小型ピロプラズマ感染牛の血液接種による 牛白血病ウイルス伝播の可能性

石原忠雄*¹⁾ 中島英男*²⁾ 南 哲郎*²⁾ 及川博幸*²⁾

(昭和 59 年 9 月 21 日受理)

Possibility of Artificial Transmission of Bovine Leukemia
Virus by Inoculation with Blood Infected with *Theileria sergenti*
TADAO ISHIHARA (Synthetic Feed Laboratory Co., Ltd., Uchikanda,
Chiyoda-ku, Tokyo 101) et al.

SUMMARY

A preliminary exposure to *Theileria sergenti* by inoculation with infected bovine blood was suspected to be a cause of artificial transmission of bovine leukemia virus (BLV) among cattle. To check the incidence of BLV infection, serum samples were collected, over a period from 1968 to 1979, from 304 cattle in 21 pastures and 37 experimental areas in total (before and after preliminary infection). The presence of antibody against BLV was determined by the agar gel immunodiffusion test.

The rate of antibody prevalence was low in herds inoculated with blood vaccine prepared in essentially the same manner as the authorized biological products, as well as in uninoculated control herds. No significant difference was observed between the two herds.

In other herds, however, where cattle were inoculated with blood vaccines which had not so carefully been prepared, the antibody prevalence increased. There was a significant difference in the prevalence between these herds and the herd inoculated with the former blood vaccine. It was suggested that the transmission of BLV by the blood vaccine was controlled when the donor was carefully selected and supervised.

要 約

小型ピロプラズマ病の発症予防法として、感染血液の計画的接種法が効果的とされているが、牛白血病ウイルス (BLV) などの病原微生物の人為的伝播の危険性がある。そこで、1968～1979 年に本法が実施された 21 カ所、延べ 37 試験地の試験牛 304 頭の経過血清について寒天ゲル内沈降反応によって BLV 抗体の推移を検討した。その結果、供血牛の血液を摘脾した実験牛に接種して迷入ウイルス、細菌、原虫等の否定試験を行って作製した試作ワクチン接種群と血液非接種群では抗体の陽転率が低く、両群間にはほとんど差がなかった。しかし、上記以外の血液接種群では接種後の舎飼期および放牧期の陽転率が高率であった。また、BLV 汚染地と考えられる舎飼地では、血液接種とは無関係に抗体陽転牛が認められた。

わが国の放牧牛では小型ピロプラズマ (*Theileria sergenti*, 以下小型ピロ) による被害が著しく^{3,5)}, ダニ駆除, 休牧, 放牧馴致, 早期診断, 治療などのみでは感染防止はもちろん, 発症予防効果も十分期待できない⁶⁾. そのため, 安全かつ有効なワクチンが開発されるまでの暫定

措置として, 感染牛の血液を計画的に接種する免疫学的発症予防法 (以下, 本法) が検討された⁴⁾.

本法は, 感染免疫による発症予防効果に加えて, 発症誘因が少ない冬期間に人工感染をさせ, 耐過後に放牧することによって, 感染による発症と放牧による衰弱を時期的に分離し, 放牧地での小型ピロによる被害を防止する方法である^{4,6)}. 本法は 1961 年以来, ピロプラズマ病による事故が多発している北海道ほか 13 県で野外試験

*¹⁾ (株)科学飼料研究所 (東京都千代田区内神田2-1-2)

*²⁾ 農林水産省家畜衛生試験場 (茨城県筑波郡谷田部町観音台3-1-1)

が行われ、その発症予防効果が各地で認められた⁴⁾。しかし、弱毒化されていない接種原虫は耐過後も牛体内に潜在して感染源になる。また、小型ピロ病での免疫は持続感染免疫であり、ストレスなどによって再発症することがある。さらに、牛血液を素材としている関係から牛白血病ウイルス (Bovine Leukemia Virus, 以下 BLV) などの病原微生物を接種感染させる危険性もある。これらの理由から、本法による小型ピロ病の発症予防に関する検討は中止されている状態にあるが⁴⁾、これにかわる防疫対策の開発が困難なこともあって、その後も小型ピロ感染牛の血液を接種する、いわゆる毒血注射をひき続き実施している地域がある。

BLV 感染の有無が寒天ゲル内沈降反応によってほぼ確実に診断できるようになったことから⁹⁾、著者らは本法実施牛と無処置の対照牛の経過血清について BLV 抗体の推移を検討し、血液接種による BLV 伝播の可能性について考察を行った。

