

黒毛和種繁殖牛にみられたトリパノソーマ病と 地方病性牛白血病の混合発症例

松本裕一^{1)†} 佐藤敦子¹⁾ 穂積愛美¹⁾ 大西英高¹⁾

壁谷昌彦¹⁾ 菅原 克²⁾ 高石英俊³⁾

- 1) 福島県中家畜保健衛生所 (〒963-8041 郡山市富田町字満水田2)
- 2) 福島県会津家畜保健衛生所 (〒965-0077 会津若松市高野町上高野字村前90)
- 3) 高石動物診療所 (〒963-4317 田村市船引町東部台6-85)

(2011年3月31日受付・2011年6月13日受理)

要 約

7歳齢、妊娠8カ月の黒毛和種牛1頭が貧血、発熱、水様下痢、削瘦を呈し流産後に死亡した。血液塗抹においてトリパノソーマ様原虫が検出され、形態的特徴及びトリパノソーマ原虫種鑑別のためのPCRの結果から、*Trypanosoma (T.) theileri*と同定された。他の血液原虫は検出されなかった。病理検査では全身リンパ節と脾臓の腫大がみられ、主要臓器及びリンパ節にリンパ球様細胞の腫瘍性増殖が認められた。リンパ節のPCRで牛白血病ウイルス (BLV) 遺伝子陽性、血清の抗BLV抗体弱陽性であった。以上より本症例をトリパノソーマ病と地方病性牛白血病 (EBL) の混合発症と診断した。高齢、妊娠ストレスとともにEBL発症や何らかの細菌感染などによる体力の低下が誘因となり、潜伏していた*T. theileri*が増殖して発症した事例と考えられた。*T. theileri*の増殖がEBLの病態をさらに進行させたことも可能性として考えられた。——キーワード：地方病性牛白血病、*Trypanosoma theileri*、トリパノソーマ病。

----- 日獣会誌 64, 941~945 (2011)

トリパノソーマ病は吸血昆虫媒介性の血液原虫病で、家畜の届出伝染病に指定されている。本病病原体のうち、わが国にも分布する牛寄生性の*Trypanosoma (T.) theileri*は一般的に非病原性であるが、まれに他疾病との混合発症やストレスで症状が顕著化する場合があるといわれている [1]。一方、同じく届出伝染病に指定されている牛白血病はリンパ球が腫瘍化する疾病で、届出頭数が近年急増しており、その多くは牛白血病ウイルス (BLV) 感染が原因となる地方病性牛白血病 (EBL) である [2]。BLV陽性牛からは*T. theileri*が高率に分離培養されることが報告されているが [3]、これまでトリパノソーマ病とEBLの混合発症例の報告はない。今回、黒毛和種繁殖牛1頭が妊娠経過において、*T. theileri*による症状を呈して死亡したため病理解剖した結果、EBLとの混合発症例と診断し、両疾病の関係や発生要因について考察したので報告する。

材料及び方法

供試動物：当該牛は7歳齢の黒毛和種1頭 (九州地方産、生後10カ月齢で導入) で、福島県内の母牛26頭規模の繁殖農場にて昼間は放牧し、夜間は舎飼されていた。発症時には妊娠8カ月であった。発生状況については成績内に記載する。同居牛についても一部の検査を実施した。

血液検査：一般血液検査に加え、血液塗抹法及びウェットフィルム法 [4] により原虫検索を行った。また、血液よりDNAを抽出し (DNeasy Blood & Tissue Kit, 株式会社キアゲン, 東京), トリパノソーマ原虫の種鑑別のため18SリボゾームDNA, 及びその近傍のスペーサー領域 (ITS1) を増幅するPCRを実施した [5, 6]。これらのPCRにおける*T. theileri*の増幅産物サイズは、前者の1st PCR 722bp, 同2nd PCR 626bp, 後者のPCR 450bpである。

† 連絡責任者：松本裕一 (福島県中家畜保健衛生所)

〒963-8041 郡山市富田町字満水田2

☎024-923-4305 FAX 024-923-4555

E-mail : mathumoto_yuithi_01@pref.fukushima.jp

表1 血液及び血液生化学所見 (9月11日)

