ヒラメの人工種苗にみられた尿路結石の形成と性状

酒井 勇一, 斉藤 節雄, 清水 幹博, 山田 寿郎, 湊 一郎

(1995年10月2日受付)

Occurrence and Properties of Urinary Calculi Found in Laboratory-Raised Larvae of Japanese Flounder *Paralichthys olivaceus*Yuichi Sakai,*¹ Setuo Saito,*² Motohiro Shimizu,*³
Jyuro Yamada,*³ and Ichiro Minato*⁴

The occurrence, chemical and crystallographic nature of the calculi, and their effects on the survivorship of larvae of Japanese flounder were investigated.

Two types of calculi were distinguished as to their colors and localities; most of calculi were a milk-white one found exclusively in the urinary bladder. Orange calculi, while comparatively few in number, were in both the kidney and the urinary bladder. Both types of calculi were mainly composed of calcium phosphate in amorphous forms, but the elements of each calculus was different. Calcium and phosphorus were detected in the milk-white calculi, while sulphur in addition to calcium and phosphorus were in orange calculi. The bladders containing milk-white calculi showed no histological changes in the kidney, but when orange calculi was observed in a proximal segment or a collecting tubule of the kidney, the lumen was abnormally expanded and the epithelium cells were flattened. But calculi-holding larvae did not show a specifically higher mortality compared to normal larvae.

キーワード: ヒラメ人工種苗, 尿路結石

現在, 北海道立栽培漁業総合センターではヒラメ *Paralichthys olivaceus* の人工種苗生産を行っているが, この養成過程において死亡した仔稚魚の尿路内に, 結石様の異物の存在が認められている。

今日までに, 人工種苗生産されたマダイ *Pagrus major* でアリザリンレッドおよびPASに陽性な尿路内異物の形成が報告されている。^{1,2)} また, ニジマス *Oncorhynchus mykiss* では, 腎臓内にリン酸カルシウムが沈着する病理現象が報告されている。³⁾ しかしながら, ヒラメ仔稚魚の尿路内にみられる結石様の異物(以下結石と呼ぶ)の形成過程および性状についての知見は得られていない。

そこで本研究では, ヒラメ仔稚魚にみられる結石の成因を探ることを目的として, その形成過程と性状について, 光学顕微鏡と走査型電子顕微鏡による結石と尿路組織の形態的観察, およびX線微小分析(EPMA)に

よる結石の構成元素の特定とX線回折による結石構造物の結晶成分の検討を行った。また, 結石保有と人工種苗のへい死との関係もあわせて検討した。

材料と方法

材料として北海道茅部郡鹿部町の北海道立栽培漁業総合センターで人工採卵により得られたふ化直後から50日目までのヒラメ *Paralichthys olivaceus* の仔稚魚を第1群と第2群の2つの群に分けて用いた。

第1群は, ふ化直後のヒラメ仔魚2,000個体を上記センター内で静止濾過海水を満たした30lポリカーボネイト円形水槽に收容し, これを1t角形FRP水槽内にてウォーターバス方式で水温を18℃に調節して30日間飼育した。飼育海水は10日毎に交換した。飼育海水にはクロレラ *Chlorella* sp. を添加し, エアーポンプで弱く送気した。餌はふ化直後から12日目まではシオ

*¹ 北海道立釧路水産試験場 (Kushiro Fisheries Experimental Station, Hamacho, Kushiro 085, Japan).

*² 北海道立中央水産試験場 (Hokkaido Fisheries Experimental Station, Hamanakacho, Yoichi 046, Japan).

*³ 北海道大学水産学部水産増殖学科 (Department of Biology and Aquaculture, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan).

*⁴ 日本電子応用研究センター電子機器工学技術本部 (Application & Research Center, Electron Optics Division, JOEL LTD., Musashino 3-1-2, Akishima, Tokyo 196, Japan).

ミズソボワムシ *Brachionus plicatilis* を1日当たり 60×10^{23} 個体、それ以降30日目までは上記の餌に加え、アルテミア *Artemia salina* 幼生も1日当たり 12×10^{23} 個体与えた。以上の方法で飼育したヒラメ仔稚魚を、ふ化後30日目まで10日毎に10個体ずつ無作為に抽出し、体長を測定後10%中性ホルマリン溶液で固定した。また、採集日ごとに生残数を計測した。

第2群は、これとは別に同センター内で養成したふ化後30日目の稚魚300個体を用い、同様の30ℓ水槽で20日間飼育した。飼料は、アルテミア幼生と、冷凍保存しておいた養成アルテミアを収容翌日から毎日 3×10^3 個体与えた。飼育開始時および10日後（ふ化後40日目）にそれぞれ20個体の稚魚を無作為に採取し、うち15個体を10%中性ホルマリン溶液で、残り5個体をカルノア液で固定した。

中性ホルマリンに固定した個体は、通常のエタノール脱水後、パラフィンに包埋し、ミクロトームで $5 \mu\text{m}$ の非脱灰連続切片として、デラフィールドヘマトキシリン—エオシン染色を施した。この切片を光学顕微鏡を用いて観察し、結石の有無ならびに尿路の組織構造を調べた。カルノア液に固定した個体も同様にパラフィンに包埋し、 $5 \mu\text{m}$ の連続切片を作成した。切片には、デラフィールドヘマトキシリン—エオシン染色、アリザリンレッド染色、過ヨウ素酸シッフ（PAS）染色を交互に施し、結石の組織化学的性状を調べた。

また、第2群の20日間の飼育期間中にへい死した個体を無固定のまま実体顕微鏡下で解剖し結石の有無を調べた。

飼育最終日（ふ化50日目）には、稚魚50個体を無作為に抽出し、0.01% 安息香酸メチルメタスルホネイト（MS 222）で麻酔し体長を測定後、実体顕微鏡下で解剖し、尿路内の結石の有無を調べた。この結果、結石が認められた個体は、結石の識別に分け、頭部と尾部を除去した体幹部ごと2%パラホルムアルデヒド-2.5%

グルタルアルデヒド混合溶液で固定した。その後0.2 M カコジレート緩衝液で洗浄し、液体炭酸を用いて臨界点乾燥（日本電子、JCPD-3）した後、実体顕微鏡下で膀胱および腎臓内から結石を摘出し、カーボンを蒸着して（日立、Vacuum Evaporator HUS-4）、走査型電子顕微鏡（日立、S-2300）で結石の外部形態を観察した。また、この走査型電子顕微鏡に装備したエネルギー分散型X線微小部分分析装置（Horiba, EMAX-2000）を用いて、結石の構成元素を調べた。

第2群の残りの稚魚179尾より採集した膀胱内の結石を、色調の違いにより実体顕微鏡下で2種類に大別して集め、それぞれ乳鉢で粉末試料として、X線回折分析（日本電子、JDX-8030 および JDX-8200X）を行い、結石に含まれ結晶成分を調べた。分析に際し、 CuK_α 線の強度を回折角（ 2θ ） $5^\circ \leq 2\theta \leq 70^\circ$ 範囲で測定した。この結果を JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) の標準データと照合し、結晶成分の特定を行った。

結 果

結石保有率と成長・生残 第1群および第2群の飼育期間中の10日ごとの仔稚魚の生残尾数、死亡率、および平均体長の変化を Table 1 に示した。また、任意抽出された仔稚魚の組織切片の観察（ふ化後40日目まで）と、実体顕微鏡下における解剖（ふ化後50日目）により、結石を保有すると認められた個体数が全観察個体数に占める割合を結石保有率として Table 2 に示した。

第1群では、結石はふ化後10日目の稚魚には認められなかったが、ふ化後20日目には22%の稚魚で観察された。この時期の稚魚の腎臓はすでに糸球体、ボーマン氏嚢、近位尿管に分化した腎小体と集合管よりなり、ふ化後10日目の仔稚魚の尿管のみからなる腎組織とは形態に大差が認められた。ふ化後30日目には33%（9個体中3個体）の稚魚に結石が認められた。また、

Table 1. Mortality and the growth in two groups of laboratory raised larvae of Japanese flounder

	Days after hatch	Number of larvae survived	Mortality at every 10 days	Mean Body length $\pm$ SE (mm)
Group 1	0	2000	—	—
	10	1137	43.10%	4.08 ± 0.15 (10)
	20	277	75.60%	8.06 ± 0.24 (10)
	30	100	63.90%	10.87 ± 0.33 (10)
Group 2	30	300	—	13.29 ± 0.23 (15)
	40	264	12.00%	13.27 ± 0.37 (15)
	50	229	13.30%	19.55 ± 0.33 (50)

Figures in parentheses show the numbers of randomly sampled fish.

Table 2. Changes of the rate of calculi holders in two groups of laboratory raised larvae of Japanese flounder

	Days after hatch	Number of larvae examined	Number of calculi holders	Rate (%)
Group 1	10	9	0	0
	20	9	2	22
	30	9	3	33
Group 2	30	14	5	36
	40	14	11	79
	50	50	46	92

第2群では飼育開始当初（ふ化後30日目）の結石保有率は36%（14個体内5個体）であったが、40日目で79%（14個体内11個体）、50日目で92%（50個体中46個体）の個体に結石が認められた。一方、ふ化後30日目から50日目までの死亡率（第2群）は、30日から40日までが12.0%、40日から50日までが13.3%とほぼ一定であったが、ふ化後30日目から50日目までの20日間にへい死した個体の結石保有率は30.9%（68個体中21個体）であった。

実験最終日（ふ化後50日目）の結石保有個体（46個体）のうち、44個体は膀胱のみに1個から数個の結石を保有しており、2個体は膀胱と腎臓の両方に結石を保有していた。腎臓内のみに結石を保有している個体は認められなかった。

結石関連組織の観察 組織切片の観察からも、結石は腎臓と膀胱の両方に見いだされた。腎臓内に結石を持つ個体は、第2群のふ化後30日目の結石保有魚5個体中2個体、40日目の結石保有魚11個体中4個体に認められ、これらはすべて膀胱内に結石積を持っていた。腎臓では結石近位尿細管および集合管の管腔内に観察された。膀胱内のみに結石を持つ個体（ふ化後30日目で3個体、40日目で7個体）の腎臓の組織には異常は認められなかったが（Fig. 1-a）、腎臓と膀胱の両方に結石を持つ個体では、腎臓内の結石周辺の近位尿細管や集合管の立方上皮が扁平化し、管腔が異常に拡大しているのが観察された（Fig. 1-b）。

結石の性状 ふ化後50日目の稚魚から得た結石の実体顕微鏡による観察の結果、結石を膀胱内にのみ保有する個体の結石は乳白色を呈していた。これに対し腎臓と膀胱の両方に結石がみられた場合には、両部位の結石はともにオレンジ色を呈していた。

結石を走査型電子顕微鏡（SEM）で観察すると、ふ化後50日目個体から摘出した乳白色の結石（膀胱内のみに存在）は、長径約200~400 μm の不定形で、表面

Fig. 1. Renal tissues of 40 day-larvae of Japanese flounder.

a, Normal kidney of a larva holding calculi only in the urinary bladder; b, Enlarged lumen of a collecting tubule with a calculus. Bar: 50 μm .

に小球状の微小粒子が多数凝集した塊状を呈していた（Fig. 2-a, b）。一方、オレンジ色結石（腎臓と膀胱の双方に存在）は、長径約25~200 μm の表面が比較的滑らかな、単一塊状を呈していた（Fig. 2-c, d）。また、オレンジ色結石保有魚の膀胱内には表面が平滑な典型的なオレンジ色結石に混じって、凹凸のある乳白色結石様のものも観察された（Fig. 3）。

膀胱内の結石、腎臓内の結石はともにPASに対して陽性であった（Fig. 4-b）。また、Caを特異的に染めるアリザリンレッド染色によって、膀胱内のみにみられる場合の結石は濃赤色に染色されるが（Fig. 5-b）、腎臓と膀胱の両方に認められる場合の結石は赤く染まらず、このうち膀胱内の結石には、まれに表面のみが赤く染まるものが観察された（Fig. 5-c）。ヘマトキシリン染色によって、膀胱内にのみ認められる結石は濃い紫色に染色されたのに対し（Fig. 5-a）、腎臓と膀胱の両方に認められた結石は淡い紫色に染色され、結石中央部に部分

Fig. 2. SEM profiles of a calculus removed from renal tissues of larvae.

a, White calculus from the urinary bladder; b, Higher magnification of the white calculus shown in a; c, Orange calculus from the urinary bladder; d, Higher magnification of the orange calculus shown in c.

Fig. 3. Orange calculi of a rough-surfaced appearance (arrowhead) found in the urinary bladder.

的に染色されない部位が認められた (Fig. 1-b, 4-a)。

X線微小部分分析の結果、乳白色結石には主成分としてCaとPが認められた (Fig. 6-a)。一方、オレンジ色結石は、主成分としてCa, Pの他にSを含んでいた (Fig. 6-b)。

乳白色結石とオレンジ色結石の結晶構造を粉碎した試料のX線回折により分析した。乳白色結石、オレンジ色結石ともに明確な結晶構造を示さず、回折角 30° 付近に弱いピークを示した (Fig. 7-a, b)。また、JCPDSの標準データと完全に一致する結晶成分は認められなかった。

以上の結果から、乳白色結石とオレンジ色結石の性状は、Table 3に示したようであった。

考 察

ヒラメ人工種苗の結石保有と死亡との関係をもつため、第2群のふ化後30日目から50日目までの20日間の生残個体と死亡個体の結石保有率を比較した。この結果、飼育期間中の死亡率はほぼ一定であったが、この期間に死亡した個体の結石保有率は生残個体よりも明らかに低かった。これらのことから、少なくともふ化30日目から50日目までに限る限り、結石の形成が稚魚の直接的な減耗要因となるとは考え難い。

実体顕微鏡による観察の結果、ふ化後50日目のヒラメ稚魚の尿路内結石には乳白色とオレンジ色の2種類があることが認められた。尿路結石の大部分は乳白色

で、膀胱内のみに存在する。乳白色の結石は、不定形の塊状で、表面は小球状の微小粒子が多数凝集し融合したような粗い形状を呈していた。この結石はCaとPを主成分とし、X線回折分析の結果、回折角(2 θ) 30°付近にピークを持つ回折像を呈した。非晶質のリン酸カルシウムは、回折角(2 θ) 30°付近にピークを持つことが知られているが、⁴⁾ 今回のX線の回折像はこれとよく類似していた。JCPDSの標準データとの照合の結果、完全に一致する物質は認められなかったが、回折像の形状からCaとPは非晶質のリン酸カルシウムの形で存在すると考えられた。

一方、オレンジ色結石は腎臓にも膀胱にも存在し、膀胱に存在する場合には必ず腎臓にもこの結石が認められた。結石の表面は比較的滑らかな単一塊の様相を呈し、X線微小分析の結果は、主な構成元素がCa, P, Sであることを示し、X線回折分析の結果、オレンジ色結石も乳白色結石と同様に非晶質のリン酸カルシウムよりなることが明らかにされた。

Fig. 4. The profiles of continuous section of renal tissue of a larva 40 days after hatch.

a, Calculi (arrowheads) positively stained with Hematoxylin; b, Calculi (arrowheads) positively stained with PAS. Bar: 50 μ m.

組織切片の観察から、尿路結石はふ化20日目の稚魚にすでに形成が認められた。その後、結石保有率は経時的に増加し、ふ化後50日目ではほとんどすべての稚魚(92.0%)が結石を保有していた。結石は泌尿孔よりも大きな径を持ち、排尿にともなう結石の排出は容易ではないと推察される。また、結石の主成分である非晶質の

Fig. 5. The profiles of calculi in the urinary bladder of a larva 40 days after hatch.

a, White calculi (arrowheads) HE stained; b, Continuous section to that shown in a, stained with Arizarin red; c, Orange calculi found in the urinary bladder stained with Arizarin red. Bar: 50 μ m.

リン酸カルシウムは水に対する溶解度が低く、一旦析出すると容易には溶解し得ないと考えられ、これらのことがふ化後の結石保有率の経時的な増加をもたらすものと考えられる。

乳白色結石と考えられる膀胱内結石は、アリザリンレ

ッド染色で濃赤色に染まり、マダイ稚魚にみられる結石様異物についての報告に一致していた。²⁾ ラットの膀胱内結石のシュウ酸カルシウム-1-水和物結晶の成長は、尿中に析出してくる微少な結晶の表面に、同じく尿中に含まれる有機物が沈着し、やがてそれが接着剤となって多数の粒子の融合、成長をもたらす結果であるという報告がある。^{5,6)} ヒラメ稚魚の乳白色結石の場合も、SEM像から尿中に析出した非晶質のリン酸カルシウムが膀胱から排出されきらず、膀胱内で成長し結石となったものと考えられる。また、PAS 陽性物質などの有機物は非晶質リン酸カルシウムを沈着する基質の役割を果たすと共に、形成された微粒子の接着剤としても機能するもの

Fig. 6. Typical patterns of energy dispersive X-ray micro analysis of a white calculus (a) and an orange calculus (b) from the urinary bladder of 50 day-old larvae.

Fig. 7. X-ray diffraction patterns of powdered white calculi (a) and powdered orange calculi (b).

