

# 温水環境中に生息する病原性を有する自由生活性アメーバ類 およびレジオネラ属菌の汚染調査の概要(2001年度)

田栗 利紹

## Investigation of Pathogenic Free-Living Amoebae and Legionellae in Warm Water Habitats in Nagasaki Prefecture (2001)

Toshitsugu TAGURI

Key word : Free-Living Amoebae , Legionellae , hot water habitats , *Naegleria fowleri*

キーワード: 自由生活性アメーバ, レジオネラ属菌, 温泉環境, ネグレリアフォーレイ

### まえがき

われわれの生活環境中の温水には病原性を有する自由生活性アメーバとレジオネラ属菌が存在していることが知られている。

自由生活性アメーバは広く環境中に生息しているが、本来ヒトに寄生するものではない。しかし、*Naegleria fowleri* (以下、N.フォーレイと略記)のような一部の高温耐性種が偶発的に中枢神経系に感染し、髄膜脳炎を引き起こすと考えられている<sup>1)2)</sup>。N.フォーレイは、これまでにニュージーランド<sup>3)</sup>、英国<sup>4)</sup>および米国<sup>5)</sup>において温泉の浴槽水から検出されている。本邦においては、1990年に De Jonckheere ら<sup>6)</sup>により関東近辺の温廃水で N.フォーレイの生息が報告され、1996年11月には佐賀県において最初の N.フォーレイによる髄膜脳炎の症例<sup>7)</sup>が報告されている。

一方で、レジオネラ属菌は一般的に河川、湖沼および土壌中等に生息しているが、ビルの冷却塔、温泉および循環式浴槽からも頻繁に検出される<sup>1)8)</sup>。レジオネラ属菌は、ヒトに致死性の肺炎を惹起することで知られ、近年、各地の浴場施設で集団感染事故を引き起こしており、公衆衛生上重要な病原細菌の一つとして注目されている。本細菌は前述の自由生活性アメーバ類あるいはその他の原生動物に寄生することができる<sup>1)2)8)</sup>、温水環境での両者の実態を掌握することは、浴場施設等の衛生指導を実施していく上で非常に重要なことである。

従って今回、長崎県下の浴場施設等を対象に、高

温耐性アメーバ類およびレジオネラ属菌の汚染実態を調査した。なお、本研究は厚生科学研究 生活安全総合研究事業「温水環境中に生息する病原性を有する自由生活性アメーバ類の汚染実態調査」<sup>2)</sup>(主任研究者 遠藤卓郎, 国立感染症研究所)に対する協力研究として実施されたものである。

### 調査方法

#### 1 試料の採取

長崎県下の公衆浴場等 15 施設 69 浴槽を対象に 2001年12月から2002年1月にかけて調査した。採水は、50ml 滅菌プラスチック遠沈管および 500ml 滅菌ポリプロピレン容器を用い、浴槽水を採取してから 24 時間以内に、それぞれ高温耐性アメーバ類およびレジオネラ属菌検査に供した。この時、アメーバ用試料は常温で、レジオネラ属菌用試料は 10℃未満で搬送した。

#### 2 理化学検査

施設ごとの試料水の水温、pH、残留塩素を測定した。残留塩素は DPD 法により測定した。

#### 3 アメーバの分離および培養

アメーバ用分離培地は、予め加温処理(60℃, 30分)により不活化した大腸菌液(約 10<sup>8</sup>CFU/ml)を、1.5%寒天培地(DIFCO)上に塗布した後、風乾させて作製した。50ml 滅菌プラスチック遠沈管に採取した浴槽水を 1,500G、5 分間遠心分離した後、上清を捨てて約 1ml に濃縮し、前述のアメーバ用分離培地に接種して初代培地とした。

