

N. lovaniensis が 11～26%の割合で検出され、最優占種である事が示された。また *N. australiensis* が 6ヶ所(6/795)の内湯からと、薬湯の2検体から検出されており、*N. australiensis* による浴用水汚染が確認された。その他、1検体の内湯から同じく病原性の指摘される *N. philippinensis* の近縁種が検出された。

3)ろ過系統試料

循環式浴槽では汚染の最大原因がろ過装置であることから、本年度も可能な範囲で調査を試みた。5 地域で調べた試料の内容としては、ろ過槽水として、ろ過装置内逆洗浄水、ヘアキャッチャー内の溜り水が集められた。また、拭取り試料としてヘアキャッチャー内壁、また便宜上配管内壁もこれに含めた。試料別アメーバの検出率は、ろ過槽水で 25%であり、内湯等の結果と大きな差が見られなかった。これに対し、拭取り試料からの検出率は 51.4%と高く、ネグレリア属アメーバに限っても 48.6%と、後述の配水系と同程度の高い検出率を示した。なお、拭取り試料から分離されたネグレリア属アメーバは *N. lovaniensis* に限られていた。

4)排水系統試料

排水試料はアメーバ全体、あるいはネグレリア属アメーバに限定した場合であっても、検出率および存在量の多さから、他の試料と比べて最も汚染度が高いことが示された。本年度の調査では浴槽排水が 8 地域 26 施設 35 試料、工場排水が 4 地域 12 施設 13 試料の計 38 施設 45 検体を対象とした。両排水試料のアメーバ検出率は極めて高く 80%前後であり、この検出率は、これまでの調査成績と同様であった(注: 昨年度の検出率は浴槽排水 84.6%、工場排水 63.2%)。ネグレリア属アメーバに限定しても、検出率は浴槽排水で 53.1%と工場排水で 30.8%であり、浴槽排水は調べた試料種別の中で最もアメーバ汚染度が高いことが示された。ネグレリア属アメーバとしては、*N. lovaniensis* が 15~25%、*N. australiensis* が 25~31%の検出状況であった。*N. australiensis* の検出率は浴槽排水試料において最も高い値となっており、本原虫の生息環境を知るうえで重要な情報と考えている。また、排水からは *N. italica* を含め、一連の調査において検出されたほとんど全てのネグレリア属アメーバが検出された点にも注目している。

5)その他

浴室内壁や水に漬かっていない浴槽周辺等の拭取り試料からアメーバの分離を試みた。2 地域2施設、16 件と試料数は限られるが、その 10 試料からアメーバが検出され、*N. lovaniensis* が 5試料から検出された。このような浴槽の周辺部における汚染は浴槽施設の継続的な汚染の原因の1つと考えられ、施設の維持管理には浴用水や浴槽内壁、配管システムなどに限らず、周辺環境の徹底したバイオフィルム対策の重要性を指摘するものとする。ちなみに、自然環境の池・湖水等の試料中には高温耐性のネグレリア属アメーバは検出されなかった。

3. 形状別/機能別浴槽におけるアメーバ汚染の状況

事業初年度の成績を受けて、次年度(平成14年度)から病原種の汚染実態を把握すべくネグレリア属アメーバの分離に主眼を置いた。そのため、培養温度や培養期間など一部の検出条件を変更した。その結果、分離されるネグレリア属アメーバ類の割合は平成 13 年度の 25%に比較して14年度は 54.1%、平成 15 年度も 45%と高率となった。

浴用水については調査開始当初から徐々にアメーバ類の検出率が低下する傾向が認められ

た。この間に厚生労働省の指導のもとでのレジオネラ汚染防止対策強化、塩素消毒の徹底が図られているが(後述参照:遊離残留塩素濃度 $\geq 0.2\text{mg/L}$ が76.8%)、レジオネラの宿主であるアメーバ類の減少につながっているものと思われる。しかしながら、その一方で経年的に調査した施設にあって、ネグレリア検出状況にほとんど変化の見られない施設も見られている。表-3 は、3年間にわたり調査が継続された施設を抽出したもので、2年あるいは3年間にわたり汚染状況がほとんど変化していない施設が認められる。そのような施設では浴槽ごとで検出されるネグレリア属のアメーバ種にほとんど変化が見られていなかった。この間の管理の不徹底さが垣間見える。

表-3 地域K内4施設のアメーバ汚染における経年変化

施設	試料	検査年度	Am陽性	Ng陽性	NI	N.a	N.t
A	1	H13					
A	1	H14	+	+	+		
A	1	H15	+	+	+		
A	2	H13					
A	2	H14					
A	2	H15					
A	3	H14	+	+	+	+	+
A	3	H15	+	+	+	+	+
A	4	H13	+				
A	4	H14	+	+			
A	4	H15	+	+	+		
A	5	H13	+				
A	5	H14	+	+	+		+
A	5	H15	+	+	+		+
A	6	H13	+				
A	6	H14	+	+	+		
A	6	H15	+	+	+		
B	1	H13	+	+	ND	ND	ND
B	1	H14	+	+	+		+
B	1	H15	+	+	+	+	+
B	2	H13	+	+	ND	ND	ND
B	2	H14	+	+	+		+
B	2	H15	+	+	+	+	+
B	3	H13	+	+	ND	ND	ND
B	3	H14	+	+	+		+
B	3	H15	+	+	+	+	+
B	4	H13	+	+	ND	ND	ND
B	4	H14	+	+	+		+
B	4	H15	+	+	+	+	+
B	5	H13	+	+	ND	ND	ND
B	5	H14	+	+	+		
B	5	H15	+	+	+		
B	6	H13	+	+	ND	ND	ND
B	6	H14	+	+			+
B	6	H15	+	+		+	+
C	1	H13	+	+	ND	ND	ND
C	1	H14	+	+	+		
C	1	H15	+	+	+		
C	2	H13	+	+	ND	ND	ND
C	2	H14	+	+	+		
C	2	H15	+	+	+		
C	3	H13	+	+	ND	ND	ND
C	3	H14	+	+	+		+
C	3	H15	+	+	+	+	+
C	4	H13	+	+	ND	ND	ND
C	4	H14	+	+	+		+
C	4	H15	+	+	+	+	+
D	1	H14					
D	1	H15					
D	2	H14	+	+	+		+
D	2	H15	+	+	+		+
D	3	H14					
D	3	H15					
D	4	H14	+				
D	4	H15	+				
D	5	H14					
D	5	H15					
D	6	H14	+	+	+		
D	6	H15	+	+	+		

Am陽性:アメーバ陽性
Ng陽性:ネグレリア属アメーバ陽性

NI: *N.lovaniensis*
N.a: *N.australiensis*
N.t: *N.tihangensis*

浴用水全体の試料数は 1,023 検体で、そのうち 281 検体 (27.5%) がアメーバ陽性であった。浴槽を形態/機能別に分けアメーバの汚染実態を比較して表-4 に示した。内湯のアメーバ陽性率は 19.1%、ジャグジー等の付帯設備を持った浴用水で 28.6%と、両者のアメーバ汚染状況に有意差は認められなかった。その一方で、薬湯および露天風呂の汚染率は循環式浴槽と比較して有意 ($p < 0.001$) に高い汚染状況であった。また、掛け流し式浴槽浴槽のでは 76 資料中 44 試料 (57.9%) からアメーバが検出されていた。形状別/機能別浴槽においてアメーバ汚染の程度に差が見られる現象は浴用水の塩素管理状況と関連させることで説明が可能と考える。

表-4 浴槽の形態/機能別とアメーバ汚染況

	試料数	アメーバ陽性 (%)	Odds 比 (95% CI)	χ^2	p value
循環式	700	156 (22.3)			
薬湯	42	22 (52.4)	3.836 (2.041-7.211)	19.681	$p < 0.001$
ジャグジー等	49	14 (28.6)	1.395 (0.732-2.658)	1.031	$p > 0.1$
露天	140	51 (36.4)	1.998 (1.356-2.944)	12.566	$p < 0.001$
掛け流し	76	44 (57.9)	4.795 (2.941-7.818)	45.440	$p < 0.001$

事例紹介:

ある地域において、平成 14、15 年度の 2 年間で、公衆浴場 16 施設、食品加工場 5 施設、計 21 施設の調査を行い、浴槽水 101 件、排水 16 件、計 117 件の試料を採取した。そのうちネグレリア属アメーバが検出された試料は、浴槽水 31/101 件 (30.7%) に対し、排水では 12/16 件 (75.0%) であり、排水系統で高率に検出された。ネグレリア属アメーバが検出された浴槽水 31 件の内訳は、循環式浴槽が 21/76 件 (27.6%)、掛け流し式 8/23 件 (34.8%)、薬湯 2/2 件 (100%) であった。ネグレリア属アメーバが検出された循環式浴槽 21 件は、いずれも遊離残留塩素管理が徹底されていなかった平成 14 年度の調査施設であり、平成 15 年度に調査を行った循環式浴槽 36 件はすべての施設で遊離残留塩素が 0.1mg/L 以上検出され、ネグレリア属アメーバは検出されなかった。一方、ネグレリア属アメーバが検出された掛け流し式 8 件 (うち平成 15 年度 1 件) 及び薬湯 2 件 (平成 15 年度分) からはいずれも残留塩素が検出されず、今後は掛け流し式あるいは薬湯などの特殊浴槽の管理に注意が必要である。

1) 浴用水 (薬等を除く)

本年度の浴用水調査結果のうち、遊離残留塩素濃度と pH の値が記載された浴槽水 587 試料 (18 地域 402 施設) を抽出し、アメーバの検出状況と遊離残留塩素濃度および pH の関係をド

ットプロットで表した(図-1)。浴用水の pH 範囲はおよそ pH6 から pH9 の範囲(pH2.5 - pH9.5)で、中央値は pH7.8 であった。また、試料水の遊離残留塩素濃度は不検出から 6mg/L と極端に高い値を示すものがあつたが、中央値は 0.3mg/L であつた。図-1 で明らかなように、アメーバ陽性試料の pH 範囲は陰性群のそれとほぼ重なつていた。ちなみに、アメーバ陽性群の pH の中央値は 8.1(7.90±0.88)で、陰性群の中央値 7.8(7.76±0.75)よりも若干高い傾向が認められた。一方、アメーバ陽性試料の遊離残留塩素濃度は低値に集中してゐた。図-2 に遊離残留塩素とアメーバの検出率との関係をヒストグラムで示したが、アメーバ汚染防止に効果を示す濃度は 0.2mg/L 以上であることが明瞭に示された($\chi^2=163.460$; $p<<0.001$)。ちなみにアメーバ陽性であつた浴用水の遊離残留塩素は 0.07±0.17mg/L(中央値:0.5mg/L)、陰性であつた浴用水では 0.83±0.84mg/L(中央値:0mg/L)と計算された(表-5)。なお、今回調査した浴用水のうち、レジオネラ汚染防止の指導に沿つて遊離残留塩素濃度が 0.2mg/L を超えていた件数は 451 件(76.8%)であつた。

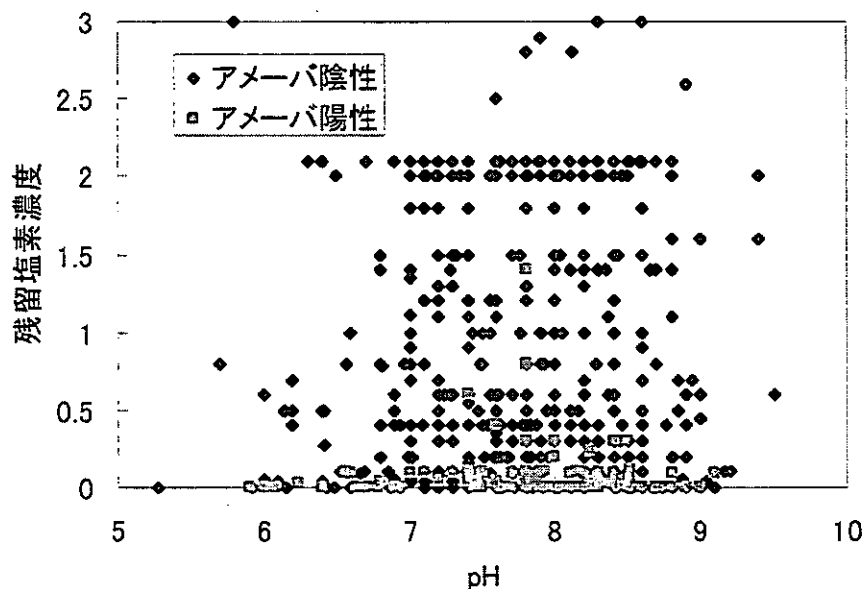


図 1. 残留塩素濃度と pH とアメーバ検出の関係

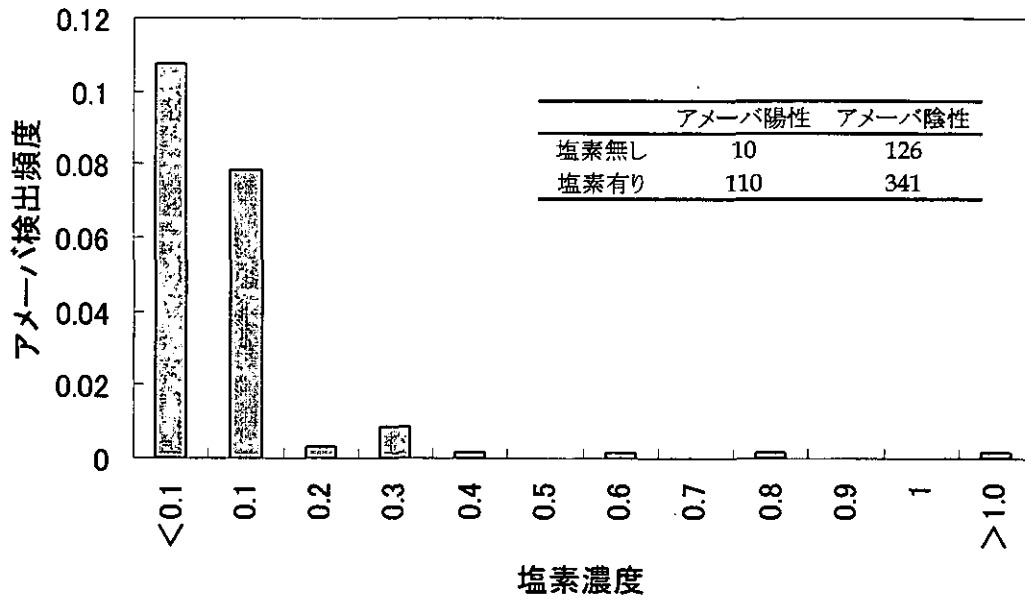


図 2. アメーバ検出と塩素濃度の関係 (n=587)

表-5 浴用水の遊離残留塩素濃度とアメーバの検出状況

遊離残留塩素濃度 (mg/L)	平均 ± SD	アメーバ		全体
		陽性	陰性	
		0.07 ± 0.17	0.83 ± 0.84	0.68 ± 0.81
	中央値	0.5	0	0.3

2) 内湯(循環式浴槽水)

表-2には循環式浴槽、掛け流し浴槽および、浴槽の形状が不記載であったものを加えて内湯としてまとめたが、ここから掛け流し式と不記載のものを除いた 700 件が循環式浴槽水であった。循環式浴用水におけるアメーバ類の検出率は 22.3%、ネグレリア属アメーバは 77 検体 (11%) で、アメーバの検出率は調査試料中で最も低い値を示した。

3) 掛け流し式浴槽

掛け流しは、源泉原水で直接浴槽を満たしオーバーフローさせることで換水を行う形式のものである。平成 14 年度調査においては、水の循環使用を行っていないのにも関わらず一般細菌およびアメーバ類が効率的に検出される事例が判明している。本年度もその状況を把握するために、7 地域 30 施設、76 浴用水を対象として調査した。その結果、44 件 (57.9%) の浴用水からアメーバが検出され、ネグレリア属アメーバは 24 試料 (31.6%) から検出された。また、病原性が知られる *N. australiensis* が 3 試料から検出された。後述のろ過なし循環浴槽と同様に排水に近い汚染状況にあることが示された。掛け流し式浴用水のアメーバ汚染は循環式浴槽の浴用水に比べて有意 ($\chi^2=45.440$, $p<<0.001$) に高いことが改めて示された (表-4)。これらの試料におけるアメーバ検出率の違いはもっぱら塩素管理の差によるものと推測される。ちなみに、掛け流し式の浴槽で 0.2mg/L 以上の遊離残留塩素濃度が維持された施設は認められなかった。

近年は掛け流し式の施設と申告 (表示) されているにもかかわらず、加温のための循環装置が設置されていることもあることから、構造を把握してからの対策・管理が必要である。本調査では循環装置を設置している掛け流し式浴槽は『循環式』に分類して扱った。

4) 薬湯水

薬湯水は 9 地域 26 施設、42 検体を対象とした。そのうちの 22 検体 (52.4%) からアメーバが検出され、ネグレリア属アメーバは 11 試料から検出された。一般論として、薬湯は有機物を多量に含むことが多く、遊離残留塩素管理は難しいとされるが、遊離残留塩素濃度が測定された試料は 26 検体で、0.2mg/L 以上の遊離残留塩素が検出された薬湯は 14 検体あった。遊離残留塩素が測定された 26 検体の薬湯における塩素消毒の効果を χ^2 乗検定すると、表-6 に示すように、薬湯であっても遊離残留塩素濃度が保たれている浴槽 ($\geq 0.2\text{mg/L}$) ではアメーバの検出率が有意 ($p<0.005$) に低いことが示された。

表-6 薬湯における塩素管理とアメーバの検出

遊離残留塩素濃度	アメーバ陽性	アメーバ陰性	
0.2mg/L 以上	4	10	14
0.2mg/L 未満	10	2	12
	14	12	26

$$\chi^2 = 7.797, P < 0.01$$

5) 露天風呂

露天風呂は 18 地域 112 施設から 141 試料を採取した。その内の 51 試料 (36.4%) からアメーバが検出され、21 試料からネグレリア属アメーバが検出された。また、露天風呂の 4 試料から *N. australiensis* が分離された。循環式浴槽に比べて露天風呂のアメーバ汚染は有意に高い値となっている (表-4)。141 試料のうち、遊離残留塩素濃度の測定がなされていた試料 96 検体を抽出し、これらの中で、0.2mg/L 以上の遊離残留塩素濃度を示した試料とそれ未満のものとの間にアメーバの汚染率に差があるか検定した。その結果、表-7 に示すように両者のアメーバ汚染率には有意の差 ($p < 0.001$) があることが示された。

表-7 露天風呂における塩素管理とアメーバの検出

遊離残留塩素濃度	アメーバ陽性	アメーバ陰性	
0.2mg/L 以上	9	49	58
0.2mg/L 未満	20	18	38
	29	67	96

$$\chi^2 = 15.00008, P < 0.001$$

6) ろ過槽を持たない循環式浴槽

本調査の過程で、ある地域ではろ過装置を装備せず、数日ごとの完全換水 (1~3 日) で営業している循環式浴槽が存在していた。原水として使用している水は地下水・井戸水、水道水、温泉水またはそれらの混合であった。これらに該当する 8 施設 14 浴槽のうち 12 の浴槽からアメーバ類が検出され、4 検体から *N. australiensis* を含むネグレリア属アメーバが分離された。この汚染率は浴槽排水にほぼ匹敵した。このような形態で営業されている浴槽の種類は内湯が 7 件、薬湯が 4 件とおよび、露天風呂が 3 件であった。換水頻度を別にすれば、このような浴槽は従来の銭湯に近い構造と考えられるが、これを踏まえると、銭湯での調査の必要性が示唆される。

