

# イムノブロッティング法による型特異主要外膜蛋白 (MOMP) 抗体を指標としたクラミジア・トラコマチスの血清型別

別所 徹子, 萩原 敏且\*, 志賀 定禰\*

クラミジアの型別をイムノブロッティング法 (IB) での型特異主要外膜蛋白 (MOMP) に対する抗体を検索することにより行った。

Tawma 株の MOMP は 45 kDa, L2 のそれは 42 kDa であった。

L2 の MOMP より大きい分子量を有する A, C, D, H, I, J, K, L3 型の各抗血清と Tawma MOMP および L2 MOMP 抗原の反応において抗-A, C, I, J, K, L3 (C 群) 血清は L2 型 (B 群) MOMP より Tawma 株 MOMP 抗原に対して強い反応を示し, 抗 D (B 群) 血清は L2 型 MOMP 抗原に対して強い反応を示した。それら C 群抗血清の Tawma 株 MOMP 特異性を表す指標 Tawma MOMP 抗体価/L2 MOMP 抗体価は抗 C 血清において最も高い価を示した。よって Tawma 株は C 型と決定した。

この結果は単クローン抗体法による結果と一致した。

(平成13年1月12日受理)

## Serotyping of a *Chlamydia trachomatis* Strain by Immunoblot Analysis of the Serovar-specific Major Outer Membrane Protein (MOMP) Antibody

Hiroko BESSHO, Toshikatsu HAGIWARA\* and Sadashi SHIGA\*

This paper presents the design and results of serotyping of a *Chlamydia trachomatis* strain by immunoblot analysis of major outer membrane protein (MOMP).

The molecular weight of MOMP for the Tawma strain was 45kDa and that for the L2 serotype was 42kDa. The molecular weight of MOMP for A, C, D, H, I, J, K and the L3 serotype is known to be larger than that for L2. Antisera of C complex (Anti-A,C,I,J,K and L3) appeared to react more strongly against Tawma MOMP than L2 MOMP, and anti-D (B complex) serum appeared to react more strongly against L2 MOMP than Tawma MOMP.

We devised an index for expressing the specificity to Tawma MOMP antibody as the antibody titer against Tawma MOMP/the antibody titer against L2 MOMP. The index of anti-C serotype serum was the highest among C complex antisera. Therefore it was decided that the Tawma strain was of the C serotype. The results achieved with our typing method were the same as those gotten with the immunotyping method using a monoclonal kit. (Accepted on January 12, 2001) *Kawasaki Igakkaishi 27(2): 91-95, 2001*

**Key Words** ① *Chlamydia trachomatis* ② Serotyping ③ Immunoblotting

## ④ MOMP ⑤ Antibody titer

## はじめに

クラミジアトラコマチスの血清型別は Micro IF 法<sup>1)</sup>, 次いで単クローン抗体法<sup>2)</sup>により決定されていたが, 単クローン抗体の型別キットが発売中止となったことから近年は PCR 法が主流となった<sup>3)~5)</sup>. PCR 法による方法は主に MOMP の一定領域を増幅し, 制限酵素で切断したパターンの比較から型決定を行う. 今回, Micro IF 法の原理, すなわち *C.trachomatis* の血清型を決定している MOMP に対する抗血清の反応をイムノプロットリング法で測定する方法を考案し, その方法により血清型別が可能であることが判明したので報告する.

## 材料と方法

1. *C.trachomatis* 血清型株:

用いた血清型株は A/G-17/OT, C/TW-3/OT, D/UW-Cx, H/UW-4/Cx, I/UW-12/Ur, J/UW-36/Cx, K/UW-31/Cx, L2/434/Bu, L3/404/Bu 及び1971年 Higashi and Than<sup>6)</sup>によりビルマのトラコマ患者から発育鶏卵卵黄嚢で分離された Tawma 株である. Tawma 株は発育鶏卵卵黄嚢で継代維持した. Tawma 株を除く各株は McCoy 培養細胞で増殖継代した.

2. *C.trachomatis* 抗原の調製:

Tawma 抗原は感染卵黄嚢をホモジナイザーで破碎して作成した乳剤から低速遠心で上層の卵黄部と沈査の細胞片を除去し, 30%蔗糖クッションに層積遠心した. これらの遠心操作を繰り返し EB 分画を得た. L2 抗原は感染細胞を超音波処理により破碎, 低速遠心で細胞破片を除去し, 30%蔗糖クッションを通して EB 分画を得た.

## 3. 抗血清:

血清型 A, C, D, H, I, J, K, L3 および L2 株を McCoy 細胞に感染し, 感染後48時間の細

胞を集め, それぞれ超音波破碎後の低速遠心上清をマウス腹腔に10日間隔で3回接種して得たマウス血清を用いた.

## 4. PAGE:

10% Acrylamide gel で Tawma 株および L2 型 EB 分画を常法に従い展開した. ゲルの染色はクイック CBB (和光純薬) を用いた.

*C.trachomatis* 15型 (A, B, Ba, C, D, E, F, G, H, I, J, K, L1, L2, L3) 各型 EB PAGE パターンは Wilbert らの報告<sup>7)</sup>を参考にし, その内 L2 MOMP 分子量を基準とした.

