

血清検査においてブルセラ病と診断された輸入牛から 分離された *Ochrobactrum intermedium* の同定事例

山本和明^{1)†} 田村 孝²⁾ 岡村行岳³⁾ 梶本綾子¹⁾
森脇俊英¹⁾ 衛藤真理子¹⁾

- 1) 農林水産省動物検疫所精密検査部 (〒235-0008 横浜市磯子区原町11-1)
2) 農林水産省動物検疫所中部空港支所 (〒479-0881 常滑市セントレア1-1 CIQ棟)
3) 農林水産省消費・安全局国際衛生対策室 (〒100-8950 千代田区霞が関1-2-1)

(2009年10月27日受付・2010年3月17日受理)

要 約

輸入検疫では、牛の監視伝染病であるブルセラ病をこれまで多頭数摘発している。しかし、これらの摘発牛は血清反応検査に基づく診断によるもので、摘発牛からのブルセラ菌分離事例はない。今般、動物検疫所で輸入検疫を実施したオーストラリア産肥育用素牛において、試験管凝集反応でブルセラ病患畜と診断された牛から *Brucella* 属菌と生化学的性状および抗原性が近似している菌を分離した。分離菌はPCR検査でブルセラ属およびブルセラアボルタスと同一部位にバンドが確認されこれらと識別できなかった。しかし、遺伝子解析により *Brucella* 属菌は否定され、*Ochrobactrum intermedium* と同定した。

——キーワード：輸入検疫，ブルセラ病，*Ochrobactrum intermedium*，*recA*，16s r-RNA。

----- 日獣会誌 63, 615～619 (2010)

牛の監視伝染病であるブルセラ病は過去5年間の輸入検疫において51頭が摘発されている。しかし、これらの摘発牛は血清反応検査に基づく診断によるもので、摘発牛から培養検査によるブルセラ菌分離事例はない。今般、輸入検疫を実施したオーストラリア産肥育用素牛において、血清検査によりブルセラ病患畜と診断された牛から *Brucella* 属菌と生化学的性状が近似している菌を分離し、遺伝子解析等により同定した。

材 料 お よ び 方 法

ブルセラ病試験管凝集反応により80倍陽性（補体結合反応：5倍陰性）でブルセラ病患畜と診断したオーストラリア産肥育用素牛（平成20年4月11日入検，1歳，去勢）の剖検により採取した主要臓器を材料とし、以下のとおり検査，解析を実施した。

分離培養：主要臓器から無菌的に採取した材料をブルセラ選択培地（コロンビア血液寒天培地にブルセラ選択サプリメント，馬非働化血清，ブドウ糖を添加）を用い，割面をスタンプし，37℃，CO₂ 5～8%濃度で7日

間培養，出現したコロニーをトリプトソイ寒天培地で純培養した。

性状検査：分離菌の性状検査およびブルセラ陽性血清（ブルセラ補体結合反应用可溶性抗原添付指示血清）との急速平板凝集試験を実施し，*Brucella* 属菌の生化学的性状試験を定法により実施した（<http://www.maff.go.jp/j/syuan/douei/eisei/byouseikantei/index.html>）[1, 2]。

PCR検査：*Brucella* 属のすべての菌種が同等に反応する，*htrA* 遺伝子60kDaの塩基配列を利用したNest-edPCR（Bah1069/Bah1576，Bah1197/Bah1546）[3] および *B. abortus* および *B. melitensis* の *omp*² 遺伝子を増幅するPCR検査（JPF/JPR）[4]，および *recA* 遺伝子を利用した *Brucella* 属，*O. intermedium*，*O. anthropi* を区別するPCR検査（Bruc-f/r，Inter-f/r，Anth-f/r）[5] を実施した。

遺伝子解析：分離菌を核酸抽出キット（Prepman[®] Ultra Reagent，Applied Biosystems，東京）を用いて核酸を抽出し，検査キット（MicroSeq[®] 500 16S rDNA

