

アメーバ(*Amoeba proteus*)細胞質の寄生性封入体の研究(I)

八 島 洋 一*

(受付 2004年11月15日)

A Study of Parasitic Cytoplasmic Inclusion Bodies in *Amoeba proteus* (I)

Yoichi Yashima

Summary

A parasite of the cytoplasm of *Amoeba proteus* (stock IWT03) was observed as live specimens, stained specimens and ultra-thin sectioned preparations, using light and transmission electron microscopes, and its morphology and life cycle were examined.

The results showed that four stages in the life cycle of the parasite could be distinguished as follows: 1) Ameboid cell (4 μ m in length) not surrounded by a boundary membrane such as a food vacuole membrane; 2) Many small ameboid cells (1 μ m in length) formed by fission within the boundary membrane, with spore wall formation yet to begin; 3) Small ameboid cells take a spherical shape within the boundary membrane; 4) Mature spores are formed in the cyst. One nucleus, several mitochondria and vacuoles, and spore wall are present in a spore. The number of spores in a cyst varied from four to approximately thirty.

As compared with the life cycle of the microsporidian parasite *Steinhausia mytilovum* of *Mytilus galloprovincialis*, a large number of parasite cysts were present in the cytoplasm of *Amoeba proteus*, the tube structures protruding from several parts of the spore wall and a few mitochondria could be observed.

はじめに

筆者らは同じ池から採集したアメーバ(*Amoeba proteus*)の二つの株(stock IWT01とIWT03)にミドリゾウリムシ由来のクロレラを感染させ、その増殖に及ぼす影響について調べ、stock IWT01については昨年報告した(八島ほか2003)。この際、stock IWT01ではクロレラ

は保持されたが、もう一つの株であるstock IWT03ではクロレラが消化されて細胞質に保持されなかった。後者では、原形質流動によって移動する消化途中のクロレラを含んだ食胞の間に、多数の細胞内封入体が観察された。

アメーバの封入体としては、細胞質に普通に見られる細菌や共生関係になっている細菌

* 岩手医科大学 教養部 生物学

* Department of Biology, School of Liberal Arts and Sciences, Iwate Medical University

(Jeon 1972) とクロレラ (Patterson 1996) が知られている。また、寄生性の封入体として小型のアメーバ (Wolska 1949, Leiner and Wohlfell 1954) やミドリムシ (Fox 1946) などの例も知られている。stock IWT03で観察された封入体は、これらの封入体とは構造が異なり、イガイの卵巣の卵細胞などに寄生する微孢子虫類の1種と類似していた。

微孢子虫門は700種近くが記載されており、その宿主は多くの分類群の動物にまたがるが、アメーバの例は知られていない。また、この仲間の生活環は栄養生殖期、孢子形成期および孢子期に分けられることが知られている (猪木1981) が、超微形態学的な研究の報告は少ない。

そこで、今回は stock IWA03で見つけた寄生性封入体を光学顕微鏡と電子顕微鏡を用いて調べ、その生活環について報告する。

材料と方法

材料のアメーバ (*Amoeba proteus*) は2003年の10月に盛岡市にある岩手公園の池から、その餌生物としてのミドリゾウリムシ (*Paramecium bursaria*) は2001年10月に同じく榊山神社の池からそれぞれ採集した。

1) アメーバのクローン作製と予備培養

採集したアメーバ1個体を1 mlのKCM生理的塩類溶液 (石井1999, 以下KCMと略す) が入ったデプレッションスライドガラスに単離し、ミドリゾウリムシを餌として室内で培養を行い、クローンを作製した。これを継代培養し、観察用に用いた。

2) 標本の作製

スライドガラスに約2 cm角に切った黒色のビニールテープをはり、中央の部分約1 cm角を切りぬいたものを用意した。そこにKCMをパスツールピペットで数滴滴下し、飢餓状態にある食胞の少ないアメーバ細胞を数個体移して静かにカバーガラスをかけ、生体標本作製した。また、細胞外に出した封入体を位相差顕微鏡で

観察するため、生体標本のカバーガラスをピンセットで軽く押しつぶし細胞を壊し、押しつぶし標本作製した。さらに、細胞数個体は脱脂綿の繊維を枕にして酢酸カーミンによる固定染色標本とし、光学顕微鏡で観察した。

