

ニホンウナギに対する実験的メトヘモグロビン血症の研究—I*

窪田三朗・天野秀臣・宮崎照雄・神谷直明・一岡 衛**

三重大学水産学部

Studies on Experimentally Occurred Methemoglobinemia in Japanese Eel— I

Saburoh S. KUBOTA, Hideomi AMANO, Teruo MIYAZAKI,
Naoaki KAMIYA and Mamoru ICHIOKA**

Faculty of Fisheries, Mie University

In the previous paper, it was judged that nitrite poisoning was a representative cause of methemoglobinemia (MHb-emia) of Japanese eels (*Anguilla japonica*). But in the fish culture ponds, there may be present many other poisoning substances such as ammonia, sulfide and the like. The present paper biochemically and histopathologically deals with the effects of these poisoning substances to the occurrence of MHb-emia of Japanese eel.

Experiment 1. The eels exposed to nitrite exhibited MHb-emia. The histopathologically characteristics were similar to those of the previous paper.

Experiment 2-1. The eels exposed to nitrite, ammonia and nitrate exhibited MHb-emia and severe anemia. The anemia was caused by the destruction of erythrocytes, so this anemia is erythronoclastic anemia.

Experiment 2-2 and 2-3. The eels were exposed to nitrite, ammonia and nitrate. Some of the fishes got MHb-emia but almost of them showed no changes.

Experiment 3. The eels were exposed to nitrite, ammonia, nitrate, sodium sulfite and sodium sulfate. Numbers of poikilocytes having needle crystal were observed in the blood smear from the eels after exposure to nitrite, ammonia, nitrate and sulfate.

It seemed that there were seasonal changes about the occurrence of MHb-emia induced by exposure to nitrite. From winter to spring the eels seemed to get MHb-emia more easily than summer time.

Keywords; Japanese eel, methemoglobinemia, nitrite, sulfide,

* 本研究は昭和56年度文部省科学研究費補助金による

** 現在, 協和醗酵株式会社勤務

さきにニホンウナギのメトヘモグロビン血症（以下MHb-血症）について筆者らは生化学的に調べ（天野ら，1981），さらに病理組織学的に研究した結果（窪田ら，1981）その原因が亜硝酸中毒によるものであることを明らかにした。本研究ではMHb-血症の原因追求の一環として亜硝酸ナトリウムに各種の水質悪化の原因と予想される物質を添加し，MHb-血症の発生を試みたので以下その詳細を報告する。

1. 亜硝酸ナトリウムの影響

窪田ら（1981）の報告によると亜硝酸ナトリウムに浸漬したニホンウナギは14日目ごろからMHb-血症の病徴である血液の変色と赤血球の変性が顕著に出現するという。実験—1では亜硝酸ナトリウム溶液にニホンウナギを20日間浸漬した場合の病理学的特徴について調べた。

実 験 — 1

材料および方法

実験期間は1981年11月12日から12月2日である。亜硝酸態窒素濃度（以下NO₂-N濃度）を15ppm 30ppm に調整した亜硝酸ナトリウム溶液中でニホンウナギ（全長390~490mm，体重80~150g）を飼育した。上記NO₂-N濃度区他に1対照区を設け各区4尾の魚を供試し，アクアライン KC-7 SPを用い流水にて20日間飼育した。飼育期間中のNO₂-N濃度はGRISS-ROMIJN法を，溶存酸素量および水温はYSI MODEL 54 OXYGEN METERで，pH はデジタル pH メーターHM-20Bを用いて適時測定した。実験条件はTable 1 に示すとおりである。

Table 1. Water chemistry in a flow-through system of aquaria used to test the occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eels. (Experiment 1)

Plot No.	1 (control)	2	3
Setting concentration			
of NO ₂ -N (ppm)	0	15	30
Net concentration			
of NO ₂ -N (ppm)	0	19	31
Water temp. (°C)	22.9	24.9	23.3
pH	7.1	7.6	7.7
DO (ppm)	6.2	7.1	6.9
Numbers of eels	4	4	4

Flow-through system : 34 litter/day.

実験期間中に頻死状態になったものと20日目まで生残した全ての個体を取りあげて採血し，血液学的および生化学的検査として血液塗抹標本の作成，ヘモグロビンのメト化率（EVELYN-MALLOY法），血色素量（シアンメトヘモグロビン法，藤沢アキュスタットシステム），ヘマトクリット値（毛細管法）および赤血球数（血球計算板）を求めた。また供試魚の各臓器はホルマリン水またはヘリー液で固定したのち常法に従ってパラフィン切片を作成し，目的に応じて各種染色を施して病理組織学的研究に供した。

結 果

剖 検 的 所 見

対照区を除き、実験魚はいずれも MHb 血症の主徴である褐色を帯びた鰓、肝臓および血液をもっていた。

血 液 学 的 所 見

ヘモグロビンのメト化率は Table 2 に示すように対照区では全て検出限界以下であった。15 ppm 区の魚のメト化率は20%前後を示したが 30ppm区の魚では3尾が32.6~36.3%に達し、その値と NO₂-N の濃度の間に比例関係が認められた。また対照区と亜硝酸ナトリウム浸漬区では血液指数に差がみられ、亜硝酸ナトリウム浸漬区のヘモグロビン量とヘマトクリット値は対照区よりも全般的にやや低く、なかにはヘモグロビン量が 2.8~3.0 g/dl という激しい貧血症状を示す個体もみられた。貧血症状を示した個体の末梢血液には小円形幼若赤血球が多数出現しており (Plate I-1)、メト化率の高い個体のなかには細胞質の空胞化を起こした変性赤血球の出現した個体もあった。

