

淋菌およびクラミジア・トラコマチス 同時核酸増幅同定精密検査

まつ だ せい じ
松 田 静 治
Seiji MATSUDA

はじめに—性感染症の動向と検査

近年の性感染症（STD）は無症状感染の広がりとともに患者の低年齢化、つまり性行動の活発な若年層の間での流行が懸念されている。性感染症には梅毒をはじめ細菌感染症の淋菌感染症、性器クラミジア感染症や、ウイルスによる性器ヘルペス、尖圭コンジローマ、HIV感染、肝炎（B, C型など）やそのほか膣炎など10種類以上の疾患があり、なかでも性器クラミジア感染症は発生数の最も多い疾患である。厚労省の感染症発生動向調査から年次別の比率をみても増えている疾患は女性の性器クラミジア感染症と男性の淋菌感染症で、両疾患とも20歳代の罹患が多い（図1, 2）^{1, 2)}。

性感染症の診断で重要なのは起炎病原体の検出で、培養法（淋菌培養など）を除き有用性と迅速診断の立場からみると、まず淋菌の塗抹標本上のグラム染色鏡検があげられる。この染色鏡検法は場所を選ばず実施でき、短時間で結果が得られる有用な方法であるが、菌量による検出の限界や精度管理が困難といった難点がある。加えて鏡検法で診断できないクラミジア・トラコマチスやウイルスによる性感染症が多いため、鏡検法の対象はほぼ淋菌診断に限られている。そこで現在性感染症病原体の検出には、免疫学的・分子生物学的的方法による抗原診断が行われるようになり、この抗原検査は短時間で結果の判定が可能のため、現在迅速診断法としての評価を高めている。クラミジア・トラコマチス（*Chlamydia trachomatis*: CT）、淋菌（*Neisseria gonorrhoeae*: NG）の場合、日常臨床面で遺伝子法である核酸検出法、核酸増幅法によるDNA診断がPCR法を代表として

多用されており、核酸増幅法の陽性率が核酸検出法に比べ高いとされている。

PCR法はCTおよびNGのDNAを増幅し、それぞれの菌に特異的なDNAプローブを用いて検出する方法で、キットとして「アンプリコアSTD-1クラミジアトラコマチス」、「アンプリコアSTD-1ナイセリアゴノレア」（ロシュ・ダイアグノスティックス社）がある。³⁾

SDA法はDNA polymeraseとRestriction enzymeを利用したCTとNGを検出する核酸増幅法の1つでPCR法と同等の検出性能を有している（自動核酸増幅検査装置「BDプローブテックET」（日本ベクトンディッキンソン社）使用）。ただ、近年PCR法によるクラミジア検出法の問題点として、検体中の血液や粘液などの増幅阻害物質が偽陰性の結果をもたらす可能性が報告されており、その対策として測定検体を10倍程度希釈して阻害物質の影響を少なくする方法が試みられているが、この場合、測定感度の低下に留意する必要がある。このほかCT、NGによる咽頭炎（STDの性器外感染）の増加が指摘されていることを踏まえ、検査で重要なことはNGの場合PCR法（アンプリコアSTD-1NG）では口腔内常在菌であるナイセリア属の一部と交差反応を起こすため、咽頭検査には使用できないことである。²⁾

近年新しくNGおよびCTによる尿道炎、子宮頸管炎などの検査法として登場したのが、これから述べる淋菌（NG）およびクラミジア・トラコマチス（CT）同時核酸増幅同定精密検査「アプティマ™ Combo 2クラミジア/ゴノレア」（富士レビオ社）である。^{4~7)}

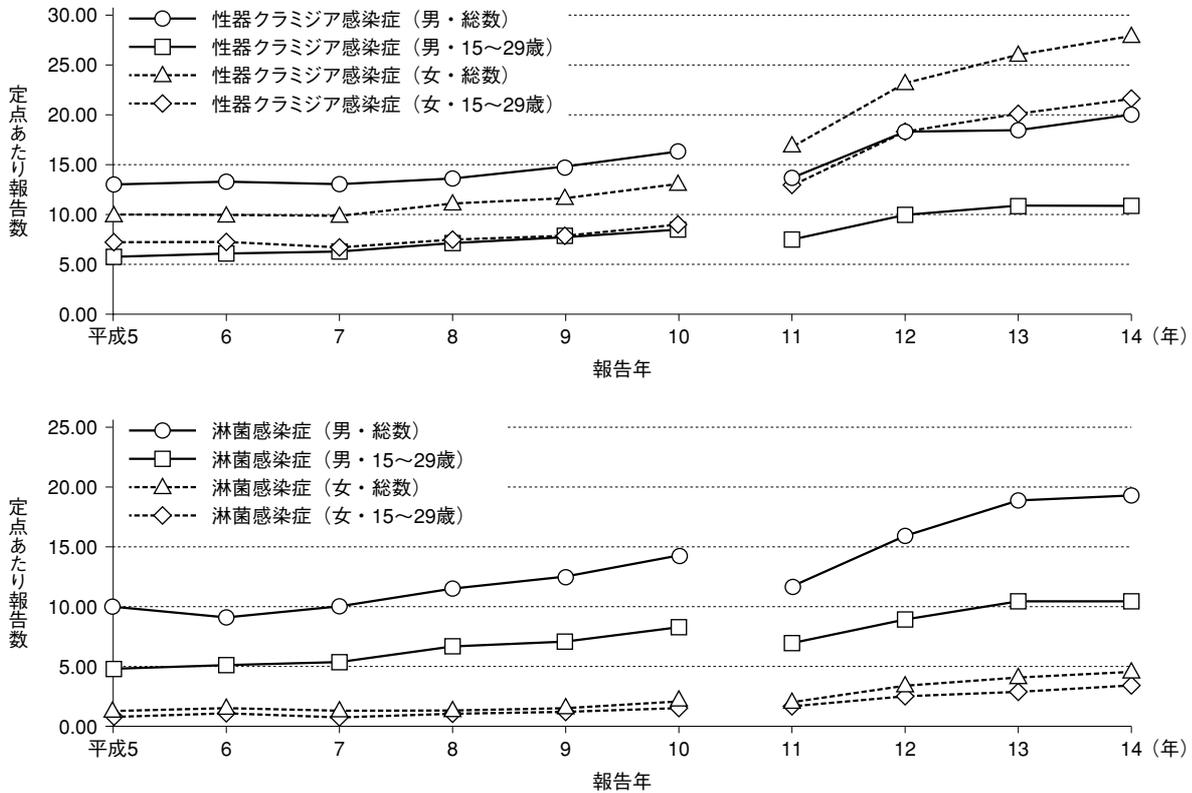


図1 性感染症 (STD) 報告数の年次推移

〔厚生労働省定点調査 感染症サーベイランス事業年報 (平成11年3月まで)、
感染症発生動向調査 (平成11年4月以降)〕

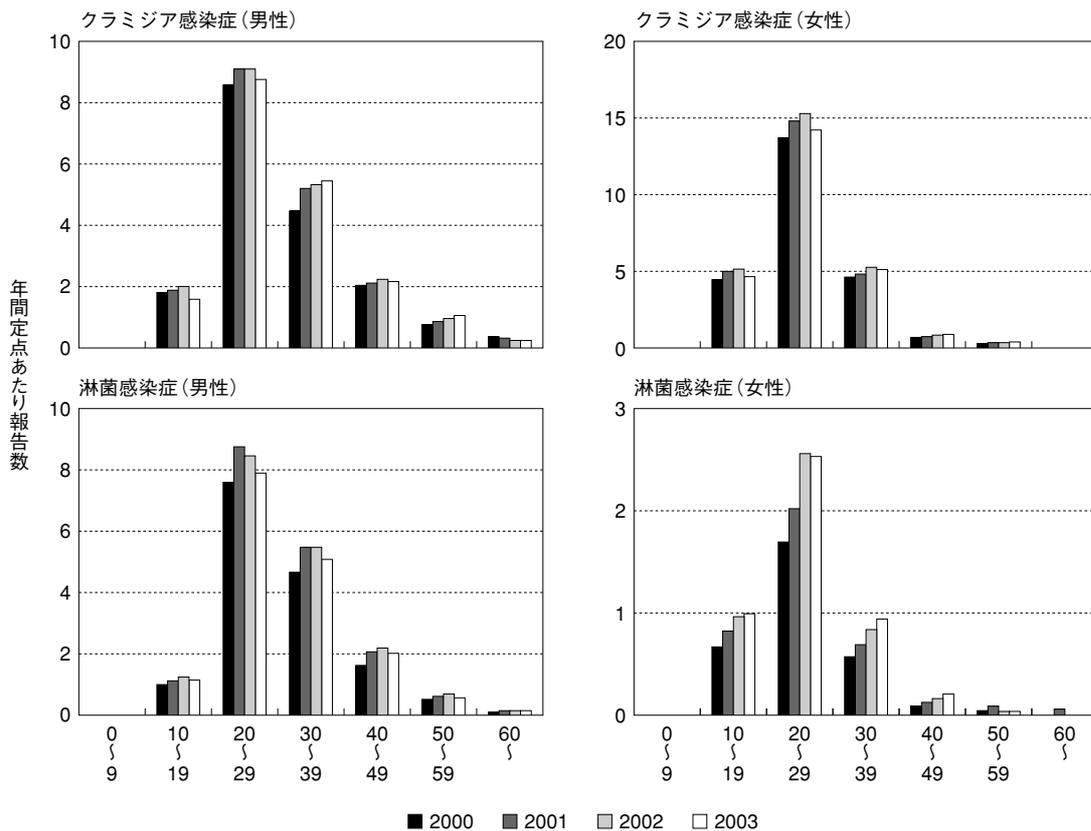


図2 感染症発生動向調査による各性感染症の年次別、年齢別患者報告数

表1 クラミジア感染および淋菌感染の蔓延防止と重症化阻止のために有効な検査とは？

感染因子の特定	：クラミジアか、淋菌か、重複感染かを1度の検査で同時鑑別 ⇒適切な抗菌薬選択が可能（クラミジアと淋菌は治療法が異なる!） ⇒再診時再検査の必要がない（再診率が低いので1度に鑑別できることが望ましい） ⇒少ない機会でも効率的な診断・検査が可能（妊婦検診におけるクラミジア・淋菌同時検査など）
感染を見逃さない	：症状が弱い、無症状、重複感染による隠れた感染因子の発見 ⇒放置による感染の蔓延および重症化を防止する
高感度	：微量存在する感染因子も検出 ⇒初期の感染状態も確実に捉える
正確性	：交差反応による偽陽性、反応阻害因子による偽陰性を低減 ⇒誤った薬剤投与の防止

I. アプティマ™Combo 2 クラミジア/ゴノレア

