原 著

順天堂医学 37 (3)
P. 416~424 (1991)

Polymerase chain reaction による *Chlamydia trachomatis* の検出とドットブロット法を応用した型別診断

A new method for the detection of *Chlamydia trachomatis* infection
and the serovar determination using polymerase chain reaction and
dot-blot hybridization

齊 藤 十 一*1) 淡 路 正 則*1) 西 村 裕 之*2)
JUICHI SAITOH, M.D., MASANORI AWAJI, M.D., HIROYUKI NISHIMURA, Ph.D.,
鶴 井 博 理*2)
& HIROMICHI TSURUI, M.D.,

今回われわれは、Polymerase Chain Reaction (PCR) とドットブロット法を応用することにより、泌尿生殖器感染症の原因となる *Chlamydia trachomatis* (CT) 感染を検出し、その CT の血清型 (D~K型, 8種類) を簡便に診断する方法を開発した。各 CT は菌体外膜蛋白をコードする遺伝子領域内の4つの variable domain (VD I~IV) の一部に型特異的塩基配列を持つ。そこで PCR の標的 DNA 領域としてこの VD I~IV を含む領域を選び、この DNA 領域を増幅するために、その前後を挟むプライマーとして CT の全ての型、および *Chlamydia psittaci* (CP) に共通する塩基配列を選び DNA を合成した。各型の CT および CP 感染培養細胞より抽出した DNA を用いた場合、PCR によりこれら全ての試料で特異的増幅が認められ、*Chlamydia* 感染が証明された。実際に子宮頸管粘膜材料94例について検討した結果、この方法で調べた CT 感染陽性率 (35.1%) は従来の Chlamydiazyme 法 (25.5%) に比べて高く、より高感度であった。続いてD~K型の CT 8種類を識別するために、PCR 増幅後の標的 DNA とわれわれが合成した DNA プローブを用いたドットブロット法を行った。用いた DNA プローブは、8型の CT の VD I~IV 遺伝子領域内から7箇所の型特異的核酸配列領域を選び合成した。各型の CT 感染培養細胞より得た標的 DNA を検討した結果、D~I・K型の7種類で既知の核酸配列から予想される結果と一致するドットハイブリッド形成を認めた。一方、J型においては予想外の結果が得られたが、これについては、用いたJ型 CT に突然変異が存在するためか、報告された核酸配列に問題があるのか、なお課題を残した。以上より、PCR を応用することで高感度に CT 感染の診断が可能となり、さらにドットブロット法を組み合わせることで従来の方法に比べてより簡便、かつ信頼性のある型別診断ができることが示された。

索引用 語 : *chlamydia trachomatis*, polymerase chain reaction, DNA probe,
ドットブロット法, 型別診断

Key words : *chlamydia trachomatis*, polymerase chain reaction, DNA probe,
dot-blot hybridization, typing

*1) 順天堂大学医学部産婦人科学講座

*2) 順天堂大学医学部病理学第二講座

*1) Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

*2) Department of Pathology (II), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

〔Oct. 23, 1990 原稿受領〕 (Nov. 22, 1990 掲載決定)

緒 言

Chlamydia 属は *Chlamydia trachomatis* (CT) と *Chlamydia psittaci* (CP) の2種に分類され、CT はさらに15種類の血清型に分けられている¹⁾。CP では現在のところ CT の血清型に相当するものは認められていない。CT は多彩な感染像を示すが、その違いは血清型に関係している。たとえば、CT の A B Ba C の4型は眼のトラコーマを起こし、L₁ L₂ L₃ の3型は性病性リンパ肉芽腫症(第四性病)の原因となり、D~Kの8型は泌尿生殖器感染症・封入体結膜炎・新生児肺炎などを引き起こすことが知られている。これら CT の型による抗原性の違いは、菌体外膜蛋白をコードする遺伝子領域内の4つの variable domain (VD I~IV) に存在する²⁾³⁾。この VD I~IV 内のいずれかに型間で異なる塩基配列があり、生物学および免疫学的特異性を決めている⁴⁾。

