

## 二三寄生性アメーバ及び自由生活性アメーバ の澱粉分解酵素について

金子 信

慶応義塾大学医学部寄生虫学教室 (主任 松林久吉教授)

(昭和30年12月21日 受領)

赤痢アメーバ等寄生原虫類が培地中で発育増殖する場にも、その化学的な働によつて、細胞成分の合成と培地中の栄養物質の分解との両者が行はれているのは常態である。この様な過程に関係する酵素は極めて多数で、その綜合された作用も非常に複雑であらうと思はれるが、私はその中の一つのアミラーゼを取上げてみた。Dobell-Laidlaw (1926) によつて報告されて以来、米粉末はアメーバの培養に不可欠なるものであることが判つてゐるが、之は米粉の主成分であるところの澱粉が原虫の有する酵素によつて、加水分解され、その分解産物が原虫の発育に必要であると考えられている。それでその過程に作用するアミラーゼについて歯齧アメーバ、二核アメーバ、赤痢アメーバ、自由生活性アメーバを用ひて検討した。

使用したアメーバは赤痢アメーバ、二核アメーバ、歯齧アメーバ、自由生活性アメーバの4種である。赤痢アメーバ及二核アメーバは、馬血清を試験管内で熱凝固斜面とし、之にリングルを液体部とせる培養基に継代培養した。歯齧アメーバは上記の固形に馬血清1、リングル8、の割合に混じたるものを液体部とする培養基に継代培養した。両者共に移植直前に少量の米粉を加へた。亦自由生活性アメーバは加熱凝固した卵黄を蒸溜水で浸出し、加圧滅菌したものを小シヤレーに採り、27°Cで継代培養した。

### 実験材料

実験は1) 生活している虫体から体外に出される酵素。2) 一定時間培養基内に培養した場合、その培養基内に存在する酵素を夫々略々量的に観察することを目的とした。各実験に用いたアメーバの数は1 ml 中50万と

なる様に調節した。之等のアメーバ培養には細菌が随伴することが避けられないので、それらの細菌に由来する酵素の影響を考えなければならない。そのためには実験材料からなるべく細菌を除く様につとめると共に、残つた細菌についてはその活動を抑えるために抗生物質を加へた。その上に、全く同様に処理した材料からアメーバを除き、残存する細菌だけについての酵素作用を検して実験の対照とした。材料の処理は次の如く a), b), c) の3方法によつた。

a) 48時間培養した培養基の底部からアメーバを多量に含む沈澱物を採り、リングルにて数回遠心洗滌することにより随伴細菌を出来る丈除くと同時にアメーバを多数集めた。之を更にガーゼにてこし、米粉を加法的に除き、残存する細菌の活動を阻止する目的で、之にペニシリン2000  $\mu$ /ml 及ストレプトマイシン2000 r/ml を加へた。之は生活虫体より体外に分泌される酵素量の測定に使用する目的で作られた被検液である。

b) 48時間培養した培養基の液体部を採り、更に之を遠心分離し、その上澄液のみを集め之にa)法と同様に抗生物質を加へた。之はアメーバが培地中に既に分泌した酵素について観察する為であり、亦抗生物質の意義は上記と同様である。

c) 同様に遠心洗滌により集めた虫体をドライアイスで凍結融解することを6回反覆し、虫体を完全に破壊し、更に之を濾過滅菌したもので、之は虫体内にある酵素についての検索を目的とした。亦c)法に於て対照の随伴細菌の凍結融解は14回以上行つた。之は細菌体は原虫よりはるかに破壊しがたいものである為である。

各実験共同じ操作を30回反覆して、各回に於ける澱粉分解域の直径の平均を求め、それを酵素の活性度の指標として表示した。

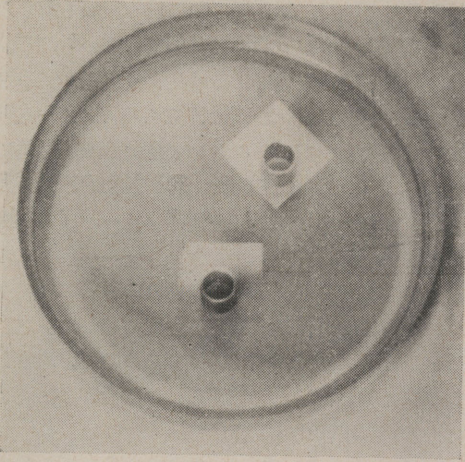
### 実験方法

Hallman 及び DeLamater の方法に従つた。即ち普

Makoto Kaneko: Investigations on amylolytic activity of several parasitic and free-living amoebae. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan)

