

神経壊死症ウイルスの新宿主スズキにおける病理組織像

鄭 星珠・宮崎 照雄・宮田 雅人・大石 巧

三重大学生物資源学部

Histopathological Studies on Viral Nervous Necrosis in a New Host, Japanese Sea Bass *Lateolabrax japonicus*

Sung-Ju JUNG, Teruo MIYAZAKI, Masato MIYATA and Takumi OISHI

Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

Viral nervous necrosis (VNN) is a disease with Nodavirus among larval and juvenile stages of many species of marine fish. In February 1995, VNN occurred in the juvenile of the Japanese sea bass *Lateolabrax japonicus* as a new host. The infection of the nodavirus was confirmed by PCR (polymerase chain reaction) method.

Histopathological study revealed the brain, spinal cord and retina had nerve cells with coagulative necrosis accompanied by formation of intracytoplasmic PAS positive inclusions and vacuoles. The necrotic cells were replaced by empty spaces after the destruction. In 48-day-old fish, nervous necrosis was marked in the diencephalon and medulla oblongata of the brain, the dorsal part of gray matter in the spinal cord, and the ganglion cell layer and nuclear layer in the retina. In 63-day-old fish, focal necrosis of nerve cells was obvious in all parts of the brain, where a few inflammatory cells followed, and in the dorsal area of the spinal cord. Necrosis of the retinal cells developed with accompanying inflammatory cell infiltration.

Electron microscopy revealed unenveloped spherical virus particles (30nm in diameter) present within inclusions or diffusely in the cytoplasm in the brain and spinal cord as well as the retina.

Key words : Japanese sea bass, VNN, Histopathology, Electron microscopy

緒 言

ウイルス性神経壊死症 (Viral nervous necrosis : VNN) は、脳、脊髄および網膜などの神経細胞がウイルス感染を受けて壊死することが特徴的な疾病で、人工種苗生産のイシダイ *Oplegnathus fasciatus* で最初に認められた¹⁾。シマアジ *Pseudocaranx dentex* からの

原因ウイルスは Striped jack nervous necrosis virus (SJNNV) と呼称された²⁾。本ウイルスの分離培養は成功していないが、そのビリオンの構造タンパク質と核酸の性状からノダウイルス科 (Nodaviridae) の1種と判断されている³⁾。VNN は現在、日本各地の人工種苗生産施設で生産されるイシダイ、シマアジ¹⁻⁴⁾のほか、キジハタ *Epinephelus akaara*⁵⁾、クエ *Epinephelus moara* およびトラフグ *Takifugu rubripes*⁶⁾ の仔稚魚でも発生が報告されている。また、最近、オーストラリアの Barramundi *Lates calcarifer*⁷⁾、ノルウェーの

Turbot *Scophthalmus maximus*⁹⁾, フランスの Sea bass *Dicentrarchus labrax*⁹⁾ でも似た病変を示し、同じ形態を持つウイルス感染症が報告され、世界的な広がりを見せている。本ウイルスは感染力が強く、冒された仔稚魚は100%近い死亡率を示すことも珍しくない^{1, 3-6)}。

1995年2月に静岡県下の人工種苗生産施設で生産されたスズキ *Lateolabrax japonicus* の稚魚に本病が発生し、スズキがSJNNVの新しい宿主となることが確認された。本研究では、VNNに罹病したスズキ稚魚の病理組織像と電子顕微鏡像を明らかにした。

材料および方法

1) 供試病魚

1995年2月に日本栽培漁業協会、南伊豆事業場にてスズキの48日齢の稚魚(体長12-14mm)50尾と、63日齢稚魚(体長15-20mm)200尾を入手した。SJNNVの感染は、同五島事業場において、病原ウイルスSJNNVから作製したプライマーを用いたPCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法により、スズキ病魚の脳においてSJNNVの構造タンパク質遺伝子を検出することにより確認した¹⁰⁾。なお、対照として疾病が全く発生していなかった同日齢魚群から健常魚を採取した。

2) 病理組織学的観察

スズキ稚魚の瀕死魚を採取し、リン酸緩衝10%ホルマリン水で全身固定後、常法に従ってパラフィン連続切片を作成した。マイヤー氏ヘマトキシリン・エオジン(H-E)染色、PAS反応(唾液消化法を含む)、ピロニン染色、クリューバー・パレラ染色、ウェル氏染色を目的に応じて施した。

