

## 【原著・基礎】

*Mycoplasma pneumoniae* の迅速検索を目的とした PCR

—小児呼吸器感染症検体を用いて—

諸角美由紀<sup>1)</sup>・岩田 敏<sup>2)</sup>・遠藤 廣子<sup>3)</sup>・大石 智洋<sup>4)</sup>・大成 滋<sup>5)</sup>・川村 尚久<sup>6)14)</sup>  
 黒木 春郎<sup>7)</sup>・小林 正明<sup>8)</sup>・斎藤 洪太<sup>9)</sup>・酒井 律子<sup>10)</sup>・砂川 慶介<sup>11)</sup>・田島 剛<sup>12)</sup>  
 新田 雅彦<sup>13)14)</sup>・野々山勝人<sup>11)</sup>・小林 玲子<sup>15)</sup>・千葉菜穂子<sup>1)</sup>・生方 公子<sup>16)</sup>

<sup>1)</sup>北里大学大学院感染制御科学府感染制御科学専攻\*, <sup>2)</sup>国立病院東京医療センター小児科,

<sup>3)</sup>東北労災病院小児科, <sup>4)</sup>上越総合病院小児科, <sup>5)</sup>なかふかわ小児科, <sup>6)</sup>大阪労災病院小児科,

<sup>7)</sup>医療法人永津会斎藤病院小児科, <sup>8)</sup>小林小児科医院, <sup>9)</sup>斎藤小児科医院, <sup>10)</sup>酒井医院,

<sup>11)</sup>北里大学医学部感染症学講座, <sup>12)</sup>博慈会記念総合病院小児科, <sup>13)</sup>清恵会病院小児科,

<sup>14)</sup>大阪医科大学小児科, <sup>15)</sup>明治製菓株式会社薬品総合研究所, <sup>16)</sup>北里大学北里生命科学研究所

(平成 15 年 4 月 1 日受付・平成 15 年 4 月 28 日受理)

*Mycoplasma pneumoniae* の 16 S rRNA 遺伝子上に新たな primer を設計し, それを用いた PCR によって, 検査材料からの直接的な *M. pneumoniae* の検索法について検討した。この primer の基礎的検討における感度は 1 cycle あたり 94℃: 15 秒, 53℃: 15 秒, 72℃: 15 秒, 35 cycle の条件下で 2 CFU /tube であった。この結果から, 検体あたり  $1.1 \times 10^3$  CFU の *M. pneumoniae* が存在すれば, PCR 陽性 (PCR (+)) となるものと判断した。検査材料の前処理から結果を得るまでの所要時間は 2.5 時間であった。次に, 本 PCR は 2002 年 5 月から 2003 年 1 月の期間に「acute respiratory diseases 研究会」参加の小児科医によって採取された 783 検体について実施された。検査材料は, 上咽頭ぬぐい液 (n = 612), 咽頭ぬぐい液 (n = 141), 耳漏 (n = 12) などであった。これらの検体において PCR (+) と判定された症例は 79 例 (10.1%) であった。その内訳は, 肺炎 58/291 例 (19.9%), 急性気管支炎 13/207 例 (6.3%), 急性咽頭炎 2/130 例 (1.5%), 急性上気道炎 2/45 例 (4.4%) など, 下部気道感染症となるにしがたい, PCR (+) 例が有意に多くなる ( $\chi^2 = 53.3008$ ,  $p = 0.0000$ ) という結果であった。肺炎例において *M. pneumoniae* に対する抗体価の有意な上昇あるいは高抗体価を示したことにより, *M. pneumoniae* 肺炎と診断された症例は 65 例あったが, そのうち PCR (+) であった症例は 46 例 (70.8%) であった。この 65 例について前投与抗菌薬との関係を調べると, 抗菌薬投与がないと記載されていた 21 例, ならびに *M. pneumoniae* に無効な経口  $\beta$ -ラクタム系薬が投与されていた 22 例, 計 43 例中 38 例 (88.4%) で PCR (+) であった。*M. pneumoniae* に抗菌力を有しているマクロライド系薬あるいはニューキノロン系薬などが投与されていた 13 例では, 3 例 (23.1%) のみが PCR (+) であった。以上の成績は, 発症してからの病日と PCR の実行日との関係も考慮する必要があるが, 抗菌薬が投与されていない症例に対し, 本 PCR を実施することは, 治療薬選択の上できわめて有用であると考えられた。

**Key words:** *Mycoplasma pneumoniae*, 小児呼吸器感染症, PCR, 肺炎, 抗体価

*Mycoplasma pneumoniae* はヒトの呼吸器感染症における病原微生物のひとつとして知られている<sup>1)</sup>。本菌による感染症の確定診断は, 発症時における胸部レントゲン写真(X-P)<sup>2)</sup>に見られる特徴や咳嗽, 発熱などの臨床症状の把握と共に, 末梢白血球数(WBC)やCRPの検査所見を参照にし, 最終的には感染初期と1週間以降のペアー血清による*M. pneumoniae*に対する抗体価上昇によって行われている<sup>3-7)</sup>。本来, 培養による微生物検査も行われなければならないが,*M. pneumoniae*の培養には1週間以上を必要とするため,

ほとんど実施されていないのが現状である。そのような培養検査に代わって, 感染初期に迅速診断法のひとつであるPCR法を用い,*M. pneumoniae*の検索を行う研究がすでにいくつか報告されている<sup>8-12)</sup>。

しかし, それらの方法の多くは,*M. pneumoniae*のみを迅速に検索するシステムであること, 検索の感度を高めるためにDNAの増幅回数が40 cycle以上と多いこと, 検体処理から結果を得るまでの所要時間がやや長いこと, ルーチン検査へ応用するには手技が煩雑であるなどの問題点も散見され

る。

われわれは、呼吸器感染症の起炎菌となり得る主要な諸微生物を発症初期にPCR法によって同時に検索し、原因微生物を特定して適切な抗菌薬投与へ結びつくシステムの構築を検討しているが、そのためには、*M. pneumoniae* も含めて、同一条件下でPCRを実行できることが必須と考えている。そのような視点から、*Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*, *Chlamydia pneumoniae*, および *Legionella pneumophila* の検索も視野に入れ、各菌種に対する検出感度を維持したまま、同一条件下で実行可能なPCRを開発することを目的とし、そのための *M. pneumoniae* 検出用の primer を設計した。

この論文においては、acute respiratory diseases (ARD) 研究会参加12医療施設において、感染症が疑われた小児例から採取された検査材料の送付を受け、独自に設計した primer を用いてPCRを行い、その成績と同一検体を用いて行った *M. pneumoniae* の培養成績を比較検討した。その結果、有意な相関が得られたので報告する。

また、その相関性をより確かなものにするために、PCR陽性であった各症例における *M. pneumoniae* に対する抗体価を可能な限り測定し、それに加えて、WBCやCRPなどの検査所見との関係についても検討したので、そのこともあわせて報告する。なお、ARD研究会で行った上記6菌種についての同時検索の成績は別に報告する予定にしている。

## I. 材料と方法

### 1. 対象症例と検査材料

*M. pneumoniae* の検索対象とした検査材料は、ARD研究会(2002.5月発足、班長:国立病院東京医療センター 岩田 敏,事務局:北里大学北里生命科学研究所・感染情報学研究室)に参加する12医療施設より送付を受けた。ARD研究会参加医師は、小児感染症を専門とする臨床医で、症例からの検査材料の採取は医師みずからが実施したものである。2002年5月~2003年1月の期間に送付を受けた検体数は783検体であり、1症例につき1検体とした。症例の疾患別内訳は、後述するTable 1の割合であった。対象症例からはキャリーブレア(シードスワブ2号<sup>®</sup>栄研(株))を用いて検査材料

