

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（食品の安全確保推進研究事業）

生鮮食品を共通食とする原因不明食中毒の発症機構の解明

研究代表者 大西 貴弘（国立医薬品食品衛生研究所 衛生微生物部）

#### 分担研究報告書

*Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定に関する研究

研究分担者 佐藤 宏（山口大学 農学部）

ヒラメに寄生する *Kudoa septempunctata* が喫食者に一過性の嘔吐や下痢を主症状とした食中毒を引き起こすことが明らかとなった。このことから、食中毒事例の原因食分析に際した生鮮魚類にみられる *Kudoa* 属粘液胞子虫の種同定、あるいは、市販魚における粘液胞子虫感染状況調査における種同定が正確に行われなければならない。粘液胞子虫の種分類あるいはその認識は、最近の分子生物学的手法の導入によって大きく展開し、かつての宿主特異性と形態学的特徴に依拠した種分類から、分子系統進化学的視点を重視した分類に代わってきた。しかしながら、この新しい種分類は、まだ形成過程にあつて、原因病原体の特定にあたり、どこまでの生物学特徴の確認で種同定に足りるのか、信頼性をもつ種同定に求められる基準が未確定であるともいえる。本研究では、市販魚から広く *Kudoa* 属粘液胞子虫感染魚を集め、日本で喫食される生鮮魚類における *Kudoa* 種および類縁種について生物学特徴を収集し、その種同定に当たっての課題を検討した。また、食中毒事例の原因食とされるマグロから分離した *Kudoa* 種について、既知で宿主に筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* との異同について検討した。現在の粘液胞子虫分類において頻用される 18S ribosomal RNA gene (rDNA)、あるいは最近になって情報の集まりつつ 28S rDNA の塩基配列だけでの種同定がもつ限界を明らかにし、今後の利用が見込まれる internal transcribed spacer (ITS) 領域についての予備的データを収集した。食用となる市販魚の体側筋にシストを形成して寄生する *Kudoa thunni*（ビンチョウマグロ）、*Kudoa trachuri*（アジ）、*Kudoa* sp.（サバ）について新種として特徴づけを行った。また、食用魚の内臓に *Kudoa* 属粘液胞子虫との肉眼的鑑別が難しい白色シストを形成する *Henneguya ogawai*（クロダイ）、*Henneguya yokoyamai*（クロダイ）、*Myxobolus machidai*（イシガキダイ）を新種として記録した。

## A. 研究目的

粘液胞子虫類 (Myxozoa 門) は淡水、汽水、海水棲魚類の多細胞性寄生虫として知られ、基礎生物学分野や水産学分野では昔から注目され重要視される生物群の1つである。一方、公衆衛生領域ではほとんど知られることのない生物群であった。2011年4月下旬に、厚生労働省薬事・食品衛生審議会食品衛生食中毒・乳肉合同部会において、ヒラメ寄生の粘液胞子虫 (*Kudoa septempunctata*)<sup>38)</sup> が、最近の「生食用生鮮食品を共通食とする病因物質不明有症事例」の原因となっている可能性が高いと報告され、その因果関係究明に、食品の安全性確保にあたる感染症学や公衆衛生学の専門家、医療関係者の努力が注がれている<sup>33,41)</sup>。粘液胞子虫類には、2綱(軟胞子虫綱および粘液胞子虫綱)、約60属2,200余種が分類され、市場流通している魚類に感染している種も少なくはない。その形態学的特徴の確認や種名特定に関する研究は、現在、大きく展開し、従来とは違った分子系統分類学的視点からの種分類が行われつつある。このような状況にある中で、食中毒事例を扱う現場で正確で信頼性をもつ種同定が行われることは、その原因究明上の意義のみにとどまらず、未確認の病原体についてもその可能性を検討する貴重な情報となる。

本研究では、現在の *Kudoa* 属を中心とした粘液胞子虫類の分類の現状を確認するとともに、国内で食用に市販される海産魚における *Kudoa* 種を中心とした粘液胞子虫の

感染状況を調査し、それらについて生物学的特徴を確認し種同定を行った。また、食中毒の原因が強く疑われるマグロ寄生の *Kudoa* 種について検討を行い、既知の *Kudoa neothunni* との異同について検討して今後の課題について明らかにした。

## B. *Kudoa* 属粘液胞子虫の分類学的現状

二宿主性生活環の発見(1984年)<sup>51)</sup>と軟胞子虫類の発見(2000年)<sup>11)</sup>以降の新たな分類体系では、ミクソゾア門は軟胞子虫綱(Class Malacosporea)と粘液胞子虫綱(Myxosporea)に大別され、前者には軟殻目(Order Malacovalvulida)1つが、後者には双殻目(Order Bivalvulida)と多殻目(Order Multivalvulida)の2つが分類される。Lom & Dyková (2006)<sup>35)</sup>の示した分類体系では、軟殻目に2属、双殻目に52属、多殻目に8属、計62属約2,200種が既知であるとされた。下述のように、*Kudoa* 属のシノニムとなった3属があることから、多殻目については、現在、5属が分類され、*Kudoa* 属のみの Kudoidae 科、3属の Trilosporidae 科と1属の Spinavaculidae 科が分類されている。

Whipps et al. (2003)<sup>49)</sup>は殻片/極囊数13ヶの粘液胞子虫をオーストラリア沖で得たヨコシマサワラ (*Scomberomorus commerson*) から検出し、その18S rDNA シークエンスを検討したところ、*Kudoa* 属のクレードに入ること、次いで、*Pentacapsula* 属(殻片/極囊数5ヶ)や *Hexacapsula* 属(殻片

／極囊数 6 ヶ)についても同様であることを確認した<sup>50)</sup>。Lom & Dyková (2006)<sup>35)</sup>は、従来、殻片／極囊数を形態分類体系の最も重要な基盤としてきたことを考慮し、*Pentacapsula* 属、*Hexacapsula* 属、*Septemcapsula* 属(殻片／極囊数 7 ヶ)を *Kudoa* 属のシノニムとすることに躊躇した。しかしながら、今日、多くの研究者はこれら 3 属を *Kudoa* 属のジュニアシノニムとして理解している。今日、食中毒様症状を引き起こす原因とされるヒラメ寄生のクドア粘液胞子虫も殻片／極囊数は 7 もしくは 6 であり<sup>38)</sup>、形態分類体系の時代であれば、その扱いは難しかったことだろう。同一種であっても、殻片／極囊数が必ずしも一定しないことは、*K. crumena*<sup>29)</sup>、*K. iwatai*<sup>14, 18)</sup>、*K. yasunagai-like sp.*<sup>16)</sup>、*K. neurophila*<sup>23)</sup>、*K. chaetodoni*<sup>9)</sup>、*K. lethrini*<sup>9)</sup> などでも報告されている。このような状況からも、殻片／極囊数は種診断の分かりやすい指標とはなるものの、*Kudoa* 属については変異を考慮する必要性がある。

