

***Chlamydia trachomatis* の遺伝子配列解析による血清型判定**

島田 信子, 伊瀬 郁, 高野 弘紀, 貞升 健志, 甲斐 明美

**Serotyping of *Chlamydia trachomatis* by DNA Sequence Analysis**

Nobuko SHIMADA, Iku ISE, Hiroki TAKANO,  
Kenji SADAMASU and Akemi KAI

## *Chlamydia trachomatis* の遺伝子配列解析による血清型判定

島田 信子<sup>a</sup>, 伊瀬 郁<sup>a</sup>, 高野 弘紀<sup>a</sup>, 貞升 健志<sup>a</sup>, 甲斐 明美<sup>b</sup>

性感染症クラミジアには19種の血清型の存在が報告されている。血清型別は膜タンパク質の抗原性の差異に基づく検査であるため、従来はクラミジアを分離培養しなければ実施することが出来なかった。今回、DNA シーケンス解析による型別法を導入し、2010年1月から12月までに定点医療機関から搬入されたクラミジア遺伝子陽性例40件について、検体から直接、血清型別検査を実施した。その結果、D, E, F 型が全体の65%を占め、年代別にみると40歳を境に型分布が変化している傾向が認められた。

**キーワード:** クラミジアトラコマトィス, 血清型別, DNA シーケンス法, 系統樹解析

### はじめに

クラミジア感染症は最も感染頻度が高い性感染症 (Sexually Transmitted Infections: STI) と言われている。ときに症状が乏しいまま感染が体内深部まで進行して不妊症や流産の原因となり、また産道感染により新生児結膜炎や新生児肺炎、その他の母児感染を引き起こす。多くは無症状であるため、無自覚に感染を繰り返し拡大すると考えられている<sup>1)</sup>。さらに、他の STI 同様、クラミジア感染と HIV 感染は相互に易感染性を高めるとされており<sup>2)</sup>、注意が必要である。STI は一般市民の若年層から高齢層にまで蔓延していると言われているが、その実態は明らかでなく、その予防・啓発を含め、検査の受診を積極的に進めることが重要である。

クラミジア感染症の原因菌である *Chlamydia* 属 *Chlamydia trachomatis* (CT) 種は病原性と生物学的特性 (増殖・形態) から、生物型として、トラコーマ (*Trachoma*)、鼠径リンパ肉芽腫 (*Lymphogranuloma venereum*: LGV) の原因菌および mouse 感染型に分類される。さらに CT は主要外膜タンパク (major outer membrane protein: MOMP) の抗原性に基づいて亜種を含めて 19 種に分類されている<sup>3)</sup>。感染組織からみると、血清型 A, B, Ba, C は眼, D, Da, E, F, G, H, I, Ia, J, Ja, K は泌尿生殖器にそれぞれ組織指向性があり、LGV には、L1, L2, (L2a), L3 の血清型がある。分子進化学的には大きく 3 つのクラスに分けられている。すなわち、B-complex (B, Ba, D, E, L1, L2), C-complex (A, C, H, I, Ia, J, K, L3) および intermediate complex (F, G) である。ただし、この分類と組織指向性の分類とは完全には一致せず、血清型の臨床的な意義はまだ明確でない<sup>4,5)</sup>。

MOMP は分子量 40 kDa のタンパク質で、コードする遺伝子としては、*omp1* あるいは *ompA* (約 1,190bp) が知られている。MOMP は 5 つの保存された領域と 4 つの変化に富む可変領域 (variable domain: VD) I~IV より構成される。

保存領域は菌体外膜に埋まって抗体結合には関与しない部位であり、可変領域は膜表面に露出して多様な抗原性を示す部位である<sup>6,7)</sup>。

クラミジアの血清型別検査は、MOMP を標的としたモノクローナル抗体による間接蛍光抗体法<sup>8,9,10)</sup>、*omp1* を標的とした PCR-サザンハイブリダイゼーション<sup>11)</sup>、PCR-制限酵素消化パターン比較 (Restriction Fragment Length Poly-morphism: RFLP<sup>12,13,14)</sup>) などで行われてきた。いずれも技術および時間を要する方法である。近年、DNA シーケンシング技術の高速化・低コスト化によりデータベースが充実し、得られた DNA 配列を BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) 等により解析することで病原体の解析が可能となった。CT についても、ゲノムあるいは *omp1* の登録件数が、その多様性を反映して膨大なものとなっており、VD 領域のわずか数百ベースの遺伝子配列を解読すればその血清型を判定することが可能となっている。

