

回帰熱

目 次

I. 概説

臨床症状

病原体ボレリア

病原体診断

治療・予防

媒介動物

II. ボレリアの分離培養法

作業上の一般的注意

ボレリアの培地製法 (BSK-II 培地)

生体試料からの分離培養

病原体輸送法

血清、髄液、穿刺液の輸送法

病原体保存方法

III. 病原体の検出

IV. 病原体の同定

V. 参考文献

VI. 検査依頼先

VII. 執筆者

I. 概説

回帰熱 (Relapsing fever) は、齧歯類小動物、鳥類等を保菌動物とし、野生のダニ (オルニソドロス属ダニ) やシラミによって媒介される細菌 (スピロヘータ) 感染症である。アメリカ大陸、アフリカ、中東、欧州の一部で患者の発生が報告されている。本邦では、戦後の混乱期に発生したといわれているが、少なくともここ数十年、患者の報告はなされていない。

【臨床症状】

菌血症による発熱期、及び感染は持続しているものの、菌血症を起こしていない状態 (無熱期) を数回繰り返す、いわゆる回帰熱が臨床上見受けられる。致死率は、治療を行わない場合、病原体の種類や健康状態等によっても異なるが、数%-30%といわれている。

〔発熱期〕 感染後 5-10 日を経て菌血症による頭痛、筋肉痛、関節痛、羞明、咳などをもとに発熱、悪寒がみられる。またこのとき髄膜炎、点状出血、紫斑、結膜炎、肝臓や脾臓の腫大、黄疸がみられることもある。発熱期が 3-7 日続いた後、一旦解熱し無熱期に移行する。

〔無熱期〕 無熱期では血中からは菌は検出されない。この時期、発汗、倦怠感、時に低血圧症や斑点状丘疹をみることもある。抗生剤による治療を行わなかった場合この後 5-7 日後再び発熱期にはいるとされる。

上記症状以外で肝炎、心筋炎、脳出血、脾臓破裂、大葉性肺炎などがみられる場合もある。

【病原体ボレリア】

回帰熱病原体であるボレリアは少なくとも十数種類が確認されている。これらボレリアはいずれもダニ媒介性或いはシラミ媒介性で、ダニ媒介性回帰熱の場合、媒介ダニの分布地域と患者発生地域はほぼ一致する。他のボレリア感染症としてライム病がほぼ世界的に見い出されるが、病原体の種類は回帰熱ボレリアとは異なる。

【病原体診断】

回帰熱は感染症法での 4 類感染症に含まれ、全数報告が義務づけられている。

〈報告のための基準〉

診断した医師の判断により、症状や所見から当該疾患が疑われ、かつ以下のいずれかの方法によって病原体診断がなされたもの。

1) 病原体の分離

病原体ボレリアの分離培養には BSK-II 培地が用いられ、発熱期の血液から病原体分離が可能である。

2) 病原体の検出

暗視野顕微鏡による鏡検で、発熱期の血中に病原体が観察できる場合がある。

【治療・予防】

回帰熱には抗生剤による治療が有効である。ダニ媒介性回帰熱の場合は、テトラサイクリンが用いられる。シラミ媒介性回帰熱の場合は、テトラサイクリンとエリスロマイシンの併用、若しくはドキシサイクリンが有効とされている。小児の場合はエリスロマイシンが推奨されている。治療に伴ない Jarisch-Herxheimer 反応が見られることもある。

予防には、媒介ダニ、シラミとの接触を避けることが重要である。保菌ダニが生息する地域では、ダニが生息する洞窟、廃屋などにはなるべく近寄らないこと、また特に渡航中、近くで回帰熱発生の情報を得た場合にはシラミ、ダニ刺咬に注意することが重要であろう。

予防を目的としたワクチンは開発されていない。

【媒介動物】

回帰熱ボレリアは、自然環境に生息するダニ若しくはシラミに咬着されることによって媒介、伝播される。

〈オルニソドロス属ダニ〉 アフリカ大陸、アメリカ大陸、欧州や中近東の一部の自然環境中に見いだされる軟ダニで、一般家庭内に生息するダニとは異なる。本邦で見いだされる軟ダニの一種、クチビルカズキダニ、サワイカズキダニが形態学的にオルニソドロス属に分類されるが、国内でも限られた地域でしか確認されていない。これら国内で見いだされる軟ダニのボレリア保有の有無及び伝播能力については不明である。吸血時間は1時間以内といわれ、咬着・脱落后に気がつくことが多いであろう。

〈シラミ〉 ヒト寄生性シラミが媒介すると言われているが、詳細については不明である。一般的にシラミはヒトから吸血するので、吸血されたヒトが回帰熱ボレリアを保有していないかぎり次の感染が起こる可能性は極めて低いと考えられる。本邦ではシラミ刺咬症が多発しているが回帰熱は報告されていないことから、輸入例を除き、国内でのシラミ刺咬による回帰熱は今のところ心配ないと考えられている。

