

子豚の小腸及び大腸パラフィン包埋切片を用いた

Tritrichomonas foetus の遺伝子学的同定及び

粘膜固有層への侵入の特徴

猜都勇介¹⁾ 北原尚英²⁾ 三角和華子²⁾ 伊藤弘貴³⁾松林 誠^{4),5)} 笹井和美^{4),5)} 芝原友幸^{4),6)†}

- 1) 鹿児島県肝属家畜保健衛生所 (〒 893-0025 鹿屋市西祓川町 145-1)
- 2) 鹿児島県鹿児島中央家畜保健衛生所 (〒 899-2201 日置市東市来町湯田 1678)
- 3) 広島県西部家畜保健衛生所 (〒 739-0013 東広島市西条御条町 1-15)
- 4) 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)
- 5) 大阪府立大学アジア健康科学研究所 (〒 598-8531 泉佐野市りんくう往来北 1-58)
- 6) 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)

(2019年11月8日受付・2020年3月9日受理)

要 約

鹿児島県内の一養豚農場で2019年2月に40日齢の離乳豚が水様性下痢を呈し、死亡豚が増加した。下痢を呈した2頭において、病理組織学的に回腸、盲腸及び結腸の陰窩腔にトリコモナスの濃厚寄生が観察された。そのうち1頭では、多数のトリコモナスの陰窩上皮及び粘膜固有層への侵入が認められた。小腸及び大腸病変部のパラフィン包埋切片を用いたPCR検査で*Tritrichomonas foetus*が同定された。超微形態学的検査で、3本の前鞭毛と1本の後鞭毛が観察された。Caspase-3免疫染色及びTUNEL法で、陰窩上皮のアポトーシス陽性細胞の増加が観察された。細菌学的検査で*Escherichia coli*が分離された。病理組織学的検査と遺伝子学的検査の結果より、*T. foetus*の豚に対する侵襲性及び下痢への関与が示唆された。——キーワード：子豚の下痢、パラフィン包埋切片、*Tritrichomonas foetus*。

-----日獣会誌 73, 449~456 (2020)

トリコモナスは、パラバサリア門 Parabasalia, トリコモナス目 Trichomonadida に属する偏性嫌気性の鞭毛虫である [1]。ミトコンドリアの代わりに、ヒドロゲノソームを有し、その他細胞小器官として、最大6本の鞭毛、波動膜及び軸索等を有する [2]。

トリコモナスは、多くの哺乳類、爬虫類及び鳥類等に寄生し、病原性及び非病原性の種が存在する [3]。病原性を有する種として、牛の繁殖障害 [4] と猫の大腸性下痢 [1] を引き起こす *Tritrichomonas foetus*、人の膣トリコモナス症を引き起こす *Trichomonas vaginalis* [5] 及び鳥類の上部消化管障害の原因である *Trichomonas gallinae* [6] が知られている。一方、豚の消化管に寄生するトリコモナスは、共生性で非病原性と考えられ [7]、*T. foetus*、*Tetratrichomonas buttreyi*、*Trit-*

richomonas rotunda、*Hypotrichomonas acosta*、*Trichomitus batrachorum* 及び *Pentatrichomonas hominis* の6種が報告されている [8]。

豚に寄生するトリコモナスの形態学的特徴による種の同定は、種間で類似するため難しく [9]、近年、糞便を用いたPCRによる種の同定 [8] が実施されている。また、2つの研究グループは、パラフィン包埋切片を用いたPCRによる種の同定及びIn situ hybridization (ISH) による検索 [10, 11] を報告している。

近年、豚の消化管に寄生する *T. foetus* と牛に繁殖障害を引き起こす *T. foetus* が遺伝子学的、形態学的及び病原性において同一であることが示唆された [12]。またオーストリアにおける調査で、豚に寄生する *T. foetus* が消化管障害を引き起こすことが示唆されている [11]。

† 連絡責任者：芝原友幸 (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 ☎・FAX 029-838-7774 E-mail : tshiba@affrc.go.jp

しかし、詳細な病理学的検索は実施されておらず、病態への関与について不明な点が多い。また、日本において豚の糞便を用いたPCR法による疫学調査が実施されており、その報告では多くの豚が *T. foetus* に感染していた [13]。しかし、糞便からのPCR検査では、検出された原虫が臨床症状及び病変形成に関与したかの明確な判断ができない。病変を形成している部位に存在する原虫の正確な種の同定と病理組織学的評価を合わせて実施する必要がある。

今回、下痢を呈した豚において、病理組織学的に小腸及び大腸でトリコモナスの濃厚寄生が観察された。病変部パラフィン包埋切片を用いた遺伝子学的検査の結果、*T. foetus* が同定された。さらに、トリコモナスの陰窩上皮や粘膜固有層への侵入及びアポトーシスの誘導が観察された。豚に対する *T. foetus* の病原性が認められ、下痢への関与が示唆されたので、その詳細を報告する。

材料及び方法

発生状況と材料：鹿児島県内の母豚20頭、種豚2頭、子豚・肥育200頭を飼養する繁殖肥育一貫経営農場で、2019年1月に計13頭が生まれ、2月に40日齢の離乳豚が水様性下痢を呈し、重度の下痢を呈した10頭中7頭が死亡した。離乳豚以外の個体に異常は認められなかった。衰弱豚1頭 (No. 1) と下痢を呈していた豚2頭 (No. 2, No. 3) の計3頭を管内の家畜保健衛生所で鑑定殺後、病性鑑定を実施した。当該農場では母豚に、日本脳炎、パルボウイルス、豚繁殖・呼吸障害症候群 (PRRS) 及びマイコプラズマワクチンを接種していた。

