

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(B)

研究期間：2011～2014

課題番号：23405044

研究課題名(和文) 南・東南アジアにおける単為生殖型肝蛭と家畜ウシの分布・拡散に関する分子系統解析

研究課題名(英文) Molecular phylogenetic analyses of parthenogenic *Fasciola* sp. in southern and south-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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 10,600,000円

研究成果の概要(和文)：単為生殖型肝蛭は*Fasciola hepatica*および*Fasciola gigantica*の種間交雑により中国で誕生したと考えられた。単為生殖型肝蛭には*F. hepatica*を母系祖先とするFh系統と*F. gigantica*を母系祖先とするFg系統が存在し、Fh系統は中国、韓国および日本だけに分布するが、Fg系統はこれら3国に加えて、東南～南アジア(ベトナム、タイ、ミャンマー、ネパール、バングラデシュ、インド東部、フィリピン)に広く分布する。中国からこれらの国々への分布拡大には家畜ウシ(品種)の人を介した移動が深く関わったと考えられた。

研究成果の概要(英文)：Parthenogenic *Fasciola* sp. came into existence to result from interspecific hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* in China. Parthenogenic *Fasciola* sp. is divided into two distinct lineages (Fh and Fg lineages) of which maternal ancestors are *F. hepatica* and *F. gigantica*, respectively. Fh lineage is found in Japan, Korea and China, whereas Fg lineage widely occur in Vietnam, Thailand, Myanmar, Nepal, Bangladesh, eastern India and Philippines in addition to the three countries of Fh lineage. Domestic cattle was thought to have played an key role as a final host in spread of parthenogenic *Fasciola* sp. throughout Asian countries from China.

研究分野：寄生虫学

キーワード：単為生殖型肝蛭 東南アジア 南アジア 分子系統 *Fasciola gigantica*

1. 研究開始当初の背景

人および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、その病原体である肝蛭 (*Fasciola* 属) には *F. hepatica* および *F. gigantica* の2種が知られてきた。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) が東アジア (日本、韓国、中国東部) 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., *Parasitology*, 2005, 131:679-685; Itagaki et al., *J Vet Med Sci*, 2005, 67:1115-1118; Peng et al., *Parasitol Res*, 2009, 105:809-815)。さらに、単為生殖型肝蛭は、中国の中央部で比較的近年 (少なくとも1~2千年前) に、*F. hepatica* および *F. gigantica* の種間交雑により誕生した雑種子孫が単為生殖能 (parthenogenesis) を獲得して出現し、その宿主である家畜ウシ (中国黄牛系) の移動・拡散とともに分布域を広げ、朝鮮半島 (韓国) から日本までその分布を拡大したと考えられる。南アジア・東南アジアの肝蛭症は *F. gigantica* に起因するとされているが、研究代表者らのベトナムの調査を除いて、単為生殖型肝蛭を含めた原因種については解明されていない。また、家畜黄牛系は中国の他に、南アジア・東南アジア一体にも広く分布するウシ品種であることから、単為生殖型肝蛭はこれら地域における肝蛭症の原因種である可能性が強く示唆される。さらに、単為生殖型肝蛭は比較的新しく出現した病原種であるため、家畜ウシ品種の移動・拡散との関連性を解明できると考え、本研究課題を企画するに至った。

2. 研究の目的

南アジア (インド、バングラデシュ、ネパール) と東南アジア (タイ、ミャンマー、フィリピン) における肝蛭症の原因種は十分に解明されていない。本研究では、各国で採取した肝蛭虫体を形態および分子系統学的に解析して原因種を明らかにするとともに、その宿主である家畜ウシ (品種) についても分子系統学的に解析し、南・東南アジアにおける単為生殖型肝蛭症の蔓延と家畜ウシの移動・拡散との相互関連性を明らかにし、これらの病因疫学的見地から肝蛭症の制圧対策に寄与することを目的とする。

3. 研究の方法

各調査地の屠畜場で屠殺された家畜ウシ (インド、ネパールなどのヒンズー教国では、バッファロー、ヤギ、ヒツジ) の胆管から肝蛭虫体を回収する。検体は海外共同研究者の所属施設 (大学、研究所) や関連施設に搬入し、肝蛭虫体は圧平固定 (70%エタノール) 標本として一部を協力者が保管、残りを日本に持ち帰る。肝蛭虫体は、一部から全DNAを抽出するとともに虫体前部をカーミン染色して貯精嚢内精子の有無を顕微鏡で確認す

