原 著

歯肉アメーバに関する臨床病理学および細胞学的検討

日本大学松戸歯学部病理学講座¹⁾, 同 検査室²⁾, 株式会社サンリツ病理事業部³⁾, 千葉西総合病院検査科病理⁴⁾

岡田 裕之¹⁾ 松本 敬²⁾ 森川 美雪¹⁾ 中平 隆志³⁾

大村 光浩⁴⁾ 山本 浩嗣¹⁾

目的および方法：歯肉アメーバはミトコンドリアを持たない真核生物の代表であるアメーバ類に属し、絶対嫌気的環境で寄生する。歯肉アメーバ症 28 例を、臨床病理学および微細構造を含め細胞学的に検討した。

結果：アメーバ虫体は小型染色中心を伴う核と、ライトグリーン淡染性、PAS 陽性の細顆粒状の胞体を有しており、Giemsa 染色では濃青色の細胞境界の明瞭な外質が認められた。また、虫体は食胞を有し、白血球を貪食する栄養型として存在していた。虫体は放線菌に随伴して認められることが多かった。

画像解析において、虫体の最大径は $9.3\sim 37.5\ \mu\text{m}$ (平均 $18.2\pm 5.0\ \mu\text{m}$)、面積が $51.0\sim 360.1\ \mu\text{m}^2$ (平均 $175.6\pm 68.3\ \mu\text{m}^2$) であった。

微細構造学的に、虫体における胞体の外質と内質が明瞭に区別され、外質が細胞小器官に乏しく突起を有していた。内質にはグリコーゲン顆粒と種々の大きさの食胞が多数みられ、食胞内には変性した細胞などが観察された。

結論：歯肉アメーバ症 28 例を臨床統計的にみると、60 歳代と 50 歳代に出現することが多く、それらが過半数を占め、放線菌と共存していた。細胞学および微細構造学的検索では、歯肉アメーバは食胞を有し、白血球を貪食しており、栄養型として観察された。

Key words : *Entamoeba gingivalis* — Oral smear — Cytology — Ultrastructure

I. 緒 言

Clinicopathological and cytological study of *Entamoeba gingivalis*

Hiroyuki OKADA¹⁾, D.D.S., Takashi MATSUMOTO²⁾, C.T., I.A.C., Miyuki MORIKAWA¹⁾, M.T., Takayuki NAKAHIRA³⁾, C.T., I.A.C., Mitsuhiro OHMURA⁴⁾, M.D., Hirotsugu YAMAMOTO¹⁾, D.D.S.

¹⁾Department of Pathology, ²⁾ Department of Clinical Laboratory, Nihon University School of Dentistry at Matsudo

³⁾Department of Pathology, SANRITSU Co. Ltd.

⁴⁾Department of Pathology, Chiba West General Hospital

論文別刷請求先 〒 271-8587 千葉県松戸市栄町西 2 の 870 の
1 日本大学松戸歯学部病理学講座 岡田裕之

平成 14 年 1 月 21 日受付

平成 14 年 6 月 21 日受理

口腔内には多くの常在菌が存在し、これらは口腔内環境の変化などにより、種々の病態を引き起こすことが知られている。それらの中で、歯肉アメーバ (*Entamoeba gingivalis*) は、赤痢アメーバ (*Entamoeba histolytica*) や大腸アメーバ (*Entamoeba coli*) などとともに、ミトコンドリアを欠く真核生物の代表であるアメーバ (根足虫: Rhizopoda) 類に属する原虫で、絶対嫌気的環境で寄生する¹⁾。また、歯肉アメーバは、口腔衛生状態が良好なヒトにも観察されうるが、主に残根菌を有する患者や歯周病患者の歯周ポケットに寄生するといわれている²⁾。しかしながら、それらに関

する詳細な形態学的研究は少なく、病態像や細胞像などの詳細に関しては不明な点が多い。

今回われわれは菌肉アメーバ症例に関し、臨床病理学および微細構造を含め細胞学的に検討し、若干の知見を得たので報告する。

II. 材料および方法

1. 材料

日本大学松戸歯学部付属歯科病院にて、1998年1月より2001年10月末までに、口腔粘膜から擦過細胞診を行った1,258例において、菌肉アメーバを観察し得た28例を用いた。なお、全てが菌周ポケットからの検体ではないことを付記する。

