

# Theileria sergenti感染牛に対する耐過牛白血球の移入効果

誌名	日本獣医師会雑誌 = Journal of the Japan Veterinary Medical Association
ISSN	04466454
著者	小山, 弘之 永井, 由紀子 八木, 行雄
巻/号	41巻9号
掲載ページ	p. 640-644
発行年月	1988年9月

*Theileria sergenti* 感染牛に対する耐過牛白血球の移入効果

小山弘之\*<sup>1)</sup> 永井由紀子\*<sup>2)</sup> 八木行雄\*<sup>3)</sup> 小笠原俊実\*<sup>1)</sup> 宝達 勉\*<sup>1)</sup> 斉藤 博\*<sup>1)</sup>

(昭和 63 年 6 月 24 日受理)

The Effects of Adoptive Transfer of Immunity to *Theileria sergenti* Infection in Cattle

HIROYUKI KOYAMA (Department of Veterinary Infectious Diseases, Kitasato University, Towada, Aomori 034), YUKIKO NAGAI, YUKIO YAGI, TOSHIMI OGASAWARA, TSUTOMU HOHDATSU and HIROSHI SAITHO

SUMMARY

Transfusion with neutrophils of cattle recovered from *Theileria sergenti* (TS) infection was performed to examine the effects on the percentage of parasitized erythrocytes (PPE) in peripheral blood of TS infected cattle. A cow recovered from an artificial infection with the Fukushima strain of TS showing the persistent low PPE was selected as a donor.

Leukocytes were obtained from 1 liter of a donor cow's blood and washed 3 times with a buffer solution by centrifugation. These leukocytes (more than  $10^9$  cells) were intravenously injected twice to the recipient cows at 3-day intervals. PPE in recipient cows rapidly decreased, but increased again to the previous value within a few days. The leukocyte transfusion was more effective when injected 5 times. However, the neutrophils from cattle not infected with TS showed no effects on PPE in the recipient cattle. Culture supernatant of co-culture with neutrophils from the donor cow recovered from TS infection and parasitized erythrocytes from the recipient cow was injected 8 times demonstrating no effects on PPE in the recipient cow. The PPE in the recipient cow was rapidly decreased after the blood transfusion from the donor cow as was the neutrophil transfusion.

These results suggested that the neutrophils of cows recovered from TS infection were effective to reduce the PPE in the cows highly infected with TS.

要 約

*Theileria sergenti* (TS) 感染耐過牛の末梢白血球を TS 寄生率の高い牛に輸注し、TS 寄生率に対する効果を検討した。供与牛は実験的に TS 福島株を感染させ、一度寄生率を上昇させた後に耐過状態となったものを用いた。受容牛には TS 寄生率の高い時期の個体を用いた。供与牛の血液 1l を採取し、その白血球層のみを回収して 3 回遠沈洗浄後、1 回当たり  $10^9$  細胞以上を静脈内に移入した。耐過牛白血球を 3 日間隔で 2 回移入すると TS 寄生率は急速に減少したが、一時的で再び増加した。耐過牛白血球を 5 回移入すると、その移入効果は前者よりも長期間持続した。いっぽう、TS 非感染牛の白血球移入では TS 寄生率の変化はなかった。なお、耐過牛白血球と受容牛の TS 寄生赤血球とを混合培養し、その培養上清を受容牛に 8 回移入したが効果はみられなかった。また、この供与牛と受容牛の前述の組み合わせで輸血を実施したところ、一時的ではあるが TS 寄生率は急速に減少した。これらの結果から、耐過牛白血球には TS 寄生赤血球を減少させる作用のあることが示された。

わが国におけるウシの小型ピロプラズマ病は *Theileria*

*sergenti* (TS) の赤血球内感染に起因し、発熱と貧血を主徴とした住血原虫性の疾病である<sup>14,24)</sup>。本症は放牧地のダニによって媒介されるため、ウシの放牧衛生上重要な疾病の一つとなっている<sup>10,14,15)</sup>。*T. parva* や *T. annulata* 感染では抗体が感染防御に効果を示さないことが知られているが<sup>2,3,16,25)</sup>、回復牛は再攻撃に対して抵抗性である

