

配列を得た 13 個の *N. fowleri* 特異的なスポットの内、既存のタンパク質と相同性を認めたのは 1 個のみで、ほとんどが未知の配列であった。

得られた配列については UniProt データベースに登録しておりこれまでに以下のスポットについて公開されている。(P83898, P83723, P83602, P83737, P83889, P83890, P83598, P83899, P83601, P83724, P83725, P83726, P83727, P83728, P83729, P83730, P83600)(表1, 2)。

2. クリーブランド法を用いた中間アミノ酸配列解析

N 末端ブロックあるいは N 末端アミノ酸配列から同定が出来なかったスポットについて、V8 プロテアーゼを用いたクリーブランド法を応用してデブロッキングを試みた。その結果シーケンシング可能なペプチドを得ることができ、10 個のスポットの中間配列情報が得られ、その内 3 個のスポットについては相同性検索により同定できた(表1)。

クリーブランド法によるペプチドマッピングは HPLC によるペプチド分取に比べ感度が低く、少なくとも 100 pmol 以上の多量のサンプルを必要とする点で不利である。しかし HPLC よりも一度に多くのサンプル(1 日当たり 10 個程度)を扱える点では有利であり、またペプチドのパターンを PVDF 膜に転写しておくことで、ペプチドサンプルの保存も容易である。文献によればこの方法で 2D-PAGE の 100 個以上のタンパクスポットについて中間アミノ酸配列解析に成功している例もある。*Naegleria* 属アメーバは比較的培養が容易で、十分なタンパク量を確保しやすいことから、中間アミノ酸配列解析を効率的に行う上でクリーブランド法は有効であると考えられる。

3. 質量分析によるタンパクスポット解析

質量分析による *N. fowleri* のタンパク質解析では、MALDI-TOF MS で 20 個、LC-MS/MS 測定では 5 個のスポットを解析した(表1)。MALDI-TOF MS を用いた Peptide Mass Fingerprinting (PMF 法) による解析ではタンパクの同定は出来なかった。LC-MS/MS 解析では Sequest サーチにより MP2CL5 および アクチンの同定が可能であった。また、各 MS/MS データから手動で DeNovo シークエンシングを試み、3 個のスポットからはそれぞれ 5 残基前後の中間アミノ酸配列情報を得たものの、そこからタンパクの同定には至らなかった。

プロテオーム解析において PMF 法はハイスループットな手法として主流であるが、同定作業が既存のデータベースに依存しているため、目的タンパクが登録されていない場合は同定が出来ない。ゲノムデータベース等が確立していない *Naegleria* 属アメーバで PMF 法を行う場合、生物間で共通性の高いタンパク質については同定出来る可能性はあるが、*Naegleria* 属特有のタンパクに関しては現時点では限界があり、測定をしても未知の場合が多かった。最近、PMF 法に代わり、MS/MS 解析についても盛んに行われるようになってきた。こちらも同定作業がデータベースに依存しているのは従来と同様だが、MS/MS データをとっておくことで DeNovo シークエンシングを行える可能性が残る。文献によると S/N 比の非常に高いデータに関しては 15~20 残基程度のアミノ酸配列情報が得られた例もある。シーケンシング用のソフトウェアも発達してきているので、*Naegleria* のように未知のタンパクが多いサンプルについて質量分析を行う場合は、配列情報を得られる可能性が残る MS/MS 解析を中心とした質量分析を進めるのが妥当だと考えられた。

4. ウェスタンブロット解析

N. fowleri Nf66 株のウェスタンブロット解析では、抗アクチン抗体に反応したスポット 5 個、及び Nf-5D12u に反応したスポット 5 個が得られた。使用した抗アクチン抗体は回虫のみならず、原虫、哺乳類の骨格筋等にも広範囲の特異性を持つことが確認されており、今回分離したタンパク質中に複数のアクチン様タンパク質が存在することが示された。文献によると *N. gruberi* のアクチンの場合、分子量は 42kDa、全タンパクに占める割合は 5~16%とされている。今回抗アクチン抗体に対し、特に強い反応を示した 1 個のスポットについては約 42kDa, pI 5.23 で、スポットボリューム比は約 7%であったことから、アクチンである可能性が高いと考えられる。一方、市販品である Nf-5D12u は *N. fowleri* の膜タンパク画分に反応し、糖鎖を認識するとされており、最も近縁の *N. lovaniensis* とも交叉反応しないものとされている。しかし今回の結果では、Nf-5D12u は 2 種間で共通と確認されたスポットとも反応した。この共通スポットについては、今後解析を進める予定である。

5. データベース構築

データベースを構築するにあたり、数百以上のタンパクスポットに対する情報ファイルを個別に記述することは大変な手間であり、変更も容易ではない。本研究では Perl/Apache 上で適宜変更を加えた Listgen (<http://yugen.main.jp/about/listgen/>)を用い、CSV 形式のデータから動的にスポットファイルを生成することとした。表示形式を指定するファイルをカスタマイズすることで全ファイルに対して一括して更新を適用することが可能であり、スポット数が多い場合に有効な手法であると考えられる。実際のカスタマイズには若干時間を要したが、動的に作成されたページのファイルをサーバー上に静的に配置することで、CGI を使用しない、より安全なサーバーの運用が可能となった。データの更新にも対応が容易で、半自動的にスポット情報ファイルを生成することが可能である。将来的には CSV 形式のデータを更新することでリアルタイムなページの更新を可能とすることも視野に入れており、カスタマイズ後のスクリプトの安全性が確認されればサーバーに登録することも可能である。今後もデータの拡充をはかる予定である。

D. 結論

強い病原性を持つ *N. fowleri* と、生態学的にも形態学的にも非常に近縁である非病原性の *N. lovaniensis* のタンパクレベルでの両種間の比較は、これまで数種のアイズイムパターンあるいは SDS-PAGE による解析は行われてきたが、プロテオミクスを主体とした総タンパクレベルでの詳細な解析はほとんど行われていなかった。そこで本研究では 2 種間の相同性および *N. fowleri* 特異的なタンパク質の分離を目的に 2D-PAGE 解析による詳細な比較を行った。

始めに 2 種間の相同性について解析するため、*N. fowleri* 5 株、および *N. lovaniensis* 2 株の 2D-PAGE 画像から、それぞれ種内のすべての株に出現するスポットのみ真のスポットとする条件でアベレージゲル画像を作成して両者を比較した。その結果 2 種間の相同率は 38.6%で、各種内で共通するタンパクスポットは *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個であった。これらの内 88 個が 2 種間共通スポットであった。

次に *N. fowleri* 特異的なタンパクスポットを分離するため、*N. lovaniensis* 2 株で得られたタンパクスポットを全て足し合せた Reference gel 画像を作成し、*N. fowleri* のアベレージゲルと比較した。両者でマッチしたスポットをアベレージゲルから差引くことにより、102 個の *N. fowleri* 種特異的のスポ

ットの情報が得られた

2D-PAGE 画像解析により 2 種それぞれおけるタンパクスポットの種特異性が判明したことで、*N. fowleri* の 1 株の 2D-PAGE ゲルから種特異的あるいは 2 種間共通なタンパクスポットを選択できるようになった。この解析結果をもとに *N. fowleri* Nf66 株から主要なスポットを選出し、N 末端および中間アミノ酸配列解析と質量分析による解析を行った。

アミノ酸配列解析では N 末端および中間配列解析合わせて 59 個のスポットを解析したが、その内 34 個について 20 残基前後の N 末端アミノ酸配列が得られ、相同性検索の結果 14 個が既存のタンパク質と相同性を認めた。得られたアミノ酸配列は UniProt データベースに登録しており、現在 17 個のアミノ酸配列が公開されている。

質量分析では 25 個のスポットについて PMF 法および LC-MS/MS による解析を行った。PMF 法ではタンパク質の同定が出来なかったが、LC-MS/MS 解析ではアクチンおよび MP2CL5 を同定出来た。さらに MS/MS データから DeNovo シークエンシングを試み 5 残基程度のアミノ酸配列情報を得た。

上記の手法によるスポット解析を行う一方、さらに各タンパクスポットの特徴づけを行うため、2D-PAGE によるウェスタンブロット解析を行い、アクチン関連タンパク質および *N. fowleri* モノクローナル抗体 Nf-5D12u に反応するスポットを分離した。

これまでの解析で得られたタンパク質の情報を統合するため、2D-PAGE データベースを構築した。さらに 2D-PAGE マップを作成し、マップ画像上からスポット情報に直接アクセス出来るようにした。現在もデータの拡充をはかっており、今後も更新を重ねる予定である。

Spot No.	MW	pI	N terminal Sequencing	Internal Sequencing	MS Analysis	Homologous protein	Specificity
1	21.7	6.5	DONE (Blocked)	-	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
2	24.7	6.2	DONE (Blocked)	-	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
3	46.4	7.1	DONE	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
4	37.2	6.7	DONE	-	DONE	Isocytate dehydrogenase	-
5	34.8	6.7	DONE	-	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
6	25.5	6.6	DONE (Blocked)	DONE	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
7	24.1	6.7	DONE	DONE	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
8	17.8	-	DONE (Complex)	DONE	DONE	Cyclophilin	Nf ^{*1}
9	30.8	6.5	DONE	-	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
10	34.2	6.6	DONE	-	-	Unknown	Common ^{*2}
11	34.3	6.5	DONE (Blocked)	-	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
12	48.5	6.7	DONE (Complex)	DONE	DONE	Unknown	Nf ^{*1}
13	59.8	6.7	DONE	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
14	58.9	6.5	DONE (Blocked)	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
15	24.1	6.5	DONE	DONE	DONE	Thioredoxin peroxidase	Nf ^{*1}
16	21.1	6.9	DONE	-	DONE	Membrane protein MP2CL5	Common ^{*2}
17	26.7	6.7	DONE	-	DONE		Nf ^{*1}
18	21.6	7.2	DONE (Complex)	DONE	DONE	Nucleoside diphosphate kinase	Common ^{*2}
19	92.4	7.2	DONE	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
20	108.7	6.8	DONE	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
21	41.3	7.2	DONE	-	-	Unknown	Common ^{*2}
22	39.0	7.0	DONE	-	DONE	Glyceraldehyde-3- phosphate dehydrogenase	Common ^{*2}
23	34.5	7.0	DONE (Complex)	-	-	Unknown	Common ^{*2}
24	69.3	5.7	DONE	-	DONE	Chaperone protein dnaK	Common ^{*2}
25	74.8	5.3	DONE (Blocked)	DONE	-	Unknown	Common ^{*2}
26	71.4	5.3	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Common ^{*2}
27	64.8	5.2	DONE	-	-	Unknown	Common ^{*2}
28	33.9	6.7	DONE	-	-	Cytosolic malate dehydrogenase	Common ^{*2}
29	24.0	5.7	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
30	17.0	5.7	DONE (Blocked)	DONE	-	Unknown	Common ^{*2}
31	23.5	6.4	DONE (Complex)	-	-	Unknown	Common ^{*2}
32	31.9	6.6	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Common ^{*2}
33	44.8	6.8	DONE	-	DONE	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Common ^{*2}
34	45.3	6.7	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
35	50.9	6.7	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
36	44.0	6.7	DONE (Blocked)	DONE	-	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Common ^{*2}
37	46.7	6.5	DONE	-	-	S-adenosylmethionine synthetase	Common ^{*2}
38	14.7	6.7	DONE (Blocked)	-	DONE	Unknown	Common ^{*2}
39	14.7	5.4	DONE (Blocked)	DONE	DONE	Unknown	Common ^{*2}
40	23.9	5.1	DONE	-	-	Translationally controlled tumor protein homolog	Common ^{*2}

41	71.3	5.9	DONE	-	-	Serum albumin homolog	Common ^{*2}
42	28.2	-	DONE	-	-	Dehydrogenase	Common ^{*2}
43	35.0	5.9	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
44	46.7	6.0	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
45	33.8	5.9	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
46	38.0	6.1	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
47	35.8	5.7	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
48	60.2	6.9	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
49	60.5	6.8	DONE	-	-	Unknown	Common ^{*2}
50	62.7	6.8	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Common ^{*2}
51	56.3	7.2	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
52	58.8	-	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
53	31.9	6.0	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
54	31.3	-	DONE	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
55	38.0	-	DONE	-	-	Unknown	-
56	32.0	-	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
57	18.5	6.7	DONE	DONE	-	Unknown	Nf ^{*1}
58	24.5	-	DONE (Blocked)	-	-	Unknown	Nf ^{*1}
59	42.0	5.4	DONE (Blocked)	-	DONE	Actin	Common ^{*2}

表1. *N. fowleri* タンパクスポット解析結果

*1: *N. fowleri* 特異的スポット、*2: *N. fowleri*、*N. lovaniensis* 2種間共通スポット

Spot No.	Accession Number	N terminal Sequence
3	P83898	YAEKAILAKQIPEKQAXIN
4	P83723	KTXATLFPGHGIGPEIXQAVXPIL
5	P83602	AGKARKQLSKNEDTKLKEQYIXD
7	P83737	KLQLPTLDDPVPIGIAPAIT
9	P83889	ATSAAQGAALDESVRKVLKP
15	P83890	TPQIQKPAPQFSKTALLPDE
16	P83598	MITVPHVNLNLTGQWRENGG
19	P83899	KRTKAPFSRVVKFSIDEIRN
22	P83601	VKVGINGFGRIGRXVFA
24	P83724	KIIGIDLGTNSXVAVMESN
28	P83725	TKQTLKVLITGAAGQIGYSL
33	P83726	AXFQKIKVANPVVELDDEM
37	P83727	VEQFHFSXEXVTEGHQDKI
40	P83728	MKVYTDIFTRDEFLSDSYPM
41	P83729	DTHKSEIAHRQPDLG
42	P83730	AGKLEGVXLVGTGAPSGIGK
45	P83600	SHDVNINIQFGFENPQQVVD

表2. UniProtデータベース登録スポットおよび登録アミノ酸配列配列

D. 学会発表

1. (Proceeding) M. Omura, R. Furushima-Shimogawara, K.Yagita, S. Izumiyama, and T. Endo. 2D-PAGE protein profiles of pathogenic and non-pathogenic *Naegleria* species., Xth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoebae Proceedings., pp115-123.
2. Mako OMURA, Kenji YAGITA, Shinji IZUMIYAMA, Rieko SHIMOGAWARA and Takuro ENDO. Comparative study of protein profiles on pathogenic and nonpathogenic *Naegleria* species by 2D-PAGE. [in preparation]

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

Naegleria fowleri と粘膜感染防御機構との関連

分担研究者： 福間 利英 (久留米大学医学部寄生虫学講座)

協力研究者： 原 樹 (久留米大学医学部寄生虫学講座)

Naegleria fowleri と鼻腔粘膜感染防御システムとの関連は、殆ど未解明のままである。つまり、*N. fowleri* が頭蓋内へ進入し髄膜脳炎を発症する最初の段階である感染の成立に関する知見が想像の域を出ていないわけである。そこで本研究では、鼻腔・口腔粘膜上で非特異的な抗微生物活性を示す抗菌ペプチドの *N. fowleri* に対する影響を検討した。

多くの抗菌ペプチドの中で鼻腔粘膜の感染防御において主要な役割を担っているラクトフェリンとリゾチムを選択し、*N. fowleri* に対する抗アメーバ作用を調べた。その結果、生理的濃度範囲ではこれら抗菌ペプチドは *N. fowleri* に対して抗アメーバ作用を示さないことが判った。ラクトフェリンについては驚くべきことに生理的濃度より高濃度では、濃度依存的に *N. fowleri* の増殖をエンハンスする効果が観察された。

一般に知られている鼻腔粘膜上の感染防御システムと本研究の結果とを総合して考えた場合、*N. fowleri* の感染に対して粘膜感染防御システムは全く機能していないことが強く示唆された。

