海面養殖ギンザケにみられたウイルス性貧血の 病理組織学的研究

早川 穰^{*1}・原田隆彦^{*2}・山本雅一^{*1}・畑井喜司雄^{*1}・
窪田三朗¹・文谷俊雄^{*3}・星合愿一^{*3}

(1989 年 8 月 16 日受付)

Histopathological Studies on Viral Anemia in Sea-cultured Coho Salmon (*Oncorhynchus kisutch*)

Yutaka HAYAKAWA^{*1}, Takahiko HARADA^{*2}, Masaichi YAMAMOTO^{*1},
Kishio HATAI^{*1}, Saburoh S. KUBOTA^{*1}, Toshio BUNYA^{*3}
and Gen-ichi HOSHIAI^{*3}

^{*1}Department of Fish Diseases, Nippon Veterinary and Zootechnical College,
1-7-1 Kyonan Cho, Musashino, Tokyo 180, Japan

^{*2}Department of Biology, Nippon Veterinary and Zootechnical College,
1-7-1 Kyonan Cho, Musashino, Tokyo 180, Japan

^{*3}Miyagi Prefectural Freshwater Fisheries Experimental Station,
Hatasaka, Yoshida, Daiwa, Miyagi 981-36, Japan

(Received August 16, 1989)

A severe anemia occurring in sea-cultured coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*) has been associated with serious losses in the northern coastal water of Miyagi Prefecture. The death due to the disease has been recorded from February to May, since 1985.

Clinical signs of the disease were pale gills, yellowish liver, blood retain in the atrium and watery blood.

The hematological parameter of the diseased fish exhibited lower hematocrits, erythrocyte counts, hemoglobin concentrations, mean corpuscular hemoglobin concentration and greater numbers of immature erythrocytes in comparison to healthy fish.

Blood smears showed a few bodies of inclusion like structure ranging in size from 1 to 2 μm and a large number of rods in the cytoplasm. Electron microscopy revealed virus particles scattered randomly in the cytoplasm, and marked swelling in mitochondria with occasional loss of mitochondrial cristae. It was thought that bodies of inclusion like structure were formed by deposited electron dense materials in the swollen mitochondria.

Histopathological examination showed necrosis of muscle fibers in the ventricle and atrium, and deposits of hemosiderin and ceroid like materials were also found within macrophages in the spleen, kidney and liver.

As a result, the cause of the disease was thought to be as follows: The virus first infected erythrocytes to make hemolysis, leading to hypoxemia, and then produced phospholipid peroxidation; finally heart lesions and hemolysis were progressed by hypoxemia and phospholipid peroxidation.

^{*1} 日本獣医畜産大学魚病学教室

^{*2} 日本獣医畜産大学生物学教室

^{*3} 宮城県内水面水産試験場

近年、宮城県を中心にギンザケの海面養殖が著しく発展しているが、それに伴って、細菌性疾病であるせつそう病（絵面ら，1984）、ビブリオ病（田島ら，1981）、およびBKD（早川ら，1989）が、またヘルペスウイルス感染症である口部基底細胞腫（KIMURA *et al.*, 1981; YOSHIMIZU *et al.*, 1987）などが発生している。しかし、これらの疾病に起因しない被害例も少なくない。厚田ら（1988）は肝臓に類脂肪変性が見られる症例を報告している。この疾病は一般にギンザケの肝臓障害と呼ばれているが、それとは病徴の点で類似するがその原因はウイルス感染によると判断されるものが原田ら（1988）により報告されている。本報はこのウイルス感染魚について病理組織学的ならびに血液学的に詳査した結果、さらに得られた2, 3の知見について報告するものである。

材料および方法

供試魚：供試ギンザケは1987年5月、1988年2月、5月および1989年3月にかけて宮城県下の海面養殖場から採取した。血液学的検査には瀕死状態および健康と判断された各20尾ずつの計40尾で、前者は他の疾病の関与しないものだけに限った。このうち、病理組織学的検査には、原田ら（1988）によりウイルス感染が電顕的に確認されている6尾と1988年5月に採材し、同様のウイルス粒子が観察された2尾の計8尾、および上述の健康魚の中から無作為に選択した5尾を供した。供試魚の尾叉長は30～50 cmであった。

