

AMCoR

Asahikawa Medical University Repository <http://amcor.asahikawa-med.ac.jp/>

皮膚科の臨床 (2006.09) 48巻10号:1363~1366.

【知っておきたい検査とその読み方】
感染症の検査
Borrelia burgdorferi

橋本喜夫

3 感染症の検査

7) *Borrelia burgdorferi*

橋本 喜夫*

I. はじめに

ライム病は起因菌の *Borrelia burgdorferi sensu lato* (広義の *B. burgdorferi*, B.b.) を保有するマダニ類の媒介により生じる全身性感染症である。ライム病の原因菌である *B. burgdorferi* (B.b. ボレリアブルドルフェリ) は genotype による分類が行われ、現時点では *B. burgdorferi sensu stricto* (B.b. ss) (狭義の B.b.), *B. garinii*, *B. afzelii* などの種が記載されている。本症は現在、北米、ヨーロッパ、オーストラリア、アジアと広く分布し、米国では現在でも年間 10000 名以上の患者が発生している。臨床症状は早期 (I, II 期), 後期 (III 期) に大別され、早期は遊走性紅斑 (erythema chronicum migrans, 以下 ECM), ボレリア性リンパ球腫, 循環器症状, 神経症状, 関節痛などをきたし、後期には慢性萎縮性肢端皮膚炎, 関節炎, 慢性の神経障害などを呈する。本邦では主に北海道, 本州中部以北で約 200 例以上の報告がある。また北海道, 特に道北¹⁾ではマダニ刺咬症の約 8% にライム病が発症する。

本邦のライム病²⁾³⁾は、現在までのところ、媒介者は *I. persulcatus* (シュルツェマダニ) のみであり、皮膚症状, 神経症状など早期症状でとどまることが多い。

II. 診断の基本

あくまでも、臨床症状とマダニ刺咬などの疫学

表 1 CDC のライム病診断基準

A: 疫学的汚染地域では
a) 遊走性紅斑 (erythema migrans; ECM) の存在
b) ECM がみられない場合; 少なくとも 1 臓器以上の症状 + 血清診断陽性
B: 疫学的に非汚染地域では
a) 典型的な EM 症状があり, 少なくとも 2 臓器以上の症状がある
b) 典型的な EM 症状があり, かつ血清診断が陽性である

的背景が診断に重要で、CDC の診断基準⁴⁾を表 1 に示す。重要なことはマダニ刺咬後 1 カ月以内に発症する ECM を正確に診断することである。ECM が不明のときは、その他の臨床症状 (関節炎, 皮膚リンパ球腫, 神経症状など) が少なくとも 1 個と後述の血清抗体陽性または病原体の検出が必要である。また本症は、1999 年 4 月施行の感染症新法では 4 類に指定されて、全例報告義務が生じている。ECM (慢性遊走性紅斑) とはマダニ刺咬後、数日から 1 カ月後に刺咬部を中心に出現する紅斑性皮膚病変で、欧米で 90% 以上、本邦のライム病ではほぼ必発の症状である。マダニ刺咬部を中心に丘疹状紅斑ではじまり、急速に拡大して環状になり、径 10 cm 以上になる。典型的なものでは ring-shaped erythema (環状型) が多く (図 1), homogeneous erythema (均一型) (図 2) も頻度が高い。浮腫性紅斑で、小水疱, 膿疱を伴い蜂窩織炎様の臨床像も呈する。さらに、径 1~

* Yoshio HASHIMOTO, 旭川厚生病院, 皮膚科, 主任部長

別刷請求先 橋本喜夫: 旭川厚生病院皮膚科 (〒078-8211 旭川市 1 条通 24 丁目 111 番地)

キーワード ライム病, *B. burgdorferi*, 遊走性紅斑, 血清診断, BSK II 培地



図1 ECMの臨床像(環状型)

2 cm 程度の atypical stationary erythema もまれに存在する。自覚症状は強くないが、癢痒感、灼熱感も伴う。ダニ刺咬部は多くは硬結、時に壊死、痂皮を伴う。