A. 研究目的

自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* は温水を好んで生息するうえ、アメーバ性髄膜脳炎が我が国でも散見されるようになってきた。原発性アメーバ性髄膜脳炎(PAM)は *N. fowleri* に汚染された水が水泳などの際に鼻腔に入り、嗅神経を上行して頭蓋内へ進入することで発症すると考えられている。鼻腔粘膜上には、特異的・非特異的な免疫防御システムが数多く存在しているが、*N. fowleri* と防御システムとの関連や何故 *N. fowleri* がこれら防御システムによって排除されないのかについての知見は殆ど報告されていない。唯一明らかにされているのは補体系との関連で、*N. fowleri* は C5b-C9 経路を活性化する一方で、*N. fowleri* 細胞膜上に結合した補体タンパク質を巧妙なメカニズムで解離させる逃避機構を有する点である。

本研究では、鼻腔経路以外の *N. fowleri* 感染経路の有無の検討と鼻腔・口腔粘膜上で感染防御に重要な役割を果たしている抗菌ペプチドが *N. fowleri* に及ぼす影響について解析した。

B. 研究方法

本研究テーマでは、PAM 本邦初症例の患者より分離した *N. fowleri* YT9611 株を用いた。

Naegleria の培養

N. fowleri は、病原性を維持する目的から脳微小血管内皮細胞 (BMEC) との共培養系で継代培養を行った。10% 牛胎仔血清 (FBS) を含む MEM を用いて継代培養している BMEC がほぼ単層状態に増殖した時点で、別容器で培養中の *N. fowleri* を接種した。3-4 日後に BMEC 細胞がほぼ全て破壊され、*N. fowleri* が十分に増殖した時点で培養液を SCGYEM に交換し、さらに一晚培養を続けた後、各種解析に供した。また、一部の解析では SCGYEM に換えてアフリカトリパノソーマ血流型原虫の培養液 (HMI-9) を用いた。培養は全て 37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

SCGYEM の組成

カゼイン	10 g	Na ₂ HPO ₄	1.42 g
グルコース	2.5 g	K ₂ HPO ₄	0.87 g
酵母抽出物	5 g		

精製水で全量を 1,000 ml に調整しオートクレーブ滅菌後、FBS を 10% となるように加えて使用する

HMI-9 の組成

イスコフ改変ダルベッコ培養液

Supplements: 10% FBS

0.1 mM Bathocuproine sulfonic acid
0.75 mM Cysteine
1 mM Hypoxanthine
0.12 mM 2-Mercaptoethanol
1 mM Sodium Pyruvate
0.16 mM Thymidine

感染実験

種々の系統 (BALB/c, ICR, ddY, C3H, C57BL/6)、週齢 (7-68 週齢)、性別のマウスに対して、*N. fowleri* の感染実験を行った。培養で得られた *N. fowleri* は PBS で洗浄後、種々の細胞密度に懸濁し、鼻腔・口腔・外耳道・眼窩に対しては 10 μl、皮下・静脈内・腹腔に対しては 100 μl を接種した。*N. fowleri* 接種後、マウスの状態を毎日観察し、死亡した場合には頭蓋内の肉眼的観察および *N. fowleri* の検出を行い PAM か否かを判定した。

増殖速度の測定

アメーバの増殖は、酸化還元指示薬である Alamar Blue (BioSource International 社) を用いた比色定量により測定した。Alamar Blue は還元されると色調が青色から赤色さらに無色へと変化するため、還元された Alamar Blue を定量することで細胞の代謝活性つまり細胞増殖を測定できる。還元量の測定は、終濃度 10% の Alamar Blue を添加した後、経時的に 570 nm の吸光度から 630 nm の吸光度を差し引くことで求めた。

ラクトフェリンのペプシン消化

ラクトフェリンは森永乳業の特許製品で市販されていないため、ラクトフェリンのペプシン消化によってラクトフェリンを含むペプチド溶液を調製した。ラクトフェリンを精製水に5%になるように溶解後、1 N HClを用いてpHを2.5に調整し、溶解液の3%に相当するペプシンを添加した。37°Cで4時間のペプシン消化後、80°Cで15分間加熱することで反応を停止した。溶液の温度が室温まで低下した後、1 N NaOHを用いて中和し、15,000×gで30分間遠心分離することで沈殿物を除去した。得られたペプシン分解物は凍結乾燥後、PBSに溶解し実験に供した。

C. 研究結果

N. fowleri 感染経路の検討

経鼻腔を含めた *N. fowleri* の感染・進入ルートを検討を行った。その結果、従来から言われていた鼻腔に加え口腔への接種でも PAM を発症することが確認された。静脈内と腹腔内接種では接種数によってはマウスが死亡する場合が認められたが、いずれも頭蓋内から *N. fowleri* は検出されず、PAMとは異なる障害が発生したものと考えられた。上記以外の接種経路では、外見上、マウスに対する影響は確認できなかった。また、PAM 発症に関してマウスの性差、週齢、系統による違いは認められなかった。

アメーバ数と吸光度変化の関係

Alamar Blue を *N. fowleri* の増殖測定に応用した報告がなされていないため、まず、*N. fowleri* 細胞数と吸光度の変化の関係を経時的に測定した。

その結果、SCGYEM を使用した場合には 12,500~800,000 cells/ml の細胞数と吸光度の変化には半定量的ではあるものの比例関係が認められた (Fig. 1)。

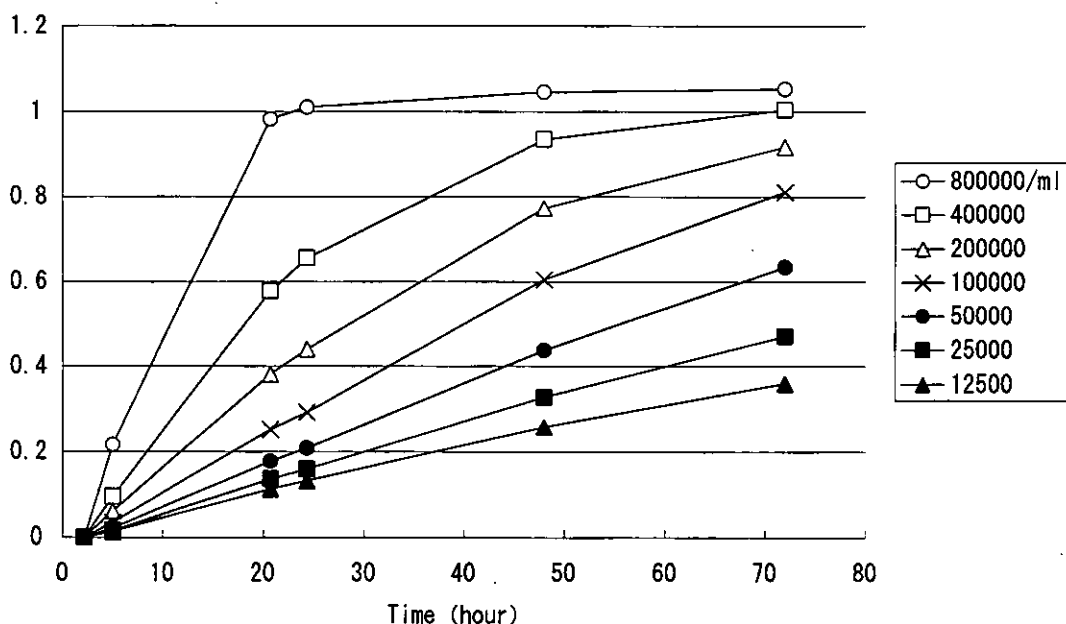


Fig. 1 細胞数と吸光度変化 (SCGYEM)

