

## 【産業動物】 原著

ホルスタイン種乳牛における小型ピロプラズマ  
(*Theileria orientalis*) の垂直感染調査

佐藤 雄太<sup>1)</sup> 前野 和利<sup>2)</sup> 斉藤 昭<sup>2)</sup>  
中瀬 愛<sup>2)</sup> 横山 直明<sup>3)</sup> 猪熊 壽<sup>4)</sup>

- 1) 釧路地区農業共済組合東部事業センター姉別家畜診療所 (〒088-1641 北海道厚岸郡浜中町姉別3丁目13)  
2) 釧路地区農業共済組合中部事業センター標茶家畜診療所 (〒088-2311 北海道川上郡標茶町開運10丁目25)  
3) 帯広畜産大学 原虫病センター (〒080-8555 帯広市稲田町西2線13番地)  
4) 帯広畜産大学 臨床獣医学研究部門 (〒080-8555 帯広市稲田町西2線11番地)

(2012年8月29日受付)

## 要 約

小型ピロプラズマ病流行地域で放牧飼養されているホルスタイン種乳牛30頭を対象として、小型ピロプラズマ (*Theileria orientalis*) の垂直感染調査を実施したところ、出生後間もない3頭 (10%) の子牛に垂直感染が示唆された。また、垂直感染の有無に影響する要因を調査したところ、母牛の発症の有無、寄生赤血球率、分娩月齢および子牛の初乳摂取の有無は垂直感染に影響を与えないことが明らかとなった。

キーワード：牛 小型ピロプラズマ 垂直感染 PCR 検査

-----北獣会誌 56, 615~618 (2012)

牛の小型ピロプラズマ病は赤血球内寄生性タイレリア (小型ピロプラズマ、*Theileria orientalis*) によって引き起こされる家畜原虫病である<sup>[1]</sup>。感染した牛の多くは無症状で耐過するが原虫は持続感染し、妊娠・分娩や輸送などのストレスが負荷されると発症するとされている。本疾病は、発熱、貧血、心悸亢進、呼吸促迫、元気・食欲の不振などの症状を示し、重症例では死亡することもある<sup>[1-2]</sup>。本病は主として放牧地におけるマダニ、あるいは舎飼期のウシホソジラミによる媒介<sup>[3]</sup>のほか、垂直感染することも証明されている<sup>[4]</sup>。しかし、出生後間もない子牛における小型ピロプラズマの垂直感染、実際の発生率などは不明である。

そこで今回、小型ピロプラズマ病流行地域において、小型ピロプラズマ陽性の母牛を対象に垂直感染の有無に影響する要因、また出生後間もない子牛の垂直感染の頻度について検討した。

## 材料と方法

## 1. 供試牛

北海道釧路管内標茶町で飼育されるホルスタイン種乳牛のうち、2010年11月~2012年1月までの期間に分娩した30頭を用いた。供試牛はいずれも妊娠期間中、小型ピロプラズマ病が流行する牧野に夏期放牧されていた。分娩時の母牛の月齢は22.2~93.3カ月齢 (平均34.8カ月齢) であり、採血は分娩後2.6±3.1日に頸静脈または尾静脈から行った。また、子牛は母牛に並行して頸静脈から採血した。

## 2. 小型ピロプラズマの検出

小型ピロプラズマの検出は、末梢血から抽出したDNAを材料に、主要ピロプラズマ表面蛋白 (Major Piroplasma Surface Protein: MPSP) 遺伝子を標的とするポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 法により行った<sup>[5]</sup>。

また、各血液材料については、血液塗抹のギムザ染色標本も作製し、鏡検により小型ピロプラズマの寄生赤血

球 (parasitized erythrocytes : PE) 率を算出した。判定は石原法を用いて<sup>[2]</sup>強拡大 (10×100) で鏡検し、各視野に寄生赤血球が10個以上を PE10%、1個~10個未満を1%、10視野に1個以上を0.1%、10視野に1個未満を0.01%そして検出されない場合を0%に区分した。

