

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 Uday Kumar Mohanta

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)

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。さらに、*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は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。

1. 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と分子系統解析

本研究では、核リボソーム DNA の internal transcribed spacer1 (ITS1) およびミトコンドリア DNA の nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 遺伝子の塩基配列、さらに虫体の精子形成状況にもとづいて、*Fasciola* 属吸虫を同定することを目的とした。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。ITS1 型は PCR-RFLP 法で解析し、*nad1* ハプロタイプは PCR 増副産物 (535bp) をダイレクトシーケンシングにより解析した。無精子型の *Fasciola* 属 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. gigantica* 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. gigantica* 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。

2. 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

*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。本研究では、牛から検出された *Eurytrema* 属吸虫を形態学的特徴の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。

### 3. 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

本研究は *Explanatum explanatum* について,その起源および生物地理学的解明を目的として分子学的に解析した。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虫体を用いた。核リボソームDNAのITS2領域(442bp)およびミトコンドリア *nad1* の断片(657bp)の塩基配列を解析した。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。*nad1* に基づく系統解析から,少なくとも4つの異なる *E. explanatum* 集団 (groups I to IV) がバングラデシュに分布し,2つの集団がネパールに分布することが明らかとなった。*E. explanatum* の I, II, III, IV 集団間では *Fst* 値が有意に異なったことから,これら集団は遺伝的に異なると考えられた。一方,バングラデシュとネパールの III および IV 集団間では *Fst* 値に有意差が認められなかったことから,これら集団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 *Explanatum 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。本研究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。

### 4. 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た *Linguatula serrata* (Pentastomida:Linguatulidae) の分子系統解析

世界的な寄生虫である *Linguatula serrata* は舌虫としてよく知られ,Pentastomida 亜綱に属している。牛の腸間膜リンパ節から検出した若虫を形態学的に *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%と高かった。両遺伝子に基づく分子系統解析から,Porocephalida 目に属する *Linguatula* 属は同目の別属よりも別目 (Cephalobaenida) の属と遺伝的な近縁性が示唆された。これは,Pentastomida 亜綱の形態に基づくこれまでの分類が分子系統と一致しないことを示唆し,今後は多くの taxa で分子マーカーを解析し Arthropoda (節足動物門) における Pentastomida 亜綱の系統学的位置を解明すべきであると考えられた。

# 学 位 論 文 要 約

氏 名 Uday Kumar Mohanta

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)

Parasitic infection is considered as one of the major hindrances for livestock rearing in Bangladesh. Among the parasites, *Fasciola* spp., *Eurytrema cladorchis* and *Explanatum explanatum* parasitize the liver and bile ducts of definitive hosts and cause severe health impact through inducing damage to the liver, vital organ of the body. Besides, *Linguatula serrata* causes serious health consequences in carnivorous mammals and humans. Molecular phylogenetic analyses on these parasites are indispensable to elucidate their origin, geographical expansion and DNA barcoding. Unfortunately, no molecular as well as detail morphological analyses of these parasites have been carried out in Bangladesh. Therefore, the objectives of this study were to precisely characterize these parasites through detailed morphology, morphometry and molecular properties to develop the DNA barcoding approach, and to track their origin and geo-graphical expansion through phylogenetic analyses.

1. Characteristics and molecular phylogeny of *Fasciola* flukes from Bangladesh, determined based on spermatogenesis and nuclear and mitochondrial DNA analyses

The aim of this study was to precisely discriminate *Fasciola* spp. based on DNA sequences of nuclear internal transcribed spacer 1 (ITS1) and mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) gene as well as spermatogenic status. Spermatogenic status was determined by analyzing stained seminal vesicles. The ITS1 types were analyzed using the polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) method. *Nad1* (535 bp) haplotypes were identified based on PCR and direct sequencing. Of the 127 aspermic flukes, 98 were identified as Fg type (*Fasciola gigantica* type) in ITS1, whereas 29 were identified as Fh/Fg type (combination of *Fasciola hepatica* and *F. gigantica* type). All the 127 aspermic flukes showed Fsp-NDI-Bd11 in *nad1* haplotype with nucleotide sequences identical to aspermic *Fasciola* sp. from other Asian countries. Further, 20 spermic flukes were identified as *F. gigantica* since they displayed Fg type in ITS1. *Fasciola gigantica* population was thought to be distributed in Bangladesh considerably earlier than the aspermic *Fasciola* sp., because 11 haplotypes with high haplotype diversity were detected from the *F. gigantica* population.

