

角膜炎患者より分離されたアcantアメーバ 4株の形態学的特徴

ISHII, Keiichi / HORIKAMI, Hideki / 石井, 圭一 / 堀上,
英紀

(出版者 / Publisher)

法政大学教養部

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学教養部紀要. 自然科学編 / 法政大学教養部紀要. 自然科学編

(巻 / Volume)

72

(開始ページ / Start Page)

51

(終了ページ / End Page)

62

(発行年 / Year)

1990-02

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00005202>

法政大学教養部紀要

No.72, 1990年

角膜炎患者より分離されたアカント アメーバ 4 株の形態学的特徴

堀 上 英 紀・石 井 圭 一

序 論

最近我が国でコンタクトレンズ装着者からアメーバによる角膜炎が報告され (石橋他, 1988), 以後今日までに 5 例が知られているが, 激しい痛みと強度の視力低下, 及び的確な治療薬がまだ見つかっていないことなどから, このアメーバに対する関心が急速に高まっている。病原体は土壌アメーバの一群 (アカントアメーバ *Acanthamoeba*) で, 元来自由生活性であり, 運動場, 芝生, 植木鉢の土中など自然界で極く普通に見られるだけでなく, 淡水から海水まで約 25 種が生息している。その一方でこれらの種の中には他動物に寄生するもの, 所謂, 両生 (*amphizoic*) アメーバも知られている (Page, 1974)。通常, 細菌を餌とし, 悪環境下では容易に耐乾性のシスト (囊胞) を形成することにより一年以上耐え忍ぶことができる (Griffin, 1978)。

アカントアメーバの病原性に関する最初の報告は, Culbertson, et al. (1958) による哺乳動物に対するもので, ヒトへの最初の感染報告は, 角膜潰瘍及びぶどう膜炎, 脳炎併発 (Jones, et al., 1975) である。それ以後アカントアメーバによるヒトの GAE (アメーバ肉芽腫性脳炎 *granulomatous amoebic encephalitis*) が, 他の土壌アメーバのネグレリア (*Naegleria fowleri*) による PAM (原発性アメーバ髄膜脳炎 *primary amoebic meningoencephalitis*) と共に, 世界各地から報告されている (Martinez, 1985)。

今回, 本邦の角膜炎 4 例から分離したアカントアメーバの種の同定をすべく, 主としてそれらの形態学的特徴を調べ, American Type Culture Collection (ATCC) から入手した 2 種の非病原性アカントアメーバとも比較検討した。

材料と方法

材料：筑波 (Tsuk 株) で発見 (石橋 他, 1988) されて以降, 今日まで福島 (Fuks 株), 徳島 (Toks 株), 及び東京 (Jike 株) で見つかった 4 株のほかに, ATCC から取り寄せた 30234 (*A. castellanii*, Balamuth 株) と 30871 (*A. polyphaga*, Page 3a 株 = CCAP 1501/3a) を材料として用いた。

培養：アcantアメーバ用生理塩類溶液 (A S) の組成は 1mM Na Cl, 0.09 mM KCl, 0.05mM CaCl₂, 0.02mM MgSO₄ · 7H₂O, 1mM Tris-HCl (pH 7.0) である。培養基は滅菌した 1.5% NN 寒天平板培地 (BiTec Agar, Difco) に純培養した納豆菌 (*Bacillus subtilis*) を塗付したもの (石井 他, 1989) を使用し (容器は 6cm Polystyrene dish, Corning), その中央に白金耳でシストを移し非冠水 (non-overlay) の状態で恒温器 (30℃) に入れて暗黒下に置いた。

栄養体およびシストの計測：培養中の寒天板上から白金耳でアメーバを採りだし, あらかじめスライドガラス上に滴下した A S 中に移して位相差顕微鏡 (Apophot, Nikon) で Technical Pan Film (Kodak) に撮影した後, 印画紙上で計測した。