クラミジア（CT）感染症と淋菌（NG）感染症は症状がそれぞれ異なり、強い症状を伴う場合には感染の鑑別が比較的容易であるが、症状が軽かったり、あるいは症状が現れないCT感染およびNG感染の場合には、感染者に自覚症状がなく放置されることにより、感染の拡大が危惧される。また、クラミジアと淋菌の混合感染では症状の強いどちらか一方の感染のみが診断され、他方の感染を見落とす危険性が考えられる。したがって、初期診断においてCTとNGを同時に検査することは潜在的な感染や混合感染を明らかにする意味で重要であり、加えてCTおよびNG感染の有無を明確にすることで適切な薬剤選択が可能となろう。

CTおよびNGの検査においては、高感度であること、他の菌との交差反応性を持たないこと、そして反応阻害を受けずに検査が可能であることが必要である。この度、米国 Gen-Probe 社においてCTとNGを1回の検査で同時に検出できる診断キット、アプティマ™Combo 2 クラミジア/ゴノレア（以下 Combo 2）が開発された。本キットは、CTとNGのrRNAを増幅することにより抗原検出法や培養法に比べて高感度であり、また検出部位に特異性の高い配列を選択したことにより他菌種との交差反応性はなく、標的遺伝子を捕捉するときに独自の検体前処理法により余分な検体成分を除去で