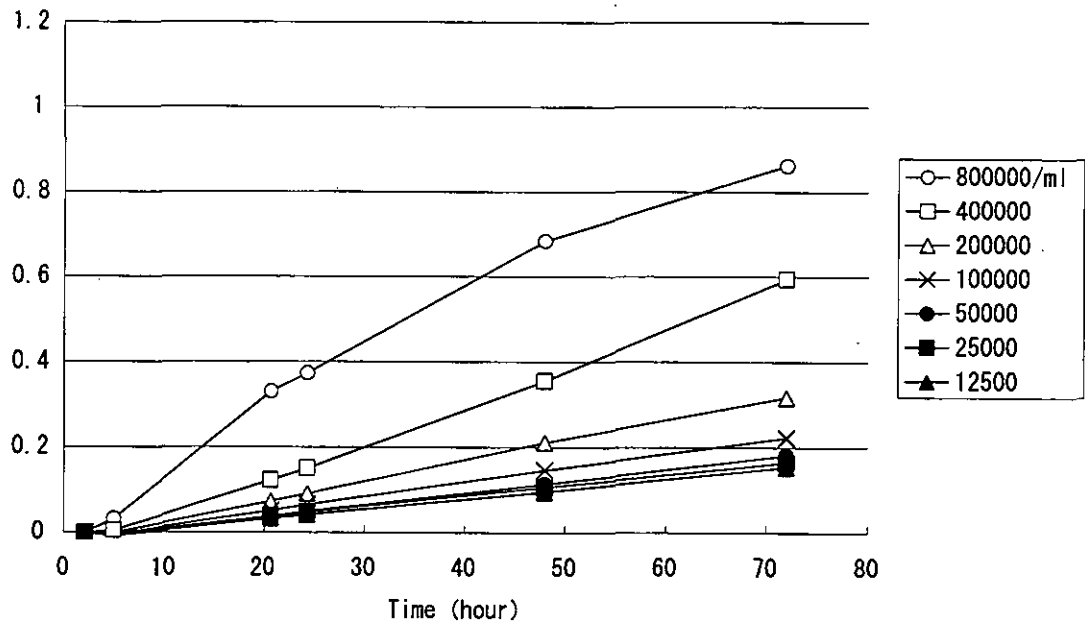


Fig. 2 細胞数と吸光度変化 (HMI-9)

一方、本来はアフリカトリパノソーマ血流型原虫の培養のために開発された HMI-9 を用いた場合、速度は遅いものの *N. fowleri* の増殖が確認された。そこで、HMI-9 を使用した場合の細胞数と Alamar Blue の吸光度変化の関係を測定した。その結果、SCGYEM と比較すると変化は小さいものの、低い増殖速度を反映した吸光度の変化が確認できた (Fig. 2)。ただし、SCGYEM の場合とは異なり、100,000 cells/ml 以下の細胞密度では吸光度の変化にほとんど差異が認められなかった。

以上の結果より、*N. fowleri* の細胞密度を 200,000~400,000 cells/ml の範囲で抗菌タンパク質の影響についての検討を行うこととした。また、Alamar Blue は抗菌タンパク質との培養開始 16 時間後、つまり *N. fowleri* に対しての影響が細胞密度の差として現れる時期に培養系へ添加した。

N. fowleri に対するラクトフェリンの影響

ラクトフェリンが *N. fowleri* に対してどのような作用を及ぼすかを検討した。最初に鼻腔粘膜上の生理的濃度である 1 mg/ml のラクトフェリン共存下で抗アメーバ作用を観察した結果、コントロールとの相違は殆ど観察されなかった。そこで、ラクトフェリンの濃度を生理的濃度より高濃度に設定して *N. fowleri* に対する影響を経時的に観察した。その結果、SCGYEM 中ではラクトフェリン 5 mg/ml 以上の濃度で *N. fowleri* の増殖をエンハンスすることが確認された (Fig. 3)。同様のエンハンス効果は、HMI-9 を使用した場合にも観察された (図省略)。

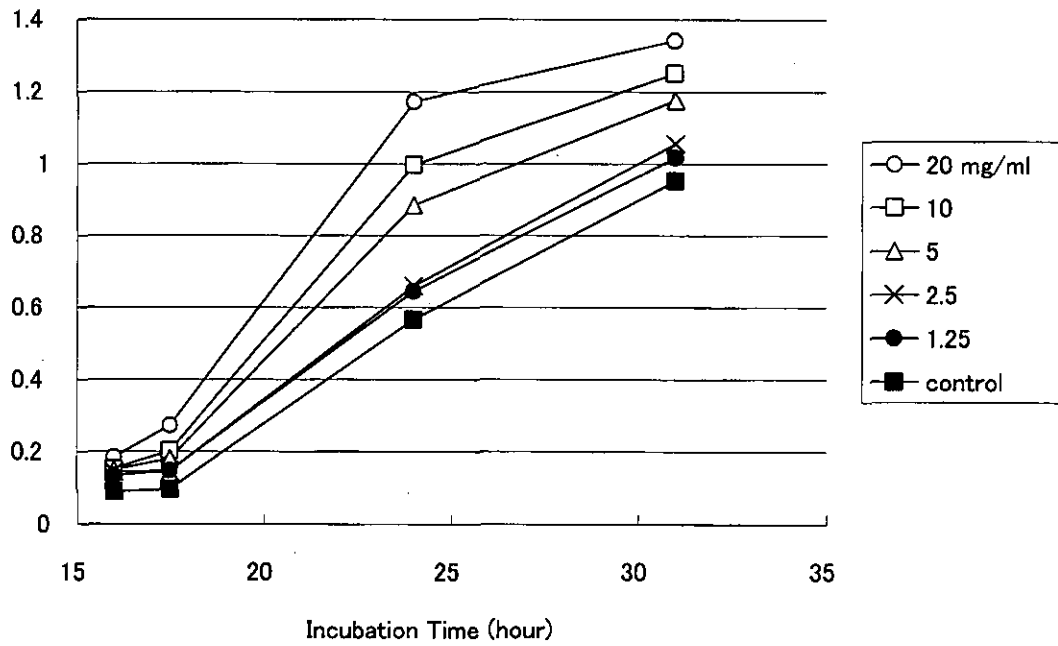


Fig. 3 *N. fowleri* に及ぼすラクトフェリンの影響 (SCGYEM)

N. fowleri に対するラクトフェリン・ペプシン分解物の影響

市販品としてラクトフェリンを入手できなかったため、ラクトフェリンのペプシン分解物を調製し、*N. fowleri* に対する影響を検討した。その結果、SCGYEM 中では未分解のラクトフェリンと同様、*N. fowleri* の増殖をエンハンスする結果が得られた (Fig. 4)。

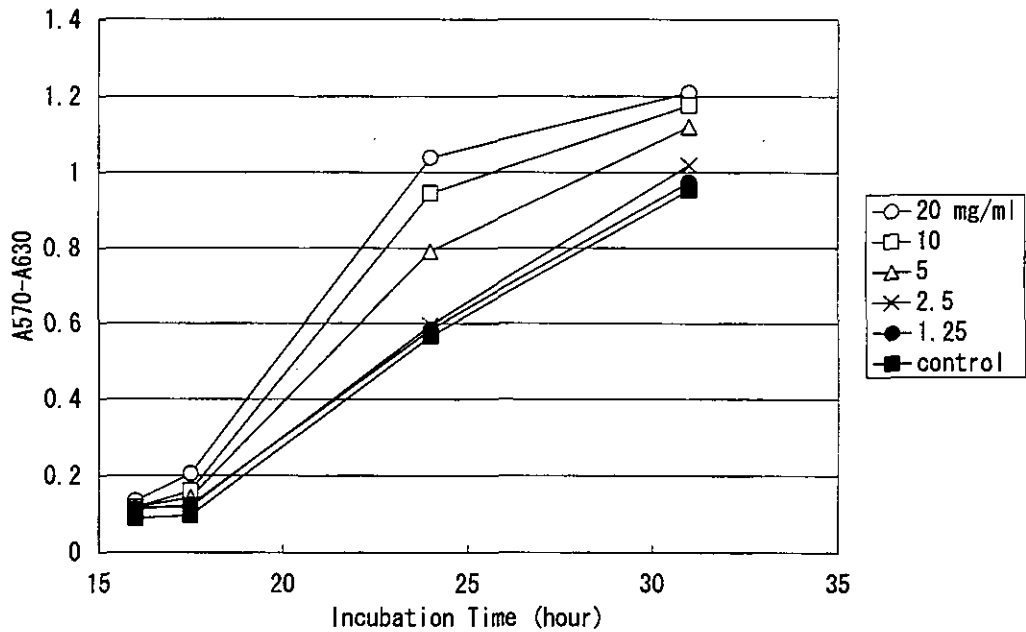


Fig. 4 *N. fowleri* に及ぼすラクトフェリン・ペプシン分解物の影響 (SCGYEM)
(濃度はペプシン消化前のラクトフェリン濃度で表示した)

