放牧牛における *Trypanosoma theileri* の感染状況調査

石田秀史^{1)†}

太田洋一²⁾

仲山美樹子²⁾

小見 清²⁾

佐藤将典²⁾

楠原征治³⁾

1) 新潟大学大学院自然科学研究科 (〒950-2181 新潟市五十嵐二の町8050)

2) 新潟県下越家畜保健衛生所 (〒957-0215 新発田市東新町1-7-6)

3) 新潟大学農学部 (〒950-2181 新潟市五十嵐二の町8050)

(2001年6月18日受付・2001年9月10日受理)

要 約

放牧牛の *Trypanosoma theileri* の感染状況を把握する目的で、放牧牛24頭を対象に入牧前から下牧まで毎月1回採血を行い、バフィーコート培養による *T. theileri* の検出および間接蛍光抗体法による抗体検査を実施した。その結果、培養法では入牧前に24頭中3頭(12.5%)から検出された。入牧後は、夏期に向かって検出率が上昇し9月に24頭中14頭(58.3%)となった。その後、検出率は低下した。間接蛍光抗体法による抗体検査では、全調査期間の抗体価は40~2,560倍の範囲に分布し、*T. theileri* が検出された個体では、80~1,280倍の範囲に分布した。また、抗体価の幾何平均値は、夏期に向かって上昇する傾向にあり、9月に最高値640.0倍を示した。

——キーワード：バフィーコート、牛、間接蛍光抗体法、放牧場、*Trypanosoma theileri*。

-----日獣会誌 55, 13~16 (2002)

Trypanosoma theileri は全世界に分布し、わが国においても確認されている [2, 4, 8]。しかし、わが国における感染状況については40年以上調査がなされておらず、現時点でのその実態は不明である。そこで、放牧場における感染状況を明らかにする目的で、新潟県内の1放牧場の放牧牛24頭を対象として定期的にバフィーコートの培養による *T. theileri* の検出および間接蛍光抗体法による抗体検査を実施した。

材 料 お よ び 方 法

放牧場：新潟県の北部山間地に位置するW放牧場。標高350~450m、総面積36.9ha。

対象牛：3市村11戸の農場から集められた前年放牧牛5頭を含む黒毛和種繁殖牛24頭(経産牛14頭、未經産牛10頭)。放牧期間は平成11年5月7日~11月5日までの182日間。また、ピロプラズマ病対策のため、放牧期間中2週間ごとにフルメトリン製剤をプアオン法で投与した。

検査方法：入牧前の4月および入牧後の6~11月までの毎月1回、頸静脈または尾静脈からEDTA-Na添加および血清分離用真空採血管を用いて採血した。血清は遠心分離後、測定時まで-40℃で保存した。

血液検査は、自動血球計算機^{a)}で白血球数、常法によりヘマトクリット(Ht)値および血漿総蛋白量を測定し

た。また、血液塗抹標本を作製後ギムザ染色を施し *T. theileri* および *Theileria orientalis* 感染の有無を光学顕微鏡で観察した。

バフィーコート培養による *T. theileri* の検出：バフィーコートの培養は、Schlafer [10] の方法に準じて行った。すなわち、12ウェルマルチプレートの各ウェルに1mlずつ10%牛胎子血清加イーグルMEM (50μg/ml ゲンタマイシンおよび7%炭酸水素ナトリウム水溶液2%添加) を分注した。次に、供試EDTA添加血液を700×g、10分間遠心、バフィーコート50μl/検体を採取し、マルチプレートの各ウェルに接種後、5%炭酸ガス存在下37℃で培養した。培養2日目または3日目、6日目または7日目および10日目に倒立顕微鏡(×200)で観察し、*T. theileri* に特徴的な波動運動する原虫がみられた検体を *T. theileri* 陽性とした。

間接蛍光抗体法による抗体検査：間接蛍光抗体法は、Reiterら [7] の方法を96ウェルマイクロプレートに応用した。すなわち、別の放牧場の牛血液から前述の培養条件下で分離した *T. theileri* を継代用の培地(8%めん羊血液寒天培地5mlを50mlプラスチックボトル内で凝固させ、リン酸緩衝生理食塩液(PBS)2ml加えた培地)で7日間隔5代継代した。次に、PBSで3回洗浄し、

a) Celltac, 日本光電, 東京。

† 連絡責任者：石田秀史(新潟県中央家畜保健衛生所)

