

魚類のイクチオフォヌス症に関する研究—Ⅶ

イクチオフォヌスの形態と生活史

簡 肇衡*・宮崎照雄・窪田三朗

三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonus Disease of Fish—Ⅶ

Morphology and Life Cycle

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—Ⅶ イクチオフォヌスの形態と生活史

簡 肇衡*・宮崎照雄・窪田三朗

三重大学水産学部

Studies on Ichthyophonus Disease of Fish—Ⅶ Morphology and Life Cycle

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

Faculty of Fisheries, Mie University

The authors histologically researched on the morphology and size of well grown multinucleate spherical bodies of ichthyophonus affecting Japanese eel, yellowtail fry, black sea bream and rainbow trout. They had the same morphology, and life cycle : growth of multinucleate spherical bodies, pregermination stage, germination to form hyphal bodies, endospore production, and release of spores. The mean size was smallest in yellowtail fry, and became larger in black sea bream, and Japanese eel. The multinucleate spherical bodies affecting rainbow trout had the largest mean size, and were walled off by the thickest cell wall.

In the early case of infection, ichthyophonus formed a hypha like shape in the stomach wall. In cultivation it formed various shapes according to the medium. It formed hyphae with heavy-walled spores at their tips in Sabouraud dextrose agar. It formed hyphae with many branches and hyphal bodies at their tips in TGC fluid medium adding 10% calf serum.

魚体内のイクチオフォヌスの形態と生活史の観察は DANIEL (1933), SPROSTON (1944), SINDERMAN *et. al.* (1954), DORIER *et. al.* (1961) および宮崎ら (1977) により研究されている。DORIER *et. al.* と宮崎らのニジマスに感染したイクチオフォヌスの生活史の見解は基本的によく似ている。

著者らはニジマス、ニホンウナギ、ブリ、クロダイなどに感染したイクチオフォヌスの形態と生活史を比較検討するとともに、人工培地におけるその生活史についても検討した。

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

材料および方法

魚体内におけるイクチオフォヌスの形態の観察は第Ⅳ報で供したブリ稚魚 *S. quinqueradiata*, ニホンウナギ *A. japonica*, クロダイ *A. schlegelii*, ニジマス *S. gairdneri* の各組織標本と, 宮崎ら (1977a,b) により作成保存されていたニジマスの組織標本および第Ⅵ報において人工感染実験に用いたキンギョ *C. carassius auratus*, ウロハゼ *G. giuris*, ヤガタイサキ *T. jarbua* の組織標本を用いて行なった。各宿主体内のイクチオフォヌスの成熟した多核球状体の直径を計測し, モード曲線, 大きさの平均値とその標準偏差を求めた。

培養条件下のイクチオフォヌスの形態は第Ⅴ報で報告した生理的食塩水, サブロー寒天平板, 10% 牛牛血清添加TGC液体培地で培養したものを観察した。

結 果

1. 各感染系の形態

イクチオフォヌスの分類上の特徴は多核球状体である。ニホンウナギ, ブリ, クロダイ, ニジマスの感染病巣に観察されたイクチオフォヌスの形態は, それらの間に基本的な差は見出せないが, 成熟した多核球状体の大きさが宿主の種類により異なっている。それを比較検討したところ, Table 1 に示す結果が得られた。また多核球状体の大きさとその出現数を魚種別にモード曲線グラフで現わすと Fig. 1 のようになる。多核球状体の大きさの平均値と標準偏差値を比較すると, ブリ系イクチオフォヌスが最も小さくて直径 $52.70 \pm 3.18 \mu$, クロダイ系で直径 $62.13 \pm 4.10 \mu$, ニホンウナギ系がそれより大きくて直径 $63.13 \pm 4.35 \mu$ である。ニジマス系が最も大きく, 直径 $80.13 \pm 4.63 \mu$ である。ブリ系イクチオフォヌスとクロダイ, ニホンウナギ各系のイクチオフォヌスの間には危険率 1% で有意差がみられるが, クロダイ系とニホンウナギ系のイクチオフォヌスの間には有意差はみられない。しかし, モード曲線の線形やピークを示す大きさではこれら 3 系の間に差があるとはみえない。また上記の 3 系とニジマス系イクチオフォヌスの間には同危険率で有意差があり, モード曲線の線形やピークの大きさにも明瞭な差がみられる。

