小型ピロプラズマ野外分離株人工感染牛の 臨床病理学的所見

新沼伸吾¹⁾ 池田逸夫¹⁾ 北島克好¹⁾

中根淑夫²⁾ 南 哲郎³⁾

¹⁾ 全農家畜衛生研究所 (佐倉市大蛇町 7)

²⁾ (株)科学飼料研究所 (千代田区内神田 2-1-2)

³⁾ 農林水産省家畜衛生試験場 (つくば市観音台 3-1-1)

(平成 2 年 5 月 28 日受付・平成 2 年 8 月 24 日受理)

Clinicopathological Findings of Calves Experimentally Infected with a Field Isolate of *Theileria sergenti*.

SHINGO NIINUMA¹⁾, ITSUO IKEDA¹⁾, KATSUYOSHI KITAJIMA¹⁾, HIDEO NAKANE²⁾
and TETSURO MINAMI³⁾ (¹⁾ ZEN-NOH Institute of Animal Health, Sakura-shi, Chiba 285,

²⁾ Synthetic Feed Laboratory Co., LTD., Chiyoda-ku, Tokyo 101, ³⁾ National Institute
of Animal Health, Tsukuba-sh, Ibaragi 305)

SUMMARY

Clinicopathological responses of calves to experimental infection with a field isolate of *Theileria sergenti* were studied in two splenectomised and one non-splenectomised calves.

In the two splenectomised calves, the maximum parasitemia level reached 26.3% and 31.3%. Severe anaemia, and hepatic and renal dysfunction were caused by parasite multiplication in the blood. One of them died at the acute anaemic phase. In the dead calf, a decrease in mean corpuscular hemoglobin concentration and a marked increase in leucocyte count were observed. Moreover, a large increase in GOT, GPT and LDH levels and a large decrease in blood glucose level were observed.

In the non-splenectomised calf, the maximum parasitemia level reached 12.6%, and anaemia appeared, just as in the splenectomised calves. No blood chemical changes were observed at the anaemic phase, but the GOT and LDH levels increased at the schizogonic phase.

These results indicated that this field isolate of *T. sergenti* was proliferated in not only splenectomised calf but also non-splenectomised calf and caused severe anaemia and hepatic and renal dysfunction by multiplication. It was confirmed that the dead calf developed severe hepatic dysfunction, leucocytosis and macrocytic, hypochromic anaemia. In addition, hepatic dysfunction was present at not only the acute anaemic phase but also the schizogonic phase.—**Key Words** : *Theileria sergenti*, field isolate, clinicopathology, hematological findings, biochemical findings.

-----J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 44, 7~10 (1991)

要 約

野外発症牛から新しく分離された小型ピロプラズマ原虫 (高原株) を人工感染させた牛の病態を摘脾牛 (2 頭) と非摘脾牛 (1 頭) を用いて臨床病理学的に検討した。

摘脾牛では、原虫寄生率が 26.3 および 31.3% に達し、それに伴い重度の貧血症状と肝機能および腎機能障害が認められ、貧血極期に 1 頭が死亡した。死亡牛では、臨床病理学的性状のうち、とくに、平均赤血球血色素濃度の低下と白血球数の著増および GOT, GPT, LDH の著増と血糖値の激減が観察された。

また、非摘脾牛においても原虫寄生率は 12.6% に達し、摘脾牛と同様の貧血症状が観察された。貧血期においては生化学的性状にとくに変化は認められなかったが、シゾゴニー期には GOT および LDH の増加が観察された。

以上のことから、今回分離された野外株原虫は、摘脾牛のみならず非摘脾牛においても高度に増殖し、それによって感染牛は重度の貧血と肝機能および腎機能障害に陥ることが確認された。とくに、死亡牛の病態として著しい肝機能の低下と白血球増多症および大球性低色素性貧血が確認された。また、肝機能障害は急性貧血期のみでなくシゾゴ

ニ一期にも発現している可能性が示唆された。

——キーワード：小型ピロプラズマ，野外分離株，臨床病理，血液所見，生化学所見。

小型ピロプラズマ感染牛の臨床病理学的所見は，木村ら^{3,4)}によって野外感染牛について詳細に報告されている。いっぽう，実験室内でのダニによる人工感染牛における臨床病理学的所見については詳細な検討の報告はなく，血液性状の変化を中心とした南ら⁵⁾の報告があるに過ぎない。

今回，われわれは独自の小型ピロプラズマ人工感染系を確立することを目的として，小型ピロプラズマの濃厚汚染牧野より分離した野外株を用いて人工感染試験を行い，その病態について臨床病理学的に検討したのでその概要を報告する。

