ノカルジア菌を接種したハマチの血液成分 に関する診断学的研究

池田弥生^{*1}・尾崎久雄^{*1}・早山萬彦^{*2}

池田静徳^{*2}・見奈美輝彦^{*3}

(1976年4月24日受理)

Diagnostic study on blood constituents in the yellow-tail inoculated
with *Nocardia kampachi*

Yayoi IKEDA^{*1}, Hisao OZAKI^{*1}, Kazuhiko HAYAMA^{*2},
Shizunori IKEDA^{*2}, and Teruhiko MINAMI^{*3}

The changes in various blood constituents were examined in the yellow-tail *Seriola quinqueradiata* inoculated with a pathogenic microorganism *Nocardia kampachi*. The changes characteristic of chronic suppurative inflammation were visually observed in most of the inoculated specimens. Increases in the total white cell, neutrophil, and monocyte counts and in the serum levels of total protein, albumin, globulin, and alkaline phosphatase were recognized. In addition, the A/G ratio was increased. Of the serum protein fractions as separated by cellulose acetate electrophoresis, fractions II, II₁, and III showed a significant increase. On the other hand, mature erythrocyte and reticulocyte counts, hemoglobin concentration, and the serum levels of fraction I, total cholesterol, urea-N and sodium were all observed to decrease slightly. It was noticed that the increases in neutrophil count, albumin level, and alkaline phosphatase activity precede external symptoms. Mean corpuscular hemoglobin and the serum levels of glucose, chloride, potassium, calcium, magnesium, phosphate-P, and of some enzymes such as GOT, GPT, LDH and LAP, remained unchanged.

From these results, it was concluded that the disturbances in the liver, kidney, and spleen caused by *Nocardia* inoculation are slight.

魚類の健康および病態の診断法に関しては未だ十分な研究はされておらず、系統立てられてもいない。ヒトの臨床検査法をそのまま利用できるものもあるが、魚類に特有な方法もある。魚病研究に関しては従来より病理組織学的検査がよく用いられている。最近では血液学的検査もかなり多く試みられるようになってきたが、中でも病理学的に重要な白血球の活用はまだ十分ではない。血清成分を利用する生化学的検査は今のところ生理学的領域に関するものぐらいてあつて、病態時の変動や鑑別診断に利用するところまでは進展していない。生化学的検査によつて各種の代謝状態を動的に把握することができるため、治療や予後の判定に際し、本法は特に有効な手段である。

診断法の研究には自然発症魚を利用することが望ましい。しかし実験材料としての入手が不安定であり、

^{*1} 東京水産大学 (Tokyo Univ. of Fisheries, Konan 4-5-7, Minato-ku, Tokyo, 108)

^{*2} 京都大学農学部水産学科 (Dept. of Fish., Fac. of Agr., Kyoto Univ., Kitashirakawa Oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606)

^{*3} 和歌山県水産増殖試験場 (Wakayama Pret. Inst. Fish., Motomachi, Tanabe, Wakayama-ken, 646)

Table 1. Progression of pathological changes in the yellow-tail inoculated with *Nocardia kampfchi*

Symptoms		Days after inoculation												
		0					2				5			
		Specimen No.												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Tubercle in	spleen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+
	kidney	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	hepatopancreas	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	heart and gill	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abscess in	inoculated part	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	remaining parts	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Symptoms		Days after inoculation											
		8				11				14			
		Specimen No.											
		14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25
Tubercle in	spleen	†	+	+	+	†	‡	‡	†	‡	‡	†	‡
	kidney	‡	+	+	+	‡	‡	‡	‡	‡	‡	+	‡
	hepatopancreas	-	-	-	-	†	-	-	-	+	-	-	-
	heart and gill	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Abscess in	inoculated part	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	remaining parts	-	-	-	-	†	-	+	†	†	†	-	‡

