

グラム染色による歯齦アメーバの培地内 喰菌現象の観察

鈴木 啓 之

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 32 年 5 月 21 日)

寄生性アメーバの培養に際し、随伴細菌の役割が重要な要素を有している事は明らかな事である。即ち随伴細菌自身の栄養及び代謝産物、又培地に作用して生ずる所の物質及び物理化学的要素等複雑な諸条件が満たされて始めてアメーバの増殖が維持されるのであるが、特にその内で菌体自身の栄養素としての役割を研究したのでは培養赤痢アメーバに於て Korlsson & Anderson (1952)、沢田 (1950) 等の報告があり、それは随伴細菌の死菌体がアメーバの増殖に良好な影響を与えたと論じており、その事はアメーバが細菌を摂取する事に深い意義があるものと思われる。

私は前の論文に於て歯齦アメーバ S 株の試験管内における生存に対し随伴細菌死菌体の影響を検討した結果を報告した。即ち随伴細菌 *Micrococcus epidermidis*, *Aerobacter aerogenes*, *Bacillus subtilis* の 3 種は本アメーバの生存に対しそれぞれ異なつた成績を示した。中でも *M. epidermidis* の影響が最も良好で次に *A. aerogenes* で *B. subtilis* は何ら効果を示さなかつた。茲には同じ随伴細菌を伴なつた培養歯齦アメーバ S 株にグラム染色を行い、アメーバ体内に於ける細菌摂取の状態を観察した所上記の実験成績を裏づける結果を得たので報告する。

実験材料と方法

実験に使用した歯齦アメーバは Dobell-Laidlaw 培地に長期安定した継代培養を行つている S 株で *M. epidermidis*, *A. aerogenes*, *B. subtilis* の 3 種の細菌を伴つているものである。そのアメーバを培養後 2, 4, 6 日の各段階にそれぞれグラム染色を行つた。アメーバの固定

法としては湿性固定であるシャウチン固定法とカルノワ固定法とを行つた。

1. シャウチン固定法。この液の処方には飽和昇汞水 2 分、95%アルコール 7 分の混合液に 5%の割合に水醋酸を加えたもので、この液を約 45°C に加温しておき、12×24 mm のカバーガラスに塗抹した材料を 20~30 分間浸漬して固定する。次に沃度アルコールに約 30 分間浸し材料に附着している昇汞を取り、次に 70%アルコールに 10 分、50%アルコール 5 分、水洗 10 分としてからグラム染色を行つた。然しながらこの場合グラム染色を行う前に沃度が作用している為に沃度がなお標本に附着している可能性も考えられる。グラム染色でルゴール液を使用するのは石炭酸ゲンチアナ紫液に染色した陽性菌が、ルゴールの中の沃度と作用して色素が脱色せずに残ると云う作用を利用したものであるので、初めから多少でも沃度が存在することはグラム染色の結果に悪影響を与えないかと沃度アルコールで処置せずに昇汞が附着しているものを直ぐにグラム染色を行うと云う方法も試みた。

2. カルノワ固定法。この液の処方には水醋酸 1、無水アルコール 3 の割合に混合したもので、この液中に材料を約 1 時間放置して固定し、次いで 70%アルコール 20 分間 2 回通し水洗 15 分行つてからグラム染色を行つた。この場合にはシャウチン固定と異り材料を固定する場合に沃度を作用させる事がなく後のグラム染色に於て細菌の染色度に変化を起すことがないと思われたからである。

以上の方法で原虫が固定されたならばグラム染色を行うのであるが、これに用いた染色液は細菌の染色に使用するものと同様のものであり、石炭酸ゲンチアナ紫液、ルゴール液、フクシン液で染色方法も細菌の時と同様であるが、細菌の場合にはルゴール液に浸し次いで無水アルコールで脱色し、直ぐに水洗を行うのであるが、この方法ではアメーバに損傷を起す恐れがあるので無水アルコールから順次 95, 90, 80, 70, 50 を通してから水洗を

KEISHI SUZUKI: Observations on the bacterial phagocytosis of *Entamoeba gingivalis* in vitro by Gram staining. (Department of Parasitology, School of Medicine, Keio University, Tokyo, Japan).

行つた。この時にあまり時間をかけるとグラム陽性に染色したものが脱色する事も考えられるのでなるべく短時間に行つた。

実験成績

湿性固定法であるシャウチン、カルノワ両固定に於て歯齶アメーバのグラム染色を行つた所虫体内部に於ける細菌の状態は、シャウチン固定よりもカルノワ固定の方が比較的良好的な状態に染色された。

特にシャウチン固定に於て昇汞を沃度で取去らずそのまま石炭酸ゲンチアナ紫液に浸すと、両者間に化学的变化を起し白濁した液を生じ染色後検鏡に際し、アメーバは非常に変性を起し内部も顆粒状となつており、細菌の存在を識別するのに困難であつた。然しながらカルノワ固定の場合には、内部の細菌の状態が比較的良好にわかつたが、鉄ヘマトキシリン染色したアメーバの形態と比較するとアメーバの破損がひどく良好な状態とは思われなかつた(附図の1及び2)。

