

## 牛の *Babesia ovata* 感染血液内における抗原分布

廣田和久\*・地代所明\*・高橋清志\*・黒沢 隆\*  
其田三夫\*・小沼 操\*\*・桐沢力雄\*\*

### Localization of Babesial Antigen in Bovine Blood infected with *Babesia ovata*

Kazuhisa HIROTA\*, Mei JIDAISHO\*, Kiyoshi TAKAHASHI\*  
Takashi KUROSAWA\*, Mitsuo SONODA\*, Misao ONUMA\*\*  
and Rikio KIRISAWA\*\*

(May, 1985)

*Babesia ovata* は、1980年南および石原<sup>17)</sup>により命名された大型種の *Babesia* の一つである。*B. bovis* では1969年 Ludford<sup>13)</sup>により感染赤血球膜に抗原物質が存在していることが認められ、それ以後 Goodger ら<sup>7-9)</sup>によって3つの抗原物質が感染赤血球内に存在することが示された。また Sivinovic ら<sup>20)</sup>は *B. canis*, *B. equi*, *B. caballi* および *B. rodheini* に感染した動物の血清から *Babesia* 抗原物質を抽出し、感染赤血球膜にも抗原物質が存在することを証明した。しかし、*B. ovata* の血液内の抗原分布は現在のところ明らかにされていない。今回、*B. ovata* 人工感染牛を用いてこれらの点について検討した。

### 材料および方法

1. 供試牛に対する *B. ovata* の接種および感染血液の採取 各供試牛は *B. ovata* 非汚染地区より搬入し、血液塗抹上に *B. ovata* ならびに赤血球内寄生原虫が存在しないことを確認した上で摘脾を行ない供試した。供試牛の概要は Table 1 に示した。No. 1 および 2 は接種回数と採取間隔を変化させることにより、血中で *Babesia* 抗原がどのように分布するかを経時的に調べた。No. 1 は *B. ovata* 凍結保存血液と新鮮継代血液を4回接種し38日後に採血した。No. 2 は新鮮継代血液を1回接種し4日後に採血した。採血時

\* 獣医学科，家畜内科学教室

Laboratory of Veterinary Internal Medicine, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

\*\* 獣医学科，家畜微生物学教室

Laboratory of Veterinary Microbiology, Department of Veterinary Medicine, The College of Dairying, Ebetsu, Hokkaido 069, Japan

の寄生率は両方とも 31% であった。

No. 3 は血中抗体の推移と血中の *Babesia* の抗原抗体複合体を調べるため凍結保存血液を 2 回接種し経時的に検査した。

## 2. 蛍光抗体間接法による感染赤血球

の観察および抗体価の測定 高橋ら<sup>21)</sup>

の方法に従いカバーガラス上に供試牛 No. 3 の接種後 10 日目の感染赤血球 (寄生率 0.9%) の塗沫を用い蛍光抗体間接法を行った。実験感染牛 No. 3 における抗体価の推移は、感染赤血球を抗原として経過血清を反応させ測定した。1:1,600 より低い希釈では陰性血清で非特異反応が認められたので陽性限界値を 1:1,600 とした。

## 3. 粗抗原の作製および部分精製

粗抗原の作製は *Theirelia sergenti* 粗抗原の作製法に従った<sup>22)</sup>。粗抗原は No. 1 および 2 の感染血液から作製し、その抗原を部分精製する目的で DEAE セルロースカラムクロマトグラフィーを行った。0.01 M リン酸緩衝液 pH 7.2 (PB) でカラムを平衡化した後粗抗原を添加した。溶出法は段階溶出法で PB に 0.1 M きざさみで 1 M まで塩化ナトリウム (NaCl) を加えた。溶出液は 1 分画 5 ml ずつ集め OD 280 の吸収を参考にしながら補体結合反応 (CF) により *Babesia* 抗原活性を確認し、抗原活性のある分画をブールしてポリエチレングリコール 6,000 で濃縮しこれを *Babesia* 可溶化抗原として以下の実験に用いた。

## 4. 酵素免疫測定法 (ELISA) による可溶化抗原の検定

ELISA による可溶性抗原の検査法は諸報告に従った。<sup>2,3,18,24,26)</sup> No. 1 および 2 の可溶化抗原を 0.05 M 炭酸一重炭酸緩衝液 pH 9.6 で 2 段階希釈し、96 ウェル平底マイクロプレートに 50  $\mu$ l ずつ分注し 4°C、一晩放置した。分注した液を捨て 0.05% Tween 20 加 PBS を各ウェルに入れ 3 回洗浄を行った。次に 1% 牛血清アルブミン (BSA) 加 PBS を 50  $\mu$ l ずつ各ウェルに分注し 37°C、30 分放置した (リコート)。3 回洗浄後 1% BSA 加 PBS で 20 倍希釈した *Babesia* 陽性血清、陰性血清および 1% BSA 加 PBS を抗原希釈列に 50  $\mu$ l ずつ分注し 2 時間室温に放置した。3 回洗浄後 1% BSA 加 PBS で 2,000 倍希釈したペルオキシダーゼ標識抗牛 IgG を各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ分注し 3 時間室温に放置した。5 回洗浄した後 ABTS (2-2' azino-di-3 ethyl benzothiazolin sulfate-6), 1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> および 0.05 M クエン酸-クエン酸ナトリウム緩衝液 pH 4.0 で基質溶液を調製し各ウェルに 50  $\mu$ l ずつ分注し、60 分後イムノリーダーを用い吸光度 405 nm で測定した。

## 5. *B. ovata* 実験感染牛 No. 3 の血液学および血清学的所見

No. 3 を経時的に接種前より血液学および血清学的に観察した。観察項目はヘマトクリット値、寄生率、

Table 1. Experimental calves

Nos.	species	sex	age
1	Holstein	female	8 months
2	Holstein	male	4 days
3	Holstein	female	1 month

抗体価および7% ポリエチレングリコール (7% PEG) 沈殿法<sup>4,25)</sup> による血清中抗原抗体複合体の測定のため4項目を行った。さらに免疫学的特異性を検討するため *Babesia* 陽性血清を7% PEG で沈殿させグリシン-HCl 緩衝液 pH 3.0 で溶解し、同緩衝液で2時間、4°C で透析した。透析したサンプルは抗原抗体複合体を抗原と抗体に分離する目的でセファデックス G-200 によるカラムクロマトグラフィーを行った。分画された各ピークの抗原および抗体価を ELISA により測定した。

## 成 績

蛍光抗体間接法による感染赤血球の観察：*B. ovata* 感染赤血球の抗原分布を観察するため接種後10日目に採取した No. 3 の感染赤血球と *Babesia* 陽性血清、陰性血清および PBS を反応させたところ、陽性血清において感染赤血球内の虫体と同時にその膜にも蛍光が認められ、それは感染赤血球のすべてに観察された。しかし、陽性血清と非感染赤血球間および陰性血清ならびに PBS と感染赤血球間における反応では蛍光は認められな

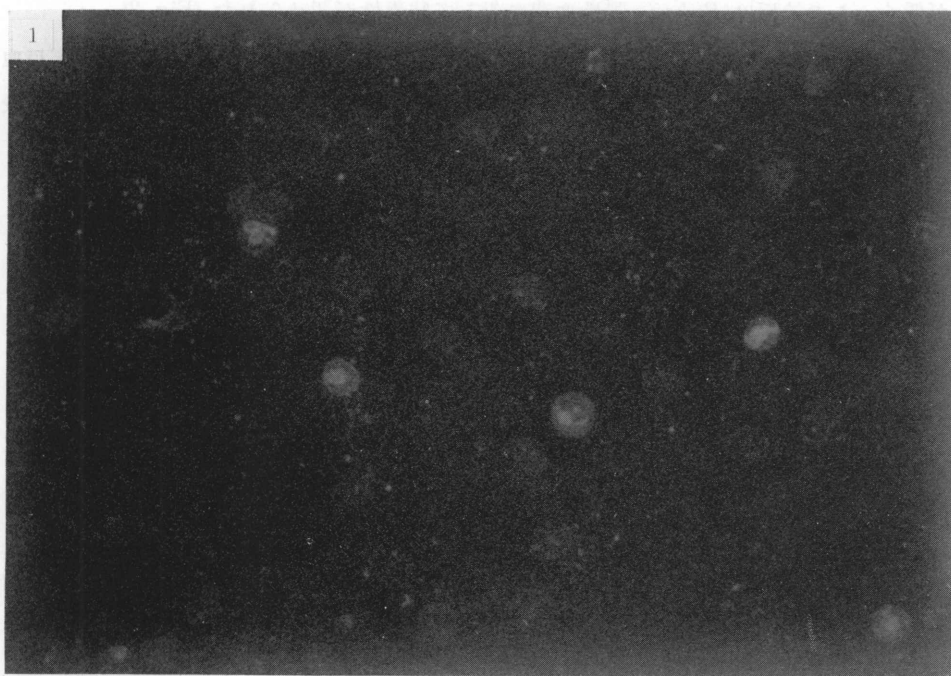


写真1 感染赤血球における *B. ovata* と膜の特異蛍光  
(No. 3 の接種後10日目、寄生率0.9%, ×400)

Photo 1. Specific staining of *B. ovata* organism and infected erythrocytic membranes by IFA. (10 days after inoculation on No. 3 cattle, parasitemia 0.9%, ×400).

った(写真1)。

供試牛 No. 1 および 2 における血中 *Babesia* 抗原物質の経時的变化: 接種後 38 日目に採血した No. 1 の粗抗原と接種後 4 日目に採血した No. 2 の粗抗原を DEAE セルロースクロマトグラフィーにより部分精製したところ, 0.01 MPB, pH 7.2 から 0.6 M NaCl 加 PB で溶出した分画に蛋白質が検出されたが 0.7 M NaCl 以上ではほとんど蛋白質は溶出されなかった。溶出された蛋白質中 CF で 1:10 以上の抗原力価を示したのは 0.1 M から 0.4 M NaCl 溶出分画であった (Fig. 1)。その部分をプールしポリエチレングリコールで濃縮した。このようにして得られた可溶化抗原中には虫体と同時に感染赤血球膜も存在するため, 血球膜に特異抗体が結合し可溶化抗原に含まれている可能性が考えられた。そこで得られた可溶化抗原に対する陽性および陰性血清との反応を ELISA で検討した。No. 1 の抗原では陽性血清および陰性血清とも同様な吸光度を示し, 一次血清のかわりに PBS を用いた場合でも高い吸光度を示し, 可溶化抗原中に特異抗体の存在が示唆された。これに比べ No. 2 の抗原は陽性血清が高い吸光度を示したのに対し陰性血清および PBS では吸光度が低く, この抗原は *Babesia* 陽性血清に対して特異性が認められた (Fig. 2)。

供試牛 No. 3 の血液学的および血清学的所見: No. 3 の経過を Fig. 3 に示した。末梢血液中において原虫は初回接種より 7 日目に出現し, 11 日目に最高寄生率 1.3% を示した後

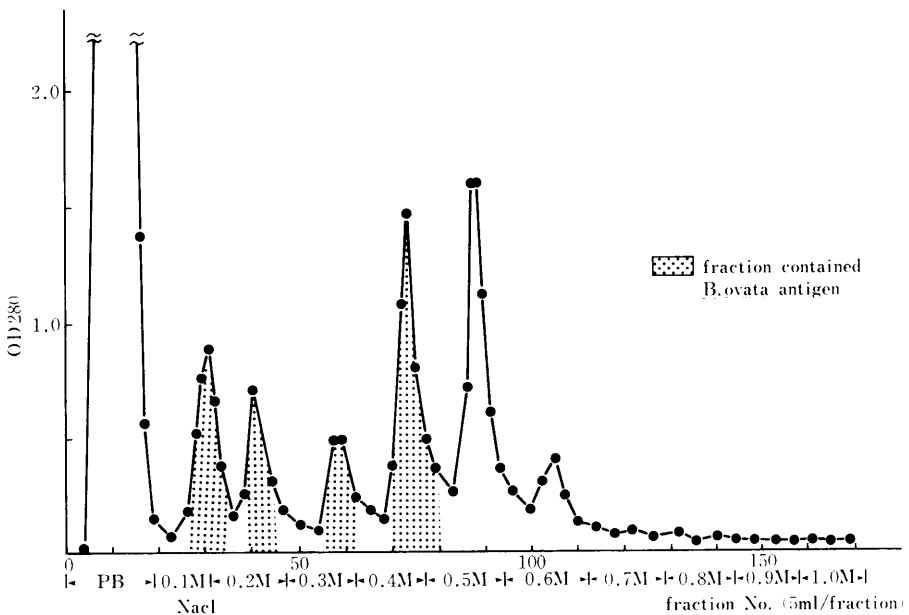


Fig. 1. Partial purification of disintegrated *B. ovata* antigen using DEAE cellulose chromatography.

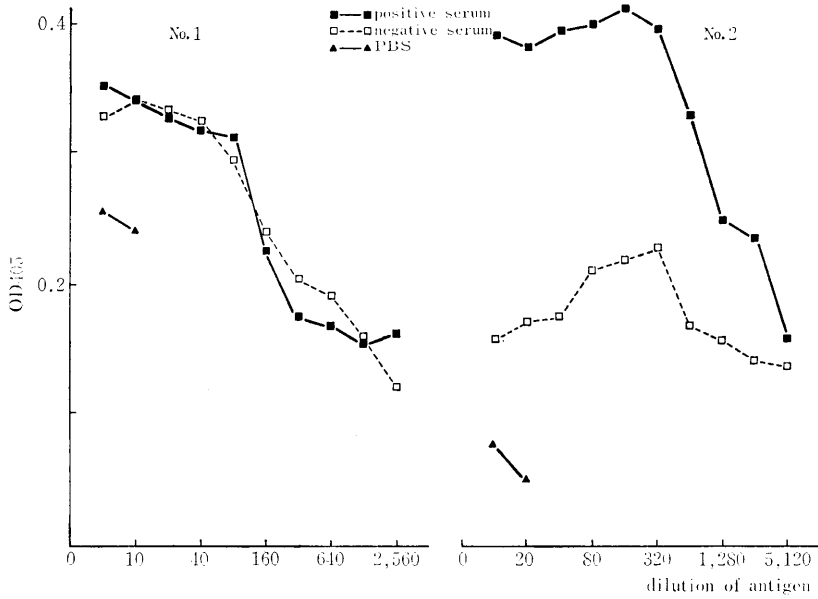


Fig. 2. Reaction between positive and negative sera and *B. ovata* antigen by ELISA.

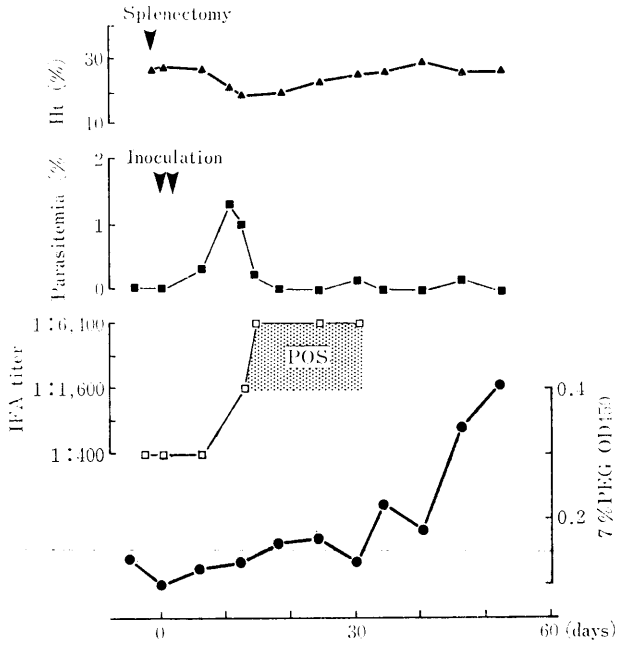


Fig. 3. Hematological and serological findings.

18日目に消失したが、31日目と45日目で2、3日の経過で再び出現した。ヘマトクリット値は虫体の出現とともに下降し、14日目に18%の最低値を示した後だいに回復した。抗体価は13日目から陽性を示し31日目まで陽性であった。7% PEG 沈殿法による血清中抗原抗体複合体の測定では、虫体が出現し抗体価の上昇が起こってから吸光度が上昇した。さらに、免疫学的検討をするためPEGによる沈殿物をELISAで抗原価および抗体価を測定した。供試牛No. 3の接種前と接種後の血清を7% PEGにより沈殿させ、pH 3.0のグリシン-HCl緩衝液でpHを下げ抗原と抗体を解離させた。その解離したものを同緩衝液で平衡化したセファデックスG-200で分離すると、接種前では第11分画でピークとなり第20分画を過ぎるとなだらかな山を形成したのに対し、接種後では第13および25分画でピークが出現した (Fig. 4)。接種前後の各ピークについて *Babesia* 抗原およびその特異抗体を検出するためELISAを行なった結果、接種後の2つのピークは *Babesia* 抗原として0.6および0.8と特異的に高い吸光度を示した。これに較べ接種前のピークは0.2程度の吸光度を示したにすぎなかった。各ピークからは抗体としての特異的な吸光度の上昇は認められなかった。

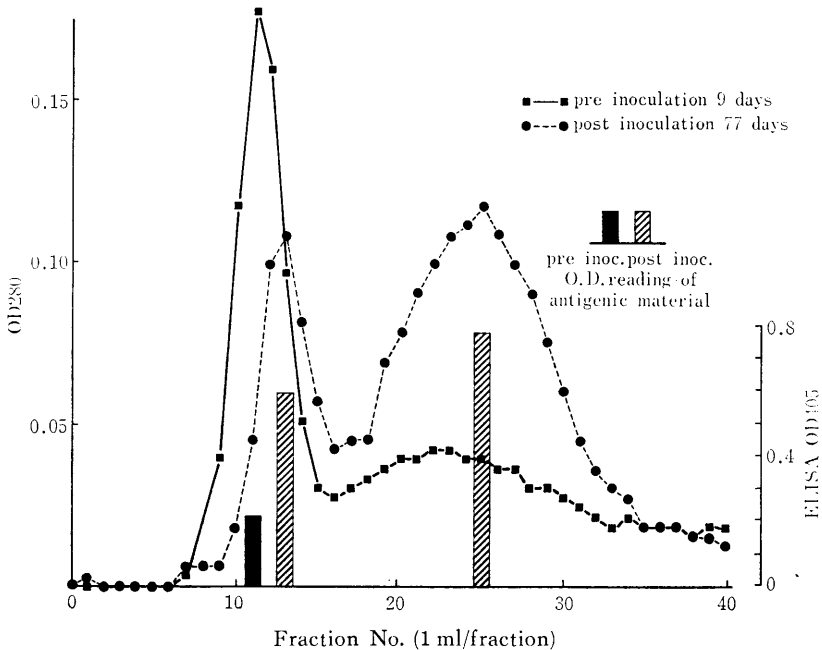


Fig. 4. Isolation of antigen and antigen-antibody complex.

## 考 察

*Babesia* 感染赤血球中の抗原の所在を調べるため蛍光抗体間接法を行った結果、虫体と感染赤血球膜が反応した。Sivinovic ら<sup>20)</sup> は *B. canis* および *B. rodhaini* 感染赤血球を蛍光抗体法で観察した結果、感染赤血球のみならず非感染赤血球も特異蛍光を発することを報告しているが、今回の実験では感染赤血球膜のみが蛍光を発した。Sivinovic らが観察した蛍光は血清中の抗原が赤血球膜に吸着してすべての赤血球が蛍光を発している、これは生理食塩液で赤血球を洗浄すると蛍光は発しなくなるものであった。今回の実験の赤血球は生理食塩液で洗浄して使用しているため血清由来の抗原ではないと考えられる。1969年、Ludford<sup>13)</sup> は蛍光抗体法により *B. bovis* 感染赤血球内に抗原性があることを示し、Goodger ら<sup>7-9)</sup> や Mohoney ら<sup>15)</sup> は *B. bovis* 感染血液中からフィブリノーゲンと類似の抗原物質 (fibrinogen-associated antigen) を抽出し、それが感染赤血球膜下に存在することを蛍光抗体法で証明した。Mohoney<sup>16)</sup> は *B. bovis* 粗可溶性抗原に対する3つの単クローン性抗体産クローンを得て、このクローンより産生された抗体のうち、1つは虫体および赤血球膜と反応し、他の2つは虫体と反応したと報告している。最近では James ら<sup>10,11)</sup> は *in vitro* での *B. bovis* 培養<sup>5,12)</sup> で得られた培養上清を免疫しその産生された抗体を感染赤血球と反応させ蛍光抗体法で観察し、抗原は赤血球膜、細胞質および虫体に存在することを証明した。また本実験で No. 1 の抗原が ELISA で陽性血清および陰性血清と同様な吸光度を示し、抗原とペルオキシダーゼ抗ウシ IgG との直接反応がみられた。これは粗抗原作製時に虫体と赤血球膜が同比重なため分離不可能でセルロースクロマトグラフィーを行った後の部分精製抗原中にも赤血球膜の成分が含まれているので、No. 1 のような長い経過の後採取した感染赤血球膜には特異抗体が結合あるいは共存していたためと考えられる。以上のことより、虫体の存在する赤血球膜には *Babesia* 由来の抗原物質が存在していることが明らかとなった。

感染血清中の抗原抗体複合体の検出は PEG で行った。PEG による抗原抗体複合体の検出は最近、膠原病や癌において診断の補助的手段として行われている<sup>6,19,25)</sup>。PEG 溶液濃度を7%に設定したのは、予備実験においてこの濃度でも牛アルブミンおよびグロブリンがほとんど沈殿しないことによる。No. 3 の血清を経時的に測定した結果、血中に虫体が出現して抗体価が上昇した後血清中に7% PEG による沈殿物が出現したことから、これが抗原抗体複合体であると考えられた。*B. rodhaini* では抗原抗体複合体が形成されるということが証明されている。今回の7% PEG による沈殿法で得られた沈殿物に *B. ovata* 抗原が検出されたが特異抗体は検出されなかった、これは血清中の抗原抗体複合体がわず

かであったか抗原自体がポリマーになっていたためではないかと考えられる。Sivinovicら<sup>20)</sup>は感染血清中より、MahoneyとGoodger<sup>14)</sup>は感染血漿中より、またJamesら<sup>10,11)</sup>は培養上清より虫体由来の可溶性抗原物質を抽出している。以上より*B. ovata*も虫体の分泌物あるいは代謝産物に由来すると思われる抗原物質を血漿中に放出していることは明らかであるが、抗原抗体複合体の形成についてはさらに検討が必要である。

最後に*B. ovata*を分与された家畜衛生試験場伊藤進午および南哲郎の両博士に深謝いたします。

## 要 約

*B. ovata* 感染血液内における抗原の所在を解明するため、人工感染牛の感染赤血球および血清を免疫学的に検討した結果、以下の成績が得られた。

1. 蛍光抗体法により感染赤血球において虫体と同時に感染赤血球膜にも抗原物質の局在していることが証明された。

2. *B. ovata* の parasitemia がピークを過ぎて減少する時期 (接種 38 日後) に、感染赤血球から作製した抗原液には特異抗体の含まれることが ELISA により実証された。しかし、接種 4 日後の parasitemia のピークの赤血球から調製した抗原には抗体が検出されなかった。

3. 感染牛を経時的に調べると *B. ovata* 接種後 parasitemia が出現し、次いで特異抗体が出現した。抗体の産生に続き 7% PEG による沈殿物が増加した。

4. 7% PEG による沈殿物中から *B. ovata* 抗原が検出された。

## 文 献

- 1) Annable, C. R. and P. A. Ward, 1974. Immunopathology of the renal complications of babesiosis. *J. Immunol.*, **112**: 1-8.
- 2) Barry, D. N., B. J. Rodwell, P. Timms and W. McGregor, 1982. A microplate enzyme immunoassay for detecting and measuring antibodies to *B. bovis* in cattle serum. *Aust. Vet. J.*, **59**: 136-140.
- 3) Bidwell, D. E., P. Turp, L. P. Joyner, R. C. Payne and R. E. Purnell, 1978. Comparisons of serological tests for babesia in British cattle. *Vet. Rec.*, **103**: 446-449.
- 4) Creighton, W. D., P. H. Lambert and P. A. Miescher, 1973. Detection of antibodies and soluble antigen-antibody complexes by precipitation with polyethylene glycol. *J. Immunol.*, **111**: 1219-1227.
- 5) Erp, E. E., R. D. Smith, M. Ristic and B. M. Osorno, 1980. Continuous in vitro cultivation of *Babesia bovis*. *Am. J. Vet. Res.*, **41**: 1141-1142.
- 6) Füst, G. B., Fekete, I. Angyal, A. Jakab, A. Pal, K. Meretey, A. Falus, K. Török, G. Szegedi, M. Kawai, E. Puskas, M. Csecsinagy, T. Szabo, A. Lenkey and M. Mész, 1981. Evaluation of different methods for detecting circulating immune complexes. *Sutudies*



