

## Entamoeba invadens (ヘビアメーバ)

### の基礎的実験

疫学室 仲宗根 民 男  
徳 村 勝 昌

#### はじめに

*Entamoeba invadens* (以下 *E. invadens* と略する) は、ヘビに対して病原性がありヘビを死に至らしめることから、毒蛇の生物学的制圧に用いることのできる可能性が示唆され、今日注目を集めている。

1933年、Ratcliffと Geimannがフィラデルフィア動物園の蛇から報告し (H.L. Ratcliff and Geimann, 1933)、1934年アントワープ動物園のものを Rodhain が *E. invadens* (ヘビアメーバ) と名付けた (Rodhain, j. 1934)。その後、ロンドン・チューリッヒ及び、1974年札幌円山動物園などで蛇に感染流行し、被害が報ぜられている (坂本、金田ら、1974)。*E. invadens* は亀の共生的アメーバで動物園などで非特異的に感染するという説もある (Meerovitch, 1961)。

本邦においては、1971年石井らによってハ虫類・両棲類に対して実験的経口感染を行ない、種による病原性の有無を検討している (Ishii and Noboru, 1971)。又、奄美大島産の数種の蛇に対する実験的経口感染により強い病原性のあることが示めされた (Ishii and Noboru, 1971)。温血動物であるラット・マウスに対しては脾臓摘出などの色々な方法を試みても感染しないことが判った (Ishii and Noboru, 1971)。

1976年10月、本県に *E. invadens* が導入されたので、今回導入後の継代培養における1) 観

察経過とアメーバの形態、2) アメーバの生存状態、3) アメーバの増殖状態などについて調べたのでその結果を報告する。

#### 材料と方法

アメーバ：基礎的実験に使用したアメーバ *E. invadens* Rodhain 1934 は最初1953年ロンドン動物園の蛇 *Constrictor constrictor* から R.A. Nealらによって分離された BAH 株で、その後、*in vitro* で継代されていたものを1976年10月、東京大学医科学研究所寄生虫研究部の石井明助教授より分与されたものである。

Robinson 培地：アメーバの培養・維持のための培地で G.L. Robinson (1968) の方法による。ペニシリンビンを図-1に示した。

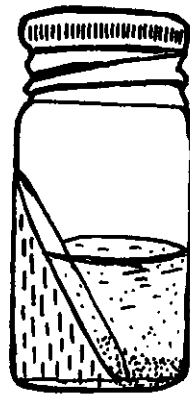


図-1：Robinson 培地のための培養瓶

Robinson 培地の組成：組成は表-1に示したとおりである。

表-1 Robinson 培地の組成

G.L. Robinson (1968)

1. 寒天斜面
2. 米デンプン (Difco 社製)
3. エリスロマイシン
4. バクトペプトン
5. フタル酸カリ液
6. \*大腸菌 *Escherichia coli* のための培地 "R"
7. 大腸菌培養 "BR"
8. 仔牛血清
9. "BR" に当量の血清を加えて37°Cで24~48時間おく。これを "BRS" として冷蔵庫に保存する。

※大腸菌株名……*Escherichia coli* B-株

Robinson 培地による継代法：*E. invadens* の継代方法は表-2に示したとおりである。

表-2 *Entamoeba invadens* の継代方法 (Robinson 培地による)

第1 Medium

1. 5%寒天斜面培地 (含0.7%NaCl)
- 5 ml程度のペニシリンビンに培地3.5 mlの斜面に固めたもの (図-1)

第2 Medium

1. 米デンプン (Difco 社製) 1~2白金耳
2. 0.05Mフタル酸カリ液 1.0 ml
3. 20%ペプトン水 2~3 drops
4. 0.5%エリスロマイシン 2~3 drops
5. stock "BRS" 0.3~0.4 ml
6. 継代用アメーバ 1~2 drops

