

豚の *Entamoeba* 属原虫感染による潰瘍性大腸炎

矢口裕司^{1)†} 松林 誠²⁾ 板橋知子³⁾ 藤井勇紀¹⁾ 小貫登輝夫⁴⁾
 笹井和美²⁾ 小林 勝⁵⁾ 芝原友幸⁵⁾

- 1) 茨城県県北家畜保健衛生所 (〒310-0002 水戸市中河内町 966-1)
- 2) 大阪府立大学大学院 生命環境科学研究科 (〒598-8531 泉佐野市りんくう往来北 1-58)
- 3) 宮城県仙台家畜保健衛生所 (〒983-0832 仙台市宮城野区安養寺 3-11-22)
- 4) 茨城県鹿行家畜保健衛生所 (〒311-1517 鉾田市鉾田 1367-3)
- 5) 国研農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 (〒305-0856 つくば市観音台 3-1-5)

(2016年2月12日受付・2016年4月4日受理)

要 約

削瘦が認められた83日齢の肥育豚2頭について、病性鑑定を実施した。2頭ともに潰瘍性大腸炎が広範囲に認められ、病変部組織には多数の *Entamoeba* 属原虫の栄養型が認められた。遺伝子解析の結果より、同原虫は *E. polecki* サブタイプ3であった。病理学、細菌学及びウイルス学的検索から、この原虫が病態発現に関与したことが示唆された。

—キーワード: *Entamoeba polecki*, 肥育豚, 潰瘍性大腸炎.

-----日獣会誌 69, 389~393 (2016)

人を含む哺乳類に寄生する *Entamoeba* 属原虫の多くは、生活環として、宿主体内で無性的に分裂、増殖をする栄養型と宿主体外の環境下に対し強い抵抗性を有するシスト(嚢子)の2つの形態をとる。*Entamoeba* 属原虫の分類は、成熟シスト内の核数により5つのグループ、つまり8核、4核、1核、シストの形成なし、そして核数が不明、に分けられている [1]。しかしながら、シストの核数や大きさなど、形態のみから種を鑑別することは困難な場合が多く、近年は遺伝子解析による同定が行われている [2, 3]。

Entamoeba 属原虫の中で最も病原性が高く、重要とされているのは、*E. histolytica* である。*E. histolytica* は、シストが経口摂取された後、小腸で脱シストした栄養型が大腸壁に侵入することにより、宿主に下痢や血便、そして場合により肝膿瘍を引き起こす [4]。本種は、人以外の動物にも寄生することが知られており、動物由来感染症としても重要である。

豚に寄生する *Entamoeba* 属原虫は、上述の *E. histolytica* に加えて、*E. suis*, *E. polecki* の3種が知られている。*E. histolytica* は、家畜の豚からの報告はないも

の、ミニブタでの感染実験で病態発現が確認されているため、豚は本種の保虫宿主として重要であることが示唆されている [5, 6]。*E. suis* は、豚に特異的に寄生すると考えられている。一方、*E. polecki* は人からも検出され、人獣共通に感染性を有する [7]。また、*E. polecki* は、近年、遺伝子型の解析により4つのサブタイプに分類されることが示されている。つまり、人からは全サブタイプが検出されているが [8]、人以外にも、サブタイプ1は豚、サブタイプ2はサル、サブタイプ3は豚とダチョウから検出されている [9]。

これまで、*E. suis* と *E. polecki* の病原性はない、または低いと考えられていた。しかし、近年、わが国において出血性大腸炎を呈する豚から *E. suis* が検出され、本原虫が潰瘍形成に関わる可能性が示唆された [2]。また、*E. polecki* は、*Lawsonia intracellularis* との混合感染により難治性の下痢症を引き起こし、病態が重篤化することが示唆されている [3]。しかし、これら *Entamoeba* 種の報告はきわめて限られており、その病原性を評価するためには、さらなる症例の蓄積が必要である。今回、潰瘍性大腸炎を示した豚から *Entamoeba* 様

