

## 学位論文題名

Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival *in vitro* without requirement for amoebae

(院内環境における環境クラミジア *Parachlamydia acanthamoebae* の検出頻度と自由生活性アメーバとの共存性について)

## 学位論文内容の要旨

## 【背景と目的】

自由生活性のアカント・アメーバ (以下アメーバ) は、土壌・水系等自然環境に広く生息する原生動物である。このアメーバは、難治性の角膜炎や稀ではあるが脳炎を引き起こすことからヒト病原性原虫としても広く知られている。1997年 Amann らは、ヒト鼻腔粘膜より分離されたアメーバ内に共生する偏性細胞内寄生性の小型細菌が系統解析からヒトを含む哺乳動物に起病性を持つ病原性クラミジアの近縁種であることを発見した。これらのクラミジア近縁種は、現在、クラミジア目に入れられ、環境クラミジアと総称されている。環境クラミジアは、病原性クラミジアと同様に細胞への感染型 (基本小体) と細胞内での増殖型 (網様体) と二相性の増殖環を有するが、環境クラミジアのヒトへの病原性は、いまだ良くわかっていない。その一方、環境クラミジアの一種である *Parachlamydia acanthamoebae* (Pa) と市中肺炎や流産との関連性や、病院内で集中治療が必要な患者で血清中 Pa 抗体価の上昇が認められることが報告されている。さらに環境クラミジアの株化ヒト肺胞マクロファージや繊維芽細胞内での増殖も観察されている。このように環境クラミジアは、院内の基礎疾患を抱え抵抗力の落ちた患者に対して、アメーバを介して呼吸器に侵入後、マクロファージや繊維芽細胞内で増殖することで、肺炎など急性の呼吸器感染症を惹起する可能性が十分に考えられる。それ故に、院内環境における Pa とアメーバとの分布を正確に把握し、ヒトへの感染源としての Pa とアメーバとの共生様式を理解することは、院内の感染管理上極めて重要である。

そこで本研究では、院内環境 (床や水周り) における環境クラミジア Pa の分布状況と生存様式を明らかにするために、Pa とアメーバの遺伝子検出と系統解析を試みるとともに試験管内の実験にて乾燥や湿潤状態がアメーバ外での Pa の生存性にどのような影響を与えるのか詳細に検討した。

## 【対象と方法】

**菌株と生菌数算定方法**：アメーバ共生細菌としてヒト咽頭より分離された Pa Bn<sub>9</sub> (ATCC VR-1476) を ATCC により購入し、アメーバ内にて増殖後、実験に使用した。生菌数は、我々が独自に確立したアメーバへの感染性を指標した Amoeba-infectious units (AIU) 法を用いて行った。

**アメーバ株と生アメーバ数の調整方法**：アメーバ標準株 [*Acanthamoeba castellanii* C3 (ATCC 50739)] は、菌株同様に ATCC より購入し使用した。アメーバは、PYG (proteose peptone-yeast extract-glucose) 培養液にて 30°C の湿潤条件下にて培養維持した。アメーバ生細胞数は、トリパンプルーにて染色後、血球計算版にて算定した。

**検体と採取方法**：北海道大学病院より採取した計 90 検体 (床スワブ 56 検体、水周りスワ

ブ 34 検体) を対象とした。検体の採取は 6 ヶ月程度の期間をあけ 2 度行った[1 回目, 2007 年 11 月-2008 年 3 月(計 52 検体); 2 回目, 2008 年 10 月-2009 年 2 月(計 38 検体)]。床スワブは 1m<sup>2</sup> を滅菌ガーゼで拭き、PAS (Page's amoeba saline) に混和し遠心後の沈殿を試料とした。水周りスワブは排水溝を滅菌ガーゼで拭き、上記と同様の操作を行い試料とした。

**遺伝子検出(PCR)と系統解析**: DNA は UltraClean Soil DNA 抽出キット(MBL)を用いて抽出した。PCR はフミン酸等遺伝子増幅阻害物質の影響を受け難くするために BSA 存在下で行った。Pa は 16S rRNA 遺伝子を、アメーバは *Acanthamoeba* 特異的 18S rRNA 遺伝子を標的として増幅し、一部の PCR 産物はダイレクトシーケンス法にて塩基配列を決定した。PCR の陽性コントロールには、ATCC から購入した Pa Bn<sub>9</sub> と C3 アメーバより抽出した DNA を用いた。系統解析は、MEGA ソフトの近隣結合法を用いて行った。

