

日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) の核型とその表現型

森山 信子† 辻 守 康† 瀬 戸 武 司§

(昭和53年8月25日 受領)

緒 言

日本産肝蛭の分類に関しては、東 (1956), Itagaki and Akane (1959), 大島ら (1968), 渡辺・上野 (1960), 大塚 (1960) など多くの研究がある。研究者によつて若干異なるが、現在までのところ成虫の形態、精巢の形態、睾丸末端の位置、排泄管・排泄孔の形、虫卵の大きさなどから、日本産肝蛭は *Fasciola gigantica*, *F. hepatica*, *F. indica* の3種のうちのいずれかのタイプに属するものと、これらの中間型が存在することが認められている。しかし、いまなお分類学上多くの疑問点を残したままである。従つて日本産肝蛭の形態学的な知見に加えて細胞学的究明をすることは分類学上の多様性を吟味するのに望まれるところである。

日本産肝蛭の細胞学的な研究としては、Sakaguchi and Nakagawa (1975) および Sakaguchi and Yoneda (1976) が肝蛭の精巢細胞の染色体を観察して、基本数を10とする $2n=20$ と $3n=30$ の個体が存在することを報告している。著者らは更に詳細な核型の検討が必要であると考え、多数個体の核型の検討を行なうと同時に、近年ヒトや他の哺乳類の個々の染色体の識別にしばしば用いられる染色体分染法を初めて肝蛭の染色体の分析に適用することを試みた。さらに核型に対比させて表現型の差異を検討するために、一つの形質として虫卵に着目し、その大きさの比較検討も行なつた。これらの結果は従来問題とされている日本産肝蛭の分類学上の位置に関する問題はもちろんであるが、*Fasciola* 属の類縁関係を考える上でも一つの資料となり得るものと考えられる。

材料と方法

材料は広島市食肉検査所で1975年から1977年の間に採集した牛寄生肝蛭の生殖腺を用いた。牛胆管より取り出した虫体は0.9%生理食塩水中に入れたまま研究室に持ち帰り以下の如き処理を施した。染色体標本作製法はおもに Wroblewska (1969) の乳酸エアドライ法を用いた。即ち採取した肝蛭は各個体別に生理食塩水中ですぐに卵巢・精巢部分を切り出し、そのまま組織培養培地 TC 199 (Difco 社製) の中で37C 2時間コルセミド処理 (0.2mcg/ml) をし、1%クエン酸ソーダで低調処理を30分間行ない、カルノア氏液 (酢酸1:メチルアルコール3) で固定した。固定材料を50%乳酸1:酢酸3の混液中で細切し、細胞浮遊液をスライドガラス上におき、その上にカルノア氏液を滴下して細胞を拡散させ自然乾燥した。染色はギムザ液で行なつた。その他の標本作製法としては、Rothfels and Siminovitch (1958) のエアドライ法と Makino and Nishimura (1952) の水処理押しつぶし法を併用した。染色体の類別は Levan *et al.* (1964) の方法に準じて行なつた。

分染法は染色体の動原体部位に局在する構成的異質染色質 constitutive heterochromatin を特異的に染色するいわゆる C-染色法、および染色体腕の全長にわたつて個々の染色体に特徴的な縞模様を生じさせる G-染色法の二法を用いた。即ち、(1) C-バンドの検出にはプレパラートを0.2N 塩酸溶液と50C 加温5%水酸化バリウム (8水塩) 溶液でそれぞれ処理をした後、60C 加温2×SSC (0.03M クエン酸ソーダを含む0.3M 塩化ナトリウム溶液) で1時間前処理を加え、10%ギムザ染色液 (Gurr R 66; pH=6.8 in phosphate buffer) で1

† 広島大学医学部寄生虫学教室

§ 島根大学教育学部生物学教室

Table 1 Quantitative characteristics of *Fasciola* sp. (Japanese type)
based on measurements of the gonadal cell chromosomes

Chromosome Pair No.	1) Relative length		2) Arm ratio		3) Centromere position
	2n=20	3n=30	2n=20	3n=30	
1	20.13	19.10	1.74	1.71	sm
2	13.35	12.74	5.69	5.95	st
3	13.27	12.24	22.24	22.92	t
4	10.32	10.79	4.21	5.39	st
5	10.42	10.62	4.11	3.24	st
6	7.91	7.97	5.48	4.82	st
7	6.77	7.18	3.05	2.83	sm or st
8	6.49	6.20	4.04	6.13	st
9	5.99	6.04	2.95	3.81	st or sm
10	5.62	5.65	2.05	2.18	sm

1) Relative length=length of each chromosome/total length of whole chromosomes.

2) Arm ratio=length of long arm/length of short arm.

3) Centromere position according to the quantitative definitions of Levan *et al.* (1964).

