

学 位 論 文 要 旨

氏名 Aogu Setsuda (説田 景)

題 目 : Molecular phylogenetic study of *Gongylonema* worms to understand interspecific borders and transmission dynamics in the natural environment
(*Gongylonema* 属線虫の種区分と自然環境での伝播の理解を目指した分子系統学的研究)

論文要旨 :

Gongylonema spp. (Nematoda: Spirurida: Gongylonematidae) are thread-like spirurid nematodes dwelling in the mucosal epithelium of upper digestive tract of mammals and birds worldwide. *Gongylonema pulchrum* is well known as the gullet worm, and found in a wide spectrum of mammals such as cattle, sheep, goats, donkeys, cervids, equines, camels, bears, pigs, non-human primates, and human beings. Although generic diagnosis of the adult worms is not difficult due to the presence of characteristic verruciform protrusions in the anterior surface of body, it is hard to make a specific identification based solely on morphology, since distinct growth of the adult worms in different hosts is known. To overcome this difficulty in specific diagnosis, molecular genetic characterization of *Gongylonema* worms and clarification of intraspecific genetic variation or interspecific genetic differences are necessary. Previous studies in our laboratory provided long nucleotide sequences of ribosomal RNA gene (rDNA), including internal transcribed spacer (ITS) regions, and partial cytochrome *c* oxidase subunit 1 gene (*cox-1*) of Iranian and Japanese isolates of *G. pulchrum* from domestic or captive animals (cattle, and squirrel monkeys) and wild mammals (Japanese sika deer *Cervus nippon*, Japanese wild boars *Sus scrofa leucomystax*, and Japanese macaques *Macaca fuscata*), providing a spectrum of intraspecific genetic variation of *G. pulchrum* in Japan.

In Chapter I of the present study, I extended the research to rodent *Gongylonema* worms, i.e. *G. aegypti* from spiny mice *Acomys dimidiatus* in the Sinai Peninsula, Egypt, and *Gongylonema neoplasticum* from black rat *Rattus rattus* in Okinawa island, Japan, to clarify interspecific genetic differences between them and *G. pulchrum*. This study finally disclosed the validity to differentiate *Gongylonema* worms from Nepalian water buffaloes *Bubalus bubalis* from *G. pulchrum* as an independent species, i.e. *G. nepalensis*, although adult worms of *G. pulchrum* and *G. nepalensis* showed an identical morphology except for different proportions of left spicule length against the body length (>24% vs. <22%, respectively). In addition, two *cox-1* haplotypes of *G. pulchrum* from cattle in Japan was also found in *G.*

pulchrum worms collected from cattle in Alashan League, Inner Mongolia, China, suggesting that these two *cox-1* haplotypes might be widely distributed in East Asia. The origin of these two *cox-1* haplotypes of *G. pulchrum* in domestic or captive animals is unknown yet.

In Chapter II of the present study, I attempted to clarify genetic variation of *G. neoplasticum* from 114 rats of seven species (five *Rattus* spp., *Maxomys surifer*, and *Berylmys bowersi*) from Southeast Asia (Thailand, Cambodia, Laos, Philippines, and Indonesia), where originated the dominant hosts for the species worldwide, *Rattus norvegicus* (brown rats) and *Rattus rattus*, from. This study demonstrated substantial nucleotide variations of *G. neoplasticum* in the stomach mucosa of rats (24 haplotypes), and this data may facilitate the reliable specific differentiation of local rodent *Gongylonema* spp. from the cosmopolitan congener, *G. neoplasticum*.

