

令和 6 年度厚生労働科学研究費補助金
 (食品の安全確保推進研究事業)
 (分担) 研究報告書

イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭の集団遺伝構造の解析

研究分担者 入江 隆夫 (宮崎大学)
 研究協力者 吉田 彩子 (宮崎大学)

研究要旨：

これまで国内に分布する肝蛭（単為生殖型肝蛭）はイノシシを好適な宿主としない集団であると考えられていたが、山口県および大分県のイノシシにおいては、成熟した肝蛭虫体が検出されることがあるという情報が寄せられた。また同地域はヒトの肝蛭症患者も多い地域とされており、分布する肝蛭に何かしらの集団的特徴があることが疑われた。そこで本研究では、大分県のイノシシ由来の肝蛭、および同県や周辺地域のシカおよびウシ由来の肝蛭について、特にミトコンドリアゲノムを指標として集団遺伝学的に解析した。

日本国内の肝蛭は *Fasciola hepatica* を母系に持つ肝蛭と *F. gigantica* を母系に持つ肝蛭の両者が存在しているとされている。本研究により、イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭は *F. hepatica* を母系に持つものの中でも、さらに特徴的な遺伝学的集団であり、大分県内ではシカとも相互伝播している可能性が示された。一方で、宮崎県のウシ等にみられた *F. gigantica* を母系に持つ肝蛭とは明らかに異なる集団であり、仮説のように地域により分布する肝蛭集団に違いがある可能性が見いだされた。また、この遺伝学的集団の構造把握には、*cox3* 領域を指標とすることが有効である可能性が示された。

イノシシからの伝播による産業動物やヒトでの肝蛭症の再興リスクを評価するためには、イノシシで成熟できる肝蛭の分布を理解することが重要だと考えられる。今後、各地の動物由来肝蛭ならびにヒト患者由来肝蛭の解析を進め、国内の肝蛭の集団構造の把握に努める予定である。

A. 研究目的

肝蛭類はヒトや家畜など幅広い哺乳類を終宿主とする。本研究室が実施してきた国内のイノシシでの調査では、高率な抗肝蛭抗体の保有状況がある一方、成熟虫体の寄生は認められなかった。そこで、イノシシ体内では肝蛭は成熟に至らないと考えてきたが、近年、大分県や山口県のイノシシにおいて肝蛭の成虫寄生が確認され、イノシシで成熟できる肝蛭の存在が明らかとなった。日本に分布する肝蛭は、*Fasciola hepatica* (Fh) および *F. gigantica* (Fg) の交雑により誕生したとされる単為生殖型肝蛭である。加えて、Fh はイノシシでも成熟することが既知であることから、大分県等に分布する肝蛭集団の中には、イノシシで成熟しうる Fh の形質を強く引き

継ぐ肝蛭がいると仮定し、大分県のイノシシおよび同地域や近隣地域の終宿主動物（シカ、ウシ）から得た肝蛭を集団遺伝学的に解析した。

B. 研究方法

2023 年 5 月から 2024 年 10 月に採取された大分県のイノシシ由来肝蛭 7 隻、シカ由来肝蛭 3 隻、宮崎県のウシ由来肝蛭 9 隻、佐賀県の牛由来肝蛭 1 隻を使用した。

まず既報 (Itagaki *et al.*, 2005) に基づき、核 DNA である Internal Transcribed Spacer 1 (*ITS1*) 領域およびミトコンドリア (mt) DNA である NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 領域の塩基配列の違いによる肝蛭の分類を行った。

次に、*nad1* 領域のハプロタイプを参考に選出した一部虫体について、次世代シーケンズ解析により mt ゲノム全長配列を解読し、祖先種である Fh、Fg を含めた系統解析を行った。また、mt ゲノムの特徴を反映する解析指標の候補として、Cytochrome *c* oxidase subunit 3 (*cox3*) 領域の有用性を評価した。

(倫理面への配慮)

該当なし

C. 研究結果

野生動物および牛の肝蛭について、既報に基づく *ITS1* 領域および *nad1* 領域を指標とした肝蛭の分類法では、地域や宿主動物種の違いによる明確な特徴は見いだせなかった。ミトコンドリアゲノムの全長解析および *cox3* 遺伝子領域の解析を行ったところ、日本の肝蛭（単為生殖型肝蛭）は Fg を母系とする集団と Fh を母系とする集団とに大きく分類され、さらに後者の中で 2 つに分かれていた。一方はイノシシ由来肝蛭が位置する集団（Fh-1 集団）であり、もう一方は他動物種（シカ、牛）由来肝蛭が位置する集団（Fh-2 集団）であった。

Fh-1 集団と Fh-2 集団の mt ゲノム全長配列間の変異率は 0.14~0.15% であり、中でも *cox3* 領域で最も高い 0.62% の変異が見られた。この *cox3* 領域では、4 つの塩基変異とそれに伴う 1 つのアミノ酸変異が認められた。そこで、*cox3* 領域の配列のみに基づく肝蛭集団の系統解析を行った結果、mt ゲノム全長を用いた系統樹に近いトポロジーを示した。これまでシカと牛とで肝蛭が相互伝播してきた可能性について報告がされており、本研究によって分類された Fh-2 集団もそれを支持するものであった。一方で、イノシシの肝蛭および同地域のシカ由来の肝蛭はそれらとは異なる集団（Fh-1 集団）を構成し、地域に特異な集団であることが示唆された。

