

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

平成 15 年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 遠藤 卓郎

平成 16 (2004) 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 －特にネグレリア類の実態調査－ 八木田健司・泉山 信司・黒木 俊郎	11
2. ネグレリア属アメーバの遺伝子型別 泉山 信司・八木田健司・黒木 俊郎	91
3. 本邦におけるアメーバ性髄膜脳炎およびマウス感染実験例を 用いた病理組織学的・免疫組織科学的検討 高橋 均	113
4. 診断法の開発 福間 利英	133
5. <i>Naegleria</i> 及びその近縁種 <i>N. lovaniensis</i> における タンパク組成の比較 泉山 信司・八木田健司	141
6. <i>Naegleria fowleri</i> と粘膜感染防御機構との関係 福間 利英	151
7. 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 八木田健司・泉山 信司・黒木 俊郎	159
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	179

# I. 総括研究報告書

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）  
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 寄生動物部 部長

分担研究者 福間利英 久留米大学 医学部 教授  
高橋均 新潟大学脳研究所 教授  
黒木俊郎 神奈川県衛生研究所 微生物部 主任研究員  
八木田健司 国立感染症研究所 寄生動物部 主任研究官  
泉山信司 国立感染症研究所 寄生動物部 研究員

**研究要旨：** 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。平成14年度には国内最大のレジオネラ症集団感染が発生し、問題の深さを露呈した。このような事例を教訓に、あらたな脅威となり得る病原微生物に対して監視ならびに予防措置を予め講じる周到さが要求されている。当該研究は温水を棲息場所とする *Naegleria fowleri*、*Acanthamoeba spp.* および *Balamuthia mandrillaris* 等の髄膜脳炎の起因アメーバ類、特にネグレリア属アメーバを対象として汚染実態調査、検査・診断法の普及・開発を企図し、併せて本症の病理学的な洞察を深めることにあった。併せて、本研究事業を通じて協力地方衛生研究所にアメーバの分離・解析技術の普及が図られた。

本年度は、全国14地域の地衛研の協力を得て全国25地域からのべ631施設、1,173試料を検査した。試料総数1,173に対し、いずれかのアメーバが検出された試料は357(30.4%)件、ネグレリア属アメーバ陽性であった試料は173(14.7%)件であった。ネグレリア属アメーバの簡易分類法の開発とそれを用いた解析により、日本各地で病原性を有する *N. australiensis*、*N. philippinensis* の棲息が確認され、マウスに対する致死的な障害性が実証された。これまでのところ、これらのアメーバ種は体表の傷口や粘膜あるいは、経鼻的な感染の証拠は無く、感染力は *N. fowleri* に比べてはるかに劣るものと判断された。しかしながら、入浴者への不測の感染事故を回避する上で汚染防止は必須と考える。浴用水におけるアメーバ汚染管理として塩素消毒が有効であることが確認され、有効遊離残留塩素濃度は0.2mg/L以上であることが示された。

*N. fowleri* の抗原に関して二次元電気泳動により分画されたタンパクスポットに関

して、N 末端および中間アミノ酸配列解析、質量分析およびウェスタンブロット解析等によるタンパクの同定を行ない、一部のアミノ酸配列を公開している。

特異蛍光抗体法によりわが国のアメーバ性髄膜脳炎の全例についてその起因アメーバ種を特定した。その結果、わが国の症例は *N. fowleri* および *Acanthamoeba* sp. による脳炎患者が各 1 名、他の 4 例は全て *B. mandrillaris* に起因することが証明された。さらに、マウスを用いた感染実験により髄膜脳炎の初期像を検討し、病態発症メカニズムについて明らかにすると共に、ヒト剖検脳の病理組織像との比較をすることができた。

## A. 研究目的

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* や *Balamuthia* 感染に起因する肉芽腫性アメーバ性脳炎 (Granulomatous amoebic encephalitis: GAE) 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。わが国では 1996 年に佐賀県で原発性アメーバ性髄膜脳炎による死亡例が発生している。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 *Acanthamoeba* の日和見感染とされていたが、近年、健常者での *B. mandrillaris* による脳炎が報告されている。わが国では、これまでに 6 例のアメーバ性脳炎患者が報告されているが、病原アメーバの特定(確定診断)がなされていない症例があるのに加えて、感染源や感染経路などに関しては解明されていない。これらの病原アメーバは温水を棲息域としているものと考えられている。一方、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では、循環式浴槽にアメーバ汚染が著しく、特にろ過槽内の汚泥に多様なアメーバ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、(1)疫学、(2)検査法の開発、(3)病理学的検討の 3 項目を柱とし、ネグレリア属アメーバを中心としたアメーバ類の検出・同定法の開発・普及、温泉を含む浴槽水、温排水等における病原アメーバ類の汚染実態の調査と汚染防止策の検討、アメーバ性脳炎の早期診断技術の確立、各種アメーバの感染モデルを用いて中枢神経系における病理組織学的検討、本邦 6 例のアメーバ性髄膜脳炎剖検脳に間する病理組織学的再検討と免疫組織学的な起因アメーバ種の特定等々に関する研究を行った。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。

## B. 研究方法

### 1. 疫学調査

#### 1.1. 調査対象および試料採取

全国 14 箇所の協力地衛研の管轄区域とその近隣県へ調査協力を募り、温泉原水、浴用水、浴槽排水、食品工場、給食施設からの工場温排水などを採取し、検査対象とした。前年度の検出結果を参照に、一部の施設では月単位で試料を採取し経時的な変化を検討した。浴用水試料水については可能なかぎり入浴施設の分類、水温、泉質、pH、遊離残留塩素濃度、電気伝導度、過マンガン酸カリ消費量、換水等の管理状況、大腸菌群、一般細菌数等の情報収集に

努め、これら諸因子とアメーバ検出状況との相関性について解析を試みた。

## 1.2. アメーバの分離

試料水1検体につき、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てアメーバの分離を行った。培養温度を42°C一点に絞り、培養期間を3~4日に限定してその間に出現したアメーバ集落を回収し、形態的観察および鞭毛誘出試験によりネグレリア属アメーバを分離・同定した。本研究を通して得られた技術成果は『ネグレリア類を中心とした高温耐性アメーバ類の検査マニュアル』の改訂に有効利用された。

