

ミトコンドリアDNA解析を基軸にした ヤマビルの進化学的研究

Phylogenetic Analysis of Mountain Leech Based on Mitochondrial DNA Sequences

井内 勝哉* 佐藤 尚衛**
Katsuya Iuchi Naoe Sato

Abstract

The land leech, *Haemadipsa*, is a terrestrial bloodsucking leech. *Haemadipsa* leeches are segmented worms belonging to the phylum, Annelida. In Japan, *Haemadipsa* leeches are found in the forest region between Akita and Okinawa, which is known to be very humid. *Haemadipsa* leeches are also found in the tropical and subtropical regions of Taiwan, Vietnam, Thailand, and Malaysia. Deer, monkey, and birds serve as host animals for *Haemadipsa* leeches. These leeches inhabit a wide range of regions owing to the movement of the host animals and due to global warming. Despite the high global abundance of land leeches, their diversity and expansion routes are poorly understood. The distinct morphological differences in *Haemadipsa* leeches have not been discovered. In this study, mitochondrial DNA (mtDNA) sequences were analyzed to determine the species identity and to evaluate the genetic relationship among *Haemadipsa* leeches. First the complete mtDNA sequences of several Japanese land leeches were determined. The results revealed 70% sequence similarity—at the amino acid level—with the reference sequences of *Megascolecidae* and *Hirudo nipponia*. The tRNA or rRNA sequences of *Haemadipsa* leeches are unique compared to those of other leeches belonging to the phylum, Annelida. Next, the mitochondrial cytochrome *c* oxidase subunit 1 (COX1) gene from 10 *Haemadipsa* leeches in Japan was analyzed and compared with that of land leeches from around the world. Phylogenetic analyses for COX1 gene were performed using the neighbor-joining method. These results suggest that *Haemadipsa* leeches have evolved independently and by different mechanisms compared to other leeches.

* 成蹊大学理工学部物質生命理工学科 Department of Materials and Life Science, Faculty of Science and Technology, Seikei University iuchi@st.seikei.ac.jp

** 成蹊中学高等学校生物科研究室 Seikei Junior & senior High School, Biology & Ecology education laboratory naoe-sato@th.seikei.ac.jp

背景

ヒル (leeches) は環形動物門 (Annelida Clitellata) に属し、*Rhyncobdellae* (jawless leeches) と *Arhynchobdellae* (jawed leeches) の2つのグループに分けられる。*Arhynchobdellae* は吸血性であり、陸上および水生環境に生息する。その中でも、陸上に生息するヒルはヤマビル (*Haemadipsidae*) と呼称される。ニホンヤマビル (*Haemadipsa japonica*) は、野生動物に対して吸血する日本で唯一の陸生ビルである (図1) (佐藤 2017)。

ヤマビルの生理・生態について、2009年の神奈川県ヤマビル対策共同研究推進会議の報告書に記載されている。ニホンヤマビルは、体長は伸びた状態で、小さい個体で約1 cm、大きい個体で約8 cmになる。体色は赤褐色から茶褐色で色彩の変異は少ない。背面に明瞭な3本の細い黒色縦縞が見られる。体軸前後に吸盤を持ち、行動はこの前後吸盤でしゃく取り状に行う。

吸血は成長及び産卵のために行い、後吸盤で体を保持し、前吸盤中央にあるY字の3枚の歯で、吸血対象動物の皮膚をY字型に切り裂き吸血する。吸血対象動物は血圧の高いノウサギ以上の大型動物が適していると考えられ、ヤマドリやキジといった鳥類を吸血する場合もある。吸血量は体重の約8倍で、吸血された動物の失血量は傷口からの出血量を含めると体重の約10倍となる。一度吸血すると個体によっては約1年吸血せず、その間探索行動は行わず落ち葉の下などに静止し、じっとしている。吸血の際は、体全体を収縮させて血液を体内に送り込み、体表からは血液中の水分を濾過した無色透明な液体を排出する。この液体には高分子のタンパク質は含まれず、カリウム・ナトリウムなどのイオンが排出され、血漿成分の一部が排出されていると考えられる。吸血中は血液凝固阻止剤であるヒルジン ($C_{30}H_{60}O_{12}N_8$) を分泌し、ヒル体内で血液が凝固するのを防ぐ。吸血後にもヒルジンが体内に残存するため出血が継続する場合が多い。また、吸血された部位は強いかゆみを感じるなど、唾液中の各種成分によるアレルギー症状が出る場合がある。

