



短 報

## 人 *Brucella melitensis* 感染症の病性鑑定報告

今田由美子

動物衛生研究所生物学的製剤センター品質管理科

(平成15年7月31日 受付)

### Diagnosis Report of Human Brucellosis caused by

### *Brucella melitensis* in Japan

Yumiko IMADA

Quality Control Division, Department of Biologicals Production, National Institute of Animal Health

#### Summary

In Japan, brucellosis has been very rare not only in human but also in animals except dogs for a long time, although it was prevalent among cattle before 1965. In 1998, four bacterial strains suspected to be a member of genus *Brucella* were submitted from Metropolitan Komagome Hospital to National Institute of Animal Health for the identification of the species. Three were isolated from a man and one was from his wife, who manifested sickness with undulant fever, swelling of liver and spleen, and arthritis. They had visited Iraq shortly before becoming ill. The identification of these isolates was impossible with commercially available kits. Identification was done by Gram staining, slide-glass agglutination test with anti-smooth type *Brucella* serum and anti-rough type *Brucella* serum, colonial morphology, growth on selective agar medium, requirement of carbon dioxide for growth, growth on

agar medium containing thionin and basic fuchsin, growth on selective agar medium, production of hydrogen sulfide, lysis with Weybridge-phage, and slide-agglutination test with monospecific antisera against A and M. These isolates were also examined by PCR specific to *Brucella abortus*, *B. melitensis*, and biotypes 1 and 5 of *B. suis*. From these characteristics, all isolates were identified as *B. melitensis* biotype 2. Five serum samples collected from the patients at intervals of 2 to 3 weeks were also submitted for the measurement of antibody titer against *Brucella* species. The tube agglutination titers of all five sera were between 400 IU and 800 IU and were greater than the threshold titer of 160 IU. The complement fixing titers were between 256 IU and 1,024 IU and also greater than the threshold titer of 16 IU. From these results their illness were diagnosed as brucellosis caused by *B. melitensis* biotype 2.

\* Corresponding author; Mailing address: Yumiko IMADA, Quality Control Division, Department of Biologicals Production, National Institute of Animal Health, 3-1-5 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-0856, JAPAN Tel&Fax: +81-(0)29-838-7874. E-mail: yumima@affrc.go.jp

Key Words: human brucellosis, *Brucella melitensis*

#### 本 文

ブルセラ病はグラム陰性小桿菌で細胞内寄生性のブル

セラ属菌による人獣共通感染症である<sup>11)</sup>。ブルセラ属菌は従来6菌種に分けられていたが、DNA-DNA相同性に基づく分類学ではこれらはすべて*Brucella melitensis* 1菌種であり、従来の菌種は生物型に当たることが分かっている<sup>15)</sup>。しかし、それぞれの生物型により宿主が異なるなど相違点もあり旧菌種名の使用が広く認められている<sup>3, 10)</sup>。ブルセラ属菌はリポ多糖の構造からスムーズ型とラフ型に二大別され、スムーズ型のうち*B. melitensis*はめん羊と山羊、*B. abortus*は牛、*B. suis*の1型、3型は豚、2型はノウサギと豚、4型はトナカイ、5型は野生齧歯類、*B. neotomae*は砂漠キネズミを宿主とし、ラフ型のうち*B. ovis*はめん羊、*B. canis*は犬を宿主とする<sup>10)</sup>。感染家畜は流産や精巣炎以外の症状は殆ど示さず乳汁中に排菌する。一般の人は感染した山羊、めん羊、牛、時にはラクダの未殺菌乳やそれらを原料としたフレッシュチーズを摂取して感染することが多いが、畜産関係者は感染動物の流産胎児、胎盤に高濃度に含まれるブルセラ属菌が結膜、口、傷口に付着して感染する危険性が高い。中近東、インド、南欧、メキシコなどではめん羊や山羊が多数飼育されており、これらの*B. melitensis*の感染率が高いこと、*B. melitensis*は人に感染しやすく病原性も強いことから、人のブルセラ感染症の発生も多い<sup>1, 7, 9, 12, 13)</sup>。先進国では感染家畜の摘発淘汰および乳汁の殺菌処理の徹底により国内で感染する人は少なく、発生は汚染地域に出かけるか汚染地域から入国した人に限られている<sup>14)</sup>。わが国でも汚染地域への海外渡航により人が感染する機会は少ないと思われるが、幸いなことに実験室内感染以外のブルセラ感染症の発生は殆どないようである。