II. ボレリアの分離培養法

【作業上の一般的注意】

P2 実験施設。その他特記なし。

【ボレリアの培地製法 (BSK-II 培地)】

回帰熱ボレリア分離には BSK-II 培地を使用する。

1) A 液、B 液を各々調製する。B 液は Autoclave により滅菌できる。

A 液	特記
蒸留水	up to 500 ml (約 440 ml) Milli-Q レベル
1N NaOH	10 ml
HEPES	3 g
Sodium Dihydrogen Citrate	0.35 g

D-(+)-Glucose	2.5 g	
N-Acetylglucosamine	0.2 g	
Sodium Pyruvate	0.4 g	
Sodium Bicarbonate	1.1 g	溶液後の分解早い*4
CMRL 1066 with glutamine (Sigma)	4.9 g	
TC Yeastolate	1 g	
BSA, Fraction V	25 g	ミリポア*1

以上の試薬を記載順に溶解する。BSA が溶解しにくいのでスターラーで攪拌しながら溶解する。1M NaOH で pH 7.5 に調製。上記量で大まかに pH7.5 程度になる。

B 液		特記
Neopeptone	2.5 g	
Gelatin	7 g	
蒸留水	100 ml	Milli-Q

Autoclave 滅菌。滅菌後、ボトルの冷却をまって、使い捨て吸引ろ過装置 (0.22 μ m, 500 ml ないし 1000ml 用、CORNING 等) を装着し、必ず付属のプレフィルターを乗せて、A 液をろ過滅菌する*2。

2) 滅菌済ウサギ血清 (Gibco) *1 を 40 ml (final 約 6%) 添加し、よく混合する。培養液総量は約 640 ml となる。なお、ウサギ血清は 56°C で 30 分間、前処理 (非働化) しておく。

3) すべて混和後、37°C で Overnight 加温し、無菌を確認すること*3。BSK-II 培地は Gelatin を加えず、autoclave 滅菌を行わない点で BSK-II 培地と異なる。

4) ヒト皮膚組織からの分離培養には、下記抗生剤を加えることを推奨する。添加量は 1XBSK-II 培地 640ml 当たりの量である。純培養時には下記抗生剤添加は特に必要ない。

32 mg/ml Rifampicin (20% DMSO)	1 ml/640ml
12.8 mg/ml Fosfomycin	1 ml/640ml
0.32 mg/ml Amphotericin B	5 ml/640ml

*1:ウサギ血清 (出来れば Young rabbit serum が良い) と BSA のロットがボレリア増殖の良否を左右するようである。あくまでも経験上の話ではあるが、Gibco のウサギ血清と Miles の BSA ははずれが少ない傾向がある。

*2:感染研では、A 液を濾紙、ガラスフィルター、0.65 μ m プレフィルターであらかじめプレ濾過後 Sartorius, Nalgen, Corning, IWAKI の 0.22 μ m 滅菌フィルター (PES) で濾過している。

*3:培地の Quality を確認するには、*Borrelia japonica*、或いは *Borrelia miyamotoi* を接種し増菌が見られればよい。培地による増菌傾向は以下の通りである。生化学的試験による Quality check は出来ない。

*4:保存期間は-20°C で 1 ヶ月程度とされている。これは Sodium Bicarbonate が培地中で

分解されてしまうためであると考えられる。Sodium Bicarbonate を用時調製・混和することで保存期間は延長できるかもしれない。

【生体試料からの分離培養】

分離に用いる生体試料には、血液、髄液などが挙げられる。

血液・髄液からの分離培養

発熱期血液を材料とする。髄膜炎（稀に脳炎）患者髄液からは病原体が分離される場合がある。採取された新鮮体液を培地量の 10 分の 1 程度加え、33-37°C で微好気若くは好氣的に培養する。また、培地接種翌日に継代することで培養率が上昇する場合がある。病原体の確認は暗視野顕微鏡を用いて行う。鏡検で病原体が観察されるまで通常 1-8 週間必要である（8-12h/generation）。汚染菌（含む非運動性螺旋状細菌）の除去には、動物接種法、若くはフィルター法を用いる（詳細はライム病診断マニュアル「生体試料からの分離培養」項参照）。動物接種法では接種後の発熱期に血液採取・培養することで回帰熱ボレリアは回収できる。

