

ニシキゴイの滑走細菌性あなあき病の
病理組織学的研究—I
感染病巣について

宮崎照雄・窪田三朗・江草周三*

三重大学水産学部

Histopathological Studies of Gliding-bacterial Ulcer Disease
of the Color Carp (*Cyprinus carpio*) —I
Infected Ulcers in the Body Surface

Teruo MIYAZAKI, Saburoh S. KUBOTA and Syuzo EGUSA*
Faculty of Fisheries, Mie University

三重大学水産学部研究報告

第3号別刷

Reprinted from
Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University
No. 3, November 1, 1976

ニシキゴイの滑走細菌性あなあき病の
病理組織学的研究— I
感染病巣について

宮崎照雄・窪田三朗・江草周三*
三重大学水産学部

Histopathological Studies of Gliding-bacterial Ulcer Disease
of the Color Carp (*Cyprinus carpio*) — I
Infected Ulcers in the Body Surface

Teruo MIYAZAKI, Saburoh S. KUBOTA and Syuzo EGUSA*
Faculty of Fisheries, Mie University

We examined histopathologically the diseased color carps suffering from the flexible bacterial infection which broke out in late spring in 1974. This paper deals with histopathological observation of the infected ulcers manifested in the body surface. The isolated flexible bacterium has a growth-temperature range lower than that of *Flexibacter columnaris*. In the shallow ulcers the epithelium disappeared and the exposed dermis was attacked by a considerable number of flexible bacteria. In the large ulcers excavating the lateral musculature, 1) in the central area the exposed musculature was strikingly necrotized and flexible bacteria and other Gram-negative rods invaded its superficial layer, 2) in the marginal areas the dermis which was attacked by a large number of flexible bacteria and was necrotized, covered the meshwork of fibrin precipitated on the affected musculature, in which many macrophages infiltrated and acute inflammatory reactions occurred, 3) in the surrounding areas a considerable number of flexible bacteria disseminated just through the superficial layer of the dermis.

The diseased carps were attacked by also fish-lice and the lesion was a micro defect of the epithelium.

From the histopathological observation, we can point out that the flexible bacterium plays an important role to enlarge ulcer, and its marked invasiveness

*東京大学農学部 (Faculty of Agriculture, Tokyo University)

through the collagenous tissues is an important characteristic of this bacterium. We conclude that the flexible bacterium may enter the dermis through the dermal wound which has been produced by external parasites and it enlarges ulcers by means of its lateral dissemination through the dermis. We also conclude that other bacteria invaded subsequently the exposed lateral musculature aid to deepen ulcers.

1972年頃から毎年夏から初秋にかけて、あるいは晩冬から春にかけてキンギョ、コイ、フナなどにいわゆる“あなあき病”が流行するようになった。このうち夏期に流行するあなあき病が、*Flexibacter columnaris* 感染症であることは既に明らかにされている(宮崎・江草 1973)。これに対して、冬から春にかけての低水温時に流行するあなあき病は採卵用の親のキンギョや若いキンギョに少なからぬ被害を与えている。この低水温性あなあき病について、病状の形態的な検討(高橋ら 1975)や患部から分離された各種細菌のある程度の細菌学的検討(高橋ら 1975)がなされている。しかしそれら個々の細菌と宿主との関係については検討されていないし、本病の病状発展に主体的な役割を果たす病原体のしっかりとした把握がなされていないのが現状である。こうした事実は本病の治療のみならず予防対策を立てることさえも難しくしている。今回、我々は1974年の6月初旬にニシキゴイに流行したあなあき病の感染病巣を病理組織学的に検討した結果、この病気には *F. columnaris* よりも低温度域に成長適温をもつ未同定滑走細菌が最も密接に関与していること、および細菌と宿主の関係についても明らかにしたので報告する。

