

## [原 著]

外来診療を目的とした Real-Time PCR 法による *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎迅速診断のための検査体系の構築

中村彰宏・阿部教行・河野 久・藤本宜子  
福田砂織・畑中徳子・松尾収二  
天理よろづ相談所病院臨床病理部

(平成 20 年 12 月 26 日受付, 平成 21 年 5 月 11 日受理)

外来患者において市中肺炎起炎菌のうち約 10~30% は非定型肺炎病原体が占めている。しかし、現在 *Mycoplasma pneumoniae* などの非定型病原体は通常の病院検査室で行っている検査では迅速検出が困難である。われわれは外来診療における迅速検査として real-time PCR 法を用いた *M. pneumoniae* 迅速検出方法を確立した。検査系確立にあたり、以下の 3 点について検討を行った。

まず第一に、蛍光検出フォーマットとして SYBR Green I を用い、Light Cycler 2.0 system (Roche) を使用し、PCR 検査総所要時間を検体提出より 45 分の系を組んだ。本 PCR 検査に用いた primer は *M. pneumoniae* 16S rRNA 遺伝子上をターゲットとし、感度は 3.09 fg/ $\mu$ l まで検出可能であった。これはコピー数に換算すると約  $10^2 \sim 10^3$  コピーに相当し、菌量の多い急性期 *M. pneumoniae* 肺炎症例には十分対応可能であると思われた。

次に、通常遺伝子検査で行われる特殊な DNA 抽出操作の省略を試みた。最終診断として *M. pneumoniae* 肺炎と診断された 15 症例において DNA 抽出操作の有無で crossing point values の比較を行ったが、DNA 抽出操作を行わない本検査の前処理検体においてもほぼ良好な感度が得られた。

最後に、PCR 阻害物質について検討した。抗菌薬混入による影響はみられなかったが、血液混入により明らかな感度低下を認めた。

今後、従来からの塗抹検査、分離培養検査および血清学的検査に加え本法のような迅速検出可能な遺伝子検査を導入することで早期診断に寄与できるものと考えられる。

**Key words:** real-time PCR, *Mycoplasma pneumoniae*, 16S rRNA gene

## 序 文

*Mycoplasma pneumoniae* は、ヒト呼吸器感染症の重要な起炎病原体の一つで、本邦では市中呼吸器感染症のうちおよそ 10~30% を占める<sup>1)</sup>。特に入院治療を行った重篤肺炎患者の原因微生物として 15 歳から 44 歳の若年者においては約 40% が *M. pneumoniae* が占めるともいわれている<sup>2)</sup>。近年、若年者における *M. pneumoniae* 肺炎劇症例および死亡例が報告

されつつあるなかで<sup>3~7)</sup>、早期に *M. pneumoniae* 肺炎を診断し的確な治療を行うための迅速検査が必要とされている。現在、通常の病院検査室で検出可能な呼吸器感染症病原体は *Streptococcus pneumoniae* や *Haemophilus influenzae* といった一般的な培養法で発育可能な菌種である。これら一般細菌による感染症は外来診療ではグラム染色を至急に実施し、感染症治療に貢献しているが、非定型病原体である *M. pneumoniae* や *Chlamydia pneumoniae* は比較的頻度が多いにもかかわらず、現行の検査では迅速検出が困難である。*M. pneumoniae* や *C. pneumoniae* は菌の特性として細胞壁を欠くため一般細菌による感染症の際に汎用される  $\beta$ -ラクタム系抗菌剤は効果を示さない。したがって、起炎菌が一般細菌によるものか非定型病原体によ

著者連絡先: (〒632-8552) 奈良県天理市三島町 200  
天理よろづ相談所病院臨床病理部  
中村彰宏  
TEL: 0743-63-5611 内線 8665  
FAX: 0743-62-5576  
E-mail: nakamurium\_a802@yahoo.co.jp

