

## 温水環境中に棲息する*Naegleria* 属アメーバの検出と分布について

烏谷竜哉 竹内潤子 奥山正明 高見俊才 大瀬戸光明 井上博雄  
八木田健司\* 泉山信司\* 下河原理恵子\* 遠藤卓郎\*

### Detection and Distribution of *Naegleria* Species in Thermal Waters in Ehime, Japan

Tatsuya KARASUDANI, Junko TAKEUCHI, Masaaki OKUYAMA, Syunsai TAKAMI  
Mitsuaki OSETO, Hiroo INOUE, Kenji YAGITA\*, Shinji IZUMIYAMA\*  
Reiko FURUSHIMA-SHIMOGAWARA\*, Takuro ENDO\*

The free-living amoebae belonging to the genus *Naegleria* contain both pathogenic and nonpathogenic species. To facilitate the identification of species of the genus *Naegleria*, we improved the PCR-RFLP method that developed by Pélandakis & Pernin. The RFLP analysis with restriction enzymes *Mse* I, *ScrF* I and *Dde* I allowed the identification of the main thermophilic *Naegleria* species that were isolated in the present study. From our epidemiological survey of 87 thermal baths and 10 thermal-discharge waters in Ehime, Japan, free-living amoebae were detected in 37 (42.5%) thermal baths and all 10 thermal-discharge waters. *Naegleria* species were detected in 31 (35.6%) thermal baths and 9 thermal-discharge waters. Although *N. fowleri*, the causative agent of primary amoebic meningoencephalitis, was not isolated, the two known pathogenic species, *N. australiensis* and *N. philippinensis* were isolated in 2 thermal baths and 9 thermal-discharge waters. The occurrence of pathogenic *N. australiensis* in thermal waters correlated with the increased number of standard plate count bacteria, and appear to be ubiquitous in a variety of thermal waters in Japan.

**Keywords** : free-living amoeba, *Naegleria*, *N. australiensis*, internal transcribed spacer (ITS), PCR-RFLP, thermal bath, thermal-discharge water.

### はじめに

自由生活性アメーバは環境中に広く棲息しており、本来ヒトに寄生するものではない。しかし、温水環境を好む*Naegleria*属アメーバの1種*Naegleria fowleri*は、遊泳・入浴等による温水環境との接触の際に、鼻咽頭の粘膜を通して脳内に侵入し、原発性アメーバ性髄膜脳炎(PAM)を引き起こす<sup>1)</sup>。症状が急激に進行するため死亡後に診断される例がほとんどであり、発症後に回復する症例は極めて稀である。本アメーバは温水中で増殖し、湖、池などの淡水での遊泳歴をもつ若年層に発症例が多いのが特徴であり、そのシストは塩素に対する抵抗性を持つため、プールでの感染も知られている。本症の症例は米国、南米、ヨーロッパ、オーストラリア、ニュージーランドなどの世界各地から、現在までに200例以上の症例が報

告されている<sup>2,3)</sup>。わが国では1999年11月に佐賀県で初の*N. fowleri*によるPAM症例が報告されたが<sup>4)</sup>、その感染源は良く分かっていない。また、*Naegleria*属アメーバには*N. fowleri*以外にも実験的にマウスに対して病原性を示す*N. australiensis*, *N. italica*, *N. philippinensis*の3種が知られており、ヒトに対する潜在的な危険性が指摘されている<sup>5)</sup>。

近年の健康意識の高まりとともに日本各地で温泉が開業し、これら高温耐性アメーバの生育に好適な温水環境は至る所に存在していると考えられる。国内では1991年にDe Jonckheereら<sup>6)</sup>が環境水中からはじめて*N. fowleri*を分離しているが、その後の調査は少数にとどまり<sup>7)</sup>、病原性アメーバの分布の実態はほとんど把握されていない。また、循環式浴槽におけるレジオネラ属菌の集団感染事例が問題となっているが<sup>8)</sup>、*Naegleria*属アメーバはレジオネラ属菌の宿主として関与することが知られており<sup>9)</sup>、その温水環境中の分布を把握することは公衆衛

愛媛県立衛生環境研究所 松山市三番町8丁目234番地

\*国立感染症研究所寄生動物部

生上重要と考えられる。

我々はまず、*Naegleria*属アメーバの同定作業を効率化するため、Pélandakisらが示したPCR-RFLP法<sup>10)</sup>の制限酵素を改良し、簡便な分類法を確立した。次いで、愛媛県内の公衆浴場、温泉、食品加工場等を対象に、浴槽水及び温排水中の高温耐性アメーバ分布調査を実施したので詳細を以下に述べる。

## 材料と方法

### 1. 試料

平成14年9月から平成16年1月の間に、愛媛県内の温泉、公衆浴場等の入浴施設11施設の浴槽50箇所から延べ87件の浴槽水を採取した。また、排水の採取が可能であった入浴施設6施設及び、食品加工場2施設の計8施設からのべ10件の温排水を採取した。

アメーバ検査用の試料は500mlの滅菌プラスチックボトルに400ml程度採取し、常温にて移送後その日のうちに培養に供した。アメーバ以外の検査項目は、水温、遊離残留塩素濃度、pH、一般細菌数について実施した。

### 2. アメーバの分離、同定

厚生労働科学研究事業作成「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」<sup>11)</sup>に準じてアメーバの分離を行った。すなわち、試料原液並びに50ml遠心濃縮液各1mlを大腸菌塗布寒天平板に塗布したものをそれぞれ2枚以上作成し、42℃で2~3日間培養した。出現したアメーバ集落は、一平板毎に20集落を上限として他の集落と重なる前に辺縁部を平板から切り出し、新たな大腸菌塗布寒天平板上に倒置して継代培養を行った(クローニング)。得られたクローン株は、シスト及び栄養体の形態学的特長、並びに栄養体の鞭毛誘

