

ウシ小型ピロプラズマ病の赤血球酸化障害と貧血機構に関する研究

塩野 浩紀

Studies on the oxidative damage in red blood cells and mechanism of anemia
in Japanese bovine theileriosis

Hiroki SHIONO

牛の小型ピロプラズマ病は、貧血を主要症状とする住血原虫病であり、赤血球内寄生性のタイレリア原虫 (*Theileria orientalis*: 小型ピロプラズマ原虫) の感染によって起こる。本病は、小型ピロプラズマ原虫感染ダニが放牧地において牛を吸血することで伝播されるが、本病を媒介するダニ、主としてフタトゲチマダニは北海道から沖縄まで広く生息しており、全国各地の放牧地でその発生がみられる。全国的にみて本病の死産率は0.2~0.4%と低く、原虫の感染を受けた牛がすべて臨床的に発症するわけではない。東アフリカ海岸熱や熱帯タイレリア病など、他の悪性タイレリア病に比較すると本原虫種の病原性は弱いことから、良性タイレリアの範疇に入ると考えられている。しかし、他の疾病との混合感染、放牧地における環境や飼料の急変、妊娠・分娩、または輸送などのストレスが引き金となって発症あるいは再発する 경우가多く、発病誘因が重なると一般症状も悪化し、急激な貧血の進行で致死的経過をたどる例もある。

小型ピロプラズマ病では、原虫生活環のなかで赤血球内の増殖ステージが病態上重要である。すなわち、メロゾイト期の原虫が赤血球に寄生することで、貧血が引き起こされると考えられているが、末梢血中の原虫寄生率と貧血との関係は必ずしも一致しない例が多い。野外では原虫寄生率が高いにもかかわらず、貧血が軽度なため臨床的には軽症牛と判断される牛もかなり存在し、逆に原虫寄生率は軽度ながら、貧血が顕著なため重症化する牛もみられる。これらの事実から、本病の発病や病勢は、宿主赤血球に対する原虫寄生率の高低ではなく、貧血の状態に依存していることが示される。したがって、本病の発病を左右する貧血の発生機構を解明し、これに基づく貧血の防除策が確立できれば、赤血球における原虫寄生の状態がいかにあろうと、発病を阻止したり病勢

を制御できる可能性がある。

これまでに、小型ピロプラズマ病では貧血の病態に関する因子として、感染牛における有棘、有角およびウニ様赤血球など形態学的に異常な赤血球の出現、赤血球浸透圧抵抗性の低下、体内からの赤血球除去の異常な亢進、血清中における溶血促進因子の存在、さらに末梢血単球の活性化などが報告されている。これらのうち、奇形赤血球の出現と赤血球浸透圧抵抗性の低下は、原虫寄生だけでなく非寄生の赤血球でもみられ、さらに血流中からの赤血球の除去は、原虫寄生・非寄生赤血球の両者で起こることが判明しており、原虫寄生率の増加と貧血の程度が相関しない本病の貧血の特徴を説明できる所見として非常に興味深い。したがって、本病では原虫の赤血球寄生の状態にかかわらず、原虫寄生および非寄生赤血球の両者が末梢血中から速やかに除去されることで、貧血が発生すると考えられる。しかし、現在までのところ、体内からの赤血球除去をもたらす赤血球変化の成因については解明されていない。

いっぽう、寄生虫疾患、特に住血微生物病においては、宿主の防御反応として末梢血中の貪食白血球から産生される活性酸素種 (ROS) が重要な役割を果たしており、発病時における大量のROS産生と末梢血中への放出が起こり、これが原虫と宿主細胞の両者に障害を与えるとの報告がある。また、小型ピロプラズマ原虫と同様の赤内型原虫であるマラリア原虫では、感染赤血球に対する酸化障害の影響に焦点をあてた研究も行われている。小型ピロプラズマ病においても、末梢血単球からのROS産生の報告があるが、貧血との関連性については検討されていない。したがって、本病の発病経過においても、マラリア原虫感染と同様に末梢血中の貪食白血球からROSの産生・放出が起こっているとしたら、赤血球が原

虫寄生・非寄生にかかわらず酸化的な損傷を受ける可能性がある。このような状態に陥った赤血球は、容易に血流中から消失する結果、原虫寄生率の高低に依存せずに貧血が起こったり、病態の悪化がもたらされることは十分に考えられる。また、本病の発病経過では、貧血の進行に伴って血液が次第に褐色調を帯び、特に重度の貧血時には血液の色はチョコレート様を呈することがしばしば観察される。一般に新鮮血液でみられるこの現象は、血液が酸化されている可能性を示す所見として注目できる。しかし、これまでに赤血球に対する酸化ストレス、すなわちROSによる赤血球の酸化障害という観点から、本病における貧血の病態解明は全く行われていない。

本研究ではこれらの背景から、ROSによってもたらされる細胞の酸化障害という現象に着目し、「小型ピロプラズマ病では、赤血球の酸化障害が貧血の病態と密接に関連する」という仮説を実証すること企図した。はじめに、本病の貧血発生時には赤血球酸化が実際に起こっているのかを明らかにするために、赤血球の酸化障害および抗酸化防御系について調べた。次いで、貧血発生時にみられる赤血球酸化の原因を調べることを目的とし、末梢血貪食白血球から産生されるROSが赤血球酸化に及ぼす影響を調べ、さらにROSによる病態悪化の因子として最も重要な鉄関連物質の動態について調べた。最後に、貧血発生時に赤血球が末梢血中から除去される現象を解明するために、貪食細胞による認識・貪食除去の指標となる赤血球膜表面の変化について調べた。

