

咽頭からの淋菌およびクラミジア検出方法の検討

余田敬子 新井寧子

東京女子医科大学東医療センター 耳鼻咽喉科

Discussion about how Pharyngeal Infection with *Neisseria gonorrhoeae* or *Chlamydia trachomatis* will be Diagnosed.

Keiko YODA, Yasuko ARAI

Department of Otorhinolaryngology, Tokyo Women's Medical University Medical Center East

To discuss about reasonable methods that otolaryngologist diagnose pharyngeal infection with *Neisseria gonorrhoeae* or *Chlamydia trachomatis*, we presented two results of our examination of pathogenic microbe detectability.

First, we compared specificities of two nucleic acid amplification tests (NAATs) for the detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* with oropharyngeal samples, Becton Dickinson ProbeTec strand displacement amplification (SDA) and Roche Amplicor PCR were performed on throat wash of 20 healthy volunteers, consisting of 4 females and 16 males ranging in age from 23 to 42 years old (mean ; 32.7 years). As a standard test of gonococcus, a culture was done with throat swabs. A true positive result of *N. gonorrhoeae* was defined as a positive result by culture. A true positive result of *C. trachomatis* was defined as a positive result by PCR. No positive result was seen in SDA for *N. gonorrhoeae* or *C. trachomatis* and PCR for *C. trachomatis*. In 13 samples (65%), positive results for *N. gonorrhoeae* were shown by PCR only. According to the definition, these were regarded as false positives. SDA was considered an adaptable test with high specificities for detection of both *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in oropharyngeal samples.

Second, we evaluated performance of throat wash compared to throat swab as oropharyngeal specimen for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis*. The two oropharyngeal specimens, throat wash and throat swab, were simultaneously obtained from 530 cases attending a sexually transmitted disease clinic with suspected gonorrheal infection or chlamydial infection. Gonococcal culture was performed on 71 cases, who were a subset of the 530 cases and were strongly suspected of gonorrheal infection. Throat wash and throat swab obtained from all 530 cases were performed two NAATs, SDA and PCR. SDA analysis was performed for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis*, and PCR analysis was performed for detection of only *C. trachomatis*. From the results of experiments with all NAATs, throat wash outnumbered in the number of cases with a positive result of *N. gonor-*

rhoeae and *C. trachomatis*, while small number of combined result of throat wash negative and throat swab positive were observed. The throat wash was considered an adaptable specimen for detection of both *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis* in oropharynx. Improvement of detection performance of throat wash is expected by keeping gargle volume between 10ml to 20ml that is considered most pertinent volume for detection by NAATs, by taking enough time to obtain throat wash from eating and by inducing subject to gargle hardly.

はじめに

性感染症の原因として最も多い *Chlamydia trachomatis* (以下 クラミジア) と、次いで多い *Neisseria gonorrhoeae* (以下 淋菌) は、性行動が多様化しオーラルサービス主体の風俗産業が盛んな日本では、咽頭を介して感染する者が少なくない¹⁻³⁾。咽頭の淋菌およびクラミジア感染者では無症状で咽頭発赤や扁桃腫脹など他覚的所見が見られないことがほとんどで²⁻⁷⁾、耳鼻咽喉科医であっても咽頭所見や症状から咽頭の淋菌およびクラミジア感染症を診断することはできない。今回、咽頭の淋菌およびクラミジア感染症の診断に用いられる検査について、それぞれの特徴と問題点、検体採取法について呈示する。

1 咽頭からの淋菌およびクラミジア検査

淋菌は炭酸ガス好性で、温度変化や乾燥に弱く、一般細菌と同じ培養方法では菌が死滅して検出できない。淋菌の培養同定には、淋菌選択培地である変法 Thayer-Martin 寒天培地に咽頭を拭った綿棒から直接培地に塗抹後速やかに密閉し、炭酸ガス発生装置により炭酸ガス充填下に室温で保存、その後 35℃ 48 時間炭酸ガス培養を行えば 98% 以上の感度で淋菌を検出することができる⁸⁾。近年、抗菌薬耐性化が顕著な淋菌では、薬剤感受性検査をも可能とする培養検査は極めて有用である²⁻⁴⁾。しかし、淋菌選択培地・密閉バッグ・炭酸ガス発生装置を揃えて常備する必要があり、淋菌感染症を診る機会が少ない耳鼻咽喉科医にとって利用しやすい検査とは言い難い。クラミジアも、細胞内寄生性の病原体であ

るため培養同定には培養細胞が必要であり、一般の培地を用いた培養方法では検出できない。

培養以外の方法として、淋菌は核酸検出法・核酸増幅法、クラミジアは酵素抗体法・核酸検出法・核酸増幅法がある。核酸増幅法のうち PCR 法 (アンプリコア STD-1 ナイセリアゴノレアおよびアンプリコア STD-1 クラミジアトラコマティス、ロシュ・ダイアグノスティクス・SRL、以下それぞれアンプリコア G、アンプリコア CT) は、核酸検出法の DNA プローブ法・ハイブリッドキャプチャー法に比べて 100~200 倍検出感度が高い。しかし、アンプリコア G は *N. cinerea*, *N. subflava* などの口腔咽頭に常在する非病原性ナイセリアとの交叉反応による陽性反応 (偽陽性) を生じるため、男性の尿または尿道スワブ、女性の膣スワブまたは子宮頸管スワブの検体に限定され、咽頭からの検体には使用できない。アンプリコア CT では他のクラミジア属との交差反応がないため検体の限定がなく、咽頭からの検体に使用でき信頼性の高い検査である。

核酸増幅法で PCR 法の後に開発された SDA (Strand Displacement Amplification) 法^{1) 11)} (BD プローブテック ET CT/GC、日本ベクトン・デッキンソン・三菱化学メディエンス、以下プローブテック) と TMA (Transcription-Mediated Amplification) 法 (アプティマ Combo 2 クラミジア/ゴノレア、富士レビオ・SRL) は、口腔内常在性ナイセリアとの交差反応が極めて少ない。TMA 法は、まだ咽頭領域に利用できないが、SDA 法は 2007 年 9 月 1 日より咽

頭領域で保険収載され咽頭検査に利用できるようになった。これまで、簡便かつ特異性の高い検査法がなかった咽頭からの淋菌検出での有用性が期待されている。

2 咽頭からの検体採取法

咽頭粘膜の表面積は、尿道や膣・子宮頸管の粘膜に比べて格段に広い。そのため、尿道や膣・子宮頸管の検査と同様に綿棒で咽頭スワブを採取した場合、咽頭全体からみるとほんの一部の粘膜上皮しか採取できないことになる。さらに、淋菌では罹患部位の菌量が尿道、子宮頸管、直腸、咽頭の順に少なくなり、分離培養、核酸検出法ともに淋菌検出の正診性が低い⁴⁾ことが指摘されている。他覚的所見に乏しい咽頭の淋菌およびクラミジア感染症においては、目で咽頭の感染部位を確認できないため盲目的に検体を採取することになり綿棒で拭って採取する咽頭スワブでは標的病原体を捕らえられていない可能性が否定できない。これらの点から、採取方法をスワブからうがい液に変更することで、標的病原体の検出性の向上が期待される。

3 うがい液を用いた淋菌・クラミジアの検出性の検討

われわれがプローブテックの咽頭への保険適応に先行して、うがい液からの淋菌・クラミジア検出性を検討した結果を呈示する。

1) プローブテックとアンプリコアの特異性の検討

検体としてうがい液を用いた場合、スワブよりも口腔内常在ナイセリアの混入もより多くなると考えられる。うがい液を用いた場合の検査の特異性について、スワブと比較して検討した結果⁹⁾を示す。

①対象

健常ボランティア20人、男性16人、女性4人、年齢23歳～42歳・平均年齢32.6歳、を対象とした。

②方法

採取方法は、咽頭後壁から2本の綿棒でスワブを採取し、続けて生理食塩水20mlを口に含ませ顔を上へ向けて「ガラガラ」と息を吐くうがいを10～20秒間つづけた後に、口から直接

50mlの滅菌チューブに吐き出させて採取した。

1本目の咽頭スワブは変法Thayer-Martin寒天培地に塗抹後ただちに炭酸ガス充填密閉する方法で淋菌培養を行った。2本目の咽頭スワブとうがい液からプローブテックとアンプリコアによる淋菌とクラミジアの検出を行った。いずれも咽頭スワブはドライスワブ法で、うがい液は尿検体のプロトコールを参考に前処理後、添付文書に従って測定を行った。

③結果

淋菌は、アンプリコアでは13例が陽性であったが、プローブテックでは全例陰性であった (Table.1)。淋菌培養からは、淋菌は全例陰性であった。淋菌培養の結果とボランティアの背景から、アンプリコアで淋菌陽性の13例は全員偽陽性と考えられた。プローブテックでは、偽陽性は1例もみられなかった。

クラミジアでは、プローブテック、アンプリコアともに20検体全て陰性であった。

Table 1 Result of the test performance in throat washings of Amplicolor PCR versus BD ProbTec SDA for detection of *Neisseria gonorrhoeae* and *Chlamydia Trachomatis*⁹⁾.

Amplicolor PCR	BD ProbTec SDA			
	<i>N. gonorrhoeae</i>		<i>C. trachomatis</i>	
	+	-	+	-
+	0	13 *	0	0
-	0	7	0	20

* As a standard test of gonococcus, a culture was done with all 20 cases. The 13 samples (65% of all samples), which were shown positive results by Amplicolor PCR for *N. gonorrhoeae* but not by gonococcal culture and BD ProbeTec SDA for *N. gonorrhoeae*, were regarded as false positives.

2) うがい液とスワブの検出性の検討

次に、実際の性感染症クリニック受診者を対象に、うがい液と咽頭スワブからの淋菌およびクラミジアの検出性を比較して検討した結果¹⁰⁾を示す。

①対象

2005年11月1日より2006年7月1日の間に性感染症クリニックにて、咽頭の淋菌・クラミジア検査を受けた530人を対象とした。

②方法

健常ボランティアと同様の方法で、咽頭スワブとうがい液を同時に採取し、淋菌はプローブテック、クラミジアはプローブテックおよびアンプリコアCTで検査した。うがい・スワブのいずれか一方または両方陽性の結果が出た人の中で、うがい液で陽性と判定された人の占める割合と、スワブ陽性と判定された人の占める割合から、うがい液とスワブの検出性を比較した。

③結果 (Table. 2)

対象530人中、淋菌プローブテック検査で陽性であったのは69人、そのうちでうがい液の陽性数は61人 (69人中の88.4%) であった。同じくスワブによる陽性数は42人 (60.9%) であった。クラミジア検査では、アンプリコアCTによる陽性数は22人、そのうちのうがい液による陽性数は20人 (22人中の90.9%) で、スワブで8人 (36.4%)、クラミジアプローブテック検査の陽性数は25人、そのうちうがい液による陽性数は19人 (25人中の76.0%)、スワブは14人 (56.0%) であった。プローブテックおよびアンプリコアCTのいずれにおいても、陽性検出数はうがい液の方がスワブを上回っており、咽頭から淋菌およびクラミジアを核酸増幅法によって検査する場合の検体として、うがい液は咽頭スワブよりも目的とする病原体の取りこぼしが少ないと推察された。

Table 2 Performance of throat specimens for detection of *N. gonorrhoeae* and *C. trachomatis*¹⁰⁾.

No. of cases with positive result	<i>N. gonorrhoeae</i>		<i>C. trachomatis</i>	
	SDA	SDA	SDA	PCR
Throat washings or Throat swabs*	69	25	22	
Throat washings†	61/69 (88.4)	19/25 (76.0)	20/22 (90.9)	
Throat swabs‡	42/69 (60.9)	14/25 (56.0)	8/22 (36.4)	

* The data represent total number of cases with a positive result in throat washings or in throat swabs.
 † The data represent the number of cases with a positive result in throat washings / total number of cases with a positive result in throat washings or in throat swabs (percent).
 ‡ The data represent the number of cases with a positive result in throat swabs / total number of cases with a positive result in throat washings or in throat swabs (percent).

④考察

今回の結果の中にスワブが陽性でうがい液が陰性の例が少なからずみられた。口腔咽頭粘膜表面は、唾液や飲食によって常に洗い流されていることが、他の部位に比べて淋菌やクラミジアが検出されにくい原因の一つと考えられる。うがい液採取に用いる溶液を極端に多くしすぎないこと、食事から時間をおいてうがい液を採取すること、で、うがい液からの検出率はより向上すると考えられる。

ま と め

咽頭からの淋菌およびクラミジアの検査法として最も適しているのは、淋菌ではSDA法または淋菌選択培地・密閉バッグ・炭酸ガス発生装置を用いた培養、クラミジアではSDA法またはPCR法である。さらに、SDA法やPCR法などの核酸増幅法によって検査する場合は、綿棒で拭った咽頭スワブよりもうがい液を用いた方が、より検出性が高まると考える。

参 考 文 献

- 1) 余田敬子, ほか: 当科および性感染症クリニックにおける咽頭の淋菌・クラミジア陽性率. 口咽科, 20: in press, 2008.
- 2) 田中正利: 新興・再興感染症 耳鼻咽喉科における性感染症-淋菌の咽頭感染について. 日耳鼻107: 760-763, 2004.
- 3) 村谷哲郎, ほか: 淋菌感染症の現況と対策. 化療の領域 21: 1107-1112, 2005.
- 4) 松本哲朗, ほか: 性感染症 診断・治療ガイドライン2007 疾患別診断と治療 淋菌感染症. 日性感染症会誌 17 suppl. 35-39, 2006.
- 5) 野口靖之, ほか: 性感染症 診断・治療ガイドライン2007 疾患別診断と治療 性器クラミジア感染症. 日性感染症会誌 17 suppl. 40-43, 2006.
- 6) 濱砂良一: 泌尿器科よりみたクラミジア, 淋菌性咽頭炎. MB ENT 43: 37-44, 2004.

- 7) 三嶋廣繁, ほか: 性器クラミジア感染症の現況と対策. 化療の領域 21: 1113-1120, 2005.
- 8) 西山貴子, 雑賀 威, 小林寅喆, 他: 咽頭材料からの *Neisseria gonorrhoeae* 検出用培地, 変法 Thayer-Martin 寒天培地 (m-TM) の有用性, 感染症誌, 75: 573-575, 2001.
- 9) 余田敬子, ほか: プローブテックを用いた口腔咽頭からの淋菌・クラミジア検査の検討. 口咽科, 18: 445-451, 2006.
- 10) 余田敬子, ほか, 小林寅喆: うがい液を検体とした *Neisseria gonorrhoeae* および *Chlamydia trachomatis* 咽頭感染の診断 - 咽頭スワブとの比較検討 -, 日性感染症会誌, 18: 115-120, 2007.

連絡先: 余田 敬子

〒116-8567

東京都荒川区西尾久 2-1-10

東京女子医科大学東医療センター耳鼻咽喉科

TEL 03-3810-1111 FAX 03-3894-7988