



● クラミジア／淋菌 rRNA 検出試薬 TRCReady[®] CT/NG の開発

バイオサイエンス事業部 第二開発部 遺伝子グループ

北森 有加
宇根 隆哉
俵田 直人
中島 寿一
齋藤

1. はじめに

クラミジアトラコマチス (*Chlamydia trachomatis*, CT) 感染症 (以降、クラミジア感染症) は性感染症の中でも最も罹患率の高い感染症である¹⁾。クラミジアトラコマチスは主に泌尿生殖器に感染し様々な症状を引き起こすことが知られている。女性で重症化した場合は、不妊症、流産、早産といった後遺症を残したり、出産の際に新生児に感染したりすることもある。ただし、女性の場合、感染しても症状を呈しないことも多いため、感染を自覚することが少ない。しかしながら、無症候であっても感染者は性的パートナーに感染させる可能性が高く、合併症を発症するリスクが高い²⁾。一方、男性の場合は、尿道炎が大部分を占め、その他に急性精巣上体炎、直腸炎などを呈することもあるため²⁾、疾患負担の低減のために早期の治療開始が求められている。

近年、咽頭感染例も増加しているが、咽頭のクラミジア感染症は特徴的な症状に乏しい²⁾。このため、クラミジア感染症と診断されて適切な治療を受ける例が少なく、クラミジア感染症の感染源となっていると指摘されている。

淋菌 (*Neisseria gonorrhoeae*, NG) 感染症は厚生労働省の定点調査によると 2016 年まではクラミジアに次いで最も感染報告の多い感染症であり³⁾、淋菌性尿道炎の患者において、クラミジアトラコマチスも 20～30% 程度検出されるなど、混合感染が比較的多く認められる²⁾。

淋菌に感染すると、男性では主に尿道炎を呈し、重症化した場合、不妊症となることがある。女性では主に子宮頸管炎の症状を呈する⁴⁾。また、クラミジア感染同様に、淋菌においても咽頭感染が問題となっている。女性の淋菌感染者のうち、58% が咽頭より淋菌が検出され、21% が咽頭及び性器から淋菌が検出されたと報告されている³⁾。

咽頭は唾液や飲食によって表面が常に洗浄されてい

る部位であるため、クラミジアトラコマチス、淋菌とも他の部位に比べて、上皮に存在する菌体数が少ないことが推察されている³⁾。よって、咽頭検体においては高感度に菌体を検出する核酸増幅法による検査が推奨されている⁵⁾。

淋菌は抗菌薬を用いた治療において、薬剤耐性を獲得しやすいことが知られており、現在淋菌に確実に有効な抗菌薬は限定的であり、当該抗菌薬の多用により耐性菌が増加することは世界的な脅威とされている⁶⁾。クラミジア感染症の治療に推奨されているマクロライド系抗菌薬に耐性を持つ淋菌も報告されており、両者を鑑別し、適切な抗菌薬を選択することは非常に重要である。

2. クラミジア／淋菌 rRNA 検出試薬 TRCReady[®] CT/NG の開発

クラミジアトラコマチスの鑑別には抗体検査や核酸増幅検査が用いられるが、感度が高いことなどから核酸増幅検査が推奨されている⁵⁾。一方、淋菌の鑑別には鏡検法や核酸増幅法、分離培養法などが用いられるが、核酸増幅法はクラミジアトラコマチスとの同時検査が可能で感度が高いとされている⁵⁾。鏡検法は臨床現場で検査したその場で結果がわかるが、子宮頸管擦過物など検体によっては、夾雑物が多く検査が難しいとされている。また、女性の子宮頸管炎の感染診断にあたっては、尿の使用は言及されておらず、子宮頸管擦過物を採取することとされている⁵⁾。

再診率が低いとされている性感染症患者に対して治療を来院当日中に開始するために、検査結果をより迅速に報告するニーズが存在するが、既存の核酸増幅検査は数時間の検査時間を要するという課題が存在する。

