

200/0884

厚生科学研究研究費補助金

生活安全総合研究事業

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

平成 13 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 14 (2002) 年 4 月

目 次

I. 総括研究報告書	
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 <i>Naegleria fowleri</i> の疫学と病原性発現に関する研究 遠藤 卓郎	1
II. 分担研究報告	
1. 温水環境における高温耐性アメーバ類の実態調査 八木田健司	9
2. 診断法法の開発および感染経路の解明 福間 利英	59
3. アメーバ性髄膜脳炎の病理学的検討 高橋 均	65
4. 循環式浴槽の洗浄方法 黒木 俊郎・遠藤 卓郎	71
5. 分離アメーバの分類・同定 八木田健司・黒木 俊郎	77
6. <i>Naegleria fowleri</i> 及びその近縁種 <i>N. lovaniensis</i> における 蛋白組成の比較 八木田健司	85
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	93

I. 総括研究報告書

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）
総括研究報告書

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

主任研究者：遠藤 卓郎（国立感染症研究所）

平成 12 年 12 月に厚生省の通達（衛生発第 1811 号、衛指第 133 号）を受け、公衆浴場等の水質基準および公衆浴場営業者等が講じるべき措置の基準について指針が示された。この措置は循環式浴槽が汎用される現状を踏まえ、生活環境からの健康影響を抑える必要が生じたことによる。

本事業においては、全国 295 施設で温泉浴用水を中心に各種温（排）水における *Naegleria fowleri* 等の温度耐性アメーバ類の汚染実態を調査した。総計で 1,996 検体の温水試料を調査したところ、197 施設（66.2%）、401 検体（48.5%）検体から *Naegleria*、*Hartmannella*、*Willaertia*、*Acanthamoeba* 等、多岐にわたる高温耐性アメーバが分離された。*Naegleria* 属アメーバは 502 株が検出されたが、PCR 法による *N. fowleri* の特異塩基配列陽性を示す分離株は認められなかった。また、無作為抽出の 154 株についてアイソザイム解析を行ったが、*N. fowleri* は認められなかった。しかしながらその内の 75.9% が *N. fowleri* の指標とされる *N. lovaniensis* と同定された。施設別に見ると *N. lovaniensis* は調査対象施設のおよそ 26%（アメーバが検出された施設の約半数の 46.3%に相当）から検出された。また、これまでの報告にはないアイソザイムパターンを有する分離株が複数検出された。アメーバ汚染を防止の観点からは浴槽系等に形成されるバイオフィルムの洗浄・除去が重要で、化学的洗浄法を中心に整理した。

本邦発症例患者より分離した *N. fowleri* を抗原として単クローン抗体の作製に着手し、2クローンを得た。現在、抗体の特異性等について解析中である。また、二次元電気泳動法により *N. fowleri* と *N. lovaniensis* タンパクの相同性について検討したところ、両者の相同性は 38.6%程度と予想外に低いものであった。現在、*N. fowleri* に特異的なタンパク、および *Naegleria* 属に共通するタンパクの特定を急いでいる。本症の早期診断法として鼻腔洗浄液からのアメーバ分離方法を検討した。マウスを実験動物とし、鼻腔内拭い液からアメーバの分離培養を検討したが分離には至らなかった。現在、実験動物としてのマウスの妥当性も含めて検討中である。アメーバ性髄膜脳炎の 1 例につき、病理組織学的検討を加え、国内の他の 5 例と文献的に比較検討を行った。当該症例は亜急性の肉芽腫性脳炎の病態を呈するもので、主として脳室周囲に広範な壊死を伴う炎症を惹起し、血管周囲並びに脳実質内に多数のアメーバ栄養体および嚢子の存在を認めた。*Balamuthia* の感染が疑われ、さらに検討中である。わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の起因病原体は *N. fowleri* に限らず、*Acanthamoeba* および *Balamuthia* の報告があり、症例数が少ないにも関わらず多岐にわたり、それぞれ特徴的な病理像を呈しており、それらの感染経路は今後の課題である。

A. 研究目的

近年、個人住宅のみならず公衆浴場や

旅館において循環式浴槽が普及し、浴槽
水質の衛生管理を徹底し、生活環境から

の健康影響を最小限に抑える必要が生じた。レジオネラ汚染調査に付随して当該研究者らが行った宿主アメーバ調査によって循環式浴槽のアメーバ汚染が著しいこと、特に循環式浴槽のろ過槽に蓄積した汚泥に多様なアメーバ種が高濃度に存在することが明らかとなっている。本研究事業では温水環境のアメーバ汚染防止に係る監視と管理体制確立に向けて、全国規模で温泉を含む循環式浴用水、温排水等における病原アメーバ類の汚染実態を調査し、後述のアメーバ性髄膜脳炎の予防、診断・治療に関する研究と併せて、生活環境からの健康影響の防御と監視に係る施策の策定に貢献することを目的としている。

わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の剖検例の報告はわずか6例で、極めて稀な疾患とされてきた。本研究事業において、このうちの1例を経験し、病原性アメーバによる病態の病理組織学的な検討の機会を得た。わが国で既報の5例と文献的比較検討を行うことにより、アメーバ性髄膜脳炎の病理組織学的診断法の確立、さらには感染経路並びに病態発現のメカニズムを明らかにしたい。*Naegleria* 属のアメーバの中で *N. fowleri* は強い病原性を示し、向神経的に脳へ達することが知られているが、神経系に対する親和性や組織侵入性に係る因子の発現機構は不明である。また、病原性発現と生活上の発育ステージとの関係も明らかとなっていない。*Acanthamoeba* や *Balamuthia* についても同様の状況である。そこで、*Naegleria* 属アメーバのプロテオーム解析を通し、タンパクの発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みる。併せて、*N. fowleri* 特異的及び *Naegleria* 属共通の抗原の検索を行い、免疫学的、あるいは遺伝子診断への基礎資料を得る。本研究を通して、単クローン抗体を用いた免疫学的検査法や分子生物学的な分類・同定法を開発し、診断法と併せて普及に努める。

B. 研究方法

1. 疫学調査

- 1) 当該研究年度においては全国14箇所の地研の協力のもとで、温泉を含む循環式浴用水、各種温排水、その他の人工/自然の温水に関して、307施設827件の試料についてアメーバの分離を行った。各地衛研で温度条件を42℃として初代培養を行い、得られたアメーバ分離株を国立感染症研究所に送付して解析を行った。
- 2) アメーバの分類・同定は形態分類によった。
- 3) 既存のPCRプライマーを用いて特異遺伝子配列の増幅及び等電点電気泳動法によるアイソザイム解析により *Naegleria* 属の種分類を行った。
- 4) アメーバの汚染防除対策として、温水環境に発生するバイオフィルムの洗浄・除去方法についてとりまとめを行った。