かつ感染時期が不明であるため時間的経過を追うことが難しい。自然感染と人為感染とは必ずしも経過が同じであるとはいえない。しかし疾患を理解し、その特徴を把握するためには実験病理学的な立場から全経過を追跡する必要がある。

本研究ではノカルジア菌を接種したハマチについて、血液成分量の変動を中心に諸検査を行ない、その結果を診断学的立場から検討した。

実験方法

実験は 1973 年 10 月に実施した。供試魚は和歌山県田辺湾内で養殖中の体長約 29 cm、体重約 450 g の 0 年魚ハマチ (*Seriola quinqueradiata*) で、屋内のコンクリート水槽 (3×3×1.5 m) に収容し、4 日間予備飼育した。供試魚は 20 尾づつ 2 群に分け、対照区と菌接種区とを設け、2～4 日毎に両区から 4 尾ずつ取り上げ検査に供した。供試魚には 1 日 1 回冷凍マイワシを十分に給与した。なお飼育水温は 24.0～25.2℃であつた。

病原菌には 1% 小川培地で 25℃、5 日間培養した *Nocardia kampfchi*^{1,2)}、W-1 株を用い、魚体重 g 当り 4 μg (湿重量) の割で背部皮下に接種した。菌液は 0.85% 生理食塩水で希釈し、1 尾当りの注射液量が 0.1 ml になるように調製した。対照魚には生理食塩水のみを同量注射した。

分析に用いた血清は、魚を麻酔せず、尾柄部切断により集めた血液を室温に 1 時間放置後、3000 rpm、10 分間遠心分離して得た。採血後の魚体から肝脾臓、脾臓、腎臓および心臓を剔出し、重量を測定した。

血液中の成熟赤血球数、網状球 (幼若赤血球) 数および白血球数は、トーマの算定盤により求めた全血球

Fig. 1. Changes in mature erythrocyte count, reticulocyte count, hemoglobin concentration, and M.C.H. (mean corpuscular hemoglobin) in the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail. The shaded areas represent the ranges of value in the non-inoculated yellow-tail.

数に、メタノール固定後、ギムザ染色を施した血液塗抹標本から求めた比率を乗じて算出した。好中球、好酸球、単核球およびリンパ球の割合は、白血球 100 個を検鏡し、その各出現率で表示した。血色素量はシアンメトヘモグロビン法により定量した。

血清の総蛋白、アルブミン (BCG 法)、グロブリン (BCG 法)、糖、尿素-N、総コレステロール、カルシウム、マグネシウム、無機磷、および塩化物の測定は市販の臨床検査用キット (和光純薬工業 K. K. 製) および同指針によつた。血清のナトリウムとカリウムの測定は原子吸光分光分析法によつた。血清の glutamate oxaloacetate transaminase (GOT), glutamate pyruvate transaminase (GPT), alkaline phosphatase (Al-P), lactate dehydrogenase (LDH) および leucine aminopeptidase (LAP) の活性測定は RaBA system による市販のユニキット (中外製薬 K. K. 製) によつた。血清蛋白の分画はセルローズ・アセテート膜電気泳動法³⁾によつた。

抗体価の測定は凝集反応⁴⁾により、その条件は前述の菌を用いて 25°C, 20 時間とした。

結 果

肉眼的所見 菌接種後 2～3 日間は接種区、対照区ともに取扱いによつて生じたとされる“すれ”が観察された。摂餌は期間中非常に良好であつた。菌接種後の症状を窪田ら⁵⁾の報告に準じて、Table 1 に示した。本実験では菌接種 2 日目には何ら特別な所見はみられなかつたが、5 日目から結節が、8 日目からは

Fig. 2. Changes in total and differential white cell count in the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

膿瘍がそれぞれにみられるようになり、ノカルジア菌による定型的症状を呈した。実験期間中の死亡魚はなかった。

内臓重量 接種区では対照区に比して、比肝重は2日目以後平均30%増加し、これは期間中続いた。比腎重は8日目以後徐々に増加し、14日目の結果では平均150%の増加であつた。比脾重も8日目以降に平均50%の増加を示した。心臓重量には菌接種の影響はみられなかつた。

