

総説

豚のアメーバ症；出血性大腸炎の豚から同定された *Entamoeba suis*鈴田史子¹⁾、松林 誠²⁾、寺山好美³⁾、下條憲吾¹⁾、油井 武⁴⁾、播谷 亮⁵⁾、芝原友幸⁵⁾

(1)長崎県中央家畜保健衛生所, 2)農研機構・動物衛生研究所 細菌・寄生虫研究領域, 3)長崎県県北家畜保健衛生所,

4)埼玉県中央家畜保健衛生所, 5)農研機構・動物衛生研究所 病態研究領域)

Suzuta, F., Matsubayashi, M., Terayama, Y., Shimojo, K., Yui, T., Haritani, M. and Shibahara, T. (2015).

Identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 65, 44-50.

キーワード：出血性大腸炎、アメーバ症、*Entamoeba suis*、ミトコンドリア、アクチン遺伝子

Entamoeba に関する現在までの知見をまとめるとともに、その検査手法の詳細を紹介する。

【はじめに】

病原性のある *Entamoeba* がヒトと各種動物に感染することにより、アメーバ症を発症させる^{2,12,13,31,40)}。ヒトでは腸管、肝臓、肺及び脳に病変がみられる。ヒトのアメーバ赤痢は感染症法の五類感染症に指定されている^{13,39)}。このため効果的な予防、治療及び対策のためにその原因、病原性、病理発生について科学的知見が蓄積されている³⁹⁾。一方、豚のアメーバ症に関する報告は非常に乏しいのが現状である¹⁶⁾。

近年、我々は、出血性大腸炎を呈した豚について病理組織学的、寄生虫学的及び細菌学的検査を実施した。その過程で検出された *Entamoeba* の超微形態学的特徴を明らかにするとともに、分子生物学的解析により豚に特異的に寄生する *E. suis* と同定した¹⁶⁾。本稿では、

【*Entamoeba* 属】

Entamoeba 属は単細胞の寄生性原虫であり、ヒトを含む様々な動物に感染する^{2,12,26,31,35,39,40)}。一般的に、本原虫の生活環に中間宿主はなく、厳しい環境条件に強く感染力を持つシスト（嚢子）と宿主体内で脱嚢して組織に侵入するトロフォゾイト（栄養体、栄養型）の二つの形態をとる^{39,40)}。*Entamoeba* は、シストの形態学的特徴、主に成熟シスト内の核の数に基づいて、現在までに大きく5つのグループ（①. 8核、②. 4核、③. 1核、④. シスト形成なし、⑤. 未知のグループ）に分けられる^{15,18)}。

【*Entamoeba* の病原性】

ヒトと動物に寄生する主な *Entamoeba* を表1に示

表1 ヒトと動物の主な*Entamoeba* の特徴

	病原性	主な寄生動物	寄生部位	シスト		トロフォゾイト (μm)
				核数	大きさ(μm)	
<i>E. histolytica</i> ⁴⁰⁾	あり	ヒト、各種動物	大腸 肝臓、肺、脳	4	12~15	20~50
<i>E. nuttalli</i> ³⁵⁾	あり	霊長類(ヒト以外)	大腸	—	—	18~60
<i>E. invadens</i> ^{17,29)}	あり	爬虫類	大腸	4	10~25	17×20
<i>E. suis</i> ¹⁶⁾	あり*	豚	大腸	1	10**	10~15**
<i>E. dispar</i> ⁴⁰⁾	なし	ヒト、各種動物	大腸	4	12~15	20~50
<i>E. polecki</i> ⁸⁾	なし	豚	大腸	1 稀に2~4	10~15	15~20
<i>E. coli</i> ⁴⁰⁾	なし	ヒト等	大腸	8	15~25	15~50
<i>E. gingivalis</i> ⁴⁰⁾	なし	ヒト	口腔	シスト形成なし		10~35

): 文献番号、— 記載なし、* 病原性があることが示唆される、** 組織標本上

す^{8,16,17,29,35,40}。病原性のある種としては、人獣共通の *E. histolytica* (赤痢アメーバ)、ヒト以外の霊長類に感染する *E. nuttalli*、爬虫類に感染する *E. invadens* の3種が知られている^{2,12,17,26,29,31,35,39,40}。さらに近年、出血性大腸炎の豚から *E. suis* が検出され、病原性を持つことが示唆されている¹⁶。その他の *Entamoeba* では、明らかな病原性は示さない。

