

総説

日本産肝蛭（単為生殖型肝蛭）の起源・形成とアジアにおける分布・拡散

板垣 匡

肝蛭症は、蛭状吸虫科 (Fasciolidae) の肝蛭属 (*Fasciola*) の吸虫の感染により、主にウシやヒツジ、ヤギなどの反芻動物、ヒトに肝機能障害などを及ぼす感染症である。本症は世界中の畜産業に甚大な経済損失を与え、その被害額は年間 30 億 US ドル以上であると見積もられている [60]。また本症は世界の 1 億 8 千万人以上に感染のリスクがあり、公衆衛生学的にも重要な人獣共通感染症である [66]。肝蛭症の原因種として、主としてヨーロッパやアメリカ、オセアニアに分布する *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758, 主にアフリカやアジアに分布する *Fasciola gigantica* Cobbold, 1855, の 2 種が一般的に認められている。この 2 種は虫体の形態（体長と体幅の比率など）の違いにより同定されるが、類似した形態学的特徴も多く、その正確な識別は必ずしも容易ではない [59]。

1. 日本産肝蛭（単為生殖型肝蛭）とは？

日本における肝蛭症は、1897 年に岡山県のウシで初めて報告され [52]、1926 年には初めての人体症例が報告された [26]。その後、1950 年代までに多数の肝蛭症例が報告されたが、その原因種は一貫して *F. hepatica* と記載され、その種同定が頑なに信じられていた。しかし、1954 年、日本には *F. gigantica* に類似する虫体、*F. hepatica* と *F. gigantica* の中間的な形態の虫体が多く存在するが、*F. hepatica* に類似する虫体は少数であることが報告され、肝蛭症の原因種について初めて問題提起がされた [64]。1950 年代後半から 1970 年代にかけて日本の肝蛭虫体を用いた形態学および生態学的研究が行われ、原因種の解明が試みられた。その結果から、日本には *F. hepatica* と同定される虫体は存在しないこと、形態学的に *F. hepatica* に類似する虫体から *F. gigantica* に類似する虫体までの連続的に変異した虫体が混在することが明らかになっ

た [2-4, 18, 27, 48, 61-63]。このことは、日本の肝蛭虫体を *F. hepatica* あるいは *F. gigantica* と種同定することが困難であることを示しており [27, 48, 64]、便宜的に日本産肝蛭 (*Fasciola* sp.) と名付けた [34]。また 1980 年代に行われた細胞遺伝学的研究から、日本産肝蛭は 2 倍体個体 (16.7%-17.1%)、3 倍体個体 (75.8%-76.7%)、モザイク体個体 (6.2%-7.5%) の混合集団であることが明らかになった [43, 53]。2 倍体個体および 3 倍体個体は正常な精子を産生することなく（無精子型肝蛭）、2 倍体または 3 倍体の卵細胞を形成することから [53, 56, 57]、日本産肝蛭は単為生殖 (parthenogenesis) で繁殖することが示唆された。この生殖・繁殖様式は両性生殖 (bisexual reproduction) で繁殖する *F. hepatica* および *F. gigantica* とは根本的に異なるため [17, 57]、日本産肝蛭は単為生殖型肝蛭 (parthenogenetic *Fasciola* sp.) と呼ばれるようになった [34]。最近のマイクロサテライト DNA 解析により、日本産肝蛭 (3 倍体) は自家受精や他家受精すること無く、クローン的に次世代の子孫を産出することが示され、偏性単為生殖 (obligate parthenogenesis) により繁殖することが強く示唆された [46]。また、世界各国の肝蛭虫体の精子形成を観察することによって、単為生殖型肝蛭は日本の他にも、韓国やフィリピン、ベトナム、ネパール、台湾、インドなどのアジア各国にも分布することが示された [56]。単為生殖型肝蛭は、*F. hepatica* および *F. gigantica* と形態学的に識別することは困難であるが、後述するように *pepck* および *pold* 遺伝子領域の DNA 解析と ND1 遺伝子領域のハプロタイプ型解析によって、*F. hepatica*, *F. gigantica*, さらに両種の偶発的交雑で形成された雑種肝蛭と識別することが可能である。

2. 日本およびアジア各国の単為生殖型肝蛭の DNA 解析

生物が進化する過程で受けた突然変異は DNA 塩基配列に痕跡として蓄積されるので、DNA 解析によって生物種の同定や近縁生物種間の系統関係などを解析することができる。そこで日本およびアジア各国に分布する肝蛭虫体の DNA 解析を行い、単為生殖型肝蛭の DNA と比較検討した。解析した DNA 領域は、核リボソームの internal transcribed spacer (ITS) の ITS1 および ITS2 領域、核遺伝子の phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*) and polymerase delta (*pold*) 領域、ミトコンドリアの NADH dehydrogenase subunit 1 (ND1) and cytochrome c oxidase subunit 1 (CO1) 遺伝子領域などである。単為生殖型肝蛭は、ITS1 および ITS2 領域において *F. hepatica* と *F. gigantica* で異なる塩基配列を合わせ持つ個体が多く、また *pepck* および *pold* 領域では全ての個体が両種の配列を合わせ持っていた。この結果は、単為生殖型肝蛭が *F. hepatica* と *F. gigantica* の雑種子孫であることを示唆するとともに [31], *pepck* および *pold* 領域の DNA 塩基配列を解析することで *F. hepatica*, *F. gigantica*, 単為生殖型肝蛭を含む雑種肝蛭が識別されることを示唆する [55]。次に ND1 および CO1 領域の解析から、種間交雑において *F. hepatica* を母系親とする単為生殖型肝蛭と、*F. gigantica* を母系親とする単為生殖型肝蛭が存在することが確認された [31]。アジア各国

