

## ニホンウナギのメトヘモグロビン血症

窪田三朗・天野秀臣・一岡 衛・宮崎照雄・丹羽 誠\*

三重大学水産学部

### Methemoglobinemia in Japanese Eel

Saburoh S. KUBOTA, Hideomi AMANO, Mamoru ICHIOKA,  
Teruo MIYAZAKI and Makoto NIWA\*

Faculty of Fisheries, Mie University

The authors investigated biochemically and histopathologically spontaneous and experimental methemoglobinemia in the Japanese eel (*Anguilla japonica*).

#### 1. Spontaneous methemoglobinemia.

The disease occurred in Japanese eels reared in culturing ponds using a water recirculating system which had high levels of nitrite (7.8~10.5ppm) in the winter of 1980, in Mie Prefecture. Twelve sampled fish had chocolate brown colored blood and liver characteristically. A few of them were accompanied by dropsy and jaundice. The blood of nine fish had high proportions of methemoglobin to total hemoglobin as 33~70%. Histopathological findings were varied with the levels of methemoglobin. In fish having 61~70% of methemoglobin levels, degeneration of erythrocytes in the blood, erythrophagocytosis in the spleen and thrombosis of gill lamellae were distinctive. In fish having 33~47% of methemoglobin levels, degeneration of erythrocytes was mild and hemosiderosis was intensive in the spleen and the kidney.

#### 2. Experimental methemoglobinemia.

Twelve eels were exposed to a nitrite concentration of 20, 30 and 40 ppm, using a flow-through system of aquaria, for 31 days. The fish exhibited methemoglobinemia and had 4~66% of methemoglobin to total hemoglobin. They manifested histopathological characteristics similar to those of fish suffering from spontaneous methemoglobinemia. Based on results from this study, it was judged that nitrite poisoning was a representative cause of methemoglobinemia.

**Keywords:** Japanese eel, methemoglobin, methemoglobinemia, hemosiderosis, erythrophagocytosis

1980年の冬に三重県下の加温循環濾過式養鰻池で飼育中のニホンウナギに血液が褐色に変色する疾病が発生し、病魚の斃死もみられた。天野ら(1981)\*\*は褐色に変色した血液を生化学的に調べ、

\* 三重県内水面水産試験場 (Mie Prefectural Freshwater Fisheries Experimental Station)

\*\* 本研究の一部は、天野らにより、速報として日水誌(1981, 47巻6号)に報告された。

それがヘモグロビンのメト化に因ることを明らかにした。本研究では自然発生のメトヘモグロビン血症の病魚を病理組織学的に検索し、合わせて、亜硝酸塩を含む水でニホンウナギを飼育することにより実験的にメトヘモグロビン血症を再現するとともにその病理組織学的特徴も調べた。本報ではその詳細を報告する。

## 材料および方法

### 1. 自然発病魚

供試魚は1980年2月、三重県下の加温循環濾過式養鰻池から入手した病気のニホンウナギ12尾である。そのうち8尾は病魚の大量死後に清澄な地下水が注入されて水質条件が良くなった時点で、残りの4尾はその後飼育水の水質が悪化した時点で採捕された。病魚の発生状況と飼育水の水質は Table 1 にまとめた。

病魚はヘパリン処理した採血器で採血した後、血液塗抹標本の作製、剖検を行ない、臓器は10%ホルマリン水またはヘリー液で固定した。その採血した血液から、赤血球ヘモグロビンのメト化率を測定(佐野・橋本法)するとともに、キット法(BOUTWELL 変法, 藤沢アキュスタットシステム)により血清総ビリルビン量も求めた。

### 2. 実験発病魚

メトヘモグロビン血症の再現実験は、亜硝酸態窒素(以下 $\text{NO}_2\text{-N}$ )濃度20, 30および40ppmと

Table 1. Water chemistry in a recirculating eel culture pond in which methemoglobinemia (MHb-emia) occurred.

