

肺炎マイコプラズマ
(*Mycoplasma pneumoniae*)
検査マニュアル

平成 23 年 9 月

目次

1. <i>Mycoplasma pneumoniae</i> によって起こる疾患	3
2. 検査に関する一般的な注意	4
1) 検査材料の採取	4
2) 検査材料の輸送	5
3) 検査の進め方	5
4) 検査結果による確定診断	6
3. 検査方法	8
1) 培養法 (<i>M. pneumoniae</i> の分離法)	8
2) 抗体検査法	18
3) 抗原検査法	21
4) 遺伝子検出法 (PCR 法、LAMP 法)	22
4. その他	27
参考情報 1 : 薬剤耐性菌	27
参考情報 2 : <i>M. pneumoniae</i> の遺伝子型別	33
参考情報 3 : アルギニン添加 Hayflick 変法液体培地	40
参考情報 4 : 届出基準	42
5. 文献	43
6. 執筆者	45

1. *Mycoplasma pneumoniae* によって起こる疾患

M. pneumoniae は Mollicutes 綱 *Mycoplasma* 属の細菌であり、分類学的にはグラム陽性菌に近い。細胞壁を全くもたず、増殖にはコレステロールや多くの栄養素を要求する。しかし、純培養が可能であり、ゲノムサイズの小ささ(約 800kb) から自己増殖が可能な最小クラスの細菌の一つとされている。G+C 含量は 40%、形態は細長い形をしている。

M. pneumoniae によって起こる主な疾患は、気管支炎と肺炎である。原発性異型肺炎の 30-40% がマイコプラズマ肺炎であり、市中肺炎としての頻度も高い。患者は若年齢層に多いが、すべての年齢層で発生する。秋冬期に多い傾向はあるが、年間を通して発生し、家族内や学校での集団発生がしばしば見られる。潜伏期間は 1-3 週間程度である。かつて日本では 4 年ごとにマイコプラズマ肺炎の大流行が見られ ” オリンピック肺炎 ” と呼ばれたこともあったが、現在は、4 年の流行周期は見られなくなっている。症状は風邪に似た感冒症状、発熱で、乾いた咳が長く続くのが特徴である。胸部 X 線検査では、すりガラス様の淡い陰影が認められる。マイコプラズマ肺炎は他の細菌性肺炎に比べれば症状が軽度なことが多い。しかし様々な合併症をおこすこともあり、まれに重篤な臨床経過をみることもある。合併症としては発疹、溶血性貧血、関節炎、中耳炎、髄膜脳炎、末梢神経障害、心外膜炎、収縮性心膜炎などがある。中枢神経系合併症を併発した場合は重症となることもある。また、回復期以降にアレルギー性紫斑病や血小板減少性紫斑病なども見られることがある。*M. pneumoniae* 感染は、ギラン・バレー症候群やスティーブンス・ジョンソン症候群を引き起こすことがあるとの報告もある。肺炎症状回復後は、体内から比較的すみやかに消失すると考えられているが、気管内に数ヶ月間、また、低ガンマグロブリン血症の患者では数年間留まった例も報告されている。

M. pneumoniae がヒトに肺炎を起こす仕組みは、完全には明らかにされていないが、*M. pneumoniae* が気道粘膜に接着して増殖し、細胞に傷害を与えることと、菌体成分によって免疫細胞が刺激を受け、炎症反応を引き起こすことが主な原因だと考えられている。近年、*M. pneumoniae* が百日咳毒素と構造が似た毒素を持つことが明らかになり (Community Acquired Respiratory Distress Syndrome toxin (CARDS 毒素) と呼ばれている)、研究が行われているが、どの程度病原性に関与しているかはよくわかっていない。

2. 検査に関する一般的注意

M. pneumoniae は、BSL2 の病原体であり、臨床検体および菌の取り扱いには P2 実験室の安全キャビネット内で行う。患者検体、汚染した器材、培養液等は、使用后、オートクレーブ滅菌あるいは消毒液で処理し、しかるべき廃棄を行う。

1) 検査材料の採取

M. pneumoniae 感染症の診断に使われる臨床材料は、主として、咽頭スワブと血清（血液）である。鼻咽頭スワブからも咽頭スワブと同様に検出を行うことができる。合併症の症状がある場合は病変部の体液（胸水、髄液）、細胞組織などを検査することもある。

咽頭スワブ検体の採取、取り扱い法

採取時は以下の点に留意するよう、医師に依頼する。

- ・ 木軸以外の滅菌綿棒で咽頭の後壁を強くこすりとるようにする。*M. pneumoniae* は咽頭の粘膜細胞に付着しているため、粘膜細胞がたくさん綿棒でこすりとられるようにする。

- ・ 咽頭スワブは、*M. pneumoniae* 分離用培地に直ちに入れ、37°Cで培養を開始するか、検査機関へ速やかに輸送する。医療機関で一時保管する場合は、輸送培地に入れた状態で冷凍保管し、できるだけ早く検査機関に輸送する。一晩程度の保管であれば、輸送培地に入れた状態で室温に置いてよい。4°Cの冷蔵庫には入れないほうがよい。

- ・ 遺伝子検出法のみを目的とし、菌の分離培養を行わない場合は、スワブが多少乾燥してしまってもかまわないが、できるだけ早く検査を実施するようにする。

その他の検体の採取、取り扱い法

M. pneumoniae の分離培養を目的とする全ての検体は、下記の点に留意する。分離培養を目的としない遺伝子検出用の検体でも、*M. pneumoniae* の DNA の分解、消失をできるだけ防ぐため下記に準じた取り扱いをする。血清診断用の血清は一般的な取り扱い法で行う。

M. pneumoniae をはじめとするマイコプラズマ属の菌は、乾燥に弱いので検体が乾かないようにする。低温にも弱いため 4°C の冷蔵庫には長時間保存しない。一晚程度保管する場合は室温でよい。長期間、安定的に保管ができるのは、-80°Cでの冷凍保存のみで、-20°Cの保存では生菌数が徐々に低下する。凍結、融解の繰り返しも好ましくない。

2) 検査材料の輸送

臨床材料を輸送する場合は、感染症法に基づき「感染性物質の輸送規則に関するガイダンス (WHO)」等による適正な梱包を行い、ゆうパックで輸送する。咽頭スワブならびに鼻咽頭スワブは輸送培地に入れ、胸水、細胞組織、髄液はそのまま、ドライアイスにて冷凍して輸送する。ドライアイスを用いることができない場合には、冷蔵輸送よりも常温で速やかに輸送したほうがよい。

肺炎マイコプラズマ疑いの臨床分離株を輸送する場合は、菌の増殖が認められる液体培地や寒天培地を上述の通り適正に梱包し、ゆうパックで常温輸送する。

輸送培地

輸送培地として、後述の培地 (Hayflick 変法液体培地) を使用するが、検体中の他の菌の増殖抑制を目的としてアンピシリンを 200 μ g/ml の濃度で添加する。また、輸送用培地として、BD 社の Universal Viral Transport for Viruses, Chlamydiae, Mycoplasmas and Ureaplasmas も利用できる。この培地は滅菌済みのスワブ採取棒とセットになって個装されており、常温で保存が可能である。感染研における使用経験では Hayflick 変法液体培地とのあいだに大きな性能の違いはない。(医療機関などでは輸送培地の調製、準備ができない場合が多いので、検査機関から提供するようにする。)

3) 検査の進め方

検査を行うにあたり、培養法と遺伝子検出法を同時に行う場合は、

検体を分割し、一方を培養法、もう一方からは、遺伝子検出法用の鋳型 DNA 抽出を行う。以下に検体種類別の検査手順を示す。

咽頭スワブ、鼻咽頭スワブ

培養法か遺伝子検出法、あるいはこの両方を試す。スワブの入っていた輸送培地は、最初に $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターで濾過すると、他の菌の影響を少なくすることができる。*(M. pneumoniae* は $0.45\ \mu\text{m}$ のメンブランフィルターを通過する)。処理できる検体数に余裕があれば、念のためフィルターを濾過した検体と濾過しない検体の両方について検査を行う（菌量が少ない検体ではフィルター濾過が逆効果なことがあるため）。また、必要に応じ遠心で濃縮する（卓上遠心器、最高回転数で 10 分程度）。

遺伝子検出法のみを目的とした乾燥スワブの場合には、送付されたスワブに $500\ \mu\text{l}$ の生理食塩水を加え、綿球をよく洗った後、生理食塩水を回収し、ゲノム DNA を抽出する。

血清（血液）

抗体検査法を行う。PA 法は必ず行い、他の抗体検査法は補助的に行う。PA 法にはセロディア-MYCO II（富士レビオ（株）などのキットが利用できる。）

胸水、髄液、細胞組織などの検体

培養法と遺伝子検出法の両方を行う。

4) 検査結果による確定診断

臨床的に肺炎症状を呈し、胸部 X 線像に特有の陰影がみられる症例で、下記のいずれかの検査結果が得られた場合、マイコプラズマ肺炎と確定診断される。

1、培養法により、*M. pneumoniae* が分離同定されたとき。

2、抗体検査法の受身凝集反応（PA）によって、ペア血清で 4

倍以上の抗体価上昇、単一血清では、320 倍以上の抗体価が見られた場合。または、補体結合反応（CF）、によってペア血清で 4 倍以上の抗体価上昇、単一血清では、64 倍以上の抗体価がみられた場合。

3、遺伝子検出法で *M. pneumoniae* の DNA が検出された場合。

また、*M. pneumoniae* に感染していても症状が軽く、肺炎には至らない上気道炎症例もあるので、胸部 X 線像の陰影が無くても、*M. pneumoniae* の存在、あるいは明らかな抗体上昇認めた場合は、*M. pneumoniae* 感染によるものと診断できる。

（参考資料 4 には、感染症発生動向調査における定点医療機関からの届出基準を記載した。）

3. 検査方法

1) 培養法 (*M. pneumoniae* の分離法)

