

## ブリ稚魚変形症の原因菌および病理組織

界外 昇<sup>\*1</sup>・宮崎照雄<sup>\*2</sup>・窪田三朗<sup>\*3</sup>

(昭和 59 年 4 月 13 日受理)

### The Pathogen and the Histopathology of Vertebral Deformity in Cultured Yellowtail

Noboru KAIGE<sup>\*1</sup>, Teruo MIYAZAKI<sup>\*2</sup> and Saburoh S. KUBOTA<sup>\*3</sup>

<sup>\*1</sup>Chusei Liverstock Hyg. Ser. Ctr., Takachayakomori, Tsu, Mie, Japan

<sup>\*2</sup>Fac. Fish., Mie Univ., Edobashi, Tsu, Mie, Japan

<sup>\*3</sup>Nippon Veterinary and Zootechnical College,  
Kyonan, Musashino, Tokyo, Japan

(Received April 13, 1984)

Vertebral deformity occurred in cultured marine fish, yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) at an occurrence rate of 2.1% from July to September, 1982 in Mie Prefecture. Eighteen deformed fish (11-15 cm in body length) were investigated with bacteriological, soft radiographical and histopathological technics.  $\beta$ -hemolytic streptococcal bacterium was dominantly isolated from the brain of the diseased fish and identified as *Streptococcus iniae*. The soft radiographical technic confirmed that the deformity was due to vertebral lordosis, kyphosis and scoliosis at the trunk and tail parts. The histopathology of diseased fish was characterized by a massive infiltration of cocci-laden macrophages and production of granulomas containing cocci in the third ventricle, maninges and granular layer of cerebellar cortex of the brain. There were also granulomas in the hepatec capsule and peritoneum.

魚類の変形症には種々の原因が報告されている。そのうち細菌ではブリの *Streptococcus* sp. 感染 (宮崎, 1982), 原生動物ではマス類の *Myxosoma cerebralis* の頭蓋骨寄生 (HOFFMAN *et al.*, 1962, YASUTAKE, *et al.*, 1970), ブリの *Myxobolus buri* の脳寄生 (江草, 1983) が知られている。栄養性疾患としては, ビタミンC欠乏症のマス類 (ASHLEY, *et al.*, 1975), 栄養性ミオパチーのトラフグ稚魚 (延東ら, 1979) に変形がみられている。薬剤ではサルファ剤中毒のブリ (窪田ら, 1970) や有機燐系農薬中毒の淡水魚 (窪田ら, 1982) に変形が起こっている。

今回, 1982年7月に $\beta$ 型溶血性連鎖球菌の脳感染による脊椎変形症がブリ稚魚に発生した。本病について細菌学および病理組織学的に検討を行ったのでその結果を報告する。

#### 材料および方法

1982年7月, 三重県下の養殖漁場でモジャコ期よりイカナゴおよびイワシのミンチで飼育してきたブリ稚魚 (*Seriola quinqueradiata*) に変形症が発生した。変形症の

発生は7月に最も目立ち, その後9月まで発生が散見された。その期間中, 1小割で変形のため捕獲処分した病魚は2.1% (63000尾中1302尾) であった。供試魚は上記小割から7月中に採捕された変形魚18尾 (体長11~15cm) である。なお7月中は細菌性類結節症の発生もあり, オキシテトラサイクリンが治療目的で投与されていた。

軟X線写真撮影は脊柱変形のみられた10尾について軟X線 (3mA, 30mV) で1分間側方向および背方向から行った。

病理組織学的検査は病魚18尾について外観観察の後, 10%ホルマリン液にて固定し, 常法に従って3~5 $\mu$ mのパラフィン切片を作製した。組織標本はヘマトキシリン・エオジン染色, ギムザ染色, PAS反応, グットバスター染色を施した。

細菌分離は病魚6尾の脳, 心臓, 肝臓, 腎臓から, 5%綿羊血液加トリプトソイ寒天平板培地 (栄研) を用いて行い, 37°Cで24時間, 好気および嫌気培養を行った。分離細菌の性状試験は, 医学細菌同定の手びき第2版 (坂崎, 1974) および新細菌培地学講座, 上・下



Fig. 1. Yellowtail showing vertebral deformity.  
 図 1. 病魚の外観写真. 脊柱の上下彎がみられる.

(坂崎, 1979, 1980) に準じて行った。ただし, 10°C および 45°C における発育試験は 5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天平板培地を, 食塩濃度 6.5% および pH 9.6 における発育試験はハートインフュージョンブイヨン(ニッスイ)を使用した。

### 結 果

#### 剖検所見および軟 X 線写真像

病魚の脊柱は側彎および上下彎(図 1)を呈し, 側彎部の断面では脊椎骨の神経弓門が彎曲内側方向に変形し, それに伴って脊髄も変位していた。軟 X 線写真像でも同様に脊柱の側彎と上下彎がみられた(図 2)。重症例では彎曲局所の脊椎骨間が彎曲内側の収縮, 対側の伸張を示していた。また, 側彎を呈しているものでは肋骨が左右不対称になっていた。しかし, 背椎骨の脱臼, 骨折等はみられなかった。剖検的に脳に充血がみられたが他器官に著変はなかった。

#### 病理組織学的所見

脊椎: 剖検所見で脊柱彎曲のみられた局所では脊椎骨が変形し, その脊椎骨間の線維論が彎曲内側では収縮, 対側では伸張していた。重度に彎曲したものでは背椎骨の彎曲内側接続部がずれているもの(図 3)もあった。

脳: 脳では脳髄膜(図 4, 7), 視葉内第 3 脳室内(図 5, 6), 小脳顆粒層内(図 8)に肉芽腫あるいはマクロファージの浸潤, 集簇巣が形成されていた。そのうち肉芽腫は内部に凝固壊死細胞や乾酪物質を含み, マクロファージと類上皮細胞層で囲まれていた。いずれの病巣でもマクロファージにグラム染色で陽性の球菌の貧食像および増殖像がみられた。脳髄膜には充血がみられることも多く, 一例ではあるが小脳に出血があった。

肝臓: 18 例中 16 例の肝臓被膜に肉芽腫(図 9)が形成されていた。肉芽腫内部は乾酪化し, その周囲をマクロファージ, 類上皮細胞が取り囲み, さらに外側を結合組織が取り囲んでいた。これらの病巣および炎症性細胞内に球菌は観察されなかった。

腸間膜: 肝臓に形成されていたものと同様の肉芽腫(図 10)が腸間膜でも散見された。

心臓: 心外膜に 1 例ではあるが肉芽腫の形成がみられた。

#### 細菌検索結果

検索した 6 例の全ての脳より  $\beta$  型溶血性グラム陽性球菌(図 11)が分離された。そのうち 1 例には  $\alpha'$  型\*溶血性グラム陽性球菌が混合していた。他の内臓諸器官から細菌は分離されなかった。

分離菌の性状は Table 1 に示した。分離された両菌は

Table 1. Biochemical characteristic of the isolates from yellowtail.

characteristics	$\beta$ -hemolytic isolates	$\alpha'$ -hemolytic isolates
Cell form	cocci	cocci
Gram stain	+	+
Catalase	—	—
Oxidase	—	—
OF test	F	F
Voges-Proskauer	—	+
Growth at: 10°C	—	+
45°C	—	+
65% NaCl	—	+
pH 9.6	—	+
Growth after 60°C		
30 minutes	—	—
Growth on		
40% Bile agar	—	+
Hydrolysis of		
Hippurate	—	—
Esculin	+	+
Arginine	+	+
Acid from:		
Arabinose	—	—
Lactose	—	—
Mannitol	+	+
Raffinose	—	—
Sorbitol	—	—
Trehalose	+	+
Sucrose	+	—
Glycerin	—	—

F: Fermentation.

\* 平戸勝七編: 獣医微生物学 (1973) による。

**Table 2.** Comparison in characteristics between the isolates and  $\beta$ -hemolytic *Streptococcus* strains previously reported.

characteristics	$\beta$ -hemolytic isolates	ayu and amago*	yellowtail**	ayu, rainbow, trout and tilapia***	ayu****
Growth at: 10°C	—	—	—	—	—
45°C	—	—	—	—	—
6.5% NaCl	—	—	—	—	—
pH 9.6	—	—	—	—	—
Growth on 40% Bile agar	—	—	—	—	—
Hydrolysis of					
Hippurate	—	—	—	—	—
Esuculin	+	+	+	+	+
Arginine	+	+	+	+	+
Acid from:					
Arabinose	—	—	—	—	—
Lactose	—	—	+	—	—
Mannitol	+	+	+	+	—
Raffinose	—	—	—	—	—
Sorbitol	—	—	—	—	—
Trehalose	+	+	+	+	+
Sucrose	+	+	+	+	+
Glycerin	—	—	—	—	—

\* Reported by ONISHI *et al.* (1978).\*\* Reported by MINAMI *et al.* (1979).\*\*\* Reported by KITAO *et al.* (1981).

\*\*\*\* Reported by UGAJIN (1981).

カタラーゼ陰性、オキシダーゼ陰性、O-F 試験で発酵などの性状を示し、連鎖球菌属に分類された。連鎖球菌属の種分類上重要な key とされている 10°C, 45°C, pH 9.6, 6.5% NaCl における発育および馬尿酸加水分解試験では  $\beta$  型溶血性連鎖球菌はいずれも陰性を示し、 $\alpha'$  型溶血性連鎖球菌では馬尿酸加水分解のみ陰性を示すが他は陽性であった (Table 2)。

### 考 察

魚類に発生する脊椎変形の原因は種々ある。ブリの *Streptococcus* sp. 感染症 (宮崎, 1982) と *Myxobolus buri* 感染症 (江草, 1983), サケ・マス of *Myxosoma cerebralis* 感染症 (HOFFMAN, *et al.*, 1962) では、微生物がそれぞれ脳や頭蓋骨内に侵入したために脊椎変形が起こっている。これらの変形症では脳の神経障害が変形の原因となっていると考えられている。トラフグの栄養性ミオパチーでは体側筋組織の退行性病変による運動障害が脊椎変形の原因とされている (延東ら, 1979)。サケ・マスや channel catfish (*Ictalurus punctatus*) のビタミン C 欠乏症 (ASHLEY, *et al.*, 1975, WILSON, *et al.*, 1973)

では脊椎骨の膠原線維の形成不全による骨折が変形の原因となっている。ブリのサルファ剤中毒 (窪田ら, 1970) やボラなどの有機燐農薬中毒 (窪田ら, 1982) では、神経伝達の障害による脊椎が脱臼、骨折して脊椎変形が起こるといわれている。

今回研究した変形ブリ稚魚では、全例の脳に  $\beta$  型溶血性連鎖球菌の侵入と、細菌を貪食したマクロファージの集簇、肉芽腫形成が観察された。一方、脳内および頭蓋骨内に寄生虫の侵入像は認められなかった。さらに変形した脊椎骨には骨折像や骨基質の形成不全はなく、体側筋の著しい退行性病変も起こっていなかった。以上の事実から、ブリ稚魚にみられた脊椎の変形では、連鎖球菌の脳内感染で生じたマクロファージの集簇あるいは肉芽腫が脳組織を圧迫して運動障害を起こし、二次的に脊椎の変形が生じたと推察される。このように  $\beta$  型溶血性連鎖球菌感染症では脳内感染とそれに起因する脊椎変形が主病徴と言える。本病の場合全身感染が軽度で、肉芽腫は肝被膜、腸間膜等に限られていた。これは本症発生期間中に細菌性類結節症の治療目的のためにオキシテトラサイクリンを餌料に添加していたためと考えられる。脳

は哺乳類では脳血液関門により薬剤が作用しにくいとされており、魚類でも同様と推察され、脳を主体とした感染病巣が発達していたと推測される。

ブリ稚魚の脳から分離された $\beta$ 型溶血性連鎖球菌は、アユ、アマゴ、ニジマス、テラピアなどの連鎖球菌症の病魚からの分離菌(大西ら, 1981, KITAO, *et al.*, 1981, 城, 1982)と同じ性状を示した。上記の淡水魚の病魚から分離された $\beta$ 型溶血性連鎖球菌は *Streptococcus iniae* に同定されており(北尾ら, 1981\*), ブリ稚魚の脊椎変形症の原因菌も *S. iniae* と判断された。なお、混在していた $\alpha'$ 型溶血性連鎖球菌は既報(楠田ら, 1976, 1978; 北尾, 1982)のブリ連鎖球菌症原因菌 *Streptococcus sp.* に同定された。

### 要 約

三重県下の養殖場で発生したブリ稚魚の脊椎変形症について細菌学的および病理組織学的に検討した結果、以下のようであった。

1. 病魚の外観は脊柱の側彎および上下彎がみられ、軟 X 線写真像でも脊柱の側彎および上下彎が認められた。
2. 病理組織所見では、脳、肝臓、腸間膜および心臓に細菌を貪食したマクロファージの集簇巣および肉芽腫形成が特徴であった。
3. 細菌検索した全例の脳から *Streptococcus iniae* が、また、その内1例より *Streptococcus sp.* が同時に分離された。

### 文 献

- ASHLEY, M. L., J. E. HALVER and R. R. SMITH (1975): Ascorbic acid deformity in rainbow trout and coho salmon and effects on wound healing, 769-786, *Pathology of Fishes* ed. by RIBELIN, E. W. and G. MIGAKI, The University of Wisconsin Press, U.S.A., 1004 pp.
- 延東 真, 宮崎照雄, 窪田三朗, 大林萬鋪, 長野泰三, 松本紀男 (1979): 養殖魚の栄養性ミオパチー症候群に関する研究—II, 種苗生産中に発生したトラフグの栄養性ミオパチー症について. 魚病研究, 13(4), 183-187.
- HOFFMAN, L. G., D. E. GLARENCE and A. BRADFORD (1962): Whirling disease of trouts caused by *Myxosoma cerebralis* in the United States. *Special Scientific Report—Fisheries*, Washington, D.C. 427, 1-15.
- 城 泰彦 (1982): 淡水養殖魚の連鎖球菌症症例. 魚病研究, 17(1), 33-38.
- KITAO, T., T. AOKI and R. SAKOH (1981): Epizootic caused by  $\beta$ -haemolytic *Streptococcus* species in cultured freshwater fish. *Fish. Path.*, 15(3/4), 301-307.
- 北尾忠利 (1982): 連鎖球菌の検査法—培養学的, 生化学的および血清学的性状を中心として—. 魚病研究, 17(1), 17-26.
- 窪田三朗, 小島清一, 石田昭夫 (1970): サルファ剤の副作用. 同誌, 4(2), 98-102.
- 窪田三朗, 宮崎照雄, 江草周三 (1982): 魚病アトラス, 新水産新聞社, 東京, 212 pp.
- 楠田理一, 川合研児, 豊嶋利雄, 小松 功 (1976): 養殖ハマチから分離された *Streptococcus* 属の新魚病細菌について. 日本水産学会誌, 42 (12), 1345-1352.
- 楠田理一, 小松 功 (1978): 各種病魚から分離された *Streptococcus* 属細菌の比較研究. 同誌, 44(10), 1073-1078.
- 見奈美輝彦, 中村正夫, 池田弥生, 尾崎久雄 (1976): 養殖ハマチから分離された $\beta$ 溶血レンサ球菌. 魚病研究, 14(1), 33-38.
- 宮崎照雄 (1982): 連鎖球菌症の病理学的研究—病魚の病理組織像. 同誌, 17(1), 39-48.
- 大西圭二, 城 泰彦 (1981): 淡水養殖魚の連鎖球菌症に関する研究—1. 1977年および1978年に養殖アユおよびアマゴから分離された $\beta$ 溶血連鎖球菌の性状. 同誌, 16(2), 63-67.
- 坂崎利一 (1974): 医学細菌同定の手びき第2版, 近代出版, 東京, 335 pp.
- 坂崎利一 (1979): 新細菌培地学講座・下, 近代出版, 東京, 431 pp.
- 坂崎利一 (1980): 新細菌培地学講座・上, 近代出版, 東京, 419 pp.
- 宇賀神光夫 (1981): 1980年栃木県下の養殖アユの流行病の原因である連鎖球菌に関する研究. 魚病研究, 16(3), 119-127.
- WILSON, P. R. and W. E. POE (1973): Impaired collagen formation in the scorbutic channel catfish. *J. Nutr.* 103, 1359-1364.
- YASUTAKE, W. T. and H. WOLF (1970): Occurrence of whirling disease of trout in western United States. *J. Fish. Bd. Canad.*, 27, 955-956.