\*<sup>1)</sup> 北里大学獣医畜産学部 (青森県十和田市前谷地 149-2)

\*<sup>2)</sup> 静岡県 開業 (清水市)

\*<sup>3)</sup> 農林水産省家畜衛生試験場東北支場 (青森県上北郡七戸町海内31)

こと<sup>1,18,26)</sup>, 耐過牛の胸管リンパ球の移入実験で養子免疫が成立すること<sup>4)</sup>, 回復牛には cytotoxic leukocyte が存在することなどから細胞性免疫が重視されている<sup>5,6,17,20)</sup>.

TS では, 副腎皮質ホルモンの投与や摘脾によって寄生率が上昇し<sup>9,22)</sup>, また, 再攻撃に抵抗することや計画的な人工感染によって免疫が成立する<sup>8,15,21)</sup>. いっぽう, 液性免疫については明確な効果を示す報告はないが, IgG 抗体の関与について論じられている<sup>22)</sup>. また, TS 感染で貧血になった個体への輸血効果が示されているが<sup>21,23,27)</sup>, この場合に赤血球と一緒に移入される白血球の作用については不明である. そこで著者らは, TS で養子免疫伝達に関する実験を行った.

## 1. 材料および方法

### 1) 供試牛

ホルスタイン牛, 雄4頭 (No. 4, 6, 10, 12) を生後ただちにダニの感染から隔離した部屋で飼育し, また, 飼料からダニが混入しないように配慮した. 生後1カ月間の血液検査では TS 感染が認められなかった. また, 自然感染を受けたホルスタイン牛の雄1頭 (No. 7) も使用した. これら5頭はいずれも生後6カ月齢から1歳半で実験に用いた.

### 2) TS の接種

No. 6 牛は1カ月齢で TS (福島株)<sup>7)</sup> 感染赤血球を  $8.3 \times 10^8$  個皮下接種し, 3カ月後に摘脾した. 寄生率は上昇し, ついで下降して耐過牛となった. No. 4, No. 10, No. 12 牛は4カ月齢で摘脾し, No. 4 と No. 10 牛は1カ月後に  $8.3 \times 10^8$  個の同上 TS 感染赤血球を皮下接種し, 寄生率が上昇するまでデキサメサゾン (DM; 0.4 mg/kg/1回) を連日皮下投与した<sup>12)</sup>.

### 3) 供与牛と受容牛

No. 6 牛は寄生率の高い期間には受容牛として実験1・2に, また, 寄生率の低下した耐過期間では供与牛として実験3・4・5・6に用いた. No. 4 と No. 10 牛は TS 耐過期間に供与牛として実験1に用い, No. 12 牛は非感染供与牛として実験2に用いた. No. 7 牛は寄生率の高い期間には受容牛として実験3・4・5に, また, No. 4 牛は実験6にそれぞれ用いた.

### 4) TS 寄生率の測定

(1) ギムザ染色: 血液塗抹標本をギムザ染色し, 赤血球内型原虫を測定した.

(2) 間接蛍光抗体法 (IFA): 血液塗抹標本は固定後, 福島株耐過 No. 5 牛血清 (ポリクローナル) と, 同株に対するモノクローナル抗体 (1-G, 11-D, 3-H) を一次血清として用い, それぞれに蛍光色素結合二次血清を反応させた<sup>11)</sup>.

### 5) T および B リンパ球の測定

T リンパ球はウサギ抗ウシ胸腺血清 (ATS) を用いた間接蛍光抗体法を, また, B リンパ球は蛍光色素結合ウサギ抗ウシ IgG (Cappel Lab., USA) を用いた<sup>13)</sup>.

