牛の Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による赤血球浸透圧抵抗性

鈴木 實^{*1)} 豊澤敬一郎^{*1)} 七條喜一郎^{*1)} 遠藤喜久^{*2)} 渡部恭正²⁾

(昭和 56 年 11 月 20 日受理)

Osmotic Fragility of Erythrocytes in Cattle Determined by Coil Planet Centrifugation
MINORU SUZUKI (Faculty of Agriculture, Tottori University, Tottori 680) et al.

SUMMARY

Osmotic fragility of erythrocytes was estimated by coil planet centrifugation (CPC). In cattle free from Piroplasma infection and abnormal hematological findings, it was 122.5 ± 6.8 , 99.9 ± 7.3 , and 84.0 ± 5.4 mOsm as HSP, HMP, and HEP, respectively, regardless of age.

In cattle infected with Piroplasma (卅), HEP was higher in level, but the range of hemolysis was lower than in those free from the infection. Raising cattle exhibited low levels of HSP and HMP at 5 months of pasturing and almost the same levels of them as those reared in the barn at 7 months of pasturing. The estimation of osmotic fragility of erythrocytes by CPC was considered to be useful for the clinical diagnosis of hematological disease in cattle and health administration of cattle reared in the pasture.

要 約

牛 (ホルスタイン種) の赤血球浸透圧抵抗性 (血球抵抗) を Coil Planet Centrifuge (CPC) 法で測定した。その結果、CPC 法による牛の溶血曲線は M タイプ、L タイプ、R タイプおよび T タイプに分類されたが、各タイプと血液性状 (赤血球数、白血球数、ヘマトクリット値、血清タンパク成分、血清無機物質) およびピロプラズマ感染との関係は明らかでなかった。

ピロプラズマ非寄生舎飼い牛の血球抵抗性は最小抵抗値 (HSP) が 122.5 ± 6.8 mOsm、極大溶血値 (HMP) は 99.9 ± 7.3 mOsm、最大抵抗値 (HEP) は 84.0 ± 5.4 mOsm であり、明らかな年齢差は認められなかった。

ピロプラズマ感染牛 (卅) の血球抵抗性は HEP が非寄生牛に比べて高い値を示し、溶血幅は非寄生牛よりも低値であった。

放牧育成牛の HSP および HMP は放牧 5 カ月後まで低い値であったが、7 カ月後には増加して、ほぼ舎飼い牛の値となった。

以上の結果から CPC 法による血球抵抗性の測定は、牛の血液疾患の臨床診断および放牧牛の健康管理面に応用し得るものと思われる。

Coil Planet Centrifuge (CPC) 法は種々な溶液をコイル (内径 0.5mm、長さ 3m のポリエチレン製チューブをアクリル製の棒に巻きつけたもの) に封入しておき、その溶液中を細胞やその他の顆粒状物質を移動させる特殊な遠心装置である。本装置は主に赤血球の浸透圧抵抗性 (血球抵抗性) の測定に応用され、ヒトの溶血性貧血の診断や^{4,9)}、肝・胆道疾患の経過観察^{1,18,19)}、あるいは腎透析における適正透析療法の指標¹²⁾として利用されている。また、この CPC 法は、マウス、ラットおよびウサギなどの実験動物にも応用されているが^{3,16,20)}、家畜動物についての報告は少なく、佐藤ら¹³⁾、本好ら¹⁰⁾がイ

ヌについて報告しているにすぎない。そこで、今回著者らは CPC 法を牛の血球抵抗性の測定に応用する目的で、舎飼い牛および放牧育成牛について CPC 法を検討したので、その結果を報告する。

1. 実験方法

実験にはホルスタイン種の舎飼い雌牛 68 頭 (0.5~10 才) および放牧育成雌牛 10 頭 (1 才) を供試した。供試動物からの採血は、ヘパリン処理を施した真空採血管を用いて、外頸静脈より行った。

血球抵抗性の測定は三鬼エンジニアリング KK 製の CPC 装置で行い、食塩水の濃度勾配が 3~150 mOsm のコイルを使用した。なお、血球抵抗性の測定と同時に赤

*1) 鳥取大学農学部 (鳥取市湖山町南 4-101)

*2) 鳥取県鳥取家畜保健衛生所 (鳥取市国安 210)

血球数, 白血球数, ヘマトクリット (Ht) 値, 血清総タンパク量, 血清タンパク分画, 血清無機物質 (Na, K, Ca, Mg, Fe, Cu, Zn) およびピロプラズマ原虫の検査を行い, CPC 法による血球抵抗性とこれらの血液性状との関係について検討した。

