

ブルセラ症検査マニュアル

第3版

2021年12月

目 次

- I. ブルセラ症の概説
 - 1. 法律上の取扱い
 - 2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

- II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項
 - 1. 作業上の一般的注意

- III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌
 - 1. 検査材料の採取・輸送
 - 2. 検査材料および病原体の保存
 - 3. 消毒・滅菌法

- IV. 検査・診断
 - 1. 抗体の測定（試験管凝集反応）
 - 2. 細菌学的検査
 - 3. 遺伝子の検出

- V. 参考文献

- VI. 依頼先

I. ブルセラ症の概説

波状熱やマルタ熱として知られるブルセラ症 (Brucellosis) は、ブルセラ属菌 (*Brucella* spp.) により引き起こされる人獣共通感染症である。わが国では家畜ブルセラ症は清浄化したが、3%程度のイヌが犬ブルセラ属菌に感染している。患者は多くないが、犬ブルセラ属菌の国内感染例と家畜ブルセラ属菌感染の輸入症例が報告されている。世界では、食料や社会・経済面での動物への依存度が強く、家畜でブルセラ症が発生している国や地域において、いまだに多くの患者が発生しており、新規患者は年間 50 万人に上るといわれる。そのため、公衆衛生面のみならず経済的にも重要な感染症の一つである。また、米国 CDC によるバイオテロに用いられ得る病原体カテゴリーB であり、家畜への影響の大きさからバイオテロだけでなくアグリテロにも用いられ得る病原体として、Overlap Select Agents and Toxins の 1 つにあげられている。

1. 法律上の取扱い

国内では、ヒトブルセラ症については、1999 年 4 月 1 日より感染症法で、家畜ブルセラ症については家畜伝染病予防法で、それぞれ対策が取られている。

また、病原体については 2007 年 6 月 1 日より、感染症法でその所持・保管、輸送等に関して厳しく制限されている。

1) 感染症法 (感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律)

* 感染症法及び施行令 (法第六条第五項、政令第一条) によりブルセラ症は、感染症法に基づく感染症発生動向調査では 4 類感染症として、診断した医師に全数届出が義務付けられている (<http://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekkaku-kansenshou11/01-04-28.html>)。診断した医師は届出基準に基づいて、直ちに最寄りの保健所長を経由して都道府県知事に届け出なければならない (法第十二条)。

* 感染症法及び施行令 (法第六条第二十一項、政令第二条) により、*Brucella melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* が特定三種病原体に指定されている。よって、これらの所持には厚生労働大臣への届出が必要であり、また、取扱施設が三種病原体等取扱施設基準を満たしている必要がある (法第五十六条の十六及び二十四、省令第三十一条の十七及び二十九)。

* 病院や病原体等の検査を行っている機関が、業務に伴い三種病原体を所持することになり、滅菌譲渡をするまで所持することになった場合は、届出は不要である (法第五十六条の十六)。ただし、定められた基準 (省令第三十一条の十八：十日以内に滅菌する、もしくは遅滞なく譲

渡しをする、など) に従う必要がある。

2) 家畜伝染病予防法

*家畜伝染病予防法及び施行令(法第二条第一項、政令第一条)により、スムーズ型の *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis*、およびラフ型の *B. ovis* によるブルセラ症(対象動物:牛、めん羊、山羊、豚、水牛、しか、いのしし)が家畜伝染病に指定されている。

2. 病原体・疫学・感染源・症状・治療・予防

1) 病原体

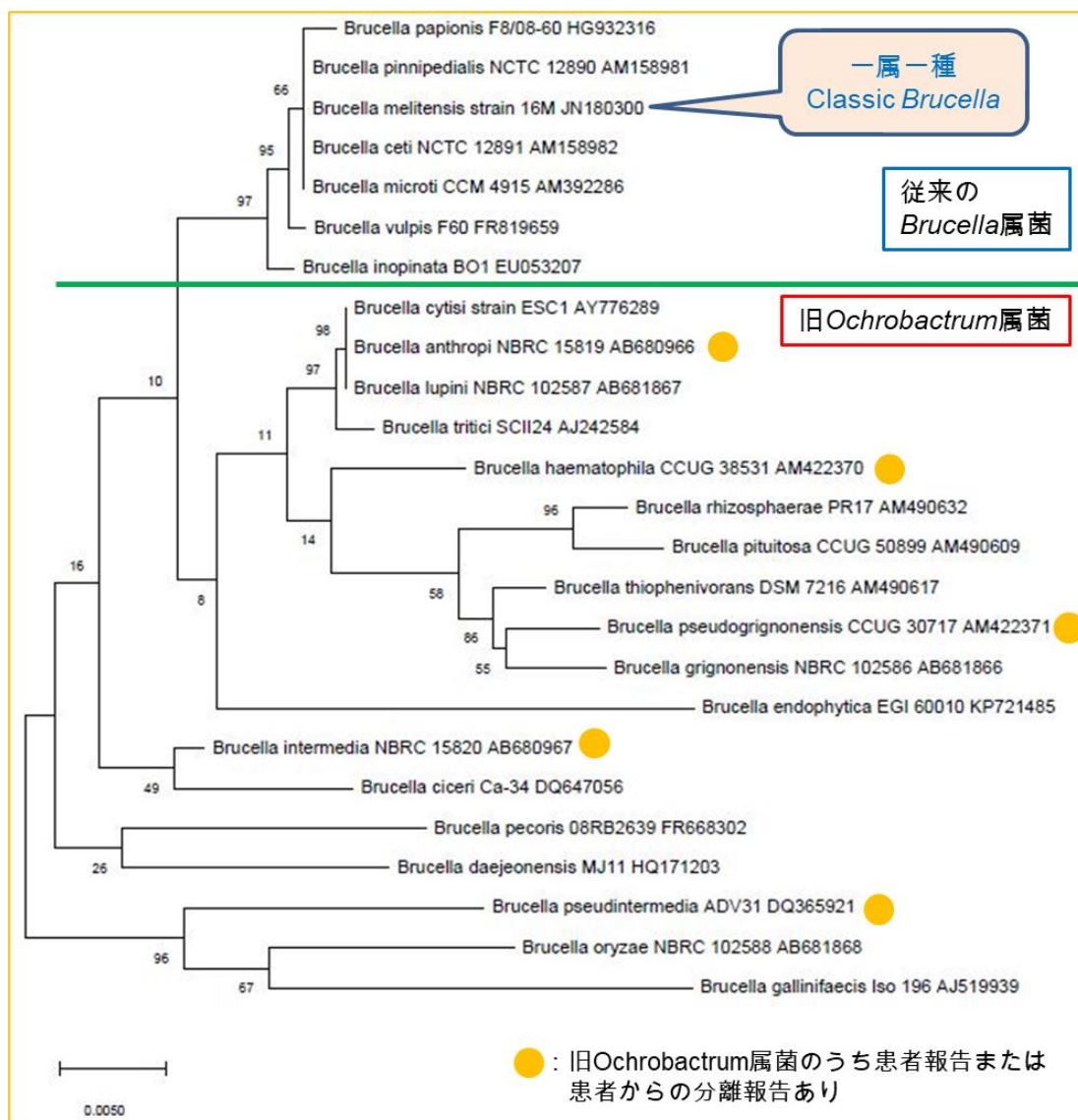
19 世紀中頃のクリミア戦争当時に英国軍兵士の間で流行したマルタ熱の原因菌として、1887 年、Sir David Bruce により *Brucella melitensis* (発見当初は *Micrococcus melitensis*) が分離されて以降、種々のブルセラ属菌が発見された。ブルセラ属菌はグラム陰性、偏性好気性短小桿菌で、芽胞や鞭毛を持たず、細胞内寄生性である。

