

れ、他の株とも差異が認められた。

N. italica

N. italica に近い塩基配列を有する分離株が我が国の温水環境から複数分離され、本研究では近縁種として注意を払ってきた。ITS1/ITS2 領域で標準株と 8 塩基の違いがあり、18S rRNA では 12 塩基の違いが認められた。本研究で病原性を検討したところ、マウスへの病原性は認められなかった。

N. philippinensis

臨床分離株として報告された *N. philippinensis* (PI 株) と ITS1/ITS2 領域の塩基配列が完全に一致する分離株が得られた。一方、18S rRNA の塩基配列に関しては、標準株がイントロンを持つのに対し当該分離株 (K415) はイントロンを持たない点で異なっていた。イントロンを除きその他の配列は完全に一致した。K415 分離株はマウスに対する病原性が確認されている。なお、ITS1/ITS2 領域で僅かに塩基配列を異にする分離株も得られており、今後の解析が待たれる。

その他のネグレリア属アメーバ

N. endoi, *N. mexicana*, *N. clarki*, *N. jamiesoni* と ITS1/ITS2 領域の配列が完全一致する分離株が得られており、他に近似の配列を有する分離株も得られた。この中で DD28 分離株は塩基配列では明らかに *N. fowleri* と異なるものであるが、PCR/RFLP 像において *N. fowleri* に類似することから、PCR/RFLP による同定を行なう際はこの分離株の存在を知っておくべきものとする。

D. 結論

PCR/RFLP 法および直接塩基配列決定を行うことで、簡便迅速にネグレリア属アメーバの種を同定することが可能となり、病原性アメーバの汚染調査において有効な手段として機能した。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ことにより、遺伝子型別によるネグレリア属アメーバの同定の試みは一定の成果を上げた。

参考文献

1. Sugita, Y., Fujii, T., Hayashi, I., Aoki, T., Yokoyama, T., Morimatsu, M., Fukuma, T. & Takamiya, Y. 1999. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: an autopsy case in Japan. *Pathol. Int.*, 49:468-470.
2. Pelandakis, M. & Pernin, P. 2002. Use of multiplex PCR and PCR restriction enzyme analysis for detection and exploration of the variability in the free-living amoeba *Naegleria* in the environment. *Appl. Environ. Microbiol.*, 68:2061-2065.

3. Dykova I, Kyselova I, Peckova H, Obornik M, Lukes J. Identity of *Naegleria* strains isolated from organs of freshwater fishes. *Dis Aquat Organ* 2001 46(2):115-21.
4. Nicholas, K.B., Nicholas H.B. Jr., and Deerfield, D.W. II. 1997 GeneDoc: Analysis and Visualization of Genetic Variation, *EMBNEW.NEWS* 4:14
(<http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>)
5. Sudhir Kumar, Koichiro Tamura, Ingrid B. Jakobsen, and Masatoshi Nei (2001) MEGA2: Molecular Evolutionary Genetics Analysis software, *Bioinformatics* Vol. 17, 12:1244-1245.
6. De Jonckheere, J. F. 2002. A century of research on the amoeboflagellate genus *Naegleria*. *Acta Protozool.*, 41:309-342.
7. De Johnckeere, J. F. 1987. Taxonomy. *In*: Rondanelli, E. G. (ed.), *Amphizoic Amoebae Human Pathology*, Piccin Nuova Libreria, Padua, Italy, p. 25-48.

E. 発表

論文発表

Izumiyama S, Yagita K, Furushima-Shimogawara R, Asakura T, Karasudani T, Endo T. Occurrence and distribution of *Naegleria* species in thermal waters in Japan. *J Eukaryot Microbiol* 2003;50 Suppl:514-5.

口頭発表

Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Reiko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Tatsuya Karasudani And Takuro Endo Occurrence and Distribution of *Naegleria* Species in Thermal Waters in Japan, International Workshop on Opportunistic Protist (Hawaii), 平成 15 年 7 月

Shinji Izumiyama, Kenji Yagita, Rieko Furushima-Shimogawara, Tokiko Asakura, Mako Omura, Tatsuya Karasudani, Takuro Endo Characterization of the *Naegleria* Isolates from Thermal Waters in Japan Xth International conference on the biology and pathogenicity of free-living amoebae (Ciudad Obregon, Sonora, Mexico.), 平成 15 年 10 月

朝倉登喜子、下河原理江子、八木田健司、烏谷竜哉 わが国の温水環境より初めて分離された *Naegleria australiensis*、環境技術研究協会年次大会、平成 15 年 6 月