生殖行動は雌雄同体のため、産卵前に他の個体と交接し、互いの精子を雌性生殖器に送り込む。卵は複数の卵が1つに集まった卵のうとして産み落とされ、卵のうは外側が透明なプラスチックのような形状で乾燥から卵を守る仕組みとなっている。1回の卵のう数は1～9個で個体の大きさと吸血量で個数が変化する。産卵から孵化まではおよそ1ヶ月、1つの卵のうからおよそ5～8個体が生まれる。

環境適温は25℃付近であり、暑いと行動活性は高まるが、蒸れを嫌う傾向がある。基本的に乾燥に弱く、晴天の多い夏は地表が乾燥するため、出現数が減少する。自然界では乾燥した場合の忌避行動として、落葉下や石の下などへ移動を行い、地表面からの乾燥を防ぐ。0℃～35℃の範囲で生息可能であり、0℃以下になっても凍結はしない。高温・低温でも短時間であれば範囲を超えていても生存可能である。

ニホンヤマビルの外部形態の主な特徴として、27の体節と前吸盤と後吸盤をもつ (図4)。2・3・4・5・8体節に1対ずつ合計10個の眼を持つが、物を識別する能力はなく、主に光を感知するセンサーとして機能していると考えられている。体表には各種センサーがあると考えられ、吸血対象の野生動物の体温や二酸化炭素を感じて接近する。



図1 ニホンヤマビル (千葉県君津市産)



図2 ヤマビルsp(タイ チャンタプリー産)



図3 ニホンヤマビルの生息分布図

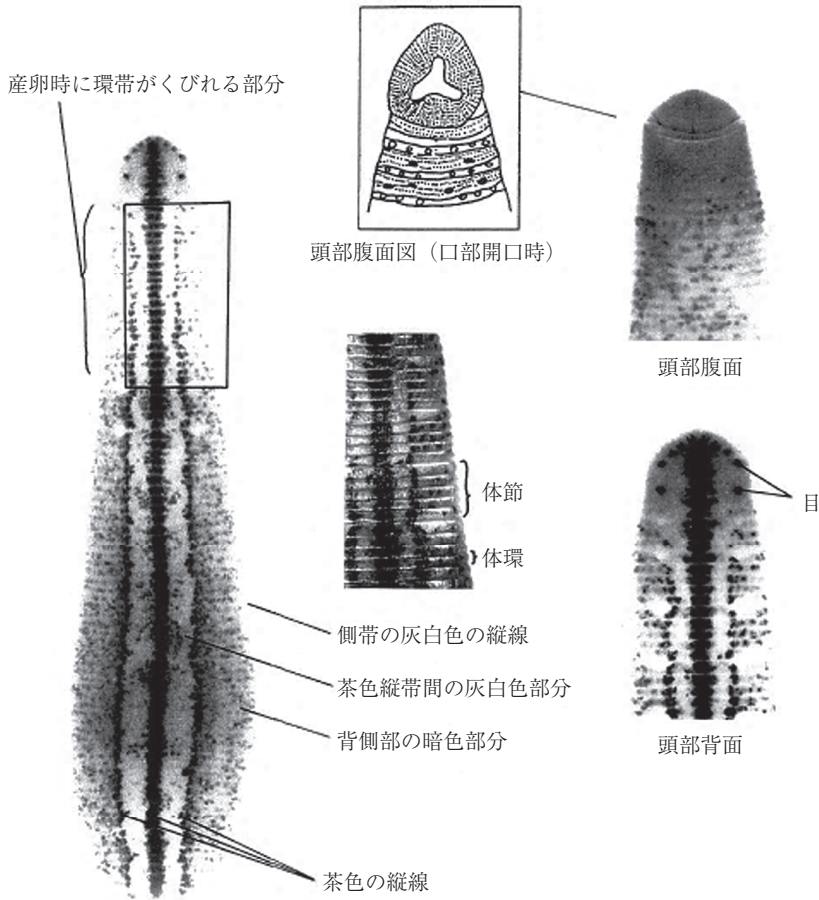


図4 ニホンヤマビルの外部形態 (中川 1981)

野生動物に依存した生活形態をもっており、野生動物の分散に伴い、生息域が拡大してきている (図3)。しかし、野生動物の行動範囲は限られているため、ヒルの分散速度は緩慢である。したがって、各生息場所における遺伝的特徴を伴う地域個体群の存在が考えられる。しかし、生息場所における各個体の外部形態に差異はほとんど認められていない。