20 世紀に見つかった 6 種のブルセラ属菌(いわゆる *Classic Brucella*)はその遺伝子的近縁もあり、1 属 1 種として *B. melitensis* の 6 つの生物型 (*biovar melitensis*, *suis*, *abortus*, *canis*, *ovis*, *neotomae*) としてまとめられた。ただし、病原性の違いなどから、独立させた旧称(通称)の使用も便宜的に認められている。その後、21 世紀に入って種々のブルセラ属菌が発見されるが、これらについては *B. melitensis* の生物型(1 属 1 種)に組み込むのではなく独立した種としている。ヒトへの感染が報告されている主要なものには、その病原性の順に *B. melitensis biovar melitensis* (自然宿主:ヤギ、ヒツジ)、*biovar suis* (ブタ)、*biovar abortus* (ウシ)、*biovar canis* (イヌ)の 4 菌種がある。ほかには数例の患者報告だが、海棲ほ乳類の *B. ceti* (クジラ、イルカ)、*B. inopinata* (不明)がある。ヒトの感染例は報告されていないが *biovar ovis* (ヒツジ)は家畜伝染病であり、*biovar neotomae* (齧歯類)、海棲ほ乳類の *B. pinnipedialis* (アザラシ)などもある。*B. melitensis biovar melitensis*、*biovar abortus*、*biovar suis* は smooth-type (LPS が O 側鎖を持つ)、*biovar canis*、*biovar ovis* は rough-type (LPS が O 側鎖を持たない、もしくは不完全)である。公衆衛生的には *B. melitensis biovar melitensis* 感染が、家畜衛生的には *biovar abortus* によるウシの感染が最も重要である。

ところで、細菌の命名に関しては、1980 年 1 月 1 日に発効した細菌学名承認リスト (*Approved Lists of Bacterial Names*) がすべての細菌の学名の出発点となっている。それ以降、現在に至るまで、新しい学名に関する記載をのせた論文が、*International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, *IJSEM* に掲載された日が、その学名の正式発表の日とされている。近年の全ゲノム解析の結果等により、元々、*Brucella* 属菌に遺伝子的に近縁であると知られていた *Ochrobactrum* 属菌を、*Brucella* 属菌に命名変更(統合)するとの報告が、2020 年 7 月に

IJSEMに掲載された。そのため、*Brucella* 属菌は、旧 *Brucella* 属菌 7 菌種と旧 *Ochrobactrum* 属菌 18 菌種を併せて 25 菌種となった。旧 *Ochrobactrum* 属菌では、主に日和見感染として *B. anthropi*、*B. intermedia*、その他、*B. pseudintermedia*、*B. haematophilum*、*B. pseudogrignonense* が患者より分離されている。

表) *Brucella* 属菌の種類 (Evolutionary relationships of taxa (16S rRNA))



なお、本稿では以降の記載については、通称を用いる。

2) 疫学

ブルセラ症が世界的に注目されたのは、19 世紀中頃にマルタ熱が流行したことによるが、すでに、紀元前 400 年頃のヒポクラテス著「Of the Epidemics」にブルセラ症と思われる疾患が記載されており、ヤギなどの家畜化に伴い古くから流行していたと考えられる。近年では、中

国、西アジア、中東、地中海地域およびアフリカと中南米を中心として、世界中で毎年 50 万人を越える家畜ブルセラ菌感染患者が新規に発生している。これら流行地は、総じて動物に対するブルセラ症対策が不十分で、家畜で発生が多い地域である。中でも中国では東北部を中心として、近年、報告患者が急増し、年間 3.5 万人を越えている。主にヒツジ・ヤギを感染源とすることから、家畜の出産シーズンの 1~2 ヶ月後、すなわち毎年 4~8 月に *B. melitensis* 感染による新規患者が多くなっている。動物間でブルセラ症が流行している地域で人の感染率が低く報告されている場合にはサーベイランスや報告システムの不備である可能性を疑われる。なお、多くの国では本症は届出感染症になっているが、診断が不正確なため患者は他の疾患名、あるいは「原因不明熱」として扱われることも多い。そのため、実際の感染者数は公式に発表される患者数の 10~25 倍存在するものと推定されている。

3) 感染源

家畜ブルセラ菌は非常に感染しやすく 10~100 個の菌で感染しうる。感染動物の加熱(殺菌)不十分な乳・チーズなど乳製品や肉の喫食による経口感染が最も一般的である。家畜が流産した時の汚物・流産仔への直接接触、汚染エアロゾルの吸入によっても感染する。生乳中の菌は 62.7°C で 30 分または 71.6°C で 15 秒加熱することにより死滅する。日本、米国、EU などの生乳殺菌基準はこれを満たしており、通常の流通販売ルートを経て入手した生乳・乳製品で感染するリスクは低い。*B. canis* については、感染イヌの流産時の汚物や死流産胎仔中には非常に多く排菌され、主要な感染源となり、特にブリーダーなどペット用イヌの繁殖・流通に関与している者や獣医療関係者は注意が必要である。また、尿や精液中にも排菌され、一般飼育者における感染源にもなり得る。ヒト-ヒト感染は、授乳、性交、臓器移植による事例が報告されているが極めてまれである。

