

れ、簡易な方法である一方、非特異反応の可能性があること、検出感度が高くないこと、溶血が著しい検体では利用しにくい等の問題がある。また、ELISA 法は、多検体処理が可能で感度もよい方法であるが、利用できる標識二次抗体に制限がある。これらの問題を解決する抗体検出法として競合 ELISA を確立できた。MA 法で 10 倍以上の抗体価を示した全検体が Ft-cELISA でも陽性と判定できたことから、本法が多種類の動物血清の抗体を高感度に検出することに有用であることが示唆された。しかしながら、野兔病菌抗体陽性の野生動物の検体数は少なく他の手法との相関性等を正確に検証するためにもさらに多数の検体の測定と MA をはじめウエスタンブロット法や蛍光抗体法等の他の測定方法との比較検証をする必要があると考えられる。

これまで検討がなされてきたエキノコックス原頭節の人工培養法は、生活環を完結させることに目標が置かれてきた。すなわち、成虫型への分化であれば性成熟（中間宿主への感染能を持つ虫卵の有無）である。しかしながら、これらの方法では、そのような処理によって一時的にはあれ生じている虫体そのものの損傷が顧みられることはなかった。今回の成績からは先行研究のプロトコルでは、分化・発育自体は促進されたものの、生体へのダメージが大きく、マイクロアレイで要求される品質の RNA を得ることは極めて困難であった。今回確立した方法では、虫体の損傷をできるだけ避けつつ、従来報告されてきた分化・発育程度とほぼ同等の効率を達成することができ、マイクロアレイデータを取得し現在解析を進めている。また、今回の *in vitro* の人工培養法は、分化関連遺伝子の発現解析に有用であるのみならず、新規薬剤候補をスクリーニングする際の評価にも応用可能なものであり、作用機序の理解など、トランスクリプトーム解析と組み合わせての活用も期待される。

土壌から効率よく *B. cereus* group 菌種群を分離培養する方法を確立することができた。これにより、近縁菌の菌株ライブラリーを充実させて、国内各地域の土壌中の *B. cereus* group 菌種群の分布を解析することが可能になった。また、これらの方法は土壌からの炭疽菌芽胞の分離に応用可能であると考えられる。次年度は、構築した菌株ライブラリーから遺伝子を抽出して、*B. cereus* の 7 house keeping genes を用いた MLVA (タンデムリピート) 解析による系統

解析を行い、土壌分離地域との相関の有無や食中毒由来の *B. cereus* との比較解析を行って遺伝子型別の方法の確立を試みる。土壌中における炭疽菌の生活史を明らかにすることは国内における炭疽発生リスクを考える上でも非常に重要である。また、本研究の推進によって *B. cereus* group 菌種群の菌株ライブラリーを構築することで、臨床分離株と環境由来株との鑑別および、感染経路の特定にも有益となる遺伝子型別に必要なゲノム情報等を得られることが期待される。

2006 年 11 月に、2 例の輸入狂犬病が発生したのは、曝露後発病予防希望者の受診が急増し、2007 年における曝露後発病予防被実施者は 138 例に達した。輸入狂犬病発症例発生後の被実施者急増は、以前であれば治療を考えなかった海外咬傷被害者が新聞やテレビなどの報道から狂犬病の致命率の高さに気づいたためと考えられる。しかし 2007 年を境に受診者数は減少に転じ、2009 年には輸入狂犬病が発生した 2006 年以前の水準に戻った。この間海外で動物咬傷を受ける渡航者数が減少したとは考えにくく、海外で動物に傷つけられても狂犬病の可能性を考えない渡航者が以前の水準まで増えたと推測すべきであろう。海外旅行者などに対する狂犬病に関する知識の啓発が重要である。これまでに報告された狂犬病発症後の救命例は、いずれも狂犬病ウイルスが検出されておらず、抗体上昇により診断されている。これは、狂犬病ウイルスが発症早期に排除されていることが、発症後の転帰に影響することを示唆していると思われる。狂犬病ウイルスの早期排除には、曝露量、宿主の免疫応答などが予後に影響する可能性があり、今後これらの因子について更なる検討が必要であると思われる。

E. 結論

国内での存在は明らかにされているがその存在様式が不明な動物由来感染症について検査法を確立し、我が国の自然界におけるこれら病原体の存在様式に関する実態調査を継続した。その結果様々な動物が動物由来感染症の伝播に関与していることが確認されたが、どの動物が真のリザーバーであるか未だに不明なものもあり、今後の調査研究の継続がわが国における動物由来感染症のリスクを評価するためには不可欠である。そのためにはワンヘルスの理念を実践に移して行くことが重要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

1. 紙上発表

- (1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.
- (2) Katsukawa C, Komiya T, Yamagishi H, Ishii A, Nishino S, Nagahama S, Iwaki M, Yamamoto A, Takahashi M. : Prevalence of *Corynebacterium ulcerans* in dogs in Osaka, Japan.: *J Med Microbiol. Feb; 61(Pt 2): 266-273. 2012*
- (3) A. Hotta, K. Tanabayashi, Y. Yamamoto, O. Fujita, A. Uda, T. Mizoguchi and A. Yamada Seroprevalence of tularemia in wild bears and hares in Japan. *Zoonoses and Public Health* (印刷中)
- (4) A Okutani, H Tungalag, B Boldbaatar, A Yamada, D Tserennorov, I Otgonchimeg, A Erdenebat, D Otgonbaatar, and S Inoue. Molecular Epidemiological Study of *Bacillus anthracis* Isolated in Mongolia by Multiple-Locus Variable-Number Tandem-Repeat Analysis for 8 Loci (MLVA-8) *Japanese Journal of Infectious Diseases* 2011;4:345-348.

