魚類寄生グルゲア属 3 種の孢子 SEM 像

特にアユ寄生 *Glugea* sp. AWAKURA に関する論議を中心として

中島健次*・江草周三**

(昭和 53 年 9 月 30 日受理)

Surface Pattern and Size of Spores of Three Species of the
Genus *Glugea* Observed with a Scanning Electron Microscope,
with Special Reference to a Comparison between
G. plecoglossi and *Glugea* sp. AWAKURA, 1974

Kenji NAKAJIMA* and Syuzo EGUSA**

*Central Research Labs., Sankyo Co., Hiromachi, Shinagawa-ku, Tokyo, Japan

**Dept. Fish., Fac. Agr., Univ. of Tokyo, Yayoi, Bunkyo-ku, Tokyo, Japan

(Received September 30, 1978)

Three species of the genus *Glugea* (Microsporidea: Nosematidae), *G. plecoglossi* TAKAHASHI et EGUSA, 1977, *G. anomala* (MONIEZ, 1887) GURLEY, 1893 and *G. hertwigi canadensis* FANTHAM et al., 1941, were studied on their spore surface construction and dimensions with a scanning electron microscope. Spores of *G. plecoglossi* were collected from both fresh and the formalin-preserved *Plecoglossus altivelis*. Fresh spores of *G. anomala* from *Gasterosteus aculeatus* were sent by Dr. J. LOM of the Czechoslovak Academy of Sciences and spores of *G. hertwigi canadensis* were gathered from a frozen Canadian smelt, *Osmerus mordax*, imported commercially from Canada. These spores were fixed in 2% glutaraldehyde in 0.1 M phosphate buffer of pH 7.4 for 90 minutes and then in 2% osmium tetroxide in the same buffer for 60 minutes. After fixation, they were rinsed, dehydrated by passage through a graded series of ethanol, replaced with isoamyl acetate, dried with a critical point dryer, coated with golden ion and examined with the Hitachi MSM-6 at accelerating voltages of 25kV.

G. plecoglossi spores have the smooth surface, though an exception with a fine wrinkle-like structure was found in the formalin-preserved specimens. The treated fresh spores of *G. plecoglossi* measured 3.9–5.1 μm long by 1.7–2.1 μm wide, being a little smaller than the figures of 5.1–6.2 μm long by 2.0–2.5 μm wide reported on the basis of optical microscopic observations. The formalin-fixed spores did not shrink through the treatment. *Glugea* sp. AWAKURA, 1974 from *P. altivelis* is distinctly different from *G. plecoglossi*, because, first, the formalin-preserved spores are bigger than those of *G. plecoglossi*, being 5.9–6.9 μm long by 2.0–2.4 μm wide according to an optical microscopic observation, and secondly, they have dense fine folds on the surface. *G. anomala* spores were characterized by the highly rugose surface with a winding longitudinal ridge. *G. hertwigi canadensis* spores had the rough surface with loose folds and distinct or obscure longitudinal wrinkles which was slightly different from that of *G. hertwigi* reported by LOM and WEISER in 1972.

邦産アユに寄生する *Glugea* 属の微孢子虫が, *G. plecoglossi* TAKAHASHI et EGUSA, 1977 の一種だけではないかもしれないとの疑問は, 走査型電子顕微鏡 (以

下 SEM と略す) による観察で, 表面が平滑 (smooth) の孢子と皺々 (rugose) の孢子とが認められことによる。すなわち, 著者らの観察 (中島・江草, 1976) では *G. plecoglossi* の表面が平滑であったのに対し, 栗倉 (1974) は, 岡山県産養殖アユから採取した孢子を *G. anomala* (MONIEZ, 1887) GURLEY, 1893 に同定し得るかもしれないとし, その表面が SEM 像において有皺型で

養殖魚貝甲類の有害無脊椎動物に関する調査・観察・実験ノート <28>

* 三共株式会社中央研究所

** 東京大学農学部

あることを明らかにしている。しかし、両者とも、10%ホルマリリンで固定した胞子を用いて SEM 用試料を作製しており、処理法の不統一もあって種差を論議するには至らなかった。そこで、改めて *G. plecoglossi* の生活胞子についてその SEM 像を確認するとともに、栗倉 (1974) が有皺型のグルゲアを認めたという問題の岡山産アユ罹虫魚の保存標本を入手し、さらに、*G. anomala* および *G. hertwigi* として提供された胞子も加え、これらを同一方法で処理して表面構造を観察することにした。

