

厚生労働科学研究費補助金(新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業)  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークの強化に関する研究」班  
分担研究報告書  
動物由来感染症

研究分担者 森川 茂 国立感染症研究所獣医科学部 部長

研究協力者 今岡浩一 国立感染症研究所獣医科学部 室長  
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(4類感染症)の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地方衛生研究所(地衛研)でブラインド検体を用いた検査(抗体検査:TAT、遺伝子検出:PCR)について、外部精度管理(検査法・手技等の検証)を実施した。抗体検出については、うまく結果が出なかったところや結果の判定方法が誤っている地衛研も認められた。また、遺伝子検出に関しては、定性試験(菌種同定)は良好であったが、検出感度は各地衛研により差が大きく見られた。これは、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間でまちまちで、感度に違いが出ているのではないかと推測された。行政検査対象項目に関しては、使用機器、アガロースについても統一を図る事が望ましいと考えられた。ただ、全体的にみて参加21地衛研において、今回の結果のフォローを行うことで、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた。

#### A. 研究目的

ブルセラ症は世界的にも重要な動物由来感染症の一つであるが、日本では感染源家畜の清浄化が達成され、国内で家畜ブルセラ菌感染は認められず、現在ではその患者は、全て流行地からの入国者や流行地への渡航者など輸入症例に限られている。ただ、犬ブルセラ属菌については、国内犬の3%が感染していることから、国内感染患者となっている。感染症法に基づく届出対象(4類感染症)となった1999年4月1日以降、40例の患者が報告されており、うち14例が家畜ブルセラ菌感染、残りは犬ブルセラ菌感染である。

ブルセラ症の検査については、医療機関からの依頼が想定されるが、その内容は、届出基準となる血清抗体検査(TAT)と菌の分離・同定依頼となる。このうち、血清抗体検査につ

いては、ブルセラ症は通常、慢性経過をたどり、有症状期に抗体を保有していることが多いことや、細胞内寄生菌のため“抗体陽性=保菌が疑われる”と考えられることから、診断意義がきわめて大きい。今回、地方衛生研究所(地衛研)でもこれら検査に対応することが求められていることから、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地衛研で検査(抗体検査:TAT、遺伝子検出:PCR)について、ブラインド検体を用いて外部精度管理(検査法・手技等の検証)を実施することとした。

#### B. 研究方法

##### 1. ブルセラ症検査 EQA

表1に示す21地衛研から参加希望があった。参加希望地衛研に対して、ブラインド検体および凝集反应用菌液、試薬、puReTaq

Ready-To-Go PCR Beads、試験管など感染研の方法で実施するのに必要な物を送付した。実施方法については、感染研で実施している SOP に準じた実施手順書(表2)を作成し、これに沿って実施し、結果を報告することを求めた。

なお、実施内容は以下の通りである。

## 2. 抗体検出

ブルセラ病診断用菌液(*B. abortus* 用: 農業・食品産業技術総合研究機構、*B. abortus* 99 もしくは 125 株(*B. melitensis* biovar *abortus* strain 99 or 125)の加熱死菌液))を用いた試験管凝集反応により実施した。方法は、抗原添付のプロトコル(感染研 SOP も同じ)に従った。

検査検体には適宜希釈したウサギ免疫血清(TAT-1:*B. suis*、TAT-2:*B. canis*、TAT-3:*Yersinia enterocolitica* O9、TAT-PC:*B. abortus*)を用いた。なお、*Y. enterocolitica* O9 の LPS は家畜ブルセラ菌と相溶性が高いことから、当該免疫血清は家畜ブルセラ属菌に交差反応する。今回はその事象を経験してもらうために検体の1つに加えた。ただ、現実的には、臨床症状がブルセラ症とは異なるので、検査診断上問題になる懸念はないと思われる。

## 3. 遺伝子検出

遺伝子検出については次の5つの検討を実施した。1) 感染研の方法(puReTaq Ready-To-Go PCR Beads 使用)での実施、2) 各地衛研にて通常使用している DNA Polymerase を使用して実施、3) 血清からの DNA 抽出と PCR による同定、4・5) 感染研および各地衛研の方法で検体希釈列を用いた検出限界の検討、である。

1~3)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から、ヒトに感染しうる主要 4 菌種の鑑別同定ができるかどうかを実

施、検証した(表4、図1)。4・5)では、*bcs31*-PCR のみ実施した。

検査検体は、1・2)の PCR では、#1:*B. abortus*、#2:*B. melitensis*、#3:*B. canis*、#4:*Streptobacillus notomytis*、#PC:*B. suis*より抽出した DNA(1ug/ml)を用いた。また、3)のスパイクテストは、FBS に *B. abortus* 死菌体を添加した物を使用した。4・5)は、1、0.3、0.1、0.03、0.01、0.003、0.001ng/ul(#1~7)の *B. abortus* および DW(#8)を8連 PCR チューブに入れた物を用いた。どのプライマーや検体も、ロット差をなくすために、1つのチューブでまとめて作成し、これを各地衛研用に小分けした。

## C. 研究結果

### 1. 実施状況

参加希望の21地衛研のうち、1機関で、当該地衛研で通常使用している DNA polymerase を用いた検討が未実施だったが、それ以外の機関および検査に関しては、全て実施され、結果が報告された。

### 2. 抗体検出(表3)

1地衛研で、陽性となるべき検体(TAT-1)が陰性であり、TAT-PC の価も 40 倍と低くなっていた。また、別の地衛研で TAT-PC が 640<と高くなっていた。それ以外については、ほぼどの地衛研も想定していた結果が得られた。ただ、検査は 10~640 まで、7試験管を用いて行われている。そのため、最終の試験管で陽性の場合には 640<、陰性の場合には 320 となる。9地衛研で 640 と判定していたが、今回の検査では、640 の判定は不可能で、これは 640<としなくてはならない。その他、抗体価を、最終陽性となった試験管の次の倍率で提示している1地衛研があった。このように、21地衛研のうち、10地衛研で判定方法に誤りが見られた。

### 3. 遺伝子検出

1) 感染研の方法 (puReTaq Ready-To-Go PCR Beads) および 2) 各地衛研の DNA Polymerase を使用して実施、いずれの方法でも正しく菌種の同定がなされていた。また、3) 血清からの DNA 抽出と PCR による同定でも、菌種の特定がされており、いわゆる定性試験は問題なく実施されていた。

4・5) の、感染研および各地衛研の方法による検出限界の検討では、各地衛研間での感度の差が大きく認められた (表 5)。ただ、それぞれの地衛研内では、RTG-PCR beads やその他 DNA polymerase による感度の違いは少なく、使用するサーマルサイクラーやアガロースの組み合わせの違いによると推測される。

そこで、各地衛研で使用している機器、試薬等を表 6 にまとめた。サーマルサイクラーは、ABI Veriti が最も多かったが、使用機器は 5 メーカー、13 機種にも及んだ。アガロースも多くの種類が使用されており、さらに、標的増幅産物のサイズ (今回は 186-249bp) が小さいにもかかわらず、1,000bp 以上の分離に適している Agarose L03 を使用するなど、不適切なアガロースの選択が多く認められた。染色については、エチジウムブロマイドを用いた後染色が多かった。

通常、地衛研で使用している DNA polymerase や DNA 抽出キットは、機器やアガロースの多様性と異なり、Takara Ex Taq、Qiagen QIAamp DNA Mini Kit が大半を占めた。

#### D. 考察

ブルセラ症 (4 類感染症) の検査について、感染研使用の試薬・マニュアルなどを提供し、参加希望地衛研でブラインド検体を用いた検査 (抗体検査: TAT、遺伝子検出: PCR) について、外部精度管理 (検査法・手技等の検証) を実施した。

現状、抗体検査については、市販の抗原菌液を使用して実施することも可能だが、民間の臨床検査センターにおいて保険診療に基づく検査を実施しているため、医療機関から当該センターに検査依頼することができる。そのため、我々 (国立感染症研究所獣医科学部) は、医療機関等からの問い合わせの際には、通常は、民間の臨床検査センターに抗体の検査依頼をするよう伝えている。結果、大半のケースで、抗体が検出されず、その時点でブルセラ症が否定される。ただし、1) 検査センターでの抗体検査の結果が陽性であった、2) 菌 (未同定) が分離された、3) 患者背景 (流行地域出身の外国人、流行地への海外渡航歴、臨床症状等) からブルセラ症が強く疑われる、などの場合については、原則、行政検査として、抗体検査および菌の分離培養、菌の同定検査を受けることとしている。今回は、ブルセラ症では診断意義がきわめて大きい抗体検査について、その原理と方法を理解してもらうために EQA 実施項目に入れた。結果、手技については、1 地衛研を除き問題は無いと考えられたが、抗体価の判定方法に誤りが認められた地衛研が半数近く認められ、フォローが必要である。

遺伝子検出については、特に定性試験に関しては、問題なく実施されたと思われる。ただ、遺伝子検出に使用するサーマルサイクラー機種や電気泳動用アガロースが地衛研間でまちまちで、場合によっては、感度や特異性に影響を及ぼすことが推測された。行政検査対象項目に関しては、結果の共有を行うためにも、可能な限り使用機器やアガロースについて、地衛研間で統一を図ることが望ましいと考えられた。

#### E. 結論

抗体検出については、うまく結果が出なかったところや結果の判定方法が誤っている地衛

研も認められた。また、遺伝子検出に関しては、定性試験(菌種同定)は良好であったが、検出感度は各地衛研により差が大きく見られた。ただ、全体的にみて参加21地衛研において、ほぼ問題なくブルセラ症検査が実施できると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

論文発表

1. Yamamoto K, Kato Y, Mutoh Y, Kutsuna S, Imaoka K, Ohmagari N. Photo Quiz: A Traveler from Africa with Fever and Aggravated Chronic Back Pain. *Clinical Infectious Diseases*, 66(5):805-807, 2018

2. 今岡浩一. ブルセラ症. in: JBSA ニュースレター, 日本バイオセーフティ学会, 7(1): 7-13, 2017

学会発表

1. 今岡浩一. 教育講演9:ブルセラ症とバイオセーフティ. 第29回日本臨床微生物学会総会・学術集会, 岐阜, 2018年2月

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
該当なし
2. 実用新案登録  
該当なし
3. その他  
該当なし

表1) 参加地方衛生研究所

岩手県環境保健研究センター	京都府保健環境研究所
山形県衛生研究所	兵庫県立健康生活科学研究所
東京都健康安全研究センター	神戸市環境保健研究所
群馬県衛生環境研究所	広島県立総合技術研究所
横浜市衛生研究所	保健環境センター
静岡県環境衛生科学研究所	徳島県立保健製薬環境センター
富山県衛生研究所	香川県環境保健研究センター
愛知県衛生研究所	長崎県環境保健研究センター
名古屋市衛生研究所	長崎市保健環境試験所
岐阜県保健環境研究所	宮崎県衛生環境研究所
三重県保健環境研究所	沖縄県衛生環境研究所

表2) ブルセラ症検査EQA用、実施手順書見本

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく  
検査実施手順書を EQA 用の一部改変

**ブルセラ症検査実施手順書**

平成 21

送付先および問い合わせ先:  
162-8640 東京都新宿区戸山  
国立感染症研究所  
第一室 今  
Tel: 03-5283-  
E-mail: [msi@nih.go.jp](mailto:msi@nih.go.jp)

以下、本手順書を遵守して実施すること。  
実施にあわせて、逐次、各項目の (○) にチェックを入  
(実施途中で、目付が変更する場合は左余白に記載する。)

検査材料の受け入れ  
○ 検査内容を再度確認  
○ 必要試薬、器具等の確認  
○ 検査検体の受領: 検体受取日時 ( 年 月 日、  
受領者氏名 ( )  
○ 梱包状態の確認: 良 不良 不良備考 ( )

受領内容の確認: 普通郵便、クール便で送られてきた物の確認  
○ 郵便: H29 ブルセラ症遺伝子検出 PCR 依頼書・送付内容 17003  
H29 ブルセラ症検査実施手順書 171003  
ブルセラ菌遺伝子検出 PCR 検査(簡便)  
pUrTag Ready-To-Go PCR Beads (48assay) 常温保存

○ クール便:  
□ 二次容器 1 (合計 7本): プライマー 7種 各 1本  
□ 二次容器 2 (合計 6本): 検体 4種 各 1本  
陽性コントロール DNA 1本  
不活化ブルセラ菌を含むウシ血  
□ 二次容器 3 (合計 4本): 凝集反応用検体 3種 各 1本  
陽性コントロール 1本  
□ 検出感度検出用検体希釈液 (8 連 0.2ml チューブ 1個)  
□ 凝集反応用菌液 1本+凝集反応用希釈液 2本  
□ 凝集反応用試験管 (通常は常温輸送だが破損防止のため)

○ 不足、破損等あれば、上記問い合わせ先に連絡してください

○ 検査終了後、検体結果の写真も添付して、検査実施記録として、本手  
続に添付してください。(こちらで確認・処理した後、実施手順書は返  
却)

以下、実施手順書に従って実施をお願いします

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく  
検査実施手順書を EQA 用の一部改変

**1. 血清抗体検査 (試験管凝集反応)**

検査開始日  
検査実施者

目的: 被検血清中のブルセラ菌特異的抗体を試験管凝集反応  
必要な試薬・器具等: 確認し、該当する項目にチェックを記入

感染研より送付  
□ \*ブルセラ菌診断用菌液 (B. abortus 用・真菌・食品産業技術研  
99もしくは125株 (B. melitensis biovar abortus strain 99 or 12  
□ \*0.5wt%フェノール加生理食塩水 (生理食塩水に 0.5% (w  
解したフェノールを加える) (B. abortus 用希釈液)  
□ \*B. abortus 用 陽性対照血清 (ウサギに標準菌液を免疫して  
□ \*透明なガラス製小試験管 (直径 12mm・長さ 75mm, Di  
#9831-1207, IWAKI)

地研にて準備  
□ \*その他、一般的に血清反応に必要とされる器具類 (チップ  
管立て、ラップなど)

1) B. abortus, B. melitensis, B. suis に対する抗体の検出  
抗原: ブルセラ菌診断用菌液 (B. abortus 既菌液) (原液)  
✓ **ロット番号: H28-1; 使用期限: H30年 10月**  
希釈液: 0.3wt%フェノール加生理食塩水 (B: 希釈液)  
□ \*菌液と希釈液の必要量 (N= 検体数+陽性対象)

標準菌液管①	10倍希釈液 (A)
標準菌液管①	1.25 ml
1検体あたり (7本)	3.5 ml
検定検体数 (N=3) ②	14 ml (N×3.5)
必要量 (①+②)	15.25 ml ③

②は菌液 1: 希釈液 9なので、菌液と希釈液の必要量は、  
③は菌液 1: 希釈液 9なので、菌液と希釈液の必要量は、  
菌液 (原液): ③ x 0.1ml = (15.25) ml, 希釈液: ③ x 0.9 =  
(実際にはロスを考えて上で計算された量よりも少し多  
今回は、菌液 1.5ml + 希釈液 16.2ml → 計 18ml で調

検査手順 (今回は 7 段階希釈とする)  
○ (1) 0.5wt%フェノール加生理食塩水 (B: 希釈液) の必要  
(菌液の 9 倍量: ml) を 50ml チューブ  
○ (2) 2ml チューブ内の 10 倍菌液全量(1.8ml) を上記 50ml チ  
○ (3) 10 倍希釈液 (A) ができる

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく  
検査実施手順書を EQA 用の一部改変

NIID  
NATIONAL INSTITUTE OF  
INFECTIOUS DISEASES

○ (4) 下記要領で、標準菌液管 (#1-#5) を調整する。

	#1: 100%	#2: 75%	#3: 50%	#4: 25%	#5: 0%
10倍希釈液 (A)	0	0.125ml	0.25ml	0.375ml	0.5ml
希釈液 (B)	1ml	0.875ml	0.75ml	0.625ml	0.5ml

○ (5) 検体は 5 倍希釈血清から出発して 2 段階希釈で、各 7 段階の希釈系列を用意  
(0.5 ml / 試験管、希釈倍数 1:5~1:320)。

希釈液 (B)	0.8ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	捨て
検体血清	0.2ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml	0.5ml
菌液 (A)	0.5ml を加える					
最終希釈倍数	x10	x20	1	3320	3640	

\*1 検体につき、7本の試験管をチューブスタンドに立てる  
(試験管には、遊性ペンで検体番号とチューブ番号 1-7 を書いておく)  
\*1ml ピペットマンを使って、番号 1には 0.8ml、番号 2-7には 0.5ml の希釈液 (B)  
を入れる。  
\*番号 1に、0.2ml の検体血清を入れる。  
\*試験管をボルテックスでよく攪拌する (こぼさないように注意する)。  
\*0.5ml をピペットマンでとって、番号 2 の試験管に移す。  
\*試験管をボルテックスでよく攪拌する (こぼさないように注意する)。  
\*ピペットチップはその都度新しい物に交換して、同様に番号 7 まで移していき、  
最後に番号 7 から 0.5ml をとって、捨てる。  
\*これで、各試験管に 0.5ml ずつの希釈系列ができあがる。  
(血清希釈倍数は 1:5~1:320 となる)  
○ (6) 同様に (力価が 160 倍以上の) 陽性対照血清 (PC) の希釈系列を作る。  
○ (7) 10 倍希釈液 (A) 0.5 ml  
(最終血清希釈倍数は 1: )  
○ (8) 各試験管をボルテックスで  
○ (9) 溶液が乾燥しないように、  
○ (10) 37°C の孵卵器に入れて、

ブルセラ症診断 SOP ver.4 (2017.1) に基づく  
検査実施手順書を EQA 用の一部改変

NIID  
NATIONAL INSTITUTE OF  
INFECTIOUS DISEASES

検査結果  
判定実施日時: 年 月 日、時 分  
判定者: \_\_\_\_\_

(1) 既読: B. abortus

検体番号	結果	判定 (陽性/陰性)	検定値
10	10		
20	20		
30	30		
40	40		
50	50		
60	60		
70	70		
80	80		
90	90		
100	100		
110	110		
120	120		
130	130		
140	140		
150	150		
160	160		
170	170		
180	180		
190	190		
200	200		
210	210		
220	220		
230	230		
240	240		
250	250		
260	260		
270	270		
280	280		
290	290		
300	300		
310	310		
320	320		
330	330		
340	340		
350	350		
360	360		
370	370		
380	380		
390	390		
400	400		

○ (11) 試験管を揺らさないよう  
○ (12) 判定は、検体試験管の白  
濁度の標準菌液管の番号を  
○ (13) #3 の標準菌液管 (50%凝  
として記録する。  
○ (14) 血清の最終希釈倍数 40 倍  
(注: 実際には、凝集抗体価が  
異なることがあるため、必要)

○ の記録された最終希釈倍数平均値を  
記録簿 #40 以上から判定は陽性

表3) 各地方衛生研究所における抗体検査結果

	1	2	3	PC
<10	1	20		
10		1		
20				
40			4	1
80			15	
160			2	14
320	3			5
640	9			
640<	8			1

表4) 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>bcsp31</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*

表5) 各地方衛生研究所におけるPCR検出感度検査結果

#	3	4	5	6	7
RTG	1	7	6	4	2
他*)	1	8	4	5	1

\*) 1地研未実施

表6) 各地方衛生研究所における使用機器、試薬等

サーマルサイクラー	Applied Biosystems	Veriti (5)	GeneAmp9700 (3)	2720 (2)
		SimpliAmp	ProFlex	
	BioRad	C1000 Touch (2)	T100	MyCycler
	Takara	TP600	TP650	TP350
	Astek	GeneAtlasG02		
	日本ジェネティクス	G-Storm GS4		
アガロース	Nusieve3:1 (3)	Agarose LO3 (4)	AgaroseS (3)	AgaroseX
	AgaroseME	Agarose Typel	Agarose Typell	et.al.
	MultiNA (マイクロチップ電気泳動、島津)			
	QIAxcel (キャピラリー電気泳動、QIAGEN)			
染色試薬	EtBr (15)	GelRed (3)	ミドリグリーンDirect	

DNA polymerase \*)

- Takara ExTaq (HotStart含む) (14)
- Promega GoTaqGreen Master Mix (3)
- puReTaq Ready-To-Go PCR Beads (1)
- Takara EmeraldAmp PCR Master Mix (1)
- Takara Tks Gflex (1)

DNA抽出キット \*)

- QIAamp DNA Mini Kit (17)
- QIAamp DNA Blood Mini Kit (2)
- Takara NucleoSpin Tissue (1)

\*) 1地研未実施

図1) 遺伝子の基本検出パターンと*B. melitensis*検出例