ることで単為生殖型肝蛭と両性生殖型肝蛭 (*F. hepatica* と *F. gigantica*) を識別した。両性生殖型肝蛭については全DNAから核リボソームDNAのITS1領域をPCR法により増幅し、その塩基配列の違いまたは制限酵素切断片長多型 (PCR-RFLP) の違いにより *F. hepatica* であるか *F. gigantica* であるかを同定した。また、それぞれの虫体について、ミトコンドリアDNAのcox1およびnad1遺伝子の一部のDNAをPCR増幅し、その塩基配列をダイレクトシーケンシング法により決定した (Itagaki et al., 2005)。得られた塩基配列からハプロタイプを識別し、GenBankに登録されている *Fasciola* spp. の塩基配列と共に分子系統解析を行った。すなわち、Genetyxソフトを用いた近隣結合法による分子系統樹の作成、Median joining ネットワーク解析、さらにハプロタイプ多様度と塩基多様度、集団分化指数 (Fst) を算出することによる集団遺伝学的解析を行った。

4. 研究成果

(1) ミャンマー産肝蛭

3地域 (Yangon, Lashio, Myitkyna) で感染牛より88虫体を採取した。そのうちYangonおよびLashioで回収された80虫体は有精子型で、しかもITS1型がFg型を示したことから *Fasciola gigantica* と種同定された。残りの8虫体は中国と国境を接する北部Myitkynaで得られた虫体で、これらは貯精嚢に成熟性がみられない無精子型肝蛭 (単為生殖型肝蛭: aspermic *Fasciola* sp.) であり、ミャンマーに無精子型肝蛭が分布することを初めて明らかにした。nad1ハプロタイプによる系統解析により、無精子型肝蛭は塩基配列が完全に一致する単一のハプロタイプ (M14) であり、本ハプロタイプは中国や日本、韓国などの東アジアで発見された無精子型肝蛭のハプロタイプと完全に一致したことから、中国で出現した集団が感染家畜の移動と共に中国よりミャンマーに侵入したと考えられた。一方、*F. gigantica* 虫体では、17型のnad1ハプロタイプが識別され、ネットワーク系統解析によりこれらのハプロタイプには主要な2系統 (M15, M1) に識別されることから、ミャンマー産 *F. gigantica* は2系統起源であると考えられた (図1)。

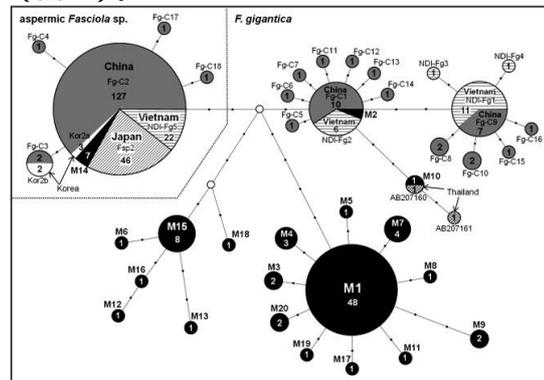


図1 ミャンマー産肝蛭のM-Jネットワーク解析結果

(2) タイ産肝蛭

19地域の屠畜場においてウシから合計147虫体が回収された。そのうちの128虫体は有精子型でITS1型がFg型の*F. gigantica*と同定され、残りの19虫体が無精子型肝蛭であり、タイもミャンマーと同様に*F. gigantica*が優勢な種であった。nadIハプロタイプによる系統解析により、*F. gigantica*では、29型のハプロタイプ(Fg-ND1-Thai 2-30)が識別され、が、そのうち3型(Fg-ND1-Thai 7, 9 および 27)が優性であり、タイ産*F. gigantica*は3系統起源と考えられた。一方、無精子型肝蛭にはハプロタイプは1型(Fg-ND1-Thai 1)だけが認められ、このハプロタイプは中国産無精子型肝蛭のハプロタイプと塩基配列が一致し、ミャンマー産無精子型肝蛭とも同一であったことからミャンマーと同様に中国起源の集団であると考えられた(図2)。また、単為生殖型肝蛭は*F. gigantica*に比べて、ハプロタイプ多様度が低いことから、*F. gigantica*よりかなり新しくタイに侵入したと考えられた。

