

各種血清型菌体を抗原とした immunoblot 法による

抗 *Chlamydia trachomatis* 抗体の検出

¹⁾ 杏林大学保健学部臨床検査学研究室, ²⁾ 明治乳業株式会社医薬事業部, ³⁾ もとむら産婦人科医院,
⁴⁾ 聖マリアンナ医科大学横浜西部病院小児科, ⁵⁾ 独立行政法人国立病院機構東京医療センター小児科,
⁶⁾ 富士重工業健康保険組合総合太田病院小児科, ⁷⁾ 北里大学医学部感染症学講座

菰田 照子¹⁾ 大島 俊文²⁾ 芦田 愛²⁾
 坂内 久一¹⁾ 本村龍太郎³⁾ 秋田 博伸⁴⁾
 岩田 敏⁵⁾ 佐藤 吉壮⁶⁾ 砂川 慶介⁷⁾

(平成 18 年 8 月 14 日受付)

(平成 18 年 10 月 24 日受理)

Key words: *Chlamydia trachomatis*, immunoblot, MOMP, antibody

要 旨

Chlamydia trachomatis に対する抗体検出法の 1 つである immunoblot (IB) 法を用いて各種血清型菌株と患者血清との反応性を検討した。また *C. trachomatis* 特異的合成ペプチドを抗原とした enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) との関連を検討した。

C. trachomatis 抗原陽性婦人血清 12 例を用い、血清型 E と C 菌体をそれぞれ抗原とした IB 法を比較したところ、反応の強さは $E > C$ 11 例, $E < C$ 1 例であった。一方、E または C 株のペプチドを抗原とした ELISA では、 $E > C$ の吸光度値を示したのが 6 例, $E < C$ が 6 例であった。また、別の *C. trachomatis* 抗原陽性婦人血清 6 例に対して血清型 L2, D, E, C の各菌体を各々抗原とした IB 法を実施したところ、反応の強さは $E \geq D \geq L2 \geq C$ の順であった。更に複数株の合成ペプチド (C, E, G, L2) を抗原としたペプチド クラミジア「明乳」(P-ELISA) では IB 法で陽性を示した血清 18 例全てが陽性であった。

以上の結果は IB 法による *C. trachomatis* 抗体検出では抗原として用いる菌体の血清型により感度が異なることを示している。また、ペプチドを抗原とする ELISA では複数の血清型菌由来のペプチドを用いることが重要であり、結果の判定にはこれを考慮した判断が必要と思われる。

[感染症誌 81:133~137, 2007]

序 文

Chlamydia trachomatis 感染症の実験室内診断法は、感染部位から菌体や DNA を検出する方法と血清中の抗体を検出する方法の 2 つに大きく分けられる¹⁾。抗体検査は抗原検査が困難な骨盤内感染症、卵管炎、副睾丸炎等^{2)~4)}の疾患で特に有用とされ、micro-immunofluorescence assay (MIF 法)⁵⁾が標準法として定着している。しかし、抗原として各種血清型菌体が必要であること、操作や判定に熟練を要することなどから、一部の研究機関でのみ行われている。それ故、一般的には操作が容易で多数検体処理が可能な ELISA⁶⁾⁷⁾が

用いられている。一方、immunoblot (IB) 法はバンドの検出により、*C. trachomatis* 菌体が包含する各種抗原に対する抗体との反応を肉眼で確認できることから、測定法間の不一致例の検討などに用いられている。しかし、HIV や HTLV 感染症での確認試験^{8)~11)}のように確立された方法にはなっていない。

今回、ペプチドを抗原とした ELISA と IB 法との関連を明らかにするため、血清型 L2, D, E, C の各菌体を抗原とした IB 法と ELISA (抗原: E, C 単独合成ペプチドまたは C, E, G, L2 の 4 種混合ペプチド) について、患者血清との反応性を比較検討した。

別刷請求先: (〒192-8508) 東京都八王子市宮下町 476

杏林大学保健学部臨床検査学研究室

菰田 照子

Fig. 1 Confirmation of purity for highly purified *C. trachomatis* for immunoblotting antigen
Cell debris are usually seen as red when detected in fluorescence assay (FA). No distinct contaminants were seen in the purified organisms in either FA (A) or electron microscopic observation (B).

