

IPN 症のニジマスにおける膵臓および肝臓の電子顕微鏡による観察

工藤 重治・黒沢 団・国峯 一声・信沢 邦宏・小林 茂

(1973年3月15日受領)

Electron Microscopic Observations of the Pancreas and Liver in the Fingerling Rainbow Trout with Symptoms of IPN

Shigeharu Kudo, Dan Kurosawa, Issei Kunimine, Kunihiro Nobusawa,
and Shigeru Kobayashi

The histo- and cyto-pathological changes in the exocrine portions of the pancreas and in the liver were observed in the fingerling of the infected rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson). Symptoms of the trouts suffered from infectious pancreatic necrosis (IPN) disease are the dark coloration, exophthalmos, and acites.

Although the extent of the necrotic or degenerated lesions in the cytoplasm of the pancreatic acinar cells was different from cell to cell, a number of cells displayed one, several, or all of the following structures in the cytoplasm: myelin-figured lysosomes with often intermingled virions; necrotic degeneration of zymogen granules; and of flattened layered cisternae of rough endoplasmic reticulum accompanied with loss of ribosomes; grouped virions; cytolysosomes containing several of the myelin-figured electron dense material, virions, cell organelles, fine filaments, winding membranous structures; and clear zymogen granules containing a flocculent material. In more advanced and the most advanced cases there appeared pycnotic nuclei of the acinar cells, cellular detritus, degenerated cell organelles such as mitochondria which are often scattered in the intercellular space, and in the exocrine portions there appeared some regions electron-microscopically indistinguishable from each other by fusion of several acinar cells. Also in the hepatocytes pathologically displayed cytoplasmic structures were almost similar to those of the acinar cells except degeneration of zymogen granules. However, the extent of necrotic lesions of the hepatic tissue was so far small as compared with the pancreatic tissue in one and the same individual, and a heavy destruction of the acinar cells in several regions of the pancreatic tissue was accompanied with the beginning of the necrotic degeneration of hepatocytes with accumulations of fat droplets different in size and increase of lysosomes. In the pancreatic and hepatic tissues of IPN disease infiltration of macrophages and two or polymorphonuclear wandering cells was conspicuous, and these cells and Kupffer's stellate cells contained a large number of lysosomes and one to three cytolysosomes.

The majority of virions in the pancreatic acinar cells, hepatocytes, wandering cells and Kupffer's stellate cells appeared in lysosomes and cytolysosomes identified with the intracytoplasmic inclusions by light microscopy, in which virions became indistinct in profile and were destroyed to transform electron dense myelin-figured and finely granular materials. A round, oval, or bacilliform materials occupied by an electron dense myelin figure alone were often discharged into the intercellular space.

In ultra-thin sections, virions (size range of 50–60 m μ , an average diameter of 54.3 m μ) appeared unenveloped, and hexagonal to round in appearance. The virus perhaps is IPN virus and may belong morphologically to reovirus group in comparison with the observations by Moss and Gravell (1969).

Near the virions of various numbers, two kinds of rod-like bodies having an average diameter of 60 m μ and 28 m μ often appeared setting in parallel array or crossing in irregularity, respectively. The end of the rod-like bodies often showed roundness, and the transverse sections of them showed a round shape and tubular structures exhibiting a clear central portion.

(S. K. Department of Anatomy, School of Medicine, Gunma University, Maebashi-shi, 371, Japan; D. K., I. K., K. N., and S. K., Fisheries Experiment Station, Maebashi-shi, Gunma-ken, 371, Japan)

IPN 症の組織病理学的研究は比較的多く (Wood et al., 1955; Parisot et al., 1965; Yasutake et al., 1965; Yasutake, 1970), その特徴として膵臓外分泌部の腺房細胞 (acinar cell) の壊死および細胞質内の球状封入体 (inclusion body) の出現が報告されている。しかし、電子顕微鏡によるその細胞病理学的な報告は殆んどない。また、IPN 症のマス類からウィルスが分離されて以来 (Wolf et al., 1960), その性質、大きさおよび形態などについて、多く研究されてきた (Malsberger and Cerini, 1963, 1965; Wolf, 1964; Cerini and Malsberger, 1965; Moss and Gravell, 1969)。しかし、IPN ウィルスの分類は確定されておらず、ピコルナウィルス (picorna virus) 群 (Malsberger and Cerini, 1963; Cerini and Malsberger, 1965) あるいはレオウィルス (reovirus) 群 (Amend and Chambers, 1969; Moss and Gravell, 1969) に属すると言われている。

