— Note —

Investigation of Nitroblue Tetrazolium Reduction of Neutrophils in the Dog Infected with *Hepatozoon canis*

Tomoaki MURATA, Reiko TAGAMI*, Makoto INOUE**, Yuji UZUKA*,
Yasuho TAURA, and Sanenori NAKAMA

Departments of Veterinary Surgery, *Veterinary Internal Medicine, and **Veterinary Pathology,
Faculty of Agriculture, Yamaguchi University, 1677-1 Yoshida, Yamaguchi-shi,
Yamaguchi 753, Japan

(Received 20 April 1993/Accepted 13 July 1993)

Investigation of nitroblue tetrazolium (NBT) reduction of neutrophils was performed in the dog infected with *Hepatozoon canis*. No positive reactions were observed in the parasitized neutrophils by the resting and the stimulated NBT reduction tests. However, results of resting and stimulated NBT reduction tests apparently made no differences between non-parasitized neutrophils of the infected dogs and neutrophils of the non-infected dogs. These findings show that the parasitized neutrophil has no oxidative bactericidal capacity and the infected dogs had no change in the host protective mechanism. —KEY WORDS : dog, *Hepatozoon canis*, neutrophil, nitroblue tetrazolium reduction test

Hepatozoon canis 感染犬における好中球の Nitroblue Tetrazolium 還元能の検討

村田 智昭・田上 礼子*・井上 誠**・宇塚 雄次*
田浦 保穂・中間 實徳

山口大学農学部家畜外科学教室

*山口大学農学部家畜内科学教室

**山口大学農学部家畜病理学教室

Hepatozoon canis のガモントについては形態学的な観察や寄生好中球の酵素活性の欠損に関する研究が報告されている [5, 8, 11, 12]。この好中球内酵素の欠損が広範に及べば生体にとって危機的な状態をもたらす事が考えられる。しかし、生体防御機構の上で重要な機能面についての *H. canis* 寄生好中球に関する研究はまだない。したがって今回、好中球の機能検査として Nitroblue Tetrazolium (NBT) 還元試験を行い、寄生好中球におけるこの還元能を調べるととも

に、寄生好中球の出現率が感染犬にどのような影響を与えるかを検討した。

供試犬として *H. canis* 自然感染犬15頭を用いた。また陰性対照群としては実験犬として隔離飼育している *H. canis* 非感染犬10頭を用いた。抗凝固剤として末梢全血 1 ml に対してヘパリン（ヘパリン注、ミドリ十字）10単位を使用した。

NBT 還元試験は Park の方法 [14] を原法にした伊藤らの変法 [6] を基に実施した。NBT 溶液は

Table 1. Results of nitroblue tetrazolium reduction test of the neutrophils

	neutrophils of <i>H. canis</i> infected dog		neutrophils of negative control dog
	parasitized	non-parasitized	
RESTING TEST			
positive rate(%)	0.0	54.3± 22.3 ¹⁾	47.5± 20.0
score	0.0	200.1±122.4	187.4±149.0
STIMULATED TEST			
positive rate(%)	0.0	76.3± 8.8	73.9± 6.7
score	0.0	428.1±132.6	435.3±130.4

1) : mean±S.D.

NBT (関東化学) を1/15M リン酸緩衝液 (pH 7.2) で 2 mg/ml の濃度に調整し, stimulated NBT 還元試験 (S 試験) には *Escherichia coli* 由来のエンドトキシン (LPS 0127 B8, Sigma) を生理食塩水溶液で 100 μ g/ml の濃度に調整した。resting NBT 還元試験 (R 試験) は次の方法で行った。37°C で 3 分間予備加温したプラスチック試験管を用い, 25 μ l の NBT 溶液に等量の生理食塩水溶液を加えたものによくかくはんした血液を 50 μ l 加え混合した後, 37°C で 15 分間そして室温で 15 分間反応させた。反応終了後, 試験管内容をよく混合して塗抹標本作製し, ライト染色を行った。S 試験では R 試験の生理食塩水溶液の代わりにエンドトキシン溶液を用い, R 試験と同様の方法で行った。

成績は好中球細胞質内のフォルマザン形成を観察し, 朝長の方法 [16] を参考にガモント寄生好中球ならびに 100 個の非寄生好中球に対する細胞質内にフォルマザン沈着を呈した陽性細胞を分類し, そして 0 型 a %, I 型 b %, II 型 c %, III 型 d %, IV 型 e % とした時, 陽性率 = 100 - a %, スコア = b + 4c + 9d + 16e とした。

また, ガモント寄生率は常法により作製した末梢血液塗抹標本をギムザ染色し, 白血球 2,000 個におけるガモント寄生白血球数をカウントし, 算出した。白血球数は自動血球計数装置 (CC-110, Sysmex, Tokyo) により測定した。

検定には Student-t 検定を用い, 危険率 5% 以下を有意差があるとした。

15 頭の *H. canis* 感染犬から計 101 個のガモント寄生好中球を検査したが, R 試験および S 試験において陽性化したものはまったく認められなかった。

また, *H. canis* 感染犬における非寄生好中球の R

および S 試験, ならびに陰性対照群の好中球の R および S 試験の成績は表の通りであった (Table 1)。R および S 試験における陽性率およびスコアとも *H. canis* 感染犬の非寄生好中球と陰性対照群の好中球との間には有意差は認められなかった。

