアメーバへの感染率から回帰曲線を作成し、その曲線より得られた 50% 感染率を基に求めることとした。50% 感染率の算出方法としてはウイルス感染価 TCID<sub>50</sub> 決定時に汎用されている Reed & Muench 法が信頼度の高い方法として良く知られているが、一つの検体について 0% から 100% に到る幅広い感染率を求める必要があり煩雑である。そのため本法では、一部の感染率より 50% 感染率が算出できるようにシグモイド回帰曲線論理関数を採用した。その結果、20% 以上の感染率を示す一つのプロットを含む 4 つのポイントがあれば正確に 50% 感染率が決定できることが明らかになった。そこで AIU 法を用いて実際にアメーバ内での *P. acanthamoebae* 生菌数を算定した。その結果、アメーバ内での *P. acanthamoebae* 菌数の推移が電子顕微鏡による形態観察の所見と一致することより、本法により得られた値は、*P. acanthamoebae* 生菌数の変動を正確に反映しているものと考えられた。一方、哺乳細胞での *P. acanthamoebae* の増殖は AIU 法ならびに電子顕微鏡観察にて確認できなかった。しかしながら HEp-2 細胞内には小胞膜を伴わない菌体様構造が観察された。Vero 細胞の食胞内にも菌体様構造が観察された。これらの結果は、*P. acanthamoebae* が一部の哺乳細胞に侵入し持続感染を起こす可能性を示唆しているものと考えられた。このように本研究にて確立した AIU 法は *P. acanthamoebae* の生菌数算定方法として有用であり、他の環境クラミジアにも応用できるものと考えられた。

**【結論】** 本研究では *P. acanthamoebae* の生菌数算定方法として AIU 法を確立した。本法により、*P. acanthamoebae* の宿主細胞内での動態を正確にモニタリングすることができた。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 有 川 二 郎  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

## Novel *Parachlamydia acanthamoebae* quantification method based on coculture with amoebae

(パラクラミジア・アカンソアメーバの新規生菌数算定法の確立)

偏性細胞内寄生性細菌 *Parachlamydia acanthamoebae* は、自由生活性アメーバの共生細菌として、土壌や水系など自然界に幅広く分布しているが、何らかの伝播様式によりヒトに感染し、呼吸器感染症に関与するものと考えられている。しかしながら、*P. acanthamoebae* は、*Chlamydomphila pneumoniae* や *Chlamydia trachomatis* とは異なり、その増殖過程において大型の封入体を形成しないため、*P. acanthamoebae* の生菌数算定には、*C. pneumoniae* や *C. trachomatis* で広く用いられている封入体を指標とした菌数算定方法 (IFU 法) を用いることができない。そのため、宿主細胞内における *P. acanthamoebae* の生存・増殖様式は明らかではない。そこで本研究では、*P. acanthamoebae* の新規生菌数算定方法 (AIU 法) を確立し、アメーバならびに哺乳細胞内における生存・増殖様式について検討を行った。

まず *P. acanthamoebae* のアメーバへの感染を判定する手段として、DAPI 染色の有用性を検討したところ、*P. acanthamoebae* 感染アメーバと非感染アメーバは容易に区別された。さらに *P. acanthamoebae* 感染アメーバに認められた球状の蛍光シグナルの特異性は FISH 法においても確認された。次に感染アメーバ数を算定するために必要な最適培養日数を検討した。その結果、3 日以上培養ではアメーバ外に *P. acanthamoebae* が認められ、*P. acanthamoebae* によるアメーバへの 2 次感染が起こっているものと考えられ、培養日数は 2 日とした。これらの結果を踏まえ、*P. acanthamoebae* のアメーバへの感染率を測定したところ、*P. acanthamoebae* 感染アメーバ率は、菌液の希釈倍率に従い減少し、シグモイド曲線上にプロットされ、50%アメーバ感染率 (AID<sub>50</sub>) を求めることができた。そして、希釈倍数と AID<sub>50</sub> 値を基に *P. acanthamoebae* 生菌数 (AIU) を決定した。確立された AIU 法を用いて、アメーバおよび哺乳細胞内における *P. acanthamoebae* 生菌数のモニタリングを行った。アメーバ内における *P. acanthamoebae* 生菌数は、共培養開始から 4 日目の時点で約 1,000 倍にまで増加した。一方、哺乳細胞 (HEP-2 および Vero 細胞株) 内では、*P. acanthamoebae* は培養期間中一定の菌数で推移し、明らかな菌数増加は認められなかった。さらに DAPI 染色および透過型電子顕微鏡により形態観察を行ったところ、アメーバ内には *P. acanthamoebae* の増殖像が認められ、小さな封入体様構造物の中に多数の典型的な基本小体あるいは二分増殖をする網様体が観察された一方、哺乳細胞内においては、そのような菌体や封入体を観察されず、小胞膜を伴わないあるいは多数の膜に包まれた菌体様

構造が観察されるのみであった。このように *P. acanthamoebae* と、アメーバまたは哺乳細胞との共培養における AIU 値の推移が電子顕微鏡による形態観察の所見と一致することより、AIU 法により得られた値は *P. acanthamoebae* 生菌数の変動を正確に反映していた。

口頭発表後、まず副査の浅香教授より *P. acanthamoebae* の病原機構や抗菌薬感受性、さらに *P. acanthamoebae* 感染がアメーバの病原性に与える影響について質問があった。次に副査の今村教授より AIU 法に要する培養日数とクラミジア目における *P. acanthamoebae* の生活環の特徴、環境クラミジアの病原性、そして肺上皮細胞やマクロファージ等ヒト細胞への感染性に関する質問があった。さらに主査より、*P. acanthamoebae* 生菌数算定に使用するアメーバの特徴、動物実験における *P. acanthamoebae* の感染動態、そして生体における *P. acanthamoebae* の免疫排除機構について質問があった。いずれの質問に対しても、申請者は質問の主旨を理解し、実験結果および文献的考察に基づいて適切に回答した。

この論文は、これまで困難であった *P. acanthamoebae* 生菌数の算定を可能にした点で高く評価され、今後、本菌の微生物学的研究の進展や本菌を原因とする疾患の診断および治療法開発に貢献することが期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。