Table 2. Changes in blood indices and proportions of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin(Hb) of Japanese eels exposed to nitrite. (Experiment 1)

Plot No.	Exposed time (days)	MHb-proportion (%)	Hb ^{A)} (g/dl)	Ht ^{B)} (%)	RBC ^{C)} (10 ⁴ /mm ³)	Anemia
1 (control)	20	t*	7.1	27.4	187	—**
	20	t	6.5	25.6	223	—
	20	t	7.2	29.2	175	—
	20	t	8.1	31.8	230	—
2	6	22.2	6.3	26.0	170	+
	20	18.7	3.0	14.8	95	++
3	20	12.6	6.9	26.9	192	—
	20	33.6	6.6	24.3	187	—
	20	36.3	6.8	23.9	206	—
	20	32.6	2.8	13.0	111	++

A); Hemoglobin volume

B); Hematocrit value

C); Red blood cell count (cells/mm³)

*; trace

**; —: none, +; slight, ++; moderate

病 理 組 織 学 的 所 見

a. 鰓 前報 (窪田ら, 1981) にも示されたように鰓に起こる主な病変としては血栓の形成と血鉄素の沈着で、それらはいずれも認められた (Plate I-2)。

b. 脾臓 30 ppm区で変性赤血球の貧食像や血鉄素への移行像のみられる個体もあるが、殆んど個体ではすでに崩壊した赤血球が血鉄素に移行しており、血鉄素貧食細胞は脾髄に散在する形ではなくすでに集簇化した状態で観察された (Plate I-3)。

c. 腎臓 対照区の魚を除いて、実験区の殆どどの個体では類洞細網内皮系細胞に血鉄素の沈着がみられた (Plate I-4)。

d. その他の臓器 他の臓器には特筆すべき異常は認められなかった。

以上述べた実験1の病魚の病理組織学的所見は Table 3 にまとめた。

Table 3. Summary of the histopathological findings of the Japanese eels exposed to nitrite. (Experiment 1)

Plot No.	1 (control)				2		3			
	20	20	20	20	6	20	20	20	20	20
Exposure time (days)	20	20	20	20	6	20	20	20	20	20
MHb proportion (% of total Hb)	t*	t	t	t	22.2	18.7	12.6	33.6	36.3	32.6
Gill										
thrombosis	—**	—	—	—	+++	—	—	—	—	—
hemosiderosis	—	—	—	—	+	±	±	—	—	—
Spleen										
erythrophagocytosis	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—
hemosiderosis	—	±	—	—	+	+++	++	+	+	+++
Kidney										
erythrophagocytosis	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
hemosiderosis in hematopoietic tissue	—	—	—	—	—	+++	+	±	—	++
Liver										
hemosiderosis	—	—	—	—	—	—	—	±	—	—

*: trace

** : —; none ±; slight +; mild, ++; moderate, +++; heavy

2. 亜硝酸ナトリウムにアンモニアと硝酸を加えた場合

MHb血症の発生した飼育池ではNO₂-N濃度のほかアンモニア態窒素濃度 (以下NH₄-N濃度) も最高値が19.9ppm と高い値を示していた (窪田ら, 1981)。また, このような池では硝酸態窒素濃度 (NO₃-N濃度) も高くなる。そこで亜硝酸ナトリウムにアンモニアとpHの調整を兼ねる目的でさらに硝酸を加え, これらの物質がMHb血症の発生に関与するかどうかを調べた。

実験2-1ではNH₄-N, NO₃-Nの濃度をあげるのにアンモニア水と硝酸を用い, 実験2-2では硝酸アンモニウムを用いた。実験2-3は実験2-1と実験2-2の比較を目的として行った。

材料および方法

実験2-1. 実験期間は1981年5月13日から5月26日である。供試魚はニホンウナギ (全長383~443mm, 体重71~100g) を用い, 使用薬剤は亜硝酸ナトリウム, アンモニア水および硝酸である。第1区を対照区とし, 亜硝酸ナトリウムのみを添加した第2区, 亜硝酸ナトリウムにアンモニア水と硝酸を加えた第3~第5区, アンモニア水と硝酸のみを加えた第6~第8区を設定し, 各区にはそれぞれ5尾の供試魚を入れた。実験は全て止水式で行ない, 2日毎に全量を換水した。設定区の水質は Table 4 に示した。13日目には生残した全ての個体について実験1と同一の方法で血

Table 4. Water chemistry in static bioassay aquariums used to the occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eels. (Experiment 2-1)

Plot No.	Setting concentration (ppm)			Water temp. (°C)	DO (ppm)	pH	Numbers of eels
	NO ₂ -N	NH ₄ -N	NO ₃ -N				
1	0	0	0	18.1	7.8	7.8	5
2	20	0	0	18.0	8.6	7.8	5
3	20	5	6.8	19.5	7.7	6.4	5
4	20	10	10.5	18.5	8.1	6.5	5
5	20	15	12.2	18.5	8.1	6.6	5
6	0	5	6.8	18.3	7.8	7.3	5
7	0	10	10.2	18.3	8.1	6.6	5
8	0	15	12.2	18.3	8.5	6.1	5

Water volume : 20 liters. Tank water was renewed every other day.

液学のおよび病理組織学的な検査を行なった。

実験 2—2. 実験期間は1980年6月8日から6月25日である。供試魚はニホンウナギ(全長373~450mm, 体重63~120g)を用い, 使用薬剤は亜硝酸ナトリウムおよび硝酸アンモニウムである。第1区を対照区とし, 亜硝酸ナトリウムのみを添加した第2, 第3区, 亜硝酸ナトリウムに硝酸アンモニウムを添加した第4~第9区, 硝酸アンモニウムのみを加えた第10~第12区を設定した。各設定区の水質はTable 5に示した。

Table 5. Water chemistry in static bioassay aquariums used to test the occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eels. (Experiment 2-2)

Plot No.	Setting concentration (ppm)			Water temp. (°C)	DO (ppm)	pH	Numbers of eels
	NO ₂ -N	NH ₄ -N	NO ₃ -N				
1 (control)	0	0	0	21.4	7.4	7.0/7.1*	8
2	10	0	0	20.9	7.1	7.4/7.0	8
3	20	0	0	20.8	6.7	6.9/7.0	8
4	10	5	6.4	20.9	6.6	6.7/7.0	8
5	10	10	11.4	20.9	7.1	6.8/7.0	8
6	10	20	22.7	20.9	6.8	6.2/6.7	8
7	20	5	6.4	21.1	6.0	6.4/6.8	8
8	20	10	11.4	21.1	6.3	6.4/6.9	8
9	20	20	22.7	21.1	6.6	6.0/6.8	8
10	0	5	6.4	21.0	6.5	6.4/6.9	8
11	0	10	11.4	21.0	6.1	6.3/6.8	8
12	0	20	22.7	21.2	6.4	6.0/7.0	8

Water volume : 50 liters. Tank water was renewed every other day.

* Left is of renewed water. Right is of water after exposure for two days.

頻死魚は適時とりあげたほか, 14日目には生残した魚を全てとりあげ, 血液塗抹標本を作成した。メト化率は EVELYN-MALLOY 法により測定した。

実験 2—3. 実験期間は1980年7月1日から7月16日である。供試魚はニホンウナギ(全長370~480mm, 体重78~110g)を用いた。使用薬剤は亜硝酸ナトリウム, 硝酸アンモニウム, アンモニア水および硝酸である。第1区を対照区とし, 第2区は亜硝酸ナトリウムのみを, 第3, 第4区に

は亜硝酸ナトリウムにアンモニア水と硝酸を、第5、第6区には亜硝酸ナトリウムに硝酸アンモニウムを加えた。各区の設定条件は Table 6 に示した。

Table 6. Water chemistry in static bioassay aquariums used to test the occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eels. (Experiment 2-3)

Plot No.	Setting concentration (ppm)			Water temp. (°C)	DO (ppm)	pH	Numbers of eels
	NO ₂ -N	NH ₄ -N	NH ₃ -N				
1 (control)	0	0	0	23.5	6.9	7.1/7.2*	5
2	20	0	0	23.6	6.8	6.0/7.0	5
3	20	5	6.8	23.5	6.6	7.0/7.0	5
4	20	5	6.8	23.6	6.9	7.0/7.0	5
5	20	5	6.4	23.7	6.4	6.8/7.0	5
6	20	5	6.4	23.5	6.7	7.0/7.2	5

Water volume : 20 liters. Tank water was renewed every other day.

* Left is of renewed water. Right is of water after exposure for two days.

飼育期間の14日目までの頻死魚および14日目に生残した全ての個体について血液塗抹標本の作成とメト化率の測定を実験2-2と同じ方法で行った。

結 果

実 験 2 - 1

剖 検 的 所 見

亜硝酸ナトリウムのみを加えた第2区で5尾中3尾の魚の鰓が褐色に変化しており、MHb血症の特徴を呈していた。それに加えて軽度の貧血症状を伴う個体もみられた。亜硝酸ナトリウムにアンモニア水を加えた第3～第5区では殆んど魚の鰓が変色していたがその程度にはかなりの個体差があった。第3～第5区で特徴的だったことは激しい貧血症状を呈する個体の多かったことで、これらの症例では鰓や肝臓は退色していた。これに対し、第1区およびアンモニア水と硝酸を添加し亜硝酸ナトリウムを加えなかった第6～第8区では剖検的な異常は認められなかった。

血液学的所見

第1区および第6～第8区の各個体のメト化率は Table 7 に示されるように全て検出限界以下で貧血もみられなかった。第2区および第3～第5区ではメト化率はかなりの個体差を示し、0～30%という値が得られた。第2区と第3～第5区を比較してみると、メト化率は第2区の方が比較的高い値を示している。しかし、第2区の魚のヘモグロビン量が最低5.5g/dlであるのに対し第3～第5区では10尾中4尾のヘモグロビン量が3.0g/dl以下であり、メト化率は亜硝酸ナトリウムのみ第2区の方が高く、貧血の度合は亜硝酸にアンモニアを加えた第3～第5区の方が大きいという傾向がみられた。赤血球の異常は第1区および第6～第8区ではみられなかった。第2区ではメト化率が34%を示した個体で核濃縮など核が変形した変性赤血球が出現していた。第2～第5区では核崩壊を起こした変性赤血球が高頻度に観察された (Plate 1-5)。また、貧血症状を呈した個体

Table 7. Changes in blood indices and proportions of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin(Hb) of Japanese eels exposed to nitrite, ammonia and nitrate. (Experiment 2-1)

Plot No.	Exposure time (days)	MHb-proportion (%)	Hb ^{A)} (g/dl)	Ht ^{B)} (%)	RBC ^{C)} (10 ⁴ /mm ³)	Anemia
1 (control)	13	t *	8.0	30.6	208	—**
	13	t	9.2	33.6	237	—
	13	t	11.4	42.8	262	—
	13	t	8.4	33.2	218	—
2	13	t	7.5	34.7	267	—
	13	25.0	9.7	36.8	262	—
	13	t	7.6	31.5	197	—
	13	28.9	5.5	20.5	153	+
3	13	34.2	6.0	16.3	127	+
	13	t	1.6	8.8	64	+++
	13	13.5	6.3	21.5	132	+
	13	t	3.9	10.0	87	++
4	13	13.2	8.9	27.8	201	—
	13	t	1.4	3.4	38	+++
	13	t	2.9	14.9	127	+++
5	13	9.8	7.3	30.9	258	—
	13	22.3	2.6	9.5	62	+++
	13	10.3	4.5	16.1	110	++
	13	13.6	3.0	11.3	84	++
6	13	t	11.0	42.5	289	—
	13	t	11.5	45.8	295	—
	13	t	7.0	30.0	218	—
	13	t	8.2	34.7	229	—
7	13	t	9.1	37.0	237	—
	13	t	13.5	28.3	355	—
	13	t	12.7	50.5	303	—
	13	t	9.1	34.5	229	—
8	13	t	8.1	34.5	226	—
	13	t	11.5	41.6	321	—
	13	t	9.7	37.5	258	—
	13	t	8.6	33.3	257	—
	13	t	8.8	31.9	213	—

A); Hemoglobin volume

B); Hematocrit value

C); Red blood cell count (cells/mm³)

*: trace

**—; non, +; slight, ++; moderate, +++; heavy.

では細胞質が多染性ないし好塩基性に染まる幼若系赤血球が顕著にみられ (Plate II-1)。特に貧血の激しい症例では末梢血液中に赤芽球と思われる細胞の有糸分裂像が認められた (Plate II-2)。この幼若系赤血球の出現率と変性赤血球の出現率には、やや負の相関性を示す傾向があった。

病理組織学的所見

a. 鰓 第2区では血栓の形成を起こした個体がみられたが、実験1のような血鉄素の沈着は起こしていなかった。

b. 脾臓：第2～第5区の魚に脾臓における赤血球の崩壊像およびその細網細胞による貧食像がみられた (Plate II-3)。また、それにあわせて血鉄素の沈着像も顕著であった。実験1と異り、血鉄素が沈着した細網細胞の集塊化は少なく、脾髄に散在した状態のものが多く観察された。しかし、症例によっては血鉄素まで完全に移行しておらず鉄反応が弱陽性の段階のものもみられた。

c. 腎臓 末梢赤血球の崩壊像が顕著であった第4区の1個体は腎臓においても類洞の細網内皮系細胞による変性赤血球の貧食像がみられた (Plate II-4)。第2区および第3～第5区の魚には共通して血鉄素の沈着からみれたがその程度は実験1と比べ軽度であった。

d. その他の臓器：肝臓に軽度の血鉄素沈着を起こした個体の他には特に異常は認められなかった。

以上述べた実験2-1の病魚の病理組織学的所見は Table 8 にまとめた。

Table 8. Summary of histopathological findings of the Japanese eels exposed to nitrite, ammonia and nitrate. (Experiment 2-1)

Plot No.	1 (cont.)	2	3	4	5	6	7	8
Exposure time (days)	13	13	13	13	13	13	13	13
MHb proportion (% of total Hb)	t*	t~34.2	t~13.5	t~13.2	t~22.3	t	t	t
Gill								
thrombosis	—**	—~+	—	—	—	—	—	—
hemosiderosis	—	—	—	—	—	—	—	—
Spleen								
erythrophagocytosis	—	—~+++	—~++	—~+	—~+	—	—	—
hemosiderosis	—~±	—~+++	—	—~+	—~++++	—~±	—~±	—~±
Kidney								
erythrophagocytosis	—	—	—	—~±	—	—	—	—
hemosiderosis in hematopoietic tissue	—	—~±	—~+	—~+	—~+	—~±	—~±	—
Liver								
hemosiderosis	—	—	—~±	—~+	—	—	—	—

*: trace

** : —; none, ±; slight, +; mild, ++; moderate, +++; heavy

実験 2 - 2

剖検的所見

亜硝酸ナトリウムのみを添加した第2区で1尾に鰓の変色を認めたが、他の全ての個体は鰓の変色や貧血症状がみられなかった。

血液学的所見

実験2—2の魚のメト化率の測定結果は Table 9 に示した。亜硝酸ナトリウムのみを添加した第2区および第3区で各1尾が、それぞれメト化率が27.7%、13.9%という値を示した。また、亜硝酸ナトリウムに硝酸アンモニウムを加えた第4～第9区のうち第5区で5.3%、第7区で9.3%、第9区で7.3%という値を示した個体もあるが、その他の個体はいずれもメト化率が検出限界以下であり、血液像にも著変はみられなかった。

Table 9. Proportions of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin (Hb) of Japanese eels exposed to nitrite, ammonia and nitrate. (Experiment 2-2)

Fish No.	1	2	3	4	5	6	7	8
Plot No.	methemoglobin as (%) of total hemoglobin							
1 (cont.)	t* (14)**	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
2	t ^{B)} (9)	t (14)	27.7 (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
3	— ^{A)}	— ^{A)}	t (14)	13.9 (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
4	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
5	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	5.3 (14)
6	t ^{B)} (10)	t ^{B)} (10)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	— ^{A)}
7	9.3 (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
8	— ^{A)}	— ^{A)}	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
9	— ^{A)}	t ^{B)} (9)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	7.3 (14)	t (14)
10	t ^{B)} (9)	t ^{B)} (13)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
11	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
12	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)

* : trace
 ** : Period of exposure (days)
 A) : dead fish
 B) : moribund fish

実験 2 — 3

剖見的所見

剖検的には全ての個体で何らの異常も見い出せなかった。

血液学的所見

メト化率の測定結果は Table 10 に示すとおり、全ての個体で検出限界以下であり、血液像に

も変化はみられなかった。

Table 10. Proportion of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin (Hb) of Japanese eels exposed to nitrite, ammonia and nitrate. (Experiment 2-3)

Fish No.	1	2	3	4	5
Plot No.	methemoglobin as % of total hemoglobin				
1 (control)	t* (14)**	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
2	t ^{B)} (10)	t ^{B)} (10)	t (14)	t (14)	t (14)
3	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
4	t ^{B)} (10)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
5	— ^{A)} (9)	t ^{B)} (11)	t (14)	t (14)	t (14)
6	— ^{A)} (8)	t (9)	t (14)	t (14)	t (14)

* : trace

** : Period of exposure (days)

A) : dead fish

B) : moribund fish

3. 亜硝酸ナトリウムに含硫化合物を加えた場合

哺乳類ではヘモグロビンに硫化水素が作用するとスルフヘモグロビンという異常ヘモグロビンが形成される (SMITH, 1975)。魚類では現在までスルフヘモグロビン血症の報告例はない。しかしニホンウナギの粘液中には硫酸根をもつムコ多糖類を含むことが知られており (浅川, 1970), このような硫酸根や排泄物中の含硫化合物が水中に溶出している可能性がある。硫化物が MHb 血症あるいはスルフヘモグロビン血症の発現に関与するか否かを調べるため, 亜硝酸ナトリウムに亜硫酸化合物と硫化物を加え, 浸漬実験を行なった。

実 験 3

材料および方法

実験期間は1981年7月27日から8月13日である。供試魚はニホンウナギ (全長350~470mm, 体重50~120g) を用いた。使用薬剤は亜硝酸ナトリウム, 亜硫酸ナトリウム, 硫化ナトリウム, アンモニア水および硝酸である。亜硫酸ナトリウムは SO_3 , 硫化ナトリウムは S として濃度設定を行なった。第1, 第2区には亜硝酸ナトリウムに亜硫酸ナトリウムを, 第3, 第4区には硫化ナトリウムを添加した。第5~第7区には亜硝酸ナトリウム, 亜硫酸ナトリウム, アンモニア水を加え, 硝酸を添加して pH が 5, 7, 9 になるように調整した。さらに第8区には亜硝酸ナトリウム, アンモニア水および硝酸を加え, 第9区には亜硝酸ナトリウムのみを添加した。第10区は薬剤無添加の対照区とした。実験設定区の水質は Table 11 にまとめた。

実験期間中, 頻死魚はその度毎に, また14日目には生残した魚を全てとりあげ, 血液塗抹の作成

とメト化率の測定 (EVELYN-MALLOY法) に供した。

Table 11. Water chemistry in static bioassay aquariums used to occurrence of methemoglobinemia (MHb-emia) in Japanese eels. (Experiment 3)

Plot No.	Setting concentration (ppm)					Water temp. (°C)	DO (ppm)	pH	Numbers of eels
	NO ₂ -N	NH ₄ -N	NO ₃ -N	SO ₃	S				
1	20	0	0	5	0	25.0	6.8	7.4/7.5*	5
2	20	0	0	10	0	25.1	6.9	7.5/7.5	5
3	20	0	0	0	5	25.3	7.0	8.6/7.6	5
4	20	0	0	0	10	25.3	7.0	9.1/7.7	5
5	20	10	11.3	10	0	25.3	6.3	5.1/7.2	5
5'	20	10	11.3	10	0	27.0	5.9	5.9/	5
6	20	10	6.7	10	0	24.7	6.5	7.1/7.4	5
7	20	10	0	10	0	24.7	6.9	9.4/7.7	5
8	20	10	11.3	0	0	25.1	7.1	5.0/7.3	5
9	20	0	0	0	0	24.9	6.9	7.2/7.5	5
10 (cont.)	0	0	0	0	0	24.6	7.1	7.5/7.2	5

Water volume : 20 liters. Tank water was renewed every other day.

* Left is of renewed water. Right is of water after exposure for two days.

結 果

剖 検 的 所 見

第5区の魚は5日以内に斃死し十分な血液学的検査ができなかったため再度第5'区として実験を行ったところ、24時間以内に全て斃死した。第5区の5尾および第5'区の5尾中4尾は鰓が明確な変色を起こしていた。亜硝酸ナトリウムに亜硫酸ナトリウムを加えた第1, 第2区は亜硝酸ナトリウムに硫化ナトリウムを加えた第3, 第4区より斃死尾数が多く、第1区では2日目にとりあげた個体に鰓の変色が認められた。第2区で8日目にとりあげた魚の1尾が貧血を起こしていた。その他には特に異常を認めなかった。

血 液 学 的 所 見

メト化率の測定結果は Table 12 に示す。第5'区で4尾中3尾が15~25%と比較的高い値を示していた。第5区の5尾および第1区の1尾もメト化率は測定できなかったが、鰓の変色の度合からみて同様のメト化を起こしていたと思われる。しかし、その他の個体についてはヘモグロビンのメト化は認められなかった。血液像で特徴的だったことは、血液の変色を起こした第1区の1尾および第5区の魚にみられた細胞が変形した赤血球の出現である。この変形赤血球は細胞が三角形ないし長方形様に変形しており、細胞質中には針状結晶様のものがみられ、赤血球によってはその結晶が細胞を貫通しているものもあった (Plate II-5)。第2区および第8区で貧血症状を呈した個体は末梢血液に幼若赤血球が増加していた。しかし、他の大部分の魚では血液像に著変はなかった。

考 察

今回の一連の実験および前報 (窪田ら, 1981) の結果から、ニホンウナギのメトヘモグロビン血

Table 12. Proportion of methemoglobin (MHb) to total hemoglobin (Hb) of Japanese eels exposed to nitrite, sulfite, sulfide, ammonia and nitrate. (Experiment 3)

Plot No.	Fish No.				
	1	2	3	4	5
	methemoglobin as % of total hemoglobin				
1	— ^{A)} (2)**	— ^{A)} (5)	t ^{*B)} (6)	t ^{B)} (9)	t ^{B)} (14)
2	t ^{B)} (7)	t ^{B)} (8)	t ^{B)} (8)	t (14)	t (14)
3	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)	t (14)
4	t ^{B)} (2)	t ^{B)} (4)	t (14)	t (14)	t (14)
5	— ^{A)} (2)	— ^{A)} (2)	— ^{A)} (2)	— ^{A)} (4)	— ^{A)} (5)
5'	20.3 ^{B)} (1)	24.8 ^{B)} (1)	15.4 ^{B)} (1)	9.7 ^{B)} (1)	t ^{B)} (1)
6	— ^{A)} (10)	t ^{B)} (11)	t (14)	t (14)	t (14)
7	t ^{B)} (4)	t ^{B)} (6)	t ^{B)} (6)	— ^{A)} (11)	t (14)
8	— ^{A)} (5)	t ^{B)} (9)	— ^{A)} (11)	t ^{B)} (12)	t (14)
9	t ^{B)} (7)	t ^{B)} (8)	t ^{B)} (8)	t ^{B)} (10)	t (14)
10	t ^{B)} (11)	— ^{A)} (12)	t ^{B)} (13)	t (14)	t (14)

* : trace

** : Period of exposure (days)

A) : dead fish

B) : moribund fish

症の病徴は、Ⅰ)剖検的には血液の褐変およびこれに伴う鰓、肝臓等の変色、Ⅱ)血液学的にはヘモグロビンのメト化、変性赤血球の増加と赤血球の崩壊による溶血性貧血の発現、代償性の幼若赤血球の増加、Ⅲ)病理組織学的には脾臓での細網細胞による変性赤血球の貧食処理像および血鉄素の沈着像、腎臓、肝臓への血鉄素沈着像、鰓の鰓薄板での血栓の形成および血鉄素の沈着等の症状があげられる。

宮地(1980)によればヒトの赤血球の崩壊はヘモグロビンのメト化に始まり、メト化したヘモグロビンのヘム蛋白は変性して溶解度が減少し、そのような赤血球では赤血球膜が変性し、柔軟性、透過性を失うため脾臓で微細血管を通過する際に破壊される、としている。MHb血症を起こしたウナギにおいても以上述べたヒトとほぼ同様の過程で赤血球破壊が進行すると推測される。

実験1と実験2—1で亜硝酸ナトリウムのみを添加した第2区の病理組織学および血液学的結果を比較してみると、まず血液学的には実験2—1では末梢血液中に変性赤血球が認められたのに対し、実験1では貧血とそれに伴う幼若系赤血球の増加が主な病変であった。次に病理組織学的には実験2—1で、脾臓では変性した赤血球の貧食像や赤血球の崩壊から血鉄素への移行像、腎臓では軽微な血鉄素沈着が主な異常であったのに対し、実験1では脾臓に激しい血鉄素沈着が起こりそれらを貧食した細胞は集簇化した状態でみられた。また腎臓における血鉄素沈着も実験2—1と比

べ顕著であり、血鉄素の沈着は鰓にまで及んでいた。実験期間は実験2—1が13日間、実験1は20日間である。以上の結果と前報（窪田ら、1981）の結果より、ニホンウナギを亜硝酸ナトリウム溶液に浸漬するとまず赤血球のヘモグロビンの中心鉄が亜硝酸態窒素により酸化されメトヘモグロビンとなる。この赤血球は上述のヒトにおける赤血球崩壊過程をたどり変性に至る。このような赤血球は脾臓において処理される。ここまでの過程がほぼ14日目前後を中心として起こる傾向がみられ、この赤血球崩壊と脾臓での赤血球破壊の充進により溶血性貧血が発現し、代償性の幼若赤血球の増加が起こるといえよう。脾臓では貧食された変性赤血球が血鉄素へ移行し、その沈着状況も脾臓に散在する状態から集簇化した状態になる。また、腎臓および鰓にも血鉄素の沈着が顕著となる。ここまでの過程が約20日以降に起こると判断された。

実験2—1で亜硝酸ナトリウムにアンモニアを加えた第3～第5区についてみると、この実験区では血液の変色と激しい貧血が特徴的だった。アンモニアと硝酸のみを加えた第6～第8区では上記のような変化は全くみられなかったこと、赤血球のヘモグロビンがメト化していたこと、末梢血液中に変性赤血球が顕著に観察されたこと、脾臓および腎臓においても赤血球の崩壊像と貧食処理像がみられたこと、赤血球の崩壊が亜硝酸ナトリウムのみを加えた第2区より激しかったことなどから、この貧血はメトヘモグロビン血症に起因する溶血性貧血であり、亜硝酸ナトリウムにアンモニアを加えると赤血球の崩壊が促進されると判断される。

次に亜硝酸ナトリウムに硫化物を加えた実験4について述べる。まず、亜硝酸ナトリウムに亜硫酸ナトリウムを加えた第1区および第2区と亜硝酸ナトリウムに硫化ナトリウムを加えた第3、第4区とを比較してみる。斃死状況は第3、第4区より第1、第2区の方が多傾向にあった。また、第1区の2日目の個体でみられたような血液の変色と顕著な変形赤血球の増加および第2区で8日目の個体にみられた貧血症状は第3、第4区の魚には全くみられなかった。これらの事実から硫化ナトリウムより亜硫酸ナトリウムの方が毒性が強いと見えよう。

亜硝酸ナトリウムに亜硫酸ナトリウム、アンモニアを加え、硝酸でpHを5、7、9に調整した第5区および第5'区、第6区、第7区について比較すると、斃死状況は第5区が5日以内に、第5'区では24時間以内に全て斃死した。これに対しpHを7にした第6区では14日以前に5尾中2尾、pHを9とした第7区では5尾中4尾の斃死が認められた。さらに第5'区では5尾中3尾でメト化率が15～25%という比較的高い値であったこと、メト化率の測定はできなかったが第5区では全ての魚に血液の変色が認められ、また変形赤血球の出現が顕著であったこと、第5区、第5'区と同じ設定から亜硫酸ナトリウムのみを除いた第8区と第5、第5'区とを比較すると後者の方がメトヘモグロビン血症を顕著に起こしていたことによりメトヘモグロビン血症の発現には低pHと亜硫酸ナトリウムの存在が大きく関与しているといえる。

今回の一連の実験で興味深かった点は実験を実施した時期によりメトヘモグロビン血症の発現に大きな差がみられたことである。亜硝酸ナトリウムのみを添加した場合について比較してみても5月および11～12月に行なった実験と6～8月に行なった実験とでは前者の方がメトヘモグロビン血症の発生が顕著である。

宮地（1980）によれば、哺乳類では通常体内で酸化されたヘモグロビンはメトヘモグロビン還元酵素系により正常なヘモグロビンへと還元される。この還元酵素系の機能に障害が生じた場合や、酸化剤等によりヘモグロビンのメト化が還元機構の処理能力以上に進んだ時にメトヘモグロビン血症が起こると述べている。メトヘモグロビン還元機構が魚類にも存在することは MIYAUCHI *et al*, (1979) がアメマス (*Salvelinus leucomaenis*) について証明している。このメトヘモグロビン

還元構機の活性度や、これに関与する代謝速度、魚の健康状態等のさまざまな内因的要素が夏期と冬～春期におけるウナギの亜硝酸に対する抵抗力に差を生じさせ、その結果、冬～春期にウナギがメトヘモグロビン血症を発現しやすい体質になると考えられる。前報（窪田ら、1981）で報告した自然発症例も冬期のものであるし、また実際に加温養鰻池における水質悪化による事故は一般に冬期に多いと言われている。

加温循環ろ過式養鰻池においては、近年のエネルギー節約等の問題から冬期の換水が怠慢になりがちであるが、そのような養鰻池や過密殖状態の養鰻池では換水を励行して水質管理に努めるべく方針を改める必要がある。

ニホンウナギのメトヘモグロビン血症の内因性についてはまだ不明な点が多いので、これらの点や、亜硝酸とその他の水質悪化物質とにウナギを浸漬した場合の継時的変化、コイ、テラピア等の他の魚種のメトヘモグロビン血症について現在検討をすすめている。

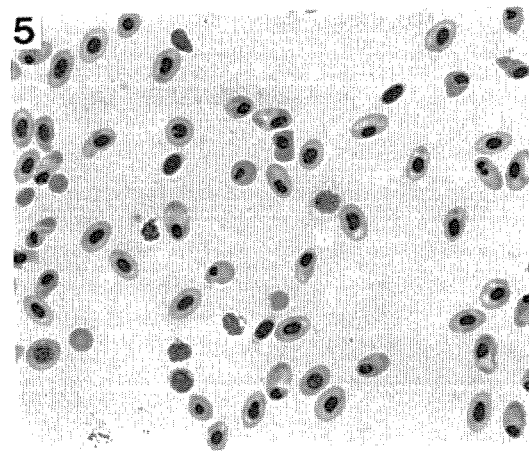
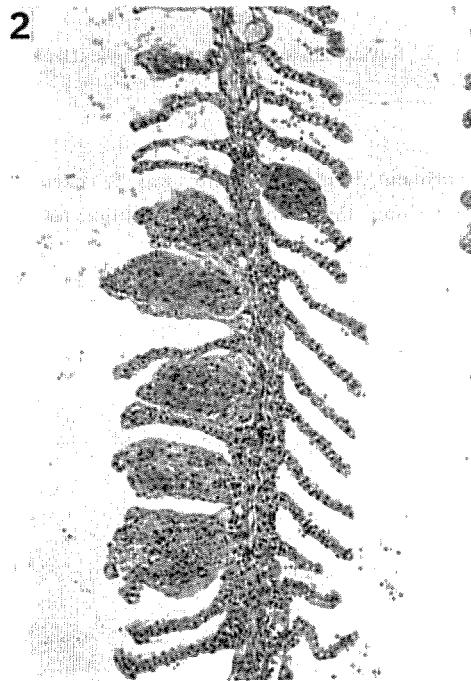
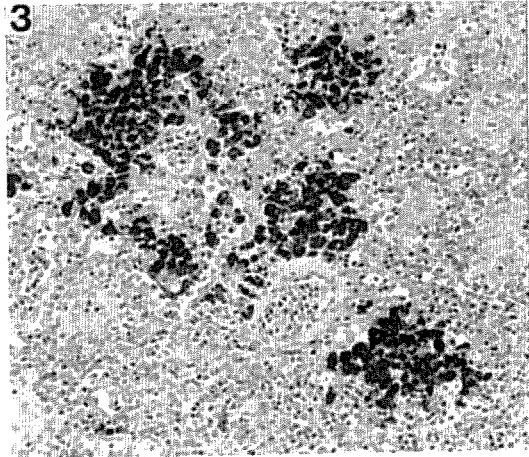
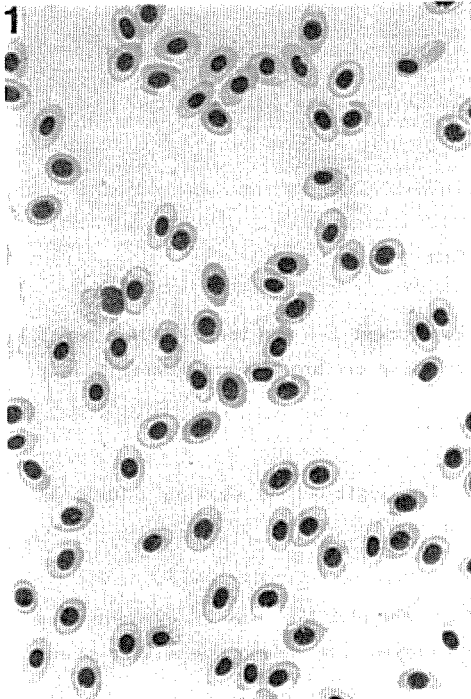
文 献

- 浅川牧夫, 1970. ウナギ体表面粘質物の組織化学的研究. 日水誌, 36(1): 83-87.
- 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.
- 窪田三朗・天野秀臣・一岡 衛・宮崎照雄・丹羽 誠, 1981. ニホンウナギのメトヘモグロビン血症. 本誌 8: 149-161.
- 宮地隆興, 1980. 溶血を生じるヘモグロビン異常症. 代謝, 17(3): 213-220.
- MIYAUCHI M., M. TAKAGI and T. UEMATSU, 1979. Studies on toxicities of biphenyl ether herbicides and their analogus to fish -I. The methemoglobin-formation by the nitroso-derivatives in white-spotted char, *Salvelinus leucomaenis*, erythrocytes. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.*, 45 (12): 1563-1567.
- SMITH R. P., 1975. Toxicology of the formed elements of the blood. *Toxicology: The basic science of poisons*. Edited by Casarett L. J. and J. Doull. Macmillan Publishing Co., Inc. N. Y.: 235-256.



Explanation of Plate- 1

- Fig 1.** Blood smear taken from an eel having Mhb-proportion of 32.6 % and exhibiting anemia which was exposed to 30 ppm of $\text{NO}_2\text{-N}$ for 20 days. Polychromatocyte and normochromatocyte increased in numbers. May-Giemsa stain $\times 400$
- Fig 2.** Gill of an eel having Mhb-proportion of 22.2 % which was exposed to 15 ppm of $\text{NO}_2\text{-N}$ for 6 days. The lamellae undergo thrombus. Hemosiderin-laden macrophages appear within the gill lamellae. H-E stain $\times 100$
- Fig 3.** Spleen of same sample shown in Fig 1. Large numbers of hemosiderin-laden splenocytes accumulat around the veins in the splenic pulp. Berlin-Blue stain $\times 160$
- Fig 4.** Kidney of an eel having a Mhb-proportion of 18.7 % which was exposed to 15 ppm of $\text{NO}_2\text{-N}$ for 20 days. Reticuloendothelial cells lining the sinusoids exhibit deposition of hemosiderin. Hemosiderin-laden macrophages appear in the vein. Berlin-Blue stain $\times 80$
- Fig 5.** Blood smear taken from the eel treated in Experiment 2-1, and the plot No. was 4, the exposure time was 13 days. Degenerated erythrocytes are increased extensively. May-Giemsa stain $\times 320$



Explanation of Plate- II

- Fig 1.** Blood smear taken from the eel treated in Experiment 2-1 and the plot No. was 5, the exposure time was 13 days. Round shaped young erythrocytes are dominant. May-Giemsa stain $\times 320$
- Fig 2.** High power view of the same blood smear. The erythroblasts showing mitosis are appear in circulating blood. May-Giemsa stain $\times 800$
- Fig 3.** Spleen of the eel treated in Experiment 2-1 and the plot No. was 2, exposure time was 13 days. Degenerated erythrocytes are phagocytized by splenocytes within splenic pulp. H-E stain $\times 480$
- Fig 4.** Kidney of the same sample showed in Plate 1-5. Reticuloendothelial cells phagocytized degenerated erythrocytes. H-E stain $\times 320$
- Fig 5.** Blood smear from a coma fish treated in Experiment 3 and the plot No. was 5, exposure time was 2 days. Needle crystals appear from the cytoplasm of poikilocytes. May-Giemsa stain $\times 800$