Table 3. Characteristics of two types of urinary calculi found in larvae of Japanese flounder

	Milk-white calculus	Orange calculus
Color	Milk-white	Orange
Locality	Urinary bladder	Both in kidney and Urinary bladder
Shape	Amorphous shape in a mass of globe particle	Single lump with smooth surface
Size	200~400 μm	25~200 μm
PAS	Positive	Positive
Reaction to stain Arizarin red	Positive	Negative
Hematoxylin	Positive	Weakly positive
Elements of calculus	Ca, P	Ca, P, S
Crystallographic structure	No definite crystalloid identified	No definite crystalloid identified

と考えられる。

一方、腎臓内および膀胱内のオレンジ色結石は、アリザリンレッドに対する染色性を示さなかった。このようなアリザリンレッドに対する染色性の違いは、X線微小部分分析およびX線回折分析の結果から示唆されるように、乳白色結石とオレンジ色結石の構成成分およびその存在形態などの違いによると考えられる。

膀胱内に存在するオレンジ色結石と考えられるものの中に、表面がアリザリンレッドに濃く染まるものが存在した。また、オレンジ色結石を多量に持つ個体の膀胱内結石のSEM像に、乳白色結石のような凹凸のある構造が認められた。これらの結石は、オレンジ色結石の表面に乳白色結石と同様に成分が膀胱内で沈着して形成されたものであろう。乳白色結石が膀胱内のみに観察されたことを考え合わせると、乳白色結石はオレンジ色結石とは異なり、膀胱内で形成されるものと考えられる。

腎臓内結石（オレンジ色結石）は、近位尿細管と集合管内に存在していた。結石周辺の管腔の立方上皮では、組織の扁平化や管腔の拡大が認められた。このような腎臓組織の変形は腎臓内に結石を持つ個体でのみ観察された。ニジマスでは、腎臓中に少量のアパタイトとブルッシャイト結晶を含むリン酸カルシウムが沈着し、腎臓組織の扁平化や管腔の拡大を引き起こす腎石灰症があることが報告されている。³⁾ 一般に、硬骨魚類の近位尿細管は主に2価イオンの排出の場であると言われている。^{7,8)} この腎臓内結石（オレンジ色結石）に含まれるCa, P, Sは、 Ca^{2+} , HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} のような2価イオンとして主に近位尿細管から排出されると考えられる。乳白色結石（膀胱内結石）を含めて、結石の形成が初めて観察さ

れるふ化後20日目の稚魚の腎臓には、近位尿細管や集合管などがすでに分化していること、結石が近位尿細管以降の尿路でしかみられないことは、結石の形成に近位尿細管における代謝異常が関与する可能性を示唆している。

以上のことから、ヒラメ種苗の尿路には、色調、組成の異なる2種類の結石が形成されることが明らかとなったが、これらが初期減耗の直接的な要因となるとは考えられなかった。

文 献

- 1) 上田和夫, 石岡宏子, 岡本 亮, 福原 修: 種苗生産に関する基礎的研究 第I報 マダイ仔稚魚における膀胱内異物形成と成長・死亡との関係について. 南西水研研報, 20, 1-9 (1970).
- 2) 石岡宏子, 上田和夫, 岡本 亮, 福原 修: 種苗生産に関する基礎的研究 第II報 マダイの膀胱内異物の性状について. 南西水研研報, 21, 11-17 (1970).
- 3) J. G. Harrison and R. H. Richards: The pathology and histopathology of nephrocalcinosis in rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson in fresh water. *J. Fish Disease*, 2, 1-12 (1979).
- 4) A. S. Posner: Crystal chemistry of bone mineral. *Physiol. Rev.*, 49, 760-792 (1969).
- 5) S. R. Khan and R. L. Hackett: Developmental morphology of Calcium Oxalate foreign body stones in rats *Cal. Tis. Int.*, 37, 165-173 (1985).
- 6) S. R. Khan and R. L. Hackett: Crystal-Matrix relationships in experimentally induced urinary Calcium Oxalate Monohydrate crystals, and ultrastructural study. *Cal. Tis. Int.*, 41, 157-163 (1987).
- 7) 尾崎久雄: 魚類生理学講座IV. 腎臓の生理, 緑書房, 東京, 1977, pp. 1-297.
- 8) A. L. Grafflin: Renal function in marine teleosts IV. The excretion of inorganic phosphate in the Sculpin. *Biol. Bull.*, 71, 360-374 (1936).