HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	HRV (Hirame rhabdovirus; Rhabdovirus olivaceus) 感染ヒラメの病理組織学的検討
Author(s)	大迫, 典久; 吉水, 守; 五利江, 重昭 他
Citation	魚病研究, 23(2), 117-123
Issue Date	1988-06
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/38609
Type	journal article
File Information	Yoshimizu-62.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

魚病研究 Fish Pathology 23 (2) 117–123, 1988. 6

HRV (Hirame rhabdovirus; *Rhabdovirus olivaceus*) 感染ヒラメの病理組織学的検討

大迫典久[*1]・吉水　守[*1]・五利江重昭[*2]・木村喬久[*1]

(1987 年 12 月 25 日受付)

Histopathological Study on Diseased Hirame (Japanese Flounder; *Paralichthys olivaceus*) Infected with *Rhabdovirus olivaceus* (Hirame Rhabdovirus; HRV)

Norihisa OSEKO[*1], Mamoru YOSHIMIZU[*1], Shigeaki GORIE[*2] and Takahisa KIMURA[*1]

[*1]*Laboratory of Microbiology, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Minatocho 3–1–1, Hakodate, Hokkaido 041 Japan*
[*2]*Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, Nakasaki 1–6–8, Akashi, Hyogo 673, Japan*

(Received December 25, 1987)

Histopathological studies were conducted on diseased hirame (*Paralichthys olivaceus*) naturally infected with *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus; HRV) during 1984 and 1985 in Hyogo Prefecture and Hokkaido. Studies of hirame artificially infected with HRV (strain 8401-H) were also conducted.

Signs of infection were congestion of the gonad, focal hemorrhage of skeletal muscle and fins, and accumulation of ascitic fluid.

Histopathologically, the kidney indicated necrotic changes by nuclear degeneration of hematopoietic cells and hemorrage in the interstitial tissue. The spleen showed necrosis and hemorrhage in the pulp, and skeletal muscle revealed hyperemia and hemorrhage of capillary vessels. Hyperemia and hemorrhage were observed in the interstitial tissue of the seminiferous duct, ovarian lamella, and in the connective tissues around the seminal duct and oviduct of the testis and ovary. Mucosa of alimentary tract showed hyperemia and hemorrhage. No pathological changes were observed in the liver.

1984 年兵庫県下で養殖中のヒラメ (*Paralichtys olivaceus*) 病魚より分離されたウイルス (五利江ら, 1985) は, その生物学的, 理化学的性状からラブドウイルス科に属し, 生物学的性状および血清学的性状から既知魚類ラブドウイルスと異なる新しいウイルスであることが明かとなり分離魚種ヒラメにちなみ *Rhabdovirus olivaceus* (hirame rhabdovirus; HRV) と命名された (KIMURA *et al.*, 1986)。その後 HRV は 1985 年兵庫県水産試験場, 北海道焼尻島および香川県女木島の養殖ヒラメ, 1986 年には三重県, 岡山県下の養殖ヒラメ稚魚, 香川県下のクロダイ稚魚さらに韓国から輸入されたメバル稚魚からも分離された[*3] (五利江ら, 1986; 吉水ら, 1987)。

本報においては 1984 年兵庫県下の養殖場で自然発病したヒラメ病魚, 翌年同県水産試験場および北海道焼尻島で自然発病したヒラメ病魚, ならびに同水産試験場で人工感染試験に供されたヒラメを対象に病理組織学的検討を行ったので, その結果を報告する。

*1 北海道大学水産学部微生物学講座
(Correspondence: Professor T. KIMURA, Faculty of Fisheries, Hokkaido University, Hakodate 041, Japan.)
*2 兵庫県立水産試験場

*3 反町, 私信

実験材料と方法

供試魚

1984年3月兵庫県下の海面小割生簀で自然発病した10カ月齢のヒラメ病魚5尾（体重約100～300 g，水温6～18°C）の生殖腺，1985年1月から2月にかけ兵庫県水産試験場において自然発病したヒラメ病魚（8カ月齢，体重111～230 g，水温8～10°C）5尾の腎臓，脾臓，筋肉，生殖腺，肝臓，消化管，さらに同試験場で1984年に分離されたウイルスの腹腔内（$10^{8.0}$ $TCID_{50}$/尾）および筋肉内（$10^{6.0}$ $TCID_{50}$/尾）接種による人工感染試験（水温10°C）に供され（五利江・中本，1986）発病した病魚3尾とこの試験に供された対照群の健康魚2尾の腎臓，脾臓，筋肉，肝臓，消化管を実験に供試した。