3) 電子顕微鏡観察

病魚の一部をさらに改良Karnovsky固定液で前固定し、2%四酸化オスミウム酸で後固定後、常法に従ってEPON812で包埋し、日立H-800型電子顕微鏡で顕鏡した。

結 果

1) 発生状況

屋内コンクリート水槽(50t, 水温17-17.5℃)で

飼育していた44日齢のスズキ稚魚に異常死が起こり、4日後には23万尾の稚魚のうち14万尾が死に至った。その瀕死魚の多くは体表黒化を示し、鰓蓋を開け、水槽の表面近くを緩慢に遊泳していた。また、生存していた、48日齢および63日齢の病魚の多くは体躯彎曲を起こしていた。

2) 病理組織学的観察

脳: 稚魚の脳では大型神経細胞の観察は容易であるが、小形神経細胞とグリア細胞はクリューバー・パレラ染色などを用いても厳密に区別できない。病魚では大型神経細胞および小型の脳細胞がともにウイルス感染を受けていた。感染細胞は凝固壊死して細胞質の凝固を示す他、細胞質内に微細な空胞が多発するに至っていた。凝固壊死細胞では核膜と核仁が不明瞭になっていた。細胞質の空胞化の明瞭な壊死細胞は核濃縮や核融解を示していた。細胞質の空胞化の激しい壊死細胞では、核残渣だけが残り細胞質全体が空胞化に至り、さらには核および細胞質がともに消失していた。細胞消失に至った壊死細胞の跡は組織内に残る円形の空隙として観察された。こうした変性・壊死細胞の細胞質にはPAS反応陽性・ピロニン好性顆粒が出現していた。この壊死細胞に出現したPAS反応陽性顆粒は唾液消化されず、かつ健常魚の脳の神経細胞などの細胞質には通常観察されなかった。

48日齢稚魚では主に間脳の視床下部および延髄で、凝固壊死細胞、細胞質の空胞化を示す壊死細胞に加え円形空隙の形成が見られた(Fig. 1)。こうした壊死細胞は細胞単位に出現する他、病魚によっては巣状壊死巣として発現していた。63日齢稚魚になると壊死病変は脳内に広く拡がり、さらに細胞質の空胞化を示す壊死細胞と円形空隙からなる巣状壊死巣が多発していた(Fig. 2)。これら巣状壊死巣のなかには、軽微ながら炎症性細胞浸潤を示すこともあった。端脳では他の部分と比べ細胞壊死は軽度であり、嗅球では病変はほとんど見られなかった。しかし、間脳から中脳では、脳室周囲の視床部、視床下部および視葉の視蓋神経細胞層、中脳腹部において、細胞質の空胞化を示す壊死細胞の多発に加え、巣状壊死巣も多発していた(Fig. 2)。脳室や水道周囲の組織で壊死が顕著な例では壊死細胞が脳室内や水道内に剥落していた。後脳の小脳冠と小脳弁ではともに、顆粒層に壊死が顕著であり、微粒層においては血管の周囲だけに壊死細胞巣が小規模に見られた。この日齢では、脳下垂体

が形成されており、なかに壊死細胞が見られることもあった。他方、松果腺と血嚢体には著変はなかった。延髄では細胞質の空胞化を示す壊死細胞や壊死巣が広く観察された (Fig. 3)。

脊髄：48日齢稚魚では大型神経細胞の凝固壊死や細胞質の空胞化を示す壊死細胞および円形空隙が瀰漫的に見られた (Fig. 4, 5)。63日齢稚魚では後柱の小型神経細胞の巣状壊死が顕著となっていた。他方、大型神経細胞は細胞質内空胞形成と不明瞭な核膜と核仁を示して壊死していた。脊髄では炎症性細胞浸潤はほとんど観察されなかった。