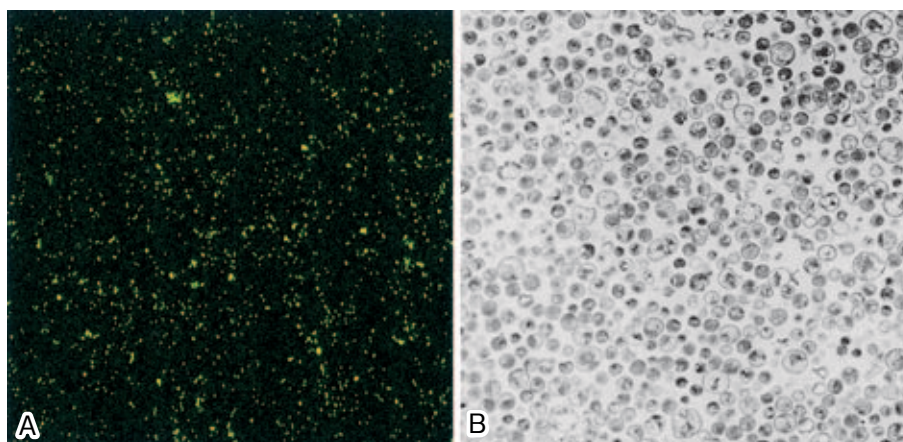


Table 1 Summary of reactivity to different serovar antigens of *C. trachomatis*

Serum No	ELISA * (IgG)			P-ELISA **		Immunoblot *** (IgG)	
	Blank	Ag (peptide)		IgA	IgG	Ag (whole organism)	
		VDIV E	VDIV C			E	C
1	0.046	0.138	0.045	± (1.06)	+ (4.66)	++	+ weak
2	0.093	0.167	0.356	+ (1.78)	+ (7.45)	++	++
3	0.070	0.107	0.285	+ (2.38)	+ (4.81)	+	++
4	0.060	0.416	0.074	- (0.47)	+ (7.12)	++	+
5	0.156	0.478	0.630	+ (4.21)	+ (6.34)	+++	+++
6	0.095	0.125	0.187	+ (2.19)	+ (4.42)	++	+
7	0.054	0.258	0.093	+ (5.04)	+ (7.03)	+++	+
8	0.040	0.062	0.201	+ (1.85)	+ (4.70)	++	++
9	0.045	0.162	0.069	+ (3.90)	+ (5.25)	++	+
10	0.052	0.271	0.117	+ (2.31)	+ (6.69)	+++	+
11	0.050	0.082	0.158	- (0.34)	+ (5.42)	++	++
12	0.043	0.118	0.046	+ (2.92)	+ (4.32)	++	+
13	0.083	0.075	0.068	- (0.13)	- (0.23)	-	-

* : Absorbance at 450nm

** : ELISA using mixed peptides synthesized by gene expression of *C. trachomatis* serovar C, E, G, and L2 as antigen and showing cutoff index

*** : Tone of band reacting with MOMP.

材料と方法

1. 血清

1993-1995年に、もとむら産婦人科医院（長崎市）を受診し、*C. trachomatis*感染症の疑いで採取された頸管スワブおよび血清で抗原・抗体検査が陽性の患者18例、そして陰性者1例の保存血清を用いた。抗原検出はIDEIA クラミジア（協和メデックス）、抗体測定はセロイパラライザ クラミジア（明治乳業）にて行われていた。これら血清はクラミジア関連検査に使用する旨を了解して採取されており、本実験での成績管理、保存等の徹底を図るため本学倫理委員会の承認を得た（No. 17-6）。

2. *C. trachomatis*抗原の調製

*C. trachomatis*血清型 C/TW-3/OT (C), D/UW-3/Cx (D), E/UW-5/Cx (E), L2/434/Bubo (L2) の4血清型菌株をそれぞれ HeLa 229細胞に感染させ、48時間培養した。各々の感染細胞を培養液ごと回収し、超音波（20KHz, 1分）により破碎した後、Caldwellら¹²⁾の比重遠心分画法を行った。更に新たにフィルター（Nylon Net Filter 孔径11μmとDurapore membrane filter 孔径5, 1.6, 0.65μm; Millipore）を通し、高純度の精製菌体とした。精製した菌体をSPG¹³⁾に浮遊させ、使用まで-80℃に保存した。