In Chapter III of the present study, I characterized longer *cox-1* nucleotide sequences (852 bp) of *G. pulchrum* from wild mammals, such as sika deer, wild boars, Japanese macaques and feral alien Reeves's muntjacs *Muntiacus reevesi*, in Japan, and *G. nepalensis* from a red fox *Vulpes vulpes* and a wild boar *Sus scrofa meridionalis* on Sardinia Island, Italy, to clarify their haplotypes and relationships with the worms in domestic animals. *Gongylonema* worms from feral alien Reeves's muntjacs on Izu-oshima Island, Tokyo, showed *G. pulchrum* cattle *cox-1* haplotypes I and II, distinct from *cox-1* haplotypes of the worms from wild mammals in Japan. Genetic variation of *cox-1* nucleotide sequences of *G. nepalensis* from domestic and wild animals (*Bos Taurus*, *Ovis aries*, *Capra hircus*, *Ovis aries musimon*, *Vulpes vulpes*, and *Sus scrofa meridionalis*) on the Island was minimal, suggesting a shared transmission cycle among domestic and wild animals, which is distinct from separate transmission cycles between domestic and wild mammals, except for feral alien Reeves's muntjacs, at least in Japan.

I believe that my studies on *Gongylonema* worms mentioned above can provide a research platform for genetic differentiation of *Gongylonema* spp., followed by further characterization of different species of the genus. In addition, I have shown the utility of genetic characters of the worm in discussing transmission dynamics of the worms in nature.

学位論文審査の結果の要旨

氏名	説田 景
審査委員	主査：山口大学 教授 佐藤 宏
	副査：山口大学 教授 前田 健
	副査：山口大学 教授 度会 雅久
	副査：山口大学 准教授 柳田 哲矢
	副査：鳥取大学 准教授 金 京純
題目	Molecular phylogenetic study of <i>Gongylonema</i> worms to understand interspecific borders and transmission dynamics in the natural environment (<i>Gongylonema</i> 属線虫の種区分と自然環境での伝播の理解を目指した分子系統学的研究)
審査結果の要旨：	
<p><i>Gongylonema</i> 属食道虫は旋尾線虫目に分類される細長い線虫で、世界各地のさまざまな哺乳類や鳥類の上部消化管上皮層に寄生する種が報告されている。<i>Gongylonema pulchrum</i> (美麗食道虫)は世界的によく知られ、ウシ、ヒツジ、ヤギ、ロバ、シカ類、ウマ類、ラクダ、クマ、ブタ、ヒトやサルなどの霊長類といった広汎な宿主域をもつ。本属の虫体は、その体前部のクチクラ上に特徴的な多数の疣状隆起をもつことが知られることから、属レベルでの同定は可能であるが、虫体長など計測値が宿主により異なるなど形態学的変異も大きく種レベルでの鑑別は難しい。このことから、分子マーカーによる種鑑別が行えれば、その真の種多様性を明らかにできるだろうと期待できる。これまでに、リボソーム RNA 遺伝子(rDNA)、その internal transcribed spacer (ITS)領域、チトクローム c 酸化酵素遺伝子(<i>cox-1</i>)の DNA 塩基配列が検討され、国内では、家畜(ウシ)と野生動物(シカ、イノシシ、ニホンザル)から分離した美麗食道虫間に有意な塩基置換が確認され、それぞれの集団(家畜 vs. 野生動物)内で専ら伝播が起こっている状況が強く示唆されている。本研究では、由来が異なる虫体について rDNA あるいは <i>cox-1</i> 塩基配列の種内変異に注目し、分子マーカーの種鑑別における有用性について検証を進展させている。</p> <p>第 1 章 Intraspecific and interspecific genetic variation of <i>Gongylonema pulchrum</i> and two rodent <i>Gongylonema</i> spp. (<i>G. aegypti</i> and <i>G. neoplasticum</i>), with the proposal of <i>G. nepalensis</i> n. sp. for the isolate in water buffaloes from Nepal</p> <p>ネパールの水牛の食道粘膜上皮に寄生する食道虫は、左交接刺長を除き <i>G. pulchrum</i> と</p>	