- in patients with lung cancer. *J. Immunol. Methods*, **46**: 259-276.
- 7) Goodger, B. V., 1973. *Babesia argentina*: Intraerythrocytic location of babesial antigen extracted from parasite suspensions. *Int. J. Parasitol.*, **3**: 387-391.
  - 8) Goodger, B. V., 1976. *Babesia argentina*: studies on the nature of an antigen associated with infection. *Int. J. Parasitol.*, **6**: 213-216.
  - 9) Goodger, B. V., I. G. Wright, D. F. Mahoney and R. V. Mckenna, 1980. *Babesia bovis (argentina)*: Studies on the composition and location of antigen associated with infected erythrocytes. *Int. J. Parasitol.* **10**: 33-36.
  - 10) James, S. M., M. A. James and M. Ristic, 1983. Localization of culture-derived soluble *Babesia bovis* antigens in the infected erythrocyte. *Vet. Parasitol.*, **13**: 311-316.
  - 11) James, M. A., 1984. An update of the isolation and characterization of culture-derived soluble antigens of *Babesia bovis*. *Vet. Parasitol.*, **14**: 231-237.
  - 12) Levy, M. G. and M. Ristic, 1980. *Babesia bovis*: Continuous cultivation in a microaerophilous stationary phase culture. *Science*, **207**: 1218-1220.
  - 13) Ludford, C. G., 1969. Fluorescent antibody staining of four babesia species. *Exp. Parasitol.*, **24**: 327-335.
  - 14) Mahoney, D. F. and B. V. Goodger, 1972. *Babesia argentina*: Immunogenicity of plasma from infected animals. *Exp. Parasitol.*, **32**: 71-85.
  - 15) Mahoney, D. F., I. G. Wright and B. V. Goodger, 1981. Bovine babesiosis: The immunization of cattle with fractions of erythrocytes infected with *Babesia bovis* (syn. *B. argentina*). *Vet. Immunology and immunopathology*, **2**: 145-156.
  - 16) Mahoney, D. F., 1983. Studies on the protection of cattle against *Babesia bovis* infection. In tropical parasitoses and parasitic zoonoses. (dunsmore, J. D. ed.), 93-104. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, Perth.
  - 17) Minami, T. and T. Ishihara, 1980. *Babesia ovata* sp. n. isolated from cattle in Japan. *Natl. Inst. Anim. Health Q. (Jpn.)*, **20**: 101-113.
  - 18) Purnell, R. E., D. J. Hendry, D. E. Bidwell and P. Turp, 1976. Microplate enzyme linked immunosorbent assay for antibody to *Babesia divergens* in cattle. *Vet. Rec.*, **99**: 102.
  - 19) Rayner, A. A., G. J. Steele, M. L. Rodrick, P. J. Harte, A. E. Munroe, N. Zamcheck and R. E. Wilson, 1981. Applications of polyethylene glycol turbidity assay to detection of circulating immune complexes in cancer patients. *Am. J. Surg.*, **141**: 160-164.
  - 20) Sivinic, K. H., R. Milar, M. Ristic and H. W. Cox, 1969. In vivo and in vitro effects of serum antigens of babesial infection and their antibodies on parasitized and normal erythrocytes. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, **63**: 327-336.
  - 21) 高橋清志, 山下正亮, 清水悠紀臣, 1972. 蛍光抗体法による小型ヒロプラズマとその抗体の検出. *日獣誌*, **34**: 275-281.
  - 22) 高橋清志, 1976. 牛の小型ヒロプラズマの感染と免疫に関する研究. *酪農学園大学紀要*, **6**: 179-248.
  - 23) 田宮信雄, 吉田 浩, 1976. クロマトグラフィー, 生化学実験講座1. タンパク質の化学I, (日本生化学編), 99-133, 東京化学同人, 東京.
  - 24) 上田 進, 1982. 酵素免疫測定法 (ELISA). *日獣会誌*, **35**: 601-603.
  - 25) 上床 周, 青塚新一, 大川雅子, 横張龍一, 相沢 力, 鈴木慶二, 1983. 免疫複合体測定法の種類と原理. *免疫血液学*, **5**: 306-310.
  - 26) Voller, A., D. Bidwell and A. Bartlett, 1976. Microplate enzyme immunoassays for the immunodiagnosis of virus infections. In *Manual of clinical immunology*. (Rose, N. and W. Friedmann ed). 506-516. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

### Summary

Localization of babesial antigen in blood was investigated on cattle infected with *Babesia ovata*.

1. The antigen was revealed on membranes of infected erythrocytes by fluorescent antibody test.

2. It was demonstrated by ELISA that lysate antigen of erythrocytes infected with *B. ovata* obtained from the calf after the peak of parasitemia contained specific antibody as well as the antigen. However the lysate antigen prepared from erythrocytes obtained from the infected calf at the parasitemia did not contain the antibody.

3. On the infected calves, the level of circulating immune complexes (CIC) isolated by polyethylene glycol (PEG) precipitation test with final concentration of 7% was increased after developing the specific antibody.

4. The antigen derived from *B. ovata* was detected in the CIC.