

## 子宮頸管炎患者および無症候性検診者における Chlamydia trachomatis の分離培養成績について

群馬大学医学部産科婦人科学教室 (主任: 五十嵐正雄教授)

大和田信夫 塚越 俊夫 小菅 利弘

永山 雅之 伊吹 令人

群馬大学医学部解剖学第一教室 (主任: 柴崎 晋教授)

萩原 治夫

### Incidence of Chlamydia Trachomatis Isolated from Endocervical Columnar Cells of the Uterine Cervix

Nobuo OHWADA, Toshio TSUKAGOSHI, Toshihiro KOSUGE,

Masayuki NAGAYAMA and Yoshito IBUKI

*Department of Obstetrics and Gynecology, Gunma University School of Medicine, Maebashi*

*(Director: Prof. Masao Igarashi)*

Haruo HAGIWARA

*1st Department of Anatomy, Gunma University School of Medicine, Maebashi*

*(Director: Prof. Susumu Shibasaki)*

**概要** 群馬県における Chlamydia trachomatis (以下 C.T.) の蔓延度を調査することを目的として、群馬大学医学部付属病院産婦人科外来を受診した患者から採取した子宮頸管細胞について本病原体の分離培養を行ない、以下の結果を得た。

1) 子宮頸管細胞からの C.T. 陽性分離頻度は 1,041 例中 60 例 (5.8%) で、その内訳は症状を伴った子宮頸管炎患者 183 例中 38 例 (20.8%)、無症候性検診者 858 例中 22 例 (2.6%) であった。今回の成績では無症候性婦人からの分離率は 2.6% で群馬県における健康女性の C.T. 保有率と考えられた。これに対し症状を伴った頸管炎患者からの分離率は 20.8% であり有意に高率であった ( $p < 0.001$ )。

2) 30 歳未満群と 30 歳以上群で C.T. 分離陽性頻度を比較すると 30 歳未満群で有意に高率であった ( $p < 0.001$ )。

3) C.T. の細胞質内封入体は位相差顕微鏡により容易に観察され、アクリジンオレンジ染色により網状体と基本小体との鑑別が可能であった。

**Synopsis** To study the incidence of Chlamydia trachomatis (C.T.) infection among women, we obtained swab (endocervical columnar cells) from the uterine cervix of 1,041 women attending the Department of Obstetrics and Gynecology of Gunma University Hospital. The results were as follows.

1) Overall, C.T. was isolated from 60 of the 1,041 women (5.8%). With reference to the diagnoses, the organism was isolated from 38 of 183 patients with cervicitis (20.8%) and from 22 of 858 asymptomatic women (2.6%) ( $p < 0.001$ ).

2) C.T. antigen was detected at a higher frequency (15.0%) in the under 30 years age group than in the over 30 year age group (2.3%) ( $p < 0.001$ ).

3) The unstained inclusion C.T. bodies were confirmed more easily by phase contrast microscopy.

4) Inclusion bodies were specified as either reticulate or elementary bodies by the acridine orange staining method.

**Key words:** Chlamydia trachomatis • Uterine cervicitis • Infection

#### 緒 言

Genu Chlamydiae は偏性細胞寄生性の特殊な

細菌で、ヒトに対してはトラコーマ、オウム病および第 4 性病の起因菌として知られており、分類

上オウム病クラミジアとトラコーマクラミジアの2種に区分されている。かつては我が国でも大流行をみせていた眼疾としてのトラコーマや、小流行をみせていた第4性病は抗生物質とりわけテトラサイクリンの開発により今日ではほとんど姿を消している。これに反し、ここ十数年前より性器クラミジア感染症が欧米で流行の傾向をみせ、最近では最も頻度の高い性病として注目を浴びている。

女性性器におけるクラミジア感染症は、子宮頸管炎に留まらず、子宮内膜炎、卵管炎、骨盤腹膜炎など、広範囲にわたることが報告されている<sup>8)</sup>が、一般的に症状は軽微であり、自覚症状が乏しいため社会的に潜行し、その実態は把握しがたい。

我が国では、有症候女性での報告<sup>2)3)</sup>はあるが、無症候女性についての報告は乏しく、その流行の程度を正しくは推測できないが、実際にはかなり広く潜行していることが予想される。今回われわれは群馬県における *Chlamydia trachomatis* (以下C.T.)の蔓延度を調査することを目的にして、当科外来を受診した患者より本病原体の分離培養を行なったのでその成績について報告する。

表1 対象および平均年齢

	例数	平均年齢±S.D.
無症候性検診者	858	41.4±8.3
子宮頸管炎患者	183	30.7±6.5
計	1,041	39.5±8.0

### 研究対象および材料

表1に対象および平均年齢を示す。当科外来を受診した症状を伴った頸管炎患者群183名、無症候性検診者858名の計1,041検体を対象とした。分離材料は、swabにて頸管内を擦過し採取した。採取された材料は1mlのtransport medium (10% FCS+0.2M sucrose phosphate solution, 4℃)にのりただちに培養した。

子宮頸管炎の診断は、子宮腔部の発赤、浮腫、膿性帯下、易出血性を基準とした。

### 分離培養法

C.T.の分離培養法は図1に示したように Evans and Taylor-Robinson<sup>5)</sup>、加藤ら<sup>1)</sup>の方法に準じた。平底試験管内の11mm径の円形 cover slip上にMcCoy細胞単層シートを作成し0.02% EDTAで37℃、30分前処理後、これに各患者検体

Specimens were obtained by inserting a cotton swab into the cervical os and rotating it for 5 seconds before withdrawal.

↓

The swab was diluted in 2.0ml of transport medium and stored at 4°C before inoculation.

↓

0.5ml of transport medium were inoculated on monolayers of McCoy cells in flat tubes.

↓

Each tubes were centrifuged at 3,000rpm for 60min at 4°C.

↓

incubated at 37°C for 2hr.

↓

The medium was removed and 2.0ml of growth medium containing 1μg/ml cycloheximide was added.

↓

incubated at 37°C for 48hr.

McCoy cells were stained by Giemsa solution.

Inoculation medium : 10%FCS+0.2M sucrose phosphate solution  
+100μg/ml vancomycin (or 10μg/ml gentamycin)  
+100μg/ml streptomycin

Growth medium : 10%FCS+Eagle MEM+0.5%glucose  
+100μg/ml vancomycin+100μg/ml streptomycin

(by modified methods of Evans and Taylor-Robinson)

図1 Procedure of isolation of *Chlamydia trachomatis* from the uterine cervix



写真1 位相差顕微鏡 (×2,000)

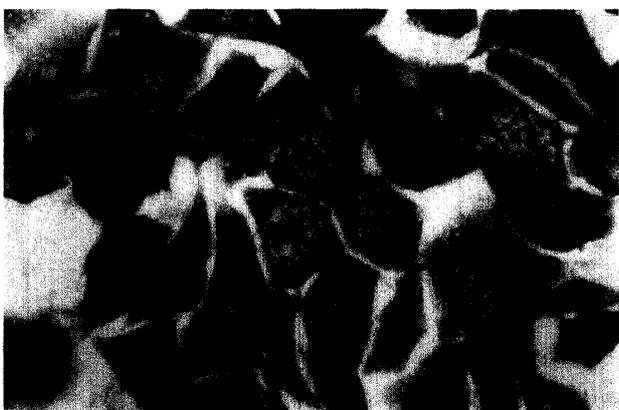


写真2 Giemsa 染色 (×800)



写真3 アクリジンオレンジ染色 (×800)

を添加，細胞表面への C.T. の吸着を促進するため 3,000rpm，1 時間遠心，さらに 37°C で 2 時間放置後 1μg/ml の Cycloheximide を含む Eagle の MEM 培養液 (10% FCS, 100μg/ml Streptomycin, 100μg/ml Vancomycin 添加) にて 37°C で 48 時間培養。培養後単層シートを位相差顕微鏡で観

表2 子宮頸管細胞からの C.T. 分離陽性頻度

	例数	分離陽性例	分離陽性頻度
無症候性検診者	858	22	2.6%
子宮頸管炎患者	183	38	20.8%
計	1,041	60	5.8%

$$\chi^2=91.993 \quad p<0.001$$

察し (写真1)，その後 Giemsa 染色 (写真2) およびアクリジンオレンジ染色 (写真3) し鏡検。写真1, 2, 3 に示したような典型的な細胞質内封入体が確認された場合 C.T. 分離陽性とした。

#### 研究成績

1. 子宮頸管細胞からの C.T. 分離陽性頻度は表2に示したように1,041例中60例 (5.8%) で，その内訳は症状を伴った頸管炎患者183例中38例 (20.8%)，無症候性検診者858例中22例 (2.6%) であり，症状を伴った頸管炎患者での C.T. 分離陽性頻度は有意に高率であった ( $p<0.001$ )。

2. 表3に示したように年齢別に分離陽性頻度をみると，20歳未満で3例中2例 (66.7%) と最も高率であり，以下20歳代で18.7%，30歳代で3.5%，40歳代で1.8%，50歳代で1.2%認められ，加齢とともに分離陽性頻度の低下傾向が認められた。また60歳以上では分離陽性例は認められなかった。この傾向は両群において認められたが，とくに30歳未満と30歳以上で比較検討すると30歳未満で分離陽性頻度は有意に高率であった ( $p<0.001$ ) (表4)。

3. 培養後48時間の位相差顕微鏡での観察において写真1に示したように細胞質内封入体中に粒子が認められ，またその粒子がブラウン運動をしているのが明瞭に観察された。

4. 写真3に示したようにアクリジンオレンジ染色により RNA に富んだ網状体はオレンジ色の粒子として，DNA に富んだ基本小体は黄緑色の微小粒子として染色され，両者の鑑別は容易であった。

#### 考 察

C.T. は1907年 Halberstaedter and von Prowazek により眼疾トラコーマ患者から最初に報告された特殊な細菌であり，細胞質内封入体は

表3 年齢別分離陽性頻度(1)

年齢	無症候性検診者	子宮頸管炎患者	計
～19		2/3 (66.7%)	2/3 (66.7%)
20～29	9/103(8.7%)	29/100(29.0%)	38/203 (18.7%)
30～39	9/343(2.6%)	5/54 (9.3%)	14/397 (3.5%)
40～49	3/257(1.2%)	2/26 (7.7%)	5/283 (1.8%)
50～59	1/86 (1.2%)		1/86 (1.2%)
60～	0/69 (0.0%)		0/69 (0.0%)
計	22/858(2.6%)	38/183(20.8%)	60/1,041(5.8%)

表4 年齢別分離陽性頻度(2)

年齢	無症候性検診者	子宮頸管炎患者	計
～29	9/103(8.7%)	31/103(30.1%)	40/206(19.4%)
30～	13/755(1.7%)	7/80 (8.8%)	20/835(2.4%)
$\chi^2$	17.858	12.471	88.149
p	<0.001	<0.001	<0.001

Prowazek 小体と呼ばれている<sup>7)</sup>。

性器におけるC.T.感染症は1909年に Lindner<sup>12)</sup>により初めて確認された。彼らはこれを genitales Trachom とよび、眼疾トラコーマと区別した。

1957年 T'ang et al.<sup>23)</sup>は鶏胎 (yoek sac) を用い眼疾トラコーマから最初にC.T.の分離をし、1959年に同方法により、Jones et al.<sup>10)</sup>は子宮頸管腺細胞から初めて分離している。その後 Gordon et al.<sup>6)</sup>により培養細胞を用いてC.T.の分離および継代培養が可能となり、その後性器からの本病原体の分離培養を用いた研究が広く行なわれるようになった。欧米における報告によれば、男性の非淋菌性尿道炎患者の30～60%にC.T.が細胞培養法により証明され<sup>9)15)16)19)20)22)24)26)</sup>、C.T.陽性患者 sexual partner の40～70%は性器C.T.感染症であったという<sup>4)9)15)18)24)</sup>。今回のわれわれの成績では頸管炎患者からのC.T.の分離陽性頻度は20.8%であり、Kuo et al. の34%<sup>11)</sup>から Paavonen の61%<sup>17)</sup>、平均46.8%に比べ若干低く、また無症状婦人からの検出率も Schachter et al. の4%から Paavonen の20%、平均12.5%に比べ2.6%と有意に低く、群馬県におけるC.T.保有率と考えられ

た<sup>11)13)14)17)21)</sup>。

年齢別に分離陽性頻度をみると、30歳未満で206例中40例(19.4%)と高率であり、スウェーデンにおける Westrom et al. の報告<sup>25)</sup>や、我が国における野口らの報告<sup>3)</sup>とも一致している。このことは若年者の場合には頸管腺の未熟性のためにC.T.に対する感受性が高いことや、逆に30歳を過ぎているような場合には過去に無症状のまま感染していることが多く、そのための局所反応による再感染阻止により分離頻度が低いものと考えられた。

写真2に示したようにC.T.の確認には Giemsa 染色による観察が必要であるが、今回われわれは位相差顕微鏡による観察を行ない Giemsa 染色をすることなくC.T.を確認することができた(写真1)。また Giemsa 染色1,000倍での観察においても細胞質内封入体の粒子の鑑別は困難であると思われた。この点に関し、今回われわれはアクリジンオレンジ染色を施し、粒子を染色することによりRNAに富んだ網状体はオレンジ色の粒子として、DNAに富んだ基本小体は黄緑色の微小粒子として鑑別することが可能であることを確認した(写真3)。このことよりC.T.の分離に際し Giemsa 染色による観察のみでなく位相差顕微鏡やア

クリジンオレンジ染色による観察を同時に実施することは細胞質内封入体中の粒子の鑑別や正確なC.T. 感染症の診断に重要であると思われた。

御指導いただきました田波 洋群馬大学医学部名誉教授、御校閲いただきました恩師五十嵐正雄教授に深謝いたします。

#### 文 献

1. 加藤直樹, 伊藤康久, 出口 隆, 兼松 稔, 坂 義人, 河田幸道, 西浦常雄, 鄭 漢林, 土井達郎, 酒井俊助, 松田聖士: Chlamydia trachomatis の尿道炎患者からの分離. 感染症誌, 58: 29, 1984.
2. 熊本悦明: すそ野ひろがる性感染症. モダンメディシン, 16: 23, 1987.
3. 野口昌良, 岡本俊充, 秋田敏行, 稗田茂雄, 石原実: 産婦人科領域におけるChlamydia trachomatis 感染症に関する臨床的検討. 日産婦誌, 40: 452, 1988.
4. Alani, M.D. and Darougar, S.: Isolation of Chlamydia trachomatis from the male urethra. Br. J. Vener. Dis., 53: 88, 1977.
5. Evans, R.T. and Taylor-Robinson, D.: Comparison of various McCoy cell treatment procedures used for detection of Chlamydia trachomatis. J. Clin. Microbiol., 10: 198, 1979.
6. Gordon, F.B. and Quan, A.L.: Isolation of the trachoma agent in cell culture. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 118: 354, 1965.
7. Halberstaedter, L. and von Prowazek, S.: Zur Aetiologie des Trachoms. Dtsch. Med. Wochenschr., 33: 1285, 1907.
8. Hare, M.J. and Thin, R.N.: Chlamydial infection of the lower genital tract of women. Brit. Med. Bulletin., 39: 138, 1983.
9. Holmes, K.K. and Handsfield, H.H.: Etiology of nongonococcal urethritis. N. Engl. J. Med., 292: 1199, 1975.
10. Jones, B.R., Al-Hussaini, H.K. and Dunlop, E. M.C.: Genital infection in association with TRIC virus infection of the eye. 1. Isolation of virus from urethra, cervix and eye: Preliminary report. Br. J. Vener. Dis., 40: 19, 1964.
11. Kuo, C.C. and Wang, S.P.: Primary isolation of TRIC organisms in HeLa 229 cells treated with DEAE-dextran. J. Inf. Dis., 125: 665, 1972.
12. Lindner, K.: Gonoblennorrhoe, Einschlußblennorrhoe und Trachoma. Albrecht von Graefes Arch. Klin. Exp. Ophthalmol., 78: 380, 1911.
13. Nayyar, K.C. and O'Neil, J.J.: Isolation of Chlamydia trachomatis from women attending a clinic for sexually transmitted disease. Br. J. Vener. Dis., 52: 396, 1976.
14. Oriel, J.D. and Johnson, A.L.: Infection of the uterine cervix with Chlamydia trachomatis. J. Inf. Dis., 137: 443, 1978.
15. Oriel, J.D. and Reeve, P.: Isolation of Chlamydia from patients with non-specific genital infection. Br. J. Vener. Dis., 48: 429, 1972.
16. Oriel, J.D. and Ridgway, G.L.: The lack of effect of ampicillin plus probenecid given for genital infections with Neisseria gonorrhoeae on associated infections with Chlamydia trachomatis. J. Inf. Dis., 13: 568, 1976.
17. Paavonen, J.: Chlamydia trachomatis induced urethritis in female partners of men with nongonococcal urethritis. Sex Transm. Dis., 6: 69, 1979.
18. Paavonen, J. and Kousa, M.: Examination of men with nongonococcal urethritis and their sexual partners for Chlamydia trachomatis and Ureaplasma urealyticum. Sex Transm. Dis., 5: 93, 1978.
19. Perroud, H.M. and Miedzybrodzka, K.: Chlamydial infection of the urethra in men. Br. J. Vener. Dis., 54: 45, 1978.
20. Richmond, S.J., Hilton, A.L. and Clarke, S.K. R.: Chlamydial infection: Role of Chlamydia subgroup A in non-gonococcal and post-gonococcal urethritis. Br. J. Vener. Dis., 48: 437, 1972.
21. Schachter, J., Causse, G. and Tarizzo, M.L.: Chlamydiae as agents of sexually transmitted diseases. Bull. WHO, 54: 245, 1976.
22. Schachter, J., Hanna, L. and Hill, E.C.: Are chlamydial infection the most prevalent venereal diseases? J.A.M.A., 231: 1252, 1975.
23. T'ang, F.F., Chang, H.L. and Huang, Y.T.: Trachoma virus in chick embryo. Natl. Med. J. Clin., 43: 81, 1957.
24. Terho, P.: Chlamydia trachomatis in non-specific urethritis. Br. J. Vener. Dis., 54: 251, 1978.
25. Westrom, L. and Mardh, P.-A.: Genital chlamydial infections in the female. In Chlamydial Infections (eds. P.-A. Mardh, et al.), 121. Elsevier Biomedical Press, Amsterdam, New York, Oxford, 1982.
26. Wong, J.L. and Hines, P.A.: The etiology of non-gonococcal urethritis in men attending a venereal disease clinic. Sex Transm. Dis., 4: 4, 1977.

(No. 6924 平2・12・17受付)