さらに1985年4月に北海道焼尻島の養殖場で自然発病したヒラメ病魚（体重110～210 g，水温2～12°C）7尾の腎臓，脾臓，筋肉，生殖腺，肝臓，消化管をまた対照として1985年6月北海道立栽培漁業センターで飼育中のヒラメ（体重約90 g）3尾の各臓器を供試した。なおこれら病魚の腎臓および脾臓組織からはいずれもHRVが分離された。

病理組織標本作製法

供試魚を斃死寸前もしくは斃死直後に飼育槽より取り上げ，直ちにそれぞれの臓器を摘出し，ブアン氏液で固定後脱水し，パラフィンで包埋した。切片は厚さ4 μmとし，ヘマトキシレン・エオシンの2重染色を施して組織標本とし，光学顕微鏡を用いて観察した。

結　果

腎臓の病理組織

兵庫県水産試験場の自然発病ヒラメでは，造血組織の各所に著しい出血像が観察され，さらに組織全体に瀰慢的な壊死と著しい融解壊死巣が認められた（Figs. 1, 2）。病変は出血部に隣接した場所に多く認められ，病巣には核の濃縮，消失あるいは膨化が観察され，塩基性色素による染色性が悪く，細胞が崩壊して融解するとともに繊維素の沈着も起こっていた。この壊死病巣に巻き込まれた尿細管上皮も壊死崩壊していることが多かった。しかしボーマン氏嚢には顕著な病変はみられなかった。また黒色大食細胞集塊部の色素沈着は少なく，褐色色素小顆粒が組織中に散在していた。一方兵庫県水産試験場の人工感染試験供試魚のうち腹腔内接種群でも自然発病魚と同様の出血像，細胞壊死像が観察された。

北海道焼尻島の自然発病魚においても兵庫県水産試験場のヒラメと同様の病理組織像が観察されたが，血球が密に詰まった組織像を示した個体も存在した（Fig. 3）。

脾　臓

兵庫県水産試験場の自然発病魚の脾臓は全体に著しい出血および壊死巣が観察され，特に脾髄には著しい巣状壊死および瀰慢的な壊死が観察された（Fig. 4）。この巣状壊死域では細胞質の崩壊または融解が観察された。さらに著しい出血に加え出血辺縁部に繊維素の沈着が認められた。また瀰慢的な壊死局所でも壊死細胞の崩壊に加えて出血，水腫と繊維素の沈着を起こしていた。莢動脈や莢組織の細胞も顕著に変性していて，この変性細胞が多数の小塊を形成して脾髄組織中に散在していた（Fig. 5）。一部の中心動脈の周囲には壊死崩壊のみられない細網細胞の集団が認められた。兵庫県水産試験場の人工感染実験供試魚の腹腔内接種群でも自然発病魚と同様脾臓全体に著しい出血像および細胞の壊死が観察された。

焼尻島の病魚にも出血像が観察されたが，兵庫県水産試験場の自然発病魚に比べればその程度は軽度であった。脾髄では著しい巣状壊死はみられなかったが，細網細胞の核濃縮，核消失を伴う壊死が広範囲に起こり，核の膨潤も若干観察された。特に莢動脈やその周囲の莢組織，リンパ様組織において細胞は核消失を伴う融解壊死を起こしていた。この壊死部は，水腫と繊維素の沈着を伴い脾髄組織中で小塊として分画されていた。また中心動脈にも著しい壊死が観察された（Fig. 6）。

体側筋

兵庫県水産試験場の自然発病魚では筋肉組織中の毛細血管が充血していた。さらに毛細血管末端の筋組織間質に著しい出血像が観察され，毛細血管壁に細胞の崩壊像が観察されたことからこれが出血の原因と考えられた（Fig. 7）。人工感染実験供試魚の腹腔内接種魚でも同様の組織像が観察され，北海道焼尻島の病魚の筋肉にも同様の毛細血管の充血，怒張およびその端部における出血が観察された。