材料および方法

材料は1974年6月中旬、大 학교内の水槽で飼育中に自然発生的に罹病したニシキゴイ (*Cyprinus carpio*) 4尾で、それらの体長は20~30cmの範囲のものであった。病魚は軀幹部などに潰瘍病巣を発現していた。患部の壊死した真皮の一片を切り取って顕鏡し、小さなカラム状の集落をつくる滑走細菌の存在を確認後、キトファーガー寒天平板を用いて分離を試みた。各病魚から病巣と内蔵諸器官を切り出して、ヘリー液、ブアン液、10%ホルマリン水で固定し常法に従って4~8 μ のパラフィン切片を作成した。染色はHE染色、ギムザ染色、グットパスチャー染色、ワイゲルト線維素染色、ワン・ギーソン染色、アザン染色、PAS反応、PTAH染色、好銀性線維染色(渡辺変法)を目的に応じて施した。

結 果

肉眼的所見

感染病巣は主に軀幹部に形成されていた。頭頂部、鰓蓋部、尾柄部、鰭にも見られることがあった。小さな病巣は3、4枚の鱗の脱落と皮内および皮下発赤を伴う浅い潰瘍を特徴としていた。発展すれば広範囲にわたって鱗が脱落し、その中心域では白色に壊死した体側筋組織が露呈していた、その周囲を壊死してぼろ布のようになった真皮が被っていた。この病巣の辺縁域では鱗は脱落寸前となり、皮内および皮下には出血も起こっていた(Fig. 1)。今回の観察では肋骨または脊椎が露呈するほどの深い潰瘍はみられなかった。なお壊死した真皮のうえに *Flexibacter columnaris* 感染によるあなあき病(宮崎ら 1973)で見られたような黄色の細菌集落は肉眼的には認められなかった。

供試魚の中にはウオジラミ (*Argulus japonicus*) がいくつか寄生しているものもあったが、その寄生局所の皮下または皮内に鱗一枚分位の大きさの発赤が起こっていた。

病巣からキトファーガー寒天平板を用いて細菌分離を試み、約20℃で5～7日間培養した結果、一種の滑走細菌が分離された。キトファーガー寒天平板上における集落の形態は *F. columnaris* のそれとは全く異なり、若林ら (1975) の報告にある一種の未同定の病原性滑走細菌のそれと同じであった。

病理組織学的所見

脱鱗と真皮の露呈を特徴とする小さな浅い潰瘍性病巣においては、表皮は既に消失し、真皮の疎結合織層には滑走細菌と思われる多数のグラム陰性長桿菌が侵入、増殖して、疎結合織は融解壊死に陥るとともにその一部は崩壊していた。病巣局所の鱗の周囲には線維素より成る網状構造物が構築されていた (Fig. 3)。析出した線維素は HE 染色で赤色、アザン染色で輝赤色、ワン・ギーソン染色で黄色、ワイゲルト線維素染色で紫青色に染った。表面を線維素で被われた真皮の密結合織の表層には軽度の出血と炎性細胞浸潤がみられた。この潰瘍病巣の周辺域では滑走細菌が疎結合織に伝播し、そのうえの表皮は上皮細胞の萎縮によって疎化していた。

この潰瘍病巣が進展したものでは、疎結合織で増殖した滑走細菌がその下の析出線維素層内に伝播して、線維素は融解して顆粒状に崩壊するとともに炎性細胞も壊死に陥っていた (Fig. 4)。そして真皮の密結合織の表層にも滑走細菌が伝播して増殖し、組織は軽度の壊死に陥っていた (Fig. 5)。この病巣の中心域では真皮の下の皮下脂肪組織の血管は赤血球を満して拡張していた。

