

S. Weltevreden のヤモリ由来株 78 株とヒトの胃腸炎患者由来株 3 株の計 81 株の PFGE パターンの相同性をもとに、UPGMA 法により系統図を作製した結果、系統樹は大きく 2 つのクラスターに分けられた。パターン数が最も多かったメコンデルタ由来株の大部分は 1 つのクラスターに分類された。また、2 番目に多かったタイ由来株はメコンデルタ由来株とは異なったクラスターに分類された。

3. MLVA 法による遺伝子型別

PFGE で型別されたそれぞれのパターンのうち、パターン F1 から 3 株、パターン F12、F14、F15、F16 および F17 から 2 株ずつ、パターン F2、F3、F4、F5、F6、F7、F8、F9、F10、F11、F13、F18、F19、F20、F21 および F22 からそれぞれ 1 株の計 29 株を用い、MLVA を実施した結果、14 の MLVA タイプに分類された。その内訳は、タイプ M1 に 5 株、タイプ M2 に 4 株、タイプ M3 に 3 株、タイプ M4、M5、M6、M7、M8 および M9 にそれぞれ 2 株ずつ、タイプ M10、M11、M12、M13 および M14 にそれぞれ 1 株ずつであった。RN が菌株間で異なっていた領域は、Sal16 と STTR3 および STTR7 であったが、今回新たに用いた STTR3 および STTR7 の領域で差異が見られたのは 1 株だけであり、菌株識別能力は低かった。これに対し、Sal16 の領域では、RN 数に顕著なばらつきがみられた。また、SE-4 では差異が確認されなかった。

2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離結果

今回、ベトナム・メコンデルタで採取した水田の土 40 検体について、増菌法を併用して培養法により類鼻疽菌の分離を行ったところ、3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌が分離された。

D. 考察

東南アジアでは、*S. Weltevreden* が人のサルモネラ感染患者から分離される最も重要な血清型であり、ヤモリが本血清型を高率に保菌し、自然界における重要なレゼルボアであることが報告されている。本研究では、ベトナム、カンボジア、タイおよび沖縄県においてヤモリから分離された *S. Weltevreden* 78 株と、ベトナム・メコンデルタにおいてヒト胃腸炎患者から分離された *S. Weltevreden* 3 株の計 81 株について PFGE 法を実施した結果、22 の PFGE パターンに型別された。このうち、ヒトの胃腸炎患者由来株のみで見られた 1 つの PFGE パターンをのぞき、それ以外の 21 パターンはすべてヤモリ由来株から得られた。近年、欧米や日本などの先進国で大きな社会的問題となっている *S. Enteritidis* や *S. Infantis* は、PFGE で遺伝子型別しても得られる PFGE パターンは極めて少ないことが報告されており、これらのことは近年のこれらの血清型による *Salmonella* 感染症の流行は特定のクローンによるものであ

ることを示している。一方、メコンデルタで分離された様々な由来の *S. Weltevreden* について PFGE で解析したところ、多様な PFGE パターンが分離されたことが報告されているが、本研究でも東南アジアの野生ヤモリ由来の *S. Weltevreden* は PFGE により、多様なパターンに型別された。また、系統樹解析により、同じ地域で分離された *S. Weltevreden* はほぼ同じクラスターに入っていた。これらのことは、本地域には古くから本血清型が土着しており、やがて地域ごとに遺伝的に多様なものへ分化していったことを示していると考えられる。また、メコンデルタの胃腸炎患者由来株 2 株の PFGE パターンは、フエのヤモリから分離されたパターン F14 と同じであったことから、ヤモリはヒトへの感染源となっている可能性が推察される。

日本では *S. Weltevreden* はほとんど分離されないが、沖縄県だけは本血清型菌の分離頻度が高いことが報告されている。沖縄では 1960 年代くらいまでは東南アジアで普遍的に分布するホオグロヤモリは分布しておらず、1960 年代以降にこのヤモリが沖縄に侵入したことが報告されている。本研究で供試した沖縄県におけるヤモリ由来 *S. Weltevreden* 2 株の PFGE パターンはどちらもパターン F16 であった。本研究で供試した東南アジアのヤモリ由来株には同じ PFGE パターンを示す菌株は確認されなかったが、系統図解析により東南アジア由来株との遺伝子間の距離を測ると、タイ由来株やメコンデルタ由来株と

