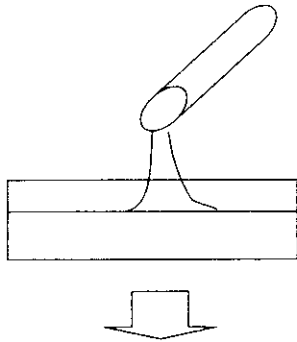


アメーバの検出とコロニー分離

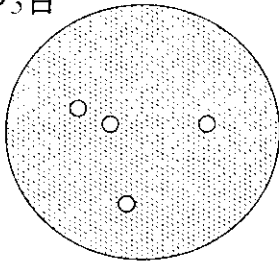


- ・アメーバ分離用培地に検水1mlを塗り広げる。
- ・シャーレを揺らしながら全面に検水を広げ、均一に表面を濡らす。
- ・水が流れなくなるまで自然乾燥する。

予め培地を十分乾燥させておくと、検水の乾燥が早い。

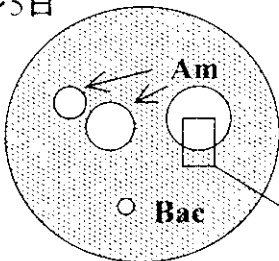
42°Cで培養

培養後2~3日



- ・アメーバの培養は毎日観察する。
- ・培養後1日では、あまり変化はない。
- ・培養後2~3日でアメーバの増殖はプラーク形成として肉眼的に確認可能となる(直径数mm程度)。
- ・一方で、カビ、細菌類の増殖も進むので、アメーバの確認は顕微鏡下で行う方が正確。

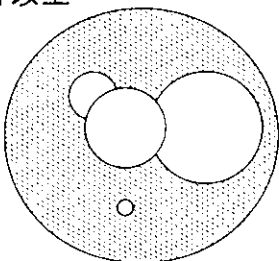
培養後4~5日



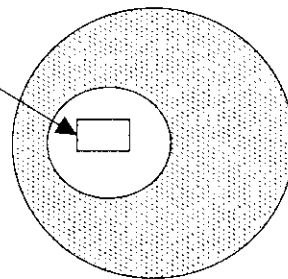
- ・培養後4~5日でプラークは大きく成長する。
- ・紛らわしい細菌類のコロニーとは形態的に区別が付きやすくなる。

個々のプラークが分離している間にクローニングを行う。

培養後7日以上



- ・さらに培養後1週間では成長したプラークが相互にか重なり合う。
- ・クローニングには適さない。



- ・プラーク最外部を切り取り、上下反転して新しいアメーバ用培地に植えて培養する。

コロニーとして分離完了

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

診断法の開発および感染経路の解明

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）

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）

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 株を抗原として使用し、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。産生されるモノクローナル抗体の特異性等詳細については次年度に検討予定である。

また、早期診断法の開発では、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回収を試みたが、現在までに回収に成功していない。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。

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。そこで、被害を最小限に抑えることを目的として診断方法の開発を行った。今年度

は、*N. 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、蛍光抗体診断試薬開発のためのモノクローナル抗体作製と早期診断法の開発のための鼻腔内洗浄によるアメーバの回収方法の検討を行った。

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（以下、アメーバ）を用いた。

Naegleria の培養

アメーバは、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%ウシ胎児血清（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、別容器で培養中のアメーバを接種した。3・4 日後に BMEC 細胞がほぼ全て破壊され、アメーバ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。培養は全て 37°C、5% CO₂ の環境下で行った。

SCGYEM 培養液

カゼイン	10	g
グルコース	2	.5 g
酵母抽出物	5	g
Na ₂ HPO ₄	1	.42 g
K ₂ HPO ₄	0	.87 g

精製水を加え全量を 1,000 ml に調整

オートクレーブにより滅菌し、これにウシ胎児血清を 10% となるように加える。

単クローン抗体作製

マウス B 細胞ハイブリドーマ作製のため、上記培養系で得られたアメーバを集めてリン酸緩衝生理的食塩水（PBS）で 3 回洗浄し、1%ホルマリンで 4°C、1 時間固定後、さらに PBS で 3 回洗浄して抗原用アメーバとした。固定・洗浄したアメーバは PBS を用いて 10⁷/ml に再懸濁し、この 1 ml を BALB/c マウスの腹腔内へ投与した。

この免疫操作は、1 週間隔でさらに 4 回繰り返してブーストした。抗体産生の確認は最終免疫から 3 日後に部分採血を行い、ELISA（酵素抗体法、Enzyme-Linked Immunosorbent Assay）により抗体価の測定をすることで行った。十分に抗体価が上昇したことを確認後、マウスから脾臓を取り出し脾細胞の調製を行った。マウス骨髄腫細胞（P3-X63）は、10%FBS を含む RPMI1640 で培養し、対数増殖期の細胞を以下の細胞融合に供した。脾細胞と P3-X63 の細胞融合は、ポリエチレングリコール法で行い、HAT 培地（ヒポキサンチン、アミノプテリン、チミジン、FBS を含む RPMI1640）を用いて融合細胞を選択する培養を行った。選択培養開始 2 週間後に、ハイブリドーマの増殖が良好なウェルの培養上清を採取して ELISA を用いたスクリーニングを行い、抗体価の高いウェルのハイブリドーマをクローニングした。クローニングは、培養液としてエスクローンクローニングメディウム CM-B（HAT 添加）を用いた限界希釈法で行った。クローニングの結果、増殖が思わしくないクローンは排除し、増殖の良好なクローンについてはスクリーニングの後、2 回目のクローニングを行った。

抗体価の測定には ELISA を用いた。上記培養系で得られたアメーバを集めて PBS で 3 回洗浄後、50 mM 炭酸緩衝液（pH 9.6）を用いて 10⁶/ml に再懸濁し、凍結融解と超音波処理で細胞を破壊し抗原溶液とした。抗原溶液をマイクロタイタープレートの各ウェルに 100 μl ずつ分注し、4°C で一晚静置して抗原を固相化した。その後、抗原を固相化した各ウェルにブロックエースを 250 μl ずつ分注し、4°C で一晚静置することでブロッキングを行

った。被検血清及び培養上清は抗原を固相化しブロッキングした各ウェルに100 μ lずつ分注して37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた後、界面活性剤(0.05% Tween 20)を含むPBS(PBS-T)で4回洗浄した。その後、PBS-Tで希釈したワサビペルオキシダーゼ標識抗マウスIgG二次抗体を100 μ lずつ分注し、37 $^{\circ}$ Cで2時間反応させた。反応後、各ウェルはPBS-Tで4回洗浄し、フェニレンジアミンを含む基質溶液100 μ lを分注して、37 $^{\circ}$ Cで30分間酵素反応を行った。酵素反応は、50 μ lの6M硫酸を加えることで停止し、マイクロプレートリーダー(吸光度492nm)を用いて比色定量を行った。

単クローン抗体の特異性

Naegleria 虫体破碎試料に2クローンの単クローン抗体を用いたウェスタンブロッティングを実施した。抗原として*N. fowleri* NF66及びKUL株、その近縁種である*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D株をSCGYEM培地で2日間培養して得られたアメーバ(約 4.5×10^5 個)をTCA処理により蛋白抽出を行った。得られた試料につき、SDS-PAGEおよび2次元電気泳動を行った。当初のタンパク量を50 μ g(一部、100 μ g使用)とし、1次元目(等電点電気泳動)は18cm IPGphor p H3-10 イモビリンストリップ(Amersham pharmacia社)に載せ、35,000Vhrの条件で泳動した。2次元目(PAGE)として、24 \times 20 \times 0.1cmのプレートサイズの12.5%ポリアクリルアミドゲルを用いて縦型泳動装置(バイオクラフト社製)にて25mA、16hrの条件で泳動した。次いで、定法に従い、蛋白をPVDF膜へ転写した。転写時間等は80V2時間とした。得られた転写膜を上述の単クローン抗体(一次抗体)を作用させ、次いで二次抗体