例えばタイ産と日本産のヤマビルでは外部形態の差では区別ができない (図1・2)。ヤマビルは、アジアにおいて数多く生息するにも関わらず、種の多様さや生態については研究が進んでいない。

様々な生物が地球上に存在するのは、生物の進化の過程で生じた多様性による (臼井 2014)。地球誕生は今から約46億年前までさかのぼり、生命が誕生したのは約35-40億年前である。生物の遺伝情報であるDNAが核膜に覆われていない原核生物の古細菌が誕生する。古細菌は、嫌気性細菌とも呼ばれ、硫化水素を代謝してエネルギーを作るため、酸素を必要としない。その後、光合成を行うシアノバクテリアの誕生により地球上に大量の酸素が作られた。このような酸素の存在下で生息する真正細菌が誕生する。さらに、古細菌同士が融合し、DNAを保護す

る核膜を持った古細菌から真核生物が誕生した。真核細胞の特徴である細胞内小器官は、細胞内に原核生物が共生し細胞内小器官が生まれたとする細胞内共生説 (intracellular symbiotic theory) が有力である。ミトコンドリアは、古細菌に原核生物の好気性細菌プロテオバクテリアが共生した (Esser 2004)。このようにして誕生した真核生物が、さらに進化の過程をたどる中で原生生物・植物・菌類・そして我々のような動物が誕生した。

ヤマビルも属する動物は、真核細胞が多く集まった集合体で運動性を有する生物である。体腔の有無や胚葉数などの違いをもとにして分子系統学的解析に基づき、30以上の門に分類される。進化の道筋をたどる分類学において、系統樹作製をもとに地球上に生存する生物がどのようにに進化したかを考察する。現在、科学技術の発展によりDNAの塩基配列に基づいた系統解析が行われている。形態的特徴をもとにした分子系統樹作製は、分類学の分野においての功績が大きい。しかしながら、いわゆる形態分類学からの系統樹作製は分類学者の主観的要素を含み、科学的根拠が希薄な場合がある。

進化してきた細胞内小器官のひとつであるミトコンドリアは、1細胞当たり約1,000個存在する (内海・井上 2001)。生体のエネルギー通貨であるアデノシン三リン酸 (ATP) の大部分の生産を担う器官である。ヒトなどの高等動物のミトコンドリアDNA (mtDNA) は、1倍体の環状2本鎖DNAを持つ。ヒトのミトコンドリアゲノムは約16 kbpであり、30億 bpである核ゲノムと比較して非常に小さい。ヒトでは37種類の遺伝子がmtDNAにコードされている (Anderson 1981)。2個のリボソームRNA (rRNA)、22種類のトランスファーRNA (tRNA)、13種類の電子伝達系を構成するサブユニットタンパク質をコードする遺伝子である。核DNAにコードされる他のミトコンドリアのタンパク質と協調してDNAの複製・転写・タンパク質の生合成を行う。ミトコンドリアは、核とは異なるタンパク質合成システムを有する。ヒトmtDNAは核DNAの遺伝暗号と異なっており、コドンの使用頻度も特徴的である (Anderson 1981, Wolstenholme 1992)。開始コドンは、AUGに加えてAUAやAUUも用いられる。また、UAA、UAGは共通する終始コドンであるが、AGAとAGGを終止コドンとする。ヒトで終止コドンとして用いられるUGAはトリプトファンをコードする。他のほ乳類では、これらと異なるアミノ酸をコードすることもある。環形動物門では、ミトコンドリアのタンパク質合成において、さらに異なったアミノ酸のコドン様式をとる可能性がある。

mtDNAは核ゲノムDNAのようにヒストンには巻き付いておらず、裸の状態で存在する。多くの動物では、母方のmtDNAが遺伝 (母性遺伝) し、父親のmtDNAは次世代に受け継がれない。健常人では、個体内の全てのmtDNAが同じ塩基配列である (ホモプラスミー)。mtDNAの修復機構は核DNAと比較して発達していないため、mtDNAは核ゲノムDNAと比較して変異速度が5から10倍速い (Brown 1975)。例えば、動物の中で最もヒトと近いチンパンジーの核ゲノムの同じ遺伝子とヒトを比較した場合、1から2%のDNA塩基配列の差異しかない。一方で、mtDNAの塩基配列では、ヒトとチンパンジーで10%程の違いを有する (Horai 1992)。このような理由から、進化の過程を探るうえでmtDNAの塩基配列解析は有用とされている。