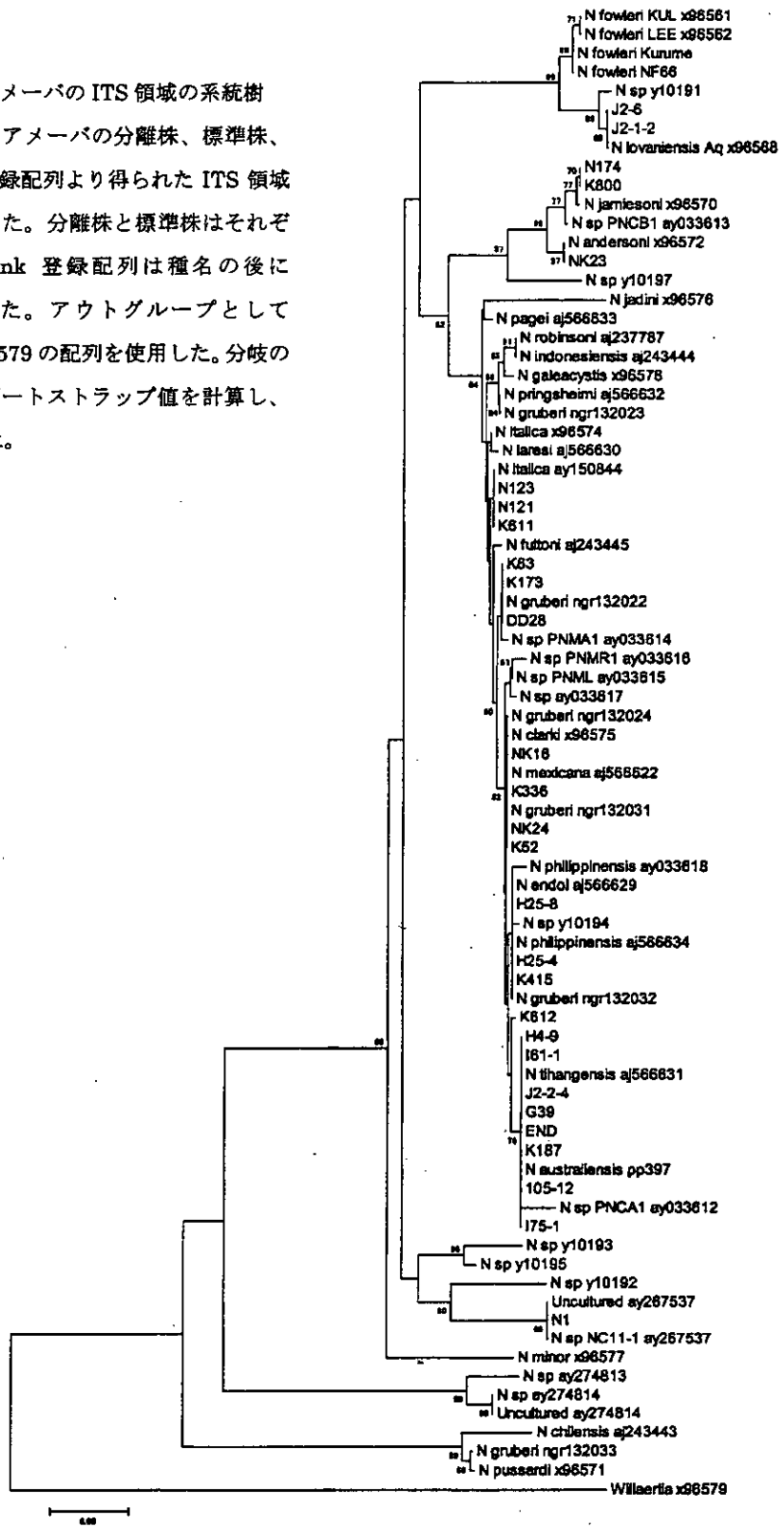
朝倉登喜子、八木田健司、下河原理江子、泉山信司、遠藤卓郎 温水環境より分離した *Naegleria* 属アメーバの遺伝子型別 日本原生動物学会 (東京)、平成 15 年 11 月

泉山信司、八木田健司、下河原理江子、朝倉登喜子、遠藤卓郎 温水環境より分離した *Naegleria* 属アメーバの遺伝子型別 日本寄生虫学会 (前橋)、平成 16 年 4 月

遺伝子型	株	ITS1/2領域における配列の差異の概要										標準株に対する 変異塩基数	PCR産物の 理論的 塩基数 (bp)	ITS1/2 領域の 塩基数 (bp)	ITS1/2領域の一 致度	分離株数								
		ITS1		5.8S rRNA		ITS2		LSU rRNA		500						H13	H14	H15	H16	計				
		1	50	100	150	200	250	300	350	400	450					500								
<i>N. australensis</i>	PP39(標準株)												395	308	308/308	100%	1	32	14	6	53			
	105-12	33			175			100		45			0	0	0	395	308	308/308	100%					
	END	33			175			100		45			0	0	0	395	308	308/308	100%					
	G39	33			175			100		45			0	0	0	395	308	308/308	100%					
<i>N. shanghaiensis</i>	T2A(AJ56631)												310											
	H4-9	33			175			102		45			0	0	0	397	310	310/310	100%	0	39	13	1	53
	I 75-1	33			175			102		45			0	0	0	397	310	310/310	100%					
	K187	33			175			102		45			0	0	0	397	310	310/310	100%					
	I 81-1	33			175			102		45			0	0	0	397	310	310/310	100%					
	J2-2-4	33			175			102		45			0	0	0	397	310	310/310	100%					
<i>N. loyensis</i>	Ao11/9/45D(標準株)												406	319										
	J2-8	41			175			103		45			0	0	0	406	319	319/319	100%	14	36	10	17	77
	J2-1-2	41			175			103		45			0	0	0	406	319	319/319	100%					
<i>N. fowleri</i>	NB6(標準株)												452	365										
	Kurume	84			175			106		45			0	0	0	452	365	365/365	100%	0	0	0	0	0
	KUL(標準株)	84			175			106		45			2	0	1	454	367	364/367	99.18%					
	IT9811(AJ033818)	86			175			106		45			0	0	2	452	365	363/365	99.45%					
<i>N. bataviae</i>	AB-T-F3(標準株)												459	372										
	N121	33			175			164		45			1	3	4	457	370	365/373	97.88%	0	5	6	0	11
	N123	33			175			162		45			1	3	4	457	370	365/373	97.88%					
<i>N. brassii</i>	EDF147(AJ566830)												369											
	K811	33			175			163		45			1	0	5	457	370	364/370	98.38%	0	1	3	1	5
<i>N. philippinensis</i>	PK(標準株)												408	321										
	K415	33			175			113		45			0	0	0	408	321	321/321	100%	0	1	2	1	4
	K812	33			175			113		45			0	0	1	408	321	320/321	99.89%	0	0	0	2	2
<i>N. andrii</i>	EDF8(AJ566828)												320											
	H25-4	33			175			112		45			0	0	0	407	320	320/320	100%	1	8	5	1	15
	H25-8	33			175			112		45			0	0	0	407	320	320/320	100%					
<i>N. mexicana</i>	MbJKAJ566822)												320											
	K338	33			175			112		45			0	0	0	407	320	320/320	100%	0	0	0	2	2
<i>N. olerti</i>	RJ00(X96575)												408											
	NK16	33			175			200		45	11		0	0	0	495	408	408/408	100%	0	4	2	0	6
<i>Neogleria</i> sp. PNMA-1	PNMA-1(AJ033814)												450	363										
	K173	33			175			155		45			0	1	1	450	363	362/363	99.72%	0	0	1	0	1
	K83	33			175			155		45			0	1	2	450	363	361/363	99.45%	0	2	1	1	4
	DD28	33			175			155		45			0	3	8	450	361	355/363	97.80%	0	2	4	0	6
<i>N. jamaicensis</i>	T58E(X96570)												307											
	K868	34			174			98		14			0	0	0	397	307	307/307	100%	1	3	1	3	8
	H174	34			174			98		48			0	0	2	397	307	305/307	99.35%	1	3	0	1	5
<i>Neogleria</i> sp. PNMR-1	PNMR-1(AJ033816)												407	320										
	K52	33			175			112		44			1	0	3	407	320	317/320	99.06%	0	2	2	0	4
<i>Neogleria</i> sp. PNML	PNML(AJ033815)												(372)											
	NK24	(27) 33			175			170		44 45			1	0	4	466	(378)	370/372	99.46%	0	0	2	0	2
<i>Neogleria</i> sp. NC11-1	NC11-1(AJ287537)												328											
	H1	38 38			175			117		45 45			0	0	0	415	328	328/328	100%	0	0	1	0	0
<i>N. andersoni</i>	A2 O36572)												308											
	JRC23	35 35			174			100		14 49			1	0	1	400	308	308/309	99.68%	0	0	1	0	1