血液学的検査：赤血球数、ヘマトクリット値（以下Ht値と称する）およびヘモグロビン量（以下Hb量と称する）を測定し、それらの測定値から赤血球指数を算定した。また、血液塗抹標本を作製し、ギムザ染色を施した後、血球形態を観察するとともに赤血球500個に対する幼若赤血球の出現率を算定した。

電子顕微鏡的検査：尾柄部および動脈球より注射筒を用いて採取した血液はプラスチック製毛細管に移した後、5000回転5分間遠沈（ヘマトクリット用遠心器）後、赤血球層を切りだし1%グルタルアルデヒド、1.6%パラホルムアルデヒド/0.1 M カコジル酸 Na 緩衝液にて固定・保存した。その後、同緩衝液で洗浄後、1%四酸化オスミウム液/0.1 M カコジル酸 Na 緩衝液で1.5時間後固定し、エタノール・アセトン系列による脱水後エポンアラルダイドに包埋した。また心臓、肝臓および脾臓についても同様の方法により固定・包埋を行なった。超薄切片は酢酸ウラニルとクエン酸鉛による二重電子染色を施し、JEM 100 CX-II 型電子顕微鏡を用い観察撮影

した。

病理組織学的検査：供試魚の各臓器（肝臓、腎臓、脾臓、胃、幽門垂、腸管、鰓、心臓）を10%リン酸緩衝ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を、さらに肝臓については凍結切片を作製した。染色はHE染色、PAS反応、オイル赤O染色、ズダン黒B染色、ズダンIII、シュモール反応、チールネルゼン染色、ベルリン青染色、ルクソールファースト青染色およびホール法を目的に応じて施し観察に供した。

結 果

病徴：罹病魚の主病徴は肝臓の黄変、胆嚢内の暗緑色胆汁の貯留、鰓の褪色、胃水貯留による腹部膨満、血液貯留による心房の拡張と囲心腔への出血、腸管内容物が生時から黄色を呈することなどであった。また、血液はかなり希薄であり、血液凝固の遅延を呈した。

血液塗抹標本：幼若赤血球、赤芽球および一般にゴーストと呼ばれる溶血像が多く観察され、赤血球細胞質内には直径1～2 μm の好塩基性で球形の封入体様構築物が散見された（Fig. 1）。その他、核の分節像（Fig. 2）や成熟した赤血球の細胞質内に好塩基性に染色される桿状体も観察された。

血液性状：赤血球数、Ht値、Hb量、赤血球指数および幼若赤血球の出現率をTable 1に示した。病魚の赤血球数、Ht値およびHb量は正常魚のそれらと比較して有意に低く、病魚の赤血球指数についてはMCHCの低下がみられた。

赤血球の電顕像：全体的に赤血球内のミトコンドリア量は増加しており（Fig. 3）、それらは基質が腫脹したものの、全体構造が変形し円形に膨化しているものなど種々の異常を呈するものがみられた（Fig. 4）。特異的な物質

Table 1. Comparison of hematological parameter between diseased and healthy fish.

	Diseased (n=20)	Healthy (n=20)
RBC ($\times 10^4/\text{mm}^3$)	60.9 $\pm$ 28.5 ^{a),*}	123.0 $\pm$ 16.9
Ht (%)	19.3 $\pm$ 7.6*	39.4 $\pm$ 19.3
Hb (g/dl)	4.0 $\pm$ 1.6*	10.2 $\pm$ 1.5
MCV (μm^3)	337.0 $\pm$ 70.0	326.6 $\pm$ 47.7
MCH (pg)	72.6 $\pm$ 21.3	84.5 $\pm$ 17.0
MCHC (%)	21.4 $\pm$ 4.0*	26.0 $\pm$ 4.0
Immature erythrocytes (%)	31.2 $\pm$ 24.8*	4.4 $\pm$ 3.9

^{a)} Mean $\pm$ S. D.

* P < 0.01.