これまでの IPN ウィルスに関する研究は 2~3 の細胞系に接種し、培養したウィルスについてなされているが (Wolf et al., 1960; Malsberger and Cerini, 1963, 1965; Cerini and Malsberger, 1965; Moss and Gravell, 1969), 著者らは IPN 症のニジマス稚魚の膵臓の腺房細胞や肝細胞内に直接ウィルス粒子を見出し、しかもそれらが細胞質内で崩壊する過程を観察することができたので報告する。群馬県水産試験場箱島養鱒場では昭和 35 年より毎年 IPN 症の徴候を示すニジマス春稚魚が大量へい死し、その生残率は 40~60% で現在にいたっている。

材料および方法

群馬県水産試験場箱島養鱒場で水温 13~14°C の湧水で飼育中の健康および IPN 症のニジマス (*Salmo gairdneri* Richardson) の膵臓と肝臓を用いた。IPN 症の稚魚は 1972 年 1 月上旬から下旬に孵化し、3 月上旬から 4 月上旬に発病中の数群の中から、IPN 症の外見の特徴である体表の暗調な色彩、両眼突出、腹部膨満および泳ぎ方などをもとに選別された。被検個体数 250 匹、体長 2.0~4.0 cm, 体重 0.25~1.0 g, 標本数 30 匹である。肝臓は肉眼的に点状うっ血がしばしば認められた。健康魚は 1971 年 11 月 18 日に採卵、12 月 11 日に孵化し、IPN 症の全く発生しなかった群の稚魚および一年魚のものである。

電顕による観察のために、膵臓および肝臓の小組織片を 3% 蔗糖を含む 4% または 5% グルタルアルデヒド磷酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 時間前固定した後、5% 蔗糖を含む同緩衝液で 1 晩、3~4 回液を交換して洗滌し、さらに 3% 蔗糖を含む 1% オスミウム酸磷酸緩衝液 (pH 7.4) で 3 時間、後固定した。エタノール系列およびプロピレンオキサイド脱水を経て、エポン包埋した。IPN 症の稚魚から得たエポン包埋の小組織片から約 1 μ の切片を作製し、トルイジン青で染色して光学顕微鏡で観察し、組織学的に病変を確認した後、その小組織片から超薄切片を作製した。超薄切片は酢酸ウランと酢酸鉛で二重染色し、電子顕微鏡で観察した。

また、健康および IPN 症のニジマス稚魚の膵臓と肝臓の小組織片を Levi 氏液で固定し、光顕的に観察して参照した。

結 果

I. 膵臓外分泌部

1) 正常な膵組織

膵臓の外分泌組織は幽門垂間やその付近の脂肪組織の中に見出され、胞状ないし管状の終末部 (acinus) よりなり、その外側は中皮 (mesothelium) で被われている。終末部の狭い腺腔には細胞質が相対的に少ない腺房中心細胞 (centro-acinar cell) が 1~2 個存在する。腺房細胞の核はやや細胞基底側に偏在し、通常核内には相対的に大きな核小体を 1~2 個含む。その核上部には普通チモーゲン顆粒 (zymogen granule) を含むが、また殆んどチモーゲン顆粒を含まない腺房細胞も少なくない。導管は腺房中心細胞と殆んど類似の上皮細胞よりなり、縦断面では紡錘形で、その核の形は不定形または紡錘形で、著名な核小体を有することは殆んどない。

電顕的には腺房細胞の腺腔面に通常少数の短い微絨毛が不規則な方向に派生している。核上部から腺腔面にかけての細胞質内には限界膜で包まれたチモーゲン顆粒、よく発達したゴルジ装置 (Golgi apparatus)、粗面小胞体 (rough-surfaced endoplasmic reticulum) がある (Fig. 1)。核側部や核下部では密な層板配列の粗面小胞体が見られる。糸粒体は細胞質全体に散在しており、また時折り少数のライソゾーム (lysosome) がみられる。ゴルジ装置は 2~3 層の平行に配列した層



Fig. 1. Normal pancreatic acinar cells containing the well-developed cisternae of rough endoplasmic reticulum, zymogen granules, Golgi apparatus (G) and scattered mitochondria. Formation of zymogen granules in the cytoplasm is shown. AC: centro-acinar cell. ($\times 5,000$).