としてアルカリ-フォスファターゼ(AP)で標識した抗マウスIgG抗体を用いた。反応後、十分洗浄し、NBT/BCIPの発色反応による検出系を用いた。

マウスへのアメーバ経鼻感染と回収

早期診断法の開発では、上記培養法で得られたアメーバをマウスの鼻腔内へ接種し、経時的にマウス鼻腔内の拭き取りを行った。得られたスワブは、SCGYEMを分注した培養フラスコへ移して37 $^{\circ}$ Cで培養を行い、培養フラスコを顕微鏡下で毎日観察しアメーバの検出を行った。

(倫理面への配慮)

全ての動物実験は、久留米大学及び国立感染症研究所の動物実験指針に従って計画・実行された。必要があれば、実験施設管理責任者の許可のもとで可能な限り苦痛を与えない方法で処理が行われた。

C. 研究結果

1. マウス B 細胞ハイブリドーマの作製

ホルマリン固定アメーバをマウス腹腔内へ接種し、ハイブリドーマ作製に十分な抗体価の上昇を確認した後、脾細胞とP3-X63を細胞融合させ、HAT培地を用いてハイブリドーマを選択した。ELISAを用いたスクリーニングの結果、いくつかの抗体産生陽性のハイブリドーマが得られたので、それらを2回のクローニングに供し、最終的に2クローンのB細胞ハイブリドーマを樹立することができた。

2. 単クローン抗体の特異性

虫体のSDS-PAGEパターン(図1A)より、TCA処理蛋白は均一に分画され

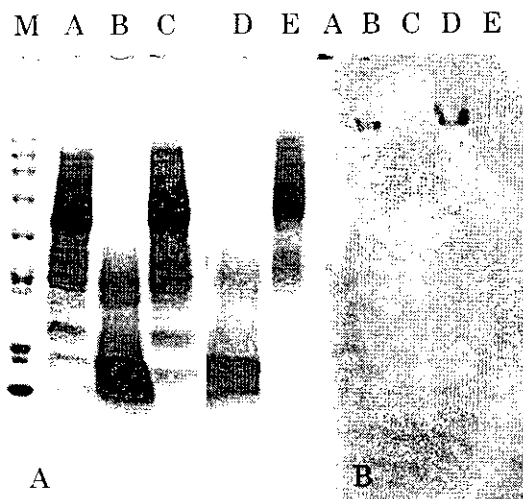


図1 単クローン抗体の特性

Aは8%SDS-PAGEにより分離したタンパク質のCBB染色像、BはWestern blotting像を示す。それぞれ、レーンAおよびBは*N. fowleri* Nf66株、レーンCおよびDは*N. fowleri* KUL株、レーンEは*N. lovaniensis* Aq/9/1/45D株より抽出した試料を用いた。レーンA、CおよびEはTCA沈殿、BおよびDは凍結融解により試料調製を行った。レーンMはサイズマーカーで、分子量は上から、250、160、105、75、50、35、30、25、15、10kDaの順である。

ており、35 kDa 付近の蛋白量も多かった。それに比べ、粗抽出サンプルの蛋白泳動パターンは、250kDa以上に分布するバンドが薄く、試料作成中に生じたと思われる分解産物を含むのか10kDa付近に広範なバンド (smear) が観察された。単クローン抗体を用いた特異染色について、発色反応の結果を図1Bに示した。陽性反応と思われる発色反応は、250kDa付近でのみ観察され、他の蛋白分子の領域には認められなかった。TCA処理により調製したサンプルでは、バンドは観察されなかった。250kDa付近での陽性反応はNf66、KUL株共に認められており、*N. fowleri* に特異的な蛋白であると考えられた。*N. lovaniensis* Aq株との交差反応は認められなかったが、TCA処理のサンプルのみを用いたため、正確

には確認できておらず、現在確認中である。

同様にウェスタンブロッティングで、*Naegleria* の2次元電気泳動パターンの高分子蛋白領域に対する反応性を調べたが、TCA沈殿試料によるためか、蛋白スポットの明確な染色像は得られなかった。

近年の*N. fowleri* の蛋白分子の研究は、13.1kDa¹⁾あるいは膜蛋白由来の17kDa²⁾、またはCa²⁺非依存的な膜結合性 phospholipase、80 kDa³⁾の報告などがみられるが、250kDaの蛋白分子に該当または関連するものはなく、本単クローン抗体が認識する蛋白についてはさらに検討が必要である。一方、*Naegleria* に対するモノクローナル抗体についての報告によると、Nucleolar⁴⁾、Chaperonin 遺伝子の発現系⁵⁾などに対する抗体が報告されている。また、*Naegleria* の感染防御への単クローン抗体の影響を調べた報告によると、ネズミへの実験感染での生存率の上昇をみたとの報告がある⁶⁾。

3. 早期診断法の検討

マイクロピペットを用いてマウス鼻腔内の洗浄を試みたが、注入したPBSが全く回収できないなど生きたマウスでは非常に困難であった。そこで、投与したアメーバの一部が鼻腔内の比較的浅部に残存していれば、スワブからの検出も可能ではないかと考え、この方法での検出を検討した。培養で得られたアメーバをマウス鼻腔内へ接種し、翌日から経日的に手術用結索糸を用いてマウス鼻腔内の拭き取りを行った。得られたスワブはSCGYEMで培養し、2週間まで観察を続けたが、アメーバを検出できなかった。

D. 考察

*N. fowleri*に起因するPAMの診断のため、蛍光抗体診断試薬開発のためのモノクローナル抗体作製と早期診断法の開発のための鼻腔内洗浄によるアメーバの回収方法の検討を行った。今年度は時間的な制約から、得られた2種のモノクローナル抗体が蛍光抗体診断試薬に適しているか否かの検討を行えなかったため、これらの特異性等については次年度に検討する予定である。

鼻腔内からのアメーバの検出については、検体採取方法の再考が必要である。今年度の結果から、マウスを用いること自体に無理があるような印象も受けた。ラットや家兎など、大形の実験動物の使用も検討する必要がある。

E. 結論

今年度は診断法開発の基礎研究を行った。時間的制約から得られた結果は限られているが、モノクローナル抗体産生ハイブリドーマを2クローン得ることに成功した。今後、これらの抗体を利用した蛍光抗体診断試薬の開発が期待される。

一方、早期診断法の開発については、実験動物の種類を含めたモデル系の確立が出来れば、非侵襲性の簡便な検査方法の確立が期待できる。

参考文献

1. Shin HJ, Cho MS, Jung SU, Kim HI, Park S, Kim HJ, Im KI. Molecular cloning and characterization of a gene encoding a 13.1 kDa antigenic protein of *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot Microbiol.* 2001 Nov-Dec;48(6):713-7
2. Reveiller FL, Suh SJ, Sullivan K, Cabanes PA, Marciano-Cabral F.

Isolation of a unique membrane protein from *Naegleria fowleri*. *J. Eukaryot Microbiol.* 2001 Nov-Dec;48(6):676-82.