2. 学会発表

- (1) 木田浩司、中本敦、溝口嘉範、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、福士秀人、大屋賢司、松本千聖。ウシにおける Q 熱コクシエラ感染実態。平成 23 年度獣医学術中国地区学会。広島市
- (2) 川端寛樹、高野 愛、中尾稔、増沢俊幸、高田伸弘、矢野泰弘、石畝史、藤田博己、伊東拓也、及川陽三郎、川森文彦、熊谷邦彦、三上稔之、花岡希、安藤秀二、本田尚子、カイルテイラー、坪田敏男、今内覚、渡邊治雄、大西真。マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究。第 63 回日本衛生動物学会大

会。2011 年 4 月。東京。

- (3) 伊東拓也、高田伸弘、藤田博己、川端寛樹、中本敦、赤松達矢、安藤秀二、大久保（佐藤）梢、高野 愛、小笠原由美子。礼文島におけるマダニ類及びダニ媒介性病原体の調査。第 57 回日本衛生動物学会北日本支部大会。2011 年 10 月。山形
- (4) 川端寛樹、多田有希、高野 愛、佐藤梢、大西真。我が国におけるライム病の現状と疫学解析。第 153 回日本獣医学会学術集会。2012 年 3 月。大宮。
- (5) 佐藤 梢、後藤みなみ、村井厚子、柳井徳磨、高野 愛、川端寛樹。猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況。第 153 回日本獣医学会学術集会。2012 年 3 月。大宮。
- (6) 泉田さゆり、峯田有美子、浅井蓉子、長原正静、今岡浩一。*Brucella melitensis* による腸腰筋膿瘍の 1 症例。第 22 回日本臨床微生物学会総会、岡山、2011 年 1 月
- (7) Koichi Imaoka. Brucellosis in Japan. 8th Japan-Taiwan Symposium on Antibiotics resistance and Foodborne Disease, Tokyo, Oct. 12-14, 2011
- (8) Koichi Imaoka. Bacterial infection from dogs and cats - Brucellosis and *Capnocytophaga canimorsus* infection-. Workshop I: Zoonoses transmitted from pet animals in daily life. The 2nd International Conference on Animal Care in KOBE 2012, Kobe, Feb. 18-19, 2012
- (9) 畠山 薫、藤元 琢也、奥野 ルミ、貞升健志、甲斐 明美、山本明彦、高橋元秀。*Corynebacterium ulcerans* の遺伝子検査法の検討。第 23 回地研全国協議会関東甲信静支部細菌研究部会（宇都宮）。2011 年 2 月。
- (10) 吉村幸浩、立川夏夫、山本明彦、小宮貴子。*Corynebacterium ulcerans* による腋窩リンパ節膿瘍の一例。第 85 回日本感染症学会（東京）、2011 年 4 月
- (11) 岡本その子、内藤秀樹、船渡川圭次、今井一穂、佐伯貴之、小宮貴子、山本明彦、高橋元秀：栃木県内のイヌ・ネコにおける *Corynebacterium ulcerans* の保有状況調査、第 49 回栃木県公衆衛生学会総会、宇都宮、2011 年 9 月
- (12) 佐藤静香、大井誠明、側嶋絵里菜、松本淳、柳井徳磨、村井厚子、野中成晃、堀井洋一、野上貞雄。猟犬のトキソプラズマ抗体保有

状況. 第 17 回日本野生動物医学会(東京),
2011 年 9 月, 要旨集 p108

- (13) N Sharma, A Hotta, K Tanabayashi, Y Yamamoto, O Fujita, A Uda, T Mizoguchi, J Shindo, C-H Park, N Kudo, H Hatai, T Oyamada, A Yamada. Development of competitive ELISA for serosurvey of tularemia among various animal species. 5th Asian Workshop on Zoo and Wildlife Medicine/Conservation in Nepal 2011

厚生労働科学研究費補助金(新型インフルエンザ等新興・再興感染症研究事業)

分担研究報告書

Q 熱コクシエラの生態系における感染リスク評価に関する研究

研究分担者	岸本壽男	岡山県環境保健センター	所長
研究協力者	木田浩司	岡山県環境保健センター 保健科学部	研究員
	葛谷光隆	同	専門研究員
	濱野雅子	同	専門研究員
	溝口嘉範	同	研究員
	中嶋 洋	同	科長
	藤井理津志	同	部長
	猪熊 壽	帯広畜産大学獣医内科学・感染症学	教授
	福士秀人	岐阜大学農学部獣医学科獣医微生物学講座	教授
	大屋賢司	同	准教授

研究要旨 本邦における Q 熱は 4 類感染症として重要であるが、不明な点が多く、感染経路や実態の解明はほとんどなされていない。特に、*Coxiella burnetii* の生態系での存在様式については全く不明であるため、家畜を含む動物並びに環境、ヒトでの実態について調査を行い、国内における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境における Q 熱コクシエラ感染の実態調査。②国内における本病原体の存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データとの比較検証と現在の感染リスクの評価。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシを対象に疫学調査を実施している。本年度は、昨年に引き続き、全国の食用ウシ 125 頭の全血から抽出した DNA を用いて real-time PCR で遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。追加調査として、平成 20 年度の調査で未実施であった、ネコ 1762 頭の全血から同様に遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。また、ベクターと考えられているマダニについて、岡山県全域で捕獲した 622 個体から遺伝子検出を試みたが、全て陰性であった。これまでの調査で、ヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシについては、感染リスクが低いことが明らかとなってきたが、本邦における野生動物への侵淫実体や、ベクターと考えられているマダニ種など、不明な点が多く存在しており、今後の課題である。

A.研究目的

Q 熱はヒトでは特異的な症状が認められず、インフルエンザ様疾患、肺炎、肝炎等、多彩な病状を示すが、動物では一般に無症

状とされる人獣共通感染症である。起因菌は *Coxiella burnetii*(以下 *C.burnetii*)であり、感染症法では 4 類感染症に分類されるが、本邦での実態は未だ不明な点が多く、感染