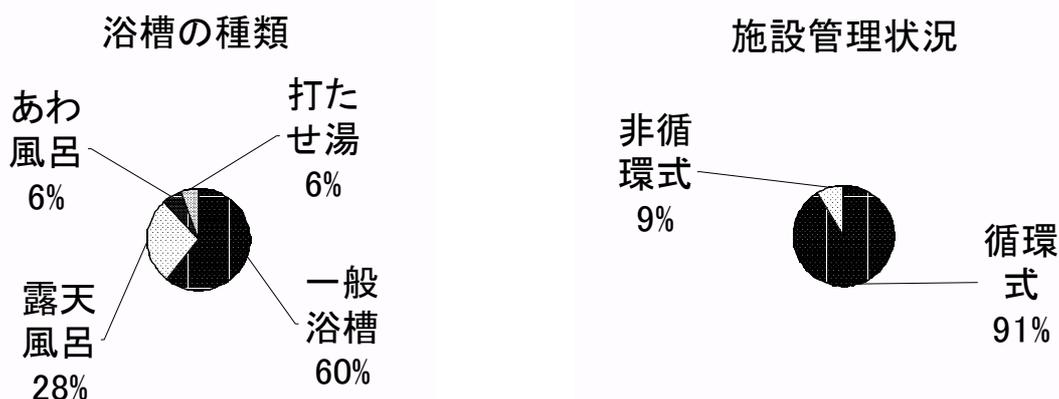


図1 公衆浴場等における浴槽の種類と施設管理状況

初代培地は表面が十分乾燥するまで風乾させ、ビニール袋等で密閉した後、高温耐性アメーバを特異的に検出する目的で 42.0℃、2週間培養した。アメーバが大腸菌を捕食、消費することで形成される培地上の透明なプラークにより発育を確認した。発育を確認した試料は、プラーク辺縁部を寒天ごと 1cm<sup>2</sup> 角に切り取り、発育面を下にして新しいアメーバ用分離培地に継代してクローニング培地とした。得られた初代培地とクローニング培地は、常温で全て国立感染症研究所に送付し、アメーバの種を同定した。

種の同定は、主に形態学的観察により行われたが、高温培養条件下で発育を示した *Naegleria* 属アメーバに関しては Propionyl esterase および Acidphosphatase のアイソエンザイム解析を用いた<sup>2)</sup> (データは厚生科学研究総括・分担報告書に掲載)。

#### 4 レジオネラ属菌類の分離・培養と同定

レジオネラ症防止指針<sup>8)</sup>に準拠し、浴槽水 500ml を、径 47mm、ポアサイズ 0.45 μm の滅菌済メンブランフィルター (ADVANTEC) でろ過した。フィルターを 15ml のスクリューキャップ付き滅菌ポリプロピレン製遠心管に入れ、滅菌精製水 5ml を加えてボルテックスした後、滅菌ガラス棒で激しく攪拌した。加温処理 (50℃、20分) した浮遊液 100 μl を WYO α 寒天平板培地 (栄研科学) に接種し、35℃ で 1週間観察した。得られた集落は L-システイン要求性を確認し、生化学的性状と PCR 法によりレジオネラ属菌および *Legionella pneumophila* の同定を行った。

### 調査結果

#### 1 施設の源泉と管理状況

今回採水した公衆浴場等の浴槽の種類および施設管理状況を図 1 に示した。全施設の 91% が循環

式浴槽を採用していた。浴槽の種類は、一般浴槽 42 浴槽 (60%)、露天風呂 19 浴槽 (28%)、あわ風呂 4 浴槽 (6%) および打たせ湯 4 浴槽 (6%) であった。

#### 2 理化学検査結果

水温は 34.5 ~ 42.0℃ で、pH は 6.6 ~ 8.8 であった。残留塩素濃度は 0.0 ~ 2.0ppm 以上を示し、濃度ごとの占有率は図 2 に示した。