また、ブルセラ菌は環境・食品中で長期間、生残り、感染源となることが知られている。さらに、検査室・実験室感染事故の起こりやすい菌である。近年、安全キャビネットの使用により、感染事故は減少したが、特に菌の分離培養(増菌培養)時に感染リスクは高くなる。安全キャビネットを使用しない、培養液をこぼす、培養プレートの臭いをかぐ、などにより、エアロゾルを介して感染することが知られている。

4) 症状

B. melitensis がもっとも症状が重く、ついで *B. suis*、*B. abortus* となる。通常、潜伏期は 1~3 週間であるが、時に数ヶ月になることもある。症状そのものに特異的なものはなく、軽症では単にインフルエンザ様だが、筋肉・骨格系に及ぼす影響が強く、全身的な疼痛、倦怠感を示す。発熱は主に午後から夕方かけて、時に 40°C 以上となることもあるが、発汗とともに朝には解

熱する。このような間欠熱が数週間続いた後、1～2 週間の症状の好転、そして再び間欠熱、という波状熱が特徴である。病気の期間は、数週間から数ヶ月、数年あまりに及ぶこともあり、また、治療が不完全な場合、再発しやすい感染症としても知られる。

臨床症状により、急性型、慢性型に分けられ、その他合併症としてさまざまな局所症状を示すことがある。骨関節症状が最も多く、中でも仙腸骨炎が一般的である。その他、吸入感染による肺炎や経口感染に伴う胃腸症状、ブドウ膜炎、まれに中枢神経障害を示すこともある。男性では精巣炎や副精巣炎が認められる。心内膜炎が死亡原因の大半を占め、未治療時の致死率は5%程度である。

急性型：発熱、悪寒、倦怠感、関節痛など。脾腫、リンパ節腫脹、肝腫大を認めることもある。発熱は午後から夕方にかけて認められることが多い。

限局型：心内膜炎、肺炎、骨髄炎、睪炎、精巣炎。心内膜炎はブルセラ症による死亡原因の大半を占める。

慢性型：発症後、数年あまりにわたって脱力感や疲労感が続く。

5) 治療

抗菌剤の2剤併用が基本である。1986年のWHO 専門家委員会##による、成人に対する推奨療法はドキシサイクリン (DOXY) +リファンピシン (RFP) であった。しかし、[Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.] #および抗菌薬治療の効果を比較した論文では、RFP は血中からの DOXY のクリアランスを早めることや、脊椎炎などの合併症に対して DOXY+ストレプトマイシン (SM) の方が効果的であったことから、DOXY+SM を推奨している。また、ゲンタマイシン (GM) の方が、SM よりも治療の中止に至る副作用が少ないとも言われる。可能ならば、DOXY+SM+RFP の3剤併用が最も効果的という報告がある。小児にはコトリモキサゾール (ST 合剤) +SM / GM の併用、妊婦には ST 合剤または RFP の長期投与が推奨されている。

6) 予防

ヒトのブルセラ症の予防は、家畜へのワクチン接種や検査陽性動物の殺処分 (Test and Slaughter) などによる、感染動物の根絶対策を中心とした獣医学的な対策が有効である。これらの方法によってヒトのブルセラ症の発生が激減した国や地域が多い。また、根本的な解決には至らないが、乳と乳製品の適切な加熱処理も感染者予防には効果が高い。

かつて旧ソ連、中国、およびフランスにおいて、ヒト用の弱毒生菌ワクチンやペプチドグリカンワクチンが用いられたこともあるが、現在では用いられていない。

II. ブルセラ属菌検査に関する一般的な注意事項

1. 作業上の一般的注意

ブルセラ属菌のうち感染者の報告が多い *B. melitensis*、*B. suis*、*B. abortus*、*B. canis* は、国立感染症研究所バイオセーフティーレベル3 (BSL3) に分類されている。ブルセラ症が疑われる臨床材料の取り扱いには、まず、BSL2 内の安全キャビネットで行う。上記のブルセラ属菌4菌種が同定された場合、以降の検討はすべて BSL3 実験室内で行う。

ブルセラ属菌は、安全キャビネットが一般的になるまでは、検査室・実験室内感染が最も多い細菌であった。今日では、ブルセラ属菌であっても、安全キャビネットを使用して、基本的な取扱いを守っている限りにおいては、それほど検査室内感染のリスクは高くない。しかしながら、必ずしもすべての検体で安全キャビネットが使用されているわけでもないため、確定するまでに検査室内感染してしまうリスクは依然高い。通常、血液や関節液など患者検体中の菌量はあまり多くなく、したがって感染リスクも比較的低い。しかし、それら検体の増菌培養（とりわけ液体培地を用いて）を実施すると、感染リスクは格段に高くなる。ただ、報告されている感染経路については、試験管や血液培養ボトルの破損によるエアロゾルよりも、むしろ、大半は、培養プレートの臭いをかぐ、生菌を安全キャビネットの外で取扱う、個人用防護具 (PPE: personal protective equipment) を使用していない、口でピペット操作をする、など不適切で危険な取扱いをしたことに起因している。

- * 疑い検体は BSL2 内の安全キャビネット内で取り扱う。
- * ブルセラ属菌が同定された場合、以降の作業はすべて BSL3 実験室で実施する。
- * ガウン、マスク、手袋など PPE を使用する。
- * 使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。
- * オートクレーブ可能な器具等や汚物は、オートクレーブ (121°C、20 分) 処理をする。

III. 検体の採取・輸送・保管および滅菌

1. 検査材料の採取・輸送

血清抗体検査、遺伝子検出、血液培養が実施されるので、発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液を無菌的に採取する。通常は血清分離用滅菌真空採血管と DNA 分離のための EDTA-2K 滅菌真空採血管に採取する。血清分離用滅菌真空採血管は、常法通りに血清を分離する。分離した血清と EDTA-2K 血液含め、その他の材料ともに凍結を避けて氷冷して輸送する（血清のみの場合は凍結も可）。

また、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料、合併症として認められる腸腰筋膿瘍なども遺伝子検出や分離・培養に用いられる。

ブルセラ属菌のうち *B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis* は特定三種病原体に指定されているため、これら 4 種であると同定された病原体は運搬について感染症法の規定に従う必要がある。

2. 検査材料および病原体の保存

疑い検体は、BSL2 実験室内で保存する。

ブルセラ属菌 4 菌種 (*B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*、*B. canis*) は、BSL3 実験室内で保存する。

