

資料

豚の *Entamoeba polecki* と *Lawsonia intracellularis* が関与する腸炎

金森健太¹⁾、貞弘真行¹⁾、松林 誠²⁾、所 正治³⁾、阿部仁一郎⁴⁾、播谷 亮⁵⁾、芝原友幸⁵⁾

(¹⁾ 静岡県中部家畜保健衛生所、²⁾ 大阪府大・生命環境科学研究科・獣医国際防疫学、³⁾ 金沢大・院医・寄生虫感染症制御学、⁴⁾ 大阪市環科研・微生物保健、⁵⁾ 農研機構・動物衛生研究所 病態研究領域)

Kanamori, K, Sadahiro, M., Matsubayashi, M., Tokoro, M., Abe, N., Haritani, M. and Shibahara, T. (2016).

Swine enteritis associated with *Entamoeba polecki* and *Lawsonia intracellularis*.

Proc. Jpn. Pig Vet. Soc. 67, 28-33.

キーワード：アメーバ症、*Entamoeba polecki*、*Entamoeba suis*、*Lawsonia intracellularis*、潰瘍

【はじめに】

Entamoeba 属の原虫は、一般にアメーバ様の形態をもち、寄生性のもの、及び脊椎動物などに寄生することなく自由生活を営むもの、その両方の性質を有するもの等、多くの種が含まれる¹⁾。寄生生活を行う種の多くは、中間宿主を持たず、外界において強い耐性を有する嚢子（シスト）と、アメーバ様の栄養型（トロフォゾイト）の2形態をとる^{21,22)}。宿主への感染は、感染性を有する成熟シストを経口的に摂取することにより成立し、この成熟シスト内の核数により形態的に4群に分類される。つまり、1つの核を有する単核嚢子群（*E. polecki* や *E. suis* 等）、4核の四核嚢子群（*E. histolytica*、*E. dispar* 及び *E. invadens* 等）、8核の八核嚢子群（*E. coli* 等）及び無核の無嚢子群（*E. nuttalli* 等）である。

ヒトには、現在のところ6種（*E. histolytica*、*E. dispar*、*E. moshkovskii*、*E. polecki*、*E. coli* 及び *E. hartmanni*）の感染が確認されている。中でも、*E. histolytica* は病原性が強く、腸管内で脱嚢した栄養型は、腸管粘膜に侵入し、アメーバ性大腸炎や肝膿瘍を形成し、感染者は稀に死に至る¹⁷⁾。本種は、ヒト以外の霊長類からも検出され、また実験的にはミニブタにも感染することが報告されており¹⁴⁾、これらの動物は本種の保菌動物（レゼルボア）として機能する可能性が示唆されている。しかし、本種以外のヒトや動物に寄生する多くの *Entamoeba* 種については、病原性は不明、または低いと考えられている。

近年、豚に寄生するアメーバ種について、病原性を有することを示す興味深い知見が報告されている⁹⁾。

本稿では、我々が経験した症例⁸⁾の概要を紹介するとともに、増殖性腸炎罹患豚における *Entamoeba* 種の関与について記述する。

【豚の *Entamoeba* 種】

豚では、上述した *E. histolytica*⁵⁾（実験感染例）の他に、*E. polecki* と *E. suis* の2種が自然感染することが報告されている^{3,12)}。*E. polecki* はヒトにも感染性を有するが、*E. suis* は豚以外の動物からは検出されておらず、豚に特異的に寄生する種であると考えられている²⁾。後者2種は、成熟シスト内に一つの核を持つ単核嚢子群であり、形態学的に区別することは困難である。しかし系統発生的解析により、*E. suis* は *E. gingivalis*（シスト未形成、ヒトの口腔内に寄生する）と単一のクラスターを形成し、*E. polecki* とは遺伝学的に異なることが証明された²⁾。

近年、長崎県の出血性大腸炎を起こした豚の腸内容物から、*E. suis* が検出され、本種が病原性を有することが示された⁹⁾。しかし、この報告以外に、豚に寄生する *Entamoeba* について、遺伝子解析及び病理組織学的解析を行った報告はなく、他の病原因子との関与も含め、これらの病原性についてさらなる情報の蓄積が望まれていた。

