

[原 著]

Mycoplasma 感染症診断における LAMP 法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* DNA 検出の有用性と従来法（培養法・血清学的検査法）の比較検討

杵渕貴洋¹⁾・加野大樹¹⁾・角谷不二雄²⁾・田中亮介²⁾・藤保洋明²⁾

¹⁾ 社会福祉法人北海道社会事業協会富良野病院臨床検査科

²⁾ 社会福祉法人北海道社会事業協会富良野病院小児科

（平成 25 年 1 月 8 日受付，平成 25 年 4 月 3 日受理）

マイコプラズマ感染症診断における loop-mediated isothermal amplification 法（LAMP 法）の有用性について，培養法，PCR 法，及び血清学的検査法の成績を加え検討した。また，LAMP 法陽性検体では，macrolide 系抗菌薬の耐性についても検索した。検討症例数はマイコプラズマ感染症を疑った小児 167 症例である。検体は LAMP 法及び培養法に咽頭粘液を用い，血清学的検査法では enzyme immunoassay（EIA 法）と particle agglutination test（PA 法）の 2 法を用いた。LAMP 法では，19 症例（11.4%）が陽性となり LAMP 法陽性検体では培養法も全て陽性となった（一致率 100%）。また，PCR 法との比較では 1 例で PCR 法陰性となった（一致率 94.7%）。LAMP 法陽性例では，EIA 法陽性は 7 例（36.8%）であり，シングル血清を用いた PA 法で 6 症例（31.6%）が陽性，ペア血清が採取可能であった 14 症例の PA 法では全症例（100%）が陽性となった。なお，LAMP 法陰性例では，培養法も全て陰性であった。また，LAMP 法陽性検体を用いた macrolide 系抗菌薬耐性 *Mycoplasma pneumoniae* の検出成績は，89.5% の耐性であった。1 症例で，LAMP 法陰性，ペア血清を用いた PA 法で血清抗体価が上昇した症例が存在したが，第 6 病日目に再検査した結果，LAMP 法が陽性となった。本症例は，初診時に咳嗽を認めなかったことが LAMP 法陰性となった原因の 1 つと考えられた。以上の成績より，LAMP 法の信頼度評価は，感度 95%，特異度 100%，偽陽性率 0%，偽陰性率 5% であり，マイコプラズマ感染症診断における LAMP 法は非常に有用性の高い検査法であると言える。

Key words: LAMP 法，*Mycoplasma pneumoniae*，マイコプラズマ肺炎，マイコプラズマ IgM 抗体

序 文

マイコプラズマ感染症における臨床検査では，血清学的検査法が今なお主流であり多くの医療機関で用いられている。血清学的検査法は，IgM 抗体を検出する enzyme immunoassay（EIA 法）と particle aggluti-

nation test（PA 法）の 2 法がその中心となっている。しかし，IgM 抗体の上昇しない例が存在するとの報告もある¹⁾。EIA 法では検査のタイミングによって感度や特異度が低下し，PA 法においては，判断にペア血清が必要なことで確定診断までに時間を要するなど，血清学的検査法には問題がある。また，感染症診断における Gold standard は培養法であるが，培養法は手間がかかり，最長約 1 カ月程度の培養期間を必要とするためほとんど実施されていない検査法である。さらに，遺伝子診断法として PCR 法が実用化されているが，保険収載されていないため一般的な医療機関では実施されていない。マイコプラズマ感染症は肺炎を主とする急性の下気道感染症であり，小児のみなら