7) 細菌学的汚染度とネグレリア属アメーバ検出状況

調査試料ごとに分離された *Naegleria* 種の分布を見ると、排水からは *N. australiensis* が多く検出される傾向が見られたが、細菌類に高度に汚染された薬湯 (一般細菌 10^6 個/ml) から大量の *N. australiensis* が検出された例があった。そこで、試料水の一般細菌数に応じたネグレリア属アメーバの出現頻度を種ごとに比較した結果、*N. lovaniensis* は一般細菌数が $10^{3.6}$ 個/ml の試料で 50-70% の出現頻度、*N. tihangensis* は $10^{3.7}$ 個/ml の試料で 50% 程度の出現頻度であるのに対し、*N. australiensis* は一般細菌数の増加とともに出現頻度も増加し、 $10^{6.7}$ 個/ml の試料では出現頻度が 100% であった (図 3)。一般細菌数が $10^{6.7}$ 個/ml となる浴槽水及び排水が

6件と少ないが、今回の調査結果からは、実験的にマウスに対する病原性を示す *N. australiensis* は細菌類に高度に汚染された環境を好む可能性が示唆された。

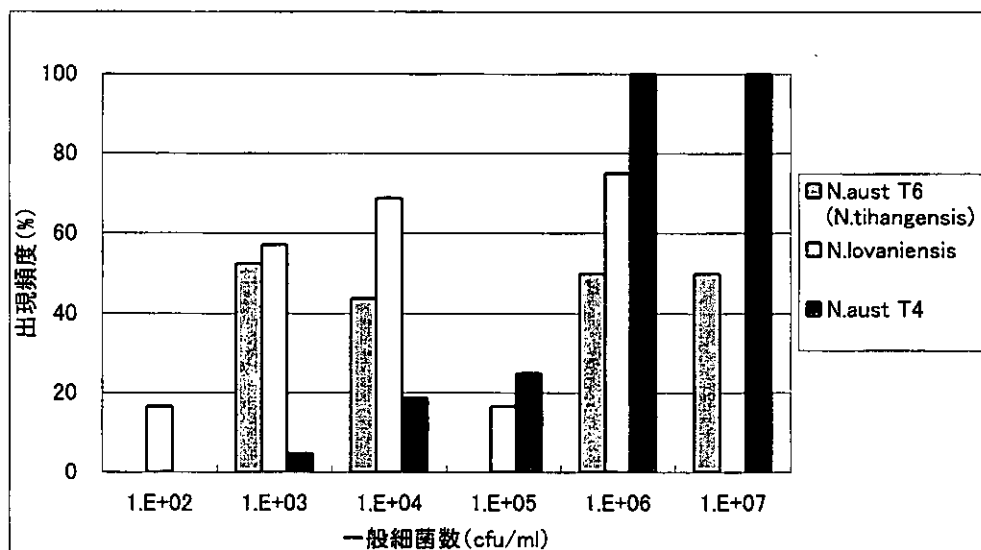


図-3 一般細菌数と *Naegleria* 属アメーバの出現頻度

5. アメーバ分離株の感染実験

病原性を有することが知られている *N. australiensis*, *N. philippinensis* ならびにその近縁種と *N. italica* 近縁種が検出されたことから、マウスを用いた病原性試験を行った。検査した分離株とその種類、および各感染方法における結果を表-8 にまとめた。これら実験感染動物の病理組織学的な検討は別途の分担研究にまとめた(高橋均:分担研究報告書)。

表-8、ネグレリア分離株-マウス病原性試験結果

分離株	種類	脳注感染		経鼻感染		皮下感染	
		死亡/試験	分離培養	死亡/試験	分離培養	死亡/試験	分離培養
K368	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
K201	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
K356	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
OA41	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
N138	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
N135	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
B33	N.aust.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
L1(#1)	N.aust.	1/6	+	ND	ND	ND	ND
G39(#1)	N.aust.	1/5	+	ND	ND	ND	ND
G39(#2)	N.aust.	2/5	+	0/5	ND	0/5	ND
H25-18(#1)	N.aust.	1/5	+	ND	ND	ND	ND
H25-18(#2)	N.aust.	3/5	+	0/5	ND	ND	ND
J4311(#1)	N.aust.	3/5	+	ND	ND	ND	ND
J4311(#2)	N.aust.	3/5	+	0/5	ND	ND	ND
K1(#1)	N.aust.	2/5	+	ND	ND	ND	ND
K1(#2)	N.aust.	3/5	+	0/5	ND	0/5	ND
GHC-14(#1)	N.aust.	4/5	+	ND	ND	ND	ND
GHC-14(#2)	N.aust.	0/5	-	0/5	ND	ND	ND
J423	N.aust.	発症2/5	ND	ND	ND	ND	ND
A10	N.aust.	発症2/5	-	ND	ND	ND	ND
YODO6	N.aust.	発症1/5	-	ND	ND	ND	ND
F13-2	N.ita.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
DD36	N.ita.	0/5	ND	ND	ND	ND	ND
AB-T-F3	N.ita.	5/5	+	ND	ND	ND	ND
K415(#1)	N.phi	1/5	+	ND	ND	ND	ND
K415(#2)	N.phi	0/5	-	0/5	ND	ND	ND

分離株(#1)1回目感染
 分離株(#2)同一株(感染後再分離)による2回目感染
 N.aust.: *N.australiensis*
 N.ita.: *N.italica*
 N.phi.: *N.philippinensis*

死亡/試験 : 死亡頭数/全試験頭数
 死亡/試験 ND: 感染実験せず
 分離培養 +: 培養成功
 分離培養 -: 培養不成功
 分離培養 ND: 培養試験せず

1) *N. australiensis*

N. australiensis は 10 地域より得た 16 株を感染実験に供した。そのうち 6 地域より分離した K1、G39、GHC-14、H25-18、J4311 ならびに L1 の計 6 分離株において、脳注マウスに対する致死病的病原性が認められた。各分離株は H25-18 を除き、7 日以内に最初の死亡例が確認され