精　巣

兵庫県下の養殖場の自然発病魚では精巣小葉中隔及び精細管間質に充血から出血に至る循環障害が観察された。個体差はあったが精細管間質での出血の程度が著しい個体では特に精巣辺縁部の出血が顕著で，精細胞や支持細胞は壊死に陥り間質を構成する繊維芽細胞が消失していた（Fig. 8）。精巣中心部では間質の充血が顕著で，血栓状を呈していたが精細管の精上皮の壊死は認められなかった。さらに精巣の輸管や精管の結合織にも充血および出血が観察された。腹腔内接種試験群でも，精巣中

で同様の出血像が観察され，特に精管の結合組織中の出血が顕著であった (Fig. 9)。北海道焼尻島の病魚にも間質に充血像が認められ，輸管や精管の結合織に顕著な出血像が観察された。

卵　巣

兵庫県下の養殖場の自然発病魚では，卵巣薄板間質中の毛細血管が充血，怒張し，卵巣腔に沿った毛細血管末端部には顕著な出血像が観察された (Fig. 10)。さらに間質中の毛細血管周囲の繊維芽細胞には，核の膨化や核濃縮が起こり壊死が認められ，輸卵管の粘膜下結合組織にも充血や出血が起こっていた。北海道焼尻島の病魚も兵庫県下の養殖場の自然発病魚とほぼ同様な病理組織像を示した。

消化管

兵庫水産試験場の自然発病魚のうち症状の著しい個体では，腸管の粘膜固有層，粘膜下組織および筋層内の血管が顕著に充血，怒張し，組織内には著しい出血像が観察された。また粘膜固有層や粘膜下組織の疎性結合組織には細胞変性が起き，粘膜上皮組織中にも激しい出血が観察された。胃では粘膜上皮の出血は顕著でなかったが，腸管同様粘膜固有層や粘膜下組織，筋層中の著しい血管の充血，出血，細胞変性が認められた (Fig. 11)。

兵庫県水産試験場の人工感染実験供試魚のうち腹腔内接種魚の胃にも粘膜固有層，粘膜下組織に出血が観察された。北海道焼尻島の病魚の腸管および胃の標本にも兵庫県水産試験場の自然発病魚とほぼ同様の変化が観察された。またこれら消化管の粘膜固有層および粘膜下組織中の充血や出血は特に消化管壁側面で顕著であった (Fig. 12)。

肝　臓

兵庫県水産試験場の自然発病魚の肝臓には，前述した他の組織中の毛細血管に観察されたような著しい充血や出血像は認められず，肝実質細胞には壊死巣をはじめ，核や細胞質にも顕著な病変は観察されなかった (Fig. 13)。北海道焼尻島の病魚にも肝臓内に局所的な壊死巣や増生像は観察されなかった。

考　察

今回供試した兵庫県下の養殖場，兵庫県水産試験場および北海道焼尻島の養殖ヒラメ病魚に共通して観察された症状は，体色黒化，体側筋および鰭基部，端部の著しい出血ならびに充血が特徴であり，中でも生殖腺の出血は兵庫県下の養殖場および兵庫県水産試験場のヒラメ病魚の全個体，さらに個体差はあるものの北海道焼尻島のヒラメ病魚に雌雄を問わず観察された。

病理組織学的には北海道と兵庫県下の自然発病魚の共通点として腎臓の造血組織や脾臓の脾髄組織に壊死像として核濃縮，核消失，核膨化や組織内での著しい出血が観察され，さらに体側筋繊維間，精巣，卵巣の間質組織，消化管の粘膜層，筋層中等，魚体内各組織にも充血，出血像が観察された。しかし肝臓には著しい壊死および出血は観察されなかった。もちろん対照に供試した健康魚には上記のような変化は観察されなかった。北海道と兵庫県下の自然発病魚は同じ症状を示しながらその程度に差が認められ，兵庫県下のヒラメ病魚の方が北海道の病魚より病変が著しく，この地域による病理組織像の相違の要因としては水温の影響が考えられた。北海道の場合冬期の海水温は 2～5°C と極めて低く，斃死率が 92% と高かったのも魚の行動が不活発となり摂餌も困難で，栄養状態が悪く病原体に対する抵抗力が低下していたためと考えられる。

HRV はラブドウイルス科に属するウイルスであるが，既知魚類ラブドウイルスとの比較では，構造蛋白の面で HRV は IHNV や VHSV に近いとされている (吉水ら, 1987)。このうち IHNV 感染症は造血組織の著しい壊死を主徴とし，消化管の壊死が顕著で，特に粘膜下組織中の好酸性顆粒細胞の変性が著しく，また肝臓内の肝実質細胞に核の膨化を伴う融解壊死が明瞭に観察され，広範囲な融解壊死巣の形成や，肝門脈，肝静脈の血管壁，胆管周囲の結合織の壊死が報告されている (Yasutake and Rasmussen, 1968; Amend *et al.*, 1969; Amend and Chamber, 1970; Yasutake and Amend, 1972; Carlisle *et al.*, 1979)。一方 VHSV 感染症では激しい出血像を示し，急性型では肝臓全域にわたる肝実質細胞の漸慢的壊死が観察され，著しい壊死巣を形成し，細胞質の好酸性化，核内の染色質の核壁側への遍在，核濃縮，核崩壊，壊死巣周縁の水腫等が報告されている (Ghittino, 1965; Amlacher *et al.*, 1980; de Kinkelin and Castric, 1982)。

本報の HRV 感染症を含めこれら 3 者に共通した主な症状は体色の黒化，異常遊泳，眼球の突出，腹水の貯留，筋肉中および鰭基部の出血であり，病理組織学的には，腎臓の造血組織の壊死，脾髄組織中の細網細胞の核濃縮，核崩壊，核融解を伴う壊死である。相違点としては IHNV や VHSV 感染症では肝臓に著しい変化が報告されているが，HRV 感染症では肝臓にこのような変化は観察されなかった。一方 HRV 感染症は脂肪組織，鰾，腸等魚体内各組織に著しい充血，出血を伴う出血性の敗

血症をひき起こし，特に軀幹筋の出血が顕著である点VHSV感染症の報告例 (GHITTINO, 1965; BELLET, 1965) に類似していたが，IHNV感染症とは異なっていた。またIHNV感染症では消化管の壊死が顕著であり特に消化管粘膜下組織中の好酸性顆粒細胞の変性が報告されているが，ヒラメではニジマスの消化管に観察される好酸性顆粒細胞が粘膜層中に存在しない (Fig. 14) ために，この点に関しては考察できなかった。

また最近VHSVは海産魚のシーバスやターボットにも病原性を有することが人工感染試験において明かにされた (CASTRIC and de KINKERIN, 1984) が，ヒラメのHRV感染症の症状および病理組織像と共通する点が多く，今後VHSV感染症とのより詳細な比較検討を行う必要があると考える。

要　約

1984年兵庫県下の養殖場でHRV感染により自然発病したヒラメ病魚，翌年同県水産試験場および北海道焼尻島で自然発病したヒラメ病魚，ならびに同水産試験場で人工感染試験に供されたヒラメを対象に病理組織学的検討を行い，以下の結論を得た。

腎臓の造血組織中に出血と核変性を伴う細胞壊死が観察され，脾臓においても脾髄に出血および細胞壊死が観察された。筋肉では筋肉組織中の毛細血管に充血が見られ，精巣では精巣小葉中隔および精細管間質，さらに精巣輸管や精管の結合織中に充血や出血が認められた。卵巣でも卵巣薄板の間質，輸卵管の粘膜下結合織中に出血，充血が観察された。消化管では粘膜層に充血および出血が観察されたが，肝臓においては顕著な病変はみられなかった。

謝　辞

本研究の遂行に当たり病理組織の観察に種々有益なるご助言を賜った三重大学水産学部助教授宮崎照雄博士に厚く御礼申し上げる。また本研究の一部は水産庁の昭和61年度および昭和62年度健苗育成技術開発委託事業，ヒラメ育苗期の異常減耗に関する疫学的研究ならびに昭和62年度財団法人北水協会学術助成金，新しい魚類病原ウイルス *Rhabdovirus olivaceus* に関する研究によった。ここに記して謝意を表する。

文　献

AMEND, D. F., and V. C. CHAMBER (1970): Morphology of certain viruses of salmonid fishes. II. *In vivo* studies of some viruses causing infectious haematopoietic necrosis virus. *J. Fish. Res. Board Can.*, **27**, 1385–1388.