リスク評価が求められている。そこで、ヒト、家畜を含む動物並びに環境における本病原体の存在様式を明らかにすることを目的とした。すなわち①ヒト、ペット、家畜、野生動物、環境における Q 熱コクシエラ感染の実態調査。②国内における本病原体の存在様式、感染源、感染経路の解明。③過去の疫学データとの比較検証と現在の感染リスクの評価。以上を目的としている。これまでにヒト、ペットとしてのイヌ、ネコ、家畜としてのウシを対象に疫学調査を実施したが、本年度はウシについてさらに調査を進めるとともに、平成 20 年度に未実施であったネコ全血からの遺伝子疫学調査を実施した。さらに海外の報告からベクターと考えられてはいるが、本邦での実体は全く不明であるマダニを対象に遺伝子疫学調査を実施した。

B.研究方法

1) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

ウシについては、岡山県食肉衛生検査所の協力により、2011 年に T と畜場に搬入された食用ウシのうち、健康牛 73 頭及び病畜 52 頭 (計 125 頭) から全血を採取した (表 1)。ネコについては、2008 年 3 月～10 月に全国 47 都道府県の動物病院に来院した患畜 1762 頭から全血を採取した (表 2)。また、2010 年から 2011 年にかけて岡山県でマダニを採集し、形態学的に種を同定した後、1 匹ずつリン酸緩衝液 (PBS) で洗浄・圧潰し、内臓をウシ胎児血清 100 μ l に浮遊した (表 3)。

ウシ血液、ネコ血液及びマダニ内臓浮遊液から、それぞれ Qiagen DNA mini kit を使用して DNA を抽出し、Real-time PCR 法に

よる遺伝子疫学調査を実施した。

C.burnetii の Real-time PCR 法は、Klee(2006)らの報告をもとに、既存分離株において保存性の高い領域である Isocitrate dehydrogenase (icd) gene をターゲットに、Primer 及び Taqman probe は、それぞれ icd-439F= CGTTATTTTACGGGTGTGCCA (439-459), icd-514R = CAGAATTTTCGCGGAAAATCA (494-514), icd-464TM = FAM-CATATTCACCTTTTCAGGCGTTTTG ACCG-TAMRA(464-492) を使用した (Genbank accession no. AF146284)

また、合成 Oligo = CGTTATTTTACGGGTGTGCCAAGCCCGG TCAAAACGCCTGAAAAGGTGAATATGGT GATTTTCCGCGAAAATTCTG (439-514) を Internal control として、定量分析を行った。

C.研究結果

1) Q 熱に関する遺伝子疫学調査

ウシ 125 頭、ネコ 1762 頭及びマダニ 622 匹について、Real-time PCR 法による *C.burnetii* 遺伝子検出を試みたが、すべて陰性であった。

D.考察

昨年に引き続き、全国で飼育された食用ウシを対象として遺伝子疫学調査を行ったが、陽性個体は無かった。昨年までの結果を勘案すると、食肉を介したヒトへの感染リスクは低いと思われるが、最終的な判断は、今回実施できていない血清疫学調査の結果と併せて行うべきであろう。Htwe らの報告 (1992) では日本のウシの抗体陽性率は 46.6%であった。血清疫学調査に用いた

間接蛍光抗体法で陽性と判定する血清希釈倍数は、我々は128倍であるが、Htweらは16倍と低い。しかし、このことを考慮しても、現在のウシの感染率は1990年代と比較して低いと考えられた。

ネコについては、平成20年に実施した血清疫学調査では580頭のうち36頭が陽性(6.2%)であったが、今回新たに1762頭の遺伝子疫学調査を追加実施した。その結果は全て陰性であり、血清疫学調査の結果を勘案すると、ネコからの感染リスクは低いと考えられた。

マダニ622匹から*C.burnetii*の遺伝子検出を試みたが、全て陰性であり、宿主の特定には至らなかった。Hoらは岐阜県の牧場で採集したマダニ約250匹の15プール検体中4検体から*C.burnetii*を分離した(1995)。我々の調査と比較して高い検出率を示した理由として、牧場のマダニが高率に*C.burnetii*を保有している、岐阜県の汚染率が全体に高いなどの可能性が考えられるが、結論を出すためにはさらなる調査が必要である。

生態系での感染様式を解明するためには、今後さらにウシやマダニの数を増やして検討するとともに、昨年の本研究で明らかになった一部の牧場のウシの抗体保有率から*C.burnetii*汚染地域が存在する可能性が考えられる北海道の野生動物についての調査も必要と思われる。今後の課題である。

E.結論

昨年度に引き続き、食肉処理場に搬入されたウシ125頭、平成20年の調査で未実施であったネコ1762頭、さらに宿主と目されているマダニ622匹を対象として*C.burnetii*遺伝子の検

出を試みたが全て陰性であった。昨年度までの結果を勘案すると、近年の国内のウシ及びネコの*C.burnetii*感染率は低く、これらの動物を介したヒトへの感染リスクは低いと考えられた。また、宿主と目されるマダニについても、少なくとも岡山県では*C.burnetii*保有率は低いと考えられた。今後、さらにウシ及びマダニの数を増やして検討するとともに、*C.burnetii*汚染地域の存在が推察されている北海道の野生動物についても検討予定である。

F.健康危険情報

特になし

G.研究発表

1)木田浩司、中本敦、溝口嘉範、葛谷光隆、濱野雅子、藤井理津志、岸本壽男、福士秀人、大屋賢司、松本千聖. ウシにおけるQ熱コクシエラ感染実態. 平成23年度獣医学術中国地区学会. 広島市

論文発表は特になし

表1 津山市 Tと畜場へ搬入された食用牛(都道府県別)

