

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580420

研究課題名(和文)単為生殖型肝蛭のトリクラベンダゾール耐性を評価する虫卵孵化試験法の開発

研究課題名(英文)Development of egg-hatching assays for evaluatingTCBZ resistance of parthenogenic Fasciola sp.

研究代表者

板垣 匡 (Itagaki, Tadashi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：80203074

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：Fasciola hepatica (Fh)および単為生殖型肝蛭(Fasciola gigantica系統の2倍体個体：Fsp)の交雑実験によりTCBZ耐性の単為生殖型肝蛭3倍体作出を試みた。交雑子孫F1およびF2が作出され、これら子孫虫体は精細胞に減数分裂異常が認められたため野外の単為生殖型肝蛭と同様の単為生殖能を持つと考えられた。しかし、TCBZ投与による駆虫試験の結果から、F1およびF2はTCBZ感受性であることが判明し、TCBZ評価のための虫卵孵化試験法の開発には至らなかった。

研究成果の概要(英文)：Experimental production of TCBZ-resistant parthenogenic Fasciola sp. was attempted due to hybridization between Fasciola hepatica and diploid parthenogenic Fasciola sp. (Fg lineage). Hybrid F1 and F2 descendants produced had aberrant meiotic division in their spermatogenesis as well as wild-type parthenogenic Fasciola sp. However, the descendants were proved to be TCBZ-susceptible due to TCBZ administration experiments, and the development of egg-hatching assay turn out not to be ture.

研究分野：寄生虫学

キーワード：parthenogenic Fasciola hybridization Fasciola hepatica diploid

1. 研究開始当初の背景

家畜の肝蛭症は世界的に広く蔓延する寄生虫疾患であり、畜産産業に及ぼす経済的被害は甚大で年間 20 億ドルと見積もられている。その病原体である肝蛭 (*Fasciola* 属) には *F. hepatica* および *F. gigantica* の 2 種が知られている。しかし、近年、研究代表者らは、この 2 種とは別種と考えられる単為生殖型肝蛭 (*Fasciola* sp.: 新種記載を予定している) が東~東南アジア (日本、韓国、中国東部、ベトナム、タイ、ミャンマー) に分布し、同地域における肝蛭症の原因種として極めて重要であることを示した (Itagaki et al., 2005a; Itagaki et al., 2005b; Peng et al., 2009; Itagaki et al., 2009; Chaichanasak et al., 2011; Mohanta et al., 2014 など)。一方、肝蛭症の治療は、Bithionol、Nitroxynil、Oxyclozanide、Closantel などの抗吸虫薬を投与することで行われてきたが、これらの薬剤は胆管寄生の肝蛭成虫に対しては駆虫効果を認めるものの、肝臓実質移行中で最も危害性の高い肝蛭幼虫に対しては駆虫効果が低い。その後、肝蛭の成虫および幼虫に対して高い駆虫効果を示す Triclabendazole (TCBZ) が開発され、現在、肝蛭症治療の第 1 選択薬剤として世界的に使用されている。しかし、最近になって TCBZ 耐性の肝蛭 (*F. hepatica* 分離株) がヨーロッパ (アイルランド、オランダ、スペイン) やオーストラリアで相次いで発見され、肝蛭症に対する今後の治療・予防に大きな問題点が示された (Fairweather, 2011)。肝蛭の薬剤耐性を評価する方法としては、実験的に作出された感染動物に薬剤を投与し、剖検により残存した虫体数から評価する標準法が知られている。しかし、本法は、中間宿主 (ヒメモノアラガイ) を用いた感染体 (メタセルカリア) の作出など、特殊な技術を必要とするのみならず、評価までに長期間 (少なくとも 6 ヶ月間) を要する。一方、野外感染動物を対象とした評価法としては、薬剤投与前後の糞便内虫卵数または抗原物質量の減少程度を指標した簡便法が知られているが、虫卵の胆嚢内停滞や虫齢による抗原物質の変化など薬剤耐性とは異なる要因で数値が変動し、評価の標準法としては適していない。寄生線虫類では、TCBZ が虫卵の発育と孵化を阻害することが知られている (Albonico et al. 2005)。そこで、TCBZ 抵抗性肝蛭を評価する虫卵孵化試験法の確立を目的として本研究を企画した。

