

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—I

ニジマス稚魚

宮崎照雄・窪田三朗

三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonous Disease of Fishes—I

Rainbow Trout Fry

Teruo MIYAZAKI and Saburoh S. KUBOTA

Faculty of Fisheries, Mie University

三重大学水産学部研究報告

第 4 号 別 刷

Reprinted from

Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University

No. 4, November 1, 1977

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—I

ニジマス稚魚

宮崎照雄・窪田三朗
三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonous Disease of Fishes—I

Rainbow Trout Fry

Teruo MIYAZAKI and Saburoh S. KUBOTA
Faculty of Fisheries, Mie University

Ichthyophonous disease had broken out among rainbow trout fry in July 1975, and after that a fish group containing diseased fish had been kept for one year. Hence authors observed histopathologically diseased fry in the initial stage of the epizootic and moribund yearling fish in the clonic condition. This paper deals with the result of the observation on diseased fry.

Ichthyophonous invaded the various tissues and took the shape of multinucleate spherical or hyphal body. The smallest form was binuclear bodies. The multinucleate-spherical bodies were walled by the thick cell wall and contained many nuclei with a large nucleolus and granular cytoplasm forming the mesh-work. Their size was varied and became to large with growth and could be measured in the diameter 7 to 10 μ in the binuclear bodies and 20 to 140 μ in multinucleate spherical ones. The hyphal bodies often extended from the spherical body and produced hyphal spores with one to ten nuclei, whose hematogenous dissemination caused systemic infection.

The inflammatory reaction against Ichthyophonous was characterized by mononuclear-cellular proliferation with giant cell formation and fibroblasts proliferation.

鮭鱒類のイクチオフォヌス症はヨーロッパで古くから知られ、種々の研究が行なわれた (M. PLEHN *et al.* 1911, A. PETTIT 1913, C. LEHMANN *et al.* 1933, A. DORIER *et al.* 1961, E. AMLACHER 1965)。また本邦でも北海道でニジマスに本症の流行があったことが報告されている (粟倉ら1966)。近年、本症が本邦の広範な地区にわたって流行し、大きな被害が見られるようになった (畑井私信, 井上ら 1977)。我々は本症が三重県下の養殖場で発生したのを機会に1975年6

月から1976年6月にかけて、感染初期の稚魚から慢性感染状態にある当才魚にわたる本症の経過を経時的に観察した。本報ではまず稚魚の本症の病理組織学的観察結果について述べる。

材料および方法

1975年6月に三重県下の一養殖場で、県外の養殖場から移入直後のニジマス稚魚にイクチオフォス症が発生した。そこで1975年6月と8月に疾病発生群から体色黒化やヤセの症状を呈している病魚15尾を採取した。病魚の体長は約4cmであった。なお、この魚群はその後も有効な治療や処置を施すことなく飼育され続けたので、1975年12月に1年魚、1976年6月に1.5年魚の重篤な病魚を採取し、イクチオフォススの培養*と病理組織学的観察に供した。病魚を10%ホルマリン水またはブアン液で固定後、常法に従ってパラフィン切片を作成した。染色はワイゲルト鉄ヘマトキシリン・エオジン染色、マソンのトリクローム染色、アザン染色、PAS反応、渡銀染色（渡辺変法）を目的に応じて施した。

結 果

肉眼的所見

稚魚期の病魚は外見的に体色黒化やヤセを示す以外に著変はない。剖検的にも軽症例では異常を認めることは難しいが、重症例では貧血、肝臓や脾臓表面の白点、腎臓の局所的な腫大が認められた。重症例の病魚は一般に頻死の状態にあった。

病理組織学的所見

感染病巣の圧扁標本の観察では、イクチオフォススは一般に厚い細胞壁で囲まれ、その中に屈光性の高い顆粒を多数含む細胞質をもつ球体としてみられる。なかには球状体の厚い細胞壁の一端が破れ、そこからアメーバー状の胞体突出しているもの、または短く太い菌糸を出しているものもみられた (Fig. 1)。