家畜衛生統計によると、わが国でも40年前までは牛の間で*B. abortus*によるブルセラ病が流行し、1947-1972年の26年間で4,596頭が抗体検査により摘発淘汰された歴史がある。しかし、国内防疫と輸入検疫の徹底により1973年以降は殆ど発生がなく、1973-2001年の29年間の患者摘発頭数はわずか23頭にすぎない。現在も人への感染源となる可能性が高い乳用雌牛と種雄牛ならびにこれらの同居牛については、家畜伝染病予防法に基づいて患者が摘発された区域では毎年、その他の区域では5年に1回以上の検査が義務付けられている。人への感染の危険性が低い*B. canis*を除くとわが国の清浄度は極めて高く、ブルセラ属菌の分離同定については家畜衛生分野のみならず人の分野でも殆ど機会がない状況にある。今回の報告は、平成10年にイラクから帰国直後に不明熱を呈した夫婦から分離され、市販キットで同定不能の菌についてブルセラ属菌か否かの識別、ブルセラ属菌の場合は菌種

までの同定、ならびに両患者から2~3週間隔で採取された血清のブルセラ抗体検査について、都立病院から依頼があり、病性鑑定の結果20年間で初めてブルセラ属菌を同定する機会を得たのでその経過を紹介するものである。

菌の同定は既報に従って実施した<sup>2, 6, 11)</sup>。基礎培地は5%非働化馬血清、1%グルコース添加ブレインハートインフュージョン寒天培地とし、培養は37℃の10%炭酸ガス孵卵器内で48時間行った。免疫用抗原およびスライド凝集反作用抗原には、リン酸緩衝食塩水(PBS)に浮遊したブルセラ生菌を65℃で1時間殺菌して使用した。被検菌4株(No.98060094, 98060140, 98070294, および98070136)の性状検査には、参照株として*B. abortus* 544株(生物型1)、*B. melitensis* 16M株(生物型1)、*B. suis* 1330株(生物型1)、*B. canis* RM6/66株を用いた。

スライド凝集反作用のウサギ免疫血清は、菌濃度(OD<sub>620nm</sub>)を0.2に調整した*B. abortus*、*B. melitensis*および2.0に調整した*B. canis*の各洗浄死菌液1mlをウサギの静脈内に1回注射し、前者は1週後に後者は1か月後に全採血して調製した。抗スムーズ型(S)ブルセラ(抗*B. abortus*)血清と抗ラフ型(R)ブルセラ(抗*B. canis*)血清は予め交差反応がでない希釈倍数を検討し、それぞれ10倍および2倍希釈で使用した。抗Aおよび抗M単相血清は、*B. abortus*および*B. melitensis*免疫ウサギ血清を前者は1/20湿菌重量の*B. melitensis*死菌ペレットを混合して、後者は吸収が難しいため3倍容の補体結合反応用可溶性抗原(*B. abortus*弱毒株で製造)を混合して吸収後、予め交差反応がでない希釈倍数を検討し、それぞれ4倍および2倍希釈で使用した。スライド凝集反応は被検菌4株の死菌液と各抗血清をそれぞれ10μlずつ混合して行った。

ブルセラ属菌特異的ファージ感受性試験は、寒天平板に被検菌4株、*B. abortus*、*B. melitensis*、および*B. suis*の生菌浮遊液をガラス棒で塗抹して乾燥後、1 RTD(routine test dilution: 完全な溶菌スポットを示すファージの最高希釈倍数)を含むWeybridge(Wb)ファージ液10μlをスポットし、24時間培養して判定した。色素添加培地での発育性は、チオニンおよび塩基性フクシンをそれぞれ20μg/ml添加した寒天平板に、被検菌4株、*B. abortus*、および*B. melitensis*を画線培養し、48時間培養して判定した。ブルセラ属菌用選択培地上の発育性は、米国農務省処方培地(バシトラシン7.5 U/ml、シクロヘキシミド 30μg/ml、ポリミキシンB 1.8 U/mlを添加した寒天平板)<sup>11)</sup>に、検体4株、*B. abortus*、および*B. melitensis*を塗抹し、24時間培養して判定した。硫化水