〒959-0432 新潟県西蒲原郡西川町旗屋686

☎0256-88-3141 FAX 0256-88-3185

放牧牛における *Trypanosoma theileri* の感染状況調査

表1 放牧牛 24 頭の血液検査成績

区 分		検 査 月 日*						
		4. 12	6. 7	7. 5	8. 6	9. 3	10. 1	11. 5
Ht (%)	全 体	39.7±5.0**	36.2±4.8	35.4±3.6	32.6±3.3	33.8±5.1	36.6±2.6	35.3±3.0
	検出個体	40.7±3.1	36.5±4.1	37.0±3.0	35.3±3.4	37.2±2.7	38.3±3.9	38.0
WBC (×100個/μl)	全 体	69.0±23.1	75.0±19.2	84.4±16.2	84.6±30.0	76.5±23.2	67.1±12.1	69.1±16.7
	検出個体	76.3±13.3	81.5±10.7	85.7±14.6	79.5±20.6	91.7±28.1	73.3±14.8	68.0
TP (g/dl)	全 体	7.0±0.7	7.0±0.5	7.1±0.5	7.4±0.5	7.8±0.4	7.5±0.4	7.6±0.4
	検出個体	6.3±0.2	7.1±0.7	7.1±0.7	7.5±0.8	7.5±0.4	7.9±0.5	7.5

Ht: ヘマトクリット値, WBC: 白血球数, TP: 血漿総蛋白量.

*: 4月は入牧前; 6~11月は入牧後.

** : 平均値±標準偏差.

図1 バフィーコート培養法による *Trypanosoma theileri* の検出

1.25 × 10⁶/mlになるようPBSに再浮遊させ、40μlずつ96ウェルマイクロプレートの各ウェルに分注した。37℃の孵卵器内で1夜乾燥させた後、20% (v/v) アセトン加エタノールを100μl/ウェル加え10分間固定した。固定後PBSで3回洗浄し、使用まで-40℃に保存した。使用時PBSで1回洗浄した後、2倍階段希釈(1:20~1:2,560)した血清を50μl/ウェル加え37℃1時間反応させ、PBSで3回洗浄した。次にFITC標識抗牛IgGウサギ抗体を50μl/ウェル加え37℃1時間反応させた後、PBSで3回洗浄し蛍光顕微鏡(×200)で観察した。特異蛍光が認められた最高希釈倍数の逆数を抗体価とした。

成 績

血液検査成績: 血液検査成績を表1に示した。血液塗抹標本の観察では、期間中いずれの個体からも *T. theileri* および *T. orientalis* は検出されなかった。白血球数は、3,800~17,400個/μlの範囲に分布し、培養により *T. theileri* が検出された個体とされなかった個体間での数値に統計学的に有意差は認められなかった。Ht値は24~49%の範囲に分布し、血漿総蛋白量は6.0~8.8g/dlの範囲に分布し、いずれも培養で *T. theileri* 陽性/陰性群間で統計学的に有意差は認められなかった。

バフィーコート培養法による *T. theileri* の検出: バフ

図2 間接蛍光抗体法による抗体価の推移

イーコート培養法による *T. theileri* の検出率の推移を図1に示した。 *T. theileri* は、全期間で延べ37頭から検出された。入牧前の4月の検査では24頭中3頭(12.5%)から検出され、3頭のうち2頭は経産牛で、うち1頭は前年放牧経験牛、他の1頭は放牧経験のない未經産牛であった。入牧1カ月後の6月は4頭(16.7%)から検出され、8月以降検出率は上昇する傾向がみられ、9月には半数以上の14頭(58.3%)となった。10月以降検出率は低下し、下牧時の11月には1頭(4.2%)のみの検出であった。この間1回だけ検出された個体は4頭で、いずれも9月検査であった。2回検出されたものは5頭、3回検出されたものは3頭、4回検出されたものは2頭、5回以上検出されたものは1頭であった。