【ヒトの *Entamoeba*】

ヒトの主な *Entamoeba* には、病原性のある *E. histolytica*、非病原性の *E. dispar*、*E. coli*、*E. gingivalis* がある^{8,39,40}。アメーバ赤痢の原因となる *E. histolytica* は、そのトロフォゾイトが大腸粘膜に侵入して潰瘍を形成し、粘血便の排泄を引き起こすだけでなく、時に肝臓、肺、脳などの諸臓器に移行して膿瘍を形成することもある(腸管外アメーバ症)^{10,13,39,40}。以上のような臨床症状を認めるのは *E. histolytica* 感染患者の10%で、90%は臨床症状を認めない無症候性の病原体保持者に該当するとも言われている³⁹。また、*E. histolytica* は豚にも感染するため、豚はこの種のレゼルボアとして重要な役割を担う²⁸。

【豚の *Entamoeba*】

豚では *E. polecki* と *E. suis* の報告がある。前者では、豚以外にヒトからも検出されているが、病原性は低いと考えられている^{3,23,27}。一方、後者の *E. suis* は不明な点が多く、豚における病原性及び浸潤状況は分かっていない。両者は形態的に類似し、過去には同一種と考えられていた^{6,22}。しかし、*Entamoeba* の小サブユニットリボソーム RNA (SSU rRNA) 遺伝子領域での DNA 塩基配列及び系統樹解析により、*E. polecki* と *E. suis* が別種であることが明らかにされている⁵。また、これら遺伝子解析による結果は、前述したシスト内の核数による形態学的な分類とほぼ一致している⁴。しかし、この系統樹解析で、*E. suis* が属するクラスターは、ヒトの口腔内に寄生する *E. gingivalis* が含まれ、本種のシスト内には核は確認されず、1核である *E. suis* とは差異がある。*E. suis* の報告は、ベトナムの豚から検出された1報⁵と、我々が報告した日本の症例¹⁶のみであり、さらなる症例の蓄積並びにその解析が待たれている。

【国内における *Entamoeba* 属を疑う豚の感染事例】

日本では、過去に香川県で出血性大腸炎を呈した豚のアメーバ症²¹、新潟県でアメーバ様原虫を主体とし

たコクシジウムおよびバランチジウムの混合感染による豚の下痢症¹¹の報告がある。これらは糞便検査、病理組織学的検索を中心とした形態観察に基づいてアメーバ原虫の関与が確認されたもので^{11,21}、検出されたアメーバ原虫について分子生物学的手法を用いた種の同定は未実施、または実施したが同定に至っていない。

【豚の *Entamoeba suis* による出血性大腸炎の肉眼及び組織所見】

著者らが経験した *E. suis* の症例の概要について述べる¹⁶。

長崎県内で母豚270頭を飼養する一貫経営農場において、2013年6月下旬、3ヵ月齢の豚群(148頭、約10頭/房)に軟便または水様性下痢が数日間にわたって散発的にみられ、7月初旬に3頭が死亡した。同一農場において、同年11月に6ヵ月齢の肥育豚1頭が急死した。7月と11月の死亡豚各1頭の計2頭の病理解剖を実施し、2頭に類似した所見が得られている。

肉眼的には、盲結腸から直腸におよぶ大腸粘膜の充出血と肥厚、腸間膜の水腫(図1)が特徴的で、その他に膀胱粘膜の充血と肥厚が認められている。

組織所見では、大腸粘膜の出血と血栓形成、粘膜表層の変性・壊死が認められ、粘膜表層には線維素析出と多数の好中球浸潤もみられている(図2a)。粘膜固有層には多数のリンパ球と形質細胞が浸潤しており、粘膜下組織では、重度のうっ血、水腫、血栓形成が認められている。特に、大腸内腔や粘膜病変部において不整円形を呈するアメーバ原虫の多数のトロフォゾイトと少数のシスト様虫体が観察されている(図2b)。トロフォゾイトは直径約10~15 μ mで過ヨウ素酸シッフ反応(PAS染色)に陽性を示している。シスト様虫体は細胞質内に濃染する1個の核を入れ、トロフォゾイトは赤血球の貪食も顕著であった。トルイジンブルー染色では赤血球と血栓が明瞭に観察されている。ワーチン・スターリー染色²⁴では、コンマ型やらせん状の菌体は認められていない。

