アユのグルギア症に関する研究—IV.

胞子の注射による人為感染

高橋 誓*・江草周三**

(昭和 52 年 10 月 15 日受理)

Studies on *Glugea* Infection of the Ayu, *Plecoglossus altivelis*—IV.

Artificial Infection by Spore Injection

Sei TAKAHASHI* and Syuzo EGUSA**

*Shiga Pref. Fish Exp. Station, Hassaka-cho, Hikone 522 Japan

**Dept. Fish., University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo, 113 Japan

(Received October, 15, 1977)

Suspensions of spores of *Glugea plecoglossi* in distilled water or 0.85% NaCl solution (about 10^7 – 10^8 spores per ml) were injected subcutaneously (0.05 ml) and intraperitoneally (0.1 ml) into Ayu (*Plecoglossus altivelis*) (9–15 g). Fish injected with distilled water or 0.85% NaCl solution were used for controls. The experimental and control fish were kept at about 19–20°C after injection. After 22 to 35 days all fish were sacrificed and examined by the naked eye for the presence of “*Glugea* cysts” not only in the site of inoculation but also in the other parts of the body. The results were as follows. In almost all fish inoculated with spores subcutaneously many *Glugea* cysts had been produced at the site of inoculation. Besides, cysts were observed in internal organs such as pyloric caeca, peritoneum, gonads, adipose tissue and spleen.

In the fish received spores intraperitoneally many cysts were observed to be formed on pyloric caeca, peritoneum, gonads, adipose tissue, liver, heart and spleen. In addition, cysts were found in subcutaneous tissue and peripheral muscle tissue in various part of the trunk.

This spore injection method seems to be useful for the studies not only on the pathology, and treatment of microsporidiosis but also on the life cycle and host range of microsporidia.

Glugea plecoglossi の胞子の蒸留水等への懸濁液をアユの皮下,あるいは腹腔内に注射することによりグルギア症を起こさせることに成功した。著者らの知る限り,魚類寄生微胞子虫類を同様の方法で人為感染せしめた報告をみないので,以下に実験成績の一部を紹介し参考に供したい。

材料と方法

胞子懸濁液 蒸留水あるいは 0.85% NaCl 溶液中でグルギア症のアユより摘出したグルギアシストを押し潰し,得られた胞子懸濁液を東洋濾紙 No. 2 で汙過して夾雑物を除いた。一部の実験では作製直後の胞子懸濁液を注射に用いたが,一部では作製後冷蔵庫内に保存したものをを用いた。注射に際しては,懸濁液を一滴スライド

グラス上に取り,等量の 30% H_2O_2 液を加え,極糸を弾出した胞子が過半数に達することが確認された懸濁液を用いた。蒸留水胞子懸濁液の場合の胞子濃度は 10^7 – 10^8 胞子/ml, NaCl 懸濁液の場合もほぼ同様であった。

供試魚 琵琶湖で春季採捕後,滋賀県水産試験場で飼育した 9–15 g のアユである。皮下注射実験は 1976 年 8 月–10 月に,腹腔内注射実験は 1977 年 5 月–7 月の間に行なわれた。

注射法

1) 皮下注射 アユの軀幹背側部背鰭側下の一点の皮下にツベリクリン筒を用い胞子の蒸留水または NaCl 懸濁液 0.05 ml を注射した。注射は各懸濁液について 2 魚群 (15–28 尾) に対して行ない,蒸留水あるいは 0.85% NaCl 液を同様に接種したものを対照とした。

2) 腹腔内注射 胞子蒸留水懸濁液 0.1 ml をツベリクリン筒により腹腔内に注射した。実験は 2 回 (各 7 尾

* 滋賀県水産試験場

** 東京大学農学部

と 10 尾を用いた) 行ない、蒸留水注射魚を対照に設けた。

飼育 注射した魚は地下水を通じた水槽に収容し、1 日 1 回配合飼料を与えて飼育した。水温は実験ごとに多少異なるが、19~20°C 前後であった。

発症の判定 注射後 22 日ないし 35 日間飼育したのち、魚を取り上げ魚体各部位におけるグルギアシストの形成の有無を肉眼的に調べ、それが確認されたものを発症魚とし、その尾数の剖検尾数に対する比を発症率とした。

なお、別に 0.85% NaCl 懸濁液を同様に魚に皮下注射した後、ある期間をおいて魚を取り上げ、接種点付近の皮膚・筋肉組織塊を切りとり、ブアン氏液で固定、常法によってパラフィン切片を作製、ヘマトキシリン・エオシン染色を施し検鏡した。

結 果

I. 皮下注射実験 実験結果を表 1 に示す。実験 2 および 3 における供試魚の各 1 尾を例外とし注射された魚は殆んどすべて (但し 0.85% 孢子懸濁液接種魚 27 尾中の 1 尾は例外 (表 1)) 注射部位の皮膚、皮下あるいは筋肉に多くのグルギアシストが形成され、外観的にシスト塊による膨隆となって現われた (図 1, 2)。但し実験 4 の 0.85% 孢子懸濁液接種魚 27 尾中の 1 尾では接種点におけるシスト形成はなかった。これら例外の 3 尾で接種魚

にシスト塊が形成されなかった原因は不明である。

接種点以外の場所で体表に外観的小隆起あるいは白点として認められるシストの形成は実験 4 の 1 尾を例外としてまったくなかった。接種点の組織学的観察によると、真皮の鱗嚢内、疎性結合組織、コラーゲン線維組織、皮下脂肪組織、また表層の筋肉組織などにキセノマの形成が認められた (図 3, 4)。宿主反応は注射 14 日後までは殆んど認められなかったが 24 日後には各種の遊走細胞や線維芽細胞がキセノマの周囲に現われ、被包化が始まっていた (図 4)。

実験 1 は対照を欠くので論議の対象となしえないが、実験 3 では対照魚で内臓にシストが形成されていた魚は皆無であったのに対し、注射魚では 13 尾中の 9 尾で幽門垂、腹膜、生殖腺、脂肪組織、脾臓などにシストが形成されていた。実験 2 および 4 では対照魚も内臓にシスト形成がみられたものがあつた。これは琵琶湖で既にグルギア症に感染していたことによるが、内臓にシストが形成されていた魚の出現率をみると、接種魚のほうが対照魚よりやや高い。それは別としても、対照魚では脾臓にシスト形成がみられた魚は皆無であったのに対し、注射魚ではそれが多い点が注目された。

いずれの実験においても対照魚で、体表に近い組織にシストが形成されていたものはなかった。従って実験区の魚の接種魚に現われたシストは、注射による人為感染によるものであることは明らかである。また、脾臓のシ

Table 1. Experimental infection of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) with *Glugea plecoglossi* by subcutaneous spore injection

Inocula	No. of Experiment and experimental period (days)		No. of fish examined	No. of fish with <i>Glugea</i> cysts (%)	No. of fish with <i>Glugea</i> cysts in			W.T. (°C)
					Site of inoculation	Organs* near the body surface	Internal organs**	
Spore suspension in distilled water	1 (22)	Exp. Cont.	16 —	16 (100) —	16 —	0 —	13 (9)***	18.6–19.4
	2 (35)	Exp. Cont.	14 30	13 (92.9) 14 (46.7)	13 0	0 0	9 (7) 14 (0)	18.5–19.4
Spore suspension in 0.85% solution	3 (22)	Exp. Cont.	20 30	19 (95.0) 0	19 0	0 0	7 (7) 0 (0)	19.3–20.1
	4 (35)	Exp. Cont.	27 30	27 (100) 14 (46.7)	26 0	1 0	21 (10) 14 (0)	18.4–19.4

* Subcutaneous tissue in other than the site of inoculation; fins, eyes, gills and opercula.