### 6) 供与牛からの白血球調整

クエン酸ナトリウム添加末梢血を1回に1 $l$ 採血し, 遠心で白血球層を採取し, これに赤血球除去用トリス緩衝液を添加して得られた白血球はハンクス液で3回洗浄し, 同液100 ml に浮遊した. 細胞液はただちに受容牛の頸静脈内に100 ml をゆっくりと注入した.

### 7) 供与牛白血球と受容牛赤血球との混合培養

上述のようにして供与牛 No. 6 から1回につき500  $\mu$  あて採血し, 得られた白血球は RPMI 1640 培養液の100 ml 中に浮遊した. いっぽう, 受容牛 No. 7 からヘパリン添加末梢血を1回につき25 ml 採血し, 遠心洗浄にて白血球を除去し, 赤血球沈査を得た. ついで, 白血球液 ( $2.1 \sim 7.7 \times 10^9$  個/100 ml) と赤血球沈査 ( $1.1 \sim 2.2 \times 10^{10}$  個) を混合し, セルローラーボトル (50 cm  $\times$  10 cm) にて37°C で24時間培養した. 培養上清は遠心後, 0.45  $\mu$  メンブランフィルター通過後, ただちに受容牛 No. 7 の頸静脈に80 ml/1回を注入した.

### 8) 血液学的検査

赤血球数および白血球数は Thoma-Zeiss 法, ヘマトクリット値は毛細管法, ヘモグロビン量はシアンメトヘモグロビン法によって測定した.

## 2. 成績

### 1) 実験1 (耐過牛白血球の2回移入による効果)

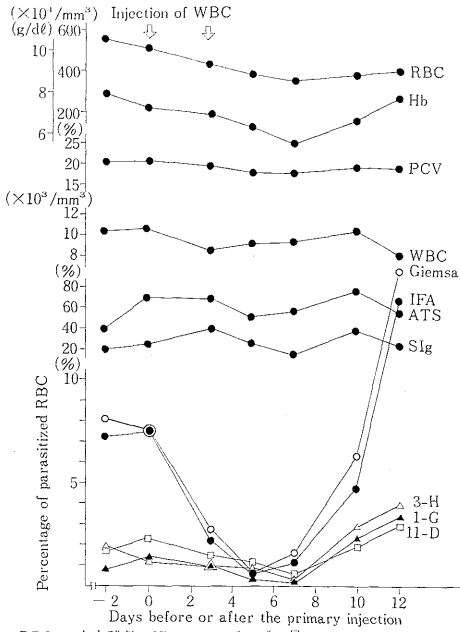
(1) 受容牛 No. 6 における白血球移入2日前と移入当日の寄生率は7.5%であった. 供与牛 No. 10 の白血球を採取し, 初回には  $4.4 \times 10^9$  個を, 2回目には3日後に  $2.9 \times 10^9$  個を移入した. ギムザ染色による寄生率は急速に低下し, 5日後には0.7%を示したが, その後は逆に上昇し, 12日後には高い値を示した (図1). モノクローナル抗体を用いた寄生率の測定でも同様な傾向がみられた. 他の検査項目では著しい変化はなかった.

(2) 同様な実験では供与牛 No. 4 の白血球を採取し, 初回  $6.9 \times 10^9$  個, 3日後に  $6.7 \times 10^9$  個を受容牛 No. 6 に移入した. ギムザ染色による寄生率は初回移入時の7.2%から, 4日後には2.7%まで減少した. しかし, 10日後には上述の結果と同様に上昇傾向がみられた. その他の検査では変化がなかった.

### 2) 実験2 (非感染牛白血球の2回移入による効果)

受容牛 No. 6 のギムザ染色による寄生率が8%まで低下した時点で, 非感染牛 No. 12 の白血球を初回  $2.7 \times 10^9$  個, 3日後には  $6.5 \times 10^9$  個を移入したが, 寄生率や他の検査項目に変化はみられなかった (図2).