2014年に、我々は重度の消瘦と慢性下痢が問題として認められている静岡県の養豚一貫経営農場において、症状を示す3頭の豚について病性鑑定を実施した。その結果、回腸の重度な潰瘍病変部位に *Entamoeba* spp. の栄養型が検出された。さらに超微形態学的特徴及び分子生物学的解析により、回腸に認められた *Entamoeba* spp. は、*E. polecki* であると同定された。この症例は増殖性腸炎を引き起こす *Lawsonia intracellularis* にも感染しており、*E. polecki* の病原性を考察する上で

貴重な症例となると考えられた⁸⁾。その詳細を以下に述べる。

【*E. polecki* と *L. intracellularis* の混合感染症例の概要】

E. polecki と *L. intracellularis* の混合感染症例の概要は次のとおりである。

〔発生状況〕

発生農場は40頭の母豚、2頭の雄豚、400頭の肥育豚を飼育する静岡県の一貫経営農場で、豚舎内はおよそ10頭程度に分けられた豚房で区切られ、肥育豚は出荷される6か月齢まで同農場で飼養されていた。

2014年9月、3頭（No.1:46日齢、No.2、3:69日齢）の消瘦（図1）及び下痢を呈している豚が病性鑑定に供された。



図1 同腹豚における重度の消瘦。

〔材料と方法〕

＜病理組織学的検査＞

病理解剖後、十二指腸、空腸、回腸、盲腸、結腸、直腸及び主要臓器を採材し、10%ホルマリン緩衝液において室温固定後、パラフィン包埋処理、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE染色）を行い、鏡検による評価を実施した。さらに消化器のパラフィンブロックは過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色とワーチン・スターリー染色¹³⁾を実施した。

＜免疫組織化学的検査＞

抗 *L. intracellularis* マウスモノクローナル抗体¹⁵⁾ を用いた免疫染色を、病変が認められた腸管に対して実施した。また肺と各種リンパ節は抗豚繁殖・呼吸障害症候群ウイルス（PRRSV）家兎血清⁶⁾ と、抗豚サーコ

ウイルス2型（PCV2）家兎血清（動衛研）を用いた免疫染色による評価を追加した。

＜病原学的検査＞

ウイルス学的検査は、豚コレラ検出キット（京都微研）を用い、扁桃において抗原検査を行った。細菌学的検査は、脳及び主要5臓器についてDHL培地及び7.5%血液加寒天培地を用い、嫌気、微好気培養を48時間実施した。寄生虫学的検査は糞便を検体としたショ糖浮遊法¹⁸⁾を実施した。

＜透過型電子顕微鏡検査＞

No.3のホルマリン固定された回腸組織を、1Mリン酸緩衝液（PBS、pH7.4）でリンスし、1%四酸化オスmiumで固定、エタノールで脱水し、エポンで包埋した。超薄切は酢酸ウラニル（TAAB Laboratories Equipment Ltd., Aldermaston, 英国）で染色し、透過型電子顕微鏡検査を実施した⁹⁾。

＜分子生物学的解析＞

Entamoeba spp の分子生物学的解析には、No.3の腸管内容物を材料とし、QIAamp DNA Stool Mini Kit(QIAGEN GmbH, Hilden, ドイツ)を用い、定法に従いゲノムDNAを抽出した。

抽出されたDNAを用い、PCRを実施した（表1）。プライマーは *E. histolytica* と *E. dispar* を検出するため、30-kDa cysteine-rich protein gene を標的としたもの（p11-p12、p13-p14）¹⁶⁾、及び small subunit ribosomal RNA (SSU rRNA) 遺伝子を標的としたもの（EhL-EhR、EdL-EdR）⁴⁾ を用いた。また、多くの *Entamoeba* 種における、SSU rRNA 遺伝子を増幅可能であるプライマー（Entam1、Entam2）²⁰⁾、そして *E. polecki* の特異プライマー（Epolecki1-Epolecki2）¹⁹⁾ と *E. suis* の特異プライマー（1st: 764-RD3、2nd: 764-765; Nested PCR）²⁾ を用いた。増幅産物は、1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen GmbH) を用いて精製し、ダイレクトシーケンシング法により塩基配列を決定した⁹⁾。