感染症発生动向調査において、CT の血清型調査は都内における CT の感染状況を解析していく上で有用な情報になるものと考えられる。そこで当センターでは CT 遺伝子陽性検体について、DNA 塩基配列解析による CT の血清型別検査法の検討に着手し、2010 年度から感染症発生动向調査にこの検査法を導入したのでその概要を報告する。

### 実験方法

#### 1. 試料

2010 年 1 月~12 月に都内の性感染症病原体定点病院から 282 件の検体が搬入された。その内訳は、男性患者から採取された尿 213 件、尿道擦過 (分泌物) (スワブ) 60 件、女性患者から採取された子宮頸管擦過 (分泌物) (スワブ) 9 件である。そのうち、PCR-ハイブリダイゼーション法の遺伝子検出検査機器、コバス・アンプリコア法 (ロシュ・ダイアグノティクス) により CT 陽性と判定された検体 55 件を対象とした。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部病原細菌研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター微生物部

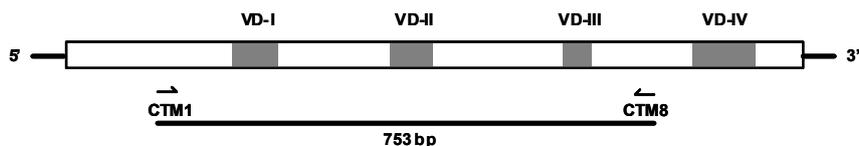


図 1. CT *omp1* のドメイン構造とプライマー位置

## 2. DNA 抽出・精製

尿検体は、遠心沈渣 (1,500×g, 10 min) を生理食塩水 1 ml で洗浄後再び生理食塩水 100 μl に懸濁したもの (原尿 5 ml に相当) を、スワブ検体は生理食塩水抽出液 100 μl (全量の 1/3 量) を出発材料として、SepaGene (三光純薬, 東京) を用い、添付のマニュアルにしたがって DNA を抽出精製し、最終的に 30 μl の 10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8.0 (TE) に溶解した。抽出操作は検体搬入後直ちに行い、DNA 溶液は使用まで -30°C で凍結保存した。

## 3. PCR

CT の MOMP をコードする *omp1* の VDI~VDIII の外側の相同領域に、各血清型を共通に増幅できるプライマーとして、国立感染症研究所より既報の CTM1 (5'-TTGCGATCC TTGACCACTT-3') および CTM8 (5'-GCTCGAGACCAT TTA ACTCC-3') を使用した<sup>15)</sup>。

上記の精製した検体の DNA 溶液 2 μl を鋳型として、Ex Taq polymerase (TaKaRa, 滋賀) により PCR 反応 (反応液量 25 μl) を行った。PCR の条件は、(94°C, 3 分) × 1 回、(94°C, 20 秒, 55°C, 20 秒, 72°C, 40 秒) × 30 回、(72°C, 7 分) × 1 回である。反応終了後、1/10 量を 3% アガロースゲル (Agarose 21; ニッポンジーン, 東京) 電気泳動に供し、臭化エチジウム染色により約 750 bp の増幅産物を確認した。非常に低収量の場合は反応液の一部 (0.5 μl) をそのまま鋳型として再度同条件で PCR 反応を繰り返した。充分量の目的増幅産物が得られたところで、改めて残り全量を 3% 低融点アガロースゲル (Nusieve GTG Agarose, Lonza Lockland, ME, USA) 電気泳動で分離し、UV 透過光可視下で臭化エチジウム染色により確認される目的のバンドを含むアガロースブロックを切り出した。さらに QIAamp Gel extraction kit (キアゲン, 東京) によりアガロースから分離精製し、最終的に 30 μl の TE に溶解した。アガロース電気泳動はすべて 25 mM Tris, 25 mM Boric acid, 1 mM EDTA, pH 8.2 (TBE) バッファーにて行った。

