

## 海産底棲魚類に寄生する線虫に関する研究—II.

仔虫の發育経過および第1中間宿主への人工感染

阪口清次・福原修

### Studies on a Nematode, *Philometra*, in the Marine Benthic Fishes-II.

#### Morphology of the Larvae and Experimental Infection to the Intermediate Host.

Seiji SAKAGUCHI and Osamu FUKUHARA

#### Summary

Some observations of embryonic development in the uterus of female worm and experimental infection with the larvae to the first intermediate host were carried out on the Nematode, *Philometra mariae*, parasitic to the marine benthic fishes, *Rhinogobius flauvi* and *Chaeturicys scitius*. The results are summarized as follows:

1. The embryos developed in the uterus of female and grew completely to the active first-stage larvae in the uterus of female from August to September. The larvae escape into the seawater after rupture of the body of the gravid worm which is living in the capsule being formed in the subcutaneous tissue of the host fish. Each gravid worm of 8-20 mm in length contains 20,000-100,000 larvae in the uterus.
2. Some copepod presumed as first intermediate host were experimentally exposed to the first-stage which were kept in a small vessel. The larvae were successfully obtained from the hemocoel of the infected copepods of several species. The larvae ingested by the copepod, penetrate into the hemocoel through the gut wall and then they develop to the third-stage larva after two times molt in the place.
3. The free living larvae kept in the seawater at 20°C of water temperature showed high survival rates for 4 days, but thereafter the mortality is increased *pari passu* with days. They possessed the ability to penetrate into the host for 3 days.
4. Larval development of the *Philometra* in the uterus of gravid worm and in the hemocoel of copepod are following:
  - 1) The first-stage larvae just escaped from the gravid worm are unsheathed and 360-460  $\mu$  in the length and 14-15  $\mu$  in width. The larvae are characterized by long filiform tail, tapering to a sharp point. Three lips are visible on the top of anterior extremity of the body. The esophagus appears narrow muscular, homogeneous tube and protrudes into the lumen of the intestine which is not yet joined to the proctodeum in the stage. The anus is situated at the ventral surface a distance of 85-95  $\mu$  from the posterior end. The intestine of the first-stage larva, is joined with the rectum after developed for 2 days in the hemocoel of the copepod. They move actively in the hemocoel of the copepod.
  - 2) The second-stage larvae were found in the copepods after 5 days. These larvae have

a loose sheath. They did not move actively in the hemocoel of the copepod. The tail of the second-stage larva is shorter and rapidly tapers to a sharp point. The esophagus is divided into a relatively narrow muscular part and thicker glandular portion.

- 3) The third-stage larvae were found in the copepods maintained in the seawater of 20°C, during 25 days. The third-stage larva differs from the second-stage in the following points:

The muscular bulbous part comes to be discernible at the anterior part of muscular esophagus. The glandular portion of esophagus is wider and the structure of the esophagointestinal valve is protruded into the lumen of intestine.

前報では、広島湾北西域の海産底棲魚類に寄生する線虫について、宿主における寄生生態および成虫の形態などを検討して、本種を *Philometra mariae* と同定した<sup>1)</sup>。

魚類から得られた本属線虫については多くの記載があるが<sup>2)3)</sup>、生態についての報告は少なく、とくに生活史に関して、感染実験が試みられているのはいずれも淡水産種のみである<sup>4)5)6)</sup>。

著者らはこの海産線虫の生態を明らかにするために、スジハゼに寄生する線虫を材料として研究を進めた。すなわち、宿主の表皮下に寄生している雌虫の子宮内仔虫の発育経過とその形態を観察し、あわせて、発育した第1期幼生を第1中間宿主と想定される小型甲殻類へ人工感染させた。この結果、2、3の橈脚類で感染に成功し、2回の脱皮を経て感染仔虫として発育させることができたので、その経過および寄生生態などについて報告する。

稿を草するにあたり、指導と校閲を賜った保科利一博士ならびに淡水区水産研究所水質病理部長藤谷超博士に深謝する。また、実験材料の採取については南西水研・山口義昭、後藤幹夫技官に一方ならない御協力をいただいた。心から感謝の意を表す。