第1章 貧血発生に伴う赤血球の酸化ストレスと抗酸化防御能

小型ピロプラズマ病の貧血発生には、赤血球に対する酸化ストレスの増加が関与しているのかを明らかにするために、第1章では赤血球の細胞内および細胞膜における酸化障害物質の変化と赤血球内の抗酸化防御系酵素・物質の変化を実験感染牛を用いて調べ、以下の結論を得た。

実験感染牛の発病経過において、赤血球内の酸化指標物質であるメトヘモグロビン濃度および過酸化物質量は貧血の発生（ヘマトクリット値の低下）に伴って増加し、特にメトヘモグロビン濃度とヘマトクリット値は有意（ $p < 0.01$ ）な負の相関関係を示した。さらに、赤血球膜の酸化指標物質である赤血球膜酸化蛋白濃度および過酸化脂質濃度も、貧血の発生時には著明に増加した。これらの細胞内および細胞膜における酸化指標物質は、いずれも貧血の発生前および回復期には低い値であった。ま

た、赤血球内の抗酸化系酵素であるグルコース・6・リン酸脱水酵素活性値および抗酸化物質である還元型グルタチオン濃度は、両者とも貧血の進行に伴って次第に減少した。

以上の結果から、本病の貧血発生時には赤血球の細胞内および細胞膜の両者に酸化障害が起こっていることが明らかになった。さらに、酸化ストレスから赤血球を守る抗酸化防御系の機能も同時に低下することが示されたことから、赤血球の酸化障害は貧血の発生や病態悪化にかかわる重要な要因であると考えられた。

第2章 貧血発生に伴う貪食細胞の活性酸素産生と赤血球の酸化障害

小型ピロプラズマ病の貧血発生時にみられる赤血球の酸化障害は、末梢血中に存在する何らかの酸化物質によってもたらされると考えられる。第2章では、赤血球酸化を起こす原因物質を明らかにするために、末梢血貪食細胞が放出するROSに着目し、好中球・単球由来のROS産生と赤血球酸化との関連性を実験感染牛を用いて調べた。また、ROSによる細胞障害を悪化させる因子として、最も重要な影響を及ぼす鉄代謝物質の変化を感染経過で調べ、以下の結論を得た。

実験感染牛の発病経過では、赤血球内酸化の指標となるメトヘモグロビン濃度および赤血球膜酸化の指標となる過酸化脂質濃度の増加に一致して、好中球および単球のROS産生量は増加し、感染経過における赤血球酸化と好中球・単球ROS産生の動態は類似していた。さらに、末梢血中のROS産生総量と赤血球酸化指標（メトヘモグロビン濃度および過酸化脂質濃度）の増加は、いずれも有意（ $p < 0.01$ ）な相関を示した。また、ROS障害の悪化因子である血清鉄濃度、トランスフェリン飽和率およびフェリチン濃度は、いずれも貧血の発生時には著明に増加した。

以上の結果から、本病の貧血発生時における赤血球の酸化障害は、貪食細胞由来のROSによってもたらされる可能性が大きいことが明らかとなった。また、貧血の発生時には鉄代謝の破綻（鉄過剰症状）も同時にみられたことから、ROSによる酸化障害の増悪化には鉄代謝物質が深くかかわっていると考えられた。

第3章 貧血発生に伴う赤血球膜表面の変化

小型ピロプラズマ病において貧血が発生するためには、貧血発生時の赤血球が網内系組織に存在する貪食細胞（マクロファージ）に異常な赤血球であると認識・貪食

され、末梢血中から速やかに除去されることが必要である。第3章では、赤血球が血流から除去される機序を明らかにするために、貪食細胞による認識・貪食の指標となる赤血球膜表面の変化を実験感染牛を用いて調べ、以下の結論を得た。

実験感染牛の発病経過において、赤血球に対する自己抗体（IgG）の付着は、貧血の発生に伴って著明に増加し、IgG付着率が最大となる時期は貧血のピーク時期と同じであった。また、貪食目印分子であるホスファチジルセリン（PS）の赤血球膜上への発現は、貧血の発生時に増加し、貧血の発生前や回復期にはPS発現はほとんどがみられなかった。発病経過の赤血球におけるPS発現率を人工的な酸化ストレス負荷の違いで比較したところ、酸化ストレスを与えた赤血球において、貧血発生時のPS発現が著明であった。

赤血球へのIgG付着は、網内系組織に存在するマクロファージによる抗体依存性の貪食を導き、またPSが発現した細胞は抗体などの血漿成分を介さずマクロファージに直接認識される。実験感染牛において、IgG付着とPS

発現の増加は貧血の発生と一致していたことから、酸化障害に起因するこれらの赤血球表面の変化が末梢血中からの赤血球除去に大きくかかわり、本病の貧血が発生するものと考えられた。

本研究における赤血球の細胞生化学的な解析から、酸化ストレスすなわち赤血球に対する酸化障害の増加が、小型ピロプラズマ病の貧血発生や病態悪化に重要な役割を演じていることが明らかにされた。本研究で得られた成績は、東アフリカ海岸熱や熱帯タイレリア病など他の悪性タイレリア病や牛のパベシア病における貧血の病態解明にも大きく貢献すると思われる。さらに、動物の感染症分野においても、今後普及していくことが予想される抗酸化物質による病態制御や治療法などの開発にも役立つことが期待される。

岐阜大学大学院連合獣医学研究科（帯広畜産大学）

平成16年9月17日授与