

令和元年6月11日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07768

研究課題名(和文)ニホンヤマビル(ヤマビル)の遺伝構造の検出と分布拡大ルートの推定

研究課題名(英文)Genetic structure and current range expansion of *Haemadipsa japonica*

研究代表者

逢沢 峰昭(Aizawa, Mineaki)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：70436294

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、全国的にニホンヤマビル(ヤマビル)の分布拡大が問題化している。しかし、このような拡大がどの集団を核にして、どのような動物を介して起きているのか不明である。本研究は全国39地域でヤマビルを採集し、ミトコンドリアDNAおよび核マイクロサテライトDNAを解析して、ヤマビルの遺伝的組成の地理的違いを調べた。また、ヤマビルの消化管内の血液塊のミトコンドリアDNAを解析して宿主動物を同定した。その結果、ヤマビルは地域によって遺伝的組成が明瞭に異なっており、近年の分布拡大は各地域の狭い範囲で生じている可能性が示唆された。そしてその多くは、ニホンジカを介して起きていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、研究例のごく少ない環形動物において、ニホンヤマビル(ヤマビル)の遺伝的組成の地理的違いを地史的形形成過程も含めて明らかにしたこと、ヤマビルの集団間の遺伝的分化が両生類や水生ヒル類などよりもかなり大きいほか、近年の分布拡大が各地域内の狭い範囲で生じている可能性を示したこと、吸血血液中のDNAの塩基配列を基に、全国的なヤマビルの宿主動物を同定し、シカが最も主要な宿主であるほか、両生類も宿主とすることを明らかにしたことである。これらの成果は、昔からヤマビルの分布する地域におけるシカの頭数管理の重要性等、ヤマビルの分布拡大対策を検討する上で社会的意義をもつものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：*Haemadipsa japonica* is a land leech species endemic to Japan. Recently, the range of *H. japonica* has expanded to include areas of anthropogenic activity. However, the origin and host animals of the currently expanding *H. japonica* populations are still unknown. In this study, we assessed the genetic structure of *H. japonica* collected from 39 populations across Japan using the COI sequences of mitochondrial DNA (mtDNA) and nine nuclear microsatellite loci. Furthermore, we identified the host animals of *H. japonica* across Japan based on the 16S rRNA sequences determined for isolated DNA from undigested blood clots in the digestive system of *H. japonica*. Phylogeographical analyses and DNA identification of host animals revealed (i) the clear regional genetic structure of *H. japonica*, (ii) the current expansion of *H. japonica* populations might be caused within each narrow region, and (iii) the current expansion is largely caused by *Cervus nippon*, a main host animal of *H. japonica* in Japan.

研究分野：森林生物学

キーワード：ニホンヤマビル ミトコンドリアDNA 核マイクロサテライトDNA 地理的遺伝構造 遺伝的多様性 宿主動物 ニホンジカ 両生類

1. 研究開始当初の背景

環形動物門環帯綱ヒル亜綱のヒル下綱に属する分類群をヒル類といい、このうち陸上生活に適応し、吸血性を持つものを陸生ヒルと呼ぶ。日本にはニホンヤマビル (*Haemadipsa japonica*; 図1) とサキシマヤマビル (*H. rjukjuana*) の2種の陸生ヒルが分布する。サキシマヤマビルがトカラ海峡以南の南西諸島のほか南アジアに広く分布するのに対して、ニホンヤマビルは日本固有で、秋田県から屋久島までの本州、四国、九州に分布する唯一の陸生ヒルである。

近年、関東地方を含め、全国的にニホンヤマビル (以下、ヤマビルと呼ぶ) の吸血被害が問題化している。このようなヤマビル被害の拡大要因として、ニホンジカ (以下、シカと呼ぶ) やイノシシの増加・分布拡大との関連性が指摘されている。ヤマビルはヒトに吸血被害をもたらすという特徴的な生物であるため、古くからの分布地が把握されてきた (図2)。ヤマビルは、かつては、人があまり入らず、開発のおよばない山奥の沢筋のごく限られた地域に生育していたと考えられる。ヤマビルは尺取虫様に動くため移動性は低いと予想され、このような相互に隔離した分布を示すことから、遺伝的組成の地理的な違い (地理的遺伝構造) や、集団間の遺伝的分化をもつことが予想される。もし、このような地域ごとに異なる遺伝的特徴をもつならば、各集団の遺伝的な類似性を調べることで、近年の分布拡大がどの集団を核に生じたのか、どのようなルートで生じたのか、明らかにすることができるかと期待される。また、ヤマビル体内の吸血液中のDNAを解析してヤマビルの宿主動物を同定できれば、どのような動物によってヤマビルの分布拡大が生じているのか明らかにできると考えた。