ITS1, 5.8S rDNA, ITS2領域の塩基数 (bp) 及び登録配列との一致率

種	株 (Accession No.)	分離株の由来	ITS1	5.8S rDNA	ITS2	Total	登録配列との一致率
<i>N. fowleri</i>	KUL (X96561)		86	175	106	367	
	LEE (X96562)		86	175	106	367	
	Kurume		84	175	106	365	
<i>N. lovaniensis</i>	Aq/9/1/45D (X96568)		41	175	103	319	
	H14-K217	浴槽水	41	175	103	319	100%
	H14-K336	浴槽水	41	175	103	319	100%
	H14-K559	排水	41	175	103	319	100%
	H15-K549	排水	41	175	103	319	100%
	H15-K604	排水	41	175	103	319	100%
<i>N. australiensis</i>	PP397 (X96573)		33	175	100	308	
	H14-K085,569,848	排水	33	175	100	308	100%
	H15-K201,228	排水	33	175	100	308	100%
	H15-K244,299,356,368	浴槽水	33	175	100	308	100%
	H15-K389	排水	33	175	100	308	100%
	H15-K502	排水	33	175	100	308	100%
	H15-K557	排水	33	175	100	308	100%
<i>N. tihangensis</i>	T2A (AJ566631)		33	175	102	310	
	H14-K103,187,227	浴槽水	33	175	102	310	100%
	H14-K896	排水	33	175	102	310	100%
	H15-K212	排水	33	175	102	310	100%
	H15-K503	排水	33	175	102	310	100%
<i>N. italica</i>	AB-T-F3 (X96574)		33	175	164	372	
<i>N. laresi</i>	EDF147 (AJ566630)		33	175	161	369	
	H15-K370	排水	33	175	162	370	98.4%
	H15-K512	排水	33	175	162	370	98.4%
<i>N. philippinensis</i>	NG206 (AJ132032)		33	175	113	321	
	H15-K415	排水	33	175	113	321	100%
	H15-K602	排水	33	175	113	321	100%
<i>N. mexicana</i>	Mx6J (AJ566622)		33	175	112	320	
	H15-K336	浴槽水	33	175	112	320	100%
<i>N. endoi</i>	EDF6 (AJ566629)		33	175	112	320	
	H14-K870	浴槽水	33	175	112	320	100%
	H15-K340,394	浴槽水	33	175	112	320	100%
<i>N. sp</i> PNMA-1	PNMA-1 (AY033614)		33	175	155	363	
	H15-K564	排水	33	175	153	361	97.8%
<i>N. jamiesoni</i>	T56E (X96570)		34	174	100	308	
	H14-K557,558,563,564	排水	34	174	100	308	100%
<i>N. pussardi</i>	EDF258 (X96571)		38	174	92	304	

出試験に基づきアメーバの属を同定した。 *Naegleria*属アメーバのスクリーニングを効率化するため、後述のPCR-RFLP法を同時に実施した。 *Naegleria*属アメーバのうち、マウスに対する実験的病原性が知られる種及びその近縁種については、国立感染症研究所において感染試験を行った<sup>11)</sup>。

### 3. DNAの調整

継代培養後の平板上で、アメーバが活発に増殖している集落の辺縁部をループで5mm程度かき取り、200  $\mu$ lのlysis buffer (1% Triton X-100, 10mM Tris, 1mM EDTA, pH 8.0) で懸濁後、100°Cで15分間加熱し、得られた溶解液をそのままPCRの鋳型とした。検体数が多い場合は、本操作を96ウェルPCRプレートで行った。

### 4. PCR-RFLP法

PCRはPelandakisらの方法<sup>10)</sup> に準じ、5.8S rDNAを

含むITS (Internal Transcribed Spacer) 領域を増幅するプライマー (5' GAACCTGCGTAGGGATCATTT及び5' TTTCTTTTCCTCCCCTTATTA) を使用した。PCR反応液は、20  $\mu$ l中に1 $\times$ PCR buffer, 200 mM dNTP, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.6  $\mu$ Mプライマー, 0.1 mg/mlクレゾールレッド, 5% グリセロール, 1Unit Taq DNA polymerase (TAKARA Ex Taq) を含むマスターミックスを検体数分調整分注し、最後に鋳型DNAを1.5~2.0  $\mu$ l添加して作成した。PCR反応にはPERKIN ELMER GeneAmp 9600を使用し、94°C5分間の後、94°C 30秒, 55°C 30秒, 72°C 45秒を35回繰り返し、最後に72°C5分間の伸長反応を行った。検体数が多い場合は、本操作を96ウェルPCRプレートで行い、増幅産物の確認には96ウェル専用泳動槽 (One lambda Micro-SSP MGS108) を用いた。増幅産物3  $\mu$ lを2.5%アガロースゲ

