

魚類のイクチフォヌス症に関する研究—Ⅲ
ニジマスに感染したイクチフォヌスの生活史

宮崎照雄・窪田三朗
(三重大学水産学部)

Studies on Ichthyophonus Disease of Fishes—Ⅲ
Life Cycle of Ichthyophonus Affected Rainbow Trout

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

魚類のイクチフォヌス症に関する研究—Ⅲ ニジマスに感染したイクチフォヌスの生活史

宮崎照雄・窪田三朗
(三重大学水産学部)

Studies on Ichthyophonus Disease of Fishes—Ⅲ Life Cycle of Ichthyophonus Affected Rainbow Trout

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

The authors constructed the life cycle of Ichthyophonus in the infected fish tissues. The life cycle was made by four stages: growing stage, pre-germination stage, hyphal development stage and proliferation stage.

1) Growing stage: The youngest form is binuclear bodies. They grow to multinucleate-spherical bodies increasing in size, the number of nuclei, the cytoplasmic density and thickness of the cell wall.

2) Pre-germination stage: The well grown, multinucleate-spherical bodies undergo the stage preparative to germination. They are characterized by a further increase in the nuclear number, concentration of the cytoplasm, plasmolysis, forming the pseudopodium-like protuberance of the cell and secretion of a new cell wall inside the primal one.

3) Hyphal development stage: The cell of the spherical body germinates through its primal cell wall and extends to form the hyphal body. The extension of the hyphal body depends on the migration of the cell of the spherical body. The hyphal body is always walled by the newly secreted cell wall.

4) Proliferation stage: Hyphal spores are produced by the cell division of the hyphal bodies and released from open ends. The produced hyphal spores vary in the nuclear number from one to ten.

From a histological observation, the authors might define the growing stage of multinucleate-spherical bodies as the vegetative phase, and the hyphal body as a reproductive organism. The authors might demonstrate the presence of the pre-germination stage in the life cycle.

我々は第Ⅰ報（宮崎ら1977a）でニジマス稚魚の、第Ⅱ報（宮崎ら1977b）でニジマス当才魚のイクチオフォス症における宿主－寄生体関係を明らかにした。この感染症の発生初期段階から慢性感染症の状態にわたる組織学的観察からニジマス魚体内におけるイクチオフォスの生活史を組立てることができたので、その詳細を報告する。

材料および方法

供試材料はニジマス稚魚15尾と当才魚11尾である。各病魚の病巣のパラフィン連続切片を作製し、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反応を目的に応じて施した。

結 果

組織内におけるイクチオフォスの生活史は発育期（Growing stage）、前発芽期（Pre-germination stage）、発芽および糸状体期（Hyphal development stage）および繁殖期（Proliferation stage）の4段階に分けられた。

1) 発育期： イクチオフォスの組織内伝播は初発病巣で形成された糸状体胞子の血行性伝播によっていたが、伝播病巣に現われる最も小さな糸状体胞子は2個の核と薄い細胞壁をもつ2核体（Binuclear body）であった（Fig. 1, 16A）。この2核体は核の直接分裂によって核数を増し、細胞質の増量によって細胞質の網工をより複雑にし、細胞壁を肥厚しながら大きくなり、数10から100位の核をもつ多核球状体に発育する（Fig. 2, 3, 4, 16B, C, D）。発育期の多核球状体の細胞質は顆粒状で念珠状に縦がり網目状に配列するがPAS反応性は弱い。核は円形で1個の明瞭な核仁を含み、細胞質の網工の接点上か原形質膜の内側に接して分布する。核は主に原形質膜の内側に接しているものが直接分裂することによってその数を増し、新しくつくられた核が細胞質の増加にともなって細胞体中央部に移行していることが多かった。なお細胞体中央部の核に核分裂像を認めることは稀れであった。なお発育期の多核球状体が直接分裂して新しく球状体をつくることは全く認められなかった。発育期の多核球状体の大きさは稚魚期の病魚において直径20～125 μ 、当才魚の病魚では直径40～140 μ であった。

2) 前発芽期： この段階はある大きさに発育した多核球状体が発芽のための準備をする期間で、細胞体の著しい増大はみられず、次に示すように核数の増加、細胞質の増量など細胞体の質的な変化、次いで原形質分離から偽足状突起の形成などの細胞体の形態的变化が起るのが特徴である。この段階の初期には、多核球状体の原形質膜に接した核が激しく核分裂し、核は原形質膜内面に層をなしてびっしりと付着する。その細胞質は増量してPAS反応強陽性の太い糸状になり、それが作る網工もより複雑になっていた（Fig. 15, 16E）。細胞体中央部の細胞質網工上には核は少ない。原形質膜内面に接して数を増した核は、その後、複雑になった細胞質の網工上に移行し細胞体内に均等に分散するようになる（Fig. 6, 16F）。その核数は多いものでは恐らく数100位に達していた。この状態の細胞体の原形質膜は肥厚して明瞭になり、一部に褶曲が起り局所的に細胞壁内面から分離している例もあった。

