

厚生労働科学研究費補助金（インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業）  
（ 総括（分担） ）研究報告書

ベトナムの北部山岳地域で散発的に発生がみられる炭疽の分子遺伝学的解析方法の確立のための共同研究について

分担研究者：井上 智 国立感染症研究所獣医科学部、室長  
協力研究者：奥谷晶子 国立感染症研究所獣医科学部、主任研究官

研究要旨： 昨年度に引き続き、ベトナムの北部山岳地帯で 2011 年から 2013 年に発生した炭疽の発生事例から分離された炭疽菌株から抽出された DNA を用いて、80 カ所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) による系統解析を行った。その結果、患者分離株は日本やモンゴルなどのアジア諸国で分離される A3 クラスタに分類される一方、市販食肉分離株は西ヨーロッパや北アメリカで分離される菌株と同じ遺伝学的クラスタ (A1 クラスタ) に分類された。系統解析とともに疫学情報を加えることで詳細かつ実態を反映した感染源対策および感染経路の探索が可能となると思われることから常に最新の情報を基に調査結果を考察していく必要があると思われる。

## A. 研究目的

これまでにベトナム北部山岳地帯で発生した集団発生事例の患者分離株由来 DNA を用いて、我々が日本で分離された炭疽菌株が菌株レベルで識別を目的に選定した 80 箇所の SNP (Single Nucleotide Polymorphism) を用いて系統解析を行ってきた。

ベトナム分離株の遺伝子解析における SNP タイピングの有用性を確認するため、今回は三件の発生事例からの患者分離株および市販食肉から抽出された DNA を用いて系統解析を行った。

## B. 研究方法

事例 1) 2011 年 6 月 Lai chau, Dien Bien, Cao Bang 省の発生事例からの患者分離株、事例 2) 2012 年 Dien Bien 省発生事例からの皮膚炭疽患者皮膚生検材料分離株および事例 3) 2012 年から 2013 年における Dien Bien 省で発生した炭疽患者および患者周辺土壌と市販食肉から炭疽菌分離用の培養と DNA の抽出を行った。DNA 抽出には QIAGEN DNAeasy kit を NIHE において行い、本邦へ搬入した。

炭疽菌特異的遺伝子を保有する抽出済み DNA 検体を用いて、我々が以前に選定した菌株識別用の 80 カ所の SNP を特定し、詳細な系統解析

を行った。

## C. 研究結果

事例 1) と 3) の患者検体から菌培養および DNA が抽出できた。一方、事例 2) の皮膚生検からは菌分離はできなかったものの、DNA は抽出された。また事例 3) の市販食肉から得られた DNA から炭疽菌特異的遺伝子を確認できたが菌の培養ができなかった。事例 3) の土壌からは菌分離されず、抽出された DNA から炭疽菌特異的な遺伝子は検出されなかった。

患者由来および市販食肉から分離された炭疽菌 DNA から 80 カ所の SNP を特定して詳細な系統解析を行った結果、事例 1)、2) および 3) の患者由来菌株 DNA は他のアジア諸国分離株で多く分類される A3 クラスタに分類された。一方、市販食肉由来菌株は西ヨーロッパ地域由来株が多く分類される A1 クラスタに分類された。

## D. 考察および結論

今回、患者発生地域における市販食肉から抽出された炭疽菌 DNA の遺伝子型が患者由来のものとは異なることが明らかとなった。ベトナム炭疽発生地域では複数の菌株が浸淫している可能性が示唆されたものの市販食肉の搬入

元や輸送経路などが明確ではないため詳細な疫学調査はできなかった。昨年度に解析した患者由来菌株は A1 クラスターに分類されたが今回は A3 クラスターに分類された。前回より複数の地域で発生した菌株が加わったことで、系統解析に用いた解析株数が増加し、より詳細な分類が可能となったと考えており、解析数は今後も増えることが予想されることから系統解析結果は常に最新のものを反映したもので検討していく必要があると思われる。

ベトナム北部山岳地帯はラオスおよび中国との国境付近であり、これらの地域の物流や交通手段など詳細な情報は入手が困難な状況である。

感染源や感染経路の探索には詳細な疫学情報が必須であることから今後の発生に備えて NIHE のカウンターパートである Ha 博士には菌および DNA そのものの確保と共に丁寧な聞き取り調査を依頼している。発生地域は険峻な山間地帯で交通の便が著しく不便であることから現地における迅速診断および DNA の確保を可能とする体制作りも必要であると考えている。

本研究の最初の目的であったベトナムでの炭疽菌の分子遺伝学的解析は我々が選定した 80 カ所の SNP を特定することで可能であることが明らかとなったことから、今後も SNP による遺伝子解析および感染源や感染経路調査のための共同研究体制を維持していきたいと考えている。

## E. 研究発表

- 1 Petsophonrakul W., Khuernrart W., Pornvisedsirikul S., Srichan M., Jaisuda S., Sripanya T., Khaoplod P., Munepo M., Witunrakul C., Anukul W., and Inoue S. Learning about a case of imported rabies to establish a rabies control area. IMED

2013. 15-18 Feb, 2013. Vienna, Austria.

- 2 Hoang H.T.T., Okutani A., Inoue S., Pham H.T., Dang A.D., Nguyen T.T., Dang H.N., and Nguyen H.T. Anthrax outbreaks and B.anthraxis isolation in Vietnam, issues of public health. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.
- 3 Okutani A., Tungalag K., Tserennorov D., Bazartseren B., Hoang H.T.T., Nguyen H.T., and Inoue S. Novel genotyping by SNPs selected from genome-wide analysis of B.anthraxis isolation in Japan and Mongolia. Bacillus ACT 2013: The International Conference on Bacillus anthracis, B.cereus, and B.thuringiensis. 1-5 Sep, 2013. Victoria, Canada.

## F. 知的所有権の取得状況

なし

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

80SNP による炭疽菌株の系統解析 NJ tree analysis by MEGA

