

形態学および分子系統学に基づく
粘液胞子虫の分類に関する試み

山口大学大学院連合獣医学研究科

李 迎春

2014年9月

目次

目次	-----	i
表一覧	-----	iii
図一覧	-----	iv
略語一覧	-----	vi
要旨	-----	1
緒言	-----	3
第1章 山口市産ドンコに寄生する双殻目粘液胞子虫 (Myxosporea: Bivalvulida) の2新種: <i>Myxobolus marumotoi</i> と <i>Cardimyxobolus japonensis</i>	-----	7
1.1 概要	-----	8
1.2 諸言	-----	8
1.3 材料および方法	-----	10
1.4 結果	-----	12
1.5 考察	-----	16
第2章 日本近海産魚類の内臓に寄生する <i>Henneguya</i> 属 と <i>Myxobolus</i> 属(Myxosporea: Bivalvulida)に分類 される3新種: <i>Henneguya ogawai</i> 、 <i>Henneguya</i> <i>yokoyamai</i> と <i>Myxobolus machidai</i>	-----	20
2.1 概要	-----	21
2.2 諸言	-----	22
2.3 材料および方法	-----	22
2.4 結果	-----	24
2.5 考察	-----	30

第 3 章	マグロ (<i>Thunnus</i> spp.) 寄生の <i>Kudoa neothunni</i> の rDNA 塩基配列に基づく遺伝学的特徴づけ、ならびにマサバ寄生粘液胞子虫 (<i>Myxosporea</i> : Multivalvulida) の 1 新種: <i>Kudoa scomberi</i>	-----	32
3.1	概 要	-----	33
3.2	諸 言	-----	34
3.3	材料および方法	-----	35
3.4	結 果	-----	38
3.5	考 察	-----	42
	総 括	-----	46
	謝 辞	-----	49
	参考文献	-----	50
	表	-----	62
	図	-----	70

表一覧

- Table 1** Primers used to amplify and sequence seven overlapping segments of 18S and 28S rDNA of *Kudoa* spp.
- Table 2** Detection of myxosporean plasmodia in dark sleepers in Yamaguchi City, Japan.
- Table 3** Comparison of phenotypical features of *Myxobolus* spp. reported from the muscle of fish hosts.
- Table 4** Measurements of *Kudoa* spp. having six shell valves/polar capsules and characteristic tissue tropism to somatic muscles.
- Table 5** Measurements of *Kudoa* spp. having quadrate or semiquadrate spores in apical view and forming macroscopic cysts in the trunk muscle.
- Table 6** 日本国内に分布する *Myxobolus* 属粘液胞子虫として報告された種
- Table 7** 日本国内に分布する *Henneguya* 属粘液胞子虫として報告された種
- Table 8** *Kudoa* 属粘液胞子虫として日本で報告された種

図一覽

- Fig. 1** Microscopic views of plasmodia of *Myxobolus marumotoi* forming a pseudocyst in the myofiber of trunk muscles and *Cardimyxobolus japonensis* forming cysts in the wall of intestines of dark sleepers in Yamaguchi City, Japan.
- Fig. 2** Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *Myxobolus marumotoi* in valvular view, apical view, and sutural view.
- Fig. 3** Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *Cardimyxobolus japonensis* in valvular view and apical view.
- Fig. 4** Stylized illustrations of *Myxobolus marumotoi* and *Cardimyxobolus japonensis*.
- Fig. 5** PhyML phylogenetic trees based on the SSU rDNA sequences of the two new species (*Myxobolus marumotoi* and *Cardimyxobolus japonensis*) and representative myxosporean species of Bivalvulida.
- Fig. 6** Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of two new *Henneguya* spp. (*H. ogawai* and *H. yokoyamai*) from the alimentary tract wall and gall bladder wall of black sea breams.
- Fig. 7** Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *M. machidai* from the esophageal wall of a spotted knifejaw.
- Fig. 8** Stylized drawings of *H. ogawai*, *H. yokoyamai*, and *M. machidai* in frontal and lateral views.
- Fig. 9** ML phylogenetic tree based on the SSU rDNA sequences of the three myxobolid species (*H. ogawai*, *H. yokoyamai* and *M. machidai*) and representative myxosporean species of Bivalvulida..
- Fig. 10** Partial view of a pseudocyst of *Kudoa neothunni* in a myofiber of a northern bluefin tuna under a light microscope.
- Fig. 11** Photographs of fresh spores of *Kudoa neothunni* from a northern bluefin tuna under a light microscope.
- Fig. 12** Scanning electron microscopy of a *Kudoa neothunni* spore in oblique view.

Fig. 13 Photographs of fresh spores of *Kudoa scomberi* from a chub mackerel fished in the Sea of Japan

Fig. 14 Stylized diagrams of *Kudoa scomberi* in apical and lateral views.

Fig. 15 ML phylogenetic tree based on the 18S rDNA sequence of *Kudoa* spp.

Fig. 16 ML phylogenetic tree based on the 28S rDNA sequence of *Kudoa* spp.

略語一覧

LPC; length of polar capsule (極囊長)

LS; length of spore (孢子長)

LSB; length of spore body (孢子体部の長さ)

LT; length of tail (尾長)

PC; polar capsule (極囊)

PCR; polymerase chain reaction

SV; shell valve (殻片)

TS; thickness of spore (孢子厚)

TSB; thickness of spore body (孢子体部の厚さ)

WPC; width of polar capsule (極囊幅)

WS, width of spore (孢子幅)

WSB; width of spore body (孢子体部の幅)

要 旨

Myxozoa 門の粘液胞子虫綱に分類される 2,400 余種は、魚類と環形動物(水棲貧毛類や多毛類)を交互宿主とする多細胞性寄生虫である。1970 年代以降、食用魚の養殖が世界各地で盛んになるに伴って、その生産性に関わる魚病の病原体として研究が行われてきたが、2011 年以降は生鮮魚喫食を原因とする集団食中毒の病原体として公衆衛生学分野でも重要な寄生虫となった。また、生物多様性研究としても精力的な研究が世界的に行われている。

粘液胞子虫(Myxosporea)の胞子は殻片が組み合わされ構成され、その内部には宿主上皮組織への接着に働く極糸を容れた極嚢、宿主への侵入体である胞子原形質などが見られる。殻片数(SV)と極嚢数(PC)は同数が基本である。さて、粘液胞子虫綱は SV/PC が2つの双殻目と3つ以上の多殻目に分けられている。前者が約 52 属、後者が約 8 属に分けられてはいるが、1属1種が総計 60 属の3割を占める一方で、*Myxobolus* 属に約 900 種、*Henneguya* 属に約 200 種といったように、特定の属は膨大な種を含んでいる。最近益々活発な研究が進められている粘液胞子虫類において、そのいびつな分類体系の見直しと種鑑別について研究者が広く共有できる基準が早急に準備されることが望まれている。従来の胞子の形態学的特徴に基づく表徴分類(体系)に対して、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列情報を利用する分子系統分類の試みも本格化してきた。現在、その両分類体系をどのように繋ぐかを模索する世界的な研究状況の中にあって、その一助となることを念頭に、本研究では、1) 特有の胞子形態をもつ *Cardimyxobolus* 属粘液胞子虫について世界で初の rDNA 解析を成功させ、また、淡水魚の鰓寄生種がほとんどを占める *Myxobolus* 属において筋肉寄生種がどのような分子系統学的な位置づけをもつのかを明らかにし、次に 2) 淡水魚を主要な宿主とする *Myxobolus* 属粘液胞子虫について、海産魚寄生種を収集して分子系統学的な解析を行い、3) 胞子形態が酷似しながらも死後筋肉融解現象の誘導能が違うことを根拠に区別される *Kudoa* 属粘液胞子虫について、その表徴的違いが分子遺伝学的な違いとしてどのように確認されるかを検討し考察した。

第1章では、日本国内山口市で採集されたドンコ(*Odontobutis obscura*)から検出された粘液胞子虫類双殻目(Myxosporea: Bivalvulida)の2種について形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴づけを行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* として新種記載するとともに、前

種が淡水魚の体側筋にシュードシストを形成して寄生していること、後種がこれまでにまったく分子系統学的な解析が行われていない小属(世界的に今回の種が3種目)に属することに注目して、その分子系統学的位置づけについて解析した。18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、前種は *Henneguya/Myxobolus* クレード内に独自の支枝を作って位置し、後者はこのクレードから外れて双殻目として独自の位置づけを示した。本研究は、分子系統学的解析が進まない Ortholineidae 科双殻目粘液胞子虫に分類される *Cardimyxobolus* 属について世界で初めて分子遺伝学的研究を行ったことが特記される。

第2章では、Myxozoa のほぼ半数の種を占める *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属のほとんどの種が淡水魚、殊に鰓寄生である中で、ごく限られた種記載しかない海産魚寄生種あるいは内臓寄生種がどのような系統進化的位置づけをもつかに注目して実施した。*Henneguya* 属の2新種は日本国内瀬戸内海産クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)2尾の食道および腸管壁、あるいは、胆嚢壁や腹腔の漿膜下に寄生し、*Myxobolus* 属の新種は、日本国内下関沖の日本海で釣られたイシガキダイ(*Oplegnathus punctatus*)1尾の食道壁から検出された。*Henneguya* 2種(*H. ogawai* と *H. yokoyamai*)は分子系統学的に海外の海産魚寄生の *Henneguya* spp.と極めて近縁な位置づけをもち、*M. machida i* は、既知の海産魚寄生の *Myxobolus* spp.との近縁性より、淡水魚から記載された種との近縁性が確認された。

第3章では、粘液胞子虫の形態分類において重要な指標とされる「死後筋肉融解現象(post-harvest myoliquefaction)」の有無が、実際の種鑑別においてどのような意義をもつのかという点に注目して実施した。形態学的にほぼ同一の胞子をもち、死後筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* 分離株をキハダマグロから、一方、重度感染にも関わらず筋肉融解を起こさない *Kudoa neothunni* 分離株をクロマグロから得て、一連の rDNA 塩基配列の比較検討を行った。18S および 5.8S rDNA 塩基配列は同一であるが、他の領域では顕著な変異が確認された。現在、Myxozoa、殊に粘液胞子虫綱のあるべき分類体系が模索され、形態分類と分子系統分類の間の乖離について様々な研究材料の解析を通して解決策が議論されている。*K. scomberi* については、四角形の胞子形態をもつ種の分類を考える新たな知見を提供できた。rDNA を中心として分子系統進化的視点から種分類が考えられているが、どの領域をどのように評価するのかは未だ研究者で基準が共有されていない。この点も含め、今後の種分類のあり方について考察した。

緒 言

粘液胞子虫綱(Class Myxosporea)は、軟胞子虫綱(Class Malacosporea)とともにミクソゾア門(Phylum Myxozoa)を構成し、淡水、汽水、海水棲魚類の多細胞性寄生虫である(Canning and Okamura, 2004)。その胞子は顕微鏡的大きさ(おおよそ 6~20 μm)で、その単純な構造から 20 世紀末までの長い間、原虫として分類されてきた経緯をもつ(Smothers et al., 1994; Schlegel et al., 1996)。基礎生物学分野からの生物多様性理解や水産学分野での魚病病原体として古くから研究が進められてきたが、1980 年代以降の淡水・海水魚養殖産業の発達と共に、その生産性に関わる重要な魚病病原体としての研究が更に精力的に行われるようになってきた(Egusa and Nakajima 1980; 江草 1986; Moran et al. 1999; Kent et al. 2001; Yokoyama 2003; 横山 2004; Lom and Dyková 2006; 佐藤 2011)。更に、2011 年6月 17 日付け食安 0617 第3号「生食用生鮮食品による病因物質不明有症事例への対応について」において、生食用ヒラメの *Kudoa septempunctata* を原因とすると考えた有症事例を、今後は食中毒事例として扱うとする通知が出されたことで、これまで公衆衛生分野からは注目されることのなかった粘液胞子虫類が多角的な研究の対象となるとともに、養殖現場や流通段階、市場等広く社会に知られる寄生虫の1つとなった(小西 2012; 大西 2012)。

粘液胞子虫の寄生状態と胞子構造

粘液胞子虫綱の粘液胞子 (myxospore)が、魚類の組織内(細胞間)に形成されたシスト内や細胞内のシュードシストにみられる場合を組織寄生性(histozoic)と呼び、胆嚢や膀胱などの管腔内にみられる場合を管腔寄生性(coelozoic)と呼ぶ。胞子形成は、アメーバ状の多核原形質体(plasmodium)内で起こり、細胞分裂により増員された胞子形成細胞(sporogonic cell)と周細胞(pericyte)を中心に粘液胞子へと発育する。周細胞に包み込まれた中で、胞子形成細胞は極嚢形成細胞(capsulogenic cell)、殻片形成細胞(valvogenic cell)、胞子原形質形成細胞(sporoplasmogenic cell)へと細胞分裂する。1つの周細胞内で2つの粘液胞子が形成されることになるが、この単位をパンスポロブラスト(pansporoblast)と呼ぶ。1つ1つの粘液胞子形成単位はスポロブラスト(sporoblast)である。1つの多核原形質体が多数の胞子を形成する場合を polysporic と呼び、1つか2つの胞子を形成するものを monosporic または disp

oric と区別すると共に、その場合には偽多核原形質体(pseudoplasmodia)と別称する。発育や細胞構成の詳細については Kent et al. (2001)や横山(2004)の総説が参考にできる。

1つの粘液胞子は、その種に固有な数の極囊(polar capsule; PC)、1つか2つの孢子原形質細胞(sporoplasm)、それらを包む殻片(shell valve; SV)から構成される。殻片数は通常は極囊数に一致し、殻片同士が縫合線で結ばれて、硬い孢子構造となっている。極囊の中には、交互宿主(alternative host)組織への接着の際に弾出される極糸(polar filament)が螺旋状に収納されている。孢子原形質細胞は、1つの細胞がもう一方の細胞を包むかたちで用意され、極糸の弾出後に孢子が割れて交互宿主(貧毛類や多毛類といった環形動物と考えられている)の腸管組織へ実際に侵入する細胞である。

粘液孢子虫類の分類

1984年の二宿主性生活環の発見(Wolf and Markiw 1984))と2000年の軟孢子虫の報告(Canning et al. 2000)以降の新たな分類体系では、ミクソゾア門は軟孢子虫綱と粘液孢子虫綱に大別され、それまで区別されてきた放線孢子虫綱(Class Actinosporea)は粘液孢子虫の1生活期に過ぎないことから削除された(Kent et al. 1994)。粘液孢子虫綱はさらに、双殻目(Order Bivalvulida)と多殻目(Order Multivalvulida)が分類群として区別される。Lom and Dyková (2006)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る。1属1種が3割を占め、一方、*Myxidium* 属(217種)、*Zschokkella* 属(72種)、*Ceratomyxa* 属(172種)、*Sphaerospora* 属(78種)、*Chloromyxum* 属(115種)、*Myxobolus* 属(792種)、*Henneguya* 属(204種)、*Kudoa* 属(69種)など、一部の属に記載種が集中する傾向が顕著である。Whipps et al. (2003)は殻片数/極囊数13ヶの粘液孢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SSU 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(殻片数/極囊数5ヶ)や *Hexacapsula* 属(殻片数/極囊数6ヶ)についても同様であることを確認した(Whipps et al. 2004)。Lom and Dyková (2006)はこのことに言及はしているものの、従来、殻片数/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(殻片数/極囊

数7ヶ)を存続させていることを考慮すると、上述した多殻目8属は実際には5属に圧縮される。一方で、Lom and Dyková (2006)以降に、*Gadimyxa* Køie et al., 2007 や *Soricimyxa* m Prunescu et al., 2007 等の新属も提唱されている(Køie et al. 2007; Prunescu et al. 2007)。

Lom and Dyková (2006)によってまとめられた粘液胞子虫の形態学的分類体系では、胞子サイズ、殻片数、殻片表面の突起の有無、頭頂部突起の有無と形状、極嚢数、極嚢サイズ、極糸長、胞子原形質細胞でのヨード胞の有無等が重要な指標として用いられる。双殻目は2つの殻片と極嚢をもっており、多殻目は3つ以上の殻片と極嚢をもっている。上述した最近の食中毒事例の原因とされる *Kudoa* 属粘液胞子虫は4つ以上の殻片と極嚢をもつ多殻目粘液胞子虫である。

粘液胞子虫の生活環

養殖ニジマスの旋回病の原因となる *M. cerebralis* について研究した Wolf and Markiw (1984)が、Myxozoa の生活環を初めて明らかにしたことは上述した。魚類を宿主として種記載された粘液胞子虫は、環形動物(おそらく、淡水魚では貧毛類、海水魚では多毛類)が交互宿主となって放線胞子虫期が寄生して生活環の維持が行われている(横山, 2004; Yokoyama et al. 2012a)。10年前に Køie et al. (2004)は初めて海洋性粘液胞子虫の生活環を明らかにした。すなわち、双殻目 *Ellipsomyxa gobii* は魚宿主 *Pomatoschistus microps* と多毛類 *Nereis diversicolor* で生活環が維持されていることを示した。その後、*Ceratomyxa uberbachii* と *Gadimyxa atlantica* でも交互宿主と放線胞子虫が確認された(Yokoyama et al. 2012a)。これらを含め、粘液胞子虫期と放線胞子虫期の両生活期が確認された Myxozoa は、2011年に至っても約39種に留まっている(Yokoyama et al. 2012a)。なお、放線胞子虫の形態は18グループに大別されるが(Yokoyama et al. 2012a)、特定の粘液胞子虫の属(形態学的特徴に基づく)とこの放線胞子虫の形態グループとの対応性に明確なルールはないようである。また、交互宿主を介さずに、魚類個体間で直接的な感染が起こることが一部の双殻目粘液胞子虫 *Enteromyxum scophthalmi*、*Enteromyxum fugu*、*Enteromyxum leei* あるいは多殻目粘液胞子虫 *Kudoa ovivora* で示されている(Swearer and Robertson 1999; R

edondo et al. 2004; Yanagida et al. 2006)。

粘液胞子虫の種鑑別と分類に関する課題：本研究の目的

粘液胞子虫綱を中心に Myxozoa 門の現在の形態分類体系の概要は Lom and Dyková (2006)によって提供され、また、今後の解決すべき課題が言及されている。粘液胞子虫の胞子は円形、楕円、四角、放射状と形容されるいくつかの形をとり、その胞子壁を構成する殻片と極糸を容れた極嚢の存在はあまりにも明瞭で、従来 of 形態分類体系の主要な分類基準とされ見直しの必要性を考えた研究者はいなかっただろう。Whipps et al. (2003, 2004)によって、13 SV/PC をもつ *Kudoa permulticapsula* が記載され、明らかな別属とされてきた *Pentacapsula* (5 SV/PC)、*Hexacapsula* (6 SV/PC)、*Septemcapsula* (7 SV/PC)を *Kudoa* (4 SV/PC)とシノニムとして扱うことが提唱されたことは衝撃的なことであった。Lom and Dyková (2006)は、Myxozoa の分類において、分子系統解析が胞子形態に依拠する旧来の分類体系を打ち破る最初の研究として Whipps et al. (2003, 2004)の研究を評価している。分子遺伝学的解析が広く粘液胞子虫類の種鑑別に関する研究に導入されるについて、さまざまな新たな課題が出てきた。分子遺伝学的解析は、胞子計測値、宿主特異性や地理的分布といった漠然とした根拠を越えて明確な種鑑別手段となり、従来 of 形態分類体系を補完する技術として評価を受けるとともに、分類体系の大きな見直しを迫る新知見をも提出してきた。尾状突起という明確な胞子構造の有無で分けられてきた *Henneguya* 属と *Myxobolus* 属が多系統群であり、将来的には新たな分類群の提唱が必要なことも指摘されている(Fiala 2006, Fiala and Bartošová 2010)。

本研究では、分子系統分類学的視点から従来 of 形態分類学の妥当性と問題点を明らかにすることを目的に、1) 特有の胞子形態をもつ *Cardimyxobolus* 属粘液胞子虫について世界で初の rDNA 解析を成功させ、また、淡水魚の鰓寄生種がほとんどを占める *Myxobolus* 属において筋肉寄生種がどのような分子系統学的な位置づけをもつのかを明らかにし、次に 2) 淡水魚を主要な宿主とする *Myxobolus* 属粘液胞子虫について、海産魚寄生種を収集して分子系統学的な解析を行い、3) 胞子形態が酷似しながらも死後筋肉融解現象の誘導能が違うことを根拠に区別される *Kudoa* 属粘液胞子虫について、その表徴的違いが分子遺伝学的な違いとしてどのように確認されるかを検討し考察した。

第 1 章

山口市産ドンコに寄生する双殻目粘液胞子虫
(Myxosporea: Bivalvulida) の 2 新種:
Myxobolus marumotoi と *Cardimyxobolus japonensis*

*本章の研究については、以下の論文として公表済みである。

Li Y-C and Sato H (2014) Two novel myxosporean species (Myxosporea: Bivalvulida), *Myxobolus marumotoi* n. sp. and *Cardimyxobolus japonensis* n. sp., from the dark sleeper, *Odentobutis obscura*, in Japan. Parasitol. Res. 113: 1371-1381.

1.1 概要

日本国内山口市で採集されたドンコ(*Odontobutis obscura*)から検出された粘液孢子虫類双殻目(Myxozoa: Myxosporrea: Bivalvulida)の2種について形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴づけを行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* として新種記載した。*Myxobolus marumotoi* のプラズモディウムは体側筋内にシュードシストを形成して寄生していた。その孢子(n=15)は以下の通りの計測値である。孢子長 13.3–15.0 (平均 13.8) μm 、孢子幅 14.2–15.0 (14.6) μm 、孢子厚 10.0–11.7 (10.8) μm 、2つの極嚢は類円形で同等のサイズであり、極嚢長 7.9–9.6 (8.4) μm 、極嚢幅 5.4–6.3 (5.9) μm 。極嚢は孢子頭頂に向かい、極糸はその中で 5–6 回巻かれていた。*Cardimyxobolus japonensis* (Ortholineidae)のプラズモディウムは線維性の被膜により囲まれて、消化管固有層にシストを形成して寄生していた。孢子正面像は幅広の卵円形であり、孢子側面像は紡錘形であった。その孢子(n=15)は以下の通りの計測値である。孢子長 8.8–10.4 (9.4) μm 、孢子幅 11.3–12.5 (11.9) μm 、孢子厚 5.2–6.7 (5.8) μm 、2つの極嚢は洋梨形で同等のサイズであり、極嚢長 4.2–5.0 (4.7) μm 、極嚢幅 2.9–3.8 (3.3) μm 。卵円形の孢子の頭頂側はしばしば直線的で、反対側は円状を呈した。また、2つの極嚢は孢子の側方に開口部を向け、孢子原形質にはヨード胞が確認された。プライマー結合部を含めると、ほぼ全長にわたる 18S リボソーム RNA (rDNA)塩基配列を、上記 2 種について得た。*M. marumotoi* では 1,996 塩基対、*C. japonensis* では 1,588 塩基対であった。18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、前種は *Henneguya/Myxobolus* クレード内に独自の支枝を作って位置し、後者はこのクレードから外れて双殻目として独自の位置づけを示した。本研究は、分子系統学的解析が進まない Ortholineidae 科双殻目粘液孢子虫に分類される *Cardimyxobolus* 属について世界で初めて分子遺伝学的研究を行ったことが特記される。

1.2 緒言

Myxozoa 門粘液孢子虫綱の分類と種鑑別においては、孢子の形態、殊に殻片と極嚢の数と構造が主要な役割を果たしてきた(Kent et al. 2001; Abdel-Ghaffar et al. 2005, 2008, 2012; Lom and Dyková 2006)。殻片数(SV)と極嚢数(PC)を用いた分類体系の限界に

については、次の3属、すなわち 5 SV/PC の *Pentacapsula* Naidenova et Zaika, 1970、6 SV/PC の *Hexacapsula* Arai et Matsumoto, 1953、7 SV/PC の *Septemcapsula* Hsieh et Chen, 1984 が、当時 4 SV/PC とされていた *Kudoa* Meglitsch, 1947 属のシノニムとされたことで顕在化した(Whipps et al. 2004)。この契機となったのは、Whipps et al. (2003) が 13 SV/PC のクドア種、*K. permulticapsula* Whipps et al., 2003 をオーストリアのグレートバリアリーフ海域で採集したヨコシマサワラ(*Scomberomorus commerson*)の体側筋に検出したことだった。さらに、形態学的分類体系が重要視してきた孢子殻の構造、尾状突起の有無で明確に区別されてきた2属、*Henneguya* Thélohan, 1892 および *Myxobolus* Bütschli, 1882 が、18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹では同一クレード内に混在し、2 属を遺伝学的視点からは分けられないことが指摘された (Fiala 2006; Liu et al. 2010)。すなわち、明確な形態学的表徴に依拠する形態学的分類と 18S rDNA に基づく分子系統分類学的分類は大きな齟齬を来している現状が指摘されることになった(Fiala, 2006)。この状況の理解の下、現在の形態学的表徴による分類体系は、側系統群や他系統群としての生物種の仮分類に留まっているに過ぎず、今後の単系統群単位の分類体系を目指す知見収集に今後精力に取り組む必要性があるといえる。

双殻目(Bivalvulida Shulman, 1959) には多種多様な種が分類され、孢子形態に基づいて 52 属が少なくとも区別されている(Lom and Dyková 2006)。しかし、その属の中には他属との境界が不明瞭な区別もかなり見受けられる(Lom and Dyková 2006)。例えば、*Leptotheca* Thélohan, 1895 と *Ceratomyxa* Thélohan, 1892、*Myxidium* Bütschli, 1882 および *Zschokkella* Auerbach, 1910 との区別、*Myxobolus* 属の一部と *Thelohanellus* Kudo, 1933 である。また、多くの属について、その構成種が1種もしくは2, 3種であることも(Lom and Dyková 2006 あるいは佐藤, 2011 の表 1 参照)、今後の検討が必要なことを示しているように思われる。Gunter and Adlard (2010) は *Leptotheca* 属を無効として、そこに従来分類されてきた 63 種を *Ceratomyxa* 属、*Ellipsomyxa* 属、*Myxobolus* 属、*Sphaerospora* 属に再分類することを実際に提唱している。その折には、それぞれの属の定義が修正されることはもちろんである。

本章の研究では、国内産ドンコ(*Odontobutis obscura* (Temminck et Schlegel 1845))か

ら得た双殻目粘液胞子虫2種について、形態学的ならびに分子遺伝学的解析を行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* として新種記載するとともに、それら固有の形態学的特徴を示す粘液胞子虫の系統分類学的位置づけを考察した。

1.3 材料と方法

1.3.1 研究材料の収集と寄生虫学的検査

2012年2月～12月に、日本国内山口市宮野地区の小川と山口大学吉田地区の用水路で、手網を用いてドンコ22匹を採集した。皮膚、鰭、鰓、脳、筋肉、内臓諸臓器について粘液胞子虫感染の有無を肉眼的に、また、実体顕微鏡を用いて徹底的に検査した。粘液胞子虫の寄生が確認された場合には、その組織片を生理食塩水に入れ、その後、スライドガラスとカバーガラスで挟みプラズモディウム内から胞子を放出させた。分離した胞子を微分干渉顕微鏡下で400倍率にて写真を撮り、コンピュータ内の画像処理ソフト Adobe® Photoshop® ver. 11.0 (Adobe Systems, San Jose, California, USA)で拡大印刷し、Lom and Arthur (1989)に従って実施した。特に記述しない限り、本研究での呈示する測定値は μm で示した。DNA抽出に用いた胞子材料を除き、寄生虫材料は10%中性緩衝ホルマリン液もしくは70%アルコール液で固定した。本研究で採取した寄生虫標本は、東京の国立科学博物館に寄託した(標本番号 NSMT-Pr343～Pr352)。

1.3.2 DNA抽出、polymerase chain reaction (PCR)と塩基配列のシーケンス

寄生虫サンプルを1.5 mlのプラスチックチューブに入れ、凍結乾燥機(Model EYELA F D-5N; Tokyo Rikakikai Co., Bunkyo-ku, Tokyo, Japan)を用いて乾燥冷凍した後、清浄なプラスチック乳棒で寄生虫材料を粉砕した。この処理材料について、Illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK)を用いてDNA抽出を個々に行った。18S rDNAについて重複するように用意した2つの断片についてDNAポリメラーゼ Blend Taq-Plus(TOYOBO, Dojima Hama, Osaka, Japan)と真核細胞ユニバーサルプライマー(NSF4/18とNSR1438; NSF573/19とSSU18R; Table 1参照)を用いて20 μl の反応液中でPCR増幅を行った。PCRサイクルは次の通りである: 94 $^{\circ}\text{C}$ で3

分、その後、94℃で45秒間、64℃で1分間、72℃で1分間を40サイクル、最後に72℃で7分間維持。PCR産物をFastGene Gel/PCR Extraction Kit (NIPPON Genetics Co., Tokyo, Japan)を用いて精製、plasmid vector である pTA2 (TAarget Clone™; TOYOBO)に組み込み、*Escherichia coli* JM109 (TOYOBO)に導入した。1つのサンプル当たり3つ以上のコロニーを任意に選択し、plasmid DNA をFastGene Plasmid Mini Kit (NIPPON Genetics Co.)を用いて抽出した。これらは forward/reverse M13 ユニバーサルプライマーでシーケンシングした。

1.3.3 分子系統樹解析

本研究で得た2種からの 18S rDNA 配列(DDBJ/EMBL/GenBankの登録番号 AB873006 ならびにAB873007)と、*Henneguya/Myxobolus* に関連塩基配列と他の代表的な双殻目の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得て、多重整列プログラムCLUSTAL W (Thompson et al. 1994)を用いて並べたのち、細部については目視で微調整した。本研究で分析に用いた塩基配列の登録番号は、後述する系統樹図上に示してある。塩基の変異が大きく、塩基配列によってはギャップとなる領域は解析から外し、全配列が相同の塩基を比較できるようにしたことで、最終的には、本研究で得た2種を含めた 63 塩基配列について 493 塩基部位に変異がみられる 860 塩基長のシーケンシングで系統樹を作成した。系統樹の解像度を高めるために、次に、本研究で得た2新種に関係の深い塩基配列を上記のデータベースからそれぞれ収集した。ドンコの筋肉から得た粘液胞子虫については、最終的に 23 塩基配列について 532 塩基部位に変異がみられる 1,413 塩基長のシーケンシングで系統樹を作成した。また、ドンコの消化管壁から得た粘液胞子虫については、最終的に 29 塩基配列について 42 塩基部位に変異がみられる 1,140 塩基長のシーケンシングで系統樹を作成した。分子系統樹解析は最尤法(Maximum likelihood, ML)を用い、“phylogeny.fr” website (<http://www.phylogeny.fr/>) で実施した(Guindon and Gascuel 2003; Dereeper et al. 2008)。信頼度の計算はブーストラップ法の代替法として有用性が報告されている approximate likelihood-ratio test を用いた(Anisimova and Gascuel 2006)。

1.4 結果

1.4.1 粘液胞子虫の検出状況

今回検査した 22 尾のドンコは体重:2.2–65.0 g、体長:5.4–16.5 cm であった。粘液胞子虫のプラズモディウムは、魚の成長あるいは季節と関わりなく体側筋と消化管のみに見られた (Fig. 1, Table 2)。体側筋の粘液胞子虫寄生は 22 尾中 4 尾に確認され、山口市吉田地区で捕獲した最も大きなドンコ(体重 65.0g)から最も多数のプラズモディウムが検出され、宮野地区でも 3 尾に寄生があったが、その検出プラズモディウム数は 1 もしくは 2 であった。一方、消化管、特に腸管の粘膜固有層の粘液胞子虫プラズモディウムは宮野地区で採集されたドンコ 17 尾のうち 11 尾(64.7%)に確認され、その検出数は 1–34 (幾何平均 13.0; n=11) であった。吉田地区で採取された 5 尾のドンコにも腸壁に粘液胞子虫寄生のある個体が 1 尾あったが、前述の体側筋に粘液胞子虫寄生のある個体と同一であった。筋肉および消化管壁に検出されたプラズモディウムに形成された胞子は双殻目粘液胞子虫であるものの、まったく異なる形態であった(Figs. 1-2~4)。また、知る限りにおいて既知種にも今回検出した粘液胞子虫と同一の種はないことから、これら 2 種を新種として以下に詳述したい。

1.4.2 新種記載: *Myxobolus marumotoi* (Myxosporae: Bivalvulida)

(Figs. 1a, 2, 4a, 4b)

細長いプラズモディウムが筋線維内に寄生し、その 1 つは 4.54mm 長、0.30mm 幅で、両端は鈍円に終わっていた。感染のある筋線維周囲に炎症応答は特に認められなかった。

本種の胞子は正面から見ると円形で、縫合面から見ると卵円形であり、胞子の計測値 (n=15) は以下のとおりであった。胞子長は 13.3–15.0 (平均±標準偏差; 13.8±0.5)、胞子幅は 14.2–15.0 (14.6±0.3)、胞子厚は 10.0–11.7 (10.8±0.4) であり、正面像で類円形を呈する 2 つの極嚢は胞子長の半分前後に相当するほどに大きく、また、2 つの極嚢は同じサイズであった。すなわち、極嚢長 7.9–9.6 (8.4±0.4)、極嚢幅 5.4–6.3 (5.9±0.2) であった。小さな極嚢間突起も観察された。極嚢は胞子の頂上部に向かっており、その中に極糸が 5–6 回巻かれていた。極糸が弾出した場合、その極糸長は 52.5–65.0 (58.4±4.8; n=8) であった。胞子原形質の

コード胞あるいは孢子殻外側の粘液層は観察されなかった。

5'-および 3'-末端に隣接するプライマーを除いた 18S rDNA 塩基配列は 1,996 塩基長で、この配列を DDBJ/EMB/GenBank に登録した (登録番号 AB873006)。

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: ドンコ、*Odontobutis obscura* (Temminck et Schlegel 1845), dark sleeper (Actinopterygii: Perciformes: Odontobutidae)。

感染部位: 体側筋にシュードシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、山口市、吉田地区。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr343, Parahapantotype NSMT-Pr344, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は、山口大学の現学長(当時)でもある丸本卓哉名誉教授 (Professor Emeritus Takuya Marumoto)に因んでいる。丸本学長の海外留学生受け入れが本研究の実施を可能にし、また、その土壌細菌に関わる顕著な研究活動は若い研究者にとって大きな刺激でもあり励みともなったことに因んでの命名である。

感染率: 低い。22 尾中 4 尾(18.2%)。

感染度: 変異に富む。ごく少数寄生から多数寄生と個体により異なる。

[類種鑑別]

今回新種記載した粘液孢子虫は、*Myxobolus* 属の定義によく合致している(Lom and Dyková 2006)。本研究第 2 章でも論じるように、本属には 744 種 (Eiras et al. 2005) もしくは 792 種(Lom and Dyková 2006)が分類され、また、最近に至っても活発に新種が記載されている。Eiras et al. (2005)以降の 7 年間で少なくとも約 40 種の新種記載が行われている。本属粘液孢子虫のほとんどは各種魚類の鰓に寄生し、体側筋に寄生する種は 33 種にとどまる(Table 3)。筋肉寄生の *Myxobolus* 種は卵円形の孢子をも

つ種が多く記載されて、今回の新種 *M. marumotoi* 胞子のような円形～類円形の胞子を持ち、同様の胞子サイズをもつ既知種は見当たらない。更に、既知種のほとんどは紡錘形もしくは涙形の極嚢を持ち、唯一、今回記載した *M. marumotoi* と同様の円形～類円形の極嚢をもつ種としては *M. sphaerocapsularis* Shulman, 1962 がある。しかしながら、その胞子サイズは今回の新種よりは大きい(Chen and Ma 1998)。また、後述するように、*M. marumotoi* の 18S rDNA 塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている *Myxobolus* 属と高い塩基配列同一性を持ちながらも、いずれの種とも合致しない。

1.4.3 新種記載: *Cardimyxobolus japonensis* (Myxosporia: Bivalvulida)

(Figs. 1b～d, 3, 4C, 4d)

プラズモディウムは線維性の被膜に包まれ、消化管、特に腸の固有層に円形～類円形のシストとして局在していた。そのサイズは 0.08–1.13 (0.28 ± 0.20) × 0.05–0.99 (0.24 ± 0.18) mm (n=52)であった。その粘液胞子虫シスト周囲に炎症応答は特に認められなかった。

本種の胞子は正面からみると幅広の卵円形で、縫合面から見ると紡錘形であり、胞子の計測値(n=15)は以下のとおりであった。胞子長は 8.8–10.4 (9.4 ± 0.5)、胞子幅は 11.3–12.5 (11.9 ± 0.4)、胞子厚は 10.0–11.7 (10.8±0.4)であった。卵円形の胞子の頭頂側はしばしば直線的で、反対側は円状を呈した。また、2つの極嚢は胞子の側方にその頭端となる開口部を向け、胞子原形質にはヨード胞が確認された。洋梨形の2つの極嚢は同じサイズで、極嚢長 4.2–5.0 (4.7 ± 0.3)、極嚢幅 2.9–3.8 (3.3 ± 0.2)であった。極嚢内での極糸の巻数は観察が難しかったが、極糸が弾出した場合、その最も長い極糸長は 76.7 であった。

5'-および 3'-末端に隣接するプライマーを除いた 18S rDNA 塩基配列は 1,588 塩基長で、この配列を DDBJ/EMBL/GenBank に登録した (登録番号 AB873007)。

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: ドンコ、*Odontobutis obscura* (Temminck et Schlegel 1845)、dark sleeper

r (Actinopterygii: Perciformes: Odontobutidae)。

感染部位: 消化管の固有層にシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、山口市、宮野地区。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr345, Parahapantotype NSMT-Pr346-Pr35

2, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は、収集地である日本に因んでの命名である。

感染率: 高い。22 尾中 12 尾(54.5%)。

感染度: 1–34 シスト/宿主 (幾何平均±標準偏差; 12.4 ± 10.4 ; n=12)。

[類種鑑別]

*Cardimyxobolus japonensis*の胞子は幅広の卵円形の正面像をもち、側面像では紡錘形であり、2つの同じ大きさの卵形の極嚢は左右両側に頭端を向けて、その開口部から極糸を左右両側(反対側)に放出する(Fig. 4)。胞子殻片の表面は滑らかであり、原形質はコード胞を含んでいる。さらに、本種のプラズモディウムでは多数の胞子が形成され、組織寄生性である。これらの形態学的特徴は、*Cardimyxobolus* Ma, Dong et Wang, 1982 と一致し、部分的には *Neomyxobolus* Chen et Hsieh 1960 と *Triangula* Chen et Hsieh 1984 と一致するところがある(Lom and Dyková 2006)。特に四川省産の淡水魚 (*Rhodeus sinensis*) から新種記載された *Cardimyxobolus rhodeus* Ma, Zhao et Ma, 1998) とは縫合部の彫り込みも見られず、同じ胞子形態をもっていた。縫合部の彫り込みは同じく中国四川省産の淡水魚 (*Garra pingi pingi*) から記載された *Cardimyxobolus leshanensis* Ma, Dong et Wang 1982 では明瞭にみられる(Chen and Ma 1998)。今回の新種の胞子は *C. rhodeus* の胞子(胞子長 11.0–12.5, 胞子幅 13.6–15.2, 胞子厚 9.0–10.0、同じサイズで円形の2つの極嚢は 5.0–6.0 長)より明らかに小さくて薄い。後述するように、*C. japonensis*の著しく短く独特の 18S rDNA 塩基配列は、DDBJ/EMBL/GenBankデータベースに登録されているいずれの双殻目粘液胞子虫のそれらと明確に区別できる。

1.4.4 分子系統樹解析

遺伝子クローニングによって決定した *M. marumotoi* と *C. japonensis* の 18S rDNA 塩基配列(それぞれ、DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB873006 と AB873007)は、1,996 塩基長と 1,588 塩基長であった。*C. japonensis* の胞子は、宿主個体により胞子の形態に若干の変異もあるように思われたので、複数の胞子サンプルを検討したが、最終的に同一であることが確認された。すなわち、胞子の成長度によって胞子の形態に若干のばらつきがあったようである。

Fiala (2006)が *Henneguya/Myxobolus* 属が混在するクレードの存在を指摘しているが、*M. marumotoi* はこのクレード内に含まれ、そして、*C. japonensis* はこのクレードからは外れることが、Fig. 5 に示した分子系統樹で確認できる。今回の 2 種いずれも、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録された既知種との高い塩基配列同一性は見られず、この点からも独立種である可能性が高い。

1.5 考察

本章の研究では、Myxozoa 門粘液胞子虫綱双殻目に分類される2新種について、それらの固有の胞子形態、宿主特異性、組織特異性を記載した。*Myxobolus marumotoi* は類円形の胞子をもち、淡水魚ドンコ(*Odontobutis obscura*)の体側筋組織の筋線維内にシュードシストを形成して寄生する。ドンコは西日本と韓国の巨済島(Geojje Island)にのみ分布する(Sakai et al. 1993, 1998)。上述したように、ほとんどの *Myxobolus* 属粘液胞子虫は淡水魚の鰓に寄生する(Eiras et al. 2005; Lom and Dyková 2006)。800 余種の中で、筋肉に寄生する種は33種に限られている(Table 3)。そして、それらであっても、胞子の正面像は卵円形、極嚢は洋梨形であり、*M. marumotoi* のようにほぼ円形の胞子をもち、類円形の極嚢をもつ種は、中国産の淡水魚(*Acheilognathus chankaensis*)に寄生する *M. sphaerocapsularis* を除けば (Chen and Ma 1998)、既知種にはない。但し、*M. sphaerocapsularis* の胞子サイズは明らかに *M. marumotoi* よりも大きい(Table 3)。直接的に遺伝子情報を比較することは現時点ではできないので、形態学的に近縁なこれら 2 種がどのような分子系統学的な近縁性をもつのかは不明である。*M. marumotoi* は 18S rDNA 分子系統樹上で *Henneguya*

/Myxobolus クレード内に独自の支枝を作って位置し、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録される既知種のいずれとも注目されるクレードは作らなかった (Fig. 5a)。

Cardimyxobolus 属に分類されている粘液胞子虫は、本研究以前には 2 種に限られていた(Lom and Dyková 2006)。すなわち、中国四川省産の淡水魚 (*Garra pingi pingi*) の腸間膜寄生の *C. leshanensis* および他種淡水魚 (*R. sinensis*) の鰓寄生の *C. rhodeus* である。Chen and Ma (1998)は、ウクライナの Salhyr River のヨーロッパヒメハヤ(*Phoxinus phoxinus*) の膀胱、尿管、腎臓寄生種 *Neomyxobolus olae* Miroshnichenko, 1981 も *C. olae* として本属に分類している。当該種の胞子形態は、*Neomyxobolus* とも *Cardimyxobolus* とも言い難いところで、その分類は今後の課題として残っている。本研究で新種記載した *C. japonensis* は、胞子形態、宿主、組織特異性、地理学的分布といった点から、これら3種と明確に区別できる。さて、*Neomyxobolus* 属や *Triangula* 属が分類される科 Ortholineidae Lom et Noble 1984 (Lom and Dyková 2006)の既知種との分子遺伝学的比較は登録塩基配列がないので、現時点では行えない。唯一、同科の *Ortholinea* 属の数種とは 18S rDNA 塩基配列の比較が可能ではあるが、*C. japonensis* と *Ortholinea* spp.との近縁性を確認することはできていない(Fig. 5b)。このことは、Ortholineidae 科自体の分類基準の見直しも必要であることを示唆しているかもしれない。

Ortholineidae 科の粘液胞子虫は、胞子正面像で円形もしくは変異に富んだ類円形をとり、胞子内の2つの極嚢は離れて位置し、それぞれが左右側部の縫合面に頭頂部を向いている(Lom and Dyková 2006)。極嚢が胞子の縦断面に対して、どの程度倒れ込んでいるのかは、種によって異なる。胞子の形態(正面像では円形、卵円形、三角形に区別、側面像では類円形、卵円形、紡錘形等に区別)、胞子殻表面の構造(線状構造の有無)に加え、小さなプラズモディウムが上皮内細胞寄生で管腔内に胞子が検出されることが多いか、同様に管腔臓器に寄生しながらプラズモディウムに多数の胞子が形成される *Ortholinea* 属や *Neomyxobolus* 属等のような成長を示す coelozoic タイプか、*Cardimyxobolus* 属や *Triangula* 属のように組織寄生で多数の胞子を形成するプラズモディウムが特徴となる histozoic タイプかでもグループ分けができる (Lom and Dyková 2006)。10 余種が記載されている *Ortholinea* 属を除けば、他属に分類される種はごく限られ、また、18S rDNA 塩基配列も本研究で *C. jap*

onensis について検討するまで全く登録がなかった。形態学的な類似性を持ちつつも、独立した属に分類されたこれらの種について今後検討が進めば、Ortholineidae 科の粘液胞子虫の相互の関係と分類群としての妥当性が正しく評価できるであろう。一般的に、海産魚に寄生する粘液胞子虫よりも、淡水魚に寄生する粘液胞子虫が長めの 18S rDNA 塩基配列をもち、1,800 塩基長を越えることが多いとされる(Fiala 2006)。今回、ドンコの消化管壁から得た *C. japonensis* は 1,588 塩基対とプライマー結合部の 38 塩基対を足しても、一般的な傾向とは大きく離れ、著しく短めであることには興味もたれる。18S rDNA 二次構造図にあてはめると、変異が多発する領域 V2、V3、V4、B7 (Holzer et al. 2007)の塩基が著しく短いことが明らかであった。

最近では 18S rDNA 塩基配列を利用して、粘液胞子虫の種鑑別や同定が信頼性をもって行えるようになってきた(Yurakhno et al. 2007; Liu et al., 2010, 2013; Matsukane et al. 2010, 2011; Yokoyama et al. 2012b; Li et al. 2012, 2013; Mansour et al. 2013; Miller et al. 2013; Zhao et al. 2013)。粘液胞子虫類の形態学的あるいは古典的分類体系において、18S rDNA に基づいた分子遺伝学的研究が進むにつれて、単系統群と見てきた分類単位が、多系統群あるいは側系統群を一括していることも理解されてきた(Fiala 2006; Fiala and Bartošová 2010)。ここで唯一の比較可能な系統進化マーカーとして用いてきた 18S rDNA 塩基配列が果たして粘液胞子虫の系統進化を反映しているかどうかを検証されるべき必要性もでてきた。しかしながら、Fiala and Bartošová (2010)は、蛋白をコードする遺伝子として“elongation factor 2”塩基配列に基づく分子系統樹と 18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹が一致することを示し、粘液胞子虫の系統発生を論ずる上で 18S rDNA を用いることが妥当性をもつことを示した。

粘液胞子虫類のうち、まだごく一部の記載種についてのみ、18S rDNA 塩基配列が DDB J/EMBL/GenBank データベースに登録されているに過ぎず、多くの種が表現型(形態学的特徴等)でのみ特徴づけられている(Fiala 2006)。更に問題となるのは、タイプ宿主とは大きくかけ離れた宿主から得られたとされる既知種の塩基配列登録が信用性をもつかどうかである。Molnár (2011)は、そのような塩基配列登録を信用することなく、再検討する必要性を強調している。未知種のみならず、既知種も含めて、形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴

づけを進めることでこそ、粘液胞子虫類の真の生物多様性理解も行えると考えることが肝要であろう。

第 2 章

日本近海産魚類の内臓に寄生する *Henneguya* 属と *Myxobolus* 属
(Myxosporidia: Bivalvulida) に分類される 3 新種:

Henneguya ogawai, *Henneguya yokoyamai* と *Myxobolus machidai*

*本章の研究については、以下の論文として公表済みである。

Li Y-C, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T and Sugita-Konishi Y (2012) Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporidia: Bivalvulida) from marine fish in Japan. Parasitol. Res. 111: 819-826.

2.1 概要

粘液孢子虫綱双殻目の *Henneguya* 属ならびに *Myxobolus* 属は Myxobolidae 科に分類され、形態学的・分子遺伝学的近縁性が高い。また、この 2 属で 1,000 種以上の多様な種が記載されている。それらの多くは世界各地の淡水魚から記録され、海産魚寄生種はまだまだごく限られた種が知られるにとどまっている。本章の研究では、日本近海の家産魚から得られた 3 種の Myxobolidae 科粘液孢子虫について検討した。*Henneguya* 属の 2 新種、*H. ogawai* と *H. yokoyamai* は日本国内瀬戸内海産クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)2尾の食道および腸管壁、あるいは、胆嚢壁や腹腔の漿膜下にそれぞれ寄生していた。プラズモディウム内での孢子形成は 2 種ともに同調的で、均一な発育を示した。*H. ogawai* の孢子は以下の通りの計測値である(n=30)。孢子長 8.9–12.2 (平均 11.0) μm 、孢子幅 6.3–7.5 (6.9) μm 、孢子厚 5.2–6.6 (5.9) μm 、同長の分岐する尾部突起は 8.4–12.7 (10.0) μm で、孢子全長としては 19.2–23.4 (21.1) μm であり、2つの極嚢は 3.8–5.2 (4.3) μm × 1.4–2.3 (1.9) μm であった。*H. yokoyamai* の孢子は以下の通りの計測値である(n=35)。孢子長 10.1–13.7 (平均 11.0) μm 、孢子幅 6.6–7.5 (7.1) μm 、孢子厚 4.5–6.4 (5.6) μm 、同長の分岐する尾部突起は 10.8–17.0 (14.1) μm で、孢子全長としては 21.9–29.2 (25.0) μm であり、2つの極嚢は 3.1–4.2 (3.7) μm × 1.8–2.4 (2.0) μm であった。*Myxobolus* 属の新種 *M. machidai* は、日本国内下関沖の日本海で釣られたイシガキダイ(*Oplegnathus punctatus*)1尾の食道壁から検出された。その類円形の孢子は以下の通りの計測値である(n=5)。孢子長 8.1–9.4 (平均 9.0) μm 、孢子幅 7.5–8.3 (7.8) μm 、孢子厚 5.1–6.0 (5.5) μm で、2つの極嚢は 3.2–3.8 (3.5) μm × 2.2–2.5 (2.3) μm であった。プラズモディウム内での孢子形成は同調せず、さまざまな発育状態の孢子が混在していた。*Henneguya* 2 種は分子系統学的に海外の家産魚寄生の *Henneguya* spp. と極めて近縁ではあったが、既知種とは明確に区別された。一方の *Myxobolus machidai* は、地中海産の家産魚寄生の *Myxobolus* spp. との近縁性より、海外の淡水魚から記載された一部の種との近縁性が確認された。本研究は、日本近海の家産天然魚寄生の *Henneguya-Myxobolus* 属粘液孢子虫について複合的に検討した初めての研究である。

2.2 諸言

広汎な粘液胞子虫について 18S rDNA 塩基配列を比較解析していくなかで、分子系統樹において *Henneguya-Myxobolus* 2属(Myxozoa: Myxosporidia: Bivalvulida: Myxobolidae) の記載種が1つのクレード内に複雑に混在することが明らかになった(Fiala 2006; Liu et al. 2010)。 *Henneguya* Thélohan, 1892 並びに *Myxobolus* Bütschli, 1882、両属の基本的な胞子構造は類似性が高いが、前者の胞子のみが尾状突起をもつ点で明確に区別される(Lom and Dyková 2006)。Eiras (2002)がまとめた記載種一覧では、*Henneguya* 属には 146 種が分類されている。この Eiras (2002)の公表以降、少なくとも 2012 年までに 33 種が新たに種記載されている(e.g., Dyková et al. 2011; Barassa et al. 2012)。一方、Lom and Dyková (2006) は同属に 204 種が分類されるとしている。同じように、*Myxobolus* 属について見てみると、744 種 (Eiras et al. 2005)、もしくは 792 種(Lom and Dyková 2006)が分類され、Eiras et al. (2005)から 2012 年までに新たに約 40 種が記載されている(e.g., Kaur and Singh 2011; U-taynapum et al. 2011)。ミクソゾア門には総計 2,200 種以上の種が分類されているが(Lom and Dyková 2006)、その半数近くが上述の *Myxobolus* 属もしくは *Henneguya* 属となる計算である。また、これらのほとんどは世界各地の淡水魚からの種記載であることも特記される。

日本国内で日常的に消費される海産魚に寄生する粘液胞子虫類を継続的に調査研究しているが(Matsukane et al. 2010, 2011)、今回、クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)の消化管壁と胆嚢壁から *Henneguya* 属の粘液胞子虫が、また、イシガキダイ(*Oplegnathus punctatus*)の食道壁から *Myxobolus* 属の粘液胞子虫が検出された。それらについて、形態学的ならびに分子生物学的解析を行い、既知種との類種鑑別を本研究では行った。

2.3 材料と方法

2.3.1 研究材料の収集と寄生虫学的検査

体長約 30cm のクロダイ 2 尾を瀬戸内海の山口県防府沖(三田尻湾; N34°03', E131°35')で 2011 年 7 月 11 日および 15 日に釣り上げ、研究室に持ち込んだ。イシガキダイは山口県下関沖の日本海で釣り上げられ、2011 年 10 月 5 日に山口市内のレストランで刺身用

