

平成21年 5月29日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2008
 課題番号： 18406011
 研究課題名 (和文) 東南アジアにおける吸血性昆虫ブユの種分化およびフィラリア媒介能に関する研究
 研究課題名 (英文) Studies on speciation of black flies and filaria transmission in Southeast Asia
 研究代表者
 高岡 宏行 (TAKAOKA HIROYUKI)
 大分大学・医学部・教授
 研究者番号：00094152

研究成果の概要：

東南アジアにおける吸血性昆虫ブユ（現在 300 種超，ブユ属の 13 亜属に分類）の 1 亜属および他の 2 亜属の 7 種グループの構成種（計 75 種）について，ミトコンドリア 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決め，系統樹を作成し，グループ別に地理的分布も考慮して種分化の推定を行った．その結果，多くのグループにおいて，狭い地域内における種分化が示唆された．また，タイ北部において，3 種のブユが，各々，異なる 3 種のフィラリアを媒介していることを明らかにした．

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2007年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	4,400,000	1,320,000	5,720,000

研究分野：医歯薬学 A

科研費の分科・細目：寄生虫学（含衛生動物学）

キーワード：感染症、昆虫、進化、寄生虫、生物多様性、ブユ、タイ、フィリピン

1. 研究開始当初の背景

(1) 我々は，過去 25 年間にわたり，東南アジアにおいて，衛生上重要な吸血昆虫ブユの調査を行い，新種 240 種を含め，約 320 種のブユの分布を明らかにしてきた．これらを形態分類学的に検討し，ブユ属 (*Simulium*) の 13 亜属（3 新亜属を含む）に分類した．さらに，大きな亜属 (*Gomphostilbia*, *Nevermannia*, *Simulium*) ではその中に種グループを作り，整理した (Takaoka, 2003)．また，亜属，種グループ別に地理的分布を調

べ，分布のパターンが大陸型および島嶼型に分けられ，亜属，種グループごとに特異的であることを明らかにした．

(2) 東南アジアに分布するブユ種について人吸血性および病原体媒介性に関する調査をタイのチェンマイにおいて行い，23 種のブユ成虫を人囀法で採集し，優先種は調査地の標高により異なること，種により季節的および日内飛翔活動が異なることを明らかにした (Choochote et al., 2005)．また，人およ

び水牛を宿主とした調査において、採集した2種のブユ (*S. nodosum*, *S. nigrogilvum*) を解剖して動物寄生性フィラリアの感染幼虫を保有している事を見いだした。東南アジアにおけるブユのフィラリア媒介に関する初めての知見として報告した (Takaoka et al., 2003; Fukuda et al., 2003)。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、成虫が形態的に類似し、しばしばその蛹や幼虫無しでは同定が困難な種から構成される種グループに着目し、形態学および分子系統学的に種間の系統関係を分析し、種分化機構の解明を目的とした。

(2) タイ北部チェンマイの人吸血性でかつ優先種のブユ2種 (*S. asakoeae*, *S. nodosum*) について、フィラリア自然感染の実態を調べ、フィラリア-媒介種の関係、自然感染の年間消長などを明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) タイ、フィリピンおよびマレーシアの流水系において、大陸型および島嶼型分布パターンを示す亜属および種グループの構成種の蛹、幼虫を新たに採集した。蛹は成虫が羽化するまで個別にプラスチック容器で飼育した。一部は以前に採集し、既にアルコール液に保存している標本も用いた。実体顕微鏡下で種の同定を行った幼虫または成虫標本からDNAを抽出し、ミトコンドリア16S rRNA遺伝子の約300塩基対の配列を決定した。方法はOtsuka et al. (2001)に従った。対象とした1亜属、3亜属の7種グループの構成種に関して、得られた塩基配列を比較し、系統解析を行った。この結果と、形態的に比較した系統関係との相関を調べ、地理的分布パターンを考慮して種分化を解析した。形態形質としては蛹の呼吸器官に着目し、呼吸糸の数の減少および肥大化を派生形質として用いた。*Simulium* 亜属の *melanopus* 種グループでは雌の外部生殖器のうち *paraproct* の内板の長いものを派生形質とした。*Wallacellum* 亜属では、蛹の呼吸器官のほかに、雌の外部生殖器の *paraproct* (長いものを派生形質) と *genital fork* (腕の先端が縦に *paraproct* に沿って後方へ延びるものを派生形質) を用いた。