H. canis 感染犬の白血球数は 13,500±3,700/ μ l, 陰性対照群の白血球数は 11,770±1,800/ μ l であったが, 有意差は認められなかった。

H. canis のガモント寄生率は平均 1.4% (0.1-12.4%) であった。

H. canis のガモントが寄生する犬の好中球にはパーオキシダーゼ, エステラーゼやフォスファターゼが欠損している事が報告されている [5,8,12]。これらの事から *H. canis* 感染犬においては生体防御の上で重要な位置を占める好中球の機能障害が推察される。本研究によりガモント寄生好中球は NBT 還元能が全く消失している事が認められた。つまりガモント寄生好中球は好中球の本来持っている機能を失っているものと考えられた。ガモント寄生好中球は, *H. canis* のガモントの寄生により殺菌能を消失した状態で血流中に存在していると考えられた。機能消失の機序としては, 我々は好中球の成熟段階での寄生により酵素の蓄積ができなかったのではないかと考えており [12], よって同様に寄生が成熟段階のため酸化的殺菌能もほとんど発現しないのではないかとと思われる。この点に関しては今後の検討課題であろう。

本研究から宿主側からみるとガモント寄生好中球数が増加する事, つまり多数の感染や何等かのトリガーによってシゾグニーの活性化等が起これば宿主にとって生体防御機構の一つである好中球の殺菌能の低下を起こし, 危機的な状態になってしまう事が推察された。

一般には、異物であるガモント寄生により好中球から活性化因子の誘導等を引き起こす事が考えられる。本研究においても陰性対照群と比較して、*H. canis*感染犬の非寄生好中球のNBT還元試験の多くの項目の成績が高くなった事や白血球数が多くなった事は、わずかながらでも寄生好中球における白血球活性化因子の産生やコロニー刺激因子産生が誘導されている事によるものかも知れない。

本研究においては、ガモント寄生率の最も高い個体でも全白血球数の12.4%であった。この個体では臨床的には何ら異常を認めず、非感染好中球のNBT還元試験成績における陽性率並びにスコアおよび白血球数は陰性対照群の平均値とほぼ同じであった。この成績が有意差を認めなかったのは活性化機構を誘導できなかったのか、あるいは逆に抑制する機構を誘導しているのかも知れない。

*H. canis*感染症において、ガモントの好中球寄生率が臨床症状発現に何等かの示唆を与えるものかどうかは、本研究では明らかにできなかったが、この感染症に関してもっと多くの症例を集めて検討する事は非常に重要であろう。

*H. canis*感染症は世界中に広がる原虫性疾患の一つである[1-4,7,9,13,15]。日常の臨床では*H. canis*感染犬と遭遇する機会は極めて少ないが、最近我々がわが国において行った感染調査では約7.9%の感染率であった[10]。そのほとんどの症例においてガモント寄生好中球数は本研究と同じくらいの低い出現率であった。実験用として隔離飼育されている犬にはまず寄生しているとは考えにくい、非常に低い寄生率のため見逃され易いという事をここで強調しておきたい。

要 約

Hepatozoon canis 自然感染犬における好中球の

NBT還元試験を行った。ガモント寄生好中球はresting および stimulated NBT還元試験とも全く陽性化を認めなかった。*H. canis*感染犬のガモント非寄生好中球のresting および stimulated NBT還元試験における陽性率並びにスコアは非感染対照群と比較して有意差を認めなかった。以上の成績からガモント寄生好中球は酸化的殺菌能を消失していたが、感染犬の防御機能にはほぼ異常がない事が示された。

文 献

- [1] Bentley, C. A. (1905). *Br. Med. J.*, **6**, 988.
- [2] Carlos, E. T., Atienza, L. M., and Cabiles, C. C. (1971). *Philipp. J. Vet. Med.*, **10**, 181-189.
- [3] Craig, T. M., Smallwood, J. E., Knauer, K. W., and McGrath, J. P. (1978). *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, **173**, 967-972.
- [4] Elias, E. and Homans, P. A. (1988). *J. small Anim. Pract.*, **29**, 55-62.
- [5] Ibrahim, N. D. G., Rahamathulla, P. M., and Njoku, C. O. (1989). *Int. J. Parasitol.*, **19**, 915-918.
- [6] 伊藤直之・伊藤さや子(1991). 日獣会誌, **44**, 1034-1036.
- [7] McCully, R. M., Basson, P. A., Bigalke, R. D., Vos, V. D., and Young, E. (1975). *Onderstepoort J. Vet. Res.*, **42**, 117-134.
- [8] Mercer, S. H. and Craig, T. M. (1988). *Vet. Clin. Pathol.*, **17**, 63-65.
- [9] Murata, T., Shiramizu, K., Hara, Y., Inoue, M., Shimoda, K., and Nakama, S. (1991). *J. Vet. Med. Sci.*, **53**, 1097-1099.
- [10] 村田昭智・網本昭輝・白水完治・原 行雄・井上 誠・鹿江雅光・宇塚雄次・田浦保穂・中間實徳(1993). 日獣会誌, **46**, 395-397.
- [11] Murata, T., Inoue, M., Kanoe, M., Horio, M., Shimada, M., Yokoyama, M., Taura, Y., and Nakama, S. (1993). *Jpn. J. Trop. Med. Hyg.*, **21**, 107-110.
- [12] Murata, T., Inoue, M., Kanoe, M., Kono, Y., Horio, M., Shimada, M., Yokoyama, M., Taura, Y., and Nakama, S. *J. Vet. Med. Sci.*, (in press).
- [13] Ogunkoya, A. B., Adeyanyu, J. B., and Aliu, Y. O. (1981). *J. small Anim. Pract.*, **22**, 775-777.
- [14] Park, B. H., Fikrig, S. M., and Smithwick, E. M. (1968). *Lancet*, **2**, 532-534.
- [15] Rajamanickam, C., Wiesenhuber, E., and Hamid, J. (1984/85). *Vet. Parasitol.*, **17**, 151-157.
- [16] 朝長万左男(1976). 臨床血液, **17**, 1266-1275.