

平成 22 年 6 月 9 日現在

研究種目： 基盤研究 (B)
 研究期間： 2006～2009
 課題番号：18405035
 研究課題名 (和文) 東アジアにおける *Fasciola japonicum* の分布、起源および進化
 研究課題名 (英文) Distribution, origin and evolution of *Fasciola japonicum* in eastern Asia

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

研究成果の概要 (和文) : これまで単為生殖型肝蛭は日本および韓国に存在することが知られていたが、本研究で新たにベトナム、中国にもその存在が確認され、単為生殖型肝蛭は東アジア地域に広く分布すると考えられた。日本産、韓国産、ベトナム産および中国産の肝蛭虫体について、核リボソーム DNA (internal transcribed spacer 1:ITS1) およびミトコンドリア DNA (NDI 遺伝子:NADH dehydrogenase I) に基づく分子学および系統学的解析を行った。その結果、単為生殖型肝蛭は中国中央部において、両性生殖型の *Fasciola hepatica* および *F. gigantica* の種間交雑子孫が、戻し交配などを経て単為生殖能を獲得して出現したと考えられた。誕生した単為生殖型肝蛭は終宿主である家畜、特にウシの移動とともに東では韓国から朝鮮半島を経て日本、南部では隣接するベトナムへ分布を拡大したと考えられた。

研究成果の概要 (英文) : Parthenogenic *Fasciola* species have been known in Japan and Korea. The present study showed that parthenogenic *Fasciola* sp. also distributed in Vietnam and mainland China, suggesting occurrence throughout Asian countries. Molecular and phylogenetical studies based on nuclear ribosomal DNA (ITS1) and mitochondrial DNA (NDI gene) suggested that parthenogenic *Fasciola* forms came into existence by resulting from interspecific hybridization between *F. hepatica* and *F. gigantica* and following backcross with the two species, and that they acquired the ability of parthenogenesis. New born parthenogenic *Fasciola* forms spread out with final hosts such as domestic cattle into neighboring countries as Korea and Japan in the east and Vietnam in the south.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2007 年度	2,200,000	660,000	2,860,000
2008 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
年度			
総計	8,300,000	2,490,000	10,790,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学 基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：Fasciola, Asia, distribution, origin, evolution

1. 研究開始当初の背景

反芻家畜の肝蛭症は世界的に広く分布し、畜産産業に甚大な経済的損失を与えている寄生虫疾患である。その病原体である肝蛭 (*Fasciola* 属) には *F. hepatica* および *F. gigantica* の2種が知られる。前種はヨーロッパ、南北アメリカおよびオセアニアに分布し、特にヒツジ、ヤギに対する病害性が強く、後種はアフリカおよびアジアに分布しウシに対する病害が強い。両種は形態学的特徴により種が識別されている。一方、日本に分布する肝蛭は、*F. hepatica* に類似する虫体から *F. gigantica* に類似する虫体に至るまで形態学的変異の幅が大きく、しかもその変異は連続的であることから種の決定は保留され、日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) と総称されている。また日本産肝蛭は精子形成能力がない単為生殖 (parthenogenesis) 集団であり、両性生殖集団の既存種 (*F. hepatica*, *F. gigantica*) とは生物学的特徴が根本的に異なるばかりでなく、家畜に対する病原性や生活環も異なる。日本産肝蛭と同様に多様な形態を示し、単為生殖を行う肝蛭集団は韓国、台湾、中国 (東部地域) の東アジア地域にも分布することを研究代表者らは明らかにし、単為生殖型肝蛭はアジア地域に広く分布する可能性を示唆した。一方、研究代表者らは単為生殖型肝蛭と既存2種 (*F. hepatica*, *F. gigantica*) との種の異同を明らかにするため、これら3種の肝蛭の交雑実験を実施した。その結果、いずれの肝蛭種を組み合わせた交雑によって F1 雑種は形成されたが、そのゲノム構成はいずれも場合でも異種ゲノムであり、F1 雑種は不稔性であったことから、これら3種の肝蛭は互いに生殖隔離されていると考えられた。このことは生物学的種概念から判断すれば、これら3種は別種と考えられ、現在、単為生殖型肝蛭を新種 (*Fasciola japonicum*) として記載を予定している。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 新種 *F. japonicum* の東アジアにおける分布を明らかにすること、

(2) 東アジアに分布する *F. japonicum* と *F. hepatica* および *F. gigantica* との遺伝的類縁関係をミトコンドリア DNA およびリボソーム DNA マーカーを用いて解析し、*F. japonicum* の起源、その進化と日本を含むアジア地域への拡散の全貌を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