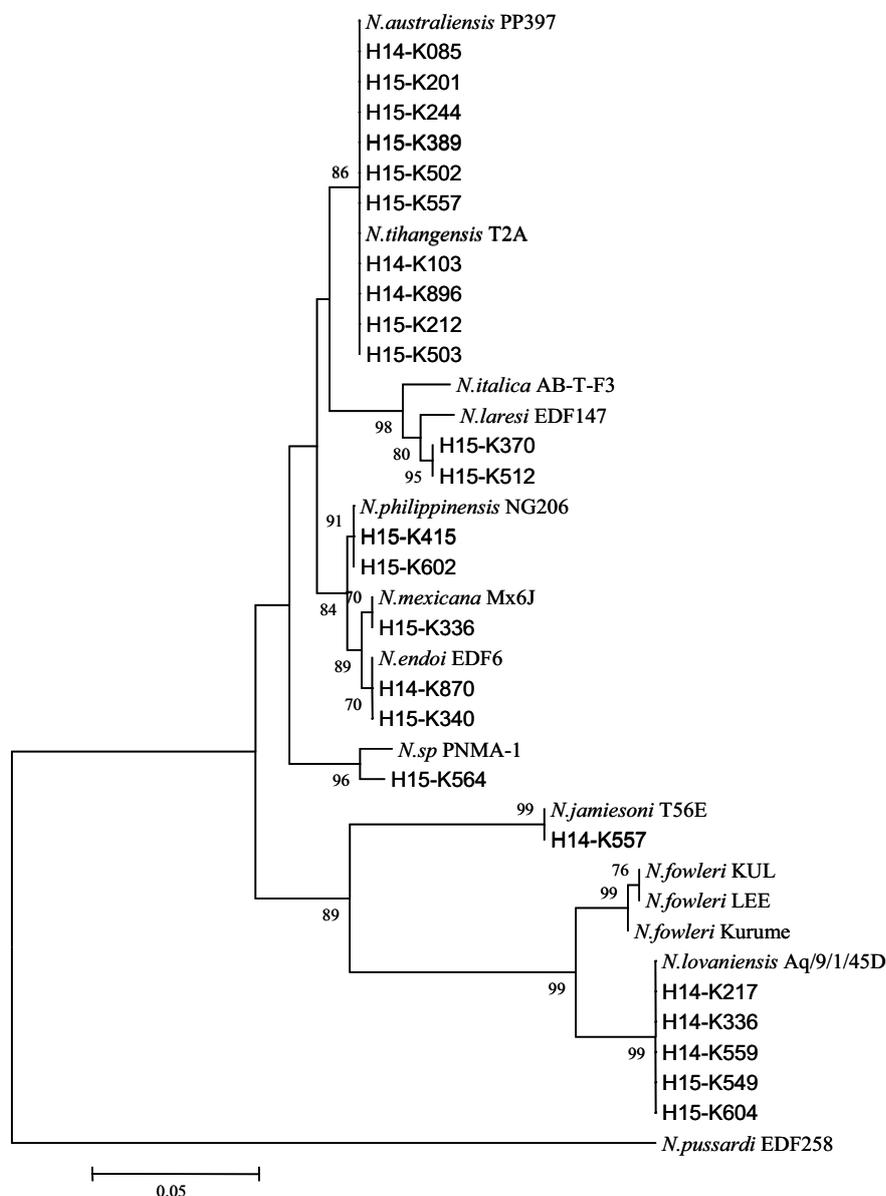


図1 *Naegleria* 属アメーバのITS1, 5.8S rDNA, ITS2領域の系統樹  
NJ法により作成。数値はブートストラップ確立50%以上を表示

ルに直接アプライし、150Vで4分間泳動後、EtBr染色にて400~500bp付近にバンドが検出された株を*Naegleria*属アメーバと判定し、RFLP解析に供した。

RFLP解析には制限酵素*Mse* I, *Nla* IV, *ScrF* I, *Dde* I (NEB) を使用した。制限酵素反応液は、6μl中に1×制限酵素バッファー、0.1mg/ml BSA, 2 Unit制限酵素を含むマスターミックスを検体数分調整分注し、最後にPCR増幅産物3μlを添加して37℃で2時間以上消化した。その後、反応液9μlにloading buffer 1μlを添加し、Mupid (ADVANCE) を用いて7%ポリアクリルアミドゲルで40分間泳動し、EtBr染色にてフラグメントサイズを解析した。

#### 5. シークエンス解析及び系統樹解析

PCR増幅産物はQIAquick PCR purification kit (QIAGEN) で精製後、Thermo Sequenase Cy5.5 Dye Terminator Sequencing Kit (Amersham Biosciences) を用いてサイクルシークエンス反応を行い、Gene Rapid (Visible Genetics) により増幅産物の塩基配列を決定した。解析には、シークエンスエディタとしてGeneDoc Ver2.6 (Nicholas et al.)<sup>12)</sup> を、マルチプルアラインメントの作成にはClustal X (Thompson et al.)<sup>13)</sup> を使用し、系統樹はMEGA2 Ver2.1 (Kumar et al.)<sup>14)</sup> を用いてNeighbor joining法にて作成した。GenBankから取得した登録配列の加工及び制限酵素切断パターンの解析にはGENETYX Ver6.1 (ゼネティックス) を使用した。系統樹解析に用いた*Naegleria*属ITS領域の登録配列のAccession No. は表1に示した。

## 結 果

### 1. *Naegleria*属アメーバ分離株の遺伝子型

*Naegleria*属アメーバ分離株を、調査地点別にRFLPパターンの異なるグループに分類し、各グループ1株以上について5.8S rDNAを含むITS領域の塩基配列を決定した。GenBank登録配列との相同性を比較し、そのグループの遺伝子型を決定した(表1, 図1)。

