

## 12 採卵鶏の盲腸にみられたアメーバ様原虫の寄生事例

県中央家畜保健衛生所

戸崎香織、米山州二、高橋孝志

県北家畜保健衛生所

白井幸路

はじめに

*Entamoeba* 属は単細胞の寄生性原虫で、土壌や淡水等の環境中に広く存在し、ヒトを含む多くの動物種の主に大腸に感染してアメーバ症を引き起こす。生活環はトロフォゾイト(栄養体)と感染力を有するシスト(嚢子)の二形態をとる<sup>1)</sup>。感染は、シストの経口感染によって起こり、小腸内で栄養体が脱出、大腸粘膜に侵入後、分裂・増殖を繰り返すことで宿主に下痢を起こす。*Entamoeba* 属のうち、赤痢アメーバの病原体である *E. histolytica* が最も重要で、ヒトでは感染症法の第五類感染症に指定されている。本種は病原性が強く、ヒト以外の動物にも感染することが知られており、人獣共通感染症としても重要である。また、一般的には病原性を示さないものの、*E. histolytica* と形態が類似し、鑑別が困難であることから *E. dispar* も重要とされている。家畜では、これまで遺伝子解析により種の同定には至らなかった、あるいは病原性がないとされていた *Entamoeba* 属が解明され、豚で *E. suis* や *E. polecki* による大腸炎<sup>2-4)</sup>、牛で *E. bovis*<sup>5,6)</sup> の寄生が報告されている。一方、鳥類においても *Entamoeba* spp.<sup>7,8)</sup>、ダチョウで *E. polecki* subtype 3<sup>9)</sup> の寄生報告があるものの、臨床症状を伴うアメーバ症の報告はなく、鶏では *Entamoeba* 属の寄生報告そのものがない。

今回、採卵鶏の盲腸にアメーバ様原虫が寄

生する事例に遭遇したので、その概要を報告する。また、本県で過去5年間に病性鑑定を実施した家きんについて、遡り調査を実施したので併せて報告する。

### 発生概要

#### 1 発生畜

採卵鶏(ジュリアライト)

#### 2 農場概要

県内の大規模農場で、飼養形態はウインドレスの多段ケージ、県内の育雛場から120日齢で導入していた。

#### 3 発生状況

2018年8月中旬以降、農場内の複数鶏舎で死亡羽数が増加した。農場管理獣医師が剖検したところ、伝染性気管支炎(IB)の腎炎型が疑われたため、管轄の家畜保健衛生所に2018年9月及び10月の二度にわたり病性鑑定依頼があった。いずれの立入検査時も、鶏舎内での死亡鶏の偏りはなく、呼吸器症状は認められなかった。また、産卵率に変化はなかった。

### 材料及び方法

#### 1 病理解剖

2018年9月7日に鶏舎Aで飼養されている365日齢の2羽(症例1、2)及び鶏舎Bで飼養されている444日齢の2羽(症例3、4)の計4羽、同年10月1日に鶏舎Cで飼養されている

147日齢の3羽(症例5~7)、合計7羽の死亡鶏について剖検を実施した。

## 2 病理組織学的検査

7羽の主要臓器について、20%中性緩衝ホルマリンで固定後、定法に従いパラフィン切片を作製し、ヘマトキシリン・エオジン(HE)染色を実施した。また、全羽の盲腸膨大部について、過ヨウ素酸シッフ(PAS)反応及びワーチン・スターリ(Ws)染色を実施した。

## 3 遺伝子解析

7羽の盲腸膨大部(No.1~7:パラフィン切片、No.5~7:生材料)を材料とし、各材料からDNAを抽出した。No.1~7のパラフィン切片についてはQIAamp DNA FFPE Tissue、No.5~7の生材料についてはQIAamp DNA Stool Mini Kit(いずれもQiagen GmbH, Hilden, Germany)を用いてDNAを抽出後、*Entamoeba*属及びヒストモナス原虫を検出する既報の各種プライマー(表1)を用いてPCR検査を実施した<sup>10)</sup>。

表1 各種プライマー

標的	プライマー
<i>Entamoeba</i> 属共通	Entam 1-2
	P11-P12
<i>E. histolytica</i>	P13-P14
<i>E. dispar</i>	EhL-her
	EdL-EdR
<i>E. polecki</i>	Epolecki F6-R6
<i>Histomonas meleagridis</i>	HmF-Hmr