眼球：48日齢稚魚では網膜において細胞質の空胞化を示す壊死細胞が神経細胞層、内顆粒層、外顆粒層で観察され、なかに壊死細胞の消失による空隙形成も見られた (Fig. 6)。こうした壊死細胞の細胞質にはPAS反応陽性・ピロニン好性顆粒が出現していた。ただし網膜の組織構造は保たれていた。63日齢稚魚では網膜での空隙形成と壊死が顕著となり、この変化は内顆粒層と外顆粒層で最も顕著であった。病変の進行した症例では網膜の組織構造が広範囲にわたって崩れ、さらに内限界膜が破壊された網膜では壊死細胞が神経細胞層から離れて硝子体内に剥離していた (Fig. 7)。髄鞘を染めるウェル氏染色では内網状層の神経線維の走行の乱れが観察された。壊死の進行した網膜内では細胞質にPAS陽性顆粒を持つ、好中球と思われる炎症性細胞浸潤が認められた (Fig. 8)。以上の網膜の病変は盲斑部に近いほど顕著であり、周縁に向かうほど軽微になる傾向があった。

神経節：脳神経節や脊髄神経節では神経細胞の萎縮、核濃縮が主に観察されたが、壊死病変は見られなかった。他の内臓諸器官・体側筋組織：胸腺、肝臓、脾臓、腎臓、消化管、心臓、鰓などの内臓諸器官および体側筋組織には特に壊死は認められなかった。しかし、48日齢稚魚、63日齢稚魚ともに肝細胞の貯蔵糖原の顕著な減少および消失をともなった萎縮が観察された。また、消化管に摂餌物はほとんど見られなかった。

3) 電子顕微鏡観察

脳、脊髄、眼球網膜の壊死細胞の細胞質内および空胞内に、直径30nm (n=50) のエンベロープを持たないウイルス粒子が共通して観察された (Fig. 9)。凝固壊死した感染細胞では核が濃縮し、細胞質全体にウイルス粒子が見られた。他方、細胞質内に薄い膜で包まれた球

形の封入体が形成されることもあり、封入体の中に多数のウイルス粒子が密に詰まったり、結晶状配列をしたものも観察された (Fig. 10, 11)。封入体の中にはウイルス合成過程で作られると思われる線状の構造物が出現することもあり、そこでは線状に並ぶウイルス粒子が見られた (Fig. 12)。こうした封入体の大きさはさまざまであり、核よりもかなり大きいものも観察された。また、細胞質内や細胞の間では封入体からウイルスが放出された形跡と思われる円形空隙が多く観察された (Fig. 13)。細胞質内空胞形成が顕著になった細胞では、細胞質内、空胞内および細胞外にウイルス粒子が瀰漫的に分布するのが観察された。なお、ウイルス感染を受けた脳の神経細胞はニッスル小体を形成する粗面小胞体塊が分散・消失し、ミトコンドリアも変性していた。髄鞘の周期線の周期間線の崩壊像が観察されたので、有髄神経線維を持つ希突起膠細胞にもウイルスの感染があったと考えられた (Fig. 10, 14)。しかし、電子顕微鏡レベルで神経膠細胞の同定はできなかった。

考 察

病魚の脳および脊髄における感染壊死細胞の細胞質には共通して、光顕レベルで糖原とは異なりアマラーゼに消化されない、PAS陽性の顆粒の形成が顕著であった。このPAS陽性顆粒は凝固壊死細胞および細胞質内空胞形成を示す凝固壊死細胞の両方に観察できた。この顆粒は電子顕微鏡観察におけるウイルス封入体に相当すると考えられた。ウイルス粒子がPAS陽性になるとは考えにくく、封入体内のなんらかの物質がPAS陽性に反応していると推察された。

48日齢と63日齢稚魚では病変の差が認められた。つまり48日齢稚魚では、特に脊髄の大型神経細胞の細胞質内空胞形成を示す凝固壊死が顕著であった。脳では大型神経細胞および小型脳細胞は細胞単位で壊死していた。また、眼球網膜では、感染細胞の細胞質内空胞形成が顕著で、壊死消失後の跡が空隙として観察された。63日齢稚魚では、脳の広範囲にわたり巣状壊死巣が多発し、その一部には軽微な炎症性細胞の浸潤も観察された。ただし、この炎症性細胞浸潤は特に眼球網膜で顕著になる傾向があった。63日齢稚魚では造血組織内で好中球と判断される細胞の形成が進んでおり、それらが血行を介