本研究を通して9種の*Naegleria*属アメーバが分離

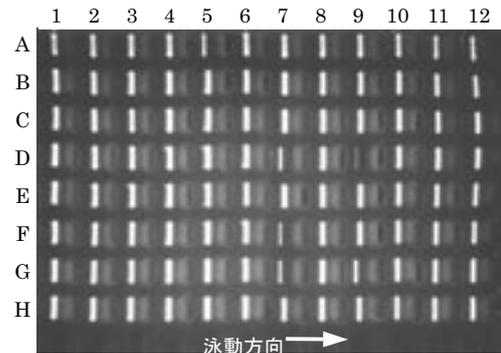


図2 ITS領域のPCR泳動像  
5A, 7D, 7F, 7G, 9D, 9G は *Hartmanella*

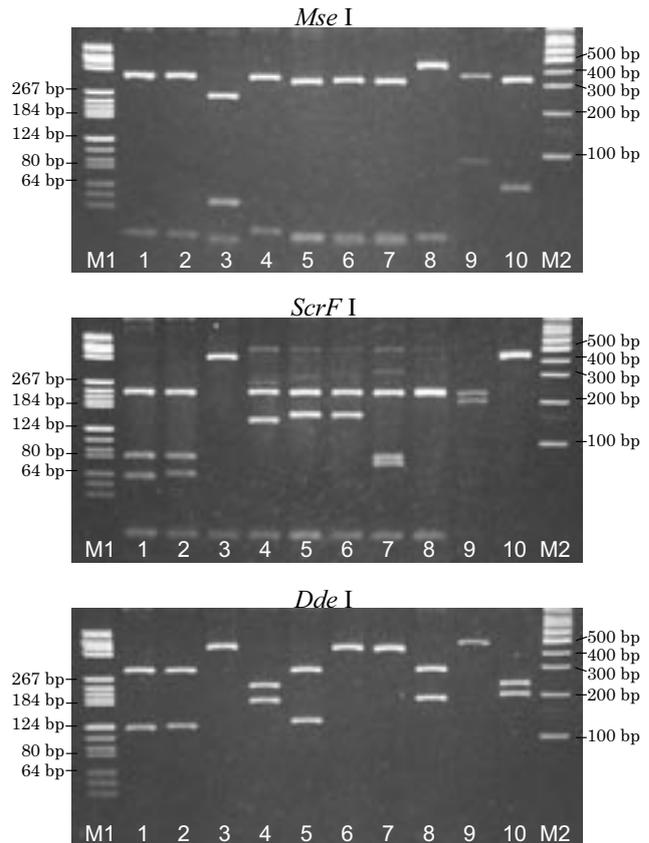


図3 *Naegleria* 属アメーバの RFLP パターン  
各レーンは表 2 の No. の分離株による RFLP パターンを示す。M1 : pBR322/*Hae*III, M2 : 100 bp

表2 *Naegleria* 属アメーバのRFLP フラグメントサイズ

No.	種	株	PCR 産物	(bp)			
				<i>Mse</i> I	<i>Nla</i> IV	<i>ScrF</i> I	<i>Dde</i> I
	<i>N. fowleri</i>	kurume	452	285,100,37,21,9	410,42	416,36	452
1	<i>N. australiensis</i>	H15-K201	395	327,38,21,9	266,87,42	218,80,61,36	279,116
2	<i>N. tihangensis</i>	H14-K103	397	329,38,21,9	266,89,42	218,80,63,36	279,118
3	<i>N. lovaniensis</i>	Aq/1/9/45D	406	232,52,51,37,21,9	364,42	370,36	407
4	<i>N. jamiesoni</i>	H14-K557	397	327,40,21,9	355,42	218,143,36	222,175
5	<i>N. endoi</i>	H15-K340	407	303,38,36,21,9	365,42	218,153,36	407
6	<i>N. philippinensis</i>	H15-K415	408	303,38,37,21,9	366,42	218,154,36	279,129
7	<i>N. mexicana</i>	H15-K336	407	303,38,36,21,9	365,42	218,80,73,36	407
8	<i>N. laresi</i>	H15-K370	457	389,38,21,9	415,42	218,203,36	279,178
9	<i>N. sp.</i> PNMA-1	H15-K564	448	330,88,21,9	406,42	218,194,36	448
10	<i>N. pussardi</i>	H15-K70	394	302,62,21,9	352,42	394	213,181

され、そのうち*N. lovaniensis*, *N. australiensis*, *N. tihangensis*, *N. philippinensis*, *N. mexicana*, *N. endoi*, *N. jamiesoni*の7種については、すべての分離株が登録配列と100%一致した(表1)。H15-K370, H15-K512のグループについては、*N. laresi*の登録配列と比較して370塩基中6塩基(置換5, 挿入1)に相違が認められ一致率は98.4%であった。他の近縁種*N. italica*と比較すると7塩基(置換4, 挿入1, 欠損3)の相違で一致率が97.8%となり、系統樹解析の結果と併せて*N. laresi*の近縁種と考えた(図1)。また、H15-K564は、Fontanillaら<sup>15)</sup>が報告した*Naegleria* sp. PNMA-1と比較して363塩基中8塩基(置換6, 欠損2)の相違があり、一致率は97.8%であった。

分離された*Naegleria*属アメーバのうち、*N. australiensis* 3株(H15-K201, 356, 368)及びその近縁種*N. tihangensis* 1株(H15-K187)はマウスに対する実験的な病原性が認められなかったが、*N. philippinensis* 1株(H15-K415)でマウスに致死的な病原性が確認された。

## 2. ITS領域のPCR-RFLP法

*Naegleria*属アメーバのPCR-RFLPの結果を図2及び図3に、フラグメントサイズを表2に示す。今回分離された9種の*Naegleria*属アメーバは、制限酵素*Mse* I, *ScrF* I, *Dde* Iを用いることですべて異なるRFLPパターンとして分類が可能であった。なお、*N. tihangensis*は*N. australiensis*と比較してITS2領域にチミン2塩基の挿入があるだけで、当該部分を直接認識する制限酵素がないため、*ScrF* Iによる61bpと63bpのバンドを識別する必要があるが、サイズマーカーpBR322/*Hae* IIIが持つ64bpのバンドと比較することで両者の識別が可能であった。また、*Mse* I及び*Nla* IVの組み合わせで*N. fowleri*と類似のRFLPパターンを示す*N. sp.* PNMA-1の近縁種は、*ScrF* Iを用いると400bp付近のバンドの有無で明瞭に区別できた。

## 3. 温水環境中に生息する*Naegleria*属アメーバの分布

今回調査した浴槽水87件のうち、何らかの自由生活

性アメーバが検出された試料は42.5% (37/87)であり、*Naegleria*属アメーバが35.6% (31/87)と最も多くの試料から検出された(表3)。また、排水では調査した10件すべてからアメーバが検出され、*Naegleria*属アメーバは90.0% (9/10)の試料から検出された。自由生活性アメーバが検出された試料におけるアメーバの平均濃度は、浴槽水40 PFU/100mlに対し、排水720 PFU/100mlであり、排水から高濃度に検出された。

得られた843株の*Naegleria*属アメーバ(浴槽水560株、排水283株)について、PCR-RFLP法の結果に基づき種の同定を行った(表4)。浴槽水では、*N. lovaniensis*が29.9% (26/87)、*N. tihangensis*が16.1% (14/87)の試料から主に検出された。管理方法が異なる循環式浴槽、掛け流し式浴槽、薬湯の3種に分類して検出状況を比較すると、循環式浴槽では*N. lovaniensis*の27.5%に続いて*N. tihangensis*が18.8%で検出されたのに対し、掛け流し式ではそれぞれ31.3%及び6.3%と*N. lovaniensis*がより優占的に検出された。薬湯では調査地点が2件と限られたデータしか得られなかったが、実験的な病原性が知られる*N. australiensis*が両地点で高濃度(平均200 PFU/100ml)に分離されるとともに、*N. endoi*, *N. laresi*, *N. mexicana*等の多様な*Naegleria*属アメーバが検出された。

表3 検出されたアメーバ

検出アメーバ (属)	浴槽水 87件		温排水 10件	
	検出件数	株数	検出件数	株数
アメーバ 合計	37 (42.5)	675	10 (100)	396
<i>Naegleria</i>	31 (35.6)	560	9 (90.0)	283
<i>Platyamoeba</i>	9 (10.3)	21	3 (30.0)	14
<i>Hartmannella</i>	8 (9.2)	65	6 (60.0)	46
<i>Echinamoeba</i>	4 (4.6)	9	1 (10.0)	1
<i>Vannella</i>	2 (2.3)	9	2 (20.0)	17
<i>Acanthamoeba</i>	2 (2.3)	3	3 (30.0)	7
<i>Rhizamoeba</i>	2 (2.3)	4	0 (0.0)	0
<i>Vexillifera</i>	2 (2.3)	2	3 (30.0)	13
<i>Willaertia</i>	1 (1.2)	2	4 (40.0)	6
<i>Nuclearia</i>	0 (0.0)	0	3 (30.0)	9

PCR-RFLP解析の結果により分類された*Naegleria*属アメーバ検出数

検出アメーバ (種)	浴槽水 87件		浴槽水 分類別				温排水 10件			
	検出件数	株数	循環式 69件		掛け流し式 16件		薬湯 2件		検出件数	株数
<i>Naegleria</i> 属 合計	31 (35.6)	560	22 (31.9)	393	7 (43.8)	30	2 (100)	137	9 (100)	283
<i>N. lovaniensis</i>	26 (29.9)	163	19 (27.5)	126	5 (31.3)	26	2 (100)	11	4 (40.0)	21
<i>N. tihangensis</i>	14 (16.1)	268	13 (18.8)	267	1 (6.3)	1	0	0	7 (70.0)	67
<i>N. australiensis</i>	2 (2.3)	112	0	0	0	0	2 (100)	112	9 (90.0)	111
<i>N. endoi</i>	3 (3.4)	12	0	0	1 (6.3)	1	2 (100)	11	0	0
<i>N. laresi</i>	1 (1.2)	2	0	0	0	0	1 (50.0)	2	4 (40.0)	25
<i>N. mexicana</i>	1 (1.2)	1	0	0	0	0	1 (50.0)	1	0	0
<i>N. jamiesoni</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (30.0)	45
<i>N. philippinensis</i>	0	0	0	0	0	0	0	0	3 (30.0)	12
<i>N. sp.</i> PNMA-1	0	0	0	0	0	0	0	0	1 (10.0)	1
<i>N. sp.</i>	2 (2.3)	2	0	0	2 (12.5)	2	0	0	1 (10.0)	1

一方、排水からは浴槽水と比較してより多様な *Naegleria* 属アメーバが幅広く検出された。最も広範囲の温排水から検出されたのは *N. australiensis* であり、10件中9件の試料から高濃度（平均340 PFU/100ml）に分離された。次いで、*N. tihangensis* が7件の排水から、*N. lovaniensis* 及び *N. laresi* がそれぞれ4件の排水から検出された。また、*N. australiensis* と同様に実験的に病原性の知られる *N. philippinensis* が3件の排水から検出され、分離株1株においてマウスに対する病原性が確認された。その他、*N. jamiesoni* が3件、*N. sp.* PNMA-1が1件の排水から分離された。

なお、今回の調査ではヒトに対して致死的な病原性を有する *N. fowleri* は検出されなかった。

#### 4. アメーバの分布に影響を及ぼす環境要因

アメーバの分布に影響を及ぼす要因として、遊離残留塩素濃度、一般細菌数、水温及びpHの影響を検討した。

遊離残留塩素濃度0.1mg/l未満の試料からアメーバが検出されたのは68.2% (45/66) であったのに対し、0.1mg/l以上の試料では6.5% (2/31) にとどまり、遊離残留塩素濃度が0.1mg/l以上の試料ではアメーバの検出率が有意 ( $P < 0.0001$ ) に低下した (表5)。*Naegleria* 属アメーバが検出された40件の試料はすべて遊離残留塩素濃度が0.1mg/l未満であり、0.1mg/l以上の試料からは全く検出されなかった。

自由生活性アメーバは細菌類を捕食して増殖するため、一般細菌数が低濃度の試料はアメーバ検出率も低いと予想される。今回、一般細菌数が  $1 \times 10^3$  CFU/ml 以上の試料からの検出率は80.0% (40/50) であったのに対し、 $1 \times 10^3$  CFU/ml 未満の試料では14.9% (7/47) と有意 ( $P < 0.0001$ ) に低いことが確認された。*Naegleria* 属アメーバにおいては、 $1 \times 10^3$  CFU/ml 未満の試料からの検

