

○ 臨床検査アップデート76 ○ Up date

Chlamydia pneumoniaeの検査診断

みやした なお ゆき お がた まこと ふく だ なお き や むら あき ひさ
 宮下 修行*:尾形 誠:福田直樹:矢村明久
 Naoyuki MIYASHITA Makoto OGATA Naoki FUKUDA Akihisa YAMURA

はじめに

本邦における抗 *Chlamydia pneumoniae* 抗体保有率は、4歳までは低く、幼稚園、小・中・高校生時に急激に上昇して、健常成人で約60～70%に至る(図1)¹⁾。このように感染機会が多いにもかかわらず、そのほとんどが不顕性感染であり、顕性感染であっても感冒様症状にとどまることが多い。このため抗菌薬が投与されない症例が多く、小集団内で蔓延することが大きな特徴とされている。流行事例は家族内や保育園、幼稚園、小学校、中学校、軍隊などさまざまな施設で報告されているが、レジオネラやインフルエンザなどの集団感染事例とは異なり軽症が多いため、あまり社会的な問題とはならない。

呼吸器感染症の病型としては肺炎をきたすことが多いとされていたが、集団感染事例をみても上気道炎を起こすことが最も多い。すなわち上気道主体の炎症で、咽頭炎、扁桃炎、副鼻腔炎、中耳炎、喘息発作やCOPDの増悪などが報告されている^{2,3)}。市中肺炎の重症度は超軽症例が多く、胸部単純X線写真では検出困難な場合が多い。

I. クラミジア菌体とその特徴

クラミジアは他の微生物には見られない独特のライフサイクルを有しており、菌形態の変換を通じて宿主細胞質に形成される膜胞-封入体内で宿主ATPに依存して増殖する⁴⁾。すなわち、感染性ではあるが代謝は休眠状態にある基本小体(EB)の吸着

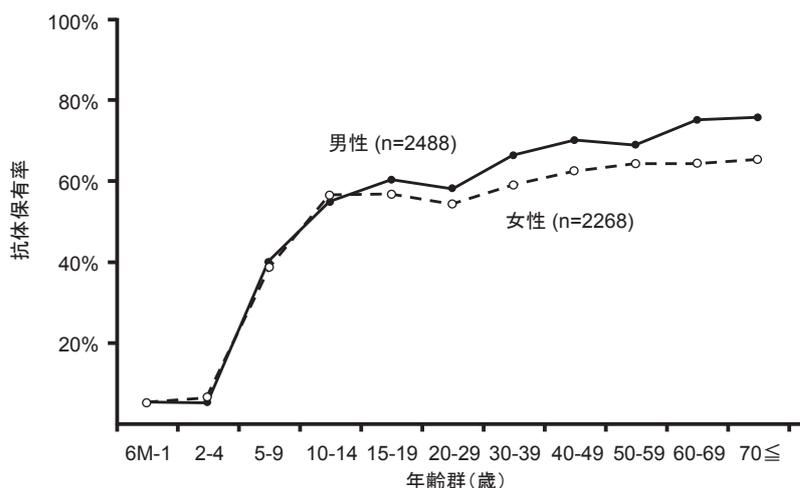


図1 年齢別抗 *Chlamydia pneumoniae* 抗体保有率

抗肺炎クラミジア抗体保有率は、4歳までは低く、幼稚園、小・中・高校生時に急激に上昇して、健常成人で約60～70%に至る。(文献1)より転載)

関西医科大学 内科学第一講座
 呼吸器感染症・アレルギー科 教授*
 ☎573-1010 大阪府枚方市新町2-3-1

First Department of Internal Medicine, Division of Respiratory Medicine,
 Infectious Disease and Allergy, Kansai Medical University
 (2-3-1 Shinmachi, Hirakata city, Osaka)

(図 2A)・侵入(図 2B)、移行体(IF)を経て(図 2C)、旺盛な代謝活性を發揮して分裂増殖する網様体(RB)への変換、封入体の形成(図 2D)、RBからEBへの成熟変換、宿主細胞死による増殖菌体の放出という一連の増殖サイクルである。各菌体の同調性は低く、感染末期には封入体内に3つの菌体が存在する(図 2D)。したがって、クラミジア感染症の診断には臨床検体中に存在する菌体あるいは菌体構成成分や遺伝子を直接証明するか、菌体の属特異的または種特異的な抗原に対する特異抗体を検出することが必要となる(表 1)。

現在、多種類の抗体価測定法が存在するが、使用

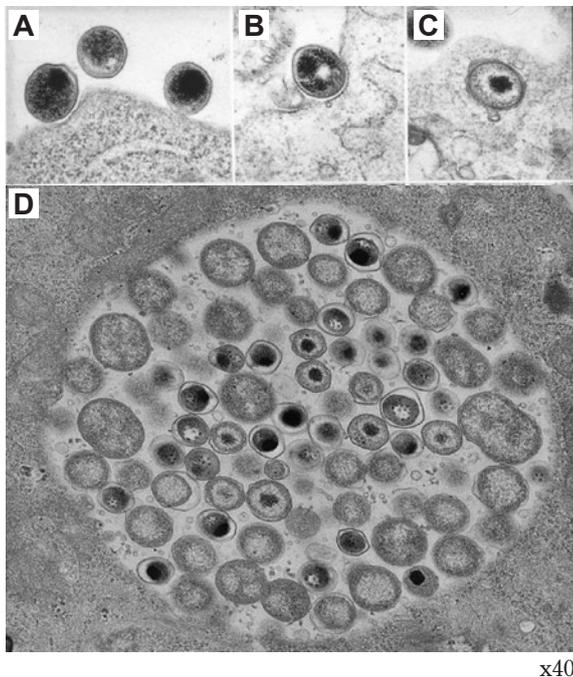


図 2 *Chlamydia pneumoniae* 基本小体(EB)の侵入と菌体変換

A. 感染と吸着、B. 貪食、C. 移行体への変換、D. 封入体の形成

表 1 クラミジア検査法の種類と特徴

分離培養法	手技が煩雑で長時間を必要とする 特殊な設備と技術が必要とする
直接蛍光抗体法	簡便で迅速 菌体の判別に熟練を必要とする
酵素抗体法	客観的で多数の検体を処理できる 感度が低く種の鑑別ができない
遺伝子検出法	感度・特異度ともに最も優れている 市販キットはクラミジア・トラコマチスのみ 死菌も検出するため治癒の判定は困難
抗体価測定法	ベア血清が必要で診断に長期間を必要とする IgM抗体は急性感染の指標であるが病早期 (1週間以内)には上昇しない

抗原の種類が結果を解釈する上で重要となる。すなわち、3種類の菌体のどの粒子を使用するか、またどの菌体構成成分を使用するかで測定値が大きく異なる。例えばEBは種特異抗原を多く含み、反対にRBは属特異抗原を多く含むことから、EBを抗原とした場合にはクラミジア種間の交差反応を低くして種の鑑別が可能となり、RBを抗原とした場合は感度が高くなる。

II. 分離培養法

感染症診断の基本は病巣部からの原因微生物の培養であり、菌体の性状解析や薬剤感受性を知る目的から必要不可欠とされている(図 3)。クラミジアは偏性細胞内寄生性であるため、分離培養には感受性細胞を必要とし、感染効率を上げるために遠心吸着法が用いられている。しかし、*C. pneumoniae*の培養は極めて困難であり、設備や技術、時間を必要とすることから一般の検査室では実施されていない。

III. 直接蛍光抗体法

直接蛍光抗体法は、検体採取後にエタノール固定と蛍光染色を行うのみで、グラム染色よりも簡便な方法といえる。急性呼吸器感染症患者検体を用いた場合、陽性率は直接蛍光抗体法で最も高く、培養陽性検体はすべて本法でも陽性と高い一致率をみた⁵⁾。しかし、陽性検体中3検体は他の方法で陰性、確認のため施行したPCR法でも陰性だったことから、これらの検体は直接蛍光抗体法の偽陽性と考えられた。これらの結果から直接蛍光抗体法は、簡便かつ