## I. 母虫の子宮内における仔虫の発育および産仔現象

### 材料および方法

供試材料は1972年9月～10月および1973年7月～10月までに、広島湾北西海域の山口県岩国市から広島県大竹市に至る沿岸域で手繰第2種漁業のエビ漕網で採集したスジハゼのうちで、表皮下に包囊の形成している罹病魚から得られた雌虫である。実験に当っては、罹病魚を生かしたまま運搬し、屋内のガラス水槽に飼育しておき、適宜とりだし母虫の子宮内仔虫の発育状態を観察した。

虫体の観察は主として生標本について行なったが、必要に応じて10%ホルマリン液で固定したものをラクトフェノールで透化させ検鏡した。虫体の諸器官の大きさは生きた標本の両端に厚さ0.2mmのカバーガラスの細片をおき、その上に静かにカバーガラスをのせマッチの焰で軽くスライドガラスの下から温め、仔虫の運動を弱めて計測した。

### 結 果

#### 1 子宮内仔虫の発育とその形態

宿主の表皮下に包囊を形成する以前の6～7月ごろの雌虫は、鰓表ならびに胸膈屈筋などにしばしみられるが、これらの母虫の子宮内には球形を呈する卵が充満している。母虫が宿主の表皮下に出現して包囊を形成する8月ごろになると、子宮内には各発育段階の胚がみられるようになり、8月から9月ごろになると活発に運動する仔虫によって子宮内は充たされる。初期の受精卵は直径約20μの球形であるが、定則どおり、卵割が進み、桑実期、胞胚期および囊胚期を経て胚子を形成する。胚子は伸長するにつれて、その皮下に液胞を生じ、ついでこれが崩壊することによって卵膜がゆるみ、ゆるやかに螺旋運動をするようになる。胚子は卵膜中でコイル状を呈して次第に成長し、体長270～300μになると孵化し、活発に運動する仔虫となる (Fig. 1)。発育した第1期仔虫は全体としては糸状を呈するがその他鎌状あるいは環状に巻曲してみられ