次いで多核球状体の細胞体は原形質分離を起し、細胞質の濃縮により萎縮するとともに細胞体は1極性に（Fig. 7, 16G）または多核性に（Fig. 8, 16H）偽足状突起を出す。この状態の球状体の細胞体では細胞質の網工はさらに複雑化し、ついには粗大な顆粒となって細胞内に核とともに

均等に分散し、細胞体の PAS 反応は強陽性となる。原形質膜は元の細胞壁の内面から全面的に分離するとともにその原形質膜の表面には新しく薄い細胞壁が分泌され、萎縮した細胞体と元の細胞壁との間に幾重もの薄い層が形成されて細胞壁は著しく肥厚する (Fig. 7, 8, 16G, H)。

3) 発芽および糸状体期： イクチオフォヌスの発芽の様式は非常に特徴的で、一般の胞子の発芽管形成の様式とは異っていた。球状体の細胞壁の中で原形質分離をして形態的には偽足状突起を出し、発芽のための方向づけが決定された細胞体は、元の細胞壁の一部 (Fig. 9, 16I) また数ヶ所 (Fig. 10) を突き破り、新しく形成された薄い細胞壁に包まれた状態で元の細胞壁を貫通して壁外に突出していた。発芽の方向は一極性または多極性のこともあるが発芽の方向性と細胞体の大きさとの間に相関性は見出せなかった。

発芽した細胞体は原形質膜の周囲に薄い細胞壁を分泌しながら連続的に伸長し、時には分枝をし、無隔の不規則な太さをもつ菌糸状の糸状体となる (Fig. 11, 16J)。糸状体の細胞体は元の多核球状体の細胞体由来し、その形状は前発芽期後期の細胞体と同じであった。そして、糸状体の伸長とともに元の球状体内の細胞体が糸状体内に移動し、元の球状体内の細胞体の体積は減少し、著しい場合には球状体内の細胞体が全て移行し、球状体は中空の細胞壁と化す。糸状体の細胞体はほとんど全て元の球状体のそれに由来し、糸状体伸長期には細胞体の発育の証左は把握できなかった。また細胞体放出後残された元の球状体の細胞壁はほぼ球状を保ち、萎縮や褶曲することはなかった。

この糸状体は稚魚期の病巣の胃壁におけるように宿主の炎症反応に乏しい状態ではかなり長く伸びるが (宮崎ら1977a)，一般に炎症反応を被った状態では糸状体の長さは元の球状体の直径の3～4倍位にすぎない。この炎症反応を被った多核球状体から伸長した糸状体も大単核細胞や異物巨細胞に囲繞されることが多かった。

4) 繁殖期： 元の球状体から伸長した糸状体の細胞体は、糸状体内で分裂し、通常、2個から10個の核をもち、薄い細胞壁で囲まれた糸状体胞子を形成する (Fig. 13, 15, 16K)。しかし細胞分裂の進んだ例では2核の胞子が数で卓越し、1核のものも出現する (Fig. 12, 13)。このように親の球状体から発芽して伸長した糸状体は一種の繁殖器官と解された。糸状体の伸長が良好な例では球状体内の細胞体は全て糸状体内に移行し、そこで糸状体胞子となるが (Fig. 12, 13)、球状体内の細胞体の量に比べて伸長した糸状体の長さが短い例では細胞体の一部は球状体内に残留し、細胞体は糸状体内と球状体内の両方で分裂する (Fig. 14)。このように糸状体内で形成された糸状体胞子は主に糸状体先端の破壊によって (Fig. 13, 14)、または糸状体全体の破壊によって (Fig. 15)、糸状体から組織内に放出される。糸状体胞子は糸状体先端の破壊口から、先端部にあるものから順に放出されるようで、形成された胞子は全て球状体や糸状体から外に放出される。以上のような胞子の放出状態から考えて、この胞子は移動性があると推察される。放出された胞子はその周囲の組織に分布する血管に入って伝播されたり、または、それらが親の細胞体の中空化した細胞壁の周囲に集塊をつくって残り、そこでまた発育を始める (Fig. 15, 16L)。胞子のうち早くに放出されたものは成長が早い、遅く放出されたものは親の球状体の細胞壁の近隣にあり一般に成長が遅い。このように同じ親の球状体由来する糸状体胞子でもその発育にはばらつきがみられた。