図1. ITS領域に見られた多様性と分離株数

図2. ネグレリア属アメーバのITS領域の系統樹
 系統樹はネグレリア属アメーバの分離株、標準株、
 ならびに GenBank'登録配列より得られた ITS 領域
 の塩基配列より作成した。分離株と標準株はそれぞ
 れの株名を、GenBank 登録配列は種名の後に
 Accession No.を示した。アウトグループとして
Willaertia magna x96579 の配列を使用した。分岐の
 信頼性の指標となるブートストラップ値を計算し、
 50 以上の値を表示した。



```

* 20 * 40 * 60 * 80 * 100 * 120 * 140 *
K866 : TTGGT-AAAAGGTCGAAAGCCCTTT-----TTGCCCTCT-AAACTCTGTGCAATGGGACACACCGCTTGTGGATCGATGAAAGCCCGCGCAAAAGCGATATGATG *
N174 : -----T.A.----- *
NK23 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
DD28 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K173 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K63 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K611 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
N121 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
N123 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K336 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K52 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
H25-4 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
H25-8 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K415 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K612 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
105-12 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
END : -----T.A.C.-----A.C.----- *
G39 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
H4-9 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
I61-1 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
I75-1 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
J2-2-4 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
K187 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
NK24 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
NK16 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
J2-1-2 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
J2-6 : -----T.A.C.-----A.C.----- *
Kurume : -----T.A.C.-----A.C.----- *
N1 : -----T.A.C.-----A.C.----- *

```

```

* 160 * 180 * 200 * 220 * 240 * 260 * 280 * 300 *
K866 : AGATTCGTTAGCCTCGGATTCATCAAAATGGTGAACACATACTGGACCTC-TCTGAGGTACTTACGTTATAGTCTAGTGTATTTTATATCAATTCATCTCTGTAATAAGTGT-TTGACCAITTAGGTCTTACCCCTAGCTGGAGTAGCCGG *
N174 : -----T.G.-----G.-----GT.A.----- *
NK23 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
DD28 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K173 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K63 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K611 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
N121 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
N123 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K336 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K52 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
H25-4 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
H25-8 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K415 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
K612 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
105-12 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
END : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
G39 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
H4-9 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
I61-1 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
I75-1 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
J2-2-4 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
NK24 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
NK16 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
J2-1-2 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
J2-6 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
Kurume : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *
N1 : -----T.G.-----G.-----A.T.-----A.T.----- *

```

	320	340	360	380	400	420	440	
K866	ATTCCTTT--GAGAACGGGATTCATCTG						AT--CTTCGGATTGGATTCAATCAA	302
N174								302
NK23								303
D028								352
K173								352
K63								352
K611								359
N121								359
N123								359
K336								311
K52								311
H25-4								312
H25-8								312
K415								313
K612								313
105-12								299
END								299
G39								299
H4-9								299
I61-1								299
I75-1								299
J2-2-4								299
K187								299
NK24								367
NK16								309
J2-1-2								309
J2-6								357
Kurume								319
N1								

	460	480	500	
K866	--TAATTAAC--GCTGGCCTGTAATGTGAGAGGAGGATCCCTGGATTTAAGCATAT			355
N174				355
NK23				357
D028				408
K173				408
K63				408
K611				415
N121				415
N123				415
K336				365
K52				365
H25-4				365
H25-8				365
K415				366
K612				366
105-12				353
END				353
G39				353
H4-9				355
I61-1				355
I75-1				355
J2-2-4				355
K187				423
NK24				423
NK16				453
J2-1-2				364
J2-6				364
Kurume				410
N1				373

図3. ネグレリア風アメーバ分離株のITS領域塩基配列のアライメント

遺伝子型	株	SSU rRNA領域における配列の差異の概要				PCR産物あるいは登録配列の塩基数(bp)	イントロンの有無	標準株に対する変異塩基数			イントロンを除く配列の塩基数(bp)	イントロンを除く18S rRNA領域の一致度
		1000	2000	挿入	欠損			置換				
<i>N. australiensis</i>	PP397(標準株)					1980	無				1980	1980/1980 100%
	105-12					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
	END					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
	G39					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
<i>N. thangsensis</i>	H4-9					1980	無				1980	1980/1980 100%
	I 75-1					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
	K187					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
	I 61-1					1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
<i>N. lovariensis</i>	Aa/1/9/45D(標準株)					1987	無				1987	
	C-049D(U80062)					1981	無	0	1	3		1978/1982 99.80%
	J2-5					1987	無	0	0	0	1987	1987/1987 100%
	J2-1-2					1987	無	0	0	0	1987	1987/1987 100%
<i>N. fowleri</i>	NF66(標準株)					1987	無				1987	
	MCM(NFU80059)					1982	無	1	1	1		1979/1982 99.85%
	Kurume					1987	無	0	0	2	1987	1985/1987 99.90%
	KUL(標準株)					1987	無	0	0	1	1987	1986/1987 99.95%
<i>N. philippinensis</i>	PI(標準株)					約3000	有				1980	
	K415	630		1350		1980	無	0	0	0	1980	1980/1980 100%
<i>N. endoi</i>	PI(標準株)					約3000	有				1980	
	H25-4	630		1350		1980	無	0	0	5	1980	1975/1980 99.75%
	H25-6	630		1350		1980	無	0	0	5	1980	1975/1980 99.75%
		630		1350								
<i>N. italice</i>	AB-T-F3(標準株)					約3000	有				1979	
	N121	630		1349		約3000	有	1	0	11	1980	1988/1980 99.39%
	N123	630		1350		約3000	有	1	0	11	1980	1988/1980 99.39%
		630		1350								