この事例では、病理組織学的検査により出血病変がみられた大腸の内腔、粘膜表層ないし粘膜固有層においてのみアメーバ原虫が認められている。また、原虫の赤血球貪食、大腸粘膜表層の変性・壊死は、*E. histolytica* の病変と類似している。

【*Entamoeba suis* の超微形態】

長崎県の症例¹⁶の結腸を用いた透過型電子顕微鏡検



図1 出血性大腸炎を呈した豚の結腸の肉眼写真：粘膜の肥厚と充出血、腸間膜の水腫

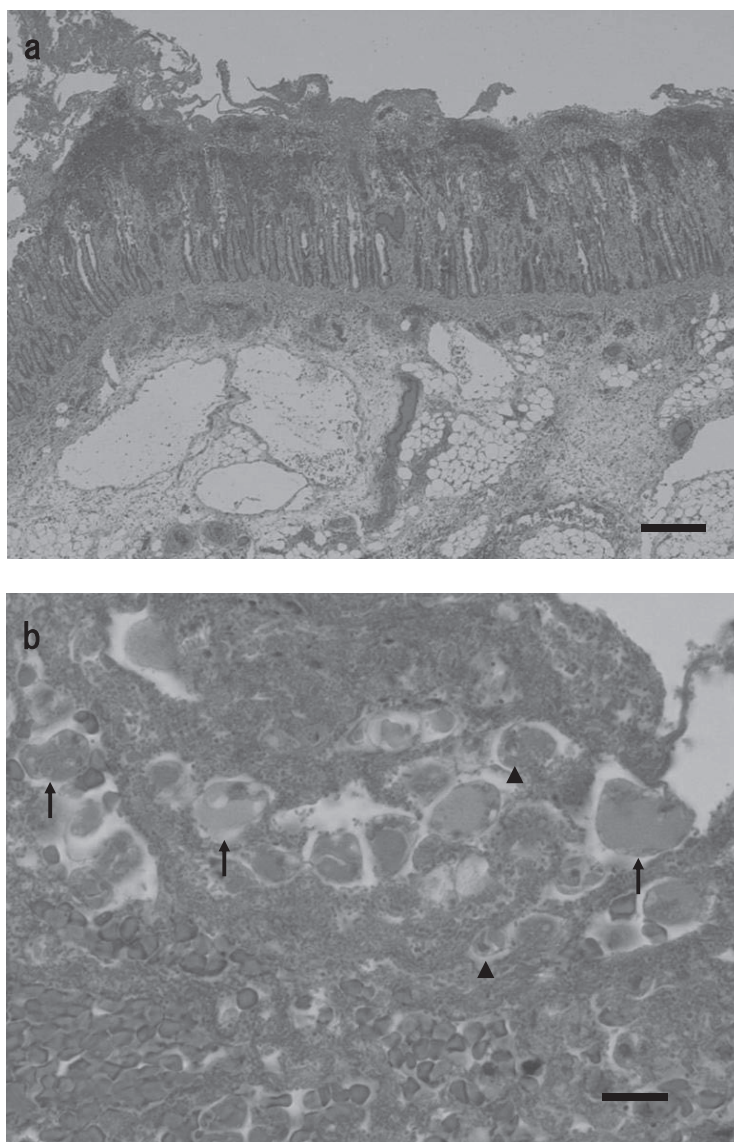


図2 図1の結腸の組織写真（HE染色）：a 粘膜固有層の出血、血栓、粘膜表層の線維素析出、粘膜下組織のうっ血、水腫、血栓、bar：250 μ m。b 粘膜表層の直径10～15 μ mの不整円形を呈するアメーバ虫体（トロフォゾイト；矢印）、シスト様物（矢頭）、bar：10 μ m。

査では、トロフォゾイトの細胞質内に電子密度の高いミトコンドリア、貪食された赤血球、核膜寄りにクロマチンが偏在した核が観察されている（図3）。

一般的な *Entamoeba* 属原虫は、典型的なミトコンドリアを欠き^{14,25,38}、代わりにミトコンドリアに由来するとされるマイトソームを有している³⁷。しかしながら、長崎県の症例¹⁶に検出された *E. suis* は、*Blastocystis hominis*（ヒトプラストシスチス）のミトコンドリア³²と同様の構造を有し、他の *Entamoeba* とは異なる超微細構造を有している。

【*Entamoeba* 種の同定】

Entamoeba 属を同定する最も一般的な方法に、糞便検査や病理組織学的検査といった形態に基づく鑑別がある^{8,20,39}。しかし、虫体の形態のみでは種の判別まで

は難しい場合もある²⁰。血清学的検査では、*E. histolytica* に対する抗体が豚の *Entamoeba* 属に交差反応を示すことが知られており、現時点では、種を同定出来る特異的診断用抗体はない^{9,21}。一方、人の *Entamoeba* 属において、形態的には区別出来ないが、組織侵入性を有し病原性のある *E. histolytica* と非病原性の *E. dispar* の鑑別にPCRが用いられている^{1,7,34}。我が国においても、両種は広く存在し、人や動物^{2,13,26,31}において報告されている。両種は、人以外の動物にも感染性を有するため、豚から検出されたアメーバにおいても、これらPCR法が実施されてきた。しかしながら、これまでに豚由来のアメーバでの解析で、目的とする増幅産物は得られていない¹¹。我々が行った豚由来サンプルでも、同様の結果であった（図4）。

Clark ら（2006）は、豚の *Entamoeba* 属の検出、及

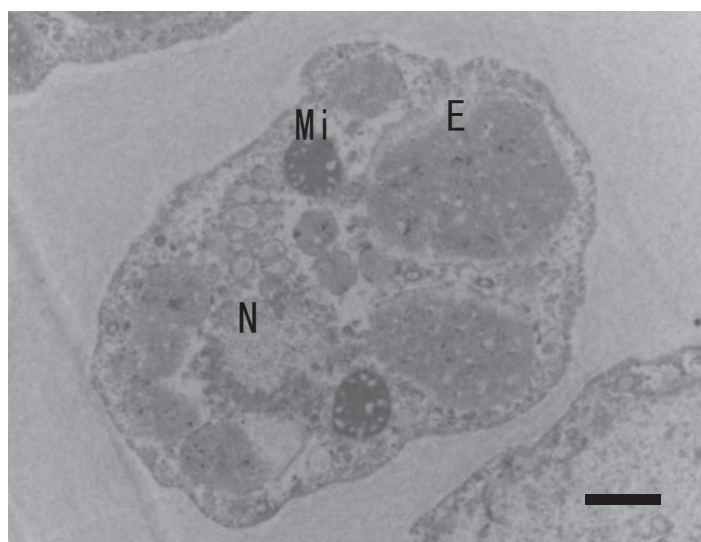


図3 アメーバ虫体（トロフォゾイト）の電子顕微鏡写真（TEM）：虫体内の核（N）、電子密度の高いミトコンドリア（Mi）、貪食された赤血球（E）、bar：1 μm。

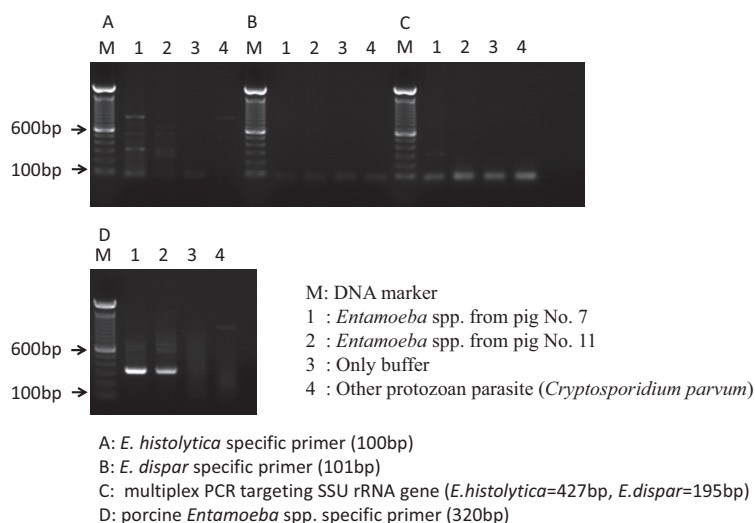


図4 *Entamoeba* 属の種特異的PCR（電気泳動像）：豚由来サンプルでは *E. histolytica* と *E. dispar* の増幅は認められず、豚の *Entamoeba* 属を検出するプライマーで約320bpの増幅産物が得られた。

び同定に有用なPCRプライマーを報告した⁵⁾。これによると、豚由来のアメーバのみ増幅が可能であり、ヒトの他、鶏等のサンプルからは増幅がみられない。我々の試験¹⁶⁾においても、このプライマーを使用したPCRにより、約320 bpの期待される増幅産物が得られている(図4)。

【豚の *Entamoeba suis* の多座位配列解析】

長崎県の死亡豚2頭の結腸内容物を用いて、SSU rRNA 遺伝子のPCRを実施し、シーケンスにより *Entamoeba* 種の同定が行われている¹⁶⁾。また、アクチン遺伝子領域の多座位解析³³⁾により系統樹解析³⁶⁾が実施されている。併せて、2010年1月から2011年1月に埼玉県内で飼育されていた豚(特に臨床症状は無く、糞便検査で少数のアメーバ様原虫が検出された)の糞便5検体についても同様の検査を実施している¹⁶⁾。

長崎県の1検体及び埼玉県の4検体は、SSU rRNA のPCRとシーケンス解析により *E. suis* と同定されている¹⁶⁾。さらに、アクチン遺伝子に基づく系統樹解析では、同定された *E. suis* は、その他のアメーバ原虫と同様に、*E. histolytica* や *E. invadens* と同じクラスターに分類される¹⁶⁾。

系統樹解析では、*E. suis* は形態的に類似している *E. polecki* などの単一核のアメーバ種とは離れており、さらに超微細構造も異なっている¹⁶⁾。これは、形態と分子生物学的分類との間に不一致があったという報告⁵⁾を裏付けるものである。さらに、現在、GenBankには遺伝子登録数が十分ではないが、我々はアクチン遺伝子の多座位解析により検出された *E. suis* の遺伝子配列を決定した。この遺伝子領域の解析は、*Entamoeba* 属の分類に関して新たな知見をもたらすものと考えられる。

【類症鑑別】

豚で出血性大腸炎がみられる代表的な病気の一つに、*Brachyspira hyodysenteriae* による豚赤痢がある。しかし、長崎県の事例¹⁶⁾では、病変部組織にブラキシピラ属菌を疑うらせん状の菌体は認められず、結腸内容物の培養検査も陰性であった。さらに当該農場では、数年前から散発的に肥育豚の下痢がみられており、豚赤痢の対策として予防的に抗生物質(リンコマイシン)が飼料添加されていたが、著効はみられていない。以上の所見は、*E. suis* が出血性大腸炎を引き起こす原因となる可能性を示唆している。

なお、その他の病原細菌についても主要臓器、腸内

容物からは検出されていない。

【治療】

ヒトのアメーバ赤痢の治療では、メトロニダゾールを主成分とする抗原虫薬が第一選択薬として使われる³⁹⁾。しかし、現在(2013年11月30日以降)、当該物質の家畜への使用は禁止されている。また、ヒトの糞便中へのシスト排出を止める薬剤としてパロモマイシンを主成分とした抗菌薬がある³⁹⁾が、国内では動物用医薬品としては未承認であり、実際のところ家畜のアメーバ症への使用状況やその効果は不明である。新潟県の事例では、オキシテトラサイクリンの飼料添加により症状の改善がみられたと報告している¹¹⁾。しかし、長崎県の発生農場では、7月の死亡事例発生後にオキシテトラサイクリンの飼料添加を試みたが、同年11月に同様の事例が発生している¹⁶⁾。