各症例の年齢、性、採取部位など臨床事項を Table 1 に示す。

2. 方法

1) 細胞学的検索

通法に従い、Papanicolaou (Pap), Giemsa, periodic acid-Schiff (PAS), Grocott および Gram 染色を行った。

2) 画像解析 (最大径および面積の計測)

これらの標本をもとに、画像解析ソフト (Win ROOF, Mitani Co.) を使用した。光学顕微鏡対物レンズ 40 倍にて、各症例に対して無作為に 3~4 個の虫体を抽出し、全症例で 100 個について最大径および面積を計測した。

3) 電顕的検索

3 例における 2 回目の細胞診施行時に、擦過したサイトブラシを 0.01M リン酸緩衝食塩水 (pH 7.2) の入った試験管内で洗浄した後、遠沈 (1,200rpm, 5 分) した。上清を捨て、残存した細胞を 2% グルタルアルデヒド液と 1% オスミウム液にて二重固定した。

Table 1 Clinical data and cytological findings

Case No.	Age (yrs.)	Gender	Location	Clinical diagnosis	Microbe
1	29	Male	Gingiva	Ulcer	Ameba
2	50	Male	Gingiva	Lichen planus	Ameba
3	25	Male	Buccal mucosa	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
4	30	Male	Gingiva	SCC	Ameba + Actinomyces
5	50	Male	Gingiva	Erosion	Ameba + Actinomyces
6	54	Male	Gingiva	SCC	Ameba + Actinomyces
7	60	Male	Gingiva	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
8	60	Male	Gingiva	Leukoplakia	Ameba + Actinomyces
9	62	Male	Maxillary sinus	Carcinoma	Ameba + Actinomyces
10	62	Male	Palate	Leukoplakia	Ameba + Actinomyces
11	63	Male	Palate	Carcinoma	Ameba + Actinomyces
12	67	Male	Gingiva	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
13	80	Male	Gingiva	SCC	Ameba + Actinomyces
14	30	Female	Gingiva	Pregnancy tumor	Ameba
15	71	Female	Buccal mucosa	Erosion	Ameba
16	28	Female	Mouth floor	Ulcer	Ameba + Actinomyces
17	40	Female	Gingiva	Carcinoma	Ameba + Actinomyces
18	50	Female	Palate	SCC	Ameba + Actinomyces
19	54	Female	Palate, Buccal mucosa	Lichen planus	Ameba + Actinomyces
20	56	Female	Gingiva	Erosion	Ameba + Actinomyces
21	57	Female	Gingiva	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
22	60	Female	Gingiva	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
23	60	Female	Gingiva	Erosion	Ameba + Actinomyces
24	60	Female	Pharynx	Erosion	Ameba + Actinomyces
25	64	Female	Gingiva	Erosion	Ameba + Actinomyces
26	66	Female	Gingiva	Lichen planus	Ameba + Actinomyces
27	70	Female	Gingiva	Malignant tumor	Ameba + Actinomyces
28	72	Female	Gingiva	Hyperemia	Ameba + Actinomyces

Note : The cytological diagnosis was Class II in all cases but cases 15 and 18, which were Class V.

後、ゼラチンにて包埋して、試料とした。試料を細切後、通法に従い、エポキシ樹脂 (Quetol 812) に包埋し、超薄切片を作成後、酢酸ウラン・クエン酸鉛の二重染色を施し、透過型電子顕微鏡 (JEM-1010, 日本電子) にて観察した。

III. 結 果

1. 細胞学的検索

本感染症において、アメーバ虫体は炎症性背景および多数の連鎖球菌や桿菌とともに、一部集塊をなす小桿菌の内部や周辺に散在性に観察されることが多かった (Photo. 1)。虫体は類円形で、小型円形細胞の2~3倍、表層扁平上皮細胞の1/2倍程度の直径を有するものが多く (Photo. 2~5)、染色中心を伴う1個の核と、ライトグリーン淡染性でPAS陽性を呈する細顆粒状の胞体を有していた (Photo. 2, 3)。PapおよびPAS染色において、細胞外縁部は淡明に染まり、やや境界不明瞭であったが (Photo. 2, 3)、Giemsa染色では濃青色を呈し、内質と外質とが明瞭に観察された (Photo. 4)。さらに、虫体は内質に多くの食胞を有し、ヘマトキシリンに好染する類円形ないし分葉状核を有する白血球を包蔵しており、栄養型として観察された (Photo. 2~5)。