抗体検査成績: 間接蛍光抗体法による抗体価の平均値の推移を図2に示した。各個体の抗体価は、40~2,560倍の範囲に分布し、入牧前の4月では、抗体価の平均値は119.9倍で期間中最も低い値を示した。また、6月以降は抗体価の平均値は上昇する傾向にあり、9月が最も高い640.0倍を示し、その後10月、11月と抗体価は低下し、11月は369.7倍であった。

全期間を通じて、 *T. theileri* が分離された個体の抗体価は、80~1,280倍、分離されなかった個体は40~2,560倍であり、抗体価の平均値で比較した場合、両者間に統計学的に有意差は認められなかった。

考 察

今回の成績では、入牧前から下牧までの *T. theileri* の検出率は、4.2～58.3%で、冬と夏で比較した Glaser [1] の報告（冬期0%，夏期46.7%）および Niak [6] の報告（12.5%と37.5%）と同様に夏期検出率が高い傾向にあった。Schlafer [10] のバフィーコート0.3～0.8mlを培養液5mlに接種した5月と9月の検出率を比較した成績では、0%と66.7%を示した。今回、原虫検出に用いたバフィーコート50 μ lを培養液1mlに接種した成績でもほぼ同等の検出率が得られたことから、本法のようなより少量の血液材料、培養液容量でも効率よく *T. theileri* が検出できるとものと考えられた。

調査期間中の *T. theileri* の感染は、吸血昆虫の発生がないと考えられる4月にすでに3頭に認められた。うち1頭は前年放牧牛で、他の2頭は放牧経験のない個体であり、放牧時以外の畜舎内での吸血昆虫による感染または垂直感染 [3] が疑われた。これら4月に *T. theileri* が検出された3頭は、いずれも4～6月の抗体検査でも、抗体価に変動がなく、さらに調査期間中2～6回 *T. theileri* が検出されている。このことから、これらの個体は、持続感染していたものと考えられ、他の個体への感染源となった可能性もある。また、吸血昆虫の発生が比較的少ない6月の検査では、さらに他の2頭からも検出されたが、1頭ではその後抗体価の上昇がみられ、新たな感染を受けた可能性が示唆された。吸血昆虫の発生がピークとなる8～9月に検出率が上昇するとともに、抗体価も上昇し、さらに吸血昆虫の発生が減少する10月以降は、検出率が低下し、抗体価も低下傾向を示した。このことより夏季に新たな感染が起こったものと推測された。県内の他の放牧場で1992～1994年に行われた吸血昆虫の発生消長調査（未発表）および早川（私信）によると、7～8月がアブの発生数の最も多い時期とされる。特に本放牧場での8月の検査時に観察された飛来の多いアカウシアブ (*Tabanus chrysurus*) およびシロフアブ (*Tabanus trigeminus*) が *T. theileri* の媒介に関与しているものと考えられた。また、9月に原虫が検出されなかった個体においても4月の抗体価と比べると明らかな抗体上昇が認められ、これらの個体もすべて感染したものと判断された。しかも、*T. theileri* が検出された個体よりも高い抗体価を示す個体も認められ、感染後の速やかな抗体上昇により血中から原虫が消失したものと推測される。

一方、*T. theileri* が検出された15頭中11頭が2回以上検出され、そのほとんどが連続した2回以上の検査で検出された。*T. brucei* では原虫が牛体内で抗原変異を起こすことが知られており [11]、今回の場合も、*T. theileri* が体内で抗原変異を起こしながら持続感染していた可能性が考えられたが、IFAによる抗体検査結果からは、再感染も否定できなく判断できなかった。また、血液塗抹標本の鏡検では、いずれの検体からも原虫は検出されなかったことから、通常牛体内で増殖した場合でも、血液中に多数出現する期間が短く、その後は、少数の出現を繰り返しているのではないかと思われた。

血液検査成績では、バフィーコート培養法により多くの個体から原虫が検出されたが、貧血など *T. theileri* の感染による特徴的な臨床症状を示す個体は認められなかった。また、*T. orientalis* の寄生も認められなかったことから、複合的な増悪因子が少なく発病に至らなかったものと考えられた。