2. 検査法の開発

- 1) 原発性アメーバ性髄膜脳炎の本邦初症例の患者より分離した *N. fowleri* YT9611株を抗原として、単クローン抗体の作製を行った。単クローン抗体の特異性に関しては後述の抗原解析法との組み合わせにより解析した。
- 2) 等電点電気泳動と Polyacrylamide Gel 電気泳動の組み合わせ（二次元電気泳動法）及びそのタンパク画分のアミノ酸解析により *Naegleria fowleri* 及び *Naegleria* 属に特異的な抗原解析を行った。
- 3) 既存のPCR用プライマーを用いて、*N. fowleri* および *Naegleria* 属アメーバの特異遺伝子の増幅試験を行い、反応の条件設定を行った。
- 4) アメーバ症の診断方法の開発に向けて、マウスへの感染実験と鼻腔からのアメーバ分離方法について検討した。

3. 病理学的検討

- 1) アメーバ性髄膜脳炎の1例につき、電子顕微鏡的、免疫組織学的、さらに遺

伝子学的手法を併用し病理組織学的検討を行った。

- 2) 国内の他の発症例 5 例と文献的な比較検討を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 疫学調査

わが国では、温泉を含む温水の病原性を有する自由生活性アメーバ類の汚染防止に関する指針は策定されていない。当該研究年度においては全国 14 箇所 の地研の協力を得て、307 施設から総計 827 件の温水試料を得て、病原アメーバ類による汚染実態調査を行った。その結果、197 施設 401 温水試料より 1,996 株のアメーバが分離された。

浴槽水に関しては 237 施設が対象とされた。県を単位とした地域別の調査状況をまとめると、大半の地域において 10 カ所以上の施設で調査が行われており、地域内の全域にわたって調査が行われていたことがわかる。施設あたり調査対象となった浴槽数は約 3 カ所 (2~6 カ所) であった。浴槽水の試料総数は 693 件で、主に内風呂 (男女)、露天風呂 (男女) の他、ジャグジー、薬湯などが対象とされた。施設総数に対するアメーバ陽性率は 63.7% であり、地域間では差があり、0~92.8% の範囲にあった。また、試料総数に対するアメーバ陽性試料の割合は、0~100% と地域差は大きいものの、概ね 30~60% の浴槽水からアメーバが検出された。アメーバの属別の検出率は *Platyamoeba* (23.1%) が最も高く、次いで *Naegleria* (15.4%)、*Hartmannella* (9.7%)、*Echinamoeba* (6.9%)、*Acanthamoeba* (5.3%)、*Rhizamoeba* (2.3%)、*Vannella* (1.3%)、*Nuclearia* (0.3%) となり、*Hartmannella* および *Platyamoeba* は 12 の地域から、また *Naegleria* は 11 の地域、*Acanthamoeba* は 9 地域で検出された。*Rhizamoeba*、*Vannella* ならびに *Nuclearia* はこれまで温水環境との関連性が不明、あるいはほとんどないと考えられていたが、それぞれ 3、5、および 2 地域から検出された。アメーバの出現傾向に地域差は認められなかった。温水環境の主要アメーバ

類 (*Naegleria*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*、*Acanthamoeba* ならびに *Echinamoeba*) の検出率で比較した場合、全体的にアメーバ類の検出率が高かったのが 4 地域 (E、I、J、K) で、逆に低かったのは 5 地域 (C、F、L、M、A) 確認された。このうち L では 1 施設 9 試料が調査対象となったが、いずれも塩素処理を施した後の試料であったこと、また C に関してはすべての試料が含硫黄泉であったなどの例外的な事例が含まれている。

各種アメーバのうち、*Naegleria* は浴槽排水中から最も高頻度 (86.6%) に検出され、浴槽水からは 15.3% の率で検出された。分離された *Naegleria* のうちおよそ 76% が *N. fowleri* の指標アメーバである *N. lovaniensis* と同定されたことは注目に値する。換言すれば、これらの浴槽施設は *N. fowleri* にとって良好な環境で、汚染の危険性が高いと判断される。今後、*N. lovaniensis* の生息場所を精査し、*N. fowleri* の汚染の有無を詳細に検討する予定である。また、今回の調査で温度耐性を有する *Naegleria* 属アメーバ多様であり、新しいアイソザイムパターンを持つ分離株が複数見つかった。これらの病原性については全く未知であることから、速やかに動物への感染実験等による病原性の検証試験が必要と考えている。

循環式浴槽は温泉等で普及しており、具体的な洗浄・管理技術の検討・普及が必要である。本年度事業において、化学洗浄法を中心として実行可能な洗浄方法について整理した。使用薬剤の選択に際してはバイオフィーム内部への浸透、あるいは微生物の剥離効果の検討が重要である。また、バイオフィームの発達状況 (厚さ) や対象とするシステム (設備機器の種類、配管の複雑さ、保有水量) に応じた薬剤の選択等が重要となる。使用薬剤の取り扱いや使用後の廃液 (産業廃棄物等) の扱いには専門的な知識が必要となるが、次亜塩素酸ナトリウムなどの塩素剤あるいは過酸化水素などの過酸化物が用いられることが多い。

2. 検査法の開発

自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* に起因する原発性アメーバ性髄膜脳炎 (PAM) の診断のため、蛍光抗体診断試薬及び早期診断法の開発を行った。蛍光抗体診断試薬の開発では、PAM 本邦初症例の患者より分離した *N. fowleri* YT9611 株を抗原として、モノクローナル抗体産生のためのマウス B 細胞ハイブリドーマを作製した。最終的に 2 種のハイブリドーマクローンを得ることができた。単クローン抗体の特異性等については *Naegleria* 属の抗原解析と併せて検討中である。

