

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 14 日現在

機関番号：24403

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15049

研究課題名(和文) 日本に蔓延する非病原性とされてきた豚アメーバの病態発現機序の解明と診断技術の開発

研究課題名(英文) Elucidation of pathogenesis mechanism and development of diagnostic technology of Nonpathogenic pig ameba spread into Japan

研究代表者

笹井 和美 (Sasai, Kazumi)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：70211935

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：Entamoeba(E) histolytica はヒトに感染した場合、アメーバ性大腸炎や肝膿瘍を形成し、重篤例では死に至る。これら豚に寄生するEntamoeba 種の病態を詳細に明らかにすべく以下の解析を実施し、4つあるサブタイプの型別方法を構築した。さらに、国内の難治性下痢症を呈する豚において、E. polecki サブタイプ1と3を検出した。以上より、国内には、3種(サブタイプ)のEntamoeba が存在し、E. polecki がより広く分布している可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Entamoeba (E) histolytica forms amebic colitis or liver abscess when infected with humans, and in severe cases it is lethal. In recent years, parasitism of Ameba-like protozoa has been confirmed in swine exhibiting a lethal gastrointestinal symptom in Japan. However, in the conventional method, the species was not clarified. In order to clarify in detail the pathology of pigs infected with E, we performed the following analysis and constructed a typing method of four subtypes. In addition, E. polecki subtypes 1 and 3 were detected in swine exhibiting domestic refractory diarrhea. From the above, it is suggested that there are three species (subtype) of E in Japan, and that E. polecki may be more widely distributed.

研究分野：獣医内科学

キーワード：Entamoeba PCR 原虫性消化器疾患 疫学 豚

1. 研究開始当初の背景

1. 我が国で頻発する豚アメーバ症による死亡例

過去に香川県(野崎ら, 1993)や新潟県(桐生ら, 2010)などの養豚場において、育成豚が重度の下痢・消瘦を呈し、死亡個体が多発した。下痢症を誘発するウイルスおよび細菌は検出されておらず、病理学的解析でアメーバ様原虫の多数寄生が確認された。この後も、複数の都道府県の豚でアメーバ原虫が検出されているが、アメーバで唯一病原性のある *E. histolytica* の遺伝子は検出されず、種の同定には至っていない。これらの知見は、ヒトなどで病原性のある *E. histolytica* 以外の種が、豚で致死性的下痢症を誘発している可能性を強く示唆するものである。

2. 既存の遺伝子診断法の問題点

豚に寄生する *Entamoeba* 種は、*E. histolytica* 以外に *E. polecki* と *E. suis* の報告が過去にあるが(Das and Ray, 1968)、病原性は無いとされていた。しかし、両種が豚で病態を発現している可能性があると考えられた。これらの種は、形態的に極めて類似し、容易には鑑別できない。特異遺伝子の増幅を行い、同定をする必要がある。申請者らの予備的な解析では、過去に報告のある豚のアメーバ種の SSU rRNA gene を増幅できる Primer (Verweij et al, 2003) は特異性がなく、また別のものは、*E. suis* のみしか増幅できない Primer (Clark et al, 2006) であることが分かった。このため、豚のアメーバ種を鑑別できる特異性の高い遺伝子診断法を早急に構築する必要がある。

3. *E. suis* と *E. polecki* の病態解析の予備所見

申請者らは、長崎で死亡した豚の結腸から *E. suis* の遺伝子の増幅に成功し、虫体が大腸粘膜深層に侵入し、赤血球を貪食していることを見出した。静岡県や愛知県の豚で、*Brachyspira* spp. (豚結腸スピロヘータ症) や *Lawsonia intracellularis* (豚回腸炎) との共感染により、損傷した上皮より *E. polecki* が侵入し【図 1】、重度の潰瘍を形成していることを確認している。。

2. 研究の目的

Entamoeba 属の原虫には多くの種が含まれるが、ヒトや動物で唯一病原性を有するものは、*E. histolytica* であり、アメーバ性大腸炎や肝膿瘍を形成し、重篤例では死に至る。家畜においては数多くの *Entamoeba* 種が報告されているが、いずれも病原性はないと世界的に認識されている。近年、我が国において致死性の消化器症状を呈する豚において、ア

メーバ様原虫の寄生が確認されている。しかし、人獣共通に寄生する *E. histolytica* は否定され、長年の間、種は明らかにされなかった。本研究課題では、我が国で豚に多発する高病原性的アメーバ原虫を遺伝子学的に同定し、さらに病態を詳細に明らかにするため、診断法の確立、また成功例の無い単離培養法の構築、感染実験による病態発現機構を明らかにする。

3. 研究の方法

1. 豚アメーバの高度汚染農家における原虫の分布調査【平成 28 年度】

目標：豚アメーバ原虫が高度に汚染している農家において、病理学的、寄生虫学的・遺伝子学的に解析を行い、農家内および宿主体内における原虫の動態を明らかにする。

方法：下痢症状を呈する豚の糞便検査を行い、病理学的に病変を検索し、アメーバ原虫の組織内分布および病態を明らかにする。

1) 下痢発症豚の病理学的検索【担当：笹井、松林、芝原】

① 豚アメーバの高度汚染農家を既に確定している(新潟県、愛知県、静岡県、長崎県、鹿児島県など)。当該農家において、下痢発症豚を各都道府県の家畜保健衛生所の協力のもと、糞便検査を実施し、病理解剖を行う。消化管を部位別に採取後、固定し、大阪府立大学において病理組織切片を作成する。目標とする検体数は、5 都道府県で年間 50-100 検体とする。

② 同時に、解剖豚以外の飼育豚の糞便を採材し、栄養体の検出には直接塗抹法、シストの検出にはシヨ糖遠心浮遊法を実施し、虫体の有無を確認する。

③ 原虫のオルガネラ、特にミトコンドリアの形態、また赤血球や細菌の貪食を観察するため、同組織は電子顕微鏡による観察を行う。

2) 豚アメーバの遺伝子学的解析と簡便診断法の開発【担当：笹井、松林】

① 豚アメーバを増幅できる既報の Primer、*E. polecki* と *E. suis* を増幅できる Primer を用いて PCR を行い、種および遺伝子型 (*E. polecki* はさらに 4 つのサブタイプに分かれる) の同定を試みる。鋳型となる DNA は、糞便検査および病理組織学的検査で陽性と判定された便または切片から精製する。

② 上記 Primer で増幅が認められない場合には、我々が作出した豚アメーバに特異的な Primer (E-F6, R6) を用いて、遺伝子解析を試みる。③ さらに簡便で特異性の高い遺伝子診断法の開発のため、*E. suis* および *E. polecki* 4 サブタイプの鑑別が行える、Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD) 法

を構築する。

2. ウイルス学的・細菌学的な検索【平成28年度】

目標：下痢発症の原因が、ウイルスおよび細菌によるものか、またこれら共感染により病態が悪化しているのかを解析するために、以下の検査を行う。

1) ウイルス学的検査【担当：笹井・谷】

下痢起因ウイルス (transmissible gastroenteritis virus, porcine epidemic diarrhoea virus, rotavirus) の検出は、既報の PCR にて実施する (Ellis et al., 1999; Kim et al., 2001; Matthijnsens et al., 2008)。

2) 細菌学的解析【担当：松林・古家】

①下痢起因細菌 (豚赤痢菌、大腸菌、サルモネラ菌) の有無を検査するため、糞便材料を用いて、CWY などの各種選択培地により培養を行う。

②組織切片については、acid-Schiff (PAS) 染色、トルイジンブルー染色、そして Warthin-Starry 染色 (Prophet et al. 1992) を実施し、組織学的に細菌感染の有無を精査する。ブラキスピラおよびローソニア属菌は、検出用抗体により検査する。

3. 豚アメーバを特異的に認識する診断マーカーの作出【平成28-29年度】

目標：現在、豚のアメーバを認識する抗体マーカーは報告されていない。現場において、最も簡便に診断できるツールが抗体である。豚アメーバを特異的に認識する抗体を作出する。

方法：豚アメーバに近縁で全ゲノム情報が公開されている *E. histolytica* の DNA 塩基配列をもとにクローニングを行い、リコンビナントを作出し、マーカーとなる抗体を作成する。

1) 【担当：笹井、松林、古家】

①motif 領域は高度に保存されるが、種間で相同性の低い遺伝子 (rhomboid protease (Baxt et al., 2008), cysteine protease (Bruchhaus et al., 2003) など) をターゲットに豚アメーバのゲノム DNA を鋳型として、クローニングを行う。

②得られた全長の遺伝子を大腸菌に組み込み、リコンビナントタンパクを作成する。この精製たんぱく質をウサギに免疫し、ポリクローナル抗体を作製する。これを用いて、重度感染豚の各諸臓器を網羅的に探索し、豚アメーバの臓器侵入性を確認する。

③有用なマーカーが得られなかった場合には、モチーフ以外のアミノ酸20残基程の合成ペプチドを作成し、同様に抗体マーカーを作製する。

4. 豚アメーバの単離培養方法の構築【平成29年度】

目標：これまで報告が無い、豚アメー

バ原虫の単離培養方法を構築する。

方法：アメーバ原虫を含む豚糞便を各種培地に接種し、培養条件を確定する。

1) 【担当：笹井、谷、松林】

①予備実験において、一般に広いアメーバ種で培養が可能とされる Neff 培地では、豚アメーバは培養が出来ないことが分かっている。そのため、豚糞便中にシストが含まれることを確認した後、田辺・千葉、ロビンソン、TYM および Balamuth 培地等に接種し、培養を試みる。

②短期培養が確認できれば、ウマ血清、死菌種や量、およびアスパラギン酸の添加量を変更し、長期培養のための条件検討を行う。

5. SPF 豚を用いた豚アメーバの病態発現解析【平成29年度】

目標：豚アメーバの病原性を確認するため、単離培養した豚アメーバを SPF 豚に接種し、病態発現を解析する。

方法：SPF 豚にアメーバ原虫を経口投与し、病原性を評価する。

1) 【担当：笹井、松林、芝原】

①動物衛生研究所で飼育管理されている SPF 豚を用い、同施設の BSL2 の感染動物舎内で感染実験を実施する。

②単離培養したアメーバ原虫を経口的 (104 個) に投与し、経日的に糞便を採取し、原虫の排泄の有無、および臨床症状を観察する。

③病理解剖を実施し、病変を確認するとともに、各臓器について、病理組織学的な検索を行う。

4. 研究成果

E. histolytica はヒトに感染した場合、アメーバ性大腸炎や肝膿瘍を形成し、重篤例では死に至る。その他の *Entamoeba* 属原虫は、比較的病原性が低いか無いと認識されている。家畜においても、複数種の *Entamoeba* 種が報告されているが、いずれも病原性はないと報告されている。しかし、近年、我が国で致死性の消化器症状を呈する豚において、その組織病理学的解析によりアメーバ様原虫の寄生が確認されている。しかし、人獣共通に寄生する *E. histolytica* による PCR では鑑定できず、その種は明らかにされなかった。申請者らは、これまでに難治性・致死性の下痢症を呈する豚から、*E. suis* および *E. polecki* を同定することに成功している。本研究課題では、これら豚に寄生する *Entamoeba* 種の病態を詳細に明らかにすべく以下の解析を実した。昨年度は、特に *E. polecki* について、PCR およびシーケンス解析により、4 つあるサブタイプの型別方法を構築した。本年度は、国内においてさらに調査を実施し、複数の県において、難治性下痢症を呈す

豚において、*E. polecki* サブタイプ 1 と 3 を検出した。また、糞便検体、水や土壌検体からの PCR による *Entamoeba* の検出に加え、病理組織解析によりアメーバ様原虫が検出された場合でも、パラフィン切片から DNA を抽出し、遺伝子型を同定する事も可能であることが分かった。これにより、アメーバのシストおよび栄養型においても、解析は可能であることが分かった。いずれの検体も、可能な範囲で細菌学およびウイルス学的解析を行ったが、他の病原体の関与の可能性は低く、その誘発因子は不明であるが、豚に寄生する *Entamoeba* は病原性を有することが示された。これまでの結果から、国内には、3 種 (サブタイプ) の *Entamoeba* が存在し、*E. polecki* がより広く分布している可能性が示唆された。また、*E. histolytica* で用いられる培地を用いて、豚の *Entamoeba* 感染便から豚 *Entamoeba* の培養を試みたが、成功しなかった。今後は培地成分や培養条件等の検討が必要と考えられた。

5. 主な発表論文等
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

- 1: Hirashima Y, Manchanayake T, Yano T, Kitahara S, Koreeda T, Kamimura S, Sasai K, Matsubayashi M, Shibahara T. Development of molecular diagnostic protocols for detecting three types of *Entamoeba* from diarrheal and asymptomatic pigs and environmental moist soils. *Parasitol Res.* 2017 Jul;116(7):2001-2007. doi: 10.1007/s00436-017-5483-1.
- 2: Matsuura Y, Matsubayashi M, Nukata S, Shibahara T, Ayukawa O, Kondo Y, Matsuo T, Uni S, Furuya M, Tani H, Tsuji N, Sasai K. Report of fatal mixed infection with *Cryptosporidium parvum* and *Giardia intestinalis* in neonatal calves. *Acta Parasitol.* 2017 Mar 1;62(1):214-220. doi: 10.1515/ap-2017-0026.

28030344.

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：

権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

笹井 和美 (SASAI, Kazumi)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授
研究者番号：70211935

(2) 研究分担者

谷 浩行 (TANI, Hiroyuki)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：00305658

(2) 研究分担者

松林 誠 (MATSUBAYASHI, Makoto)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：00305658

(2) 研究分担者

古家 優 (Furuya, Masaru)
大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授
研究者番号：30500706