

クラミジア同定用キット (PAP) を 利用した, クラミジアの細胞学的検索と臨床成績

済生会滋賀県病院泌尿器科 (部長: 荒木博孝)

豊田和明・荒木博孝

CYTODIAGNOSIS OF *CHLAMYDIA TRACHOMATIS* BY IMMUNOPEROXIDASE TECHNIQUE

Kazuaki TOYODA and Hirotaka ARAKI

From Urological Clinic, Saiseikai Shigaken Hospital
(Chief: Dr. H. Araki)

The PAP-immunocytochemistry using a monoclonal antibody against *Chlamydia trachomatis* was applied to male patients with clinically manifest urethritis and their female sex partners. In addition, serum levels of the antibody were determined by means of an ELISA system.

Immunoperoxidase reactions were recognized on urethral scrapes in 53 (33%) out of 160 cases, and on endocervical specimens in 13 (59%) out of 22 sex partners of PAP-positive patients. In patients with gonococcal urethritis, an infection of *C. trachomatis* was revealed immunocytochemically in 11 (31%) out of 36 cases, and in 29 (46%) out of 62 cases with non-gonococcal urethritis. Following medication with 200 mg of minocycline or doxycycline per day, PAP staining became negative in 23 (66%) out of 35 cases. The levels of serum antibody against *C. trachomatis* were undetectable in 8 (26%) out of 29 PAP-positive cases, but positive in 7 (15%) out of 44 PAP-negative cases.

Key words: PAP technique, *Chlamydia trachomatis*

はじめに

近年泌尿器科領域において, クラミジア感染による尿道炎が増加してきている¹⁾.

済生会滋賀県病院泌尿器科では, 尿道炎症状を主訴として外来受診した患者に対し, 一次抗体として抗クラミジアモノクローナル抗体を用いた直接鏡検法により, クラミジアの細胞学的検索を試みたので, 若干の文献的考察を加えて報告する.

方 法

1. 対 象

1984年9月より1986年1月までの期間に, 尿道炎症状を主訴として当科を受診した男性160名を対象とした. 年齢分布は18歳から65歳, 平均年齢は33.2歳であった. また女性は, クラミジア陽性と認めた男性患者の性的パートナー22名で, 年齢分布は18歳から45歳, 平均年齢は30.1歳であった.

2. 尿道分泌物採取法

外来受診患者に対し, 排尿後外尿道口を清拭し, アルミ軸性 swab を 6~8 cm 挿入, 検索細胞材料を採取し, スライドガラスの円内に均等に塗りつけ, ただちに methanol-ether 等量混合液で固定を行なった (Fig. 1).

3. クラミジア検索法

1) 直接鏡検法

一次抗体としてクラミジアモノクローナル抗体を用いた市販の酵素抗体キット (Chlamydia Identification Kit, Immuno Peroxidase Chlamydia Assay-A Monoclonal Antibody Procedure, Ortho Diagnostic Systems Inc, : 以下PAP と略す) を用いて行なった.

抗クラミジアモノクローナル抗体は, クラミジアに特異的なものであり, *C. trachomatis* の既知の15種すべての血清型および *C. psittaci* と反応するものである. 抗クラミジアモノクローナル抗体は, クラミ

ジア封入体のあると思われる細胞と反応する。感染細胞内にクラミジア抗原が存在すれば、抗クラミジアモノクローナル抗体はこれらと結合し、続いて第2次抗体（抗マウス IgG）、標識抗体（ペルオキシダーゼ抗ペルオキシダーゼ）を添加することにより、クラミジア封入体を通常の光学顕微鏡で観察することが可能となる訳である。すなわち、標識抗体中のペルオキシダーゼが反応する発色基質（AEC: 3-アミノ-9-エチルカルバゾール）を加えることにより、クラミジア感染部が赤褐色に染色され、抗体複合物全体が判明することとなる（Fig. 2）。

2) 直接鏡検法による陽性の判定

Fig. 3 は、MaCoy 細胞を用いて分離培養したクラミジアのコントロールスライドに PAP 反応を行なったもので、左側は PAP 陰性を、右側は PAP 陽性を示したものである。