以上のように、豚のアメーバ症における治療方法・効果についての報告はほとんどなく、不明な点が多い。さらに、有効薬剤の一つは家畜での使用が禁止されていることから、今後、アメーバ原虫が関与した疾病の増加が懸念される。

【予防と対策】

Entamoeba の感染はシストを経口的に摂取することで成立する。シストは感染動物の糞便中に排出されるため、糞便の直接摂取の他にシストで汚染された飼料や水などを介して感染する可能性がある¹⁹⁾。香川県の事例では、肥育豚以外に临床上健康な母豚の糞便からシストが、また離乳豚から栄養型虫体が検出されている²¹⁾。長崎県の事例では、詳細な疫学調査は未実施であり *E. suis* の感染経路については不明だが、考えられる予防・対策として豚舎・豚房の水洗・消毒、敷料交換(長崎県の発生豚房では敷料としてノコクズが使われていた)があげられる。一般的に原虫類のシストは乾燥や熱に弱い、多くの消毒薬に抵抗性を示すので、オールアウト後に糞便等の有機物を除去し、水洗後は十分に乾燥させることが重要である。その他、消毒には石灰乳塗布、十分な空舍期間を設けるといった対策が有効と思われる。しかし、豚での有効な治療方法が不明であるため、一貫経営農場で母豚が感染している場合には、豚舎の洗浄・消毒のみでは感染サイクルを絶つのは困難かもしれない。

【おわりに】

E. suis は病原性を示さないという報告もある³⁰⁾が、実際のところ、その病原性についてはよく分かっていないのが現状と思われる。今回、著者らが経験した豚の調査結果は、*E. suis* が優先的に大腸粘膜に侵入して損傷を与え、豚に水様性下痢や重篤な出血性下痢を引き起こす可能性があることを示唆するものである¹⁶⁾。しかしながら、*E. suis* の病原性とその感染の程度、他病原体との混合感染、または宿主の健康状態に影響されるかという点については、明らかにすることが出来なかった。こうした問題点を解明するためには、今後さらに症例を積み重ねるとともに、詳細な疫学調査や分子生物学的解析が必要である。

稿を終えるにあたり、病理学的検索にご協力いただいた農研機構・動物衛生研究所の小林勝技師、嶋田恵美技師に深謝する。

【引用文献】

- 1) 阿部仁一郎ら (2002) 赤痢アメーバ *Entamoeba histolytica* と *Entamoeba dispar* の鑑別診断における Multiplex-PCR 法の有用性. 感染症学雑誌, 76: 921-927.
- 2) Carin W (1976) *Entamoeba histolytica* infection in a German shepherd dog. Can Vet J, 17: 259-263.
- 3) Chacín-Bonilla L (1992) *Entamoeba polecki*: human infections in Venezuela. Trans R Soc Trop Med Hyg, 86: 634.
- 4) Clark CG, et al. (1997) Intraspecific variation and phylogenetic relationships in the genus *Entamoeba* as revealed by riboprinting. J Eukaryot Microbiol, 44: 142-154.
- 5) Clark CG, et al. (2006) 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.
- 6) Das N, et al. (1968) A hyperparasite of *Entamoeba suis* from the Indian domestic pig *Sus scrofa*. J Protozool, 15: 383-385.
- 7) Evangelopoulos A, et al. (2000) 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.
- 8) Fotadar R, et al. (2007) Laboratory diagnostic techniques for *Entamoeba* species. Clin Microbiol Rev, 20: 511-532.
- 9) Giboda M, et al. (1988) *Entamoeba polecki*: morphology, immunology, antigen study and clinic of the first infections in Czechoslovakia. Folia Parasitol (Praha), 35: 11-16.
- 10) Hamzah Z, et al. (2006) Differential detection of *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, and *Entamoeba moshkovskii* by a single-round PCR assay. J Clin Microbiol, 44: 3196-3200.
- 11) 桐生直哉ら (2012) アメーバ様原虫を主体とした原虫の混合感染による豚の下痢症. 平成23年度新潟県家畜保健衛生業績発表会集録, p77-79.
- 12) Kojimoto A, et al. (2001) Amebiasis in four ball pythons, *Python reginus*. J Vet Med Sci, 63: 1365-1368.
- 13) 国立感染症研究所 (2007) アメーバ赤痢2003-2006. 病原体微生物検出情報, 28: 103-104.
- 14) León-Avila G, et al. (2004) Mitosomes of *Entamoeba histolytica* are abundant mitochondrion-related remnant organelles that lack a detectable organellar genome. Microbiology, 150: 1245-1250.
- 15) Levine, ND (1985) Veterinary Protozoology. Iowa State University Press, Ames, IA, p414.
- 16) Matsubayashi M, et al. (2014) Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: implications for pathogenicity. Parasitol Res, 113: 3023-3028.
- 17) McConnachie EW (1954) The influence of environmental factors on the size of cysts of *Entamoeba invadens* Rodhain, 1934. Parasitology, 44: 342-348.
- 18) Neal RA (1966) Experimental studies on *Entamoeba* with reference to speciation. Adv Parasitol, 4: 1-51.
- 19) 日本獣医師会 (2004) 共通感染症ハンドブック, p80-81.
- 20) 野崎知義ら (2003) アメーバ赤痢 検査・診断マニュアル, p1-25
- 21) 野崎宏ら (1993) 香川県で発生した豚のアメーバ症. 日本獣医師会雑誌, 46: 639-642.
- 22) Pakandl M (1994) The prevalence of intestinal protozoa in wild and domestic pigs. Vet Med

