

北海道の牧野における牛寄生 *Babesia* 原虫の 分離, 伝播および病原性の検討

高橋 清志*・和田 章裕*・川 合 寛*
横田 裕之*・黒 沢 隆*・其 田 三 夫*

Investigations of Isolation, Transmission and Virulence of Bovine *Babesia* sp. in Hokkaido

Kiyoshi TAKAHASHI*, Akihiro WADA*, Satoru KAWAI*
Hiroyuki YOKOTA*, Takashi KUROSAWA*
and Mitsuo SONODA*
(May, 1983)

北海道における牛 *Babesia* 病の発生は古く,すでに 1925 年に小華和ら⁴⁾, および 1929 年に小倉ら⁷⁾によって報告されている。しかし, その後は, 最近橋場ら²⁾が道南の一牧場で *Babesia* sp., *Theileria sergenti* および *Anaplasma* sp. の混合感染例を報告するまで発生は確認されなかった。本試験は, 北海道で分離した *Babesia* 原虫の伝播および病原性を明らかにする目的で実施した。橋場らにより *Babesia* 原虫が確認された牧野の *Haemaphysalis longicornis* フタトゲチマダニの若ダニと幼ダニによる牛への感染試験, アブによる感染牛から非感染牛への感染試験, ならびに *Babesia* 原虫の分離と病原性について実験的に検討した。

I. 実験動物および試験方法

1. 供試牛: 今回の実験に用いた牛の概要を Table 1 に示した。
2. ダニおよびアブによる牛への感染試験

1) 汚染牧野における野外採取ダニによる牛への感染試験

Babesia の発生が報告されている道南の放牧牛から吸血中の成ダニを採取して, 産卵, 孵化した幼ダニを 500 頭ずつ 2 回, 耳袋法により摘脾牛 No. 1 から吸血させた。これとは別に, 汚染牧野の草地から採取した未吸血若ダニ 200 頭ずつに Nos. 28~30 の牛を同一方法で吸血させ *Babesia* 感染の有無について, 血液塗抹標本をギムザ染色して検査した。な

* 獣医学科, 家畜内科学教室

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069-01, Japan

Table 1. List of experimental cattle

Cattle No.	Species	Sex	Treatment	Age
1	Holstein	Female	Splenectomy	4 M
3	"	Male	"	1 W
4	"	Female	"	1 W
7	"	Male	"	1 W
8	"	Male	Splenectomy	1 M
11	"	Female	"	2 Y
12	"	Female	"	2 Y
13	"	Female	Splenectomy	1 W
14	"	Male	"	2 W
15	"	Female	"	3 Y
16	"	Male	"	2 M
17	"	Male	Splenectomy	2 W
18	"	Female	"	3 Y
19	Japanese black	Female	"	4 Y
20	Holstein	Female	"	13 Y
22	"	Female	Splenectomy	2 M
23	"	Female	"	1 M
24	"	Female	"	9 M
25	"	Female	"	1 M
26	"	Male	"	1 W
28	"	Female	"	1 W
29	"	Female	"	1 Y
30	"	Female	"	1 Y
35	"	Male	"	2 W
36	"	Female	"	2 W

Y: Years old M: Manths old W: Weeks old.

お、今回用いたダニは全て単為生殖系のフタトゲチマダニであった。

2) アブによる牛への感染試験

おとり牛に飛来した *Tabanus nipponicus* ニッポンシロアブ 136 頭に、12 日間にわたり *Babesia* sp. と *Theileria sergenti* の混合感染牛 No. 1 を約 1 分間吸血させ、強制的に離脱後ただちに未感染牛 No. 4 を吸血させた。吸血直後のアブの口器を、温風乾燥し走査型電子顕微鏡で観察した。

3. 混合感染牛から *Babesia* 原虫の分離

1) 感染血液の早期接種による分離

Babesia 原虫と *Theileria* 原虫が同時に感染すると、*Babesia* 原虫の方が早く末梢血中

に出現する特性を利用し、血中に *Babesia* 原虫の出現を確認すると、ただちに感染血液を次代の牛の静脈内に接種した。この方法で牛 No. 3 の血液を Nos. 7, 8 および Nos. 11~18 に順次接種した。