Lom & Dyková (2006)<sup>35)</sup>は、*Kudoa* 属の記載種を 63 種とした。Moran et al. (1999)<sup>39)</sup>は、*Kudoa funduli* (Hahn, 1915) あるいは本属の模式種となっている *K. clupeidae* (Harh, 1917) 以降 44 種が本属粘液胞子虫として記載されたとしている。これを基にして、その後の新種記載を追うと、2012 年 3 月末までに確認できた種数は 84 前後となった(表 1)。2003 年 5 新種、2004 年 6 新種、2005 年 3 新種、2006 年 2 新種、2007 年 3

新種、2008 年と 2009 年は各 1 新種、2010 年 7 新種、2011 年 4 新種と、18S rDNA 塩基解析の本格導入後は新種記載が増えている。このことは、確認できている種が一部に留まり、現在のところ、分子系統進化学的種同定には限度があることをも意味している。更に網羅的な種の収集と 18S rDNA 情報の集積が必要である。また、形態分類体系と 18S rDNA を基盤とした分子系統分類体系との間の齟齬も明らかになってきている<sup>5, 19)</sup>。幸いにも *Kudoa* 属では大きな齟齬はないが、例えば *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属は分子系統樹上で両属が著しく錯綜し、分子系統樹と合致する形態学的特徴や生物学的特徴も見出せていない。なお、18S rDNA 情報と形態学や他の生物学的特徴との間での相関性が崩れる *Kudoa* 粘液胞子虫について、より解像度の高い塩基配列情報として、最近では 28S rDNA 情報についても検討する必要性が強調されている。

### C. 国内市販魚での *Kudoa* 属粘液胞子虫の感染状況とその種同定

#### 1. 材料と方法

##### (1) 市販魚からの *Kudoa* 感染検体の収集

山口市内の生鮮魚販売店舗の店頭に陳列される切り身や刺身について、肉眼的に白色シストを検出したものを購入し、寄生虫学的検査に供した。この検査は 2008 年 3 月以降、本研究室で継続して実施している。その結果、スズキ (*Lateolabrax japonicus*) 3 尾、クロダイ (*Acanthopagrus schlegelii*) 2 尾、マアジ (*Trachurus*

*japonicus*)7尾、マサバ(*Scomber japonicus*)1尾、ボラ(*Mugil cephalus*)1尾、ビンチョウマグロ(*Thunnus alalunga*)1尾、キハダマグロ(*Thunnus albacares*)に *Kudoa* 粘液胞子虫の感染を確認した(表2)。また、調理店で刺身を提供する際に白色シストが内臓に見られたイシガキダイ(*Oplegnathus punctatus*)1尾と釣り人から提供を受けたクロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)2尾についても検討を行った(表2)。

感染魚についてシストの計測を行い、回収したシストは Dulbecco(-) PBS (pH 7.2) 中で剣先ピンセットを用いてシスト壁を破り、胞子を浮遊させた。微分干渉光学顕微鏡下400倍で胞子の形態観察を行うとともに、撮影した写真を Adobe Photoshop ver. 11.0 (Adobe Systems, San Jose, California, USA) にデジタルデータとして取り込んだ。この画像データについて高倍率下で、Lom and Arthur (1989)<sup>34)</sup>に従って胞子の計測に供した。また、一部のシストは冷凍しDNA抽出のために保存するとともに、10%中性緩衝ホルマリン液にも保存した。

## (2) 組織学的検査

検出したシストの一部は筋組織とともに10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、定法に従ってヘマトキシリン-エオジン(HE)染色組織標本作製した。

## (3) 走査電子顕微鏡観察

ホルマリン固定した胞子を0.2Mリン酸バッファー(PB; Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>-buffered saline, pH7.8)で3回洗い、2.5%

glutaraldehyde in PBで1晩再固定した。これをPBで3回洗浄し、1% (w/v) osmium tetroxide in PBで1時間にわたり後固定した。PBで3回洗浄し、ガラス片(約5x5mm)とともに、濾紙(No. 5B; ADVANTEC, Otowa, Tokyo, Japan)でつくった小さな袋に入れ密封した。アルコール系列を使い脱水し、常温下の *t*-butyl-alcohol に浸漬した。これを4°C下で固形化し、濾紙袋ごと、凍結乾燥機(model JFD-300; JEOL, Akishima, Tokyo, Japan)で乾燥させた。その後、袋から胞子の付着した小ガラス片を取り出し、標本台の上に両面テープで固着させた。金パラジウムコーティングは200 Å (model JFC-1500; JEOL)で行い、15kV下で走査電子顕微鏡(model JSM-6100; JEOL)での観察を実施した。

## (4) 寄生虫DNA抽出、遺伝子増幅とシーケンス

粘液胞子虫シストからのDNA抽出は添付された指示書に従い Illustra™ tissue & cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK)を用いて行った。粘液胞子虫 rDNA 断片の増幅反応は表3に示すプライマーペアを用いて20μl容量で行った。Polymelase chain reaction (PCR)のポリメラーゼとしては Blend Taq-Plus- (TOYOBO, Dojima Hama, Osaka, Japan)を用い、94°C 3分間の酵素活性化後、94°C 45秒、64°Cもしくは62°C 1分間(表3参照)、72°C 1分のサイクルを40回、最後に、72°Cで7分間の反応を行っ

た。PCR 増幅産物は High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いて精製し、表 3 に示したプライマーを用いてダイレクトシーケンスを行った。ダイレクトシーケンスがうまくいかない PCR 産物については プラズミッドペクター pTA2 (TARget Clone™; TOYOBO) に組み込み、*Escherichia coli* JM109 (TOYOBO) を用いてクローニングを行った。クローニング大腸菌を増殖させ、NucleoSpin® Plasmid kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Germany) を用いてプラズミッド DNA を精製し、ユニバーサル M13 forward/reverse プライマーを用いてシーケンスした。個々のサンプル毎に独立した少なくとも 3 つのクローンについて塩基配列を検討した。

#### (5) 分子系統樹解析

今回の研究を通して得られた rDNA 塩基配列と DDBJ/EMBL/GenBank に登録された *Kudoa* 属もしくは類縁の粘液胞子虫の rDNA 塩基配列について、CLUSTAL W multiple alignment program<sup>45)</sup> を用いてアライメントした。最終的に目視にて修正し、いずれかの検討塩基配列に塩基挿入欠失がある塩基部位を除き、系統樹解析に用いるデータとした<sup>43)</sup>。最尤法 (ML [maximum likelihood]) 解析には、‘phylogeny. fr’ ウェブサイト (<http://www.phylogeny.fr/>) で公開されている PhyML 法<sup>13, 24)</sup> を用いた。信頼性検証には、aLRT (approximate likelihood-ratio test) 法<sup>3)</sup> を用いた。*Kudoa* 属

粘液胞子虫を中心とした ML 分子系統解析には、*Unicapsula* sp. (Trilosporidae, Multivalvulida; DDBJ/EMBL/GenBank accession nos. AY302725 and AY302727) を外群として用いた。

## 2. 結果

### (1) 肉眼観察

スズキならびにクロダイの体側筋に観察されたクドア粘液胞子虫シストは乳白色で球状もしくは卵円形であった (図 1A, B)。スズキ 1 尾については、体側筋だけでなく頭部も観察可能であったが、眼球外側部と体側筋組織を走る神経束にも粘液胞子虫のシストが観察された。マアジに形成されたクドア粘液胞子虫シストは白色で卵円形を呈していた (図 1C)。ビンチョウマグロの体側筋に観察されたクドア粘液胞子虫シストは白色で球状～卵円形であった (図 1D)。それらシストの計測値を表 2 に示す。