出率は4.3% (2/47) であった。ただし、一般細菌数が低濃度の試料では遊離残留塩素の影響が大きいと考えられるため、遊離残留塩素濃度が0.1mg/l以上の試料を除いて同様の検討を行った。その結果、塩素処理を施されていない試料においても、一般細菌数が  $1 \times 10^3$  CFU/ml 未満に保たれていれば、*Naegleria* 属を含むアメーバの検出率が有意に低いことがわかった (表5)。

水温及びpHにおいては、自由生活性アメーバの検出率との相関は見られなかった。

#### 5. *Naegleria* 種と環境要因

今回の調査では9種の *Naegleria* 属アメーバが、97件中40件の試料から843株分離された。そのうち *N. lovaniensis* が30件から184株、*N. tihangensis* が21件から335株、*N. australiensis* が11件から223株分離され、*Naegleria* 属アメーバが検出された40件中39件に上記の3種が広く分布していることがわかった。そこでまず、これら3種が高頻度に分離される環境因子を比較検討した。図4に示すように、*N. lovaniensis* 及び *N. tihangensis* は水温40-43℃の高温で、かつ一般細菌数  $10^{3-5}$  CFU/ml の適度に汚染された試料から高頻度に検出された。一方、*N. australiensis* は40℃以上の高温水では全く分離されず、13-39℃の比較的低温で一般細菌数  $10^{4-7}$  CFU/ml の高度に汚染された試料から高頻度に検出された。他の *Naegleria* 属アメーバについても、一般細菌数及び水温との相関を検討した結果を表6に示す。検出試料数は少ないものの *N. laresi*、*N. philippinensis*、*N. endoi* の3種については、*N. australiensis* と同様に一般細菌数が  $10^5$  CFU/ml 以上かつ水温が40℃未満の環境から検出され、*N. lovaniensis* 及び *N. tihangensis* とは異なる環境に分布する可能性が示唆された。

表5 アメーバの検出と環境要因

環境因子	試料数	アメーバ		P value <sup>3)</sup>	<i>Naegleria</i> 属		P value <sup>3)</sup>
		陽性	陰性		陽性	陰性	
遊離残留塩素 (mg/l)	≥0.1	31	2	29	0	31	P<0.0001
	<0.1	66	45	21	40	26	
一般細菌数 <sup>1)</sup> (CFU/ml)	≥1x10 <sup>3</sup>	50	40	10	38	12	P<0.0001
	<1x10 <sup>3</sup>	47	7	40	2	45	
一般細菌数 <sup>2)</sup> (CFU/ml)	≥1x10 <sup>3</sup>	50	40	10	38	12	P<0.0001
	<1x10 <sup>3</sup>	16	5	11	2	14	
水温 <sup>2)</sup> (°C)	≥42	20	12	8	10	10	NS <sup>4)</sup>
	40.1-41.9	29	20	9	18	11	
	≤40	17	13	4	12	5	
pH <sup>2)</sup>	≥9.0	13	7	6	6	7	NS
	8.5-8.9	32	26	6	24	8	
	≤8.4	21	12	9	10	11	

1) 調査試料97件すべてを用いて一般細菌数の影響を検討した結果

2) 遊離残留塩素の影響を除くため、遊離残留塩素濃度0.1mg/l以上の試料を除いた結果

3) Fisherの正確確率法による

4) NS, Not significant. (P value ≥ 0.05)