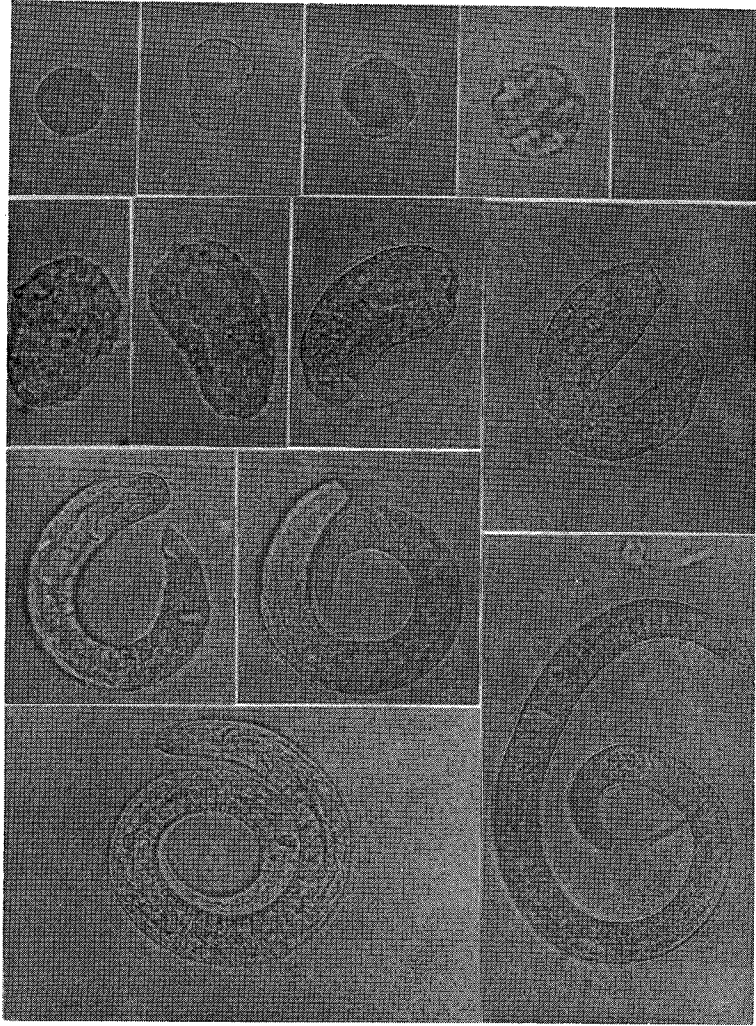


Fig. 1. Development of *Philametra mariae* in the uterus of female.

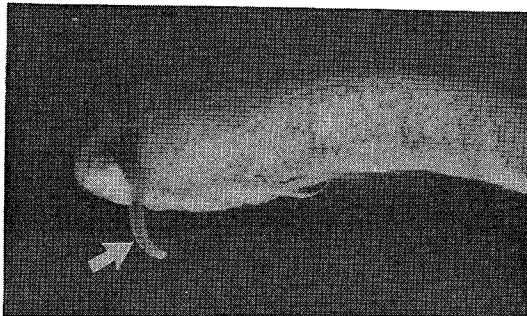


Fig. 2. A gravid worm emerged from the capsule in supcutaneous tissue of the operculum of the host fish.

る。大きさは体長360~440 $\mu$ ，体幅14~15 $\mu$ である。尾部は細長く，かつ尖っている。頭端には未発達の三叉した口唇がみられる。食道は細長く110~160 $\mu$ を算し，未発達の同質同型の筋肉性の管状を呈し，その末端は腸内に連結している。腸の長さは120~160 $\mu$ で体腔内を後方に向かって直走するが，後腸とは結合していない。後腸は盲管をもたない単純な管状で，体の後方から85~95 $\mu$ に位置する肛門に開く。

## 2 母虫の脱出現象ならびに産仔数

宿主の体表から産仔中の母虫は，体の前端部を皮下組織中に留め，円筒状の体部を海中に露出させて宿主の游泳にともなって軟泥状の仔虫塊を盛んに放出する。宿主を麻酔させ計測したところ，虫体の露出部の長さは12mm，皮下組織内には0.4mmの頭部を残存させていた。露出部の検鏡観察では母虫の体壁は裂開して腸管と子宮を体外に脱出させ，その先端は擦り切れ，断端が開いているため子宮内の仔虫はほとんど完全に流出していた (Fig. 2)。子宮内仔虫の概数を把握するため，10月採集の罹病魚から体長の異なる母虫6個体を選び，子宮内の仔虫数を稀釈法により計数盤を使用して顕微鏡下で数えた。反復5回の資料から母虫1体の産仔数を推定した結果は Table 1. のとおりであり，母虫の体長に対応して2万~10万程度の仔虫を抱含していた。

Table 1. Numbers of larvae by size observed in the uterus of gravid worm

Numbers of larva ( $\times 10^3$ )	Total length of worm (mm)
20.9 $\pm$ 1.9	8.0
32.0 $\pm$ 1.6	11.5
35.1 $\pm$ 1.4	13.0
63.2 $\pm$ 4.0	14.0
71.5 $\pm$ 2.5	16.5
109.3 $\pm$ 6.8	20.0

## II. 仔虫の第1中間宿主への人工感染

### 材料および方法

人工感染実験は仔虫が充分発育していることを確かめたるうえで実施した。第1中間宿主の探索のために供試した小型甲殻類は南西水研地先の海域でネット採集した。さらに屋外のコンクリート水槽の壁面に付着していた小型甲殻類も採集して実験に供した。これらは天然に由来する線虫の感染のないことを確認した。1972年の実験によって第1中間宿主が，2，3の橈脚類であることが明らかになってからは，寄生生態を主体として研究するために，宿主としては人工培養したチグリオパス *Tigriopus japonicus* をもっぱら利用した。

