

## 牛の小型ピロプラズマ寄生赤血球内に 出現する桿状小体に関する研究

高尾稔治\*・其田三夫\*\*  
高橋清志\*\*・黒沢 隆\*\*

Studies of the Rod-bodies in the Erythrocytes of Cows  
affected with *Theileria sergenti*

Toshiji TAKAO\*, Mitsuo SONODA\*\*, Kiyoshi TAKAHASHI\*\*  
and Takashi KUROSAWA\*\*

(May, 1983)

### 緒 論

日本における牛の小型ピロプラズマ(以下小型ピロと略記)は、紫山・宮島(1906)<sup>16)</sup>により発見されたが、その後長い間病原性のないピロプラズマの一種と見做されていた。しかし第2次世界大戦後石井・石原(1948)<sup>9)</sup>は小型ピロが畜牛に対して病原性のあることを確認して以来、本症について多くの研究が行なわれている。1972年、石原<sup>9)</sup>は日本の小型ピロは、*Theileria sergenti* Yakimoff and Dekhtereff 1930に一致することを明らかにした。さらに同氏<sup>7)</sup>は小型ピロの寄生した赤血球内に桿状の小体の出現することを報告し、これに桿状小体の名を付し、ついで角田ら<sup>23)</sup>は本小体の出現性および染色性に関して若干の検討を行なっている。Tayama<sup>21)</sup>は、桿状小体が ferritin 抗体法により鉄タンパクの明確な反応を示したことを報告している。最近、樋口ら<sup>4)</sup>は本小体をピロ原虫の死骸あるいは変性物と見做している。

以上の如く、わが国の小型ピロ寄生赤血球にみられる桿状小体については若干の研究が行なわれてはいるが、その本態に関してはいまだ解明されていない。

よって私達は、小型ピロ感染に伴う本小体の出現率の検索、光学顕微鏡、位相差および

---

\* 現在：神戸市 衛生局 食肉検査所

Present Address: Meat Inspection Section, Sanitary Bureau, Kōbe Municipal Office, Kobe, Hyogo 653, 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

電子顕微鏡を用いた形態学的ならびに組織化学的観察を行なったのでその成績の概要を報告する。

## 供試材料および方法

### 1. 供試材料

小型ピロを  $10^7$  個/kg 宛人工接種した生後 2~3 週齢のホルスタイン雄子牛 5 例の静脈血について、小型ピロの赤血球への寄生率および桿状小体の出現率を観察した。また 1 例の小型ピロ自然感染歴のあるホルスタイン雌成牛を摘脾し、さらに多数の原虫を出現させる目的で第 10 日に小型ピロ原虫を  $2 \times 10^{10}$  個/kg 接種し、桿状小体の出現率の推移を観察した。この例ではさらに小型ピロ寄生率が約 30% で、かつ桿状小体の出現率が約 45% の時期の頸静脈血を採取し桿状小体の形態学的観察および組織化学的観察に供試した。

### 2. 観察方法

#### 1) 出現率の観察要領

5 例のホルスタイン雄子牛では、接種後 5 日間隔で 60 日間、またホルスタイン雌成牛では 3 日間隔で 90 日間およびその後 7 日間隔で 35 日間観察した。小型ピロの寄生率の算定は頸静脈血の塗抹ギムザ染色標本 (メタノール固定, pH 6.4 の磷酸緩衝液使用) を用いて赤血球平均寄生率 (%) を求め、また小型ピロ寄生赤血球 200 個当たりの桿状小体含有赤血球数を算定し、桿状小体の出現率とした。

#### 2) 光学顕微鏡による観察要領

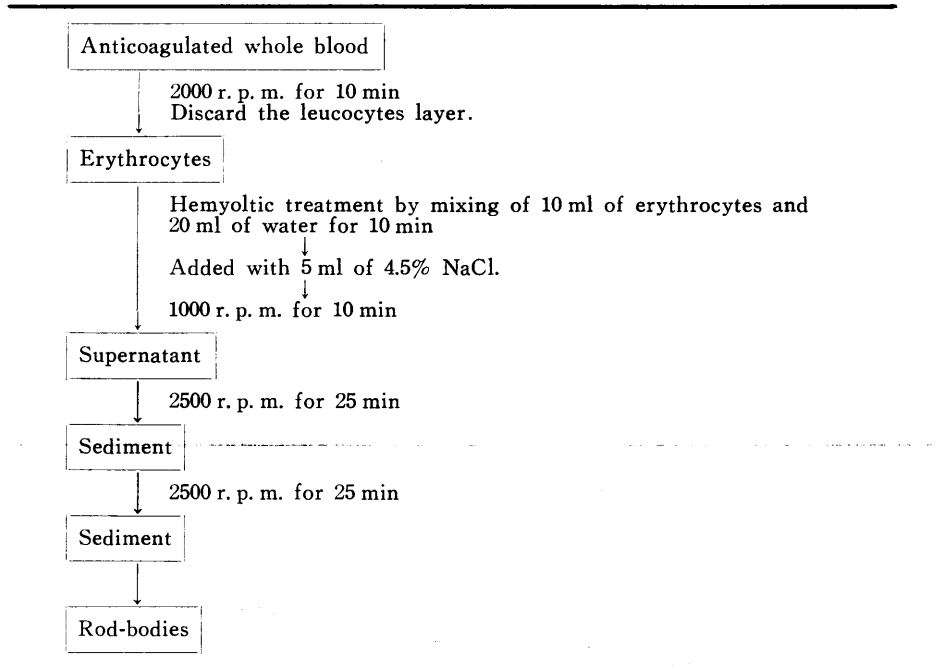
小型ピロ感染牛の頸静脈血の塗抹ギムザ染色標本 (メタノール固定, pH 5.4~7.0 の磷酸緩衝液使用) および水溶血法<sup>20)</sup> の変法 (Table 1) により得た桿状小体の生標本ならびに塗抹乾燥ギムザ染色標本 (メタノール固定, pH 5.4~6.4 の磷酸緩衝液使用) について形態学的観察を行なった。

