

## ニホンウナギのビブリオ病の病理組織学的研究—II. 破壊菌体で前処理した魚の生菌攻撃に対する反応

宮崎照雄\*・窪田三朗\*

(昭和 56 年 3 月 2 日受理)

### Histopathological Studies on Vibriosis of the Japanese Eel (*Anguilla japonica*)—II.

#### Responses of Fishes Pretreated with Bacterial Sonicate against Challenge with Viable Bacteria

Teruo MIYAZAKI\* and Saburoh S. KUBOTA\*

\*Fac. Fish., Mie Univ., Edobashi, Tsu, Mie, Japan

(Received March 2, 1981)

In this study, Japanese eels were injected with bacterial sonicate and then challenged with viable cells of *Vibrio anguillcida*. Bacterial sonicate was injected intramuscularly at a rate of 2.0 mg per 100 g body weight. After 24 hours, the treated fishes were challenged with an intramuscular injection of the viable bacteria at rates of 0.5 and 1.0 mg per 100 g body weight.

Sixty percent of challenged fishes survived for three to seven days. The fishes produced protrudent lesions at the injected areas within three days and ulcerative lesions on the fifth day. In the protrudent lesions, many neutrophils infiltrated and phagocytized bacteria extensively in the affected tissues which exhibited necrosis, edema and hemorrhage. In the viscera, reactions of neutrophils and cells belonging to the reticulo-endothelial system were extensive, which prevented bacterial dissemination.

Forty percent of challenged fishes became moribund within two days. The moribund fishes had protrudent lesions at the injected areas and exhibited the congested liver, splenomegaly and enteritis. They underwent systemic infection and the infected tissues exhibited extensive necrosis, circulatory disturbances and slight reactions of neutrophils.

Based on the results, it was clarified that the fishes which were previously treated with the bacterial sonicate, manifested extensive reactions of neutrophils as defensive responses against challenge with the viable bacteria.

筆者らは第 1 報 (宮崎ら, 1978) でニホンウナギ (*Anguilla japonica*) のビブリオ病 B 型 (*Vibrio anguillcida* 感染症) (室賀ら, 1977, 1979) の自然発病魚について病理組織学的検討を行った。その後の研究 (宮崎, 1980) で, 分離菌株を用いた人工感染魚が自然発病魚と酷似の病理組織像を示し, その破壊菌体を注射した魚が脾臓にリンパ球の増生, 腎臓造血組織に好中球の増生および全身の未分化間葉系細胞の繁殖など感染防御機構の亢進を示すことを明らかにした。本研究では上記の知見に基づいて破壊菌体の注射を施した魚に生菌攻撃を加えた結果, その処置魚は自然発病魚とは異なった病理組織

学的反応を呈し, 感染を克服する症例がみられた。本報告では破壊菌体の注射という処置をした魚の感染防御反応の特徴について述べる。

#### 材料および方法

供試菌株は広島大学の室賀清邦助教授から分与を受けた *V. anguillcida* ET-517 株で, 3% NaCl 添加ブレインハートインフュージョン寒天平板培地 (以下, 3% NaCl BHI 培地) で 25°C, 24 時間培養したものを生菌接種, 破壊菌体の作製に供した。供試魚は体重 100~150 g のニホンウナギで, 10 尾に既報 (宮崎, 1980) に述べた方法で作製した破壊菌体を体重 100 g 当り湿菌量

