

平成 18 年度厚生労働科学研究費補助金  
地域健康危機管理研究事業

温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究

「入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる汚染菌濃度に関する研究」

主任研究者 国立感染症研究所寄生動物部 倉 文明  
分担研究者 神奈川県衛生研究所微生物部 黒木俊郎

レジオネラ症発生時に関連した浴槽のレジオネラ属菌の菌濃度のデータを蓄積することは、レジオネラ症の発生を防ぐための衛生管理手法の確立や患者発生予防対策の策定のために非常に重要である。しかし、種々の理由により患者発生時の浴槽の菌数に関する報告は非常に少ない。そこで、全国の地方衛生研究所にアンケート調査への協力を求めた。アンケートの内容は、それぞれの自治体で実施された疫学調査のなかから浴槽の菌数に関するデータとそれに付随した情報に関するものとした。60 機関から回答が得られ、このうち 30 機関が患者発生時に関連する入浴施設の調査を実施し、患者由来株と入浴施設由来株が一致する結果を得たのは 10 機関、13 症例であった。起因菌はすべて *L. pneumophila* であった。浴槽水中の菌濃度は 90～4700CFU/100mL であった。

はじめに

レジオネラ症は *Legionella pneumophila* を代表とするレジオネラ属菌による呼吸器系感染症である。この菌を含んだエアロゾルの吸入により感染し、ヒトからヒトへの感染はない。欧米に比べて日本では、入浴施設に関連したレジオネラ症の発生が多いと考えられている。

入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる浴槽水の汚染菌濃度について、予備的な文献調査をしたところ、多くの大規模な集団感染事例は 10,000cfu/100ml 以上で起こり、1,000cfu/100mL 以下の場合には溺水事故や免疫力の低下した患者で起きている。しかしながら報告されている事例が少なく、十分な検討ができない状況にある。実際には、各自治体において環境中の菌量が調査されている感染事例を持ちあわせていると思われる。このため、本研究では、地方衛生研究所に協力を求め、アンケートによる研究を実施して、レジオネラ症発生時の浴槽水の菌濃度に関する情報の収集を行った。

## 材料と方法

### アンケート

レジオネラ症発生時の感染関連施設の調査の有無、菌の分離の有無、患者の健康上の背景、関連施設での菌濃度、分離菌の菌種等に関する設問を設定したアンケートを Word で作成した(資料参照)。アンケートの設問に対応した回答票を Excel で作成した(資料参照)。

### アンケートの送付および回収

アンケートを依頼するメールにアンケート調査協力依頼文、アンケート用紙および回答票のファイルをメールに添付し、衛生研究所長および担当者宛てに各地方衛生研究所の代表メールアドレスあるいは企画部署のメールアドレスに送付した。

アンケート回答票ファイルにパソコン画面上で回答を入力していただき、そのファイルをメールに添付して返送していただくように求めた。

### アンケートの集計

回答票ファイルに入力された回答をコピーし、集計用ファイルにペーストすることで Excel シートに転記した。設問ごとに回答の集計を行った。

## 結果

全国の 76 地方衛生研究所(北海道東北支部 12 機関、関東甲信静支部 20 機関、東海北陸支部 8 機関、近畿支部 14 機関、中国四国支部 10 機関、九州沖縄支部 12 機関)にアンケート調査への協力を依頼し、60 機関から回答が送られた。回収率は 79%であった。

レジオネラ症発生に関連する施設調査を実施したことがない機関は 30 機関であった。これに対して、レジオネラ症の患者発生に関連する施設調査の経験があるとしたのは、30 機関であった。

施設調査を実施したことがある 30 機関からは、82 症例の情報が集められた。82 症例が発生したのは 2001 年 10 月から 2007 年 1 月 22 日までの期間であった。大規模集団発生の 2 事例を除いた 80 症例のほとんどが散发例あるいは散发と推定される症例であった。症状は「ポンティアック熱」1 例、「その他」9 例、「呼吸困難」2 例、「肺炎」60 例、「肺炎とポンティアック熱」1 例、「不明」7 例であった。

潜伏期間は「1 日」が 3 例、「2 日」が 1 例、「3 日」が 3 例、「1~2 日」が 1 例、「1~3 日」が 1 例、「4 日」が 5 例、「5 日」が 6 例、「6 日」が 2 例、「7 日」が 6 例、「8 日」が 1 例、「9 日」が 1 例、「不明」が 32 例、確定できなかったのが 2 例、回答なしが 5 例であった。

易感染性要因は「その他」が 18 例、「健常者」23 例、「糖尿病」16 例、「パーキンソン病」

2例、「肺がん」1例、「肺炎」1例、「腎臓移植、風邪」1例、「リュウマチ」1例、「腎肝機能低下」1例、「合併症有り（肺気腫）」1例、「要介護度 5」1例、「高血圧／高脂血症」4例、「タバコ週 1～2本、アルコール飲む時は多量」1例、「心房細動」1例、「潜った」1例、「不明」18例、無回答 5例であった。複数の易感染性要因を持っている症例が複数あった。

診断の根拠は「菌分離」7例、内 2例は尿中抗原を同時に検出、「尿中抗原」66例、内 3例は同時に PCR による遺伝子検出、「血清抗体価」3例、「不明」2例であった。また、診断の根拠を「尿中抗原」とした症例のうち 14例では、次問の菌の分離の有無の設問で、菌が分離されたと回答した。したがって、散发事例の 80症例中 20症例で菌が分離された。

16症例から *L. pneumophila* SG1(内 1症例は SG 6 も分離された)、SG2 が 2症例、SG3、SG4、SG6 がそれぞれ 1症例ずつから分離された。

年齢分布は図 1 に示した。最低年齢は 13 歳、最高年齢は 87 歳であった。平均は 65.04 歳、中央値は 67 歳であった。

施設の内訳は公衆浴場 34 例、旅館 13 例、ホテル 8 例、老人施設 4 例、スポーツ施設 3 例、個人宅 3 例、スパプール 2 例、訪問入浴車 1 例、ゴルフ場 1 例、温泉 1 例、宿泊研修施設（社会教育施設）1 例、船内浴室 1 例、不明 4 例であった。

散发事例の 55 症例で関連施設からレジオネラ属菌が検出された。このうち 52 症例では浴槽水や浴槽の拭き取りから菌が検出され、浴槽から検出されなかった症例では貯湯槽あるいはシャワー水から検出された。検出されたレジオネラ属菌は *L. pneumophila* SG 1 が 27 例、SG2 が 1 例、SG3 が 11 例、SG4 が 13 例、SG5 が 12 例、SG6 が 17 例、SG8 が 2 例、SG9 が 3 例、SG10 が 5 例、SG11 が 4 例、SG14 が 1 例、*L. pneumophila* 型別不能が 8 例、レジオネラ属菌が 9 例であった。4 SG が同時に分離された症例もあった。

菌数の分布は、<100CFU/100ml は 52 検体、100-1000CFU/100ml は 38 検体、1000-10000CFU/100ml は 14 検体、>10000CFU/100ml は 6 検体であった（図 2）。

浴槽のシステムは循環式が 38 例、掛け流し式が 12 例、自宅の風呂が 2 例、不明が 12 例であった。

浴槽の容量は「5m<sup>3</sup>未満」が 6 例、「5m<sup>3</sup>～15m<sup>3</sup>未満」が 12 例、「15m<sup>3</sup>～30m<sup>3</sup>未満」が 2 例、「30m<sup>3</sup>以上」が 2 例、「不明」が 34 例、「該当しない」が 5 例であった。

浴槽の原水の泉質は、塩化物泉 13 例、塩化物・炭酸水素塩泉 2 例、硫酸塩泉 2 例、硫酸塩・塩化物泉 1 例、硫酸塩・炭酸水素塩・塩化物泉 2 例、アルカリ単純泉 8 例、酸性硫黄泉 3 例、単純酸性泉 1 例、冷鉱泉 3 例、温泉 1 例、地下水（井戸水）11 例、水道水 8 例、不明 15 例、回答なし 10 例であった。

塩素による消毒が「ある」としたのが 39 例、「なし」が 11 例、「不明」が 9 例、回答なしが 4 例であった。塩素消毒を行っているとした 39 例中 36 例でレジオネラ属菌が分離されていた。残留塩素濃度は不検出から 2.2ppm であった。

原因となった設備と推定されたのは、「浴槽」が 18 例、「シャワー」2 例、「スパプール」1 例、「打たせ湯」1 例、「ジャグジー」1 例であった。このうち、13 例では患者由来株と設

備からの分離株の PFGE が一致した。PFGE の結果が一致した 13 例の原因と推定された設備と菌種および菌数を表 1 に示した。

今回のアンケートにより、80 症例の詳細を解析することができたが、このうち何らかの形で報告として公表されているのは 6 症例に過ぎなかった。具体的には、所報が 2 症例、病原微生物検出情報に掲載されたのが 4 症例であった。

## 考察

レジオネラ症の発生に関連した浴槽水の菌濃度に関する情報の収集を目的としてアンケート調査を実施した。アンケートの対象は地方衛生研究所とし、それぞれの機関において、入浴施設利用者からレジオネラ症患者が発生した場合に、その施設を対象とした疫学調査を実施したか否か、レジオネラ属菌が患者および施設から分離されたか、分離された菌株の菌種、PFGE パターンなどが一致したかなどを調べた。

60 の衛生研究所から 80 症例に関する回答があり、疫学調査の内容などからこのうち 9 症例における菌数のデータが、患者発生のリスクを評価する上で利用可能であるとした。9 症例の浴槽水 100mL あたりの菌濃度は 90～4700CFU であった（表 1）。4 施設では 260CFU 以下という低い菌濃度でも患者が発生していた。90CFU/100mL で患者が発生した症例ではそれぞれ「高血圧、不正脈、糖尿病」あるいは「糖尿病、胃潰瘍、心房細動」を患っていた。260CFU/100mL で患者が発生した症例の患者は健常者という回答であった。この症例の患者は浴槽中で溺水していた。これらの低い菌濃度で患者が発生した例では、患者の免疫機能の低下が予想される場合と、浴槽で溺れるあるいは泳ぐという危険な行動が伴う場合があることが改めて明らかとなった。

レジオネラ属菌の浴槽水中の菌濃度に関するリスク評価をする場合、レジオネラ属菌の種、患者の健康状態（特に免疫機能）、患者の浴槽での行動、入浴施設の設備の状況、感染経路などとこれらの組み合わせを十分に検討して行われなければならない。このうち、患者の行動や入浴施設の設備の状況は、レジオネラ属菌が感染する感染経路を決める要素となり得る。また、患者の健康状態はレジオネラ属菌への抵抗性を左右し、少ない菌濃度においても感染が成立する可能性を大きくしている。

