ブリ幼魚のベコ病の病原微胞子虫について

江 草 周 三

(昭和 57 年 1 月 18 日受理)

A Microsporidian Species from Yellowtail Juveniles, *Seriola quinqueradiata*, with "Beko" Disease

Syuzo EGUSA

Fish Disease Laboratory, Nippon Veterinary and
Zootechnical College, Kyonan-cho, Musashino City, 180 Japan

(Received January 18, 1982)

A microsporidian species which invades the trunk muscle of yellowtail juveniles (*Seriola quinqueradiata*) and causes "Beko" disease was studied. The parasites appeared as multiform masses in cross sections of the muscle and usually elongated masses in longitudinal sections. The masses were bounded externally by a host-produced fibrous membrane. Almost all the parasites clearly represented stages in the sporulation sequence. Sporogony was believed to occur by multiple fission of sporogonial plasmodia. Sporocyst, sporogony vacuole and pansporoblast membrane were absent. The diplocaryon was not confirmed in any sporulation stage. Fresh spores were ovoid and measured $2.9-3.7 \times 1.9-2.4 \mu\text{m}$ and had a coiled polar tube within the spore membrane. Extruded polar tubes were $44-52 \mu\text{m}$ in length. This species could not be classified in any established genus and therefore it seemed appropriate to place it provisionally in the collecting group *Microsporidium*. The name *M. seriolae* was proposed. The specific name refers to the genus name of the host.

ブリ幼稚魚のいわゆるベコ病はモジャコを生簀で飼育し始めて間もない5月下旬頃から7月頃にかけて発生する疾病で、進んだ症状がみられるのは体長 5~15 cm くらいのものが主である。罹病魚は体表のところどころに目立った陥没が生じることを特徴とし、剖検すると陥没部下の筋肉内に白色の凝固した牛乳粒様のものが密な集塊をなして存在し、その周辺の筋肉組織は融解しているのが観察される。このような患部が多数形成された個体は痩せて活力を失い、斃死することが多いが、患部数の少ない個体は生長に伴って自然治癒するといわれている。

本病はブリの小割養殖が15~6年前に始まって間もない頃から知られているものであるが、それに関する研究報告は皆無であり、その原因は微胞子虫の筋肉寄生であると古くからいわれながらも確認されてはいない。筆者は今回本病を観察する機会を得て、その病患部にみられる寄生体は微胞子虫であることを確認するとともに、その分類学上の位置の検討を試みた。以下にその要点を報告する。

材料と方法

供試魚は 1981 年 7 月宮崎、鹿児島両県下の養殖生簀から採集された体長 6~8 cm のブリ稚魚で、供試までに数時間氷蔵された。体表が陥没している軀幹部を切開し、筋肉内の凝固した牛乳粒様物（後述するようにこれは宿主由来の結合織性の薄膜で囲まれた種々の発育段階の微胞子虫の集合であり、以下便宜上シストと呼ぶ）を取り出し、生理食塩水中で潰してスライドガラス上に拡げ、生鮮胞子の形態、大きさを光学顕微鏡下で観察、計測した。また、シスト内容物の塗抹標本を 10% ホルマリン水またはメタノールで固定し、HE 染色、ギムザ染色および PAS 反応を行った胞子、さらに胞子の核数を観察する目的で VÁVRA and MADDOX (1976) の推す PIEKARSKI の変法に従い、酸処理後ギムザ染色を施した胞子の光顕観察を行った。

胞子の極管 (polar tube) の突出は一般に行われる KOH や NaOH 処理、また過酸化水素処理ではみられず、蒸留水浸漬、乾燥、機械的圧迫などでも起こらなかったが、以下の方法で認められた。即ち、スライドグラ

* 日本獣医畜産大学魚病学教室

ス上に蒸留水を1滴落とし、その中でシスト小片を潰して払い、直ちに火焰上で蒸発・乾固させる方法である。しかし、この方法によっても極管突出は1%にも満たない胞子に認められたに過ぎなかった。突出した極管の長さを光顕下で測定した。

微孢子虫類の分類上必要な胞子形成過程を知るために、10%ホルマリン水で固定した魚体からシストを含む病患部のパラフィン切片を常法によって作製し、HE染色、ギムザ染色およびPAS反応を施し観察した。一方、氷藏魚からシスト内容物の塗抹標本を作り、メタノール固定、ギムザ染色を施し観察した。また、10%ホルマリン水固定魚体のシスト集塊の辺縁部から1mm角程度の小片を切り出し、洗滌後2.5%グルタルアルデヒドによる再固定、1%四酸化オスミウムによる後固定を行い、エポン包埋して超薄切片を作製し電顕観察を行った。しかし、数ヶ月以上ホルマリン水中で保存された魚体から作製したため満足すべき標本は得られず、ここではその観察は参考の範囲に止めることとした。