\* 三重大学水産学部

換算で 2.0 mg, 1 回, 体側筋内に注射した。処置後, 24 時間目に体重 100 g 当り培養菌の 0.5 mg (供試魚 4 尾) または 1.0 mg (供試魚 6 尾) を破壊菌体注射の反対側の体側筋内に接種し, 攻撃試験とした。また, 無処置の 7 尾に体重 100 g 当り培養菌の 0.5 mg (供試魚 2 尾) または 1.0 mg (供試魚 5 尾) を体側筋内に接種し, 対照とした。供試魚はプラスチック水槽 (水温 23~24°C) に収容し, 適時とりあげた。各個体について細菌接種局所と肝臓から 3% NaCl BHI 培地で細菌の再分離を試みた後, 接種局所と内臓諸器官を摘出してヘリー液で固定した。常法に従って 4~5  $\mu$  のパラフィン切片を作製し, マイヤーのヘマトキシリン・エオジン染色 (以下, H-E 染色), ギムザ染色, PAS 反応, ワイグルトの線維素染色, アザン染色を目的に応じて施した。

## 結 果

### 肉眼的所見

破壊菌体を注射した魚 (以下, 処置魚) は生菌接種から 24~48 時間の間に瀕死状態に陥るもの (生菌 0.5 mg 接種例 1 尾, 1.0 mg 接種例 3 尾) と, 一時的に衰弱するが 3 日以降に回復するもの (0.5 mg 接種例 3 尾, 1.0 mg 接種例 3 尾) とにわかれた。瀕死魚はいずれも接種局所に腫脹患部をつくり, 剖検的に激しい肝うっ血, 脾腫, 腸管の発赤を示していた。その接種局所と肝臓から細菌が再分離された。これに対して, 3 日目の生残魚の接種局所は軟化融解し, 5 日目にはその局所が崩壊して体側筋が露出する潰瘍となり, そのまま 7 日目まで生残することが確認された (図 1)。3 日と 5 日目にとりあげた 4 個体について剖検的に内臓諸器官に著変がみられず, 接種局所からのみ少数の細菌が分離された。

対照とした 7 個体はいずれも 24 時間以内に瀕死状態となった。なお, それらの肉眼的所見と病理組織学的所見は既報 (宮崎, 1980) に詳述したので, 本報では省く。

### 病理組織学的所見

処置魚に生菌攻撃した後, 瀕死状態になった個体を処置-瀕死魚, 3 日以降生残した個体を処置-生残魚として, それぞれの病理組織像を示すと以下ようになる。なお, 接種菌量による病理組織像の相違はみられなかった。

#### A. 処置-生残魚

1. 細菌接種局所: 細菌接種後 3 日目の接種局所は腫脹から軟化融解に陥っていた。この病巣では細菌が真皮, 皮下脂肪織, 体側筋組織に分布していた。病巣中心

部の表皮は剝離し, その下の真皮には水腫性疎開, 出血に加えて類線維素変性, 好中球やマクロファージの浸潤および食菌像がみられた。皮下脂肪織, 血合筋組織, 白色筋組織は出血, 水腫および顕著な好中球浸潤を伴って融解壊死していた (図 2)。その融解壊死巣周囲の血合筋組織と白色筋組織の筋節には細菌がび散的に拡がり, 壊死, 水腫, 出血, 好中球浸潤が強く起こり, マクロファージの浸潤もみられた。その好中球の多くは崩壊しているが, マクロファージとともに活発な食菌や壊死組織の貪食を営み, その一部は菌球となっていた (図 3)。さらにその周囲の筋節では細菌の拡がり, 壊死, 水腫, 出血は軽度であるが, 筋隔膜から筋節辺縁部にかけて顕著な好中球浸潤がみられた (図 4)。また, 皮下脂肪織では, 融解壊死巣周囲に水腫, 出血, 好中球の浸潤と食菌が顕著であり, 遠位周辺部には出血が顕著となっていた。以上の病巣内に分布する動脈や静脈の血管壁は細菌の侵襲を受けているが, 管壁での類線維素変性あるいは好中球の浸潤と食菌のため, 細菌が内膜を侵して管腔内に侵入する像はみられなかった (図 5)。その血管内の血液中には多数の好中球が移行していた。

細菌接種後 5 日目の接種局所は皮膚から体側筋組織にかけての崩壊のため潰瘍化していた。潰瘍周囲の真皮には出血, 好中球浸潤, 類線維素変性に加えて結合織の増殖が起こっており, そこには組織学的手法で細菌を認めることはできなかった。露出した皮下脂肪織と体側筋組織の表面は好中球とマクロファージを含む線維素の厚い被膜で覆われていた。この被膜には少数の細菌と食菌像がみられた (図 6)。被膜の下の皮下脂肪織と体側筋組織の間質には好中球やマクロファージの浸潤, 肉芽組織の増殖が起こり, 壊死組織は好中球やマクロファージの貪食処理を受けていた。血管系には好中球と小円形細胞の浸潤を伴う血管炎が起こっていた。また, 上記の組織のいずれにも細菌はほとんどみられなかった。

2. 内臓諸器官: 細菌接種後 3 日と 5 日目にとりあげた個体のいずれにも, 組織学的手法では内臓諸器官への細菌伝播像は認められなかった。肝臓では, 3 日と 5 日目の観察例のいずれでも, 部分的な実質細胞の萎縮, 肝動脈・門脈・肝静脈の血管における好中球浸潤がみられた (図 7)。

脾臓では, 3 日と 5 日目の観察例はともに, 脾髄に多数の好中球の浸潤, リンパ芽細胞の増生がみられたが, 特に 5 日目の観察例では胚中心様構造も認められた。脾臓内の血管系には多数の好中球とリンパ球の移行像がみられた (図 8)。

腎臓実質にはいずれの個体でも著変がみられないが、造血組織には幼若好中球と造血細胞の増生、類洞の細網内皮細胞の活性・腫大、血管腔内への好中球の移行像が共通してみられた。

胃や腸管では、いずれの個体でも、それぞれの粘膜固有層や粘膜下織に未分化間葉系細胞が増生し、細動脈や細静脈には小円形細胞浸潤を伴う血管周囲炎が起こっていた。

心臓では、心内膜、心筋層、心外膜に好中球や小円形細胞の浸潤巣がみられる例もあった。なお、鰓には共通して著変はみられなかった。

## B. 処置-瀕死魚

1. 細菌接種局所: 細菌接種後 24~48 時間の間に瀕死状態に陥った個体はいずれも、接種局所は腫脹し、細菌が、真皮、皮下脂肪織、体側筋組織にび散的に拡がり、増殖していた。細菌の侵襲した局所は激しい壊死、水腫、出血および軽度の好中球浸潤を起こしていた (図 9)。その好中球浸潤は分散的で、食菌像も少ないのが特徴であった。病巣内の血管は好中球浸潤を伴う血管炎を起こしており、激しい細菌の侵襲を受けているものもあるが、管腔内の血液中に細菌の侵入像がみられないものも少なからずあった (図 10)。

2. 内臓諸器官: 肝臓では細菌が血管壁や類洞に伝播しており、類洞が激しくうっ血して拡張するため実質細胞は圧迫萎縮に陥っていた。血管腔内には多数の好中球がみられるが、その食菌像はほとんどみられなかった。

脾臓は細菌の伝播の強さにより異なった病変を現わしていた。細菌伝播が弱かった 1 尾では莢組織と脾髄に好中球の浸潤のみが顕著で、出血や壊死はほとんどみられなかった (図 11)。細菌伝播の激しい 2 尾では英動脈と脾髄とともに激しい好中球の浸潤と赤血球のうっ滞のためその構造が破壊されていた (図 12)。脾髄中心静脈周囲と脾臓辺縁部にはリンパ球の集簇が、脾動脈と脾静脈にはリンパ球浸潤が起こり、血管腔内には多数の好中球とリンパ球がみられた。

腎臓の実質には著変はみられないが、造血組織は細菌伝播の強さによって異なった病変を呈していた。細菌伝播の弱い症例では細菌は主に類洞にみられ、類洞の細網内皮細胞の活性・腫大、造血組織の減数萎縮などが起こっていた。細菌伝播が造血組織に激しい症例では出血を伴う巣状壊死が形成され、非侵襲部には減数萎縮がみられた。

胃では血管腔内に細菌の伝播がみられるが、組織侵襲

像はみられなかった。

腸管では一般に粘膜固有層、粘膜下織の血管が小円形細胞浸潤を伴う血管周囲炎を起こしており、細菌は血管腔内に伝播しているが、組織侵入には至っていない (図 13)。粘膜固有層の毛細血管はうっ血することもあるが、粘膜上皮は剝離することはなかった (図 14)。

心臓では細菌伝播が激しかった 1 尾において、心外膜と動脈球外膜の血管周囲に細菌が侵入して増殖しており、その病巣には好中球の浸潤と食菌像、水腫性疎開などがみられた (図 15)。

## 考 察

*V. anguillcida* の破壊菌体注射で処置した魚に同種の生菌攻撃を加えた結果、瀕死状態に陥るものと感染に耐えて生残するものがあった。これらの処置魚と対照とした無処置の人工感染魚 (宮崎, 1980) の病理組織学的特徴をまとめると表 1 のようになる。即ち、1) 体重 100 g 当り、0.5 または 1.0 mg の菌量を接種した場合、無処置のものは 24 時間以内に瀕死状態に陥るが、処置魚は瀕死状態になるのが 24~48 時間に遅延するだけでなく、生残する個体もあった。2) 細菌接種局所の病変が、無処置魚では壊死を伴う漿液性出血性炎で特徴づけられるが、処置-瀕死魚では弱いながらも好中球反応が加わり、処置-生残魚では好中球浸潤と食菌像が顕著となっていた。また、後者では好中球の融解が接種局所を潰瘍化させる結果、壊死組織と細菌がとり除かれていた。3) 細菌接種局所において、無処置魚では細菌の血管侵入が激しいが、処置魚では血管炎のため細菌の血管内腔への侵入は抑えられる傾向にあった。従って、4) 無処置魚は激しい全身感染から敗血症に陥るが、処置-瀕死魚は消化管と鰓を除く他の器官にのみ転移病巣を形成し、処置-生残魚では転移病巣が生じなかった。また、5) 処置-生残魚では造血組織での好中球の増生と血管系への好中球の動員、脾臓でのリンパ球反応、全身の網内系の反応も顕著であった。以上の所見から、細菌の破壊菌体注射により処置された魚は、その後短時間の間に同種の細菌の攻撃にも耐える能力を獲得し、その感染防御には好中球反応と血管炎が重要な役割を果していると思われる。

内毒素で処置した実験小動物が、処置後 1~2 日間で好中球による感染防御能を獲得することが知られており、これは非特異反応とみなされている (本間, 1973)。この非特異反応が魚類にあてはまるか否かについては今後の問題である。

Table 1. Summary of histopathological findings in artificial Vibriosis

Fish	pretreated*		untreated**
	moribund	survivors	moribund
After artificial challenge***			
Injected area			
bacterial multiplication	+++	+~++	+++
necrosis of musculature	+++	++	+++
edema and hemorrhage	+++	+++	+++
neutrophils infiltration	+	+++	-
angitis	+	++	-
Liver			
bacterial dissemination	++	-	+++
congestion	++	-	+++
hepatocytes degeneration	+++	+	+++
neutrophils infiltration	+	++	-
Spleen			
bacterial dissemination	+~+++	-	+++
necrosis and hemorrhage	++	-	+++
neutrophils infiltration	++	+++	-
lymphocytes hyperplasia	-	++	-
Renal hematopoietic tissue			
bacterial dissemination	++	-	+++
necrosis and hemorrhage	++	-	+++
neutrophils hyperplasia	+	+++	-
Intestine			
bacterial dissemination	+	-	+++
desquamative catarrh	-	-	+++
peri-angitis	++	++	-
Heart			
bacterial dissemination	++	-	+
Gill			
bacterial dissemination	-	-	++
edema	-	-	++

\* Treated by the intramuscular injection with the bacterial sonicate at a rate of 2.0 mg per 100 g body weight.

\*\* MIYAZAKI (1980).

\*\*\* Intramuscular injection with the bacteria at rates of 0.5 and 1.0 mg per 100 g body weight. Water temp.: 23~24°C. -: no-change, +: slight, ++: moderate, +++: extensive.

## 要 約

1. *V. anguillicida* の破壊菌体注射により感作した魚に生菌攻撃を行ない、感作魚の感染防御反応について病理組織学的に検討した。
2. その結果、生残率は 60% に達し、生残魚では顕著な好中球反応が観察された。
3. 瀕死魚では好中球反応が弱いながらも認められた。

## 謝 辞

本研究を進めるにあたり、菌株分与を賜った広島大学助教授室賀清邦先生に深謝します。

## 文 献

- 本間 遜・齊藤和久・河西信彦・丹羽 充 (1973): 細菌内毒素. 講談社, 東京, 574 pp.
- 宮崎照雄・城 泰彦・窪田三朗・江草周三 (1977): ニホンウナギのピブリオ病の病理組織学的研究—I, 自然感染魚. 本誌, 12 (3), 163-170.
- 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.
- 室賀清邦・城 泰彦・西淵光昭 (1976): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*-I. 性状と分類学的位置. 本誌, 11 (3), 141-146.
- 西淵光昭・室賀清邦・城 泰彦 (1980): 養殖ウナギから分離された病原性 *Vibrio*-VI. 本菌感染症の診断法. 本誌, 14 (3), 125-131.

## Explanation of Figures

- Fig. 1.** An eel which survived for seven days after challenge. The injected area produces an ulcer involving the lateral musculature.
- Fig. 2.** An injected area of a fish which survived for three days after the challenge. Neutrophil infiltration, hemorrhage and necrosis are extensive within the subcutaneous adipose tissue and the lateral musculature. H-E stain,  $\times 32$ .
- Fig. 3.** A high-power view of the above area. Infiltrated neutrophils phagocytize the bacteria. Giemsa stain,  $\times 800$ .
- Fig. 4.** The margin of the injected area of the above fish. Neutrophil infiltration is extensive in the myoseptum and the affected white musculature. H-E stain,  $\times 50$ .
- Fig. 5.** A segmental artery in the same injected area. There are fibrinoid degeneration, infiltration and bacteria-phagocytosis of neutrophils, and bacterial invasions within the vessel. Bacterial invasions into the lumen are not observed. Giemsa stain,  $\times 160$ .
- Fig. 6.** An injected area of a fish which survived for five days after the challenge. A large amount of fibrin is precipitated on the surface of an ulcer. Neutrophil infiltration and growth of granulation tissue occur in the affected white musculature. H-E stain,  $\times 60$ .
- Fig. 7.** Liver of a fish which survived for three days. Angitis accompanying neutrophil infiltration occurs within the portal vein and the hepatic artery. H-E stain,  $\times 200$ .
- Fig. 8.** Spleen of a fish which survived for five days. Neutrophil infiltration, proliferation of lymphocytes and lymphoblast, and lymphocyte migration into vessels become extensive. Giemsa stain,  $\times 200$ .
- Fig. 9.** An injected area of a moribund fish. In affected tissues, there are extensive necrosis, hemorrhage, edema and slight infiltration of neutrophils. Marked bacterial multiplication occurs at the segmental vein. H-E stain  $\times 50$ .
- Fig. 10.** A detail of the injected area of a moribund fish. The segmental vein exhibits slight infiltration of neutrophils and no invasion of the bacteria into the lumen. Giemsa stain,  $\times 200$ .
- Fig. 11.** Spleen of the moribund fish. In a case which bacterial dissemination is slight, infiltration of neutrophils is extensive. H-E stain,  $\times 200$ .
- Fig. 12.** Spleen of a moribund fish. Dissemination of considerable numbers of the bacteria causes neutrophil infiltration, hemorrhage and necrosis. H-E stain,  $\times 160$ .
- Fig. 13.** Intestine of the moribund fish. Slight dissemination of the bacteria induces vascular dilatation in the tunica propria. H-E stain,  $\times 160$ .
- Fig. 14.** Intestine of a moribund fish. Small numbers of the bacteria migrate to the vein undergoing periphlebitis but they do not invade the surrounding tissues. Giemsa stain,  $\times 320$ .
- Fig. 15.** Heart of a moribund fish. There are bacterial multiplication, edema, hemorrhage, infiltration and bacteria-phagocytosis of neutrophils within the epicardium. Giemsa stain,  $\times 160$ .

## 図 の 説 明

- 図 1. 破壊菌体注射による処置後 24 時間目に体重 100 g 当り生菌を 1 mg 接種して攻撃した後 7 日間生残した魚. 細菌接種局所は崩壊して潰瘍を形成している.
- 図 2. 処置後の生菌攻撃から 3 日目にとりあげた魚の細菌接種局所. 皮下脂肪織と体側筋組織には好中球浸潤, 出血が激しく, 局所的に融解もみられる. H-E 染色,  $\times 20$ .
- 図 3. 図 2 と同部位における好中球の食菌像. ギムザ染色,  $\times 800$ .
- 図 4. 同接種局所の辺縁部. 筋隔膜から白色筋組織にかけて好中球浸潤が激しい. H-E 染色,  $\times 50$ .
- 図 5. 同接種局所内の体節動脈. 血管壁に類線維素変性が, その周囲に好中球の浸潤と食菌が起こっており, 細菌の管腔内への侵入が阻止されている. ギムザ染色,  $\times 160$ .
- 図 6. 生菌攻撃後 5 日目にとりあげた魚の細菌接種局所. その局所は潰瘍化し, 画面上部の潰瘍底には線維素性分画線が形成され, 白色筋組織には好中球浸潤と肉芽組織の増殖がみられる. H-E 染色,  $\times 50$ .
- 図 7. 生菌攻撃後 3 日目にとりあげた魚の肝臓. 肝門脈, 肝動脈の血管壁に好中球浸潤がみられる. H-E 染色,  $\times 200$ .
- 図 8. 生菌攻撃後 5 日目にたとりあげ魚の脾臓. 好中球浸潤, リンパ球とリンパ芽細胞の増生が著しい. ギムザ染色,  $\times 200$ .
- 図 9. 生菌攻撃後 2 日目で瀕死となった魚の細菌接種局所. 皮下脂肪織と体側筋組織には壊死, 水腫, 出血, 血管壁の細菌増殖が顕著である. H-E 染色,  $\times 50$ .
- 図 10. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の細菌接種局所. 体節静脈での細菌増殖は激しいが, 好中球の浸潤と食菌が生じ, 管腔への細菌侵入は弱い. ギムザ染色,  $\times 200$ .
- 図 11. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の脾臓. 細菌伝播の弱い症例では好中球浸潤が激しい. H-E 染色,  $\times 200$ .
- 図 12. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の脾臓. 細菌伝播の強い症例では好中球浸潤と出血が著しい. H-E 染色,  $\times 160$ .
- 図 13. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の腸管. 粘膜固有層の充うっ血が激しい. H-E 染色,  $\times 160$ .
- 図 14. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の腸管. 粘膜下織の静脈内に少数の細菌の伝播がある. その血管には周囲炎が起こっており, 周囲組織への細菌の侵入はみられない. ギムザ染色,  $\times 320$ .
- 図 15. 生菌攻撃後 2 日目に瀕死となった魚の心臓. 心外膜には細菌増殖, 好中球の浸潤と食菌がみられる. ギムザ染色,  $\times 160$ .