** Pyloric caeca, peritoneum, adipose tissue, gonads, liver, heart and spleen.

*** Figures in parenthesis indicate the number of fish with *Glugea* cysts in the spleen.

Table 2. Experimental infection of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) with *Glugea plecoglossi* by intraperitoneal spore injection

Inocula	No. of Experiment and experimental period (days)		No. of fish examined	No. of fish with <i>Glugea</i> cysts (%)	No. of with <i>Glugea</i> cysts in		W.T. (°C)
					Organs* near the body surface	Internal organs**	
Spore suspension in distilled water	5 (31)	Exp.	4	4 (100)	1	4 (4)***	18.9–19.6
		Cont.	5	0	0	0	
	6 (25)	Exp.	6	5 (83.3)	5	5 (3)	19.7–21.7
		Cont.	7	0	0	0	

* Subcutaneous tissue in other than the site of inoculation; fins, eyes, gills and opercula.

** Pyloric caeca, peritoneum, adipose tissue, gonads, liver, heart and spleen.

*** Figures in parenthesis indicate the number of fish with *Glugea* cysts in the spleen.

ストについても同様のことがいえる。

II. 腹腔内注射実験 実験結果を表2に示した。2つの実験で剖検した魚、計10尾のうち9尾で幽門垂間、腹膜、腹腔内脂肪組織、生殖腺、脾臓、鰓などにグルギアシスト形成が認められ、対照の12尾にはそれは全く見出されなかった。なお、1尾の接種魚で腹腔内シスト形成がみられなかった原因は不明である。腹腔内注射の場合も脾臓にグルギアシストが形成されている例が多かった(図6)。また、腹腔内のほか皮下組織や表層に近い筋肉組織にシストが形成され、体長に外観的に明瞭な小隆起を作っている魚があった(図5)。対照魚ではむしろ皮下組織のシスト形成はみられなかった。従ってこの皮下組織や表層に近い筋肉組織のシスト形成は注射による人為感染によってもたらされたものと考えられる。

考 察

SPRAGUE and VERNICK (1968) は *Glugea weissenbergi* の感染機序に関し、魚の消化管内で弾出された極糸(管)を経て、感染単位と呼ばれる微小体が胞子内から腸組織内に送りこまれ、それが腸固有層の間充織に遊走してきた組織球(大部、大食細胞)に摂り込まれ、その細胞内で増殖することによって感染が成立すると報告した。アユの *Glugea plecoglossi* でもキセノマの初期発育状況は *G. anomala* (WEISSENBERG 1921, 1968) や *G. weissenbergi* と殆んど一致することから(高橋ら1977)、同様の感染経過をたどると考えられる。

胞子の皮下注射によって接種点にキセノマが形成され、さらにグルギアシスト形成も起こったことは、接種点で極糸の弾出が起り、感染単位がそこに検出され、出現した組織球に摂取されたものと思われる。腹腔内に

注射された胞子もそこで極糸を弾出し、感染単位を放出したものと考えられる。これらの場合の極糸弾出の機構は明らかではない。

なお、皮下注射の場合グルギアシストが内臓に形成されたこと、また腹腔注射の場合には皮下にも現われたが、これは注射された胞子そのものが循環系を経て接種点以外の場所に運ばれそこで極糸を弾出し、遊走細胞に摂り込まれたか、または初期キセノマが血行などによって他に運ばれたかはさらに検討の要がある。

感染の機構には不明の点があるものの、注射法は殆んど100%近く、グルギア症を発症せしめることが明らかになった。従ってこの方法は *G. plecoglossi* の宿主の検討、さらにグルギア症の対策の検討に有力な研究手段となろう。

要 約

1. *G. plecoglossi* の胞子を蒸留水または0.85% NaCl 溶液に懸濁させ、アユの軀幹背側背鰭側下の一点の皮下に0.05 ml 注射した。その結果22日および35日後には注射点の皮膚、皮下組織さらに表層に近い筋肉組織に多数のグルギアシストの形成が認められた。さらに幽門垂、腹膜、生殖腺、蓄積脂肪体、肝臓、心臓、脾臓にもグルギアシストを認めた。