N. fowleri に対するリゾチームの影響

リゾチームが *N. fowleri* に及ぼす影響を検討した。リゾチームを生理的濃度より 10 倍高い 10 mg/ml の濃度で HMI-9 培養系に添加し、*N. fowleri* に対する影響を経時的に観察・測定した。その結果、リゾチームは *N. fowleri* に対して抗アメーバ作用を示さず、増殖に対しても影響も示さないことが判った(図省略)。

D. 考察

N. fowleri によって発症する PAM の病因論については、嗅神経を上行して頭蓋内へ進入する事実に加え、*N. fowleri* が補体系の防御システムを回避する機構を有することが確認されているのみである。なぜ嗅神経のみが進入経路となりうるのか、なぜ鼻腔粘膜上の感染防御システムは機能しないのか、なぜ若年者に患者が多いのか、など多くの事象は推論の域を出ていない。

鼻腔以外の感染ルートの再検討を実施したが、予想通り口腔経由でも PAM を発症することが確認された。口腔経由での感染の可能性は文献中では指摘されていたものの、実験的に確認した例としては恐らく世界初であると思われる。本研究で口腔経由での感染を確認できた要因として、我々が PAM 本邦初症例の患者から分離した *N. fowleri* YT9611 株のマウスに対する病原性が、これまでに報告されている分離株の中で致死率が最も高い部類に属する点が考えられる。いずれにしても、遊泳時に *N. fowleri* 汚染水が鼻腔に入り PAM が発症するとされていた発症論に修正を加えるべき重要な結果であると考えている。つまり、飲料水が汚染されていた場合、PAM 発症のリスクが発生することになる。

N. fowleri に対して口腔粘膜上の感染防御システムが機能しているか否かは我々が本邦初症例を経験したときから抱いていた疑問である。鼻腔・口腔粘膜上には他の粘膜上と同様、細胞性(免疫担当細胞など)や液性(分泌型 IgA、抗菌ペプチドなど)の免疫システムが備わっている。本研究では生化学的防御機構の主役を担うラクトフェリンとリゾチームについて、*N. fowleri* に対する影響を検討した。ラクトフェリンとリゾチームは共に非特異的な抗菌ペプチドで、生理的濃度 0.1–1 mg/ml の範囲で鼻粘膜上での殺菌の主役を担っている。ラクトフェリンはトランスフェリンなどと同様に鉄結合能を有するタンパク質で周囲から遊離の鉄を奪うことにより抗菌作用を発揮する上に、機構は明確ではないが真菌やウイルスに対しても抗微生物作用を示すことが知られている。加えて *N. fowleri* の病原性発現に鉄が必須であるとの報告が多く見受けられることから、ラクトフェリンが抗アメーバ作用を示すのではないかと考え影響を検討した。その結果、生理的濃度範囲では *N. fowleri* に対して外見上の影響が認められなかったばかりか、高濃度のラクトフェリン存在下では驚くべきことに *N. fowleri* の増殖をエンハンスするという結果が得られた。この理由として、ラクトフェリンが培養液中の鉄と結合した後、*N. fowleri* に取り込まれて栄養素になった可能性が考えられる。リゾチームは細菌の細胞壁を破壊することで殺菌作用を発揮するため抗アメーバ作用は期待していなかったが、予想通り *N. fowleri* に対しては影響が認められなかった。また、森永乳業の研究者により発見されたラクトフェリシンは、ラクトフェリンのペプシン消化物から見いだされたラクトフェリン N 末端領域の分子量 3,000–5,000 のペプチドで、抗微生物活性はラクトフェリンの数十倍以上強いことが報告されている。また、ラクトフェリシンそのものは鼻腔粘膜上に存在しないものの、トキソプラズマ原虫に対して抗微生物活性を示すことも報告されていることから、治療薬としてのラクトフェリシンの抗アメーバ作用を期待して *N. fowleri* に対する影響を検討した。ラクトフェリシンは市販されておらず試薬として入手できなかったため、本研究ではラクトフェリシンを含むラクトフェリンのペプシン消化物を用いた検討を行った。ペプシン消化物を用いたためラクトフェリシンの濃度は不明であるが、*N. fowleri* に対する抗アメーバ作用は確認できなかった。

鼻腔・口腔粘膜上にはラクトフェリンやリゾチーム以外にも抗微生物活性を示すペプチド類が分泌されているが、大部分は生理的濃度が 100 分の 1 以下と薄いうえ免疫担当細胞との協

力で抗微生物活性を示す化合物である。以上の結果から、鼻腔・口腔粘膜上で非特異的感染防御に主要な役割を示す抗菌ペプチド類は、*N. fowleri* に対して抗アメーバ作用を発揮していないことが強く示唆された。

E. 結論

鼻腔・口腔粘膜における主要な抗菌ペプチドであるラクトフェリンとリゾチームは、生理的濃度より10倍以上の高濃度でも *N. fowleri* に対して抗アメーバ作用を示さないことが判明した。これら2種の感染防御タンパク質のみで病原体をはじめとする生体外異物の侵入を防いでいるわけではないが、極めて短時間で頭蓋内へ進入する *N. fowleri* に対しては粘膜防御システムが十分に機能していないことが強く示唆された。

F. 健康危険情報

関連事項なし

G. 研究発表

Tatsuru Hara, Toshihide Fukuma : Diagnosis using PCR of the primary amoebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*. (投稿準備中)

H. 知的財産権の出願・登録状況

関連事項なし

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)
分担研究報告書

温泉・公衆浴場、その他の温水環境におけるアメーバ性髄膜脳炎の病原体
Naegleria fowleri の疫学と病原性発現に関する研究

ネグレリア属を中心とした高温耐性アメーバの検査マニュアル

分担研究者： 八木田健司（国立感染症研究所 寄生動物部）
泉山信司（国立感染症研究所 寄生動物部）
黒木俊郎（神奈川県衛生研究所 微生物部）

A. 研究目的

本研究事業においては高温耐性アメーバ類、特にネグレリア属アメーバの検出とその解析に関して、継続的に方法の改良を進めてきた。実態調査から得られてくる最新の知見をアメーバ類の検査、解析の技術的改良に還元し、標準化した方法を確立することは本研究事業の重要目的の一つとして位置付けられる。既に平成 14 年度報告書において、アメーバ類の実態調査に関連した資料として検査方法に関する簡易マニュアルをまとめたが、事業最終年度にあたり、標準検査マニュアルとしてこれまでの成果をまとめなおした。本マニュアルは、本研究事業に参加協力のあった各地方衛生研究所からの指摘、要望等を取り入れ、微生物取扱いの可能な検査施設において高温耐性アメーバ類あるいは病原性アメーバ類に関する環境調査、感染事例に際しての感染源、感染経路の諸調査および病原体診断が全国的に対応可能となるように考案した。

B. 研究方法

本マニュアルについては、以下の内容で構成する。

- 1、 温水試料からのネグレリア属など高温耐性アメーバ類検出方法の標準化
 - 2、 温水環境より検出される代表的なアメーバと形態学的同定の要点
 - 3、 ネグレリア属アメーバの PCR/RFLP による検出方法
1. 検出方法の標準化については、平成 14 年度作成の簡易マニュアルをベースに、手順を標準化した。特にアメーバ分離の成否に最も影響がある大腸菌塗布無栄養寒天培地の準備に関して、塗布用大腸菌液の調整とその塗布方法を詳細に記述し、検査誤差の最小化を図った。また、アメーバ標準株を用いての、分離における精度管理に有用となる方法も付記した。
 2. アメーバの形態学的同定に関しては、温水環境より検出される主要なアメーバ類の形態的特徴を写真等を用いて解説した。
 3. ネグレリア属アメーバの PCR/RFLP による検出方法に関しては、検査施設において導入が進み、一般化しつつある DNA 診断法の応用の形で、スクリーニング方法としての有用性も考慮して、標準的手順をまとめた。