2) 早期接種と 8-アミノキノリン製剤 (プリマキン) 投与による分離

上記の早期接種法に加え、プリマキンを 0.5 mg/kg 宛原虫接種と同時に静脈内に注射して、*Theileria* 原虫の増殖を抑制して *Babesia* 原虫の分離を試みた。すなわち No. 22 の混合感染血液を Nos. 23~26 まで順次接種し、No. 23 と No. 24 にプリマキンを注射した。

4. 分離した *Babesia* 原虫の形態

牛 Nos. 13, 35 および 36 を *Babesia* 原虫の形態観察のために用い、この 3 頭はいずれも、摘脾手術後 *Babesia* 原虫の単独感染血液を 100~400 ml 静脈内に接種して、原虫を増殖させた。感染血液にギムザ染色を施し、原虫の形態を観察した。各標本について、*Babesia* 原虫をその形態により、円ないし楕円形虫体 (A-type)、出芽虫体 (B-type)、双梨子状虫体 (C-type) に分類し、その比率を求め、さらに *Babesia* 原虫の大きさを、それぞれの type について測定した。また、分裂様式についても観察した。

5. *Babesia* 原虫の病原性の検討

上記の方法で *Babesia* 原虫の分離を試み、*Babesia* の単独感染が確認された 6 頭 (Nos. 12~17) について、臨床症状、血液性状および parasitemia の変化を観察した。また 6 頭中の 3 頭 (Nos. 13, 14 および 17) には摘脾手術を実施し、このうち 2 頭 (Nos. 14 および 17) に原虫増数時ジミナーゼン製剤 (ガナゼック) を 2 mg/kg 宛皮下に 1 ないし 2 回注射した。非摘脾牛に $10^8 \sim 10^{10}$ 個、摘脾牛に $10^7 \sim 10^9$ 個の感染赤血球を静脈内にそれぞれ接種した。

II. 実験成績

1. ダニおよびアブによる牛への感染試験

原虫は、幼ダニに吸血させた No. 1 では、第 1 回目の吸血から 31 日後まで検出できず、第 2 回目の吸血では、11 日後から血中に確認された (Fig. 1)。また、汚染牧野の草地から採取した未吸血若ダニに吸血させた牛 3 頭 (Nos. 28~30) 中の 2 頭 (Nos. 28 および 29) に吸血後第 9 および 16 日目末梢血中に *Babesia* 原虫が出現し、若ダニによる伝播が成立した (Fig. 2)。

一方、アブを用いて *Babesia* 原虫の機械的伝播を検討した結果、吸血開始 50 日後から *Babesia* 原虫が牛 No. 4 の末梢血中に出現した。吸血直後のアブの口器には多数の赤血球が付着していた (Plate I)。

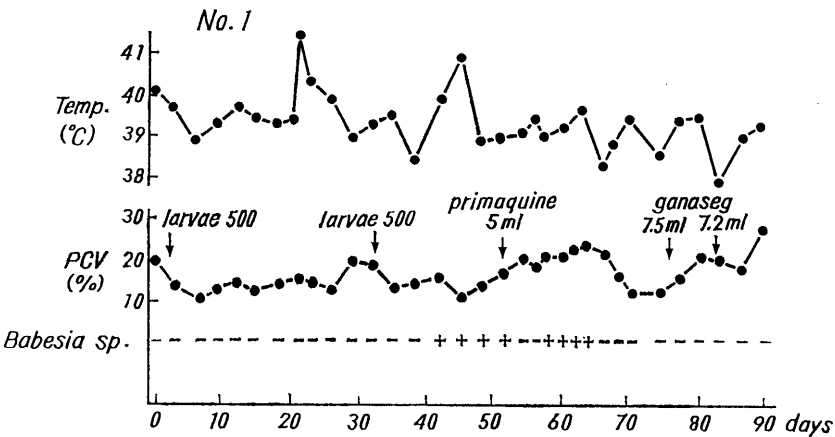


Fig. 1. Transmission to a calf by larva of *Haemaphysalis longicornis* naturally infected with *Babesia* sp.