材料および方法

供試小型ピロプラズマ株

栃木県氏家畜保健衛生所管内の一放牧場の感染牛から1985年に新しく分離され，ダニ継代によって維持されている *Theileria sergenti* (TS) 高原株を用いた。

供試動物

ホルスタイン種，2～3カ月齢の健康な摘脾牛2頭，非摘脾牛1頭を用いた。

感染方法

TS 野外感染牛より分離した血液を摘脾牛に 10^{10} 個/頭皮下接種し，原虫寄生率が20.1%の時点でフタゲチマダニの若ダニを付着，24.6～25.3%の時点で飽血・落下したダニを回収し，脱皮後高原株感染ダニとして使用した。使用したダニのスポロゾイト感染率（感染ダニ数/検査ダニ数×100）は96.1%であった。供試動物は感染成ダニ31～189匹を耳袋法によって感染させた（表1）。

臨床観察

一般臨床（元気，食欲，粘膜の色，体表リンパ節の腫脹）および体温は毎日定時に1回観察し，体重は週に1回測定した。

原虫検査

感染後1日間隔で採血し，ギムザ染色による血液塗抹

表1 小型ピロプラズマ人工感染試験の実験条件

牛No.	感染株	感染材料	感染量
1 (spl)	高原株 ^{a)}	成ダニ ^{b)}	31 ^{c)}
2 (spl)	"	"	189
3	"	"	175

a) 栃木県内で新しく分離された株

b) 感染成ダニを吸血

c) 吸血させたダニの匹数

spl：摘脾牛，No. 3 は非摘脾牛

標本を作製して原虫の寄生率を観察した。寄生率は赤血球1000個中の寄生赤血球数の百分比で求めた。

血液検査

感染後1日間隔で採血し，赤血球数 (RBC)，白血球数 (WBC)，赤血球容積 (PCV)，血色素濃度 (Hb) および赤血球恒数を測定した。

RBC，WBC はマイクロセルカウンター（東亜医用電子株式会社），PCV はマイクロヘマトクリット法および Hb はシアンメトヘモグロビン法により測定した。赤血球恒数は Wintrobe 法により平均赤血球容積 (MCV)，平均赤血球血色素量 (MCH) および平均赤血球血色素濃度 (MCHC) を求めた。

血液生化学検査

感染後1週間隔で採血し，血清分離後，血清総蛋白 (TP)，アルブミン (Alb)，A/G 比，総ビリルビン (T-Bil)，直接ビリルビン (D-Bil)，血糖 (Glu)，総コレステロール (T-Chol)，尿素窒素 (BUN)，尿酸 (UA)，カルシウム (Ca)，無機リン (iP)，鉄 (Fe)，GOT，GPT，アルカリフォスファターゼ (Alp)，LDH およびチモール混濁試験 (TTT) の17項目を測定した。これらの測定は，すべてオリパス製血清自動分析装置 AU 500 を使用し

表2 小型ピロプラズマ人工感染牛の臨床および原虫学的所見

牛No.	潜伏期 (日)	最高寄生 率到達日 (日)	最高寄生 率 (%)	第一次 ^{a)} 発症 (℃)	第二次 ^{b)} 発症 (℃)
1 (spl)	11	25	26.3	40.9(11) ^{c)}	41.0(25)
2 (spl)	10	25	31.3	41.0(10)	40.1(26)
3	10	31	12.6	40.8(10)	— ^{d)}

a) シンゴニー期における発熱

b) 急性貧血期における発熱

c) () 内は感染後日数

d) 変化なし

spl：摘脾牛，No. 3 は非摘脾牛

図1 小型ピロプラズマ人工感染牛における寄生率の推移

て行った。

成績

臨床所見および原虫学的所見

各感染牛における臨床所見および原虫学的所見は表 2 に示した。また、原虫寄生率の推移を図 1 に示した。

原虫出現前における発熱（第一次発症）は、すべての牛において認められ原虫の流血中出現と同時に 40℃ 以上の発熱が観察された。

潜伏期は、10 ないし 11 日であったが、最高寄生率到達日は摘脾牛で 25 日、非摘脾牛で 31 日であった。

寄生率は摘脾牛（No. 1, 2）ではほぼ同様の上昇を示し、最高寄生率はそれぞれ 26.3%, 31.3% であった。

また、非摘脾牛（No. 3）でも 12.6% に達した。

急性貧血期における発熱（第二次発症）は摘脾牛にお

いて認められ、この時期に元気・食欲の消失と粘膜の退色が観察され、1 頭（No. 1）は感染後 27 日目に死亡した。

血液学的所見

急性貧血期における血液学的所見を表 3 に示した。

原虫の増殖に伴い、RBC, PCV, Hb は徐々に減少し、寄生率が最大値を示した日より 1～2 日後にこれらの値は最低値を示した。摘脾牛 2 頭（No. 1, 2）のこれらの平均値はそれぞれ 161 (万/mm³), 11.3 (%), 2.9 (g/dl) であり、正常値の約 80%, 67%, 74% の減少であった。非摘脾牛では正常値の約 73%, 48%, 55% の減少であった。

