

ニワトリの Leucocytozoon 病の予防に関する研究

VI. 新鮮無染色標本における *L. caulleryi* の Gametocyte の形態について

堀 慧・鳥海 徹・田辺 昭

Studies on the Prevention of Leucocytozoon Infection of the Chicken.

VI. The Observation of the Gametocytes of *Leucocytozoon caulleryi* in the Unstained Wet Blood Film.

Satoshi HORI, Toru TORIUMI and Akira TANABE

Usually the diagnosis of the infected chickens with leucocytozoon disease has been made by finding gametocyte of *Leucocytozoon caulleryi* in the blood smear stained by Giemsa's or May-Grünwald's method. But, as the inner part of the gametocyte can be observed in the unstained wet film of blood, the feature of the gametocyte considerably differs from that of the fixed sample.

Method: One drop of blood from an affected chicken is placed on a cover-glass. This is inverted on a slide and the preparation is rimmed with paraffin. Then it is examined with phase-contrast microscopy at 37°C.

Results and considerations: In macrogametocyte, the nucleus is rather small, usually have a curved or twisted rod shape and is suspended in protoplasm. The protoplasm is rich and filled with the immense number of fine granules. But in an usual smear sample, the nucleus shrinks and is covered with the granules at the time of smearing, and yet the granules are stained in dark purple by Giemsa's method, and hence it is considered that the shape of the nucleus is obscured.

In microgametocyte, the nucleus is globular or oval, rather large in size compared with the size of the gametocyte itself, and placed at the nearly central point of the cell. The granules of protoplasm are a little larger in size and less in number than that of the macrogametocyte, and as the most of the granules are attached around the nucleus, these look like a pearl necklace in an optical section. As the nucleus expands at the time of smearing, it extends on nearly the whole surface of gametocyte and the protoplasm is seen indistinctly around it. As the granules are attached to the nucleus, they scatter on the surface of the nucleus as it expands.

Most of the macro- and microgametocyte are covered with the membrane of the host cell. These cell membranes contain semifluid thinner than the protoplasm of the parasite. Some of which contain the granules of various sizes and they present the vivid Brownian motion. But these granules cannot be stained with Giemsa's dye.

緒 言

我が国に現在流行しているニワトリの leucocytozoon 病は、秋葉らが1954年の夏、兵庫県下ではじめて発見したもので、その後の研究¹⁾により本原虫は1909年に Mathis および Leger がトンキンのニワトリから発見した *Leucocytozoon caulleryi* に一致することが明らかになった。さらに秋葉²⁾³⁾は、本原虫の鶏体内における schizogony, gametogony および *Culicoides arakawae* の体内での sporogony をふくめた一連の發育環をあきらかにした。

本病の感染の有無を生前に診断するためには、Giemsa 染色または May-Grünwald 染色をほどこしたニワトリの血液塗抹標本中で、*L. caulleryi* の gametocyte を検出することが重要な手懸りとなる。したがって、本原虫の gametocyte の形態を Giemsa 染色以外の方法によって観察し、その細胞学的所見をあきらかにしておくことは、日常おこなわれている Giemsa 染色標本の鏡検にさいして、いっそう正確な判断をすることの助けになると考えられる。よって著者らは新鮮無染色標本、超生体染色標本、ならびにその他の染色標本による gametocyte の観察をこころみた。本報告では、新鮮無染色標本で観察した gametocyte の形態についてのべる。

新鮮無染色標本をもちいることにより、当然虫体が生存している本来の形態が観察できるが、その所見と、Giemsa 染色標本における所見とを比較すると、1個の細胞としての虫体の形態にかなりの相違がみとめられた。これは主として、虫体が slide 上で塗抹乾燥されるまでに、人為的に変形されるためにおこるものであって、この変形の状況を理解しておくことは、Giemsa 染色標本中の虫体を観察するために参考となることと考える。またこの方法を野外で応用した場合は一種の簡易診断法として、染色に要する時間を省略することができ、現場で多数のニワトリを診断することが可能となる。

観察材料および観察方法

1. 1963年および1964年の夏、当研究室所属の実験鶏舎でおこった薬剤投与による本病の感染予防試験の試験鶏のうち、無添加対照区に属して、本病に自然感染して、血中に本病の gametocyte のみとめられたものを観察材料として使用した。ニワトリの品種は白色レグホーン種、日令は40日ないし80日令のものである。