時間染色を行なう Sumner (1972) の BSG 法を用いた。(2) G-バンドの検出には0.025%トリプシン溶液で前処理を行なった後ギムザ染色をする Wang and Fedoroff (1972) の方法で行なった。

また虫卵の計測は1個体につき20~30個ずつの子宮内成熟卵を採り、35個体分について固定せずにその長径および短径を接眼マイクロメーターで測定し、標本平均値と標準偏差値を求めた。

成 績

1. 日本産肝蛭の核型

今回行なった染色体観察の結果、Photo. 1 および Photo. 2 にみられる如く日本産肝蛭は染色体数20の個体と30の個体の両型があることが確認された(以下便宜的にそれぞれ2n=20, 3n=30と記す)。これら両個体にはいかなる時期においても減数分裂像はみとめられず、生殖腺細胞の体細胞分裂の染色体のみが分析可能であった。2n=20の細胞の染色体構成は大きさの上から大型(No. 1), 中型(Nos. 2~5), 小型(Nos. 6~10)に分けられ更に紡錘糸付着点の位置から次のように識別できる。すなわち1対の大型次中部着糸型(sm), 3対の中型次端部着糸型(st), 1対の中型端部着糸型(t), 3対の小型次端部着糸型および2対の小型次中部着糸型からなる。3n=30の個体の染色体構成でも同様な類別がなされ、2n=20の10対がそのまま3本ずつの相同対になっている。これらの10対を大きさの順にNo. 1から

No. 10までの番号を付し、それぞれ染色体の相対的な長さや染色体腕の比を求めたのがTable 1である。このうちNo. 5の染色体対は両型ともサテライト染色体である。

以上の結果から日本産肝蛭には体細胞の染色体数が20と30をもつ個体があり、それぞれ基本数を10とする二倍体と三倍体であろうと考えられた。以下、二倍性個体、三倍性個体と呼ぶことにする。

2. 分染法による核型の比較

二倍性個体と三倍性個体の核型を構成する染色体の間で本質的な差を有するか否かを検討するためになされた染色体の分染の結果、構成的異質染色質を特異的に染色するいわゆるC-染色法では核型を構成する殆んどどの染色体の動原体周辺にC-バンドが現われた。しかしC-バンドの大きさ、出現部位、濃淡は各染色体対によつて差異があり、特にNo. 2, No. 7, No. 8の染色体には大きくて濃いスポットが認められた(Photo. 3)。これら染色体を核型分析し各相同対間のC-バンドを比較してみると、二倍性と三倍性の染色体のバンドパターンには明らかに同型性が認められた。また三倍性個体の個々の染色体に於けるバンドパターンは3本の相同対相互に同じパターンが認められた。

G-染色法による分染では、染色体を縦軸方向に識別できる程度の濃淡の縞模様は染色体腕に出現した。C-染色法と同様G-染色法のバンドパターンにも二倍性と三倍性個体における核型の間で同型性が認められ、三倍性

個体では3本ずつの染色体相互に同じバンドパターンが現われ、相同対であることを示している(Photos. 4, 5). 以上の結果から先に記した $2n=20$, $3n=30$ の個体は、それぞれ基本数を10とする正二倍体、正三倍体であり同質のゲノム構成であることが確認された。

3. モザイクの存在と共存性

今回の肝蛭の染色体観察によつて、従来から知られていた二倍性と三倍性個体のほかにモザイク個体と考えられる個体の存在を見出した。すなわち同一虫体内に二倍性および三倍性の細胞が混在しているのが観察された。モザイク個体中の二倍性の細胞の核型分析を行なうと完全に二倍性個体の染色体構成と一致し、三倍性細胞は三倍性個体のそれと一致する。

また二倍性個体と三倍性個体およびモザイク個体には生息場所の隔離があるか否かを調べるため、肝蛭を宿主である牛の個体別に分け、各群の染色体を検査したところ、同一宿主内に二倍性個体と三倍性個体の共存、および三倍性個体とモザイク個体の共存があることが認めら

Table 2 Appearance of three types of *Fasciola* sp. in different host bovines

No. of hosts	Type of <i>Fasciola</i> sp. (ind.)		
	$2n=20$	$3n=30$	$2n/3n$ mosaic
1	0	2	0
2	1	2	0
3	0	8	1
4	3	9	0
5	2	6	0
6	0	5	3
7	0	3	0
8	1	1	0
9	0	6	0
10	0	7	0
11	0	19	3
12	0	10	0
13	0	7	0
14	13	0	0
15	0	4	0
16	0	1	0
17	2	6	0
18	0	3	1
	22 (17.1%)	99 (76.7%)	8 (6.2%)
Total 129 individuals			

れた (Table 2). これら3型の肝蛭が宿主より見出される頻度は三倍性個体で129個体中99個体(76.7%), 二倍性個体で22個体(17.1%), モザイク個体で8個体(6.2%)であった。

4. 表現型としての虫卵の大きさと核型

Fasciola 属の分類上の重要な根拠となつている形質の一つに虫卵の大きさがある。肝蛭卵の大きさに差異があることに注目して、これが核型の差異と併行するか否かを検討した。その結果三倍性個体は大型の虫卵をもち、長径 $142.7\sim 195.1\mu$ ($168.4\pm 9.4\mu$), 短径 $74.7\sim 114.5\mu$ ($92.2\pm 8.1\mu$) の計測値を示した。これに対して二倍性個体の虫卵は明らかに小さな虫卵で長径 $126.2\sim 171.8\mu$ ($145.4\pm 7.3\mu$), 短径 $63.1\sim 104.8\mu$ ($88.5\pm 7.1\mu$) であつた。またモザイク個体の虫卵は長径 $156.3\sim 191.2\mu$ ($172.8\pm 9.76\mu$), 短径 $77.6\sim 99.0\mu$ ($91.35\pm 4.83\mu$) であり三倍性個体の虫卵に近い傾向が認められた (Fig. 1)。

以上の結果から表現型としての虫卵の大きさと核型の変異の間には関連性が認められ、大型虫卵をもつ肝蛭は染色体数が30の三倍性個体、小型虫卵をもつ肝蛭は染色体数が20の二倍性個体であることが判明した。

考 察

肝蛭の染色体に関する研究は古くより多くの研究者によりなされている。Sanderson (1953) は *F. hepatica* の染色体数が $2n=20$ であるとし、また Venkat-Reddy and Subramanyan (1973) は *F. gigantica* の染色体数が $2n=20$ であつたと報告している。最近では坂口・上野 (1977, 1978) がエアドライ法を用いてオーストラリア産肝蛭 *F. hepatica* および英国産肝蛭 *F. hepatica* の核型分析を行ない、染色体数は $n=10$, $2n=20$ で核型は大型の m 染色体1対、中型の st 染色体5対、小型の sm 染色体4対から構成されていることを報告している。

一方、日本産肝蛭の細胞学的な研究としては、Sakaguchi and Nakagawa (1975), Sakaguchi and Yoneda (1976) が基本数を10とする $2n=20$ と $3n=30$ の2型の存在することを明らかにし、その核型分析は $2n=20$ では大型の sm 1対、中型の st 5対、小型の sm 3対と小型の st 1対からなり、 $3n=30$ で大型の sm 1対、中型の st 2対、中型の sm 3対、小型の sm 4対から成ると報告した。今回のわれわれの観察では、坂口らの示した成績、すなわち二倍性個体 $2n=20$ と三倍性個体 $3n=30$ の2型に加えて、同一虫体内に二倍性細胞と

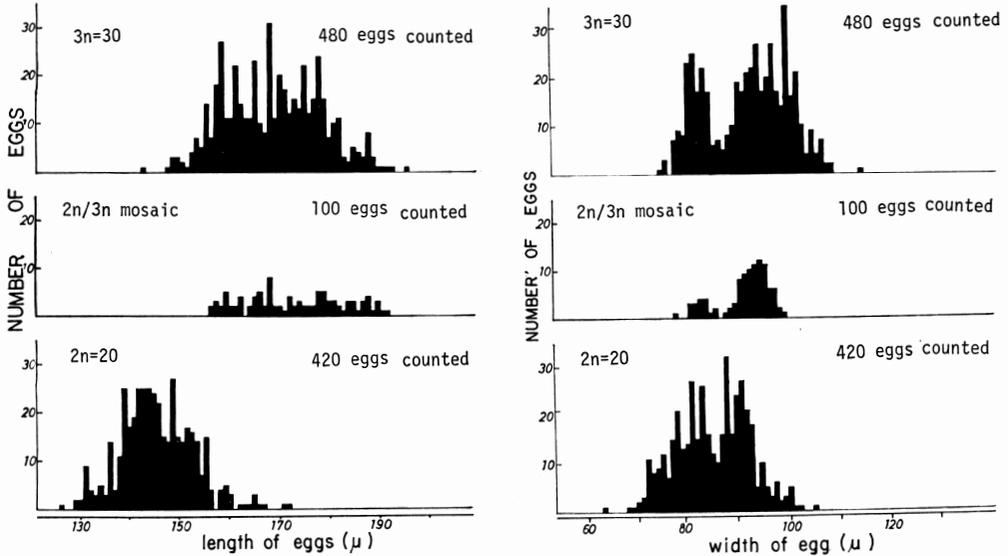


Fig. 1 Comparative size of eggs among three types of *Fasciola* sp. (Japanese type).
left=length, right=width.

三倍性細胞を併せ持ついわゆるモザイク個体の存在も見出された。二倍性個体の核型構成は Sakaguchi *et al.* の報告とはわずかに異なり、1対の大型の sm, 中型の3対の st と1対の t, 小型の3対の st と2対の sm からなっており、三倍性個体は核型が二倍性個体の10対がそのまま3本ずつの組合せになつている。モザイク個体では二倍性細胞はそのまま二倍性個体の核型と、三倍性細胞は三倍性個体の核型と一致している。

染色体分染法による核型分析では C-バンド、G-バンドの出現様式がともに二倍性個体と三倍性個体との間で同型性が認められた。すなわち三倍性個体の個々の染色体におけるバンドパターンは二倍性個体のそれと同一でトリソミックな状態、つまり相同染色体が各3本ずつ現われる正三倍性の特徴を示すことが明らかになった。以上の観察結果から日本産肝蛭の染色体は基本数を10とする倍数性を示すという坂口らの推定を裏付けると共に、二倍性個体群と三倍性個体群が同質のゲノムを保有する可能性が強いと解釈することができる。またモザイク個体の存在、二倍性個体と三倍性個体の核型の同質性などから考えると、両個体群は少くとも同一の species complex 内にあると考えるのが妥当であると思われる。またモザイク個体の存在の意義は日本産肝蛭の細胞学的な研究を進める上で今後追求してゆくべき問題として残されている。

また坂口・上野 (1977, 1978) が観察したオーストラ

リア産、英国産の *F. hepatica* の核型と比較すると、染色体数はともに $2n=20$ であるが、我々の観察した日本産 *Fasciola* sp. の核型と比較すると、一部の染色体に形態的な違いのあることが指摘でき、全く同一の核型を有するとは言えない。しかしゲノムの相違を結論づけるには、上記の種についても分染法による検討が必要である。

虫卵の大きさに関しては、渡辺 (1964) が *F. hepatica* の虫卵の大きさは $112.0 \sim 157.6 \times 59.8 \sim 85.8 \mu$ 、*F. gigantica* では $147.0 \sim 183.8 \times 78.5 \sim 105.0 \mu$ というデータを報告している如く、従来 *Fasciola* 属の分類形態の一つとして重視されている。しかし一方では日本産肝蛭卵には *F. gigantica* タイプの大型虫卵から *F. hepatica* タイプの小型虫卵までの幅広い変異がみとめられるという報告も多い (Itagaki and Akane, 1959; 大塚, 1960; 渡辺・上野, 1960; 大島ら, 1968)。また赤羽・大島 (1976) は家兎への感染実験の結果から大型虫卵 (長径平均 170.6μ , 短径平均 94.6μ) をもつ系統と小型虫卵 (長径平均 154.3μ , 短径平均 82.0μ) をもつ系統の形質は遺伝すると報告している。

今回我々の観察では三倍性個体は大型虫卵 (長径平均 168.4μ , 短径平均 92.2μ) を持ち、二倍性個体は小型虫卵 (長径平均 145.4μ , 短径平均 84.5μ) をもつという成績が得られ、倍数性の差異と虫卵の大きさの差異が相対応しているという結果は日本産肝蛭の分類学上の問題を

考える上で興味深い問題であると思われる。

結 論

1. 日本産肝蛭には基本数を10とし染色体数が20の二倍性個体と染色体数が30の三倍性個体のあることが知られていたが、今回の研究からこの両型の他に二種類の細胞を同一虫体内に持つモザイク個体 $2n/3n$ の存在が見い出された。

2. 上記3型の出現頻度は三倍性個体が76.7%、二倍性個体が17.1%、モザイク個体が6.2%であった。この3型には生息的な隔離がなく同一宿主内に二倍性個体と三倍性個体および三倍性個体とモザイク個体が共存しているものがあることを認めた。

3. 二倍性個体と三倍性個体の核型をより詳細に比較するため、分染処理により肝蛭の染色体の核型分析を試みた。用いた分染法はC-染色法とG-染色法である。C-バンド、G-バンドの出現様式からみて両型には明らかな相同対間の同型性がみとめられ、同質のゲノムを保有する可能性があること、および三倍性個体では相同染色体相互に同じバンドパターンが認められることから正三倍性を示すことが明らかになった。

4. 染色体数に併せて *Fasciola* 属分類の重要な形質の一つである虫卵の大きさを測定してみると、三倍性個体は大型虫卵(平均 $168.4 \times 92.2 \mu$)を持ち、二倍性個体は小型虫卵(平均 $145.4 \times 84.5 \mu$)を持つこと、さらにモザイク個体では三倍性個体の虫卵に似た大型虫卵(平均 $172.8 \times 91.3 \mu$)を持つことがわかった。

謝 辞

稿を終るにあたり、標本作製法について貴重なる助言をいただいた広島大学原爆放射能医学研究所鎌田七男助教授に感謝の意を表すると共に、材料採集に御協力いただいた広島市食肉検査所職員の方々および研究に御協力いただいた教室員各位に厚く御礼申し上げます。

参 考 文 献

- 1) 赤羽啓栄・大島智夫(1976) : 日本産肝蛭の変異に関する研究, 第5報, 虫卵の大きさの遺伝性. 寄生虫誌, 25, 231-239.
- 2) 東 胤弘(1956) : 日本産肝蛭の鑑別について. 日獣誌, 18, 第41回日獣学会記事, 62.
- 3) Itagaki, H. and Akane, S. (1959) : Morphological study on the Japanese liver fluke, compared with the African specimens. Bull. Azabu Vet. Coll., 6, 115-123.

- 4) Levan, A., Fredga, K. and Sandberg, A. A. (1964) : Nomenclature for centromeric position on chromosomes. Hereditas, 52, 201-220.
- 5) Makino, S. and Nishimura, I. (1952) : Water-pretreatment squash technique. A new and simple practical method for the chromosome study of animals. Stain Techn., 27, 1-7.
- 6) 大島智夫・赤羽啓栄・嶋津 武(1968) : 日本産肝蛭の変異に関する研究, 第1報, 肝蛭外部形態及び虫卵の変異. 寄生虫誌, 17, 97-105.
- 7) 大塚睦夫(1960) : 群馬県下の畜畜に感染せる肝蛭の虫体及び寄生状況に関する研究. 獣医畜産新報, 282, 6-11.
- 8) Rothfels, K. H. and Siminovitch, L. (1958) : An air-drying technique for flattening chromosomes in mammalian cells grown *in vitro*. Stain Techn., 33, 73-77.
- 9) Sakaguchi, Y. and Nakagawa, C. (1975) : A note on the chromosomes of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) from Japan. Chromosome Information Service, 19, 20-21.
- 10) Sakaguchi, Y. and Yoneda, W. (1976) : A further chromosome study of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan. Chromosome Information Service, 20, 25-26.
- 11) 坂口祐二・上野 計(1977) : 寄生蠕虫の染色体に関する研究 (8), 日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) とオーストラリア産 *F. hepatica* の核型比較. 寄生虫誌, 26(補), 54.
- 12) 坂口祐二・上野 計(1978) : 寄生蠕虫の染色体に関する研究 (10), 英国産肝蛭の核型. 寄生虫誌, 27(補), 77.
- 13) Sanderson, A. R. (1953) : Maturation and probable gynogenesis in the liver fluke, *Fasciola hepatica*. Nature, 172, 110-112.
- 14) Sumner, A. T. (1972) : A simple technique for demonstrating centromeric heterochromatin. Exp. Cell Res., 75, 304-306.
- 15) Venkat-Reddy, P. and Subramanyan, S. (1973) : Chromosome studies in the liver fluke, *Fasciola gigantica* Cobbold, 1856, from Andhra Pradesh. Curr. Sci., 42, 8, 288-291.
- 16) Wang, H. C. and Fedoroff, S. (1972) : Banding in human chromosomes treated with trypsin. Nature New Biology, 235, 52-54.
- 17) 渡辺昇蔵(1964) : 日本産肝蛭の分類学的研究. 日本に於ける寄生虫学の研究, 第4巻, 427-447, 目黒寄生虫館.
- 18) 渡辺昇蔵・上野 計(1960) : *Fasciola* 属の分類に関する研究, 特に邦産肝蛭の種類について. 日獣誌, 22, 472.
- 19) Wroblewska, J. (1969) : Chromosome preparations from mouse embryos during early

organogenesis: dissociation after fixation, followed by air drying. Stain Techn., 44, 3, 147-150.

Abstract

THREE KARYOTYPES AND THEIR PHENOTYPES OF
JAPANESE LIVER FLUKES (*FASCIOLA* sp.)

NOBUKO MORIYAMA, MORIYASU TSUJI AND TAKESHI SETO

(*Department of Parasitology, University of Hiroshima, School of Medicine,
Hiroshima and Department of Biology, Shimane University,
Faculty of Education, Matsue, Japan*)

Chromosomes of *Fasciola* sp. in Japan were studied mainly by the air-drying technique after dissociation of the gonadal tissue in the mixture of glacial acetic acid and 50 % lactic acid.

From detailed karyological analyses with the preparation of regular Giemsa stain and C- and G-staining methods, we found an additional type of *Fasciola* sp. to two different types, which were reported by Sakaguchi and Nakagawa (1975), based on their chromosomal complements. Three different types of *Fasciola* sp. were individuals having 20 chromosomes, 30 chromosomes and 20/30 mosaic constitution that was newly found. Worms having 30 chromosomes were proved to be practically triploid type and 20/30 mosaicism were mixoploid of cells having basic monoploid number of 10. The proportion of appearance of three types of cells to total number of cells we observed was 76.7 % triploid, 17.1 % diploid and 6.2 % mixoploid types. No in-habitant isolation was seen in these types. Diploid and triploid types were found in the same host bovine.

To compare the phenotypic variance with three different genotypes among Japanese *Fasciola* sp., the egg size was measured since it has been known as an important taxonomical character in liver flukes. The statistical data indicated triploid eggs were significantly larger than diploid eggs. Eggs from diploid-triploid mosaic worms were larger than diploid eggs and were more similar to the triploid eggs.

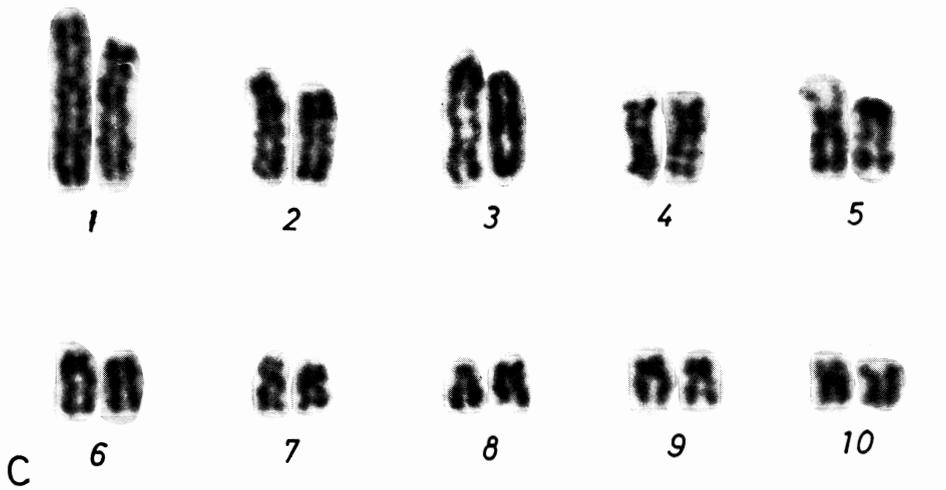
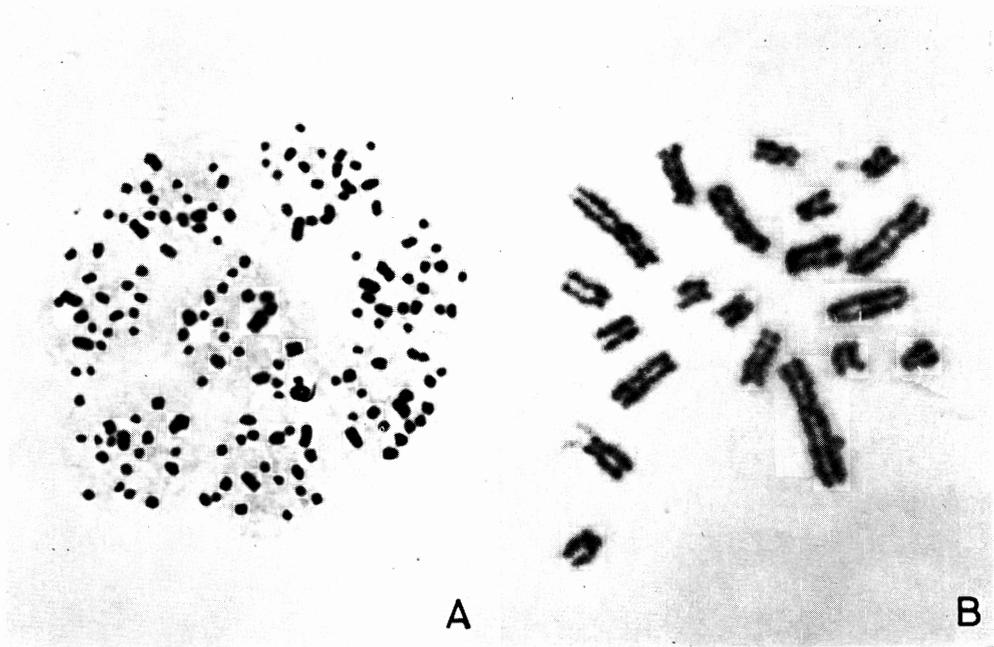


Photo. 1 Metaphase figures from the germ cells of *Fasciola* sp. (Japanese type; $2n=20$)
 A; Eight-cell colony at mitotic metaphase observed by the squash method, Giemsa stain.
 B; Mitotic metaphase chromosomes observed by the air-drying method, Giemsa stain.
 C; Karyotype of the cells shown in B. The scale indicates 10 micra.

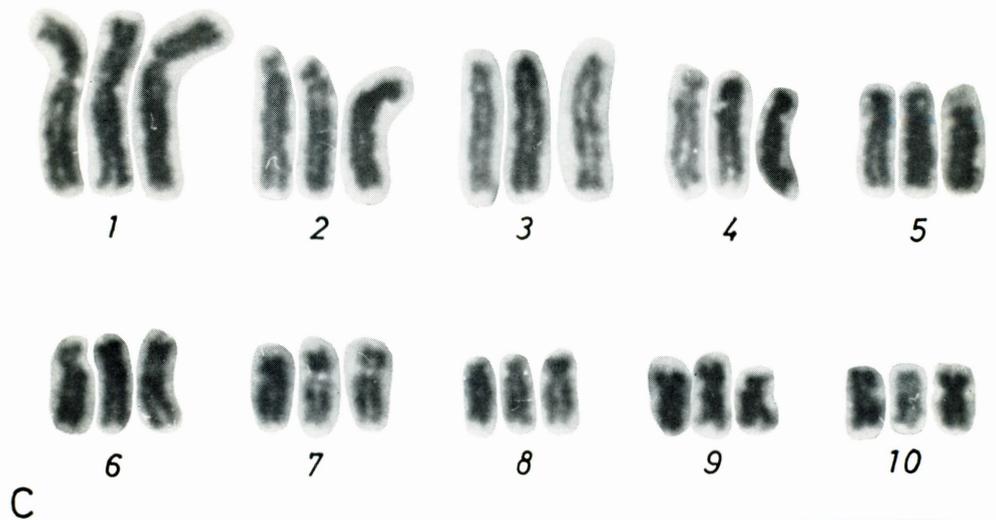
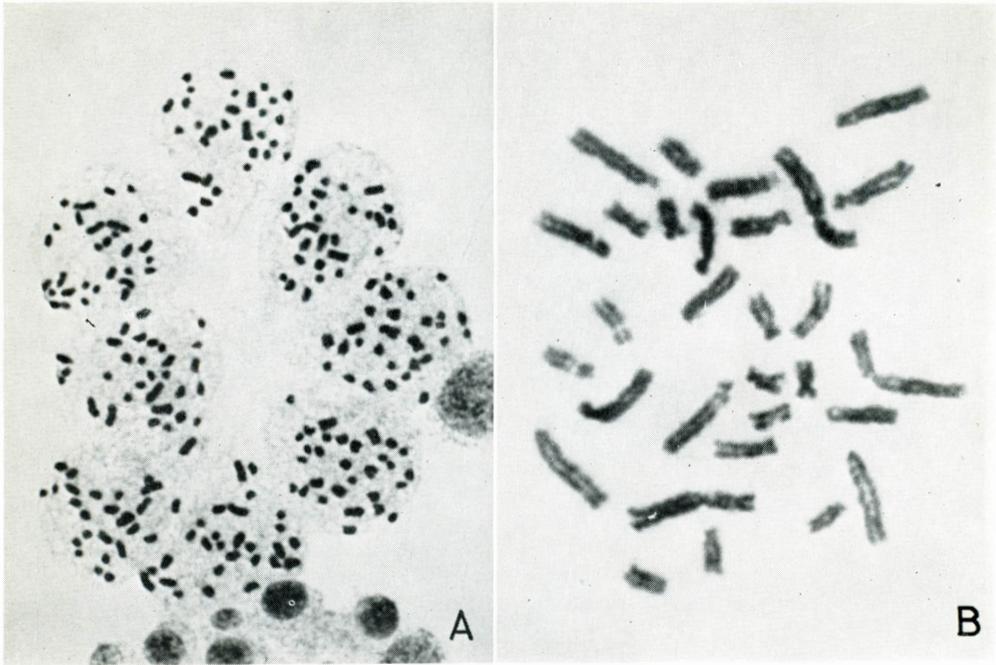


Photo. 2 Metaphase figures from the germ cells of *Fasciola* sp. (Japanese type; $3n=30$)
 A; Eight-cell colony at mitotic metaphase observed by the squash method, Giemsa stain.
 B; Mitotic metaphase chromosomes observed by the air-drying method, Giemsa stain.
 C; Karyotype of the cells shown in B. The scale indicates 10 micra.

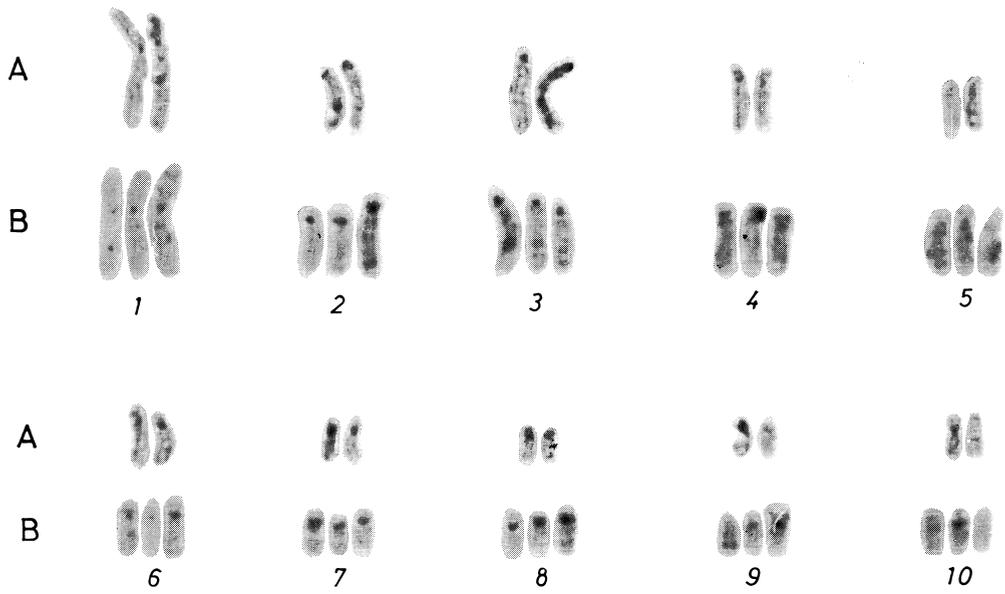


Photo. 3 Karyotypes from *Fasciola* sp. (Japanese type) after C-staining method.
A ; $2n=20$ type, B ; $3n=30$ type.

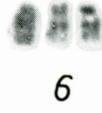
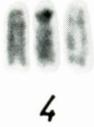
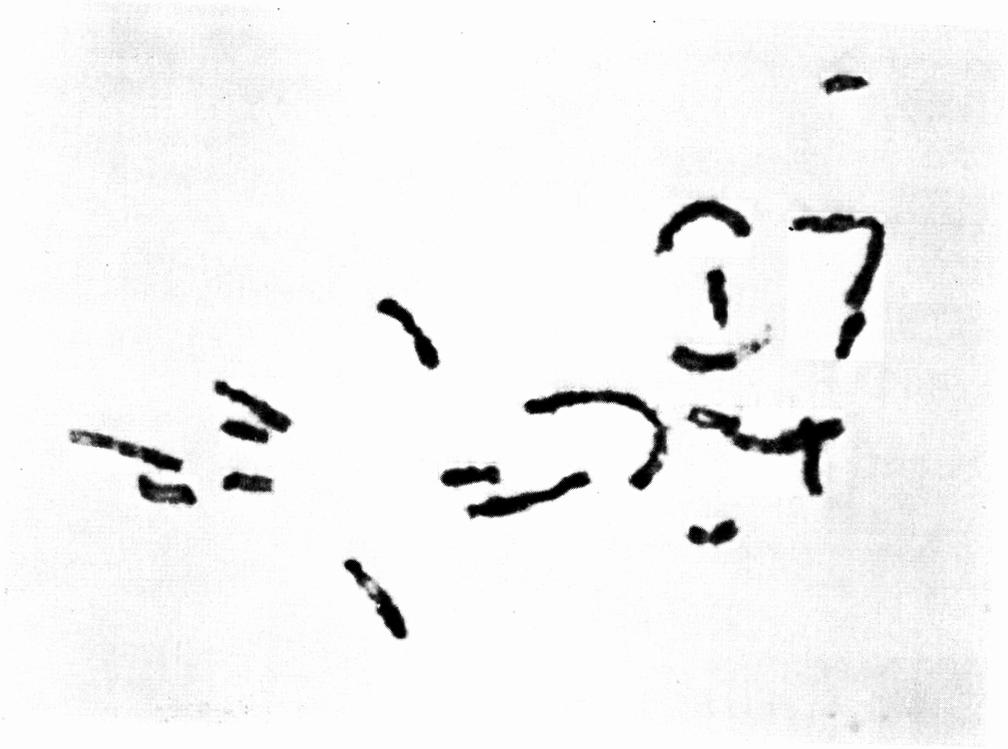


Photo. 4 Metaphase figure and karyotype from *Fasciola* sp. (Japanese type; $3n=30$) after G-staining method.



1



2



3



4



5



6



7



8



9



10

Photo. 5 Metaphase figure and karyotype from *Fasciola* sp. (Japanese type; $2n=20$) after G-staining method.