

養殖カンパチおよびブリにおける腎症の病理組織学的研究

高橋 了・宮崎 照雄*

三重大学大学院生物資源学研究科 生物圏生命科学専攻 水圏生物生産学講座
水族病理学教育研究分野

Histopathological Studies on Nephropathy in Cultured Amberjack and Yellowtail

Ryou TAKAHASHI, Teruo MIYAZAKI*

Laboratory of Fish Pathology, Graduate School of Bioresources, Mie University

Abstract

In 2008, a mass mortality occurred in amberjack seedlings (*Seriola dumerili*) which were imported from China and 2-year old yellowtail (*Seriola quinqueradiata*) cultured in Japan. The affected fishes showed the swollen kidney. We studied on histopathological and electron microscopic features of the swollen kidney. Renal tubular epithelia in both proximal and distal tubules were markedly necrotized and necrotic cells were separated into the lumen. Some necrotized tubules were replaced by masses of proliferated macrophages or showed fibrosis. In renal corpuscles, necrosis of podocytes and mesangial cells occurred in glomeruli with thickened basal lamina of capillary as well as necrosis of Bowman's capsule. In electron microscopy, all of necrotic tubular epithelial cells, podocytes, mesangial cells and hematopoietic cells showed no evidence of a virus infection. The nephropathy signs resembled that of tiger puffer orally administered melamine and cyanuric acid. EP pellets given to yellowtail were revealed to contain 5 ppm melamine. Based on these facts, we confirmed that nephropathy was caused by intake of either melamine or cyanuric acid contaminated in feed in China and Japan.

Key Words: nephropathy, melamine, cyanuric acid, amber jack, yellowtail,

緒 言

2007年春、アメリカのイヌとネコが、メラミンおよびシアヌル酸が混入した中国からの輸入原料を使用したペットフードを摂食したことにより腎不全を発症して大量斃死を起こした¹⁻³⁾。また、2008年9月、メラミンが添加された中国製粉ミルクによって多くの乳児が腎臓障害を発症して死亡にまで至った事件が報道された。そのメラミン添加中国製粉ミルクの事件が報道されたと同じ2008年の6月に、鹿児島県下の養殖場において中国海南島から輸入

したカンパチ (*Seriola dumerili*) 稚魚を馴致する期間中に、顕著な腎臓腫大を発症した病魚が大量斃死した。また、同年夏にメラミンおよびシアヌル酸が混入した中国製飼料原料を用いて製造したEP飼料を投与して飼育していた大分県下の養殖ブリ (*Seriola quinqueradiata*) 2歳魚において、食欲低下や運動の緩慢を呈する病魚が発生し、少数ながら斃死が継続的に発生した。これらカンパチとブリの病魚を採集して病理組織学的に検討した結果、メラミンおよびシアヌル酸を投与して飼育実験を行ったトラフグとサラサハタに発現した腎症⁴⁾と同じ病

2012年10月9日受理

〒514-8507 三重県津市栗真町屋町 1577

* for correspondence (miyazaki@bio.mie-u.ac.jp)

変が発現していることが確認できた。この養殖カンパチとブリに発現した腎症の詳細を報告する。

1. 中国海南島から輸入したカンパチ稚魚における腎症

供試魚およびその病徴

2008年6月に鹿児島県下の養殖場において、中国海南島から輸入した直後のカンパチ稚魚を無給餌で馴致する期間に大量斃死が発生した。同月に大量斃死発生群から病魚8尾を採取した。病魚は、外見的には著変を示さないが、解剖したところ、全ての病魚で、顕著な腎臓腫大が観察された。

病理組織学的検討

採集した病魚から、腎臓や肝臓などの内臓諸器官および鰓を切り出し、ブアン氏液で固定した。組織は、定法に従いパラフィン包埋した後、3-4 μm の切片を作製し、デラフィールド氏ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) を施し、病理組織学的観察に供した。

電子顕微鏡観察

採集した病魚から、腎臓、肝臓、脾臓を切り出し、改良カルノフスキー固定液で前固定した。組織は、0.2 M リン酸緩衝液で洗浄し、2%四酸化オスmium固定液にて後固定した。さらに、定法に従って EPON 812 に包埋後、80 nm の超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛染色を行