3. 抗原菌体の純度検討

精製した菌液について蛍光顕微鏡および電子顕微鏡下で宿主由来成分が除去できたことを確認した。即ち、

Table 2 Comparison of immunoblotting reactivity among patient sera and different serovar antigens of *C. trachomatis*

Serum	P-ELISA *		Immunoblotting ** (IgG)				MIF ***	
	IgA	IgG	L2	D	E	C	IgA	IgG
1	- (0.47)	+ (2.44)	+ weak	+ weak	+ weak	-	< 8	32
2	+ (8.63)	+ (7.06)	+ weak	+	+	+ weak	≥ 128	64
3	- (0.74)	+ (3.80)	+ weak	+ weak	+ weak	+ weak	< 8	8
4	+ (> 8.95)	+ (> 7.76)	++	+++	+++	+	128	256
5	+ (1.35)	+ (3.98)	+	+	+	+	16	16
6	+ (1.60)	+ (4.54)	+	+	++	+ weak	ND	ND

* : P-ELISA using mixed peptides synthesized by gene expression of *C. trachomatis* serovar C, E, G, and L2 as antigen and showing cutoff index

** : Tone of band reacting with MOMP.

*** : Using serovar L2 as antigen.

ND : Not done.

スライドガラスに菌液を点置，アセトン固定し抗 *C. trachomatis*-FITC 標識抗体（デンカ生研）を 37°C 30 分反応させた。洗浄後，透過型蛍光顕微鏡（Olympus BH：オリンパス）にて蛍光緑に染まる *Chlamydia* 菌体と赤く染まる細胞成分の有無を観察した。一方，精製菌液を遠心（18,500×g）後，沈渣を 2.5% グルタルアルデヒドおよび 1% 四酸化オスミウムにより固定，エポン包埋，薄切し，酢酸ウラニルおよびクエン酸鉛による二重染色後，透過型電子顕微鏡（JEM-100CX：日本電子）にて観察した。

4. Immunoblot (IB) 法

著者らのこれまでの方法¹⁴⁾を一部変更し行った。抗原は 2. で調製した各血清型の精製菌体を用いた。即ち，タンパク量を BCA 法（Pierce）にて測定後，4~12% のグラジエント SDS-PAGE（Tefco）に 1 レーン当り 2μg タンパク量相当の菌液を負荷し，15mA/cm で泳動した。ニトロセルロース膜（Hybond-C：GE ヘルスケアバイオサイエンス）に転写し，5% スキムミルクでブロッキングした。0.5% スキムミルクで希釈した血清（1:100）を室温で振盪しながら 2 時間反応させた。洗浄後，抗ヒト IgG-POD 標識抗体（Protos）を室温で振盪しながら 1 時間反応させた。洗浄後，ジアミノベンチジンを chromogen として発色させた。判定は *C. trachomatis* の主要外膜タンパク（MOMP）バンドの出現をもって抗体陽性とした。

5. 抗体測定

Wang らの MIF 法⁵⁾および ELISA を用いて *C. trachomatis* に対する IgA および IgG 抗体を測定した。MIF 法は STD の起因菌である B 群の血清型株と広く交差反応を示す血清型 L2 を用い，血清の最高希釈倍数 16 倍以上を陽性とした。また ELISA にはペプチド クラミジア-IgA（または-IgG）「明乳」（明治乳業：P-ELISA）⁶⁾¹⁵⁾¹⁶⁾を用いた。本法の抗原は血清型の異なる *C. trachomatis* MOMP の VDIV 領域の種特

