クルマエビのバキュロウィルス性中腸腺壊死症に関する研究—III.

仮診断法*

桃 山 和 夫**

(昭和 58 年 1 月 11 日受理)

Studies on Baculoviral Mid-Gut Gland Necrosis of Kuruma Shrimp (*Penaeus japonicus*)—III.

Presumptive Diagnostic Techniques

Kazuo MOMOYAMA

Yamaguchi Prefectural Naikai Fishery Experimental
Station, Yamaguchi, Japan

(Received January 11, 1983)

In the previous paper (1981), this author indicated that the most characteristic cytological change of this disease producing high mortality of kuruma shrimp larvae and postlarvae was hypertrophied nuclei resulting in chromatolysis of the affected mid-gut gland epithelial cells. SANO *et al.* (1981) also pointed out the hypertrophy of affected nuclei as the characteristic symptom of this disease, demonstrated Baculoviral infection in such hypertrophied nuclei and the epizootic in the intensive culture farm of kuruma shrimp.

In the present study, the author examined to diagnose this epizootic by detecting hypertrophied nuclei in squash and stained preparations of the affected mid-gut gland, or in squash unstained preparations under central illumination, dark field illumination, phase contrast and interference microscope. These results obtained were as follows;

1. Squash and stained preparations: hypertrophied nuclei were clearly seen due to probably increased DNA.

2. Squash unstained preparations: 1) under central illumination hypertrophied nuclei were observed as if containing many granules, but not clear. 2) under dark field illumination hypertrophied nuclei were clearly seen in white. 3) under phase contrast a lot of rod-like particles (about 1 μ m length) were often observed in the hypertrophied nuclei. These rod-like particles were arranged almost vertically to the nuclear membrane at the marginal area, and also they scattered throughout in the nuclei, or sometimes they lined up parallelly to each other. 4) under interference surface of the hypertrophied nuclei was somewhat rough.

Three out of these methods, squash and stained preparations, squash unstained preparations under dark field illumination and phase contrast microscope seemed to be available as presumptive diagnostic techniques for Baculoviral Mid-Gut Gland Necrosis of kuruma shrimp.

本症の外部症状は主として中腸腺の白濁以外特に肉眼的異常は顕著ではない。しかし、Postlarva の時期に肉眼的に中腸腺が白く見える現象は本症以外にも認められるし、健康エビにおいてさえしばしば観察される。SANO *et al.* (1981) および前報 (桃山, 1981) において筆者は

病理組織学的検討を行い、中腸腺上皮細胞核の肥大と核質の崩壊に伴う核内無構造化が本症の極めて特徴的病変であることを示した。

今回、筆者は病エビの生鮮中腸腺やその押しつぶし染色標本について、上皮細胞核を種々の方法で観察することにより本症を簡便かつ迅速に診断することが可能か否かについて検討し、以下の結果が得られたので報告する。

なお、本症の病名については SANO *et al.* (1981) に

* 本報告の一部は昭和 57 年 10 月 2 日、日本魚病学会ワークショップ (広島) で口頭発表した。

** 山口県内海水産試験場

より Baculoviral Mid-Gut Gland Necrosis (BMN) が提唱されており、以後筆者も本病名を用いることとした。

材料および方法

I. 押しつぶし染色標本

以下の手順にしたがった。

生活状態の Postlarva を汙過海水で体表を洗浄後、解剖針で中腸腺を摘出しスライドガラスの上におく。更にその上にカバーガラスを載せてかるく圧扁すると中腸腺はスライドガラスとカバーガラスの間で薄い膜状となる。次いでカバーガラスを取り除き直ちに固定液を盛り10分間固定した。水洗後、染色して上皮細胞核を観察した。用いた固定液は、メタノール、アルコール・ホルマリン、Carnoy 液および Davidson 液であり、染色方法は、Mayer のヘマトキシリン・エオジン染色、Giemsa 染色、PAS・ヘマトキシリン染色、Heidenhein の鉄ヘマトキシリン染色および Feulgen 反応である。

II. 生鮮標本

I と同様の方法で摘出した中腸腺を海水を少量盛ったスライドガラスの上におき、カバーガラスを載せた後余分の海水を汙紙で吸いとり検鏡した。

観察方法は明視野、暗視野、位相差、微分干渉によった。なお、暗視野観察では、10% ホルマリン水、Bouin 液、Davidson 液による固定保存の材料も一部供試した。

これら I および II で得られた中腸腺上皮細胞核の観察像と、供試エビの一部で作成した組織切片の観察像とを比較することにより、各方法で本症が診断可能か否かを判定した。

