

[総 説]

マイコプラズマ肺炎の細菌学的診断法

佐々木次雄

国立感染症研究所細菌第二部

(平成15年6月2日受付)

*Mycoplasma pneumoniae*により起こる疾患は、主に気管支炎と肺炎である。原発性異型肺炎の約30～40%が*M. pneumoniae*によるマイコプラズマ肺炎であり、クラミジア肺炎とともに高い割合を占めている。マイコプラズマ肺炎は若年齢層に多いが、すべての年齢層に発生する。一年中発生が見られるが、秋冬期に多い傾向があり、家族内や学校での集団発生がしばしば見られる。以前は4年ごとに周期的な大流行が見られたが現在は見られなくなっている。主な症状は、発熱、長く続く咳、その他の感冒様症状であり、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。潜伏期間は1～3週間程度である。マイコプラズマ肺炎は他の細菌性肺炎に比べて臨床症状は比較的軽いとされるが、様々な合併症があり、まれに重篤な症状に陥ることがある。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り、中枢神経系合併症を併発した場合は重症化することもある。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もある。

本稿は、*M. pneumoniae* 感染症の実験室診断法について、病原体分離法、抗原検出法、抗体検出法に関する一般的な方法を示す¹⁾。

Key words: マイコプラズマ肺炎, 異型肺炎, *Mycoplasma pneumoniae*, 実験室診断法

I. 検査材料の採取

Mycoplasma pneumoniae 感染症の実験室診断には、主に以下の臨床材料を用いる。

- 1) 病原体分離: 主に咽頭スワブであるが、髄液、胸水、細胞組織などから病原体分離を試みることもある。
- 2) 抗原検出: 主に咽頭スワブであるが、髄液、胸水、場合によっては血液などから抗原検出を試みることもある。
- 3) 抗体検出: 主として血清、場合によっては、髄液、胸水である。

II. 検査方法

1. 病原体の分離培養法

種々の培地が提案されているが、最も一般的な培地を示す。

注意: 咽頭から *M. pneumoniae* を分離する場合には、以下の点に注意すること。

ア) 患者の咽頭粘膜細胞に *M. pneumoniae* が付着しているので、滅菌綿棒で咽頭の後壁を力強くこすりとり、採取日に分離培養を開始すること。

イ) 採取日に分離培養ができない場合には、適当な輸送用培地に入れ、-60℃以下に保存する。

輸送培地組成

PPLO Broth w/o CV (Difco 255420)	2.1 g
グリセロール	5 ml
水	45 ml

高圧蒸気滅菌後、約5～10 ml用細胞凍結用チューブに、約3 mlずつ分注する。

著者連絡先: (〒208-0011) 東京都武蔵村山市学園4-7-1
国立感染症研究所細菌第二部 佐々木次雄
TEL 042-561-0771 FAX 042-565-3315
E-mail: sasaki@nih.go.jp

1) Hayflick 変法培地, 液体
PPLO Broth w/o CV (Difco 255420) 21 g
ブドウ糖 5g (0.5%)
0.4%フェノールレッド液 5ml (0.002%)

精製水	750 ml
高圧蒸気滅菌後、無菌的に以下のものを加える。	
ウマ血清 (55℃で30分間加熱済)	150ml (15%)
25% 新鮮酵母エキス	100ml (10%)
ペニシリンG	50万単位
2.5%酢酸タリウム	10 ml

フタが密閉できるガラス容器に約3 mlずつ無菌的に分注し、凍結保存する。

2) 寒天平板培地

PPLO Broth w/o CVの代わりにPPLO Agar (Difco 241210) を35g加える。高圧蒸気滅菌を行い、約50℃に冷やす。他の成分を加えた後、シャーレに流す。ビニール袋に入れて4℃で保存すると2~3週間は使用できる。

3) メチレンブルー含有二層培地

臨床検体からの*M. pneumoniae*分離には、メチレンブルーを含む選択培地を用いる。液体培地あるいは寒天培地、両方の添加成分として、上記培地成分の他に、メチレンブルー0.001%を加える。小試験管に、本寒天培地1 mlを入れて斜面に固めた後、液体培地2 ml

培地添加物1: 新鮮酵母エキスの調製法

*M. pneumoniae*分離株は、市販の酵母エキス粉末未添加培地中でも増殖可能であるが、臨床検体から*M. pneumoniae*を分離する場合には、新鮮酵母エキスを用いた方が分離率は向上する。そのため、煩雑ではあるが、新鮮酵母エキスを調製する必要がある。