### (2) 光学ならびに電子顕微鏡所見

胞子を詰めたシスト構造物は、組織学的には線維性により周囲の筋組織と境界されていた (図 2)。スズキおよびクロダイから分離した胞子は 4 々の同一サイズの殻片をもち、頂面像では丸形もしくは丸味をもった四角形を呈した (図 3, 4)。また、側面像では、巾着状の形状を呈し、頂上部には 4 つの突起が認められた。縫合線は明確であった。殻片/極囊数が 5 から 8 つの胞子も稀に観察された。胞子の計測値は、その宿主個体に関わらず均一で、*K. iwatai* の計測値とよく一致した (表 4)。

マアジならびにビンチョウマグロから分離した胞子は同一サイズの4つの殻片をもち、頂面像では四角形に近いかたちを呈した(図3, 4)。側面像は楕円形で、頂上部の突起は光学顕微鏡では確認が難しかった。マアジあるいはビンチョウマグロから収集した胞子は計測値では明らかに異なっていた(表5)。

上記の3つの異なる形態学的特徴をもつ胞子の走査電子顕微鏡観察を実施したところ、スズキやクロダイに寄生する *K. iwatai* の頂上部突起は指状で長く、マアジからの胞子では頂上部の突起は低い構造物であった(図5)。ビンチョウマグロからの胞子では頂上部突起は小さく、角状であった。

クロダイの消化管(食道と腸管)壁に *Henneguya* 属粘液胞子虫によるシストが見られた(表2)。また、クロダイの胆管壁にも *Henneguya* 属粘液胞子虫によるシストが見られた(表2)。シストから分離した胞子は図6と図8に示すように、典型的な双殻目の形態を持ち、また、2本に分岐する尾突起を有していた。イシガキダイの食道壁には *Myxobolus* 属粘液胞子虫によるシストが見られ(表2)、シストから分離した胞子は図7と図8に示すように縫合面からは正円形、側面からはラクビーボール様であった。

今回収集した粘液胞子虫標本と組織標本は国立科学博物館に寄託した(登録番号 NSMT-Pr262-272; Pr322-335)。

### (3) 分子系統樹解析

今回集めたスズキ3尾ならびにクロダイ2尾から収集した *K. iwatai* 分離株すべてと DDBJ/EMBL/GenBank に登録された日本産マダイ由来の *K. iwatai* (J isolate) の 18S rDNA 塩基配列は完全に一致した(表6)。紅海産 *Sparus aurata* および *Siganus rivulatus* に寄生していた *K. iwatai* と日本産の同種では 1,560 塩基対のうち3箇所塩基置換がみられた。また、台湾南部産の養殖魚 *Lutjanus erythropterus* から報告された *K. lutjanus* Wang et al., 2005 と日本産あるいは紅海産 *K. iwatai* の 18S rDNA の間では、比較可能な 828 塩基対のうちそれぞれについて3箇所に塩基置換がみられた(表6)。

長崎県沖で漁獲されたマアジからの *Kudoa trachuri* n. sp. と太平洋産ビンチョウマグロからの *Kudoa thunni* n. sp. は、DDBJ/EMBL/GenBank に '*K. crumena*' として登録された 18S rDNA 塩基配列 (accession nos. AF378347 & FJ417057) と最も同一性が高かった(図9, 10)。特に *K. thunni* n. sp. は、比較可能な 18S rDNA の 1,630 塩基対では 22 箇所、28S rDNA の 766 塩基対では 4 箇所に変異がみられた。種内変異がどのように ML 分子系統樹に反映されているのかが分かるように、複数の分離株について塩基配列が登録されている *K. thyrsites*、*K. whippsi*、*K. gunterae*、*K. amamiensis* 等については詳しく図9と図10にデータを入れ込んだ。

クロダイからの2種の *Henneguya* 属粘液

胞子虫とイシガキダイからの *Myxobolus* 属 粘液胞子虫 1 種についても 18S rDNA 塩基配列を検討し、また、分子系統樹解析を行った(図 11)。DDBJ/EMBL/GenBank に登録された配列に一致するものはなく、また、形態学的な特徴が既知種と合致しないことから、これらは新種と考えられた。

#### (4) 新種記載

##### *Kudoa trachuri* n. sp.

(Myxosporea: Multivalvulida)

胞子は頂面像で亜方形、4 つの殻片と極囊をもち、すべては同一サイズである。殻片に附属構造はない。極囊は水滴状で、胞子の頂上点近傍に位置する。頂面像では、極囊は胞子径の 50%以上を占める。側面像では、胞子は楕円形で、頂上面がやや尖り、底面は円形である。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。胞子(n=10)の計測値平均(括弧内は範囲)は以下の通りである。胞子幅 7.9 (7.0-8.5)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 5.8 (5.3-6.2)  $\mu\text{m}$ ; 胞子長 6.1 (5.5-6.9)  $\mu\text{m}$ ; 極囊長 2.9 (2.6-3.5)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 2.0 (1.6-2.2)  $\mu\text{m}$ 。

走査電子顕微鏡でも、胞子を構成する 4 つの殻片は同一サイズであること、頂上部に 4 つの低い突出があること、縫合線は観察可能であるが、明瞭ではないことが確認される。

18S rDNA(1,776-bp 長)と 28S rDNA(758-bp 長)は DDBJ/EMBL/GenBank (登録番号 AB553299・AB553305)に登録済み。

##### *Kudoa thunni* n. sp.

(Myxosporea: Multivalvulida)

胞子は頂面像で亜方形、4 つの殻片と極囊をもち、すべては同一サイズである。殻片に附属構造はない。極囊は水滴状で、胞子の頂上点近傍に位置する。頂面像では、極囊は胞子径の約 20-40%を占める。側面像では、胞子は楕円形である。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。胞子(n=10)の計測値平均(括弧内は範囲)は以下の通りである。胞子幅 9.5 (9.2-9.9)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 8.3 (7.7-9.0)  $\mu\text{m}$ ; 胞子長 6.5 (6.4-6.6)  $\mu\text{m}$ ; 極囊長 2.5 (2.2-2.9)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 2.1 (1.9-2.2)  $\mu\text{m}$ 。

走査電子顕微鏡でも、胞子を構成する 4 つの殻片は同一サイズであること、頂上部に 4 つの小突起があること、縫合線は観察可能であるが、明瞭ではないことが確認される。

18S rDNA(1,763-bp 長)と 28S rDNA(802-bp 長)は DDBJ/EMBL/GenBank (登録番号 AB553300・AB553306)に登録済み。

##### *Kudoa* sp. from a *Scomber japonicus*

(Myxosporea: Multivalvulida)

原形質体は線維性の被膜に覆われ、体側筋に局在する。肉眼的に白色の微小シストとして確認可能で、そのサイズは以下の通りである。0.30-0.75 (平均 0.49) mm  $\times$  0.20-0.40 (平均 0.26) mm (n=7)。