附 図 1

a) 実験用セット

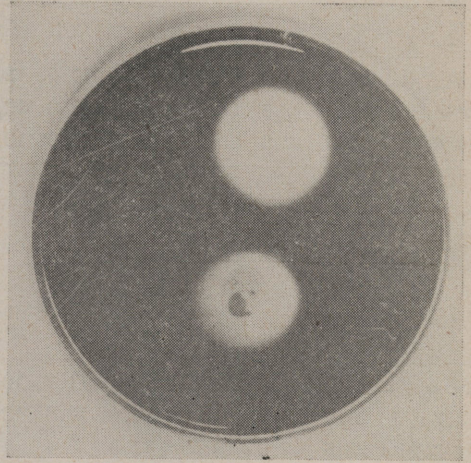


b) 赤痢アメーバによる実験

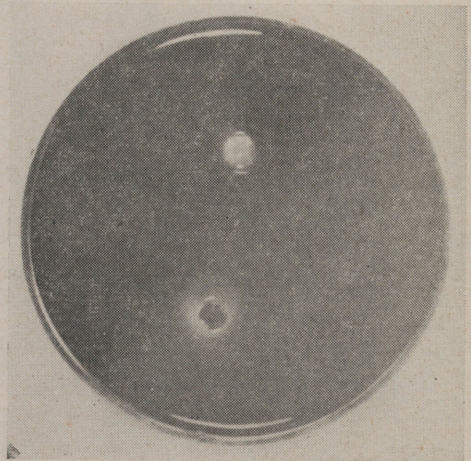
左は対照で細菌だけによる分解域。右はアメーバと細菌とによる分解域。カップ内の黒点は培養基より一緒に移された米粉。



c) 赤痢アメーバによるもので、上は上澄液による分解域、下は生活虫体によるもの



d) 自由生活アメーバによるもの。



通寒天培地に 0.8% の割合に可溶性澱粉を加へたものを、滅菌シャーレにそそぎ、24時間孵卵器におさめて無菌であることを確認した後、抗生物質検定用の鉄製の高さ、10 mm、内径、6 mm、外径 8 mm のカップを垂直に立て、被検液を 0.1 加へ、カップ内の液の蒸発を防ぐ為に、滅菌カバーガラスにておほい、37°C の孵卵器に静置した(附図 I, a)。48 時間後に取出し、カップ内の被検液の乾燥していないもの、及び生活虫体を用いた実験では運動する虫体を尚認め得るもの丈を撰び、之について観察した。先づピペットにてカップ内の液を除き、つい

でカップを取去り、ルゴール液をシャーレに一杯注ぐとアミラーゼの作用した部分は澱粉が分解されている為にカップの外縁より輪状に透明な層を生じ、平板のアミラーゼの作用の及ばなかつた所は沃度澱粉反応により青紫色を呈する。(附図 I b, c, d) 計測は「ノギス」を使用し、透明層の境界より輪の中心点をとほり、他端の透明層の境界まで、即ち澱粉分解域の直径を測定した。

実験成績

赤痢アメーバ、歯齧アメーバ、二核アメーバでは澱粉分解層、即ち透明層が著明に現われ、然もその直径は随

第1表 赤痢アメーバの材料を以つて行つた  
澱粉分解域の大きさ (単位 mm)

|       | 実験群  |      |       | 対照群  |      |       |
|-------|------|------|-------|------|------|-------|
|       | 最大   | 最小   | 平均    | 最大   | 最小   | 平均    |
| 生活虫体  | 24.5 | 18.0 | 20.26 | 16.4 | 11.5 | 12.23 |
| 培養液上澄 | 26.1 | 17.8 | 20.72 | 16.0 | 11.2 | 12.12 |
| 凍結融解  | 22.5 | 17.0 | 20.36 | 12.0 | 10.0 | 10.5  |

第2表 歯齲アメーバの材料を以つて行つた  
澱粉分解域の大きさ (単位 mm)

|       | 実験群  |      |       | 対照群  |      |      |
|-------|------|------|-------|------|------|------|
|       | 最大   | 最小   | 平均    | 最大   | 最小   | 平均   |
| 生活虫体  | 23.6 | 17.5 | 20.29 | 16.0 | 11.2 | 13.6 |
| 培養液上澄 | 24.6 | 18.2 | 20.77 | 14.8 | 10.8 | 13.4 |
| 凍結融解  | 23.5 | 17.0 | 19.58 | 11.9 | 8.4  | 7.48 |