3. 消毒・滅菌法

使用した器具等は、70%エタノールで消毒する。汚物やオートクレーブ可能な器具等は、オートクレーブ（121℃、20 分）処理をする。

IV. 検査・診断

図) ブルセラ症の検査・診断

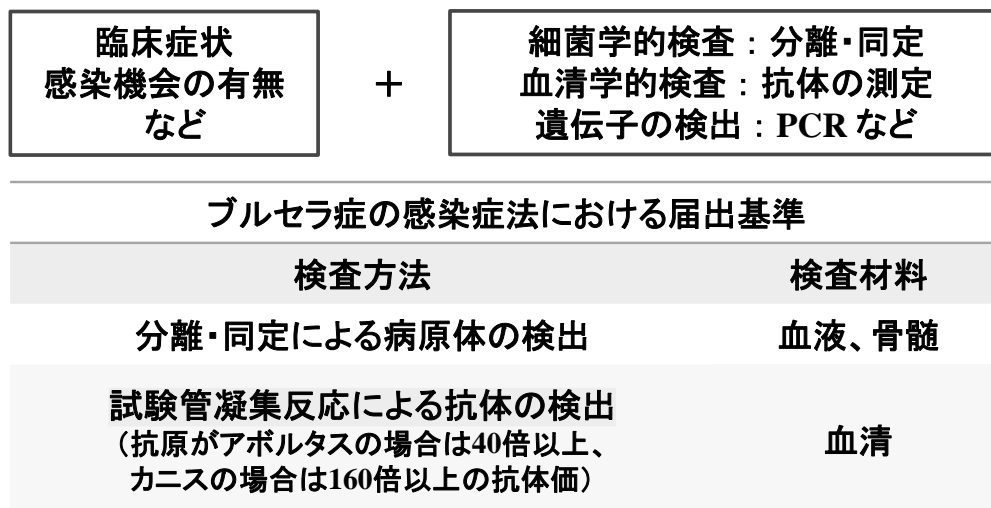
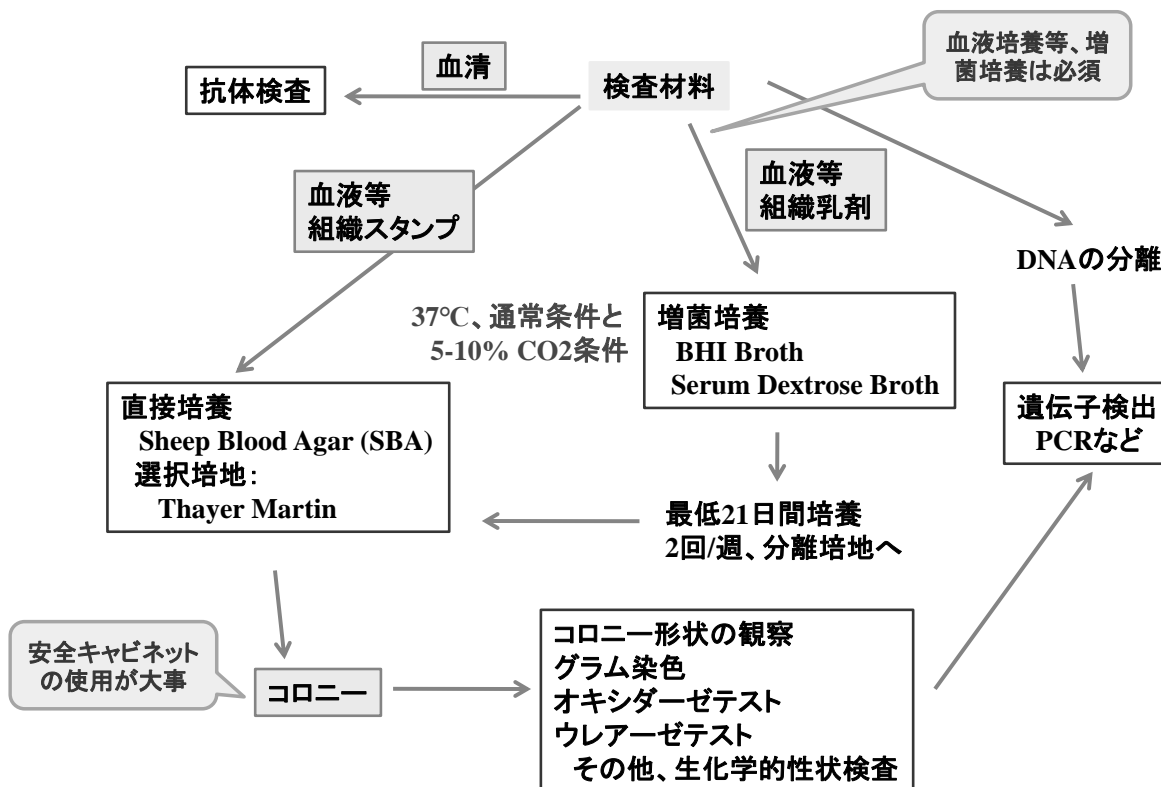