Table 1 Size of well grown multinuclear spherical bodies of ichthyophonous

Hosts	Range of size* (μ)	Mean size (μ)
yellowtail	38 ~ 75	$52.70 \pm 3.18^{**}$
black sea bream	50 ~ 100	62.13 ± 4.10
Japanese eel	50 ~ 100	63.13 ± 4.35
rainbow trout	55 ~ 105	80.13 ± 4.63

* number is 60 in each host

** standard error ($\alpha=0.01$)

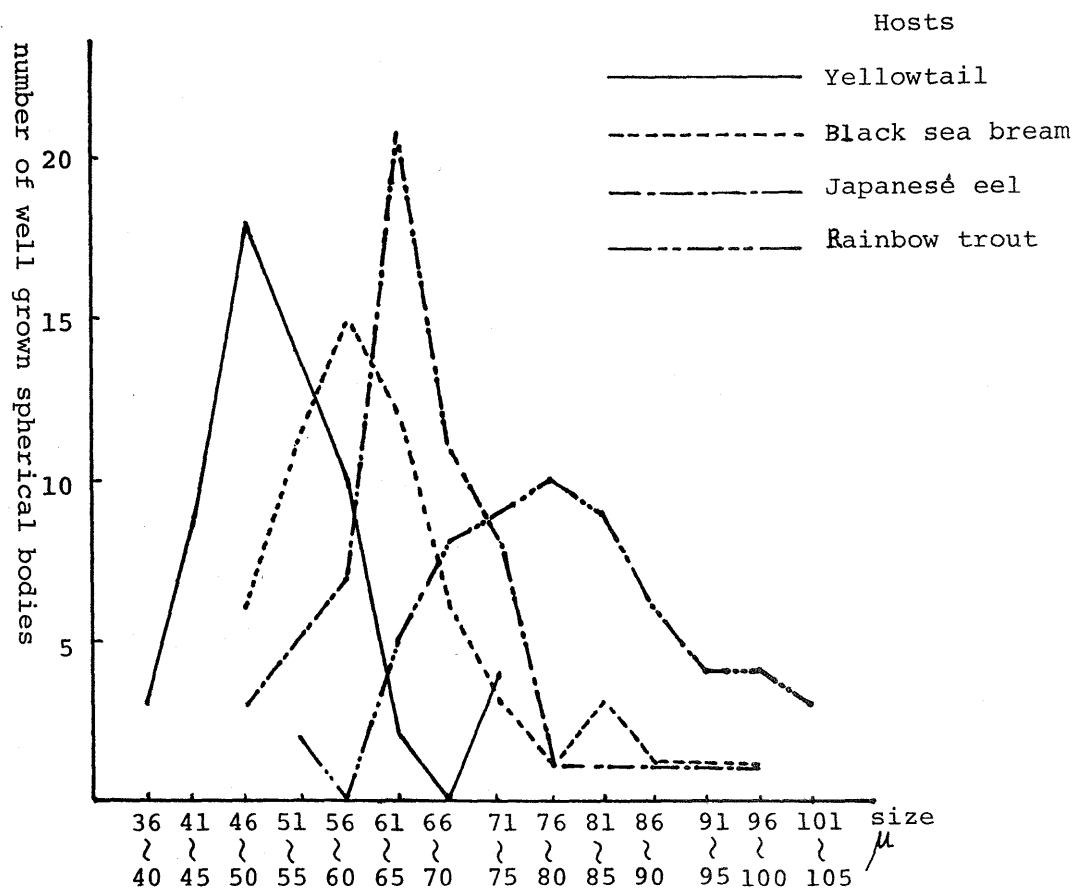


Fig. 1 Relation between the number and size of well grown multinuclear spherical bodies of ichthyophonus affected yellowtail, black sea bream, Japanese eel and rainbow trout.