こうした進化系統樹作製をもとに、人類の起源を明らかにする方法が一般的である (橋本 2002)。ヒトのみならず、他の動植物の進化過程を研究するうえで、mtDNAの塩基配列を解析し、進化系統樹を作製することは重要である。分子系統樹の作製する方法にはいくつもある。例えば、

距離行列法、最節約法、および最尤法がある(斎藤 1994)。本研究では、日本ヤマビルのmtDNA配列の近隣結合法を用いた系統樹作製を行った。本研究では、ヤマビルのmtDNA配列を解析し、これまで環形動物門の分子系統樹作製に使用されてきたcytochrome c oxidase subunit 1 (COX1)の配列に加え、他の有用な候補配列の存在を発見することを目的とした。地域によって、ヤマビルのmtDNA配列に差異が確認できれば、ヤマビルの進化・系統学的な意義を見出すことができる。さらに日本およびアジア各地のヒルのCOX1の塩基配列を解析し、分子系統樹を作製することを目的とした。特に日本における地域個体群のmtDNA塩基配列による分類を可能とするため、ニホンヤマビルのmtDNA全塩基配列の決定を試みた。全く解析が行われていないヤマビルのmtDNAの全長を解析することで、ミミズやゴカイなどの他の環形動物門の既知mtDNAの塩基数や配列を比較できる。これまでの形態学的手法による分類を元に、分子化学的手法を加えることでより詳細な系統関係を示すことが可能となる。

実験方法

サンプル採集

ニホンヤマビルは、神奈川県愛甲郡清川村、千葉県鴨川市、千葉県君津市、群馬県利根郡みなかみ町、岐阜県揖斐郡揖斐川町、静岡県静岡市、三重県いなべ市、鹿児島県熊毛郡屋久島町、秋田県秋田市、滋賀県高島市にて採取した。主に落葉広葉樹林の林床及び林道沿いの獣道をメインに、落ち葉の堆積した湿った環境を採取場所として選択した。吸血対象であるニホンジカやニホンザルなどの野生動物の生息も確認した。落ち葉や草をかき分け、地面に向かって息を吹きかけた後、周辺に集まってくるニホンヤマビルをピンセットで採取した。採取したサンプルはスクリー管瓶に入れた99%エタノールで固定し、常温保存した。

DNA抽出

採取したニホンヤマビルからメスを用いて消化管を傷付けないように筋組織(約25 mg)を取り出した。DNA抽出キットNucleoSpin Tissue (TaKaRa)の使用法に基づき、mtDNAを抽出した。抽出したmtDNAは冷凍保存した。

PCR増幅

ニホンヤマビルのmtDNAの一部塩基配列をPCR法により増幅した。CYTB-ATP6遺伝子領域のPCR増幅はNested PCRによりおこなった。

すべてのPCR増幅はPCR mixtureにDNAを10-15 ng添加し、95°C/3 min後、95°C/20 sec、55°C/20 sec、72°C/45 secを1 cycleとして35 cycle、その後72°C/3 minのPCR反応をおこなった。

電気泳動

得られたPCR増幅産物を2%アガロースゲル、200 V、20 minの電気泳動をおこなった。エチジウムブロマイド染色したPCR増幅産物をUVトランスイルミネーターによって確認した。反応終了後、PCR増幅産物を1%および2%アガロースゲル電気泳動に供し、目的部分の塩基配列の増幅を確認した。

Sequence解析

電気泳動後FastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティックス) を用い、ゲルから目的のPCR増幅産物を切り出し、精製処理をおこなった。なお、使用するシリカゲルカラムは使用前にH₂Oを用いて洗浄した。精製したPCR増幅産物をファスマックに郵送し、解析を依頼した。

精製したPCR増幅産物をファスマックに郵送し、解析を依頼した。解析にはPCR法に用いたprimerを使用した。

塩基配列の決定

GeneStudio Professional softwareによりSequence解析で得られた波形を確認し、塩基配列を決定した。

PCR増幅産物のカラム精製

DNA精製キットFastGene™ Gel/PCR Extraction Kit (日本ジェネティックス) の使用方法に基づき、PCR増幅産物の精製処理をおこなった。なお、使用するシリカゲルカラムはカラム精製処理前にH₂Oを用いて洗浄した。

系統解析

分子系統樹作製

分子系統樹作製には、解析ソフトウェアMEGA6 (Molecular Evolutionary Genetis Analysis software version6) を使用した。解析方法は近隣結合法を用いた。解析ソフトウェアMEGA6により決定した塩基配列から分子系統樹を作製した。解析方法には近隣結合法を用いた。Bootstrap反復回数は500回とした。