そこで、迅速性を有し、簡便で高感度な検査を可能とする TRCReady[®]-80 システムを用いて、クラミジアトラコマチスと淋菌の同時検出を可能とする検出試

薬の開発を試みた。検出系の設計にあたっては、他の類縁菌と交差反応を示さず、高感度に検出するために、クラミジアトラコマチスは 23S rRNA を、淋菌については 16S rRNA を増幅対象として選択し TRC 法^{7), 8)} による「クラミジア/淋菌 rRNA 検出試薬 TRCReady[®] CT/NG」を開発した。ここにその試薬性能を報告する。

3. 基本性能

自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80 システム（以下、TRCReady[®]-80）⁹⁾ では、自動的に核酸精製から増幅、検出まで行われる。また、結果の判定においては、増幅されたクラミジアトラコマチス核酸および淋菌核酸とそれぞれ特異的に結合して蛍光増感する INAF プロブ（INtercalation Activating Fluorescence probe）の蛍光をリアルタイムに検出し、それぞれの蛍光強度に関して一定時間内に蛍光強度から算出された蛍光強度比がカットオフ値以上を示したとき、陽性と判定した。

[1] 迅速性

TRCReady[®]-80 における本試薬を用いた検査は、検体採取後、前処理を実施し、装置にセットしてから約 40 分で結果報告可能であった。

[2] 最小検出感度・特異性

in vitro で合成したクラミジアトラコマチス rRNA（以下、CT 標準 RNA）および *in vitro* で合成した淋菌 rRNA（以下、NG 標準 RNA）の希釈溶液を調製し、本試薬で測定した。その結果、本試薬は 1 テストあたり CT 標準 RNA 3×10^2 分子相当、NG 標準 RNA 1×10^3 分子相当まで検出されることが示された。

また、クラミジアトラコマチス培養物（ATCC No. VR-1500）を健常人尿検体に添加し希釈系列を作成し、既存の核酸増幅検査と比較した結果を表 1 に示す。検査は各キットの添付文書に従い実施した。TRC 法における核酸抽出は TRCR[®] 核酸精製キットを利用し、TRCR[®] 核酸精製キットの取扱説明書に従い精製操作を実施した。

表 1 より既存の核酸増幅検査と同等以上の感度が示された。

本試薬を用いて *Neisseria* 属菌 15 種の培養抽出物及び、人体に感染する恐れのある *Chlamydomphila* 属菌 2 種の 23S rRNA の配列を有する合成 RNA 溶液（ 1×10^9 分子相当/テスト）の 3 重測定を実施した。培養抽出物は TRCR[®] 核酸精製キットにそれぞれ表 2 に記載の菌量を添加し、抽出物を得た。

表 1 クラミジアトラコマチス希釈系列における各検査法比較

培養物 希釈倍率	TRC 法	TMA 法	SDA 法
	判定	判定	判定
10 ³	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
3×10 ³	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
10 ⁴	+	+	+
	+	+	+
	+	+	+
3×10 ⁴	+	+	+
	+	+	-
	+	+	+
10 ⁵	-	-	-
	+	判定保留	-
	+	-	-
3×10 ⁵	-	-	-
	-	-	-
	-	-	-

＋は陽性、－は陰性の判定結果を示す。

試験結果を表 2 に示す。検討した 17 菌種全てを陰性と判定された。これよりこれらの菌に対して交差反応性を示さないと考えられた。

また、本試薬はクラミジアトラコマチスおよび淋菌を同時に検出する試薬であるため、2 菌種が同時に検出された場合（混合感染）を想定し、片方の菌が大量に存在した際のもう一方の菌の検出感度について標準 RNA を用いて評価した。結果を表 3 に示す。これより、クラミジアトラコマチスまたは淋菌標準 RNA が 1×10^6 分子相当存在した際も、それぞれの最小検出感度濃度の標準 RNA が検出されることが示された。

4. 臨床評価

[1] 方法

(1) 対照試薬に関して

本試薬との相関性を評価する既承認体外診断用医薬品としては、SDA 法試薬および TMA 法試薬を用いた。両試薬共に、核酸を増幅し検出するものであるが、TMA 法は本試薬と同じ rRNA を増幅対象とし、SDA 法は DNA を増幅対象としている。

(2) 検体採取に関して

宮本町中央診療所にて採取された検体（子宮頸管擦過物検体、尿道擦過物検体、男性尿検体、咽頭検体（咽頭擦過物、うがい液））について、SDA 法、TMA 法及び TRC 法（本試薬）でそれぞれ測定した。検体採

表2 交差反応性に関する検討結果

検討菌種	ATCC No.	濃度	判定
<i>Neisseria cinerea</i>	14685	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria elongata</i>	25295	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria flava</i>	14221	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria flavescens</i>	13120	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria lactamica</i>	23970	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria mucosa</i>	25999	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria sicca</i>	29256	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria subflava</i>	49275	10 ⁷ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup A	13077	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup B	BAA-335	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup C	31275	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup C, serotype 2a	700532	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup D	13113	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup W-135	35559	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Neisseria meningitidis</i> Serogroup Y	35561	10 ⁶ CFU/ test	— — —
<i>Chlamydophila pneumoniae</i> 合成 RNA	.	10 ⁹ 分子相当/ test	— — —
<i>Chlamydophila psittaci</i> 合成 RNA	.	10 ⁹ 分子相当/ test	— — —

十は陽性、一は陰性の判定結果を示す。CFUは colony forming unitを示す。

表3 クラミジアトラコマチスまたは淋菌が大量に存在した際の最小検出感度に関する検討

濃度 [分子相当/ test]		CT	NG
CT	NG	判定	判定
3×10 ²	0	+++	---
3×10 ²	10 ³	+++	+++
3×10 ²	10 ⁴	+++	+++
3×10 ²	10 ⁵	+++	+++
3×10 ²	10 ⁶	+++	+++
0	10 ³	---	+++
10 ³	10 ³	+++	+++
10 ⁴	10 ³	+++	+++
10 ⁵	10 ³	+++	+++
10 ⁶	10 ³	+++	+++

＋は陽性、－は陰性の判定結果を示す。

取に際しては各試薬に付随する採取キットを使用し、添付文書に従い測定を実施した。本試薬測定用の検体はTRCR[®]核酸精製キットの変性試薬にそれぞれ規定量を添加し、精製物を得た。精製操作はTRCR[®]核酸精製キットの取扱説明書に従い実施した。

(3) 本試薬の結果の判定に関して

本試薬においてクラミジアトラコマチスまたは淋菌に由来する蛍光強度比がカットオフ値を超えたものをそれぞれ陽性と判定した。

[2] 結果

(1) クラミジアトラコマチス核酸検出に関して

1) 本試薬と SDA 法との相関性について

臨床検体 501 例（子宮頸管擦過物検体：123 例、尿道擦過物検体：36 例、男性尿検体：182 例、咽頭検体：160 例）における全体一致率は 97.4%（488/501）であり、高い相関性を示した（表 4）。

表4 全検体（クラミジアトラコマチス核酸の検出）

	SDA 法			
	陽性	陰性	合計	
本試薬	陽性	92	7	99
	陰性	6	396	402
	合計	98	403	501
全体一致率	97.4%			
陽性一致率	93.9%			
陰性一致率	98.3%			

2) 本試薬と TMA 法との相関性について

臨床検体 438 例（子宮頸管擦過物検体：106 例、尿道擦過物検体：36 例、尿検体：179 例、咽頭検体：117 例）

における全体一致率は 96.6%（423/438）であり、高い相関性を示した（表 5）。

表5 全検体（クラミジアトラコマチス核酸の検出）

		TMA 法		
		陽性	陰性	合計
本試薬	陽性	95	3	98
	陰性	12	328	340
	合計	107	331	438
全体一致率	96.6%			
陽性一致率	88.8%			
陰性一致率	99.1%			

(2) 淋菌核酸検出に関して

1) 本試薬と SDA 法との相関性について

臨床検体 501 例（子宮頸管擦過物検体：123 例、尿道擦過物検体：36 例、尿検体：182 例、咽頭検体：160 例）における全体一致率は 96.8%（485/501）であり、高い相関性を示した（表 6）。

表6 全検体（淋菌核酸の検出）

		SDA 法		
		陽性	陰性	合計
本試薬	陽性	78	3	81
	陰性	13	407	420
	合計	91	410	501
全体一致率	96.8%			
陽性一致率	85.7%			
陰性一致率	99.3%			