著者連絡先：（〒076-8765）北海道富良野市住吉町 1 番 30 号

社会福祉法人北海道社会事業協会富良野病院
臨床検査科

杵渕貴洋

TEL: 0167-23-2181

FAX: 0167-39-1077

E-mail: fk-saikin@apost.plala.or.jp

ず成人までもが発症する市中感染症である。ときに重症化する疾患であり、横断性脊髄炎や心膜炎等といった肺外合併症の発生があることなどから²³⁾、感染初期における確定診断の必要性が求められる。そこで今回、血清学的検査法や培養法の問題点を解決すべく、感度、特異度及び迅速性の向上を目的とし、2011年10月に保険収載された遺伝子診断法、loop-mediated isothermal amplification法(LAMP法)を用いて *Mycoplasma pneumoniae* DNAを検出し、診断の有用性について検討した。また、LAMP法陽性検体については、近年増加傾向を示している macrolide 系抗菌薬に耐性の *M. pneumoniae* についても検索し、さらに従来からの遺伝子診断法であるPCR法との比較も行った。

材料と方法

1. 対象

2012年3月12日から9月4日までに、当院小児科を受診しマイコプラズマ感染症が疑われた小児167症例。

2. 材料

LAMP法及び培養法では咽頭粘液、血清学的検査法(EIA法及びPA法)には初診時の採血を被検体としたが、PA法においては可能な限りペア血清を採取した。

3. 方法

(1) PPLO液体培地の作成

国立感染症研究所肺炎マイコプラズマ検査マニュアル⁴⁾に準じ、ブドウ糖添加Hayflick変法液体培地(PPLO液体培地)を作成した。培地組成は、PPLO Broth (BD)、ブドウ糖(ハウスウェルネスフーズ)、フェノールレッド(和光純薬工業)、ウマ血清(日本バイオテスト)、新鮮酵母エキス(オリエンタル酵母工業)、penicillinG (Meiji Seika ファルマ:PCG)、酢酸タリウム(和光純薬工業)、及び蒸留水である。なお、PPLO液体培地の作成において、雑菌発育の抑制を目的としてPCGを300万単位に増量した。作成したPPLO液体培地は、1本あたり3mlづつ滅菌チューブに分注し、マイナス40℃で凍結保存した。なお、LAMP法、培養法では1本のPPLO液体培地で両検査を実施した。

(2) LAMP法

PPLO液体培地3ml中にスワブにて採取した咽頭粘液検体成分を絞り出し、菌液1mlをQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN)を用いてDNA抽出精製を行った。その後、95℃5分間加熱処理後急冷した。さらに、

マイコプラズマP検出試薬キット(栄研化学)にてマスターミックスを調整し、検体と混合、反応をリアルタイム濁度測定装置LoopampEXIA(栄研化学)を使用し、*M. pneumoniae* DNAの増幅および検出を行った。増幅条件は、65℃60分とした。

(3) 培養法

LAMP法に使用後のPPLO液体培地1mlを35℃、最長30日間まで培養した。培地色に変化があったものに関しては、PPLO液体培地から培地成分を採取しマイコプラズマPPLO寒天培地(日研生物医学研究所)に接種、発育した集落の形状を確認した。

(4) PCR法

他の遺伝子診断法であるPCR法との比較を行うため、LAMP法にて陽性となった検体については、(株)SRLにおいてPCR法を実施した。検体は、最終的に残ったPPLO液体培地1mlを使用し、Taq DNA polymeraseによるDNA増幅法を実施した。測定法に関しては、Jensen JSらの方法⁵⁾に準じた。

(5) 血清学的検査法

EIA法ではイムノカードマイコプラズマ抗体(TFB)、PA法ではセロディア-MYCO II(富士レビオ)を使用し、添付文書に従い実施、判定した。EIA法では初診時の採血を使用し、PA法では可能な限りペア血清を採取したが、外来患者では採取率が低い傾向であった。入院患者では退院時期の問題もあり、ペア血清採取の時期を一律に定めることが出来なかったが、ほとんどの症例で2回以上の採血が可能であった。なお、ペア血清採取が可能であった症例数は45症例である。PA法のカットオフ値は、シングル血清で320倍以上、ペア血清では初診時と比較しての抗体陽転、もしくは有意な抗体価上昇を陽性と設定した。