病理組織学的検査：剖検豚3頭の主要臓器を10%中性緩衝ホルマリンで固定した。定法に従いパラフィン包埋、薄切を行い、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色、グラム染色 (Brown・Hopps法)、ワーチン・スターリー (WS) 染色及び過ヨウ素酸シッフ (PAS) 染色を実施した。

免疫組織化学的検査：剖検豚3頭の小腸及び大腸のパラフィン切片を用いて、抗 *Escherichia coli* O111 B4 LPS 家兎血清 (農研機構動物衛生研究部門、茨城)、マウス抗 Cleaved Caspase-3 (Asp175) 抗体 (Cell Signaling, U.S.A.) 及び TdT-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) 法による免疫組織染色キット (Apop Tag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit S7100, 日本ミリポア株式会社、東京) により、免疫組織化学的検査を実施した。Caspase-3 及び TUNEL 法では、35日齢の正常豚の小腸及び大腸を対照とした。また、陽性コントロールとして、35日齢の正常豚の脾臓及び胸腺を用いた。

電子顕微鏡学的検査：ホルマリン固定した No. 3 の回腸、盲腸及び結腸について、定法に従い1%オスミウム

酸固定、エポキシ樹脂包埋及び超薄切を実施し、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 (JEM-1400Flash, 日本電子株式会社、東京) を用いた。

原虫遺伝子学的検査：*Trichostrongylus* spp. の遺伝子解析には、剖検豚3頭の小腸及び大腸のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用いた。10 μ m に薄切した組織切片3枚をチューブに回収し、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit (Qiagen株式会社、東京) を用いてDNAを抽出後、PCRを実施した。プライマーは、TFR3-TFR4 及び TFITS-F-TFITS-R を用いた [14, 15]。得られた増幅産物は、ダイレクトシークエンスにより塩基配列を決定し、BLAST 検索を実施した。また、上記の方法で既報に従い *Cystoisospora suis* の感染の有無の判定も実施した [16]。

細菌学的検査：大脳、脊髄、心臓、肺、肝臓、腎臓、脾臓及び腸間膜リンパ節を分離材料とし、5%綿羊血液加トリプトソイ寒天培地 (血寒)、DHL寒天培地 (DHL)、チョコレート寒天培地及び5% GAM寒天培地 (GAM) を用いて好気培養、5%炭酸ガス培養または嫌気培養を実施した。また、腸内容を分離材料とし、血寒、DHL及びGAMを用いて好気培養、5%炭酸ガス培養または嫌気培養を実施した。サルモネラ検査として、腸内容をラバポート液体培地で一晚増菌培養後、DHL寒天培地に画線塗抹した。

剖検豚3頭の腸内容由来非溶血性 *E. coli* 各3株について毒素遺伝子 (*LT*, *STa*, *STb* 及び *Stx2e*) 及び定着因子遺伝子 (*eae*, *F4*, *F5*, *F6*, *F41* 及び *F18*) に関するPCR検査を実施した。

ウイルス学的検査：腸内容を材料とし、豚流行性下痢 (PED) 及び伝染性胃腸炎 (TGE) のRT-PCRを実施した。また、扁桃を材料とし、CSF (豚熱) ウイルス遺伝子検査 (PCR) 及び蛍光抗体検査 (FA)、血清を用いてCSF (豚熱) 抗体検査 (ELISA法) を実施した。

成 績

病理解剖所見：No. 2 の小腸の一部で菲薄化が認められた。その他の豚では、著変は認められなかった。

病理組織学的所見：HE染色において、No. 2 と3の回腸、盲腸及び結腸では、粘膜上皮の変性、剥離及び壊死が認められた (表1)。粘膜固有層では、少数のリンパ球及び好酸球の浸潤が観察された。No. 2 と3の回腸、盲腸及び結腸の陰窩腔には、多数のトリコモナスが観察された。No. 3 でより多くのトリコモナスが観察された。さらに、No. 3 の小腸と大腸では、トリコモナスの陰窩上皮への接着、陰窩上皮細胞間への侵入、陰窩上皮細胞基底膜への到達、上皮細胞と基底膜間への侵入及び粘膜固有層への侵入が観察された (図1)。粘膜固有層へ侵

表 *T. foetus* の寄生状況及び病理組織学的所見のまとめ

	No. 1		No. 2		No. 3		
	回腸	回腸	盲腸	結腸	回腸	盲腸	結腸
腸管腔のトリコモナス	-	+	+	+	+	+	+
粘膜上皮への侵入(内腔側)	-	-	-	-	+	+	+
陰窩腔のトリコモナス	-	+	++	++	+++	+++	+++
陰窩上皮への接着	-	-	-	-	+++	++	+++
陰窩上皮への侵入	-	-	-	-	++	++	++
粘膜固有層への侵入	-	-	-	-	+	+	+
粘膜上皮の剝離、壊死	-	+++	+	+	+++	++	++
炎症細胞の浸潤	-	+	+	+	+	+	+
陰窩の過形成	-	+	+	+	+	+	+
アポトーシス小体	-	+	-	-	++	++	+++
有糸分裂	-	+	+	+	++	++	++
陰窩膿瘍	-	-	-	-	++	+	-
上皮の扁平化	-	-	-	-	+	+	+
粘液細胞の増殖	-	-	+	+	+	+	+

+++ : 多数 ++ : 中等度 + : 少数 - : なし

入したトリコモナスに対して軽度の炎症細胞の浸潤が観察された。PAS 染色及び WS 染色においても同様の所見が観察され、トリコモナスは、類円形から紡錘形を呈し、PAS 染色では赤紫色 (図2)、WS 染色では好銀性 (図3) に明瞭に観察された。また、トリコモナスの杯細胞との接着面積の増加、杯細胞の粘液内への侵入、トリコモナスの侵入により陰窩上皮が剝離・離断した像 (図4) がみられた。さらに、トリコモナスが接着した上皮細胞の細胞質が好酸性を増し核クロマチンの凝縮が認められる像及びトリコモナスが侵入した上皮細胞周辺で多数のアポトーシス小体が観察された。その他、陰窩腔の拡張、陰窩膿瘍、陰窩上皮細胞の肥大・過形成、粘液の増量、有糸分裂の増加及び粘膜上皮内リンパ球の増加も認められた。その他の臓器では、著変は認められなかった。

グラム染色では、剖検豚3頭の小腸及び大腸の粘膜上皮周辺にグラム陰性短桿菌が多数認められた。陰窩では、細菌はほとんど観察されなかった。また、観察されたグラム陰性短桿菌は、免疫組織化学的に、抗 *E. coli* O111 B4 LPS 家兔血清に対して陽性反応を示した (図5)。Caspase-3 (図6, 7) 及び TUNEL 法 (図8) では、

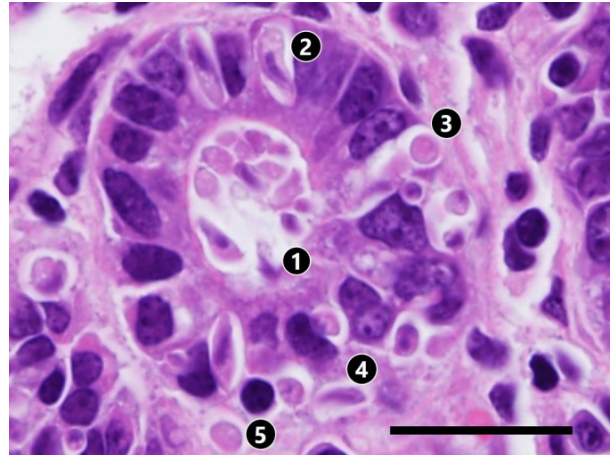


図1 結腸における *T. foetus* の粘膜固有層への侵入過程
 ①陰窩上皮への接着, ②陰窩上皮細胞間への侵入, ③陰窩上皮細胞基底膜への到達, ④陰窩上皮細胞と基底膜間への侵入, ⑤粘膜固有層への侵入 (豚 No. 3 結腸 HE 染色 Bar = 20µm).

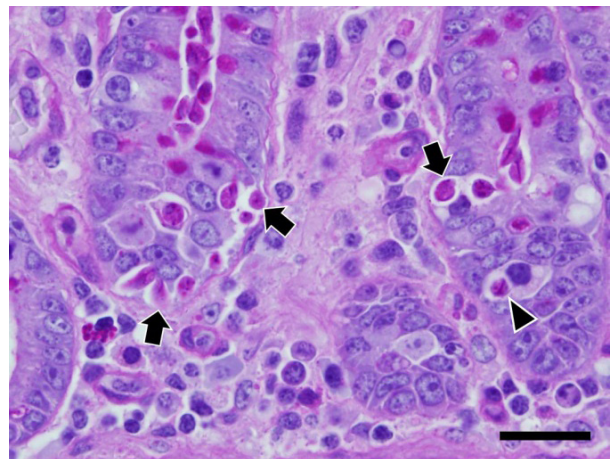


図2 結腸における PAS 陽性 *T. foetus*
 類円形から紡錘形の *T. foetus* が赤紫色に明瞭に観察される。陰窩上皮間・基底膜部への侵入 (矢印) が観察される。 *T. foetus* (矢頭) に近接するマクロファージが観察される (豚 No. 3 結腸 PAS 染色 Bar = 20µm)。

陰窩腔にトリコモナスが観察された上皮細胞で、正常豚と比べ多数の陽性反応が観察された。

電子顕微鏡学的検査: トリコモナスは、3本の前鞭毛、1本の後鞭毛、波動膜、核、食物胞及びヒドロゲノソームが認められた (図9A)。鞭毛の微細管は2+9構造で配列していた (図9B)。また、トリコモナスの陰窩上皮間への侵入過程が観察された (図10)。トリコモナスの陰窩上皮細胞 (図11) 及び杯細胞への接着 (図12) が観察された。トリコモナスが接着した陰窩上皮細胞の微絨毛は消失していた。アポトーシス小体が観察された (図10)。



図3 結腸におけるWS染色で好銀性の *T. foetus* 類円形から紡錘形の *T. foetus* が好銀性に明瞭に観察される。 *T. foetus* の陰窩上皮基底膜への侵入によってできた上皮細胞の間隙に、多数の *T. foetus* が続いて侵入していく像が観察される (矢印) (豚 No. 3 結腸 WS 染色 Bar = 20 μ m).