して病巣部に浸潤したと考えられた。以上の所見から、スズキの病魚では、他魚種の病魚同様に、脳、脊髄および網膜の神経細胞を中心に細胞単位の壊死が起こるが、63日齢稚魚ではむしろ巣状壊死が顕著となり、炎症性細胞浸潤も加わっていた。63日齢稚魚では、造血組織における好中球などの細胞の増生が顕著となっており、それにともなって脳および網膜の壊死病巣に炎症性細胞浸潤が起こり、脳炎および網膜炎に進展すると考えられた。

48日齢までの仔稚魚は脳および脊髄の神経細胞が冒されたため斃死し、また63日齢まで成長した稚魚は、同様に脳および脊髄の神経細胞の壊死のため遊泳異常や脊椎変形などの外見異常を示す他、網膜の障害により失明し、そのため摂餌不能になり衰弱・斃死に至ると考えられた。

ウイルス性神経壊死症は高い斃死率を示すため海産魚の種苗生産期の疾病の中でも重要な疾病である。また、養殖産業の発達により、魚類種苗の移動の範囲も広がってきているので本疾病の伝播を防ぐための技術の確立などの努力が今後必要である。

要 約

1995年2月、ウイルス性神経壊死症(VNN)が新宿主であるスズキ *Lateolabrax japonicus* に発生し、その48日齢と63日齢の病魚について病理組織学的検討、電子顕微鏡観察を行った。

病理組織学的に脳、脊髄、網膜の神経細胞は凝固壊死し、細胞質には空胞が形成されていた。壊死細胞が消失した跡は円形の空隙として観察された。また、細胞質内でのPAS反応陽性・ピロニン好性顆粒はウイルス封入体に起因するものと考えられた。48日齢では脳の間脳および延髄、脊髄の後柱、網膜の神経細胞層、顆粒層で壊死が顕著であった。63日齢では巣状壊死が脳の全体と脊髄の後柱で顕著となり、脳では炎症性細胞浸潤も加わっていた。網膜細胞の壊死も顕著になり、炎症性細胞浸潤をともっていた。

電子顕微鏡観察では脳、脊髄、網膜で、直径30nmのエンベロープを持たない、円形のウイルス粒子が細胞質内と封入体内で観察された。

謝 辞

本研究のためのサンプルを提供して頂いた日本栽培漁業協会南伊豆事業場の島 康洋場長および病原ウイルスの確定検査を行なっていただいた同五島事業場に篤く御礼申しあげます。

文 献

- 1) YOSHIKOSHI, K. and K. INOUE. Viral nervous necrosis in hatchery-reared larvae and juvenile of Japanese parrotfish *Oplegnathus fasciatus* (Temminck & Schlegel). *J. Fish Dis.* 13: 69-77 (1990).
- 2) MORI, K., T. NAKAI, K. MUROGA, M. ARIMOTO, K. MUSHIAKE and I. FURUSAWA. Properties of a New Virus Belonging to Nodaviridae Found in Larval Striped Jack (*Pseudocaranx dentex*) with Nervous necrosis. *Virology* 187: 368-371 (1992).
- 3) ARIMOTO, M., K. MORI, T. NAKAI, K. MUROGA, and I. FURUSAWA. Pathogenicity of the causative agent of viral nervous necrosis disease in striped jack, *Pseudocaranx dentex* (Bloch & Schneider). *J. Fish Dis.* 16: 461-469 (1993).
- 4) 有元 操, 丸山敬悟, 古澤 巖. シマアジのウイルス性神経壊死症の発生状況. *魚病研究*, 29 (1): 19-24 (1994).
- 5) MORI, K., T. NAKAI, M. NAGAHARA, K. MUROGA, T. MEKUCHI and T. KANNO. A viral Disease in Hatchery-reared Larvae and Juveniles of Red-spotted Grouper. *Gyobyo kenkyu* 26: 209-210 (1991).
- 6) 中井敏博, NGUYEN HUU DUNG, 西澤豊彦, 室賀 清, 有元 操, 大槻観三. クエおよびトラフグにおけるウイルス性神経壊死症の発生. *魚病研究*, 29 (3): 211-212 (1994).
- 7) GLAZEBROOK, J. S., M. P. HEASMAN and S. W. de BEER. Picorna-like viral particles associated with mass mortalities in larval barramundi, *Lates calcarifer* Bloch. *J. Fish Dis.* 13: 245-249 (1990).
- 8) BLOCH, B., K. GRAVNINGEN and J. L. LARSEN. Encephalomyelitis among turbot associated with a picornavirus-like agent. *Dis. aquat. Org.* 10: 65-70 (1991).
- 9) BREUIL, G., J. R. BONAMI, J. F. PEPIN and Y. PICHOT. Viral infection (picorna-like virus) as-

-
- sociated with mass mortalities in hatchery-reared seabass (*Dicentrarchus labrax*) larvae and juveniles. *Aquaculture*. 97 : 109-116 (1991).
- 10) NISHIZAWA, T., K. MORI, N. TOSHIHIRO, I. FURUSAWA and K. MUROGA. Polymerase chain reaction (PCR) amplification of RNA of striped jack nervous necrosis virus (SJNNV). *Dis. aquat. Org.* 18 : 103-107 (1994).

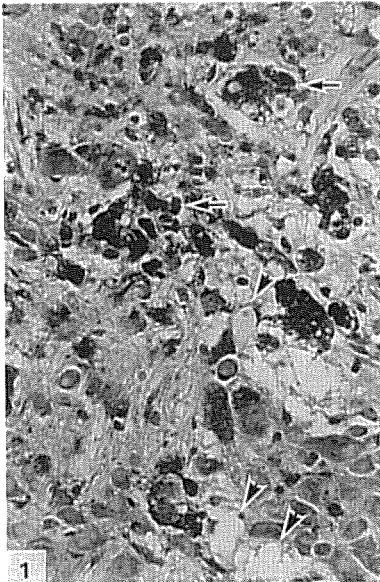


Fig. 1 Inferior lobe of 48-day-old juvenile has nerve cells showing coagulative necrosis (arrows) with formation of intracytoplasmic vacuoles (headarrows) and PAS positive inclusions. PAS reaction. X320

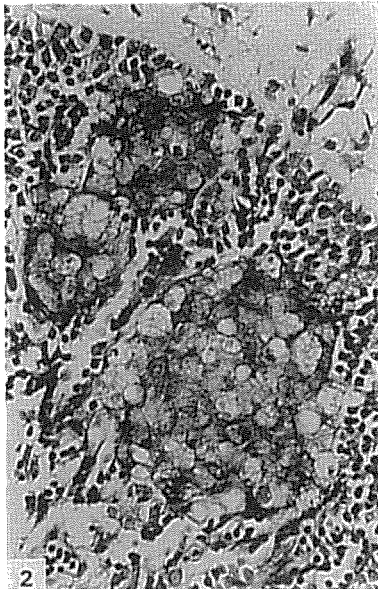


Fig. 2 Optic tectum of 63-day-old juvenile shows focal necrotic areas in the granular layer of optic tectum. Kluver-Barrera's stain. X320

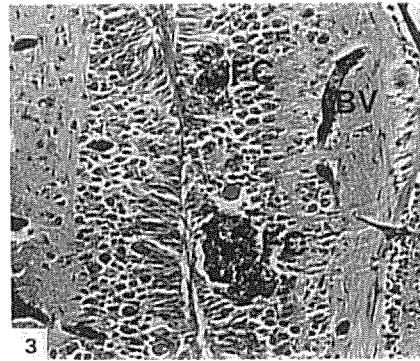
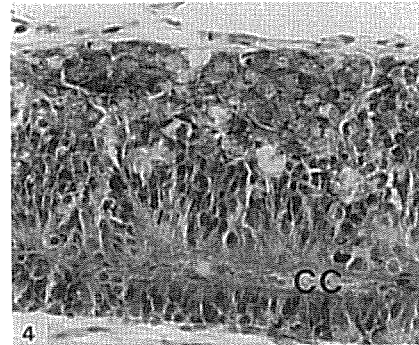


Fig. 3 Sagittal section of the medulla oblongata of 63-day-old juvenile displays dilatated blood vessel (BV) and focal necrotic areas (FC) with a few inflammatory cells. PAS reaction. X160



Figs. 4-5 Spinal cord of 48-day-old juvenile.
Fig. 4 The dorsal part of this spinal cord shows nerve cells undergoing coagulative necrosis. CC : Central canal. HE. X320

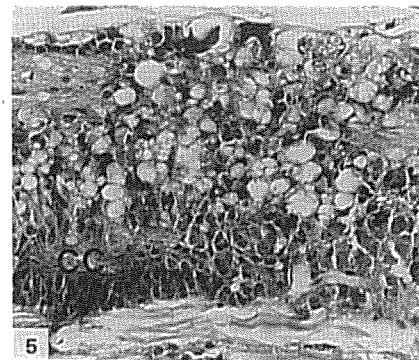


Fig. 5 The dorsal part of the spinal cord contains necrotic nerve cells with large intracytoplasmic vacuoles. CC : Central canal. HE. X320

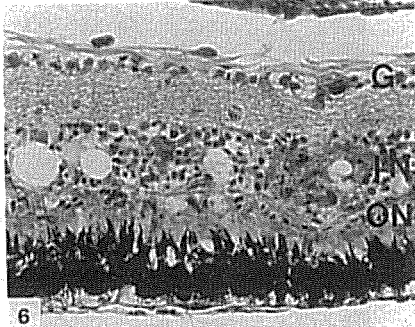


Fig. 6 Retina of 48-day-old juvenile displays necrotic cells with vacuole formation in the ganglion cell layer (G) and nuclear cell layer. IN : inner nuclear layer. ON : outer nuclear layer. HE. X320

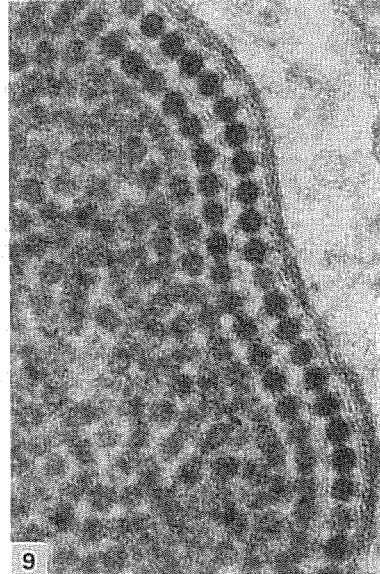


Fig. 9 High magnification of electron microscopy reveals virus particles with approximately 30nm in a diameter and spherical shape within the cytoplasm of nerve cell in the spinal cord. X100,000

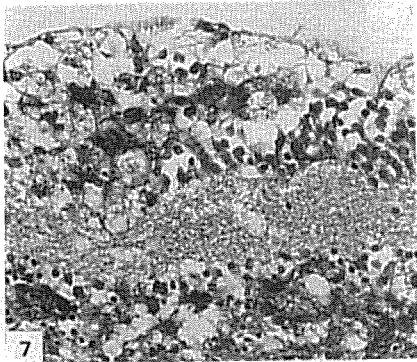


Fig. 7-8 Retina of 63-day-old juvenile.
Fig. 7 Retinal layer structure is destroyed due to intensive necrosis of retinal cells. PAS reaction. X320

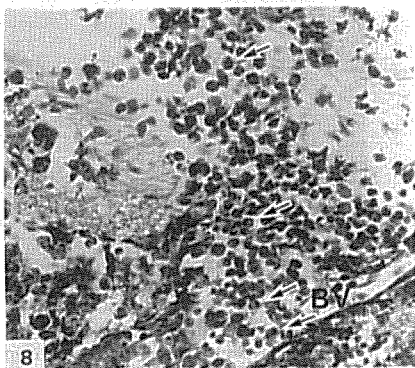


Fig. 8 Neutrophils (arrows) infiltrate into necrotic area occurred around the blood vessel (BV). PAS reaction. X320

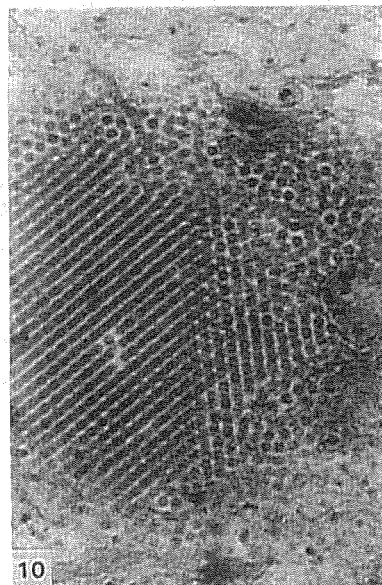


Fig. 10 Electron micrograph shows virions with crystal array in the cytoplasm of a necrotic cell in the retina. X50,000

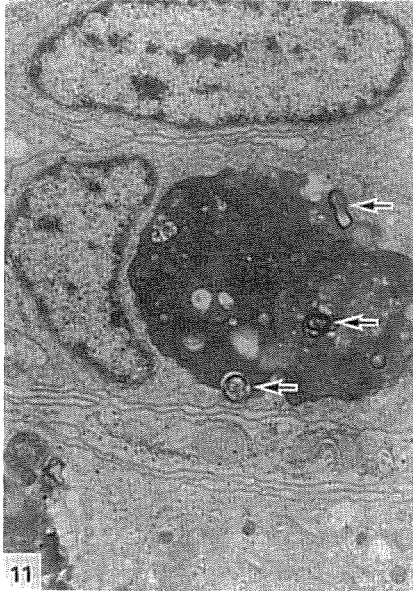


Fig. 11 Electron micrograph shows numerous number of virions in the intracytoplasmic inclusion body (IB) of oligodendrocyte having the myelin sheath (arrows). X 7,000

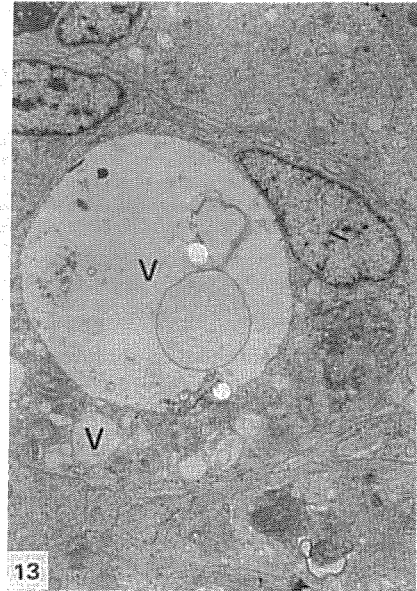


Fig. 13 Electron micrograph shows various sizes of intracytoplasmic vacuoles (V) in the nervous cell which formed after virion release from inclusion bodies. X 4,000

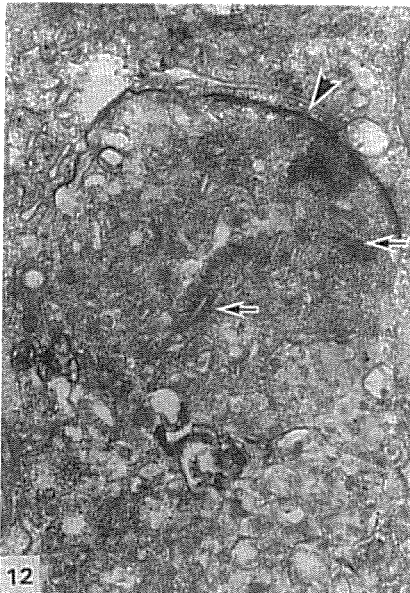


Fig. 12 Electron microscopy of inclusion body within nerve cells reveals parts of the outer membrane (head arrow) destroyed and virions released through. Virus-associated lamellar structures (arrows) formed. X12,000

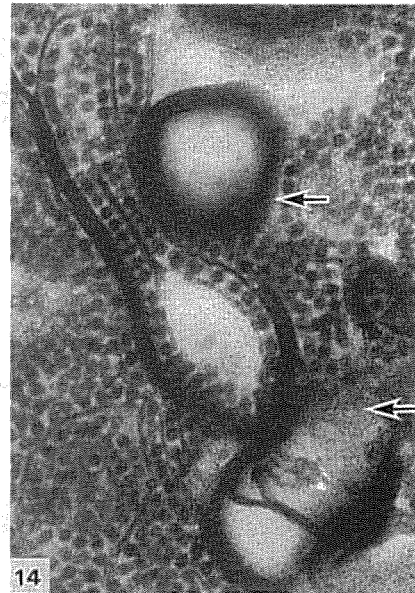


Fig. 14 High magnification view of Fig. 10. The intraperiod line (arrows) of myelin sheath was destroyed. X70,000