板、多数の小胞およびチモーゲン顆粒とはほぼ同様の物質を含む液胞よりなる。細胞質基質は多数の遊離リボソーム (free ribosome) によって満たされている。腺腔はチモーゲン顆粒と同様の電子密度をもった均質な物質で満たされ、また時折り腺房細胞より腺腔に開口分泌 (emiocytosis) の様式でチモーゲン顆粒の放出がみられる。腺房中心細胞は腺房細胞より電子密度は高いが遙かに小さい。その核は細胞質に比べて極めて大きく、ところどころに深い陥凹がみられる。その細胞質内には少数の小さな糸粒体、小さなゴルジ装置、少数の粗面小胞体が含まれる。これに続く導管の上皮細胞は形態学的には腺房中心細胞と殆んど同様であるが、管腔面に比較的長い微絨毛を派生し、管腔は狭くなっている。

2) IPN 症膵組織

IPN 症のニジマス膵組織はその症例により病変の程度は一樣でなく、ある腺房細胞ではその細胞質内に円形、卵形または杆状の小体を少数含み、しかも細胞間腔にも同様の小体が存在するが、組織全体としては正常に近いもの、終末部の腺房細胞の配列が不規則で胞状または管状の形態を有せず細胞質の変性または壊死

した腺房細胞が多数みられるもの、膵組織の識別が不可能なほどに壊死しているものなどである。細胞質内および細胞間腔に存在する小体はアザン染色で赤色、トルイジン青で濃紺色に染まる。IPN 症における既知の細胞内封入体は本材料では細胞質の変性または壊死した腺房細胞の特に多い組織で頻繁に観察され、腺房細胞内に 1~2 個の大きな円形封入体を含むものも少なくない。この封入体と細胞質の間には Levi 氏液固定の標本では僅少の間隙が認められたこともあるが、エボン包埋した標本では殆んど認められなかった。細胞変性や壊死の比較的顕著な膵組織で、外見的に正常に近い腺房細胞の細胞質内に通常の染色性をもつチモーゲン顆粒以外に染色性の極めて弱いチモーゲン顆粒が混在することがしばしばである。

電顕的にも腺房細胞の細胞質における変性の程度はそれぞれの細胞によって一樣でないが、ミエリン像 (myelin figure) を有するライソゾームの出現、チモーゲン顆粒の崩壊、粗面小胞体の脱リボソーム (de-ribosome)、集団をなすウィルス粒子 (virion) の出現、ウィルス粒子その他の構造を含むチトリゾーム (cytolysome) の出現、雲絮状物質を含むチモーゲン



Fig. 2. Pancreatic tissue from the fingerling rainbow trout with IPN disease. A great number of necrotic cellular detritus and degenerated cell organelles of the acinar cells containing several fat droplets are scattered. Many virions are packed in the membrane-bound cytolysosomes of the cellular detritus (arrow). CA: blood capillary. ($\times 3,500$)

顆粒の出現などの変化がみられた。核、ゴルジ装置および糸粒体は腺房細胞の細胞質変性があまり顕著でない場合には殆んどそれらの形態的变化は認められなかった。しかし、脾組織の細胞変性や壊死が顕著で個々の細胞が識別できない部位があったり、また多数の細胞破片が散在している場合には、しばしば核が細胞の片方に極端に偏在し、その輪郭部には種々の凹凸があり (Fig. 2)、しかも長く延び、濃縮の状態を呈するものも少なくない。さらにゴルジ装置では層板は正常と殆んど変わらないことが多いが、ゴルジ小胞やゴルジ空胞は極めて少なく、殆んど存在しないこともある。

細胞質変性の比較的少ない腺房細胞ではライソゾームの増加があるが、この多くはミエリン像を伴う円形、卵形または杆状の物質塊で光顕的に観察されたトルイジン青染色で濃紺色の小体に一致するものである。ミエリン像は疎に配列したもから緻密に配列したものまで種々の段階があるが、前者から後者へと電子密度の増大を伴いながら移行する傾向がある。また、電子密度が低く、疎な配列のミエリン像では粗面小胞体膜と連続していることが多く、しばしば層板配列した粗面小胞体が十数層に及んで脱リボソームしていることがある。この状態は崩壊中のチモーゲン顆粒や糸粒体およびウィルス粒子などを含むチトリゾームに接してみられることが多い。チモーゲン顆粒の崩壊の過程が頻繁にみられるが、これには個々のチモーゲン顆粒が細胞質の色々な部域で起こる場合と、数個またはそれ以上のチモーゲン顆粒がチトリゾームの中で起こる場合とがある。いずれの場合にもチモーゲン顆粒の崩壊初期にはその内容が微細顆粒状物質の集塊となり、限界膜との間に相対的に広い空隙が生ずる。また、この集塊は偏在することがしばしばである。このような崩壊中のチモーゲン顆粒ではその限界膜が波状を呈し、その周囲には一重ないし数重の波状の膜構造を伴うことが多いが、この膜構造はしばしば粗面小胞体膜と連続している。一般に、崩壊したチモーゲン顆粒の内容が電子密度の高い微細顆粒状物質として分散している場合には数重の膜構造で細胞質域と境される。