III. 血清診断

血清診断におけるボレリアブルドルフェリ抗体の検出は、最も有用な検査室試験法であるが、血清抗体陽性が即診断確定には至らない。血清診断法は、主に培養全菌体を抗原とした蛍光抗体法 immunofluorescence assay (以下 IFA) と、全菌体または部分精製鞭毛抗原を用いた酵素抗体法 enzyme-linked immunosorbent assay (以下 ELISA) がある。その他、3 M IgG/IgM FAST LYME test (ライム診断用に 1991 年 7 月に保険適応認可の下りた本邦で唯一のテストキット) があるが、現在検査会社側の都合もあり、臨床的に適応が不可能となっている。代表的方法の概説と基準値を述べる。

1. 蛍光抗体法 (IFA)

IFA は、フルオレセイン標識抗ヒト IgG または IgM 抗体を利用している。*Borrelia* を顕微鏡用スライドに固定化し、患者試料の連続希釈液と一緒



図2 ECMの臨床像(均一型)

にインキュベートし、洗浄後フルオレセイン標識抗ヒトγグロブリンと反応させ、スライドを UV 光のついた顕微鏡で測定する。通常 1 : 256 以上を陽性とする。数少ない検体では効果的な方法だが、多数の検体のスクリーニングには向かない。

2. ELISA

感度においては IFA に匹敵するが、操作のオートメーションに関しては優れている。

マイクロタイトレーションウェルを個体の支持体として、酵素と基質の間の反応によって起こる色の変化を分光光度計により測定する。抗原は菌体、鞭毛抗原を用いる。米国 CDC 法では OD 比 0.41 以上を陽性とする。本邦では施設間でばらつきがある。2006 年 4 月現在 SRL では海外発注で検査を受託しており、EIA 数値として 1.0 未満が陰性、1.0~1.1 が判定保留、1.2 以上が陽性としている。加えて、EIA 1.0 以上では後述するウエスタンブロット法で IgG、IgM バンドの検出 (two-step 診断) も施行することになっている。

3. Two-step 診断法⁵⁾

現在米国疾病対策センター (CDC) では、第 1 ステップとして EIA (または ELISA) または IFA により試験して、陽性または疑陽性の場合は第 2 ステップとしてウエスタンブロット法を行い、確認する two-step 法を必須として提唱している。本邦でもこれに従うのが最善の方法と考える。ウエスタンブロットの診断基準では、IgM 抗体では 24 kDa、29 kDa、41 kDa のうち 2 つのバンドが確認されれば、IgG 抗体では 18 kDa、21 kDa、28

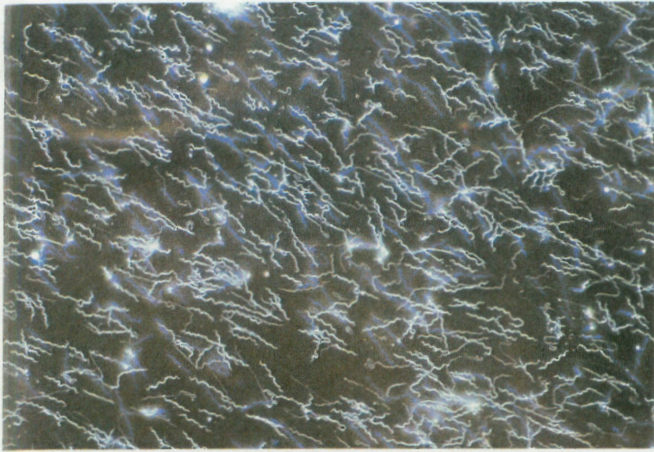


図3 暗視野顕微鏡像 (ライム病ボレリア)

