Cold Hemagglutinin in Plasma of Chickens Infected with *Leucocytozoon caulleryi*

Kozo FUJISAKI, Katsuhiko MIURA, Haruhisa TAKAMATSU*,
Shigeo KITAOKA, Tsutomu MORII** and Kyo SUZUKI

First Research Division, National Institute of Animal Health, Yatabe-cho, Tsukuba-gun,
Ibaraki 300-21; *Department of Parasitology, Nippon Veterinary and Zootechnical
College, Kyonan-cho, Musashino-shi, Tokyo 180; **Department of Parasitology,
Kyorin University School of Medicine, Shinkawa, Mitaka-shi, Tokyo 181

(Received for publication April 2, 1979)

Abstract. The present work was undertaken to observe the presence of auto-cold hemagglutinin in the plasma of chickens infected with *Leucocytozoon caulleryi*, and elucidate the immunological characteristics of this hemagglutinin. As a result, auto-cold hemagglutinin was found in all chickens infected with *L. caulleryi*. Pattern of the production and disappearance of this hemagglutinin was classified into two types, e.g., one peak type and two peaks type. It was noticed that the period of appearance of the highest titer of cold hemagglutinin coincided with that of anemia of chickens. Immunological characteristics of cold hemagglutinin was examined by the direct antiglobulin, the agar gel precipitation, and the absorption tests. The results of these tests suggested that the cold hemagglutinin in chickens infected with *L. caulleryi* was more likely autoantibody rather than a parasite product, unlike the study by Kocan on *Leucocytozoon simondi*.

Leucocytozoon caulleryi 感染鶏における寒冷血球凝集素

藤崎幸蔵・三浦克洋・高松治久*・

北岡茂男・森井 勤**・鈴木 恭

農林水産省家畜衛生試験場研究第1部

*日本獣医畜産大学獣医畜産学部 **杏林大学医学部

自己の赤血球を凝集する病的寒冷凝集は人畜の種々の疾病で貧血の誘因となることが知られており [8, 9]. マラリア感染症においてもその出現する事実が報告されている [4]. *Leucocytozoon caulleryi* 感染鶏における免疫学的研究は Morii [6, 7] により端緒が開かれたが, 病的寒冷凝集素の存在は未だ知られていない.

Kocan [3] は, *Leucocytozoon simondi* 感染アヒルにおける貧血機序の研究を行ない, 感染アヒル血清中に寒冷凝集素を認めて抗赤血球因子と名付け, この本態は自己抗体ではなく原虫由来の代謝産物であるとみなした. 本研究で著者らは, 実験的に *L. caulleryi* を感染させた鶏血漿中の寒冷凝集素について調べ若干の知

Table 1. Chickens used in cold hemagglutination test

Chicken used			Number of sporozoites inoculated	Types of pattern of production and disappearance of cold hemagglutinin	
Number [*] of examination	Sex	Age in months		One peak type	Two peaks type
3	Male	3	1.0×10^3	0*	3
2	Male	3	1.0×10^3	0	2
3	Male	1.5	4.8×10^2	0	3
2	Male	5	1.0×10^3	1	1
5	Female	4	1.0×10^3	1	4
4	Male	3	$6.5 \times 10^3, 3.3 \times 10^3, 6.5 \times 10^2$	2	2
3	Male	3	0	0	0

Remarks.

* Number of chickens.

見を得たので報告する。

材料および方法

原虫，供試鶏：*L. caulleryi* は静岡株を用いた。これは著者らの研究室で鶏と系統化されたニワトリヌカカ *Culicoides arakawae* により累代飼育されているものである。本実験に供試した鶏は白色レグホン系の雄または雌計19羽で，生後1.5～5ヶ月令のものである。これらの鶏に $4.8 \times 10^2 \sim 6.5 \times 10^3$ 個／羽のスποロゾイトを静脈内接種して感染させた (Table 1)。

寒冷凝集素：感染鶏からほぼ毎日採血し，血漿中の寒冷凝集素を測定した。血漿の分離に際しては，凝集素が自己の赤血球に吸着するのを防ぐため，採血と同時に 37°C に保温し直ちに遠心分離を行なった。凝集素の測定は，2倍段階希釈した各血漿 0.25 ml に 0.5% 自己赤血球 0.25 ml を添加し， 4°C の氷室に4時間静置した後，凝集塊の有無を判定した。なお，余分の経過血漿は -20°C に保存し，その後の用に供した。

