

## 〈研究報告〉

# 自動遺伝子解析装置「GENECUBE」を用いた クラミジア・トラコマティスおよび 淋菌の迅速検査の性能評価

宮崎成美<sup>1)</sup>・山岸由佳<sup>1,2)</sup>・和泉孝治<sup>3)</sup>・  
川嶋洋介<sup>4)</sup>・末松寛之<sup>1)</sup>・三嶋廣繁<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> 愛知医科大学病院感染制御部感染検査室

<sup>2)</sup> 愛知医科大学病院感染症科

<sup>3)</sup> いずみレディスクリニック

<sup>4)</sup> 東洋紡株式会社

(2016年5月6日受付)

性器クラミジア感染症および淋菌感染症の検出法としては、核酸増幅法（遺伝子検査法）が感度の高い方法として推奨されている。我々は、約1時間で遺伝子検査を実施可能な全自動遺伝子解析装置 GENECUBE（東洋紡株式会社）を用いた遺伝子検査法（以下GC法）の感度、特異度について、検査に2～4時間程度を要する既存検査法であるTMA法および免疫クロマトグラフィー法（クリアビュー クラミジア、クリアビュー ゴノレア、共にアリーア メディカル株式会社）と比較検討した。クラミジア・トラコマティス検出におけるGC法とTMA法との全体一致率は95.8%、陽性一致率は90.5%、陰性一致率は98.6%で良好な相関を示した。淋菌検出におけるGC法とTMA法との全体一致率、陰性一致率はいずれも100.0%で非常に良好な相関を示した。GENECUBEを用いたクラミジア感染症および淋菌感染症検査は、従来の核酸増幅法による検査と同等の結果が得られた。GENECUBEは約1時間で核酸抽出、核酸増幅、増幅産物の検出が可能であるため、従来よりも短時間での検査が可能になり、クラミジアおよび淋菌感染症の迅速な診断や治療に貢献することが期待される。

## I. 序文

日本国内で最も感染者数が多い性感染症はクラミジア・トラコマティス（以下、クラミジアと略す）感染症であり、男性では次いで淋菌感染症が

多く、女性でも淋菌感染症は頻度が高い性感染症である<sup>1,2)</sup>。クラミジア、淋菌とも女性が感染した場合は子宮頸管炎などを発症し得るが、無症状のまま感染が進行し、卵管障害や腹腔内癒着を形成して異所性妊娠や不妊症の原因となることもある。そのため、高感度かつ正確にクラミジアや淋

菌を検出できる検査法の意義は大きい。

性器クラミジア感染症および淋菌感染症の検出法としては、核酸増幅法（遺伝子検査法）が感度の高い方法として推奨されており、複数の方法が臨床検査用に提供されている<sup>2)</sup>。2015年時点ではリアルタイムPCR法（コバス<sup>®</sup>4800システムCT/NG、ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社）、TMA法（アプティマ<sup>™</sup>Combo2クラミジア/ゴノレア、ホロジックジャパン株式会社）、SDA法（BDプローブテックETクラミジア・トラコマチス、ナイセリア・ゴノレア、日本ベクトン・ディッキンソン株式会社）、リアルタイムPCR法（アキュジーンm-CT/NG、アボットジャパン）などが主に用いられている。また、免疫クロマトグラフィー法を原理とする検査キットも臨床現場では用いられている<sup>2)</sup>。

今回、約1時間で遺伝子検査を実施可能な全自動遺伝子解析装置GENECUBE（東洋紡株式会社）を用いた遺伝子検査法（以下GC法）が、臨床検体を測定した場合に臨床上に有用と認められる感度、特異度を有すること、および既存検査法（以下既存法）と十分な相関性を有することを検討する目的で行った。既存法にはTMA法および免疫クロマトグラフィー法（クリアビュー クラミジア、クリアビュー ゴノレア、共にアリーア メディカル株式会社）を選択した。

## II. 方法

### 対象患者

本検討は2015年10月から2015年12月までにいずみレディスクリニック（岐阜県岐阜市）を受診した女性患者のうち、クラミジアまたは淋菌感染症の疑いがある患者を対象として行った。なお、本研究は、愛知医科大学病院倫理委員会の承認を得て実施した（承認番号13-151）。