1. 材料および方法

1) 供血牛および接種血液

(1) **供血牛**：臨床血液学的所見および採血後の病理解剖学的所見から、ピロプラズマ病以外の病変が認められない牛を使用し、1978 年の A および B 血液供血牛では、BLV 補体結合反応によって抗体陰性の確認を行った。

(2) **接種血液**：小型ピロ感染の生鮮血液または、それを原材料として作製した凍結生ワクチン（以下、試作ワクチン）を使用した。試作ワクチンは -78°C の超低温で 10 日～12 カ月間保存し、その間に供血牛の血液を摘出した実験牛に接種して迷入ウイルス、細菌、原虫等の否定試験を行った。A 血液は小型ピロ福島株⁵⁾ を実験牛に血液継代して作製した試作ワクチンで、原則として迷入ウイルスの否定試験を行った。B 血液は製造年度ごとに毎回 B 牧場の放牧経験牛から採材し、B-1～B-4 血液は試作ワクチン、B-5 血液は B-4 血液を接種した放牧牛から採材した生鮮血液である。C、D および E 血液はそれぞれの試験地から採材した生鮮血液であり、D-1～D-3 血液は 3 頭の牛からそれぞれ採血した。

(3) **接種方法**：放牧実施前の 12 月から 2 月までの舎飼期に、1 頭当たり血液量で 1 ml を頸部皮下に注射した。

2) 試験地

家畜衛生試験場九州支場が実施した本法の試験地から経過血清が保存されていた 21 カ所の試験地（北海道 7、東北 3、関東 5、中部 3、中国 3）、延べ 37 試験を無作為抽出した。各試験地は血液接種を行った舎飼地と放牧地に区分された。

A 血液接種の 12 カ所の試験地、延べ 19 試験を I 群とし、B、C、D および E 血液接種の 6 試験地、延べ 11

表 1 試験地の群区分と接種時の BLV 抗体検出状況

試験 番	地 号	年 度						
		'68	71	75	76	77	78	79
1		○			●*			
2					●	●		
3					●	●	●	
4						●	●	
5					●	●		
6					●			
7					●			
8					●			
9					●	●	●	
10						●		
11					●	●		
12					●			
13					●*	●*	●*	●
14					●			
15					●	●*		
16							●*	○*
17		○						
18		○						
19							○	
20								○
21								○

注) ●: I 群 (A 血液接種) ●: II 群 (B, C, D および E 血液接種) ○: III 群 (対照, 非接種)
*: 接種時抗体陽性

試験を II 群、血液非接種の対照 7 試験地、7 試験を III 群とした (表 1)。

ただし、第 11 試験地を除いた I 群では、試作ワクチンの A 血液接種による本法がすでに応用されていた。II 群の第 13 試験地では試作ワクチンが、III 群の第 16 試験地においては毒血注射が応用されていたが、II および III 群のその他の試験地では本法が応用されたことがなかった。なお、III 群については、毒血注射が行われてきた第 16 試験地 (III-a 群) と本法が応用されたことのない 6 カ所の試験地 (III-b 群) に区分した。

3) 試験牛と被検血清

(1) **試験牛**：試験年度および接種血液ごとに各試験地から 5～10 頭、計 304 頭を無作為抽出した。いずれも初放牧牛であり、試験期間中に牛白血病の所見を示した例は認められなかった。

(2) **被検血清**：接種時血清は放牧前の 12 月から 2 月に、入牧時血清は 3 月下旬から 6 月中旬に、退牧時血清は 8 月下旬から 11 月上旬に採材した。ただし、8 カ所の試験地の牛 75 頭では接種時の血清が採取されてなく、総検査数は 837 例であった。

4) 寒天ゲル内沈降反応

(1) **抗原**：ペンシルバニア大学、FERRER 教授から分与を受けた BLV 持続感染コウモリ肺由来細胞 (Bat₂

Cl₁ 細胞) の培養上清から, 中島らの方法⁹⁾ で精製した BLV 外膜由来の糖蛋白 (gp) 抗原を使用した。

(2) 反応条件: 中島らの方法⁹⁾ により, 寒天平板上に直径 5 mm 間隔 3 mm の穴を作り, 可検血清, 指示血清および抗原をそれぞれ約 0.05 ml 入れ, 15~25℃ で反応を行った。沈降線が明瞭に出現した時点で判定し, 72 時間までに検出できないものは陰性とした。

5) 統計学的検討

接種時の BLV 抗体陽性率および接種後の陽転率は, 接種時または入牧時の頭数から算出し, 陽転率は舎飼期と放牧期に区分して検討した。接種時の血清を欠除した牛については, 入牧時陰性牛は接種時陰性, 入牧時陽性牛は舎飼期に陽転したものと仮定して, 陽性率および舎飼期陽転率を算出した。

2. 成績

1) 接種血液別 BLV 抗体陽性牛の推移

本法を実施した 21 カ所の試験地, 延べ 37 試験の 304 頭, 837 血清について BLV 抗体を調べた。その結果, 表 1 に示した第 1, 13, 15 および 16 試験地の 4 カ所では 55 頭中 12 頭 (21.8%) の接種時血清から BLV 抗体が検出された。接種血液別の抗体陽性牛の推移は表 2 に示したようであり, 第 1, 5, 7, 8, 11~16 および 19 試験地の 11 カ所 (52.3%), 延べ 18 試験 (48.5%), 79 頭 (25.9%), 135 血清 (16.1%) から抗体が検出された。

(1) A 血液接種(I)群: 接種時の陽性牛は 162 頭中 1 頭 (0.6%) であり, 舎飼期には 2 カ所の試験地でそれぞれ 1 頭が陽転し, 入牧時の陽性牛は 3 頭 (1.8%) であった。放牧期には 5 カ所の試験地で 8 頭 (5.0%) が陽転し, 退牧時の陽性牛は 11 頭 (6.7%) に増加した。

(2) B, C, D および E 血液接種(II)群: A 血液以外の血液を接種したこの群では接種時からすでに 60 頭中 8 頭 (13.3%) が陽性を示し, 陽性牛は入牧時 36 頭 (46.1

%), 退牧時 60 頭 (76.9%) に増加した。陽転率は舎飼期 46.1%, 放牧期 72.7% であり, いずれも I 群より高率であった ($P < 0.01$)。

また, B 血液のうち B-1, B-3 および B-5 血液接種群では舎飼期に 17 頭 (73.7%), 放牧期に 3 頭 (50.0%) が陽転し, 退牧時の陽性率は 23 頭中 20 頭 86.9% であった。他方, B-2 および B-4 血液接種群では接種時の陰性牛 21 頭は入牧時まですべて陰性であったが, 放牧期には 17 頭 (80.9%) が陽転し, 退牧時の陽性率ではこの両群間に有意差がなかった ($P < 0.01$)。

(3) 血液非接種(III)群: I, II 群の接種時に相当する時期の陽性率は 64 頭中 4 頭で 6.2%, 陽転率は舎飼期 7.8%, 放牧期 5.0% であった。いずれの陽転率も II 群より低く, I 群との間には有意差がなかった ($P < 0.01$)。III-a 群では接種時に相当する時期から 7 頭中 3 頭 (42.8%) が陽性を示し, 入牧時までに 1 頭, 残り 3 頭も退牧時までに陽転した。他方, III-b 群では入牧時の陽性牛は 1 頭 (1.7%) のみであり, 放牧期に陽転した牛は認められなかった。

2) 同一試験地における陽転状況

第 1, 11, 14~16 試験地における 11 試験の接種血液別陽転状況を示すと図 1 のようである。

(1) 非接種牛と接種牛の比較

第 1 試験地: 1968 年に入牧した 10 頭の牛はすべて陰性であり, かつ舎飼期および放牧期を通じて陽転が認められなかった。その後も 8 年にわたって A 血液による本法を実施したが, 1976 年の接種時においても陽性牛は 1 頭 (12.5%) のみであり, 放牧後の陽転はまったく認められなかった。

第 16 試験地: 毒血注射を実施してきたこの試験地では, 接種時からすでに両群とも 3 頭ずつが陽転し, 13 頭中 6 頭 (46.1%) が陽性を示した。さらに舎飼期には非接種牛では 1 頭, E 血液接種牛では残りの 3 頭全例も陽転した。また, 非接種の 3 頭は舎飼期には陰性であった

表 2 接種血液(群)別 BLV 抗体陽性牛の推移

群	接種血液	試験地番号	試験数	試験牛頭数*	抗体陽性牛			抗体陽転率(%)**	
					接種時***	入牧時	退牧時	舎飼期	放牧期
I	A	{ 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 14	19	162(162)	1	3	11	1.8(3/162)	5.0(8/159)
II	BC DE	11 12 13 14 15 16	11	78(60)	8	36	60	46.1(36/78)	72.7(24/33)
III (非接種)	III-a	16	1	7(7)	3	4	7	57.1(4/7)	100(3/3)
	III-b	1 17 18 19 20 21	6	57(0)	0(1)	1	1	1.7(1/57)	0(0/56)
	小計	7 試験地	7	64(7)	3(1)	5	8	7.8(5/64)	5.0(3/59)
計		21 試験地	37	304(229)	12(1)	44	79	14.4(44/304)	13.9(35/251)

注) *: () 内は接種時の検査頭数 ** : () 内の分母は検査頭数, 分子は陽性頭数

*** : () 内は接種時未検査で入牧時陽性頭数

(1) 非接種牛と接種牛の比較

a. 第1試験地
非接種 (1968)

A 血液 (1976)

b. 第16試験地
非接種 (1978)

E 血液 (1978)

(2) 接種血液による比較

a. 第11試験地
A 血液 (1976)

B-1 血液 (1976)

b. 第14試験地
A 血液 (1975)

C 血液 (1975)

c. 第15試験地

D-2 血液 (1975)

D-3 血液 (1977)

⊗ : 非検査
□ : 抗体陰性
■ : 抗体陽性

上段: 接種時
中段: 入牧時
下段: 退牧時

図1 同一試験地における牛個体別 BLV 抗体の保有状況

が、放牧期には全例が陽転した。

(2) 接種血液による比較

第11試験地: 接種時には陰性であった10頭のうちA血液接種の5頭では退牧時まで陰性であったが、B-1血液接種の5頭では舎飼期に4頭(80.0%)が陽転し、残り1頭も退牧時までに陽転した。

第14試験地: 接種時には10頭全例が陰性であったが、A血液接種牛でも舎飼期に5頭中1頭、放牧期に2頭が陽転した。また、C血液接種牛では接種後退牧時までに5頭全例が陽転した。

第15試験地: 1975年のD-1、D-2血液接種の試験牛10頭では接種時の陽性牛は認められず、1977年でも1頭のみであった。他方、舎飼期の陽転率は接種血液または飼育地によって異なり、D-1血液接種牛では退牧時までに陽転した例は認められなかった。D-2血液接種の5頭では舎飼期に全例が陽転した。しかし、2年後のD-3

血液接種牛では接種時すでに1頭の陽性がみられたが舎飼期に1頭、放牧期に2頭が陽転したのみで、接種時から退牧時までの陽転牛は9頭中3頭であった。

3. 考 察

Babesia bovis, *B. bigemina* および *Anaplasma centrale* の感染牛血液は牛のバベシア病およびアナプラズマ病のワクチンとして、豪州や南アフリカなどでは古くから検討され、現在でも広く応用されている^{1,2,15)}。また、最近では凍結血液ワクチンも作製されるようになり、豪州からトリニダードトバコなどへの輸送試験も行われた⁷⁾。

わが国に分布する小型ピロは一般に舎飼環境における病原性が弱いことから、その感染血液の応用法が検討された⁴⁾。しかし、血液ワクチンの使用はいままでもなく、未知の病原微生物伝播など危険性が高い。そこで、今回の試験では小型ピロ感染血液を計画的に接種した試験牛について、BLV 抗体の保有状況を検査した。

その結果、供血牛の血液を摘脾した実験牛に接種して迷入ウイルス、細菌、原虫等の否定試験を行って作製したA血液を接種したI群では、その他の血液を接種したII群に比して、BLV 抗体の陽転率がきわめて低いことが確認された。また、A血液とB血液を応用した同一試験地(第11試験地)においても同様の結果が得られ、A血液接種群では舎飼期、放牧期ともに抗体は陰性であった。

各群間の比較では、II群の舎飼期および放牧期の陽転率はI群に比して高率であった。さらに、全試験地の76.1%を占めているI群とIII-b群の16カ所の陽転牛は舎飼期で219頭中4頭(1.8%)、放牧期でも215頭中8頭(3.7%)であった。これらのことから、検定したA血液を応用してきた放牧地とその周辺地区におけるBLV汚染の進行程度はそれほど強くなく、その応用地区におけるBLV汚染と血液接種による本法が必ずしも結びついているとは考えられなかった。

同一試験地での接種血液別陽転状況をみると、A、D-1およびD-3血液接種牛では舎飼期の陽転率が8.3%と低いが、B-1、CおよびD-2血液接種牛では舎飼期に80.0%が陽転していた。血液接種によるBLV抗体の陽転には4~6週間を必要とすることから^{8,10)}、今回の試験でも血液接種による場合はほとんどが舎飼期に陽転したものと考えられる。また、接種血液によっては舎飼期の陽転率がきわめて高いことが確認された。

第1試験地の接種時抗体陰性牛17頭は舎飼期においても陽転しなかったが、第16試験地では接種時にす

に46.1%が陽性を示していた。このことから、第16試験地では放牧地ばかりでなく、周辺の舎飼地もBLVで汚染されていたものと考えられた。さらに、4カ所の7試験で接種時から21.8%の牛にBLV抗体が検出されたことから、BLV汚染地の舎飼牛では計画感染による接種感染とは無関係にBLV抗体が陽転していることが確認された。

Ⅱ群での放牧期陽転率は舎飼期のそれに比較して若干高率であった($P < 0.05$)。BLV汚染地と考えられた第16試験地の接種牛では放牧期に3頭全例が、第14試験地でも6頭中4頭が放牧期に陽転していた。また、B-2およびB-4血液接種牛のうち接種時陰性牛の21頭では舎飼期に陽転した例は認められなかったが、放牧期には17頭(80.9%)が陽転していた。これらの成績から、BLV汚染には接種血液による伝播以外に、放牧地における水平伝播の関与の多いことが示唆された。このことはOHSHIMAら¹¹⁾、大島ら¹²⁾、ONUMAら¹³⁾およびPIPERら¹⁴⁾の報告とも一致している。NAKAJIMAら¹⁰⁾のBLV全国調査成績と比較すると今回の抗体検出率(16.1%)はきわめて高率であったが、これは対象試験地を放牧地とその周辺地区から抽出したためと考えられた。

成牛型の牛白血病の発病機序は複雑で、その蔓延には多くの要因が考えられるが、最近では、BLV感染の有無が血清学的にほぼ確実に診断できるようになった^{9,10)}。したがって、今回のⅠ群における試験成績が示しているように、供血牛を厳密に選定し、生物学的製剤の製造基準にのっとった検査を行えば、BLVの接種感染はほぼ防止できるものと考えられた。

稿を終わるにあたり、ビロプラズマ病の計画感染免疫による野外試験に協力された各県の畜産課、家畜保健衛生所の関係各位に深謝します。また、ご指導をいただいた滝沢隆安博士およびBLVの補体結合抗体検査にご協力をいただいた高取一郎博士に感謝します。

文 献

- 1) CALLOW, L. L.: *World Anim. Rev.*, 18, 9~15 (1976).
- 2) DE Vos, A. J.: *J. South Afr. Vet. Ass.*, 50, 357~362 (1979).
- 3) 石原忠雄, 平 詔亨, 南 哲郎, ほか: 家保技研報, 20, 89~110 (1972).
- 4) 石原忠雄, 南 哲郎: 獣畜新報, 685, 442~451 (1978).
- 5) ISHIHARA, T. and MINAMI, T.: *Protozoan Diseases*, ISHIZAKI, T., et al., editors, 201~209, Japanese-German Association on Protozoan Diseases, Tokyo (1978).
- 6) ISHIHARA, T.: *Food and Fertilizer Technology Center Technical Bull.*, 61, 1~18 (1982).
- 7) MELLORS, L. T., DALGLIESH, R. J., TIMMS, P., et al.: *Res. Vet. Sci.*, 32, 194~197 (1982).
- 8) MILLER, J. M.: *J. Natl. Cancer Inst.*, 43, 1297~1307 (1969).
- 9) 中島英男: 動生協会報, 15, 1~16 (1982).
- 10) NAKAJIMA, H., OIKAWA, H., INUMARU, S., et al.: *Jpn. Agr. Res. Quart.*, 16, 136~143 (1982).
- 11) OHSHIMA, K., OKADA, K., NUMAKUNAI, S., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43, 79~81 (1981).
- 12) 大島寛一, 池田卓也, 沼宮内 茂, ほか: 日獣会誌, 36, 130~134 (1983).
- 13) ONUMA, M., HONMA, T., MIKAMI, T., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 40, 691~696 (1978).
- 14) PIPER, C. E., ABT, D. A., FERRER, J. F., et al.: *Cancer Res.*, 35, 2714~2716 (1975).
- 15) PURNELL, R. E.: *Vaccines Against Parasites*, TAYLOR, A. E. R. and MULLER, R., editors, 25~55, Blackwell Scientific Publications, Oxford (1980).
- 16) VAN DER MAATEN, M. J. and MILLER, J. M.: *Ann. Rech. Vet.*, 9, 831~835 (1978).