【病原体輸送法】

分離材料としての生体試料、或いは病原体を BSK-II 培地にいれ室温で送付。輸送方法は他の病原体輸送方法に準拠。

【血清、髄液、穿刺液の輸送法】

滅菌容器にいれ密栓したものを 4°C で輸送。

【病原体保存方法】

10-20%グリセロール添加後、-80°C で保存。

III. 病原体の検出

発熱期全血の塗沫標本をギムザ染色することで 10-30um のスピロヘータが観察される。また市販の DNA 抽出キットを用い全血より抽出した DNA より PCR 法によりボレリア核酸検出が可能である。以下 PCR 法の 1 例を示す。

1) 使用PCR プライマーの一覧を示す。

増幅対象

Primer塩基配列(5' -3')

鞭毛遺伝子(*flaB*)

1st-PCR

BflaPAD

GAT CA(G/A) GC(T/A) CAA (C/T)AT AAC CA(A/T) ATG CA

BflaPDU

AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC

2nd-PCR(nested)

BflaPBU

GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC

BflaPCR TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA

()内はこれら塩基のmixであることを示す。

2) 試料DNAの調製

髄液や全血等の体液を材料として、DNeasy Blood&tissue kit (Qiagen)、Wizard Genomic DNA purification kit (Promega)等を用い、添付プロトコールに従ってDNA抽出、精製を行う。

3) 上記精製DNAを、以下のPCR反応の鋳型DNAとして使用した。反応組成は以下の通りである。

puReTaq PCR Ready-to use ビーズ (GE healthcare)	1
20 μ M forward primer	0.5 μ l (BflaPADのみ2 μ l)
20 μ M reverse primer	0.5 μ l
鋳型 DNA	2 μ l
dH2O	up to 25 μ l

4) PCR cycleは以下の通りである。本PCRでは、1st-PCR溶液を鋳型として2nd-PCRを行う。
1st-PCR: 95°C10sec, 50°C30sec, 72°C30sec (25-30 cycles) + 72°C2min(post elongation)
2nd-PCR: 95°C10sec, 50°C30sec, 72°C30sec (25-30 cycles) + 72°C2min(post elongation)

5) 反応終了後、PCR産物を0.8%アガロースゲルにて電気泳動後、臭化エチジウムにて染色、ポラロイドフィルムにて写真撮影を行い判定を行う。

IV. 病原体の同定

形態学的にはスピロヘータに特徴的な螺旋状を示すが、レプトスピラに特徴的な末端部のフック構造は見られない。培養可能になる以前は、細胞長、径、巻数などでトレポネーマ等と分けられていたが、現在では実際的ではない。また回帰熱ボレリアとライムボレリア間での形態による鑑別はまったく不可能である。ボレリア属の同定方法として、単クローン抗体 (H9724) との反応性があげられるが、この抗体 H9724 はライム病ボレリアとも交差反応するため、あくまでも回帰熱ボレリアのみの同定のためには用いることができない。したがって、同定には 16S rRNA 遺伝子や鞭毛遺伝子の塩基配列決定など遺伝学的手法を用いる。詳細はライム病病原体診断マニュアル、「病原体の同定」項参照。

V. 参考文献

- 1) Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 521-525.
- 2) Long SS et al ed. Principles and Practice of Pediatric Infectious Diseases. Churchill Livingstone, 1067-1069.
- 3) Alje, P.V.D. et al. 1999. Tick-borne relapsing fever imported from West

- Africa: diagnosis by quantitative buffy coat analysis and in vitro culture of *Borrelia crocidurae*. J. Clin. Microbiol. 37: 2027-2030.
- 4) Burman N, Shamaei-Tousi A, Bergstrom S. 1998. The spirochete *Borrelia crocidurae* causes erythrocyte rosetting during relapsing fever. Infect Immun. 66(2): 815-819.
- 5) Fukunaga M, Okada K, Nakao M, Konishi T, Sato Y. 1996. Phylogenetic analysis of *Borrelia* species based on flagellin gene sequences and its application for molecular typing of Lyme disease borreliae. Int J Syst Bacteriol. 46(4): 898-905.
- 6) Cutler SJ, Akintunde CO, Moss J, Fukunaga M, Kurtenbach K, Talbert A, Zhang H, Wright DJ, Warrell DA. 1999. Successful in vitro cultivation of *Borrelia duttonii* and its comparison with *Borrelia recurrentis*. Int J Syst Bacteriol. 49 Pt 4:1793-1799.

VI. 謝辞

本マニュアルを作成するにあたり、ご助言・ご助力を賜りました福山大学・福長将仁博士に深謝致します。

VII. 検査依頼先

分離培養、分離株同定

国立感染症研究所 細菌第一部 川端寛樹

〒162-8640 東京都新宿区戸山 1-23-1

電話 03-5285-1111

ファックス 03-5285-1163

E-mail kbata@nih.go.jp

VIII. 執筆者

国立感染症研究所 細菌第一部 川端寛樹