

山羊の繊維状小体含有赤血球に関する研究

情野正道*・其田三夫**・高橋清志**

小岩政照***・黒沢隆**

Studies on Erythrocytes Containing Fibres in the Goat

Masamichi SEINO*, Mitsuo SONODA**, Kiyoshi TAKAHASHI**

Masateru KOIWA*** and Takashi KUROSAWA**

(May, 1982)

緒 言

われわれは1977年に *Eperythrozoon ovis* の接種試験を実施したが、その際供試の山羊の血液を塗抹して Giemsa 染色し、鏡検していたところ、赤血球に赤褐色に濃染する繊維状の小体（以下繊維状小体と略記）の存在することに気づいた。この小体は、1952年 Mukherjee, B. N. [8] が初めて発見し、ついで1961年 Bandaranayake and Neitz [1] が観察しているものと、形態学的に同一のものと考えられた。近年、Jain and Kono [3] はこの繊維状小体含有赤血球が、異常ヘモグロビンを含有していることを報告している。一方わが国の山羊の本小体含有赤血球に関する報告はいまだ全く見当たらないので、今回、私達が観察した山羊の繊維状小体含有赤血球（以下 FCE と略記）について若干の細胞学および理化学的検討を試みたので、その概要を報告する。

供試材料および観察方法

1. 供試山羊

酪農学園大学で実験用に飼育中の山羊12例および夕張郡長沼町にあるA牧場で飼育中の10例、計22例の、何れも頸静脈から採血した血液を供試材料とした (Table 1)。

* 仙台市役所衛生局

Sanitary Bureau, Sendai Municipal Office, 3-7 Kokubun-cho, Sendai-shi, Miyagi 980, Japan.

** 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 069-01, Japan.

*** 十歳市農業共済組合

Chitose-shi Agricultural Mutual Association, Chitose-shi, Hokkaido 066, Japan.

Table 1. Experimental Goats

Owner	Number of goats	Age (yrs.)	Sex		Species		
			male	female	Native	Japanese Zaanen	Mon-grel
College of Dairying	12	1-4	7	5	4	5	3
A Farm in Naganuma-cho	10	1-5	2	8	4	1	5

2. 光学顕微鏡観察

光学顕微鏡観察は Pappenheim 染色法を用いて染色（リン酸緩衝液, pH 7.2）した血液塗抹標本を用い, 1,000 倍の倍率で観察した。FCE の出現状態は, 赤血球数 1,000 個を算定し FCE の出現率が 20% 以下のものを (+), 20~50% のものを (++) , 50~80% のものを (++) および 80% 以上のものを (++) として区分した。

3. 電子顕微鏡観察

走査型電子顕微鏡観察：赤血球を 1.0% グルタルアルデヒド燐酸緩衝液 (pH 7.4) で 1 時間固定, アセトン系列で脱水した後, 金で蒸着し HHS-2R 型電子顕微鏡で観察した。

透過型電子顕微鏡観察：赤血球を 1.0% オスミウム酸燐酸緩衝液 (pH 7.4) で 40 分間固定, アセトン系列で脱水した後エボンで包埋, 超薄切片を作成し, これをウランと鉛で二重染色し, JEM7 型電子顕微鏡で観察した。

4. 理化学的観察

鎌状赤血球形成試験, 村山試験 (HbS 検出), 溶解度試験, 分光学的検査および電気泳動による Hb の検査は宮地が報告している方法 [7] に準じて実施した。その際, 分光学的検査は, Ox-Hb と Met-Hb の吸収曲線について検討し, また Hb の電気泳動はセルローズアセテート膜法により実施した。