結 果

I. 押しつぶし染色標本

本法では標本作成時の操作により、ほとんどの中腸腺上皮細胞の細胞質は崩壊してしまうが、核だけは固有の構造をとどめているものも多かった。健康エビの核は円形～卵円形で大きさ $7\sim 12\mu\text{m}$ の範囲のものがほとんどで、核小体やクロマチン等を認めることができるものが多かった (Fig. 1)。病エビでは円形、楕円形、半月形等様々な形を呈する大きさ $10\sim 30\mu\text{m}$ の肥大した異常核が認められ (Fig. 2)、病状の進行とともに量的に増加した。これらの異常核は内部は無構造で核小体等は識別されず、染色性も好酸性に傾いていた。Feulgen 反応では異常核は一様に濃染され DNA の増加を示していた (Fig. 3)。異常核のこれらの特徴は組織切片による観察

像とよく一致していた。しかし、組織切片上で時々観察される桿状の物体 (桃山, 1981) は認めることはできなかった。

用いた固定液の種類による差異は特になく、ほぼ同様の染色結果であった。また、染色方法に関しては、Giemsa 染色は核の構造を観察する上ではやや不適当であるが、他の染色方法はいずれも核の構造を観察するのに適していた。

II. 生鮮標本

II-1. 明視野観察

病状がかなり進行した病エビでは、中腸腺上皮細胞が基底膜から脱落しやすいこと、および微小な顆粒を多数内蔵しているかの如くに観察される無構造な肥大核が認められるが (Fig. 4)、それ程明瞭ではなかった。初期症状の病エビではこれらの核は観察しがたく健康エビと明らかに区別することはかなり困難であった。

II-2. 暗視野観察

健康エビの中腸腺では上皮細胞の核等は不明瞭であった (Fig. 5)。

病エビではそのような核に代って、大きさ $10\sim 30\mu\text{m}$ の円形ないし楕円形の内部構造の一樣なほぼ白色の物体が例外なく容易に観察された (Figs. 6, 7)。これらの白色物体は、上皮細胞内に占める位置、大きさ、形態や、更にその出現割合が病エビの行動や中腸腺の白濁の程度等、病エビの肉眼的症状ともよく対応しており、組織切片上の肥大した異常核に一致することがわかった。これら白色の異常核はエビに摂餌・成長不良や行動の異常等の認められない極めて初期症状と考えられる時期にも、既に少数ながら中腸腺中央付近の成熟上皮細胞に観察することができた。しかし、白色の異常核の内部には桿状の物体を観察することはできなかった。

固定保存されていた病エビについては、用いた固定液のうち 10% ホルマリン水で固定されていたもののみ白色の異常核を明瞭に認めることができた。ただし、ホルマリン固定標本は組織がかなり硬化しており、解剖針で組織を解きほぐす等できるだけ組織を薄い状態にして観察する必要があった。

なお、健康エビにおいても低倍率下では不鮮明ながら病エビに見られるのと同じような白色の物体が中腸腺上皮細胞内に観察されることがあるが、この細胞は高倍率で検鏡すると多数の顆粒状物質を内蔵している点で病エビの異常核と区別できた (Fig. 8)。これらの顆粒状物質の機能等については現在不明であり、ここでは一応このように呼ぶこととした。

II-3. 位相差観察

正常核は円形ないし卵円形で約 10 μm の大きさであり、核内には明らかに核小体を識別することができた。低倍率下では正常核がやや明るい物体として観察されるのに対し、肥大し無構造化した異常核はやや暗い物体として観察された (Figs. 9, 10)。高倍率下では異常核内部には、時々組織切片で観察されるものと同様の長さ約 1 μm の桿状の物体がしばしば多数観察された。これらの桿状の物体は、核周辺部では核膜の内側に向って核膜にほぼ垂直に並んでおり、それ以外の部分では多くは分散しているが、時には並列して長いひも状となっているものも観察された (Fig. 11)。

II-4. 微分干渉観察

正常核は大きさ約 10 μm のへこみとして観察され、中央部分に球状の隆起した核小体が認められることで識別された。肥大した異常核では核小体は認められず表面がざらざらした構造を呈するが、あまり明瞭ではなかった (Fig. 12)。異常核内部には位相差観察で認められた桿状の物体は観察されなかった。

考 察

本症の大きな病理組織学的特徴は、中腸腺上皮細胞核の肥大と核質の崩壊に伴う核内無構造化であることは前に述べた。今回、本症の診断の目安をこのような異常核が各種の方法で観察可能か否かという点に置いて検討したが、病理組織学的観察結果と良く一致する結果が得られた。ただし、軽症の病エビについては、生鮮標本の明視野観察で異常核を探し出すことはかなり困難であり、また微分干渉観察もそれ程容易ではなく、これら二つの方法は軽症の中腸腺壊死症の診断には適当な方法とは思われない。

押しつぶし染色標本では、メタノールの 10 分間固定とヘマトキシリン染色のような核染色を施すことで診断は充分可能であると思われる。特に Feulgen 反応による観察結果は、パキウイルスが DNA ウィルス群の一員であり (川瀬, 1976)、本ウィルスがエビ中腸腺の上皮細胞核内で増殖すること (SANO *et al.*, 1981, MATTHEWS, 1982) と一致する結果を示しておりすぐれた方法と言える。