## 4 寄生虫学的検査

4羽(No.1~4)の十二指腸内容物及び7羽の盲腸内容物を用い、マックマスター法によ

りコクシジウムのオーシスト数を測定した。

## 5 ウイルス学的検査

7羽の気管乳剤上清を発育鶏卵の尿膜腔内に接種し、37℃で7日間培養を2代継代した。培養後、発育鶏卵の尿膜腔液を回収し、伝染性気管支炎ウイルス(IVB)を標的としたPCR検査を実施した。

## 6 細菌学的検査

定法に従い、7羽の主要臓器について、5%羊血液加寒天培地を用いて好気及び嫌気条件下で培養、DHL培地を用いて好気条件下で培養した。また、7羽の盲腸内容物について、サルモネラ属菌の検出を目的としてハーナーテトラチオン酸塩培地で増菌後、DHL寒天培地及びクロモアガーサルモネラ培地を用いて好気条件下で分離培養した。

## 7 遡り調査

2014年4月から2019年9月までの期間に、病理組織学的検査を実施した家きん35戸201羽の腸管(十二指腸、空回腸、盲腸、結直腸及び総排泄腔)について、鏡検によりアメーバ様原虫の有無を確認した。家きんの内訳は、鶏31戸194羽、あひる2戸4羽、だちょう1戸1羽、七面鳥1戸1羽及びほろほろ鳥1戸1羽であった。

## 結果

### 1 病理解剖

7羽中1羽(No.2)で盲腸の赤色化、2羽(No.3及び7)で腸管壁の肥厚、2羽(No.3及び4)で肝臓の退色が観察された(図1)。その他の個体及び臓器に著変は認められなかった。

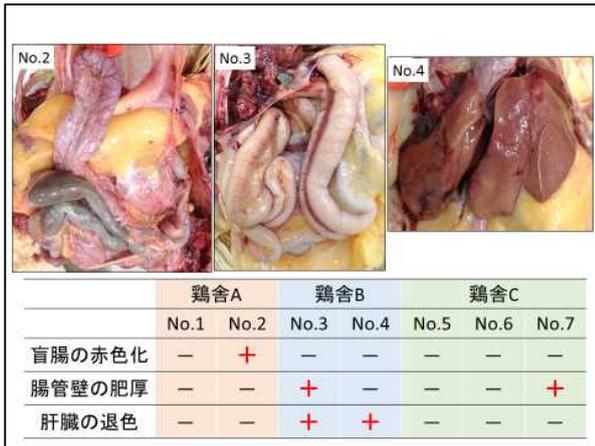


図1 盲腸の赤色化(左)、腸管壁の肥厚(中)及び肝臓の退色(右)

## 2 病理組織学的検査

7羽中6羽(No. 2~7)の腸管各部位にコクシジウムの寄生、3羽(No. 2、4及び5)の盲腸膨大部にアメーバ様原虫の寄生、1羽(No. 6)の総排泄腔にクリプトスポリジウムの寄生が認められた(表2)。その他の臓器に有意な所見は認められなかった。

表2 各原虫の寄生状況

コクシジウムの寄生(6/7)							
	鶏舎A		鶏舎B		鶏舎C		
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
十二指腸	-	+	-	+	-	-	++
空回腸	-	+++	-	+++	+	-	+++
盲腸	-	+	+	+	-	++	+++
結直腸	-	-	-	-	-	+	+
総排泄腔	-	-	-	-	-	-	-
アメーバ様原虫の寄生(3/7)							
	鶏舎A		鶏舎B		鶏舎C		
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
盲腸	-	+++	-	+	+	-	-
クリプトスポリジウムの寄生(1/7)							
	鶏舎A		鶏舎B		鶏舎C		
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
総排泄腔	-	-	-	-	-	+	-

### (1) コクシジウム

コクシジウム寄生が認められた6羽(No. 2~7)のうちNo. 7で寄生が最も重度であり、十二指腸から結直腸にかけて観察され、特に空回腸と盲腸扁桃で重度であった。寄生は主に

粘膜上皮の基底膜側と粘膜固有層でみられ、シズント、ミクロガメート、マクロガメート及びオーシストの各種発育ステージが観察された(図2)。寄生部位と生殖期から、*Eimeria necatrix*、*E. tenella*及び*E. maxima*等の複数種が寄生していると考えられた。なお、コクシジウム寄生が認められたその他の個体についても同様であった。

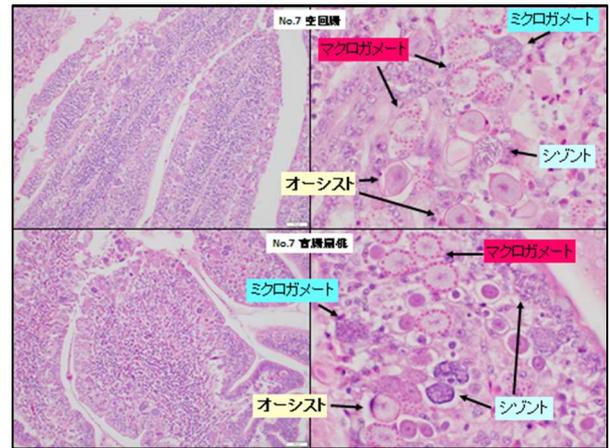


図2 No. 7の空回腸(上部)、盲腸扁桃(下部)に寄生するコクシジウム(HE染色)

### (2) アメーバ様原虫

アメーバ様原虫の寄生は、7羽中3羽(No. 2、4及び5)の盲腸膨大部の内腔や粘膜固有層において認められ、No. 2で最も重度であった(図3)。原虫はPAS反応に陽性を示し、大きさは15μm程度、不整円形で好酸性の核を1個有しており、核がみられないものもあった。細胞質内には多数の空胞を有していた(図4及び5)。

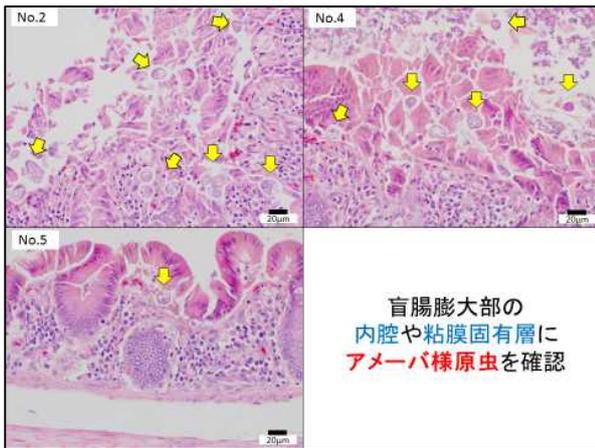


図3 3羽(No. 2、4及び5)の盲腸膨大部で観察されたアメーバ様原虫(HE染色)

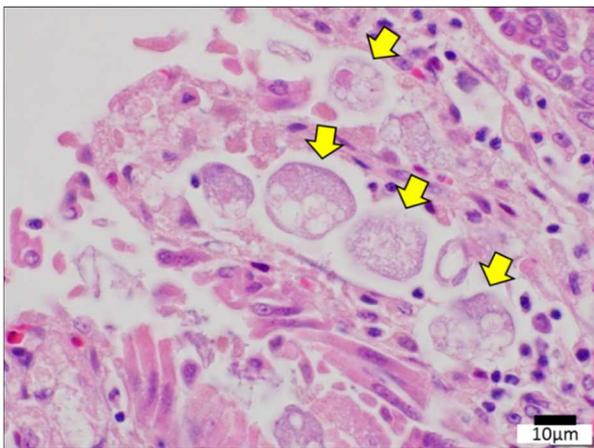


図4 No. 2の盲腸膨大部で観察されたアメーバ様原虫(HE染色)

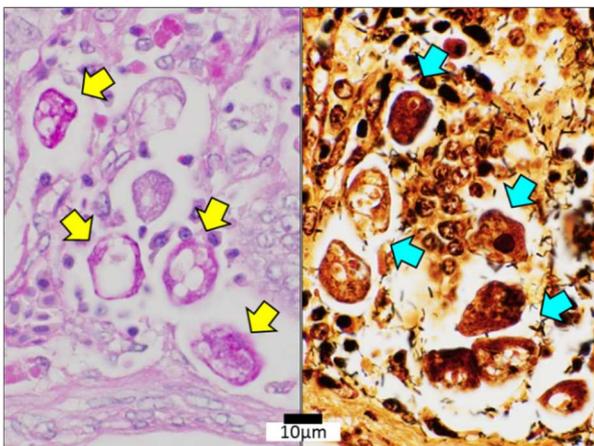


図5 No. 2の盲腸膨大部で観察されたアメーバ様原虫(左: PAS反応、右: WS染色)