## 1.3. アメーバ分離株の感染試験

遺伝子型別により病原種あるいはその近縁種と同定された分離株についてはマウスへの感染実験を行った。接種方法は脳内接種と経鼻感染、皮内接種の3通りの方法を採用し、接種後、マウスを継時観察し、健康度・行動異常の有無を目視で確認した。必要に応じてマウスを安楽殺し、アメーバの再分離と病理標本の作製を行った。

## 2. 検査法の開発

### 2.1. 遺伝子解析

本研究事業ではPCR/RFLP法に基づくDNAを用いたネグレリア属アメーバの同定方法を開発した。PCR/RFLP法では、PCRで増幅したInternal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA領域(ITS1/ITS2領域)のDNAを制限酵素Mse I、Nla IVで消化し、その切断型から*N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis*を分別した。しかしながら、本方法では上記のアメーバ種に加え、*N. philippinensis*、*N. italica*等の病原性を有するネグレリア属アメーバの型別には不相当であった。加えて、昨年調査で国内の温水環境には多様な種が存在することが明らかとなり、さらに詳細な鑑別指標が必要となった。そこで、PCR反応で得られたITS1/ITS2領域の塩基配列を解析することで詳細な情報を得ることとした。追加情報が必要な場合には、18S rRNAの塩基配列を決定して種別鑑定の補助とした。また、得られた病原種とその近縁種についてはマウスへの感染実験を行った。分離株の無菌培養への順化と維持に努めた。

### 2.2. 単クローン抗体作製と抗原分析

患者由来の*N. fowleri* YT9611株を抗原として単クローン抗体を作製し、プロテオーム解析と連携して抗原検索を行った。*N. fowleri*の特異抗原(蛋白)の検索の方法として、生態的・形態的に近縁種とされる*N. lovaniensis*の二次元電気泳動解析像(2D-PAGE)との比較から*N. fowleri*に特徴的なタンパクスポットの特定を行い、N末端アミノ酸配列解析、LC-MS/MS等による中間アミノ酸配列解析、質量分析あるいは、単クローン抗体を用いたウエスタンブロット解析等々の手法を採用した。これらの得られた情報をもとに*N. fowleri*の2D-PAGEマップを作成し、データベース構築を行った。

59個のタンパクスポットを解析した。そのうち34個のN末端アミノ酸配列(各20

残基程度)を決定し、14個が既知のタンパクと高い相同性を認めた。現在17個のタンパクについてアミノ酸配列を公開している。

### 3. 臨床材料ならびにマウス感染モデルの病理学的検討

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、主な脳組織のパラフィン包埋切片を用い、HE、PAS、Bodian、その他必要な染色を行い顕微鏡観察に供した。一部については電子顕微鏡観察を行った。さらに、抗-*N. fowleri*、抗-*B. mandrillaris*、抗-*Acanthamoeba*の3種類の免疫家兎血清を用い、免疫組織化学的にアメーバ種の特定を行った。

また、*N. fowleri*、*B. mandrillaris*、*A. culbertsoni*によるマウス感染モデルを作成し、病理組織学的検討を行った。

### 4. 倫理面への配慮

国立感染症研究所の病原体取扱管理規定、ならびに実験動物取扱規程に沿って行うこととし、周辺環境の汚染を引き起こさないように十分に配慮した。病理検索に当たっては、各症例とも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厳重に保管し、個人情報の安全性に対し十分に配慮した。

## C. 結果と考察

### 1. 疫学

当該年度では地方衛生研究所等の協力を得て、管轄地域の温泉、公衆浴場、ならびに温排水を排出する食品工場、給食施設などから温水試料を採取し、ネグレリア属アメーバを中心とした自由生活性アメーバ類の汚染実態の把握に努めた。試料採取は計25地域とし、試料採取範囲を拡大した。得られた試料は原水系統(原水、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、他)、ろ過系統(ろ過槽、拭取り、他)、排水系統(浴槽排水、工場排水)および、その他(地下水などを含む)に分けて解析した。なお、同一施設より月単位で経時的に試料を採取し反復調査も行った。検査した試料数はのべ1,173試料におよんだ。平成15年度における全試料を対象としたアメーバの検出率は30.2%で、前年(33.9%)と同程度の汚染であった。平成13年度の48.5%と比較して有意( $p < 0.001$ )に低していた。厚生労働省は都道府県等を通じて塩素による浴用水の衛生管理の徹底を指示しており、その対策が効を奏した結果としてアメーバ検出率の低下につながったものと考えられる。

わが国の温水環境には多様なアメーバが棲息しているが、その中でネグレリア属アメーバは優占的であった。調査期間中に *N. fowleri* は検出されなかったが、ネグレリア属の中では *N. lovaniensis* が際立った優占種であった。本種は *N. fowleri* と形態的同一種で同一環境に棲息することから、わが国の温水環境は *N. fowleri* の棲息に適した環境であるものと判断される。また、本研究事業を通して病原性が証明されている *N. australiensis* や *N. philippinensis* の存在が明らかとなったが、前者は全国的な分布を示していた。脳内接種によるマウスへの感染実験では *N. australiensis* および *N. philippinensis* のいずれも致死的な障害性を確認した。一方、これら

の種では体表の傷口や粘膜あるいは経鼻的な感染の証拠は無く、感染力は *N. fowleri* に比べて劣るものと判断される。しかしながら、入浴者での不測の感染事故を回避する上で汚染対策は必須と考える。加えて、わが国の温水環境中には *N. tihangensis*、*N. mexicana*、*N. endoi* など、多様なネグレリア属アメーバ種が棲息しており、これらの中には病原性が不明のものも少なくない。

### 1.1 温泉原水

アメーバ類は細菌類の捕食者であり、その棲息環境としては細菌の繁殖が必須である。したがって、源泉がアメーバにより高度に汚染されている状況は考え難い。それでも、平成 15 年度の調査において、1 件の源泉試料からアメーバ類が検出された(1/9)。同じく稀ではあるが貯湯槽からは 15 試料のうち 2 試料からアメーバが検出された。