#### 3) 位相差顕微鏡による観察要領

小型ピロ感染牛の頸静脈血ならびにその溶血液をスライドガラス上にとり、カバーガラスで被い、軽く圧定したのち位相差顕微鏡 (日本光学, DL レンズ) により観察した。

#### 4) 走査型電子顕微鏡による観察要領

水溶血法の変法 (Table 1) で分離した桿状小体を Tokunaga ら<sup>22)</sup> の方法に従って、1% グルタルアルデヒド液 (0.1 mol 磷酸緩衝液, pH 7.4) で  $4^{\circ}\text{C}$  で 1 時間固定し、0.1 mol 磷酸緩衝液 (pH 7.4) で 1 回洗浄した後アセトン系列で脱水、少量の純アセトン液中に再浮遊させその 1~2 滴をカバーガラス上に載せ風乾させる。ついで真空中で金蒸着を施し、日立 HHS-2R 型走査電子顕微鏡により観察した。

**Table 1.** A separation method of rod-bodies

### 5) 透過型電子顕微鏡による観察要領

小型ピロ感染牛の頸静脈血ならびに水溶血法の変法 (Table 1) で得た桿状小体を 5% グルタルアルデヒド液 (0.1 mol 磷酸緩衝液, pH 7.4) で 1 時間固定した後 1% オスミウム酸 (0.1 mol 磷酸緩衝液, pH 7.4) で 20 分間再固定し, アセトン系列で脱水後エポキシ樹脂 (Epon 812) で包埋, 超薄切片を作製し酢酸ウランと硝酸鉛とで二重染色し, 日立 JEN 7 型透過電子顕微鏡により観察した。

### 6) 組織化学的観察要領

小型ピロ感染牛の頸静脈血ならびに水溶血法の変法 (Table 1) で得た桿状小体の塗抹標本を作り, これらについてベンチジン染色 (ヘモグロビンの検出), Feulgen-Rossenbeck 法 (Deitch 変法, DNA の検出), メチルグリーン・ピロニン染色 (Unna-Pappenheim 染色, RNA の検出) と RNA-ase 消化試験 (Brachet テスト, RNA の検出), PAS 染色法 (多糖類の検出), ベルリン青法 (鉄の検出), アルーシャンブルー染色 (酸性粘液多糖類の検出), マロリー染色原法 (膠原線維の検出), ワイゲルト法 (線維素の検出) およびグリドリィ法 (真菌の検出) を用い検討した。その他マロリー染色原法 (膠原線維の検出) で使われる酸フクシンならびにグリドリィ法 (真菌の検出) で使われるメタニール黄による単染色も試みた (Table 3)。

## 試 験 成 績

## 1. 桿状小体の出現率

小型ピロは、ホルスタイン雄子牛5例の末梢赤血球中に接種後第10~15日、平均第13日に現われた。その後寄生率は経過とともに増加を続け、その平均値は接種後第45日と第55日とに最高値を示したのちやや減少した。接種前に平均32.2%であったHt値は、接種後には低下し平均23~28%の間を消長した。桿状小体は接種後第10~15日、平均第13日から小型ピロの出現と同時に小型ピロ寄生赤血球内に現われた。出現率は経過とともに増加を続けその平均値は接種後第50日に最高の平均値を示したが、その後は減少の傾向をとり、観察終了時には平均35.8%であった (Fig. 1 と Table 2)。