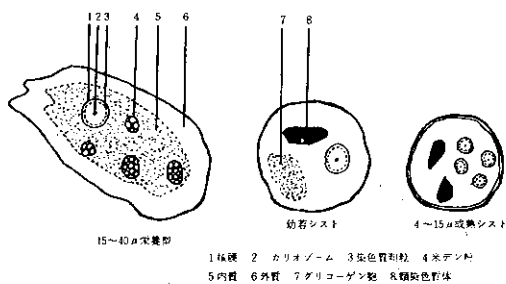
25°Cにincubate2週間毎に継代を実施

*E. invadens* の Robinson 培地を使用しての培養方法は、大腸菌 (B-株) 培養を併用した2相性の培地が必要である。第1 Mediumは約5 ml程度のペニシリンビンに0.7% NaClを含む1.5%の寒天斜面に、第2 Mediumである米デンプン、PH 6.5 フタル酸カリ液、20%ペプトン水、0.5%エリスロマイシン、大腸菌培養液 (Stock "BRS") を加え、これらのMediumの入った培養ビンは、良く馴染ませるために軽く振り混ぜておく。次に今まで継代してきた継代用アメーバを静かに手で覆うようにしてフタを取り、スライドグラスに1滴のせ、10×10倍 (視野) で生きていることを確認し又、10×40倍 (視野) で運動性を確認してから、1~2滴培養ビンの中に入れて、フタをして25°Cに培養して完了する。その後、経過観察及び基礎的実験に供し、アメーバ維持のために2週間毎に継代培養を行なった。アメーバの数の算定には白血球計算盤 (Neubauer 改良型) を用いて行なった。

結果

1) 観察経過とアメーバの形態

*E. invadens* は、形態学的には人の腸管に寄生する *Entamoeba histolytica* (赤痢アメーバ) と同一であることが知られている。アメーバの模式図を図-2に示した。



1. 核膜
2. カリオゾーム
3. 染色質顆粒
4. 米デンプン
5. 肉質
6. 外質
7. グリコーゲン胞
8. 類染色質体

図-2：*Entamoeba invadens* の模式図

アメーバの形態は、透明で屈光性の強い外質と顆粒状の内質とからなり、1個の核を有し、偽足によって運動していた。このような形態は栄養型 (Trophozoite) と称し、一般に無性生殖によって2分裂あるいは多数分裂によって増殖する。栄養型は生存に不適当な環境下に置れると、運動あるいは食物の摂取を中止して、円型となり外表に被膜を形成してシスト (cyst) となる。シストの段階には幼若シスト (pre cyst) と成塾シスト (matured cyst) があり、それぞれ1個、4個の核を有していた。栄養型については、15~40 $\mu$ 程度、運動性は活発、内質と外質の区別が明瞭で、生鮮標本には核は認められないが、ヨードカリ染色によって認めることができた。シストについては、4~15 $\mu$ 程度、運動性はなく、生鮮標本で見ると円型の光った状態で、核その他の構造はほとんど認められなかった。ヨードカリ染色を施すと、淡黄色に染まり、核も認められるようになった。シストになった直後のものは、10 $\mu$ 程度でやや大きく、グリコーゲン胞がヨードに染まり赤褐色に認められた。papanicorr の細胞染色、鉄ヘマトキシリン染色などを施すと栄養型、シスト型共に細胞自体の萎縮が認められるが、10 $\times$ 100倍 (視野) で検鏡すると、核の存在が良く分った。

## 2) アメーバの生存状態

表-3にアメーバの生存状態を示した。

Robinson 培地におけるアメーバの生存状態は極めて良く、10~15日目前後のアメーバの運動性が最も活発であった。その後、日を迫うに従って運動性は緩慢になり、栄養型の数も減少した。栄養型の状態で60日前後生存している場合があったが、運動性はかなり低下し不活発な状態であった。シストの場合、90日前後生存しているものもあった。このシストを取りだして新しい培地内に移したところ、継代培養と同じようなアメーバの増殖をした。この生状態はア