### 1.2 浴槽水

浴用水におけるアメーバの検出率は浴槽水全体で 27.5% (281/1,023) であった。本年殿調査では、循環式浴槽水およびジャグジーなど機能付き浴槽からのアメーバの検出率は低かった。一方、掛け流し式浴槽は換水率が高く微生物汚染が少ないものと期待されるが、本調査ではむしろ微生物汚染が進んでいる実態が明らかとなった。また、薬湯や露天風呂も高い検出率となっていた。

遊離残留塩素 0.2mg/L を境にしてアメーバはほとんど検出されなくなることが明らかとなった。ちなみに、今回の調査において 0.2mg/L 以上の遊離残留塩素濃度が検出された浴用水が循環式浴槽を中心に 76.8% に達していた。上述のように、薬湯や露天風呂においてはアメーバの検出頻度が高かったが、それらにあっても遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L 以上検出されたものとそれ未満とではアメーバの検出率に明らかな差があり ( $p < 0.005$ )、遊離残留塩素の効果は歴然としていた。遊離残留塩素の殺菌効果は pH レベルに依存し、pH が高くなるのに従って消毒効果が低下する(次亜塩素酸 ⇒ 次亜塩素酸イオンへ解離)ことが知られている。しかしながら、本調査の限りでは、消毒効果が pH 依存性に低下しているという証拠は得られなかった。

### 1.3 ネグレリア分離株によるマウスへの感染実験

*N. australiensis* は実験的にマウスに対する病原性が知られているが、わが国では本研究により初めてその存在が明らかになった。この調査を通じ 15 地域、のべ 33 施設 38 試料より分離され、*N. lovaniensis* と同様、*N. australiensis* の分布は全国的な広がりを示すことが確認された。また、*N. australiensis* と同様に実験的に病原性が知られる *N. philippinensis* と *N. italica* の近縁種が各々、2 地域 3 試料より分離された。当該分離株を用いたマウスへの感染実験(脳内接種)により *N. australiensis* および、*N. philippinensis* に致死な障害性が確認された。一方、これらの分離株では経鼻感染、皮下接種などによる感染は確認されなかった。なお、*N. italica* 近縁種にはマウスに対する障害性ないものと判断された。



## 2. 検査法の開発

### 2.1. 単クローン抗体作製と抗原分析

これまでに、*N. fowleri* タンパクの 2D-PAGE 解析から主要な 59 個の蛋白スポットについて N 末端アミノ酸配列解析をおこなった。そのうち N 末端アミノ酸配列が得られた 34 個の特異的スポットのなかで既知のタンパクと相同性を認めたものは 14 個のみであった。現在までに 17 個のスポットについてアミノ酸配列の登録を完了した。ウエスタンブロット解析では、抗アクチン抗体に反応したスポット 5 個、及び市販の Nf-5D12u に反応したスポット 5 個が得られた。抗アクチン抗体を用いてアクチンのスポットを同定した。また、当該研究で得られた抗-*N. fowleri* 単クローン抗体のうち、C015 は *N. lovaniensis* に対して弱い交叉反応が認められるものの、*Acanthamoeba* や *Balamuthia* などの他の生物との交差反応を認めなかった。一方、2D-PAGE のウエスタンブロットの結果、*N. fowleri* タンパクに対しては分子量サイズに関わらず広くタンパクスポットを認識し、糖鎖もしくはその他の修飾基を認識する抗体ではないかと推測された。

### 2.2. 遺伝子解析による種の同定

Internal Transcribed Spacer Regions of Nuclear Ribosomal DNA 領域 (ITS1/ITS2 領域) を標的とした PCR/RFLP 法および塩基配列決定を行うことで、迅速にネグレリア属アメーバの種の同定が可能となり、病原性アメーバの汚染調査において有効なスクリーニング手段として機能した。しかしながら、*N. fowleri*、*N. lovaniensis*、*N. australiensis* など限られたアメーバの型別は可能であるが、病原種を含むその他のアメーバ種の型別には不相当であった。加えて、調査の過程で国内の温水環境には多様な種が存在することが明らかとなり、さらに詳細な鑑別指標が必要となった。そこで、PCR 反応で得られた ITS1/ITS2 領域の塩基配列を解析することで詳細な情報を得ることとした。追加情報が必要な場合には、18S rRNA の塩基配列を決定して種別鑑定の補助とした。その結果、わが国に存在する温度耐性ネグレリア属アメーバはきわめて多様であることが明らかとなった。本研究を通じてネグレリア属アメーバの汚染防止対策に必要な遺伝子情報の充実が図られた。

## 3. 病理学的検討

### 3.1. マウス感染モデルの病理組織学的検討

アメーバ性脳髄膜炎疾患モデルマウスを用い、アメーバの種別ごとの中枢神経系における病理組織像を検討した。また各種抗アメーバ抗体を使用し、感染マウス脳内のアメーバを特異的に染色した。マウスでは *N. fowleri*、*N. australiensis*、*N. philippinensis*、*B. mandrillaris* の感染による発症が確認され、脳内接種により高度の壊死性病変が惹起された。*N. fowleri* は、嗅脳・嗅神経に親和性を有している可能性が示唆された。さらに、アメーバ接種初期、未発症状態のマウス脳での免疫組織化学的検討では、予測よりもより広範なアメーバの浸潤が認められ、病態メカニズムや形態学的診断上で重要な所見を得た。また、*N. australiensis* や *N. philippinensis* という新たな病原体が出現する可能性が示された。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。

### 3.1.1. *Naegleria fowleri*

*N. fowleri* の接種実験では、右側頭葉・視床を中心とした壊死性脳炎、あるいはくも膜下腔から脳実質を主体とする髄膜脳炎を呈し、同領域にアメーバ栄養体の出現が認められた。また、脳内接種実験において、右側頭部より接種したにもかかわらず 10 例のうち 2 例のマウスで両側嗅脳から嗅神経にかけて栄養体の出現を伴った高度の炎症像が認められ、嗅脳・嗅神経に対し何らかの親和性を有している可能性が示唆された。

### 3.1.2. *Naegleria australiensis*

*N. australiensis* においても壊死性脳炎および脳髄膜炎の所見が認められ、第 3 脳室・側脳室周囲あるいは脳底部のくも膜下腔を主座とした炎症性病変が認められ基本的には PAM の像を呈するものと考えられた。*N. fowleri* と異なり、嗅脳病変は認められなかった。