### 3. 血液一般検査および血液生化学検査

血液一般検査は全自動血球計数器 (Celltacα MEK-6358、日本光電工業(株)、東京) で行い、血液凝固阻害剤 EDTA 加血液を用いて白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、平均赤血球容積 (MCV)、平均ヘモグロビン容積 (MCH)、平均ヘモグロビン濃度 (MCHC) および血小板数を測定した。また、血液生化学検査は自動分析装置 (TBA-200FR Neo、東芝メディカルシステムズ(株)、栃木) で行い、得られた血清の総蛋白質濃度、血液尿素窒素、総ビリルビン、直接ビリルビンおよびシアル酸を測定した。子牛については初乳摂取の有無を確認するため、血清 IgG をウシ・IgG 定量キット (メタボリックエコシステム研究所(株)、宮城) を用いて測定した。

### 4. 統計処理

PCR 検査により子牛から小型ピロプラズマ遺伝子が検出された母牛群 (垂直感染陽性群) と検出されなかった母牛群 (垂直感染陰性群) に区分し、両群間の血液一般検査項目、生化学検査項目、PE 率および分娩月齢について Mann-Whitney の U 検定を実施した。p<0.05 を有意差ありと判定した。

## 成 績

#### 1. 小型ピロプラズマ垂直感染

PCR 検査陽性母牛から娩出された子牛30頭のうち3頭 (10%) が PCR 陽性を示した。陽性子牛と陰性子牛の判定例は図1に示す。

PCR 陽性3頭の子牛は臨床的に異常を認めず、また陰性子牛と比較して血液性状に差は認められなかった (表1)。

また、PCR 検査陽性子牛3頭の概要は表2に示す。3頭中1頭では母牛が小型ピロプラズマ病を発症しており、PE1.0%、貧血と食欲不振を示していた。また、その子牛は初乳未摂取であった。残りの2頭については母牛の一般状態に異常はみられず、子牛も十分に初乳を摂取していた。

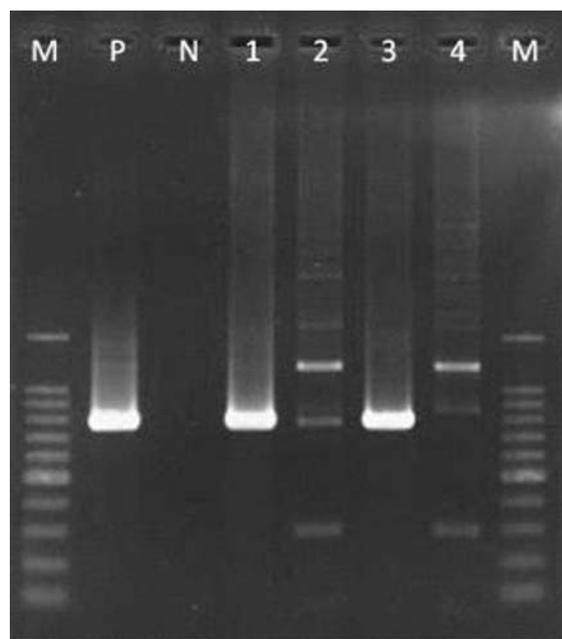


図1 母子ペア末梢血からの小型ピロプラズマ遺伝子検出結果  
Lane 1 : 母牛1 - 陽性 2 : 母牛1からの子牛 - 非特異バンドは見えるが、776bpの位置に微弱な陽性バンドが認められる 3 : 母牛2 - 陽性 4 : 母牛2からの子牛 - 陽性バンドが認められず陰性である  
P : 陽性コントロール N : 陰性コントロール M : 分子量マーカー

表1 子牛の垂直感染陽性群と陰性群の比較

	垂直感染陽性群 (n=3)	垂直感染陰性群 (n=27)
白血球数 ( $\times 10^2/\mu\ell$ )	87±40	105±58
赤血球数 ( $\times 10^6/\mu\ell$ )	888±219	818±136
ヘマトクリット (%)	36.3±11.3	34.6±5.9
ヘモグロビン (g/dl)	11.7±3.6	10.9±1.7
MCV (fl)	40.3±2.5	42.5±3.4
MCH (pg)	13.0±0.8	13.3±1.0
MCHC (g/dl)	32.3±0.4	31.0±2.8
血小板数 ( $\times 10^4/\mu\ell$ )	30.5±3.6	50.2±26.7
総蛋白質 (g/dl)	5.6±1.0	5.2±0.7
血液尿素窒素 (mg/dl)	15.1±5.9	9.2±5.8
総ビリルビン (mg/dl)	1.2±0.2	0.7±0.5
直接ビリルビン (mg/dl)	0.6±0.1	0.4±0.2
シアル酸 (mg/dl)	140.4±21.7	133.2±26.6

#### 2. 垂直感染陽性母牛群と陰性母牛群の比較

垂直感染陽性群および陰性群の比較は表3に示す。それぞれ平均分娩月齢は48.1カ月齢および35.5カ月齢、平均 PE 率は0.55%および0.13%であり、分娩月齢および PE 率について両群間に有意差は認められなかった。また、両群に小型ピロプラズマ発症牛が存在していた。

血液性状については白血球数、赤血球数、ヘマトクリット値、ヘモグロビン濃度、MCV、MCH、MCHC、血

表2 PCR検査陽性子牛の概要

	No.1	No.2	No.3
出生後採血日数(日)	0	1	3
赤血球数( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	1180	654	829
ヘマトクリット(%)	51.8	25.1	32.1
IgG( $\mu\text{g}/\text{ml}$ )	0	29498	7162
初乳摂取の有無	無	有	有
母牛の発症	有	無	無
母牛のPE率(%)	1.0	ND	0.1

PE: 小型ピロプラズマ寄生赤血球

表3 母牛の垂直感染陽性群と陰性群の比較

	垂直感染陽性群 (n=3)	垂直感染陰性群 (n=27)
白血球数( $\times 10^9/\mu\text{l}$ )	121 $\pm$ 16	110 $\pm$ 39
赤血球数( $\times 10^6/\mu\text{l}$ )	436 $\pm$ 214	597 $\pm$ 153
ヘマトクリット(%)	23.6 $\pm$ 9.0	31.5 $\pm$ 6.8
ヘモグロビン(g/dl)	8.1 $\pm$ 3.1	10.6 $\pm$ 2.1
MCV(fl)	58.4 $\pm$ 9.0	54.2 $\pm$ 7.2
MCH(pg)	20.1 $\pm$ 3.0	18.3 $\pm$ 2.6
MCHC(g/dl)	34.5 $\pm$ 0.2	33.8 $\pm$ 1.4
血小板数( $\times 10^4/\mu\text{l}$ )	26.1 $\pm$ 5.7	29.3 $\pm$ 15.8
総蛋白質(g/dl)	6.7 $\pm$ 0.4	6.9 $\pm$ 0.8
血液尿素窒素(mg/dl)	12.3 $\pm$ 9.2	10.2 $\pm$ 5.2
総ビリルビン(mg/dl)	0.6 $\pm$ 0.5	0.3 $\pm$ 0.3
直接ビリルビン(mg/dl)	0.3 $\pm$ 0.3	0.2 $\pm$ 0.2
シアル酸(mg/dl)	50.8 $\pm$ 5.1	57.4 $\pm$ 7.8
PE率(%)	0.55*	0.13
分娩月齢(カ月)	48.1	33.3
発症牛(頭数)	1	2

\* n=2

血小板数、総蛋白質濃度、血液尿素窒素、総ビリルビン、直接ビリルビン、シアル酸のいずれの項目も両群間に有意差は認められなかった。

## 考 察

本調査では、PCR陽性母牛から娩出された3頭(10%)の子牛がPCR陽性を示した。小型ピロプラズマの末梢血出現は感染後10-14日から認められるとされているが<sup>[6-7]</sup>、陽性子牛はいずれも生後3日以内であることから、出生後の感染ではなく、胎生期の垂直感染が強く示唆された。