形態学的に酷似するが(虫体長に対する左交接刺長が水牛寄生虫体では<22%に対して、他種動物寄生の *G. pulchrum* 虫体では>24%)、rDNA および *cox-1* では両者に一定の差異が確認されるものの、この塩基置換程度が種鑑別においてどの程度の意義を有するのかが不明であった。そこで、本研究では、中国大陸(内モンゴル)のウシから分離した *G. pulchrum* に見られる rDNA および *cox-1* 塩基配列における種内変異を明らかにするとともに、げっ歯類寄生の *G. aegypti* および *G. neoplasticum* の rDNA および *cox-1* 塩基配列を特徴づけることで種間変異について探った。この研究アプローチから、ネパールの水牛寄生種は新種 *G. nepalensis* として区別されるべきことを提唱している。内モンゴルのウシ寄生 *G. pulchrum* は、日本国内で分離されている同種の *cox-1* 塩基配列と同様に家畜寄生集団としての二型性を示すことも確認し、この二型性の起源について考察するとともにさらに研究を進める必要性を指摘している。

第 2 章 Molecular genetic diversity of *Gongylonema neoplasticum* (Fibiger & Ditlevsen, 1914), (Spirurida: Gongylonematidae) from rodents in Southeast Asia

本章では、*Rattus* 属げっ歯類に世界的に寄生が知られる *G. neoplasticum* について、宿主の起源となる東南アジアに注目し、その rDNA および *cox-1* 塩基配列における種内変異の程度について研究した。材料はタイ、カンボジア、ラオス、フィリピン、インドネシアで収集した 127 虫体で、rDNA では塩基置換がほとんどみられないことを明らかにし、一方で *cox-1* では 24 ハプロタイプを確認している。げっ歯類寄生の *Gongylonema* spp. は 10 種近くが形態学的に記載されているが、これらの独立種としての検証は今後の課題である。宿主の人為的な世界的分散に伴い世界的に分布するに至った *G. neoplasticum* について分子遺伝学的な特徴づけならびに包括的な種内変異が明らかにされたことにより、げっ歯類寄生種として形態学的に記載された種について分子遺伝学的な検証が行われる基盤が整えられたことになる。

第 3 章 *Gongylonema* infection of wild animals in Japan and Saldinia (Italy)

地中海のサルディニア島(イタリア)のウシ、ヒツジ、ヤギの食道粘膜上皮に寄生する食道虫は、形態学および分子遺伝学的な特徴づけから *G. nepalensis* と同定されている。ネパールの水牛寄生種として確認された経緯があるが、欧州の哺乳類に広く寄生している可能性が示唆されることを共同研究として明らかにしている。本研究では、サルディニア島の野生動物であるキツネとイノシシから分離された *G. nepalensis* 虫体、日本国内の野生動物であるシカ、イノシシ、ニホンザルおよび外来種キョン(*Muntiacus reeves*)から分離された *G. pulchrum* 虫体を用いて、野生動物寄生集団での種内変異を明らかにしようとして取り組んだ。サルディニア島の野生動物に寄生する *G. nepalensis* は同島の家畜寄生虫体と同一の rDNA および *cox-1* 塩基配列をもっていた。一方、日本国内の在来野生動物に寄生する *G. pulchrum* は家畜(ウシ)寄生集団とは区別される独自の分子遺伝学的な特徴をもっていた。外来種キョンに寄生する虫体は家畜寄生 *G. pulchrum* 集団に属していた。この研究をとおして、*Gongylonema* のそれぞれの種における分子遺伝学的種内集団の存在がそれぞれの地域や宿主集団において複雑な分布をもつことが示唆され、その伝播について更に詳細に理解する必要性が指摘されている。

本研究は、形態学的な種同定が難しかった *Gongylonema* 属線虫について、分子遺伝学的な種鑑別が適用できる基盤をつくる挑戦として高く評価できる。人獣共通寄生虫である *G. pulchrum* から形態学的な種鑑別が難しい *G. nepalensis* を区別できた意義も大きいと考える。このことから、本論文は博士(獣医学)の論文として十分に妥当なものであると判断された。