— 一致 — 挿入部分 — 置換部分 — 欠損部分

図4. 18S rRNA領域における配列の差異

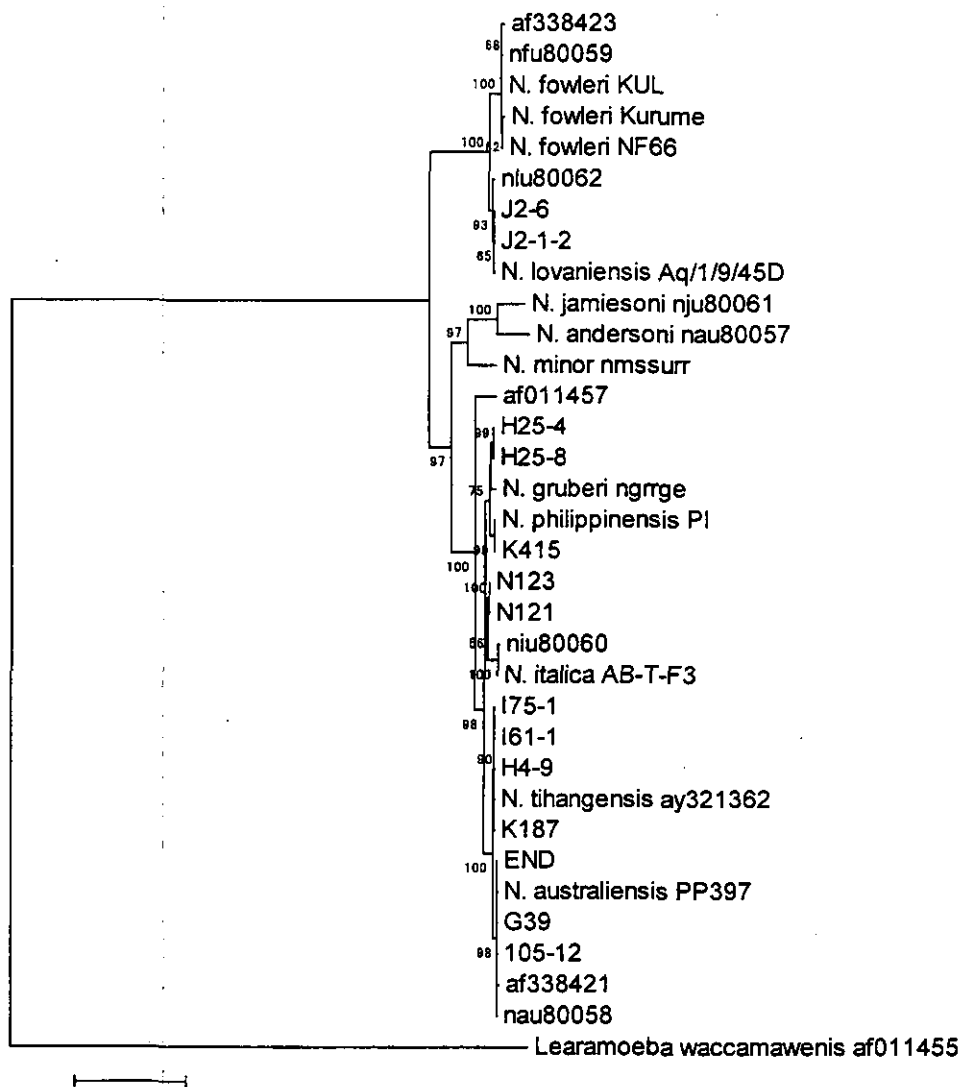


図5. ネグレリア属アメーバの18S rRNA領域の系統樹

系統樹はネグレリア属アメーバの分離株、標準株、ならびに GenBank 登録配列より得られた 18S rRNA 領域の塩基配列より作成した。分離株と標準株はそれぞれの株名を、GenBank 登録配列は種名の後に Accession No.を示した。アウトグループとして *Learamoeba waccamawensis* af011455 の配列を使用した。

640 660 700 720 740 760 780
 GTCTGTGTCAGCAGCCCGGTAATCCAGAGGTATATAATACCTCCAGAGGAGTGTTCAGGAGGAGCTTAACTCCCTTTCCCTACT-CT
 Aq1945D
 J2-1-2
 J2-6
 nlu80062
 KOL
 NF66
 Kurume
 nfu80059
 af338423
 AB-T-E3
 nlu80060
 H4-9
 I75-1
 I75-1
 K187
 ay321362
 I05-12
 nau80058
 END
 G39
 PP397
 af338421
 N121
 N123
 K415
 PI
 H25-8
 H25-4
 ngrirge
 af011457
 nau80057
 nju80061
 nmsurr

800 820 840 860 880 900 920 940
 TGTGAACCTTTAGCTGGGAGGACTTCCTGGCTCTGCGGATTCACCTGCTCCAGGCTTCATCCAGGCTTAAAGGGGCTATGATCTGCCAGGCGATTAGCA
 Aq1945D
 J2-1-2
 J2-6
 nlu80062
 KOL
 NF66
 Kurume
 nfu80059
 af338423
 AB-T-E3
 nlu80060
 H4-9
 I75-1
 I75-1
 K187
 ay321362
 I05-12
 nau80058
 END
 G39
 PP397
 af338421
 N121
 N123
 K415
 PI
 H25-8
 H25-4
 ngrirge
 af011457
 nau80057
 nju80061
 nmsurr

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
960          980          1000          1020          1040          1060          1080          110
Aq194SD : TGGACTGCAGAGTAGCTGATTTAGCGGAAGGTTGGACTTCGGTTGACTGTAGCTTGCTACAGCCCTTGTATGGAGCTCAGGGTGAAGCCCGGGTACCATGAGGCTAGAGGTGMAATTCCTGAGACCCCTCATGTGACCCACTAAGGGCGAANGCT : 1094
J2-1-2 : ..... : 1094
J2-6 : ..... : 1094
nlu80062 : ..... : 1093
KUL : ..... : 1094
NF66 : ..... : 1094
Kurume : ..... : 1094
nfu80059 : ..... : 1094
af338423 : ..... : 1095
AB-T-F3 : ..... : 1088
nlu80060 : ..... : 1088
H4-9 : ..... : 1089
I61-1 : ..... : 1089
I75-1 : ..... : 1089
K187 : ..... : 1089
ay321362 : ..... : 1089
105-12 : ..... : 1089
nau80058 : ..... : 1089
END : ..... : 1089
G39 : ..... : 1089
PP397 : ..... : 1087
af338421 : ..... : 1089
N121 : ..... : 1089
N123 : ..... : 1089
K415 : ..... : 1089
PI : ..... : 1089
H25-8 : ..... : 1089
H25-4 : ..... : 1089
n9r98 : ..... : 1088
af011457 : ..... : 1092
nau80057 : ..... : 1097
nlu80061 : ..... : 1092
nms$urr : ..... : 1060

```

```

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *
1120          1140          1160          1180          1200          1220          1240
Aq194SD : GTCTGGCCACCAAGCTGTCTATCAGGAGGAGGAGTGGTTCAGMAGCGATTAGATACCGTGTAGTCCCACTATACAGCATACCGAGT---ATTGGGAGACACTATCCCGGATCTTCTAGACTCAGGGAAACCTTAAG : 1249
J2-1-2 : ..... : 1249
J2-6 : ..... : 1249
nlu80062 : ..... : 1248
KUL : ..... : 1249
NF66 : ..... : 1249
Kurume : ..... : 1249
nfu80059 : ..... : 1249
af338423 : ..... : 1250
AB-T-F3 : ..... : 1243
nlu80060 : ..... : 1243
H4-9 : ..... : 1244
I61-1 : ..... : 1244
I75-1 : ..... : 1244
K187 : ..... : 1244
ay321362 : ..... : 1244
105-12 : ..... : 1244
nau80058 : ..... : 1244
END : ..... : 1244
G39 : ..... : 1244
PP397 : ..... : 1242
af338421 : ..... : 1244
N121 : ..... : 1244
N123 : ..... : 1244
K415 : ..... : 1244
PI : ..... : 1244
H25-8 : ..... : 1244
H25-4 : ..... : 1244
n9r98 : ..... : 1243
af011457 : ..... : 1247
nau80057 : ..... : 1254
nlu80061 : ..... : 1249
nms$urr : ..... : 1215

```

```

1260 * * * * * 1280 * 1300 * 1320 * 1340 * 1360 * 1380 * 1400 *
: ICITTTGGGTTCTGGGGGAGTATAGTTCGCAAGACCGMAACTTTAAAGAAATTGACGGAAAGCCACCACCGGAAACTCCACCAGGTCAGGACACCAAGTTTGGATTGCAGAGTTAATAGCCCTTT : 1406
J2-1-2 : 1406
J2-6 : 1406
nlu80062 : 1405
KUL : 1406
NF66 : 1406
Kurume : 1406
nfu80059 : 1407
af338423 : 1400
AB-T-F3 : 1401
nlu80060 : 1401
H4-9 : 1401
I61-1 : 1401
I75-1 : 1401
K187 : 1401
ay321362 : 1401
105-12 : 1401
nau80058 : 1401
END : 1401
G39 : 1401
PP397 : 1401
af338421 : 1399
N121 : 1401
N123 : 1401
K415 : 1401
PI : 1401
H25-8 : 1401
H25-4 : 1401
ngr19e : 1404
af011457 : 1411
nau80057 : 1406
nju80061 : 1406
nms5urr : 1372

```

```

1420 * * * * * 1440 * 1460 * 1480 * 1500 * 1520 * 1540 * 1560 *
: CTTGATTTGTTGTTGGTGGTAGTGCATGGCCGTTTCAGTTGCGTGGAGTGATCTGTCCTTAAATTCAGATAACGAAAGCCTTAGCCCTTAACTAGCCGTAGCCCTTCCTTCGGGGAGCGGTTAGTTTCGGAAACAGGCTTTTATAGCTTGTTC : 1562
J2-1-2 : 1562
J2-6 : 1562
nlu80062 : 1561
KUL : 1562
NF66 : 1562
Kurume : 1562
nfu80059 : 1564
af338423 : 1555
AB-T-F3 : 1555
nlu80060 : 1555
H4-9 : 1555
I61-1 : 1555
I75-1 : 1555
K187 : 1556
ay321362 : 1556
105-12 : 1556
nau80058 : 1556
END : 1556
G39 : 1556
PP397 : 1556
af338421 : 1554
N121 : 1556
N123 : 1556
K415 : 1556
PI : 1556
H25-8 : 1556
H25-4 : 1556
ngr19e : 1559
af011457 : 1566
nau80057 : 1561
nju80061 : 1561
nms5urr : 1527

```