さらに、確定診断までの時間を比較するため、LAMP法導入前1年間(2011年3月12日~2012年3月11日)にペア血清を用いたPA法にて診断されたマイコプラズマ感染症37症例の確定診断所要日数について調査した。

(6) macrolide系抗菌薬耐性 *M. pneumoniae* の検出

近年増加傾向にある macrolide 系抗菌薬に耐性の *M. pneumoniae* の把握を行うため、培養法で使用したPPLO液体培地500µlを用いて、*M. pneumoniae* の macrolide 系抗菌薬耐性に関与する23SrRNAドメインVの、2063、2064、2617位点変異を川崎医科大学小児科学講座にて検索した。これらの検索は、Lucier, T. S.ら⁶⁾及び、Matsuoka, M.ら⁷⁾の方法によりダイレクトシーケンス法を用いた。なお、DNAの調整は

Table 1. Comparison of the LAMP test results and the PA test results

LAMP method result	PA method result					
	paired serum			acute-stage single serum		
	+	-	total	+	-	total
+	14	0	14 (31.1%)	6	13	19 (11.4%)
-	1	30	31 (68.9%)	10	138	148 (88.6%)
total	15 (33.3%)	30 (66.7%)	45	16 (9.6%)	151 (90.4%)	167

The PA test results using paired serum samples showed better accordance with the LAMP test results when compared with those using acute stage single serum samples.

QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いた。

結 果

1. LAMP 法と比較した培養法及び PCR 法の検査成績

咽頭粘液 167 検体中 19 検体で培養法が陽性となり (陽性率 11.4%)、それらは LAMP 法においても同様であった。よって、培養法と LAMP 法の一致率は 100% であった。なお、LAMP 法陰性例では、培養開始から数日で PPLO 液体培地が混濁黄変したものを 30 例程度認めたが、培養液を用いて LAMP 法を施行し全て陰性を確認した。また、培養法陰性の 148 検体は LAMP 法でも全て陰性となった。LAMP 法陽性となった患者の年齢分布は、1 歳 1 カ月から 17 歳 1 カ月であり 0 歳児の症例は認めなかった。PCR 法との比較では、LAMP 法陽性の 19 検体中、18 検体で PCR 法陽性となり 1 検体で PCR 法陰性という結果が得られた。遺伝子診断法としての一致率は 94.7% であった。

2. LAMP 法と血清学的検査法の検査成績

LAMP 法が陽性となった 19 症例の血清学的検査法の成績は、EIA 法では 7 症例で陽性となり (陽性率 36.8%)、PA 法では、急性期のシングル血清では 6 症例 (陽性率 31.6%)、ペア血清では 5 症例で追加採血がなかったため 14 症例で検討した結果、全ての症例で抗体価上昇を認めた (陽性率 100%)。LAMP 法陰性の 148 症例では、EIA 法陽性となった症例は 38 症例あり (陽性率 25.7%)、急性期シングル血清では 10 症例 (陽性率 6.8%)、ペア血清では 1 症例 (陽性率 2.2%) で抗体価上昇を認めた (Table 1)。なお、LAMP 法が陰性であった 1 症例では、8 カ月前の感染によって EIA 法が陽性となり、シングル血清を用いた PA 法でも 160 倍という抗体価高値を認める症例が存在した。

3. macrolide 系抗菌薬耐性 *M. pneumoniae* の検出成績

LAMP 法が陽性となった 19 検体の macrolide 系抗菌薬の耐性を検索した結果、17 症例で遺伝子変異を認めた。その変異は全て、ドメイン V の 2063 番目の adenine が guanine へと変異していた (A2063G)。他の 2 症例では、1 症例で変異なし、もう 1 症例では 2063 番目と 2064 番目で変異は認めなかったものの、2617 番目の配列が読めなかったため、macrolide 系抗菌薬の耐性と判定することができなかった。