アミノ酸変換

決定した塩基配列をExpASy (Bioinformatics Resource Portal) のtranslate toolによりアミノ酸配列に変換した。アミノ酸の相違割合の確認にはEMBL-EBIのPairwise Sequence Alignmentを用いた。

結果

ニホンヤマビル (*Haemadipsa japonica*) のmtDNA全塩基配列を決定した (図5)。遺伝子領域としてNADH dehydrogenase subunit 1 (ND1)、NADH dehydrogenase subunit 2 (ND2)、cytochrome c oxidase 1 (COX1)、cytochrome c oxidase 2 (COX2)、mitochondrial ATP synthase subunit 8 (ATP8)、cytochrome c oxidase 3 (COX3)、NADH dehydrogenase subunit 6 (ND6)、ubiquinol-cytochrome-c reductase complex cytochrome b subunit (CYTB)、mitochondrial ATP synthase subunit 6 (ATP6)、NADH dehydrogenase, subunit 5 (ND5)、NADH dehydrogenase, subunit 4L (ND4L)、NADH dehydrogenase subunit 4 (ND4) の13種類と判明した。また、他の環形動物と同様に、ND1とND4の間に16SリボソームRNA (rRNA) 配列と12S rRNA配列が存在した。

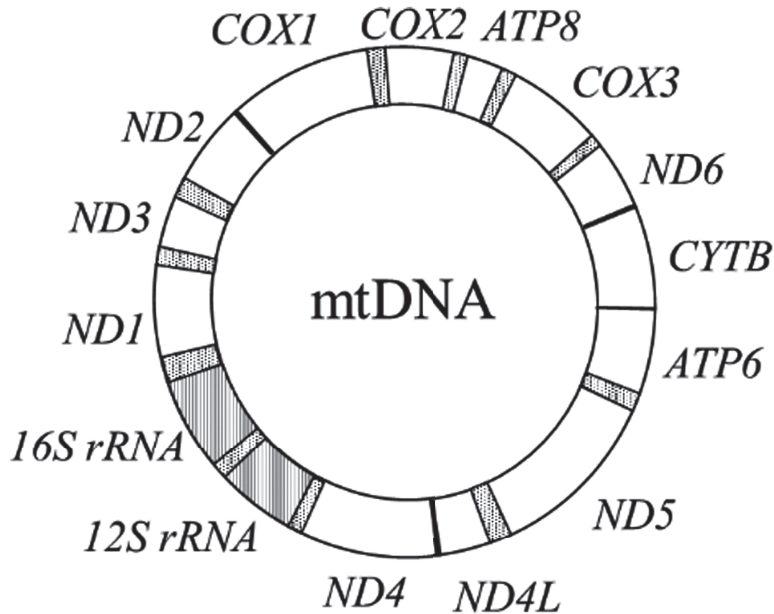


図5 ニホンヤマビルのmtDNAの遺伝子配置

ニホンヤマビルのmtDNA塩基配列をもとにした変換したアミノ酸配列を、環形動物門であるフトミミズやチスイビルと比較した結果、70%の類似性を示した。しかし、トランスファーRNA (tRNA) およびrRNAの配列や長さは、フトミミズやチスイビルと全く異なる結果となった。

以前に採取したニホンヤマビル（秋田県秋田市、群馬県利根郡、神奈川県愛甲郡、静岡県静岡市、岐阜県揖斐郡、三重県いなべ市、滋賀県高島市）に加え、本プロジェクト中に採取したヤマビルのmtDNAを抽出し、DNAシーケンス解析によりDNA配列を決定した。得られたDNA配列をもとに、分子系統樹作製ソフトMEGA6を使い分子系統樹を作製した。決定したニホンヤマビル10個体のCOX1一部塩基配列（605 bp）とGenBankに登録されている世界のヤマビル60個体のCOX1一部塩基配列を用いて分子系統樹を作製した（図6）。

また、COX1一部塩基配列を用いた分子系統樹（図5）において、ニホンヤマビルは海外のヤマビルと異なる集団を形成した。この結果より、ニホンヤマビル固有の塩基配列の存在が示唆された。また、ニホンヤマビルはボルネオ島に生息する*Haemadipsa picta*と共通の祖先種をもつと推測された。