異的ペプチドをそれぞれ合成，混合したものである。測定操作は添付文書に従い行った。判定はカットオフインデックス（COI）で表し，COI が 0.9 未満を陰性（-），0.9-1.1 を判定保留（±），1.11 以上を陽性（+）とした。更に血清型 E または C のペプチドを抗原とした ELISA（S-ELISA）を行った。すなわち，血清型 E または C の遺伝子情報により PSSM-8 システム（島津製作所）で合成したペプチドを ELISA 用プレートに固相化し，1%BSA でブロッキング処理を行った。各血清の Blank はペプチドを固相化せず，ブロッキング処理のみとした。反応条件は P-ELISA と同様に行えることを確認しており（未発表データ），操作は添付文書に従い行った。結果は 450nm における吸光度値で表した。

成 績

1. *C. trachomatis* 菌体の純度

Fig. 1 に高純度に精製した *C. trachomatis* 血清型 L2 株を示した。抗 *C. trachomatis*-FITC 標識抗体による染色像では，対比染色により通常染め出される赤色の細胞由来成分が認められなかった（A）。また電子顕微鏡下（B）では，増殖段階の異なる L2 菌体（基本小体，中間体，網様体）以外に明らかな細胞残渣は認められず，高度に精製されていることが確認された。

2. 血清型 E または C 株特異的ペプチドを抗原とした S-ELISA と菌体を抗原とした IB 法

C. trachomatis 抗原陽性患者血清 12 例，陰性患者血清 1 例の抗体測定結果を Table 1 に示した。抗 *C. trachomatis* 抗体陰性血清の 1 例（No. 13）は S-ELISA，P-ELISA，IB の全法で陰性であった。12 例の抗原陽性患者血清の P-ELISA，IB 法による抗体測定結果は IgG 抗体は全て陽性であったが，P-ELISA では IgA 抗体は 9 例が陽性，判定保留 1 例，陰性 2 例であった。IB 法で IgG 抗体陽性の 12 例は全例に MOMP（40 kDa）以外に 60-62kDa のバンドが検出された。血

清型 E, C 菌体を用いた IB 法の反応性を比較すると, E>C が 11 例, E<C が 1 例となり, 血清型 E の反応性が強い傾向にあった. S-ELISA での反応性は E>C が 6 例, E<C が 6 例となり, 血清型 E に強く反応した 6 例は IB 法でも全て血清型 E に強く反応した. しかし, 血清型 C に強く反応した 6 例のうち IB 法でも強く反応したのは 1 例のみであり, 4 例はほぼ同等ないしはやや弱く, 1 例は血清型 E に強く反応した. S-ELISA に比べ IB 法では血清型 E に対する反応性が高い傾向にあった.

3. 血清型 L2, D, E, C 菌体を抗原とした IB 法

C. trachomatis 抗原陽性患者血清 6 例について IB 法及び P-ELISA を実施した. 結果を Table 2 に示した. 血清型 L2, D, E, C のいずれの抗原を用いた場合でも IB 法の結果は全て陽性であり, MOMP 及び 60-62 kDa のバンドが検出された. IB 法上のバンドの強さは $E \geq D \geq L2 \geq C$ の順であり, 上記 1. の結果と同様に血清型 E は C より反応性が高い傾向にあった. P-ELISA では IgA 抗体が 4 例, IgG 抗体が 6 例陽性であった.

考 察

IB 法は MIF 法に比し操作や判定に熟練を要しないため, 各種測定法間で生じた不一致症例の検討などに確認試験として用いられる. しかし, 統一された方法はなく, 各研究者が独自に行っているのが現状である. 著者らは比較的種特異性の高い MOMP のバンドの有無を指標に抗体の有無を判定している.

同一タンパク量の血清型 L2, D, E, C 菌体を抗原とした IB 法では, 抗原の血清型により, 陽性, 陰性の判定結果に違いはなかったが, 血清により染め出されるバンドの濃淡が大きく異なる場合が認められた. それ故, IB 法の検出感度限界に近い抗体レベルの血清では判定が逆転する可能性があると考えられた. 事実, IB 法の反応は, $E \geq D \geq L2 \geq C$ の順で強く, STD の患者から検出される血清型群 (B 群) に属する血清型 D, E, L2 菌体はトラコーマを起す群 (C 群) の血清型 C 菌体より反応性が強い傾向にあった. 本邦では B 群の血清型 D, E や中間群の血清型 G の感染者が多いとされており¹⁷⁾¹⁸⁾, 今回の限られた例数の患者血清についても同様な分布を示していた可能性が考えられた.