樹脂包埋による切片標本は、常法に従って作製した。アメーバを0.05Mリン酸緩衝液 (pH7.4) で緩衝した2.5%グルタルアルデヒドにより室温で1時間前固定を行った後、同じ緩衝液で数回洗浄した。その後1%オスミウム酸により4℃で1時間後固定を行い、上昇エタノール系列で脱水し、プロピレンオキサイドを通してエポキシ樹脂 (Epok 812 Oken) に包埋し、60℃で2日間重合を行った。これから超ミクロトームで0.5 μ mの厚切切片を作製し、トルイジンブルーで染色して光学顕微鏡で観察した。また、0.05 μ mの超薄切片は酢酸ウランとクエン酸鉛により電子染色し、透過型電子顕微鏡 (日立H-7100) で観察した。

結果

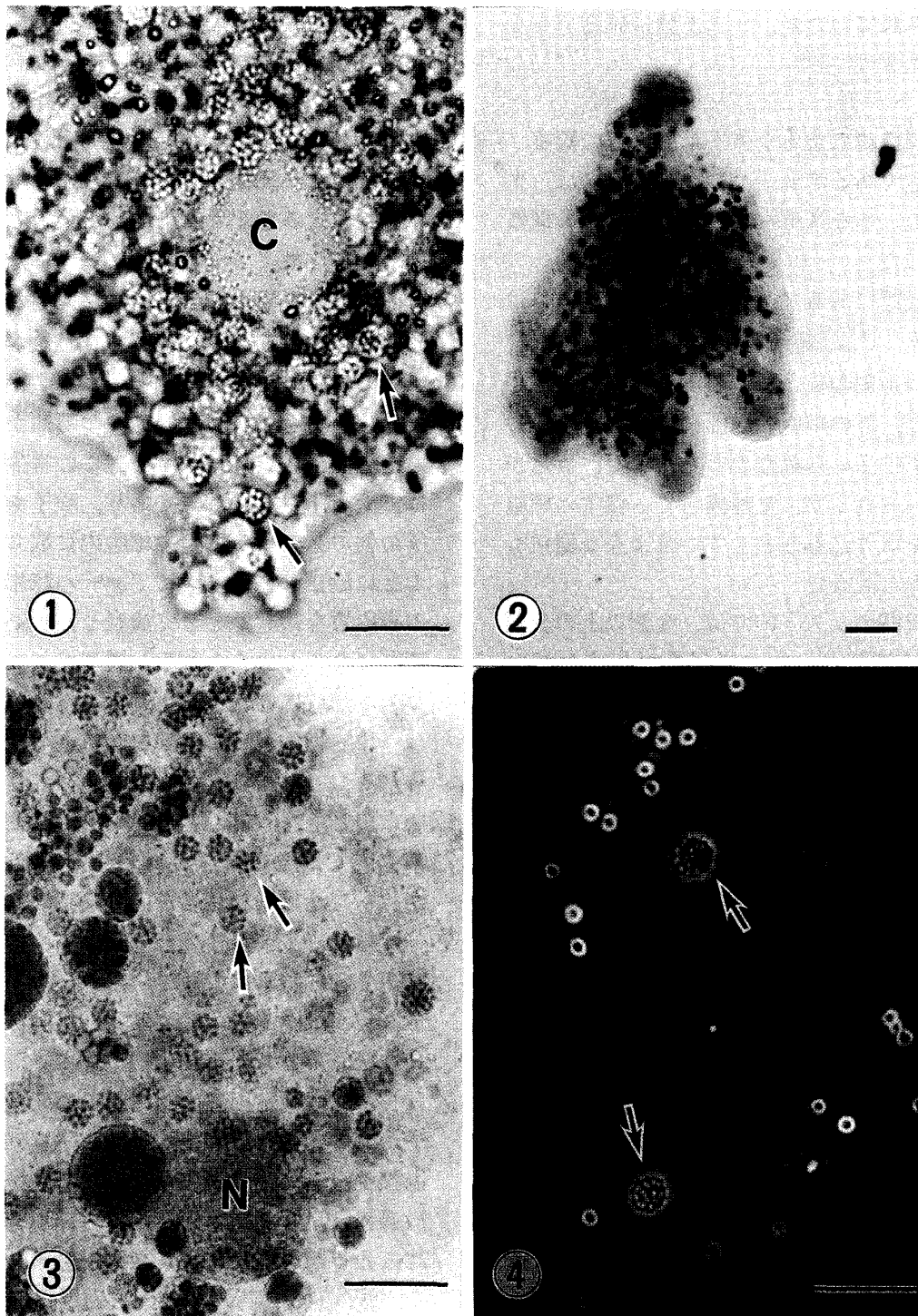
1) 光学顕微鏡による観察

アメーバの生体細胞内質に多数観察される封入体の大部分は、寄生体のシストであることがわかった (図1)。シストの直径は5~10 μ mで、内部には4~30個程度の胞子が見られたが、シスト壁の存在は不明瞭であった。これらの胞子の直径は1 μ m程度で、各胞子からは細長い柄のような繊維状構造が伸びているように見えた。

押しつぶし標本を位相差顕微鏡で観察すると、細胞から出たシストの大部分は壊れていたが、構造が保たれているシストでは胞子の集合状態が明確に見えた (図4)。

アメーバ細胞を酢酸カーミンで染色して観察すると、低倍率では細胞内に赤く染色された直径5~10 μ mのシストが多数見られた (図2)。高倍率では各シストが赤く染色される4個~30個程度の胞子 (矢印) から構成されていることが確認された (図3)。

この細胞の樹脂切片をトルイジンブルーで染色して観察すると、シストは濃紺に染まる胞子



- 図1. アメーバ生細胞後端部の光学顕微鏡写真。細胞質には多数の白色に見えるシスト (矢印) がある。シスト内の孢子数は4~30個程度で、これらの孢子は集合している。Cは収縮胞。スケールは25 μm 。
- 図2. 酢酸カーミンで固定染色したアメーバの光学顕微鏡写真。赤く染色されたシストが細胞質に多数存在する。スケールは50 μm 。
- 図3. 図2の拡大写真。赤いシスト (矢印) は4~30個程度の濃染される孢子から構成される。Nは宿主細胞の核。スケールは25 μm 。
- 図4. 壊れたアメーバ生細胞から外に出されたシスト (矢印) の位相差顕微鏡写真。シストは白い孢子の集団から構成される。スケールは25 μm 。

から構成されていたが、シスト壁は確認できなかった(図5)。

2) 電子顕微鏡によるシスト形成過程の観察

宿主細胞であるアメーバの細胞質内には、生活環のいろいろなステージにある寄生体の構造が観察された。

栄養増殖期にあるアメーバ状細胞(大きさは $4\mu\text{m}$ 程度)では、電子密度の高い細胞質内に、核膜をもつ1個の核と多くのミトコンドリアが観察された。この細胞の周囲には、食胞膜のような限界膜は認められなかった。また、仮足が食椀(フードカップ)を形成して、宿主の細胞質の一部を取り込もうとしているような構造も観察された(図6)。

胞子形成期のシスト内では、8個以上の分裂途中の多核細胞が一枚の限界膜で包まれていた。細胞の1個の大きさは $1\mu\text{m}$ 前後で、細胞内に1個の核、数個のミトコンドリアと空胞が見られた。限界膜には、小型アメーバ状細胞の細胞質の一部が接着して残っているように観察された。この時期には、胞子壁は認められなかった(図7)。

更に発生が進むと、小型アメーバ状細胞は丸くなっていた。外側には薄い2層の胞子壁が形成され、外壁の数箇所から突出した管状構造が観察された。管状構造は電子密度が高く、細胞内には核が1個、ミトコンドリアと空胞が観察された(図8)。

成熟したシストは球形を呈し、各胞子の細胞内には核やミトコンドリアが認められ、胞子間には隙間が生じていた。胞子の外壁は電子密度の高い2層からなり、細胞膜に密着しているように観察された。胞子間には管状構造が数本束になっている横断面が見えた(図9)。2層をあわせた胞子壁の厚さは $0.01\mu\text{m}$ で、管状構造の壁の厚さは $0.02\mu\text{m}$ であった。球形のシストから管状構造への移行部はテーパ型をしており、起始部の径は $0.2\mu\text{m}$ で管の直径は $0.02\sim 0.04\mu\text{m}$ であった(図10)。