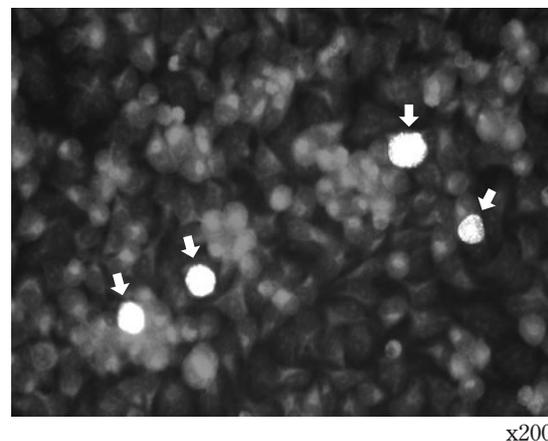


図 3 *Chlamydia pneumoniae* 封入体の蛍光染色像(矢印)

迅速である点で他の検査法より優れた検査法と位置づけられるが一般的に普及していない。その大きな理由は判定が主観的であり、菌体を非特異的な発色と区別するのに熟練を要すること、一度に多数の検体を処理できない点にある。

市中肺炎におけるグラム染色の判定は評価者によって左右される。クラミジアは細菌よりはるかに小さな菌体 (0.3 μm) であることを考慮すると、実地医療での直接蛍光抗体法の判定は困難といえる。

IV. 遺伝子検出法

1. LAMP 法を原理とした新規肺炎クラミジア検出試薬

クラミジアは分離培養が困難で抗体価上昇に長時間を必要とすることから、遺伝子検出キットが多数開発され臨床診断に応用されている (主に *Chlamydia trachomatis*)。最近、鼻咽頭拭い液または喀痰を用いた核酸増幅法である LAMP 法を原理とした *C. pneumoniae* DNA 検出試薬、全自動核酸検査装置、Simprova 呼吸器感染症パネル CP (栄研化学株式会社) が保険

収載された⁶⁾。LAMP 法検査には QIAamp DNA Mini Kit を用いた核酸抽出 (用手核酸抽出法) と全自動核酸抽出法それぞれを用いて実施しているが、用手核酸抽出法と全自動核酸抽出法の一致率は、鼻咽頭拭い液で 98.3% (225/229)、喀痰で 98.1% (51/52) と良好であった⁶⁾。以下、用手核酸抽出法のデータのみを示す。

①前向き研究

13 施設の医療機関において、*C. pneumoniae* 感染症あるいはその疑いである患者 230 例を対象に、用手核酸抽出法と PCR 法の比較検討が行われた⁶⁾。鼻咽頭拭い液での PCR 法との陽性一致率は 100% (3/3)、陰性一致率は 98.7% (224/227)、全体一致率は 98.7% (227/230) であった。喀痰の場合 (52 例) は PCR 法との陽性一致率は 100% (2/2)、陰性一致率は 98.0% (49/50)、全体一致率は 98.1% (51/52) であった。また、不一致例は、**図 4** に示すとおり鼻咽頭拭い液では 3 例あり、喀痰では 1 例あった。これらは全て LAMP 法検査陽性、PCR 法陰性であった。

②後ろ向き研究 (検体種は鼻咽頭拭い液のみ)

非定型の病原体感染が疑われた肺炎症状または気管支炎が認められた患者において、*C. pneumoniae*

本製品の判定結果と確定診断との相関性(鼻咽頭拭い液)

		本製品					
		用手核酸抽出			全自動抽出		
		+	-	計	+	-	計
確定診断	+	36	19	55	38	17	55
	-	1	234	235	0	234	234
	計	37	253	290	38	251	289

陽性一致率：65.5% 陽性一致率：69.1%
陰性一致率：99.6% 陰性一致率：100%
全体一致率：93.1% 全体一致率：94.1%

本製品と PCR 法との相関性(鼻咽頭拭い液)

		本製品					
		用手核酸抽出			全自動抽出		
		+	-	計	+	-	計
PCR 法	+	29	1	30	29	1	30
	-	8	252	260	9	250	259
	計	37	253	290	38	251	289

陽性一致率：96.7% 陽性一致率：96.7%
陰性一致率：96.9% 陰性一致率：96.5%
全体一致率：96.9% 全体一致率：96.5%

本製品の判定結果と確定診断との相関性(喀痰)

		本製品					
		用手核酸抽出			全自動抽出		
		+	-	計	+	-	計
確定診断	+	2	0	2	2	0	2
	-	1	49	50	0	50	50
	計	3	49	52	2	50	52

陽性一致率：100% 陽性一致率：100%
陰性一致率：98.0% 陰性一致率：100%
全体一致率：98.1% 全体一致率：100%

本製品と PCR 法との相関性(喀痰)