2. 研究の目的

研究代表者が実施しているアジア地域の肝蛭症調査・研究において、肝蛭症の重度蔓延地域は単為生殖型肝蛭の分布地域と密接に関連し、単為生殖型肝蛭においても TCBZ 耐性株の出現が強く示唆される。本研究の目的は、TCBZ 抵抗性肝蛭を評価す

る虫卵孵化試験法の確立、さらに開発した虫卵孵化試験法を用いてアジアの単為生殖型肝蛭の TCBZ 耐性について評価することを目的とする。

3. 研究の方法

「Triclabendazole (TCBZ) 抵抗性肝蛭を評価するための虫卵孵化試験法の開発」には、実験室内経代の TCBZ 感受性肝蛭株を用いて虫卵孵化を 100% 阻害する TCBZ 濃度を決定し (実験 1)、次に、TCBZ 感受性肝蛭株および抵抗性肝蛭株を用いて虫卵孵化試験法を評価する (実験 2)。

「南・東南アジアの単為生殖型肝蛭における TCBZ 感受性・抵抗性評価」には、海外学術調査において南・東南アジア諸国の屠畜場で肝蛭虫体を回収し、虫体から分離した虫卵を日本に持ち帰り、虫卵孵化試験法を実施する。

(1) 実験 1: TCBZ 感受性の肝蛭分離株を用いて虫卵孵化を 100% 阻害する TCBZ 濃度を決定する。

CBZ 感受性株の虫卵 200 個を 1 群として、それを低濃度~高濃度の Triclabendazole sulphoxide (TCBZ.S0) を含む、または含まない (対照) 蒸留水に入れ、25 遮光環境下に 14 日間放置する。

各群の虫卵に太陽光を 3 時間暴露させ、光刺激による虫卵内幼虫 (ミラシジウム) の孵化を促す。

顕微鏡で孵化した虫卵数、孵化しなかった虫卵数を計数する。また、孵化しなかった虫卵は、虫卵内の状況によって死滅卵、胚未形成卵、胚形成卵に細分類して、それぞれを計数する。

虫卵孵化率 0% を示した最高濃度の TCBZ 量を決定し、TCBZ 感受性肝蛭株の虫卵に対する発育阻害 TCBZ 量として実験 2 以降に用いる。

(2) 実験 2: TCBZ 感受性株、TCBZ 抵抗性株を用いて虫卵孵化試験法を評価する。

実験 1 と同様に、各肝蛭分離株の虫卵 200 個を 1 群として、実験 1 で決定した発育阻害 TCBZ 量に虫卵を暴露させる (25 で 14 日間)。

各群の虫卵に太陽光を 3 時間暴露させ、光刺激による虫卵内ミラシジウムの孵化を促す。

顕微鏡で孵化した虫卵数、孵化しなかった虫卵数を計数する。また、孵化しなかった虫卵は、虫卵内の状況によって死滅卵、胚未形成卵、胚形成卵に細分類して、それぞれを計数する。

各分離株の虫卵孵化率を算出し、TCBZ 感受性株の孵化率と統計学的有意差検定を行うことで、本虫卵孵化試験法の有用性を評価する。なお、TCBZ 感受性株と TCBZ 抵抗性株との間に有意差が認められなかった場合には、各分離株の TCBZ 感受性を再評価するために感染動物を用いた残存虫体数法を実施するとともに、野外より新たな TCBZ 感受性株と TCBZ 抵抗性株を分離し、