に調理された残りの魚幹部を研究室に持ち込んだ。これらについて、可能な限り検査できる臓器について粘液胞子虫感染の有無を肉眼的に、また、実体顕微鏡を用いて検査した。粘液胞子虫の寄生が確認された場合には、その組織片を生理食塩水に入れ、その後、スライドガラスとカバーガラスで挟みプラズモディウム内から胞子を放出させた。分離した *Henneguya* 属の胞子の観察法と胞子計測値の算出法は前章と同様である。一方、*Myxobolus* 属の胞子については、寒天埋め込み法(Lom 1969)を用いて、油浸レンズ 1,000 倍率にて写真を撮り、以降の処理を行った。なお、計測は Lom and Arthur (1989)に従って実施した。特に記述しない限り、本研究での呈示する測定値は μm で示した。DNA 抽出に用いた胞子材料を除き、寄生虫材料は 10%中性緩衝ホルマリン液もしくは 70%アルコール液で固定した。なお、本研究で採取した寄生虫標本は、東京の国立科学博物館に寄託した。

2.3.2 DNA 抽出、polymerase chain reaction (PCR)と塩基配列のシーケンス

寄生虫サンプルを 1.5 ml のプラスチックチューブに入れ、使用説明書に従って Illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, U K)を用いて DNA 抽出を個々の材料について行った。前章の DNA 増幅と同様に、18S rDNA について重複するように用意した2つの断片について DNA ポリメラーゼ Blend Taq-Plus(TOYOBO, Dojima Hama, Osaka, Japan) と真核細胞ユニバーサルプライマー(NSF4/18 と NSR1438; NSF573/19 と SSU18R; Table 1 参照)を用いて 20 μl の反応液中で PCR 増幅を行った。PCR サイクルは前章と同様である。これと共に、汎用真核細胞プライマーEuri b1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAG-3')と Eurib2 (5'-CTTCCGCTGGTTCAC-CTACGG-3')を用いた 18S rDNA の 1 回での増幅も試みた。PCR サイクルは次の通りである: 95 $^{\circ}\text{C}$ で 2 分、その後、95 $^{\circ}\text{C}$ で1分間、48 $^{\circ}\text{C}$ で 1 分間、72 $^{\circ}\text{C}$ で 90 秒間を 35 サイクル、最後に 72 $^{\circ}\text{C}$ で 7 分間維持。PCR 産物を High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いて精製し、PCR 増幅に用いた 2 種のプライマー、NSF117/18 (5'-AATTTGACTCAACACGGG-3')、NSF1624/20 (5'-TTTG- TACACACCGCCCGT CG-3')、NSR581/18 (5'-TCTCAGGCTCCCTCTCCGG-3')などのシーケンス用プライマーを用いて塩基配列の決定を行った。

2.3.3 分子系統樹解析

本研究で解析した3種からの 18S rDNA塩基配列 (DDBJ/EMBL/GenBankの登録番号A B693050–AB693054)と、*Henneguya/Myxobolus* に関連した塩基配列ほかの双殻目の塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得て、多重整列プログラムCLUSTAL W (Thompson et al. 1994)を用いて並べたのち、細部については目視で微調整した。本研究で分析に用いた塩基配列の登録番号は、後述する系統樹図上に示してある。塩基の変異が大きく、塩基配列によってはギャップとなる領域は解析から外し、全配列が相同の塩基を比較できるようにしたことで(Smythe et al. 2006)、最終的には、554 塩基部位に変異がみられる 1,161 塩基長のシークエンスで系統樹を作成した。分子系統樹解析は最尤法 (Maximum likelihood, ML)を用い、“phylogeny.fr” website (<http://www.phylogeny.fr/>) で実施した(Guindon and Gascuel 2003; Dereeper et al. 2008)。信頼度の計算は、前章と同様にapproximate likelihood-ratio test を用いた(Anisimova and Gascuel 2006)。

2.4 結果

2.4.1 粘液胞子虫の検出状況

7月11日に釣り上げたクロダイの食道壁には少数の白色シストが見られ、その大きさは 0.78mm×0.58mm あるいは 0.66mm×0.66mm であった。7月15日に釣り上げたクロダイの腸管壁にも同様に少数の白色シストが見られ、その大きさは 0.78mm×0.32mm あるいは 0.38mm×0.20mm であった。更に、後者の胆嚢壁に微小な白色シストが散在的に確認された。その大きさを範囲(平均値±標準偏差; n=5)で示すと、0.22–0.71 (0.42±0.19) mm×0.17–0.57 (0.28±0.17) mm であった。一方のイシガキダイの食道壁に、4つの白色シストが見つかり、その大きさは 0.16–0.30 (平均 0.22) mm×0.13–0.28 (0.19) mm であった。

クロダイから分離された粘液胞子虫のプラズモディウムの中の胞子は楕円形で、2つずつの極嚢をもち、分岐した尾状突起が確認されたことから、*Henneguya* 属粘液胞子虫の特徴と一致した。消化管(食道と腸管)から得たプラズモディウムの中の胞子と、胆嚢壁もしくは腹腔壁の漿膜下のプラズモディウムの中の胞子では、尾状突起の長さの違いが見られた(Fig. 6)。この違いは、後述する 18S rDNA の塩基配列においても見られたことから、異なる臓

器に異なる粘液胞子虫種の寄生があったことが明らかになった。イシガキダイの食道壁から得られたプラズモディウムの中の胞子は円形で、2つの極嚢をもち、尾状突起はなかった。この特徴は *Myxobolus* 属とよく一致した(Fig. 7)。胞子の形態学的特徴や 18S rDNA についての分子遺伝学的な解析により、今回の研究で検査対象とした3種はいずれも未記載の Myxobolidae 科粘液胞子虫であることが明らかになったことから、これらを新種として以下に詳述したい。

2.4.2 新種記載: *Henneguya ogawai* (Myxosporia: Bivalvulida)

(Figures 6, 8A, 8B)

胞子は長楕円形で、分岐した尾状突起をもつ。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。胞子体部の長さは 8.9–12.2 (11.0±0.8) μm; 胞子幅 6.3–7.5 (6.9±0.4) μm; 胞子厚 5.2–6.6 (5.9±0.4) μm; 尾状突起は同等長で 8.4–12.7 (10.0±1.2) μm、胞子全体の長さは 19.2–23.4 (21.1±1.3) μm、極嚢長 3.8–5.2 (4.3±0.4) μm; 極嚢幅 1.4–2.3 (1.9±0.2) μm。2つの極嚢のサイズはやや異なる。極嚢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。

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: クロダイ、Black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)。

感染部位: 消化管壁の固有層あるいは筋層の結合組織にシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、山口県、防府沖の瀬戸内海(三田尻湾)。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr332, Parahapantotype NSMT-Pr331, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は、東京大学大学院水産生物科学専攻魚病学研究室の小川和夫名誉教授に因んでいる。小川名誉教授は粘液胞子虫類を含めた魚類寄生虫学に多大な貢献をされた研究者である。

感染率: 不明。

[類種鑑別]

楕円形の孢子は 2 枚の殻片が合わさって形成され、それに尾状突起が付帯している形態学的特徴は、*Henneguya* 属の定義とよく一致する(Lom and Dyková 2006)。多くの *Henneguya* 属粘液孢子虫は淡水魚の鰓、皮膚、腎臓から記載されている(Eiras 2002)。次のような *Henneguya* 属粘液孢子虫が、淡水棲もしくは汽水棲の魚類の消化管壁から報告されている(Eiras 2002; Reed et al. 2007)。すなわち、エジプトの魚(*Clarias lazera*)から *H. branchialis* Ashmawy et al., 1989、エジプトの魚(*Lates niloticus*)から *H. ghaffari* Ali, 1999、中国の魚(*Channa argus*)から *H. gigas* Chen et Hsieh, 1960、中国の魚(*Misgurnus anguillicaudatus*)から *H. hainanensis* Chen et Ma, 1998、アメリカの魚(*Sciaenops ocellatus*)から *H. ocellata* Iversen et Yokel, 1963、中国の魚(*Channa striatus*)から *H. ovaliformis* Ma, Wang et Cai, 1986、日本のチチブ(*Tridentiger obscurus*)から *H. preintestinalis* Ozaki et Isizaki, 1941、中国の魚(*Rhinogobius giurinus*)から *H. rhinogobii* Li et Nie, 1973、中国の魚(*Channa argus*)から *H. sinensis* Chen et Hsieh, 1960、中国の魚(*Channa argus*)から *H. tangschensis* Wu, 1997、フランスの魚(*Gymnocephalus cernuus*)から *H. tenuis* Vaney et Conte, 1901、日本のギンブナ(*Carassius auratus auratus*)から *H. zikawiensis* Sikama, 1938 である。これらの種いずれの孢子の計測値も本研究で新種記載した *H. ogawai* と一致するものはない。また、ごく少数にとどまるが、海産魚から記載された *Henneguya* 属粘液孢子虫としては、日本で養殖されたスズキからの *H. lateolabracis* Yokoyama et al., 2003、日本のマダイからの *H. pagri* Yokoyama et al., 2005、ハワイの魚(*Selar crumenophthalmus*)からの *H. akule* Work et al., 2008 である。この海産魚寄生の *Henneguya* 属のほとんどは、鰓、動脈球および腎臓から記録されている(Kpatcha et al. 1997; Eiras 2002; Yokoyama et al. 2003, 2005; Reed et al. 2007; Work et al. 2008)。また、*H. ogawai* はごく短い尾状突起をもつことから、*H. ouakamensis* Kpatcha et al., 1997 を除く、すべての海洋性 *Henneguya* spp. との種鑑別は容易かもしれない。*H. ogawai* と *H. ouakamensis* の異なる宿主特異性と組織特異性に加え、両種間では極囊の実寸、あるいは孢子内に占

める相対測定値において違いがみられる。

2.4.3 新種記載: *Henneguya yokoyamai* (Myxosporea: Bivalvulida)

(Figures 6 I~L, 8C, 8D)

胞子は長楕円形で、分岐した尾状突起をもつ。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。胞子体部の長さは 10.1–13.7 (11.0±0.8) μm; 胞子幅 6.6–7.5 (7.1±0.4) μm; 胞子厚 4.5–6.4 (5.6±0.4)μm; 尾状突起は同長で 10.8–17.0 (14.1±1.6) μm、胞子全体の長さは 21.9–29.2 (25.0±1.7)μm、極囊長 3.1–4.2 (3.7±0.4) μm; 極囊幅 1.8–2.4 (2.0±0.2) μm。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。1つのプラズモディウム内での胞子の発育は同調している。

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: クロダイ、Black sea bream (*Acanthopagrus schlegelii*)。

感染部位: 胆嚢壁の固有層あるいは筋層の結合組織にシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、山口県、防府沖の瀬戸内海(三田尻湾)。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr334, Parahapantotype NSMT-Pr333, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は、東京大学大学院水産生物科学専攻魚病学研究室の横山 博博士に因んでいる。横山博士は粘液胞子虫類全般に関する分類とその生物学的特徴づけを行い多大な貢献をされている研究者である。

感染率: 不明。

[類種鑑別]

楕円形の胞子の形態学的特徴は、上述の *H. ogawai* とほぼ同じであり、違いは尾状突起の長さにある。本種と他の *Henneguya* 属粘液胞子虫との種鑑別も、上述した *H. ogawai* と同様である。淡水魚の胆嚢寄生の *Henneguya* 属粘液胞子虫としては次のような種があ

る。すなわち、アメリカの魚 (*Ictalurus punctatus* と *Ictalurus furcatus*) から *H. limatula* Me glitsch, 1937、カメルーンの魚 (*Brienomyrus brachyistius*) から *H. ntemensis* Fomena an d Bouix, 1996、中国の魚 (*Mylopharyngodon piceus*) から *H. kawangtungensis* Chen, 199 8、ブラジルの魚 (*Arapaima gigas*) からの *H. arapaima* Feijó et al., 2008 である。*H. ntem ensis* を除いた、これらのすべての種には、*H. yokoyamai* より細長い孢子体とより長い尾状突起がある。また、*H. ntemensis* と *H. yokoyamai* の孢子体はほぼ同じサイズであるが、前種 *H. ntemensis* の尾状突起は極めて短い (3.2–9.6 μ m 長; 平均 5.1 μ m) (Fomena and Boui x 1996; Eiras 2002; Feijó et al. 2008)。更に、後述するように、18S rDNA 塩基配列で比較可能なすべての既知種ならびに *H. ogawai* と明確な種鑑別が可能である。

2.4.4 新種記載: *Myxobolus machidai* (Myxosporea: Bivalvulida)

(Figures 7, 8E, 8F)

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

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: イシガキダイ、Spotted knifejaw (*Oplegnathus punctatus*)。

感染部位: 食道壁の固有層あるいは筋層の結合組織にシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、山口県、下関沖の日本海。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr335, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は、(元)国立科学博物館動物研究部長であり、(元)目黒寄生虫館長町田昌明博士に因んでいる。町田博士は魚類寄生虫をはじめ寄生虫学に多大

な貢献をされた研究者である。

感染率: 不明。

[類種鑑別]

本種 *M. machidai* の形態学的特徴は、尾状突起を欠くことを除けば、*Henneguya* spp. ともよく類似している。*Myxobolus* 属の孢子は小型で、互いによく似ていることから、種鑑別は容易ではない。孢子の形態学的特徴と共に、宿主特異性、臓器・組織特異性は粘液胞子虫の古典的種鑑別において重要な点である。この観点から言うと、本研究以前にイシダイ科(Oplegnathidae)の海産魚からの *Myxobolus* 属粘液胞子虫の 2005 年時点でも記録はなく(Eiras et al. 2005)、また、それ以降について調べても特には見つけられなかった。約 45 種の *Myxobolus* 属粘液胞子虫が消化管壁に寄生するとされるが、中国近海のボラ(*Mugil cephalus*)から記載された *M. chungchowensis* Chen, 1998 を除けば、その宿主はすべて淡水魚である(Eiras et al. 2005)。*M. chungchowensis* の孢子ならびに極嚢は *M. machidai* のそれに比べて大きく(Chen and Ma 1998)、これら 2 種の鑑別は形態学的に可能である。

2.4.5 分子系統学的解析

ダイレクト・シーケンス法で、*H. ogawai* と *H. yokoyamai* の 18S rDNA 塩基配列が得られた。それぞれ 2,038 塩基長と 2,029 塩基長であり、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録した(登録番号 AB693050–AB693053)。また、*M. machidai* については 2,020 塩基長の 18S rDNA 塩基配列が得られ、同様にデータベースに登録した(DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB693054)。7 月 11 日に釣り上げたクロダイの食道壁寄生の *H. ogawai* と 7 月 15 日に釣り上げたクロダイの腸壁に寄生する *H. ogawai* の 18S rDNA 塩基配列は完全に同一であった。7 月 15 日に釣り上げたクロダイの胆嚢壁あるいは腹膜に寄生していた *H. yokoyamai* についても同様に、寄生部位による塩基配列の違いはなく、同一種であった。今回得たいずれの粘液胞子虫種についても、既知種として登録された塩基配列の中に一致するものはなかった。

18S rDNA 塩基配列に基づいて構築した ML 分子系統樹において、*H. ogawai* と *H. yo*

koyamai は海産魚から報告のある *Henneguya* 属粘液胞子虫とクレードを作った。ここに含まれる種としては、動脈球にプラズモディウム寄生が起こす *H. pagri*、*H. lateolabracis*、*H. akule* など(Yokoyama et al. 2003, 2005; Work et al. 2008)、あるいは鰓寄生の *H. tunisiensis* (Bahri et al. 2010) であった(Fig. 9)。この分子系統樹のクレードの中でも、*H. ogawai* と *H. yokoyamai* は特に近縁な種といえるが、18S rDNA 塩基配列自体を比較した場合の同一性は 95.4%に過ぎない。一方、*M. machidai* は淡水魚寄生の一部の *Henneguya* spp. が集まるクレードに含まれ、海産魚寄生の *Myxobolus* spp. が集まる(Bahri et al. 2003)クレードからは離れて系統樹上では位置していた。

2.5 考察

世界のクロダイ属(genus *Acanthopagrus*)から記載のある *Henneguya-Myxobolus* 属粘液胞子虫としては唯一、*Myxobolus acanthopagri* (Lom and Dyková 1994)があげられる。イシダイ科(Oplegnathidae)の他の海産魚を広く眺めても、この分類群の粘液胞子虫の記録はない。*M. acanthopagri* はオーストラリアのニューサウスウェールズ州の Coffs 湾で釣ったクロダイ属魚(*A. australis*)の上皮下組織と腸管筋層から記録された種である。残念ながら、その 18S rDNA 塩基配列は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに未登録で、今回日本近海で得たクロダイ寄生の *Henneguya* spp. との分子系統学的関係は解析できなかった。

特定魚種や近縁魚種を宿主とするかどうか、あるいは胞子形態の類似性が高いかどうかよりも、同一臓器を寄生部位とする粘液胞子虫種が分子系統樹において同一クレードに集まりやすいようである(Andree et al. 1999; Eszterbauer 2004; Holzer et al. 2004; Fiala 2006)。さらに、分岐する尾状突起をもつ "*Henneguya*" 属は、その仲間となる粘液胞子虫の系統発生において、種分化する機会が複数回あったことが推測されている(Kent et al. 2001; Fiala 2006; Lom and Dyková 2006)。すなわち、多系統群として存在する "*Henneguya*" 属あるいは "*Myxobolus*" 属については新たな分類体系の提起が近い将来に求められている(Lom and Dyková 2006; Bartosová et al. 2009; Picon-Camacho et al. 2009; Liu et al. 2010)。Liu et al. (2010)は単一種 *M. turpisrotundus* Zhang, 2009 を観察する中で、*Myxobolus*-タイプと *Henneguya*-タイプの胞子が同時に観察されたことを報告して

いる。但し、後者の混在率は約 10%であった。このことは、Kent et al. (2001)も指摘しているように、尾状突起の有無だけで属を分けることの危険性を考えさせる報告である。このような必要性からも、現在のところ専ら 18S rDNA が用いられる分子遺伝学的解析ではあるが、種鑑別においてその有用性が益々高まっている。しかしながら、既知種のごく一部しか現在のところ解析できない。このような現状を考えると、形態学的種鑑別と分子遺伝学的解析を併用するかたちで既知種の遺伝学的情報を蓄積し、形態学的種分類体系と分子系統学的種分類体系の間の齟齬をなくす努力がどうしても必要となる。

Henneguya-Myxobolus 属は 1,000 種を超える粘液胞子虫が分類されているが、その分子遺伝学的情報が分子系統樹解析に適用できる種はまだまだ限られている。このことで、この大きな分類群を再構成した分類群の提唱が遅れる要因ともなっている。本研究で、海産魚から検出した *Henneguya-Myxobolus* 属の 3 種について詳細に検討したことは、淡水魚寄生種と海産魚寄生種との間の分子系統学的位置さらには分類学的関係を推測していく上で、とても重要な知見となることが期待される。

第 3 章

マグロ (*Thunnus* spp.) 寄生の *Kudoa neothunni* の rDNA 塩基配列
に基づく遺伝学的特徴づけ、ならびにマサバ寄生粘液胞子虫
(Myxosporea: Multivalvulida) の 1 新種:
Kudoa scomberi

*本章の研究については、以下の論文として公表済みである。

Li Y-C, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporea: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). Parasitol. Res. 112: 1991-2003.

3.1 概要

Kudoa neothunni は6つの殻片と極囊をもつ特有の多殻目粘液胞子虫として世界で初めて確認され、当初は *Hexacapsula Arai and Matsumoto, 1953* と命名されたが、現在は、*Kudoa* 属に組み込まれている。その分子遺伝学的解析は未だ実施されていないことから、本研究では死後筋肉融解現象を示したキハダマグロ(*Thunnus albacares*)からの分離株、正常な筋肉外観をもつクロマグロ(*Thunnus thynnus*)からの分離株についてリボソーム RNA 遺伝子 (rDNA)について塩基配列を比較検討した。胞子は体側筋の筋線維に局在しシュードシストを形成し、頭頂像で6つの殻片が放射状に配置される典型的な *K. neothunni* の特徴を有していた。胞子の計測値は以下の通りである(n=15)。すなわち、胞子幅(width) 9.5–11.4 μ m、縫合線胞子幅(sutural width) 7.3–8.6 μ m、胞子厚(thickness) 8.9–10.9 μ m、胞子長(length) 7.3–7.7 μ m、極囊は 3.6–4.1 μ m \times 1.8–2.3 μ m であった。胞子側面像はピラミッド形を呈し、頭頂部突起はない。2分離株の 18S ならびに 5.8S rDNA の塩基配列はほとんど同一であるが、ITS1 (757 塩基長で同一性は 62.4%)、ITS2 (599 塩基長で同一性は 66.9%)、28S rDNA (2,245 塩基長で同一性は 99.0%)と変異が見られた。18S あるいは 28S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、*K. neothunni* は5つ以上の殻片・極囊をもつ *Kudoa* 属粘液胞子虫とクレードを作り、殊に *K. grammatorcyni* や *K. scomberomori* と高い近縁性をもっていた。これとは別に、日本海で採取したマサバ(*Scomber japonicus*)の体側筋に微小なシスト(0.30–0.75 mm \times 0.20–0.40 mm)を作って寄生する4つの殻片と極囊をもつ *Kudoa* 属粘液胞子虫を検出した。胞子の形態は、太平洋南東部のペルー沖で漁獲されたマサバから記載のある *K. caudata* に似ていたが、後者がもつ殻片表面に生えたフィラメント状の突出物を欠いていた。また、太平洋のキハダマグロから知られる *K. thunni* と形態学的に類似していた。胞子の計測値は以下の通りである(n=30)。すなわち、胞子幅 8.2–10.5 μ m、胞子厚 7.0–8.8 μ m、胞子長 6.1–6.8 μ m、極囊は 2.5–3.4 μ m \times 1.3–2.0 μ m であった。今回得た種と *K. thunni* の 18S および 28S rDNA 塩基配列の同一性はそれぞれ 98.5%と 96.3%であった。また、*K. thunni* 寄生時に見られる筋肉内シストのサイズは明らかに大きい(1.3–2.0 mm \times 1.1–1.4 mm (n=14) vs. 0.30–0.75 mm \times 0.20–0.40 mm (n=7))。マサバから分離した粘液胞子虫について、新種 *Kudoa scomberi* と命名した。

3.2 諸 言

Kudoa neothunni Arai and Matsumoto, 1953 (Myxosporea: Multivalvulida)は、インドネシア海域(Banda Sea)で漁獲され東京築地市場に持ち込まれたキハダマグロ(*Thunnus albacares*; syn. *Neothunnus macropterus*)の死後筋肉融解現象の原因として新種記載された(Arai and Matsumoto 1953)。その胞子は体側筋の筋線維内にシュードシストを形成して集簇しており、6つの殻片と極囊(SV/PC)は放射対称性に配置されていた。この特有の胞子構造と当時の *Kudoa* 属の定義(Lom and Noble 1984) もあって、本種を元に新属 *Hexacapsula* が提唱された(Arai and Matsumoto 1953)。その後も同様な経緯で、*Pentacapsula* (5つの SV/PC)や *Septemcapsula* (7つの SV/PC)が多殻目クダア科に加わった(Naidenova and Zaiika 1970; Hsieh and Chen 1984)。Whipps et al. (2003)が 13 SV/PC の多殻目粘液胞子虫、すなわち *K. permulticapsula* を報告した折に、彼らはその種を *Kudoa* 属に分類した。その理由は、新たに見つけた種の 18S リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)塩基配列が、*K. thyrssites* や *K. quadricornis* と大きく違うことなく、分子系統樹上で古典的定義による *Kudoa* 属粘液胞子虫(当時の定義では 4 SV/PC)と同じクレード内に収まったことによる。引き続いて、Whipps et al. (2004) は *Pentacapsula* 属、*Hexacapsula* 属(6つの SV/PC)、*Septemcapsula* 属に分類されていた種についても検討し、4つ以上の SV/PC をもつ海洋性粘液胞子虫を同一の *Kudoa* 属に分類することに妥当性があることを示した。

粘液胞子虫の胞子は小さく、種鑑別に用いることができる形態学的特徴も乏しいといえることから、形態学的な特徴の精査だけでは信用できる種鑑別は難しい。このことから、rDNA 塩基配列や、組織特異性、宿主特異性、病原性、地理学的分布などの様々な生物学的情報が種同定に動員されることが求められる。同一海域に分布し、同様の胞子形態をもち、18 S rDNA 塩基配列もほぼ同一(1,680 塩基長で 99.8%の同一性)である *K. alliaris* と *K. rosenbuschi* の種鑑別点は、後者のみが死後筋肉融解現象を起こし得ることである(Whipps and Diggles, 2006)。更に、Burger et al. (2007)は胞子の形態学的特徴が大きく異なり、また、分離された宿主が分類学的に遠い、2つの *Kudoa* 属粘液胞子虫の分離株が、同一の 18S rDNA 塩基配列をもつことを報告した。すなわち、日本産ヒラメに寄生する7つの SV/PC をもつ *K. yasunagai* と(Yokoyama et al. 2004)とオーストラリア産サンド・ホワイティング

(*Sillago ciliata*)に寄生する5つのSV/PCをもつ*Kudoa* sp.である。この状況を受けて、Burger et al. (2007)は、18S rDNA 塩基配列では明らかに異なる異種であっても区別できない場合もあるのではないかと考えた。しかしながら、その後、Burger and Adlard (2010b)は、前述の異なる孢子形態をもつ分離株であっても、18S rDNA 塩基配列が同一であれば同一種と考えていいことを示した。18S rDNA の種鑑別における分離能に問題があったわけではないとされたのである。

現在*Kudoa* 属に分類されている80余種の約半数について18S rDNA 塩基配列が明らかにされている(Burger and Adlard 2011; 佐藤 2011)。上述したように、分子遺伝学的な特徴づけをされた*Kudoa* spp.でもあっても分類学的な課題が解決されたとはいえない状況であるが、まったく分子遺伝学的情報のなく形態学的な特徴づけのみで種記載された*Kudoa* 粘液孢子虫の種鑑別は特に難しい。タイプ宿主以外の魚類から検出された場合、これまでに分布が知られていなかった海域からの検出があった場合など、既知種と孢子形態が同一であれば、その種鑑別は極めて慎重に行われなければならない(Moran et al. 1999; Kent et al. 2001; Yokoyama 2003; Diamant et al. 2005; Whipps and Diggles 2006; Whipps and Kent 2006; Burger and Adlard 2010a, 2011)。