2. 同様に胞子の蒸留水懸濁液を腹腔内に0.1 ml 注射することにより、25日および31日後に幽門垂、腹膜、生殖腺、蓄積脂肪体、脾臓、鰓そして皮下組織または表層に近い筋肉組織内にグルギアシストの形成を認めた。

3. 現在までに魚類微胞子虫の注射による感染の報告はない。他の微胞子虫に対して同様に成立するか不明であるが、この方法により *G. plecoglossi* の生物学的研究

や治療法の研究には多に役立つ。

謝 辞

本研究を行うにあたりお世話いただいた滋賀県水産試験場長古川優氏ならびに技師大江孝二氏に厚く感謝の意を表します。

文 献

SPRAGUE, V. and S. H. VERNICK (1968): Light and electron microscope study of a new species of *Glugea* (Microsporidia, Nosematidae) in the

4-spined stickleback *Apeltes quadracus*. *Protozool.*, 15, 547-571.

高橋 誓・江草周三 (1977): アユのグルギア症に関する研究—I. 新種の提案. 魚病研究, 11(4), 175-182.

WEISSENBERG, R. (1921): Zur Wirtsgewebsableitung des Plasma-körpers der *Glugea anomala*—Cysten. *Arch. Protist.*, 42, 400-421.

WEISSENBERG, R. (1968): Intracellular development of the microsporidian *Glugea anomala* moniez in hypertrophing migratory cells of the fish *Gasterosteus aculeatus* L., an example of the formation of "Xenoma" tumors. *J. protozool.*, 15, 44-57.

Explanation of Plate

- Figs. 1 and 2.** External appearance of Ayu (*Plecoglossus altivelis*) injected subcutaneously with suspensions of spores of *Glugea plecoglossi*. Thirty five days after inoculation. A mass of *Glugea* cysts are formed at the site of inoculation.
- Fig. 3.** A xenoma appeared in the subcutaneous fatty tissue of an Ayu injected with spores subcutaneously. Nine days after inoculation. (H-E stain) (Scale : 20 μ m)
- Fig. 4.** Two xenomas formed in the dermis of an Ayu injected with spores subcutaneously. Twenty four days after inoculation. The xenomas are surrounded by wandering cells and fibroblast cells. (H-E stain) (Scale : 40 μ m)
- Fig. 5.** External appearance of Ayu injected with spores intraperitoneally. Small protuberances (arrows) caused by *Glugea* cysts formation in the subcutaneous tissue are observed in various parts of the body surface. Thirty one days after inoculation.
- Fig. 6.** *Glugea* cysts developed on the spleen of an Ayu injected with spores intraperitoneally. Protuberances of the skin caused by subcutaneous cyst formation are seen (arrows). Thirty one days after inoculation.

図版説明

- 図 1. *G. plecoglossi* の胞子の皮下接種により、接種点付近にのみ形成されたグルギアシスト塊。(35 日目)
- 図 2. 蒸水に懸濁された胞子液を皮下に接種した場合のグルギアシストによる接種点の隆起。(31 日目)
- 図 3. 胞子の NaCl 懸濁液で皮下接種後 9 日目。皮下脂肪層に認められたキセノマ。ヘマトキシリン・エオシン染色。スケールは 20 μ 。
- 図 4. 上に同じく 24 日目の疎性結合組織内のキセノマ。すでに宿主反応があらわれシスト化がはじまっている。ヘマトキシリン・エオシン染色。スケールは 40 μ 。
- 図 5. *G. plecoglossi* 胞子の腹腔内接種により外観的に点状に認められる“シスト”。(矢印)
- 図 6. 腹腔内接種で脾臓に多くのシストが形成された例。表皮にもシストによる隆起が認められる。(矢印)

1

2

3

4

5

6