



岐阜大学機関リポジトリ

Gifu University Institutional Repository

Title	Molecular Phylogenetic and Morphological Analyses of Important Parasites Affecting Livestock in Bangladesh(内容と審査の要旨(Summary))
Author(s)	Uday Kumar Mohanta
Report No.(Doctoral Degree)	博士(獣医学) 甲第479号
Issue Date	2017-03-13
Type	博士論文
Version	none
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/56193

この資料の著作権は、各資料の著者・学協会・出版社等に帰属します。

氏名 (本 (国) 籍)	Uday Kumar Mohanta (バングラデシュ共和国)
主指導教員氏名	岩手大学 教授 板垣 匡
学位の種類	博士 (獣医学)
学位記番号	獣医博甲第479号
学位授与年月日	平成29年3月13日
学位授与の要件	学位規則第3条第2項該当
研究科及び専攻	連合獣医学研究科 獣医学専攻
研究指導を受けた大学	岩手大学
学位論文題目	Molecular Phylogenetic and Morphological Analyses of Important Parasites Affecting Livestock in Bangladesh (バングラデシュの家畜に影響を与える重要な寄生虫の分子系統解析および形態学的解析)
審査委員	主査 岩手大学 教授 村上賢二 副査 帯広畜産大学 教授 河津信一郎 副査 岩手大学 教授 板垣 匡 副査 東京農工大学 准教授 古谷哲也 副査 岐阜大学 准教授 高島康弘

学位論文の内容の要旨

寄生虫感染症はバングラデシュの家畜飼養を障害する原因の一つである。その寄生虫の中で *Fasciola* 属, *Eurytrema cladorchis*, *Explanatum explanatum* は宿主動物の肝臓に寄生し、生命維持に不可欠な器官である肝臓を傷害することで重大な健康被害を及ぼしている。また、*Linguatula serrata* は家畜やヒト、肉食動物の諸器官に若虫が寄生することにより健康被害を与える。これらの寄生虫の分子系統解析は、その起源や分布・拡散の解明、さらには DNA barcoding 解析を行う上で不可欠である。バングラデシュでは、これらの寄生虫の分子系統学的解析のみならず、形態学的解析についても殆ど行われていない。そこで本研究は、バングラデシュの家畜から検出された *Fasciola* 属, *Eurytrema cladorchis*, *Explanatum explanatum*, *Linguatula serrata* の形態学および分子学的特徴の解明を目的とした。

第1章では、バングラデシュで検出された *Fasciola* 属吸虫の精子形成状況と核およびミトコンドリア DNA 解析にもとづく特徴づけと分子系統解析を行った。すなわち、バングラデシュの6地域で家畜から得た肝蛭虫体について、核リボソーム DNA の internal transcribed spacer1 (ITS1) の遺伝子型は PCR-RFLP 法で解析し、ミトコンドリア DNA は nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 遺伝子の塩基配列 (535bp) をダイレクトシーケンスにより解析した。また精子形成は染色された虫体の貯精嚢内精子の有無を観察することで判定した。貯精嚢内精子が認められない無精子型肝蛭は127虫体のうち、98虫体は ITS1 型で Fg 型 (*Fasciola gigantica* 型)、29虫体は Fh/Fg 型 (*Fasciola hepatica* と *F. gigantica* のヘテロ型) を示した。また、これらの無精子型虫体は同一の *nad1* ハプロタイプ (Fsp-NDI-Bd11) を示し、その塩基配列は中国を含むアジア諸国の無精子型虫体と完全に一致したことから、中国起源の無精子型虫体が同国に侵入したと考えられた。一

方,有精子型の20虫体は,ITS1がFg型であったことから*F. gigantea*と種同定され,その*nad1*ハプロタイプは異なる11型に識別された。これらのハプロタイプ多様性の違いから,*F. gigantea*集団は無精子型集団よりバングラデシュに分布した歴史が古いと考えられた。

