

氏名（本籍）	塩野浩紀（京都府）		
学位の種類	博士（獣医）		
学位記番号	獣医博乙第64号		
学位授与年月日	平成16年9月17日		
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当		
学位論文題目	ウシ小型ピロプラズマ病の赤血球酸化障害と貧血機構に関する研究		
審査委員	主査	帯広畜産大学	教授 杉本千尋
	副査	帯広畜産大学	教授 藤崎幸蔵
	副査	岩手大学	教授 安田 準
	副査	東京農工大学	教授 加茂前 秀夫
	副査	岐阜大学	教授 福士 秀人

## 論文の内容の要旨

牛の小型ピロプラズマ病は、貧血を主要な臨床症状とするダニ媒介性の住血原虫病であり、赤血球内寄生性のタイレリア原虫 (*Theileria orientalis*) の感染によって起こる。本病は、北海道から沖縄まで広く生息しているフタトゲチマダニによって伝播され、全国各地の放牧牛に大きな被害を与えている。本病では、原虫の生活環のなかで赤血球内の増殖ステージが病態上重要であり、この時期の原虫が赤血球に寄生することで、貧血が引き起こされると考えられているが、貧血の発生機構については十分に解明されていない。本研究では、活性酸素による赤血球細胞の酸化障害に着目し、「小型ピロプラズマ病の感染牛では、赤血球の酸化が貧血の病態と密接に関連する」という仮説を実証することから、本病における貧血の発生機構を考察したものである。

第1章では、実際に本病の貧血発生時には赤血球の酸化障害が起こるのかについて調べた。実験感染牛の貧血発生時には、赤血球に著しい酸化障害と抗酸化防御能の低下が起こることを明らかにし、赤血球に対する酸化障害の増加が、貧血の発生や病態の悪化に深く関与していることを示した。

第2章では、本病の貧血発生時にみられる赤血球の酸化障害を起こす可能性因子を調べた。実験感染牛の感染経過において、貧血発生時には末梢血貪食細胞の活性酸素産生量の増加が赤血球の酸化障害の程度と良く相関することを明らかにし、赤血球の酸化障害は、貪食細胞由来の活性酸素によってもたらされている可能性が大きいことが示された。さらに、貧血の発生時には酸化障害を増悪化させる因子として、鉄代謝が破綻することも示され、貧血の病態悪化に影響を及ぼしている可能性が示された。

第3章では、本病の貧血発生時に赤血球が血流中から除去される現象を明らかにするために、貪食細胞による認識・貪食の指標となる赤血球膜表面の変化を調べた。実験感染牛

の発病経過において、貧血発生時には赤血球に対する自己抗体の付着や食目印分子が赤血球表面へ発現することが明らかにされ、本病の貧血発生はこれらの赤血球膜表面の変化によって導かれる可能性が示された。

本研究における赤血球の細胞生化学的な解析から、酸化ストレスすなわち赤血球に対する酸化障害の増加が、小型ピロプラズマ病の貧血発生や病態悪化に重要な役割を演じていることが初めて明らかにされた。本研究で得られた成績は、東アフリカ海岸熱や熱帯タイレリア病など他の悪性タイレリア病、あるいは牛のバベシア病における貧血の病態解明にも大きく貢献すると思われる。さらに、動物の感染症分野においても、今後普及していくことが予想される抗酸化物質による病態制御や治療法などの開発にも役立つことが期待される。

## 審査結果の要旨

牛の小型ピロプラズマ病は、貧血を主要な臨床症状とするダニ媒介性の住血原虫病であり、赤血球内寄生性のタイレリア原虫 (*Theileria orientalis*) の感染によって起こる。本病は、北海道から沖縄まで広く生息しているフタトゲチマダニによって伝播され、全国各地の放牧牛に大きな被害を与えている。本病では、原虫の生活環のなかで赤血球内の増殖ステージが病態上重要であり、この時期の原虫が赤血球に寄生することで、貧血が引き起こされると考えられているが、貧血の発生機構については十分に解明されていない。本研究では、活性酸素による赤血球細胞の酸化障害に着目し、「小型ピロプラズマ病の感染牛では、赤血球の酸化が貧血の病態と密接に関連する」という仮説を実証することから、本病における貧血の発生機構を考察したものである。

第1章では、実際に本病の貧血発生時には赤血球の酸化障害が起こるのかについて調べた。実験感染牛の貧血発生時には、赤血球に著しい酸化障害と抗酸化防御能の低下が起こることを明らかにし、赤血球に対する酸化障害の増加が、貧血の発生や病態の悪化に深く関与していることを示した。