の肝蛭虫体の DNA 解析によって、単為生殖型肝蛭は日本の他に、韓国、中国、ベトナム、タイ、ミャンマー、バングラデシュ、ネパール、インド、フィリピンなどのアジア地域に広く分布し、その主要な ND1 ハプロタイプは Fh-C4 型 (母系親は *F. hepatica*) と Fg-C2 型 (母系親は *F. gigantica*) であることが明らかになった [2-4, 18, 27, 48, 61-63] (図 1)。日本と韓国、中国には、Fh-C4 型単為生殖型肝蛭および Fg-C2 型単為生殖型肝蛭が共に分布し、それ以外の国 (ベトナム、タイ、ミャンマー、バングラデシュ、ネパール、インド、フィリピン) には Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭だけが分布する。ND1 ハプロタイプの類似性から判断すると、日本に分布する単為生殖型肝蛭は、2 世紀頃に朝鮮半島から導入された朝鮮牛とともに渡来し、国内のウシの移動とともに全国に分布を拡げたと考えられる [31]。さらに近年のマイクロサテライト DNA の解析結果から、単為生殖型肝蛭は家畜からニホンジカなどの野生動物にも感染が拡大したと考えられる [47]。中国では Fh-C4 型および Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭の分布とともに Fh-C4 型の *F. hepatica* や Fg-C2 型近縁の *F. gigantica* の分布が確認され、両型の単為生殖型肝蛭は中国で誕生 (出現) したことが強く示唆された。またベトナムやタイ、ミャンマー、バングラデシュ、ネパール、インド、フィリピンでは Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭とともに *F. gigantica* の分布も確認された。

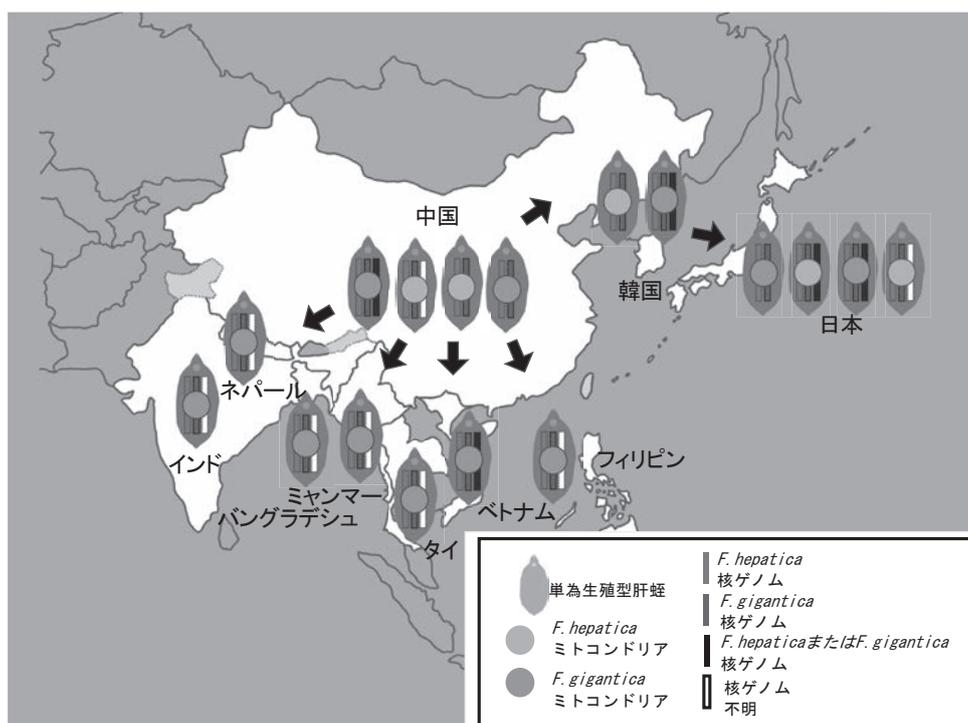


図 1 単為生殖型肝蛭 (二倍体, 三倍体) の核・ミトコンドリアゲノム構成とアジアにおける分布

3. 単為生殖型肝蛭の起源と形成, 分布拡大と繁栄

F. hepatica と *F. gigantica* の祖先にあたる原始肝蛭は東アフリカのローランド地方において出現し、アフリカ大陸において *F. gigantica*, ユーラシアの近東地方において *F. hepatica* に種分化したと推測されている [40]. 種形成後, 両種はユーラシア大陸において分布を拡大させるが, 両種の宿主であるウシの近東・中東における家畜化と, 家畜ウシの移動が深く関与したと考えられる. *F. hepatica* は耐寒性のヨーロッパ系牛 (*Bos taurus*) の移動とともに温帯から亜寒帯の地域を経て大陸東方に分布を拡大させ, *F. gigantica* は耐熱性のインド系牛 (*Bos indicus*) あるいはバッファローとともに (亜) 熱帯地域を東方に拡散し, 単為生殖型肝蛭の生誕地である中国に侵入したと考えられる (図2). 中国では, 今から 4000 年から 5000 年前に北部から中央部でヨーロッパ系牛が確認され [15], 南部では 2500 年前にインド系牛, 3400 年前にバッファローの分布が確認されている [9, 20]. これらの家畜の移動とともに Fh-C4 型の *F. hepatica* と, Fg-C2 型 (あるいはその近縁型) の *F. gigantica* が中国に侵入したと考えられる. 実際, *F. hepatica* の東方移動ルートと考えられるイラン北部やアルメニア, アフガニスタンでは Fh-C4 型 *F. hepatica* の分布が確認されている [1, 36, 59]. 中国西北部から侵入した *F. hepatica* (Fh-C4 型) と西南地域から侵入した *F. gigantica* (Fg-C2 型?) は感染家畜の移動とともに中国国内に拡散

し, 中国中央部で両種が混合感染した宿主において種間交雑が行われ, その雑種として単為生殖型肝蛭が出現したのであろう (図2). 中国では, Fh-C4 型とは異なる多様なハプロタイプの *F. hepatica* や, Fg-C2 型とは異なる多様な *F. gigantica* の分布も確認されているので, 様々なハプロタイプの *F. hepatica* と *F. gigantica* による種間交雑も当然, 行われたと考えられる. しかし, これまでに発見された単為生殖型肝蛭のほぼ全ての虫体が Fh-C4 型および Fg-C2 型ハプロタイプを示し, 残りの一部虫体は両型から 1 塩基置換で発生したハプロタイプ (Fsp3, Fsp4, Fh-C9, Fg-C3, Fg-C4, Fg-C17, Fg-C18, ND1-E2, Fsp-ND1-N2) であった [19, 24, 25, 47, 54]. すなわち, Fh-C4 型および Fg-C2 型と系統遺伝学的に遠縁なハプロタイプの単為生殖型肝蛭は存在しないことを示唆する. ミトコンドリアは母系遺伝すると考えられるので, 単為生殖型肝蛭を出現させた種間交雑において卵子を提供した母系親は, Fh-C4 型の *F. hepatica* あるいは Fg-C2 型 *F. gigantica* のいずれかであったと考えられる. 一般的に種間交雑により形成された雑種においては, 雑種強勢 (heterosis) や雑種弱勢 (hybrid weakness), 雑種崩壊 (hybrid breakdown) などが発現する. *F. hepatica* と *F. gigantica* の交雑実験においても, 雑種 F1 および F2 に虫卵発育率や孵化率の低下が認められ, 雑種の繁殖力低下が確認され, F2 以降の世代は存続することなく雑種崩壊した [30]. また, *F.*