きることにより反応阻害が抑えられることを特徴としている。

以上、CTとNGの蔓延防止と重症化阻止のための有効な検査法としてのCombo 2の利点をまとめたのが表1である。

II. Combo 2の測定原理

Combo 2では、米国 Gen-Probe 社が開発した3つの主要な技術を採用している。本キットは2005年6月に承認され、2006年には保険適用（300点）となった（写真1）。表2はキットの概要と測定原理を示したものである。

(1) Target Capture System (TCS)：前処理

標的遺伝子を磁性微粒子で特異的に捕獲し、残りの溶液を吸引除去する検体前処理技術である。すなわち、技術的特徴として標的rRNAを磁性微粒子に特異的に吸着させるため、特異性が向上し、検体中の血液、尿中成分、非特異遺伝子、蛋白などを洗浄除去できるため、反応の阻害が大幅に低減できる。

(2) Transcription Mediated Amplification (TMA)：増幅

T7プライマー、non-T7プライマー、逆転写酵素により標的1本鎖RNAから2本鎖DNAを合成し、それを鋳型としてT7RNAポリメラーゼにより標的RNAを増幅する遺伝子増幅技術である（図3）。

(3) Dual Kinetic Assay (DKA) : 検出

標的とする遺伝子増幅産物を特異的に検出する Hybridization Protection Assay (HPA) の原理を基本とし、さらに2種類の発光特性の異なる発光基質 (アクリジニウムエステル) を、2種類それぞれの標的遺伝子に相補的な配列に標識したプローブを用

いて検出を行う2種遺伝子同時検出技術である。つまり、DKAの特徴は2種類のターゲットを同時に鑑別検出できる方法である。なお Combo 2 では、CT23srRNA および NG16srRNA が標的として増幅され、増幅産物それぞれと相補的な配列を持つ標識プローブを用いて反応を行うことにより、CTとNGの鑑別検出が可能となっている (図4)。



写真1 アプティマ™ Combo 2 クラミジア/ gonoreia
承認日: 2005年6月30日 保険点数: 300点 (2006年2月1日適用)

表2 キットの概要と測定原理

キット概要	測定対象
	<ul style="list-style-type: none"> ◎クラミジア: <i>Chlamydia trachomatis</i> ◎淋病: <i>Neisseria gonorrhoeae</i>
検体	<ul style="list-style-type: none"> ◎尿 ◎子宮頸管擦過物 ◎男性尿道擦過物
	測定方法
測定原理	1. 前処理: Target Capture System (TCS)
	2. 増幅: Transcription-Mediated Amplification (TMA)
	3. 検出: Hybridization Protection Assay (HPA) / Dual Kinetic Assay (DKA)