3. Barbour SE, Marciano-Cabral F. *Naegleria fowleri* amoebae express a membrane-associated calcium-independent phospholipase A(2). *Biochim. Biophys. Acta.*, 2001 Feb 26;1530(2-3):123-33.
4. Trimbur GM, Goeckeler JL, Brodsky JL, Walsh CJ. Cloning, sequencing, and nucleolar targeting of the basal-body-binding nucleolar protein BN46/51. *J. Cell. Sci.*, 1999 Apr;112 (Pt 8):1159-68
5. Archibald JM, O'Kelly CJ, Doolittle WF. The chaperonin genes of jakobid and jakobid-like flagellates: implications for eukaryotic evolution. *Mol. Biol. Evol.*, 2002 Apr;19(4):422-31
6. Soh EY, Shin HJ, Im K.

F. 健康危険情報

関連事項なし

G. 研究発表

口頭発表

1. 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 *Naegleria 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)
2. 小村麻子、八木田健司、泉山信司、遠藤卓郎 (2001) *Naegleria fowleri* と *Naegleria 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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

関連事項なし

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*の疫学と病原発現に関する研究

アメーバ性髄膜脳炎の病理学的検討

分担研究者： 高橋 均 （新潟大学脳研究所病理学分野）

研究協力者： 林 森太郎 （新潟大学脳研究所病理学分野）

我々は、これまでわが国では極めて稀な疾患とされてきたアメーバ性髄膜脳炎の貴重な1例を経験する機会を得、病理組織学的検討を加えると共に、他の国内5例との文献的比較検討を行った。その結果、我々の症例は、亜急性の肉芽腫性脳炎の病態を呈しており、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が認められた。電子顕微鏡的、免疫組織学的、さらに遺伝子学的検索から、病原体として *Balamucia* 属のアメーバが強く疑われたが、残念ながら確定には至らなかった。文献的検索では、わが国におけるアメーバ性髄膜脳炎の起因病原体は *Naegleria fowleri* だけではなく、*Acanthamoeba* 属、および *Balamucia* 属の報告が認められ、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。また我々の症例と同様に他の例においても、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、その感染経路は不明であった。以上の結果より、今後は実際にそれぞれの症例を検討し直すことにより、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、臨床家並びに各関係方面への啓蒙活動が必要であると考えられた。

A. 研究目的 これまで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例であり、極めて稀な疾患とされてきた。我々はこの内の貴重な1例を経験する機会を得、主として病理組織学的検討によって病原性アメーバによる病態を明らかにすることを目的とした。加えて他の5例の報告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

らかにすることによって、アメーバ性髄膜脳炎の発生を防ぐ為の施策の策定、また不幸にして発症した場合の診断・治療に貢献することを目的とした。

B. 研究方法

症例：死亡時53歳、男性。高校教師。既往歴としては41歳時に胃癌により胃全摘・脾摘を受けたが、転移・再発は認められず。平成7年11月下旬より体の具合が悪いとの訴えがあり、その後頭

痛・発熱が出現、近医を受診し解熱剤などの投与を受けたが 38℃台の発熱が持続し、12月14日に地域の基幹病院の内科を受診。血液検査では CRP 陰性、白血球数増加も認めず。抗生剤および鎮痛消炎剤の投与により一時解熱したが、19日には再び発熱し入院。髄液検査で細胞数、蛋白、IgGとも著明に増加。頭部 CT では側脳室および第三脳室の拡大を認められた。入院後、意識レベルの低下と髄膜刺激症状が認められ、単純ヘルペスウイルスの抗体価が血清で8倍、髄液で2倍と軽度上昇していたことから、ヘルペス脳炎を疑い、ゾビラックスが投与され、その後多少意識レベルは改善したが、12月25日の頭部 MRI では側脳室・第三・第四脳室周囲に T2 およびプロトン高信号域が認められた(別紙 Fig. 1)。27日には再び意識レベルが低下、瞳孔不同も出現。その後深昏睡となり人工呼吸器装着、平成8年1月12日に死亡。全経過約40日。発症前の9月頃より、生徒指導上の問題が度々発生し、かなり疲れ多様子だったとの夫人の証言がある。また、温泉好きでよく行っていたとのことだが、日時・詳細は不明である。

病理学的検索：死後3時間半後、全身解剖を行った。採取した臓器はホルマリンに固定、中脳の一部は電子顕微鏡用にグルタル固定を行った。脳をはじめ各内臓器に割を加え肉眼的に観察した後、必要な部位を切り出し、パラフィン包埋切片を作成、必要と思われる様々な染色を行い、光学顕微鏡的観察を行った。またグルタル固定された中脳組織よりエポン包埋ブロックを作成し、超薄切片を作成、電子顕微鏡観察を行った。

一部のパラフィン切片および電子顕微鏡写真は主任研究者である遠藤卓郎先生へ送り、免疫組織学的、遺伝子的並びに超微形態学的検討を依頼した。

(倫理面への配慮)

解剖および病理組織学的検索に当たっては、遺族の了解を書面で得、死体解剖保存法に則って行った。また、標本及び

関係書類については当施設のしかるべき場所に厳重に保管し、個人情報安全性に対し十分に配慮している。

C. 研究結果

肉眼所見：新鮮時脳重は1,200 g、全体に高度に腫脹し、脳底部では両側の鉤ヘルニアが認められた。嗅球・嗅索は保たれてみえた(Fig. 2)。頭頂面のくも膜下腔に軽度の混濁が認められた。固定後の大脳冠状断では側脳室・第三脳室周囲組織を中心とし、両側の視床・視床下部・尾状核・脳梁を含む広範な壊死性・出血性病変が認められた(Fig. 3)。また脳室から離れた大脳皮質にも結節性の同様の病変を認めた。脳幹では中脳水道あるいは第四脳室周囲を中心として壊死性・出血性病変が認められた(Fig. 4)。

光学顕微鏡所見：脳室周囲は広範な壊死像を呈し、その周辺部では、血管周囲及び実質内に直径10・30 μmの球形ないし楕円形の胞体を有し、核膜が不明瞭で大型明瞭な核小体を有するアメーバ栄養体が多数集簇して認められた(Fig. 5)。また厚いwallを有する直径8・15 μmのアメーバ嚢子も多数認められた(Fig. 6)。その他壊死巣周辺ではリンパ球・形質細胞・マクロファージの浸潤および血管の増生、アストロサイトやミクログリアの反応を伴った肉芽腫性病変が認められ、多核巨細胞も散在性に認められた(Fig. 7)。大脳皮質に認められた結節性の病変も同様に、血管周囲性に Virchow-Robins 腔から周囲組織へと浸潤するアメーバ栄養体から成るものであった。脳表近傍、あるいはくも膜下腔には検索した限りアメーバは認められなかった。

電子顕微鏡所見：アメーバ栄養体は大型で電子密度の高い核小体と顆粒状のクロマチンを容れた核を有し、薄く明瞭な細胞膜に囲まれていた。胞体内には多数の tubular なミトコンドリア、free ribosomes、vacuoles、vesicles が認められた(Fig. 8)。アメーバ嚢子は3層から成る厚い wall を有しており、最外側(ectocyst)は皺のある電子密度の高い薄い膜、最内側

(endocyst)は厚い膜、その間に amorphous な mesocyst が存在していた。嚢子内部には電子密度の高い顆粒状物質、祖面小胞体、ミトコンドリア、脂肪滴様物質が認められた (Fig. 8)。

D. 考察

現在アメーバによる中枢神経病変として知られているものには原発性アメーバ性脳髄膜炎、肉芽腫性アメーバ性脳炎、脳膿瘍があり、それぞれ病原体が異なっているといわれている。本例は、臨床・病理学的特徴から肉芽腫性アメーバ性脳炎の一例と考えられ、さらにその形態学的・免疫組織学的・遺伝子学的特徴から、確定はできなかったものの、*Balamucia* 属のアメーバが強く疑われた。肉芽腫性アメーバ性脳炎の感染経路としては、皮膚の損傷や下気道が知られている。本例においても嗅球・嗅索が保たれていること、血管周囲性にアメーバ栄養体の集簇が認められることから、血行性の脳への感染がもっとも強く疑われたが、皮膚には特別な所見はなく、一般内臓器にもアメーバは認められなかった。また、免疫能の低下も、現時点の段階で調べられる限りでは明らかではなかった。