## 4. DNA シーケンシングおよび系統樹解析

精製した PCR 反応増幅産物を鋳型 (2 μl 使用) として、ダイレクトシーケンシング法を行った。ABI PRISM BigDye Terminator ver. 3.1 Cycle Sequencing Kit (ライフテクノロジー・ジャパン, 東京) により 5' 側 (プライマー CTM1),

3' 側 (プライマー CTM8) 両方向からそれぞれサイクルシーケンス反応を行った。未反応の蛍光色素標識基質等をスピニングカラム Centri-Sep (PRINCETON SEPARATIONS, Adelphia, NJ, USA) で除き、乾燥後ローディングバッファー Hi-Di Formamide (ライフテクノロジー・ジャパン, 東京) に溶解し、熱処理した上で Applied Biosystems 3130/3130xl Genetic Analyzer (ライフテクノロジー・ジャパン, 東京) で解析した。得られた蛍光波形データは、解析ソフトウェア MEGA 4<sup>16)</sup> により塩基配列に変換し、3', 5' 両方向からの解読配列の一致した部分を検体の塩基配列とした。CT *omp1* は変異株が多く登録件数が非常に多いため、予め NCBI (National Center for Biotechnology Information, USA) ヌクレオチドデータベースの BLAST 検索により各種血清型のサブツリー群上に分散した 2~3 株を選び、MEGA 4 に塩基配列を読み込み、プログラム ClustalW<sup>17)</sup> により「標準」マルチアラインメント・ファイルを作成した。「標準」として使用した CT *omp1* のシーケンスは、B-complex では B (3 株), Ba (3 株), D 又は Da (5 株), E (2 株), L1 (1 株), L2 (2 株) の 16 配列, C-complex として A (1 株), C (2 株), H (3 株), I (3 株), Ia (4 株), J (3 株), K (3 株), L3 (1 株) の 20 配列, intermediate complex として F (2 株), G (3 株) の 5 配列である。neighbor-joining (N-J) 法の条件として、p-distance 補正および outgroup は使用せず、bootstrap test は 1,000 回実施した。その結果、一部、D と Da のようにサブツリーに分けられない型も存在したが、それ以外はすべての血清型を分類することができた。

検体の解読塩基配列をこの「標準」マルチアラインメント・ファイルを読み込み、改めてアラインメントを行い、引き続き N-J 法により系統樹解析を行った。その結果「標準」系統樹上の各血清型サブツリー上のどこに位置するかにより、検体の血清型を判定した。なお、「標準」配列として使用したデータの GenBank ID を図 2 中に型名とともに示した。なお血清型のサブツリー上の位置がはっきりしない場合には、個別に BLAST 検索を行って確認した。