	2009年	2010年	2011年	合計	総計	
健康牛	岡山県	20	46	41	107	
	広島県	3	5	4	12	
	島根県	4	7	6	17	
	鳥取県	3	—	4	7	
	北海道	10	—	4	14	
	山形県	6	1	2	9	
	福島県	1	1		2	
	新潟県	1	6	1	8	
	栃木県	5	—	—	5	
	静岡県	1	—	—	1	
	長野県	—	1	1	2	214
	愛知県	7	—	2	9	
	岐阜県	—	—	1	1	
	三重県	—	5	—	5	
	滋賀県	2	—	—	2	
	兵庫県	1	—	6	7	
	香川県	—	1	—	1	
	愛媛県	—	—	1	1	
	徳島県	—	1	—	1	
	大分県	1	—	—	1	
	長崎県	1	—	—	1	
	沖縄県	—	1	—	1	
病畜	岡山県	46	65	40	151	
	鳥取県	3	3	—	6	
	島根県	—	2	4	6	
	北海道	—	3	5	8	177
	新潟県	—	1	—	1	
	愛知県	—	—	3	3	
	京都府	1	—	—	1	
	兵庫県	—	1	—	1	

表2 全国47都道府県の動物病院で採材したネコ検体(内訳)

都道府県	検体数	都道府県	検体数	都道府県	検体数	都道府県	検体数	都道府県	検体数
北海道	28	埼玉県	35	岐阜県	40	鳥取県	30	佐賀県	40
青森県	40	千葉県	35	静岡県	40	島根県	40	長崎県	40
岩手県	40	東京都	23	愛知県	15	岡山県	40	熊本県	40
宮城県	40	神奈川県	38	三重県	40	広島県	31	大分県	40
秋田県	40	新潟県	40	滋賀県	39	山口県	40	宮崎県	40
山形県	40	富山県	40	京都府	40	徳島県	40	鹿児島県	38
福島県	40	石川県	40	大阪府	40	香川県	40	沖縄県	37
茨城県	40	福井県	40	兵庫県	40	愛媛県	40		
栃木県	40	山梨県	40	奈良県	40	高知県	40		
群馬県	40	長野県	14	和歌山県	39	福岡県	40		
								合計	1762

表3 岡山県で採集したマダニ

マダニ種	個体数
<i>Haemaphysalis flava</i> (キチマダニ)	372
<i>Haemaphysalis hystricis</i> (ヤマアラシチマダニ)	23
<i>Haemaphysalis longicornis</i> (フタトゲチマダニ)	115
<i>Haemaphysalis formosensis</i> (タカサゴチマダニ)	2
<i>Haemaphysalis kitaokai</i> (ヒゲナガチマダニ)	6
<i>Haemaphysalis megaspinosa</i> (オオトゲチマダニ)	39
<i>Ixodes turdus</i> (アカコッコマダニ)	31
<i>Ixodes ovatus</i> (ヤマトマダニ)	19
<i>Ixodes nipponensis</i> (タネガタマダニ)	3
<i>Amblyomma testudinarium</i> (タカサゴキララマダニ)	7
<i>Dermacentor taiwanensis</i> (タイワンカクマダニ)	5
合 計	622

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

国内分離ライム病ボレリア遺伝子データベースの構築

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	藤田博己	大原総合病院
	高田伸弘	福井大学
	伊東拓也	北海道立衛生研究所
	今内覚	北海道大学
	高野愛、大久保(佐藤)梢	国立感染症研究所
	中本 敦	岡山県環境保健センター

研究要旨:

国内でのライム病ボレリアの高感度 DNA 型別解析法による遺伝子データベース構築作業を継続的に行った。本年度は新たに26株についてデータベースへの登録を行った。また、中国、モンゴルを含むアジア地域で共通の DNA 型が存在することも明らかとなった。

A. 研究目的

ライム病はボレリア属細菌による感染症で、病原体ボレリアは、野生動物を保菌宿主とし、マダニによって媒介されることでヒトへの感染が成立する。世界では、*Borrelia burgdorferi*, *B. garinii*, および *B. afzelii* が病原体として知られている。欧米では年間数万人規模で患者が報告されており、特に欧州では *B. garinii* 感染による神経ボレリア症が見出されるなど、患者発生数に加え、その重い病態のため重大な社会問題となっている。我が国でも、1999 年の感染症法施行後、主な流行地である北海道での 49 例を含む、計 122 例(2010 年 50 週時点)のライム病症例が報告されている。

本疾患の制御には、自然界における病原体の分布状況の把握とそこからの感染経路の遮断が

重要であり、このためには精度の高い病原体同定法が必要である。また、近年渡り鳥等の移動に付随した非人為的病原体の拡散も指摘されており、多国間での病原体比較解析において、基準となるものさし(国際標準)の導入も求められていた。近年 Margos らはボレリアの多領域 DNA 配列型別法(Multilocus sequence typing 法、以下 MLST 法と略す)を開発し、これが前記疫学解析を行う上で解像能が高いことから、国際標準として用いることを提唱した(Margos et al. 2008, 2009)。また我々も昨年度までの研究により、国内における病原体疫学調査に本法が有効であることを示してきた。そこで本研究では、国際標準法に準拠した国内ボレリアの DNA 型別データベースを充実させ、多国間での疫学解析に必要な情報を提供すると

ともに、我が国では患者はほとんど見出されませんが、欧州では患者数が見出される *B. afzelii* 等についてもデータベース構築を開始した。

B. 研究方法

ボレリア分離のため、北海道、長野県において野鼠の捕獲、およびマダニ採取を協力研究者とともにいった。捕獲された野鼠は安楽殺後無菌的に膀胱を採取し培養に用いた。マダニは体表面をエタノール消毒後、内容物を取り出し培養に供した。ボレリアの培養には BSK-H 培地を用い、32°Cで2ないし3週間培養を行った。培養されたボレリアは常法に従い DNA 抽出し、Takano らの方法に従って種同定後、Margos らの方法に従って、8 遺伝子の塩基配列を決定しそれぞれの sequence type (以下 ST) を決定した (Margos et al. 2008)。得られた DNA 情報は *Borrelia* MLST database (<http://borrelia.mlst.net>) に登録し世界の研究者へ情報発信を行った。

(倫理面からの配慮について)

該当しない。

C. 研究結果

野鼠およびマダニより 26 株のボレリア分離に成功した。分離ボレリアは Takano らの方法により *B. afzelii* 4 株、*B. garinii* 20 株、および *B. japonica* 2 株に分けられた。北海道で捕獲された野鼠からは ST131 (mema As11 株および Mr17 株) の他、新規 ST418 (mema As13 株) が分離された。長野県で捕獲された野鼠からは *B. garinii* および *B. japonica* が各 1 株分離されたが、これらはこれまでに知られていない ST であった。 *Ixodes*

persulcatus からは *B. garinii* 17 株および *B. afzelii* 3 株が分離された。*B. garinii* 17 株の内、ST131 が 4 株、ST375 が 3 株、新規 ST420 が 3 株見出された。*B. afzelii* は全てこれまで報告の無い新規 ST であった。*I. ovatus* より分離された *B. japonica* は長野県の野鼠より分離された株と近縁であったが異なる ST に分類された。

D. 考察

ST131 は野鼠の他、これまでに国内患者、中国、モンゴルの *I. persulcatus* からも分離されていることから、ヒトに病原性があり、かつアジアに広域分布している可能性が示された。本 ST は 1990 年代に長野県で採取された *I. persulcatus* からも分離されており、国内にも広く浸潤していると考えられる。昨年度の本研究で ST375 は北海道で捕獲された野鼠から分離されていることから、本 ST は野鼠からマダニへ伝播されていると考えられた。ST376、ST384、ST387 は国内患者からも分離されており本マダニが病原体伝播に関与していることが強く示された。

一方、本研究で広域型ボレリアであることが明らかとなった ST131 の拡散方法については不明であるが、これは 1) ST131 に感染した野鳥類が移動した、2) ST131 を保菌したマダニが野鳥類などに寄生し移動した、もしくは 3) その両方、が考えられた。

E. 結論

国際標準に準拠した我が国におけるライム病ボレリアの MLST データベースを作成するとともに、近隣諸国で分離されているライム病ボレリアが我が国でも見出されることを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K, Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. Journal of Clinical Microbiology. 49: 2035-2039, 2011.

2.学会発表

- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 中尾稔, 増沢俊幸, 高田伸弘, 矢野泰弘, 石畝史, 藤田博己, 伊東拓也, 及川陽三郎, 川森文彦, 熊谷邦彦, 三上稔之, 花岡希, 安藤秀二, 本田尚子, カイルテイラー, 坪田敏男, 今内覚, 渡邊治雄, 大西真. マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究. 第

63 回日本衛生動物学会大会. 2011 年 4 月. 東京.

- 2) 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹, 中本敦, 赤松達矢, 安藤秀二, 大久保(佐藤)梢, 高野 愛, 小笠原由美子. 礼文島におけるマダニ類及びダニ媒介性病原体の調査. 第 57 回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011 年 10 月. 山形
- 3) 川端寛樹, 多田有希, 高野 愛, 佐藤梢, 大西真. 我が国におけるライム病の現状と疫学解析. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.
- 4) 佐藤 梢, 後藤みなみ, 村井厚子, 柳井徳麿, 高野 愛, 川端寛樹. 猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況. 第 153 回日本獣医学会学術集会. 2012 年 3 月. 大宮.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. 本年度に新たに分離したボレリア株の由来とその sequence type(ST)番号.

株名	ボレリア種	ST	分離材料	採取地
meman As 11	<i>Borrelia garinii</i>	131	<i>Apodemus speciosus</i>	Memambetsu, Hokkaido
meman As 13	<i>Borrelia afzelii</i>	418	<i>A. speciosus</i>	Memambetsu, Hokkaido
Mr 17	<i>B. garinii</i>	131	<i>Myodes rufocanus bedfordiae</i>	Wakkanai, Hokkaido
kaminae Ip 1	<i>B. garinii</i>	387	<i>Ixodes persulcatus</i>	Wakkanai, Hokkaido
tonbetsu lo 7	<i>Borrelia japonica</i>	419	<i>Ixodes ovatus</i>	Tonbetsu, Hokkaido
rebun 8	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
rebun 9	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
rebun 20	<i>B. garinii</i>	427	<i>I. persulcatus</i>	Rebun Island, Hokkaido
horobetsu 5	<i>B. garinii</i>	376	<i>I. persulcatus</i>	Horobetsu, Hokkaido
horobetsu 8	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Horobetsu, Hokkaido
sarufutsu 2	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Sarufutsu, Hokkaido
sarufutsu 3	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Sarufutsu, Hokkaido
konnai 1	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 2	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 3	<i>B. afzelii</i>	421	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 8	<i>B. afzelii</i>	422	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 10	<i>B. garinii</i>	420	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 14	<i>B. garinii</i>	423	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 15 clone5	<i>B. garinii</i>	428	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 17 clone1	<i>B. garinii</i>	131	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 17 clone3	<i>B. afzelii</i>	424	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 20	<i>B. garinii</i>	384	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 25	<i>B. garinii</i>	375	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
konnai 26	<i>B. garinii</i>	429	<i>I. persulcatus</i>	Hokkaido
takamine As 5	<i>B. garinii</i>	425	<i>A. speciosus</i>	Mt. Asama, Nagano
myogi As 11	<i>B. japonica</i>	426	<i>A. speciosus</i>	Karuizawa, Nagano

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

猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査

研究分担者	川端寛樹	国立感染症研究所 室長
研究協力者	大久保(佐藤)梢、高野 愛 後藤みなみ、村井厚子、柳井徳麿	国立感染症研究所 岐阜大学

研究要旨:

猟犬を歩哨動物としたライム病ボレリアの血清疫学調査を行った。ライム病非流行地と考えられている南九州などにおいても猟犬から抗ボレリア抗体が見出された。一方、ウエスタンブロット法による抗体検索では、猟犬の在住地域により反応する抗原が異なる傾向が見られた。これは猟犬が感染したボレリア種が地域によって異なるためと考えられた。

A. 研究目的

ライム病はボレリア属細菌による感染症で、病原体ボレリアは、野生動物を保菌宿主とし、マダニによって媒介されることでヒトへの感染が成立する。このため、病原体を保有かつ伝播するマダニの分布を調べることは、地域毎のライム病感染リスクを評価するうえで重要である。しかしながら、マダニの病原体保有率や野生動物の病原体感染率等は地域、季節等によって変動することが知られている。また、調査実施者がマダニ刺咬を受ける可能性があること、さらには調査対象となる野生動物からの病原体曝露の危険性もあり、調査実施時にこれらリスクを低減することも必要である。

近年、イヌがボレリアに対して感受性が高いこと、加えてマダニ刺咬を受けやすいことから、イヌを歩哨動物とする病原体ボレリアの環境モニタリン

グが海外で試みられてきている。そこで本研究では、マダニの曝露機会が高いと考えられる猟犬を歩哨動物として、その血中抗ボレリア抗体保有状況を調べた。

B. 研究方法

抗ボレリア抗体測定のため、猟犬血清 506 検体を収集した。猟犬血清は柳井らより分与を受けた。血清中の抗ボレリア抗体測定は、一次スクリーニングとして Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay (以下 ELISA 法と略す) にて抗ボレリア IgG 抗体価を測定し、陽性と判定された検体についてはウエスタンブロット法(以下 WB 法と略す)による確認を行った。ELISA 法は recomWell Borrelia canis IgG (Mikrogen, Germany) を用いた。WB 法には recomBlot Borrelia canis IgG (Mikrogen) を用いた。試験は各検査キット添付の手順書に従って行っ

た。感染ボレリア種の同定を目的として、ボレリア分離のため、鹿児島県および沖縄県で猟犬 84 頭から採血し、その全血約 0.1ml を BSK-H 培地に接種し 32°C で 3 週間培養した。

(倫理面からの配慮について)
該当しない。

C. 研究結果

猟犬血清 506 検体のうち、ELISA 法にて 134 検体(26.5%)が抗ボレリア IgG 抗体陽性と判定され、うち 83 検体(16.4%)が WB 法により陽性が確認された。WB 法による地域別での抗体陽性率は、北信越地方で 10.3%、東海地方で 21.8%、中国・四国地方で 6.5%、南西諸島を除く九州地方で 23.5%、南西諸島では 12.6%であった。

それぞれのボレリア抗原に対する陽性率は地域毎に異なり、ライム病患者が散見される北信越地方および東海地方などでは抗 VlsE 抗体陽性率が高い傾向が見られた。これに対して、南西諸島を含む九州地方では抗 VlsE 抗体の陽性率が低下する一方で P100 抗原に対する抗体陽性率が上昇する傾向が見られた。

イヌ全血 84 検体からのボレリア培養を鹿児島県以南の地域において試みたが、いずれの全血からもボレリアは培養されなかった。

D. 考察

イヌを歩哨動物とする病原体環境モニタリングは、マダニ媒介性感染症のサーベイランス手法として世界的に用いられている。特に欧米では、ライム病患者発生地域におけるイヌの抗体保有率が高いこと等から、その歩哨動物として可能性が

示されている(Goossens et al 2001, Rand et al. 2011)。米国における大規模な疫学調査では、ライム病流行地域におけるイヌの抗体陽性率は 4.0-11.6%である一方、ライム病患者の罹患率が低い地域では 1.0-1.4%であることが示されている(Bowman et al. 2009)。本研究では、猟犬の抗ボレリア抗体陽性率はこれと比較して高かったが、これは愛玩動物と比較して猟犬はマダニの曝露機会が高いためである可能性が考えられた。一方、地域間でボレリア抗原に対する反応性に違いが見られた。特に九州以南の地域では、それ以外の地域と比較して反応抗原に違いが見出された。これは各地域に浸潤しているボレリア種が異なることが一因として考えられたが、血液からのボレリア分離培養は全て陰性であったため、感染種の同定にはいたらなかった。

E. 結論

ヒトでのライム病非流行地と考えられる西日本においても抗ボレリア抗体陽性検体が見出された。一方でその感染ボレリア種の同定には至らなかった。今後は北海道等ライム病流行地での調査が必要である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

- 1) Takano A, Nakao M, Masuzawa T, Takada N, Yano Y, Ishiguro F, Fujita H, Ito T, Ma X, Oikawa Y, Kawamori F, Kumagai K, Mikami T, Hanaoka N, Ando S, Honda N, Taylor K,

Tsubota T, Konnai S, Watanabe H, Ohnishi M, Kawabata H. Multi-locus sequence typing implicates rodents as the main reservoir host of human pathogenic *Borrelia garinii* in Japan. *Journal of Clinical Microbiology*. 49: 2035-2039, 2011.

2.学会発表

- 1) 川端寛樹, 高野 愛, 中尾稔, 増沢俊幸, 高田伸弘, 矢野泰弘, 石畝史, 藤田博己, 伊東拓也, 及川陽三郎, 川森文彦, 熊谷邦彦, 三上稔之, 花岡希, 安藤秀二, 本田尚子, カイルテイラー, 坪田敏男, 今内覚, 渡邊治雄, 大西真. マダニ媒介性のライム病病原体 *Borrelia garinii* の維持伝播サイクルに関する研究. 第63回日本衛生動物学会大会. 2011年4月. 東京.
- 2) 伊東拓也, 高田伸弘, 藤田博己, 川端寛樹, 中本敦, 赤松達矢, 安藤秀二, 大久保(佐藤)梢, 高野 愛, 小笠原由美子. 礼文島における

マダニ類及びダニ媒介性病原体の調査. 第57回日本衛生動物学会北日本支部大会. 2011年10月. 山形

- 3) 川端寛樹, 多田有希, 高野 愛, 佐藤梢, 大西真. 我が国におけるライム病の現状と疫学解析. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.
- 4) 佐藤 梢, 後藤みなみ, 村井厚子, 柳井徳磨, 高野 愛, 川端寛樹. 猟犬における抗ライム病ボレリア抗体の保有状況. 第153回日本獣医学会学術集会. 2012年3月. 大宮.