用意するもの

滅菌フラスコ 2 L用	1個
3 Lフラスコに1.5 L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, 500 g	1缶
(日本甜菜糖株式会社, Nippon Beet Sugar MFG. Co. Ltd)	
3N NaOH	
分注用, 滅菌済容器	
(細胞培養用25cm ² フラスコや, 50mlチューブ等でよい)	
滅菌済遠心チューブ (15,000 xgに耐えるもの)	
大容量高速遠心機 (15,000 xg以上で回転可能な機種)	
鍋 + コンロ	

コンロ上の鍋で湯を沸騰させ、1.5 L蒸留水入りフラスコを湯煎し、充分に加熱する。Nitten Dry Yeast 500 gを1.5 L蒸留水に攪拌しながら加える。熱湯水中で約30分間、熱水抽出を行う。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。以下の作業は、無菌的に行う。1.5 Lの抽出液を滅菌した遠心チューブに分け、約15,000 x gで20分間、冷却遠心する。上清を再度、新しい遠心チューブに入れ、同じ条件で遠心し、その上清を新しい滅菌フラスコに集める。NaOHでpHを7.0~7.2に調整し、ペニシリンを加え、小分けの上凍結保存する。保存前に一部について無菌試験を行い、汚染が認められなければそのまま使える。本法での調製法に汚染の心配がある場合には、ろ過滅菌する。ろ過滅菌を行う場合は、目詰まりを防ぐため、孔径の大きなフィルターでろ過した上で0.45 μmフィルターでろ過する。新鮮酵母エキスは、凍結融解の繰り返しを避けた方がよい。

培地添加物2: 馬血清のロットチェック

マイコプラズマはコレステロールを必須栄養源とするが、その合成能力がないため、コレステロール源を供給する必要がある。コレステロール源としては一般にウマ血清(リポ蛋白)が好んで用いられているが、ウマ血清中には*M. pneumoniae*の発育阻害活性因子が含まれているものが多く、ロットチェックが必要である。ウマ血清のロットチェックが難しい場合には、発育阻害活性因子を不活化するために、55℃で30分間、熱処理したものをを用いる。

を重層して作製する。メチレンブルーはヒト口腔内に存在する*M. pneumoniae*以外のマイコプラズマの増殖を抑制する。二層培地は作製後、冷蔵保存で2週間位使用できる。

4) 検体の培養、培養条件ならびにコロニーの観察
咽頭拭い綿棒絞り液の0.2 mlを二層培地の液層に、0.1 mlを寒天平板培地に接種する。平板培地は5%炭酸ガスインキュベータ中、又は乾燥を防ぐためビニール袋に入れて37℃で好気培養する。二層培地は好気培養でよい。二層培地に*M. pneumoniae*が発育すると寒天表面層が黄変する。液層は、通常1~2週間の培養で弱いグリーンを呈する。分離菌によって、または培地基材(酵母エキスやウマ血清)が不適切な場合には、発育に1ヶ月程度を要することもある。*M.*

*pneumoniae*が成育するとブドウ糖発酵によりpHが低下し、培地の黄変とメチレンブルーの色調が交じって弱いグリーンを呈するが、液は澄んでいる。二層培地が黄変した時点で培養陽性とする。黄変した液体培地の一部を寒天平板培地に接種し、*M. pneumoniae*の確認を行う。また、一部を凍結保存剤と1:1に混合し、-80℃に凍結保存する。寒天平板培地の場合、培養7日目頃から観察を始める。コロニー観察には、40~100倍率の実体顕微鏡を用いる。平板を逆さにし、裏側から目玉焼き状の特徴的コロニーを探す。コロニーが小さいうちは判別ができないが、培養日数がたつと中心部が生じ、いわゆる目玉焼き状のコロニーを形成する。

5) *M. pneumoniae* 同定法

寒天平板培地に形成したコロニーが*M. pneumoniae*かどうかの判別には、以下の方法がある。

注意: 短期間内(1~3日間)に培地が黄変したり、濁りが生じた場合は、マイコプラズマ以外の細菌や酵母が増殖したと考えられる。この場合、*M. pneumoniae*発育の判定は不可能である。カビ汚染を含め、細菌増殖率は3~10%の割合で存在する。