それらを含めて再検討する。

4. 研究成果

(1) *Fasciola hepatica* および単為生殖型肝蛭の実験的交雑による TCBZ 抵抗性肝蛭の作出：実験室継代肝蛭株を感染させたラットに TCBZ を経口投与し、虫体の駆虫率を算出したところ、当初 TCBZ 抵抗性株と考えられていた株を含めて、全ての実験室株は高い駆虫率を示し、これらは TCBZ 感受性であることが判明した。そのため、当初の計画にはなかった TCBZ 抵抗性株の実験的作出を目的とした *Fasciola hepatica* (Fh) および単為生殖型肝蛭 (*Fasciola gigantica* 系統の 2 倍体個体：Fsp) の交雑実験を実施した。すなわち、Fh および Fsp 成虫の子宮内より回収した虫卵を 25 で培養し、ミラシジウムを孵化させ、実験室継代の中間宿主貝 (ヒメモノアラガイ) に暴露・感染させた。40 日後に感染貝より遊出したメタセルカリア 20 個ずつをラット (Wistar 系雄 6 週齢) に経口投与した。6 ヶ月後に感染ラットを剖検して肝蛭虫体 (F1) を回収した。回収虫体の精巣組織をカルノア液で固定し、定法に従って押しつぶし法による染色体観察を行い、全ての F1 虫体は 3 倍体であることが確認され、両親肝蛭 (Fh, Fsp) による交雑が確認された。さらに核リボソーム ITS1 解析において F1 成虫はヘテロ型を示したことから、F1 虫体の精巣では減数分裂異常が確認されたことから F1 は遺伝学的にも両親肝蛭 (Fh, Fsp) の雑種であることが確認された。この F1 成虫の子宮内虫卵を培養して得られたミラシジウムから中間宿主を介して回収したメタセルカリアをラットに感染させて F2 虫体を得た。F2 も染色体観察により 3 倍体であることが確認されたが、ITS1 型は Fh/Fg 型を示す虫体と Fg 型を示す虫体がみられた。さらに F2 は子宮内虫卵の孵化率が高い個体群と低い個体群が区別された。これらから、F1 および F2 の高孵化率群では野外の単為生殖型肝蛭 3 倍体と同様に精子形成異常で卵の発生は正常であると考えられた。F1 および F2 感染ラットに通常量の TCBZ を投与し、2 週間後に剖検して胆管寄生の虫体有無を観察した。その結果、F1 および F2 虫体は全く回収せず、これら雑種虫体は TCBZ 感受性であることが判明した。

(2) 野外からの TCBZ 抵抗性肝蛭の分離：

(1) より実験的 TCBZ 抵抗性肝蛭の作出が不成功であったことから、野外感染ウシから TCBZ 抵抗性肝蛭の分離・実験室継代化を試みた。すなわち、日本および中国の感染ウシから肝蛭虫体を回収し、その子宮内虫卵からミラシジウム孵化、中間宿主貝感染を経てメタセルカリアを回収、ラット感染を経て TCBZ 投与による TCBZ 感受性を評価した。しかし、評価した肝蛭株はすべて TCBZ 感受性であることが判明した。結果的に本研究では TCBZ 抵抗性肝蛭を得ることが出来ず、当初予定していた虫卵孵化試験法の開発には至らなかった。今後は、肝蛭流行地域で TCBZ が

繰り返し投与されている感染家畜の屠殺・剖検により、その胆管から回収された虫体を TCBZ 抵抗性候補虫体として回収し、その子宮内虫卵の回収、虫卵培養、ミラシジウム孵化と中間宿主貝への感染によりメタセルカリアを作出し、それを終宿主へ感染させて TCBZ 投与により、TCBZ 抵抗性肝蛭虫体を得ることが必要であると考えられた。これらの教訓を糧に将来的には単為生殖型肝蛭の TCBZ 耐性を評価する虫卵孵化試験法の開発を実現したいと考えている。

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 18 件)

Kei Hayashi, Madoka Ichikawa-Seki, Uday Kumar Mohanta, Singh T Shantikumar, Takuya Shoriki, Hiromu Sugiyama and Tadashi Itagaki Molecular phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from eastern India. *Parasitol. Int.* in press.

Uday Kumar Mohanta, Madoka Ichikawa-Seki, Kei Hayashi, Tadashi Itagaki, Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh. *Parasitol. Res.* 2015, 114(6): 2099-105.

Takuya Shoriki; Madoka Ichikawa-Seki; Bhuminand Devkota; Hari B Rana; Shiva P Devkota; Sudeep K Humagain; Tadashi Itagaki Molecular phylogenetic identification of *Fasciola* flukes in Nepal. *Parasitol Int.* 2014, 63(6): 758-62.

Uday Kumar Mohanta, Madoka Ichikawa-Seki, Takuya Shoriki, Ken Katakura, Tadashi Itagaki, Characteristics and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Parasitol. Res.*, 113(7): 2493-501.

Chaichanasak P, Ichikawa M, Sobhon P, Itagaki T. Identification of *Fasciola* flukes in Thailand based on their spermatogenesis and nuclear ribosomal DNA, and their intraspecific relationships based on mitochondrial DNA. *Parasitol. Int.* 2011, 61: 545-549.

Nguyen, S., Amer, S., Ichikawa, M., Itagaki, T., Fukuda, Y. and Nakai, Y. (2012) Molecular identification of *Fasciola* spp. (Digenea: Platyhelminthes) in cattle from Vietnam. *Parasite* 19 : 85-89.