*Theileria sergenti* 感染牛に対する耐過牛白血球の移入効果



RBC : 赤血球数 Hb : ヘモグロビン量  
 PCV : ヘマトクリット値 WBC : 白血球数  
 ATS : Tリンパ球陽性率 S Ig : Bリンパ球陽性率  
 Giemsa : ギムザ染色による *T. sergenti* 寄生率  
 IFA : *T. sergenti* 感染実験牛血清を用いた間接蛍光抗体法による寄生率.  
 3-H, 1-G, 11-D : *T. sergenti* に対する3種のモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法による寄生率.

図1 *T. sergenti* 耐過牛 (No. 10) の白血球移入による *T. sergenti* 感染牛 (No. 6) への効果

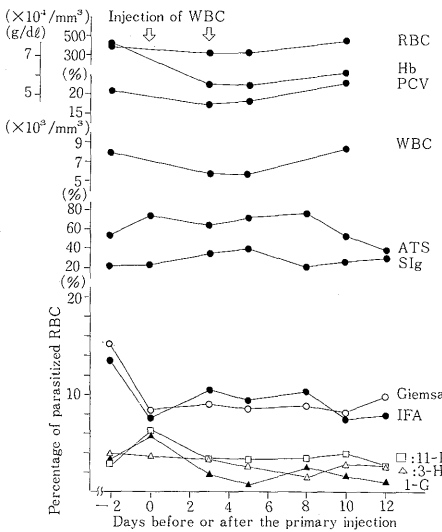


図2 *T. sergenti* 非感染牛 (No. 12) の白血球移入による *T. sergenti* 感染牛 (No. 6) への効果

3) 実験3 (耐過牛白血球の5回移入による効果)

ギムザ染色による寄生率が16%の受容牛 No. 7 に1回当たり  $1.7 \sim 3.5 \times 10^9$  個の供与牛 No. 6 の白血球を移入し、さらに3, 10, 20, 23日後も移入し計5回移入し

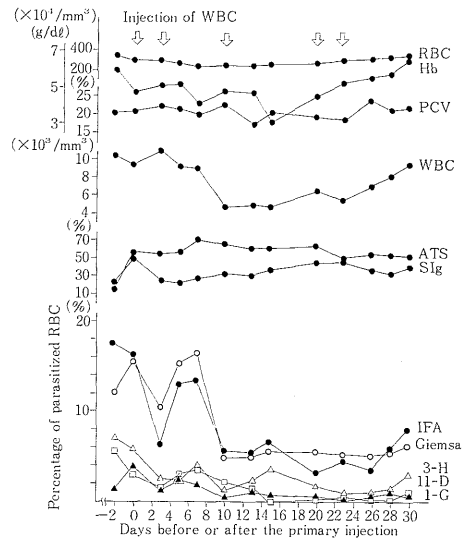


図3 *T. sergenti* 耐過牛 (No. 6) の大量白血球移入による *T. sergenti* 感染牛 (No. 7) への効果

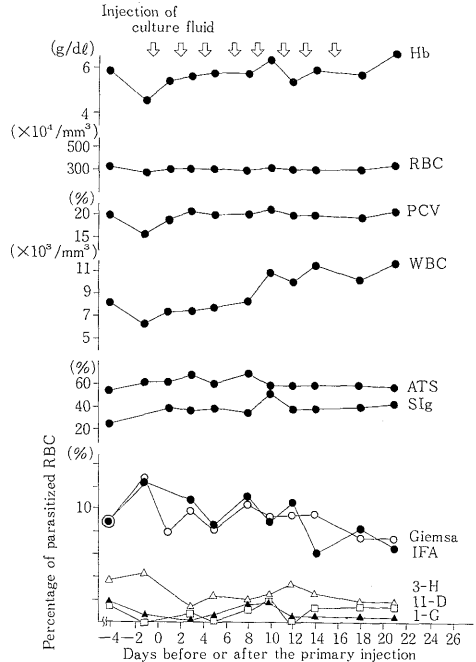


図4 *T. sergenti* 耐過牛 (No. 6) の白血球培養液による *T. sergenti* 感染牛 (No. 7) への効果

た(図3)。移入効果は著しく、10~28日後まで5%前後の寄生率を維持した。しかし、30日後には再び上昇傾向を示した。寄生率の減少と連動して白血球数の変化が認められたが、他の検査には顕著な動きはなかった。