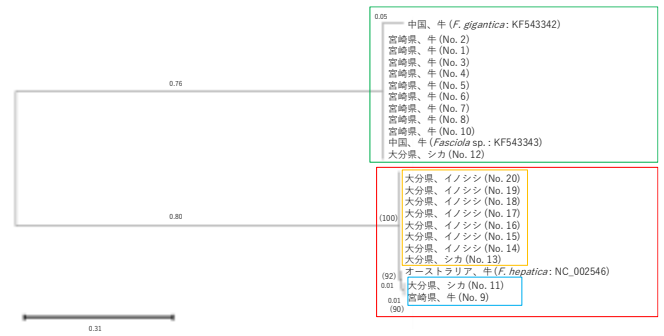


図1 肝蛭類の *cox3* 領域配列を用いた系統樹

また *cox3* 領域を用いて描いたハプロタイプネットワーク解析でも、単為生殖型肝蛭に 3 つのハプロタイプが見いだされ、1 つは起源となった Fg に近く、残りの 2 つは Fh に近しかった。特に後者について、イノシシから採取された単為生殖型肝蛭が有するハプロタイプと、牛およびシカから採取された単為生殖型肝蛭が有するハプロタイプの間、オーストラリアの牛から採取された単為生殖型肝蛭の祖先である *F. hepatica* が存在していた。

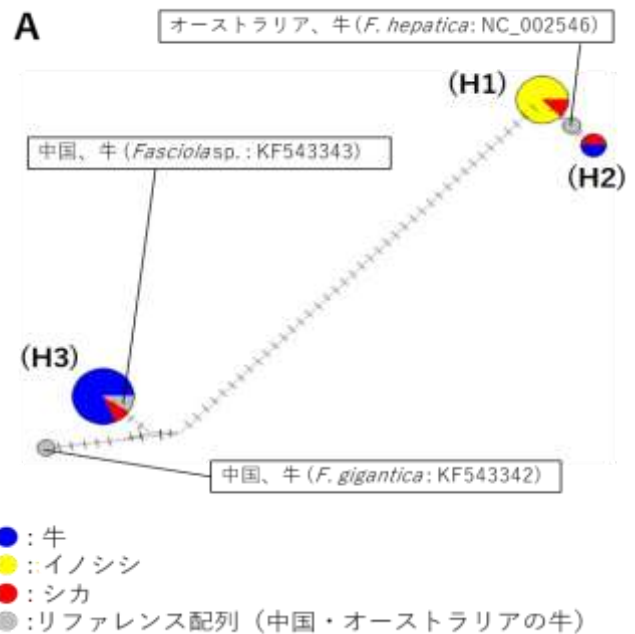


図2 肝蛭類の *cox3* 領域塩基配列のハプロタイプネットワーク図

D. 考察

イノシシで成熟できる肝蛭は特定の遺伝学的集団である可能性が考えられた。また、*cox3* 領域はイノシシで成熟できる肝蛭の属する遺伝学的集団を把握するための解析指標として、mt ゲノム全長を用いて行った遺伝学的

集団分類と同程度の有効性を持つ可能性が示唆された。

また *cox3* 領域のハプロタイプネットワーク解析も、系統解析の結果を支持するものであると考えられた。加えて、本研究で検出された Fh に近い 2 つのハプロタイプは、単為生殖型肝蛭が国内に流入してきた以前に海外で分岐し、別々に日本に侵入してきた可能性が示唆された。つまり、イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭は大分県や山口県で最近になって突発的に発生したのではなく、国内に侵入してきて以降、流行の主流とはなっていないが、継続して分布していた可能性が考えられた。

今回の調査地域とした大分県、および同様にイノシシにおいて肝蛭成虫の寄生報告がある山口県は、ヒトの肝蛭症も多い傾向がある地域とされている。現在、ヒトの患者由来の肝蛭を収集しており、ヒトの肝蛭感染がどの集団に由来するものであるかを明らかにすることで、野生動物からの肝蛭症のリスクについて検討していく予定である。

E. 結論

日本国内の肝蛭の構成としては、*F. hepatica* を母系に持つ肝蛭と *F. gigantica* を母系に持つ肝蛭が同程度国内で分散しているとされている。本研究により、イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭は *F. hepatica* を母系に持つ集団の中でもさらに特異な遺伝学的集団を構成しており、大分県内ではシカとも相互伝播している可能性が考えられた。イノシシからの伝播による肝蛭症の再興リスクを適正に評価するため、イノシシで成熟できる肝蛭の分布を把握することで、公衆衛生上ならびに産業動物防疫上、肝蛭への対策の重要地域などの評価につながると期待している。

F. 健康危機情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

1. イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭の集団遺伝構造の解析. 水野雄介、入江隆夫、水村匡伸、吉田彩子. 第 76 回 日本寄生虫学会 南日本支部大会 第 73 回 日本衛生動物学会 南日本支部大会 合同大会. 2024 年 10 月、大分.
2. イノシシで成熟できる単為生殖型肝蛭のミトコンドリアゲノム配列による集団遺伝学的解析. 水野雄介、入江隆夫、水村匡伸、吉田彩子. 第 94 回日本寄生虫学会大会. 2025 年 3 月、大阪.

3. 講演会

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし