

# 小型ピロプラズマ病の貧血機構 — 赤血球寿命の短縮について —

環境・常在疾病研究チーム 上席研究員

塩野 浩紀

SHIONO, Hiroki

牛のタイレリア病の一つである小型ピロプラズマ病は、マダニ媒介性の小型ピロプラズマ原虫の感染による住血原虫病であり、放牧衛生を推進するうえで大きな障害となっている。これまで発病牛の治療には、抗原虫剤（8-アミノキノリン製剤）が広く用いられてきたが、放牧地では本薬剤に対する抵抗性原虫の出現による治療効果の低下が問題となっている。さらに、本薬剤の製造・販売が平成16年度で打ち切られたことから、治療の継続のためには類似薬を個別に輸入せざるを得ない状況に陥っている。また、媒介マダニ対策として、現在では殺ダニ剤（フルメトリン製剤）を牛体に投与する方法が普及しているが、国際交易の拡大や地球温暖化などの影響を受け、媒介マダニの生息地域と密度が増加する可能性に加え、本薬剤の普及から長期間が経過したことから、耐性マダニが出現する可能性も指摘されている。小型ピロプラズマ原虫の感染を阻止するワクチンや薬剤は、現在のところ市販されておらず、放牧地では小型ピロプラズマ病の発生・流行についての新たな感染拡大への強い危惧が生じており、まさに本病を取り巻く情勢は大きな転換期を迎えている。

小型ピロプラズマ病で問題となる主病態は貧血である。貧血の発生は、媒介マダニの吸血によって牛へ感染した小型ピロプラズマ原虫が赤血球に寄生することに起因する。病態が悪化すると、慢性的な貧血の持続や発育停滞が著明となり、育成牛では種付け時期の遅れ、乳牛における泌乳量の減少、あるいは妊娠牛における流産などが起こり、経済的損失は大きい。病態の主役をなす貧血の特徴として、末梢血中における原虫寄生率の高低と貧血の程度が必ずしも一致しないことがあげられる。野外では原虫寄生率が高いにもかかわらず、貧血が軽度なため軽症牛と判断される牛が存在し、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多くみられる。このことから、発病や病勢は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、感染牛の臨床状態は貧血の程度が重いほど不良となる。したがって、貧血の病態あるいは発生機構に対処した貧血の改善・防除策が確立できれば、赤血球の原虫寄生の状態にかかわらず、発病を阻止したり臨床症状の悪化を回避することが可能となる。

本研究では貧血の病態に焦点をあて、「小型ピロプラズマ原虫感染牛では原虫の寄生にかかわらず赤血球に著明な酸化傷害が起こり、マクロファージがこれらの酸化赤血球を認識・貪食することで血流中から排除する」という仮説を立て、実験感染牛の赤血球における細胞生化学的な解析を通じ、貧血機構の解明に取り組んだ。先行した研究から、貧血の発生時には原虫が寄生した赤血球だけでなく、原虫が寄生していない赤血球においても著明な寿命の短縮がみられ、このことが貧血を引き起こすと考えられてきた。この興味深い現象の発生について究明したところ、感染牛の赤血球には原虫寄生・非寄生を問わずに著明な酸化ストレスが負荷されること、すなわち活性酸素による酸化傷害赤血球の増加（ヘモグロビンや赤血球膜の酸化変性など）と赤血球の抗酸化能が低下することを見だし、酸化ストレスが貧血の発生や病態を悪化させる重要な要因であることを初めて明らかにした。

小型ピロプラズマ病の貧血を病態生理からみた場合、血管外溶血に分類される。血管外溶血とはさまざまな原因により、赤血球がその寿命（牛の正常な赤血球寿命は約160日）をまっとうすることなく、脾臓や肝臓を中心とする網内系組織（単球・マクロファージ系）に捕獲・貪食され、マクロファージ内で赤血球が破壊されることである。感



染牛における貧血の進行はきわめて急激であることから、貧血発生時の赤血球には単球・マクロファージ系に感知されやすくなるような、何らかの劇的な変化が起こっていることが予想された。以下からは、本稿の主題である感染牛の貧血発生時にみられる赤血球の変化と血流中からの排除について、酸化ストレスのかかわりから検討した概要を紹介する。