赤血球恒数では、貧血極期より MCV, MCH, の上昇が認められ、貧血の回復に伴い正常値に戻った。

MCHC については死亡牛（No. 1）においてのみ低下

表 3 小型ピロプラズマ人工感染牛の急性貧血期における血液学的所見

牛 No.	RBC ($\times 10^6/\text{mm}^3$)	PCV (%)	Hb (g/dl)	MCV (fl)	MCH (pg)	MCHC (g/dl)	WBC ($\times 10^3/\text{mm}^3$)
1 (spl)	1.53	10.0	2.4	78.4	— ^{a)}	20.0	50.4
2 (spl)	1.69	12.5	3.3	90.7	24.5	—	18.4
3	2.18	18.0	5.1	91.7	25.7	—	—
正常値 ^{b)} (S. D.)	8.12 (0.77)	34.7 (1.6)	11.3 (1.1)	42.9 (2.8)	13.9 (0.5)	31.9 (1.0)	9.9 (0.9)

a) 変化なし

b) 試験牛 3 頭の感染前の値の平均（標準偏差）

spl: 摘脾牛, No. 3 は非摘脾牛

表 4 小型ピロプラズマ人工感染牛の急性貧血期における生化学的所見 (1)

牛 No.	Tp (g/dl)	Alb (g/dl)	A/G	T-Bil (mg/dl)	D-Bil (mg/dl)	Glu (mg/dl)	T-Cho (mg/dl)	BUN (mg/dl)	UA (mg/dl)
1 (spl)	— ^{a)}	—	—	1.7	0.4	6.2	32.0	38.0	7.7
2 (spl)	—	—	—	2.4	0.4	15.8	20.0	38.2	2.4
3	7.6	—	0.85	0.9	—	—	36.0	—	—
正常値 ^{b)} (S. D.)	5.3 (0.6)	3.0 (0.1)	1.38 (0.26)	0.1 (0.1)	0.03 (0.06)	58.9 (27.3)	83.0 (9.2)	20.6 (5.1)	0.7 (0.2)

a) 変化なし

b) 試験牛 3 頭の感染前の値の平均（標準偏差）

spl: 摘脾牛, No. 3 は非摘脾牛

表 5 小型ピロプラズマ人工感染牛の急性貧血期における生化学的所見 (2)

牛 No.	Ca (mg/dl)	iP (mg/dl)	Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$)	GOT (IU/l)	GPT (IU/l)	Alp (IU/l)	LDH (WU)	TTT (Ku. U)
1 (spl)	— ^{a)}	—	—	625.2	85.3	—	7178	5.0
2 (spl)	—	—	—	—	42.6	—	—	5.5
3	—	—	—	391.0 ^{b)}	—	—	3565 ^{b)}	42.0
正常値 ^{c)} (S. D.)	10.1 (0.2)	9.6 (0.9)	166 (5.3)	58.9 (8.2)	16.8 (5.0)	443 (168)	1574 (22)	1.5 (0.5)

a) 変化なし

b) シゾゴニー期における値

c) 試験牛 3 頭の感染前の値の平均（標準偏差）

spl: 摘脾牛, No. 3 は非摘脾牛

が認められた。

白血球数は、死亡牛 (No. 1) において正常値の約 5 倍の増加が認められた。

生化学的所見

急性貧血期における生化学的所見を表 4 および表 5 に示した。

17 項目の検査のうち T-Bil, D-Bil, BUN, UA, GOT, GPT, LDH, TTT の上昇と Glu, T-Cho の減少が観察された。

死亡牛 (No. 1) ではこのうちとくに GOT, GPT, LDH の急激な上昇と Glu の急激な減少が観察された。GOT の死亡直前の値は正常値の約 10 倍, GPT は約 5 倍, LDH は約 4 倍の高値を示し, Glu は約 10 分の 1 の低値を示した。

また、非摘脾牛 (No. 3) においてシゾゴニー期に GOT, LDH の増加が観察された。第一次発症後 2～4 日目に GOT は正常値の約 6 倍, LDH は約 2 倍の高値を示した。

その他の TP, Alb, A/G 比, Ca, iP, Fe, Alp には著明な変化は認められなかったが、非摘脾牛 (No. 3) で急性貧血期以降 TP の増加とそれに伴う A/G 比の低下が観察された。

考 察

小型ピロプラズマ単独での牛に対する病原性は非常に弱く、実験的に舍飼環境下で正常牛に感染させても無症状のまま耐過するため、実験的に発症牛を作製する場合は摘脾牛が用いられている⁹⁾。今回、新しく分離した原虫 (高原株) を用いた試験では摘脾牛のほかに非摘脾牛についても感染試験を行った。その結果、非摘脾牛において典型的な臨床症状は観察されなかったが、原虫の寄生率は 12.6% に達し、高原株の牛体における高度の増殖性が確認された。

ダニ感染による牛体内での原虫の増殖性については、石原ら²⁾の報告があるに過ぎず、詳細な検討はなされていない。今回、非摘脾牛においても高度の原虫増殖が認められたことは、感染ダニの付着量の多さによるものなのか、この株の特性によるものかなど今後検討されなければならない部分が残されているが、摘脾牛において死亡例が認められたことを考慮すると、高原株自体の高い病原性に由来することが明らかであろう。

小型ピロプラズマ感染牛の血液所見に関する報告は南ら⁵⁾、木村ら³⁾および高橋ら⁸⁾によってなされている。今回の成績も基本的にはこれらの報告と同様であり、寄生率の上昇に伴って RBC, PCV, Hb の低下が観察された。さらに、これらの値から赤血球恒数を求め、貧血を形態学的に分類してみると、感染から貧血極期にいたるまでは MCV, MCHC ともに変化なく正球形正色素性

貧血の状態を経過し、貧血極期以降は MCV が増加する一方、MCHC は正常範囲内にとどまり大球形正色素性貧血となることが確認された。また、死亡牛では貧血極期に MCHC の減少および白血球の著増が認められ、死亡牛の病態として大球形低色素性貧血および高度の白血球増多症が確認された。これらの変化は、溶血性貧血を伴う *Babesia bigemina*, *B. bovis* (= *B. argentina*)¹⁰⁾, *B. ovata*¹⁾ 感染牛などでも報告されており、小型ピロプラズマの貧血機序は十分明らかではないものの、形態学的な分類ではこれらの原虫疾患の貧血は同様の範疇のものであることが確認された。

小型ピロプラズマ感染牛の生化学的所見に関する検討は、木村ら⁴⁾および高橋ら⁹⁾によって自然感染牛についてなされている。今回のわれわれの人工感染牛での成績も、急性貧血期の所見はこれらの報告ととくに相違点はなく、急性貧血に一致して肝機能および腎機能障害を裏付ける所見が観察された。とくに、死亡牛では GOT, GPT, LDH の著増と血糖値の激減が観察され、死亡牛の病態として著しい肝機能の低下が確認された。

さらに、今回の試験では 1 頭のみであるがシゾゴニー期と考えられる時期 (感染後 12～14 日) においても GOT と LDH の上昇が認められ、シゾゴニー期における肝機能障害の存在が推察された。小型ピロプラズマのシゾントは南⁷⁾らによって体表リンパ節内において観察されているが、今回のこれらの血清酵素の上昇はシゾントの発育が肝臓にもなんらかの障害を与えている可能性を示唆しているものと考えられた。

稿を終えるにあたり、ご指導いただいた農林水産省家畜衛生試験場原虫研究室の藤崎幸蔵室長、ご助言をいただいた神尾次彦主任研究官、日本獣医畜産大学獣医寄生虫学教室の佐伯英治講師に深謝いたします。

引用文献

- 1) FUJINAGA, T.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 43, 803～813 (1981).
- 2) ISHIHARA, T.: *Jpn. Agr. Res. Q.*, 3, 23～31 (1968).
- 3) 木村容子, 内山博司: 獣畜新報, No. 729, 185～188 (1982).
- 4) 木村容子, 野呂明弘, 山田 勤: 獣畜新報, No. 737, 663～667 (1982).
- 5) MINAMI, T. et al.: *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, 20, 44～52 (1980).
- 6) 南 哲郎: 獣医往血微生物病, 南 哲郎・藤永 徹編, 163～168. 近代出版, 東京 (1986).
- 7) MINAMI, T. et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.* 52, 601～604 (1990).
- 8) 高橋清志, 安田純夫, 村上大蔵: 日獣会誌, 26, 279～284 (1973).
- 9) 高橋清志: 酪農学園大学紀要, 6, 179～248 (1976).
- 10) WRIGHT, I. G.: *Res. Vet. Sci.*, 14, 29～34 (1973).