AMEND, D. F., W. T. YASUTAKE, and R. W. MEAD (1969): A hematopoietic virus disease in rainbow trout and sockeye salmon. *Trans. Amer. Fish. Soc.*, **98**, 796–804.

AMLACHER, E., J. UDE, Christiane RUDOLPH, and G. ERNST (1980): Direct electron microscopical visualization of the presumptive virus of viral haemorrhagic septicemia (VHS) in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) and additional histophathological and haematological observations. *J. Fish Dis.*, **3**, 55–62.

BELETT, R. (1965): Viral hemorrhagic septicemia (VHS) of the rainbow trout bred in France. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126** (Art. 1), 194–198.

CARLISLE, J. C., K. A. SCHAT, R. ELSTON (1979): Infectious haematopoietic necrosis in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) in a semi-closed system. *J. Fish Dis.*, **2**, 511–517.

CASTRIC, J. and P. de KINKELIN (1984): Experimental study of the susceptibility of two marine fish species, sea bass (*Dicentrarchus labrax*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) to viral haemorrhagic septicemia. *Aquaculture*, **41**, 203–212.

de KINKELIN, P. and J. CASTRIC (1982): An experimental study of the susceptibility of Atlantic salmon fry (*SALMO SALA*) to viral hemorrhagic septicemia. *J. Fish Dis.*, **5**, 57–65.

GHITTINO, P. (1965): Viral hemorrhagic septicemia (VHS) in the rainbow trout in Italy. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **126** (Art. 1), 468–478.

五利江重昭・中本幸一 (1986): ヒラメより分離されたウイルスの病原性，魚病研究，**21**，177–180.

五利江重昭・中本幸一・片嶋一男 (1985): ヒラメの病害について—I: 海面小割養殖ヒラメのウイルス感染に起因すると考えられる斃死，兵庫県水試研報，**23**，63–68.

五利江重昭・中本幸一・木村喬久 (1986): 1985年兵庫県立水産試験場に発生したヒラメのウイルス病について，兵庫県水試研報，**24**，43–47.

KIMURA, T., M. YOSHIMIZU, and S. GORIE (1986): A new rhabdovirus isolated in Japan from cultured hirame (Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*) and ayu (*Plecoglossus altivelis*). *Dis. Aquat. Org.*, **1**, 209–217.

YASUTAKE, W. T. and D. F. AMEND (1972): Some aspect of pathogenesis of infectious hematopoietic necrosis (IHN). *J. Fish Biol.*, **4**, 261–264.

YASUTAKE, W. T. and C. J. RASMUSSEN (1968): Histopathogenesis of experimentally induced viral hemorrhagic septicemia in fingerling rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Bull. off. Int. Epiz.*, **69**, 977–984.

吉水 守・西沢豊彦・大迫典久・木村喬久 (1987): ヒラメのラブドウイルス病，魚病研究，**22**，54–55.

Fig. 1. Section of the kidney of a diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing necrosis of hematopoietic cells and hemorrhage in the interstitial lymphoid tissue. H & E stain. (ber=100 μm)

Fig. 2. Higher magnification of a portion of the kidney in Fig. 1, showing necrosis of hematopoietic cells. H & E stain. (ber=25 μm)

Fig. 3. Section of the kidney of a diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido. Hyperemia is recognized in the vessel. H & E stain. (ber=100 μm)

Fig. 4. Section of the spleen of a diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing hemorrhage and necrosis of elliposid and pulp. H & E stain. (ber=100 μm)

Fig. 5. Higher magnification of a portion of the spleen in Fig. 4. H & E stain. (ber=25 μm)

Fig. 6. Section of the spleen of a diseased fish, sampled at Yagishiri Island, Hokkaido, showing necrosis of ellipsoid and pulp. H & E stain. (ber=25 μm)

Fig. 7. Section of the muscle of a diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing hyperemia and hemorrhage of capillary vessels. H & E stain. (bar=25 μm)

Fig. 8. Section of the testis of a diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture, showing hyperemia and hemorrhage in tissue. H & E stain. (bar=100 μm)

Fig. 9. Section of the testis of a diseased fish caused by artificial infection under 10°C, showing hyperemia and hemorrhage in the connective tissue around seminal duct. H & E stain. (bar=100 μm)