ア) コロニーへの赤血球吸着試験: 適当な濃度の新鮮な赤血球(動物種は問わないが、羊赤血球が入手しやすい)をPBSで希釈後、寒天平板に加え、室温に15~30分置き、PBSで余分な赤血球を洗い流した後、顕微鏡下で観察する。*M. pneumoniae*の場合、コロニー表面に赤血球が多数付着する。赤血球入手が難しい場合には動物細胞でもよいが、コロニーへの付着数は赤血球に比べ少ない。

イ) 抗血清を用いた代謝阻害試験(Metabolic inhibition test)、発育阻試験(Growth inhibition test): マウスやウサギを用いて作製した*M. pneumoniae*抗血清が必要。

ウ) PCR法: 後述

2. 抗原検出法

抗原検査法の利点は、培養法や抗体検査では不可能な早期診断が行えることである。特に*M. pneumoniae*はβ-ラクタム剤が無効であり、発病初期に適切な薬剤を選択して治療を行うためにも、早期診断が望まれている。*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がまだに広く普及していない。比較的利用されている方法は、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を用いて、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*を検出するものである。方法はやや煩雑で習熟を要するが、早期診断法として有用であるとの報告もある²⁾。また、最近海外で、カード型の*M. pneumoniae*簡易抗原検査キットが市販されているが、日本ではまだ市販されておらず有用性は不明である。*M. pneumoniae*抗原の検出法としてはPCRが優れている。*M. pneumoniae*検出におけるPCR法と培養法の比較成績を表1に示す。以下に我々がやっている*M. pneumoniae*DNA検出法を示す。

1) PCR法

*M. pneumoniae*DNAのPCRによる検出は、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。多くのプライマーが報告されているが、主に16S rRNA遺伝子や、P1細胞付着タンパク質の遺伝子配列を検出ターゲットとしてデザインされている。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による検出法の一例を示す。

① 鋳型DNAの調製

検体からのDNA調製は、DNAの分解を防ぐためにも、検体の採取後できるだけ速やかに行うのが好ましい。適当な市販DNA抽出キットを用いて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。

・咽頭スワブや体液から鋳型DNAの調製

a) 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15,000 rpm, 10分間遠心し、上清を除く。

b) 沈渣に0.1% Triton-X100を含むTE buffer(10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0)を50 μl加え、懸濁する。

c) 95℃で5分間加熱した後、鋳型DNAとして使用する。

② PCR反応

使用するプライマー

表1 *M. pneumoniae*検出におけるPCR法と培養法の比較³⁾

	培養検査				
	陽性	陰性	培地汚染	計(%)	
PCR	陽性	62	4	9	75(23.7)
	陰性	5	216	20	241
	計	67	220	29	316
	(%)	(21.2)			

一例として *M. pneumoniae* の 16S rRNA に対する nested PCR 用のプライマー配列をあげる。このプライマーを使用すれば、かなり高感度、特異的に *M. pneumoniae* を検出することができる。

・ 1st PCR 用プライマー

MPN/1F: 5'-AGA GTT TGA CTG TAC CAT-3'
MPN/1R: 5'-GCT CAC TTT TAC AAG CTG
GCG-3'

・ 2nd PCR 用プライマー

MPN/2F: 5'-CTC GGT AGT GAA GTT AAC
AC-3'
MPN/2R: 5'-GCA TTA GCA GTC TCG CTA G-
3'

このプライマーを使用した場合、1st PCR では 782 bp, 2nd PCR では 301 bp の PCR 産物が生成する。1st PCR プライマーのみでの検出感度は良くないが、2nd PCR プライマーのみでの検出感度は比較的高い。しかし、nested PCR にした場合、2nd PCR プライマーのみに比べ、100 倍は検出感度が上がる。PCR を行う場合には必ず、陰性対照と陽性対照を置くこと。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 がぎりぎり陽性になるような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。

(1st, 2nd PCR 共通)

94℃	1分	}	30 サイクル
94℃	1分		
55℃	1分		
72℃	1分		
72℃	5分		
4℃	保存		

③ アガロースゲル電気泳動による分析と判定

PCR 産物の電気泳動分析の例、サンプル 1・2 とも、1st PCR では PCR 増幅が起きていないが、2nd PCR ではサンプル 2 で特異的な増幅 (約 300 bp) が起こっており、陽性。サンプル 1 は不明瞭なスメアで陰性 (検出限界以下)。本 PCR 法では、数 ng 程度の *M. pneumoniae* DNA の検出が可能である (図 1)。