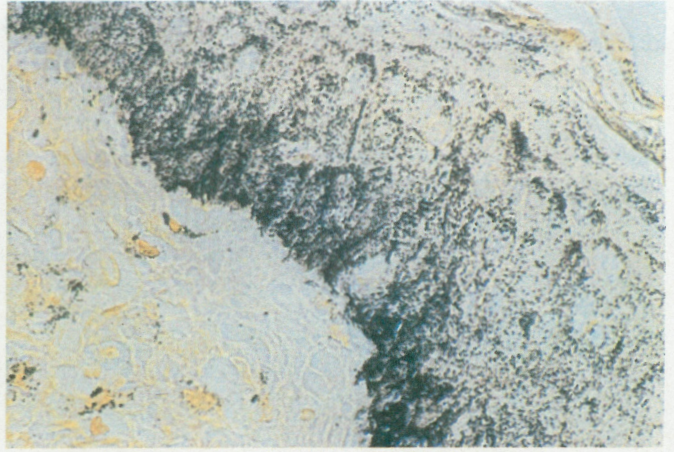


図4 Warthin-Starry 銀染色 : 表皮下層にらせん状のスピロヘータを認める。

kDa, 30 kDa, 39 kDa, 41 kDa, 45 kDa, 58 kDa, 66 kDa, 93 kDa のうち 5 つのバンドが確認されればライム病陽性とする。

◎血清診断の問題点

上記の血清診断 (ELISA, EIA) は梅毒, 回帰熱などのスピロヘータ感染症や, 自己免疫疾患 (全身性エリテマトーデス, 抗リン脂質抗体症候群, リウマチ因子陽性者), 伝染性単核球症などとの交叉反応が問題になる。梅毒血清を除外すれば IFA, ELISA の測定値の特異性は 97~100% である。ライム病患者血清は梅毒血清反応の RPR, VDRL テストは陰性であるので, 梅毒とは区別可能である。特異性を高めるため, 抗原として全菌体, 部分精製鞭毛抗原ではなく, 遺伝子組み換え法により作製された蛋白を抗原とする血清診断法も開発されているが, 適応する検査機関が限られる。したがって, 血清診断による確定は, 国立感染症研究所作成のライム病パンフレットに記載されている特定の施設の厚意で行われていることが多い。年間数万人は発生する米国, 欧州でも感染初期での血清抗体陽性率が米国約 50%, 欧州約 20~50% と推定され, 血清診断のみに依存した確定診断は不可能である。血清診断での陽性は過去に *Borrelia* に曝露し, 抗体が陽性であることを示すのみであり, 現在ライム病であることを診断確定するものではない。また, 本邦でも感染初期 (3 週間以内) では偽陰性が多い²⁾。最近の総説⁶⁾でも後述するような皮膚組織をはじめとした組織からの *Borrelia* 培養が診断の golden standard であるとしている。ま

た, *Borrelia* 抗体価は治療効果を反映しないが, IgG が高値を持続している場合は慢性萎縮性肢端皮膚炎など後期症状が出現する可能性がある。

IV. 細菌学的検査法

① 患者から無菌的に採取した血液, 髄液, 関節液, 尿, 皮膚の生検材料, 患者に咬着したマダニが対象となる。培地は BSK (Barbour-Stoenner-Kelly) 培地または, BSKII 培地を用い, 血液は凝血阻止剤を加えた血液を, 髄液, 関節液はそのまま, 皮膚は無菌的に細切して, 培地に接種し, 32°C の条件で最低 5 週間培養する。早いものでは 1 週間で *Borrelia* が観察される。培地に生育した *B. b.* は暗視野顕微鏡で確認する (図 3)。特に皮膚の培養は陽性率が非常に高く, 現在でも診断の golden standard とされ, 皮膚生検の手技は国立感染症研究所作成のライム病パンフレットに詳しい。問題は培養を施行してくれる施設が限られていることである。

V. 組織学的検査法

皮膚や滑膜が検査の対象になる。Giemsa 染色, 鍍銀法 (Warthin-Starry 銀染色など), 蛍光抗体法, 免疫ペルオキシダーゼ染色法, 電顕法などにより組織中の *B. b.* を検出する。鍍銀法では, 多くは表皮内に黒色に染まったらせん状のスピロヘータが観察される (図 4)。