文献的検索では、アメーバ性脳髄膜炎のわが国での剖検例は、本症例を含め6例存在し、その起因病原体は *Naegleria fowleri* だけではなく、*Acanthamoeba* 属、および *Balamucia* 属の報告が認められ、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。また我々の症例と同様に他の例においても、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明白ではなく、その感染経路は不明であった。

臨床的なアメーバ性髄膜脳炎の確定診断としては、髄液を採取し未固定で検鏡し、アメーバを認めることとされている

が、本例を検討する限りではくも膜下腔にアメーバ栄養体を認めることはなく、この診断法が必ずしも全てのアメーバ性髄膜脳炎に有用であるとはいえない可能性が指摘された。

E. 結論

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残念ながら認められなかった。今後は実際にそれぞれの症例を検討し直すことにより、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、アメーバ性髄膜脳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、臨床家並びに各関係方面への啓蒙活動が必要であると考えられた。

F. 健康危険情報 現在のところ特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. 林 森太郎、小出 隆司、山田 光則、永井 博子、高橋 均 アメーバ性肉芽腫性脳炎の1剖検例 *Neuropathology*, 1997;17(suppl):203

2. 学会発表

1. 林 森太郎、小出 隆司、山田 光則、永井 博子、高橋 均 アメーバ性肉芽腫性脳炎の1剖検 第38回日本神経病理学会総会 1997年 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

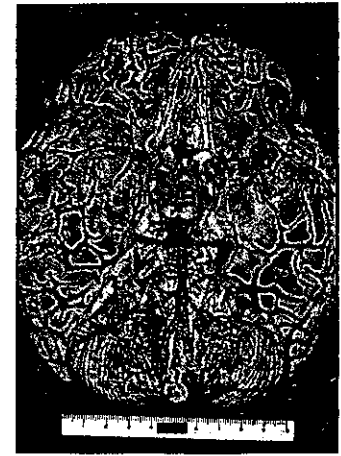
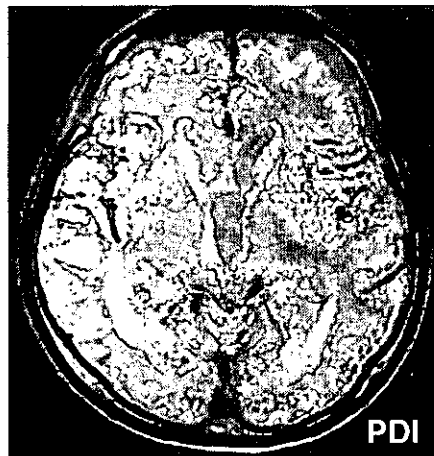
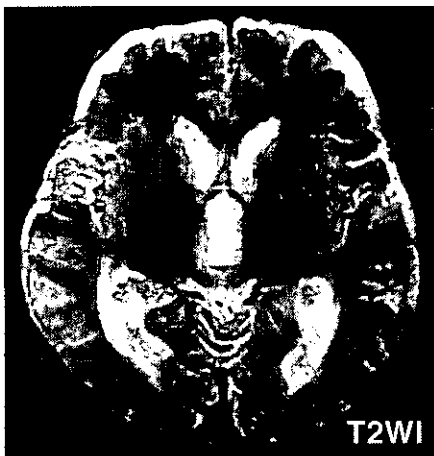


Fig. 1: MRI像。側脳室・第3脳室の拡大と脳室周囲のT2及びproton高信号域を認める。

Fig. 2: 脳は全体に高度に腫脹し（脳重1,320 g）、脳底部では両側の鉤ヘルニアが認められる。嗅球・嗅索は保たれる。



Fig. 3: 大脳固定後冠状断。側脳室・第3脳室を中心として、両側の視床、視床下部、尾状核、脳梁、海馬をも含む、広範な壊死性・出血性病変が認められる。

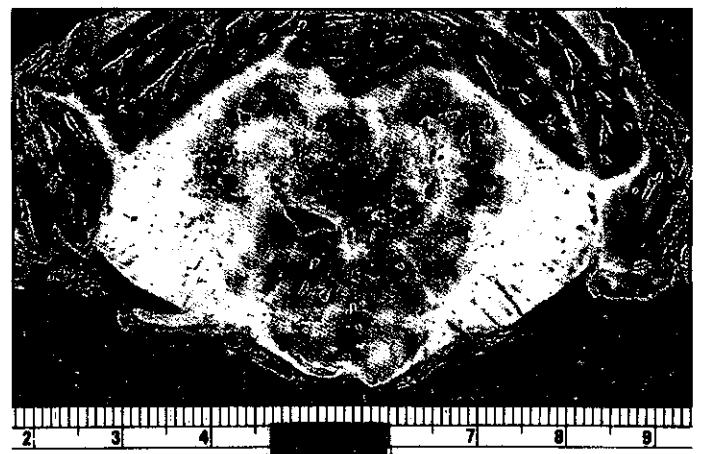


Fig. 4: 中脳（左）および橋・小脳（右）水平断。中脳水道・第4脳室周囲に壊死性・出血性病変が認められる。

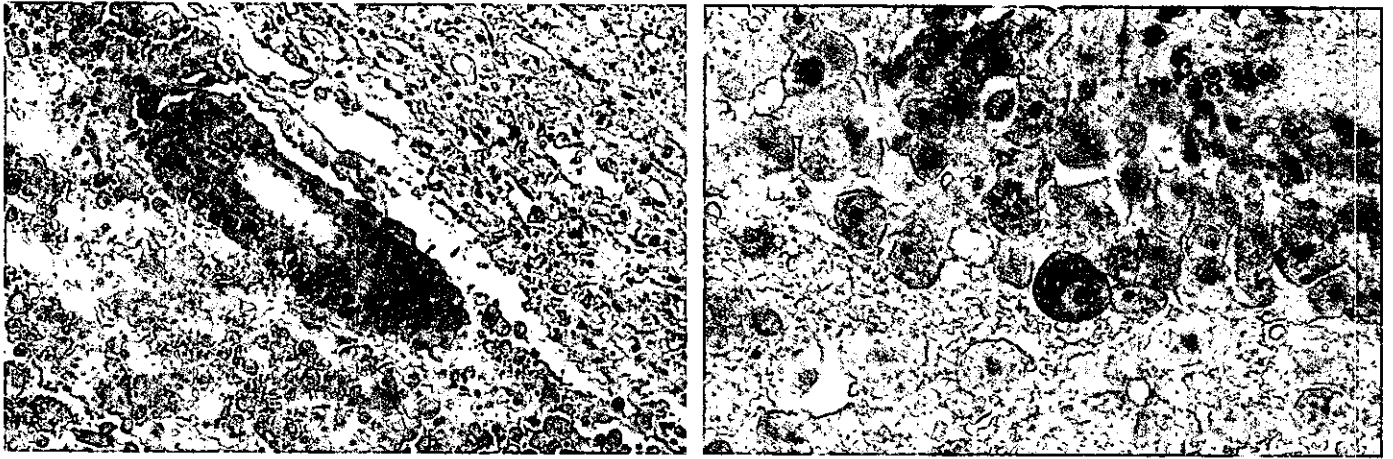


Fig. 5: 顕微鏡観察。壊死性病変の周囲では、血管周囲及び実質内に直径10~30 μm の球形ないし楕円形の胞体を有し、核膜が不明瞭で核小体が明瞭な大型の細胞体（アメーバ栄養体）が多数集簇して認められる。（視床、H&E 染色）

