

厚生労働科学研究費補助金

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

平成 14 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 15 (2003) 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. 分担研究報告書	
1. 温水環境における高温耐性アメーバ類 ー特にネグレリア類の実態調査ー 八木田健司	9
2. <i>Naegleria</i> 属アメーバの PCR/RFLP による検出法に関する研究 泉山 信司	59
3. 本邦におけるアメーバ性髄膜脳炎の臨床病理学的検討 高橋 均	67
4. 診断法の開発および感染経路の解明 福間 利英	81
5. <i>Naegleria</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	89
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	95

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

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。

本年度の疫学調査においても、昨年と同様に温泉浴槽等のアメーバ汚染の実態が確認された。本年度当初において入浴施設を介した大規模なレジオネラ症の集団発生があり、多くの犠牲者を出すに至ったにもかかわらず、浴槽水の微生物対策はその実効性が問われる状況にある。また、今年度の調査で特筆される点は遺伝子解析により新たに *N. australiensis* の存在が初めて明らかとなったことである。*N. australiensis* は実験的にマウスに対して病原性を示すことが知られており、本研究でも実験動物への脳内接種により確認された。本種は全国 9 地域の 54 件の試料水から検出され、その地域的分布は全国的なものであった。その一方で、塩素消毒の有効性が改めて確認され、アメーバの検出率は残留塩素が存在する ($\geq 0.1\text{mg/L}$) 環境で有意に低下することが示された ($p < 0.001$)。具体的な有効濃度についての情報を得ることは無かったが、文献上の有効濃度に比べ低いところで効果が現れているものと推測された。この機序については今後の研究に待たれるが、目下のところ水系からアメーバの餌となる細菌類を減少(殺滅)させることで実効が上がっているものと考えている。

本年度の成果として、ITS 領域を標的とした PCR-RFLP 法および、その遺伝子配列決定をネグレリア属アメーバの分類・同定方として導入・普及した点が上げられる。作業効率の格段の向上と、技術移転が可能となった。

また、アメーバ感染に伴う病理診断において、新たに Bodian 染色法の有効性が明らかとなった点も高く評価される。本染色法の導入によりわが国のアメーバ性脳髄膜脳炎の病原体として、*N. fowleri*、*B. mandrillaris*、*Acanthamoeba sp.* の 3 種が確認されると共に、新たな不明種が存在する可能性が示唆され、アメーバ性脳髄膜炎は症例数が少ないにも関わらず多岐に渡っていることが示唆された。

本研究事業においてモノクローナル抗体作製とプロテオーム解析から、遺伝子情報とその産物である蛋白とが可視的に結びついたことで今後の診断技術等への貢献が期待される。現段階ではわずかな種類の蛋白分子の情報に留まっているが、今後は genome project の発展と併せて加速度的に情報の蓄積が可能となるものと確信している。

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途としている。

髄膜脳炎の病形は *Naegleria fowleri* を病原体とした原発性アメーバ性髄膜脳炎 (Primary Amoebic Meningoencephalitis: PAM) と *Acanthamoeba* 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。本症での治癒例はわずかに4例程度知られているのみで、いずれも感染のごく初期に治療が施されたもので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真正のPAM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。近年では *Acanthamoeba* のみならず、他に *Balamuthia mandrillaris* による脳炎も報告されるにいたり、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、これまでに研究班で確認した6例アメーバ性脳炎患者が報告されている。

わが国では、国民の間に温泉の根強い人気があり、温泉・入浴施設は観光産業として脚光を浴びている。これを背景に、公衆浴場や旅館において循環式浴槽の普及が著しい。平成14年7月には温泉施設を介してレジオネラ症の大規模集団発生があり、およそ300名の患者と7名の死者を出すに至り、浴槽水質の衛生管理を徹底し、健康影響を最小限に抑える必要が生じている。当該研究者らが行ってきたレジオネラ属菌の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、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用水、温排水等における病原アメーバ類の棲息状況(汚染実態)を調査し、汚染防止に係る監視と管理体制確立への提案を目指し、あわせて感染経路の解明を行う。また、健康被害を最小限にとどめるべく、アメーバ性脳炎の早期診断技術と治療方法等の確立を企図している。

B. 研究方法

1. 疫学調査

調査対象および試料採取

前年度と同様、温水環境を形成する温泉、公衆浴場、食品工場、給食施設などの施設を対象に水試料を採取した。調査地域も前年度と同様の14地域とした。試料採取の方法も前年度に準じた。なお、本年度は前年度ネグレリアが高率に検出された施設に着目し、同施設より月単位で経時的に試料を採取することを試みた。また、経時的に反復して調査を行ったデータはのべ数として集計した。結果の集計では原泉系統(原泉、貯湯槽水、ボイラー水を含む)、浴槽系統(内湯、ジャグジー、薬湯、露天を含む)、ろ過系統(ろ過槽)、排水系統(工場排水、浴槽排水を含む)およびその他(地下水などを含む)に分類・集計することを試みた。

アメーバ分離

前年度作成した「アメーバの分離・検出マニュアル」に準じてアメーバの分離を行った。1つの検査試料についてその1ml、および50mlを遠心濃縮して1mlにしたものを大腸菌塗布寒天平板に均一に塗り広げ、これらをマザープレートとし、本年度はより効率的にネグレリアを分離するために、培養温度を42℃一点に絞り、培養後3～4日までに出現したアメーバ集落を回収し、形態的特長および鞭毛誘出試験によりネグレリア属を特定・分離した。

遺伝子解析

PCR-RFLP法による同定法を導入して分離株の同定作業の効率化をはかった。さらに詳細な同定が必要な場合は分類指標となる Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA 領域 (ITS 領域) の遺伝子配列を決定した。方法論については「*Naegleria* 属アメーバの PCR/RFLP による検出法に関する研究」において詳細に記載した。得られた配列の相同性検索は Blast を使用し、アライメントの作成は GCG パッケージプログラムを使用した。NJ 法による系統樹の構築には MEGA2 プログラムを使用した。

アメーバ分離株の感染試験

病原性が疑われる分離株についてはマウスへの感染実験を行ない、病原性の有無を確認した。感染方法は脳内接種あるいは、経鼻感染とした。接種マウスの行動観察は毎日行い、症状の発現を調べた。明らかに昏睡あるいは死亡した場合は、速やかに解剖を行い、脳を摘出後アメーバの再分離を試みた。

2. 検査法の開発

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。マウス B 細胞ハイブリドーマ作製のため、ホルマリン固定アメーバ粗抗原で BALB/c マウスを初期免疫し、抗体価の上昇を確認した後、未固定の生鮮アメーバの腹腔内接種を試みた。抗体価が上昇したことを確認して脾細胞の調製を行い、脾細胞と P3-X63 の細胞融合させた。抗体価の測定には ELISA を用いた。得られたモノクローナル抗体の反応性・特異性をウェスタンブロットにより検討した。併せて、抗原解析を兼ねて 2 次元電気泳動方法により *N. fowleri* および *N. lovaniensis* 両者の全蛋白における相同性を網羅的に比較し、特異タンパク及び属共通タンパク特定を行った。

3. 病理学的検討

わが国で発生した 6 例のアメーバ性脳炎患者を対象とした。全例において臨床病歴抄録を用い臨床学的検討を行った。一部の症例では CT あるいは MRI 画像による検討を加えた。病理組織学的検討には主な脳組織のパラフィン包埋切片を用い、HE、PAS、Bodian およびその他必要な染色を行い顕微鏡観察を行った。一部については電子顕微鏡観察を行った。また症例 6 については、同症例より分離された *Naegleria fowleri* をマウス脳へ接種し、その脳を光学顕微鏡によって観察した。また、病原性が疑われている *N. australiensis* について、同様にマウス脳へ接種し病変の観察を行った。

C. 研究結果及び考察

1. 疫学調査

昨年に引き続き、全国 14 地域、227 施設（のべ 285 施設）から浴槽水、排水、その他の温排水をのべ 626 件採取し、温度耐性 *Naegleria* 属アメーバ類を中心とした汚染実態を調査した。本年度は *Naegleria* 属を調査の中心に据え、PCR-RFLP 法およびその遺伝子配列の解析方法を改良/導入し、迅速かつ的確な分離・同定に努めた。その結果、212 試料（33.9%）から *Naegleria*、*Hartmannella*、*Willaertia*、*Acanthamoeba*、その他の温度耐性アメーバ類が分離された。分離アメーバの総株数は 2,184 株で、そのうち *Naegleria* 属アメーバは 1,183 株におよんだ。そのなかで、最も多く検出されたアメーバ種は *N. lovaniensis* で、わが国の温水環境にあつては本種が優占種であることが確認された。

今年度の調査で特筆される点は、遺伝子解析により新たに *N. australiensis* の存在が明らかとなったことである。本種は実験的にマウスに対して病原性を示すことが知られており、わが国で初めてその存在が確認された。本種は全国 9 地域の 54 件の試料水から検出され、その地域的分布は全国的であつた。同分離株を用いた病原性試験において、脳内接種により実験動物（マウス）で発症・致死させることが確認されたが、本来の感染経路と思われる経鼻感染で感染は成立せず、レファレンス株に比べて病原性は弱い可能性がある。

循環式浴槽から得た試料水のうち、残留塩素の有無の明らかな 223 件についてアメーバ類の分離状況を比較した。その結果、134 件では 0.1mg/L 以上の残留塩素が検出され、89 件は 0.1mg/L 未満の試料であつた。便宜的に 0.1mg/L 以上の残留塩素が検出された場合を「塩素消毒有り」とし、それ未満を「無し」とみなして塩素の有無によるアメーバ汚染状況を比較したところ、アメーバの検出率は残留塩素が存在する環境で有意に低下することが示され（ $p < 0.001$ ）、塩素消毒の効果が確認された。その一方で、浴槽水の残留塩素濃度の管理が徹底されていない状況も見て取れた。

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。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。本年度の最大の特徴は、抗原として接種するアメーバに未固定の生きた虫体を使用した点である。最終的に 9 種のハイブリドーマクローンを得ることができ、予備的な特異性の検討結果から 1 種のハイブリドーマの産生するモノクローナル抗体が *N. fowleri* に高い特異性を有することが判明した。

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方法を検討した。マウスを疾患モデル動物として用いた場合、鼻腔内洗浄毎にマウスを屠殺しないと完全な洗浄は困難であるとの結論に達した。

病原性を有する *Naegleria fowleri* と形態的同一種の *N. lovaniensis* の比較を行うべく、プロテオーム解析を試みた。その結果 *N. fowleri* で 228 個、*N. lovaniensis* で 246 個の種内共通蛋白（スポット）が得られたが、両者の相同率は 38.6% と低いものであつた。N-末アミノ酸配列解析によって、得られた蛋白画分のうち 1 個のスポット (No.16) は *N. fowleri* の膜タンパク MP2CL5 と高い相同性を示すことが示された ($E < 10^{-5}$)。MP2CL5 は *N. fowleri* で遺伝子から組み替え蛋白が作成さ

れたもので、*N. fowleri* の膜に局在する約 17kDa の膜蛋白として報告されている。今回分離された Nf66 株の蛋白画分と MP2CL5 は分子量、生物種とも一致しており、本研究によって初めて特定の遺伝子産物が 2 次元電気泳動による分離に成功した例となった。その後の解析により、*N. lovaniensis* においても N 末端から 20 残基まで MP2CL5 と同じアミノ酸配列を持つ蛋白スポットが存在することが確認された。

3. 病理学的検討

本邦においてこれまでに報告された 6 例のアメーバ性脳髄膜炎、全例について臨床病理学的に比較検討した。その結果、病原アメーバの種別によって臨床・病理像が異なることを確認すると共に、アメーバそのものの形態の相違を認め、形態学的にアメーバを識別できる可能性が示唆された。特に Bodian 染色法は、アメーバ栄養体の細胞膜の嗜銀性が種によって異なることを示し、この方法が極めて有用であることを見いだした。これらの検討から本邦におけるアメーバ性脳髄膜炎の病原体として、*N. fowleri*、*B. mandrillaris*、*Acanthamoeba sp.* の 3 種が確認されると共に、新たな不明種が存在する可能性が示唆され、本邦におけるアメーバ性脳髄膜炎は症例数が少ないにも関わらず多岐に渡っていることが示唆された。また、*N. australiensis* という新たな病原体が出現する可能性が示された。アメーバ感染マウスを用いた疾患モデルの有用性が確認され、今後このモデルを使用してアメーバ性脳髄膜炎の病態メカニズムや形態学的診断への応用が期待される。

D. 結 論

本年度はアメーバの同定方法の改善に向けて PCR/RFLP 法を導入し、迅速化が図られた点は高く評価される。本方法は地衛研への技術移転が比較的容易で、今後の普及が期待される。また、PCR 増幅産物の塩基配列解析によりさらに詳細な種の同定も可能となった。

当該研究年度においては地衛研の協力を得て、広範な地域から温水中アメーバ汚染実態を調査している。本年度はすでにネグレリア汚染が明らかとなっている施設を軸にその後の汚染状況の把握を行った。その結果、わが国の温水環境においては *N. lovaniensis* が優占種であることが確認された。また、わが国で新たに病原性を有する *N. australiensis* の存在が明らかとなった。本種は全国的に分布しており、注意が必要である。アメーバ汚染対策としてレジオネラ対策の一環として進められている浴槽水の残留塩素濃度管理が有効であることがあらためて確認された。

病原性試験において、全国分離された *N. australiensis* 脳内接種により実験動物を発症・致死させることが示されたが、本来の感染経路と思われる経鼻感染で感染は成立しなかった。また、分離株によっては病原性を示さないものも存在した。

アメーバ性髄膜炎の病理学的検討から、Bodian 染色法の有用性が指摘された点も活気的な成果といえる。本染色では細胞膜の嗜銀性が種によって異なり、本邦におけるアメーバ性脳髄膜炎の病原体として、*N. fowleri*、*B. mandrillaris*、*Acanthamoeba sp.* に加え、不明種が存在する可能性が示唆された。本邦におけるアメーバ性脳髄膜炎は症例数が少ないにも関わらず多岐に渡っているという興味深い知見となった。また同時に行われたアメーバ感染マウス脳の詳細な検討から、アメーバ性脳髄膜炎の病態メカニズムや形態学的診断の研究が可能となった。今年度の調査でその存在が明らかとなった *N. australiensis* による症例の洗

い出しも技術的に可能と考えている。

N. fowleri に関するプロテオーム解析に進展が見られ、*N. fowleri* の膜蛋白 MP2CL5 と高い相同性を示すスポット(No.16)を特定した ($E < 10^{-5}$)。MP2CL5 は *N. fowleri* Lee 株で遺伝子が特定され、その組替蛋白が作成されたもので、今回分離した Nf66 株のスポットと MP2CL5 は分子量、生物種とも一致している。さらに、本膜蛋白は、*N. lovaniensis* においても N 末端から 20 残基まで同じアミノ酸配列を持つ画分が存在することが確認された。今後は特異抗原として診断等への応用が期待される。

E. 学会発表

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)

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 Porkers 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、福間利英、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(Sanitaly Problmes of 24th-Bath and Admiunistrative 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.

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

厚生労働科学研究費補助金（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

温水環境における高温耐性アメーバ類、特にネグレリア類の実態調査

分担研究者：	八木田健司	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	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)
研究協力者：	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)
	朝倉登喜子	(国立感染症研究所 寄生動物部)
	堀内 雅人	(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)
	斉藤 紀行	(宮城県保健環境センター)
	佐々木美江	(宮城県保健環境センター)
	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)
	板垣 道代	(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)
	田口 寛	(京都府保健環境研究所)
	中嶋 洋	(岡山県環境保健センター)
	柏木 淳子	(鳥取県衛生環境研究所)
	鳥谷 竜哉	(愛媛県立衛生環境研究所)
	村上 光一	(福岡県保健環境研究所)
	田栗 利紹	(長崎県衛生公害研究所)

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。

昨年に引き続き、全国 14 地域、227 施設（のべ 285 施設）から浴槽水、排水、その他の温排水をのべ 626 件採取し、温度耐性 *Naegleria* 属アメーバ類を中心とした汚染実態を調査した。本年度は *Naegleria* 属を調査の中心に据え、PCR-RFLP 法およびその遺伝子配列の解析方法を改良/導入し、迅速かつ的確な分離・同定に努めた。その結果、212 試料（33.9%）から *Naegleria*、*Hartmannella*、*Willaertia*、*Acanthamoeba*、その他の温度耐性アメーバ類が分離された。得られた分離アメーバの総株数は 2,184 株で、そのうち *Naegleria* 属アメーバは 1,183 株におよんだ。そのなかで、最も多く検出されたアメーバ種は *Naegleria lovaniensis* で、わが国の温水環境にあっては本種が優占種であることが確認された。

今年度の調査で特筆される点は、遺伝子解析により新たに *N. australiensis* の存在が明らかとなったことである。*N. australiensis* は実験的にマウスに対して病原性を示すことが知られており、わが国で初めてその存在が確認された。本種は全国 9 地域の 54 件の試料水から検出され、その地域的分布は全国的であった。同分離株を用いた病原性試験において、脳内接種により実験動物（マウス）で発症・致死させることが確認されたが、本来の感染経路と思われる経鼻感染で感染は成立しなかった。循環式浴槽から得た試料水のうち、残留塩素の有無の明らかな 223 件についてアメーバ類の分離状況を比較した。その結果、134 件では 0.1mg/L 以上の残留塩素が検出され、89 件は 0.1mg/L 未満の試料であった。便宜的に 0.1mg/L 以上の残留塩素が検出された場合を「塩素消毒有り」とし、それ未満を「無し」とみなして塩素の有無によるアメーバ汚染状況を比較したところ、アメーバの検出率は残留塩素が存在する環境で有意に低下することが示され ($p < 0.001$)、塩素消毒の効果が確認された。その一方で、上述の大規模集団感染事例が発生したにもかかわらず、浴槽水の残留塩素濃度の管理が徹底されていない状況も見て取れた。

A.研究目的

わが国では、国民の間に温泉の根強い人気があり、温泉・入浴施設は観光産業として脚光を浴びている。これを背景に、公衆浴場や旅館において循環式浴槽の普及が著しい。平成 14 年 7 月には温泉施設を介してレジオネラ症の大規模集団発生があり、およそ 300 名の患者と 7 名の死者を出すに至り、浴槽水質の衛生管理を徹底し、健康影響を最小限に抑える必要が生じている。当該研究者らが行ってきたレジオネラ属菌の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、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用水、温排水等における病原アメーバ類の棲息状況（汚染実態）を調査し、汚染防止に係る監視と管理体制確立への提案を目指し、あわせて感染経路の解明を行う。

前年度に引続き、温水環境における高温耐性アメーバ類、特にネグレリア属アメーバ類の汚染実態調査を行った。前年度の成績では、アメーバ性髄膜脳炎の病原体であり、本研究事業で探索の第 1 の標的となっている *Naegleria fowleri* に関しては検出がされなかった。しかしながら、ネグレリア属は浴槽水およびその排水等の試料から高率に検出されることなど、全国的な温水環境の汚染実態を部分的に明らかにすることができた。本年度は、さらにアメーバの分離方法、および同定方法を改善し、効率的にネグレリア属アメーバ類を検出することに努力し、特に *Naegleria fowleri* を始めとする病原性を有する本属アメーバによる温水環境の汚染実態の把握、汚染防止方法、また、これまでにわが国で発生した自由生活性アメーバ類による患者髄膜脳炎症例の病理学的な再検討を行い、原因となったアメーバ種の解析を行った。

B.研究方法

調査対象および試料採取

前年度と同様、温水環境を形成する温泉、公衆浴場、食品工場、給食施設などの施設を対象に水試料を採取した。調査地域も前年度と同様の A~N までの 14 地域とした。試料採取の方法も前年度に準じた。なお、本年度は前年度ネグレリアが高率に検出された施設に着目し、同施設より月単位で経時的に試料を採取することを試みた。また経時的に反復して調査を行った場合は、調査データとしての施設数は、同一施設であっても調べた回数をのべ施設数として集計した。結果の集計では原泉系統（原泉、貯湯漕水、ボイラー水を含む）、浴槽系統（内湯、ジャグジー、薬湯、露天を含む）、ろ過系統（ろ過漕）、排水系統（工場排水、浴槽排水を含む）およびその他（地下水などを含む）に分類・集計することを試みた。

アメーバの分離

前年度作成した「アメーバの分離・検出マニュアル」に準じてアメーバの分離を行った。1つの検査試料についてその 1ml、および 50ml を遠心濃縮して 1ml にしたものを大腸菌塗布寒天平板に均一に塗り広げ、これらをマザープレートとすることは前年度と同様とし、本年度は、前年度のアメーバ検出結果を踏まえ、より効率的にネグレリアを分離するために、培養温度を 42°C とし、培養後 3~4 日までに出現したアメーバ集落をクローニングし、形態的特長および鞭毛誘出試験によりネグレリア属を特定・分離した。

遺伝子解析

アメーバ分離株は形態学的な特徴を観察するとともに、ネグレリア属検出を目的とした PCR-RFLP 法による同定法を導入して分離株の同定作業の効率化をはかった。さらに詳細な同定が必要な場合は分類指標となる Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA 領域（ITS 領域）の遺伝子配列を決定した。方法論については別途報告書「*Naegleria* 属アメーバの PCR/RFLP による検出法に関する研究」で詳細に記載した。

その概要は、PCR の設計は基本的に Pelandakis and Pernin (2002) の方法に従い、ITS 領域に特異的なプライマー、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。PCR 産物は QIAquick PCR purification kit (Qiagen) を用いて精製し、配列決定用試薬に BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いた。塩基配列決定には ABI-310 (Applied Biosystems) を使用した。得られた配列の相同性検索は Blast を使用し、アライメントの作成は GCG パッケージプログラムを使用した。NJ 法による系統樹の構築には MEGA2 プログラムを使用した。

アメーバ分離株の感染試験

大腸菌塗布寒天培地上に増殖するアメーバ栄養体を滅菌蒸留水で浮遊させ、シャーレより遠心管に移し、4°C で遠心 (1,000xg、5 分間) し上清を除いた。この行程を 2 回繰返し、混在するバクテリアを可能な限り除去後、滅菌蒸留水で濃度を 1×10^4 細胞/ μ l に

調整した。対照実験用には *N. fowleri* として、くるめ株および Nf66 株 (ATCC30214) また *N. australiensis* として pp397 (ATCC30958) を用いた。これらは SCGYE 培地で無菌培養したものを用い、PBS で洗浄後、PBS で濃度を 1×10^4 細胞/ μl に調整した。さらに、別の調査で得られた *N. australiensis* の環境分離株 105-12 および 17-1 を用いた。これらは大腸菌培養株であるので、それに応じた方法で濃度調整を行った。

マウスは ddY 系統、メス 4 週齢を用い、以下の 2 通りの感染方法を用いた。1) 2 段針を用いて直接脳内 (側頭部) に $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 細胞を接種した。2) アメーバ浮遊液を鼻腔内に滴下、吸引させ $2.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 細胞を感染させた。各実験区のマウス頭数は、脳内接種実験に 3~4 頭、経鼻感染には 5 頭を用いた。感染マウスの行動観察は毎日行い、異常の有無、症状の発現を調べた。明らかに昏睡あるいは死亡した場合は、速やかに解剖を行い、脳を摘出後その一部を SCGYE 培地、あるいは vero 細胞とともに MEM 培地で共培養しアメーバの分離を試みた。

C. 結果および考察

温水環境と微生物叢

平成 14 年 7 月に宮崎県日向市において入浴施設を会した大規模なレジオネラ症集団感染事例が発生し、これを重くみて厚生労働省の指導のもとでレジオネラを中心とした浴用水中の微生物管理、具体的には塩素消毒と洗浄の徹底がはかられてきた。本来、レジオネラ対策は入浴施設内 (循環式浴槽施設) のバイオフィーム対策で、特にアメーバはレジオネラ属菌の宿主であることから対策上の重要な対象となっている。

今日、なぜレジオネラあるいはアメーバが問題となっているのかと言えば、我々の身の周りに温水環境が増えたことが原因している。温水環境は空調設備の冷却水、循環式浴槽、給湯器、貯湯器、加湿器等々きわめて多様な形態をとりながら存在している。このような設備で使われている水は飲用、浴用等で人と直接に触れたり、エアロゾルとして吸引される可能性がある。その一方で微生物学的な汚染防止が難しいという問題を抱えている。

中でも、循環式入浴施設の抱える問題点を指摘せざるを得ない。循環式浴槽の構造は、系内に発生したバイオフィームが結果的に浴用水に溶けた蛋白質などの汚れを除去する機能を担っている。バイオフィームとは、多様な微生物によって構成された生態系全体を指すもので、アメーバ類はその生態系の頂点の一角に位置する微生物である。したがって、ろ過槽などに雑菌が繁殖すると、やがてこれを餌にアメーバ等が繁殖することになる。このアメーバ類を宿主としてレジオネラ属菌が寄生・増殖することはよく知られたところである。すなわち、水の浄化能力を高める (微生物を繁殖させる) ことはアメーバ (やレジオネラ) の繁殖を助長することでもある。一方、アメーバの汚染防止措置、すなわち消毒、とは微生物の繁殖を抑えることで、浄化システムのうちの 1 つを破壊することに他ならない。すなわち、微生物対策と浴用水の浄化とは互いに相容れない背反した事象で、システム自体に矛盾を抱えていることが判る。現在の技術では温水系に繁殖してくる微生物種を正確にコントロール、例えばアメーバ類のみを殺菌することは不可能である。

図 1a には昨年度及び今年度の地域別アメーバの分離状況を示したものである。上述のような社会的背景を踏まえれば、今年度はアメーバの分離数が激減するものと予想された。全体として減る傾向 (D,G,H,I,K) が見られたものの、逆に増加した地域 (A,C,J) もあった。両年度にわたり同一対象を調査してはいないものの、このような結果からは浴槽水等における微生物管理が必ずしも徹底されていない状況が示唆された。また、図 1b はネグレリア属アメーバに限った分離成績を示したもので、本年度はネグレリアの分離率が顕著に向上していることが見て取れる。ここに至った要因としては協力研究者の技術の向上、PCR-RFLP 法によるネグレリア属アメーバ類の同定法の改良等が上げられる。本研究事業の目的の 1 つに検査方法の開発・改良とその普及があるが、着実に成果を上げているものと認識している。

アメーバ類の分離状況

本年度の研究事業では全国 14 地域において施設総数 285、試料総数 626 を検査し 2,184 株のアメーバを分離した。全体的な調査結果を表-1 にまとめた。すなわち、2,184 株のアメーバのうち 1183 株 (54.2%) のアメーバが形態学的にネグレリア属と同定された。分離されたネグレリアは PCR-RFLP 法、遺伝子解析および、アイソザイム解析から、*Naegleria lovaniensis*、*N. australiensis*、*N. italica*、*N. philippinensis* の 4 種類、あるいは、それらに極めて近縁な種が確認され、その他にも種が確定されていないネグレリアが多数検出された (表-2)。なお、本論文においては遺伝子解析により極めて高い相同性を有するものを暫定的に最も近似した既知の種名で表現することとした。

昨年および今年度の解析結果から、わが国の温水環境におけるネグレリア属アメーバ類の中では *N. lovaniensis* が優占種であることが確認された。すなわち、今年度の解析結果によると *N. lovaniensis* はネグレリア属アメーバのおよそ半数にあたる 577 株を占めた。次いで *N. australiensis* が 416 株分離された。しかしながら、調査の初期段階で *N. australiensis* が分離された地域では積極的にネグレリア株の分離が行われたため、地域ごとの分離アメーバ数に著しい差異 (4 株~792 株) が生じ、上述の出現頻度は統計的な意味合いに欠けるものと判断された (地域別クローン数集計)。試料水を単位として *Naegleria* 属アメーバ類の検出状況をまとめると (表-3)、626 件の試料水のうち 212 件 (約 34%) でアメーバ陽性、そのうち 141 件 (23%) が *Naegleria* 属陽性となり、*N. australiensis*、*N. australiensis* が分離された試料水はのべで 95 件および 54 (12+28+14) 件であった。*N. australiensis* が分離された地域は 9 地域におよび、その分布状況からは全国的に広く分布するものと推測されることから、今後とも注意する必要があるものと考えられる。なお、昨年に引き続き本年度の調査においても *N. fowleri* を検出するに至らなかったことを付記する。

本年度の調査で特筆すべき点は、遺伝子解析により新たに *N. australiensis* の存在が明らかとなったことである。*N. australiensis* は実験的にマウスに対して病原性を示すことが知られており、わが国で初めて存在が確認された。本論文の後段で詳細に記載するが、*N. australiensis* について病原性試験を行ったところ、脳内接種により実験動物 (ハツカネズミ) で発症・致死させることが確認されたが、本来の感染経路と思われる経鼻感染で感染は成立しなかった。また、分離株によって病原性に差があることも明らかとなっ

た。

その他にネグレリア以外のアメーバ類として *Acanthamoeba*、*Hartmannella*、*Platyamoeba*、*Vannella*、*Echinamoeba*、*Rhizamoeba* などが分離されたが、これらに関する詳細な解析は本年度は行わず、その他のアメーバとして一括した。

地域別アメーバ検出結果

調査対象となった施設の総のべ数は前年度と同程度であったが、今年度は前回の調査で汚染の確認されている施設を中心に定点観察に重点を置いたこともあり、各地域の調査施設は 10 施設以内（2-97 施設）が多かった。ネグレリア属アメーバ類はすべての地域より検出されたが、その検出率は 3.6%（L）～100%（C）と大きな差が見られた。優占種である *N. lovaniensis* は 12 地域より検出され、全国的な分布が確認された。*N. australiensis* に関する詳細な遺伝子解析（ITS 領域を対象）によると、基準種（reference strain）の PP397 株と全く同一の遺伝子型を示す株（T4）と、わずかに異なった遺伝子配列を有する株（T6）とが存在することが明らかとなっている（図-2）。これらの株はそれぞれ 8 地域、5 地域から分離されており、T6 株の分離された全て地域で T4 株も分離された。なお、今年度の調査では一部 T4/T6 が峻別されていない地域が残されており、引き続き解析中である。この他、*N. philippinensis* は 4 地域、*N. italica* は 1 地域から分離された。

これらのネグレリア株から得られた塩基配列を基に系統樹を作成した結果、分離株のいくつかは、実際に病原性の報告されている *N. australiensis*、*N. philippinensis*、*N. italica* の標準株に近い種であることが確認された（図-3）。

採取環境別アメーバ検出結果

表-4 には試料を 5 種類の系統に分類し、さらに具体的な採取環境が分かるように試料別に分類し整理した。原泉系統は原泉が 7 試料、原泉貯蔵用の貯湯槽水 6 試料等の 14 試料が調査対象であった。浴槽としては、大小の内湯が 382 試料、主に薬湯などの特殊浴槽が 16 試料、また、打たせ湯、ジャグジー、ジェット風呂、超音波発生装置などを具備し、機能性を持たせた浴槽の水が 48 試料、露天浴槽が 65 試料の計 511 試料が調査された。ろ過系統としては、循環式浴槽附設のろ過装置内の水 21 試料を調べることができた。排水系統としては、温泉、公衆浴場の浴槽からの浴槽排水として 39 試料、食品加工、魚肉・豚肉加工、牛乳加工あるいは給食施設の工場排水が 38 試料の計 77 試料が調べられた。その他としては、地下水、魚類飼育用水槽の水槽水、飲用用温泉水が合計 3 試料あった。

アメーバの検出率は排水系統で最も高く、浴槽排水で 84.6%、工場排水で 63.2%に達した。浴槽系統、ろ過系統での検出率は、26.7%~43.8%であった原泉系統の汚染状況については試料数が少ないことから統計的な意味合いは無いが、貯湯槽水からアメーバが検出されたことは注意する必要があると考えている。すなわち、今回の結果は従来から指摘されていたように源泉の微生物汚染は殆んど考えられないが、一旦、温水を貯留すると管理次第で汚染が始まることを示しているといつてよい。

本調査で排水系のアメーバ汚染状況を調査したのは、基本的に循環式浴槽系の単位を

浴槽水、配管系、ろ過系に排水系を加えたものとするべきと考えているからである。アメーバ類の移動能力を考慮すれば排水系統から遡上して浴槽に至ることは十分に想定される。排水系のバイオフィルム対策は浴槽に比べてはるかに悪いことが想像され、排水系の汚染実態の把握は浴槽水の汚染を強調した形で捉えることができるものと考えている。調査件数は少ないものの排水系からは *N. lovaniensis* よりも *N. australiensis* が高率に分離されていた点に注目している。

施設管理状況。水質学的要因、消毒等との関係

本研究事業において多くの研究者協力者が抱えた問題として、試料水採取に際して塩素消毒あるいは事前の洗浄が徹底されている浴場施設が多かったことである。また、残留塩素濃度とアメーバ分離状況との間に安定した規則性が認められない点も指摘された。

循環式浴槽から得た試料水のうち、残留塩素の有無の明らかなもの 223 件についてアメーバ類の分離状況を比較した (図-4)。そのうち 134 件は残留塩素が 0.1mg/L 以上検出され、89 件は 0.1mg/L 未満であった。便宜的に 0.1mg/L 以上の残留塩素が検出された場合を塩素消毒有りとし、それ未満を無しとみなして塩素の有無によるアメーバ汚染状況を比較した。その結果、図-4 で明らかなように全アメーバ類の検出状況でもネグレリア属アメーバに限った検出状況をみても、残留塩素のある環境では有意に検出率が低下しており ($p < 0.001$)、塩素消毒の効果が示された。

さらに、その内容を詳しく検討するため、アメーバ類の検出と一般細菌数および残留塩素濃度等の管理状況との関連について解析を試みた。今回の調査では、試料水の物理・化学組成として水温、pH、電気電導度や泉質および、管理状況 (循環式、掛け流しの別、また残留塩素濃度値)、さらには微生物学的な項目として一般細菌数および大腸菌数を設定し、可能な範囲で聞き取り調査および水質検査を並行して行った。アメーバ類の汚染要因としては、その栄養源となる細菌類の存在と、浴槽のあるいは循環系全体の管理状況との関連を知ることが重要と考えられる。本調査では 46 施設について、アメーバ類の検出と一般細菌数および残留塩素濃度等の管理状況を同時に調べることができた。内訳は、循環式浴槽が 40 施設、97 浴槽、掛け流し式と報告された施設が 6 件、27 浴槽あった。図-5a-c に循環式管理浴槽におけるアメーバ類の検出状況と一般細菌数および残留塩素濃度との関係を、同様に図-6a,b に掛け流し浴槽の場合を示した。

図-5a にはネグレリア属アメーバ類陽性/陰性の試料水について、一般細菌数 (指数) ごと出現頻度を示した。これによると 1) ネグレリア陽性の試料水中に一般細菌が出現しないような例は認められなかったこと、2) ネグレリア陰性であった試料水中の一般細菌数は右肩下がりの分布を示していることが示された。次に、塩素の有無と一般細菌数 (指数) ごとの試料水の分布頻度を図-5b に示した。この図から、1) 残留塩素が検出される試料水においては一般細菌数は 10^3 個/ml 以上検出された例はなかったこと、一方、2) 塩素管理されていても一般細菌が 10^2 個/ml までは観察されること、3) 残留塩素が存在しない場合、 10^3 個/ml の一般細菌を含む試料水が最も多くみられ、その分布様式はなだらかな一峰性を示した ($0 - 10^6$ 個/ml)。図-5c では試料水中の一般細菌数とネグレリアの検出頻度を棒グラフで表し (Y 軸は左側に従う)、加えて検出頻度の変

化量を折線グラフで表した（Y 軸は右側に従う）。1）一般細菌が認められない試料水ではアメーバは不検出であったこと、2）一般細菌数が増えるにしたがってアメーバの検出頻度が増加し、 10^3 個/ml 以上の試料水ではその 6 割以上からネグレリア属アメーバが検出された。3）一般細菌数が 10^2 個/ml と 10^3 個/ml の間でアメーバ検出頻度の変化量が最も大きく、この間でアメーバ汚染の危険性が大きく変化する可能性が指摘されることなどが示された。

一方、掛け流し式浴槽由来の試料水では残留塩素濃度はすべて 0.1 未満であり、試料水中の一般細菌数（指数）ごと試料水は、 10^{2-5} 個/ml に分布し、その分布は右肩上がりであった。これに呼応して、ネグレリアの検出された試料水は 60 - 80% であった。すなわち、掛け流し式と申告されている入浴施設の大半は塩素管理がされておらず、アメーバ汚染は深刻な状況にあった。この原因は不明であるが、掛け流し式を謳う施設にあっても、その実は浴槽水が長期間滞留している実態を反映したものとも取れる結果であった。

なお、当該研究において排水についてもアメーバ調査を行ったが、浴槽排水は 39 試料に留まった。その 33 試料水（84.6%）からアメーバ類が検出されている（表-4）。これらのうち残留塩素が無いか塩素の有無が不明の試料水ではおよそ 91%（31/34）からアメーバが検出されている。アメーバ類は運動性を有し、流水を遡上する能力を備えている。したがって、排水系が常にアメーバに汚染されている場合には管理次第によって汚染が浴槽水にまで波及することが懸念される点を指摘したい。今後の調査においては、排水を調査対象とすることの是非について積極的に検討したい。

アメーバ分離株の感染実験

本調査で分離された *N. australiensis*, *N. philippinensis*, *N. italica* の分離株について、マウスを用いた病原性試験を行った結果を表-5 にまとめた。本調査で分離された *N. australiensis* H4-9 および K187 分離株は、脳内接種、経鼻感染いずれの場合も感染が成立しなかった。また *N. philippinensis* H25-4、H25-8 ならびに *N. italica* N121、123 も脳注感染でマウスは生存した。また、対照として用いた *N. australiensis* のレファレンス株 pp397 でも、いずれの感染方法でもマウスは生存したが、*N. australiensis* 105-12 分離株を脳内接種されたマウスは 3~9 日の間に全頭死亡した。その剖検脳組織からは試験したアメーバが再分離され、感染が証明された。ただし、同株の経鼻感染では感染の成立を見なかった。*N. fowleri* くるめ株は脳内接種でマウスの死亡が確認され（感染 7 日後）、Nf66 株では経鼻感染で死亡が確認された（感染 5 日後）。なお、*N. australiensis* H4-9 および K187 は ELISA による抗体価測定で、脳注感染マウスではほぼ全頭が明確な IgG 抗体価上昇を示し、H4-9 では鼻腔感染マウスの一部に抗体価上昇が認められた。

D. 結論

前年度調査の結果から、温水環境におけるネグレリア属アメーバの国内分布の特徴として、浴槽水からはおよそ 16%、浴槽排水からはおよそ 47%、また水温が低めの工場排水でもおよそ 15% の検出率が見られ、アメーバの存在量からみると排水試料の方が浴槽水試料よりも多いことが示された。この成績を踏まえ、本年度は短期間培養でネグレ

リア属アメーバを集中的に検出するよう努めた。さらに PCR-RFLP 法の導入により分離株の迅速な解析を行うことで、各種ネグレリアの効率的な分離・同定を図った。その結果、ネグレリア全体としての検出率は浴槽系統試料で 14~20%とほぼ前年度と同様ではあったが、排水系統の試料からの検出率はおよそ 60%に上昇し、また種類としては *N. lovaniensis* が優占種であることが再確認され、さらに *N. australiensis* が検出されたことが明らかとなった。検出方法の改良はネグレリア解析の向上に有効であったと考えられた。ちなみに、本年度も *N. fowleri* は検出されなかった。

ネグレリア分離株の遺伝子解析と、それに基づく系統樹解析は、国内の温水環境に存在する病原性アメーバとして *N. australiensis* に加え *N. philippinensis*, *N. italica* が存在することを明らかにした。これまで、*N. australiensis* は温泉あるいは公衆浴場からの検出例がほとんどなかった中で (Rivera,1989)、浴槽水とその排水より検出に成功した今回の結果は疫学的に重要な知見と考えられる。*N. italica* および *N. philippinensis* はともに *N. australiensis* を含む大きなクラスター (群) に含まれており、実験的には病原性が認められている。*N. italica* はイタリアの浴場 (spa) から分離されたネグレリアで、世界的に極めて分離例が少ない (Scaglia,1987)。*N. philippinensis* はフィリピンの河川、温水プールにて分離されたものである。これらのネグレリア種の分離株について、一部ではあるが病原性を調べたが、わが国の *N. italica* および *N. philippinensis* 分離株はマウスに対し致死的不是ではなく、その病原性は低いものと考えられた。*N. australiensis* は株による病原性に差があることが知られる (John DT. 1985、1995)。今回 T4 タイプにマウス致死的な病原性が認められたのに対し、T6 タイプに関してはその病原性は低いものと考えられた。*N. australiensis* の中での病原性の差がタイプの違いによるものかは、今後の検討課題である。本調査で検出された *N. australiensis* をはじめとする病原性アメーバ類は、検出率ならびに分布状況からみてその実態は限局的な存在と想定されるが、公衆衛生上の問題点を明らかにするにはさらにデータが必要である。バイオフィルムの多い排水管内等に主に定着しているものか、あるいは浴槽水中にも存在するのか、またろ過装置内に潜在しているのか、今後の調査で明らかにする必要がある。

国内の温泉、公衆浴場は近年、循環式のメンテナンス導入が進んでおり、アメーバを含め微生物学的な汚染が起りやすい状況にある。今回調査した範囲では、循環式浴槽水の場合、ネグレリアに直接的な効果が期待できない程度の 0.1mg/L という残留塩素濃度が恐らくは一般細菌等の増殖を抑制することで、間接的にネグレリアの検出率を抑える方向に作用している可能性が示唆された。残留塩素濃度が低い、あるいはない場合は、一般細菌の汚染を招き、循環式の場合と同様のネグレリア汚染が生ずることが示され、循環式浴槽に留まらず掛け流し式浴槽の場合にも起りうることを示された。アメーバに限らずレジオネラ対策という点も合わせて考えると、残留塩素濃度管理は現実的な汚染管理手法として位置付けられるが、そこには定期的な濃度測定に基づく適正な管理が求められる。

来年度はさらに調査地域の数を増やすこと、また試料水量のスケールアップと多量の分離株の迅速解析で積極的に *N. fowleri* の検出を試み、また *N. australiensis* をはじめとする病原性アメーバ類のより正確な分布を把握したい。