た。H25-18は死亡するまでの日数が長く、17日目に1頭の死亡が確認されたのみであった。死亡マウス数で比較すると、GHC-14の4頭が最多であった。

死亡マウスは剖検後、脳組織を摘出しアメーバの再分離を行った。病原性のあった上記6株の*N. australiensis*についてはすべて再分離に成功した。さらに、再分離した6株については、再分離後培養したアメーバをマウスに再接種させ、K1、G39、H25-18、J4311ならびにL1の5株については致死病的病原性が再現された。なお、1回目の感染実験で再分離されたアメーバを培養し、経鼻感染および皮内接種を行ったところ致死病的病原性あるいは行動異常を惹起するような結果は得られず、動物実験に限っては経鼻的な感染経路は否定的であった。

接種マウスへの障害が致死病的ではないが行動異常を惹起する分離株として、A10、J423ならびにYODO6が確認された。A10感染の場合は、2頭が発症し、2頭同様に激しく頭部を上下に断続的に振り続ける特異な行動を示した。一方、J423感染の場合は、2頭がネグレリア感染マウスに特徴的な旋回行動を断続的に示し、体位が側方に強く傾くため頻繁に転倒した。YODO6は1頭が旋回運動を示した。これらの特徴的な行動は感染1ヶ月後も継続しており、株によっては非致死病的で行動異常に限定された病原性を表わす場合があるものと思われた。なお、これらの行動異常とアメーバ感染の関係を明らかにするために、異常のみられたA10およびJ423感染マウスを1頭ずつ安楽殺後、剖検し、アメーバの再分離を試みた。3週間培養を継続した時点で、アメーバの増殖は確認できなかった。

2) *N. philippinensis*

*N. philippinensis*はK415の1株を感染実験に供した。脳内接種により1頭のマウスに致死病的な障害が認められた。マウスは感染後9日目に死亡したており、*N. australiensis*の病原性に匹敵していた。K415接種により死亡したマウスからアメーバが再分離され、感染が確認された。再分離されたアメーバを培養して経鼻感染を行ったが、致死病的病原性あるいは行動異常を呈するような結果は認められなかった。

3) *N. italica* 近縁種

*N. italica*は対照として用いたイタリア国内分離株であるAB-T-F3を含め、国内分離株のF-13ならびにDD36の計3株を試験した。対照株であるAB-T-F3は2週間以内に実験感染に供した5頭すべてが死亡し、強い病原性が示されたのに対し、国内分離の近縁種2株には行動異常を含め、マウスに対してなんら障害を惹起することはなかった。

D. 結論

当該研究では全国的な状況を判断するために、全国14地方衛生研究所の協力を得て、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。最終年度は14地域に周辺の11の自治体を加え計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。平成15年度におけるアメーバの検出率は30.2%と前年と同程度の汚染にとどまっていた。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よう。ちなみに、平成 13 年度の検出率（48.5%）との間での検定では有意（ $p < 0.001$ ）の差が認められた。

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と考えられた。調査期間中に *N. fowleri* は検出されなかったが、ネグレリア属にあつては *N. lovaniensis* が際立った優占種であることが明らかとなった。本種は *N. fowleri* と形態的同一種で同一環境に生息することから、わが国の温水環境は *N. fowleri* の棲息に適した環境であることが指摘される。また、本研究事業を通して実験的に病原性が証明されている *N. australiensis* や *N. philippinensis* の存在が示されたのみならず、前者は全国的に分布していることが確認された。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* のいずれもがマウスに対する致死的な障害性を示した。ただし、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た。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*, *N. laresi*, *N. clarki*, *N. jamiensoni* など、きわめて多様なネグレリア属アメーバ種が生息しており、これらの中には病原性が不明のものも少なくないことを付記する。

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、温泉原水などでの繁殖は考え難いが、低率ではあるが原水や貯湯槽からも検出された。貯め湯することでアメーバなどの微生物汚染が始まることから、安易な貯め湯は極力避けるべき行為と考える。

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。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検出率は低い値を示した。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、実際には微生物汚染率が高いことが判明した。また、薬湯や露天風呂も循環式浴槽に比べて高い検出率となっていた。この現象は浴用水の塩素管理状況と相関させることで説明が可能である。図-1に見られるように、アメーバ類の検出された浴用水は遊離残留塩素濃度の低い浴用水に集中していることが見て取れる。これらの施設では塩素管理が難しかったり、あるいは免除されるとの誤解があつたりして実際に塩素投入がなされていない例が多いものと推測される。

図-2 に示すごとく、遊離残留塩素 0.2mg/L を境にしてそれ以上の濃度でアメーバ類はほとんど検出されないことが判った。この間、厚生労働省指導のもとでのレジオネラ汚染防止対策強化では塩素消毒の徹底が図られていることは周知の事実である。この施策が現場に浸透・反映してきたことが伺える現象として、0.2mg/L 以上の遊離残留塩素濃度が検出された浴用水がおよそ 77%に達していたことが挙げられる。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、少なくとも循環式浴槽に関しては浸透してきたものと判断される。薬湯や露天風呂におい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る（表-6、表-7）。

遊離残留塩素の殺菌効果は pH レベルに依存し、高 pH 環境下で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。ちなみに、調査に供された温水試料は概ね pH6～pH9 の範囲にあった。また、過マンガン酸カリ消費量や電気伝導度などその他の要因とアメーバの出現との関連性については、得られた試料数が少ないことや、塩素の効果が顕著であったことから解析には至らなかった。

E. 研究協力者コメント

[A]

平成 15 年度 水試料、感染研へ送付、分離、同定。レジオネラ検査用のため、日数がたっていたが、アメーバは検出された。6施設 9試料から、3施設、3試料がアメーバ陽性であり、アメーバ 74 株を得た。*Naegleria* の検出された試料は、温泉水と薬湯の 2 試料であった。

[B]

平成 13 年度から 15 年度にわたり、温泉旅館 18 施設 47 試料の浴槽水及び温排水からアメーバの検出を試みた。平成 13 年度は 11 施設 23 試料のうち 7 施設 9 試料(浴槽水 8 試料、温排水 1 試料)から *Naegleria* 11 株、*Platyamoeba* 8 株、*Hartmannella* 2 株、*Acanthamoeba* 1 株検出された。平成 14 年度は、前年度にアメーバが検出された 4 施設 13 試料について調査した結果、3 施設 6 試料(浴槽水 3 試料、温排水 3 試料)から *N. lovaniensis* 13 株、*N. australiensis* 3 株、*Naegleria. spp* 7 株等が分離された。平成 15 年度は、県内のレジオネラ属菌調査と併行して、平成 13 年にアメーバが検出された 2 施設 4 試料と新規の 7 施設 7 試料から *Naegleria* の分離を行った。平成 13 年にアメーバが検出された 2 施設 (D,G 施設) の浴槽水 4 試料のうち 1 施設 (G 施設) 2 試料から *N. lovaniensis* 28 株が分離された。また、2 施設の配管等のぬめり 11 試料の全てからアメーバを分離し、このうち 9 試料から分離されたアメーバは全て *N. lovaniensis* であった。今回の調査において県内の温泉施設から *N. lovaniensis* が高率に分離された。