1、温水試料からのネグレリア属等高温耐性アメーバ類検出法の標準化

1. 目的

汚染調査、また感染源調査に際して、試料からのネグレリア属等高温耐性アメーバ類検出に要する試薬、器材等を示し、検出の標準的な手順を解説し、各施設において作成される標準作業の手引き、マニュアルとして使用されることを目的とする。

2. 適用範囲

この標準マニュアルは、浴槽施設の浴槽水とその排水、また工場等からの温排水等の水試料からの高温耐性アメーバ類の検出を主たる目的とするが、ほぼ同様の作業で感染事例に関連した臨床材料等からの病原体診断にも利用することができる。

3. 検査の概要

対象となるアメーバ類は自然環境に生息する自由生活性アメーバ類であり、細菌捕食性である。これらアメーバの選択分離用合成培地は未開発であるため、試料からの分離用培地として、非病原性大腸菌を栄養源として塗布した寒天平板培地を用いる。試料を接種後、細菌を消費し増殖したアメーバを増殖集落(プラーク)として検出する。アメーバの確認は基本的に顕微鏡を用いての形態学的観察に基づいて行う。

4. 手順

4-1. 必要な器材等

滅菌済み採水ビン(500ml 容量ポリビンなど)、90mm 径プラスチックシャーレ、遠心管(15ml および 50ml 容量)、凍結保存チューブ(1ml 容量)、スライドグラス、カバーグラス、メスピペット、ビニールバッグ、ループ(径 5mm 程度)、釣菌針(先端を鋭利にしたピアノ線等で代用可)、ホットバス、恒温器(42℃設定可能な機種)、倒立または微分干渉顕微鏡、遠心器

4-2. 必要な試薬等

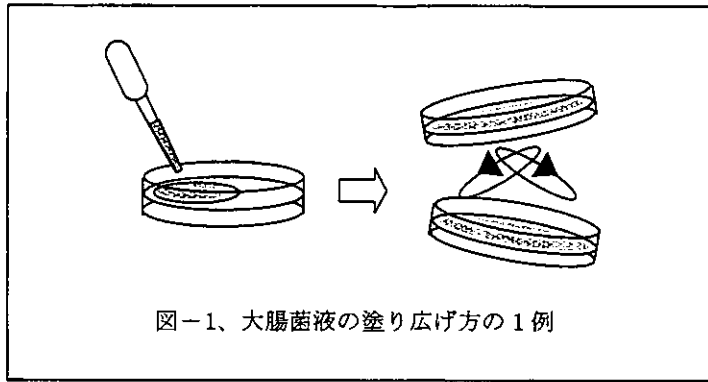
大腸菌(DH1株)、大腸菌用増殖培地(市販汎用培地)、寒天粉末培地(無栄養の製品、Bacto-Agar/DIFCO、他)、滅菌蒸留水

4-3 試料の採取・輸送・保存

検査対象となる水試料 300ml 程度を採水ボトルに採る。室温で保存・輸送する。培養は 24 時間以内に行うことが望ましい。

4-4. 大腸菌の準備

1) 大腸菌用平板培地に大腸菌DH1株を増殖させる。次に菌を滅菌蒸留水で1ループ分とり、1ml の滅菌蒸留水に懸濁し、これを 0.5ml 程度新しい平板に移し、表面が広く濡れ広がるように平板をゆり動かすか(図-1)、ピペットで吹きつける、あるいはコンラージ棒で塗り広げる。菌液塗布後は安全キャビネット内で培地表面に皺が生ずる程度まで乾燥させる。乾燥が不十分な場合、増殖した菌層が湿潤となり回収が難しくなる。培養は 37℃で 2～3 日行う。

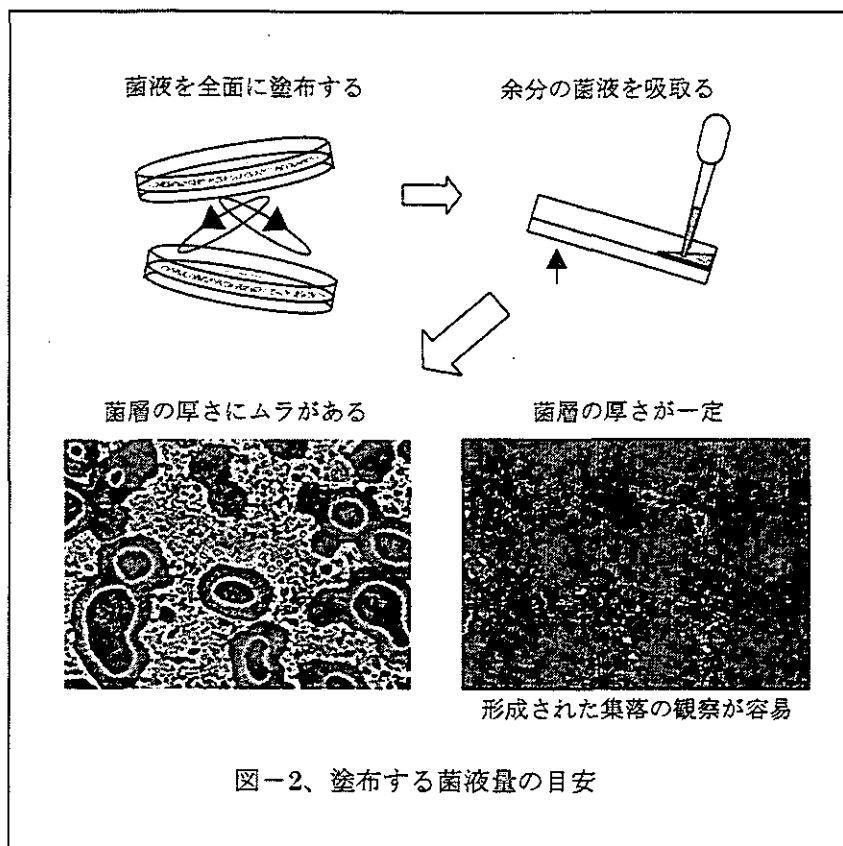


- 2) スクリューキャップ付の遠心管(15ml 容量)に滅菌蒸留水 1ml を入れ、寒天を削らないようにループを使って大腸菌をかき取り、蒸留水中に移し懸濁する。菌液濃度は大腸菌培養平板 1 枚分の菌を蒸留水 1ml に懸濁することを基準とする。平板数が増す場合は蒸留水量を増やし、菌濃度を調整する。
- 3) 2)において作製した菌液の菌濃度を測定する場合は、蒸留水で 100 倍に菌液を希釈し、600nm の吸光度を測定する。上記の方法で調整した菌液の 100 倍希釈時の吸光度はおよそ 0.3OD 前後である。菌液の吸光度が低い、菌濃度が低い場合は無栄養寒天塗布時に塗布する菌量を調整する(4-5、2)参照)。
- 4) 菌を不活化するため、ボルテックスで均一に懸濁後、58～60℃のホットバスで 1時間加熱する。時間は厳守し、前半 30 分間は 10 分毎に菌液を撪拌することで均一な加熱を行う。
- 5) 室温で 10 分間ほど自然冷却した後、安全キャビネットに移し、雑菌による汚染を防ぐためキャップ付近をアルコール綿でよく拭ってからキャップを開ける。雑菌で汚染された菌液を使用するとアメーバの増殖阻害につながるため、判明次第、菌液は廃棄する。
- 6) 加熱処理した菌液を無菌的にピペットを用いて1mlずつ凍結保存チューブ等に分注する。これをストック菌液として-20℃で保存する。半年程度は保存可能である。
- 7) DH1株の保存は定法に従い凍結保存するか、あるいは数ヶ月程度であれば平板で増殖したまま乾燥を防ぎ、冷蔵庫保存する。