さらに、屋久島町のニホンヤマビルは独自の塩基置換が生じていた。神奈川県愛甲郡清川村、千葉県鴨川市、千葉県君津市、群馬県利根郡みなかみ町、三重県いなべ市などの遺伝子領域のアミノ酸を比較すると、平均で約100アミノ酸が異なっていた。これは、アミノ酸の相違数からのみ判断すると、全く別の生物であり、形態は類似しているものの、本州に生息するニホンヤマビルと異なる集団と想定された。

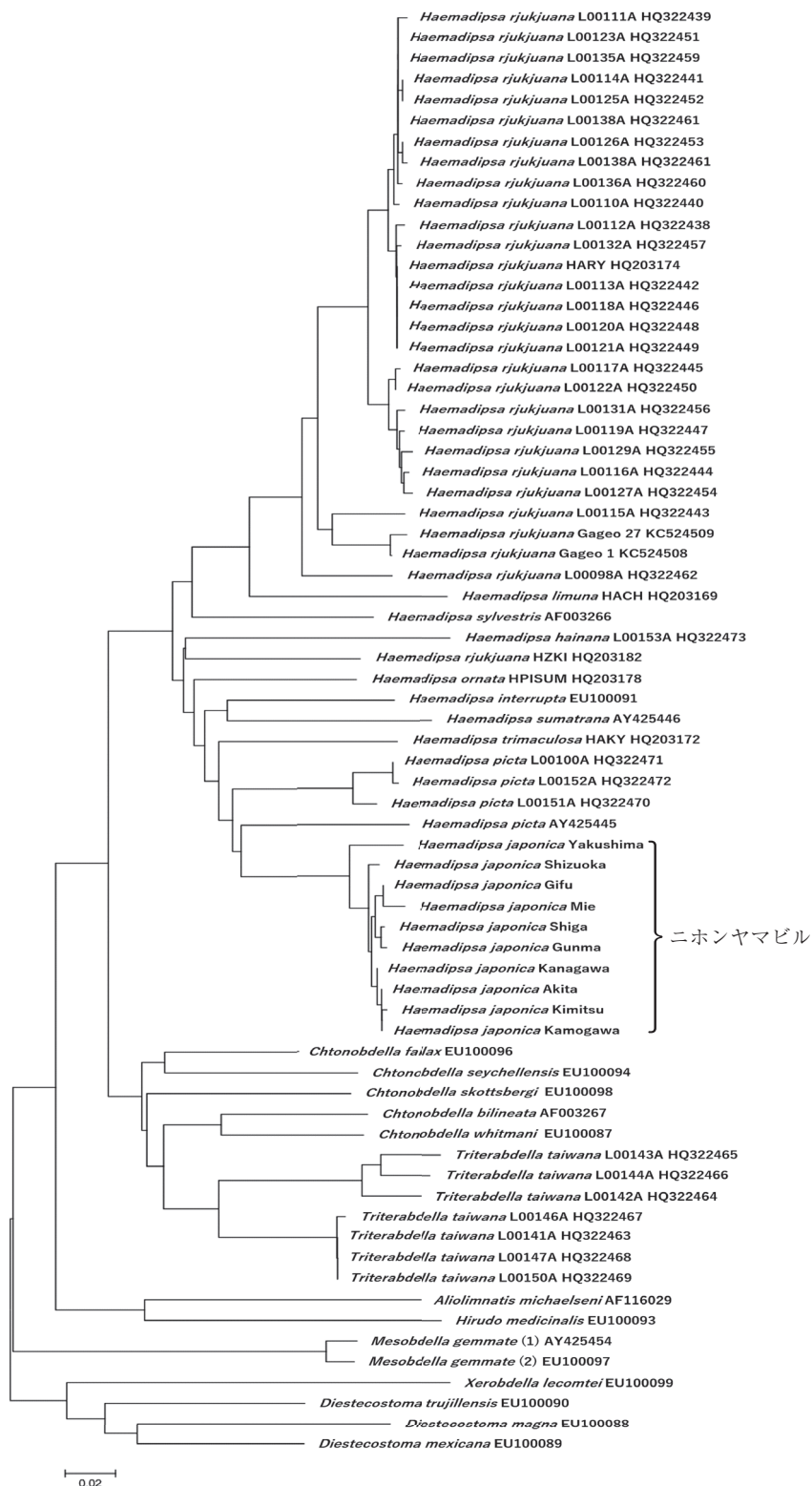


図6 世界のヤマビルとニホンヤマビルの比較 (Sato 2019)