平成 15 年度は *Naegleria* が検出された浴槽水及び配管のぬめりからのレジオネラ属菌検出率は 84%(n=98)に達し、*Naegleria* とレジオネラ属菌の関連性が明確となった。そのため、レジオネラ属菌の検査時にアメーバ検査を併行することによってレジオネラ属菌の発育以前に、レジオネラ属菌の分離確率が推定可能であった。アメーバが検出された浴槽水の残留塩素濃度は 0.1 mg/L 以下であったのに対し、検出されなかった浴槽水の残留塩素濃度は 0.4 mg/L 以上であった。当県は平成 12 年より温泉施設のレジオネラ属菌調査を実施してきたが、年毎にレジオネラ属菌汚染防止のため残留塩素濃度を徹底する施設の増加や、適度な残留塩素濃度を保持することが困難なため多量の塩素系薬剤を投入する施設も確認されている。しかし残留塩素濃度が高い施設の排水からもアメーバは検出され、高濃度の塩素系薬剤を投入するのみでは施設内からアメーバを完全に除去することは困難と考えられた。

[参考:レジオネラ属菌調査概要]

平成 12 年度から 3 年間の調査において、約 6 割の施設からレジオネラ属菌を検出し、そのレジオネラ属菌を除去するためには、薬剤処理や電動ブラシの使用等の清掃が効果的であることを確認した。しかし、これらの方法ではレジオネラ属菌を除去できない施設も認められたことから、その原因を追求するために、施設から検出した複数の菌株について PFGE 解析を行った。その結果、同じ浴槽から異なる時期に検出した同一血清群の *L. pneumophila* 菌株の中に、同一パターンを示す株が存在した。このことは、浴槽の清掃等が不完全なため同一菌株が長期にわたり生存し続けていたと推測され、浴槽以外の配管内などにも有機物が付着してバイオフィルムを形成し、レジオネラ属菌の増殖場所になっている可能性が考えられた。

そこで、より効果的なレジオネラ属菌汚染防止対策を構築するために配管内のレジオネラ属菌の汚染状況を把握し、配管の清掃がレジオネラ属菌の生息に与える影響を調査した。

(D 施設)

平成 15 年 7 月 3 日に調査を開始。7 月 3 日と 8 月 5 日に配管清掃を実施し、配管清掃後は次回の配管清掃まで 1 週間間隔で検査を実施した。

浴槽水は、清掃前 (B8) と清掃後 (B9) に採取し、浴槽周辺のぬめり (B10) も採取した。

配管からの検体は、配管洗浄に使用したスポンジ (B11, 12, 13) と清掃後・消毒前又は清掃・消毒後に配管 (B14, 16) から、ガーゼでぬめりをふきとり、検体とした。また、ヘアキャッチャー (B15) からは、たまり水を採取した。

(G 施設)

3 日毎に実施している配管清掃時に調査を行い、6 月 30 日から開始した。

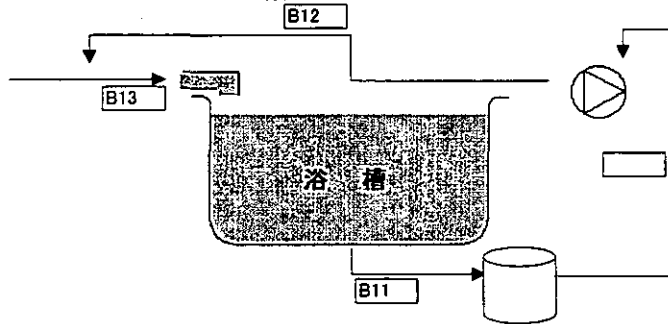
浴槽水は、D 施設と同様に採水を行い、浴槽周辺のぬめり (B6) も同時に採取した。

配管は、清掃・消毒前に浴槽へ開口している配管 (B3) 及びヘアキャッチャー近くの配管 (B4) のぬめりをガーゼでふきとり採取した。また、ヘアキャッチャー (B5) からは、たまり水を採取し検体とした。

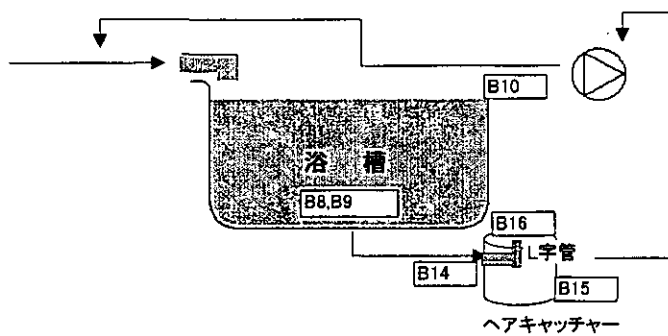
検体採取場所

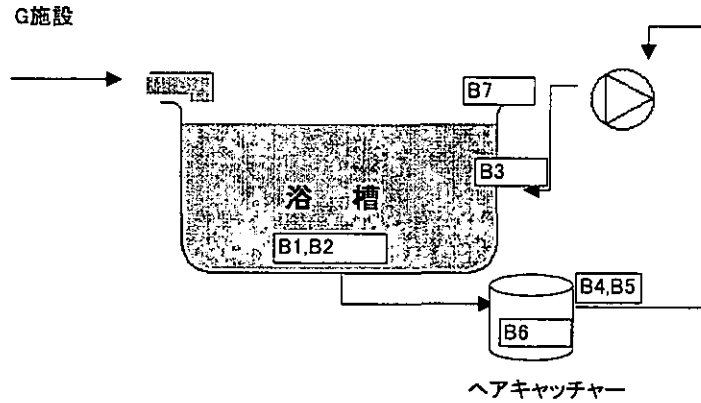
D 施設

配管清掃(スポンジ清掃)



浴槽水、浴槽周辺、配管(温泉水及びガーゼ)





[C]

- (1) 調査期間 ①平成13年度 11月から1月まで
 ②平成14年度 8月から12月まで
 ③平成15年度 8月から11月まで

(2) 試料の種類及び数

- ①浴槽水 59検体 工場排水 6検体
 ②工場排水 3検体
 ③工場排水 3検体 湖水 2検体

(3) 検査方法

- ①試料原液と濃縮したもの1mlを各々1枚のプレートに接種して42℃で培養し、発育したアメーバのプラークをクローニングしたものを感染症研究所に送付。
 ②③試料原液と濃縮したもの1mlを各々数枚ずつのプレートに接種して42℃で培養し、ネグレリア属を疑うプラーク及びその他のアメーバのプラークを10株程度クローニングして検査した。ネグレリア属と思われるものについては、PCR-RFLP法で同定を行った。その他、各泉質を確認し、水温、pH等の測定を実施。

(4) 結果

	試料	試料数	アメーバ 陽性試料数	ネグレリア 陽性試料数	ネグレリア				その他 アメーバ
					NI	NA	NT	?	
3	浴槽水	59	0	0					
	工場排水	6	1	1	1				
4	工場排水	3	3	3	3	1	1		2
5	工場排水	3	3	1					3
	湖水	2	2	0	1	1		1	2

NI: Naegleria lovaniensis; NA: N. australiensis; NT: N. tihangensis; ?: unknown

まとめ

- 1 浴槽水及び湖水からは、ネグレリア属のアメーバは検出されなかった。

- 2 13年度にネグレリア属のアメーバが検出された工場の排水を、14・15年度にわたり3回ずつ継続して検査したところ、15年度の第1回目まで連続してネグレリア属が検出されたが、第2回目以降検出されなくなった。なお、排水の水温は、調査期間を通じて約25～40℃、pHは7前後であった。
- 3 ネグレリア属は、大半が*N. lovaniensis*であったが、*N. australiensis*が少数検出され、*N. fowleri* は検出されなかった。
- 4 ネグレリア属のプラーク数は、試料1 mlあたり1～12であった。

[D]

県内の昨年度と同じ温泉施設(1施設)について、浴槽水、排水について調査を行った。

- ・ 試料数：浴槽水7 排水3～5
- ・ 培養・分離法：すべての試料において42℃でまる3日間培養し、その間生じたプラークを分離した。

◇調査施設について

施設の概要と採水時の状況

- ・ 泉質は硫黄泉と単純泉。浴槽は硫黄泉が2件、単純泉が5件(2件は露天風呂)計7件。
- ・ 浴槽水は源泉からの湯をつぎたしつつ循環使用。浴槽により1週間～1ヶ月で交換。

◇アメーバの分離結果

第1回調査

浴槽水

- ・ 調査した7浴槽水からアメーバは不検出であった。また、調査した浴槽水すべてから残留塩素が検出(濃度:0.6～2.6 mg/L)された。

排水

- ・ 調査した3排水のうち1排水から *Naegleria* 属を含むアメーバが検出された。アメーバ不検出の2試料からは残留塩素が検出(濃度:0.5 mg/L)された。
- ・ 分離された *Naegleria* 属アメーバは *N. spp* であった。

第2回調査

浴槽水

- ・ 調査した7試料のうち、2試料(硫黄泉)より *Naegleria* 属を含むアメーバが検出された。この2試料からは残留塩素は検出されなかった。他の5試料からは残留塩素が検出(濃度:0.4～3.2 mg/L)され、アメーバは不検出であった。
- ・ 検出された *Naegleria* 属アメーバは *N. australiensis*、*N. lovaniensis* であった。

排水

- ・ 5試料中3試料からアメーバが検出され、このうち2試料からは *Naegleria* 属を含むアメーバが検出された。アメーバ不検出の2試料からは残留塩素が検出(濃度:0.5～0.8 mg/L)された。
- ・ 検出された *Naegleria* 属アメーバは *N. italica*、*N. lovaniensis*、*N. spp* であった。

(調査結果のまとめ)

- ・ 今年度の調査でも浴槽水、排水いずれからも人に対する病原性を持つ *N. fowleri* は分離さ

れなかった。

- ・ 浴槽水からは昨年度と同様 *N. australiensis* が分離された。また、昨年度は分離されなかった *N. lovaniensis* が分離された。
- ・ 排水からは昨年度と同様 *N. fowleri* とまぎらわしい PCR-RFLP のバンドを示す種を含む *N. spp* と、*N. lovaniensis* が分離された。また、今年度の特徴として昨年度は分離されなかった *N. italica* が分離された。

今年度分離された *Naegleria* 属アメーバのうち実験的に病原性が報告されているのは *N. australiensis*、*N. italica* である。昨年度、今年度とも残留塩素が検出された試料からアメーバは検出されなかった。このことは、同じ温泉水を繰り返し使用する循環式温泉において、消毒処理の重要性を示唆していると考えられた。

[E]

総施設数112、試料数226の温泉水または貯湯水を調査したところ、69 試料、アメーバ陽性そのうち、11 試料が *N. lovaniensis* を検出した。得られた *Naegleria* 属はすべて *N. lovaniensis* であったが、単離同定に用いた株数が少数になり、他のネグレリア属アメーバの検出される可能性を残した。アメーバの検出頻度が高い試料については、レジオネラ菌検出数が高かった。レジオネラ菌数の高い試料に多くの”その他”のアメーバが認められ、詳細な分析またはその関連性を明らかにしてゆく必要がある。

[F&FN]

県内6施設25試料(浴槽水23試料、浴槽排水2試料)、FN市内3施設17試料(すべて浴槽水)についてアメーバの分離、同定を行った。浴槽水の内、残留塩素が測定できたのは35試料であった。

(結果)

- ・ 浴槽水では8施設(89%)19試料(48%)からアメーバが分離された。試料中の株数は、1～2,500株/100mLであった。

残留塩素の有無で見ると、塩素未検出の試料は15試料であり、そのうち12試料(80%)からアメーバが検出され、分離株数は7～25,000株/100mLであった。塩素が検出された試料は20試料で、そのうち6試料(30%)からアメーバが検出された。分離株数は1～10株/100mLと少なく、*Naegleria* 属は分離されなかった。

浴槽排水では1施設1試料からアメーバが分離され、分離株数は500,000株/100mLであった。

全体のクローニング数162株の内、*Naegleria* 属は38株(23%)であった。内訳は、*N. lovaniensis* 19株、*N. australiensis* 15株、*N. italica* 2株、*Naegleria spp.* 2株であった。