(2) タイ北部チェンマイのバンパンファンにおいて、毎月2回朝6時から午後6時まで、人に飛来した雌成虫をハンドネットを用いて採集した。採集したブユ標本はエタノール液に保存した。実体顕微鏡下で種の同定を行い、優先種2種のブユの周年消長および日内消長を調べた。さらに、優先種2種について、1種につき毎月約100個体の雌成虫を実体顕

微鏡下で解剖を行い、フィラリア幼虫感染の有無を調べた。月別に自然感染率を求め、感染の季節消長を調べた。

4. 研究成果

(1) 種分化の解明のために新たに採集したブユ標本を形態学的に検討した結果、*Gomphostilbia* 亜属の *baisasae* 種グループで3種、*banauense* 種グループで10種 (4新種を含む)、*batoense* 種グループで15種 (6新種を含む)、*ceylonicum* 種グループで7種 (2新種を含む)、*Wallacellum* 亜属で15種 (6新種を含む)、*Simulium* 亜属の *melanopus* 種グループで18種 (12新種を含む)、*nobile* 種グループで9種、*striatum* 種グループで5種 (1新種を含む)、*tuberosum* 種グループで12種 (4新種を含む)、および *variegatum* 種グループで4種を得た。新種は記載論文として発表した。

(2) このうち、以下の亜属、種グループの構成種についてミトコンドリア16S rRNA遺伝子の塩基配列を決定し、系統解析を行った。大陸型分布パターンでは、*striatum* 種グループで5種、*tuberosum* 種グループで11種、および *variegatum* 種グループで4種、島嶼型分布パターンでは、*Gomphostilbia* 亜属の *baisasae* 種グループで3種、*banauense* 種グループで10種、*Wallacellum* 亜属で15種、*Simulium* 亜属の *melanopus* 種グループで18種、*nobile* 種グループで9種。結果を図1-8に示した。

その結果、*striatum* 種グループでは (図1)、次の2点が明らかとなった。形態的特徴から、我が国、タイ、ミャンマーの *S. quinquestriatum* とされているものは、本種の基産地である台湾のとは別のクラスターをつくっていることが分かった。またタイでは少なくとも2つのクラスターに分かれた。タイの *S. nakhonense* と *S. Chiangmaiense* は蛹の呼吸糸が10本と8本と異なるが遺伝子配列では同一であった。

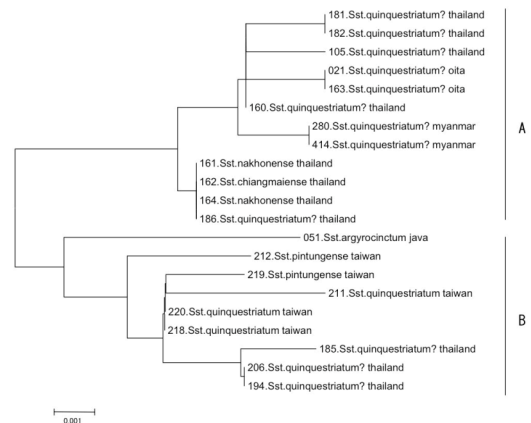


図1 *Simulium* 亜属 *striatum* 種グループの系統樹

tuberosum 種グループでは (図 2), 4つのクラスターに分けられた (A, B, C, D). このうちクラスターDの *S. weiji* は形態的に雌の第七節腹面に剛毛束を有することからクラスターCの2種と同系統と推定されたが異なる結果が得られた. クラスターBの3種はそれぞれ分布が離れているが形態的な類似度から推定された結果が得られた. クラスターAに含まれる種はこの種グループの典型的な形態的特徴を持つもので, 互いに形態的にも区別が容易ではない. 遺伝子配列でも種間の違いは無いが, あるいはあっても僅かであった.