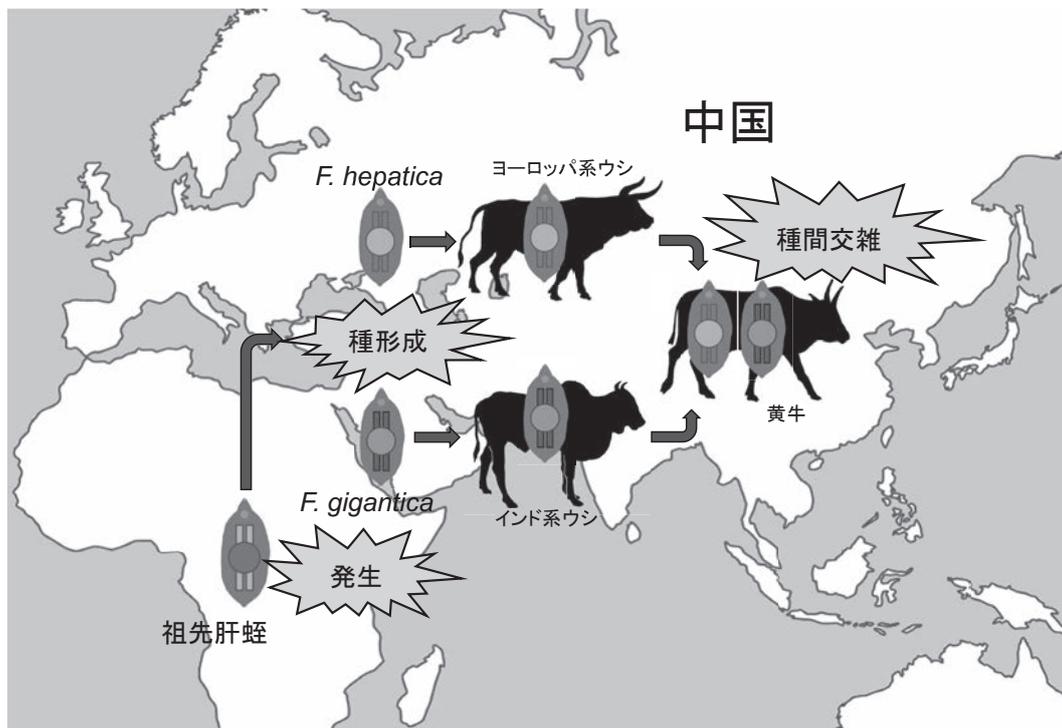


図2 *Fasciola hepatica* および *F. gigantica* の移動経路と中国における種間交雑

hepatica と *F. gigantea* の両種が分布するアルジェリアやニジェール、南アフリカ、アルメニアでは、両種による交雑の可能性は考えられるが、実際には雑種個体 (hybrid type) は確認されていない [1, 5, 10, 11, 45]. さらに両種が分布するエジプトで検出された雑種虫体は、有精子型の両性生殖虫体であり、単為生殖型肝蛭では無いことが報告されている [6]. これらの事実は、単為生殖型肝蛭の出現は非常に稀で偶発的な出来事であったことを物語っている. 中国中央部で出現した単為生殖型肝蛭は、東方へ分布を拡げて朝鮮半島を経由して韓国から日本へ侵入するとともに、南方に分布拡大して南・東南アジア各国に侵入して生息地域を拡大させた (図 1). このような単為生殖型肝蛭の繁栄は、雑種が単為生殖という繁殖様式を獲得したことと密接に関係する. 両性生殖を行う *F. hepatica* と *F. gigantea* は、精子と卵子の受精により発生して次世代を作出する. 雌雄同体 (hermaphrodite) の肝蛭類は、同一個体の精子と卵子で受精させることも可能であるが、この受精卵は発育が低下し孵化率も低下する. そのため *F. hepatica* と *F. gigantea* は他個体との交配によって精子を交換させる必要があるが、単為生殖型肝蛭は卵細胞が減数分裂を行うこと無く雌性発生するので単一個体の虫卵で次世代を生み出すことができる. すなわち、単為生殖型肝蛭は単一個体での寄生や、他個体との交配機会が減る少数寄生においても繁殖力を低下させずに次世代を作出することができる. さらに単為生殖型肝蛭の虫卵は、親種 *F. hepatica* および *F. gigantea* の虫卵に比較して虫卵孵化率が有意に高い (Itagaki et al., unpublished data for submission). このような次世代生産力の有為性は単為生殖型肝蛭が獲得した雑種強勢と考えられ、単為生殖型肝蛭がアジア各国に分布を拡大させた要因の一つと考えられる. このように、種間雑種が両親種より繁殖力 (fertility) や多産力 (fecundity), 生存力 (survival) を高める雑種強勢は、生物種間の交雑において一般的に認められている [14, 21]. 中国やベトナム、バングラデシュ、ネパールでは単為生殖型肝蛭が *F. gigantea* または *F. hepatica* に比べて優勢に分布し [24, 33, 41, 54], 日本や韓国では単為生殖型肝蛭だけが分布することも [31, 32], 単為生殖型肝蛭の生存力や繁殖力の高さがうかがえる.