組織学的に、イクチオフォススは最も小さなものでは1~2個の核を持つにすぎないが、发育したものでは多数の核を持つ球状体 (Multinucleate spherical bodies) として認められることが多い。この多核球状体の細胞壁は無構造で厚く、PAS反応強陽性で、その内側に接して薄い原形質膜がある。その細胞質は微小なPAS反応陽性の顆粒が念珠状に継がり網目状に配列していた。また核は円形で1個の明瞭な核仁を含み、細胞質の網目の接点上か原形質膜に接して分布し、直接分裂で数を増していた (Fig. 2, 3, 4, 5, 6)。イクチオフォススの球状体の大きさは、2核体で直径7~10 μ であり赤血球 (6 \times 14 μ) より小さく (Fig. 2)、8核体では12~17 μ 、多核体では20~125 μ (最大140 μ) の範囲にあった (Fig. 3~6)。小型の球状体の細胞壁は薄く、核の数も少なく細胞質の網目も粗であるが、发育するにつれ細胞壁は肥厚し、核数は増加し、網目はより複雑になっていた。

数多くの多核球状体のなかには、1本から数本のかかなり太い糸状体 (Hyphal body) を伸長している例 (Fig. 7) もみられた。それでは細胞壁が成層して肥厚し、その細胞壁の1点または数カ所で穴があき、そこから薄い細胞壁で囲まれた短い糸状体が伸長していた。この糸状体の細胞質は多核球状体のそれがそっくり糸状体内に移動したもので、親の多核球状体は中空の細胞壁のみを

*イクチオフォススの培養は三共株式会社畑井喜司雄氏によりなされている。分離株の分類学的研究結果は同氏から報告される予定である。

残すようになる。糸状体内の細胞質は不規則に分裂し、1～2個から10個の核をもつ糸状体胞子 (Hyphal spores) を形成していた。糸状体胞子は糸状体の先端部の破壊によって順次糸状体外に放出されていた (Fig. 7)。肝臓や腎臓、脾臓でみられた糸状体を伸長した多核球状体のうち、大単核細胞反応を被っているものの大きさは直径25～100 μ であるが、その反応を伴わないものでは25～60 μ で幾分か小さかった。なお数のうえでは前者の方が卓越していた。

イクチオフォスが組織内に伝播、侵入するのは一般に2核体が血行性に伝播することから始まっていた (Fig. 2, 19)。肝臓、腎臓造血組織、脾臓などの網内系細胞に富む組織では2核体が網内系細胞に呑食されて組織内への侵入が確立し、または4～8核体が類洞を閉塞することによっても組織感染が確立していた。他の組織・器官では血行性に伝播した2～8核体が毛細血管を閉塞することによって組織内への侵入が確立されていた (Fig. 16, 21)。多核球状体の発育とともに周囲の組織が圧迫されるが、球状体の周囲には活発な炎症反応が起る。炎症反応は大単核細胞の繁殖を主徴とし、少数の線維芽細胞を伴う繁殖性炎で特徴づけられ、多くの組織・器官に共通的であった。炎症反応の主体をなす大単核細胞は1～2個の明瞭な核仁を含む楕円形または一部がくびれた円形の核と、PAS反応陽性顆粒を含み弱好塩基性の細胞質をもっている。炎症性細胞反応の形態は次のようであった。

- a) 大単核細胞が層を成して多核球状体の細胞壁表面の全面を囲繞する (Fig. 3)。
- b) 大単核細胞が合胞体 (Syncytium) を形成して多核球状体を囲繞する (Fig. 4)。これら a), b) の二形が最も一般的な反応であった。
- c) 大単核細胞またはその合胞体と異物巨細胞が多核球状体を囲む (Fig. 5)。この異物巨細胞は多数の核の半円状の配列によって大単核細胞の合胞体と区別できる。
- d) 大単核細胞の反応が弱く、線維芽細胞の反応が卓越することもある (Fig. 6)。この反応は体側筋組織に著しかった (Fig. 14)。
- e) 多核球状体から糸状体が伸長し、その糸状体内で糸状体胞子が形成されている段階のものでは、糸状体を囲む異物巨細胞を含む肉芽腫がその周囲に形成されることもある (Fig. 7)。特に糸状体に対する異物巨細胞反応は著しく、長く伸びた糸状体に対して異物巨細胞が単独で反応することが多かった。この段階では膠原線維形成を伴う線維細胞、線維芽細胞の層が肉芽腫や巨細胞の周囲を囲むこともあった。しかし糸状体を出す球状体に対して炎症反応が欠除していることもあった。そこでは糸状体が組織内に直接伸びていた。この現象は初発病巣と推察される胃壁で特に目立った (Fig. 9, 10)。
- f) 糸状体の先端から放出された糸状体胞子はその場に集塊を成して多核球状体に発育していることが多く、それらに対してそれらを囲繞する肉芽腫が形成されることもあった (Fig. 18矢印)。