なお Fig. 16 にイクチオフォヌスの生活史を模式図として示した。

考 察

イクチオフォヌスの生活史の究明は herring (*Clupea harengus*) (DANIEL 1933), mackerel (*Scomber scomber*) (SPROSTON 1947), やニジマス (DORIER *et al.* 1961) などの魚種に寄生したものについて行なわれている。このうち SPROSTON が示したイクチオフォヌスの種々の像および生活史の像は顕微鏡観察の能力限界をはるかに越えた観念的なもので、それはそこに示された2, 3の所見を除いて他の研究者から追認されていず、また我々もそれを追認できなかった。

DANIEL や DORIER *et al.* により示された生活史はそれらの研究者が使用した呼称名はそれぞれ異なるが、1) 多核の球状体の発育, 2) 球状体から菌糸の伸長, 3) 菌子内における胞子形成, 胞子の放出とその胞子の発育, という主幹において一致していた。また両研究者の報告の内容の詳細は異なるが、発育した多核の球状体から直接 plasmodium-like body (DANIEL)。または plasmodium (DORIER *et al.*) が放出され、それが胞子形成を行なうというもう一つの繁殖方法が示されている。この plasmodium または plasmodium-like body における胞子形成に関する論議は後述することとして、上述した主幹とみなすべき生活史の大筋は我々の観察においても追認することができた。

1) 発育期について：組織に一般的にみられる多核球状体の核数や細胞質の網工の密度、細胞壁の厚さなどの推移に基づいて、それらは核数の少ない幼若な球状体が発育したもので、その多核球状体も発育中であることがわった。また生活史上の各段階にあるイクチオフォヌスの観察から細胞体が発育するのはこの多核球状体の時代のみであることもわった。以上の事実から、この多核球状体の時代は栄養体の相 (Vegetative phase) と考えられた。この多核球状体の取扱いは研究者によって異なり、その呼称も parasite (PLEHN 1911, AMLACHER 1965), cyst (PETTIT 1913, DANIEL 1933, LEHMANN *et al.* 1933, DORIER *et al.* 1961, RUGGIERI *et al.* 1970), Plasmodium (NERESHEIMER *et al.* 1914), chlamidospore (SPROSTON 1947), spore (SINDERMAN 1954) と千差万別である。これらのうち cyst, spore, chlamidospore の名称は多核球状体が栄養体相にあるという事実に基づけば不適切なものと言えよう。そこで我々は、発育期であり栄養体相である多核の球状体を多核球状体 (Multinucleate-spherical body) とした。

2) 前発芽期について：この段階は発芽の準備期間であり、或る大きさに達した多核球状体が核数を増し、原形質分離を起こして細胞体の濃縮が起こり、細胞体が偽足状突起を出して発芽のための方向づけを行なうのが特徴であった。これらの姿を示す多核球状体の時代を前発芽期とした理由として、次に述べる発芽中の細胞体や球状体の細胞壁の像が、この前発芽期とした多核球状体のそれらと類似すること、そして発育途上の多核球状体が直ちに発芽することはほとんどないという事実が指摘された。この段階の多核球状体の細胞壁の肥厚は、稚魚期の病巣 (宮崎ら 1977 a) や慢性感染症の当才魚の病魚 (宮崎ら 1977 b) においても認められた。SINDERMAN *et al.* は人工培地におけるイクチオフォヌスの培養結果に基づいて、厚い細胞壁で囲繞された多核球状体を quiescent spore と呼び、また RUGGIERI *et al.* はこれを resting cyst とし、その PAS 反応強陽性を指摘している。SINDERMAN *et al.* の言う厚膜の胞子 (heavy walled spore) に匹敵する胞子は、10% 血清添加 TGC 培地での培養において発芽して菌糸を伸長し、幾代もの世代を重ねることが畑井 (私信) により指摘されている。また、RUGGIERI *et al.* が resting cyst に似た PAS 反応強陽性は我々が言う前発芽期の多核球状体そのものの特徴であった。以上の事実から厚い細胞壁で囲まれ、PAS 反応強陽性の密度の高い細胞体をもつ多核球状体は決して休眠期や無活動期にあるのではなく、発芽のための準備状態にあるとするのが妥当と考えられた。生活史における前発芽期の

段階は他の研究者によって全く指摘されていないが、イクチオフォススの生活史を正しく把握するにはこの段階の設定が絶対に必要であると思われる。

3) 発芽および糸状体期： イクチオフォススの発芽は、球状体内で萎縮とともに発芽の方向づけを得た細胞体が新しく形成された細胞壁に囲まれるようにして、元の球状体の細胞壁を突き破って発芽しているのが特徴であった。この発芽様式は一般の胞子の発芽管の発芽とは異っていた。また発芽後、糸状体の伸長はその細胞体の周りに常に細胞壁が分泌されながら行なわれていた。糸状体の細胞体は全て元の球状体のそれが移行したもので、糸状体の細胞体の発育の証左は把握されなかった。以上のようにイクチオフォススの発芽および糸状体の伸長は、一般の胞子の発芽管とは異なり、細胞壁を欠いたまま伸長したり、核分裂を伴う発育を示さないのが特徴であった。そしてこの糸状体自体が繁殖器官の働きをしているのも特徴であった。またその発芽は、イクチオフォススの細胞体が発育相の球形から繁殖相の菌子状形への形態変化の過程と解された。

DORIER *et al.* は plasmodial germination を指摘するが、そのような原形質膜のみで被われ細胞壁を欠き、かつ運動性を有する細胞体は認められなかった。また DANIEL が示した cyst wall——原形質膜のこと、細胞壁は cyst capsule としている——の破壊による細胞質の流出と flagmentation が見られるとする plasmodium-like body は組織学的には追認することができなかった。恐らくそれは圧扁標本作製の際の人工産物と判断される。

4) 繁殖期について： イクチオフォススの繁殖は糸状体内に1核から10核の糸状体胞子を形成するのを唯一の方法としていた。この糸状体胞子は糸状体内で個々に遊離して球形になった段階から非常に薄い細胞壁で囲まれていた。糸状体胞子は主に糸状体先端の破壊口から放出されるが、その放出状態から胞子は移動能をもつと推察された。なお2, 3の研究者は球状体内における endogenous division を指摘するが、これと類似の像は我々が観察結果において述べたごとく、糸状体の伸長が悪くて細胞体が球状体内に残ったまま分裂した状態のものを糸状体を含まない断面で切った時にみられた。DORIER *et al.* が示すような多核球状体の endogenic division による球状体の新生や plasmodium における endospore の形成はみられず、また DANIEL が示した plasmodium-like body の cytoplasmic fragmentation による新しい胞子形成は把握できなかった。我々の観察結果に基づき、イクチオフォススの繁殖方法は糸状体胞子形成のみとするのが妥当と判断された。

以上の事実に基づき、我々はイクチオフォススの生活史を1) 多核球状体の発育期、2) 発芽の準備のための前発芽期、3) 発芽と糸状体伸長期、4) 糸状体胞子の形成と放出を主徴とする繁殖期の4段階から成ると判断した。

要 約

- 1) ニジマスに感染したイクチオフォススの生活史を組み立てた。
- 2) その生活史は、発育期、前発芽期、発芽および糸状体期、繁殖期の4期から成っていた。
- 3) イクチオフォススの栄養体相は発育期の多核球状体であり、糸状体は生殖器官の役割を果たしていることを明らかにした。また、発芽のための準備段階として前発芽期を新しく設けた。

Explanation of Figures

Fig. 1 Binuclear bodies as the youngest form in the growing stage. PAS reaction, $\times 4000$

Fig. 2 to 4 : Multinucleate-spherical bodies in the growing stage. They grow increasing in the size, the number of nuclei, the cytoplasmic density and thickness of the cell wall.

Fig. 2 Trichrome stain, $\times 4000$

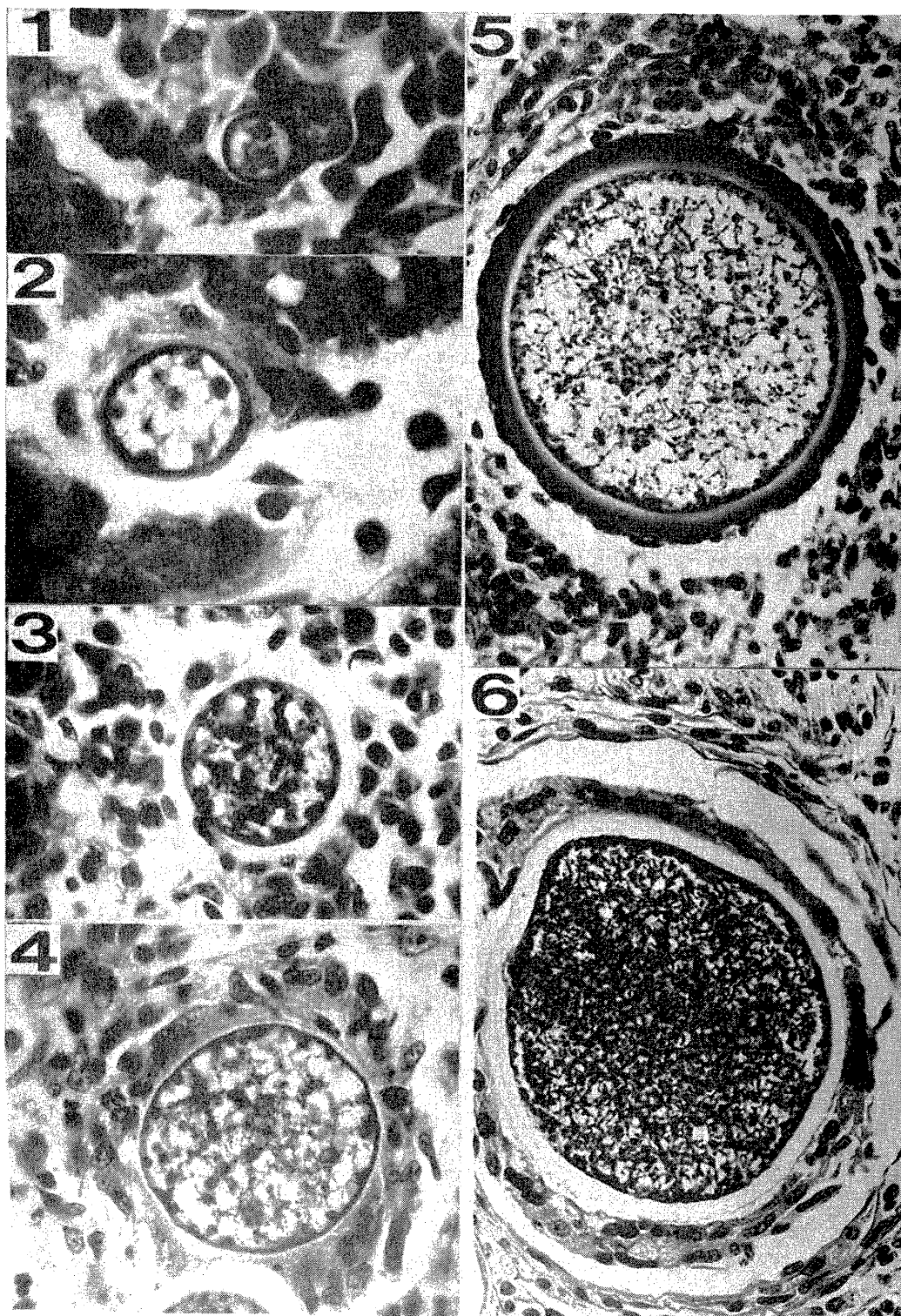
Fig. 3 Trichrome stain, $\times 800$

Fig. 4 Trichrome stain, $\times 800$

Fig. 5 to 8 : Multinucleate-spherical bodies in the pre-germination stage.

Fig. 5 A multinucleate spherical body in the early pre-germination stage. The well grown one initiates further nuclear multiplication with direct division of nuclei attaching to the inner surface of the cytoplasmic membrane and increasing in cytoplasmic density. Trichrome stain, $\times 320$

Fig. 6 A multinucleate-spherical body having a large number of nuclei. At the end of nuclear multiplication each nucleus migrates to the center and are interspersed homogenously among the granulated cytoplasm which became greatly positive in PAS reaction. The cytoplasmic membrane becomes thicker. HE stain, $\times 320$



Explanation of Figures

Fig. 7 A multinucleate-spherical body just before germination. This one causes plasmolysis owing to cellular concentration and forms a pseudopodium-like protuberance of the cell. The surface of the cytoplasmic membrane of the shrunken cell is walled by newly secreted, thin cell walls, so that, the total thickness becomes thicker. Trichrome stain, $\times 320$