考察

mtDNAの塩基配列を用いた系統樹作成は、進化の過程を推測するために最も一般的に用いられている。人類の祖先がアフリカから各地に広がったと提唱したCannらの1987年の論文でもmtDNAの一部配列を用いている。この祖先はミトコンドリアイブと呼ばれ、世界的に有名になった。我々はその当時では困難だったmtDNAの全塩基配列を解析し、ヒルの分子系統樹作成を試みた。

アジア諸国のヤマビルのmtDNAの塩基配列との比較では、日本のヒルが独自の進化を遂げているのが印象的である。台湾のヒルは他の国のヒルとの交雑が進んでいるのか、台湾に特徴的な集団と、台湾、オーストラリア、セーシェルなどとの集団、そして中国、ネパール、マレーシア、タイ、日本との集団の3つの集団に別れている。それに比べ、日本のヒルは中国、ネパール、マレーシア、タイと同じ集団のみに位置した。さらに、解析した日本のヒルは全て日本のヒルだけの小さな集団として位置し、他の国のヒルとは全く別の固有種として解析された。我々が解析したmtDNAは全塩基配列であるが、アジアを中心とした各国のヒルとの比較では、各国のヒルのmtDNAの塩基配列が一部配列しか判明していないため、わずか605塩基を用いた比較となっている。このため、信憑性には不満が残るものの、現時点ではこれ以上の解析は不可能である。

アジア諸国との比較では日本のヒルは1つの集団として確認されたが、屋久島のヒルは本州のヒルとは分子系統樹で明らかに異なる集団に位置した。屋久島には他の地域と比較して、ヤマビルの吸血対象の野生動物が多く存在し、ヤマビルが生育するのに適している。そのため、他の地域よりも変異が速まった結果、固有の系統樹になった可能性もある。また、他の地域とは海で隔たれており、独自の進化を遂げた可能もあり、新種の可能性も否定できない。さらに形態学的調査が必要である。

mtDNAの全塩基解析により、ニホンヤマビルのmtDNA内の遺伝子領域はND1、ND2、COX1、COX2、ATP8、COX3、ND6、CYTB、ATP6、ND5、ND4L、ND4の13種類の電子伝達系を構成するサブユニットタンパク質をコードする遺伝子と決定された。この領域はヒトでも保存されており、種によって配列の特徴はあるものの、生物において広く共通する遺伝子群と考えられる。

ほ乳類のmtDNAにコードされている遺伝子と同様に、ニホンヤマビルにおいても13種類のミトコンドリアのサブユニットタンパク質の遺伝子がコードされる結果を得たが、tRNAなどについての塩基配列の決定には到っていない。今後さらにDNA塩基配列の解析を進め、ニホンヤマビルのmtDNAの全容を詳しく解明する必要がある。

謝辞

本研究を進めるにあたり、多大なるご助言を承りました成蹊大学理工学部物質生命理工学科久富寿教授には深謝いたします。研究に協力頂いた成蹊大学理工学部物質生命理工学科卒業生の長瀬圭登氏、三浦夏海氏、犬飼美希氏、宮下沙絵子氏に心より感謝申し上げます。また、サンプル提供にご協力下さった京都大学理学研究科動物学教室の中野 隆文准教授に感謝の意を申し上げます。

参考文献

<日本語文献>

- 秋田県林務部林政課 1997年「秋田のヤマビル～生態と防除～」『ヤマビル被害防止総合対策事業報告書』
- 白田秀明 2014年「知は地球を救う 7. 地球・生命の誕生とその後の変容 ―われわれはどこから来て、どこに向かおうとしているのだろうか―」『帝京大学教育学部紀要』第2巻：1-107
- 内海耕慥、井上正康 2001年『新ミトコンドリア』：共立出版
- 神奈川県ヤマビル対策共同研究推進会議事務局 2008 ヤマビル対策協共同研究中間報告書
- 康東天 2006年 体細胞ミトコンドリアDNAの維持機構：疾患と老化 福岡醫學雑誌. 第97巻 第12号：351-357
- 斎藤成也 1994年「分子系統進化学と分子系統樹作製」『日本農芸化学会誌』第68巻第1号：72-76
- 佐藤尚衛、井内勝哉、久富寿、中野隆文 2019年「ニホンヤマビル (*Haemadipsa japonica*) の mtDNA COX1 領域における系統樹作成」『日本DNA多型学会第27回学術集会要旨』
- 佐藤尚衛、長瀬圭登、井内勝哉、久富寿 2017年「ニホンヤマビル (*Haemadipsa japonica*) の mtDNA 抽出法」『成蹊大学理工学研究報告』第54巻 第1号：9-10
- 中川信行 1981年「ヤマビルの形態・産卵・発生」『秋田自然史研究』第14号：6-9
- 谷重和・石川恵理子 2005年「Biology and control of land leech, *Haemadipsa zeylanica japonica*」『FOREST PESTS』No.638：87-95
- 橋本哲男、有末伸子、長谷川政美 2002年「分子系統樹法の応用と現状の問題点 真核生物の初期進化の解析を例として」『統計数理』第50巻 第1号：45-68

