

## 学 位 論 文 要 旨

氏名 Patrice Makouloutou

題 目 : Molecular genetic markers for parasite species identification and epidemiological study with special reference to *Gongylonema pulchrum* and *Oesophagostomum stephanostomum*.

(寄生虫の種同定と疫学研究において有用な遺伝子マーカーの研究 —特に *Gongylonema pulchrum* と *Oesophagostomum stephanostomum* に注目して—)

論文要旨 :

Human-wildlife interactions have reached unprecedented levels recently because of expanding anthropogenic activity on the earth's ecosystem, giving rise to serious negative effects such as mutual disease transmissions between humans and wildlife, or those between domestic animals and wildlife animals. Reliable identification of a causative pathogen(s) of zoonotic diseases found synchronously in humans and animals or domestic animals and wildlife animals is critically important for understanding the disease transmission dynamics in the confined environment or nature. For species identification of parasitic helminths, morphological characterization of adult worms play a pivotal role, and recently molecular-based approaches define more exactly or finely the species or cryptic species, or further 'units' for understanding the disease transmission in nature. In the present study, I have tried to know the disease transmission dynamics among multiple animal species in the field.

In Chapter I, I studied the gullet worm, *Gongylonema pulchrum* Molin, 1857, found worldwide from a variety of mammals such as cattle, sheep, goats, camels, pigs, equines, cervids, rodents, bears and primates including humans. Due to its wide host range, it has been suggested that the worm may be transmitted locally to any mammalian host by chance. To investigate this notion, the ribosomal RNA gene (rDNA), mainly regions of the internal transcribed spacers (ITS) 1 and 2, and a cytochrome *c* oxidase subunit I (COI) region of mitochondrial DNA (mtDNA) of *G. pulchrum* were characterized using parasites from the following hosts located in Japan: cattle, sika deer, wild boars, Japanese macaques, a feral Reeves's muntjac and captive squirrel monkeys. The rDNA nucleotide sequences of *G. pulchrum* were generally well conserved regardless of their host origin. The COI sequences of *G. pulchrum* were divided into multiple haplotypes, and two groups of haplotypes, i.e. those from a majority of sika deer, wild boars and Japanese macaques and those from cattle and zoo animals, were clearly differentiated. Our findings indicate that domestic and sylvatic transmission cycles of the gullet worm are currently present, at least in Japan.

In Chapter II, I characterized morphologically and genetically the gullet worms collected

from Murrah cross water buffaloes (*Bubalus bubalis*) in the Kathmandu and Chitwan districts of Nepal. The morphology and measurements of collected worms were identical to those of *G. pulchrum*, except for the length of the left spicules relative to the body length. The ITS regions exhibited higher variations between the buffalo-collected worms and *G. pulchrum* from the other host mammals (85-88% identity for ITS1 and 56-80% identity for ITS2). The COI also showed lower identities (89.2-90.2%), although only a single amino acid substitution was noted compared with the majority of *G. pulchrum* samples collected in Japan. Based on these molecular genetic characters in the rDNA and COI mitochondrial DNA, together with a shorter left spicule length relative to body length, the gullet worms isolated from buffaloes in Nepal might belong to a distinct local or buffalo-preferring population of *G. pulchrum*, although its geographical distribution on the continent and host specificity remain to be clarified.

In Chapter III, I studied a local mange epizootic, which was caused by *Sarcoptes scabiei* (Acari: Sarcoptidae), in wild mammals such as raccoon dogs, wild boars, feral racoons, badgers, martens, and serows in Japan. The ITS2 region of the rDNA and the partial 16S and COI genes of mtDNA were characterized in the mangy skin lesions of 128 animals. The majority of *S. scabiei* mites had almost identical ITS2 nucleotide sequences to those recorded in a variety of mammals worldwide. Partial 16S and COI fragments of mtDNA showed an identical nucleotide sequence except for one site ('C' vs. 'T') for the former and four sites ('G', 'C', 'C', 'C' vs. 'A', 'T', 'T', 'T', respectively) for the latter fragment. Furthermore, these substitutions were always synchronized, with the two mtDNA haplotypes, i.e. 'C/GCCC' and 'T/ATTT', appearing to separately colonize in small geographical units. Moreover, the 'T/ATTT' haplotype was claded into a branch where animal-derived mites worldwide dominated, whereas the 'C/GCCC' haplotype formed a geographical branch unique to Japanese isolates. These results suggest that heterologous populations of monospecific *S. scabiei* are expanding their populations and distributions regardless of host species in an apparently local mange epizootic of wild mammals in Japan.

In Chapter IV, the prevalence of the nodular worm *Oesophagostomum stephanostomum* (Nematoda: Strongylida) in western lowland gorillas at Moukalaba-Doudou National Park (MDNP), Gabon, was determined in fecal samples, along with their coprocultures. Genetic analyses of the parasites suggest that at MDNP, Gabon, only a single population of *O. stephanostomum* with a degree of genetic diversity is prevalent in western lowland gorillas, without zoonotic complication in local inhabitants.

Through the studies shown above, I have clarified the presence of previously unnoticed 'transmission units' of *G. pulchrum*, and involvement of different 'parasite units' of distinct origins in a local epidemic of the parasitic disease. Appropriately selected genetic markers of parasites may allow us to predict the potential risk(s) of the epizootic disease of the wildlive animals to humans and domestic animals having a possible contact with them, and vice versa.

## 学位論文審査の結果の要旨

氏名	PATRICE MAKOULOUTOU
審査委員	主査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副査：山口大学 教授 山本 芳実
	副査：鳥取大学 教授 奥 祐三郎
	副査：山口大学 教授 音井 威重
	副査：鹿児島大学 准教授 田仲 哲也
題目	Molecular genetic markers for parasite species identification and epidemiological study with special reference to <i>Gongylonema pulchrum</i> and <i>Oesophagostomum stephanostomum</i> (寄生虫の種同定と疫学研究において有用な遺伝子マーカーの研究—特に <i>Gongylonema pulchrum</i> と <i>Oesophagostomum stephanostomum</i> に注目して—)
審査結果の要旨： 地球上での人の活動は大いに増大し、大きな影響を自然環境や生態系に与えている。人と野生動物との間でも、これまでにない密接な関係がみられるようになり、人と野生動物間あるいは家畜と野生動物間で伝播される感染症が身近な問題となってきている。このような関係にあることが疑われる動物感染症の病原体について、その種あるいは系統を正確に把握することは、特定地域や自然界での感染動態を把握する上で極めて重要である。寄生蠕虫の種同定は、その成虫の形態学的特徴づけで行われてきた。近年導入が進む分子遺伝学的手法を用いた寄生蠕虫の特徴づけにより、種や隠蔽種、あるいは宿主域を越える系統等の存在について正確な理解が可能になりつつある。本研究では、宿主域が広いとされ野外で多くの動物種が関わりとされてきた寄生蠕虫について、その分子遺伝学的な特徴づけを行い、実際の野外での伝播動態を推測することを試みている。 第1章では、牛、羊、山羊、駱駝、ウマ類、ブタ類、齧歯類、熊、ヒトを含めた霊長類等、様々な動物種に寄生し世界的な分布をもつとされる美麗食道虫( <i>Gongylonema pulchrum</i> Molin, 1857)に注目している。その宿主域の広さから、中間宿主の経口的な摂取さえ可能であれば、動物種を問わずに感染が成立するだろうと考えられてきた。この点を検証するために、日本国内の牛、鹿、イノシシ、ニホンザル、野生化キョン、動物園飼育リスザルから採集した虫体を用いて、ゲノムのリボソーム RNA 遺伝子(rDNA、特に ITS1 と ITS2)とミトコンドリア DNA のチトクローム c オキシダーゼ・サブユニット I (COI) 遺伝子について解析を	

行い、鹿、イノシシ、ニホンザルなどの野生動物から得られた虫体と牛や動物園動物から得た虫体で ITS 領域と COI の塩基配列に明確な違いがあることを示した。すなわち、現在日本に分布する美麗食道虫には、家畜や動物園動物で伝播維持される系統と、野生動物で維持される系統が区別できることを初めて明らかにした。

第 2 章では、ネパールのスイギュウ(*Bubalus bubalis*)での美麗食道虫の感染状況と、その形態学的・分子遺伝学的特徴づけを行った。スイギュウから分離した虫体は、左交接刺長は他種動物に寄生する虫体に比べて有意に短い、他の形態学的な特徴は美麗食道虫と一致しており、その分子系統学的な位置づけに興味をもたれるところであった。スイギュウからの虫体と他種動物からの虫体について比較すると、18S rDNA 塩基配列の同一性は 99.83%、28S rDNA は 98.34—98.76%であるが、ITS1 領域では 85—88%、ITS2 領域では 56—80%であり、また、COI では 89.2—90.2%であった。この研究は、現在定義される「美麗食道虫」が複合種である可能性を指摘しており、更に世界的に材料収集と解析を進める必要性を訴えている。

第 3 章では、タヌキ、イノシシ、野生化アライグマ、アナグマ、テン、カモシカ等の日本国内の多くの野生動物を巻き込んで流行する疥癬に注目し、和歌山県下のタヌキを中心に、野生動物 128 頭から得たセンコウヒゼンダニ(*Sarcoptes scabiei*)の rDNA (ITS2 領域)とミトコンドリアの 16S rRNA と COI 遺伝子について解析している。本種については、各宿主動物に特異的なバリエーションが存在することが知られてきたが、今回の解読結果を含む世界の本種の解析では、日本のイヌ、タヌキ、カモシカに共通のバリエーション、人に特異的なバリエーションなどの存在が示唆された。さらに、和歌山県内で疥癬流行には、2 型のミトコンドリア DNA ハプロタイプが関わっていることが示され、また、県下の地域毎に優勢なハプロタイプが異なっていることが明らかにされた。国内野生動物での近年の疥癬流行に関わるセンコウヒゼンダニは、特別な系統の新たな国内侵入に伴うものではなく、何らかの他の要因によって、在来の系統が流行的伝播したことを示唆している。

第 4 章では、ガボンの Moukalaba-Doudou National Park (MDNP)のゴリラおよび近隣住民の腸結節虫感染状況が、糞便虫卵検査と培養法により調査され、当該地のゴリラでの *Oesophagostomum stephanostomum* 感染とその ITS 領域、ミトコンドリア DNA の COI 領域について解析されている。*Oesophagostomum* spp.について、その塩基配列の変異率が高いことが示され、分子系統学的な種鑑別を実施する上での留意点が議論されている。

以上の研究結果は、同一種内であっても、異なる宿主特異性をもつ分子系統学的なポピュレーション(寄生虫単位)が寄生蠕虫にも区別され、自然界での伝播が複雑性をもつことを明らかにした。この点を踏まえ、野生動物とヒトあるいは家畜での感染症流行の危険性予測が可能となることを目指して、適切な分子遺伝学的マーカーで区別される「寄生虫単位」毎に、その宿主域を把握しておく努力も必要であると考察されている。今後ますます、野生動物と人との接点は増すことが推測され、これまでそれぞれに固有と考えてきた感染症が、相互に伝播する可能性は大きくなっている。この点からも、この研究で示された実際の野外材料での伝播動態に関する結果と考察は示唆に富んでいる。

以上により、学位論文としての妥当性を審査し、審査委員一同は、博士(獣医学)の学位論文として十分な価値を有すると判定した。