Role of Antibody Detected by the Indirect Fluorescent Antibody Test in the Clinical Signs of Cattle Infected with *Theileria sergenti*

Kiyoshi TAKAHASHI and Seiryō YAMASHITA

Department of Veterinary Medicine, College of Dairying,
Nishinopporo, Ebetsu-shi, Hokkaido 069-01

Yukio SHIMIZU

National Institute of Animal Health, Kodaira-shi, Tokyo 187

(Received for publication March 20, 1975)

Abstract. The antibody titer measured by the indirect fluorescent antibody (IFA) test rose rapidly with the appearance of *Theileria sergenti* in the peripheral blood of infected cattle. When it reached a peak, the number of parasites tended to decrease gradually until 60 days after infection. Of two splenectomized calves infected experimentally with *T. sergenti*, one died of severe piroplasmiasis on the 25th day postinoculation, without antibody developed. Two animals which had recovered from experimental or natural infection resisted challenge inoculation. When calves were treated with synthetic corticosteroid 2 months after infection with *T. sergenti*, a recrudescence of infection was observed. No fluctuations in antibody titer were shown during the corticosteroid treatment.

It seemed that humoral factor might play an important role in the immune mechanism of cattle infected with *T. sergenti*, and that cell-mediated immunity might also be related with the relapse of infection.

Theileria sergenti 感染牛の螢光抗体間接法によって 検出される抗体と症状の関係

高橋清志・山下正亮

酪農学園大学家畜内科学教室

清水悠紀臣

家畜衛生試験場

Theileria sergenti 感染から回復した牛は以後、再感染しても発症することは少ない。石原 [3] は凍結保存した原虫寄生血液を放牧前の牛に接種し、感染耐過後、汚染牧野に放牧しても発病率が低く、予防効果があったと報告している。しかしその根拠となる免疫機構については触れていない。この研究では、*T. sergenti* 感染による小型ピロプラズマ病の感染免疫を明らかにする目的で、螢光抗体間接法による抗体の推移と感染牛の症状の関係について検討した。

材料および方法

1. 原虫株：実験感染に用いた原虫は、北海道千歳市市営牧野の自然感染牛から分離し、酪農学園大学において実験牛で継代した原虫株である。実験には、その新鮮血液を生理食塩液で3回洗浄して、血漿、白血球および血小板を除去したものを使用した。なお、この原虫株は、大型ピロプラズマやアナプラズマの混入がなく、螢光抗体間接法による比較では、家畜衛生試験場九州支場より分与を受けた *T. sergenti* (ソ連株) と抗原性

Fig. 1. Parasitemia and antibody responses following experimental infection with *Theileria sergenti*

Remarks.

- : Number of parasites.
▲——▲: Antibody titer.

に差がなかった。

2. 試験牛: 実験感染に用いた牛は合計11頭で、すべて7カ月齢以下のホルスタイン種の雄であった。上記の実験感染牛のほか、放牧経験のない2~6才のホルスタイン種の雌10頭を *T. sergenti* 汚染牧野に放牧し、自然感染させたものと、自然感染に耐過した2才のジャージ種1頭 (No. 100) を用いた。

3. 試験牛の処置と観察法: 試験牛は実験の目的に従って4グループに区分した。原虫の接種および薬剤投与後、原虫寄生率、赤血球容積および抗体価を経時的に測定した。

a. *T. sergenti* 寄生率の測定: 血液の薄層塗抹標本をギムザ染色し、赤血球1,000個中の原虫寄生赤血球数を寄生率として表わした。

b. 抗体価の測定: 前報で著者らが実施した方法[7]で行なった。すなわち、*T. sergenti* の多数寄生した血液を pH 7.2 の 0.01 M リン酸緩衝食塩液 (PBS) で3回洗浄して、血小板と白血球を除去した赤血球浮

