

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—Ⅱ
ニジマスにおける慢性感染症

宮崎照雄・窪田三朗
三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonus Disease of Fishes—Ⅱ
Yearling Rainbow Trout—Clonic Infection

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—Ⅱ ニジマスにおける慢性感染症

宮崎照雄・窪田三朗
三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonosis Disease of Fishes—Ⅱ Yearling Rainbow Trout—Clonic Infection

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

Ichthyophonosis disease had broken out among rainbow trout fry and then this fish group had been kept without effective treatment for a year. The authors observed histopathologically the prolonged diseased fish aged 12 and 18 months from this fish group. Diseased fish showed markedly stunted growth and darkish coloration, and anatomically the liver with small white nodules, the heart with red nodules, the tumefied spleen with its granular surface, and the markedly tumefied kidney.

Histopathologically systemic dissemination and systemic proliferation of Ichthyophonosis were defined. In addition to single, multinucleate-spherical bodies appeared in the various tissues, large granulomas containing two to several generations of Ichthyophonosis were formed especially in the liver, kidney and spleen. The number of its generation within granulomas tended to increase with the aging of the fish. The multinucleate-spherical bodies passing generations were enclosed by very thick cell walls, but most of the well grown spherical bodies reached the pre-germination stage and some of them were able to proliferate.

From the histopathological observation on diseased fish aged from 12 to 18 months Ichthyophonosis had been adding to the generations with active and continuous proliferation in the tissues and the disease prolonged from 6 months to one year became clonic.

我々はイクチオフォヌス症が発生した一群のニジマスを、病気の発生直後から約1年間にわたって経時的に病理組織学的観察を行った。本報では慢性感染症の段階に達している満1年魚と満1.5年魚の病魚における観察結果を述べる。

材料および方法

稚魚期にイクチオフォヌス症が発生し、その後有効な治療や処置を施すことなく一年間飼育され続けた魚群から、1975年12月に3尾の満1年魚（体長約10cm）と1976年6月に3尾の満1.5年魚（体長約10~15cm）を採取した。また稚魚期からイクチオフォヌス症の流行が認められた他の養殖場からも、1976年12月に満1年魚5尾（体長10~15cm）を採取した。病魚をブアン液または10%ホルマリン水で固定し、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、PAS反応、アザン染色などを目的に応じて施した。

結 果

肉眼的所見

供試病魚はいずれも体色黒化を示し、著しい発育不良を起していた。病魚は健康魚とともに群をつくって摂餌しているものもあるが、群から離れて池底で静止したり横臥しているものが多い。病魚は外見的には眼球突出や脊椎彎曲、腹部の歪な膨満を示していることが多かった。剖検的には、病魚はいずれも貧血を起し、心臓（Fig. 1 矢印）、肝臓、脾臓、腎臓、腸管に白色または赤色の結節が多発していた。特に池底に静止や横臥している重症例では脾臓や腎臓における結節形成が著しく、大きな腫瘤を伴う脾腫や腎腫がみられた（Fig. 1）。なお、満1.5年魚のなかには肝臓内に多数の水胞が発現して囊腫と見まちがえるような外見を示す肝臓もみられた。

病理組織学的所見

1) 肝臓、脾臓、腎臓： 満1年魚と満1.5年魚ともイクチオフォヌスは全身感染を呈していた。これらの病魚の肝臓や脾臓、腎臓においてイクチオフォヌスの多核球状体が孤在的に現われることはむしろ稀れで、その多核球状体もよく発育して大単核細胞で厚く囲繞されることが多かった。また、糸状体形成後、中空になった多核球状体の細胞壁が組織内に散在していることもあるが、それらは大単核細胞反応を受け破壊、呑食されていた。