2. イクチオフォヌスの生活史

ニホンウナギ、ブリ稚魚、クロダイおよびニジマスに感染しているイクチオフォヌスのそれぞれの生活史は基本的に共通していた。宮崎ら (1977c) ニジマス系イクチオフォヌスの生活史を発育期、前発芽期、発芽および糸状体期、繁殖期の4区分にわけており、それにしたがってニホンウナギ系、ブリ系、クロダイ系のイクチオフォヌスの生活史をみると次のようになった (Fig. 10A~H)。

発育期は1~数核の胞子が核数、細胞質の量を増加しながら増大し、多核球状体となる時期である。幼若な多核球状体では細胞質の網工も疎で、細胞壁も薄い (Fig. 2, Fig. 10B)。よく発育した多核球状体の細胞質は網工が密でPAS反応が強陽性となり、脂肪滴も現われる。なおこの時期には細胞壁が肥厚する (Fig. 3, 4, Fig. 10C, D)。

前発芽期は発芽のための準備段階の時期である。多核球状体の核数は増加し、細胞質の網工は太く密になり、細胞壁も層を成して肥厚する。さらに進むと原形質が収縮して原形質分離が起こる。この時ニジマス系以外のイクチオフォヌスでは、収縮した原形質の周囲に細胞壁の新たな形成は織

細であるが (Fig. 5), 胞体のPAS反応性は著しく強くなる (Fig. 6, Fig. 10E)。

発芽および糸状体期は原形質が球状体の細胞壁をつき破って発芽し, それが伸長して糸状体を形成する時期である。一般に発芽は一方向だけではなく, 多極的に細胞壁の肥厚部分で行なわれる。糸状体は多核球状体内の原形質が棒状に伸びることによって伸長する。糸状体も新しい薄い細胞壁で包まれるが, ブリ稚魚, ニホンウナギ, クロダイの各系の細胞壁はニジマス系のものと比べてかなり薄い (Fig. 7, Fig. 10F)。糸状体の原形質の増加はほとんどなく, もとの球状体内が中空になった状態で糸状体の伸長は止まる。糸状体の形および長さには各感染系に特異性はみられない。ニホンウナギ, ブリ, クロダイに感染したイクチオフォヌスでは, 糸状体の伸長後空になった球状体の細胞壁は, しわができて萎縮することが多い。この現象は特にブリ, クロダイ感染系のイクチオフォヌスに顕著であった。しかしニジマス感染系のイクチオフォヌスではその細胞壁は厚く, 空になった後もその形態を保っている。

繁殖期は伸長した糸状体内で原形質が分裂し内生胞子がつくられるのが特徴である (Fig. 8, Fig. 10G)。内生胞子は球形で, 1~数個の核と少量の網目状の細胞質をもち, 薄い細胞壁で包まれる。その大きさは直径7~10 μ である。この内生胞子の大きさと形は, 宿主の相違により異なることはなく, 共通している。内生胞子は糸状体の先端の崩壊により菌体外に放出される (Fig. 9, Fig. 10A, H)。

胃壁における感染時のイクチオフォヌスの姿は細長い菌糸状を呈し, 薄い細胞壁で囲まれた多核細胞である。胃腔内で多核球状体から多核の菌糸がつくられる過程は究明できなかった (Fig. 10F', H')。

宿主の死後におけるイクチオフォヌスの形態は, ブリ稚魚病魚の病巣を生理的食塩水に保存した時に観察された。イクチオフォヌスの多核球状体は, 幼若なものも成熟したものも共通に細胞壁の肥厚を起こした後に発芽する。糸状体はよく伸長するものが多いが, ほとんど伸長しないものもまれにみられる。よく伸長した糸状体の先端に原形質が集まり, 内生胞子がつくられる。この内生胞子は糸状体の伸長がほとんどないものでもつくられる。しかし, この内生胞子は菌体外に放出されることもなく, また発育もない (Fig. 10K, L, M)。