**アメーバ外での Pa の生存性に関する試験管内での検討**: Pa を約 10<sup>7-8</sup> AIU 含む 100μL の PAS を 24 穴マイクロプレートへ添加した群 (乾燥条件) と、900μL の PAS と混和後に添加した群 (湿潤条件) に分けて、15°C と 30°C で 0、3、7、15、28 日間放置しに試料中の生菌数の推移と菌体膜の安定性について検討した。乾燥条件の系では 900μL の PAS で洗った溶液を試料とした。生菌数は AIU 法、菌体膜の安定性は Live/Dead 染色 (Molecular Probes) を用いて検討した。

**統計処理**: Pa とアメーバの検出頻度の相関関係はフィッシャーの  $\chi^2$  乗検定を用いて精査した。

### 【結果ならびに考察】

#### 系統解析

計 90 検体の試料のうち 53 検体で Pa 16S rRNA 遺伝子が検出された。一部の PCR 産物 (4 検体) の系統解析を行った結果、いずれの増幅遺伝子も既に報告されている Pa Bn<sub>9</sub> や UV-7 の 16S rRNA 遺伝子の配列と 96% 程度の相同性を示した。この結果は、院内環境に Pa が広範囲に存在する可能性を示唆している。

#### 院内環境から検出された Pa とアメーバ遺伝子検出頻度について

院内からの Pa 遺伝子検出頻度は、1 回目の調査では 64.3%、2 回目の調査では 76% であった。一方、アメーバの遺伝子検出頻度は、1 回目の調査では 48%、2 回目の調査では 63.1% であった。Pa とアメーバの検出頻度には統計学的に有意な関連性が認められた (1 回目の調査;  $P=0.011$ , 2 回目の調査;  $P=0.022$ )。検体採取場所別に再解析すると、乾燥している床から採取した検体では、この相関はさらに強くなった ( $P=0.002$ )。しかしながら、水周りスワブ (湿潤環境) においては、Pa とアメーバの検出頻度に有意差は見られなかった ( $P=0.273$ )。これらの結果は、乾燥状態では Pa がアメーバに強く依存しながら環境にて生息している可能性を示唆している。一方、興味深いことに Pa とアメーバどちらの遺伝子検出頻度も院内の上階に行くほど有意に減少した。この結果は、Pa がヒトの流れに伴い院外からアメーバと共に持ち込まれている可能性を示唆している。

#### アメーバ外での Pa の生存性

これ迄の結果から、Pa はより乾燥した環境では、アメーバに強く依存し生存する一方で、湿潤環境では、アメーバ外にて長期にわたり生存できる可能性が示唆された。そこで、試験管内にてアメーバ非存在下における Pa の生存能力について検討した。その結果、湿潤条件下では Pa の生菌数はアメーバが存在しなくとも温度条件に関係なく 28 日間維持され、菌体膜も安定とであった。その一方で、乾燥条件での Pa の生菌数は、その減少傾向が培養温度に依存して急激に減少し、菌体膜の安定性も減弱した。これらの結果は、院内環境にて見られた Pa とアメーバとの相互依存様式を示唆する結果を強くサポートしている。

#### 【結論】

このように Pa はアメーバ共生細菌として院内環境に広く分布し、長期に渡り定着・生存している実態が初めて明らかになった。またその存在様式は湿度と温度に強く影響を受けることも明らかになった。

# 学位論文審査の要旨

主査 教授 瀬谷 司  
副査 教授 志田 壽利  
副査 教授 有賀 正

## 学位論文題名

### Impact of free-living amoebae on presence of *Parachlamydia acanthamoebae* in the hospital environment and its survival *in vitro* without requirement for amoebae

(院内環境における環境クラミジア *Parachlamydia acanthamoebae* の検出頻度と自由生活性アメーバとの共存性について)