第3表 二核アメーバの材料を以つて行つた  
澱粉分解域の大きさ (単位 mm)

|       | 実験群  |      |       | 対照群  |      |       |
|-------|------|------|-------|------|------|-------|
|       | 最大   | 最小   | 平均    | 最大   | 最小   | 平均    |
| 生活虫体  | 26.0 | 18.5 | 20.92 | 15.5 | 10.4 | 12.02 |
| 培養液上澄 | 24.8 | 18.2 | 20.82 | 14.6 | 11.4 | 12.82 |
| 凍結融解  | 22.8 | 17.4 | 19.94 | 13.8 | 9.4  | 11.42 |

第4表 自由生活性アメーバの材料を以つて行つた  
澱粉分解域の大きさ (単位 mm)

|       | 実験群  |     |      | 対照群  |     |      |
|-------|------|-----|------|------|-----|------|
|       | 最大   | 最小  | 平均   | 最大   | 最小  | 平均   |
| 生活虫体  | 12.1 | 8.0 | 8.22 | 11.2 | 8.0 | 8.17 |
| 培養液上澄 | 11.8 | 8.0 | 8.18 | 11.9 | 8.0 | 8.20 |
| 凍結融解  | 10.2 | 8.0 | 8.10 | 9.0  | 8.0 | 8.09 |

伴細菌群のみに就て行つた対照実験に比して遙に大であつた。かくて之等のアメーバが澱粉分解酵素をもつことは明瞭である。自由生活性アメーバでは澱粉分解層が現われるには現われたが、それは極めて狭いので、その直径は対照に比して差がなかつた。個々のアメーバ種に就ての成績は第1表より4表に示した。之等の表の数値は何れも澱粉分解層の直径 (mm) を示したものであるが、生活虫体を含むもの、培養上澄液、凍結融解による虫体破壊

液の何れの材料に於ても澱粉分解層の直径の平均は20mm前後を示して、その間に差がない。更に寄生性アメーバ3種を比較して見ても、何れの種に於ても失張り20mm前後を示して、種と種の間にある差異も認められない。全く同様な事が対照群に就いても認められる。この場合、その数値は実験群に於けるよりも遙かに小さいものであるが、各試験材料間に於ても、各アメーバ種の間においても大差が認められない。唯凍結融解材料においては他の材料におけるよりも稍々小さいと云う所見が、赤痢アメーバ (10.5mm) と歯齲アメーバ (9.84mm) とに於て認められる。

自由生活性アメーバに於ては、何れの材料に於ても平均において 8.0mm を僅かに超える程度であつた。之は実験に用いたカップの外径が 8.0mm であるので、澱粉分解層はカップの外側に殆んど拡がらない場合が多いと云うことになる。(附図d)

#### 考 按

赤痢アメーバを初めとして他の腸管寄生アメーバの培養に米粉を加えることにより、アメーバの増殖が著しく促進されることが、Dobell によつて明らかにされて以来、之等アメーバが澱粉を分解する酵素をもつことは当然想像された所である。アメーバ類の培養に細菌が随伴することが避けられないために寄生性アメーバのもつ酵素についての研究は進歩していない。Hallman & DeLamater (1953) は巧妙な方法を考案して、赤痢アメーバにアミラーゼの存在することを明らかにした。私は彼等の方法にならつて、赤痢アメーバ、歯齲アメーバ、二核アメーバについてアミラーゼの存在を検討し、尚それらの間に量的な差異があるか否かを知らうとした。その結果3種のアメーバ共アミラーゼをもつことは証明されたが、ここに用いた方法によつては、それらの間に量的な差を見出すことは出来なかつた。対照として検討した自由生活性アメーバにはアミラーゼは殆んど証明されなかつた。

アメーバの生活虫体と、培養濾液と、虫体融解物質の3者でアミラーゼ活性度に差があるか否かをもち検討しようとした。之はアミラーゼが虫体外に分泌されて作用するのが主であるか、虫体内で作用するのが主であるかを確かめようとしたものである。之等3通りの材料に於て、澱粉分解域の直径には差は見られなかつたが、之等分解域の大きさはアメーバと細菌の両者に由来するアミラーゼの作用によるものであるので、今、仮りに対照実験に示された細菌群だけによる澱粉分解域の直径を、上記の