人工培地のうちサブロー寒天平板における形態は, ニホンウナギに感染したイクチオフォヌスについて観察した。多核球状体の発芽後, 長い菌糸が伸びる。この菌糸の原形質はもとの多核球状体の原形質より多く, 成長していることがわかる。この菌糸の先端に原形質が集まり, 厚い細胞壁で囲まれた heavy-walled spore がつくられるが, この胞子の成長はみられない (Fig. 10N)。

また10%仔牛血清添加 TGC 液体培地では多核球状体の発芽後, 菌糸は原形質の量を増し, 多数の分枝をつくりながら成長する。菌糸の先端には原形質が集まって糸状体をつくるが, それはさらに伸長する (Fig. 10 O, P)。

以上, 生体内, 生体外および人工培地におけるイクチオフォヌスの生活史を Fig. 10 にまとめた。

考 察

ニジマスに感染しているイクチオフォヌス宿主体内における生活史は DORIER *et. al.* (1961) と宮崎ら (1977) によって組立てられており, それらは基本的に同じである。宮崎らはその生活史を発育期, 前発芽期, 発芽および糸状体期, 繁殖期に区分して, 各段階のイクチオフォヌスの形態を詳細に述べている。著者が観察したニホンウナギ, ブリ稚魚, クロダイ, ニジマスの宿主体内にお

けるイクチオフォヌスの生活史上各段階の特徴は上記の報告（宮崎ら1977）と同一であることがわかった。生活史の上から、上記の4魚種に感染していたイクチオフォヌスを類別することはできない。

病魚の死後のイクチオフォヌスの形態は、病巣を生理的食塩水中に保存することで観察した。この場合、種々の発育段階にある多核球状体が共通に発芽し、孢子形成を行なったことは、宿主の死が寄生体にとって緊急事態であり、それに対して孢子形成により対処すると考えられる。このブリ稚魚に感染したイクチオフォヌスの宿主の死後の形態は DORIER *et. al.* (1961) がニジマス感染系のイクチオフォヌスで観察したものと基本的に同じである。またニホンウナギに感染したイクチオフォヌスのサブロー寒天平板上における形態は SINDERMAN *et. al.* (1954) がニシンに感染したイクチオフォヌスで観察したものと同じである。ただし、10%仔牛血清添加 TGC 液体培地でのイクチオフォヌスの形態の観察は著者らが最初であり、他魚種に感染したイクチオフォヌスとの比較はできない。以上のように同一の環境条件におけるイクチオフォヌスの形態は、宿主が相違していてもよく似ていることがわかった。

各感染系のイクチオフォヌスの成熟した多核球状体の大きさの比較の結果、ブリ、ニホンウナギ、クロダイ各感染系とニジマス感染系との間に明らかな有意差がみられた。また、これらの4系の間にみられる形態的な差は本質的にはなにもないが、細胞壁の性質に差を見出すことができる。ニジマス系イクチオフォヌスの多核球状体を包む細胞壁は他の3系のものよりも厚く強固で、発芽して糸状体が伸長し、原形質が移行後の空になった細胞壁はしばしばもとの形を保っている。他の3系では細胞壁が薄いために多くのしわができて萎縮する。以上のことから、これら4系の間に次のことを推測できる。ブリ系、クロダイ系、ニホンウナギ系の間には形質的な差が小さいかあるいはないと言える。これら3系のイクチオフォヌスとニジマス系のそれとの間には大きさに著しい差があり、細胞壁の性質にも多少の差があると言えよう。病理組織学的にもニジマス感染系のイクチオフォヌスは軀幹筋組織への侵襲が弱い、ブリ、ニホンウナギの各系では筋組織への侵襲と繁殖が顕著である（第Ⅳ報）。このことは著者の集めたイクチオフォヌスが2大別できることを示唆していると言える反面、宿主の相違によっても大きさの差や細胞壁の性質の差が生じないという証拠をもたない限り、2型に分けることは早尚である。その理由として他魚種にニジマス系イクチオフォヌスを人工感染または移植した場合、成熟した多核球状体が得られたものではその大きさが一般的に小型化していることなどがあげられる（第Ⅶ報）。したがって今後イクチオフォヌスを2型に分けるためには、種々の感染方法で宿主互換を行いその上で有意差を求めて決定されねばならない。