† 連絡責任者: 矢口裕司 (茨城県県北家畜保健衛生所)

〒310-0002 水戸市中河内町 966-1

☎ 029-225-3241 FAX 029-224-6661

E-mail: y.yaguchi@pref.ibaraki.lg.jp

の虫体が観察された。そこで病因を特定するために、病理学、細菌学及びウイルス学的検索を実施し、そして検出された *Entamoeba* の種及びサブタイプの同定を試みたのでその概要を報告する。

材料及び方法

発生状況と材料：2015年8月中旬、母豚120頭を飼養する茨城県の一貫経営農場で、約60頭の肥育豚（約80日齢）のうち5頭が削瘦及び軟便を呈し、うち2頭が死亡した。8月下旬、さらに83日齢の肥育豚2頭（豚No. 1, 2）が削瘦及び軟便を示したため、原因を特定するために、この2頭を脳通電失神後に放血殺し、病性鑑定を実施した。

病理学的検査：剖検後に、肝臓、脾臓、腎臓、心臓、肺、腸管、脳及び体表リンパ節を採取した。各臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定し、定法に従いパラフィン包埋し、切片を作製した。各切片は、ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色を実施し、アメーバ様虫体が検出された結腸（豚No. 1, 2）について、ワーチンスターリー染色 [10] 及び過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を実施した。

豚No. 1及び2の結腸のパラフィン切片を用いて、抗 *Brachyspira hyodysenteriae* 家兎血清（動物衛生研究所、茨城）、抗 *L. intracellularis* マウスモノクローナル抗体（Bio-X Diagnostics, France）、及び抗 *Salmonella* O4 群兎血清（デンカ生研(株)、新潟）により、免疫組織化学的検査を実施した。

透過型電子顕微鏡検査：ホルマリン固定した豚No. 1及び2の結腸について、定法に従いオスミウム酸固定を行い、エポキシ樹脂による包埋、そして超薄切を実施し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色を行った。観察には、透過型電子顕微鏡（H-7500, (株)日立製作所、東京）を用いた。

遺伝子解析：ゲノムDNAの精製は、豚No. 1及び2の結腸内容物から QIAamp DNA Stool Mini Kit（Qiagen GmbH, Hilden, Germany）を用いて実施した。*Entamoeba* 種の同定は、既報のプライマーを用いて、PCR及びシーケンス解析により行った。つまり、*E. histolytica*, *E. suis*, そして *E. polecki* の SSU rRNA 遺伝子を特異的に増幅できるプライマー、それぞれ EhL-EhR [11], 764-RD3 と 764-765 (Nested PCR) [12], Epolec F6-R6 [13] を用いた。得られた増幅産物については、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した [2]。

細菌学的検査：剖検時に採取した豚No. 1及び2の各臓器及び腸内容物について、5%脱線維めん羊血液（(株)日本生物材料センター、東京）、加トリプトソイ寒天培地（日水製薬(株)、東京）、及び DHL 寒天培地（日水製

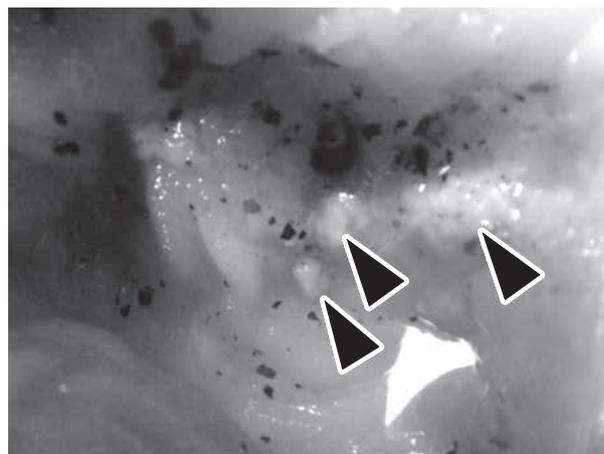


図1 豚No. 1の結腸粘膜の肉眼写真。潰瘍病変が散見される（矢印）

薬(株)、東京)を用いて、37℃ 48時間、好気培養及び嫌気培養を実施した。また、豚No. 1及び2の回腸と結腸の腸内容物については、*B. hyodysenteriae* 及び *L. intracellularis* の特異遺伝子を検出するPCR [14, 15] を実施した。