体側筋組織が露呈するほどの深い潰瘍病巣においては、組織の退行性変化はより進行し、それに伴う炎症反応もより複雑になっていた。まず、病巣の中心域では皮膚および皮下脂肪組織は完全に崩壊し、体側筋組織の上部にある筋線維は凝固壊死に陥って萎縮するとともに間質組織とそこに分布する血管も壊死に陥っていた。特に筋節表層の組織は壊死崩壊していた (Fig. 6)。間質に分布する血管は赤血球を満して著しく拡張しているが、その中に入っている赤血球は細胞質が崩壊して核だけとなっていて、太い血管では血栓も形成されていた。間質に出血した赤血球も細胞質が崩壊して核だけとなっていることが多かった。そしてこの壊死した筋線維と間質に多数の滑走細菌が単独で (Fig. 7)、または種々のグラム陰性短桿菌が混在する状態で、またはグラム陰性短桿菌のみが侵入伝播して増殖するとともに、筋隔膜に分布する太い血管壁にも侵入増殖していた (Fig. 8)。この部位にみられた細菌では通常 Fig. 7 に示したように滑走細菌が卓越していたが、潰瘍底の体側筋組織の部位によっては Fig. 8 に示したようにグラム陰性短桿菌が滑走細菌よりも卓越している症例もあった。病巣の体側筋組織の深部には細菌の伝播はなく、生活組織と接する区域では間質の血管は正常な赤血球を容れて拡張し、間質や壊死した筋線維には軽微ながら大単核細胞が浸潤して壊死した筋線維を吞食していた。

筋肉組織が露呈する潰瘍の辺縁域では露呈した筋肉組織の表層に漿液、好中球、大単核細胞および赤血球を混えた多量の線維素が析出して層をなしていた (Fig. 9, 10)。析出線維素層の下の体側筋は凝固壊死に陥って萎縮していた。析出線維素層に近い体側筋組織表層の血管は著しく拡張して、その血管壁は非常に薄くなり、血行静止を思わせる像もみられた (Fig. 9)。滑走細菌は析出線維素層の表層には伝播していたが、退行性変化に陥った体側筋組織への細菌の伝播はみられなかった。なおこの部位の変性壊死した筋線維には多数の大単核細胞が浸潤繁殖して筋線維を吞食していた (Fig. 11)。

上述したような体側筋組織に達する潰瘍病巣局所の周囲では、真皮の密結合織が壊死に陥ってい

るがまだ残存する状態にあった。壊死した真皮の膠原線維は断裂、萎縮または局所的に融解し、密結合織特有の膠原線維による柵構造 (Fig. 2) は完全に崩壊していた (Fig. 12, 13)。壊死した密結合織では滑走細菌が卓越して増殖しているが、グラム陰性桿菌が混在することも多く (Fig. 14)、時には組織表層にグラム陽性球菌もみられた。壊死した真皮はその下の脂肪組織から分離していることが多く、この皮下脂肪組織には多量の線維素が析出していた。ここでは体側筋組織の上部域に限って筋肉の壊死と血管拡張、炎性水腫および壊死した筋線維への炎性細胞浸潤が起っていた。特に壊死した筋線維への大単核細胞の浸潤とその細胞による壊死した筋肉の呑食はこの部位で最も顕著であった。なお滑走細菌は皮下脂肪組織に析出した線維素表層にのみ伝播していた。

体側筋組織が露呈する深い潰瘍病巣周縁の表皮の剥離と脱鱗が生じているだけの浅い潰瘍局所では、露呈した表皮基底膜と真皮の疎結合織および密結合織表層には多数の滑走細菌が伝播して純培養的に増殖し、細菌の伝播増殖域は変性壊死に陥っていた (Fig. 15)。しかし、密結合織の深部にまで滑走細菌が伝播することはなかった。その下の皮下脂肪組織では血管拡張、漿液の滲出、線維素の析出、炎性細胞浸潤が生じていた (Fig. 16)。

潰瘍病巣の周辺域では疎結合織に軽微な滑走細菌の伝播が生じ、表皮は上皮細胞の萎縮のため疎化していた。真皮の密結合織、皮下脂肪組織には著変はみられなかった。

ウオジラミの寄生していた局所の病理組織学的検討も行なった。Fig. 2 に示した病巣は固定直前までウオジラミの寄生していたところである。組織切り出しの時にウオジラミが逃亡したため図の中に虫体は見られない。虫の口針の搜入局所の表皮は疎結合織を巻き込む状態で基底膜より隆起し、隆起先端の表皮は基底膜も含めて欠損していた。その周囲の表皮も上皮細胞の萎縮のため疎化していた。真皮の疎結合織の血管は顕著に拡大し、そこに高度の漿液の滲出と線維素の析出が生じ、特に表皮の隆起に巻き込まれた局所では線維素の析出が目立っていた。また、真皮の密結合織表層には軽度の出血も見られた (Fig. 2)。