4-5. アメーバ分離用培地の準備

- 1) 蒸留水で滅菌溶解した 1.5%無栄養寒天溶液を 20ml とり、90mm 径シャーレに流し込み無栄養寒天平板を作製する。厚さは 5mm 程度となる。寒天が厚くなると顕微鏡観察に際し焦点距離が合わず、観察不能となることがあるので注意する。寒天平板は安全キャビネット内で培地表面にかかるく皺が生ずる程度まで乾燥させる。この生培地は数ヶ月、4℃で保存可能であるが、保存中は乾燥を防ぐためビニール袋などで密封する。
- 2) スtock用の菌液を滅菌蒸留水で 10 倍に希釈し、その 1ml を上記アメーバ用の無栄養寒天培地に移す。図-1 のようにシャーレを揺らしながら全面を菌液で濡らした後、シャーレを傾けて下に溜まった菌液 0.5ml を吸取り回収する。試験的に生培地 1-2 枚を使って希釈菌液を塗布し、倒立顕微鏡で平板表面が全面的に菌で塗布され寒天の露出した部分がない(菌層にムラがない)ことを確認するとよい(図-2)。塗布量が少ない場合は、塗布する菌液量を増やす(回収する液量を減らす、例え

ば 0.5ml→0.2 あるいは 0ml にする)、希釈した菌液にストック菌液を少量加えて菌濃度を上げる、あるいはストック菌液の希釈倍率を低くして用いる。ストック菌液の 100 倍希釈時の吸光度が 0.30.D (塗布用の希釈菌液として調整した場合は 3.00.D に相当する)程度であれば、上記塗布条件で良好な菌塗布培地が作製できる。



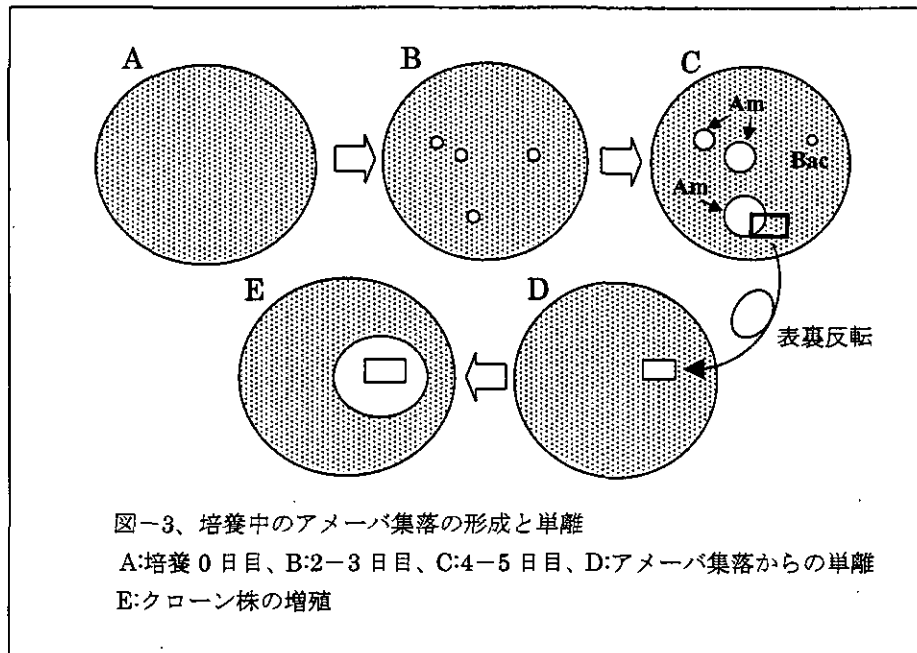
- 3) 菌液塗布後、安全キャビネット内で培地表面に再び皺が生ずる程度まで乾燥させる。菌を塗付した寒天培地は 1、2 週間であれば 4℃で保存可能である。保存中にカビが生じた場合は使用しない。

4-6. 試料からのアメーバの分離と定量およびアメーバの単離(クローニング)

- 1) 被検試料水はそのまま 1ml、および 50ml を遠心 (1,000xg、5 分間) 後上清をおよそ 1ml 残して捨て、沈渣を再浮遊したものをアメーバ用分離培地に移す。図-1 のようにシャーレを揺らしながら全面に 1ml の試料を広げ、均一に表面を濡らした後、風乾させる。この操作は安全キャビネット内で行う。
- 2) ビニール袋等に入れ乾燥を防ぎ、42℃で培養する。
- 3) アメーバのプレートは毎日観察する。培養 1 日程度では肉眼的にはほとんど変化は見られないが、倒立顕微鏡下で観察すると、数十個ほどに増殖しているアメーバ集落が見られる場合がある。培養 2、3 日後になると増殖したアメーバが集落として肉眼的に確認可能となる。アメーバ性の集落の特徴は、塗布した菌を消費しながら拡大、成長していく点である(図-3; A-C)。肉眼的にはほぼ円形で菌が塗布されている部分との対比で透明感があり、周囲がやや線状に観察される。日毎に集落

は成長していくことから、アメーバの集落と思われるものについてはプラスチックシャーレ裏側から黒色マーカーペン等でマークしておくこと成長の遅い雑菌類の集落との判別が容易となる。集落の成長速度、出現までの時間はアメーバ個々に異なるので注意する。毎日プレートを観察し、観察期間中につけられたマーク数を合計すれば元の試料水中に存在したアメーバ数を算出できる。なお、試料中に混入していた雑菌の増殖が激しい場合は、アメーバの集落が判然としないことがある。それでもアメーバの定量が必要な場合には、疑わしい集落にマークして、それを倒立顕微鏡下で観察し確認することが必要である（4-7、アメーバの顕微鏡観察を参照）。

- 4) 培地上に形成される集落の外観、形態にはアメーバの種類による特徴が見られない。したがって、どのようなアメーバが分離されたかの確認には、培地より集落を単離（クローニング）し、その後形態学的あるいは生化学的、分子生物学的方法により同定を行う。単離は、釣菌針または先端を鋭利にしたピアノ線を用いて、集落の最外部（最もアメーバが活発に増殖している部分）を3-5mm角の大きさに寒天ごと切り出し、増殖面を下にして、新しいアメーバ分離培地にのせる（図-3;D）。寒天片が小さいので、アメーバの付着している表面部分だけでも移植できれば良い。単離したアメーバは新しい培地で再び増殖を開始する（図-3;E）。



- 5) 高温耐性のネグレリアの集落はアメーバ類の中では培養早期に出現する傾向にあるので、ネグレリアの検査を目的とする場合には培養後 3 日間の間に出現した集落に関して単離を行う。3 日以降になると他のアメーバ類の増殖も進むので、ネグレリアの分離効率が悪くなる。
- 6) 単離したクローン株はビニール袋等に入れ 42°C で培養継続する。

4-7. アメーバの顕微鏡観察

- 1) 平板上で増殖させたアメーバは倒立顕微鏡を用い、平板をステージ上に乗せ 100~200 倍の倍率で観察する。小さな集落をアメーバと考えてシャーレ底にマークしてある時は、始めにそのマークを

視野の中心にもってくる。アメーバの増殖がまだ進んでいない場合は、放射的に栄養体が分散して存在することが多い(図-4;A)。個々のアメーバは細胞内小器官である収縮胞が数十秒毎に収縮を繰り返すので、これを目印にするとアメーバの存在が判りやすい(図-4;B)。集落が成長してくると、シスト形成するアメーバの場合は、集落の中心にシストが(図-4;C)、その外側に栄養体が観察される(図-4;D)。寒天平板上ではアメーバの形態を詳細に観察することは難しく、シストの形態的特徴がようやく分かる程度であるが、紛らわしい細菌の集落との鑑別に役立つ。