次に摂取している細菌の状態を観察すると、アメーバ自身はグラム陰性に染色され虫体内には明らかにグラム陽性の球菌である *Micrococcus epidermidis* の双球状となっているものが多数認められた(附図の2)。其の外にもグラム陽性に染色した多数の顆粒状の存在があつたが、それ等は虫体内の内部構造の様に思われる。

又 *M. epidermidis* 以外の随伴細菌の虫体内摂取の状態を見るに、グラム陰性小桿菌である *A. aerogenes* はグラム染色によつて、アメーバ体内でそれを識別することは困難である。次にグラム陽性の大桿菌である *B. subtilis* はどのアメーバを検査してもその体内にそれらしい細菌の染色されているのを認める事が出来なかつた。

次に培養2, 4, 6日目と経過した各時期のアメーバの喰菌現象を観察すると、総ての時期を通じて *M. epidermidis* の存在が認められるが6日目のアメーバは他の2, 4日目のものに比して喰菌状態が悪い様に思われ、又2日目頃の虫体では、アメーバの外縁に比較的多数の *M. epidermidis* の染色されているのが観察されたが、4, 6日目の虫体ではその様な状態があまり観察されなかつた(附図の3と4)。

以上の実験成績は潤性固定に於て行われたものであるが、通常細菌のグラム染色を行う時には乾燥固定を使用するので、その方法も行つてみたが、この場合には培養液中の食塩が析出して来るのでアメーバの存在がわからず、又虫体も破壊されてしまうので失敗に終つた。

考 按

培養アメーバがその随伴細菌を摂取し栄養としている事はすでに明らかにされている事である (Anderson 1952; Ress 1941; 沢田 1950)。

私は前の実験に於て、*M. epidermidis*, *A. aerogenes*, *B. subtilis* の3種の細菌を伴つている培養歯齶アメーバに於て、それ等の細菌を死菌体として加えアメーバの影響を検討した所が *M. epidermidis* がアメーバの生存時間を最も延長せしめ良好な結果を得たので、その培養歯齶アメーバS株の喰菌現象をグラム染色を行い観察してみた。従来より行われているアメーバの染色は鉄ヘマトキシリン染色であるが、この場合にはアメーバの形態及び内部構造は正確に観察出来るが、摂取している細菌の存在はわかつて、それがどの様な種類であるかを決定するのは困難である。そこでアメーバにグラム染色を行つたのであるが、原虫に於けるグラム染色の報告は、腔トリコモナスに於て Schmid & Kamniker (1926), 三宅 (1933) の報告があり、それは原虫内に細菌の存在を認めてをり、又ギームザ染色による口腔トリコモナス(佐藤1955)、歯齶アメーバ(日野1954)の報告がある。この場合には原虫の固定が問題となり本来のグラム染色の場合では乾燥固定であるが、それを原虫に応用するとアメーバは破壊してしまい観察が不可能となつた。そこで潤性固定であるシャウチン、カルノワの固定を使用した、シャウチン固定よりもカルノワ固定の方が染色後に於て稍々良好の様に思われた。それは恐らくシャウチン液中の昇汞を沃度アルコールで落したつもりでも、それがなお或程度残つて、後の石炭酸ゲンチアナ紫液と作用して化学的变化を起すのか、又はグラム染色の前に沃度が細菌に作用し、後のルゴール液の沃度の作用が満足に作用出来ない為ではないかと思われる。又カルノワ固定が良いとはいつても鉄ヘマトキシリン染色したアメーバの状態と比較すると、アメーバは収縮して外形は不規則となり内部の細部の状態は不明瞭であつた。しかしながら佐藤(1955)は口腔トリコモナスのギームザ染色に於て10%ホルマリン水固定剤が良好であり鉄ヘマトキシリン染色と大差のない状態を得る事が出来たと報告している。

以上の如くあまり良好なアメーバの染色は得られなかつたが、内部に於ける細菌摂取の状態は割合に良く観察する事が出来た。即ち前報に於て死菌体としても良好な影響を与えることの判つた *M. epidermidis* が歯齶アメーバの培養に際して随伴増殖すれば2, 4, 6日目の各

時期に虫体内に摂取されているのが明らかに認められた。

この事より死菌体としてアメーバに良好な影響を及ぼした *M. epidermidis* は培養アメーバの中に於て生菌としてもアメーバに摂取されておりアメーバの栄養源の一部としての役割を示している様に思われる。

結 論

培養菌叢アメーバ S 株のグラム染色を行いその喰菌現象を観察して次の所見を得た。

1. 培養菌叢アメーバ (S 株) はその体内に *M. epidermidis* を摂取しているのが観察された。
2. グラム陰性菌である *A. aerogenes* はグラム染色でアメーバ虫体内にその存在の有無を確定する事は出来なかつた。
3. 死菌体としてアメーバの生存に良好な影響を与えた *M. epidermidis* は生菌としてもアメーバの栄養素として摂取されており、死菌体として何ら効果のなかつた *B. subtilis* は随伴細菌として増殖してもアメーバは摂取していなかつた。

