

ニホンウナギのパラコロ病の実験感染に関する研究

著者	宮崎 照雄, Gutierrez Miguel A., 田中 真二
雑誌名	魚病研究
巻	27
号	1
ページ	39-47
発行年	1992-03-01
その他のタイトル	Experimental Infection of Edwardsiellosis in the Japanese Eel
URL	http://hdl.handle.net/10076/2455

ニホンウナギのパラコロ病の実験感染に関する研究

宮崎 照雄・Miguel A. Gutierrez・田中 真二*¹

(1992年1月5日受付)

Experimental Infection of Edwardsiellosis in the Japanese Eel

Teruo Miyazaki, Miguel A. Gutierrez and Shinji Tanaka*¹

Faculty of Bioresources, Mie University 1515 Kamihama, Tsu, Mie 514, Japan
(Received January 5, 1992)

Experimental infection method for Paracolo disease (*Edwardsiella tarda* infections) was studied to imitate histopathologically natural infections in the Japanese eel *Anguilla japonica*. Prior to the bacterial challenge, the intestine of eel was damaged by 0.1 or 0.05 ml of 30% hydrogen peroxide introduced through a silicon tube (1 mm in diameter) which was inserted 3 to 5 cm into the intestine from the anus. *E. tarda* was mixed with a sterilized eel diet and administered into the stomach by a cannula 18 hours after the hydrogen peroxide treatment. Bacterial doses used were from 2.6×10^4 to 8.4×10^7 CFU/eel. Most fish that were challenged with doses from 2.6×10^4 to 2.6×10^6 CFU/fish formed abscess in either the liver or the kidney and died within 5-23 days after the challenge. Histopathological changes of their kidneys or livers were principally identical to those observed in the natural infection. On the other hand, fish challenged with doses over 7.9×10^6 CFU/fish mostly underwent acute process without abscess formation and died within first 4 days after the challenge, though abscesses were formed in some survived animals within 6-12 days.

ニホンウナギ (*Anguilla japonica*) のパラコロ病 (*Edwardsiella tarda* 感染症) は産業上重要な疾病である。最近では、本菌の菌体やその糖脂質で作製したワクチンの免疫効果 (Salati *et al.*, 1983; Salati and Kusuda, 1986; Salati *et al.*, 1987; Salati, 1988) や多剤耐性菌株に対する薬剤の有効性 (Aoki *et al.*, 1989) が検討されている。これらの研究では感染実験に細菌の腹腔内注射法が用いられた。本菌は腹腔内注射や筋肉内注射で実験魚を斃死させることができるが、それは敗血症による急激な斃死であり自然発病魚の症状とは異なることが指摘されている (宮崎, 1980)。いっぽう、ウナギの稚魚において細菌懸濁液に浸漬する方法で、あるいは細菌懸濁液に浸したイトミミズを投餌するといった経口投与方法により人工感染が成立することが確認されている (石原・楠田,

1981)。しかし、大型魚では細菌浸漬法では人工感染が成立しない (未発表)。また、Mushiake *et al.* (1984) は、低濃度の塩化銅水溶液で前処理した 52~115 g 程度の大きさのウナギを本菌懸濁液に浸漬する方法で人工感染が成立するとしたが、静岡県水産試験場における追試験ではその再現性が否定されている*²)。本病は稚魚のみならず出荷対象の大型魚にも発生して被害を及ぼすものであり、大型魚に対するワクチンの免疫効果や化学療法の効果などを検討するためには、自然感染に近い病変を起こす実験感染方法の確立が必要である。

本研究では、保利 (1962) の研究および宮崎・江草 (1976b) の自然感染魚の病理組織学的研究が、腸管からの本菌の侵入を示唆していることに注目し、大型魚について *E. tarda* の経口投与方法による感染を確実に成立させる方法を検討した。

材料および方法

供試魚

実験魚は、本菌感染症の発生がほとんど見られない 2

ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究—IV

三重大学生物資源学部

*¹ 現在、三重県水産技術センター

*² 田中・大上, 1987, 静岡県水産試験場浜名湖分場
通刊, 256

Table 1. Experimental infections with *Edwardsiella tarda* by oral inoculation in the Japanese eels that were previously damaged in the intestine by per anus infusion of hydrogen peroxide

Experiment No.	Bacterial number for challenge (CFU/eel)	Sampling date* ¹	Disease form* ²	Bacterial count (CFU/g)	
				Liver	Kidney
1	2.6×10^4	10	L	1.6×10^7	3.4×10^8
		12	L	1.2×10^8	5.1×10^7
		19	K	1.7×10^7	1.8×10^8
2	8.0×10^5	5	K	5.4×10^7	9.5×10^8
		6	K	9.1×10^7	1.9×10^9
		9	K	7.6×10^7	6.7×10^8
		10	K	7.9×10^7	5.8×10^8
		11	K	1.3×10^8	1.7×10^8
3	1.3×10^6	3	A	NT* ³	NT
		3	A	NT	NT
		23	L	NT	NT
4	1.7×10^6	4	A	NT	5.0×10^7
		5	K	3.4×10^8	3.0×10^9
		6	K	1.5×10^8	6.3×10^8
		7	K	7.7×10^8	6.9×10^9
		11	K	0	5.2×10^8
5	2.6×10^6	3	A	NT	NT
		6	L	NT	NT
		14	K	NT	NT
6	7.9×10^6	2	A	7.6×10^8	7.9×10^7
		2	A	NT	2.6×10^8
		2	A	NT	4.3×10^8
		2	A	1.6×10^8	1.1×10^8
		3	A	3.3×10^8	6.6×10^8
7	8.7×10^6	2	A	NT	8.3×10^8
		3	A	3.3×10^8	2.1×10^7
		4	A	9.1×10^4	1.2×10^7
		4	A	3.3×10^7	8.0×10^8
		4	A	NT	NT
8	9.5×10^6	4	A	NT	NT
		4	A	NT	NT
		6	L	NT	NT
		12	L	NT	NT
9	8.4×10^7	3	A	2.1×10^7	1.3×10^8
		3	A	5.6×10^7	1.0×10^9
		7	K	1.5×10^8	5.4×10^8
		8	L	2.1×10^7	2.0×10^8
		12	K	3.8×10^7	9.8×10^8

*¹ days after challenge. Fish were sampled in the moribund condition or immediately after death.

*² L: abscess formation in the liver.

K: abscess formation in the kidney.

A: acute infection without abscess formation.

*³ not tested.

所の養殖場より入手した体重 85~170 g の健康なニホンウナギを用いた。供試魚には養殖初年級と 2 年級が含まれたが、年級の違いが実験結果に全く影響しなかった。以下の記述で魚の年級のことは省いた。各実験に先立ち、それらの腸管内に *E. tarda* が存在していないことを以下の方法で確かめた。すなわち、入手した魚群の一部の魚 (2~3 尾) から全腸管を摘出し、切開した後、0.85% 滅菌生理的食塩水 5 ml の入ったプラスチックチューブに入れて攪拌器で良く攪拌した。得られた腸管内容物の懸濁液 0.05 ml を SS 寒天平板に接種し、25°C で 48 時間培養した。その結果、どの魚の腸からも本菌特有の黒色の細菌コロニーの発育はなかった。

供試菌株

供試菌株は静岡県水産試験場より分与を受けた *E. tarda* SH-89133 を用いた。それを HI ブイヨン (ニッスイ) で 25°C、24 時間培養した後、遠心分離器で集菌し、滅菌生理的食塩水に再懸濁した。感染実験にはそれを適宜希釈して供試した。この菌株は HI ブイヨンで 25°C、48 時間培養後、魚体重 100 g 当たり 1 mg 湿菌量の腹腔内注射により供試魚を 24 時間以内 (25~28°C) に斃死させるだけの毒力を有していた。

供試魚の前処理

供試魚の腸管から病原菌の侵入を容易ならしめる試みとして、粘膜障害作用を有し、かつ分解の速やかな過酸化水素水を魚の肛門から腸管に注入した。すなわち内径 0.5 mm・外径 1 mm のシリコンチューブを 1.5% ウレタン水で麻酔したウナギの肛門から腸管内に 3~5 cm 挿入し、それを通して 30% 過酸化水素水の 0.05~0.1 ml を注入した。一部の処置魚について 18 時間後に腸管を切開して剖検したところ、腸後半部の絨毛は発赤・腫脹して表面が糜爛しており、peroxid test 紙 (メルク社) を接触させて過酸化水素を調べたところ過酸化水素は消失していることが確認された。

本研究では、過酸化水素水処理による腸管の障害局所を *E. tarda* の侵入門戸とさせることを目的としていることから、腸管の障害状態を観察するため、30% 過酸化水素水 0.1 ml を注入後、処理魚を水槽 (水温 28°C) に収容し、24 時間後と 48 時間後に 2 尾ずつ取り上げ腸管を含む内臓諸器官をブアン液で固定した。また、過酸化水素水処理による腸管の障害が後述の実験感染に影響を及ぼすことが危惧されたので、実験に並行して、過酸化水素水で前処理しただけの手術対照区 (3 区; 各区 3~4 尾) を設け、異常や斃死を観察した。

E. tarda の経口投与

過酸化水素水による前処理から 18 時間後、前記の *E. tarda* 懸濁液 1.75 ml とウナギ用配合飼料 (市販飼料をメッシュ径 0.28 mm のふるいにかけて、オートクレーブで滅菌) 0.25 g を混ぜて作ったペースト 2 ml を 1 尾ずつゾンデで胃の中に強制経口投与した。各実験区で実際投与された菌量は以下のように求めた。すなわち、使用したペースト 1 ml を 10 倍段階希釈法で希釈し、SS 寒天平板に接種・培養後平板上に生じた本菌の細菌コロニーを計数し、ウナギ 1 尾当たりの投与菌量を算定した。各実験区の投与菌量は Table 1 に示した。細菌を投与した魚は 20 l の水槽 (水温 28°C) に収容して、24 日間、発病、斃死を観察した。実験区では日を追って斃死が始まったが、瀕死魚および斃死直後の魚を取り上げ、その肝臓と腎臓を摘出してそれらの一部を秤量後、滅菌生理的食塩水 10 ml とともに 20 ml ガラスホモジナイザーで磨砕した。残りの臓器片および他の内臓諸器官はブアン液で固定した。磨砕液は 10 倍段階希釈し、希釈液の 0.05 ml を SS 寒天平板に接種、25°C で 48 時間培養後の黒色コロニー数から肝臓と腎臓の *E. tarda* の菌数を算定した。得られた黒色コロニーの一部について、本研究室で作成した抗 *E. tarda* 家兎血清 (凝集価 1:320) によるスライド凝集反応試験で、当該コロニーが *E. tarda* のものであることを確認した。

病理組織学的検討

過酸化水素水による前処理魚および感染実験魚から採取し、固定した臓器について、常法にしたがって固定標本からパラフィン切片を作成し、マイヤーのヘマトキシリン・エオジン染色、ギームザ染色を施して検鏡した。

結 果

1. 過酸化水素水の前処理で腸管に障害を与えた魚における病変

過酸化水素水の前処理の 24 時間後と 48 時間後の腸管の過酸化水素水におかされた部分は発赤してかなり腫大していた。病理組織学的にはその部分の中心域に粘膜上皮の剥落とその下の粘膜固有層の局所的な壊死が起っていた。また、粘膜固有層から粘膜下織の毛細血管が充・鬱血して拡張し、粘膜固有層には水腫と出血が起っていた (Fig. 1)。辺縁域では、粘膜上皮の部分的な剥離が起り、剥離した上皮と粘膜固有層の間には小円形細胞の浸潤が見られた。また、粘膜固有層には顕著な充血と軽度の水腫が起っていた。

2. 実験感染群の発病状況および解剖所見

各実験区の発病および肝臓・腎臓からの細菌分離状況を Table 1 にまとめた。なお、実験期間中、手術対照区には斃死魚の発生はなく、実験終了時に肝臓と腎臓から *E. tarda* は分離されなかった。

瀕死魚と斃死魚の剖検で肉眼的に病型が3大別された。すなわち、白色の小膿瘍が腎臓に形成されていた腎膿瘍型(K)、肝臓に形成されていた肝膿瘍型(L)、およびそれらの形成が認められず急性死した急性死型(A)であった。

これらの病型と瀕死ないしは斃死に至る経過日数と投与菌量との関係を見てみると、以下のようになった。すなわち、投与菌量が少ない (2.6×10^6 CFU/尾以下) 1~5 実験区では、3, 4 および 5 区に各1尾の急性死型が出たが、他の14尾は腎膿瘍型または肝膿瘍型であった。そしてそれらの病魚は5~23日経過する間(大部分は5~14日経過する間)に瀕死ないし斃死に到っていた。いっぽう、投与菌量が多い (7.9×10^6 CFU/尾以上) 6~9 実験区では、18尾中13尾が4日経過以内に急性死型の病型を示して瀕死ないし斃死に到っていた。ただし、投与菌量がより多い8区と9区では9尾中5尾が腎膿瘍型または肝膿瘍型を示していた。以上の病魚において、急性死型の病魚ではいずれも前処理で過酸化水素による障害を受けたと判断される腸管後半部で絨毛の融解壊死が顕著であり、なかには腸管後半部の一部が融解し、崩壊していることもあった。それらの腎臓と脾臓は顕著に腫大し、肝臓は鬱血していた。他方、腎膿瘍型または肝膿瘍型においては、細菌投与の5, 6日後に瀕死ないし斃死に到った病魚のなかには腸管後半部で絨毛の融解壊死が顕著な例があった。しかし、経過日数が多い病魚では、腸管に顕著な異常は認められなかった。

肝臓と腎臓の生菌数は Table 1 に示した通り、全ての病型を通して、大部分の魚で $10^7 \sim 10^9$ CFU/g であった。なお、6区と7区の急性死型の病魚では肝臓の生菌数は少なかったが、それらの腎臓からは $10^8 \sim 10^9$ CFU/g の生菌数が検出された。これら急性死型では2~3日間でこのような菌量に達していたことが注目された。これらの急性死型の魚では腸管の後半部が部分的に融解から崩壊していることが多かった。

3. 実験感染魚の病理組織学的所見

実験感染魚のうち細菌投与後4日以内に瀕死から斃死に至った急性感染発病魚の17尾では腸管組織が融解壊死していることが多かった。つまり、過酸化水素の前処理で障害を受けた腸後端部において、粘膜上皮の剝落し

た絨毛の粘膜固有層、粘膜下織から筋層にかけて細菌が顕著な瀰漫的増殖像を示し、侵された組織は出血・壊死するとともに部分的な崩壊に至っていた (Figs. 2, 3)。病魚の中には、感染病巣の中央部の絨毛から筋層までが融解・崩壊していることもあった。それらの病巣の辺縁域では、絨毛の粘膜固有層と粘膜下織などに充血や軽度の出血が起こっていたが、細菌の顕著な増殖像は見られなかった。腎臓の造血組織には細菌の瀰漫的な侵入・増殖が起こり、組織は壊死して出血を起こしていた (Fig. 4)。脾臓では、脾髄と莢組織に瀰漫的な細菌増殖が起こり、莢組織は壊死し、脾髄は顕著な出血をともなって壊死に陥っていた。肝臓では類洞に細菌伝播と鬱血が起こり、肝細胞は萎縮的になっていた。その他、胃の毛細血管や心臓にも細菌の伝播が見られた。

