

男子クラミジア性尿道炎の治療効果判定における PCR 法の応用

米田 尚生・出口 隆・多田 晃司・伊藤 康久
 岩田 英樹・原田 吉将・岡野 学・齊藤 昭弘

山田伸一郎・坂 義人・河田 幸道
 岐阜大学泌尿器科*

江崎 孝行
 同 微生物

玉 木 正義・前 田 真 一
 トヨタ記念病院泌尿器科

齊 藤 功
 東京共済病院泌尿器科

(平成4年12月24日受付・平成5年4月20日受理)

PCRを用いた男子尿道炎患者の初尿からの *Chlamydia trachomatis* の検出は侵襲がなく、尿道炎診断に有用であると報告してきた。抗菌剤治療の早期には微生物が死滅しても、そのDNAは残存し、高感度のPCR法では陽性と判定される可能性が考えられることより、PCRによる初尿からの *C. trachomatis* の検出が尿道炎の治療効果の判定にも応用可能か否かについて検討した。治療前にPCR法とIDEIA®クラミジアにて初尿から *C. trachomatis* が検出された非淋菌性尿道炎患者25症例を対象とした。尿道炎の治療はdoxycycline 200 mg 7日間投与6例、tosufloxacin 450 mg 7日間投与19例である。治療後、7日から10日目の判定で25例すべてでPCR法により *C. trachomatis* は陰性と判定された。これらの症例では臨床症状の消失と初尿中白血球の正常化とを認め、PCRの検出結果は臨床効果と一致した。クラミジア性尿道炎において適切な抗菌剤投与により、臨床効果の改善と一致して *C. trachomatis* DNAは消失することが示された。したがって、PCRはクラミジア性尿道炎の通常の治療経過の判定に応用可能であると考えられた。

Key words: PCR, *C. trachomatis*, 治療効果判定

我々はすでにpolymerase chain reaction (PCR)¹⁾を応用した男子尿道炎患者の尿道スワブと初尿からの *Chlamydia trachomatis* の検出法を報告し、PCR法の尿道炎診断における有用性を報告してきた^{2,3)}。今回、PCR法による抗菌剤治療後の男子尿道炎患者の初尿からの *C. trachomatis* の検出が治療効果判定に応用可能であるかについてIDEIA®クラミジア (Novo Nordisk社) (以下IDEIA) による検出結果と比較し、検討した。

I. 材料と方法

1. 男子尿道炎患者

尿道炎の臨床症状を有し、治療前の初尿沈渣中白血球数が400倍視野にて5コ/hpf以上認め、PCRおよ

びIDEIAにて初尿より *C. trachomatis* が検出された男子クラミジア性尿道炎患者25症例を対象とした。

2. 尿道炎の治療

クラミジア性尿道炎患者25例の治療としてはtosufloxacin (TFLX) 450 mg/day およびdoxycycline (DOXY) 200 mg/day の7日間経口投与がそれぞれ19例と6例であった。

3. 臨床経過および検査

治療後は原則として抗菌剤投与7日後に尿道炎症状の有無を観察した。臨床検査としては治療前および治療後に初尿30 mlを採取し、このうち10 mlから初尿沈渣中白血球数のカウント、残りの20 mlをIDEIA

* 岐阜市司町40

と PCR による *C. trachomatis* の検出に用いた。

4. 初尿からの IDEIA による *C. trachomatis* の検出

治療前および治療後の初尿からの IDEIA による *C. trachomatis* の検出は初尿 30 ml のうちの 10 ml を 3,500 rpm, 15 分間遠心分離し, 上清を捨て, 尿沈渣に IDEIA の検体希釈液 1 ml を加え, 100°C, 15 分間湯浴した後, キット添付の操作手順に従った。陰性コントロールの平均吸光度に 0.05 を加算した吸光度を cut-off 値とし, cut-off 値以上を陽性, cut-off 値未満を陰性とした。ただし, 陰性コントロールの平均吸光度 +0.03 から cut-off 値までの吸光度を示す検体は再検し, 判定した。

5. 初尿からの PCR による *C. trachomatis* の検出

治療前および治療後の初尿からの PCR による *C. trachomatis* の検出は初尿 10 ml を 3,500 rpm, 15 分間遠心分離し, 上清を捨て, 尿沈渣を Chlamydiazyme® (Abott 社) の検体希釈液 1 ml に懸濁し, その一部から NP-40, Tween-20, proteinase K を用いて DNA の抽出を行い, すでに報告した方法に従って行った^{3,4)}。PCR 後, 2%アガロースゲルにて電気泳動を行い, ethidium bromide 染色にて塩基配列から予測される 242 bp の DNA 断片の増幅を認めた場合を *C. trachomatis* 陽性と判定した。