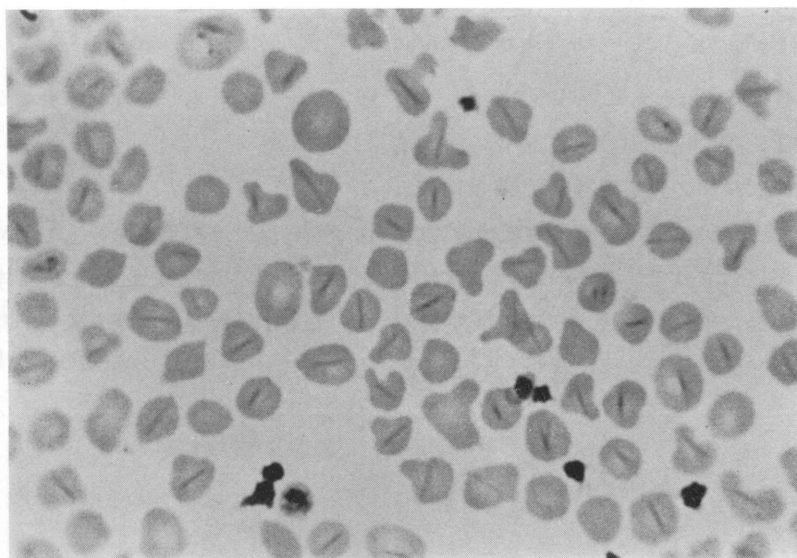
観 察 成 績

1. FCE の出現状況

22 例の供試山羊について FCE の出現率を算定したところ, FCE を全く認めない (—) のものが 7 例, (+) の出現率を示したものが 8 例, (++) のものが 6 例および (++) のものが 1 例とそれぞれの個体間で出現率の著しい差異が認められた。つぎに Ht 値が 34% で FCE が (++) の出現を認めた山羊に瀉血をおこなって Ht 値を 11% まで減少させたのち 23% まで再生する間の FCE の消長をみたところ, FCE の瀉血前の出現率は 81.3% であったものが, 最低の Ht 値を示した第 4 日目には 76.9% および Ht 値が 18% を示した第 6 日目には最低の 58.3% に減少し, その後 Ht 値の増加とともに出現率は回復した (Table 2)。

Table 2. Changes of rate of appearance of erythrocytes containing fibres by blood-letting

Course	Ht value (%)	Rate of appearance of erythrocytes containing fibres (%)
Before Blood-letting	34	81.3
The 2th day	21	77.3
The 4th day	11	76.9
The 6th day	18	58.3
The 8th day	18	62.8
The 10th day	23	78.0

**Fig. 1.** Microscopic findings of erythrocytes of goat bloodletted with Ht value of 11%. Fibres are observed in the poikilocytes. Pappenheim's stain $\times 1,000$

Ht 値の低下の認められた時期には、大小不同症、多染性赤血球および変形赤血球の多数出現が認められたが、繊維状小体の出現は多染性赤血球では著しく少なく、観察されたものもコマ状のものが主体を占めていた。しかし多数の変形赤血球では、繊維状小体の出現が認められた (Fig. 1)。つぎに繊維状小体の出現と遺伝との関係を明らかにするため FCE の出現率が (－)～(卅) の雌 8 頭に (－) または (＋) の出現率の雄 3 頭を交配し、得られた 9 頭の子山羊について FCE の出現率を検討した。その結果、FCE の出現率が (＋) の雄と (＋) 以上の雌の間に生れた 5 例の子山羊では、全例が (卅) の FCE の出現率を示した。しかし FCE の全く観察されなかった雌に (＋) の出現を示した雄を交配して生れた 2 例の子山羊

Table 3. Rate of appearance of erythrocytes containing fibres in mating

Mather goat No.		Father goad Name		Kid
No. 1 (－)	—	× No. A (+)	→	No. 1 (+)
No. 2 (+)			→	No. 2 (≡)
No. 3 (－)			→	No. 3 (≡)
No. 4 (≡)	—	× No. B (+)	→	No. 4 (≡)
No. 5 (+)			→	No. 5 (≡)
No. 6 (≡)			→	{No. 6 (≡) No. 7 (≡)}
No. 7 (－)	—	× No. C (－)	→	No. 8 (－)
No. 8 (－)			→	No. 9 (－)

Remarks. ().....Degree of appearance of red cells containing fibres.