```

1580      *      1600      *      1620      *      1640      *      1660      *      1680      *      1700      *      1720
Aq194SD : CAAAACCTACGTGACTTTTGTACGCTTCTTAAAGGACTTCATTCGTTCTGTAGAAATGAGGAGATTAGCCCATACAGGTCTGTGATGCTTCTTAGTCTCCCTGGGCTGCACCGTACTACATACAGGTACACAGCGGCTTAGGTTTTTTAA : 1719
J2-1-2 : ..... : 1719
J2-6 : ..... : 1719
nu800062 : ..... : 1718
KUL : ..... : 1719
NF66 : ..... : 1719
Kurume : ..... : 1719
nf800059 : ..... : 1719
af338423 : ..... : 1721
AB-T-FJ : ..... : 1711
nu800060 : ..... : 1711
H4-9 : ..... : 1712
I61-1 : ..... : 1712
I75-1 : ..... : 1712
K187 : ..... : 1712
ay321362 : ..... : 1712
105-12 : ..... : 1712
nu800058 : ..... : 1712
END : ..... : 1712
G39 : ..... : 1712
PP397 : ..... : 1712
af338421 : ..... : 1710
N121 : ..... : 1712
N123 : ..... : 1712
K415 : ..... : 1712
PI : ..... : 1712
H25-8 : ..... : 1712
H25-4 : ..... : 1712
ngrrge : ..... : 1712
af011457 : ..... : 1711
nu800057 : NN..... : 1714
nu800061 : NN..... : 1717
nmesaur : A.G..... : 1683

```