II. 結 果

7 日間の抗菌剤の投与が行われたクラミジア性尿道炎患者 25 症例において, 7 日目 20 例, 9~10 日目 5 例で治療効果判定が行われた全例で臨床症状が消失し, 初尿中白血球数も正常化した。治療後の初尿を用いた IDEIA による検討では, 7 日目判定のうち 1 例は *C. trachomatis* 陽性, 他の 24 例は *C. trachomatis* 陰性と判定された。PCR による検討では 7 から 10 日目の検討では 25 例すべてで *C. trachomatis* 陰性と判定された。すなわち初尿を用いた抗菌剤投与後 7 から 10 日目における IDEIA と PCR の *C. trachomatis* 検出における不一致は 1 例に認められた (Table 1)。

Table 1. Test-of-cure analysis by PCR and IDEIA® chlamydia for *Chlamydia trachomatis* after antimicrobial therapy

Day of assessment	IDEIA -	IDEIA +
	PCR -	PCR +
Day 7	19	1
Day 10	5	

III. 考 察

従来, 感染症診断には原因菌の分離培養が必須であったが, 遅発育細菌では同定に時間がかかる点や株化培養細胞が必要なクラミジアなどでは手技が煩雑で検査室レベルでの検出が難しい。これに対して遺伝情報を蓄える DNA や遺伝情報を蛋白に翻訳する RNA を用いた DNA 診断法が感染症の迅速診断に応用されつつある。微生物の同定に特異的な塩基配列に対するプローブを用いて検出する DNA hybridization 法が開発され, さらに最近では PCR による DNA 増幅を行うことによりその検出感度が飛躍的に向上した。

抗菌剤などにより病原体が死滅したり, 不活化した場合, 従来の培養法では陰性となってもその抗原性を検出する酵素抗体法や DNA 診断法ではある時期までは陽性と判定され, 臨床経過と不一致となる可能性が考えられる。特に PCR 法は高感度であるため病原体が死滅しても, 微量の DNA が残存すれば陽性となる可能性があり, このような鋭敏な検査法が実際臨床の場で抗菌剤の治療効果判定に応用可能か疑問が持たれる。

C. trachomatis の治療中の細胞培養法と他法との比較としては西浦ら⁷⁾, 加藤ら⁹⁾ による報告があり, この報告では抗菌剤投与 3 日目の治療開始間もない時期においては *C. trachomatis* の培養は陰性であるが, 抗原性を検出する MicroTrak® 直接蛍光抗体法や Chlamydiazyme® は陽性となる不一致例がみられた。これは *C. trachomatis* の増殖がきわめて弱くなるか死滅しているが, 抗原性のみが残存するためであろうとしている。抗菌剤 7 日治療後の検討としては婦人科領域において MicroTrak® 直接蛍光抗体法と細胞培養法の比較があり⁹⁾, 高い一致率であった。

今回は初尿からの *C. trachomatis* の検出法が治療効果の判定に応用可能かについて検討したが, 治療後 7 日目以降の PCR での *C. trachomatis* の陰性化は初尿沈渣中白血球数の正常化や臨床症状の消失などと全例において一致した。一方, IDEIA による治療後の *C. trachomatis* の検出では DOXY 投与の 1 例で *C. trachomatis* 陽性と判定されたが, この症例においても臨床症状は消失し, 初尿沈渣中白血球数も正常化しており, 臨床経過を反映しない結果と思われた。この症例ではさらに 7 日間 DOXY の投与が行われ, 14 日目には IDEIA で *C. trachomatis* 陰性と判定されている。しかし 7 日目において *C. trachomatis* DNA は消失したものの抗原性のみが存続したか, あるいは IDEIA の偽陽性であるかの判断は困難である。このような点を含め *C. trachomatis* 抗原および DNA の治

療後の消失時期の比較、さらに、治療早期(3日目程度)における *C. trachomatis* DNA の消失についての PCR 法による検討に興味を持たれる。

クラミジア感染症の治療後の検討としては、子宮頸管スワブや尿道スワブからの PCR と培養法の比較検討がなされ¹⁰⁾、抗菌剤治療7日後における治癒例での培養法と PCR の結果はすべて一致しており、我々の臨床的治癒と考えられた初尿からの PCR の結果と同様の結果であった。

現在、非淋菌性尿道炎の治療効果の判定が行われる7日目には今回の検討から *C. trachomatis* DNA の存在は認められていない。したがって、初尿を用いた PCR はクラミジア性尿道炎の診断だけでなく、抗菌剤治療後、通常行われる7日目あるいは14日目の治療効果判定にも応用可能であり、初尿を検出材料として使用できる点を含めて有用な方法と考えられる。