ウイルス学的検査：豚No. 1及び2の脳、扁桃、腎臓、脾臓及び副腎の10%乳剤を作製し、CPK細胞に接種することにより、ウイルスの分離を試みた。

成績

病理解剖検査：豚No. 1及び2は著しく削瘦し、いずれの結腸粘膜においても広範囲に潰瘍の形成が認められた（図1）。結腸内容物はいずれも泥状を呈していた。

病理組織学的検査：豚No. 1及び2の結腸では、固有層にまで及ぶ潰瘍形成が広範囲に認められ、その粘膜下組織は線維芽細胞の増生により肥厚し、表層には細胞退廃物を含む線維素の析出がみられた。同様の病変は豚No. 2の盲腸の一部でも認められた。この潰瘍部には、大きさが10～15µmのアメーバ様の虫体が多数認められた。これらの虫体は、潰瘍部の組織内に侵入しており、一部では、粘膜固有層内にも確認された。虫体はPAS陽性を示し、単核の不定形であり、細胞質に数個の空胞を有しており、*Entamoeba* 属原虫の栄養型と考えられた（図2）。シスト様の虫体は検出されなかった。また、潰瘍部表層にはバランチジウム、そして一部の陰窩腔にはトリコモナスが散見された。

結腸粘膜では、陰窩上皮の過形成が軽度に認められ、陰窩腔の軽度な拡張が観察された。その他の臓器には、病変は認められなかった。

ワーチンスターリー染色では、豚No. 1及び2の一部の結腸の拡張した陰窩腔内において、らせん菌がわずかに認められた。しかし、陰窩上皮細胞の細胞質内にはコンマ状菌は確認されなかった。

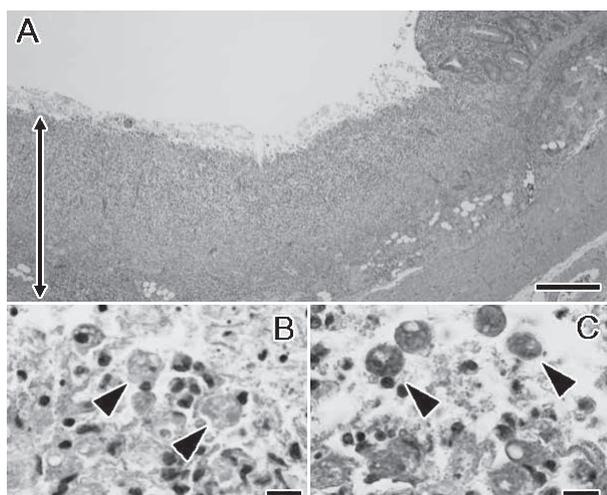


図2 豚 No. 2 の結腸の組織写真

- A: 広範囲に潰瘍性大腸炎を認め、粘膜下組織が肥厚している (矢印) (Bar=200 μ m)
- B: 潰瘍部の組織に侵入している *Entamoeba polecki* の栄養型 (矢印) (HE 染色 Bar=10 μ m)
- C: 同部位の PAS 染色. 栄養型は PAS 陽性を示した (Bar=10 μ m)

免疫組織化学的検査では、豚 No. 1 及び 2 の結腸陰窩腔内のらせん菌体は、抗 *B. hyodysenteriae* 家兔血清に対して陽性反応を示した。抗 *L. intracellularis* 及び抗 *Salmonella* O4 群血清に対する反応はみられなかった。

透過型電子顕微鏡検査: 栄養型虫体は細胞質内に1つの核を持ち、電子密度の高い細胞小器官、そして貪食胞が認められた (図3)。ミトコンドリアや貪食された赤血球は観察されなかった。

遺伝子解析: *Entamoeba* の遺伝子解析では、2頭ともに *E. polecki* の特異遺伝子が増幅され、その塩基配列は既報の *E. polecki* サブタイプ3 (Accession No. FR686386) のものと100%一致した。また、両検体ともに、わずかではあるが、電気泳動後、*E. suis* の特異遺伝子と考えられるバンドが認められ、その部分の塩基配列は既報の *E. suis* のもの (Accession No. DQ286372) と100%一致した。*E. histolytica* の特異遺伝子は増幅されなかった。

細菌学的検査: 細菌培養ではいずれの病原細菌は分離されなかった。また、*B. hyodysenteriae* を検出する PCR では、増幅産物は認められなかったが、*L. intracellularis* を検出する PCR では、特異遺伝子が増幅された。

ウイルス学的検査: ウイルスの検出については、CPK 細胞を2代まで継代を行ったが、CPE は認められず、ウイルスは分離されなかった。

考 察

消瘦し軟便を呈する肥育豚2頭の病理組織学的検索の結果、潰瘍形成は広範囲にわたり、同領域の粘膜下組織

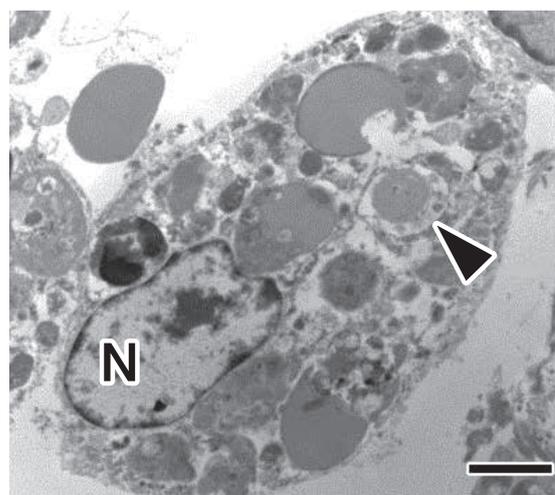


図3 *Entamoeba polecki* の栄養型の電子顕微鏡写真 (豚 No. 1)

- 細胞質内には、1つの核 (N)、貪食胞が観察された (矢印) (Bar=2 μ m)

は線維芽細胞の増生が著しく認められたことから、病態は慢性に経過したと考えられた。一般に、豚における潰瘍性大腸炎の原因としては、*B. hyodysenteriae*、*L. intracellularis*、サルモネラ属菌等が知られている。検索の結果、結腸の陰窩腔内にのみ少数ながららせん菌が認められ、免疫組織化学的検査で陽性反応を示したことから、このらせん菌は *Brachyspira* 属菌と考えられたが、PCR では *B. hyodysenteriae* の特異遺伝子の増幅産物は得られなかった。また、*L. intracellularis* の PCR では特異遺伝子の増幅が得られたが、結腸における免疫組織化学的検査では陽性反応は認められず、上皮内へのコマ状菌の侵入もみられなかった。これらのことから、*Brachyspira* 属菌と *L. intracellularis* の過去の感染は否定できないものの、本症例の潰瘍の直接的な原因ではないと考えられた。

潰瘍病変部には、多数の栄養型虫体が検出された。これまでの報告では、*E. histolytica* の栄養型は20~50 μ m、*E. polecki* では15~20 μ m、*E. suis* は10~15 μ m の大きさであるとされている [2, 16]。また、*E. histolytica* と *E. suis* の栄養型は赤血球を貪食していることが多く、後者はミトコンドリアを有することが示唆されており、*E. polecki* では細胞質内に空胞を有することが特徴とされている。今回、病変部において多数認められた虫体は、栄養型の大きさ及び細胞質内にミトコンドリアが観察されなかったこと、また空胞を多数有することから、形態的に *E. polecki* であることが推察された。

遺伝子解析により、豚 No. 1 及び 2 に寄生していた *Entamoeba* 種は、*E. polecki* サブタイプ3と *E. suis* であることが分かった。*E. polecki* サブタイプ3は人及び豚、ダチョウにおいて検出されており、本邦では2例目