小桿菌集塊の出現形態は放射線状または不規則に突起を出すものが多く、その中心部が線状で、その線状より小桿菌が左右に配列していた。これらはPASおよびGrocott染色に陽性を示し、放線菌に特徴的なシグダ状配列 (Photo. 3) や硫黄様顆粒を呈するものも観察された。

同時に出現している口腔扁平上皮細胞には核腫大、大小不同、軽度クロマチン増量、核形不整、核崩壊および核周囲明庭、細胞質空胞化が観察され、オレンジG~ライトグリーン好染性を示した (Photo. 1)。

2. 画像解析

虫体の最大径は $9.3\sim 37.5\ \mu\text{m}$ の範囲にみられ、それらの平均が $18.2\pm 5.0\ \mu\text{m}$ であった。また、面積は $51.0\sim 360.1\ \mu\text{m}^2$ で、それらの平均が $175.6\pm 68.3\ \mu\text{m}^2$ であった。

3. 電顕的検索

虫体は1個の小型核と豊かな胞体を有していた (Photo. 6)。核は類円形で、均一なクロマチンの分布をとっていた。胞体において外質と内質が明瞭に区別され、外質の表面は凹凸不正で多数の突起 (偽足)

が観察されるものもあり、外質中には細胞内小器官がほとんど認められなかった (Photo. 6, 7)。内質には高電子密度の顆粒状物質と種々の大きさの食胞が多数みられ、食胞内には核を伴う変性した細胞および絮状物質が観察された (Photo. 6, 7)。他の小器官は目立たず、粗面小胞体が散見される程度で、ミトコンドリアは認められなかった (Photo. 6, 7)。

IV. 考 察

生物は細胞内に核をもつ真核生物 (動物, 植物, 菌類, 原生生物) と、もたない原核生物 (真正細菌と古細菌) に大別される。真核生物は一般に酸素呼吸によるエネルギー生成器官であるミトコンドリアを有するが、アメーバ類はミトコンドリアを持たない真核生物で、真核生物の初期進化との関わりが注目されてきている¹⁾。ミトコンドリアをもたない菌肉アメーバは、グリコーゲンを多数有し、解糖系によりエネルギーを得て、絶対嫌気性環境で生育するため、口腔内では主に菌周ポケットに観察されるといわれている²⁾。また、そのような環境下にて菌肉アメーバが、食物残渣や細胞物質に対して清掃細胞の役割を有すると考えられている³⁾。

本研究に供した菌肉アメーバ症例28例を臨床統計的にみると、Table 1に示すとおり、28歳~80歳の患者に観察され、平均年齢は54.5歳 (男性53.2歳, 女性55.9歳) で、男女とも60歳代と50歳代が多く過半数 (18例, 64%) を占めていた。部位別では菌肉が19例 (男性: 9例, 女性10例)、口蓋4例 (1例は頬粘膜と合併)、頬粘膜3例 (1例は口蓋と合併) の順であった。臨床診断では、扁平上皮癌 (SCC) など悪性腫瘍を疑ったものが13例と最も多かった。しかし、その中の1例は細胞診にてClass V (病理診断にてSCC) とされたが、その他12例が細胞診にてClass IIと診断され、炎症性変化が認められるのみであった。次いで、びらんなど炎症性の病変と臨床診断されたものが10例あり、そのうち1例が細胞診にてClass V (病理診断にてSCC) とされ、その他9例はClass IIで炎症性変化が観察された。残り5例の臨床診断が白色病変で、細胞診にてClass II, 角化性および反応性変化が認められた。

これまでに口腔菌肉アメーバの検索は細胞像と出現頻度^{3,4)}、遺伝子解析⁵⁾に関するものが散見されるのみである。出現頻度について、残根菌や菌周病などの

Photo. 1 Cytological findings in oral smear : trophozoites of *Entamoeba gingivalis* (arrows) have small bacilli, inflammatory cells, and squamous epithelial cells (Pap, $\times 40$).