〔結果及び考察〕

＜肉眼所見＞

剖検時、No.1の肺に点状から斑状の出血巣が認められ、No.2、3では肺の肝変化が認められた。No.2、3の回腸は、ゴムホース様の腫大と充血、さらにNo.3

表 1. 本研究で使した *Entamoeba* に関する各種 PCR のプライマー配列と特異性

	Sequences of each primer pair	Target	Product size (bp)	特異性	文献
p11	5'-GGA GGA GTA GGA AAG TTG AC-3' (Forward)	30-kDa	100	<i>E. histolytica</i>	16
p12	5'-TTC TTG CAA TTC CTG CTT CGA-3' (Reverse)	cysteine			
p13	5'-AGG AGG AGT AGG AAA ATT AGG-3' (Forward)	rich protein	101	<i>E. dispar</i>	
p14	5'-TTC TTG AAA CTC CTG TTT CTA C-3' (Reverse)				
EhL	5'-ACA TTT TGA AGA CTT TAT GTA AGT A-3' (Forward)	SSU rRNA	427	<i>E. histolytica</i>	4
EhR	5'-CAG ATC TAG AAA CAA TGC TTC TCT-3' (Reverse)				
EdL	5'-GTT AGT TAT CTA ATT TCG ATT AGA A-3' (Forward)		195	<i>E. dispar</i>	
EdR	5'-ACA CCA CTT ACT ATC CCT ACC-3' (Reverse)				
Entam1	5'-GTT GAT CCT GCC AGT ATT ATA TG-3' (Forward)	SSU rRNA	Approximately 550	<i>Entamoeba</i> spp.	20
Entam2	5'-CAC TAT TGG AGC TGG AAT TAC-3' (Reverse)				
Epolecki1	5'-TCG ATA TTT ATA TTG ATT CAA ATG-3' (Forward)	SSU rRNA	Approximately 170	<i>E. polecki</i>	19
Epolecki2	5'-CCT TTC TCC TTT TTT TAT ATT AG-3' (Reverse)				
764	5'-ATC AAA TCA ATT AGG CAT AAC TA-3' (Forward)	SSU rRNA	1800	<i>E. suis</i>	2
RD3	5'-ATC CTT CCG CAG GTT CAC CTA C-3' (Reverse)			(Nested PCR)	
764	5'-ATC AAA TCA ATT AGG CAT AAC TA-3' (Forward)	SSU rRNA	764		
765	5'-AAT TAA AAC CTT ACG GCT TTA AA-3' (Reverse)				

の回腸粘膜面では細胞頽廃物や好中球から成る偽膜が管腔内に重度に認められた (図 2)。

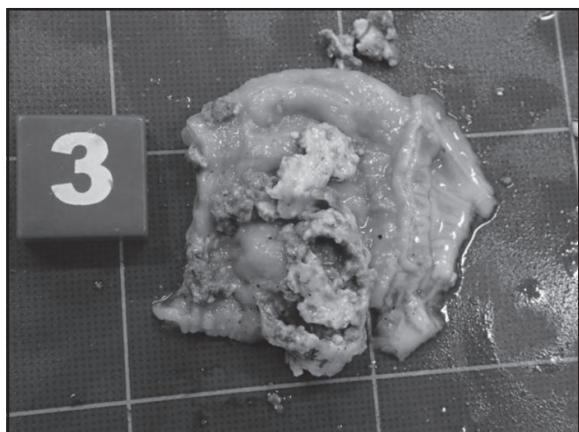


図 2 豚 No. 3 の消化器の肉眼写真：腫脹した回腸の切開部。粘膜面に細胞頽廃物から成る、重度の偽膜形成。

<病理組織学的検索>

病理組織学的所見として、No. 2、3 の回腸において陰窩上皮細胞の腺腫様過形成が認められた。No. 3 では重度のマクロファージや好中球の浸潤と共に絨毛の萎縮が認められ (図 3 a)、潰瘍部の粘膜上皮細胞は壊死・脱落し、粘膜固有層に *Entamoeba* spp. の栄養型が多数認められた (図 3 b)。この栄養型は10-15 μ m の大きさで、1つの核を有していた。これらはPAS陽性を示し、他の細胞とは明らかに区別できた (図 4)。