最近、性行為感染症の一つとして泌尿生殖器の CT 感染が世界的に流行し問題になっている。この CT 感染は特に20歳代の若年者に多く、妊婦子宮頸管粘膜のスクリーニングでその感染率は 2.6~7.2%にも達している⁵⁾⁶⁾⁷⁾。このように現在 CT 感染は臨床的重要性を増してきているが、一方、いまだ CT 型の違いによる病態の違いやこれに関連した疫学的研究に関する報告は少ない。この理由の一つとして、CT 型診断法の煩雑性があげられる。現在、CT 型診断は抗血清もしくはモノクローナル抗体を用いた micro-immunofluorescence 法 (micro-IF 法) により行われているが⁸⁾⁹⁾、このためには多数の感染細胞を培養する必要がある上、検査の手段も煩雑である。

今回われわれは、Polymerase Chain Reaction (PCR) とドットブロット法を応用し、簡便・迅速・高感度に *Chlamydia* 感染を診断するとともに、各 CT の型を決定する方法を開発したので、その感度・特異性について報告する。

実験材料と実験方法

1. *Chlamydia* とその他の微生物

今回の研究に用いた全血清型 (A~K・Ba・L₁~L₃、15種類) の CT 感染培養細胞は、国立予防衛生研究所において継代培養されている標準株、A/G-17/OT YHL-13, B/TW-5/OT YHL-12, Ba/AP-2/OT YHL-21, C/TW-3/OT YHL-11, D/UW-3/CX YHL-13, E/UW-5/CX YHL-16, F/UW-6/CX YHL-21, G/UW-57/CX YHL-9, H/UW-4/CX YHL-18, I/UW-12/UR YHL-14, J/UW-36/CX YHL-39, K/UW-31/CX YHL-7, L₁/440/Bubo YHL-6, L₂/434/Bubo YHL-11, L₃/404/Bubo YHL-6 である。これらは、モノクローナル抗体を用いた micro-IF 法により血清型が同定されている。同様に CP の培養細胞も同研究所より供与された標準株である。

用いた腔内常在菌・腔炎起因菌の培養株は、*Escherichia coli*・*Klebsiella pneumoniae*・*Enterobacter cloacae*・*Proteus mirabilis*・*Pseudomonas aeruginosa*・*Staphylococcus aureus*・*Staphylococcus epidermidis*・*Enterococcus faecalis*・*Streptococcus agalactiae*・*Lactobacillus* sp. No. 939・*Lactobacillus* sp. No. 940・*Corynebacterium* sp.・*Neisseria gonorrhoeae*・*Bacteroides fragilis*・*Candida albicans* の15種類であり、10⁸ CPU/mlに調整されたものを用いた。

2. 臨床検体

当院産婦人科外来において1989年10月~1990年6月にかけて採取された子宮頸管綿棒擦過材料を用いた。対象は、帯下感・下腹痛などを主訴とする治療前94症例とした。これらの材料は、1 ml の 1 M塩酸ゲアニジン、10 mM EDTA、10 mM トリス塩酸、0.05% アジ化ナトリウムの入ったチューブ内で4℃に保存され、DNA 抽出操作は検体採取後2週間以内に行われた。

3. DNA 抽出

チューブ内の細胞を遠心操作によりペレット状に沈澱させた後、その沈澱物を1% (W/V) SD

S, 0.1mg/ml proteinase K にて変性・溶解させた。続いて hexadecyltrimethylammonium bromide にて細胞壁断片・蛋白・ポリサッカライドを選別し, phenol/chloroform にてDNA 抽出を行い, isopropanol を用いて沈澱させた¹⁰⁾。

4. PCR

反応液として10X Reaction Buffer : 10 μ l, dNTPs Mix. (1.25mM in each dNTP) : 16 μ l, Primer #1 (50 μ M) : 2.0 μ l, Primer #2 (50 μ M) : 2.0 μ l, template DNA : 100ng ~ 1 μ g, Taq Polymerase (TAKARA) : 1 μ l (5 Units) にH₂Oを加え計100 μ l としたものを調整した。1サイクルは melting step を92°C 1分, annealing step を54°C 1分, extension step を72°C 5分に設定し, amplification system (Cetus 社)を用いて標的 DNA を30サイクル増幅した¹¹⁾。

5. ゲル電気泳動法

0.8%のアガロースゲルにエチジウムブロマイドを 0.5 μ g/ml 加え電気泳動を行った。泳動後 254nm の紫外線を照射し, エチジウムブロマイドの発色反応によりバンドを検出した。

6. DNA プローブの合成と標識

各 DNA プローブは, Phosphoramidite 法により合成され, OPCTM (Applied Biosystems) カートリッジを用いて精製された。標識は 5' 末端の磷酸化反応により, [γ -³²P] ATP, T₄ polynucleotide kinase を用いて行われた。

7. ドットブロット法

PCR により増幅された DNA 断片を試料とし, その分子数を260nm の吸光度により算出した。そしてこの10¹² molecule / 1~2 μ l を90°Cで denature させた後ナイロンメンブレンに滴下し, 254 μ m の紫外線 1.2 $\times$ 10⁵ μ JOULES/cm² (UV stratalinkerTM; STRATAGENE) により固着させた。³²Pで標識された DNA プローブは, 1回のハイブリダイゼーションにつき10⁶cpm/ml 使用した。プレハイブリダイゼーションは, 反応液として6 X SSC・5 X Denhardt's reagent・0.5% SDS・100 μ g/ml denatured fragmented

salmon sperm DNA を用い, 65°C 2時間行った。ハイブリダイゼーションは, 反応液として 3.0M TMACl・0.01 M sodium phosphate (pH 6.8)・1 mM EDTA (pH 7.6)・0.5% SDS・100 μ g/ml denatured fragmented salmon sperm DNA・0.1% nonfat dried milk を用い, 62°C 2時間行った。ハイブリダイゼーション後, ナイロンメンブレンをラップに包みオートラジオグラフィーを-70°C 4時間施行し, 各プローブとのドットハイブリッド形成の有無により試料の血清型を決定した。

8. Chlamydiazyme 法

この方法は Abbott 社で開発された enzyme immunoassay (EIA) を利用した *Chlamydia* 検出法であり, 特殊ビーズにクラミジア粒子を吸着させ, 抗クラミジア血清 (ウサギ)・ペルオキシダーゼ標識抗ウサギ IgG 血清 (ヤギ)・OPD 基質液を用いて発色させた後, 492nm の吸光度を測定した。

結 果

1. PCR とゲル電気泳動法による *Chlamydia* の検出

CT 感染を PCR 法で検出するために, まずわれわれは現在までに報告されている各型 CT の菌体外膜蛋白 (major outer membrane protein ; MOMP) コード塩基配列をもとにプライマーの設定を行った^{2)3)12)~15)}。目的とする標的 DNA を PCR 法で増幅するには, MOMP 領域内に位置する型間で塩基配列の異なる VDI~IV を含む領域を増幅することのできるプライマーが必要であり, しかもそのプライマーの塩基配列は, 全ての型の CT および CP に共通でなければならない。そこでわれわれは, VDI の 5' 側と VDIV の 3' 側との各々において, Fig.-1 に示した領域をプライマーとして定めた。プライマーの長さは annealing での特異性を高くするため各々21mer とやや長めにし, これらのプライマーに挟まれた 1050bp の領域を標的 DNA とした。

Fig.-1 Sequences of specific oligonucleotide primers used in PCR and the locations of the primers and four variable domains (VD I ~ IV) in major outer membrane protein (MOMP) genomes of *C. trachomatis*

次に PCR 法における各ステップの温度・時間に関する条件設定を行った。PCR 法は原則的に、annealing の温度が低いほどプライミングの効率が高くなるが、この条件ではまた非特異的な増幅も増大する。extension においても温度により Taq polymerase の酵素活性が異なる。また両ステップの時間に関しても、短かすぎた場合ハイブリダイズしないしポリメライズが十分でなく、長すぎた場合テンプレート同士の結合が多くなり増幅効率が低下する。これらのことをふまえ、われわれは特異的な増幅をほとんど認めず、しかも標的 DNA の増幅効率が高くなるべく高い条件を見いだすため、annealing・extension について実験的検討を行った。その結果、各ステップの温度・時間の微妙な変化により非特異的なバンドの出現の有無がいちじるしく異なり、annealing : 54°C 1 分・extension : 72°C 5 分の条件で最も適切な結果が得られた。