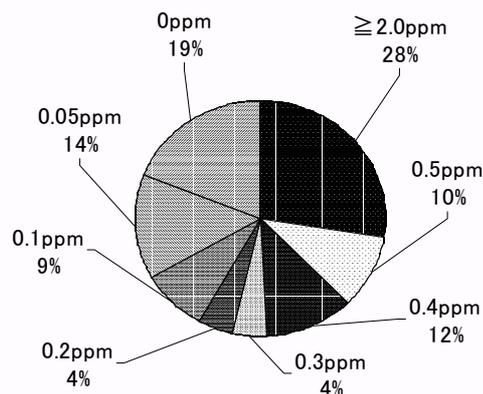


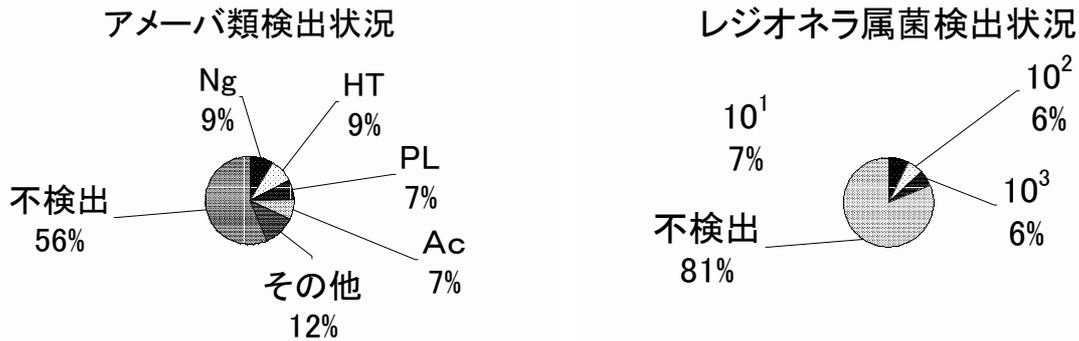
図2 残留塩素濃度

#### 3 アメーバ類の検出状況

アメーバ類は 15 施設 69 浴槽のうち、12 施設 26 浴槽 (38%) から検出された。その種類は、*Naegleria* (ネグレリア) 属、*Hartmannella* (ハルトマネラ) 属、*Platyamoeba* (プラッティアメーバ) 属、*Acanthamoeba* (アカンソアメーバ) 属およびその他の属であり、占有率を図 3 に示した。

#### 4 レジオネラ属菌の検出状況

レジオネラ属菌は 15 施設 69 浴槽のうち、6 施設 13 浴槽 (19%) から検出された。検出されたレジオネラ属菌は、PCR 法により全て *Legionella pneumophila* と同定された。検出数の内訳は、10<sup>1</sup>CFU/100ml が 4



(左図) Ng: ネグレリア属, HT: ハルトマネラ属, PL: プラッティアアメーバ属, Ac: アカンソアメーバ属, (右図) レジオネラ属菌は全て *Legionella pneumophila*, 菌数の単位は CFU/100mL

図3 アメーバ類及びレジオネラ属菌検出状況

施設 5 浴槽 (7%),  $10^2$ CFU/100ml が 1 施設 4 浴槽 (6%),  $10^3$ CFU/100ml が 3 施設 4 浴槽 (6%) であり, 不検出が 9 施設 56 浴槽 (81%) であった (図 3)。

考 察

(1) N.フォーレイの検出状況

26 浴槽から検出された高温耐性アメーバ類の中から N.フォーレイは同定されなかった。同じく全国から検出された 1,996 株の高温耐性アメーバの中からも同定されなかった<sup>2)</sup>(データは厚生科学研究総括・分担報告書に掲載)。しかしながら, N.フォーレイ生息の指標とされる<sup>1,2)</sup>同属の *Naegleria lovaniensis* (以下 N.ロバニエンシスと略記) が各地で検出されており, 潜在的な生息は否定できない。長崎県においても 4 施設 6 浴槽 (9%, 図 3) から N.ロバニエンシスあるいは *Naegleria spp.* が検出された。今後も調査

を継続していくことが必要であると考えられた。

(2) アメーバ類とレジオネラ属菌の検出状況

レジオネラ属菌は自由生活性アメーバ類と寄生関係にあり, 原生動物に取り込まれるとその細胞内で増殖し, 細胞を破壊して, 次々と寄生を繰り返していくと考えられている<sup>1)</sup>。したがって両者の生息実態を掌握することは, 浴場施設等のレジオネラ対策を考える上で有用なデータとなるため, アメーバと複合させて検出状況を解析した。

15 施設 69 浴槽からの検出率は, アメーバ類が 38%, レジオネラ属菌が 19% を示した (図 3)。これらの数値は, 神奈川県における黒木らの報告<sup>1)</sup>(アメーバ類: 73.3%, レジオネラ属菌: 70%) と比較するとかなり低い値であった。これは, 今回の対象を高温耐性アメーバに局限したため培養温度を高温に設定したことと採取した浴槽水の 28% が残留塩

表 1 高温耐性アメーバ類とレジオネラ属菌の検出状況

	高温耐性アメーバ類検査		
	検 出	不 検 出	合 計
レジオネラ属菌検査 検 出	7	6	13
レジオネラ属菌検査 不 検 出	19	37	56
合 計	26	43	69

表 2 浴槽の種類による高温耐性アメーバ類とレジオネラ属菌の検出状況

浴槽の種類と浴槽数	高温耐性アメーバ検出数	レジオネラ属菌検出数
一般浴槽 42	16	10
露天風呂 19	6	1
打たせ湯 4	2	0
あわ風呂 4	2	2
69	26	13