遊液を蛍光抗体用カバーガラスに塗抹した。風乾後、冷アセトンで10分間固定した。5分間 PBS (pH 7.2) で洗浄した後、一次抗体 (PBS で2倍階段希釈した被検血清) を 37°C 30分間作用させ、15分間 PBS で洗浄した。ついで二次抗体 (Fluorescein isothiocyanate 標識抗牛ウサギ γ -グロブリン) を 37°C で30分間作用させ、15分間 PBS で洗浄し、pH 9.0 の緩衝グリセリンで封入した後鏡検した。赤血球内における原虫の特異的蛍光の観察が可能な最高希釈の逆数を抗体価とした。

c. 赤血球容積: (packed cell volume, PCV) の測定 高速遠心器による毛細管法で実施した。EDTA-2Na で凝固防止した血液を毛細管 (内径 1.8 mm, 長さ 75 mm) に 2/3 までとり、一端を溶封し、11,000 回転5分間遠心分離して PCV を求めた。

成績

1. 実験感染牛における原虫および抗体の推移

Fig. 2. Packed cell volume, parasitemia and antibody responses of two splenectomized calves following experimental infection with *Theileria sergenti*

Remarks.

- : Number of parasites.
- ▲---▲: Antibody titer.
- : Packed cell volume.

T. sergenti 未感染子牛10頭に感染赤血球を用いて、原虫 $1.4 \sim 1.5 \times 10^{10}$ 個を静脈内に接種した。この10頭のうち2頭 (No. 43 および No. 82) では、原虫接種前に摘脾手術を実施した。すなわち右横臥に保定し、一般開腹手術の術式に従って、左臍部を最後肋骨にそって切開し、脾臓を摘出した。

T. sergenti を接種した10頭の子牛において、60日目までの原虫寄生率と抗体価の推移を調べ、Fig. 1 および Fig. 2 に示した。Fig. 1 は無処置牛、Fig. 2 は摘脾牛の所見である。無処置牛の原虫寄生率の推移は、接種した月齢によって差が見られた。生後1カ月以内に接種した No. 86, 87, 88 では、20日目にピークがあり、4カ月齢以上の No. 89, 114, 115, 119, 120 では30~45日目にピークがあった。しかし寄生率のピークの高さには大きな差がなかった。

無処置牛における抗体価の推移には、やや個体差はあったが、全体として寄生率の上昇に伴い抗体価も上昇し、20~40日目でピークに達し、60日目まで1,280倍以上の抗体価を持続した。抗体価がピークに達すると、寄生率は低下し、貧血も著明に回復した。しかし原虫は末梢血中から消失しなかった。

摘脾牛 (No. 82 および No. 43) の寄生率は、20日

目まで20個以下であったが、それ以後急激に上昇し、25と35日目にピークに達した。寄生率のピークの高さは226と293個で、無処置牛に比べ高かった。抗体は、耐過した No. 82 では20日目以降に上昇したが、無処置牛の抗体産生に比較してかなり遅く、かつそのピークも低かった。また、死亡した No. 43 では、全経過を通じて抗体が検出されなかった。

2. 自然感染発症牛の治療に伴う抗体の推移

初放牧で自然感染し発生した瀕死の重症牛10頭に、以下のような治療を行ない、その回復の経過を観察した。治療は油性パマキン (2 ml)、または水溶性プリマキン (10~30 ml) を2~5日間隔で1~3回投与し、さらに効果の認められないものには、ガナゼック 2.5~3.5 g を1~2回投与した。対症療法として、症状に応じ6~19日間、ブドウ糖液 500~1,000 ml、メチオニン製剤 100 ml、ビタミン B₁ 剤 20 ml および安息香酸ナトリウムカフェイン注射液 20 ml を投与した。さらに健康牛の血液を1,000~3,000 ml、1~3回輸血した。

10頭の治療経過に伴う PCV、寄生率および抗体価の平均値の推移を Fig. 3 に示した。治療前 PCV は $13.4 \pm 2.7\%$ であったが、全牛の治療を中止した19日

Fig. 3. Changes in antibody titer, parasitemia and packed cell volume during treatment against *Theileria sergenti*

Remarks.

- : Number of parasites.
- ▲---▲ : Antibody titer.
- : Packed cell volume.

Fig. 4. Responses of experimentally or naturally infected calves before and after challenge inoculation with *Theileria sergenti*

Remarks.

- : Number of parasites.
- ▲---▲ : Antibody titer.
- : Packed cell volume.