文 献

- 1) Saiki R K, Golfando D H, Stoffel S, Scharf S J, Higuchi R, Horn G T, Mullis K B, Erlich H A: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487~491, 1988
- 2) 出口 隆, 山本啓之, 岩田英樹, 伊藤康久, 玉木正義, 前田真一, 小野一徳, 斎藤 功, 江崎孝行, 河田幸道: Polymerase chain reaction 法による男子尿道炎患者の尿道擦過材料からの *Chlamydia trachomatis* の検出。感染症誌 65: 1555~1559, 1991
- 3) 米田尚生, 出口 隆, 山本啓之, 岩田英樹, 伊藤康久, 斎藤昭弘, 坂 義人, 玉木正義, 前田真一, 斎藤 功, 江崎孝行, 河田幸道: Polymerase chain reaction 法を用いた初尿沈渣からの *Chlamydia trachomatis* の検出。感染症誌 66: 831~836, 1992
- 4) 米田尚生, 出口 隆, 多田晃司, 山本啓之, 兼松江巳子, 岩田英樹, 岡野 学, 伊藤康久, 斎藤昭弘, 坂義人, 伊藤証二, 玉木正義, 前田真一, 斎藤 功, 江崎孝行, 河田幸道: 男子尿道炎患者の初尿沈渣からの *Chlamydia trachomatis* の検出における polymerase chain reaction 法と酵素抗体法の比較。感染症誌 66: 1473~1477, 1992
- 5) Stephens R S, Mullenbach M, Sanchez-Peacador R, Agabian N: Sequence analysis of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L₂. *J. Bacteriol.* 168: 1277~1282, 1988
- 6) 出口 隆, 山本啓之, 岩田英樹, 山本直樹, 伊藤康久, 江崎孝行, 斎藤 功, 河田幸道: Polymerase chain reaction 法による *Chlamydia trachomatis* 検出の基礎的検討。感染症誌 65: 1183~1187, 1991
- 7) 西浦常雄, 加藤直樹, 熊本悦明, 橋爪 壮, 村上信乃, 斎藤 功, 小島弘敏, 長田尚夫, 中村正夫, 中野博: *Chlamydia trachomatis* による尿路性器感染症に対する Doxycycline の臨床効果。Chemotherapy 33: 712~725, 1985
- 8) 加藤直樹, 坂 義人, 西浦常雄, 熊本悦明, 橋爪壮, 小島弘敏, 斎藤 功, 長田尚夫, 野口昌良, 中野博: *Chlamydia trachomatis* 感染症診断薬としての Chlamydiazyme™ の有用性—尿路性器感染症における検討—。感染症誌 60: 378~385, 1986
- 9) Nachamkin I, Sawyer K, Skaline D, Crooka G W, Ciotti R, Sondheimer S J: Test-of-cure analysis by direct immunofluorescence for *Chlamydia trachomatis* after antimicrobial therapy. *J. Clin. Microbiol.* 25: 1774~1775, 1987
- 10) Claas H C J, Wagenvoort J H T, Niesrera H G M, Tio T T, Van Rijsoort-vos J H, Quint W G V: Diagnostic value of the polymerase chain reaction for *Chlamydia* detection as determined in a follow-up study. *J. Clin. Microbiol.* 29: 42~45, 1991

Test-of-cure analysis by polymerase chain reaction for *Chlamydia trachomatis*
after antimicrobial therapy

Hisao Komeda¹⁾, Takashi Deguchi¹⁾, Yasuhisa Itoh¹⁾,
Hideki Iwata¹⁾, Yoshimasa Harada¹⁾, Manabu Okano¹⁾,
Akihiro Saitoh¹⁾, Shin-ichiro Yamada¹⁾, Yoshihito Ban¹⁾,
Yukimichi Kawada¹⁾, Takayuki Esaki²⁾, Masayoshi Tamaki³⁾,
Shin-ichi Maeda³⁾ and Isao Saito⁴⁾

¹⁾Department of Urology and ²⁾Department of Microbiology,

Gifu University School of Medicine, Tokyo, Japan

³⁾Department of Urology, Toyota Memorial Hospital

⁴⁾Department of Urology, Tokyo Kyosai Hospital

Detection of *Chlamydia trachomatis* in first-void urine (FVU) by polymerase chain reaction (PCR) has been reported to be a useful non-invasive test for diagnosing male urethritis caused by *C. trachomatis*. Although *C. trachomatis* is killed by antimicrobials therapy, its DNA may remain, and a highly sensitive PCR might give a positive result for *C. trachomatis*. To evaluate PCR as a method for posttreatment determination of the efficacy of antimicrobial drugs against chlamydial urethritis, test-of-cure analysis by PCR for detecting *C. trachomatis* in FVU was performed in 25 patients with nongonococcal urethritis, in whom *C. trachomatis* was detected in FVU by both PCR and IDEIA® chlamydia. Six patients were treated with 200 mg of DOXY for 7 days, and 19 were treated with 450 mg of tosufloxacin (TFLX) for 7 days. After treatment, PCR and IDEIA® were carried out for detection of *C. trachomatis*. IDEIA® was negative in 24 patients, and positive in one patient. PCR was negative in all patients. Clinical symptoms resolved and FVU sediments normalized in all patients. In one patient, though, *C. trachomatis* was detected by IDEIA® regardless of resolution of clinical symptoms and normalization of FVU sediments. The results with PCR were in complete agreement with the clinical results. Therefore, PCR may be useful for monitoring the clinical efficacy of chemotherapy against chlamydial urethritis.