

コイのエロモナス病における発病機構

高橋 幸 則

Appearance Mechanisms of Symptoms of the Aeromonas Disease in Carp

By

Yukinori TAKAHASHI

The appearance mechanisms of symptoms of the Aeromonas disease, which occurs in carp, became clear from anatomical and histopathological findings that were obtained by inoculating healthy carp with pathogenic *Aeromonas* and sonic extracts of the bacteria. The results of inoculating the bacteria themselves were closely similar to those of inoculating the sonic extracts. The appearance mechanisms of the symptoms could be considered as follows; (1) pathogenic *Aeromonas* proliferate abnormally in the intestinal tract; (2) the intravascular bacteria proliferate further and reach to all the tissues via blood; on the other hand, the permeability of the blood vessels is enhanced by the bacterial endotoxins owing to self-dissolution of the bacteria; (3) hemorrhage occurs in areas of severe damage of the vascular wall, while in areas of minor injury, only plasma is exuded and edema occurs; and (4) as a result that plasma, which exudes from the capillary wall of dermis, accumulates in the intercellular spaces of the scale sacks, those tissues become swollen, and the scales are pushed upwards to protrude.

1. 緒 言

Aeromonas hydrophila の感染に基づく、コイ科魚類のエロモナス病の特徴的な肉眼的所見は、体表、肛門および各鱗の出血と発赤、肝臓のうっ血ならびに腸管の発赤などである。

また、病理組織学的には肝臓、腎臓、脾臓および腸管に、

滲出性ならびに出血性の炎症が著しい。

これらの症状は、病原菌のいかなる作用によって発現するのかについては、十分に研究されていない。

そこで、本病の発病のメカニズムを明らかにするために、病原菌の生菌と、その菌体破壊抽出液とを接種して発現した人為的病魚の病変を、肉眼的ならびに病理組織学的に比較検討したので、その概要を報告する。

* 水産大学校研究業績第1006号, 1983年10月5日受理。

Contribution from the Shimonoseki University of Fisheries, No. 1006. Received Oct. 5, 1983.

本報告の概要は昭和58年度日本水産学会中四国支部例会(於水大校)で発表した。

2. 材料および方法

2・1 供試魚

マゴイ (平均体重205 g), 36尾をアクリル樹脂水槽 (75×45×45 cm³) 3個に分けて収容し, 2週間の予備飼育をしたのち実験に供した。なお, 実験期間中の水温は23°C±0.5°Cであった。

2・2 生菌の経口投与による発病

本病の病魚から分離した *A. hydrophila* SC-1 株を, 普通寒天培地斜面に25°C, 20時間培養後, 生菌数にして約10¹⁰細胞を微量の粉末飼料に吸着させ, ゼラチン製カプセルにつめて経口投与した。経口投与後24時間目に4尾の供試魚に対して, 背大動脈から市販の墨汁0.1 mlを注入した。対照群には粉末飼料のみをつめたカプセルを経口投与し, そのうちの2尾に対しては同様に墨汁を注入した。

2・3 菌体破壊抽出液の背大動脈注射による発病

A. hydrophila SC-1 株を, 普通寒天培地平板に25°C, 20時間培養後, 滅菌生理食塩水で5回洗浄し, 同食塩水に10%の割合で懸濁した。そして, 氷冷下で細胞が破壊されるまで超音波処理を行ったのち, 4°Cで10,000 rpm, 30分間遠心分離し, 得られた上清を0.45 μmのミリポアフィルターで濾過した。超音波による菌体破壊抽出液の0.1 mlを, マゴイの背大動脈に注射し, 24時間後に6尾の供試魚に対して, 上記と同様に墨汁0.1 mlを注入した。対照群には, 背大動脈に滅菌生理食塩水の0.1 mlを注射後, 2尾の供試魚に対して, 同様に墨汁を注入した。

2・4 病理学的検索

経口投与ならびに背大動脈注射後, 24~28, 48および72時間ごとに, 各群4尾ずつ取りあげて, 外観的ならびに解剖学的観察を行った。そして, 鱗囊, 肝臓, 腎臓, 脾臓および腸管を摘出し, ブアン液で固定したのち, パラフィン包埋を行い, 常法にしたがってヘマトキシリン・エオシン二重染色法により組織標本を作製し, 病理組織学的変化を観察した。