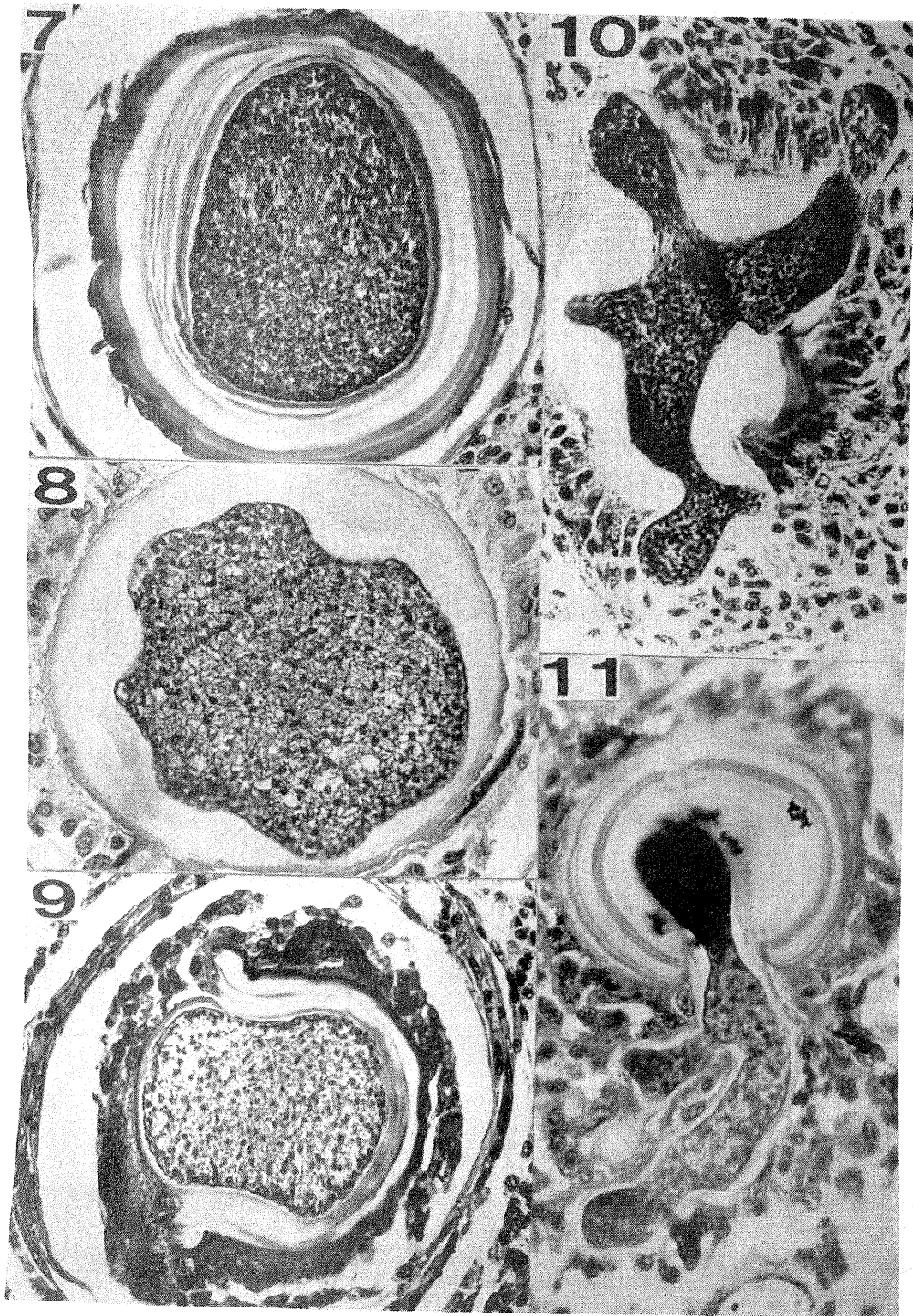
Fig. 8 A multinucleate-spherical body just before germination. This one extends pseudopodia-like protuberance in several directions. HE stain, $\times 320$

Fig. 9 to 11 : Hyphal development stage.

Fig. 9 A multinucleate body just at germination. At germination the cell breaks through the primal cell wall and emerges being walled by a newly secreted, thin cell wall. HE stain, $\times 400$

Fig. 10 A multinucleate body emerging in several directions just at germination. HE stain, $\times 320$

Fig. 11 A hyphal body extending from a spherical body. The cell of the hyphal body is derived from cell of the spherical body and its migration aids development of the hyphal body. The hyphal body is always walled with a newly secreted cell wall. Trichrome stain, $\times 800$