考 察

電子顕微鏡観察では、アメーバ細胞内に寄生体の4つの時期が区別された。(1) $4\mu\text{m}$ 程度の大きさのアメーバ状細胞の時期、(2)限界膜で包まれた4~30個程度に分裂中の小型アメーバ状細胞(大きさ $1\mu\text{m}$ 程度)が集合している時期、(3)小型アメーバ状細胞が球形になって、その周囲に2層からなる密着した胞子壁が形成され始めた時期、(4)成熟した胞子ができ、胞子壁の外壁の複数箇所から突き出した管状構造が見られる時期。上記の4つの時期から寄生体とその生活環を推定すると、この寄生性封入体は、微孢子虫類に近縁であり、胞子あるいは、その他のステージで宿主細胞内に取り込まれることに始まり、その後にアメーバ状細胞が宿主の細胞質を栄養源として成長し、上記の(1)の時期になると考えられる。観察された時期からシスト形成にいたる発生過程を推測するとその後、(2)(3)(4)の時期を順に進行すると考えられる。

このとき、上記(1)のアメーバ状細胞が宿主細胞内で二分裂により細胞数を増加させるのか、もしくは増加させないのかによって二つに分けられる。前者の場合はアメーバ細胞内へ取り込まれる胞子は少数ですむが、後者の場合はアメーバ細胞内へ一度に取り込まれる胞子は、大量になると考えられる。

しかし、宿主細胞内への胞子の取り込み、胞子からアメーバ状細胞、アメーバ状細胞の成長過程や胞子の細胞質内もしくは培養液中への分散過程は、まだ観察が行われていない。今後これらの時期の観察を行う必要があると考えられる。

アメーバ細胞質内のシストと光学顕微鏡レベルで類似の構造をもつ寄生体(*Chytridiopsis mytilovum*)は、軟体動物イガイの生殖腺の卵細胞の細胞質と核内に見られ、前述のようにこれは微孢子虫類の一種と同定されている(Sprague 1965, Sagrista et al. 1998)。この場合のシスト数は卵細胞あたり1個から数個であり、シストの大きさは $15\mu\text{m}$ から $20\mu\text{m}$ であった。また、

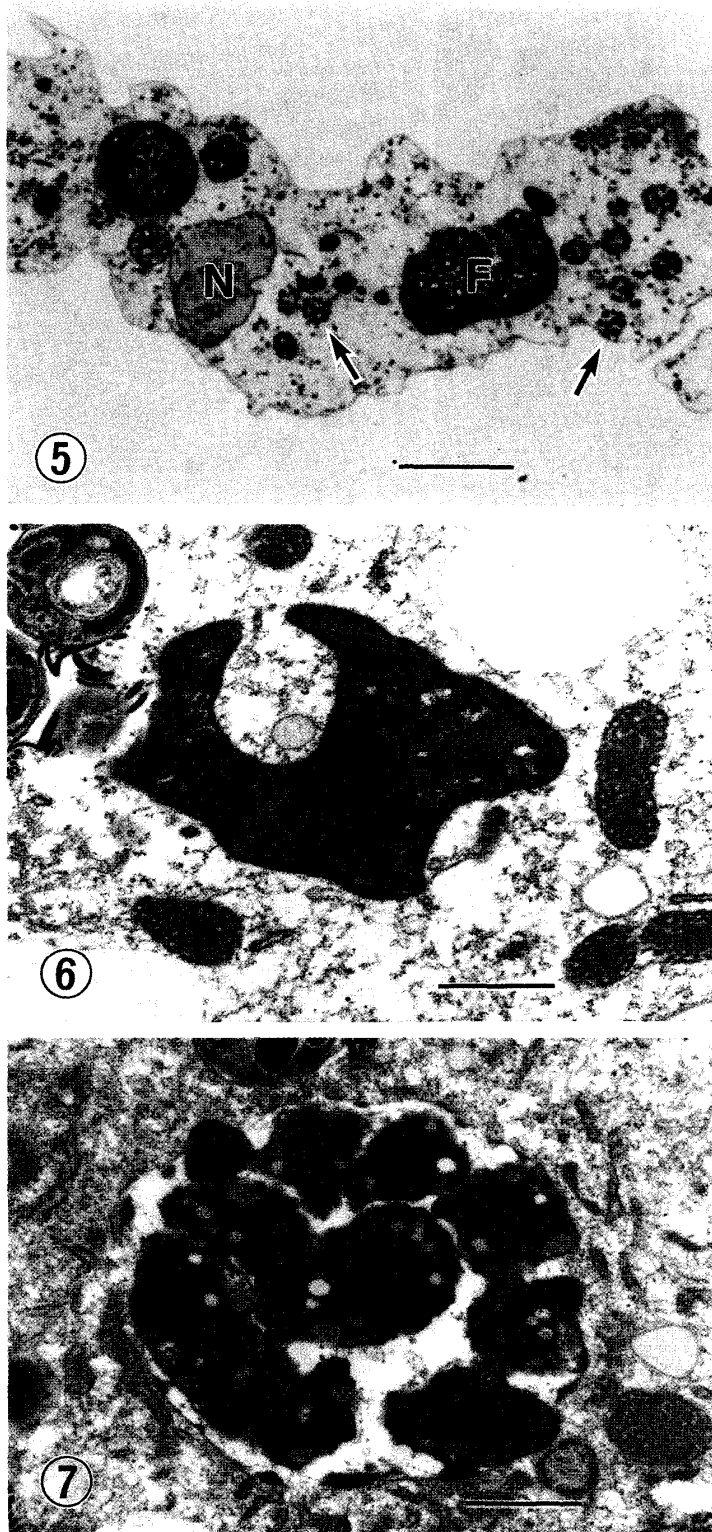
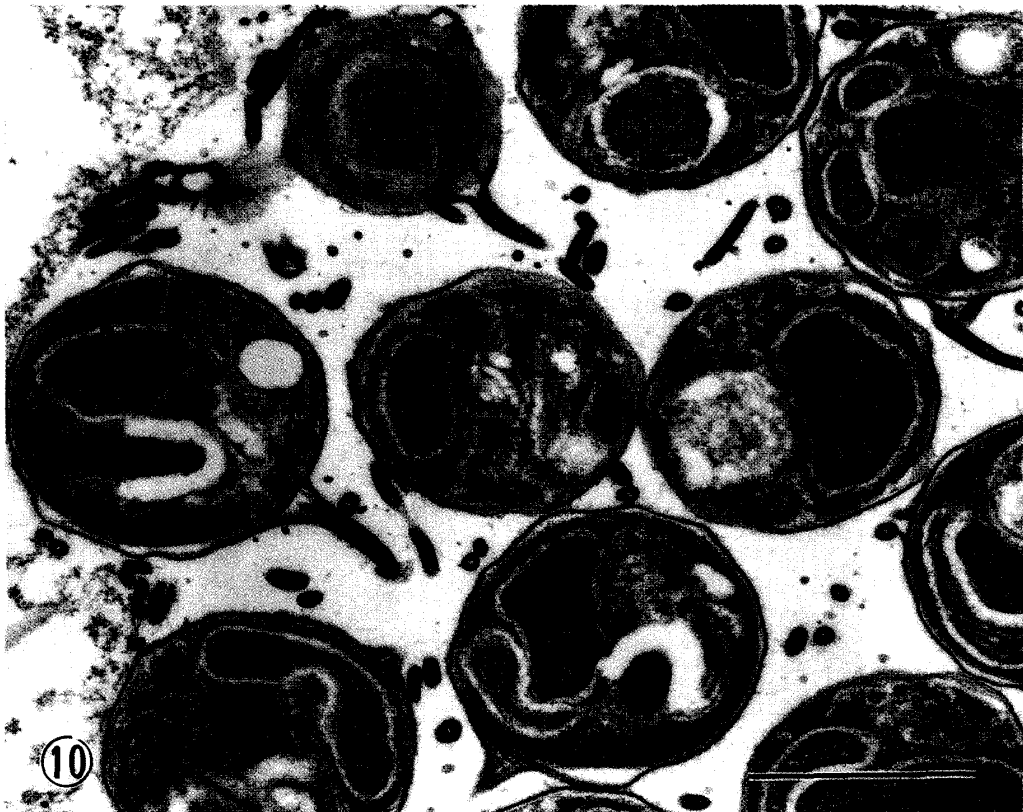