4. LAMP 法の信頼度評価

LAMP 法の信頼度評価は、検討した 167 症例を用いて行った。疾患あり (マイコプラズマ感染症あり) と判定したのは初診時に LAMP 法及び培養法が陽性であった 19 症例と、初診時に LAMP 法及び培養法が陰性であり、第 6 病日の LAMP 法及び培養法が陽性となった 1 症例 (Fig. 1) を加えた 20 症例である (Table 2)。

なお、上記 1 症例は、患者の主訴として 38℃ 台の発熱のみであり咳嗽は認めず同時期に家族内において肺炎や咳嗽が継続している状態が散見されており、このような家族内状態であったことから、早期の受診により各種検査が施行され、胸部 XP にて肺炎所見を認め入院となった症例である。初診時の各種検査が陰性であったため、マイコプラズマ感染を疑う所見は得られなかったが、第 3 病日より咳嗽が出現し第 6 病日に再度 LAMP 法を施行したところ陽性と判定された。さらに第 8 病日の PA 法では 640 倍という抗体価上昇を確認したことで、最終的にマイコプラズマ肺炎と確定された。

以上より、マイコプラズマ感染症における LAMP 法の感度は 95%、特異度 100%、偽陽性率 0%、偽陰性率 5%、陽性予測値 100%、陰性予測値 99.3%、陽性尤度比無限大 ($p > 10$)、陰性尤度比 0.05 ($p < 0.1$) となった。なお、検討期間中の有病率は 12% であっ

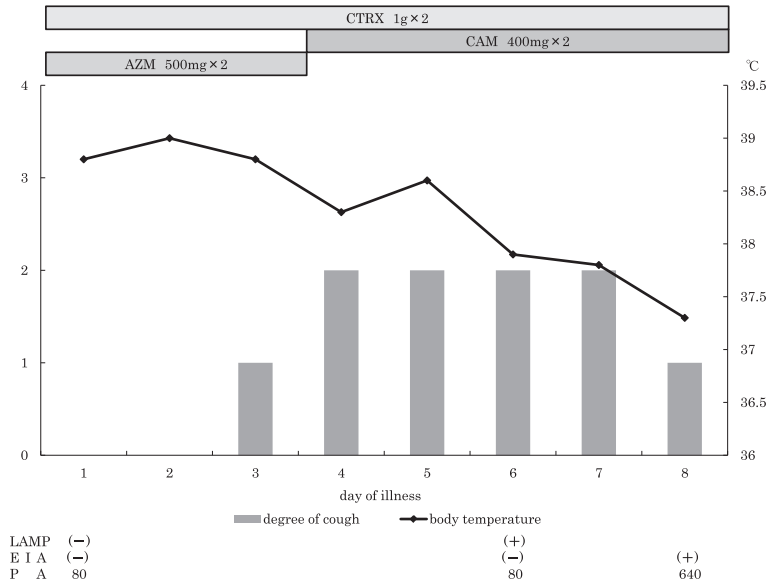


Fig. 1. Clinical course of one case in which the LAMP test result was initially negative and turned to be positive later. Cough appeared from the 3rd day of illness and the LAMP test result which was negative at day 1 turned to be positive at day 6.

