



兵庫県下におけるクラミジア感染症および淋疾の実態とその対策に関する調査研究(第3報) (社団法人神緑会事業報告3)

田中, 一志
長久, 裕史
今井, 敏夫[他]

(Citation)

神戸大学医学部神緑会学術誌, 9:19-22

(Issue Date)

1993-06

(Resource Type)

departmental bulletin paper

(Version)

Version of Record

(JaLCD0I)

<https://doi.org/10.24546/81007266>

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/81007266>



社団法人神緑会事業報告 (3)

兵庫県下におけるクラミジア感染症および淋疾の実態と その対策に関する調査研究 (第3報)

田中一志 長久裕史 今井敏夫 宮崎茂典 松井 隆

山下真寿男¹⁾ 荒川創一 松本 修²⁾ 守殿貞夫 (神戸大学医学部泌尿器科)

大前博志 原 信二 (原泌尿器科病院) 寺杣一徳 三田俊彦 (三田・寺杣泌尿器科医院)

富岡 収³⁾ (姫路赤十字病院泌尿器科) 望月真人 大橋正伸 (神戸大学医学部産婦人科)

清重欽二 (神戸市立西市民病院産婦人科) 児玉荘一 (姫路赤十字病院小児科)

中村 肇 松尾雅文⁴⁾ 米谷雅彦 (神戸大学医学部小児科)

¹⁾現明石市民病院泌尿器科 ²⁾現県立加古川病院泌尿器科 ³⁾現富岡医院

⁴⁾現神戸大学医学部附属医学研究国際交流センター教授 (熱帯環境衛生)

はじめに

泌尿器科領域の性感染症 (STD) には、淋菌、クラミジア、ウイルス等、各種微生物による感染があるが、最も頻度の高い疾患は、淋菌、クラミジアを起炎微生物とする尿道炎である。さらに、近年40歳以下の急性精巣上体炎はそのほとんどが、STD性であり、クラミジアを原因とするものが、50%以上を占るとされている¹⁾。クラミジアの診断は当初細胞培養法が行なわれていたが、その後さまざまな簡易診断法が開発され一般化し、DNA診断法も含めより特異的でより簡便な方法へと進んでいる。今回我々は、淋菌、クラミジアに関して、診断法の進歩、およびそれらの特徴について考察したので報告する。

1. 淋菌 (表1)

表1 淋菌の検出法

1. 直接鏡検法
2. 培養同定法
3. 酵素抗体法 (EIA)
Gonozyme
4. DNA Probe法
Gen-Probe

1) 従来 of 診断法

a. 直接鏡検法

分泌物をスライドガラスに塗抹し、グラム染色後に鏡検し、淋菌を検索する。本法は、比較的簡便で、迅速でスクリーニング検査としては有用であるが、分泌物中に他の細菌が混入した場合、淋菌の確認は容易ではないので、検出感度が劣る。また、淋菌以外の *Neisseria* 属が混入することもあり、特異性にも問題がある。

b. 培養同定法

本法は最も確実な方法であるが、淋菌の取り扱いが一般の細菌と異なり煩雑で簡便性に欠ける。すなわち、淋菌は温度変化、乾燥などに抵抗力が弱く、栄養要求性が複雑で普通寒天培地には発育しない。培養には CO₂ が必要で、同定はグラム染色性、形態 (双球菌)、オキシダーゼ反応、糖分解能試験により行なわれる。

本法は2日間かかるので迅速性で劣るが、菌株の保存ができ、薬剤感受性、βラクタマーゼ産性等の検索の点から重要な方法である。

2) 酵素抗体法 (ゴノザイム)

a. 原理

表面を特殊処理したビーズ表面に検体中の淋菌抗原を吸着させ、次にウサギ抗淋菌抗体を、さらにペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG ヤギ抗体を結合させ、最後に基質としてオルトフェニレンジアミンを加え、ビーズに結合したペルオキシダーゼを基質の発色反応で測定する。

b. 特徴

抗原の免疫学的検出法のため死菌の状態でも検出可能であり、培養法のように検出採取後直ちに培地に接種し、培養しなければならないという時間的制約がなく、保存液の入ったチューブ内で検体の保存が可能である。操作は簡便で、結果も3～4時間で判明し迅速である。

問題点として、本法はポリクローナル抗体を使用しており、他の *Neisseria* 属や、*E.coli* など、 10^7 /ml程度の多量菌が存在する場合交差反応を起こし、false-positive となる可能性がある。

3) DNA Probe 法 (Gen-Probe)

a. 原理

化学発光物質であるアクリジニウムエステルを標識とした1本鎖DNAで、淋菌の1本鎖リボゾームRNAに相補的になっており、DNA-RNA ハイブリダイゼーションに基づき、淋菌のリボゾームRNAを検出する。

b. 特徴

菌体中には、DNAは1つかせいぜい数コピーしか存在していないのに対し、リボゾームRNAは、約 10^4 コピーも存在しているため、標的をDNAから、リボゾームRNAにしたことにより、特異性を維持したまま検出感度が、数千倍に増感された。結果も約2時間で判定でき迅速で、また、非アイソトープで標識している点で、簡便といえる²⁾。

c. 臨床的検討 (表2)

表2 淋菌検出によるDNA Probe法と培養法の比較

		DNA Probe法		
		陽性	陰性	計
培養法	陽性	15	0	15
	陰性	0	63	63
	計	15	63	78

(田中ら³⁾, 西日本泌. Vol53, 516-520, 1991.)

田中ら³⁾の、男子尿道炎78例におけるDNA Probe法と培養法の比較検討では、培養陽性15例中全例がDNA Probe陽性で、陽性一致率は100%であった。一方、培養陰性63例中全例がDNA Probe陰性で陰性一致率も100%であったと報告されている。

2. クラミジア (表3)

表3 クラミジア検出法

1. 細胞培養法
2. 蛍光抗体法 (直接塗抹法)
Micro Trak
3. EIA 法
Chlamydiazyme
IDEIA Chlamydia
4. DNA Probe 法(直接検出法)
5. PCR 法

1) 細胞培養法

培養したMcCoy cellもしくはHeLa cellを基に破碎処理した検体を接種し、メタノールで固定後Giemsa染色を行ない、封入体の有無とその数を測定する。本法はもっとも確実な方法とされているが、実施にあたっては細胞培養、検体処理等、特殊な技術と設備が必要であり、また最低でも2日間と、判定までに時間を要する。しかし、薬剤感受性を検討できる利点がある。

2) 直接塗抹蛍光抗体法 (Micro Trak)

検体をスライドガラスに塗布しFITC標識抗*C. trachomatis*モノクローナル抗体を反応させ蛍光顕微鏡で観察し封入体を検出する。

蛍光顕微鏡さえあれば短時間で判定可能であるものの観察に一定の熟練を要し、多量の検体を処理するには、適当ではない⁴⁾

3) Enzyme immunoassay (EIA) 法

a. Chlamydiazyme

ポリクローナル抗体を用いた方法で、specimen dilution buffer にて検体を処理し、処理ピーズを反応させ、抗 chlamydia ウサギ血清、peroxidase 標識抗ウサギ IgG ヤギ血清、o-phenylene diamine (OPD) 基質を反応させ吸光度を測定する。

比較的短時間で、多量の検体の判定が可能でその結果も客観的ではあるが、検出限界、cut off level の設定、他の微生物との交差反応等が問題となる⁵⁾

b. IDEIA chlamydia

モノクローナル抗体を用いる方法で検体を煮沸し、抗体固相のウエルに分注し、酵素標識モノクローナル抗体、基質液を反応させ吸光度を測定する。モノクローナル抗体を用いており感度にすぐれ、男性の尿道炎においては初尿を検体としてクラミジアを検出し得る。しかし、特異性の点では、Chlamydiazyme 同様、検出限界、cut off level の設定、交差反応等が問題となる⁶⁾。

4) DNA Probe 法

C. trachomatis のリボゾーム RNA を標的とし、arcidinium ester という化学発光物質で、DNA Probe を標識した liquid hybridization 法である。検出は rRNA の抽出、hybridization、hybrid 形成核酸のみの選別、化学発光量の検出の4段階のプロセスよりなる。特異性にすぐれ、全行程の所要時間は2~3時間と短く迅速性にもすぐれている。しかし測定感度については、C. trachomatis 4×10^3 /assay と EIA 法のそれと比較し若干劣るとされている⁷⁾。

5) PCR 法

a. 原理と特徴

C. trachomatis の major outer membrane pro-

tein 遺伝子の一部の塩基配列に、相補的な2種類の oligonucleotide を primer として設定し、DNA polymerase により in vitro で DNA 増幅をおこなう方法である。

検体より proteinase K により DNA の抽出を行ない、C. trachomatis 血清型 L 2 株の major outer membrane protein 遺伝子に対するプライマーを用い、変性、アニーリング、伸長の温度サイクルを繰り返して反応させる。

PCR 後、2%アガロースゲルにて電気泳動をおこない、ethidium bromide 染色にて DNA の band を検出すれば陽性と判定される。

操作は簡便で極めて高い特異性を有する高感度の検査法であるが、ときにコンタミネーションの可能性がある⁸⁾。

b. 臨床的検討 (表4)

表4 C. trachomatis 検出における PCR 法と Chlamydiazyme の比較

		PCR法		
		陽性	陰性	計
Chlamydiazyme	陽性	41	0	41
	陰性	4	29	33
	計	45	29	74

(出口ら⁹⁾、感染症誌、Vol66、172-175、1991。)

出口ら⁹⁾の尿道擦過材料からの PCR 法と Chlamydiazyme の比較検討では、PCR 法では、74例中45例が陽性と判定されたのに対して、Chlamydiazyme では、74例中41例が陽性と判定されている。Chlamydiazyme で陽性の41例すべてで PCR 法陽性であり、Chlamydiazyme 陰性例33例中、29例で PCR 法陰性で、4例で PCR 法陽性であった。

PCR 法の Chlamydiazyme に対する陽性一致率100%、陰性一致率87.9%で、全体での一致率は94.6%と良好な一致性をみるとともに PCR 法の感度の高いことが示されている。

まとめ

STD の患者数は、田中ら¹⁰⁾の報告では1987年の AIDS ショック以後一次的には減少したが、これ以後明らかな減少傾向はみられていない。守殿ら¹¹⁾は、前回の本研究の報告において男子 STD 性尿道炎の受診は、三次医療機関（神戸大学泌尿器科）では一年間で12例と少ないものの、一次医療機関（原泌尿器科病院、三田・寺杣泌尿器科医院）では一年間で169例と多数であることを報告している。

STD の病原体で最も高頻度に見られる微生物はクラミジア、淋菌であり、泌尿器科領域ではクラミジアは尿道炎のみならず、精巣上体炎の原因微生物としても重要である¹⁾。クラミジアの検出法は、従来の細胞培養法では特殊な技術、設備、時間を要していたが、その後、蛍光抗体法、酵素抗体法、DNA Probe 法等、より簡便ですぐれた方法が開発され一般化された。最近では PCR 法による診断も行なわれるようになりつつある。

淋菌の診断においても直接鏡検法、培養同定法から酵素抗体法、また DNA 診断法である DNA Probe 法も普及している。

今回、クラミジアでは PCR 法、淋菌では DNA Probe 法についての他法と比較した成績を示したが、どちらも従来の方法と高い一致性を示し診断法として有用であると思われた。

また、クラミジアにおける PCR 法は一部の EIA 法と同様、初尿沈査からも検出可能であること、DNA Probe 法は1回の擦過によりクラミジア、淋菌両方の診断が可能であることは、より非侵襲的な診断への志向として大きな意義をもつものと言える。

今後 STD の診断法は高感度、特異的、非侵襲的、簡便迅速なものが求められ DNA Probe、PCR 法等の DNA 診断法はこれらの点からもさらに一般化されていくものと思われる。しかし、EIA 法にも長所があり、また培養法はこれら微生物の疫学的背景や薬剤感受性をみる上で重要な方法であることも理解しておくべきといえる。

文 献

1. 齊藤 功：最近の STD. 臨泌, 45/ (増), 149-152, 1991.
2. 田中正利, 他：DNA プローブ法による淋菌検出. 日本臨床, 50 (特別号), 390-393, 1992.
3. 田中正利, 他：淋菌感染症診断における DNA プローブ法の臨床的検討. 西日泌尿, 53, 516-520, 1991.
4. 西浦常雄, 他：FITC 標識モノクローナル抗体 (Micro-TrakTM 法) による *Chlamydia trachomatis* の検出. 感染症誌, 58, 1305-1313, 1984.
5. 加藤直樹, 他：Chlamydia trachomatis 感染症診断試薬としての ChlamydiazymeTM の有用性——尿路感染における検討——. 感染症誌, 60, 378-385, 1985.
6. 田中正利, 他：Chlamydia trachomatis 尿路性器感染症における抗原検出について——IDEIATM CHLAMYDIA による初尿沈査からの Chlamydia 抗原検出——. 西日泌尿, 53, 30-34, 1991.
7. 齊藤十一, 他：PCR 法による Chlamydia trachomatis の検出と型別診断. 日本臨床, 50 (特別号), 412-417, 1992.
8. 出口 隆, 他：Polymerase chain reaction 法による Chlamydia trachomatis 検出の基礎的検討. 感染症誌, 65, 1183-1187, 1991.
9. 出口 隆, 他：男子尿道炎患者からの Chlamydia trachomatis 検出における polymerase chain reaction 法と酵素抗体法 (ChlamydiazymeTM) との比較. 感染症誌, 66, 172-175, 1992.
10. 田中正利, 他：性感染症の臨床的検討. 西日泌尿, 53, 1222-1227, 1991.
11. 守殿貞夫, 他：兵庫県下におけるクラミジア感染症および淋疾の実態とその対策に関する調査研究(2)男子尿道炎の臨床的検討——1次および3次医療機関における集計成績——. 神緑会誌, 8, 16-22, 1992.