血液性状 Fig. 1 に示すように、菌接種によつて成熟赤血球数、幼若赤血球数および血色素量は僅かであるが減少傾向がみられた。平均血球血色素量 (M. C. H.) には差はみられなかつた。

白血球像 Fig. 2 に示した。接種区では対照区に比して、白血球数は5日目以降に増加した。好中球は2日目に期間中最高値を示し、以後減少した。好酸球には差がみられなかつた。単核球は2日目には10%以下であつたが、徐々に増加し、14日目には平均25%を示した。リンパ球は絶対数では増加していたが相対的には減少した。

血清蛋白量 Fig. 3 に示した。接種区では対照区に比して、総蛋白量は5日目、アルブミン量は2日目、グロブリン量は5日目より各々増加し、何れも14日目まで高値を保持した。A/G は僅かであるが常に高値であつた。

血清蛋白 ハマチの血清蛋白は Fig. 4 に示したように、セルローズアセテート膜電気泳動において、

Fig. 3. Changes in total protein, albumin, and globulin levels, together with A/G of serum from the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

大きく4分画に分離される。ここでは陽極側から主な4分画をI~IVと呼称し、それらの間に生ずる小分画は陽極側のものを1、陰極側のものを2とした。それらの量的変化をFig. 5に示した。接種区では対照区に比して、分画Iは5日目以後僅かに減少、分画II、IIおよびIIIは逆に増加した。分画I、II₂、IVおよびIV₂には差がなかった。

血清酵素活性 Fig. 6に示した。接種区では対照区に比して、Al-P活性は8日目の結果を除けば全体的に高かったが、GOT、GPT、LDHおよびLAP活性には差が認められなかった。

血清無機物量 Fig. 7に示した。接種区では対照区に比して、ナトリウム量は8日目以後僅かに減少する傾向がみられた。カリウム量は14日目に高値を示した。塩化物、カルシウム、マグネシウムおよび無機磷量には差がみられなかった。

その他の血清成分 Fig. 8に示した。接種区では対照区に比して、尿素-Nおよび総コレステロール量は減少したが、糖およびクレアチニン量には差がなかった。

抗体価 対照区の希釈度80~320の範囲に対して、接種区では期間を通じて160~640の範囲にあり、菌接種による抗体価の有意な増加は認められなかった。

考 察

BCG法の魚類血液への使用 魚類の血清アルブミンの測定にHABA法を用いられないことは既に確めた(未発表)。本実験の接種区ではBCG法で得た“アルブミン”量は増加したのに対し、電気泳動法で得た分画I量は減少した。従つて両者が同じものであるとはいえない。分画IIとIII量が増加したことから、

Fig. 4. Changes in electrophoretic protidogram of serum from the non-inoculated and inoculated yellow-tail, compared with reference human serum.

Fig. 5. Changes in electrophoretic fractions of serum protein in the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

Fig. 6. Changes in GOT, GPT, AI-P, LDH, and LAP activities of serum from the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

BCG 法で得た“アルブミン”の中にはこれらの分画の一部も含まれていると思われる。よつて、ハマチ血清ではアルブミンの定量に BCG 法を利用できないが、蛋白代謝を現わす一指標としては利用価値がある。

実験開始時の値の変動 15 日間という短期間であつても魚類の生理状態が完全に一定であるということは稀である。対照区においても実験開始時から 2 日目にかけて測定値の減少がみられた。変動した成分の種類とその大きさからみて、この時の変動は取扱いのストレスによるものと推察される。

