

14 *Entamoeba suis* が関与した肥育豚のアメーバ症

中央家畜保健衛生所

鈴田 史子・下條 憲吾

県南家畜保健衛生所

中島 大・常岡 純也

アメーバ症は、*Entamoeba* 属による原虫病の一つで、生活環はトロフォゾイト（栄養体）と感染力を持つシスト（嚢子）の二形態をとる^{9, 10}）。

ヒトでは、*E. histolytica*（赤痢アメーバ）の感染によるアメーバ赤痢が代表的で、大腸に潰瘍を形成し、イチゴゼリー状の粘血便の排出を特徴とする^{9, 10}）。アメーバ赤痢の患者は、世界的に広く分布し、男性同性愛者に多いとされる^{4, 6, 9, 10}）。本病は、感染症法の五類感染症に指定され、人獣共通感染症の一つでもある^{6, 9, 10}）。

一方、豚では、海外において *E. polecki*、*E. suis* などの検出報告があるが²）、わが国における豚のアメーバ関与事例の報告は非常に少なく、これまで分子生物学的手法により種の同定に至った例は見当たらない^{3, 8}）。それゆえに、豚のアメーバ症の病態や浸潤状況は不明な点が多いのが現状である。

今回、県下の一養豚場において、肥育豚に出血性大腸炎がみられ、*E. suis* が関与したアメーバ症と診断されたので、その概要ならびに発生農場出荷豚の廃棄大腸調査、汚染状況調査について報告する。

1 発生状況

母豚 270 頭飼養の一貫経営農場において、平成 25 年 6 月下旬、約 3 か月齢の肥育豚群全体（148 頭）に軟便や水様性の下痢がみられ、7 月初旬に 3 頭が死亡し、1 頭について病性鑑定が実施された（症例 ）。また、11 月に 5 か月齢の肉豚 3 頭が急死し、1 頭について病性鑑定が実施された（症例 ）。2 頭ともに豚丹毒、マイコプラズマ、PCV2 のワクチンが接種されていたが、治療歴はなかった。豚房の敷料としては、

いずれもノコクズが使われていた。

2 材料および方法

（1）病性鑑定

症例 および を病理解剖し、以下の検査を実施した。

1）病理組織学的検査

主要臓器および器官を 10% 中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いパラフィン包埋切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）、過ヨウ素酸シッフ反応（PAS 染色）、ワートン・スターリー染色を実施した。

2）透過型電子顕微鏡検査

症例 のホルマリン固定後の結腸を用いて、樹脂包埋後、酢酸ウラニル水溶液・佐藤氏混合鉛液で染色して観察した。

3）細菌学的検査

主要臓器を用いて、常法に従い一般細菌検査を実施した。また回腸または結腸内容物を用いて、サルモネラ増菌培養、豚赤痢菌培養および *Lawsonia intracellularis*、*Brachyspira hyodysenteriae*、*B. pilosicoli* の遺伝子検査を実施した。

4）寄生虫学的検査

結腸内容物を用いて、*E. histolytica*、*E. dispar* および豚アメーバ属の遺伝子検査を実施した⁵）。

（2）発生農場出荷豚の廃棄大腸調査

平成 26 年 3 月にと畜場で廃棄となった大腸 7 検体について病理組織学的検査および前述のアメーバ種の遺伝子検査を実施した。

（3）発生農場の汚染状況調査

平成 26 年 9 月、ステージ別の糞便として母豚 10 検体、哺乳豚 5 検体、離乳豚 5 検体、肥育豚

(ノコズ豚舎) 5 検体、肥育豚(スノコ豚舎) 5 検体、発育不良豚群 1 検体の計 31 検体、肥育豚舎の飲用水 2 検体、未使用敷料(ノコズ) 1 検体を用いて、シヨ糖浮遊法とヨード染色によりアメーバ原虫のシスト検出を試みた。なお、哺乳豚、離乳豚および肥育豚の糞便は豚舎または豚房毎の複数頭分のプール材料とした。

また、平成 26 年 10 月、急死した 25 日齢の離乳豚 2 頭の結腸組織について病理組織学的検査を実施した。

3 結果

(1) 病性鑑定

剖検所見の概要を表 - 1 に示す。肉眼的に 2 頭に共通して、大腸腸間膜の著しい水腫と漿膜面の点状出血(写真 - 1)、大腸粘膜の充出血と肥厚、偽膜様物の付着が認められた(写真 - 2)。