2. 実験成績

1) CPC 溶血曲線と血液性状

舎飼い牛の血液性状は各測定項目ともとくに異常な値は認められなかった。しかし舎飼い牛のうち約半数例 (33 頭) にピロプラズマ原虫の寄生が認められた。

舎飼い牛の CPC 溶血曲線を 4 つのタイプに分類して図 1 に示した。すなわち溶血極大点 (HMP) が最小抵抗値 (溶血開始点, HSP) と最大抵抗値 (溶血終了点, HEP) の中央に位置するものを M タイプとし, HMP が左 (高浸透圧側) に偏位したものを L タイプ, HMP が不明瞭で台型をしたものを T タイプ, HMP が右 (低浸透圧側) に偏位したものを R タイプとして分類した。M, L および R の各タイプには, 溶血曲線が単峰性あるいは多峰性を示す例がみられたが, T タイプにおいて

は全例とも多峰性であった。これらの各溶血タイプおよび単峰性, 多峰性と血液性状の関係は明らかでなく, またピロプラズマ原虫の寄生率との関連も明らかでなかった (表 1)。

2) 健康牛の血球抵抗性

血液性状にとくに異常な値がみられず, また, ピロプラズマの寄生が認められなかった舎飼い牛の血球抵抗値を年齢別に表 2 に示した。小数例のため明らかでないが, 牛の血球抵抗値は年齢差が少なく, 平均値において, HSP は 122.5 mOsm, HMP は 99.9 mOsm, HEP は 84.0 mOsm, HW は 38.2 mOsm であった。

3) ピロプラズマ寄生牛の血球抵抗性

舎飼い牛の血球抵抗性をピロプラズマの寄生率により分類 (石原の方法⁵⁾) した。表 3 にみられるように, ピロプラズマ寄生 (+) 群および (++) 群の HSP, HMP, HEP および HW は非寄生 (-) 群と有意な差を示さなかったが, (++) 群の HEP は (-) 群よりも高い値を示し, HW は (-) 群よりも低い値であった ($P < 0.05$)。

4) 放牧育成牛の血液性状および血球抵抗性

供試動物は 1979 年の 3 ~ 4 月に出生した子牛で, 同

図 1 CPC 法による舎飼い牛の溶血曲線

牛の Coil Planet Centrifuge (CPC) 法による赤血球浸透圧抵抗性

表1 牛の CPC 溶血曲線のタイプ別 CPC 値および血液性状

溶 血 パ タ ー ン		M	L	T	R
動 物 数		26 単(10) 複(16)	6 単(2) 複(4)	21 単(0) 複(21)	13 単(4) 複(9)
ピロプラズマ寄生率 (%)		65.3	50.0	57.1	46.1
CPC 値 (mOsm)	{HSP HMP HEP HW	120.2±6.5	122.6±8.9	123.3±4.6	122.0±5.9
		101.4±5.8	105.3±9.7	102.8±7.2	95.8±5.0
		83.8±4.7	86.0±7.3	85.3±5.9	83.3±3.6
		36.2±5.3	36.6±5.8	38.1±6.5	38.6±3.8
赤 血 球 数		567.3±105.0	527.5±63.7	527.5±40.0	517.1±72.8
白 血 球 数		8,020±2,020	9,180±3,610	9,100±1,890	7,140±1,940
ヘマトクリット値 (%)		30.8±3.8	29.5±1.7	29.5±3.6	30.6±3.0
血清総タンパク量 (mg/dl)		6.9±0.7	7.0±0.5	7.0±0.5	6.7±0.6
タンパク分画 (%)	{Alb α-glob β-glob γ-glob	40.5±6.3	41.8±5.6	41.1±5.9	43.3±3.2
		13.9±2.2	13.7±2.1	12.7±3.1	14.4±2.0
		10.1±3.5	10.4±3.3	9.9±3.0	10.3±2.8
		35.1±8.2	33.7±5.5	35.4±6.9	31.7±4.5
血清無機物質	{Na (mg/dl) K " Ca " Mg " Fe (μg/dl) Cu " Zn "	294.4±38.9	275.3±49.4	294.4±45.3	284.2±37.2
		20.3±4.1	20.2±3.8	19.2±3.2	20.6±2.2
		11.8±1.8	11.8±0.9	11.3±0.7	11.6±0.9
		2.3±0.2	2.2±0.4	2.3±0.2	2.3±0.1
		62.0±16.2	70.3±24.3	64.0±18.9	79.3±63.0
		25.6±7.5	24.8±5.3	27.0±8.1	23.5±10.2
		50.3±10.7	47.8±11.1	52.9±9.8	48.8±10.5

注) 単:単峰性 複:多峰性 (平均±SD)