の FCE の出現率はともに(+)であった。また雌と雄とが何れも(－)の組み合わせから生れた 2 例の子山羊では、両例とも FCE (－)であった (Table 3)。

2. 繊維状小体の光学顕微鏡所見 (Figs. 2 & 3)

Pappenheim 染色標本では、繊維状小体は赤血球の内部に赤褐色に濃染して認められ、赤血球 1 個に含まれているその数は通常は 1 本であったが、ごくまれには 2〜4 本認められた。その形は細長い線状、やや幅のある線維状、一端が鈍な長短多様な細長い棒状および時にはやや湾曲したコマ状などかなり多形性を示していた。

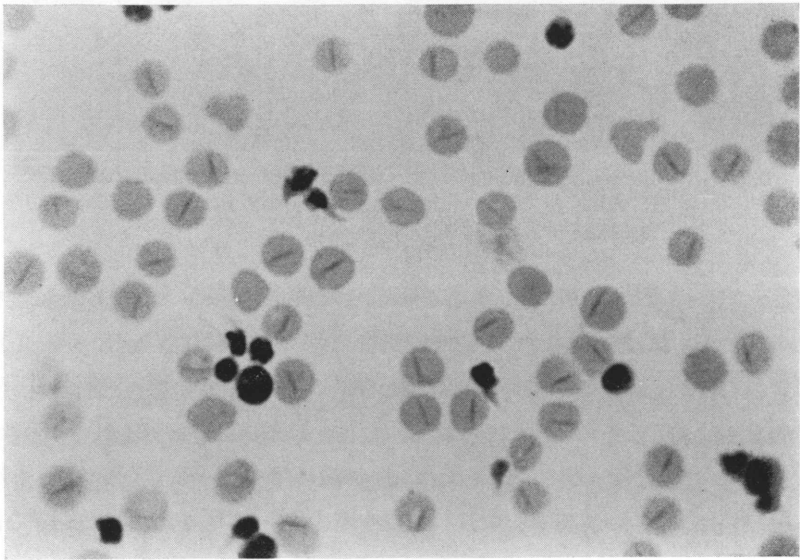


Fig. 2. Microscopic findings of the erythrocytes containing fibres. Pappenheim's stain ×1,000

3. 繊維状小体の電子顕微鏡所見

1) 走査型電子顕微鏡像 光学顕微鏡で繊維状小体が多数(冊)確認された赤血球を観察したところ、いずれの赤血球の立体像も正常な山羊の赤血球のそれと差異はみられず、また何れの赤血球の表面もスムーズで異常は認められなかった。2) 透過型電子顕微鏡像 繊維状小体の縦断面ではかなり電子密度の高いおおむね 160 \AA の太さの細長い繊維状物体が数本宛一束になって带状に配列し、各束はおおむね $1,200 \text{ \AA}$ の幅で併列するが如く、赤血球内に認められた (Fig. 4)。さらにこれらの繊維状小体の横断面では電子密度の高い 160 \AA の大きさの多数の点状物が円形～不正円形に束になっており数個が集団となって確認された (Fig. 5)。

4. 理化学的観察

繊維状小体陰性および陽性山羊の赤血球を供試して、鎌状赤血球形成試験、村山試験、溶解度試験、分光学的検査および Hb の電気泳動を実施した結果、繊維状小体陰性赤血球と陽性赤血球との間には、差を示す試験成績は全く得られなかった (Table 4)。

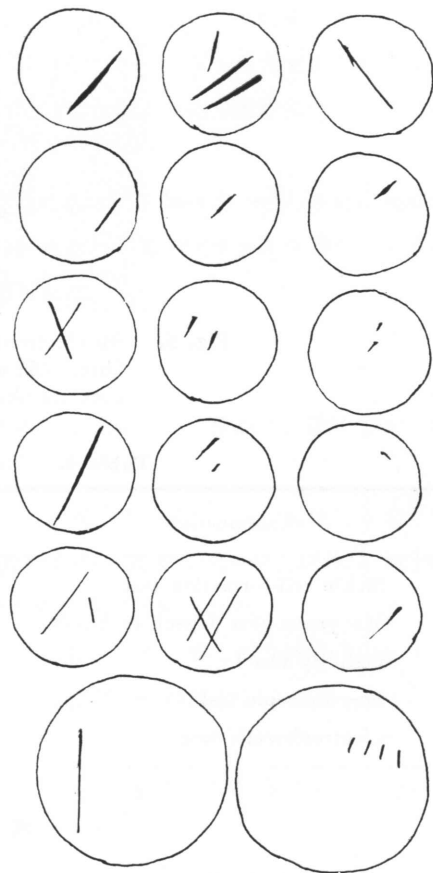


Fig. 3. Diagrams of the erythrocytes containing fibres.