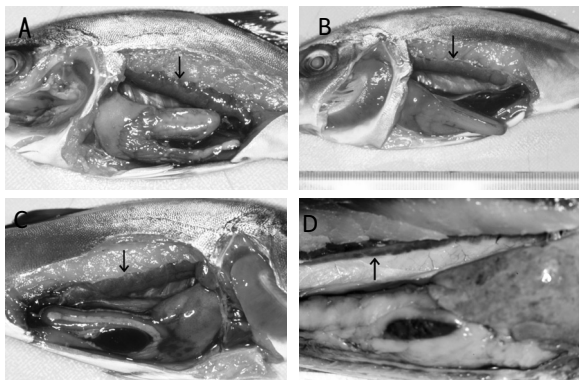


図 1

(A, B, C) 中国海南島から輸入したカンパチの病魚。いずれも腎臓 (矢印) の腫大が顕著である。体長約 18 cm (D) 大分県の養殖ブリの病魚。腎臓は腫大している (矢印、鰓が除去していないので腫大状況は見づらい)。体長 54 cm

い、透過型電子顕微鏡 (日立 H-7000) を用いてウイルス感染像の有無を観察した。

投与飼料のメラミンおよびシアヌル酸分析

分析のための資料の入手を試みたが、輸入したカンパチ稚魚の飼育に使った飼料は中国海南島から入手することはできなかった。

結 果

外見所見, 解剖所見

病魚は、外見的には著変を示さないが、解剖したところ、全ての病魚は顕著な腎臓腫大を起こしていた (図 1 A-C)。しかし他の内臓諸器官には著変は見られなかった。また、腹膜炎の症状も全く観察されなかった。

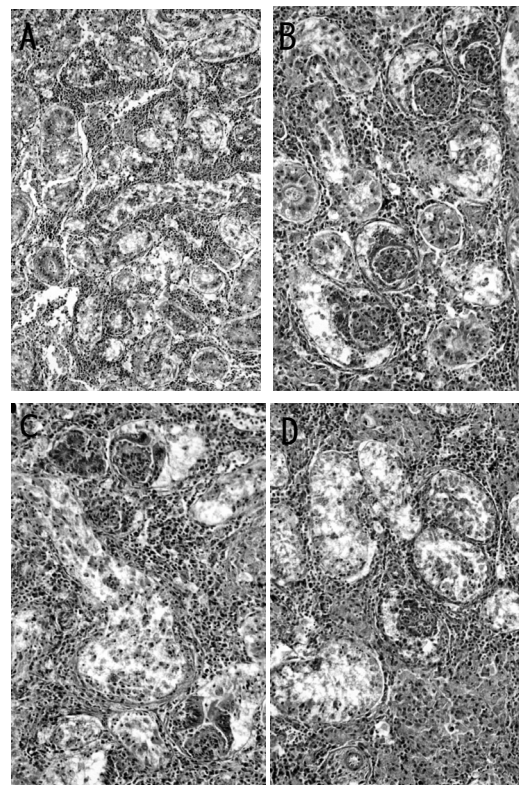


図 2

中国海南島から輸入したカンパチ病魚の腎臓。(A) ほぼ全ての尿細管上皮細胞が壊死・剥落するか、空胞変性を起こしている。H-E 染色 X100 (B) ほぼ全ての尿細管に、上皮細胞の壊死、壊死・剥落、円柱形成が見られる。腎小体の代償性過形成も顕著である。X160 (C) 集尿管が上皮の壊死・剥落を起こすとともに、細胞性円柱を示す。一部の壊死尿管に多数のマクロファージが浸潤している。腎小体の代償性過形成も見られる。X160 (D) 尿細管上皮の壊死・剥落が顕著である。造血組織に多数のマクロファージが増生し、壊死した尿細管と置き換わっている。X160

病理組織学的所見

腫大した腎臓では、ほぼすべての尿細管および腎小体に壊死性の病変が起こっていた(図2 A)。尿細管では遠位および近位尿細管ともに、上皮細胞が空胞変性や壊死を起こし、管腔内に剥落し、崩壊に至っていた。また尿細管上皮細胞は核濃縮を起こして壊死しており、まだ管腔内に剥落するに至っていない壊死上皮を持つ尿細管の管腔内には顆粒状の円柱が観察された(図2 B)。さらに上皮細胞の壊死剥落は集尿管に及んでおり、太い集尿管には剥落細胞による細胞円柱が作られていた(図2 C)。他方、腎小体では、糸球体の血管間膜細胞、タコ足細胞、ボウマン氏嚢内皮細胞が壊死し、尿腔内に剥落して崩壊に至っていた(図2 D)。また、壊死・崩壊した尿細管に接して腎小体の代償性増殖が顕著であった(図2 B, C)。代償性増殖した腎小体の糸球体は好塩基性細胞からなり毛細血管野分化はまだ見られなかった。ボウマン氏嚢内皮とそれに続く近位尿細管も幼弱細胞により形成されていた(図2 B, C, 3 B)。造血組織では、造血細胞の壊死は見られないが、マクロファージの増生が顕著な症例もあり、造血組織内に細胞塊をつくとともに崩壊尿細管に浸潤して置換していた(図2 D, 3 A, B)。特に慢性化したと思われる症例では、造血組織での顕著なマクロファージの増生に加え、集尿管壁や血管壁への細胞浸潤も顕著であった(図3 B)。