まず1年魚のこれらの臓器には、一般に2世代から3世代の世代交番を重ねた種々の姿を呈するイクチオフォヌスを包含した肉芽腫（以下これを多世代性肉芽腫とする）が多発していた（Fig. 2, 3, 6）。肉芽腫は個々のイクチオフォヌスを囲繞する大単核細胞と巨細胞、そしてそれらの間を満す類上皮細胞と線維芽細胞から成っていたが、類上皮細胞の繁殖があまり進んでいず後述する満1.5年魚の多世代性肉芽腫に比較して疎なるもの多かった（Fig. 2, 3, 6）。2世代のイクチオフォヌスは1個の親細胞から糸状体が発育し、その中に2核から10核の糸状体胞子を形成して放出している像（Fig. 2）や、親細胞から発育した糸状体から放出された糸状体胞子が中空となった親細胞や糸状体の周囲で発育している像（Fig. 6）として認められた。親細胞から伸長した糸状体の先端より早く放出され、しかも親細胞から遠くに分布する糸状体胞子は大きく（Fig. 3）、発育も早くて発芽直前の段階に達するものもあるが（Fig. 6 矢印B）、親細胞に接して分布している後から放出されたものは小さくて未熟である（Fig. 6）。3世代のイクチオフォヌスを包含した肉芽腫では（Fig. 3）、最も新しい世代は親細胞の糸状体から放出された糸状体胞子（Fig. 3 矢印A）あるいはそれが幾分発育した多核球状体としてみられた。中間世代は糸状体を伸長して中空の細胞壁を残す親細胞（Fig. 3 矢印B, Fig. 4）あるいは発育のばらつきから発芽直前の段階にあ

る多核球状体 (Fig. 3, 矢印C), または発育途上の多核球状体としてみられた。最も古い世代は大単核細胞の食作用を受けて破壊され, PAS反応によって僅かに存在が判断される細胞壁の断片としてみられた (Fig. 3 矢印D, Fig. 5)。

満1.5年魚のこれらの組織では3代から数代にわたり世代交番を重ねた数多くのイクチオフォヌスを包含する大きな肉芽腫が多発していた (Fig. 9, 10, 11)。この肉芽腫では個々のイクチオフォヌスに対して大単核細胞と巨細胞が反応し, それらの間を埋めるように類上皮細胞, 大単核細胞, 細い膠原線維形成を伴う線維細胞や線維芽細胞が多量に繁殖して緻密な肉芽腫が構成されていた (Fig. 11)。この肉芽腫内のイクチオフォヌスの最も若い世代は発育途上か発芽直前の段階の多核球状体としてみられ, 中間世代および旧世代は前述のような中空の細胞壁が種々の破壊段階にある細胞壁の断片としてみられた。これら中空化した細胞壁としてみられる親細胞の拡がりや破壊状況から中間および旧世代の世代数として2~4代が数えられた。この多世代性肉芽腫の中で世代を重ねたイクチオフォヌスの多核球状体の大きさは, 直径40~140 μ であり, それらは幾重もの年輪が現われた厚い細胞壁 (厚さ4~20 μ) をもつのが特徴的であった (Fig. 11)。しかし, 厚い細胞壁に囲まれた多核球状体の発育したものの多くは発芽直前の段階に達していた。また糸状体の伸長と糸状体胞子形成の後, 中空となった親細胞の大きさは直径100~140 μ であり, 親となる多核球状は十分に発育した後に繁殖体制に入っていることがわかった。

諸器官の感染病巣に現われた病変は満1年魚と満1.5年魚との間に次のような差違がみれた。

満1年魚の肝臓では, 多世代性肉芽腫の境界は明瞭で周囲の肝実質を圧迫するように増大していた。肉芽腫周囲の類洞は虚血的に拡張し, クッパー星細胞の繁殖があった。肝細胞は広範囲にわたって糖原が消失して萎縮したり脂肪変性に陥っていた。脾臓では多世代性肉芽腫は主に莢組織に形成されていた。腎臓では肉芽腫は周囲の造血組織内にび散的に浸潤する状態で拡大することが多く, 造血組織の占める割合は減少し, 腎実質は疎開していた。腎小体は糸球体毛細血管に伝播した2核体の発育のため破壊され肉芽腫に置換されていて, 正常な腎小体は極めて少なかった。尿細管は広範囲にわたって硝子滴変性に陥っていた。