図) ブルセラ症の検査フロー

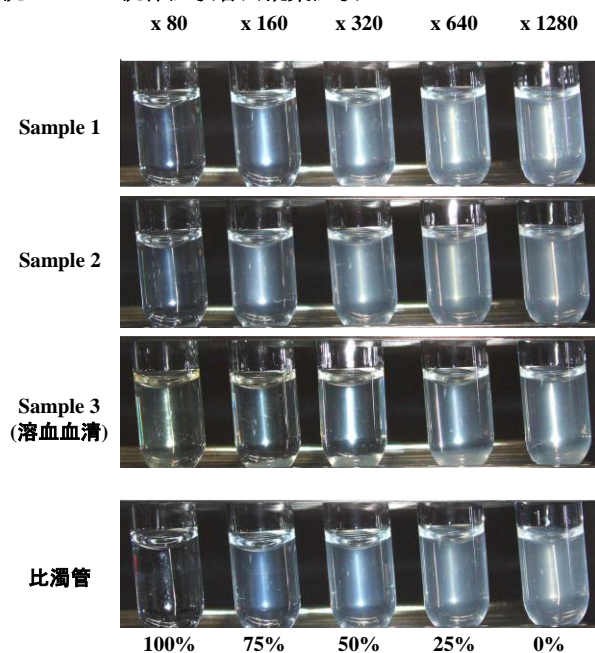


1. 抗体の測定（試験管内凝集反応）

ブルセラ症は、潜伏期間が長いことも多く、発症初期（風邪様症状など）でもすでに抗体を保有していることが多い。また、ブルセラ属菌は細胞内寄生菌であるため、抗体は菌の排除には余りに立たない。つまり抗体が存在すると言うことは、「菌がどこか（リンパ節など）に潜伏していて、時折、抗原刺激を与えている＝感染が継続している」、と考えることもできる。そのため、抗体保有状況はそのときの感染状況を直接反映すると考えられ、抗体検査の診断的意義は非常に大きい。IgG 抗体は、治癒後も1年くらい検出できると言われている。ヒトの血清診断では試験管内凝集反応（SAT）が行われる。S-LPSを持つ家畜ブルセラ属菌に対する抗体の測定には、*B. abortus* の死菌体を用いた試験管内凝集反応が広く用いられるが、これではR-LPSを持つ *B. canis* に対する抗体は検出できない。*B. canis* に対しては *B. canis* の凝集反応用抗原を用いる。基本的に臨床検体では、両方の検査をセットで行うことになる。家畜ブルセラ菌感染症例では *B. abortus* 抗原に陽性を示すが、*B. canis* 抗原にも陽性を示すこともある。野兔病菌、エルシニア菌、コレラ菌などとの交差反応に注意が必要であり、特に *Yersinia enterocolitica* O9 と家畜ブルセラ菌はほぼ100%交差反応する。

注意事項として、過度に溶血した検体は、ヘモグロビンの影響によるとされる偽陽性を示すことが知られており、その場合は採血をやり直す必要がある。なお、血清は非動化しないで検査に供する。

抗 *B. canis* 抗体試験管内凝集試験



必要な器具等

- *透明なガラス製小試験管（直径 12mm-長さ 75mm、Disposable culture tubes、#9831-1207、IWAKI）
- *0.5w/v%フェノール加生理食塩水（生理食塩水に 0.5%（w/v）になるよう加温融解したフェノールを加える）（*B. abortus* 用）
- *リン酸緩衝食塩液（pH7.2、46.7g リン酸二ナトリウム・12 水、6.55g リン酸一ナトリウム・2 水、9.0g 塩化ナトリウム、1.0g 窒化ナトリウム、以上を 1,000ml に調整）（*B. canis* 用）
- *試験管内凝集反応用菌液（*B. abortus*：農業・食品産業技術総合研究機構、*B. canis*：国立感染症研究所）
- *陽性対照血清（ウサギに *B. abortus*、*B. canis* それぞれの死菌体を免疫して調整する）
- *その他、一般的に血清反応に必要なとされる器具類

1) *B. abortus*、*B. melitensis*、*B. suis* に対する抗体の検出

抗原：ブルセラ病診断用菌液（*B. abortus* 99 もしくは 125 株（*Brucella melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125）の加熱死菌液、製造・販売：農業・食品産業技術総合研究機構）

検査手順

- (1) 菌液をよく振り、フェノール加生理食塩水（B：希釈液）で 10 倍に希釈（A：10 倍希釈診断用菌液）。
- (2) 標準混濁管を調整。
- (3) 5 倍希釈血清から出発して 2 倍段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意（0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1：5～1：640）。
- (4) 同様に力価が 160 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (5) 抗原菌液 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、37°Cで 18～24 時間感作後、判定。（最終血清希釈倍数 1：10～1：1280）
- (6) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (7) 血清の最終希釈倍数 40 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

表) 判定の基準と標準混濁管

判定の基準			混濁管の作り方		
凝集度	記号	所見	A : B	A	B
100%	++++	凝集沈殿し、上清はまったく透明	0 : 8	0ml	1.0ml
75	+++	強い凝集沈殿があるが、上清はかすかに混濁	1 : 7	0.125ml	0.875ml
50	++	かなりの凝集沈殿があり、上清もかなり混濁	2 : 6	0.25ml	0.75ml
25	+	わずかな凝集塊の沈殿を認める	3 : 5	0.375ml	0.625ml
0	—	凝集を認めない	4 : 4	0.5ml	0.5ml

注 : *Yersinia enterocolitica* serotype O9、*Francisella tularensis*、*Vibrio cholera* との交差凝集があり偽陽性を呈することがあるため注意を要する。また、凝集抗体価が高値の検体では血清希釈の低いところで疑陰性を呈することがあるため、320 倍以上も希釈し検査する。

2) *B. canis* に対する抗体の検出

抗原 : ブルセラ病診断用菌液 (*B. canis* 死菌液、製造 : 国立感染症研究所)

検査手順

- (1) 標準混濁管を調整 (*B. abortus* に準じる)。
- (2) 20 倍希釈血清から、2 倍段階希釈で 8 段階の希釈系列を用意。(0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1 : 20 ~ 1 : 1280)。
- (3) 同様に力価が 320 倍以上の陽性対照血清を希釈。
- (4) 抗原菌液 (OD600 = 0.685) 0.5 ml を各試験管に加えてよく攪拌し、50°C で 24 時間感作後、判定。(最終血清希釈倍数 1 : 40 ~ 1 : 2560)
- (5) 判定は、標準混濁管と対比して凝集の程度を調べ、50%凝集を示す最終血清希釈倍数を読む。
- (6) 血清の最終希釈倍数 160 倍以上で 50%以上の凝集を示すものを陽性と判定。

*なお、抗体検査は、抗原として市販の *B. abortus* と *B. canis* の死菌体が用いられ、医療機関からの外注による民間臨床検査機関での対応が可能であった。ところが、*B. canis* 抗原が、2019年製造ロット（最終有効期間 2020年10月）を最後に製造中止になったため、民間臨床検査機関による抗体検査診断が実施不可能となった。そこで、*B. canis* の検査用抗原を国立感染症研究所で作製し、行政検査としてブルセラ症抗体検査に対応している。

2. 細菌学的検査

1) 検査材料

検査材料としては発熱時の、なるべく抗生物質投与前の血液（同時に血清を分離し抗体測定に用いる）、リンパ節生検材料、骨髄穿刺材料、合併症として認められる腸腰筋膿瘍などの無菌的に採取した組織、体液を対象とする。本菌の増殖は遅いので、菌分離には無菌的に採取された材料が望ましい。血液には滅菌真空採血管（培養だけならヘパリン加でよいが、DNA 分離を考える場合は EDTA-2K）を用いる。

2) 培養

直接平板寒天培養もしくは増菌培養を行うが、特に血液などでは菌数が少ないことが多く、増菌培養は必要である。

直接平板寒天培養は、血液などの検査材料を 5% Sheep Blood Agar (SBA)、Serum Dextrose Agar (5% v/v equine/bovine serum, 1% w/v dextrose)、Trypticase Soy Agar (TS Agar) などに塗抹して培養する。組織・臓器の場合は、平板全体に断面をスタンプする。ブルセラ菌は淋菌の選択培地である Thayer Martin 培地や Martin Lewis 培地を選択培地としても成長するので、創傷部位や肺などからの菌の分離に利用できる。ただし、Thayer Martin 培地でのブルセラ属菌の成長は、SBA に比較してやや遅い。