4) 実験4 (白血球培養液の8回移入による効果)

耐過牛 No. 6 の白血球と受容牛 No. 7 の赤血球との混合培養液を受容牛に8回移入したが、明確な寄生率の減少は観察されなかった(図4)。他の検査でも大きな変化

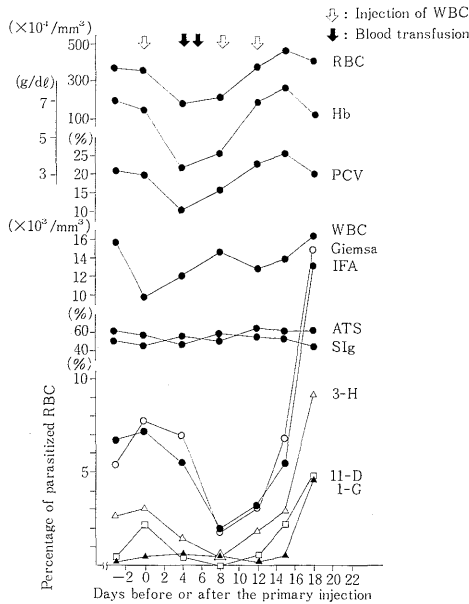


図5 *T. sergenti* 耐過牛 (No. 6) の白血球と全血液との移入による *T. sergenti* 感染牛 (No. 7) への効果

はなかった。

5) 実験5 (耐過牛白血球と全血の組み合わせ移入による効果)

実験4では受容牛 No. 7 と供与牛 No. 6 間の組み合わせに問題があるか否かを調べた(図5)。初回白血球( $2.4 \times 10^9$  個) 移入の4日後, 赤血球数, ヘモグロビン量および PCV の著明な減少が認められた。そこで, 供与牛 No. 6 の全血を 1l, さらに24時間後に 2l の全血を輸血し, その後,  $2.0 \times 10^9$  個と  $2.5 \times 10^9$  個の白血球を移入した。寄生率は8日後に3.5%と最低値を示したが, 12日後の白血球移入にもかかわらず, 8日後には16%以上の高い値となった。モノクローナル抗体を用いた寄生率の測定でも同様な傾向が認められた。赤血球数, ヘモグロビン量および PCV は全血移入により回復した。

6) 実験6 (デキサメサゾン投与牛における耐過牛白血球の移入による効果)

受容牛 No. 4 には寄生率を上昇させるため, 初回細胞移入の16日前から連日 DM (0.4 mg/kg/1回) を投与し, それ以後も6日間連日投与を続けた。ギムザ染色による寄生率が10%以上を示しているとき, 供与牛 No. 6 の白血球を初回  $7.2 \times 10^9$  個, 3日後には  $3.4 \times 10^9$  個を移入したが寄生率に変化はみられず細胞移入の効果は認められなかった。DM 投与によって, T, B リンパ球の百分比は変動し, いずれも低値を示した(図6)。

3. 考 察

実験1および3では, 受容牛 No. 6 は耐過牛 No. 10

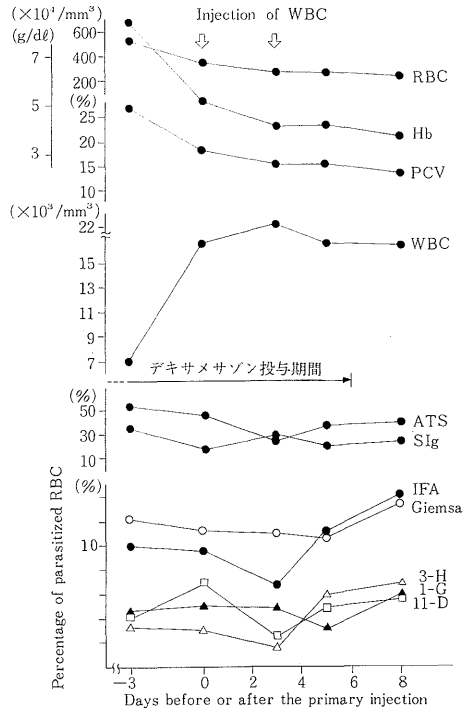


図6 デキサメサゾン投与牛 (No. 4) における耐過牛 (No. 6) 白血球の移入による効果

および No. 4 から, また, No. 7 は No. 6 からそれぞれ白血球の移入を受けた。2回と5回の移入回数では寄生率の低下日数に差がみられた。また, 3回移入と2回の輸血を組み合わせた実験5では一時的な低下しか得られなかった。No. 7 は自然感染例であるが, 福島株耐過牛の白血球移入で効果がみられた。いっぽう, 実験2では非感染牛の白血球移入効果は得られなかった。これらの結果は耐過牛の白血球移入が一時的にせよ寄生率を減少させることを示唆している。しかし, 実験4で示したように培養上清の移入では効果が不明であった。供与牛には一度寄生率が上昇した耐過牛を使用しているため, 白血球採取時の寄生率は実験1 No. 10 の3.7~3.9%を除き, 他の牛では0.5~1.8%であり, いずれも pre-munition とか infection immunity の免疫状態にあったと思われる<sup>9)</sup>。非自己の牛リンパ球を移入すると血液中では2日間しか検出されない<sup>10)</sup>。このため, 移入リンパ球の寿命は短いと考えられる。実験4において寄生赤血球膜の異物化については, それを明確に示す成績は提出されていないものの, 白血球との混合培養でメディアエーターの放出を期待した。しかし, それを支持する結果は得られなかった。

原因は不明であるが, 実験1と5で寄生率は低下の後, 急激な上昇が一時的にみられ, その後, 徐々に回復した。実験5では従来の報告と同じく輸血が貧血の回復に効果

を示した。この場合、全血中に含まれる白血球は寄生率の減少に働いていることが予想される。

受容牛 No. 4 に DM を 22 日間連日投与して寄生率を上昇させ、この期間中に耐過牛 No. 6 の白血球を実験 1 と同様に 2 回移入したが、移入効果はみられなかった。この結果は、移入白血球も DM の影響を受けて、その効力を消失したものと考えられる。