パラシテミア，貧血：上記の採血と平行して，血液 1 mm^3 当たりの赤血球数，メロゾイト数，ガメトサイト数とヘマトクリット値を調べた。

ゲル内沈降反応：Morii [6] に従って経過血漿中の抗原と抗体について測定した。

ゲル透過：スποロゾイト 1.0×10^3 個を接種し凝集素の存在が認められた鶏のうちの2例について，接種後5, 9, 19日目の血漿 1 ml を用いて Sephadex G-200 によるゲル透過を実施し，得られた分画における凝集素の存否を調べた。

直接抗グロブリン試験：寒冷凝集素の認められる感染鶏より得た血液を PBS (pH 7.2) で3回遠心洗浄して 2% 血球浮遊液を作成した。この 0.1 ml を，あらかじめ健康鶏血球で充分吸収した抗-鶏 Ig G 家兔血清または抗-鶏 Ig M 家兔血清（いずれも2倍段階希釈したもの） 0.2 ml にそれぞれ添加し，10分間室温に放置後， 1000 rpm で1分間遠心した沈澱について凝集の有無を判定した。

異種血球による吸収試験：寒冷凝集素の特異性を検討するため，凝集素の認められる血漿に，鶏，家兔，牛，ウズラ，緬羊血球の各々を加え吸収試験を行なった。すなわち，4～16倍に希釈した血漿 $2 \sim 3\text{ ml}$ に対し 0.3 ml の各種血球沈澱を添加し， 4°C 1晩吸着後遠心分離した上清について鶏血球による寒冷凝集反応を実施した。

成 績

1. 寒冷血球凝集反応：Table 1 に示した通り，感染鶏全例において流血中に自己の赤血球を低温 (4°C) で凝集する寒冷凝集素が検出された（凝集素価 $2 \sim 256$ ）。凝集素の推移型からみて，1峰性のものと2峰性のもの (Figs. 1, 2) とに区別されたが，2峰性のものが多かった。このような凝集反応は 37°C の温浴4時間で消失した。

2. パラシテミアと寒冷凝集素：Fig. 1 に凝集素価が1峰性に推移した例を示した。これは90日令時に *L. caulleryi* のスποロゾイトを 6.5×10^3 個接種した雄の例である。重篤な貧血がスποロゾイト接種後17日目より5日間認められた。凝集素はスποロゾイト接種

Fig. 1. Values for parasite count, hematocrit value, titer of serum antigens and their antibodies, and titer of cold hemagglutinin in a chicken infected with *L. caulleryi* (One peak type pattern of the production and disappearance of cold hemagglutinin)

* Chicken No. This chicken was inoculated 6.5×10^3 sporozoites at 3 months.

Fig. 2. Values for parasite count, hematocrit value, titer of serum antigens and their antibodies, and titer of cold hemagglutinin in a chicken infected with *L. caulleryi* (Two peaks type pattern of the production and disappearance of cold hemagglutinin)

* Chicken No. This chicken was inoculated 3.0×10^3 sporozoites at 3 months.

後17日目より産生され、この時期はメロゾイトの流血中への出現後2日目、ガメトサイトの出現の2日前に相当していた。ゲル内沈降反応による抗原と抗体の検

出は、この例ではスポロゾイト接種後13日目より実施し、抗原は13～16日目の間に、抗体は17日目以降認められた。したがって、貧血の出現時期は、寒冷凝集

素の出現時期にはほぼ一致していたが抗原のそれより明らかに遅れていた。

Fig. 2 に凝集素価が2峰性に推移した例を示した。これはスポロゾイト接種数 3.0×10^3 、接種時10日令の雄の場合であり、第1峰に相当する凝集素はスポロゾイト接種後9日目より3日間認められた。この他の例では、第1峰は接種後3日目より出現するものもあったが、全例で13日目には消失した。第2峰に相当する凝集素はスポロゾイト接種後16日目以降に現われ、その経過は Fig. 1 における1峰性の凝集素価のそれとほぼ同様であった。貧血はスポロゾイト接種後16日目より6日間認められ、第2峰の凝集素の出現時期に一致していた。パラシテミアの推移、抗原、抗体の出現様相は凝集素が1峰性に推移した場合と同様であった。凝集素価は、2峰性に推移した場合の第1峰と第2峰間でとくに差はみられず、また1峰性あるいは2峰性に推移した場合とで差はほとんどなかった。