測定値の突発的な変動 6~10 日目を中心にして測定値の突発的な変動がみられた。変動した成分の中には蛋白代謝の活発さを表わすと考えられる成分が多かつた。幼若赤血球や白血球数も増加したが、好中球や単核球の割合に変動がみられなかつたことから、細菌感染によるものとは考えられない。供試魚は飼育場所を移動させられたために軽度の飢餓状態にあつたことが考えられ、実験開始後の活発な摂餌から代謝が急速に亢進したことによる現象と推測される。

これらの諸点を考慮した上で、接種区にみられた特徴を下記のように検討した。

接種魚の所見 ノカルジア菌接種によつて、肉眼的には 5 日目に結節を、8 日目に膿瘍を認めた。本実験では多量の菌を接種したため、結節や膿瘍を指標とした潜伏期は自然感染魚の場合より短かいであろう。しかし、期間中に死亡したものはなかつた。ビブリオ菌接種では短期間に死亡する（尾崎，未発表）ことからみても、本症の経過は亜急性ないしは慢性とみられる。

白血球の変動 白血球の変動は本来病理的なものであり、ヒトでは特に感染症の重要な診断法の一つである。しかし魚病診断ではあまり利用されていない。その理由は TÜRK 氏液のような信頼できる白血球数算定用試薬がないことや白血球の分類ならびに各種白血球の機能が十分に研究されていないことなどによる。

Fig. 7. Changes in serum levels of sodium, potassium, chloride, calcium, magnesium, and phosphate-P in the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

このように困難な問題はいろいろの病魚について研究されて初めてその利用価値が明らかになるし、技術も開発されるであろう。魚類の白血球の分類にはまだ定説がない⁴⁾が、本研究ではフナ⁷⁾およびヒト⁸⁾における分類に従った。好中球は感染に対して即刻反応し、初期に増加した。この増加は肉眼的な結節の出現に先立つて有意な変動を示しており、診断に役立つ。好中球の増加はウナギの鰯赤病⁹⁾やビブリオ菌接種^{*}でも報告されている。好酸球は変動しなかつた。単核球は魚類においてもヒトと同様食食能を有することが報告⁷⁾されている。本結果では8日目以後次第に増加しており、その増加時期が好中球より遅いことなどヒトの場合とよく似ている。魚類におけるリンパ球の割合は高い⁸⁾。本実験でも増加し、好中球の増加よりやや遅れた点などヒトの場合に似ている。保科⁹⁾もウナギの鰯赤病で同様のことをみている。以上のような白血球の変動は感染症の特徴を示すものである。

造血機能 本実験ではノカルジア菌接種によつて徐々に貧血症を起こしてきた。血清ビリルビン量の増加がなかつたことから、ノカルジア菌は溶血作用をもつていないと推測される。期間中よく摂餌していたことから飢餓による貧血は考えられない。従つて、本結果でみられた貧血は幼若赤血球数の減少と考え併せて、造血機能の低下によるものと推測される。魚類では鰯赤病⁹⁾やビブリオ病¹⁰⁾で同様の報告がみられる。

肝臓の機能 菌接種によつて肝臓が肥大したことは感染に対する反応を示すものである。肝機能は測定した血清成分の変動にいろいろな形で現われている。血清総蛋白、蛋白分画 II₁ および III 量が増加したことは細菌感染に対する肝臓のストレス反応とみることができよう。蛋白分画 I の量的減少は肝臓の生合成機

* 室賀清邦・江草周三：日本水産学会春季大会講演要旨，p. 83 (1974)。

Fig. 8. Changes in serum levels of glucose, urea-N, creatinine, and total cholesterol in the non-inoculated (○) and inoculated (●) yellow-tail.

能の低下を示しており、尿素-Nや総コレステロール量の減少も同様に考えられる。血清 GOT, GPT, LDH および LAP 活性は肝障害時に上昇することが魚類で報告されている^{11,*1,*2}。本実験では特に変動がみられなかったことから、酵素の逸脱するような型の障害ではないと推測される。血清 AI-P 活性の上昇が本実験でみられた。魚類では CCl_4 による肝障害時に僅かに増加したことが報告^{*1,*2} されているが、他の酵素が変動していないことからみて、AI-P が肝臓から逸脱したものとは思われない。以上のように、肝機能には軽度の障害が認められた。

腎臓と鰓の機能 腎臓は肥大し結節を生じた。また組織はもろく崩れ易くなり、菌接種による腎機能への影響が考えられた。血清尿素-N 量の減少は前述したように、尿素生成が障害されたとみるべきで、腎臓や鰓からの排泄促進は考えられない。血清クレアチニン量はヒトでは腎障害のときに尿素と共に増加する。保科⁹⁾ もウナギで腎障害との関係をみているが、本結果ではみられなかった。血清コレステロール量はヒトではネフローゼのとき増加する。魚類ではウナギの鰓腎炎で増加がみられる（未発表）。本結果では低下していることから、腎障害ではなく肝障害に基づくものと考えられる。窪田ら⁹⁾ はノカルジア症のハマチではネフローゼを起こしていると報告しているが、本実験では病状がそこまで進んでいなかったと思われる。以上の結果から、腎臓に結節が生じていても腎機能は未だ障害を受けていないと推測される。但し、鰓の存在は無視できないから腎機能を正確に知るには血液と共に尿の検査をする必要がある。

*1 早山萬彦・穴井直幾・池田静徳：日本水産学会秋季大会講演要旨集，p. 82 (1973)。

*2 池田弥生・早山萬彦・池田静徳：日本水産学会秋季大会講演要旨集，p. 83 (1975)。

脾臓の機能 魚類においても脾臓は頭腎と共にリンパ系器官であり、白血球生成能も知られている*。本実験で脾臓に結節が生じたことはここへの感染を示すものであり、肥大したことはそれへの反応を示している。

心臓の機能 心臓には結節もみられなかつたし、重量変化もなかつた。このことは肝臓や腎臓での循環障害はなく、心臓への負担がかかっていることを示している。

以上の考察から、ノカルジア菌接種は感染症として白血球像に定型的な反応を示す。軽度の造血機能抑制があり、肝機能については感染への反応がみられ、更に軽度ではあるが機能低下も起こる。腎臓への影響も少なく、その機能は十分に維持されていることから、ノカルジア菌感染の経過は慢性的であると考えられる。

終りに、菌の分与ならびに取扱上の助言をいただいた高知大学楠田理一助教授、および実験遂行に御協力いただいたニッポン飼料株式会社研究所に深謝する。なお、本研究は昭和 48 年度文部省科学研究費補助金によつた。

文 献

- 1) 狩谷貞二・窪田三朗・中村恵江・吉良桂子：魚病研究，3，16-23 (1968).
- 2) 楠田理一・滝 秀雄：本誌，39，937-943 (1973).
- 3) 電気泳動学会：生物物理化学，11，267-269 (1966).
- 4) 中村 豊：細菌学免疫学講本，克誠堂書店，東京，1941，pp. 183-202.
- 5) 窪田三朗・狩谷貞二・中村恵江・吉良桂子：魚病研究，3，24-33 (1968).
- 6) 尾崎久雄：魚類生理学講座，第1巻，緑書房，東京，1968，pp. 41-49.
- 7) 入江 亮：十全会雑誌，37，1605-1622 (1932).
- 8) 三澤敬義・沖中重雄・美甘義夫・田坂定孝・大島良雄：臨床検査の実際，医学書院，東京，1959，pp. 398-408.
- 9) 保科利一：J. Tokyo Univ. of Fish., (Special edition), 6，1-104 (1962).
- 11) R. D. CARDWELL and L. S. SMITH: Prog. Fish-Cult., 33，232-235 (1971).
- 11) Y. INUI: Bull. Freshwater Fish. Res. Lab., 19，25-30 (1969).

* 田村栄光・本間義治：日本水産学会春季大会講演要旨集，p. 34 (1974).