今回、放牧場で同一個体を追跡して *T. theileri* の検出を行った結果、夏期に58.3%と高率に検出され、放牧場では容易に感染が広がっているものと考えられた。本原虫の病原性は低いとされているものの、貧血、流産等に関与したことが報告されている [2, 4, 5, 12]。また、アブだけでなくダニによる媒介も報告されていることから [9]、今後も放牧衛生の中で感染動向を把握していく必要があると思われる。

引 用 文 献

- [1] Glaser RW : J Parasitol, 8, 136-148 (1922)
- [2] Herbert IV : Vet Bull, 34, 563-570 (1964)
- [3] Hussain K, Broidie B, Ott RS, Montealegre F : Am J Vet Res, 46, 1256-1258 (1985)
- [4] 岩田明敏, 高村 礼, 喜多英治, 乾 純夫, 川島秀雄, 永井 仁 : 日獣会誌, 12, 22-27 (1959)
- [5] Levine ND, Watrach AM, Kantor S, Hardenbrook HJ : J Parasitol, 42, 533 (1956)
- [6] Niak A : Trop Anim Hlth, 10, 26-27 (1978)
- [7] Reiter I, Buttner M, Seitz A : J Vet Med, B34, 380-390 (1987)
- [8] 佐々木 昇 : 日獣会誌, 11, 327-329 (1958)
- [9] Shastri UV, Deshpande PD : Vet Parasitol, 9, 151-155 (1981)
- [10] Schlafer DH : Cornell Vet, 69, 411-425 (1979)
- [11] Vickerman K : Parasitology, 99, 37-47 (1989)
- [12] Ward WH, Hill MWM, Mazlin ID, Foster CK : Aust Vet J, 61, 324 (1984)

Seasonal Changes in *Trypanosoma theileri* Infection in Grazing Cattle

Hideshi ISHIDA^{*†}, Yoichi OTA, Mikiko NAKAYAMA, Kiyoshi KOMI, Masanori SATO
and Seiji KUSUHARA

^{*} Graduate School of Science and Technology, Niigata University, 8050 Igarashi-ninocho,
Niigata 950-2181, Japan

SUMMARY

Seasonal changes in *Trypanosoma theileri* infection in grazing cattle (Japanese Black) were investigated by means of buffy-coat culture and indirect fluorescent antibody tests (IFT). Blood samples were collected from 24 cows every month from April to September. *T. theileri* was detected in 3 out of 24 (12.5%) of the samples collected before grazing in April. After the animals were put out to graze in a pasture, the detection rate of *T. theileri* increased toward the summer; and in September 14 out of 24 (58.3%) animals were positive. Throughout the investigation, the overall antibody titer was distributed in the range between 1 : 40 and 1 : 2,560. The antibody titer in infected cows, however, ranged from 1 : 80 to 1 : 1,280. Geometrical antibody-titer means increased toward summer, to reach a maximum of 1 : 640.0 in September.

—Key words : buffy coat, cattle, indirect fluorescent antibody test, pasture, *Trypanosoma theileri*.

[†] Correspondence to : Hideshi ISHIDA (Chuo Livestock Hygiene Service Center, Niigata Prefecture)

686 Hataya, Nishikawa-machi, Nishikanbara, Niigata Prefecture 949-0423, Japan
TEL 0256-88-3141 FAX 0256-88-3185

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 55, 13 ~ 16 (2002)

≡ 理 研 の 動 物 用 医 薬 品 ≡

理研の治療薬グループに新しい仲間が加わりました!!

共済薬価基準表 収載品

ネオグリセロ注

牛の乳熱・産後起立不能に

優れた効果を発揮します!!

◆成分分量 (100ml中)	グリセロリン酸カルシウム……………7g チアミンジスルフィド硝酸塩……………0.2g
◆効能効果	うし：低カルシウム血症及び低リン血症

お問い合わせ TEL. 048-224-8454

Riken 理研畜産化薬株式会社

〒332-0011 埼玉県川口市元郷4-1-8 TEL. 048-224-8451 FAX. 048-224-1079