また、Fig. 4 は実際の症例で PAP 反応陽性を示したものである。単層円柱上皮の細胞質が赤褐色に染色されているのが陽性の所見である。

3) 血清学的診断法

患者血清中の抗体価を測定する方法は、micro-immunofluorescence (Micro-IF 法) や、クラミジア L-2 株の網様体を抗原とした ELISA 法があるが、

当施設では、ELISA 法を用いて血清学的診断も同時に行なった。なお抗体価32倍以上を（+）とし、16倍は（±）とした。

結 果

外来男性患者160名および女性22名に対し PAP 法を行なった結果、男性は53名33%が PAP 陽性であり、女性の場合は、13名59%が陽性であった（Table 1）。

PAP 法と ELISA 法とを比較すると、PAP 陽性

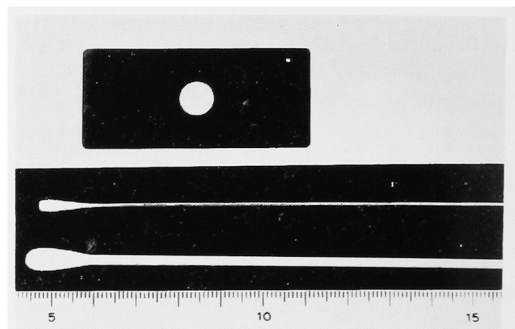


Fig. 1. アルミ軸性 swab
上：アルミ軸綿棒
下：竹軸綿棒

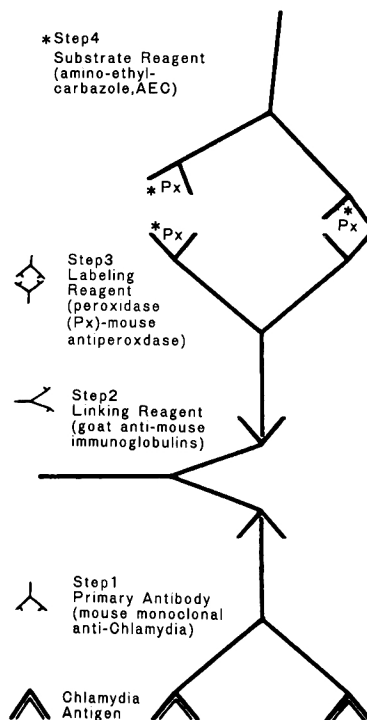


Fig. 2. PAP 法模式図

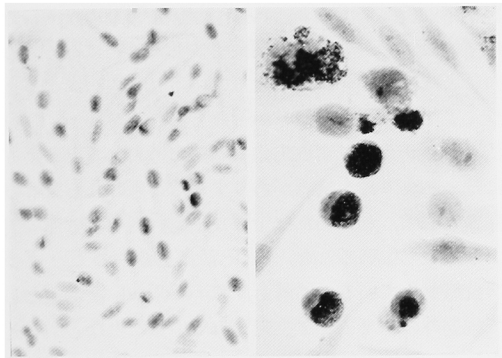


Fig. 3. PAP 反応
a: PAP negative
b: PAP positive

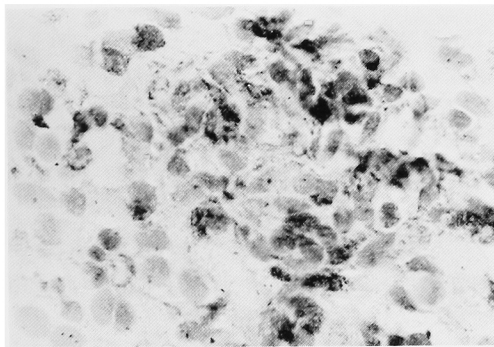


Fig. 4. 臨床例における PAP 陽性反応

Table 1. Detection of chlamydia antigen by means of PAP technique.

	CHLAMYDIA-PAP POSITIVE	CHLAMYDIA-PAP NEGATIVE
MEN n=160	53 (33%)	107 (67%)
WOMEN n=22	13 (59%)	9 (41%)

Table 2. Relationship between serum antichlamydial antibodies and chlamydia detection by PAP technique.

	CHLAMYDIA SEROLOGY (+)	CHLAMYDIA SEROLOGY (±)	CHLAMYDIA SEROLOGY (-)	TOTAL
CHLAMYDIA PAP (+)	21	0	8	29
CHLAMYDIA PAP (-)	7	1	36	44
				73

29例中 8 例 26% に血清抗体陰性が認められ、PAP 陰性 44 例中 7 例 15% に血清抗体陽性を認めた (Table 2).