第2章では、本病の貧血発生時にみられる赤血球の酸化障害を起こす可能性因子を調べた。実験感染牛の感染経過において、貧血発生時には末梢血貪食細胞の活性酸素産生量の増加が赤血球の酸化障害の程度と良く相関することを明らかにし、赤血球の酸化障害は、貪食細胞由来の活性酸素によってもたらされている可能性が大きいことが示された。さらに、貧血の発生時には酸化障害を増悪化させる因子として、鉄代謝が破綻することも示され、貧血の病態悪化に影響を及ぼしている可能性が示された。

第3章では、本病の貧血発生時に赤血球が血流中から除去される現象を明らかにするために、貪食細胞による認識・貪食の指標となる赤血球膜表面の変化を調べた。実験感染牛の発病経過において、貧血発生時には赤血球に対する自己抗体の付着や食目印分子が赤血球表面へ発現することが明らかにされ、本病の貧血発生はこれらの赤血球膜表面の変化によって導かれる可能性が示された。

本研究における赤血球の細胞生化学的な解析から、酸化ストレスすなわち赤血球に対する酸化障害の増加が、小型ピロプラズマ病の貧血発生や病態悪化に重要な役割を演じていることが初めて明らかにされた。本研究で得られた成績は、東アフリカ海岸

熱や熱帯タイレリア病など他の悪性タイレリア病,あるいは牛のバベシア病における貧血の病態解明にも大きく貢献すると思われる。さらに,動物の感染症分野においても,今後普及していくことが予想される抗酸化物質による病態制御や治療法などの開発にも役立つことが期待される。

以上について,審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

#### 基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Acquired methemoglobinemia in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*  
著 者 名 : Shiono, H., Yagi, Y., Thongnoon, P., Kurabayashi, N., Chikayama, Y., Miyazaki, S. and Nakamura, I.  
学術雑誌名 : Veterinary Parasitology  
巻・号・頁・発行年 : 102 (1-2) : 45-51, 2001
- 2) 題 目 : Oxidative damage and phosphatidylserine expression of red blood cells in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*  
著 者 名 : Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S. and Nakamura, I.  
学術雑誌名 : Parasitology Research  
巻・号・頁・発行年 : 89 (3) : 228-234, 2003
- 3) 題 目 : The influence of oxidative bursts of phagocytes on red blood cell oxidation in anemic cattle infected with *Theileria sergenti*  
著 者 名 : Shiono, H., Yagi, Y., Chikayama, Y., Miyazaki, S. and Nakamura, I.  
学術雑誌名 : Free Radical Research  
巻・号・頁・発行年 : 37 (11) : 1181-1189, 2003
- 4) 題 目 : Accelerated binding of autoantibody to red blood cells with increasing anaemia in cattle experimentally infected with *Theileria sergenti*  
著 者 名 : Shiono, H., Yagi, Y., Kumar, A., Yamanaka, M. and Chikayama, Y.  
学術雑誌名 : Journal of Veterinary Medicine Series B  
巻・号・頁・発行年 : 51 (1) : 39-42, 2004

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Occurrence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in retail raw pork  
著 者 名 : Shiono, H., Hayashidani, H., Kaneko, K., Ogawa, M.  
and Muramatsu, M.  
学術雑誌名 : Journal of Food Protection  
卷・号・頁・発行年 : 53 (10) : 856-858, 1990
- 2) 題 目 : *In vitro* susceptibility of *Mycoplasma hyosynoviae* and *M. hyorhinis* to  
antimicrobial agents  
著 者 名 : Kobayashi, H., Sonmez, N., Morozumi, T., Mitani, K., Ito, N.,  
Shiono, H. and Yamamoto, K.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 58 (11) : 1107-1111, 1996
- 3) 題 目 : Flow cytometry to evaluate *Theileria sergenti* parasitemia using the  
fluorescent nucleic acid stain, SYTO16  
著 者 名 : Yagi, Y., Shiono, H., Kurabayashi, N., Yoshihara, K. and Chikayama, Y.  
学術雑誌名 : Cytometry  
卷・号・頁・発行年 : 41 (3) : 223-225, 2000
- 4) 題 目 : Increase in oxidized proteins in *Theileria sergenti*-infected erythrocyte  
membrane  
著 者 名 : Yagi, Y., Thongnoon, P., Shiono, H. and Chikayama, Y.  
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science  
卷・号・頁・発行年 : 64 (7) : 623-625, 2002
- 5) 題 目 : Increase in apoptotic polymorphonuclear neutrophils in peripheral blood  
after intramammary infusion of *Escherichia coli* lipopolysaccharide  
著 者 名 : Yagi, Y., Shiono, H., Shibahara, T., Chikayama, Y. Nakamura, I.  
and Ohnuma, A.  
学術雑誌名 : Veterinary Immunology and Immunopathology  
卷・号・頁, 発行年 : 89 (3-4) : 115-125, 2002