図1 患者の年齢分布

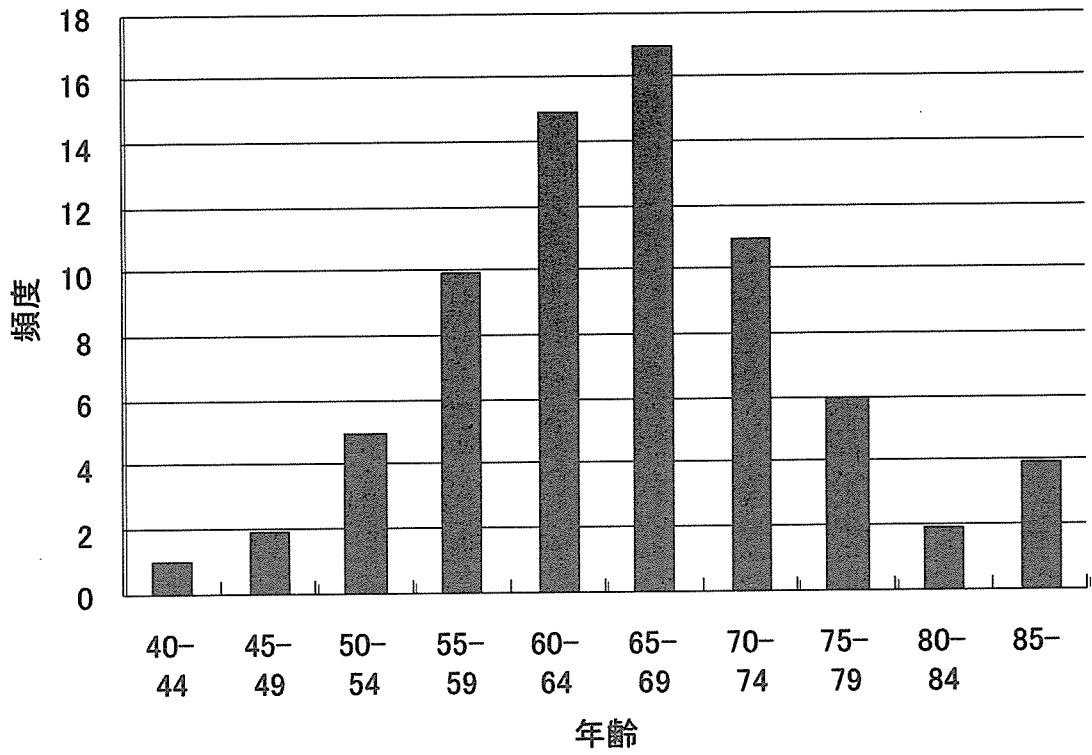


図2 施設におけるレジオネラ属菌種の菌数の分布

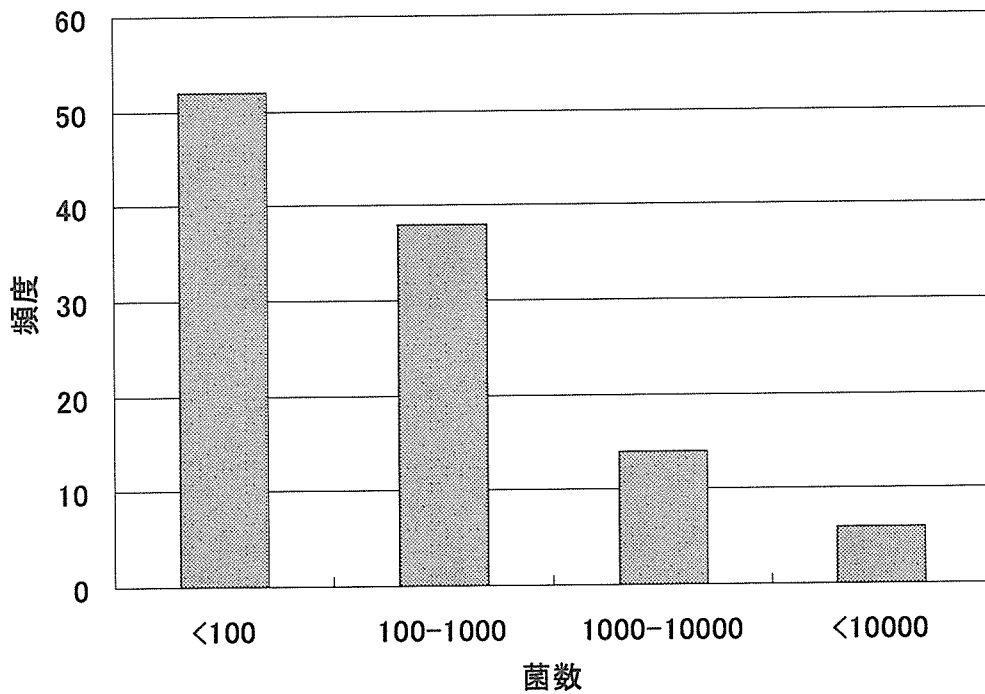


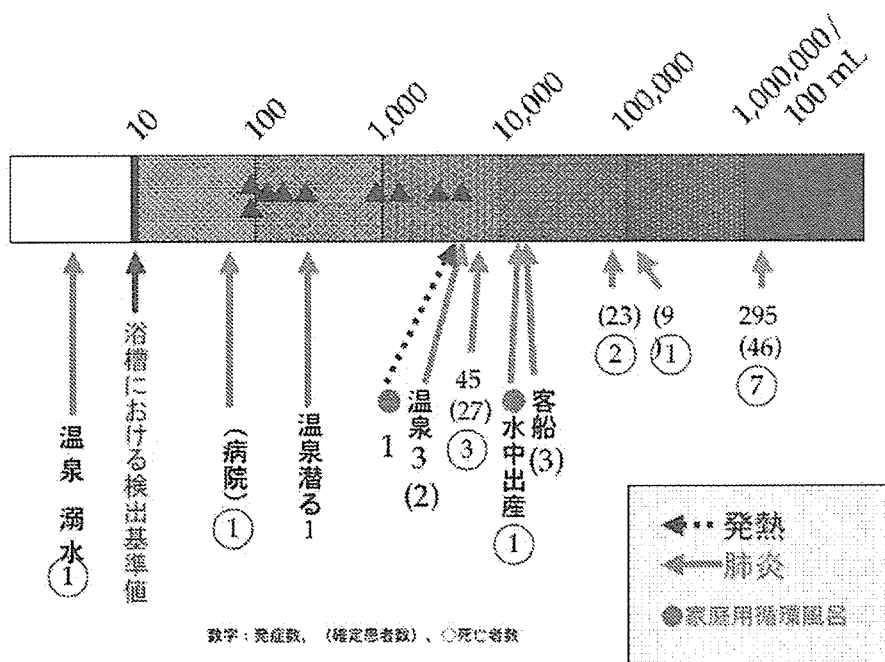
表 1 臨床分離株と環境分離株の PFGE 型が一致した例

症例 1~9 は感染時の菌濃度が測定されていると思われる (患者は 53~81 歳の男性)。

	菌数 (/100mL)	患者分離株	原因設備	易感染性	備考
1	4700	<i>L. pneumophila</i> SG1	浴槽、無回答	不明	
2	3000	<i>L. pneumophila</i> SG1	浴槽、循環式	糖尿病	
3	1400	<i>L. pneumophila</i> SG1	浴槽、循環式	糖尿病、脳梗塞	
4	890	<i>L. pneumophila</i> SG2	浴槽、循環式	腎肝機能低下	
5	260	<i>L. pneumophila</i> SG1	浴槽、循環式	健常者 (溺水)	
6	160	<i>L. pneumophila</i> SG3	浴槽、循環式	大酒家、重喫煙、糖尿病	
7	110	<i>L. pneumophila</i> SG1	無回答、循環式	無回答	
8	90	<i>L. pneumophila</i> SG1	ジャグジー	高血圧、不正脈、糖尿病	
9	90	<i>L. pneumophila</i> SG1	ジャグジー	糖尿病、胃潰瘍、心房細動	
10	10	<i>L. pneumophila</i> SG1	スパプール		感染時はもっと多かったか
11	10	<i>L. pneumophila</i> SG1	打たせ湯		塩素 1.3 mg/mL
12	不明	<i>L. pneumophila</i> SG4	浴槽		
13	拭き取り	<i>L. pneumophila</i> SG6	浴槽		

図 3 レジオネラの汚染量と感染事例

表 1 の症例 1~9 を▲で示した。



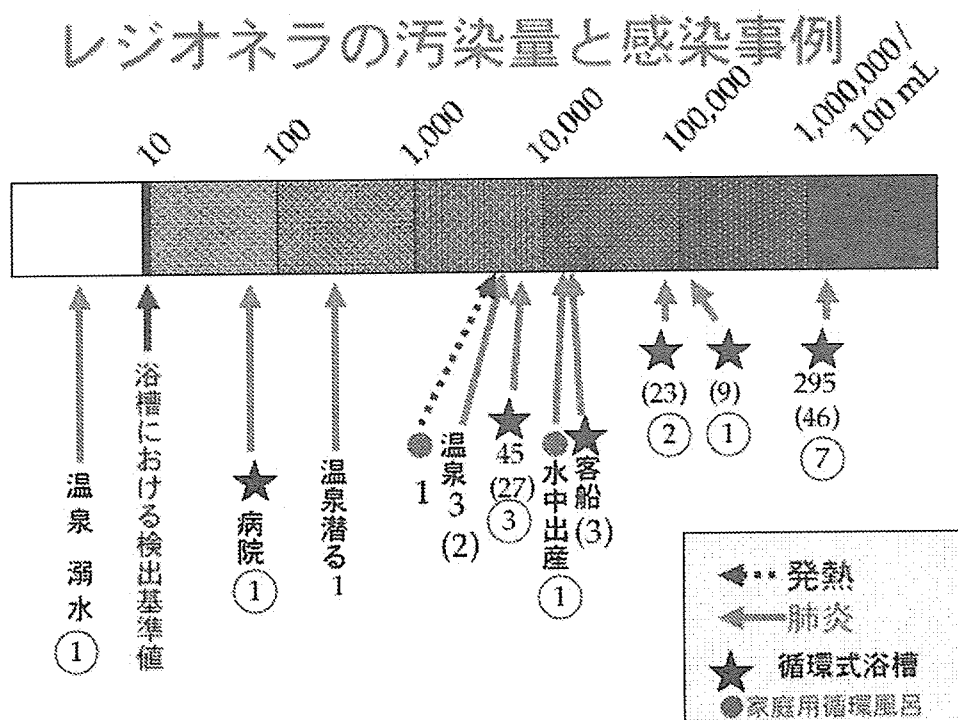
(資料)

「入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる汚染菌濃度の調査」  
アンケートのお願い

「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」研究班  
主任研究者 倉 文明 (国立感染症研究所・細菌第一部)

私たちは、入浴施設に関連したレジオネラ症の発生に関わる汚染菌濃度について、予備的な文献調査により下記の図を作成しました。多くの大規模な集団感染事例は、100mLあたり1万cfu以上で起こり、100mLあたり1,000cfu以下の場合には、溺水事故や免疫力の低下した患者で起こるようです。しかしながら報告されている事例が少なく、十分な検討ができない状況です。実際には、各自治体において環境中の菌量が調査なされている感染事例をお持ちであると思われる。このため、厚生労働省の地域健康危機管理研究事業の中で、標記のアンケートを企画しました。当該アンケートは感染症発生動向調査により収集された情報をもとにご回答いただくものですが、発生動向調査の性質上、患者の方にあらためて同意を得ることは困難であるため個人を特定できる情報以外の情報を対象としています。

アンケート調査結果は、研究報告書としてまとめ、希望される方にお送りいたします。  
趣旨をご理解いただきご協力いただければ幸いです。



事例下部の数字は発症数、かっこ数字は確定患者数、丸数字は死亡者数

※図説呼吸器系細菌感染症：疫学、診断、治療（荒川宜親、渡辺治雄監修，佐々木次雄編集、2006年11月、じほう）図6-7を改変

始めに問1から問5までをエクセルの「回答用シート」に回答してください。問6以降は症例（事例）毎にそれぞれのカラムに回答してください。集団発生の場合は事例ごとに回答してください。

選択肢が示されている設問では、回答を選択肢から選んでください。複数回答は可能です。その他を選択した場合は、その内容を回答してください。なお、2000年の茨城、静岡（掛川）、2002年の鹿児島、宮崎の事例については把握済みですので回答不要です。

問1 研究所名をお答えください。

問2 このアンケートの回答の担当者名をお答えください。

問3 担当者のメールアドレスをお答えください。

問4 これまでに貴自治体の管内において入浴施設に関連したレジオネラ症患者が発生し、関連施設の調査を実施したことがありますか。

選択肢：ある、ない、その他、不明

問5 経験した症例（事例）数はいくつですか。

以下は、入浴施設が関連したレジオネラ症が発生した症例（集団発生の場合は事例）についてお答えください。

複数の症例を回答いただく場合は、症例（事例）20までのカラムを準備しましたので、問5で回答された症例（事例）数に応じてそれぞれについて記載をお願いします。

問5で「0」と回答いただいた場合は質問は以上です。ありがとうございました。「回答用ファイル」に回答を入力し、それを保存した上でアンケート調査担当：神奈川県衛生研究所 黒木まで、メールに添付してお送りください。