また、各組織・器官の感染病巣の姿は次のようであった。

1) 胃：初期病巣は胃盲のう部胃壁に他の組織・器官に先がけてみられた (Fig. 8)。そこでの多核球状体は粘膜上皮間および胃腺層内で発芽したり、さらには細くて長い分枝をもつ糸状体を粘膜下織に向けて伸長していた。ここで発芽している多核球状体の直径は15～20 μ にすぎず、その細胞壁も薄い。また糸状体の管径は約8 μ で2核体の大きさとほぼ近似的であった。粘膜下織に伸長した糸状体の先端から糸状体胞子が放出されているが、ここでは2核体が卓越していた。感染局所の粘膜上皮は剥離するが炎症反応はみられなかった。

さらに、粘膜下織で多数の幼若な多核球状体が発芽して糸状体を粘膜下織や筋肉層に縦横に伸長しそこに糸状体胞子を放出している例があった (Fig. 9, 10)。この感染局所は融解壊死に陥り、

胃腺組織を巻き込んだ潰瘍が形成されていた (Fig. 9)。こうした活発な糸状体胞子の形成は胃壁に特徴的であり、胃の連続切片の観察から粘膜下織で発芽する球状体の数に多寡があってもその全例に共通して見られた。この段階に達した個体はいずれもイクチオフォヌスの全身感染が確立していた。

2) 腸, 幽門垂, 腹膜: これらの消化管の粘膜下織や筋肉層には多核球状体が孤在的に現われていた (Fig. 20)。ここには、胃の感染病巣で見られた若い球状体からの胞子形成の特徴は確認できなかった。腹膜とその中の睪細胞塊およびランゲルハンス氏島にも大単核細胞の合胞体などで囲繞された多核球状体が孤在していた。

3) 肝臓, 腎臓, 脾臓: 肝臓 (Fig. 11) や腎臓の造血組織 (Fig. 18) など類洞構造が発達し、網内系細胞に富む組織では多数の多核球状体が孤在的に現われ、その大半は活発な炎症性細胞反応を受けていた。これらの組織ではイクチオフォヌスの糸状体胞子の形成が盛んであった (Fig. 7) が、胃の初発病巣とは異って、発芽 (Germination) している多核球状体は大きくて、その球状体から伸長した糸状体の管径も太く、糸状体内で形成された糸状体胞子も1~2核のものより、10核ぐらいをもつものの方が多かった。イクチオフォヌスの組織内感染の程度は一般に腎臓造血組織で最も著しかった。脾臓では球状体は夾組織に多く現われていた (Fig. 17)。また腎臓の腎小体の糸球体毛細血管内に多数の2核体が充塞することもあり (Fig. 19)、この所見は2核体が血行性伝播をしていることを裏づけるものであろう。

4) 心臓, 鰓, 赤腺, 脈絡膜, 偽鰓腺: これら血管系および毛細血管に富む組織にもかなりの数の多核球状体が現われていた。心臓では主に心室心筋層 (Fig. 15) や心外膜に、鰓では鰓薄板毛細血管や鰓弁動脈 (Fig. 13) に、赤腺, 脈絡膜 (Fig. 21), 偽鰓腺 (Fig. 16) では毛細血管内に多核球状体が孤在的に現われていた。これらの組織・器官のうち、偽鰓腺では炎症性細胞反応に乏しいが、他の組織ではいずれも大単核細胞が合胞体を形成して多核球状体を囲繞していた。また脈絡膜中の多核球状体のなかには糸状体胞子形成を行っている例もあった。

5) 脳, 脊髄, 神経節: 脳では脳膜や脳髄 (Fig. 12) に多核球状体が孤在的に現われ、その周りには大単核細胞合胞体に囲繞されていた。なお、イクチオフォヌスの糸状体胞子形成による繁殖は、胃, 肝臓, 腎臓造血組織, 脾臓などで著しく、他の組織・器官では稀れかほとんど起らなかった。

