養殖ウナギ (*Anguilla japonica*) の“鰓うっ血症” に関する病理組織学的研究

井上 潔^{*1}・三輪 理^{*1}・青島秀治^{*2}
岡 英夫^{*3}・反町 稔^{*4}

(1993 年 12 月 9 日受付)

A Histopathological Study on the Etiology of Intense Congestion of the Gills of Japanese Eel, *Anguilla japonica*

Kiyoshi Inouye^{*1}, Satoshi Miwa^{*1}, Hideharu Aoshima^{*2},
Hideo Oka^{*3} and Minoru Sorimachi^{*4}

^{*1}National Research Institute of Aquaculture, Inland Station, Tamaki, Mie 519-04, Japan

^{*2}Hamana Branch, Shizuoka Prefectural Fisheries Experiment Station,
Maisaka, Shizuoka 431-02, Japan

^{*3}Fuji Trout Hatchery, Shizuoka Prefectural Fishery Experiment Station

^{*4}National Research Institute of Aquaculture, Nansei, Mie 516-01, Japan

(Received December 9, 1993)

Histopathology of the disease, which was reported to be characterized by intense congestion in central venous sinuses of gill filaments found in cultured eel was studied with spontaneously diseased fish and experimentally infected fish by light and electron microscopy. Experimental infection produced similar histopathological changes to those observed in the spontaneously diseased fish. In gill filaments of diseased fish, dilatation of the central venous sinuses was observed. In the liver, hemorrhage in the parenchyma and destruction of blood vessels were observed. Furthermore, hemorrhage in the haematopoietic tissue and degeneration of blood vessels and glomeruli were observed in the kidney. These pathological changes were always accompanied by degeneration of endothelial cell nuclei of blood vessels. The degeneration of the nuclei were characterized by swelling, intense staining of the nuclear rim with hematoxylin, and a homogenous appearance of the nucleoplasm. Electron microscopy revealed hexagonal viral particles in the nuclei of the degenerated endothelial cells. Each virion measured about 80 nm in diameter. The virions were observed only in the degenerated endothelial cells. These results suggest that the disease of cultured eel is a systemic viral infection, which is characterized by the necrosis of endothelial cells of blood vessels.

1983 年頃より静岡県下の養殖ウナギ (*Anguilla japonica*) に、*Flexibacter columnalis* や *Cytophaga* sp. による感染症とは症状の異なる。鰓の障害を伴った疾病が発生し、1985 年以降、広範囲に流行がみられるようになっていく。これらの病魚は鰓弁の著しい充血と腹腔内の出血を特徴とし、鰓の肉眼的所見から業者間では棒状出血と

呼称された。江草ら (1989) は病魚の鰓の病理組織観察結果から、鰓の病変が鰓弁の中心静脈洞の血液の充満と拡張であることを報告し、本症を“鰓うっ血症”と呼ぶことを提案した。本症の原因については一連の魚病対策技術開発研究において静岡水試浜名湖分場 (岡・田中; 1986, 大上・田中; 1987) で検討され、さらに田中・江草 (1992) によって濾過性病原体の可能性なども検討されたが、結論をみるには至らなかった。

著者らは、本症の自然発病魚および実験感染魚を用いて、病理組織学的手法による原因解明を試みた。

^{*1} 養殖研究所玉城庁舎

^{*2} 静岡県水産試験場浜名湖分場

^{*3} 静岡県水産試験場富士養鰻場

^{*4} 養殖研究所南勢庁舎

材料と方法

1991年6月に静岡県新居町の養鰻場で採集した自然発病魚3尾および健康魚3尾を供試した。また同年に静岡水試浜名湖分場において実施した本症の感染実験、すなわち自然発病魚の鰓および肝臓の磨砕液を0.45 μmのメンブランフィルターで濾過し、その濾液を腹腔内に接種したウナギ（平均体重25.6g）から外観的症状により、重症魚および中程度の個体、外観的に異常が認められない個体（軽症魚）の3尾を選び実験材料とした。

材料魚は外観および剖検所見を記載後、鰓および体軀幹部（皮膚・筋肉）、肝臓、腎臓、脾臓、心臓、胃、消化管を切り出し、10%ホルマリン液で固定したのち、常法によりパラフィン切片を作製した。切片はヘマトキシリン・エオシン染色して光顕観察に供した。また同部位をKarnovsky液と1%オスミウム酸で二重固定し、エタノール系列で脱水後、Spurr樹脂(TAAB)に包埋した。樹脂包埋試料はウルトラミクロトーム(RMC・MT6000)を用いて超薄切片および準超薄切片を作製し、超薄切片

は酢酸ウラン溶液とクエン酸鉛溶液による二重染色の後、電子顕微鏡(JEOL JEM100CX型)観察に、また準超薄切片は1%トルイジンブルー液で染色し光顕観察に供した。