本研究では、死後筋肉融解を引き起こすあるいは起こさない2系統の*K. neothunni* 分離株について、その分類学上の関係を明らかにするためにrDNA 塩基配列を比較検討した。さらに、日本海で漁獲されたマサバ(*Scomber japonicas*)の体側筋に微小なシストを形成していた4つのSV/PCをもつ*Kudoa* 種について、形態学的・分子遺伝学的に検討し、同じくマサバから報告のある*K. caudata* Kovaleva and Gaevskaya, 1983と比較検討した。後者はマサバから検出されているが、太平洋南東部ペルー沖で漁獲された個体から種記載されている。

3.3 材料と方法

3.3.1 研究材料の収集と寄生虫学的検査

2010年夏に、日本の静岡県に所在する和風レストランから、*Kudoa* 粘液孢子虫の寄生したクロマグロ(*T. thynnus*)の冷凍筋肉ブロックを供与された。太平洋産であること以外に

は、正確な漁獲情報は得ていない。粘液孢子虫の重度の寄生はあったが、死後筋肉融解現象は呈しておらず、正常な外観を保っていた。

冷凍筋肉ブロックを薄くスライスし、生理食塩水に入れ、剣先ピンセットで寄生筋線維を分離して、孢子を放出させた。分離し孢子の観察法と孢子計測値の算出法は前章と同様である。計測は Lom and Arthur (1989)に従って実施した。特に記述しない限り、本研究での呈示する測定値は μm で示した。DNA 抽出に用いた孢子材料および 70%アルコール液固定材料を除き、寄生虫材料は 10%中性緩衝ホルマリン液で固定し、Matsukane et al. (2010)が行った方法に準じて走査電子顕微鏡観察を実施した。簡述すれば、以下の通りである。ホルマリン固定した孢子を 0.2M リン酸バッファー(PB; $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4\text{-buffered saline}$, 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、袋から孢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。

一方のキハダマグロ(*T. albacares*)由来の *K. neothunni* であるが、本宿主は 2011 年 10 月 15~20 日にフィリピンのミンダナオ島沖の太平洋南西部(おおよそ北緯 7~8°、東経 131°)で漁獲された体重 36kg の個体で、2011 年 11 月 5 日に沖縄県那覇市に水揚げされた。その折には顕著な死後筋肉融解現象を示していた。この材料についても、上述した顕微鏡観察を実施した。

2011 年 2 月 11 日に山口大学近くの魚市場でいくつかの微小な白点をもつマサバの切り身を購入した。この魚は、長崎県沖の日本海で漁獲されたものである。この材料についても、上述したように寄生虫学的検査を実施した。

なお、本研究で採取した寄生虫標本は、東京の国立科学博物館に寄託した(標本番号 N

SMT-Pr320-Pr330)。

3.3.2 DNA 抽出、polymerase chain reaction (PCR)と塩基配列のシーケンス

寄生虫サンプルを 1.5 ml のプラスチックチューブに入れ、使用説明書に従って Illustra™ tissue and cells genomicPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare UK, Buckinghamshire, UK)を用いて DNA 抽出を個々の材料について行った。前章の DNA 増幅と同様に、DNA ポリメラーゼ Blend Taq-Plus (TOYOBO, Dojima Hama, Osaka, Japan) と真核細胞ユニバーサルプライマー(Table 1 参照)を用いて 20µl の反応液中で PCR 増幅を行った。PCR サイクルは次の通りである: 94°C で 3 分、その後、94°C で 45 秒間、64°C もしくは 62°C (Table 1 参照)で 1 分間、72°C で 1 分間を 40 サイクル、最後に 72°C で 7 分間維持した。PCR 産物を High Pure PCR Cleanup Micro Kit (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany)を用いて精製し、表 3-1 に示した PCR 増幅に用いたプライマーを用いてダイレクト・シーケンシングした。ダイレクト・シーケンシングがうまくいかない増幅産物については、plasmid vector である pTA2 (Target Clone™; TOYOBO)に組み込み、*Escherichia coli* JM109 (TOYOBO)に導入した。1つのサンプル当たり3つ以上のコロニーを任意に選択し、plasmid DNA を NucleoSpin® Plasmid kit (MACHEREY-NAGEL GmbH, Düren, Germany)を用いて抽出した。これらは forward/reverse M13 ユニバーサルプライマーでシーケンスした。

3.3.3 分子系統樹解析

本研究で新たに得た 18Sおよび 28S rDNA 配列(DDBJ/EMBL/GenBankの登録番号AB693040–AB693049)と、*Kudoa*属に関連した塩基配列を DDBJ/EMBL/GenBank データベースから得て、多重整列プログラムCLUSTAL W (Thompson et al. 1994)を用いて並べたのち、細部については目視で微調整した。本研究で分析に用いた塩基配列の登録番号は、後述する系統樹図上に示してある。塩基の変異が大きく、塩基配列によってはギャップとなる領域は解析から外し、全配列が相同の塩基を比較できるようにしたことで(Smythe et al. 2006)、最終的には、341 塩基部位に変異がみられる 1,341 塩基長の 18S rDNAシーケンスで系統樹を作成した。また、286 塩基部位に変異がみられる 506 塩基長の 28S rDNA

シーケンスで系統樹を作成した。分子系統樹解析は最尤法(Maximum likelihood, ML)を用い、“phylogeny.fr” website (<http://www.phylogeny.fr/>) で実施した(Guindon and Gascuel 2003; Dereeper et al. 2008)。信頼度の計算は、前章と同様にapproximate likelihood-ratio test を用いた(Anisimova and Gascuel 2006)。Unicapsula sp. (Trilosporidae, Multivalvulida; DDBJ/EMBL/GenBank登録番号AY302725 and AY302727) を系統樹解析の外群として用いた。

3.4 結果

3.4.1 形態学的観察

クロマグロの体側筋は正常な外観を呈していたが、キハダマグロは顕著な死後筋肉融解を起こしていた。Fig. 10 に示したクロマグロでは、筋肉 1g あたり 7×10^7 個の胞子を含んでいた。その胞子は 6 つの殻片をもち、頭頂像では放射状に配置され、側面像ではピラミッド形をしていた(Fig. 11)。頭頂部突起は欠いていた。これら光学顕微鏡下での所見は、走査電子顕微鏡観察でも確認された(Fig. 12)。キハダマグロの融解した筋肉および正常な筋肉から採取した胞子はすべて同じ形態学的特徴であった。以上の分離した胞子の形態学的特徴は *K. neothunni* のそれと一致した。胞子の計測値は以下の通りである(n=15)。すなわち、胞子幅(width) 9.5–11.4 (平均 10.6) μm 、縫合線胞子幅(sutural width) 7.3–8.6 (8.1) μm 、胞子厚(thickness) 8.9–10.9 (9.7) μm 、胞子長(length) 7.3–7.7 (7.6) μm 、極嚢は 3.6–4.1 (3.8) $\mu\text{m} \times 1.8$ –2.3 (2.0) μm であった(Table 4)。光学顕微鏡下では、極嚢内の極糸の巻数は確認できなかった。

本研究で観察した *K. neothunni* の極嚢は Arai and Matsumoto (1953) の原記載よりも大きい。が、*K. grammatorcyni* とは、より大きい胞子サイズ、胞子殻片の辺縁部の尖り方、側面像の違い (pyramidal vs. ovoid; Table 4) といった点で鑑別可能である。*K. neothunni* と *K. scomberomori* の胞子形態はかなり類似しているが、*K. neothunni* のほうがより大きな胞子と極嚢を持っており、また側面像も異なる(Table 4)。*K. thalassomi* 胞子は側面突起をもつことから *K. neothunni* と区別される。一方 *K. septempunctata* はその胞子の形と極嚢サイズがばらつく特徴により区別される(Table 4)。

日本海で漁獲されたマサバの切り身には、薄い線維性被膜に囲まれた白色シスト 20 個が検出された。そのシスト (平均±標準偏差;n=7)は、0.30–0.75 (0.49 ± 0.15) mm × 0.20–0.40 (0.26 ± 0.07) mm であった。胞子は頂上面から見ると角の丸い正方形で、4 つの同じ大きさの殻片をもっていた (Figs. 13, 14)。胞子の側面像は卵円形で、胞子の頭頂部に突起は見られなかった。極嚢は水滴状または卵形である。この胞子を形態学的に類似している胞子をもつ *Kudoa* spp. と比較した (Table 5)。

3.4.2 分子系統樹解析

クロマグロから得た *K. neothunni* の rDNA は 6,226-bp 長で、ETS (external transcribed spacer) 領域の一部が 170-bp、18S rDNA は 1,741-bp、ITS (internal transcribed spacer) 1 領域は 705-bp、5.8S rDNA は 158-bp、ITS2 領域は 529bp、28S rDNA の一部として 2,923-bp である (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB693042)。キハダマグロから採取した *K. neothunni* の rDNA は 5,609-bp 長で、18S rDNA の一部は 1,720-bp、ITS1 領域は 705-bp、5.8S rDNA は 158-bp、ITS2 領域は 588-bp、28S rDNA の一部は 2,438-bp であった (DDBJ/EMBL/GenBank 登録番号 AB693049)。2 つの分離株の 18S および 5.8S rDNA 塩基配列はほとんど一致した (それぞれについて、1,720-bp 長で 99.9% の同一性、158-bp で 100% の同一性)。しかし、この 2 つの分離株の rDNA では、ITS1 領域 (757-bp 長で 2.4 % の同一性)、ITS2 領域 (599-bp 長で 66.9 % の同一性)、28S rDNA (2,245-bp 長で 99.0 % の同一性) に違いが明らかであった。

18S および 28S rDNA シークエンスに基づく ML 法分子系統樹では、*K. neothunni* は *K. grammatorcyni* と最も近縁で、5 つ以上の SV/PC をもち体側筋寄生の *Kudoa* spp. と同じクレードに入った (Figs. 15 and 16)。*K. septempunctata* と *K. thalassomi* は体側筋寄生種であるが、この 2 種は 5 つ以上の SV/PC をもち脳寄生の *Kudoa* spp. とクレードをつくる。*K. neothunni* と *K. grammatorcyni* 間の 18S および 28S の rDNA 塩基配列の同一性は、それぞれ 99.4% (1,680-bp 長で 10 塩基の違い) と 93.4 % (726-bp 長で 48 塩基の違い) であった。*K. neothunni* と *K. scomberomori* の 18S rDNA 塩基配列の同一性は 99.6 % (1,680-bp 長で 6 塩基の違い) であった。両種間の 28S rDNA 塩基配列の比較

は、*K. scomberomori* についての当該塩基配列情報が DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されていないので実施できなかった。

マサバから分離された *Kudoa* 種は、ML 法による 18S および 28S rDNA に基づく分子系統樹において、*K. thunni* および “*K. crumena*” と共に 1 つのクレードを形成した (Fig. 15 and 16)。この *Kudoa* 分離株と *K. thunni* 間の 18S および 28S rDNA 塩基配列の同一性は、それぞれ 98.5 % (1,765-bp 長で 27 塩基の違い) と 96.3% (804-bp 長で 30 塩基の違い) であった。同様に、今回の分離種と “*K. crumena*” は 98.8 % (1,631-bp 長で 20 塩基の違い) と 96.6% (815-bp 長で 28 塩基の違い) であった。今回の *Kudoa* 分離種と *K. trachuri* の間の 18S および 28S rDNA 塩基配列の同一性は、それぞれ 96.2% (1,780-bp 長) と 90.4% (771-bp 長) であった。以上の通り、形態学および分子学的特徴が既知種とは異なることから、本種を新種として記載する。

3.4.3 新種記載: *Kudoa scomberi* (Myxosporae: Multivalvulida)

(Figures 13, 14; Table 5)

プラズモディウムは薄い線維性被膜に包まれ、体側筋に局在する。その白色シストの大きさは微小で、0.30–0.75 (平均 0.49) mm × 0.20–0.40 (平均 0.26) mm (n=7) であった。

胞子は頭頂像で角の丸い四角形を呈し、4つの殻片と極嚢は同等のサイズである。光学顕微鏡観察においては、殻片に特に目立つ構造はない。極嚢は水滴状で、胞子の前端に近く位置している。胞子の頭頂像では、極嚢は胞子の半径の約 50% もしくはそれ以下を占めるにすぎない。側面像では、胞子は楕円形で、底部がやや平たい印象を与える。極嚢内での極糸の巻数は確認できない。胞子 (n=30) の平均計測値 (括弧内は平均 ± 標準偏差) は以下の通りである。胞子幅 9.2 (8.2–10.5) μm; 胞子厚 8.1 (7.0–8.8) μm; 胞子長 6.4 (6.1–6.8) μm; 極嚢長 2.9 (2.5–3.4) μm; 極嚢幅 1.6 (1.3–2.0) μm。

18S rDNA、ITS1 領域、5.8S rDNA の一連の塩基配列 (2,232-bp 長)、および 5.8S rDNA、ITS2、28S rDNA の一連の塩基配列 (1,052-bp 長) を DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録している (登録番号 AB693044 と AB693045)。

[新種寄生に際しての各種情報]

タイプ宿主: マサバ、*Scomber japonicus* Houttuyn, 1782, chub mackerel (Actinopterygii: Perciformes: Scombridae)。

感染部位: 体側筋にシストを形成して寄生。

タイプ採取地: 日本、長崎県沖の日本海。

標本の寄託状況: Hapantotype NSMT-Pr323, National Museum of Nature and Science, Tokyo, Japan.

命名の由来: 本種の種小名は宿主の学名 *Scomber japonicus* に因む。

感染率: 不明。

[類種鑑別]

K. caudata は同じ宿主(*S. japonicus*)から報告されたが、宿主の地理的が異なり、太平洋南東部のペルー沖で捕獲されている(Kovaleva and Gaevskaya 1983)。全般的にいえば、*K. caudata* と *K. scomberi* の胞子は類似性が高いが、*K. caudata* は各殻片の側面に髪の毛のような長い糸状の突起をもつことで、本研究で記載した種と区別される。同様な微細で短い突起を各殻片の側面に持つ種はアマゾン河口域で捕獲された魚(*Aequidens plagiogonatus*)から記載された *K. aequidens*、地中海で捕獲された魚(*Pomatoschistus minutus*)から記載された *K. camarguensis* でも記録されている(Pampoulie et al. 1999; Casal et al. 2008)。その原記載以降、*K. caudata* は検出されていない。このことから *K. caudata* の rDNA 塩基配列は不明であり、本研究で記載した *K. scomberi* との系統学的関係は知ることができない。*K. scomberi* は 18S および 28S の rDNA 塩基配列に基づいたそれぞれの分子系統樹上で、*K. thunni*、“*K. crumena*”および *K. trachuri* のような頭頂像で正方形の胞子を持つ *Kudoa* 種とクレードを形成した。“*K. crumena*”との 18S および 28S rDNA 塩基配列での同一性はかなり低く(それぞれ 98.8%以下あるいは 96.6%以下)、また、今回記載した種の胞子の側面像 (ovoid versus pouch-shaped with truncated apex)、胞子長が小さいこ

と、極嚢が小さいことから、両種の鑑別は可能である。*K. trachuri* に比べると、孢子サイズが大きいことから両種の区別はできる(Table 5)。*K. scomberi* と *K. thunni* を光学顕微鏡に基づいて形態だけで区別することは困難である。18S と 28S rDNA 塩基配列の同一性の低さ(それぞれ 98.5 % と 96.3 %)に加え、筋肉寄生 *K. thunni* のシストは明らかに今回の種よりも大きいことが挙げられる(Matsukane et al. 2011)。すなわち、1.5 (1.3–2.0) mm × 1.2 (1.1–1.4) mm (n=14) vs. 0.49 (0.30–0.75) mm × 0.26 (0.20–0.40) mm (n=7)という具合である。

Matsukane et al. (2011)によって述べられているように、*K. crumena* は合衆国フロリダ州南部沖のスパニッシュ・マカレル(*Scomberomorus maculatus*)から原記載されたが(Iversen and Van Meter 1967)、その後、合衆国北カロライナ州沖のキハダマグロ(*T. albacores*)からも得られたとされる(Moran et al. 1999)。DDBJ/EMBL/GenBank に登録されている *K. crumena* の 18S および 28S rDNA 塩基配列は(登録番号 AF378347 と FJ417057)、北カロライナ州沖のキハダマグロとタスマニア沖のクロマグロからそれぞれ分離された種に由来するとされ、原記載の宿主とは異なったマグロから分離されている(Kent et al. 2001; Bartosová et al. 2009)。太平洋産ビンナガマグロからの *K. thunni* とマグロ類から分離された“*K. crumena*”の 18S および 28S rDNA 塩基配列はあまりにも同一性が高いことから、マグロ類から分離されたとされる“*K. crumena*”と Iversen and Van Meter (1967)が種記載した *K. crumena* が同一種かどうか、再検討の余地がある。なお、マグロ類から分離した“*K. crumena*”の形態学的観察は記録されていない。

3.5 考察

K. neothunni は、キハダマグロの筋肉融解巣から知られるだけでなく、太平洋の台湾沖のメバチマグロ(*Thunnus obesus*) や北日本沖の太平洋で漁獲されたクロマグロの筋肉融解巣からも記録されている(Arai and Matsumoto 1953; Konagaya 1982, 1984)。本研究では、異なるマグロ種であるキハダマグロの筋肉融解巣および正常な外観をもつクロマグロ筋肉から分離した *K. neothunni* 分離株について形態学的ならびに分子遺伝学的に比較検討した。孢子の形態学的特徴は酷似し、また、18S rDNA 塩基配列もほぼ同一であった。1,72

0-bp 長で 2 塩基の違いしかなかった。アルゼンチン・ホキ(*Macruronus magellanicus*)に感染し死後筋肉融解現象を引き起こさない *K. alliaris* と、アルゼンチン・ヘイク(*Merluccius hubbsi*)に感染し筋肉融解現象を引き起こす *K. rosenbuschi* の 1,679-bp 長の 18S rDNA を比較すると、2 塩基の違いしか確認できない。さらに、これら2種の胞子は極めて類似し、また、その地理的分布も同じである(Abollo et al. 2005; Whipps and Diggles 2006)。この2種間の主要な種鑑別点は、死後筋肉融解現象を引き起こすか引き起こさないかだけである。同様の扱いをするならば、今回のキハダマグロからの分離株とクロマグロからの分離株は別種としなければならない。しかしながら、死後筋肉融解現象は様々な要因の影響を受けることを考慮する必要がある。死後筋肉融解現象は蛋白分解酵素による筋肉消化であることを考えると、死後のどの時点での評価なのか、あるいは保存温度、感染度の違い、プラズモディウム の 発 育 段 階、 宿 主 の 炎 症 応 答、 魚 種 に よ る 筋 肉 の pH 状 態 な ど 多 くの 要 因 が 筋 肉 融 解 現 象 の 進 行 に 深 い 関 わ り を も つ (Konagaya 1984; Dawson-Coates et al. 2003; Funk et al. 2007, 2008; Zhou and Li-Chan 2009)。特定の *Kudoa* 種と死後筋肉融解現象の発現が一般的傾向として理解されるならば、死後の経過のどの時点でその現象を種鑑別の指標として評価するのかが問題となる。また、個々の事例については、種鑑別の指標として使いようがない。

18S rDNA 塩基配列ではほとんど違いがなかった2つの *K. neothunni* 分離株ではあったが、ITS1 領域 (757-bp 長で 62.4%の同一性)、ITS2 領域 (599-bp 長で 66.9%の同一性)、28S rDNA (2,245-bp 長で 22 塩基の変異)では塩基配列に大きな変異がみられた。宿主魚種や採集地が異なる多くの分離株を集め、ITS 領域や 28S rDNA 塩基配列を検討することで潜在種(cryptic species)や *K. neothunni* 内の系統といった存在が明らかにできる可能性がある。また、ITS 領域の塩基変異がもつ意義を明らかにする手がかりが得られるかもしれない。このような研究を行うに当たっては、死後筋肉融解現象を示す筋肉からばかりでなく、正常な外観をもつ感染筋肉からも粘液胞子虫を集める努力が払われないと、材料収集に偏りができる危険性がある。世界的分布をもつ *K. thrysites* は多くの研究者が「上種(species complex)」として理解している。カナダ、合衆国、チリ、英国、南アフリカ、オーストラリア、日本の近海と広く世界中で集められた *K. thrysites* 分離株であっても、その 18S rDNA の塩基配列はほ

とんど変異を示さない(変異率は 0.2–1.0%にとどまる)。一方、28S rDNA (700-bp 長で変異率 3.0–9.6%)、あるいは ITS1 領域(393–493-bp 長で最大 65.6%の変異率) では、かなりの塩基変異が確認されている(Whipps and Kent 2006)。一般に、18S rDNA よりも 28S rDNA で塩基変異が起りやすいことが複数の *Kudoa* 種で確認されている(Burger and Adlard 2011)。オーストラリアのグレートバリアリーフ海域で採集された6科 18 種の海産魚から得た *K. thalassomi* の 18 分離株は 18S rDNA では最小で 99.7%の塩基配列同一性(1,539-bp で 0–10 塩基の変異)、28S rDNA では 98.5%の塩基配列同一性(814-bp 長で 0–10 塩基の変異) であった(Burger and Adlard 2011)。従来頻用されてきた 18S rDNA 以外の領域の利用性については、今後の知見集積とその評価が待たれているといえるだろう。

最近、Burger and Adlard (2010b)は 18S rDNA 塩基配列が同一であることを根拠として、オーストラリア産サンド・ホワイティング(*Sillago ciliata*)に寄生する 5 つの SV/PC をもつ *Kudoa* 種を *K. yasunagai* と同定した。本来、*K. yasunagai* は7つの SV/PC をもち、ヒラメ(*Paralichthys olivaceus*)とクロマグロの脳に寄生する種として認識されてきた。この同一種内での SV/PC の変異は、従来知られてきた SV/PC の特定種での変異とは明確に区別して考えなければならない。従来の知られてきた SV/PC 変異は *K. chaetodoni* (Burger et al. 2007)、*K. crumena* (Iversen and Van Meter 1967)、*K. iwatai* (Egusa and Shiomitsui 1983; Diamant et al. 2005)、*K. lethrini* (Burger et al. 2007)、*K. monodactyli* (Gunter et al. 2006)、*K. neurophila* (Grossel et al. 2003)、*K. permulticapsula* (Whipps et al. 2003)、*K. septempunctata* (Matsukane et al. 2010)、*K. thalassomi* (Burger and Adlard 2011)、*K. yasunagai* (Hsieh and Chen 1984)などで報告されてきた。

一方で、同じ研究者たちは(Burger et al. 2007)、18S rDNA 塩基配列での変異が 0.19%(3 塩基)で 28S rDNA 塩基配列での変異が 0.6–1.3% (4–8 塩基)に過ぎない脳寄生の *K. chaetodoni* と *K. yasunagai* を胞子のサイズと極囊数の違いに基づいて別種としている。また、Burger and Adlard (2010a)は、1,683-bp 長の 18S rDNA で1塩基に変異(99.94%の塩基配列同一性)があり、715-bp 長の 28S rDNA で 27 塩基に変異(96.22%の塩基配列同一性)のある *K. paraquadricornis* と *K. quadricornis* を胞子サイズの違いで別種とした。同様に、養殖クロマグロの脳に寄生する *K. prunusi* はオーストラリア産サンド・ホワイ

ティングに寄生する 5 つの SV/PC をもつ *K. yasunagai* と形態学的に酷似し、18S rDNA での塩基変異は 0.3% (5 塩基)、28S rDNA での塩基変異は 1.7% (11 塩基) にとどまっている(Meng et al. 2011)。このような現状を考えると、異なる魚種や地理的分布をもつ *Kudoa* 分離株を更に集め、それらの形態学的特徴づけと分子遺伝学的解析を進めることで、種内変異と種間変異の境界についてどのように考えるべきかが理解できてくるのではないだろうか。

18S および 28S rDNA に基づく ML 法分子系統樹において(Figs. 15 and 16)、一見すると *K. scomberi* と *K. thunni* は非常に近縁であるかのような印象を与えるが、このことはこれら2種が同一種であることを意味はしていない。分子系統樹作成にあたって、ギャップなど変異性が高い領域を多く除外する作業が、このような結果をもたらした。四角や類四角といった胞子をもつ4つの SV/PC をもつ *Kudoa* 種はお互いによく似ており、類種鑑別に当たっては、18S rDNA だけでなく 28S rDNA についても塩基配列を解析することが重要である。

最近になって、*K. septempunctata* が公衆衛生上重要性をもつことが日本人研究者たちによって指摘されている(Konishi 2011; Ohnishi 2011; Grabner et al. 2012; Harada et al. 2012; Kawai et al. 2012)。実際に、年間 20 もしくは 30 件の集団発症がこの2, 3年に記録されている。この食中毒は生鮮ヒラメを刺身もしくは寿司として喫食して12時間以内に嘔吐や下痢として発症するが、症状は一過性で予後は良好である。日本の厚生労働省は *K. septempunctata* が生鮮魚喫食による食中毒の原因であることを公式に通達している。この食中毒は経口摂取する胞子の数とその活発度に依存しているので、*Kudoa* 胞子が感染した生鮮魚の喫食を避けることが対策となる。ヒラメの *K. septempunctata* やマグロの *K. neothunni* 寄生は体側筋の筋線維内にシュードシストを形成するのが特徴で、Fig. 10 に示す重度の感染であってさえも、肉眼的にその感染を見抜くことはできない。その結果、想像を超える胞子が経口摂取されることになる。スペインでは、Martínez de Velasco et al. (2008)によって *Kudoa* 胞子が食品由来アレルゲンとなりアレルギー性消化器症候群の患者発生に繋がっている可能性が指摘されている。*Kudoa* 種の簡易で信頼できる診断技術あるいは診断基準があれば、公衆衛生分野の技術者が食中毒の原因を解明し、その原因となる魚種での対策を進めることが可能になることが期待される。

総括

本研究で扱った粘液胞子虫は、*Myxobolus* 属、*Henneguya* 属、*Cardimyxobolus* 属、*Kudoa* 属の4属であり、約 60 属を有するとされる Myxozoa 門のごく一部に過ぎないが、これらの4属で当該分類群の過半数近くの種を有していることを考えると、本研究で検討した分類や種鑑別に関する事案は広い対象に対しての問題提起ともいえるように考える。さて、本研究で新種記載した *C. japonensis* を含めても世界的に3もしくは4種しか分類されない *Carudimyxobolus* 属を除いた上記3属について、日本からの種記載と分布記録はどのような状況であろうか。*Myxobolus* 属が 26 種(Table 6)、*Henneguya* 属が8種(Table 7)、*Kudoa* 属が 17 種となる(Table 8) (Eiras 2002; Eiras et al. 2005, 2014; 佐藤 2011)。日本での研究が水産業、特に各種海産魚類の養殖産業との関連で進んできたことが、海産魚を宿主とする *Kudoa* 属での活発な種記載を招き、一方、中国やインド、ブラジルなどで生物多様性研究の一環として淡水魚を主要な宿主とする *Myxobolus* 属や *Henneguya* 属粘液胞子虫の種記載が活発であることと対照的に、日本国内からこの2属の種記載はそれほど多いとはいえない。現在の研究状況から考えれば、多くの種が記載・記録されずに残っていることが強く推測される。