中国は、広大な国土を有し、西部および北

部は既存種である *Fasciola hepatica* の分布地域、また南部は *F. gigantica* の分布地域にそれぞれ隣接するため、多様な形質を備えた種々の肝蛭集団が存在することが予想される。また、肝蛭の分布を拡散させたと考えられる家畜ウシの品種改良も古くから積極的に行われていることから、肝蛭間での交雑や突然変異の出現頻度も多いことが推察され、*F. japonicum* (単為生殖型肝蛭) の発祥地である可能性が高い。従って、初年度は中国での調査を重点的に行う。調査地は東側の審陽、上海、南東部の広州、昆明、北中部の西安、西部のウルムチ、カシュガルを中心に実施する。日本 (仙台空港) より上海に入り、国内航空機で広州→昆明→ウルムチ→カシュガル→西安→審陽と周り、日本 (仙台空港) に帰着する。それぞれの調査地では4~5日間滞在して、レンタカー (運転手付き) を借りて2~3日間屠畜場に通って採材をする。中国での屠畜場関係者との調整役は青海大学の Dr. Mao が担当する。

(1) 各調査地に所在する屠畜場において屠殺された感染牛の胆管から肝蛭虫体を回収する。虫体は生理食塩水で一時保存後、虫体の一部 (精巣、卵巣部分) を切り取りそれをカルノア液で固定して日本へ持ち帰り、染色体観察に供する。また残りの虫体部分は70%エタノールで圧扁固定して持ち帰り、形態観察およびDNA解析を行う (板垣、青木)。

(2) 肝蛭の染色体の観察: カルノア固定した精巣および卵巣の少量の組織を Snow (1963) による押しつぶし法によって染色体標本作製し、精原細胞および卵原細胞の第1減数分裂中期像の染色体数を計数することによって2倍体、3倍体またはモザイク体であるかを確認する (板垣、青木)。

(3) 圧扁固定虫体の形態観察: 虫体はカーミン染色して封入標本とする。外部形態を記録するために写真撮影した後、既存2種 (*F. hepatica*, *F. gigantica*) を識別する際の指標とされている体長、体幅を計測し体長/体幅比を算出する。また腸管、精巣および卵巣の分岐状況について詳細に観察することによって2種の同定をする。一方、*F. japonicum* と既存2種との鑑別点である貯精嚢内精子の有無を観察する。以上の過程で形態学的に3種を同定、それぞれの分布、特に *F. japonicum* の分布を明らかにする (青木)。

(4) 虫体の分子系統学的解析: 70%エタノール固定虫体の一部からDNA抽出キットを用いてゲノムDNAを抽出し、それをテンプレートDNAとしてミトコンドリアDNAの cytochrome c oxidase subunit I (COI) およ

び NADH dehydrogenase I (NDI) 遺伝子、さらに核リボソーム DNA の internal transcribed spacer (ITS1、ITS2) を PCR によって増幅する。増幅産物をゲル電気泳動によって確認後、ダイレクトシーケンスキット、シーケンサーを用いて塩基配列を決定する。得られたシーケンズデータを Clustal X (Thompson, 1997) により多重整列させ、近隣結合法および最大節約法による分子系統解析を行う。この過程で肝蛭個体間の遺伝的類縁関係を解明し、*F. japonicum* の遺伝的多様性 (ハプロタイプ)、祖先肝蛭種、進化、東アジアへの拡散について考察する (板垣)。

4. 研究成果

(1) ベトナムには、両性生殖型 2 倍体の *Fasciola* 属虫体と単為生殖型 3 倍体の *Fasciola* 属虫体が存在することが分かり、前者は *Fasciola gigantica* と正確に同定された。しかし、後者は、虫体の形態学的特徴 (体長・体幅の比など) 核リボソーム DNA ITS1 およびミトコンドリア DNA の NDI および COI 遺伝子の塩基配列に基づいて種を同定することが困難であった。ベトナム産単為生殖型 3 倍体虫体は、既存種である *Fasciola hepatica* および *Fasciola gigantica* の DNA 配列を共有するヘテロ型であったことから、両肝蛭種の交雑子孫であると考えられた。しかも、ベトナム産単為生殖型 3 倍体虫体はベトナムで誕生したものではなく、別の地域で出現し感染動物とともにベトナムに拡散したと考えられた。