Date	February, 13	February, 15	February, 16	February, 28
$\text{NO}_2\text{-N}$ (ppm)	7.8	trace*	0.89	10.5
$\text{NH}_4\text{-N}$ (ppm)	3.8	trace*	0.24	19.9
DO (ppm)	—	—	—	7.0
pH	6.1	6.5*	6.8	7.0

Water temperature : 25°C

Feb.13 : Occurrence of mass mortality.

Feb.15 : Ground water was supplied. \*Quality of ground water.

Feb.16 : A decrease in the number of dead eels. Eight diseased eels were sampled. (First sampling)

Feb. 28 : Mass mortality occurred again. Four diseased eels were sampled. (Second sampling)

Table 2. Water chemistry in a flow-through system of aquaria used to test the occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eel.

Setting concentration of $\text{NO}_2\text{-N}$ (ppm)	0 (control)	20	30	40
Numbers of eels	3	4	4	4
Net concentration of $\text{NO}_2\text{-N}$ (ppm)	0.02	18.5	27.4	35.6
$\text{NH}_4\text{-N}$ (ppm)	0.34	0.29	0.40	0.39
DO (ppm)	4.6	5.0	3.5	4.2
pH	7.2	7.1	7.14	7.1

Flow-through system : 126 l/day. Water temperature : 15.2°C~21.6°C

なるように調製した亜硝酸ナトリウム水溶液中でニホンウナギ（体重120～175g）を飼育した。上記の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度区のほか1対照区を設け、各区3または4尾の魚を供試し、流水にて最高31日間飼育した。飼育期間中、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度はGRISS-ROMIJN法、 $\text{NH}_4\text{-N}$ 濃度はNESSLAR法、pH、溶存酸素および水温は水質チェッカー（ホリバ、U-7型）にて適時測定した。実験条件はTable 2に示す通りである。

実験発病魚は2週間目と1ヶ月目にとりあげるほか、瀕死魚は適時とりあげ、自然発病魚と同じ処理を施した。自然発病魚および実験発病魚の固定標本から常法に従って、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、PAS反応、ベルリン青染色、渡銀染色（渡辺変法）を目的に応じて施した。また血液塗抹標本にはメイ・ギムザ染色を施し観察に供した。

## 結 果

### 肉 眼 的 所 見

#### 1. 自然発病魚

第1回採捕8尾中の3尾には黄疸と腹水病の併発がみられたが、第2回採捕例を含めて他の10尾は外観的な異常がみられなかった。剖検的には、程度の差はあるものの鰓や肝臓はいずれの個体も褐色を帯び、著しい症例では鰓はチョコレート色を呈し、肝臓は淡褐色に変色していた。採血した血液も褐色を帯び、著しいものではチョコレート色を呈していた。

#### 2. 実験発病魚

対象区の3尾と $\text{NO}_2\text{-N}$ 20ppm区の31日目採取の2尾を除き、他の実験魚のいずれも褐色を帯びた色の鰓、肝臓および血液をもっていた。それらの変色の程度は、 $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度と相関はみられず、むしろ個体差として考えられた。

### 血液の生化学的性状

#### 1. 自然発病魚

自然発病魚の赤血球ヘモグロビンのメト化率の測定結果はTable 3に示すように顕著な個体差があり、全ヘモグロビンのメト化率は一部の魚で3%以下と低い値を示したが、大半の魚は33～70%の間にあって、明らかに高い値を示していた。ニホンウナギのヘモグロビンは2成分から成り、成分別にはS成分のメト化率のほうがF成分よりも高い傾向がみられた。

血清総ビリルビン量は黄疸を示していた3個体で3.6～8.0mg/dlという値が得られたが、他の魚では2.7mg/dl以下であった。

#### 2. 実験発病魚

実験に供した魚の赤血球ヘモグロビンのメト化率測定結果はTable 4に示した。対象区の魚のメト化率はいずれも3%以下と低い値であった。実験区の魚では、そのメト化率に個体差があり、各濃度区ともに14日目あるいは17日目に採取した個体ではメト化率が54～66%と高い値がみられたが、31日目の検査では逆にメト化率が33%以下に低下する傾向を示した。血清総ビリルビン量は全個体で2.6mg/dl以下であり、いずれも黄疸はみられなかった。

**Table 3.** Proportions of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin (Hb) of Japanese eels suffering from spontaneous methemoglobinemia.