現在、血流中からの赤血球排除に関して、「赤血球表面にIgG性自然抗体が結合し、マクロファージによる結合IgG依存性の貪食が起こる」という機構が赤血球寿命にかかわる主要説として受け入れられていることから、実験感染牛におけるこの現象をフローサイトメトリーで調べた。その結果、貧血の発生前には赤血球へのIgG付着は低い値で推移していたが、貧血の発生時にはヘマトクリット（血球容積）値の低下に一致して著明なIgG付着の増加がみられ、貧血ピーク期にはIgG付着は最大値を示した。さらに、赤血球へのIgG抗体付着の詳細を解析するため、非感染（正常）牛から得た赤血球に人工的な酸化傷害（37℃、5%CO<sub>2</sub>下で48時間保存）を与え、酸化赤血球および同一牛の無傷赤血球に対し、自己の非感染血清および感染牛血清を反応（37℃、5%CO<sub>2</sub>下で30分間）させた。その結果、感染牛血清中のIgG抗体は無傷赤血球よりも酸化赤血球に多く付着することが明らかとなった。また、酸化赤血球に対するIgG付着を感染・非感染牛血清による違いで比較したところ、感染牛血清と反応させたときのIgG付着が、自己の非感染血清を反応させたときのIgG付着よりも高かった。これらから、感染牛の血清中には酸化赤血球に結合するIgG抗体が増加していること、さらに感染牛の赤血球に対してIgG付着が増加する要因のひとつとして、感染牛の末梢血中におけ

る酸化赤血球の増加が考えられる。

以上の自然抗体依存性の認識のほかに、抗体などの血漿成分を介さない直接的な認識機構として、「異常な細胞には貪食の目印となる分子が細胞表面に出現し、貪食細胞は特異的に標的細胞を認識する」という説が提唱されている。そこで、貪食目印分子のなかで最も解析が進んでいる細胞膜リン脂質ホスファチジルセリンに着目し、その発現状況を実験感染牛で調べた。フローサイトメトリーによる解析の結果、赤血球表面へのホスファチジルセリン発現は貧血の発生前にはほとんど認められなかったのに対し、貧血の発生時にはホスファチジルセリン発現の増加がみられた。さらに、感染牛の赤血球に弱い酸化ストレス（1.5% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>処理、37℃、90分間）を負荷するとホスファチジルセリン発現が著明に増加することも確認され、貧血発生時の赤血球は酸化ストレスに感受性の状態になっていることが判明した。

次に、慢性感染牛および非感染（正常）牛から末梢血マクロファージと赤血球を採取し、チェンバースライドシステムを用いてマクロファージによる自己および非自己に対する赤血球の貪食率を比較した。その結果、慢性感染牛から得たマクロファージによる赤血球貪食率は、非感染牛のマクロファージによる赤血球貪食率よりも明らかに高く、慢性感染牛におけるマクロファージの活性化が示された。また、新規の実験感染牛について、原虫の感染前後におけるマクロファージの赤血球貪食率を比較したところ、感染前は自己および非自己（非感染牛）の赤血球貪食率は低い値を示していた。しかし、感染後の貧血発生時には著明な赤血球貪食率の亢進がみられ、特に自己赤血球に対する貪食率が非自己赤血球の貪食率よりも高かった。これは、前述した赤血球の認識・貪食にかかわる赤