図1 ニホンヤマビル (Morishima & Aizawa 2019)

2. 研究の目的

本研究では、古く (1980年代以前) から分布記録のある地域を中心に全国でヤマビルを採集し、ミトコンドリアDNA (mtDNA) のCOI領域および核マイクロサテライト (CACACAなどの単純反復配列; SSR) DNAの変異を調べ、地理的遺伝構造と遺伝的分化を明らかにするとともに、地史的にどのようにして地理的遺伝構造が形成されてきたのか (系統地理学的背景) を明らかにすることを目的とした。さらに、ヤマビルの消化管内の血液塊からDNAを抽出し、ヤマビルがどのような動物を宿主としているのか、そして近年の分布拡大がどのような動物を介して起きているのか明らかにすることを目的とした。

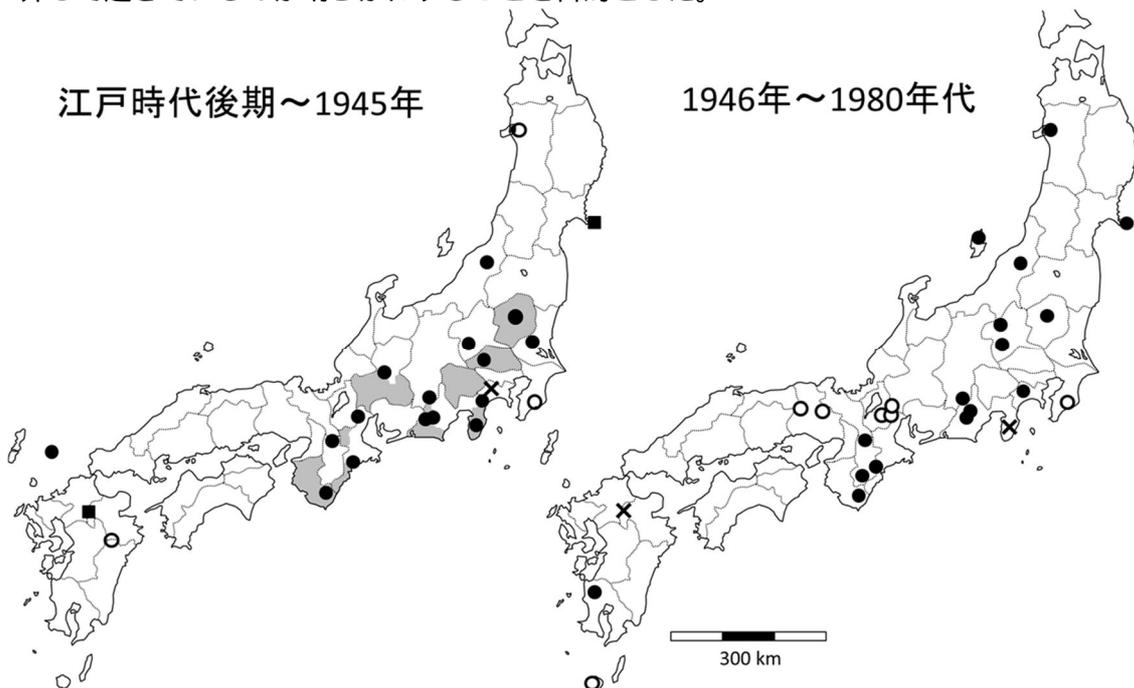


図2 過去の文献情報を基に作成した1980年代以前のニホンヤマビルの分布図 (逢沢・森嶋2018を一部改編)。分布地は文献情報の信頼性に基づいて、高い (●) ままあり (○) で示した。×は絶滅したと推定される分布地、●は標本情報に基づく分布地、灰色の塗りつぶしは、旧国名で記された分布地をそれぞれ示す。

3. 研究の方法

(1) ヤマビル採集と DNA 抽出

過去のヤマビルの分布図(図2)を参考に、1980年代以前から分布記録のある地域を中心に遺伝解析用サンプルとして、合計39集団[東北(5集団)、関東(11集団)、近畿中部(17集団)、中国四国(2集団)、九州(4集団)]から、人をおとりにしてヤマビルを採集した。捕獲したヤマビルはDNA抽出まで100%エタノール中に保存した。DNA抽出には、ヤマビル以外のDNAの混入を防ぐため、ヤマビルの尾吸盤を用いた。実体鏡下で尾吸盤を摘出し、DNesy Blood & Tissue キット(Qiagen)を用いて、全DNAを抽出した。

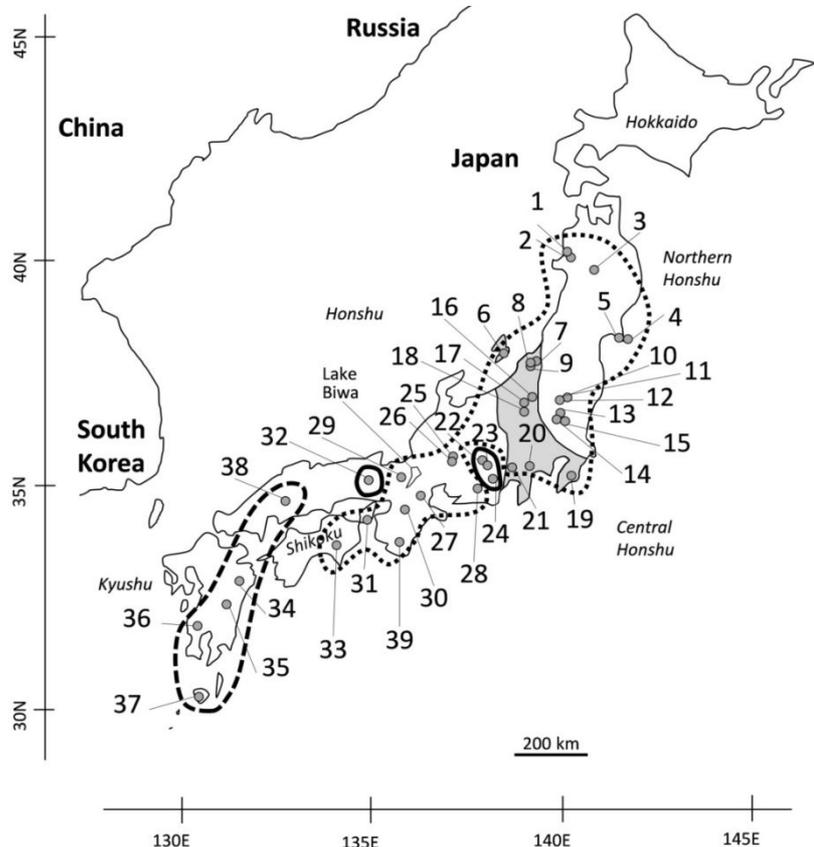


図3 遺伝解析に用いたニホンヤマビル集団の位置(Morishima & Aizawa 2019)。ミトコンドリアDNAの2系統群の分布を点線(A系統群)、実線(B1サブ系統群)、破線(B2サブ系統群)で示した(詳細は本文参照)。

(2) ヤマビルの核 SSR マーカーの開発と遺伝子型の決定

これまでヒル類ではヒルド科の *Macrobdella decora*, *Hirudo medicinalis* や *H. verbana* で核 SSR マーカーが開発されている。しかし、予備実験の結果、*M. decora* で開発された核 SSR マーカーでは PCR 増幅がうまくいかなかった。このため、ヤマビルで使用可能な新たに核 SSR マーカーを開発する必要があった。

核 SSR マーカー開発には、次世代シーケンサーを用いた。抽出したDNAに対して、イルミナ社の次世代シーケンサーを用いてゲノムを解読し、SOAPdenovo2 プログラムを用いてアセンブル後、MISA プログラムを用いてマイクロサテライト部位を抽出し、Primer3 でプライマーを設計した。設計したプライマーのうち、2塩基から3塩基のモチーフの反復配列を持ち、かつ9から17のリピート数である塩基長300 bp以下の断片を増幅するプライマーを30対選抜した。そして、フラグメント解析によって多型性をスクリーニングし、使用マーカーを選抜した(Morishima et al. 2018)。このうち、多型性の得られた9遺伝子座のSSRマーカーを用いて、マルチプレックスPCR(複数の遺伝子座を同時に増幅するPCR法)によるフラグメント解析を行い、798個体について遺伝子型を決定した。そして、各集団における遺伝的多様性をヘテロ接合度の期待値(H_E)およびアレリックリッチネス(A_r)で評価した。さらに、核SSRにおける地理的遺伝構造を明らかにするため、STRUCTURE解析を行った。

(3) ミトコンドリアDNAの塩基配列の決定と最尤系統樹の推定

ヤマビル503個体について、mtDNAのCOI領域の塩基配列を決定した。ミトコンドリアDNAのハプロタイプ間の系統関係は、最尤法を用いて推定した。

(4) 宿主動物の同定

実体鏡下でヤマビルを解剖して消化管に残る血液塊を摘出し、DNesy Blood & Tissue キットを用いて全DNAを抽出した。そして、ミトコンドリアDNAの16S rRNA領域の塩基配列を決定した。得られた配列を塩基配列情報データベースと照合し、宿主動物を同定した。

4. 研究成果

(1) ヤマビルの集団間の遺伝的分化

ヤマビルの核SSRの遺伝的分化の程度は $G'_{ST} = 0.77$ と、両生類や水生のヒル類(例えば、ウマビル; $G'_{ST} = 0.63$; Liu et al. 2016)よりもかなり大きかった。これはヤマビルの移動性の低さ

を反映していると考えられた。

(2) ヤマビルの地理的遺伝構造と地史的形成過程

全国のヤマビル 39 集団 503 個体の mtDNA の COI 領域の塩基配列を解析した結果、81 のハプロタイプが検出された。系統解析の結果、ヤマビルの系統は、秋田県から兵庫県淡路島や徳島県にかけて広く分布する A 系統群と、より限定された B 系統群の 2 つに大別された(図 3、4)。分岐年代推定の結果、2 系統群は第四紀中期更新世頃に分岐したと推定された。さらに、全国 37 集団 798 個体に対する 9 遺伝子座の核 SSR 解析の結果、ヤマビルは本州中部に南北に走るフォッサマグナ地域(図 3 の灰色部)を境に、南北で大別され(図 5 の $K=2$ 、 $K=4$)、さらに各集団あ

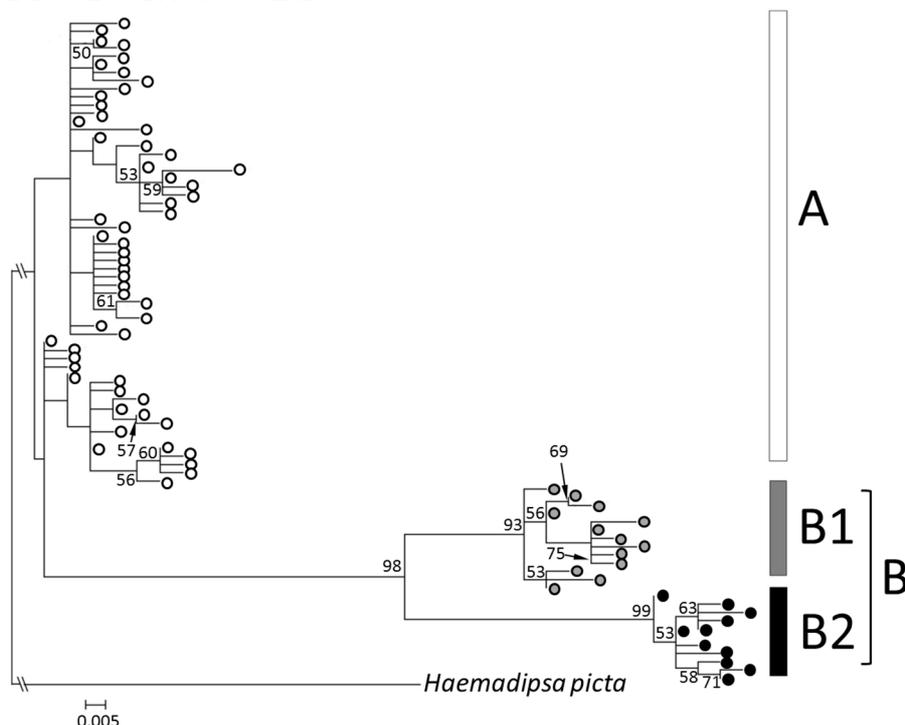


図 4 最尤法で推定したニホンヤマビルのミトコンドリア DNA のハプロタイプ間の系統関係 (Morishima & Aizawa 2019 を一部改編)。A、B1 および B2 の地理的分布は図 3 に示した。枝上の数値は枝の支持確率を示す (50% 以上のみ表示)。

るいは地域によって遺伝的組成に明瞭な違いがみられた(図 5 の $K=13$)。また、A 系統群における核 SSR の遺伝的多様性は、緯度の上昇につれて低下していた。これらのことから、現在みられるヤマビルの地理的遺伝構造は、更新世の氷期・間氷期の変動の中で 2 系統群に分岐し、さらに A 系統群は完新世に入って急速に北へと分布拡大したことで形成されたと推論された。

このような地史的背景で形成されたヤマビルの明瞭な地理的遺伝構造から、近年の分布拡大がどの集団を核に拡がっているのか推定できる地域もみられた。例えば、栃木県集団(図 5 集団 No. 10~15)は、数十キロの範囲内で南北 2 つに遺伝的に分化していた(北部地域は No. 10~12、南部地域は No. 13~15; 図 5)。北部地域においては、集団 No.11 はヤマビルが古くから分布していた集団(図 2)であり、集団 No. 10、12 は近年分布拡大した集団である。このように、ヤマビルの近年の分布拡大は、古くからの分布集団を核として起きており、各地域内の狭い範囲で生じていることが示唆された。

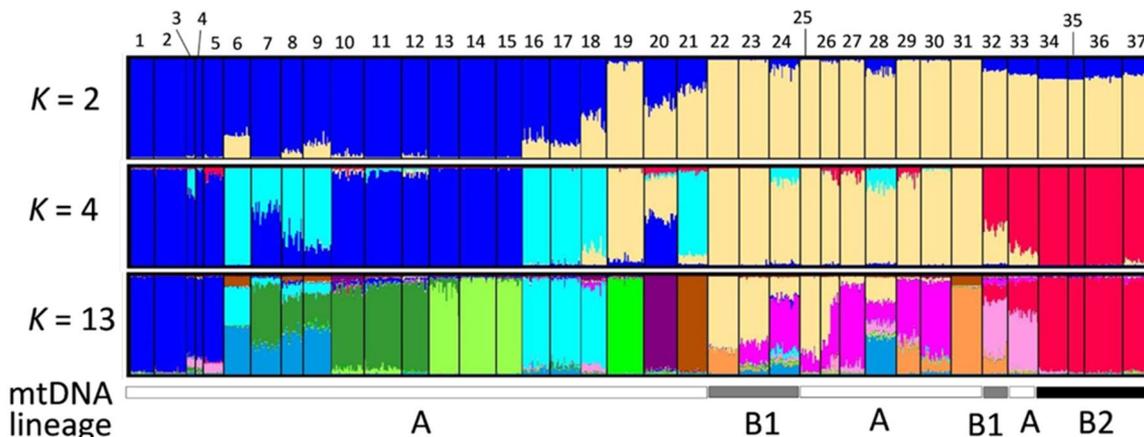


図 5 核 SSR の 9 遺伝子座に基づくニホンヤマビルの地理的遺伝構造 (Morishima & Aizawa 2019 を一部改編)。遺伝的組成の違いは色の違いとして示した。集団 No. は図 3 と対応している。西日本(集団 No. 22~33)ではミトコンドリア DNA の系統群と核 SSR の遺伝的組成はほとんど一致しない。これは A 系統群と B1 サブ系統群が分化後に二次的に接触し、さらにその後、再分断化と遺伝的浮動が起き、ランダムなハプロタイプの固定が起きたためと考えられた (Morishima & Aizawa 2019)。

(3) ヤマビルの宿主動物の同定

全国 20 県のヤマビル 144 個体の宿主動物がそれぞれ各個体 1 種類ずつ同定された。その内訳は、シカ 57 匹 (40%)、その他の哺乳類 (ニホンカモシカ、イノシシ、ホンダタヌキ、ほか 6 種) 48 匹、両生類 (ヒキガエル、タゴガエル、ヤマアカガエル、ほか 4 種) 39 匹であった。このように、ヤマビルの宿主動物の優占種はシカであった。また、ヤマビルは多くの両生類も宿主としていることが今回の研究で初めて明らかになった。

シカの分布する地域と分布未確認の地域に分けると、シカの分布地域の宿主動物 105 匹のうち、57 匹がシカ (54%) であった。一方、シカの未分布地域の秋田県 (図 6 の集団 No. 1)、新潟県 (集団 No. 6~8)、群馬県北部 (集団 No. 16~17) の宿主動物 39 匹のうち、両生類は 19 匹、ニホンカモシカ 14 匹、そのほか 6 匹であった。このようにシカの有無によって、宿主動物相が異なることが明らかになった。

これらの結果から、全国的にみても (40%)、シカの分布地域でみても (54%)、ヤマビルの主要な宿主動物はシカであり、近年の分布拡大は主としてシカを介して起きていると考えられた。また、シカの未確認地域との宿主動物相の比較から、シカの増加以前は両生類やシカ以外の哺乳類などを宿主としていたヤマビルが、シカの増加にともなって、シカに宿主転換することで近年の分布拡大が起きた可能性も示唆された。

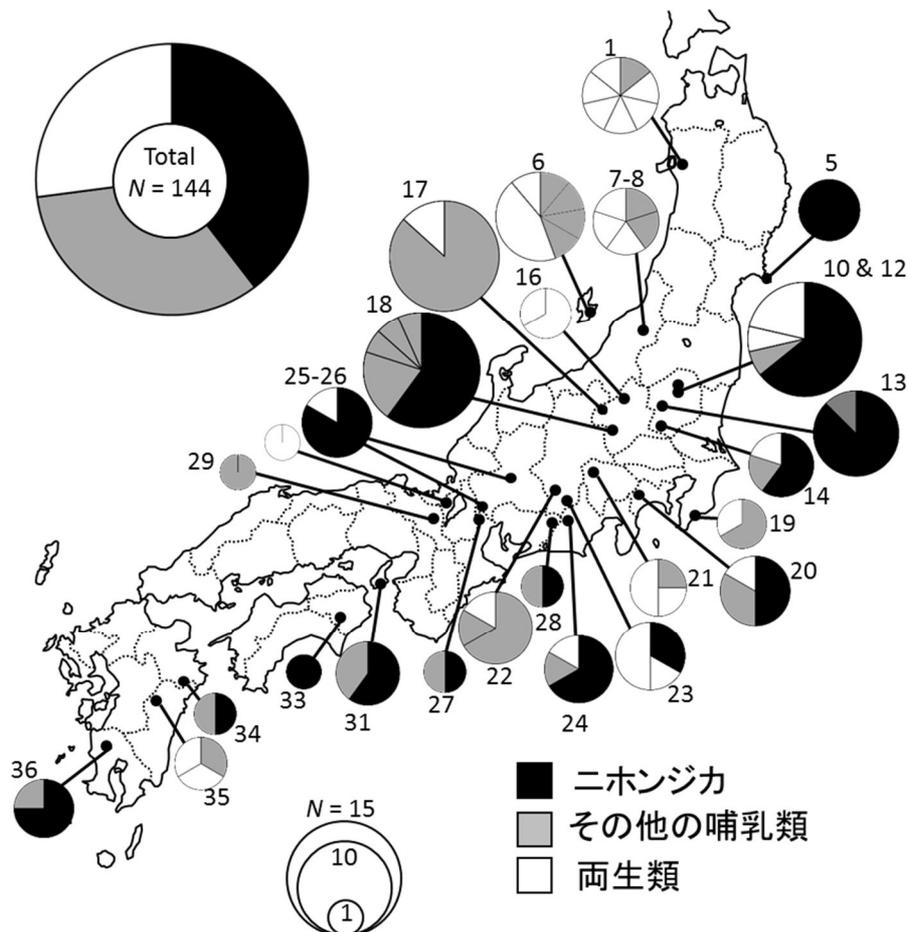


図 6 ミトコンドリア DNA の塩基配列情報を基に同定したニホンヤマビルの宿主動物 (Morishima et al. unpublished data)。円グラフの大きさは個体数に比例している。各円グラフの数値は図 3 の集団 No. と対応している。集団 No. のないものは、新たに解析した個体を示す。

< 引用文献 >

- 逢沢峰昭・森嶋佳織 (2018) 1980 年代以前のニホンヤマビルの分布. 日本森林学会誌 100: 65–69.
- Liu F., Guo Q., Shi H., Cheng B., Lu Y., Gou L., ... Wu M. (2016) Genetic variation in *Whitmania pigra*, *Hirodo nipponica* and *Poecilobdella manillensis*, three endemic and endangered species in China using SSR and TRAP markers. *Gene* 579: 172–182.
- Morishima K., Aizawa M. (2019) Nuclear microsatellite and mitochondrial DNA analyses reveal the regional genetic structure and phylogeographical history of a sanguivorous land leech, *Haemadipsa japonica*, in Japan. *Ecology and Evolution* 9: 5392–5406.
- Morishima K., Suzuki T., Aizawa M. (2018) Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in the Japanese land leech. *Parasitology International* 67: 13–15.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 6 件)

Morishima K., Aizawa M. (2019) Nuclear microsatellite and mitochondrial DNA analyses reveal the regional genetic structure and phylogeographical history of a sanguivorous land leech, *Haemadipsa japonica*, in Japan. *Ecology and Evolution* 9: 5392–5406. 査読有

<https://doi.org/10.1002/ece3.5132>

森嶋佳織・林 宇一・逢沢峰昭 (2019) 栃木県におけるニホンヤマビルの分布と被害状況 . 栃木県立博物館研究紀要 (35): 1–7. 査読有

逢沢峰昭・森嶋佳織 (2018) 1980 年代以前のニホンヤマビルの分布 . 日本森林学会誌 100: 65–69. 査読有

<https://doi.org/10.4005/jjfs.100.65>

森嶋佳織・逢沢峰昭 (2018) 徳島県那賀町におけるニホンヤマビルの生息状況 . 四国自然史科学研究 (11): 62–64 . 査読無

逢沢峰昭 (2018) 山岳文献にみられる 1945 年以前の丹沢におけるニホンヤマビルの生息情報 . 神奈川自然誌資料 (39): 27–29. 査読有

http://nh.kanagawa-museum.jp/files/data/pdf/nhr/39/nhr39_027_029aizawa.pdf

Morishima K., Suzuki T., Aizawa M. (2018) Characterization of 13 polymorphic microsatellite loci in the Japanese land leech. *Parasitology International* 67: 13–15. 査読有

DOI:10.1016/j.parint.2017.10.002

〔学会発表〕(計 5 件)

森嶋佳織・小金澤正昭・福井えみ子・中野隆文・逢沢峰昭 (2019) 栃木県におけるニホンジカを介したニホンヤマビルの分布拡大. 第 66 回日本生態学会大会.

森嶋佳織・半谷吾郎・中野隆文・逢沢峰昭 (2018) ニホンヤマビルの宿主動物の同定. 第 129 回日本森林学会大会.

森嶋佳織・逢沢峰昭 (2018) ニホンヤマビルの遺伝的多様性と地理的変異. 第 65 回日本生態学会大会.

森嶋佳織・逢沢峰昭・大久保達弘 (2017) ニホンヤマビルの近年の分布拡大と遺伝的集団構造. 第 128 回日本森林学会大会.

森嶋佳織・逢沢峰昭・中山ちさ・大久保達弘 (2016) 関東地方におけるニホンヤマビルの集団遺伝構造. 第 127 回日本森林学会大会.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://cocplus.utsunomiya-u.ac.jp/backnumber/column/column23.html>

6 . 研究組織

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：森嶋 佳織

ローマ字氏名：(Morishima Kaori)

所属研究機関：東京農工大学大学院連合農学研究科環境資源共生科学専攻

職名：大学院生 (博士課程)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。