2) 本試薬と TMA 法との相関性について

臨床検体 438 例（子宮頸管擦過物検体：106 例、尿道擦過物検体：36 例、尿検体：179 例、咽頭検体：117 例）における全体一致率は 98.4%（431/438）であり、高い相関性を示した（表 7）。

表7 全検体（淋菌核酸の検出）

		TMA 法		
		陽性	陰性	合計
本試薬	陽性	80	1	81
	陰性	6	351	357
	合計	86	352	438
全体一致率	98.4%			
陽性一致率	93.0%			
陰性一致率	99.7%			

5. 考 察

[1] クラミジアトラコマチス核酸検出における本試薬との不一致例に関して

本試薬で陽性となり SDA 法で陰性となった乖離検体 7 例のうち、4 例は TMA 法で陽性と判定された。残り 3 例は増幅産物の配列を解析したところクラミジアトラコマチスの塩基配列が確認された。

本試薬で陽性となり TMA 法で陰性となった乖離検体 3 例は増幅産物の配列を解析したところクラミジアトラコマチスの塩基配列が確認された。

本試薬で陰性となり SDA 法で陽性となった乖離検体 6 例のうち、5 例は TMA 法で陰性と判定された。

本試薬で陰性となり TMA 法で陽性となった乖離検体 12 例のうち、11 例は SDA 法で陰性と判定された。それぞれの残り 1 例については、SDA 法及び TMA 法にて陽性と判定された。本検体は子宮頸管擦過物検体であり、菌体の局在の影響、もしくは陽性が否定できなかった。

[2] 淋菌核酸検出における本試薬との不一致例に関して

本試薬で陽性となり SDA 法で陰性となった乖離検体 3 例のうち、2 例は TMA 法 にも陽性と判定された。残り 1 例は増幅産物の配列を解析したところ淋菌の塩基配列が確認された。

本試薬で陽性となり TMA 法で陰性となった乖離検体 1 例は増幅産物の配列を解析したところ淋菌の塩基配列が確認された。

本試薬で陰性となり SDA 法で陽性となった乖離検体 13 例のうち、12 例は TMA 法で陰性と判定された。

本試薬で陰性となり TMA 法で陽性となった乖離検体 6 例のうち、5 例は SDA 法で陰性と判定された。それぞれの残り 1 例については咽頭擦過物検体であり、同時期に採取したうがい液からは本試薬陽性と判定された。これより、咽頭中の菌体の局在の影響を受けているものと推測された。

6. まとめ

迅速、簡便にクラミジアトラコマチスおよび淋菌を同時検出可能な試薬を開発した。感度においても既存品と同等以上の性能を有していることが示された。また、臨床検体を用いた評価においても高い感度、特異度が示された。

謝 辞

本報における臨床評価は宮本町中央診療所 院長 尾上泰彦先生（当時）との共同研究によって実施されました。厚く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) 小野寺 昭一、性感染症に関する予防、治療の体系化に関する研究 平成 22 年度総括研究報告書、20-39 (2011)
- 2) 田中正利、性感染症 STD、南山堂 (2008)
- 3) 厚生労働省健康局結核感染症課情報管理係、感染症発生動向調査、[online]<http://www.mhlw.go.jp/topics/2005/04/tp0411-1.html>、(accessed 2018-07-02)
- 4) 余田敬子、淋菌の咽頭感染、クラミジアの咽頭感染に関する更新、改定について、泌尿器外科 25 (9) 1783-1787 (2012)
- 5) 2016 ガイドライン委員会、性感染症 治療・診断ガイドライン 2016、日本性感染症学会誌第 27 号 第 1 号 Supplement (2016)
- 6) WHO, WHO/RHR/11.14 1-2 (2011)
- 7) Ishiguro T. *et al.*, Intercalation activating fluorescence DNA probe and its application to homogeneous quantification of a target sequence by isothermal sequence amplification in a closed vessel., *Analytical Biochemistry*, 314, 77-86(2003).
- 8) 保川清、TRC 反応による RNA の増幅とリアルタイム検出、*医学のあゆみ*, 206 (8), 479-483 (2003).
- 9) 伊澤祐一、自動遺伝子検査装置 TRCReady[®]-80 の開発、*TOSOH Research & Technology Review*, 59, 47-50 (2015)