## 5. イムノプロットリング法:

マーカー付き1ウエルコームを使用してゲルに Tawma および L2 EB 分画を常法に従い展開後, semidry 法により Immovilon (Millipore) に転写した. 各々の抗原を3mm幅に切断して抗体価測定用抗原とした. 染色は Vecstain ABC キット (VECTOR Lab. Inc.) を使用した. IB で Tawma 株 MOMP 抗原あるいは L2 MOMP 抗原と反応する各型抗血清の最高希釈度を各々の抗原に対する MOMP 抗体価とした.

## 6. Tawma MOMP 抗体特異性指標の算定:

C 群抗血清の L2 (B 群) MOMP 抗原に対する抗体価は *C.trachomatis* 種ないし属共通 MOMP に対する抗体価である. そこで Tawma 株抗原 MOMP 抗体価/L2抗原 MOMP 抗体価を Tawma MOMP 抗体特異性指標とした.

## 7. 単クローン抗体法による同定:

萩原らの方法<sup>8)</sup>により標準 C, D および Tawma 抗原を調整法しモノクロナールキット (Washington Foundation Research) での反応性を検討した.

## 結 果

## 1. Tawma 株と L2型の MOMP 分子量:

Tawma 株および L2型の Polyacryl amide ゲル電気泳動後のクマシー染色像によって Tawma 株の MOMP は分子量 45 kDa, L2のそれは 42

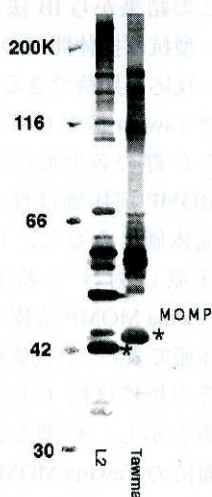


Fig. 1. Coomassie blue-stained polyacrylamide gel after SDS-PAGE of *C. trachomatis* L2 and Tawma strains

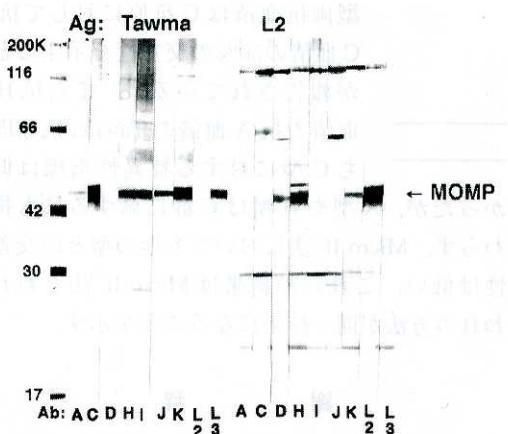


Fig. 2. Immunoblot pattern of each antiserum. Left lanes : *C. trachomatis* Tawma antigen. Right lanes : L2 strain. Serotypes of antiserum designations are given at the bottom of each lane.

kDaと計測された (Fig. 1). 従って, Tawma株はL2型より大きいMOMPを持つ型に属する.

## 2. TawmaおよびL2抗原とB群およびC群抗血清との反応:

Wilbertらの*C. trachomatis* EB 15型のPAGEクマジー染色像ではL2のMOMP分子量より大きい分子量を示す型はA, C, D, H, I, J, K, L3型である. これら8血清型にL2型を加えた9種の抗血清のTawmaおよびL2抗原に対する反応

をFigure 2に示した. 両抗原に対して各々同一濃度の抗血清を反応させているにもかかわらず, A, C, I, J, K, L3 (C群)に対する抗血清はTawma MOMPに対して強い反応を示し, 抗D, L2 (B群)抗血清はL2 (B群) MOMPに対して強い反応を示した. 即ちTawma抗原に対してはC群がL2のMOMPに対してはB群が強く反応することが判明した. この結果よりTawma抗原はC群に属すると推定された.

## 3. C群血清のTawma株MOMP特異性指標の算出:

C群血清のTawma株MOMP特異性指標を算出しTable 1に示した. Tawma MOMP特異性指標は抗C血清が最も高く, ついで抗J, 抗Kであった. この結果はTawma株抗原と抗C血清の特異性が最も高く, Tawma株はC型と判定した.

## 4. 単クローン抗体による確認試験:

Tawma株の各単クローン抗体との反応結果 (Table 2)は標準C型抗原に対するものと全く同じであり, イムブロット法で得たTawma株はC型であるという結果を単クローン抗体を用いて確認出来た.

## 考 察

*C. trachomatis*のMicro IFにおける同定原理はEB表面に存在する型特異MOMP抗原と特異抗体との反応が指標となる. それ故Micro IF同定用抗原は内部への抗体の侵入を防ぐフォルマリン固定したEBを使用する<sup>1)</sup>. しかし*C. trachomatis*抗原精製において共通抗原性の強

Table 1. Comparison of specificity of each serum against Tawma MOMP antigen

Antibody	Antibody titer		Index (Tawma-specificity) A/B
	Tawma MOMP (A)	L2 MOMP (B)	
Anti A	500	125	4
C	128000	1000	128
H	250	250	1
I	4000	500	8
J	32000	500	64
K	8000	500	16
L3	1000	125	8



**Table 2.** Serotyping *C.trachomatis* Tawma strain by monoclonal antibody typing kit of *C.trachomatis*

MAb	Reference C serotype	Tawma	Reference D serotype
LV-22	+	+	+
LL-33	+	+	-
GG-11	-	-	-
BB-11	-	-	+
CC-1	+	+	-
PE-5	-	-	-
AC-11	-	-	-
LA-10	-	-	-
KK-1	-	-	-
FC-2	-	-	-
DD-1	-	-	-
LV-23	-	-	-
LV-27	-	-	-
KB-8	-	-	-
JG-9	-	-	-
DP-1	-	-	-
RP-402	-	-	-
serotype	C	C	D

いRBを全く含まず無傷のEBのみからなる分画を得ることは容易なことではない。従って蛍光抗体法における各抗血清の抗体価の比較により特異性の決定がなされている。

Micro IFや今回我々が考案した方法いづれも型特異 MOMP 抗体価が種あるいは属共通 MOMP 抗体価より高いことが前提となっている。15型の *C.trachomatis* 抗原と抗 I 血清との IB 反応における Newhall らの報告では I 抗原 MOMP に対して最も強い反応が認められる<sup>9)</sup>。

この結果から IB 法によっても同一型抗原抗体間での反応に最も強い反応が期待できる。今回、我々は Tawma 株が C 群に属することから C 群の各型血清の L2 (B 群) MOMP 抗体価は種ないし属共通抗体価とみなし、Tawma MOMP 抗原に対する特異性指標を Tawma MOMP 抗体/L2 MOMP 抗体価で表わし、数値化して示した。その指標は抗 C 血清で最も高い値を示し、C 型と決定した。各血清の Tawma MOMP 特異性は C 型について J 型、K 型が高かった。Micro IF 法においても C 型と J および K 型との交差性は強く J、K 型両抗血清は C 抗原に対して抗 C 血清の50%の交差性を示すことが報告されている<sup>10)</sup>。また抗 H 血清や抗 A 血清の Tawma 抗原即ち C 型に対する特異性指標は低

かったが、A 型や H 型は C 群に属するにも拘わらず、Micro IF 法においても他の型との交差性は低い。これらの結果は Micro IF 法とわれわれの方法が同一結果になることを示す。

## 謝 辞

本研究中御助言いただきました松本明 前教授に深謝致します。なお本研究は川崎医科大学プロジェクト研究費「10-502」の援助によって行われたものである。

## 文 献

- 1) Wang S-P, Grayston JT, Kuo CC, Alexander ER, Holmes KK : Serodiagnosis of *Chlamydia trachomatis* infection with the micro-immunofluorescence test. In Nongonococcal urethritis and related infections, ed by Holmes KK and Hobson D. Washington, DC, American Society for Microbiology. 1977, pp 237-248
- 2) Wang S-P, JT Grayston : Microimmunofluorescence antibody responses in *Chlamydia trachomatis* infection, a review. In *Chlamydial Infections*. ed by March PA, Holms KK et al. Amsterdam, Elsevier. 1982, pp 301
- 3) Morre SA, Ossewaarde JM, Lan J, van Doornum GJ, Walboomers JM, MacLaren DM, Meijer CJ van den Brule AJ : Serotyping and genotyping of genital *Chlamydia trachomatis* isolates reveal variants of serovars Ba, G, and J as

- confirmed by omp1 nucleotide sequence analysis. J Clin Microbiol 36 : 345-51, 1998
- 4) Isobe K, Aoki K Itoh N, Ohno S, Takashima I, Hashimoto N. : Serotyping of Chlamydia trachomatis from inclusion conjunctivitis by polymerase chain reaction and restriction fragment length polymorphism analysis. Jpn J Ophthalmol 40 : 279-285, 1996
  - 5) 宮野昭弘 : Chlamydia trachomatis DNA の制限酵素による解析. 感染症誌 65 : 730-737, 1992
  - 6) Higashi N, Than KA : Isolation and characterization of trachoma agent from Burma. Ann Rept Inst Virus Res Kyoto Univ 15 : 19-23, 1972
  - 7) Wilbert J, Newhall V : Macromolecular and antigenic composition of chlamydiae. In Microbiology of Chlamydia, ed by Barron AL. CRC Press. 1988, pp 60-61
  - 8) 萩原敏且, 志賀定嗣, 小島 禎 : わが国の尿路性器感染症患者より分離された Chlamydia trachomatis の血清型. 感染症誌 65 : 447-450, 1992
  - 9) Newhall WJ, Batteiger B, Jones RB : Analysis of the human serological response to proteins of *Chlamydia trachomatis*. Infect Immun 38 : 1181-1189, 1982
  - 10) Podgore JK, Holmes KK, Alexander ER : Asymptomatic urethral infections due to Chlamydia trachomatis in male U.S. military personal. J Infec Dis 146 : 828, 1985