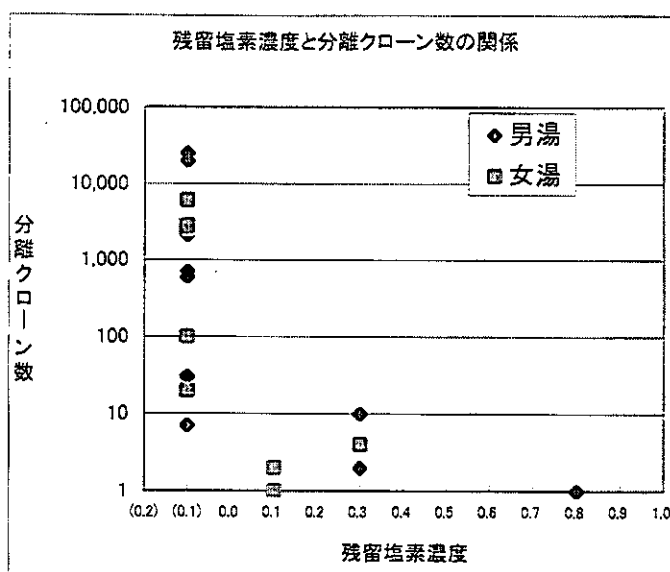
(考察)

浴槽水と浴槽排水を併せると全ての施設からアメーバが分離され、アメーバが広範囲に生息していることが再確認された。

残留塩素が検出された検体において *Naegleria* 属は分離されておらず、塩素消毒の有効性が再確認された。これらの検体においては、塩素に強い *Acanthamoeba* 属等が分離されたと思われるが、分離数は1～10株/100mLと少数であった。

Naegleria 属の分離率は、昨年の全体の結果に比べ低かった。分離された *Naegleria* 属は、昨

年は *N. lovaniensis* のみであったが、今回はF県内では *N. lovaniensis* に加え *N. australiensis*、*N. italica*、*Naegleria* spp.、FN 県内では *N. lovaniensis* と *N. australiensis* が分離された。



[G]

前回までと同じ施設43施設及び浴槽水を中心とした試料76試料を含む54施設、95試料の検査を実施した。アメーバ類を検出した施設数は17(31%)で、試料数は22(23%)であり、それらのうち *Naegleria* と同定したのがそれぞれ11(アメーバ検出数に対して65%)と15(同じく69%)であった。*Naegleria* は、1施設を除いてすべて病原性のない *N. lovaniensis* であった。1施設から *N. australiensis* が検出された。

今回は遊離残留塩素が 0.2 mg/L 以上でもアメーバ類が検出された試料があったが、今回の調査では、アメーバ類が検出された試料は、1試料で遊離残留塩素が 0.05mg/L 検出された以外は、全て遊離残留塩素が 0.05 mg/L 未満であった。塩素消毒の効果がより明瞭になった結果となった。

前回と同じ試料での結果を見ると、アメーバ類が検出された施設数は、18から12へ、試料数は、22から14へ減少した。1回目の結果を受けた保健所による指導により改善されたが、アメーバを完全に不検出とするためには、より以上の維持管理の徹底が必要と思われた。

また、同時に検査を実施した *Legionella* 属菌の結果では、アメーバ類と同時に検出されたのが14、アメーバ類のみ検出されたのが4、*Legionella* 属菌のみが検出されたのが6となり、両者が共存して生息していることを示したが、それ以外の結果も予想以上に多かった。

[GH]

11施設24試料でアメーバ類の検査を行った。試料の種類は、主浴槽、露天風呂、排水、逆洗水で行った。1施設を除く10施設、16試料からアメーバ類が検出された。特に、排水中からの検出率が高く(91%)、逆洗水の2試料いずれからもアメーバ類が検出された。同定のための検査を継続しているため、確定はしていないが、10試料から *Naegleria* が検出され、*N.*

lovaniensis が4試料から *N. australiensis* が2試料から、*Naegleria* sp. と考えられる株が2試料から検出された。

アメーバ類が検出された試料は、残留塩素が0.05 mg/L 以下が11試料で、塩素消毒が不十分な施設が多かった。しかし、2試料において、pH が7付近で残留塩素が1 mg/L 以上あった試料でもアメーバ類が検出された。これらは、排水と逆洗水であったことから、懸濁物が多いため、アメーバ類が塩素から保護されていたためと考えられる。

[OA]

29施設、白湯、露天風呂、薬湯などの浴槽水113試料(再検査を含む。採水箇所数は72)について、アメーバ類と *Legionella* 属菌の検査を行った。22試料から *Naegleria* 属(7試料)、*Hartmannella* 属(4試料)、*Vannella* 属(5試料)、*Vahlkampfhia* 属(1試料)及びその他のアメーバ類が検出された。*Naegleria* は *N. lovaniensis* が7試料から38株、*N. australiensis* は1試料から2株同定した。

アメーバが検出された22試料中、7試料で残留塩素が検出されなかったが、11試料が0.5mg/L 以上存在しており、塩素消毒の効果が見られない場合が多かった。残留塩素がない場合も含め、薬湯からのアメーバ類が検出される割合が高く、8の薬湯(再検査を含めると11)からアメーバ類が検出された。薬湯における維持管理が難しいことが示された。

[H]

本年度は、近県の温泉水、公衆浴場を含め調査を行った。温泉水からは、*Naegleria* 及び *Hartmannella*, *Acanthamoeba* が分離され、公衆浴場からはアメーバは検出されなかった。温泉排水からは、*Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *platyamoeba*, *Filamoeba* 及び *Rhizamoeba* が検出された。

3年間としまして温泉水、温泉排水、工場排水からは *Naegleria* が多数検出された。温泉排水、工場排水からは *N. australiensis* や *N. philippinensis* が検出されたが、温泉水からは、*N. Lovaniensis* のみであった。

[I]

平成13年度～15年度の3年間に、のべ274施設の浴槽水(多くは循環式の浴槽水で一部浴槽水の排水や原水等を含む) 339検体について検査を実施した。13年度および14年度の結果については既に報告書に示しているが、13年度は116検体中42検体(36.2%)、14年度は111検体中22検体(19.8%)からアメーバが検出された。このうち、13年度の13検体(11.2%)と14年度の14検体(12.6%)からネグレリア属が検出され、特に14年度に検出されたネグレリア属はすべてが *N. lovaniensis* であり、特徴が見られた。15年度も112検体について検査を行ったところ、21検体(18.8%)がアメーバ陽性でネグレリア属は5検体(4.5%)より検出され、*N. australiensis* が2検体、*N. lovaniensis* が3検体で、*N. australiensis* が初めて検出された。アメーバの検出率は13年度に比べて14年度及び15年度では半減しており、ネグレリア属の検出率も15年度は13年度や14年度に比べて減少しかなり低率で、循環式浴槽の管理指導の成果があらわれているものと思われた。しかし、何れの年度においてもネグレリア属が検出された施設については病原性のある *N. fowleri* による汚染の可能性が否定できないため、十分な対策が求められる。ネグレリア属以外のアメーバは *Acanthamoeba*, *Hartmannella*, *Platyamoeba*, *Echinamoeba*, *Vannella*,