アメーバ・細菌による分解域の直径から引いたものを、アメーバ自身のアミラーゼの活性度を示す指数と考へることとする。尚培養上澄液については、その中のアミラーゼを産出したアメーバ数が全く不明であるので比較の材料とすることは出来ない。それで生活虫体との材料(用いたアメーバ数は同じ)で、上記の如き計算をして、アメーバだけに由来するアミラーゼ指数を求めて見ると第5表の如くなる。これで見ると、赤痢アメーバと齒齲アメーバとでは融解虫体の方が生活虫体におけるよりも指数が大であつて、二核アメーバは差が見られない。そこでこのアミラーゼが主として虫体外に分泌されて作用するものか、或は虫体内で作用するものかに立帰つて考察

第5表 各種アメーバに於ける実験群澱粉分解域と対照群との差

|      | 赤痢<br>アメーバ | 齒齲<br>アメーバ | 二核<br>アメーバ | 自由生活性<br>アメーバ |
|------|------------|------------|------------|---------------|
| 生活虫体 | 8.4        | 6.7        | 8.9        | 0             |
| 凍結融解 | 9.9        | 9.7        | 8.5        | 0             |

を進める事にする。ここに云う生活虫体とは上記実験装置に入れる際に生存していたと云う意味であつて、それを48時間37°Cの孵卵器中において、アミラーゼの検査を行うのであるから、検査時に尚、生存し運動する虫体があるにしても、多数の虫体が既に死亡融解し、ここに検出されたアミラーゼもそのような過程で遊離したものも多量に含まれていると考えなければならぬ。然もこの生活虫体の材料において、凍結融解虫体の材料におけるより、アミラーゼ活性が弱いと言うのであるからアミラーゼがたとえ虫体外に分泌されることがあるにしても、その量は比較的少いものであつて、この酵素は主としてアメーバ体内で作用するものと考え可きであらう。実際に培養アメーバ虫体の体内には多量の米粉を取入れているのであつて、之等は当然体内で消化されるべき運命にあるのである。二核アメーバでは両者間に差が見られなかつたが、このアメーバは宿主外では甚しく速に死滅することが知られており、孵卵器に48時間おかれている間に生活虫体の殆んど総てが死亡融解したものであろう。従つて初めから凍結融解により虫体を破壊して入れた場合と大差ないことになつたと思われる。なほ、培養濾液中にも多量のアミラーゼの存在が証明されているが、これも培地内ではアメーバは増殖すると同時に多数が死亡してゆくの、主として死亡虫体に由来するものであつて分泌ということはあるにしても著明なものではない

あらう。自由生活性アメーバでは殆んど証明されなかつた。元来自由生活性アメーバは極めて僅かな(稀薄な)栄養物の中でも増殖してゆくものであり、アミラーゼの如きも皆無ではないにしても、極めて少量で足りるものと思われる。

## 結 論

- 1) 赤痢アメーバ、齒齲アメーバ、二核アメーバに於てはアミラーゼ作用が明瞭に認められた。
- 2) この作用物質は主として虫体内で作用するものであると考へられる。
- 3) 自由生活性アメーバでは殆んど認め得なかつた。

終りに御指導御校閲を賜りました松林教授に深謝致します。

## 参 考 文 献

- 1) Hallman, A. and DeLamater, J. N.: Demonstration of amylolytic activity in culture of *Entamoeba histolytica*. *Exper. Parasit.*, 2: 170~[73, 1953, —2) Rees, C. W., Baerstein, H. D., Reardon, L. V. and Phillips, L.: Some interactions *in vitro* of *Entamoeba histolytica* and single species of microbial symbionts. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 2: 1002~1014, 1953. —3) Stiphanson, M. 田中正三訳 (1955). 細菌の代謝, 丸善, 東京. —4) 田所哲太郎 (1933), 続酵素化学, 丸善, 東京.

## Summary

Amylolytic activity of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba gingivalis*, *Dientamoeba fragilis* and *Naegleria* sp. was examined according to the method of Hallman and De Lamater (1953). The amylolytic activities of associated bacterial flora were also examined in the control experiments. The strength of the activity of each species of amoeba was determined by the diameter of the area of decomposed amyllum in the test.

The activity was demonstrated in the experiments with the three species of parasitic amoebae and was hardly recognizable with the free-living one. No definite difference was seen in the strength of activity among the parasitic species. Results of the experiments carried on with living and lysed amoebae demonstrated that the amylolytic enzyme worked mainly intracellularly.