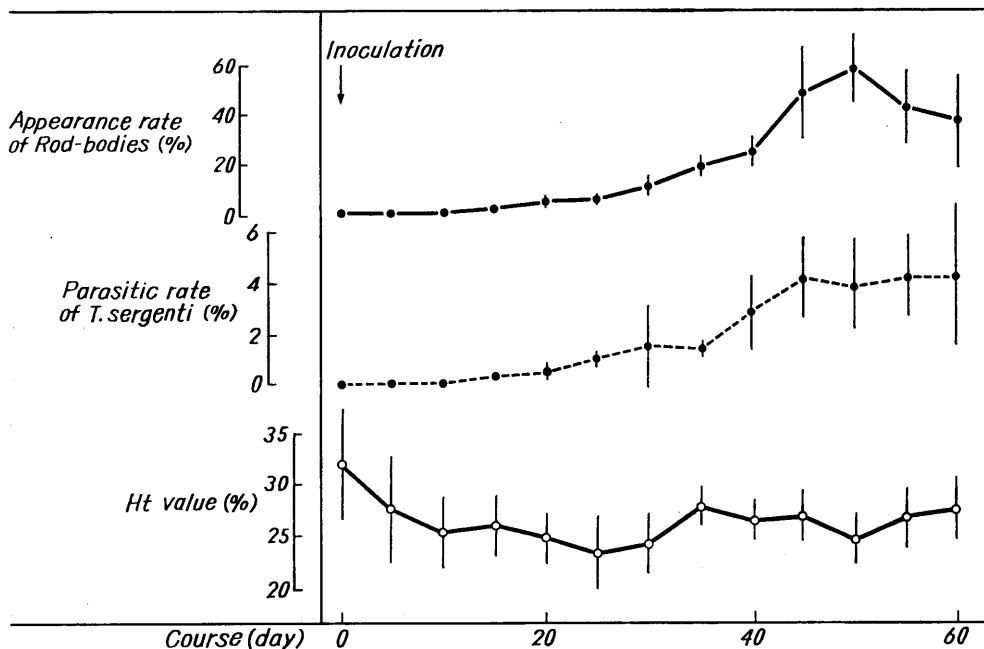


Fig. 1. Findings of the group inoculated artificially with *T. sergenti*.

摘脾ホルスタイン雌成牛では、小型ピロは摘脾後第6日に末梢赤血球中に現われた。その後寄生率は経過とともに増加を続け、第27日には32%に達し、その後やや減少がみられたが、摘脾後第42日には最高の33%に達した後減少し1.8~18.6%の間を消長した。摘脾前24%であったHt値は摘脾後にやや増加したものの摘脾後第24日まではほぼ25%前後を消長した。第42日には最低値(9%)を示したが、その後は増加の傾向をとった。桿状小体は摘脾後第6日から小型ピロの出現と同時に小型ピロ寄生赤血球内に現われた。

**Table 2.** Findings of the group inoculated artificially with *T. sergenti*

		Course (day)												
		0	5	10	15	20	25	30	35	40	45	50	55	60
Appearance rate of Rod-bodies (%)	1	0	0	0	2.0	4.0	3.0	6.5	18.0	18.5	33.5	60.5	53.0	7.5
	2	0	0	1.0	1.0	4.0	9.0	6.0	24.5	19.5	47.0	71.0	32.5	32.0
	3	0	0	0	2.0	3.0	6.0	8.5	21.0	31.5	74.5	70.0	59.0	44.0
	4	0	0	0	1.0	6.5	4.0	10.0	20.5	15.5	26.5	38.0	17.0	31.5
	5	0	0	1.0	2.0	4.0	2.0	18.0	9.5	28.0	57.0	43.0	40.0	64.0
	—mean	0	0	0.4	1.6	4.3	4.8	9.8	18.7	22.6	47.7	56.5	40.3	35.8
Parasitic rate of <i>T. sergenti</i> (%)	1	0	0	0	0.3	0.9	0.2	0.3	1.1	0.6	1.4	2.8	4.0	0.2
	2	0	0	0.1	0.2	1.0	1.5	1.3	0.6	3.2	3.6	6.0	4.8	5.0
	3	0	0	0	0.1	0.2	1.3	3.4	2.0	5.1	5.6	3.5	5.0	7.0
	4	0	0	0	0.1	0.1	0.4	0.7	0.9	2.6	6.2	1.1	0.6	1.3
	5	0	0	0.1	0.2	0.8	0.7	1.2	1.4	2.0	4.0	5.7	6.4	7.2
	—mean	0	0	0.04	0.18	0.42	0.82	1.38	1.20	2.70	4.16	3.82	4.16	4.14
Ht value (%)	1	28	26	23	28	24	21	24	27	27	28	25	26	31
	2	29	25	22	25	23	18	19	24	22	22	19	21	22
	3	26	21	23	21	22	21	23	29	27	25	25	30	28
	4	38	31	27	26	26	29	29	30	28	27	26	28	27
	5	40	37	32	30	29	26	27	27	26	29	26	27	28
	—mean	32.2	28.0	25.4	26.0	24.8	23.0	24.4	27.4	26.0	26.2	24.2	26.4	27.2

その後増加の傾向をとり、摘脾後第21日には最高の64%に達した後減少して第45日から全く消失した (Fig. 2)。

## 2. 光学顕微鏡による観察

桿状小体は、pH 6.6以上の緩衝液を用いたギムザ染色標本では、赤血球と同様に染色されるため判別は不可能であった。しかし pH 6.4以下では赤血球の細胞質よりやや濃い均一な桃紅色に染色された。すなわち pH の低下とともに明瞭さを増し、pH 5.4前後で最も明らかであった。その形は棒状ないしは桿状で、赤血球内に1個の原虫とともに1個観察されるものが最も多かったが、数個の原虫とともに1個みられるものもあった。稀ではあるが、1~数個の原虫とともに2個みられるものもあったが3個以上のものは全くみられず、また桿状小体のみが赤血球内に出現することはなかった。