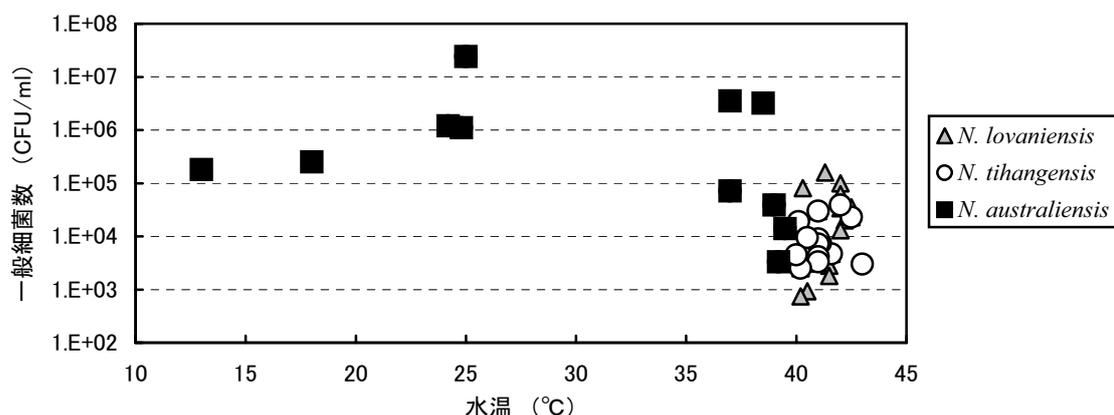


図4 *Naegleria* 属アメーバが検出される試料の特徴

## 考 察

*Naegleria*属アメーバは病原性の種と非病原性の種とに分かれる。ほとんどの種は形態学的に区別が不可能であり、種の分類にはアロザイム解析よりも分子生物学的手法のほうが適切とされている<sup>5)</sup>。現時点ではITS領域及びSSU, LSU rDNA領域の解析から35種の*Naegleria*属アメーバが提唱されている<sup>16)</sup>。今回、分離された*Naegleria*属アメーバの潜在的な病原性の有無を推定するため、種の同定に最も有用なマーカーとして広く利用されているITS領域<sup>10), 17-19)</sup>の塩基配列を決定し、データベースと比較した。その結果、*N. lovaniensis*, *N. australiensis*, *N. tihangensis*, *N. philippinensis*, *N. mexicana*, *N. endoi*, *N. jamiesoni*の7種については、県内の異なる調査地点から分離された株の塩基配列がすべて同一であり、また、世界各地で分離された登録配列と100%一致していたことがわかった(表1, 図1)。このことから、*Naegleria*属アメーバのITS領域は、種ごとに特徴的な塩基配列を持ち、種内での変異は極めて少ないことが改めて確認された。そこで今回、*Naegleria*属アメーバの種の分類を容易にするため、ITS領域のPCR-RFLP法を改良し、従来法よりも詳細に解析できる方法を開発した。既報<sup>10)</sup>に示されたMse I及びNla IVの組み合わせでは、最も病原性の高い*N. fowleri*は特徴的なバンドパターンを示すため明瞭に区別できるが、マウスへの実験的な病原性が知られている*N. australiensis*や*N. philippinensis*は他の非病原性種との判別は不可能である<sup>10), 11)</sup>。制限酵素Mse I, ScrFI, Dde Iはそれぞれ病原性を持つ*N. fowleri*, *N. australiensis*, *N. philippinensis*と他の非病原性種との区別に必須であり(表2, 図3)、分離された*Naegleria*属アメーバ843株すべてが、塩基配列から予想した通りのRFLPパターンに分類できた。

このPCR-RFLP法と形態学的分類とを併用し、温水環境中に棲息する自由生活性アメーバの分布調査を行った。浴槽水におけるアメーバの検出率は42.5% (37/87)であり、同時期の全国調査<sup>20)</sup>の検出率27.8% (426/1534)と比較すると有意に高い (P<0.005) 結果であった。こ

れは、県内で平成14年度に調査を行った浴槽水58件のうち0.1 mg/l以上の残留塩素が検出されたのが8件にとどまった結果、平成14年度調査の浴槽水の55.2% (32/58)からアメーバが検出されたことが高い検出率につながったと考えられた。レジオネラ属菌対策として塩素消毒の指導が徹底された平成15年度に調査を行った浴槽水29件ではアメーバ検出率が17.2% (5/29)と有意に低下し (P<0.002)、その間の保健所による衛生指導の成果が裏付けられた。一方、同時に調査を行った排水では、両年度を通じて調査した10件すべてから高濃度のアメーバが検出され、浴槽水と比較して温排水での高度な汚染の実態が明らかとなった。

*Naegleria*属アメーバの検出率を採取試料別に比較すると、循環式浴槽が31.9% (22/69)、掛け流し式が43.8% (7/16)、薬湯が100% (2/2)であった。このうち、*Naegleria*属アメーバが検出された循環式浴槽22件はいずれも平成14年度の調査施設であり、塩素消毒が徹底された平成15年度調査の循環式浴槽27件はすべて遊離残留塩素が0.1 mg/l以上検出され、*Naegleria*属アメーバは分離されなかった。一方、*Naegleria*属アメーバが分離された掛け流し式7件(うち平成15年度調査が1件)及び薬湯2件(ともに平成15年度調査)からはいずれも残留

表6 *Naegleria*属アメーバの検出件数と環境要因

検出アメーバ	一般細菌数 (CFU/ml)		水温 (°C)	
	<10 <sup>5</sup>	10 <sup>5</sup> ≤	<40	40≤
<i>N. lovaniensis</i>	25	5	6	24
<i>N. tihangensis</i>	18	3	7	14
<i>N. australiensis</i>	4	7 **	11 **	0
<i>N. laresi</i>	1	4 **	5 **	0
<i>N. philippinensis</i>	0	3 **	3 *	0
<i>N. endoi</i>	0	3 **	2	1
<i>N. jamiesoni</i>	3	0	3 *	0
<i>N. mexicana</i>	0	1	1	0
<i>N. sp.</i> PNMA-1	0	1	1	0
<i>N. sp.</i>	3	0	1	2
試料数	52	14	15	51

\*\* : P<0.01, \* : P<0.05

塩素が検出されなかった。このことから、レジオネラ属菌対策で基準となっている残留塩素濃度0.2 mg/lを徹底することが、アメーバ対策においても有効であることがわかった。また、循環式浴槽においては塩素消毒による衛生管理が徹底されてきたが、一律に塩素処理を行うことが難しい掛け流し式温泉や薬湯の衛生管理が今後の課題と考えられた。

これら自由生活性アメーバの分布に影響を及ぼす環境要因としては、遊離残留塩素濃度0.1 mg/l以上の試料から*Naegleria*属を含む自由生活性アメーバはほとんど分離されず、塩素消毒による影響が最も大きいのは明らかであった。そこで、遊離残留塩素濃度0.1 mg/l未満の試料66件のみを対象として、塩素消毒以外の環境因子を検討した(表5)。その結果、水温及びpHについてはいずれもアメーバ検出の有無との相関は見られなかったが、一般細菌数 $10^3$  CFU/ml未満の試料では*Naegleria*属を含むアメーバの検出率が有意に低いことがわかった。自由生活性アメーバは細菌類を捕食して増殖することを考えれば当然の結果と言えるが、塩素消毒以外の衛生管理法を検討する際には考慮すべき事項と考えられる。