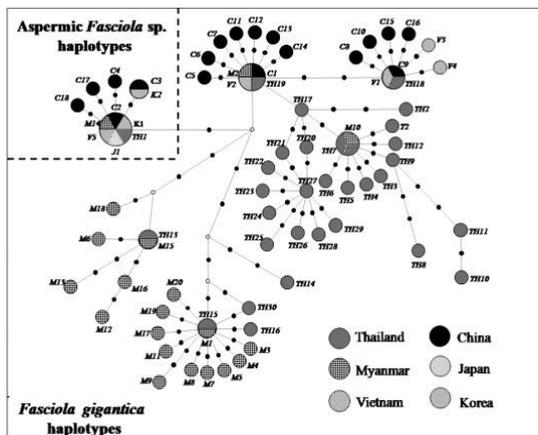


図2 タイ産肝蛭のM-Jネットワーク解析結果

(3) ネパール産肝蛭

8地域の屠畜場においてウシから合計81虫体が回収された。そのうちの61虫体(75.3%)が貯精嚢内に成熟精子が存在しない無精子型肝蛭であり、残りの20虫体(24.7%)は有精子型でITS1型がFg型であることから*F. gigantica*と同定された。このことから、ネパールはタイやミャンマーとは異なり、無精子型肝蛭が優勢な種であることが明らかとなった。nadIハプロタイプによる系統解析により、無精子型肝蛭にはハプロタイプは2型(Fsp-ND1-N1, Fsp-ND1-N2)が認められ、殆ど(60虫体)がFsp-ND1-N1を示し、このハプロタイプは中国産無精子型肝蛭の主要ハプロタイプ(Fg-C2)と塩基配列が一致し、またミャンマーおよびタイ産無精子型肝蛭とも同一であったことから中国起源の集団であると考えられた。また、単為生殖型肝蛭は*F. gigantica*に比べて、ハプロタイ

プ多様度が低いことから、*F. gigantica*よりかなり新しくネパールに侵入したと考えられた。一方、*F. gigantica*では、10型のハプロタイプ(Fg-ND1-N1~Fg-ND1-N10)が識別され、Fg-ND1-N1はミャンマーおよびタイ産のハプロタイプ(M15, T3)と配列が一致し、これらと極めて近縁関係であった(図3)。

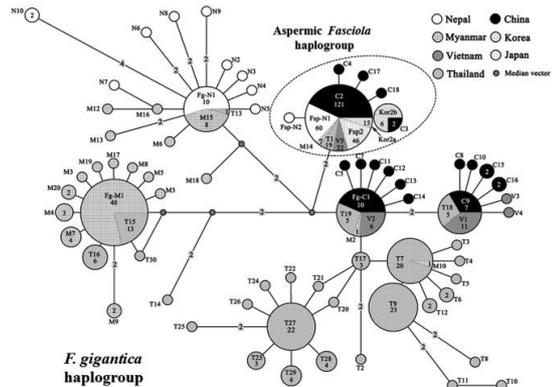


図3 ネパール産肝蛭のM-Jネットワーク解析結果

(4) バングラデシュ産肝蛭

6地域の屠畜場においてウシ、バッファロー、ヒツジ、ヤギから合計150虫体が回収された。そのうちの129虫体(86.0%)が貯精嚢内に成熟精子が存在しない無精子型肝蛭であり、残りの21虫体(14.0%)は有精子型でITS1型がFg型であることから*F. gigantica*と同定された。このことから、バングラデシュはネパールと同様に無精子型肝蛭が優勢な種であることが明らかとなった。nadIハプロタイプによる系統解析により、無精子型肝蛭129虫体にはハプロタイプは1型(Fsp-ND1-Bd11)だけが認められ、このハプロタイプは中国産無精子型肝蛭の主要ハプロタイプ(Fg-C2)と塩基配列が一致し、また日本や韓国、ベトナム、タイ、ネパール、ミャンマーの無精子型肝蛭とも同一であったことから中国起源の集団であると考えられた。また、単為生殖型肝蛭は*F. gigantica*に比べて、ハプロタイプ多様度が低いことから、*F. gigantica*よりかなり新しくバングラデシュに侵入したと考えられた。

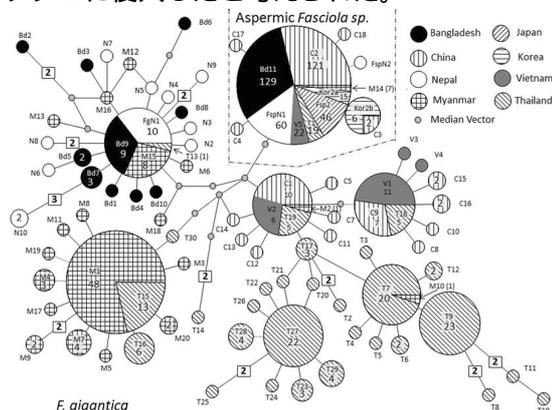


図4 バングラデシュ産肝蛭のM-Jネットワーク解析結果

一方、*F. gigantea* では、10 型のハプロタイプ (Fg-ND1-Bd1~Fg-ND1-Bd10) が識別され、これらは一つのハプログループを形成し、ネパールやタイ、ミャンマー産 *F. gigantea* ハプロタイプ (FgN1, M15, T13 など) と近縁な関係であった (図 4)。