Fish No.	total MHb (%)	F component (%)	S component (%)
First sampling			
1	36	34	40
2	67	61	76
3	2	3	1
4	47	46	48
5	1	1	1
6	65	60	74
7	70	63	79
8	3	1	3
Second sampling			
10	61	61	63
11	33	31	36
12	63	63	63
13	33	31	36

**Table 4.** Proportions of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin (Hb) of Japanese eels exposed to nitrite.

Setting concentration of NO <sub>2</sub> -N (ppm)	exposure time (days)	MHb as % of total Hb		
		total MHb (%)	F component (%)	S component (%)
0 (control)	14	1	0.4	1
	31	3	2	4
	31	1	1	1
20	14	54	50	60
	29	33	51	39
	31	5	3	8
	31	4	2	6
30	14	39	33	48
	17	66	64	71
	31	31	27	37
	31	17	13	25
40	4	44	39	52
	14	65	59	71
	31	33	31	37
	31	17	12	22

#### 病理組織学的所見

病魚の病理組織学的所見はヘモグロビンのメト化率の高低と相関があり、メト化率の似た値の自然発病魚と実験発病魚とは病理組織学的特徴の上で同様な所見を示していた。メト化率の値が54~70%の範囲を高メト化率、17~47%の範囲を中等度メト化率、5%以下を低メト化率と類別し、各範囲にある症例について、それらの特徴を以下に述べる。

a. 赤血球像：自然発病魚と実験発病魚の両者とも高メト化率の症例では、赤血球の変性が顕著で、滴状や紡錘型に変形したり、核濃縮・核崩壊・消失などの核変性、細胞崩壊などが高頻度に見られ、円形を呈する幼若赤血球も末梢血中に現われていた (Plate I—1, 2)。中等度メト化率の症例では、赤血球の変形と変性は顕著でなく、主な異常は多染性赤血球の増加であった (Plate I—3)。低メト化率の症例では赤血球の変形は多いが、それらはいずれも殆んど変性を伴っていなかった (Plate I—4)。なお、対照区の症例には赤血球の異常はみられなかった。

b. 脾臓：自然発病魚と実験発病魚の両者とも高メト化率の症例では、いずれも脾髄に多数の変性赤血球が集まり、細網細胞の赤血球貪食像、貪食されてから血鉄素に至る変遷像や血鉄素の細胞内沈着が顕著であった (Plate II—1, 2, 3)。細網細胞内に貪食された赤血球は核濃縮を伴う萎縮、核消失と細胞質の嫌色素化などの変化を経て、血鉄素前階程の状態のものや血鉄素にかわっていた。

中等度メト化率の症例では脾髄に血鉄素貪食細胞の集簇が顕著であった (Plate II—4)。血鉄素貪食細胞の集簇巣では細網線維の網工の拡張が起こり (Plate III—1)、併せて赤血球貪食像もみられた。

低メト化率の症例でも脾髄に血鉄素貪食細胞の集簇が顕著にみられたが、赤血球貪食像はほとんど見られなかった (Plate III—2)。

c. 腎臓：対照区の2尾と NO<sub>2</sub>—N40ppm 区の4日目採取の1尾を除き、自然発病と実験発病のいずれの個体にも類洞細網内皮細胞に血鉄素の沈着がみられ (Plate III—3)、それはメト化率の中等度の個体で特に顕著であった。また特に自然発病魚では、メト化率が高度の症例で尿細管管腔内や上皮細胞内にも血鉄素の沈着がみられた。

d. 肝臓：どの症例にも共通して、実質細胞は貯蔵糖原の減少や消失を伴って萎縮していた。特

Table 5. Summary of histopathological findings in the spontaneous methemoglobinemia (MHB-emia).

Fish No.	1	2	3	4	5	6	7	8	10	11	12	13
MHb proportions (% of total Hb)	36	67	2	47	1	65	70	3	61	33	63	33
Total bilirubin (mg/dl)	3.6*	8.0*	0.4	1.9	1.5	2.7	1.4	0.4	0.2	0.1	6.1*	0.1
Spleen												
erythrophagocytosis	++	+++	++	+	+	+	++	++		+	++	
hemosiderosis	++	+	+++	+++	++	++	+	++		+++	+	
Kidney												
hemosiderosis in tubules	++	+	-	++	-	+	+	-	+	+	+	
hemosiderosis in hematopoietic tissue	++	+	+	++	+	++	+	+	++	++	++	
Liver												
atrophy of hepatic cells	+++	++	+	+	+	++	+	-	+	+	+++	
edema	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++	
Gill												
thrombosis	++	+	-	-	-	+	+	-		-	+++	
hemosiderosis	++	+	-	+	-	+	+	±		±	+	

\*Appearance of jaundice

- : no change, ± : very slight, + : mild, : moderate, +++ : severe

**Table 6.** Summary of histopathological findings in the experimental methemoglobinemia (MHb-emia).

Setting concentration of NO <sub>2</sub> -N (ppm)	0 (control)			20			30			40					
Exposure time (days)	14	31	31	14	29	31	31	14	17	31	31	4	14	31	31
MHb proportions (% of total Hb)	1	3	1	54	33	5	4	39	66	31	17	44	65	33	17
Total bilirubin (mg/dl)	0.9	2.6	1.8	0.8	1.9	0.9		0.3	1.5	1.1	2.0		2.3	0.9	1.0
<b>Spleen</b>															
erythrophagocytosis	±	±	+	++	++	+	++	+	+++	++	++	-	++	++	+
hemosiderosis	-	+	+	-	+++	+++	+++	+	+	+++	++	-	-	+++	++
<b>Kidney</b>															
hemosiderosis in tubules	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
hemosiderosis in hematopoietic tissue	-	-	+	++	++	++	++	+	+	+++	+	-	+	++	+
<b>Liver</b>															
atrophy of hepatic cells	-	-	-	++	++	++	++	+	+	+++	+	-	+	++	+
edema	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Gill</b>															
thrombosis	-	-	-	+	-	-	-	++	++	+	-	+	-	+	-
hemosiderosis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

- : no change, ± : very slight, + : mild, ++ : moderate, +++ : severe

に腹水をもっていた症例では、実質部に水腫も起こっていた。

e. 鰓：自然発病魚のうち中等度以上のメト化率を示す症例で、鰓弁上皮と鰓薄板毛細血管内に血鉄素貪食細胞が認められ、症例によっては鰓薄板毛細血管に血栓形成がみられた (Plate III-4)。実験発病魚では鰓薄板毛細血管に血栓形成がみられたが、メト化率とは相関がなかった。また血鉄素の沈着は認められなかった。

f. 心臓，消化管，その他：腹水をもっていた症例で胃の粘膜下織に水腫が認められたが，他には特記すべき異常はみられなかった。

以上述べた自然発病魚と実験発病魚の病理組織学的特徴は Table 5 と 6 にまとめた。

## 考 察

ニホンウナギの加温循環濾過式養鰻池では飼育飽和量は濾材重量の30分の1程度とされている (佐伯, 1958)。疾病の発生池では飼育飽和量の約5倍量の魚を飼育しており，こうした超過密飼育が濾材の浄化力を破綻させ，亜硝酸やアンモニアの濃度を異常に高めたと考えられる。水中の亜硝酸が魚類にメトヘモグロビン血症をひき起こすことは，よく研究されており，SMITH *et al.* (1974) はニジマスに NO<sub>2</sub>-N 濃度 0.15 ppm で 48 時間，マスノスケを NO<sub>2</sub>-N 濃度 0.5 ppm で 24 時間飼育し，メト化率がそれぞれ 70%，80% に達することを認めている。また SMITH *et al.* (1975) はニジマスに NO<sub>2</sub>-N 濃度 0.096~0.78 ppm で 1~8 日間飼育すると，メト化率が 14.3~65.8% に達することを認めている。KONIKOFF (1975) は channel catfish を用いて亜硝酸の半数致死濃度を求め，死魚の血液がチョコレート色に変色したことを報告している。山形ら (1979) は亜硝酸の

ニホンウナギに対する毒性を調べ、 $\text{NO}_2\text{-N}$  30ppm で9週間飼育することにより、実験魚の血液がメトヘモグロビン血症の特徴であるチョコレート色を呈することを認めている。上記のように、ヘモグロビンのメト化を起こす原因の1つに亜硝酸があげられる。本研究においても、メトヘモグロビン血症が発生した飼育水の $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度が7.8~10.5ppmの範囲にあって高い値を示したこと、亜硝酸ナトリウムを用いた飼育実験で自然発病のものとはほぼ類似のメトヘモグロビン血症をつくれたこと、および実験的に発生した病魚と自然発病魚の病理組織学的特徴が多くの特で共通していたことなどの事実から、メトヘモグロビン血症の重要な原因として環境水中の溶存亜硝酸による中毒症が考えられる。自然発病魚および実験発病魚ともにヘモグロビンのメト化率に個体差があるのは、各個体のメトヘモグロビン還元酵素の活性に差があること、および環境水中に他の不良因子が存在することによるためと考えられる。魚類がメトヘモグロビン還元酵素をもつことは既に知られており、宮内ら(1979)はアメマス(*Salvelinus leucomaenis*)の赤血球中におけるニトロソ誘導体によるメトヘモグロビンについて還元機構を調べ、その能力がヒトのものより高いことを明らかにしている。

メトヘモグロビン血症の治療について、清澄な水の注入により $\text{NO}_2\text{-N}$ の濃度の減少を図ることが有効であるが、メチレン青がメトヘモグロビン還元酵素を活性化することがヒトなどから知られている(高久, 1978)。また WEDEMEYER *et al.* (1978) は steelhead trout を用いた亜硝酸中毒実験において、メチレン青によるメトヘモグロビン血症の治療の有効性を示し、食塩や塩化カルシウムの添加により亜硝酸の毒性が低下することも認めている。岩井ら(1974)もアユのふ化仔魚に対する亜硝酸の毒性が塩分やCa, Mg, Kなどの塩類の添加により低下することを報告している。

今後は自然発生池の水質にみられたような $\text{NO}_2\text{-N}$ 濃度(10ppm前後)でのメトヘモグロビン血症の再現を試みるため、不良因子、例えば亜硫酸などの他の水質汚濁物質との関連、メトヘモグロビン血症の予防や治療方法について検討したい。

## 文 献

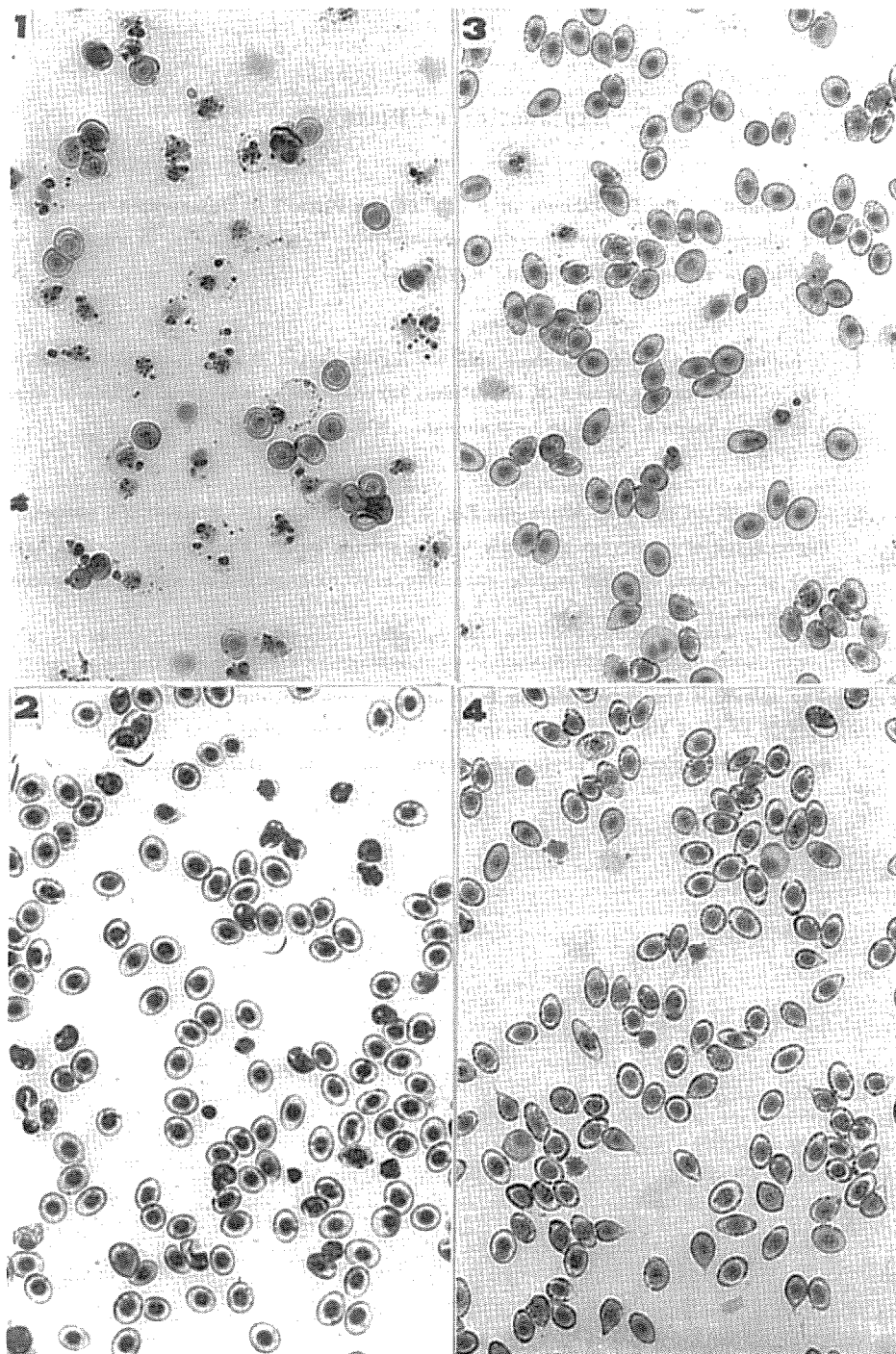
- 天野秀臣・宮崎照雄・一岡 衛・丹羽 誠・窪田三朗, 1981. 亜硝酸塩によるウナギのメトヘモグロビン血症の発生. 日水誌, 47(6): 823.
- 岩井寿夫・伊藤 隆・田村憲二, 1974. アユのふ化仔魚に対する亜硝酸塩の毒性および飼育水の塩分濃度について. 本誌1: 43~51.
- KONIKOFF M., 1975. Toxicity of nitrite to channel catfish. *Prog. Fish-Cult.*, 37(2): 96-78.
- 宮内真幸・高木光造・植松孝悦, 1979. ビフェニールエーテル系除草剤および同族体の魚類に対する毒性研究—I—. アメマス血球中におけるニトロソ誘導体のメトヘモグロビン(Met Hb)形成. 日水誌, 45(12): 1563-1567.
- 佐伯有常, 1958. 魚介類の循環濾過式飼育法の研究. 基礎理論と装置設計基準. 同誌, 23(11): 684-695.
- SMITH C. E. and W. G. WILLIAMS, 1974. Experimental nitrite toxicity in rainbow trout and chinook salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, 103(2): 389-390.
- SMITH C. E. and R. C. RUSSO, 1975. Nitrite-induced methemoglobinemia in rainbow trout. *Prog. Fish-Cult.*, 37(3): 150-152.
- 高久史磨, 1978. ヘモグロビン代謝とその異常(3)異常ヘモグロビン症とサラセミア. 高久史磨編集, 血液病学, 医学書院: 45-58.
- WEDEMEYER G. A. and W. T. YASUTAKE, 1978. Prevention and treatment of nitrite toxicity in juvenile steelhead trout (*Salmo gairdneri*). *J. Fish. Res. Board. Can.*, 35: 822-827.
- 山形陽一・丹羽 誠, 1979. 亜硝酸のウナギに対する毒性について. 水産増殖, 27(1): 5-11.