Fig.-2 Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from 15 *C. trachomatis* serovars and one *C. psittaci*

M : marker DNA (λ Hind III),
A~L₃ : serovar of *C. trachomatis*
P : *C. psittaci*

次に上記の条件下で、CT の全ての型 (15種類) および CP の感染培養細胞より抽出した DNA を試料として PCR を施行し、ゲル電気泳動法を行った。その結果、検索した試料全てに増幅された1050bp の標的バンドを検出できることが明らかになった (Fig.-2)。約 2000bp の位置に薄く非特異的なバンドが検出される試料もあったが、これらは

λ Hind III などのマーカーを同時に泳動し、分子量を比較することにより容易に非特異的なバンドとして判断することができた。

この PCR の特異性を検討するために、15種類の腔内常在菌・腔炎起因菌などの微生物から抽出した DNA を試料とした結果、全く標的とするバンドは検出されず交差反応は認められなかった (Fig.-3)。

Fig.-3 Electrophoretic analysis of the PCR products obtained from 15 distinct microbes

1 : *Escherichia coli*, 2 : *Klebsiella pneumoniae*,
3 : *Enterobacter cloacae*, 4 : *Proteus mirabilis*,
5 : *Pseudomonas aeruginosa*, 6 : *Staphylococcus aureus*,
7 : *Staphylococcus epidermidis*,
8 : *Enterococcus faecalis*, 9 : *Streptococcus agaractiae*,
10 : *Lactobacillus* sp. No. 939,
11 : *Lactobacillus* sp. No. 940, 12 : *Corynebacterium* sp.,
13 : *Neisseria gonorrhoeae*, 14 : *Bacteroides fragilis*,
15 : *Candida albicans*, M : marker DNA (λ Hind III)

続いて臨床検体として、患者の子宮頸管擦過綿棒より得られた細胞より DNA を抽出し、この PCR 法を施行した。その結果 Tab.-1 に示すように、検索した94例中33例 (35.1%) において標的 DNA が検出された。この際同時に採取された子宮頸管上皮細胞における CT 感染をクラミジアザイム法で調べたところ、その陽性率は25.5% (24例) であった。なお、PCR 法で陰性でありな

Tab.-1 Comparison of PCR and Chlamydia-enzyme method for the detection of *C. trachomatis* infection to the uterine cervix

PCR	Chlamydiazyme		
	Positive	Negative	Total
Positive	23	10	33
Negative	1	60	61
Total	24	70	94

Fig.-4 Locations of 4 variable domain (VD I ~ IV) sequences of 10 *C. trachomatis* serovars (B to K) and 7 DNA probe sequences used for the serovar determination of *C. trachomatis*

1): probe # 1, 2): probe # 2, 3): probe # 3, 4): probe # 4, 5): probe # 5, 6): probe # 6, 7): probe # 7

Fig.-5 Do-blot hybrid-formations of the PCR products from 8 *C. trachomatis* serovars (D to K) and one with 7 DNA probes *C. psittaci*

がらクラミジアザイム法で陽性を示した例が1例認められた。

2. DNA プローブを用いたドットプロット法による CT の血清型診断

CT の血清型を DNA レベルで診断するために、報告された各型 CT (D E F G H I J K) の V

DI ~ IV の塩基配列から Fig. -4 に示した比較的特徴のある配列を7箇所選び、各々20 bp の DNA プローブを合成した。

これらの DNA プローブを用い、PCR 法により増幅された各 CT と CP 感染培養細胞より得た DNA 断片を試料としてドットプロット法を施行した結果、Fig.-5 に示すように CT の D E F G H I K型の7種類の DNA と、7個の DNA プローブとは塩基配列から推定された通りの反応を示した。

しかしJ型では、推定された以外の反応がプローブ # 1 と # 4 に認められた。このうち、プローブ # 1 は理論的には Fig.-6 に示すように CT のE型とG型と、プローブ #

Serovar of <i>Chlamydia trachomatis</i>	DNA Probe							Presumed reaction with Probes
	#1	#2	#3	#4	#5	#6	#7	
D		○						#2
E	○	○						#1, #2
F				○				#4
G	○			○				#1, #4
H					○	○		#5, #6
I			○		○			#3, #5
J					○			#5
K					○		○	#5, #7

Fig.- 6 Expected dot-blot hybrid-formations of 8 *C. trachomatis* serovars (D to K) with 7 DNA probes

4はF型とG型とハイブリダイズすることが予測された。またCPでは、全くドットハイブリッドを示さず、交差反応は認められなかった。

考 察

今回われわれは、PCRを応用した新しい *Chlamydia* 感染診断法とCTの血清型診断法を考案した。第1段階としてはPCRにより全ての *Chlamydia* に特異的で、しかも各CTの型特異性が存在するVDI～IVの遺伝子領域を含む標的DNAを増幅できるプライマーを考案し、これで増幅した標的DNAの有無から *Chlamydia* 感染を検出する試みをした。第2段階としては、型の異なるCTのVDI～IV領域から特徴のある塩基配列を選び、これをもとに7種類のDNAプローブを合成し、これらと標的DNAとのドットブロット法によりCTの型を診断する試みを行った。

子宮頸管粘膜における *Chlamydia* 感染の検出法としては現在 Chlamydiazyme 法などが臨床応用されているが、細菌との交差反応性になお問題が残されている¹⁶⁾。今回われわれが開発した方法はこの点には全く問題がなく、しかも検出感度に関しても Chlamydiazyme 法と比較して明らかに高かった。Chlamydiazyme 法と細胞培養法との比較では、陽性一致率が73.7～88.0%，陰性一致率が93.8～98.9%という報告がなされている¹⁷⁾¹⁸⁾。

今回われわれは細胞培養法は行わなかったが、Chlamydiazyme 法とPCR法との比較結果とこれらの報告結果とを考え合わせると、PCR法と細胞培養法とは非常に高い一致率を示すものと推察される。また従来の方法では、検出感度を上げようとするたえず偽陽性の出現が問題となっていたが、PCR法では適切な条件設定をしていれば、方法論上は偽陽性の存在が考えられないので、きわめて信頼のおける方法と考えられる。

PCR法は非常に感度が高いため、操作時の極微量のコンタミネーションが偽陽性の原因となるという問題があるが、この点は実験者が注意深く操作することにより容易に解決できると思われる。今後PCR法で増幅されたDNAを定量的に検討することにより、CT感染細胞の変化、たとえば封入体数と病態像との関連などに、より詳細な検討を行うこともできるようになると思われる。

今回、ラジオアイソトープ標識DNAプローブを用いたドットブロット法をCTの血清型診断に応用してみた。DNAプローブは、発表されているCTのVD領域の塩基配列をもとに合成したが⁴⁾、なるべく少ないプローブ数により型診断ができるように、まず数種類のCT型に共通する塩基配列領域を探し、その後この領域では識別できない型を検出するために型特異的塩基配列領域を見つける努力をした。また偽陽性を避けるため、各プローブとそのプローブが認識しない型のVD塩基配列との相同性は90%以下とした。一方、このようにして得られた各プローブのGC含有量は異なるのでハイブリッドの安定性に差が出ることが予想されたが、われわれは、Tetramethylammonium Chloride (TMACI) を用いることによりスタビリティの差を解消した¹⁹⁾²⁰⁾。今回、ハイブリダイゼーションの温度としては62℃を選んだが、この温度はハイブリッド形成の有無を最も容易に判別できる温度として実験的検討を行い設定された。

今回の研究において、CTのJ型に関しては発表されている塩基配列から推定し得ない反応がプローブ#1・#4に認められた。プローブ#1とJ型の

その領域について報告されている塩基配列との相性は70% (14/20) であり、6塩基のミスマッチが存在するような二つの試料が今回の条件下でハイブリダイズするとは考え難い。また、同領域での H I J型の塩基配列は同一であるにもかかわらず、J型のみがプローブ#1と反応した。同様なことがプローブ#4においても言えた。これらの事実より、今回用いたJ型は、VD 遺伝子領域に突然変異をもつ新種 (J' 型) の可能性が高いと考えられたが、報告された VD 領域の塩基配列に問題がある可能性もあるため、現在、われわれが用いたJ型の VD 遺伝子の解析を進めている。

このような CT の遺伝子解析は、将来 CT 型と疾患の病態像との関連に関する研究にも新たな情報を与えるものと考えられる。現在の CT 分類は抗血清を用いた Micro-IF 法により免疫学的になされたものであり、抗体応答を誘発する分子領域のみの特異性しか反映していない。今後 CT の分子生物学的解析が進むことにより、より詳細で普遍的な CT 分類法が確立されていくものと考えられる。今回われわれが開発した CT 分類法は、この意味においても有益な方法と考えられるが、用いた原理・方法は、他の分野においても類似性の高い塩基配列を高感度で効率的に識別する一般的手法として応用できるものと思われる。

結 語

PCR 法とわれわれが合成した7種類の DNA プローブを組み合わせたドットプロット法により、泌尿生殖器感染の原因となる *Chlamydia* 感染の診断と CT の型 (D~K型, 8種類) 診断の方法を開発した。その結果、PCR 法により高感度で特異性の高い *Chlamydia* 感染の診断が可能となり、また PCR 法により増幅された DNA を試料として、ドットプロット法を行うことにより信頼性の高い CT の型診断を行い得た。この方法は、従来の Micro-IF 法に比べ迅速、かつ簡便に信頼性の高い結果が得られる非常に優れた診断法であ

らと思われる。またこの方法の原理は各分野において、類似性の高い塩基配列を高感度で効率的に識別する一般的手法として応用することができるものとする。

稿を終えるにあたり、ご指導・ご校閲を賜りました順天堂大学医学部産婦人科学講座高田道夫教授・病理学第二講座白井俊一教授、また研究にご協力いただきました産婦人科学講座・病理学第二講座の教職員各位に深く感謝の意を表します。

なお、この研究の一部は武田科学振興財団研究助成金により行われた。

文 献

- 1) Moulder, J. W., Hatch, T. P., Kuo, C-C., et al.: *Chlamydia*. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, In Kreig, N. R. (ed.), 1: 729~739, Jones, Rake and Stearns, 1984
- 2) Stephens, R. S., R. Sanchez-Pescador, E. A. Wagar, et al.: Diversity of *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. J. Bacteriol., **169**: 3879~3885, 1987
- 3) Baehr, W., Y.-X. Zhang, T. Joseph, et al.: Mapping antigenic domains expressed by *Chlamydia trachomatis* major outer membrane protein genes. Proc. Natl. Acad. Sci., **85**: 4000~4004, 1988
- 4) Ying Yuan, You-Xun Zhang, Nancy G. Watkins, et al.: Nucleotide and deduced amino acid sequences for the four variable domains of the major outer membrane proteins of the 15 *Chlamydia trachomatis* serovars. Infect-Immun., **57**: 1040~1049, 1989
- 5) 高田道夫, 石川克美: 産婦人科におけるクラミジア検査法の評価とコッ. 産婦の実験, **37**: 321~327, 1988
- 6) 熊本悦明, 西村昌宏, 林 謙治, 他: 妊婦における *Chlamydia trachomatis* 感染症の疫学調査——3,182例での検討. 臨床科学, **24**: 1503~1508, 1988
- 7) Richard, L. S., Daniel, V. L., Cheryl, W., et al.: *Chlamydia trachomatis* infection and pregnancy outcome. Am. J. Obstet. Gynecol., **156**: 824~833, 1987

- 8) Wang, S-P., and Grayston, J. T.: Classification of TRIC and related strains with micro-immunofluorescence. Trachoma and related disorders caused by Chlamydial agents, In Nichols, R. L. (ed.), 305~312, Excerpta Medica, Amsterdam, 1971
- 9) Wang, S-P., Kuo, C-C., Barners, R. C., *et al.*: Immunotyping of *Chlamydia trachomatis* with monoclonal antibodies. J. Infect. Dis., **152**: 791~799, 1985
- 10) Preparation of genomic DNA from bacteria. Current protocols in molecular biology, Frederic M. Ausubel (ed.), Unit 2.4, Greene publishing associates, NY, 1989
- 11) Saiki, R. K., Gelfand, D. H., Stoffel, S., *et al.*: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science, **239**: 487~491, 1988
- 12) Zhang, Y. X., Morrison, S. G. and Caldwell, H. D.: The nucleotide sequence of major outer membrane protein gene of *Chlamydia trachomatis* serovar F. Nucleic Acids Res., **18**: 1061, 1990
- 13) Hamilton, P. T., and Malinowski, D. P.: Nucleotide sequence of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar H. Nucleic Acids Res., **17**: 8366, 1989
- 14) Pickett, M. A., M. E. Ward, and I. N. Clarke: Complete nucleotide sequence of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L₁. FEMS Microbiol. Lett., **42**: 185~190, 1987
- 15) Stephens, R. S., G. Mullenbach, R. Sanchez-Pescador, *et al.*: Sequence analysis of the major outer membrane protein gene from *Chlamydia trachomatis* serovar L₂. J. Bacteriol., **168**: 1277~1282, 1986
- 16) 加藤直樹, 西浦常雄: 酵素免疫法——クラミジア感染症の基礎と臨床, 熊本悦明, 他編, 74~80, 金原出版, 1988
- 17) 久保田武美, 石 和久, 高田道夫, 他: 産婦人科領域における *Chlamydia trachomatis* 抗原検索法としての EIA 法 (Chlamydiazyme) の意義について. 産婦の実際, **36**: 623~629, 1987
- 18) 加藤直樹, 坂 義人, 西浦常雄, 他: *Chlamydia trachomatis* 感染症診断薬としての Chlamydiazyme™ の有用性——尿路性器感染症における検討. 感染症誌, **60**: 378~385, 1986
- 19) Melchior, W. and von Hippel, P. T.: Alteration of the relative stability of dA-d T and dG-d C pairs in DNA. Proc. Natl. Acad. Sci., **70**: 298, 1973
- 20) Wood, W., *et al.*: Base composition-independent hybridization in tetramethylammonium chloride—A method for oligonucleotide screening of highly complex gene libraries. Proc. Natl. Acad. Sci., **82**: 1585, 1985

Original Paper

Summary

A new method for the detection of *Chlamydia trachomatis* infection and serovar determination using polymerase chain reaction and dot-blot hybridization

Using the polymerase chain reaction (PCR) and dot-blot hybridization methods, we developed a new and simple method for the detection of chlamydial infections and the determination of 8 serovars (D to K) of *Chlamydia trachomatis* (CT). The major outer membrane proteins of CT include four variable domains (VDs) in which each serotype-specific determinant is expressed. To amplify the target DNA encoding the VD regions by PCR, we chose two oligonucleotide primers common to all serovars of CT and *Chlamydia psittaci* (CP). Using such primers, we could detect the target DNA (1050bp) from all 15 different serovars of CT and one CP. *Chlamydia* infection to mucosal cells of uterine cervix obtained from 94 untreated patients were examined simultaneously by the PCR method and EIA (Chlamydiazyme™). The data showed that the PCR method is more sensitive than EIA. To determine 8 CT serovars, we constructed 7 types of DNA probes that can distinguish type-specific VD regions of CT. Using the dot-blot hybridization assay, each DNA probe was hybridized with PCR-amplified DNA fragments from 7 serovars of CT (D to I, and K), in such a manner as expected by the known VD sequences of CT, except for serovar J. Serovar J CT is now being examined for presence or absence of mutations. Thus, our new methods provide a simple, reliable diagnostic tool for *Chlamydia* infection.

Key words : *chlamydia trachomatis*, polymerase chain reaction, DNA probe, dot-blot hybridization, typing

JUICHI SAITOH, M. D., * 1) MASANORI AWAJI, M. D., * 1)
HIROYUKI NISHIMURA, Ph. D., * 2) & HIROMICHI TSURUI, M. D., * 2)

* 1) Department of Obstetrics and Gynecology, Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan

* 2) Department of Pathology (Ⅱ), Juntendo University School of Medicine, Tokyo, Japan