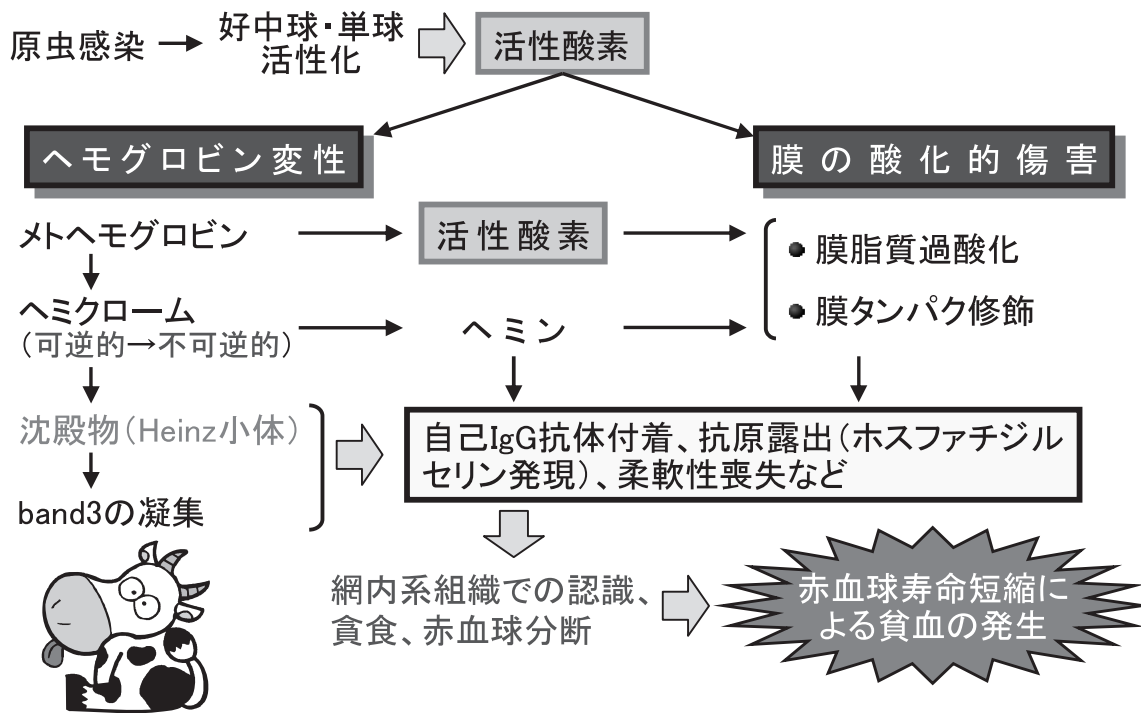


図 小型ピロプラズマ病の貧血機構

血球表面の変化（ホスファチジルセリンの発現、自己IgG抗体の付着）に基づいているものと考えられる。

血流中における赤血球寿命の短縮には、免疫機序を介する赤血球貪食だけではなく、物理的な溶血機序も重要な役割を演じている。そこで、実験感染牛の赤血球に超生体染色（ニュートラルレッド/ブリリアントグリーン二重染色）を行い、赤血球破壊の重要な指標となるHeinz小体（酸化変性したヘモグロビンの赤血球膜への不溶性沈殿物）の証明を試みた。その結果、貧血の進行に一致してHeinz小体の生成量が著明に増加することが明らかとなった。赤血球内にHeinz小体が生成すると変形能が低下し、血液の濾過装置である網内系組織を速やかに通過することができず、そこにいる貪食細胞によって認識・破壊される運命にある。溶血性貧血の原因として、Heinz小体形成性によるものは食餌因子や薬剤によるものが主体であり、家畜の感染症におけるHeinz小体の生成は初の報告例である。

これまでに述べた点および関連する研究成果を踏まえ、小型ピロプラズマ病の貧血機構を酸化ストレスのかかわりから考察すると、図に要約でき

る。まず、原虫感染によって貪食細胞が活性化し、活性酸素の産生と血流中への放出が起こる。活性酸素は原虫を死滅させるとともに赤血球に酸化傷害を与え、酸化赤血球は網内系組織における認識・貪食へと導かれる。感染牛の赤血球には血流中でさまざまな変化が起こっていると考えられるが、その変化を引き起こす大きな要因の一つは明らかに酸化ストレスである。感染牛では酸化傷害に基づく赤血球の変性が繰り返される結果、原虫の寄生・非寄生を問わずに赤血球寿命の短縮が起こり、貧血が引き起こされるものと理解される。

今後は感染牛の損耗を防止する技術を確認することを目的とし、「小型ピロプラズマ病における酸化ストレスの亢進を人為的に排除すること、さらに貧血に即効性のある薬剤を用いることで、本病の主病態である貧血を防除できる」という仮説を立て、これを検証することで放牧地における小型ピロプラズマ病の対策を効率的に実施できる体制の樹立に寄与したい。

稿を終えるにあたり、本研究を側面から支えていただいた動物衛生研究所北海道支所の技術専門職員ならびに関係者の皆様から心から感謝の意を表したい。