の検出となる [13]. 1 例目の報告では, 豚の盲腸及び結腸の潰瘍部において多数の *E. polecki* サブタイプ 3 の栄養型の寄生が認められた. また, *L. intracellularis* は組織切片による免疫染色では陰性だったが, PCR 検査では検出された [13]. そのため, 潰瘍形成の主たる原因は, *E. polecki* サブタイプ 3 であると考察されている. われわれの解析でも, その知見と同様の結果であった. また, 組織学的検査及び電子顕微鏡による検索で, *E. suis* 様の栄養型が検出できなかったこと, また電気泳動後の増幅産物のバンドが明瞭ではなかったことから, *E. suis* はきわめて少数感染していたと推測された.

Entamoeba の栄養型は外界で長期間生存できず, 糞便検査により検出するためには, 保温した新鮮便を用いて迅速に検査を実施するなどの条件が必要となる. また, シストの検出は MGL (ホルマリン・エーテル) 法などが有効とされるが, 有症時にはシストは排泄されにくく, 検出は難しい. そのため, 本原虫の検出は病理組織学的な検索により, 栄養型が見出されることが多いと考えられる. しかし, 形態のみから種の同定を行うことは難しいのが実情である. これまでに, わが国では散発的に, 豚からアメーバ様虫体が検出されていた [17]. しかし, 重要種である *E. histolytica* が推測されたものの, 遺伝子解析による種の同定は行われていない. 豚に寄生する *E. suis* 及び *E. polecki* を検出するためには, 上述のいくつかの特異プライマーを用いて PCR を実施し, また *E. polecki* サブタイプの同定にはシークエンス解析を行う必要がある. これまでの過去の報告で, 腸管のパラフィン切片から DNA を精製し, PCR を実施することにより *Entamoeba* 種の同定が可能であることから [13], PCR による遺伝子型の解析は有用である.

今回の結果から, 潰瘍の形成に *E. polecki* が関与したと示唆されたが, *E. suis*, *Brachyspira* 属菌及び *L. intracellularis* 等の他の病原体との混合感染により重篤化した可能性も否定できない. 豚の *Entamoeba* の病原性を明らかにするためには, 今後, 詳細な遺伝子型の同定及び調査等により知見を蓄積していくことが望まれる.

稿を終えるにあたり, 指導, 助言をいただいた丹羽竜祐氏, 山口遼作氏, 暁波氏, 嶋田恵美技師に深謝する.