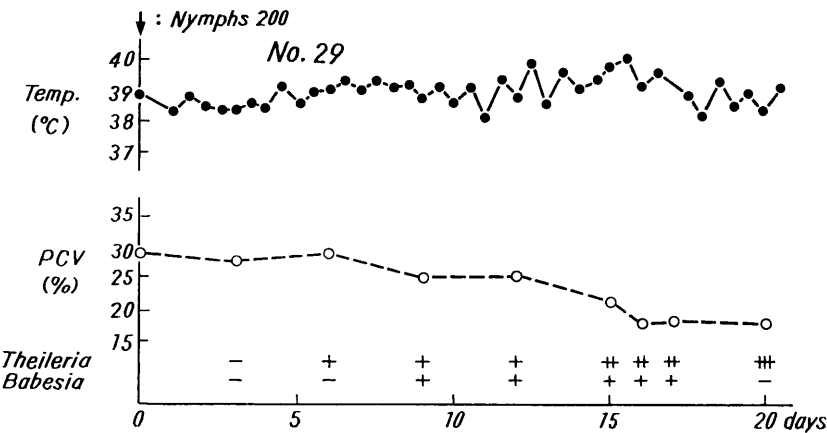


Fig. 2. Transmission to the calf by the prefed nymphs of *Haemaphysalis longicornis* from the pasture in Hokkaido.

2. 混合感染牛からの *Babesia* 原虫分離

早期接種では5代目 (No. 12) の牛において、摘脾手術後も *Theileria* 原虫は検出されず、*Babesia* 原虫の単独感染となった。これに対して殺 *Theileria* 剤であるプリマキン投与と早期接種の併用では4代目 (No. 25) で単独感染となった (Fig. 4)。

3. *Babesia* 原虫の形態

牛 Nos. 13, 35 および 36 のギムザ染色による血液塗抹標本で、*Babesia* 原虫の A-type, B-type および C-type (Fig. 5, Plate 2) の百分比は、寄生率の上昇に伴い牛 No. 13 では A-type が 34% から 53% まで上昇し、牛 No. 35 でも A-type が 36% から 51% まで上昇し

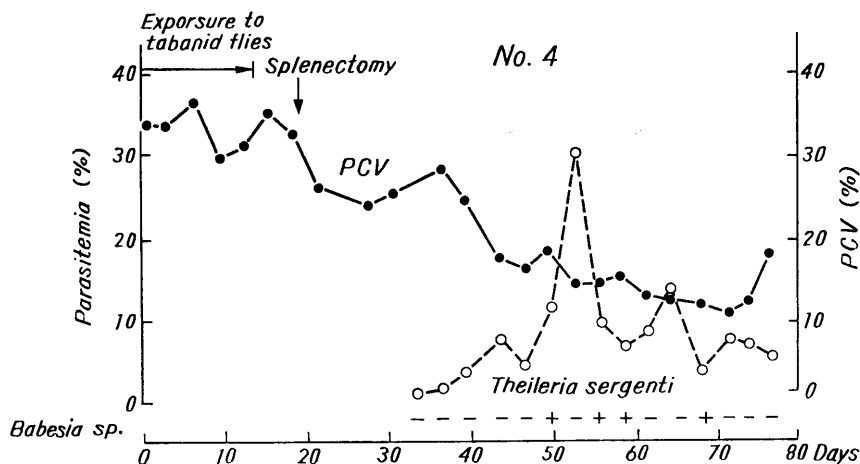


Fig. 3. Mechanical transmission of *Babesia* sp. and *Theileria sergenti* by *Tabanus nipponicus*.