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表 1. ELISA 陽性 134 検体における、各ボレリア抗原に対する反応性

地域	ELISA 陽性数	P39 陽性数 (陽性率)	P100 陽性数 (陽性率)	VlsE 陽性数 (陽性率)
北信越	11	1 (9.1%)	6 (54.5%)	9 (81.8%)
東海	64	11 (17.2%)	30 (46.9%)	50 (78.1%)
中国・四国	9	0	4 (44.4%)	8 (88.9%)
九州 (南西諸島を除く)	28	1 (3.6%)	20 (71.4%)	15 (53.6%)
南西諸島	22	3 (13.6%)	15 (68.2%)	5 (22.7%)
合計	134	16 (11.9%)	75 (56.0%)	87 (64.9%)

ブルセラ症等に関する研究

（国内野生イノシシにおける抗 *Brucella* 抗体の保有状況に関する研究）

研究分担者 今岡 浩一 国立感染症研究所 獣医科学部 第1室長
研究協力者 木村 昌伸 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官
研究協力者 鈴木 道雄 国立感染症研究所 獣医科学部 主任研究官

研究要旨： ブルセラ症 (brucellosis) はブルセラ属菌 (genus *Brucella*) の感染を原因とする人獣共通感染症である。欧米では、毎年のように、家畜ブルセラ菌のリザーバーである有蹄類の野生動物が感染源となり家畜にブルセラ病が発生したとする報告がされる。とくに近年では、欧州の野生イノシシが広範囲に渡りブルセラ菌に感染していることが確認され、家畜への伝播が懸念されている。

我々の、野生イノシシの血液サンプルを用いたこれまでの調査から、国内野生イノシシのイヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対する抗体保有が疑われている。本年度も、四国地方を中心に、イノシシ血液サンプルを収集した。MAT 法によりブルセラ属菌に対する抗体保有を検討したイノシシ血液は、前年までと合計で 543 サンプルとなった。イヌブルセラ菌 (*B. canis*) に対しては、全国で 11.0% (60/543)、うち四国では 15.4% (47/305)、家畜ブルセラ菌 (*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*) に対しては、全国 0.6% (3/543)、うち四国では 0.7% (2/305) が、それぞれ陽性であった。

さらに、MAT 法により血清陽性となったサンプルについて PCR 法によりブルセラ特異的遺伝子の検出を行ったところ、25 サンプルが、陽性を示し、そのうち 5 サンプルがイヌブルセラ菌 (*B. canis*) 型の陽性パターンを示した。それらイヌブルセラ菌型陽性の増幅バンドのシーケンスは、3 つの異なる遺伝子座においてブルセラ属菌遺伝子と配列が一致した。しかし、ブルセラ SE 抗原を用いたウェスタンブロッティング法で、MAT 陽性サンプルの再検討を実施したところ、明らかに陽性と判定されるものは無かった。

遺伝子検出の結果から、一部のイノシシはイヌブルセラ菌に感染していたと考えられうる。しかし、MAT 陽性例 (イヌブルセラ菌陽性、家畜ブルセラ菌陽性) は、より高感度で特異性の高い WB 法では、全て陰性であり、現時点では、他のグラム陰性菌との交叉反応によるものである可能性を否定できない。さらなる検討が必要と考える。

A. 研究目的

ブルセラ症 (brucellosis) は、重要な人獣共通

感染症である。世界中で毎年50万人を超える患者が新規に発生しており、特に家畜での対策が不十分な地域では、年間数百～数千症例のヒト

患者が報告されている。国内では、感染症法によって4類感染症（全数把握）に指定された1999年4月1日以降、2011年12月31日現在までに、ブルセラ症患者18例の届け出がされている（表1）。そのうち7例は家畜ブルセラ菌（*B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis*）である。*B. melitensis* 感染5例、*B. abortus* 感染2例であった。それらは、すべて推定感染地域を国外とする輸入症例である。残り11例のうち、国内を推定感染地域とする10例は*B. canis*感染であると考えられている。

国内では、家畜における家畜ブルセラ菌感染は、感染家畜の摘発・淘汰の結果、現在は清浄化している。しかしながら近年、数年に1頭程度、ウシブルセラ病とされたウシが報告されている。ただし、発生は単発で、同居家畜はもとより、その他の家畜間でも感染の伝播が起こっているとする報告はなく、菌も分離されない。何らかの交差反応とも考えられるが、仮に、家畜ブルセラ菌が国内に、依然、存在しているとすると、野生動物によって維持されている可能性もある。一方、*B. canis*は国内に定着しており、全国のイヌの2~5%程度が抗体を持っていることが確認されている。*B. canis*については、野生動物による保菌も考えられる状況にある。

これまでの我々の調査により、国内のイノシシで*B. canis*に対する抗体を持つものや、血中にブルセラ属菌特異的遺伝子を保有するものが認められている。前年に引き続き、過去に抗体保有の報告があった四国地方を中心に、ブルセラ属菌の宿主となりうる野生イノシシの血液サンプルを入手し、ブルセラ属菌の保菌状況やブルセラ属菌に対する抗体の保有状況を検討した。

B. 研究方法

1. 血液サンプルの採取： 大日本猟友会及び各地猟友会の協力を得て、同协会会员にイノシシの血液サンプルの採取を依頼した。サンプルは、

保冷して輸送し、回収した血液は当室にて血清を分離して測定まで-40℃に保管した。

2. マイクロプレート凝集反応（MAT）による抗ブルセラ抗体の検出： 家畜ブルセラ菌に対する抗体は、ブルセラ病診断用菌液（農業・生物系特定産業技術研究機構）を、*B. canis*に対する抗体は、ブルセラ・カニス凝集反应用菌液（北里研究所）を用いて検出した。イノシシ血清を96穴U底マイクロプレート上で10倍から2倍段階希釈し、これにサフラニンを加えて調整した同量の菌液を加える。家畜ブルセラ菌に対しては、保湿環境で37℃、18~24時間反応させた後に、40倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。*B. canis*については、溶血による擬陽性を排除する目的でブルセラ・カニス凝集反应用菌液(OD=1.0)をOD=2.5に濃縮し使用し、保湿環境で50℃、24時間反応させた後に、40倍希釈以上で凝集像の確認された物を陽性と判定した。

3. ブルセラ属菌特異的遺伝子の検出と菌分離： MAT法で、抗体陽性となったイノシシの血液よりDNAを分離し、ブルセラ属菌特異的DNAを*bcspl1*、*omp2* (*abortus* typeおよび*canis* type)、*omp31* 遺伝子を標的として、PCRにより検出した。

また、血液は、ブルセラ選択サプリメント（関東化学）を添加したATCC488 brothで培養した。血液培養液については、その一部をPCRによるブルセラ属菌特異的遺伝子の検出に用いた。陽性となった培養液については菌分離を試みた。分離された菌は、当該遺伝子ならびに16S rRNA 遺伝子シーケンスを行った。また、ブルセラ属菌等で免疫したウサギ抗血清との反応性を調べた。

C&D. 研究結果と考察

1. サンプルの採取状況： 表2にサンプル

ル・プロファイルを示した。イノシシは 18 県から 2005 年以前 47 頭、2005-6 年シーズン 98 頭、2007-8 年 68 頭、2008-9 年 87 頭、2009-10 年 41 頭、2010-11 年 146 頭、2011-12 年 56 頭 (1/1 現在) の合計 543 頭であった (表 2)。

2. MAT による抗体検査： 家畜ブルセラ菌に対しては、3 検体 (愛媛 2、鹿児島 1) が陽性を示した。その他の検査したサンプルはすべて 1:10 未満であり、抗体は確認されなかった。*B. canis* に対しては、検査したイノシシ 543 頭のうち 60 頭 (11.0%) が陽性を示した。

四国地区のみでは、2011-12 年分は、*B. canis* に対して 13/56 (23.2%) が陽性を示した。調査開始からの合計では、家畜ブルセラ菌に対して 2/305 (0.7%)、*B. canis* に対して 47/305 (15.4%) が陽性であった (表 3)。

3. 血液中のブルセラ属菌特異的遺伝子の検出：*B. canis* に対し抗体陽性となったイノシシ 60 サンプル中 25 サンプルが、4 つのプライマーセットのうちいずれかで陽性となった。また、そのうち 5 サンプルで *B. canis* と同一の増幅パターンが確認された (表 4)。家畜ブルセラ菌抗体陽性の 3 サンプルからは、ブルセラ特異的遺伝子は全く検出されなかった。

PCR で *B. canis* と同一の増幅パターンを示したサンプルについて各増幅産物のシーケンスを確認したところ、ブルセラ属内で保存性の高い *bcs*p31 の増幅領域では 100%ブルセラ属菌の配列と一致した。*omp*31 の増幅領域の配列は、この配列を欠く *B. abortus* を除いた、他のブルセラ属菌と 100%一致した。*omp*2 の増幅産物は、*B. canis* の配列と 100%一致した。すなわち、*B. canis* の保菌が強く疑われた。

4. 血液培養および菌分離： 本年度のサンプルで血液培養後の PCR の結果、*bcs*p31、*omp*2 プライマーで陽性を示すものは無かったが、10 サンプルが *bcs*p31 プライマーでのみ陽

性となった。これは、前回報告したグラム陰性菌 *A. xylosoxidans* による交叉反応と考えられた。*A. xylosoxidans* は、環境菌として知られており、血液採取時の混入が疑われるが、イノシシが保菌していた可能性も否定できない。しかし、本菌とブルセラ属菌の交差反応の検討結果では、ブルセラ属菌で免疫したウサギ血清は本菌には反応しなかった。従って、イノシシに見られた抗体は、本菌に対する抗体の交差反応ではないことが確認された。

5. ウェスタンブロッティング： MAT 陽性血清 (家畜ブルセラ陽性 3 サンプル、イヌブルセラ陽性 60 サンプル) について *B. canis* SE2-1 分画を抗原としたウェスタンブロッティング法で再検討を行った。

B. melitensis, *B. abortus*, *B. canis* に対するウサギ抗血清で、11kDa 付近に見られる特異的なバンド (hypothetical protein BMEI0805) の有無を指標に判定した (図 1)。

イノシシ血清での一例を図 1 に示す。陽性標準である *B. canis* ウサギ免疫血清と *B. canis* 感染イヌ血清では、11kDa 付近に陽性バンドが出現しているが、ウサギ、イヌそれぞれの陰性標準血清とイノシシ血清では、このバンドを確認できない (図 1)。

結果は、MAT 陽性のイノシシ血清のについては、全てがウェスタンブロッティング法では、陰性であった。

6. ELISA： MAT 陽性血清について ELISA 法で検討した。抗原としてブルセラ属 4 菌種 (*B. melitensis*, *B. suis*, *B. abortus*, *B. canis*) およびブルセラ属菌の主要抗原である LPS の相溶性が高く、交叉反応が予想されるグラム陰性菌として *Y. enterocolitica* (O9) の計 5 菌種のホルマリン不活化菌体を用いた。一例を図 2 に示す。5 菌種、それぞれの抗原に対し、標準血清として用いたウサギ免疫血清では、陽性および陰性標準で OD 値に大きな差がみられ抗ブルセラ抗