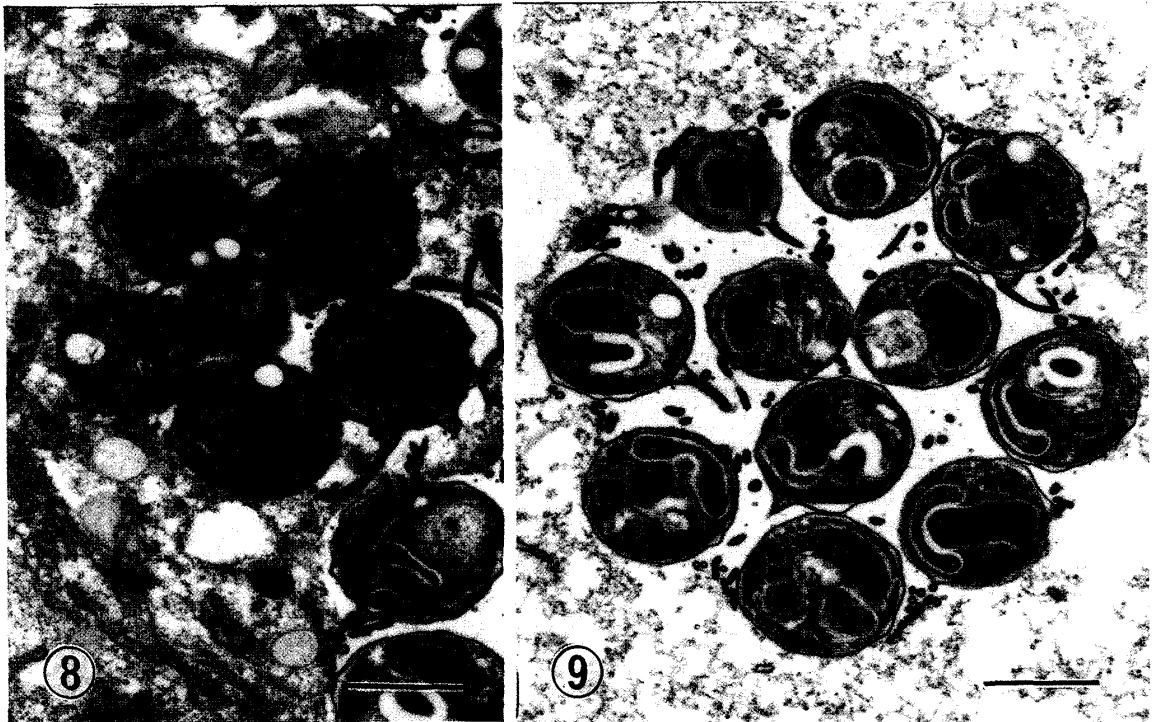