中国とその東方に位置する韓国、日本においては、Fh-C4 型の単為生殖型肝蛭と Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭の両者が分布するが、中国以南のアジア各国では Fg-C2 型の単為生殖型肝蛭だけが分布する [8, 19, 24, 31-33, 41, 49, 55] (図 1). この地域による分

布の違いは、両型単為生殖型肝蛭の中間宿主となる Lymnaeidae 科貝種または strain とその分布の違いに原因するかもしれない. 両型はともに *F. hepatica* と *F. gigantea* の雑種子孫であるが、母系親種は Fh-C4 型では *F. hepatica*, Fg-C2 型では *F. gigantea* と異なる. 住血吸虫 *Schistosoma haematobium* と *Schistosoma intercalatum* の雑種 F1 は、交雑において母親種と父親種を入れ替えることで両親種の中間宿主貝である *Bulinus truncatus* や *Bulinus forskalii* に対する感染性が変化することが知られる [65]. *F. hepatica* は温帯から亜寒帯地域に分布し、*F. gigantea* は (亜) 熱帯地域に分布するので、それぞれの気候環境に生息する Lymnaeidae 科貝種 (strain) が中間宿主となる. *F. gigantea* と Fg-C2 型単為生殖型肝蛭が分布する (亜) 熱帯のアジア各国では、*F. gigantea* に好適な貝種が中間宿主と考えられるが、(亜) 熱帯アジア各国では肝蛭の中間宿主貝種については十分に解明されていない. タイでは *Radix rubiginosa* [37], インドでは *Radix* spp. [51], ベトナムでは *Radix Auricularia* や *Radix rubiginosa* など [13] が肝蛭の中間宿主として報告されているが、Lymnaeidae 科貝の種については議論が多く信頼性のある同定法は確立されていない. 一方、極東、温帯の日本では *Austropeplea ollula* [61], 韓国では *Lymnaea viridis* (*Austropeplea viridis*) [38], 中国では *Galba cubensis*, *Radix cucumerica* などが肝蛭の中間宿主とされているが [22], 国内地域別で中間宿主貝種が異なることも考えられ、特に広大で様々な気候風土の中国では地域により中間宿主貝種が全く異なるであろう. *F. hepatica* と *F. gigantea* が存在しない日本と韓国では、それぞれ *A. ollula* と *L. viridis* が Fh-C4 型単為生殖型肝蛭と Fg-C2 型単為生殖型肝蛭の中間宿主であると考えられ、日本産の *A. ollula* は *F. gigantea* (ナイジェリア産) の好適中間宿主であるとともに、*F. hepatica* (オーストラリア産) にも感受性が確認されている [28, 29].

単為生殖型肝蛭には Fh-C4 型の二倍体および三倍体、Fg-C2 型の二倍体および三倍体が確認されている. これらは中国において *F. hepatica* と *F. gigantea* の種間交雑により出現したと考えられるが、その成り立ちについては不明である. 種間交雑は両性生殖から無性生殖 (単為生殖を含む) へ転換する一つの手段と考えられ、単為生殖生物の出現に重要な役割を果たしている [35, 67]. しかし 1 回の種間交雑で雑種が単為生殖能を獲得することは少なく [16], ネコブセンチュウ [39] やミジンコ [67], *Calligrapha* 属甲虫 [42] などの無脊椎動物、*Cobitis* 属ドジョウ [35]

や *Cnemidophorus* 属トカゲ [44] などの脊椎動物においても、単為生殖獲得には通常、戻し交配を含む複数回の複雑な交雑が必要である。単為生殖型肝蛭では最初に二倍体が出現したと考えられるが、*F. hepatica* と *F. gigantica* の1回の交雑により単為生殖二倍体が形成される場合と、種間交雑により両性生殖二倍体が形成され、この二倍体が再び *F. hepatica* または *F. gigantica* と戻し交配して単為生殖二倍体が形成される場合が想定される。さらに雑種の両性生殖二倍体が *F. hepatica* と *F. gigantica* と複数回の戻し交配を経て単為生殖二倍体が形成されることも考えられる。いずれの場合でも、単為生殖能が賦与される交雑において卵子を提供した母系親は、Fh-C4型 *F. hepatica* または Fg-C2型 *F. gigantica* のいずれかであったと考えられる。中国には両型以外のハプロタイプの *F. hepatica* または *F. gigantica* も分布するので [24, 49], 様々なハプロタイプの組み合わせによる種間交雑が行われて雑種二倍体が形成されたと推測される。しかし、前述したように両種の実験的交雑で作成された雑種は雑種崩壊したことから [30], 雑種二倍体の殆どは消滅し、単為生殖能を獲得した Fh-C4 型および Fg-C2 型の雑種二倍体だけが生き残る自然淘汰が行われたに違いない。一方、単為生殖型肝蛭の三倍体は、単為生殖二

倍体と *F. hepatica* または *F. gigantica* との戻し交配、すなわち前者が卵子（二倍体）、後者が精子（一倍体）を提供した交雑で形成される [58]。最近、単為生殖型肝蛭二倍体を母系、*F. hepatica* または *F. gigantica* を父系とした戻し交配実験によって、無精子型の雑種三倍体 F1 および F2 が作出されることが確認された (Itagaki et al., unpublished data for submission)。これらを考え合わせると、単為生殖型肝蛭の核ゲノムおよびミトコンドリア ND1 ハプロタイプの主要な構成は、二倍体で2型、三倍体で4型であると考えられる (図3)。二倍体の2型は中国と韓国、日本で確認されているが、三倍体の4型については確認されていない (図1)。これは、肝蛭の核ゲノム構成を解析する手法が未だ確立されていないためであり今後の開発が期待される。

4. 単為生殖型肝蛭は新たな無性生殖種か？

アジア各国では、Fh-C4型およびFg-C2型から1塩基置換したハプロタイプ9型の単為生殖型肝蛭が発見されている [19, 24, 25, 47, 54]。また、単為生殖型肝蛭は日本に侵入してから少なくとも2000年が経過したと考えられている [31]。これらの事実から、単為生殖型肝蛭は中国で出現してから淘汰される

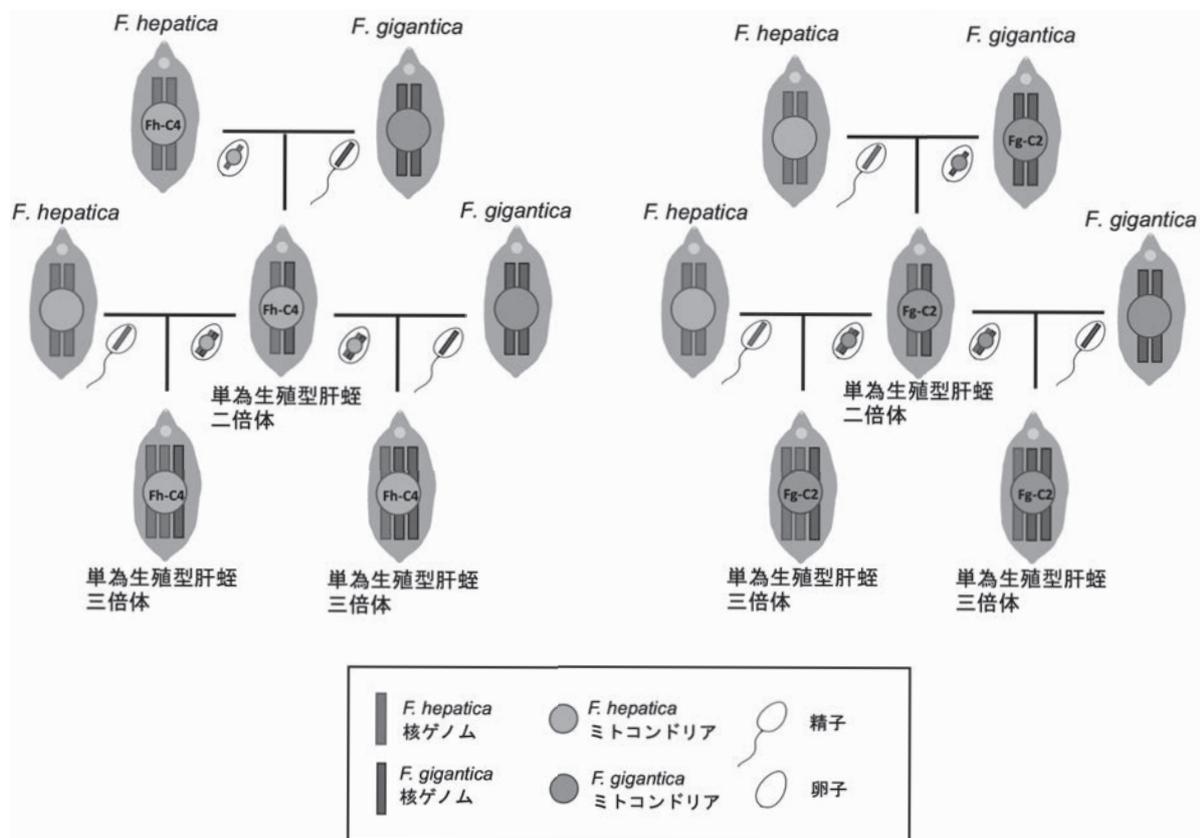


図3 Fh-C4型およびFg-C2型単為生殖型肝蛭（二倍体、三倍体）の形成

こと無く、世代を積み重ねて、長い期間生存し続けたことを示唆する。DNA は分子時計と呼ばれ、一定の割合で突然変異を蓄積し生物進化の時間推測に用いられる。肝蛭属 (*Fasciola*) のミトコンドリア DNA 塩基置換速度は解明されていないが、肝蛭と同じ吸虫綱 (Trematoda) に属する住血吸虫 (*Schistosoma*) のミトコンドリア COI 遺伝子の塩基置換速度は 100 万年で 1 塩基当たり 0.035 ± 0.0071 と見積もられている [7, 12]。仮に、この数値を *Fasciola* 属のミトコンドリア ND1 遺伝子に当てはめると、ND1 の 535bp では 18.7 変異 /100 万年であり、1 塩基の変異に 5 万 3476 年を要すると推定できる。他生物のミトコンドリア塩基置換速度も考慮すれば、単為生殖型肝蛭は出現から少なく見積もっても数千年以上は生存しているに違いない。このことは、遺伝的に均一でクローン的な繁殖をする単為生殖型肝蛭は、二倍体が *F. hepatica* または *F. gigantica* と戻し交配によって三倍体を形成した時の核ゲノムの新たな追加を除いて、明らかな遺伝子侵入 (introgression) を経験すること無く、世代を維持してきたと考えられる。生物種間の雑種が無性生殖能 (単為生殖を含む) を獲得することで新たな種が形成される [35, 39]。肝蛭属 (*Fasciola*) においては、現在、*F. hepatica* と *F. gigantica* だけが妥当な種として認められている。両種は形態学的特徴や生態学的特徴において重複する部分も多くみられる。両種を独立種として今後も認識し続けるのであれば、両種の雑種であり、しかも数千年以上も絶滅すること無く生存し、既にアジア地域に広く分布している単為生殖型肝蛭を新たな種として認識すべきであろう。

5. おわりに

日本に分布する肝蛭は、過去 60 年間、種同定されずに日本産肝蛭あるいは単為生殖型肝蛭と呼ばれてきた。単為生殖型肝蛭は日本の他にもアジア各国 (韓国, 中国, ベトナム, タイ, ミャンマー, バングラデシュ, ネパール, インド, フィリピン) に広く分布し、*F. hepatica* と *F. gigantica* の種間雑種として中国に起源する。単為生殖型肝蛭は、単為生殖という繁殖様式を獲得したことで次世代生産力を強め、少なくとも数千年間、絶滅すること無く生存し宿主である家畜の移動とともに中国からアジア各国に分布を拡大させた。日本へは中国から朝鮮半島を経由して感染ウシとともに侵入したであろう。単為生殖型肝蛭は、日本や韓国はもとよりアジア各国における肝蛭症の重要な病原体であり、無性生殖雑種としての新種記載が望まれる。

本総説は Infection, Genetics and Evolution の投稿論文 The causative agents of fascioliasis in animals and humans: parthenogenetic *Fasciola* flukes in Asia and other regions を改変したものである。

引用文献

- [1] Aghayan S, Gevorgian H, Ebi D, Atoyan HA, Addy F, Mackenstedt U, Romig T, Wassermann M, *Fasciola* spp. in Armenia: Genetic diversity in a global context, Vet Parasitol, 268, 21-31, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2019.02.009>
- [2] Akahane H, Harada Y, Oshima T, Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan. IV. Comparative studies on the external form, size of egg and number of eggs in the uterus of fluke in pig and horse. Jpn. J. Parasitol. 23, 207-212 (1974a).
- [3] Akahane, H., Harada, Y., Oshima, T., Observation on the development and the distribution of *Fasciola* sp. in heavily infected cattle. I. Relative growth of *Fasciola* sp. in cattle. Jpn. J. Parasitol. 23, 14-19 (1974b).
- [4] Akahane, H., Oshima, T., Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan. V. Heredity of large egg strain and small egg strain. Jpn. J. Parasitol. 25, 231-234 (1976).
- [5] Ali, H., Ai, L., Song, H.Q., Ali, S., Lin, R.Q., Seyni, B., Issa, G., Zhu, X.Q., Genetic characterisation of *Fasciola* samples from different host species and geographical localities revealed the existence of *F. hepatica* and *F. gigantica* in Niger, Parasitol. Res. 102, 1021-1024, (2008) <https://doi.org/10.1007/s00436-007-0870-7>
- [6] Amer, S., Dar, Y., Ichikawa, M., Fukuda, Y., Tada, C., Itagaki, T., Nakai, Y., Identification of *Fasciola* species isolated from Egypt based on sequence analysis of genomic (ITS1 and ITS2) and mitochondrial (NDI and COI) gene markers. Parasitol. Int. 60, 5-12, (2011). <https://doi.org/10.1016/j.parint.2010.09.003>
- [7] Attwood, S.W., Fatih, F.A., Campbell, I, Upatham, E.S., The distribution of Mekong schistosomiasis, past and future: Preliminary indications from an analysis of genetic variation in the intermediate host. Parasitol. Int. 57, 256-270, (2008) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.04.003>

- [8] 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.* 61, 545-549, (2012) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.03.009>
- [9] Chang, Y.N., Early Chinese management thought. *Calif. Manage. Rev.* 19, 71-76, (1976) <https://doi.org/10.2307/41164698>
- [10] Chougar, L., Amor, N., Farjallah, S., Harhoura, K., Aissi, M., Alagaili, A.N., Merella, P., New insight into genetic variation and haplotype diversity of *Fasciola hepatica* from Algeria. *Parasitol. Res.* 118, 1179-1192, (2019) <https://doi.org/10.1007/s00436-019-06270-5>
- [11] Chougar, L., Mas-Coma, S., Artigas, P., Harhoura, K., Aissi, M., Agramunt, V.H., Bargues, M.D., Genetically 'pure' *Fasciola gigantica* discovered in Algeria: DNA multimarker characterization, trans-Saharan introduction from a Sahel origin and spreading risk into north-western Maghreb countries. *Transbound. Emerg. Dis.* tbed.13572. (2020) <https://doi.org/10.1111/tbed.13572>
- [12] Dejong, R.J., Morgan, J.A.T., Wilson, W.D., Al-Jaser, M.H., Appleton, C.C., Coulibaly, G., D' Andrea, P.S., Doenhoff, M.J., Haas, W., Idris, M.A., Magalhães, L.A., Moné, H., Mouahid, G., Mubila, L., Pointier, J. -P., Webster, J.P., Zanotti-Magalhães, E.M., Paraense, W.L., Mkoji, G.M., Loker, E.S., Phylogeography of *Biomphalaria glabrata* and *B. pfeifferi*, important intermediate hosts of *Schistosoma mansoni* in the New and Old World tropics, *Mol. Ecol.* 12, 3041-3056, (2003) <https://doi.org/10.1046/j.1365-294X.2003.01977.x>
- [13] Dung BT, Doanh PN, The DT, Loan HT, Losson B, Caron Y, Morphological and molecular characterization of lymnaeid snails and their potential role in transmission of *Fasciola* spp.in Vietnam, *Korean J Parasitol*, 51, 657-662, (2013) doi: 10.3347/kjp.2013.51.6.657.
- [14] Ekechukwu NE, Baeshen R, Traorè SF, Coulibaly M, Diabate A, Catteruccia F, Tripet F: Heterosis increases fertility, fecundity, and survival of laboratory-produced F1 hybrid males of the malaria mosquito *Anopheles coluzzii*:G3 (Bethesda), 5,2693-709, (2015) doi: 10.1534/g3.115.021436.
- [15] Flad, R.K., Yuan, J., Li, S., Zooarcheological evidence for animal domestication in northwest China, in: *Developments in Quaternary Sciences*. Elsevier, pp. 167-203, (2007) [https://doi.org/10.1016/S1571-0866\(07\)09012-4](https://doi.org/10.1016/S1571-0866(07)09012-4)
- [16] Galis, F., Alphen, J.J.M., Parthenogenesis and developmental constraints. *Evol. Dev.* 22, 205-217, (2020) <https://doi.org/10.1111/ede.12324>
- [17] Hanna, R.E.B., Moffett, D., Forster, F.I., Trudgett, A.G., Brennan, G.P., Fairweather, I., *Fasciola hepatica*: a light and electron microscope study of the ovary and of the development of oocytes within eggs in the uterus provides an insight into reproductive strategy. *Veterinary Parasitology*, 221, 93-103, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.03.011>
- [18] Harada, Y., Akahane, H., Oshima, T., Observation on the development and the distribution of *Fasciola* sp. in heavily infected cattle. 2. Difference of shape and size of flukes and number and size of eggs in the uterus of flukes collected from the liver parenchyma, bile duct, gall-bladder and duodenum of the cattle. *Jpn. J. Parasitol.* 23, 66-72 (1974)
- [19] Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Mohanta, U.K., Singh, T.S., Shoriki, T., Sugiyama, H., Itagaki, T., Molecular phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from eastern India. *Parasitol. Int.* 64, 334-338, (2015) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.04.004>
- [20] Higham, C., *The Bronze Age of Southeast Asia*, Cambridge world archaeology. Cambridge University Press, Cambridge [England] ; New York, 1996
- [21] Hotz H, Semlitsch R D, Gutmann E, Guex G D, Beerli P: Spontaneous heterosis in larval life-history traits of hemiclinal frog hybrids, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 2171-2176, (1999)
- [22] Huang SY, Gong JZ, Yang B, Fan YM, Yao N, Wang CR, Development of a nest-PCR for detection of *Fasciola hepatica* DNA in the intermediate snail host, *Radix cucunorica*, and the prevalence in northwestern China, *Infect*

- Genet Evol. 75, 103984, (2019) doi: 10.1016/j.meegid.2019.103984.
- [23] Ichikawa, M., Bawn, S., Maw, N.N., Htun, L.L., Thein, M., Gyi, A., Sunn, K., Katakura, K., Itagaki, T., Characterization of *Fasciola* spp. in Myanmar on the basis of spermatogenesis status and nuclear and mitochondrial DNA markers. Parasitol. Int. 60, 474-479, (2011) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2011.08.007>
- [24] Ichikawa-Seki, M., Peng, M., Hayashi, K., Shoriki, T., Mohanta, U.K., Shibahara, T., Itagaki, T., Nuclear and mitochondrial DNA analysis reveals that hybridization between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* occurred in China. Parasitology 144, 206-213, (2017) <https://doi.org/10.1017/S003118201600161X>
- [25] Ichikawa-Seki M, Shiroma T, Kariya T, Nakao R, Ohari Y, Hayashi K, Fukumoto S, Molecular characterization of *Fasciola* flukes obtained from wild sika deer and domestic cattle in Hokkaido, Japan, Parasitol Int. 66, 519-521, (2017) doi: 10.1016/j.parint.2017.04.005.
- [26] 稲田：人体に寄生する肝蛭 *Fasciola hepatica* の 1 例, 内科学誌, 25, 1-9 (1926)
- [27] Itagaki, H., Akane, S., Morphological study on the Japanese liver fluke, compared with the African specimens. Bull. Azabu Vet. Coll. 6, 115-123, (1959)
- [28] Itagaki T, Fujiwara S, Mashima K, Itagaki H, Experimental infection of Japanese *Lymnaea* snails with Australian *Fasciola hepatica*, Jpn J Vet Sci, 50, 1085-1091, (1988) DOI: 10.1292/jvms1939.50.1085
- [29] Itagaki T, Uchida A, Itagaki H, Susceptibility of Japanese *Lymnaea ollula* to Nigerian *Fasciola gigantica*, Jpn J Vet Sci, 51, 853-854, (1989) doi: 10.1292/jvms1939.51.853.
- [30] Itagaki, T., Ichinomiya, M., Fukuda, K., Fusuyuku, S., Carmona, C., Hybridization experiments indicate incomplete reproductive isolating mechanism between *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica*. Parasitology 138, 1278-1284, (2011) <https://doi.org/10.1017/S0031182011000965>
- [31] Itagaki, T., Kikawa, M., Sakaguchi, K., Shimo, J., Terasaki, K., Shibahara, T., Fukuda, K., Genetic characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Japan on the basis of the sequences of ribosomal and mitochondrial DNA. Parasitology 131, 679-685, (2005a) <https://doi.org/10.1017/S0031182005008292>
- [32] Itagaki, T., Kikawa, M., Terasaki, K., Shibahara, T., Fukuda, K., Molecular characterization of parthenogenic *Fasciola* sp. in Korea on the basis of DNA sequences of ribosomal ITS1 and mitochondrial NDI gene. J. Vet. Med. Sci. 67, 1115-1118, (2005b) <https://doi.org/10.1292/jvms.67.1115>
- [33] Itagaki, T., Sakaguchi, K., Terasaki, K., Sasaki, O., Yoshihara, S., Van Dung, T., Occurrence of spermic diploid and aspermic triploid forms of *Fasciola* in Vietnam and their molecular characterization based on nuclear and mitochondrial DNA. Parasitol. Int. 58, 81-85, (2009) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2008.11.003>
- [34] 板垣 匡：肝蛭症，動物寄生虫病学（四訂版），板垣 匡・藤崎幸蔵編，95-102, 朝倉書店，東京（2019）
- [35] Janko, K., Pačes, J., Wilkinson-Herbots, H., Costa, R.J., Roslein, J., Drozd, P., Iakovenko, N., Rídl, J., Hroudová, M., Kočí, J., Reifová, R., Šlechtová, V., Choleva, L., Hybrid asexuality as a primary postzygotic barrier between nascent species: On the interconnection between asexuality, hybridization and speciation. Mol. Ecol. 27, 248-263, (2017) <https://doi.org/10.1111/mec.14377>
- [36] Javanmard, E., Ohari, Y., Sadeghi, A., Cheraghipour, K., Asadzadeh Aghdaei, H., Mirjalali, H., Zali, M.R., Itagaki, T., Multigene typing and phylogenetic analysis of *Fasciola* from endemic foci in Iran. Infect. Genet. Evol. 80, 104202, (2020) <https://doi.org/10.1016/j.meegid.2020.104202>
- [37] Kaset C, Eursitthichai V, Vichasri-Grams S, Viyanant V, Grams , Rapid identification of lymnaeid snails and their infection with *Fasciola gigantica* in Thailand, Exp Parasitol. 126, 482-488, (2010) doi: 10.1016/j.exppara.2010.05.021.
- [38] Lee CG, Cho SH, Lee CY, Metacercarial production of *Lymnaea viridis* experimentally infected with *Fasciola hepatica*, Vet Parasitol, 58, 313-318, (1995) doi: 10.1016/0304-4017 (94)

00725-r.

- [39] Lunt, D.H., Kumar, S., Koutsovoulos, G., Blaxter, M.L., The complex hybrid origins of the root knot nematodes revealed through comparative genomics. *Peer J.* 2, e356, (2014) <https://doi.org/10.7717/peerj.356>
- [40] Mas-Coma, S., Valero, M.A., Bargues, M.D., *Fasciola*, lymnaeids and human fascioliasis, with a global overview on disease transmission, epidemiology, evolutionary genetics, molecular epidemiology and control. *Adv. Parasitol.* 69, 41-146, (2009) [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(09\)69002-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(09)69002-3)
- [41] Mohanta, U.K., Ichikawa-Seki, M., Shoriki, T., Katakura, K., Itagaki, T., Characteristics and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses. *Parasitol. Res.* 113, 2493-2501, (2014) <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3898-5>
- [42] Montelongo, T., Gómez-Zurita, J., Nonrandom patterns of genetic admixture expose the complex historical hybrid origin of unisexual leaf beetle species in the genus *Calligrapha*. *Am. Nat.* 185, 113-134, (2015) <https://doi.org/10.1086/678408>
- [43] Moriyama, N., Tsuji, M., Seto, T., Three karyotypes and their phenotypes of Japanese liver fluke (*Fasciola* sp.). *Jpn. J. Parasitol.* 28, 23-33 (1979)
- [44] Moritz, C.C., Wright, J.W., Brown, W.M., Mitochondrial-DNA analyses and the origin and relative age of parthenogenetic lizards (Genus *Cnemidophorus*). III. *C. velox* and *C. exsanguis*. *Evolution* 43, 958-968, (1989) <https://doi.org/10.1111/j.1558-5646.1989.tb02542.x>
- [45] Mucheka, V.T., Lamb, J.M., Pfukenyi, D.M., Mukaratirwa, S., DNA sequence analyses reveal co-occurrence of novel haplotypes of *Fasciola gigantica* with *F. hepatica* in South Africa and Zimbabwe. *Vet. Parasitol.* 214, 144-151, (2015) <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2015.09.024>
- [46] Ohari, Y., Hayashi, K., Takashima, Y., Itagaki, T., Do aspermic (parthenogenetic) *Fasciola* forms have the ability to reproduce their progeny via parthenogenesis? *J. Helminthol.* 95, e36, (2021) [doi:10.1017/S0022149X21000328](https://doi.org/10.1017/S0022149X21000328)
- [47] Ohari, Y., Matsuo, K., Yoshida, A., Nonaka, N., Sato, H., Itagaki, T., Genetic diversity and population structure analyses based on microsatellite DNA of parthenogenetic *Fasciola* flukes obtained from cattle and sika deer in Japan. *Parasitol. Res.* 120, 1341-1350, (2021) <https://doi.org/10.1007/s00436-021-07061-7>
- [48] Oshima, T., Akahane, H., Shimazu, T., Patterns of the variation of the common liver fluke (*Fasciola* sp.) in Japan. I. Variations in the sizes and shapes of the worms and eggs. *Jpn. J. Parasitol.* 17, 97-105, (1968)
- [49] Peng, M., Ichinomiya, M., Ohtori, M., Ichikawa, M., Shibahara, T., Itagaki, T., Molecular characterization of *Fasciola hepatica*, *Fasciola gigantica*, and aspermic *Fasciola* sp. in China based on nuclear and mitochondrial DNA. *Parasitol. Res.* 105, 809-815, (2009) <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1459-0>
- [50] Periago, M.V., Valero, M.A., Panova, M., Mas-Coma, S., Phenotypic comparison of allopatric populations of *Fasciola hepatica* and *Fasciola gigantica* from European and African bovines using a computer image analysis system (CIAS). *Parasitol. Res.* 99, 368-378, (2006) <https://doi.org/10.1007/s00436-006-0174-3>
- [51] Rajanna R, Thimmareddy PM, Sengupta PP, Siju SJ, Mamatha GS, Epidemiological and genetic characterization of larval stages of *Fasciola gigantica* in snail intermediate hosts in Karnataka State, India, *Acta Parasitol.* 63, 609-616, (2018) [doi: 10.1515/ap-2018-0070](https://doi.org/10.1515/ap-2018-0070).
- [52] 斎藤：肝蛭ニ就テ，東京医学誌，11, 679-681 (1897)
- [53] Sakaguchi, Y., Karyotype and gametogenesis of the common liver fluke, *Fasciola* sp. in Japan. *Jpn. J. Parasitol.* 29, 507-513, (1980)
- [54] Shoriki, T., Ichikawa-Seki, M., Devkota, B., Rana, H.B., Devkota, S.P., Humagain, S.K., Itagaki, T., Molecular phylogenetic identification of *Fasciola* flukes in Nepal. *Parasitol. Int.* 63, 758-762, (2014) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2014.07.001>
- [55] Shoriki, T., Ichikawa-Seki, M., Sukanuma, K., Naito, I., Hayashi, K., Nakao, M., Aita, J., Mohanta, U.K., Inoue, N., Murakami, K., Itagaki, T., Novel

- methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes. *Parasitol. Int.* 65, 180-183, (2016) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2015.12.002>
- [56] Terasaki, K., Akahane, H., Habe, S., Moriyama, N., The geographical distribution of common liver flukes (the genus *Fasciola*) with normal and abnormal spermatogenesis. *Jpn. J. Vet. Sci.* 44, 223-231, (1982) <https://doi.org/10.1292/jvms1939.44.223>
- [57] Terasaki, K., Moriyama-Gonda, N., Noda, Y., Abnormal spermatogenesis in the common liver fluke (*Fasciola* sp.) from Japan and Korea. *J. Vet. Med. Sci.* 60, 1305-1309, (1998) <https://doi.org/10.1292/jvms.60.1305>
- [58] Terasaki, K., Noda, Y., Shibahara, T., Itagaki, T., Morphological comparisons and hypotheses on the origin of polyploids in parthenogenetic *Fasciola* sp. *J. Parasitol.* 86, 724-729, (2000) [https://doi.org/10.1645/0022-3395\(2000\)086\[0724:MCAHOT\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1645/0022-3395(2000)086[0724:MCAHOT]2.0.CO;2)
- [59] Thang, T.N., Hakim, H., Rahimi, R.R., Ichikawa-Seki, M., Molecular analysis reveals expansion of *Fasciola hepatica* distribution from Afghanistan to China. *Parasitol. Int.* 72, 101930, (2019) <https://doi.org/10.1016/j.parint.2019.101930>
- [60] Toet, H., Piedrafita, D.M., Spithill, T.W., Liver fluke vaccines in ruminants: strategies, progress and future opportunities. *Int. J. Parasitol.* 44, 915-927, (2014)
- [61] Ueno, H., Watanabe, S., Ecological studies on the common liver fluke in Japan. 1. Comparison of intermediate host between the Japanese native liver fluke and *Fasciola hepatica* from England. *Bull. Natl. Inst. Anim. Health.* 38, 167-181, (1960)
- [62] Watanabe, S., A revision of genus *Fasciola* in Japan, with particular reference to *Fasciola hepatica* and *F. gigantica*., in: Morishita, K., Kamiya, Y., Matsubayashi, H. (Eds.), *Progress of medical parasitology in Japan*. vol. 2. Meguro parasitological museum, Tokyo, pp. 359-381, (1964)
- [63] Watanabe, S., Fascioliasis of ruminants in Japan. *Bull. Off. Int. Epizoot.* 58, 313-322, (1962)
- [64] Watanabe, S., Iwata, S., Various *Fasciola* genus in Japan. *J. Jpn. Vet. Med. Assoc.* 7, 124-126, (1954)
- [65] Webster BL, Southgate VR: Compatibility of *Schistosoma haematobium*, *S. intercalatum* and their hybrids with *Bulinus truncatus* and *B. forskalii*, *Parasitology*, 127, 231-242, (2003) doi: 10.1017/s0031182003003597.
- [66] World Health Organization, Control of food borne trematode infections. WHO technical report series. no.849. Geneva: WHO, Head quarters, (1995)
- [67] Xu, S., Spitze, K., Ackerman, M.S., Ye, Z., Bright, L., Keith, N., Jackson, C.E., Shaw, J.R., Lynch, M., Hybridization and the origin of contagious asexuality in *Daphnia pulex*. *Mol. Biol. Evol.* 32, 3215-3225, (2015) <https://doi.org/10.1093/molbev/msv190>