培養温度効果：3 台の恒温器を用いて培養温度を便宜的にそれぞれ 23℃, 30℃, 37℃ に維持して増殖率の相違を調べるために次の新法を考案した。餌として A S に懸濁させた乾燥酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) を寒天板上に出来る限り均一かつ密に敷き詰める。余分の水分を乾燥させた後, 寒天板の中央に白金耳で対数増殖期のアメーバを移し non-overlay の状態で恒温器で培養した。一定時間後寒天表面の無酵母領域 (ブランク) を写真にとり, その面積を比較して最適増殖温度を推定した。

結果及び考察

栄養体細胞：検鏡資料にはすべて 30℃ で脱シストさせた対数期の細胞を用い, 室温 (23~25℃) で観察した。図 1 は ATCC Balamuth 株及び Page 3a 株の前進中の栄養体とシストを示す。この属の栄養体細胞の標徴はまず体前端部の葉状擬足の他に少数のアcant擬足 (acanthopodia) を有し, 細胞内には 1 個の大きな中心仁を含む胞状核 (vesicular nucleus) を持ち, 滑らかな前進運動 (non eruptive movement) を行うことである。これら 2 株と, 患者より分離した 4 株 (Tsuk, Fuks, Toks, 及び Jike 株) の各 100 例の形態計測値のグラ

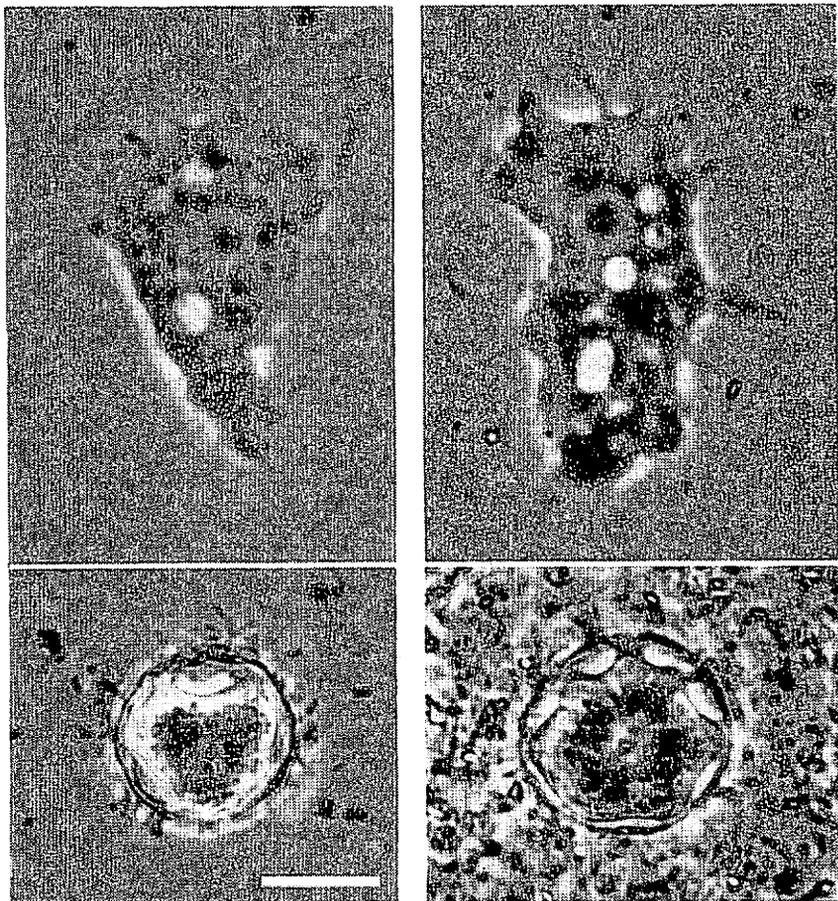


図1 *A. castellanii*, Balamuth 株 (左) 及び *A. polyphaga*, Page 3a 株 (右) の栄養体細胞とシスト (スケールは 10 μm)