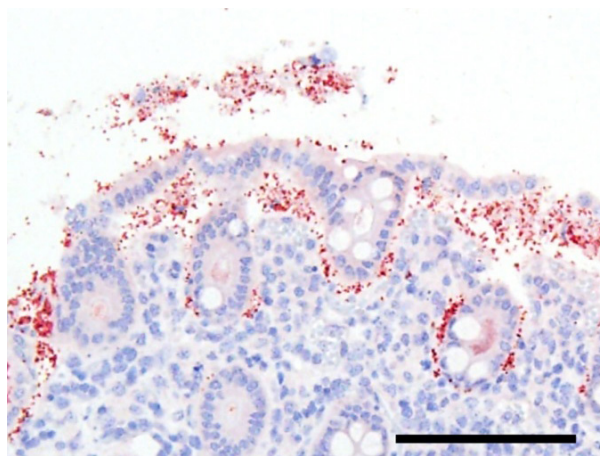


図5 結腸の抗 *E. coli* O111 B4 LPS 抗体陽性粘膜上皮周辺に抗体陽性細菌が観察される (豚 No. 3 結腸 免疫組織化学染色 Bar = 100 μ m).

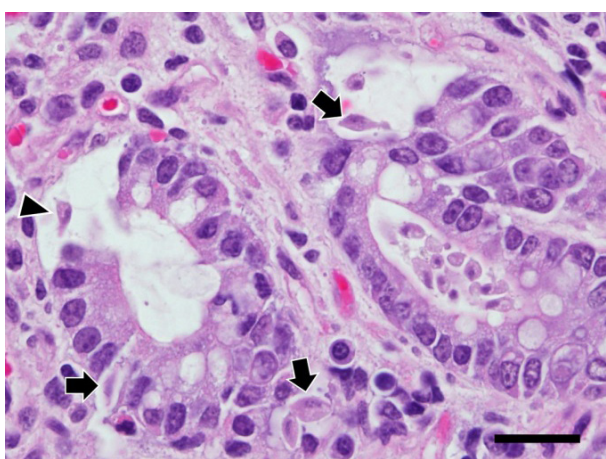


図4 結腸における *T. foetus* の病変 陰窩上皮の離断・剝離 (矢頭), 粘膜固有層への侵入 (矢印), リンパ球及び好酸球の軽度浸潤が認められる (豚 No. 3 結腸 HE 染色 Bar = 20 μ m).

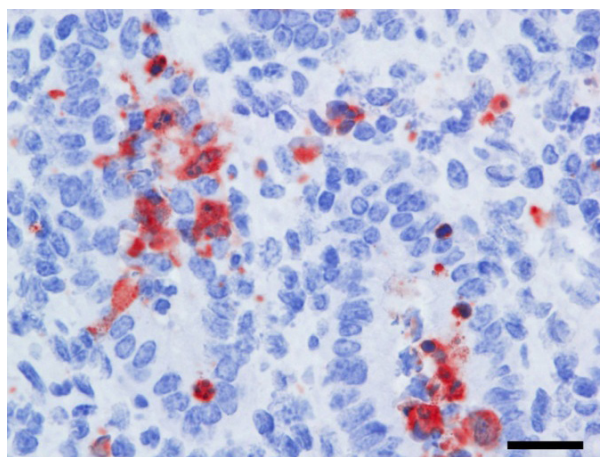


図6 結腸の Cleaved Caspase-3 陽性 陰窩腔に *T. foetus* が観察された陰窩上皮細胞で Caspase-3 陽性細胞の増加が観察される (豚 No. 3 結腸 免疫組織化学染色 Bar = 20 μ m).

原虫遺伝子学的検査: No. 2 の盲腸及び結腸, No. 3 の回腸, 盲腸及び結腸で TFR3-TFR4 では約 350bp, TFITS-F-TFITS-R では約 210bp の増幅産物が得られた。No. 2 の回腸は, TFITS-F-TFITS-R のみ増幅された。増幅産物のダイレクトシーケンス及び BLAST 検索の結果, 既知の *T. foetus* と 100%一致した。 *C. suis* の特異遺伝子の増幅は認められなかった。

細菌学的検査: 臓器から有意菌は分離されなかった。腸内容から, 非溶血性 *E. coli* が No. 1 で 1.58×10^8 CFU/g, No. 2 で 4.80×10^8 CFU/g, No. 3 で 1.66×10^8 CFU/g 分離された。溶血性 *E. coli* 及び *Clostridium perfringens* は分離されなかった。No. 2 由来 1 株及