Explanation of Figures

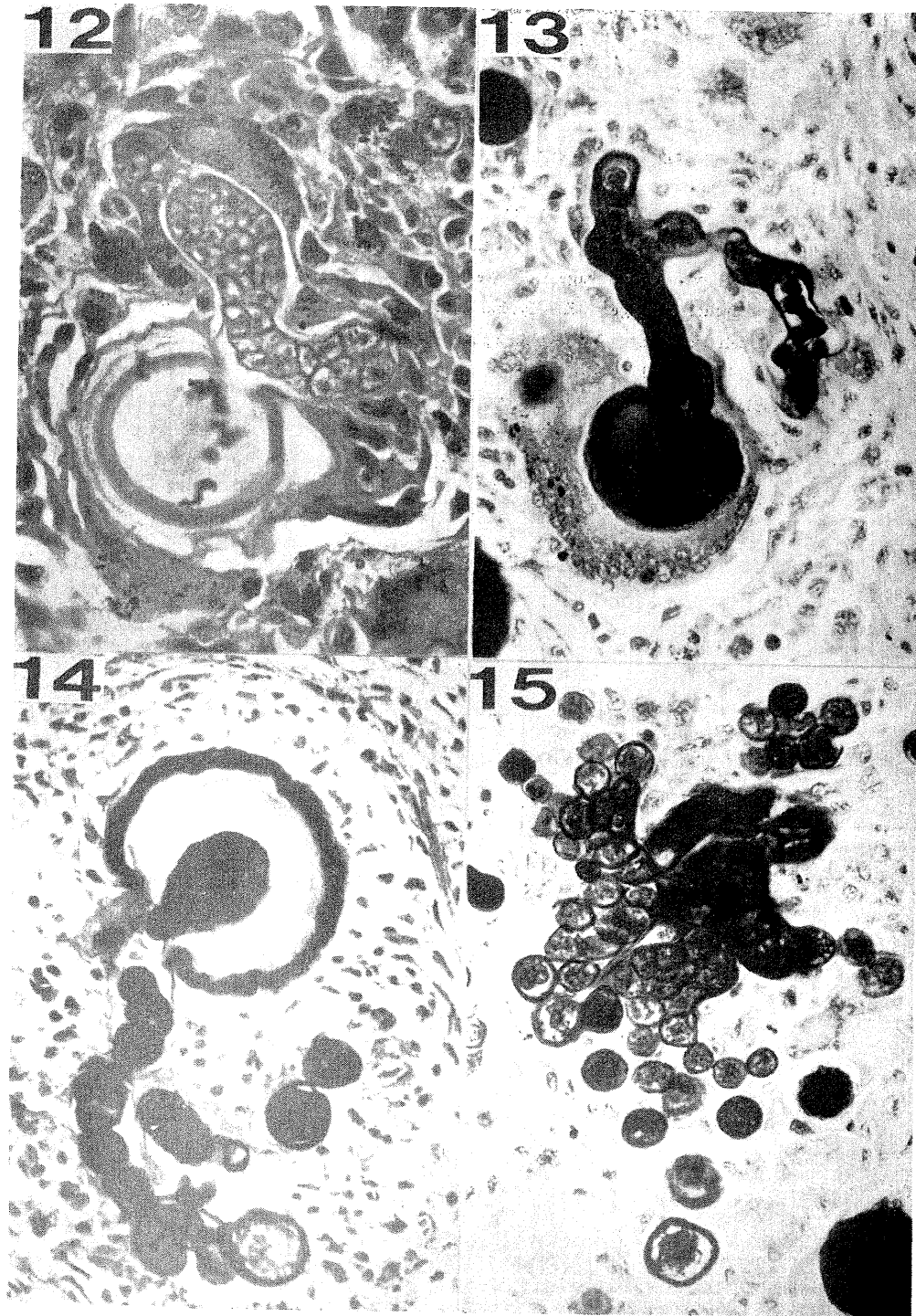
Fig. 12 to 15 : Proliferation stage.

Fig. 12 Production of the hyphal spores in the hyphal body. Mono and bi-nuclear spores are produced by the division of the whole cell of the hyphal body. Trichrome stain, $\times 800$

Fig. 13 A hyphal body releasing the separated hyphal spores with one or two nuclei. PAS reaction, $\times 800$

Fig. 14 A hyphal body releasing hyphal spores with two to ten nuclei from the open ends. PAS reaction, $\times 800$

Fig. 15 Release of hyphal spores in the manner of the rupture of a hyphal wall. PAS reaction, $\times 320$



Explanation of Figures

Fig. 16 Life cycle.

A—D : Growing stage. A : Binuclear body. B—D : Growing multinucleate-spherical bodies.
E—H : Pre-germination stage. E and F : Multinucleate-spherical bodies with further
nuclear multiplication. G and H : Multinucleate-spherical bodies heavily walled, showing
plasmolysis and pseudopodium-like protuberance of the cell.

I—J : Hyphal development stage. I : Germination. J : Hyphal body.

K—L : Proliferation stage. K : Hyphal body producing hyphal spores according to the
method of cell division. L : Hyphal spores released from open ends of the hyphal body.