洋梨状ないし楕円型などの比較的大きな形の小型ピロ寄生赤血球内での桿状小体の出現

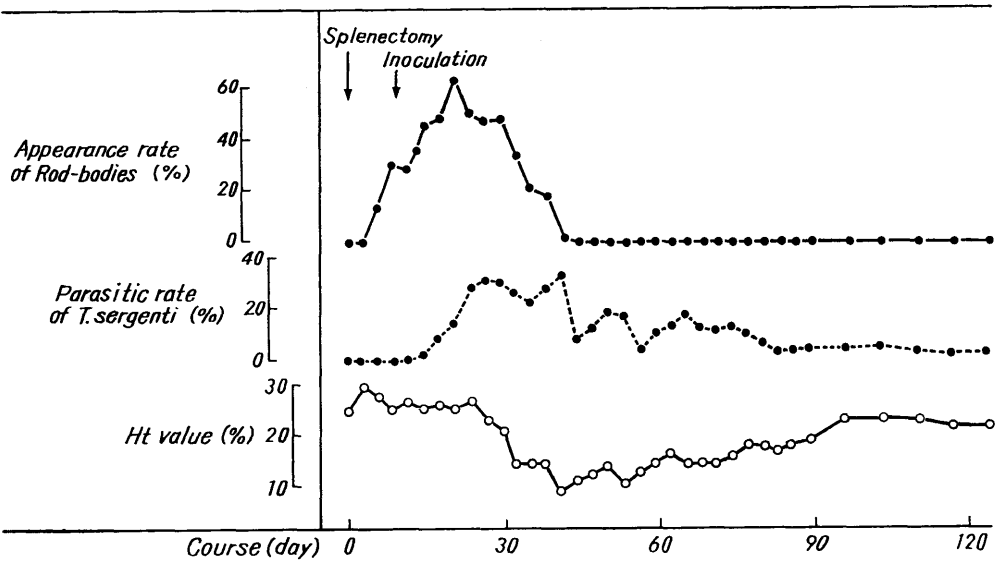


Fig. 2. Findings of a splenectomized and inoculated cow.

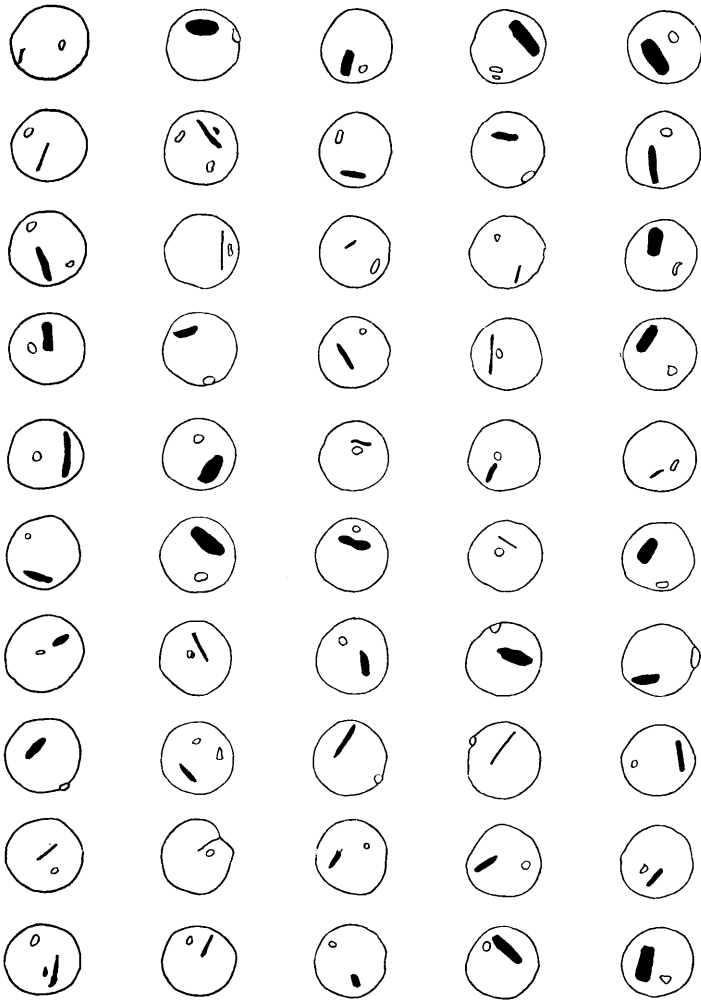
Table 3. Histochemical findings of *T. sergenti* and Rod-bodies

Method of stain	Before hemolysis		After hemolysis	
	<i>T. sergenti</i>	Rod-bodies	<i>T. sergenti</i>	Rod-bodies
Benzidine stain	-	*	-	+
Feulgen-Rossenbeck stain	+	-	+	-
RNA-ase digestion test	+	-	+	-
PAS stain	-	-	-	-
Berlin-blue stain	-	-	-	-
Alcian blue stain	-	-	-	-
Mallory stain	-	reddish	-	reddish
Weigert's fibrin stain	-	-	-	-
Acid-fucsin stain	-	reddish	-	reddish
Metanil yellow stain	-	*	-	yellowish
Methylgreen-pyronin stain	+	-	+	-

\* Undifferentiated with the cytoplasm of erythrocytes.