### 3 遺伝子解析

7羽全てにおいて *Entamoeba* 属及びヒストモナス原虫の特異遺伝子は検出されなかった。

### 4 寄生虫学的検査

7羽中6羽からコクシジウムのオーシストが検出された(表3)。

表3 各個体のコクシジウムのオーシスト数

	鶏舎A		鶏舎B		鶏舎C		
	No.1	No.2	No.3	No.4	No.5	No.6	No.7
十二指腸	ND	53,400	ND	18,900	—	—	—
盲腸	ND	46,000	8,200	34,000	600	40,400	185,200

—: 検査未実施、ND: 検出なし、単位: OPG

### 5 ウイルス学的検査

7羽全てにおいて、気管乳剤上清を接種した発育鶏卵に発育異常は観察されず、発育鶏卵の尿膜腔液からIBVの特異遺伝子は検出されなかった。

### 6 細菌学的検査

7羽全てにおいて、病原細菌は分離されなかった。

### 7 遡り調査

201羽全てにおいてアメーバ様原虫の寄生は確認されなかった。

### まとめ及び考察

今回、採卵鶏の盲腸内にアメーバ様原虫が寄生する事例に遭遇し、原虫の形態は、*Entamoeba* 属の栄養体あるいはヒストモナスの内腔型や組織型の侵入期原虫に類似していたことから、いずれかの原虫である可能性を考慮し検討した。

*Entamoeba* 属は、シストの核数、シストや栄養型の大きさによって形態的に分類されるものの、実際には鑑別が困難な場合が多く、近年は遺伝子解析による同定が行われている

3, 10)。本症例では、形態的に *Entamoeba* 属の栄養体に類似し、核数や栄養型の大きさから *E. polecki* に近いと思われたものの、遺伝子解析による同定には至らなかった(図6)。

一方で、寄生部位や原虫の形態からヒストモナス原虫も考慮し検査を実施した。ヒストモナス症は一般的には平飼いで発生するとされており、通常、原虫は単独で感染せず、鶏盲腸虫とシマミズの媒介を必要とする。今回観察された原虫は、ヒストモナス原虫の内腔型や組織型の侵入期原虫に類似すると考えられた(図7)。しかし、本事例はウインドレス鶏舎の多段ケージで飼養されていることや、遺伝子解析でヒストモナス原虫の特異遺伝子は検出されなかったことから、感染については否定的であると考えられた。

本事例では、病性鑑定を実施した7羽は日齢や飼養鶏舎がそれぞれ異なる鶏群であり、そのいずれからもアメーバ様原虫が検出されたことから、農場内に広く浸潤していると推測された。しかし、当該農場で、過去に病性鑑定を実施したことはなく、今回観察された原虫の感染経路や感染時期等については不明である。また、過去5年間の遡り調査で、アメーバ様原虫が観察された事例はなく、県内での浸潤状況等について考察することはできなかった。

今回、農場において死亡羽数が増加した主因は、鶏コクシジウム病によるものと推測された。3羽の盲腸でアメーバ様原虫の寄生が観察されたものの、炎症性変化に乏しく、本事例においては病原性を有していた可能性は低いと考えられた。野鳥やダチョウにおいても、*Entamoeba* 種の寄生が報告されているものの<sup>7-9)</sup>、世界的に臨床症状を伴う家きんのアメーバ症は報告されていない。しかし、ヒト

では、通常は非病原性である *E. dispar* や *E. moshkovskii* が病原性を示したとの報告がある<sup>11, 12)</sup>。また、豚では、*E. polecki* と *Lawsonia intracellularis* との混合感染により病態が重篤化することが示唆されている<sup>13)</sup>。アメーバ症は人獣共通感染症であることから、今後も検索を継続し、原虫の種の同定及び病態解明に努めたい。