本研究では *N. fowleri* を中心に環境の変化に伴うタンパクの発現、およびその調整について病原性発現との関連で解析を試みた。具体的には、非病原種でありながら *N. fowleri* と生態学的、形態学的に同種とされる *N. lovaniensis* とのタンパクを比較することで *N. fowleri* の病原性に関するタンパクの発現機構を探ろうとするものである。本年度は 2 次元電気泳動により *N. fowleri* と *N. lovaniensis* におけるタンパクの相同性を比較した。他の報告に見る一次元電気泳動 (PAGE) の解析結果と異なり、両者間での相同性は 36~39% と低いものであった。この結果の検証として、同種内での株間の差異について確認したところ *N. fowleri* KUL 株と Nf66 株との間の相同率は 71.9% と計算された。ちなみに、同一種内で共通するタンパク画分は *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個確認された。これらの内、88 個が *N. fowleri*、*N. lovaniensis* 両種間の共通タンパク画分として検出され、種固有のタンパク画分として、*N. fowleri* では 140 個、*N. lovaniensis* では 158 を確認した。上記で得られた 2 種間共通あるいは種固有の主要なタンパク画分について、アミノ酸配列解析を開始し、現在までに *N. fowleri* Nf66 株の 2 個のタンパク画分についてアミノ酸配列を決定した。また、N 末端ブロックが疑われる 1 個については目的タンパクのゲル内消化、ペプチドの HPLC 分画を経

てアミノ酸配列解析を行う予定である。*Naegleria* 属については、タンパク情報の網羅的、基礎的なデータが乏しく、今後さらにタンパク画分の解析を進め、データの蓄積を進める予定である。

診断法の開発では、安全かつ早期の診断が可能となる鼻腔内からのアメーバの検出を試みた。まず生きたマウスを用いた場合、鼻腔内洗浄は非常に困難であった。そこで、アメーバ接種翌日よりマウス鼻腔内スワブからのアメーバの分離を試みたが、現在まで成功していない。用いる実験動物の種類も含め次年度以降の検討課題としたい。

現在のところ、アメーバ分類の基礎は形態分類であるが、今後は遺伝子解析や単クローン抗体等を有効に用いた免疫学的手法を開発する必要があるものと判断された。この点で、*N. fowleri* YT9611 株に対する単クローン抗体が作製された意義は大きいものと考えている。また、*Naegleria* 属アメーバに共通した抗原を認識する単クローンや PCR プライマーの作製も重要と考え、研究を急いでいる。現在までに、*N. fowleri* 検出用のプライマーとして McLaughlin 等による 5'-CGT ATC TAG TAG ATA GAA CA -3' および 5'-CGT AAC GAC ACA AAC CTA CAG A -3' を使用し、本属特異性のプライマーとしては Pelandakis 等による 5'-GAA CCT GCG TAG GGA TCA TTT -3' および 5'-TTT CTT TTC CTC CCC TTA TTA -3' を使用した。現在までの検討結果では、Pelandakis らの *Naegleria* 属検出用 PCR プライマーは陽性対照試料および分離株のいずれからも PCR 産物を得ることが非常に困難で、プライマーの設計から改めて検討する必要があるものと結論された。いずれにせよ、PCR 法はアメーバ性髄膜脳炎の診断にも応用可能で、本研究事業の一環として新たな診断法の開発につなげたい。

3. 病理学的検討

わが国で発生した症例の病理学的検討により、アメーバ性髄膜脳炎のマクロおよびミクロの病理像が明らかとなった。当該

症例は亜急性の肉芽腫性脳炎の病態を呈するもので、主として脳室周囲に広範な壊死を伴う炎症を惹起し、血管周囲並びに脳実質内に多数のアメーバ栄養体および嚢子の存在を認めた。電子顕微鏡的、免疫組織学的、さらに遺伝子学的検索から *Balamuthia* の感染が強く疑われた。現在も検討中である。わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の起因病原体は *N. fowleri* に限らず、*Acanthamoeba* および *Balamuthia* の報告があり、症例数が少ないにも関わらず多岐にわたり、それぞれ特徴的な病理像を呈していた。また、欧米での報告例のような明白な免疫能の低下や感染を疑わせるエピソードは無く、その感染経路は今後の課題である。ちなみに、アメーバ性髄膜脳炎の病形は *N. fowleri* を病原体とした原発性アメーバ性髄膜脳炎と *Acanthamoeba* 等の感染に起因する肉芽腫性アメーバ性脳炎の2型に大別される。前者は、鼻腔の嗅神経末端からアメーバが侵入し、嗅神経沿いに中枢神経へ到達し、感染から5-10日のうちに患者を死に至らしめる。本症では感染のごく初期に治療が施された4例以外に治癒例が知られておらず、初期診断の重要性が指摘されている。わが国では1996年に佐賀県在住の女性が本症に罹患・死亡している。後者の亜急性、慢性の肉芽腫性アメーバ性脳炎は免疫不全者における日和見感染とされ、1週間から数ヶ月を経て死に至る。これまで、本症はもっぱら *Acanthamoeba* 感染を原因とするとされてきたが、*Balamuthia mandrillaris* という新たなアメーバが知られるに至り、必ずしも日和見感染に限らない可能性が指摘されている。わが国では、平成12年に *Acanthamoeba* 性脳炎、平成8年に *Balamuthia* 感染が疑われる死亡例が発生している。

今後さらに、わが国の症例を対象に retrospective な病理学的な解析を加える予定である。また、動物への感染実験によりアメーバの感染経路および病原性発現のメカニズム究明を急いでいる。わが国ではアメーバ性髄膜脳炎そのものの認識の不

足から、実際の症例数はより多いことが推測され、医療現場家並びに各関係方面への啓発活動も本事業の一環と考えている。

D. 結 論

当該研究年度においては全国14箇所の地研の協力を得て、可能な限り広範な地域から温水等の検査試料採取を行い、197施設401温水試料より1,996株のアメーバを分離した。施設別には64.2%、温水試料としては48.5%からアメーバが分離された。分離アメーバの25%が *Naegleria* 属アメーバで、*N. fowleri* の指標アメーバである *N. lovaniensis* が頻繁に検出されたことに注目している。*N. lovaniensis* が検出された施設においては詳細なアメーバ叢の解析が必要と考えている。また、今回の調査で得られた *Naegleria* 分離株のうち、病原性の不明なものについては速やかに病原性試験を行う必要がある。

本年度の研究事業で提案した浴槽等の温水環境におけるアメーバ類の管理方法はあらかじめ実機レベルへの適用を想定したもので、すでに形成されたバイオフィルムの剥離・洗浄には過酸化剤が効果的と判断された。今後は協力施設を得て具体的な管理方法の是非・問題点を検証したい。

病原アメーバの形態分類は多くの経験が必要で、普及に向けてはむしろPCRあるいは免疫反応を利用した検査法に限定すべきものと考えられた。本年度の検討で、*Naegleria* 属に特異的な塩基配列の増幅用に開発された既存のPCRプライマーに問題が有るものと考えられ、新たに開発することとした。併せて、これまで得られた *N. lovaniensis* 分離株を材料として18S RNA 遺伝子など特定領域の遺伝子情報を収集し、温水施設における汚染監視に利用したい。

