

氏名（本（国）籍）	林 慶（愛媛県）
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480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	南アジアにおける反芻動物の胆管内寄生吸虫 <i>Fasciola</i> spp. および <i>Explanatum explanatum</i> の分子系統に関する研究
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 横 山 直 明 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

肝蛭 *Fasciola* spp. および双口吸虫 *Explanatum explanatum* はいずれも反芻動物の胆管内寄生吸虫であり、南アジアの畜産業に甚大な被害を与えている。*Fasciola* 属のうち、南アジアには *F. gigantica* および単為生殖型（無精子型）肝蛭（*Fasciola* sp.）が分布している。単為生殖型肝蛭は *F. hepatica* と *F. gigantica* の交雑子孫として中国で発生し、家畜の伝播に伴ってアジア諸国へと分布を拡大したと考えられている。また、*F. gigantica* の世界的な分布はゼブー牛の分布域と一致していることが知られている。ゼブー牛はインダス渓谷で家畜化された後、世界中に分布域を広げたことから、それに伴って *F. gigantica* も南アジアから世界中へ広がった可能性が考えられる。しかしながら、南アジア地域における *Fasciola* 属の遺伝学的情報は限られており、系統学的解析は十分に行われていない。また、*E. explanatum* は南アジアにおいてごく一般的に検出される吸虫であるが、その起源や拡散経路については何も分かっていない。本研究では、南アジアにおける、これらの胆管内寄生吸虫の起源および反芻動物との共伝播について、分子系統学的手法を用いて解析した。

第1章では、インド北東部における肝蛭の分子系統解析を行った。すなわち、インド北東部のウシ、スイギュウおよびヤギから採取された *Fasciola* 属 157 虫体について、貯精嚢内精子の有無および核リボソーム DNA の internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域の遺伝子型に基づいて種同定を行った。その結果、これらの地域には *F. gigantica* および単為生殖型肝蛭が分布していることが明らかとなった。次に、*Fasciola* 属の系統解析に最もよく用いられるミトコンドリア DNA の NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 領域の塩基配列 (535bp) を、ダイレクトシーケンス法を用いて決定した。その結果、インド北東部に分布する単為生殖型肝蛭のハプロタイプは近隣のアジア諸国に分布する個体群と同一もしくは一塩基置換であり、中国で発生した単為生殖型肝蛭がインド北東部まで分布を拡大していることが示唆された。しかしながら、単為生殖型肝蛭の割合は近隣諸国に比べて低く、*F. gigantica* が優勢であった。*F. gigantica* のハプロタイプは南アジアで優勢なハプログル

ープ A と、東南アジアで優勢なハプログループ B に分類された。各国の個体群の塩基多様度を比較した結果、*F. gigantica* ハプログループ A はゼブー牛の移動に伴ってインド亜大陸の西から東へと分布を拡大したグループである可能性が示唆された。一方、ハプログループ B はスイギュウの移動に伴って東南アジアからインド北東部にもたらされた可能性が示唆された。

第 2 章では、新規の種同定マーカー分子を用いた南アジア産肝蛭の同定を行った。すなわち、第 1 章において解析されたインド北東部産肝蛭 157 虫体のうち、6 虫体は貯精嚢内に精子を有しない無精子型にも関わらず、*nad1* のハプロタイプが *F. gigantica* クレードに属していたため、従来の方法では正確な種同定が困難であった。このような虫体は隣国のバングラデシュおよびミャンマーでも報告されており、より確実な種同定法が望まれていた。近年、核 DNA の phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*) および DNA polymerase delta (*pold*) の遺伝子型を用い、*F. hepatica*、*F. gigantica* および単為生殖型肝蛭を識別する方法が報告された。そこで、これらの種同定マーカーを用い、インド北東部、バングラデシュおよびミャンマーの *Fasciola* 属虫体の種同定を試みた。解析の結果、*nad1* ハプロタイプが *F. gigantica* ハプログループに属する全ての虫体は *pepck* もしくは *pold* 遺伝子型も *F. gigantica* 型を示し、単為生殖型肝蛭ハプログループに属する全ての虫体は *pepck* もしくは *pold* 遺伝子型が単為生殖型肝蛭であることを示すヘテロ型を示した。このことから、*pepck* および *pold* は *Fasciola* 属の種同定に有用なマーカー分子であることが確認された。

第 3 章では、インド北西部のデリーにおける肝蛭の分子系統解析を行った。まずインド北西部のデリーにおいてスイギュウから採取された *Fasciola* 属 40 虫体について、*pepck* および *pold* の遺伝子型に基づいて種同定を行った。その結果、40 虫体は全て *F. gigantica* であると同定され、単為生殖型肝蛭は検出されなかった。次に *nad1* の塩基配列を決定した結果、40 虫体のハプロタイプは全てハプログループ A に分類された。南アジアの各地域の虫体とともに塩基多様度を比較した結果、ハプログループ A に属する *F. gigantica* は、ゼブー牛の伝播に伴って、インド亜大陸の西から東へとその分布域を拡大した可能性が示唆された。

第 4 章では、インドにおける *Explanatum explanatum* の分子系統解析を行った。まず、インドの 4 地域においてゼブー牛およびスイギュウより採取された双口吸虫 70 虫体について、核リボソーム DNA の ITS1 領域 (903bp) および ITS2 領域 (442bp) の塩基配列に基づいて種同定を行った。その結果、70 虫体はすべて *E. explanatum* であると同定された。次に *nad1* の塩基配列 (657bp) を決定し、隣接するバングラデシュおよびネパールの個体群との系統関係を解析した。その結果、これら 3 か国のハプロタイプは 6 つのクレードに分類され、インドではクレード A および C が優勢であった。また、これらのクレードはバングラデシュおよびネパールでも検出されたことから、インド亜大陸に広く分布していると考えられた。さらに、遺伝的分化の指標である分子分散分析 (AMOVA) を行った結果、これら 3 か国には遺伝的に多様な *E. explanatum* の個体群が分布しているものの、国や地域による遺伝的な偏りは認められなかった。このことから、インド亜大陸の *E. explanatum* の個体群には遺伝子流動が存在することが示唆された。インド亜大陸のインド、バングラデシュおよびネパールは地理的に近いだけでなく、歴史的・文化的に強く結びついており、*E. explanatum* の宿主である家畜や野生の反芻動物の移動が、*E. explanatum* の遺伝子流動に関与している可能性が示唆された。

以上より、*Fasciola* 属および *E. explanatum* 個体群のいずれにおいても、その分布拡大に宿主である家畜が大きな役割を果たしたことが示唆された。アジアにおける *F. gigantica* は *nad1* ハプロタイプに基づいて 3 つのハプログループに分類することができ、各グループは異なる地域を起源とし、ゼブー牛やアジアスイギュウなどの家畜の移動に伴って分布を拡

大したと考えられた。また、中国で発生したと考えられる単為生殖型肝蛭も家畜の移動に伴って南アジアの一部にその分布を拡大していることが示唆された。一方、南アジアにおける *E. explanatum* 個体群には宿主の移動に起因する遺伝子流動が存在していることが示唆された。*Fasciola* 属および *E. explanatum* はいずれも中間宿主である淡水生巻貝は移動性に乏しいことから、終宿主である反芻動物の家畜化およびその伝播が、これらの寄生虫の個体数の増加および分布域の拡大に大きく寄与したことが示唆された。

審 査 結 果 の 要 旨

肝蛭 *Fasciola* spp. および双口吸虫 *Explanatum explanatum* は反芻動物の胆管に寄生する吸虫であり、南アジアの畜産業に甚大な被害を与えている。南アジアには *Fasciola gigantica* および単為生殖型肝蛭 (*Fasciola* sp.) が分布している。*F. gigantica* はアジア南西部のインダス溪谷で家畜化されたゼブー牛を終宿主として南アジアを含む熱帯地域に分布を拡大したと考えられ、単為生殖型肝蛭は中国で発生し、家畜の移動に伴ってアジア諸国へ拡散したと考えられている。しかし、南アジアにおける *Fasciola* 属の分布と拡散を解明するための分子系統解析は十分に行われていない。一方、*E. explanatum* は南アジアに広く分布するが、その起源や拡散経路については不明である。本研究では、反芻家畜を終宿主とするこれら吸虫類の南アジアにおける起源と宿主との共伝播について分子系統学的手法を用いて解析するとともに、南アジアに分布する *Fasciola* 属を新規の種同定マーカー分子を用いて解析した。