		本製品					
		用手核酸抽出			全自動抽出		
		+	-	計	+	-	計
PCR 法	+	2	0	2	2	0	2
	-	1	49	50	0	50	50
	計	3	49	52	2	50	52

陽性一致率：100% 陽性一致率：100%
陰性一致率：98.0% 陰性一致率：100%
全体一致率：98.1% 全体一致率：100%

図 4 *Chlamydia pneumoniae* 検出用 LAMP 法臨床性能試験結果

前向き研究における鼻咽頭拭い液と喀痰での PCR 法と LAMP 法検査結果の一致性成績、および後ろ向き研究における PCR 法と LAMP 法検査結果の一致性成績を合算したデータ。

(文献 6) を参考に作成)

検出の PCR 法が川崎医科大学附属病院にて実施され、陽性・陰性判定がなされている検査残余保存検体（鼻咽頭拭い液の懸濁液）60 検体を用いた。PCR 法との陽性一致率は 96.3% (26/27)、陰性一致率は 84.8% (28/33)、全体一致率は 90.0% (54/60) であった。不一致例は 6 例あり、LAMP 法検査陰性、PCR 法陽性が 1 例、LAMP 法検査陽性、PCR 法陰性が 5 例であった。

③前向き研究と後ろ向き研究のまとめ

前向き研究における鼻咽頭拭い液と喀痰での PCR 法と LAMP 法検査結果の一致性成績、および後ろ向き研究における PCR 法と LAMP 法検査結果の一致性成績を合算したデータを図 4 にまとめた。鼻咽頭拭い液での PCR 法との陽性一致率は 96.7% (29/30)、陰性一致率は 96.9% (252/260)、全体一致率は 96.9% (281/290) であった。喀痰での PCR 法との陽性一致率は 100% (2/2)、陰性一致率は 98.0% (49/50)、全体一致率は 98.1% (51/52) であった。

2. PCR 法の問題点と限界

C. pneumoniae を検出する PCR 法として、CDC は 4 つのプライマーを推奨し、多くの研究施設で臨床診断に応用されている⁷⁾。しかし、報告者によってデータに大きな違いがみられ、その原因にアッセイ系や使用プライマーの違いが推測されていた。われわれはこれらの事実を明らかにするため肺炎クラミジア種特異的外膜蛋白を決定し、この蛋白内に設定したプライマーを使用して、CDC の推奨する 4 つの PCR 法と比較検討した⁸⁾。精製 EB を用いた最小検出限界個数の検討では検査間で有意な差がみられ、最も感度の優れた方法と最も感度の劣る方法の間では 100 倍以上の差がみられた。再現性に関する検討では、100% の再現性を得る最も優れた方法と最も劣る方法の間で 100 倍以上の差がみられ、また 100% の再現性を得るためには、少なくとも 10^3 個以上の EB 菌体が必要となることが判明した。実際の臨床検体中には菌体数が少なく、かつ阻害物質も含まれていることから、臨床検体を用いた検討では *in vitro* の結果よりも検査間で検出率に大きな差がみられることが予測された。結果は予測を上回り、2 つの検査法では肺炎クラミジアを検出できなかったのに対し、われわれの方法では 23% と高率に検出することが出来た⁸⁾。すなわち臨床検体を用いた

場合、検査間で大きな差があり、報告者によるデータの違いがアッセイ系や使用プライマーの違いに大きく関与していると証明された。

V. 抗体価測定法

1. 検査法の種類と特徴

抗体検査法は、その測定方法から間接蛍光抗体法、補体結合反応 (CF, complement fixation) および酵素抗体法 (EIA, enzyme immunoassay; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay) に大別されており、使用抗原も各々の検査法で異なる。このうち世界の疫学調査に広く用いられ、世界共通の検査法として使用されているものは間接蛍光抗体法の micro-immunofluorescence (MIF) 法と CF 法である⁷⁾。

MIF 法は抗原に精製 EB を使用しており、種特異性が高く最も優れた抗体価測定法とされ、唯一世界で推奨されている検査法である⁷⁾。ただし、抗原の準備や手技の煩雑さから研究室レベルでしか行われていないのが現状である。一方、CF 法は一般にオウム病の血清診断に用いられるが、抗原に LPS を使用しているためクラミジア属共通の抗体を検出する。したがって種の鑑別は不可能で *C. pneumoniae* 確立以前には、オウム病と診断されていた多くの症例が *C. pneumoniae* 感染症であったことも判明した。現在、CF 法はオウム病の診断より *C. pneumoniae* 感染症のスクリーニングとして使用されている。

2. 使用抗原による反応の相違

市販の EIA と ELISA キットには精製菌体、精製外膜複合体、リコンビナント LPS などを抗原としたものがある。しかし、これらの抗体検査法を同時に使用した場合、その陽性と陰性一致率は低く、また感染症の病態によっても一致率が異なる^{9,10)}。例えば、*C. pneumoniae* が生体に感染した場合、どの抗原に対する抗体を産生したか免疫ブロット法で容易に判る（ただし、免疫ブロットでは判定出来ない免疫原性の強い蛋白の存在も明らかとなっている）。感染患者血清の反応性をみると、98, 53, 46, 43 KDa 蛋白が *C. pneumoniae* 特異的であるが、MOMP, 73, 60 KDa 蛋白は属特異性を示す¹⁵⁾。興味あることに、MOMP は外膜に多量に存在するが免疫原性は弱く、

これに対して 60 KDa 蛋白は量的に少ないものの免疫原性は強い蛋白である。免疫原性の強い抗原を使用することが高感度の検査方法といえるが、その反応性は病相によって異なる。抗体検査法には多くの種類があり、使用抗原が検査法により異なることから検査間で反応値に違いが生じる。このことは実際の臨床研究で検証されている^{9,10)}。

3. IgM 抗体の有用性と問題点

C. *pneumoniae* 感染例の抗体価の推移を図 5 に示した¹²⁾。IgG 抗体を C. *pneumoniae* 感染症診断の指標とした場合、ペア血清採取の間隔は少なくとも 4 週間以上、ときに 8 週間が必要となり、しばしば長期間の経過観察が困難である⁷⁾。これに対し IgM 抗体は病初期に検出されることから、初感染例の診断には有用である¹²⁾。ただし、症状発現後 10 日以内では抗体が産生されないことが多く、迅速診断としての有用性は乏しい。さらに、再感染では IgM は上昇しない場合があり、小児や若年成人での診断的有用性はあると考えられるが、再感染例の多い高齢者では有用性が低いと考えられる。また、IgM 抗体が 16 倍の低抗体価保有者も多数存在することから、単一血清での低抗体価をみた場合には再検査が必要となる。本邦では精製外膜複合体を抗原に用いた ELISA 法 (ヒタザイム) が広く普及した。

4. ELISA 法の問題点

市販されている IgM 検出用診断キットはいずれも使用菌体が異なるため、陽性基準も異なり、基準

値の設定によって感度と特異度が異なる⁹⁾。つまり陽性基準値が高いと感度は低くなるものの特異度は高く、逆に陽性基準値が低いと感度は高くなるが偽陽性が生じる可能性がある。当初から多くの施設において、ヒタザイム法の IgM 抗体は偽陽性例が多く、陽性例の解釈について問題があった^{13,14)}。

ヒタザイム法 IgM の診断基準の見直しを行う目的で、急性呼吸器感染症状のない無症候者を対象に IgM 抗体を測定し、分離培養法と MIF 法で比較検討した。その結果、ヒタザイム法で反応値が 1.6 以上の陽性例は 16.5% に対し、MIF 法で 32 倍以上の陽性例や分離培養陽性例はみられなかった (図 6)¹³⁾。さらに、小児と成人の急性呼吸器感染症患者を対象に同様の検討を行い、ヒタザイム法の陽性例は小児 62% と成人 27% であり、成人より小児で無症候者よりも急性呼吸器感染症患者での偽陽性例が多くみられた¹⁴⁾。

2006 年、ヒタザイム法の診断基準を改定するための委員会が設置され、2007 年秋から診断基準が 2 以上に変更となった。加えて新しい吸着剤が使用され、偽陽性が減る可能性が示唆されている。しかし、変更後も IgM 持続高値症例 (MIF 法陰性) も多数存在し、上述の変更基準でも偽陽性を完全に除くことは不可能であった。

5. 抗体価測定法の流れ

欧州では様々な抗原を使用した EIA 法や ELISA 法が普及しており、中でも Ani Labsystems 社の EIA キット (エルナス法) は感度、特異性ともに良好な