現在、*Naegleria* 属の抗原タンパク等に関する基礎的なデータはきわめて乏しい状況にある。二次元電気泳動により *N. fowleri* と *N. lovaniensis* におけるタンパクの相同性を比較したところ、既報の一次元電気泳動 (PAGE) の解析結果と異なり、両者間

での相同性は低いことが示され、種間の隔たりが確認された。一方、*N. fowleri* の種固有のタンパク分子として 140 個、*N. lovaniensis* で 158 個が確認された。現在、2 種間で共通、あるいは種固有の主要なタンパクについてアミノ酸配列解析を開始し、現在までに *N. fowleri* で 2 種についてアミノ酸配列を決定した。これと並行して *N. fowleri* に対する単クローン抗体作製を行っており、その特異性等について比較検討している。

これまでわが国におけるアメーバ性脳髄膜炎の病理像を詳細に比較検討した業績は認められない。当該研究年度には亜急性に経過したアメーバ性肉芽腫性脳炎症例（当時 53 歳男子）につき詳細な病理学的検討を加えた。今後は実際にそれぞれの症例を検討し直す (retrospective study) ことにより、その病理学的診断法の開発、さらにはアメーバの感染経路および病原性発現のメカニズムを明らかにする必要があると考えられた。またわが国ではその死亡率が極めて高いにも関わらず、アメーバ性脳髄膜炎そのものの認識が不足していると考えられる。この為、実際の症例数はより多いことが推測され、早期診断法の開発と併せて臨床現場並びに各関係方面への啓発活動が必要であると考えている。

E. 学会発表

論文発表

1. Z. Szenasi, T. Endo, K. Yagita, V. Ilona and N. Erzebet. (2001) Epidemiology and laboratory diagnostics of legionellae. *Orv. Hetil.*, **142**, 1035-1043.
2. S. Izumiyama, I. Furukawa, T. Kuroki, S. Yamai, H. Sugiyama, K. Yagita and T. Endo. (2001) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* Infections in Weaned Piglets and Fattening Porks in Kanagawa Prefecture, Japan. *Jpn. J. Infect. Dis.*, **54**, 23-26.
3. K. Ono, H. Tsuji, S. K. Rai, A. Yamamoto, K. Masuda, T. Endo, H. Hotta, T. Kawamura and S. Uga. (2001) Contamination of Water *Cryptosporidium parvum* Oocysts in Western Japan. *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(9), 3832-3836.
4. K. Yagita, S. Izumiyama, H. Tachibana, G. Masuda, M. Iseki, K. Furuya, Y. Kameoka, T. Kuroki, T. Itagaki and T. Endo. (2001) Molecular characterization of *Cryptosporidium* isolates obtained from human and bovine infections in Japan. *Parasitol. Res.*, **87**, 950-955.
5. S. Jongwutiwes, L. Pariyakanok, M. Charoenkorn, K. Yagita and T. Endo. (2000) Heterogeneity in cyst morphology within isolates of *Acanthamoeba* from keratitis patients in Thailand. *Tropical Medicine and International Health*, **5**(5), 335-340.
6. K. Yagita, T. Endo and J. F. DeJonkheere. (1999) Clustering of *Acanthamoeba* isolates from human eye infections by means of mitochondrial DNA digestion patterns. *Parasitol. Res.*, **85**, 284-289.
7. Y. Sugita, T. Fujii, I. Hayashi, T. Aoki, T. Yokoyama, M. Morimatsu, T. Fukuma and Y. Takamiya. (1999) Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: An autopsy case in Japan. *Pathology International*, **49**, 468-470.
8. 遠藤卓郎、八木田健司. (2001) 近年のレジオネラ問題. *東京都予防医学協会年報*, **30**, 218-221.
9. 山本正治、宇野敏彦、大橋裕一、坪井敬文、岡本茂樹、遠藤卓郎. (2001) 特異抗体による切除角膜内アcantアメーバシストの同定. (The *Acanthamoeba* cysts were identified in the cornea using specific antibody) *眼科*, **43**, 939-943.
10. 黒木俊郎、八木田健司、杉山 広、山井志朗、福岡利英、勝部泰次、遠藤卓郎. (1998) *Naegleria fowleri* 臨床分離株のマウスへの感染実験. *感染症学*

雑誌、72(10), 1064-1069.

11. 高橋武秀、藪内英子、遠藤卓郎、古畑勝則. (1998) 「24時間風呂」の衛生問題と行政の対応(Sanitary Problems of 24^h-Bath and Administrative Countermeasures for Them) 環境感染、13(2), 129-136.
12. 林森太郎、小出隆司、山田光則、永井博子、高橋 均. (1997) アメーバ性肉芽腫性脳炎の1剖検例. *Neuropathology*, 17(suppl.), 203.

口頭発表

1. 原 樹、福間利英 (2002) 病原性アメーバ *Naegleria fowleri* 感染経路の検討 第71回日本寄生虫学会大会 (神奈川県 伊勢原市、3月29-30日)

2. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、下河原理江子、遠藤卓郎 (2002) *Naegleria fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の2D-PAGEによる比較 第71回日本寄生虫学会大会 (神奈川県 伊勢原市、3月29-30日).
3. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎 (2001) *Naegleria fowleri* と *N. lovaniensis* のタンパク質の2D-PAGEによる比較 日本原生動物学会第34回大会 (兵庫県神戸市、11月16-18日)

著書

1. 遠藤卓郎 (2001) リスク評価に関する基本的な考え方. 水と微生物リスクとその評価 (技報堂出版) 87-108.