RBC	258 × 10 ⁴ /μl	T-Pro	4.2 g/dl
Ht	14.0 %	Alb	2.7 g/dl
WBC	2,300 /μl	α ₁ glb	0.4 g/dl
Sta	0 /μl	α ₂ glb	0.5 g/dl
Seg	1,265 /μl	β glb	0.3 g/dl
Lym	1,035 /μl	γ glb	0.2 g/dl
Mon	0 /μl	α ₁ AG	14.8 μg/dl
Eos	0 /μl	IgG	360 mg/dl
Glu	20 mg/dl	シアル酸	101.5 mg/dl
T-Cho	<50 mg/dl	LDH	3,536 U/l
ALP	<50 U/l	LDH 1	1,410 U/l
GOT	127 U/l	LDH 2	1,361 U/l
GGT	96 U/l	LDH 3	636 U/l
BUN	29 mg/dl	LDH 4	53 U/l
CPK	320 U/l	LDH 5	70 U/l

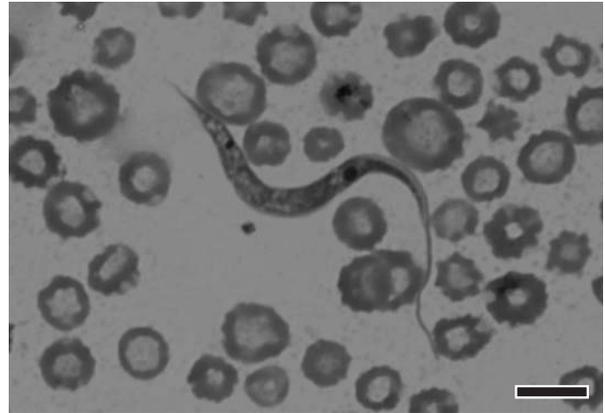


図1 血液中に観察された *Trypanosoma theileri* (ギムザ染色 ×1,000 Bar = 10 μm)

病理学的検査：肉眼病変の観察とともに、全身諸臓器から得た検査材料を20%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従いパラフィン包埋切片のヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して鏡検した。

ウイルス学的検査：牛白血病診断用抗原 (学北里研究所, 埼玉) を用いた寒天ゲル内沈降試験により、血清の抗BLV抗体検出を行った。腎リンパ節からDNAを抽出し、BLV env 遺伝子の特異的に増幅するPCRを実施した [7]。

細菌学的検査及び寄生虫検査：主要臓器について、5%羊血液寒天培地を用いて37℃・48時間好気及び嫌気培養を行った。下痢便についてサルモネラ分離培養検査及び抗酸性染色した精製糞便希釈液塗抹標本の直接鏡検を実施した。また、定法に従い浮遊法、沈殿法にて寄生虫検査を実施した。

生化学的検査：血清の一般生化学検査は自動分析装置 (スポットケム SP-4410, アークレイ(株), 京都) を用いて実施するとともに、定法に従いセルロースアセテート膜で電気泳動した。また、LDH アイソザイムを電気泳動法 (タイタンジェール S-LD, (株)ヘレナ研究所, 埼玉) で、IgGを免疫拡散法 (ウシIgGプレート, (株)メタボリックエコシステム研究所, 宮城) で測定した。

成 績

発生状況：当該牛は2009年8月下旬、食欲不振、削瘦と発熱を呈したためペニシリン製剤の投与を受け、症状の改善がみられた。しかし9月上旬に発熱 (体温40.0℃)、水様下痢と削瘦を認め、9月8日の検査で貧血 (Ht値13%, RBC 291 × 10⁴/μl) とトリパノソーマ様原虫が確認されたため、ジミナゼン製剤の投与を受けた。9月10日に流産し、翌日体温が38.0℃となったものの、9月13日に死亡した。