胞子は頂面像で亜方形、4 つの殻片と極囊をもち、すべては同一サイズである。殻片に光学顕微鏡で確認される附属構造はな

い。極囊は水滴状で、胞子の頂上点近傍に位置する。頂面像では、極囊は胞子径の50%あるいはそれ以下を占める。側面像では、胞子は楕円形で、底面はやや平たい。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。胞子(n=30)の計測値平均(括弧内は範囲)は以下の通りである。胞子幅 9.2 (8.2-10.5)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 8.1 (7.0-8.8)  $\mu\text{m}$ ; 胞子長 6.4 (6.1-6.8)  $\mu\text{m}$ ; 極囊長 2.9 (2.5-3.4)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 1.6 (1.3-2.0)  $\mu\text{m}$ 。

18S~5.8S rDNA (2,232-bp 長)と 5.8S~28S rDNA (1,052-bp 長)は DDBJ/EMBL/GenBank (登録番号 AB693044・AB693045) に登録済み。

#### ***Henneguya ogawai* n. sp.**

(Myxosporea: Bivalvulida)

胞子は長楕円形で、分岐した尾突起をもつ。胞子(n=30)の計測値範囲(括弧内は平均±標準偏差)は以下の通りである。胞子長 8.9-12.2 (11.0±0.8)  $\mu\text{m}$ ; 胞子幅 6.3-7.5 (6.9±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 5.2-6.6 (5.9±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 尾突起は同長で 8.4-12.7 (10.0±1.2)  $\mu\text{m}$ 、胞子全長は 19.2-23.4 (21.1±1.3)  $\mu\text{m}$ 、極囊長 3.8-5.2 (4.3±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 1.4-2.3 (1.9±0.2)  $\mu\text{m}$ 。2つの極囊のサイズはやや異なる。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。原形質体内での胞子の発育は同調している。

#### ***Henneguya yokoyamai* n. sp.**

(Myxosporea: Bivalvulida)

胞子は長楕円形で、分岐した尾突起をもつ。胞子(n=35)の計測値範囲(括弧内は平均

±標準偏差)は以下の通りである。胞子長 10.1-13.7 (11.0±0.8)  $\mu\text{m}$ ; 胞子幅 6.6-7.5 (7.1±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 4.5-6.4 (5.6±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 尾突起は同長で 10.8-17.0 (14.1±1.6)  $\mu\text{m}$ 、胞子全長は 21.9-29.2 (25.0±1.7)  $\mu\text{m}$ 、極囊長 3.1-4.2 (3.7±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 1.8-2.4 (2.0±0.2)  $\mu\text{m}$ 。2つの極囊のサイズはやや異なる。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。原形質体内での胞子の発育は同調している。

#### ***Myxobolus machidai* n. sp.**

(Myxosporea: Bivalvulida)

胞子は円形で、粘液性の被覆物はなく、また、極囊間突起もみられない。胞子(n=5)の計測値範囲(括弧内は平均±標準偏差)は以下の通りである。胞子長 8.1-9.4 (9.0±0.6)  $\mu\text{m}$ ; 胞子幅 7.5-8.3 (7.8±0.4)  $\mu\text{m}$ ; 胞子厚 5.1-6.0 (5.5±0.3)  $\mu\text{m}$ ; 極囊長 3.2-3.8 (3.5±0.2)  $\mu\text{m}$ ; 極囊幅 2.2-2.5 (2.3±0.1)  $\mu\text{m}$ 。2つの極囊のサイズは同一である。極囊内の極糸は光学顕微鏡では観察できない。原形質体内での胞子の発育は同調していない。

### 3. 考察

前報<sup>38)</sup>で、韓国で養殖され国内に輸入されたヒラメに寄生していた *K. septempunctata* について報告した。この感染は筋細胞内にシュードシストを形成し、肉眼的に感染を認知することは不可能であるが、同様の感染は他のクドア粘液胞子虫でも知られている。今回の市販海産魚の調



査では、筋組織でのシスト形成が肉眼的に検出可能なクドア粘液胞子虫感染に焦点を当てた。その結果、最も一般的に市販海産魚で遭遇するクドア粘液胞子虫はスズキやクロダイに寄生する *K. iwatai* であった。この種に加え、マアジやビンチョウマグロにもクドア粘液胞子虫の寄生があり、既知種とは異なる形態学的、遺伝子学的特徴を有していた。このことは、日常的に喫食する市販魚にも未記載の種が残されていること、その種同定に当たっては細心の注意を払うべきことを示唆している。従来、光学顕微鏡下の観察を中心とした形態学的特徴づけが主体となっていたが、最近では、rDNA 情報が簡易で信頼性における種特定手段として普及してきた<sup>9, 27, 50)</sup>。しかしながら、既知種、未知種を問わず、更に遺伝子情報を収集充実させることが必要である。現在のところ、全身感染を起こす種としては、*K. iwatai* と *K. lutjanus* が知られているだけである<sup>14, 46)</sup>。後者については、現在のところ 18S rDNA として 828 塩基対が報告されているだけで、*K. iwatai* との関係は部分的な理解に留まっている。形態学的に非常に類似性が高く、より長い rDNA 情報について確認を行っていく必要がある。同様の問題は、*K. alliaria* と *K. rosenbuschi* にも見られることが Whipps & Diggles (2006)<sup>47)</sup> によって指摘されている。両種の違いは、宿主の死後に筋肉融解を起こすかどうか、その点だけである。すなわち、分子生物学的な特徴づけですべてが解決する

わけではなく、形態学的な精査と病態生理学的な特徴をも種鑑別において考慮していく必要がある。また、Burger et al. (2007)<sup>9)</sup> は、形態学的に異なる胞子ながら、18S rDNA 塩基配列が同一のクドア粘液胞子虫を報告し、18S rDNA だけでは種の鑑別が十分に行えない可能性を指摘した。その後、Burger & Adlard (2010)<sup>6)</sup> は、同一種が形態学的に明確に異なる特徴を示すことがあると結論づけた。

分子系統樹の主枝の分岐は、18S ならびに 28S rDNA とともに共通しているが、より細かなレベルでは、用いる遺伝子領域によって異なるクレードに属することがあった(図 9, 10)。5 つ以上の殻片/極囊をもつ種は、18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹上では 2 つのクレードに分かれることから、この特徴をもつクドア粘液胞子虫には、少なくとも 2 回の起源があることが示唆されている<sup>19, 50)</sup>。今回も 18S rDNA 系統樹解析では同様の所見を得たが(図 9)、28S rDNA 系統樹解析では、5 つ以上の殻片/極囊をもつ種すべてが同一のクレードに入った(図 10)。将来的には、異なる遺伝子についても検討し、実際にどのような進化を辿ったのかを複合的に検討することが望ましい。

最近になって、クドア粘液胞子虫を原因とするアレルギー性消化器病の可能性が示唆されるなど<sup>37)</sup>、公衆衛生学的にも本属粘液胞子虫は注目を集めている。簡便で信頼性をもつクドア粘液胞子虫の種同定が行えることは、公衆衛生学分野の専門家が原因

究明に当たる現場で重要なことであり、また、天然海産魚の粘液胞子虫の種多様性の理解や養殖海産魚の健康管理にも有用性が高いと考えられる。また、海産魚の内臓に白色のシストを作る種があり、これらは、*Henneguya* 属や *Myxobolus* 属の双殻目粘液胞子虫によることが判明した。