の沈着は円形に膨化したものの内部に観察されたが、最終的にそれらが封入体様構築物になるものと思われた (Fig. 5, 6)。

器官・組織の病理学的所見

心臓：心室の心筋線維の横紋の消失や空胞変性および凝固壊死がみられ、それに伴い炎症性細胞や線維芽細胞の出現も認められた (Fig. 7)。また、全体的に内皮細胞の活性化がみられた。電顕的には筋線維の構築の乱れや空胞変性、グリコーゲン顆粒の減少、膨化したミトコンドリアや筋小胞体および脂肪滴の増加がみられた (Fig. 8)。心筋線維が変性していない個体では、健康魚に比べて著明な心筋線維の肥大や走行異常および交錯像がみられた。心房では心室と同様な病変がみられたが、とくに内皮細胞の活性化と赤血球の貯留が顕著であった。また、個体によっては心外膜への出血がみられた。

脾臓：静脈内や莢組織に存在しているマクロファージ様細胞および細胞内皮細胞は多量にヘモジデリンを貪食しており (Fig. 9)、同時にチールネルゼン染色に弱陽性、ズダン III 染色に陽性、ズダン黒 B 染色に陽性およびシュモール反応に陽性に反応するセロイド様物質（ここではパラフィン切片に残るセロイドやリポフスチンを含む過酸化脂質を指している）やルクソールファースト青染色に陽性に反応するリン脂質などもその胞体内に認められた (Fig. 10)。電顕観察でもマクロファージ様細胞内に、セロイド物質と思われる電子密度の高から中等度の顆粒で満たされた大小不同の小体や層状に渦巻く像が観察され (Fig. 11, 12)、ヘモジデリンも電子密度の高いシデロゾームとして認められた。また、同時に赤血球の貪食像もみられた。

腎臓：脾臓と同様に間質造血組織内のマクロファージ様細胞や細網内皮細胞にヘモジデリンやセロイド様物質およびリン脂質などが高度に検出され、電顕的にも脾臓で観察されたものと同様の像が観察された。しかし、糸球体や尿管には著変は認められなかった。

肝臓：肝細胞は萎縮しており、肝細胞の連続性が失われ、類洞周囲に浮腫および血漿成分の貯留が観察された (Fig. 13)。また、中心静脈周囲の肝細胞に空胞変性および壊死が観察されることもあった。また、肝細胞内にヘモジデリンの取り込みがみられたが、脾臓や腎臓でみられたセロイド様物質やリン脂質などの取り込みは軽度であり、それらはマクロファージ様細胞内に多く観察された。肝細胞内脂肪は正常魚と比較してやや多い傾向にあったが、そのことに起因すると思われる変性像は観察されなかった。電顕観察では肝細胞の空胞変性と滑面小胞

体の増生および細胞質内にヘモジデリンの沈着が観察された。また、光顕でみられたセロイド様物質は肝細胞内にも認められたが、それは主としてマクロファージ様細胞内に認められ、その構造は脾臓および腎臓でみられたものと同様であった (Fig. 14)。なお、ホール法を試みたが、この手法では胆汁色素の確認はできなかった。

鰓：鰓薄板毛細管内の赤血球の減少がみられた以外に著変は認められなかった。

消化管：胃、幽門垂および腸管の各部位には著変は認められなかった。また、消化管内容物については固定時にその内容を除去したために、その組織化学的検討ができなかった。

考 察

本論文中で病理組織学的に検査された病魚に見出されたウイルスについて、原田ら (1988) はウイルス粒子の直径が 74-98 nm の球形状を呈し、外殻は明瞭で電子密度の高い直径 30-36 nm のコアを包んでいたことから、ウイルスの直径が VEN に比べて半分以下であると述べている。従って本病は HOLT and ROHOVEC (1984) および LEEK (1987) によって報告された Erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) に類似しているように思われる。

VEN によって引き起こされるタラおよびニシンの貧血は正球性正色素性であり (RENO *et al.*, 1985)、フェニールヒドラジンを用いた魚類の実験的溶血性貧血では、マスノスケでは小球性低色素性 (SMITH *et al.*, 1971)、コイでは正球性正色素性である (KAWATSU, 1972) ことが報告されているが、今回観察したギンザケでは正球性低色素性の貧血であった。しかし、幼若赤血球の出現率の増加や赤芽球などが認められたこと、さらに脾臓および腎臓に赤血球の崩壊に起因するヘモジデリンの高度な沈着がみられたことなど、ギンザケでの貧血は溶血性貧血と判断された。