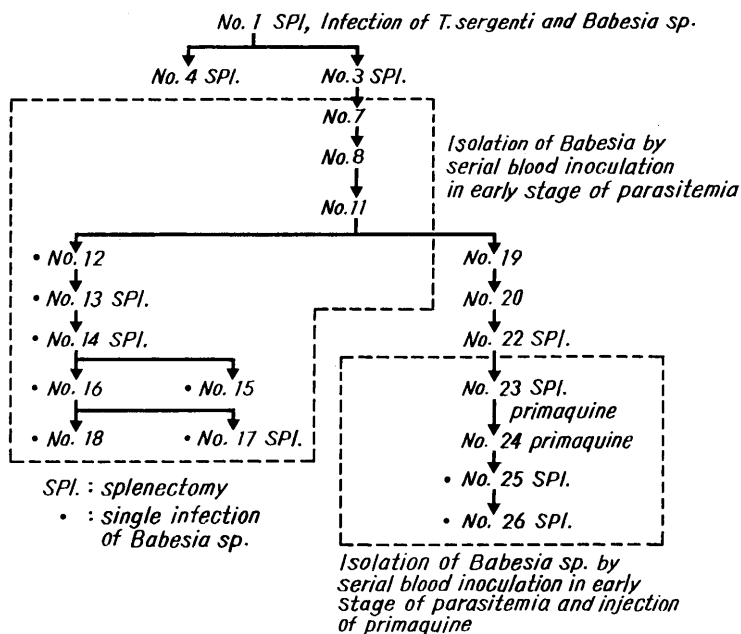


Fig. 4. Isolation of *Babesia* sp. from cattle infected with *Theileria sergenti* and *Babesia* sp.

た。しかし牛 No. 36 では A-type が 34% から 43% まで上昇したにもかかわらず、最高寄生率を示す 7 日には 22% まで減少し、B-type が 27% から 53% に上昇した (Fig. 6)。このように、寄生率と各タイプの出現率には一定の関連が認められなかった。牛 No. 13 の

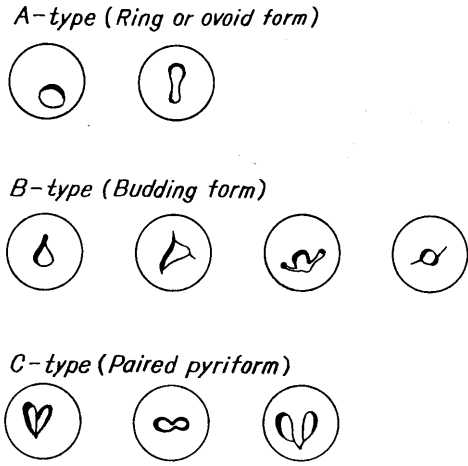


Fig. 5. Schema of A, B and C-type of *Babesia* sp.

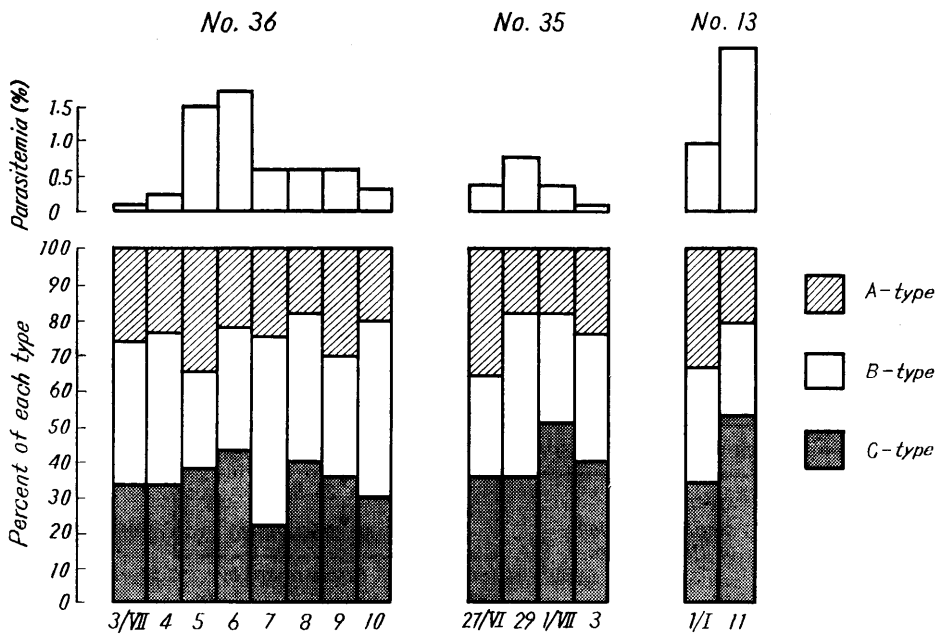


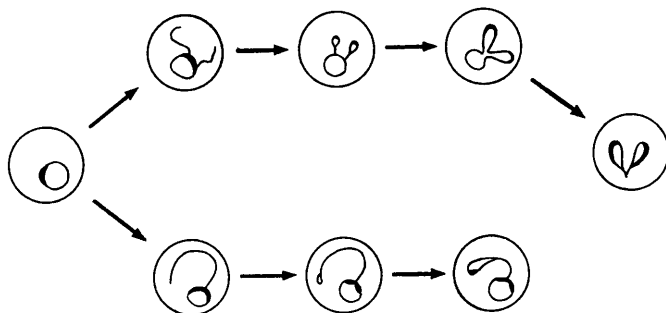
Fig. 6. Percentage of each type and parasitemia of the *Babesia* sp.