脾組織全体としても、また腺房細胞自身も細胞変性や壊死の程度が少ない場合にはその細胞質に現われる比較的小さなチトリゾームはその形成初期には通常いろいろな数のウィルス粒子やいろいろな程度に同心円配列したミエリン像を含むが (Fig. 3)、その後期にはミエリン像のみからなる物質塊となり、細胞外に放出される所見がある。しかし、細胞質変性の顕著な腺房細胞に現われる極めて大きな、時折り細胞質全体の半

分以上も占めるチトリゾームにはミエリン像からなる物質塊、変性した多数の糸粒体、崩壊中のチモーゲン顆粒、電子密度の高い微細顆粒状の物質塊、集団をなすウィルス粒子、いろいろな方向に迂曲する膜構造、微細な原線維などが含まれるが、このようなチトリゾームの中ではそれらの構造が完全に消化されて細胞外に放出されることは殆んどなく、腺房細胞自身の崩壊によって、それらの構造の形態的变化を殆んど伴わずに細胞間腔に分散される。この分散した構造物がマクロファージ (macrophage) やその他の遊走細胞 (wandering cell) によって貪食される所見がある。

雲架状物質を含む明調なチモーゲン顆粒は光顕的に観察された染色性の弱いチモーゲン顆粒に一致するが、これらはゴルジ装置で形成され、正常なチモーゲン顆粒の変性した状態とは識別することができる。明調なチモーゲン顆粒のあるものはその限界膜の一部が内部へ落込み、しかも波状を呈して萎縮を示すが、その内容物が濃縮して偏在することはない。

IPN 症の脾組織ではマクロファージ、その他 2~3 葉の分葉核を有する遊走細胞の浸潤が顕著で、その細胞質内には多数のライソゾームやウィルス粒子を含むチトリゾーム、細胞小器官 (cell organelle)、少数の脂肪滴などを含むことが多いが、特殊顆粒を含むことは少ない。よく発達したゴルジ装置ではライソゾームの形成が盛んである。ライソゾームやチトリゾームを多く含む遊走細胞では細胞質の一部が変性していることがあるが、核濃縮は稀れである。時折り特殊顆粒を含む遊走細胞では一般にライソゾームやチトリゾームを有することは少ない。脾組織の壊死が顕著な場合にはその周囲の脂肪組織にも細胞変性や壊死がみられることがある。

II. 肝臓

1) 正常な肝組織

正常な肝細胞は多面体形で、Disse 氏腔 (類洞周囲腔, perisinusoidal space)、毛細胆管 (bile canaliculus) 腔および隣接する肝細胞に面している。肝細胞から Disse 氏腔に向って多数の迂曲した微絨毛が突出され、これらのうちには分岐するものも少なくない。また、毛細胆管腔にも少数の微絨毛を突出しているが、これらの微絨毛は殆んど迂曲することではなく、稀れに分岐するものがみられるに過ぎない。肝細胞と肝細胞の隣接面はゆるやかな波状を呈することもしばしばであるが、おおむね平滑で、稀れに楔状の嵌合が認められる。この隣接面にある少数のデスモソームと毛細胆管の縁にみられる junctional complex によって肝細胞は互

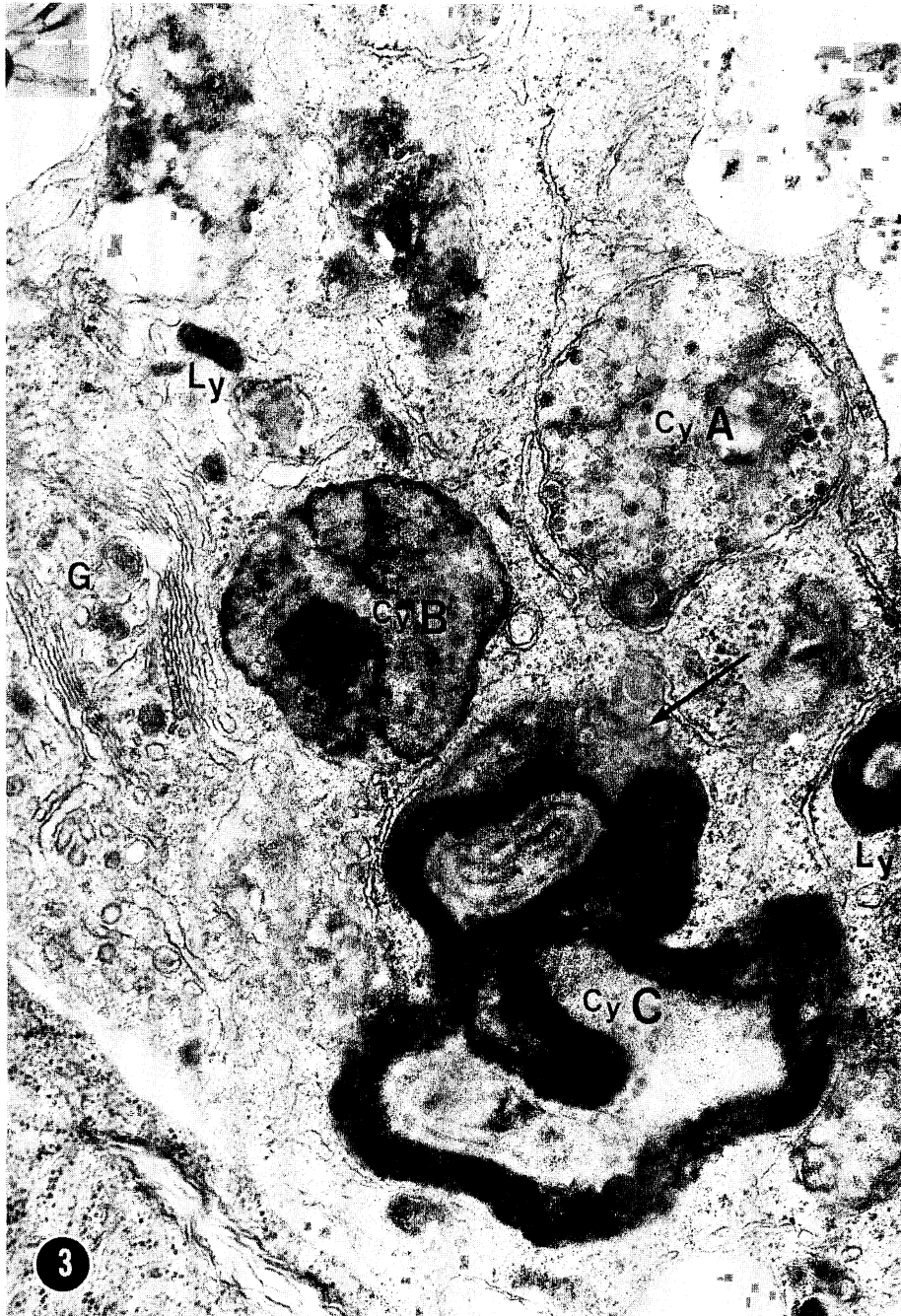


Fig. 3. A cytoplasmic portion of the acinar cell from the rainbow trout with IPN disease. Cytolysosomes (Cy), A, B, and C contain virions and a myelin-figured material, and the virions appear indistinct in profile in the order of the A, B, and C (arrow). The finding suggests destruction of the virions in the cytolysosomes. G: Golgi apparatus, Ly: lysosome. ($\times 28,800$).

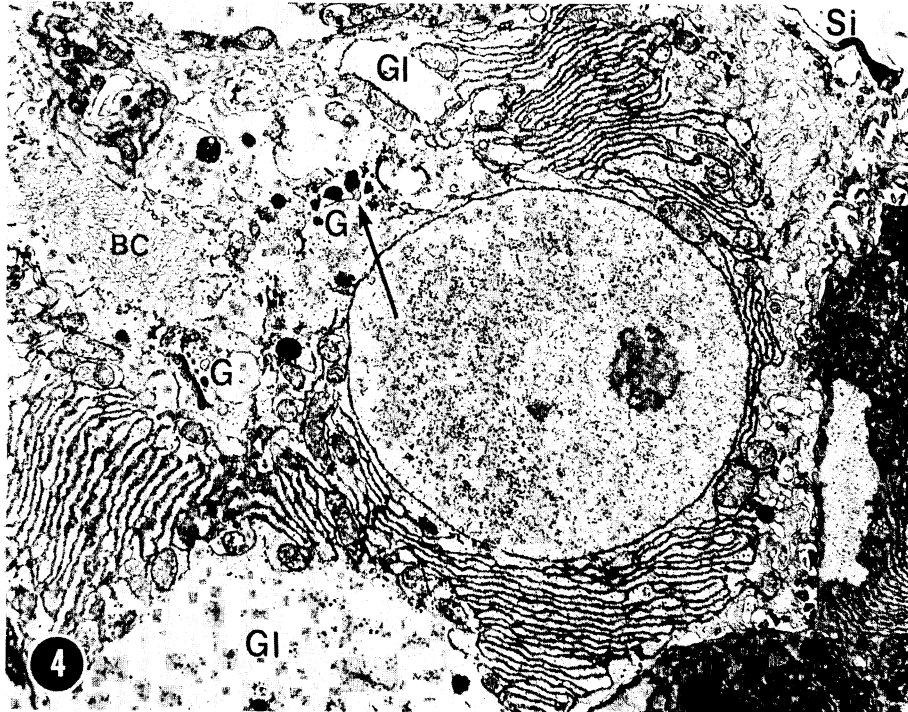


Fig. 4. A normal hepatocyte from the healthy rainbow trout. The cytoplasm contains the well-developed cisternae of rough endoplasmic reticulum, scattered mitochondria, lysosomes, Golgi apparatus (G), and glycogen areas (Gl). A lysosome originates from the enlarged end of Golgi lamellae (arrow). BC: bile capillary, Si: sinusoid. ($\times 4,900$).

に結合されている。

肝細胞の核は 1~2 個ではほぼ円形または卵形で、比較的大きな核小体を 1~2 個含む (Fig. 4)。大多数の糸粒体は円形ないし楕円形で、細胞質全域に散在するが、グリコーゲン野には分布しない。また、長い杆状を呈する糸粒体も少数認められる。さらに、糸粒体内の一部に電子密度の高いミエリン像がみられるものもある。粗面小胞体は扁平囊状で非常によく発達し、数層から十数層にほぼ平行な配列をした層板を形成して細胞質の大部分を占めるが (Fig. 4)、ゴルジ装置の付近では層板を形成することは少なく、粗面小胞体囊の端で附着リボソーム (adherent ribosome) を失い、ゴルジ小胞に移行する像もしばしばみられる。滑面小胞体 (smooth-surfaced endoplasmic reticulum) はグリコーゲン野およびその周縁部で比較的良好に発達し、分岐吻合もみられる。しかし、その発達程度は個々の肝細胞によってかなりの違いがある。また、滑面小胞体と粗面小胞体とが連続していることもしばしばある。ゴルジ装置は瀰漫性であるが多くは毛細胆管側またはそ

の付近に位置し、3~4 層のゴルジ層板、多数のゴルジ小胞および比較的电子密度の高い物質を満たすゴルジ液胞よりなる (Fig. 4)。この液胞よりゴルジ装置付近に存在する顆粒性のライソゾームが由来する。また、このようなライソゾームにゴルジ小胞が 1 ないし数個合体する所見がある。ライソゾームは直径約 $0.5\sim 2\mu$ で限界膜に包まれるが、この中に均質無構造で種々の電子密度をもつ円形体や空胞を有し、一般にゴルジ野またはその付近に集中する傾向がある。マイクロボディ (microbody) は限界膜に包まれ、中程度の電子密度を有する微細顆粒状物質で満たされる。これらは細胞質内に散在し、しかも、しばしば粗面小胞体膜とその限界膜が直接連続している。グリコーゲンは一般にグリコーゲン野に集積して存在する。また、一年魚の肝細胞は少数の小脂肪滴を含むことがある。

正常なニジマス肝組織の類洞腔 (sinusoidal space) に存在する Kupffer 氏星細胞は類洞腔の内上皮 (endothelium) の一部を構成し、有核部を類洞腔内に伸張させ、細胞表面より細胞質突起を出す。核は分葉ま