第2章では,バングラデシュの牛に寄生する*Eurytrema cladorchis*の形態学および分子学的解析を行った。*Eurytrema*属吸虫の種同定については,これまで多くの議論がされてきた。その原因の一つは種同定が主に形態学的特徴に依存してきたため,研究者間で形態特徴の解釈が異なり誤同定を招いたことによる。そこでまず,牛から検出された*Eurytrema*属吸虫を形態学的に観察とともに客観的判断が容易な分子学的解析(18S rRNA 遺伝子,ITS2)を行い,正確に種同定することを目的とした。バングラデシュ南東部の丘陵地域Bandarbanの牛22頭より検出された*Eurytrema*属22虫体を用いた。虫体は染色標本を作製し,その形態学的特徴ならびに計測値から*Eurytrema cladorchis*と種同定された。さらに,その18S rDNA(1784bp)とITS2(229bp)を決定し,*Eurytrema*属各種や近縁種を加えて分子系統解析を行った。その結果,本研究の*E. cladorchis*虫体は分子系統樹で単系統群を形成し,*Eurytrema pancreaticum*や*Eurytrema coelomaticum*とは別のクレードに含まれ,これらとは分子学的にも異なる種であると考えられた。本研究はバングラデシュに*E. cladorchis*が存在することを初めて明らかにし,さらに本虫の分子学的情報を提供した。

第3章では,バングラデシュおよびネパールの家畜から検出された胆管寄生の双口吸虫*Explanatum explanatum*(Creplin, 1847) Fukui, 1929の核リボソームITS2およびミトコンドリア*nad1*塩基配列にもとづく分子系統解析を行った。まず,バングラデシュの4地域のバッファロー26頭および牛7頭から得た66虫体,ならびにネパールのChitwan地区のバッファロー10頭から得た20虫体について,核リボソームDNAのITS2領域の塩基配列(442bp)を決定し,分子学的に*E. explanatum*と同定した。ITS2では,バングラデシュの虫体に配列の異なる2つの遺伝子型が識別され,ネパールの虫体では配列は一致した。これらの虫体を用いてミトコンドリア*nad1*の塩基配列(657bp)を解析し分子系統学的に解析した。バングラデシュには少なくとも4つの異なる*E. explanatum*集団(ハプログループI~IV)が分布し,ネパールには2つの集団(III, IV)が分布することが明らかとなった。*E. explanatum*のI, II, III, IV間では,*Fst*値が有意に異なったことから,これらの集団は遺伝的に異なると考えられた。一方,IIIおよびIVのバングラデシュ個体群とネパール個体群間では*Fst*値に有意差が認められなかったことから,これら個体群は遺伝的に極めて近縁であると考えられた。このような遺伝的に異なる*E. explanatum*集団は家畜化現象がしばしば行われたことに関連して出現したと考えられた。本章ではバングラデシュとネパールの*E. explanatum*の分子学的特徴を初めて解明し,同吸虫のアジアにおける起源と分布拡散を解明するための基礎的情報を提供した。

第4章では,*Linguatula serrata*(Pentastomida:Linguatulidae)を核リボソームDNAの18S rDNAおよびミトコンドリアcytochrome *c* oxidase I遺伝子の塩基配列に基づいて分子系統解析を行った。舌虫として世界的に知られている*Linguatula serrata*は昆虫綱Pentastomida亜綱,Porocephalida目に属している。牛の腸間膜リンパ節から検出した舌虫の若虫を形態学的に*L. serrata*と同定した。その18S rDNA塩基配列には種内変異が認められず,また*cox1*塩基配列においても種内相同性は99.7%-99.9%と極めて高かった。Cephalobaenida目の舌虫種や昆虫綱,線虫綱などの寄生虫種を加えた分子系統解析から,*Linguatula*属はCephalobaenida目の属種と遺伝的な近縁性が示唆された。これは,形態学に基づいた舌虫Pentastomida亜綱の従来分類体系が分子系統に基づく系統関係に一致しないことを示し,Arthropoda(節足動物門)におけるPentastomida亜綱の系統学的位置は今後様々なtaxaと分子マーカーを用いて検討すべきであると考えられた。