結 果

肉眼所見

材料魚の肉眼所見をTable 1に示した。自然発病魚では3尾とも鰓弁の中心静脈洞にうっ血(江草ら, 1989)が観察された。また胸鰭や腹鰭の発赤、腹水の貯留や腹腔内の出血、肝臓の発赤や出血も観察された。一方、実験感染魚では3尾中2尾に鰓弁の中心静脈洞のうっ血や腹水の貯留、腹腔内の出血のほか、体表や鰭の発赤、消化管表面血管の拡張、肝臓のうっ血や出血、全身の浮腫などが観察された。しかし残りの1尾には外観や鰓、内臓の異常は認められなかった。

病理組織学的所見

自然発病魚3尾と肉眼的に上記の病変が確認された実

Table 1. Body weight (BW), body length (BL) and symptoms of eel examined in this study

	No.	BW (g)	BL (cm)	Symptoms
Spontaneously diseased fish	1	27.7	28.0	Congestion* in the gills
	2	41.2	30.8	Congestion* in the gills Reddening of fins Hemorrhage in the liver
	3	38.2	31.1	Congestion* in the gills Atrophy of the liver Congestion in the liver
Experimentally infected fish	1	69.5	34.4	Congestion* in the gills Pale gills Systemic edema Mandibular reddening Hemorrhage in the abdominal cavity Hemorrhage in the liver
	2	27.0	29.7	Congestion* in the gills Congestion in the liver Hemorrhage in the abdominal cavity
	3	65.8	37.2	Slight ascites
Control	1	28.0	31.4	No signs
	2	37.7	29.1	No signs
	3	25.8	27.8	No signs

*: Congestion of CVS.

験感染魚2尾の光顕および電顕による組織学的所見は基本的に一致し、全身の血管系の異常を特徴とした。

鰓: 光顕観察では鰓弁の中心静脈洞の拡張が顕著で、部位によって血液が流入する場合と、拡大、空洞化を呈する場合の両者が観察された。拡張した中心静脈洞のほか、小出鰓動脈や小入鰓動脈、鰓薄板の血液流路などの血管系全般にわたって、核が肥大して内部の染色性が低下し、周囲が核膜にそって過染状態を呈する、変性した血管内皮細胞が観察された (Figs. 1, 2)。これらの変性した血管内皮細胞では肥大した核の核膜にそってクロマチ

ンが偏在し、核の中央部に特異な繊維様構造が観察され、この繊維様構造中に直径約 80nm の正 20 面体のウイルス粒子が散在して認められた (Figs. 3, 5)。同様のウイルス粒子は壁柱細胞の核内にも観察された (Fig. 4)。

体軀幹部: 発赤の見られた体軀幹部の光顕観察では、真皮の表皮基底部直下や緻密結合織下の血管の拡張と血液のうっ滞、真皮緻密結合織や真皮下の筋肉内への出血像が認められた。

肝臓: 実質細胞には顕著な変性は認められなかった。表面を走る太い動脈では外膜の変性が顕著で、膠原繊維性

Fig. 1. Degeneration of an endothelial cell (arrow) in central venus sinus (C). The degeneration of the endothelial cell is characterized by swelling of the nucleus and a homogenous appearance of the nucleoplasm. Bar=20 μ m

Fig. 2. Afferent filament artery in a gill filament. Arrow shows a degenerated endothelial cell. Bar=20 μ m.

Fig. 3. Electron micrography of the degenerated endothelial cell (E1) indicated by the arrow in Fig. 2. Arrow heads show virions in nucleus. Inset (top right) showing high magnification of virions. E2: normal endothelial cell. Bar=1 μ m.

Fig. 4. Electron micrograph of a pillar cell (P) in a gill lamella. Arrow shows virions in nucleus of the pillar cell. E, Erythrocyte; Ep, Epithelial cell. Bar=2 μ m.

Fig. 5. Electron micrograph of a degenerated endothelial cell of central venus sinus. Note regularly arranged filamentuouse structures in the center of the nucleus (N). Arrow shows virions. Bar=1 μ m.