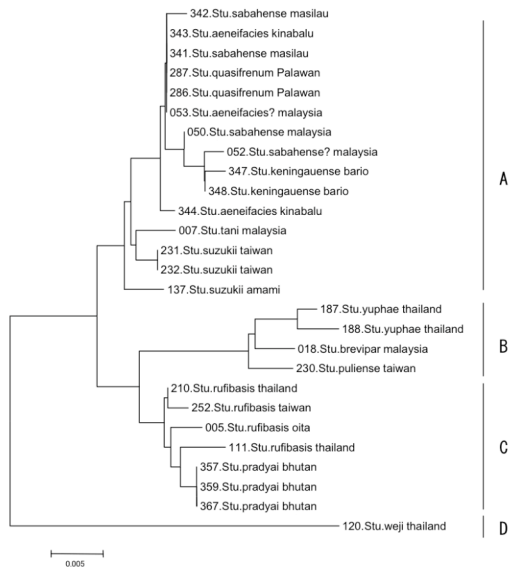


図 2 Simulium 亜属 tuberosum 種グループの系統樹

variegatum 種グループでは (図 3), 2ないし3のクラスターに分かれた. 雌雄の生殖器の形態から本種グループに含めていたインドネシアのスラウェシ島産の2種 *S. luridum* および *S. globosum* は, 主に大陸に分布し本種グループの典型的な形態を有する種とは遺伝子配列ではかなり異なっていた. スラウェシ島にはこれら2種の他に9種の類縁種が報告されているが, いずれもこの種グループに含めるには無理があるという結果となった.



図 3 Simulium 亜属 variegatum 種グループの系統樹

島嶼型分布をする亜属あるいは種グループについては, 以下の結果が得られた. Gomphostilbia 亜属の *baisasae* 種グループでは (図 4), 蛹の呼吸糸数の違いで別種とされた3種が遺伝子配列でも違いがみられた.

ただ, *S. baisasae* とされている標本では配列の違いもみられているので本種は集団別に再検討の必要がある.

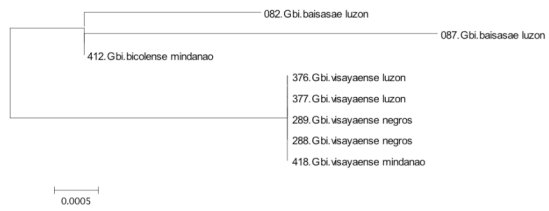


図 4 Gomphostilbia 亜属 baisasae 種グループの系統樹

同亜属の *banauense* 種グループでは (図 5), 10種のうち *S. ifugaoense* と *S. alienigenum* の2種が他の8種と異なるクラスターに分けられた. 本種グループは, 本来呼吸糸数が6本であるので呼吸糸数が4本の *S. alienigenum* は遺伝子配列でも異なることが推定されたが, *S. ifugaoense* の違いは予想外の結果となった. さらに, 本種グループでは, 6本の呼吸糸を有する種のうち, 呼吸器官が肥大化しているものも見られる (*S. banauense*, *S. riverai*, *S. cagayanense*, *S. ifugaoense*). しかし, 遺伝子配列の結果は, 呼吸器官の肥大化傾向とは関係のない結果となった.

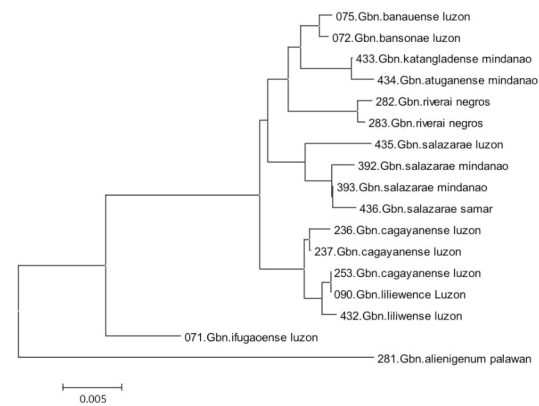


図 5 Gomphostilbia 亜属 banauense 種グループの系統樹

Wallacellum 亜属では (図 6), 2つのクラスター (A と B) に大別された (8種がA, 7種がB). このうちAはさらに2つの小クラスター (Aa と Ab) に分けられた (5種がAa, 3種がAb). この3つのクラスター別に蛹の呼吸器官および雌雄外部生殖器の形態形質において検討を行った結果, 蛹の呼吸器官の形態では, Aa と Ab に祖先形質がみられ, B では派生形質がみられた. 雌の外部生殖器のうち生殖叉 (genital fork) の形態では, Aa に祖先形質, B では派生形質, そして Ab では中間の形態がみられた. 本亜属にあっては, Aa から Ab, そして B へと種の分化が進んできたことが示唆される. また, 地理的分布においては, Aa が本亜属の分布域の中心部から