本研究では,バングラデシュの家畜から検出された*Fasciola*属,*Eurytrema*

cladorchis, *Explanatum explanatum*, *Linguatula serrata* の形態学および分子学的特徴を解析した。今後、これらの寄生虫種の起源、世界での分布拡散を解明する上で重要な成果であると考えられる。

審査結果の要旨

バングラデシュでは家畜の吸虫感染症が畜産業の発展に深刻な影響を及ぼしている。*Fasciola* 属, *Eurytrema cladorchis*, *Explanatum explanatum* は反芻家畜の肝臓（胆管）に寄生する吸虫で肝機能障害を主体とした病態を引き起こす。一方, *Linguatula serrata* は節足動物門の舌虫類に属し, 家畜では主に内臓器官に若虫が寄生する。近年, 寄生虫学分野においても分子情報の有用性が明らかにされ, 寄生虫種の分子同定や診断法に分子情報が応用されている。さらに分子情報を用いた寄生虫の起源や分布・拡散の解明も試みられている。本研究では, バングラデシュにおける *Fasciola* 属, *Eurytrema cladorchis*, *Explanatum explanatum*, *Linguatula serrata* について形態学および分子系統学的な解析を行った。

Fasciola 属については, バングラデシュに分布する種を同定するために貯精嚢内精子の有無と核リボソーム DNA の internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域の遺伝子型を解析し, 単為生殖型（無精子型）肝蛭が *Fasciola gigantica* よりも優性に分布することを明らかにした。またミトコンドリア NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 領域の塩基配列から *F. gigantica* 20 虫体には 11 ハプロタイプが識別され, 単為生殖型肝蛭 127 虫体では中国起源と考えられる 1 ハプロタイプが確認された。これらのハプロタイプ多様性の評価から, *F. gigantica* 集団は単為生殖型肝蛭集団よりも古い時代からバングラデシュに分布していたと考えられた。

丘陵地域のウシの胆管から検出された *Eurytrema* 属 22 虫体を形態学的に解析し, *Eurytrema cladorchis* と種同定され, 同種がバングラデシュに分布することを初めて明らかにした。さらに, 核リボソーム DNA の 18S rRNA 遺伝子および ITS2 の塩基配列を決定し, *Eurytrema* 属各種や近縁種の配列を加えて分子系統解析を行った。*E. cladorchis* 個体群は分子系統樹で単系統群を形成し, *E. pancreaticum* や *E. coelomaticum* とは別のクレードに属したことから, これらの種とは分子学的にも異なる種であることを確認した。

バングラデシュおよびネパールのウシおよびスイギュウの胆管から検出された双口吸虫 86 虫体について, 核リボソーム DNA の ITS2 領域の塩基配列 (442bp) を決定し, その配列が同種の既知配列と一致したことから全ての虫体を *Explanatum explanatum* と同定した。次にミトコンドリア *nad1* の塩基配列 (657bp) の解析によりバングラデシュには少なくとも 4 つの異なる *E. explanatum* ハプログループ (I~IV) が分布し, ネパールには 2 つのハプログループ (III, IV) が存在することを明らかにした。*E. explanatum* の I, II, III, IV 間では, *Fst* 値に有意差が確認され, これらのハプログループは遺伝的に異なる集団と考えられた。一方, III および IV のバングラデシュ個体群とネパール個体群間では *Fst* 値に有意差が認められず, 両個体群は遺伝的に極めて近縁であると考えられた。バングラデシュでは遺伝的に異なる *E. explanatum* 集団の混在が確認され, これは本来, 野生動物を宿主として遺伝的に異なった *E. explanatum* が家畜化現象と家畜の分散により生じたと考えられた。

