

# 人工環境水におけるアメーバ類の生息実態とレジオネラ属菌の関連性

田中忍、中西典子、岩本朋忠(神戸市環境保健研究所 感染症部)

## 1 はじめに

レジオネラ属菌(以下、レジオネラ)は、アメーバ類(以下、アメーバ)に取り込まれても殺菌されることなく、食胞内で分裂・増殖し、最終的に食胞が破裂して環境水中に遊出され、次々と寄生する。また、高塩素濃度でも生存できるアメーバが存在することから、レジオネラはアメーバ内に取り込まれることで、消毒薬等の化学物質から逃れることができる。従って、アメーバはレジオネラに、増殖および感染性を高める形態へと変化させる環境を与えていると言える<sup>1)</sup>。

レジオネラ属菌種によってアメーバ内の増殖性が大きく異なることや、遺伝子型グループに対する適合性も異なることも示されている<sup>2)</sup>。

そこで、市内の人工環境水においてアメーバとレジオネラの検出状況を調査し、さらに検出されたアメーバに対するレジオネラの感染性を評価することで、環境中のアメーバとレジオネラ属菌種との関連性について明らかにすることを目的とした。

## 2 方法

### 2.1 材料

H29年4月～12月およびH30年6月～H31年2月に採水された冷却塔水 27 検体、温泉浴槽水 101 検体、公衆浴場水 133 検体、プール採暖槽水 14 検体、給湯水 10 検体の計 285 検体を用いた。

感染実験には、アメーバは *Stenamoeba* 属(温泉浴槽水由来 3 株)、*Acanthamoeba* 属(温泉浴槽水由来 2 株)、*Echinamoeba* 属(温泉浴槽水由来 1 株)、*Hartmannella* 属(温泉浴槽水由来 1 株、公衆浴場水由来 1 株)、*Naegleria* 属(公衆浴場水由来 1 株)、*Vannella* 属(温泉浴槽水由来 1 株)の 6 種類 10 株を用いた。レジオネラ属菌株は、*L. pneumophila* SG1/5/6/8/9/10 (温泉浴槽水由来 8 株、公衆浴場水由来 3 株、給湯水由来 1 株、プール採暖槽水由来 1 株)、*L. israelensis* (温泉浴槽水由来 2 株)、*L. londiniensis* 2 群(温泉浴槽水由来 2 株)、*L. micdadei* (温泉浴槽水由来 2 株)を用いた。

### 2.2 アメーバの検出

検水 150mL をメンブレンフィルター(孔径 1.2  $\mu$ m・直径 25mm)で吸引ろ過し、8 等分したメンブレンフィルターを 4 枚ずつ不活化大腸菌塗布寒天培地(60°C 1 時間加温処理した大腸菌約 500  $\mu$ L を塗布した無栄養寒天培地)に貼り付け、30°C と 42°C で 7 日間培養を行った。フィルターから出現したプラークからアメーバを分離し、倒立顕微鏡下でのアメーバの形態と 18S rRNA 遺伝子のシーケンスによりアメーバの種類を同定した。

### 2.3 レジオネラ属菌検査

国立感染症研究所 病原体検出マニュアル「レジオネラ症」平成 23 年 10 月 7 日改訂版記載の方法で実施した。

### 2.4 アメーバを用いたレジオネラ感染実験

レジオネラは BCYE  $\alpha$  寒天培地で 30°C 3 日間培養したものを供試した。アメーバ株は不活化大腸菌塗布寒天培地で 30°C にて増殖させた栄養体を用いた。

不活化大腸菌とレジオネラを濃度 McF4 に調整し、1:9 の割合で混合した菌液約 500  $\mu$ L を塗布した無栄養寒天培地と、対照として不活化大腸菌のみを塗布した無栄養寒天培地を用意した。アメーバ株の栄養体の断片をそれぞれの培地上に置き、30°C で 2~4 日間培養を行った。対照となる培地上で観察された正常なアメーバ増殖であるプラーク域の大きさととの比較で感染性を評価した。即ち、プラーク域が小さいほど、レジオネラがアメーバに感染し死滅させたことを示し、感染性が高いと評価した。

