

Abstract of Doctoral Thesis

Name: Abdelrahman Adnan Abdellatif

Muhammad Saeed Ahmed

Title: Surveillance study of bacterial zoonotic diseases among wild animals in Yamaguchi Prefecture, Japan

(日本の山口県における野生動物の細菌性人獣共通感染症に関するサーベイランス研究)

Abstract of thesis:

This doctoral thesis investigates the prevalence of two significant bacterial zoonotic pathogens, *Francisella tularensis* and *Orientia tsutsugamushi*, in wildlife populations in Yamaguchi Prefecture, Japan. Given the increasing frequency of human-wildlife interactions, the status of these pathogens remains largely unknown, which may pose an emerging risk to human health. Therefore, the objectives of this research were to elucidate the prevalence of these pathogens in wildlife populations and explore their potential ecology and enzootic cycles.

Chapter 1 focuses on *F. tularensis*, an intracellular gram-negative bacterium responsible for tularemia, a zoonotic disease that can be transmitted to humans through direct contact with infected animals, via bites from infected ticks, or through the consumption of contaminated animal products. Despite the significant pathogenicity associated with *F. tularensis*, reported cases of tularemia in Japan remain low, thus prompting the current investigation into its prevalence among local wildlife species. This study employed a robust surveillance approach involving the collection and analysis of 809 samples from diverse wildlife populations, including 90 Japanese black bears, 105 Japanese monkeys, 168 sika deer, 205 wild boars, and 84 bats.

Seroprevalence analysis was conducted using 177 serum samples obtained from 75 black bears and 102 monkeys. Initial findings from the microagglutination test indicated slight agglutination in serum from five black bears, which could suggest potential exposure; however, confirmatory Western blot tests did not yield any positive signals. Additionally, molecular surveillance was conducted using DNA extracted from 464 whole blood samples and 168 tissue samples. Real-time PCR and conventional PCR were employed to target the genes encoding 23 KDa hypothetical protein and outer membrane protein A associated with *F. tularensis*, respectively. As a result, neither serological nor molecular analyses revealed any *F. tularensis*-positive samples. However, the presence of other *Francisella* spp. and *Francisella*-like species cannot be excluded, highlighting a critical gap in understanding the true prevalence of this pathogen within local wildlife populations. This underscores the urgent need for continuous surveillance, especially considering that sporadic human cases of tularemia have been reported in Japan.

Chapter 2 focuses on *O. tsutsugamushi*, an obligate intracellular bacterium transmitted by larval trombiculid mites, which is responsible for scrub typhus in humans. In Japan, approximately 500 cases of scrub typhus are reported annually, with six major serotypes identified: Kato, Karp, Gilliam, Irie/Kawasaki, Shimokoshi, and Hirano/Kuroki. Despite its public health significance, the prevalence of *O. tsutsugamushi* in Yamaguchi Prefecture remains largely unstudied, necessitating further investigation.

The objective was to determine the prevalence and serotypes of *O. tsutsugamushi* in wild rodents collected from eight locations within Yamaguchi Prefecture. DNA was extracted from the spleen and liver samples of 135 wild rodents collected between 2015 and 2024. The detection of *O. tsutsugamushi* was performed using nested PCR targeting the 56 kDa type-specific gene, which revealed that 3.7% of the rodents tested positive for *O. tsutsugamushi* DNA. Subsequent isolation efforts successfully characterized two strains of *O. tsutsugamushi*, designated YU19 and YU130, and characterized by multilocus sequence analysis (MLSA) based on 11 housekeeping genes. The MLSA results confirmed that both isolates clustered with *O. tsutsugamushi* strain Ikeda (Japanese Gilliam serotype).

In addition to molecular analyses, a serological assessment was conducted on 117 rodent serum samples utilizing the indirect immune peroxidase test. Results showed that 59.8% of the rodents had antibodies against *O. tsutsugamushi*, with 73% of these seropositive individuals demonstrating high titers against the *O. tsutsugamushi* strains Gilliam (Gilliam serotype) and Ikeda (JG serotype). These serotypes are notably associated with transmission through *Leptotrombidum pallidum* mites, reinforcing the concern for potential human health implications.

In conclusion, this thesis underscores the critical need for enhanced surveillance of zoonotic diseases in wildlife, specifically *Francisella tularensis* and *O. tsutsugamushi*, due to their potential implications for human health. While no evidence of *F. tularensis* was detected within the surveyed wildlife populations in Yamaguchi Prefecture, the confirmed presence of *O. tsutsugamushi* and its serotypes presents significant public health concerns. Furthermore, additional studies are necessary to evaluate the dynamics of these pathogens in wildlife, as well as their potential transmission pathways to humans, including the identification of vectors for *O. tsutsugamushi*. These efforts will be crucial for improving preparedness for future public health challenges associated with zoonotic diseases. As human-wildlife interactions continue to evolve, the insights gained from this study will be pivotal in informing strategies for disease prevention and control in the region and beyond.

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	Abdelrahman Adnan Abdellatif Muhammad Saeed Ahmed
審 査 委 員	主 査：山口大学 教授 高野 愛
	副 査：鹿児島大学 教授 小原 恭子
	副 査：山口大学 教授 度会 雅久
	副 査：山口大学 教授 西垣 一男
	副 査：山口大学 教授 早坂 大輔
題 目	Surveillance study of bacterial zoonotic diseases among wild animals in Yamaguchi Prefecture, Japan (日本の山口県における野生動物の細菌性人獣共通感染症に関するサーベイランス研究)

審査結果の要旨：

本博士論文は、2つの重要な細菌性人獣共通感染症病原体である *Francisella tularensis* と *Orientia tsutsugamushi* を山口県において調査したものである。

近年、野生動物の個体数が増加し、ヒトの居住地への侵入が問題となっている。このように、ヒトと野生動物の物理的な距離が接近していることから、人獣共通感染のリスクが高まっているといえる。一方で、野生動物におけるこれら細菌性病原体の浸潤状況は不明な点が多い。本研究では、野生動物におけるこれら病原体の浸潤状況を明らかにし、その潜在的なリスクと発生状況を調査することを目的とした。

第 1 章 人獣共通感染症である野兔病は、感染動物との直接接触、感染したベクターによる刺咬、汚染された動物性食品の喫食などによりヒトに感染する。起因菌である *F. tularensis* の病原性は非常に高く、世界中で問題となっている。日本における野兔病の発生は、1950 年代以前は多かったが、近年の症例数は少ない。本研究では、ツキノワグマ 90 頭、ニホンザル 105 頭、ニホンジカ 168 頭、イノシシ 205 頭、コウモリ 84 頭の合計 809 検体を収集し、非常に多数検体を用いた疫学調査研究を実施した。

血清疫学調査では、ツキノワグマ 75 頭とニホンザル 102 頭から得た 177 検体の血清サンプルを用いて、血清中の抗体保有率を調査した。凝集試験によるスクリーニングでは、ツキノワグマ 5 頭の血清においてわずかな凝集が見られたため、ウェスタンブロットを実施したが、全て陰性と判定された。さらに、合計 464 検体の全血、ならびに 168 検体の組織サンプルから抽出した DNA を用いて、抗原の検出を試みた。*F. tularensis* 特異的 23kDa タンパク遺伝子を標的としたリアルタイム PCR と、外膜タンパク A 遺伝子を標的としたコンベンショナル PCR

を実施したが、全て陰性であった。

本研究では多様な動物を用い、多数の検体から *F. tularensis* の検出を試みたが本菌の感染の可能性を証明することはできなかった。しかし、他の *Francisella* 属菌や類似菌の存在を否定することはできないため、引き続き野生動物の集団内における継続的な調査が必要だと言える。

第 2 章 本章では、ツツガムシ病の山口県内における疫学調査研究を実施した。*O. tsutsugamushi* はツツガムシ類の幼虫によって媒介される、偏性細胞内寄生性細菌であり、ヒトにおけるツツガムシ病の原因菌である。日本では年間約 500 例のツツガムシ病症例が報告されており、6 つの主要な血清型が知られている。血清型により媒介するツツガムシ類の種類が異なり、媒介ツツガムシの生態に応じて患者発生時期や地域が異なることが知られている。本疾病は死亡例も報告されるなど、公衆衛生上重要な疾病にも関わらず、山口県におけるツツガムシ病の調査はほとんどなされていなかった。

本研究では、県内 8 箇所では採取した野生齧歯類における *O. tsutsugamushi* の陽性率と血清型を明らかにすることを目的とした。2015 年から 2024 年の間に採取された 135 匹の野生齧歯類の脾臓と肝臓から DNA を抽出し、菌特異的 56kDa 遺伝子を標的とした PCR を行った。その結果、3.7% の検体が陽性となった。さらに、PCR 陽性となった検体の一部を用い、マウスを用いた分離を行い、2 株の分離に成功した。これら 2 株は、MLSA による分子系統学的解析により、Japanese Gilliam 型の血清型である Ikeda 株と一致した。

さらに、分子生物学的解析に加え、血清疫学調査も実施した。本研究では間接免疫ペルオキシダーゼ法を用い、117 匹の検体を用いて保有抗体の検出と血清型の調査を行った。その結果、59.8% の検体から抗体が検出され、このうち 73% の検体が Gilliam 型あるいは Japanese Gilliam 型の血清型に高い抗体価を示した。これらの血清型は、フトゲツツガムシによって媒介されることが知られている。山口県ではツツガムシ病の患者報告は非常に少ないが、本研究により県内にもツツガムシ病が潜在することが明らかとなった。

以上の研究により、野生動物における人獣共通感染症のサーベイランスの必要性が改めて再確認されたと言える。野生動物は潜在的な病原体の調査に有用であり、今後も公衆衛生上のリスク評価のためにも継続した調査が必要だと言える。ヒトと野生動物の相互作用が続く中、本研究で得られた知見は、山口県のみならず、それ以外の地域における感染症の予防と制御のための基礎的な知見として重要であると考えられた。

以上により、本論文は博士（獣医学）の論文として、妥当なものであると判断された。