† 連絡責任者：山本和明（農林水産省動物検疫所精密検査部病理・理化学検査課）

〒235-0008 横浜市磯子区原町11-1 ☎045-751-5947 FAX 045-752-5466 E-mail: y-byori@maff.go.jp

ブルセラ病患者から分離した *Ochrobactrum intermedium*

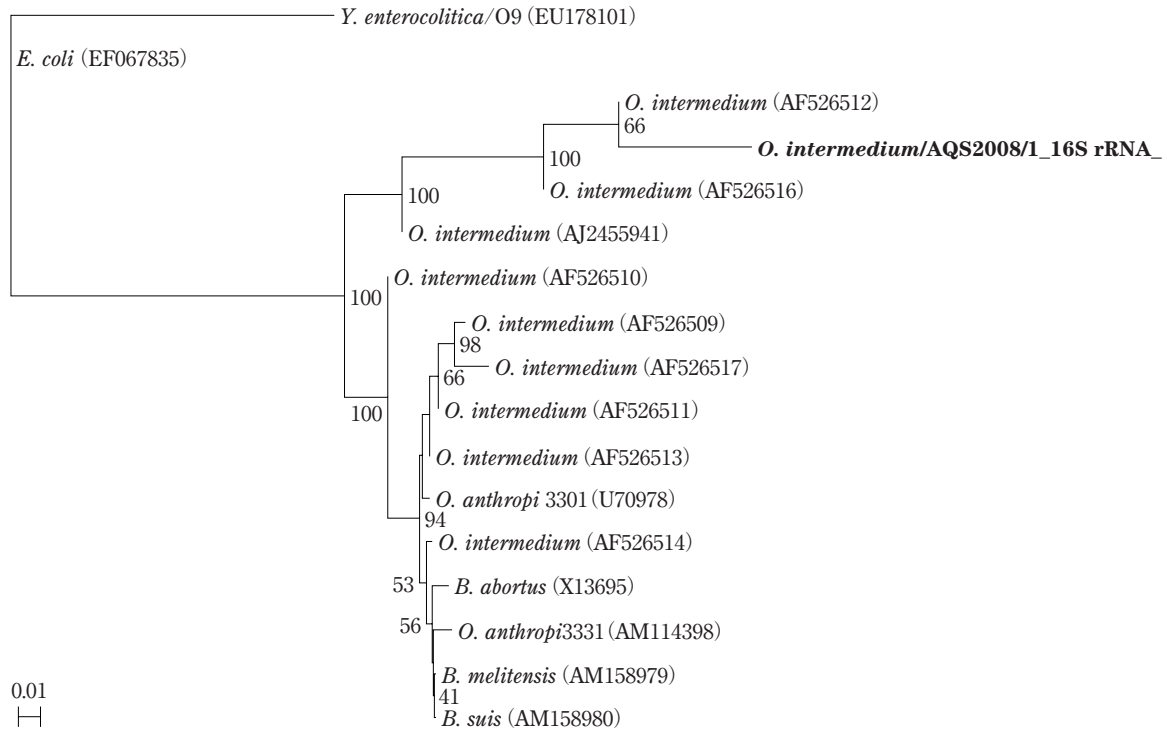


図1 分離菌 (*O. intermedium*/AQS2008) の16S rRNA 領域の系統樹

表1 分離菌の性状

	分離菌	ブルセラ属菌
運動性 (SIM培地)	-	-
硫化水素産生	-	d
カタラーゼ	+	+
オキシダーゼ	+	+
ブドウ糖利用	-	-
VP試験	-	-
メチルレッド試験	-	-
インドール産生	-	-
クエン酸利用	-	-
硝酸塩還元	+	+
ウレアーゼ	+	+
色素抵抗性 (フクシン)	+	+
色素抵抗性 (チオニン)	+	+
運動性 (MN培地)	+	-
硫化水素産生 (酢酸鉛ろ紙)	+	d
SS寒天培地発育	+	-
コリスチン耐性	+	+
マッコンキー寒天培地発育	+	d