\* 日本水産学会口頭発表

## Explanation of Figures

- Fig. 2. Soft radiograph of a deformed fish. Scoliosis, lordosis and kyphosis of vertebrae are seen in the trunk and tail parts.
- Fig. 3. Saggital section of deformed vertebrae showing discrepancy of inter vertebral ligaments. H-E stain,  $\times 40$ .
- Fig. 4. Infected brain showing formation of granulomas in the meninges. Giemsa stain,  $\times 100$ .
- Fig. 5. Infected brain showing granuloma in the third ventricle of the optic lobe. Giemsa stain,  $\times 80$ .
- Fig. 6. Infected brain showing infiltration of macrophages which phagocytize bacterial cells in the third ventricle of the optic lobe. Giemsa stain,  $\times 160$ .
- Fig. 7. Detail of bacteria-laden macrophages in the cranial meninges. PAS reaction,  $\times 1000$ .
- Fig. 8. Detail of bacteria-laden macrophages in the granular layer of cerebellar cortex. PAS reaction,  $\times 480$ .
- Fig. 9. Infected liver showing old granuloma in the capsule of liver. Giemsa stain,  $\times 160$ .
- Fig. 10. Infected peritoneum showing an old granuloma. Giemsa stain,  $\times 160$ .
- Fig. 11. Colonies of *Streptococcus iniae* displaying  $\beta$ -hemolysis on 5% sheep blood tryptosoy agar after 24 hour incubation at 37°C.

## 図の説明

- 図 2. 病魚の軟 X 線写真。脊椎の側および上下彎が認められる。
- 図 3. 脊椎の彎曲局所。彎曲内側の椎骨間の線維輪にずれが生じている。H-E 染色,  $\times 40$ 。
- 図 4. 脳髄膜の感染病巣。脳髄膜に肉芽腫が形成され、内部は乾酪化し、周囲は類上皮細胞で被包されている。ギムザ染色,  $\times 100$ 。
- 図 5. 脳内感染病巣。視葉内第 3 脳室内に形成された肉芽腫。内部は乾酪化し、周囲は類上皮細胞で被包されている。ギムザ染色,  $\times 80$ 。
- 図 6. 脳内感染病巣。視葉内第 3 脳室内には浸潤したマクロファージの集簇巣がみられ、それらのマクロファージは細菌を食食している。ギムザ染色,  $\times 160$ 。
- 図 7. 脳髄膜のマクロファージ集簇巣の拡大図。マクロファージは細菌を食食し、細菌がマクロファージ内で増殖し、菌球となっているものもある。PAS 反応,  $\times 1000$ 。
- 図 8. 小脳の感染病巣の拡大図。小脳顆粒層内にみられたマクロファージの集簇巣。マクロファージの食菌像および細菌の細胞内増殖が認められる。PAS 反応,  $\times 480$ 。
- 図 9. 肝臓の感染病巣。肝被膜に形成された古い肉芽腫。内部は乾酪化し、周囲を類上皮細胞が取り囲んでいる。ギムザ染色,  $\times 160$ 。
- 図 10. 腸間膜の感染病巣。腸間膜には肝被膜にみられたものと同様の肉芽腫が散発している。ギムザ染色,  $\times 160$ 。
- 図 11. 病魚の脳より分離された *Streptococcus iniae* の集落。5% 綿羊血液加トリプトソイ寒天平板培地で 37°C, 24 時間培養。



