

日本産膵蛭 (*Eurytrema pancreaticum* 及び *E. coelomaticum*) の電気泳動法による検討

井上 徹¹⁾ 吾妻 健¹⁾ 波部 重久²⁾

(昭和60年7月9日 受領)

Key words: *Eurytrema pancreaticum*, *E. coelomaticum*, electrophoresis, isozyme, genetic distance

緒 言

Eurytrema 属の *E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* は、主として虫体の大きさ、虫卵の大小、腹吸盤 / 口吸盤比などの形態学的特徴によって分類されている。しかし、上記2種の鑑別点として重視されている体長 / 体幅比や腹吸盤 / 口吸盤比は、虫体の成長に伴って変化する場合もあり、小形種の *E. coelomaticum* の中に、*E. pancreaticum* の発育途中の個体が含まれている可能性があると推察されている (Chinone and Itagaki, 1976)。一方、森山 (1982) 及び Moriyama (1982) は、核型分析、C-分染法、免疫電気泳動法によって日本産の牛寄生膵蛭を調べたところ、これらの材料が2種類に区別されることを認めると同時に、得られた結果は従来 *E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* の形態学的分類法に一致すると報告している。しかし、いずれにしても、*Eurytrema* 属吸虫の分類に関しては、現在のところなお未解決な部分が残されている。そこで我々は、牛寄生の膵蛭についてアイソザイム分析を試み、*E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* の分類学的位置や遺伝的類縁関係について検討した。アイソザイムによる分析は、原虫類や蠕虫類の分類・同定において、従来の形態や生態などの生物学的知見に加え、きわめて有用な手法の1つとなっている (Tait *et al.*, 1984, 1985; Agatsuma and Habe, 1985a, b)。

材料と方法

本研究に用いた膵蛭は福岡市の屠場の牛より採取し、

形態学的特徴に基づいて *E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* に分類した。即ち個々の牛の膵管より採取した虫体をその大小によって区別し、大形の虫体を *E. pancreaticum*、小形のものを *E. coelomaticum* とした。これらの材料については、圧平した虫体各部や虫卵の計測を行ない、大小2群の虫体が Moriyama (1982) による両種の計測値に一致することを確認した (Table 1)。

Table 1 Summarized data of the morphological characteristics of *E. pancreaticum* and *E. coelomaticum*

Characteristics	<i>E. pancreaticum</i>	<i>E. coelomaticum</i>
Body size (mm)*		
Length	1.40-16.4	8.6-10.4
$\bar{x} \pm SD$	(15.0 \pm 0.3)	(9.5 \pm 0.2)
Width	7.2-9.3	5.3-6.9
$\bar{x} \pm SD$	(8.4 \pm 0.3)	(5.8 \pm 0.2)
Ratio of size of ventral/oral sucker*		
Length	0.58-0.70	0.80-1.02
$\bar{x} \pm SD$	(0.64 \pm 0.0006)	(0.92 \pm 0.0019)
Width	0.59-0.68	0.84-0.94
$\bar{x} \pm SD$	(0.62 \pm 0.0003)	(0.89 \pm 0.0003)
Egg size (μ m)#		
Length	41.6-54.4	40.6-52.4
$\bar{x} \pm SD$	(47.0 \pm 0.6)	(45.1 \pm 0.7)
Width	27.6-33.6	28.0-37.6
$\bar{x} \pm SD$	(30.2 \pm 0.5)	(30.4 \pm 0.5)

* n=7 for each species.

n=100 for each species, which are derived from 5 adults equally.

¹⁾ 高知医科大学寄生虫学教室

²⁾ 福岡大学医学部寄生虫学教室

Table 2 Enzymes examined and their electrophoretic systems, and the number of individuals surveyed for *E. pancreaticum* and *E. coelomaticum*