### Explanation of Plate I

- Fig. 1** Blood smear taken from an eel suffering from spontaneous methemoglobinemia (MHb-emia) with a methemoglobin (MHb) proportion of 67% to total hemoglobin (Hb). Ghost cells and degenerated erythrocytes accompanying karyopyknosis, karyorrhexis and loss of the nucleus, increase numbers. The number of young round erythrocytes increases. May-Giemsa stain,  $\times 320$
- Fig. 2** Blood smear taken from an eel after exposure to 27.4ppm of nitrite nitrogen ( $\text{NO}_2\text{-N}$ ) for seventeen days. This fish has a MHb-proportion of 66% to total Hb. Degeneration of erythrocytes characterized by karyopyknosis and loss of the nucleus are extensive. May-Giemsa stain,  $\times 320$
- Fig. 3** Blood smear taken from an eel suffering from spontaneous MHb-emia with a MHb-proportion of 36% to total Hb. Young round erythrocytes and polychromatic erythrocytes increase numbers. Small numbers of degenerated erythrocytes and poikilocytic erythrocytes are contained. May-Giemsa stain,  $\times 320$
- Fig. 4** Blood smear taken from an eel suffering from spontaneous MHb-emia with a MHb-proportion of 2% to total Hb. Spindle-shaped and teardrop-shaped poikilocytes are extensive. May-Giemsa stain,  $\times 320$



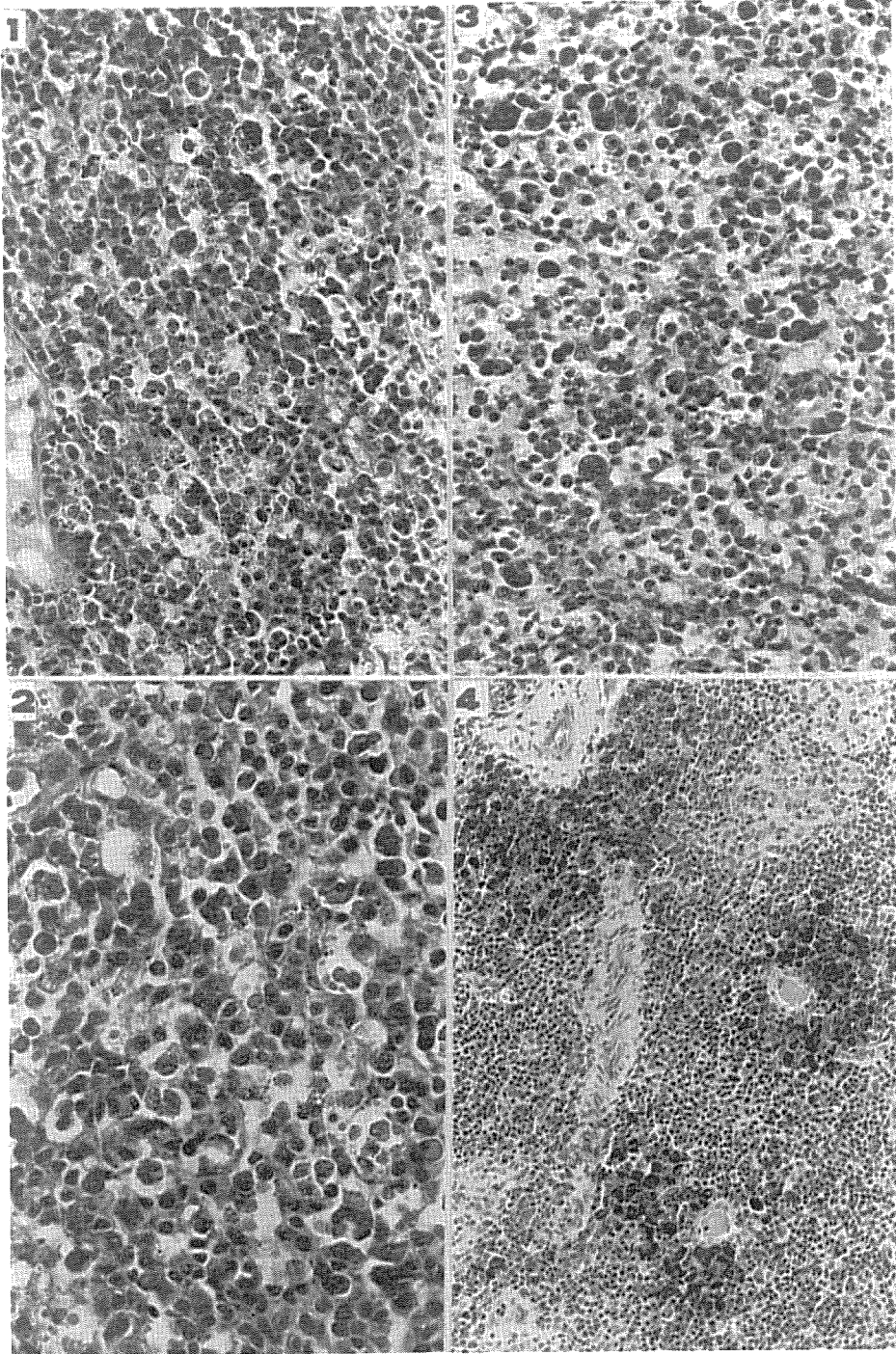
Plate I



### Explanation of Plate II

- Fig. 1** The spleen of the fish shown in Fig. 1 of the Plate I. Degenerated erythrocytes are phagocytized by splenocytes extensively. Hemosiderin is deposited within phagocytes slightly. H-E stain,  $\times 320$
- Fig. 2** A high-power detail of the same spleen. Erythrocytes phagocytized within splenocytes exhibit various shapes of alterations; karyopyknosis, karyorrhexis, loss of nuclei, debris and various stages to hemosiderin. H-E stain,  $\times 500$
- Fig. 3** The spleen of the fish shown in Fig. 2 of the Plate I. Splenocytes phagocytize degenerated erythrocytes markedly within splenic pulp. Experimental fishes having high proportions of MHb realize extensive erythrophagocytosis within the spleen. H-E stain,  $\times 320$
- Fig. 4** The spleen of the fish suffering from spontaneous MHb-emia with a MHb-proportion of 33% to total Hb. Hemosiderin-laden splenocytes accumulate extensively around veins in splenic pulp. Erythrophagocytosis is slight. Berline Blue stain,  $\times 160$

Plate II



### Explanation of Plate III

- Fig. 1** The spleen of the fish shown in Fig. 4 of the Plate II. In pulp which hemosiderin-laden splenocytes markedly accumulate, the mesh-work stroma composed of argyrophil fibers are destroyed. Silver impregnation,  $\times 320$
- Fig. 2** The spleen of an eel after exposure to 18.5ppm of  $\text{NO}_2\text{-N}$  for thirty-one days. This fish has a Mhb-proportion of 5% to total Hb. Large numbers of hemosiderin-laden splenocytes accumulate around veins in splenic pulp. Erythrophagocytosis is very slight. Instead of a low proportion of Mhb, hemosiderosis is extensive. This finding demonstrates occurrence of degeneration of erythrocytes in the past. Berline blue stain,  $\times 160$
- Fig. 3** The kidney of the fish shown in Fig. 4 of the Plate II. Hemosiderin deposition is extensive within epithelial cells of renal tubules and within reticulo-endothelial cells lining sinusoids of hematopoietic tissue. Berline blue stain,  $\times 320$
- Fig. 4** A gill filament of an eel suffering from spontaneous Mhb-emia with a Mhb-proportion of 65% to total Hb. A lamella exhibits thrombosis. Hemosiderin-laden macrophages migrate within the thrombus and lamella capillaries. Berline blue stain,  $\times 320$

Plate III