考 察

本病において初期感染病巣の真皮の疎結合織、潰瘍病巣の周囲域における疎結合織、同じく最辺縁域における疎結合織および密結合織などに卓越して侵入増殖していた細菌は滑走細菌であった。それに比べて他のグラム陰性短桿菌、グラム陽性細菌は潰瘍病巣の中心域に目立ち、潰瘍病巣の拡大に関与するよった周辺域への伝播はほとんど見られなかった。以上のことから、初期感染病巣の確立、潰瘍の拡大と深まりには滑走細菌が最も重要な役割を果していると推察された。今回観察したニシキゴイのあなあき病は滑走細菌感染症として考えるのが妥当であり本病の病状の発展はこの滑走細菌の侵入、伝播、増殖に沿って考えるべきと思われた。

まず、滑走細菌の感染の一つの方法としてウオジラミの寄生との関係が考えられる。ウオジラミの寄生局所の組織像 (Fig. 2) と初期感染病巣のそれ (Fig. 3) とが極めて類似していることと、この滑走細菌が表皮に対する直接的な侵襲性を示していないことが指摘される。以上の理由から、恐らくこの滑走細菌はウオジラミがつけた表皮の傷口を侵入門戸として露呈した真皮の疎結合織に侵入して、そこに感染の足場を確立するという感染方法の可能性が推察された。なおウオジラミ以外の体表に傷をつけるような寄生虫類もウオジラミ同様の役割を果すと推察される。

滑走細菌の感染が確立した後、真皮の疎結合織における細菌の側方伝播に際して、そこに発現する炎症反応は線維索性炎であった。この滑走細菌は線維素を融解する能力をもつようで、細菌の侵入増殖とともに線維素は融解し、細菌は真皮の密結合織へと伝播する。このようにして感染局所に

おける潰瘍は深まっていく。この滑走細菌は密結合織で盛んに増殖し組織を融解壊死に陥らせる。このことからこの滑走細菌は膠原線維性結合織に対して顕著な侵襲性をもつことが指摘される。類似の現象が *Flexibacter columnaris* によるコイ、キンギョ、フナのあなあき病（宮崎ら 1973）とウナギの尾ぐされ症（宮崎ら 未発表）、ハマチの海洋性滑走細菌による潰瘍病（宮崎ら 1975）などの病原性滑走細菌の経皮感染においても認められていて、「膠原線維性結合織に対する高度の侵襲性」は病原性滑走細菌のもつ重要な属性とも考えられる。

滑走細菌の伝播により形成された潰瘍病巣の各組織における炎症反応は、密結合織では炎症細胞浸潤であり、皮下脂肪組織では炎症充うっ血と線維索性炎であり、体側筋組織においては筋肉の壊死と炎症充うっ血、漿液性—出血性—線維索性炎、炎症細胞浸潤であった。以上のように感染局所および退行性変化に陥った体側筋組織に生じた炎症反応は血管反応を主体に発展していたことから、病巣に展開している炎症反応は滲出性の急性炎症反応と判断された。

真皮の密結合織における滑走細菌の盛んな増殖によって密結合織が融解壊死に陥って崩壊した後、滑走細菌は皮下脂肪組織から体側筋組織表層に伝播増殖し、体側筋組織を変性壊死に陥らせる。以上のようにして大きな潰瘍病巣への発展が説明された。

