

氏名(本(国)籍)	Nguyen Khanh Thuan(ベトナム社会主義共和国)			
主指導教員氏名	東京農工大学 准教授 林 谷 秀 樹			
学位の種類	博士(獣医学)			
学位記番号	獣医博甲第514号			
学位授与年月日	平成30年9月21日			
学位授与の要件	学位規則第4条第1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	東京農工大学			
学位論文題目	Epidemiological Studies on <i>Salmonella</i> Weltevreden of Wild Gecko in Southeast Asian Countries (東南アジアのヤモリが保有する <i>Salmonella</i> Weltevreden に関する疫学的研究)			
審査委員	主査	東京農工大学	教授	藤 川 浩
	副査	帯広畜産大学	教授	小 川 晴 子
	副査	岩手大学	教授	寺 嶋 淳
	副査	東京農工大学	准教授	林 谷 秀 樹
	副査	岐阜大学	教授	浅 井 鉄 夫
	副査	岐阜大学	教授	朝 倉 宏

学位論文の内容の要旨

Salmonella は、重要な食中毒または人獣共通感染症の原因菌として知られている。*Salmonella* は哺乳類、爬虫類、鳥及び環境に広く分布しており、ベトナム、タイ、マレーシアなどの東南アジア諸国においては、*Salmonella* Weltevreden が、人のサルモネラ症において分離頻度の高い血清型として知られている。しかし、本血清型菌の自然界におけるレゼルボアは明らかになっていない。爬虫類は、*Salmonella* の自然界におけるレゼルボアの一つとして知られており、特にヤモリは東南アジアにおいて広く人の環境に分布し、人との接触も多い。しかし、ヤモリにおける *Salmonella* の保有状況に関する報告は少ない。そこで、本研究では、東南アジアのヤモリにおける *S. Weltevreden* の疫学を明らかにするために調査・研究を行い、以下の成績を得た。

1. 東南アジアの野生ヤモリにおける *S. Weltevreden* の分布

2012-2015年に、カンボジア(98匹)、タイ(261匹)、ベトナム(959匹)において計1,318匹の野生ヤモリを捕獲し、直腸内容物を採取し、*Salmonella* の保有状況を調べた。捕獲したヤモリは、ホオグロヤモリ(*Hemidactylus frenatus*) 794匹、ヒラオヤモリ(*Hemidactylus platyurus*) 464匹およびオンナダケヤモリ(*Gehyra mutilata*) 60匹である。*Salmonella* は、ベトナムでは16.3%、カンボジアでは17.3%、タイでは46.0%のヤモリから分離された。ヤモリの種類により、分離率に差は認められなかった。分離された *Salmonella* 293株のうち、*S. Weltevreden* は、最も分離率が高く(32.1%)、いずれの国に

においても同様の傾向であった。分離されたすべての *S. Weltevreden* 菌株は、供試した 9 種類の抗生物質すべてに感受性を示した。これらの結果から、東南アジアにおいて、野生のヤモリは *S. Weltevreden* の自然界におけるレゼルボアになっている可能性が高いものと思われた。

2. ヤモリの糞便中の *Salmonella* の排菌量と生存期間

野生ヤモリは、*Salmonella*を腸管内に保菌し、糞便とともに環境中に排出している。従って、ヤモリは、人のサルモネラ症の感染源となり得る。しかし、ヤモリの糞便中の *Salmonella* の排菌量と環境中の糞便における生存期間は明らかになっていない。そこで、ベトナム・メコンデルタにおいてヤモリ 201 匹を捕獲し、糞便中の *Salmonella* 菌数を定量するとともに、環境中の糞便中における *Salmonella* の生存性を調べた。調べた糞便 101 検体中、24 検体 (23.8%) から *Salmonella* が分離された。*Salmonella* が分離された 24 検体からの糞便中の *Salmonella* 菌数は、1~8.6 log CFU/g で、平均の排菌数は 4.5 ± 3.2 log CFU/g であった。分離された *Salmonella* の血清型では、*S. Weltevreden* (37.5%) が最も分離頻度が高かった。また、糞便中において、*Salmonella* はベトナムにおける室温 (25-30°C) の環境下で、6 週間生存した。これらの結果から、ヤモリは高い菌量の *Salmonella* を糞便中に排菌し、また、環境に排出された糞便中で、*Salmonella* は長期間にわたって生存することが明らかになった。従って、東南アジアにおいて、野生ヤモリは *Salmonella* の自然界における重要なレゼルボアであり、人への感染源になっているものと思われた。

3. 東南アジアのヤモリから分離された *Salmonella Weltevreden* の遺伝的多様性

東南アジアで高頻度に分離される *S. Weltevreden* の遺伝的多様性に関する報告はほとんどみられない。本研究では、東南アジアと日本においてヤモリと人から分離された *S. Weltevreden* 80 株について、遺伝的多様性を調べるとともに、菌株間の遺伝的関連性を解析した。*Xba*I による PFGE (Pulse-fielded Gel Electrophoresis) により、*S. Weltevreden* 80 株から 20 の PFGE パターンが得られた。ほとんどの供試菌株は、地域特異的な PFGE パターンを示した。一方、MLVA (Multiple-Locus variable number tandem repeat analysis) 解析では 16 の MLVA タイプが、P-BIT (PCR - binary typing) 解析では 10 の binary プロファイルが得られ、PFGE の菌株識別能は、MLVA と P-BIT 解析に比べて高かった。以上のようにより、東南アジアのヤモリから分離された *S. Weltevreden* は遺伝的多様性を示し、また、地域特異的であったことから、本血清型菌は古くから本地域に分布していたものと推測された。