アメーバの至適温度である25 $^{\circ}$ Cの場合である。この他に、温度差による発育 (生存) 状態について調べた結果が表-4のごとくである。

温度は至適温度以外の45 $^{\circ}$ C、37 $^{\circ}$ C、20 $^{\circ}$ C、4 $^{\circ}$ Cについて試みた。これは、アメーバの各温度内での生存期間を調べるために行なったので当初25 $^{\circ}$ Cで2週間、培養を行ないその後、各温度で培養した。45 $^{\circ}$ Cで培養したアメーバは翌日すべて死滅していた。37 $^{\circ}$ Cでは、5~6日間は生存していた。Lachance の調べによると、*E. invadens* は37 $^{\circ}$ Cで最長7日間しか生存しないと言われている (Lachance, 1963)。20 $^{\circ}$ Cでは、栄養型は60日前後生存していたが運動性はほとんどなかった。4 $^{\circ}$ Cでは、58日目において栄養型の存在は確認できなかった。

## 3) アメーバの増殖状態

図-3は、*E. invadens* の25 $^{\circ}$ CにおけるRobinson 培地での増殖曲線でTrophozoiteの数を隔日毎に示した。

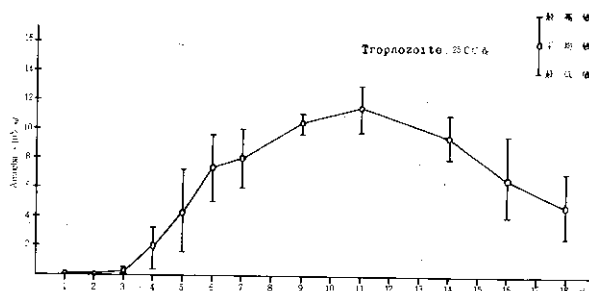


図-3 *Entamoeba invadens* の増殖曲線

アメーバの数は同時期に培養した5本の数の平均値を示し、又、最高値と最低値を示した。培養開始後、4日目から11日目までにアメーバは対数的な増殖を示し、その後、減少の傾向をたどっていた。最も増殖した状態でアメーバの数は $13 \times 10^4$  個/mlを数えた。

図-4は同じく*E. invadens* の25 $^{\circ}$ CにおけるRobinson 培地内での隔週毎の増殖曲線で、T-

表-3 E. invadens の生存状態

1978. 7月4日、5日調べ

継代培養後	Tro	C	運動性	継代培養後	Tro	C	運動性	継代培養後	Tro	C	運動性
5日目 A	+	-	活発	37日目 A	-	+	不活発	79日目 A	-	+	(+)
B	+	-	活発	B	+	+	不活発	B	-	-	(+)
C	+	-	活発	C	+	+	不活発	C	-	-	(+)
D	+	-	活発	D	+	+	不活発	D	-	+	(+)
E	+	-	活発	E	+	+	不活発	E	-	+	(+)
15日目 A	##	-	活発	54日目 A	-	-	(+)	90日目 A	-	-	(+)
B	##	-	不活発	B	+	+	不活発	B	-	+	(+)
C	##	-	不活発	C	-	-	(+)	C	-	-	(+)
D	##	-	活発	D	-	-	(+)	D	-	-	(+)
E	##	-	不活発	E	-	+	(+)	E	-	-	(+)
30日目 A	+	+	活発	68日目 A	-	+	(+)	110日目 A	-	-	(+)
B	+	+	不活発	B	-	##	(+)	B	-	-	(+)
C	##	-	活発	C	+	##	不活発	C	-	-	(+)
D	+	+	不活発	D	+	##	不活発	D	-	-	(+)
E	+	-	不活発	E	-	##	(+)	E	-	+	(+)

- : なし    + : 1~2個    ++ : 10個まで    ## : 10個以上 (10×10倍視野)    培養温度25°C

Tro : Trophozoite (栄養型)    C : cyst (シスト型)    (+) : 運動性なし

表-4 温度差による*E. invadens* の生存状態 (Trophozoite)