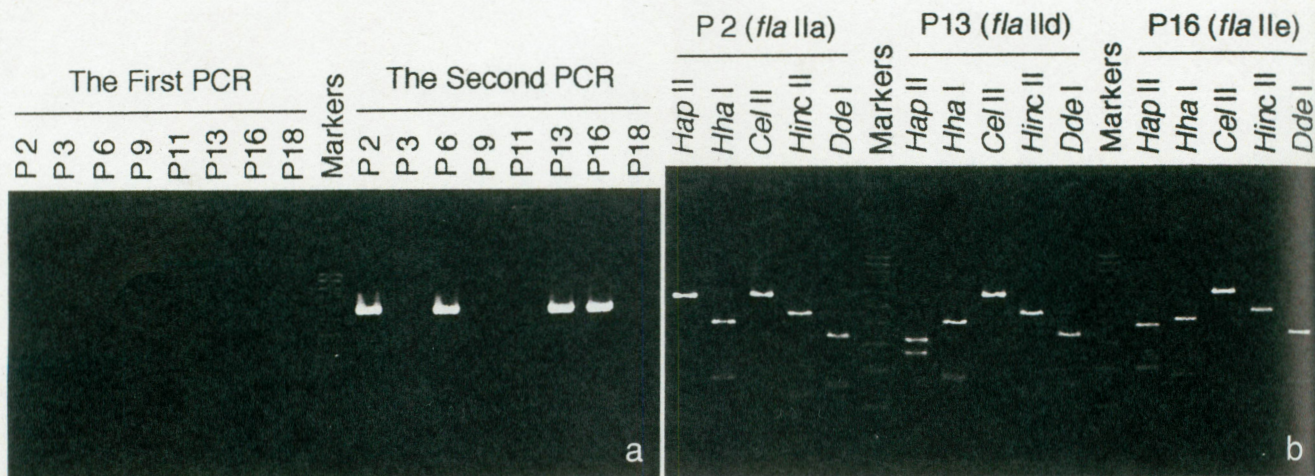


図5 nested PCR を用いたボレリア迅速診断

P2～P18：患者番号であり皮膚検体から抽出された DNA

A：first PCR 所見 second PCR 所見；second PCR にて 580 bp の PCR 産物が検出

P2, P6, P13, P16：ECM を呈した皮膚組織（ライム病症例）。P3, P9, P11, P18：マダニ刺咬部の皮膚組織（非ライム病症例）

B：得られた PCR 産物の制限酵素処理による RFLP パターン；P2, P13, P16 はパターンから *B. garinii* であることが判明した。

VI. PCR (polymerase chain reaction) 法による

1. 診断

欧米ではライム病の診断法として、*B. b.* の分離培養，血清診断に加えて，PCR 法による病原体の検出が行われている。標的遺伝子としては鞭毛遺伝子 (flagellin)，主要表層蛋白 A (*Osp A*) 遺伝子，*Osp B* 遺伝子などがあるが，検出 PCR には鞭毛遺伝子が最適と考えられる。尿，血液，髄液，皮膚などを材料に用いる。皮膚からは培養の方が感度が高いといわれるが，2 段階 PCR により検出感度を上げることができる。われわれも，過去に nested PCR を用いて皮疹部からの迅速診断⁷⁾ (図 5) を施行しているが，一般的に普及していない。

また，尿も PCR に適しているといわれる。髄液も検出率 60～90% という報告⁸⁾ もある。また，皮膚においては ECM や，ボレリアリンパ球腫などすでにパラフィン包埋された検体の retrospective な解析も可能で，過去に報告⁹⁾ している。

文献

- 1) 橋本喜夫ほか：日皮会誌，**112**：1467-1473，2002
- 2) 橋本喜夫ほか：臨皮，**51**：181-1086，1997
- 3) Hashimoto Y et al：Dermatology，**191**：193-198，1995
- 4) Ciesielski CA：Ann NY Acad Sci，**539**：283-288，1988
- 5) Trevejo RT et al：J Infect Dis，**179**：931-938，1999
- 6) Nadelman RB, Wormser GP：Lancet，**352**：557-565，1998
- 7) Hashimoto Y et al：Br J Dermatol，**138**：304-309，1998
- 8) Keller TL et al：Neurology，**42**：32-42，1992
- 9) 木ノ内基史ほか：日皮会誌，**105**：1423-1426，1995