壊死尿細管上皮、マクロファージ細胞塊内には寄生虫としての Rhabdo spore あるいは炎症性細胞としての Rodlet cell の侵入が散見された。

肝臓では、肝細胞の萎縮が見られたが、壊死性病変は見られなかった。

電子顕微鏡観察

腫大した腎臓の顕著な壊死を示す尿細管上皮細胞を電子顕微鏡観察したが、その核内および細胞質内にウィルス感染像は確認できなかった(図3 C)。壊死細胞の核は濃縮し、ミトコンドリアや小胞体などの微小器官は変性、崩壊を示していた。

2. 大分県下の養殖ブリに発生した腎症
材料および方法

供試魚およびその病徴

EP 飼料を用いて飼育していた大分県下の養殖ブリ 2 歳魚に、2008 年夏から食欲低下や運動の緩慢を呈する病魚が発生し、少数の斃死が継続的に発生した。同年 10 月に養殖ブリ病魚 2 尾を採取し、病理検査を行った。そのうちの 1 尾はやや痩せており、他の 1 尾は痩せてはいないが体表の一部が発赤していた。

病理組織学的検討

採集した病魚から、腎臓や肝臓などの内臓諸器官および鰓を切り出し、ブアン氏液で固定した。組織は、定法に従いパラフィン包埋した後、3-4

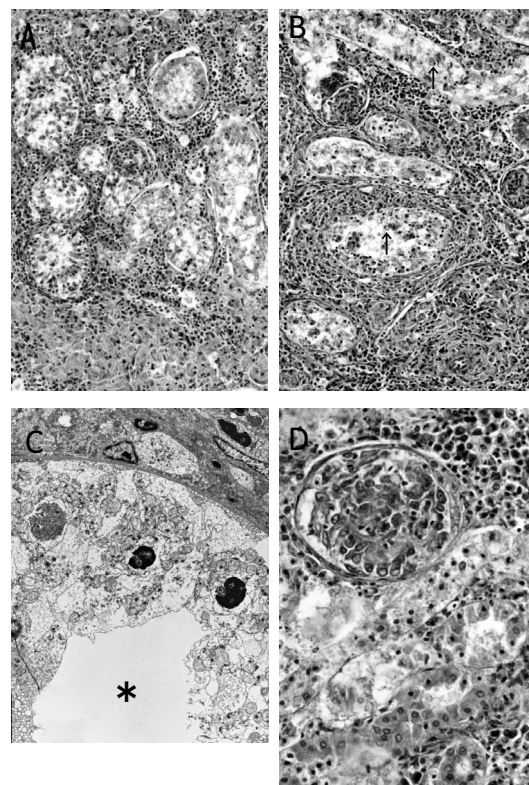


図 3

(A-C) カンパチ病魚の腎臓。(A) ほぼ全ての尿細管上皮細胞が壊死・剥落している。造血組織に多数のマクロファージが増生し、壊死した尿細管と置き換わっている。X 160 (B) 造血組織の多数のマクロファージの増生が顕著で、上皮が壊死・剥落した集尿管壁、血管壁、壊死尿細管に浸潤している。矢印は Rhabdo spore (Rodlet cell) を示す。X 160 (C) 壊死尿細管上皮細胞の電顕像。壊死上皮細胞は、核濃縮、ミトコンドリアの変性、微絨毛の崩壊を示す。細胞質や核内にウィルス感染像は見られない。*：管腔 X 3000 (D) 大分県の養殖ブリ病魚の腎臓。尿細管上皮の壊死・剥落が顕著である。腎小体の糸球体において、タコ足細胞や血管間膜細胞の壊死、毛細血管基底膜の膨化がみられる。X 320