2. 観察方法としては、24mm×32mmの cover-glass および slide を使用したが、これらはあらかじめ充分洗滌、清拭したものを使用した。すなわち超生体染色に使用するものに準じて、クローム硫酸に1週間浸漬、2昼夜水洗、蒸留水中に1昼夜ずつ3回浸漬、さらに無水 alcohol 中に1昼夜ずつ2回浸漬したものを、無水 alcohol 中に保存しておき、用のぞんで、充分脱脂したガーゼで清拭して使用した。

病鶏の翼下静脈を穿刺して、湧出する血液の少量を cover-glass の中央下面にとり、これを slide 上に静かに伏せ、薄い膜状に血液が拡がるのをまって、cover-glass の周囲を paraffin で封じ、直ちに鏡検した。

位相差装置 および、写真撮影装置つきの顕微鏡を 37°C に調節した加温装置内において観察をおこなった。位相差装置としては主として Dark-Medium および Dark-High の油浸系を使用し、必要に応じ写真撮影をおこなった。

このようにして観察した場合でも、手技のいかんにより、また時間の経過により、虫体は順次死滅してゆくので、同一視野内の他の遊走性細胞が、充分活発に運動しているような状況のもと

でのみ観察をし、また観察時間も、採血時より15分以内に限定した。

観 察 結 果

現在までにえられた観察例にしたがい *L. caullryi* の gametocyte の一般的形態についてのべる。このほか、秋葉²⁾が記載している鞭毛をもった microgametocyte は、極めてまれにみとめられるものであって、著者らも2例観察したが、これらの小数例についての記載ないし意義づけは本報告から除外する。またこのほかに同じく血中に出現する本原虫の merozoite、すなわち秋葉³⁾⁴⁾の分類によるI期像ないしIII期像については観察例が不足しているのでこれも除外する。

本病の感染鶏に一般的にみとめられる *L. caullryi* の macro および microgametocyte は新鮮無染色標本では、遊走運動ないしアメーバ状運動はせず、つねに正円形をして、血液中に浮遊しており、さらに以下にのべるような特殊な形をしているので、容易に他の血液細胞とは識別することができる。

Macrogametocyte の形態：

原形質——13~15 μ の直径をもつ正円形で、やや不透明で、軽度な粘稠性をもっており、その中に無数の微細顆粒が充満している。これらの顆粒の大きさは約0.5 μ 以下で、ほとんど大小不同はみとめられない。位相差装置の Dark-Medium では、焦点面を上下するにつれて、光線を屈折して、白色に輝いてみえ (Fig. 1), また Dark-High では焦点面を上下するにつれて、青色、白色、橙色などに変化しながら輝いてみえる (Fig. 3)。普通は原形質中に静止しているが、一部の顆粒が、活発に Brown 運動しているもの、あるいは一定の方向に静かに流動している場合もみとめられる。このほかに特異な構造ないしは色素顆粒はみとめられない。

核——原形質の中央部、ないしはやや偏在していて、全く無構造で透明にみえる。したがって原形質の顆粒にはさまれた空隙のような状態でみとめられ、1焦点面では Fig. 1 にしめすように2~3核のようにみえても、焦点面を上下して、その立体的形状を推察すると、核は不正球形、バナナ形ないしは馬蹄形に彎曲した桿状形、またある場合は分葉形をなすというふうに、非常に多形性である。したがって一概に核の大きさの表現は困難であるが、原形質と核の容積の割合は、哺乳動物の好中球のそれに匹敵する程度と思われる。

宿主細胞被膜——虫体の周囲を完全にとりかこんでいるもの、虫体の一側に半月状に附着しているもの、すでに破壊して、虫体の一部ないしは、周囲にごみ状に附着しているものなどがある。また全く被膜がみとめられない虫体もある。

破壊されていない被膜は半流動性物質でみとめられており、これは虫体の原形質に比較するとやや透明度が高い点、ないしはその中の顆粒の Brown 運動の状況から推測して、やや密度の低い物質であると思われる。このなかには大小不同の顆粒が数個ないし十数個ふくまれている場合が多い。これらの顆粒の小型のものは、macrogametocyte と同程度ないしはそれよりもやや大きく、白色に輝きながらはげしく Brown 運動をしている。比較的大型の顆粒は3 μ に達するものもあり、このような顆粒は不透明で静止している。これらの顆粒は宿主細胞の核の破砕物または、その老廃産物と考えられる。またまれに宿主細胞の核が残っているもの、すなわち秋葉³⁾⁴⁾の分類でIV期像に相当するものがみとめられるが、この場合の核は新鮮無染色標本ですでにやや不透明で、褶状の構造がみとめられ退化変性をしているあり