結合組織の配列の乱れや膨潤が認められ、血管の内膜には鰓の血管系に見られたものと同じ形態の血管内皮細胞の変性・壊死と周囲組織中への出血像が観察された。これらの大型の動脈のほかに、肝組織中に分布する静脈や肝類洞などの血管系においても、うっ血や血管壁の崩壊と周囲組織中への出血 (Fig. 6)、血管周囲の肝実質細胞の

変性像が観察された。崩壊した血管やその周囲の肝実質細胞の電顕観察では、鰓の場合と同様に、血管内皮細胞の変性とその核内にウイルスの増殖像が観察された。しかし血管内皮細胞以外の細胞ではウイルスの増殖は認められなかった。

腎臓: 造血組織内への出血のほか、血管の拡張や血液の

Table 2. Localization of degenerated endothelial cells and virions in several organs of examined eel

	No.	Gills	Liver	Kidney	Spleen	Heart	Stomach
Spontaneously diseased fish	1	++	NT	NT	NT	NT	NT
	2	++	+	+	NT	NT	NT
	3	++	++	++	++	NT	NT
Experimentally infected fish	1	++	++	++	++	++	++
	2	++	—	+	—	NT	—
	3	—	—	—	—	NT	NT
Control	1	—	—	—	—	—	NT
	2	—	—	—	—	—	NT
	3	—	—	—	—	NT	NT

++: Both degenerated endothelial cells and virions were observed.

+: Degenerated endothelial cells were observed by light microscopy. Electron microscopic examination was not carry out.

—: Neither degenerated endothelial cells nor virions were observed.

NT: Histopathological observation was not carry out.

Fig. 6. Degeneration of blood vessel (Arrow head) and hemorrhage in the liver. Bar=20 μ m.

Fig. 7. Kidney of a diseased eel. Arrows show degenerated endothelial cells in the glomerulus and a blood vessel. Bar=20 μ m.

Fig. 8. Electron micrograph showing a degenerated endothelial cell (E) in a capillary of glomerulus. Arrows show virions. P, Podocyte; M, Mesangium cells. Bar=1 μ m.

うっ滞が顕著で、これらの血管には変性した血管内皮細胞がいたるところに観察され、血管内皮細胞の変性は糸球体の毛細血管にも認められた (Fig. 7)。血管系の異常のほかに尿管管には上皮細胞の核融解像も観察された。電顕観察では変性した血管内皮細胞の核内にウイルス粒子が観察されたが (Fig. 8)。尿管管上皮細胞の変性部位にはウイルス粒子は認められなかった。

脾臓: 毛細血管の内皮細胞の変性が顕著で (Fig. 9)、一部には比較的大きな動脈の崩壊と動脈壁内への出血像も見られた。

心臓: 心臓の表面を走る血管や心内膜に血管内皮細胞の変性が観察された (Fig. 10)。

胃・消化管: 消化管の粘膜固有層や粘膜下組織、漿膜下

組織に分布する血管の拡張と血液のうっ滞が観察され、粘膜下組織への激しい出血像がみられた。また、胃においても漿膜下組織や筋層で同様の症状が認められた (Fig. 11)。電顕観察では、これらの血管に変性・壊死した血管内皮細胞が観察され、細胞内にはウイルス粒子が認められた (Fig. 12)。

血管内皮細胞の変性およびウイルス粒子の検出状況

光顕および電顕観察結果から、血管内皮細胞の核内にみられたウイルス粒子とウイルスに起因すると考えられる血管内皮細胞核の変性像の検出状況を Table 2 に示した。

3尾の自然発病魚ではすべての個体で血管内皮細胞核

Fig. 9. Degenerated endothelial cells (arrow heads) of a blood vessel in the spleen. Bar=20 μ m.

Fig. 10. Degenerated endothelial cell (arrow) in the heart. M: Cardiac muscle. Bar=20 μ m.

Fig. 11. Blood vessel in Muscularis of the stomach wall. Arrows show degenerated endothelial cells. Arrow head shows hemorrhage in muscularis. Bar=20 μ m.

Fig. 12. Electron micrograph of the blood vessel (C) shown in Fig. 11. A necrotized endothelial cell (E) is coming off from the wall (arrow head). Bar=2 μ m.

の変性とウイルス粒子が確認された。一方、実験感染魚では、重症魚については自然発病魚と同様の結果が得られた。また外観から中程度の症状と判断した個体では鰓と腎臓でウイルス粒子や内皮細胞の変性が観察されたものの、肝臓、脾臓、胃では血管内皮細胞の変性やウイルス粒子は認められなかった。軽症魚では血管内皮細胞の変性もウイルス粒子も観察されなかった。

対照群として供試した健康魚には、病魚に観察されたような異常はまったく認められなかった。

考 察

ウナギの鰓うっ血症は、発生当初、原因としてストレスによる生理障害、Mg 欠乏による循環器障害などが考えられたが、いずれも原因として特定されるには至らな

かった。その後、永井・小野^{*1,2}および小野ら^{*3}は電顕観察および実験感染の結果から、本症はウイルス感染症の可能性が高いこと、さらに田中・江草 (1992) は病魚鰓の磨砕濾液を健康魚に接種することにより鰓弁の中心静脈洞のうっ血を再現し、本症の原因として濾過性病原体の可能性あることを報告した。一方、本症の病理学的所見に関する報告は少なく、江草ら (1989) が鰓に局限して詳細に記載しているに過ぎない。