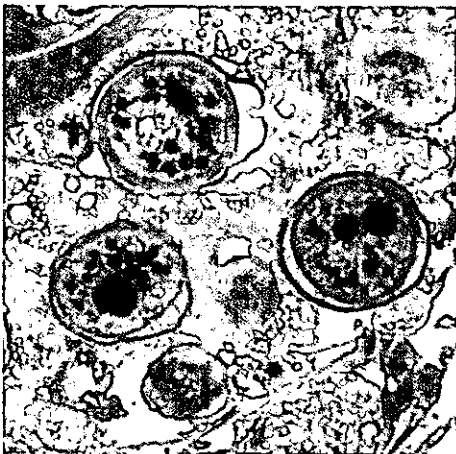


Fig. 6: 厚いwallを有した直径8~15 μm のアメーバ嚢子も多数認められる。（中脳、トルイジンブルー染色）

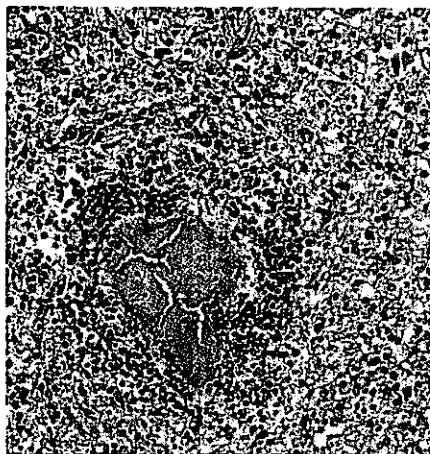


Fig. 7: 壊死巣周辺には、リンパ球・形質細胞・マクロファージおよび血管の増生を伴った肉芽腫性の病変（左）が認められ、散在性に多核巨細胞も認められる（右）。（視床、H&E 染色）

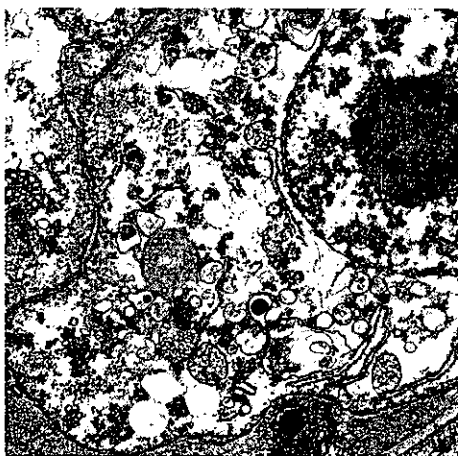
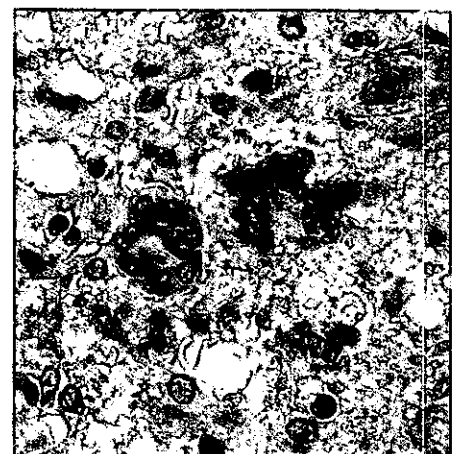


Fig. 8: 電子顕微鏡像。アメーバ栄養体（左）は、大型で電子密度の高い核小体と顆粒状のクロマチンを容れた核を有し、薄く明瞭な細胞膜に囲まれている。胞体内には多数のミトコンドリア、free ribosomes、vacuoles、vesiclesが認められる。アメーバ嚢子（中・右）は、3層からなる厚いwallを有している。最外側（ectocyst）は皺のある電子密度の高い薄い膜、最内側（endocyst）は厚い膜、その間にamorphなmesocystが認められる。Cyst内部には電子密度の高い顆粒状物質、粗面小胞体、ミトコンドリア、lipid-like dropletsが認められる。

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

循環式浴槽の洗浄方法

分担研究者：黒木 俊郎（神奈川県衛生研究所 細菌部）
遠藤 卓郎（国立感染症研究所 寄生動物部）

協力研究者：縣 邦雄（アクアス㈱ つくば総合研究所）

自由生活性アメーバ類は温水環境に広く存在しているが、これらの中には *N. fowleri* 等の人に対して強い病原性を持つアメーバの存在が知られている。近年、循環式浴槽水をはじめとする人工の温水環境が増加し、病原微生物汚染防止の観点から浴槽水等の衛生管理が重要となっている。アメーバ類はいわゆるバイオフィルムの重要な構成生物で、水中に浮遊するアメーバに比較してはるかに多数のアメーバがバイオフィルム中に存在している。従って、アメーバ汚染防除は総合的なバイオフィルム対策の一環として取り組む必要がある。本報告に当面考えられる物理・化学的洗浄方法について概説した。

研究の目的

温水環境には各種の自由生活性アメーバ類が生息しており、*Naegleria fowleri* 等の人に対して強い病原性を持つアメーバの存在が知られている。近年、循環式浴槽水をはじめとする人工の温水環境が増加し、病原微生物汚染防止の観点から浴槽水等の衛生管理が重要となっている。自由生活性アメーバ類はいわゆるバイオフィルムの重要な構成生物で、バイオフィルム中には水中に比べてはるかに多数のアメーバが存在している。従って、アメーバ汚染防除は総合的なバイオフィルム対策の一環として取り組む必要がある。形成されたバイオフィルムの剥離・除去とバイオフィルム形成防止の両面からの措置が必要である。

循環式浴槽に関しては、すでに厚生省生活衛生局（現厚生労働省健康局）からの通達（衛生発第 1811 号、衛指第 133 号）にあるように、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」に従って衛生管理が徹底されるべきである（参考資料：新版レジオネラ症防止指針）。本報告では、循環式浴槽を中心としたバイオフィルムの

除去方法についてとりまとめを行った。

1. バイオフィルムの殺菌洗浄

バイオフィルムの殺菌／洗浄の目的は、対象とする水系内の壁面に付着した微生物類を剥離・除去あるいは消毒し、水中への微生物類の供給源を断つことである。方法論的には物理（機械）的除去と、化学消毒による除去が考えられる。それぞれに一長一短がある。

1) 物理的除去方法

① ブラシ等での機械的剥離

物理的除去では、観察可能な場所で手の届く範囲であるならばブラシなどで洗浄することで容易に、しかも安価にバイオフィルム除去が可能である。しかしながら、循環式浴槽の配管系は基本的にブラシ掛け等の作業を想定した設計となっていないことから、ブラシ等の届かない個所が生じる。また、取り

残し部分からバイオフィームが容易に再生される可能性がある。

② 熱殺菌

病原性を有する自由生活性アメーバ類の中で *N. fowleri* は 45℃ の培養温度で増殖が確認されているが、これ以上の温度での増殖は無いものと考えられている。従って、レジオネラ対策で用いられる温度処理を励行すれば、アメーバ対策に通じるものと考えられる。これに関し、急騰施設の処理として、70℃ 20 時間の熱水による循環が推奨されている¹⁾。あるいは英国では 60℃ 1 時間以上の温水保持により、配管系を含む系全体の消毒が可能であるとの報告がある²⁾。しかしながら、水温を上げるためには多くのエネルギーが必要であること、系内材質の軟化・劣化、腐食あるいはタイル等の亀裂の危険性があること、および作業員等に対する火傷への注意が必要となる。