Enzymes	Abbreviation	Enzyme Commission No.	Fluke number examined for each species	Electrophoretic [#] systems used
1. Alkaline phosphatase	ALP	E C 3.1.3.1	35	Poulik
2. Esterase	EST	E C 3.1.1.1	33	Poulik
3. Glucosephosphate isomerase	GPI	E C 5.3.1.9	29*, 44**	S18
4. Glucose-6-phosphate dehydrogenase	G6PD	E C 1.1.1.49	30	FWL
5. Glutamic pyruvate transaminase	GPT	E C 2.6.1.2	30	FWL
6. Hexokinase	HK	E C 2.7.1.1	55	S1
7. Lactate dehydrogenase	LDH	E C 1.1.1.27	75	S1
8. Leucine aminopeptidase	LAP	E C 3.4.1.1	53	Poulik
9. Leucylglycylglycine aminopeptidase	LGG	E C 3.4.1.3	71	Poulik
10. NADH-diaphorase	DIA	E C 1.6.2.2	56	Poulik
11. Phosphoglucomutase	PGM	E C 2.7.5.1	45*, 44**	S18
12. 6-phosphogluconate dehydrogenase	6PGD	E C 1.1.1.44	30	S1
13. Tetrazolium oxidase	TO	E C 1.15.1.1	29	FWL

*: *E. pancreaticum* **: *E. coelomaticum* # See Shaw and Prasad (1970).

各虫体は1個体ずつ pH 6.9, 0.1 M リン酸緩衝液 100 μ l 中でホモジナイズし, 3,000 rpm で3分間遠沈したのち, 得られた上清をデンブングル電気泳動法に供した. 調べた酵素は両者ともに13種類であり (Table 2), 電気泳動法及び酵素の染色方法は Shaw and Prasad (1970) 及び Agatsuma and Suzuki (1981) に従った. LGG については, 基質として Leucylglycylglycine, Glycylglycine, Leucyltyrosine の3種類を用いて, 酵素活性の基質特異性を調べた.

検出されたバンドについては, 従来の方法に従い遺伝的な解釈を与えた. また, それぞれの酵素を支配していると考えられる遺伝子座の名称は, その酵素名の略符をイタリックで記した. 遺伝子座が複数存在すると考えられるとき, 移動度の遅い順に番号を付した. 各遺伝子座の対立遺伝子は, 移動度の遅い方から a, b, c, ... と記した. またバンドの遺伝的解釈が困難なとき, 移動度の遅い順に A, B, C, ... として表現型のみを示した.

結 果

調べた13酵素のうち, GPT, G6PD, 6PGD の3酵素では明瞭なバンドが得られなかったため, 10酵素 (ALP, DIA, EST, GPI, HK, LAP, LDH, LGG, PGM, TO) について, 種内および種間の比較解析を行なった.

1. 両種内にみられる酵素多型

GPI と PGM を除いた8酵素で, 両種とも個体間の変異がまったくみられず, いわゆる monomorphism の状態であった (Fig. 1).

バンドパターンから, ALP, DIA, HK, LAP, LDH, TO の6酵素は両種とも単一遺伝子座により支配されていると考えられた. また LGG は3つの部位に活性帯があらわれ, それぞれ独立の遺伝子座に支配されていると考えられた. すなわち, 基質 leucylglycylglycine に対しては3つのすべての活性帯 (LGG-1, -2, -3) で強い活性がみられたが, 他の基質 glycylglycine では LGG-2 及び LGG-3 の2つの部位で活性が強く, LGG-1 には活性がみられなかった. また別の基質, leucyltyrosine では, 3つの活性帯部位とも活性がみられなかった. このことはこれらの3つの活性帯には, 3遺伝子座が関与していると解釈できる. EST も泳動パターンから, 2つの遺伝子座に支配されていると考えられた (Fig. 1).

一方, GPI は *E. pancreaticum* のみ, PGM は両種とも多型的であった (Fig. 1). Table 3 は, PGM の遺伝子型頻度および遺伝子頻度を示すが, χ^2 検定によって Hardy-Weinberg の法則に従っていることがわかった. また *E. pancreaticum* の GPI については, 遺伝的解釈が困難であったので (Fig. 1), 今回の調査では3つの表現型が存在すると解釈するにとどめた.

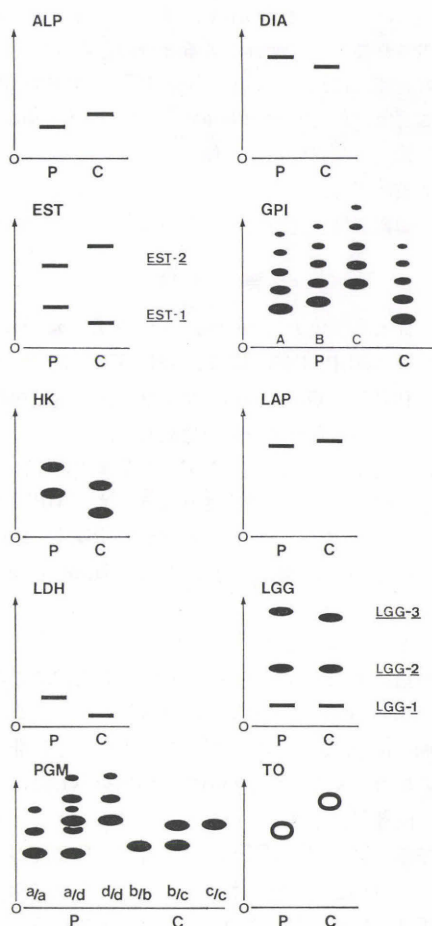


Fig. 1 Electrophoretic patterns of ten enzymes in *Eurytrema pancreaticum* and *E. coelomaticum*. P: *E. pancreaticum* C: *E. coelomaticum*. For the other abbreviations see text and Table 2 & 3.

2. 両種間の泳動パターンの比較

両種間を比較すると、LGGの2つの遺伝子座(LGG-1, LGG-2)を除いた全ての11遺伝子座で、酵素の移動度に違いがみられ、両者は異なった対立遺伝子に固定していることがわかった。なお、PGMとGPIは多型的であるが、共通した対立遺伝子は両種の間で観察されなかった。

考 察

1. 観察されたアイソザイムバンドの遺伝的解釈

肺蛭は、実験室内での交配が困難なために、アイソザイムの遺伝的な制御について直接証明することは今のと

Table 3 Presumptive genotype and allele frequencies at PGM locus in both of *E. pancreaticum* and *E. coelomaticum*, and phenotype frequencies of GPI in *E. pancreaticum*

	<i>E. pancreaticum</i>	<i>E. coelomaticum</i>
PGM genotypes		
a/a	28 (26.5)**	
a/d	13 (16.1)	
b/b		29 (29.4)**
b/c		14 (13.1)
c/c		1 (1.5)
d/d	4 (2.4)	
Total	45	44
Allele frequencies at PGM locus		
a	0.767	
b		0.818
c		0.182
d	0.233	
GPI phenotypes		
A	4 (14.0%)	
B	22 (76.0%)	
C	3 (10.0%)	
Total	29	

*: $X^2=1.748$ ($0.1 < P < 0.2$).

** : $X^2=0.234$ ($0.5 < P < 0.7$).

*: Number in parenthesis indicates expected number calculated on the basis of the Hardy-Weinberg law.

ころできないが、両種の PGM において遺伝子型頻度が Hardy-Weinberg の法則に従っていることは、今回仮定した遺伝解釈が妥当なものであることを、間接的に裏付けるものである。また肺吸虫類では、Agatsuma and Habe (1985c) は GOT アイソザイムをマーカーとして交配実験を行ない、アイソザイムが単純なメンデル遺伝に従うことを証明している。このことから、寄生虫類においても非寄生性の種と同様のアイソザイムの遺伝的制御があると考えると矛盾のないものと思われる。

一方、*E. pancreaticum* の GPI において複数のバンドが得られ、かつホモ、ヘテロの判別がきわめて困難であったため、今回は表現型の記載のみにとどめた。しかし、GPI は他の寄生虫、たとえばアニサキスや肺吸虫では明瞭な 2 量体パターンを示すので (Agatsuma, 1981a;

1982), 膵蛭のもつこのような泳動パターンはきわめて特徴的といえよう。

2. 兩種内の遺伝的変異性

遺伝的変異の尺度として、多型的遺伝子座の割合 P (調査した全遺伝子座中に占める多型的遺伝子座の割合) 及び平均ヘテロ接合体率 H (各遺伝子座におけるヘテロ接合体率の平均) を求めてみると、*E. pancreaticum* では、

$$P=2/13=0.154 \quad (15.4\%)$$

$$H=0.289/12=0.024 \quad (2.4\%)$$

E. coelomaticum では、

$$P=1/13=0.077 \quad (7.7\%)$$

$$H=0.318/12=0.027 \quad (2.7\%)$$

であった。ただし、 GPI は P の計算では含めたが、 H では省いた。昆虫類、貝類、哺乳類などの非寄生性生物では、平均して P は約30%、 H は約10%という値が得られているが、今回得られた膵蛭の値は、それに比べてきわめて低いものといえる。なお、大平肺吸虫においても同様に、低い P 値や H 値が得られており (Agatsuma and Habe, 1985b), 寄生虫種集団のもつこのような傾向については、今後とも他の寄生虫類も含めて、総合的な検討を加えていく必要がある。