## 3 結果

### 3.1 人工環境水におけるアメーバの検出状況

285 検体中 89 検体(31.2%)からアメーバを検出した。冷却塔水からの検出率は 59.3%と高く、次いで温泉浴槽水 38.6%、公衆浴場水 22.6%、プール採暖槽水 21.4%、給湯水 10.0%であった(表 1)。また、アメーバが検出された 89 検体中 58 検体(65.2%)からレジオネラが検出された。アメーバ不検出検体からのレジオネラ検出率は 17.3%であり、有意差が認められた( $p < 0.01$ ) (表 2)。環境水別に見ると、アメーバ検出と不検出検体のレジオネ

ラ検出率は、冷却塔水ではどちらも検出率が高く、有意差は認められないが、温泉浴槽水および公衆浴場水においては、有意差を認めた( $p < 0.01$ ) (表 3)。

検出されたアメーバの種類は、冷却塔水では *Vermamoeba vermiformis* が最も多く 12 株 (57.1%)、次いで *Naegleria* 属 3 株 (14.3%) であった。温泉浴槽水では、*Stenamoeba* 属 14 株 (25.9%)、*Acanthamoeba* 属 11 株 (20.4%)、*Pharyngomonas* 属 8 株 (14.8%) が検出された。公衆浴場水では、*Vermamoeba vermiformis* 14 株 (29.2%)、*Stenamoeba* 属 8 株 (16.7%)、*Hartmannella* 属 8 株 (16.7%)、*Naegleria* 属 7 株 (14.6%) であった。他にも *Echinamoeba* 属、*Vannella* 属等多様な種類を検出した。プール採暖槽水からは、*Vermamoeba vermiformis* と *Flamella* 属が 1 株ずつ検出され、給湯水からは、*Acanthamoeba* 属 1 株を検出した。環境水別の分布状況をみると、冷却塔水は偏りがみられた一方で、温泉浴槽水および公衆浴場水では、冷却塔水に比べて多様なアメーバが検出された (表 4)。

### 3.2 アメーバを用いたレジオネラ感染実験

上記で分離されたアメーバを用いて、レジオネラの感染性の評価を行った。

その結果、アメーバ別では、*Stenamoeba* 属と *Acanthamoeba* 属は、*L. pneumophila* と *L. micdadei* が高い感染性を示したのに対して、*L. israelensis* と *L. londiniensis* 2 群は、感染性を示さなかった。*Echinamoeba* 属は、*L. israelensis* 以外の菌種で感染性を示した。*Hartmannella* 属は、*L. pneumophila*、*L. micdadei*、*L. israelensis* は感染性を示したものの、*L. londiniensis* 2 群は感染性を示さなかった。*Naegleria* 属は、*L. pneumophila* と *L. micdadei* が高い感染性を示し、*L. israelensis*、*L. londiniensis* 2 群も対照と比較すると感染性を示していた。*Vannella* 属は、プラーク域のばらつきが大きい傾向にあり、*L. pneumophila* が感染性を示したが、血清群によってプラーク域の大きさが異なった。

またレジオネラ属菌種別に見ると、*L. pneumophila* は、血清群でやや異なる場合があったが、6 種類のアメーバに感染性を示し、とりわけ *Acanthamoeba* 属、*Hartmannella* 属、*Naegleria* 属に高い感染性を示した。また、*L. micdadei* は、*Acanthamoeba* 属、*Naegleria* 属、*Stenamoeba* 属に非常に高い感染性を示した。一方で、*L. israelensis* は、*Hartmannella* 属と *Naegleria* 属、*L. londiniensis* 2 群は *Echinamoeba* 属と *Naegleria* 属にのみ比

較的感染性を示した (図 1)。

## 4 考察

アメーバ検出検体からのレジオネラ検出率はアメーバ不検出検体と比較して有意に高いことから、アメーバを宿主としてレジオネラが増殖している可能性が強く示唆された。アメーバの検出率は冷却塔水が最も高かったが、アメーバ検出検体と不検出検体のレジオネラ検出率にはあまり差がなかった。しかし、温泉浴槽水および公衆浴場水ではアメーバ検出検体からのレジオネラ検出率がアメーバ不検出検体よりも著しく高いことから、アメーバ類の存在とレジオネラが増殖は密接に関連していることが示唆された。

6 種類のアメーバ類と浴槽水からの分離頻度の高い *L. israelensis*、*L. londiniensis* 2 群、*L. micdadei*、*L. pneumophila* を用いた感染実験により、アメーバ類におけるレジオネラ属菌種間の感染性に違いがあった。このことから、レジオネラ属菌種によって感染・増殖しやすいアメーバ類が存在することが考えられた。

特に、レジオネラ症患者から最も分離される *L. pneumophila* は、血清群でやや異なる場合があったが、6 種類のアメーバに感染性を示し、アメーバの生態がレジオネラ感染に大きく影響することが推測される。以上の結果より、レジオネラを増殖を抑制する上で、アメーバ類の繁殖を防止する対策が、非常に重要であることが考えられた。

## 5 参考文献

- 1) 八木田健司ら:生活用水の病原性アメーバ汚染とその健康影響—水系環境のアメーバ汚染、モダンメディア 52 巻 8 号、252-259 (2006)
- 2) 八木田健司ら:レジオネラ属菌遺伝子型とアメーバ感受性、厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「公衆浴場等におけるレジオネラ属菌対策を含めた総合的衛生管理手法に関する研究」平成 24 年度総括・分担研究報告書、研究代表者:倉文明、183-187 (2013)
- 3) 八木田健司ら:レジオネラ属菌遺伝子型とアメーバ適合性、厚生労働科学研究費補助金 (健康安全・危機管理対策総合研究事業)「レジオネラ検査の標準化及び消毒等に係る公衆浴場等における衛生管理手法に関する研究」平成 25 年度総括・分担研究報告書、研究代表者:倉文明、201-204 (2014)

表1 アメーバの検出状況

	冷却塔水 (n=27)	浴槽水		プール 採暖槽水 (n=14)	給湯水 (n=10)	合計
		温泉浴槽水 (n=101)	公衆浴場水 (n=133)			
アメーバ検出	16	39	30	3	1	89
アメーバ不検出	11	62	103	11	9	196
検出率 (%)	59.3	38.6	22.6	21.4	10.0	31.2

表2 アメーバとレジオネラの検出状況

	アメーバ検出 (n=89)	アメーバ不検出 (n=196)	アメーバの検出率 (%)
レジオネラ検出(n=92)	58	34	63
レジオネラ不検出(n=193)	31	162	16.1
レジオネラの検出率 (%)	65.2*	17.3*	

( ※  $p < 0.01$  )

表3 環境水別のアメーバ検出と不検出検体におけるレジオネラの検出率

環境水別	アメーバ検出検体の レジオネラ検出率 (%)	アメーバ不検出検体の レジオネラ検出率 (%)
冷却塔水	68.8	72.7
温泉浴槽水	66.7*	21.1*
公衆浴場水	66.7*	9.7*
給湯水	0	11.1
プール採暖槽水	33.3	18.2

( ※  $p < 0.01$  )

表4 検出されたアメーバの種類と分布比率

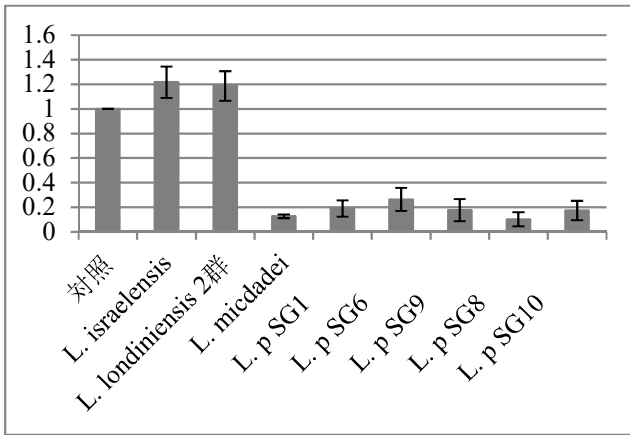
(%)は分布比率を示す

アメーバの種類	冷却塔水	浴槽水		プール 採暖槽水	給湯水
		温泉浴槽水	公衆浴場水		
<i>Vermamoeba vermiformis</i>	12 (57.1%)	9 (16.7%)	14 (29.2%)	1	
<i>Stenamoeba</i> sp.	1 (4.8%)	14 (25.9%)	8 (16.7%)		
<i>Acanthamoeba</i> sp.	1 (4.8%)	11 (20.4%)	3 (6.3%)		1
<i>Hartmannella</i> sp.	1 (4.8%)	4 (7.4%)	8 (16.7%)		
<i>Naegleria</i> sp.	3 (14.3%)	2 (3.7%)	7 (14.6%)		
<i>Pharyngomonas</i> sp.		8 (14.8%)	1 (2.1%)		
<i>Echinamoeba</i> sp.	1 (4.8%)	4 (7.4%)	3 (6.3%)		
<i>Vannella</i> sp.		2 (3.7%)	2 (4.2%)		
<i>Amoebozoa</i> sp.	1 (4.8%)		1 (2.1%)		
<i>Filamoeba</i> sp.			1 (2.1%)		
<i>Vahlkampfia</i> sp.	1 (4.8%)				
<i>Flamella</i> sp.				1	

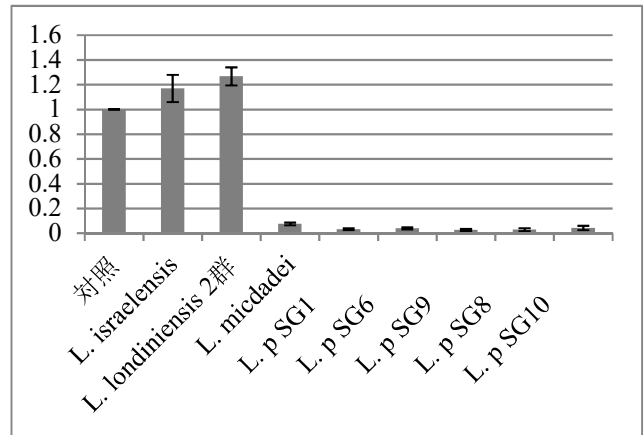
(同一検体から重複して検出されたものを含む)

図1 対照とのプラーク面積の大きさ比較

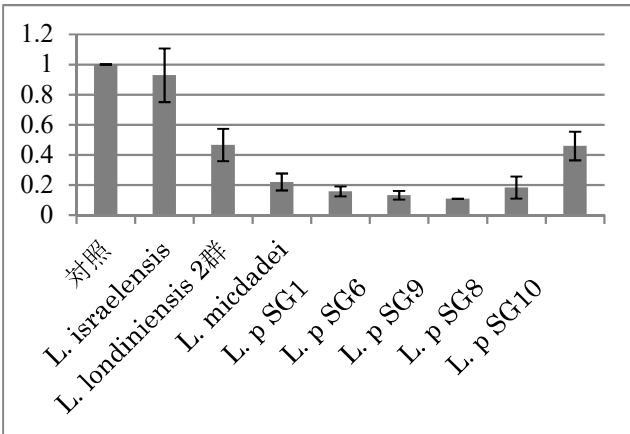
a) *Stenamoeba* sp.



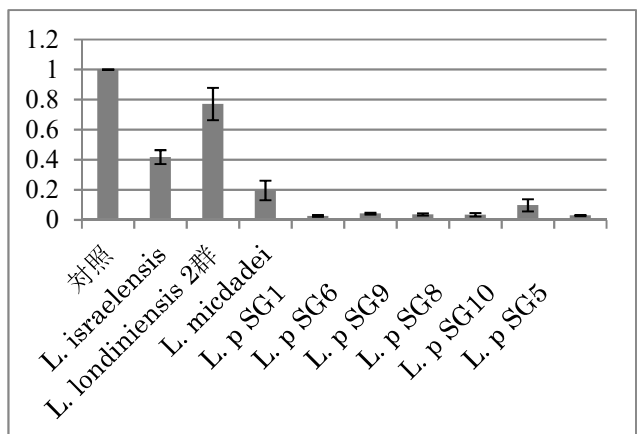
b) *Acanthamoeba* sp.



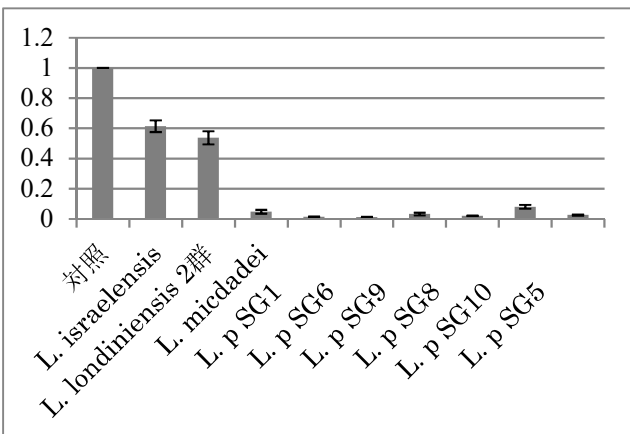
c) *Echinamoeba* sp.



d) *Hartmannella* sp.



e) *Naegleria* sp.



f) *Vannella* sp.