M. pneumoniae の分離培養による検出は、もともと確定的な実験室診断法だが、*M. pneumoniae* の培養検査は時間がかかるため、早期診断法にはならない。しかし、*M. pneumoniae* の分離が期待できる臨床材料については、できるだけ培養法を実施すべきである。

①基本培地の調製法

ブドウ糖添加 Hayflick 変法液体培地 (PPLO 液体培地)

(1 リットルあたりの組成)

マイコプラズマ基礎培地 (PPLO ブロス) *	21 g	
ブドウ糖	5 g	(0.5%)
フェノールレッド	20 mg	(0.002%)
蒸留水	750 ml	

上記を高圧蒸気滅菌し、約 50℃以下に冷えたら、無菌的に以下のものを加える。

ウマ血清 (55 °Cで 30 分間加熱済)	150 ml (15 %)
25 % 新鮮酵母エキス	100 ml (10 %)
ペニシリン G	100 万単位
(2.5 % 酢酸タリウム溶液**	10 ml)

*PPLO Broth w/o CV, Difco 255420, Becton Dickinson

**毒性があるので、取り扱いに注意する。

ウマ血清、25 % 新鮮酵母エキスについては、後述の「培地の添加物について」を参照。酢酸タリウム溶液は、他の雑菌が増殖するのを防ぐために加えるもので、添加は必須ではない。ペニシリン G はアンピシリン (終濃度 50 μg/ml) に置き換えることも可能。

培地は凍結可能な密閉チューブに約 3 ml ずつ無菌的に分注し、-20℃以下で保存する。凍結状態で数年間は安定して保存できる。解

凍後は、よく攪拌して使用する。

Hayflick 変法寒天培地 (PPLO 寒天平板培地)

(1 リットルあたりの組成)

PPLO 寒天培地*	35 g
蒸留水	750 ml

上記を高圧蒸気滅菌し、約 50℃以下に冷えたら、無菌的に以下のものを加える。

ウマ血清 (55 °Cで 30 分間加熱済)	150 ml (15 %)
25 % 新鮮酵母エキス	100 ml (10 %)
ペニシリン G	100 万単位

*PPLO Agar, Difco 241210, Becton Dickinson

上記組成を混合後、シャーレに流して寒天平板を作製する。培養中の培地の乾燥を防ぐため、培地層を 4-5mm の程度の厚さにする。ピペット等を使用して等量の培地をシャーレに注ぐと培地の厚さが均一になり (直径 9 cm のシャーレだと約 25ml 程度)、実体顕微鏡での観察が容易になる。寒天平板作製後はビニール袋に入れて 4℃で保存する。一般的な細菌用寒天は、マイコプラズマ発育阻害成分を含む場合があるので、マイコプラズマ用の寒天平板の調製には通常用いない。ペニシリン G はアンピシリン (終濃度 50µg/ml) に置き換えることも可能。

M. pneumoniae 用選択培地

メチレンブルー含有二層培地

臨床検体からの *M. pneumoniae* の分離には、メチレンブルーを添加した選択培地を用いる。上記の Hayflick 変法液体培地に、終濃度 0.001% のメチレンブルーを加えて調製する。メチレンブルーはヒトの口腔内に常在する *M. pneumoniae* 以外のマイコプラズマの増殖を抑制するはたらきがある。栓のできる小試験管に、PPLO 寒天培地 1 ml

を入れて固めた後、メチレンブルー含有培地を 2 ml を重層して二層培地とする。この培地では液層と寒天層の境界の酸化還元電位が *M. pneumoniae* の増殖に適し、分離率が向上するとされている。二層培地の有効使用期間は、作製後、冷蔵保存で 2 週間程度である (図 1)。



図 1 二層培地

Hayflick 変法液体培地は、pH 指示薬として添加したフェノールレッドによって赤色だが、*M. pneumoniae* が増殖すると pH が低下し黄色に変色する。選択培地用にメチレンブルーを添加すると、Hayflick 変法培地は茶色がかった色になる。これに *M. pneumoniae* が増殖すると緑黄色になる (図 2)。

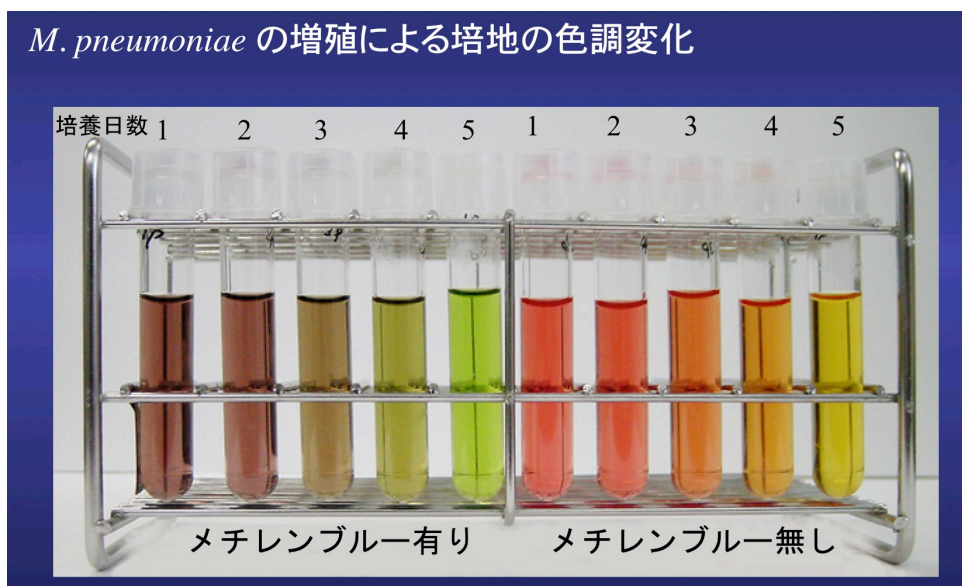


図 2 メチレンブルーの有無による Hayflick 変法培地の色調変化の例

培地の添加物について

25 % 新鮮酵母エキス

研究室で継代された *M. pneumoniae* は、新鮮酵母エキスの代わりに、市販の酵母エキス粉末を使用しても十分に増殖する。しかし、臨床検体からの分離培養を行う場合、分離率をよくするため新鮮酵母エキスを加えた培地を使用したほうがよい。新鮮酵母エキスの自家調製が煩雑であれば、市販のものを使用しても構わない。以下に調製法を記載する。

必要な試薬・器具

滅菌済フラスコ 2リットル容量	1個
3リットルフラスコに1.5リットル蒸留水を入れ滅菌したもの	1個
ニッテンドライイースト 500g	1缶
(日本甜菜糖株式会社、Nippon Beet Sugar MFG. Co. Ltd)	
鍋 + コンロ	
3N NaOH 溶液	
滅菌済遠心チューブ (8000 x g に耐えるもの)	
高速遠心機 (8000 x g 回転可能な機種)	
保存用滅菌済容器 (細胞培養用 25 cm ² フラスコや、50ml チューブ等)	

調製法

- ・ 鍋に湯を沸騰させ、1.5リットル蒸留水入りフラスコを湯煎し、充分に加熱する。ニッテンドライイースト 500g を 1.5リットル蒸留水に加える。数回に分けて加え、フラスコを湯から持ち上げ攪拌する。
- ・ 加熱しながら約 20 分間、熱水抽出を行う。この間、3、4 分毎にフラスコを持ち上げ強く攪拌する。
- ・ フラスコごと水で急冷する。これ以後の操作は、無菌的に行う。
- ・ 抽出液を滅菌済遠心チューブに分注し、4°Cにて、8000-10000 xg で 20 分間遠心する。上清を、再度、新しい滅菌済遠心チューブに入れ、同じ条件で遠心する。その上清を滅菌済フラスコに集める、NaOH 溶液で pH を 7.6 に調整する。

- ・ 50ml 滅菌チューブに小分けし、 -20°C で凍結保存する。
- ・ 解凍後はシリンジタイプの $0.45\ \mu\text{m}$ フィルターで濾過してから使用する。液中の浮遊物によってフィルターが目詰まりをおこすことがあるので、その場合はフィルターを複数個使用する。濾過しにくい場合は大きな孔径のフィルターや滅菌濾紙で前濾過してもよい。

馬血清

Gibco 社などから市販されているウマ血清を、 55°C で 30 分間、加熱処理して使用する。ウマ血清はロットによって *M. pneumoniae* の発育阻害因子が多く含まれることがあるので、これを不活化するために加熱処理をする。マイコプラズマは増殖にコレステロールを要求する。このため、馬血清をコレステロール供給源として培地に添加する必要がある。

② 検体の培養と観察

ア) 初代培養

- ・ 咽頭拭い綿棒絞り液 0.2 ml を二層培地（または通常の液体培地）に、0.1 ml を PPLO 寒天平板培地に接種し 37°C で培養する。
- ・ 二層培地および液体培地は通常のインキュベーターで培養する（炭酸ガスがあると培地の pH に影響し、色調変化の判断がしにくいため）。
- ・ 寒天平板培地は 5% 炭酸ガスインキュベータ、5% 炭酸ガスを含む窒素内で培養すると増殖が良い。5% 炭酸ガスインキュベータ等がない場合は、寒天表面の乾燥を防ぐためビニール袋に入れて 37°C で好気培養する。ビニール袋内に、精製水でしめらせたペーパータオルを 2、3 枚入れておくと乾燥を防ぐ効果がある。
- ・ 液体培地に *M. pneumoniae* が増殖すると液層が緑黄色に変化する。メチレンブルーを添加しない液体培地では黄色に変色する。
- ・ 検体中の菌数が少なかったり、分離菌の性質によっては、増殖に 2-4 週間程度要することもある。
- ・ 変色した培地液体層の一部を、後述する方法で -80°C に凍結保存する。

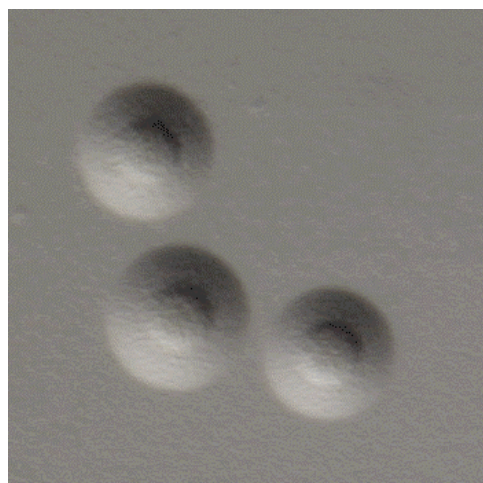
注) *M. pneumoniae* が増殖しても培地はほとんど濁らないが、細かい粒子状の浮遊物や、沈殿状が見えることがある。これは菌があつまってかたまりになっているものである (マイクロコロニー)。 短期間 (1-3 日間) で培地が変色したり、液層に濃い濁りが生じた場合は、マイコプラズマ以外の咽頭内細菌の増殖が考えられる。このような場合、*M. pneumoniae* 増殖の判定は不可能となる。雑菌の増殖はかなりの頻度 (3-10%) で起こる。

イ) 寒天平板培地への移植とコロニー観察

培地の液層が変色しただけでは *M. pneumoniae* が増殖したのか明らかではないので、変色した液層を、PPLO 寒天平板培地に移植してコロニーを形成させてみる必要がある。

・変色した培地液層を滅菌生理食塩液または Hayflick 変法液体培地で 10^{-3} ~ 10^{-6} に段階希釈し、各希釈液 10 μ l を PPLO 寒天平板シャーレにスポット接種して培養する (1 枚のシャーレを 4~6 区画に分割してスポットできる)。

・PPLO 寒天平板培地に接種した検体は、培養開始 5 日後頃から観察を開始する。マイコプラズマのコロニーは微小 (0.1mm 程度) なので、観察には 40~100 倍率程度の実体顕微鏡が必要である。寒天平板を観



察し、マイコプラズマに特徴的な目玉焼き状コロニーを探す (図 3)

図 3 マイコプラズマの目玉焼き状コロニー

マイコプラズマのコロニーが目玉焼き状になるのは、コロニーの中央部が寒天層に入り込んでいるためであり、コロニーが小さいうちは、目玉焼き形状を呈さない。*M. pneumoniae* の場合は、寒天平板培地表面の状態にもよるが、他の

マイコプラズマ種のコロニーよりも目玉焼きの形状が目立たないこともある。

ウ) コロニー染色

形状の観察だけで、マイコプラズマのコロニーであるか確信を持っていない場合は、Dienes の染色液でコロニーを染色して観察する。

Dienes の染色液

メチレンブルー	2.5 g
アズール II	1.25 g
マルトース	10 g
炭酸ナトリウム	0.25 g
安息香酸	0.25 g
精製水	100 ml

上記染色液をコロニーの生じた寒天平板にかけ、数分後に観察する。マイコプラズマのコロニーは、青色に染まる。ヘモフィルス属以外の細菌のコロニーは染まらない。染色したコロニーは、継代や純化に用いない。

エ) コロニーの純化

寒天平板上のコロニーを純化する必要がある場合は、先の細いピペット、注射針、滅菌済みつまようじなどでコロニーをひろう。マイコプラズマのコロニーは寒天に入りこんでいるので寒天ごと切り出すようにして取る。コロニーは 2-3ml の Hayflick 変法液体培地に接種して培養する。菌が増殖したら培養液を 25 ゲージの注射針に数回通す。さらに、0.45 μ m のメンブランフィルターを通過させ、適当に段階希釈した後、PPLO 寒天培地にまいてコロニーを形成させる。そこから再びコロニーを拾い、純化されるまで同じ操作を繰り返す。(この方法はフィルタークロニング法と呼ばれている。)

③ *M. pneumoniae* の同定法

培養法により検出されたマイコプラズマが *M. pneumoniae* である

かの確認は、以下のような同定法を用いる。

ア) コロニーへの赤血球付着能試験

M. pneumoniae のコロニーには赤血球が付着する性質がある。咽頭から分離される他のマイコプラズマ種のコロニーには、この性質はないので、分離菌が *M. pneumoniae* であると確認する一つの目安になる。

(*M. genitalium* のコロニーも赤血球が付着する性質をもつが、咽頭から分離されることはまれである。*M. genitalium* は非淋菌性尿道炎の原因菌として、おもに泌尿、生殖器から分離される)。

赤血球付着試験の方法

ヒツジ保存血を PBS で 100 倍に希釈する。これをマイコプラズマのコロニーが形成されているシャーレに、約 7ml 加え、37℃で 30 分～1 時間静置する。希釈血液を捨てた後、シャーレに残っている血液を PBS で 2、3 回洗い流す。実体顕微鏡でコロニーに赤血球が付着しているかを観察する。

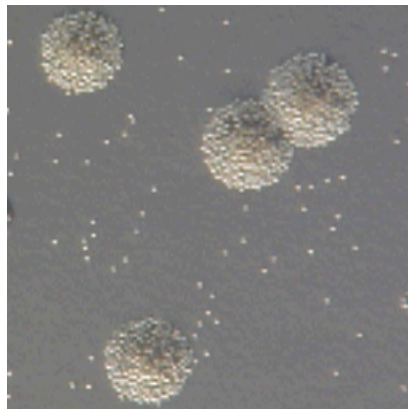


図 4. 赤血球が付着した *M.pneumoniae* のコロニー (小さな点に見えるのが赤血球)

イ) ブドウ糖代謝性、アルギニン非代謝性であることを確認する

ブドウ糖添加 Hayflick 変法液体培地あるいはアルギニン添加 Hayflick 変法液体培地での増殖を調べる。参考情報 3 を参照。

ウ) 抗 *M. pneumoniae* 血清を用いた代謝阻害試験 (Metabolic inhibition)

test)、などで確認する。**血清検査法**の項を参照。

エ) *M. pneumoniae* に対して特異的な PCR 法で確認する。後述の PCR 法を使用する。**遺伝子検査法**の項を参照。

④ *M. pneumoniae* 菌株の保存法

液体培地のまま保存する場合

液体培地で培養したマイコプラズマは、そのまま凍結保存用のチューブにいれ、 -80°C 以下に保存する。保護剤を添加する際には、グリセロール、ジメチルスルホキシド(DMSO)などを添加して保存する。下に示すような2倍保存液と、培養液を1:1に混合し、細胞凍結用のチューブに分注して、 -80°C フリーザーあるいは液体窒素中に保存する。長期保存の際は、数年ごとに定期的な継代培養を行うことが望ましい。

2倍保存液

PPLO broth w/o CV	培養液作製時の2倍濃度にする
グリセロール	10%
(高圧蒸気滅菌後、室温保存可)	

凍結乾燥して保存する場合

凍結乾燥の際の保護剤としては、12% スクロース、10% 脱脂乳などが推奨されている。凍結乾燥菌は、 4°C 以下の保存が望ましい。

菌株保存時の注意点

ア) *M. pneumoniae* の液体培養では、菌は培地中に浮遊もしているが、かなりの量が培養容器の内壁(特に底面)に付着している。継代、保存するときには培養容器の内壁面の付着菌をピペットやスクレイパーなどでこすり取るようにする。培地に浮遊している菌のみ採取して継代を繰り返すと、細胞接着能を失った変異体の割合が増えてくることがある。細胞接着能をもつ、もとの性質を保持した菌株を保存維持するために注意する。

イ) 図5に示すように、*M. pneumoniae* は増殖によって培地の pH が低下しだすと生菌数が減少しやすい。このため培地が黄色変化してから時間が経過したものは保存に適さない。そのような場合は、植え継いで再培養した方が良く、分離株ごとに増殖カーブは異なるため、培養日数よりも培地色調変化を増殖と保存時期の目安とする(培地の黄色変化後は1~2日以内に保存するようにする)。

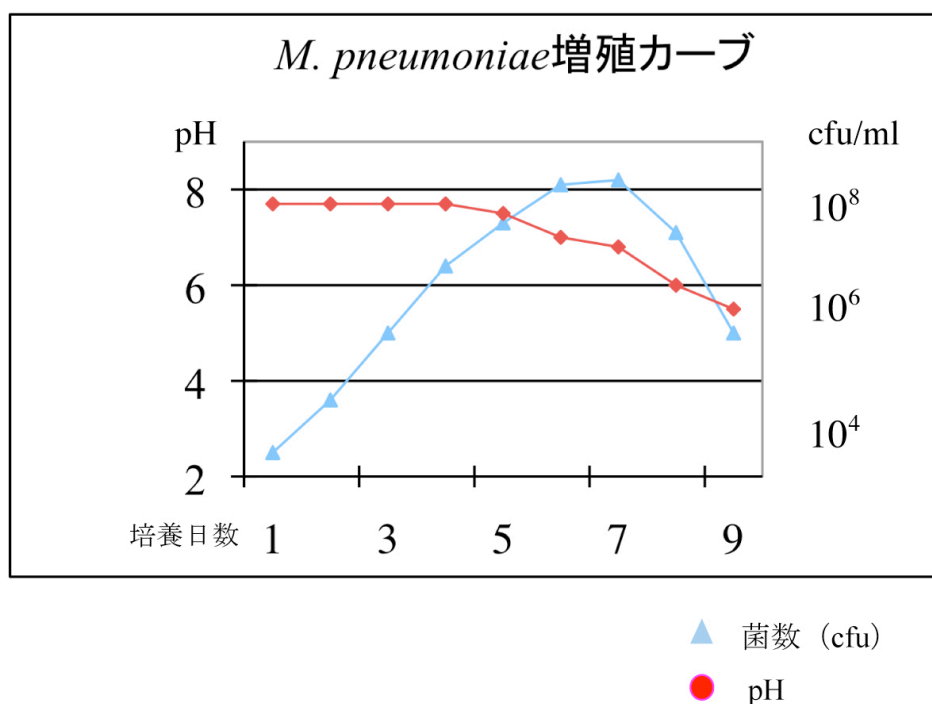


図5. *M. pneumoniae* 増殖と培地 pH 変化の関連図。

2) 抗体検査法

マイコプラズマ肺炎の確定診断の多くは、抗体検査法によって行われている。*M. pneumoniae* の抗体検査法として、おもに以下の方法があげられる。

受身凝集反応 (PA)
補体結合反応 (CF)
イムノカード (IC)
ELISA 法 (EIA)
間接蛍光抗体法 (IFA)
寒冷凝集反応
代謝阻止抗体 (MI)