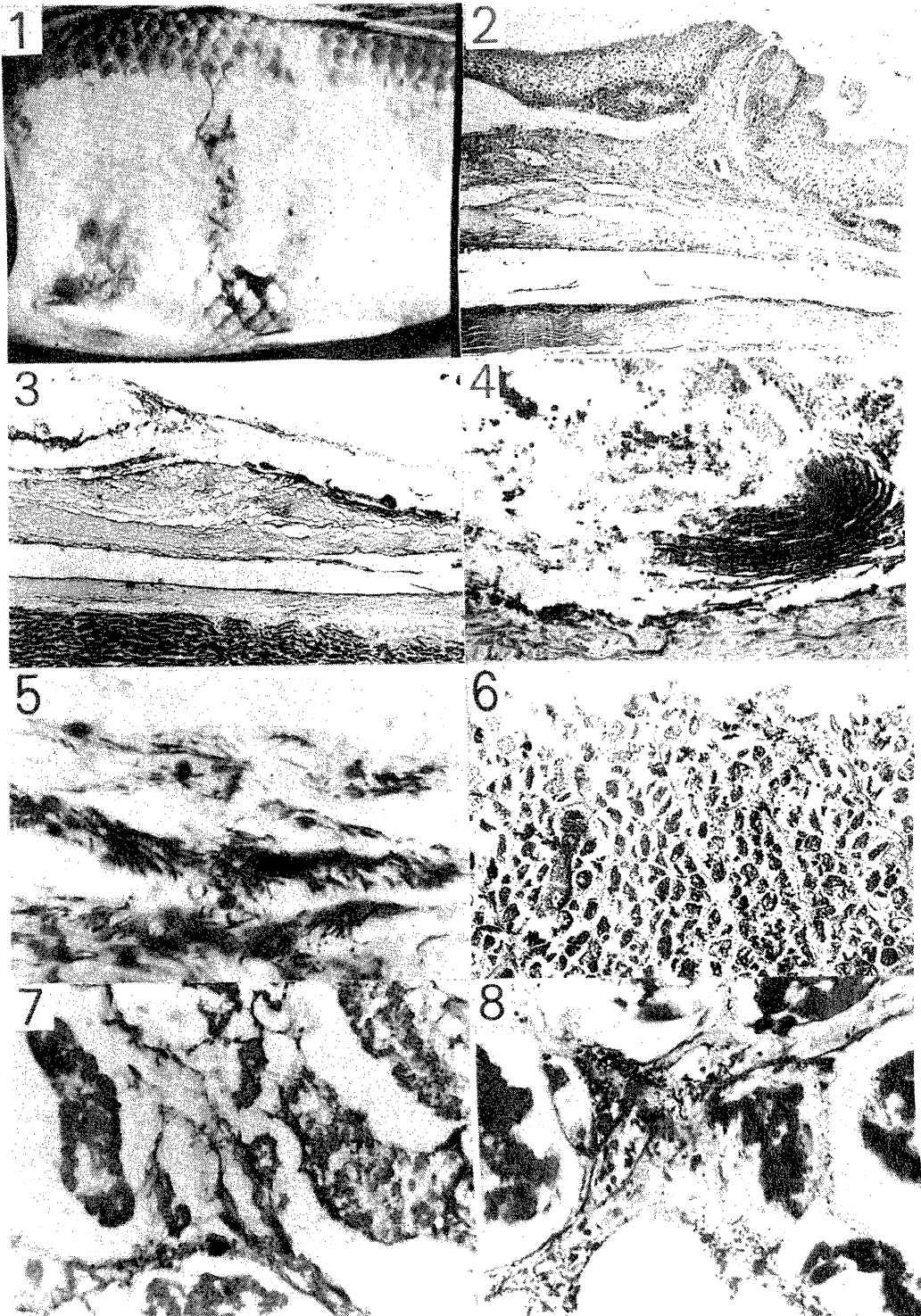
なお、壊死した真皮や体側筋組織にみられた滑走細菌以外の細菌の果す役割の解明は今後の検討を待たねばならないが、それらの果す役割の一つとして、壊死した筋肉に侵入してそれを融解することにより筋肉組織に達した潰瘍をさらに深くすることに関与していることが考えられた。また体側筋組織にみたように太い血管壁における細菌の伝播と増殖は、その細菌によってもたらされる菌血症の発生の可能性を示唆できるものであろう。

以上、考察したように、本病は一種の滑走細菌の真皮の密結合織に対する侵襲性とその組織における側方伝播による潰瘍の拡大を中心に、滑走細菌と恐らくは滑走細菌感染後に侵入したと思われる他の細菌の働きによる潰瘍の深まりと、感染病巣に展開する急性滲出性炎によって特徴づけられた。

ヨーロッパではコイの軀幹体表に潰瘍をつくる病気として Carp Erythrodermatitis（以下略して CE とする）が知られていて、多くの研究がなされている（FIJAN 1972）。この病気は 450nm 以上の大きさをもち真皮に対して親和性を示す病原体によりひきおこされると言われ罹病魚の潰瘍病巣の病理組織は、皮膚および体側筋組織上部域での急性炎症反応の発現と壊死で特徴づけられるとされている（FIJAN 1972）。また CE と同じ病気と言われているコイの潰瘍形成型の腹水症罹病魚の軀幹体表に形成された潰瘍病巣の病理組織も、SCHÄPERCLAUS（1930）や WUNDER *et al.*（1953）により検討されていて、FIJAN の指摘とほぼ同様の変化が示されている。また、最近、BUCKE *et al.*（1975）がイギリスで、ヨーロッパ大陸から移入したコイに発生した CE を検討している。この報告では BUCKE *et al.* は軽視しているが潰瘍病巣に滑走細菌の一種である *Cytophaga sp.* が存在していたとされている。以上、ヨーロッパで研究されている CE 罹病魚の潰瘍病巣の病理組織は、滑走細菌の存在を除けば、我々が検討したニシキゴイのあなあき病の病理組織とよく似ていると思われる。しかし、コイの CE の病理組織に対する詳しい報告はまだなされていず、特に BUCKE *et al.* が示した CE 罹病魚の潰瘍病巣の組織写真は、治療過程にあると判断せざるを得ない潰瘍病巣のものである。以上のことから、病理組織学の立場から CE と滑走細菌性あなあき病を比較検討をすることはむづかしい。この点については今後さらに検討を加えていきたいと思う。

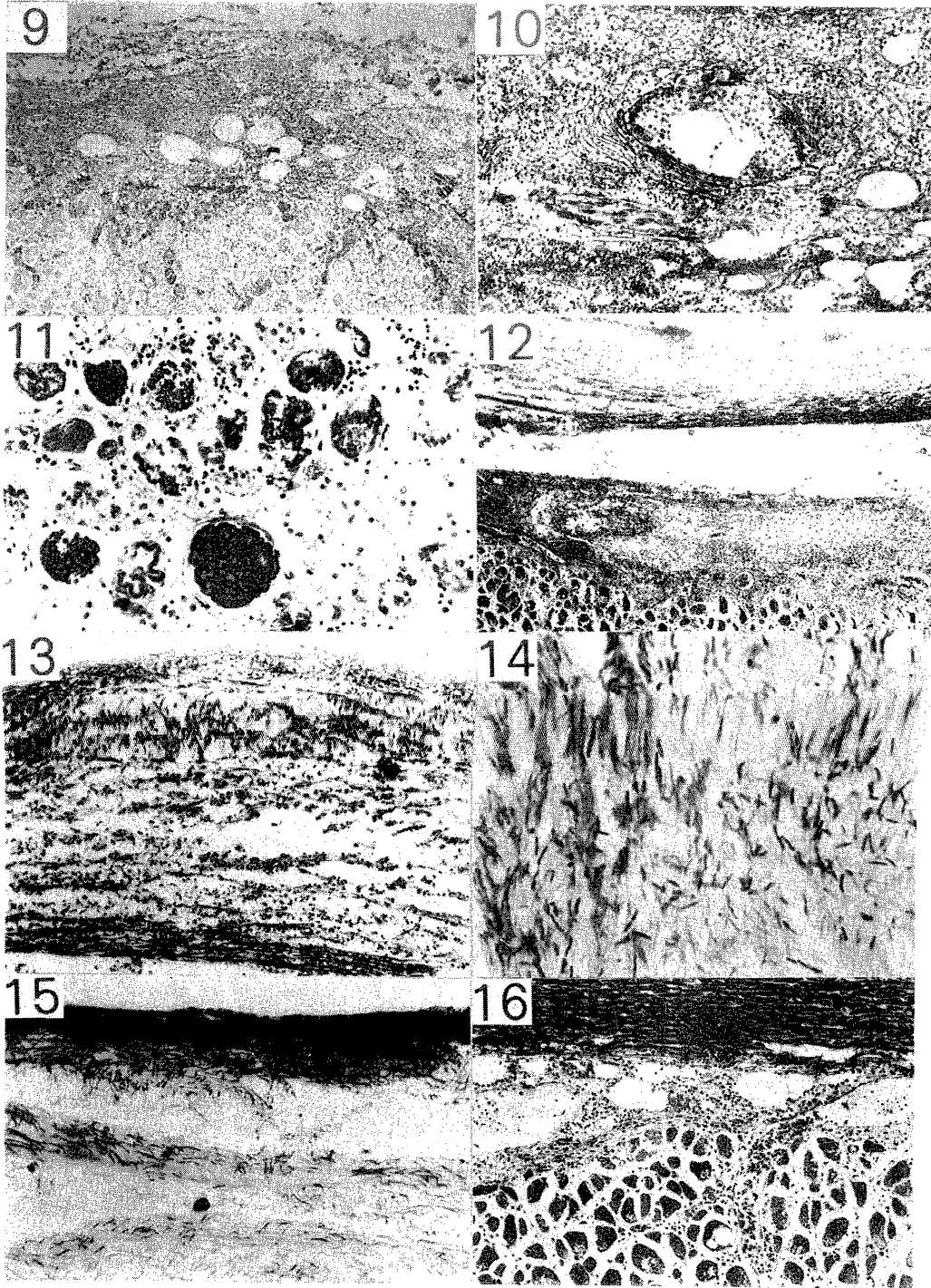
Legends for Figures

- Fig. 1. A serious diseased carp manifesting a large ulcer excavating the lateral musculature in the trunk.
- Fig. 2. A lesion attacked by a fish-louse (*Argulus japonicus*). In this area a micro defect is made in the epithelium and fibrin precipitates in the dermal loose connective tissue. Van GIESON's stain, X40
- Fig. 3. A shallow ulcer. The epithelium disappears locally and the exposed, dermal loose connective tissue is invaded by the flexible bacterium and is destroyed. An amount of fibrin precipitates on the dense connective tissue. Notice the resemblance between findings shown in Fig. 2 and 3. WEIGERT's fibrin stain, X40
- Fig. 4. The fibrin meshwork deposited on the dermal dense connective tissue. It is destroyed by the dissemination of the flexible bacterium. WEIGERT's fibrin stain X400
- Fig. 5. An ulcer involving the dermal dense connective tissue. Its superficial layer is attacked by a number of flexible bacteria. GIEMSA's stain, X100
- Fig. 6. The central area of an ulcer. The extensive lateral musculature is necrotized. A dilated vessel is in thrombosis. Pictures shown from Fig. 6 to 16 show various parts of ulcers excavating the lateral musculature. HE stain, X40
- Fig. 7. A high power view of a part of the upper layer of the lateral musculature in the ulcer center. A large number of flexible bacteria disseminate through the myomere to perimysium and necrotized muscle fibers. GIEMSA's stain, X400
- Fig. 8. A high power view of another part of the lateral musculature in the ulcer center. Many rods multiply in the vascular walls. This finding shows this lesion progressing to the septic lesion. GIEMSA's stain, X400



Legends for Figures

- Fig. 9. A marginal part of the area where the lateral musculature is involved. The fibrin meshwork covers the surface of the exposed tissues, in which vessels are engorged with blood and coagulation necrosis occurs in a considerable number of muscle fibres. HE stain, X50
- Fig. 10. A high power detail of the fibrin meshwork covering the exposed musculature. It contains serous fluid, erythrocytes and inflammatory cells. Van GIESON's stain, X200
- Fig. 11. Infiltration and proliferation of mononuclear cells in the deeper area of the affected musculature. They phagocytize necrotized muscles. HE stain, X400
- Fig. 12. The marginal area of an ulcer. The strikingly necrotized dermis scarcely remains over the subcutaneous adipose tissue. HE stain, X100
- Fig. 13. A high power view of the necrotized, dermal dense connective tissue shown in Fig. 12. HE stain, X200
- Fig. 14. A high power detail of various bacteria multiplying in the necrotized dermis. The flexible bacterium outnumbered among them. GIEMSA's stain, X1000
- Fig. 15. The edge of an ulcer. Flexible bacterial dissemination is localized in the dermal loose connective tissue and only in the superficial layer of the dermal dense connective tissue. GIEMSA's stain, X400
- Fig. 16. The edge of an ulcer. The deeper part of the dermal dense connective tissue is innocent in contrast with its superficial layer as shown in Fig. 15. Considerable vasodilatation is seen in the subcutaneous adipose tissue. HE stain, X100



要 約

1. 滑走細菌による潰瘍病に罹病したニシキゴイの進行過程にある潰瘍病巣を病理組織学的に検討した。
2. その結果、初期潰瘍病巣では、滑走細菌の真皮内侵入増殖がみられること、重篤な場合には、大きく進展した潰瘍病巣に滑走細菌や他種の細菌が体側筋組織に侵入増殖して組織を破壊し、急性炎症反応が起っていることが認められた。
3. また、初期の感染性潰瘍病巣とウオジラミ寄生局所の所見との間に変化の類似性が見られた。
4. 以上のことから、この滑走細菌は真皮の 膠原線維性結合織に 高度の侵襲性をもつことがわかり、この滑走細菌が真皮を側方伝播することで潰瘍病巣は拡大し、かつ、その後に侵入した他種の細菌とともに体側筋組織を侵して潰瘍をさらに深くすると考えられた。
5. 重篤例では、体側筋組織を巻き込んだ感染病巣が敗血病巣に発展していることがわかった。
6. また、滑走細菌は外部寄生虫によってつくられた皮膚の創傷を侵入門戸としていると推察された。

文 献

- BUCKE, D. and D. MCCARTHY, 1975. A report of suspected erythrodermatitis in carp in Great Britain. *J. Fish Biol.*, 7 (3): 301—303.
- FIJAN, N. N., 1972. Infectious dropsy in carp—A disease complex. *Symp. zool. Soc. Lond.*, 30: 39—51.
- 宮崎照雄・江草周三, 1973. キンギョおよびフナのいわゆるあなあき病とエピステリス着生ゴイについて. *魚病研究*, 7 (2): 115—124.
- 宮崎照雄・窪田三朗・江草周三, 1975. ハマチの滑走細菌性潰瘍病の病理組織学的研究. *同誌*, 10 (1): 69—74.
- SCHÄPERCLAUS, W., 1930. *Pseudomonas punctata* als Krankheits-erreger bei Fischen. *Zeit. für Fisch.*, 28: 289—370.
- 高橋耿之介・川名俊雄・中村多恵子, 1975. キンギョのあなあき病に関する研究—I. 発病部位について. *魚病研究*, 9 (2): 174—178.
- , 1975. キンギョのあなあき病に関する研究—IV. 病魚からの分離菌について. *同誌*, 10 (1): 22—30.
- 若林久嗣・江草周三, 1975. 再び静岡県吉田地区における養殖ウナギの細菌感染について——特に鰓病菌について. *同誌*, 9 (2): 193—198.
- WUNDER, W. and H. DOMBROWSKI, 1953. Untersuchungen über die Bauchwassersucht des Karpfens (Ascites). *Zeit. für Fisch.*, 51 (2): 327—416.