<外国語文献>

- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H., Coulson, A.R., Drouin J., Eperon I.C., Nierlich D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J., Staden, R., Young, I.G. 1981. "Sequence and organization of the human mitochondrial genome." *Nature*, Vol.290 No.5806:457-465
- Brown, W.M., George, M. Jr., Wilson, A.C. 1979. "Rapid evolution of animal mitochondrial DNA." *Proc Natl Acad Sci U S A*. Vol.76, No.4:1967-1971
- Cann, R.L., Stoneking, M., Wilson, A.C. 1987. "Mitochondrial DNA and human evolution." *Nature*. Vol. 325 No.6099:31-36
- Esser, C., Ahmadinejad, N., Wiegand, C., Rotte, C., Sebastiani, F., Gelius-Dietrich, G., Henze, K., Kretschmann, E., Richly, E., Leister, D., Bryant, D., Steel, M.A., Lockhart, P.J., Penny, D., Martin, W. 2004. "A genome phylogeny for mitochondria among α -proteobacteria and a predominantly eubacterial ancestry of yeast nuclear genes." *Mol. Biol. Evol.* Vol. 21:1643-1660
- Horai, S., Satta, Y., Hayasaka, K., Kondo, R., Inoue, T., Ishida, T., Hayashi, S., & Takahaka, N. 1992. "Man's place in *Hominoidea* revealed by mitochondrial DNA genealogy." *Journal of Molecular Evolution*, Vol.35:32-43.
- Lai, Y., Nakano, T., Chen, J. 2011. "Three species of land leeches from Taiwan, *Haemadipsa rjukjuana* comb. n., a new record for *Haemadipsa pita* Moore, and an updated description of

- Tritetrabdella taiwana* (Oka)". *ZooKeys*, Vol.139:1-22
- Ohno, M., 1984. "Bibliography of the selected important animals occurring in Japan (13) *Haemadipsa zeylanica japonica* Whitman (Hirudinea Haemadipsidae)," *Journal of Toyo University*, General Education (Nat. Sci) No.27:131-142
- Sasaki, O., Saito, H., Harada, M. 2005. "A survey of host animals of land leech *Haemadipsa zeylanica* var.*japonica* (Whitman) in Akita Prefecture revealed by PCR-SSCP analysis of 28S rRNA genes," *Med. Entomol.Zool.* Vol.56 No.2:79-84
- Sato, N., Yokoyama, C., Inukai, M., Miyashita, S., Nagase, K., Nakano, T., Iuchi, K., Hisatomi, H. 2019 "Analysis of genetic variation in mitochondrial cytochrome c oxidase subunit 1 between *Haemadipsa japonica* in Japan and land leeches worldwide" *Mitochondrial. DNA B* Vol.4 No.1:1408-1410
- Sato, N., Miyashita, S., Iuchi, K., Nagase, K., Yokoyama, C., Inukai, M., and Hisatomi, H. "Haemadipsa japonica mitochondrial COX1 gene for cytochrome c oxidase subunit I, complete cds 1," 569 bp linear DNA GenBank Accession: LC424190.1 GI: 1474364389
- Yoshihara, S., 1989. "Physiology, ecology and the field experiment on extermination of the land leech, *Haemadipsa zeylanica japonica*, that explosively propagated in ominato, Chiba Prefecture," *Ann.Rep.Inst Marine Ecosystem* No.9
- Wolstenholme, D.R., 1992. "Animal mitochondrial DNA: structure and evolution." *Int Rev Cytol.* Vol.141:173-216.
- Won, S., Park, B.K., Kim, B.J., Kim, H.W., Kang, J.G., Park, T.S., Seo, H.Y., Eun, Y., Kim, K.G., Chae, J.S. 2014 "Molecular Identification of *Haemadipsa rjukjuana* (Hirudiniiformes: Haemadipsidae) in Gage Island, Korea." *The Korean Journal of Parasitology*, Vol.52 No.2:169-175