

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

(from lysine to asparagine at amino acid position 315; K315N) was found in all of the +^C allele strains and three nonsynonymous mutations in *Cameo2* (V124A, V293I, and S431L) were found in part of the *C* allele strains.

Expression of *Cameo2* Was Significantly Reduced in the Middle Silk Gland of the +^C Allele Strain—We next examined *Cameo1* and *Cameo2* expression in the middle silk gland with multiple *C* and +^C allele strains by Northern blotting analysis. With probes for *Cameo1*, no specific signal has yet been detected (data not shown). Using a ³²P-labeled riboprobe for *Cameo2*, one significant signal of relatively large size (>6.5 kb) and another weaker signal of smaller size (≈3.5 kb) were obtained in *C* allele strains on day 0 of the wandering stage (W0), when the larvae exhibit a characteristic behavior with enhanced locomotory activity just before spinning cocoons in the fifth instar (Fig. 4A). The signals were significantly reduced in each of the +^C allele strains. The *Cameo2* signal in the FL501 [+^Y, *C*] strain, in which the hemolymph and silk gland were colorless due to the homozygous +^Y allele, was not reduced to the level of the +^C allele strains, suggesting that *Cameo2* expression was controlled by the *C* locus rather than lutein accumulation in the middle silk gland.

To examine protein expression of *Cameo2*, we prepared a rabbit polyclonal antibody for a 14-residue peptide in the predicted extracellular region that shows a low sequence similarity to *Cameo1* (Fig. 3B). This antibody recognized a protein of ≈68 kDa in the membrane fraction of the silk gland of the *C* allele strain, but not in the +^C allele strain (Fig. 4B), consistent with Northern blotting analysis (Fig. 4A). The difference between the observed and predicted molecular masses of *Cameo2* (56.0 kDa in the double-pass transmembrane model and 52.7 kDa in the single-pass transmembrane model) may be due to post-translational glycosylation at asparagine residues (Fig. 3B). Differences between the observed and predicted molecular masses have been observed in other CD36 family genes (5). Immunohistochemistry demonstrated that the immunoreactivity for the antibody was found on the apical surface of the middle silk gland (Fig. 4C), which would have direct contact with the hemolymph.

Developmental and Regional Expression Profiles of *Cameo1*, *Cameo2*, and *CBP* in the Middle Silk Gland—Lutein pigmentation in the middle silk gland of the *C* allele strain is known to be under developmental regulation, whereas the +^C allele strain remains colorless (8, 54) (Fig. 5A). To examine the relationship with lutein accumulation, the developmental profiles of *Cameo1* and *Cameo2* mRNA expression in the middle silk glands of both the *C* and +^C allele strains were analyzed by

quantitative RT-PCR from day 0 to 3 of the fourth instar (IV0–IV3) and from day 0 to 7 or 8 of the fifth instar (V0–V7 or -V8) (Fig. 5B). In the *C* allele strain, the expression of *Cameo1* and *Cameo2* reached a small peak on IV2, declined to a low level around the time of molting between the fourth and fifth instars, and then increased and peaked again in the middle-late fifth instar. The degree of increase in *Cameo2* expression during the fifth instar was remarkably high, showing an approximate 500-fold difference between V0 and V5. This significant increase in *Cameo2* expression during the fifth instar was consistent with the increment of the pigmentation from V3 or V4 (Fig. 5A). On V7, the day before pupation, *Cameo2* expression decreased markedly from V6, whereas *Cameo1* expression remained elevated. This drop in *Cameo2* expression was consistent with the loss of requirement of pigmentation for cocoon coloration because the larvae had stopped spinning and the silk gland was undergoing degradation. In the +^C allele strain, the developmental profile of *Cameo1* expression was similar to that of the *C* allele strain, suggesting that the *C* locus does not largely affect *Cameo1* expression in the middle silk gland. In contrast, *Cameo2* expression was significantly lower than that observed in the *C* allele strain on all days, with a small peak on V3–V5. The lower level of *Cameo2* expression was consistent with the Northern and Western blotting analyses (Fig. 4) and the reduced degree of pigmentation in the fifth instar (Fig. 5A).

We separated the middle silk gland of the *C* allele strain at W0 into five sections (Fig. 5C), and examined *Cameo1* and *Cameo2* expression in each section by quantitative RT-PCR (Fig. 5D). *Cameo2* expression was significantly higher in the middle three sections than in the anterior and posterior sections, likely consistent with localization of pigmentation (Fig. 5C). *Cameo1* expression was relatively uniform.

We examined *CBP* expression by means of quantitative RT-PCR using the same mRNA samples employed for the above experiment. *CBP* expression was definitely repressed in the fourth instar, and increased and peaked in the fifth instar similar to *Cameo2* (Fig. 5B). The highest degrees on V2–V4 were consistent with the previous Western blot analysis (13). In the middle silk gland of the *C* allele strain at W0, *CBP* expression was repressed in the anterior section similar to *Cameo2*, but at a high level in the posterior section in contrast to *Cameo2* (Fig. 5D).

The *C* Locus Regulates *Cameo2* Expression Likely in a *cis*-Regulatory Manner—To determine the molecular mechanism by which the *C* locus regulates *Cameo2* expression, we investigated whether the difference of *Cameo2* expression between the *C* and +^C allele is controlled by a *cis*-regulatory element (*i.e.* expression is controlled by a non-coding element such as a

FIGURE 3. Characteristics of the gene structures of *Cameo1* and *Cameo2*. A, schematic genomic structure. Connected dotted lines indicates the structures of the mRNAs. B, alignment of putative amino acid sequences of *Cameo1* and *Cameo2* from the N4 strain. Transmembrane helices predicted by TMHMM version 2.0 (45) are highlighted. N-Glycosylation consensus sites (N-X-S/T) and cysteine residues in the putative extracellular region, common features in CD36-related genes (64), are indicated by asterisks and bold type, respectively. The site used to produce the antibody against *Cameo2* is indicated by a dotted underline. The probable cleavage sites of the signal peptide predicted by the SignalP 3.0-HMM program (46) are indicated by arrows. C, hypothetical membrane topology of *Cameo1*, *Cameo2*, and other homologs predicted by TMHMM version 2.0 and SignalP 3.0-HMM. D, the chromosomal locations of the paralogs of *Cameo1* and *Cameo2* in the silkworm. Recently, partial sequences of *Cameo1* and *Cameo2* were reported by data base searches and named *SCRB3* and *SCRB4*, respectively (25). E, a neighbor-joining tree for *Cameo1*, *Cameo2*, and other homologs from insects and mammals. The first two characters of the gene names represent their species: *Bm*, *B. mori*; *Dm*, *D. melanogaster*; *Ag*, *Anopheles gambiae*; *Hs*, *Homo sapiens*; and *Mm*, *Mus musculus*. Bootstrap values >90%, based on 1000 replicates, are indicated by closed circles.

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

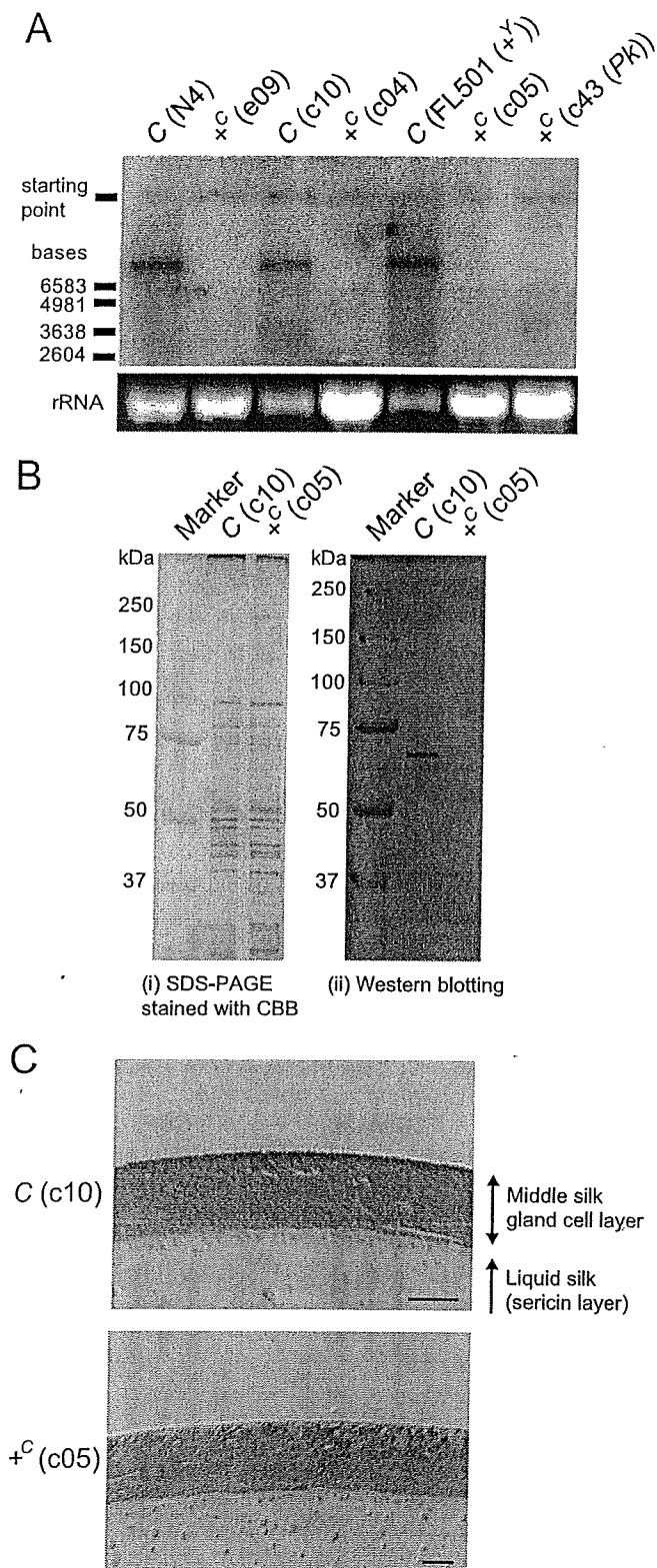


FIGURE 4. The expression of Cameo2 was definitively repressed in the $+^c$ allele strain. *A*, Northern blotting analysis of *Cameo2* expression in the middle silk gland at W0. *B*, SDS-PAGE and Western blotting analysis of *Cameo2* from the membrane fraction of the middle silk gland at W0. *C*, immunohistochemistry of *Cameo2* with the cross-section of the middle silk gland at W0. The dark red stains of *Cameo2* were found all around the apical surface of the middle silk gland. The blue stains are nuclei. Scale bar, 20 μ m.

transcriptional factor binding site) or a *trans*-acting factor (*i.e.* a coding sequence translated to a protein, such as a transcription factor). We examined SNPs of *Cameo2* mRNA in the middle silk gland of F1 individuals from the cross between the *C* and $+^c$ allele strains. In a *cis*-regulatory mechanism, *Cameo2* would be transcribed dominantly from the chromosome derived from the *C* allele strain (Fig. 6A). On the other hand, in a *trans*-acting mechanism, the translated products would act on *Cameo2* genes of both chromosomes from the *C* and $+^c$ allele strains, and *Cameo2* would be transcribed from both chromosomes (Fig. 6A). SNP analysis showed that *Cameo2* mRNA was transcribed dominantly from the *C* allele-harboring chromosome in F1 individuals, whereas *Cameo1* mRNA was transcribed from both chromosomes (Fig. 6B). Thus, repression of *Cameo2* expression in the $+^c$ allele strain would be controlled by a *cis*-regulatory mechanism.