表2 CPC 法による舎飼い牛の血球抵抗値

年 齢	動物数	血 球 抵 抗 値 (mOsm)			
		HSP	HMP	HEP	HW
0~1	3	119.1	102.6	85.3	33.8
1~2	3	123.0	100.0	87.0	36.0
2~3	8	121.7	98.3	83.0	38.7
3~4	5	123.4	100.0	83.8	39.6
4~5	3	122.3	103.0	87.0	33.3
5~6	2	121.5	100.5	80.0	41.5
6~10	3	122.0	96.6	81.6	40.3
平均±SD	28	122.5±6.8	99.9±7.3	84.0±5.4	38.2±6.2

表3 ピロプラズマ感染牛の CPC 値

(平均±SD)

ピロプラズマ 寄生率	動物数	CPC 値 mOsm			
		HSP	HMP	HEP	HW
—	26	122.0±6.6	100.2±7.6	83.8±4.9	38.6±6.3
+	13	120.2±6.8	99.6±6.6	82.0±5.2	38.1±5.3
++	16	123.6±4.4	104.2±6.6	86.5±4.5	37.1±5.1
+++	4	118.0±4.0	102.0±3.8	87.2±3.2*	30.7±1.5*

注) * P<0.05

年12月にピロプラズマ感染牛の保存血液を注射した後、翌年4月に放牧したものである。血球抵抗および血液性状の測定は放牧後2カ月目から7カ月後まで毎月1回行った。その結果、全実験期間を通じて、全例にピロプラズマの寄生(卅)がみられ、赤血球数およびHt値は同年齢の舎飼い牛の値よりも低値であった(図2)。

放牧牛の血球抵抗性はHSPが放牧2カ月目から4カ月後まで低値を示し、以後増加して、7カ月後にはほぼ舎飼い牛と同じ値になった(図3)。またHMPも5カ月後まで低い値であったが、7カ月後には増加した。し

かし、HEPには明らかな変動がみられず、全実験期間中舎飼い牛と有意な差を示さなかった。

3. 考 察

血球抵抗値は溶血性疾患をはじめ、多くの疾病において変動するが、従来のParpart法などによる測定方法は赤血球の最大抵抗値および最小抵抗値の判定が困難であり、血球抵抗性を50%溶血値で比較検討した報告が多い^{7,11,15}。

今回著者らの行ったCPC法は1966年にItoら⁹によって開発された特殊な遠心装置を用いる方法である。この方法は操作が簡単でしかも少量の血液で正確にHSP, HMP, HEPおよびHWの測定ができ、また浸透圧抵抗性を異にする赤血球の分布状態を細かく検討できる利点を有している。

今回、CPC法を牛の血球抵抗性の測定に応用したところ、血液性状に異常の認められない舎飼い牛において、溶血曲線が多峰性を示す例が多数みられた。この溶血曲線が多峰性になる原因としては、血球抵抗性を異にする赤血球の分布異状、供試血液の凝固、血小板数の増加あるいは白血球数の増加などが報告されている⁹。本実験に供試した血液には凝固が認められず、また白血球数にもとくに異常な値は認められなかった。このことから、本実験におけるCPC溶血曲線が多峰性は赤血球自身の浸透圧抵抗性の分布異常によるものであらうと推測される。しかしCPC法の測定操作条件(抗凝固剤、コイルの食塩水濃度勾配、コイルの加温条件、遠心時間など)が溶血曲線に及ぼす影響などについても考慮する必要がある、このことについてはさらに検討したいと考えている。

ヒトのCPC溶血曲線をHMPの位置により分類すると、健康なヒトの血球はLタイプを示し、肝硬変ではMタイプ、肝臓ではRタイプ、閉塞性黄疸ではTタイプを示すことが多いと報告されている¹⁰。本実験の舎飼い牛のCPC溶血曲線はMタイプ(39.3%)、Tタイプ(31.8%)、Rタイプ(19.6%)、Lタイプ(9.0%)に分類されたが、これらの各溶血タイプとピロプラズマ寄生率および各血液成分との関係は明らかでなかった。しかし、今後、牛の種々な疾病についてCPC法で検討することにより、CPC溶血タイプと疾病との関係が明らかになるものと思われる。

健康牛の血球抵抗性についてはParpart法などで多くの研究がなされており、骨髓から遊出した直後の赤血球は血球抵抗性が強く、また5カ月齢以下の子牛の血球は成熟牛よりも抵抗性が強いと報告されている¹⁴。しかし、牛の血球抵抗性をCPC法で検査した報告はなされておらず、今回著者らの行ったCPC法による1~10才の血球抵抗値はHSPが $122.5 \pm 6.8 \text{ mOsm}$ 、HMPが 99.9