C. trachomatis 特異的抗原は MOMP の可変領域 VDI~IV の中で強い抗原性を持つ VDIV である. VDIV は 32-33 個のアミノ酸からなるポリペプチドである. VDIV を抗原に用いることは遺伝子情報から理論上¹⁹⁾, *Chlamydothila pneumoniae* や *Chlamydia psittaci* との交差性がないという利点がある. 特に成人の 50% 以上が保有している抗 *C. pneumoniae* 抗体の影響

を受けないことは臨床上, 最大の利点である. しかし, VDIV は可変領域であるため同一のアミノ酸配列である領域は少なく, 唯一 9 個のアミノ酸が B 群, C 群, 中間群の各群間 (血清型 K を除く) で共通である. 従って, 15 種の *C. trachomatis* 血清型の全てに同一のアミノ酸配列が存在している訳ではない. それ故, 抗体検出には抗原として用いる血清型株の選択が重要である.

P-ELISA では *C. trachomatis* 種特異的ペプチドを各群から代表的な血清型株 (C, E, G, L2) より選択し, そのペプチドを混合して抗原としている. それ故, 単一菌体を抗原とする IB 法に比し, P-ELISA の方が抗体検出の漏れがないものと推測される. 今回の IB 法による結果はそれを強く示唆するものであった.

以上の知見から, ELISA の抗原には複数の血清型の VDIV を用いることが抗体を見逃すことなく, 検出するために重要であることが示唆された. クラミジア抗体検査における IB 法の有用性は明らかであるが, さらに症例数を増し, 標準化を視野に入れた抗原菌体の選択がなされる必要がある.

本研究は杏林大学保健学部高度推進共同研究 (2004, 2005 年) の一部として行った.

文 献

- 1) 坂内久一, 菰田照子: クラミジア感染症の診断の最近の動向. 化学療法の領域 2004; 20: 372-8.
- 2) Hamark B, Brorsson JE, Eilard T, Forssman L: Salpingitis and *Chlamydia* subgroup A. Acta Obstet Gynecol Scand 1976; 55: 377-8.
- 3) Mardh PA, Ripa T, Svensson L, Westrom L: *Chlamydia trachomatis* infection in patients with acute salpingitis. N Engl J Med 1977; 296: 1377-9.
- 4) Heap G: Acute epididymitis attributable to chlamydial infection: preliminary report. Med J Aust 1975; 1: 718-9.
- 5) Wang SP, Grayston JT: Immunologic relationship between genital TRIC, lymphogranuloma venereum, and related organisms in a new microtiter indirect immuno-fluorescence test. Am J Ophthalmol 1970; 70: 367-74.
- 6) 尾内一信, 長谷川恵子, 牧 隆司, 森岡 均, 松島 寛, 大島俊文, 他: 人工合成種特異抗原を用いた *Chlamydia trachomatis* 抗体測定キットの臨床的検討. 感染症誌 1998; 72: 249-57.
- 7) 松本 明, 別所敏子, 岸本寿男, 副島林造, 渡辺博夫, 川越清隆: 抽出抗原を用いた *Chlamydia trachomatis* 感染者抗体測定用キット (ヒタザイム クラミジア Ab) の開発. 感染症誌 1992; 66: 584-91.
- 8) World health organization: Proposed WHO criteria for interpreting results from Western blot