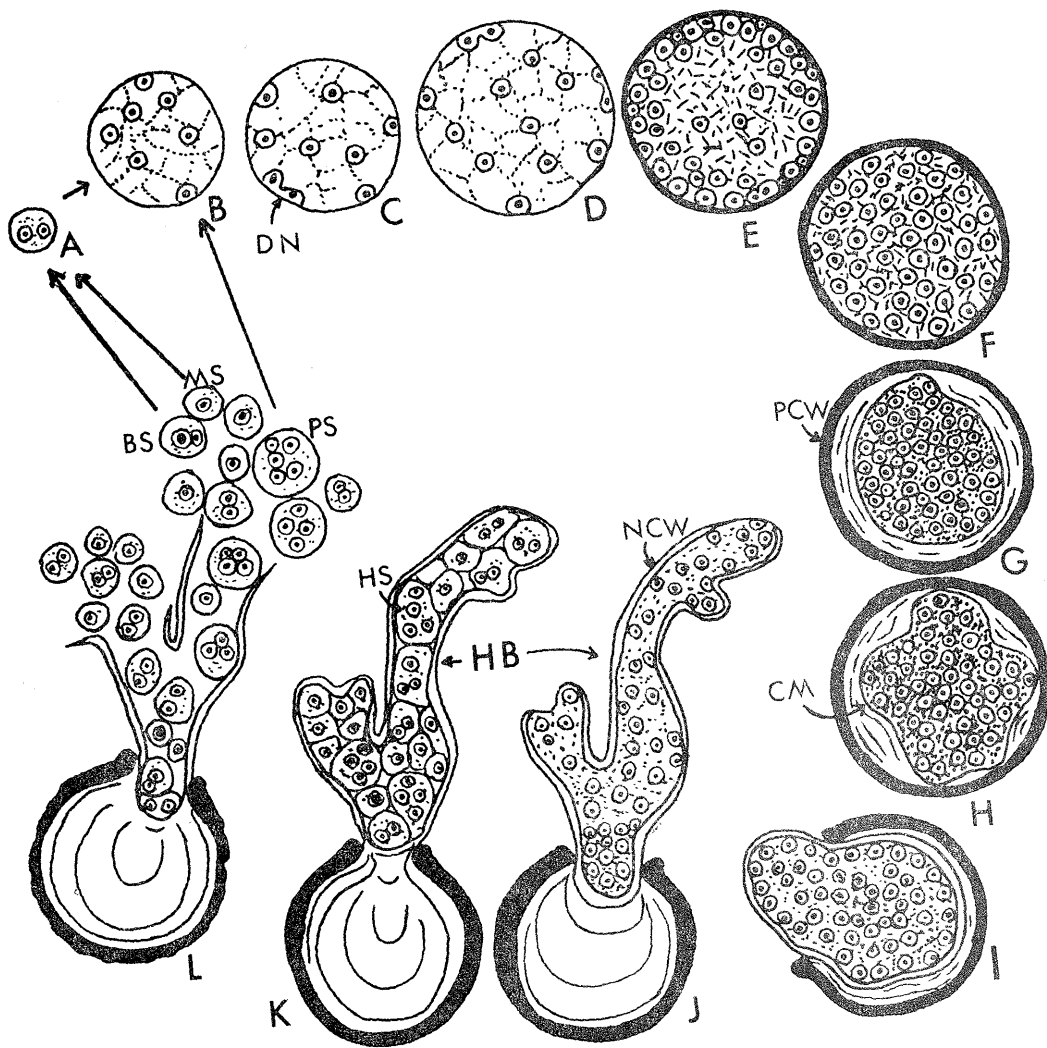
PCW : primal cell wall. NCW : newly secreted cell wall.

CM : cytoplasmic membrane. DN : dividing nuclei.

HB : hyphal body. HS : hyphal spore.

MS : mononuclear hyphal spore. BS : binuclear hyphal spore

PS : polynuclear hyphal spore.



文 献

- AMLACHER, E., 1965. Pathologische und histochmische Befunde bei Ichthyosporidienbefall der Regenbogenforelle (*Salmo gairdneri*) und am aquarienfisch *Ichthyophonus*. *Zt. Fisch.*, 15: 85—112.
- DANIER, G. E., 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. Hygiene*, 17: 267—276.
- 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, TEH.
- 宮崎照雄・窪田三朗, 1977 a. 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.
- , 1977 b. —————— II. ニジマスにおける慢性感染症, 本誌, 4: 57—65.
- NERESHEIMER, E. und C. CLODI, 1914. *Ichthyophonus hoferi* PLEHN und MULSOW der Erreger der Taumelkrankheit der Salmoniden. *Arch. Protistenk.*, 34: 217—248.
- 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. Bact.*, 59: 63—69.
- RUGGIERI, D. G., R. F. NIGRELLI, and P. M. POWLES, 1970. Eiparasitism in yellowtail flounder, *Limanda ferruginea* STREER, in the western north atlantic caused by *Ichthyophonus*, an ubiquitous parasitic fungus. *Zool.*, 55(3): 57—72.
- SINDERMAN, 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.
- SPROSTON, N. G., 1947. *Ichthyosporidium hoferi* (PLEHN and MULSOW) an internal fungoid parasite of the mackerel. *J. Mar. Biol. Assoc., U.K.*, 26: 72—98.