後には $21.4 \pm 3.6\%$ に、さらに 144 日後に $31.1 \pm 4.4\%$ となった。原虫寄生率は、治療前 169 ± 141 個であったが、19 日後には 47 ± 32 個となり、144 日後には 16 ± 9 個に減少した。抗体価は治療開始時 1,280~

10,240 倍で、19 日後に 2,560~40,960 倍となり、144 日後は 2,560~10,240 倍とやや低下した。

3. 感染耐過牛の再攻撃試験

実験感染耐過牛 (No. 85) および自然感染耐過牛

Fig. 5. Changes in antibody titer, parasitemia and packed cell volume during and after corticosteroid treatment of calves previously inoculated with *Theileria sergenti*

Remarks.

$\Downarrow$: Predonisolone, 0.7 mg/kg im.

$\downarrow$: Dexamethasone, 0.1 mg/kg iv.

$\bullet$ --- $\bullet$: Number of parasites.

$\blacktriangle$ --- $\blacktriangle$: Antibody titer.

$\circ$ --- $\circ$: Packed cell volume.

(No. 100) に対して、80~185 日の間隔で 2 回、それぞれ感染赤血球を用い、 1.2×10^{10} 個の原虫を接種して攻撃した。Fig. 4 にその結果を示した。*T. sergenti* 未感染牛である No. 85 の第 1 回目の接種に対する反応として、寄生率の増加に伴い、PCV の低下および抗体価の急激な上昇が起こった。第 1 回目の接種から 185 日後には、寄生率は 5 個以下に低下したが、抗体価は 1,280 倍を維持し、PCV は 25% 前後に回復していた。

この牛に再攻撃したところ、抗体価は 1,280 倍から 2,560 倍に上昇し、原虫寄生率および PCV はわずかに動揺したに過ぎなかった。さらに 130 日後の攻撃でも、寄生率および抗体価が軽度には上昇した以外、変化なかった。No. 100 は自然感染耐過牛で、攻撃時寄生率は 5 個以下となり、貧血は完全に回復していた。約 80 日の間隔で 2 回攻撃したが、抗体価、寄生率および PCV に著変を認めなかった。

4. 副腎皮質ホルモン剤投与による再発試験

摘脾牛 (No. 82) に *T. sergenti* を接種して、耐過

した 160 日後、プレドニソロンを 0.7 mg/kg ずつ、9 日間投与した。第 1 回目の投与後 116 日目に、同量のプレドニソロンを 10 日間投与した。また無処置の子牛 2 頭 (No. 119 および No. 120) に、 1.4×10^{10} 個の原虫を感染赤血球を用いて接種し、58 日後 1 頭 (No. 120) にデキサメサゾン (Dexamethasone) を 0.1 mg/kg ずつ、7 日間静脈内に投与した。1 頭 (No. 119) は薬剤を投与せず、対照とした。これらの実験感染牛は、副腎皮質ホルモン投与開始時に PCV が 20% 前後と低かったこと以外、臨床的に異常はなかった。

副腎皮質ホルモン投与による抗体価、寄生率および PCV の変化を Fig. 5 に示した。摘脾牛 (No. 82) に 2 度にわたってプレドニソロンを投与したが、投与中抗体価は変化せず、投与翌日から寄生率は急激に上昇した。寄生率の上昇よりやや遅れて、PCV の低下、発熱および元気食欲の減退が起こった。投与の中止により寄生率はすみやかに回復した。デキサメサゾンを投与した No. 120 では、投与期間中および投与後も抗体価は変化しなかったが、寄生率の急激な上昇に

伴い、No. 82 と同様に貧血が進み再発症した。投与中止後、原虫寄生率は低下し、元気食欲などの臨床所見は急速に回復した。対照の No. 119 では、このような変化はみられなかった。

考 察

初感染牛において、原虫寄生率、貧血および抗体価の関係をみると、抗体価がピークに到達したとき、寄生率は低下し始め、貧血は回復して来る。したがって、蛍光抗体法で検出される抗体は、parasitemia の抑制と貧血の回復に関係しているものと推測される。一方、死亡例である No. 43 では、寄生率が急上昇したにもかかわらず、抗体産生の応答がなかったことは、抗体による原虫増殖の抑制効果を示唆する。

Theileria 属の *T. parva* と *T. sergenti* には、大きな相違がある。*T. parva* では抗体価の上昇と、parasitemia の改善および臨床症状の好転との間に明らかな関連性がない [5]。それに対して、*T. sergenti* ではこれらの間に強い関連性がある。これはラットに寄生する *Babesia microti* [1] や *Plasmodium berghei* [2] の蛍光抗体間接法で検出される抗体と、parasitemia との関性に類似している。*Plasmodium berghei* [6] では、免疫血清投与による parasitemia の抑制効果が確認されている。