#### D. 海外市販魚での *Kudoa* 属粘液胞子虫の感染状況とその種同定

##### 1. 材料と方法

フィリピン国ミンダナオ島南東部に位置する Mati 市の生鮮市場で市販魚 14 種、計 231 尾についてクドア粘液胞子虫の感染状況を調査した(表 7)。本研究の実施に当たり、Dr. Lea Angsinco Jimenez (Regional Integrated Coastal Resource Management Center (RIC XI), Davao Oriental State College of Science and Technology, Mati, Davao Oriental, Philippines) の全面的な協力を得て、2012 年 2 月 9 日～12 日に調査を行った。購入した市販魚は個体売りされており(図 12)、実験室に持ち帰り切り身として、シスト形成種を対象とした肉眼的な検査と、シュードシスト形成種を対象とした実体顕微鏡下での検査をすべての個体について実施した。

##### 2. 結果と考察

今回検査した市販魚 14 種、計 231 尾いずれにおいても、クドア粘液胞子虫の感染は確認されなかった。養殖を目的として、特定海域に人為的な導入を行った魚種での重

度の粘液胞子虫感染が報告される一方で、天然魚での感染はきわめて低率であり、また、個体当たりに検出されるシスト数も数個以下に限られることはよく知られている。*K. amamiensis* は、1975 年に沖縄県の本土復帰記念事業として開催された沖縄国際海洋博覧会において、海洋牧場に放養されたブリ (*Seriola quinqueradiata*) の体側筋に肉眼的な白点を無数に多発させ問題となった<sup>17)</sup>。クドア粘液胞子虫の生活環が維持されている自然環境に、たまたま養殖魚として感染感受性の高いブリを導入し、重度の感染が起きたと説明されている<sup>17)</sup>。48 属 87 種約 2,500 尾の天然魚でレゼルボアを探したところ、スズメダイ科のロクセスズメダイ (*Abudefduf sexfasciatus*)、オヤビッチャ (*Abudefduf vagiensis*)、*Chromis isharae*、スズメダイ (*Chromis notatus*)、*Chrysiptera assimilis* に感染が確認できたが、自然感染魚での筋肉シストは 1 尾に 1～3 シストと数は多くなかった<sup>17)</sup>。杉山ら<sup>44)</sup>は、ブリとカンパチ (*S. dumerili*) を沖縄県各地で養殖し、*K. amamiensis* 汚染海域の特定に挑んだところ、沖縄海洋博覧会の海洋牧場が設置された本部町海域のみで高率に感染個体を確認した。*K. amamiensis* はオーストラリアのグレートバリアリーフ海域にも分布している。Burger et al. (2008)<sup>8)</sup>は、自然環境の異なる 2 カ所の海域でのスズメダイ科魚類、計 31 種 210 尾を調べ、1 カ所のテングスズメダイ (*Abudefduf bengalensis*) (6/12) と

*Abudefduf whitleyi* (3/22)に本種を確認した。天然魚での感染は特定海域で起こりやすいこと、感染状況は軽微であることを考慮して、より多くの検体を調べることが重要である。なお、クドア粘液胞子虫の種多様性を理解することは、市販魚で問題となるクドア粘液胞子虫の種鑑別に当たって、その信頼性を確保することに繋がること期待される。

なお、今回調べた14種のうち、アジ科2種にしばしば微胞子虫の感染が観察された。

#### E. マグロに寄生する *Kudoa neothunni* の特徴づけ

*Kudoa neothunni* (Arai and Matsumoto, 1953)は、インドネシア近海で漁獲され築地市場に入荷したキハダマグロ (*Thunnus albacares*; syn. *Neothunnus macropterus*) に死後筋肉融解を引き起こした種として記載された<sup>4)</sup>。本種は筋細胞内にシュードシストを形成し、6ヶの殻片/極囊が放射状に配置されている。当時は知られていなかったこの形態学的な特徴と、当時の *Kudoa* 属の定義<sup>36)</sup>にしたがい、新属 *Hexacapsula* が提唱された<sup>4)</sup>。その後、5ヶの殻片/極囊をもつ *Pentacapsula* 属や7ヶの殻片/極囊をもつ *Septemcapsula* 属も多殻目 Kudoidae 科に加えられた<sup>28,40)</sup>。Whipps et al. (2003)<sup>49)</sup>は13ヶの殻片/極囊をもつクドア粘液胞子虫を新たに見つけ、*K. permulticapsula* とした。*Kudoa* 属に分類する根拠となったのは、その18S rDNA塩基配列

が *K. thyrssites* や *K. quadricornis* と同一性が高く、その分子系統樹で *Kudoa* 属と同一のクレード内に収まったことによる。引き続き、Whipps et al. (2004)<sup>50)</sup>によって、*Pentacapsula* 属、6ヶの殻片/極囊をもつ *Hexacapsula* 属、*Septemcapsula* 属に分類する種が *Kudoa* 属と同一クレードを作ることが示され、4つ以上の殻片/極囊をもつ粘液胞子虫をすべて *Kudoa* 属に分類することになった。

本研究では、宿主死後に筋肉融解が見られたキハダマグロ (*Thunnus albacares*) と筋肉融解が見られなかったクロマグロ (*Thunnus thynnus*) から分離された *K. neothunni* について比較検討し、この2者の分類学上の関係を明らかにすることを目的として実施した。

#### 1. 材料と方法

クロマグロ材料は2010年に神奈川県下の料亭で調理された際にクドア粘液胞子虫感染が確認された材料の一部を冷凍した材料で、この太平洋産マグロの漁獲地は不明であった。筋肉ブロックは正常の外見を有し、筋肉融解を示唆する所見はなかった。この材料からの胞子の分離、計測、形態観察は前述の通り、常法に従って実施した。なお、計測はLom & Arthur (1989)<sup>34)</sup>の方法に従った。胞子はDNA抽出のための材料を除き、10%中性緩衝ホルマリンで固定し、前述の通り、走査電子顕微鏡観察に供した。

筋肉融解が見られたキハダマグロは、フィリピン国ミンダナオ島沖(おおよそ7-8N,

131E)で漁獲され、2011年10月15-20日に沖縄県那覇に水揚げされた。このキハダマグロから分離したクドア粘液胞子虫も同様に処理し、寄生虫学的なデータを収集した。この研究で収集した材料は、国立科学博物館に寄託した(登録番号 NSMT-Pr320-321)。

寄生虫 DNA の抽出、PCR による遺伝子増幅、その塩基配列決定ならびに分子系統樹解析は、前述している通りである。

## 2. 結果

クロマグロの筋片 1g 当たりの胞子数は  $7 \times 10^7$  であった(図 13)。胞子は 6 つの均一サイズの殻片が放射状に配置した頂上像をもち、側面像は頂上突起をもたないピラミッド形であった(図 14)。この光学顕微鏡所見は走査電子顕微鏡所見とも一致した(図 15)。死後筋肉融解を示したキハダマグロから分離された胞子も同様の形態学的特徴をもち、*K. neothunni* の原記載<sup>4)</sup>ともよく一致した。計測値は表 8 に示す。

クロマグロから分離した *K. neothunni* の rDNA 塩基配列は 6,226 塩基対について確認した。その構成としては、ETS が 170 塩基対、18S rDNA が 1,741 塩基対、ITS1 が 705 塩基対、5.8S rDNA が 158 塩基対、ITS2 が 529 塩基対、28S rDNA が 2,923 塩基対であった。この塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank に登録済みである(登録番号 AB693042)。キハダマグロから分離した *K. neothunni* の rDNA は 5,609 塩基対で、18S rDNA が 1,720 塩基対、ITS1 が 705 塩基対、

5.8S rDNA が 158 塩基対、ITS2 が 588 塩基対、28S rDNA が 2,438 塩基対である(DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB693049)。

これら 2 つの分離株の 18S ならびに 5.8S rDNA 塩基配列の同一性は高かった(1,720 塩基長で 99.9%、あるいは、158 塩基長で 100%)。一方、ITS1 での同一性は 62.4%であり、ITS2 では 66.9%、28S rDNA では 2,245 塩基長で 99.0%であった。

18S ならびに 28S rDNA に基づく分子系統樹上では、*K. neothunni* は *K. grammatorcyni* と最も近く位置し、*K. septempunctata* や *K. thalassomi* を除いた筋組織寄生の 5 ヶ以上の殻片/極囊をもつ種とクレードを作った(図 18, 19)。*K. septempunctata* や *K. thalassomi*、脳寄生の 5 ヶ以上の殻片/極囊をもつ種は別にクレードを作った。なお、*K. neothunni* と *K. grammatorcyni* の 18S rDNA の同一性は 99.4%、28S rDNA の同一性は 93.4%であった。

## 3. 考察

*K. neothunni* は死後筋肉融解の見られたキハダマグロから記録されただけでなく<sup>4)</sup>、台湾近海太平洋産のメバチマグロ(*T. obesus*)や東北沖の太平洋産クロマグロの筋肉融解巣からも報告されている<sup>31, 32)</sup>。本研究では、キハダマグロ筋肉融解巣ならびに正常所見をもつクロマグロ筋組織から分離した *K. neothunni* 2 分離株について比較した。これらは形態学的に同一の胞子をもち、18S rDNA の違いは 1,720 塩基長で 2 箇

所の塩基置換のみであった。同様の低頻度での塩基置換率ながら、アルゼンチン沖の海域で取れる海産魚の死後に筋肉融解を引き起こす *rosenbuschi* と筋肉融解を引き起こさない *K. alliardii* は別種とされる<sup>1, 47)</sup>。このことは、筋肉融解の有無のみが種鑑別の指標になっていることを意味している。同様の考えに従えば、今回の *K. neothunni* の分離株 2 つは別種と考えることになる。しかしながら、死後の筋肉融解は酵素反応であり、様々な要因に左右されることを考慮する必要がある<sup>20, 21, 32, 52)</sup>。集団を扱う際の指標としては有用性がある特徴であっても、個別の感染例に適用して種診断の指標として使うには困難を伴う。

一方、ITS1 では 62.4%、ITS2 では 66.9% の塩基配列同一性に過ぎなかった。この低い塩基配列同一性をもつ意義については、今後、更に収集材料を増やし、潜在種としての意義をもつのか、あるいは異なる病態生理学的特徴をもつ系統として考える余地があるのか、検討を進める必要がある。世界的な分布をもち、死後筋肉融解を起こす種として知られる *K. thyrssites* では、18S rDNA での塩基の変異は 0.2-1.0% であるが、28S rDNA では 3.0-9.6%、ITS1 では 65.6% であると報告され<sup>48)</sup>、多くの研究者が複合種としての可能性を考えている。18S rDNA に比べて 28S rDNA において塩基変異がより多発することは、よく知られるようになってきた<sup>7)</sup>。オーストラリアの Great Barrier Reef で実施された調査の際に 6 科 18 種の

海産魚から分離した *K. thalassomi* 18 分離株では、18S rDNA の同一性は 99.7%、28S rDNA は 98.5% であった<sup>7)</sup>。遺伝子領域により塩基変異率が違う点が種鑑別においてどのように評価されるべきなのか、更に検討を重ねる必要がある。

最近、Burger & Adlard (2010)<sup>6)</sup> は、サンド・ホワイティング (*Sillago ciliata*) の脳から分離した 5 つの殻片/極囊をもつクドア粘液胞子虫を、本来 7 つの殻片/極囊をもつことが特徴となる *K. yasunagai* と同一種であるとした。この 2 分離株は形態学的には著しく異なるが、18S rDNA 塩基配列は同一であったことに依る。この形態学的変異は、過去に種内変異として報告されてきた変異とは明確に区別される。ちなみに、後者に属する形態学的な種内変異は *K. chaetodoni*<sup>9)</sup>、*K. crumena*<sup>29)</sup>、*K. iwatai*<sup>14, 18)</sup>、*K. lethrini*<sup>9)</sup>、*K. monodactyli*<sup>25)</sup>、*K. neurophila*<sup>23)</sup>、*K. permulticapsula*<sup>49)</sup>、*K. septempunctata*<sup>38)</sup>、*K. thalassomi*<sup>7)</sup>、*K. yasunagai*<sup>16, 28)</sup> 等で記録されている。前述したように、由来や産地が異なる更に多くのクドア粘液胞子虫分離株を形態学的ならびに遺伝学的に検討し、種の鑑別基準について検討する機会をもつことが必要である。

最近になって、ヒラメ寄生のクドア粘液胞子虫 *K. septempunctata* が公衆衛生学的に重要視すべき病態を喫食者に引き起こすことが本邦研究者によって指摘されている<sup>22, 26, 30, 33, 41)</sup>。この数年、実際に、年間 20～

30 件の集団食中毒事例が記録されている。生鮮なヒラメの刺身を喫食し、12 時間以内に吐き気や下痢を主徴とした消化器症状を呈するのが特徴である。筋肉細胞内にシュードシストを形成して寄生するヒラメの *K. septempunctata* やマグロの *K. neothunni* の場合には、例え重度の感染が魚肉にあっても、そのことを肉眼的に検知することは難しく、喫食を通して多量の孢子が一気に消化管に入る可能性が高い。食中毒と関係した種の特特定を進め、また、その種の海産魚での感染を簡易に、そして信頼性における方法で診断する技術を開発することが、食中毒の発生を抑え、その危険性を啓蒙する上で重要であろう。

#### F. 参考文献

1. Abollo E, Novoa B, Figueras A (2005) SSU rDNA analysis of *Kudoa rosenbuschi* (Myxosporea) from the Argentinean hake *Merluccius hubbsi*. Dis Aquat Org 64: 135-139
2. Adlard RD, Bryant MS, Whipps CM, Kent ML (2005) Multivalvulid myxozoans from eastern Australia: three new species of *Kudoa* from scombrid and labrid fishes of the great barrier reef, Queensland, Australia. J Parasitol 91: 1138-1142
3. Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: A fast, accurate, and powerful alternative. Syst Biol 55: 539-552
4. Arai Y, Matsumoto K (1953) On a new sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the muscle of yellowfin tuna, *Neothunnus macropus*. Bull Jpn Soc Sci Fish 18: 293-299
5. Bartosová P, Fiala I, Hypsa V (2009) Concatenated SSU and LSU rDNA data confirm the main evolutionary trends within myxosporeans (Myxozoa: Myxosporea) and provide an effective tool for their molecular phylogenetics. Mol Phylogenet Evol 53: 81-93
6. Burger MAA, Adlard RD (2010) Phenotypic variation in a significant spore character in *Kudoa* (Myxosporea: Multivalvulida) species infection brain tissue. Parasitology 137: 1759-1772
7. Burger MAA, Adlard RD (2011) Low host specificity in the Kudoidae (Myxosporea: Multivalvulida) including seventeen new host records for *Kudoa thalassomi*. Folia Parasitol 58: 1-16
8. Burger MAA, Barnes, AC., Adlard RD (2008) Wildlife as reservoirs for parasites infecting commercial species: Host specificity and a redescription of *Kudoa amamiensis* from teleost fish in Australia. J Fish Dis

- 31: 835-844
9. Burger MAA, Cribb TH, Adlard RD (2007) Patterns of relatedness in the Kudoidae with descriptions of *Kudoa chaetodoni* n. sp. and *K. lethrini* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida). Parasitology 134: 669-681
10. Campbell N (2005) The myxosporean parasitofauna of the Atlantic horse mackerel, *Trachurus trachurus* (L.) in the north-east Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. Acta Parasitol 50: 97-101
11. Canning EU, Curry A, Feist SW, Longshaw M, Okamura B (2000) A new class and order of myxozoans to accommodate parasites of bryozoans with ultrastructural observations on *Tetracapsula bryosalmonae* (PKX organism). J Eukaryot Microbiol 47: 456-468
12. Cruz C, Vas A, Saraiva A (2003) Occurrence of *Kudoa* sp. (Myxozoa) in *Trachurus trachurus* L. (osteichthyes) in Portugal. Parasite 10: 69-79
13. Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guindon S, Lefort V, Lescot M, Claverie J-M, Gascuel O (2008) Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist. Nucleic Acids Res 36: 465-469
14. Diamant A, Ucko M, Paperna I, Colorni A, Lipshitz A (2005) *Kudoa iwatai* (Myxosporea: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the red sea: Redescription and molecular phylogeny. J Parasitol 91: 1175-1189
15. Dyková I, Lom J, Overstreet RM (1994) Myxosporean parasites of the genus *Kudoa* Meglitsch, 1947 from some Gulf of Mexico fishes: Description of two new species and notes on their ultrastructure. Eur J Protistol 30: 316-323
16. 江草周三 (1986) 多殻類粘液胞子虫とくにクドア類について. 魚病研究 21: 261-274
17. Egusa S, Nakajima K (1980) *Kudoa amamiensis* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) found in cultured yellowtails and wild damselfishes from Amami-Oshima and Okinawa. Japan. Bull Jpn Soc Sci Fish 46: 1193-1198
18. 江草周三, 塩満捷夫 (1983) マダイとイシガキダイの体側筋クドアおよびトラフグの囲心腔と心臓寄生クドアについて. 魚病研究 18: 163-171
19. Fiala I (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int J Parasitol 26: 1521-1534
20. Funk VA, Raap M, Sojonky K, Jones S, Robinson J, Falkenberg C, Miller KM (2007) Development and validation of

- an RNA- and DNA-based quantitative PCR assay for determination of *Kudoa thyrsites* infection levels in Atlantic salmon *Salmo salar*. Dis Aquat Org 75: 239-249
21. Funk VA, Olafson RW, Raap M, Smith D, Aitken L, Haddow JD, Wang D, Dawson-Coates JA, Burke RD, Miller KM (2008) Identification, characterization and deduced amino acid sequence of the dominant protease from *Kudoa paniformis* and *K. thyrsites*; a unique cytoplasmic cysteine protease. Comp Biochem Physiol B 149: 477-489
22. Grabner DS, Yokoyama H, Shirakashi S, Kinami R (2012) Diagnostic PCR assays to detect and differentiate *Kudoa septempunctata*, *K. thyrsites* and *K. lateolabracis* (Myxozoa, Multivalvulida) in muscle tissue of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Aquaculture 338-341: (in press) [doi:10.1016/aquaculture.2012.01.022]
23. Grossel GW, Dykova I, Handlinger J, Munday BL (2003) *Pentacapsula neurophila* sp. n. (Multivalvulida) from the central nervous system of striped trumpeter, *Latris lineata* (Forster). J Fish Dis 26: 315-320
24. Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. Syst Biol 52: 696-704
25. Gunter NL, Whipps CM, Cribb TH, Adlard RD (2006): Characterisation of *Kudoa monodactyli* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from *Monodactylus argenteus* (Teleostei: Monodactylidae) from Moreton Bay, Queensland, Australia. J Eukaryot Microbiol 53: 374-378
26. Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H, Kumeda Y (2012) Development of a quantitative PCR assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int J Food Microbiol 156: 161-167
27. Hervio DML, Kent ML, Khattra J, Sakanari J, Yokoyama H, Devlin RH (1997) Taxonomy of *Kudoa* species (Myxosporea), using a small-subunit ribosomal DNA sequence. Can J Zool 75: 2112-2119
28. Hsieh S, Chen C (1984): *Septemcapsula yasunagai* gen. et sp. nov., representative of a new family of the class Myxosporea. Acta Zootax Sinica 9: 225-227 (in Chinese with English summary)
29. Iversen ES, Van Meter NN (1967) A new myxosporidian (Sporozoa) infecting the Spanish mackerel. Bull Mar Sci 17: 268-273



30. Kawai T, Sekizuka T, Yahata Y, Kuroda M, Kumeda Y, Iijima Y, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T (2012) Identification of *Kudoa septempunctata* as the causative agent of novel food poisoning outbreaks in Japan by consumption of *Paralichthys olivaceus* in raw fish. Clin Infect Dis 54: 1046-1052
31. Konagaya S (1982) Histological observation of jellied yellowfin tuna meat. Bull Tokai Reg Fish Res Lab 106: 55-75 (in Japanese with English summary)
32. Konagaya S (1984) Studies on the jellied meat of fish, with special reference to that of yellowfin tuna. Bull Tokai Reg Fish Res Lab 114:1-101 (in Japanese with English summary)
33. Konishi Y (2011) Overview of the study on new food-borne diseases associated with raw fish and flesh. Food Sanitation Research 740: 7-12 (in Japanese)
34. Lom J, Arthur JR (1989) A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporea. J Fish Dis 12: 151-156
35. Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. Folia Parasitol 53: 1-36
36. Lom J, Noble ER (1984) Revised classification of the Myxosporea Bütschli, 1881. Folia Parasitol 31: 193-205
37. Martínez de Velasco G, Rodero M, Cuéllar C, Chivato T, Mateos JM, Laguna R (2008) Skin prick test of *Kudoa* sp. antigens in patients with gastrointestinal and/or allergic symptoms related to fish ingestion. Parasitol Res 103: 713-715
38. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2010) *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. Parasitol Res 107: 865-872
39. Moran JDW, Whitaker DJ, Kent ML (1999) A review of the myxosporean genus *Kudoa* Meglitsch, 1947, and its impact on the international aquaculture industry and commercial fisheries. Aquaculture 172: 163-196
40. Naidenova NN, Zaika VE (1970) Three new genera of myxosporean parasites of fish from the Indian Ocean. Zool Zh 49: 451-454 (in Russian with English summary)
41. Ohnishi T (2011) Food poisoning caused by *Kudoa septempunctata*. Food

- Sanitation Research 740: 13-20
42. Reimschuessel R, Giesecker CM, Driscoll C, Baya A, Kane AS, Blazer VS, Evans JJ, Kent ML, Moran DW, Poynton SL (2003) Myxosporean plasmodial infection associated with ulcerative lesions in young-of-the-year Atlantic menhaden in a tributary of the Chesapeake Bay, and possible links to *Kudoa clupeiidae*. Dis Aquat Org 53: 143-166
43. Smythe AB, Sanderson MJ, Nadler SA (2006) Nematode small subunit phylogeny correlates with alignment parameters. Syst Biol 55: 972-992
44. 杉山昭博, 横山博, 小川和夫 (1999) 沖縄県内における奄美クドア症の疫学調査. 魚病研究 34: 39-43
45. Thompson JD, Higgins DG, Gibson TJ (1994) CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Res 22: 4673-4680
46. Wang PC, Huang JP, Tsai MA, Cheng SY, Tsai SS, Chen SD, Chen SP, Chiu SH, Liaw L L, Chang LT, Chen SC (2005) Systemic infection of *Kudoa lutjanus* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) in red snapper *Lutjanus erythropterus* from Taiwan. Dis Aquat Organ 67: 115-124
47. Whipps CM, Diggles BK (2006) *Kudoa alliaria* in flesh of Argentinian hoki *Macruronus magellanicus* (Gadiformes: Merlucciidae) Dis Aquat Organ 69: 259-263
48. Whipps CM, Kent ML (2006) Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrsites* (Myxozoa: Myxosporea). J Eukaryot Microbiol 53: 364-373
49. Whipps CM, Adlard RD, Bryant MS, Kent ML (2003) Two unusual myxozoans, *Kudoa quadricornis* n. sp. (Multivalvulida) from the muscle of goldspotted trevally (*Carangoides fulvoguttatus*) and *Kudoa permulticapsula* n. sp. (Myltivalvulida) from the muscle of Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. J Parasitol 89: 168-173
50. Whipps CM, Gossel G, Adlard RD, Yokoyama H, Bryant MS, Munday BL, Kent ML (2004) Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporea) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. J Parasitol 90: 618-622
51. Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. Science 225: 1449-1452

52. Zhou LS, Li-Chan ECY (2009) Effect of *Kudoa* spores, endogenous protease activity and frozen storage on cooked texture of minced Pacific hake (*Merluccius productus*). Food Chem 11: 1076-1082

G. 研究発表

・論文発表

1. Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2011) *Kudoa iwatai* and two novel *Kudoa* spp., *K. trachuri* n. sp. and *K. thunni* n. sp. (Myxosporea: Multivalvulida), from daily consumed marine fish in western Japan. Parasitol Res 108: 913-926
2. 佐藤 宏 (2011) 食中毒の新たな寄生虫性病原体として注目される粘液胞子虫の生物学. 山口獣医誌 38: 1-26.
3. Li Y-C, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T, Sugita-Konishi, Y (2012) Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporea: Bivalvulida) from marine fish in Japan. Parasitology Research (in press) [DOI 10.1007/s00436-012-2904-z]
4. Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H, Kumeda Y (2012) Development of a quantitative PCR assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Int J Food Microbiol 156: 161-167

・講演・シンポジウム発表

1. Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y, Ohnishi T: Molecular characterization of *Kudoa* spp. found in commercially available marine fish: a possible cause of gastrointestinal symptoms of Japanese people taking raw fish slices. BIT' s 1<sup>st</sup> Annual World Congress of Microbes-2011, Beijing, China (Beijing International Convention Center), (2011.8.1).
2. 佐藤 宏: お刺身文化の危機か? クドア粘液胞子虫症. 第 33 回北海道大学獣医学学術交流基金群講演会, 札幌市(北海道大学獣医学部講堂), (2011.11.1).
3. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～. 平成 23 年度獣医公衆衛生講習会(山口県獣医師会), 山口市(山口県獣医師会会館), (2011.11.5).
4. 佐藤 宏: 身近な寄生虫の世界～食品と寄生虫～. 第 41 回全国市場食品衛生検査所協議会全国大会講演, 山口市(山口市翠山荘), (2012.1.20).

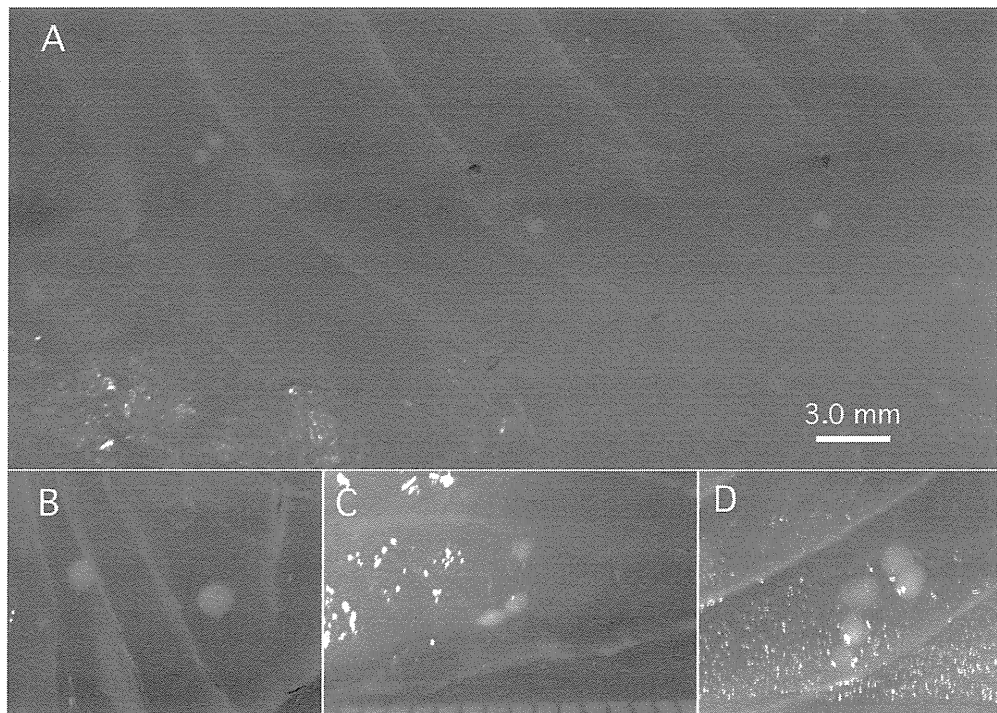


図 1. 市販魚切り身にみられたクドア粘液胞子虫シストの肉眼像.  
(A) クロダイにみられた *Kudoa iwatai* によるシスト; (B) スズキにみられた *Kudoa iwatai* によるシスト; (C) マアジにみられた *Kudoa trachuri* によるシスト; (D) ビンチョウマグロにみられた *Kudoa thunni* によるシスト. ここに示す肉眼像はすべて同一倍率である。