## 結果および考察

### 1. 系統樹解析による血清型判定

対象試料 55 件について今回導入した方法により、

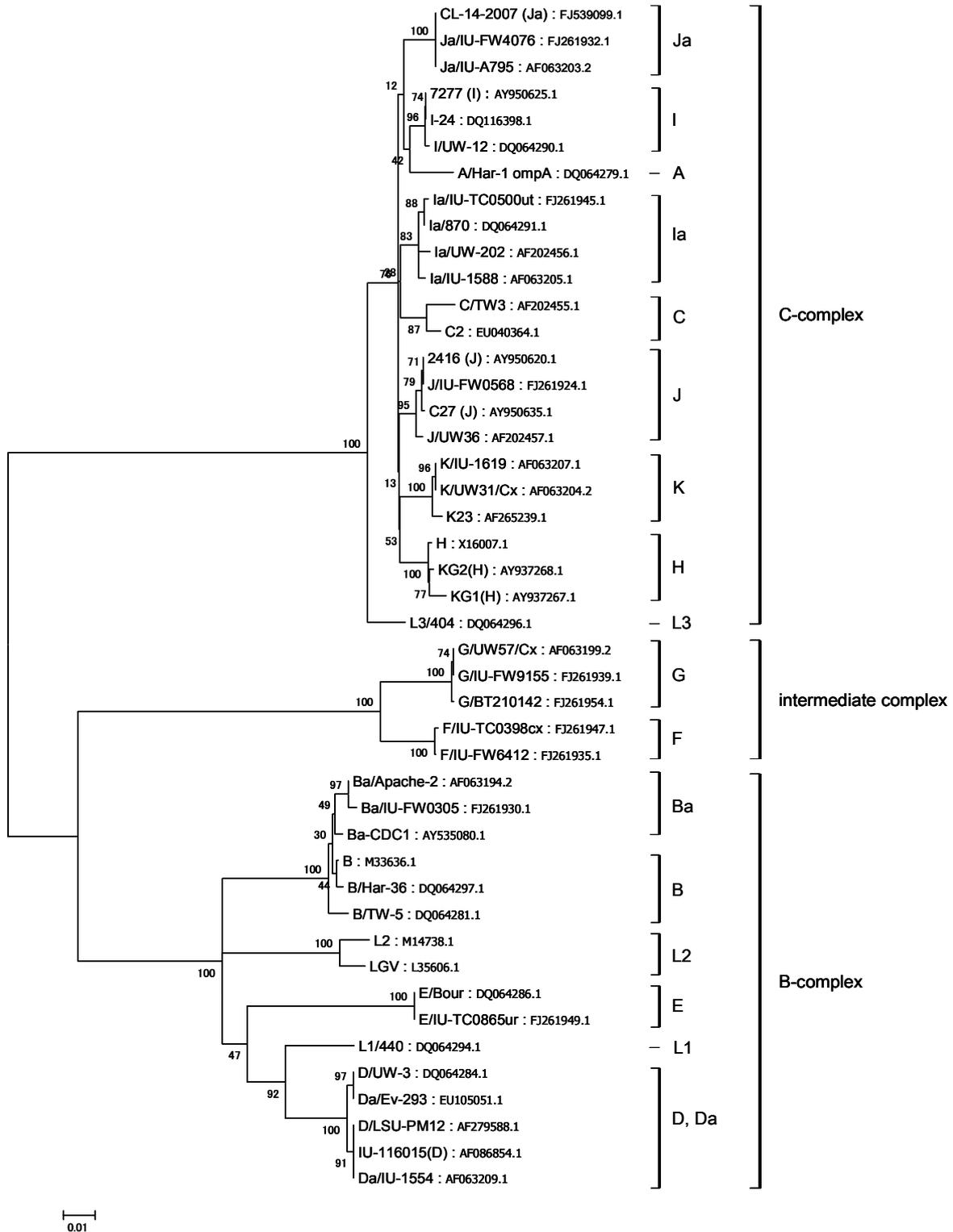


図 2. *Chlamydia trachomatis omp1* の「標準」系統樹 neighbor-joining 法により作製した。サブツリー中心点の数字は、bootstrap test 反復 1,000 回における bootstrap value (%)。型名の右に GenBank ID を付した。

血清型別検査を実施した。40 件について PCR 増幅産物が得られ、そのすべてについてシーケンス解析が可能であった。さらに、上記「標準」系統樹に、得られた検体 40 例のシーケンスを加えて解析した結果、すべて D および E

(B-complex), H, J, K, I および Ia (C-complex), F および G (intermediate complex) の 9 種類のいずれかに分類された (表 1)。

また、血清型「標準」アラインメントファイルを用いた

表1. 判定された血清型内訳 (人数) および陽性率, 判定率 (%)

総検査件数(a)	陽性件数(b)	判定件数(c)	血清型	件数
282	55	40	D	8
			E	5
			F	13
			G	2
			H	3
			J	3
			K	3
			I	2
			Ia	1
			ND	15
血清型判定率 (%) (対陽性件数 : c/b×100)				72.7
陽性率 (%) (対総検査数 : b/a×100)				19.5

ND: data not determined

N-J 法による未知検体の型別と, BLAST 検索, 及びデータベース上の系統樹による型別はすべて一致していた.

2. 都内における CT の血清型の分布

血清型分布については, D, E, F が全体の 65% を占めていた. それ以外にも G, H, I, Ia, J, K と幅広い血清型が存在することが明らかとなった (図 3). しかしながら, 眼に感染する A, B, C 型と鼠径リンパ肉芽腫の原因となる L 型は検出されなかった. D, E, F が最も多数であることは, 既報と一致していた<sup>10,18)</sup>.

患者年代と血清型の関係を見ると, D, F が共通しているが, 40 歳を境に異なる傾向を示し, G は 40 歳代以上のみで, H, J は 40 歳未満に現れるという偏りが見られた (図 4). 血清型クラスという観点では, 40 歳代以上では B-complex と intermediate-complex が見られたのに対し, 40 歳未満の年齢グループでは, C-complex が多く出現し, そ

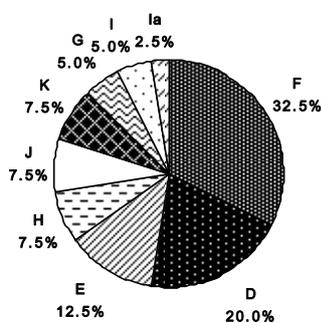


図 3. 遺伝子配列解析により判定できた血清型分布率.

の傾向は 30 歳未満で特に顕著である. また 30 歳未満では E が消え, F の割合も減少している. 例数が少ないため確定的なことは言えないが, 年代によって血清型分布が変化している可能性があり, 今後継続して観察していく必要がある.

コバス・アンプリコア法はクラミジアが菌体内に保有する特有のプラスミドの一部を標的とする PCR とハイブリダイズプローブを組み合わせた高感度の検出法を原理としている. 血清型別検査はコバス・アンプリコア法でクラミジア遺伝子陽性と判定されたものを対象として行ったが, 約 73% の判定率にとどまった.

判定に至らなかった理由は, PCR の増幅産物が得られなかったため, 原因としてコバス・アンプリコア法との検体 DNA の抽出法の違いも考えられたため, リアルタイム PCR により, 血清型共通プライマーおよび TaqMan プローブを作製して同じ鋳型 DNA から CT 遺伝子検出を行った (データ未掲載). その結果は, ほぼコバス・アンプリコア法の結果と一致していた一方, 検出したサイクル数が高かったことから, 検体からの DNA 抽出法が問題なのではなく, 元々の検体中の DNA の絶対量が少ないため, 標準的 PCR の鋳型量としては検出限界以下の低濃度であったと考えられる.

また, 同一検体に複数の血清型が混在する場合にはシーケンス解析は出来ない. 今回, PCR 増幅産物が得られた場合, すべて DNA シーケンス解析, 系統樹解析とも明快な結果が得られたことから, 複数の血清型が混在というケース<sup>19,20)</sup>は, 今回対象とした検体の中には存在しなかったものと考えられる.

DNA シーケンスの結果について, その都度直接ウェブ上で BLAST 検索を行って, ホモロジーを基に血清型を判定することは可能である. しかし今回用いたような「標準」系統樹ファイルを手元のデータベースとして持っていれば, 多数のシーケンス結果をまとめて短時間に血清型解析

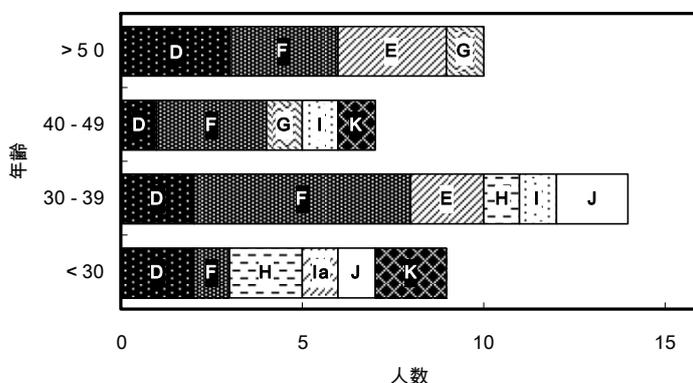


図 4. 年代別血清型検出件数.