稿を終るに際し御指導、御校閲を賜つた松林教授に深く感謝致します。

文 献

- 1) 日野年郎 (1954): *E. gingivalis* に関する研究, 第 2 篇, 歯肉アメーバの口腔内寄生に関する統計的観察, 歯科医学, 17: 303-311. —2) Korlsson, J. L., James, M. B. & Anderson, H.H. (1952): Studies on nutritional principles for *E. histolytica* in autoclaved bacterial cells. *Exp. Parasit.* 1: 347-352. —3) 松林久吉 (1947): 赤痢アメーバ, 東西出版社. —4) 三宅薫二郎 (1933): *Trichomonas vaginalis* の形態, 生理及び分裂について. 慶応医学, 13: 1443-1461. —5) 大岩弘治 (1950): グラム染色性に関する研究, 日本細菌学雑誌, 5: 19-22. —6) Ress, C. W., Reardon, L. V., Jacobs, L. & Jones, F. (1941): Problemes encountered in *E. histolytica* in cultures developed by microisolation. *Am. J. Trop. Med.*, 21: 567-578. —7) 沢田

利貞 (1950): 赤痢アメーバの培養に関する研究. —第 2 篇, 各種細菌の菌体又は加熱死菌体の培養赤痢アメーバの発育に及ぼす影響, 日本細菌学雑誌, 5: 421-424. —8) Sawada, T., Suzuki, I. & Oka, T. (1953): Bacterial cell components as a substitute for serum in the culture medium for *E. histolytica*. *Gunma, J. Med. Science*, 2: —9) 佐藤水治 (1955): 口腔トリコモナスに関する研究の総括. 日歯医会雑誌, 7: 403-406. —10) Schmid, A. L., Kamniker, H. (1926): *Trichomonas vaginalis*: Ihre Klinische Bedeutung, Morphologie und Therapie. *Arch. Gynäk.*, 127: 362-380. —11) 鈴木啓之 (1957): *E. gingivalis* の生存に対する随伴細菌死菌体の影響, 寄生虫学雑誌, 6: 432-440. 1957.

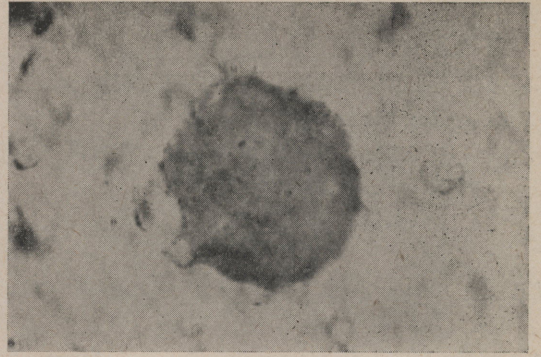
Summary

In the previous experiment the effects of killed bacterial cells upon the survival of *Entamoeba gingivalis* were studied. Among three species of bacteria tested, *Micrococcus epidermidis* had the most favourable effect and *Aerobacter aerogenes* had less favourable and *Bacillus subtilis* had no effect. In the present experiment, *E. gingivalis* growing with these 3 species of bacteria in Dobell-Laidlaw medium were stained with Gram staining method to demonstrate what kind of bacteria will be found in the protoplasm of amoeba.

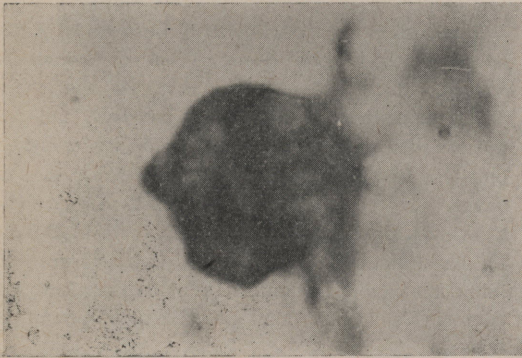
Bacteria found in the protoplasm were only diplococci which must be *Micrococcus epidermidis* in this case. *Aerobacter aerogenes* is Gram-negative species, so it was not clear whether this species of bacteria were ingested or not. *Bacillus subtilis* is Gram-positive, but they were not detected at all in the protoplasm. So it was demonstrated here that amoebae ingested preferably *M. epidermidis* which had been demonstrated to have supported the survival of *E. gingivalis*. It may be supposed that the effect of bacteria in supporting the growth or survival of amoebae in vitro would be attributed in part to the fact that they themselves might become the nutrient of amoeba.



(1)



(2)



(3)



(4)

附図の説明

- 附図1 シャウチン固定法に於ける培養2日目の歯齦アメーバのグラム染色状態。
 附図2 カルノワ固定法に於ける培養2日目の歯齦アメーバのグラム染色状態。虫体内に双球状となつている *M. epidermidis* の存在が明瞭に認められる。
 附図3 カルノワ固定法に於ける培養4日目の歯齦アメーバの染色状態。
 附図4 カルノワ固定法に於ける培養6日目の歯齦アメーバの染色状態。