暗視野観察により異常核が白く見える理由については、核内で増殖した多数のウィルス粒子、構築中のウィルス等により反射・回折光線の量が増加するためと思われる。本法では暗い視野の中に異常核が白色に輝いて見えるため識別が極めて容易であること、したがって注意

深く中腸腺を摘出すれば臓器のほとんどの上皮細胞についての観察も可能であり、極く軽症の病エビも診断し得ること、また同一スライドガラス上で複数個体の臓器を短時間内に観察できること、更にホルマリン固定標本にも適用し得ることなどこの方法にはすぐれた点が多い。

位相差観察では異常核内の桿状の物体を高倍率で観察することにより本症を適確に診断し得たが、SANO *et al.* (1981) の電顕観察では封入体が認められておらず、この桿状物体の検討は今後に残されている。

以上これらの診断方法は主として病理組織学的知見に基づいているが、中腸腺上皮細胞核の肥大と壊死は本症の特徴的病変ではあり、すべての疾病が明らかにされていない現状では特異的病変といえるであろう。本症の診断を確定するためには、電顕により直接ウィルス粒子を観察する方法や蛍光抗体法等によりウィルス抗原を証明する方法が用いられなければならないが、現時点においてはここで述べたいいくつかの方法は仮りの診断方法として、養殖現場において、早期診断・早期対策を講ずる上で充分有効であると考えられる。

要 約

病エビ中腸腺の押しつぶし染色標本または、生鮮標本を以下いずれかの方法で観察することにより、本症の診断が可能と考えられる。

1. 押しつぶし染色標本により肥大した無構造核を観察する。
2. 生鮮標本の暗視野観察により白色無構造の肥大した核を観察する。
3. 生鮮標本の位相差観察により肥大した異常核内に多数の桿状の物体を観察する。

謝 辞

本報告の御校閲をいただいた東京水産大学・佐野徳夫教授、ならびに本研究遂行にあたり貴重な御助言をいただいた養殖研究所・松里寿彦室長に厚くお礼申し上げます。

文 献

- 川瀬茂実 (1976): ウィルスと昆虫, 化学の領域選書, 12, 南江堂, 東京.
- MATTHEWS, R. E. F. (1982): Classification and nomenclature of viruses. *Intervirology*, 17 (1-3), 52-54.
- SANO, T., T. NISHIMURA, K. OGUMA, K. MOMOYAMA and N. TAKENO (1981): Baculovirus in-

fection of cultured kuruma shrimp, *Penaeus japonicus* in Japan. Fish Pathology, 15(3/4), 185-191.

桃山和夫 (1981): クルマエビの伝染性中腸腺壊死症に関する研究—I. 発生状況 および症状. 山口県内海水産試験場報告, (8), 1-11.

Explanation of Figures

- Fig. 1.** Squash and stained preparation of the normal mid-gut gland of kuruma shrimp. Nuclei remain almost normal structure. (H.E, $\times 200$)
- Fig. 2.** Squash and stained preparation of the affected mid-gut gland, showing hypertrophied nuclei (arrows). (H.E, $\times 200$)
- Fig. 3.** Squash and stained preparation of the affected mid-gut gland. Feulgen reaction is positive in hypertrophied nuclei (arrows). ($\times 200$)
- Fig. 4.** Squash unstained preparation of the affected mid-gut gland. Hypertrophied nuclei (arrows) are seen as if containing many granules, but are not clear. (central illumination, $\times 400$)
- Fig. 5.** Squash unstained preparation of the normal mid-gut gland. Nuclei can not be clearly observed. (dark field illumination, $\times 100$)
- Fig. 6.** Squash unstained preparation of the affected mid-gut gland. Many hypertrophied nuclei are seen clearly in white. (dark field illumination, $\times 100$)
- Fig. 7.** High magnification of Fig. 6. Hypertrophied nuclei show flat structure. These nuclei are noticeable due to white and round shape. (dark field illumination, $\times 400$)
- Fig. 8.** Squash unstained preparation of the normal mid-gut gland, showing masses of granule-like substances (arrows). (dark field illumination, $\times 400$)
- Fig. 9.** Squash unstained preparation of the affected mid-gut gland. Normal (arrows) and hypertrophied nuclei (double arrows) are seen under light and dark, respectively. (phase contrast, $\times 200$)
- Fig. 10.** High magnification of Fig. 9. Nucleolus is clearly distinguishable in normal nucleus (arrow), but in hypertrophied nucleus (double arrow) disappearance of nucleolus is observed. (phase contrast, $\times 1000$)
- Fig. 11.** High magnification of hypertrophied nucleus, showing numerous rod-like particles. (phase contrast, $\times 1000$)
- Fig. 12.** Squash unstained preparation of the affected mid-gut gland, showing normal (arrows) and hypertrophied nuclei (double arrows) with rough surface. (interference, $\times 200$)