57%の相同性を持つことがわかった。そのため、沖縄県のヤモリから分離された *S. Weltevreden* は、東南アジアから沖縄に持ち込まれた可能性が考えられる。今回は沖縄県におけるヤモリ由来株は 2 株だけしか供試できなかったため、結果として得られた PFGE パターンは 1 つのみだったが、沖縄県由来株と東南アジア由来株の *S. Weltevreden* の遺伝的関連性を比較するためには、さらに多くの検体を供試し、遺伝子パターンを比較する必要がある。

PFGE 法は菌株型別能力が高く、現在では分子遺伝子型別のゴールドスタンダードとして、広く普及しているが、手技が煩雑であり、フラグメント解析なので他機関との間で比較がしづらいなどの欠点もあるため、PFGE 法に代わる新たなシーケンス解析による分子遺伝子型別法のひとつとして、MLVA 法が開発されている。Chiou らは、*S. Typhimurium* を PFGE ならびに MLVA で解析した結果、PFGE では 8 パターンであったのに、MLVA では 108 パターンにも型別され、菌株型別能力は MLVA のほうが高かったことを報告しているように、MLVA のほうが PFGE より高い菌株型別能を示すことを指摘する研究者は多い。しかしながら、今回の研究では、PFGE では 22 パターンに分けられたのに対し、MLVA では 14 タイプのみであった。昨年度の検討では、Sa116 と SE-4 の 2 つの領域について、*S. Weltevreden* 株の MLVA 解析を行ったところ、Sa116 では 14 種類の RN が認められ、十分な識別能を発揮した

が、SE-4 については、差異が全く認められなかったことを報告している。また、今回新たに使用した領域である、STTR3 と STTR7 についても、差異が認められた株は 1 つだけであり、MLVA の識別能は高くなかった。すなわち、Sal16 以外の 3 つの領域は、あまり遺伝的に多様な領域とは言えず、今後 *S. Weltevreden* での MLVA の識別能を上げるためには、遺伝的に多様な領域を見つけ、検討することが必要である。今回使用したプライマーは、*S. Weltevreden* のために設計されたものではなく、*S. Typhi*、*S. Typhimurim* および *S. Enteritidis* での MLVA 解析のために設計されたものである。今後 *S. Weltevreden* ではこれらの領域は遺伝的に多様ではなかったものと考えられる。今後 *S. Weltevreden* に MLVA を用いて、PFGE と同等もしくはそれ以上の識別能を得ようとするなら、*S. Enteritidis* などのために設計された既存のプライマーではなく、Tandem Repeat Finder software を用いて、*S. Weltevreden* のシーケンスデータから MLVA マーカーになりうる領域を探し出し、新しくプライマーの設計を行い、最適なプライマーセットを開発する必要があるだろう。

2. ベトナムの土壌からの類鼻疽菌の分離

今回、我が国の類鼻疽の海外での感染国として報告の多いベトナムの水田の土を採取し、類鼻疽菌の分離を試みた結果、昨年度は選択培地に直接塗沫する方法では菌は分離されなかったが、今年度は増菌法

を併用した結果、類鼻疽菌は 40 検体中 3 検体 (7.5%) から分離された。このことから、ベトナム・メコンデルタにも本菌は分布することが明らかになった。ただ、直接塗沫では分離されなかったことから、分布はしているものの、菌の汚染菌量は高くはないものと思われた。

E. 結論

1. 東南アジアのヤモリ由来 *S. weltevreden* 81 株は、PFGE 法では 22 パターンに型別されたが、MLST 法では 14 パターンにしか型別できなかった。また、同じ地域で捕獲されたヤモリ由来の菌株は、近似した PFGE パターンを示した。
2. ベトナム・メコンデルタの土壌から、40 検体中 3 検体 (7.5%) から類鼻疽菌は検出された。

F 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 新川洋平^{*}, 長谷川瑞貴, 永田絵美, Vo Thi Minh Tam, Nguyen Khanh Thuan, Ly Thi Lien Khai, 谷口隆秀, 林谷秀樹, 東南アジアおよび沖縄県におけるヤモリ由来 *Salmonella Weltevreden* の分子遺伝子型別, 第 43 回獣疫学会学術集会, 2015 年 3 月、東京

- | | |
|------------------|-----------|
| H. 知的財産権の出願・登録状況 | 2. 実用新案登録 |
| 1. 特許取得 | なし |
| なし | 3. その他 |
| | なし |

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Igarashi M, Kariwa H, Holbrook MR, Takashima I	A Critical Determinant of Neurological Disease Associated with Highly Pathogenic Tick-borne Flavivirus in Mice.	Journal of virology	88 (10)	5406-5420	2014
Chidumayo NN, Yoshii K, Saasa N, Sakai M, Kariwa H.	Development of a tick-borne encephalitis serodiagnostic ELISA using recombinant Fc-antigen fusion proteins.	Diagn Microbiol Infect Dis	78 (4)	373-378	2014
Sakai M, Yoshii K, Sunden Y, Yokozawa K, Hirano M, Kariwa H.	The variable region of the 3' untranslated region is a critical virulence factor in the Far-Eastern subtype of tick-borne encephalitis virus in a mouse model.	J Gen Virol	95 (4)	823-835	2014
Hirano M, Yoshii K, Sakai M, Hasebe R, Ichii O, Kariwa H.	Tick-borne flaviviruses alter membrane structure and replicate in dendrites of primary mouse neuronal cultures	J Gen Virol	95 (4)	849-861	2014
Chidumayo NN, Yoshii K, Kariwa H.	Evaluation of the European tick-borne encephalitis vaccine against Omsk hemorrhagic fever virus.	Microbiol Immunol	58 (2)	112-118	2014
Tun MM, Aoki K, Senba M, Buerano CC, Shirai K, Suzuki R, Morita K, Hayasaka D	Protective role of TNF- α , IL-10 and IL-2 in mice infected with the Oshima strain of Tick-borne encephalitis virus.	Sci Rep	4	5344	2014
Nagata N, Iwata-Yoshikawa N, Hayasaka D, Sato Y, Kojima A, Kariwa H, Takashima I, Takasaki T, Kurane I, Sata T, Hasegawa H	The pathogenesis of three neurotropic flaviviruses in a mouse model of viremia depends on the route of neuroinvasio.	J Neuropathol Exp Neurol			In press
Amada T, Yoshimatsu K, Koma T, Shimizu K, Gamage, CD, Shiokawa K, Nishio S, Ahlm C, Arikawa J.	Development of an immunochromatography strip test based on truncated nucleocapsid antigens of three representative hantaviruses.	Virol J	11	87	2014
Koma T, Yoshimatsu K, Nagata N, Sato Y, Shimizu K, Yasuda SP, Amada T, Nishio S, Hasegawa H, Arikawa J.	Neutrophil depletion suppresses pulmonary vascular hyperpermeability and occurrence of pulmonary edema caused by hantavirus infection in C.B-17 SCID mice.	J Virol	88 (13)	7178-7188	2014
井上 智	狂犬病の予防と対策. シリーズ: 動物由来感染症 (第1回)	公衆衛生情報 4	44 (1)	32-33	2014
井上 智	狂犬病とバイオセーフティ (解説)	JBSA Newsletter	4 (2)	19-21	2014
井上 智	狂犬病の発生状況と野生動物調査の意義. 特集: 狂犬病をめぐる最近の情勢 (野生動物にどう対処するか)	獣医畜産新報	67 (11)	809-818	2014
Pangjai D, Maruyama S, Boonmar S, Kabeya H, Sato S, Nimsuphan B, Petkanchanapong W, Wootta W, Wangroongsarb P, Boonyareth M, Preedakoon P, Saisongkorh W, Sawanpanyalert P.	Prevalence of zoonotic <i>Bartonella</i> species among rodents and shrews in Thailand.	Comp. Immunol. Microbiol. Infect Dis.	37 (2)	109-114	2014
佐藤宏明, 冬賀秀一, 堀田緒留人, 須原靖明, 尾関拓磨, 丸茂一義, 金井尚之, 荘子久美子, 宇田川郁子, 満下恵, 今岡浩一	<i>Brucella melitensis</i> による椎間板炎の一例	病原微生物検出情報	35 (7)	182-183	2014
今岡浩一, 木村昌伸	ブルセラ症-特集・人獣共通感染症の新しい知見	臨床と微生物	42 (1)	27-32	2015