率 (平均 81%) は、点状ないしコマ状などの小さな小型ピロ寄生赤血球での出現率 (平均 14%) よりも多かった。

水溶血法で分離した生標本では、桿状小体は激しいブラウン運動を行っていた。また互いに癒着しやすく、時間の経過とともに集塊を形成した。



Noe: Dark ones are rod-bodies and open ones are *T. sergeni*

Fig. 3. Morphological findings of erythrocytes containing rod-bodies by phase-contrast microscopy

### 3. 位相差顕微鏡による観察

桿状小体には、内部構造はみられず、強く光を屈折し、暗黒色を呈し、きわめて確認しやすかった。一方、小型ピロは、全体が明るく不明瞭ではあるが内部構造が認められた。しかし暗黒色を呈することはなかった (Fig. 3)。

桿状小体の形は、針状、棒状ないしは桿状を呈し、大きさもかなり多様であった (写真 1~2)。

桿状小体は、赤血球内でブラウン様運動を行っており、小型ピロは、アメーバ様あるいはブラウン様運動を示した。しかし両者の運動はそれぞれ無関係で、互いに干渉しあう様子は全く認められなかった。

#### 4. 走査型電子顕微鏡による観察

桿状小体は、棒状ないし桿状を呈し、表面には横走する浅い縞を有しており、その大きさは $0.3\sim 0.9\ \mu\text{m}\times 1\sim 1.2\ \mu\text{m}$ であった。また桿状小体と原虫とのつながりを示す構造は観察されなかった(写真3)。

#### 5. 透過型電子顕微鏡による観察

桿状小体は、赤血球中で小型ピロと直接接触することなく離れて位置していた。割面上の形態は、桿状、不定な円形あるいは楕円形で、それをとりまく膜状構造は認められず、全体が均一な電子密度の高い物質からなっていた(写真4)。

#### 6. 組織化学的観察

桿状小体は、ヘモグロビン陽性であり、また酸フクシンとメタニール黄に強く染まった。しかしDNA、RNA、多糖類、鉄、酸性粘液多糖類、膠原線維、線維素および真菌などの染色には陰性であった。

一方、小型ピロは、DNAとRNAの染色に陽性を示し、その他の染色には陰性であった(Table 3)。

## 考 察

牛の小型ピロ寄生赤血球内に出現する桿状小体の本態を明らかにするため、小型ピロを人工感染させ、感染に伴うその出現率、光学顕微鏡、位相差および電子顕微鏡を用いた形態学的ならびに組織化学的観察を行なった。その結果、桿状小体は常に小型ピロとともに赤血球内に認められたが、桿状小体単独で赤血球内に出現することは決してなかった。また桿状小体は、小型ピロ寄生赤血球の全てに出現するのではなく、その出現率は感染の経過に伴いおおむね一定の推移を示した。すなわち桿状小体は、接種後おおむね第10~15日から出現しはじめ平均第50日に最高値を示した。しかし、摘脾例では、接種後おおむね30日までは小型ピロの寄生率と平行して赤血球内に認められたにもかかわらず、その後桿状小体のみが急速に消失した。このことから赤血球内の桿状小体の出現は小型ピロ寄生に起因することは明らかである。

形態学的には、桿状小体は棒状ないし桿状を呈し、ギムザ染色では、内部構造を認めず光を強く屈折し暗黒色を呈することから密度の高い物質であることが予測された。事実、透過型電子顕微鏡では、膜構造を持たず電子密度の高い均一な物質であることが明らかに



された。すなわち桿状小体はピロ原虫の変性物質<sup>4)</sup>とは考えられない。

赤血球内で桿状小体と小型ピロとは、たがいに明らかな距離を有して位置していた。また位相差顕微鏡による観察では、両者はそれぞれ関連のないブラウン様運動またはアメーバ様運動を行っており両者を結ぶ構造物も観察されなかった。すなわち桿状小体は小型ピロの連続物質ではないことが確認された。

生標本の観察では、桿状小体が時間の経過とともにしだいに集塊を形成するのが観察されたことから桿状小体は粘着性の強い物質であると思われる。

組織化学的観察では、桿状小体は DNA および RNA を持たず、多糖類、鉄、酸性粘液多糖類、膠原線維、線維素および真菌の染色に陰性を示した。しかしベンチジン染色でヘモグロビンに陽性の反応を示し、酸フクシンとメタニール黄には赤血球と同様の染色性を示した。これらのことから桿状小体はヘモグロビンに類似の塊状物であることが推察される。一方、小型ピロは DNA と RNA が陽性でベンチジン染色陰性を示したことから桿状小体は、小型ピロとは異なった物質であることが組織化学的にも判明した。