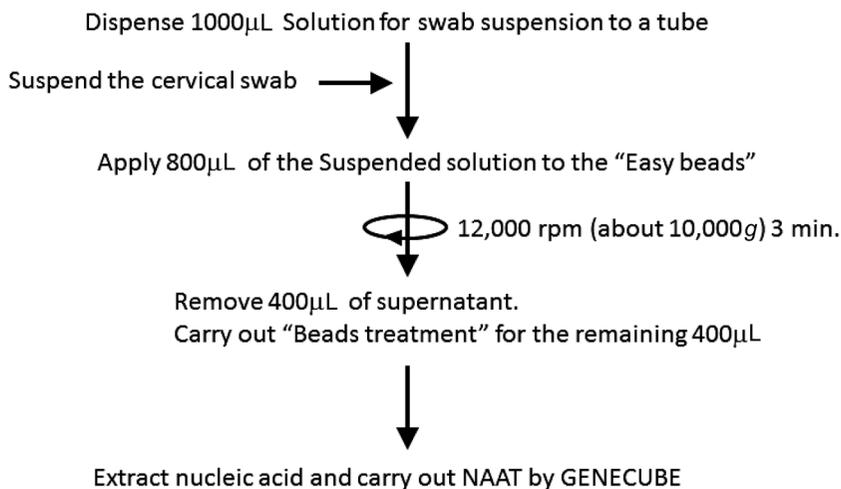
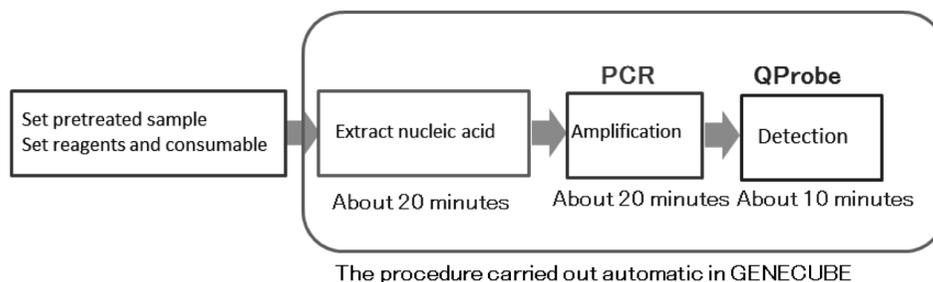
### 検体採取

対象の患者からはフロックスワブ・TR100（COPAN ITALIA S.p.A.）を用いて子宮頸管擦過物を採取した。擦過物は2本のスワブを用いて採取し、採取後のスワブは後述する方法によりGC法あるいはTMA法での検査を行った。また、これとは別に免疫クロマトグラフィー法を原理とする検査キットであるクリアビュー クラミジアおよびクリアビュー ゴノレアを用いた検査も行った。クリアビューでの検査は添付文書の記載に従って行った。

### GC法用の検体前処理法

検体前処理方法の概要をFig. 1に示す。具体的な手順は以下のとおりである。検体を採取したスワブをジーンキューブ専用スワブ検体懸濁液（東洋紡株式会社）を1mL充填した前処理用チューブに浸して攪拌した。十分に懸濁後、スワブを容器から引き上げた。スワブ懸濁後の液（以後、試料液と記載する）から800 $\mu$ Lをマイクロピペットで採取し、ジーンキューブ専用イージー・ビーズ（東洋紡株式会社）のビーズ入りチューブに分注した。試料液とビーズが入ったチューブを10,000gで3分間遠心分離を行い、遠心分離後の試料液のうち上清400 $\mu$ Lをマイクロピペットで除去し、400 $\mu$ Lをチューブ内に残した。

試料液400 $\mu$ Lが残ったビーズ入りチューブに対しては、試料液に含まれるヒト細胞等の夾雑物や細菌を破碎する目的で、ビーズ処理法と呼称する処理を行った。ビーズ処理法の具体的な方法は以下の通りである。まず、チューブを1~2秒間ボルテックスミキサーにより攪拌し、卓上遠心機を用いてスピンドアウンを行った。スピンドアウンしたチューブを80°Cで10分間加熱した。加熱後のチューブはボルテックスミキサーを用いてパルスボルテックスを20秒間行った。パルスボルテックス後のチューブに対して再度卓上遠心機により

**Fig. 1. Overview of pretreatment method of specimens for GENECUBE****Fig. 2. The flow of nucleic acid extraction, amplification and detection performed by GENECUBE**

スピンドアウンを行い、チューブの側壁に付着した試料液やビーズ粒子を底面に落とす。このチューブに対してジーンキューブ専用溶解吸着液（東洋紡株式会社）を600µL添加し、軽く攪拌した後、約1,500gで3分間遠心分離を行った。遠心分離後、上清800µLをマイクロピペットで回収し、ジーンキューブ専用カートリッジの検体分注スポットに分注した。

#### GC法

ビーズ処理法によって得られた上清800µLを分注した専用のカートリッジ、およびその他の専

用消耗品、GENECUBE専用クラミジア検出試薬であるジーンキューブクラミジア・トラコマチス（東洋紡）、同じく淋菌検出試薬であるジーンキューブナイセリア・ゴノレア（東洋紡）をGENECUBEの所定の位置にセットし、GC法による検査を行った。GENECUBEでは専用の試薬、消耗品、検体入りカートリッジをセットし、検体情報をGENECUBE本体に入力し、測定項目としてクラミジア、ナイセリアを選択してスタートすることで、自動的に核酸抽出、PCRによる核酸増幅、QProbeによる増幅産物の検出、結果表示が行われる（Fig. 2）<sup>3,4)</sup>。

### TMA法

検体を採取したスワブを APTIMA STD スワブ採取セット（ホロジックジャパン株式会社）のスワブ搬送液入り保存チューブに浸して懸濁した。この搬送液を検体として、TMA法での検査を行った。TMA法での検査は株式会社ビー・エム・エルに依頼した。

## III. 結果

### 性器クラミジア感染症検査の検討結果

のべ96名から採取した子宮頸管スワブ96検体を用いて、GC法とTMA法によるクラミジアおよ

び淋菌の検出を行った。クラミジア検出の結果を Table 1 に示した。GC法とTMA法との全体一致率は95.8%、陽性一致率は90.5%、陰性一致率は98.6%で良好な相関を示した。GC法とTMA法とで結果が乖離した検体は合計4検体であった。内訳は、GC法で陽性でTMA法で陰性であったものが1検体、GC法で陽性でTMA法で判定保留であったものが1検体、GC法で陰性でTMA法で陽性であったものが2検体であった。

のべ96名中94名でクリアビュー クラミジア（以下IC-C法）によるクラミジア検出を行った。GC法とIC-C法との比較を Table 2 に示した。GC法とIC-C法との全体一致率は85.1%、陽性一致率

**Table 1. Comparison of GENECUBE (GC) and TMA on the *C. trachomatis* tests**

		TMA				Agreement rate
		+	-	Indeterminant	Total	
GC	+	19	1	1	21	Positive 90.5% (19 / 21)
	-	2	73	0	75	Negative 98.6% (73 / 74)
	Total	21	74	1	96	Overall 95.8% (92 / 96)

**Table 2. Comparison of GENECUBE and lateral flow on the *C. trachomatis* tests**

		lateral flow			Agreement rate
		+	-	Total	
GC	+	7	14	21	Positive 100.0% (7 / 7)
	-	0	73	73	Negative 83.9% (73 / 87)
	Total	7	87	94	Overall 85.1% (80 / 94)

は100.0%、陰性一致率は83.9%となった。全体一致率および陰性一致率が低率であるのは、94検体中14検体がGC法陽性でIC-C法陰性であったためであると考えている。また、TMA法とIC-C法との全体一致率は84.0%、陽性一致率は100.0%、陰性一致率は82.8%となった。こちらも全体一致率および陰性一致率が低率であるのは、94検体中14検体がTMA法陽性でIC-C法陰性であり、かつ1検体がTMA法判定保留でIC-C法陰性であったためである。GC法で陽性でIC-C法で陰性であった14検体のうち、1検体はTMA法で陰性、1検体はTMA法で判定保留であり、残り12検体はTMA法で陽性であった。また、TMA法で陽性で

IC-C法で陰性であった14検体のうち、2検体はGC法で陰性であり、残り12検体はGC法で陽性であった。

#### 淋菌感染症検査の検討結果

クラミジア検出と同じ子宮頸管スワブ96検体を用いて行った淋菌検出の結果をTable 3に示した。GC法とTMA法との全体一致率、陰性一致率はいずれも100.0%で非常に良好な相関を示した。淋菌陽性例は本検討の期間中1例しか得られなかった。その1例はGC法とTMA法の両方で陽性を示し、結果が一致した。

のべ96名中92名でクリアビュー ゴノレア

**Table 3. Comparison of GENECUBE and TMA on the *N. gonorrhoeae* tests**

		TMA			Agreement rate
		+	-	Total	
GC	+	1	0	1	Positive 100.0% (1 / 1)
	-	0	95	95	Negative 100.0% (95 / 95)
	Total	1	95	96	Overall 100.0% (96 / 96)

**Table 4. Comparison of GENECUBE and lateral flow on the *N. gonorrhoeae* tests**

		lateral flow			Agreement rate
		+	-	Total	
GC	+	0	1	1	Positive -
	-	0	91	91	Negative 98.9% (91 / 92)
	Total	0	92	92	Overall 98.9% (91 / 92)

(以下IC-G法)による淋菌検出を行った。GC法とIC-G法との比較をTable 4に示した。GC法とIC-G法との全体一致率および陰性一致率は共に98.9%となった。GC法とIC-G法とで共に陽性となった検体はなかったため、陽性一致率は算出できなかった。また、TMA法とIC-G法との全体一致率および陰性一致率も共に98.9%であり、陽性一致率は算出できなかった。GC法で陽性、IC-G法で陰性となった1検体はTMA法で陽性であった。

#### IV. 考察

クラミジア検出では核酸増幅法とIC-C法との比較で、核酸増幅法は陽性でIC-C法は陰性だった検体数が、両者で陽性だった検体数の2倍となり、IC-C法では検出できないクラミジア感染症が少なくないことが示唆された。免疫クロマトグラフィー法は核酸増幅法と比較して感度が低いことは知られていたが<sup>2,5)</sup>、本検討の結果はその報告を裏付けるものであると考えられる。性器クラミジア感染症の検査法の一つであるTMA法の添付文書には、発光強度が陰性判定のカットオフより高く、陽性判定のカットオフより低い場合に判定保留と判定される旨の記載があることから、TMA法の判定保留とは、検査対象菌の遺伝子を増幅し検出したが、検出した遺伝子増幅産物の量が十分ではなかった状態であると考えられた。今回の子宮頸管スワブを用いた検討の結果、GC法はクラミジア検出と淋菌検出の双方でTMA法と高い一致率を示した。クラミジア検出においては全体一致率が95.8%となった。

淋菌検出ではGC法とTMA法は全検体での検査結果が一致した。本検討では陽性例数が少ないため、感度についてはさらなる検証を行うことが望ましいと考えられるが、特異度についてはTMA法と同等であることを示すには十分な検討

数であったと考えられる。また、共に唯一陽性だった患者はIC-G法で陰性だったことから、クラミジア検出と同じく淋菌検出でも免疫クロマトグラフィー法は核酸増幅法と比べて感度が低いことが改めて示唆された。

GENECUBEは、核酸抽出工程と核酸増幅・検出工程の双方が自動的に行われ、かつ核酸抽出と核酸増幅・検出の両方が合わせて約1時間で完了する<sup>3,4)</sup>。現在提供されている他のクラミジアおよび淋菌の遺伝子検査法はいずれも検査に数時間を要するため、GENECUBEを利用することで、既存の検査法と同様の感度、特異度で、かつ既存の検査法よりも高速にクラミジア感染症および淋菌感染症の検査を行うことが可能である。

感染症の迅速診断法として遺伝子検査を活用する利点には、(a) 早期診断が可能となること、(b) 抗菌薬投与後であっても診断できる可能性が高まること、(c) 培養不可能な困難な病原体が検出できること、(d) 発育が遅い病原体の検出が早期に可能となること、(e) きわめて病原性の高い微生物が迅速に診断できること、(f) 薬剤耐性遺伝子の検出ができること、(g) 病原性に関与する遺伝子や毒素遺伝子の検出ができること、(h) 至適培養法などが明らかでない新興病原微生物の迅速診断ができることなどがあげられる。今回検討した自動遺伝子解析装置「GENECUBE」を用いたクラミジア・トラコマティスおよび淋菌の迅速検査は、マルチプレックスPCR法を用いたものであるが、前述した条件の(a)から(e)を満たしている。マルチプレックスPCR法を用いた迅速診断における欠点には、プライマーのアニーリング温度や反応液組成の濃度調整など至適反応条件の設定が複雑となることやシングル反応と比較して検出感度が低下する傾向にあることなどがあげられるが、今回検討した自動遺伝子解析装置「GENECUBE」を用いたクラミジア・トラコマティスおよび淋菌の迅速検査キットではそれらの

問題も解決されていると判断され、装置が全自動であるだけでなく、臨床的に現在使用されている遺伝子診断と同等の有用な診断ツールであると考えられる。

## V. 結語

GENECUBEを用いたクラミジア感染症および淋菌感染症検査は、従来の核酸増幅法による検査と同等の結果が得られた。GENECUBEは約1時間で核酸抽出、核酸増幅、増幅産物の検出が可能であるため、従来よりも短時間での検査が可能になり、クラミジアおよび淋菌感染症の迅速な診断や治療に貢献することが期待される。

### 利益相反

本研究は、東洋紡株式会社と愛知医科大学との間で締結した共同研究契約に基づいて実施した。

宮崎成美, 山岸由佳, 和泉孝治, 末松寛之には申告すべき利益相反はない。

川嶋洋介は東洋紡株式会社の社員である。

三嶋廣繁は、大日本住友製薬(株)、大正富山医

薬品(株)、富山化学工業(株)、第一三共(株)、ファイザー(株)、MSD(株)、アステラス製薬(株)、Meiji Seikaファルマ(株)、ミヤリサン製薬(株)から講演料を得ている。三嶋廣繁は、大日本住友製薬(株)、大正富山医薬品(株)、第一三共(株)、ファイザー(株)、MSD(株)、富山化学工業(株)、武田薬品工業(株)、富士フィルムファーマ(株)、Meiji Seikaファルマ(株)から研究費を得ている。

## 文献

- 1) 小野寺昭一: 近年のわが国における性感染症の動向。モダンメディア58: 210~218, 2012
- 2) 性感染症 診断・治療ガイドライン2011。日本性感染症学会誌22(1) Suppl.: 52~64, 2011
- 3) 曾家義博: 全自動遺伝子解析装置「GENECUBE®」を用いた遺伝子検出法の開発。生物試料分析36: 310~315, 2013
- 4) HIDA, Y., *et al.*: Rapid detection of the *Mycobacterium tuberculosis* complex by use of quenching probe PCR (geneCube). J. Clin. Microbiol. 50: 3604~3608, 2012
- 5) 福地邦彦: クラミジアトラコマチス抗原・抗体。Medicina 47: 408~410, 2010

**〈RESEARCH REPORT〉**

Evaluation of rapid measurement of  
*Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* by  
using automatic gene analyzer “GENECUBE”

NARIMI MIYAZAKI<sup>1)</sup>, YUKA YAMAGISHI<sup>1,2)</sup>, KOJI IZUMI<sup>3)</sup>, YOSUKE KAWASHIMA<sup>4)</sup>,  
HIROYUKI SUEMATSU<sup>1)</sup> and HIROSHIGE MIKAMO<sup>1,2)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Infection Control and Prevention,  
Aichi Medical University

<sup>2)</sup> Department of Clinical Infectious Diseases,  
Aichi Medical University

<sup>3)</sup> Izumi Ladies' Clinic

<sup>4)</sup> TOYOBO CO., LTD.

Nucleic acid amplification tests (NAATs) are considered as one of critical diagnostic methods on *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* infections due to their high sensitivity and accuracy. However, conventional NAATs required 2–6 hours to complete the measurements including extraction, amplification, and detection of the target nucleic acids. To reduce the time, we evaluated the clinical significance of the rapid NAAT using GENECUBE (TOYOBO CO., LTD.) which can complete the measurement within 1 hour. We compared the performance of GENECUBE with those of TMA method (APTIMA™ Combo2 chlamydia/gonorrhoeae, Hologic Japan, Inc.) and lateral flow immunochromatographic assay (Clearview Chlamydia, Clearview gonorrhoeae, Alere Medical Co., Ltd.) by detecting specimens from 96 cervical swabs. The overall agreement results between GENECUBE and TMA were 95.8% and 100% for *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae*, respectively. The results suggested that GENECUBE showed equivalent sensitivity and specificity of TMA. Indeed, more than half of the positive samples in NAATs were measured as negative in the lateral flow. The lateral flow is known as a rapid assay, however the results revealed its poor sensitivity. We think rapid NAATs using GENECUBE on *C. trachomatis* and *N. gonorrhoeae* can be one of the methods, which realize rapid tests with high sensitivity and accuracy.