図2 放牧牛の血液性状

図3 放牧牛のCPC法による血球浸透圧抵抗値

±7.3 mOsm, HEP が 84.0±5.4 mOsm であった。

高橋ら¹⁷⁾は牛のピロプラズマ感染症において、原虫の寄生数の増加に伴って、赤血球の最小抵抗値が増加することを報告した(低張食塩水法)。しかし本実験の CPC 法ではピロプラズマ寄生(Ⅲ)群において、HSP には大きな変化はみられないが、HEP に明らかな増加がみられた。ピロプラズマ原虫が赤血球を脆弱化させるメカニズムについては明らかでないが、高橋ら¹⁷⁾は、ピロプラズマ原虫の寄生数の増加に伴って、血清磷脂質が低下することを認め、血清磷脂質が赤血球基質の磷脂質と相関関係にある²⁾ことから、ピロプラズマ原虫が血球膜磷脂質に影響を与えるための変化であろうと推論している。いっぽうヒトの血球において、赤血球膜の磷脂質は血球抵抗性とは関係なく、血漿コレステロールエステルおよび血球膜コレステロールが血球抵抗性に関与するとの報告もある²⁾。いずれにしても、これらの報告から考えて、血球抵抗性には脂質代謝が関与しているものと思われ、CPC 測定と合わせて血清および血球膜の脂質の動向についても検討する必要がある。

子牛を放牧する場合、放牧数カ月後に貧血症状を呈することが多く、著明な赤血球数および Ht 値の減少がみられる。この貧血の原因についてはピロプラズマ感染、あるいは環境の変化に伴う一時的な栄養障害などが大きな原因とされている。本実験においても全例にピロプラズマ感染(Ⅲ)がみられ、赤血球数および Ht 値は全実験期間を通じて低い値を示した。

放牧育成牛の CPC 法による血球抵抗性は、HSP が放牧後 2～4 カ月間低い値を示した後、5 カ月目より漸増して、7 カ月後には舎飼い牛とほぼ同様な値を示した。この 5 カ月目以降の HSP の増加は放牧牛が飼育環境に順応したための変化であろうと推察される。また、この時期に赤血球数および Ht 値が低値であったにもかかわらず、HSP の増加がみられたことは HSP の変化が赤血球数および Ht 値の変動よりも先に起こるためであろうと考えられる。

以上述べたように、本実験では外見上健康で血液性状

に異常のみられなかった牛および放牧育成牛について CPC 法で血球抵抗性を検討したが、今後、種々な疾病について検討することにより、CPC 測定値および CPC 溶血曲線と疾病の関係が明らかになるものと思われる。

[本論文の要旨は第 92 回日本獣医学会(1981 年 9 月)で発表した。]

文 献

- 1) 安藤 喬, ほか: 日消会誌, 74, 329～339 (1977).
- 2) DIMOPOULLOS, G. T. and DAVID, M. A.: *Amer. J. Vet. Res.*, 23, 820～831 (1962).
- 3) 後藤 健, ほか: 日歯麻酔誌, 6, 7～13 (1978).
- 4) HARADA, R., et al.: *Jpn. J. Physiol.*, 19, 306～314 (1969).
- 5) 石原忠雄: 家畜伝染病の診断, 農林省家畜衛生試験場技術者集談会編, 707～711, 文永堂, 東京 (1965).
- 6) ITO, Y., et al.: *Nature*, 212, 985～987 (1966).
- 7) JAIN, N. C.: *Cornell Vet.*, 63, 411～412 (1973).
- 8) 川越裕也: 検査と技術, 5, 765～771 (1977).
- 9) 黒川一郎, ほか: 総合臨床, 27, 2200～2204 (1978).
- 10) 本好茂一, ほか: 第 91 回日本獣医学会講演要旨, 32 (1981).
- 11) PERK, K., et al.: *Amer. J. Vet. Res.*, 25, 1241～1248 (1964).
- 12) 酒井信治, ほか: 腎と透析, 5, 9～12 (1978).
- 13) 佐藤 剛, ほか: 第 83 回日本獣医学会講演要旨, 108 (1977).
- 14) SCHALM, O.W., et al.: *Veterinary hematology*, 3rd edition 127～128, Lea and Febiger, Philadelphia (1975).
- 15) SOLIMAN, M. K., et al.: *Vet. Rec.*, 78 429～430 (1966).
- 16) 鈴木 實, ほか: 日獣誌投稿中.
- 17) 高橋清志, ほか: 日獣会誌, 26, 279～284 (1973).
- 18) 山本晋一郎, ほか: 医学のあゆみ, 103, 508～510 (1977).
- 19) 山本晋一郎, ほか: 日消会誌, 75, 1735～1743 (1978).
- 20) 柳浦才三, ほか: 日薬理誌, 75, 117～126 (1979).