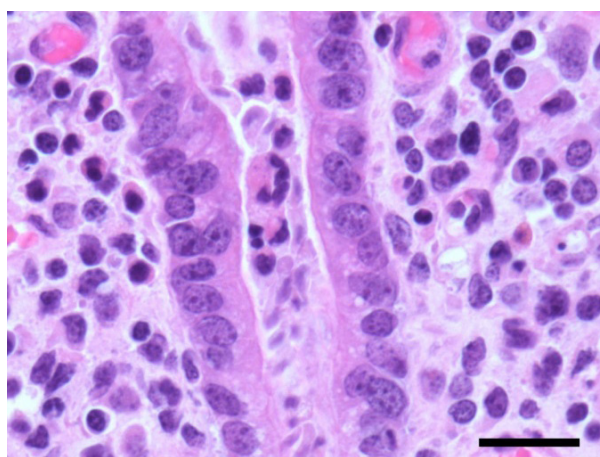


図7 図6の同領域のHE染色の高倍率 陰窩腔に *T. foetus* と変性, 壊死した細胞が観察される (豚 No. 3 結腸 HE 染色 Bar = 20 μ m)

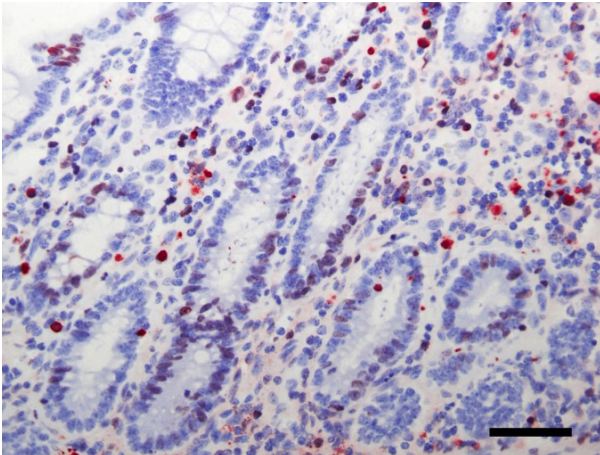


図8 結腸のTUNEL法陽性
陰窩腔に *T. foetus* が観察された陰窩上皮細胞でTUNEL陽性細胞の増加が観察される(豚No. 3 結腸 TUNEL法 Bar=50 μ m).

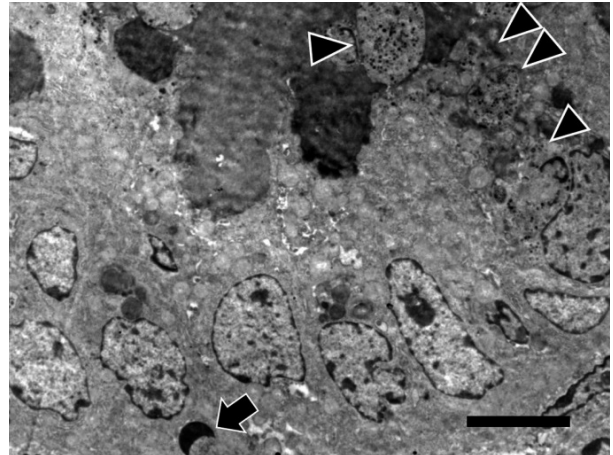


図10 *T. foetus* の侵入過程
陰窩腔から上皮細胞間への侵入が観察される(矢頭). アポトーシス小体が観察される(矢印)(豚No. 3 結腸 酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色 Bar=5 μ m).

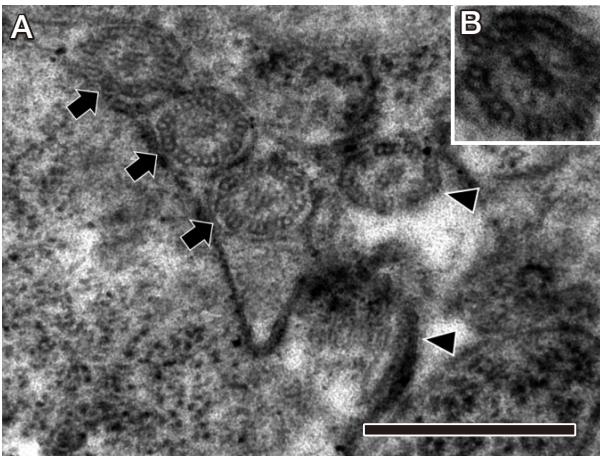


図9 *T. foetus* の透過型電子顕微鏡像
A: 3本の前鞭毛(矢印), 波動膜及び1本の後鞭毛(矢頭)が観察される(豚No. 3 結腸 酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色 Bar=500nm).
B: 鞭毛の微小管の2+9構造が明瞭に観察される.

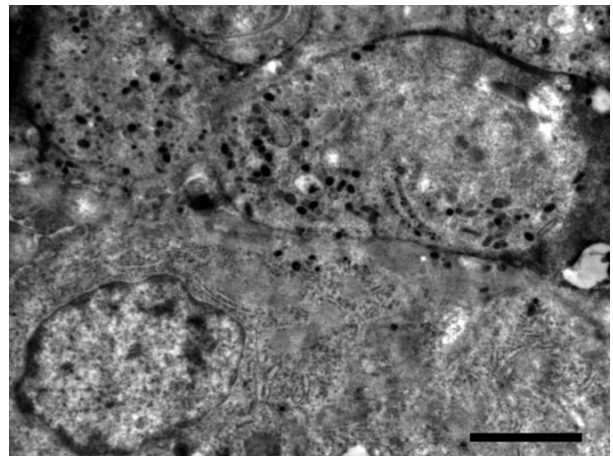


図11 *T. foetus* の陰窩上皮細胞への接着
陰窩上皮細胞との接着が観察される. 陰窩上皮細胞の微絨毛は消失している(豚No. 3 結腸 酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色 Bar=2 μ m).