引用文献

- [1] Casagrandi O, Barbagallo P : Amebae, Veterinary Protozoology, Levine ND, 1st ed, 113-114, Iowa State University Press, Iowa (1985)
- [2] Matsubayashi M, Suzuta F, Terayama Y, Shimojo K, Yui T, Haritani M, Shibahara T : Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: implications for pathogenicity, Parasitol Res, 113, 3023-3028 (2014)
- [3] Matsubayashi M, Kanamori K, Sadahiro M, Tokoro M, Abe N, Haritani M, Shibahara T : First molecular identification of *Entamoeba polecki* in piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*, Parasitol Res, 114, 3069-3073 (2015)
- [4] 柳澤如樹 : 原虫疾患 赤痢アメーバ症, モダンメディア, 58, 237-245 (2012)
- [5] He GZ, Feng Y, Deng SX : Evaluation of the intestinal microbial diversity in miniature pig after orally infected with *Entamoeba histolytica*, Parasitol Res, 111, 939-941 (2012)
- [6] Schuster FL, Visvesvara GS : Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease, Vet Parasitol, 126, 91-120 (2004)
- [7] Desowitz RS, Barnish G : *Entamoeba polecki* and other intestinal protozoa in Papua New Guinea highland children, Ann Trop Med Parasitol, 80, 399-402 (1986)
- [8] Verweij JJ, Polderman AM, Clark CG : Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species, J Clin Microbiol, 39, 1644-1646 (2001)
- [9] Ponce Gordo Martinez F, Diaz RA, Herrera S : *Entamoeba struthionis* n.sp. (Sarcocystidophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*), Vet Parasitol, 119, 327-335 (2004)
- [10] Prophet EB, Mills B, Arrington JB, Sobin LH : Laboratory methods in histotechnology, American Registry of Pathology, Washington, 132-214 (1992)
- [11] Evangelopoulos A, Spanakos G, Patsoula E, Vakalis N, Legakis N : A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces, Ann Trop Med Parasitol, 94, 233-240 (2000)
- [12] Clark CG, Kaffashian F, Tawari B, Windsor JJ, Twigg-Flesner A, Davies-Morel MC, Blessmann J, Ebert F, Peschel B, Le Van A, Jackson CJ, Macfarlane L, Tannich E : New insights into the phylogeny of *Entamoeba* species provided by analysis of four new small-subunit rRNA genes, Int J Syst Evol Microbiol, 56, 2235-2239 (2006)
- [13] Matsubayashi M, Murakoshi N, Komatsu T, Tokoro M, Haritani M, Shibahara T : Genetic identification of *Entamoeba polecki* subtype 3 from pigs in Japan and characterisation of its pathogenic role in ulcerative colitis, Infect Genet Evol, 36, 8-14 (2015)
- [14] Tom La, Nyree DP, David JH : Development of a duplex PCR assay for detection of *Brachyspira hyodysenteriae* and *Brachyspira pilosicoli* in pig feces, J Clin Microbiol, 41, 3372-3375 (2003)
- [15] Jones GF, Ward CE, Murtaugh MP, Lin G, Gebhart CJ : Enhanced detection of intracellular organism of swine proliferative enteritis, ileal symbiont intracellularis, in feces by polymerase chain reaction, J Clin Microbiol, 31, 2611-2615 (1993)
- [16] Fotedar R, Stark D, Beebe N, Marriott D, Ellis J,

Harkness J : Laboratory diagnostic techniques for
Entamoeba species, Clin Microbiol Rev, 20, 511-532
(2007)

[17] 野崎 宏, 平田和則, 天野 武, 村木優子, 實方 剛,
栗倉 毅, 島田章則, 梅村孝司 : 香川県で発生した豚の
アメーバ症, 日獣会誌, 46, 639-642 (1993)

Swine Ulcerative Colitis Associated with *Entamoeba* spp.

Yuji YAGUCHI^{1)†}, Makoto MATSUBAYASHI²⁾, Tomoko ITAHASHI³⁾, Yuki FUJII¹⁾,
Tokio ONUKI⁴⁾, Kazumi SASAI²⁾, Masaru KOBAYASHI⁵⁾
and Tomoyuki SHIBAHARA⁵⁾

- 1) *Ibaraki Prefectural Kenpoku Livestock Hygiene Service Center, 966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan*
- 2) *Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-Orai-Kita, Izumisano, 598-8531, Japan*
- 3) *Miyagi Prefectural Sendai Livestock Hygiene Service Center, 3-11-22 Anyoji, Miyagino-ku, Sendai, 983-0832, Japan*
- 4) *Ibaraki Prefectural Rokko Livestock Hygiene Service Center, 1367-3 Hokota, Hokota, 311-1517, Japan*
- 5) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Two 83-day-old pigs presented with emaciation, and were euthanized for laboratory examination. Severe extensive ulcerative colitis was observed in the animals, and a very large number of trophozoites were seen at the lesion. These parasites were genetically identified as *E. polecki* subtype 3. Through pathological, bacteriological, and virological analyses, it was suggested that the parasite could be associated with the ulcerative colitis in these pigs. — Key words : *Entamoeba polecki*, growing-finishing pig, ulcerative colitis.

† Correspondence to : Yuji YAGUCHI (Ibaraki Prefectural Kenpoku Livestock Hygiene Service Center)

966-1 Nakagachicho, Mito, 310-0002, Japan

TEL 029-225-3241 FAX 029-224-6661 E-mail : y.yaguchi@pref.ibaraki.lg.jp

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 69, 389 ~ 393 (2016)