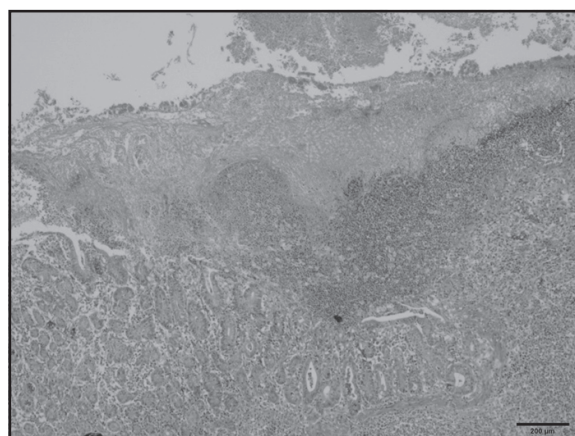


図 3 図 2 の組織写真 (HE 染色) : a 陰窩上皮細胞の腺腫様過形成、粘膜表層における炎症細胞の浸潤、絨毛の萎縮及び消失。

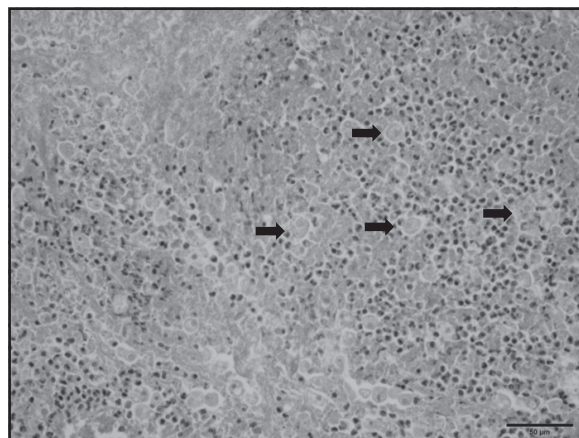


図 3 図 2 の組織写真 (HE 染色) : b 粘膜表層深部から粘膜固有層に認められた直径10~15 μ m の不整形を呈するアメーバ虫体 (栄養型：矢印)。

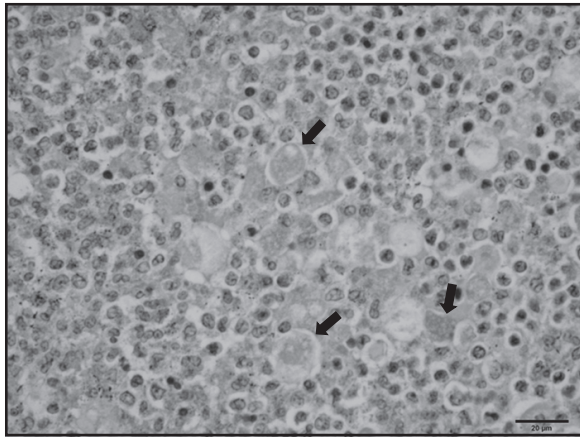


図4 PAS染色。アメーバ虫体（矢印）はPAS陽性反応を示す。

<超微形態学的検索>

透過型電子顕微鏡を用いた検査では、*Entamoeba* spp. の細胞質内に、細菌の貪食が確認された。赤血球の貪食像は認められなかった。また、*E. suis* とは異なり⁹⁾、栄養型の細胞質内にミトコンドリア様構造物は認められなかった（図5）。

ワーチン・スターリー染色では、回腸陰窩上皮細胞の細胞質内に好銀性のコマ状短桿菌が多数認められ（図6a）、抗 *L. intracellularis* マウスモノクローナル血清を用いた免疫染色で同菌は陽性反応を示した（図6b）。*Entamoeba* spp. の細胞質内に認められた細菌は陽性を示さなかった。また、抗 PRRSV 家兔血清や、抗 PCV2 家兔血清を用いた免疫染色では陽性反応は認められなかった。

豚コレラ検査は陰性で、細菌検査では有意な菌は分離されず、ショ糖浮遊法を用いた寄生虫学的検査ではオーシストや寄生虫卵は検出されなかった。

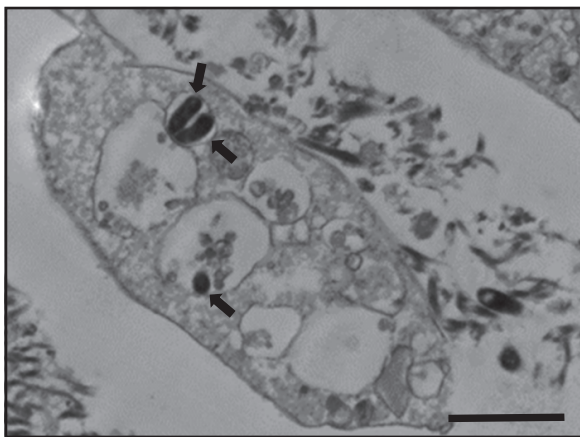


図5 *E. polecki*（栄養型）の透過型電子顕微鏡写真：栄養型の細胞質内に貪食された細菌（矢印）、bar：1 μm。

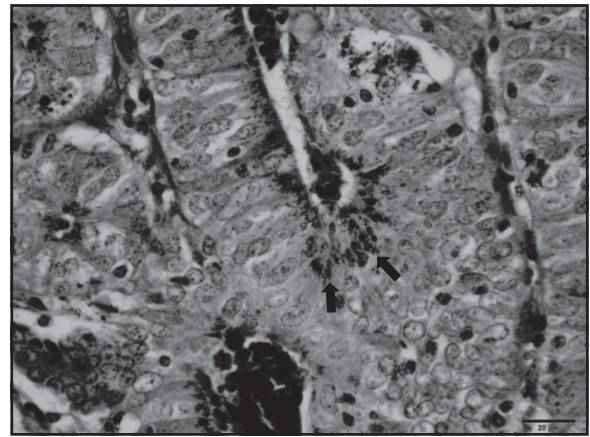


図6：a ワーチン・スターリー染色。陰窩上皮細胞の管腔側に多数の好銀性の菌体（矢印）。

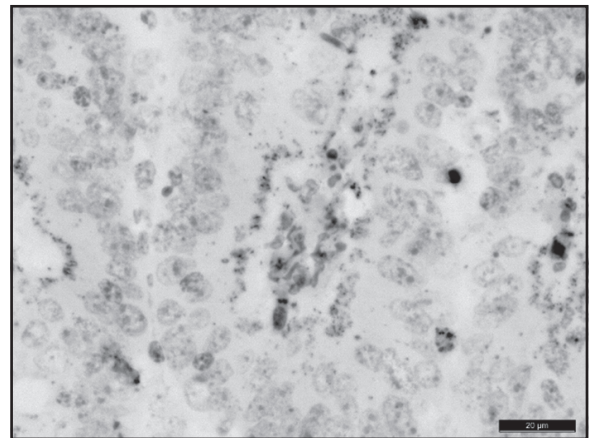


図6：b 抗 *L. intracellularis* マウスモノクローナル抗体を用いた免疫染色。

これらの結果から、No. 2 と No. 3 は *L. intracellularis* に感染し、さらに No. 3 は *Entamoeba* spp. にも感染していたことが分かった。

< *Entamoeba* spp. の分子生物学的解析 >

各種 PCR の結果、*E. histolytica* と *E. dispar*、及び *E. suis* の特異遺伝子の増幅は認められなかった。*E. polecki* の特異プライマーを用いた PCR において、約 200bp の増幅産物が認められ、その塩基配列を決定したところ、*E. polecki* の塩基配列とほぼ一致した（相同率99.5%）。これらの結果から、回腸粘膜に認められた *Entamoeba* spp. の栄養型は *E. polecki* であると判明した。また、Entam1 と Entam2 のプライマーは、*Entamoeba* spp. の特異遺伝子を増幅させることができるが、シーケンスの結果、同時に宿主である豚の18S ribosomal RNA 遺伝子も増幅されていることが分かった。

＜総括＞

これまで、我が国の豚において、散発的に *Entamoeba* 様虫体が確認されていた。しかし、種の同定は行われておらず、詳細については不明であった。今回、慢性の下痢症状を呈する豚から、分子生物学的に *E. polecki* が同定された。さらに、*L. intracellularis* との混合感染例であることが分かった。*L. intracellularis* は細胞内寄生のグラム陰性のコマ状短桿菌で、豚を含む多くの動物に増殖性腸炎と、陰窩上皮細胞の腺腫様過形成を引き起こす^{7,10)}。今回、潰瘍を形成している箇所では、*E. polecki* の栄養型が多数認められたことから、*L. intracellularis* の感染により粘膜上皮の壊死・脱落が起こり、同部位から *E. polecki* は粘膜固有層へと侵入し、病態を重篤化させ、これにより豚は、慢性の下痢症状を呈したと考察された。ヒトや野生のイノシシにおける従来の報告では、*E. polecki* (単独感染) は病原性が低いと報告されているが、今回の結果から、*L. intracellularis* のような他の病原体と混合感染した際は、症状をより悪化させる可能性が示され、本稿は *E. polecki* が豚の腸管病変に関与していた世界で初めての報告となる。

【予防と対策】

Entamoeba はシストを経口的に摂取することで、宿主への感染が成立する。感染宿主の糞便中に排出されたシストは、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¹¹⁾。原虫類のシストは乾燥や熱に弱いとされているが、多くの消毒薬に抵抗性を示すため、オールアウト後の豚舎清掃の徹底と、水洗後の乾燥を十分に行うことが重要である。その他、消毒には石灰乳の塗布、十分な空舎期間を設けるといった対策が有効と思われる。

豚の *Entamoeba* について、有効な治療方法に関する報告はない。このことから、病性鑑定を行った農場では、症状を低減させる目的で、消石灰を用いた豚舎の徹底的な消毒と、消毒後の十分な乾燥、離乳豚における *L. intracellularis* に対するワクチン接種及び抗生剤(タイロシン)の飼料への添加を指導したところ、重度の消瘦や慢性下痢の症状は治まりつつある。

【最後に】

E. polecki の病原性、罹患率等については、十分な情報があるとは言えない。実際に *E. polecki* がどのように組織内へ侵入し、病態を悪化させていたのか、感染量や宿主の健康状態等がどのように影響しているか、

また既報の *E. suis*⁹⁾ とは異なり細菌を貧食していた点等、不明な点は残されている。このような問題点を解明するためには、今後もさらに症例を積み重ねるとともに、詳細な疫学調査や組織学的・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) Clark CG, et al. (1995) Axenic cultivation of *Entamoeba dispar* Brumpt 1925, *Entamoeba insolita* Geiman and Wichterman 1937 and *Entamoeba ranarum* Grassi 1879. J Eukaryot Microbiol 42: 590-593.
- 2) 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.
- 3) Desowitz RS, et al. (1986) *Entamoeba polecki* and other intestinal protozoa in Papua New Guinea highland children. Ann Trop Med Parasitol 80: 399-402.
- 4) 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.
- 5) He GZ, et al. (2012) Evaluation of the intestinal microbial diversity in miniature pig after orally infected with *Entamoeba histolytica*. Parasitol Res 111: 939-941.
- 6) Kawashima K, et al. (1996) Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. J Comp Pathol 114: 315-323.
- 7) Lawson GH, et al. (2000) Proliferative enteropathy. J Comp Pathol 122: 77-100.
- 8) Matsubayashi M, et al. (2015) First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ileitis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*. Parasitol Res 114: 3069-3073.

- 9) 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.
- 10) McOrist S, et al. (2005) Defining the full costs of endemic porcine proliferative enteropathy. *Vet J* 170: 8-9.
- 11) 遠藤卓郎ら (2004) アメーバ赤痢 共通感染症ハンドブック, p80-81 社団法人 日本獣医師会.
- 12) Noble GA, et al. (1952) *Entamoebae* in farm mammals. *J Parasitol* 38: 571-595.
- 13) Prophet EB, et al. (1992) Laboratory methods in histotechnology. American Registry of Pathology, Washington, pp 132-214.
- 14) Schuster FL, et al. (2004) Amebae and ciliated protozoa as causal agents of waterborne zoonotic disease. *Vet Parasitol* 126: 91-120.
- 15) Shimizu C, et al. (2010) *Lawsonia intracellularis* and virulent *Rhodococcus equi* infection in a thoroughbred colt. *J Comp Pathol* 143: 303-308. doi: 10.1016/j.jcpa.2010.03.005.
- 16) Tachibana H, et al. (1991) Distinguishing pathogenic isolates of *Entamoeba histolytica* by polymerase chain reaction. *J Infect Dis* 164: 825-826.
- 17) Tanyuksel M, et al. (2003) Laboratory diagnosis of amebiasis. *Clin Microbiol Rev* 16: 713-729.
- 18) Uga S, et al. (2000) Prevalence of *Cryptosporidium parvum* infection and pattern of oocyst shedding in calves in Japan. *Vet Parasitol* 94: 27-32.
- 19) Verweij JJ, et al. (2001) Genetic variation among human isolates of uninucleated cyst-producing *Entamoeba* species. *J Clin Microbiol* 39: 1644-1646.
- 20) Verweij JJ, et al. (2003) Detection and identification of *Entamoeba* species in stool samples by a reverse line hybridization assay. *J Clin Microbiol* 41: 5041-5045.
- 21) 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.
- 22) 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.