### 3.1.3. *Balamuthia mandrillaris*

*B. mandrillaris* の接種実験においては、右側頭葉から両側海馬・大脳皮質にかけて多数の栄養体の出現を伴った高度の脳炎の像が認められた。アメーバ栄養体は *N. fowleri* に比べ、大型で不整形を成し、組織に対する浸潤性が強く認められた。電顕観察によると、栄養体はいびつな数個の核小体を有し、ectoplasm には細線維の集簇像が認められた。Endoplasm には大小の電子密度の高い球状構造物や多数の vesicles および、管状クリステを持つミトコンドリアが認められた。

### 3.1.4. *Acanthamoeba culbertsoni*

*Acanthamoeba culbertsoni* (A-1) の接種実験では、接種後 14 日までに脳炎の発症は認められなかったが、脳梁および海馬に、ごく少数ながら散在性にアメーバ栄養体が認められた例を得た。電顕観察によると、栄養体は小型球状の核小体を有し、Ectoplasm は電子密度の高い線維の集簇から成っていた。Endoplasm には多数の vesicles および、管状クリステを持ったミトコンドリアが認められた。

## 3.2. 鼻腔接種実験

鼻腔接種実験では、*N. fowleri* でのみ脳炎の発症が認められた。病変は嗅神経から嗅脳、前頭葉前方にかけての高度の出血性脳炎を呈し、多数のアメーバ栄養体が認められた。

## 3.3. 特異抗体による免疫染色

各種アメーバ感染マウス脳を用いて免疫染色を行った。抗-*N. fowleri* では、*N. fowleri* 栄養体の細胞膜および嚢子が染色された。*N. australiensis* の栄養体に対しても同様の陽性像が認められた。抗-*B. mandrillaris* では *B. mandrillaris* 栄養体の細胞膜および嚢子が染色されたが、*N. fowleri*、*A. culbertsoni* に陽性反応は認められなかった。抗-*Acanthamoeba sp.* では *A. culbertsoni* 栄養体の細胞膜および嚢子が染色されたが、*B. mandrillaris* の栄養体の細胞膜および嚢子も陽性であった。*N. fowleri* に陽性反応は認められなかった。

*B. mandrillaris* および *A. culbertsoni* 脳内接種マウスにおいて、未だ脳炎を発症していない標本で免疫染色を行ったところ、両側の海馬および脳梁に少数ながら広範にアメーバ栄養体が認められた。同標本を HE および Bodian 染色で観察すると、周囲にほとんど特別な反応もなく、

脳実質にアメーバ栄養体が細胞単位で浸潤している像が認められた。免疫組織化学的検討では、予測よりもより広範なアメーバの浸潤が認められ、病態メカニズムや形態学的診断を研究する上での重要な所見であり、この疾患モデルの有用性は極めて高いと考えられた。

### 3.4. 臨床材料の病理組織学的所見

当該研究事業では、滝本雅文(東京都立豊島病院検査病理)、矢島美穂子(市立酒田病院病理)、調輝男(川崎医科大学神経病理)、林透(県立宮崎病院臨床検査科病理)、杉田保雄(佐賀県立医大病因病態科学臨床病理学分野)の各氏の協力を得て、本邦で報告された6例のアメーバ性脳髄膜炎の全例について臨床病理学的に比較検討した。

東京の症例の病型は当初原発性アメーバ性脳髄膜炎としてきたが、病変分布は一致しているものの、嚢子の存在や実質における炎症細胞の浸潤像などは、むしろ肉芽腫性脳炎(GAE)の像に近いといえる。罹病期間が9日間と短かったためにこのような脳髄膜炎様の像を呈したものと考えられた。岡山、宮崎および、新潟の症例は肉芽腫性脳炎の像を呈していた。佐賀の症例は原発性髄膜脳炎(PAM)の像を呈し、病変は脳底部の脳表側を主体とした分布を呈した。これに対し、GAEでは主として脳室周囲の実質に分布していた。組織学的には全例でアメーバ栄養体が認められた。佐賀の症例を除き、組織内に嚢子様構造物の存在が確認された。アメーバ栄養体の大きさを計測すると、東京と佐賀の症例では直径の平均が10  $\mu\text{m}$ 以下で、比較的揃っているのに対し、症例2-5では直径が12  $\mu\text{m}$ 以上と大きく、不揃いであった。

各症例につきアメーバ栄養体の染色性を検討した。PAS染色は、赤痢アメーバにおいて強陽性を示すことが知られているが、今回の検索では、山形、岡山および、宮崎の症例で、赤痢アメーバほどではないものの陽性の顆粒が胞体内に認められた。東京および新潟の症例では弱陽性、佐賀の症例および *N. fowleri* 感染マウス脳では陰性であった。Bodian染色では、山形と佐賀の症例を除き、アメーバ栄養体の細胞膜に線状の明らかな嗜銀性が認められた。山形の症例では嗜銀性を有するものも認められたが、はっきりとした線状にならず、不明瞭なものが多数認められた。一方、佐賀の症例では、アメーバ栄養体に嗜銀性はまったく認められなかった。ちなみに、*N. fowleri* 感染マウス脳の所見ではアメーバ栄養体に嗜銀性が無いことが確認されている。

岡山と新潟の症例について電子顕微鏡観察を行ったところ、両症例とも類似したアメーバ栄養体と嚢子の像が認められた。症例5の嚢子の endocyst は症例3のものに比して厚い特徴が認められた。

### 3.5. 特異抗体による免疫染色

アメリカ疾病予防センターより分与された抗-*N. fowleri* 抗体、抗-*B. mandrillaris* 抗体、抗-*Acanthamoeba* 抗体を用い、本邦6例のアメーバ性脳髄膜炎剖検脳のパラフィン包埋切片を染色した。既に病原アメーバの判明している佐賀の症例では抗-*N. fowleri* 抗体が、岡山の症例では抗-*B. mandrillaris* 抗体と抗-*Acanthamoeba* 抗体が陽性となり、それぞれ *N. fowleri* および、*B. mandrillaris* であることが確認された。病原アメーバが判明していない、山形、宮崎、新潟の3例について各抗体による免疫染色を行ったところ、3例とも抗-*B. mandrillaris* 抗体と抗