辺縁部に満遍なくみられるのに対して、AbおよびBは、分布域の中心となるフィリピンのルソン、ミンダナオ、サマルの大きな島に限定した分布がみられた。

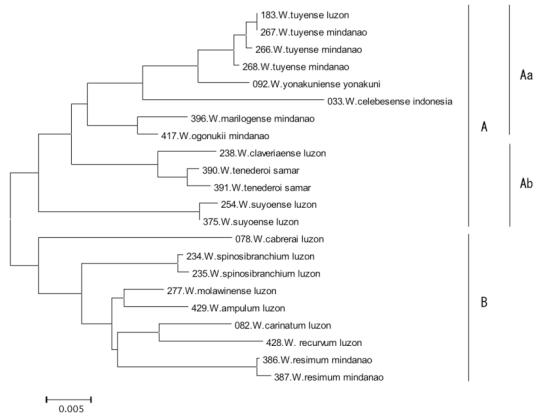


図6 Wallacellum亜属の系統樹

melanopus 種グループでは (図7), 2つの大きなクラスターに分かれた (3種がA, 他の15種がB)。Aの3種は、いずれも大型で、雌の生殖器官の形態は祖先形質を示し、他の種とはかなり異なるもので、予想された結果となった。Bはさらに3つに分けられた (6種がBa, 3種がBb, 6種がBc)。Baの種はフィリピンに分布し、種によって祖先形質から派生的形質がみられる。Bbの種はインドネシアに、Bcはマレーシアに分布し、地理的分布に対応する結果となった。なお、Bcに含まれる種の雌の生殖器官は派生形質を示す。この種グループでは、フィリピンにおいて、まずAからBaが分かれ、そこからさらにインドネシアとマレーシアに進出し、それぞれBb, Bcとして分化していったものと示唆される。

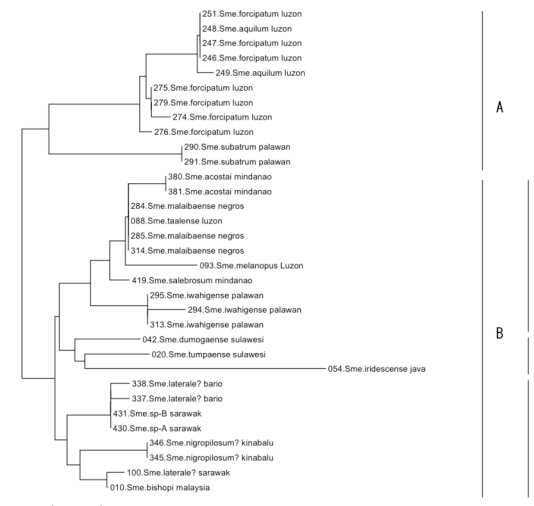


図7 Simulium亜属melanopus種グループの系統樹

nobile 種グループでは (図8), 2つのクラスターに大別された (6種がA, 3種がB)。蛹の呼吸器官の肥大化の有る無しでみると、

Aに含まれる種はすべて祖先的形質を、Bの3種は派生的形質をもつ。従って、形態的分類から予想された結果となった。AはさらにAa, Abに分けられた。Aaはフィリピンに、Abはマレーシアとインドネシアに分布するので、地理的分布に対応した結果となった。Aaには、呼吸糸数が12本のS. cotabatoense, 10本のS. baltazarae, 6本のS. leyteneとS. latistylumが含まれる。一方、Abには含まれる種の呼吸糸数は6本で、Bではフィリピンに分布するS. delfinadoeが6本、大陸部と台湾にそれぞれ分布するS. nodosumとS. shirakiiでは3本である。本種グループはフィリピンを種分化の中心とし、周辺部へ分布を広げていったのではないかと示唆されているが、遺伝子配列解析の結果は、必ずしもこれを支持するものではない。なお、S. nodosumとS. shirakiiは地理的には離れているが形態的特徴にほとんど区別点はない。遺伝子配列でも両種は一致した。S. shirakiiはS. nodosumのシノニムとする見解を支持する結果となった。

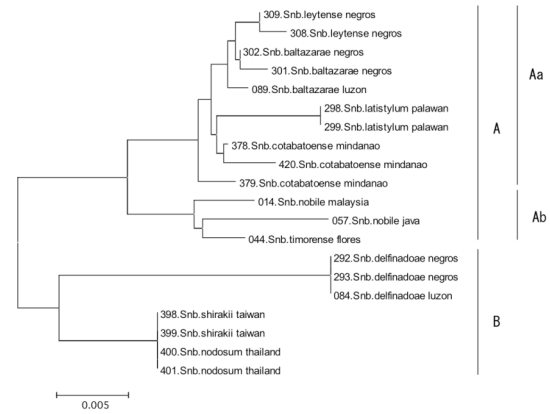


図8 Simulium亜属Nobile種グループの系統樹

(4) フィラリア媒介能に関して、タイ北部のバンパンファンにおいて実施した年間調査により、優先種2種のうち、S. asakoeは雨期に飛来数が多く、乾期に少なく、S. nodosumはこれとは対照的に乾期に多く、雨期に少なかった。