びNo. 3由来2株の計3株が *eae* 遺伝子を保有していた. サルモネラ検査では, サルモネラ属菌を疑うコロニーは分離されなかった.

ウイルス学的検査: PED, TGE 及び CSF (豚熱) について, すべて陰性であった.

考 察

今回, 下痢を呈した離乳豚において, 病理組織学的にトリコモナスの濃厚寄生が観察された小腸及び大腸の病変部パラフィン包埋切片を用いて, PCR 検査を実施したところ *T. foetus* と同定された. 豚のパラフィン包埋切片を用いたトリコモナスの種の同定は, 日本で最初の報告であり, アメリカ [10], オーストリア [2] の研

究グループについて3番目となる. 病理組織学的検査後に, 切片から正確な種の同定が行えることは, 病変部の原虫と病態の関連づけに有用である. また, 透過型電子顕微鏡において, 3本の前鞭毛と1本の後鞭毛が観察され, 今回の遺伝子学的検査の結果を支持した.

本症例では, *T. foetus* の粘膜固有層への侵入過程を明示した. さらに, 抗 Cleaved Caspase-3 抗体を用いた免疫組織化学的染色及びTUNEL法により, 陰窩上皮へのアポトーシス誘導を明らかにした. 本報は, 豚における陰窩上皮への病原性から下痢の病態への関与を示すことができた. 下痢の病原メカニズムの一因として, 粘膜固有層への侵入に伴う粘膜上皮バリアの破綻, 陰窩上皮への傷害による粘膜上皮修復の遅延及びアポトーシスの誘導が示唆された. *T. foetus* による牛の繁殖障害

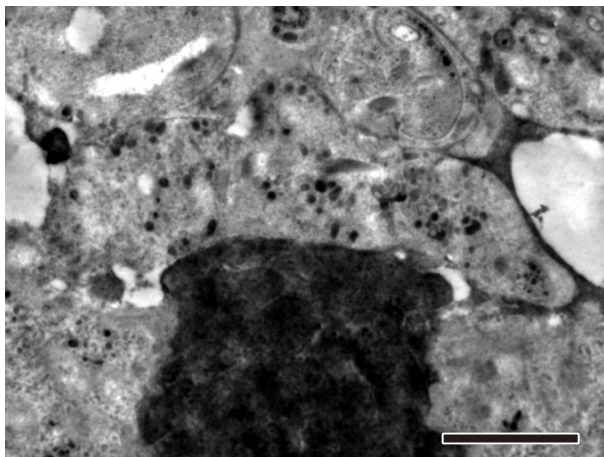


図12 *T. foetus* の杯細胞への接着
杯細胞との接着が観察される(豚No. 3 結腸 酢酸ウラニル・クエン酸鉛の二重染色 Bar=2 μ m).

及び猫の下痢は、おもにシステインプロテアーゼの関与が報告されている [17-22]。その病原メカニズムは、アポトーシスの誘導、粘膜上皮の剥離、粘膜固有層への侵入による炎症反応等によって引き起こされる [18, 19, 21, 22]。豚の消化管から分離された *T. foetus* も、牛と同様のシステインプロテアーゼを保有していることが報告されている [23]。また、病原性は、トリコモナスと粘膜上皮との接着から始まることが知られている [17, 21, 22]。本症例においても、粘膜上皮との接着が多数観察された。粘膜固有層で観察された *T. foetus* の局在は、Mostegl MM ら [11] の ISH による検索と類似していた。

今回、軽度の炎症細胞の浸潤、粘液の増加、有糸分裂像の増加等の反応が観察された。これらは、トリコモナスの侵襲による宿主の反応と考えられた。上記の所見は猫 [21, 24] 及び豚 [11] の既報と類似していた。本症例において、*T. foetus* の粘膜固有層への侵入に対する免疫反応は軽度であったが、トリコモナスは宿主の免疫反応との戦いや回避するメカニズム(免疫細胞のアポトーシス誘導・宿主サイトカイン発現の調節・免疫細胞分泌成分の分解・表現型の変化等)を有していることが報告されている [21]。また猫への *T. foetus* の感染実験では、組織学的に炎症細胞の浸潤が確認する以前に、下痢がみられ、自然感染した猫の下痢は通常抗炎症薬による治療に反応しないことが報告されている [21]。したがって、炎症細胞の浸潤による下痢の発症以外にも、非免疫介在性メカニズムによる下痢も示唆されている [21]。トリコモナスの寄生量により粘膜固有層への侵入量、宿主の反応が異なることが報告されている [25]。No. 2 と No. 3 では、No. 3 でより多数のトリコモナスが陰窩腔に観察され、No. 3 のみ粘膜固有層への侵入が観察された。したがって、No. 3 の方がトリコモナスの

病態への関与が強いと考えられた。

本症例において、腸内容物から *E. coli* が分離され、粘膜上皮で多数の細菌が観察された。*T. foetus* が検出された猫及び豚の症例で、細菌やその他病原体との混合感染が報告されている [1, 11]。このことから、ほかの病原体との混合感染が *T. foetus* の増殖・活性化の要因となることが示唆された。また報告によると、トリコモナスが増殖・活性化するには、至適 pH、嫌気性の上昇及び鉄の取り込み等が必要であることも示唆されている [18, 21]。今回、*E. coli* による下痢でこれらの条件がそろい、*T. foetus* の病原性が増したと考えられた。