II. 分担研究報告書

厚生科学研究費補助金（生活安全総合研究事業）

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

温水環境における高温耐性アメーバ類の実態調査

分担研究者：	八木田健司	(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 細菌病理部)
協力研究者：	泉山 信司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	下河原理江子	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	小村 麻子	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	古屋 宏二	(北海道立衛生研究所 生物工学室)
	斉藤 紀行	(宮城県保険環境センター)
	佐々木美江	(宮城県保険環境センター)
	不二崎順二	(新潟県保健環境科学研究所)
	川瀬 雅雄	(新潟県保健環境科学研究所)
	長 則夫	(栃木県保健環境センター)
	山岡 一清	(岐阜県保健環境研究所)
	山内 昭則	(三重県科学技術振興センター)
	降井佐太郎	(京都府保健環境研究所)
	中嶋 洋	(岡山県環境保険センター)
	柏木 淳子	(鳥取県衛生研究所)
	烏谷 竜哉	(愛媛県立衛生環境研究所)
	田栗 利紹	(長崎県衛生公害研究所)

高温耐性を有するアメーバ類の温水環境における生息実態を調査した。全国より 14 地域を選択し、温泉浴槽水や浴槽温排水、工場温排水よりアメーバ分離を行った。施設総数 307、試料総数 827 を調査した結果、401 試料より 1,996 株のアメーバを分離した。全体として *Naegleria* をはじめ 8 属のアメーバ類が検出された。検出率は試料により異なったが、浴槽水よりも排水系試料の方が高い傾向は明らかであった。特に *Naegleria* の検出率は浴槽水で 15.6%、浴槽排水で 46.6%、工場排水で 14.9%であった。アメーバ数の定量的解析からは、試料中のアメーバ数は排水系試料の方が多く傾向にあり、*Naegleria* の数に関しても同様の傾向が見られた。水温、pH、泉質等の水質学的条件、また清掃・消毒等管理状況とアメーバ検出の関係は明確ではなかった。その中で *Naegleria* の生息温度の下限値は 10°C 前後で、高温耐性 *Naegleria* であっても低温環境にまで適応して定着可能であることが明らかとなり、潜在的感染源の範囲が広いことが示された。さらに分離方法の効率化を図り、各地を精査し多数の分離株を得ることにより *Naegleria fowleri* の検出の可能性は高まるとも考えられた。

A. 研究目的

アメーバ性髄膜脳炎の原因である *Naegleria fowleri* は温水環境に生息する、本来自由生活性のアメーバである。水泳等水環境との接触から、中枢神経性に感染し致命的な髄膜脳炎を惹き起こす。米国をはじめとする世界各国で感染例が報告されており、1999 年には Sugita ら (1999) により国内で初めての、アメーバ分離が成功した感染例が報告された。国内においても感染リスクが存在することが明らかにされた一方で、*Naegleria fowleri* による汚染あるいはその生息に関する調査は少なく (De Jonckheere ら 1991、Kuroki ら 1998)、実態は把握されていない状況である。温泉利用等温水環境との接触が多い我が国においては、自然・人工なもの合わせてどのような環境が潜在的な感染源となり得るのか、今後、公衆衛生上の問題として調査に取り組む必要があると思われる。

本研究では、我が国におけるアメーバ性髄膜脳炎の発生予防を目的として、病原体サーベランス、即ち国内の温水環境における *Naegleria fowleri* の生息実態を中心に、高温耐性アメーバ類の実態を調査した。

B. 研究方法

調査対象と試料採取

国内の温水環境としては、温泉や温水プール、また工場温排水などが考えられる。今回の調査では国内でほぼ均一に試料が採取できる対象として、温泉浴槽水とその排水 (浴槽排水)、および工場温排水、特に食品加工施設の排水を主に調査

した。調査を実施した地域は、A～Nまでの県単位で区分される 14 地域を、ほぼ全国に分布するように選択した。試料採取に際しては、各調査地点で 500ml の採水ボトルに約 500ml の水試料を採り、密栓後常温で輸送し速やかにアメーバ分離を行った。なお、採水時には水質学的データとして水温、pH を測定し、温泉浴槽水であればその泉質、浴槽の管理状況 (消毒や清掃の方法と頻度等) に関し、可能な範囲で聞き取り調査を行った。

アメーバの分離ならびに検出

本調査では、ひとつの水試料について原水 1ml をそのままアメーバ培地に接種したものと 50ml の原水を遠心濃縮 (1,000 x g、5 分) して接種したもの、2 種類のプレートを作成し、それぞれをマザープレートとして 42℃ で培養した。3～7 日間培養中にマザープレート上で出現したアメーバコロニーを、個々に新しいアメーバ培地に移し (クローニング)、分離株として継代培養した。なお、結果の表記に際しては、1 つの水試料 (例えば浴槽水) に関して 1ml および 50ml の両方の結果を合わせることにした。

方法の詳細な手順は資料 1、「アメーバの分離・検出マニュアル」にまとめた。なお本調査では、各地域におけるアメーバ検出の精度を一定にする必要性から、協力研究者である各地方衛生研究所の参加を得て、本マニュアルを用いての講習会を開いた。

アメーバの同定

個々のアメーバ分離株は、形態、鞭毛

遊出性、嚢子形成能とその形態等により同定を行った。

C. 結果および考察

本年度、14 地域、施設総数 307、試料総数 827 を調査した結果、401 試料より 1,996 株のアメーバが分離された。形態学的ならびに生物学的に同定を行った結果、*Naegleria*、*Acanthamoeba*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*、*Echinamoeba*、*Rhizamoeba*、*Vannella*、*Nucleria* の 8 属のアメーバ類が検出されたことが明らかとなった。表-1 に地域別試料別のアメーバ検出結果をまとめた。また、各地域の試料ごとの調査結果を表-2 A~N に一括した。

以下、試料別にアメーバ検出結果を述べる。

1. 浴槽水からのアメーバ検出

浴槽水は施設総数 237 に関して調査が行われた。地域別のアメーバ検出結果を表-3 にまとめた。ほぼすべての地域で 10 施設以上が調査されており、各地域においてほぼ地域内均一的な調査が行われていたと考えられる。施設総数に対するアメーバ陽性施設数の割合は半数以上の 63.7% であり、地域別にみた場合は 0~92.8% の範囲にあった。施設総数における試料総数は 685 であり、主に内風呂（男女）、露天風呂（男女）の他、ジャグジー、薬湯等から採取された。

施設あたりの試料数は約 3.0 であり、ほぼすべての地域で各施設につき 2~6 程度の浴槽数が調べられた。なお本調査では、1 つの浴槽から採取した水試料の結果をまとめて、その試料の結果とした。試料