が可能となることが判明した。

今後、都内における CT 血清型検査データを疫学的に集積していくことで CT の感染実態を明らかにできるものと考えられる。

### ま と め

性感染症発生动向調査において、クラミジアトラコマテイス (CT) の血清型別検査を導入した。 *omp1* 可変領域の DNA シーケンシングと系統樹解析により、従来法より簡便・確実な血清型別が可能となった。2010 年のデータは、検体数 282 件、CT 陽性が 55 件、このうち血清型を判定できたものが 40 件 (72.7%) であった。全体としては D, E, F が多数の 65% を占めたが、その他の血清型も幅広く存在することが明らかになった。さらに、年代によって分布が異なる傾向が示唆された。

### 文 献

- 1) 熊本悦明「日本の性感染流行の現状」, 性感染症/HIV 感染 その現状と検査・診断・治療, 18-36, メジカルビュー社, 2001.
- 2) Wasseheit, J.N.: *AIDS and Womens reproductive health*, edited by Chen, L.C., Amor, J.S., Segal, S.J., Plenum Press, New York, 1991.
- 3) Stephens, R.S., Sanchez-Pescador, R., Wagar, E.A., et al.: *J Bacteriol*, **169**, 879-85, 1987.
- 4) Millman, K., Black, C.M., Johnson, R.E., et al.: *J Bacteriol*, **186**, 2457-2465, 2004.
- 5) Millman, K., Black, C.M., Stamm, W.E., et al.: *Microbes Infect*, **8**, 604-11, 2006.
- 6) Lampe, M., Suchland, R.J. & Stamm, W.E.: *Infect and Immun*, **61**, 213-9, 1993.
- 7) Baehr, W., Zhang, Y.X., Joseph, T., et al.: *Proc Natl Acad Sci U S A*, **85**, 4000-4, 1988.
- 8) Zapata, M., Chernesky, M., Mahony, J.: *J Clin Microbiol*, **19**, 937-9, 1984.
- 9) Wang, S.P., Kuo, C.C., Barnes, R.C., et al.: *J Infect Dis*, **152**, 791-800, 1985.
- 10) 萩原敏且: 株の同定と血清診断 (micro-IF), 臨床とウイルス, **13**, 431-5, 1985.
- 11) Stothard, D.R., Williams, J.A., Van Der Pol, B., et al.: *Infect and Immun*, **66**, 6010-3, 1998.
- 12) Frost, E.H., Deslandes, S., Veilleux, S., et al.: *J Infect Dis*, **163**, 1103-7, 1991.
- 13) Ikehata, M., Numazaki, K., Chiba, S.: *FEMS Immunol Med Microbiol*, **27**, 35-41, 2000.
- 14) Gao, X., Chen, X.S., Yin, Y.P., et al.: *J Clin Microbiol*, **45**, 1185-9, 2007.
- 15) 吉田洋, 岸雄一郎, 志賀定嗣, 他: 日本性感染症誌, **6**, 40-45, 1995.
- 16) Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., et al.: *Mol Biol and Evol*, **24**, 1596-9, 2007.
- 17) <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/> (The European Molecular Biology Laboratory's European Bioinformatics Institute) (2011 年 8 月 25 日現在, なお本 URL は変更または抹消の可能性がある)
- 18) 竹内道子, 白石寛子, 宮坂たつ子, 他: 病原微生物検出情報, **19**, 203-204, 1998.
- 19) Takahashi, S., Yamazaki, T., Satoh, K., et al.: *Jpn J Infect Dis*, **60**, 374-376, 2007.
- 20) 齊藤十一歩: 日本産婦人科学会誌, **47**, S-354, 1995.

**Serotyping of *Chlamydia trachomatis* by DNA Sequence Analysis**

Nobuko SHIMADA<sup>a</sup>, Iku ISE<sup>a</sup>, Hiroki TAKANO<sup>a</sup>,  
Kenji SADAMASU<sup>a</sup> and Akemi KAI<sup>a</sup>

There are at least 19 serotypes of *Chlamydia trachomatis* (CT) to date. Serotyping analysis is originally based on the specific immunoreactivity of antibody to the bacterial cell membrane protein, and so, a monoclonal antibody method was initially used. Advanced and time-consuming culturing techniques are required to obtain sufficient amounts of CT membrane proteins for determining the serotype. Recently, we employed DNA sequencing analysis as an accurate and convenient method for serovar typing. The typing tests have been successfully carried out on 40 CT gene-positive clinical samples (among 224 samples from the designated clinics) in 2010. Serovars D, E and F were most prevalent (accounting for 65%). The distribution of the serotypes is different between patients older than 40 years old and those under 40 years old, suggesting an age-related trend.

**Keywords:** *Chlamydia trachomatis*, serotyping, DNA sequencing analysis, phylogenetic analysis

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan