

ライム病（ライムボレリア症）

目 次

I. 概説

- 疾患の定義
- 病原体診断
- 臨床的特徴
- 病原体
- ライム病ボレリアと他の病原体の共感染
- 治療・予防
- 媒介マダニ

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, BSK-H 培地）
- 生体試料からの分離培養
- 病原体の同定法
- 病原体輸送法
- 病原体保存方法

III. 実験室診断（血清診断）

- 判定基準
- WB 法
- EIA (ELISA) 法
- 血清、髄液、穿刺液の輸送法

IV. 参考文献

V. 謝辞

VI. 検査に関する問い合わせ先

VII. 執筆者

I. 概説

【疾患の定義】

マダニ (*Ixodes* 属) 刺咬により媒介されるスピロヘータ (ライム病ボレリア) 感染症。北米、欧州、ロシア、本邦を含む極東地域で広くみられ、患者は皮膚症状、神経症状、心臓炎など、多様な症状を示す。本邦では国内感染例、海外感染例ともに見られる。

【病原体診断】

ライム病の診断には、欧米では、流行地での媒介マダニとの接触機会の既往などの疫学的背景、遊走性紅斑やその他ライム病に相応する臨床症状、更に米国疾病予防センター (CDC) が示した血清学的診断基準から総合的に判断することが推奨されている。

〈報告のための基準〉ライム病は感染症法での第 4 類感染症に含まれ、全数報告が義務づけられている。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や血清学的診断がなされたものが報告対象である。

病原体の検出 (例：生体試料からの分離培養、病原体 DNA の検出)

病原体に対する抗体の検出

〈病原体の検出〉病原体ボレリアの分離培養には BSK-II 培地若くは BSK-H 培地が用いられている。紅斑部からの皮膚生検ではボレリアが分離可能である。欧米では脳炎患者の髄液からも稀に分離されている。血液からの分離は難しいとされているが、これは菌血症が一過性でありしかも血中の菌濃度が極めて低いことが原因と考えられている。

〈血清診断〉本邦では輸入例、国内例ともにみられるため、それぞれに適した血清診断抗原を選択する必要がある。北米からの輸入例が疑われる場合には、血清診断はコマーシャルラボ経由で米国の臨床検査ラボに依頼することもできる。

【臨床的特徴】

全身性慢性感染を引き起こす。臨床症状は感染の進行過程で 3 stage に分類される。

感染初期 (stage I) マダニ刺咬部を中心とする限局性感染期間。ライム病に特徴的な遊走性紅斑 (Erythema migrans: EM) を呈することが多い。随伴症状として、筋肉痛、関節痛、頭痛、発熱、悪寒、倦怠感などのインフルエンザ様症状を伴うこともある。EM の出現期間は数日から数週間といわれ、形状は環状紅斑又は均一性紅斑が殆どである。その長径は 5cm 以上に及ぶことが多く、まれに数 10cm にまで達することもある。

播種期 (stage II) 体内循環を介して病原体が全身性に拡散する。これにともない、皮膚症状、神経症状、心疾患、眼症状、関節炎、筋肉炎など多彩な症状が見られる。

皮膚症状：EM がマダニ刺咬部以外の離れた皮膚領域で見られる場合もある (二次性 EM)。

また良性リンパ球腫 (ear lobe, nipple, scrotum 等) の報告例もある。

神経症状：神経根炎 (Garin-Boujadoux-Bannwarth 症候群)、髄膜炎、顔面神経麻痺 (7 th nerve palsy) 等。

心疾患：心筋心膜炎、及びこれに起因すると考えられる急性の高度（2度或いは3度）房室伝導障害。

眼症状：虹彩炎、角膜炎。

慢性期（stage III） 感染から数か月ないし数年を経て、慢性感染に移行する。患者は播種期の症状に加えて、重度の皮膚症状、関節炎などを示すといわれる。本邦では、慢性期に移行したとみられる症例は現在のところ報告されていない。

症状としては、慢性萎縮性肢端皮膚炎（Acrodermatitis chronica atrophicans）、慢性関節炎、慢性脳脊髄炎などがあげられる。

【病原体】

ライム病病原体であるボレリアは数種類が確認されている。北米では主に *Borrelia burgdorferi* 欧州では *B. burgdorferi* に加えて、*B. garinii*、*B. afzelii* が主な病原体となっている。本邦では *B. garinii*、*B. afzelii* が主な病原体となっていると考えられている。

【ライム病ボレリアと他の病原体の共感染】

原虫（*Babesia* 属）、*Borrelia* 属以外の細菌としてヒト顆粒球エーリキア HGE（現在の *Anaplasma phagocytophila* など）やウイルス（ダニ脳炎ウイルスなど）感染が起こる可能性がある。いずれも *Ixodes* 属ダニ刺咬に起因する。

【治療・予防】

ライム病ボレリアには抗生剤による治療が有効である。マダニ刺咬後の遊走性紅斑にはドキシサイクリン、髄膜炎などの神経症状にはセフトリアキソンが第一選択薬として用いられている。薬剤耐性は今のところ報告されていない。マダニ刺咬による HGE の共感染が疑われる場合にはドキシサイクリン若しくはテトラサイクリンの適用が有効とされている。

ライム病の予防には野山でマダニの刺咬を受けないことがもっとも重要である。マダニの活動期（主に春から初夏、及び秋）に野山へ出かけるときには、1）むやみに藪などに分け入らないこと、2）マダニの衣服への付着が確認できる白っぽい服装をすること、3）衣服の裾は靴下の中に入れ、虫よけをし、マダニを体に近寄らせないことが、肝要であろう。また万一刺咬を受けた場合には、自分でマダニを引き剥がさず病院の皮膚科で切除してもらうことでマダニ口器の残留による感染を予防できる。

【媒介マダニ】

ライム病ボレリアは、野山に生息するマダニ（*Ixodes tick*）に咬着されることによって媒介、伝播される。北米においては主に *I. scapularis*、欧州においては主に *I. ricinus* がライム病ボレリアを伝播するとされている。本邦においてはシュルツェ・マダニ（*I. persulcatus*）の刺咬後、ライム病を発症するケースが殆どである。これらマダニは本州中部以北の山間部に棲息し、北海道では平地でもよく見られる（一般家庭内のダニで感染することはないとされている）。

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, BSK-H 培地)】

通常は BSK-II 培地を使用する。*B. burgdorferi* 培養時は BSK-H で代用できる。以下 BSK-II 培地 作製法を記す。

1) A 液、B 液を各々調製する。B 液はオートクレーブにより滅菌できる。

A 液		特記
蒸留水	up to 500 ml	Milli-Q レベル
1N NaOH	10 ml	用時調製
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

オートクレーブ滅菌。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-H 培地は Gelatin を加えず、オートクレーブ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 Sartrius, Nalgen, Corning, IWAKI 等の 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とおりである。生化学的試験による Quality check は出来ない。

B. burgdorferi \approx *B. garinii* \approx *B. afzelii* \gg *B. japonica* \geq *B. miyamotoi*

（大抵の場合、*B. burgdorferi* は生育できる）

*4:保存期間は -20°C で1ヵ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 を用事調製・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、皮膚組織、血液、髄液などが挙げられる。

1) 皮膚からのボレリア分離方法

生検部位の選択は遊走性紅斑においてはマダニ刺咬部（中心部）でも紅斑辺縁部でも培養成功率は変わらない。消毒は通常 10%イソジン液及び 10%ハイポアルコールで行い、局所麻酔は 0.5-1%キシロカインで浸潤麻酔を行う。その際、出血を防ぐ意味で 10 万倍エピネフリン添加を使用してもよい。皮膚の切除は鋭利なメス (15 番メス) で、長軸約 0.6-1 cm、短軸 0.3-0.5 cm の紡錘形に切開線を加え、表皮、真皮、皮下脂肪織（少量でよい）の 3 要素を含む様に切除する。ボレリアの培養は、切除した組織の半量で充分可能であり、半量は病理組織検査に使用する。切除後は 5-0 ナイロン糸等で一次的に縫合すればよい。皮膚切除は 3-8 mm のトレパンによるパンチ生検でも充分であり、この後の縫合は一般に必要ない。ただし部位によって創の開きが大きいときは、5-0 ナイロンで 1 針或いは 2 針縫合しても良い。切除した組織はすぐ培養ができない場合（輸送が必要な場合など）は、滅菌シャーレ内に、生食で浸した滅菌ガーゼで組織を包んでたたんでおく。これらは無菌的に行い、 4°C 保存すれば 2-3 日間放置してもボレリア培養は成功することが多い。

2) 血液・髄液からの分離培養

血液を材料とした場合、通常ライム病ボレリアは殆ど分離できない。これは血中に出現する菌数がきわめて少ないためと考えられている。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、 $33-37^{\circ}\text{C}$ 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)。

暗視野顕微鏡観察により培養液中に運動性のある螺旋状細菌が観察できた場合に、病原体の同定を行う (次項参照)。非運動性螺旋状菌の増殖は汚染による可能性が高い。汚染菌除去には動物接種法 (マウス接種法: C3H/HeN などの純系、又は ddY 等の非近交系マウスに腹腔内若くは皮下接種後、14 日後に耳介、ボウコウなどから分離できる。)、若くはフィルター法 (汚染培地を 0.45 μm 若くは 0.22 μm 滅菌フィルターを通過させることで、多くの場合、汚染菌を除去できる。ボレリアもフィルターにトラップされるので、ある程度増菌させた後に行う)。

【病原体の同定法】

暗視野顕微鏡観察により培養液中に運動性のある螺旋状細菌が観察できた場合に、病原体の同定を進める。暗視野顕微鏡による形態観察では、他のスピロヘータ細菌との鑑別には熟練を要する。したがって、この方法は通常の検査室での同定法としては適していない。

病原体の同定には、ライム病ボレリアに特異的な鞭毛遺伝子或いは 16S rRNA 遺伝子の PCR や塩基配列決定、5S-23S rRNA intergenic spacer の PCR などの遺伝学的手法で代用する。以下一例として、鞭毛 PCR による病原体の同定作業を示す。

1) ボレリア DNA 検出及び病原体の同定作業

1. 使用 PCR プライマーの一覧を示す。

• BflaPAD 26mer (376→401)

5' -GAT CA(G/A) GC(T/A) CAA (C/T)AT AAC CA(A/T) ATG CA-3'

• BflaPDU 24mer (811←835)

5' -AGA TTC AAG TCT GTT TTG GAA AGC-3'

nest-PCR・sequencing 用プライマー

• BflaPBU 23mer (442→464)

5' -GCT GAA GAG CTT GGA ATG CAA CC-3'

• BflaPCR 24mer (770←793)

5' -TGA TCA GTT ATC ATT CTA ATA GCA-3'

() 内はこれら塩基の mix であることを示す。

2. 分離・増菌させたボレリアを遠心集菌後、0.01% tritonX-100 溶液に懸濁し、100°C10 分加温する。

3. 上記懸濁液(=template)を用い、以下の反応組成液を混和、PCR を行う。

MilliQ	39 μl
10XEX-Taq buffer	5 μl
2.5mM ea. dNTP mixture	4 μl
20 μM BflaPAD	0.5 μl

20 μ M BflaPDU	0.5 μ l
template DNA	0.5 μ l
EX-Taq (5U/ μ l)	0.5 μ l

本組成では PCR 酵素は TAKARA bio の EX-Taq を用いている。

4. PCR cycle は以下の通りである。

94°C10sec, 50°C30sec, 72°C30sec (35 cycles) + 72°C2min(post elongation)

5. 反応終了後、PCR 産物を精製する。我々は精製に Roche 社の PCR product purification kit を用いている。

6. 上記プライマーを用い、増幅産物の塩基配列を決定し病原体の同定を行う。この方法では回帰熱ボレリアに加えライム病ボレリアも同定可能である。

このほか、参考事項として血清学・免疫学的同定について述べる。血清学・免疫学的同定には、ボレリア属特異的な鞭毛抗原に対する特異的単クローン抗体 H9724 (回帰熱ボレリアにも反応する)、及びライム病ボレリア表層蛋白質 A(OspA) 特異的単クローン抗体 H5332 を使用したウエスタンブロットが行われる。しかし、アメリカ等とは異なり本邦や欧米で分離されているボレリアは OspA が多様性に富むため、H5332 との反応が見られない場合が存在するので注意が必要である。H9724 の反応抗原であるフラジェリン抗原は、ライム病ボレリアの場合、約 40kDa であり、回帰熱ボレリアの 38kDa より若干大きいことが知られている。この他に抗ボレリア抗体が 20 数種類市販されている。これら製品の感度・特異性は感染研では把握していない。

【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。

【病原体保存方法】

10-20%グリセロール添加後、-80°Cで保存。

III. 実験室診断

【抗体検査 判定基準】

米国 CDC が推奨している Two-step 法²⁾に準拠。

第1ステップ

Enzyme immunoassay (EIA) 或いは Immunofluorescent assay (IFA)により試験する。

第2ステップ

EIA 或いは IFA で陽性、疑陽性であった検体には Western blot (WB) 法を行い、

以下の場合最終的に抗体陽性とする。

i) WB 法で主要表層抗原 C (OspC)、ボレリア膜タンパク質 A (BmpA)、鞭毛抗原のうち少なくとも 2 つ以上に対して IgM 価が上昇していること。

ii) WB 法で 18kDa 抗原、21kDa 抗原 (OspC)、28kDa 抗原、30kDa 抗原、39kDa 抗原 (BmpA)、41kDa 抗原 (鞭毛抗原)、45kDa 抗原、58kDa 抗原 (not GroEL)、66kDa 抗原、93kDa 抗原のうち少なくとも 5 つ以上に対して IgG 価が上昇していること。

【WB 法】

使用抗原は、患者の疫学的背景をもとに選択する。通常、国内感染例では *B. garinii* 及び *B. afzelii* を抗原として用いる。検体が少数の場合は EIA をスキップし、WB 法のみで判定可能である。以下検査法の 1 例を記載する。

1) 診断抗原の調製

血清診断用菌体を BSK-II 培地を用いて培養する。長期継代培養により plasmid の脱落が起こるため、C3H/HeN, C3H/HeJ 等の近交系マウス (ddY などの非近交系でも可能) から分離した株を用いること。本邦診断用ボレリア種は *B. garinii* 及び *B. afzelii* である。輸入例が疑われる場合には *B. burgdorferi* を抗原種として用いること。感染症研究所では国内感染が疑われる場合には HP1 株 (北海道 *Ixodes persulcatus* 由来) 及び P/Gau 株 (旧西ドイツ患者髄液由来) を、欧米での感染が疑われる場合には B31 株 (*I. scapularis* 由来) あるいは 297 株 (米国患者髄液由来) を併用している。培養温度は 34-37°C とし late-log phase まで培養を行うこと。これは OspC を十分発現させるためである。また米国でワクチン接種を受けた患者の血清診断では OspA に対する抗体価が見い出される可能性がある点留意すること。

培養菌株を遠心・集菌・洗浄する。集菌・洗浄には PBS 若くは 5mM MgCl₂ 添加 PBS を用いる。洗浄液は冷却したものをを用いること (4°C ~ 氷中)。遠心条件は大腸菌などと同様の集菌操作で可能である。洗浄は 2 度以上おこなうこと。

湿菌重量を測定し、最終 100 mg/ml に懸濁する (滅菌水)。-20°C で長期保存可能。凍結融解は避けるために、抗原液は小分けしておいたほうがよい。

100mg/ml 抗原液を 2Xsample buffer と等量混和し、boil する (サンプルの調製方法は通常の western blotting (immunoblotting) と同様で差し支えない)。

2) Western blotting

1. 常法に従い SDS-PAGE を行う。分離ゲル濃度は 12.5%、濃縮ゲル濃度は 5%。市販の 10-20% グラジエントゲルでも代用可能。
2. PVDF メンブラン (Bio-Rad など) にゲルから抗原をブロットする。
3. メンブランをブロッキング溶液中で最低 1 時間室温で振盪。すぐに次の操作へ進まない場合は翌日まで 4°C で保存可能。

4. 血清などを上記ブロッキング溶液に 1/100 量加え、1 時間室温で振盪。
5. 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
6. 2 次抗体を含む上記ブロッキング溶液中で 1 時間室温で振盪。
7. 洗浄液で 5 分×3 回洗浄。
8. 至適条件下で発色或いは化学発光させる^{注)}。

ブロッキング溶液:

- 1% Blocking reagent (ベーリンガーマンハイム)
- 0.1 M マレイン酸ナトリウム
- 0.15 M NaCl

洗浄液:

- 0.3% Tween 20
- 0.1M マレイン酸ナトリウム
- 0.15M NaCl

注) 筆者は 2 次抗体にペルオキシダーゼラベル抗体を用い、アマシャム社 ECL キットにて化学発光させ、最終的に X 線フィルム上にて反応抗原検出を行っている。

【EIA (ELISA) 法】

1) ELISA 用抗原の調製

1. BSK-II 培地により対数増殖期後期まで培養したボレリアを PBS で 3 回遠心洗浄後、5ml の PBS に再懸濁する。
2. 氷上にて超音波細胞破砕器により 50W を 30 秒 10 回行うことで細胞を破砕。
3. 蛋白質濃度を Bradford 法により測定し、10 μ g/ml に調製して抗原液とする。

2) ELISA 法

1. 抗原液 50 μ l を ELISA 用マイクロプレート (Nunc, immuno plate, Maxisorp F96) の各穴に分注し、4°Cで一晩吸着、乾燥。
2. 0.1% 馬血清-PBS 200 μ l を加え、室温下 1 時間 15 分ブロッキング。
3. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
4. 抗体希釈液で 200 倍希釈した被検血清 60 μ l を加え、室温下 1 時間反応させた。
5. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
6. 1000 倍希釈した西洋ワサビペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ヒト抗体 (IgG + IgA + IgM, KPL) 60 μ l を加え、室温下 1 時間反応。
7. 0.05% Tween 20-PBS で 3 回洗浄。
8. 基質溶液 60 μ l を加え、室温下 30~90 分間反応。
9. 405nm における吸光度をマイクロプレートリーダーにより測定し、抗体価を optical density (OD) 値で表す。

3) 陽性判定基準値は健常人血清の平均吸光度+3×標準偏差とし、この値以上の OD 値が得られた検体を陽性と判定する。

ELISA 用試薬一覧

4×0.05% Tween20-PBS (stock solution: オートクレーブ d, 4°C保存)

10×PBS	200ml
Tween20	1g
distiled-water	up to 300ml

抗体希釈液 (用事調製)

4×0.05% Tween20-PBS	100 ml
5% Sodium dextran sulfate solution	1 ml
normal horse serum (NHS)	5 ml

塩濃度をあげることで background を低下させることができる。

50mM citrate-phosphate 溶液 (pH 5.0) (stock solution: オートクレーブ d, 4°C保存)

0.1M Sodium citrate solution	243 ml
0.2M disodium hydrogenphosphate solution	257 ml
distiled-water	up to 1000 ml

基質溶液 (Peroxidase substrate solution) (用事調製)

50mM citrate-phosphate buffer (pH 5.0)	10 ml
52mM 2-2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) diammonium salt (ABTS) solution	0.2 ml
35% hydrogen peroxide solution	2 μ l

【病原体 DNA の検出】

市販の DNA 抽出キットを用い皮膚病変部より抽出した 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

皮膚病変部を材料として、DNeasy Blood&tissue kit (Qiagen)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。

【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以下で輸送。

IV. 参考文献

- 1) Barbour, A. G. 1984. Isolation and cultivation of Lyme disease spirochetes. Yale J. Biol. Med. 57: 521-525.
- 2) Centers for Disease Control and Prevention and Association of State and Territorial Public Health Laboratory Directors. 1994. Proceeding of the Second National Conference on Serologic Diagnosis of Lyme disease. Centers for Disease Control and Prevention, Fort Collins, Colo.
- 3) Masuzawa, T., Y. Okada, Y. Yanagihara, and Y. Sato. 1991. Antigenic properties of *Borrelia burgdorferi* isolated from *Ixodes ovatus* and *I. persulcatus* in Hokkaido, Japan. J. Clin. Microbiol. 29: 1568-1573.
- 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.

V. 謝辞

本マニュアル作成に当たり、ご助言・ご助力を賜りました福山大学・福長将仁博士、千葉科学大学・増沢俊幸博士の諸先生方に感謝致します。

VI. 検査に関する問い合わせ先

分離培養、分離株同定、血清診断

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 03-4582-2682

ファックス 03-5285-1163

E-mail kbata@nih.go.jp

VII. 執筆者

国立感染症研究所

細菌第一部 川端寛樹