増菌培養は Brain Heart Infusion (BHI) Broth、Serum Dextrose Broth、TS Broth などを用いる。通常血液培養ビンを用いて行うが、ない場合は 0.2um フィルターキャップ付き細胞培養用小フラスコ (#MA-23050: 住友ベークライト、#35-3108: BD Falcon など) に液体培地 10ml を入れ、これに血液 0.05~0.2ml を加えて培養する。振盪培養が望ましいが、無理な場合は適宜、混和する。組織の場合は、無菌的に生理食塩水などで 10% 乳剤にした後に液体培地に加える。培養は通常の好気培養と、原因菌が *B. abortus* である場合を考慮して炭酸ガス (5~10%) 培養で行う。37°C で最低 21 日間培養し、各週 2 回程度分離培地 (SBA、ブルセラ寒天など) に移植する。また、汚染が危惧される場合には、ブルセラ選択サプリメント (Oxoid、#SR0083A。1 バイアル (500ml 培養液用) 中に以下の物を含む。ポリミキシン B: 2500IU, バシトラシン: 12500IU, シクロヘキシミド: 50mg, ナリジクス酸: 2.5mg, ナイスタチン: 50000IU, バンコマイシン: 10mg) をあらかじめ液体培地に加えて利用できる。血液培養時には、血球 (特に白血球) を破壊しておく方が菌の検出がよいと言われている。

3) 判定

smooth-type のブルセラ菌の場合、小さい正円形、半球状にやや隆起した表面平滑なコロニーで、rough-type の場合は、辺縁が均一ではない。初期は芥子粒をまいたような感じである。発育はやや遅く、3日以上の培養で直径1.5~2mmになる。疑わしいコロニーについてはスライドグラスに塗抹後、微量のホルマリンを入れた50mlプラスチックチューブなどに密閉燻蒸し、その後、火炎固定したのちグラム染色を行う。グラム陰性の小球菌~球桿菌で単在することが多く、長い連鎖は作らず両端濃染性を示さない。特に新鮮分離株では小球菌のように見えやすい。その他、一般的な生理学的（運動性等）・生化学的性状（オキシダーゼテスト、ウレアーゼテスト等）の検査を実施する。いわゆる生化学的性状検査キット用いられるが、あくまでも補足的な利用にとどめ、結果コードによる判定はしない。しばしばコードの誤判定があり、特にブルセラ属菌でないと誤判定されたときに、その後の取扱いによる検査室・実験室感染リスクが増す。

また、近年、普及してきている質量分析による菌種同定システムであるが、一般的なデータセットには（旧）*ブルセラ属菌が含まれていないことから、（旧）**Ochrobactrum* 属菌としてスコアが低いにもかかわらず判定されてくるケースがあり、使用には向かない。逆に、（旧）**Ochrobactrum* 属菌と判定されてきた場合には注意が必要である。

*（旧）現在 *Ochrobactrum* 属菌は *Brucella* 属菌に統合された。

以下にブルセラ属菌の鑑別のための特徴を示す。

図) 血液寒天培地上の *B. canis* コロニーとグラム染色像

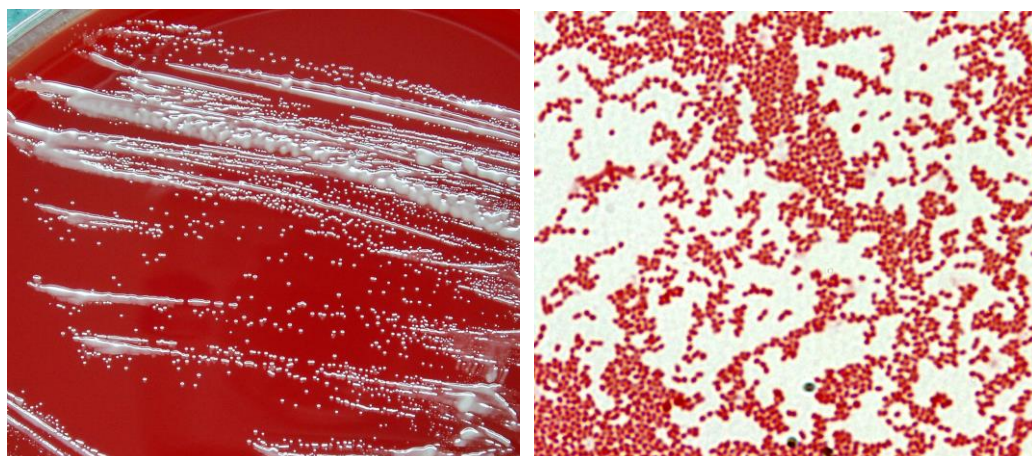


表) ブルセラ属菌と鑑別を要する細菌

試験	<i>Brucella</i> spp.	<i>Bordetella</i> <i>bronchiseptica</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.	<i>Moraxella</i> <i>phenylpyruvica</i>	<i>Oligella</i> <i>ureolytica</i>	<i>Haemophilus</i> <i>influenzae</i>
抗ブルセラ抗血清 での凝集	+	-	-	-	-	-
オキシダーゼ #	+	+	-	+	+	+
運動性	-	+	-	-	+/-	-
ウレアーゼ #	+	+	+/-	+	+	+/-
硝酸塩還元	+	+	-/+	+	+	-
血液寒天 での発育	+	+	+	+	+	-
グラム染色						
形態	極小の 球桿菌	短桿菌 小球桿菌	大球桿菌	球桿菌	極小の 球桿菌	小球桿菌
染色性	淡い	鮮明	鮮明	鮮明		

: *B. ovis* はオキシダーゼ、ウレアーゼ(-)

表) ブルセラ属菌の鑑別

鑑別試験等	<i>B. abortus</i>	<i>B. melitensis</i>	<i>B. suis</i>	<i>B. ovis</i>	<i>B. canis</i>
宿主	ウシ	ヤギ・ヒツジ	ブタ	ヒツジ	イヌ
ヒトへの病原性	中等度	強い	強い	なし	弱い
色素に対する感受性					
塩基性フクシン	耐性	耐性	感受性	感受性	感受性
チオニン	感受性	耐性	耐性	耐性	耐性
ウレアーゼ	>90min	>90min	<90min	-	<90min
H ₂ S産生	2~5 days	-	1~6 days	-	-
CO ₂ 要求性*	+/-	-	-	+	-