以上のことから、桿状小体は小型ピロ寄生によりヘモグロビンが何らかの作用をうけて変質し不溶性となり、棒状ないし桿状を呈したものと推察される。

いま、原虫寄生赤血球内における桿状小体に類似の物質の記載を文献に求めると、牛では英国およびオーストラリアの *Theileria* の veil<sup>14),27),28)</sup>、ならびにアフリカの *Haematoxenus veliferus* の veil、緬羊では *Haematoxenus spararatus* の veil<sup>26),29),32)</sup>、アフリカバッファロー<sup>25),31)</sup> およびインパラ<sup>5)</sup> の *Haematoxenus* の veil<sup>15),17),24),30)</sup> がある。また、リケッチャでも牛の *Paranaplasma caudata* の teil<sup>2),15),18),19)</sup> がある。原虫性疾患以外にもヒトのヘモグロビン C 症ならびにこれと同様の疾患とみなされている犬、猫および緬羊の疾病で赤血球内にヘモグロビンの結晶の出現することが報告されている。

Uilenberg<sup>24)</sup> は牛の *Haematoxenus veliferus* を発見し、この原虫の寄生する赤血球には桿状小体と類似の veil が出現することを報告している。この veil は赤血球内あるいは赤血球よりやや突出し原虫の側方からのびるようにして現われ、長方形あるいは先細の長方形を呈している。この veil は Vorstenbosh ら<sup>30)</sup> によれば桿状小体と同様にベンチジン染色に陽性を示し、位相差顕微鏡観察では光を強く屈折し、固定・染色したものより確認しやすかったとしている。さらに Vorstenbosh<sup>30)</sup> らは、これを電子顕微鏡で観察し膜様構造を認めず、結晶または結晶様物質からなっていることを認めている。なお今回の桿状小体の観察では結晶構造を認めていない点は、この veil の構造とは異っている。

一方、形態学的に *H. veliferus* と同一とみられている原虫が中央アフリカ共和国およびウガンダのアフリカバッファローにおいて認められている (Uilenberg<sup>26)</sup>, Young<sup>31)</sup> ら)。

Irvin ら<sup>5)</sup>は、セレンゲティ国立公園のインパラに *H. veliferus* に類似の veil を持つ *Haematoxenus* を発見している。また Uilenberg ら<sup>26)</sup> は、*H. veliferus* とは異なり veil が原虫と離れて出現する *Haematoxenus separatus* をタンザニアの緬羊において、また Young ら<sup>32)</sup> は、ケニアの緬羊において発見している。Uilenberg ら<sup>28)</sup> は英国のタイレリア症において、*H. veliferus* の veil とは異なった形態の、かつ原虫とは離れて出現する veil を認め、Morzaria ら<sup>14)</sup> および Uilenberg ら<sup>27)</sup> は、オーストラリアの牛のタイレリア症で英国のそれと同様の veil が出現することを認めた。

*Paranaplasma caudata* には、teil とよばれる構造物が *Paranaplasma* に付着して存在する<sup>18)</sup> ことが知られている。すなわちこれはニューメチレンブルーで染色され、水星状または垂鈴状を呈しており、また Espana ら<sup>2)</sup> は位相差顕微鏡を用い溶血赤血球でそれを確認している。Simpson<sup>19)</sup> は、この teil を電顕的に検討し、たておよびよこに周期性のある蛋白様線維の不規則な束よりなっていることをみており、さらに同氏<sup>18)</sup> は、この teil は膜につつまれておらず、*Paranaplasma* に必須の部分ではないとし、この teil がオキシテトラサイクリンの投与により *Paranaplasma* から分離することを観察している。また退化した *paranaplasma* においても同様の所見が観察されている<sup>19)</sup>。Kreier ら<sup>12)</sup> は、この *Paranaplasma* の teil は、蛍光抗体法で輝ったとしているが一方、*Haematoxenus* の veil は同法では輝ってはいない<sup>15), 29)</sup>。なお Tayama<sup>21)</sup> によれば小型ピロの桿状小体は ferritin 抗体法で陽性を示したとしている。

Vorstenbosh<sup>30)</sup> によると *Haematoxenus* の veil は、虫体の排泄物が赤血球のヘモグロビンを変性させ結晶化したもの、消化変性されたヘモグロビンが排泄された後に結晶化したもの、あるいは虫体の外側で不明な処理をうけて変質したヘモグロビンの可能性もあるとしている。

Grootenhuis ら<sup>3)</sup> は、この veil の出現には宿主特異性があるとし、Carson ら<sup>1)</sup> は *P. caudata* の teil の出現にも同様のことがいえるとしている。すなわちこれらの物質の生成には宿主側の要因の関与も推察される。ヒトのヘモグロビン C 症ならびに犬、猫および山羊の類似の疾病でもヘモグロビンの結晶の出現することが報告<sup>10), 13)</sup> されており、赤血球のヘモグロビンの性状の変化によってもこれらのような結晶物の出現することが推察される。

以上のように、小型ピロの桿状小体は *Haematoxenus* の veil および他の *Theileria* の veil とは形態学的に多少の相異点があるとはいえ、類似点が多く、その生成機序および本態はほぼ同一と考えられる。