素産生性は、寒天斜面培地表面に被検菌4株、*B. abortus*、および*B. melitensis*を塗抹し、10%酢酸鉛を含ませて乾燥させたる紙片を試験管内に宙ぶりし、通気性のゴム栓をして48時間培養後に紙の黒変の有無で判定した。

被検菌4株は以上の発育性状試験、血清学的試験に加えPCRでも検査した。PCRには、*B. abortus*、*B. melitensis*、ならびに生物型1と5の*B. suis*を特異的に検出し、感度と特異性が報告どおりであることを予め確認した外膜蛋白遺伝子の一つである*omp-2*をターゲットとするLeal-Klevezasらの方法を使用した<sup>8)</sup>。被検菌4株の各1コロニー相当の集落をインスタジーン・マトリクス(Bio-Rad) 200 µlで処理し、上清10 µlを全量25 µlの反応液で増幅した。陽性対照として*B. abortus*、*B. melitensis*、陰性対照として*Y. enterocolitica* O:9の精製DNA各100ngを使用した。

被検血清5例の試験管凝集抗体価および補体結合抗体価は、血清を56℃で30分間非働化した後、動物衛生研究所で製造するそれぞれの診断液を用いて測定した。わが国のブルセラ病の診断液の感度は国際法と異なること、人のブルセラ病の診断基準は国際単位(IU)で示されていることから<sup>9)</sup>、得られた抗体価は*B. abortus*国際標準血清の抗体価(それぞれの反応とも1,000 IU)<sup>1)</sup>を参考にIUに換算して判定した。

Table 1に示すとおり、被検菌4株はいずれも抗S血清で強く凝集し、抗R血清では凝集を示さず、スムーズ型ブルセラ属菌であった。さらに被検菌4株は、抗A単相血清で強く凝集し、抗M単相血清では凝集せず、Wbファージで溶菌されず、チオニンおよび塩基性フクシン添加培地ならびにブルセラ属菌選択培地上でよく発育し、硫化水素を産生し、PCRで*B. abortus* および*B. melitensis*と一致する193bpのバンドを示したことから、いずれも*B. melitensis*生物型2と同定された。また、被検血清5例の試験管凝集価および補体結合抗体価はTable 2に示すとおり、いずれも人のそれぞれの診断基準160 IU、16 IUを超えており、スムーズ型ブルセラ抗体陽性と判定された。以上の分離菌の同定ならびに抗体検査の結果、本症例は*B. melitensis*生物型2によるブルセラ病と診断された。

ブルセラ病は流産による畜産上の経済的被害も大きい上に、感染家畜が人のブルセラ病の感染源でもあることから非常に重要な人獣共通感染症である<sup>7)</sup>。人のブルセラ病は殆どが*B. melitensis*、*B. abortus*、*B. suis*によるもので、その病原性は*B. melitensis*が最も強く、ついで*B. suis*、*B. abortus*の順である。同じブルセラ属菌でも

*ovis*と*B. suis*生物型2は人への病原性がなく、*B. abortus*生物型5、*B. neotomae*および*B. canis*の人への感染はまれで症状も軽い<sup>10)</sup>。人のブルセラ病を防ぐには家畜のブルセラ病の防疫が必須で、先進国では抗体検査による感染家畜の摘発淘汰が効果をあげているが、世界的には生菌ワクチンを利用しているところ、あるいは十分な検査体制がとれないところも多い。また野生動物の感染が問題となっている国もある。人のブルセラ病の症状は他の熱性疾患と区別できる特徴的なものが少なく、発生がまれな国では発病しても正確に診断されない例もかなりあると考えられている<sup>14)</sup>。ブルセラ属菌の同定法は特殊であるが、現在ではPCR法も補助手段として利用できる<sup>4)</sup>。また抗体検査は人の診断にも有用である。わが国には人用の診断薬がないため、時に獣医領域に抗体検査依頼があるが、家畜用の診断薬でも検査性能に問題はない。海外渡航が一般的な現在では、汚染地域での未殺菌乳やフレッシュチーズの摂取の危険性について旅行者に啓蒙することが必要である。

#### 引用文献

- 1) Alton, G. G.: Animal Brucellosis. 384-404. CRC (1991)
- 2) Alton, G. G., Jones, L. M., & Pietz, D. E.: Laboratory Techniques in Brucellosis, WHO (1975)
- 3) Anonymous: Int. J. Syst. Bacteriol. 38, 450-452 (1986)
- 4) Bricker, B. J.: Vet. Microbiol. 90, 435-446 (2002)
- 5) Elberg, S. S. ed.: A Guide to the Diagnosis, Treatment and Prevention for Human Brucellosis, WHO (1981)
- 6) 伊佐山康郎: メディアサークル. 24, 209-218 (1979)
- 7) Käsbohrer, J. G. A.: Vet. Microbiol. 90, 135-145 (2002)
- 8) Leal-Klevezas, D. S., Martinez-Vazquez, I. O., Lopez-Merino, A. et al.: J. Clin. Microbiol. 33, 3087-3090 (1995)
- 9) Luna-Martínez, J. E. & Mejía-Terán, C.: Vet. Microbiol. 90, 19-30 (2002)
- 10) Moreno, E., Cloeckert, A. & Moriyón I.: Vet. Microbiol. 90, 209-227 (2002)
- 11) Nielsen, K. & Duncan, J. R.: Animal Brucellosis. CRC (1991)
- 12) Refai, M.: Vet. Microbiol. 90, 81-110 (2002)

- 13) Renukaradhya, G. J., Isloor, S. & Rajasekhar, M.: Vet. Microbiol. 90, 183-195 (2002)
- 14) Sauret, J. M. & Vilissova, N.: J. Am. Board Fam. Pract. 15, 401-406 (2002)
- 15) Verger, M. J., Grimont, F., Kelley, D. J.: Int. J. Syst. Bacteriol. 35, 292-295 (1985)

Table 1. Characteristics of the *Brucella* species and the isolates.

Group	Species	Biovar	Strain	CO <sub>2</sub> for growth	H <sub>2</sub> S produced	Growth on dyes		Agglutination by anti- <i>Brucella</i> sera		Agglutination by monospecific antisera		Lysis by 1RTD Wb phage <sup>a</sup>	<i>omp-2</i> PCR
						Thionin	Fuchsin	S	R	A	M		
Reference strains	<i>B. abortus</i>	1	544	+(+) <sup>b</sup>	+	-	+	+	-	+	-	+	+
		2	86/8/59	+	+	-	-	+	-	+	-	+	+
		3	Tulya	+(+)	+	+	+	+	-	+	-	+	+
		4	292	+(+)	+	-	+	+	-	-	+	+	+
		5	B3/96	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+
		6	870	-	+ or -	+	+	+	-	+	-	+	+
		7	63/75	-	+ or -	+	+	+	-	+	+	+	+
		9	C68	+(+)	+	+	+	+	-	-	+	+	+
		<i>B. melitensis</i>	1	16M	-	-	+	+	+	-	-	+	-
	2		63/9	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
	3		Ether	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+
	<i>B. suis</i>	1	1330	-	+	+	-	+	-	+	-	+	+
		2	Thompson	-	+ or -	+	-	+	-	+	-	+	-
		3	686	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-
		4	40/67	-	-	+	-	+	-	+	+	+	-
		5	513	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+
	<i>B. neotomae</i>		5K33	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+
	<i>B. ovis</i>		63/290	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-
	<i>B. canis</i>		RM6/66	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Isolates			98060094, 1, bone marrow <sup>c</sup>	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
			98060140, 1, blood	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
			98070294, 1, spinal disk fluid	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+
			98070136, 2, articular fluid	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+

The characteristics of the reference strains other than PCR were described in Animal Brucellosis 1990, and the results of PCR other than *B. neotomae* (our data) were described by Leal-Klevezas.

<sup>a</sup> RTD=routine test dilution (highest dilution producing lysis on the propagating strain)

<sup>b</sup> +( - ) Positive is dominant characteristic, but negative strains occur.

<sup>c</sup> No. of isolate, No. of patient, and source of isolation were shown in order.

Table2. Antibody titer of sera collected from two patients and international standard serum.

Serum No.	Patient No.	Day of collection	Tube agglutination test		Complement fixation test		Results
			Japanese titer	IU	Japanese titer	IU	
1	1	1998. 6. 5	320	800	160	1,024	Positive
2	1	1998. 6.26	320	800	80	514	Positive
3	1	1998. 7.13	320	800	160	1,024	Positive
4	2	1998. 7. 2	160	400	40	256	Positive
5	2	1998. 7.16	160	400	40	256	Positive
International standard anti- <i>Brucella abortus</i> serum			400	1,000	160	1,000	
Threshold for human diagnosis			64	160	2.5	16	