(2) アジア諸国には *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, および両種の DNA 型を有する肝蛭虫体が共存するため、これらを識別する鑑別法の開発が望まれる。そこで、核リボソーム DNA の ITS1 領域の塩基配列を指標とした PCR-RFLP 法の開発を目的とした研究を行った。ITS1 増幅産物を制限酵素 *RsaI* で切断すると、*Fasciola hepatica* の増幅産物はおおよそ 360bp, 100bp, 60bp の断片に切断され、*fasciola gigantica* では 360bp, 170bp, 60bp に切断され、泳動パターンの違いにより識別された。一方、両種のヘテロ型では、360bp, 170bp, 100bp, 60bp の断片に切断された。以上から、*RsaI* による PCR-RFLP は *Fasciola* 3 種を簡便に識別する方法として有用であると考えられた。

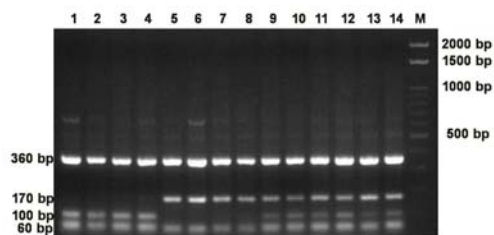
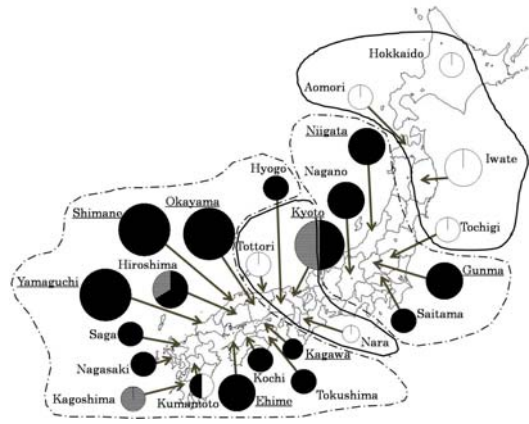


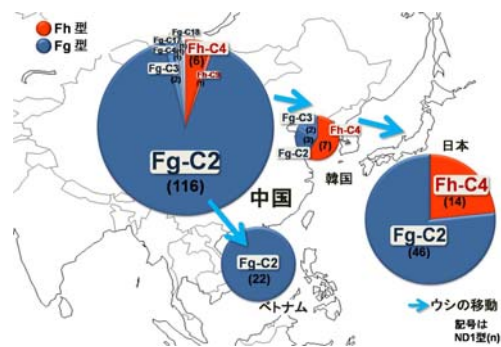
図1. ITS1型を識別するPCR-RFLP法

1-4: Fh 型, 5-8: Fg 型, 9-14: Fh/Fg 型, M: 100bp DNA ladder



(3) 日本における単為生殖型肝蛭の DNA 型を明らかにするため、8 県のウシから回収した肝蛭虫体を核リボソーム DNA の ITS1 およびミトコンドリア DNA の NDI 遺伝子の塩基配列を決定した。その結果、ITS1 と NDI の DNA 型にそれぞれ異なる 5 組の DNA 型が確認された。両 DNA 型が *F. gigantica* 型である *Fsp2* (Itagaki et al., 2005) が最も優勢であり、次に *F. hepatica* 型である *Fsp1* であった。さらに *Fsp1* は日本の北部 (北海道～関東) で主要な型であり、*Fsp2* は西部 (関東地方以西) で主要であった。これらの分布の違いは、各型の肝蛭が 2 世紀頃に感染ウシとともに日本に伝来した後にウシ系統の拡散が異なる、いわゆる創始者効果の影響が関与していると考えられた。

(4) 分子形質である ITS1 型および NDI 型、さらに精子形成型の指標を用いて、中国産肝蛭の特徴を解析したところ、中国には両性生殖型の *Fasciola hepatica* および *Fasciola gigantica* とともに単為生殖型 *Fasciola* sp. が存在することを初めて明らかにした。また、単為生殖型肝蛭は両種肝蛭の DNA 型を併せ持つことから、両種の交雑子孫であると考えられた。さらに中国産単為生殖型肝蛭は日本や韓国、ベトナム由来の単為生殖型肝蛭と NDI 型が一致したことから、これら 3 国の単為生殖型肝蛭は共通の起源由来であると考えられた。また遺伝子型 Fh-C4 型は両性生殖の中国産 *Fasciola hepatica* と単為生殖肝蛭の両方で確認され、Fg-C2 型は *F. gigantica* と単為生殖型肝蛭の両方で確認されたことから、Fh-C4 型、Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭はそれぞれ中国において同型の *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* を母系祖先とする起源であると考えられた。両型は、日本や韓国、ベトナムの単為生殖型肝蛭でも確認されたこと、さらにこれら 4 国が地理的および文化的に関係が深いことから、中国で誕生し、家畜の移動とともに周辺諸国に拡散したと考えられた。また、単為生殖型肝蛭の形態学的特徴は *Fasciola hepatica* と *F. gigantica* の中間的な特徴を示した。