3. 結果

3・1 外観的比較所見

生菌を経口投与後24時間には, 肛門の周囲ならびに各鰭が多少発赤している程度であるが, 48時間後にはこれらの部位の発赤が顕著になるほか, 眼球突出と立鱗が観察され

た。72時間後には立鱗がより明確になり, 体表に著しい出血と発赤が認められた。

一方, 背大動脈から菌体抽出液を注入した群では, 24時間後にはすでに, 各鰭および体表の出血と発赤が著しいほか, 眼球突出と立鱗が観察された。しかし, 肛門周囲の発赤は認められなかった。

生菌投与後24時間に背大動脈から墨汁を注入した群では, 注入後30分以内に胸鰭基部がわずかに黒化し, 約24時間後 (生菌投与後48時間) に, 眼球突出ならびに立鱗とともに頭部の皮膚, 各鰭および肛門が著しく黒化したのに対して (Plate I, A), 菌体抽出液注射群では墨汁注入後約4時間 (抽出液注射後28時間) に, 体表全体および各鰭の著しい黒化が観察された。対照群には, 胸鰭基部にわずかな黒化が見られたのみであった。

生菌経口投与群と菌体抽出液注射群との外観的所見を比較した結果, 前者の48~72時間後の所見と後者の24~28時間後のそれとが, よく一致した。

3・2 解剖学的比較所見

生菌を経口投与後24時間には, 腸管のみはすでに発赤しており, 48時間後にはその発赤がさらに顕著になって, 腸管内に血液を含む粘液が貯留していた。72時間後には肝臓にうっ血が見られるほか, 肝臓および腎臓の軟化が認められた。

一方, 背大動脈から菌体抽出液を注射した群では, 24時間後にはすでに, 肝臓のうっ血と肝臓および腎臓の軟化が認められたほか, 腸管上部の発赤が観察された。

生菌投与後24時間に墨汁を注入した群では, 注入後24時間 (生菌投与後48時間) に, 腹腔内に黒色の腹水が貯留し, 肝臓, 腎臓, 脾臓および腸管が黒化していた。腸管内には, 黒赤色の粘液の貯留が認められた。菌体抽出液群では墨汁注入後4時間 (抽出液注射後28時間) にすでに, 腹腔内に黒色の腹水が貯留し, 肝臓, 腎臓および脾臓の黒化が観察された (Plate I, B)。対照群には, 脾臓がやや黒化した以外に特記すべき変化は認められなかった。

生菌経口投与群と菌体抽出液注射群との解剖学的所見を比較した結果, 腸管を除くその他の組織において, 前者の48~72時間後の所見と後者の24~28時間後のそれとがよく一致した。腸管のみは, 菌体抽出液群にくらべて生菌経口投与群の病変が早く現れる傾向が認められた。

3・3 病理組織学的比較所見

生菌を経口投与後48時間の鱗囊は, 細胞の配列が乱れ,

細胞間の間隙が著しく広がっていた (Plate I, C)。菌体抽出液注射群の鱗囊には、注射後24時間にすでに、上記と同じ所見が得られ、両群の墨汁を注入した個体には、鱗囊組織の各所に墨汁の沈着が観察された (Plate I, D)。

生菌を経口投与後24時間の肝臓には、洞様血管が拡張し、うっ血像が観察された。生菌経口投与群の48時間後および菌体抽出液注射群の24時間後の肝臓には、間質に出血性ならびに滲出性の炎症像が認められた。

生菌を経口投与後48時間および菌体抽出液注射後24時間の腎臓には、間質に赤血球が浸潤しているほか、尿細管上皮細胞の一部に壊死が認められた (Plate I, E)。また、これらの墨汁注入群には、主として間質に墨汁の沈着が観察された (Plate I, F)。

生菌を経口投与後24時間の脾臓には、莢動脈および髄質部の毛細血管の拡張が認められた。生菌経口投与群の48時間後および菌体抽出液注射群の24時間後の脾臓には、髄質部に赤血球が充満していた。これらの墨汁注入群には、莢動脈およびその周囲に墨汁の沈着が観察された (Plate II, G・H)。対照区の墨汁注入群にもその沈着が見られたが、範囲がせまく莢動脈にそって痕跡程度に認められた。

生菌経口投与群の24時間以降および菌体抽出液注射群の48時間以降の腸管には、粘膜の剝離、固有層における顕著な出血性ならびに滲出性炎症像が観察された (Plate II, I)。これらの墨汁注入群には、縦走筋と輪走筋間および固有層に、赤血球の浸潤と共に墨汁の沈着が認められた (Plate II, J)。

生菌経口投与群と菌体抽出液注射群との病理組織学的所見を比較した結果、病変の発現時間には差異が見られるものの、両群のいずれの組織にも滲出性ならびに出血性の炎症像が認められた。

4. 考 察

A. hydrophila に基づく魚類の感染症の外観的症狀は、ウナギでは鱗、皮膚および肛門の発赤であり^{1,2)} アユでは、皮下出血ならびに肛門の発赤などである³⁾。また、ウナギの場合の解剖学的特徴は、肝臓のうっ血、腸管の発赤および腸管内の粘液物の貯留であり、病理組織学的には、肝臓、腎臓および腸管などに、リンパ球様細胞の浸潤と出血が認められる²⁾。

本実験において、*A. hydrophila* の生菌を経口投与したマゴイの特徴的な肉眼的所見は、体表と鱗の出血および発赤、立鱗、肛門の発赤、肝臓のうっ血ならびに腸管の発赤であった。また、病理組織学的には肝臓、腎臓、腸管に、出血性

ならびに滲出性の炎症像が認められるなど、上記のウナギおよびアユの *Aeromonas* 感染症の病変と同様の所見が得られた。さらに、同一菌の超音波破壊によって得た菌体内抽出物を、背大動脈から注入したマゴイには、生菌経口投与の場合とほとんど同じ病変が発現した。

清水⁴⁾ は、ワタカブリ病 (鱈赤病) のウナギから分離した *A. liquefaciens* (*A. hydrophila*) について、菌体の超音波破壊によって得た抽出物を、ウナギに筋肉内注射すると、接種部位およびその周囲に出血と壊死が起こり、大量に接種すると斃死すること、またその抽出物はマウスに対しても致死性をもつことを明らかにした。さらに、その抽出物をゲル濾過によって分けたところ、Sephadex G-100 のカラムを素通りする分画と、ゲル内に拡散する分画とに分かれたとし、前者の成分とウナギに対する作用は明らかにされなかったが、後者は蛋白質と考えられる物質で、ウナギに対して出血ならびに壊死を起こさせることを報告している。また、若林⁵⁾ は POPOFF and VÉRON⁶⁾ の分類に基づく、*A. hydrophila* biovar. *hydrophila* について、その培養濾液を接種したコイの36%が斃死し、菌体破壊抽出液を接種したコイの94%に顕著な眼球突出と立鱗が生じたことを明らかにしている。

以上のことから、本病の病魚に見られる出血性ならびに滲出性の炎症、壊死、立鱗および眼球突出などの主要病変は、*A. hydrophila* の菌体内物質の作用に起因するものと推察される。

動物に種々の病変を起こさせる細菌の毒素は、菌体外毒素と菌体内毒素とに大別される⁷⁾。前者は細菌の産生する蛋白性の物質で、菌体から容易に遊離し、動物に対して出血、溶血および壊死などの作用を示すことが知られている。^{8,9)} 後者はリポ多糖体よりなる物質で、自己融解または細胞破壊によってのみ細胞外へ遊離し、動物に対して発熱、白血球減少、浮腫、出血および下痢などを起こさせることが知られている。¹⁰⁻¹²⁾

