

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570120

研究課題名(和文) インドネシアの固有齧歯類に寄生する線虫類の生物地理学的研究

研究課題名(英文) Biogeographical study on nematodes parasitic in endemic rodents of Indonesia.

研究代表者

長谷川 英男 (Hasegawa, Hideo)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00126442

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：インドネシアの島嶼に分布するネズミ科の寄生線虫類について、形態とDNA塩基配列から分散と種分化過程を宿主との共進化の視点から研究した。スラウェシ島の固有ネズミのうち新土着種からSyphacia属蟻虫の新亜属を含む5新種を発見した。一方同島の旧土着ネズミにはSyphaciaは検出されず、ヘテラキス科の新属が得られた。ハルマヘラ島の固有ネズミには別のSyphaciaの新種が検出された。DNA塩基配列の解読は一部の種について成功し、系統解析の結果、スラウェシ島の種はユーラシア産種とは基部近くで分岐しているが、*S. muris*と同じクレードに入るので、新土着種と共にスラウェシ島に分散したと推定された。

研究成果の概要(英文)：Nematodes parasitic in murids on Indoensian islands were studied based on morphology and DNA nucleotide sequence analysis from the viewpoint of dispersal and coevolution with their hosts. Five species of Syphacia pinworms including 2 new subgenera were found from the new endemic murids of Sulawesi Island. Meanwhile, no Syphacia species was observed in the old endemic murids of the same island, but instead a new genus of Heterakidae was demonstrated. DNA sequence analysis was successful for Syphacia sp. from Sulawesi Island. Phylogenetic analysis revealed that these Syphacia had diverged near the base with Eurasian representatives of the genus, but formed same clade with Syphacia muris of Java and Sumatra, suggesting that they came to Sulawesi with the dispersal of new endemic murids.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生物多様性・分類

キーワード：線虫類 齧歯類 インドネシア 生物地理 共進化 国際情報交流

1. 研究開始当初の背景

インドネシアは東洋区とオーストラリア区の間であって、ウォレス以来進化研究の対象地域として注目を集めてきた。しかし野生動物の寄生線虫についての研究は少なく、特に野生齧歯類寄生線虫にはほとんど関心を持たれてこなかった。研究代表者長谷川は1991年～1993年に文部省科学研究費国際学術研究「インドネシアにおける宿主—寄生体—媒介者の生物地理と共進化の研究」[課題番号 03041065] (代表: 宮城一郎琉球大学教授 = 当時 =) に参加し、スラウェシ島、カリマンタン、イリアンジャヤ等において、多数の固有齧歯類を捕獲し、その寄生線虫を採取した。それらの標本を基に、1999年までに線虫の4新属はじめ、多くの新種、新記録種をインドネシアの研究者と共同で国際誌に発表し、その生物地理学的特性と宿主との共進化関係を考察した。残念なことにその後インドネシア側でこれらに関心を持つ研究者がおらず、共同研究が中断したまま約10年が経過した。2009年にインドネシア・ボゴール博物館の若手研究員 K. Dewi 修士 (現在日本学術振興会 RONPAKU 研究員) がこの方面に強い関心を有することを知って、同じく齧歯類寄生線虫の生物地理を研究している酪農学園大学浅川教授と共同研究を推進することで合意し、科研費を申請した。このような中、オーストラリアではネズミ蟻虫 *Syphacia* 属などに新種を次々と記載発表した Dr. Smales と Dr. Weaver がオーストラリア—ニューギニアの齧歯類寄生線虫の種分化過程に迫ろうとしており、代表者が計画しているカリマンタン—スラウェシ側からの研究と合わせれば、スダランドからオーストララシアの土着齧歯類とその特異的線虫類の共進化の総合的把握が可能になると考えられた。

2. 研究の目的

インドネシアで1991～1993年に採取され、保管されている標本およびインドネシア側で新たに採取された固有齧歯類寄生線虫類の形態学的およびDNA塩基配列解析を行い、新種線虫を記載するとともに、系統解析を行い、これら線虫類の分散と宿主との共進化過程を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

- (1) インドネシアの齧歯類に寄生する線虫類とりわけ蟻虫類と毛様線虫類を、宿主腸管から分離する。
- (2) 得られた線虫類はグリセリン・エタノールにて透徹し、グリセリンでマウントして微分干渉顕微鏡による観察を行い、計測する。また走査型電子顕微鏡による形態学的検討を行う。
- (3) 高濃度エタノール固定によってDNAが保たれている標本からは TaKaRa Dexpat でDNAを分離し、その他の標本からは Qiagen QIA amp DNA FFPE Tissue Kit

あるいは QIA amp DNA Mini Kit にてDNAを抽出する。抽出DNAをテンプレートとして、mtDNA Cox1 遺伝子および核 rDNA をPCRにて増幅する。増幅したDNAをABI premix v3.1を用いて増幅し、ABI Prism 3130によって塩基配列を解析する。プライマーは、他種で既知の当該部分のものを用いるほか、解明した配列に基づいて新たなプライマーを設計する。

- (4) 得られた寄生線虫の形態学的特徴、DNA塩基配列に基づく系統解析と、インドネシア島嶼の地史的形成過程、宿主の分散についての知見を総合して、これら線虫類の分散と宿主との共進化過程を解明する。

4. 研究成果

- (1) インドネシアのスラウェシ島、ハルマヘラ島、ジャワ島、カリマンタン、フローレス島の齧歯類寄生線虫の保存標本と新たに得られた標本を、インドネシア側共同研究者と共に調査し、多数の種を確認した。
- (2) スラウェシ島産固有ネズミの *Paruromys dominator* と *Taeromys celebensis* から得られたネズミ蟻虫はそれぞれ新種 *Syphacia paruromyos*, *Syphacia taeromyos* として記載した。
- (3) スラウェシ島産固有ネズミ *Eropeplus canus* から得た2種の *Syphacia* 属は新種であり、うち1種は口に毛房状の特異な構造があり、もう1種は雌の口が六角形であるなど、同属他種とは異なる特徴を有し、それぞれ新亜属と考えられた (論文投稿中)。
- (4) カリマンタン島産の *Maxomys whiteheadi* とスラウェシ島産固有ネズミ *Maxomys musschenbroekii* には、頭部が側方に伸張した形の新種 *Syphacia* の同一種が寄生していた。これまでインドネシアで得られている *Syphacia* 属の種は全て丸い頭部をしているのと対照的であり、オーストラリアの *Syphacia* にむしろ近い形態であった。この種はスダダシエルフから宿主 *Maxomys* とともにスラウェシに分散したものと考えられる。
- (5) スラウェシ島の *Paruromys* から得られた一見齧歯類寄生の Heligmosomidae 科所属種に類似した線虫は、詳細に観察すると独特の形態を具え、おそらく Molineidae 科、特に Molineinae 亜科に属する新属と思われた。この亜科の固有属にはオーストラリア区にのみ分布するものもあり、今後DNA塩基配列からの検討が必要である。
- (6) スラウェシ島のネズミ類のうち、捕獲がきわめて困難な旧土着ネズミ (old endemic rats) の保存臓器を米国自然史博物館より貸与を受けて、寄生線虫を検索した。 *Syphacia* 属は検出できなかったが、

ヘテラキス科の1種が *Echithrix centrosa*, *Crunomys celebenais*, *Tateomys macrocerca*, *Tateomys rhinogratoides* に検出された。この種はネズミ類に普通に寄生する *Heterakis spumosa* と異なり、頭部に cordon を有しており、新属であることが確認された。スラウェシ島に分布する新土着ネズミ(new endemic rats)には *H. spumosa* しか寄生していないので、この新属新種は旧土着ネズミに特異的で、古い時代に共に旧土着ネズミの祖先と共にスラウェシ島に分散し、閉鎖的環境の中で分化したのと考えられた。また旧土着ネズミには Helgmonellidae の新属と考えられる種などが認められた。

- (7) ハルマヘラ島で最近新属新種として記載された固有ネズミ *Halmaheramys bokimekot* より新種の *Syphacia* 属を検出した(論文印刷中)。
- (8) DNA 塩基配列の解析は新しく固定された虫体だけでなく、保存されていた材料についても試みた。しかしインドネシアで使用されているエタノールの純度・組成に問題があるためか、DNA の増幅と塩基配列の解析は極めて困難であった。DNA が短く切断されている可能性があったので、プライマーの間隔を短く設定して設計し、増幅を試みたが、ほとんどが不調に終わった。最終的に *Syphacia* 属ではスラウェシ島産固有ネズミ *Bunomys* 寄生の *S. rifaii*, *Paruromys* 寄生の *S. paruromyos*, ジャワ島とスマトラ島産 *Rattus* 寄生の *S. muris* について mtDNA Cox1 の部分配列が解読できた。
- (9) 得られた *Syphacia* の mtDNA Cox1 塩基配列に同属他種で既知の塩基配列および新たにインドネシア以外で入手解読した *Syphacia* 種の塩基配列を合わせて系統解析を行ったところ、スラウェシ島産の種はユーラシア大陸産の種と基部で分岐はしているが、*S. muris* を含むクレードを形成した。そのクレードでは *S. paruromyos* がまず先に分岐し、次に *S. rifaii* と *S. muris* が分かれたことを示唆する系統樹となった。
- (10) 上記の系統解析結果が正しければ、スラウェシ島産の *Syphacia* は新土着ネズミによって同島にもたらされたことが示唆される。しかし今回 DNA 塩基配列が可能であったものは限られており、特に *Eropeplus* 寄生の *Syphacia* 新亜属の DNA 塩基配列が解明できなかったため、将来さらに適切に採取された材料を得て結論を導くべきであろう。
- (11) インドネシア産材料と比較するために日本や他地域の齧歯類等も調査し、それらから得た *Heligmonoides cf. josephi*, *Heligmonoides speciosus*, *Heligmonoides ikeharai*, *Rattustrongylus* spp., *Syphacia obvelata*, *Aspiculuris tetraptera*,