表 - 1 剖検所見

所見	症例	症例
盲結腸粘膜の肥厚、充出血	+++	+++
空回腸粘膜の肥厚	+	-
腸間膜の水腫	+++	+++
腸間膜Lnの腫大、うっ血	+++	-
腹水貯留	+++	-
体表Ln(下顎・鼠径)の腫大、うっ血	+++	+++
膀胱粘膜の肥厚、充血	+	+

Ln:リンパ節 +++:重度 ++:中等度 +:軽度 -:著変なし



写真 - 1 結腸腸間膜の著しい水腫と漿膜面の点状出血(症例)



写真 - 2 結腸粘膜の充出血、偽膜様物の付着(症例)

組織所見を表 - 2 に示す。2 頭ともに大腸粘膜の著しい出血が認められ(写真 - 3)、粘膜表層の変性・壊死、粘膜固有層から粘膜下組織における血栓形成や血管変性、粘膜下組織の水腫も著明であった(写真 - 4)。特に、粘膜表層の出血病変部や大腸内腔において不整円形を呈する多数のアメーバ原虫が認められた。虫体の多くはトロフォゾイトと思われ、10~15µmの大きさで内部は弱好酸性から赤色調を呈し、赤血球の貪食像もしばしば観察された(写真 - 5)。PAS 染色では、虫体内部は時に陽性を示した。粘膜固有層に侵入するアメーバ原虫も少数認められ、周辺には形質細胞やリンパ球浸潤が軽度から中等度に認められた(写真 - 6)。

なお、回腸および大腸のワーチン・スターリー染色では、2 頭ともにブラキスピラ属菌や *Lawsonia intracellularis* を疑うらせん状やコンマ型の明らかな菌体は観察されなかった。

表 - 2 病理組織所見(大腸)

	所見	症例	症例
粘膜	変性・壊死	+++	+++
	出血・血栓	+++	+++
	陰窩上皮の過形成	++	+++
	アメーバ	+++	++
	バランチジウム	±	±
粘膜下組織	水腫	+++	+++
	血栓・血管変性	+++	+++
漿膜	水腫	+++	+++

+++:重度 ++:中等度 +:軽度 ±:稀 -:著変なし

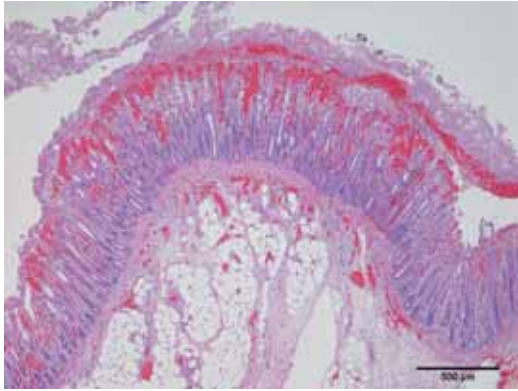


写真 - 3 結腸粘膜表面層の重度出血、線維素析出、粘膜下組織の水腫(症例)

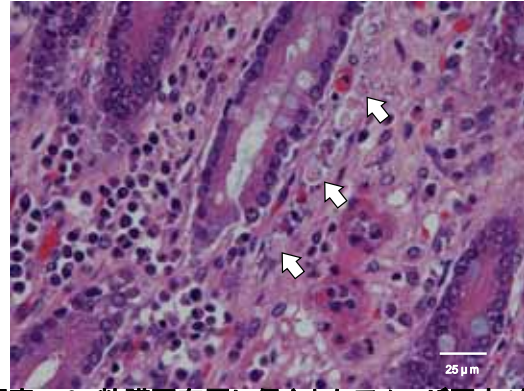


写真 - 6 粘膜固有層に侵入したアメーバ原虫(矢印)、リンパ球、マクロファージ浸潤

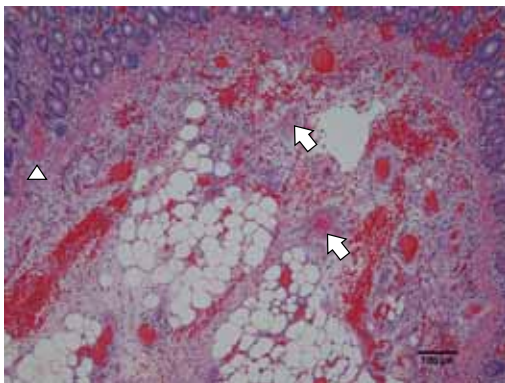


写真 - 4 粘膜下組織の血管変性(矢印)、血栓(矢頭)、出血、水腫

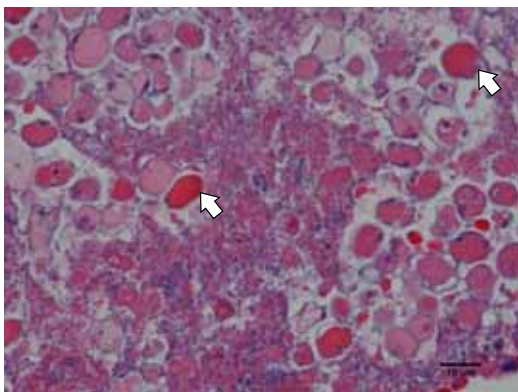


写真 - 5 結腸病変部に10~15 μm、不整円形を呈するアメーバ原虫が多数、赤血球貪食像(矢印)