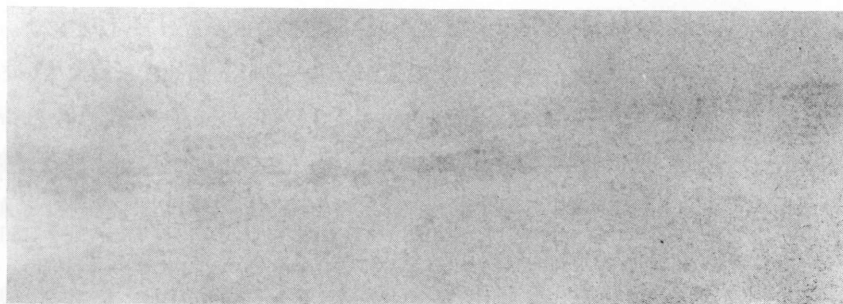


Fig. 4. An electronmicrograph of fibres in an erythrocyte. A longitudinal section. Two bundles consisting of several strings are observed. $\times 60,000$

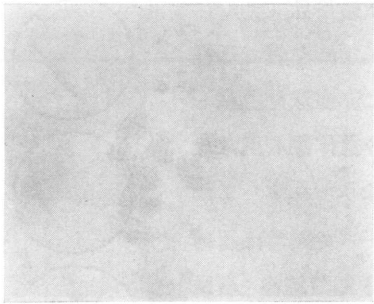


Fig. 5. An electronmicrograph cross section of a fibre. Six collections consisting of many dots are observed. $\times 50,000$

Table 4. Physico-chemical finding

Examination	Erythrocytes containing no fibres	Erythrocytes containing fibres
Sickle cell-formation test	negative	negative
Murayama test (Check of Hb S)	no change	no change
Stability test	68.7%	67.0%
Spectroscopic test	no difference between both	
Electrophoretic test	no difference between both	

考 察

今回、われわれは *Eperythrozoon ovis* の接種試験中の山羊に観察された繊維状小体含有赤血球について、その出現状況、光学および電子顕微鏡的観察所見、理化学的検査所見について、その成績を記載した。すなわち、これらの赤血球にみられた繊維状小体は、1952年 Mukherjee [8] によって初めて発見され、その後 Bandaranayake and Neitz [1], Krishna Reddy and Rao [6], Jain and Kono [3] および Uilenberg et al. [10] によって報告されている繊維状の赤血球内小体の光学顕微鏡的所見のそれと極めて一致していることが判明した。さらに今回得られた電子顕微鏡学的所見も Uilenberg et al. [10], Jain and Kono [3] および Finch et al [2] の報告しているそれと、大きさ、形態および微細構造が全く同様であることから、わが国で飼育されている山羊の中にも繊維状小体含有赤血球を有するもののあることが明らかとなった。

Simpson and Taylor [9], Kichen et al. [4・5] および Whitten [11] は、鹿の赤血球にも本小体の含有するもののあることおよびそれが人にみられる Shickling cell (Hb-S) に類似していることを報告している。しかしながら今回確認された山羊における繊維状小体含

有赤血球と、本小体を含有しない赤血球とについて物理化学的性状の比較検討を行ったところ、両者にはなんらの差も認められなかった。このことから、本小体含有赤血球内には異常ヘモグロビンがごくわずかしき含有されていないためのようにも推察され、この点については今後の説明が期待される。

Jain and Kono (1977), Uilenberg らは、赤血球にみられる繊維状小体の出現には遺伝的要因が関与することを推察しているが、今回のわれわれの親子関係と本小体含有赤血球の出現の観察でも同様のことを示唆する所見が得られた。