虫体の観察および諸器官の大きさの測定は前項と同様な方法によった。

### 結 果

#### 1 第1中間宿主の探索

1972年10月13日に採集した罹病魚から得た母虫5尾の子宮内から仔虫15~20万體を取り出し，水温25°Cのシャーレの中で小型甲殻類と接触させた。

仔虫は接触10分後にはチグリオパスの胃の中に，30分後には多くの供試生物の胃，腸内に摂取されたが，一方では生きのまま腸内の粘液物に包まれた状態で排泄されるのが観察された。1時間後の検鏡で，10尾のチグリオパスのうち2尾に仔虫が血体腔に移行したものがみられた。

供試した小型甲殻類について接触1時間後における消化管内への仔虫の摂取状況および24時間後における血体腔への仔虫の移行の有無を観察したのが Table 2. である。しかし，これらの宿主は2日目にはすべて

斃死したので、その後の観察はできなかつた。しかし、この実験結果から、チグリオパスをはじめ2、3の橈脚類が本種の間宿主となり得ることが明らかになった。

Table 2. Infestation of the larvae into the internal organs of copepods after the experimental exposure.

Species	1 hr. after infection		24 hr. after infection	
	Number of copepods examined	Number of the copepods whose digestive organs infected with the larvae	Number of copepods examined	Number of the copepods whose hemocoel infected with the larvae
<i>Tigriopus japonicus</i>	15	15	10	10
<i>Microsetella</i> sp.	5	1	3	1
<i>Macrosetella</i> sp.	4	1	3	1
<i>Calanus helgolandicus</i>	8	1	2	0
<i>Paracalanus farvas</i>	5	1	3	0
<i>Acartia clausi</i>	3	1	2	0
<i>Oithona nana</i>	4	0	5	0
<i>Paranthura japonica</i>	10	2	5	0
<i>Erichthonicus tugmex</i>	8	1	4	0
<i>Protella gracilis</i>	7	0	3	0
Nauplius of <i>Cirripedia</i>	3	0	5	0
Juvenile of <i>Peraeus japonicus</i>	5	1	5	0

## 2 仔虫の間宿主への侵入生態

実験は1973年9月19日に採集したスジハゼから母虫5尾を得て、それから得られた仔虫を供試した。

母虫から取り出した仔虫はシャーレの海水中で1時間後でも浮遊しているものがみられるが、多くは器底に沈降し、感染実験で宿主の餌料として投与したクロレラ *Chlorella* sp. など他物を介して飼集し、器底から立ち揺れ動くような状態で活発に運動していた (Fig. 3)。



Fig. 3. The active first-stage larvae libarated to the sea water from the uterus of gravid female.

仔虫の水温に対する抵抗性とそれに対応する感染力を調べるため、シャーレに海水300ccを入れ、25°C、21°C、18°C、10°Cの4段階に設定した水温条件下で、 $39,600 \pm 3,200$ 体 ( $n = 5$ )の仔虫に対してチグリオパス $206 \pm 25$ 尾 ( $n = 5$ )を接触させた。結果は Table 3. のとおりである。すなわち、18°C以上では1日後の観察ではほぼ全数のチグリオパスの血体腔に平均2.4~3.3体の仔虫の侵入が認められたが、10°Cでは全くみられなかった。このばあい、18°C以上の水温では仔虫および宿主の運動が活発であったが、10°Cの水温下では仔虫の運動力がきわめて弱々しく、また、宿主も不活発であったことが、侵入の制限要因となつたと考えられた。

Table 3. Infective rate and number of larvae found in the hemocoel of copepod at different temperature.

Days of after exposure	Items	Temperature (°C)			
		25	21	18	10
1	Infective rate (%)	80	90	80	0
	Number of larvae invaded	2.4±2.7	3.3±1.7	3.1±2.1	0
2	Infective rate (%)	100	100	100	0
	Number of larvae invaded	3.4±2.2	4.2±1.7	3.7±1.9	0
4	Infective rate (%)	100	100	100	0
	Number of larvae invaded	5.2±2.9	5.5±1.8	5.4±4.1	0

母虫からの脱出後の経過日数による仔虫の感染力を調べるため、仔虫を20°Cの恒温水槽中に収容しておき、経過日数ごとに仔虫約4,000体に対してチグリオパス20尾を接触させて仔虫の感染率を観察した結果がTable 4.である。母虫から脱出した仔虫は3日目までは活発な運動力を有しているが4日後には次第に弱まり、5日目以降は斃死しはじめる。脱出後の経過日数ごとの感染率と仔虫の侵入尾数をみると、上記の仔虫の活力と関連が認められ、3日目まではほとんどの宿主の血体腔への感染がみられるが、4日～6日目のものでは次第に低下し、7日後では全くみられなくなる。侵入尾数についても同様な傾向がみられた。すなわち、母虫から泳出した出た仔虫は、脱出後3日間はほとんど変わらない感染力を有するが、やがて低下し、5～6日目以降では感染が起きなかった。

Table 4. Survival and percent infection of larvae after emergence into the seawater from gravid worm.

Days after emergence from worm	1	2	3	4	5	6	7
Survival rate (%)	100 (n=10)*	100 (n=10)	100 (n=10)	100 (n=10)	62.0 (n=50)	55.6 (n=36)	41.6 (n=48)
Infective rate (%)	100 (n=10)**	100 (n=10)	90 (n=10)	40 (n=10)	30 (n=10)	3.3 (n=59)	0 (n=20)
Number of larvae found in the hemocoel of copepod at 24 hrs. after exposure	2.8±1.7	3.4±2.0	2.8±2.3	1.2±1.7	1.0±0	1.0±0	0

\*n Numbr of larvae examined

\*\*n Number of copepods examined

### 3 仔虫の発育と形態変化

実験は1973年10月18日に採集したスジハゼから母虫3尾を得て、それから人為的に脱出させた仔虫を供試した。

シャーレに海水400ccを入れ、20°C恒温の条件下で約10万体の仔虫に対してチグリオパス約500尾を17時間接触させた結果、血体腔への侵入尾数の平均は2.5±1.2尾 (n=20)であった。このチグリオパスをクロレ



Fig. 4. A copepod, *Tigriopus japonicus*, in which the hemocoel infested with several larvae of *Philometra mariae*

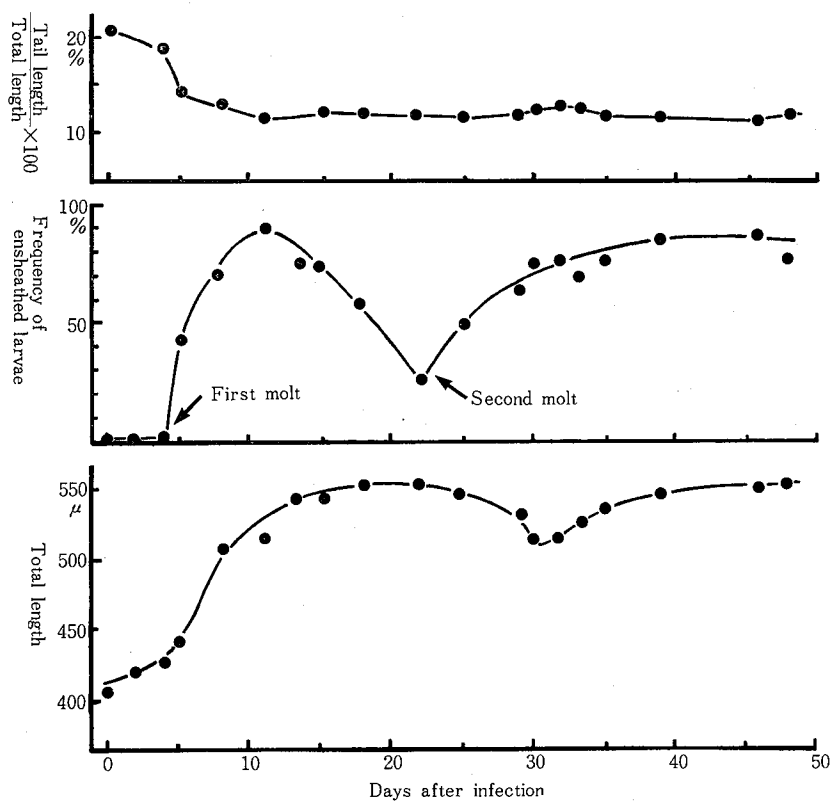


Fig. 5. Morphological changes of larval stages of *Philometra mariae* developing in the hemocoel of *Tigriopus japonicus*, reared in seawater at 20 °C.