CTRX: ceftriaxone, AZM: azithromycin, CAM: clarithromycin

Table 2. Details of 20 cases with *Mycoplasma pneumoniae* infection

case	sex	age	LAMP	EIA	PA (1st)	PA (2nd)	PA (3rd)	cough	BT	diagnosis	antimicrobial
A	female	6	(+)	(-)	40	320 (day5)	none	○	38.2	pneumonia	CAM
B	male	7	(+)	(-)	40<	40< (day3)	320 (day7)	○	39.2	pneumonia, pleurisy	TFLX, CTRX
C	male	17	(+)	(-)	40<	40 (day3)	none	○	39.5	pneumonia	MINO
D	female	6	(+)	(-)	40<	160 (day5)	none	○	38.7	pneumonia	CAM, CTX
E	female	7	(+)	(-)	40<	2560 (day9)	none	○	39.1	pneumonia	CAM
F	male	16	(+)	(-)	40<	40< (day5)	160 (day9)	○	38.6	pneumonia	AZM, MINO
G	female	13	(-)	(-)	80	80 (day5)	640 (day8)	×	38.8	pneumonia	CAM, CTRX
H	female	16	(+)	(+)	80	320 (day8)	none	○	37	bronchitis	AZM
I	male	14	(+)	(-)	40<	40< (day3)	160 (day6)	○	37.1	pneumonia	AZM, MINO
J	female	1	(+)	(+)	5120	none	none	○	36.8	pneumonia	AZM
K	female	2	(+)	(+)	5120	none	none	○	none	pneumonia	TFLX
L	female	10	(+)	(+)	160	5120 (day5)	none	○	38.5	pneumonia	AZM, CTRX
M	male	15	(+)	(-)	320	640 (day6)	none	○	37.2	pneumonia	MINO
N	female	16	(+)	(-)	160	320 (day5)	none	○	37	pneumonia	MINO
O	male	9	(+)	(-)	160	320 (day4)	5120 (day8)	○	37.1	pneumonia, pleurisy	TFLX
P	female	4	(+)	(-)	40	80 (day4)	none	○	37.4	pneumonia	CAM, CTRX
Q	female	3	(+)	(+)	2560	none	none	○	36.2	pneumonia	CAM
R	male	12	(+)	(+)	320	none	none	○	37.9	bronchitis	AZM
S	male	10	(+)	(+)	160	1280 (day4)	10240≥ (day9)	○	37.2	pneumonia	TFLX
T	male	12	(+)	(-)	1280	none	none	○	37	pneumonia	CAM

This includes 19 cases in which the initial LAMP test results were positive and one case in which the initial result was negative (Case G, presented in Fig. 1).

CTRX: ceftriaxone, CTX: cefotaxime, AZM: azithromycin, CAM: clarithromycin, MINO: minocycline, TFLX: tosufloxacin

Table 3. The necessary days of a *Mycoplasma* infection definitive diagnosis using the paired serum by the PA method. (From March 12, 2011 to March 11, 2012)

case	sex	age	PA (1st)	PA (2nd)	PA (3rd)	positive-conversion days
1	female	9	<40	160	none	4
2	female	8	<40	1280	≥ 20480	5
3	male	8	<40	1280	≥ 20480	4
4	female	8	<40	1280	none	5
5	female	7	<40	<40	1280	9
6	male	7	<40	320	none	4
7	female	6	<40	160	640	4
8	female	6	2560	10240	none	3
9	female	6	<40	<40	640	7
10	male	6	80	320	2560	3
11	female	6	<40	160	none	5
12	male	5	40	160	none	4
13	male	5	<40	2560	none	5
14	female	5	320	1280	none	5
15	female	4	160	1280	none	4
16	male	4	40	160	none	4
17	male	4	<40	1280	none	6
18	female	5	<40	160	none	5
19	female	4	640	2560	none	5
20	female	3	<40	<40	1280	8
21	male	3	160	5120	none	6
22	female	2	640	5120	none	6
23	female	2	<40	640	1280	5
24	female	3	<40	320	none	5
25	female	2	320	1280	none	4
26	female	1	160	5120	none	4
27	female	4	80	640	none	4
28	male	1	40	640	none	5
29	male	4	2560	10240	none	6
30	female	8	160	1280	none	5
31	male	1	80	640	none	5
32	male	0	1280	2560	none	6
33	female	2	80	160	none	5
34	male	2	640	2560	none	18
35	male	6	<40	320	1280	4
36	female	15	<40	640	none	5
37	female	7	<40	320	none	4
mean positive-conversion days						5.3

The definitive diagnosis of the *Mycoplasma* infection using a paired serum took an average of 5.3 days.