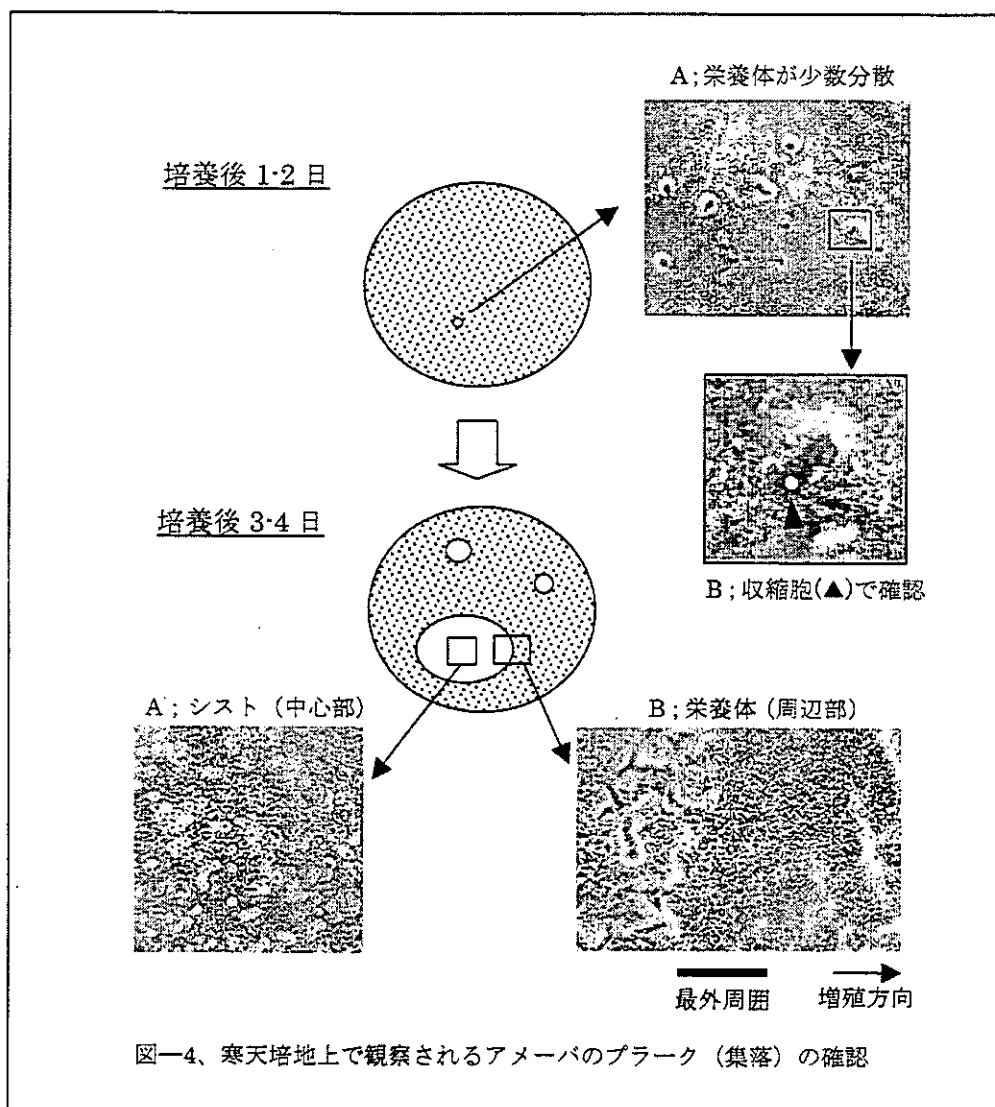
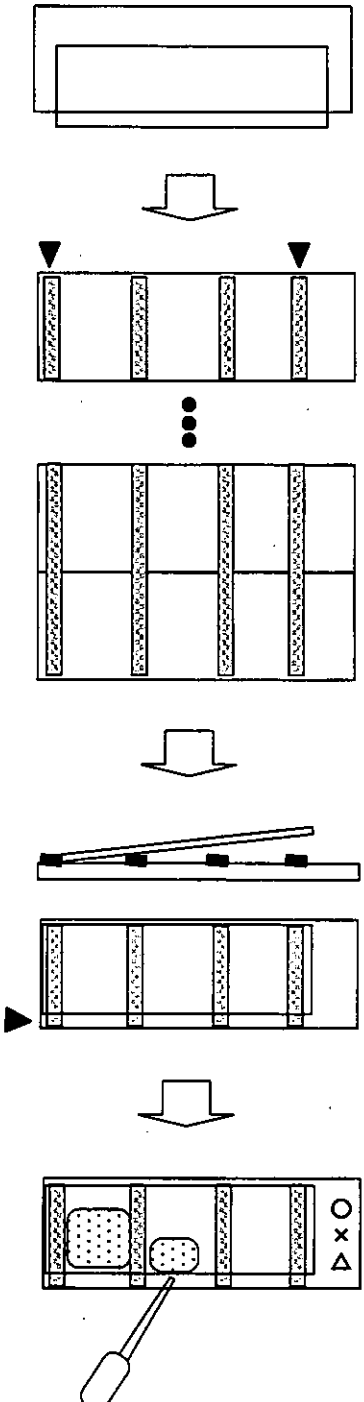


図-4、寒天培地上で観察されるアメーバのブランク(集落)の確認

- 2) 培地上に単離したアメーバのクローン株あるいは試料を塗り広げた元培地上に形成されたアメーバの集落に対して、顕微鏡的にアメーバを観察する場合は、アメーバの増殖している箇所_に 20 μ l の蒸留水をピペットで滴下し、3-4 回のピペッティングでアメーバを浮遊させ、その浮遊液をスライドグラスに移し、カバーグラスで封じる。200~400 倍の倍率で観察を行う。元培地上で集落同士が接近している場合は、少量の蒸留水によるピペッティングでもお互いが混ざり合うことになるので、クローニングを行ってから観察する。一般的な透過型生物顕微鏡または位相差顕微鏡ではアメーバ属に特徴的な運動と形態が観察でき、微分干渉顕微鏡を用いれば微細な細胞表面構造まで観察が可能である。なお、形態観察はアメーバの運動が一定するまで、標本作成後 15 分程度は待つ。観察まで時間がかかる場合には標本の乾燥を防ぐため、カバーグラス周囲をパラフィンで封じる。エナメ

ル(マニキュア)はアメーバに対する毒性が見られるので使用しない。なお、顕微鏡観察にはスライドグラスとカバーグラスを貼り合わせた「チャンバースライド」を用いると便利である。およそ $20\mu\text{l}$ 程度の浮遊液を観察できることや、カバーグラスの圧力による変形、運動の障害などが起こらない点で優れている。その作製の方法を図-5に簡単に示した。なお、検鏡用プレートとして市販品もある(セキスイ検鏡プレート、例:3窓タイプ、UR-137)。

図-5、アメーバ観察用チャンバースライドの作製方法と使用法

- 
- 1) スライドグラス (76 x 26mm) とカバーグラス (60 x 24mm) を用意する。表面は清浄しておく。
 - 2) スライドグラス上に等間隔に細く切った両面テープ (幅 3mm 程度) を貼る。この時、出来る窓 (チャンバー) の数を設定できる。図では 3 窓を作製する例を示す。両側のテープの位置はカバーグラスの長さの中に入るようにする。
スライドグラスを縦に並べて、一度に細長く切ったテープで貼ると効率良く作製できる。その場合は、後述のカバーグラスをすべてのスライドグラスに貼り合わせた後で、カッター等で切り離す。
 - 3) カバーグラスを両面テープ上へのせ、スライドグラスと貼り合わせる。この時、カバーグラスとスライドグラスの幅に数 mm の差ができるようにする。カバーグラスを割らないように、両面テープの部分を上から押さえて密着させる。
 - 4) スライドグラスとカバーグラスの隙間にアメーバ浮遊液を微量ピペットで注ぎこむ。3 窓の場合は 1 窓あたり約 $20\mu\text{l}$ 入る。
400 倍までの拡大であれば、観察像は明瞭である。
必要に応じてパラフィンで上下の隙間をシールすると乾燥が防げる。