が採取されたが、材料別内訳は、上咽頭ぬぐい液(n=612)、咽頭ぬぐい液(n=141)、耳漏(n=12)、扁桃(n=11)、喀痰(n=4)、鼓膜切開液(n=2)、鼻汁(n=1)の順であった。

### 2. 検査材料の前処理

到着後の検体は、ただちに1.5 mLの0.7% glucoseを含有する *Mycoplasma* 用 PPLO broth (Difco) へ十分に絞り出し、続いて4°C, 5,000 rpm, 5分の遠心操作を行った。なお、0.7%となるように glucose を加えたのは、培地の浸透圧を調節するためである。

上清部分を無菌的に捨て去った後、沈渣部分を150  $\mu$ Lとし、軽くミキシングした沈渣の5  $\mu$ Lを30  $\mu$ Lの lysis 液 {0.1 M Tris buffer (pH 8.9), 0.225 (V/V) % Nonidet P-40, 0.225 (V/V) % Tween 20, Proteinase K 200  $\mu$ g/mL} へ加え、60°C, 20分、続いて94°C, 5分の溶菌操作を実施した。この反応液をPCR用溶菌液(鋳型DNA液)とした。

また、本法開発の初期段階においては、検査材料の処理からの *M. pneumoniae* の回収効率を検討するため、5,000 rpm, 5分の遠心操作後の上清部分を別のチューブに移し、さらに15,000 rpm, 30分の遠心を行い、両者の沈渣物を用いてPCRで増幅されるDNA量の比較を行った。しかし、両者にほとんど差がみられないことから、以後、前者の遠心操作のみを実施することにした。

### 3. PCR

*M. pneumoniae* 検出用の primer は16S rRNAをコードする遺伝子上に設計した<sup>13)</sup>。sense側 primerの塩基配列は、16S rRNA-MS: 5'-G<sub>77</sub>TACTTTAGAG-GCGAACG<sub>97</sub>-3', revers側 primerの塩基配列は、16S rRNA-MR: 5'-T<sub>301</sub>ACTTCTCAGCATAGCTACAC<sub>281</sub>-3'である。

PCR反応液の組成は、1 mLあたり、 $\times 10$  reaction buffer 100  $\mu$ L (100 mM Tris-HCl (pH 8.9), 800 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 1% Sodium cholate, 5 mg/mL BSA), 25 mM dNTP mixture 100  $\mu$ L, 各 primer 2  $\mu$ L, 40 U *Tth* DNA polymerase (東

Table 1. Diseases of the patients from whom clinical samples were collected

Diseases	Patients	(%)	<i>M. pneumoniae</i> PCR-positive	(%)	<i>M. pneumoniae</i> Culture-positive	(%)
Pneumonia	291	37.2	58	19.9	41	14.1
Acute bronchitis	207	26.4	13	6.3	11	5.3
Acute pharyngitis	130	16.6	2	1.5	1	0.8
Acute upper respiratory infection	45	5.7	2	4.4	2	4.4
Acute tonsillitis	50	6.4	1	2.0	1	2.0
Acute otitis Media	31	4.0	1	3.2	1	3.2
Other	29	3.7	2	6.9	2	6.9
Total	783	100	79	10.1	59	7.5

$\chi^2=53.3008$ ,  $n=6$ ,  $p=0.0000$  (\*\*)

洋紡績(株))とした。30  $\mu$ LのPCR反応液へ先の溶菌液2  $\mu$ Lを加えた後、PCRを実行した。PCRは、94 $^{\circ}$ C:15秒, 53 $^{\circ}$ C:15秒, 72 $^{\circ}$ C:15秒を1 cycleとして35 cycle実行したが、スタートは94 $^{\circ}$ C, 2分, 最後の72 $^{\circ}$ Cは2分とした。PCR終了後の反応産物は3%アガロースゲル電気泳動,あるいはiチップ(日立コスモアイ, SV1210, 日立ハイテクノロジーズ(株))にて解析した。なお、PCRによって得られるDNA断片は理論上225 bpとなる。検査材料の処理から解析結果を得るまでの所要時間は、ゲル電気泳動の場合で約2.5時間, iチップによる解析では約2時間である。

#### 4. 感度・特異度

primerの感度を検討するために、*M. pneumoniae*の標準株M129株を用い、6日間培養後の細胞を $10^1$ ~ $10^5$ 倍希釈し、PCRと同時に培養も実施してコロニー数を計算した。

特異度の検討は、ヒトから分離されることがあるとされる*Mycoplasma orale*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma salivarium*と、その他に呼吸器感染症から分離される可能性のある一般細菌についても検討した。

#### 5. DNA増幅産物の遺伝子解析

PCRによって増幅されたDNA断片が*M. pneumoniae*の16S rRNA遺伝子の一部であることを確認するため、無作為に抽出した陽性例5検体のPCR産物を精製し、型のごとくsequenceを行った<sup>14)</sup>。

#### 6. *M. pneumoniae*の培養

*M. pneumoniae*の培養にはPPLO brothを基礎培地として使用した。滅菌後の基礎培地に次の7種類の物質を加えた後、1.5 mLずつ滅菌チューブ(アシスト(株))へ分注して、用時まで4 $^{\circ}$ Cに保存した。添加した物質は、①20%ウマ血清(ICN Biomedicals), ②10% yeast extract(日本甜菜糖(株)ニッテンドライイーストより抽出), ③1%酢酸タリウム, ④1% penicillin G kalium(最終濃度は1,000 units/mL), ⑤1.5% cefotaxime(最終濃度は150  $\mu$ g/mL), ⑥2.5% glucose(最終濃度は0.5%), ⑦0.2% phenol redである<sup>15)</sup>。以下、このbrothをPPLO brothと略称する。

検査材料中の*M. pneumoniae*の菌数測定のためには、PPLO寒天培地を用いた。培地の組成は上記のbrothに最終濃度が1.5%となるように寒天(Difco)を加え、直径5.5 cmの滅菌シャーレ(Iwaki(株))に7 mLずつ分注し、室温で固化させた後、用時まで4 $^{\circ}$ Cに保存した。なお、作成した培地はいずれも1か月以内に使用した。

これらの培地には、上記2.の遠心操作後の検査材料をPPLO brothに50  $\mu$ L, シャーレに30  $\mu$ L加えて培養した。培養は37 $^{\circ}$ Cで12~13日間行った。PPLO brothの黄変により菌の増殖が疑われた場合は、それらをさらにPPLO寒天培地に塗り広げて培養し、単離操作を行

った。単離した*M. pneumoniae*はさらに培養を行い、遠心集菌後、-80 $^{\circ}$ Cに保存した。

菌の同定にはPPLO寒天培地上に発育したコロニーに対し、モルモットの血球(日本バイオテスト研究所(株))吸着試験<sup>16)</sup>を行い、さらにglucoseの利用能を確認して*M. pneumoniae*と判定した。

#### 7. 一般細菌の培養

呼吸器感染症からの*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*などの一般細菌の検索についても、PCRと培養とを同時に実施しているが、それらの成績については上述したように別に報告する予定である。

#### 8. *M. pneumoniae*抗体価の測定

*M. pneumoniae*の抗体価は、それぞれの施設においてPA法,あるいはCF法のいずれかで測定された。PA法においてはペアー血清で抗体価が測定され、回復期の抗体価が4倍以上上昇しているものを有意上昇とした。ただし、単一血清のみについて測定されている例においては、320倍以上であるものを高抗体価例とした。CF法についても同様で、ペアー血清で抗体価が測定されていた症例については4倍以上を有意上昇とし、単一血清のみの測定の場合には64倍以上を高抗体価例とした。

## II. 結果

### 1. primerの感度・特異度

*M. pneumoniae*の標準株M129株を用いて検討したprimerの感度は、Fig. 1に示す。30  $\mu$ LのPCR反応チューブ中に2 CFU存在すれば陽性(PCR(+))と判定された。この感度は、滅菌綿棒で採取した検査材料中に、 $1.1 \times 10^3$  CFU以上の*M. pneumoniae*の粒子数が存在すれば、PCR(+)と判定される感度と計算される。

特異度の検討では、ヒトの呼吸器から分離される*Mycoplasma*属の7種のうち、*M. orale*, *M. hominis*, *M. salivarium*について検討したが、DNAの非特異的

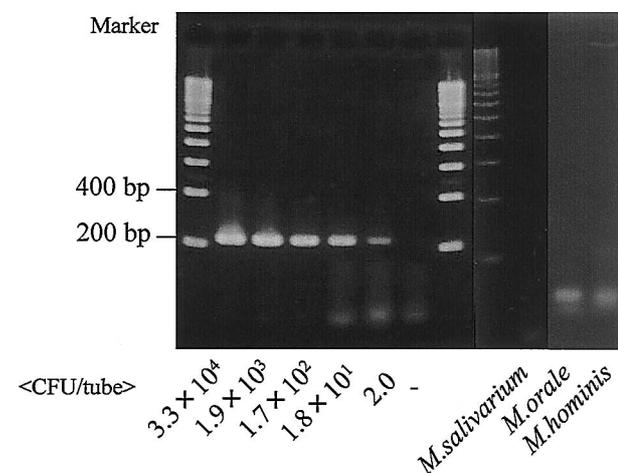


Fig. 1. Sensitivity and specificity of a set of primers designed for *Mycoplasma pneumoniae* 16S rRNA gene amplifications.

増幅は認められなかった。なお、ここには示していないが、*S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* などの一般細菌でも非特異的 DNA の増幅は認められなかった。

また、5 検体からの PCR 増幅産物について direct DNA sequence を行った成績では、増幅された DNA fragment は、*M. pneumoniae* の 16 S rRNA 遺伝子の塩基配列に完全に一致していることを確認した。

## 2. 疾患の内訳と PCR による *M. pneumoniae* の陽性率

ARD 研究会で今回対象とした期間中に送付を受けた検査材料は、783 検体であった。それらの疾患別内訳と PCR ならびに培養による *M. pneumoniae* の陽性率は Table 1 に示す。疾患の内訳は、肺炎 291 例 (37.2%)、急性気管支炎 207 例 (26.4%)、急性咽頭炎 130 例 (16.6%)、急性扁桃炎 50 例 (6.4%)、急性上気道炎 45 例 (5.7%)、急性中耳炎 31 例 (4.0%)、副鼻腔炎や気管支喘息などその他の疾患が 29 例 (3.7%) であった。783 例のうち 79 例 (10.1%) が PCR による検索で *M. pneumoniae* 陽性であった。

これら疾患別にみた PCR (+) 例は、肺炎 291 例中 58 例 (19.9%)、急性気管支炎 207 例中 13 例 (6.3%)、急性咽頭炎 130 例中 2 例 (1.5%)、急性上気道炎 45 例中 2 例 (4.4%) など、下部気道感染症となるに当たって PCR (+) の例が有意に多くなるという結果であった ( $\chi^2=53.3008$ ,  $n=6$ ,  $p=0.0000$  (\*\*))。

一方、培養による *M. pneumoniae* の検出率は、PCR (+) であった 79 例のうち 59 例 (74.7%) であった。

Fig. 2 には、PPLO 寒天培地で *M. pneumoniae* が検出された 59 検体について、コロニー数を測定した成績

と PCR の成績との関係を示す。増幅された DNA 断片の濃さは、同時に電気泳動したマーカーの濃さとの対比から、+++ (同位置のマーカー以上の濃さの場合)、++ (マーカーよりやや薄い場合)、+ (バンドは薄い) が確実に認められる場合) と区別した。コロニー数については、培地上に塗布した 30  $\mu$ L 中に証明されたコロニー数から、検体を採取した綿棒 (サンプル) あたりの *M. pneumoniae* の粒子数として表わした。PCR による DNA 増幅量と培養によるコロニー数との相関は  $r=0.9998$  と高く、PCR による DNA のバンドが濃ければ、検査材料中の *M. pneumoniae* の粒子数も多いことが示された。

なお、ここに示したコロニー数の成績は 1 サンプルあたり、平均  $10^3$  近い *M. pneumoniae* の粒子数が存在していれば、PCR で陽性と判定されることを示している。この数値は PCR 時の反応チューブ中に *M. pneumoniae* 粒子が 1~2 CFU 存在すれば陽性となり、さきの標準株での感度に一致する成績であった。

## 3. 肺炎例における前投与抗菌薬と PCR、および抗体価との関係

対象とした 783 症例中、肺炎と診断されていた 291 症例のうち、*M. pneumoniae* に対する抗体価の測定が実施されていた症例は 73 例 (25.1%) である。Fig. 3 にその概要を示すが、ペア血清で抗体価が有意に上昇した 37 例では PCR (+) が 32 例 (86.5%)、単一血清で高値であった 28 例では 14 例 (50.0%) が PCR (+) であった。一方、ペア血清で抗体価が試験管 1 本だけの上昇であることから確定診断に至らなかった 1 症例が PCR (+) であった。また、単一血清で測定された 7 症例が、確定診断するまでの高抗体価に達しておらず、

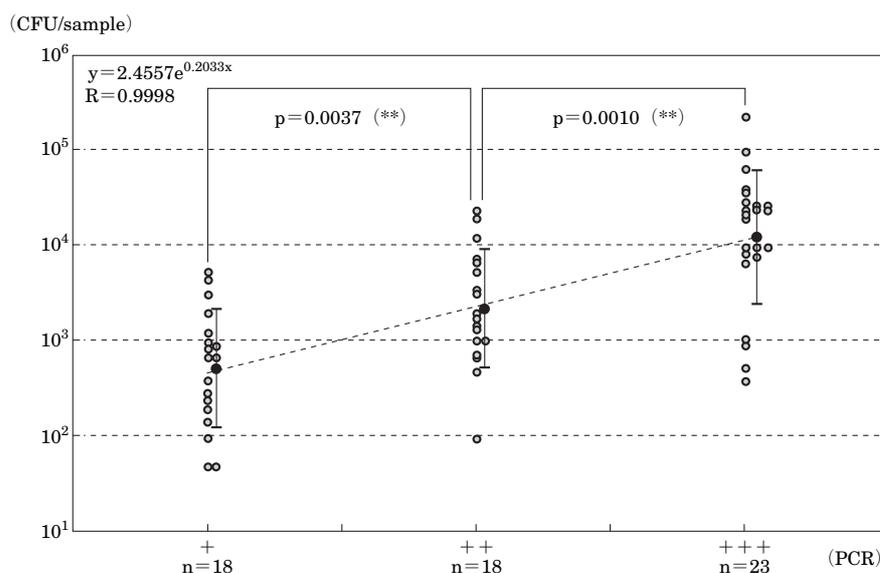


Fig. 2. Correlation between results of PCR and PPLO agar cultures for *Mycoplasma pneumoniae*.

●·····average value, bar·····standard deviation value

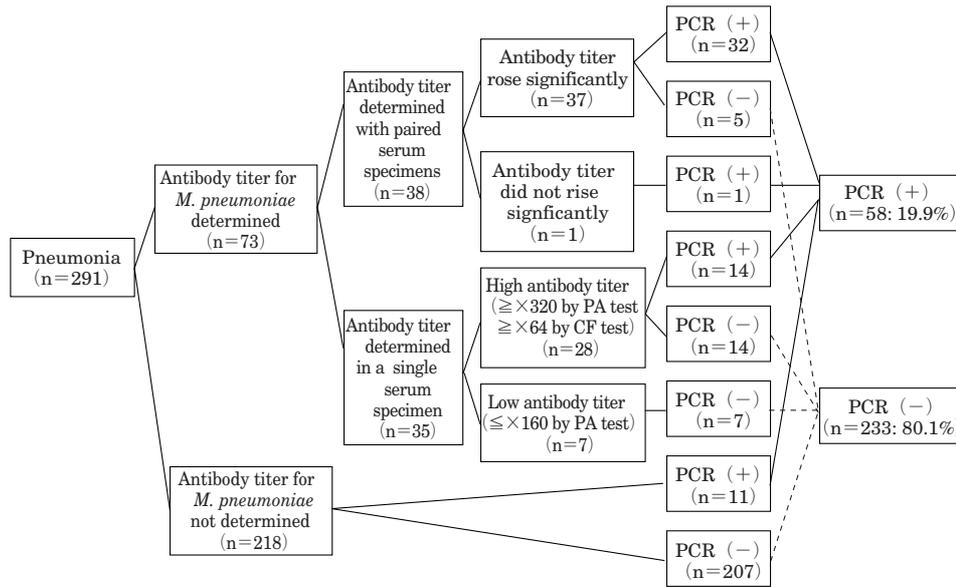


Fig. 3. Antibody titer and PCR results of pneumonia patients.

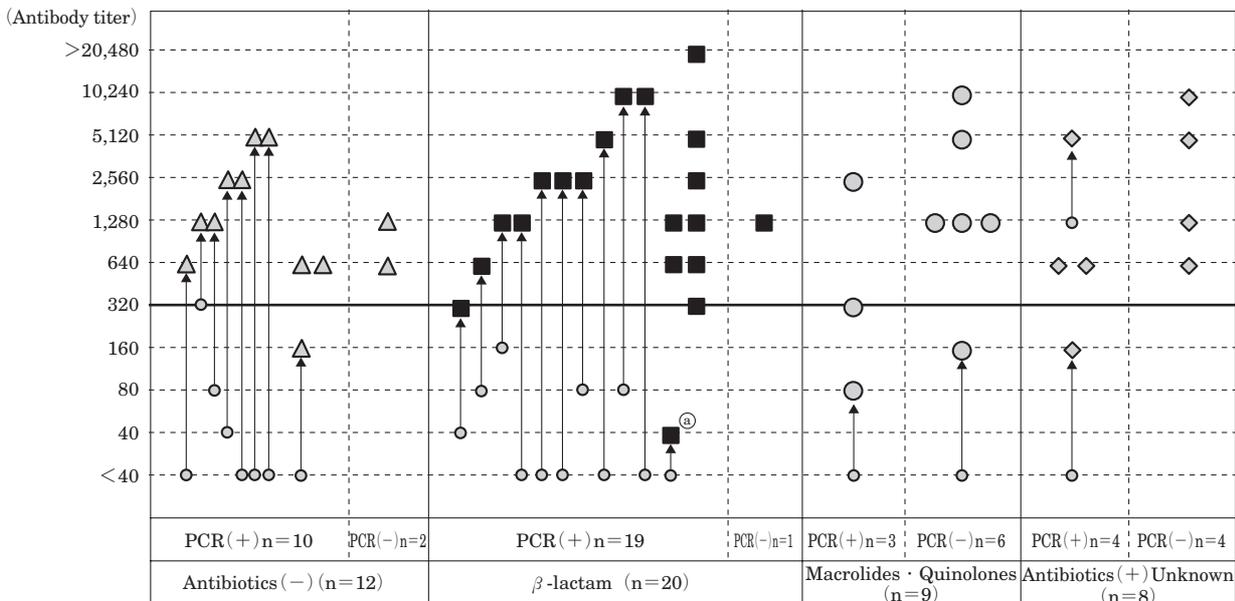


Fig. 4. Antibiotics used before PCR, PCR results, and antibody titer determined by PA test for *Mycoplasma pneumoniae* in the pneumonia patients (n=49).

Ⓐ: ×40 (after 4 days)

PCR もまた PCR (-) であった。

このことから、PCR (+) と前投与抗菌薬との関係についても検討した。Fig. 4 に、抗体価が PA 法で測定された 49 例の成績を示す。抗菌薬が *M. pneumoniae* に対して示す感受性の有無との関係から、グラフには①抗菌薬前投与なし群 (n=12)、②β-ラクタム系薬前投与群 (n=20)、③マクロライド系薬、ニューキノロン系薬などの前投与群 (n=9)、④前投与抗菌薬名不明群 (n=8) の順に示す。

抗菌薬が投与されていなかった 12 症例では 10 例 (83.3%) が PCR (+) で、ペア血清で調べられてい

た 8 例では抗体価が有意に上昇していた。残り 2 例は単一血清で抗体価の高い症例であった。PCR (-) の 2 例は単一血清で抗体価が高値であった。

*M. pneumoniae* に無効な β-ラクタム系薬が使用されていた 20 例では 19 例 (95%) が PCR (+) で、そのうちペア血清で抗体価が測定されていた 11 例のうち 10 例において抗体価の有意上昇が認められた。残りの 1 例は図中にⒶとして示したが、前述した 2 回目の血清が 4 日後に調べられていた症例である。単一血清で抗体価が高値であった 9 例では PCR (+) が 8 例、PCR (-) が 1 例であった。

一方, *M. pneumoniae* に有効なマクロライド系薬とニューキノロン系薬が投与されていた9例ではPCR (+) が3例 (33.3%) であった。このうち, ペアー血清で調べられていた2例では1例がPCR (+), 残りの1例はPCR (-) という結果で, いずれも2回目の抗体価が低値であった。単一血清で高値であったものでは2例がPCR (+), 5例はPCR (-) であった。

抗菌薬は使用されているが薬剤名が不明であった8例ではPCR (+) が4例 (50.0%) で, ペアー血清で調べられていた2例では共にPCR (+), 単一血清で高値であったものでは2例でPCR (+), 4例でPCR (-) であった。

Fig. 5 に抗体価がCF法で測定された17症例の同様の成績を示す。この測定法では17症例中15症例にお

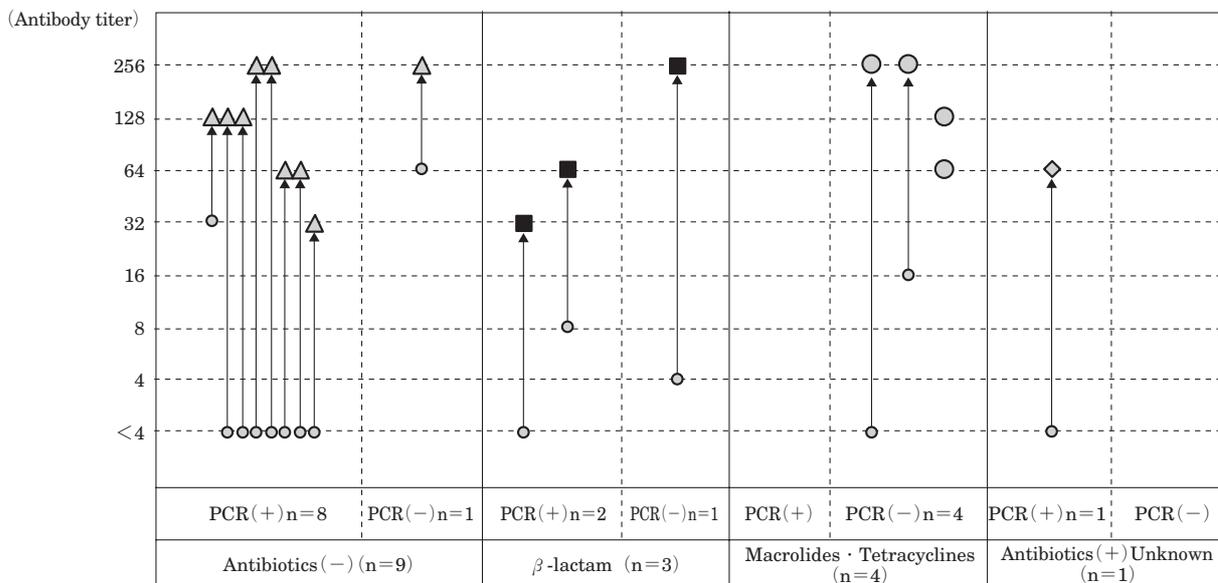


Fig. 5. Antibiotics used before PCR, PCR results, and antibody titer determined by CF test for *Mycoplasma pneumoniae* in the pneumonia patients (n=17).

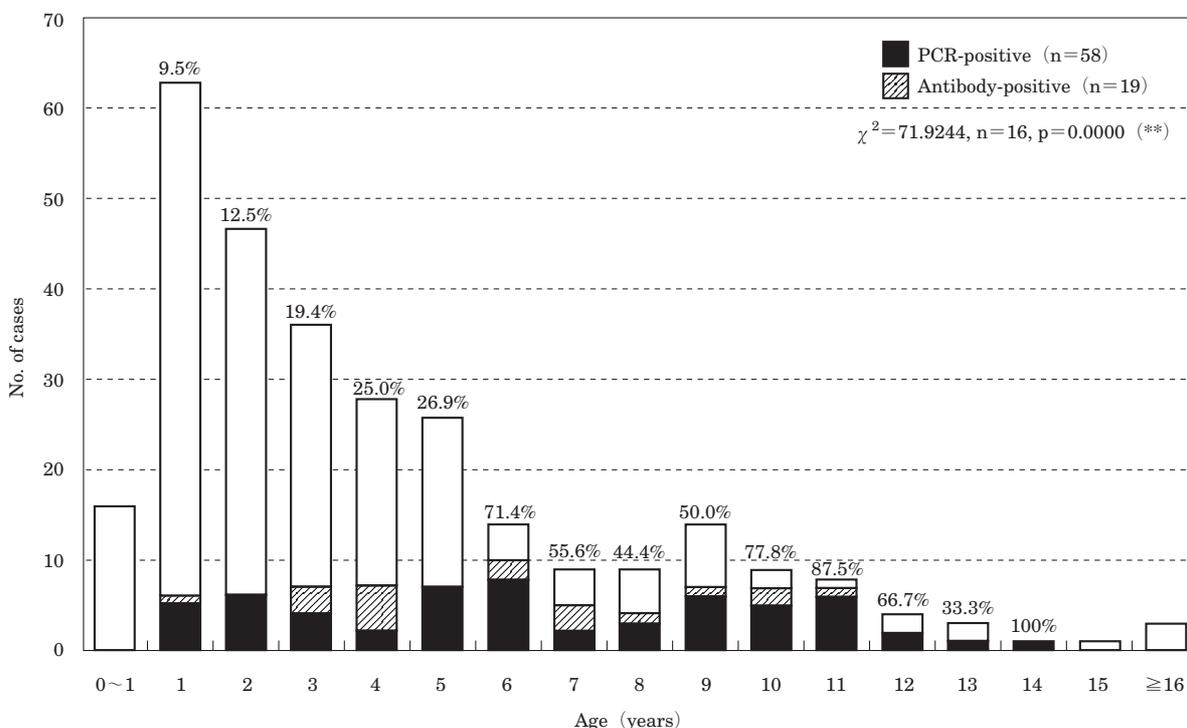


Fig. 6. Age distribution of patients with *Mycoplasma pneumoniae* infection diagnosed on the basis of PCR and serological tests.

いてペアー血清で抗体価が測定されていた。すべての例で有意に抗体価が上昇しており、このうち、抗菌薬の前投与がなかった症例9例と $\beta$ -ラクタム系薬が投与されていた3例の計12症例では10症例(83.3%)においてPCR(+)であった。マクロライド系薬が前投与されていた4症例は、すべてPCR(-)であった。

以上の成績をまとめると、抗菌薬使用なしと $\beta$ -ラクタム系薬の前投与例のみに限ったPCRの的中率は、88.4%(38/43)となった。また、*M. pneumoniae*に有効な薬剤が前投与されていた13例では3例(23.1%)のみがPCR(+)であり、ここには図示しないが、増幅されたDNA量も(+)程度であった(Fig.1参照)。

#### 4. *M. pneumoniae* 肺炎症例の年齢分布

Fig.6に、主治医によって肺炎と診断された291症例の年齢分布と、3.項のFig.3においてPCR(+)であった58症例と、PCR(-)であるが抗体価が高いことから*M. pneumoniae*肺炎と診断された19例、計77例についての年齢分布を示す。

全体でみた年齢分布は1歳台にピークを認め、年齢の上昇と共に暫時例数は減少しているが、16歳以上と幅広く分布していた。これらの症例のうち、*M. pneumoniae*肺炎症例は1歳未満では認められず、全例が1歳以上であり、平均年齢は6.3歳であった。各年齢層に占める*M. pneumoniae*肺炎症例の割合は年齢の上昇と共に有意に高くなり、6歳以降では半数以上が本菌による肺炎であった( $\chi^2=71.9244$ ,  $n=16$ ,  $p=0.0000$ (\*\*))。

#### 5. *M. pneumoniae* 肺炎症例とWBC,あるいはCRPとの関係

*M. pneumoniae*肺炎症例とした77例のうち、WBC, CRPの値が不明である1例を除く、76例について一般細菌の検出の有無を調べ、①*M. pneumoniae*単独( $n=43$ ), ②*M. pneumoniae*+*S. pneumoniae*( $n=17$ ), ③*M. pneumoniae*+*H. influenzae*( $n=8$ ), ④*M. pneumoniae*+*S. pneumoniae*+*H. influenzae*( $n=6$ ), および⑤*M. pneumoniae*+その他の菌( $n=2$ )とに層別して、発症初期に検査されたWBCとCRPの成績をFigs.7,8に示した。

解析はbox-and-whisker plot法で行っているが、boxの下辺が第1四分位、上辺が第3四分位を示し、◆印は全症例の半数が示す中央値を表している。つまり、box内部には50%の症例が含まれることになる。×印は四分位偏差の1.5倍の値を示しており、理論的にはこの範囲内にすべての症例が含まれることとなるが、それから外れる症例については四分位偏差の2倍を超えないケースを○印で示し、2倍を超えるケースは●印で示した。

*M. pneumoniae*単独例( $n=43$ )においては、WBCの平均は6,050/mm<sup>3</sup>となり、1例を除いた42例のWBCが10,000/mm<sup>3</sup>以下であった。一方、*S. pneumoniae*か*H. influenzae*,あるいはそれら2菌種が同時に検出された症例におけるWBCの平均値は6,000~7,000/mm<sup>3</sup>で、各群間に有意な差は認められなかった。しかし、詳細に眺めると*S. pneumoniae*が同時に検出されていた症例では、平均値と中央値の間に乖離がみられ、

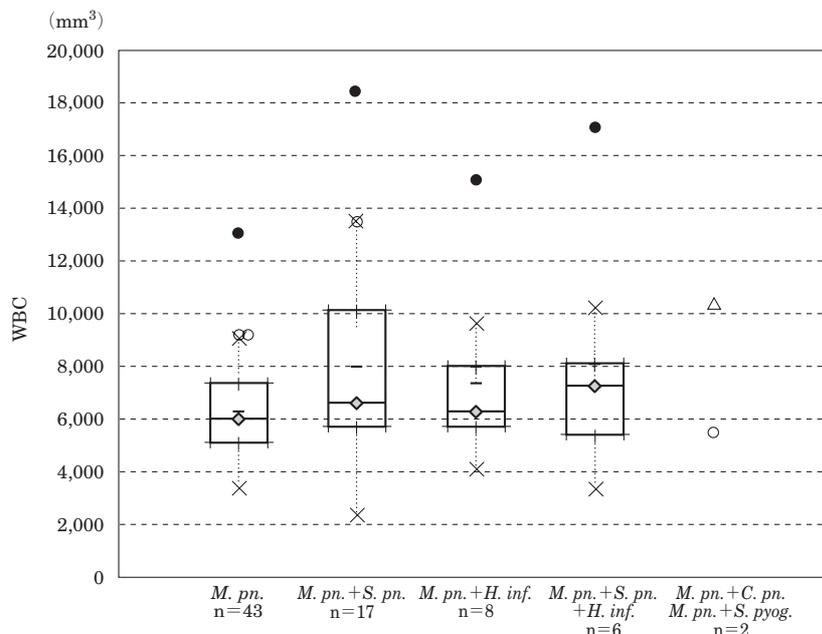


Fig. 7. *Mycoplasma pneumoniae* infection, simultaneously detected microorganisms, and WBC values in the early stage of the infection in the pneumonia patients. These data were analyzed by a box-and-whisker plot.

○...*M. pneumoniae* + *Chlamydia pneumoniae*, △...*M. pneumoniae* + *Streptococcus pyogenes*

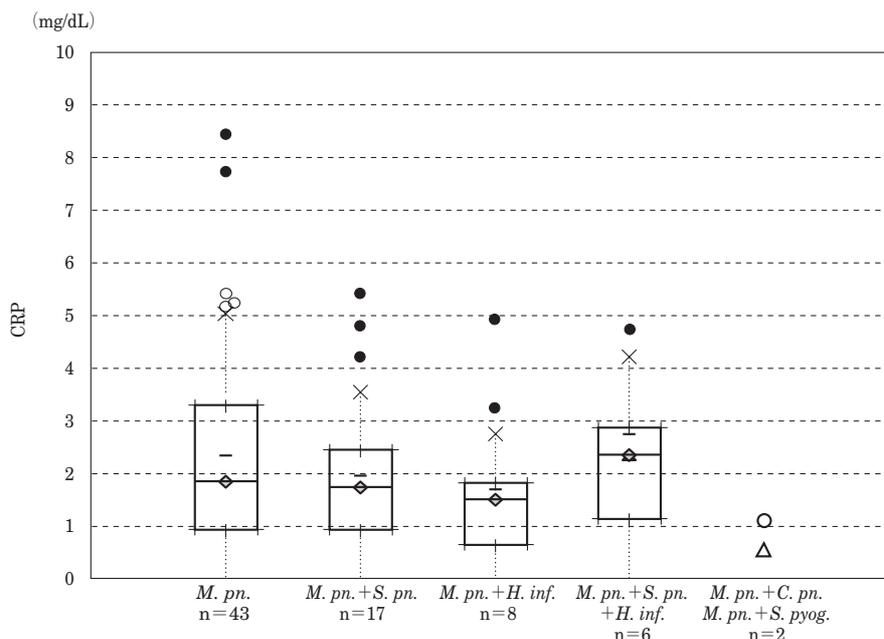


Fig. 8. *Mycoplasma pneumoniae* infection, simultaneously detected microorganisms, and CRP values in the early stage of the infection in the pneumonia patients. These data were analyzed by a box-and-whisker plot.

○···*M. pneumoniae* + *Chlamydia pneumoniae*, △···*M. pneumoniae* + *Streptococcus pyogenes*

box は上方にシフトしていた。この現象は *H. influenzae* 検出例でも多少みられ、*S. pneumoniae* と *H. influenzae* の同時検出例では中央値そのものが前記3群に比してやや上昇した成績となっていることが注目された。なお、●印で示す特異的な例は各群にそれぞれ1例ずつ認められている。

Fig. 8 に CRP の成績を示す。各群とも CRP の値にはかなりのばらつきが認められた。*M. pneumoniae* 単独例における CRP の中央値は 1.8 mg/dL であったが5例の値が異常高値であった。同様に、*S. pneumoniae* や *H. influenzae* が検出されていた症例でも、CRP の平均は 2 mg/dL 前後で、半数例が 0.5~2.8 mg/dL の閾値にあったが、それぞれ異常高値である例も見られる結果であった。

### III. 考 察

市中において発症する急性気道感染症のなかでも、肺炎においては起炎菌として *S. pneumoniae* や *H. influenzae* の占める割合が高いとされるが、起炎菌の菌種は年齢や基礎疾患の有無によって相違することが知られている。すなわち、60歳以下で基礎疾患を有しない成人例においては、*M. pneumoniae* による肺炎例の割合が30%以上と高く、次いで *C. pneumoniae* と *S. pneumoniae* が10%と報告されている<sup>16)</sup>。一方、基礎疾患を有する65歳以上の肺炎例では、*S. pneumoniae* が30%、次いで *H. influenzae* が10%であり、*M. pneumoniae* による肺炎例は数%に過ぎないとされている。

小児の肺炎においては、1~3歳の症例では *S. pneumoniae* や *H. influenzae* によるものが多く、それ以降の年齢になると、*M. pneumoniae* による例が相対的に高くなるとされている。尾内らの報告<sup>17)</sup>では小児肺炎例の27.2%が *M. pneumoniae* によるものとされているが、それらの成績は、抗体価の測定によって最終的な診断がなされている。おそらく、初期治療薬としての抗菌薬の選択は、大多数例に対し empiric therapy が行われているものと思われる。

一方、呼吸器感染症の原因菌となり得る菌種における耐性菌の増加は、世界的にも深刻な問題であるが、この耐性化防止の手段としては、感染初期に起炎菌を短時間のうちに特定し、もっとも適切な抗菌薬を使用することが重要である。その手段として、PCR法やマイクロチップによる迅速診断法が応用されてきているが、ルーチン検査への導入に際しては、短時間で結果が得られるのみならず、手技が簡便で、疑陽性例のないことが条件となる。特に、起炎菌となり得る可能性の高い菌種を網羅的に検索できれば、その有用性は一段と高まるはずである。そのような意図にもとづき、現在、第一段階として *S. pneumoniae*, *H. influenzae*, *S. pyogenes*, *M. pneumoniae*, *C. pneumoniae*, および *L. pneumophila* を同一条件のPCRによって検索するシステムの構築を著者らは目下検討している。そして、ほぼ目的に合ったシステムが確立できたと考えているが、それはこの論文を前提として別に発表する予定にしている。本論文においては、そのなかの *M. pneumoniae* 検索のために設計した

primerの感度と特異度、さらには実際の臨床検査材料に対して実施した際の成績と、*M. pneumoniae*に対する抗体価上昇との相関、および症例におけるWBC、CRPの成績について検討した。

今回設計した primerの感度は、標準株で2 CFU/tubeの感度となっていたが、この値を材料採取の綿棒にあてはめると、綿棒の先に $10^3$  CFUの*M. pneumoniae*粒子が付着していれば、検出可能であることを示している。そして、当該 primerを用いて783例の検査材料に対するPCRを実施したが、そのうち*M. pneumoniae*に対する抗体価が比較的多くの症例で調べられている肺炎291例について、本PCRとの関係を検討した。すなわち、抗体価が測定されていた73例のうち、ペアー血清で抗体価の有意な上昇が認められた37例においては32例(86.5%)がPCR(+)であった。また、2回目の抗体価測定が1回目測定の4日後で有意な上昇と認められなかった1例においてもPCR(+)であった。単一血清で抗体価が調べられていた35例については、高抗体価であった28例中PCR(+)の症例は14例(50.0%)とペアー血清で測定された症例群に比しては低値であった。また、非高値例7例ではPCRもまたすべてPCR(-)であった。

このような*M. pneumoniae*に対する抗体価の有意な上昇あるいは高抗体価とPCRの不一致例には前投与抗菌薬の有無とその種類、あるいはペアー血清でない場合には抗体価測定の時期が大きく関係する。そのことから、これらの抗体価が測定されていた肺炎の症例について、前投与抗菌薬の有無とPCRとの関係を調べている。抗菌薬が投与されていなかった症例ならびに*M. pneumoniae*に感受性を有していないβ-ラクタム薬が投与されていた43症例中では38例(88.4%)がPCR(+)であるのに対し、*M. pneumoniae*に感受性を有するマクロライド系薬やキノロン系薬あるいはテトラサイクリン系薬が投与されていた症例13例ではわずかに3例(23.1%)のみがPCR(+)であった。マクロライド薬に耐性化した*M. pneumoniae*が出現したとの報告もみられる<sup>18,19)</sup>が、一般的には本微生物に対しマクロライド薬はいぜんとして優れた抗菌力を保持しており、1日でも投与されると*M. pneumoniae*は上咽頭から速やかに消失し、その後でPCRを実施してもPCR(-)となる例の多いことが示された。

検体が採取された病日ならびに*M. pneumoniae*に対する抗体が測定された病日もまたPCR(+)に対する精度を左右する要因となる。今回の検討症例のなかでも、主治医によって*M. pneumoniae*肺炎が疑われ抗体価が測定されたが、発症1週間以内の測定であり、しかも有意な上昇とみなされなかったために除外した例が7例あった。また、単一血清の場合には抗体価が高いにもかかわらずPCR(-)の症例が28例中14例(50.0%)

と比較的多かったのも問題であるが、この中身をみると、そのなかにマクロライド薬などが使用されていた例が7例含まれていた。おそらく、有効な薬剤の使用のために回復期の血清を採血することができなかったものと推察している。

一方、*M. pneumoniae*による培養とPCRの成績との相関であるが、培養による*M. pneumoniae*の陽性率は、PCRによる陽性率と比較すると明らかに低かった。特に症例数の多い肺炎例の場合でみると、58例中41例(70.7%)のみが培養によって*M. pneumoniae*を確認できたに過ぎない。ただし、培養によるコロニー数とPCRによるDNAの増幅レベルには高い相関性が認められたことから、DNAのバンドが濃ければ検体中の*M. pneumoniae*の粒子数も多いと判断できると思われる。

なお、PCR時の前処理操作において、最終的に5,000 rpm、5分としたのは、遠心操作の違いによって増幅されるDNA量にほとんど差がみられなかったことによる。その理由は、*M. pneumoniae*は上咽頭へ侵入後、線毛上皮細胞へ付着し、増殖を繰り返すとされており、5,000 rpmの遠心で回収される沈渣物中の細胞にかなり付着していると判断されたためである。

臨床検査値として、*M. pneumoniae*肺炎症例として検討した77例における発症初期におけるWBCとCRPの値は、ごく少数の例を除いて従来の報告と一致するものであった<sup>17)</sup>。しかし、一般細菌との関係をみると、*S. pneumoniae*が同時に検出されていた症例において、box-and-whisker plot解析によるWBCの第3四分位の値が $10,000/\text{mm}^3$ を超えており、これらの症例中には肺炎以外の上気道炎などとして*S. pneumoniae*が関与している可能性は否定できない。このような症例に対しては、治療薬を含めた臨床経過の解析が必要であり、それらは今後の検討課題であると考えている。

本論文において述べたPCRによる*M. pneumoniae*の迅速検索法は、当初の目的とした小児の急性気道感染症における病原微生物を早期に検出し、適切な抗菌薬療法に資するという目的は十分に達成できたと考えている。今後、*S. pneumoniae*、*H. influenzae*、*C. pneumoniae*などを含めた「呼吸器感染症の原因菌検索キット」として確立し、市中において発症する呼吸器感染症の起炎菌を高い確率で確定できるシステムへと構築していきたいと考えている。そして、それらを培養に代わってルーチン検査へ導入することができれば、早期診断にもとづく適切な初期治療薬の選択へつながるものと確信している。

謝 辞

本研究にご協力いただきました北里大学北里生命科学研究所の村山琮明先生、北里大学大学院感染制御科学府感染制御科学専攻修士課程の長谷川恵子さん、明治製菓株式会社薬品総合研究所の鈴木悦子さん、小野暁子さんに感謝致します。

また、臨床検査データと PCR との統計解析などをご指導いただきました「ARD 研究会」顧問の帝京大学名誉教授 紺野昌俊先生に深謝致します。

本研究の一部は、文部科学省 21 世紀 COE プログラム補助金によって遂行されたものである。

#### 文 献

- 1) 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘: II 病因論. マイコプラズマ (佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘), p.67~145, 講談社, 東京, 1974
- 2) 伊藤 功朗, 石田 直, 橋本 徹, 他: *Chlamydia pneumoniae* 肺炎, オウム病, マイコプラズマ肺炎の X 線所見の比較検討. 感染症誌 74: 954~960, 2000
- 3) Ishida T, Hashimoto T, Arita M, et al.: Etiology of community-acquired pneumonia in hospitalized patients: a 3-year prospective study in Japan. *Chest* 114: 1588~1593, 1998
- 4) 武内可尚: マイコプラズマ肺炎. 臨床と微生物 29: 83~88, 2002
- 5) McIntosh K: Community-acquired pneumonia in children. *N Engl J Med* 346: 429~437, 2002
- 6) 金光敬二, 賀来満夫: マイコプラズマ感染症の診断. 臨床と微生物 30: 41~46, 2003
- 7) Hammerschlog M R: *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Curr Opin Infect Dis* 14: 181~186, 2001
- 8) 岡崎則男, 山井志朗, 佐々木次雄, 他: 二段階 PCR 法による咽頭スワブからの *Mycoplasma pneumoniae* の検出. 感染症誌 72: 742~746, 1998
- 9) Qasem J A, Khan Zu, Shiji G, et al.: Polymerase chain reaction as a sensitivity and rapid method for specific detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical samples. *Microbiol Res* 157: 77~82, 2002
- 10) Nadala D, Bossart W, Zucol F, et al.: Community-acquired pneumonia in children due to *Mycoplasma pneumoniae*: diagnostic performance of a seminested 16 S rDNA-PCR. *Diagn Microbiol Infect Dis* 39: 15~19, 2001
- 11) Hardegger D, Nadal D, Bossart W, et al.: Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens by real-time PCR. *J Microbiol Methods* 41: 45~51, 2000
- 12) Corsaro D, Valassina M, Venditti D, et al.: Multiplex PCR for rapid and differential diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* and *Chlamydia pneumoniae* in respiratory infection. *Diagn Microbiol Infect Dis* 35: 105~108, 1999
- 13) Himmelreich R, Hilbert H, Plagens H, et al.: Complete sequence analysis of the genome of the bacterium *Mycoplasma pneumoniae*. *Nucleic Acids Res* 24: 4420~4449, 1996
- 14) Ubukata K, Shibasaki Y, Yamamoto K, et al.: Association of amino acid substitutions in penicillin-binding protein 3 with  $\beta$ -lactamase-negative ampicillin-resistant *Haemophilus influenzae*. *American Society for Microbiology* 45: 1693~1699, 2001
- 15) 中村昌弘, 興水 馨, 杉浦巳代治: 第 1 章 ヒト・マイコプラズマの分離と同定. 細菌学技術叢書 2 ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定 (日本細菌学会教育委員会編), p.2~39, 菜根出版, 東京, 1982
- 16) Ishida T: Etiology of community-acquired pneumonia among adult patients in Japan. *Jpn J Antibiot* 53: 3~12, 2000
- 17) 尾内一信, 古村 速, 藤井美香代, 他: 小児科領域における *Chlamydia pneumoniae* 感染症と *Mycoplasma pneumoniae* 感染症. 感染症誌 73: 1177~1182, 1999
- 18) Stopler T, Branski D: Resistance of *Mycoplasma pneumoniae* to macrolides, lincomycin and streptomycin B. *J Antimicrob Chemother* 18: 359~364, 1986
- 19) Lucier T S, Heitzman K, Liu S K, et al.: Transition mutations in the 23 S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 39: 2770~2773, 1995

## New PCR for rapid identification of *Mycoplasma pneumoniae* in clinical specimens from children with respiratory tract infections

Miyuki Morozumi<sup>1)</sup>, Satoshi Iwata<sup>2)</sup>, Hiroko Endo<sup>3)</sup>, Tomohiro Oishi<sup>4)</sup>,  
Shigeru Ohnari<sup>5)</sup>, Naohisa Kawamura<sup>6)14)</sup>, Haruo Kuroki<sup>7)</sup>, Masaaki Kobayashi<sup>8)</sup>,  
Kouta Saito<sup>9)</sup>, Ritsuko Sakai<sup>10)</sup>, Keisuke Sunakawa<sup>11)</sup>, Takeshi Tajima<sup>12)</sup>,  
Masahiko Nitta<sup>13)14)</sup>, Masato Nonoyama<sup>11)</sup>, Reiko Kobayashi<sup>15)</sup>,  
Naoko Chiba<sup>1)</sup> and Kimiko Ubukata<sup>16)</sup>

<sup>1)</sup>Graduate School of Infection Control Sciences, Kitasato University, 5-9-1 Shirogane, Minato-ku, Tokyo, Japan

<sup>2)</sup>National Tokyo Medical Center

<sup>3)</sup>Tohoku Rosai Hospital

<sup>4)</sup>Department of Pediatrics, Joetsu General Hospital

<sup>5)</sup>Nakafukawa Pediatric Clinic

<sup>6)</sup>Osaka Rosai Hospital

<sup>7)</sup>Department of Pediatrics, Nagatsu-kai Saitoh Hospital

<sup>8)</sup>Kobayashi Pediatric Clinic

<sup>9)</sup>Saito Pediatric Clinic

<sup>10)</sup>Sakai Clinic

<sup>11)</sup>Department of Infectious Diseases, Kitasato University School of Medicine

<sup>12)</sup>Hakujikai Memorial Hospital

<sup>13)</sup>Department of Pediatrics, Seikeikai Hospital

<sup>14)</sup>Department of Pediatrics, Osaka Medical College

<sup>15)</sup>Pharmaceutical Research Center, Meiji Seika Kaisha, Ltd.

<sup>16)</sup>Laboratory of Infectious Agents Surveillance, Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University

We designed a set of primers on the 16 S rRNA gene to directly detect *Mycoplasma pneumoniae* by PCR in clinical specimens from patients with respiratory infections. The sensitivity of the primers was 2 CFU/tube under the following conditions: 35 cycles of 15 sec at 94°C, 15 sec at 53°C and 15 sec at 72°C/cycle. We therefore judged the PCR results to be positive if the CFU for *M. pneumoniae* in a clinical specimen was  $1.1 \times 10^3$ . The results of the PCR were obtained in about 2.5 h. We then used the PCR to examine 783 clinical specimens (epipharynx [n = 612], throat [n = 141], ear discharge [n = 12] etc.) collected from pediatric patients between May 2002 and January 2003. The PCR results were positive in 79 cases (10.1%); 58/291 cases (19.9%) corresponded to specimens from patients with pneumonia, 13/207 cases (6.3%) to specimens from patients with acute bronchitis, 2/130 cases (1.5%) to those from patients with acute pharyngitis and 2/45 cases (4.4%) to those from patients with acute upper respiratory infections. The percentage of PCR-positive cases was significantly higher among the patients with lower part respiratory tract infections ( $\chi^2 = 53.3008$ ,  $p = 0.0000$ ). Among the patients with pneumonia, 65 were diagnosed with *M. pneumoniae* based on a significant rise or high antibody titer for *M. pneumoniae* as determined by the PA or CF test, and 46 of these cases were PCR-positive (70.8%). We also investigated the correlation between the antibiotics used before PCR and the PCR results in these 65 cases. Of the total of 43 cases, 21 not treated with antibiotics before PCR and 22 cases given oral  $\beta$ -lactam agents ineffective against *M. pneumoniae*, 38 (88.4%) were PCR-positive, whereas only 3 (23.1%) of the specimens from 13 patients treated with macrolides or new quinolones effective against *M. pneumoniae* were PCR-positive. We concluded from these results, that the PCR is very useful in selecting suitable chemotherapeutic agents for patients not treated with antibiotics, however it may be necessary to consider the influence of days after to develop infection on PCR results.