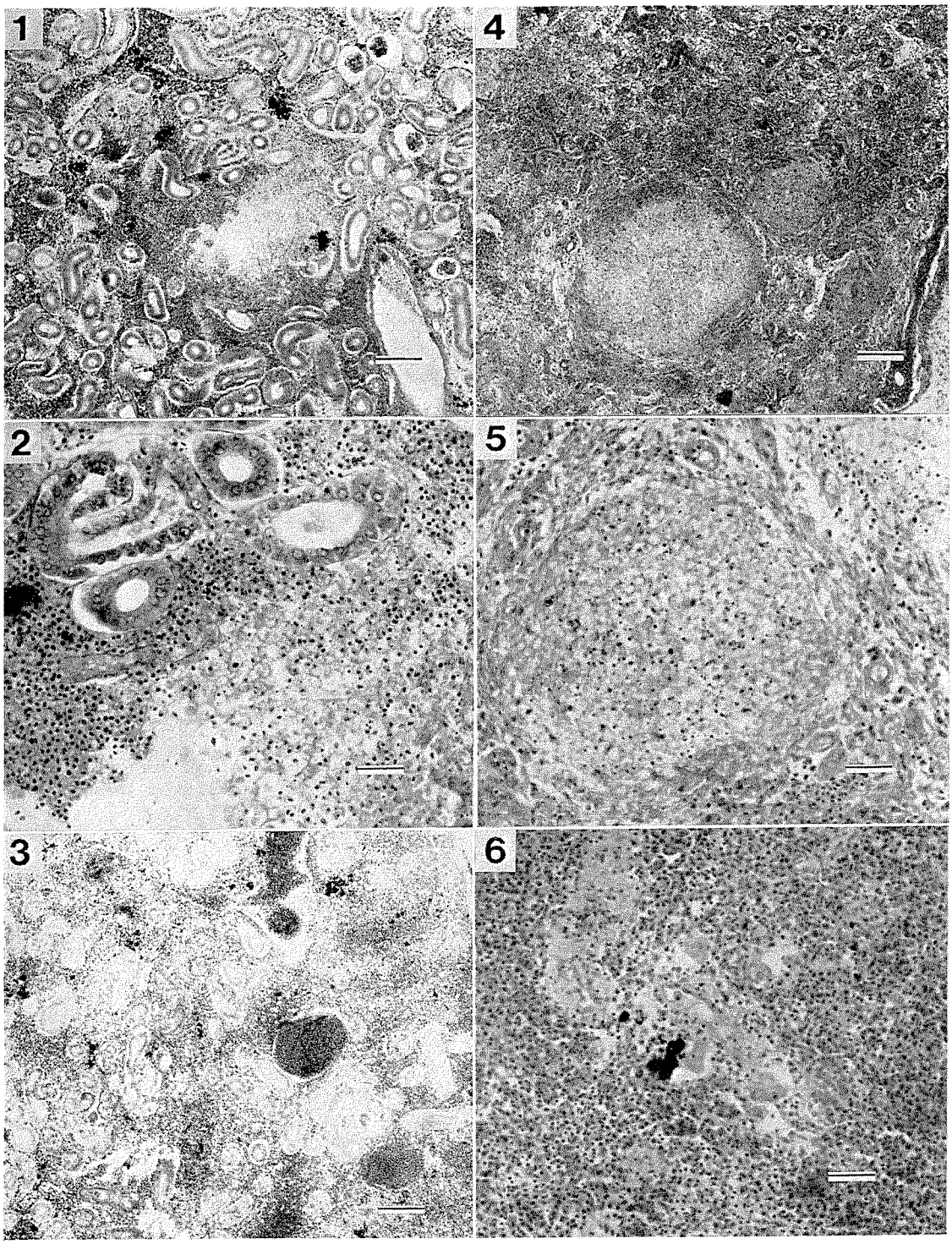
Fig. 10. Section of the ovary of a diseased fish, sampled at Awaji Island, Hyogo Prefecture, showing hyperemia and hemorrhage in interstitial tissue of ovarian lamella. H & E stain. (bar=100 μm)