本実験において、マゴイに出血、壊死、立鱗および眼球突出を起こさせた物質の本体は不明であるが、前述の清水ならびに若林と同一の手法に基づき、超音波破壊によって菌体内から得ていることから、清水が明らかにした蛋白質と考えられる毒性物質を含んでいることは、疑いないものと思われる。しかし、清水も述べているように、蛋白性で出血および壊死作用を示すなどの性状は、菌体外毒素のもつ性質に近いことから、今後、*Aeromonas* 属細菌に特有の物質であるのか、あるいは温血動物と魚類とでは細菌の毒素作用が異なって現れるのか、などについて検討する必要

がある。

一方、*A. hydrophila* 感染症の感染メカニズムについては、ウナギの鱗赤病の場合、腸内に存在した強毒株が何らかの原因で異常増殖するのではないかと考えられている。^{2,14)}

また、保科¹⁾はウナギの鱗赤病について、飼育水に培養菌を加え、魚体との接触による感染を試みたが発病せず、生菌を胃内および直腸内に注入するか、餌と共に経口投与することによって、初めて感染が成立したことを明らかにしている。

本病の感染メカニズムについては本実験で、生菌の経口投与によって感染が成立したこと、また絶食条件下で水温変化ストレスを負荷させたマゴイには、腸管内に常在した *Aeromonas* が有意に増殖すること¹⁵⁾ などから、鱗赤病と同様に、腸管内における病原性 *Aeromonas* の異常増殖の可能性が高いと思われる。

上記の感染メカニズム、肉眼的ならびに病理組織学的所見およびマゴイに対する生菌と菌体内抽出物との毒素作用の一致などから、本病における発病のメカニズムについて、次のとおり考察する (Fig. 1)。すなわち、(1) 腸管内において、病原性 *Aeromonas* が異常増殖したのち、腸管内の血管へ侵入する。(2) 血管内の細菌はさらに増殖し、血液を介して全身の組織に分布する。その一方では、細菌の自己

融解によって放出された菌体内毒素により、血管の透過性が亢進する。(3) 血管壁の損傷が大きな部分には、赤血球が漏出するために出血が生じ、損傷の小さな部分には漿液のみが滲出し浮腫が起こる。(4) 真皮の血管壁から滲出した漿液が、鱗囊の細胞間隙に貯留した結果、組織が膨脹し、鱗が上方へ押し上げられて立鱗が起こる。

5. 要約

コイ科魚類のエロモナス病の発病機構を明らかにするために、原因菌である *Aeromonas hydrophila* の生菌と、その菌体破壊抽出液とを投与したマゴイの病理学的変化を比較検討した。

その結果、生菌経口投与群と菌体破壊抽出液注射群との外観的、解剖学的ならびに病理組織学的所見がよく一致したことから、本病の発病メカニズムを次のように推論した。すなわち、病原性 *Aeromonas* が腸管内で異常増殖したのち腸管内の血管へ侵入し、血液を介して各組織に分布する。また、血管内の細菌の一部が自己融解し、その菌体内毒素によって血管の透過性が亢進する。血管壁の損傷の大きな部分には赤血球が漏出するために出血が生じ、損傷の小さな部分には漿液のみが滲出し、浮腫が起こるなどである。

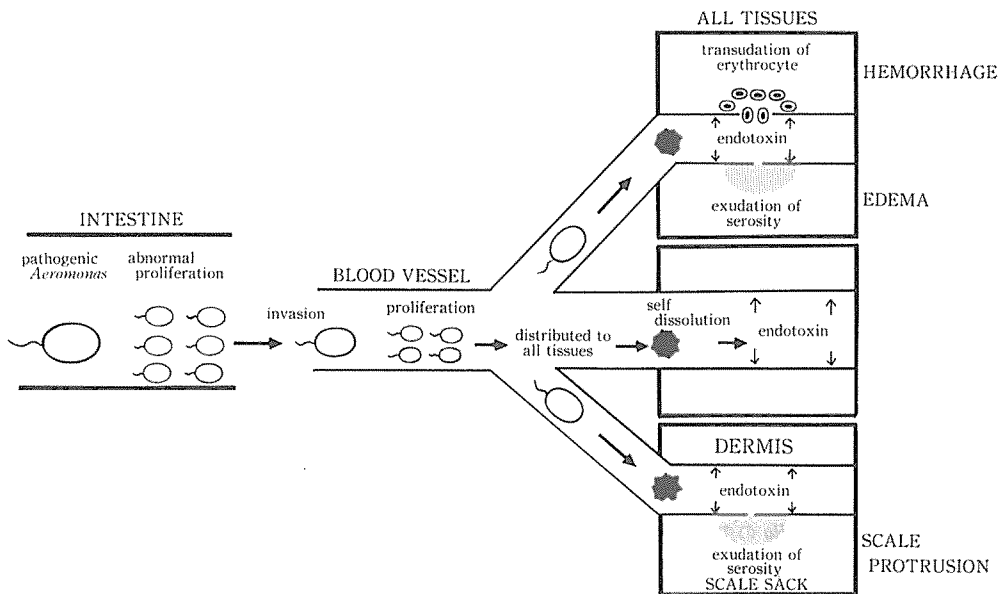
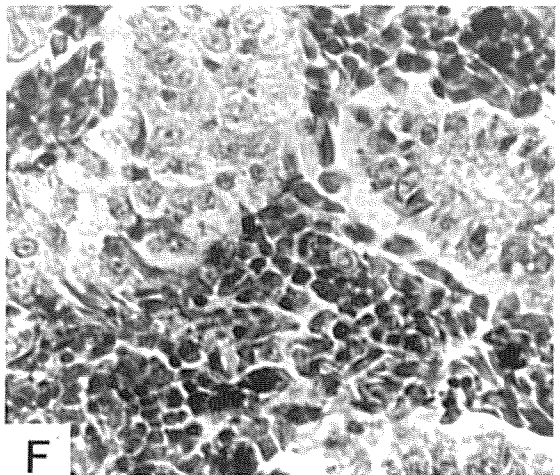
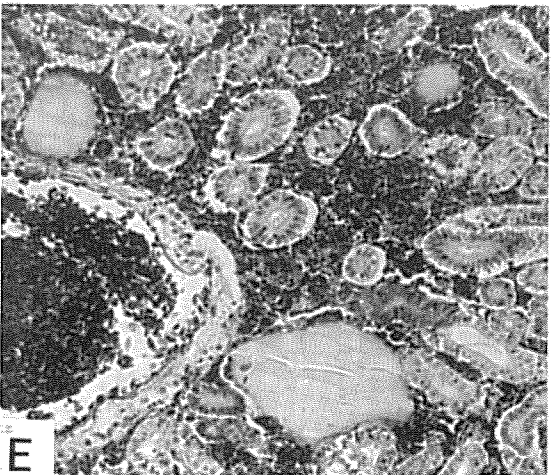
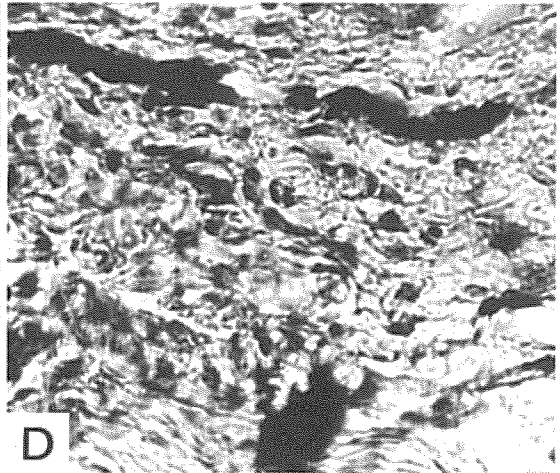
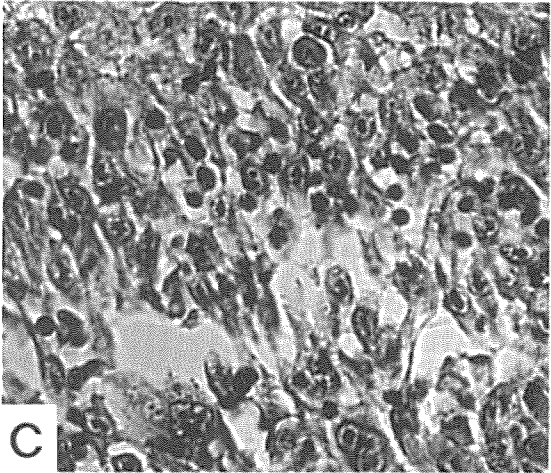
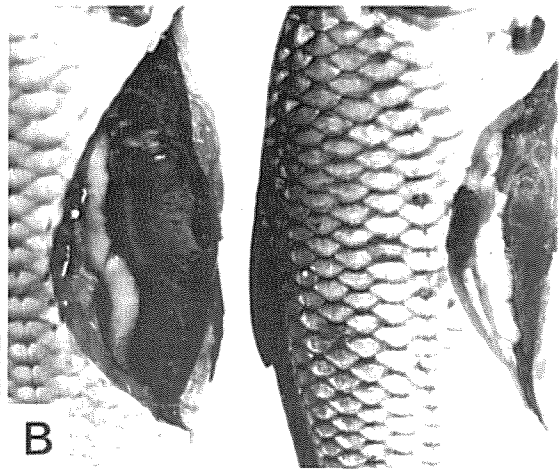


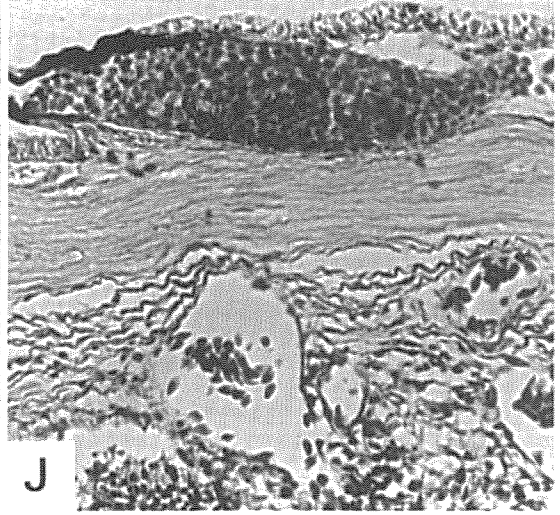
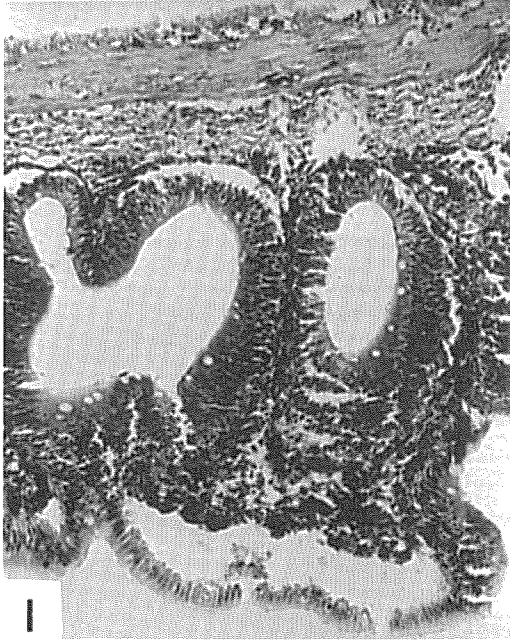
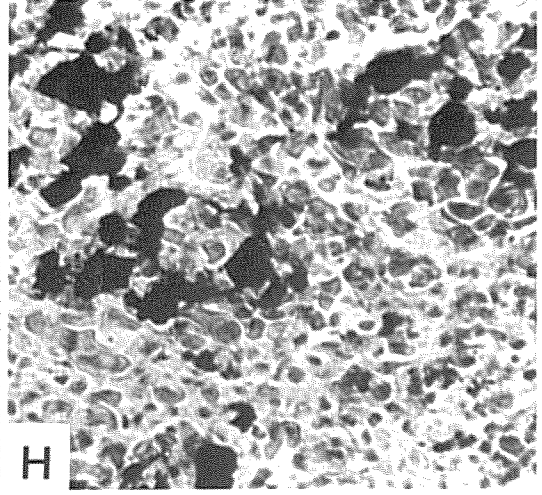
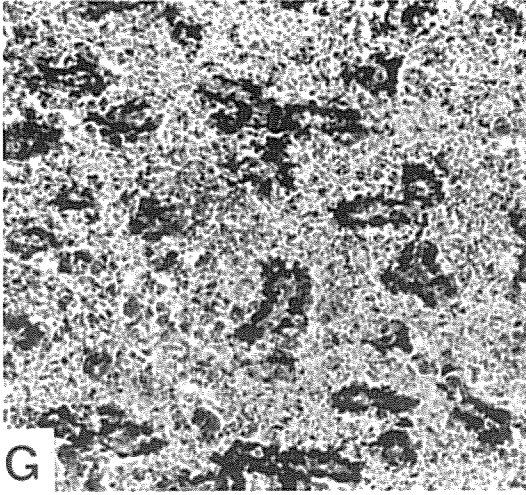
Fig. 1. Appearance mechanisms of symptoms of the *Aeromonas* disease in carp.