このようなことから、*T. sergenti* 感染によって産生される抗体においても、同じような効果が予想される。今後は実験によって、この点を解明しなければならない。しかしながら耐過牛への攻撃試験では、抗体価の高い No. 85 と、抗体価の低い No. 100 の両者とも、原虫の赤血球内寄生率の上昇や貧血は起こさず、再攻撃および再々攻撃に良く抵抗した。また、自然感染発症例の所見は、抗体価が相当高くても発症することを示しているの、発症防御能を抗体のみによって説明することはできない。

T. sergenti 感染における再発の原因として、分娩や飼養環境の急変といったストレスがあげられる。この点に着目して、実験的に再発を誘起するため、副腎皮質ホルモンを *T. sergenti* 耐過牛に投与したところ、抗体価は大きな変動を示さなかったが、原虫寄生率は急激に上昇し再発症した。すなわち、小型ピロプラズマ病の再発は、抗体価とは無関係に起こることが明らかとなった。Glucocorticoid の免疫抑制機序は単純ではないが、胸腺由来の小リンパ球に対して細胞障害作用を示し、遅延型アレルギー、移植免疫などを抑制す

るといわれている [4]。したがって抗体価とは無関係に起こる *T. sergenti* 感染牛の Glucocorticoid による再発は、細胞性免疫の抑制によるものと考えられる。

T. sergenti の感染免疫の成立に、液性抗体の持つ意義は大きいと考えられる。しかし液性抗体のみでは説明できない再発のような現象もあることから、今後 *T. sergenti* の免疫における細胞性免疫の役割を明らかにする必要がある。

要 約

1. *Theileria sergenti* 実験感染牛では、抗体価がピークに達した後、寄生率は低下し、赤血球容積が増加した。また、急性貧血で死亡した摘脾牛では、抗体を検出できなかった。
2. 自然感染発病牛は発病時においても高い抗体価を有し、回復期にはさらに上昇する傾向があった。
3. 自然感染および実験感染から、臨床的に回復した牛に対して、再攻撃した結果、寄生率の上昇や貧血は認められなかった。
4. 感染耐過牛に副腎皮質ホルモンを投与した結果、抗体価は変動しなかったが、赤血球内寄生率は急激に上昇して発症した。

以上の結果から、*T. sergenti* の免疫機構に、液性抗体が一定の役割を演じていることは明らかである。しかし再発例にみられたように、細胞性免疫の関与も無視できない。

本論文の要旨は、第77回日本獣医学会において報告した。

謝 辞

懇切なる校閲をいただいた其田三夫教授および *T. sergenti* (ソ連株) の分与をいただいた農林省家畜衛生試験場九州支場長石原忠雄博士に深く感謝の意を表する。

文 献

- [1] Cox, F. E. G., and Turner, S. A. (1970). Antibody levels in mice infected with *Babesia microti*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **64**, 167-174.
- [2] Cox, F. E. G., and Turner, S. A. (1970). Antibody levels in mice infected with *Plasmodium berghei yoelii*. *Ann. trop. Med. Parasit.*, **64**, 175-180.
- [3] 石原忠雄 (1971). 日本におけるバベシア病とタ

- イレリア病. 家畜衛生試験場研究報告, No. 62, 128-146.
- [4] 畔柳武雄 (1970), 制ガン薬の薬理作用. 畔柳武雄・大高裕一・松橋直編, 免疫抑制療法. 医学書院, 京東, 33-38.
- [5] Löhr, K. F., and Ross, J. P. J. (1969). Serological response in cattle to East Coast fever (*Theileria parva* infection) as measured by the indirect fluorescent antibody test. *Res. vet. Sci.*, 10, 453-460.
- [6] Phillips, R. S., and Jones, V. E. (1972). Immunity to *Plasmodium berghei* in rats: Maximum levels of protective antibody activity are associated with eradication of the infection. *Parasitology*, 64, 117-127.
- [7] 高橋清志・山下正亮・清水悠紀臣 (1972), 螢光抗体法による小型ピロプラズマとその抗体の検出. 日獣誌, 34, 275-281.