結 果

シスト内にみられた寄生体：シストは通常軀幹筋肉線維内に存在し、多くは短かい、あるいは長い紡錘形で、その断面は円形、随円形、三角形、不規則な叢出形状など多様であり (Fig. 1)、外観的には純白色を呈する。通常多数のシストが隣接する筋線維内に形成され、肉眼的には長さ1cm、径数mm前後のシスト集塊として存在することが多かった。各シストは宿主の核とミトコンドリアとみられる顆粒を含むことから宿主に由来すると

Fig. 1. Microsporidian cysts in a cross section of the trunk muscle. The cysts contain sporogonial plasmodia (SP), uninucleate stages (US), sporoblasts (SB), and spores (S). (Giemsa. $\times 80$)

Fig. 2. Cross section of cysts with sporogonial plasmodia, showing cyst-bounded membranes with host nuclei (arrows). (PAS. $\times 330$)

Fig. 3. Electron micrograph of a portion of the wall (CW) of a cyst. The wall is fibrous and has host nuclei (N) and mitochondria-like bodies (MC). SP, sporogonial plasmodia; S, spores; M, matrix. ($\times 3,300$)

考えられる結合織性の薄膜で囲まれている (Figs. 2, 3)。

今回観察した組織切片にみられたシスト内の寄生体は胞子形成過程の多核体、その分裂によって生じたと考えられる1核体、スポロプラストおよび胞子であり、栄養期 (vegetative phase; schizogony) のものはみられなかった。これらの組成はシストによって、また一つのシストでも場所によって異なり、多核体のみであったり (Fig. 2)、胞子のみであったり、あるいは上記4者が共存していた (Fig. 1)。

組織切片にみられた大型の多核体は大きさ6~8 μm 程度の卵形や茄子形のものも多く、また分裂過程にあることを思わせるくびれをもつものもあった (Fig. 4A, B)。塗抹標本ではリボン状の多核体もみられ、また、多

Fig. 4. Sporogonial plasmodia. (A) Portion of a section of a cyst, stained with the PAS treatment. (B) Portion of a thin section of a cyst, stained with Hematoxillin and Eosin. (C) Smear of sporogonial plasmodia, stained with Giemsa. ($\times 930$)

Fig. 5. Portion of a thin section of a cyst, showing stages in the sporulation sequence. SP, sporogonial plasmodia; US, uninucleate stages; SB, sporoblasts; S, spores. (Hematoxillin and Eosin. $\times 870$)

Fig. 6. Electron micrograph of sporogonial plasmodia and spores. Coiled polar tubes are barely perceptible in some spores and transforming sporoblasts (TS) in (A). (A $\times 4,800$; B, $\times 3,900$).

分裂像もみられた (Fig. 4C)。核数は多いもので8個を計えたが、最多核数は定かではない。細胞質は HE 染色および PAS 反応で淡赤紫色に、ギムザ染色で青色に染る。核数が少なく、大きさは小さいが形状は同様の細胞があったが、これは大形の多核体の分裂によって生じたものと考えられた。分裂の最終産物とみられる1核体は大きさ3~4 μm で、多くは球形あるいは卵形を呈し、染色性を示す細胞質が殆どみられず、外膜と濃染する核のみが観察された (Fig. 5)。これがスポロブラスト前期と考えられた。スポロブラストがスポロントの分裂によって形成される2胞子母細胞性 (disporoblastic) の種類ならばほぼ一定した形のスポロントの二分分裂像が観察される筈であるが、本種ではそのような像は確認されなかった。したがって本種は2胞子母細胞性ではないと判

断され、1核体は多核体の多分裂によって生じたものと考えられた。なおそのさいロゼット形成 (rosette formation) はみられなかった。

2個以上の核をもつ細胞の中に2個の核が対をなすよ

うに位置する像がときにみられたが、それらがごく近接し、さらには接着した状態の diplocayon (重複核) の存在は光顕的にも電顕的にも見出されなかった。(Figs. 3, 6)。即ち本種は dipolcayon をもたないと判断された。

1 核体の中に大きさが孢子とほぼ同大で、細胞質が HE 染色、PAS 反応で淡赤染し、HE 染色では表面がやや輝赤色を呈するものがあったが (Fig. 5) これがスポロプラストと考えられた。孢子は光顕像では表面は HE 染色で輝赤色を呈し、いずれの染色でも核は青ないし青紫色に染まり、その周囲に弧状に赤紫色に染る部分がみられた (Fig. 5)。以上の孢子形成過程でスポロシスト (sporocyst)、スポロゴニー胞 (sporogony vacuole) およびパンスポロプラスト膜 (pansporoblast membrane) の形成は全く認められなかった。

以上の4種類の発育段階の異なる寄生体が共存するシスト内におけるそれらの分布状態はほぼ定まっていた。即ち、シストの断面でみると大形の多核体の群は通常最外部か一侧に位置し、その内側に核数の少ない細胞群、ついで1核体群、そして孢子群がある (Fig. 1)。この事実は多核体の分裂によって1核体、そしてそれから孢子が形成されるとする前記の孢子形成過程の推定を裏付けるものであろう。

孢子: 生鮮孢子の形態、大きさは比較的斉で、形態は典型的なものでは一端がやや脹らんだ卵形、大きさは $2.9 \sim 3.7 \times 1.9 \sim 2.4 \mu\text{m}$ 、平均 $3.3 \times 2.2 \mu\text{m}$ で、光顕的には後部に1個の大きな明域 posterial vacuole が、そして稀に前部にも空胞がみられるほかには何らの構造もみられなかった (Fig. 7)。塗抹標本のギムザ染色、HE 染色、PAS 反応ではいずれも外壁の淡染する薄層の内側に染色性を殆ど示さない厚い層があり、内部に核および原形質が弧状に濃染してみられるほかには構造の識別

Fig. 7. Fresh spores. Scale indicates $10 \mu\text{m}$.

Fig. 8. Electron micrograph of a spore, showing sections (arrows) of a coiled polar tube within the spore membrane. ($\times 24,000$)

はできなかった。核数を知るための酸処理・ギムザ染色では、濃青色に染る2個の粒状体をもつ孢子が多く、2個の核の存在を疑わせたが、3個あるいは4個の粒状体をもつ孢子もあり、それらの粒状体が核であるか否かは確認できなかった。孢子の電顕像からは1個の核をもつ可能性が大きいに思われたが、この点は改めて電顕観察によって確認する予定である。

電顕像で孢子内の螺旋状に巻いた極管の存在が認められた (Fig. 8)。突出した極管の長さはほぼ斉で $44 \sim 52 \mu\text{m}$ (平均 $49 \mu\text{m}$, $n=30$) であった。なお、SPRAGUE (1966) は孢子の PAS 反応により極冒 (polar cap) と極管が染色され、その存在が確認されると報告しているが、本種では孢子の大きさが小さいためかその確認はできなかった。

考 察

本微孢子虫の分類を SPRAGUE (1976a) によって考察した。本種は螺旋状に巻いた1本の長さ $50 \mu\text{m}$ 程度の極管をもつ単細胞性の孢子を形成するが、スポロシストを形成しないことから微孢子虫門、微孢子虫綱、微孢子虫目 (Microsporidia) に分類される。さらに孢子形成過程でパンスポロプラスト膜の形成がないことからアパンスポロプラスト亜目 (Apansporoblastina) に分類される。

この亜目の第1科 Glugeidae は膜に囲まれたスポロゴニー胞内で孢子形成が起こること、2孢子母細胞性であることを特徴とするが、本種はこれらの性質をもたないことから本科に分類しえない。第2科の Unikaryonidae の科の特徴の記載は簡単であり、そのみに着目すると本種をこの科に分類することもできる。しかしこの科に属する3属の中の *Nosemoides* 属は孢子形成にさいし sporogony plasmodium がロゼット形成をする

点で本種と異なり、*Unikaryon* 属と *Perezia* 属は前者が吸虫類、後者が簇虫類のともに超寄生体である点で本種とは異なる。第3科の *Cougourdellidae* は胞子の形態が首をもつ壺状である点と2胞子母細胞性である点で本種とは異なる。第4科 *Caudosporidae* はロゼット状に *diplocaryon* をもったスポロプラストが形成される点で本種と異なる。

第5科の *Nosematidae* はスポロプラストが *diplocaryon* をもつ点で異なる。本種が *diplocaryon* をもたないと確定的にいけないところもあるが、本科の第1属 *Nosema* は2胞子母細胞性である点で本種と異なり、第2属の *Ameson* は海産十脚類寄生性である点で異なる。また第3属の *Ichthyosporidium* は魚類寄生種2種を含むが、両種とも寄生部位、シストの形態、胞子形成過程、胞子の大きさなどの点で本種とは異なる。最後の第6科 *Mrazekidae* は2胞子母細胞性であり、*diplocaryon* をもち、キセノマ (xenoma) を形成することで異なる。

以上のように本種は現在の分類体系によるとそのいずれの属・科にも分類し難いように思われる。*SPRAGUE* (1976a) はこのような種類においては便宜上 *collecting group* としての属名 *Microsporidium* *BALBANI*, 1884 を用いることが許されるとしている。したがって本種を当面の研究の便宜を考慮し、本属に分類しておくのが適当と考える。*SPRAGUE* (1976b) は本属の魚類寄生種として6種について記述しているが、それらは宿主、寄生部位はもとより、シストの形状、胞子形成過程、胞子の大きさなどのすべて、あるいは大部で本種とは異なる。そのうちの *NARASIMHAMURTI* and *KALAVATI* (1972) が報告した *M. sauridae* はベンガル湾の海産魚の “Visceral mucle” 寄生種で、胞子の大きさは $2.3 \sim 3.8 \times 1.8 \sim 10 \mu\text{m}$ で本種と殆ど差はないが極管長は $150 \sim 180 \mu\text{m}$ と長い。その他シストの構造や胞子形成過程も明らかに本種とは異なる。なお、彼等はその種類を *Nosema sauridae* として報告したのであるが、*SPRAGUE* (1976b) が *Microsporidium* に改めたものである。

以上から本種を *Microsporidium* の新種とし、宿主の属名をとって *M. seriolae* と名付けることを提案したい。

魚類の筋肉寄生種として *SPRAGUE* (1976b) は上記 *Microsporidium* 1種のほかに *Pleistophora* 属15種、*Glugea* 属1種について記述しているが、そのいずれの種の記載も本種と一致あるいはごく近似するものではない。*SPRAGUE* は記述していないが、それらの他に我が

国で栗倉 (1974) によって報告されたサケ科魚類の筋肉寄生種 *Glugea takedai* がある。三木・栗倉 (1977) は後に本種は *Nosema* 属に分類されるべきであるとしたが、*SPRAGUE* (1976b) の分類に従うとスポロプラストが *diplocaryon* をもたないとみられることから *Nosema* 属はもとより *Nosematidae* 科にも分類しえないと思われる。なお *VÁVRA* and *SPRAGUE* (1976) はスポロントとはその分裂によってスポロプラストが形成される母細胞をいうとして、1個のスポロントが1個のスポロプラストを生ずるという概念を否定している。それは兎に角として *G. takedai* においてリボン形の8核体が分裂して8個の1つの核をもつ8細胞が生じ、その各1核体がスポロプラストとなる点は本種と共通するものである。また、胞子の形態、大きさ、極管長も本種とそれほど違わない。シスト様体 (栗倉 (1974) のいうコロニー) の周囲に膜が形成されないことその他の相違点はあるものの *G. takedai* と本種は近い分類学上の位置にあるように思われる。

最後に本研究の材料の採集に協力いただいた宮崎県水産試験場岩田一男技師および鹿児島県水産試験場塩満捷夫技師、さらに組織切片等の作製を担当いただいた日本獣医畜産大学魚病学教室藤巻由紀夫助手に感謝の意を表する。

文 献

- 栗倉輝彦 (1974): サケ科魚類の微胞子虫病に関する研究。北海道立水産孵化場研究報告, 第29号, 1-96.
- 三木伸一・栗倉輝彦 (1977): 微胞子虫 *Glugea takedai* の微細構造。北海道立水産孵化場研究報告, 第32号, 1-19.
- NARASIMHAMURTI*, C. C. and C. *KALAVATI* (1972): Two new species of microsporidian parasites from a marine fish *Saurida tumbil*. *Proc. Indian Acad. Sci., Sect. B*, 76, 165-170.
- SPRAGUE*, V. (1966): *Ichthyosporidium* sp. *SCHWARTZ*, 1963, parasite of the fish *Leisotomus xanthurus*, is a microsporidian. *Jour. Protozool.*, 13, 356-358.
- SPRAGUE*, V. (1976a): Classification and phylogeny of the Microsporidia. p. 1-30 in *BULLA, Jr. L. A. and T. C. CHENG* (ed.) *Comparative Pathobiology. Vol. 2, Systematics of the Microsporidia*.
- SPRAGUE*, V. (1976b): Annotated list of species of Microsporidia. p. 31-334 in *BULLA, Jr. L. A. and T. C. CHENG* (ed.) *Comparative Patho-*

- biology. Vol. 2, Systematics of the Microsporidia.
- VÁVRA, J. and J. V. MADDOX (1976): Methods in microsporidiology. p. 281-319 in BULLA, Jr. L. A. and T. C. CHENG (ed.) Comparative Pathobiology. Vol. 1, Biology of the Microsporidia.
- VÁVRA, J. and V. SPRAGUE (1976): Glossary for the Microsporidia. p. 341-363 in BULLA, Jr. L. A. and T. C. CHENG (ed.) Comparative Pathobiology. Vol. 1, Biology of the Microsporidia.