この2種を解剖した結果、両種ブユは各々別の動物寄生性フィラリアに自然感染していることが分かった。また、自然感染は、両種ブユをまとめると12月を除いて年間を通じて認められることが明らかとなった。すなわち、この両種ブユによる人へのフィラリア感染のリスクは周年存在することが分かった。本研究により、S. asakoeがフィラリアを媒介していることが新たに明らかとなり、我々が既に報告したS. nodosumとS. nigrogilvumとあわせて、タイでは同一地域において3種のブユがそれぞれ異なるフィラリア種を媒介していることが判明した。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 26 件)

- ① Takaoka, H. *Simulium (Gomphostilbia) hoiseni* sp. nov. (Diptera: Simuliidae): a new species from Peninsular Malaysia. Med. Entomol. Zool., 59: 9-14, 2008, 査読有
- ② Takaoka, H. Taxonomic revision of *tuberosum* species-group of *Simulium (Simulium)* in Sabah and Sarawak, Malaysia (Diptera: Simuliidae). Med. Entomol. Zool., 59: 55-80, 2008, 査読有
- ③ Ishii, Y., Choochote, W., Bain, O., Fukuda, M., Otsuka, Y., Takaoka, H. Seasonal and diurnal biting activities and zoonotic filarial infections of two *Simulium* species (Diptera: Simuliidae) in northern Thailand. Parasite, 15: 121-129, 2008, 査読有
- ④ Takaoka, H. A new species of *Simulium (Simulium)* from Luzon Island, the Philippines (Diptera: Simuliidae). Med. Entomol. Zool., 58: 11-17, 2007, 査読有
- ⑤ Otsuka, Y., Aoki, C., Choochote, W., De las Llagas, L., Takaoka, H. Phylogenetic analysis of three subgenera: *Asiosimulium*, *Daviesellum* and *Wallacellum*, of the genus *Simulium* s.l. endemic in the Oriental Region. Med. Entomol. Zool., 58: 329-333, 2007, 査読有
- ⑥ Takaoka, H., Choochote, W. A new species of *Simulium (Nevermannia)* from northern Thailand (Diptera: Simuliidae). Med. Entomol. Zool., 57: 83-92, 2006, 査読有
- ⑦ Takaoka, H. Four new species of *Simulium (Simulium)* from Luzon Island, Philippines (Diptera: Simuliidae). Med. Entomol. Zool., 57: 287-307, 2006, 査読有

[学会発表] (計 7 件)

- ① 高岡宏行, 大塚靖. フィリピン国サマール島で採集されたブユ属の新種および新記録種について. 第 61 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 58 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会, 2008 年 11 月 1 日, 沖縄県那覇市
- ② 高岡宏行, 青木千春. マレーシア国サバ州およびサラワク州における *Simulium* 属 *Simulium* 亜属 *tuberosum* 種グループに含ま

れる種の分類学的検討. 第 60 回日本衛生動物学会大会, 2008 年 4 月 18 日, 栃木県下野市

- ③ 石井美光, Wej Choochote, 福田昌子, 高岡宏行. タイ北部における人吸血性ブユ 2 種 *Simulium nodosum* 及び *S. asakoe* 雌成虫のフィラリア自然感染率. 第 60 回日本寄生虫学会・第 57 回日本衛生動物学会 南日本大会・合同大会, 2007 年 10 月 17 日, 熊本県熊本市
- ④ 高岡宏行, 大塚靖, 福田昌子, 青木千春. フィリピンにおいて見いだされたブユ属 ウォレスブユ亜属の 3 新種について. 第 59 回日本寄生虫学会南日本支部大会・第 56 回日本衛生動物学会南日本支部大会・合同大会, 2006 年 10 月 28 日, 福岡県福岡市

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高岡 宏行 (TAKAOKA HIROYUKI)
大分大学・医学部・教授
研究者番号: 00094152

(2) 研究分担者

大塚 靖 (OTSUKA YASUSHI)
大分大学・医学部・助教
研究者番号: 00244161

福田 昌子 (FUKUDA MASAKO)
大分大学・総合科学研究支援センター・助教
研究者番号: 00156788

(3) 連携研究者

無し