総数に対するアメーバ陽性試料の割合は、0~100% と地域により大きな差があるものの、概ね 30~60% の間にあり、各地域からは何らかのアメーバが検出された。

浴槽水における各アメーバ類の試料総数（ $n = 685$ ）に対する検出率は *Platyamoeba*（24.1%）が最も高く、次いで *Naegleria*（15.6%）、*Hartmannella*（10.1%）、*Echinamoeba*（7.0%）、*Acanthamoeba*（5.8%）、*Rhizamoeba*（2.3%）、*Vannella*（1.5%）、*Nucleria*（0.3%）となり、*Hartmannella* は 13 地域、*Platyamoeba* は 12 地域、*Naegleria* は 11 地域、*Acanthamoeba* は 10 地域、*Echinamoeba* は 8 地域から検出された。*Rhizamoeba*、*Vannella* ならびに *Nucleria* はこれまで温水環境との関連性が不明、あるいはほとんどないと考えられていたが、*Rhizamoeba* は 3 地域、*Vannella* は 5 地域、*Nucleria* が 2 地域で検出された。各アメーバ類検出率の地域による違いは *Platyamoeba*（0~60.7%）、*Naegleria*（0~33.3%）、*Hartmannella*（0~20.9%）、*Echinamoeba*（0~20.2%）、*Acanthamoeba*（0~16.1%）、*Rhizamoeba*（0~9.7%）、*Vannella*（0~4.8%）、*Nucleria*（0~1.7%）であり、特定のアメーバが地域により高く検出されるような結果は得られなかった。温水環境の主要アメーバ類（*Naegleria*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*、*Acanthamoeba* ならびに *Echinamoeba*）の検出率で比較する限り全体的にどのアメーバ類の検出率も高かったのが E、I、J、K の各地域で、逆に全体的にどのアメーバ類の検出率も低かったのが C、F、L、M、A の各地域であった。L 地域に関しては 1 施設のみ

の調査で 9 試料調べたが、いずれも塩素処理を施した後の試料であったことが後に判明した。また、C 地域に関してはすべての試料が含硫黄泉のものであった。

2. 浴槽水の種類による検出率

浴槽水の種類を水利用の方法の違いから以下の 3 種類に分け、各種浴槽のアメーバ類の検出率を比較した(図—1)。「内湯」は一般的な屋内浴槽で静かに入浴する場合。これには薬湯も含めた。「レク湯」はレクリエーション的利用を目的と場合で、ジャグジー・打たせ湯・ジェットバス・泡風呂、サウナも含めた。「露天」は屋外浴槽として利用する場合とした。浴槽の種別がデータ化されていた 10 地域より総計 602 試料(内湯 440 試料、レク湯 40 試料および露天 122 試料)を解析した結果、アメーバ検出率は浴槽の種類により差はなく 41.1~52.5%であった。*Naegleria* においても 14.8~16.4%とほぼ同率の検出率であった。他のアメーバ類に関しても同様の結果が得られた。

3. 浴槽排水からのアメーバ検出

浴槽排水は 14 地域中 7 地域において調査された。可能な限り、浴槽水が採取できた施設において、その浴槽排水も採取するように努力した。地域別のアメーバ検出結果を表—4 にまとめた。調査した施設総数は 29 であり、地域によりその数はかなり差があった。施設総数に対してアメーバ陽性施設数の割合は 86.2%となり、浴槽水の場合よりもかなり高い数値であった。29 施設全体の試料総数(n=45)に対するアメーバ陽性試料の割合は、

84.4%であり、これも浴槽水の場合と比較して 2 倍以上の高さであった。地域別に見た場合、アメーバ陽性試料の割合は 71.4~100%であり、いずれの地域においても浴槽水の場合よりも高い数値であった。

浴槽排水における各アメーバ類の試料総数に対する検出率は *Naegleria* (46.6%) が最も高く、次いで *Platyamoeba* (35.6%)、*Hartmannella* (33.3%)、*Acanthamoeba* (33.3%)、*Echinamoeba* (20.0%)、*Rhizamoeba* (6.7%)、*Vannella* (4.4%) で *Nucleria* は検出されなかった。試料数が少ない地域が多いため、各アメーバ類の検出率の違いは明確ではなかった。また、地域により特定のアメーバが高く検出されるような結果は得られなかった。

4. 工場排水からのアメーバ検出

工場排水は 14 地域中 4 地域において調査された。地域別のアメーバ検出結果を表—5 にまとめた。施設総数は 25 であり、地域によりその数はかなり差があった。施設総数に対するアメーバ陽性施設数の割合は 72%となり、浴槽排水と同程度の高い数値であった。施設全体の総試料数 74 に対するアメーバ陽性試料の割合、60.8%であり、浴槽排水と同様、浴槽水の検出率を上回る結果であった。地域別に見た場合、アメーバ陽性試料の割合は 16.7~77.8%であった。いずれの地域においても浴槽水の場合よりも高い数値であった。

工場排水における各アメーバ類の試料総数に対する検出率は *Acanthamoeba* (36.5%) が最も高く、次いで

Hartmannella (24.3%)、*Platyamoeba* (16.2%)、*Naegleria* (14.9%)、*Rhizamoeba* (5.4%)、*Nuclearia* (4.1%)、*Echinamoeba* (2.97%)の順であった。*Vannella*は検出されなかった。*Naegleria*はすべての地域から検出された(8.5~33.3%)。

5. 源泉・その他の試料からのアメーバ検出

今回の調査では、浴槽あるいは排水系試料の他に、源泉、給水、源泉貯湯槽・貯湯槽水等についてもアメーバ検出率を調べた。地域別のアメーバ検出結果を表一6および7にまとめた。試料数は極めて少ないが、源泉に関しては4地域について施設総数6、試料総数8を調べた結果、全ての試料はアメーバ陰性であった。一方、給水・、源泉貯湯槽等に関しては、3地域について施設総数10のうち3施設がアメーバ陽性であり、試料総数15に対するアメーバ検出率は20.0%であった。*Naegleria*はE地域の源泉貯湯槽1試料より検出された。

6. 各種試料間のアメーバ検出率の違い

浴槽水、浴槽排水ならびに工場排水の各試料総数に対するアメーバ類の検出率を図一2に示した。なお浴槽水試料は他試料と比較して10倍以上の試料数があったことから、統計的な解析は行わなかった。図一2で明らかのように、*Naegleria*検出率は浴槽排水が最も高く、浴槽水の約3倍であった。同じ排水でも工場排水では検出率は浴槽水とほぼ同じであった。*Acanthamoeba*ならびに*Hartmannella*については排水系試料が浴槽水よりも高い

検出率であった。*Platyamoeba*は浴槽排水で最も高かったが、他のアメーバ類に比べ試料による検出率の差が小さかった。*Rhizamoeba*、*Vannella*、*Nuclearia*は10%以下の低率であったが、排水系試料の方が浴槽水試料よりも検出率が高かった。