図5. トルイジンブルーで染色した厚切切片の光学顕微鏡写真. シスト(矢印)は濃紺に染色される孢子から構成される. シスト壁は確認できない. F:食胞, N:核. スケールは25 μm .

図6. 宿主細胞内に見られたアメーバ状細胞の電子顕微鏡写真. 食椀を形成している仮足が見られ, 細胞内には1個の核と数個のミトコンドリアが存在する. スケールは1 μm .

図7. 限界膜で包まれたシスト内に小型のアメーバ状細胞が10個見られる. 細胞間は一部で繋がっている. 核, ミトコンドリア, 空胞が存在する. スケールは1 μm .



- 図8. 小型アメーバ状細胞は球形になり、電子密度の低い孢子壁が形成されている。孢子壁の数箇所から管状構造が突き出ている。核、ミトコンドリア、空胞が見られる。
- 図9. 成熟したシスト。孢子壁は電子密度が高く、孢子の間には隙間ができる。核、ミトコンドリア、空胞が見られる。スケールは1 μm 。
- 図10. 図9の拡大電子顕微鏡写真。孢子壁は非常に薄い2層からなり、外層の数箇所から管状構造が突き出て伸びている。管状構造の横断面や縦断面が見られ、一部ではそれらが束になっている。スケールは1 μm 。

シスト内に32~64個の孢子(直径4 μm)が見られたが、アメーバ状細胞の時期は確認されなかった。しかし、Field (1924) は同種においてアメーバ状細胞を確認し、スケッチに残している。

これに対し、本種の寄生体のシストの大きさは5~10 μm であり、多数のシストが細胞質内に見られ、孢子の大きさは直径が1 μm と小さく、シスト内のその数は4~30個程度と少なかった。孢子には孢子壁が見られ、その外層の部分から管状構造が複数認められた。

両者を比較すると最も大きな違いは、宿主細胞あたりのシスト数と栄養体の数であった。

このことはアメーバでは寄生体の増殖が細胞質内で繰り返されるのか、または確認されていないが、培養液中に放出された孢子を多量に取り込むことによるものかのどちらかが原因であると推定される。

また、一般に微孢子虫類の細胞質にはミトコンドリアが見られないが、アメーバの寄生体にはミトコンドリアが存在し、大変興味深い。しかし、孢子の細胞内に極管や極帽という突出器官の存在することが微孢子虫類の特徴となっている(猪木1981)。今回観察した寄生体の孢子にもこれらと同様な構造が見られるので、本種は微孢子虫類に属するものと考えられる。

微孢子虫類は農水産業の動物として経済的に重要な昆虫類、甲殻類、魚類の病原体として知られている。これらの予防や治療のためには、微孢子虫類の宿主への感染のしくみ、生活環や薬品抵抗性などの基礎的研究が必要であろう。このような目的には、本研究で対象としたアメーバ—寄生体封入体の系が培養と実験の解析が容易なモデル系として有効であると考えられる。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、御校閲をいただきました本教室の菊池進教授、松政正俊助教授、図版を作成していただいた技術員伊藤京子さんに感謝致します。また、画像処理に御助言と御指導をいただいた本学バイオイメージングセン

ターの専門技術員大坪啓則氏にも厚くお礼を申し上げます。

参考文献

- 石井圭一著、堀上英紀・木原章編(1999) アメーバ図鑑。金原出版
- 猪木正三監修(1981) 原生動物図鑑。講談社
- Field I. A. (1924) Biology and economic value of the sea mussel *Mytilus edulis*. Bull. U. S. Bureau Fish. 1921-2 38: 127-259
- Fox K. (1946) A possible endo-parasite of *Amoeba proteus*. Micro Notes 2: 3-6
- Jeon K. W. (1972) Development of cellular dependence in infective organisms: microsurgical studies in amoeba. Science 176: 1122-1123
- Leiner M. and Wohlfell M. (1954) Das symbiontische bacterium in *Pelomyxa palustris* Greeff. III. Zeitschrift für Morphologie und Ökologie der Tiere, Berlin 42: 529-549
- Patterson D. J. (1996) Free-Living freshwater protozoa. Manson Publishing
- Sagrista E., Bozzo M. G., Bigas M., Poquet M. and Durfort M. (1998) Developmental cycle and ultrastructure of *Steinhausia mytilovum*, a microsporidian parasite of oocytes of the mussel, *Mytilus galloprovincialis* (Mollusca, Bivalvia). Europ. J. Protistol. 34: 58-68
- Sprague V. (1965) Observation on Chytridiopsis mytilovum (Field), formerly Haplosporidium mytilovum Field, (Microsporida?). J. Protozool. 12: 385-389
- 八島洋一・松政正俊・菊池進(2003) ミドリゾウリムシ由来クロレラのアメーバ細胞質への感染とその宿主細胞の増殖に及ぼす影響。岩手医科大学教養部研究年報。37: 45-55
- Wolska J. (1949) The small amoebas in the plasm of *amoeba proteus* Pall. Annales Universitatis Mariae Curie-Sklodowska, Lublin : 4C 137-147

要 約

細胞内に見られた寄生体を生体標本，染色標本および樹脂切片標本として光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察し，その形態と生活環を調べた。その結果 (1) アメーバ状細胞の時期，(2) 多分裂により生じた多数の小型アメーバ状細胞の時期，(3) 小型アメーバ状細胞が球状化を始め，胞子壁が形成される時期，(4) 胞子形成が完了した時期が区別された。胞子には1個の核，複

数のミトコンドリアと空胞および胞子壁が観察された。シスト1個あたりの胞子数は4～30個程度であった。

イガイに寄生する微孢子虫類の *Steinhausia mytilovum* と生活環について形態的に比較したところ，シスト数と胞子壁の数箇所から突出してできた管状構造や，ミトコンドリアの有無に違いが見られた。