Ichikawa, M. Bawm, S., Itagaki, T. (9 人中 9 番目) Characterization of *Fasciola* spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis status and nuclear and

mitochondrial DNA markers. Parasitol. Int., 60, 474-479, 2011.

Itagaki, T., Ichinomiya, M. (5人中1番目): Hybridization experiments indicate incomplete reproductive isolation mechanism between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Parasitology 138, 1278-1284, 2011. (査読有り)

[学会発表](計30件)

Ichikawa-Seki M., Shimauchi, S., Fushuku, S., Fukuda, K. and Itagaki, T. An attempt to make triploid *Fasciola* flukes: An experimental hybridization between *F. hepatica* and diploid aspermic *Fasciola* flukes. 13th International Congress of Parasitology, 2014.8.12, Mexico.

Mohanta Uday-Kumar, Ichikawa-Seki Madoka, Shoriki Takuya, Katakura Ken and Itagaki Tadashi. Molecular identification and phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses. 13th International Congress of Parasitology, 2014.8.12, Mexico.

関まどか、島内早紀子、富宿誠吾、福田孝一、板垣 匡 (2014) 3倍体単為生殖型肝蛭の実験的作出: *F. hepatica* と単為生殖型肝蛭の交雑実験 第83回日本寄生虫学会大会、2014.3.27. 愛媛大学(松山市)

関まどか、島内早紀子、板垣 匡 (2014) 単為生殖型肝蛭は実験的に作出できるか? 第22回分子寄生虫ワークショップ・第12回分子寄生虫・マラリア研究フォーラム合同大会 2014.9.1. 帯広畜産大学(帯広市)

正力拓也、林慶、関(市川)まどか、中尾稔、板垣 匡. *Fasciola*属を識別するための新規シングルコピーマーカーの開発. 第157回日本獣医学会学術集会、2014.9.11. 北海道大学(札幌市)

林慶、関(市川)まどか、正力拓也、Mohanta Uday-Kumar, 杉山 広、Shantikumar S, 板垣 匡. インド東部における *Fasciola* 属の分子系統解析. 第60回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2014.10.18, 岩手大学(盛岡市)

関(市川)まどか、正力拓也、林慶、板垣 匡. Single copy geneマーカーを用いた中国産肝蛭の再解析: *Fasciola*属の種分化について. 第8回蠕虫研究会、2014.9.6, ホテル鹿の湯 札幌定山溪(札幌市)

島内早紀子、関まどか、板垣 匡 (2013) *Fasciola hepatica* と単為生殖型肝蛭2倍体の交雑実験により作出した3倍体肝蛭について. 第156回日本獣医学会学術集会 2013.9.21. 岐阜大学(岐阜市)

正力拓也、関まどか、Elena A. Villacorte, Pilarita T. Rivera, 板垣 匡

(2013) アジア産肝蛭の分子系統解析: フイリピン産肝蛭の精子型, ITS1型および *nad1*ハプロタイプの解析 第156回日本獣医学会学術集会、2013.9.21. 岐阜大学(岐阜市)

阿部美智子、関(市川)まどか、板垣 匡 (2013) アジア産肝蛭の分子系統解析: ミトコンドリアDNAの *nadI*, *nad5*, *coxI* 領域に基づく解析 第156回日本獣医学会学術集会、2013.9.21. 岐阜大学(岐阜市)

Tadashi Itagaki, Madoka Ichikawa-Seki, Takuya Shoriki, Pannigan Chaichanasak, Peng Mao and Keisuke Sakaguchi (2013) Origin and spread of aspermic *Fasciola* sp. in Asia. Joint International Tropical Medicine Meeting 2013. 2013.12.12. Thailand

市川まどか、彭毛、Pannigan Chaichanasak, 正力拓也、板垣 匡 (2013) 単為生殖型肝蛭の起源解明に関する研究 第155回日本獣医学会学術集会、東京大学(東京)

Uday Kumar Mohanta, Madoka Ichikawa-Seki, Takuya Shoriki and Tadashi Itagaki (2013) Characterization and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh on the basis of spermatogenesis, ITS1 type and *nad1* haplotype. 第59回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2013.10.4, 酪農学園大学(江別市)

郷右近賢司、市川まどか、近藤大輔、板垣 匡 (2012) 無精子型肝蛭の精巣におけるアポトーシスの検出 第58回日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部合同大会、2012.10.6. 旭川市勤労者福祉総合センター(旭川市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

板垣 匡 (Itagaki, Tadashi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号: 80203074