

宮崎俊雄 論文内容の要旨

主論文

Seasonal Fluctuation of *Acanthamoeba* spp. Contamination in Water Containers Placed Indoors and Outdoors.

(屋内外に設置された容器内の水におけるアカントアメーバ種汚染の季節的変動)

宮崎俊雄、八木田健司、柳哲雄、上村春樹、神原廣二

ACTA MEDICA NAGASAKIENSIA 52: 13 - 18, 2007

長崎大学大学院医学研究科 新興感染症病態制御学系専攻

指導教授；神原廣二教授

### 緒言

自由生活アメーバのうち *Acanthamoeba* は慢性肉芽腫性アメーバ脳炎の、*Naegleria fowleri* は原発性アメーバ性髄膜脳炎の原因として知られている。最近のソフトコンタクトレンズ利用者急増に伴うアカントアメーバ性角膜炎の増加、更にレジオネラ等マクロファージ内発育病原細菌の運搬体としての役割が注目され、自由生活アメーバの医学的重要性が高まっている。これら自由生活アメーバは種々の水や土壌に広く存在し、栄養体やシストに変化し環境に適応している。シストは埃と共に広範囲に撒布される。今回の研究では水を入れた複数の容器をカバーの有無で分け、異なる季節下に屋内外に設置して、自由生活アメーバ、特にアカントアメーバ種による水の汚染を検証した。

### 対象と方法

2000年7月末から2001年5月末までの夏秋冬春の各季節を選び、各々連続3週間を実験期間とした。ガラス製容器複数個に飲用道水又はオートクレーブ滅菌水道水を入れ、カバー有り群とカバー無し群とに分け、長崎大学熱帯医学研究所構内の屋内外の設置場所に放置した。実験開始から3日経過毎に各容器から水サンプルを採取し、容器には元の水位まで滅菌水を補充、元の場所へ再び設置した。採取サンプルは遠心後、沈殿から懸濁液を作成し一部を直接顕鏡し、残りを一部プラスチックシャーレ上の滅菌寒天培地に植え込み、加熱殺菌した大腸菌を加え培養した。シャーレは1週間以上培養し、適宜顕鏡した。形態学的特長から *Acanthamoeba* の栄養体またはシストが確認されたものを汚染陽性と判断した。*Acanthamoeba* の分離培養は、アメーバをシスト化させ回収した溶液を十分に希釈し、顕微鏡下でその微小滴中にシスト1個を確認したのもののみ新しい容器に移し再び培養した。その中でアメーバの増殖が見られたものをクローンと見なし、次にアメーバを再度シストに変化させ、無菌化処理を行った。クローン化アメーバは洗浄後、培養フラスコでPYGC培地を加え無菌的に大量培養をした。約  $5 \times 10^6$  個のクローン化アメーバを回収後、アルカリ SDS 法、PCI 法、エタノール沈殿法等の処理を加えてミトコンドリア DNA を抽

出した。ミトコンドリア DNA は制限酵素 *EcoRI* と *Bgl* で処理後、アガロースゲル電気泳動を行い、日本人角膜炎患者から分離された *Acanthamoeba* 標準株を対照に DNA 切断片のサイズを比較した。

## 結果

屋内カバー有り群は 1 例を除きアメーバ汚染は無く、屋外カバー有り群はカバー隙間より雨水が容器内に浸入し、春の飲用水道水 3 個、夏と秋の滅菌水道水各 3 個、春の滅菌水道水 4 個にアメーバ汚染が有った。屋内カバー無し群では夏、春の順でアメーバ汚染が多くカビや埃も多かった。屋外カバー無し群は春、秋、夏、冬の順で容易にアメーバに汚染された。夏の屋外カバー無し群は雨水や微小生物の浸入で汚れが最もひどかった。*Acanthamoeba* 陽性サンプルから夏 4 個、冬 6 個、春 2 個のクローンを得た。これらのクローンと標準株の DNA 切断片を同時にアガロースゲル電気泳動し、泳動パターンを比較した。その結果、同一季節のすべての株は同一パターンを示したが、季節毎にパターンは異なり、かつ標準株とも異なるという季節特異的傾向を示した。

## 考察

飲用水道水は滅菌水道水より汚染されにくかった。この原因は残留塩素の殺菌効果で餌となる微生物の発育が阻害されるためと、元々アメーバは含まれていないためと考えられた。屋内カバー有り群は汚染をほぼ完全に阻止できたが、屋外カバー有り群では不完全であった。この原因はカバーと容器の隙間に容易に雨水、微粒子が入りこむためである。屋外カバー無し群では最も汚染が多かった。季節別にはアメーバ汚染は春、秋の順に多く、屋外カバー無し群では放置後 3 日以内に汚染が生じたことから、アメーバの成長には春や秋の穏やかな気温が好適で、夏の高湿や冬の低温は不適と考えられた。春は埃っぽいことが汚染度に影響したとも考えられた。高温多湿の気候は他の微生物の成長を助けるが、大量の微生物の存在はアメーバの成長を阻害すると考えられる。今回分離されたクローン数は非常に少ないが、ミトコンドリア DNA 切断片は電気泳動の結果、季節特異的傾向を示し、このことは同一季節には限られた数のクローンしか飛来していないことを示す。またこれら 3 つのパターンは、これまで我国で報告された角膜炎由来の *Acanthamoeba* 分離株のいずれのパターンとも一致せず、病原性は未検証ではあるが、非病原性のものであろうと予測される。このように病原性 *Acanthamoeba* 汚染の危険性はきわめて低いのであるが、同一時期に同一クローンが汚染するという事は、もし病原性のものが汚染に加われば短期間に危険性が集中することになる。しかし一方、屋内ではコンタクトレンズ容器の水はカバーさえすれば極めて効果的に汚染を抑制できることを示している。