## 総 括

小型ピロを人工感染させたホルスタイン雄子牛 5 例ならびに摘脾ホルスタイン雌成牛 1 例の頸静脈血を用いて、小型ピロ寄生赤血球内に出現する桿状小体について、経過に伴う出現率の検索、光学顕微鏡、位相差および電子顕微鏡を用いた形態学的観察ならびに組織化学的検討を行なった。その成績を総括すると次の如くである。

1. 人工感染雄子牛では、桿状小体は接種後平均第 13 日 (第 10~15 日) に小型ピロと同時に出現しはじめ、小型ピロと類似の消長をとった。
2. 摘脾接種成牛例では、桿状小体は小型ピロと平行した出現を示したのち第 45 日には小型ピロが 10% 程度寄生しているにもかかわらず消失して再出現しなかった。
3. 桿状小体は赤血球内で必ず 1 個ないし数個の小型ピロと共存し、単独で赤血球内に出現することはなかった。
4. 桿状小体は、メタノール固定、pH 5.4 のギムザ染色液で最も明瞭で桃紅色均一に染色された。
5. 桿状小体は棒状ないし桿状を呈し、その大きさは  $0.3\sim 0.9\ \mu\text{m} \times 1\sim 2.1\ \mu\text{m}$  であった。
6. 位相差顕微鏡 (日本光学, DL レンズ) による桿状小体の観察では、均一に暗黒色を呈し、きわめて確認しやすかった。
7. 赤血球内で桿状小体は小型ピロとは無関係なブラウン様運動を行っていた。
8. 走査型電子顕微鏡による観察では、横走する浅い縞を有する桿状物体として認められた。
9. 透過型電子顕微鏡による観察では、膜状構造は全く認められず、全体が均一な電子密度の高い物質からなっていた。
10. 桿状小体はベンチジン染色陽性で、酸フクシンとメタニール黄で可染性であった。しかし DNA, RNA および多糖類などの染色では陰性であった。

## 参 考 文 献

- 1) Carson, C. A., R. M. Weisiger, M. Ristic, J. C. Thurmon and D. R. Nelson, 1974. Appendage-related antigen production by *Paranaplasma caudatum* in deer erythrocytes. *Amer. J. Vet. Res.*, **35**: 1529-1531.
- 2) Espana, E. M. and C. Espana, 1963. *Anaplasma marginale*. II. Further studies of morphologic features with phase contrast and light microscopy. *Amer. J. Vet. Res.*, **24**: 713-722.
- 3) Grootenhuis, J. G., A. S. Young and G. K. Kanhai, 1976. Proceedings of the International Conference on Tick-borne diseases and their Vectors, Edinburgh. [Vorstenbosh, et al. 1978<sup>30)</sup>].

- 4) 樋口誠一, 1977. 牛タイレリアの微細構造に関する研究. I. 主として走査型電顕による観察. 第84回日本獣医学会講演追加討論.
- 5) Irvin, A. D., P. Omwoyo, R. E. Purnell, M. A. Peirce and B. Schiemann, 1973. Blood parasites of the impala (*Aepyceros melampus*) in the Serengeti National Park. *Vet. Rec.*, **93**: 200-203.
- 6) 石井 進・石原忠雄, 1948. 牛の小型ピロプラズマ病について. *日本獣医協会誌*, **1**: 1-5.
- 7) 石原忠雄, 1959. ピロプラズマ病. *家畜衛生年報*, 昭和34年度版: 76-81.
- 8) Ishihara, T., 1968. Bovine piroplasmosis in Japan. *Jap. Agric. Res. Quart.*, **3**(3): 23-31.
- 9) 石原忠雄・南 哲郎・古屋考造, 1972. 日本の牛に寄生するタイレリアの種類. *日獣誌* (学会号), **34**: 306.
- 10) Jain, N. C. and C. S. Kono, 1977. Fusiform erythrocytes resembling sickle cells in angora goats: light and electron microscopic observations. *Res. Vet. Sci.*, **22**: 169-180.
- 11) 神山隆一, 1978. 電子顕微鏡 (透過・走査). *臨床病理*, 特集, **34**: 219-239.
- 12) Kreier, J. P. and M. Ristic, 1963. Anaplasmosis. XI. Immunoserologic characteristics of the parasites present in the blood of calves infected with the Oregon strain of *Anaplasma marginale*. *Amer. J. Vet. Res.*, **24**: 688-696.
- 13) Lund, J. E., 1974. Hemoglobin crystals in canine blood. *Amer. J. Vet. Res.*, **35**: 575-577.
- 14) Morzaria, S. P., A. S. Young, C. D. Kimber and D. W. Brocklesby, 1977. The serological relationship of a British *Theileria* with other *Theileria* species using the indirect fluorescent antibody test. *Res. Vet. Sci.*, **22**: 330-333.
- 15) Mpangala, C., G. Uilenberg and B. E. C. Schreuder, 1976. Studies on Theileriidae (Sporozoa) in Tanzania. I serological characterization of *Haematoxenus veliferus*. *Tropenmed. Parasit.*, **27**: 192-196.
- 16) Miyajima, M. and G. Shibayama, 1906. Uber das in Japan beobachtete Rinder piroplasma. *Z. Hyg. Infect. Krankh.*, **54**: 189-200 [Ishihara, T. 1968<sup>8)</sup>].
- 17) Oteng, A. K., 1970. *Haematoxenus veliferus* Uilenberg, 1964: a new piroplasm of cattle, recorded at Entebbe, Uganda. *Bull. Epizoot. Dis. Afr.*, **18**: 19-20.
- 18) Simpson, C. F., 1977. Morphologic alteration of *Paranaplasma caudata* following treatment of calves with oxytetracycline. *Amer. J. Vet. Res.*, **38**: 1509-1513.
- 19) Simpson, C. F., J. M. Kling and F. C. Neal, 1965. The nature of bands in parasitized bovine erythrocytes. *J. Cell. Biol.*, **27**: 225-235.
- 20) 高橋清志, 1976. 牛の小型ピ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.
- 21) Tayama, H., 1975. Studies on the life of bovine *Theileria* species of Japan. *Kitasato Arch. of Exp. Med.*, **48**: 107-120.
- 22) Tokuanga, J., T. Fujita and A. Hattori, 1969. Scanning electron microscopy of normal and pathological human erythrocytes. *Arch. Histol. Jap.*, **31**: 21-35 [神山隆一, 1978<sup>11)</sup>].
- 23) 角田 清・須藤恒二・田中正三・石原忠雄・扇本敬司・藤田壽吉, 1960. 牛の小型ピロプラズマ寄生赤血球の桿状小体について. *水曜会記事*, **9**: 48-49.
- 24) Uilenberg, G., 1964. *Haematoxenus veliferus*, n. g., n. sp., parasite incertae sedis du sang de bovins a Madagascar. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **17**: 655-662.
- 25) Uilenberg, G., 1970. Existence d'*Haematoxenus veliferus* (Sporozoa, Theileriidae) en Afrique Centrale. Presence d'*Haematoxenus* sp. chz le buffle africain. *Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop.*, **23**: 455-456.
- 26) Uielnberg, G. and M. P. Andreasen, 1974. *Haematoxenus separatus* sp. n. (Sporozoa,