2. Morphological and molecular characterization of *Eurytrema cladorchis* parasitizing cattle (*Bos indicus*) in Bangladesh

There is always controversy regarding identification of different species in the genus *Eurytrema*. Identification has been based mainly on morphology, which can be misleading and subject to differing interpretation among the scientists. Therefore, this study was focused on the identification of *Eurytrema* flukes both by morphology and molecular properties on the basis of 18-subunit ribosomal RNA (18S rRNA) gene as well as internal transcribed spacer 2 (ITS2). Among six different agro-ecological areas of Bangladesh, 22 *Eurytrema* flukes were recovered from the bile ducts of 22 cattle in Bandarban, a hill district. The flukes were identified as *E. cladorchis* through morphometric and morphological studies. Phylogenetic analyses were conducted by neighbor-joining phylogram inferred from both 18S rRNA (1784 bp) gene and ITS2 (229 bp) sequences. A monophyletic clade was constructed by the *E. cladorchis* from Bangladesh; however, the clade was distinct from those formed by *Eurytrema pancreaticum* and *Eurytrema coelomaticum*. This study first described the existence of *E. cladorchis* in Bangladesh and may provide useful information to clarify phylogenetic relationships within the genus *Eurytrema* and also for other digeneans.

3. Molecular and phylogenetic analyses of the liver amphistome, *Explanatum explanatum* (Creplin, 1847) Fukui, 1929 from ruminants in Bangladesh and Nepal based on nuclear ribosomal ITS2 and mitochondrial *nad1* sequences.

The objective of this study was molecular characterization of *Explanatum explanatum* to elucidate their origin and biogeography. A total of 66 flukes from 26 buffaloes and 7 cattle in 4 different geographic areas of Bangladesh and 20 flukes from 10 buffaloes in Chitwan district of Nepal were subjected for analysis. The sequences (442 bp) of second internal transcribed spacer (ITS2) of ribosomal DNA and the variable fragments (657 bp) of mitochondrial nicotinamide dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) were analyzed. In ITS2 region, two genotypes were detected among the flukes from Bangladesh while the flukes from Nepal constituted only one genotype. Phylogenetic analyses inferred from *nad1* gene revealed that at least four divergent populations (group I to IV) are distributed in Bangladesh, whereas two divergent populations were found to be distributed in Nepal. Significant *Fst* (pairwise fixation index) values among the four groups suggest each group of populations significantly distinct from each other. However, *Fst* values between the populations from Bangladesh and Nepal within the group III and IV were insignificant, indicating that genetically close populations in these groups are distributed in both the countries. This divergence in *nad1* gene indicates that each lineage of *E. explanatum* from diverse geography was co-adapted during the multiple domestication events of ruminants. This study, for the first time, provides molecular characterization of *E. explanatum* in Bangladesh and Nepal, and may provide useful information for elucidating their origin and dispersal route in Asia.

4. Molecular characterization and phylogeny of *Linguatula serrata* (Pentastomida: Linguatulidae) based on the nuclear 18S rDNA and mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene.

*Linguatula serrata*, a cosmopolitan parasite, is commonly known as tongue worm belonging to the subclass Pentastomida. The nymphal stage of the worm was collected from mesenteric lymph nodes of cattle and identified these as *L. serrata* based on morphology and morphometry. The 18S rDNA sequences showed no intraspecific variation, although *cox1* sequences showed 99.7%-99.9% homology. In the phylogenies inferred from both gene loci, members of the genus *Linguatula* (order Porocephalida) were closer to those of the order Cephalobaenida than to those of Porocephalida, reflecting a mismatch with the corresponding morphology-based taxonomy. Accordingly, analyses of additional gene loci using a larger number of taxa across the Pentastomida should be undertaken to determine an accurate phylogenetic position within the Arthropoda.