```

1740      *      1760      *      1780      *      1800      *      1820      *      1840      *      1860      *      1880
Aq194SD : CCCCTTATCCTAATAGGATGGGTAACCTTTTCAACACCGCTTATGACAGGGATCGAGGTTGGACATCCTCGTGMAGGAGGAAATTCCTAGTAGAGCCTGCTTGTACACACCGCCCGTGGCTCC : 1876
J2-1-2 : ..... : 1876
J2-6 : ..... : 1876
nu800062 : ..... : 1875
KUL : ..... : 1876
NF66 : ..... : 1876
Kurume : ..... : 1876
nf800059 : ..... : 1876
af338423 : ..... : 1877
AB-T-FJ : ..... : 1868
nu800060 : ..... : 1868
H4-9 : ..... : 1869
I61-1 : ..... : 1869
I75-1 : ..... : 1869
K187 : ..... : 1869
ay321362 : ..... : 1869
105-12 : ..... : 1869
nu800058 : ..... : 1869
END : ..... : 1869
G39 : ..... : 1869
PP397 : ..... : 1867
af338421 : ..... : 1869
N121 : ..... : 1869
N123 : ..... : 1869
K415 : ..... : 1869
PI : ..... : 1869
H25-8 : ..... : 1869
H25-4 : ..... : 1869
ngrrge : ..... : 1868
af011457 : ..... : 1871
nu800057 : ..... : 1878
nu800061 : ..... : 1874
nmesaur : ..... : 1840

```

	1900	1920	1940	1960	1980	1987
Aq1945D	TACCGATGGGACGAGAGATCAACCTGGCGGACCAACCGTAAGGTGAGGGAACCACTTAAATCTATTCGCTGTGTAGGAGGAAAGTCTGTACCAAGGTCCTTCGTAGGTG					1987
J2-1-2						1987
J2-6						1987
n1u80062						1981
KDL						1987
Kurume						1976
nfu80059			T			1987
af338423						1982
AB-T-F3						1979
n1u80060	G	C	A			1974
H4-9	G	C	A			1980
I61-1	G	C	A			1980
I75-1	G	C	A			1980
K187	G	C	A			1980
ay321362	G	C	A			1980
105-12	G	C	A			1980
nau80058	G	C	A			1975
END	G	C	A			1980
G39	G	C	A			1980
PP397	G	C	A			1978
af338421	G	C	A			1980
N121	G	C	A			1980
N123	G	C	A			1980
K415	G	C	A			1980
F1	G	C	A			1980
H25-8	G	C	A			1980
H25-4	G	C	A			1980
ngtrige	G	C	A			1979
af011457	G	C	A			1982
nau80057	G	C	A			1984
n1u80061	G	C	A			1980
nmsurr	G	C	A			1923

図6. ネグレリア属アメーバの18S rRNA領域塩基配列のアライメント
 分離株、標準株、ならびにGenBank登録配列より得た配列を用いてアライメントを作成した。
*N. italica*と*N. philippinensis*近縁株、*N. italica*の基準株ではイントロンが存在し、その位置はこ
 のアライメント上部にある数値を基準として636のGと637のCの間であった。このアライメン
 トではPCRのプライマー配列を除いて表示した。

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*の疫学と病原発現に関する研究

本邦におけるアメーバ性髄膜脳炎例およびマウス感染実験例を用いた
病理組織学的・免疫組織化学的検討

分担研究者：高橋 均 新潟大学脳研究所病理学分野
主任研究者：遠藤 卓郎 国立感染症研究所寄生動物部

研究協力者：林 森太郎 新潟大学脳研究所病理学分野
八木田 健司 国立感染症研究所寄生動物部

我々は昨年度までの研究によって確立された、アメーバ性髄膜脳炎疾患モデルマウスを用い、各アメーバの種別ごとにその中枢神経系における病理組織像を詳細に検討した。また各種抗アメーバ抗体を使用し、感染マウス脳におけるアメーバを特異的に染色し、その発症メカニズムについての検討を行った。同時に本邦6例のアメーバ性髄膜脳炎剖検脳についてもこの特異抗体を使用し、それぞれの病原アメーバについて検討を加えた。その結果、マウスでは *N. fowleri*、*N. australiensis*、*Balamuthia mandrillaris* での発症が確認され、脳内にアメーバが直接接種された場合には高度の壊死性病変が惹起されることが判明した。また *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。剖検脳においては、これまでその病原体が判明していた東京、岡山、佐賀の3例でそれぞれ *Acanthamoeba*、*Balamuthia mandrillaris*、*N. fowleri* が確認されるとともに、これまで病原体が特定できなかった山形、宮崎、新潟の3例でも *Balamuthia mandrillaris* の存在が認められ、本邦では *Balamuthia* の感染例が大半を占めていることが判明した。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。

A. 研究目的

アメーバ性髄膜脳炎は致死率の極めて高い疾患である。本邦においてはその発症が極めて稀ではあるが、その為に医師の間でもその認知度は低く、その発症メカニズム、特徴、治療法、予防法などは未だ不明のことが多い。このため平成 13 年度の研究において我々は、自験例であるアメーバ性肉芽腫性脳炎の詳細な報告を行い、さらに昨年度は本邦におけるアメーバ性髄膜脳炎全6症例の臨床データならびに病理組織標本を実際に比較検討し、その臨床病態、病理像、各アメーバ栄養体の形態および染色態度の違いを明らかにし(表 1)、病原アメーバ種の病理組織学的同定の可能性を示唆した。また感染モデルマウスを作製しその有

用性を示すとともに、*Naegleria australiensis* という新たな病原体が出現する可能性を示唆された。

これらの研究成果を踏まえ今年度は、各種アメーバ感染モデルマウスを用い、各アメーバの種別ごとにその中枢神経系における病理組織像を詳細に検討した。またアメリカ疾病予防センター(CDC)の Dr. Visvesvara より分与された各種抗アメーバ抗体を使用し、感染マウス脳におけるアメーバを特異的に染色し、その発症メカニズムについての検討を行った。同時に本邦6例のアメーバ性脳髄膜炎剖検脳についてもこの特異抗体を使用し、それぞれの病原アメーバについて検討を加えた。

B. 研究方法

(1) アメーバ感染モデルマウスの作製

a 脳内接種実験(中枢性病変の確立)

Naegleria fowleri、*Naegleria australiensis*、*Balamuthia mandrillaris*、*Acanthamoeba culbertsoni* の4種のアメーバを、それぞれマウス側頭部より注射針によって 4.5×10^4 個/30 μ l、脳内に接種した。接種日を D1 とし、D2、D4、D6、D7 で4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒドで経心的還流固定を行い(一部は10%ホルマリン浸漬固定)標本を採取した。

b 鼻腔接種実験(感染モデルの作製)

上記4種のアメーバを 4.5×10^5 個/5 μ l、右鼻腔に注入。D7、D8、D15、D31 で4%パラホルムアルデヒド-0.1%グルタルアルデヒドで経心的還流固定を行い(一部は浸漬固定)標本を採取した。

何れの標本も、固定後脳を取り出し細切した後、パラフィン包埋切片を作製し、HE、Klüver-Barrera、Bodian、Giemsa の各染色を行った。一部の標本ではオスミウムで後固定した後、Epon 埋切し電子顕微鏡観察を行った。

(2) 各種アメーバ特異抗体による免疫染色

アメリカ疾病予防センター(CDC)の Dr. Visvesvara より分与された以下のウサギポリクローナル抗体を用いた。

R171: 抗 *N. fowleri* (1:2000)

R146: 抗 *B. mandrillaris* (1:10000)

R150: 抗 *Acanthamoeba sp.* (1:10000)

(1)で作製した感染マウス脳および昨年度報告した本邦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用い、ABC法にて染色した。

(倫理面への配慮)

検索に当たっては、剖検脳につい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ている。

動物実験では全ての手技を麻酔下にて行っている。

C. 研究結果

(1) アメーバ感染モデルマウス

脳内接種実験では、*N. fowleri*、*N. australiensis*、*B. mandrillaris* において、脳炎の発症が認められた。*N. fowleri* の発症例では、右側頭葉・視床を中心とした壊死性脳炎およびくも膜下腔から脳実質を主体とする髄膜脳炎の像を呈し、同部にアメーバ栄養体の出現が認められた(図1)。また、接種した10例の内2例においては、右側頭部より接種したにもかかわらず、両側嗅脳から嗅神経にかけて、アメーバ栄養体の出現を伴った高度の炎症像が認められた

(図 2)。 *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たが、嗅脳病変は認められなかった。 *B. mandrillaris* 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アメーバ栄養体の出現を伴った高度の脳炎の像が認められた(図 3)。アメーバ栄養体は *N. fowleri* に比べ、より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。電顕観察で栄養体は、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、アメーバに特徴的な tubular な構造を有するミトコンドリアが認められた(図 5: A, B)。 *A. culbertsoni* では今回の実験では脳炎の発症は認められなかったが、D2 の標本で脳梁および海馬に、ごく少数ながら散在性にアメーバ栄養体が認められた(図 4)。電顕観察で栄養体は、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 tubular な構造を有するミトコンドリアが認められた(図 5: C, D)。

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(図 6)。

(2)各種アメーバ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。R171: 抗 *N. fowleri* では、 *N. fowleri* 栄養体の細胞膜および胞体が染色された(図 7)。 *N. australiensis* の栄養体でも同様の陽性像が認められた。R146: 抗 *B. mandrillaris* では *B. mandrillaris* 栄養体の細胞膜および胞体が染色されたが(図 7)、 *N. fowleri*、 *A. culbertsoni* では陰性であった。R150: 抗 *Acanthamoeba sp.* では *A. culbertsoni* 栄養体の細胞膜および胞体が染色されたが、 *B. mandrillaris* の栄養体の細胞膜および胞体も陽性であった(図 7)。 *N. fowleri* では陰性であった。

B. mandrillaris および *A. culbertsoni* 脳内接種マウスにおいて、D2 の、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(図 8)。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。

剖検脳を用いた染色では、既に病原アメーバの判明している佐賀例では R171 が、岡山例では R146 と R150 が陽性となった(図 9)。病原アメーバが判明していない、山形、宮崎、新潟の 3 例についても各抗体による免疫染色を行ったところ、3 例とも R146 と R150 が陽性、R171 が陰性を示し、病原アメーバが *B. mandrillaris* であることが判明した(図 10)。東京例では R150 陽性、R146 陰性となり、病原アメーバが *Acanthamoeba sp.* であることが判明した(図 11)。

(3)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(図 12)、 *N. fowleri* は細胞膜に嗜銀性を有さず、形はほぼ円形で、3 種の内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。

Giemsa 染色では *B. mandrillaris*、 *Acanthamoeba sp.* とも明瞭な核小体を有するものが多く認められたが、 *Acanthamoeba sp.* では核小体がいずれもより小型で球状のものがほとんどであるのに対し、 *B. mandrillaris* では複数個に分かれていたり、不整形のものが多く認められた(図 13)。

D. 考察

今回の研究から *N. fowleri*, *N. australiensis*, *B. mandrillaris* においては、病原体アメーバの脳内接種によって脳病変を惹起することができ、今後原発性アメーバ性脳病変を研究する上での有用なモデルとなりうる事が判明した。*N. fowleri* 脳内接種マウス脳において、人剖検脳で認められる髄膜脳炎よりも高度の壊死性病変が主体として認められたことは、病原体アメーバを脳実質内に直接接種したためと考えられた。また大脳に接種したにもかかわらず嗅脳に病変が認められた2例については、病原アメーバがくも膜下腔に侵入し播種したものと推測されたが、同時に *N. fowleri* が嗅脳・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。鼻腔接種においても *N. fowleri* のみが脳炎を発症しており、同じ *Naegleria* 属の *australiensis* や *B. mandrillaris*, *A. culbertsoni* では発症しなかったことも、上記の可能性を支持するものと考えられた。同時にこの嗅神経に対する親和性の違いが、*N. australiensis* が多数温水環境から検出されているにもかかわらず未だ発症の報告がない理由となっている可能性も考えられた。

特異抗体を用いた免疫染色では、R150 で *B. mandrillaris* に交差反応が認められたものの、3種の抗体を用いることで、これまでヒトにおいて報告されている原発性アメーバ性脳病変の病原アメーバを染め分けることが可能であった。この免疫染色を用いて *B. mandrillaris* や *A. culbertsoni* の D2 の脳を染色したところ、数はそれほど多くないものの、広範にアメーバ栄養体の浸潤が認められ、また個々の栄養体に対してこの段階ではほとんど宿主の反応は認められなかった。このことは一度アメーバが中枢神経系に侵入すると、急速に感染が広がる可能性が示唆され、今後病態メカニズムを研究する上で興味深い所見と考えられた。

ヒト剖検脳では既に病原アメーバが判明していた岡山例、佐賀例でそれが確認されると共に、これまで同定できなかった山形、宮崎、新潟の3例が *B. mandrillaris* によるものであることが判明した。また病原体が *Acanthamoeba sp.* とされながらも、その臨床像や病理像から疑問視されていた東京例は、やはり *Acanthamoeba sp.* であることが今回再確認された。昨年度の研究では、アメーバ栄養体の嗜銀性や形態から、本邦の症例は症例1、2-4、5の大きく3つのグループに分けられることをしめしたが、今回の免疫染色の結果はそれを裏付けるものであった。

Bodian 染色並びに Giemsa 染色は、残念ながら確定には到らないものの、形態学的にアメーバ病原体を同定する、重要かつ効果的な手段であると考えられた。

今回の結果をふまえて再度症例を見直すと、症例1の病型は当初より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、cyst 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の像に近いともいえる。罹病期間が9日間と短かったためにこのような像を呈したものと考えられた。最終的な6例における各種アメーバの形態学的特徴と免疫組織学的結果を表2にまとめる。

本邦においては *Acanthamoeba sp.* によるアメーバ性肉芽腫性脳炎の症例は結果として1例であり、それも罹病期間が短いという特殊性のため確実なことは解らなかつたが、組織中における3種のアメーバを比較すると、*N. fowleri* はその大きさが最も小さく、大きさが比較的揃っておりかつ細胞膜の嗜銀性を持たないことが判明した。*Acanthamoeba sp.* は大きさが *N. fowleri* と *B. mandrillaris* の間で *B. mandrillaris* よりも大きさは比較的揃っており、細胞膜に嗜銀性を有していた。*B. mandrillaris* は3種の中で最も大きくかつ大小不同であり、細胞膜は嗜銀性を有し、さらに脳実質の血管周囲性に、同心円状に集簇する特徴的な所見が認められた。

今回の研究結果から、本邦における原発性アメーバ性脳髄膜炎6例の内、4例までもが *B. mandrillaris* によるものとなったが、*B. mandrillaris* については、国内におけるその生息域、分布、ヒトとの接触機会等についてはほとんど解っておらず、早急な調査が必要であると考えられた。

E. 結論

今回の研究から、マウスでの感染実験モデルが原発性アメーバ性脳髄膜炎の病態メカニズムを研究する上で、極めて有用であることが判明した。このモデルとヒト剖検例を用いた観察から、Bodian 染色、Giemsa 染色が形態学的なアメーバ栄養体の同定に有効な手段であることが解った。

本邦における 6 例の原発性アメーバ性脳髄膜炎のうち、4 例の病原アメーバが *B. mandrillaris* であることが判明した。

今回の研究に際し、以下の先生方に症例をご提供頂いたことをここに記し、感謝いたします。

東京都立豊島病院 検査病理 滝本雅文

市立酒田病院 病理 矢島美穂子

川崎医科大学 神経病理 調 輝男

県立宮崎病院 臨床検査科病理 林 透

佐賀県立医大 病因病態科学 臨床病理学分野 杉田保雄 (敬称略)

参考文献

1. 中村俊彦 他 原発性アメーバ性脳髄膜炎の1例 神経進歩, 23:500-509, 1979
2. 赤井契一郎 他 自由生活アメーバによる原発性脳髄膜炎と肉芽腫性脳炎について 神経内科, 12:75-89, 1980
3. 上之原広司 他 自由生活アメーバによる脳髄膜炎の1症例 新潟医学会雑誌, 101:655, 1987
4. 矢島美穂子 他 *Acanthamoeba* による肉芽腫性髄膜脳炎の1剖検例 日本病理学会誌, 78:113, 1989
5. Shirabe T. et al. An autopsy case of amebic meningoencephalitis. The first Japanese case caused by *Balamuthia mandrillaris* Neuropathology 22:213-217, 2002
6. 林 透 他 原発性アメーバ性髄膜脳炎の 1 剖検例 Proc. Jpn Soc. Pathol., 85:172, 1996
7. Sugita Y. et al. Primary amebic meningoencephalitis due to *Naegleria fowleri*: An autopsy case in Japan Pathology International, 49:468-470, 1999

F. 健康危険情報

本邦におけるアメーバ性脳髄膜炎では 6 例中 4 例が *B. mandrillaris* によるものであることが判明し、国内におけるこの種のアメーバの生息域、分布、ヒトとの接触機会等について早急な調査が必要である。

N. australiensis も一度中枢神経系に侵入した場合には、ヒトに対して病原性を有する可能性が十分に考えられ、このアメーバは温泉等の温水環境から多数認められたことから、今後注意が必要である。

G. 研究発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。