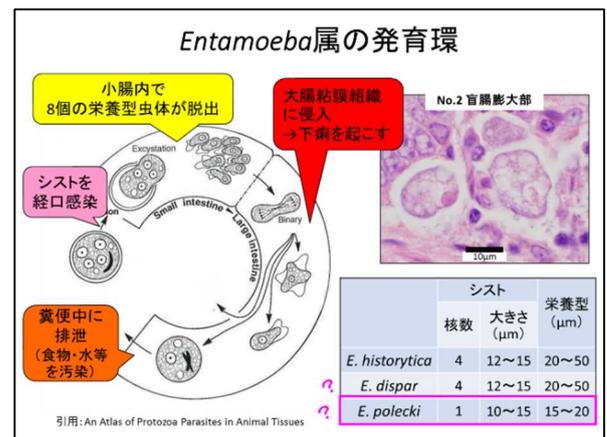


図6 *Entamoeba* 属の发育環及びNo. 2のアメーバ様原虫の形態的分類

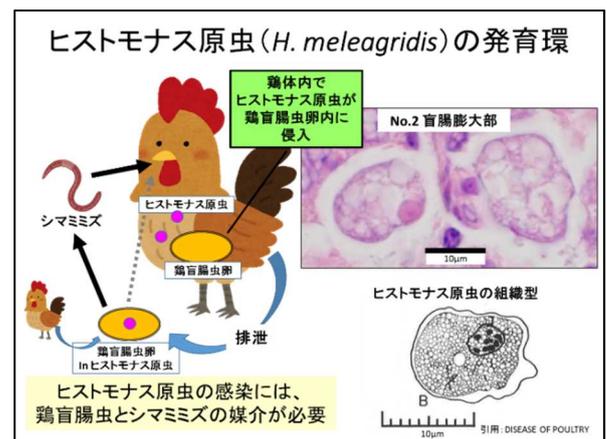


図7 ヒストモナス原虫の发育環及び組織型原虫とNo. 2のアメーバ様原虫との形態比較

## 謝辞

稿を終えるにあたり、アメーバ様原虫の遺伝子解析及び病理組織学的検査に多大なる御指導と御助言をいただいた国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構 動物衛生研究部門 病態研究領域 病理ユニットの芝原友幸先生、大阪府立大学 大学院生命環境科学研究科の松林誠先生に深謝します。

## 引用文献

- 1) 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)
- 2) Clark C.G., 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) Matsubayashi M., et al.: 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)
- 4) Matsubayashi M., et al.: First report of mixed *Entamoeba polecki* (ST 1) and *E. suis* infection in piglets shedding abnormal feces by histopathological and molecular surveys, *Acta Parasitol* 61, 665-670 (2016)
- 5) el-Refaii AH.: *Entamoeba bovis* Liebetanz 1905 recorded from large ruminants in Egypt, *J Egypt Soc Parasitol*, 23, 239-245 (1993)
- 6) Matsubayashi M., et al.: First detection and molecular identification of *Entamoeba bovis* from Japanese cattle, *Parasitol Res*, 117, 339-342 (2018)
- 7) Robertson L.J., et al.: Are molecular tools clarifying or confusing our understanding of the public health threat from zoonotic enteric protozoa in wildlife?, *Int J Parasitol Parasites Wildl*, 9, 323-341 (2019)
- 8) Carrera-Játiva P.D., et al.: GASTRO-INTESTINAL PARASITES IN CAPTIVE AND FREE-RANGING BIRDS AND POTENTIAL CROSS-TRANSMISSION IN A ZOO ENVIRONMENT, *J Zoo Wildl Med*, 49, 116-128 (2018)
- 9) Ponce Gordo F., et al.: *Entamoeba struthionis* n. sp. (Sarcomastigophora: Endamoebidae) from ostriches (*Struthio camelus*), *Vet Parasitol*, 119, 327-35 (2004)
- 10) 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)
- 11) Haque R., et al.: Diagnosis of amoebiasis in Bangladesh, *Arch Med Res*, 37, 273-276 (2006)
- 12) Shimokawa C., et al.: *Entamoeba moshkovskii* is associated with diarrhea in infants and causes diarrhea and colitis in mice, *J Infect Dis* 206, 744-751 (2012)
- 13) Matsubayashi M., et al.: First molecular identification of *Entamoeba polecki* in a piglet in Japan and implications for aggravation of ile-

itis by coinfection with *Lawsonia intracellularis*, *Parasitol Res*, 114, 3069-3073 (2015)