本研究では病魚臓器の磨砕濾液を健康なウナギに接種して鰓うっ血症を再現させ、自然発病魚と併せて、光顕および電顕観察によって病理組織学的に観察し、本症の原因について考察した。

鰓の光顕観察結果は、江草ら (1989) の記載した病魚の鰓の病理組織学的変化と基本的には一致した。一方、本研究における病理組織学的観察結果では、血管内皮細胞核の変性に代表される病変が鰓のみならず肝臓や腎臓など主要臓器をはじめとする全身の組織・器官で認められた。またそれらの変性内皮細胞の電顕観察によって、その核内に直径約 80 nm の正 20 面体ウイルス粒子が多

*1 永井・小野 (1988a): 昭和 63 年度日本魚病学会大会講演。

*2 永井・小野 (1988b): 昭和 63 年度日本魚病学会ワークショップ講演。

*3 小野真一・岩村宙史・永井 彰 (1991): 平成 3 年度日本魚病学会大会講演。

数観察された。ウイルスの増殖は血管内皮細胞以外の細胞にはまったく認められず、ウイルスの増殖に伴って血管内皮細胞が壊死し、やがて血管自体の崩壊が起こることを推測させる組織像も観察されたこと (Fig. 12) から、本ウイルスの標的細胞は血管内皮細胞と考えられた。また各臓器中の血管組織や血管周囲の組織変性など、病魚組織の変化とウイルスの増殖には明瞭な因果関係が認められ、病魚の血管内皮細胞の核内に観察されたウイルス粒子が本症の原因であることが強く示唆された。

現在、本ウイルスの分離培養に成功していないため、厳密には本症の原因を当該ウイルスに帰することはできないが、自然発病魚の病理組織学的変化は病魚磨砕濾液を用いた感染実験により正確に再現されており、両者のウイルス粒子の形態、大きさ、増殖部位も一致したことから、本症はウイルス感染による全身的な血管系の障害が死亡の主原因であり、鰓の障害はその一局面とみるのが妥当と考える。

血管内皮細胞は、連続した単層をなして血管内皮を覆っており、極めて多彩な機能を持つことが知られている。哺乳類などでは血液循環、止血や血栓形成、血管の新生、免疫、炎症など生体内の各種の生理的あるいは病的反応に深く関わっている (三井・今村, 1987)。魚類の血管内皮細胞の機能についてはいまだ良く解っていないが、哺乳類に類似する機能を持っているであろうことは十分に推測される。したがって、鰓うっ血症魚では、ウイルス感染による血管内皮細胞の変性によって血管の機能が障害され、血液の循環機能をはじめとする生理維持機能が低下し、全身的に血液のうっ滞が起こる。また血管内皮細胞の変性・壊死と相まって血管が崩壊し、全身的な出血性の障害を引き起こし、肝臓や腎臓などの主要臓器の実質組織の変性に伴う生理障害を経て、病魚は死に至ると推測される。

永井・小野^{*1}は病魚鰓の鰓薄板の毛細血管と壁柱細胞の核内に、直径が 70 nm で正六角形のアンテナ様の突起をもったアデノ様ウイルス粒子を観察している。著者らの観察したウイルスは粒子の大きさに若干の相違があるものの、粒子の形態やウイルスの増殖部位、細胞病理変化が類似することから、永井・小野^{*1}の報告したウイルスと同種の可能性もある。しかし、本ウイルス分類学的位置については、今後のウイルスの分離培養とウイルス学的検討を待たなければならない。

以上のことから、本症は全身的な血管内皮細胞壊死を主因とするウイルス感染症と考えるのが妥当であり、本症の病名をウナギのウイルス性血管内皮壊死症 (Viral endothelial cell necrosis of eel; VECNE) とすることを提案したい。

謝 辞

本研究の遂行にあたりご助言、ご指導を賜った江草周三博士に深謝する。

文 献

- 江草周三・田中 真・大上皓久・岡 英夫 (1989): 養殖ニホンウナギの鰓の強度鬱血の病理組織学的観察. 魚病研究, **24**, 51-56.
- 大上皓久・田中 真 (1987): 鰓病の感染・発病条件に関する研究. 同上 No. 257, 1-25.
- 岡 英夫・田中 真 (1986): 鰓病の感染・発病条件に関する研究. 昭和 60 年度魚病対策技術研究成果報告書. 静岡県水産試験場浜名湖分場通刊 No. 252, 1-21.
- 三井洋司・今村 亮 (1987): 血管内皮細胞, 「機能細胞の分離と培養, 三井・高木・市原・関口・松村編著, 丸善, 東京」, 225-240.
- 田中 真・江草周三 (1992): ウナギの鰓うっ血症の原因研究の試み (短報). 魚病研究, **27**, 49-50.