The *C* Locus Affects *Cameo2* Expression and Carotenoid Accumulation in a Tissue-specific Manner—To examine the tissue specificity of regulation of *Cameo2* expression by the *C* locus, tissue distribution of *Cameo2* was analyzed by Northern blotting (Fig. 6C) and RT-PCR (Fig. 6D) in the *C* and $+^c$ allele strains. *Cameo2* was expressed in tissues other than the middle silk gland, such as the midgut, testis, ovary, and brain, which was largely unaffected by the *C* gene. As mentioned before, the midgut, testis, and ovary also express CBP in the *Y* allele strain (12, 13). Then, carotenoid pigmentation of the testis and ovary were compared between the *C* and $+^c$ allele strains. In contrast to the difference in the middle silk gland, carotenoid pigmentation of the testis (Fig. 6E) and ovary (Fig. 6F) were similar between the *C* and $+^c$ allele strains in the background of the *Y* allele. Thus, regulation of *Cameo2* expression and carotenoid accumulation by the *C* locus appeared to be specific for the middle silk gland. Furthermore, carotenoid pigmentation in each tissue seemed to reflect both *Cameo2* and CBP expression.

Restoration of Lutein Accumulation by Germ line Transformation with the *Cameo2* Gene—To verify the function of *Cameo2* as a product of the *C* gene, we examined the restoration of lutein accumulation in the middle silk gland after transgenic expression of the *Cameo2* gene in a strain with the phenotype of yellow hemolymph and white cocoons. The binary *GAL4/UAS* system (30) was used. An effector vector that carried the *Cameo2* gene linked to *UAS* was constructed (Fig. 7A) and then the effector *UAS-Cameo2* (*UAS*) lines were generated by germ line transformation. Male moths of a *UAS* line were crossed with females of the *Ser1-GAL4* (*GAL4*) line that drives target gene expression in the middle silk gland (31). The restoration of pigmentation in the middle silk gland was observed in the *GAL4/UAS* line (Fig. 7B). HPLC analysis of carotenoid content revealed the restoration of selective lutein uptake in the middle silk gland of the *GAL4/UAS* line (Fig. 7, C and D). Southern blotting analysis confirmed integration of the *Cameo2* transgene into the *UAS* line (supplemental Fig. S3A). RT-PCR analysis also confirmed an increase in *Cameo2* expression in the middle silk gland of the *GAL4/UAS* line (supplemental Fig. S3B). The *GAL4/UAS* line produced yellowish colored cocoons, whereas the intensity of coloration was weak (Fig. 7E).

Cameo2 Is Coordinated with *CBP* in Carotenoid Transport

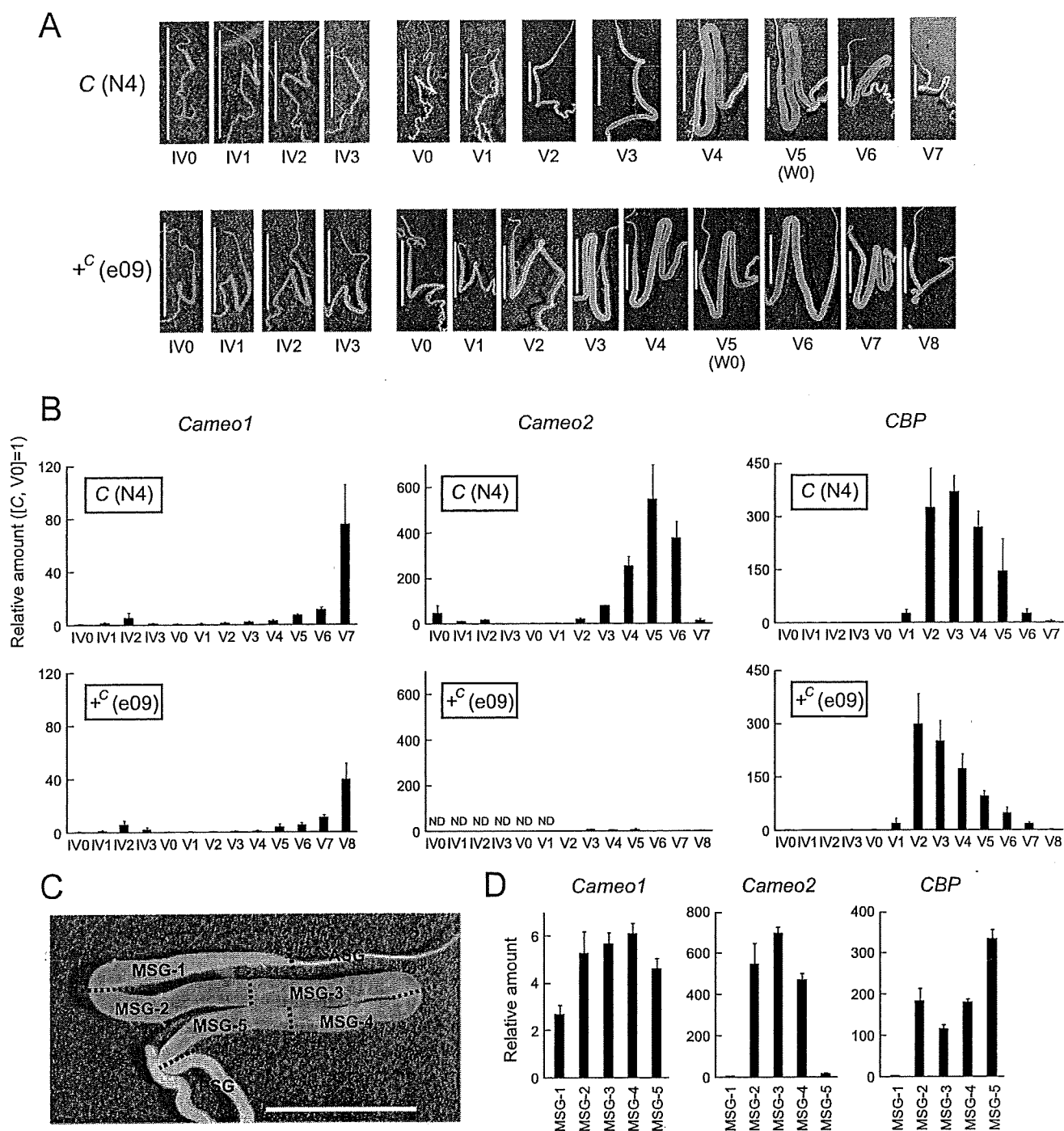


FIGURE 5. Spatiotemporal analysis of the expression of *Cameo1* and *Cameo2* in the middle silk gland by quantitative RT-PCR. **A**, changes in carotenoid pigmentation in the silk gland during the fourth and fifth male instars. From V5 (W0), larvae spat silk for cocoon formation, resulting in a decrease of pigmentation in the C allele strain. **B**, developmental expression analysis of *Cameo1*, *Cameo2*, and *CBP* in the male middle silk gland. Each vertical axis indicates the fold-increase in mRNA expression compared with that of the C allele strain at V0 (mean, S.E.; $n = 3$). ND, not detected. **C**, cutting lines and definition of regions in the middle silk gland for the expression analysis in **D**. The cutting lines were set at the boundary between the anterior silk gland (ASG) and the middle silk gland (MSG), the first bend, the midpoint between the first and second bend; the second bend, the midpoint between the second bend and the boundary between the MSG and the posterior silk gland (PSG), and the boundary between the MSG and the PSG. The presented silk gland of the C allele strain at the stage of V5 (W0) is the same as in **A**. The pigmentation in MSG-1 can derive from the posterior regions because liquid silk in the core layer of the middle silk gland likely migrates toward ASG (see the less pigmentation in MSG-1 at V4 of the C allele strain **A**). **D**, spatial expression analysis of the middle silk gland. Each vertical axis indicates the fold-increase in mRNA expression compared with that of the C allele strain at V0 as in **B** (mean, S.E.; $n = 3$). The stage was V5 (W0). The same data in **B** and **D** in the logarithmic scale are shown in supplemental Fig. S5. Scale bar, 1 cm. Error bars are S.E.