3. 兩種間の遺伝的距離

種間の遺伝的な相異を量的に表す示標としての Nei (1972) の遺伝的距離 D は、

$$D = -\log_e I$$

$$I = J_{XY} / J_X J_Y$$

の式によって与えられるが、この式は2集団で1遺伝子座あたり同一でない遺伝子が平均していくつあるかを見積もった最小値である。 J_X , J_Y , J_{XY} は、 j 番目の遺伝子座に存在する i 番目の対立遺伝子頻度を集団 X で x_{ij} , 集団 Y で y_{ij} とするとそれぞれ、

$$J_X = \sum_j \sum_i (x_{ij})^2 / r$$

$$J_Y = \sum_j \sum_i (y_{ij})^2 / r$$

$$J_{XY} = \sum_j \sum_i x_{ij} y_{ij} / r$$

で与えられる。 r は調べた遺伝子座数とする。これより求めた兩種間の遺伝的距離は、

$$D = -\log_e 0.154 = 1.871$$

であった。Nei の遺伝的距離は多くの生物分類群において報告されており、それによると今回得られた値は種間の値の範囲内に入っている (Nei, 1972; Avise, 1975)。このことは、*E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* が互いに独立したやや遠縁の種であると考えられ、本研究の実験条件下では、その違いは従来より記載されている形態学的類似性に比べて、大きいといえる。

要 約

1. 日本産膵蛭 *E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* の10酵素 (ALP, DIA, EST, GPI, HK, LAP, LDH, LGG, PGM, TO) についてデンプンゲル電気泳動法を用い、両者の泳動パターンを比較した。

2. 種内変異は GPI と PGM の2酵素のみに観察され、他の8酵素には観察されなかった。GPI は *E. pancreaticum* でのみ多型を示したが、PGM では兩種とも多型的で、それらの遺伝子型頻度は Hardy-Weinberg の法則に従っていた。

3. この種内の遺伝的変異性の尺度として多型的遺伝子座の割合 P と平均ヘテロ接合体率 H を求めてみると *E. pancreaticum* では、 $P=0.154$, $H=0.024$, *E. coelomaticum* では、 $P=0.077$, $H=0.027$ と、非寄生性生物の場合にくらべてきわめて低い値を示した。

4. 兩種間の泳動パターンを比較すると、LGG の2遺伝子座 (*LGG-1*, *LGG-2*) のみ酵素の移動度が一致した。他の11遺伝子座では、兩種間で移動度に相異があり、兩種は異なった対立遺伝子に固定していることがわかった。

5. 兩種間の遺伝的相異を量的に表す示標として、Nei の遺伝的距離 D を求めると、 $D=1.871$ であり、種間値に十分に相当することがわかった。これより *E. pancreaticum* と *E. coelomaticum* は互いに独立したやや遠縁の種であると考えられ、両者の形態学的類似性にくらべて、相異が大きいことを示す結果が得られた。

謝 辞

稿を終るにあたり、本研究に対し懇切な御指導と御校閲を賜った高知医科大学 寄生虫学教室 鈴木了司教授、および橋口義久助教授に深謝いたします。また種々の御協力をいただきました当教室の今村京子技官に感謝いたします。

文 献

- 1) Agatsuma, T. (1981a): Electrophoretic

- demonstration of polymorphism of glucosephosphate isomerase in natural populations of *Paragonimus miyazakii*. J. Parasit., 67, 452-454.
- 2) Agatsuma, T. (1982): Electrophoretic studies on glucosephosphate isomerase and phosphoglucomutase in two types of *Anisakis* larvae. Int. J. Parasit., 12, 35-39.
 - 3) Agatsuma, T. and Habe, S. (1985a): Isozyme study of diploid and triploid *Paragonimus westermani* by starch gel electrophoresis. Parasitology, 91, 489-497.
 - 4) Agatsuma, T. and Habe, S. (1985b): Genetic variability and differentiation of natural populations in three lung flukes, *Paragonimus ohirai*, *P. iloktsuenensis* and *P. sadoensis*. J. Parasit., (in press)
 - 5) Agatsuma, T. and Habe, S. (1985c): The inheritance of enzyme variants of glutamic-oxaloacetic transaminase in *Paragonimus ohirai*. Parasitology, 91, 483-488.
 - 6) Agatsuma, T. and Suzuki, N. (1981): Electrophoretic studies on enzymes in *Paragonimus* spp. I. Comparison of isozyme patterns between *P. ohirai* and *P. miyazakii*. Jpn. J. Parasit., 30, 37-43.
 - 7) Avise, J.C. (1975): Systematic value of electrophoretic data. Syst. Zool., 23, 465-481.
 - 8) Chinone, S. and Itagaki, H. (1976): Development of *Eurytrema pancreaticum* (Trematoda). II. Development in definitive hosts. Bull. Azabu Vet. Coll., 1, 73-81.
 - 9) 森山信子 (1982): 本邦産の牛に寄生する肺蛭の種の異同に関する研究. 寄生虫誌, 31, 67-79.
 - 10) Moriyama, N. (1982): Karyological studies of bovine pancreatic flukes (*Eurytrema* sp.) and their phenotypes. J. Parasit., 68, 898-904.
 - 11) Nei, M. (1972): Genetic distance between populations. Amer. Nat., 106, 283-292.
 - 12) Shaw, C.R. and Prasad, R. (1970): Starch gel electrophoresis of enzymes—A compilation of recipes. Biochem. Genet., 4, 297-320.
 - 13) Tait, A., Babiker, E. A. and Le Ray, D. (1984): Enzyme variation in *Trypanosoma brucei* spp. I. Evidence for the sub-speciation of *Trypanosoma brucei gambiense*. Parasitology, 89, 311-326.
 - 14) Tait, A., Barry, J. D., Wink, R. and Sanderson, A. (1985): Enzyme variation in *T. brucei* spp. II. Evidence for *T. b. rhodesiense* being a set of variants of *T. b. brucei*. Parasitology, 90, 89-100.

Abstract

ELECTROPHORETIC STUDIES ON ISOZYMES OF TWO JAPANESE FLUKES,
EURYTREMA PANCREATICUM AND *E. COELOMATICUM*

TETSU INOUE¹⁾, TAKESHI AGATSUMA¹⁾ AND SHIGEHISA HABE²⁾

¹⁾Department of Parasitology, Kochi Medical School, Oko-cho, Nankoku City 781-51, Japan;

²⁾Department of Parasitology, School of Medicine, Fukuoka University, Fukuoka 814-01, Japan)

Electrophoretic studies using the starch gel were carried out on ten enzymes (ALP, DIA, EST, GPI, HK, LAP, LDH, LGG, PGM and TO) in two Japanese pancreatic flukes, *Eurytrema pancreaticum* and *E. coelomaticum*. The two species were sampled from cattle of a slaughter house in Fukuoka, Japan, and were classified according to their body sizes, the ratios of sizes of ventral/oral sucker, and the egg sizes. The values measured for each fluke accorded with those of the previous studies (Moriyama, 1982).

Out of 10 enzymes studied, two enzymes, GPI and PGM, showed intraspecific variation: GPI was polymorphic in *E. pancreaticum*, and PGM, polymorphic in both species. PGM phenotypic frequencies were in agreement with the expected ones from the Hardy-Weinberg principle in each species. On the other hand, there was no intra-specific variation in the remaining 8 enzymes of both species. The proportion of polymorphic loci (P) and average heterozygosity (H) were 0.154 and 0.024 for *E. pancreaticum*, and 0.077 and 0.027 for *E. coelomaticum*, respectively. These values were much lower than those of free-living organisms, such as *Drosophila*. To assess the genetic difference between the two species, Nei's genetic distance (1972) was calculated: the value was 1.871 which means that they are much more remote genetically than expected morphologically.