問6 症例(事例)が発生した年月日（発症日、初診日、診断日、届出日など）をお答えください。

問7 原因施設は貴自治体管内の施設ですか？

はい、いいえ（自治体名）

問8 当該症例（事例）は散发事例でしたか、集団発生事例でしたか？

選択肢：散发、集団



- 問 9 患者の病態は肺炎ですか、ポンティアック熱ですか？  
選択肢：肺炎、ポンティアック熱、肺炎とポンティアック熱、その他、不明
- 問 10 入浴施設利用から発病までの潜伏期間（暴露日から発病日）は何日ですか？  
（ ）日、その他、不明
- 問 11 患者は健常者ですか、それとも基礎疾患など易感染性要因がありましたか？（複数選択可）  
選択肢：健常者、新生児、喫煙者、大酒家、肝炎、悪性疾患（癌、白血病）、ステロイド剤投与、臓器移植、その他の免疫不全、腎不全末期、その他、不明
- 問 12 診断の根拠となったのは喀痰等からの菌の分離、尿からの抗原の検出ですか？（複数選択可）  
選択肢：菌分離、尿中抗原、血清抗体価、蛍光抗体法等による菌の検出、PCR 法等による遺伝子の検出、症状と疫学、その他、不明
- 問 13 患者からは原因菌は検出されましたか？  
選択肢：はい、いいえ、不明
- 問 14 「はい」であれば、検出されたレジオネラ属菌の菌種、血清群をお答えください。  
複数株の場合は列記してください。
- 問 15 当該事例の患者数は何人ですか？ 散发事例であれば、例えば男性の欄に 1 人と記入してください。
- 問 16 患者の年齢はいくつでしたか？
- 問 17 当該症例（事例）が発生した入浴施設はどのような施設ですか？  
選択肢：公衆浴場、旅館、ホテル、サウナ、個人宅、老人施設、その他
- 問 18 レジオネラ属菌はどこから分離されましたか？ 複数の箇所から分離された場合は番号を付してください。  
選択肢：浴槽水、湯口、シャワー、施設内あるいは周辺の土壌、その他、分離されなかった

- 問 19 施設で検出されたレジオネラ属菌の菌種、血清群を由来別にお答えください。  
複数株が分離された場合は、菌種および血清群の各回答用ウェルに問 17 の回答の番号を付して記入してください。（回答例を参照してください。）
- 問 20 環境中のレジオネラ属菌の菌数をお答えください。  
複数箇所から分離された場合は問 17 で付した番号に合わせて記入してください。
- 問 21 患者および施設から検出されたレジオネラ属菌の PFGE パターンは一致しましたか？  
選択肢：一致した、一致しなかった、PFGE を実施しなかった、その他
- 問 22 PFGE 以外にどのような解析を実施しましたか？
- 問 23 当該症例（事例）が発生した入浴施設は循環式ですか？ かけ流し式ですか？  
選択肢：循環式（貯湯槽無し）、循環式（貯湯槽有り）、かけ流し式（貯湯槽無し）、かけ流し式（貯湯槽有り）、循環とかけ流しを併用、その他、不明
- 問 24 浴槽からレジオネラが検出された事例での浴槽の大きさはどのくらいでしょうか？  
選択肢：5m<sup>3</sup> 未満、5m<sup>3</sup>～15m<sup>3</sup> 未満、15m<sup>3</sup>～30m<sup>3</sup> 未満、30m<sup>3</sup> 以上、不明、該当しない
- 問 25 浴槽水の泉質は何でしょうか？
- 問 26 浴槽は塩素消毒されていたでしょうか？ オゾン殺菌、紫外線殺菌等のその他の消毒がありましたか？  
選択肢：塩素消毒あり、その他の消毒あり（ ）、消毒なし、不明
- 問 27 塩素消毒していた場合の濃度をお答えください。
- 問 28 当該症例（事例）が発生した原因となった設備は何でしょうか？  
選択肢：浴槽（溺水）、シャワー、打たせ湯、ジャグジー、その他のエアージェット、クーリングタワー、その他、不明
- 問 29 症例（事例）について特記事項がありましたら、記載してください。

問 30 当該症例（事例）を報告されていたら、報告書、論文等の引用先をお答えください。

質問は以上です。回答はすべてエクセルの「回答用シート」に記入してください。

ご協力ありがとうございました。「回答用ファイル」をアンケート調査担当：神奈川県衛生研究所 黒木まで、平成 19 年 1 月 26 日までにメールに添付してお送りください。

設問	回答(例)	
1: 研究所名		
2: 担当者名		
3: メールアドレス		
4: レジオネラ症患者発生関連施設調査の有無		
「その他」の内容		
5: 経験した症例(事例)数		
	症例(事例)1	症例(事例)2
6: 発生年月日		
7: 原因施設の場所		
8: 散発か集団か?		
9: 患者の病態		
「その他」の内容		
10: 潜伏期間		
「その他」の内容		
11: 易感染性要因		
「その他」の内容		
12: 診断の根拠		
「その他」の内容		
13: 原因菌の検出の有無		
14: 菌種、血清群		
15: 患者数		
男性		
女性		
不明		
16: 年齢幅		
最低		
最高		
平均		
17: 入浴施設の種別		
「その他」の内容		
18: レジオネラ属菌を分離した箇所		
「その他」の内容		
19: 施設からの分離菌の菌種と血清群		
20: レジオネラ属菌の菌数		
21: レジオネラ属菌のPFGEパターン		
「その他」の内容		
22: PFGE以外の解析法		
23: 入浴施設は循環式か、かけ流しか?		
「その他」の内容		
24: 浴槽の容量		
25: 原水の泉質		
26: 消毒の有無		
「その他」の内容		
27: 浴槽水の残留塩素濃度		
28: 原因となった設備		
29: 特記事項		
30: 引用文献など		

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(地域健康危機管理研究事業) 分担研究報告書  
「温泉の泉質等に対応した適切な衛生管理手法の開発に関する研究」

レジオネラ属菌の宿主となる自由生活性アメーバ類の検査に関する講習および実習

分担研究者：遠藤卓郎  
協力研究者：八木田健司

## 研究目的

本研究班における微生物学的汚染調査の一環として、レジオネラ属菌の宿主である小型自由生活性アメーバ類の検査を行うにあたり、研究班参加の各地方衛生研究所の担当者を対象としてアメーバ類の検査法に関する講習ならび実習を行った。

## 概要

平成 18 年 6 月 8 ならびに 9 日の 2 日間、国立感染症研究所、寄生動物部において講習および実習を行った。

講習では「平成 15 年度 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」の分担報告書である「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」に準じて、以下の内容で解説を行った(資料 1-3)。

- 1) 温泉等温水環境からのアメーバ類の検査法
- 2) レジオネラ属菌の宿主としてのアメーバ類の重要性
- 3) 自由生活性アメーバ類のもつ病原性

実習では上記マニュアルに準じて、実際に試料水からのアメーバの分離、同定に関して以下の内容で実習を行った。

- 1) アメーバ培養用培地等準備
- 2) 試料水からのアメーバの分離および培養
- 3) アメーバ数の定量
- 4) 顕微鏡による形態学的同定

本講習および実習により、各地方衛生研究所の微生物学的汚染調査の結果としてアメーバ類に関する汚染データを得ることができた。

資料・1 温泉等温水環境からのアメーバ類の検査法

**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**

**検査概要**

**検査対象:** 自然環境に生息する自由生活性アメーバ類

**検査試料:** 浴槽施設の浴槽水とその排水、また工場等からの温排水等

**検査方法:**

1. 試料採取
2. 大腸菌塗布寒天平板培地への接種
3. 培養・株保存
4. 顕微鏡による観察
5. 形態学的分類

**1、試料の採取ならびに輸送・保存**

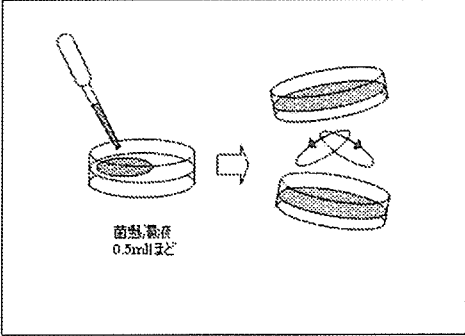
- 容量500mlの採水ボトルを準備する。採水ボトルはオートクレーブ可能なものが適している。
- 検査対象となる水試料300ml程度を滅菌採水ボトルに採る。直接浴槽から汲むなどとする。
- 室温で保存・輸送する。輸送会社を利用する場合も同様。
- 培養開始は24時間以内に行うことが望ましい。定量的な検査を目的としないのであれば、翌日程度でも問題ない。

**2、大腸菌塗布寒天平板培地への接種**

**1) 菌の準備**

- 大腸菌用平板培地に大腸菌DH1株を増殖させる。
- 菌を1ループ分とり、1mlの滅菌蒸留水に懸濁し、これを0.5ml程度新しい平板に移し、表面が広く濡れ広がるように平板をゆり動かす、ピペットで吹きつける、あるいはコンラージ棒で塗り広げる。
- 安全キャビネット内で培地表面に皺が生ずる程度まで乾燥させる。
- 培養は37℃で2～3日行う。

図、大腸菌液の塗り広げ方の1例



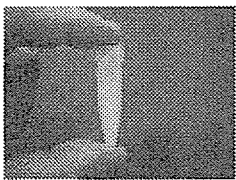
菌懸濁液 0.5mlほど

**1) 菌の準備**

- 遠心管(15ml容量)に滅菌蒸留水1mlを入れ、ループを使い大腸菌をかき取り、蒸留水中に懸濁する。菌液濃度は培養平板1枚分の菌を蒸留水1mlに懸濁することを基準とする。
- 菌濃度を測定する場合は、蒸留水で100倍に菌液を希釈し、600nmの吸光度を測定する。上記の方法で調整した菌液の100倍希釈時の吸光度はおおよそ0.3OD前後である。
- 菌を不活化するためボルテックスで均一に懸濁後、58～60℃のホットバスで1時間加熱する。時間は厳守し、前半30分間は10分毎に菌液を撈拌することで均一な加熱を行う。

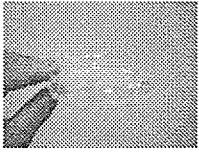
**1) 菌の準備**

- 室温で自然冷却した後、安全キャビネットに移し、雑菌による汚染を防ぐためキャップ付直管をアルコール綿でよく拭いてからキャップを開ける。雑菌で汚染された菌液を使用するとアメーバの増殖阻害につながるため、判明次第、菌液は廃棄する。
- 加熱処理した菌液を無菌的に1mlづつ凍結保存チューブ等に分注する。これをストック菌液として-20℃で保存する。半年程度は保存可能。



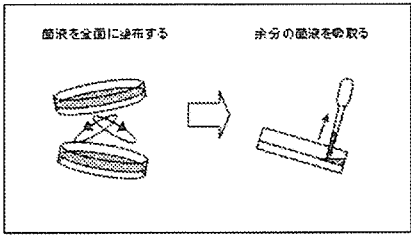
**2) アメーバ分離用培地の準備**

- Bacto-Agar/ DIFCOなどの無栄養寒天培地を用意する。
- 90mm径シャーレに蒸留水で溶解、滅菌した1.5%寒天溶液20ml入れる。厚さは5mm程度となる。寒天が厚くなると顕微鏡観察に際し焦点距離が合わず、観察不能となることがあるので注意する。
- 寒天平板は安全キャビネット内で培地表面にかかる皺が生ずる程度まで乾燥させる。この生培地は数ヶ月、4℃で保存可能で保存中は乾燥を防ぐためビニール袋などで密封する。



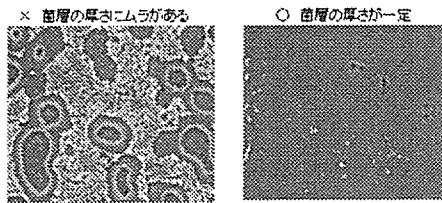
**2) アメーバ分離用培地の準備**

- ストック用の菌液を滅菌蒸留水で10倍に希釈し、その1mlを無栄養寒天培地に移す。揺らしながら全面を菌液で濡らした後、シャーレを倒して下に溜まった菌液0.5mlを吸取り回収する。



菌液を全面に塗布する      余分の菌液を回収する

## 2) アメーバ分離用培地の準備



- 菌液塗布後、安全キャビネット内で培地表面に皺が生ずる程度まで乾燥させる。乾燥不足の場合、水試料接種後の培地乾燥に、より長い時間がかかる。

## 2) アメーバ分離用培地の準備

- 菌を塗付した寒天培地は1、2週間であれば4℃で保存可能である。保存中にカビが生じた場合は使用しない。
- 塗布量が少ない場合は
  - \* 塗布する菌液量を増やす(回収する液量を減らす、例えば0.5ml→0.2あるいは0mlにする)
  - \* 希釈した菌液にストック菌液を少量加えて菌濃度を上げる。
  - \* ストック菌液の希釈倍率を低くして用いる。

## 3. 培養・株保存

### <試料からのアメーバの分離と定量>

- 被検試料水はそのまま1ml、あるいは50mlを遠心(1,000xg, 5分間)で1mlに濃縮したものをアメーバ用分離培地に移す。この操作は安全キャビネット等内で無菌的に行う。
- ビニール袋等に入れ乾燥を防ぎ、30~42℃で培養する。
- アメーバのプレートは毎日観察する。培養3日目程度では肉眼的にはほとんど変化は異ならないが、倒立顕微鏡下で観察すると、数十個(ほど)に増殖しているアメーバ集落が見られる場合がある。
- 培養2、3日後になると増殖したアメーバが菌落として肉眼的に確認可能となる。

### <試料からのアメーバの分離と定量>

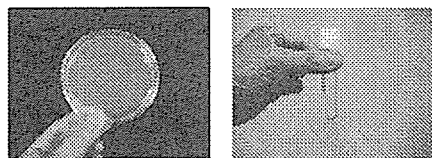
- アメーバ性の集落の特徴は、塗布した菌を消費しながら拡大、成長していく点である。肉眼的にはほぼ円形で、菌が塗布されている部分との対比で透明感があり菌叢がやや線状に観察される。
- アメーバの集落と思われるものについてはプラスティックのジャーシ蓋側から黒色マーカーペン等でマークしておく。成長の遅い細菌類の集落との判別が容易となる。
- なお集落の成長速度、出現までの時間はアメーバ個々に異なるので注意する。
- 毎日プレートを観察し、観察期間中につけられたマーク数を合計すれば、元の試料水中に存在したアメーバ数を算出できる。

### <アメーバの単離(クローニング)と保存>

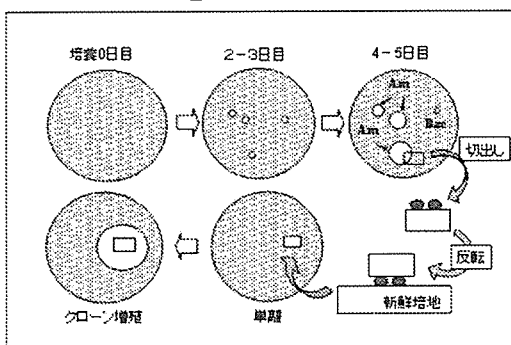
- どのようなアメーバが分離されたかの確認には、培地より集落を単離(クローニング)し、その後形態学的あるいは生化学的、分子生物学的方法により同定を行う。
- 鈎針または先端を鋭利にしたピアノ線を用いて、菌落の最外部(最もアメーバが完全に増殖している部分)を3~5mm角の大きさで寒天ごと切り出す。
- 増殖皿を下にして、新しいアメーバ分離培地にのせる。寒天片が小さいので、アメーバの付着している表面部分だけでも移植できれば良い。
- 30℃付近で培養を行う。

### <アメーバの単離(クローニング)と保存>

- 単離したアメーバは寒天培地上で保存可能。シスト化するものはシスト化後1ヶ月程度は室温で保存可。
- シスト化しないものについては、大腸菌を食べつくすと死滅するので、菌の消費具合をみて継代する。
- アメーバによっては無菌培地で増殖・保存が可能である。



### 試料接種後のアメーバ培養の流れ

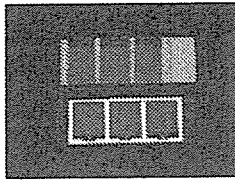


## 4. 顕微鏡観察

- 倒立顕微鏡を用いる。
  - 倍率100~200倍で観察する。
- 培養後1-2日
- 培養体が少数分散
- 培養後4日
- 虫喰痕(A)で確認
  - 培養体(周辺部)
  - シスト(中心部)
  - 鏡外周部
  - 培養方向

<顕微鏡観察>

- アメーバの増殖している箇所に20μlの蒸留水をピペットで滴下し、3-4回のピペッティングでアメーバを浮遊させ、その浮遊液をスライドガラスに移し、カバーガラスで封じる。200~400倍の倍率で観察を行う。



チャンバースライド  
上は自作  
下は市販品

- スライドガラスとカバーガラスを貼りあわせ隙間を持たせたチャンバースライドは、アメーバ運動の観察に有用である。

<顕微鏡観察>

- 一般的な生物顕微鏡または位相差顕微鏡ではアメーバ属に特徴的な運動と形態が観察でき、微分干渉顕微鏡を用いれば微細な細胞表面構造まで観察が可能である。
- なお、形態観察はアメーバの運動が一定するまで、標本作成後15分程度は待つ。
- 観察まで時間がかかる場合には標本の乾燥を防ぐため、カバーガラス周囲をパラフィンで封じる。エナメル(マニキュア)はアメーバに対する毒性が見られるので使用しない。

5. 形態学的分類

<形態学的同定の要点>

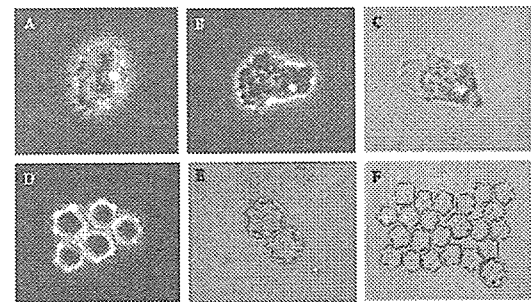
- アメーバ類は、たとえ遺伝的に均一なクローン集団を観察したとしても、形として同一に見えるものはないことから、実際の試料観察時には、多数のアメーバ(個体)を観察し、それらの共通的特徴を見つけ出すこと。
- アメーバの栄養体はスライドガラスに接着する前の浮遊時、また接着後の運動時、それぞれ特徴的な形態を示すことがある。一般的には接着後、活発に運動を開始した後の栄養体の形態を詳細に調べる。

<形態学的同定の要点>

- アメーバによっては、シストを形成するもの、しないものがある。シスト化は同定上有用な形質となるので、できるだけシストと栄養体の両方を調べる。シストの形態だけでは分類が難しいことがある。
- 顕微鏡の型式によっては観察像に違いが生ずる。しほり、コントラスト等を微調整しながら、運動時の形態、細胞周囲の構造を明確に捉えるようにする。透視型顕微鏡で観察する場合は、しほりを増し、およそのフォーカスをあわせてところで僅かに上下させるとコントラストが高くなる。

1. *Acanthamoeba* sp.

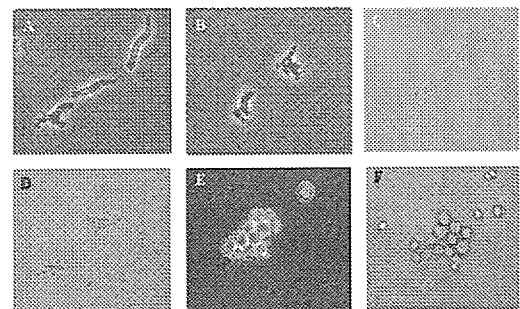
- 1) 形態的特徴:**  
栄養体は大きさ20~60μm、扁平で卵形~三角形。運動進行方向に仮足(假足)を伸ばし、その先端に棘状または針状の突起(アカンポディア)を伸ばす。シストは10~15μm、2重壁構造を有し、内外のシスト壁は共に明確に観察される。しほり円型から星型まで形態は多様である。
- 2) 観察のポイント:**  
ガラス面に接着するまでの浮遊時は、アメーバ全体が果のイガのように見える。接着まで1時間ほどかかる場合もある。運動中にこのアカンポディアが観察され、さらに2重壁構造のシストが観察できれば、形態学的に *Acanthamoeba* と同定する。
- 3) 紛らわしいアメーバ:**  
後述の *Vexillifer* はアカンポディアに似た突起を有し、特に大型の種類の場合は *Acanthamoeba* と良く似る。 *Vexillifer* はシストを形成しないので、紛らわしい場合はシストを確認する。



*Acanthamoeba* 栄養体(A-C)ならびにシスト(D-F); A,B,D-位相差型顕微鏡像、C,E,F-透視型顕微鏡像  
(倍率×400倍、セキスイ鏡プレートを使用)

2. *Hartmannella* sp.

- 1) 形態的特徴**  
栄養体は大きさ10~70μm、円筒形で、運動中の伸縮は極めて細長くなる。非運動時は多足的になる場合がある。浮遊時も短い仮足を多数伸ばした状態を示すことが多い。シストは5~7μm、円型~卵円型で2重壁構造を有する。
- 2) 観察のポイント**  
比較的ガラス面への接着が早く、直ちに伸展、運動を開始することが多い。運動途中で、体側より突出的に仮足が伸びY字型になることがあるが、直ちに1本の形態に戻って運動する。運動性は高い。一般的に伸縮が後者の5~6倍なので、細長く真っすぐに運動しているアメーバであれば、 *Hartmannella* と同定する。
- 3) 紛らわしいアメーバ**  
*Naegleria* は形態が *Hartmannella* と似ている。 *Hartmannella* は運動が直進的で、 *Naegleria* のような仮足の連続的膨出、探索的な運動は示さない点で異なる。



*Hartmannella* 栄養体(A-D)ならびにシスト(E, F); A,B,E-位相差型顕微鏡像、C,D,F-透視型顕微鏡像  
(倍率×400倍、セキスイ鏡プレートを使用)



3. *Naegleria* sp.

1) 形態学的特徴

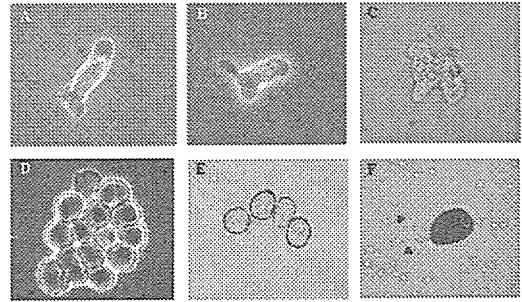
栄養体は大きさ10~40μm、円筒型で仮足を連続的に突出し、急速に付着を繰り返しながら運動する。シストは10~15μm、2重殻構造で、一側に円型であるが、密集形成が起ると半円形、多角型が生ずることもある。*Naegleria*には鞭毛期があり、等長の2鞭毛を退出、回転しながら遊泳する。

2) 観察のポイント

*Naegleria*は接着性が高く、直ちに運動を開始する。仮足の形成は一定方向に定まらず突出的に伸長し、発作的な運動性を示す。鞭毛期を観察するには、顕微鏡観察用に作製した標本を2~3時間室温におく。水中を2次元的に遊泳するのでフォーカスを上下させながら、低拡大(100~200倍)で観察する。鞭毛は動きが極めて早く肉眼的には確認しにくい。鞭毛観察はヨード染色等で固定した標本で行う。栄養体の運動の特徴と、遊泳する鞭毛期が観察できれば*Naegleria*と同定する。

3) 紛らわしいアメーバ

*Valoniopsis*は*Naegleria*とほぼ形態が同じで、鞭毛期がないと言う点で*Naegleria*と区別されるものである。両者を明確かつ簡単に区別するには、分子生物学的同定法を用いる。



*Naegleria* 栄養体(A-C)、シスト(D, E)ならびに鞭毛期(F): A,B,D-位相差型顕微鏡像、C,E,F-透過型顕微鏡像 (倍率x400倍、セキスイ複鏡プレートを採用)

4. *Platyamoeba* sp.

1) 形態学的特徴

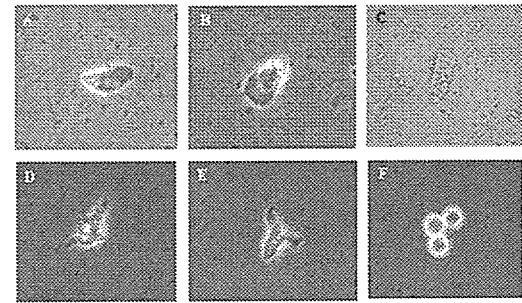
栄養体は大きさ10~40μm、扁平で円型、楕円型、扇型。仮足部分が大きく体長の1/2程度になることが多い。浮遊時には仮足を多数伸ばし、多足的な形態を示す。シストは7~10μm、2重殻構造で*Harmanella*のシストに似るが、より球型に近い。内外シスト壁の間がとて狭い。

2) 観察のポイント

ガラス面に接着しにくく、浮遊時の形態が長く狭く場合が多い。運動性は低いが、運動を始めると仮足部分が大きく伸び、蜂べらめのような形が目立つ。小型で扁平なので、コントラストを強めて観察すると仮足部が強調される。

3) 紛らわしいアメーバ

後述の*Vannella*の小型タイプに似る。*Vannella*よりも*Platyamoeba*の方が一般的に薄くて細長い。シスト形成の有無を確認する。浮遊から接着直後あたりの形態は*Harmanella*に似ており、区別しにくい。*Harmanella*はガラス面への接着性が高いこと、細長い形態を示すことなどで区別する。



*Platyamoeba* 栄養体(A, B, C)、浮遊型(D, E)およびシスト(F): A,B,D-F-位相差型顕微鏡像、C-透過型顕微鏡像 (倍率x400倍、セキスイ複鏡プレートを採用)

5. *Vannella* sp.

1) 形態学的特徴

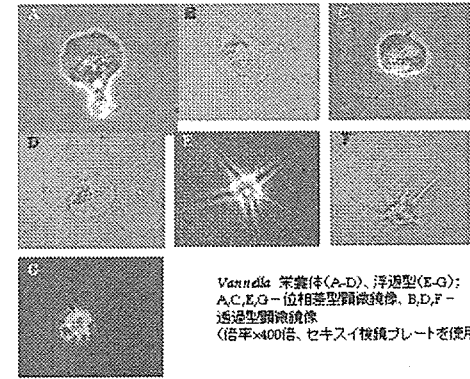
大きさ10~80μm、扁平、扇型が典型である。仮足部分は体長の1/2程度を占め、前進方向に幅広く伸びる。浮遊時には中央の細胞より放射状に、多数の、細胞の数倍も長い仮足を伸ばす。この細長い仮足は運動性があり、ガラス面への接着が始まると体部に吸収され消失する。シストは形成しない。

2) 観察のポイント

扁平な菌團のような栄養体と細長い仮足を伸ばす浮遊型は、同一のアメーバとは思えない差がある。通常は浮遊型の方が先に観察されるので、放射状の仮足が観察されれば*Vannella*と同定する。ただし、小型の*Vannella*は浮遊型の仮足が短いものもある。小型のものは比較的ガラス面への接着性が高いので、運動中の形態を良く観察する。接着後の*Vannella*の運動性は長く、また運動中でも特徴的な形が良く保たれている。

3) 紛らわしいアメーバ

接着して運動している栄養体は、*Platyamoeba*と良く似るので、浮遊時の形態で両者を区別する。また*Vannella*はシストを形成しないことから、シスト形成の有無を確認する。



*Vannella* 栄養体(A-D)、浮遊型(E-G): A,C,E,G-位相差型顕微鏡像、B,D,F-透過型顕微鏡像 (倍率x400倍、セキスイ複鏡プレートを採用)

6. *Vexillifera* sp.

1) 形態学的特徴

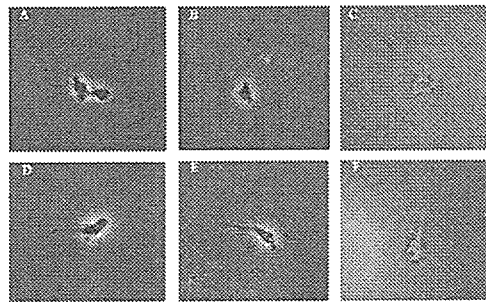
大きさ10~40μm、扁平、基本的に三角型で前方に広い。仮足の前方に比較的に細胞が3、4枚の突起を突出す。特に浮遊時にはこの棘状突起が数本にまとなり、細胞の数倍ほどの長さとなる。シストは形成しない。

2) 観察のポイント

通常、寒天プレート上では極めて小さいアメーバの集団として検出される。水に浮くと直ちに浮遊型となる。長い突起を伸ばさながら活発に動かす。一定方向に突起を揃えて伸ばすことが多い。ガラス面への接着性は種により一定していない。栄養体よりも浮遊型の特徴的な形態を良く観察する。

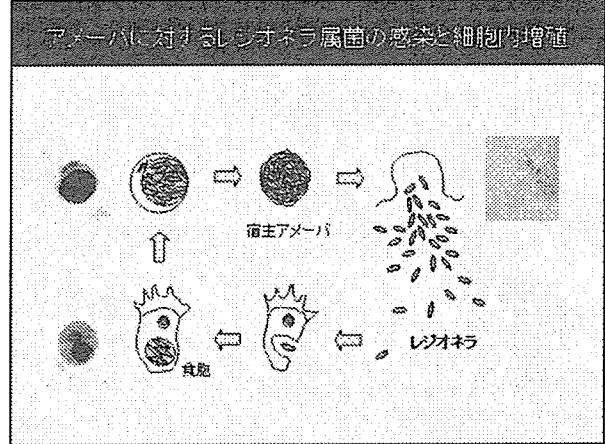
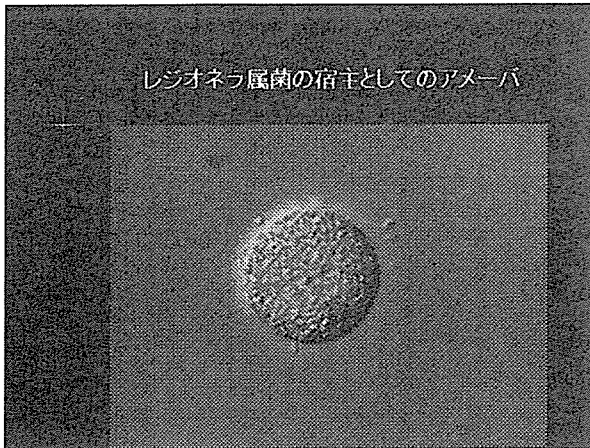
3) 紛らわしいアメーバ

運動している栄養体は*Actinobryonella*と良く似るが、大きさが一般的に小さく、シスト形成を行わない点で異なる。浮遊時の形態も棘状の突起の伸ばし方が異なる。



*Vexillifera* 栄養体(A-C)、浮遊型(D-F): A,B,D,E-位相差型顕微鏡像、C,F-透過型顕微鏡像 (倍率x400倍、セキスイ複鏡プレートを採用)

資料-2 レジオネラ属菌の宿主としてのアメーバ類の重要性

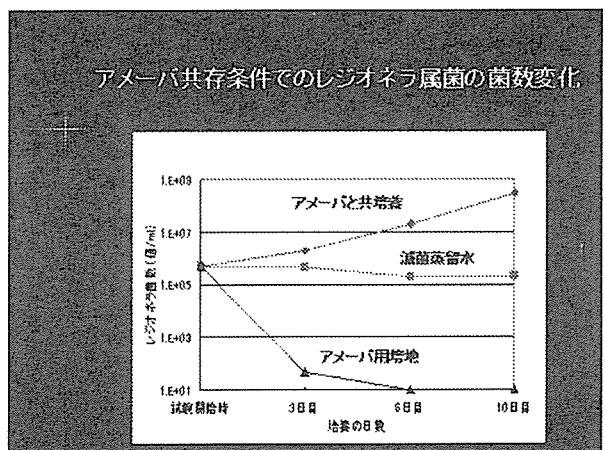


宿主としてのアメーバの重要性 1

効率的なレジオネラ属菌の増殖の場であること

＊培養容器の水試料にアメーバを添加したことで、レジオネラ属菌が検出される場合がある。

＊レジオネラ属菌のアメーバに対する感染性は、菌の種類、血清型、またアメーバの種類、さらには培養温度によっても異なる。



宿主としてのアメーバの重要性 2

アメーバ内増殖はレジオネラ属菌の感染性を向上させること。

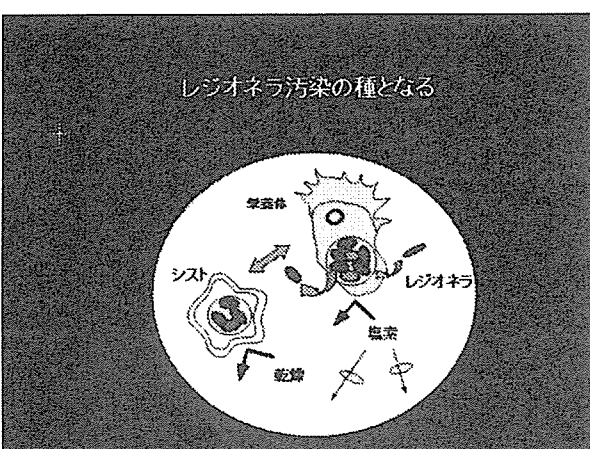
＊同一菌株をBCYE $\alpha$ 培地とアメーバ共培養で増殖させると、アメーバで増殖した方が菌の運動性が高くなる。また培養細胞への感染性が10~100倍高くなる。

宿主としてのアメーバの重要性 3

アメーバは薬剤あるいは環境変化からレジオネラ属菌を守ること

＊冷却処理の水処理剤はアメーバ内のレジオネラ属菌には無効。

＊レジオネラ属菌はシスト内で生存することで、乾燥等の環境変化にも抵抗する。



宿主としてのアメーバの重要性 4

感染媒体(ベクター)となる可能性があること

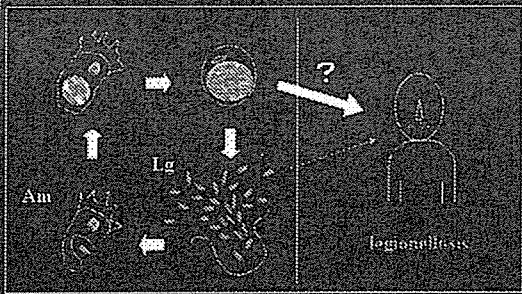
＊感染成立に必要な菌数は不明。

＊レジオネラ属菌の感染媒体は一般的にエアロゾル。2~5  $\mu$ mの粒子は肺まで到達可能。

＊アメーバ内増殖したレジオネラ属菌は、菌数1000 cfu程度で、5  $\mu$ mの球状にパックされる。

＊モルモットの感染実験では、LD<sub>50</sub>はおよそ1000 cfu。

### 感染アメーバ……ベクターか？



### アメーバ汚染の実態

各種水環境における主な宿主アメーバの検出率(%)

検出アメーバ	温泉浴槽水 (試料数685)	循環式浴槽水 (試料数43)	冷却塔水 (試料数180)
ハルトマネラ	10.1	65.1	62.8
ネグレリア	15.6	27.9	53.3
アカソアメーバ	5.8	2.3	20.0
バネラ	1.5	18.6	49.4

### アメーバ汚染の実態

浴槽とろ過装置内のろ材からのアメーバ検出率(%)

検出アメーバ	浴槽水 (試料数15)	ろ材 (試料数14)
ハルトマネラ	80.0	100.0
ネグレリア	40.0	78.6
アカソアメーバ	0.0	35.7
バネラ	13.3	50.0

### アメーバ汚染の実態

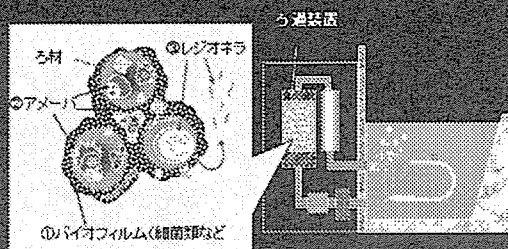
A浴場におけるアメーバ定量調査結果

浴槽系	アメーバ数		レジオネラ菌数
	浴槽水	ろ材	
No. 1	0	100	
No. 2	1	0	$2.6 \times 10^4$
No. 3	0	1,500	$9.8 \times 10^2$
No. 4	26	7,000	$6.8 \times 10^2$
No. 5	11	20,000	$1.5 \times 10^6$
No. 6	7	2	$4.7 \times 10^4$

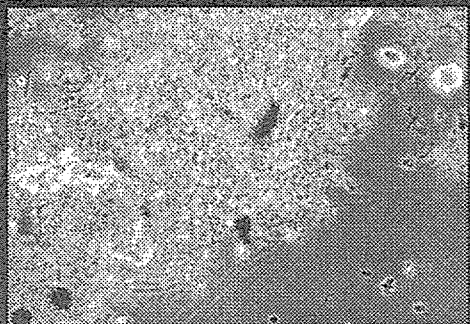
アメーバ検出は50ml、レジオネラ検出は100mlあたり

### なぜ循環式浴槽の汚染は激しいか？

ろ過装置がアメーバとレジオネラの培養場になっているため



### バイオフィーム



資料-3 自由生活性アメーバ類のもつ病原性

これまで知られている病原性アメーバ

アメーバ	種	病原性	培養	備考
<i>Naegleria</i> spp.	<i>N. australensis</i>	PAM	SCGYE	45℃耐性
	<i>N. fowleri</i>	PAM	*	42℃耐性
	<i>N. malaya</i>	PAM	*	42℃耐性
<i>Acanthamoeba</i> spp.	<i>A. culbertsoni</i>	GAE	PPGC	AIDS, 免疫疾患
	other species	Keratitis	*	Contact lens
<i>Balamuthia</i> spp.	<i>B. mandrillaris</i>	GAE	BM3	免疫不全性の報告 Scheiner, J.J., Clin. Microbiol. Nov. 1993, Vol. 30, 2008
Other amoebae:	<i>Sappinia diploides</i>	AE	NME	付録表第1編報告 Gubina, D. B. et al., JAMA, 2007; 297: 1523-1524


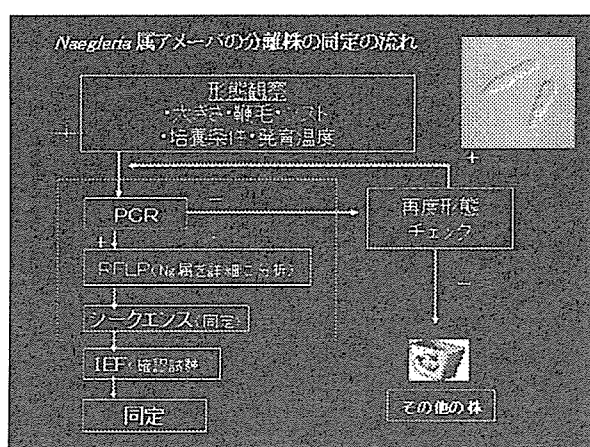
**Naegleria 属アメーバ**

- 1) 自由生活性・小型アメーバ・有鞭毛期
- 2) 40℃付近の温水環境から検出
- 3) 病原性を示す種類あり

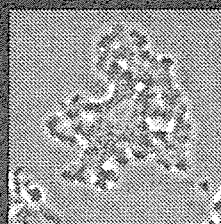
***N. fowleri* (ヒトPAM症の原因)**

国内医学データ  
 \* 感染例あり  
 \* 温排水より分離例あり

***N. australensis* 実験的にマウスに対しPAMを発症させるヒト感染例はこれまでに報告なし**

**Balamuthia mandrillaris**



新しいアメーバ性脳炎の病原性

国内報告のあった6例のアメーバ性脳炎症例中、4例が同アメーバ感染によるものと判明

本年2月、新たな感染例

感染源、感染経路不明