-*Acanthamoeba* 抗体による反応が陽性、抗-*N. fowleri* 抗体による反応が陰性となり、*B. mandrillaris* による感染症であることが判明した。東京の症例は抗-*Acanthamoeba* 抗体による反応が陽性、抗-*B. mandrillaris* 抗体による反応が陰性となり、*Acanthamoeba* であることが確認された。

### 3.6. アメーバ栄養体の形態学的相違

剖検脳を基に各病原アメーバを比較した。Bodian 染色では、*N. fowleri* は細胞膜に嗜銀性を有さず、形はほぼ円形であった。3 種のうちもっとも小型で大きさも比較的揃っていた。一方 *B. mandrillaris* は細胞膜に明らかな嗜銀性を有しており、形態は不整形で大小不同、比較的大型のものが多く認められた。*Acanthamoeba sp.* は細胞膜に嗜銀性を有するが、形はほぼ円形で大きさも比較的揃っていた。

#### 3.6.1. *Naegleria fowleri*:

組織学的に増殖した多数の栄養体が認められるが、組織内での嚢子形成は行わない。嗅脳から嗅神経にかけて栄養体の出現を伴った高度の炎症像が認められ、動物実験では感染経路によらず嗅脳から嗅神経への親和性が示唆された。アメーバ栄養体はほぼ円形で、直径の平均は 10  $\mu\text{m}$  以下で、比較的均一である。PAS 染色は陰性で、Bodian 染色標本では細胞膜に嗜銀性を欠く。

#### 3.6.2. *Balamuthia mandrillaris*:

アメーバの浸潤が認められる領域では広範な壊死像を呈し、その周辺部の血管周囲及び実質内に直径 10–30 $\mu\text{m}$  の円形ないし類円形の胞体を有し、核膜が不明瞭で大型明瞭な核小体を有する。栄養体が多数集簇して認められる。アメーバの核小体は複数個に分かれたものおよび不整形のものが多く、これらの特徴の観察には Giemsa 染色が適する。Bodian 染色により、栄養体の細胞膜に線状の明らかな嗜銀性が認められる。また厚い壁を有する直径 8–15 $\mu\text{m}$  の嚢子が多数認められた。

#### 3.6.3. *Acanthamoeba sp.*:

病理組織標本に見られる栄養体は円形で比較的そろった大きさの像を呈する。組織内で嚢子形成が認められる。栄養体は PAS に弱い染色性を示す。Bodian 染色標本で、栄養体の細胞膜に線状の嗜銀性を有する。Giemsa 染色で小型・円形の核小体が明瞭に観察された。

## D. 結論

*Naegleria* 属の分類方法として ITS 領域を標的とした PCR-RFLP 法およびその遺伝子配列の解析方法を改良/導入し、迅速かつ的確な分離・同定方法を確立した。本研究事業を通して 14 の協力地方衛生研究所にアメーバ類の検出、同定、遺伝子解析などの技術移転がなされた。また、本研究の成果の還元としてアメーバ検査法マニュアルを編集・更新し、要請に応じて研究機関等に提供することとした。温泉等温水環境は国内に普遍的に存在するものであり、各自治体において今後の取り組み強化が期待される。

温泉等の浴用水を含め、わが国の温水環境はアメーバ類の好適な棲息環境となっていることが示され、レジオネラ汚染防止とあわせて対策が必須の状況にあることが明らかとなった。ネグレ

リア属アメーバの調査において *N. fowleri* を検出することは無かったが、*N. fowleri* と形態的同一種で、棲息環境を同じくする非病原種の *N. lovaniensis* が最優占種であることが確認された。また、マウスに対し病原性が確認されている *N. australiensis* も優占種の一員であり、今回の調査では 10 地域、19 施設から検出され、その分布は全国的であった。マウス脳内接種により *N. australiensis* および *N. philippinensis* の病原性が確認された。*N. australiensis* および *N. philippinensis* に関して体表の傷口や粘膜あるいは、経鼻的な経路で感染する証拠はこれまでのところ得られていない。しかしながら、入浴者において不測の感染事態を回避する上で汚染防止策が必須と考える。

当該調査を通して遊離残留塩素濃度 0.2mg/L を境にしてそれ以上の濃度でアメーバ類が激減することが判明し、遊離残留塩素の効果が改めて評価された。温水環境中に棲息する自由生活性アメーバ類は環境中でのレジオネラの宿主として知られている。現行のレジオネラ対策はその宿主であるアメーバ類対策をも視野に入れたものと承知しているが、遊離残留塩素による浴用水の衛生管理がアメーバの増殖阻害には効果を示しているものと判断された。本調査の結果によれば、薬湯や露天風呂においてアメーバの検出率が高かった。これらの浴槽では塩素投入が難しく、あるいは掛け流しでは誤解により塩素投入がなされていない例が少なくなかった。これらの施設であっても遊離残留塩素濃度の維持が必要であることが示された。本調査を通して現行の衛生管理の正当性を証明するに足る科学的根拠が得られたことから、今後は、塩素消毒の理解のもと、定期的な濃度測定に基づく適正な浴槽水管理を広く求めるなど、関係方面の行政施策に活用することが重要と思われる。

これまでにわが国で発生したアメーバ性髄膜脳炎の 6 症例全てについて免疫病理学的に病原アメーバの鑑別・同定を行った。その結果、*Acanthamoeba* sp. および *N. fowleri* の感染によるものが各 1 例、他の 4 症例は *B. mandrillaris* によるものであった。また、マウスを用いた各種アメーバによる感染モデルを作成し、多くの病理組織学的所見を得たことは本分野における研究の進展につながるものとして高く評価される。一方、*Balamuthia* は感染例が最も多いにもかかわらず、環境中でのアメーバの棲息場所、感染経路、検出方法等々については不明で、今後の調査・研究に待たれる。また、*N. fowleri* の棲息場所についても改めて検討する必要がある。

## II. 分担研究報告書

厚生労働科学研究費補助金(がん予防等健康科学総合研究事業)  
分担研究報告書

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

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

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

研究協力者:

古屋宏二 (国立感染症研究所 寄生動物部)	森本洋 (北海道立衛生研究所)
下河原理江子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	大谷勝美 (山形県衛生研究所)
小村麻子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	佐藤直人 (秋田県衛生科学研究所)
朝倉登喜子 (国立感染症研究所 寄生動物部)	八柳潤 (岩手県環境保健研究センター)
堀内雅人 (国立感染症研究所 寄生動物部)	福島得忍 (千葉県衛生研究所)
佐々木美江 (宮城県保健環境センター)	岡村雄一郎 (長野市保健所)
不二崎順二 (新潟県保健環境科学研究所)	磯部順子 (富山県衛生研究所)
長則夫 (栃木県保健環境センター)	京田芳人 (福井県衛生環境研究センター)
板垣道代 (岐阜県保健環境研究所)	辻英高 (兵庫県立健康環境科学研究所)
山内昭則 (三重県科学技術振興センター)	伊藤正寛 (神戸市環境保健研究所)
田口寛 (京都府保健環境研究所)	木村明生 (大阪府立公衆衛生研究所)
中嶋洋 (岡山県環境保健センター)	枝川亜希子 (大阪府立公衆衛生研究所)
柏木淳子 (鳥取県衛生環境研究所)	安岡富久 (高知県衛生研究所)
烏谷竜哉 (愛媛県立衛生環境研究所)	高田三千人 (広島県保健環境センター)
村上光一 (福岡県保健環境研究所)	榊美代子 (広島県保健環境センター)
田栗利紹 (長崎県衛生公害研究所)	萩野武雄 (広島市衛生研究所)
	宮村恵宣 (広島市衛生研究所)
	富田正章 (山口県環境保健研究センター)

前年度、国内の温水環境において病原性を有するネグレリアとして知られる *N. australiensis* が確認され、浴用施設においてアメーバ汚染が公衆衛生上の重要課題であることが示された。本年度はさらに調査地域を拡大して病原性を有するネグレリア属アメーバの汚染実態を調査した。今回の調査では浴槽からのアメーバの検出率は27.5% (281/1023)であった。アメーバの検出率は平成13年度の48.5%から平成14年度の28.4%と有意に減少し、本年は昨年と比べ同程度であった。浴槽別に見ると、薬湯、露天風呂において、また、掛け流し式浴槽におけるアメーバの検出率が高く、循環式浴槽からの検出率が最も低かった。薬湯は浴用剤等を含むことで遊離残留塩素の有効性が低下することが予測されるところであ

るが、今回の調査において高率に汚染されている実態が明らかとなった。また、多くの掛け流し式浴槽で遊離残留塩素が検出されておらず、掛け流し式浴槽の場合は塩素消毒を免れるとの誤解があるのではないかと憂慮される。これらの衛生管理には特に注意すべきところと考える。一方、今回の調査では循環式浴槽を中心とした浴用水のおよそ 77%において遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L を超えていた。このことが、循環式浴槽におけるアメーバ汚染を低く抑えた理由と考えられる。調査結果から、アメーバに対する消毒は 0.2mg/L 以上の遊離残留塩素により十分な効果が得られるものと判断された。

本調査を通して温水環境より多様なネグレリア属アメーバが検出されたが、病原性アメーバとして *N. australiensis*、*N. philippinensis* とその近縁種および、*N. italica* 近縁種が浴用水を含む温水環境に生息していること、マウスに対するこれらのアメーバの病原性が確認されたこと、前者の棲息域は全国的であることなどの知見を得た。*N. australiensis* が浴用水から分離されたことは微生物学的汚染の深刻さを示すものと言える。入浴者等の不慮の感染事故を回避する上で汚染防止は必須である。一方、*N. fowleri* の棲息状況を把握すべ調査を進めたが、浴用水および排水を含む浴槽施設から検出することはなかった。今後とも、生息場所等に関しての地道な調査が必要と考えている。

## A. 研究目的

前年度調査において、マウスに対して実験的病原性を示すことの知られる *Naegleria australiensis* が本邦温水環境中にも存在することが判明し、一部の分離株ではあるが、マウス感染実験により実験的病原性が確認された。本年度は、事業の最終年度として、より正確なネグレリア病原種の生息実態を把握するために調査地域を拡大し、改良したアメーバの分離、同定法を用いてネグレリア病原種およびその近縁種を積極的に分離すべく努力した。分離された病原種/近縁種はマウスへの感染実験から病原性を判定し、疫学的なデータと合わせて公衆衛生上の問題点を明らかにした。また、浴槽水の微生物汚染の防止対策方法として現在導入されつつある塩素添加が、アメーバ汚染に影響を与えていることを示唆する成績が得られていることから、本年度もこの点を注視し、アメーバの汚染実態と残留塩素濃度、浴槽管理方法等の環境要因との関係を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 調査対象および試料採取

調査地域は前年度と同様の A～N までの 14 地域に加え、これらの地域を管轄する地方衛生研究所を中核機関として、さらに 11 の周辺自治体からの研究参加協力を得て、本年度は調査地域を 25 に拡大した。対象施設は、前年度同様、温水環境を形成する温泉、公衆浴場、ならびに温排水を排出する食品工場、給食施設などの企業施設である。同一施設より月単位で経時的に試料を採取するといった反復調査を行った場合は、同一施設に対して調べた回数をもつ施設数として集計した。得られた試料は原水系統(原水、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、他)、ろ過系統(ろ過槽、拭取り、他)、排水系統(工場排水、浴槽排水)およびその他(地下水などを含む)に大きく分類し、データ処理した。ちなみに、薬湯に関しては本年度 9 地域 26 施設に渡って調査したが、少なくとも 4 地域の 19 施設で地下



水・水道水が使用されていた。また、他の浴槽種類と同様に薬湯もほとんどが循環式で管理されているものであった。

## 2. アメーバの分離ならびに検出、同定

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。大腸菌塗布寒天平板に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にしたものを塗り広げ、42℃にて培養を行った。培養後3～4日までに出現したプラークのみをクローニングし、ネグレリア分離の効率化を図った。クローン株は形態学的特徴、鞭毛誘出試験によりネグレリア属アメーバと同定された後、前年度より導入したPCR-RFLP解析を行った。さらに詳細な同定が必要な場合は、前年度と同様に、以下の方法で塩基配列の相同性をもとに種の同定を行った。同定結果は、塩基配列が完全に一致したものはその種名を、また、完全一致は見ないもののきわめて相同性が高い場合には便宜的にその種名を採用し、その後に括弧で一致率を示した。なお、本邦の温水環境中に生息するネグレリア属アメーバの多様性については別途分担報告として