3. 抗体検査法

現在、マイコプラズマ肺炎の実験室診断には抗体検査法が一般的である。補体結合反応 (CF)、受身凝集反応 (PA)、寒冷凝集反応、代謝阻止抗体 (MI)、間接蛍光抗体法 (IFA)、ELISA 法、ウェスタンブロット法等、多くの方法が適用されてきたが、中でも臨床診断に広く用いられているのは、補体結合反応 (CF) と受身凝集反応 (PA) である。

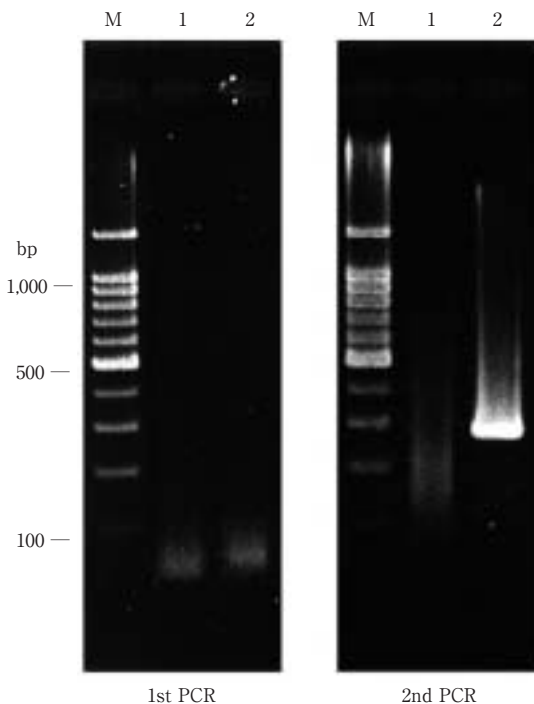


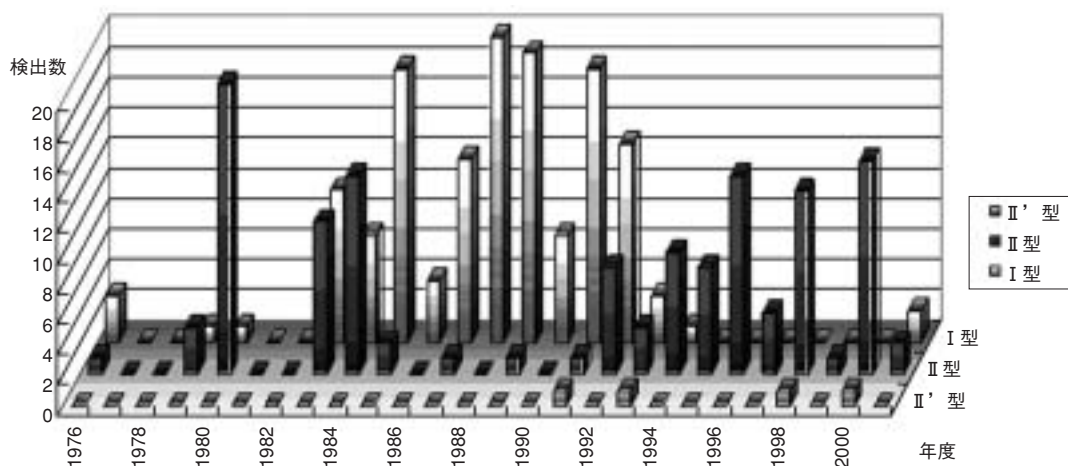
図1 *M. pneumoniae* に対する PCR
M: DNA サイズマーカー (100 bp ラダー)
1: サンプル 1
2: サンプル 2

1) 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、抗原と抗体が結合したものが存在すると、そこに補体が結合するために溶血が起こらない。CF 法では、抗原抗体結合物に結合する補体の消費量を指標として判定を行う。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。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。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。

2) 受身凝集反応 (PA)

抗原と抗体が結合することを利用し、抗原を粒子表面に結合させておき、そこに抗体を加えて粒子の凝集を見ることで判定を行う方法。粒子に赤血球を用いるとき、この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、現在ではラテックス粒子、ゼラチン粒子などがよ

図2 *M. pneumoniae* 流行株の疫学調査成績

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る。3時間で判定可能である。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320倍以上の抗体価が必要である。

III. その他

1) *M. pneumoniae* 流行株の疫学

現在 *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型菌は付着タンパク質 P1 の他、いくつかの遺伝子に違いが見られ、DNA塩基配列を調べることによって型別することができる^{4,5)}。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、疫学調査を行うと図2に示すようにI型菌とII型菌は、数年から10年程度の間隔で出現を繰り返しているように見える(図2)。