7. アメーバ検出の定量的解析

試料の種類と分離されたアメーバの量的関係を調べるため、分離アメーバ数の定量的解析を行った。図一6には、試料を浴槽水系ならびに排水系に分け、個々の試料から分離された総アメーバ数の分布を相対比で表した。浴槽水試料では試料中の総アメーバ数が1-2の試料が全体の約50%を占めるのに対し、排水系試料ではその割合は約20%と低かった。これとは逆に、総アメーバ数が11以上のアメーバが多数分離された試料の割合は、浴槽水試料がおよそ5%であるのに対し、排水系試料では約20%であり、明らかに排水系試料の方が浴槽水よりも多数のアメーバが分離される傾向にあった。

図一7には試料を浴槽水系ならびに排水系に分け、個々の試料から分離された総アメーバ数に対する主要アメーバ類(*Naegleria*、*Acanthamoeba*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*ならびに*Echinamoeba*)の分離株数の割合を算出した結果を示した。

試料あたりの総アメーバ数が5個以下の場合には、分離されるアメーバは浴槽系試料では*Platyamoeba*が、また排水系試料では*Acanthamoeba*がともに約40%と最も多く、*Naegleria*の検出される割合はそれよりも低く20%以下であった。総アメーバ数が6から10個に増えると、浴槽系

試料では *Naegleria* の割合が 30% となり、検出率は *Platyamoeba* に拮抗し、また排水系試料では *Acanthamoeba* が減り、アメーバ間の検出率にはほとんど差がみられなくなった。さらに総アメーバ数が増えて 16 以上の場合には分離されるアメーバ中 *Naegleria* の割合が 50~60% と最も高くなり、試料から分離するアメーバ数が多いほど *Naegleria* の分離数の増加、即ち検出率が高くなる傾向が見られた。

図-8 には試料を浴槽水と排水系で分けた時の、試料あたりの *Naegleria* 数 (cells/sample) の分布を相対比で示した。浴槽水試料では、1 cells/sample が全体の約 50%、5 cells 未満では約 80% となった。10 < cells の試料は全体の 4.6% で、20 < cells の試料が 3 試料見られた。一方、排水系試料では、1 cells/sample が全体の約 36%、5 cells 未満では約 65% となり。10 < cells/sample の試料は全体の 12.9% であった。10 < cells の試料は工場排水で割合が高かった。

8. アメーバ検出と水質との関係

試料からのアメーバ検出と水温および pH の関係について解析した。表-8 には浴槽水系試料として内湯、レク湯および露天、また排水系試料として浴槽排水および工場排水の各種試料について、アメーバの検出の有無に関わらず、測定された水温、pH データの範囲、ならびに平均値±SD を示した。なお、水温、pH データはすべての試料について測定されてはいなかったため、得られた数値の統計学的な比較は行わなかった。また、図-3 には水温、pH データが両方測定された

試料について、その分布を散布図で示した。

浴槽水系の 3 種類の試料は、水温、pH ともやや範囲が異なった。水温の上限温度は内湯の 48℃、下限温度は内湯の 10.0℃であったが、平均値で見ると全体としては 40℃前後に収束された。pH の上限値は内湯の 10.3、下限値は露天の 4.0 となりかなりの幅があったが、平均値から見ると pH 8.0 あたりを中心に pH 7.0~10.0 のアルカリ側にある程度の範囲をもって分布した。一方、排水系の 2 試料の場合は、水温の上限温度は工場排水の 67.9℃、下限温度も工場排水で 5.6℃であり、浴槽水と比較してその差が大きかったが、平均値から見ると浴槽水と比較して浴槽排水はおよそ 8℃、工場排水では 18℃も低いという結果であった。pH は上限値が浴槽排水の 10.3 で下限値は工場排水の 5.7 であり、浴槽水とあまり差は見られなかった。全体として各試料の特徴を考えると、浴槽水系は試料に寄らずほぼ水温、pH は一定であり、浴槽排水は水温が低下、工場排水の場合はそもそも水質が異なるためと考えられるが、水温、pH ともに試料中最も低くなる傾向を示した。

アメーバの検出と水温および pH の関係について、図-4 に各種試料におけるアメーバ陽性であった場合の水温と pH の関係を示した。何らかのアメーバが検出される水質は、図-3 に示された全体的な水質と比較してやや温度、pH の範囲とも狭くなる結果であった。図-5 は *Naegleria* に限定して、その検出と水温および pH の関係について解析した結果で

あるが、図—4 と比較して、さらに範囲は狭くなる傾向にあった。各種試料による差はあるものの、全体として水温は 20°C ~45°C に収束すると考えられた。pH は *Naegleria* の有無で大きな差は見られなかった。

9. 他の水質に影響を及ぼす因子とアメーバ検出との関係

今回の調査では、試料の水質データとして水温、pH 以外に可能な範囲で、浴槽水の泉質、管理状況等に関する聞き取りを行った。すべての施設および試料に関してこれらのデータが得られなかったが、得られたデータの範囲で *Naegleria* 検出の有無との関係を調べた。

泉質は多種多様であり、同一地域でも施設により違いが見られた。C 地域では *Naegleria* を含めアメーバ全体の検出率が低かった。調べた試料は含硫黄性の泉質であった。A、B 地域でも単純硫黄泉は *Naegleria* 陰性であった。他地域での硫黄性の泉質と *Naegleria* 検出率との関係は明らかではなかった。管理状況の内容としては、循環式・オーバーフロー式の違い、換水・清掃の頻度、塩素等による消毒、一般細菌数等を調べた。結果としては、毎日あるいは隔日で浴槽水を交換した、また調査前に清掃したという場合は施設として *Naegleria* 検出率が低かった (J 地域)。塩素添加後の残塩濃度が 0.1 以上の場合も同様に低かった (I、M 地域)。一般細菌数、大腸菌数との関係は不明であった。アメーバ全体で見た場合は、硫黄泉質以外の条件は検出の有無との関係は明らかではなかった。

国外の病原性アメーバ感染例では、野外の池、湖等の自然環境 (Barwick ら

2000) あるいは温水プール (Cerva ら 1968) 等、特定される場合が多い。これに対し、国内における感染例ではその感染源は不明であり、今後、アメーバ感染を防止する上では、潜在的な感染源を明らかにしておくことが極めて重要である。