1978年11月8日より1979年1月5日まで

	継代株名	1日目	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	3週目	4	5	6	7	8		
4℃	*781031 A	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	
	B	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
20℃	*781031 C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
	D	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
37℃	*781031 E	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	F	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45℃	*781031 G	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	H	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

\*: 1978年10月31日継代株を11月7日まで25℃で培養して、11月8日以降

4℃、20℃、37℃、45℃の各温度に培養してアメーバの生存状態を14日

目で調べ後は、隔週おきに8週まで観察した。

-: なし    +: 1~2個    #: 10個まで    #: 10個以上 (10×10倍視野)

rophozoite の数を示した。1週間目前後から急激に増え始め、2週間前で最高に到達した。その後、3週間目、4週間目と減少の一途をたどり7週間目ごろで死滅した。ここで断っておくが、これはアメーバを計算盤上に乗せて区画内での数であり、従って先程のアメーバの生存日数とは必ずしも一致していない。

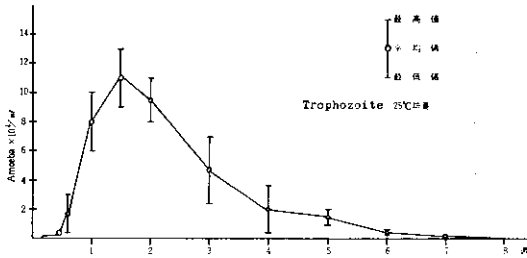


図-4 *Entamoeba invadens* の増殖曲線

#### 考察

今回の *E. invadens* (ヘビアメーバ) の *in vitro* での継代培養は、Robinson 培地という1968年に確立された培地を使用している培養法であったが私共の実験室においてもアメーバの継代培養が可能になったことが分かり、今後の動物実験にアメーバを提供できることが示唆された。培地そのものは比較的入手容易でこの維持のためには、さほどの手間もかからなかった。

形態観察は、栄養型、シスト型共に見慣れてしまえば、それほど問題はないようであり形態学的には人間等の腸管寄生アメーバである赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) と同一であることを確認した。

アメーバの生存状態に関しては、栄養型の状態で60日前後生存している場合があったが運動性はかなり低下し、アメーバ運動などの諸活動を一切停止していた。これは培地内がアメーバの生存に適当でない状態にあると思われる。シストは90日前後まで生存しているのを認めたが、

自然界におけるシストの状態に関しては、今後の課題であろう。ヨードカリ染色を施すと、シストの場合、シスト自体がかなり古くなると染り具合が良くないことが分かった。

アメーバの増殖曲線に関しては、継代培養開始後、11日前後が最もピークの状態であり、最高  $13 \times 10^4$  個/ml を数えたが、さらにアメーバの数を増やすことができないか今後の継代培養の課題と思われる。Robinson 培地における培養経験上、アメーバは米デンプンの増減によって影響を受けるように思われ、あまり多すぎても培地全体がネバネバした糊状になって良くないことが分かった。米デンプンは Difco のものを使用することになっているが、その量について、赤痢アメーバの場合添加する米デンプンの量について培地 1 ml につき 2~10 mg、特に 5 mg が最適だとしている (株ら、1954)。 *E. invadens* の場合は、4 mg 前後が良かった。随伴細菌である大腸菌 (B-株) の培地内での増殖は極めて旺盛で、培地液 1 滴を取って検鏡してもかなり繁殖していることが分かったが、これらのことが今後、アメーバの数をさらに増大させることができる要因を含んでいないかということにも興味がある。

染色については、観察の意味で実施したが、papanicorr 細胞染色・鉄ヘマトキシリン染色など技術的な問題もあるが、比較的良く染っているとと思われる。特に鉄ヘマトキシリン核染色の場合、核中のカリオゾームの存在を確認することができた。