材料および方法

供試したグルゲア胞子 4 検体の由来は次のとおりである。

1) *G. plecoglossi* (滋賀水試高橋晋氏提供): 昭和 52 年 6 月に琵琶湖で採捕した稚アユを滋賀県水産試験場内で電照飼育 (成熟制御) し、53 年 5 月、この越年魚から生活胞子を採取、滅菌生理食塩水中に懸濁させて東京へ運搬、冷蔵庫内に保存した。

2) *Glugea* spp. (岡山水試杉山英之氏提供): 岡山県総社市内の H 養鮎場で琵琶湖産稚アユを導入・飼育していたところ、昭和 44 年 9 月にグルゲア症が発生、この時点で採集された罹虫魚のホルマリリン固定標本が栗倉輝彦博士に供試されている。著者らに送付された固定標本は、同養鮎場で越年した同じ罹虫魚群から 45 年 4 月に採集した罹虫魚 3 尾 (体長 11.3~12.8 cm) であり、各罹虫魚から 5 個ずつ採取した xenoma を破碎して胞子を採取した。この胞子は、10% ホルマリリン液中に 8 年間浸漬されていたものであるが、SEM 用試料作製に当たり、あらかじめ十分に水洗してから生活胞子と同様の方法で処理した。

3) *G. anomala* (J. LOM 博士提供): 昭和 53 年 6 月、チェコスロバキア産のトゲウオ *Gasterosteus aculeatus* (魚令・体長等不明) から生活胞子を採取し、生理食塩水中に封入して空輸された。

4) *G. hertwigi canadensis* (東大小川和夫氏提供): N 水産会社がカナダから *Osmerus mordax* の冷凍品を輸入したが、その約 50% にグルゲアが寄生しており、種の同定を小川氏に依頼。昭和 53 年 7 月、*G. hertwigi* の罹虫魚としてその 1 尾 (体長 11.4 cm) が提供されたので、これを解凍し胞子を採取した。

これらの胞子をまず 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.4) で 2 回洗滌 (振盪・遠沈) し、しかるのち、これを溶媒とするグルタルアルデヒド 2% 溶液とオスミウム酸 2% 溶

液とで順次固定した。次に、エタノール系列で脱水、醋酸イソアミルに移して臨界点乾燥機で乾燥し、金イオンを被覆してから日立 MSM-6 型走査電顕 (加速電圧 25 kV) で胞子を撮影・測定した。撮影時の倍率は 2 万倍以下とし、画像の立体感を得るため試料台の角度を 45° に傾斜させた。胞子径の測定に当っては、画面にはほぼ水平の位置にある胞子 20 個を選び、倍率 1 万倍で長さと最大幅を 1 mm 単位 (換算値 0.1 μ) で測った。

結果および考察

撮影した胞子の SEM 像は写真 1~5 に、胞子径の測定値は表 1 に、それぞれ示すとおりである。

1) *G. plecoglossi* TAKAHASHI et EGUSA の胞子
G. plecoglossi の胞子は、ホルマリリン固定胞子を用いた既報 (中島・江草, 1976) の結果と同様、表面が明らかに平滑であり構造物は全く認められなかった (写真 1, 2)。栗倉 (1974) は、倍率 6 万倍で胞子表面の細皺を観察しているので、本種も、1.5 万倍で撮影した写真 2 の胞子についてさらに 6 万倍まで拡大して観察し、これが平滑であることを確認した。SEM 像における胞子の形態は長洋梨形を基本とするが、卵形 ($3.9 \times 2.1 \mu$)・紡錘形・円筒形 ($5.1 \times 1.7 \mu$; 写真 2) のものも散見された。このような形態の変異は、試料作製過程の影響に由来するとは思われない。ただし、胞子径の縮小を免れることはできず、高橋・江草 (1977) が示した生活胞子 200 個の光顕測定値 (平均 $5.8 \times 2.1 \mu$) と比較して、SEM 像での測定値 (平均 $4.4 \times 2.0 \mu$) は、長さで約 25%、最大幅で約 5% ほど収縮した。しかし、高橋・江草 (1977) が、ブアン固定の組織切片から光顕で測定した胞子の大きさは平均 $4.0 \times 1.8 \mu$ ($n=50$) であるので、SEM 用試料作製過程での収縮度はブアン固定ほどではないといえる。

2) 岡山県内養殖アユの *Glugea* spp.