ウシから検出された舌虫の若虫は形態学的特徴により *Linguatula serrata* と種同定された。さらに, 核リボソーム DNA の 18S rDNA およびミトコンドリア cytochrome *c* oxidase I 遺伝子の塩基配列を決定し, 分子学的にもその種を確定させた。舌虫類の他種や昆虫類, 線虫類を加えた分子系統解析により舌虫類の分類体系は形態指標と分子指標で異なることを見だし, 今後, 舌虫類の分類体系を再検討する必要性を示唆した。

本研究では, バングラデシュの家畜から検出された *Fasciola* 属, *Eurytrema*

cladorchis, *Explanatum explanatum*, *Linguatula serrata* の形態学および分子学的特徴を解析した。今後、これらの分子情報は寄生虫種の同定や診断、さらにその起源や分布拡散を解明する上で重要な成果であると考えられる。

以上について、審査委員全員一致で本論文が岐阜大学大学院連合獣医学研究科の学位論文として十分価値があると認めた。

基礎となる学術論文

- 1) 題 目 : Characteristics and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses
著 者 名 : Mohanta, U. K., Ichikawa-Seki, M., Shoriki, T., Katakura, K. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : Parasitology Research
巻・号・頁・発行年 : 113 (7) : 2493-2501, 2014
- 2) 題 目 : Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh
著 者 名 : Mohanta, U. K., Ichikawa-Seki, M., Hayashi, K. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : Parasitology Research
巻・号・頁・発行年 : 114 (6) : 2099-2105, 2015
- 3) 題 目 : Molecular and phylogenetic analyses of the liver amphistomes, *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) Fukui, 1929 in ruminants from Bangladesh and Nepal based on nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial *nad1* sequences
著 者 名 : Mohanta, U. K., Rana, H. B., Devkota, B. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : Journal of Helminthology
巻・号・頁・発行年 : In press
- 4) 題 目 : Molecular characterization and phylogeny of *Linguatula serrata* (Pentastomida: Linguatulidae) based on the nuclear 18S rDNA and mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene
著 者 名 : Mohanta, U. K. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : In press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Molecular phylogenetic analysis of *Fasciola* flukes from eastern India
著 者 名 : Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Mohanta, U.K., Singh, T.S., Shoriki, T., Sugiyama, H. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : Parasitology International
卷・号・頁・発行年 : 64 (5) : 334-338, 2015

- 2) 題 目 : Novel methods for the molecular discrimination of *Fasciola* spp. on the basis of nuclear protein-coding genes
著 者 名 : Shoriki, T., Ichikawa-Seki, M., Suganuma, K., Naito, I., Hayashi, K., Nakao, M., Aita, J., Mohanta, U. K., Inoue, N., Murakami, K. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : Parasitology International
卷・号・頁・発行年 : 65 (3) : 180-183, 2016

- 3) 題 目 : Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Fasciola gigantica* from western Java, Indonesia
著 者 名 : Hayashi, K., Ichikawa-Seki, M., Allamanda, P., Wibowo, P. E., Mohanta, U. K., Sodirun, Guswanto, A. and Nishikawa, Y.
学術雑誌名 : Parasitology International
卷・号・頁・発行年 : 65 (5) : 424-427, 2016

- 4) 題 目 : Molecular characterization of *Fasciola gigantica* in Delhi, India and its phylogenetic relation to the species from South Asian countries
著 者 名 : Hayashi, K., Mohanta, U.K., Neeraja, T. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 78 (9) : 1529-1532, 2016

- 5) 題 目 : Molecular characterization and phylogenetic analysis of *Explanatum explanatum* in India based on nucleotide sequences of ribosomal ITS2 and the mitochondrial gene *nad1*
著 者 名 : Hayashi, K., Mohanta, U.K., Ohari, Y., Neeraja, T., Singh, T.S., Sugiyama, H. and Itagaki, T.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
卷・号・頁・発行年 : 78 (11) : 1745-1748, 2016