- (Praha), 39: 377-380.
- 23) Park SK, et al. (2004) Status of intestinal parasite infections among children in Bat Dambang, Cambodia. Korean J Parasitol, 42: 201-203.
 - 24) Prophet EB, et al. (1992) Laboratory Methods in Histotechnology. American Registry of Pathology, Washington DC, pp. 132-214.
 - 25) Riordan CE (2003) *Cryptosporidium parvum* Cpn60 targets a relict organelle. Curr Genet, 44: 138-147.
 - 26) Rivera WL, et al. (2010) *Entamoeba histolytica* and *E. dispar* infections in captive macaques (*Macaca fascicularis*) in the Philippines. Primates, 51: 69-74.
 - 27) Santos HL, et al. (2010) Differential identification of *Entamoeba* spp. based on the analysis of 18S rRNA. Parasitol Res, 106: 883-888.
 - 28) Schuster FL, et al. (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. Vet Parasitol, 126: 91-120.
 - 29) Siddiqui WA, et al. (1965) The fine structure of axenically-grown trophozoites of *Entamoeba invadens* with special reference to the nucleus and helical ribonucleoprotein bodies. J Protozool, 12: 448-459.
 - 30) Solaymani-Mohammadi S, et al. (2004) Intestinal protozoa in wild boars (*Sus scrofa*) in western Iran. J Wildl Dis, 40: 801-803.
 - 31) Stedman NL, et al. (2003) Gastric amebiasis due to *Entamoeba histolytica* in a Dama Wallaby (*Macropus eugenii*). Vet Pathol, 40: 340-342.
 - 32) Stenzel DJ, et al. (1996) *Blastocystis hominis* revisited. Clin Microbiol Rev, 9: 563-584.
 - 33) Sulaiman IM, et al. (2002) Molecular phylogeny and evolutionary relationships of *Cryptosporidium* parasites at the actin locus. J Parasitol, 88: 388-394.
 - 34) Tachibana H, et al. (1991) Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. J Infect Dis, 164: 825-826.
 - 35) Tachibana H, et al. (2009) Isolation and characterization of a potentially virulent species *Entamoeba nuttalli* from captive Japanese macaques. Parasitology, 136: 1169-1177.
 - 36) Tamura K, et al. (2011) MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. Mol Biol Evol, 28: 2731-2739.
 - 37) Tovar J, et al. (1999) The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. Mol Microbiol, 32: 1013-1021.
 - 38) Tovar J, et al. (2003) Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. Nature, 426: 172-176.
 - 39) 柳澤如樹 (2012) 原虫疾患：赤痢アメーバ症. モダンメディア, 58: 237-245.
 - 40) 吉田幸雄ら (2013) 原虫類. 吉田幸雄ら著 医動物学 第6版, p12-55. 南山堂, 東京.