本病の成立は最初にウイルスが赤血球に感染することにより始まり、次いでミトコンドリアが障害されることにより赤血球の ATP 産生が不十分になり、その結果として赤血球に形態変化が生じ、これらの細胞が脾臓で貪食されたり、または膜の脆弱化によって溶血し貧血が引き起こされるものと推測された。RENO *et al.* (1985) はタラの VEN に赤血球の ATP の低下を報告し、同様の考察を行なっている。

重度の貧血状態が長期的に継続すると各臓器に酸素不足が生じ、機能障害が生じるものと考えられる。また、

赤血球がウイルスに感染していない場合にもミトコンドリアに障害が観察されることがあるが、それは低酸素による影響と思われ、このことが細胞内呼吸を活化化するためにミトコンドリア数が増加していた原因と考えられた。また、生体内の酸素欠乏は好氣的解糖を中心とする心筋や肝細胞の代謝障害をひきおこすと考えられるが、心筋線維にみられた病変はブタやイヌの虚血状態時にみられるものと極めて類似していた (FUJIWARA *et al.*, 1982; KANEKO *et al.*, 1986)。心筋線維の壊死は血液の拍出を困難とし、さらに低酸素状態をひきおこすものと思われるが、このことが肉眼的に心房の血液貯留と出血がみられた原因と考えられた。また、心筋線維に著明な退行変性がみられない個体では心筋線維の肥大、筋線維の走行異常および交錯像がみられたことから、感染初期の貧血に対して心臓の負荷が亢進しているものと思われる。肝臓でも中心静脈周囲に空泡変性および壊死がみられたことから、これらは心臓と同様に低酸素状態によるものと考えられた。いっぽう、溶血に由来するヘモジドリンは肝細胞やその他の臓器の実質細胞、マクロファージ様細胞内に高度に観察されており、ヘモジドリン沈着による機能障害なども全身状態の悪化を引き起こしていたものと推察された。また、循環血中および脾臓、腎臓、肝臓のマクロファージ様細胞や一部の肝細胞内に、赤血球膜由来と考えられるリン脂質や多量のヘモジドリンおよびセロイド様物質の取り込みが観察された。このことは各組織にこの過酸化脂質が増加していることを示唆しており、このために各組織の細胞、とくに赤血球が障害をうけ溶血がさらに亢進していくものと考えられた (PRYOR, 1976; RODERS, 1978)。なお、セロイド様物質はリン脂質などの多価不飽和脂肪酸が過酸化され形成されるものであるが、生体内の低酸素状態がこの過酸化を促進させるといわれている (YOSHIKAWA *et al.*, 1982a, 1982b)。

組織中にビリルビンやビリベルジンなどの胆汁色素を証明することはできなかったが、肝細胞の滑面小胞体が増生していたことからビリルビン代謝に対して過負荷の状態にあったことが推察された。しかも肝機能は低酸素症やセロイド様物質およびヘモジドリンの沈着により低下していることは明白であり、また、肝臓の黄化は飽合しきれないビリルビンが増加したためと推察された。

肝臓の類脂肪変性は変敗餌飼料またはビタミン E 欠乏の餌飼料によって起こることが知られているが (ROALD, 1976; ROALD *et al.*, 1981; SMITH *et al.*, 1971; SMITH, 1979; 厚田ら, 1988)、同時に栄養性ミオパチーを

も伴うとされている (延東ら, 1979; 窪田ら, 1980, 1981; 宮崎ら, 1981)。これらの餌飼料由来の中毒の場合、骨格筋組織のミオパチーと消化管を含めた内臓諸器官などにおけるセロイドの沈着が観察されているが、本症例の場合にはセロイド様物質の沈着は主に脾臓および腎臓のマクロファージ様細胞内にみられ、肝細胞内にはまれであったこと、さらに消化管粘膜下織には認められなかったことから、過酸化物質による病変の由来は生体内の細胞膜に由来していると考えられた。

赤血球の細胞質内にみられた封入体様構築物は電顕観察によりミトコンドリアが形態変化したものに、特異な物質が沈着して出来たものであり、ウイルスに直接関係するものではないと思われた。タラ、大西洋ニシンおよび太平洋サケの VEN にみられる封入体の形成 (APPY *et al.*, 1976; WALKER and SHERBURNE, 1977; EVELYN and TRAXLER, 1978; RENO and NICHOLSON, 1981; MEYERS *et al.*, 1986) について詳細な記載がされていないために、その形成法が同一であるか否かは今後の検討課題であると思われる。

ウイルスが赤血球に感染した場合、溶血を示唆する病理所見は RENO *et al.* (1985) および MEYERS *et al.* (1986) によっても報告されているが、低酸素やセロイド様物質の影響に関する報告はみられない。

原因ウイルスの分離・培養は現時点において成功していないが、MACMILLAN and MULCAHY (1979) および MACMILLAN *et al.* (1980) は chum salmon を用いた人為感染試験の場合、Ht 値が 28 日後には 4% に低下すること、*V. anguillarum* 感染による斃死が高まること、酸素低下に敏感になること、さらに海水中における Na と K の調節能が低下するなどを報告している。また、NICHOLSON and RENO (1981) は人為感染ニシンとタラが致死することはないもののストレスに弱くなること、赤血球が溶解しやすくなることなどを報告している。いっぽう、RENO *et al.* (1986) はタラの人為感染魚では幼若赤血球が増加することを報告している。これらのいずれの報告でも魚はウイルス感染のみでは斃死することはないとされているが、アラスカのニシンでは高い斃死率を伴う症例が報告されていることから (MEYERS *et al.*, 1986)、ウイルスの病原性については今後さらに検討される必要があろう。

VEN の感染経路については垂直感染 (ROHOVEC and AMANDI, 1981) と水平感染 (MACMILLAN and MULCAHY, 1979) のいずれもが可能であるとされているが、わが国におけるギンザケの EIBS 様の症例では同時期的に

大量に発症することから、水平感染の可能性が高いのではないかと考えられた。

なお、本研究を通じて本症とビブリオ病および BKD との混合感染（同時流行的）も多くみられたが、本研究ではウイルスの単独感染例についてのみ詳査した点を付記する。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、現場での採材に御協力をいただいた大洋飼料株式会社の皆様に謝意を表します。

文 献

- APPY, R. G., M. D. B. BURT and T. J. MORRIS (1976): Viral nature of piscine erythrocytic necrosis (PEN) in the blood of Atlantic cod (*Gadus morhua*). *J. Fish. Res. Board Can.*, **33**, 1380-1385.
- 原田静男・小林一裕・酒井正博・小林正典 (1988): 養殖ギンザケにおける肝臓の類脂肪変性について。魚病研究, **23**, 205-206.
- 絵面良男・山本啓之・吉水 守・田島研一・三戸秀敏・池田和夫・佐古 浩・原 武史・木村喬久 (1984): 海面養殖開始直後に発生したギンザケのせつそう病について。魚病研究, **19**, 75-80.
- 延東 真・宮崎照雄・窪田三朗・大林萬輔・長野泰三・松本紀男 (1979): 養殖魚の栄養性ミオパチー症候群に関する研究—II. 種苗生産中に発生したトラフグの栄養性ミオパチー症について。魚病研究, **13**, 183-187.
- EVELYN T. P. T. and G. S. TRAXLER (1978): Viral erythrocytic necrosis: natural occurrence in pacific salmon and experimental transmission. *J. Fish. Res. Board Can.*, **35**, 903-907.
- FUJIWARA, H., A. MUHAMMAD, S. SATO and R. W. MILLARD (1982): Transmural cellular damage and blood flow distribution in early ischemia in pig hearts. *Circ. Res.*, **51**, 683-693.
- 早川 穰・原田隆彦・畑井喜司雄・窪田三朗・文谷俊雄・星合愿一 (1989): 海面養殖ギンザケにみられた細菌性腎臓病 (BKD) の病理組織学的研究。魚病研究, **23**, 17-21.
- 原田隆彦・早川 穰・畑井喜司雄・窪田三朗・文谷俊雄・星合愿一・澤 伸介 (1988): 海面養殖ギンザケにみられた一疾病について。魚病研究, **23**, 271-272.
- HOLT, R., and J. ROHOVEC (1984): Anemia of coho salmon in Oregon. *Am. Fish. Soc. Fish Health Sect. Newsl.*, **12**: 4.
- KANEKO, N. and M. TAKEISHI (1986): New theory on the pathogenesis of acute myocardial infarction. *Jpn. Circ. J.*, **50**, 198-212.
- KAWATSU, H. (1972): Studies on the anemia of fish—IV: Hemolytic anemia of common carp induced by injections of phenylhydrazine hydrochloride. *Bull. Freshwater Fish. Res. Lab.*, **21**, 139-149.
- KIMURA, T., M. YOSHIMIZU and M. TANAKA (1981): Studies on a new virus (OMV) from *Oncorhynchus mason-II*. Oncogenic nature. *Fish Pathol.*, **15**, 149-153.
- 窪田三朗・舟橋紀男・延東 真・宮崎照雄 (1980): 養殖魚の栄養性ミオパチー症候群に関する研究—I. ブリの栄養性ミオパチー。魚病研究, **15**, 75-80.
- 窪田三朗・宮崎照雄・津田茂美・糟谷浩一 (1981): 養殖魚の栄養性ミオパチー症候群に関する研究—IV. ニジマスに激しいセロイド症をともなう栄養性ミオパチー。三重大水産研報, **8**, 107-115.
- LEEK, S. L. (1987): Viral erythrocytic inclusion body syndrome (EIBS) occurring in juvenile spring chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) reared in freshwater. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **44**, 685-688.
- MACMILLAN, J. R. and D. MULCAHY (1979): Artificial transmission to and susceptibility of puget sound fish to viral erythrocytic necrosis (VEN). *J. Fish. Res. Board Can.*, **36**, 1097-1101.
- MACMILLAN, J. R., D. MULCAHY and M. Landolt (1980): Viral erythrocytic necrosis: Some physiological consequences of infection in chum salmon (*Oncorhynchus keta*). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **37**, 799-804.
- MEYERS, T. R., A. K. HAUCK, W. D. BLANKENBECKLER and T. Minicucci (1986): First report of viral erythrocytic necrosis in Alaska, USA, associated with epizootic mortality in Pacific herring, *Clupea harengus pallasii* (Valenciennes). *J. Fish Dis.*, **9**, 479-491.
- 宮崎照夫・窪田三朗 (1981): 養殖魚の栄養性ミオパチー症候群に関する研究—V. 変敗蚕蛹投与によるコイの背こけ症状。三重大水産研報, **8**, 117-129.
- NICHOLSON, B. L. and P. W. RENO (1981): Viral erythrocytic necrosis (VEN) in marine fishes. *Fish Pathol.*, **15**, 129-133.
- PRYOR, W. A. (1976): Free radical reactions in biological systems. In "Free radicals in biology", Vol. 1. (ed. by W. A. PRYOR). *Academic Press, New York*. pp. 1-49.
- RENO, P. W. and B. L. NICHOLSON (1981): Ultrastructure and prevalence of viral erythrocytic necrosis (VEN) virus in Atlantic cod, *Gadus morhua* L., from the northern Atlantic Ocean. *J. Fish. Dis.*, **4**, 361-370.
- RENO, P. W., D. V. SERREZE, S. K. HELLYER and B. L. NICHOLSON (1985): Hematological and physiological effects of viral erythrocytic necrosis (VEN) in Atlantic cod and herring. *Fish Pathol.*, **20**, 353-360.
- RENO, P. W., K. KLEFTIS, S. W. SHERBURNE and B. L. NICHOLSON (1986): Experimental infection