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 6 件)

- ① Yoshihiko Sato, Tadashi Itagaki, An Occurrence of Fungal Airsacculitis Associated with Severe Helminthiasis in a Black-eared Kite (*Milvus migrans lineatus*), Avian Disease, 査読有, 2010, in press.
- ② Madoka Ichikawa, Tadashi Itagaki, Discrimination among the ITS1 types of *Fasciola* spp. based on PCR-RFLP method, Parasitology Research, 査読有, 106, 2010, pp757-761.
- ③ Tadashi Itagaki, Keisuke Sakaguchi, Kunio Terasaki, Osamu Sasaki, Shinobu Yoshihara, Truong Van Dung, Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA, Parasitology International, 査読有, 58, 2009, pp81-85.
- ④ Mao Peng, Mie Ichinomiya, Maiko Ohtori, Madoka Ichikawa, Toshiyuki Shibahara, Tadashi Itagaki, Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *F. gigantica* and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA, Parasitology Research, 査読有, 105, 2009, pp809-815.
- ⑤ 伊藤直之, 村岡 登, 河又 淳, 青木美樹子, 板垣 匡, 犬の *Strongyloides* sp. 感染症例に対するフェバンテル配合剤の治療効果, 日本獣医師会誌, 査読有, 61, 2008, pp453-458.
- ⑥ 伊藤直之, 板垣 匡, 飼育イヌの *Giardia intestinalis* 感染状況と分離株の遺伝子型. 獣医寄生虫学会誌, 査読なし, 5(2), 2007, pp17-25.

[学会発表] (計 28 件)

- ① 市川まどか, 柴原壽行, ペンモー, 板垣匡, 中国産肝蛭の生殖型および DNA 型による特徴づけ: 長春市由来虫体について. 第 148 回日本獣医学会学術集会, 2009.9.25 (とりぎん文化会館、鳥取県)
- ② Tadashi Itagaki, Mie Ichinomiya, Kouichi Fukuda, Seigo Fussyuku, Carlos Carmona, Hybridization experiments indicate incomplete isolating mechanism between *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2009.8.11 (コンベンションセンター, Calgary, Canada) .
- ③ Madoka Ichikawa, Mao Peng, Mie Ichinomiya, Maiko Ohtori, Toshiyuki Shibahara, Tadashi Itagaki, Is the origin of parthenogenic *Fasciola* sp. in China? : A study of DNA types and morphology in Chinese *Fasciola* specimens. World Association for the Advancement of Veterinary Parasitology, 2009.8.11 (コンベンションセンター, Calgary, Canada) .
- ④ 市川まどか, 板垣 匡, PCR-RFLP 法による *Fasciola* 属の ITS1 型の識別. 第 147 回日本獣医学会学術集会, 2009.4.3 (栃木県総合文化センター)
- ⑤ 市川まどか, 板垣 匡, 柴原壽行, ペンモー, 単為生殖型肝蛭の起源は中国か? 中国産肝蛭の形態および DNA 型からみた考察. 第 77 回日本寄生虫学会大会, 2008.4.2~4.4 (長崎県)

[図書] (計 4 件)

- ① 板垣 匡 (分担執筆) 動物病理学各論, 日本獣医病理学会編, 2010, pp166-169, pp228-232,
- ② 板垣 匡 (分担執筆) 獣医衛生動物学, 講談社, 2009, pp. 14-42, 271-274.
- ③ 板垣 匡 (分担編集、分担執筆) 最新家畜寄生虫病学 (今井壯一、板垣 匡、藤崎幸蔵編)、朝倉書店、2007, pp78-113, pp123-126, pp131-136, pp213-233, pp237-239
- ④ 板垣 匡 (分担執筆) 新獣医学辞典, 新獣医学辞典編集委員会編, 2007, 14 項目執筆

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

(2) 研究分担者

柴原壽行 (SHIBAHARA TOSHIYUKI)

千葉科学大学・薬学部・教授

研究者番号：70116937

(平成 18 年度～平成 20 年度)

青木美樹子 (AOKI MIKIKO)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20302060

(平成 18 年度：平成 19 年度より育児休暇取得で辞退)