3. ゲル透過試験：供試した血漿は接種後5, 9, 19日目のもので、いずれも凝集素価が2峰性に推移した感染鶏のものである。Fig. 3 の通り、いずれの血漿においても凝集素は第1峰に認められたことからその活性は19S分画にあると考えられた。とくに、スポロゾイト接種後19日目の血漿においては、ゲル内沈降反応にあずかる7S分画の抗体とこの19S分画の寒冷凝集素とが明確に区別された。

4. 直接抗グロブリン試験：寒冷凝集素陽性の供試鶏 No. 2633 は 6.5×10^2 個のスポロゾイトを90日令時に接種されたものである。Table 2 の通り、抗-鶏IgM 家兎血清の低希釈の場合にのみ抗グロブリン試験は陽性となった。

5. 異種血球による吸収試験：寒冷凝集素の特異性に関する検討の結果を Table 3 に示した。Table 3 から、寒冷凝集素は鶏血球によってのみ吸収され、家兎、

Fig. 3. Antibody activities of a fraction obtained by Sephadex G-200 gel filtration of plasma from chickens infected with *L. caulleryi*

Remarks.

* Chicken number and days after sporozoites inoculation.

▨: Titer of cold hemagglutinin.

↔: Precipitating antibodies were observed.

牛、ウズラ、緬羊などの異種血球では吸収されなかった。

考 察

Leucocytozoon 属原虫による感染症の免疫学的研究についての報告は少ないが [1], 本症の重要な症状である貧血の機序解明のために免疫学的研究は重要と考えられる。今回、著者らは、実験的に *L. caulleryi* を感染させた19羽の鶏の経過血漿について自己血球に対する寒冷凝集反応を実施し、全例において病的寒冷凝

Table 2. Direct antiglobulin test

Donor of blood cells	Anti-chicken IgG rabbit serum		Anti-chicken IgM rabbit serum		PBS
	4*	10	4	10	
Chicken infected with <i>L. caulleryi</i> **	—	—	+	—	—
Uninfected chicken	—	—	—	—	—

Remarks.

* Antisera were supplied by courtesy of Dr. C. Kuniyasu.

** Titer of cold hemagglutinin was 32.

Table 3. Cold-hemagglutinin absorption test

Plasma	Heterologous blood cells used as absorbent (0.3 ml packed cell)	Plasma dilution				
		32	64	128	256	512
2565*	Control	No absorption				
		+	+	+	+	+
	Chicken	—	—	—	—	—
	Rabbit	+	+	+	+	+
	Cattle	+	+	+	+	±
	Quail	+	+	+	+	—
2546	Control	No absorption				
		+	+	+	+	±
	Chicken	—	—	—	—	—
	Rabbit	+	+	+	+	±
	Cattle	±	+	+	—	—
	Quail	±	+	+	+	±
	Sheep	—	+	+	—	—

Remarks.

* Chicken No.

+, — : Results of cold hemagglutination test used chicken blood cells and plasma after absorption.

集素を証明することができた。

福岡 [2] は, auto-cold antibody の条件として, 19 S 分画に活性があること, 免疫グロブリンとしては IgM であること, 完全抗体であること, 反応最適温度が 4°C であること, 直接抗グロブリン試験が陽性であること, 特異性があることの諸点をあげている。今回の観察で認められた寒冷凝集素は 19 S であり, 7 S の沈降抗体 [6] とは明らかに区別された。また, 直接抗グロブリン試験は抗-鶏 IgM 家兎血清を用いた場合に陽性であり, 本凝集素の特異性が高いことは吸収試験により確認された。これらの事実から, *L. caulleryi* 感染鶏に認められた寒冷凝集素は病的に上昇した赤血球自己抗体の一種と考えられた。