考 察

SINDERMANN *et al.* (1954) によれば、イクチオフォヌスの実験感染において経皮または経鰓感染は不成功であり、経口感染のみ成功したとしている。魚体内への侵入門戸は胃などの消化管が考えられるが、ニジマスにおいて粟倉ら (1966) は胃に特徴的な変化を認め、また我々の観察の結果から、1) 胃壁に最も早くからイクチオフォヌスがみられること、2) 親の球状体から伸長した糸状体が粘膜上皮から粘膜下織に向って伸びていること、3) 胃壁に侵入したイクチオフォヌスの比較的小型の多核球状体が活発に発芽し、糸状体を伸長してその中で糸状体胞子を形成していること、4) その糸状体胞子も2核体が卓越していること、5) この2核体が血行性に伝播して全身感染に重要な働きをしていることなどが指摘され、イクチオフォヌスの魚体内への侵入門戸として胃壁が考えられた。

胃壁でつくられた糸状体胞子が血行性に伝播して血管に富む諸組織器官に侵入し、そこで多核球状体に発育する。稚魚ではその多核球状体が孤在的に出現しているのが特徴であった。肝臓, 腎臓造血組織で発育した多核球状体は糸状体胞子を形成していたが、この糸状体胞子が組織内に分布す

る類洞に入って血行性に伝播し、全身感染が進行すると考えられた。ニジマス稚魚では角膜や骨組織など血管を欠くか非常に少ない組織を除く全組織にイクチオフォヌスの伝播が認められたことから、ニジマスに感染したイクチオフォヌスは特定の組織親和性をもたないと考えられた。ニジマスでは体側筋組織へのイクチオフォヌスの侵入は弱く、この点が herring での所見 (SINDERMAN *et al.* 1954) とは異っていた。このことは SINDERMAN が指摘するように魚種特異性とも、または淡水種と海産種というイクチオフォヌスの種特異性とも考えられるが、今後の検討をまたねばならない。

イクチオフォヌスに対するニジマス稚魚の炎症反応は大単核細胞の繁殖性炎で特徴づけられたが、この炎症反応は網内系細胞に富む肝臓、腎臓造血組織、脾臓、腹膜で著しく、ここらでは炎症性細胞は網内系細胞に由来すると考えられた。また、心臓、鰓、消化管、脈絡膜、脳にも大単核細胞反応がみられたが、これらの組織では組織に分布する未分化間葉系細胞に由来すると言えよう。そしてこの大単核細胞反応の発現から、上述の組織において大単核細胞に分化する能力をもつ未分化間葉系細胞が存在することが示唆される。

イクチオフォヌスの多核球状体の発芽から糸状体の伸長、それに続く糸状体胞子の形成は、魚の組織内におけるイクチオフォヌスの繁殖の唯一の現象であった。この糸状体胞子形成は胃壁、肝臓、腎臓造血組織に最も頻発していた。このうち胃壁における糸状体胞子の形成はそれを行っている親細胞 (Parent cell) が小型で幼若なこと、炎症反応を欠くうえに組織壊死が著しいなどの特徴から、かなり急性の経過をたどっていると推察される。この現象はイクチオフォヌスの感染の確立と全身伝播に重要な意味をもつものと考えられた。

伝播病巣である肝臓や腎臓造血組織において、糸状体胞子形成のため発芽した多核球状体の大きさは、炎症反応を被ったものでは直径 $25\sim 100\mu$ 、炎症反応を欠くものでは直径 $25\sim 60\mu$ であり、それらの大きさはよく発芽した未発芽のもの大きさ ($20\sim 125\mu$) に比べてやや小さい傾向にあった。これらの事実は繁殖のための糸状体胞子形成が親細胞の大きさに余り支配されず、親となる多核球状体が定った大きさに発芽して初めて起る生活史上の機転でないことを示している。また発芽が炎症反応を受けたものに多くみられたことから、宿主の防御反応がイクチオフォヌスの発芽の誘因となっているのか、それとも発芽が防御反応を打破する作業の1つとなっているとも考えられるが、これだけでは発芽の十分な説明にはならない。この点についての検討は他魚種のイクチオフォヌス症を含めて、病魚の年齢や感染後の種々の状態のものについて十分な知見を得てから進めたい。