- assays for HIV-1, HIV-2 and HTLV-1/HTLV-2. Weekly Epidemiol Rec 1990 ; 65 : 281—98.
- 9) Centers for disease control : Inter-pretation and use of the Western blot assay for serodiagnosis of human immuno-deficiency virus type 1 infection. MMWR 1989 ; 38 : s1—7.
 - 10) 上平 憲, 中嶋茂宏, 跡上 直, 早田 央 : ウエスタンブロット法「プロブロットHTLV-1」による抗HTLV-1抗体の測定. 臨床とウイルス 1993 ; 21 : 73—6.
 - 11) 菱田 靖, Magnusen AF, 薦田温子, 奥村恭司, 今井浄子, Osei-Kwasi M, 他 : HIV-2 を含めた HIV 抗体検出法の比較検討. 医学と薬学 1992 ; 27 : 959—70.
 - 12) Caldwell HD, Kromhout J, Schachter J : Purification and partial characterization of the major outer membrane protein of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 1981 ; 31 : 1161—76.
 - 13) Tjiam KH, Van Heijst BYM, De Roo JC, De Berr A, Van Joost TH, Michel MF, *et al.* : Survival of *Chlamydia trachomatis* in different transport media at different temperatures: Diagnostic implications. Br J Vener Dis 1984 ; 60 : 92—4.
 - 14) 菰田照子, 坂内久一, 手塚敏春, 井上 薫 : Immunoblot (WB) 法によるクラミジア抗体の検出—市販測定キットとの比較—. 感染症誌 1996 ; 70 : 232—8.
 - 15) 坂内久一, 菰田照子, 秋田博伸, 岩田 敏, 佐藤吉壮, 砂川慶介 : 合成ペプチド抗原を用いた抗 *Chlamydia trachomatis* 抗体の検出. 感染症誌 1999 ; 73 : 633—9.
 - 16) 菰田照子 : 長期フォローアップ *Chlamydia trachomatis* 感染患者血清にみる抗体測定法の評価. 医学検査 2005 ; 54 : 209—13.
 - 17) 高橋 俊, 佐藤 梢, 岸本寿男, 萩原敏且, 山崎 勉, 橋北義一, 他 : 埼玉医科大学病院より検出された *Chlamydia trachomatis* 血清型の疫学. 感染症誌 2005 ; 79 : 718—9.
 - 18) 高橋幸子, 大澤洋之, 岡垣竜吾, 小林浩一, 石原 理 : 産婦人科領域における *C. trachomatis* の血清型別検査と臨床症状の関連性. 日産婦会誌 2005 ; 57 : 773.
 - 19) Yuan Y, Zhang YX, Watkins NG, Caldwell HD : Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. Infect Immun 1989 ; 57 : 1040—9.

Detection of Antibodies by Immunoblotting Using *Chlamydia trachomatis* Serovars

Teruko KOMODA¹⁾, Toshifumi OHSHIMA²⁾, Ai ASHIDA²⁾, Hisaichi BANNAI¹⁾, Ryutaro MOTOMURA³⁾, Hironobu AKITA⁴⁾, Satoshi IWATA⁵⁾, Yoshitake SATO⁶⁾ & Keisuke SUNAKAWA⁷⁾

¹⁾Department of Medical Technology, Faculty of Health Sciences, Kyorin University,

²⁾Pharmaceuticals Department, Meiji Dairies Corporation, ³⁾Koujinkai Hospital, Motomura Gynecology clinic,

⁴⁾Department of Pediatrics, St-Marianna University of Medicine, Yokohama City Seibu Hospital,

⁵⁾Department of Pediatrics, National Tokyo Medical Center,

⁶⁾Department of Pediatrics, Fuji Heavy Industries LTD. Health Insurance Society General Ohta Hospital,

⁷⁾Department of Infectious Diseases, School of Medicine, Kitasato University

We compared reactivity between *Chlamydia* serovar antigens and sera from 18 patients using immunoblotting (IB) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The antigens used were *Chlamydia trachomatis* serovar L2, D, E, and C organisms for IB and synthetic peptides derived from C, E, G, and L2-VDIV genes for ELISA.

Eleven of 12 sera collected from *Chlamydia* antigen-positive women with cervicitis strongly reacted with *C. trachomatis* serovar E, as did one serum with serovar C in immunoblotting profiles. ELISA coated individually with peptides E and C strongly reacted with the sera of 6 different patients. The IB result between serovar L2, D, E, and C and sera from the 6 other women patients showed reactivity at $E \geq D \geq L2 \geq C$. ELISA using a synthetic peptide mixture including C, E, G and L2 peptides gave positive results for all 18 sera. These results indicate that IB sensitivity differs with the *C. trachomatis* serovar antigen used and that certain cases may produce inconsistent results between IB and ELISA. Results of ELISA and IB are thus not always consistent, indicating that different synthetic peptides should be used in ELISA for detecting of low-level *C. trachomatis* antibodies.