3. 遺伝子の検出

周知のように、検体からの菌の分離・培養は困難で、時間を要し、さらに十分量の菌血症が起こっていないと分離されない場合があることから、「培養検査陰性＝非感染」とは言えない。同様に、血液など検体からの遺伝子検出も、陰性であっても感染は否定できない。したがって、特に遺伝子検出においては分離菌株の同定には効果的ではあるが、一次診断には用いられるべきではない。その点に留意した上で検査を実施する。

ブルセラ属菌遺伝子の検出にはPCR法を用いる。以下に、PCR用プライマーの性状を示す。サンプルは、血清もしくは血液、骨髄穿刺材料から、市販のDNA抽出キット(QIAamp DNA Mini Kit : #51304 : QIAGEN、SepaGene : #516221 : 積水メディカル)を用いて精製したDNA、も

しくは、分離培養した細菌コロニーの煮沸菌液上清またはキットを用いて抽出した DNA を用いる。

B. abortus 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 BCSP31 をコードする遺伝子 (*bcbp31*) 内の 224 bp の領域を標的とした PCR が最も広く用いられている。これは、全てのブルセラ属菌に保存されている。その他、16S ribosomal RNA 遺伝子や IS711 領域遺伝子に対するプライマーなども用いられる。

我々の用いている PCR を以下に述べる。この PCR では、4 セットのプライマーによる増幅パターンの違いにより、ヒトに感染しうる主要 4 菌種を鑑別することが可能である。

表) プライマーと標的遺伝子、増幅産物サイズ、陽性を示す菌種

Target gene	Primer pair	Product size	Positive
<i>bcbp31</i>	B4/B5	224 bp	BM, BA, BS, BC
<i>omp2</i>	(abortus type) JPF/JPR-ab	186 bp	BM, BA, BS
	(canis type) JPF/JPR-ca	187 bp	BS, BC
<i>omp31</i>	1S/1AS	249 bp	BM, BS, BC

BM: *Brucella melitensis*, BA: *B. abortus*, BS: *B. suis*, BC: *B. canis*

図) プライマーデザイン

bcbp31 --- 224 bp (M20404)

B4(S) --- 5'-Tgg CTC ggT TgC CAA TAT CAA

B5(AS)--- 5'-CgC gCT TgC CTT TCA ggT CTg

omp2 --- (U26438, U26439)

JPF(S) --- 5'-gCg CTC Agg CTg CCg ACg CAA

JPR-ab(AS)--- 5'-CAT TgC ggT Cgg TAC Cgg Ag (186 bp)

JPR-ca(AS)--- 5'-CCT TTA CgA TCC gAg CCg gTA (187 bp)

omp31 --- 249 bp (AF366073)

1S(S) --- 5'-gTT CgC TCg ACg TAA CAg CTg

1AS(AS)--- 5'-gAC CgC Cgg TAC CAT AAA CCA

bcbp31-PCR のプライマーによって増幅される産物は、*B. abortus* 細胞表面タンパクの 31kDa 抗原 (BCSP31) をコードする遺伝子の 224bp の領域で、全てのブルセラ属菌に保存されている。*omp31*-PCR のプライマーによって増幅される 249bp の産物はブルセラ属菌の外膜タンパク (OMP31) をコードする遺伝子の一部で *B. abortus* 以外に含まれる (*B. abortus* はその領域を欠く)。同じくブルセラ属菌の外膜タンパク OMP2 には 2 種類のプライマーセットを用いる。

omp2-ab-PCR のプライマーによって増幅される 186bp の産物は *B. ovvis*、および *B. canis* には含まれていない。*omp2-ca*-PCR のプライマーによって増幅される 187bp の産物は *B. suis* および *B. canis* に含まれる。

陽性コントロール遺伝子には、全ての PCR で標的サイズの産物が得られる *B. suis* の DNA を使用するが、コンタミネーションによる疑陽性のリスクが伴うことから、サンプル調整時には、調整の順番など注意が必要である。それぞれの増副産物のサイズを変更した陽性コントロール DNA も使用することも可能であるが、PCR 反応のコントロールではあってもサイズのコントロールとはならない。陽性コントロール DNA は、感染研から分与可能である。

PCR は、puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (#27-9559-01 : GE Healthcare、2~2.5unit puReTaq DNA polymerase, 10mM Tris-HCl pH9.0, 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂, 200uM dNTP, BSA) を用いて実施するのが簡便で良い。以下にその反応溶液の調整方法および反応条件（4セット共通）を記す。

表) 反応溶液の調整

	<i>bcbp31, omp2-JPR-ab, omp2-JPR-ca, omp31</i>	
RTG PCR Beads	1 tube	tubes
DEPC-H ₂ O	20.5 ul	ul
Primer (S & AS) (10uM)	1 ul ×2 (final: 0.4uM)	ul
	22.5 ul (/ tube)	ul
反応溶液をまとめて調整し、各チューブに 22.5ul ずつ入れる。 その後、サンプル DNA 溶液を 2.5ul 加える。		
Sample DNA	2.5 ul	ul
Total volume	25 ul	ul

図) PCR 反応条件

95 °C、5 min

--- ×35 cycle (95 °C, 1 min - 65 °C, 1 min - 72 °C, 1 min)

--- 72 °C、7 min

--- 4 °C

次に、*B. abortus* biovar 1 125 株、*B. canis* QE13 株、*B. melitensis* biovar 1 16M 株、*B. suis* biovar 1 1330 株を用いて前述の PCR を行ったときの検出パターンを示す。図のように、*B. abortus* では *bcs31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. melitensis* では *bcs31*、*omp31*、*B. abortus* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. canis* では *bcs31*、*omp31*、*B. canis* 型の *omp2* 遺伝子が検出される。*B. suis* は *B. abortus* 型と *B. canis* 型、両方の *omp2* 遺伝子を持つため、すべての遺伝子が検出される。

なお、これらのプライマーは、旧 *Ochrobactrum* 属菌とは反応しない。

図) 基本検出パターンと *B. melitensis* 検出例

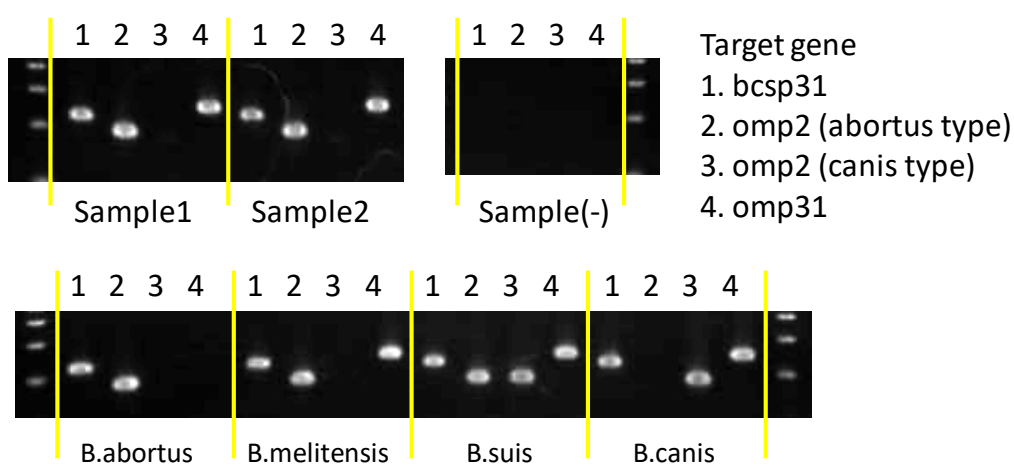
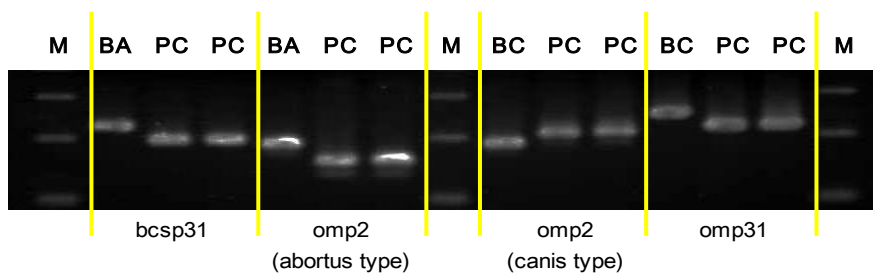


図) PCR 陽性コントロール DNA の反応パターン



BA: *B. abortus*, BC: *B. canis*,

PC: Positive control DNA

	Product Length (bp)	
	Target	Posi. Cont.
<i>bcs31</i>	224	194
<i>omp2</i> (ab)	186	156
<i>omp2</i> (ca)	187	207
<i>omp31</i>	249	219

V. 参考文献

1. Brucellosis in humans and animals. WHO/CDS/EPR/2006.7.
(<https://www.who.int/publications/i/item/9789241547130>) WHO. 2006. (総論)
2. Terrestrial Animal Health Code (2019). Chapter 8.4. Infection with *Brucella abortus*, *B. melitensis* and *B. suis*.
(https://www.oie.int/en/what-we-do/standards/codes-and-manuals/terrestrial-code-online-access/?id=169&L=1&htmfile=chapitre_bovine_brucellosis.htm) OIE. 2019. (総論)
3. Brucellosis. (<https://www.cdc.gov/brucellosis/>) CDC. 2021. (総論)
4. Pappas, G., Papadimitriou, P., Akritidis, N., Christou, L., Tsianos, E.V. The new global map of human brucellosis. *Lancet Infect. Dis.*, 6: 91-99, 2006 (総論、疫学)
5. Memish, Z.A. and H.Balkhy, H.H. Brucellosis and international travel. *J. Travel. Med.*, 11: 49-55, 2004 (総論、疫学)
6. Greene, C.E. and Carmichael, L.E. Canine brucellosis. pp369-381. In: Greene CE. (ed), *Infectious diseases of the dog and cat*, 3rd ed. Elsevier, Inc., Canada, 2006 (総論、イヌブルセラ)
7. Genus *Brucella*. (<https://lpsn.dsmz.de/genus/brucella>)
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=2826938&lvl=3&lin=f&keep=1&srchmode=1&unlock>) (分類)
8. 特集：ブルセラ症 1999年4月～2012年3月, In: 病原微生物検出情報, 国立感染症研究所, 厚生労働省健康局, 33(7), 2012. (<https://www.niid.go.jp/niid/ja/iasr-sp/2342-related->) (疫学、国内ヒト)
9. Sewell, D.L. Laboratory-associated infections and biosafety. *Clin. Microbiol. Rev.*, 8: 389-405, 1995 (実験室感染)
10. Skalsky, K., Yahav, D., Bishara, J., Pitlik, S., Leibovici, L. and Paul, M. Treatment of human brucellosis: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Br. Med. J.*, 336:701-704, 2008 (治療、ヒト)
11. Baily, G.G., Krahn, J.B., Drasar, B.S. and Stoker, N.G. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. *J. Trop. Med. Hyg.* 95:271-275. 1992. (PCR、BCSP31)
12. Imaoka, K., Kimura, M., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Simultaneous detection of the genus *Brucella* by combinatorial PCR. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 60:137-139, 2007 (PCR、omp2&omp31)
13. Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A and Martinez-Soriano JP. Single-step PCR for detection of *Brucella* spp. from blood and milk of infected animals. *J. Clin. Microbiol.*

- 33:3087-3090. 1995. (PCR、OMP2)
14. MacMillan, A. Conventional serological tests. pp153-197. In: Nielsen, K and Duncan, J.R. (eds), Animal brucellosis. CRC Press, Inc. Florida. 1990. (試験管凝集反応)
15. Hart, C.A. and Bennett, M. Gram negative infections: Gram negative zoonoses. pp581-604. In: Cimolai, N. (ed), Laboratory diagnosis of bacterial infections. Marcel Dekker, Inc. New York. 2001. (試験管凝集反応)
16. Baum, M., Zamir, O., Bergman-Rios, R., Katz, E., Beider, Z., Cohen, A. and Banai, M. Comparative evaluation of microagglutination test and serum agglutination test as supplementary diagnostic methods for brucellosis. 1995. J. Clin. Microbiol. 33: 2166-2170. (マイクロプレート凝集反応)
17. Kimura, M., Imaoka, K., Suzuki, M., Kamiyama, T. and Yamada, A. Evaluation of a microplate agglutination test (MAT) for serological diagnosis of canine brucellosis. J. Vet. Med. Sci, 70:707-709, 2008 (マイクロプレート凝集反応)

VI. 依頼先

国立感染症研究所 獣医科学部

今岡浩一、鈴木道雄、前田健

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111 (代表) FA X03-5285-1179 (直通)

初版 2003年8月

第2版 2012年8月

第3版 2021年12月