満1.5年魚のこれらの組織に, 孤在性の多核球状体が現われることは稀れて, 多世代性肉芽腫が多発しているのが特徴的であった。肝臓では増大した肉芽腫の周囲にしばしば著しい血行障害が起っていた。それは肉芽腫の周囲に少数の赤血球, 遊離の大単核細胞や肝細胞を含む多量の漿液が貯溜した大小様々の嚢胞を形成していた (Fig. 9)。その嚢胞の隔壁や周壁は線維性結合織から成っていて, 嚢胞に近接している肝細胞は萎縮や脂肪変性に陥っているが, そこに水腫性的変化はみられなかった。脾臓には比較的小型の多世代性肉芽腫が多発していた。

腎臓では境界明瞭で緻密な大きな多世代性肉芽腫が多発していた (Fig. 10, 11)。この肉芽腫群は腎実質や造血組織を著しく圧迫していた。

2) 心臓: 満1年魚の心臓ではイクチオフォヌスの多核球状体が心室心筋層や心外膜に孤在的に多数出現し, 大単核細胞や肉芽腫反応を受けていた (Fig. 7)。発育した多核球状体に接する心筋線維は局所的に融解壊死に陥っていた。

満1.5年魚では多世代性肉芽腫と孤在性の多核球状体が混在していた。

3) 鰓: 満1年と満1.5年魚とも, 広範囲の鰓薄板毛細血管を2~10核の小さな球状体が閉塞し, その部位の鰓薄板上皮は肥厚していた。またしばしば大きな多核球状体が鰓弁動脈を閉塞し大単核細胞反応を受けていた。ここではイクチオフォヌスの繁殖像は稀れであった。しかし, 上述の所見から満1年および満1.5年魚とも2~10核体が血行性伝播を行っていることがわかった。

4) 脳： 満1年魚では極く少数の多核球状体が大単核細胞に 围绕されて孤在していた。満1.5年魚では、繁殖像もみられ、中空化した親細胞の細胞壁の周囲で多核球状体が發育していた。こうした多核球状体で囲まれた区域は融解壊死に陥っていた。なお個々の多核球状体に対しては活発な大単核細胞反応がみられるが、それらを围绕する肉芽腫はみられなかった (Fig. 8)。

5) 消化管： 胃では満1年魚と 満1.5年魚とも、胃壁に大単核細胞または線維細胞で围绕された多核球状体が孤在していた。多世代性肉芽腫は稀れであった。稚魚期にみられたような胃壁における活発な繁殖像 (宮崎ら1977) は認められなかった。

腸管では、満1年魚と 満1.5年魚ともイクチオフォヌスの繁殖が著しく、漿膜や筋肉層に多世代性肉芽腫が散在していた。粘膜固有層や粘膜下織には大小様々の多核球状体や糸状体胞子形成途上の糸状体を伸長した球状体などが集塊を成して現われていた。ここでは個々のイクチオフォヌスに対して大単核細胞や異物巨細胞が反応し、その間に大単核細胞、線維芽細胞、エオジン好性顆粒細胞がび漫的に著しく繁殖するのみで明瞭な肉芽腫形成に至っていなかった。なお粘膜下織におけるエオジン好性顆粒細胞の繁殖は稚魚期には見られず (宮崎ら 1977)、慢性状態のもとに現われる特徴であった。幽門垂にも腸管類似の変化が起っていた。

消化管周囲の腹膜や肝臓にも孤在性の多核球状体や多世代性肉芽腫が散在していた。

6) 皮膚および体側筋組織： 血合筋組織や骨格筋組織には孤在性の多核球状体がかかなり多く現われていた。それらのなかには発芽段階に達したものもみられた。多核球状体周囲の筋線維に著変はみられない。また皮膚へのイクチオフォヌスの侵入は認められなかった。