Kocan [3] は, *L. simondai* 感染アヒル血清中に寒冷凝集素が出現することを認めたが, これは自己抗体ではなく hepatic schizonts 由来の代謝産物であると考察し, 抗赤血球因子 A-E factor と名付けた。しかし, アヒルの貧血に一致して hepatic schizonts 由来の物質が流血中に出現するかどうかは明らかにしていない。一方, *L. caulleryi* 感染鶏においては, 感染後 10~16日の間にシズント由来と考えられる抗原物質が流血中に出現することが Morii [6, 7] により明らかにされている。今回認められた凝集素の出現時期は, その第1峰および第2峰を問わずシズント由来の抗原物質のそれとは異なっていた。このことと前述の本凝集素

の免疫学的性状からみて, *L. caulleryi* 感染鶏に認められた寒冷凝集素は, Kocan がアヒルで認めている原虫由来の物質と同様のものとは考え難い。

なお, 鶏の感染症にみられる赤血球自己抗体に関しては, Kuniyasu ら [5] により *Mycoplasma gallisepticum* の感染時に寒冷凝集素が出現し 19 S グロブリンであることが報告されている。

今回観察したような自己赤血球に対する病的寒冷凝集素の生理的意義については, 寒冷状態にさらされやすい末梢部分において凝集素が赤血球に吸着し, その結果, 肝・脾における赤血球停滞や補体成分との協同による網内系貧食の促進などをおこし, 宿主に貧血をもたらすことも考えられている [8]。このような考えの当否は別としても, *L. caulleryi* 感染鶏の貧血時期に一致して寒冷凝集素が認められたことは, 今後この病的寒冷凝集素の生理的役割を理解するうえで興味ある点と考えられた。また, 今回の試験では凝集素価が2峰性に推移する例が1峰性の場合に比べて明らかに多かったが, その理由および第1峰の意味など今後明らかにされる必要がある。

要 約

実験的に *L. caulleryi* を感染させた鶏の経過血漿について, 自己の赤血球を凝集する寒冷凝集素の有無を調べ, その免疫学的性質を検討した。その結果, 感

染鶏全例に寒冷凝集素が認められ、その出現様相は1峰性と2峰性の2種に区別できた。

これらの凝集素は、直接抗グロブリン試験の結果、パラシテミア、ゲル内沈降反応による抗原の検出成績などから、原虫由来の物質とは考えられず、一種の病的寒冷凝集素（自己抗体）とみなされた。

今後、*L. caulleryi* 感染鶏における貧血と寒冷凝集素との関連についてさらに検討する必要がある。

謝 辞

抗-鶏 IgG および IgM 家兎血清をご恵与いただきました農林水産省家畜衛生試験場製剤研究部国安主税博士に深謝します。

文 献

- [1] Fallis, A. M., Desser, S. S., and Khan, R. A. (1975). On species of *Leucocytozoon*. *Adv. Parasitol.* **13**, 1-67.
- [2] 福岡良男 (1971). 免疫溶血性疾患. 免疫学・アレルギー学実験法, 勝田保男ら編, 文光堂, 東京, 819-831.
- [3] Kocan, R. M. (1968). Anemia and mechanism of erythrocyte destruction in ducks with acute *Leucocytozoon* infections. *J. Protozool.* **15**, 455-462.
- [4] Kruatrachue, M., and Na-Nakorn, S. (1976). A marked reduction in the incidence of cold haemagglutinin in *Plasmodium falciparum* malaria. *Ann. trop. Med. Parasitol.* **70**, 375-380.
- [5] Kuniyasu, C., and Yoshida, Y. (1972). Cold hemagglutinin in serum of chicken infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* **12**, 69-73.
- [6] Morii, T. (1972). Presence of antigens and antibodies in the sera of chickens infected with *Akiba caulleryi*. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* **12**, 161-167.
- [7] Morii, T. (1974). Characterization of antigens and specific antibodies in the sera of chickens infected with *Akiba caulleryi*. *Nat. Inst. Anim. Hlth Quart.* **14**, 174-181.
- [8] 大木与志雄 (1971). 家畜の自己免疫病と自己免疫性貧血症. 日獣会誌 **24**, 221-225, 295-299.
- [9] Ristic, M., Lykins, J. D., and Morris, H. R. (1972). Anaplasmosis: Opsonins and hemagglutinins in etiology of anemia. *Exp. Parasitol.* **31**, 2-12.