

# 夏季における水田土壌とため池の 自由生活アメーバ類調査

堀内雅人 小林 浩

Survey of Free living amoeba in soil of paddy field and pond water in summer

Masato HORIUCHI and Hiroshi KOBAYASHI

キーワード：自由生活アメーバ、水田土壌、ため池

自由生活アメーバは環境中に広く棲息しており、その中にはレジオネラ菌の増殖に関係するものやヒトに対して角膜炎や脳炎を引き起こす等病原性を持つ種が知られている<sup>1)</sup>。特に *Naegleria fowleri* は淡水中や土壌中に棲息し(温度 25℃～45℃で増殖)、ヒトに対して急性かつ致死的な脳炎を起こすアメーバとして知られており、主に水温の高い夏季の湖沼等での水遊びや遊泳時に鼻腔より脳に侵入する<sup>2)3)</sup>。世界各地で感染報告があるが<sup>4)5)</sup>、我が国での感染報告は1996年に佐賀県での1例のみであり、この時の感染経路は不明である<sup>6)</sup>。*Naegleria fowleri* は海外では淡水湖沼や河川等からの分離例が報告されている<sup>3)</sup>。我が国では事業場の温排水からの分離例はあるが<sup>7)</sup>湖沼、河川及び土壌からの分離例は報告されていない。また、過去全国規模で行われた温泉水等の温水環境についての自由生活アメーバ類調査でも分離されなかった<sup>8)</sup>。これらのことから我が国では *Naegleria fowleri* 感染の危険性は低いと考えられるが、万一感染・発症すると致死率が非常に高いため、このアメーバの棲息場所を把握することは公衆衛生上意義があると考えられる。

本調査は温泉水等の温水環境ではなく、我が国では調査報告例の少ない土壌・水環境において、40℃以上の高温条件で増殖可能な自由生活アメーバの実態を調査し、*Naegleria fowleri* の分離を試みた。調査対象として水分を多量に含んでおり、かつ夏季には温度が上昇すると考えられる水田土壌と、夏季に水温が25℃以上に上昇すると考えられるため池について調査を行った。

## 調査地点と調査方法

水田の調査地点は甲府盆地西部の水田計5地点である。用水は付近の農業用せきから引いている。ため池調査地点は本県中北地域にあるため池6

点である。

水田土壌調査は田植え後約一ヶ月経過した2007年6月下旬から同年8月上旬にかけて断続的に行った。試料は苗の根本付近から乾熱滅菌した金属製葉さじによりヒトの親指の頭1つ分程度をオートクレーブ滅菌したガラスビン(40ml)に採取した。また、試料採取時に差し込み式の電子温度計にて土壌表層(1～2cm)の温度を測定した。

ため池調査は2007年9月上旬に行った。試料採取はオートクレーブ滅菌したナルゲン容器(500ml)に各ため池の岸付近1地点の表層水300ml程度を採取した。その際水温を測定した。

## 試験方法

水田土壌試料(以下土壌試料)・ため池水試料(以下水試料)とも採取後24時間以内に培養を開始し、アメーバの分離同定を行った。培養法、同定法は厚生労働省研究班作成による検査マニュアル<sup>9)</sup>に準じ行った。以下その操作概要を記す。

土壌試料は大豆ほどの量を大腸菌塗布無栄養寒天培地(1.5%)培養プレート(大腸菌:DH-1株培地:BD社 Bacto Agar)にとった。水分の多い試料はそのまま、水分の少ない試料には滅菌精製水数滴を加えて5分間程度安全キャビネット内で風乾し、その後ポリ袋に入れ袋の口を輪ゴムで縛りインキュベータ(アドバンテック IS-2400)中において温度42℃で培養した。

水試料は試料50mlを滅菌ポリ遠沈管(50ml)に取り、室温で遠心分離(1000×g 5min)した。遠心分離終了後直ちに下層1mlを残して上澄液を除去し、残留液全量を培養プレート(土壌試料と同じもの)に塗布して風乾後、ポリ袋に入れ袋の口を輪ゴムで縛りインキュベータ内で温度42℃で培養した。

培養は4日間行い、その間に毎日培養プレート

を観察してプラークとして生じたアメーバを別の培養プレートに移し分離培養した。分離株が適度に増殖したところで一部を観察用プレートに取り、微分干渉顕微鏡にて形態観察による同定を行った。その結果 *Naegleria* 属アメーバと同定された株については PCR (PCR 試薬: TaKaRa Ex Taq™ プライマー: Forward: 5' -GAACCTGCGTAGGGATCATT-3'

Reverse: 5' -TTTCTTTTCTCCCCTATTA-3'

サーマルサイクラー: PERKIN ELMER 社製 GeneAmp PCR System2400) を行い、増幅産物を電気泳動 (エチジウムブロマイド添加アガロースゲル (2%): 和光純薬工業株) 5 × TBE 緩衝液を 10 倍希釈して 0.5 × TBE 緩衝液を調製し、これに SIGMA AGAR SELECT とエチジウムブロマイドを加えて作製 電気泳動槽: Mupid-2) して約 400 ~ 500bp 間のバンドの有無により *Naegleria* 属アメーバであることを同定した。さらに PCR 増幅産物を制限酵素 (NEW England BioLabs Mse I) で処理してエチジウムブロマイド添加 3%アガロースゲルにより電気泳動 (使用試薬、電気泳動槽は前述の PCR と同じ) を行い、100bp のバンドにより *Naegleria fowleri* であるか否かを同定した。