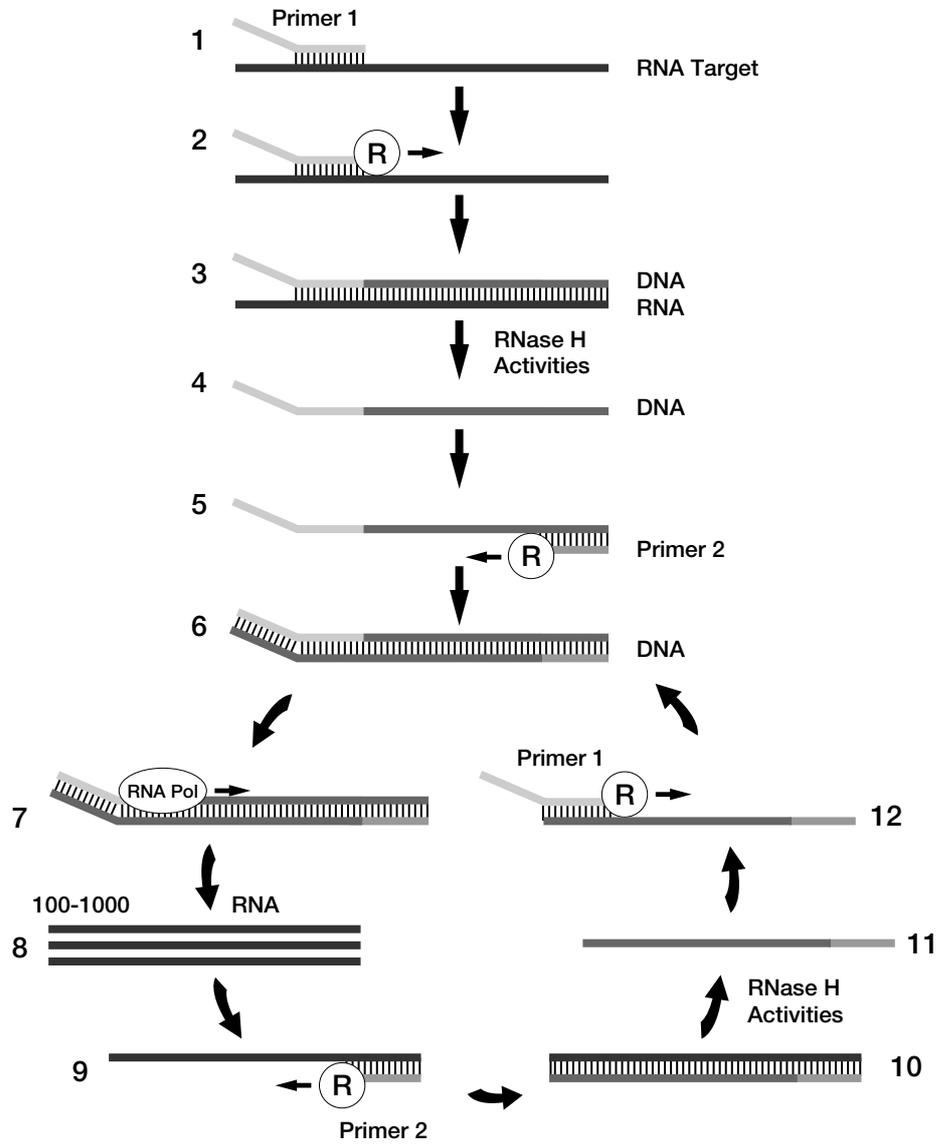


图 3 Transcription-Mediated Amplification (TMA)

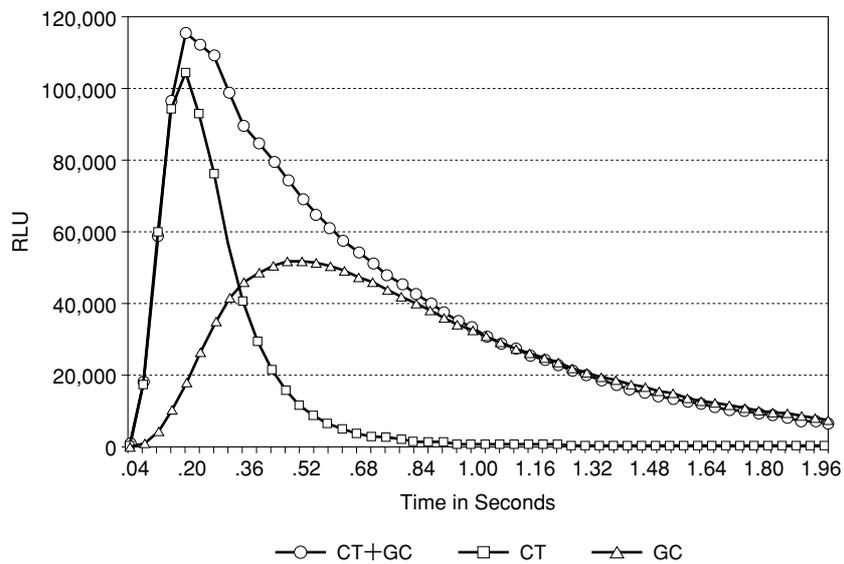


图 4 Dual Kinetic Assay (DKA)

Ⅲ. Combo 2 の成績

産婦人科と泌尿器科の患者検体を用いて、多施設における臨床評価を実施した成績を以下に述べる。

(1) 本法とアンプリコアとの比較

(a) 産婦人科

子宮頸管スワブ 120 検体について Combo 2 とアンプリコアとの判定結果の比較を表 3 に示した。CT については両キットとも陽性が 26 例、Combo 2 陽性・アンプリコア陰性が 2 例、両キットとも陰性が 92 例であり、Combo 2 陰性・アンプリコア陽性の結果はなかった。両キットにおける判定結果の一致率は、98.3%である。NG については両キットとも陽性が 9 例、Combo 2 陽性・アンプリコア陰性が 2 例、Combo 2 陰性・アンプリコア陽性が 2 例、両キットとも陰性が 107 例であった。両キットにおける判定結果の一致率は 96.7%である。