さまがうかがえる。

Microgametocyte の形態：

原形質——一般に macrogametocyte よりわずかに小型で、直径は $11\sim 14\mu$ の正円形である。

原形質はわずかに不透明な半流動性で顆粒をふくんでいる。この顆粒は macrogametocyte の顆粒に比較するとやや大きく、光の屈折性も弱く、soft な感じである。顆粒の数は macrogametocyte に比較すると、はるかに少なく、一部は原形質中に不規則に散在しているが、大部分は核の周囲に密着している。そのため、核の横断面に焦点面をあわせた時は、核と原形質の境界線は真珠のネックレス状にみえる (Fig. 2)。焦点面を少し上げて、核の上端に焦点をあわせると、そこに附着している顆粒が核の上にかさなって明瞭にみえてくる。これによっても顆粒が核の表面に密着していることが推察できる。このほかに原形質中の特殊な構造、色素顆粒物はみとめられない。

核—— microgametocyte の核は、すべて虫体の中央部に位置し、球形、卵形ないしは凹凸のある不正球形で、直径は約 $6\sim 8\mu$ であり内容は透明無構造である (Fig. 2)。原形質の大きさに対する核の割合を比較すると macrogametocyte の場合よりかなり大きい。

宿主細胞被膜—— macrogametocyte の場合と全く同様である。

Gametocyte のその他の所見：

macro および microgametocyte は、前述のように、自力による遊走運動はおこなわないが、血液中の他の細胞と接触した場合に容易に変形する。とくに血液中の遊走性白血球に衝突された時は、はげしく凹陥、彎曲してコマ状にまで変形する (Fig. 3~Fig. 6)。しかしながらやがて相手の細胞を押しもどし、ふたたび本来の姿にもどる。このような状況は顕微鏡下で、しばしば観察されるが、遊走性白血球に攻撃されて、虫体が機械的に破壊されたり、貪食されるようなことはいまだみとめられない。したがって、本病の gametocyte は一見柔軟であるが、一方強い弾力性をもっていることが推察できる。

考 察

以上述べた新鮮無染色標本における macro および microgametocyte の形態と、秋葉³⁾らが記載し、また一般に容易に観察されているところの、Giemsa 染色標本における両 gametocyte の形態とを比較すると、両者の間にかかなりの相違がみられる。この相違は主として血中の gametocyte が塗抹、乾燥、固定の過程で、虫体の各部が変形するためにおこると考えられる。前述のように虫体それ自体が柔軟なものであるが、その中でもっともはげしく変形をうけるものは両 gametocyte の核である。

macrogametocyte の核は前述のように、本来必ずしも小型ではなく、種々の形の桿状形ないしは分葉型であるが、塗抹標本では、これらの多形性はほとんどみとめられず、秋葉²⁾³⁾が $3.5\times 5.0\mu$ 、ときに $2\times 7.0\mu$ の卵形をしめすと記しているとおりに、核は本来の形態に比較するとかなり収縮して、塊状に固定されるものである。

macrogametocyte の原形質は塗抹標本では、いくぶん伸展して固定されるので、新鮮標本でみられるよりは大きく、 15μ 以上のものが多い。原形質の顆粒は、Giemsa 染色標本では濃紫色に染まり、虫体全面にゆきわたっており、とくに核の上をも覆うため、macrogametocyte の核は、ますます小型に、しかも形が不明瞭となる。

microgametocyte の核は macrogametocyte の核に比較すると、反対に、塗抹時に広く伸展

して固定される傾向があり、ほとんど虫体の全体をしめるようになる。新鮮標本において核の表面に附着して見えた顆粒は、核の伸展に応じて、虫体の各部に分散され、Giemsa 染色により濃紅色にそまって観察される。原形質は核の伸展するのに押し流されたように、虫体の周囲またはその一部に、わずかに薄い膜として残り、淡青色に染る。

宿主細胞被膜はいずれの gametocyte も原形質の外側に、いろいろの中の zone としてのこり、Giemsa 染色により淡青色に染まるが、新鮮標本にみられるような顆粒状の物質は、全くみとめられない。また Giemsa 染色標本では宿主細胞被膜と原形質との間が遊離して、その間に透明な部分がみられる場合が多いが、新鮮標本ではこのような間隙はみとめられない。これは塗抹の際に人為的に剝離されたものと考えられる。

結 論

新鮮無染色標本によって *L. caulleryi* の gametocyte を観察した。その結果 Giemsa 染色標本におけるよりも、はるかに明確に、その細胞学的形態を知ることができた。このように両者の標本において、同種の細胞の形態に差がみとめられるのは、塗抹時に人為的に細胞が変形をうけるためと考え、両者を比較しながら考察を加えた。

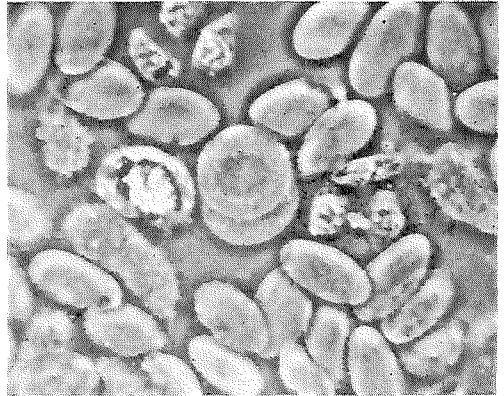
引 用 文 献

- 1) 秋葉ら (1958) : 鶏の *Leucocytozoon* に関する研究, 第1報, 日本における *L. caulleryi* に関する研究家畜衛生試験場研究報告, 39, 163~180.
- 2) 秋葉 (1960) : 鶏の *Leucocytozoon* 病に関する研究, II. ニワトリヌカカによる *L. caulleryi* の媒介について, 日本獣医学雑誌, 22, 309~318.
- 3) 秋葉 (1961) : 農林省家畜衛生試験場編, 技術の手引き I, 日本獣医師会.
- 4) 平戸 (1964) : 獣医微生物学, 養賢堂.
- 5) 日本血液学会 (1964) : 日本血液学全書, 6-1, 丸善.
- 6) Wintrobe (1962) : *Clinical Haematology*, Lea & Febiger, Philadelphia.

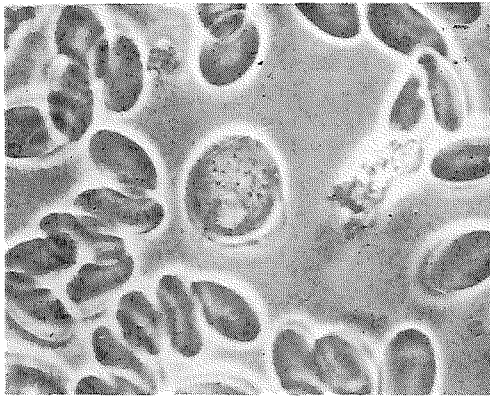
写真附圖



1



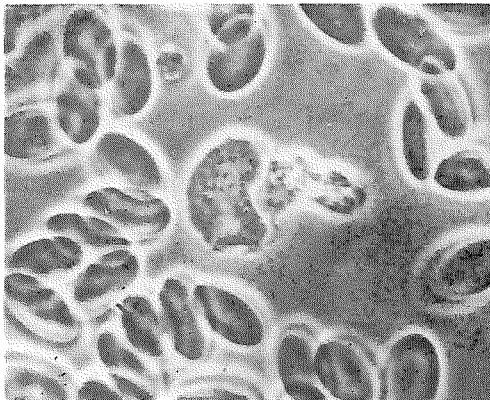
2



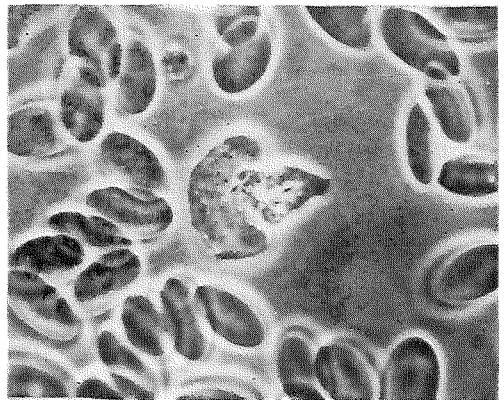
3



4



5



6

Explanation of Plate.

Photographs of gametocytes of *L. caulleryi* in the wet film of blood.

Fig. 1. Macrogametocyte. (Dark-Medium, $\times 1100$)

Fig. 2. Microgametocyte. (Dark-Medium, $\times 1100$)

Fig. 3~6. Deformation of a macrogametocyte attacked by a leucocyte
(serial photographs at intervals of 5~7 sec., Dark-High, $\times 1100$)