ヲを餌料として20°Cの条件下で48日間飼育した。

観察は適当間隔の日数で、5～10尾のチグリオパスを取りあげ、宿主の血体腔内に侵入していた仔虫を体外へ取り出し検鏡した (Fig. 4) 経過日数にともなう仔虫の外部形態の変化は Fig. 5 に、内部諸器官の発達 は Fig. 6 に示した。

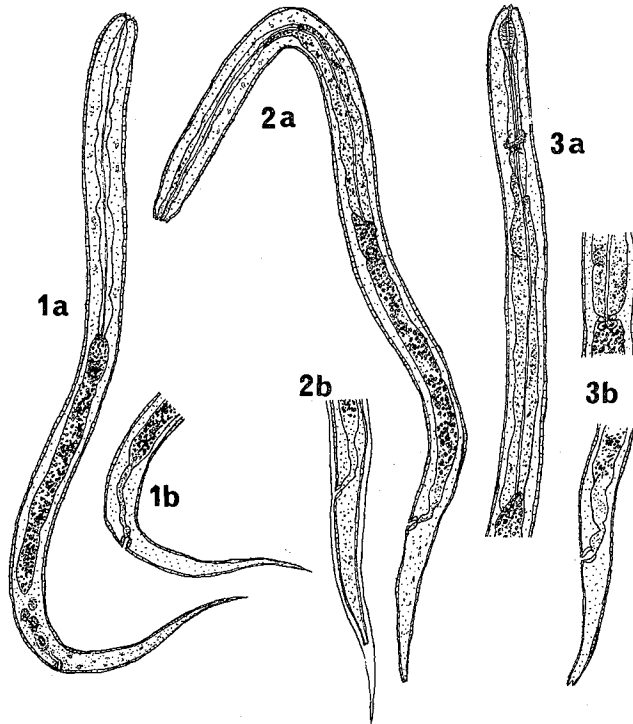


Fig. 6. General anatomical features of larvae in different stages of development.

- 1a. First-stage larva from the uterus of gravid worm.
- 1b. Posterior end of the first-stage larva obtained from the infected copepod after 2 days reared.
- 2a. Second-stage larva dissected from the hemocoel of the infected copepod after development for 5 days.
- 2b. Same, showing a loose sheath.
- 3a. Third-stage larva obtained from the hemocoel of the infected copepod after for 25 days reared.
- 3b. Showing the end of the esophagus and tail of the third-stage larva.

成熟雌虫から取り出した第1期幼生は、すでに述べたように、尾部は尖った糸状型で、食道は未発達の同質同形の管状を呈し、腸は薄い壁の単純な管からなり後腸とは結合していないが、宿主の血体腔へ侵入2日後に、腸と後腸の結合が明確にみられるようになり、腸は肛門と連がる。

第1回目の脱皮は感染5日目ごろから始まり第2期幼生となる。第2期幼生の特徴は次のとおりである。宿主の血体腔内での動きは第1期幼生にくらべていちじるしくゆるやかになる。形態的には、尾部は短かく



急に尖っているようにみえる。肛門から末端まで尾部長の体長に対する比率（尾部長/全長×100）でみると、第1期幼生の21%に対し、第2期幼生になると11~13%となり、これはその後もほとんど変化なく経過する。食道はこの時期を境に狭い筋肉性部と幅広い食道腺部に分れる。仔虫は脱皮した外殻に被鞘している。