1. 古畑勝則、高柳 保、團野直子、岡田誠之、紀谷文樹 (1994)、給湯水におけるレジオネラ汚染とその対策。日本公衛誌 41 (11) : 1073-1083.
2. Legionnaires' disease, The control of legionella bacteria in water systems, Approved Code of Practice & Guidance L8, HSE Books (2000)

③ 乾燥

系全体を乾燥させることでバイオフィームの剥離を促すもので、温風ブロー等を用いる。十分に乾燥した後、管内壁等から剥離したバイオフィームの乾燥物を水で洗い流して排出する。殺菌効果は必ずしも完全ではないが、バイオフィーム量を減少させる効果が期待できる。

2) 薬剤による化学洗浄

薬剤等を用いた化学的除去では、使用薬剤の種類によってバイオフィームの内部への浸透が不十分となり効果の期待できないことも考慮する必要がある。また、化学洗浄では微生物の剥離効果が充分ではない場合があり、バイオフィームの残骸が残ることで微

生物の再定着しやすい環境を残すことになる。加えて、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。さらに、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。

浴槽水系を化学的に除菌洗浄するための薬剤は、大きく分けて塩素剤、過酸化水素、酸、有機系殺菌剤の 4 種類に分類できる。以下にそれぞれの薬剤による洗浄について述べる。

① 塩素剤

次亜塩素酸ナトリウム、次亜塩素酸カルシウム、塩素化イソシアヌル酸、塩素化ヒダントイン等の薬剤を用い、水中で有効塩素を維持させる。遊離有効塩素濃度で 5mg/l 以上の濃度を 5 時間程度維持することで除菌洗浄が可能である。塩素濃度を高くすることにより接触時間を短縮することができる。例えば、50mg/l で 1 時間、あるいは 20mg/l で 2 時間程度の接触時間が目安となる。

洗浄後の廃液を排出する際に、高濃度の塩素が残存しているようであれば、亜硫酸ナトリウム、チオ硫酸ナトリウム等での中和後に排水する必要がある。また、温泉水などの pH が低い場合、塩素ガスが発生する危険性がある。一方、高 pH では殺菌効果が低下する。このような影響を避けるためには、浴槽水を水道水等に置換してから薬剤投与をするべきである。

② 過酸化水素

薬剤としては、過酸化水素、過炭酸ナトリウム等がある。本剤の使用では、殺菌作用に加えて酸素発生による発泡のため、強い剥離作用が期待できる。通常は有効成分濃度として 1~5% で 2~4 時間程度の処理時間を要する。洗浄が終了すると徐々に発泡が収まる。薬剤の使用濃度が高いため、処理後に亜硫酸ナトリウ

ム、あるいは酵素剤（カタラーゼ）等による中和が必要となる。

③ 酸

塩酸、スルファミン酸等の無機酸、ぎ酸、蔞酸、グリコール酸等の有機酸が酸洗浄に利用される。酸による洗浄は、炭酸カルシウムなどのスケール（鱗状に沈着する湯あか）の溶解・除去に有効であるが、バイオフィルムの消毒にも適用できる。使用濃度は 1～10% で、強酸性であるために配管等へのダメージは大きい。従って、防食剤を併用が必要で、洗浄後はアルカリ剤による中和処理が必要となる。酸による洗浄は作業が煩雑で危険性も高いので十分な注意が求められる。

3) 化学洗浄の例示

以下に、塩素剤及び過酸化剤で循環式浴槽の化学洗浄を行う場合の具体的な手順について例示する。

① 塩素剤を用いた洗浄方法

i 塩素剤により殺菌洗浄効果を得るためには、5mg/l 以上の濃度を 5 時間程度維持する必要がある。5mg/l を下回らないように一定時間維持することが望ましいが、系内の汚れや有機物との反応により残留塩素は時間と共に消費されていく。そのため、あらかじめ消費量を見越して初期添加濃度を決定する。初期添加濃度の目安は、有効塩素濃度として 10～20mg/l である。

- ii 浴槽水を循環させた状態で徐々に薬品を添加する。汚れと反応することで泡立ってくるが、後述する過酸化剤による洗浄ほどの発泡はない。万一、発泡により循環に支障をきたすようであれば配管途中でエア抜きを行う。
- iii 定期的に残留塩素を測定し、必要であれば薬剤の補充添加を行い 5mg/l を下回らないように管理する。
- iv 所定時間の循環後、浴槽水を全換水する。換水は汚れの再付着防止のためにすすぎ洗いを十分行ってから清水を張る。

参考資料として、図 1 に冷却水系を次亜塩素酸ナトリウムで洗浄したときの残留塩素濃度の消費状況を示した。具体的には、12%の次亜塩素酸ナトリウム溶液を原液として 100mg/l（塩素濃度としては 12mg/l に相当）となるように 1 時間おきに 4 回添加した。冷却塔の配管系内の汚れがひどく、はじめのうちは速やかに残留塩素濃度の低下が見られている。添加を繰り返すことにより徐々に濃度低下の速度が減じ、やがて残留塩素濃度が維持されるようになる。浴槽水の場合ではここまで急激に濃度低下を起こすことは考え難いが、残留塩素濃度を監視しながら一定時間濃度を維持することが重要である。