(b) 泌尿器科

尿 171 検体について両キットの判定結果の比較を表 4 に示した。CT については、両キットとも陽性が 54 例、Combo 2 陽性・アンプリコア陰性が 5 例、Combo 2 陰性・アンプリコア陽性が 1 例、両キットとも陰性が 111 例であった。判定結果の一致率は 96.5%である。NG については両キットとも陽性が

94 例、Combo 2 陰性・アンプリコア陽性が 1 例、両キットとも陰性が 76 例であり、Combo 2 陽性・アンプリコア陰性の結果はなかった。判定結果の一致率は 99.4%である。

(c) 子宮頸管スワブ検体と尿検体の比較および尿検体と尿道スワブ検体の比較

尿検体採取不能例を除いた 116 例で、Combo 2 での測定における子宮頸管スワブ検体と尿検体の判定結果を比較すると、CT ではスワブ検体陽性 26 例に対し、尿検体陽性は 24 例、NG ではスワブ検体陽性 11 例に対し、尿検体陽性は 9 例であった。また CT、NG とも尿検体のみ陽性でスワブ検体陰性の検体は認められなかった (表 5)。

次に、尿検体を採取できなかった 2 例を除き 26 例で、Combo 2 での測定における尿検体と尿道スワブ検体の判定結果は表 6 のとおり CT ではスワブ検体陽性例については尿検体もすべて陽性であり、NG については両検体とも陽性が 19 例、両検体とも陰性が 7 例であった。

(2) Combo 2 測定結果による陽性検体の分類

子宮頸管スワブ検体について、Combo 2 での測定結果に基づく感染状況の判定内訳を表 7 に示した。CT または NG の陽性全 36 例中で CT 単独陽性は 25 例 (69.4%)、NG 単独陽性は 8 例 (22.2%)、CT・NG 両陽性は 3 例 (8.3%) であった。

表3 クラミジアおよび淋菌検出における他の遺伝子検査試薬との比較⁴⁾

産婦人科・子宮頸管スワブ検体

クラミジア	アンプリコア		計	
	陽性	陰性		
アプティマ Combo 2	陽性	26	2	28
	陰性	0	92	92
	計	26	94	120

淋菌	アンプリコア		計	
	陽性	陰性		
アプティマ Combo 2	陽性	9	2	11
	陰性	2	107	109
	計	11	109	120

一致率：クラミジア 98.3%；淋菌 96.7%

表4 クラミジアおよび淋菌検出における他の遺伝子検査試薬との比較⁴⁾

泌尿器科・尿検体

クラミジア	アンプリコア		計	
	陽性	陰性		
アプティマ Combo 2	陽性	54	5	59
	陰性	1	111	112
	計	55	116	171

淋菌	アンプリコア		計	
	陽性	陰性		
アプティマ Combo 2	陽性	94	0	94
	陰性	1	76	77
	計	95	76	171

一致率：クラミジア 96.5%；淋菌 99.4%

表5 クラミジアおよび淋菌検出における
女性子宮頸管スワブ検体と女性尿検体の比較⁴⁾

クラミジア		尿		計
		陽性	陰性	
子宮頸管スワブ	陽性	24	2	26
	陰性	0	90	90
	計	24	92	116

淋菌		尿		計
		陽性	陰性	
子宮頸管スワブ	陽性	9	2	11
	陰性	0	105	105
	計	9	107	116

一致率：クラミジア 98.3%；淋菌 98.3%

表6 クラミジアおよび淋菌検出における
男性尿道スワブ検体と男性尿検体の比較⁴⁾

クラミジア		尿		計
		陽性	陰性	
尿道スワブ	陽性	3	0	3
	陰性	2	21	23
	計	5	21	26

淋菌		尿		計
		陽性	陰性	
尿道スワブ	陽性	19	0	19
	陰性	0	7	7
	計	19	7	26

一致率：クラミジア 92.3%；淋菌 100%

表7 アプティマ Combo 2 測定結果による陽性検体の分類⁴⁾

女性

原因菌	検体数	%
クラミジア	25	69.4
淋菌	8	22.2
クラミジア & 淋病	3	8.3
計	36	100

男性

原因菌	検体数	%
クラミジア	35	27.1
淋菌	70	54.3
クラミジア & 淋菌	24	18.6
計	129	100

一方、男性尿検体について Combo 2 での測定結果に基づく感染状況の判定内訳をみると、CT または NG の陽性全 129 例中、CT 単独陽性は 35 例 (27.1%)、NG 単独陽性は 70 例 (54.3%)、CT・NG 両陽性は 24 例 (18.6%) であった。

考 察

近年における CT および NG の診断は、遺伝子増幅法の導入により従来に比べて検出感度が大幅に上昇した。Combo 2 においても細胞内存在量の多い rRNA を増幅し、検出すること、また TCS 技術を用いていることにより、前処理で検体中の反応阻害物質を除去できることから、高感度な検出が期待され

る。従来、CT の核酸検出法の問題点として、尿およびスワブ検体に由来する多くの反応阻害物質（偽陰性の判定結果）が報告されており、原因物質として尿検体由来のリン酸塩や尿道および子宮頸管擦過物の血液成分である Fe イオンによる影響が考えられる。本キットの基礎的な外部評価データとして、精製したクラミジア基本小体 (EB) を段階希釈したものを試料として、アプティマ Combo 2 と従来検査との感度について比較すると、アプティマ Combo 2 はアンプリコアと比較して約 1,000 倍高感度であることが示され (表 8)、阻害物質の影響についても、リン酸塩と Fe イオンを添加した試験検体を用い検討した結果、アプティマ Combo 2 はこれらの物質による反応阻害を受けないことが示され

た(表9, 10)。また、アプティマ Combo 2は交差反応試験において、細菌やウイルスに高い特異性を示しており、クラミジア属では *C.pneumoniae*、*C.psittaci*、ナイセリア属では、*N.subflava*、*N.sicca*、*N.mucosa*、*N.lactamica*、*N.flavescens*、*N.meningitis* serogroup (A, B, C, D, Y)、*N.elongata*、*N.cineca* に対して、交差反応性(偽陽性)は示さなかった。

今回の臨床応用は産婦人科、泌尿器科の共同研究で実施し、前述の結果が得られたが、既存の遺伝子増幅検出キットであるアンプリコアとの判定一致率の検討では、女性子宮頸管スワブおよび男性尿どちらの検体もCTとNGの検出においてほぼ同等の成績が得られた。Combo 2とアンプリコアでの判定結果が一致しなかった例については、再判定および予備検体測定の結果判定が一致した例もあったが、不一致のままであった例が女性子宮頸管スワブ検体で2例、男性尿検体で5例あった。この原因については、標的とする物質がCombo 2ではRNAであり、

アンプリコアのDNAとは異なっていること、感度差、反応阻害物質の影響、他菌種との交差反応などが考えられた。またCombo 2ではCTで女性のスワブ検体と尿検体の陽性一致率が92.3%、NGでのそれは81.8%、男性ではCT検出、NG検出ともにスワブ検体陽性例は尿検体でもすべて陽性であった。泌尿器科では尿道スワブに比べ、検体として尿を用いるのが一般的となっているが、この点Combo 2による高感度の検査の実施が可能となる。

近年の性感染症の動向の面で注目されるのは無症状感染の増加(50~70%)とともにCTとNGの重複感染(混合感染)の可能性が高まっていることで、NG感染症のCT感染症合併率は20~30%といわれ、ことにCSW(コマーシャル・セックス・ワーカー)では重複感染の可能性が高い確率で疑われる。重複感染ではどちらか一方の症状が強い場合は、臨床症状のみではもう一方の感染を見分けることは難しいが、Combo 2を用いた場合、CTおよびNGを

表8 アプティマCombo 2クラミジア/ゴノレアとアンプリコアとのクラミジア検出における感度比較⁷⁾

EB suspension		APTIMA Combo 2	NAT Kit A
If.u. ml ⁻¹	Equivalent EBs ml ⁻¹	Result	Result
50	200	+	+
5	20	+	+
0.5	2	+	-
0.05	0.2	+	-
0.005	0.02	+	NT
0.0005	0.002	-	NT
0.00005	0.0002	-	NT
0.000005	0.00002	-	NT

表9 アプティマCombo 2クラミジア/ゴノレアとアンプリコアにおける検体中に含まれるリン酸による反応阻害比較⁷⁾

EB suspension (If.u.ml ⁻¹)	Phosphate (mM)	Detection	
		Combo 2	NAT Kit A
50	0.6	+	+
	1.2	+	+
	6.0	+	-
5	0.6	+	+
	1.2	+	-
	6.0	+	-
0.5	0.6	+	NT
	1.2	+	NT
	6.0	+	NT

表10 アプティマCombo 2 クラミジア/ゴノレアとアンプリコア
における検体中に含まれるFe²⁺イオンによる反応阻害比較⁷⁾

EB suspension (I.f.u.ml ⁻¹)	Fe ²⁺ ion (μg ml ⁻¹)	Detection	
		Combo 2	NAT Kit A
50	0.1	+	+
	0.5	+	±
	1.0	+	-
5	0.1	+	±
	0.5	+	-
	1.0	+	-
0.5	0.1	+	NT
	0.5	+	NT
	1.0	+	NT

同時に検出できるため、症状の有無にかかわらず感染状態を明確にすることが可能である。これより本キットは性感染症の蔓延防止および適切な治療を行ううえで有用性が期待され、医療経済上でも有用であると考えられる。本キットの検体は今のところ尿道擦過物、子宮頸管材料および尿検体（男性のみ）であり、最近増加の傾向にある咽頭炎の検体すなわち咽頭材料については今後の検討が待たれる。

おわりに

性感染症（STD）は複雑な病態と後遺症、合併症の恐れを含んでおり、制御の基本は予防対策の重要性（検診率の向上、性教育など）と適切な治療である。新しく登場したアプティマ Combo 2 クラミジア/ゴノレアは rRNA を標的とした高感度な検査法で、他のクラミジア属やナイセリア属との交差反応による偽陽性を抑えるほか、反応阻害物質の影響による偽陰性を抑え、再検率の低減が可能であり、利点として① CT 単独感染、NG 単独感染、CT・NG 重複（混合）感染が1本の反応チューブで鑑別可能となり、適切な薬剤選択が可能、② CT と NG

の検出を同時に行うので感染の見逃し防止に有効、③検査の回数が減らせるので患者の負担が軽減、があげられる。

文 献

- 1) 橋戸円, 岡部信彦: 発生動向調査からみた性感染症の最近の動向. 日性感染症会誌, **15** (Suppl): 60-68, 2004.
- 2) 性感染症診断・治療ガイドライン 2004. 日性感染症会誌 **15** (Suppl): 5-59, 2004.
- 3) 熊本悦明 他: PCR 法による *C. trachomatis* 診断キット (アンプリコア-CT) の基礎的・臨床的検討. 日性感染症会誌 **6**: 51-61, 1995.
- 4) 松田静治, 公文裕巳 他: TMA 法を用いた RNA 増幅による CT および NG の同時検出—産婦人科および泌尿器科における臨床評価, 日性感染症会誌 **15**: 116-126, 2004.
- 5) Mc Donough, S.H., Bott, M.A., and Giachetti, C: Application of transcription-mediated amplification to detection of nucleic acids from clinically relevant organisms, *Nucleic acid amplification technologies*: 113-123, Biotechniques Books, 1998.
- 6) Gazdos, C.A., et al.: Performance of the Aptima Combo 2 Assay for detection of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* in female urine and endocervical swab specimens. *J. Clin. Microbiol.* **41**: 304-309, 2003.
- 7) Ikeda Dantsuji Y. et al.: *J. Med. Microbiol.* **54**: 357-360, 2005.