Babesia 原虫の A-type, B-type および C-type 100 個について, 大きさを測定した結果, それぞれ $3.00 \times 1.86 \mu\text{m}$, $4.02 \times 1.92 \mu\text{m}$ および $2.61 \times 1.15 \mu\text{m}$ で, 体長と体幅の比は 1.61, 2.09 および 2.27 であった (Table 2)。 *Babesia* 原虫の分裂様式については, Fig. 7 に示すような出芽による分裂過程が観察された。

Table 2. Size of the *Babesia* sp. isolated from cattle in Hokkaido prefecture

	Size	Ratio (length/width)
A-type	3.00 (0.34)* × 1.86 (1.62)	1.61
B-type	4.02 (0.72) × 1.92 (0.54)	2.09
C-type	2.61 (0.60) × 1.15 (0.31)	2.27

()*: Standard deviation.

**Fig. 7.** Manners of fission of the *Babesia* sp.**Table 3.** Virulence of the *Babesia* sp. isolated from Hokkaido prefecture

Group	Animal	Inoculated numbers	Maximum parasitemia (%)	Minimum PCV (%)	Hemoglobinuria	Maximum temperature (°C)	Termination
Splenectomized group	No. 13	10 ⁸	5.3	8.0	+	41.1	died
	No. 14	10 ⁹	8.7	9.0	+	40.3	died
	No. 17	10 ⁷	3.5	19.0	+	40.1	died
Intact group	No. 12	10 ¹⁰	0.05	18.0	—	40.1	recovered
	No. 15	15 ⁹	0.50	28.0	—	40.2	recovered
	No. 16	10 ⁸	0.05	24.0	—	39.3	recovered

4. *Babesia* 原虫の病原性

摘脾した3頭は、非摘脾牛よりも接種原虫数が少数であったにもかかわらず、重篤な臨床症状により、6～18日の経過でいずれも死亡した (Table 3)。すなわち、parasitemia は 3.5～8.7% に達して PCV の最低値は 8.0～19.0%，3 例とも血色素尿を排泄し、体温も 40.1～41.1°C に上昇した。2 例 (Nos. 14 および 17) にガナゼックを投与したところ原虫の寄生率は低下したが、いずれも衰弱して死亡した。

一方、非摘脾牛では、parasitemia も 0.05～0.50% と低く、PCV の低下もきわめて軽度であり、血色素尿は発現しなかった。発熱も 2 例で 40°C 以上に上昇したが、1 例では認め

られず、末梢血中の原虫は全例 12～25 日で消失し自然治癒した。

III. 考 察

石原³⁾によると *B. ovata* の主要なベクターはフタトゲチマダニの幼ダニで、*T. sergenti* のベクターはフタトゲチマダニの若ダニと成ダニであると報告されている。しかし、今回の感染実験では、牧野から採取した未吸血若ダニにより、3 頭中 2 頭の牛に感染が成立した。このことにより、フタトゲチマダニの若ダニも *B. ovata* を媒介することが確認された。今回ダニを採取した牧野では、春季の放牧開始時、若ダニが約 80% を占めたことから、初放牧牛への伝播者として若ダニがむしろ重要であると考えられた。

一方、幼ダニに吸血させた牛 No. 1 で、原虫が 1 回目では検出できなかったが、2 回目の吸血から出現した。これは、1 回目の吸血時には原虫が幼ダニの唾液腺に到達していなかったか、あるいは到達していても数が少ないため、感染にいたらなかったものと考えられる。

Krinsky⁵⁾ はアブが口蹄疫、*Leptospira* 病、*Anaplasma* 病、トナカイの *Piroplasma* 病を伝播すると報告している。同様に今回の実験で、*Babesia* 原虫もアブの機械的伝播により感染が成立した。従って、牧野においても一定の条件さえそろえば、アブや他の吸血昆虫は *Babesia* 原虫を媒介すると考えられる。しかし、今回分離した *Babesia* 原虫は、血中への出現が短期間であるため、伝播可能な期間もきわめて短いものと思われる。

