

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—V
培 養

簡 肇 衡*・宮崎照雄・窪田三朗
三 重 大 学 水 産 学 部

Studies on Ichthyophonous Disease of Fishes—V
Culture

Chau-Heng CHIEN,* Teruo MIYAZAKI and Saburoh S. KUBOTA
Faculty of Fisheries, Mie University

三重大学水産学部研究報告
第 6 号 別 刷

Reprinted from
Bulletin of the Faculty of Fisheries, Mie University
No. 6, October 1, 1979

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—V

培 養

簡 肇 衡*・宮崎照雄・窪田三朗

三 重 大 学 水 産 学 部

Studies on Ichthyophonous Disease of Fishes—V Culture

Chau-Heng CHIEN,* Teruo MIYAZAKI and Saburoh S. KUBOTA

Faculty of Fisheries, Mie University

Authors observed the shapes of ichthyophonous cultured with 0.85% saline and artificial medium: Sabouraud dextrose agar and TGC fluid medium adding 10% calf serum. Pieces of visceral organs of affected yellowtail fry were kept in 0.85% saline at 5°C for one month. Various sizes of multinucleate spherical bodies germinated three days after inoculation. Endospores were produced in one week after inoculation but they never grew during the one month observation. On the Sabouraud dextrose agar long hyphae grew from pieces of visceral organs of affected Japanese eel at 18°C in one week after inoculation. Heavy-walled spores were formed at the tips of the hyphae in one week after that.

In the TGC fluid medium, hyphae grew from pieces of visceral organs of affected yellowtail fry at 23°C in one week after inoculation. Hyphae grew making many branches and hyphal bodies at the tips of the hyphae during four months observation.

病死魚や、病魚の病巣を生理的食塩水中に保存して、イクチオフォヌスがどのような動態を示すかという問題は、DORIER *et. al.* (1961) によって研究されている。また人工培地を用いた培養実験や培地上でのイクチオフォヌスの形態に関する研究は FISH (1934) がヘンリチ氏ルウチン培地、魚肉汁、サブロー培地、魚肉添加グリセリン培地を用いて行なっている。またSINDERMANN *et. al.* (1954) は血清添加サブロー培地で培養を行なっている。しかし病死魚内におけるイクチオフォヌ

*台湾省水産試験所鹿港分所 (Lu-Kang Branch, Taiwan Fish. Res. Inst., Lu-Kang, Taiwan)

スの動態と人工培地における形態には現在も不明な点が多い。

著者らはニホンウナギとブリ稚魚の病魚から摘出した病巣を滅菌生理的食塩水中に保存して、死後の組織内における形態の変化を調べ、同時にサブロー寒天平板および仔牛血清添加 TGC 液体培地を用いて人工培地における形態を明らかにした。

材 料 お よ び 方 法

摘出組織におけるイクチオフォヌスの動態の観察と10%仔牛血清添加 TGC 液体培地における培養には1978年7月に三重県下の養殖漁場から新たに採取したブリ *S. quinqueradiata* の病稚魚を用いた。摘出組織内におけるイクチオフォヌスの動態ではブリの病稚魚の肝臓、脾臓、腎臓を切り出し、それを滅菌した0.85%生理的食塩水中に入れ、5℃の冷蔵庫中に1ヶ月間保存し、随時取り出して生標本として観察した。

人工培地での培養はサブロー寒天平板と10%仔牛血清添加 TGC 液体培地を用いた。サブロー寒天平板における培養は第Ⅳ報に記したニホンウナギ *A. japonica* の内臓を摘出し、1 mm角に切った小片を平板におき18℃で2週間観察した。10%仔牛血清添加 TGC 培地における培養はイクチオフォヌスの継代のために用いた。ブリ稚魚の肝臓、脾臓、腎臓を無菌的に摘出し、1 mmの小片に切って培地内に入れ23℃で3ヶ月間観察した。適時新しい培地にとりかえてイクチオフォヌスの継代を行なった。

結 果

生理的食塩水中に保存した病魚の病巣の組織片内では2日目に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 (Fig. 1), 約3日目に発芽し、糸状体が伸長する (Fig. 2)。この過程は上記の魚体内の組織中でみたと同じであるが、死魚組織では多核球状体の発育段階に関係なく発芽し、原形質が糸状体の先端部に集まるために先端が膨大になり、その結果、もとの球状体との間の菌糸部分は中空の管状になる。3～7日目に先端部の膨大部内に内生孢子がつくられる (Fig. 3)。しかし、発芽しない球状体内にも内生孢子が形成されるが (Fig. 4), その後の観察ではこの孢子の放出と発育はみられなかった。なお球状体内につくられる内生孢子の数は極めて多く、球状体の大きさにより一定していない。

ニホンウナギの病巣をサブロー寒天平板上で培養した場合、約3日で多核球状体の成熟の程度に関係なく発芽が始まる。約1週間後には分枝をもつ細い菌糸が伸長し、その長さは200 μ を超えることもある。原形質は糸状体の先端部に移動し、その部分は膨大になり、原形質の実質的な増加が起る。この菌糸の形態は SINDERMAN *et. al.* (1954) が示した heavy-walled spore と同じ形をしていた。