た。

5. LAMP 法導入前後の確定診断所要日数

LAMP 法導入前後の確定診断所要日数は、LAMP 法導入前のペア血清を用いた PA 法による診断法で

は、平均 5.3 日を要していた (Table 3)。LAMP 法導入後は、LAMP 法陽性と判定された全ての症例において初診時に確定診断がされていた。

考 察

従来から指摘されている血清学的検査法の感度、特異度の問題や、時間的問題を抱える培養法、また、培養法と同様に優れた感度ではあるが、保険収載されておらず一般的な医療機関で実施することが困難なPCR法など、マイコプラズマ感染症診断における臨床検査には多くの課題が残されていた。今や年間を通して流行をきたすマイコプラズマ感染症は、肺炎や気管支炎といった下気道感染を引き起こし、小児のみならず成人及び高齢者までが罹患する市中感染症である。しかし、上記に示したような多くの課題が原因で誤った診断が行われていることも報告されており⁸⁾、感度、特異度、迅速性及び経済性などの問題点解決が望まれていた。2011年10月に新規遺伝子診断法であるLAMP法が保険収載され、*M. pneumoniae* DNA検出が一般的な医療機関で実施可能となった。そこで、我々は従来からの問題がどの程度解決でき、臨床に有用であるかを検討した。

培養法との比較では、LAMP法と100%の一致を示し非常に良い成績を収めた。PPLO液体培地の作成時には、雑菌発育抑制の目的でPCGが添加されるが、今回は培地作成のマニュアルに記載された3倍量のPCGを添加したにも関わらず雑菌が発育した。全てのケースで雑菌の菌種同定を実施してはいないが、口腔内常在菌が検出された例も存在した。国立感染症研究所の肺炎マイコプラズマ検査マニュアルには、終濃度が50 µg/mlとなるようにampicillin (ABPC)を添加することも可としているので、抗菌スペクトラムを考慮しABPCに置き換えることで雑菌発育抑制が增强するのではないかと考える。

また、PCR法との比較では、全検体を比較してはいないので一概に評価することはできないが、LAMP法陽性となった検体に関しては1検体でPCR法陰性を認めた。PCR法の測定は、LAMP法が陽性となった19検体目が収集されるまで検体成分を抽出したPPLO液体培地をマイナス30℃で検体保存を行い、後日PCR法を実施した。同一検体を用いて実施したが、検体保存条件、DNA抽出精製、または増幅のどの要素で陰性となったのかは今回の検討で明確にならなかった。しかしながら、PCR法陰性症例は、培養法陽性でありベア血清を用いたPA法でも有意な抗体価上昇を認めており明らかな偽陰性と言える。1検体でPCR法偽陰性症例が存在したが、遺伝子診断法としての一致率も高いことから(94.7%)評価することができる。

次に、血清学的検査法との比較では急性期の血清を

用いてEIA法を実施したが、従来から指摘されている感度及び特異度の問題が明らかとなった。EIA法の特徴としては、IgM抗体を検出するが感染初期では十分に抗体産生がされず結果的に検出出来ないこと、また、感染の既往でも1年間程度は血中に残存することが指摘されている⁹⁾ため、迅速検査の1つとして汎用されているが結果の解釈には十分に留意する必要がある検査法と言える。実際、検討した症例の中でも、過去の感染で陽性となったと思われるLAMP法陰性、EIA法陽性という症例を26症例認めた。よって、EIA法では偽陽性や偽陰性が多くの割合で発生することを認識しておく必要がある。