μm の切片を作製し、デラフィールド氏ヘマトキシリン・エオジン染色 (H&E) を施し、病理組織学的観察に供した。

電子顕微鏡観察

採集した病魚から、腎臓、肝臓、脾臓を切り出し、改良カルノフスキー固定液で前固定した。組織は、0.2 M リン酸緩衝液で洗浄し、2%四酸化オスmium固定液にて後固定した。さらに、定法に従ってEPON 812に包埋後、80 nmの超薄切片を作製し、酢酸ウラニル・クエン酸鉛染色を行い、透過型電子顕微鏡 (日立 H-7000) を用いて観察した。

投与飼料とブリ内臓 (肝臓と腎臓) のメラミンおよびシアヌル酸分析

病ブリの肝臓と腎臓の一部を採材し、 -20°C で冷凍保存した。さらに2008年11月に病魚が発生した養殖場からブリ用飼料であるM社製EP飼料を入手した。魚の内臓とEP飼料についてメラミンおよびシアヌル酸の化学分析をおこなった。メラミンおよびシアヌル酸分析は、厚生労働大臣登録検査機関(財)食品分析開発センターSUNATECに依頼した。各試料中のメラミンおよびシアヌル酸分析は、それぞれ液体クロマトグラフ質量分析およびガスクロマトグラフ質量分析にて行われた。

結 果

外見所見, 解剖所見

症例1は、やや痩せており、剖検所見では、腎臓に軽度の腫大がみられた (図1 D)。症例2は、痩せてはいないが、体表の一部が発赤していた。剖検所見では、内臓諸器官に特に顕著な病変はみられなかった。

病理組織学的所見

症例1の腎臓では、近位尿細管上皮および遠位尿細管上皮の壊死・崩壊がみられ、特に近位尿細管上皮の壊死・崩壊が顕著であった (図3 D, 4 A, B)。壊死尿細管上皮は空胞変性も伴い、核濃縮を起こして、崩壊するか管腔内に剥落していた。また、腎小体の糸球体毛細血管の基底膜肥厚が顕著であり、糸球体のタコ足細胞の壊死・剥落がみ

られた (図3 D, 4 B)。また、幼若な腎小体の形成も顕著で、腎小体の代償性過形成と判断された (図4 A)。幼若な腎小体の糸球体にも毛細血管の基底膜肥厚、タコ足細胞の壊死・剥落、血管間膜細胞の壊死が起こっていた。壊死尿細管周囲の造血細胞にも核濃縮や核膨化をともなった壊死がみられた。集尿管では、糸球体や尿細管の壊死・剥落した細胞が集まり、剥離細胞性円柱の形成がみられた。なお、壊死尿細管には、寄生虫としてのRhabdo sporeあるいは炎症性細胞としてのRodlet cellの侵入が散見された。

症例2の腎臓では、尿細管上皮細胞の軽度な壊死がみられるとともに、腎小体の糸球体毛細血管の基底膜肥厚がみられた。

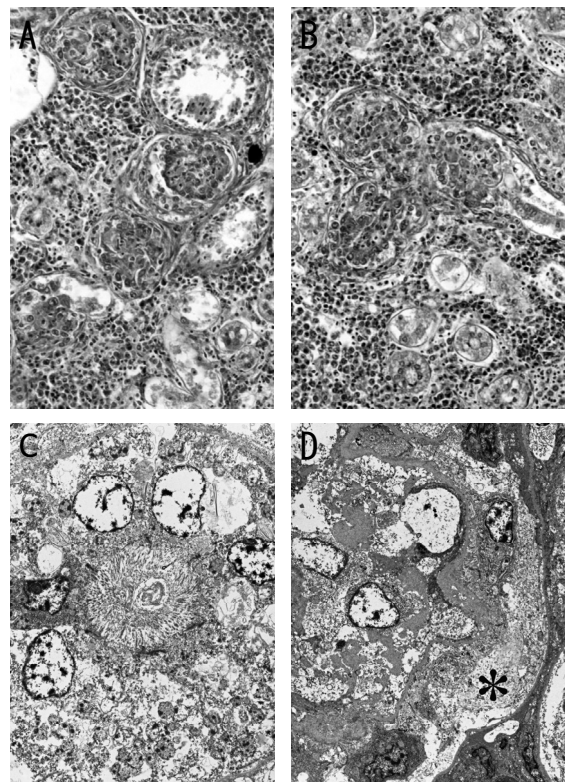


図 4

大分県の養殖ブリ病魚の腎臓。(A) ほぼ全ての尿細管上皮細胞が壊死・剥落するか、空胞変性を起こしている。腎小体の代償性過形成も顕著であるが糸球体には障害も見られる。X 160 (B) ほぼ全ての尿細管上皮細胞が壊死・剥落するか、空胞変性を起こしている。腎小体の糸球体では、タコ足細胞や血管間膜細胞の壊死が見られる。X 160 (C) 壊死尿細管上皮細胞の電顕像。X 1500 (D) 腎小体の電顕像。尿腔内 (*) には細胞残渣がつまり、糸球体のタコ足細胞や血管間膜細胞の壊死、基底膜の肥厚と断裂が観察される。X 3000