血液検査：当該牛の9月11日における血液検査所見

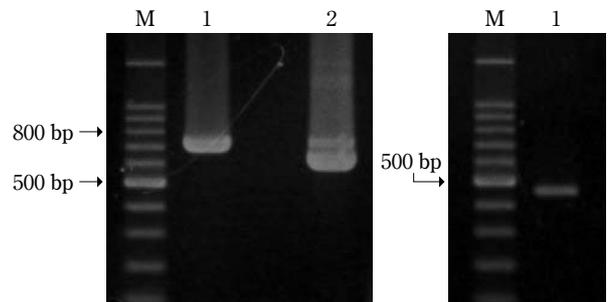


図2 血液DNAのトリパノソーマPCRによる増幅

(左) Geysenら [6] のPCR法

1 : 1st PCR産物 2 : 2nd PCR産物

(右) Hatamaら [7] のPCR法

1 : PCR産物, M : 100 bp分子量マーカー

を表1に示す。赤血球数、白血球数、Ht値が低い値であった。血液塗抹でリンパ球の約17%が異型リンパ球であり、またトリパノソーマ様原虫が検出された (図1)。原虫は体長約60 μmと大型で、鞭毛がよく発達し、キネトプラストは長径約1 μmであった。その寄生度は、9月8日に採血した試料で倍率×1,000の鏡検1視野に赤血球約300個が見える標本部分において、25視野に原虫6個程度であった。今回血液原虫数を直接計数していないが、赤血球数と血液塗抹検査における原虫検出度から、原虫数は血液1 μlあたり約2,300個と推定された。血液塗抹検査において、タイレリア及びバベシア原虫は検出されなかった。血液のPCR検査において、原虫の18SリボゾームDNA-PCRでは1st PCRで700bp付近、2nd PCRで600bp付近、ITS1-PCRでは450bp付近に増幅産物が検出された (図2)。同居牛の血液からは分離白血球層を用いるウェットフィルム法においてもトリパノソーマ様原虫は検出されなかった。

病理学的検査：剖検時に全身リンパ節の中等度腫大、脾臓の腫大 (70 × 20 × 10cm) を認めた。病理組織検査では全身の臓器、リンパ節、脂肪組織にリンパ球様細

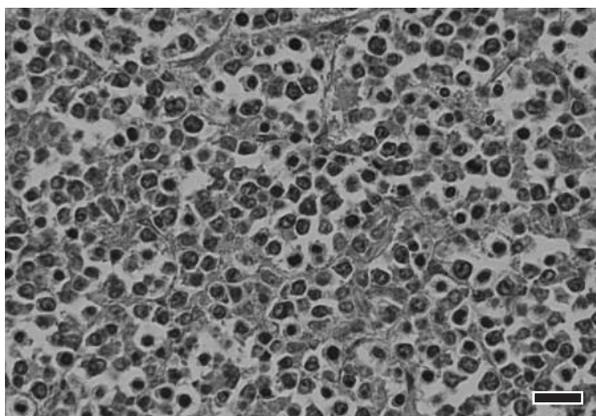


図3 浅頸リンパ節にみられたリンパ球様腫瘍細胞
(ヘマトキシリン・エオジン染色 Bar = 30 μ m)

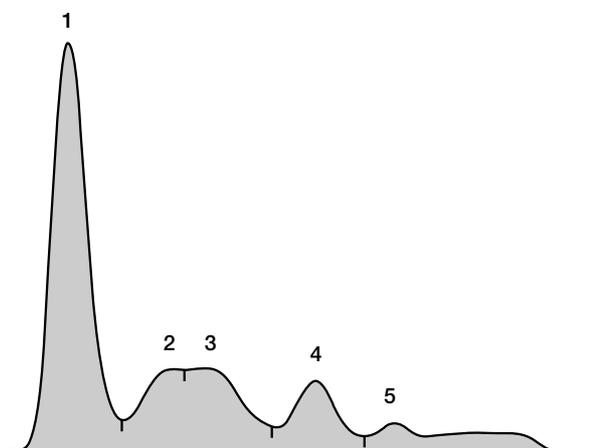


図4 血清蛋白電気泳動像
1 : Alb, 2 : α_1 glb, 3 : α_2 glb, 4 : β glb, 5 : γ glb

胞の腫瘍性増殖を認め(図3), 脾臓の白脾髄消失がみられた。また, 第4胃に真菌性肉芽腫が散在した。

ウイルス学的検査: 当該牛の9月11日血清は抗BLV抗体が弱陽性であった。腎リンパ節よりPCRでBLVのenv遺伝子断片が検出された。同居牛のBLV抗体検査の結果, 25頭中17頭(68%)が抗体陽性であった。

細菌学的検査及び寄生虫卵検査: 主要臓器及び下痢便の検査で, 有意な細菌あるいは寄生虫卵, コクシジウムは検出されなかった。

生化学的検査: 当該牛の9月11日血清において, GOT及びGGTが高く, Glu, T-Cho及びIgGが低い値であった。また, 総LDH, LDH2及びLDH3が高い値であった(表1)。血清蛋白の電気泳動では, γ glb分画が著しく低く α glbが高い急性炎症型像を示した(図4)。

考 察

今回の症例では, まず8月下旬に食欲不振, 発熱, 消瘦などがみられ, この時点において各種検査を実施していないが, 抗生剤の投与により改善がみられたことから, 少なくとも一部の病態には何らかの細菌感染が関与していたものと思われた。剖検時の細菌検査において有意な菌が検出されなかったが, 抗生剤の影響が考えられた。

その後, 9月上旬に下痢, 貧血, 発熱がみられ, 血液検査でトリパノソーマ原虫が確認された。これらの症状にトリパノソーマが関与したものと考えられた。原虫はその形態的特徴から, また, トリパノソーマ原虫特異的な2つのPCR検査結果から, *T. theileri*と同定した。本種は国内の牛にしばしば検出される[1]。石田ら[8]は一放牧場の調査で, 4月入牧時に放牧未経験牛を含む13%の牛に本種を検出し, 放牧期間中の9月に検出率が58%まで上昇したことを報告している。この報告に

おいて原虫は血液塗抹検査では検出されず, 白血球培養によって初めて検出されており, 通常の不顕性感染牛に潜伏している原虫はわずかであることが推察される。本症例では血液に多数の原虫が検出されており, 貧血と発熱を呈するも他の血液原虫は検出されていないことから, *T. theileri*によるトリパノソーマ病と鑑定した。

国内において本種によるトリパノソーマ病がまれに発生している。小型ピロプラズマ原虫の濃厚感染を受けた放牧牛における混合発症事例[9], 副腎皮質ホルモン投与を受けた虚弱子牛への輸血により本種が急速増殖した事例(稲垣達也, 全国家畜保健衛生業績抄録, No. 30, p64, 1997), 元気消失と水様血便を呈した子牛が発症し輸血の関与が疑われる事例(国重俊治ら, 第48回広島県獣医学会抄録, P19, 2003)などが報告されている。これらは, 重篤な小型ピロプラズマ病や衰弱状態において, 潜伏していたあるいは移入された*T. theileri*が増殖した事例と推察される。

本症例では, 8月下旬に何らかの細菌感染やEBL発症などが起こりさまざまな症状がみられ, 加えて高齢や妊娠ストレスなどで当該牛の体力が低下していたものと推測され, その結果, 潜伏原虫の増殖を招き9月上旬に発症した事例と考えられた。

また, 当初EBL発症を疑っていなかったが, 病理学的及びウイルス学的検査の結果から, EBL発症例と鑑定した。血液塗抹像で異型リンパ球も確認され, 牛白血病発症例に特徴的な生化学所見[10]である高値のLDH2及びLDH3も示されていた。しかしながら, 当該牛はEBL発症にもかかわらず, 抗BLV抗体応答が弱く, 末梢白血球数と血中IgGが著しく低値であったことから, 免疫不全状態であったと推測された。通常EBLを疑う場合, 血液塗抹検査により異型リンパ球の出現やリンパ球の増加を確認するため, 本種原虫が増殖していれば容易に目視されるはずである。しかしながら, EBL

発症牛の血中に本種原虫を検出したとの報告はこれまでなく、本症例はまれな事例であったと考えられる。

近年、感染症の分子病理機構の解析が進展している。トリパノソーマ感染マウスが加齢にともなって抗体応答が抑制されること [11] や、また、感染牛においてインターロイキン (IL)-4 や IL-10、腫瘍壊死因子などの発現が誘導されることが報告されている [12-14]。一方、これらのサイトカインが EBL の病態進行に関与するとの報告もあることから [15, 16]、今回の症例においてトリパノソーマ病と EBL が相互に影響を及ぼして両者の症状を重篤化した可能性も考えられる。今後、急増する EBL 発症牛における *T. theileri* 感染状況と病態について、疫学調査や免疫学的解析を含めた研究が重要になると考えられる。