第2回目の脱皮の時期は脱皮現象の観察からは明確にすることはできなかったが、感染後22日以降30日ごろまでの間に行なわれたものと推察された。

すなわち、(1)第2期幼生は脱皮殻を被鞘しており、その率は12日目には91%に達したが、その後次第に低くなり22日目には25%になった。被鞘仔虫は次の脱皮に備えて脱鞘するので、このごろが第2回目の脱皮前と考えられる。(2)Platzer<sup>6)</sup>らは脱皮後の体長はは一般に小さいとしているが、Fig. 5の体長変化に示されるように本実験でも22日から30日までは平均体長は次第に減少している。これは脱皮後にみられる体長変化の傾向と一致しており、このころを境に2回目の脱皮があったと考えられる。(3)内部諸器官はこのころを境にして、筋肉性の食道前端部にやや膨出した食道前頭球が発達する。また、食道腺部は長くその幅も体幅一杯を占めるまでになり、その末端の腸内への突出構造 Venticular appendix が観察されるようになる。これらの形態上の特徴は、第2期幼生とは明らかに区別されることから第2回目の脱皮は感染後22日を境として行なわれると考えられる。

感染後40日頃になると体長はほぼ一定し、被鞘生仔虫の出現率も80%前後を示し、宿主の血体腔での運動もやや活発となり、内部諸器官の変化はみられず第3期幼生の感染仔虫として発育する。

## 考 察

8月から9月にかけて宿主の鰓蓋部などの表皮下に包囊を形成するのは、産仔するための成熟雌虫の最終の移行である。包囊から体が露出し、海水に直接触れた成熟雌虫は間もなく体壁が裂開して子宮は体外に突出し仔虫を放出する。このばあい、宿主の游泳によって仔虫は広範囲に撒播されるが、これは中間宿主への感染を高めるのに役立つ。さらに室内実験で観察された器底での仔虫の蝸集行動は自然域でも適応され、脱皮後海底へ沈降し他物を介して立ち揺れ動くような行動をとる仔虫は匍匐性の橈脚類による摂取を容易にしていると考えられ、寄生生態として興味深い。

感染初期の仔虫の行動として、石井<sup>7)</sup>は淡水産の *Pilometra carassi* で、適正な中間宿主では消化管内に摂取された仔虫は数分~10数分で腸壁を貫通して血体腔へ移行するとしているが、本実験では仔虫はチクリオパスの胃や腸内に摂取されても初期摂取群では腸内の粘液物に包まれた状態でそのまま排泄されてしまう。このように摂取、排泄を繰り返し、30分経過以降に摂取された仔虫群のみが血体腔へ侵入することが観察されたが、これが仔虫の活力の強弱によるものかどうかについては明らかにすることはできなかった。

宿主に対する仔虫侵入の影響を知るために感染3日目において、24時間以内に斃死したチクリオパスの血体腔内の仔虫数を生存群と比較した結果、前者の平均仔虫数は $7.3 \pm 2.5$ 尾 ( $n=20$ )、後者は $2.9 \pm 1.9$ 尾 ( $n=20$ )であり両者の間には有意の差が認められた。このことは仔虫を感染させた宿主を長期間飼育するにはその仔虫数を3尾程度に押える必要があることを示唆している。本実験は、宿主1尾あたりの仔虫の侵入数を $2.5 \pm 1.2$ 尾 ( $n=20$ )に押え、20°Cの水温条件下で、クロレラを餌料として飼育した結果、実験上の資料を得るために必要とした10尾程度の仔虫の採集といううえでは48日間、さらに仔虫1尾のみが採集されたばあいを入れると61日間の飼育を継続することができた。感染後61日目に得られた仔虫は48日後のものと同くべて形態上の変化はみられなかった。

宿主内で2回脱皮した第3期幼生を感染仔虫と考えてよいかについては感染実験を予備的に試みた。秋期に自然海域から採集したものでは完全未感染のスジハゼ群は得られなかったが（感染率 $\frac{2}{10}$ ）、これらの群のスジハゼに、1回目の脱皮をおえた被鞘性の第2期幼生（感染後15日目）を、また2回の脱皮をすませた第3期幼生（感染後39日目）を、宿主とともにガラス管製のカテーテルを用いて胃中へ挿入、人為的に摂取さ

せた結果、前者では感染率の変化はなかったが、後者ではすべてのスジハゼにおいて生殖腺内に仔虫の存在を認めた(6/6)。

自然感染に由来する仔虫が全くない宿主を用いての感染実験で寄生生態を詳細に調査する必要があるが、これまでの予備的な実験結果から考えて、2回の脱皮をした第3期幼生は最終宿主へ侵入可能な感染仔虫と考えるとほぼ誤りはないと見られる。

今後は最終宿主内での仔虫の発育、移行などに関する生態研究を実施したい。

## 要 約

海産底棲類に寄生する線虫について、胎生仔虫の発育経過の観察と中間宿主への感染実験を試み以下の結果を得た。

1. 胚発生は母虫の子宮内で行なわれ、第1期幼生は8月から9月にかけて生産される。仔虫の体壁の裂開によって海水中へ産出される。8~20mmの母虫の子宮内仔虫は2~10万尾を数える。
2. 成熟母虫からとりだした第1期幼生を中間宿主と想定される橈脚類へ感染させたところ、2、3の橈脚類で感染に成功した。経口的に橈脚類に摂取された第1期幼生は腸壁を貫通して血体腔に入り、2回の脱皮を経て第3期の感染仔虫として発育する。
3. 仔虫は水温20°Cで4日までは高い生存率を示すが、以降は斃死固体が増える。高い感染率を示すのは3日以内であった。
4. 成熟母虫および橈脚類の血体腔内における仔虫の発育と形態的特徴は下記のとおりである。

### (1) 第1期幼生

母虫の子宮内仔虫から得られた第1期幼生は体長360~460 $\mu$ 、体幅14~15 $\mu$ で、細長く尖った尾部をもつ。

頭部には三叉した口唇がみられる。食道は同質同形の筋肉性の管状で、その末端は腸内に連結している。腸は後腸とはいまだ結合していない。肛門は体の後方から85~95 $\mu$ のところの位置している。宿主の血体腔に侵入した仔虫は活発に運動し、2日後には腸は後腸と結合する。

### (2) 第2期幼生

水温20°Cで、感染後5日目頃から第1回目の脱皮が行なわれ、脱皮殻を被鞘した第2期幼生となる。宿主の血体腔での動きはゆるやかになり、尾部は短かく急に尖っている。食道は狭い筋肉性部と幅広い食道腺部に分れる。

### (3) 第3期幼生

第3期幼生は20°Cで25日後以降の橈脚類で発見された。第2期幼長と異なるところは、筋肉性の食道前端部にやや膨出した食道前頭球が発達し、食道腺部は巾広く、その末端端部の腸内への突出構造が観察されるようになる。宿主の血体腔での運動も比較的活発になる。

## 文 献

- 1) 山口義昭・阪口清次・後藤幹夫, 1973: 海産底棲魚類に寄生する線虫に関する研究—1. 広島湾北西沿岸域における分布と成虫の形態, 本誌, 6, 9—16.
- 2) Rasheed, S. 1963: A revision of the genus *Philometra costa*, 1845. J. Helminth., 37, 89-130.
- 3) Yamauti, S., 1961: Systema Helminthum, III, 74-77.
- 4) Thomas, L. J., 1929: *Philometra noduosa* nov. spec. with notes on the life history. J. Parasitology, 15(3), 193-199.
- 5) Furuyama, T., 1934: On the morphology and life-history of *Philometra fujimotoi* Furuyama, 1932. Keijio J. Med, 5, 165-177.
- 6) Platzer, E. G., & Adams, J. R., 1967: The Life history of a Dracunculoid, *Philometra oncorhynchi*, in *Oncorhynchus nerka*, Can. J. Zool., 45, 31-43.
- 7) 石井重美, 1931: 日本産魚類の寄生虫9. 岩波講座生物学18別項, 179—207.