垂直感染に関する報告<sup>[8]</sup>では、2日齢の子牛に貧血症状が認められているが、本調査の垂直感染陽性子牛3頭は、いずれも採血時の臨床症状に異常を認めなかった。今後、陽性子牛の発症の有無や小型ピロプラズマ病伝播に作用する因子の追跡調査を行う必要があるだろう。

今回、供試母牛を垂直感染陽性群および陰性群に区分

し、垂直感染の有無に影響を与える要因を調査したところ、分娩月齢、PE率および血液性状のいずれも両群間に有意差がなく、これらの要因は垂直感染に影響を与えないものと考えられた。また、両群ともに分娩前後に小型ピロプラズマ病を発症し重度の貧血を示す牛が存在したことから、母牛の発症の有無は垂直感染に影響を与えないものと考えられた。

一般に、小型ピロプラズマ病はマダニの唾液腺の腺胞細胞内で増殖したスポロゾイトが牛の体内に注入され、単球でシズントを形成した後に赤血球内に侵入してピロプラズムになる。このとき、血液塗抹ギムザ染色標本から小型ピロプラズマ原虫のピロプラズムが検出できる<sup>[1]</sup>。垂直感染の経路としては初乳を介した感染も考えられるが、陽性子牛の1頭が初乳未摂取であり、垂直感染には初乳以外の感染経路が存在すると思われた。

小型ピロプラズマに関する研究は数多く存在するが、垂直感染に関する研究は少なく、垂直感染が小型ピロプラズマ病の伝播にどの程度影響しているのかは明らかではない。

本調査では、小型ピロプラズマ感染ホルスタイン種乳牛から娩出された子牛の10%に垂直感染が示唆された。また、母牛の発症の有無、PE率、分娩月齢および子牛の初乳摂取の有無は垂直感染に影響を与えないことが明らかになった。

本調査を遂行するにあたり、ご協力いただいた帯広畜産大学原虫病センタースタッフならびに臨床獣医学研究部門の学生の方々に深謝いたします。

## 引用文献

- [1] 杉本千尋 他: 動物の感染症第三版、142-143、近代出版、東京(2011)
- [2] 石井俊雄: 改訂獣医寄生虫学・寄生虫病学(1)総論/原虫、122-127、講談社、東京(2007)
- [3] Fujisaki K, Kamio T, Kawazu S, Shimizu S and Shimura K: *Theileria sergenti*; experimental transmission by the Long-nosed cattle louse, *Linognathus vltuli*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 87, 217-218 (1993)
- [4] Byeong BK, Soo KB, Kim JH, Hur J, Lee BO, Jung JM, Onuma M, Oluoch AO, Kim C-H, and Kakoma I: Verification by polymerase chain reaction of vertical transmission of *Theileria sergenti* in cows. *Can. J. Vet. Res.*, 67, 278-282 (2003)
- [5] Ota N, Mizuno D, Kuboki N, Igarashi I, Nakamura Y, Yamashina H, Hazaike T, Fujii K, Onoe S, Hata H,

- Kondo S, Matsui S, Koga M, Matsumoto K, Inokuma H and Yokoyama N: Epidemiological survey of *Theileria orientalis* infection in grazing cattle in the eastern part of Hokkaido, Japan, *J. Vet. Med. Sci.*, 71, 937-944 (2009)
- [6] 前出吉光: 獣医内科学 大動物編、日本獣医内科学アカデミー編、119、文永堂出版、東京 (2005)
- [7] 中村義男: 小型ピロプラズマ原虫実験感染牛の貧血に対するデキストラン鉄製剤の効果、動衛研研究報告、第116号、1-10 (2010)
- [8] 高倉優子: 胎内感染が疑われた子牛の小型ピロプラズマ症の一症例、家畜診療、46(2)、103-107 (1999)