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

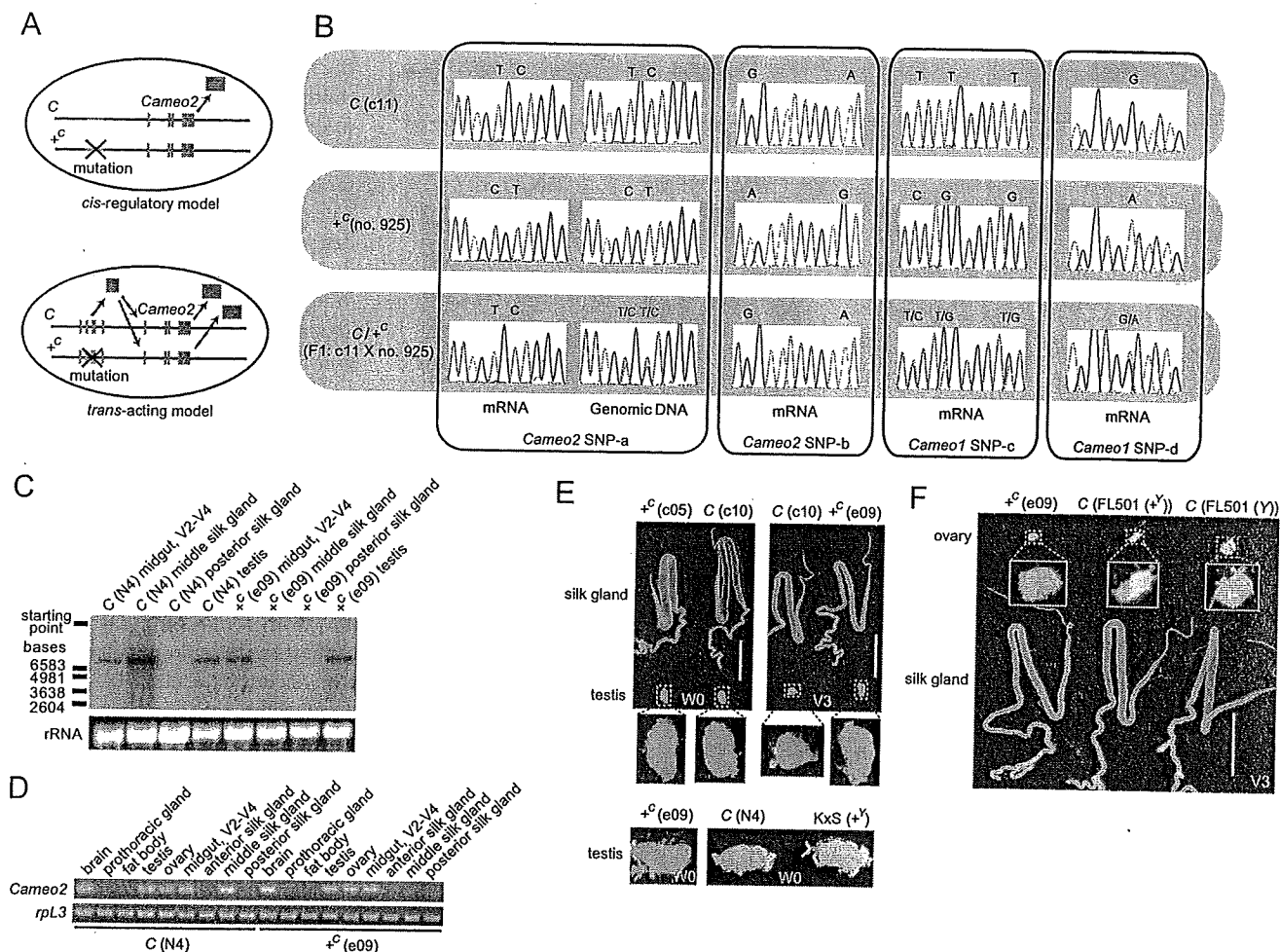


FIGURE 6. The *C* locus controlled the *Cameo2* expression in a tissue-specific manner likely by a *cis*-regulatory manner. *A*, schematic diagram of the principle of SNP analysis in F1 to elucidate whether *Cameo2* expression is controlled in a *cis*-regulatory or *trans*-acting manner. *B*, SNP analysis in *Cameo2* and *Cameo1* of the *C*, $+^C$, and F1 larvae. mRNA and genomic DNA were from the middle and posterior silk glands, respectively. The stage was V2–V4. The SNP sites are indicated in supplemental Fig. S2. Similar SNP patterns were obtained from three individuals of F1 larvae. *C* and *D*, examination of tissue distribution of *Cameo2* by Northern blotting (*C*) and RT-PCR (*D*) analyses. *rpl3* is an internal control (28). The stage was W0 unless otherwise noted. *E* and *F*, comparison of carotenoid pigmentation in the silk gland, testis, and ovary between the *C* and $+^C$ allele strains. Stages are indicated on the figures. *White* around the testis or ovary were fat body. Scale bar, 1 cm.

DISCUSSION

Recent improvements in the assembly of genome sequences (22) and physical marker resources (32, 33, 55) have made it feasible to clone mutant genes via positional cloning methods in the silkworm. Using these facilities, we attempted to elucidate the molecular identity of the *C* gene, a classical cocoon-color mutant gene mediating the cellular uptake of lutein in coordination with the *Y* gene in the middle silk gland (Fig. 1). Two paralogous membrane-spanning protein genes belonging to the CD36 gene family, *Cameo1* and *Cameo2*, were then cloned from the narrowed 375-kb interval of the *C*-linked region (see Figs. 2 and 3). Based on expression analysis (see Figs. 4 and 5) and transgenic rescue of the phenotype (see Fig. 7), the *C* gene is considered to encode *Cameo2* and control the cellular uptake of lutein in the middle silk gland by regulating *Cameo2* expression at a transcriptional level. The nucleotides responsible for the *C* mutation may correspond to a *cis*-regulatory element of *Cameo2*, which controls *Cameo2* expression in the middle silk gland in a specific manner (Fig. 6).

Based on the results presented here, along with those of previous studies of CBP, we propose a hypothetical transport pathway for lutein in the *C* and $+^C$ allele strains (see Fig. 7F). In the larval body of the *C* allele strain with the background of the *Y* allele, *Cameo2* is expressed in the midgut, middle silk gland, ovary, and testis. CBP is also expressed in these tissues (12, 13). Dietary mulberry leaves containing lutein are digested in the midgut lumen. Lutein is then absorbed into the midgut cells, possibly by *Cameo2*, and binds to CBP in the midgut cell to diffuse in the cytosol, which in turn transfers it to lipophorin in the hemolymph. Lipophorin reaches the middle silk gland and the genital organs via hemolymph, and then binds to the lipophorin receptor on each tissue. The lipophorin receptor on these tissues would be *Cameo2* itself, another membrane receptor such as the vertebrate very low density lipoprotein receptor-like protein (56), or their complexes. Lutein is transported into these tissues by a membrane lutein transporter, which could be *Cameo2* itself, where it binds to CBP in the cytosol again, resulting in yellow coloration of these tissues. In the $+^C$ allele strain

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

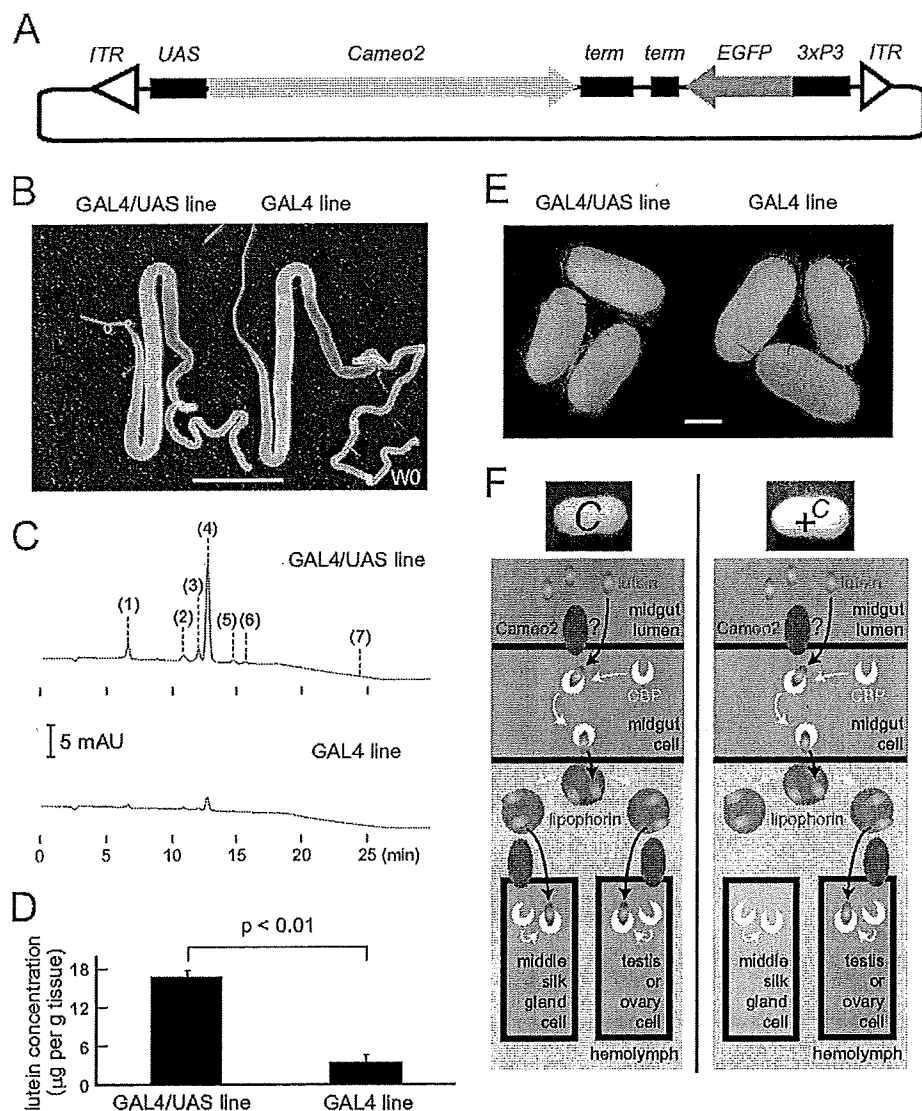


FIGURE 7. Restoration of the phenotype of lutein accumulation by transgenic expression of *Cameo2*. *A*, organization of the transgenic vector used. *ITR*, inverted terminal repeats of piggyback; *term*, SV40 terminator, *3xP3*, eye-specific promoter. *B*, silk glands of the GAL4/UAS (Ser1-GAL4/UAS-Cameo2) line, which was supposed to express *Cameo2* in the middle silk gland by the binary system (30), and the GAL4 line as a control. The stage was W0. We confirmed similar stronger colorations in the GAL4/UAS line than the GAL4 line by observation of eight larvae of the GAL4/UAS line and 10 larvae of the GAL4 line. *C*, a representative chart of the reverse-phase HPLC analysis of carotenoid composition of the middle silk gland in the transgenic larvae. The stage was W0. Detection was at 474 nm. Peak positions 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 correspond to the elution of 3'-dehydrolyutein, 13-*cis*-lutein, unknown lutein derivative, lutein (trans lutein), zeaxanthin, 9-*cis*-lutein, and β -carotene, respectively. β -Carotene was barely detectable in the middle silk gland of the GAL4/UAS line and the GAL4 line (mean, S.E.; $n = 3$). The stage was W0. Statistical significance ($p < 0.01$) was analyzed by Student's *t* test. *E*, cocoon colors of the GAL4/UAS and GAL4 lines. All individuals analyzed in *B–E* exhibited the yellow hemolymph. Scale bar, 1 cm. *F*, model of the transport pathway for lutein in the larvae of the *C* and $+^C$ allele strains. Lutein is transported into the tissues where both *Cameo2* and CBP express. *Cameo2* in the internal organs would act as the lipophorin receptor and/or the membrane lutein transporter. See "Discussion" for details.

with the background of the *Y* allele, lutein would be similarly transferred to lipophorin and absorbed into the genital organs, whereas the middle silk gland rarely accumulates lutein due to its low level of *Cameo2* expression. As both the CD36 family genes and the START domain-containing genes are prevalent in animals, coordination between them could also occur in other systems of selective lipid transport, as presumed for the mammalian steroidogenic system (36).

molecular genetic tool for regulating cocoon color; however, the intensity of cocoon pigmentation by transgenic expression of *Cameo2* might not be enough to generate a convenient phenotype for breeding or commercial value (Fig. 7E). The weakness of coloration could, at least in part, be due to low uptake of lutein in the middle silk gland (Fig. 7D), which was 5–10-fold lower than that of the native *C* allele strain at W0 (data not shown). We expect that development of a more efficient

Although the midgut expresses both *Cameo2* and CBP, its feature in the cellular absorption of carotenoids is different from that of the middle silk gland as the midgut absorbs a certain amount of β -carotene in addition to lutein (8, 9). Although the present data do not deny the involvement of *Cameo2* in the carotenoid absorption of the midgut, there would be other mechanisms/factors than those of the middle silk gland.

The function of *Cameo1* remains elusive. Although the present results do not exclude the possibility that *Cameo1* is involved in the cellular uptake of lutein, detection of *Cameo1* expression in broad tissues (see Figs. 5D and supplemental S4) implies that *Cameo1* may be associated with a more ubiquitous function rather than tissue-specific control of lutein accumulation. It is noteworthy that tandem arrays of several paralogous genes of the CD36 gene family such as *Cameo1* and *Cameo2* are frequently observed in the silkworm (Fig. 3D) and Dipterans (48), whereas the physiological meaning of these tandem arrays is unknown.

Historically, the *C* mutant was originally found to produce white cocoons even though the color of hemolymph is yellow (57, 58). This was in contrast to the belief at that time that cocoon color is inevitably correlated with hemolymph color. The genetic mechanism of cocoon coloration by carotenoids has been investigated for biological and commercial purposes in part because cocoon-color genes are useful genetic markers for breeding that do not require sophisticated equipment, and cocoon colors impart distinctive color traits on some kinds of silk production. The present study identifies *Cameo2* as a

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

expression system for the transgene product in the middle silk gland would enhance the intensity of transgenic cocoon color.

Our results demonstrate that in one mutant of a membrane protein, the *Cameo2* mutant, lutein uptake of the middle silk gland is affected. One possible explanation for these observations is that *Cameo2* is in the lutein-specific transfer factor present at the cell surface of the middle silk gland, which transports lutein from extracellular lipophorin to the intracellular CBP. A number of questions, however, remain. First, it is not yet known whether there are direct interactions between lipophorin and *Cameo2* or *Cameo2* and CBP. Although CLAMP (59), a PDZ domain-containing cytosolic protein, fatty acid-binding protein (60), and Src family proteins (61) have been suggested to have a physical interaction with the cytosolic region of SR-BI or CD36, they show no significant homology to CBP. Second, the site at which the selectivity for lutein is determined remains elusive. As the *Y* gene is involved in absorption of both lutein and β -carotene from the midgut lumen into midgut cells (8, 9) and combination of the *Y* gene and the *Flesh* gene, another cocoon-color mutant gene, facilitates the selective uptake of β -carotene in the posterior part of the middle silk gland (8, 62), the selectivity for lutein can be expected to be determined solely by *Cameo2*. However, the molecular properties of this CD36 family member that are responsible for lipid selectivity have yet to be determined. Biochemical and histological approaches with the *C* and *Y* mutants to these questions may reveal mechanisms by which dietary carotenoids are selectively transported to target tissues by relays of multiple factors to perform their diverse physiological functions.

Acknowledgments—We thank members of the Insect Genome Research Unit at National Institute of Agrobiological Sciences for technical assistance in the sampling of *BF1* individuals for mapping and R. O. Ryan for critical reading of the manuscript.

REFERENCES

- Goodwin, T. W. (1986) *Annu. Rev. Nutr.* 6, 273–297
- Loane, E., Nolan, J. M., O'Donovan, O., Bhosale, P., Bernstein, P. S., and Beatty, S. (2008) *Surv. Ophthalmol.* 53, 68–81
- Goldberg, I. J. (1996) *J. Lipid Res.* 37, 693–707
- Brown, M. S., and Goldstein, J. L. (1986) *Science* 232, 34–47
- Krieger, M. (1999) *Annu. Rev. Biochem.* 68, 523–558
- Oku, M. (1934) *Bull. Agric. Chem. Soc. Jap.* 10, 1258–1262
- Manunta, C. (1937) *Arch. Zool. Ital.* 24, 385–401
- Nakajima, M. (1963) *Bull. Fac. Agric. Tokyo Univ. Agric. Technol.* 8, 1–80
- Tsuchida, K., Katagiri, C., Tanaka, Y., Tabunoki, H., Sato, R., Maekawa, H., Takada, N., Banno, Y., Fujii, H., Wells, M. A., and Jouni, Z. E. (2004) *J. Insect Physiol.* 50, 975–983
- Van der Horst, D. J., and Ryan, R. O. (2004) in *Comprehensive Insect Physiology, Biochemistry, Pharmacology and Molecular Biology* (Gilbert, L. I., Iatrou, K., and Gill, S., eds) pp. 225–246, Elsevier, Oxford
- Tazima, Y. (1964) *The Genetics of the Silkworm*, LOGOS Press, United Kingdom
- Tabunoki, H., Sugiyama, H., Tanaka, Y., Fujii, H., Banno, Y., Jouni, Z. E., Kobayashi, M., Sato, R., Maekawa, H., and Tsuchida, K. (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 32133–32140
- Tsuchida, K., Jouni, Z. E., Gardetto, J., Kobayashi, Y., Tabunoki, H., Azuma, M., Sugiyama, H., Takada, N., Maekawa, H., Banno, Y., Fujii, H., Iwano, H., and Wells, M. A. (2004) *J. Insect Physiol.* 50, 363–372
- Hara, W., Sosnicki, S., Banno, Y., Fujimoto, H., Takada, N., Maekawa, H., Fujii, H., Wells, M. A., and Tsuchida, K. (2007) *J. Insect Biotechnol. Seric.* 76, 149–154
- Sakudoh, T., Tsuchida, K., and Kataoka, H. (2005) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 336, 1125–1135
- Sakudoh, T., Sezutsu, H., Nakashima, T., Kobayashi, I., Fujimoto, H., Uchino, K., Banno, Y., Iwano, H., Maekawa, H., Tamura, T., Kataoka, H., and Tsuchida, K. (2007) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 8941–8946
- Alpy, F., and Tomasetto, C. (2005) *J. Cell Sci.* 118, 2791–2801
- Tsuchida, K., Arai, M., Tanaka, Y., Ishihara, R., Ryan, R. O., and Maekawa, H. (1998) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 28, 927–934
- Harizuka, M. (1948) *J. Seric. Sci. Jap.* 17, 1–5
- Fujimoto, N. (1949) *J. Seric. Sci. Jap.* 18, 82–87
- Sturtevant, A. H. (1915) *Am. Nat.* 49, 42–44
- The International Silkworm Genome Consortium (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 1036–1045
- Mita, K., Morimyo, M., Okano, K., Koike, Y., Nohata, J., Kawasaki, H., Kadono-Okuda, K., Yamamoto, K., Suzuki, M. G., Shimada, T., Goldsmith, M. R., and Maeda, S. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 14121–14126
- Rogers, M. E., Krieger, J., and Vogt, R. G. (2001) *J. Neurobiol.* 49, 47–61
- Tanaka, H., Ishibashi, J., Fujita, K., Nakajima, Y., Sagisaka, A., Tomimoto, K., Suzuki, N., Yoshiyama, M., Kaneko, Y., Iwasaki, T., Sunagawa, T., Yamaji, K., Asaoka, A., Mita, K., and Yamakawa, M. (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 38, 1087–1110
- Vogt, R. G., Miller, N. E., Litvack, R., Fandino, R. A., Sparks, J., Staples, J., Friedman, R., and Dickens, J. C. (2009) *Insect Biochem. Mol. Biol.* 39, 448–456
- Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J., and Higgins, D. G. (2007) *Bioinformatics* 23, 2947–2948
- Niwa, R., Sakudoh, T., Namiki, T., Saida, K., Fujimoto, Y., and Kataoka, H. (2005) *Insect Mol. Biol.* 14, 563–571
- Tamura, T., Thibert, C., Royer, C., Kanda, T., Abraham, E., Kamba, M., Komoto, N., Thomas, J. L., Mauchamp, B., Chavancy, G., Shirk, P., Fraser, M., Prudhomme, J. C., and Couble, P. (2000) *Nat. Biotechnol.* 18, 81–84
- Imamura, M., Nakai, J., Inoue, S., Quan, G. X., Kanda, T., and Tamura, T. (2003) *Genetics* 165, 1329–1340
- Tatematsu, K. I., Kobayashi, I., Uchino, K., Sezutsu, H., Iizuka, T., Yone-mura, N., and Tamura, T. (September 30, 2009) *Transgenic Res.* 10.1007/s11248-009-9328-2
- Yamamoto, K., Narukawa, J., Kadono-Okuda, K., Nohata, J., Sasanuma, M., Suetsugu, Y., Banno, Y., Fujii, H., Goldsmith, M. R., and Mita, K. (2006) *Genetics* 173, 151–161
- Yamamoto, K., Nohata, J., Kadono-Okuda, K., Narukawa, J., Sasanuma, M., Sasanuma, S. I., Minami, H., Shimomura, M., Suetsugu, Y., Banno, Y., Osogawa, K., de Jong, P. J., Goldsmith, M. R., and Mita, K. (2008) *Genome Biol.* 9, R21
- Azhar, S., and Reaven, E. (2002) *Mol. Cell. Endocrinol.* 195, 1–26
- Martinez, L. O., Perret, B., Barbaras, R., Tercé, F., and Collet, X. (2007) in *High Density Lipoproteins* (Fielding, C. J., ed) pp. 307–338, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim
- Connelly, M. A. (2009) *Mol. Cell. Endocrinol.* 300, 83–88
- Rodriguez, W. V., Thuahnai, S. T., Temel, R. E., Lund-Katz, S., Phillips, M. C., and Williams, D. L. (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 20344–20350
- Kiefer, C., Sumser, E., Wernet, M. F., and Von Lintig, J. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 10581–10586
- Voolstra, O., Kiefer, C., Hoehne, M., Welsch, R., Vogt, K., and von Lintig, J. (2006) *Biochemistry* 45, 13429–13437
- Wang, T., Jiao, Y., and Montell, C. (2007) *J. Cell Biol.* 177, 305–316
- van Bennekum, A., Werder, M., Thuahnai, S. T., Han, C. H., Duong, P., Williams, D. L., Wettstein, P., Schulthess, G., Phillips, M. C., and Hauser, H. (2005) *Biochemistry* 44, 4517–4525
- Reboul, E., Abou, L., Mikail, C., Ghiringhelli, O., André, M., Portugal, H., Jourdeuil-Rahmani, D., Amiot, M. J., Lairon, D., and Borel, P. (2005) *Biochem. J.* 387, 455–461
- During, A., Doraiswamy, S., and Harrison, E. H. (2008) *J. Lipid Res.* 49, 1715–1724

Cameo2 Is Coordinated with CBP in Carotenoid Transport

44. Moussa, M., Landrier, J. F., Reboul, E., Ghiringhelli, O., Coméra, C., Collet, X., Fröhlich, K., Böhm, V., and Borel, P. (2008) *J. Nutr.* **138**, 1432–1436
45. Sonnhammer, E. L., von Heijne, G., and Krogh, A. (1998) *Proc. Int. Conf. Intell. Syst. Mol. Biol.* **6**, 175–182
46. Emanuelsson, O., Brunak, S., von Heijne, G., and Nielsen, H. (2007) *Nat. Protoc.* **2**, 953–971
47. Guarin, P., Thorne, R. F., Dorahy, D. J., Burns, G. F., Sitia, R., and Alessio, M. (2000) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **275**, 446–454
48. Nichols, Z., and Vogt, R. G. (2008) *Insect Biochem. Mol. Biol.* **38**, 398–415
49. Franc, N. C., Heitzler, P., Ezekowitz, R. A., and White, K. (1999) *Science* **284**, 1991–1994
50. Philips, J. A., Rubin, E. J., and Perrimon, N. (2005) *Science* **309**, 1251–1253
51. Benton, R., Vannice, K. S., and Vosshall, L. B. (2007) *Nature* **450**, 289–293
52. Jin, X., Ha, T. S., and Smith, D. P. (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 10996–11001
53. Su, X., and Abumrad, N. A. (2009) *Trends Endocrinol. Metab.* **20**, 72–77
54. Fujimoto, N. (1943) *J. Seric. Sci. Jap.* **14**, 276–282
55. Miao, X. X., Xub, S. J., Li, M. H., Li, M. W., Huang, J. H., Dai, F. Y., Marino, S. W., Mills, D. R., Zeng, P., Mita, K., Jia, S. H., Zhang, Y., Liu, W. B., Xiang, H., Guo, Q. H., Xu, A. Y., Kong, X. Y., Lin, H. X., Shi, Y. Z., Lu, G., Zhang, X., Huang, W., Yasukochi, Y., Sugasaki, T., Shimada, T., Nagaraju, J., Xiang, Z. H., Wang, S. Y., Goldsmith, M. R., Lu, C., Zhao, G. P., and Huang, Y. P. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **102**, 16303–16308
56. Gopalapillai, R., Kadono-Okuda, K., Tsuchida, K., Yamamoto, K., Nohata, J., Ajimura, M., and Mita, K. (2006) *J. Lipid Res.* **47**, 1005–1013
57. Ishii, K. (1917) *Sakurakai Zasshi.* **1**, 113–115
58. Uda, H. (1919) *Genetics* **4**, 395–416
59. Ikemoto, M., Arai, H., Feng, D., Tanaka, K., Aoki, J., Dohmae, N., Takio, K., Adachi, H., Tsujimoto, M., and Inoue, K. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **97**, 6538–6543
60. Spitsberg, V. L., Matitashvili, E., and Gorewit, R. C. (1995) *Eur. J. Biochem.* **230**, 872–878
61. Huang, M. M., Bolen, J. B., Barnwell, J. W., Shattil, S. J., and Brugge, J. S. (1991) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **88**, 7844–7848
62. Harizuka, M. (1953) *Bull. Seric. Exp. Sta. Jap.* **14**, 141–156
63. Zhao, Y. P., Li, M. W., Xu, A. Y., Hou, C. X., Li, M. H., Guo, Q. H., Huang, Y. P., and Guo, X. J. (2008) *Insect Sci.* **15**, 399–404
64. Hoosdally, S. J., Andress, E. J., Wooding, C., Martin, C. A., and Linton, K. J. (2009) *J. Biol. Chem.* **284**, 16277–16288

シンポジウム：食の安全性と感染症(1)

食習慣を背景に発生するわが国の肺吸虫症

国立感染症研究所 寄生動物部

杉山 広

Key Words：サワガニ、モクズガニ、ウェステルマン肺吸虫、宮崎肺吸虫、食習慣

緒言

食の安全・安心は、われわれにとって大きな関心事となっている。これを担保する法律として、わが国では「食品衛生法」が重要な役割を担ってきた。本法は「食品の安全性の確保のために公衆衛生の見地から必要な規制・措置を講じることにより、飲食に起因する衛生上の危害の発生を防止し、もって国民の健康の保護を図ることを目的とする（第1条）」として、1947年に制定された法律である。この条文に書かれている「飲食に起因する衛生上の危害」を、「飲食に起因する健康被害」と読み替え、さらにこれを「食中毒」として捉えるのが、最近の行政上の、すなわち厚生労働省の方針となっている¹⁾。

「食中毒」が発生した場合は、食品衛生法に則した届出が必要となる。「届出」に関する規定は、本法の第58条に認める。この第1項には「食品、添加物、器具もしくは容器包装に起因して中毒した患

者もしくはその疑いのある者を診断し、またはその死体を検案した医師は、直ちに最寄りの保健所長にその旨を届け出なければならない」と記載されている（医師の届出は文書、電話または口頭により24時間以内に行わなければならない：食品衛生法施行規則第72条）。実際には、「食中毒患者等届出票」の当該箇所（原因）に、食中毒事件票の「食中毒病因物質の分類」にリストアップされている病因物質を記載して、届出が行われることになる（表1）。

食品衛生法における寄生虫症の取り扱い

「食中毒病因物質の分類」では、寄生虫も食中毒の病因物質として、「22. その他」という分類で取り上げられている。そして具体的な例として、「クリプトスポリジウム、サイクロスポラ、アニサキス」の3つの寄生虫が「等」という文字を付して掲げられている（表1）。このように寄生虫名が例示された契機は、1999年の食品衛生法施行規則の一部改

Paragonimiasis Occurring in Japan as Foodborne Helminthiasis Relating to Eating Habits

Hiromu Sugiyama

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文請求先：杉山 広 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所 寄生動物部

表1 食中毒病因物質の分類

1. サルモネラ属菌, 2. ぶどう球菌, 3. ボツリヌス菌, 4. 腸炎ビブリオ
5. 腸管出血性大腸菌, 6. その他の病原大腸菌, 7. ウエルシュ菌
8. セレウス菌, 9. エルシニア・エンテロコリチカ
10. カンピロバクター・ジェジュニ/コリ, 11. ナグビブリオ
12. コレラ菌, 13. 赤痢菌, 14. チフス菌, 15. パラチフスA菌
16. その他の細菌(エロモナス・ヒドロフィラ等)
17. 小型球形ウイルス, 18. その他のウイルス(A型肝炎ウイルス等)
19. 化学物質(メタノール, ヒスタミン, ヒ素等)
20. 植物性自然毒, 21. 動物性自然毒
22. その他(クリプトスポリジウム, サイクロスポラ, アニサキス等)
23. 不明

表2 食中毒の届け出(食中毒統計:寄生蠕虫症を抜粋)

年	食中毒 届出総数 事件数 (患者数)	病因物質 [その他] 事件数 (患者数)	アニサキス 事件数 (患者数)	肺吸虫 事件数 (患者数)	旋尾線虫 事件数 (患者数)
1998	3,010 (46,179)	1 (781)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
1999	2,697 (35,214)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
2000	2,247 (43,307)	5 (53)	4 (4)	0 (0)	0 (0)
2001	1,928 (25,862)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
2002	1,850 (27,629)	2 (25)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
2003	1,585 (29,355)	1 (1)	1 (1)	0 (0)	0 (0)
2004	1,666 (28,175)	5 (8)	4 (4)	1 (4)	0 (0)
2005	1,545 (27,019)	8 (8)	7 (7)	0 (0)	0 (0)
2006	1,491 (39,026)	7 (23)	5 (5)	0 (0)	0 (0)
2007	1,289 (33,477)	8 (20)	6 (6)	1 (2)	0 (0)
2008	1,369 (24,303)	17 (47)	14 (14)	0 (0)	0 (0)
2009*	190 (5,427)	2 (2)	1 (1)	0 (0)	1 (1)

* 2009年は5月までの事件数(患者数)を示す

正にある。改正に当たり当時の厚生省から都道府県知事等に発出された通知を見ると、「原虫および寄生虫による飲食に起因する健康被害についても食中毒としての取り扱いを明確にするために、食中毒病因物質の分類のその他にクリプトスポリジウム等の例示を掲げた」と明記されている¹⁾。寄生虫を原因とするものであっても、「飲食に起因する衛生上の危害」は「食中毒」として取り扱い、食品衛生法に

基づいて事例発生を届け出る。その結果として、事故が調査され、被害の拡大が防がれ、再発が防止される。このような寄生虫症への対応に関する厚生労働省の見解には、現時点でも変更はない。

食品衛生法に基づく肺吸虫症の届出

肺吸虫症の例数を食中毒統計に見ると(表2)、2004年発生の佐賀県の事例(患者4名)と2007年

発生の福岡市の事例（同2名）のわずか2件しか届出がない。寄生虫症の血清診断に積極的に取り組んでおられる宮崎大医学部寄生虫学教室では、年間に30-40例の肺吸虫症例を経験されるとのことから²⁾、わが国では年間に50例を超える肺吸虫症例が発生していると考えられる。しかし実際の届出数はこれに遠く及ばないのが現状である。

論 議

肺吸虫は飲食に起因して患者に健康被害を引き起こす。これを「食中毒」として広く捉えることが、行政上の方針となっている¹⁾。現在までのところ、食中毒として実際に届け出られた肺吸虫症の事例は極めて少ない。食品衛生法に則した届出が確実に

なわれると、本症の発生実態がより正確に把握されるようになり、発生の予防にも役立つと期待される。

謝 辞：材料・情報を提供して頂き、また本稿に貴重な意見を頂いた共同研究者・関係者の各位に感謝いたします。

文 献

- 1) 厚生省生活衛生局長（1999）：食品衛生法施行規則の一部を改正する省令の施行等について（生衛発第1836号）。http://www1.mhlw.go.jp/topics/syoku_eihou/tp1228-1_13.html
- 2) 丸山治彦，他（2007）：肺吸虫。日胸，66，269-275.

肺切除で宮崎肺吸虫の虫嚢内寄生を認めた1例

滋賀県立成人病センター病理診断部

寺島 剛・武内英二

滋賀県立成人病センター 微生物検査室

西尾久明

滋賀県立成人病センター 呼吸器外科

石川将史

埼玉県衛生研究所 臨床微生物担当

山本徳栄

(財)目黒寄生虫館

荒木 潤

国立感染症研究所 寄生動物部

杉山 広

Key Words : 肺吸虫症, 宮崎肺吸虫, 虫嚢内寄生, 塩基配列

はじめに

肺切除検体に肺吸虫を認める症例を経験した。虫

体と周囲膿汁中の虫卵から塩基配列を解読・解析して、原因虫を宮崎肺吸虫と同定した。人体から宮崎肺吸虫(成虫)を確認した本例は貴重な症例と思わ

A Case of Pulmonary Paragonimiasis : Isolation of Adult *Paragonimus miyazakii* from Resected Lung Tissue

Tsuyoshi Terashima* Eiji Takeuchi* Hisaaki Nishio** Masashi Ishikawa***
Norishige Yamamoto**** Jun Araki***** Hiromu Sugiyama*****

*Department of Pathological Diagnosis, Shiga Medical Center for Adults

**Department of Clinical Laboratory, Shiga Medical Center for Adults

***Department of Respiratory Surgery, Shiga Medical Center for Adults

****Department of Clinical Microbiology, Saitama Institute of Public Health

*****Meguro Parasitological Museum

*****Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

論文請求先: 杉山 広 〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1 国立感染症研究所 寄生動物部

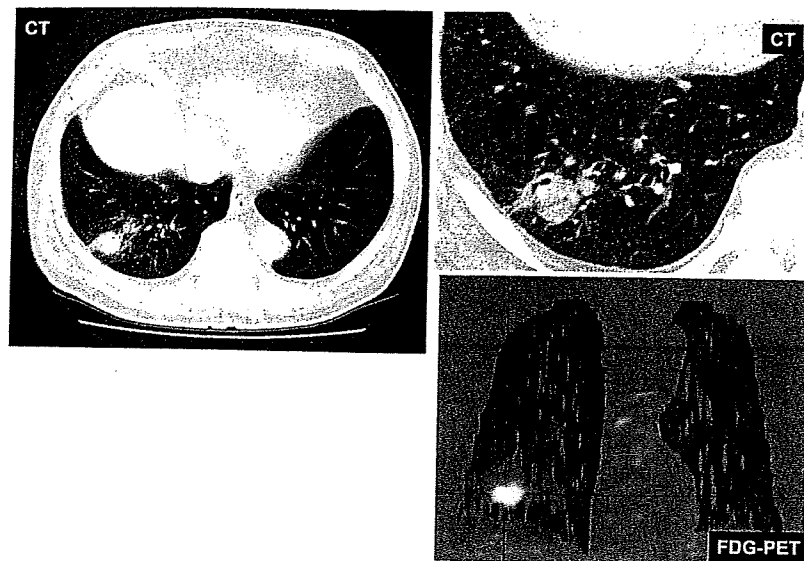


図1 胸部造影 CT (水平断) と FDG-PET (冠状断)。
右下肺野の胸膜下に径 3cm 大の腫瘤陰影を認めた (左上, 右上)。
同部には FDG の集積が見られた (右下)。

れた。

症 例：57 歳，日本人男性（滋賀県在住）。

主 訴：血痰（1 回／2 週間），咳。

現病歴：検診で高血圧，高尿酸血症を指摘されて近医受診し，胸部写真にて肺内腫瘤陰影を認め，精査加療目的にて当院を紹介受診した。

既往歴：12 年前，咳・痰を主訴に近医を初診。血液検査にて炎症反応と好酸球増加，胸水貯留（胸水中好酸球 90%）を認めた。好酸球性肺炎と診断されステロイド治療された（プレドニン 20mg/日 × 6 ヶ月）。10 年前，両側肺内に CT 上で多数の斑状陰影が出現した。以後症状は自然に減弱し，受診の必要を感じなかったとのことであった。

入院時検査所見と経過：血液検査では，炎症所見なく，好酸球は微増程度，腫瘍マーカーは陰性であった。その他特記すべき異常所見は認めなかった。

胸部 CT で，右肺下葉 S9 の胸膜直下に径 3cm 大の結節性陰影を認めた。周囲にも径 0.5cm 大までの小結節性陰影を複数個認めた。胸水貯留は認めなかった。PET で結節性陰影に一致して FDG の強い集積を認めたため，悪性病変の可能性が否定できず肺部分切除術が施行された（図 1）。

病理所見：肺切除検体（4 × 2 × 2cm）には，虫

体を取り囲む膿瘍・肉芽組織からなる主結節と，虫卵および中心壊死を伴った肉芽腫を複数個認めた。腫瘍性病変や悪性所見は認めず，肺寄生虫感染症による膿瘍・肉芽腫形成と病理診断した（図 2）。

寄生虫の虫種同定について

患者血清を用いた抗寄生虫抗体スクリーニング検査の結果は，ウエステルマン肺吸虫が陽性，宮崎肺吸虫が強陽性であった。膿汁中の虫卵は 73 × 46 μm で，無蓋端部に肥厚はなかった。組織切片内の虫体，膿汁内虫卵を出発材料に用い，DNA 抽出，PCR によるリボソーム DNA・ITS2 領域の増幅，制限酵素による切断パターンの解析，塩基配列解読・解析を行った⁶⁾。

PCR 産物の制限酵素による切断パターンは宮崎肺吸虫のパターンを示し，塩基配列解読の結果もこれに一致したことから，原因種を宮崎肺吸虫と同定した。

考 察

宮崎肺吸虫による人体寄生症例の報告は散見される¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾が，肺の病理組織標本上に虫体を証明した報告はないと思われる。本症例の組織標本上に検出された虫体は，卵巣が発達し，精巣内には活発な

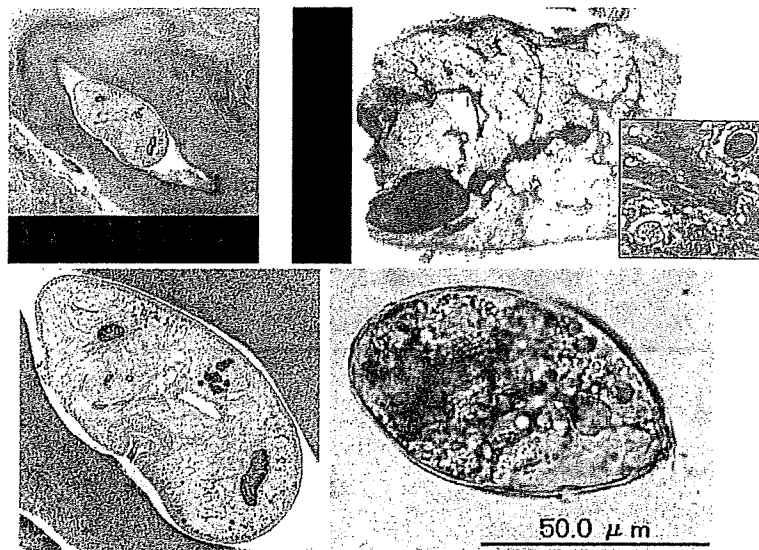


図2 HE組織所見(左上・左下:ルーペ像, 中上:ルーペ像, 右上:400倍)と膿汁内虫卵写真。虫嚢内に虫体を認めた(左上, 左下)。周囲の線維性結節内には多数の虫卵を認めた(中上, 右上)。膿汁中には, 約73×46ミクロンの虫卵を認めた。卵蓋が左側にあり, その反対側の無蓋端部には卵殻の肥厚は見られない(右下)。

精子形成像も見られたことから, 成虫と判定した。病理組織標本に観察された虫体の子宮内には虫卵を認めなかったが, 虫体周囲の膿汁中の虫卵は, 本成虫が産卵したものと考えられた。ヒト体内で虫体が成熟した症例では, ステロイドの投与や中間宿主のサワガニの頻回・多量摂食が指摘されている⁷⁾⁸⁾⁹⁾。本例でも, 過去にステロイド治療が施されていた。

本例では, 肺切除を行なった後, 宮崎肺吸虫の寄生を疑わせる所見が画像から消失した。このため内服治療は行っていない。今後, 血清抗体価の推移を調べ¹⁰⁾, 治癒が完了したか判断したいと考えている。

本患者は, 狩猟を趣味とし, 猪, 鹿, キジ, 鳩, 山鳥, 川魚, サワガニなどを頻りに摂食していた。また約20年前から, 中国, 韓国, タイ, 台湾, グアム, マカオへ毎年渡航していた。従って, 宮崎肺吸虫以外の寄生虫にも感染する危険性が高く, 寄生虫の感染予防について, 啓発の必要性が痛感された。

文 献

- 1) 宮崎一郎, 他 (1988): 肺吸虫症 図説人畜共通寄生虫症. 福岡九州大学出版会, p277-361.
- 2) 横川宗雄 (1984): 肺吸虫症研究の歩み. 千葉医学,

60, 279-287.

- 3) 西田 弘 (1989): 日本の肺吸虫症, とくにその種類と症状. 最新医学, 44 (4), 843-850.
- 4) 松峯宏人 (1985): 左右交互に繰り返す胸痛にて発症し両側胸膜病変を呈した宮崎肺吸虫症の1例. 本邦82報告例の臨床的検討. 日内会誌, 74, 597-605.
- 5) 日比谷一郎 (1984): 自然気胸, 胸水貯留を伴った宮崎肺吸虫症の4例と本邦69報告例についての検討. 日胸, 43, 289-293.
- 6) 杉山 広, 他 (2003): 開腹術により腹腔から虫体が検出され塩基配列で種同定された宮崎肺吸虫症の1例. Clin Parasitol, 14, 57-60.
- 7) 今井純生, 他 (1987): 肺内に虫嚢を形成し糞便喀痰中に虫卵を証明した宮崎肺吸虫症の1例. 日内会誌, 76, 1881-1882.
- 8) 小嶋 徹, 他 (1999): 多彩な胸部陰影を呈した宮崎肺吸虫症の1例. 日呼吸会誌, 37, 710-714.
- 9) 斉藤若菜, 他 (1999): 空洞性肺病変を形成した宮崎肺吸虫症の1例. Clin Parasitol, 10, 121-123.
- 10) 片桐佐和子, 他 (2002): 移動性浸潤影にて発症し, ELISA法が診断治療に有用であった宮崎肺吸虫症の1例. 日呼吸会誌, 40, 225-229.

アニサキスの分類学的解析： 人への感染源の特定に向けたサバ由来虫体の検索

梅原 梓里¹、荒木 潤²、川上 泰³、内田 明彦³、杉山 広¹

¹国立感染症研究所寄生動物部、²目黒寄生虫館、³麻布大学環境保健学部医動物学教室

Further analysis of Japanese *Anisakis* worms isolated from scombroid fish (mackerel) at the sibling species level

Azusa Umehara¹, Jun Araki², Yasushi Kawakami³, Akihiko Uchida³, Hiromu Sugiyama¹

¹Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases

²Meguro Parasitological Museum

³Laboratory of Parasitology, School of Life and Environmental Science, Azabu University

我が国のアニサキス症は、*Anisakis simplex*を主要病原虫として発生すると考えられてきた。本虫の分類に関しては、これを3種類の同胞種、すなわち*A. pegreffii*、*A. simplex sensu stricto* (s. str.)、*A. simplex* Cに分けるという考えが提出されている (Mattiucci and Nascetti, 2006)。

我々は、日本近海に生息する魚類から得た*A. simplex*について、この新しい分類法による同胞種の解析を試みた。その結果、南日本 (九州・日本海産のサバ) では*A. pegreffii*が、北日本 (北海道・太平洋産のサバ等) では*A. simplex* s. str.が優占することを明らかにした (Umehara *et al.*, 2006)。一方、人体症例由来の虫体 (九州と北海道の85名から得た計100虫体) は、*A. pegreffii*を1虫体認めた以外、総て*A. simplex* s. str.と同定された (Umehara *et al.*, 2007)。すなわち九州では、魚に由来する優占種と患者に由来する優占種とが異なるとの結果を得たが、その理由は説明できていない (Umehara *et al.*, 2008)。

人への主たるアニサキスの感染源は、九州ではやはりサバとの成績がある (飯野ら, 1992)。そこで今回は更に、九州の市場で日本海産と同様によく流通する東シナ海産のサバを検索対象に選び、アニサキス虫体の検出と同胞種レベルでの同定を試みた。また、千葉県産および新潟県産のサバも対象に、同様の検討を行った。

【材料と方法】

福岡県 (東シナ海) で水揚げされたサバ8尾、千葉県 (太平洋) のサバ6尾、新潟県 (日本海) のサバ16尾から、1,718匹、76匹、32匹のアニサキス虫体を検出した。このうち福岡では152匹を、残りの二県では検出した全

虫体を対象とし、1匹ずつDNAを抽出して、同胞種レベルでの分類学的解析を行った。

【結 果】

福岡県 (東シナ海) の虫体152匹のうち、150匹は*A. pegreffii*と同定され、*A. simplex* s. str.はわずか1匹であった。残り1匹は本邦で魚類から初めて検出された*A. typica*と同定された。千葉県の虫体76匹は、67匹が*A. simplex* s. str.、9匹が*A. pegreffii*と同定された。新潟県の虫体32匹は、16匹が*A. simplex* s. str.、16匹が*A. pegreffii*と同定された。

【考 察】

九州のアニサキス症例は、地元産ではない魚介類 (サバ) を主な原因として発生することが示唆された。今後はサバ以外の魚種について、特に九州の市場で流通するものを対象に、同様の検討を進める予定である。

Key words : *A. simplex*, *A. pegreffii*, sibling species

引用文献

Umehara, A. *et al.* H. 2008. Molecular analysis of Japanese *Anisakis simplex* worms. *Southeast Asian J. Trop. Med. Public Health* 39 (Suppl.) : 26-31.

連絡責任者 : 杉山 広、国立感染症研究所寄生動物部、

〒162-8640 東京都新宿区戸山1-23-1、

E-mail : hsugi@nih.go.jp

Correspondence : H. sugiyama,

Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Toyama 1-23-1, Shinjuku-ku, Tokyo 162-8640

動物園飼育ミーアキャットにおける宮崎肺吸虫症の1例

多々良成紀¹⁾, 杉山 広²⁾, 熊沢秀雄³⁾, 斑目広郎⁴⁾

1) 高知県立のいち動物公園 〒781-5233 高知県香南市野市町大谷 738

2) 国立感染症研究所寄生動物部 〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

3) 高知大学医学部寄生虫学教室 〒783-8505 高知県南国市岡豊町小蓮

4) 麻布大学附属動物病院小動物臨床研究室 〒229-8501 神奈川県相模原市淵野辺 1-17-71

(2009年9月24日受領, 2010年2月24日採択)

First Record of *Paragonimus miyazakii* Infection in Captive Meerkat (*Suricata suricatta*) in JapanSeiki TATARA¹⁾, Hiromu SUGIYAMA²⁾, Hideo KUMAZAWA³⁾ and Hiroo MADARAME⁴⁾

1) Nitchi Zoological Park of Kochi Prefecture, Konan, Kochi 781-5233, Japan

2) Department of Parasitology, National Institute of Infectious Diseases, Shinjuku, Tokyo 162-8640, Japan

3) Department of Parasitology, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi 783-8505, Japan

4) Laboratory of Small Animal Clinics, Veterinary Teaching Hospital, Azabu University, 4-17-71, Fuchinobe, Sagami-hara, Kanagawa 229-8501, Japan

ABSTRACT. Two adult flukes were found in a cyst in the left lung of a captive meerkat (suricate, *Suricata suricatta*) in a zoo in Kochi Prefecture, Japan. They have been identified as *Paragonimus miyazakii* Kamo, Nishida, Hatsushika et Tomimura, 1961, on the basis of morphological features of the adult flukes and those of the eggs in the feces, as well as a ribosomal DNA sequence. The suricate was possibly infected by ingesting wild Japanese freshwater crab (*Geothelphusa dehaani*) wandering into the place of breeding exhibition. This is the first confirmed case of *P. miyazakii* infection in a meerkat imported to a Japanese zoo. スパーズの調整を願います。

Key words : lung fluke, meerkat, *Suricata suricatta*, *Paragonimus miyazakii*, zoo animal

Jpn. J. Zoo. Wildl. Med. 15(1) : - = -, 2010

ミーアキャット (スリカータ, *Suricata suricatta*) はマンゲース科 (Herpestidae) に属し、アフリカ南部に生息する。通常、雑食性であるが、昆虫や小動物への嗜好性が高い。高知県立のいち動物公園で飼育・展示していたミーアキャットの1例が急死した。剖検にて、肺に肺吸虫の寄生が認められた。ミーアキャット以外のマンゲース科の動物における肺吸虫の寄生は既に報告されているが、ミーアキャットでの同寄生虫感染の報告はない [1]。まれな症例と考えられたので、以下にその概要を報告する。

高知県立のいち動物公園は、高知県中東部、香南市野市町の金剛山 (三宝山) 南西山麓に位置する。その山側に面したミーアキャットの飼育施設は、四方をガラスフェンス、擁壁、空堀で囲まれた開放型で、夜間は附属する獣舎に動物を収容していた。1996年に野生1群10頭を南アフリカより導入し、その後数回の繁殖と死亡・搬出などを経て、2007年6月9日時点

で全4頭を同居飼育中であった。

2007年6月9日、雌1例が活力低下を示して急死した。歯牙の摩耗度から比較的高齢と考えられたが、個体識別をしておらず当初導入個体が繁殖個体かは不明であった。

剖検では、肺は全葉赤色を帯びて剖面湿潤、左肺の後葉内側面に径約1cm大の嚢胞形成が認められ、嚢胞内から吸虫成体2隻が摘出された (図1)。虫嚢 (嚢胞) 周囲の肺実質には、多中心性暗赤色斑が認められた。左右腎臓には、皮質深部から髓質にかけて小豆~米粒大の黄白色の結節状病変が数個ずつ認められた。心臓では、左心大動脈弁に有症状心内膜炎を疑う病変が観察された。

肺および腎臓から常法に従い病理組織標本を作製し、病理組織学的に検索した。肺に認められた虫嚢は、線維性の厚い壁と内部の腔状構造からなり、内腔には虫卵を容れた好酸球形膿成分の貯留が認められた。肺実質では、多中心性出血病変に加え、