白血球移入を受けた受容牛の血液中の T, B リンパ球百分比に大きな変化はなく、その変動と寄生率の関係も明らかにすることはできなかった。

引用文献

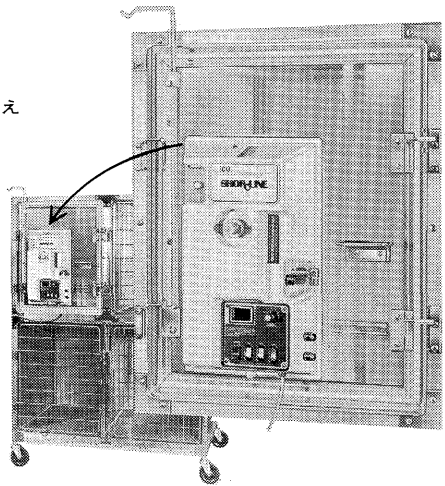
- 1) BURRIDGE, M. J., MORZARIA, S. P., CUNNINGHAM, P. M., et al.: *Parasitology*, 64, 511~515 (1972).
- 2) BURRIDGE, M. J. and KIMBER, C. D.: *Z. Tropenmed. Parasit.*, 24, 186~191 (1973).
- 3) DHAR, S. and GAUTAM, O. P.: *Indian Vet. J.*, 56, 738~740 (1978).
- 4) EMERY, D. L.: *Res. Vet. Sci.*, : 30, 364~367 (1981).
- 5) EMERY, D. L., MORRISON, W. I., BUSCHER, G., et al.: *J. Immunol.*, 128, 195~200 (1982).
- 6) EMERY, D. L. and KAR, S. K.: *Immunology*, 48, 723~731 (1983).
- 7) FUJINAGA, T. and MINAMI, T.: *Res. Vet. Sci.*, 29, 230~234 (1980).
- 8) 石原忠雄, 藤田壽吉, 百瀬澄雄: 日獣学誌, 24, 409 (1962).
- 9) 石原忠雄: 家畜衛試研究報告, 62, 128~146 (1971).
- 10) 石原忠雄: 日獣会誌, 30, 187~195 (1977).
- 11) KAJIKAWA, O., YAGI, K., KOYAMA, H., et al.: *Jpn. J. Vet. Sci.*, 47, 683~690 (1985).
- 12) KAJIKAWA, O., KUMOSHIMA, Y., KOYAMA, H., et al.: *Vet. Parasitol.*, 28, 275~282 (1988).
- 13) KOYAMA, H., IDE, T., YOSHIKAWA, H., et al.: *J. Vet. Med. B.*, 34, 371~379 (1987).
- 14) MINAMI, T., ISHIHARA, T. and FUJITA, J.: *In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, IRVIN, A. D., CUNNINGHAM, M. P. and YOUNG, A. S., editors, 94~96, Martinus Nijhoff Publishers. Hague (1981).
- 15) 南 哲郎: 家畜衛生試験場年報, 24, 83~90 (1983).
- 16) MUHAMMED, S. S., LAUERMAN, L. H. and JOHNSON, L. W.: *Am. J. Vet. Res.*, 36, 399~402 (1975).
- 17) PRESTON, P., BROWN, C. G. D. and SPOONER, R. L.: *Clin. Exp. Immunol.*, 53, 88~100 (1983).
- 18) RADLEY, D. E., BROWN, C. G. D., CUNNINGHAM, M. P., et al.: *Vet. Parasitol.*, 1, 51~60 (1975).
- 19) ROBERTS, D. H., LUCAS, M. H. and WIBBERLEY, G.: *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 11, 351~359 (1986).
- 20) SINGH, D. K., JAGDISH, S. and GAUTAM, O. P.: *Res. Vet. Sci.*, 23, 391~392 (1977).
- 21) 高橋清志: 酪農学園大学紀要, 6, 179~248 (1976).
- 22) 高橋清志: 日獣会誌, 30, 473~478 (1977).
- 23) 照井信一: 日獣会誌, 30, 481~487 (1977).
- 24) UILENBERG, G.: *In Current Topics in Veterinary Medicine and Animal Science*, IRVIN, A. D., CUNNINGHAM, M. P. and YOUNG, A. S., editors, 4~95, Martinus Nijhoff Publishers. Hargue (1981).
- 25) WAGNER, G. G., DUFFY, W. P. H. and BURRIDGE, M. J.: *Parasitology*, 69, 43~53 (1974).
- 26) WILDE, J. K. H.: *Adv. Vet. Sci. Comp. Med.*, 11, 207~259 (1967).
- 27) 安田純夫, 村上大藏, 藤井義雄, ほか: 獣医畜産新報, 432, 1085~1094 (1966).

小動物用集中治療装置

ショーライン **ICUドアー**

ショーラインの標準ケージのドアーをこのドアーに取り換え  
酸素・麻酔ガス・噴霧などの供給源に接続し IV スタンドを  
取りつけ 電球をつなげば ICU となり 集中治療と  
患者監視ができます

特殊シリコンガスケットで気密が保たれ 各種装置を  
備え コントロールパネルで 簡単に操作できます  
空気ろ過・換気装置 酸素・麻酔ガス・噴霧の取入れ  
供給装置 酸素流量計・コントロール装置 ケージ内温  
度表示装置 自動温度調整装置 ケージ内湿度計 ケー  
ジ内とコントロールパネル照明装置 プレキシガラス監  
視まど IV スタンド取り付け部を備えています



**FHK 富士平工業株式会社** 東京都文京区本郷6丁目11番6号  
電話 東京 (03) 812-2271 代表