今回の結果から、下痢及び死亡豚の増加は *eae* 保有 *E. coli* 及び *T. foetus* の濃厚寄生によって引き起こされたと考えられた。通常、*eae* 遺伝子保有の非溶血性 *E. coli* の感染のみでは、死亡率はそれほど増えない。今回、*T. foetus* が侵襲性を有する病原体であることが示唆され、濃厚寄生が下痢の病態及び症状の悪化に関与した可能性が考えられた。そのため、今後トリコモナスが観察された症例では、トリコモナスの遺伝子学的な種の同定、粘膜上皮への接着及び粘膜固有層への侵入についても観察し、トリコモナスの病態への関与について評価することが必要と考えられる。また、豚に寄生するトリコモナスの正確な種の同定、下痢を呈した豚標本の回顧調査、感染実験及び増殖・活性化要因の解明等を通して、知見を蓄積していくことが望まれる。

稿を終えるに当たり、ご助言・ご協力いただいた農研機構・動物衛生研究部門の小林 勝技師、嶋田恵美技師、鹿児島県肝属家畜保健衛生所の磯部知弘氏、小林直樹氏、尾ノ上昂希氏、大阪府立大学の朝間典子氏、関口理香氏に深謝する。

引用文献

- [1] Bastos BF, Almeida FM, Brener B : What is known about *Tritrichomonas foetus* infection in cats?, Rev Bras Parasitol V, 28, 1-11 (2019)
- [2] Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Dinhopf N, Kulda J, Liebhart D, Hess M, Weissenböck H : Design and validation of an oligonucleotide probe for the detection of protozoa from the order Trichomonadida using chromogenic in situ hybridization, Vet Parasitol, 171, 1-6 (2010)
- [3] Dimasuy KG, Rivera WL : Molecular characterization of trichomonads isolated from animal hosts in the Philippines, Vet Parasitol, 196, 289-295 (2013)
- [4] Felleisen RS : Host-parasite interaction in bovine infection with *Tritrichomonas foetus*, Microbes Infect, 1, 807-816 (1999)
- [5] Mielczarek E, Blaszkowska J : *Trichomonas vaginalis*: pathogenicity and potential role in human reproductive failure, Infection, 44, 447-458 (2016)
- [6] Borji H, Razmi GH, Movassaghi AH, Moghaddas E, Azad M : Prevalence and pathological lesion of *Trichomonas gallinae* in pigeons of Iran, J Parasit

- Dis, 35, 186-189 (2011)
- [7] Lun ZR, Chen XG, Zhu XQ, Li XR, Xie MQ : Are *Tritrichomonas foetus* and *Tritrichomonas suis* synonyms?, Trends Parasitol, 21, 122-125 (2005)
- [8] Li W, Li W, Gong P, Meng Y, Li W, Zhang C, Li S, Yang J, Li H, Zhang X, Li J : Molecular and morphologic identification of *Pentatrichomonas hominis* in swine, Vet Parasitol, 202, 241-247 (2014)
- [9] Rivera WL, Lupisan AJ, Baking JM : Ultrastructural study of a tetratrichomonad isolated from pig fecal samples, Parasitol Res, 103, 1311-1316 (2008)
- [10] Gookin JL, Stone MR, Yaeger MJ, Meyerholz DK, Moisan P : Fluorescence in situ hybridization for identification of *Tritrichomonas foetus* in formalin-fixed and paraffin-embedded histological specimens of intestinal trichomoniasis, Vet Parasitol, 172, 139-143 (2010)
- [11] Mostegl MM, Richter B, Nedorost N, Maderner A, Dinhopf N, Weissenböck H : Investigations on the prevalence and potential pathogenicity of intestinal trichomonads in pigs using in situ hybridization, Vet Parasitol, 178, 58-63 (2011)
- [12] Tachezy J, Tachezy R, Hampl V, Sedinová M, Vanacová S, Vrlík M, Van Ranst M, Flegr J, Kulda J : Cattle pathogen *Tritrichomonas foetus* (Riedmüller, 1928) and pig commensal *Tritrichomonas suis* (Gruby & Delafond, 1843) belong to the same species, J Eukaryot Microbiol, 49, 154-163 (2002)
- [13] Doi J, Abe N, Oku Y : Molecular survey of *Tritrichomonas suis* (= *T. foetus*) 'cat' and 'cattle' genotypes in pigs in Japan, J Vet Med Sci, 75, 475-479 (2013)
- [14] Felleisen RS, Lambelet N, Bachmann P, Nicolet J, Müller N, Gottstein B : Detection of *Tritrichomonas foetus* by PCR and DNA enzyme immunoassay based on rRNA gene unit sequences, J Clin Microbiol, 36, 513-519 (1998)
- [15] Gookin JL, Birkenheuer AJ, Breitschwerdt EB, Levy MG : Single-tube nested PCR for detection of *Tritrichomonas foetus* in feline feces, J Clin Microbiol, 40, 4126-4130 (2002)
- [16] Matsubayashi M, Takayama H, Kusumoto M, Murata M, Uchiyama Y, Kaji M, Sasai K, Yamaguchi R, Shibahara T : First report of molecular identification of *Cystoisospora suis* in piglets with lethal diarrhea in Japan, Acta Parasitol, 61, 406-411 (2016)
- [17] Gould EN, Giannone R, Kania SA, Tolbert MK : Cysteine protease 30 (CP30) contributes to adhesion and cytopathogenicity in feline *Tritrichomonas foetus*, Vet Parasitol, 244, 114-122 (2017)
- [18] Lucas JJ, Hayes GR, Kalsi HK, Gilbert RO, Choe Y, Craik CS, Singh BN : Characterization of a cysteine protease from *Tritrichomonas foetus* that induces host-cell apoptosis, Arch Biochem Biophys, 477, 239-243 (2008)
- [19] Singh BN, Lucas JJ, Hayes GR, Kumar I, Beach DH, Frajblat M, Gilbert RO, Sommer U, Costello CE : *Tritrichomonas foetus* induces apoptotic cell death in bovine vaginal epithelial cells, Infect Immun, 72, 4151-4158 (2004)
- [20] Tolbert MK, Brand MD, Gould EN : In vitro effects of cysteine protease inhibitors on *Trichomonas foetus*-induced cytopathic changes in porcine intestinal epithelial cells, Am J Vet Res, 77, 890-897 (2016)
- [21] Tolbert MK, Gookin JL : Mechanisms of *Tritrichomonas foetus* pathogenicity in cats with insights from venereal trichomonosis, J Vet Intern Med, 30, 516-526 (2016)
- [22] Tolbert MK, Stauffer SH, Brand MD, Gookin JL : Cysteine protease activity of feline *Tritrichomonas foetus* promotes adhesion-dependent cytotoxicity to intestinal epithelial cells, Infect Immun, 82, 2851-2859 (2014)
- [23] Morin-Adeline V, Mueller K, Conesa A, Šlapeta J : Comparative RNA-seq analysis of the *Tritrichomonas foetus* PIG30/1 isolate from pigs reveals close association with *Tritrichomonas foetus* BP-4 isolate 'bovine genotype', Vet Parasitol, 212, 111-117 (2015)
- [24] Yaeger MJ, Gookin JL : Histologic features associated with *Tritrichomonas foetus*-induced colitis in domestic cats, Vet Pathol, 42, 797-804 (2005)
- [25] Mostegl MM, Wetscher A, Richter B, Nedorost N, Dinhopf N, Weissenböck H : Detection of *Tritrichomonas foetus* and *Pentatrichomonas hominis* in intestinal tissue specimens of cats by chromogenic in situ hybridization, Vet Parasitol, 183, 209-214 (2012)

Genetic Identification of *Trichomonas Foetus* Using Paraffin Embedded Sections of Small and Large Intestines, and Characterization of Mucosal Invasion in Piglets

Yusuke ABETO¹⁾, Naohide KITAHARA²⁾, Wakako MISUMI²⁾, Hiroataka ITO³⁾,
Makoto MATSUBAYASHI^{4), 5)}, Kazumi SASAI^{4), 5)}
and Tomoyuki SHIBAHARA^{4), 6) †}

- 1) *Kagoshima Prefectural Kimotsuki Livestock Hygiene Service Center, 145-1 Nishiharaigawa, Kanoya, 893-0025, Japan*
- 2) *Kagoshima Prefectural Kagoshima Central Livestock Hygiene Service Center, 1678 Higashi-ichikichoyuda Hioki, 899-2201, Japan*
- 3) *Hiroshima Prefectural Western Part Livestock Hygiene Service Center, 1-15 Saijogojo, Higashihiroshima, 739-0013, Japan*
- 4) *Graduate School of Life and Environmental Sciences, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-oraiKita, Izumisano, 598-8531, Japan*
- 5) *Asian Health Science Research Institute, Osaka Prefecture University, 1-58 Rinku-oraiKita, Izumisano, 598-8531, Japan*
- 6) *National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan*

SUMMARY

Forty-day-old weaning piglets at a farm in Kagoshima developed watery diarrhea and died in February 2019. Two piglets with diarrhea were euthanized. A large number of trophozoites of *Trichomonas* spp. were histologically observed in the crypt lumina of the ileum, colon, and cecum in these piglets. Numerous parasites also invaded the mucosal epithelium and lamina propria mucosae in one piglet. Genomic DNA was purified from sections of the small and large intestine, and PCR amplified products were sequenced. *Trichomonas foetus* was identified based on sequencing results. Ultrastructurally, three anterior flagella and one posterior flagellum were observed in the parasite. Numbers of caspase-3 and TUNEL-positive cells increased in crypt epithelium. Bacteriologically, non-hemolytic *Escherichia coli* was isolated from the piglet intestinal content. These results suggested that *T. foetus* has the ability to invade mucosa and induce apoptosis, and is associated with the pathogenesis of diarrhea.

— Key words : diarrhea in piglets, formalin-fixed paraffin embedded sections, *Trichomonas foetus*.

† Correspondence to : Tomoyuki SHIBAHARA (National Institute of Animal Health, National Agricultural and Food Research Organization)
3-1-5 Kannondai, Tsukuba, 305-0856, Japan
TEL · FAX 029-838-7774 E-mail : tshiba@affrc.go.jp

— *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 73, 449 ~ 456 (2020)