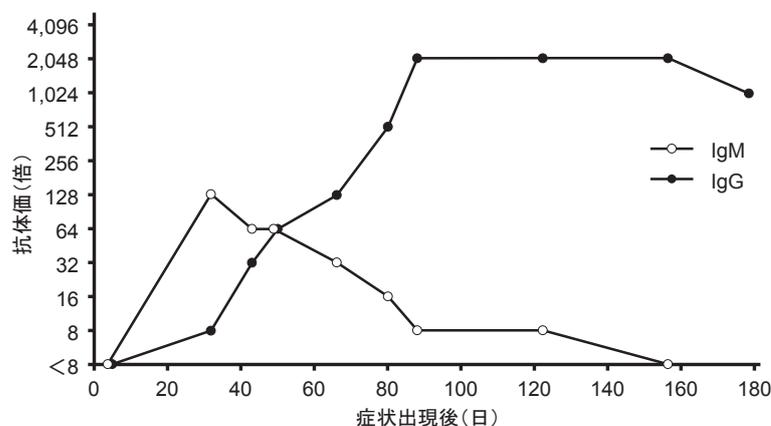


図 5 *Chlamydia pneumoniae* 特異的 IgM と IgG 抗体価の推移 (MIF 法)

病初期は IgM 抗体が上昇し、約 1 か月でピークとなる。IgG はゆっくりと上昇し、約 3 か月でピークとなる。
(文献 12) より転載)

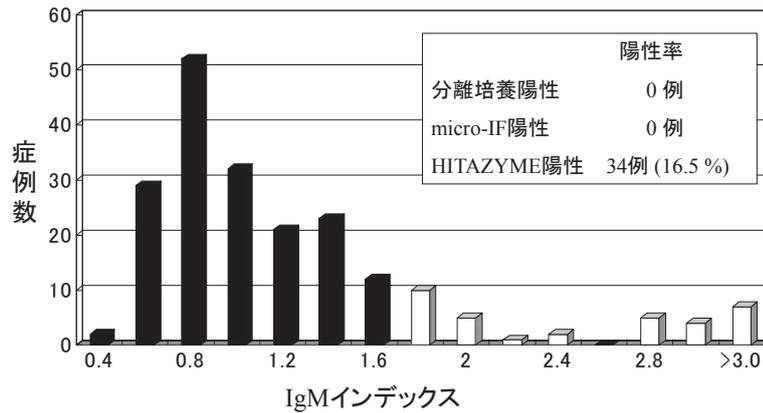


図6 急性呼吸器感染症状のない無症候患者205例のヒタザイムIgMインデックス分布

無症状者でもヒタザイム法で反応値が1.6以上の陽性例(白カラム)は16.5%に対し、MIF法で32倍以上の陽性例や分離培養陽性例はみられなかった。

(文献13)より一部改変)

表2 *Chlamydia pneumoniae* 肺炎における各種抗体価測定法の経時的IgM抗体価

症例 No.	症状出現後日数 (日)	エルナス EIA (signal / cutoff)	ヒタザイム ELISA (index value)	MIF	CF
1	24	4.22	5.29	1:512	1:64
2	32	7.88	5.42	1:512	1:32
3	55	7.80	5.21	1:512	1:32
4	68	7.33	5.05	1:128	1:16
5	110	3.55	2.29	1:16	1:8
6	144	2.37	2.20	<1:16	1:4
7	296	0.90	1.20	<1:16	<1:4
8	415	0.12	1.35	<1:16	<1:4

エルナス法、ヒタザイム法、MIF法、CF法いずれの検査法でも抗体価は同じ推移を示し、MIF法が陰性となる時点でもエルナス法での陽性が確認された。

表3 各種検査法の感度と特異度

(2つ以上の抗体検査法で陽性となった場合を Gold standard として)

抗体価測定法	Sensitivity (%)	Specificity (%)	Predictive value (%)	
			Positive	Negative
MIF法	74.3	100	100	91.9
エルナス法	97.1	100	100	99.0
ヒタザイム法	100	37.3	35.4	100

