

クラミジア ニュウモニエ (*Chlamydia pneumoniae*) 検出でのPCR法 (3つのプライマー対の感度) の検討

平山 久子 一戸 貞人

Study to detect of *Chlamydia pneumoniae* by Polymerase Chain Reaction (PCR) : sensitivity of the three primer pair

Hisako HIRAYAMA, Sadato ICHINOHE

I はじめに

クラミジア属の一つであるクラミジア ニュウモニエはヒトからヒトへ飛沫感染する偏性細胞内寄生微生物で、無症状で持続感染時には重篤な肺炎または気管支炎を引き起こすと言われる。最近、小児においては喘息との関連も注目されている。また、成人においては動脈硬化症¹⁾との関連も示唆されている。クラミジア ニュウモニエは細胞培養による検出において熟練した技術と時間を必要とし、その診断には迅速性を欠く。polymerase chain reaction (PCR) 法は感度や特異性にすぐれ、比較的簡便で迅速に診断できる試験法である。しかし、クラミジア ニュウモニエ検出においては種々のプライマー間で感度や特異性に少なからず問題があるとされる。この度、米国のCDCの推奨するCampbell, Gaydosらの2つのプライマーとKubotaらのプライマーの感度について検討したので報告する。

II 材料および方法

1. 検体

プライマーの感度の検討には埼玉医科大学小児科、山崎先生よ

り供与されたクラミジア ニュウモニエAR-39株の精製粒子 (particle ; 以後pと表示), 2.1×10^8 /mlを陽性コントロールに使用した。

2. DNA抽出

鋳型DNAはクラミジア ニュウモニエAR-39株; 2.1×10^8 p/mlの10倍段階希釈検体, 10^{-3} 希釈, 10^{-4} 希釈, 10^{-5} 希釈を作成し、各希釈検体200 μ lをQIAGEN社のDNA Mini Kitを用いて抽出し最終容量を200 μ lとした。

3. PCR及び電気泳動

PCRはワシントン大学のCampbellら²⁾のプライマーHL・1 (5'-GTTGTTTCATGAAGGCCTACT-3'), HR・1 (5'-TGCATAACCTACGGTGTGTT-3') 対, ジョン・ホプキンス大学のGaydosら³⁾のプライマーC, Pn-A (5'-TGACAACTGTAGAAATACAGC-3'), C, Pn-B (5'-CGCCTCTCTCTATAAAT-3') 対, 川崎医科大学のKubotaら⁴⁾のプライマー53-1 (5'-ATGTCGCGGTTTCTGTTGGCCA-3'), 53-2 (5'-GAGCGACGTTTTGTTGCATCTC-3') 対を用いて各濃度の鋳型DNA, 5 μ lからPCR産物を得た。PCRはEx Taq DNA Polymerase (タカラバイオ) を使用し、表1の反応系で行った。PCR産物10 μ lを2.0%アガロースゲルにて電気泳動し、エチジウムブロミドで染色後水洗 (脱色) しトランスイルミネーターにて泳動像を確認した。

表1. PCR反応系

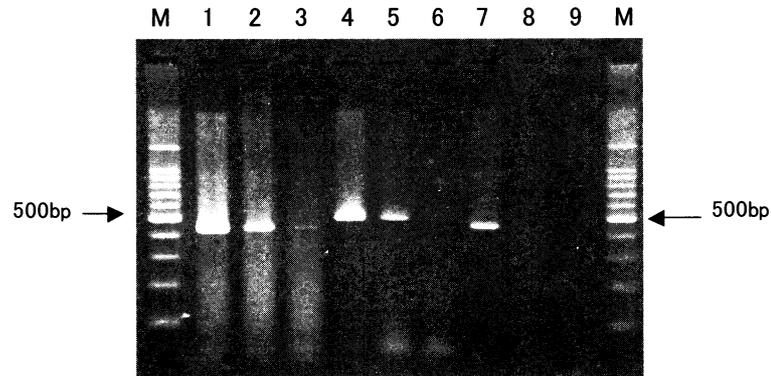
PCR反応液 (total 50 μ L)						
	Campbell等の系		Kubota等の系		Gaydos等の系	
primer濃度	50pmoles/ μ L		20pmoles/ μ L		50pmoles/ μ L	
primer1	HL1	0.5 μ L	ku53-1	0.5 μ L	CpnA	0.5 μ L
primer2	HR1	0.5 μ L	ku53-2	0.5 μ L	CpnB	0.5 μ L
PCR条件						
initial denaturation	94°C 5m		95°C 90s			
denaturation	94°C	1m	95°C	1m	94°C	1m
annealing	55°C	1m	56°C)	30s	55°C	1m
primer extension	72°C	1m	72°C	1m	72°C	1m
サイクル数	40cycles		40cycles		30cycles	
after 40cycles of amplification	72°C 5m		72°C 5m			

III 結果および考察

3つのプライマーCampbell, Gaydos, Kubotaらについて検討した結果、感度はCampbellらのプライマー、Kubotaらのプライマーの順で、Gaydosらのプライマーについてはあまり良

い結果が得られなかった。(図1) GaydosらのPCR産物については彼らのプロトコールどおりにSDS-PAGEを実施したが 10^{-4} 希釈でバンドをかるうじて認める程度であった。PCR条件の違いが感度に影響している可能性もある。今後、臨床検体で3つのプライマーの感度を検討し、PCR法による診断法を確立したい。

図1 3つのプライマー対の感度の比較



2% アガロースゲル電気泳動
No.1. 4. 7(1050p/5 μ l)、No.2. 5. 8(105p/5 μ l)、No.3. 6. 9(10.5p/5 μ l)
No. 1~3: Campbellら; 437bp
No. 4~6: Kubotaら ; 499bp
No. 7~9: Gaydosら ; 463bp
M: Marker 100bpラダー

謝 辞

研究をすすめるにあたりご指導してくださった埼玉医科大学・山崎勉先生、感染症研究所・岸本寿男先生、安藤秀二先生、齊加志津子主席研究員、橋本博之研究員に感謝します。

参考文献

- 1) Saikku P, et al. : Serological evidence of an association of novel Chlamydia, TWAR, with chronic coronary heart disease and acute myocardial infarction. Lancet 2 : 983-986, 1988
- 2) Campbell LA, Perez Melgosa M, Hamilton DJ, Kuo CC, Grayston JT. : Detection of Chlamydia Pneumoniae by polymerase chain reaction. J Clin Microbio 1992 ; 30 : 434-439
- 3) Gaydos CA, Quinn TC, Eiden JJ. : Identification of Chlamydia pneumoniae by DNA amplification of 16S rRNA gene. J Clin Microbio 1992 ; 30 : 796-800
- 4) Kubota Y. : A new primer pair for detection of Chlamydia pneumoniae by polymerase chain reaction. Microbiol immunol 1996 ; 40 : 27-32
- 5) 松本 明 : 感染症の診断・治療・疫学における遺伝子検査 クラミジア ニュウモニエ ; 臨床と微生物 1999 ; 26 : 058-061
- 6) 山崎 勉・岸本 寿男 : 技術講座 微生物 異型肺炎の検査法 ; 検査と技術 2002 ; 30 : 449-453
- 7) 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 : No. 3 26-32