

小型ピロプラズマ原虫寄生 赤血球の検出

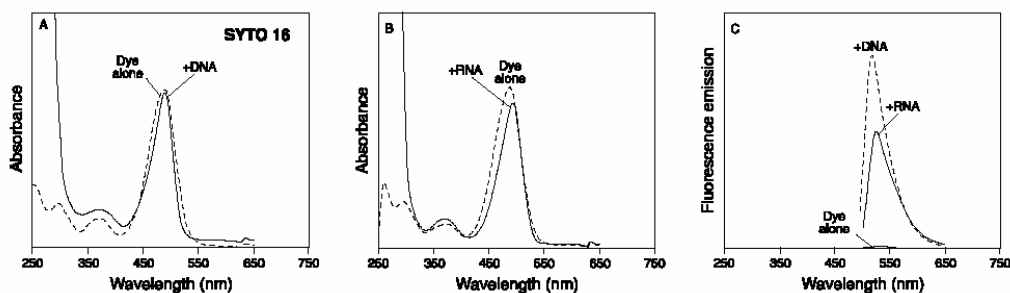
監修・資料提供: 独立行政法人 農業技術研究機構
動物衛生研究所 北海道支所
八木 行雄先生

はじめに

ウシのタイレリア病は、小型ピロプラズマ原虫 (*Theileria srgeni*) が赤血球に寄生して起こる疾病で、熱病や貧血を主な症状としています。フタトゲチマダニという放牧地に広く生息しているダニが媒介するため、多くの放牧牛が感染しています。診断は原虫寄生赤血球をギムザ染色して顕微鏡下で計数して行うため、長い時間と労力を要しますが、フローサイトメリーを利用することにより、非常に簡便に、短時間にかつ正確に原生寄生赤血球を測定することが可能になりました。

原理

感染赤血球に膜透過性の DNA 蛍光色素である SYTO-16 をロードし、色素に反応した原虫 DNA を検出します。



CYTO16 蛍光色素波長

(Molecular Probe 社カタログより)

サンプル調製

I. サンプル

タイレリア病に感染した恐れのあるウシから採取したヘパリン血或いは EDTA 血

II. 試薬

SYTO-16 Molecular Probe 社 (S-7578)

PBS

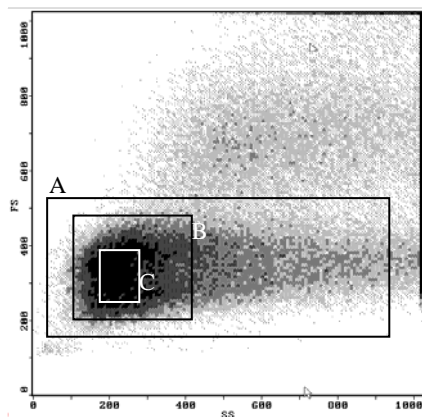
III. その他

40 μ m ナイロンメッシュ
エペンドルフチューブ

IV. 調製手順

1. 全血を 500g で 10 分遠心分離し血漿と buffy coat を取り除きます。
2. PBS を加え、500g、5 分遠心分離し、上清を吸引除去します。この操作を 3 回繰り返します。(重要: 白血球を除去するため buffy coat を取り除いてください。)
3. 赤血球数約 $1\sim 2 \times 10^7$ /mL (PBS) に対し SYTO-16 が最終濃度 250~500nM になるように加えます。
4. 37°C、暗所下で 20 分間、インキュベーションします。
5. PBS で遠心洗浄を 3 回繰り返します。
6. 沈さに PBS を 1~2mL 加えます。
7. フローサイトメトリー(励起波長 480nm、蛍光波長 525nm; FL1) で、赤血球集団にゲートを設定して測定します。この際、ゲートを絞りに込むことにより混入している白血球を除去できます (Fig.1)。

Fig.1 赤血球ゲートの絞り込みによる混入白血球の除去



ゲート設定:

C の領域でゲート設定

データ例

Fig.2 は小型ピロプラズマ原生寄生虫赤血球を SYTO-16 と、過去に報告されている hydroethidine(HE)によって測定した結果を示したものです。SYTO-16 では原虫寄生赤血球と非寄生赤血球がきれいに分かれています。一方、HE では明らかな分離はできませんでした。SYTO-16 陽性の B 領域のソーティングでこれらが原虫寄生赤血球であることが確認されました(Fig.3)。

Fig.2 SYTO-16 と hydroethidine の比較

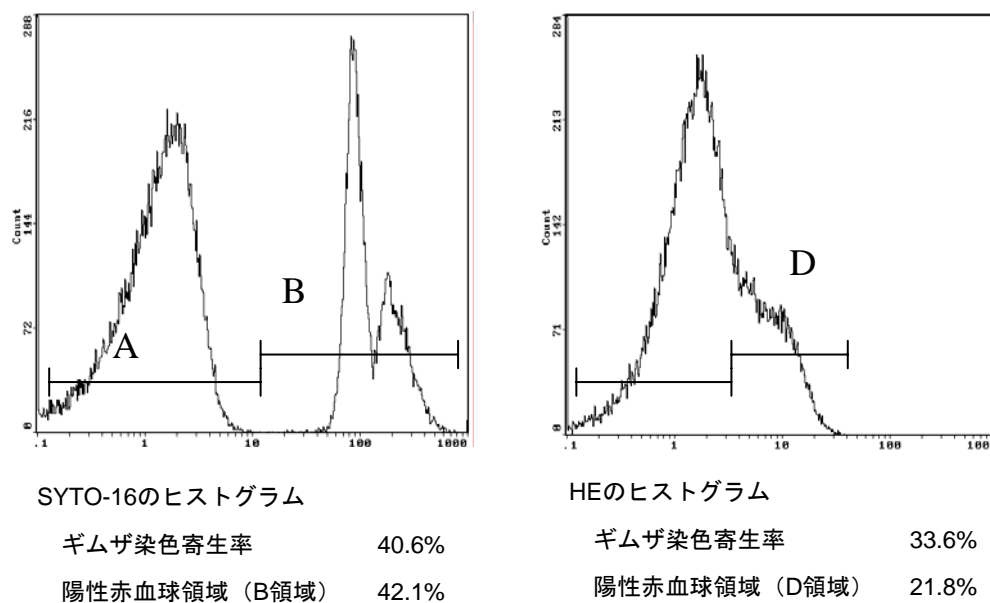


Fig.3 SYTO-16 陽性 B 領域からソーティングされた赤血球のギムザ染色

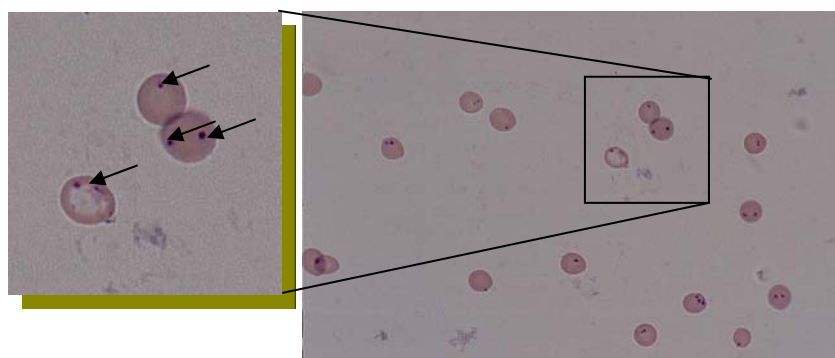
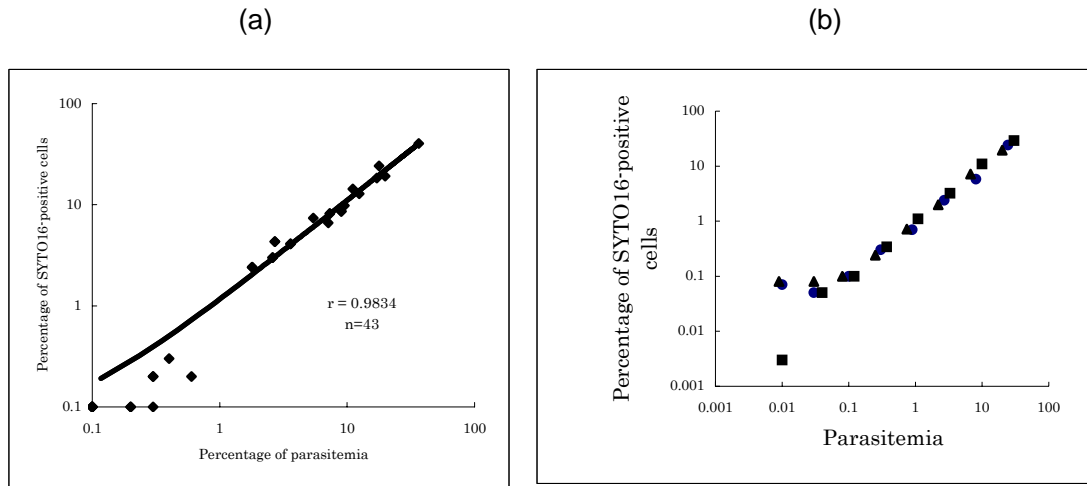


Fig.4a は野外発病牛の原虫寄生率を血液塗抹ギムザ染色法と SYTO-16 によるフローサイトメトリーで測定し、その相関を示したものです。相関係数 0.983 の高い値が得られました。

また、感染血液希釈系列を作ったところ検出感度は 0.1%以上でした(Fig4b)。

Fig.4 野外発病牛での小型ピロプラズマ寄生率と SYTO-16 陽性率との相関(a)と感染血液希釈系列を用いた検出感度の測定(b)



SYTO-16 は、DNA に対して親和性が高いため、DNA を持つ有核赤血球とは反応しますが、RNA rich な網状赤血球とは反応しづらいと考えられます。タイレリア病以外にもマラリアやバベシア病等の赤血球内寄生原虫病の簡便なスクリーニング法としても有用と考えられます。

参考文献

Yagi Y, Shiono H, Kurabayashi N, Yoshihara K, Chikayama Y “Flow cytometry to evaluate Theileria sergenti parasitemia using the fluorescent nucleic acid stain, SYTO16.” Cytometry. 2000 Nov 1;41(3):223-5.