表2 PCR検査の結果

	遺伝子	プライマー	分離菌	<i>B. abortus</i>	<i>B. canis</i>	文献
<i>Brucella</i> 属	<i>htrA</i>	Bah1069/ Bah1576	+	+	+	[3]
		Bah1197/ Bah1546	+	+	+	
<i>B. abortus</i> <i>B. melitensis</i>	<i>omp2</i>	JPF/JPR	+	+	-	[4]
<i>Brucella</i> 属	<i>recA</i>	Bruc-f/r	-	+	+	[5]
<i>O. intermedium</i>	<i>recA</i>	Inter-f/r	+	-	-	
<i>O. anthropi</i>	<i>recA</i>	Anth-f/r	-	-	-	

PCR/Sequencing Kits, Applied Biosystems, 東京) を用いて, 分離菌の16S リボゾーム RNA (16S rRNA) 領域約500bpについて増幅およびシーケンス反応を行った. 反応産物の塩基配列約500bpを遺伝子解析装置 (Genetic Analyzer3130, Applied Biosystems, 東京) を用いて解析し, 16S rRNA 遺伝子の塩基配列を決定した. この塩基配列を解析ソフト (GENETYX, (株)ゼネテックス, 東京) により相同性解析し, NCBI (National Center for Biotechnology Information) から入手し

たGenBank データベースとBLAST 検索を実施して分離菌の推定および系統樹解析 (近隣結合法) を行った. また, *recA* 遺伝子を標的としたPCR 検査により増幅した産物について同様にシーケンス反応後塩基配列を決定し系統樹解析 (近隣結合法) を行った.

電子顕微鏡による菌の観察: ブルセラブロスで18時間培養した培養液を2,500rpm, 10分間遠心後, HEPES緩衝液で洗浄し, コロジオン膜貼付きメッシュ (グリッド) に滴下し, 酢酸ウランによる電子染色を行った. 超薄切標本は培養液をエッペンドルフチューブで2,500rpm, 10分間遠心後, HEPES緩衝液で洗浄した菌体を2%グルタルアルデヒド (GLA) で4℃・1時間固定して, 菌液と等量の3%寒天を混合した. 固化後1~2mm角に細切し, 1%オスミウム酸 (OsO₄) による後固定, エタノールの階段濃度上昇系列およびプロピレンオキサライド (PO) による脱水処理, 樹脂 (EPON812)

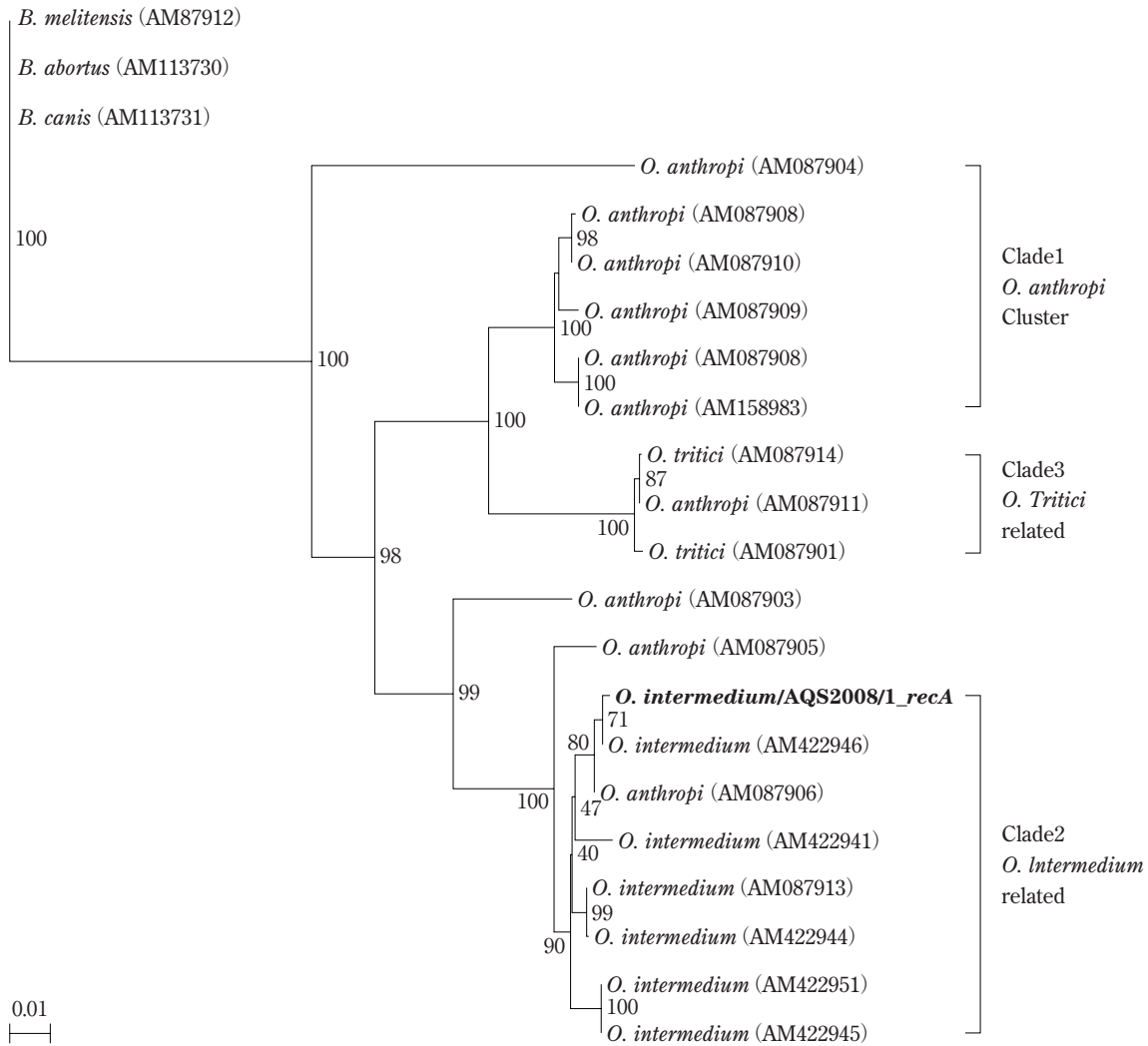


図2 分離菌 (*O. intermedium*/AQS2008) の *recA* 遺伝子領域の系統樹

への置換，包埋，重合を行った。

成 績

培養検査：肺材料の培養後7日目に直径4mm，スムーズ，半透明蜂蜜色コロニーを1個確認した。その他の臓器材料の培養ではコロニーの出現は認めなかった。

性状検査 (*Brucella* 属菌との比較)：分離菌はブルセラ陽性血清との急速平板凝集反応により凝集が認められた。病性鑑定指針 (<http://www.maff.go.jp/j/syouan/douei/eisei/byouseikantei/index.html>) および成書 [1, 2] による *Brucella* 属菌および類似菌の性状試験を実施し，オキシダーゼ (+)，カタラーゼ (+)，ウレアーゼ (+)，VP 試験 (-)，色素抵抗性 (フクシン (+)，チオニン (+))，運動性 (SIM 培地 (-)) でおもな生化学性状はブルセラ属菌と一致し，MN 培地による運動性 (+) および SS 寒天培地での発育 (+) において *Brucella* 属菌と異なっていた (表1)。

PCR 検査：分離菌は *Brucella* 属菌の *htr A* 遺伝子を増幅するプライマー (Bah1069/Bah1576) を用いた

PCRにより，対照とした *B. abortus* および *B. canis* と同様に *Brucella* 属菌と同じ位置にバンドが確認された。また，*B. abortus* の *omp²* 領域を増幅するプライマー (JPF/JPR) を用いたPCRにより，対照とした *B. abortus* と同様に *B. abortus* のと同じ位置にバンドが確認された。

Brucella 属菌，および *O. intermedium* の *recA* 遺伝子を特異的に増幅するPCRの結果の結果，*O. intermedium* 検出プライマーによるPCRにより分離菌には特異バンド (402bp) を認めたが，対照菌には認められなかった。また，*Brucella* 属菌検出プライマーによるPCRにより，対照とした *B. canis* および *B. abortus* は *Brucella* 属菌特異バンド (167bp) を認めたが，分離菌には認められなかった。(表2)

分離菌の遺伝子解析：MicroSeq[®] 500 16S rDNA PCR kitにより分離菌の16S rRNA領域を増幅した結果，約500bpの位置にバンドを検出し，この産物について塩基配列を決定したものをGenBankデータベース上の塩基配列とBLAST検索した結果，*O. intermedium*

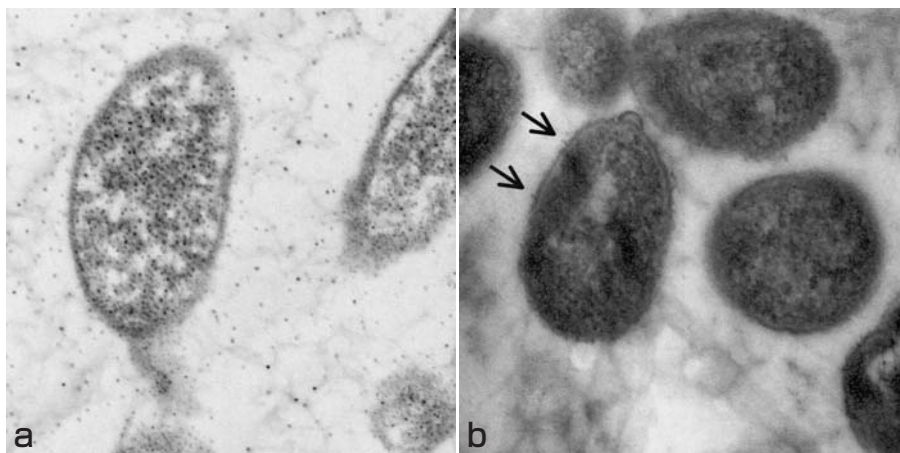


図3 a: 極付近の1本の鞭毛 b: 菌側に短い波状の側毛を持つ菌体

と99%相同であった。

16S rRNA領域をPCRにより増幅した産物の塩基配列とNCBIに掲載されている菌株の遺伝子とのBLAST検索による相同性解析の結果を用いて、16S rRNA領域の系統樹解析を行った結果、分離菌は、*Ochrobactrum* 属菌、*Brucella* 属菌と同じクラスターに位置づけられた(図1)。

recA 遺伝子領域の系統樹解析では、分離菌は *O. intermedium* の Clade2 (*O. intermedium* related) に位置し、この系統樹では *O. intermedium*、*O. anthropi* および *Brucella* 属菌はおのの別のクラスターに分類された(図2)。

電子顕微鏡による菌の観察: 分離菌株のネガティブ染色では細胞質が電子密度の高い菌体として確認された。寒天包埋法による超薄切標本では、*Ochrobactrum* 属で認められる極付近の1本の鞭毛(図3a)、菌側に短い波状の側毛を持つ菌体が観察された(図3b 矢印)。

考 察

分離菌は生化学性状と従来から用いられていた *htrA* や *omp²* 遺伝子を増幅するプライマーによるPCR検査[3, 4]ではブルセラ属菌との識別は不可能であった。分離菌の16S rRNA塩基配列解析の結果、*O. intermedium* と推定をし、MN培地とSS寒天培地を用いた性状検査および *recA* 遺伝子を標的としたPCR検査を追加して、*O. intermedium* と同定することができた。また、*Brucella* 属菌と異なりMN培地における運動性が陽性であったことは、電子顕微鏡により鞭毛が観察されたことでも裏付けられた。家畜からの *O. intermedium* 分離報告はないが、土壌などの環境中における存在および人に対する日和見感染症の原因菌としての報告[5, 6]があるので、今後とも注意を要する細菌である。分離された *O. intermedium* は、ブルセラ陽性血清との急速凝集反応で凝集を示したが、今回の摘発牛の血清検査におけ

る本菌の交差反応性や関与は確認できていない。しかし、これまでにブルセラ病の血清検査において *Yersinia enterocolitica* O9 群等との交差反応が知られている[7]。*O. intermedium* は抗原性状、生化学性状および遺伝子的にこれらの菌以上に *Brucella* 属菌と近似している[8]ことから、*Brucella* 属菌の分離同定においては本菌の存在に留意する必要がある。*recA* 遺伝子を標的としたPCR検査は *O. intermedium* と *Brucella* 属菌および *O. anthropi* との区別が可能であるので、今後のブルセラ病検査では、病性鑑定指針に基づく検査とSS寒天培地の使用、*recA* のPCRを組み合わせることを提案する。

引用文献

- [1] Brarrow GI: *Brucella*, 医学細菌同定の手引き, 坂崎利一訳, 第3版, 117, 近代出版, 東京 (1996)
- [2] King EO: *Brucella abortus*, 臨床材料にみられる腸内細菌以外のグラム陰性, 好気性および通性嫌気性桿菌の同定, 坂崎利一訳, 124-125, 近代出版, 東京 (1993)
- [3] Da Costa M, Guillou JP, Garin-Bastuji B, Thiebaud M, Dubray G, Specificity of six gene sequences for the detection of the genus *Brucella* by DNA amplification, *J Appl Bacteriol*, 81, 267-275 (1996)
- [4] Leal-Klevezas DS, Martinez-Vazouez IO, Lopez-Merino A, Martinez-Soriano JP, Singl-Step PCR for Detection of *Brucella* spp. From Blood and Milk of Infected Animals, *J Clin Microbiol*, 33, 3087-3090 (1995)
- [5] Sholz HC, Pfeffer M, Witte M, Neubauer H, Al Dahouk S, Wernery U, Tomaso H, Specific detection and differentiation of *Ochrobactrum anthropi*, *Ochrobactrum intermedium* and *Brucella* spp. By a multi-primer PCR that targets the *recA* gene, *J Med Microbiol*, 57, 64-71 (2008)
- [6] Scholz HC, Tomaso H, Dahouk SA, Witte A, Schloter M, Kampfer P, Falsen E, Neubauer H, Genotyping of *Ochrobactrum anthropi* by *recA*-based comparative sequence, PCR-RFLP, and 16S rRNA gene analysis, *FEMS Microbiol Lett*, 257, 7-16 (2006)
- [7] Mittal KR, Tizard IR, Barnum DA, Serological cross-

reactions between *Brucella abortus* and *Yersinia enterocolitica* 0 : 9, Int J Zoonoses, 12, 219-227 (1985)
[8] Velasco J, Romero C, Lopez-Goni I, Leiva J, Diaz R,

Moriyon I, Evaluation of relatedness of *Brucella* spp. and *Ochrobactrum intermedium* sp. Nov., a new species with a closer relationship to *Brucella* spp, Int J Syst Bacteriol, 48, 759-768 (1998)

Isolation and Characterization of *Ochrobactrum intermedium* from Imported Cattle Serologically Diagnosed with Bovine Brucellosis

Kazuaki YAMAMOTO*†, Takashi TAMURA, Yukitake OKAMURA, Ayako KABAMOTO
Shunei MORIWAKI and Mariko ETO

* *Animal Quarantine Service, 11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan*

SUMMARY

More than ten cattle were diagnosed with bovine brucellosis in each of the last several years using serological testing during import quarantine. However, *Brucella abortus* has not been isolated from the samples of the cattle. In 2008, a bacterium biochemically closed to the genus *Brucella* was isolated from the lung of one of the feeder cattle imported from Australia, which was serologically diagnosed with brucellosis during import quarantine. The bacterium tested positive in a plate agglutination test for *Brucella*-specific antisera, and tested positive in a PCR assay for *Brucella* spp. The bacterium was identified as *Ochrobactrum intermedium* by PCR assay of the *recA* genes and genetic analysis using 16s rRNA. The PCR assay of *recA* genes and the growth on SSagar is useful for identifying *Ochrobactrum* spp. and *Brucella* spp.

—Key words : animal quarantine, Bovine Brucellosis, *Ochrobactrum intermedium*, *recA*, 16s rRNA.

† *Correspondence to : Kazuaki YAMAMOTO (Animal Quarantine Service)*

11-1 Haramachi, Isogo-ku, Yokohama, 235-0008, Japan

TEL 045-751-5947 FAX 045-752-5466 E-mail : y-byori@maff.go.jp

—*J. Jpn. Vet. Med. Assoc.*, 63, 615 ~ 619 (2010)