

## 博士学位論文審査報告書

申請者氏名	Marcaida, Arvin Jet Bitanga (マルカイダ, アービソン ジェット ビタンガ)
学位の種類	博士 (学術)
論文題目	Phylogeography of parasitic nematodes recovered from <i>Bufo</i> species in mainland Japan (日本産ヒキガエル属から得られた寄生性線虫の系統地理学)
学籍番号	1956002
学歴	平成 25 年 9 月 9 日 サントトーマス大学大学院修士課程 生物科学科入学 平成 29 年 5 月 20 日 同上修了 平成 31 年 4 月 1 日 滋賀県立大学大学院環境科学研究科 環境動態学専攻博士後期課程入学
論文審査委員会	委員長 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 浦部 美佐子 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 教授 伴 修平 委員 滋賀県立大学環境科学研究科 准教授 細井 祥子

### 論文の内容の要旨

本研究は、本州・四国・九州に広く分布するニホンヒキガエル（亜種アズマヒキガエルを含む）および本州中部に分布するナガレヒキガエルを対象とし、これらに寄生する線虫 *Rhabdias* 属 および *Cosmocercoides* 属の分類学的再検討を行ない、これらの種分化に関連する要因を探索するとともに、線虫の分類・記載に有効な研究手法について検討したものである。学位申請論文の構成および内容は以下のとおりである。

第1章では、これまでのヒキガエルの寄生性線虫の研究史を概観している。線虫（線形動物門）は、26,000 種以上が報告され、生物多様性や生態系に大きく貢献している巨大な分類群で、現在でも次々に新種が発見されている。また、宿主のヒキガエル属 (*Bufo*) については、近年種分化についての再検討が行われ、従来亜種レベルに分類されていたニホンヒキガエル（西日本に分布）とアズマヒキガエル（東日本に分布）は別種とするのが妥当とされている。このような宿主の系統関係の解明により、寄生虫と宿主の関係も再検討を必要としている。日本産のヒキガエル属からは 12 種の寄生性線虫が報告されているが、形態情報のみに基づく種も少なくない。しかし、線虫類はその種の多様性に比して形態的な特徴が少なく、従来の形態に基づく分類学では、誤同定や近縁種が判別できない場合が非常に多かった。分子生物学的手法はこのような分類学上の問題の解決の鍵となるが、線虫類においては比較対象となる遺伝子データが得られていない分類群も多い。したがって、線虫分類学の進展には、形態および分子的アプローチの両面からデータを蓄積することが重要であることを指摘した。

第2章では、ヒキガエル類の肺に寄生する線虫 *Rhabdias incerta* について、分子系統

的手法および生物顕微鏡・走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて分類学的再検討を行なった。宿主 120 個体から得られた 74 虫体を標本とし、分析に供した。従来、琉球列島を除く日本産ヒキガエル類からは、*R. incerta* 1 種のみが記載されていた。しかし、分子系統的な再検討の結果、本土(本州・九州・四国)産ヒキガエル類には少なくとも 3 種の *Rhabdias* が寄生していることが判明した。形態観察の結果、最も高頻度で見られるのは *R. incerta* と同定された。本種は側所分布する 2 つまたは 3 つのサブグループに分かれ、宿主と同様に、地理的な要因で遺伝的に分化していると考えられた。*Rhabdias* sp. 1 は有尾類(イモリ、サンショウウオ)寄生の *R. tokyoensis* と系統的に近く、これから宿主転換によって分化したことが示唆された。*Rhabdias* sp. 2 は九州から 1 例のみ得られ、系統的位置は分析した遺伝子によって異なった。また *R. incerta* はヒキガエル属のみに寄生するスペシャリストであるが、分析に含めた同属の *R. nipponica* は、ヒキガエル以外の様々なカエル類に寄生するジェネラリストであることが明らかになった。