北海道大学病院内フィールド調査において、偏性細胞内寄生性の新興感染症起因細菌 *Parachlamydia acanthamoebae* の 16SrRNA 遺伝子が、原生動物アメーバ 18SrRNA 遺伝子と共に統計学的に有意に検出され、試験管内の実験では特に乾燥条件下において *P. acanthamoebae* がその生存に宿主アメーバの存在を強く要求したことより、*P. acanthamoebae* が床等乾燥した院内環境にアメーバと共に広く分布している実態が報告された。

副査である志田壽利教授から *P. acanthamoebae* 生菌数算定(Amoeba-infectious unit: AIU)法の具体的な手順について質問があった。それに対し申請者は、病原性クラミジアは宿主細胞に感染すると大きな封入体を作るので、封入体数を数えることにより、生菌数を計算することが出来るが、環境クラミジアは大きな封入体を形成しないため封入体数を算定することは困難である。そこで DAPI 染色を用いてアメーバへの環境クラミジアの感染率から生菌数を求めると回答した。また、*P. acanthamoebae* の院内感染を防ぐ為にはどのような対策が必要かと質問があった。これに対し申請者は、靴底についた土を介して院内に持ち込まれるアメーバが、*P. acanthamoebae* の院内での拡散の主要原因と考えられるので、院外から靴底に付着した土をできる限り持ち込まないようにし、特に免疫力が低下している患者が多い ICU へ入室する際は、靴の履き替えを徹底することが重要であると回答した。

次いで副査である有賀正教授から *P. acanthamoebae* は本当にヒトに対して病原性があるのか、抗体価や抗体保有率だけで病原性の有無を言えるのかと質問があった。これに対し申請者は *in vitro* での実験でヒトへの病原性についての報告はほとんどないが、申請者が見つけた低温条件下にて *P. acanthamoebae* が株化ヒト上皮細胞内で増殖する現象について触れ、*P. acanthamoebae* がヒトへの病原性を有する可能性は十分ありうると回答した。また *P. acanthamoebae* は本当にアメーバ内に生息しているのか、*P. acanthamoebae* がアメーバ内に共生しているとすれば、院内において *P. acanthamoebae* はアメーバに感染していると考えられるが、それは確かめたのかと質問があった。これに対し申請者は、試験管内にて院内から採取したスワブを用いてアメーバに感染させる実験を試みたが、真菌の混入が激しく *P. acanthamoebae* の株化が困難であったので、院内から *P. acanthamoebae* が感染しているアメーバそのものを株化すべく検討を進めていると回答した。

次いで主査である瀬谷司教授からイントロダクションで説明があった系統分類の信憑性がどの程度か、シアノバクテリアからクラミジアが分岐したとは考えにくいと質問があった。これに対し申請者は、詳細な分子系統解析から環境クラミジアの一種である *Protochlamydia*

にシアノバクテリアを起源とする遺伝子配列が複数認められることより、環境クラミジアがシアノバクテリアから派生した可能性は否定できないが、更なる精査が必要だろうと回答した。また、電気泳動結果から *P. acanthamoebae* は陽性だがアメーバが陰性であった検体の解釈に関連し、アメーバ非存在下での本菌の生存性について質問があった。これに対し申請者は遺伝子検出だけでは院内環境での *P. acanthamoebae* の生死については不明だが、試験管内の実験結果から少なくとも湿潤環境下の *P. acanthamoebae* はアメーバ非存在下で単独でも生存する可能性がありうると回答した。

この論文は、偏性細胞内寄生性細菌 *P. acanthamoebae* がアメーバと共に院内環境に広く分布し、長期に渡り定着している実態を明確に示した。院内のフィールド調査から *P. acanthamoebae* がアメーバと共に院内に広く分布していることが明らかになったこと、院内への持ち込みが靴底についた土中アメーバを介し起こっていること、試験管内の実験で *P. acanthamoebae* の宿主アメーバへの依存度が湿潤条件により大きく変化することから、院内での生存場所が予想できるようになったことが評価された。今後は院内環境からの *P. acanthamoebae* 感染アメーバの株化を含めた更なる解析が *P. acanthamoebae* によるヒトへの感染の機序を解明し、適切な感染対策法の道を開き、院内感染予防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。