さて、本研究の第1章では、日本国内山口市で採集されたドンコ(*Odontobutis obscura*)から検出された粘液胞子虫綱双殻目(Myxosporea: Bivalvulida)の2種について形態学的ならびに分子遺伝学的な特徴づけを行い、*Myxobolus marumotoi* ならびに *Cardimyxobolus japonensis* として新種記載するとともに、前種が淡水魚の体側筋にシュードシストを形成して寄生していること、後種がこれまでにまったく分子系統学的な解析が行われていない希少な属に分類されることに注目して、その分子系統学的位置づけについて解析した。*Myxobolus* 属 800 余種の多くは淡水魚の鰓寄生で、体側筋寄生種は Table 3 に示すように 30 余種にすぎない。18S rDNA 塩基配列に基づく分子系統樹において、前種は *Henneguya/ Myxobolus* クレード内に独自の支枝を作って位置し、後者はこのクレードから外れて双殻目として独自の位置づけを示した。本研究は、分子系統学的解析が進まない Ortholineidae 科双殻目粘液胞子虫の *Neomyxobolus* 属、*Triangula* 属、*Cardimyxobolus* 属の1つについて世界で初めて分子遺伝学的研究を行えたことは特記される。また、同科の *Ortholinea* 属の数種につ

いては 18S rDNA 塩基配列の比較が可能であるが、*C. japonensis* と *Ortholinea* spp.との近縁性を確認することはできなかった(Fig. 5b)。このことは、Ortholineidae 科自体の再編が必要なことを示唆している。

第2章では、Myxozoa のほぼ半数の種を占める *Myxobolus* 属と *Henneguya* 属のほとんどの種が淡水魚、そして鰓寄生である中で、ごく限られた種記載しかない海産魚寄生種あるいは内臓寄生種がどのような分子系統分類学的位置づけをもつかに注目した。同一臓器を寄生部位とする粘液胞子虫種が分子系統樹において同一クレードに集まりやすいといわれている(Andree et al. 1999; Eszterbauer 2004; Holzer et al. 2004; Fiala 2006)。*Henneguya* 属の2新種は日本国内瀬戸内海産クロダイ(*Acanthopagrus schlegelii*)2尾の食道および腸管壁、あるいは、胆嚢壁や腹腔の漿膜下に寄生し、*Myxobolus* 属の新種は、日本国内下関沖の日本海で釣られたインガキダイ(*Oplegnathus punctatus*)1尾の食道壁から検出された。*Henneguya* 2 種(*H. ogawai* と *H. yokoyamai*)は分子系統学的に海外の海産魚寄生の *Henneguya* spp.と極めて近縁な位置づけをもち、*M. machidai* は、既知の海産魚寄生の *Myxobolus* spp.との近縁性より、淡水魚から記載された種との近縁性が確認された。分岐する尾状突起をもつ "*Henneguya*" 属は、その仲間となる粘液胞子虫の系統発生において、種分化する機会が複数回あったことが推測されている(Kent et al. 2001; Fiala 2006; Lom and Dyková 2006)。すなわち、多系統群として存在する "*Henneguya*" 属あるいは "*Myxobolus*" 属については新たな分類体系の提起が近い将来に求められている(Lom and Dyková 2006; Bartosová et al. 2009; Picon-Camacho et al. 2009; Liu et al. 2010)。この状況の中で、今回のような特異な種について詳細な解析が行われることは、今後の分類を考えていく上で有意義であり、更に材料の収集と解析が進められることが望ましい。

第3章では、粘液胞子虫の形態分類において重要な指標とされる「死後筋肉融解現象(post-harvest myoliquefaction)」の有無が、実際の種鑑別においてどのような意義をもつのかという点に注目した。形態学的にはほぼ同一の胞子をもち、死後筋肉融解を引き起こす *Kudoa neothunni* 分離株をキハダマグロから、一方、重度感染にも関わらず筋肉融解を起こさない *Kudoa neothunni* 分離株をクロマグロから得て、一連の rDNA 塩基配列の比較検討を行った。18S および 5.8S rDNA 塩基配列は同一であるが、他の領域では顕著な変異が確認

された。この状況は、南米近海の太平洋で問題となる、アルゼンチン・ホキに感染し死後筋肉融解現象を引き起こさない *K. alliaria* と、アルゼンチン・ヘイクに感染し筋肉融解現象を引き起こす *K. rosenbuschi* との関係に比することができる。現在、Myxozoa、殊に粘液胞子虫綱のあるべき分類体系が模索され、形態分類と分子系統分類の間の乖離について様々な研究材料の解析を通して解決策が議論されている。*K. scomberi* については、四角形の孢子形態をもつ近縁種、マグロ寄生の *K. thunni* やマアジ寄生の *K. trachuri* との関係について考察した。rDNA を中心として分子系統進化学的視点から種分類が考えられているが、どの領域をどのように評価するのかは未だ研究者で基準が共有されていない。この点も含め、今後の種分類のあり方については、今後も豊富な材料の収集と解析を通して考えていくべきところである。この点については、最近、佐藤(2013)が「粘液胞子虫類の種鑑別・分類体系が直面する課題」として整理しているので、そこでの問題意識を踏まえた今後の分類体系再構築への挑戦が是非とも望まれるところである。

謝 辞

本研究は、山口大学共同獣医学部寄生虫病学教室の学部生諸氏の日常的な協力と支援があつてこそ実施できた。また、国立医薬品食品衛生研究所衛生微生物部小西良子部長(現麻布大学生命・科学部教授)、鎌田洋一室長(現岩手大学農学部教授)、大西貴弘室長には貴重な材料を検査する機会をいただいた。多くの皆さんの支えがあればこそ、一人で研究を進めることは難しかったように思われる。ここに記して、厚く感謝したい。

参考文献

- Abdel-Ghaffar F, Abdel-Baki AA, EI Garhy M (2005) Ultrastructural characteristics of the sporogenesis of genus *Myxobolus* infecting some Nile fishes in Egypt. *Parasitol Res* 95:167-171
- Abdel-Ghaffar F, Ali MA, Al Quraishy S, Entzeroth R, Abdel-Baki AA, Al Farraj S, Bashtar AR (2008) *Zschokkella helmii* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea), a new parasite of marbled spinefoot *Siganus revulatus* (Forsskal 1775), Red Sea, Egypt: light and transmission electron microscopy. *Parasitol Res* 102:183-192
- Abdel-Ghaffar F, Morsy K, Mehlhorn H, Bashtar AR, Shazly MA, Saad AH, Abdel-Gaber RA (2012) First report of *Kudoa* species (Myxozoa: Kudoidae) infecting the spotted coral grouper *Plectropomus maculatus* from the Red Sea. A light and ultrastructural study. *Parasitol Res* 111:1579-1585
- 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
- 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
- Andree KB, Szekely C, Molnar K, Gresoviac SJ, Hedrick RP (1999) Relationships among members of the genus *Myxobolus* (Myxozoa: Bilvalvulidae) based on small subunit ribosomal DNA sequences. *J Parasitol* 85:68-74
- Anisimova M, Gascuel O (2006) Approximate likelihood-ratio test for branches: a fast, accurate, and powerful alternative. *Syst Biol* 55:539-552
- Arai Y, Matsumoto K (1953) On a new sporozoa, *Hexacapsula neothunni* gen. et sp. nov., from the muscle of yellowfin tuna, *Neothunnus macropterus*. *Bull Jpn Soc Sci Fish* 18:293-299

- Bahri S, Andree KB, Hedrick RP (2003) Morphological and phylogenetic studies of marine *Myxobolus* spp. from mullet in Ichkeul Lake, Tunisia. *J Eukaryot Microbiol* 50:463-470
- Bahri S, Marton S, Marques A, Eszterbauer E (2010) *Henneguya tunisiensis* n. sp. (Myxosporea: Bivalvulida), a new gill parasite of *Symphodus tinca* (L.) (Teleostei: Labridae) off Tunisia. *Syst Parasitol* 76:93-101
- Barassa B, Adriano EA, Cordeiro NS, Arana S, Ceccarelli PS (2012) Morphology and host-parasite interaction of *Henneguya azevedoi* n. sp., parasite of gills of *Leporinus obtusidens* from Mogi-Guaçu River, Brazil. *Parasitol Res* 110:887-894
- 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 Phylog Evol* 53:81-93
- Burger MAA, Adlard RD (2010a) Four new species of *Kudoa* Meglitsch, 1947 (Myxosporea: Multivalvulida) from Australia with recommendations for species descriptions in the Kudoidae. *Parasitology* 137:793-814
- Burger MAA, Adlard RD (2010b) Phenotypic variation in a significant spore character in *Kudoa* (Myxosporea: Multivalvulida) species infecting brain tissue. *Parasitology* 137:1759-1772
- 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
- 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
- Canning EU, Okamura B (2004) Biodiversity and evolution of the Myxozoa. *Adv Parasitol* 56:43-131

- Casal G, Matos E, Matos P, Azevedo C (2008) Ultrastructural description of a new myxosporean parasite *Kudoa aequidens* sp. n. (Myxozoa, Myxosporidia), found in the sub-opercular musculature of *Aequidens plaggiozonatus* (Teleostei) from the Amazon river. *Acta Protozool* 47:135-141
- Chen C, Ma C (1998) *Fauna Sinica: Myxozoa, Myxosporidia*. Beijing: Science Press, p. 806 with 180 figure plates (in Chinese)
- Dawson-Coates JA, Chase JC, Funk V, Booy MH, Haines LR, Falkenberg CL, Whitaker DJ, Olafson RW, Pearson TW (2003) The relationship between flesh quality and numbers of *Kudoa thyrsites* plasmodia and spores in farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* L. *J Fish Dis* 26:451-459
- Dereeper A, Guignon V, Blanc G, Audic S, Buffet S, Chevenet F, Dufayard JF, Guignon 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
- Diamant A, Ucko M, Paperna I, Colorni A, Lipshitz A (2005) *Kudoa iwatai* (Myxosporidia: Multivalvulida) in wild and cultured fish in the red sea: Redescription and molecular phylogeny. *J Parasitol* 91:1175-1189
- Dyková I, De Buron I, Roumillat A, Fiala I (2011) *Heneguya cynoscioni* sp. n. (Myxosporidia: Bivalvulida), an agent of severe cardiac lesions in the spotted seatrout, *Cynoscion nebulosus* (Teleostei: Sciaenidae). *Folia Parasitol* 58:169-177
- Easy R, Cone D (2009) Taxonomy of *Myxobolus ridouti* n. sp. and *M. ridgwayi* n. sp. (Myxozoa) from *Pimephales notatus* and *Semotilus atromaculatus* (Cypriniformes) in Ontario. *J Parasitol* 95:1446-1450
- Easy RH, Johnson SC, Cone DK (2005) Morphological and molecular comparison of *Myxobolus procerus* (Kudo, 1934) and *M. intramusculi* n. sp. (Myxozoa) parasitizing muscles of the trout-perch *Percopsis omiscomaycus*. *Syst Parasitol* 61:115-122
- 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

- 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.
- 江草周三・塩満捷夫. 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, 1983
- Eiras JC (2002) Synopsis of the species of the genus *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Syst Parasitol 52:43-54
- Eiras JC, Molnár K, Lu YS (2005) Synopsis of the species of *Myxobolus* Bütschli, 1882 (Myxozoa: Myxosporea: Myxobolidae). Syst Parasitol 61:1-46
- Eszterbauer E (2004) Genetic relationship among gill-infecting *Myxobolus* species (Myxosporea) of cyprinids: molecular evidence of importance of tissue specificity. Dis Aquat Org 58:35-40
- Feijó MM, Arana S, Ceccarelli PS, Adriano EA (2008) Light and scanning electron microscopy of *Henneguya arapaima* n. sp. (Myxozoa: Myxobolidae) and histology of infected sites in pirarucu (*Arapaima gigas*: Pisces: Arapaimidae) from the Araguaia river, Brazil. Vet Parasitol 157:59-64
- Fiala I (2006) The phylogeny of Myxosporea (Myxozoa) based on small subunit ribosomal RNA gene analysis. Int J Parasitol 36:1521-1534
- Fiala I, Bartošová P (2010) History of myxozoan character evolution on the basis of rDNA and EF-2 data. BMC Evol Biol 10:228
- Fomena A, Bouix G (1996) New species of *Henneguya* Thélohan, 1892 (Myxozoa: Myxosporea) parasites of freshwater fishes in Cameroon. J Afr Zool 110:413-423
- 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
- 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
- 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* 338-341:36-40
- Grossel GW, Dykova I, Handler J, Munday BL (2003) *Pentacapsula neurophila* sp. n. (Multivalvulida) from the central nervous system of striped trumbeter, *Latris lineata* (Forster). *J Fish Dis* 26:315-320
- Guindon S, Gascuel O (2003) A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol* 52:696–704
- Gunter NL, Whipps CM, Cribb TH, Adlard RD (2006): Characterisation of *Kudoa monodactyli* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from *Monodactylus argenterus* (Teleostei: Monodactylidae) from Moreton Bay, Queensland, Australia. *J Eukaryot Microbiol* 53:374-378
- Gunter N, Adlard R (2010) The demise of *Leptotheca* Thélohan, 1895 (Myxozoa: Myxosporea: Ceratomyxidae) and assignment of its species to *Ceratomyxa* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Ellipsomyxa* Køie, 2003 (Myxosporea: Ceratomyxidae), *Myxobolus* Bütschli, 1882 and *Sphaerospora* Thélohan, 1892 (Myxosporea: Sphaerosporidae). *Syst Parasitol* 75:81-104
- Harada T, Kawai T, Sato H, Yokoyama H, Kumeda Y (2012) Development of a quantitative polymerase chain reaction assay for detection of *Kudoa septempunctata* in olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Int J Food Microbiol* 155:161-167
- 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)

- Holzer AS, Sommerville C, Wootten R (2004) Molecular relationships and phylogeny in a community of myxosporeans and actinosporeans based on their SSU rDNA sequences. *Int J Parasitol* 34:1099-1111
- Holzer AA, Wootten R, Sommerville C (2007) The secondary structure of the unusually long 18S ribosomal RNA of the myxozoan *Sphaerospora truttae* and structural evolutionary trends in the Myxozoa. *Int J Parasitol* 37:1281-1295
- Iversen ES, Van Meter NN (1967) A new myxosporidian (Sporozoa) infecting the Spanish mackerel. *Bull Mar Sci* 17:268-273
- Kaur H, Singh R (2011) Two new species of *Myxobolus* (Myxozoa: Myxosporidia: Bivalvulida) infecting Indian freshwater fishes in Punjab Wetlands (India). *Parasitol Res* 108:1075-1082
- 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
- Kent ML, Margolis M, Corliss JO (1994) The demise of a class of protists: taxonomical and nomenclatural revisions proposed for the phylum Myxozoa Grassé. 1970. *Can J Zool* 72:932-937
- Kent ML, Andree KB, Bartholomew JL, El-Matbouli M, Desser SS, Devlin RH, Feist SW, Hedrick RP, Hoffman RW, Khattra J, Hallett SL, Lester RJG, Longshaw M, Palenzeula O, Siddall ME, Xiao C (2001) Recent advances in our knowledge of the Myxozoa. *J Eukaryot Microbiol* 48:395-413
- Konagaya S (1982) Histological observation of jellied yellowfin tuna meat. *Bull Tokai Reg Fish Res Lab* 106:55-75 (in Japanese with English summary)
- 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)

- 小西良子 (2012) クドア食中毒総論. IASR 33:149-150.
- Kopečná J, Jirku M, Oborník M, Tokarev YS, Lukes J, Modrý D (2006) Phylogenetic analysis of coccidian parasites from invertebrates: search for missing links. *Protist* 157:173-183
- Kovaleva AA, Gaevskaya AV (1983) [First data on fish myxosporidia of the southeastern Pacific open waters.] *Vestnik Zoologii* 17:6-11. (In Russian)
- Køie M, Karisbakk E, Nylund A (2007) A new genus *Gadimyxa* with three new species (Myxozoa, Parvicapsulidae) parasitic in marine fish (Gadidae) and the two-host life cycle of *Gadimyxa atlantica* n. sp. *J Parasitol* 93:1459-1467
- Kpatcha TK, Faye N, Diebakate C, Fall M, Toguebaye BS (1997) Nouvelles espèces d'*Henneguya* Thélohan, 1895 (Myxozoa, Myxosporia) parasites des poissons marins du Sénégal: étude en microscopie photonique et électronique. *Ann Sci Nat Zool* 18: 81-91
- Li Y-C, Sato H, Kamata Y, Ohnishi T, Sugita-Konishi Y (2012) Three novel myxobolid species of genera *Henneguya* and *Myxobolus* (Myxosporia: Bivalvulida) from marine fish in Japan. *Parasitol Res* 111:819-826
- Li Y-C, Sato H, Tanaka S, Ohnishi T, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2013) Characterization of the ribosomal RNA gene of *Kudoa neothunni* (Myxosporia: Multivalvulida) in tunas (*Thunnus* spp.) and *Kudoa scomberi* n. sp. in a chub mackerel (*Scomber japonicus*). *Parasitol Res* 112:1991-2003
- Liu Y, Whipps CM, Gu ZM, Zeng LB (2010) *Myxobolus turpisrotundus* (Myxosporia: Bivalvulida) spores with caudal appendages: investigating the validity of the genus *Henneguya* with morphological and molecular evidence. *Parasitol Res* 107:699-706
- Liu Y, Whipps CM, Gu ZM, Huang MJ, He C, Yang HL, Molnár K. (2013) *Myxobolus musseliusae* (Myxozoa: Myxobolidae) from the gills of common carp *Cyprinus carpio* and revision of *Myxobolus dispar* recorded in China. *Parasitol Res* 112:289-296

- Lom J (1969) A new taxonomic character in Myxosporidia, as demonstrated in description of two new species of *Myxobolus*. *Folia Parasitol* 16:97-103
- Lom J, Arthur JR (1989) A guideline for the preparation of species descriptions in Myxosporidia. *J Fish Dis* 12:151-156
- Lom J, Dyková I (1994) Studies on protozoan parasites of Australian fishes. 3. Species of the genus *Myxobolus* Bütschli, 1882. *Eur J Protistol* 30:431-439
- Lom J, Dyková I (2006) Myxozoan genera: definition and notes on taxonomy, life-cycle terminology and pathogenic species. *Folia Parasitol* 53:1-36
- Lom J, Noble ER (1984) Revised classification of the Myxosporidia Bütschli, 1881. *Folia Parasitol* 31:193-205
- Mansour L, Thabet A, Chourabi K, Harrath AH, Gtari M, Al Omar SY, Hassine OK B (2013) *Kudoa azevedoi* n. sp. (Myxozoa, Multivalvulida) from the oocysts of the Atlantic horse mackerel *Trachurus trachurus* (Perciformes, Carangidae) in Tunisian coasts. *Parasitol Res* 112:1737-1747
- 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
- Matsukane Y, Sato H, Tanaka S, Kamata Y, Sugita-Konishi Y (2010) *Kudoa septempunctata* n. sp. (Myxosporidia: Multivalvulida) from an aquacultured olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) imported from Korea. *Parasitol Res* 107:865-872
- 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. (Myxosporidia: Multivalvulida) from daily consumed marine fish in western Japan. *Parasitol Res* 108:913-926
- Meng F, Yokoyama H, Shirakashi S, Grabner D, Ogawa K, Ishimaru K, Sawada Y, Murata O (2011) *Kudoa prunusi* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the brain of Pacific bluefin tuna *Thunnus orientalis* (Temminck & Schlegel, 1844) cultured in Japan.

- Miller TL, Adlard RD (2013) *Unicapsula* species (Myxosporea: Trilosporidae) of Australian marine fishes, including the description of *Unicapsula andersenae* n. sp. in five teleost families off Queensland, Australia. Parasitol Res 112:2945-2957
- Miroshnichenko, A. I. (1981) *Neomyxobolus olae* n.sp., a new species of myxosporidia (Myxosporidia, Neomyxobolidae) of the minnow. Parazitologiya 15:78-80 (in Russian with English summary)
- Molnár K (2011) Remarks to the validity of Genbank sequences of *Myxobolus* spp. (Myxozoa, Myxosporidae) infecting Eurasian fishes. Acta Parasitol 56:263-269
- 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
- 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)
- 大西貴弘 (2012) 食中毒原因物質としての“クドア”に関する最新の知見. モダンメディア 58:205-209.
- Pampoulie C, Marques A, Rosecchi E, Crivelli AJ, Bouchereau J-L (1999) A new myxosporean parasite, *Kudoa camarguensis* n. sp., recorded on two goby species (Teleostei: Pisces) in the Rhône Delta (Mediterranean Sea, France). J Eukaryot Microbiol 46:304-310
- Picon-Camacho SM, Holzer AS, Freeman MA, Morris DJ, Shinn AP (2009) *Myxobolus albi* n. sp. (Myxozoa) from the gills of the common goby *Pomatoschistus microps* Krøyer (Teleostei: Gobiidae). J Eukaryot Microbiol 56:421-427
- Prunescu C-C, Prunescu P, Pucek Z, Lom J (2007) The first finding of myxosporean development from plasmodia to spores in terrestrial mammals: *Soricimyxum fegati* gen. et sp. n. (Myxozoa) from *Sorex araneus* (Soricomorpha). Folia Parasitol 54:159-164

- Redondo MJ, Palenzuela O, Alvarez-Pellitero P (2004) Studies on transmission and life cycle of *Enteromyxum scophthalmi* (Myxozoa), and enteric parasite of turbot *Scophthalmus maximus*. *Folia Parasitol (Praha)* 51:188-198
- Reed CC, Basson L, Van As LL, Dyková I (2007) Four new myxozoans (Myxosporidia: Bivalvulida) from intertidal fishes along the south coast of Africa. *Folia Parasitol* 54:283-292
- Sakai H, Iwata A, Jeon S-R (1993) Genetic evidence supporting the existence of three distinct species in the genus *Odontobutis* (Gobiidae) from Japan and Korea. *Japan J Ichthyol* 40:61-64
- Sakai H, Yamamoto C, Iwata A (1998) Genetic divergence, variation and zoogeography of a freshwater goby, *Odontobutis obscura*. *Ichthyol Res* 45:363-376
- 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
- 佐藤 宏 (2013) 粘液胞子虫類の種鑑別・分類体系が直面する課題. *獣医寄生虫誌* 12:105-115
- Schlegel M, Lom J, Stechmann A, Bernhard D, Leipe D, Dyková I, Sogin M (1996) Phylogenetic analysis of complete small subunit ribosomal RNA coding region of *Myxidium lieberkuehmi*. Evidence that Myxozoa are Metazoa and related with Bilateria. *Arch Protistenkd* 147:1-9
- Smothers JF, von Dohlen CD, Smithe LH Jr, Spall RD (1994) Molecular evidence that the myxozoan protists are metazoans. *Science* 265:1719-1721
- Smythe AB, Sanderson MJ, Nadler SA (2006) Nematode small subunit phylogeny correlates with alignment parameters. *Syst Biol* 55:972-992
- Swearer SE and Robertson DR (1999) Life history, pathology, and description of Kudua Ovivora n. sp. (Myxozoa, Myxosporidia): an ovarian parasite of Caribbean labroid fishes. *J Parasitol* 85:337-353
- 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
- U-taynapum K, Penprapai N, Bangrak P, Mekata T, Itami T, Tantikitti C (2011) *Myxobolus supamattayai* n. sp. (Myxosporidia: Myxobolidae) from Thailand parasitizing the scale pellicle of wild mullet (*Valamugil seheli*). *Parasitol Res* 109:81-91
- Whipps CM, Diggles BK (2006) *Kudoa alliaris* in flesh of Argentinian hoki *Macruronus magellanicus* (Gadiformes; Merlucciidae). *Dis Aquat Organ* 69:259-263
- Whipps CM, Kent ML (2006) Phylogeography of the cosmopolitan marine parasite *Kudoa thyrssites* (Myxozoa: Myxosporidia). *J Eukaryot Microbiol* 53:364-373
- 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. (Multivalvulida) from the muscle of Spanish mackerel (*Scomberomorus commerson*) from the Great Barrier Reef, Australia. *J Parasitol* 89:168-173
- Whipps CM, Gossel G, Adlard RD, Yokoyama H, Bryant MS, Munday BL, Kent ML (2004) Phylogeny of the Multivalvulidae (Myxozoa: Myxosporidia) based on comparative ribosomal DNA sequence analysis. *J Parasitol* 90: 618-622
- Wolf K, Markiw ME (1984) Biology contravenes taxonomy in the Myxozoa: new discoveries show alternation of invertebrate and vertebrate hosts. *Science* 225:1449-1452
- Work TM, Takata G, Whipps CM, Kent ML (2008) A new species of *Henneguya* (Myxozoa) in the big-eyed scad (*Selar crumenophthalmus*) from Hawaii. *J Parasitol* 94:524-529
- Yanagida T, Sameshima M, Nasu H, Yokoyama H, Ogawa K (2006) Temperature effects on the development of *Enteromyxum* spp. (Myxozoa) in experimentally infected tiger puffer, *Takifugu rubripes* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* 29:561-567

- Yokoyama H (2003) A review: Gaps in our knowledge on myxozoan parasites of fishes. *Fish Pathol* 38:125-136
- 横山 博 (2004) 魚類に寄生する粘液胞子虫の生活環と起源. *原生動物誌* 37: 1-9 2004
- Yokoyama H, Kawakami H, Yasuda H, Tanaka S (2003) *Henneguya lateolabracis* sp. n. (Myxozoa: Myxosporea), the causative agent of cardiac henneguyosis in Chinese sea bass *Lateolabrax* sp. *Fisheries Sci* 69:1116-1120
- Yokoyama H, Whipps CM, Kent ML, Mizuno K, Kawakami H (2004) *Kudoa thyrsiteis* from Japanese flounder and *Kudoa lateolabracis* n. sp. from Chinese sea bass: causative myxozoans of post-mortem myoliquefaction. *Fish Pathol* 39:79-85
- Yokoyama H, Itoh N, Tanaka S (2005) *Henneguya pagri* n. sp. (Myxozoa: Myxosporea) causing cardiac henneguyosis in red sea bream, *Pagrus major* (Temminck & Schlegel). *J Fish Dis* 28:479-487
- Yokoyama H, Grabner D, Shirakashi S (2012a) Transmission Biology of the Myxozoa. *In: Health and Environment in Aquaculture*, Carvalho, E. (ed.), InTech. [DOI: 10.5772/29571], 42 pp
- Yokoyama H, Yanagida T, Shirakashi S (2012b) *Kudoa ogawai* n. sp. (Myxozoa: Multivalvulida) from the trunk muscle of Pacific barrelfish *Hyperoglyphe japonica* (Teleostei: Centrolophidae) in Japan. *Parasitol Res* 110:2247-2254
- Yurakhno VM, Ovcharenko MO, Holzer AS, Sarabeev VL, Balvuenza JA (2007) *Kudoa unicaspula* n. sp. (Myxosporea: Kudoidae) a parasite of the Mediterranean mullets *Liza ramada* and *L. aurata* (Teleostei: Mugilidae). *Parasitol Res* 101:1671-1680
- Zhao YJ, Li NN, Tang FH, Dong JL (2013) Remarks on the validity of *Myxobolus ampullicapsulatus* and *Myxobolus honghuensis* (Myxozoa: Myxosporea) based on S-SU rDNA sequences. *Parasitol Res* 112:3817-3823
- 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*)

us). Food Chem 11:1076-1082

Table 1. Primers used to amplify and sequence seven overlapping segments of 18S and 28S rDNA of *Kudoa* spp.

Segment no.	for amplifying	Primer name ^a for sequencing	Sequence	Annealing temperature	Position of 5'-end ^b
1	F: NSF4/18		5'-CTGGTTGATCCTGCCAGT-3'	64°C	4
	R: KUDCOA-SSU926R		5'-AAACACTCTTGGCGAATGCT-3'		
2	F: NSF573/19	R: NSR581/18	5'-TCTCAGGCTCCCTCCTCCGG-3'	64°C	382
	R: S.r.18S-SSU18R		5'-CGCGGTAATTCCAGCTCCA-3'		
3	F: NSF1419/20	F: NSF1419/20	5'-ATAACACAGGCTCTGTGATGCC-3'	62°C	1,380
	R: Kudoa-28S-113R		5'-ATAACACAGGCTCTGTGATGCC-3'		
4	F: NSF1419/20	NC13R(ITS2)/F	5'-ATCGATGAAGAACCAGC-3'	62°C	2,482
	R: Kudoa-28S-275R	NC13R(ITS1)/R	5'-GCTGCGTTCTTCATCGAT-3'		
5	F: KUDCOA-K28S1F	NC13R(ITS2)/F	(see above)	62°C	2,499
	R: KUDCOA-28S-795R	NC13R(ITS1)/R	(see above)		
6	F: KUDCOA-K28S1F		5'-CAAGACTACCCCTGCTGAAC-3'	64°C	3,150
	R: NLR2362/20		5'-CTGTSTTTCAAGACGKGTGG-3'		
7	F: NLF3090/24	F: Kudoa28S-260F	5'-ACATTCAGAGCACTGGGGCAG-3'	62°C	5,641
	R: Mbseq2r	F: NLF1999/19	5'-TTGGGATTGCAACCTAAAGC-3'		
		R: 28S-1284R	5'-CCGCAKCAAGGTCTCCAAG-3'		3,415
		R: 28S-2132R	5'-GTTGATTGGCAGGTGAGTT-3'		5,191
			5'-AGAGGCTGTTACCTTGGAG-3'		4,566
			5'-AGGGAACGTGAGCTGGGTTAGAC-3'		5,221
			5'-CCITGTGTGAGCCACTACCTC-3'		-194
					330

^a Primers used for amplifying and sequencing a certain segment are shown as "for amplifying", and those only for sequencing as "for sequencing". F: forward, and R: reverse.

^b The relative position of the 5'-end of each primer in *Kudoa neothumi* rDNA sequence (DDBJ/EMBL/GenBank accession no. AB693042).

Table 2. Detection of myxosporean plasmodia in dark sleepers in Yamaguchi City, Japan

Locality	No. of fish examined	Plasmodia in the trunk muscle		Plasmodia in the alimentary tract	
		No. of positive hosts	No. of plasmodia detected / host*	No. of positive hosts	No. of plasmodia detected / host*
Miyano	17	3	1-2 (1.3 ± 0.6)	11	1-34 (12.4 ± 10.4)
Yoshida	5	1	many (not counted)	1	8

* Range (geomean ± standard deviation).

Table 3. Comparison of phenotypical features of *Myxobolus* spp. reported from the muscle of fish hosts*

Species	Spore		Thickness	Polar capsule		Tissue tropism	Type host	Type locality
	Length	Width		Length	Width			
<i>M. marumotoi</i> n. sp.	13.3-15.0 (13.8)	14.2-15.0 (14.6)	10.0-11.7 (10.8)	7.9-9.6 (8.4)	5.4-6.3 (5.9)	Muscle	<i>Odonobutis obscura</i>	Japan (Yamaguchi)
<i>M. alievi</i> Gasinagomedov, 1970	14-15	11-12	8	6.5-8	3.4-4.5	Muscle	<i>Rutilus rutilus caespitus</i>	Russia
<i>M. artus</i> Akhmerov, 1960	5.4-6.6 (6.0)	7.2-8.4 (8.1)	5.5-5.7 (5.6)	3.1-3.6 (3.4)	2.6-2.8 (2.7)	Muscle, general	<i>Carassius auratus gibelio</i>	Russia, China (Amur basin)
<i>M. bhadrerisi</i> Seenappa et Manohar, 1981	8.0-11.0 (9.5)	7.0-8.0 (7.1)	6.0	3.0-4.0 (3.5)	2.0-3.0 (2.2)	Muscle	<i>Labeo rehite</i>	India
<i>M. calostomi</i> Kudo, 1923	10-12.7	7.6-10.0		3.6-5.5	1.3-2.7	Muscle	<i>Calostomus commersonii</i>	Canada
<i>M. chondrostomi</i> Donec, 1962	13.5-17	10.0-11.7		7-9	4.0-4.5	Muscle	<i>Chondrostoma nasus</i>	Ukraine
<i>M. cyprinii</i> Dolein, 1898	10-16	8-12		5.2-7		Muscle	<i>Cyprinus carpio</i>	Germany
<i>M. destrvens</i> Schuumanns et Stekhtoven, 1920	9-12	5.0-7.2	4.8	4-5.8	1.5-2.0	Muscle	<i>Scardinius erythrophthalmus</i>	Germany
<i>M. grandinerecapsularis</i> Shulman, 1962	14.4-16.1	10.0-10.5	7.7-8.2	5.5-7	3-4	Muscle	<i>Hypseleotris swinhonis</i>	Canada
<i>M. improvisus</i> Izyumova in Shulman, 1966	6.5-7.7	7.5-9.3	74.6-5.6	2-3.3		Muscle	<i>Leuciscus idus</i>	Ukraine
<i>M. insidiosus</i> Wyatt et Pratt, 1963	12.8-17.3 (15)	9-11.5 (10.3)	6.4-9 (7.5)	7-10.2 (8.8)	2.6-4.5 (3.3)	Muscle	<i>Oncorhynchus tshawytscha</i>	USA
<i>M. intramusculi</i> Easy, Johnson et Cone, 2005	9.9-15.7 (12.5)	4.6-8.0 (6.2)		4.0-7.9 (5.3)	1.0-2.7 (1.7)	Muscle	<i>Percopsis omiscomaycus</i>	USA
<i>M. iucuridus</i> Hine, 1977	11.0-14.5	10.5-11.0	7.4-8.1	6.6-9.5	3.1-4.2	Muscle	<i>Galaxias maculatus</i>	New Zealand
<i>M. kalafii</i> Kalarten et Arfin, 1991 (=M. garrai)	11.3-15.5 (13.0)	6.8-8.3 (7.3)	5.0-7.0 (5.5)	4.7-5.5 (5.3)	2.4-3.0 (2.4)	Muscle	<i>Garrus tibanicus</i>	Saudi Arabia
<i>M. kulermineae</i> Donec in Schulman, 1984	15-19.5	12-15	8-9.1	7-9	4-5	Muscle, heart	<i>Aspius aspius; Leuciscus leuciscus</i>	Ukraine
<i>M. lentisulcatus</i> Dyková, 2002	11.2-12.4 (11.8)	7.2-8.4 (7.6)	5.2	4.0-4.4 (4.2)	2.0-2.8 (2.5)	Muscle	<i>Carassius gibelio</i>	China
<i>M. multiplicatus</i> (Reuss, 1906)	12.0-12.5 (12.0)	9.2-9.5 (9.5)	6-6.5 (6.0)	3.5-4.5 (4.0)	2.0-2.5 (2.2)	Muscle	<i>Idus melanotus</i>	Russia
<i>M. nodularis</i> Southwell et Prash, 1918	9	7.2		3.4		Muscle	<i>Rasbora daniconius</i>	India
<i>M. nolyaensis</i> Fomena et Bouix, 1994	8.0-11.0 (9.0)	7.2-11.5 (8.3)		3.5-5.5 (4.4)	2.2-3.5 (3.0)	Muscle	<i>Eberus jee</i>	Cameroon
<i>M. obliquus</i> Kudo, 1934	8-9	7-8	5-6	4-5	2	Muscle	<i>Cerpiolepis velifer</i>	USA
<i>M. orbiculatus</i> Kudo, 1919	9-10	9-10	6.5-7	6-7.5	2.5-3.0	Muscle	<i>Notropis gibberli</i>	USA
<i>M. ornatus</i> Akhmerov, 1960	10	9		6	3	Muscle	<i>Acanthorhodeus asmusi</i>	Amur basin
<i>M. pseudodispar</i> Gorbunova, 1936	10-12	7-9.5	5.3-6	4.5-6.2	3.0-3.7	Muscle	<i>Rutilus rutilus</i>	Europe
<i>M. psaeudorasbora</i> (Hoshina, 1952) Landsberg et Lom, 1991	10.8-14.1 (12.8)	9.9-12.6 (11.3)	5.5-7.9 (6.4)	4.0-5.8 (5.2)	2.2-3.1 (2.8)	Muscle	<i>Pseudorasbora parva</i>	Japan
<i>M. ridgwayi</i> Easy et Cone, 2009	10.0-12.1 (11.3)	9.5-10.5 (10.4)	6.6-7	5.9-7.0 (6.5)	2.0-3.8 (3.2)	Muscle	<i>Semotilus atromaculatus</i>	Canada
<i>M. ridoufi</i> Easy et Cone, 2009	9.5-10.5 (9.9)	9.4-10.9 (10.1)	6.7-6.8 (6.7)	4.5-5.6 (5.2)	2.6-3.6 (3.0)	Muscle	<i>Pimephales notatus</i>	Canada
<i>M. saurogobionis</i> Cai et Wu, 1985	11.7-14.3 (13.0)	7.8-10.4 (10)	6.5-9.1 (8.0)	5.2-6.5 (6.1)	2.6-3.9 (3.4)	Muscle	<i>Saurogobio gymnocheilus</i>	China
<i>M. sphaerocapsularis</i> Shulman, 1962	17.0-18.0 (17.5)	16.0-17.0 (16.5)	11.0-12.0 (11.5)	7.0-8.0 (7.5)	5.6-6.5 (6.5)	Muscle	<i>Acheilognathus chankaensis</i>	China
<i>M. splendatus</i> (Kashikovskii in Keshkovskii, 1974) Landsberg et Lom, 1991	9.4-10.1	7.9-9		5.4-6	3.0-3.2	Muscle	<i>Gobio gobio</i>	Russia
<i>M. ferax</i> Kudo, 1934	9.5-11.5	9.0-10.5	5-6	6	3	Muscle	<i>Notropis whippelli</i>	USA
<i>M. wasjugani</i> Bocharova et Donec, 1974	15.1-17.6	10.0-15.1	7.4-8.8	5.8-7.7	3.3-5.0	Muscle	<i>Carassius auratus</i>	Russia (Ob river)
<i>M. wellerae</i> Li et Desser, 1985	12.5-16.5 (15)	9.5-11.5 (10)	6.5-7	5.5-6.5 (6)	3.4 (3.5)	Muscle	<i>Notropis cornutus</i>	Canada
<i>M. yibihensis</i> Zhao et Ma, 1994	8.5-9.8 (9.0)	10-12 (10.9)	6.6-6.9 (6.8)	4.5-5.0 (4.3)	3.0-4.2 (3.5)	Muscle	<i>Cyprinus carpio</i>	China
<i>M. zhongzhenis</i> Ma, 1993 (syn. <i>M. taihuensis</i>)	6.9-7.8 (7.2)	7.6-8.4 (8.1)	4.6-5.3 (5.0)	3.0-4.6 (3.7)	1.5-2.3 (1.9)	Muscle	<i>Hypophthalmichthys molitrix</i>	China

*Most data shown here are cited from Eiras et al. (2005), except for measurements of *M. artus* and *M. sphaerocapsularis*, cited from Chen and Ma (1998), *M. intramusculi*, syn. *M. procerus* (Kudo, 1934), cited from Easy et al. (2005), and *M. ridgwayi* and *M. ridoufi*, cited from Easy and Cone (2009). Measurements of *M. marumotoi* n. sp. are shown in the uppermost line, and overlapping values of other species are shadowed.

Table 4. Measurements of *Kudoa* spp. having six shell valves/polar capsules and characteristic tissue tropism to somatic muscles^a

Species	<i>K. neothurni</i>	<i>K. neothurni</i>	<i>K. grammatorcyini</i>	<i>K. scomberomori</i>	<i>K. thalassomi</i>	<i>K. septempunctata</i>
Number of shell valves / polar capsules	6	6	6	6	6/7 ^b	6/7 ^c
Representative host	<i>Thunnus thynnus</i>	<i>Thunnus albacares</i>	<i>Grammatorcyinus bicarinatus</i>	<i>Scomberomorus commerson</i>	<i>Thalassoma lunare</i>	<i>Paralichthys olivaceus</i>
Post-harvest myofibrillogenesis	No	Yes	No	No	No	No
Reference	The present study	Arai and Matsumoto (1953)	Adlard et al. (2005)	Adlard et al. (2005)	Adlard et al. (2005)	Matsukane et al. (2010)
Number of examined spores	15	— ^d	30	30	30	10
Width	9.5-11.4 (10.6)	9.1-13.0 (11.0)	8.0-8.9 (8.6)	6.8-8.2 (7.6)	9.5-11.8 (10.7)	11.1-13.1 (11.8)
Thickness	8.9-10.9 (9.7)	—	7.6-8.7 (8.1)	6.2-7.6 (6.8)	8.6-10.8 (9.4)	8.9-10.0 (9.4)
Suture width	7.3-8.6 (8.1)	5.9-8.7 (7.1)	7.2-8.2 (7.8)	5.3-6.3 (5.9)	6.8-8.8 (8.0)	—
Length	7.3-7.7 (7.6)	5.3-7.3 (6.2)	6.3-6.7 (6.5)	5.0-6.2 (5.4)	6.2-7.1 (6.7)	7.9-8.9 (8.5)
Polar capsule length	3.6-4.1 (3.8)	2.0-3.1 (2.5)	3.6-3.8 (3.7)	3.0-3.6 (3.2)	4.7-5.0 (4.9)	3.7-5.3 (4.6)
Polar capsule width	1.8-2.3 (2.0)	1.3-2.1 (1.6)	1.6-1.8 (1.7)	1.3-1.5 (1.4)	2.0-2.2 (2.1)	2.2-2.8 (2.4)
Apical view of spores	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Radially symmetrical	Irregularly radial
Lateral view of spores	Pyramidal	Pyramidal	Ovoid	Ovoid	Pyramidal	Pouch-shape
Ornamentation of valve	None	None	None	None	Lateral projections	None
Variation in size of polar capsules	Not evident	Not evident	Not evident	Not evident	Not evident	Evident

^aAll measurements are in μm and expressed as range with mean in parentheses.

^bSpores with six shell valves/polar capsules are dominant. See Burger and Adlard (2011).

^cRatio of spores with six or seven shell valves/polar capsules was variable by host individuals, e.g., 26:74, 33:67, 60:40, and 66:34 (Matsukane et al. 2010; Sato, unpublished data).

^d—, data not available.

Table 5. Measurements of *Kudoa* spp. having quadrate or semiquadrate spores in apical view and forming macroscopic cysts in the trunk muscle^a

Species	<i>Kudoa scomberi</i> n. sp.		<i>Kudoa caudata</i>		<i>Kudoa thurmi</i>		<i>Kudoa crumenata</i>		<i>Kudoa trachuri</i>		<i>Kudoa trachuri</i>	
	<i>Scomber japonicus</i>	<i>Scomber japonicus</i>	<i>Scomber japonicus</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Scomberomorus maculatus</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>	<i>Thunnus altagera</i>
Host	Elliptical cysts between myofibers	— ^b	— ^b	Ovoid cysts between myofibers	Ovoid cysts between myofibers	Ovoid cysts between myofibers	Ellipsoidal cysts between myofibers	Elliptical cysts between myofibers	Elliptical cysts between myofibers	Elliptical cysts between myofibers	Elliptical cysts between myofibers	Elliptical cysts between myofibers
Location in the host	Sea of Japan off Nagasaki	Southeastern Pacific Ocean off Peru	— ^b	Pacific Ocean	Pacific Ocean	Pacific Ocean	Miami, Florida	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki
Locality	Sea of Japan off Nagasaki	Southeastern Pacific Ocean off Peru	— ^b	Pacific Ocean	Pacific Ocean	Pacific Ocean	Miami, Florida	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki	Sea of Japan off Nagasaki
Date of collection	11-Feb-11	25-Jan-80	— ^b	3-Oct-08	3-Oct-08	3-Oct-08	—	11-Sep-08	11-Sep-08	11-Sep-08	11-Sep-08	4-Dec-08
References	The present study	Kovaleva & Gaevskaya (1983)	— ^b	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)	Iversen & Van Meter (1967)	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)	Matsukane et al. (2011)
Number of examined spores	30	—	—	20	20	20	10	20	20	20	20	20
Width	8.2-10.5 (9.2)	8.0-8.6	—	9.2-9.9 (9.5)	9.2-9.9 (9.5)	9.2-9.9 (9.5)	9.3-10.4 (9.9)	7.0-8.5 (7.9)	7.0-8.5 (7.9)	7.0-8.5 (7.9)	7.0-8.5 (7.9)	5.9-6.8 (6.3)
Thickness	7.0-8.8 (8.1)	6.7	6.7	7.7-9.0 (8.3)	7.7-9.0 (8.3)	7.7-9.0 (8.3)	8.2-9.7 (9.0)	5.3-6.2 (5.8)	5.3-6.2 (5.8)	5.3-6.2 (5.8)	5.3-6.2 (5.8)	4.5-5.6 (5.1)
Suture thickness	6.1-8.0 (7.1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Length	6.1-6.8 (6.4)	5.3-6.7	5.3-6.7	6.4-6.6 (6.5)	6.4-6.6 (6.5)	6.4-6.6 (6.5)	6.8-8.2 (7.5)	5.5-6.9 (6.1)	5.5-6.9 (6.1)	5.5-6.9 (6.1)	5.5-6.9 (6.1)	6.7-7.5 (7.0)
Polar capsule length	2.5-3.4 (2.9)	2.0-2.7	2.0-2.7	2.2-2.9 (2.5)	2.2-2.9 (2.5)	2.2-2.9 (2.5)	3.2-4.6 (4.0)	2.6-3.5 (2.9)	2.6-3.5 (2.9)	2.6-3.5 (2.9)	2.6-3.5 (2.9)	2.2-2.9 (2.7)
Polar capsule width	1.3-2.0 (1.6)	1.6-2.0	1.6-2.0	1.9-2.2 (2.1)	1.9-2.2 (2.1)	1.9-2.2 (2.1)	2.1-2.5 (2.5)	1.6-2.2 (2.0)	1.6-2.2 (2.0)	1.6-2.2 (2.0)	1.6-2.2 (2.0)	1.7-2.2 (2.0)
Apical view of spore	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate	Semiquadrate
Lateral view of spore	Ovoid	Almost cvoid	Almost cvoid	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Pouch-shaped with truncated apex	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Ovoid	Ovoid
Ornamentation of shell valve	None	Filamentous projection	Filamentous projection	None	None	None	None	None	None	None	None	None
Polar capsule	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Elongated, drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like	Drop-like

^aAll measurements are in μm and expressed as range and mean in parentheses.

^b—, data not available.

Table 6. 日本国内に分布するMyxobolus属粘孢子虫として報告された種

学名(寄主虫)	学名(宿主)	和名(宿主)	局在	孢子計測値					
				LS	WS	TS	LPC	WPC	PC
<i>M. acanthogobii</i> Hoshina, 1952	<i>Acanthogobius flavimanus</i>	マハゼ	脳表面	9.8 (7.9-11.8)	8.0 (6.6-9.5)	6.1 (5.3-7.1)	3.5 (2.9-4.2)	2.2 (1.8-2.9)	=
(syn. <i>M. buri</i> Egusa, 1985)*	<i>Seriola quinqueradiata</i>	ブリ	脳	10.6 (9.2-11.8)	9.2 (7.9-10.2)	6.6 (5.5-7.3)	4.5 (3.9-5.4)	2.8 (2.5-3.4)	=
<i>M. acheilognathi</i> (Fujita, 1927)	<i>Acheilognathus lanceolatus</i>	ヤリタナゴ	外皮	9	6	12	5.5		≠
<i>M. acutus</i> (Fujita, 1912)	<i>Carassius auratus gibelio</i>	ギベリオブナ	鰓	8-10	7-8	5-6	5	4	
<i>M. concentricus</i> (Ozaki et Ishizaki, 1941)	<i>Trideniger obscurus</i>	チチブ	膀胱	9.2-9.3	8.4	7.9	3.5	3.1	=
<i>M. cultus</i> Yokoyama et al., 1995	<i>Carassius auratus</i>	キンギョ	軟骨	10.2 (9.3-11.3)	6.0 (5.2-7.2)	4.3 (3.6-4.6)	4.0 (3.1-4.9)	1.9 (1.5-2.1)	=
<i>M. dermatobius</i> (Ishii, 1915) Landsberg et Lom, 1991	<i>Anguilla japonica</i>	ニホンウナギ	外皮	6.3-7.0	4.2-4.9		2.8-3.5		=
<i>M. ellipticus</i> (Fujita, 1924) Nagasawa, Akawura et Urawa, 1989 (syn. <i>Lentospora elliptica</i> Fujita, 1924)	<i>Carassius vulvaris</i>		腎臓	16.0-19.0	12.0-13.0	10.0-11.0	(9.0)	(5.0)	=
<i>M. elongatus</i> Fujita, 1924	<i>Carassius carassius</i>	フナ	腎臓	15	6	9	7	2	=
<i>M. episquamalis</i> Egusa et al., 1990	<i>Mugil cephalus</i>	ボラ	鰓	8.6 (7.5-9.5)	6.8 (6.0-7.5)	5.1 (4.5-5.5)	4.4 (3.8-5.0)	2.2-3.0	=
<i>M. Fujitai</i> Eiras et al., 2005 (syn. <i>Lentospora anguilli</i> Fujita, 1929)	<i>Anguilla japonica</i>	ニホンウナギ	鰓、背側体部	9.2	8.4	4.9			=
<i>M. giji</i> (Fujita, 1927) Shulman, 1962	<i>Fulvdraco nudiceps</i>	ギギ	腎臓	12	6	5	7		=
<i>M. guathopogonae</i> (Inoue et Hoshina, 1983) Landsberg et Lom, 1991	<i>Gnathopogon elongatus canulescens</i>	タモロコ	頭部外皮	11.7 (9.3-13.4)	8.9 (7.2-10.3)	7.0 (5.7-8.2)	5.4 (4.1-6.7)	2.8 (2.1-3.1)	=
<i>M. hoshinai</i> (Hoshina, 1953) Landsberg et Lom, 1991	<i>Cyprinus carpio</i>	コイ	外皮	11.4 (9.7-13.4)	9.3 (7.9-10.9)	6.6 (5.4-7.7)	4.5 (3.5-5.1)	2.8 (2.3-3.6)	=
<i>M. kawabatae</i> (Fujita, 1927) Shulman, 1962	<i>Fulvdraco nudiceps</i>	ギギ	腎臓	16	8	6	12	3	≠
<i>M. koi</i> Kudo, 1919	<i>Cyprinus carpio</i>	コイ	鰓	14-16	8-9	5-6	8-9	2.5-3	=
<i>M. leucogobianus</i> (Fujita, 1927) Landsberg et Lom, 1991	<i>Pseudogobius esocinus</i>	カマツカ	腎臓	12	10	7.5	7.5	3.5	≠
<i>M. luciogobii</i> (Ishizaki, 1957) Landsberg et Lom, 1991	<i>Luciogobius guttatus guttatus</i>	ミズハゼ	膀胱	9 (7.7-10.7)	7.7 (6.9-9.2)	6.4 (5-7.9)	3.7 (3.0-4.6)	2.6 (2.3-2.9)	=
<i>M. machidai</i> Li et al., 2012	<i>Oplegnathus punctatus</i>	イシガキダイ	食道壁	9.0 (8.1-9.4)	7.8 (7.5-8.3)	5.5 (5.1-6.0)	3.5 (3.2-3.8)	2.3 (2.2-2.5)	=
<i>M. miyaii</i> Kudo, 1919	<i>Parasilurus asotus</i>	ナマズ	腸	13-14.5	6-7		4.5		=
<i>M. murakami</i> Urawa et al., 2009	<i>Onchorhynchus masou masou</i>	サクラマス	神経細胞	10.3-12.1	9.2-10.9	6.2-8.5	4.0-6.0	2.4-3.9	=
<i>M. nagaraensis</i> Yokoyama et al., 2007	<i>Rhinogobius</i> sp. (orange type)	ヨシノボリ	体腔	12.0 (10.5-13.5)	9.0 (8.0-10.0)	6.5 (6.0-7.0)	5.5 (4.5-6.0)	3.0 (2.5-4.0)	=
<i>M. pseudoraborae</i> (Hoshina, 1952) Landsberg et Lom, 1991	<i>Pseudorasbora parva</i>	モツゴ	筋	12.8 (10.8-14.1)	11.3 (9.9-12.6)	6.4 (5.5-7.9)	5.2 (4.0-6.8)	2.8 (2.2-3.1)	=
<i>M. sacchalinenis</i> (Fujita, 1923) Landsberg et Lom, 1991	<i>Carassius auratus gibelio</i>	ギベリオブナ	腎臓	9-12	6-8.5	5.5-6	4-5	2-3.5	=
<i>M. sphaericus</i> (Fujita, 1924) Landsberg et Lom, 1991	<i>Carassius auratus gibelio</i>	ギベリオブナ	腎臓	8.5-12	9-11	6	4.5-5.5	2.6-3.5	=
<i>M. spinacurvatura</i> Maeno et al., 1990	<i>Mugil cephalus</i>	ボラ	腸間膜、鰓、脾臓	10.5-12.5	9.0-11.0	6.0-7.5	3.5-5.0	2.5-3.5	=
<i>M. spirosulcatus</i> Maeno et al., 1995	<i>Seriola quinqueradiata</i>	ブリ	胆管	8.9 (7.5-10.0)	7.8 (7.5-8.5)	6.7 (6.0-7.5)	4.1 (3.5-5.0)	2.6 (2.0-3.0)	=

* Yokoyama et al., 2004

Table 7. 日本国内に分布する *Henneguya* 属粘液孢子虫として報告された種

学名(寄生虫)	学名(宿主)	和名(宿主)	局在	孢子計測値							
				LSB	WSB	TSB	LT	LS	LPC	WPC	PC
<i>H. macropodi</i> Shiba, 1934	<i>Macropodus chinensis</i>	タイワンキンギョ	外皮	11.0-14.0	3.7-5.5		11.0-15.0		6.0-7.2	1.6	=#
<i>H. miyairii</i> Kudo, 1919	<i>Carassius auratus</i>	キンギョ	頭部下組織	12	8				10-30		
<i>H. miyazakii</i> Hoshina, 1952	<i>Chaenogobius annularis annularis</i>	ウキゴリ	外皮	9.6-13.3 (12.0)	8.5-11.1 (9.7)	4.1-7.3 (6.2)	33.1-56.1 (44.6)		3.7 (3.1-4.2)	2.0-2.9 (2.5)	=
<i>H. ogeawai</i> Li et al., 2012	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	クロダイ	消化管	8.9-12.2 (11.0)	6.3-7.5 (6.9)	5.2-6.6 (5.9)	8.4-12.7 (10.0)	19.2-23.4 (21.1)	3.8-5.2 (4.3)	1.4-2.3 (1.9)	=
<i>H. preintestinalis</i> Ozaki et Ishizaki, 1941	<i>Tridentiger obscurus</i>	チチジ	小腸	9.0-10.2 (9.6)	5.1-6.2 (5.7)	4.5 (4-5)	11.8-19 (15.3)		3.8-4.6 (4.2)		
<i>H. tridentigeri</i> Ozaki et Ishizaki, 1941	<i>Tridentiger obscurus</i>	チチジ	外皮	12.5	7.4	7.3	41.4		5.8	2.8	=
<i>H. yokoyamai</i> Li et al., 2012	<i>Acanthopagrus schlegelii</i>	クロダイ	胆嚢壁-体腔膜	10.1-13.7 (11.0)	6.6-7.5 (7.1)	4.5-6.4 (5.6)	10.8-17.0 (14.1)	21.9-29.2 (25.0)	3.1-4.2	1.8-2.4 (2.0)	=
<i>H. zikawiensis</i> Sikama, 1938	<i>Carassius auratus auratus</i>	キンギョ	腸、鰓、心臓、腎臓	8.4-10.8 (9.5)	7.2-9.6 (8.0)	6.0-6.6	15.0-38.4	23.4-49.2	4.2-4.8 (4.5)	2.4-3.6 (3.0)	

Table 8. *Kudoa*属粘液胞子虫として日本で報告された種

学名(寄生虫)	学名(宿主)	和名(宿主)	局在	SV/PC	胞子計測値					
					LS	WS	TS	LPC	WPC	PC
<i>K. amamiensis</i> Egusa et Nakajima, 1980	<i>Seriola quinqueradiata</i> ; <i>Abudefduf saxifasciatus</i> , <i>A. vaigantis</i> ; <i>Chromis isharae</i> ; <i>C. notatus</i> ; <i>Ctenyptera esmimilis</i>	ブリほか	体側筋	4	4.5-5.0	5.0-6.0	5.0-6.0	1.5-2.0	1.0-1.2	=
<i>K. intestinalis</i> Maeno et al., 1993	<i>Mugil cephalus</i>	ボラ	腸管防層	4	3.0-3.5 (3.4)	6.3-7.0 (6.5)	5.8-6.5 (6.1)	1.3-1.5 (1.5)	1.0-1.5 (1.2)	=
<i>K. iwatai</i> Egusa et Shiomitsu, 1983	<i>Pagrus major</i> ; <i>Oplegnathus punctatus</i>	マダイ、インガキ ダイ	体側筋	4	5.7-8.0 (7.2)	8.8-9.6 (9.1)	9.7-10.7 (10.1)	3.8-4.5 (4.0)	2.0-2.4 (2.2)	=
<i>K. lateolabracis</i> Yokoyama et al., 2004	<i>Lateolabrax</i> sp.	(中国産)スズキ	体側筋	4	5.4-6.9 (6.4)	5.9-6.9 (6.5) / 8.4-9.9 (9.3)	9.9-12.9 (11.5)	3.0-4.0 (3.6) / 3.0- 4.0 (3.6)	1.5-2.0 (1.9) / 1.5-2.0 (1.9)	≠
<i>K. megacapsula</i> Yokoyama et al., 2005	<i>Sphyræna pinguis</i>	カマス	体側筋	4	7.9-15.4 (13.4)	11.0-12.9 (12.0)	30.3-44.7 (40.3) / 25.6-34.9 (30.9)	11.7-14.2 (12.7) / 1.5-4.4 (2.8)	4.9-6.8 (5.8) / 1.0-1.5 (1.2)	≠
<i>K. musculoliquetaciens</i> (Matsumoto, 1954) Egusa, 1986 (syn. <i>Chloromyxum musculoliquetaciens</i> Matsumoto, 1954)	<i>Xiphias gladius</i>	メカジキ	体側筋	4	5.3-7.2 (6.2)	7.4-9.9 (8.3)	7.0-8.9 (7.8)	1.6-2.8 (2.1)	1.6-2.5 (1.9)	=
<i>K. neohurni</i> (Arai et Matsumoto, 1953) Whipps et al., 2004 (syn. <i>Hexacapsula neohurni</i> Arai et Matsumoto, 1953)	<i>Neohunnus macropterus</i>	キハダマグロ	体側筋	6	5.6-6.6 (6.2)	10.7-11.4 (11.0)	6.8-7.3 (7.1)	2.4-2.7 (2.5)	1.5-1.7 (1.6)	=
<i>K. ogawai</i> Yokoyama et al., 2012	<i>Hyperoglyphe japonica</i>	メダイ	体側筋	4	8.3-9.6 (8.9)	12.0-14.2 (13.2)	9.7-11.7 (10.9)	1.9-3.2 (2.4)	1.7-3.0 (2.4)	=
<i>K. percardialis</i> Nakajima et Egusa, 1978	<i>Seriola quinqueradiata</i>	ブリ	囲心腔	4	4.5-5.0	6.0-7.0	4.0-4.2	2.4-3.0	1.0-1.5	=
<i>K. prunusi</i> Meng et al., 2011	<i>Thunnus orientalis</i>	クロマグロ	脳	5	5.7-8.6 (7.5)	8.5-10.3 (9.6)	7.0-8.8 (8.1)	2.8-4.1 (3.6)	1.7-2.2 (1.9)	=
<i>K. scomberi</i> Li et al., 2013	<i>Scomber japonicus</i>	マサバ	体側筋	4	5.1-6.8 (6.4)	8.2-10.5 (9.2)	7.0-8.8 (8.1)	2.5-3.4 (2.9)	1.3-2.0 (1.6)	=
<i>K. septempunctata</i> Matsukane et al., 2010	<i>Paralichthys clivaceus</i>	ヒラメ	体側筋	6-7	7.9-8.9 (8.5)	11.1-13.1 (11.8)	8.9-10.0 (9.4)	3.7-5.3 (4.6)	2.2-2.8 (2.4)	≠
<i>K. shiomitsu</i> Egusa et Shiomitsu, 1983	<i>Takifugu rubripes</i>	トラフグ	囲心腔、心臓	4	5.6-6.8 (6.2)	6.7-7.5 (7.2)	8.6-9.8 (9.4)	2.5-3.0 (2.8)	1.0-1.4 (1.3)	=
<i>K. thurni</i> Matsukane et al., 2011	<i>Thunnus alalunga</i>	ビンナガ	体側筋	4	5.4-6.6 (6.5)	9.2-9.9 (9.5)	7.7-9.9 (8.3)	2.2-2.9 (2.5)	1.9-2.2 (2.1)	=
<i>K. thyrsites</i> (Glichrst, 1924) Meglitsch, 1947 (syn. <i>Chloromyxum thyrsites</i> Glichrst, 1924)	<i>Paralichthys clivaceus</i> ; <i>Lateolabrax</i> sp.	ヒラメほか	体側筋	4	5.9-8.9 (7.8)	7.9-11.9 (10.0) / 8.1-10.2 (9.1)	12.9-17.8 (14.7)	2.0-4.0 (2.8)	1.5-2.5 (1.6)	≠
syn. <i>K. cruciformum</i> (Matsumoto, 1954) Shulman, 1966 (syn. <i>Neochloromyxum cruciformum</i> Matsumoto, 1954)*	<i>Lateolabrax japonicus</i>	スズキ	体側筋	4	7.0-9.1 (7.0)	14.0-18.2 (16.0)	13.6-16.8 (15.1)	5.6-7.8 (6.3) / 2.8- 4.9 (4.0)	2.5-3.6 (4.0) / 1.7-2.8 (2.1)	≠
<i>K. trachuri</i> Matsukane et al., 2011	<i>Trachurus japonicus</i>	マアジ	体側筋	4	5.5-6.9 (6.1)	7.0-8.5 (7.9)	5.3-5.2 (5.8)	2.6-3.5 (2.9)	1.6-2.2 (2.0)	=
<i>K. yasunagai</i> (Hsieh et Chen, 1984) Whipps et al., 2004 (syn. <i>Septemcapsula yasunagai</i> Hsieh et Chen, 1984)	<i>Lateolabrax japonicus</i>	スズキ	脳	7	4.3-7.3 (6.2)	5.4-13.9 (11.7)	7.1-10.2 (8.3)	3.4-4.3 (3.6)	2.2-2.9 (2.5)	=

* Yokoyama et al., 2004

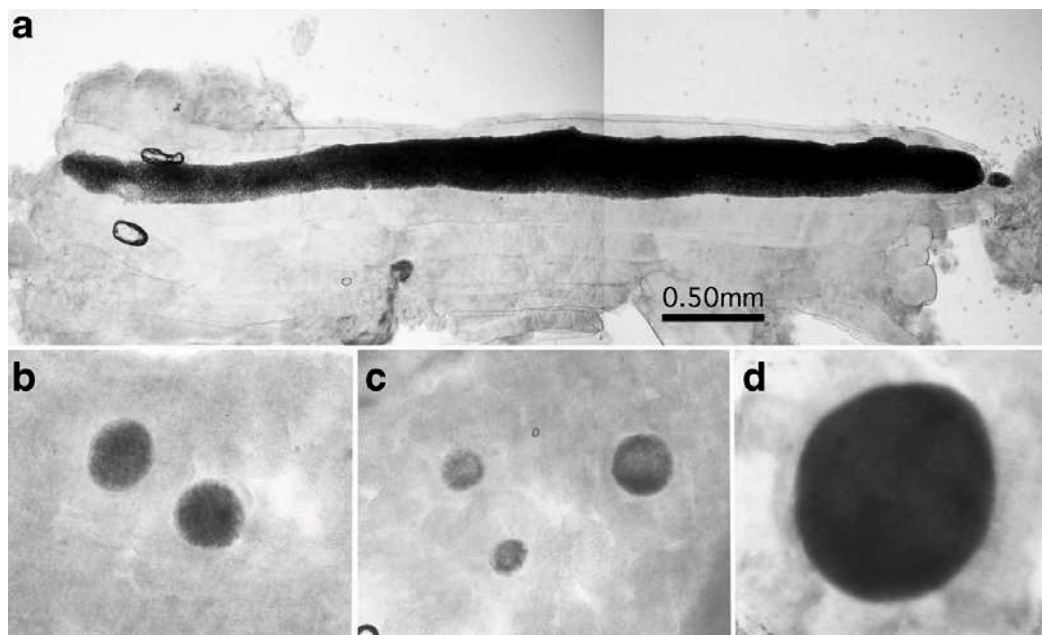


Fig. 1 Microscopic views of plasmodia of *Myxobolus marumotoi* forming a pseudocyst in the myofiber of trunk muscles (a) and *Cardimyxobolus japonensis* forming cysts in the wall of intestines (b–d) of dark sleepers in Yamaguchi City, Japan. All photographs at the same magnification.

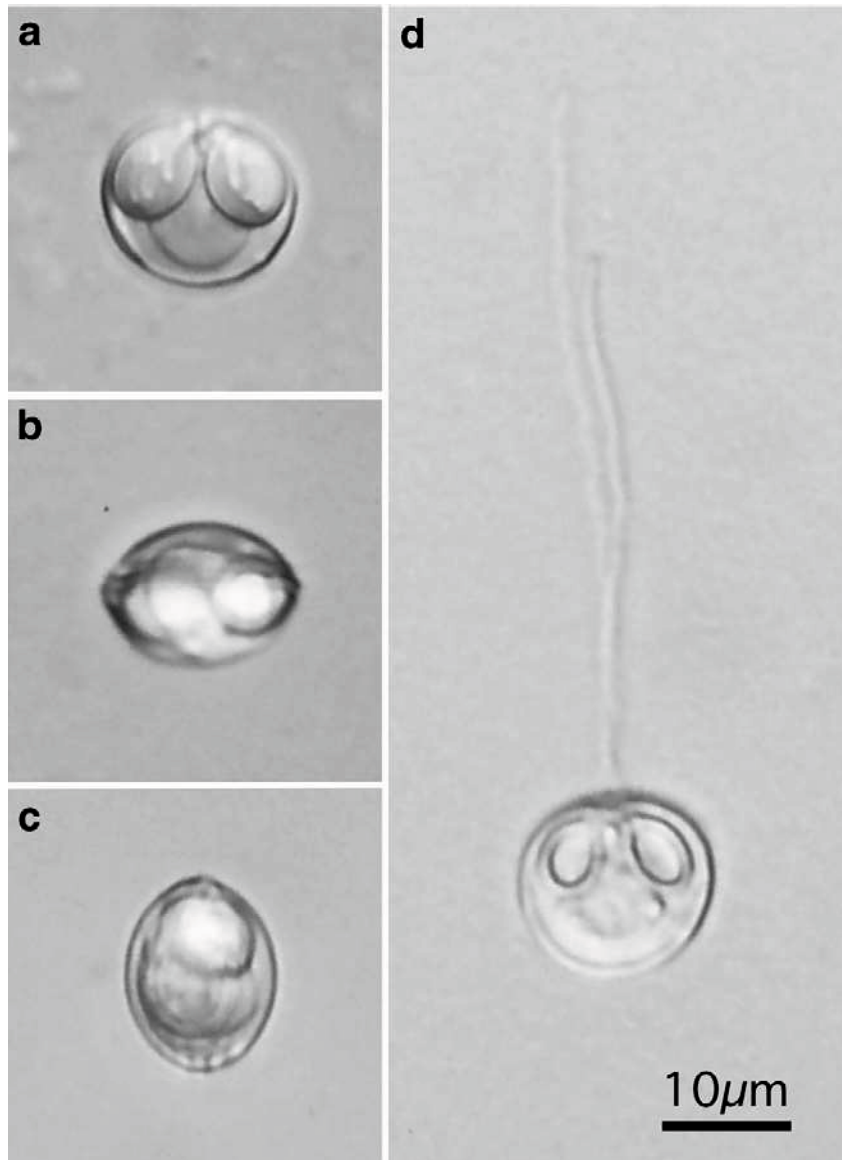


Fig. 2 Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *Myxobolus marumotoi* in valvular view (a), apical view (b), and sutural view (c). Valvular view of a spore discharging polar filaments (d). All photographs at the same magnification.

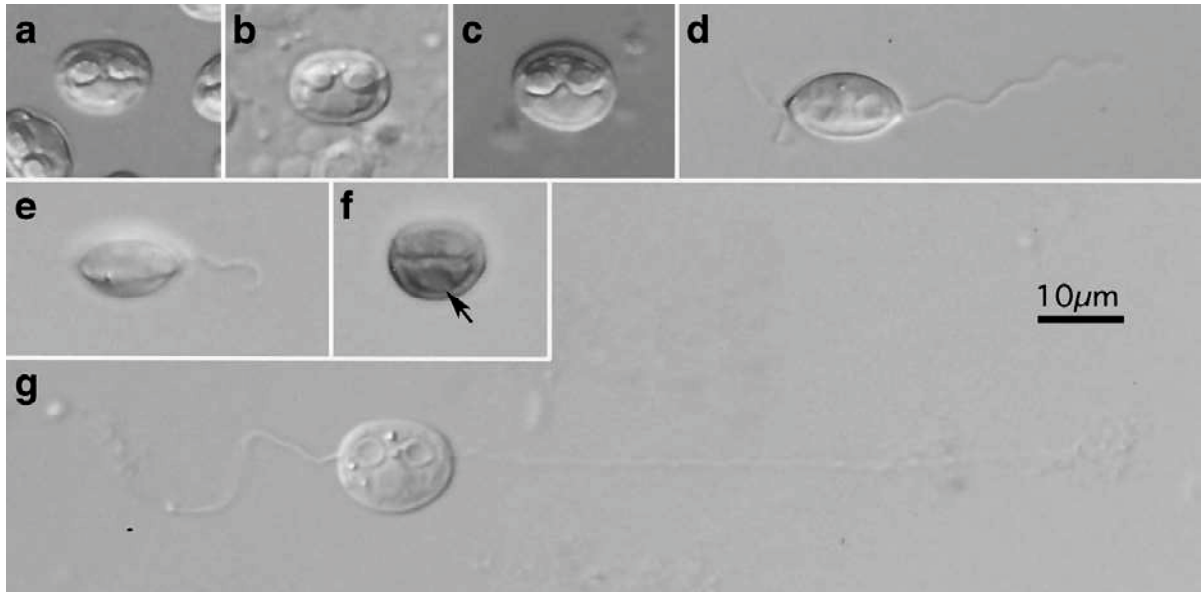


Fig. 3 Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *Cardimyxobolus japonensis* in valvular view (a–c, f, and g) and apical view (d and e). Spores discharging polar filaments (d, e, and g). By Lugol’s iodine staining, an iodophilous vacuole (arrow) is clearly visible in the sporoplasm (f). All photographs at the same magnification.

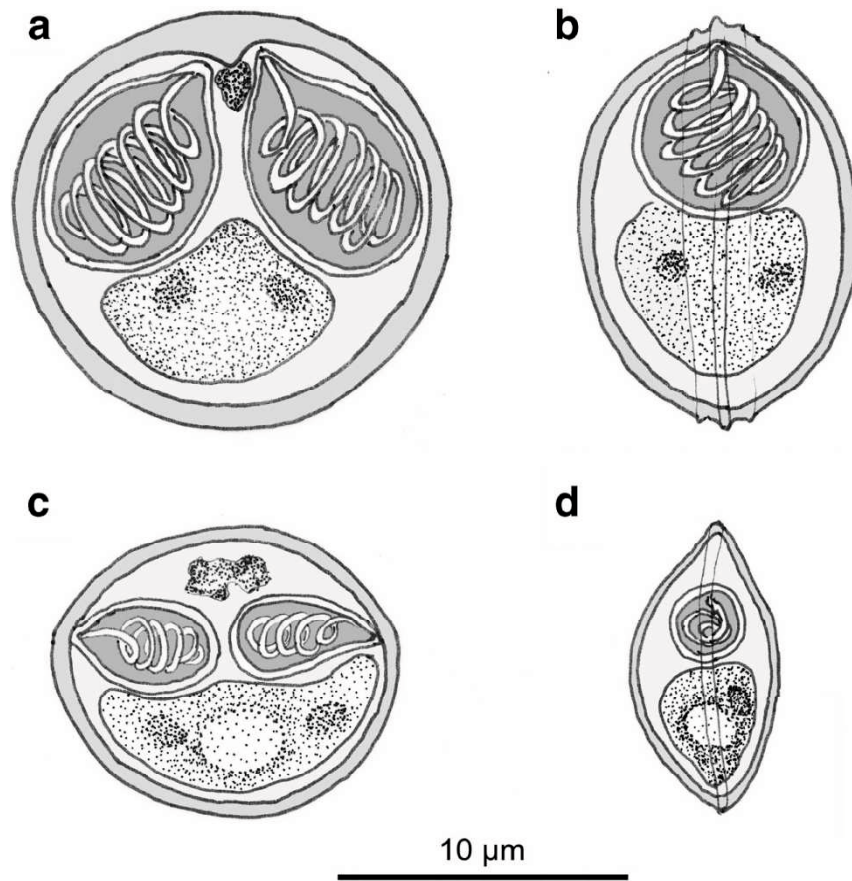


Fig. 4 Stylized illustrations of *Myxobolus marumotoi* (a and b) and *Cardimyxobolus japonensis* (c and d). Valvular view (a and c) and sutural view (b and d). All illustrations at the same magnification.

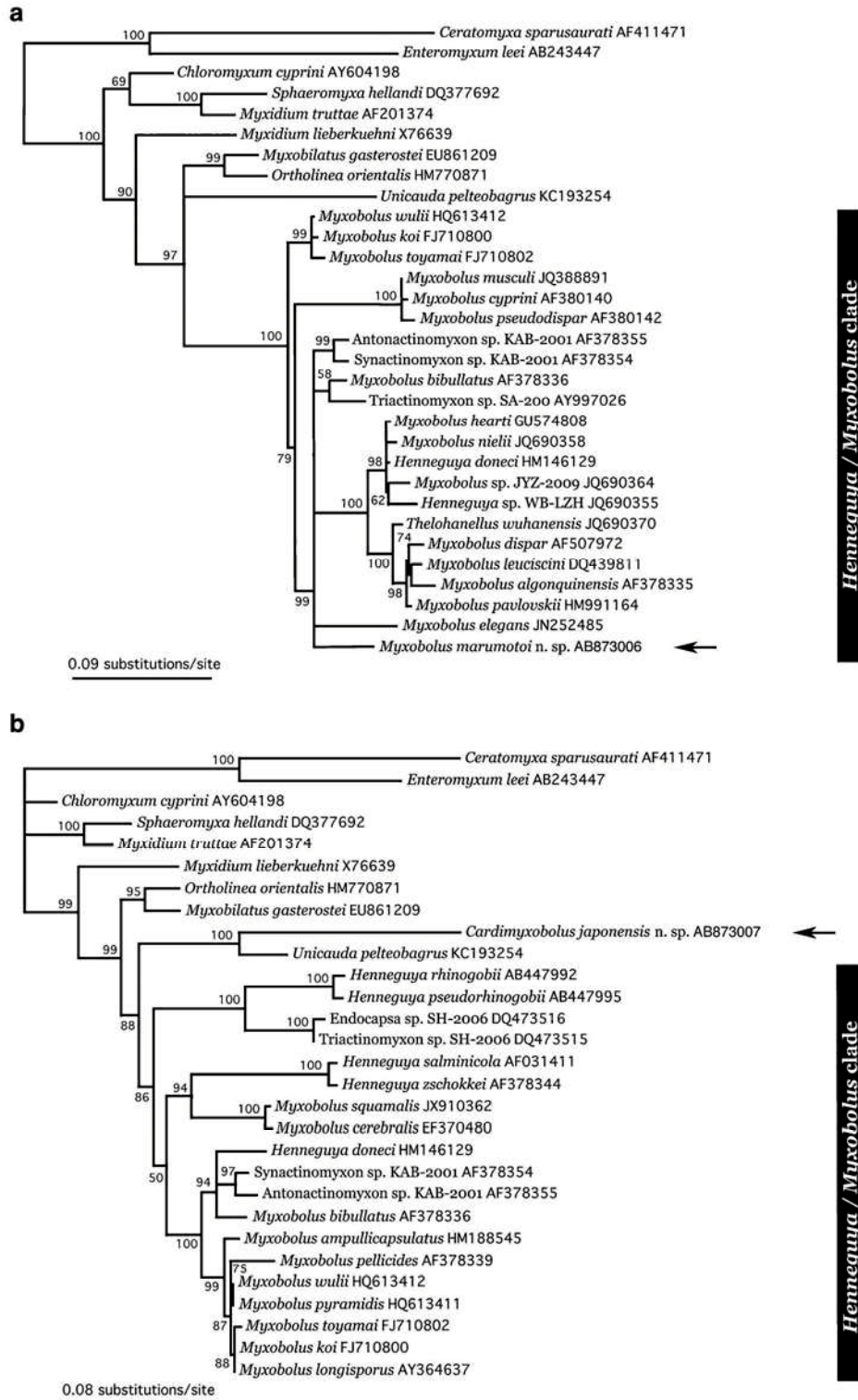


Fig. 5 PhyML phylogenetic trees based on the SSU rDNA sequences of the two new species indicated by arrows (**a** *Myxobolus marumotoi* and **b** *Cardimyxobolus japonensis*) and representative myxosporean species of Bivalvulida. Species names are shown with their DDBJ/EMBL/GenBank accession nos.

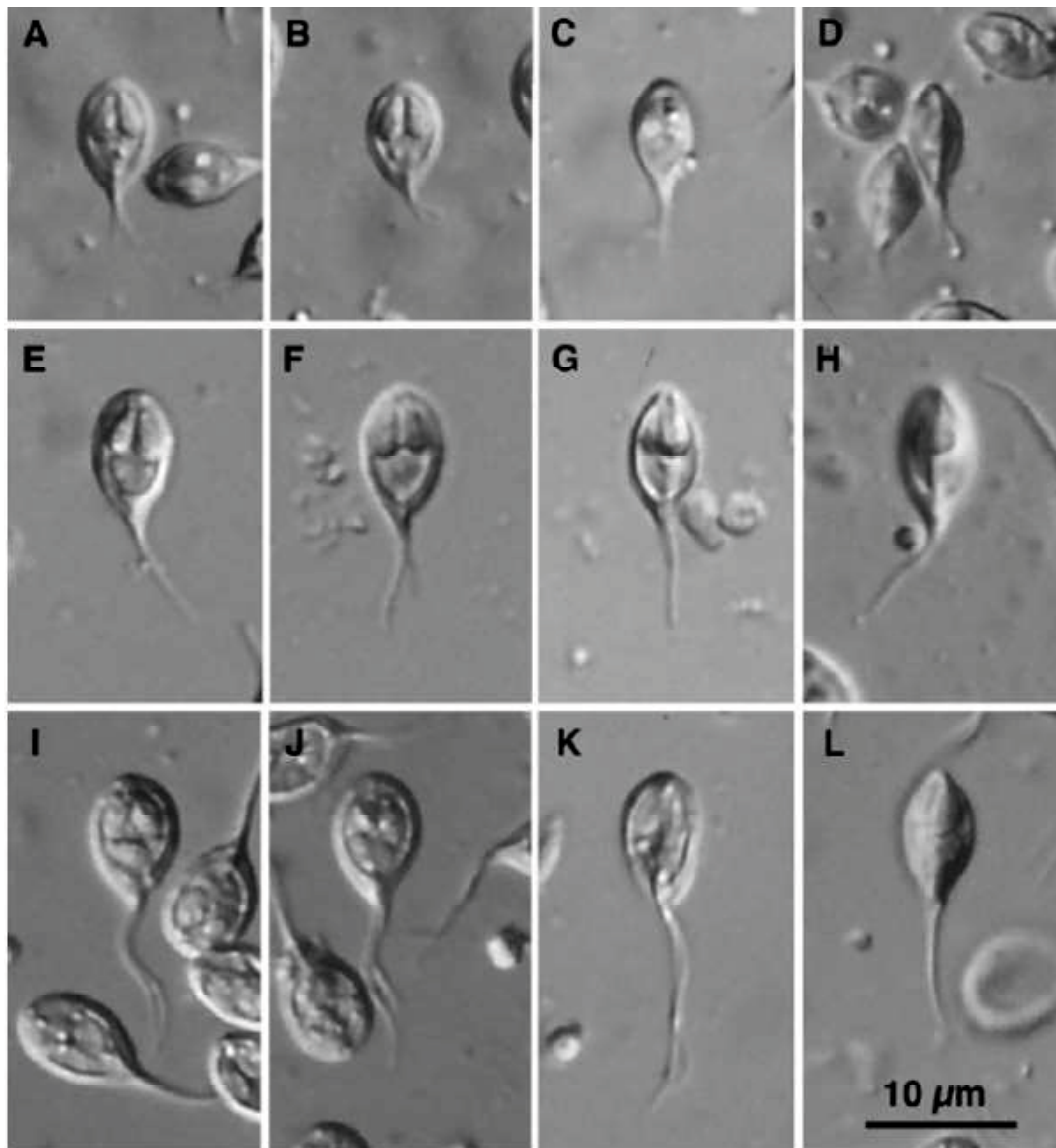


Fig. 6 Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of two new *Henneguya* spp. from the alimentary tract wall of black sea breams. A–D *H. ogawai* from a plasmodium localized in the esophageal wall; E–H *H. ogawai* from a plasmodium localized in the intestinal wall; and I–L *H. yokoyamai* from a plasmodium localized in the gall bladder wall. A, B, E, F, I, J, frontal views; C, D, G, H, K, L, lateral views.



Fig. 7 Phase contrast micrographs of fresh spore preparations of *M. machidai* from the esophageal wall of a spotted knifejaw. A frontal view; B, C lateral views.

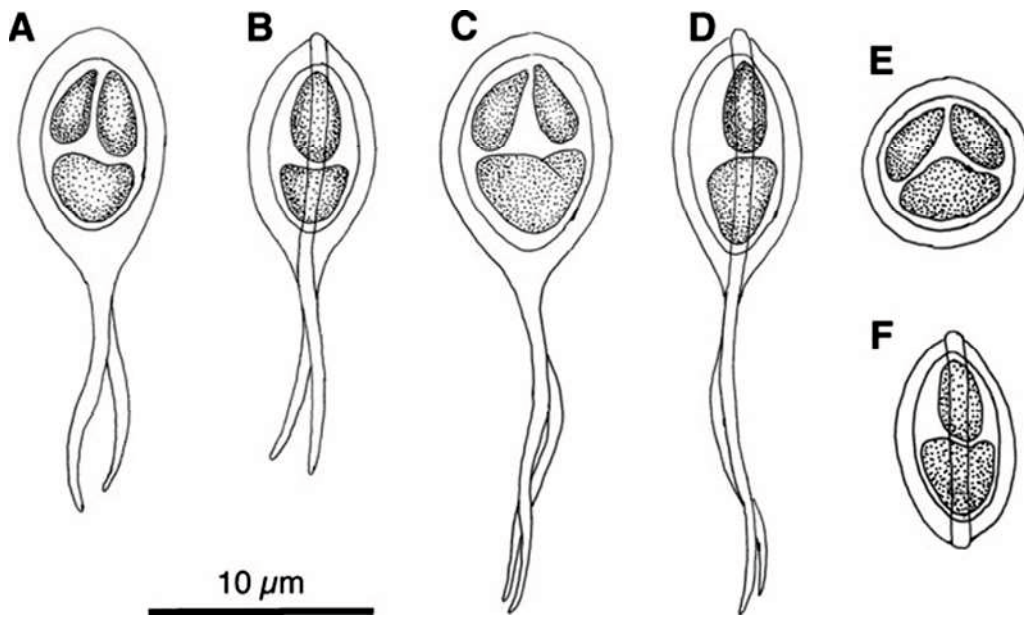


Fig. 8 Stylized drawings of *H. ogawai* (A and B), *H. yokoyamai* (C and D), and *M. machidai* (E and F) in frontal and lateral views.

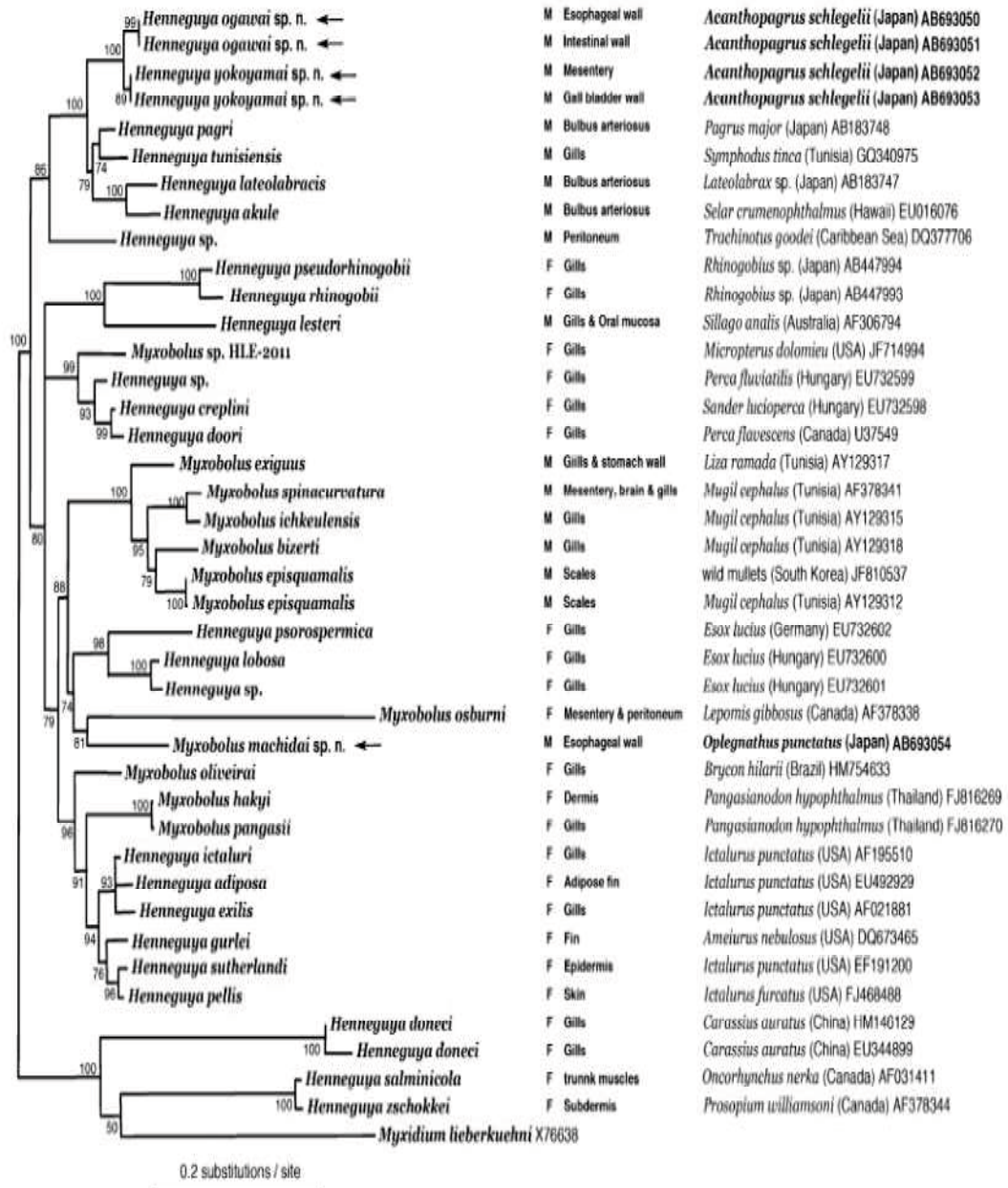


Fig. 9 ML phylogenetic tree based on the SSU rDNA sequences. On the right side of the figure, water type of the host fish (M marine and brackish water, F freshwater), location in the host, host name and country, and DDBJ/EMBL/GenBank accession no. are shown for each species.

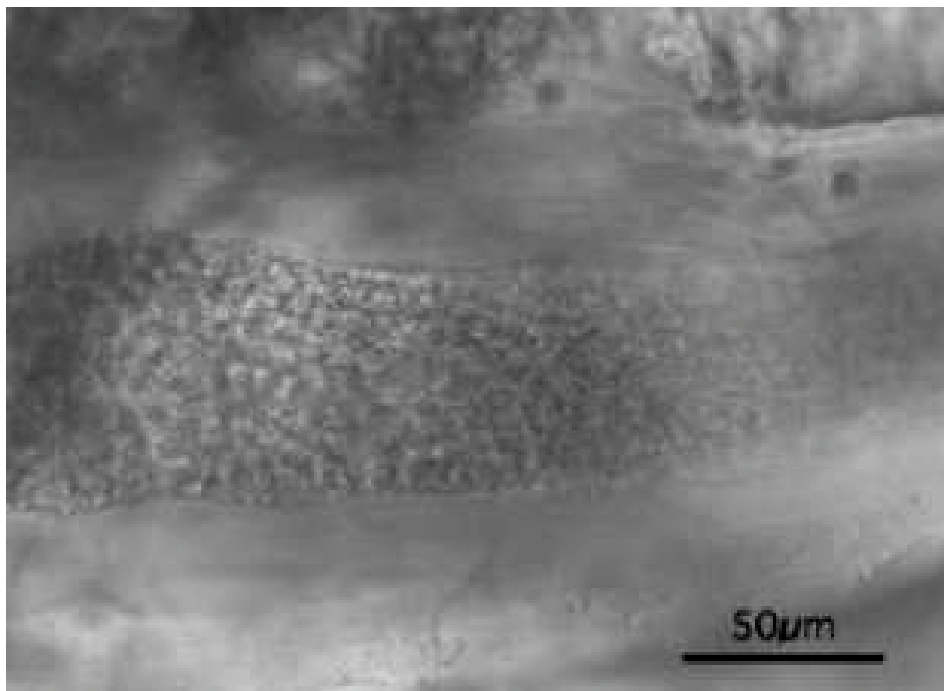


Fig. 10 Partial view of a pseudocyst of *Kudoa neothunni* in a myofiber of a northern bluefin tuna under a light microscope. Note the intact striated muscle myofibrils in the parasitized myofiber.

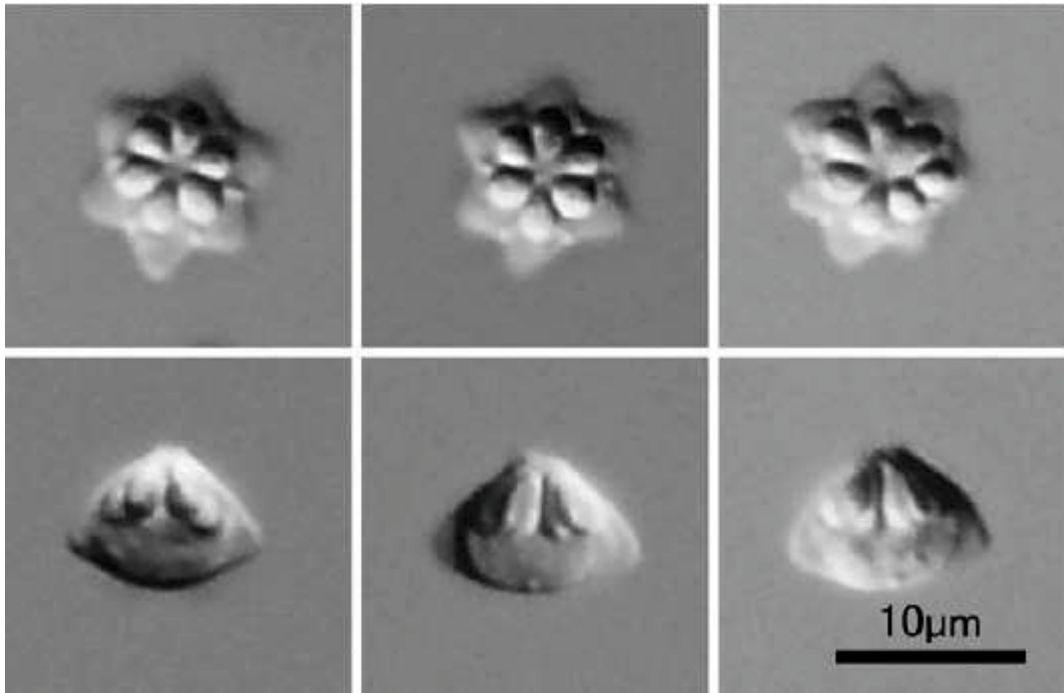


Fig. 11 Photographs of fresh spores of *Kudoa neothunni* from a northern bluefin tuna under a light microscope. Upper photographs are apical views of spores; lower photographs are lateral views of spores.

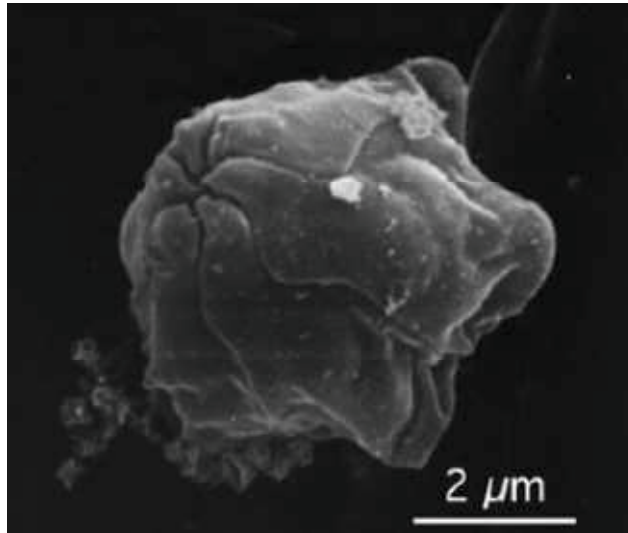


Fig. 12 Scanning electron microscopy of a *Kudoa neothunni* spore in oblique view.

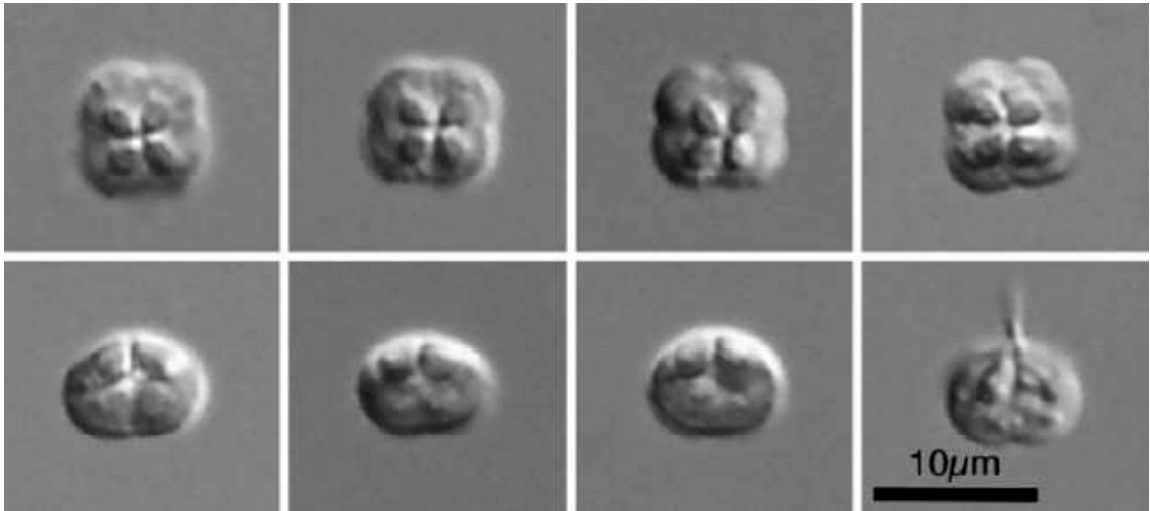


Fig. 13 Photographs of fresh spores of *Kudoa scomberi* from a chub mackerel fished in the Sea of Japan

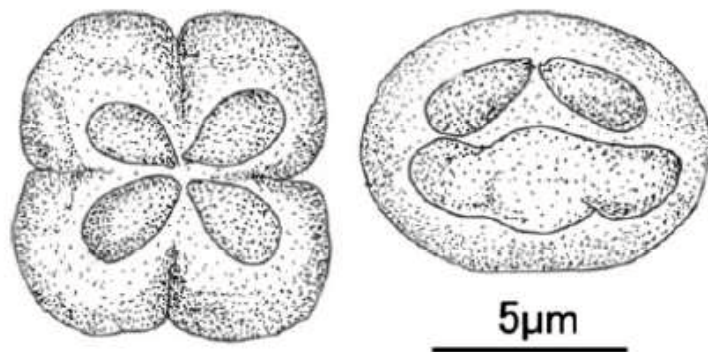


Fig. 14 Stylized diagrams of *Kudoa scomberi* in apical (left) and lateral (right) views.

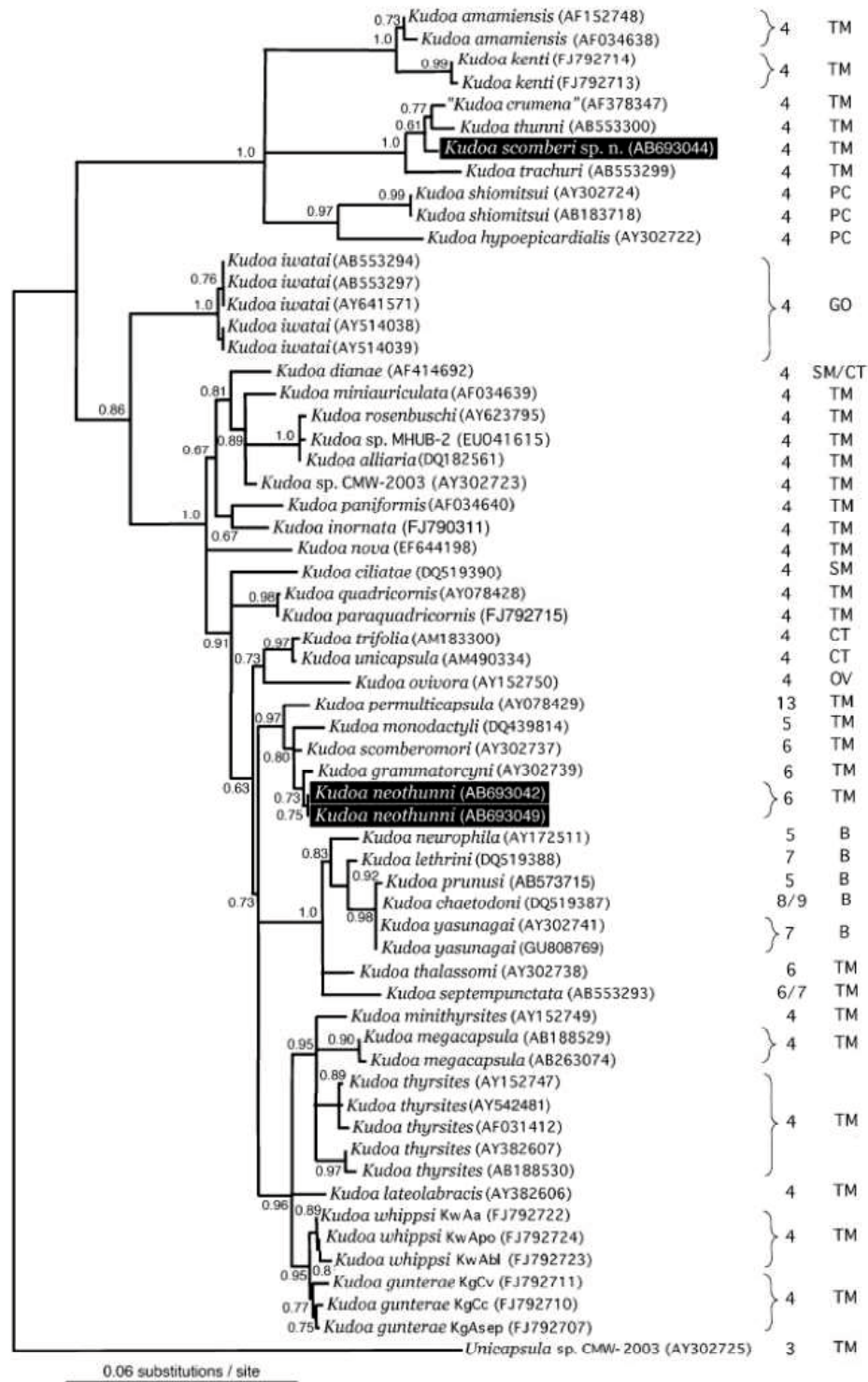


Fig. 15 ML phylogenetic tree based on the 18S rDNA sequence. On the right side, the number of shell valves and polar capsules per spore, and the location in the host are shown for each species. B brain, CT connective tissue, GO general body, OV ovary, PC pericardium, SM smooth muscle, TM trunk muscle.

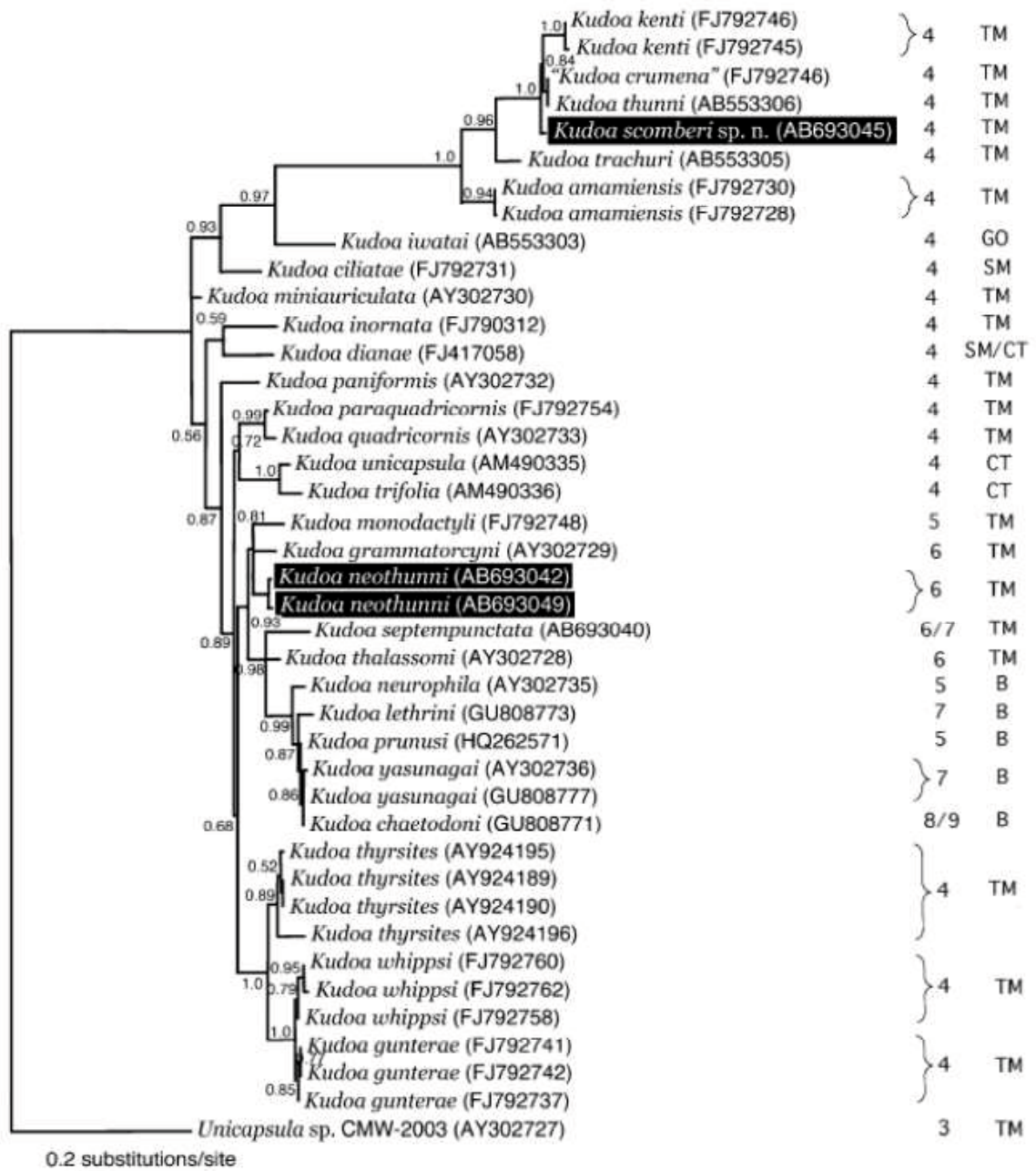


Fig. 16 ML phylogenetic tree based on the 28S rDNA sequence. On the right side, the number of shell valves and polar capsules per spore, and the location in the host are shown for each species. B brain, CT connective tissue, GO general body, SM smooth muscle, TM trunk muscle.