電子顕微鏡観察

顕著な病変の発現がみられた症例1の腎臓について、電子顕微鏡観察を行った結果、顕著な壊死を示す尿細管上皮細胞は核の膨化、細胞質内微小器官の崩壊、細胞質基質の疎化を示していた。その核内および細胞質内にウィルス感染像は確認できなかった(図4 C)。また、腎小体では尿腔内には細胞残渣がつまり、糸球体のタコ足細胞や血管間膜細胞の壊死、基底膜の肥厚と断裂が観察された(図4 D)。タコ足細胞や血管間膜細胞の壊死細胞内にウィルス感染像は確認できなかった。加えて、核濃縮を起こして壊死した造血細胞の核内および細胞質内にもウィルス感染像は確認できなかった。

ブリ用飼料とブリ内臓のメラミンおよびシアヌル酸分析の結果

メラミンおよびシアヌル酸分析の結果、ブリ用飼料からはメラミンが5.0 ppm、シアヌル酸が3.2 ppm(推定値)検出された。ブリ内臓(肝臓と腎臓)からは、0.5 ppm以下(参考値)のメラミンの痕跡が検出された。なお、推定値とは、検出値が検出限界の5.0 ppm未満であったため、分析データのピークから読み取りその量を推定した数値である。

考 察

2008年6月に鹿児島県下の養殖場において大量斃死した中国海南島から輸入したカンパチ稚魚は、馴致期間中であり日本国内で作られた飼餌料は摂取していない。にもかかわらず、腎臓腫大を起こし、腎症は慢性的な病徴を示していることから、その発病は中国海南島であった考えるのが妥当である。病理組織学的検査により、腎臓腫大は、広範囲におよぶ近位尿細管と遠位尿細管の壊死・崩壊、腎小体の糸球体の障害、および造血組織内でのマクロファージの増生のために起こった判断された。これら病変の発現にウィルス感染を疑ったが、顕著な壊死を示す尿細管上皮細胞の電子顕微鏡観察において、壊死細胞の核内および細胞質内にウィルス感染像は確認できなかった。以上の観察結果から、当該腎症の発現は毒物による中毒症と判断した。

また、2008年に大分県下の養殖場で継続的に斃死していた養殖ブリ2歳魚もカンパチ病魚同様に、近位尿細管上皮および遠位尿細管上皮の壊死・崩壊、腎小体糸球体の毛細血管基底膜の肥厚など、腎症の病徴が見られた。さらに、電子顕微鏡観察で、尿細管上皮細胞、腎小体糸球体のタコ足細胞や血管間膜細胞、および造血細胞などいずれの壊死細胞の核内および細胞質内にもウィルス感染像は確認できなかった。

病理組織学的検査により、腎臓腫大を示すカンパチとブリはいずれも同様の中毒性の腎症を起こしていたと判断された。腎症の病変は、メラニンおよびシアヌル酸を経口投与したトラフグとサラサハタの腎症⁴⁾とほぼ同じ病変であった。カンパチとブリにはメラニンシアヌレート結晶性結石がみられなかったことから、メラニン・シアヌル酸混合投与の場合とは異なっていた。実際、ブリ用EP飼料がメラニンとシアヌル酸に汚染されていたことから、養殖ブリの腎症は、メラニンあるいはシアヌル酸のどちらかを多量かつ継続的に摂取したために発病したと判断された。また、中国海南島で飼育されたカンパチも重篤な腎症を起こしており、その病原因としてメラニンあるいはシアヌル酸のどちらかを多量かつ継続的に摂取したことと推察された。今回の研究ではカンパチに投与された飼餌料のメラニンとシアヌル酸の化学分析は実施できなかった。そのため以下に間接証拠を提示するが、2007年に発生したペットの死亡に至るほどの激しい腎症の原因として中国産飼料原料へのメラニンの混入であることが、明らかにされている^{1,3)}。既に2007年には飼料原料へのメラニンの混入は実行されていたことになる。また、2009年当時中国で市販されていた魚類用ペレット飼料には、確実にメラニンとシアヌル酸が混入していた。このことは中国で入手し、依頼して日本の厚生労働大臣登録検査機関(財)食品分析開発センター SUNATEC で分析した結果、コイ用飼料でメラニンとシアヌル酸が各76 ppmと28 ppm、観賞魚用飼料でメラニンとシアヌル酸が各8.8 ppmと110 ppmが検出された(宮崎 未発表)ことから明らかである。すなわち、飼料原料へのメラニンとシアヌル酸の人為的混入は明らかに常態化しているといえる。また、2008年以降の新聞報道を加味すれば、中国海南島ではメラニン