フを図2～図5に示す。**Balamuth**株及び**Page 3a**株の体長(L)の平均値はそれぞれ**28.2 μ m**及び**29.7 μ m**であり、体幅(B)の平均値は**13.2 μ m**及び**12.5 μ m**であった。体幅に対する体長の比(L/B)の平均値は各**2.1**及び**2.4**であった。また両種における核及び仁の直径は前者が平均**3.2 μ m**及び**1.9 μ m**で、後者が平均**5.3 μ m**及び**3.4 μ m**であった。これらの値はアカントアメーバの分類を再定義したPage(1967)の示した値に近いものである。一方、**Tsuk**, **Fuks**, **Toks**, 及び**Jike**株における平均L値は各々**29, 25, 33**及び**28 μ m**であり、平均B値は各**4, 11, 12**, 及び**10 μ m**であった。また、L/Bの平均値は、それぞれ**7.5, 2.2, 2.7**, 及び**2.8**で**Tsuk**株だけが異常に大きな値を示した。これは**Tsuk**株だけが、特に細長い形態を採ることによるものである。

シスト：アカントアメーバでは内外2枚のシスト壁(endocyst 及びectocyst)で被われ、内壁と外壁とは1ないし数ヶ所で密着する以外は互いに分離して空所を生ずるため、外壁あるいは内壁の外観は類多角形または星形を呈するものが多いことが特徴である。両壁の密着部位はアメーバが脱シストする際のシスト孔であり、その数はRay数としてシストの大きさとともに種の重要な指標とされている。**Balamuth**株及び**Page 3a**株のシストの長径はそれぞれ平均**14.9**及び**17.4 μ m**で、Ray数の平均値は**2.9**及び**1.9**である。Ray数に関してPage(1967, 1976)は単にendocystの角の数を計測しているため、我々のostioleの数(Ray数)とは直接比較することはできなかった。今回患者から分離された4株のシストの長径及びRay数の平均値は**Tsuk**株では、**14.7 μ m**及び**5.4**, **Fuks**株では**15.0 μ m**及び**3.6**, **Toks**株では**15.3 μ m**及び**5.6**, **Jike**株では**15.0 μ m**及び**5.6**であった。**Balamuth**株及び**Page 3a**株のシストの平均Ray数がいずれも4株に比べて小さな値を示したのは、シスト形成後の成熟度の違いが関係している可能性もある。

培養温度効果：酵母を全面塗付した寒天培地に一定量の栄養体を植え込み一定温度の恒温器に入れ、6日間培地表面を写真に撮影しブラックの大きさを比較した(図6)。6株すべての結果が表1である。**Balamuth**株及び**Page 3a**株の増殖は共に30℃が最も早く、次いで23℃であるが、37℃ではまったく増殖できなかった。**Fuks**株は、**Balamuth**株及び**Page 3a**株と傾向が似ていたが、37℃でも極めて遅いが増殖した。**Toks**株では30℃に次いで37℃も増殖し、23℃は最も遅かった。**Jike**株は唯一37℃で最も増殖が早く、温度が下がるにつれて増殖が遅くなることがわかった。**Tsuk**株はこの実験系では増殖できなかった。これは、実験温度の不適ではなく、酵母細胞を摂食しないことによるものであ