Table 3. Relationship between chlamydia detection (PAP) and gram negative intra cellular diplococci (gonorrhea).

	CHLAMYDIA-PAP (+)	CHLAMYDIA-PAP (-)
GONORRHEA (+) n=36	11 (31%)	25 (69%)
GONORRHEA (-) n=63	29 (46%)	34 (54%)

淋菌性尿道炎 (以下 GU と略す) とクラミジアとの関係を見ると、GU 36 例中 11 例 31% に PAP 陽性を認めた。また非淋菌性尿道炎 (以下 NGU と略す) 63 例中 29 例 46% が、PAP 陽性であった (Table 3)。

治療成績

クラミジア性尿道炎に対する治療薬として、minocycline 0.2 g/日または doxycycline 0.2 g/日を使用した。PAP 陽性 53 例中、初回受診のみの drop out 症例 11 例、およびクラミジア尿道炎に対する治療開始後の drop out 症例 7 例を除く、35 例に対する治療成績を見ると、35 例中 PAP の陰性化を認めたのは 23 例 66% であり、残り 12 例は現在も治療継続中である。PAP の陰性化例における薬剤の投薬日数を見ると、最短 14 日、最長 171 日であり、平均投薬日数は 50 日であった。これら 23 例中、minocycline 単独投与が 9 例、doxycycline 単独投与が 9 例あり、平均投薬日数は、それぞれ 43 日、31.8 日であった。

考 察

近年、泌尿器科領域において NGU が注目されてきている。その病原体として *C. trachomatis*, *Ureaplasma urealyticum*, *Herpes simplex virus* などが挙げられているが、今回われわれは、これらの病原体のうちのひとつである *C. trachomatis* に注目し、クラミジアの細胞学的検索を PAP 法を用いて行なった。

PAP 法によるクラミジアの検出率の低下を防ぐためには、まず十分な検体を採取することである。採取法として、加藤ら²⁾ は、尿道マッサージ後、化繊性の swab を外尿道口より 2~4 cm 挿入し、できれば swab を回転させながら粘膜上皮を擦過してくると述べている。しかし当施設では、swab により外尿道口附近に存在する分泌物を拭い取ってくるのではなく、前部尿道部の円柱上皮を採取すべきであると考えた。そこでクラミジアおよび上皮細胞に損傷がなく、安易に挿入が可能である、アルミ軸に綿を巻いた swab を

用い、少なくとも外尿道口より6cm以上、すなわち外括約筋部手前、膀胱部尿道附近まで挿入し、回転を加えた後、引き抜くことにしている²⁻⁴⁾。

NGUの病原体としてのクラミジアは、多くの施設で分離検出されている。その分離率については、Micro-Trak法を用いて、加藤ら²⁾は159例中73例49.5%、原ら⁹⁾は61例中27例44.3%そのうち単独陽性例19例70.4%、斉藤ら⁵⁾は245例中101例41.2%と述べている。われわれの行なったPAP法では、160例中53例であった。

クラミジアの血清学的診断法としては、① micro-IF法、② ELISA法が現在使用されている。斉藤ら⁵⁾は、Micro-Trak法で*C. trachomatis*を分離した38例に対しmicro-IF法を施行し、16例42%が抗クラミジア抗体陰性であったと述べている。われわれも、ELISA法により血清学的診断を併用して行なったが、PAP陽性例中26%に抗体価陰性を認めた。すなわち血清学的診断は、斉藤⁵⁾、加藤ら²⁾が述べているように、現時点では、診断法として比較的信頼性が低いと考えられている。

GUからのクラミジア分離率をみると、加藤ら²⁾は196例中46例24%に、斉藤ら⁵⁾は29.4%に、熊本ら⁶⁾は21.3%にクラミジア陽性であったと述べているが、われわれの結果は、32%と高率を示した。

GUとクラミジア性尿道炎とは、潜伏期、分泌物の性状、量、および臨床症状などで、ある程度の鑑別は可能と思われるが、両者の混合感染の場合もあり、GUの治療を開始して1週間経っても、分泌物または炎症像の残存が認められる場合には、熊本ら⁶⁾が述べているように、抗クラミジア感染対策が考慮されねばならない。そして、このことが後淋菌性尿道炎の減少にもつながるものと考ええる。