あるいはシアヌル酸のどちらかが中毒を起こさせるに十分な量を含む飼餌料がカンパチに投与されて腎症を発病していた可能性が高く、結果として輸入後、日本での馴致期間に大量斃死が起きたと判断された。

先にも述べたように2010年12月の中国の報道で、依然として飼料用魚粉に1,200~2,000 ppmの大量のメラミンが混入していること、大問題となったメラミン混入ドライミルクが焼却処分されることなく家畜の飼料原料として依然として流通しているなどを考えると、メラミン問題は終息しているとは言えない。また、その後、家畜飼料へのメラミン混入問題が解決されたとする報道もない。今後も、中国からの輸入魚介類および飼料原料に関して、メラミン混入問題は重要課題として対処することが必須である。

文 献

1. BROWN CA, JEONG K-S, POPPENG RH, PUSCHNER B, MILLER DM, ELLIS AE, KANG K-I, SUM S, CISTOLA AM, BROWN SA (2007) Outbreaks of renal failure associated with melamine and cyanuric acid in dogs and cats in 2004 and 2007. *J. Vet. Diagn. Invest.* **19**: 525-531
 2. REIMSCUESSEL R, GIESEKER CM, MILLER RA, WARD J, BOEHMER J, RUMMEL N, HELLER DN, NOCHETTO C, de ALWIS GKH, BATALLER N, ANDERSEN WC, TURNIPSEED SB, KARBIWNYK CM, SATZGER RD, CROWE JB, WILBER NR, REINHARD MK, ROBRTS JF, WITKOWSKI MR (2008) Evaluation of the renal effects of experimental feeding of melamine and cyanuric acid to fish and pigs. *Am. J. Vet. Res.* **69**: 1217-1228
 3. THOMPSON ME, L-SMITH MR, KALASINSKY VF, PIZZOLATO KM, FLEETWOOD ML, MCELHANEY MR, JOHNSON TO (2008) Characterization of melamine-containing and calcium oxalate crystals in three dogs with suspected pet food-induced nephrotoxicosis. *Vet. Pathol.* **45**: 417-426
 4. 高橋 了, KETUT MAHARDIKA, 鈴木真奈, 宮崎照雄 (2012) 魚類におけるメラミンおよびシアヌル酸中毒症の病理組織学的研究. 本誌・本号
- メラミン関連 URL
- 2007年5月9日 Searchina News :
米向けペットフード原料からメラミン検出
http://news.searchina.ne.jp/disp.cgi?y=2007&d=0509&f=national_0509_010.shtml
- 2008年9月19日 食品安全委員会 :
メラミンの概要について
<http://www.fsc.go.jp/sonota/meramine.pdf>
- 2008年9月20日 産経ニュース :
韓国で養殖魚の餌からメラミン
<http://sankei.jp.msn.com/world/korea/080920/kor0809201225005-n1.htm>
- 2008年9月26日 北海道新聞 :
メラミン汚染 中国産粉ミルク
<http://www.hokkaido-np.co.jp/cont/kawaraban/38506.html>
- 2009年2月8日 ロイター通信 : 中国でメラミン汚染粉ミルク 72 トン押収、廃棄せず使い回し
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20100208-00000729-reu-int>
- 2010年2月6日 Searchina News :
汚染粉ミルクが再流通＝乳製品・家畜飼料用に販売－中国
<http://www.jiji.com/jc/zc?k=201002/2010020600075&rel=y&g=int>
- 2010年7月9日 Searchina News :
終わらない「毒ミルク」…青海省で製造、沿海部にも流通か
<http://headlines.yahoo.co.jp/hl?a=20100709-00000017-scn-cn>
- 2010年12月9日 Searchina News :
メラミン汚染飼料がまん延、粉ミルク上回る影響も－中国
http://news.searchina.ne.jp/disp.cgi?y=2010&d=1209&f=national_1209_172.shtml