要 約

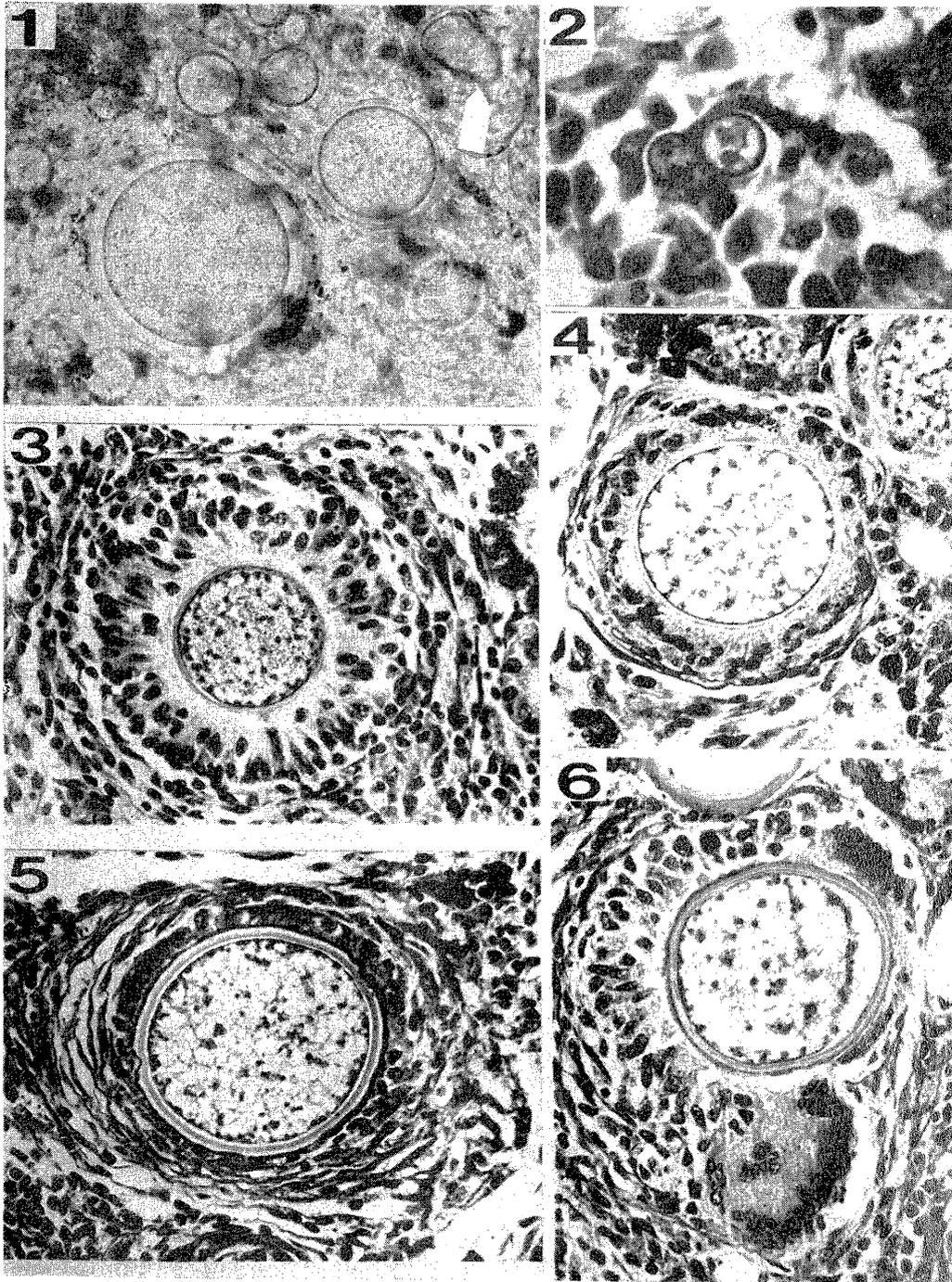
- 1) ニジマス稚魚のイクチオフォヌス症を病理組織学的に検討した。
- 2) イクチオフォヌスは稚魚に全身感染を起していた。組織に現われたイクチオフォヌスは孤在性の多核球状体の姿を示すことが最も多いが、発芽中のものや糸状体に姿をかえたもの、その糸状体内で糸状体胞子を形成しているものもみられた。
- 3) 宿主のイクチオフォヌスに対する炎症反応は大単核細胞の繁殖性炎で特徴づけられた。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、有益な文献の貸与と御助言を賜った三共株式会社の畑井喜司雄氏にあつくお礼申し上げます。

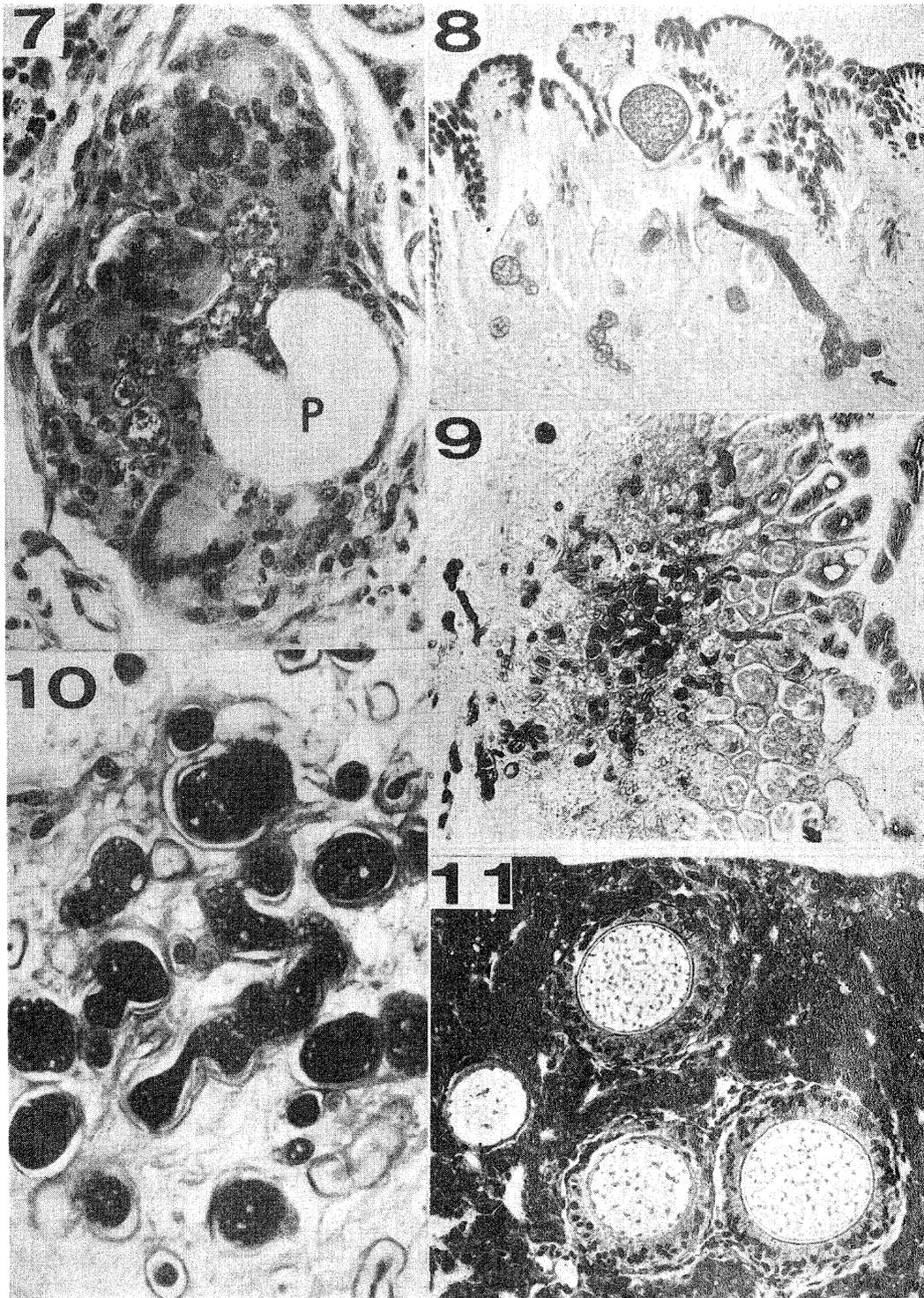
Explanation of Figures

- Fig. 1 A squash preparation of the lesion of the kidney. Ichthyophonus are seen as various sized, spherical bodies. An arrow shows the germinating one. $\times 200$
- Fig. 2 Two smallest spherical bodies with two nuclei, phagocytized by the reticuloendothelial cells lining a sinusoid. They were produced as hyphal spores and systemic infection is owed to their hematogenous dissemination. Trichrome stain. $\times 3200$
- Fig. 3 to 8 show the various inflammatory reactions against Ichthyophonus showing various shapes.
- Fig. 3 The mononuclear cellular reaction. The mononuclear cells, having a oval nucleus including a nucleolus and the much cytoplasm basophilic and including granules positive in PAS reaction, make the layer to enclose a spherical body. Trichrome stain. $\times 320$
- Fig. 4 The reaction of the syncytium of mononuclear cells. This reaction is common in the various tissues. Trichrome stain. $\times 320$
- Fig. 5 The reaction of the predominant fibroblasts and fibrocytes. The mononuclear cellular reaction is weak and partial. Trichrome stain. $\times 320$
- Fig. 6 The reaction of the mononuclear cells and a foreign body giant cells. Trichrome stain. $\times 320$



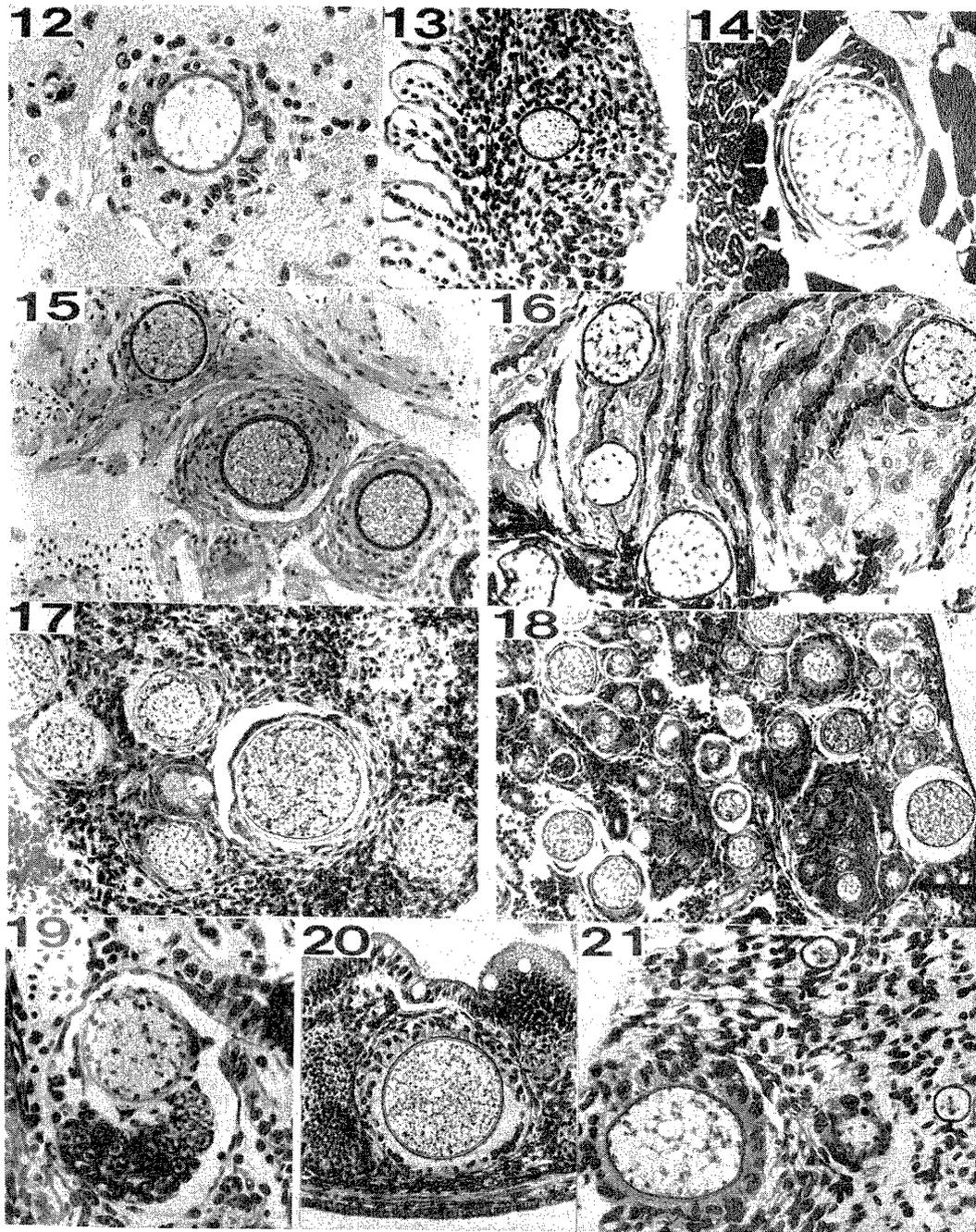
Explanation of Figures

- Fig. 7 The granulomatous reaction against the proliferating *Ichthyophonus*. Foreign body giant cells reacts directly to the hyphal bodies extended from a parent body (P), in which hyphal spores are produced. Trichrome stain, $\times 320$
- Fig. 8 The initial lesion in the stomach wall. Two multinucleate-spherical bodies penetrate through the epithelium and one is just germinating and another is extending narrow hyphae through the submucosa to release the hyphal spores (arrow). PAS reaction, $\times 160$
- Fig. 9 The advanced lesion in the stomach wall. In the propria and submucosa young spherical bodies extend hyphae in all directions. The epithelium is desquamated partly. PAS reaction, $\times 80$
- Fig. 10 A detail of the advanced gastric lesion. The active germination and hyphal extention of *Ichthyophonus* are seen. The affected tissues undergo liquefaction necrosis. PAS reaction, $\times 160$
- Fig. 11 Multinucleate-spherical bodies in the liver. Trichrome stain, $\times 200$



Explanation of Figures

- Fig. 12 A multinucleate-spherical body in the brain. Azan stain, $\times 320$
- Fig. 13 A multinucleate-spherical body in the gill filament. PAS reaction, $\times 160$
- Fig. 14 A multinucleate-spherical body in the lateral musculature. PAS reaction, $\times 320$
- Fig. 15 Multinucleate-spherical bodies in the heart. PAS reaction, $\times 100$
- Fig. 16 Multinucleate-spherical bodies in the pseudobranch gland. Azan stain, $\times 200$
- Fig. 17 Multinucleate-spherical bodies in the spleen. Trichrome stain, $\times 160$
- Fig. 18 Multinucleate-spherical bodies in the kidney. A arrow shows a granuloma containing growing spherical bodies. Trichrome Trichrome stain, $\times 100$