考 察

満1年と 満1.5年魚ともイクチオフォヌスは全身感染を起し、伝播した組織内で繁殖していた。また組織に侵入して繁殖したイクチオフォヌスに対して多世代性肉芽腫がつくられ、この所見は肝臓、腎臓、脾臓、消化管、腹膜で特に顕著であった。この多世代性肉芽腫内のイクチオフォヌスは、1年魚で2~3世代そして1.5年魚で3~数世代の世代交番をくり返えていて、魚の加齢と成長ともにその世代数は多くなる傾向が認められた。これらの事実から、イクチオフォヌスは感染してから体内で繁殖をくり返し、全身感染から多世代性肉芽腫の形成までには相当数の世代を経ていると推察される。また多世代性肉芽腫内のイクチオフォヌスの多核球状体は發育して発芽直前の段階に達することから、肉芽腫で固く围绕されてもその繁殖能は低下していないと言えよう。イクチオフォヌスの上述のような体内の動勢から、組織内に侵入したイクチオフォヌスは休止または休眠期をもつとは考えられず、活発に發育と繁殖をくり返していると判断された。これまでの研究報告のなかには、多核球状体に休止期 (resting stage DANIEL 1933 RUGGIEI *et al.* 1970) または無活動期 (quiescent stage SLNDERMANN *et al.* 1954) の存在を指摘するものもあるが、我々は前述の根拠に基づき、少なくとも生体内寄生のものについては休止期などの存在を把握することができなかった。

満1.5年魚において世代を重ねたイクチオフォヌスの多核球状体の細胞壁が著しく肥厚しているのが特徴的であった。同様の現象が SINDERMANN (1954) がニシンに感染したイクチオフォヌスを人工培地の上で約30日という長期培養した時に観察した厚膜胞子 (heavy-walled spore) にもみられている。また彼はそれを根拠に組織内にみられた厚い被膜をもつ多核球状体を quiescent spore としている。人工培地でのこの現象は培養されたイクチオフォヌスの活性低下によるものか

も知れない。我々が観察した満1.5年魚の組織内のイクチオフォヌスの多核球状体の細胞壁肥厚の原因として、宿主の肉芽腫による囲繞や大単核細胞の食作用に対する抵抗性の増大、または、旧世代の中酸化した細胞壁が大単核細胞の食作用を受けていたことからイクチオフォヌスの細胞壁に対する抗体が産生されている可能性が高く、このような免疫学的な作用に対する抵抗性の増大などが推察された。またこのように厚い細胞壁で被われた多核球状体のよく発育したものは一般に発芽直前の段階に達して、繁殖能の低下はみられなかった。上述の理由から魚体内に寄生したイクチオフォヌスの厚い細胞壁で囲まれた多核球状体は、SINDERMANN (1954) が言うような無活動期のものでは必ずしもないのではないだろうか。

稚魚期ではイクチオフォヌスの多核球状体が孤在的に現われ、それに対する宿主の反応は大単核細胞の繁殖性炎で特徴づけられた(宮崎ら1977)。満1年魚と満1.5年魚では多世代性肉芽腫が一般的であり、魚の加齢と病気の長期化とともに肉芽腫反応がより高度となっていた。稚魚と満1年魚および満1.5年魚の間にみられた宿主反応の差は、成長による宿主の抵抗性の増大あるいは上述した宿主の免疫学的な作用によるものと考えられた。

満1年魚および満1.5年魚の病理組織学的観察結果と上述の諸事実から、稚魚期における病気の発生直後から観察してきた魚群中のこれらの年齢群の病魚は、一般に成長後に新たに感染したのではなく、少なくとも稚魚期に感染したがその時は軽症で経過して生残し、加齢とともにイクチオフォヌスの体内繁殖によって外見的にも著しい病変を発現するようになったと判断された。このことは、稚魚期(宮崎ら1977)のイクチオフォヌスの激しい全身感染症の病魚は一般に斃死し、体力のある軽症魚は生残できたことから裏づけられよう。そしてこのように感染後約6ヶ月から1年間にわたって長期化した病状は慢性感染状態にあると考えられた。

要 約

1. 稚魚期にイクチオフォヌスの感染が起り、その後有効な処置を施すことなく飼育し続けた魚群から満1年魚および満1.5年魚の病魚を採取し、病理組織学的に検討した。
2. これらの年齢群の病魚では、イクチオフォヌスは全身感染を起し、1年魚で2～3世代の、1.5年魚で3～数世代のイクチオフォヌスを包含する肉芽腫が多発していた。またイクチオフォヌスの全身的な繁殖もみられた。
3. 魚体内のイクチオフォヌスの動勢と宿主の炎症反応から、これらの年齢群の病魚は慢性感染症の状態にあると考えられた。

文 献

- DANIEL, G., 1933. Studies on *Ichthyophonus hoferi*, a parasitic fungus of the herring (*Clupea harengus*) — I The parasite as it is found in the herring. *Amer. J. Hyg.*, 17: 262—276.
- 宮崎照雄・窪田三朗, 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, 本誌4: 45—56.
- RUGGIERI, D. G., R. F. NIGRELLI, and P. M. POWLES, 1970. Epizootics in yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* STREER, in the western north atlantic caused by *Ichthyophonus* an ubiquitous parasitic fungus. *Zool.*, 55(3): 57—72.
- SINDERMANN, C. J. and L. W. SCATTERGOOD, 1954. Diseases of fishes of the western north atlantic — Ⅱ *Ichthyosporidium* disease of the sea herring (*Clupea harengus*). *Res. Bull.*, 19: 4—40.

Explanation of Figures

Fig. 1 Two moribund fish aged 12 months. They show the liver with white nodules, the heart with large red nodules (arrow), the tumefied spleen, the reddishly tumefied intestine and the whitish tumefied kidney.

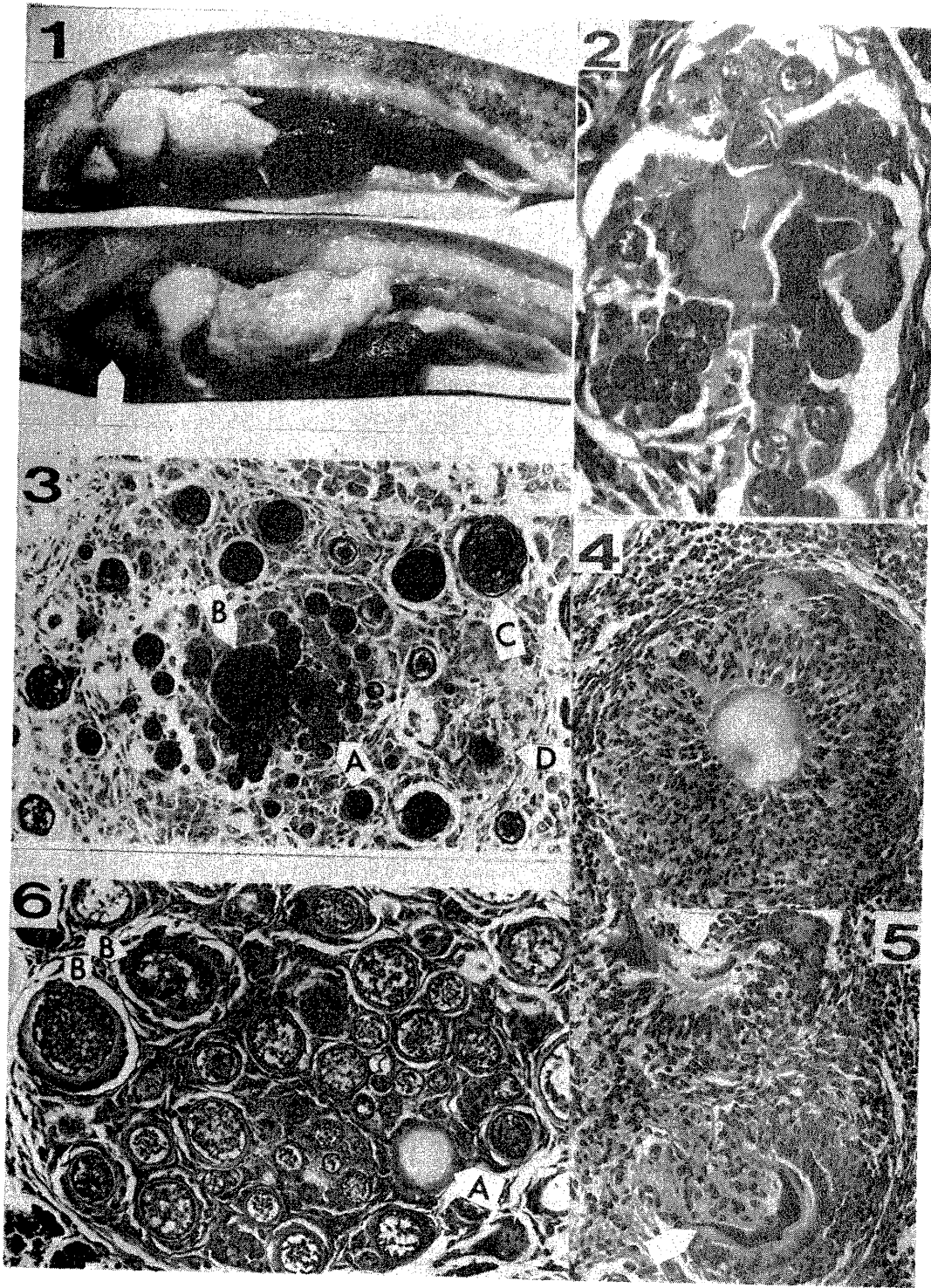
Fig. 2 Proliferating Ichthyophonus in the liver of fish aged 12 months. Most of the singly appearing Ichthyophonus are in the proliferation stages. Many various-sized hyphal spores are produced and released from hyphal bodies extending from a parent cell (P). Trichrome stain. $\times 320$

Fig. 3 A granuloma containing three generations of Ichthyophonus formed in the liver of fish aged 12 months. The youngest generation are defined as hyphal spores(A). The middle one is defined as a parent cell(B) releasing the hyphal spores or multinucleate-spherical bodies, young or being in the pre-germination stage (C). The oldest one is demonstrable from a destroying cell wall(D). PAS reaction, $\times 160$

Fig. 4 A high power detail of a left cell wall emptied by the release of hyphal spores and enclosed by the thick layer of large-mono-nuclear cells and giant cells within a granuloma. The middle generation can be observed as this form. Trichrome stain, $\times 320$

Fig. 5 A high power detail of destroyed cell walls (arrows). They are enclosed and phagositized by large-mono-nuclear cells. The oldest generation can be demonstrable as this form. Trichrome stain. $\times 320$

Fig. 6 A granuloma containing two generation of Ichthyophonus, formed in the kidney of fish aged 12 months. The parent cell (A) is defined as a empty cell wall. The second generation is defined as various-sized, multinucleate-spherical bodies which had been released from a parent cell. The well grown spherical bodies (B) already developed to the pre-germination stage. Trichrome stain, $\times 160$



Explanation of Figures

- Fig. 7 The heart of fish aged 12 months. Many various-sized, multinucleate-spherical bodies are seen. Affected cardiac muscle fibers undergo necrosis and large-nomonuclear cells react against the single spherical bodies. Some of them developed to the pre-germination stage(arrows). PAS reaction, $\times 80$
- Fig. 8 The brain of fish aged 18 months. A parent cell (arrow) and several multinucleate-spherical bodies of the second generation are seen. Each of them is enclosed by a layer of large-nomonuclear cells. The affected tissue undergoes necrosis. HE stain, $\times 160$
- Fig. 9 The liver of a fish aged 18 months. A large amount of fluid accumulated in the parenchyma surrounding the well developed granuloma. Triclome stain $\times 40$
- Fig. 10 The kidney of a fish aged 18 months. Many large granulomas containing several generations of Ichthyophonous are formed. The youngest generation is observed as young or well growing, multinucleate-spherical bodies. The middle and older ones can be observed as empty cell walls or ruptured cell walls in the various shapes of destruction resulting from phagocytosis of the large-nomonuclear cells. Trichrome stain, $\times 20$
- Fig. 11 A high power detail of the multinucleate-spherical bodies in the granuloma shown in Fig.10. Ones which had passed several generations have very thick cell walls. The large-nomonuclear cellular reaction occurs individually in the granuloma. The right one reached the pre-germination stage. Trichrome stain, $\times 320$.