インドでは、北西部に *F. gigantica* および単為生殖型肝蛭が分布し、北東部には *F. gigantica* が分布することが明らかになった。ミトコンドリア NADH dehydrogenase subunit 1 (*nad1*) 領域の塩基配列から北西部の単為生殖型肝蛭は極めて近縁な集団であり、そのハプロタイプは近隣のアジア諸国の単為生殖型肝蛭個体群と同一もしくは一塩基の置換であった。このことから中国起源の単為生殖型肝蛭がインド北東部まで分布を拡大していることが示唆された。また、*F. gigantica* の *nad1* ハプロタイプは南アジアで優勢なハプログループ A と、東南アジアで優勢なハプログループ B に分類された。各国の *F. gigantica* 個体群の塩基多様度から、ハプログループ A はゼブー牛の移動に伴ってインド亜大陸の西から東へと分布を拡大したグループであり、ハプログループ B はスイギュウの移動に伴って東南アジアからインド北東部に侵入した可能性が示唆された。

Fasciola 属の種同定は貯精嚢内精子の有無と核リボソーム DNA の internal transcribed spacer 1 (ITS1) 領域の遺伝子型による方法で行われてきたが、この従来法では同定が困難な個体が検出されている。近年、核 DNA の phosphoenolpyruvate carboxykinase (*pepck*) および DNA polymerase delta (*polδ*) の遺伝子型による *Fasciola* 属の識別法が報告された。そこで、インド北東部、バングラデシュおよびミャンマーの *Fasciola* 属虫体の *pepck* および *polδ* 遺伝子型を解析し、既に明らかにされている従来法による同定評価と *nad1* ハプロタイプの結果を比較することで *pepck* および *polδ* 同定法を評価した。その結果、全虫体の *pepck* および *polδ* 遺伝子型による同定は *nad1* ハプロタイプ系統樹による種の識別と一致した。以上から、*pepck* および *polδ* は *Fasciola* 属の種同定に有用なマーカー分子であることが確認された。

インド北東部および北西部の 4 地域のゼブー牛およびスイギュウから得た *Explanatum explanatum* の *nad1* の塩基配列を決定し、隣接するバングラデシュおよびネパールの個体群との系統関係を解析した。これら 3 か国の *nad1* ハプロタイプは 6 つのクレード (A~F) に分類され、インド個体群では A および C が優勢であった。両クレードはバングラデシュおよびネパール個体群でも検出され、インド亜大陸に広く分布していると考えられた。遺伝的分

化の指標である分子分散分析（AMOVA）により、これら3カ国には遺伝的に多様な *E. explanatum* 個体群が分布するが、国や地域の個体群間による遺伝的な偏りは認められなかった。このことから、インド亜大陸の *E. explanatum* 個体群には遺伝子流動が存在することが示唆された。インド亜大陸のインド、バングラデシュおよびネパールは地理的に近いだけでなく、歴史的・文化的に強く結びついており、*E. explanatum* の宿主である家畜や野生の反芻動物の移動が、*E. explanatum* の遺伝子流動に関与している可能性が示唆された。

本研究の成果から 南アジアにおける *Fasciola* 属および *E. explanatum* の分布と拡散は反芻家畜の移動と密接に関係することが示唆された。

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 : 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
巻・号・頁・発行年 : 64 (5) : 334-338, 2015
- 2) 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
巻・号・頁・発行年 : 78 (9) : 1529-1532, 2016
- 3) 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
巻・号・頁・発行年 : 78 (11) : 1745-1748, 2016

既発表学術論文

- 1) 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

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

巻・号・頁・発行年： 65 (3) : 180-183, 2015

3) 題 目： Identification and functional analysis of a novel mitochondria-localized 2-Cys peroxiredoxin, BbTPx-2, from *Babesia bovis*

著 者 名： Masatani, T., Asada, M., Hakimi, H., Hayashi, K., Yamagishi, J., Kawazu, S. and Xuan, X.

学術雑誌名： Parasitology Research

巻・号・頁・発行年： 115 (8) : 3139-3145, 2016

4) 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

巻・号・頁・発行年： 65 (5) : 424-427, 2016