要 約

- 1) ブリ稚魚、クロダイ、ニホンウナギ、ニジマスに感染したイクチオフォヌスの形態と生活史を比較検討した。
- 2) これら4系のイクチオフォヌスの形態と生活史は基本的に共通していた。
- 3) しかし、成熟した多核球状体の大きさでは、ニジマス感染系と他の3系との間に有意差がみられた。

Explanation of Plate I

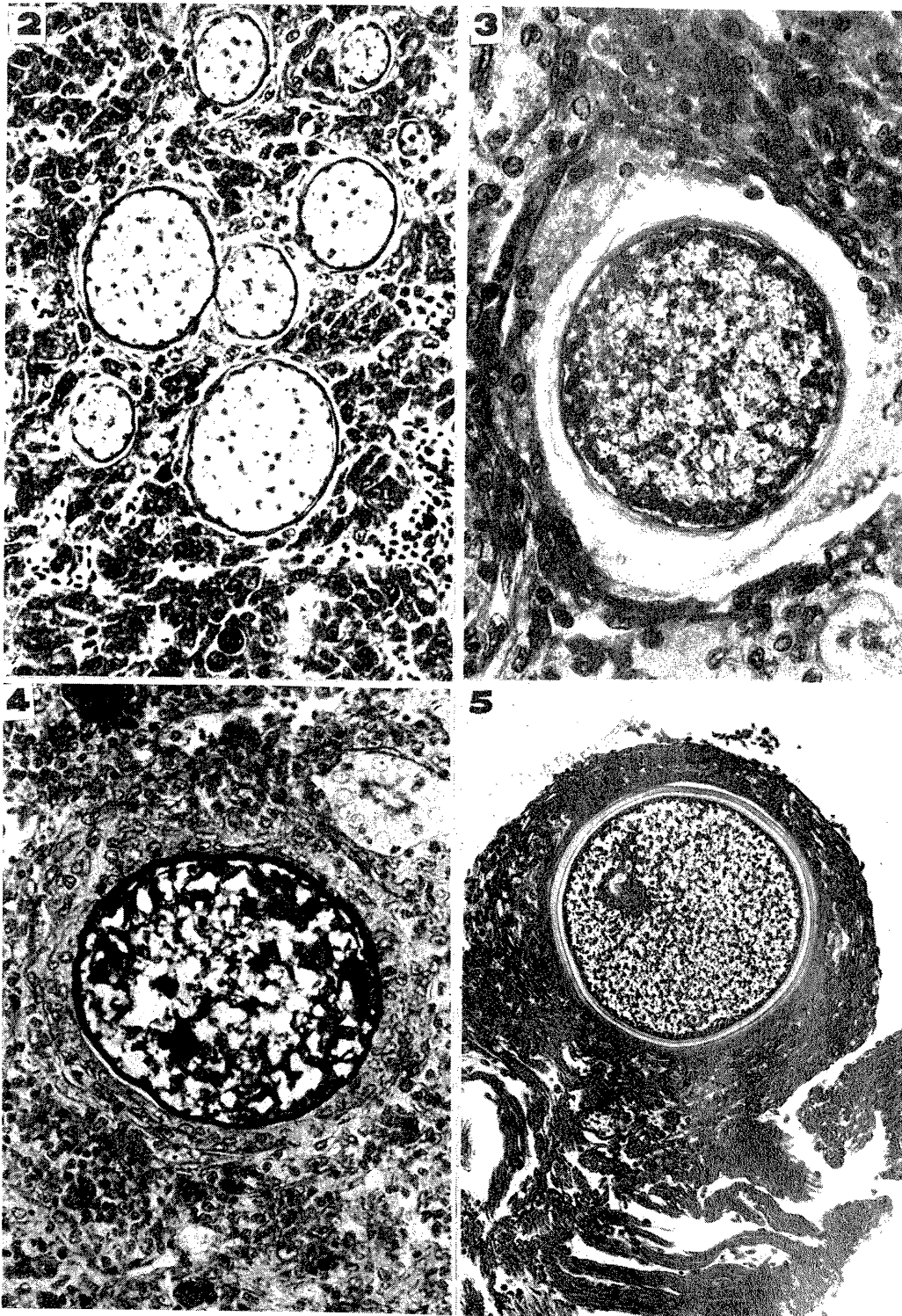
Fig. 2 Young multinucleate spherical bodies in the liver of yellowtail fry. They have a small number of nuclei, a simple mesh-work of cytoplasm, and a thin cell wall. H-E stain, $\times 320$

