

クラミジアおよび淋菌感染症スクリーニング 検査におけるプーリング法の検討

高野 弘 紀*, 伊 瀬 郁*, 柳 川 義 勢*

Examination of Pooling Method in Screening Test for Genital Chlamydial Infection and Gonococcal Infection

Hiroki TAKANO*, Iku ISE* and Yoshitoki YANAGAWA*

Keywords : 性器クラミジア感染症 genital chlamydial infection, 淋菌感染症 gonococcal infection, プーリング法 pooling method, リガーゼ連鎖反応 ligase chain reaction

緒 言

Chlamydia trachomatis (以下 CT と略す) によって引き起こされるクラミジア性感染症は、本邦で最も罹患率が高い性感染症である。本疾患は女性の罹患率が高く、特に、20代前半の若年層においては顕著にその傾向を示している。さらに、女性罹患者の 7~8 割が無症状で経過しているため、最近の性行為低年齢化により広く蔓延していく可能性がある¹⁾。

また、*Neisseria gonorrhoeae* (以下 NG と略す) によって引き起こされる淋菌感染症は、耐性菌の増加と再流行の兆しを見せており重視すべき疾患である²⁾。さらに最近の疫学的調査より CT, NG の感染者は Human immunodeficiency virus (以下 HIV と略す) の感染を受けやすいことが指摘されており³⁾、淋菌・クラミジア検査の実施は患者の早期治療ばかりでなく、性感染症の蔓延防止対策においてもきわめて重要である。

クラミジアや淋菌の検査は従来の組織培養法あるいは細菌学的検査法から、短時間で検出率の高いエンザイムイムノアッセイ法や、核酸増幅検査法がキット化され普及している。我々は核酸増幅法の中でも熊澤ら⁴⁾がその有用性を報告している Ligase Chain Reaction 法 (以下 LCR 法と略す) による検査法を導入し、検査検体の増加に対して迅速に対応している。しかし、核酸増幅検査法は従来の検査法と比較して特異性が高く、高感度である反面、費用がかかることが欠点である。そこで、多数の検体を迅速に処理していくことを目的に、複数の検体をプールして核酸増幅を行うプーリング法が試みられている⁵⁾。しかし、尿検体を用いてプーリング法を行う場合、尿検体中には核酸増幅を阻害する物質が多く存在するため、十分な検討が必要である。このようなことから検査の迅速化と検査コストの低減化を計る検査法の確立を目的に、子宮頸管ふきとり検体 (以下スワブ検体と略す) と尿検体を用いて LCR 法におけるプーリング法を試行し、通常の方法との比較検討を

行ったので報告する。

材料と方法

1. 検査材料

1) スワブ検体: 2001 年 12 月~2002 年 6 月までにサーベイランス定点医院より淋菌およびクラミジア核酸同定検査依頼のあったスワブ検体 255 検体 (淋菌陽性検体: 7 検体, クラミジア陽性検体: 36 検体) を使用した。

2) 尿検体: 2002 年 6 月に特別区保健所より淋菌核酸同定検査依頼のあった尿検体から無作為に選んだ 100 検体 (淋菌陽性検体: 4 検体, クラミジア陽性検体: 8 検体) を使用した。

2. 検体処理

スワブ検体、尿検体の検体処理法は、基本的に LCR 法キットの処理法に従って行った。その手順は図 1 に示した。

1) スワブ検体の処理手順: 検体を採取した綿棒を LCR 法キット専用のトランスポートチューブ (ダイナボット社) に入れて密封し、97 (±2) に 15 分間加熱後、室温で 15 分間放冷した。放冷後、チューブの内壁に綿棒を押し当てて、綿棒に付着した検体液を絞り出し、綿棒とキャップを捨て、新しいキャップで密封して処理済み検体とした。

2) 尿検体の処理手順: 尿 1.0 mL を滅菌チューブに採り、15,000 rpm, 15 分間遠心後上清を捨て、キットについている尿検体処理液を 1.0 mL 加え 97 (±2), 15 分間加熱後、室温で 15 分間放冷した。放冷後 10~15 秒遠心し、処理済み検体とした。なお、スワブ処理済み検体は、通常の検査を実施し、残りをプーリング法検討試料とするため -40℃ で凍結保存した。また、尿処理済み検体はプーリング法検討試料とせず、新たにプーリング法検討試料を調整するまで、尿検体を -40℃ で凍結保存した。

* 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

* Tokyo Metropolitan Institute of Public Health

3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0023 Japan

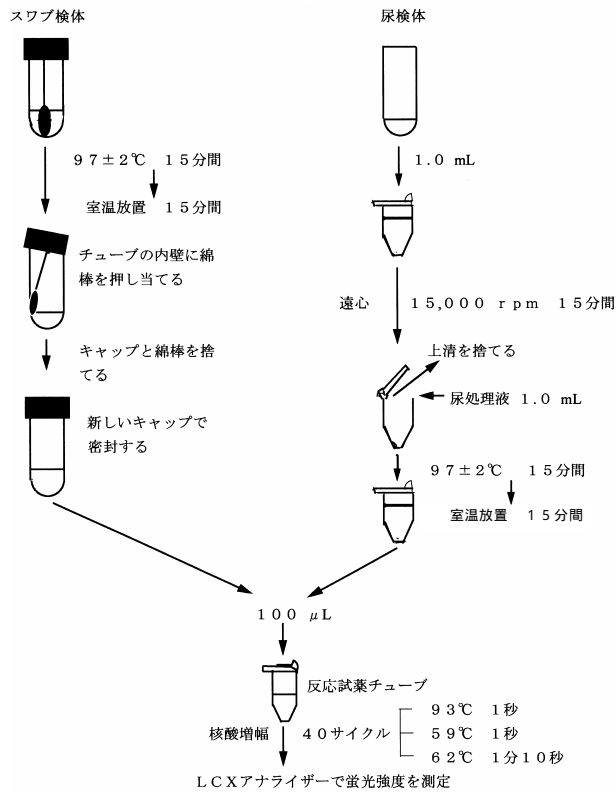


図1 . ルーチン法による尿検体、スワブ検体の処理法

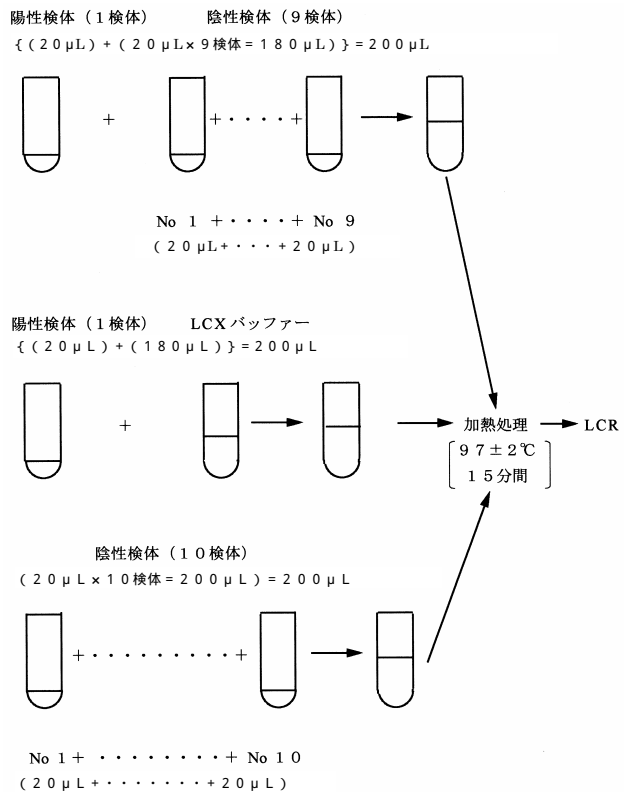


図2 . スワブ検体の10倍プーリング法手順

3 . プーリング法

1) スワブ検体プーリング法

10倍プーリング法では、通常の検査において淋菌核酸同定またはクラミジア核酸同定で陽性と判定されたスワブ処理済み検体1検体20 µLと陰性と判定されたスワブ処理済み検体9検体を各20 µLずつ混合し、全容量が200 µLになるように調整した。また、対照として陰性検体の影響を調べるために、同一の陽性スワブ処理済み検体1検体20 µLとLCX専用スワブ検体用バッファ-180 µLを混合したもの、および陰性スワブ処理済み検体10検体の各20 µLずつを混合したものを準備した。各試料は97 (±2) , 15分間再加熱処理を行ってからLCR検査を実施した(図2)。

20倍プーリング法では、10倍プーリング法と同様に通常の検査において淋菌核酸同定またはクラミジア核酸同定で陽性と判定されたスワブ処理済み検体1検体10 µLと陰性と判定されたスワブ処理済み検体19検体を各10 µLずつ混合し、全容量が200 µLになるように調整した。対照検体についても同様の割合で混合し、検査試料とした(図3)。

2) 尿検体プーリング法

10倍プーリング法では、通常の検査において淋菌核酸同定またはクラミジア核酸同定で陽性と判定された尿1検体100 µLと陰性と判定された尿9検体を各100 µLずつを混合し、全容量が1.0 mLになるように調整した。また、対照として同一の陽性尿1検体100 µLとLCX専用スワ

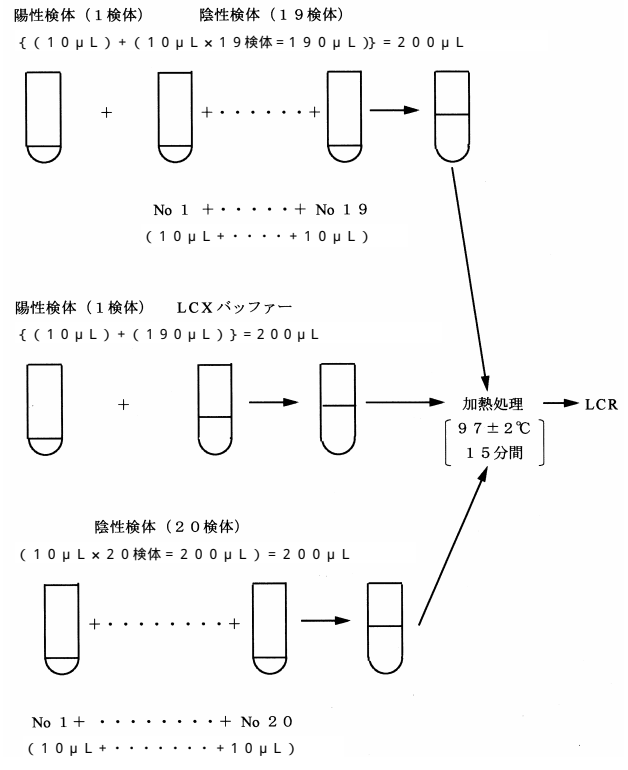


図3 . スワブ検体の20倍プーリング法手順

ブ検体用バッファ-900 µLを混合したもの、および陰性尿検体10検体を各100 µLずつを混合したものを準備した。各試料は前述した方法と同様に処理し、LCR検査を実施した(図4)。

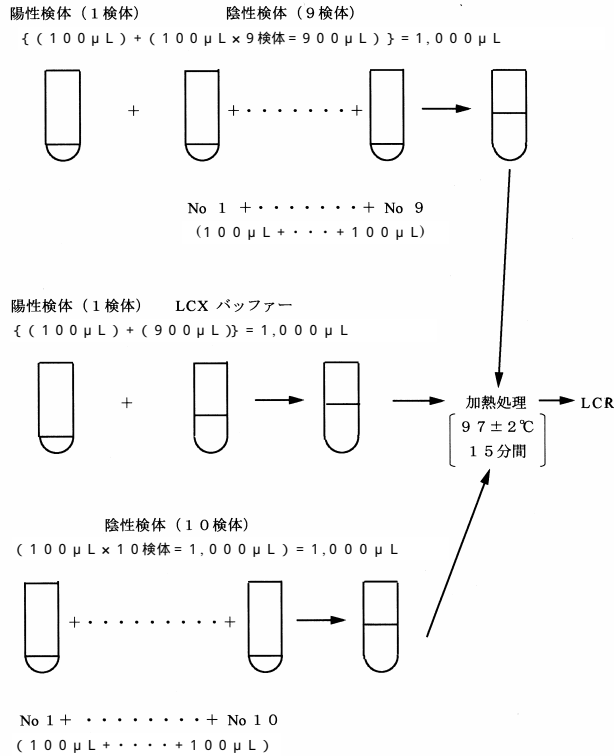


図 4 . 尿検体の 10 倍プーリング法手順

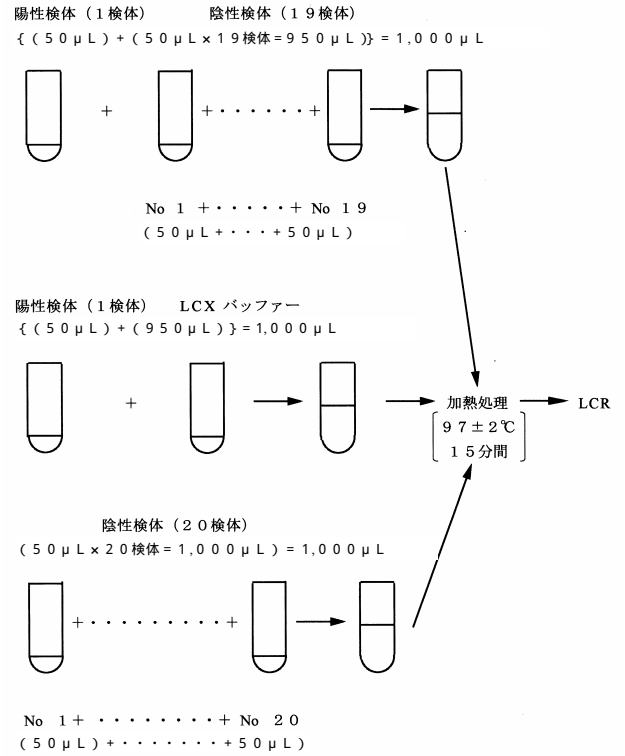


図 5 . 尿検体の 20 倍プーリング法手順

20 倍プーリング法では、10 倍プーリング法と同様に通常の検査において淋菌核酸同定またはクラミジア核酸同定で陽性と判定された尿 1 検体 50 μL と、陰性と判定された尿 19 検体を各 50 μL づつを混合し、全容量が 1.0 mL になるように調整した。また、対照検体についても同様の割合で混合し、試料とした (図 5)。

4 . 測定

測定は LCX アナライザー (ダイナボット社) を用い、専用反応チューブに陰性コントロール、陽性コントロールおよび処理済み検体をそれぞれ、100 μL 入れて実施し蛍光強度の計測によって行った。

結 果

プーリング法に用いた検体の常法による検査成績を表 1 に示した。スワブ検体において淋菌陽性検体数は 255 検体中 7 検体 (2.7%)、クラミジア陽性検体数は 36 検体 (14.1%) であった。尿検体では淋菌陽性検体数は 100 検体中 4 検体 (4.0%)、クラミジア陽性検体数は 8 検体 (8.0%) であった。

陽性を示した検体を用いてプーリング法検討試料を作成し、実施した成績を表 2 と表 3 に示す。スワブ検体のプーリング法の結果は、淋菌陽性検体において 10 倍プーリング法、20 倍プーリング法とも 7 検体中 1 検体 (同一検体) が陰性に転化した。また、クラミジア陽性検体において 10 倍プーリング法、20 倍プーリング法とも 36 検体中 1 検体 (同一検体) が陰性に転化した。淋菌およびクラミジア陰性対照としての 10 倍プーリング法、20 倍プーリング法は

ともに陰性であり、陰性検体およびバッファーの淋菌、クラミジア核酸同定に与える影響はなかった。これは尿検体においても同様であった。尿検体のプーリング法の結果は、淋菌陽性検体において 10 倍プーリング法、20 倍プーリング法とも 4 検体中 1 検体が陰性に転化した。クラミジア核酸同定のプーリング法結果は 10 倍、20 倍とも供試した 8 検体すべてが陽性となり通常法と一致した。

考 察

多量の検体をプールしてスクリーニング検査を行い、陽性となったプール検体を改めて個別に実施するプーリング法は、Emmanuel⁶⁾らがプールした血清から HIV 抗体を検出するために行った。その後、HIV だけでなく他の血清中ウイルスの核酸増幅も行いその有用性が認められた。一方、Katherin⁷⁾らはクラミジアの核酸増幅を LCR 法を用いて尿を対象に 4 倍法、10 倍法でプーリング法を行い良好な結果を得ている。さらに、Katherinらは、有病率 (1~10%) とプーリング法 (2~10 倍) による検査コストも併せて試算を行い、有病率が 1% と低い場合 10 倍プーリング法を行うと 70~80% のコスト削減が期待できると報告している。一方、Kapala⁸⁾スワブ検体を 4 倍法、8 倍法で行い同様な結果を得ているがプール検体数が、多くなるほど感度は低下する傾向があると報告している。我々はスワブ検体と尿検体を用い、さらにプールする検体数を多くして 10 倍法、20 倍法によるプーリング法を行い、その有用性を検討した。その結果スワブ検体において、淋菌では例数は少ないがクラミジアと同様に感度・特異性とも良好な

表 1 . 調査対象とした検体の通常法における成績

	淋菌			クラミジア	
	検体数	陽性検体数 (%)	蛍光強度	陽性検体数 (%)	蛍光強度
スワブ検体	255	7 (2.7)	1176.1 ± 202.2	36 (14.1)	2396.4 ± 282.1
尿検体	100	4 (4.0)	1576.9 ± 192.0	8 (8.0)	2013.8 ± 352.4

: 平均値 ± 標準偏差

表 2 . スワブ検体を用いた淋菌、クラミジアのプーリング法の結果

	淋菌			クラミジア		
	実施検査数	陽性数	蛍光強度 §	実施検査数	陽性数	蛍光強度 §
10倍プーリング法						
陽性 + 陰性 ^a	7	6	1106.1 ± 172.3	36	35	2298.4 ± 182.4
陽性 + 緩衝液 ^b	7	6	1098.6 ± 182.5	36	35	2218.7 ± 122.7
陰性対照 ^c	20	0	121.3 ± 72.9	20	0	215.2 ± 66.1
20倍プーリング法						
陽性 + 陰性 ^d	7	6	1086.7 ± 122.3	36	35	2148.9 ± 129.4
陽性 + 緩衝液 ^e	7	6	1016.5 ± 152.0	36	35	2098.0 ± 182.3
陰性対照 ^f	10	0	101.5 ± 79.1	10	0	151.1 ± 76.5

a : 陽性検体1検体 (20 µL) + 陰性検体9検体 (180 µL)

b : 陽性検体1検体 (20 µL) + L C X 専用スワブ検体用バッファー (180 µL)

c : 陰性検体10検体 (200 µL)

d : 陽性検体1検体 (10 µL) + 陰性検体9検体 (190 µL)

e : 陽性検体1検体 (10 µL) + L C X 専用スワブ検体用バッファー (190 µL)

f : 陰性検体20検体 (200 µL)

g : 平均値 ± 標準偏差

表 3 . 尿検体を用いた淋菌、クラミジアのプーリング法の結果

	淋菌			クラミジア		
	実施検査数	陽性数	蛍光強度 §	実施検査数	陽性数	蛍光強度 §
10倍プーリング法						
陽性 + 陰性 ^a	4	3	1206.8 ± 122.8	8	8	2298.4 ± 182.0
陽性 + 緩衝液 ^b	4	3	1136.6 ± 102.5	8	8	2190.5 ± 112.3
陰性対照 ^c	10	0	134.1 ± 67.0	10	0	172.0 ± 62.2
20倍プーリング法						
陽性 + 陰性 ^d	4	3	1097.5 ± 108.7	8	8	2198.4 ± 213.7
陽性 + 緩衝液 ^e	4	3	1037.4 ± 123.4	8	8	2091.3 ± 163.9
陰性対照 ^f	5	0	77.8 ± 51.4	5	0	185.8 ± 61.4

a : 陽性検体1検体 (100 µL) + 陰性検体9検体 (900 µL)

b : 陽性検体1検体 (100 µL) + L C X 専用スワブ検体用バッファー (900 µL)

c : 陰性検体10検体 (1000 µL)

d : 陽性検体1検体 (50 µL) + 陰性検体19検体 (950 µL)

e : 陽性検体1検体 (50 µL) + L C X 専用スワブ検体用バッファー (950 µL)

f : 陰性検体20検体 (1000 µL)

g : 平均値 ± 標準偏差

な結果を得た。なお、淋菌陽性検体が陰性に転化した検体はプーリング法実施までの保存期間が - 40 で 84 日間であった。本検体はルーチン検査当日の蛍光強度数が 296.5 (カットオフ値 202.2) と低値であり、血液混入が認められた検体であったため、当初は血液混入による阻害と思われた。しかし、プーリング法を行うことにより検体は希釈されるため血液による阻害とは考えにくい。また、クラミ

ジア陽性検体が陰性に転化した検体は (保存期間, - 40 で 68 日間), ルーチン検査当日において血液混入は認められなかったが、蛍光強度数は 868.5 (カットオフ値 670.9) であった。一方、尿検体において淋菌陽性検体が陰性に転化した検体は (保存期間, - 40 で 62 日間), ルーチン検査当日の蛍光強度数が 529.5 (カットオフ値 202.2) の検体であった。LCR 試薬キットは、淋菌においては opa gene

に特異的な DNA の一部が、クラミジアにおいては cryptic plasmid に特異的な DNA の一部が増幅されていれば、原法、10 倍法、20 倍法とも蛍光強度数が淋菌の場合 1,200 以上、クラミジアの場合 2,000 以上を示す。しかし、凍結融解を繰り返した検体は、蛍光強度数が低下する傾向がある。特に、検体中に血液混入や他の核酸増幅阻害物質が存在し、カットオフ値に近い低蛍光強度数を示した陽性検体では、長期の凍結保存後に、再融解することで陰性化する可能性が示唆された。一般的に、LCR 法は他の核酸増幅法である Polymerase Chain Reaction 法と同様に核酸増幅を阻害する物質が確認されている。特に、尿は侵襲性が少なく多量に採取できる反面、核酸増幅阻害物質が多種類存在し、偽陰性の原因となりやすい。その原因物質として a) 健康成人が尿中に排泄する塩類化合物・イオン類⁹⁾、b) 生理的、病的、または人為的、機械的傷害により排泄される血液¹⁰⁾、c) 女性尿、特に妊娠時に多量に排泄する女性ホルモン等¹¹⁾がある。さらに今回使用した LCR 法による核酸増幅法キットで注意しなければならない物質としてリン酸塩がある。Notomi¹²⁾らが本法を用いてクラミジア培養細胞で行った実験では、リン酸塩 (KH₂PO₄, Na₂HPO₄·12H₂O) を最終濃度 1.2 mmol/L と 6.0 mmol/L に調整して核酸増幅前と増幅後に添加した場合、増幅前に添加した検体がすべて陰性となったと報告している。著者も陽性検体 (淋菌 5 検体、クラミジア 15 検体) を用いて行った予備的な実験で同様な結果を得ている。このように、リン酸塩は LCR 法による核酸増幅を阻害するため、リン酸塩を含有している検体希釈液あるいは保存液の使用はもちろん、健康成人尿でも多量のリン酸塩が尿中に排泄されている可能性があり、十分な注意が必要である。また、健康成人でも尿結晶が多量に排泄された尿検体では、冷凍保存する段階で結晶が析出し、尿を加温処理しても溶解できない。特に、遠心沈渣を使用する本検査においては、不溶解の結晶が核酸を取り込んでしまう恐れがある。これらの尿結晶は尿の僅かな pH 変動においても結晶の溶解度が大きく異なるため LCR 法ばかりでなく、今後、尿を用いての核酸増幅検査では、さらなる検討が必要である。

ま と め

- 1) 尿検体とスワブ検体を用いたプーリング法を 10 倍法、20 倍法で調整した試料において LCR 法による淋菌とクラミジア核酸増幅検査を実施した。その結果、スワブ検体、尿検体とも、微量・迅速で多量の検体処理が可能でありコストダウンが期待できた。しかし、尿検体を用いたプーリング法では、核酸増幅を阻害する物質に注意する必要がある。今後、尿プーリング法の有用性を高めるための検討を進める必要がある。
- 2) 今回検討したプーリング法で陰性化したスワブ検体は、淋菌、クラミジア用の両検体ともプーリング法を実施するまでに保存期間が 60 日間を経過したことが原因であると判断され、プーリング法も検体搬入後迅速に行うべきであると考えられた。

文 献

- 1) 熊本悦明：日本性感染症学会誌，**13**，14-17，2002。
- 2) 熊本悦明，塚本泰司，利部輝雄，他：日本性感染症学会誌，**12**，42-45，2001。
- 3) 熊本悦明：アニムス，**6**，33-38，2001。
- 4) 熊澤浄一，松本哲朗，佐久本操：西日本泌尿器学会誌，**58**，600-610，1996。
- 5) Garcia, Z. Taylor, L. Ruano, A., et al.: *J. Med. Virol.* **49** (3), 218-222, 1998。
- 6) Emmanuel, J C. Bassett, M T. Smith, H J, et al.: *J. Clin. Pathol.* **41** (5), 582-585, 1988。
- 7) Katherin, A. Kacena, Sean, B., et al.: *J. Clin. Microbiol.* **36**, 481-485, 1998。
- 8) J. Kapala., D. Copes., A. Sporoston., et al.: *J. Clin. Microbiol.* **38**, 2449-2452, 2000。
- 9) 納富 貴，池田百合香，岡留 綾，他：日本性感染症学会誌，**8**，17-25，1997。
- 10) 田中正利，熊澤浄一：臨床と微生物 **26**(増)，618-621，1999。
- 11) J. Mahony., S. Chong., D. Jang., : *J. Clin. Microbiolol.* **36**, 3122-3126, 1998。
- 12) T. Notomi., Y. Ikeda., A. Okadome., et al.: *J. Clin. Pathol.* **51**, 306-308, 1988。