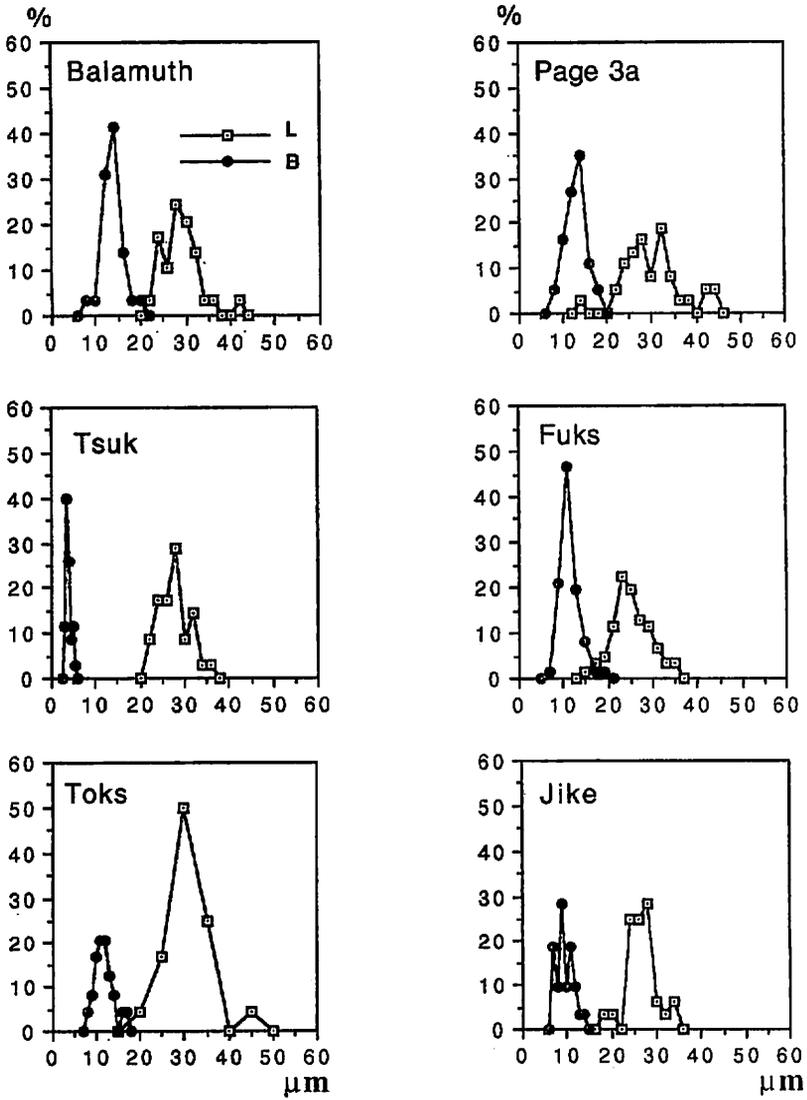


図2 6株の栄養体細胞の体長 (●) と体幅 (□) の頻度分布

56

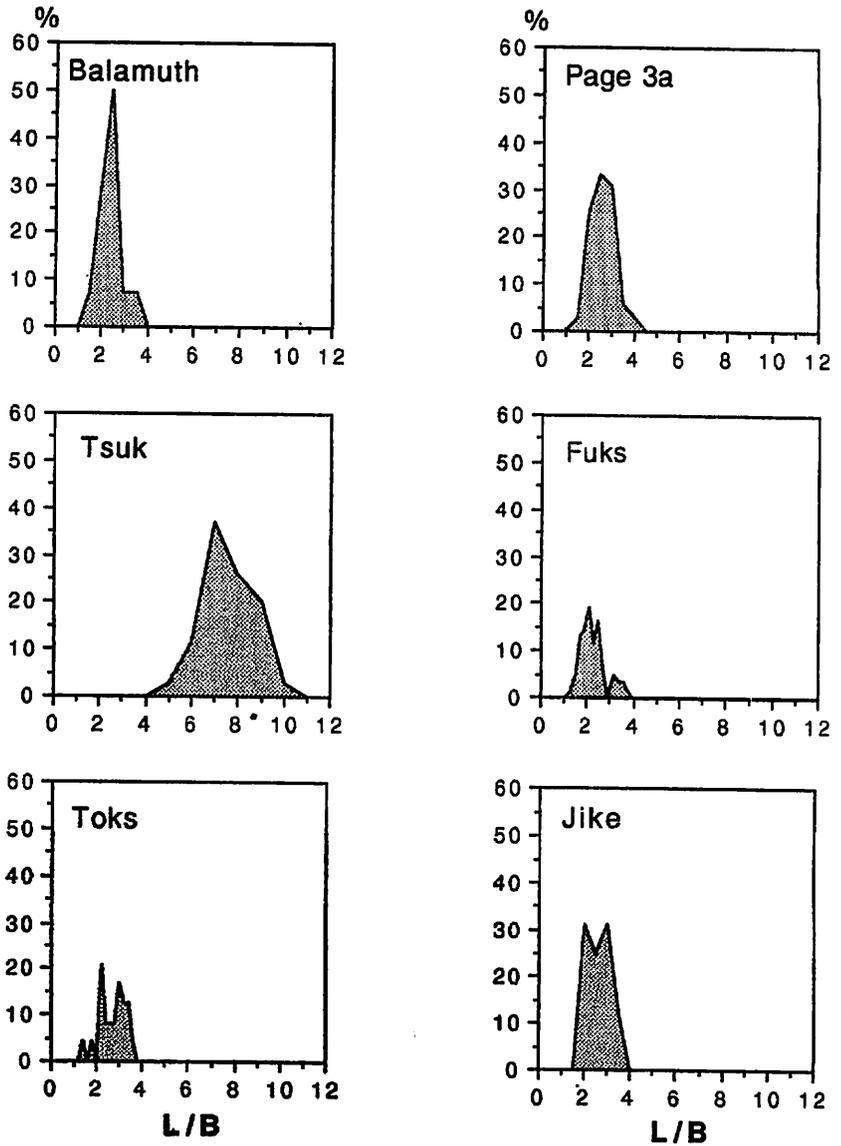


図3 栄養体細胞の体幅 (B) に対する体長 (L) の比頻度分布