Fig. 3 A well grown multinucleate spherical body in the kidney of a Japanese eel. The nuclei increase in number and the mesh-work of the cytoplasm becomes complicated. The cell wall becomes thicker. H-E stain, $\times 320$

Fig. 4 A well grown multinucleate spherical body in the kidney of a Japanese eel. The mesh-work of the cytoplasm and the cell wall react to PAS reaction. PAS reaction, $\times 320$

Fig. 5 A multinucleate spherical body in the pregermination stage in the heart of a Japanese eel. The nuclei markedly increase in number and the mesh-work of the cytoplasm becomes more complicated. The cell wall becomes thick and plasmolysis occurs. H-E stain, $\times 200$

Plate I



Explanation of Plate II

- Fig. 6** A multinucleate spherical body in the pregermination stage in the kidney of a Japanese eel. The mesh-work of cytoplasm and cell wall begin to react strongly to PAS reaction. The shape is distorted following germination. PAS reaction, $\times 320$
- Fig. 7** A hyphal body in the germination stage in the spleen of a Japanese eel. The hyphal body has a thin cell wall newly secreted. The cell wall of the spherical body is shrunken. H-E stain, $\times 320$
- Fig. 8** A hyphal body producing and releasing endospores in the liver of yellowtail fry. The number of nuclei vary from one to several, and the size varies according to the number of nuclei. H-E stain, $\times 500$
- Fig. 9** Released spores in the heart of the Japanese eel.

Plate II

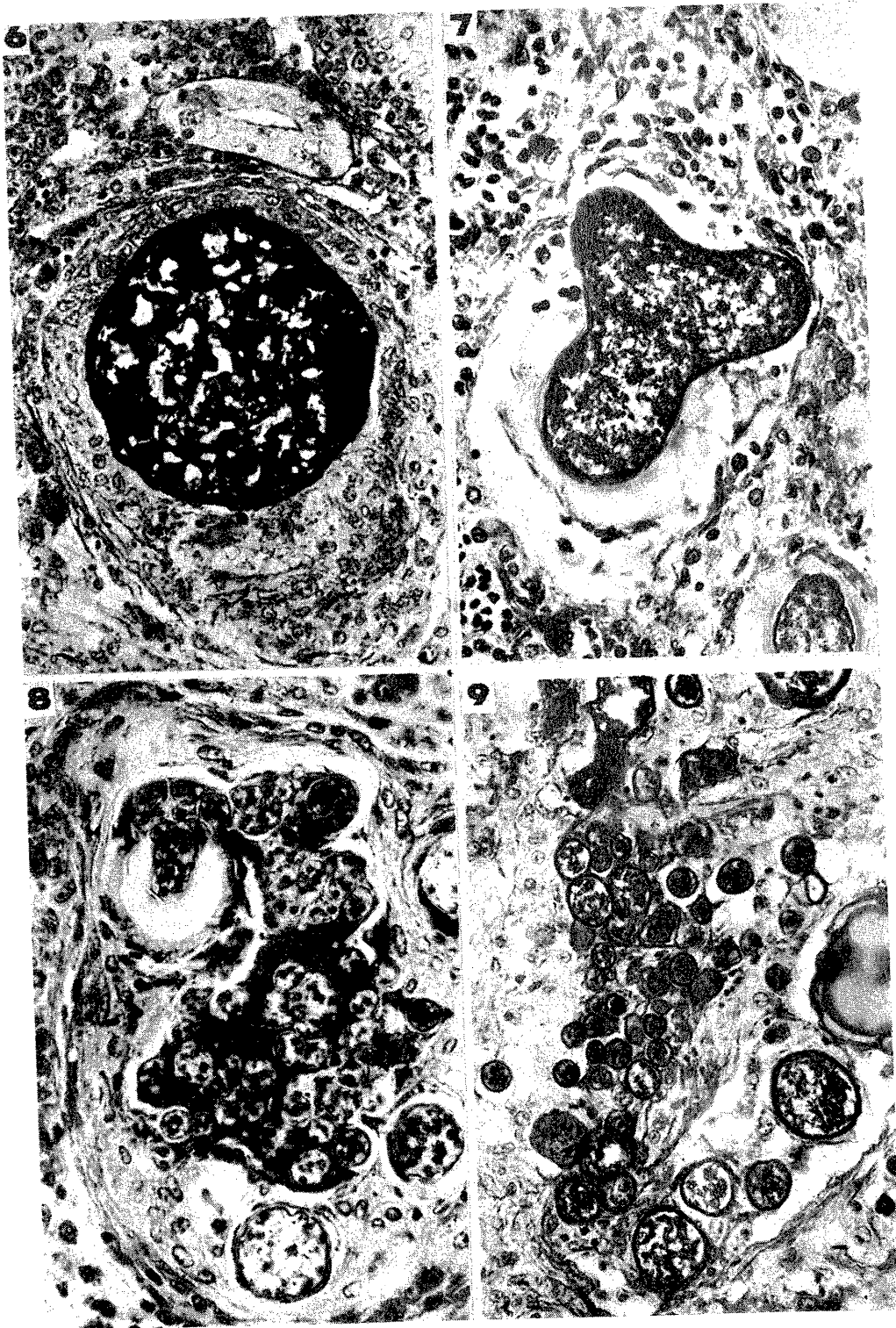


Fig. 10 Life cycle of ichthyophonus

A—H : Life cycle in the tissue of fish.

A : spores.

B, C, D : multinucleate spherical bodies.

E : a multinucleate spherical body in the pregermination stage.

F : a hyphal body.

G : endospore production in the hyphal body.

H : release of spores.

D—H' : Life cycle in the stomach wall in the early stage of infection.

F' : a hyphal body penetrating the stomach wall.

H' : spore production in the hyphal body

* Passage from D to F' and E to F' is unknown.

I—M : Life cycle in saline.

I : a multinucleate spherical body in the pregermination stage.

J : germination.

K : hyphae.

L : endospore production at the tips of hyphae.

M : endospore production in a spherical body.

I, J and N : Life cycle in Sabouraud dextrose agar.

N : hyphae with heavy-walled spores at the tips.

I, J, O and P : Life cycle in TGC fluid medium adding 10% calf serum.

O and P : hyphae with many branches and hyphal bodies in their tips.

ES : epithelium of the stomach.

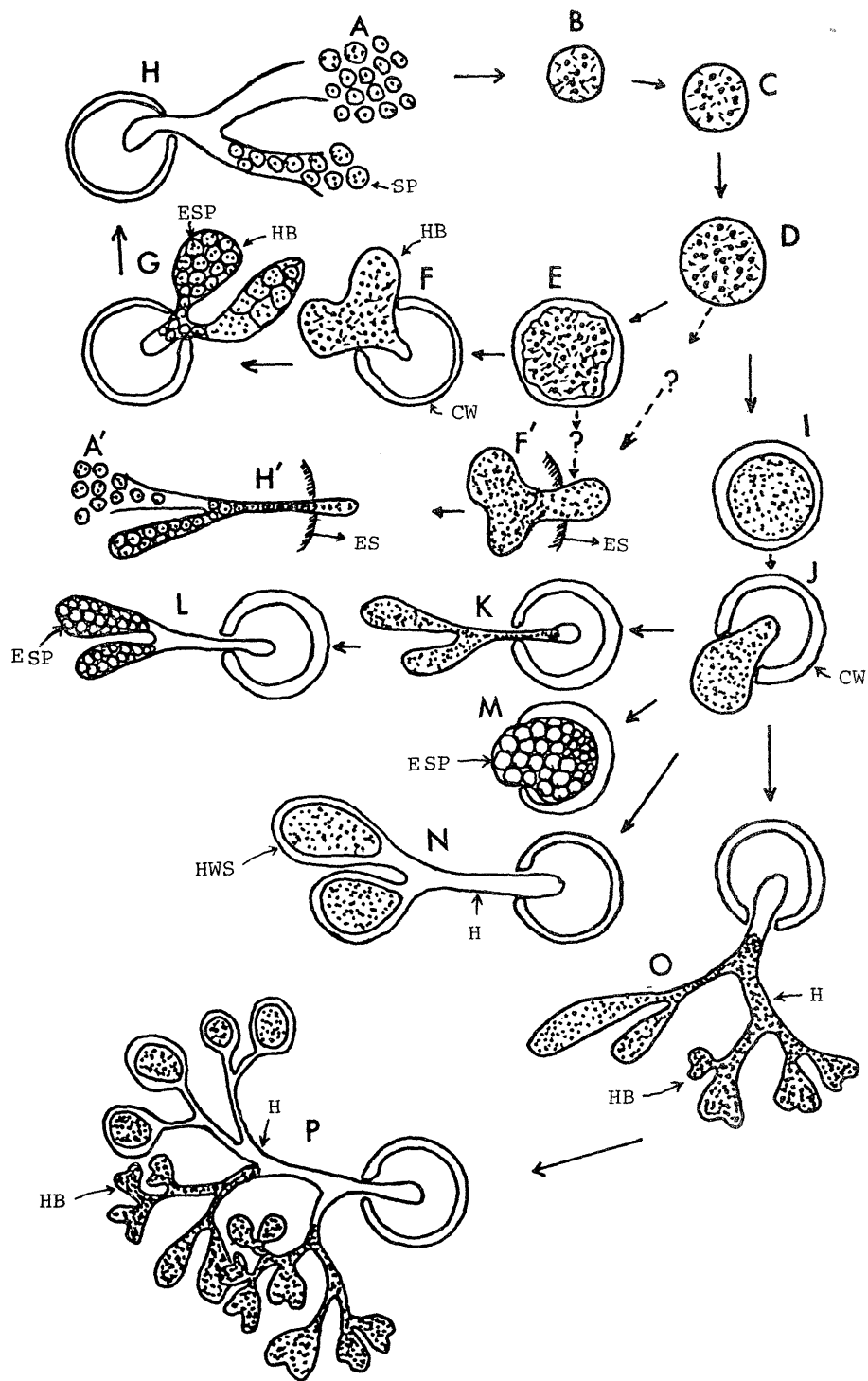
ESP : endospore.

H : hypha.

HB : hyphal body.

HWS : heavy-walled spore.

CW : cell wall.



文 献

- DANIEL, G. E., 1933. Studies on *Ichthyophonus hoferi*, a parasitic fungus of herring (*Clupea harengus*)—I. The parasite as it is found in the herring. *Amer. J. Hygiene*, 17: 262—276.
- DORIER, A. and C. DEGRANGE, 1961. L'évolution de l'*Ichthyosporidium* (*Ichthyophonus hoferi* (PLEHN et MULSOW)) chez les salmonides d'élevage. *Trav. Lab. Hydrob. Pascic.*, Grenoble, 52/53: 7—44.
- Indirectly referred from the Textbook of fish diseases edited by D. A. CONROY and R. L. HERMAN, TFH, 1970.
- 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—Ⅲ. ニジマスに感染したイクチオフォヌスの生活史. 本誌, 4: 67—80.
- SINDERMAN, C. J. and L. W. SCATTERGOOD, 1954. Disease of fish of the western north Atlantic—II. *Ichthyosporidium* disease of sea herring (*Clupea harengus*). *Res. Bull.*, 19: 4—40.
- SPROSTON, N. G. 1944. *Ichthyosporidium hoferi* (PLEHN and MULSOW, 1911) an internal fungoid parasite of the mackerel., *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 26: 72—98.