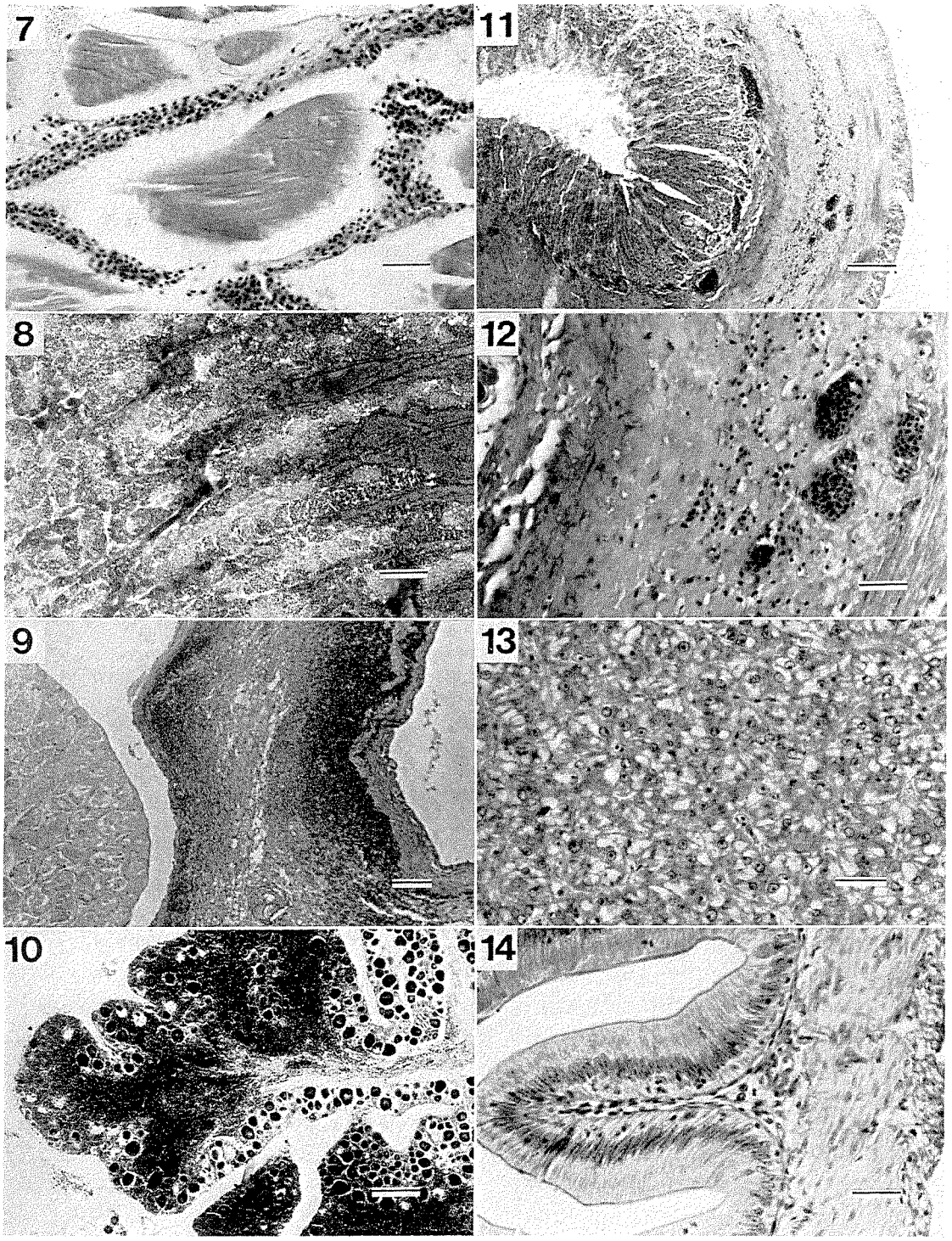
Fig. 11. Section of the stomach of a diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station, showing hyperemia and hemorrhage in submucosa. H & E stain. (bar=100 μm)

Fig. 12. High magnification of a portion of the stomach in Fig. 11, showing hyperemia and hemorrhage in submucosa. H & E stain. (bar=25 μm)

Fig. 13. Section of the liver of a diseased fish, sampled at Hyogo Prefectural Fisheries Experimental Station. No histopathological changes are found in the tissue. H & E stain. (bar=25 μm)

Fig. 14. Section of the intesine of a control fish. H & E stain. (bar=25 μm)


1
4
2
5
3
6


7
11
8
12
9
13
10
14