2) 薬剤耐性菌と感受性試験

M. pneumoniae 感染症の治療には抗生物質が有効で、通常はエリスロマイシン、ジョサマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシン等のマクロライド系あるいはミノサイクリン等のテトラサイクリン系抗生物質が第一選択剤として使用される。つい最近まで、これらの薬剤に対する *M. pneumoniae* の耐性化は問題にはなっていなかったが、最近、*M. pneumoniae* 感染症の流行において、一部の患者からマクロライドおよび類似抗生物質に高度の交差耐性を示す *M. pneumoniae* が分離されるようになってきた。これら耐性を獲得した菌は、通常 23S rRNA 遺伝子の領域

表2 23S rRNA 遺伝子の変異と薬剤感受性パターン

抗生物質	変異パターンとMIC			
	A2063G	A2063C	A2064G	A2064C
Erythromycin	高	高	高	高
Oleandomycin	高	高	高	高
Josamycin	中	中	高	高
Spiramycin	中	中	高	高
Tylosin	低	中	中	中
Clarithromycin	高	高	中	中
Tetracycline	感	感	感	感

高: MIC > 200 μ g/ml, 中: 5~25 μ g/ml,
低: MIC < 5 μ g/ml, 感: 感受性

Vに点変異が起きており、変異パターンによって各種薬剤に対する感受性も少しずつ異なっている⁶⁾。今後、このような耐性菌の出現が拡大する危険性も考えられ、耐性 *M. pneumoniae* 株の動向に注意する必要がある。従って、マクロライド系抗生物質で薬効を示さない場合には、菌分離を行い薬剤感受性を調べることも研究的には重要である。

文献

- 1) 見理 剛, 佐々木裕子, 新谷三春, 堀野敦子, 佐々木次雄, 岡崎則男, 荒川宜親. 国立感染症研究所検査・診断マニュアル「肺炎マイコプラズマ」, 2003年版.
- 2) 田澤節子, 岩澤篤郎, 中村良子. 2001. Mycoplasma, 臨床と微生物 27: 650-653.
- 3) 岡崎則男, 佐々木次雄. 1995. 臨床とウイルス 23: 247-251.
- 4) Kenri T, Taniguchi R, Sasaki Y et al. 1999. Identification of a new variable sequence in the P1

- cytadhesin gene of *Mycoplasma pneumoniae*: evidence for the generation of antigenic variation by DNA recombination between repetitive sequences. *Infect Immun.* 67: 4557-4562.
- 5) Dorigo-Zetsma JW, Wilbrink B, Dankert J *et al.* 2001. *Mycoplasma pneumoniae* P1 Type 1- and Type 2-Specific Sequences within the P1 Cytadhesin Gene of Individual Strains. *Infect Immun.* 69: 5612-5618.
- 6) Okazaki N, Narita M, Yamada S, Izumikawa K, Umetsu M, Kenri T, Sasaki Y, Arakawa Y, Sasaki T. 2001. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro. *Microbiol Immunol.* 45: 617-620.

Laboratory Diagnosis of Mycoplasmal Pneumonia

Tsuguo Sasaki

Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control
National Institute of Infectious Diseases

Mycoplasma pneumoniae is a common cause of atypical pneumonia in children and young adults. Although the proportion differs from report to report, usually 30~40% of atypical pneumonia is caused by *M. pneumoniae* that show a feature of transient pulmonary infiltration in an X-ray photograph of the chest. The most frequent clinical syndrome is tracheobronchitis, often accompanied by upper respiratory tract symptoms. Typical complaints can persist for weeks to months and include hoarseness, fever, cough, sore throat, headache, chills, coryza, and general malaises. The incubation period is 1 to 3 weeks. There is no sex difference in the incidence of mycoplasmal pneumonia. Epidemics of mycoplasmal pneumonia in Japan broke out every four years up to 1980s, but since 1990, large outbreaks were not occurred in Japan.

This paper shows laboratory diagnosis of mycoplasmal infections. The isolation of *M. pneumoniae* from pharyngeal specimens for etiological diagnosis is not well accepted, because it requires special culture media, a long incubation period (2~4 weeks), and somewhat complicated procedures, and involves invalid testing results in 5~10% of specimens due to the growth of contaminants. At present, serodiagnosis is commonly used. Of varieties of antibody-determining methods, several kinds of kits for indirect hemagglutination (IHA) are available commercially. Recently, detection of *M. pneumoniae* by the PCR method has become available and many laboratories have been using this method.