第 3 章では、ヒキガエル類の腸管に寄生する線虫 *Cosmocercoides* 属について、同様に分類学的再検討を行なった。従来、日本からは主にヒキガエル類に寄生する *C. pulcher*、琉球列島の有尾類に寄生する *C. tridens* の 2 種が同定されている。宿主 120 個体から得られた 52 虫体を研究に供した。形態観察の結果、大部分は *Cosmocercoides pulcher* と同定された。しかし、SEM による表面観察の結果、分類形質の一つとされる rosette papillae が、従来の報告(10-18 対)と異なり、21-24 対存在することが示された。このことから、光学顕微鏡による従来の観察は papillae の見落としが多く、正確な記載のためには SEM 観察が必須であることが示された。また、ミトコンドリア DNA の COI 領域を用いた分子系統解析の結果、*C. pulcher* の種内変異は比較的小さく、一方で別種と考えられる別クレードとは明瞭な違いがあり、COI 領域は本属の分類に非常に有効な部位である可能性が示された。分子系統解析の結果、九州のニホンヒキガエルから未同定種 *Cosmocercoides* sp. 1 が発見された。また、分子系統分析に含めた北海道のエゾアカガエルおよびエゾサンショウウオからの標本は、未同定種 *Cosmocercoides* sp. 2 であることが判明した。これらは形態観察を実施できなかったため種同定には至らず、記載には新しい標本を入手する必要がある。

以上のように、ヒキガエル寄生の *Rhabdias* 属、*Cosmocercoides* 属のどちらの属においても将来的に新種となる可能性が高い未記載種が発見され、これらは従来の分類学的研究から知られていたよりも多様であることが明らかになった。また、既知種についても形態的・分子的な形質が明らかにされ、これらの成果は寄生虫分類学への貢献となる。

## 論文の審査結果

論文審査委員会は、Marcaida, Arvin Jet Bitanga が提出した学位申請論文が博士（学術）を授与するに値すると判定した。審査過程と審査結果の概要は以下の通りである。

令和4年度第4回環境科学研究科会議において、申請者が提出した学位論文を受け、浦部美佐子教授、伴修平教授、細井祥子准教授を委員とする論文審査委員会の設置が承認された。同委員会において、学位申請論文の査読を行うと共に委員会会議を開催し、論文内容を審査した。さらに、学位論文審査報告会において最終試験を実施し、試験終了後、委員会による学位審査を行った。

本学位申請論文は、日本産ヒキガエル類に寄生する主要な線虫の2属 *Rhabdias*, *Cosmocercoides* の分類学的研究である。東北から九州までの広い範囲を調査対象とし、ヒキガエル類 120 個体を解剖して数多くの標本を得た。これらの分子系統学的解析を行うことにより、どちらの属にも未記載の種が含まれていることが見出だされ、今まで知られているよりも種の多様性が高いことが明らかになった。また既知種 *R. inserta* に関しては、種内においてかなりの程度の遺伝的分化が見られ、それは宿主種よりも分布する地域との関連性が強いことを見出した。本種は一生ヒキガエルに寄生するのではなく自由生活世代が存在し、宿主との関係だけではなく生息地との関連も強いことが一因であると考えられる。また、既知種 *C. pulcher* については、SEM を使用した表面構造の詳細な観察を実施し、光学顕微鏡観察による従来の記載の不十分な点を補完した。

これらの研究成果の一部は、下記の査読付論文として公表されている。

Marcaida, et al. (2022) Phylogeography of *Rhabdias* spp. (Nematoda: Rhabdiasidae) collected from *Bufo* species in Honshu, Shikoku, and Kyushu, Japan including possible cryptic species.

Parasitology International 90 : [doi.org/10.1016/j.parint.2022.102612](https://doi.org/10.1016/j.parint.2022.102612)

本論文は、従来の研究よりも多数の虫体から遺伝情報を得ることにより、形態観察を主軸とした従来の分類学研究では見出せなかった隠蔽種を複数見出したことで、寄生虫分類学および生物多様性のより良い理解へ貢献することができた。また、広汎な地域から得られた標本の解析により、寄生虫の遺伝的分化にとって、宿主の種と地理的条件のいずれがより重要であるか推察が可能になった点で新規性が高い。

以上のことから、論文審査委員会は本論文が博士（学術）を授与するに値するものと認めた。