- and pathogenesis of viral erythrocytic necrosis (VEN) in Atlantic cod, *Gadus morhua*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, **43**, 945-951.
- ROALD, S. (1976): An outbreak of liver lipid degeneration (LLD) in Atlantic salmon in a fish farm and attempts to cure the disease. *Nordisk Veterinaermedicin*, **28**, 243-248.
- ROALD, S. O., D. ARMSTRONG and T. LANDSVERK (1981): Histochemical, fluorescent and electron microscopical appearance of hepatocellular ceroidosis in the Atlantic salmon *Salmo salar* L. *J. Fish. Dis.*, **4**, 1-14.
- RODERS, M. K (1978): NADPH-dependent microsomal lipid peroxidation and problem of pathological action at a distance; New data on induction of red cell damage. *Biochem. Pharmacol.*, **27**, 437-443.
- ROHOVEC, J. S. and A. AMANDI (1981): Incidence of viral erythrocytic necrosis among hatchery reared salmonids of Oregon. *Fish Pathol.*, **15**, 135-141.
- SMITH, C. E., L. R. MCLAIN and W. S. ZAUGG (1971): Phenylhydrazine induced anemia in chinook salmon. *Toxicol. Appl. Pharm.*, **20**, 73-81.
- SMITH, C. E. (1979): The prevention of liver lipid degeneration (ceroidosis) and microcytic anemia in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson fed rancid diets: a preliminary report. *J. Fish. Dis.*, **2**, 429-437.
- 田島研一・吉水 守・絵面良男・木村喬久 (1981): 我が国の海面養殖ギンマスに発生したビブリオ病原菌について. 日水誌, **47**, 35-42.
- WALKER, R. and S. W. SHERBURNE (1977): Piscine erythrocytic necrosis virus in Atlantic cod, *Gadus morhua*, and other fish: ultrastructure and distribution. *J. Fish. Res. Board Can.*, **34**, 1188-1195.
- YOSHIKAWA, T., Y. FURUKAWA, Y. WAKAMATSU, H. TANAKA, S. TAKEMURA and M. KONDO (1982): The increase of thiobarbituric acid reacting substances in rats with experimental chronic hypoxia. *Experientia*, **38**, 312-313.
- YOSHIKAWA, T., Y. FURUKAWA, Y. WAKAMATSU, S. TAKEMURA, H. TANAKA and M. KONDO (1982): Experimental hypoxia and lipid peroxide in rats. *Biochem. Med.*, **27**, 207-213.
- YOSHIMIZU, M., M. TANAKA and T. KIMURA (1987): *Oncorhynchus masou* virus (OMV): Incidence of tumor development among experimentally infected presentative salmonid species. *Fish Pathol.*, **22**, 7-10.

Explanation for the Figures

- Fig. 1. A body of inclusion like structure (arrow) in the cytoplasm of an erythrocyte. GIEMSA stain, Scale: 2.5 μ m.
- Fig. 2. Nuclear segmentation in erythrocytes (arrows). GIEMSA stain, Scale: 5 μ m.
- Figs. 3-6. Electron micrographs (TEM) of erythrocytes. 3, Increase of mitochondria in the cytoplasm (Scale: 1 μ m). 4, Swelling of mitochondria accompanied by a loss of mitochondrial cristae in a virus-infected erythrocyte (Scale: 0.5 μ m). 5, Swollen mitochondria which deposits electron dense materials (Scale: 1 μ m). 6, A body of inclusion like structure consisting of electron dense materials deposited in swollen mitochondria (Scale: 1 μ m).
- Fig. 7. Coagulation necrosis of muscle fibers and infiltration of inflammatory cells in the ventricle. H-E stain, Scale: 0.3 mm.
- Fig. 8. Electron micrograph of the ventricle muscle, showing the disorder and vacuolar degeneration of the muscle fibers, the increase of swollen mitochondria, the sarcoplasmic reticulum and lipid droplets. Scale: 5 μ m.
- Fig. 9. Macrophage-like cells containing haemosiderin pigments in the spleen. Berlin blue stain, Scale: 0.1 mm.
- Fig. 10. Macrophage-like cells containing ceroid-like materials in the vessel and parenchymal tissue of the spleen. ZIEHL-NEELSEN stain, Scale: 0.2 mm.
- Fig. 11. Electron micrograph of the spleen, showing the deposition of various sizes of ceroid-like materials within macrophage-like cells. Scale: 5 μ m.
- Fig. 12. Electron micrograph of the spleen, showing layered ceroid-like materials in a macrophage-like cell. Scale: 2 μ m.
- Fig. 13. Disorder of hepatocytic disposition and edema in the surrounding sinusoid of the liver. H-E stain, Scale: 0.2 mm.
- Fig. 14. Electron micrograph of the liver, showing vacuolar degeneration and hyperplasia of smooth endoplasmic reticulum. Note ceroid-like materials in a macrophage-like cell (arrow). Scale: 5 μ m.