

ヒラメ仔魚の腸管白濁症の病理組織学的研究

著者	宮崎 照雄, 梶原 直人, 藤原 和恵, 江草 周三
雑誌名	魚病研究
巻	25
号	1
ページ	7-13
発行年	1990-03-01
その他のタイトル	A Histopathological Study on Intestinal Necrosis of Larval Japanese Flounder
URL	http://hdl.handle.net/10076/2454

ヒラメ仔魚の腸管白濁症の病理組織学的研究

宮崎照雄*¹・梶原直人*¹・藤原和恵*¹・江草周三*²

(1989年9月28日受付)

A Histopathological Study on Intestinal Necrosis of Larval Japanese Flounder

Teruo MIYAZAKI*¹, Naoto KAJIHARA*¹, Kazue FUJIWARA*¹ and Syuzo EGUSA*²

*¹Faculty of Bioresources, Mie University, 2-80 Edobashi,
Tsu, Mie 514, Japan

*²Fish Disease Center, Tokyo Suisan Bldg. 6F, 4-18 Toyomi,
Chuo-ku, Tokyo 104, Japan

(Received September 28, 1989)

Desquamative enteritis, due to a *Vibrio* and externally displays white gut, occurred among larval Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) reared at the Hiroshima Prefectural Fisheries Experimental Station in 1986 and the Mie Prefectural Fisheries Experimental Station in 1988. *Vibrio* sp. INFL group that has been confirmed to be a causative bacterium of this disease by experimental infection (MASUMURA *et al.*, 1989) was the dominant isolate from diseased fish. In this study an indirect immunofluorescent technique and a histopathological study were performed to reveal the invasiveness of *Vibrio* sp. INFL group into intestinal tissues. Slight infectious lesions occurred in the mucosae of posterior part of intestine and the rectum. These lesions showed separation of affected mucosal cells with invasions of numbers of *Vibrio* sp. INFL group that were revealed by the specific fluorescence. Extended intestinal lesions involved the posterior half of intestine and the rectum. They showed marked bacterial multiplication in mucosae and the underlying tunica propria, and extensively sloughed mucosae, indicating that the histological characteristic was desquamative enteritis. The invasive bacteria were revealed to be *Vibrio* sp. INFL group by the specific fluorescence. Other visceral organs were spared of the bacterial invasions. The damage of intestine and rectum would induce fish mortalities.

近年、種苗生産中のヒラメ (*Paralichthys olivaceus*) 仔魚に腸管白濁症が発生するようになった。増村ら (1989) は腸管白濁症の病魚から細菌の分離を試みるとともに、分離細菌を用いて感染実験を行なった。その結果、1種のビブリオ属細菌が本病の病原細菌であることを明らかにし、*Vibrio* sp. INFL 群と命名した。本研究では、広島県水産試験場と三重県水産技術センターにおいて採取した自然発病魚を用いて、病魚の病理組織学的特徴を明らかにするとともに、蛍光抗体法により病魚中の病原細菌 *Vibrio* sp. INFL 群の感染状態についても検討を加えた。以下、その結果について述べる。

材料および方法

1. 病魚採取と細菌分離

1986年広島県水産試験場で採取した変態期のヒラメ病魚9尾と2尾の健常ヒラメ、および1988年三重県水産技術センターにおいて採取した変態期のヒラメ病魚30尾を供試した。広島県水産試験場で採取したヒラメ病魚と同群のヒラメ病魚からは、増村らによって細菌分離が行なわれ、*Vibrio* sp. INFL 群の分離が確認された。三重県水産技術センターにおいて採取したヒラメ病魚と同群のヒラメ病魚からは3%食塩添加BHI(日本)寒天平板を用いて、白濁を示す腸管から細菌の分離を行なった。採取した病魚は外見観察後、そのまま10%ホルマリン水で固定するかまたは腹部にハサミで切り込みを入れた後ブアン液で固定した。固定標本は常法にしたがって

*¹ 三重大学生物資源学部

*² 日本水産資源保護協会魚類防疫部

4~5 μm の矢状断パラフィン切片を作成し、マイヤー氏ヘマトキシリン・エオジン染色 (H・E 染色), ギームザ染色, PAS 反応などの染色を施した。

2. 蛍光抗体法

蛍光抗体法を行なうに際して、広島県水産試験場で採取したヒラメ病魚から分離された *Vibrio* sp. INFL 群の 1 株 (F-1 株) を広島大学の室賀教授から分与を受け、ホルマリン死菌作成後、不完全アジュバント (Difco) とともに家兎に注射して家兎抗血清 (凝集価 1:128) を得た。また、後述するように病魚の腸管からは同時に他の *Vibrio* 属細菌 (*Vibrio* sp.) も分離されることから、その菌株 (D-7 株) も広島大学の室賀教授から分与を受け、同様に家兎抗血清 (凝集価 1:128) を準備した。蛍光抗体法は FITC 標識抗家兎 IgG 山羊血清 (MBS) を用いた間接蛍光抗体法とした。病魚のパラフィン切片について常法による処置後、蛍光顕微鏡 (日本光学) で BV 励起で観察した。

結 果

1. 外見所見

多くの病魚は、腸管後半部から直腸にかけて白濁病巣を有していた。なかには胃から直腸にかけて白濁病巣が広がった病魚も見られた。これら腸管の白濁病巣を有する病魚の一部は腹水貯溜による腹部膨満あるいは腹部の陥没を呈したり、肛門から糞を垂下していた。また、感染初期と思われる病魚は腸管後半部に軽微な白濁病巣を持つだけであった。

2. 細菌分離

三重県水産技術センターにおいて採取した病魚からは BHI 寒天平板で 2 種類の異なったコロニーを形成する細菌が分離された。家兎抗血清を用いたスライド凝集試験で、卓越して分離される 1 種は *Vibrio* sp. INFL 群の F-1 株家兎抗血清に反応し、*Vibrio* sp. INFL 群と判断された。他の 1 種は病魚個体により分離されないこともあったが、*Vibrio* sp. D-7 株家兎抗血清に反応した。また、分離細菌は *Vibrio* sp. INFL 群および D-7 株と同じ *Vibrio* sp. であると確認された (室賀; 未発表)。このように *Vibrio* sp. INFL 群のほか D-7 株に代表される 1 種の *Vibrio* 属細菌が腸管病巣から分離されたので、前述したように、その家兎抗血清も準備し、間接蛍光抗体法で病魚の腸管におけるその細菌の出現状況も併せて調査することにした。

3. 病理組織学的所見および蛍光顕微鏡所見

腸管の後半部に軽微な白濁病巣を持つだけの病魚で

は、腸後半部から直腸にかけて粘膜上皮に細菌の感染病巣が散在していた (Figs. 1, 2B)。その病巣では、粘膜上皮に少数のコンマ状や短桿状細菌が侵入し、侵された上皮細胞は空胞変性や壊死に陥り、基底膜から遊離して滴状あるいは球形に変形していた。その下の粘膜固有層や粘膜下織には細菌の侵襲はなかった。これら初期病魚の 4 尾について間接蛍光抗体法を行なったところ、*Vibrio* sp. INFL 群 F-1 株抗血清 (以下抗 *Vibrio* F-1 抗血清) で処理した時、粘膜上皮の感染病巣に顕著な特異蛍光が発現し、*Vibrio* sp. INFL 群細菌の存在が確認された (Fig. 2A)。同標本をギームザ染色で後染色して観察した結果、当該病巣にコンマ状や短桿状細菌の侵襲像が確認された (Fig. 2B)。他方、*Vibrio* sp. D-7 株抗血清 (以下抗 *Vibrio* D-7 抗血清) で処理した時には腸管および直腸の粘膜上皮に特異蛍光反応は現われなかった。これら間接蛍光抗体法による観察に際し、腸管以外の器官組織には特異蛍光反応は見られなかった。また、1 尾の肝臓に軽度の肝細胞萎縮が見られた以外、他の内臓諸器官などには著変は見られなかった。

腸管と直腸に広がった白濁病巣を持つ病魚では、腸管後半部のみならず腸管前半部の一部と直腸に及ぶ剝離性カタルが起こっていた (Figs. 3, 4, 5, 7, 9A)。腸管の管腔内に消化物はなく、多数の細菌を含む組織の崩壊物で満たされていた。同様の組織崩壊物は腸病巣から逆流して胃腔内に達していた (Fig. 8)。腸管の感染病巣では、コンマ状や短桿状細菌が粘膜上皮から筋層にかけて侵襲し、粘膜上皮と粘膜固有層で顕著に増殖していた (Figs. 3-5)。細菌の侵襲を受けた粘膜上皮は剝離し、その細胞は個々に分離するとともに球形化、空胞変性、壊死を呈していた (Figs. 3 & 4)。管腔内の剝離細胞は細菌の増殖を受けて細胞残渣に至っていることもあった (Fig. 5)。剝離粘膜下の粘膜固有層は細菌の増殖像を示して壊死し、粘膜下織にはマクロファージの浸潤、軽度の水腫や出血が起こっていた。なお、粘膜固有層から筋層に細菌の侵襲が及んだ症例では粘膜下織や筋層にも壊死が起こっていた。抗 *Vibrio* F-1 抗血清を用いた間接蛍光抗体法では、腸管後半部の粘膜上皮とその下の粘膜固有層、管腔内の剝離した粘膜上皮、分離した上皮細胞とその残渣間に分布する細菌に強い特異蛍光が発現した (Fig. 6)。それに対して、抗 *Vibrio* D-7 抗血清を用いた間接蛍光抗体法では、直腸の管腔内に流入した分離細胞とその残渣間に分布する細菌に強い特異蛍光が見られた (Fig. 9A, 9B)。しかし、腸管後半部の感染局所では、管腔内の分離細胞とその残渣間に分布する細菌の一部に弱

い特異蛍光が見られるのみであった。外見的に腹部の陥没を呈していた病魚では、病巣部で腸管が変形し、腸の旋回が乱れていた。腸管以外に感染病巣の形成はなく、胃腔内に細菌を含む組織崩壊物が腸管から逆流して分布することもあったが、胃粘膜に感染病巣は認められず、組織崩壊物中に胃粘膜を構成する粘液細胞が混在することもなかった (Fig. 8)。これらの病魚の肝細胞は貯蔵糖原と脂肪の減少および類洞の拡張を伴って軽度から高度の萎縮像を呈していた。腎臓では尿細管上皮の萎縮、造血組織の水腫が起っていた。心室と心房の内腔には多数の好中球が含まれていた。脾臓、鰓、体側筋組織、皮膚に顕著な異常は見られなかった。また、上述の間接蛍光抗体法でも、肝臓などの器官組織に特異蛍光は認められなかった。

考 察

増村ら (1989) は腸管白濁症の病魚からは *Vibrio* sp. INFL 群が例外なく分離され、その細菌の懸濁液に漬けたワムシヤアルテミア幼生を健常魚に経口投与することで腸管白濁症が発症することを認めている。本研究でも、三重県水産技術センターで飼育していたヒラメ仔魚の間で発生した腸管白濁症の病魚から同様に *Vibrio* sp. INFL 群が分離された。この事実から、本細菌はヒラメの種苗生産場に広く拡がっていると判断された。病理組織学的検討と間接蛍光抗体法による検討の結果、*Vibrio* sp. INFL 群細菌は腸管後半部から直腸の粘膜上皮を侵襲して初期の限局性の壊死病巣を作っていることが明らかになった。そして、本細菌の粘膜上皮から粘膜固有層への侵襲と増殖により、腸管の広範囲に及ぶ剝離性カタルが起ると判断された。また、本細菌は腸管以外に感染病巣を形成する性質はないようであった。以上のことから、*Vibrio* sp. INFL 群の腸管感染は、剝離性カタル性腸炎が特徴であった。本細菌の腸組織の広範囲に及ぶ侵襲とそれによる腸組織の崩壊は、それ自体、病仔

魚にとって大きな障害である。食欲を喪失した病魚は、肝細胞の貯蔵糖原および脂肪の消耗を来していた。これら腸管の障害と肝細胞の貯蔵物質の消耗の結果、病魚は衰弱し、斃死すると考えられた。また、腹部膨満を併発した病魚では腹水が貯溜していたが、これらの病魚の腸病巣には循環障害が起っており、その病巣から漿液が滲出して腹腔に貯溜したのであろう。また、腹部の局所的な陥没を併発した病魚では腸の病巣部で腸管が変形していたことから、腸管の変形がその原因と考えられた。室賀ら (私信) の指摘があるように、病魚からは他種の *Vibrio* 属細菌も分離されたが、それらは本病原菌ではないと言われている。本研究でも *Vibrio* sp. D-7 株の抗血清を使って間接蛍光抗体法による検討を加えたが、当該細菌が腸管の感染病巣の形成に係わっていることを示唆する所見は得られなかった。間接蛍光抗体法による検討の結果は *Vibrio* sp. INFL 群が感染病巣の形成の主体であることを示しており、本結果は増村ら (1989) の感染実験の結果と一致した。複数の種類の細菌が分布する腸管のような器官で、自然発病条件で感染病巣が形成されるとき、病巣における病原細菌の出現状況の把握には蛍光抗体法は有効な技法といえよう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、菌株の分与ならびに分離菌株の検索を賜った広島大学室賀清邦教授に篤く御礼申し述べます。また、病魚の採取に便宜を賜った広島県水産試験場の増村和彦氏および三重県水産技術センターの辻ヶ堂諦氏に謝意を表します。本研究は水産庁・魚病対策技術開発研究委託費によった。

文 献

- 増村和彦・安信秀樹・岡田直子・室賀清邦 (1989): ヒラメ仔魚の腸管白濁症病原細菌としての *Vibrio* sp. の分離. 魚病研究, 24, 135-141.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** Early infectious lesion of the posterior intestine. Rod- and comma-shaped bacteria invaded the mucosa. Affected epithelial cells are necrotic and individually separated. Giemsa stain, Bar: 30 μm .
- Fig. 2A.** Immunofluorescent seen at the slightly infectious lesions in the intestine. Specific fluorescence occurs on the bacteria in the mucosa (arrows) by the treatment with anti-F-1 (*Vibrio* sp. INFL group) antiserum. Bar: 50 μm .
- Fig. 2B.** Post-Giemsa stain on the mucosal lesion indicated with arrow-A in Fig. 2A clearly displays the bacteria invading into the mucosa (arrow). Giemsa stain. Bar: 30 μm .
- Fig. 3.** Intestinal lesion showing extensively sloughed mucosae in a severe case. Bacterial multiplication occurred in the mucosa (M). The underlying tunica propria and submucosa are necrotic and edematous. Giemsa stain, Bar: 100 μm .
- Fig. 4.** Infected lesion of the intestine in a severe case. Many bacteria invaded the mucosa (M) and the underlying tunica propria (T), and multiply in the tissues. The infected mucosa is necrotic and sloughed. The underlying tunica propria is necrotic and edematous. Giemsa stain, Bar: 50 μm .
- Fig. 5.** Infected lesion of the intestine in a severe case. Many bacteria multiply in the mucosa and infected epithelial cells are individually separated and destroyed. The tunica propria (T) shows bacterial multiplication and necrosis. The underlying submucosa (S) shows macrophage invasions. Giemsa stain, Bar: 50 μm .
- Fig. 6.** Immunofluorescent seen at the extensively infectious lesion in the intestine. Prominent fluorescence occurs on bacteria multiplying behind the sloughed mucosa (M) and in separated epithelial cells in the lumen by the treatment with anti-F-1 (*Vibrio* sp. INFL group) antiserum. Bar: 50 μm .
- Fig. 7.** Infectious lesions occurred in the posterior half of intestine (I) and the rectum (R). The infected intestine displays extensive desquamative catarrh and the deformed convolution accompanying cave-in of abdominal walls (arrow). P: pancreas. S: stomach. H-E stain, Bar: 200 μm .
- Fig. 8.** The stomach of fish exhibiting extensive intestinal lesions. The stomach (S) contains cellular debris with bacteria that came from intestinal lesions. The mucosa is spared of the bacterial invasions. Liver (L) shows atrophic hepatic cells accompanying decreased fat vacuoles and expanded sinusoids. Giemsa stain, Bar: 50 μm .
- Fig. 9A.** Immunofluorescent seen at the rectal lumen in the fish shown in Fig. 7. Treatment with anti-D-7 (*Vibrio* sp.) antiserum reveals the specific fluorescence on bacteria in cellular debris in the lumen. Bar: 50 μm .
- Fig. 9B.** Post-Giemsa stain shows existence of many bacteria multiplying in cellular debris in the rectal lumen. Giemsa stain, Bar: 50 μm .