PCR産物はQIAquick PCR purification kit (Qiagen)を用いて精製を行い、配列決定用試薬としてBigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)を、プライマーはPCRと同じものを用いて反応を行った。塩基配列決定にはABI310 (Applied Biosystems)を使用した。得られた配列の相同性検索はBlastを使用した。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。

## 3. アメーバ分離株の感染試験

### 感染実験用アメーバの培養

試料より単離した感染用アメーバ株は大腸菌塗布寒天培地を用いて35℃にて増殖させた後、およそ5mlの滅菌蒸留水をシャーレに入れ、ピペッティングで栄養体を浮遊後、その浮遊液をシャーレより遠心管に移した。4℃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した後、滅菌蒸留水に再浮遊し濃度をおよそ $1 \times 10^4$ 細胞/ $\mu$ lに調整した。調整したアメーバ浮遊液はマウスへの接種まで氷冷保存した。

### マウスの感染方法

マウスはddy系統、メス、4週齢を用いた。マウス接種実験は以下の手順に従った。

- 1 脳内感接種方法: エーテルにて麻酔後、注射用2段針を用いて側頭部に約20 $\mu$ lを注射し、マウス当り $1 \times 10^3 \sim 2 \times 10^4$ 個のアメーバを接種した。
- 2 経鼻感染方法: マウスを仰向けに保定し、微量ピペットを用いてアメーバ浮遊液を鼻腔内に5 $\mu$ l滴下、吸引させマウス当り $2.5 \times 10^3 \sim 5 \times 10^4$ 個のアメーバを接種した。
- 3 皮内感染方法: エーテルにて麻酔後、背側部皮内に50 $\mu$ lを注射、 $2 \sim 5 \times 10^4$ アメーバを接種した。
- 4 各実験区のマウス頭数は5頭とした。感染マウスは継時的に観察し、その健康度・行動異常を調べた。明らかに昏睡あるいは死亡した場合は、必要に応じてマウスを安楽殺し速やかに解剖を行い、脳を摘出した。
- 5 感染マウス脳からのアメーバの分離
- 6 摘出した脳は形を残さない程度に軟化している場合はそのまま用い、形が保たれている場

合は数 mm 角に細断した。この脳試料を用いて、以下の2つの方法でアメーバ分離のための培養を行った。

- 7 無菌液体培養法: 25cm<sup>2</sup>フラスコに培地である SCGYE 培地 5ml を入れたところに前述の脳試料を加え、30℃にて培養した。
- 8 Vero 細胞共培養法: 25cm<sup>2</sup>フラスコに MEM 培地 5ml を入れ vero 細胞を増殖させたところに、前述の脳試料を加え、37℃にて培養した。

### C. 結果および考察

#### 1. H15 年度の全国的なアメーバ類の検出状況

全国 25 地域について、施設総数のべ 631、試料総数 1,173 を検査し 3,167 株のアメーバを分離、同定した。全体的な調査結果を地方別に表-1 にまとめた。試料総数 1,173 に対し、いずれかのアメーバが検出された試料は 357 (30.4%) 件、ネグレリア属アメーバ陽性であった試料は 173 (14.7%) 件であった。

表-1 地域別施設数ならびに試料数を単位としたアメーバ分離状況

地域	施設 総数	試料 総数	Am 陽性 試料数	Ng 陽性 試料数	N.i.	N.a.	N.t.	N.i.	N.p.	N.sp.	その他 のAm	Amクローン 総数
A	9	9	3	3	3	0	0	0	0	0	1	74
B	18	45	42	30	30	0	0	0	0	0	24	147
BA	4	8	4	1	1	0	0	0	0	0	4	6
BI	48	111	5	1	1	0	0	0	0	0	4	23
BY	4	6	6	5	5	0	0	0	0	0	1	6
C	8	8	8	2	2	2	0	0	0	0	6	66
D	2	22	6	5	2	0	2	2	0	2	6	93
E	112	225	69	13	11	0	0	0	0	2	60	133
F	6	25	7	4	4	1	0	1	0	1	7	71
FN	3	17	11	8	4	5	0	0	0	1	11	73
G	54	95	22	15	13	2	0	0	0	0	14	166
GH	12	26	16	10	6	2	0	0	0	2	16	166
GO	39	85	25	7	7	1	0	0	0	0	25	108
H	8	8	3	0	0	0	0	0	0	0	3	113
HF	5	9	4	1	1	0	0	0	0	0	3	70
HT	1	8	4	0	0	0	0	0	0	0	4	45
I	100	130	26	6	4	2	0	0	0	0	23	41
J	4	10	10	7	6	2	0	0	0	2	10	106
JH	33	44	9	4	4	0	0	0	0	0	6	65
JY	10	31	16	10	10	0	0	0	0	0	16	192
K	16	74	41	35	29	7	19	0	2	7	29	997
KK	11	20	6	2	0	2	0	0	1	2	6	159
L	6	36	8	3	3	0	0	0	0	0	5	148
M	117	120	5	0	0	0	0	0	0	0	13	97
N	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	2
総計	631	1173	357	173	146	26	21	3	3	20	298	3,167

Am陽性:アメーバ陽性

Ng陽性:ネグレリア属アメーバ陽性

N.i: *N.lovaniensis*

N.a: *N.australiensis*

N.t: *N.tihangensis*

N.i: *N.italica*

N.p: *N.philippinensis*

N.sp: *Naegleria sp*

得られた *Naegleria* 属の分離株は ITS 領域を標的とした PCR-RFLP 法、およびその遺伝子配列の解析から詳細に同定し、主に病原性のある種類を中心にその検出結果をまとめた。種類別に検出結果をみると、*N. lovaniensis* は 20 地域 88 施設 146 試料より検出されており、前年度までの調査と同様、我が国の温水環境における最優占種であることが示された。H14 および H15 年度の 2 年間にわたる調査成績をまとめると、のべ 23 地域より検出されており、国内の分布には大きな偏りはなくほぼ全国的に検出された。