- Fig. 19 Binuclear bodies in the glomerular capillary. This finding shows binuclear bodies are disseminated hematogenously to cause systemic infection. Trichrome stain, $\times 320$
- Fig. 20 A multinucleate-spherical body in the intestine. Trichrome stain, $\times 160$
- Fig. 21 Multinucleate-spherical bodies in the chorioid. Azan stain, $\times 320$



文 献

- AMLACHER, E., 1956. Pathologische und Histochemische Befunde bei Ichthyosporidienbefall der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und am aquarienfisch Ichthyophonus. *Zt. Fisch.*, 13: 85-112.
- 栗倉輝彦・小野威, 兼子樹広, 1966. 日本におけるニジマス (*Salmo gairdneri*) の Ichthyosporidium disease に関する病理学的研究. 水産孵化場研究報告, 21: 43-53.
- DORIER, A. et C. DEGRANGE, 1961. L'évolution de l'Ichthyosporidium (*Ichthyophonus*) hoferi (PLEHN et MULSOW) chez les salmonides d'élevage. *Trav. Lab. Hydrob. Piscic. Grenoble*, 52/53: 7-44. Indirectly referred from **Textbook of fish diseases** edited by D. A. CONROY, and R. L. HERMAN, TFH.
- 伊上潔・村井衛・西村和久, 1977. ニジマス稚魚にみられたイクチオフォヌス病の血液性状について, 昭和52年度日本水産学会春季大会講演要旨.
- LEHMANN, C. und G. A. MEIERJURGEN, 1933. Ein bisher unbekanntes Stadium der Taumelkrankheit der Salmoniden. *Zit. Fisch.*, 31: 417-425.
- PETTIT, A., 1913. Observations sur l'Ichthyosporidium et sur la maladie qu'il provoque chez la truite. *Ann. Inst. Past.*, 27: 986-1008.
- PLEHN, M. und K. MULSOW, 1911. Die Erreger der Taumelkrankheit der Salmoniden. *Z. Bakt.*, 59: 63-69.
- SINDERMANN, J. C. and L. W. SCATTERGOOD, 1954. DISEASES of FISHES of the western north atlantic - I Ichthyosporidium disease of the sea herring (*Clupea harengus*). *Res. Bull.*, 19: 4-40.