この中で比較的広く用いられているのは、受身凝集反応 (PA) と補体結合反応 (CF) である。簡便さから、イムノカードも使われるようになってきている。抗体検査法は、患者の抗体価が上昇していることが前提なので、早期診断にはなりにくい。しかし、IgM 抗体を検出する方法なら、ある程度の早期診断も期待できる。

受身凝集反応 (PA)

M. pneumoniae 抗原を粒子表面に結合させておき、そこに血清を加えたときの粒子の凝集を見ることで、血清中の抗マイコプラズマ抗体の有無を判定する。粒子に赤血球を用いた古典的な方法は間接赤血球凝集反応 (IHA) とよばれる。抗原の吸着を促進するためにタンニン酸やホルマリン、塩化クロムなどで処理をした赤血球の表面に抗原を吸着させて行う。しかし、赤血球を用いた凝集反応では非特異的な凝集が起こることがある。このため、現在では凝集体としてラテックス粒子、ゼラチン粒子などがよく用いられる。市販品として富士レビオ (株) からセロディア-MYCO II が出ている。色素で着色したゼラチン粒子を使用したキットであり、判定までの時間は3時間程度である。海外で市販されているキットでは IgM と IgG を同時に、または別々に検出する物もある (海外のキットについては文献 (4) を参照)。

補体結合反応 (CF)

感作赤血球に補体が結合すると溶血が起こるが、抗原と抗体の結合物が存在すると、それに補体が結合して消費されるために溶血が起こらなくなる。CF 法では、抗原と抗体の結合物による補体の消費量を指標として判定を行う。反応抗原は膜糖脂質とされ、血清中の IgG クラスの抗体を測定する。ペア血清で 4 倍以上の上昇を陽性とするが、単一血清で判定するには 64 倍以上の抗体価が必要である。抗体価が上昇するまで発症後 2 週間以上を要するため、本法での早期診断は困難である

市販の試薬として、以下の試薬が入手可能である。

「肺炎マイコプラズマ CF 試薬-生研」として「CF 抗原」、「CF 抗血清 (x 32 倍の陽性血清)」ならびに「正常抗原」デンカ生研。

イムノカード (IC)

迅速に臨床検査を行うためのカード型の製品 (Meridian Diagnostics, Immuno Card Mycoplasma Test) で、日本ではイムノカード マイコプラズマ抗体の名称で (株) ティエフビーから販売されている。カード型のキットに患者血清や血漿を加え、抗 *M. pneumoniae* 抗体の存在を酵素抗体法で検出する仕組みになっている。検体と試薬を入れれば 5 分程度で結果が得られるため、臨床の現場でも簡単に検査が行える利点がある。IgM 抗体を検出するように作られており、発病の初期にも診断が行えるとされている。しかし、簡便な迅速キットであるため、検出感度や特異性にやや問題があるとの報告もある (文献 9、10、11、12) 正確さを期すにはペア血清の検査が望ましい。

株式会社ティエフビー

http://www.tfb-net.com/iryoy/products/01_03.html

ELISA 法

ELISA 法は、高感度、特異的で汎用性があり、定量的な結果が得られる利点もある。マイコプラズマ肺炎診断の抗体検査に応用する場合は、*M. pneumoniae* の菌体成分 (粗精製又は精製菌体成分) を抗原

とする方法が用いられる。菌体の超音波破碎液などを未精製で抗原に用いると患者以外の人々の血清でもかなりの反応が起こり、バックグラウンドが高くなる。この場合、抗 *M. pneumoniae* 抗血清を用いてサンドイッチ ELISA を行えばバックグラウンドを低く抑えることができる。精製抗原を使用する場合は、P1 細胞接着タンパク質などがあげられる。また、合成ペプチドや、遺伝子組換えによって生産した *M. pneumoniae* のタンパク質を抗原として使用することもできる。

海外では ELISA 法に基づく診断キットも複数販売されている（文献 4 参照）。

間接蛍光抗体法 (IFA)

固定した *M. pneumoniae* の抗原に、患者の血清を反応させて、血清中に *M. pneumoniae* に対する抗体が存在するかを調べる。通常、培地に沈めたカバーガラス上に *M. pneumoniae* を増殖させ、メタノール - 酢酸などで固定し、患者血清と反応させる。反応後カバーガラスを洗浄し、*M. pneumoniae* 抗原に結合してカバーガラス上に残っている抗体を、蛍光標識した抗ヒト Ig 抗体で検出する。観察には蛍光顕微鏡を用いる。操作がやや煩雑で、蛍光像の観察と判定にも習熟を要するが、*M. pneumoniae* 抗体の存在を直接検出する有効な方法である。

寒冷凝集反応

寒冷凝集反応とは、低温（4℃）で O 型、Rh(-) の赤血球が凝集する反応で、赤血球の I 抗原に対する IgM 抗体によって起こる。マイコプラズマ肺炎ではこの抗体の上昇が見られるため、寒冷凝集反応が診断の指標となりうる。通常、マイコプラズマ肺炎発症後 1~2 週間で寒冷凝集反応がみられるが、陽性になるのは、マイコプラズマ肺炎の約 30~40% であるとされる。寒冷凝集反応は、他の細菌やウイルス感染症、自己免疫疾患、血液の疾患によっても見られ、マイコプラズマ肺炎に特異的ではない。現在はマイコプラズマ肺炎の検査法としてほとんど使用されない。

代謝阻止抗体 (MI)

M. pneumoniae 感染患者の血清中には、*M. pneumoniae* の増殖を阻止する抗体(MI抗体)が産生されている。患者の血清に、*M. pneumoniae* の増殖を阻害する活性が見られれば、*M. pneumoniae* の感染が疑われる。

<参考> 抗原検査法

抗体検査法による早期診断には限界があるが、もし *M. pneumoniae* の菌体成分を高感度、特異的に検出する抗原検査法があれば、有効な早期診断が可能になると考えられる。しかし、*M. pneumoniae* の抗原検査はこれまでいくつかの方法が報告されているが、特異性と感度が十分ではなく、有効な方法はいまだに普及していない。過去に海外で、イムノクロマト法にもとづいた *M. pneumoniae* 簡易抗原検査キットが実用化されたが、日本では市販されず、どの程度有用であったのかは不明である。現状で利用が考えられる抗原検査法は、直接蛍光抗体法(DFA)で、蛍光標識した抗 *M. pneumoniae* モノクローナル抗体で、マイコプラズマ肺炎患者の咽頭ぬぐい液中に存在する *M. pneumoniae* を免疫染色して顕微鏡観察する方法である。蛍光顕微鏡での観察や判定に多少の習熟を要するが、早期診断法として有用であるとの報告もある(5)。

マイコプラズマ肺炎の早期診断を意図するなら、現時点では遺伝子検出検査法を使用するのが最も信頼性が高い。

4) 遺伝子検出検査法

現在、*M. pneumoniae* の遺伝子検出検査法としては、① PCR 法 か② LAMP 法を用いるのが一般的である。

① PCR 法

PCR 法は比較的簡便に行うことができ、検出感度も培養法より高い。PCR による *M. pneumoniae* DNA の検出は、現在、マイコプラズマ肺炎の早期診断法として最も有効な方法であると考えられる。しかし、PCR はしばしば擬陽性による誤判定も起こすので注意を要する。

PCR 法は、すでに多くの方法が報告されているが、*M. pneumoniae* の細胞接着タンパク質 P1 の遺伝子 (*p1* 遺伝子) の配列を検出ターゲットとしたものが多い。臨床材料から直接検出を行う場合は、検出感度を上げるため nested PCR が用いられる。ここでは、nested PCR による *p1* 遺伝子検出法の例を示す。

PCR 法の実験操作

■ 鋳型 DNA の調製

検体のからの DNA の調製は、*M. pneumoniae* DNA の分解を防ぐためにも、採取後できるだけ速やかに行うのが好ましい。方法は、一般的な DNA 抽出操作を行えばよいが、次のような簡便な方法でもよい。

1. 咽頭スワブや体液中から鋳型 DNA の調製

1~2 ml の咽頭拭い液や、体液（髄液、組織液など）を卓上遠心機で遠心し（15000 x g、10 分間）、上清をのぞく。沈渣に 0.1% Triton-X100 を含む TE buffer（10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0）を 50 μ l 加え、懸濁する。95°C で 5 分間加熱した後、鋳型 DNA として使用する。

さらに、プロテイナーゼ K を終濃度 1 μ g/ml になるように加え、55°C で 15 分間処理すると DNA の収率が上がる場合があるが、プロテイナーゼ K を使用した場合は、フェノール抽出、エタノール沈殿でプロテイナーゼ K を失活、除去する必要がある。咽頭スワブや体液からの DNA の抽出は、QIAGEN 社の QIAamp DNA Mini Kit などのようなキットでも簡便に行うことができる。

2. 細胞組織からの鋳型 DNA の抽出

患者の細胞組織などから PCR で *M. pneumoniae* の検出を試みることもある。この場合の検体処理法も、DNA を抽出するための方法であればどのような方法を用いてもかまわないが、QIAGEN 社などのキット製品を使用すれば簡便に行うことができる。

■ PCR 反応

使用プライマー（*pl* 遺伝子検出用プライマー）

1st PCR 用プライマー

ADH2F: 5'-GGC AGT GGC AGT CAA CAA ACC ACG TAT-3'

ADH2R: 5'-GAA CTT AGC GCC AGC AAC TGC CAT-3'

2nd PCR 用プライマー

ADH/3F: 5'-GAA CCG AAG CGG CTT TGA CCG CAT -3

ADH/3R: 5'-GTT GAC CAT GCC TGA GAA CAG TAA -3'

これらのプライマーを使用した場合、1st PCR では 1451 bp、2nd PCR では 1324 bp の PCR 産物が生成する。

注) ここに示したプライマーは一例であり、*M. pneumoniae* の検出用のプライマー配列は数多く報告されている。参考情報 2 : *M. pneumoniae* の遺伝子型別 の 2) 項にも、*pl* 遺伝子を検出する nested PCR 用のプライマーを記した。

PCR 反応液組成 (1st、2nd PCR 共通)

鋳型 DNA (10ng ~ 1μg)	5μl
dNTP 溶液 (各1.25 mM)	16μl
プライマー F (10 pmol/ml)	2μl
プライマー R (10 pmol/ml)	2μl
Taq DNA ポリメラーゼ (1 U/μl)	2μl
MgCl ₂ (25 mmol/l)	8μl
10倍緩衝液*	10μl
滅菌精製水	55μl
	100μl

*10 倍緩衝液は市販の PCR 酵素製品に付属のものを利用。

上記の反応液を混合して下記の条件で PCR を行う (現在は、あらかじめ混合された PCR 用の酵素試薬も市販されており (タカラバイオの Premix Taq EX など)、このような試薬を用いれば、反応液に鋳型 DNA とプライマーを加えるだけなので簡便で再現性も良い。)

PCR 反応を行う場合には必ず、陰性対照と陽性対照を置かなくてはならない。 陽性対照用には、あらかじめ、*M. pneumoniae* の菌体又は DNA を希釈して、PCR が陽性になるような低濃度のサンプルを調製しておく。これを小分け冷凍保存しておき、検査時に使用する。

PCR 反応条件 (1st, 2nd PCR 共通)

94°C	1 分	} 35 サイクル
94°C	1 分	
55°C	1 分	
72°C	1 分	
72°C	5 分	

1st PCR が終了したら、0.8%のアガロースゲル電気泳動によって

DNA の増幅が起こっているかを確認する。特異的な増幅が起こっていたら陽性と判断し、増幅が起こっていない場合は、1st PCR の反応液 1～数 μ l を鋳型として、2nd PCR 反応を行う。

■アガロースゲル電気泳動による分析と判定

PCR 終了後、反応液 5～10 μ l を 0.8% アガロースゲルで電気泳動し、エチジウムブロマイド溶液 (0.5 μ g/ml) で染色した後、UV トランスイルミネーターを使用して観察する。PCR によって特異的な DNA の増幅がおこっていれば陽性と判定する。増幅が見られない場合や、不明瞭なスメアになっている場合は陰性（検出限界以下）と判定する。

② LAMP (loop mediated isothermal amplification method) 法

LAMP 法は栄研化学により開発された遺伝子検出法で (<http://loopamp.eiken.co.jp/>)、簡便で検出感度が高い方法である。実験室内のコンタミネーションで擬陽性を示すこともあるので、反応後のチューブは決して実験室で開けないなど作業環境と手技に注意が必要である。

肺炎マイコプラズマ用の LAMP キットが栄研化学より発売されているので、これを使用する。

必要な試薬・器具

- ・ LAMP 試薬； Loopamp マイコプラズマ P 検出試薬キット (栄研化学株式会社)
- ・ マスターミックス調製用滅菌チューブ
- ・ ピペット
- ・ 滅菌チップ
- ・ Loopamp 反応チューブ
- ・ 氷
- ・ 微量簡易遠心機
- ・ Loopamp リアルタイム濁度測定装置

リアルタイム濁度測定装置を使わない場合

- ・ Loopamp 蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社)
- ・ ヒートブロック

試験手順

DNA サンプルは 95℃で 5 分加熱ののち、氷上で急冷したのちに鑄型として用いる。

汚染による擬陽性を防ぐため、予め UV を照射した安全キャビネットやクリーンベンチの中で手袋を装着し作業を行う。

反応時には必ず陽性対照と陰性対照を用いること。

4. その他

参考情報1: 薬剤耐性菌

M. pneumoniae 感染症には β -ラクタム系薬剤は無効であり、通常はエリスロマイシン、ジョサマイシン等のマクロライド系あるいはテトラサイクリン、ミノサイクリン等のテトラサイクリン系薬剤が治療に使用される。一方、最近、一部の患者からマクロライド系薬剤に耐性を示す *M. pneumoniae* が分離されるようになった。耐性菌は、通常、23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域に点変異を起こしており、変異部位によって各マクロライド系薬剤に対する耐性度も少しずつ異なっている（文献 8）。今後、このような耐性菌による感染の拡大を防止する観点から、*M. pneumoniae* 分離株の薬剤感受性を調べ、耐性菌の動向を把握していく必要がある。

M. pneumoniae の薬剤感受性試験法には定まったものがなく、その確立および標準化が急務と思われるが、以下に神奈川県衛生研究所で現在実施している微量液体培地希釈法による感受性試験法について記述する。

1 薬剤感受性試験

1) 培地

培養法の項に記した、Hayflick 変法培地を使用する。

2) 菌液の調製

液体培地で十分に増殖させた *M. pneumoniae* の新鮮培養液を新たな液体培地を用いて希釈し、 $10^4 \sim 10^5$ CFU / ml としたものを使用する。

3) 感受性試験

① 液体培地で 2 ないしは 4 倍階段希釈した薬剤希釈液 $100 \mu\text{l}$ を 96 穴マイクロプレート(滅菌済)の各ウェルに分注する。

② *M. pneumoniae* 希釈液 $100 \mu\text{l}$ をマイクロプレートの各ウェルに分注する。

③ 対照として、薬剤を含まない培地 $200 \mu\text{l}$ (培地対照) および薬剤

を含まない培地 100 μ l に *M. pneumoniae* 希釈液 100 μ l を分注した対照ウェルを用意する (*M. pneumoniae* 対照)。

④ マイクロプレートをミキサーで十分混釈し、乾燥を防ぐために湿潤箱（精製水で湿らせたペーパータオルなどを入れたタッパー容器など）に入れ、37°Cで好気培養する。

⑤ マイクロプレートを毎日2回（朝と晩）観察し、*M. pneumoniae* 対照ウェルが完全に黄変した時に、培地対照ウェルと変わらない色調（橙色）を呈するウェルの薬剤濃度を最小発育阻止濃度（MIC; μ g/ml）とする。

感受性試験実施上の注意事項

- ① 培地 pH は MIC 値に影響を与える。pH7.2~8.2 の範囲で、エリスロマイシンの MIC 値は酸性側で高く、テトラサイクリンはアルカリ側で高い。感受性用培地の最適 pH については今後の検討課題であるが、感受性試験を実施するには常に一定にしておく必要がある。
- ② *M. pneumoniae* 菌数も MIC 値に影響するが、 10^4 ~ 10^5 CFU/ml であればバラツキは小さい。
- ③ MIC の判定において、*M. pneumoniae* 対照ウェルが完全に黄変した時に判定する MIC をイニシャル MIC、その後数日間培養し、*M. pneumoniae* の増殖が停止した時に判定するものをファイナル MIC とする場合もある。しかし、エリスロマイシンやテトラサイクリンのように静菌的に作用する抗生物質では判定後における培養で MIC が変動し、ファイナル MIC の判定に戸惑うことがある。従って、当所ではイニシャル MIC を感受性値として採用している。
- ④ *M. pneumoniae* の薬剤感受性試験には、ここで記載した微量液体培地希釈法以外に寒天培地希釈法も利用されているが、当所では、感受性用培地の調整や感受性試験の操作が容易であること等の理由から、上記方法を採用している。両者において測定された MIC に大差はないとする報告もあるが、今後、感受性試験法の標準化を進める上で検討すべき課題と考えられる。

2 マクロライド耐性 *M. pneumoniae* の遺伝子解析

上述のように、マクロライド耐性 *M. pneumoniae* は 23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域に点変異を起こしていることが明らかにされており、既知の変異については PCR-RFLP 法 (文献 15) やリアルタイム PCR (文献 16、17) で迅速に検出することが可能である。更に、上記の遺伝子領域を塩基配列解析することにより、未知の変異の検出が可能となる。以下に、これらの耐性遺伝子解析法について記載する。

1) PCR-RFLP 法による遺伝子変異の検出

PCR-RFLP 法 (文献 15)を用いて、*M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子ドメインV領域の A2063C (2063 位の adenine が cytosine に置換)、A2063G、A2064G、C2617G の変異を調べることができる。これらの変異を含む遺伝子塩基配列を Nested PCR で増幅し、増幅産物を制限酵素で処理後、その切断パターンを電気泳動により確認する。

① サンプル DNA の調整

- a) クローニング後の *M. pneumoniae* の液体培養液 0.5ml をマイクロチューブにとる。
- b) 15,000rpm、20 分間冷却遠心する。
- c) 上清を捨て、沈査に 20 μ l の TE 緩衝液を加えて攪拌する。
- d) アルミブロックヒーターで 99 $^{\circ}$ C、5 分間処理する。
- e) 加熱後、氷水中で冷却する (又は冷凍庫に保存する)。

② Nested PCR

- a) First PCR (23S rRNA 遺伝子ドメイン V 領域の変異部位を含む 927bp の塩基配列を増幅)

【プライマー】

1 (MN23SDVF) :

5'- GCAGTGAAGAACGAGGGG -3' (1758-1775)

2 (MN23SDVR) :

5'- GTCCTCGCTTCGGTCCTCTCG -3'(2664-2684)

【反応液組成】

2 \times PCR Solution Premix Taq	25 μ l
蒸留水	17 μ l
プライマー 1 (MN23SDVF : 10 μ M)	3 μ l
プライマー 2 (MN23SDVR : 10 μ M)	3 μ l
サンプル DNA	2 μ l
計	50 μ l

【PCR 反応条件】

94°C	2分	}	30 サイクル
94°C	45秒		
55°C	1分		
72°C	1.2分		
72°C	5分		

※ First PCR の増幅産物 (927bp) を Second PCR に使用し、23S rRNA の 2063、2064 あるいは 2617 位を含む塩基配列を増幅する。

b) Second PCR-1 (2063、2064 位を含む 210bp の塩基配列を増幅)

【プライマー】

1(MN23SF1937):

5'-ACTATAACGGTCCTAAGGTA-3' (1918-1937)

2(MN23SR2128):

5'-ACCTATTCTCTACATGATAA-3' (2128-2177)

【反応液組成】

2×PCR Solution Premix Taq	25 μ l
蒸留水	17 μ l
プライマー 1 (MN23SF1937 : 10 μ M)	3 μ l
プライマー 2 (MN23SR2128 : 10 μ M)	3 μ l
サンプル DNA	2 μ l
計	50 μ l

【PCR 反応条件】

94°C	2分	}	30 サイクル
94°C	45秒		
55°C	1分		
72°C	1.2分		
72°C	5分		

c) Second PCR-2 (2617 位を含む 108bp の塩基配列を増幅)

【プライマー】

1(MN23SF2577):

5'-TACGTGAGTTGGGTTCAAA-3' (2577-2595)

2(MN23SR2664): (M23SDVR プライマーと同配列)

5'-GTCCTCGCTTCGGTCTCTCG-3' (2664-2684)

【反応液組成】

2×PCR Solution Premix Taq	25 μ l
蒸留水	17 μ l
プライマー 1 (MN23SF2577 : 10 μ M)	3 μ l
プライマー 2 (MN23SR2664 : 10 μ M)	3 μ l
サンプル DNA	2 μ l
計	50 μ l

【PCR 反応条件】

94°C	2 分	} 30 サイクル
94°C	45 秒	
55°C	1 分	
72°C	1.2 分	
72°C	5 分	

③制限酵素処理

a) *Bce*AI、*Bbs*I 及び *Bsa*I による処理

上記 b)の Second PCR 産物を用い、A2063C 及び A2063G の検出をするため、*Bce*AI (1U/PCR 産物 1μl) 及び *Bbs*I (5U/PCR 産物 1μl) で 37°C 2 時間 50 分処理し、A2064G の検出には *Bsa*I (1U/PCR 産物 1μl) で 50°C 2 時間 50 分処理する。

b) *Bsm*FI による処理

上記 c)の Second PCR 産物を用い、C2617G の検出をするために *Bsm*FI (2U/PCR 産物 1μl)を用い、37°C 2 時間 50 分処理する。

④アガロースゲル電気泳動

制限酵素で処理した PCR 産物及び制限酵素非処理の産物を 15% グラジエントポリアクリルアミドゲルあるいは 4% Nusive3:1 アガロースゲルを用いて電気泳動し、それぞれの泳動パターンを比較して変異の確認を行う。通常は、アガロースゲルによる電気泳動パターンで充分に変異の確認は可能である。

2) 23S rRNA ドメイン V 塩基配列解析方法

塩基配列解析法は煩雑ではあるが、2063、2064、2617 位点変異の迅速かつ確実な検出が可能で、現在 PCR-RFLP 法で確認できない A2064C も検出可能である。更に、薬剤感受性試験でマクロライド耐性を示すにもかかわらず上記 PCR-RFLP 法で点変異が検出できない *M. pneumoniae* 臨床分離株については、塩基配列解析でしか変異を確認できない。しかし、この方法によりこれまでに報告のない他の部位に変異が検出されても、薬剤感受性試験を実施して耐性との関連性を証明する必要がある。

① サンプル DNA の調整と PCR

サンプル DNA の調整は上記 PCR-RFLP 法と同様に行い、塩基配列解析に用いる PCR 増幅産物も、上記 PCR-RFLP 法における First PCR と同様に行い作成する。

② PCR 産物 (927bp) について DNA の精製を MiniElute PCR purification kit (Qiagen)等で行う。

方法はキット解説書に従う。

③ BigDye Terminator V3.1 cycle sequencing kit(Applied Biosystems) を用い、ABI Prism3100 genetic analyzer (Applied Biosystems)で解する。

プライマーは、PCR-RFLP 法で使用したものと同様のものを用いる。(2063,2064 位の変異確認の場合は、MN23SDVF、MN23SDVR、MN23SF1973 を用いる。) PCR 産物の DNA 塩基配列は、BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) を用いて *M. pneumoniae* M129 株の塩基配列 (accession no.X68422)と比較する。

参考情報 2 : *M. pneumoniae* の遺伝子型別

M. pneumoniae には I 型菌と II 型菌の 2 つの型があることが明らかになっている。I 型菌と II 型菌は *p1* 遺伝子の塩基配列に違いが見られ、これを調べることによって区別することができる (文献 6、7)。I 型菌と II 型菌の病原性の違いや流行との関連はよくわかっていないが、過去の国内分離菌の型別調査では、下図のように数年から 10 年程度の間隔で I 型菌と II 型菌が出現を繰り返している。下図の上の矢印は、過去に日本で大きなマイコプラズマ肺炎の流行が見られた年である。

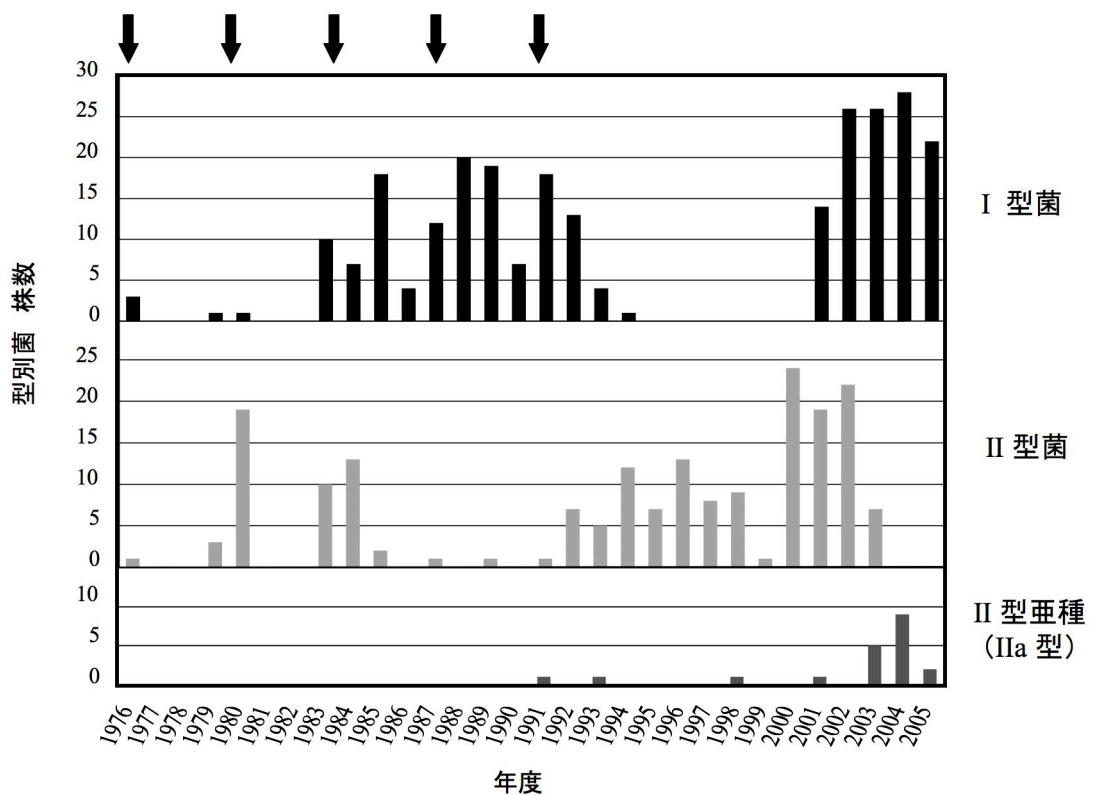


図 6 国内 *M. pneumoniae* 分離株の遺伝子型別調査 (文献 13)

検査によって *M. pneumoniae* が分離できた場合、分離菌の型別を行えば、出現菌型の地域差や発生状況との関連で興味を持たれる。分離菌が得られている場合は、型別は比較的簡単に行えるので、以下に、方法を記す。

1) *M. pneumoniae* の遺伝子型別法 (PCR-RFLP 法)

M. pneumoniae の遺伝子型別は PCR-RFLP 法が簡便で正確である。*M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子 (P1 タンパク質の遺伝子) には、I 型菌と II 型菌で塩基配列が異なる部位が 2 カ所存在する (RepMP2/3 領域と RepMP4 領域)。この部分を PCR で増幅し塩基配列の違いを制限酵素の切断パターンで区別する。

プライマー ADH1 と ADH2 は、RepMP4 領域を増幅するのに用い、ADH3 と ADH4 は RepMP2/3 領域を増幅するのに用いる。どちらの部位の分析を行っても I 型菌と II 型菌は区別できる。ただし、近年はそれぞれの菌型の亜種も見つかってきており、このような亜種では RepMP4 と RepMP2/3 領域の両方を分析しないと、区別できない場合がある。

使用プライマーセット 1 (RepMP4 領域用)

ADH1 : CTGCCTTGTCCTCAAGTCCACT

ADH2 : AACCTTGTCGGGAAGAGCTG

使用プライマーセット 2 (RepMP2/3 領域用)

ADH3 : CGAGTTTGCTGCTAACGAGT

ADH4 : CTTGACTGATACCTGTGCGG

PCR 反応条件

94°C	1 分	} 30 サイクル
94°C	1 分	
55°C	1 分	
72°C	2.5 分	
72°C	10 分	

M. pneumoniae 分離株の DNA を鋳型として上記の条件で PCR を行うと、いずれの場合も約 2.5 kb の PCR 産物が得られる。この PCR 産物を制限酵素 *Hae*III で消化した後、2% アガロースゲル電気泳動で分析し、泳動パターンを比較して型別を行う。

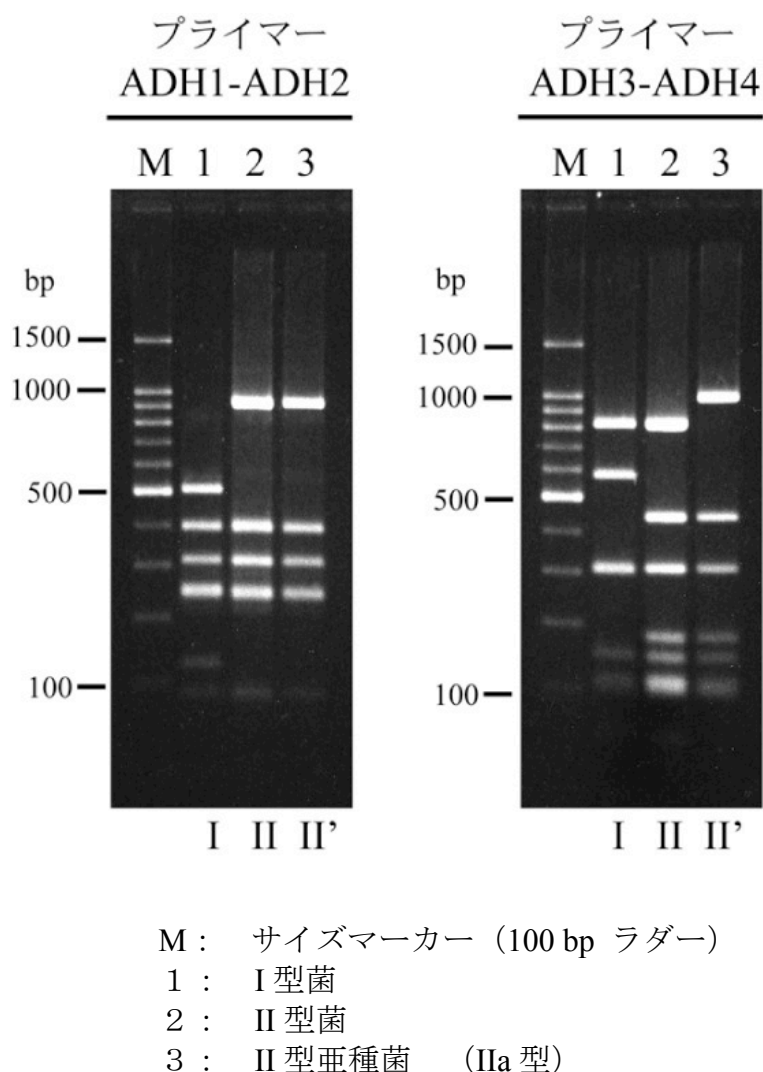


図7 *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子型別結果 (PCR-RFLP 法)
(詳しいバンドのサイズは次ページの付表も参照。)

上記は、レーン1がI型菌、レーン2がII型菌の分析結果である。また、レーン3 (ADH3-ADH4 プライマー使用) のように、I型菌、II型菌とは RFLP パターンが異なる株が見つかることがある (この写真の場合はIIa型)。現時点で3種のII型亜種 (IIa、IIb、IIc) およびI型亜種が1種見つかってきており (文献14)。既知のものと異なる RFLP パターンを示す株が発見された場合は、*p1* 遺伝の塩基配列分析などを行い、論文やデータベース登録などの形で報告しておく価値がありますので、分析のための技術情報が必要な場合は、感染研までご連絡下さい。

《付表》 *M. pneumoniae* の *p1* 遺伝子にもとづいた型別
 (PCR 産物の *HaeIII* 処理で、以下のサイズの断片が生じる。)

プライマー ADH1-ADH2			プライマー ADH3-ADH4		
I 型	II 型	II' 型	I 型	II 型	II' 型
510	939	939	824	824	989
396	396	396	579	440	440
316	313	313	313	313	313
253	240	240	305	183	183
250	237	237	153	153	153
240	91	91	104	119	119
130	17	17	55	119	112
91			31	112	104
31			10	104	39
17			8	55	31
				39	10
				31	8
				10	
				8	

単位 bp

2) Nested PCR によって高検出感度化した *M. pneumoniae* の遺伝子型別法

上述の PCR-RFLP 法による *M. pneumoniae* の遺伝子型別法では、*p1* 遺伝子の比較的長い領域を PCR で増幅するため、鋳型 DNA の品質が悪いと、PCR がうまくかからないことがある。このため、*M. pneumoniae* がかなり多く存在している臨床検体であっても、分離培養なしで直接、遺伝子型別を行うことはできない例が多かった。この PCR-RFLP 法を Nested PCR 化することによって、*M. pneumoniae* の検出と型別の両方が行えるになった。

(この方法を用いるときには陽性対照として I 型菌、II 型菌、II 型亜種菌のゲノム DNA を準備し、陰性対照もおくこと。陽性対照用の DNA が必要な場合は、感染研にお問い合わせ下さい。)

1st PCR 反応

1st PCR では前述の ADH1 と ADH4 プライマーを用いて *pl* 遺伝子のほぼ全体を増幅する。

1st PCR プライマー

ADH1 : CTGCCTTGTCCAAGTCCACT

ADH4 : CTTGACTGATACCTGTGCGG

PCR 反応液組成 (1st PCR)

鋳型 DNA (10ng ~ 1 μ g)	5 μ l
プライマー F (10 pmol/ μ l)	2 μ l
プライマー R (10 pmol/ μ l)	2 μ l
EX Taq DNA ポリメラーゼ premix	25 μ l
滅菌精製水	16 μ l
	50 μ l

1st PCR 反応条件

98°C	10 秒	} 30 サイクル
98°C	10 秒	
65°C	30 秒	
72°C	4 分	
72°C	10 分	

M. pneumoniae 分離株または臨床検体由来のゲノム DNA を鋳型とした場合、上記の条件で PCR を行うと、約 4 kb の PCR 産物が得られる。増幅産物は 0.8% アガロースゲル電気泳動で PCR 産物を確認するが、鋳型の量が少ないと 1st PCR ではバンドが確認できないこともある。

2nd PCR 反応

1st PCR の産物を鋳型に RepMP4 領域と RepMP2/3 領域を増幅する 2 組の PCR を行う。

使用プライマーセット 1 (RepMP4 領域用)

ADH1a: AAGTCCACTTGGATTCTCATCCTCACCGCC

ADH2a: GGAAGAGCTGCTAACAATTCCGGATTGAGA

使用プライマーセット 2 (RepMP2/3 領域用)

ADH3a: GCTAACGAGTACGAGCGCTTTAACCGAAG

ADH4a: ACCTGTGCGGTTAATGATTTTCCTTAAAGACA

PCR 反応液組成 (2nd PCR)

鋳型 DNA (10ng ~ 1 μ g)	5 μ l
プライマー F (10 pmol/ μ l)	2 μ l
プライマー R (10 pmol/ μ l)	2 μ l
EX Taq DNA ポリメラーゼ premix	25 μ l
滅菌精製水	16 μ l
	50 μ l

2nd PCR 反応条件

98°C	10 秒	} 18 サイクル
98°C	10 秒	
65°C	30 秒	
72°C	2 分	
72°C	10 分	

1st PCR 産物を鋳型として上記の条件で PCR を行うと、それぞれ約 2.5 kb の PCR 産物が得られる。0.8% アガロースゲルで PCR 産物 2 μ l を電気泳動し結果を確認する。

この Nested PCR 法を検出法として用いる場合は、をここで特異的なバンドが確認できたものは *M. pneumoniae* 陽性とする。

HaeIII を用いた RFLP 型別

2nd PCR 産物 (RepMP4、RepMP2/3 領域それぞれ) を *Hae* III で消化し、断片を 2%アガロースゲルで電気泳動する。制限酵素処理後

の電気泳動泳動結果は、既出の図7の型別結果の写真と同様になる。

(厳密には Nested PCR-RFLP 法では用いているプライマー部位が原法の PCR-RFLP 法の位置と少し異なるため、前出の附表のサイズとは、バンドのサイズがわずかに異なっている。しかし、この差は電気泳動では区別できない。)

参考情報 3 : アルギニン添加 Hayflick 変法液体培地 (PPLO 液体培地)

(1 リットルあたりの組成)

マイコプラズマ基礎培地 (PPLO ブロス) *	21 g
アルギニン	5 g (0.5%)
フェノールレッド	20 mg (0.002%)
蒸留水	750 ml

アルギニン培地は、滅菌前に 1N HCl で pH を中性～微酸性に調製し濃いオレンジ色にしておく (菌増殖によりピンク色に色調変化するため、培養前に培地の色が赤いと判別しづらいため。)

上記を高圧蒸気滅菌し、血清が凝固しない温度 (約 50°C) 以下に冷えたら、無菌的に以下のものを加える。

ウマ血清 (55 °C で 30 分間加熱済)	150 ml (15 %)
25 % 新鮮酵母エキス	100 ml (10 %)
ペニシリン G	100 万単位
(2.5 % 酢酸タリウム溶液**)	10 ml)

*PPLO Broth w/o CV, Difco 255420, Becton Dickinson : クリスタルバイオレット無添加

**毒性があるので、取り扱いに注意。必須ではない。

ペニシリン G はアンピシリン (終濃度 50µg/ml) に置き換えることも可能。

Mycoplasma 属菌の代謝性をみるには、ブドウ糖添加 PPLO 液体培地ならびにアルギニン添加 PPLO 液体培地の 2 種類の培地に検体や菌コロニーを接種し、37°C、好気条件で培養する。何も接種しない培地のみの陰性対照も一緒に培養し、色調変化を比較観察する。例えば *M. pneumoniae* は、グルコースのみを代謝するので、増殖するとブドウ糖添加培地のほうが強く黄変する (アルギニン添加培地も黄変する)。 *M. orale* は、アルギニンのみを代謝するので、アルギニン添加培地のほうがより強いピン

ク色に変わる（ブドウ糖添加培地もピンク色に変化してくる）。*M. fermentans* や *M. penetrans* は、ブドウ糖、アルギニンの両方を代謝するため、ブドウ糖添加培地は強く黄変、アルギニン添加培地は強いピンク色になる。

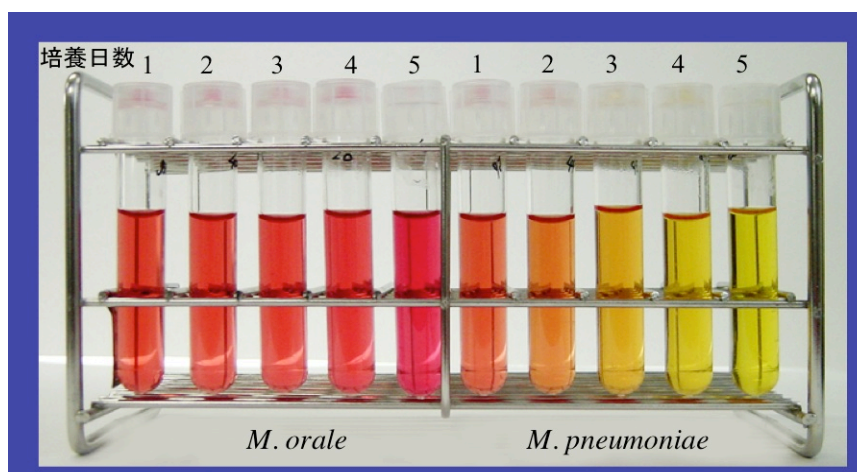


図8 代謝性の異なるマイコプラズマ培養時の培地の色調変化
(*M. pneumoniae* はブドウ糖添加、*M. orale* はアルギニン添加培地で培養した。)

《補足》ヒト臨床検体からは、*M. pneumoniae* 以外に下記のマイコプラズマ種が分離されることがある。それぞれが主に分離される部位とそれらの代謝性を示す

種名	主に分離される部位	代謝性	赤血球付着性
<i>M. pneumoniae</i>	気道	ブドウ糖	有り
<i>M. orale</i>	口腔	アルギニン	無し
<i>M. salivarium</i>	口腔	アルギニン	無し
<i>M. fermentans</i>	口腔等	両方	無し
<i>M. hominis</i>	泌尿器	アルギニン	無し
<i>M. genitalium</i>	泌尿器	ブドウ糖	有り
<i>M. penetrans</i>	気道・泌尿器	両方	有り
<i>M. amphoriforme</i>	気道	ブドウ糖	有り
<i>Acholeplasma laidlawii</i>		ブドウ糖	無し

参考情報4：マイコプラズマ肺炎届出基準

マイコプラズマ肺炎は感染症法上 五類感染症（定点把握感染症）に分類されている。国内の感染症動向調査の定点として指定されている医療機関からは、以下の基準をみたした場合に届け出が提出される。

マイコプラズマ肺炎

(1)	<p>定義</p> <p><i>Mycoplasma pneumoniae</i> の感染によって発症する肺炎である。</p>								
(2)	<p>臨床的特徴</p> <p>好発年齢は、6～12歳の小児であり、小児では発生頻度の高い感染症の一つである。潜伏期は2～3週間とされ、飛沫で感染する。異型肺炎像を呈することが多い。頑固な咳嗽と発熱を主症状に発病し、中耳炎、胸膜炎、心筋炎、髄膜炎などの合併症を併発する症例も報告されている。</p>								
(3)	<p>届出基準</p> <p>ア 患者（確定例）</p> <p>指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、(2)の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見からマイコプラズマ肺炎が疑われ、かつ、(4)により、マイコプラズマ肺炎患者と診断した場合には、法第14条第2項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。</p> <p>イ 感染症死亡者の死体</p> <p>指定届出機関の管理者は、当該指定届出機関の医師が、(2)の臨床的特徴を有する死体を検案した結果、症状や所見から、マイコプラズマ肺炎が疑われ、かつ、(4)により、マイコプラズマ肺炎により死亡したと判断した場合には、法第14条第2項の規定による届出を週単位で、翌週の月曜日に届け出なければならない。</p>								
(4)	<table border="1"> <thead> <tr> <th data-bbox="322 1518 1209 1615">検査方法</th> <th data-bbox="1209 1518 1327 1615">検査材料</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td data-bbox="322 1615 1209 1675">分離・同定による病原体の検出</td> <td data-bbox="1209 1615 1327 1783" rowspan="2">気道から採取された検体</td> </tr> <tr> <td data-bbox="322 1675 1209 1783">PCR法又はLAMP法による病原体の遺伝子の検出</td> </tr> <tr> <td data-bbox="322 1783 1209 1998">抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇、又は単一血清で間接血球凝集抗体価320倍以上、補体結合抗体価64倍以上、ゼラチン粒子凝集抗体価320倍以上、若しくはIgM抗体の検出(迅速診断キット))</td> <td data-bbox="1209 1783 1327 1998">血清</td> </tr> </tbody> </table>		検査方法	検査材料	分離・同定による病原体の検出	気道から採取された検体	PCR法又はLAMP法による病原体の遺伝子の検出	抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇、又は単一血清で間接血球凝集抗体価320倍以上、補体結合抗体価64倍以上、ゼラチン粒子凝集抗体価320倍以上、若しくはIgM抗体の検出(迅速診断キット))	血清
検査方法	検査材料								
分離・同定による病原体の検出	気道から採取された検体								
PCR法又はLAMP法による病原体の遺伝子の検出									
抗体の検出 (ペア血清による抗体陽転又は抗体価の有意の上昇、又は単一血清で間接血球凝集抗体価320倍以上、補体結合抗体価64倍以上、ゼラチン粒子凝集抗体価320倍以上、若しくはIgM抗体の検出(迅速診断キット))	血清								

5. 文献

1. 尾形学監修、輿水馨、清水高正、山本孝史編集、マイコプラズマとその実験法、1988、近代出版
2. 佐々木正吾編、マイコプラズマ図説、1980、東海大学出版会
3. 佐々木正吾、尾形学、中村昌弘編、マイコプラズマ、1974、講談社サイエンティフィック
4. Waites, K. B., Bébéar, C. M., Robertson, J. A., Talkington, D. F. and Kenny, G. E. : Laboratory diagnosis of mycoplasmal infections in Cumitech-Cumulative techniques and procedures in clinical microbiology, edited by Nolte, F. S. 2001, ASM press, Washington, DC, U.S.A.
5. 田澤節子、岩澤篤郎、中村良子 : Mycoplasma, 臨床と微生物, 2001, 27 650-653
6. Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y *et al.* : Identification of a new variable sequence in the P1 cytoadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect Immun* **67** : 4557-4562, 1999.
7. Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J *et al.* : *Mycoplasma pneumoniae* P1 Type 1- and Type 2-Specific Sequences within the P1 Cytoadhesin Gene of Individual Strains. *Infect Immun* **69** : 5612-5618, 2001.
8. Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T.: Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol* **45** : 617-620, 2001
9. 成田 光生 富樫 武弘: 小児マイコプラズマ感染症診断における迅速診断キットの有用性 . 感染症学雑誌 77(5) : 310-315、2003
10. Matthias F.C.Beersma, et al : Evaluation of 12 Commercial Tests and the Complement Fixation Test for *Mycoplasma pneumoniae*- Specific Immunoglobulin G (IgG) and IgM Antibodies, with PCR Used as the “Gold Standard” . J. Clin. Microbiol. 43: 2277-2285, 2005

11. Thacker, W. L., and D. F. Talkington. Analysis of complement fixation and commercial enzyme immunoassays for detection of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* in human serum. Clin. Diagn. Lab. Immunol. 7:778–780, 2000.
12. 加藤彰一、半定量解析によるイムノカードマイコプラズマ抗体キットの有用性の評価. 小児感染免疫 19 : 27-35、2007
13. Kenri T, Okazaki N, Yamazaki T, Narita M, Izumikawa K, Matsuoka M, Suzuki S, Horino A, Sasaki T. Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains. J. Med. Microbiol. 57: 469-475, 2008.
14. Zhao F, Cao B, Li J, Song S, Tao X, Yin Y, He L, Zhang J. Sequence analysis of the *pl* adhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical isolates collected in Beijing in 2008 to 2009. J. Clin. Microbiol. 49: 3000-3003, 2011.
15. Matsuoka M. et al :Characterization and molecular analysis of macrolideresistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob. Agents Chemother. 48:4624–4630, 2004.
16. Morozumi M, et al.:Acute Respiratory Diseases Study Group. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. Antimicrob. Agents Chemother. 52:348-50,2008.
17. Peuchant O,et al.: Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis. J Antimicrob Chemother. 64(1):52-8.2009.

6. 執筆者

神奈川県衛生研究所 微生物部

大屋日登美

国立感染症研究所 細菌第二部 第二室

堀野敦子

見理 剛

佐々木 裕子

問い合わせ先

神奈川県衛生研究所

〒253-0087 神奈川県茅ヶ崎下町屋 1-3-1

E-mail:

国立感染症研究所 細菌第二部

〒208-0011 東京都武蔵村山市学園 4-7-1

E-mail: horino@nih.go.jp

kenri@nih.go.jp

yuko@nih.go.jp