前年度の調査でその棲息が確認された *N. australiensis* に関しては、前年度において遺伝的に極めて近縁な 2 群(塩基配列解析により T4 および T6 タイプと表記)を *N. australiensis* としてまとめて取り扱ったが、本年度は病原性の有無に基づく生物学的差異により T4 タイプを病原種 *N. australiensis*、また T6 タイプを非病原種 *N. tihangensis* (De Jonckheere, 2002)として各々独立種として取扱うこととした。*N. australiensis* に関しては、前年度よりも検出地域が増えており、本年度は 10 地域 19 施設 26 試料より検出された。H14 および H15 年度の 2 年間では、のべ 15 地域より検出されており、*N. lovaniensis* と同様、全国的な広がりを示すことが明らかとなった。*N. tihangensis* は本年度 2 地域 21 試料より検出され、前年度と合わせると 8 地域から検出された。*N. australiensis* と同様に実験的病原性の知られる *N. philippinensis* およびその近縁種 (ITS1/ITS2 領域の塩基配列一致度:99.4%)と *N. italica* 近縁種 (ITS1/ITS2 領域の塩基配列一致率:97.9%)が、本年度各々、2 地域 3 試料より分離され、前年度と合わせると *N. philippinensis* とその近縁種は総計で 4 地域、一方 *N. italica* の近縁種は 3 地域より検出された。これらは優占種である *N. lovaniensis* や *N. australiensis* に比較すれば少ないものの存在が確認されたことは重要である。*N. australiensis*、*N. philippinensis* および *N. italica* はいずれも病原性があるものとされていることから、各分離株についてマウスを用いた感染実験を行った。これらの他に多様なネグレリア属アメーバが検出され、わが国には極めて多様なネグレリア属アメーバが存在していることが明らかとなった。これらの分類学的考察は別途報告書にまとめた(泉山信司: 分担研究報告書)なお、*N. fowleri* に関しては本年度も浴槽系から検出されなかった。

## 2. 採取環境別アメーバ検出結果

温水環境からのアメーバ検出の特性を明らかにするために、系統別試料別に検出結果を比較した(表-2)。採取環境を原水、浴用水、ろ過、排水、その他の 5 系統に分け、さらにそれぞれにつき具体的な採取場所が分かるようにまとめた。原水系統として泉源原水 9 試料、貯湯槽水 15 試料の計 24 試料が採取された。浴槽系統としては内湯 792 試料、薬湯などの特殊浴槽水が 42 試料、また打たせ湯、ジャグジー、ジェット風呂、超音波風呂などの付帯設備を持った浴槽水が 49 試料、露天風呂の浴槽水が 140 試料、の計 1,023 試料が採取された。また、掛け流し式の管理がなされている施設からの試料が 76 検体採取された。ろ過系統としては循環式浴槽のろ過装置内の水が 16 試料、配管内壁に付着するヌメリ(バイオフィーム)の拭取り試料が 35 検体含まれる。排水系統に関しては、温泉、公衆浴場の浴槽水の排水として 32 試料、また食品加工、や給食施設からの温排水 13 試料の計 45 試料が採取された。その他として、浴室や浴槽周辺の拭取りを 16 試料、湖沼水 3 試料、水泳プール水 4 試料、その他 6 試料の計 29 検体が採取された。

表-2 系統別試料数集計

系統	試料	試料 総数	Am 陽性 試料数	Ng 陽性 試料数	Ng陽性 %	N.l.	N.a.	N.t.	N.i.	N.p	N.sp.	その他 のAm
源泉系統	源泉	9	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
	貯湯槽水	15	2	2	13.3	2	0	0	0	0	0	2
浴槽系統	内湯*	792	194	88	11.1	75	6	13	0	1	5	170
	薬湯他	42	22	10	23.8	10	2	0	0	0	2	16
	ジャグジー他	49	14	7	14.3	6	2	0	0	0	1	12
	露天	140	51	21	15	19	4	4	0	0	2	44
ろ過系統	ろ過槽水	18	4	1	5.6	1	0	0	0	0	0	4
	拭取り	35	18	17	48.6	17	0	0	0	0	0	7
排水系統	浴槽排水	32	25	17	53.1	8	8	4	3	1	8	23
	工場排水	13	11	4	30.8	2	4	0	0	1	2	8
その他	拭取り	16	10	5	31.3	5	0	0	0	0	0	8
	池・湖水	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0	2
	プール水	4	1	1	25	1	0	0	0	0	0	0
	その他	5	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1
		1173	356	173		146	26	21	3	3	20	298

\*循環式浴槽と掛け流し浴槽の試料を含む。

Am陽性:アメーバ陽性

Ng陽性:ネグレリア属アメーバ陽性

N.l: *N.lovaniensis*

N.a: *N.australiensis*

N.t: *N.tihangensis*

N.p: *N.philippinensis*

N.sp: *Naegleria sp*

N.i: *N.italica*

### 1) 原水

源泉原水の水温は 23.0~60.6℃の範囲であった。原水 9 検体のうち 1 検体からネグレリア属以外のアメーバが検出された。その原水水温は 41℃であった。一方、貯湯槽から採取した 15 試料のうち 2 試料からネグレリア属アメーバ(*N. lovaniensis*)が検出された。その試料水は 35℃および 43℃であった。46℃以上の水温が維持されていた貯湯槽からはアメーバが検出されなかった。しかしながら、原水そのものが高温、あるいは低温のためアメーバの棲息に不利な条件にあったとしても、貯湯槽で温度調節が施されることでアメーバの汚染につながる事が確認された。

### 2) 浴槽水

本年度の 1,023 試料を含め 3 年間の事業全体で、検査した試料数はのべ 2,200 件におよんだ。本年度調査における試料別アメーバの検出率は、内湯で 25~37%、薬湯ではさらに高く 42 試料中アメーバ陽性となった試料は 22 検体(52.4%)と汚染が目立った。薬湯ではネグレリア属アメーバの検出頻度も高く、10 検体(25.6%)が陽性であった。ネグレリア属のアメーバとしては