PA法との評価では、LAMP法が陽性で急性期シングル血清で320倍以上の血清抗体価を示した症例が6症例のみであった。これらの症例は、長引く咳嗽や発熱が改善されず発症数日から1週間程度経過した後に受診した症例であり、時間経過とともに抗体価が上昇したことが示唆される。言い換えると、発症間もなく受診した症例では、初診時のPA法はカットオフ値よりも低値であり、今回の検討の中でも、LAMP法陽性群で13症例(68.4%)がPA法陰性と判定された。よって、既往との判別が可能なベア血清を用いて判断することの重要性が明らかとなった。なお、抗体価の変動では、LAMP法陽性となった2症例(caseC及びcaseP)では、1管差の抗体価変動ではあったが2回目の採血までの間隔が短かったこともあり、十分に抗体価が上昇するに至らなかったと考える。本症例では追加で抗体価検査が実施されなかったが、このような事例の場合は、可能な限り再検査を実施し4倍以上の上昇を確認することが望まれる。

また、1症例で初診時のLAMP法が陰性であり、ベア血清を用いたPA法で有意な抗体価上昇を認めた症例が存在したが、LAMP法が陽性であった症例では全て咳嗽を認めており、本症例では唯一咳嗽がない状態で検査を施行した症例である。マイコプラズマの感染様式は、飛沫感染が主であり体内に*M. pneumoniae*が侵入すると上皮細胞表面で増殖を開始し上皮細胞を破壊する。臨床症状としては初発症状出現後3~5日より咳嗽が始まることが多く、本症例と一致する経過である。本症例の初診時にLAMP法が陰性となったことに関しては、検体に咽頭粘液を用いていることで咳嗽により下気道から*M. pneumoniae*が咽頭へ排出されず検出できなかったことが原因の1つとして考えられた。第6病日の検体ではすでに咳嗽がピークを迎えており、十分量の*M. pneumoniae*が咽頭へ排出されていたためLAMP法で検出可能であったと

考える。以上より、LAMP 法は非常に感度、特異度に優れる検査法であるが、本症例を経験したことで、咽頭粘液を検体とする場合、咳嗽の有無は検出に少なからず影響するものと考えられた。本症例のように、発症後間もなく受診される患者も存在するので、その後の臨床経過から再検査することも考慮する必要がある。

次に、*M. pneumoniae* の macrolide 系抗菌薬耐性の検索であるが、当院は富良野 2 次医療圏のセンター病院であり、他院での macrolide 系抗菌薬治療に無効なことで紹介される患者も存在する。よって、バイアスが生じている可能性も考えられるが、結果的には 17 症例 (89.5%) で耐性を認め、その全てが国内で最も多く報告されている¹⁰⁾ A2063G であった。一般的に、*M. pneumoniae* による感染症は、macrolide 系抗菌薬が第一選択薬となっているが、耐性化により遅延化し合併症等を生じ重篤化する症例も存在する。よって、macrolide 系抗菌薬の耐性調査は、可能な限り実施することが必要ではないかと考える。

最後に、LAMP 法の信頼度評価であるが、初診時に咳嗽を認めなかった 1 症例を含めても感度、特異度ともに良好であり、現在のマイコプラズマ感染症診断の弱点をカバーできる検査法と言える。また、LAMP 法導入前の PA 法を用いた確定診断では、平均 5.3 日を要していたが、LAMP 法導入後では初診時における早期確定診断が可能となった。なお、LAMP 法を導入するにあたり、施設内に微生物検査室が設置されている場合、設備的問題はないため導入が比較的可能である。また、時間的メリットとして、約 2 時間という短時間で DNA の抽出精製、増幅までを行えることから、従来の遺伝子検査法と比較し検査室側の負担軽減に繋がる。その結果、臨床の側面からも非細菌性の重症肺炎や、外来診療における抗菌薬療法にも適切及び迅速に対応することが可能であり、しいては使用頻度の高い β ラクタム系抗菌薬に無効な *M. pneumoniae* に対する抗菌薬選択の一助となると考える。

結 語

LAMP 法は、これまでのマイコプラズマ感染症診療に対する臨床検査の諸問題をクリアにすることができ、結果、過剰に処方されてきたであろう macrolide 系抗菌薬の適正使用にも貢献できるものと考えられる。PCR 法のような煩雑な操作を必要とせず一般的な医療機関でも導入可能であり、市中感染症であるマイコプラズマ感染症の早期診断に対するひとつのツールとなる。

謝辞：本検討において、macrolide 系抗菌薬耐性 *M. pneumoniae* の検出にご助力賜りました。川崎医科大学小児科学講座の尾内一信先生、藤岡恵子先生に深謝致します。

利益相反：申告すべき利益相反なし

文 献

- 1) Sillis, M. 1990. The limitations of IgM assays in the serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Med Microbiol* 33: 253-258.
- 2) 西屋克己, 平 康二, 黒木茂一. 2001. マイコプラズマ感染症に関連した二次性髄膜脳炎の 1 例. *感染症誌* 75: 209-212.
- 3) Waites, K.B., Y Rikihisa, D Taylor-Robinson. 2003. *Mycoplasma* and *Ureaplasma*. p. 972-990. In: manual of clinical microbiology, 8th ed (P.R. Murray, E.J. Baron, M.A. Pfaller, et al ed.), American Society for Microbiology, Washington, D.C.
- 4) 大屋日登美, 堀野敦子, 見理 剛, 他. 2011. 国立感染症研究所肺炎マイコプラズマ検査マニュアル.
- 5) Jensen, JS, J Søndergård-Andersen, SA Uldum, et al. 1989. Detection of *Mycoplasma pneumoniae* in simulated clinical samples by polymerase chain reaction. *APMIS* 97: 1046-1048.
- 6) Lucier, T. S., K Heitzman, S.K. Liu, et al. 1995. Transition mutations in the 23S rRNA of erythromycin-resistant isolates of *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 2770-2773.
- 7) Matsuoka, M., M. Narita, N. Okazaki, et al. 2004. Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48: 4624-4630.
- 8) 成田光生. 2007. マイコプラズマ感染症診断における IgM 抗体迅速検出法の有用性と限界. *感染症誌* 81: 149-154.
- 9) van Griethuysen, AJ, R de Graaf, JA van Druten, et al. 1984. Use of the enzyme-linked immunosorbent assay for the early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol* 3: 116-121.
- 10) 小池千裕, 中村竜也, 乾佐知子, 他. 2011. Real-time PCR 法による *Mycoplasma pneumoniae* の検出とそのマクロライド耐性化について. *感染症誌* 85: 652-657.

The usefulness of the LAMP method for diagnosing *Mycoplasma* infection

Takahiro Kinebuchi¹⁾, Hiroki Kano¹⁾, Fujio Kakuya²⁾, Ryouzuke Tanaka²⁾, Hiroaki Fujiyasu²⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Social Welfare Corporation Hokkaido Social Work Association
Furano Hospital

²⁾Department of Pediatrics, Social Welfare Corporation Hokkaido Social Work Association Furano Hospital

In this paper, the usefulness of the loop-mediated isothermal amplification (LAMP) method for diagnosing *Mycoplasma* infection is examined. For this, a culture method, polymerase chain reaction (PCR), a serological-test, and macrolide antimicrobial resistance were used. In this study, 167 cases were analyzed in which a *Mycoplasma* infection was suspected. Pharyngeal specimens were used for the LAMP and the culture methods. For the serological-test, enzyme immunoassay (EIA) and particle agglutination (PA) were used. The LAMP method exhibited a sensitivity of 11.4% and the culture method and the consistent became a negative in the PCR method in one case. With regard to LAMP method positivity, 36.8% became EIA positive and 31.6% became positive by single-serum PA. Using PA, all 14 cases that were possible for paired-serum extraction were positive. Moreover, the resistance of the macrolide was 89.5%. Reliability evaluations of the LAMP method showed it has 95% sensitivity and 100% specificity, thus it has a high usefulness in diagnosing *Mycoplasma* infection.