Photo. 2

Photo. 3

Photo. 4

Photo. 5

Photo. 2~5 The trophozoite has a small round nucleus with a central karyosome (arrow) and fine granular cytoplasm showing pale blue on Pap and positive reaction with PAS. Ectoplasm showing dark blue is distinguished from endoplasm in Giemsa staining. The trophozoite has some food vacuoles containing leukocytes, and is mostly observed with inflammatory cells, and Gram-positive streptococci and bacilli. Some bacilli form a fern-like structure, typical of *Actinomyces* in PAS (2 : Pap, 3 : PAS, 4 : Giemsa, 5 : Gram, $\times 100$).

Photo. 6

Photo. 7

The trophozoite has numerous glycogen granules and many food vacuoles containing amorphous materials and degenerated cells with nuclei in ectoplasm. Endoplasm has few organelles and many projections (6: $\times 5,000$, 7: $\times 10,000$).

歯科患者の59%に、口腔清掃状態良好者の32%に観察されたとの報告がある³⁾。これまでの研究では、歯肉アメーバが種々の状態において高頻度に出現するものが多い。また、歯周疾患や年齢との関係で、30歳代に出現率のピークを有するとの報告もある⁴⁾。しかし、本研究での出現率は2.2%であった。これは、本研究が歯周ポケットからではなく、主に粘膜病変に対する routine work による観察であるのに対し、これまでの報告が食塩水付きの綿棒による歯肉溝や歯周ポケットの全顎擦過や歯周ポケット内の歯垢や歯石採取などによる歯肉アメーバ検出に主眼をおいたものであり、採取方法の違いによるものと考ええる。また、本研究に供した28例において、多数の口腔内常在菌が認められるとともに、21例に小型円形細胞浸潤に代表される炎症性変化が観察され、また24例(86%)に放線菌との共生が認められた。この結果は、常在菌の増生により粘膜局所が歯肉アメーバの生育できる絶対嫌気性環境に変化するとともに、炎症時に現れる小型円形細胞、細菌や食物残渣が歯肉アメーバの栄養源

となり増生すると考える。さらには放線菌自体やそれに関連するなんらかの物質が歯肉アメーバの生育・増生に重要な役割を果たし、共生することが示唆された。

最近、子宮内(避妊)装置(intrauterine contraceptive device: IUD)使用者の生殖管に、高頻度で歯肉アメーバと放線菌が観察されたとの報告があり⁶⁻⁸⁾、女性の生殖管においても歯肉アメーバの存在かつ、放線菌との共生が示唆された。歯肉アメーバは一般にキスにより直接感染するといわれているが、このような症例においては、女性の男性性器に対するオーラルセックス後に、歯肉アメーバの付着した男性性器の挿入による性交感染によるものと考えられる。

これまでの光顕的な形態学的研究において、歯肉アメーバは嚢子を形成せず栄養型として存在し、大きさが $15\text{ }\mu\text{m}$ ⁹⁾、 $12\sim 30\text{ }\mu\text{m}$ ³⁾、 $10\sim 20\text{ }\mu\text{m}$ ²⁾であり、また、胞体にミトコンドリアがみられず、食胞を有し白血球および赤血球を貪食すると報告されている⁸⁾。本研究による光顕的な画像解析においても、歯肉アメーバの最大径は $9.3\sim 37.5\text{ }\mu\text{m}$ (平均 $18.2\pm 5.0\text{ }\mu\text{m}$)で

あった。電顕的にも 10~20 μm 程度のものが多く、胞体内にミトコンドリアはなく、多数のグリコーゲン顆粒と食胞が認められ、食胞内には核を有する白血球と思われる細胞が観察され、光顕の所見が裏付けられた。

また、形態学的に歯肉アメーバは赤痢アメーバの栄養型と類似しているが、前者が白血球および赤血球を貪食するのに対して、後者は赤血球のみを包蔵すると考えられている^{10,11)}。本研究の光顕的および電顕的検索は、歯肉アメーバが白血球を貪食するとの結果を裏付けた。

謝辞：本研究の一部は学術フロンティア推進事業および日本大学松戸歯学部鈴木研究費（一般研究 01-1005）による。

Abstract

Objective : *Entamoeba gingivalis* belongs to the *Entamoeba*, the representative eukaryote without mitochondria, and is absolutely parasitic in an anaerobic environment. We studied the cytology characteristics with the ultrastructure of *Entamoeba gingivalis* and discuss clinicostatistical features.

Study design : Subjects were oral smear from 28 cases in which *Entamoeba gingivalis* was observed.

Results : *Entamoeba gingivalis* had a small round nucleus with a central karyosome and fine granular cytoplasm. Granules showed pale blue in Papanicolaou staining and reacted positively with PAS staining. In Giemsa staining, the dark blue ectoplasm was clearly distinguished from endoplasm. *Entamoeba* had some food vacuoles containing erythrocytes and leukocytes, and was mostly associated with *Actinomyces*. In cytomorphometry, *Entamoeba* ranged from 9.3 to 37.5 μm (average : $8.2 \pm 5.0 \mu\text{m}$) in diameter, and 51.0 to 360.1 μm^2 (average : $175.6 \pm 68.3 \mu\text{m}^2$) in area. Ultrastructurally, endoplasm and ectoplasm could be clearly differentiated. Endoplasm had few organelles and many projections, and ectoplasm had numerous glycogen granules and many food vacuoles varying in size and some containing amorphous materials and degenerated cells with a nucleus.

Conclusion : In 28 cases of *Entamoeba gingivalis*, over half

(18 cases, 64%) were from patients in their 50s and 60s, and most (24 cases, 86%) were associated with *Actinomyces*. *Entamoeba* $8.2 \pm 5.0 \mu\text{m}$ in diameter had food vacuoles with erythrocytes and leukocytes.

文 献

- 1) 橋本哲男, 中村嘉宏, 長谷川政美. ミトコンドリアをもたない原生生物の系統的な位置づけ：真核生物の初期進化との関わり, 細胞工学 1995 ; 14 : 1024~1030.
- 2) 高橋優三. 基本人体寄生虫学 (第3版). 東京：医歯薬出版, 2000 : 70~75.
- 3) Dao, A.H., Robinson, D.P., Wong, S.W. Frequency of *Entamoeba gingivalis* in human gingival scrapings. Am. J. Clin. Pathol. 1983 ; 80 : 380~383.
- 4) Wantland, W.W., Wantland, E.M. Incidence, ecology and reproduction of oral protozoa, J. Dent. Res. 1960 ; 39 : 863.
- 5) Yamamoto, A., Kikuta, N., Hashimoto, T., Oyaizu, H., Goto, N. Nucleotide sequence of the SrRNA gene of *Entamoeba gingivalis* : Applications for construction of a species-specific DNA probe and phylogenetic analysis. Microbiol. Immunol. 1995 ; 39 : 185~192.
- 6) deMoraes-Ruehsen, M., McNeill, R.E., Frost, J.K., Gupta, P.K., Diamond, L.S., Honigberg, B.M. Amebae resembling *Entamoeba gingivalis* in the genital tracts of IUD users. Acta Cytol. 1980 ; 24 : 413~420.
- 7) 松尾裕也, 黒島 司, 野河孝充, 平岡仁司, 原田忠敏. 子宮内避妊器具使用者の膣スミアに見られた E アメーバの一例. 日本臨床細胞学会九州連合会雑誌 1986 ; 17 : 92~95.
- 8) Arroyo, G., Quinn, J.A. Jr. Association of amoebae and *Actinomyces* in an intrauterine contraceptive device user. Acta Cytol. 1989 ; 33 : 298~300.
- 9) 堤 寛. ミクロスポリジウム症, 肉孢子虫症, 歯肉アメーバ症. 病理と臨床 1998 ; 16 : 1456~1458.
- 10) Rachman, R., Rosenberg, M. Distinction between *Entamoeba gingivalis* and *Entamoeba histolytica*, revised. Acta Cytol. 1986 ; 30 : 82.
- 11) Dao, A.H. *Entamoeba gingivalis* in sputum smears. Acta Cytol. 1985 ; 29 : 632~633.