終わりに、本研究遂行上、有益なご助言を賜った水産大学校小林博教授ならびに西川昇平教授に深謝申し上げます。また、供試魚の便宜を賜った水産大学校小野実習場平野修場長ならびに山元憲一教官に衷心から感謝申し上げます。

文 献

- 1) 保科利一：東京水産大学特別報告，6，(1)，1～104 (1962)。
- 2) 江草周三：魚の感染症，第1版，恒星社厚生閣，東京，1978，pp. 146～164。
- 3) 城 泰彦・大西圭二：魚病研究，15，85～89 (1980)。
- 4) 清水朋子：魚病研究，4，19～30 (1969)。
- 5) 若林久嗣：昭和55年度魚病対策技術開発研究成果報告書，1～24 (1981)。
- 6) M. POPOFF and M. VÉRON: *Jour. Gener. Microbiol.*, 94, 11～22 (1976)。
- 7) L. PILLEMER and K. C. ROBBINS: *Ann. Rev. Microbiol.*, 3, 265～288 (1949)。
- 8) 小山次郎：蛋白質・核酸・酵素，9，708～715 (1964)。
- 9) 加藤 巖：蛋白質・核酸・酵素，9，697～707 (1964)。
- 10) O. WESTPHAL: *Ann. Inst. Pasteur*, 98, 789～813 (1960)。
- 11) O. LUDERITZ, A. M. STAUB, and O. WESTPHAL: *Bact. Rev.*, 30, 192～255 (1966)。
- 12) 植竹久雄：蛋白質・核酸・酵素，12, 1436～1445 (1967)。
- 13) 二階堂溥：蛋白質・核酸・酵素，12, 1446～1458 (1967)。
- 14) 金井欣也・若林久嗣・江草周三：魚病研究，12，199～204 (1977)。
- 15) 高橋幸則・藤野博文：昭和58年度日本水産学会春季大会，講演要旨，p. 113 (1983)。





Explanation of Plate I

Plate I

- A. External symptoms of carp which appeared 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*, 24 hrs after injection with India ink.
Right; inoculated fish, Left; control fish.
- B. Internal symptoms of carp which appeared 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*, 4 hrs after injection with India ink.
Left; injected fish with the extracts, Right; control fish.
- C. Scale sack lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. HE stain, $\times 400$.
- D. Scale sack lesion in carp which passed 48 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*, 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.
- E. Kidney lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*. HE stain, $\times 100$.
- F. Kidney lesion in carp which passed 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*, 4 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.

Explanation of Plate II

- G. Spleen lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*, 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 100$.
- H. Spleen lesion in carp which passed 28 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*, 4 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.
- I. Intestinal lesion in carp which passed 48 hrs after peroral inoculation with *A. hydrophila*, 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 100$.
- J. Intestinal lesion in carp which passed 48 hrs after intraarterial injection with sonic extracts of *A. hydrophila*, 24 hrs after injection with India ink. HE stain, $\times 200$.