引用文献

- [1] 藤崎幸藏：トリパノソーマ症，最新家畜寄生虫病学，今井壮一，板垣 匡，藤崎幸藏編，64-72，朝倉書店，東京 (2007)
- [2] 村上賢二，小林創太，筒井俊之：我が国の地方病性牛白血病の発生動向と対策，日獣会誌，62，499-502 (2009)
- [3] Mammerickx M, Dekegel D : Presence of *Trypanosoma theileri* in herds with a high incidence of enzootic bovine leukosis, Ann Soc Belg Med Trop, 56, 47-53 (1976)
- [4] 蛭海啓行：牛のトリパノソーマ病，獣医住血微生物病，南 哲郎，藤永 徹編，170-193，近代出版，東京 (1986)
- [5] Geysen D, Delespaux V, Geerts S : PCR-RFLP using Ssu-rDNA amplification as an easy method for specific diagnosis of *Trypanosoma* species in cattle, Vet Parasitol, 110, 171-180 (2003)
- [6] Hatama S, Shibahara T, Suzuki M, Kadota K, Uchida I, Kanno T, Isolation of a *Megatrypanum* trypanosome from sika deer (*Cervus Nippon yesoensis*) in Japan, Vet Parasitol, 149, 56-64 (2007)
- [7] Fechner H, Blankenstein P, Looma AC, Elwert J, Geue L, Albrecht C, Kurg A, Beier D, Marquardt O, Ebner D : Provirus variants of the bovine leukemia virus and their relation to the serological status of naturally infected cattle, Virology, 237, 261-269 (1997)
- [8] 石田秀史，太田洋一，仲山美樹子，小見 清，佐藤将典，楠原征治：放牧牛における *Trypanosoma theileri* の感染状況調査，日獣会誌，55，13-16 (2002)
- [9] 岩田明敏，高村 礼，喜多英治，乾 純夫，川島秀雄，永井 仁：高度貧血牛にみられたトリパノゾーマについて，日獣会誌，12，22-27 (1959)
- [10] Ishihara K, Ohtani T, Kitagawa H, Onuma M : Clinical studies on bovine leukemia in Japanese black cattle. III. Serum lactate dehydrogenase activity and its isoenzyme pattern in groups of leukemic cattle and those negative or positive for antibody against bovine leukemia virus, Jpn J Vet Sci, 42, 289-295 (1980)
- [11] Utsuyama M, Albright JW, Holmes KL, Hirokawa K, Albright JF : Changes in the subsets of CD4+ T cells in *Trypanosoma musculi* infection : delay of immunological cure in young mice and the weak ability of aged mice to control the infection, Int Immunol, 6, 1107-1115 (1994)
- [12] Mertens B, Taylor K, Muriuki C, Rocchi M : Cytokine mRNA profiles in trypanotolerant and trypanosusceptible cattle infected with the protozoan parasite *Trypanosoma congolense* : protective role for interleukin-4, J Interferon Cytokine Res, 19, 59-65 (1999)
- [13] Taylor K, Mertens B, Lutje V, Saya R : *Trypanosoma congolense* infection of trypanotolerant N'Dama (*Bos taurus*) cattle is associated with decreased secretion of nitric oxide by interferon-gamma-activated monocytes and increased transcription of interleukin-10, Parasite Immunol, 20, 421-429 (1998)
- [14] Lucas R, Magez S, Songa B, Darji A, Hamers R, de Baetselier P : A role for TNF during African trypanosomiasis : involvement in parasite control, immunosuppression and pathology, Res Immunol, 144, 370-376 (1993)
- [15] 小沼 操：BLV 感染と病態発現，臨床獣医，22，10-14 (2004)
- [16] Ikeda M, Konnai S, Onuma M, Isiguro N, Goryo M, Okada K : Immunohistochemical analysis of expression patterns of tumor necrosis factor receptors on lymphoma cells in enzootic bovine leucosis, J Vet Med Sci, 67, 425-432 (2005)

A Case of a Japanese Black Cow Developing Trypanosomosis Together
with Enzootic Bovine Leukosis

Yuichi MATSUMOTO^{*†}, Atsuko SATO, Manami HOZUMI, Hidetaka OHNISHI,
Masahiko KABEYA, Masaru SUGAWARA and Hidetoshi TAKAISHI

** Fukushima Prefecture Kenchu Livestock Hygiene Service Center, 2 Mansuida, Tomitamachi-Aza, Koriyama, 963-8041, Japan*

SUMMARY

A Japanese Black cow, 7 years of age and 8 months pregnant, showed anemia, fever, watery diarrhea, and emaciation, and died after abortion. *Trypanosoma*-like parasites were detected in the blood film, and identified as *Trypanosoma (T.) theileri* by morphology and PCR analyses for the differentiating *Trypanosoma* species. No other hemoparasites were detected in the blood. At necropsy, lymph nodes of the whole body and the spleen were found to be swollen. Neoplastic proliferations of lymphoid cells were found in the main organs and lymph nodes. A fragment of bovine leukemia virus (BLV) gene was amplified in the lymph node sample by PCR. Anti-BLV antibodies were weakly detected in the serum sample using an immunodiffusion test. These findings indicated that the animal developed trypanosomosis together with enzootic bovine leukosis (EBL). It was considered that unusual growth of *T. theileri* parasites was induced under mixed conditions of aging, stress of pregnancy, EBL, and bacterial infections. An additional consideration could be that parasite growth was in fact an outcome of the progress of EBL.

—Key words : enzootic bovine leukosis, *Trypanosoma theileri*, trypanosomosis.

† Correspondence to : Yuichi MATSUMOTO (*Fukushima Prefecture Kenchu Livestock Hygiene Service Center*)
2 Mansuida, Tomitamachi-Aza, Koriyama, 963-8041, Japan

TEL 024-923-4305 FAX 024-923-4555 E-mail : mathumoto_yuithi_01@pref.fukushima.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 64, 941 ~ 945 (2011)