(5) インド東部産肝蛭

3 地域 (インパール、コヒマ、ガントク) の屠畜場においてウシ、バッファロー、ヤギから合計 157 虫体が回収された。そのうちの 118 虫体 (75.2%) が貯精嚢内に成熟精子が存在する有精子型肝蛭であり、ITS1 型が Fg 型であることから *F. gigantea* と同定された。残りの 39 虫体 (24.8%) は無精子型であったことから、インド東部地域はミャンマーやタイと同様に *F. gigantea* が優勢な種であることが明らかとなった。nad1 ハプロタイプによる系統解析により、無精子型肝蛭のハプロタイプは 2 型 (NDI-E1, NDI-E2) が認められ、両ハプロタイプの違いは 1 塩基置換であり、中国 (Fg-C2) を初めとするアジア諸国の無精子型肝蛭の主要ハプロタイプと塩基配列が一致したことから中国起源の集団であると考えられた。また、単為生殖型肝蛭は *F. gigantea* に比べて、ハプロタイプ多様度が低いことから、*F. gigantea* よりかなり新しくインド東部に侵入したと考えられた。一方、*F. gigantea* では、35 型のハプロタイプ (NDI-E3~NDI-E37) が識別され、これらは二つの異なるハプログループ (A, B) を形成した (図 5)。

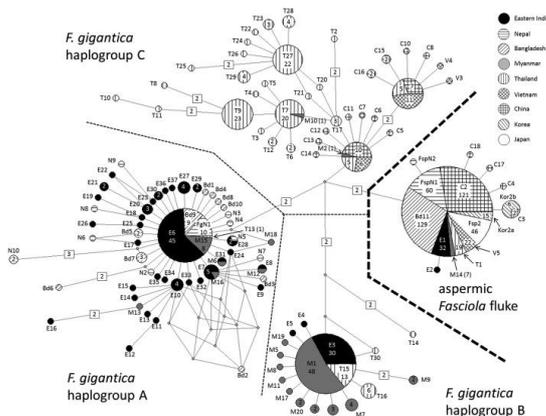


図 5 インド東部産肝蛭のM-Jネットワーク解析結果

(5) 総括

単為生殖型肝蛭は既存種である *Fasciola hepatica* および *Fasciola gigantica* が共存する中国において、その終宿主 (家畜) で両種が交雑することにより単為生殖能を獲得して誕生した雑種集団であると考えられる。単為生殖型肝蛭には *F. hepatica* を母系祖先とする Fh 系統と *F. gigantea* を母系祖先とする Fg 系統が存在し、Fh 系統は中国、韓国および日本だけに分布するが、Fg 系統はこれら 3 国に加えて、東南~南アジア (ベトナム、タイ、ミャンマー、ネパール、バングラデシ

ユ、インド東部、フィリピン) に広く分布する。中国からこれらの国々への分布拡大には家畜ウシ (品種) の人を介した移動が深く関わっていると考えられた。

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 29 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 39 件)

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.

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.

正力拓也、林慶、関(市川)まどか、中尾稔、板垣 匡. Single copy gene マーカーに基づいた *Fasciola* 属の新規識別法の確立. 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)

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)

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)

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)

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: フィ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

正力拓也, 市川まどか, 板垣 匡 (2012) ネパール産肝蛭の精子型, ITS1 型および *nad1* 型の解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会、2012.9.15, 岩手大学 (盛岡市)

市川まどか, Rast, L., 正力拓也, 板垣 匡 (2012) アジアに分布する *Fasciola gigantica* の系統関係の解明: ラオス産肝蛭の分子学的解析. 第 154 回日本獣医学会学術集会、2012.9.15, 岩手大学 (盛岡市)

Ichikawa, M., Chaichanasak, P., Bawn, S., Maw, N. N., Htun, L. L., Sobhon, P., Katakura, K. and Itagaki, T. (2011) Genetic relationship between *Fasciola* spp. in Asian countries: A molecular study of *Fasciola* flukes collected in Thailand and Myanmar. 23rd International Conference of the World

Association for the Advancement of
Veterinary Parasitology, 2011.8.11.
Argentina

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

青木美樹子 (Mikiko, Aoki)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：20302060

平成 23 年 3 月に退職したため研究分担者
から外れた。