クラミジア性尿道炎の治療においては、Oriel and Ridgwayの*C. trachomatis*の薬剤感受性に関する報告⁷⁾、および1982年米国CDC (Center for disease control)で発表されたSTD治療指針⁸⁾に基づき、われわれも、minocycline 0.2 g/日またはdoxycycline 0.2 g/日を用いている。

他家の治療成績をみると、クラミジアの消失率は、斉藤ら⁵⁾の場合、minocyclineで96%、doxycyclineで92.9%、原ら⁹⁾の場合、doxycycline 0.2 g/日7日投与にて96.3%、加藤ら²⁾はminocycline/doxycycline 0.2 g/日7日にて100%と述べている。しかし、われわれの場合は、多核白血球の正常化(<4/hpf)および自覚症状の消失などはすべての症例において14日以内に認められたが、PAPの陰性化を認めたのは、

35例中23例66%であり、PAP陰性化までの投薬日数は平均50日と、著しく長期間を要したことになる。このことは、われわれが行なっているPAP法によるクラミジア検出法と、彼らが行なっているMicro-Trak法によるクラミジア検出法との差だけとしてとらえるには、あまりにも格差がありすぎると思われる。この原因として、われわれは十分な細胞材料を膀胱部尿道より採取していること、PAP法は細胞内のクラミジア抗原をみているのに対し、Micro-Trak法は主として細胞外のクラミジア抗原をみていることなどが考えられる。この点に関しては、今後さらに症例を重ね、検討を加えていきたいと考えている。

ま と め

1) 尿道炎症状を主訴として外来受診した160名の男性患者およびその性的パートナー22名に対して、抗クラミジアモノクローナル抗体を用いた直接鏡検法により、クラミジア感染症の細胞学的検索を行ない、53名33%の男性患者、13名59%の女性患者にPAP陽性を認めた。

2) ELISA法による血清抗体価測定では、PAP陽性29例中8例26%に抗体価陰性を、PAP陰性44例中7例15%に抗体価陽性を認めた。

3) 淋菌性および非淋菌性尿道炎のクラミジア感染の割合は、前者が36例中11例31%、後者が63例中29例46%であった。

4) Minocycline 0.2 g/日またはdoxycycline 0.2 g/日によるクラミジア治療により、35例中23例66%にPAP法によるクラミジア抗原の陰性化を認めた。また平均投薬日数は50日であった。

細胞学的検索にご協力いただいた病理検査部小林忠男氏、ご校閲いただいた京都府立医科大学泌尿器科渡辺 洸教授に感謝する。

文 献

- 1) 西浦常雄：STD-病因・診断・治療-総論。臨床と細菌(臨時増刊) 1：7~14, 1984
- 2) 加藤直樹・西浦常雄：STD-病因・診断・治療-クラミジアおよびウレアプラズマと尿道炎。臨床と細菌(臨時増刊) 11：75~91, 1984
- 3) 加藤直樹・西浦常雄：性行為感染症の検査・2 *Chlamydia*, *Mycoplasma* の検査。臨床検査 28(2)：130~137, 1984
- 4) 徐慶一郎：技術講座<細菌>クラミジアの検査法。検査と技術 12(7)：597~601, 1984
- 5) 斉藤 功：講座 性行為感染症(STD)の診断と治療 IV クラミジア, ウレアプラズマ。臨泌 39(4)：293~299, 1985

- 6) 熊本悦明：STD-病因・診断・治療- B. 淋菌感染症, 1. 淋菌感染症の臨床, 臨床と細菌(臨時増刊) 1: 15~33, 1984
- 7) Oriel JD and Ridgway GL: Current topics in infection series 2. Genital infection by Chlamydia trachomatis, p 18, Edward Arnold, London 1982
- 8) STD treatment guidelines, US Department of Health and Human Services 31: No 2S: 355~425, 1982
- 9) 原 三信・藤沢保仁・鷺山和幸・山口秋人・中州肇・小松 潔：男子非淋菌性尿道炎に対する Doxycycline (Vibramycin) の使用経験, 西日泌尿 47: 1561~1569, 1985

(1986年3月27日受付)