Glugea sp. AWAKURA, 1974 が発見された同一罹虫魚群のホルマリリン固定魚から得た胞子の SEM 像は、その形態が基本的に長洋梨形であり、*G. plecoglossi* との差違は全く認められなかった。また、胞子の大きさも平均 $4.1 \times 1.8 \mu$ であり、*G. plecoglossi* のブアン固定胞子の光顕測定値 (高橋・江草, 1977) に一致した。従って著者らの得たグルゲアは、紛れもなく *G. plecoglossi* とみて間違いのないと思われるのであるが、ただひとつ、胞子の表面に関する所見で留意しなければならない問題が生じた。すなわち、約 100 個の胞子を観察した結果、たまたま 1 例だけ細皺らしきものの認められる個体 (写真 3) に遭遇した。他はすべて平滑であるにもかかわらず、こ

Table 1. Surface pattern and size of spores of three Glugeans (Measurements in micron)

Species	<i>G. plecoglossi</i> TAKAHASHI et EGUSA, 1977		<i>G. anomala</i> (MONIEZ, 1887)	<i>G. hertwigi canadensis</i> FANTHAM et al., 1941
SEM observations	<i>Plecoglossus altivelis</i>		<i>Gasterosteus aculeatus</i>	<i>Osmerus mordax</i>
Host				
Locality	Biwa Lake in Shiga pref.	Farm in Okayama pref.	Czechoslovakia	Canada
Spore condition	Fresh	Preserved ¹	Fresh	Frozen
Surface	Smooth	Smooth ²	Rugose	Rugose
Length: $\bar{x}$ (range)	4.39 (3.9–5.1)	4.06 (3.3–4.6)	3.87 (3.4–4.8)	3.44 (3.1–3.8)
Breadth: $\bar{x}$ (range)	1.96 (1.7–2.1)	1.84 (1.6–2.1)	1.81 (1.5–2.0)	1.60 (1.5–1.8)
Optical microscopic measurements				
Length: $\bar{x}$ (range)	5.8 (5.1–6.2)	4.0 (3.8–4.8)	3.0–6.0	3.5–4.6
Breadth: $\bar{x}$ (range)	2.1 (2.0–2.5)	1.8 (1.5–2.0)	1.5–2.0	1.5–2.3
Spore condition	Fresh	In sections	—	Fresh
Source	TAKAHASHI and EGUSA (1977)		PUTZ et al. (1965)	FANTHAM et al. (1941)

¹ AWAKURA (1974) reported that spores of *Glugea* sp. which had been collected from the same population of *P. altivelis* and preserved in 10% formalin had the rugose surface and measured $5.9\text{--}6.9 \times 2.0\text{--}2.4$ microns in size with an optical microscope.

² There was an only exceptional spore with a fine wrinkle-like structure (Photo 3).

の1個だけが平滑とはいえない。もっとも、後述する *G. anomala* 孢子の明瞭な皺に比べれば、皺とは呼べないほど軽微なものであり、むしろ、環状紋と表現するのが妥当であるかもしれない。

3) *G. anomala* (MONIEZ) の孢子

G. anomala の孢子 (写真4) には、その表面に倍率14,700 倍でも明瞭に認められる顕著な皺があり、また、長軸にって蛇行する隆起帯がほぼ例外なく観察された。SEM 像での孢子径は平均 $3.9 \times 1.8\mu$ であり、PUTZ et al. (1965) のまとめた光顕測定値 ($3\sim 6 \times 1.5\sim 2\mu$) と一致した。

4) *G. hertwigi canadensis* FANTHAM et al. の孢子

当初、*G. hertwigi* WEISSENBERG, 1911 ではないかとして供試されたカナダ産 *Osmerus mordax* 寄生種は、SEM 像での孢子径が $3.1\sim 3.8\mu$ (平均 3.4μ) $\times 1.5\sim 1.8\mu$ (平均 1.6μ) であり、*G. hertwigi* var. *canadensis* FANTHAM et al., 1941 の生活孢子の大きさ ($3.5\sim 4.6 \times 1.5\sim 2.3\mu$) にはほぼ一致した。すなわち、前述した *G. plecoglossi* の場合の孢子収縮率 (長径 25%・短径 5%) を適用すれば、この光顕測定値は、SEM 像において $2.6\sim 3.5 \times 1.4\sim 2.2\mu$ となるからである。

この亜種の設定は、カナダの Edward 湖で採捕された淡水性 *O. mordax* 寄生のグルゲアが、ヨーロッパ産 *O. eperlanus* (海産) を宿主とする *G. hertwigi* (孢子径 $4.5\sim 5.4 \times 2.3\mu$: WEISSENBERG, 1911) やアメリカ産 *O. mordax* (淡・海産) に寄生する *G. hertwigi* (孢子径 $4\sim 4.5 \times 2\sim 2.3\mu$: SCHRADER, 1921) よりも孢子が小形であること、および孢子内の極糸の配置が前者と異なることを理由にしている。その後、この主張は顧みられることもなかったようであるが、例えば、HALEY (1954) の計測した北米東岸の海産・河川産 *O. mordax* 寄生 *G. hertwigi* の孢子径が $3.5\sim 4.8 \times 2.0\sim 2.6\mu$ であることからみても、このカナダ型亜種の孢子には、長径はともかくその短径において、*G. hertwigi* のそれよりも短かい個体の存在することは確かであると思われる。

いっぽう、著者らに供試された孢子の SEM 像をみると、表面に粗大な横皺が認められるほか、部分的に繊細な縦皺もあり、また不明瞭ながら隆起帯らしきものも観察された。(写真5) これに対し、LOM and WEISER (1972) が示したヨーロッパ産 *O. mordax* 寄生 *G. hertwigi* の孢子 SEM 像 (Pl. I, Fig. 1) では、撮影された孢子3個中2個の表面に波状の縦皺しかなく、他の1個は皺が網

状で落花生の殻に似ている。もしも、*G. hertwigi* が孢子表面の変化に富むことを種の特徴とせず、また著者らの得た凍結孢子 SEM 像が解凍その他の影響を受けていないとすれば、*G. hertwigi canadensis* は、亜種よりも独立種とするのが妥当ではないかと考えられる。種差の決定に走査型顕微鏡が偉力を発揮するところであろう。

Glugea sp. AWAKURA に関する論議

上記の結果 1~3) をもとに論議を進める。栗倉 (1974) が *G. anomala* ではないかとして報告した有皺型の孢子 *Glugea* sp. AWAKURA, 1974 は、前述の如く琵琶湖産稚アユを種苗として岡山県内で養殖されたアユから採取されたものである。しかるに、著者らがこれと同じ羅虫魚群から得たホルマリン固定孢子 SEM 像は、1 例を除きすべて表面が平滑であり、孢子の形態と大きさからみても、明らかに *G. plecoglossi* に同定し得るものであった。この例外個体における皺とも言えないほどの僅微な環状紋が、単なる人工形成物であるのか、奇形な異常にすぎないのか、低率ながらも稀に出現する種固有の性質であるのか、あるいは別種が混入している証拠なのか、議論の分かれるところであろう。しかし、いずれにせよ、この例外個体のみに着目して *G. plecoglossi* と *Glugea* sp. AWAKURA との共通性を論ずることはできない。何となれば、後者の孢子はホルマリン固定標本での光顕測定値が $5.9 \sim 6.9 \times 2.0 \sim 2.4 \mu$ であり、*G. plecoglossi* のそれよりもはるかに大きいからである。両者は別種とみるのが妥当であろう。

それでは、*Glugea* sp. AWAKURA が *G. anomala* であるかという点、これも明確に否定される。栗倉 (1974) の示した 2 万倍の SEM 像 (Pl. 10, Fig. 45) では、*G. anomala* のような明瞭な皺や隆起帯が認められないし、*G. anomala* 孢子は *G. plecoglossi* よりもさらに小形であるからである。*Glugea* sp. AWAKURA の孢子がその長径において該当しそうな既知種は、*G. intestinalis* CHEN, 1956 ($6.2 \times 3.6 \mu$) と *G. weissenbergi* SPRAGUE et VIERNICK, 1968 ($6 \sim 7 \times 2.5 \sim 3.6 \mu$) しかないが、これらとはいずれも短径が一致せず、*Glugea* sp. AWAKURA が新種である可能性もなしとはしない。従って、現状では、邦産アユに寄生するグルゲアをすべて *G. plecoglossi* と即断するのは危険である。学術報告の記載に際しては、必ず孢子径の測定を実施して確実を期すべきであろう。

要 約

1. *Glugea plecoglossi* の生活孢子 (琵琶湖産アユ) とホルマリン固定孢子 (岡山県養殖アユ), *G. anomala* の生活孢子 (チェコスロバキア産トゲウオ), および *G. hertwigi canadensis* の凍結孢子 (カナダ産キュウリウオ類) を用い、常法に従って走査型電子顕微鏡用試料を作製、各々の表面構造と大きさを観察・測定した。

2. *G. plecoglossi* の孢子は、ホルマリン固定の有無にかかわらず表面が平滑であった。ただし、ホルマリン固定孢子の中に 1 例だけ僅微な環状紋を有する個体が認められた。生活孢子を処理した SEM 像での孢子径は $4.39 (3.9 \sim 5.1) \times 1.96 (1.7 \sim 2.1) \mu$, ホルマリン固定孢子を処理した場合の大きさは $4.06 (3.3 \sim 4.6) \times 1.84 (1.6 \sim 2.1) \mu$ であった。

3. *G. anomala* の孢子表面には顕著な皺と隆起帯が存在し、SEM 像での孢子径は $3.87 (3.4 \sim 4.8) \times 1.81 (1.5 \sim 2.0) \mu$ であった。

4. *G. hertwigi canadensis* の孢子は、表面に粗大な横皺かもしくは繊細な縦皺と不明瞭な隆起帯があり、SEM 像での大きさは $3.44 (3.1 \sim 3.8) \times 1.60 (1.5 \sim 1.8) \mu$ であった。*G. hertwigi* よりも小形で孢子表面も若干異なることから、亜種とするよりも独立種とみるべきではないかと考えられた。

5. *Glugea* sp. AWAKURA の有皺型孢子と *G. plecoglossi* および *G. anomala* との異同を論じ、孢子径が既知種と一致しないことから、新種の可能性を指摘した。

謝 辞

材料を提供せられた滋賀県水産試験場技師高橋誓氏、岡山県水産試験場技師杉山英之氏、Czechoslovak Academy of Sciences の Dr. Jiri LOM, 東京大学農学部助手小川和夫氏、並びに SEM 用試料作製と器機の使用に便宜を計られた三共株式会社醸酵研究所榎田竜三氏、同社中央研究所電顕室福田邦昭氏に対し、深甚なる謝意を表するものである。

文 献

- 栗倉輝彦 (1974): サケ科魚類の微孢子虫病に関する研究。水産解化場研究報告, No. 29, 1-95.
FANTHAM, H. B., A. PORTER and L. R. RICHARDSON (1941): Some Microsporidia found in certain fishes and insects in eastern Canada. *Parasit.*, 33, 186-208.
HALEY, A. J. (1954): Microsporidian parasite,

Glugea hertwigi, in American smelt from the Great bay region, New Hampshire. *Trans. Am. Fish. Soc.*, 83, 84-90.

LOM, J. and J. WEISER (1972): Surface pattern of some microsporidian spores as seen in the scanning electron microscope. *Folia Parasitologica*, 19, 359-363.

中島健次・江草周三 (1976): 微孢子虫孢子の走査電顕像を種の同定に利用する試み. 魚病研究, 11 (3),

167-170.

PUTZ, R. E., G. L. HOFFMAN and C. E. DUMBER (1965): Two new species of *Plistophora* (Microsporidea) from north American fish with a synopsis of Microsporidea of fresh water and euryhaline fishes. *J. Protozool.*, 12 (2), 2-10.

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

Explanation of Photographs (SEM)

- Photo. 1.** *Glugea plecoglossi*. $\times 8,000$. Most spores show an elongated pyriform.
- Photo. 2.** *G. plecoglossi*. $\times 11,800$. The longest spore observed.
- Photo. 3.** *G. plecoglossi*. $\times 14,200$. An exceptional spore with a fine wrinkle-like structure on the surface found in formalin-preserved spores.
- Photo. 4.** *G. anomala*. $\times 14,700$.
- Photo. 5.** *G. hertwigi canadensis*. $\times 15,500$.

写真の説明

- 生活孢子を用いて SEM 用試料を作製した場合の *G. plecoglossi*. 大半の孢子は長洋梨形を呈し、表面はすべて平滑である。 $\times 8000$ 。
- 同上試料中、長径が最大の *G. plecoglossi* 孢子。 $\times 11,800$ 。
- ホルマリン固定魚から採取した *G. plecoglossi* の孢子も表面が平滑であるが、この1個体にのみ環状の縞模様が認められた。 $\times 14,200$ 。
- G. anomala* の孢子。表面の皺と隆起帯が顕著である。 $\times 14,700$ 。
- G. hertwigi canadensis* の孢子。粗大な横皺が全面に繊細な縦皺が部分的に認められ、不明瞭ながら隆起帯らしきものもある。 $\times 15,500$ 。