細菌投与後5日以降に瀕死から斃死に至った魚20尾は Table 1 に見られるとおりすべて腎膿瘍型または肝膿瘍型を示し、そのうちの腎膿瘍型の13尾では、腎臓造血組織に好中球の集簇による大小の膿瘍が形成されていた。それらの膿瘍の中で、細菌の増殖があまり顕著でない例では、好中球の融解像および好中球の食菌像はともに軽微であった。その膿瘍は線維素で被包され、その周囲に鬱血が起こっていた。細菌投与後から斃死までの経過日数にかかわらず、病巣内で顕著な細菌増殖が起った膿瘍は融解していた (Fig. 5)。融解膿瘍の中心部では好中球は融解壊死し、細菌増殖は比較的軽度であった。それに対して融解膿瘍周縁域では、細菌増殖が顕著で、好中球の食菌像、細胞内細菌増殖像も顕著であった (Fig. 6)。また、融解膿瘍は周囲の腎実質を巻き込むとともに、周辺の類洞や造血組織にも細菌が侵入し、類洞の鬱血、造血組織に出血と壊死が起こっていた。これら腎膿瘍型の病魚では、一部の症例で腸管後半部の絨毛の粘膜固有層から粘膜下織にかけて細菌の侵入増殖が起こり、侵された組織が融解壊死に陥っているものが多かったが、多くの例では腸管後半部の粘膜固有層に充血、出血、好中球の浸潤や肉芽組織の増殖が起こっており、顕著な細菌の増殖像は見られなかった。

また、腎膿瘍型の病魚では脾臓および肝臓にも病変が認められたが、その程度は投与菌量により異なるほか、腎臓造血組織内膿瘍での細菌の増殖状態とも関係があった。すなわち 10^4 CFU のレベルの投与菌量の例および造血組織の膿瘍内での細菌増殖が比較的軽度な症例では、脾髄に軽度な細菌の伝播と壊死および好中球の浸潤が起こっているだけであり、肝臓では類洞に細菌伝播と鬱血が起こり、肝細胞はやや萎縮している程度であっ

た。投与菌量の多い場合 ($10^5 \sim 10^7$ CFU) および腎臓造血組織の膿瘍内での細菌増殖が顕著な症例では、脾臓および莢組織は瀰漫的な細菌増殖と出血を伴った壊死を起こしていることが多かった (Fig. 7)。肝臓では類洞に瀰漫的に細菌伝播と鬱血が起こり、肝細胞は糖原を失って萎縮し、静脈に沿った実質に線維素の析出と好中球の浸潤を伴った巣状壊死が多発する例もあった (Fig. 8)。その他、胃の毛細血管や心臓にも細菌の伝播が見られた。

他の7尾は肝膿瘍型であり、肝臓実質部に好中球の集簇による大小の膿瘍が形成されていた (Fig. 9)。膿瘍の多くは析出した線維素で被包されていた。細菌攻撃後6日から12日までの病魚では、膿瘍中に細菌の増殖像が見られ、膿瘍周囲の類洞には細菌の侵入と鬱血が起こっていた。また、脾臓と腎臓造血組織には細菌の伝播と軽度な壊死が起こっていた。これらの病魚の腸管の病変は前述の腎膿瘍型のものとはほぼ同じであった。しかし、細菌投与後23日経過した病魚では肝臓膿瘍内の細菌増殖は軽度で、腎臓造血組織で造血細胞の増生が顕著となっていた。また、腸管では後半部の粘膜固有層に好中球の浸潤および肉芽組織の増殖が起こり、その表面は粘膜上皮で覆われていた。

考 察

保科 (1962) は *Paracolobactrum anguillimortiferum* を用いた感染実験で胃および直腸への細菌の注入により発病から斃死に至らすことができたとして、経口感染を指摘していた。しかし、得られた病魚が肝臓や腎臓に膿瘍を発現していたという記述はなかった。また、胃内への本菌の大量投与で感染が成立しないこともあり (宮崎, 1980)、健全な腸管からの本菌の侵入は難しいと考えられていた。本研究では、微量の過酸化水素で腸管の絨毛粘膜に障害を及ぼすことにより、本菌の実験感染に成功した。つまり、細菌投与後5日以降に瀕死から斃死に至った症例は全て肝膿瘍あるいは腎膿瘍を発現しており、その病理組織学的特徴は自然発病魚の肝膿瘍型あるいは腎膿瘍型の病魚の特徴 (宮崎・江草, 1976a, b) とほぼ同じであった。この結果から、細菌が障害がある腸管から侵入し、血行経由で肝臓あるいは腎臓に伝播して感染病巣を作るに到ったと考えられた。また、パラコロ病には肝膿瘍型および腎膿瘍型の二発現型があるが、いずれも経口感染で発現することがわかった。以上から、1尾あたり 10^4 CFU から 10^6 CFU の菌量の経口投与で過酸化水素の前処理を施したウナギに自然発病魚とほぼ同じ病変を発現させることができると判断された。肝膿瘍型

および腎膿瘍型の病魚について肝臓と腎臓の細菌数の定量を行なったが、いずれの発現型でも瀕死から斃死に到った病魚では肝臓と腎臓での顕著な細菌増殖を示唆する数値が認められた。病理組織学的検討結果を考え併せると、当該臓器内に形成された膿瘍で細菌が増殖後、他臓器に伝播して増殖し、最終的に全身感染が起こると考えられた。ただし、自然感染病魚では肝臓と腎臓の細菌数の定量は未検討であり、今回の結果を自然感染病魚のものと比較することはできない。この点は今後の検討課題としたい。

他方、実験感染魚のうち4日以内に急性に斃死に至った急性死型病魚があり、それらではその短期間内に腎・肝の菌数は高いレベルに達していた。急性死型は、 7.9×10^6 CFU/尾以上の菌量を投与されたものに多かった。これらの病魚では、腸管組織での細菌増殖が顕著であり、中には、細菌増殖のため腸管壁が部分的に融解し、崩壊している例もあった。このことから、本菌が大量に腸管内に入った場合には、障害を受けた腸管組織に侵入して増殖することがあると考えられた。その肝臓、脾臓および腎臓の病理組織学的特徴は細菌の筋肉内注射により発病した病魚の特徴 (宮崎, 1980) とほぼ同じであった。これら急性発病例では、腸管での顕著な細菌増殖とそれによる組織崩壊および全身感染とが合わさって急性死に到ったと考えられた。このように投与菌量の多い場合には急性死が起こりやすいので、それを防いで、より自然感染に近い発病をせしめるため、前処理の過酸化水素水の濃度と注入量にまだ検討の余地があるといえよう。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、*E. tarda* の菌株の分与を賜った静岡県水産試験場浜名湖分場の田中真氏に篤くお礼を申し述べます。

要 約

ニホンウナギの大型魚における *E. tarda* の人工感染方法を確立する目的で、以下の方法で感染実験を行なった。すなわち、肛門から腸管に外径 1 mm のシリコンチューブを 3~5 cm 挿入し、30% 過酸化水素水の 0.05~0.1 ml を腸管内に注入して腸管に障害を与え、18 時間後に培養細菌を含むウナギ用配合飼料をゾンデで胃内に強制投与した。投与菌量は 1 尾あたり 2.6×10^4 CFU~ 8.4×10^7 CFU の間の 9 段階に設定した。投与後、実験魚の発病状況を観察し、また、瀕死状態に陥った魚の腎臓、肝臓、その他の器官の病理組織学的観察を行ない、

以下の結果を得た。

1. 1尾あたりの投与菌量が 10^4 CFU レベルから 10^6 CFU の下位レベルでは、実験魚は5日以降に瀕死から斃死に至り、肝膿瘍か腎膿瘍を発現していた。その病魚の病理組織学的特徴は自然発病魚の特徴とほぼ同じであった。

2. 1尾あたりの投与菌量が 8×10^6 CFU から 8×10^7 CFU の高レベルでは腸管障害部での細菌増殖から全身感染に進展して急性に発病・斃死に到る急性例が多かった。

文 献

Aoki, T., T. Kitao and M. Kobayashi (1989): Chemotherapy against infection with multiple drug resistant strains of *Edwardsiella tarda* in cultured eels. *Fish Path.*, **24**, 161-168.

保科利一 (1962): ウナギの鱗赤病に関する研究. 東京水産大学特別研究報告, **6**, 104 pp.

石原秀平・楠田理一 (1981): シラスウナギおよびクロコに対する *Edwardsiella tarda* の実験的感染について. 日水誌, **47**, 999-1002.

宮崎照雄 (1980): 魚類の細菌感染症の病理組織学的研究. 三重大水産研報, **7**, 63-149.

宮崎照雄・江草周三 (1976a): ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究—I. 自然感染-化膿性造血組織炎型. 魚病研究, **11**, 33-43.

宮崎照雄・江草周三 (1976b): ニホンウナギの *Edwardsiella tarda* 感染症の病理組織学的研究—II. 自然感染-化膿性肝炎型. 魚病研究, **11**, 67-76.

Mushiake, K., K. Muroga and T. Nakai (1984): Increased susceptibility of Japanese eel *Anguilla japonica* to *Edwardsiella tarda* and *Pseudomonas anguilliseptica* following exposure to copper. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **50**, 1797-1801.

Salati, F. (1988): Vaccination against *Edwardsiella tarda*. in "Fish vaccination" (ed. by A. E. Ellis). Academic Press, London, pp. 135-151.

Salati, F. and R. Kusuda (1986): Immune response of eel to *Edwardsiella tarda* lipid. *Fish Path.*, **21**, 201-205.

Salati, F., Y. Ikeda and R. Kusuda (1987): Effect of *Edwardsiella tarda* lipopolysaccharide immunization on phagocytosis in the eel. *Nippon Suisan Gakkaishi*, **53**, 201-204.

Salati, F., K. Kawai and R. Kusuda (1983): Immunoresponse of eel against *Edwardsiella tarda* antigens. *Fish Path.*, **18**, 135-141.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** Intestinal lesion formed 24 hours after per anum infusion of hydrogen peroxide. Villous mucosae sloughed off and the underlying tunica propria (TP) showed dilated vessels with erythrocytes, hemorrhage, edema and slight necrosis. S: submucosa. H-E stain. Bar: 100 μ m.
- Fig. 2.** Bacterial infection in the intestine of a fish that was challenged with a dose of *E. tarda* 8.4×10^7 CFU/fish 18 hours after hydrogen peroxide treatment, and became moribund after 3 days. Villi were necrotized accompanying hemorrhage in the tunica propria (TP) and expanded vessels with erythrocytes in the submucosa (S). M: muscle layers. Se: serosa. H-E stain. Bar: 100 μ m.
- Fig. 3.** Bacterial infection in the intestine of the same fish as shown in Fig. 2. Bacteria penetrated and multiplied in the villi (V) and the underlying submucosa (S) which was necrotized. Giemsa stain. Bar: 50 μ m.
- Fig. 4.** Kidney of the same fish as shown in Fig. 2. Bacteria diffusely penetrated and multiplied in the hematopoietic tissue that showed hemorrhage and necrosis of hematopoietic cells. R: renal tubule. Giemsa stain. Bar: 50 μ m.
- Fig. 5.** Kidney of a fish that was challenged with *E. tarda* at a dose of 8.4×10^7 CFU/fish and become moribund after 7 days. Abscesses were formed. H-E stain. Bar: 100 μ m.
- Fig. 6.** An abscess in the kidney of a fish that was challenged with *E. tarda* at a dose of 1.7×10^8 CFU/fish and became moribund after 6 days. The marginal area showed marked bacterial multiplication, bacterial phagocytosis by neutrophils and bacterial multiplication in neutrophils. R: renal tubule. Giemsa stain. Bar: 50 μ m.
- Fig. 7.** Spleen of the same fish as shown in Fig. 6. Sheathed arteries (SA) were markedly invaded by bacteria and necrotic. Pulp (P) were hemorrhagic and necrotic due to bacterial invasions. Giemsa stain. Bar: 50 μ m.
- Fig. 8.** Liver of the same fish as shown in Fig. 6. Necrotic lesion was formed due to bacterial invasion. H-E stain. Bar: 50 μ m.
- Fig. 9.** Liver of a fish that was challenged with *E. tarda* at a dose of 1.3×10^8 CFU/fish and became moribund, forming abscesses after 23 days. Abscesses were walled off by deposited fibrin. Hepatic cells were extensively atrophic. H-E stain. Bar: 100 μ m.