- Theileriidae), a new blood parasite of domestic sheep in Tanzania. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 27: 459-465.
- 27) Uilenberg, G., C. Mpangala, W. McGregor and L. L. Callow, 1977. Biological differences between African Theileria mutans (Theiler 1906) and two benign species of Theileria of cattle in Australia and Britain. Austral. Vet. J., 53: 271-273.
  - 28) Uilenberg, G., J. Robson and V. Pedersen, 1974. Some experiments on the transmission of Theileria mutans (Theiler, 1906) and Theileria parva (Theiler, 1904) by the ticks Amblyomma Variegatum (Fabricius, 1974) and Rhipicephalos appendiculatus Neumann, 1901, in Uganda. Tropenmed. Parasit., 25: 207-216.
  - 29) Uilenberg, G. and B. E. C. Schreuder, 1976. Further studies on Haematoxenus separatus (Sporosoa, Theileriidae) of sheep in Tanzania. Rev. Elev. Méd. Vét. Pays Trop., 29: 119-126.
  - 30) Vorstenbosh, C. J. A. H. V., G. Uilenberg, J. E. Dijk, 1978. Erythrocytic forms of Theileria velifera. Res. Vet. Sci., 24: 214-221.
  - 31) Young, A. S., A. D. Irvin and M. J. Woodford, 1973. Haematoxenus species from Ugandan buffalo syncerus caffer. J. Wild. Dis., 9: 94-98.
  - 32) Young, A. S. and S. J. Mchinja, 1977. Observations on Haematoxenus separatus Uilenberg and Andreasen 1974 in the erythrocytes of Kenyan sheep. Res. Vet. Sci., 23: 387-388.

### Summary

In the erythrocytes of 5 calves artificially infected with *T. sergenti*, the rod-bodies began to appear on the 13 th day on average after inoculation and showed similar rates of change of appearance to those of *T. sergenti*.

They were seen together with one to several *T. sergenti* in each of the containing erythrocytes. Rod-bodies alone were never seen in the cells. They were rod-like in shape and 0.3~0.9  $\mu\text{m}$  in size. In the cells, they were doing Brownian movement independently of *T. sergenti*.

Under the scanning electron-microscope, they appeared rod-like with shallow lateral stripes, and under the transmission electron-microscope, they appeared as uniform electron-dense objects without membraneous structure.

Histochemically, the rod-bodies stained positive with benzidine, acid-fuchsin and metanil yellow stains and negative for DNA, RNA and polysaccharide.

From the results obtained, it was concluded that the rod-bodies were degenerative hemoglobin in the erythrocytes.

**Explanation of plate****Plate**

1. Phase-contrast microscopy of red cells containing *T. sergenti* (white ones) and rod-bodies (dark one)  $\times 1,500$
2. Rod-bodies by phase-contrast microscopy after hemolysis  $\times 1,500$
3. Rod-bodies after hemolysis by scanning electron-microscopy  $\times 30,000$
4. A rod-body (R) and *T. sergenti* (T) by transmission electron-microscopy  $\times 30,000$