Babesia と *Theileria* の混合感染血液から *Babesia* を分離する方法として、混合感染血液を牛に接種すると、最初に *Babesia* 原虫が、続いて *Theileria* 原虫が増殖するという性質を利用した。すなわち混合感染血液の早期連続接種法によって *Babesia* 原虫の分離は可能であったが、これに加え 8-アミノキノリン製剤で *Theileria* 原虫の増殖を抑制することによりさらに効率よく分離することができた。石原³⁾ は 8-アミノキノリン製剤投与だけで *Babesia* 原虫を分離したと報告しているが、最近では 8-アミノキノリン製剤が多用され、耐性原虫が出現し、殺タイレリア剤のみによる *Babesia* 原虫の分離は困難とされているので、早期接種をあわせて行なうことが必要であると思われる。

Minami and Ishihara⁶⁾ の報告によると、各種の *Babesia* 原虫は双梨子状虫体が一定の割合を占め (*B. bigemina*: 44.6%, *B. divergens*: 11.4%, *B. bovis*: 6.6%, *B. ovata*: 18%), 寄生率が増減してもその比率には大きな変化がないことを指摘している。今回の実験では、寄生率にかかわらず *B. ovata* の双梨子状虫体の割合は平均 23% と高く、その大きさは Minami and Ishihara⁶⁾ の $3.17 \times 1.65 \mu\text{m}$, 1.94, あるいは小華^和と小倉⁴⁾ の $2.20 \times 1.50 \mu\text{m}$, 1.69 とおおよそ一致した。

摘脾牛における *Babesia* 原虫感染による臨床症状は、非摘脾牛に比べて元気食欲の減退、発熱、貧血および parasitemia の程度が明らかに強度であり、血色素血症および血色素尿症が観察された。発症時にガナゼックを投与した摘脾牛の2例では、いずれも *Babesia* 原虫の寄生率は低下したが、PCV は増加することなく、下痢を併発して衰弱死した。しかし、非摘脾牛に *Babesia* 原虫を接種しても、貧血や発熱などの臨床症状は極めて軽度であり、病原性は原虫の感染数にもよるが *Theileria sergenti* よりも軽度と考えられた。今回分離した *Babesia* 原虫の摘脾牛に対する病原性の増強は、摘脾により宿主の免疫応答が著しく抑制されるためと考えられる。

この牧野の *Babesia* 感染牛血清は、*Babesia ovata* の抗原と補体結合反応により、特異的に反応することが橋場⁹⁾らによって報告されている。今回分離した *Babesia* 原虫の媒介ダニ、形態および病原性については Minami and Ishihara⁶⁾, Fujinaga¹⁾ の *B. ovata* に関する報告と一致した。従って、道南の牧野で発生した *Babesia* 病の原因は、本州各地に発生している *B. ovata* と同一のものと判断される。

IV. 総 括

北海道の *Babesia* 病発生牧野から採取したフタトゲチマダニおよびアブによる伝播の可能性、ならびに *Babesia* 原虫の分離、形態、病原性について実験牛を用いて検討し、以下の成績を得た。

1. 汚染牧野から採取したフタトゲチマダニの幼ダニ 500 頭に1頭の子牛を2回、若ダニ 200 頭に3頭の子牛を1回吸血させたところ、幼ダニ吸血および若ダニ吸血の2頭に *Babesia* 原虫の感染が確認された。

2. 感染牛から吸血した直後のアブ 136 匹に未感染牛を吸血させたところ、50 日後より *Babesia* 原虫が出現し、アブによる機械的伝播の可能性が示唆された。

3. *Theileria* と *Babesia* 原虫の混合感染血液を非感染牛に接種後、*Babesia* 原虫が最初に出現した時期に次代の牛に接種する早期接種法では5代目に、ブリマキンと早期接種の併用では4代目に *Babesia* 原虫が分離できた。

4. *Babesia* 原虫は3つの型、A-type (円ないし楕円形虫体)、B-type (出芽虫体)、C-type (双梨子状虫体) に分類され、それぞれの大きさは、 $3.00 \times 1.86 \mu\text{m}$, $4.02 \times 1.92 \mu\text{m}$, および $2.61 \times 1.15 \mu\text{m}$ であり、体長と体幅の比はそれぞれ、1.61, 2.09 および 2.27 であった。また双梨子状虫体の割合は寄生率の変化にかかわらず、平均 23% と一定の値を示した。

5. 分離した *Babesia* 原虫を摘脾牛3頭に接種したところ、体温の上昇 ($40.1 \sim 41.1^\circ\text{C}$)、血色素尿の排泄、parasitemia の増強 (3.5~8.7%)、元気食欲の減退、発熱および貧血を示し

て全例が死亡した。しかし、非摘脾牛3頭ではこれらの臨床症状はきわめて軽度であった。

6. 今回分離した *Babesia* 原虫は、媒介ダニ、形態および病原性などから *B. ovata* と考えられた。

参 考 文 献

- 1) Fujinaga, J., 1981. Bovine babesiosis in Japan: Clinical and clinico-pathological studies on cattle experimentally infected with *Babesia ovata*. Jpn. J. Vet. Sci., 43: 803-813.
- 2) 橋場 徹・秋本浩志・瀬能俊雄・大沼 裕・小林 浩・及川 武・福原吉豊, 1982. *Theileria sergenti*, *Babesia ovata*, *Anaplasma centrale* の混合感染例について. 北海道獣医師会雑誌, 26: 9-13.
- 3) 石原忠雄, 1964. ビロプラズマ病. 家畜衛生試験場年報, 164-170.
- 4) 小華和忠士・小倉喜佐次郎, 1925. 札幌地方ニ於ケル一種ノ畜牛びろぶらずま症ニ就テ. 日本獣医学雑誌, 4: 301-328.
- 5) Krinsky, W. L., 1976. Animal disease agents transmitted by horse flies and deer flies (Diptera: Tabanidae). J. Med. Entomol., 13: 225-275.
- 6) Minami, T. and Ishihara, T., 1980. *Babesia ovata* sp.n. isolated from cattle in Japan. Natl. Inst. Anim. Health Q., 20: 101-113.
- 7) Ogura, K., 1929. Uber Rinderpiroplasmose in Hokkaido (Japan), Jpn. J. Vet. Sci., 8: 1-38.

Summary

Bovine *Babesia* sp. was isolated from cattle in Hokkaido. Isolation of *Babesia* sp. from blood was carried out by serial inoculation of blood infected with *Theileria sergenti* and *Babesia* sp. in early stage of parasitemia and injection of primaquine.

Babesia sp. were transmitted to cattle by larvae and nymphs of *Haemaphysalis longicornis*. Transmission of *Babesia* sp. from infected cattle to susceptible splenectomized calves was also accomplished with 136 tabanid fly bites.

Babesia sp. were classified into three types: A) Ring and oval forms. size = $3.00 \times 1.68 \mu\text{m}$. Length/Width index = 1.69. B) Budding form. size = $4.02 \times 1.92 \mu\text{m}$. Length/Width index = 2.09. C) paired pyriform. size = $2.61 \times 1.15 \mu\text{m}$. Length/Width index = 2.27. The means of the rate of detection of paired pyriform protozoa were 23% in the isolated *Babesia* sp. The rate did not affect by changes of parasitemia.

Three splenectomized and intact cattle were experimentally infected with *Babesia* sp. Anemia, anorexia, fever ($40.1 \sim 41.1^\circ\text{C}$) and hemoglobinuria were observed in the splenectomized group. Minimum PCV was 8~19%, degree of parasitemia increased to 3.5~8.7%. These clinical and hematological changes in intact cattle were mild, and all cases recovered from temporal anemia.

In morphological characteristics, transmission and virulence, isolated *Babesia* sp. from cattle of Hokkaido prefecture were identical to *Babesia ovata* reported by Minami et al.

Explanation of plates

Plate I

Bovine erythrocytes on mouth parts of *Tabanus nipponicus*.

Plate II

Babesia sp. from cattle in Hokkaido prefecture. Giemse stain, $\times 1,400$

1, 2: A-type (Ring form and ovoid form)

3, 4: B-type (Budding form)

5, 6: C-type (Paired pyriform)