Skrjbaninema kamosika, *Necator* spp., *Oesophagostomum* spp., *Paralibyostrongylus* sp.などの線虫についても形態と DNA 塩基配列を解析し、新知見を得て一部は学会および論文で発表した。

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 15 件)

Dewi, K., Asakawa, M., Fitriana, Y. S. 2014: *Syphacia* (*Syphacia*) **** n.sp. (Nematoda: Oxyuridae) from a peculiar murine (Rodentia: Muridae) on Halmahera Island, Indonesia and a key to the species present in Sulawesi to the Australia region. Transactions of the Royal Society of South Australia, 138: (in press.) 査読有

Hasegawa, H., Modry, D., Kitagawa, M., Shutt, K. A., Todd, A., Kalousova, B., Profousova, I., Petrzekova, K. J. 2014: Humans and great apes cohabiting the forest ecosystem in Central African Republic harbour the same hookworms. PLOS Neglected Tropical Diseases 8(3): e2715. 査読有

Dewi K., Hasegawa, H. 2014: Two new species of *Syphacia* (Nematoda: Oxyuridae) in endemic murid rodents from Sulawesi, Indonesia. Journal of Helminthology 88: 41-49.

小野陽子, 上山剛司, 佐鹿万里子, 村上隆広, 塚田英晴, 増田 泰, 岡田秀明, 長谷川英男, 浅川満彦 2013: 知床半島産野生小哺乳類の寄生線虫. 知床博物館研究報告 35: 11-14. 査読有

Asakawa, M., Koyasu, K., Harada, M., Shrestha, K., C., Mekada, K., Tsuchiya, K., Oda, S. -I., Hasegawa, H. 2013: Parasitic nematodes obtained from *Niviventer eha* and *Mus* spp. (Murinae: Rodentia) captured in the Himalayas, Nepal. Biogeography, 15: 73-77. 査読有

浅川満彦 2013: 日本学術振興会論博事業によるインドネシア科学院(LIPI)生物学研究センターを拠点にした野生動物寄生虫研究. 獣医寄生虫学会誌, 12: 121-124. 査読有

秋葉悠希, 片山亨輔, 岡本 実, 大川あゆ子, 長谷川英男, 浅川満彦 2013: 東京大学演習林に生息する小哺乳類から見出された内外寄生虫. 日本生物地理学会会報, 68: 129-133. 査読有

Yoshino, T., Yanai, T., Asano, M., Asakawa, M. 2012: First record of *Porrocaecum depressum* (Nematoda: Ascaridoidea), *Craspedorhynchus* sp. and *Degeeriella* sp. (Insecta: Psocodea)

obtained from a Hodgson's hawk eagle, *Spizaetus nipalensis*, in Gifu Prefecture, Japan. Biogeography 14: 143-148. 査読有
Onuma, M., Zhao, C., Asakawa, M., Nagamine, T., Kuwana, T. 2012. Duplex real-time PCR assay for the detection of two intestinal parasites, *Heterakis isolonche* and *Glaphyrostomum* sp., in Okinawa rail (*Gallirallus okinawae*). Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 17: 27-31. 査読有

Yoshino, T., Hayakawa, D., Yoshizawa, M., Osa, Y., Asakawa, M. 2012: First record of *Strongyloides avium* Cram, 1929 (Nematoda: Rhabditoidea) obtained from a fairy pitta, *Pitta brachyura nympha* Temminck & Schlegel, 1850, kept in zoological garden. Bulletin of Tokushima Prefectural Museum 22: 1-6 査読無

Ito, H., Yoshino, T., Nakamura, S., Endo, D., Fujimaki, Y., Nakada, T., Asakawa, M. 2012: Isolation of three nematode species from the hazel grouse, *Bonasa bonasia vicinitas* Riley, 1915, in Hokkaido, Japan. Japanese Journal of Zoo and Wildlife Medicine 17: 21-25. 査読有

Hasegawa, H., Sato, H., Suzuki, K., Kaneshiro, Y. 2012: A new oxyurid species (Nematoda) collected from a Japanese serow, *Capricornis crispus* (Mammalia: Bovidae), in Japan. Journal of Parasitology 98: 1161-1165. 査読有

Kooriyama, T., Hasegawa, H., Shimozuru, M., Tsubota, T., Nishida, T., Iwaki, T. 2012: Parasitology of five primates in Mahale Mountains National Park, Tanzania. Primates 53: 365-375. 査読有

Hasegawa, H., Sato, M., Maeda, K., Murayama, Y. 2012: Description of *Riouxgolvania kapapkamui* sp. n. (Nematoda: Muspiceoidea: Muspiceidae), a peculiar intradermal parasite of bats in Hokkaido, Japan. Journal of Parasitology 98: 995-1000. 査読有

Hasegawa, H., Sato H., Torii, H. 2012: Redescription of *Enterobius (Enterobius) macaci* Yen, 1973 (Nematoda: Oxyuridae: Enterobiinae) based on material collected from wild Japanese macaque, *Macaca fuscata* (Primates: Cercopithecidae). Journal of Parasitology 98: 152-159. 査読有

〔学会発表〕(計7件)

浅川満彦. インドネシア科学院(LIPI)生物学研究センターによる野生動物の寄生虫研究. 日本寄生虫学会第83回大会, 2014年3月27日-28日愛媛県松山市.

Dewi, K., Hasegawa, H., Asakawa, M.: A preliminary report of trichostrongylid nematodes obtained from *Paruromys dominator* (Muridae; Rodentia) at Mt. Mekongga, Southeast Sulawesi, Indonesia. The 6th Asian Meeting on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation in Singapore in 2013 'One World, One Health in Asia', 2013年10月26-27日, シンガポール.

Dewi, K., Hasegawa, H., Asakawa, M.: *Syphacia* spp. (Nematoda: Oxyuridae) parasitic in Indonesian murids (Muridae: Rodentia). 日本寄生虫学会・日本衛生動物学会北日本支部第59回合同大会, 2013年10月5日北海道江別市.

Hasegawa, H., Shigyo, M., Fujita, S., Vbehang Nguema, P. P., Takenoshita, Y.: Molecular identification of nematode larvae raised by filter paper culture of feces from wild great apes in Gabon Republic. 日本寄生虫学会第82回大会, 2013年3月29日—31日東京.

Asakawa, M., Dewi, K., Hasegawa, H.

Endemic and/or exotic host-parasite relationship between rodents and their nematodes occurring from east to South-East Asia. What's a problem? Second International Symposium on East Asian Vertebrate Species Diversity. 2012年7月27日-27日, 京都.

Asakawa, M., Dewi, K., Hasegawa, H. Endemic and/or exotic host-parasite relationship between rodents and their nematodes occurring from east to South-East Asia. Wildlife Disease Association - Australian Section Conference. 2012年9月23日-25日, オーストラリア・クイーンズランド

Hasegawa, H., M. Kitagawa, K. J. Petrzalkova, B. Kalousova, A. Todd and D. Modry: Are soil-transmitted nematodes shared by humans and great apes in the rain forest of Dzanga-Ndoki National Park, Central African Republic? 第81回日本寄生虫学会大会, 2012年3月24日, 兵庫県西宮市.

〔図書〕(計4件)

浅川満彦(編): 寄生虫学研究: 材料と方法-2013年版, 三恵社, 名古屋: pp. 165 (2013年)

Asakawa, M., Hasegawa, H. 浅川満彦: 野生動物の疾病と病理-寄生虫.(村田浩一・坪田敏男 編) 獣医学・応用動物科学系学生のための野生動物学. 文永堂, 東京: 149-157 (2013年)

Asakawa, M., Dewi, K., Hasegawa, H. Ecological and biological wellbeing of the animal world. Publishing House

FESAU, Russia, 50-51 (2012 年)
Conservation medical strategy of
endemic host-parasite relationships- Case
model of Japanese rodents (Mammalia)
and their nematodes. In: Boari, F. and
Chung, J. A. Eds. Nematodes:
Morphology, Functions and Management
Strategies. Nova Science Publishers, NY,
USA. (2012 年)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

(1) 研究代表者

長谷川英男 (HASEGAWA HIDEO)

大分大学・医学部・教授

研究者番号：00126442

(2) 研究分担者

浅川 満彦 (ASAKAWA MITSUHIKO)

酪農学園大学・獣医学部・教授

研究者番号：30184138