4. ベトナム・メコンデルタの市販野菜における *Salmonella* の汚染状況

2017 年 7 月~2018 年 3 月に、ベトナム・メコンデルタの市場で販売されていた野菜 358 検体における *Salmonella* の汚染状況を調査した。*Salmonella* は調査した野菜 358 検体中 58 検体 (16.2%) から分離された。雨季 (20.9%) は乾季 (7.3%) よりも *Salmonella* の分離率が有意に高かった。調査したいずれの市場ならびに野菜検体からも *Salmonella* は分離され、*S. Weltevreden* (29.5%) の分離頻度が最も高かった。分離されたすべての *S. Weltevreden* は供試した 9 種類の抗生物質すべてに感受性を示した。これらの結果から、ベトナム・メコンデルタでは市場で販売されている野菜は、*Salmonella* の重要な感染源になっている可能性が高いことが示された。

以上のように、本研究は東南アジアにおいて、ヤモリにおける *S. Weltevreden* の保有状況を明らかにするとともに、その分離菌の遺伝学的な特徴を解明し、さらに感染源として

の市販野菜の重要性を指摘したものである。本研究で得られた成績は、本地域における *S. Weltevreden* の疫学を理解するうえで重要な知見を提供し、その予防対策の確立に資するものである。

審査結果の要旨

本研究は、東南アジアで *Salmonella* 感染患者からの分離頻度の高い *Salmonella* Weltevreden について、その自然界におけるレゼルボアとしてのヤモリの役割を保菌状況、排菌数、環境での生存期間などについて疫学的に検討するとともに、分離菌株の遺伝学的関連性を明らかにし、さらに、感染源としての市販野菜の重要性について検討を加えたものである。

申請者はまず、ベトナム、カンボジアならびにタイにおいて、野生ヤモリから *Salmonella* を分離した。その結果、ヤモリは *Salmonella* を高率に保菌し、いずれの国においても *S. Weltevreden* が最も分離頻度の高い血清型であったことから、東南アジアにおいて、野生のヤモリは *S. Weltevreden* の自然界におけるレゼルボアになっている可能性の高いことを指摘した。

次に、ベトナムで捕獲したヤモリの糞便中の *Salmonella* 菌数を定量するとともに、環境中の糞便における *Salmonella* の生存性を調べた。その結果、糞便から *Salmonella* が分離された検体からの *Salmonella* の平均排菌数は $4.5 \pm 3.2 \log \text{CFU/g}$ で、高い排菌数であった。また、糞便中において、*Salmonella* は、ベトナムにおける室温 (25~30°C) において、6週間生存した。これらの結果から、野生ヤモリは、東南アジアにおいて *Salmonella*、特に *S. Weltevreden* の自然界における重要なレゼルボアであり、人への感染源になっている可能性が高いことを明らかにした。

さらに、東南アジアのヤモリや人から分離された *S. Weltevreden* 80株について、PFGE (Pulse-fielded Gel Electrophoresis)、MLVA (Multiple-Locus variable number tandem repeat analysis)ならびにP-BIT (PCR - binary typing)の3つの手法で遺伝子型別を行った。その結果、供試菌株80株は、PFGEで20、MLVAで16ならびにP-BITで10のタイプに遺伝子型別され、PFGEの菌株識別能が最も高かった。また、ほとんどの供試菌株は、地域特異的なPFGEパターンを示した。以上のように、東南アジアのヤモリから分離された *S. Weltevreden* は遺伝的多様性を示し、また地域特異的であったことから、本血清型菌は古くから本地域に分布していたことを指摘した。

最後に、ベトナムの市販野菜における *Salmonella* の汚染状況を調査した。その結果、調査した野菜の16.2% (58/358) から *Salmonella* が分離され、*S. Weltevreden* (29.5%) の分離頻度が最も高かった。これらの結果から、ベトナムで市販されている野菜は、*Salmonella* 特に *S. Weltevreden* の人への感染源になっている可能性が高いことを明らかにした。

以上のように、申請者は東南アジアで人からの分離頻度の高い *S. Weltevreden* のレゼルボアはヤモリであり、また市販野菜がその感染源の一つであることを明らかにした。本研究で得られた結果は、東南アジアにおける *Salmonella* 感染症の予防対策を確立する上で貴重な知見を提供しうるものであると考えられる。

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 : The importance of wild gecko as a human *Salmonella* infection
著 者 名 : Nguyen, K.T., Hasegawa, M., Nguyen, T.T., Vo, T.M.T., Tran, T.H.T., Ly, T.L.K., Taniguchi, T. and Hayashidani, H.
学術雑誌名 : The Journal of Veterinary Medical Science
巻・号・頁・発行年 : In Press

既発表学術論文

- 1) 題 目 : Evaluation of chromogenic medium for selective isolation of *Yersinia*
著 者 名 : Nguyen, K.T., Kamrun N., Kubo, R., Taniguchi, T. and Hayashidani, H.
学術雑誌名 : Food Hygiene and Safety Science
巻・号・頁・発行年 : 57(5) : 166-168, 2016