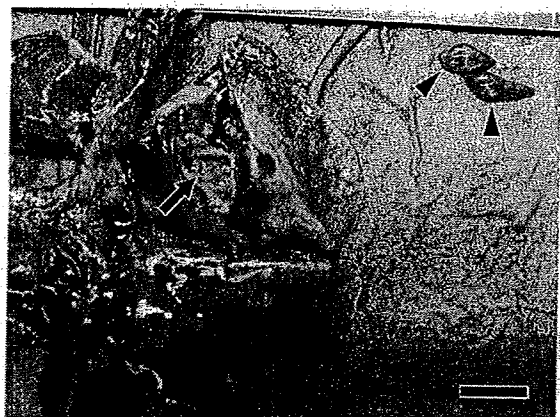


図1 左肺に形成された虫嚢(矢印)と虫嚢内に寄生していた2隻の肺吸虫成体(矢頭)
スケールバーは10mm。

複数の肺動脈と気管支動脈の腔内に、新鮮な血栓形成が観察された。特に肺動脈に認められた血栓は、塞栓症として死因に関連する病変と推定された。しかし、血栓の由来を特定することはできなかった。腎臓の結節状病変は、腎盂(腎盤)に連絡する壊死物質を含む嚢胞と判明し、その辺縁部には石灰沈着巣が認められたが、細胞反応は乏しく、肺吸虫感染との明らかな関連はみられなかった。

虫嚢から得た2隻の吸虫成体は、大きさが各々10×4.5mm, 8×4.5mmで、いずれも腹吸盤が口吸盤より大きかった。連続薄切標本を作製して観察したところ、卵巣は基幹

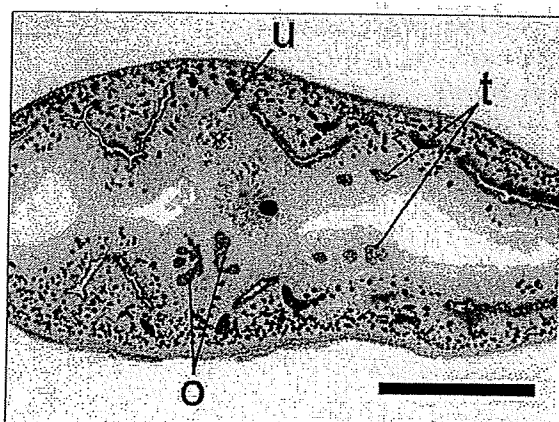


図2 肺吸虫成体の薄切標本(虫体中央部, HE染色)
o: 卵巣, t: 精巣, u: 子宮および内部の虫卵。[スケールバーは2mm。改行]

図1, 図3と特異な同じ位置に

部から分岐して複雑に分葉し、精巣では分葉構造が明らかで、内腔には精子形成過程の各種細胞(精祖細胞・精子細胞・精子)が認められた(図2)。虫嚢内と直腸便からは均一で薄い卵殻壁を有する吸虫卵(長径73~79 μ m)が検出され(図3)、成虫体の形態学的特徴と併せて宮崎肺吸虫(*Paragonimus miyazakii*)と同定された。また、成虫体の薄切標本からDNAを抽出し、リボソームDNAのITS2領域をPCR増幅して塩基配列を解読したところ、既報の宮崎肺吸虫の配列(国際塩基配列データベースのアクセッション番号: U96912)と一致した。

高知県立のいち動物公園では、降雨量の多い時期に山麓から雨水が公園内まで流れ込むことがある。そうした際、山側に面したミーアキャットの飼育施設周辺では、宮崎肺吸虫の第2中間宿主であるサワガニ(*Geothelphusa dehaani*)が散見される。また、施設構造上、サワガニが擁壁を乗り越えるなどしてミーアキャットの飼育施設内に侵入することは可能と思われる。高知県は宮崎肺吸虫の分布域として知られており[2]、本動物公園の位置する香南市野市町内で採取されたサワガニからも宮崎肺吸虫のメタセルカリアが検出されている[3]。また最近、本動物公園に近隣する地域において、複数のネコの宮崎肺吸虫感染例が報告されている[4]。宮崎肺吸虫は日本の固有種であることから、今回の症例は、本動物公園で飼育中に宮崎肺吸虫陽性のサワガニを摂食したことにより感染したものと推定された。なお、同居の3頭については、本症例の発生直後に糞便検査(直接法と時計皿法)を実施したが、肺吸虫卵は検出されなかった。このうちの1例は、本症例発生の1か月後に死亡したが、剖検でも肺吸虫の寄生は認められなかった。残る2例は、発生の6か月後に糞便検査で肺吸虫卵陰性を再度確認し、その4か月後に本園から搬出された。

宮崎肺吸虫は、国内の野生動物では、イタチ類(*Mustela*

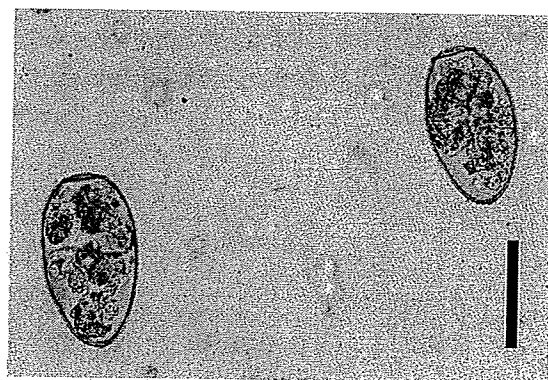


図3 直腸便から検出された吸虫卵(生鮮標本)
スケールバーは50 μ m。



sp., 引用文献中では *M. sibirica* と記載) [5], テン (*Martes melampus*) [6], アナグマ (*Meles meles*) [7], タヌキ (*Nyctereutes procyonoides*) [8], イノシシ (*Sus scrofa leucomystax*) [9], また, 家畜では, イヌ (*Canis familiaris*) [10], ネコ (*Felis catus*) [11] を終宿主とすることが知られている。しかし, 動物園動物, 特に今回のミーアキャットをはじめとした外国産の動物種での寄生報告は知る限りにおいて見当たらない。一方, 国内の動物園動物における肺吸虫類の寄生例としては, すでにトラ (*Panthera tigris*) で肺吸虫 (*Paragonimus* sp. 種は未同定) [12], ジャワヒョウ (*Panthera pardus melas*) でウエステルマン肺吸虫 (*Paragonimus westermani*) [13], ウンビョウ (*Neofelis nebulosa*) で大平肺吸虫 (*Paragonimus ohirai*) [14] の寄生がそれぞれ報告されている。ジャワヒョウの論文で考察されているように [13], 動物園の飼育環境や給餌内容などから考えて, いずれも入園前にすでに感染していたものと推察される。今回の事例は, 飼育下の外国産輸入動物種が肺吸虫に自然感染した点で従来の報告とは異なる。

我が国における宮崎肺吸虫の地理的分布はきわめて広い [15]。また宮崎肺吸虫の宿主域も上述のように広く, それに今回のミーアキャットにおける寄生例の発生を考え併せると, 飼育施設へのサワガニ侵入の可能性と飼育動物の食性という条件がそろえば, ミーアキャット以外の外国産動物種にも本寄生虫が感染する可能性がある。今後, 動物園などの動物飼育施設においては, 本症の感染予防について十分に留意する必要がある。

要 約

高知県の動物園で飼育されていたミーアキャット (*Suricata suricatta*) の 1 例について, 左肺の虫嚢から 2 隻の吸虫が認められ, その虫体と卵の形態学的特徴および DNA 分析から宮崎肺吸虫 (*Paragonimus miyazakii*) と同定された。ミーアキャットの飼育区画に侵入した野生サワガニ (*Geothelphusa dehaani*) を摂食し感染したと考えられた。本例は, 輸入動物であるミーアキャットが動物園飼育下で宮崎肺吸虫に自然感染した初めて

の報告である。

キーワード: ミーアキャット, *Suricata suricatta*, 宮崎肺吸虫, 動物園動物

引用文献

- Blair D, Xu ZB, Agatsuma T. 1999. Paragonimiasis and the genus *Paragonimus*. *Adv Parasitol* 42: 113-222.
- 橋口義久, 大倉俊彦, 平岡英一, 1974. 四国における肺吸虫の分布 (1) 南四国の宮崎肺吸虫. *寄生虫誌* 23: 181-186.
- 坪井敬文, 鳥居本美, 行天淳一, 酒井雅博, 西田 弘, 1992. 高知県産サワガニにおける宮崎肺吸虫の寄生状況. *寄生虫誌* 41: 408-413.
- 杉村博幸, 前野 望, 吾妻美子, 吾妻 健. 2007. 高知県物部川水系における肺吸虫感染の発症例. 平成 19 年度日本獣医師会学会年次大会抄録 (香川): 232.
- 宮崎一郎. 1954. 佐賀県のイタチからえた肺吸虫 (おそらくケリコト肺吸虫) (会). *寄生虫誌* 3: 28-29.
- 西田 弘, 初鹿了. 1960. 中国地方のイタチとテンからえた肺吸虫について (会). *寄生虫誌* 9: 370.
- 波部重久, 芦沢広三, 斉藤哲郎. 1977. アナグマ, イヌおよびブタから得た肺吸虫の種類. *寄生虫誌* 26: 63-66.
- Hirai K, Nishida H, Okada N. 1978. On the natural final host of *Paragonimus miyazakii* Kamo, Nishida, Hatsushika et Tomimura, 1961 in Ehime prefecture, Japan. *J Jpn Assoc Rural Med* 27: 800-805.
- 浜島房則, 宮崎一郎. 1968. ニホンイノシシとコオライイタチから得た肺吸虫の種類. *寄生虫誌* 17: 229-234.
- 寺内 淳, 岡武哲, 宮村 保, 清水亮祐. 1961. *Paragonimus miyazakii* (宮崎肺吸虫) の犬における一自然感染例. *寄生虫誌* 10: 386-397.
- 波部重久, 浜島房則. 1971. 熊本県天草のネコにおけるウエステルマン肺吸虫と宮崎肺吸虫の混合感染. *寄生虫誌* 20: 462-468.
- 中川志郎, 増井光子, 田辺興記, 田代和治. 1967. 動物園に於ける内寄生虫症. I 哺乳動物の感染状況. *動水誌* 9: 112-114.
- 志保田進, 富島登, 宮村 保, 川崎嘉代司. 1967. クロヒョウ *Panthera pardus melas* からえた肺吸虫について. *動水誌* 9: 108-111.
- 横山晴美, 渡辺正, 中村 彰, 大島正昭, 鹿島英佑, 柳井徳磨, 榎木和昭. 1995. ウンビョウから得られた肺吸虫について. 第 43 回動物園技術者研究会抄録 (東京).
- 西田 弘, 柴原壽行. 1999. 肺吸虫症の疫学. 日本における寄生虫学の研究 7 (大鶴正清 監修), pp.189-203. 日黒寄生虫館, 東京.

弘
宮 (わかんむりに訂正)
イタリック体
訂正