本調査では、その感染源として予想される浴槽水を中心に、温水環境における *Naegleria* 等高温耐性アメーバ類の実態調査を行い、実際に多様なアメーバ類が存在することを明らかにした。調べた温水環境から何らかのアメーバが検出される割合は 40% 以上と高率で、試料による比較から排水系試料の方が浴槽水よりも検出率は高かった。*Acanthamoeba*、*Hartmannella* は排水系試料で、特に *Naegleria* は浴槽排水で高いという傾向が見られた。国内におけるこれまでの調査で、温排水試料より *Naegleria fowleri* の検出が確認されており (De Jonckheere ら 1991)、今回の温排水における高い検出率とアメーバの存在量の多さを考えると、温排水は感染源特定に際し今後調査に加えるべき重要対象になるものと思われる。なお本調査では *Naegleria* とともに病原性アメーバとして知られる *Acanthamoeba* も比較的高率に検出されており、温水環境が公衆衛生上注意すべき場所であることが示された。*Hartmannella* および *Platyamoeba* に関しては病原性の報告はないが、高温耐性の種類が温水環境中に存在することは明らかであり、今後病原性の確認試験を通じて公衆衛生上の重要性を明らかにする必要がある。

アメーバ類の温水環境における生息・定着決定因子としては、主に物理的除去と水温が重要と考えられる。今回の調査では水質学的にはほぼ同様と考えられる浴槽排水が浴槽水よりも検出率が高いこと、浴槽水では清掃等管理方法が検出率に関連していること（特に *Naegleria*）、また、排水系の場合は配管内のバイオフィームがアメーバの増殖場所となり、その除去が難しいと予想されることから、物理的除去はアメーバの汚染度に大きく影響していると考えられる。衛生管理の一環としての清掃が感染源対策に果たす役割は大きいと思われる。一方、水温と検出率の関係から、低温水試料が多かった排水、特に工場排水で *Naegleria* 検出率が低く、水温がその生息因子として重要なことは明らかであったが、注意すべきは浴槽水のように恒常的に高温ではなくても、排水のように断続的に温度が保たればかなり幅広い温度環境でも *Naegleria* は生息できる可能性が示されたことである。国外における原子力発電所や工場からの温排水に関する調査結果によれば、*Naegleria fowleri* の検出される水温は必ずしも 30~40°C の高温域に限定されず、20°C 前後の試料からも検出されている（De Jonckheere and van de Voorde 1977, Sykora ら 1983, Huizinga and McLaughlin 1990）。これまでに *Naegleria fowleri* 感染と温排水との関係は証明されていないが、その *Naegleria* 汚染には注意を払うことが必要であろう。本調査は冬場の低水温期に行われており、高温期である夏場では排水からの検出率が異なると予想される。浴槽水以外の試料では検出率の季節的変

動を調べる必要がある。

今回の調査では水質の化学的な要因とアメーバ検出率の関係は明確ではなかったが、硫黄泉質や残留塩素濃度が *Naegleria* の検出率に影響すること示唆された。浴槽水に関しては、清掃・消毒等管理の徹底でアメーバ汚染防止につなげることが可能と思われる。が、一方でこのことは清掃、消毒により浴槽水からの検出率が左右される可能性があり、事後調査における感染源の特定が難しくなるという問題を生ずる。種々の温水環境は潜在的な感染源であるとの前提で、感染後直ちに関連地域を調査することが感染源特定の成否につながるものと思われる。

本研究では、高温耐性の *Naegleria* を分離することが主たる目的であったが、予想外に多様なアメーバ類が検出され、結果的に *Naegleria* が検出される割合が低くなっている可能性がある。試料別にみると浴槽水では *Platyamoeba* が、また排水では *Acanthamoeba* が *Naegleria* とともに培養・増殖しており、その分離効率に影響している恐れがある。今後より選択的に *Naegleria* を分離するための条件の再検討が必要である。非病原性の温度耐性 *Naegleria* の存在が *Naegleria fowleri* の indicator になることから、本研究ではその選択条件として 42°C を培養温度とした。この選択条件で温度耐性 *Naegleria* の分布が明らかになったことから、今後は *Naegleria fowleri* の選択的溫度として用いられる 45°C による培養で積極的に検出することを検討する。またアメーバの培養の経過を観察すると、42°C の培養条件下で、*Naegleria* は早期にクローニングされ

やすくその後の成長が早いのに対し、*Naegleria*と同様か、それ以上に検出率の高い*Platyamoeba*は、逆にクローニングまでにかかる時間が長いこと、そしてその後の成長が遅いというアメーバ間の生物学的相違も認められた。以上の点を考慮し、今後の検出方法として100~200mlの試料を濃縮して、培養温度を42~45℃とし、短期間(3~4日)の培養で、早期に形成されるプラークをクローニングすることで*Naegleria*検出率を上げることが可能ではないかと考えられる。

D. 結論

国内における感染源の特定において、どこを、何を調べれば良いかは重要な問題である。国内の一般的、かつ身近な温水環境には*Naegleria*をはじめとする高温耐性アメーバ類が生息していることが明らかとなった。さらに温排水系はアメーバの存在量も多いことが示された。現在のところ*Naegleria fowleri*は検出されていないが(分担研究報告書「分離アメーバの分類・同定」、潜在的な感染源は温排水を含め広い範囲にわたっていると考える必要がある。分離方法の改善と地域集中的な調査でさらに精度の高い*Naegleria*分離を進めることが今後の課題である。

参考文献

- Barwick,R.S, D.A.Levy, G.F.Craun, M.J.Beach, R.L.Calderon (2000) Surveillance for waterborne-disease outbreaks--United States, 1997-1998.Mor Mortal Wkly Rep CDC Surveill Summ., 26;49(4):1-21.
- Cerva,L.,V. Novak, and C.G Culbertson (1968) An outbreak of acute fatal amoebic meningo-encephalitis.Am.J.Epidemiol.,88:436-444.
- De Jonckheere, J., K. Yagita, T. Kuroki, and T. Endo.(1991) First isolation of pathogenic *Naegleria fowleri* in Japan. Jpn.J.Parasitol.40:352-357.
- De Jonckheere, J. and H. van de Voorde.(1997) The distribution of *Naegleria fowleri* in Man-made thermal waters. Am.J.Trop.Med.Hyg. 26(1):10-15.
- Kuroki T, K. Yagita, E. Yabuuchi, K. Agata, T. Ishima, Y. Katsube, and T. Endo.(1998) Isolation of *Legionella* and free-living amoebae at hot spring spas in Kanagawa, Japan Kansenshogaku Zasshi. (10):1050-1055.
- Huizinga, H. W. and G. L. McLaughlin.(1990) Thermal ecology of *Naegleria fowleri* from a power plant cooling reseroir. Appl.Environ.Microbiol.56(7):2200-2205.
- Sugita Y, T. Fujii, I. Hayashi, T Aoki, T. Yokoyama, M. Morimatsu, T.Fukuma, Y. Takamiya. (1999) Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. Pathol Int. 49(5):468-70.