今回の調査は、主にITS領域のPCR-RFLP法を用いて*Naegleria*属アメーバの種を同定し、県内の温水環境における*Naegleria*属アメーバの棲息状況を初めて明らかにした。非病原性の*N. lovaniensis*が試料全体の30.9% (30/97) から分離され、全国調査での結果<sup>11)</sup>と同様、県内でも最優占種であることがわかった。しかし、全国調査では*N. lovaniensis*の検出率が他の*Naegleria*属アメーバに比べて突出していたのに対し、今回の調査では*N. tihangensis*及び*N. australiensis*がそれぞれ21.6% (21/97) 及び11.3% (11/97) と比較的多数の試料から検出されたのが印象的であった。県内で分離された*N. australiensis* 3株についてはマウスに対する病原性が認められなかったが、本種は株間で病原性の強さが異なることが知られており、全国調査で得られた他県の分離株では病原性が証明されていることから<sup>11)</sup>、本県で分離された*N. australiensis*についても潜在的な病原性種であると考えられる。これら3種の*Naegleria*属アメーバが検出された水質の特徴を比較すると、*N. lovaniensis*と*N. tihangensis*が検出された試料は一般細菌数 $10^{3-5}$  CFU/ml及び水温40℃以上とほぼ共通しているのに対し、*N. australiensis*は一般細菌数 $10^{3-5}$  CFU/ml以上及び水温40℃未満の試料からの検出率が有意に高く、前述の2種と棲息環境が異なっていたことは興味深い(図4、表6)。*N. australiensis*は最高生育温度が42℃の好熱性種とされており<sup>5)</sup>、42℃で培養中の増殖速度は他の*Naegleria*属よりもかなり早いことから、40℃以上で棲息できないとは考え難い。一般細菌数 $10^5$  CFU/mlを超えるような細菌学的汚染度の高い試料が、比較的低温の低い排水に

多かったことによる二次的な現象と考えるのが妥当であろう。なお、*N. laresi*、*N. philippinensis*、*N. endoi*については分離された試料数が少ないが、*N. australiensis*と同様の環境に棲息する可能性が示唆された。

今回の調査ではヒトに対して致死的な病原性を示す*N. fowleri*は検出されなかった。同時期に行われた全国調査からも*N. fowleri*は分離されておらず、他国の検出状況<sup>21-23)</sup>と比較すると国内では極めて低いレベルの汚染状態であることが推察された。ただし、今回の調査では培養温度を42℃に絞って検出を試みたため、増殖速度の速い*N. australiensis*や*N. tihangensis*と*N. fowleri*が共存していた場合には分離が妨げられた可能性は否定できない。また、*N. fowleri*棲息の指標<sup>24)</sup>とされる*N. lovaniensis*が幅広く検出されていることから、*N. fowleri*の棲息に好適な環境は至る所に存在すると思われる。不特定多数が利用する入浴施設や温水プール等の温水環境では、*Naegleria*属アメーバを含む自由生活性アメーバの汚染対策には十分注意を払う必要がある。

## まとめ

1. *Naegleria*属アメーバの種を同定するため、制限酵素*Mse* I、*Scr*F I、*Dde* Iを用いるPCR-RFLP法を確立した。
2. 浴槽水87件の調査を行い、自由生活性アメーバが42.5% (37/87) の試料から、*Naegleria*属アメーバが35.6% (31/87) の試料から検出された。また、温排水10件の調査を行い、自由生活性アメーバがすべての試料から、*Naegleria*属アメーバが90.0% (9/10) の試料から検出された。
3. 致死的な病原性を示す*N. fowleri*は検出されなかったが、マウスに対する実験的な病原性を示す*N. australiensis*及び*N. philippinensis*が検出された。
4. *Naegleria*属アメーバを含む自由生活性アメーバは、一般細菌数 $10^3$  CFU/ml未満の試料からの検出率が有意に低かった。
5. *N. australiensis*は細菌学的汚染度の高い排水、薬湯等からの検出率が有意に高かった。

本研究は平成13-15年度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「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」及び愛媛県立衛生環境研究所特別研究調査事業の一部として実施した。

終わりに、本研究の試料採取等にご協力いただきました松山市保健所、西条中央保健所、大洲保健所の皆様に感謝いたします。

## 文 献

- 1) Carter RF et al. : J Pathol Bacteriol. 96, 1-25 (1968)
- 2) Marshall MM et al : Clin Microbiol Rev. 10, 67-85 (1997)
- 3) MMWR surveillance summaries. 53, SS-8 (2004)
- 4) Sugita Y et al. : Pathol Int. 49, 468-470 (1999)
- 5) De Jonckheere JF. : Acta Protozool. 41, 309-342 (2002)
- 6) De Jonckheere JF. : Jpn J Parasitol. 40, 352-357 (1991)
- 7) 黒木俊郎 他：感染症学雑誌. 72, 1050-1055 (1998)
- 8) 病原微生物検出情報. 24, 27-28 (2003)
- 9) 八木田健司 他：水環境学会誌. 26, 14-19 (2003)
- 10) Pelandakis M et al. : Appl Environ Microbiol. 68, 2061-2065 (2002)
- 11) 遠藤卓郎：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 平成15年度総括・分担研究報告書. (2004)
- 12) Nicholas KB et al. : EMBnet. News. 4, 14 (1997)
- 13) Thompson JD et al. : Nucleic Acids Res. 25, 4876-4882 (1997)
- 14) Kumar S et al. : Bioinformatics. 17, 1244-1245 (2001)
- 15) Fontanilla IK et al. : IXth International Meeting on the Biology and Pathogenicity of Free-Living Amoe-bae Proceedings. 243-253 (2001)
- 16) De Jonckheere JF. : Protist. 155, 89-103 (2004)
- 17) De Jonckheere JF et al. : Protist. 149, 221-228 (1998)
- 18) Izumiyama S et al. : J Eukaryot Microbiol. 50 Suppl, 514-515 (2003)
- 19) Robinson BS et al. : Parasitol Int. 53, 23-27 (2004)
- 20) 遠藤卓郎：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 平成13~15年度総合研究報告書. (2004)
- 21) De Jonckheere JF et al. : Am. J. Trop. Med. Hyg. 26, 10-15 (1977)
- 22) Seehan KB et al. : Appl. Environ. Microbiol. 69, 5914-5918 (2003)
- 23) Reveiller FL et al. : J. Eukaryot Microbiol. 50, 109-113 (2003)
- 24) Stevens AR et al. : Int. J. Parasitol. 10, 51-64 (1980)