要 約

山羊の赤血球に認められた繊維状小体を含有する赤血球について検討し、次のような成績を収めた。

1. 22 例の山羊について繊維状小体含有赤血球の出現率をみたところ、陰性のもの 7 例 (31.8%), 20% 以下のもの 8 例 (36.4%), 50~80% のもの 6 例 (27.3%) および 80% 以上のもの 1 例 (4.5%) であった。また瀉血により出現率の低下が認められた。

2. 繊維状小体含有赤血球の出現率と親子関係をみたところ、雄と雌が陰性例同志の子は全例が陰性、陰性の雌と (+) の雄との子は (+), および (+) の雌と (+) の雄との子は全例が (++) であった。

3. 繊維状小体は Pappenheim 染色で赤褐色に染まり、通常は赤血球内で 1 本時には 2~4 本の細長い繊維状物として認められた。

4. 繊維状小体は透過型電顕観察で 160 Å の細長い繊維状物体が数本~10 数本宛 1 束となり、これが数束集合して 1 本の繊維状小体を形成していることが判明した。

5. 繊維状小体陽性血液を用いて、鎌状赤血球形成試験、村山試験、溶解度試験、分光学的検査および Hb の電気泳動を行ったところ、陰性血液のそれと差のない成績が得られた。

文 献

- 1) Bandaranayake, A. and Neitz, W. O., 1961. Mukherjeella caprae a parasite of the red blood cells of the goat. Ceylon vet. J. 9: 49-50.
- 2) Finch, J. T., et al., 1973. Structure of sickled erythrocytes and of sickle-cell hemoglobin fibres. Proceedings Nat. Acad. Sci. 70: 718-722.
- 3) Jain, N. C. and Kono, C. S., 1977. Fusiform erythrocytes resembling sickle cells in angora goats: light and electron microscopic observations. Res. vet. Sci. 22: 169-180.
- 4) Kitchen, H., et al., 1964. Hemoglobin polymorphism: its relation to sickling of erythrocytes in white-tailed deer. Science 144: 1237-1237.
- 5) Kitchen, H., et al., 1967. Hemoglobin polymorphism in white-tailed deer: subunit basis. Blood 29: 867-877.

- 6) Krishna Reddy, M. A. and Rao, C. G., 1964. A preliminary note on the occurrence of *Mukherjeella caprae* in a goat in Andhara Pradesh. *Indian vet. J.* **41**: 730-732.
- 7) 宮地隆興, 1978. 臨床検査技術全書, 第3巻, 血清検査, 三輪史郎編, pp. 241-249, 医学書院, 東京.
- 8) Mukherjee, B. N., 1952. *Bartonella* in goats. *Indian vet. J.* **28**: 343-345.
- 9) Simpson, C. F. and Taylor, W. J., 1974. Ultrastructure of sickled deer erythrocytes. I. The typical crescent and holly leaf forms. *Blood* **43**: 899-906.
- 10) Uilenberg, G., et al., 1978. Is *Mukherjeella caprae* Bandaranayake and Neitz, 1961 (rickettsiales) a microorganism? *Res. vet. Sci.* **25**: 152-156.
- 11) Whitten, C. F., 1967. Innocuous nature of the sickling (pseudosickling) phenomenon in deer. *Br. J. Haemat.* **13**: 650-655.

Summaay

The erythrocytes containing fibres of the goat were studied. The fibres were stained reddish brown with Pappenheim' stain. The number of the fibres in each of the erythrocytes was one in almost all cells, however, 2~4 fibres were in a few cells. The rates of the appearance of the cells containing fibres were (—) in 31.8%, (+) in 36.3%, (##) in 27.3% and (###) in 4.5% of the cases examined. By blood-letting, the rates of the appearance of the erythrocytes containing fibres decreased.

From the tracing of the parent and their kids, it was suspected that there was a genetic factor in the appearance of the erythrocytes containing fibres.

By electron-microscopic examinations, it was clarified that the fibres consisted of several bundles in which a lot of fine long fibres were gathered. There were no differences between the cells with or without fibres in the 5 tests such as the sickling formation test, the test for Hb-S, the Hb-solubility test, spectroscopic and electrophoretic tests of Hb.