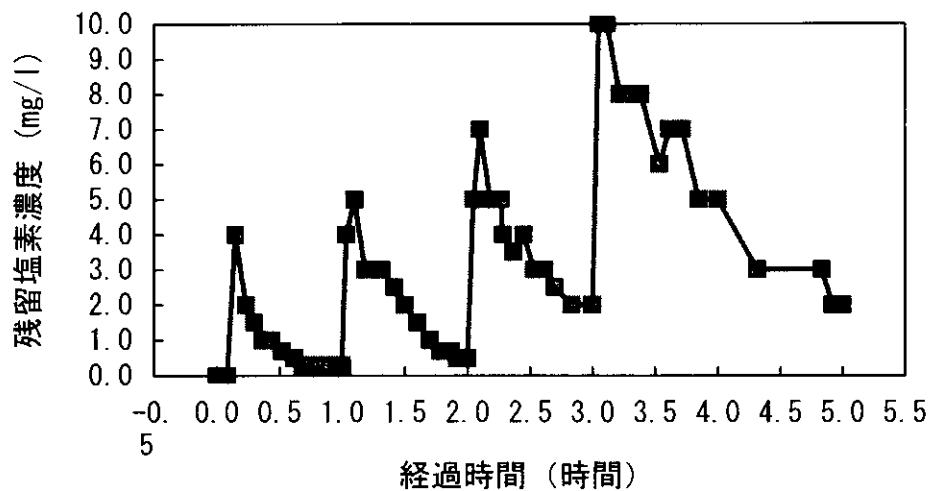


図 1. 冷却水系塩素洗浄時の残留塩素濃度推移

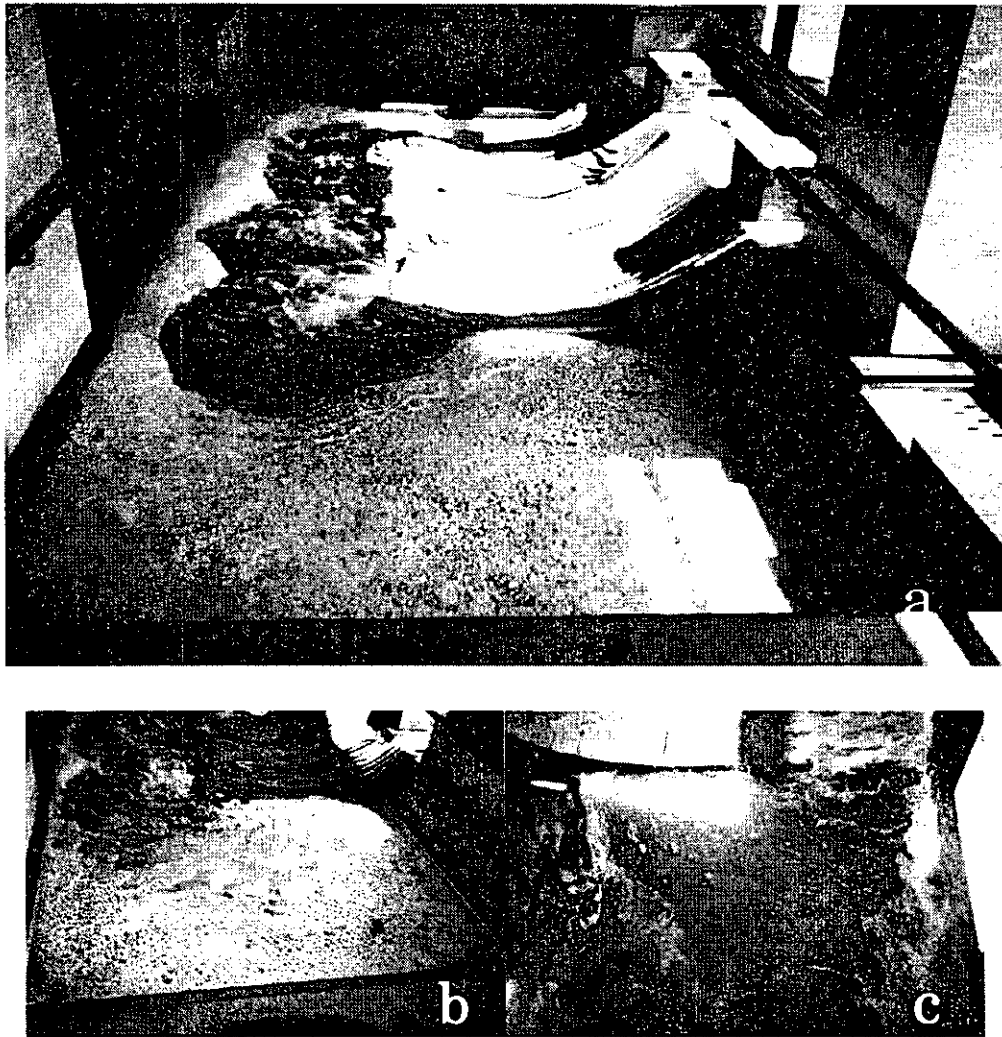
② 過酸化物による洗浄方法 (図 2)

- i 過酸化物の有効濃度は、1～5% と塩素剤に比べて高濃度。循環に支障の無い程度に浴槽水量を減らしてから薬剤を投入した。泡などが飛散しないように循環水の流入口に養生をした。処理期間中に濃度の急激な低下は起こらないので、細かな濃度監視や薬剤の補充は不要である (図 2a)。
- ii 塩素剤と同様、浴槽水を循環させながら薬剤を徐々に添加していく。激しく発泡するので (図 2b)、ポンプのエア噛み等に注意し、必要に応じて配管途中でエア抜きを行う。また、

酸素による発泡なので、処理期間中は下記の取り扱いには十分注意が必要である。

- iii 発泡に注意しながら数時間循環する。必要に応じて残留過酸化物濃度を測定し、過酸化物の濃度低下が殆ど無くなり、発泡が少なくなってきたら反応終了を意味する (図 2c)。
- iv 洗浄終了後に、残留している過酸化物を亜硫酸塩、酵素剤(カタラーゼ)等を用いて中和する。
- v 中和終了後に浴槽水を完全排水し、十分にすすぎ洗いを行ってから水を張る。

図 2. 過酸化水素による洗浄例



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

分離アメーバの分類・同定

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）

研究協力者：下河原理恵子（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）
泉山 信司（国立感染症研究所 寄生動物部）

温度耐性アメーバ類の棲息（汚染）状況調査により分離されたアメーバの分類・同定を行った。温泉を含む循環式浴用水、各種温排水、その他の人工／自然の温水を対象とした 14 地域 307 施設 827 温水試料から *Naegleria fowleri* の分離を主目的として同定を行った。その結果、197 施設 401 温水試料から 1,996 株のアメーバが検出された。すなわち施設としては 64.2% (197/307)、温水試料としては 48.5% (401/827) からアメーバが検出された。培養条件を 42°C に設定し、温水環境に順応したアメーバの分離に努めたところ、*Naegleria*、*Hartmannella*、*Willaertia*、*Acanthamoeba*、*Echinamoeba*、*Platyamoeba*（属名）等、多岐にわたるアメーバが分離された。

Naegleria 属の同定は形態観察および鞭毛誘発試験による有鞭毛期の確認によって行った。その結果、1,996 株中に 502 株の *Naegleria* 属アメーバが検出された。これらを対象に 2 種類の生化学的分析法で種の同定を試みた。すなわち、全株について PCR 法により *N. fowleri* の特異塩基配列の増幅を試みたところ、全て陰性であった。併せて、アイソザイムパターン解析により *Naegleria* の種の同定を試みた。502 株より無作為で選んだ 157 株について解析したが、*N. fowleri* は検出されなかった。その一方で、51% (78 / 154) 株が *N. lovaniensis* と同定された。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ことも注目された。

A. 研究目的

平成 12 年 12 月の衛生管理要領の改定に伴い、「公衆浴場における水質基準等に関する指針」が出され、公衆浴場および旅館業において使用する浴場水の水質基準、および公衆浴場営業者等が講じるべき措置が示された。通知では新たにレ

ジオネラ症発生防止が謳われた。本措置の趣旨は個人宅を含む各種入浴施設を汚染源として発生する健康被害を防止することであり、あらたな脅威となり得る病原微生物に対しても予め監視ならびに予防措置を講じる周到さが要求されている。当該研究では温水を生息場所とする *N.*

fowleri、*Acanthamoeba spp.* および *Balamuthia mandrillaris* 等の髄膜脳炎の起因アメーバ類を対象としており、その汚染実態調査を企図した。本研究を通じて各種浴槽水の衛生管理にむけた行政施策に活用し得る科学的な情報を提供するものである。

アメーバ性髄膜脳炎の起因アメーバは40°C付近の温水（淡水）を好適な棲息環境としていることから、わが国において広く普及する循環式浴槽水などのアメーバ汚染状況を把握することは重要で、生活環境からの健康被害を最小限に抑える努力が求められる^(1,2)。浴槽水中の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の蓄積汚泥中には多様なアメーバ種が高濃度に存在していることが明らかとなっている⁽³⁾。本研究では、3年間の調査期間を通じ全国規模で温泉を含む循環式浴槽水、温排水等における病原アメーバ類の棲息状況を調査し、汚染防止に係る監視と制御体制確立への提案を行い、これをもって公衆浴場等の衛生管理の向上と国民の健康増進に寄与するものである。

B. 研究方法

温度耐性アメーバの収集は全国14箇所の衛生研究所の協力を得て実施した。すなわち、温泉を含む循環式浴用水、各種温排水、その他の人工/自然の温水を対象として14地域307施設827温水試料から *N. fowleri* の分離を主目的としてアメーバの検出を行った。アメーバの検出には大

腸菌を塗布した寒天平板培地を使用した。大腸菌は1時間60°C処理を行ったDH1株を使用した。温水試料は1mlの原液および50mlからの遠心濃縮液を用いた。これらを寒天平板培地上に塗布し、十分に乾燥させた後に42°Cで3日から7日の間、倒置培養した。試料の一部に浴槽内壁等のぬぐい液（スワブ）が含まれており、これらについては適宜懸濁液を作成し、培養に供した。出現したアメーバのコロニー（肉眼ではブランクとして観察される）を新しい寒天平板培地に植え継ぎ、観察、PCR、アイソザイムパターン解析に十分な細胞数に増殖するまで数日間培養した。1試料ごとに10株前後を目標に分離を行った。

寒天平板培地上で生育したアメーバの同定は、微分干渉顕微鏡による形態観察により行った。寒天平板上のアメーバは滅菌水のピペッティングにより吸い上げ、スライドガラスチャンバーに入れた。35~42°Cでしばらく保温の後、顕微鏡観察に供した。*Naegleria* 属等の同定は、スライドチャンバー内で誘発される有鞭毛期の確認（鞭毛誘発試験）によって行った。図1に *Naegleria* 属アメーバの微分干渉顕微鏡写真を示した。以下に主なアメーバの形態的特徴を要約した。

Naegleria : 通常、20-40μm程度、それ以下の大きさの太い棍棒状（リマックス型）のアメーバで、運動方向に向けて透明な仮足を連続的に形成する。仮足の形成は風船が勢いよくふくらむ様に似る（eruptive）。これらの形態的特徴は *Vahlkampfiidae* (科) のアメーバに共通するが、本属は鞭毛期を有し、通常2本の

鞭毛を形成する。嚢子は $\leq 15\mu\text{m}$ 程度で、蓋を有している。

Hartmannella: 細長く伸びた棍棒状の形態をし、大きさは $40\mu\text{m}$ 以下である。先端には透明冠が見られるが、透明冠の幅が体幅を超えることはない。仮足は移動方向を変えるとき以外には見られない。浮遊型は数個の短い棍棒状の仮足を持つ。嚢子はほぼ球形で、種により大きさが異なるが平均で $7\sim 9\mu\text{m}$ 。嚢子壁は内外の2層からなるが、外壁は内壁より薄い。

Acanthamoeba: 通常 $25\mu\text{m}$ 程度の扁平なアメーバで、体前端に葉状仮足を出す。透明外皮は狭い。仮足は時に2~3又に分岐し、外形はしばしば不規則となる。

分岐し、外形はしばしば不規則となる。体前方から体側、時には後方にかけて棘状仮足に覆われる。嚢子は内外2層の壁からなり、内壁は厚く、金平糖状をなすものが多い。外壁は球形から、内壁に沿って不規則のものがある。およそ $\leq 17\mu\text{m}$ 程度の大きさである。

Echinamoeba: 平均で $15\mu\text{m}$ 以下の扁平・小型のアメーバで、扇型、あるいはそれよりも少し伸張した形態を取る。球形で、 $5\sim 7\mu\text{m}$ の嚢子を形成する。

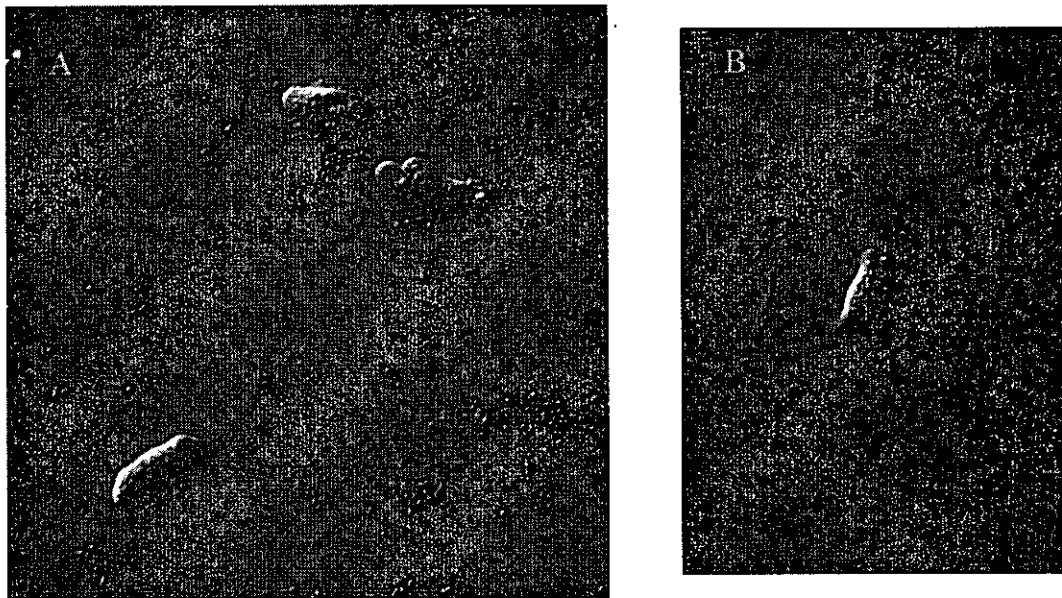


図1 *Naegleria* 属アメーバの微分干渉顕微鏡写真

写真A: *Naegleria* はスライドガラス上に付着し、活発に仮足を出して運動する。写真B: 有鞭毛期へ移行中の栄養体で、2本の鞭毛が観察される。やがて、洋ナシ状に形状を変えて遊泳を始める。遊泳中のアメーバの観察は容易でなく、ヨードヨードカリ液等で固定して鞭毛観察する。

Naegleria 属と同定された株は、PCR法およびアイソザイムパターン解析により *N. fowleri* の同定を行った。

PCR反応の鋳型にはアメーバの懸濁液を用いた。懸濁するアメーバ数が一定となるよう内径5mmの寒天平板用穴あけ器

を用いてブランクの辺縁部位を寒天ごと一定の大きさに切り出した。アメーバを一定量の滅菌水に懸濁後、寒天を除いてから 100°C で 15 分間加熱処理した。PCR プライマーは McLaughlin らのプライマー (5'-CGT ATC TAG TAG ATA GAA CA -3' および 5'-CGT AAC GAC ACA AAC CTA CAG A -3') を使用した⁽⁴⁾。Taq 酵素および緩衝液等は Ex Taq (Takara) を使用した。液量 50 μ l で反応を行い、反応液の組成は表 1 に示した。鋳型には上記抽出液 2 μ l を使用した。反応プログラムは表 2 に示した条件を用いた。PCR 産物は 2% アガロースゲル電気泳動により確認した。

Naegleria 属アメーバの PCR による同定には Pelandakis らのプライマー (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⁽⁵⁾。反応液の組成および反応プログラムは *N. fowleri* 検出用を基本に種々変更して用いた (表 1、2)。

表1 *N. fowleri*検出用PCR反応液組成

試薬	容量
蒸留水	32.9 μ l
10×反応用緩衝液	5.0 μ l
dATP、dCTP、dGTP、dTTP混合液	4.0 μ l
20 μ Mプライマー	1.0 μ l×2
TaqDNAポリメラーゼ (0.5unit)	0.1 μ l
25mM MgCl ₂	4.0 μ l
鋳型DNA	2.0 μ l
計	50.0 μ l

表2 *N. fowleri*検出用PCR反応のパラメーター

初期熱変成	変成	アニーリング	伸張反応	サイクル数	最終伸張反応
94°C、5分	94°C、0.5分	55°C、0.5分	72°C、0.5分	40	72°C、5分

アイソザイムパターン解析は基本的に De Jonckheere の方法に従い、アガロースゲルのかわりにポリアクリルアミドゲルを使用した^(6,7)。概要は次の通りである。寒天平板培地上で活発に増殖中のアメー

バに沿って等電点電気泳動サンプル用フィルター (Amersham Pharmacia Biotech) を置き、ここに濃縮した大腸菌液を 30 μ l 滴下した。これを 30°C または 42°C で 1~2 日培養した。倒立顕微鏡にて虫体の増殖