透過型電子顕微鏡検査では、トロフォゾイトの虫体内に1個の核、貪食された赤血球、電子密度の高いミトコンドリアが観察された。核では核膜よりクロマチンが偏在していた(写真 - 7)。

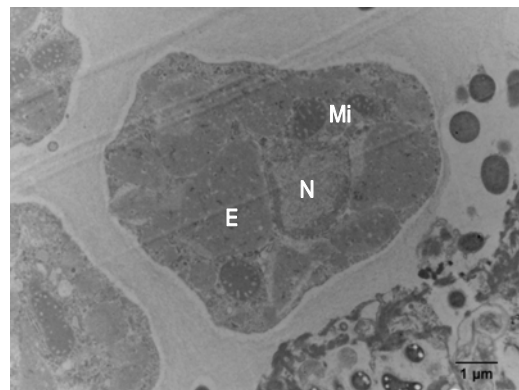


写真 - 7 トロフォゾイト内に核(N)、ミトコンドリア(Mi)、貪食された赤血球(E)がみられる

細菌学的検査では、症例の結腸内容物からのみ *B. hyodysenteriae* の特異遺伝子が検出されたが、分離は陰性であった。その他、主要臓器・器官から病原細菌は分離されなかった。

寄生虫学的検査では、2頭から豚アメーバ属の遺伝子が検出され、遺伝子解析の結果、*E. suis* と同定された。

(2) 発生農場出荷豚の廃棄大腸調査

図 - 1 は、発生農場のと畜場出荷豚における大腸炎による大腸廃棄率の推移である。当該農場では、平成 20 年 10 月頃から廃棄率が上昇し、20%を超える月もみられた。また、平成 24 年 6 月には、病性鑑定豚 1 頭で豚赤痢の疑いがあり、飼料添加剤による対策を実施されていたが、以後も廃棄率は高い状態で推移し、平成 25 年に 2 例のアメーバ症が確認された。

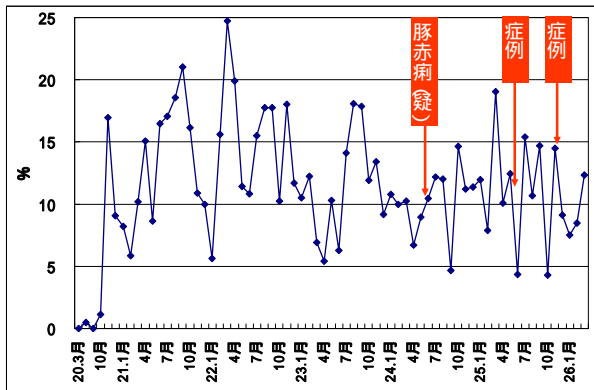


図 - 1 大腸の廃棄率

平成 26 年 3 月に実施した廃棄大腸 7 検体の検査成績を表 - 3 に示す。肉眼的には腸間膜は水腫様を呈し、漿膜および粘膜充血が認められたが、多くは部分的で軽度な病変であった。

肉眼的に異常がみられた部位について病理組織学的検査を実施した結果、すべての検体でアメーバ原虫が認められた。粘膜は変性・壊死し、出血を伴うものもみられた。また、程度に差はあるものの、バランチジウムの感染、ブラキスピラ属菌を疑うらせん状菌体の増殖をみる検体もあった。

アメーバ種の遺伝子検査では、7 検体すべての大腸内容物から、*E. suis* が検出された。

表 - 3 成績

検体	肉眼所見		病理組織所見(病変部)							PCR	
	腸間膜水腫	* 粘膜充血	アメーバ	バランチジウム	らせん菌	粘膜変性壊死	固有層の出血	陰窩の増生	下組織の水腫		下組織の血管炎
1	+	+	+++	+	+++	+++	+++	++	+++	+	+
2	+++	+++	++	±	+	+	±	+	-	-	+
3	+	+	++	±	±	+	-	+	-	-	+
4	+	+	±	±	+	+	-	+++	-	-	+
5	+	+	+++	±	+++	+++	±	++	-	-	+
6	+	+	+++	±	+	+++	-	++	-	-	+
7	+	+	±	+++	±	+++	+	+++	-	-	+

肉眼所見 * : いずれも部分的病変
 病理組織所見 +++ : 重度 ++ : 中等度 + : 軽度 ± : 稀 - : 著変なし

(3) 発生農場の汚染状況調査

成績は表 - 4 のとおりで、様々な産歴または日齢の豚群の糞便、ならびに環境材料についてアメーバのシスト検出を試みたが、検出されなかった。

しかしながら、急死した 25 日齢の離乳豚 2 頭の病理組織学的検査では、重篤な病変はみられなかったものの結腸組織にアメーバ原虫が確認された。

表 - 4 成績

検体	産歴or日齢	アメーバ	コクシジウム	検体	産歴or日齢	アメーバ	コクシジウム
1	4産	-	-	1	107日	-	-
2	初産	-	+	2	171日	-	-
3	5産	-	-	3	211日	-	-
4	3産	-	+	4	127日	-	-
5	8産	-	+	5	115日	-	-
6	9産	-	+	6	183日	-	-
7	1産	-	+	7	134日	-	-
8	4産	-	+	8	104日	-	-
9	5産	-	+	9	104日	-	-
10	1産	-	+	10	203日	-	-
1	9日	-	-	発育不良豚	-	-	-
2	19日	-	-	肥育ノコス	-	-	-
3	26日	-	-	飲用水	舎	-	-
4	8日	-	-	肥育ノコス	舎	-	-
5	17日	-	-	未使用敷料	-	-	-
1	50日	-	-	- : 検出なし + : 検出あり			
2	36日	-	-	離乳豚2頭の結腸組織でアメーバを確認！！			
3	71日	-	-				
4	86日	-	-				
5	78日	-	-				

4 まとめおよび考察

今回、死亡豚 2 頭の病理組織学的検査において、大腸病変部に多数のアメーバ原虫を伴う線維素出血性大腸炎が認められ、これら 2 頭の腸内容物から *E. suis* が検出されたことから、*E. suis* が関与したアメーバ症と診断された。さらに、発生農場出荷豚の廃棄大腸調査においてもすべての検体でアメーバ原虫が認められ、いずれも腸内容物から *E. suis* が検出された。以上のことから、本原虫が豚の大腸炎に関与してい

る可能性が示唆された。

一方で、程度の差はあるものの豚赤痢菌やバランチジウムとの混合感染が確認された検体もあり、他病原体との混合感染により症状悪化を招く可能性も考えられた。

死亡豚 2 頭にみられた臨床症状や肉眼・組織病変は、豚赤痢、サルモネラ症、増殖性腸炎、豚便虫症などとも類似しており、類症鑑別上、豚のアメーバ症は今後、注視すべき疾病と考える。

わが国における過去のアメーバ関与事例では、野崎ら⁸⁾は、検出されたアメーバ原虫の形態学的特徴、血清診断等から *E. histolytica* の可能性が高いとしているが、遺伝子検査は実施していない。桐生ら³⁾は、*E. histolytica*、*E. dispar* について遺伝子検査を実施しているが、いずれも陰性であり種の同定には至っていなかった。よって、本事例は、わが国における豚のアメーバ症例において、分子生物学的手法により種の同定に至った初めての症例と思われる。

また、透過型電子顕微鏡による超微細構造観察では、*E. suis* が他の一般的なアメーバ種と異なりミトコンドリアを有することも明らかとなったことも、大変貴重なデータと思われる。

発生農場における糞便および環境材料を用いた汚染状況調査では、いずれもアメーバのシストは検出されず、浸潤状況、汚染源は不明であった。しかしながら、25 日齢の病性鑑定豚 2 頭の結腸組織にアメーバ原虫が確認されたことから、感染母豚が存在し、すでに哺乳期に感染、農場内に広く浸潤している可能性も考えられた。

豚のアメーバ症の報告は少ないために、有効な衛生対策や治療薬など、その実態は不明な点が多い。ヒトのアメーバ症の治療では、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用されるが⁹⁾、現在、家畜では使用禁止であり、家畜に使用できる特効薬はないのが現状である。また、一般的に原虫類のシストは乾燥には弱いですが、各種消毒薬に抵抗性を示す。

発生農場では、平成 26 年 3 月の廃棄大腸調査

の結果から、大腸炎の一要因としてアメーバ原虫の関与も視野に入れ、アメーバ症の対策を検討していた矢先の同年 4 月に豚流行性下痢 (PED) が発生し、アメーバ症に対する具体策をとれないままの状況が続いた。しかしながら、PED 発生以降の大腸廃棄率は、以前と比較して低下傾向にある (図 - 2)。これは、PED 対策として実施された豚舎の水洗・消毒により、アメーバも減少させたのではないかと推察された。

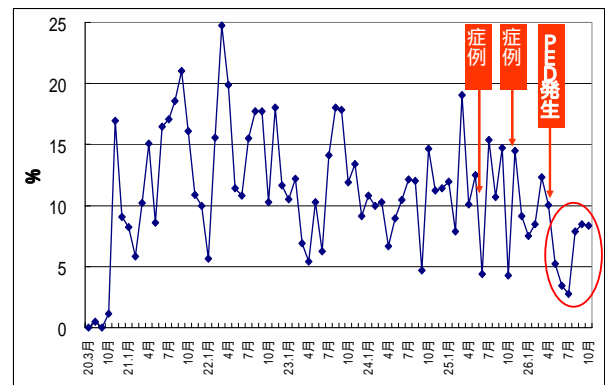


図 - 2 大腸の廃棄率 (PED 発生後)

また、PED 発生以降は、農場内での新たなアメーバ症の発生もみられていない。当然、PED ウイルスおよびアメーバ以外の病原体の低減にもつながっているものと思われ、豚群全体の健康状態が良好であるために、アメーバ原虫に感染していても、病変形成～発症までは至っていないとも考えられる。以上のことから、豚舎の水洗・消毒は、アメーバ症の予防・対策として一定の効果をもたらすかもしれない。

診断法は、*E. histolytica* では、発症患者の糞便を用いた直接鏡検によるトロフォゾイトの確認、遺伝子検査、抗原検査、血清学的検査のほか培養方法も確立されている^{1, 7, 9, 10)}。今回、*E. suis* に感染した発症豚の病理組織学的検査による虫体の確認および形態観察、腸内容物を用いた遺伝子検査の有用性は確認された。また、透過型電子顕微鏡検査による超微細構造観察は、他のアメーバ種と異なりミトコンドリアを有する *E. suis* の鑑別への有用性が示唆された。

一方、ヒトのアメーバ症においても、糞便を用いたシストの形態観察は、シストが小さいこ

と、白血球や酵母類など他の類円形構造物と見誤りやすいことから、鑑別には熟練を要するといわれている^{7, 10)}。さらに、慢性の症状を示さないシスト保有者では、糞便中にシストを排出するものの排出数が少ないうえに、日によっても増減があるため、少なくとも6日間連続しての検査が必要といわれる¹⁰⁾。よって、今回、発生農場の臨床上健康な豚の糞便からシストが検出されなかった要因の一つとして、シスト排出数が少なく、また糞便検査は1回のみであったことから、感染豚はいたが検出できなかった可能性も考えられた。検出率を上げるためには複数回に渡る採材が必要と考えられ、また鏡検の熟練度も影響するため、多検体の検査となる浸潤状況調査には、糞便の顕微鏡検査は不向きと思われた。

今後は、より客観的な診断法として、豚のアメーバ症に利用可能な免疫組織化学的染色や血清学的診断法の確立、また、感染試験による病原性の証明のためにも、*E. suis*の培養方法の確立などが望まれる。

以上のように、豚のアメーバ症の対策や病態は不明な点も多く、課題も残ることから、今後さらなる症例の蓄積と調査により実態を明らかにしていく必要があると思われる。

最後に、アメーバ種の分子生物学的解析、病理組織学的検査および電子顕微鏡学的検査に多大なるご尽力ならびにご指導・ご助言いただいた独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究所の松林 誠 先生、播谷 亮 先生、芝原 友幸 先生に深謝する。

参考文献

- 1) 阿部仁一郎ら：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．感染症学会誌，76, 921-927 (2002)
- 2) Clark CG, et al.: 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)
- 3) 桐生直哉ら：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，77-99 (2012)
- 4) 国立感染症研究所：アメーバ赤痢 2003 - 2006．病原体微生物検出情報，28, 103-104 (2007)
- 5) Matsubayashi M, et al.: Ultrastructural characteristics and molecular identification of *Entamoeba suis* isolated from pigs with hemorrhagic colitis: implications for pathogenicity. Parasitol Res, 113, 3023-3028 (2014)
- 6) 日本獣医師会：共通感染症ハンドブック，80-81 (2004)
- 7) 野崎知義ら：アメーバ赤痢 検査・診断マニュアル，1-25 (2003)
- 8) 野崎宏ら：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 (1993)
- 9) 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)
- 10) 吉田幸雄ら：原虫類．医動物学 第6版，南山堂，東京，12-55 (2013)