また、232bp のバンドにより *Naegleria fowleri* 棲息の指標<sup>10)</sup>とされる *Naegleria lovaniensis* の同定も行った。

## 結果と考察

本調査では土壌試料より 64 株、水試料より 43 株、合計 107 株の自由生活アメーバが分離された。得られた分離株の内訳を表 1 に示す。土壌試料、水試料とも *Naegleria* 属が最も多く、次いで *Hartmannella* 属が多かった。本調査で用いた培養法は、主に高温耐性の *Naegleria* 属アメーバを分離することを目的としているため、この結果は妥当と考えられた。試料別に分離アメーバ株の特徴を見ると、*Hartmannella* 属の占める比率に違いはあるものの同じような傾向であった。試料採取時の温度は土壌試料で 21.9 ~ 24.8 °C、水試料で 24.6 ~ 29.8 °C であった。土壌採取は早朝であったため昼間より温度は低かったと考えられるが、当該水田土壌温度を気温 30 °C を超える晴天時の昼間測定したところ 30 °C 未満であった。今回の調査地点は過去調査された温泉水等と比較して低温の環境であったが、温度 42 °C で増殖できる自由生活アメーバが多数分離された。

分離した *Naegleria* 属アメーバについて PCR-RFLP 法により同定を行ったが *Naegleria*

表1 各試料から分離されたアメーバ株数

| 分離アメーバ属             | 水田土壌 | ため池 | 計   |
|---------------------|------|-----|-----|
| <i>Naegleria</i>    | 43   | 32  | 75  |
| <i>Acanthamoeba</i> | 5    | 3   | 8   |
| <i>Hartmannella</i> | 11   | 4   | 15  |
| その他                 | 5    | 4   | 9   |
| 計                   | 64   | 43  | 107 |

*fowleri* は不検出であった。また、*Naegleria lovaniensis* も検出されなかった。

今回の調査では標的とする *Naegleria fowleri* を分離することはできなかった。また、*Naegleria fowleri* と同様の棲息環境を好むといわれる *Naegleria lovaniensis* も分離されなかった。今回調査した環境は予想より温度が低く棲息場所として適していなかった可能性がある。一方、温泉水等の調査を行った烏谷らは、*Naegleria fowleri* について、他の増殖速度の速い *Naegleria* 属アメーバに分離を妨げられた可能性を指摘しており<sup>11)</sup>、今回の調査でも同様の状況が生じた可能性もある。また、培養過程でアメーバ類のプラークの発生に先んじて細菌類と見られるプラークが多数発生し、アメーバプラークの発生・成長を妨げたと考えられる試料もあった。これらのことから、今後環境試料より *Naegleria fowleri* 分離の確率を上げるためには、調査場所の選定に加え、培養方法についても温度以外の要素を検討し、より分離に適した条件を見出すことが必要と考えられる。

## 文献

- 1) 八木田健司, 泉山信司: 生活用水の病原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, 8, 12 ~ 19, (2006)
- 2) 丸善: 水道の病原微生物対策, (2006)
- 3) Frederick L. Schuster, Govinda S. Visvesvara: Free-living amoeba as opportunistic and non-opportunistic pathogens of humans and animals, International Journal for Parasitology, 34, 1001 ~ 1027 (2004)
- 4) Martinez AJ: Free-living amebas: Infection of the central nervous system, Mt Sinai J Med, 60, 271 ~ 278 (1993)
- 5) MM Marshall, D Naumovitz, Y Ortega, CR Sterling: Waterborne protozoan pathogens, Clinical Microbiology Reviews, 10, 1, 67 ~ 85 (1997)

- 6) 福間利英：自由生活アメーバ *Naegleria fowleri* が分離された本邦初の原発性アメーバ性髄膜脳炎の症例,病原微生物検出情報,18,5(1997)
- 7) JF De Jonckheere, K Yagita, T Kuroki, T Endo : First Isolation of Pathogenic *Naegleria fowleri* in Japan, Jpn.J.Parasitol,40,4,352 ~ 357(1991)
- 8) 厚生労働省科学研究費補助金がん予防等健康科学総合研究事業：温泉・公衆浴場、その他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 ~ 15 年度総合研究報告書(2004)
- 9) 温泉・公衆浴場、その他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 15 年度 総括・分担研究報告書：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,159 ~ 178(2004)
- 10) Stevens AR, De Jonckheere, Willaert E : *Naegleria lovaniensis* new species: isolation and identification of six thermophilic strains of new species found in association with *Naegleria fowleri*, International Journal for Parasitology, 10, 1, 51 ~ 64 (1980)
- 11) 烏谷竜哉ら：温水環境中に棲息する *Naegleria* 属アメーバの検出と分布について, 愛媛衛環研年報 ,6,25 ~ 33(2003)