ブリ系のイクチオフォヌスを10%仔牛血清添加 TGC 液体培地で培養すると容易に増殖する。約23℃の条件下で培養したもので約1週間後に培地中の組織片のまわりに多数の菌糸が伸長してきた (Fig. 5)。培地中における発芽は一極のことが多いが、伸長した菌糸は激しく分枝し、各枝の長さが200～300 μ に達することもまれではない (Fig. 6)。菌糸は細く、先端部に原形質が移行し、その部分は球状に膨大し、それ以外の部分は中空となって菌糸状の形態をもつ。菌糸先端部の膨大部の総量はもとの球状体よりもはるかに多く、量的に増加していることが確認された。条件が良好な時には菌糸先端の膨大部が分離し、それがまた発芽して菌糸を伸ばすこともある。しかし古

い培地では菌糸先端の膨大部は球形になり、厚い細胞壁に包まれる。この状態のものは少なくとも約4ヶ月の間、培地中で形態を保有している。

考 察

イクチオフォヌスを含む病魚の組織片を生理的食塩水に入れ、宿主の死後におけるイクチオフォヌスの動態を観察した結果、1) 発芽は多核球状体の発育段階に無関係に起こり、2) 発芽後、糸状体が伸長し、その先端につくられた膨大部内に内生胞子がつくられ、3) また糸状体の伸長がないままに球状体内に内生胞子がつくられることがわかった。これらの内生胞子を生理的食塩水に長く保存しても胞子の発育はない。また第Ⅵ報に述べたようにこの内生胞子は感染力をもたない。以上の事実から、宿主の死はイクチオフォヌスにとって緊急事態であり、多核球状体は発育段階に関係なく発芽し、胞子をつくることがわかった。しかしその胞子の感染力には問題があり、そのまま休止すると考えられる。

DORIER *et. al.* (1961) は、病死魚内のイクチオフォヌスの観察に基づいて、病魚の死後、魚体外に出たプラスモジウム（菌糸先端の膨大部）が魚に摂取され、それが消化管内で内生胞子をつくり、放出された単核のアメーバー状の胞子が消化管壁に侵入すると推察している。しかし、この推測は第Ⅵ報の著者らの経胃感染に関する実証からも正しくないと言える。

サブロー寒天平板上ではイクチオフォヌスは長い菌糸をつくり、最終的には heavy-walled spore (SINDERMAN *et. al.* 1954) がつくられた。ニホンウナギ感染系のイクチオフォヌスもサブロー寒天平板上では、ニシン感染系と同じ形態をとることがわかった。サブロー寒天平板上では heavy-walled spore の発育がないことからこの培地はイクチオフォヌスの発育と継代には十分なものとは言えない。

10%仔牛血清添加 TGC 液体培地ではイクチオフォヌスの糸状体が激しく伸長するが、その形態は魚体内における糸状体とははるかに異なり、菌糸と呼ぶのがふさわしい。その菌糸の先端には原形質を含む球状の膨大部がつくられ、その原形質の量はもとの多核球状体よりも増加しており、本培地は発育培地となることがわかる。しかし培養中の菌糸の感染力は疑問があり、感染力を保ったままイクチオフォヌスの継代ができる培地ではないと考えられる。

要 約

- 1) ブリ稚魚とニホンウナギに感染していたイクチオフォヌスを用いて、宿主の死後の形態、サブロー寒天平板と10%仔牛血清添加 TGC 培地での培養下での形態を観察した。
- 2) 宿主の死後、あらゆる段階の多核球状体が発芽し、内生胞子がつくられた。
- 3) サブロー寒天平板上では heavy-walled spore がつくられた。
- 4) 10%仔牛血清添加 TGC 培地では多数の分枝をもつ菌糸が増殖した。

文 献

- DORIE, A. and C. DEGRANGE, 1961. L'évolution de l'*Ichthyosporidium* (*Ichthyophonus*) *hoferi* (PLEHN et MULSO) chez les salmonides d'élevage., *Trav. Lev. Hydrob. Piscic.*, Grenoble 52/53: 7—44.
Indirectly referred from Textbook of fish diseases edited by D. A. CONROY and R. L. HERMAN, TFH, 1970.
- FISH, F., 1943. A fungus disease in fish of the Gulf of Maine. *Parasitology*, 36: 1—16.
- SINDERMAN, C. J. and L. W. SCATTERGOOD, 1954. Disease of fish of the western north Atlantic—II. *Ichthyosporidium* disease of the sea herring (*Clupea harengus*)., *Res. Bull.*, 19: 4—40.

Explanation of Plate

- Fig. 1** Multinucleate spherical bodies in the pregermination stage two days after inoculation in 0.85% saline. They are walled by a thick cell wall. $\times 320$
- Fig. 2** A hyphal body four days after inoculation in 0.85% saline. A hyphal body extends from the spherical body and all protoplasm migrates in the hyphal body. $\times 320$
- Fig. 3** Hyphae with endospore production at the tips of them one week after inoculation in 0.85% saline. Spores were not released and did not grow during the one month observation. $\times 200$
- Fig. 4** Endospore production in the spherical body one week after inoculation in 0.85% saline. They did not grow during the one month observation. $\times 320$
- Fig. 5** Growth of hyphae one week after inoculation at 23°C in TGC fluid medium adding 10% calf serum. Many hyphae extend from a piece of the liver of yellowtail fry. $\times 50$
- Fig. 6** A hypha extending many branches with hyphal bodies at the tips one week after inoculation in TGC fluid medium adding 10% calf serum. $\times 160$
- Fig. 7** Hyphae with heavy-walled spores at the tips 30 days after inoculation in TGC fluid medium adding 10% calf serum. $\times 200$

Material is ichthyophonus infected yellowtail fry.