結果を示している。本邦でのエルナス法の基礎的検討では、高い特異性と再現性が得られ、ヒタザイム偽陽性例も全例に陰性の結果が確認され、本キットの有用性が示唆された¹⁵⁾。さらに臨床的検討では、*C. pneumoniae* 肺炎患者から経時的に採取した血清の反応値を他法と比較した結果、いずれの検査法でも抗体価は同じ推移を示し、MIF法が陰性となる時点でもエルナス法での陽性が確認され(表2)、MIF法よりも感度が優れている可能性が示唆された。また、急性呼吸器感染症患者を対象とした比較検討で

は、エルナス法が最も優れた成績となった(表3)¹⁵⁾。エルナス法はヒタザイム法よりも感度は劣るが特異度に優れており、とくにIgM陽性の場合には急性感染の存在を意味する。

おわりに

1990年代、*C. pneumoniae* は高齢者に多く肺炎を引き起こす病原体と報告されていたが、現在では小児が感染の主体であり、病型は上気道炎が最も多い

と認識されている。問題は上気道での菌量が少なく（とくに成人）、抗体価測定法が主体であった。2021年にはLAMP法を原理とした新しい検査試薬が使用可能となり、今後が注目される。

文 献

- 1) Miyashita N, Fukano H, Yoshida K, et al. Seroepidemiology of *Chlamydia pneumoniae* in Japan between 1991 and 2000. *J Clin Pathol* **55**: 115-117, 2002.
- 2) Miyashita N, Kubota Y, Nakajima M et al. *Chlamydia pneumoniae* and exacerbations of asthma in adults. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **80**: 405-409, 1998.
- 3) Miyashita N, Niki Y, Nakajima M et al. *Chlamydia pneumoniae* infection in patients with diffuse panbronchiolitis and COPD. *Chest* **114**: 969-971, 1998.
- 4) Miyashita N, Matsumoto A. Morphology of *Chlamydia pneumoniae*. "Chlamydia pneumoniae infection and disease" (Friedman H, Yamamoto Y, Bendinelli M eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, USA, 2004, p11-28.
- 5) Miyashita N, Matsumoto A, Soejima R, et al. Evaluation of a direct fluorescent antibody assay for detection of *Chlamydia pneumoniae*. *Jpn J Assoc Infect Dis* **70**: 224-231, 1996.
- 6) 尾内一信、他. LAMP法を用いた肺炎クラミジア検出の臨床的有用性の検討. *感染症誌*. 2022; **96**: 74-81.
- 7) Dowell SF, Peeling RW, Boman J, et al. Standardizing *Chlamydia pneumoniae* assays: recommendations from the Centers for Disease Control and Prevention(USA) and Laboratory Centre for Disease Control(Canada). *Clin Infect Dis* **33**: 492-503, 2001.
- 8) Fukano H. Comparison of five PCR assays for detecting *Chlamydia pneumoniae* DNA. *Microbiol Immunol* **48**: 441-448, 2004.
- 9) Persson K, Boman J. Comparison of five serologic tests for diagnosis of acute infections by *Chlamydia pneumoniae*. *Clin Diag Lab Immunol* **7**: 739-744, 2000.
- 10) Hermann C, Graf K, Groh A, et al. Comparison of eleven commercial tests for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin G in asymptomatic healthy individuals. *J Clin Microbiol* **40**: 1603-1609, 2002.
- 11) Miyashita N, Matsumoto A. Microbiology of chlamydiae – with emphasis on physicochemistry, antigenicity and drug susceptibility of *Chlamydia pneumoniae*. *Kawasaki Med J* **20**: 1-17, 1994.
- 12) Miyashita N, Fukano H, Mouri K, et al. Self-limiting pneumonia due to *Chlamydia pneumoniae*. *Intern Med* **44**: 870-874, 2005.
- 13) Miyashita N, Obase Y, Fukuda M, et al. Evaluation of serological tests detecting *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin M antibody. *Intern Med* **45**: 1127-1131, 2006.
- 14) Miyashita N, Ouchi K, Kawasaki K, et al. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for *Chlamydia pneumoniae*-specific immunoglobulin M in acute respiratory tract infection. *Respirology* **13**: 299-302, 2008.
- 15) Miyashita N, Ouchi K, Kawasaki K, et al. Comparison of serological tests for detection of immunoglobulin M antibodies to *Chlamydia pneumoniae*. *Respirology* **13**: 427-431, 2008.