現在、このヘビアメーバを実験的経口感染によりサキシマハブに対して強制的投与実験を行っているが、今後の課題としてさらに検討を加えたい。

#### まとめ

Robinson 培地を使用して、 *E. invadens* の継代培養が本県において、1976年10月以来続

けられているが、培養法においては確立された。

*E. invadens* (ヘビアメーバ) の形態は各種染色法により、栄養型、シスト型共に確認された。

アメーバの生存状態に関しては、生存の状態と運動性に関しては10~15日前後が極めて良好であった。

アメーバの増殖に関しては、最高 $13 \times 10^4$  個/mlを数え、さらに増大させられるかどうかの検討を加えた。

各種染色法については、鉄ヘマトキシリン染色が良かった。

#### 参考文献

- 1) Geimann, Q.M (1937) : Cross-infection experiments with three species of amoeba from reptiles J. Parasit., 23 : 557
- 2) Ratcliff, H.L and Q.M. Geimann, (1933) : Eleven cases of amoebiasis J. Parasitol 20 . 139
- 3) Ishii, A and Noboru, Y. (1971) : Attempts to infect laboratory rats and mice and the Snake Habu, *Trimeresurus flavoviridis*, with *Entamoeba invadens*. Snake, 3 ; 24-29
- 4) 石井明・鼻善久・小野継男・沢井芳男 : (1971) : 奄美大島の数種の蛇に対する *Entamoeba invadens* の実験的経口感染について Snake 3 ; 30~34
- 5) Robinson, G.L (1968) : The laboratory diagnosis of human parasitic amoebae. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. & Hyg., 62 : 285~294
- 6) 坂本司・金田寿夫・大内格之 (1976) : 爬虫類において集団発生を見た原虫症、寄生虫学雑誌, 25(2).

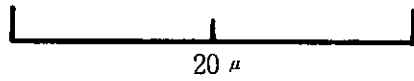
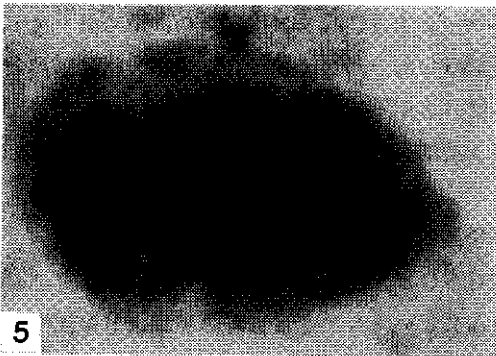
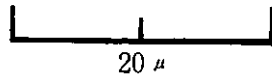
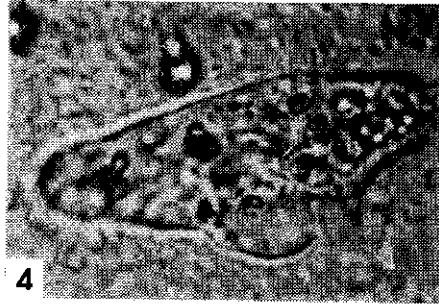
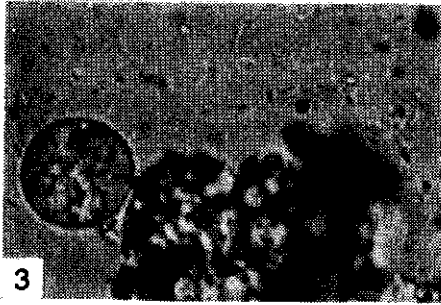
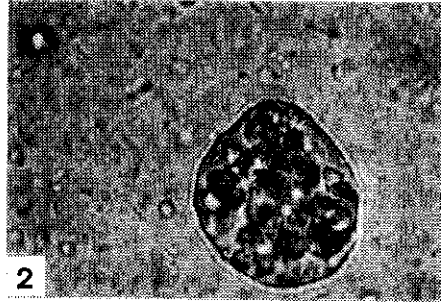


写真 1. 2. 4. *E. invadens* の Trophozoite (生鮮標本)

3. *E. invadens* の Cyst (生鮮標本)

5. *E. invadens* の Trophozoite (鉄ヘマトキシリン染色)

6. *E. invadens* の Trophozoite, Cyst (ヨードカリ染色)