表3 浴槽水の残留塩素量とpHによる高温耐性アメーバ類とレジオネラ属菌の検出状況

残留塩素濃度と浴槽数		高温耐性アメーバ検出数		レジオネラ属菌検出数	
		≥ pH8.0	< pH8.0	≥ pH8.0	< pH8.0
> 2.0ppm	19	2	0	0	0
0.1-0.5ppm	27	7	7	5	0
< 0.1ppm	23	4	6	4	4
69		26		13	

素濃度 2.0ppm 以上を示した(図 2)ことに関係していると考えられた。15 施設 69 浴槽からの検出において、高温耐性アメーバ類とレジオネラ属菌の検出状況に有意差は認められなかった(表 1)。浴槽の種類ごとに比較しても差は認められなかった(表 2)。

ここで、今回採取した浴槽水の残留塩素濃度が、> 2.0ppm, 0.1 ~ 0.5ppm および < 0.1ppm でほぼ三分割されることに着目し(図 2), 高温耐性アメーバ類とレジオネラ属菌検出数を ≥ pH8.0 および < pH8.0 に区分して分類した(表 3)。> 2.0ppm の 19 浴槽では、pH に関係なく、アメーバおよびレジオネラ属菌共にほとんど検出されなかった。0.1 ~ 0.5ppm の 27 浴槽において、アメーバは pH に関係なく検出されたが、レジオネラ属菌は、≥ pH8.0 で 5 浴槽が検出されたにもかかわらず、< pH8.0 では全く検出されなかった。石間ら<sup>9)</sup>は、pH が高い浴槽水では、塩素剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効果が低下することを報告しているが、本事例はこの理論をよく実証したものと考えられた。< 0.1ppm では、pH に関係なくアメーバ及びレジオネラ属菌共に検出された。

### まとめ

長崎県下の公衆浴場等 15 施設 69 浴槽を対象に高温耐性アメーバ類およびレジオネラ属菌の汚染実態を調査した。アメーバ類は 15 施設 69 浴槽のうち、12 施設 26 浴槽(38%)から *Naegleria* (ネグレリア) 属, *Hartmannella* (ハルトマネラ) 属, *Platyamoeba* (プラッティアメーバ) 属, *Acanthamoeba* (アカンソアメーバ) 属およびその他の属が検出されたが、ヒトに病原性を有する *N.フォーレイ* は同定されなかった。レジオネラ属菌は 15 施設 69 浴槽のうち、6 施設 13 浴槽(19%)から *Legionella pneumophila* が  $10^1 \sim 10^3$ CFU/100mL のオーダーで検出された。残留塩素量 0.1 ~ 0.5ppm の 27 浴槽において、アメーバは

pH に関係なく検出されたが、レジオネラ属菌は、≥ pH8.0 で 5 浴槽が検出されたにもかかわらず、< pH8.0 では全く検出されなかった。このことから、高い pH では塩素剤のレジオネラ属菌に対する殺菌効果が低下することが示唆された。

### 文献

- 1) 黒木俊郎, 他: 神奈川県下の温泉浴槽水中における *Legionella* 属菌と自由生活性アメーバ調査, 感染症誌, 72, 1050 ~ 1055, (1998)
- 2) 遠藤卓郎, 他: 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13年度報告書, 9 ~ 55, (2002)
- 3) Brown TJ, et al: The occurrence and distribution of pathogenic free-living amoebae in thermal areas of the north island of New Zealand, N Z J Marine Freshwater Res, 17, 56 ~ 59, (1983)
- 4) Aufy S, et al: Improved selective isolation of *Naegleria fowleri* from the environment, Trans Roy Soc Trop Med Hyg, 80, 350 ~ 351, (1986)
- 5) Fields BS, et al: Intracellular multiplication of *Legionella pneumophila* in amoebae isolated from hospital hot water tanks, Current Microbiol, 18, 131 ~ 137, (1989)
- 6) De Jonckheere JF, et al: First isolation of pathogenic *Naegleria fowleri* in Japan, Jpn J Parasitol, 40, 352 ~ 357, (1991)
- 7) 福間利英, 他: 自由生活性アメーバ *Naegleria fowleri* が分離された本邦初の原因性アメーバ性髄膜脳炎の症例, 病原微生物検出情報, 18, 8, (1997)
- 8) 財団法人ビル管理教育センター: 新版 レジオネラ症防止指針-厚生省生活衛生局企画課監修, 東京, 85 ~ 94, (1999)
- 9) 石間智生, 他: 日本防菌防黴学会第 29 回年次大会要旨集, 日本防菌防黴学会, 74, (2002)