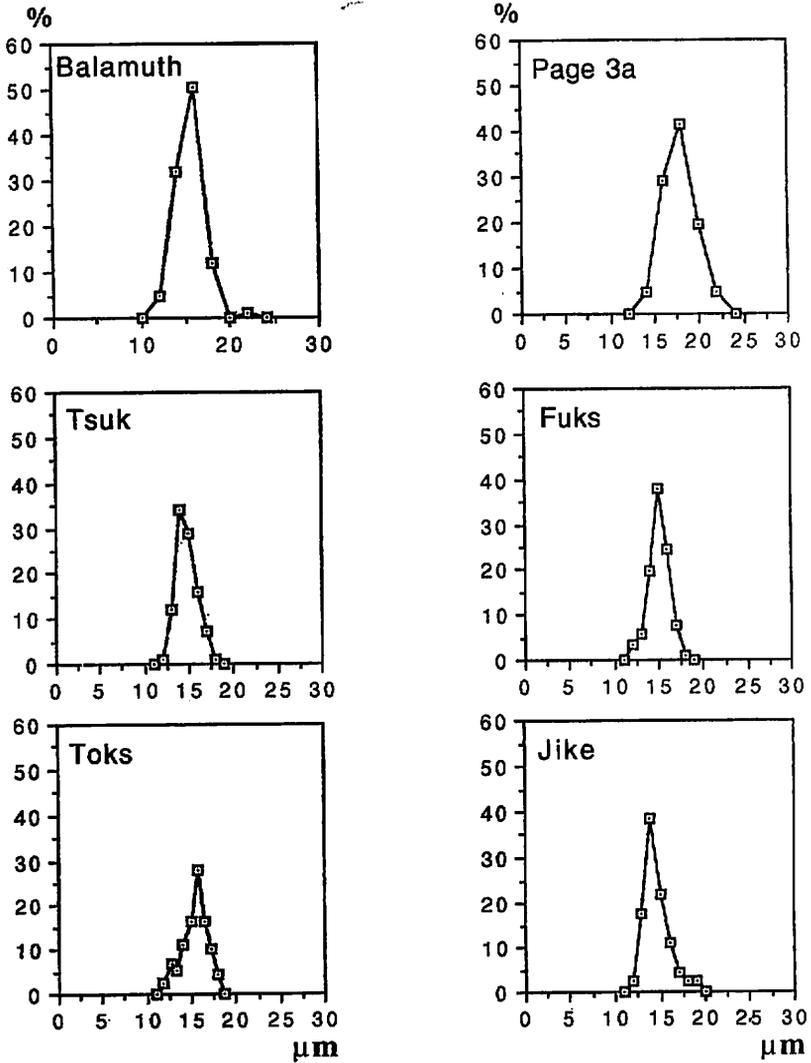


図4 6株のシストの長径の頻度分布

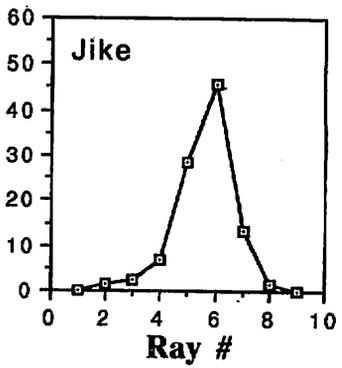
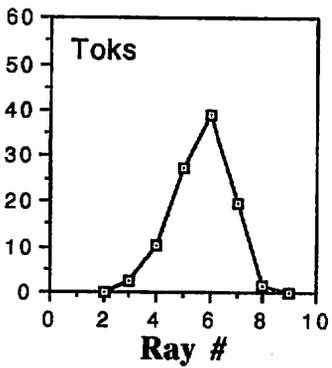
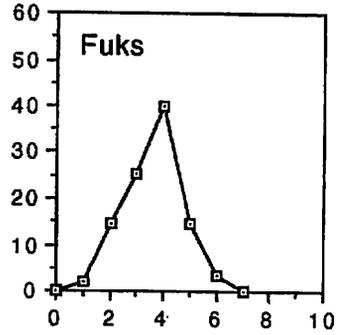
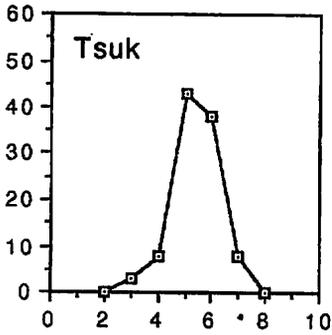
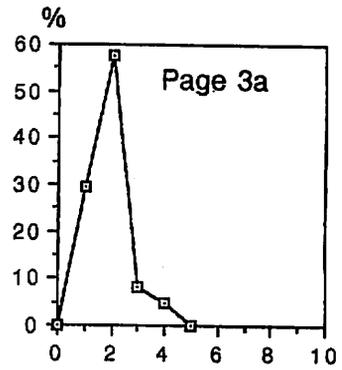
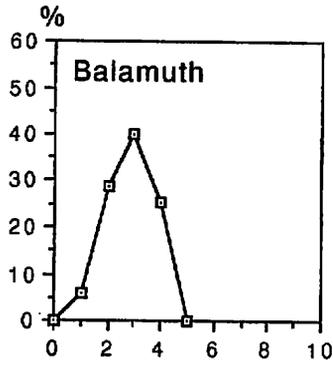


図5 シストの Ray 数の頻度分布

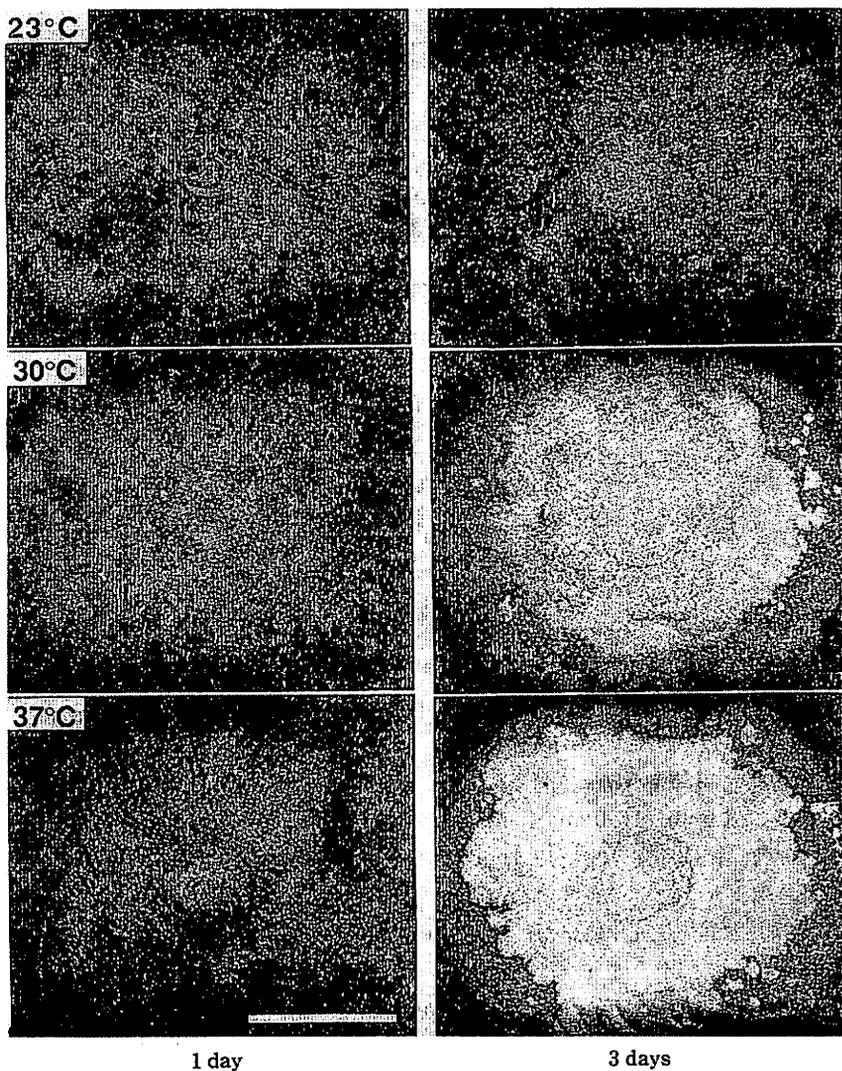


図6 Jike 株の栄養体細胞の増殖に対する温度効果
寒天平板上に一様に塗付した酵母の上に、接種されたアカント
アメーバによって出来たブランク (スケールは 10 mm)

strains	23°C	30°C	37°C
Balamuth	+	++	-
Page 3a	+	++	-
Fuks	++	+++	(+)
Toks	+	+++	++
Jike	+	++	+++
Tsuk*	-	-	-

図1 栄養体細胞の増殖に及ぼす培養温度効果
+は同一株内における無酵母領域（プラーク）の相対的大きさを示す。*Tsuk株のみ増殖せず測定不能

る。

本属のアメーバは、病原性と温度感受性との間にある程度の相関性があり、ふつう毒性の強いものほど高温で増殖することが知られている(Griffin, 1972, 1973)。ただし、病原性の有無は現在のところヒトに角膜炎や脳炎等を起こさせることができるか否かではなく、哺乳動物（ネズミ等）に対する致死作用の有無に基づいている。我が国の4患者から分離された4株のうち、今回の実験条件で増殖できなかった Tsuk 株を除い

て、いずれも37℃で増殖できたことは病原性を考慮する上で大変興味深い。

以上の結果をもとに、主としてPage (1967, 1976) のアカントアメーバの分類基準と比較しながら4株の種の同定を試みた。4株のシストにみられたシスト孔部位の構造は、operculum の周囲に ostiole 構造を有すること、及び角膜炎を起こしたことを考慮すると、これまで角膜炎から分離されている5種(*A. castellanii*, *A. culbertsoni*, *A. hatchetti*, *A. polyphaga*, 及び *A. rhysodes*) (Jones, 1986) のうち、ostiole を持たない *A. culbertsoni* は除外できる。*A. hatchetti* と *A. rhysodes* に関してそれぞれの栄養体のL、BおよびL/B値は、前者では23.6μm, 16.0μm, 1.5で、後者では28.5μm, 17.8μm, 1.6であり、シストの直径は前者は平均13.1μm, 後者は16.7μmである (Sawyer, et al., 1977) 栄養体およびシストの各数値から見て *A. hatchetti* も除外できる。一方、L/B値が小さかった *A. rhysodes* は、その性状が *A. castellanii* と極めて類似することから、分類学上の独立性に疑問があり同一種と見なすものも多い。従って候補としては *A. castellanii* と *A. polyphaga* に絞ることができる。前進中のアメーバの体長と体幅の比(L/B)は、Pageによれば *A. castellanii* では平均2で、*A. polyphaga* では3までの値をとるとされている。この基準に従えば、Fuks 株はその値が2.2であり、*A. castellanii* に近い。また Toks 及び Jike 株は *A. polyphaga* に近い。Tsuk株はその比が7.5であって基準をはるかに越えていてどちらにも当てはめることが出来なかった。一方、シストの各数値から見

ると、Ray 数の小さい Fuks 株は *A. polyphaga* が、Toks, Jike 株はいずれも *A. castellanii* が候補に挙げられる。現在までのところ、アカントアメーバでは分類の指標として比較的安定なシストの形態学的特徴が重視されている。従って、シストの形態学的特徴からは Fuks 株は *A. polyphaga*, Toks, Jike 株はいずれも *A. castellanii* と考えられる。Tsuk 株については、シストからは *A. castellanii* に近いが、酵母培地での非増殖性及び栄養体の形態学的特徴から考慮すると、むしろ新種である可能性も考えられる。

アメーバは種々の内外要因によって容易に激しい形態的变化を起こしやすいため、未だ分類が安定せず、種の異同も整理されていないのが現状である。そこで免疫学的手段や生化学的・分子生物学的データなども用いることが不可欠であるが、データの蓄積が十分になされておらず、手法も確立されていない。今後、アメーバの分類の基準に使えるより安定した新標徴を見つけ出すことが必要と思われる。

結 論

1. 最近、我が国で角膜炎患者から見つかった4株のアカントアメーバの形態学的特徴と増殖時の温度感受性を調べた。

2. シストの特徴から見て1株は *A. polyphaga*, 2株は *A. castellanii* とされる。しかし、残る1株は従来の基準に全く当てはまらず種名は不明である。

3. 酵母を塗付した1.5% NN寒天培地にアカントアメーバを接種し、酵母が摂食されて消失した面積からアメーバの増殖を推定する新法を開発した。培養温度23℃, 30℃, 及び37℃で6株の温度適性を調べた結果、全く増殖できなかったTsuk株を除いて、3株とも37℃で増殖したが、Jike 株は37℃が、Toks 及びFuks株は30℃が、最も増殖が早かった。Balamuth及びPage 3a株は、37℃では全く増殖出来ず30℃での増殖が最も早かった。

文献

- Culbertson, C. G., Smith, J. W., and Minner, J. R. (1958) *Acanthamoebae*: Observations on animal pathogenicity. *Science*, 127: 1506.
- Griffin, J. L. (1972) Temperature tolerance of pathogenic and nonpathogenic free living amoeba. *Science*, 178: 869-870.
- _____ (1978) Pathogenic free-living amoebae. In: *Parasitic Protozoa*, Kreier, J. P. ed, vol. 2, Academic Press, New York.

- 石橋康久他 (1988) *Acanthamoeba keratitis* の一例. 日眼会誌, 92 : 963-972.
- 石井圭一他 (1989) 両生アカントアメーバによる角膜炎. 原生動物学雑誌, 22 : 4-9.
- Jones, D. B., Visvesvara, G. S. and Robinson, N. M. (1975) *Acanthamoeba polyphaga* keratitis and *Acanthamoeba uveitis* associated with fatal meningoencephalitis. Trans. Ophthalmol. Soc. U. K., 95 : 221-232.
- Jones, D. B. (1986) *Acanthamoeba*—The ultimate opportunist? Amer. J. Ophthalmol. 102 : 527-530.
- Martinez, A. J. (1985) Free-Living Amebas. CRC Press, Boca Raton.
- Page, F. C. (1967) Re-definition of the genus *Acanthamoeba* with descriptions of three species. J. Protozool., 14 : 709-724.
- _____ (1974) *Rosculus ithacus* Hawes, 1963 (Amoebida, Flabellulidae) and the amphizoic tendency in amoebae. Acta Protozool., 13 : 143-154.
- _____ (1976) An Illustrated Key to Fresh Water and Soil Amoebae. Scientific Publication No. 34. Freshwater Biological Association. Ambleside, Cambria.
- Sawyer, T. K., Visvesvara, G. S. and Harke, B. A. (1977) Pathogenic amoebas from brackish and ocean sediments, with a description of *Acanthamoeba hatchetti*, n. sp. Science, 196 : 1324-1325.

法政大学 第一教養部
東京都千代田区
(1989年9月22日受理)