るものかを迅速に鑑別することは呼吸器感染症治療を行ううえで極めて重要である。現状の *M. pneumoniae* 検査法としては、分離培養法や血清学的診断法が汎用されているが、検査実施から報告までに長時間を要し外来診療と並行した検査結果を報告することは難しい。そこで、現在の臨床における感染症診断は2007年に発行された成人市中肺炎診療ガイドライン（日本呼吸器学会）に基づき、年齢、基礎疾患の有無、臨床症状および末梢白血球数などから細菌性肺炎と非定型肺炎の鑑別を行う方法が汎用されている<sup>8)</sup>。今回、われわれは非定型肺炎のうち最も頻度の高い *M. pneumoniae* に着目し、外来診療に対応可能な *M. pneumoniae* 迅速検出のための PCR 検査系を構築すべく、検体提出から結果報告まで45分以内に報告可能な検査体系の構築を試みた。

## 材料と方法

### (1) 使用機器と試薬

使用機器はRoche社のReal-time PCR 機器 LightCycler 2.0 system を使用した。蛍光検出フォーマットは、LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 試薬（FastStart Taq DNA Polymerase, reaction buffer, dNTP mix, SYBR Green I 色素および 10 mM MgCl<sub>2</sub> を含む）を用いた SYBR Green I 方式とした。

### (2) Primer の検討

今回の検討では16S rRNA をコードする遺伝子上に設計された primer<sup>9)</sup> [forward primer 配列: 5'-cgccagcttgtaaaagtgc-3', reverse primer 配列: 5'-tagcaacacgttttaaatattacc-3'] (以下 primer A) および P1 をコードする遺伝子上に設計された primer<sup>10)</sup> [forward primer 配列: 5'-attccgaacaaaataatga-3', reverse primer 配列: 5'-gtttgacaaagtc-cgtgaag-3'] (以下 primer B) の2種類を使用し各 primer を比較した。比較内容は、①融解曲線の明瞭さ、②primer dimer および非特異増幅産物の有無、③検出感度である。なお、今回使用した primer によって得られる DNA 断片は、理論上 primer A を用いた際は 190 bp, primer B は 151 bp となる。

### (3) PCR 反応溶液調整と PCR 反応条件

PCR 反応溶液の組成は 20  $\mu$ l 用ガラスキャピラリー当たり DW 14.0  $\mu$ l, MgCl<sub>2</sub> 1.6  $\mu$ l (終濃度 3.0 mM), Forward-primer 0.2  $\mu$ l (終濃度 0.5 mM), Reverse-primer 0.2  $\mu$ l (終濃度 0.5 mM), LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I 2.0  $\mu$ l であり、これに sample 2.0  $\mu$ l を加え、全反応溶液量を 20  $\mu$ l

とした。

PCR 反応条件は primer dimer 形成などの軽減のため Touch down PCR 方式とし、初期変性は 95°C 7 min の Hot start, 変性 95°C 1 s, アニーリング 63~53°C 5 s (step size 0.5°C/cycle) および伸長 72°C 8 s を 1 cycle (=計 14 s) の 40 cycle とした。その後、融解曲線解析 65~95°C 15 s (step size 0.2°C/cycle) および冷却 20°C 30 s とし、PCR 工程は約 28 min とした。

### (4) 臨床材料からの DNA 抽出操作の省略

本検査に用いる検体は、原則咽頭ぬぐい液とし、DNA 抽出操作の省略を試みた。咽頭ぬぐい液を綿棒にて採取後、滅菌精製水 500  $\mu$ l へ約 1 分間十分に絞り出し、つづいて 12,000 G 15 s 遠心操作を行った。その後、上清部分を無菌的に捨て去り、沈渣部を約 200  $\mu$ l としその上清部分を sample として使用した。遠心条件は 15 s, 30 s, 1 min, 2 min, および 2 min 遠心後に沈渣部をミキシングしたもの、それぞれの条件にて検討した。次に、DNA 抽出した sample との感度を比較するため、*M. pneumoniae* 血清抗体価検査 (PA 法) において有意な上昇を認め、臨床的にも *M. pneumoniae* 感染症と診断された 15 症例の検体を用いて QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN) による DNA 抽出した sample と本法の処理を行った sample にて、PCR を実施した際の crossing point values (CP 値) を比較した。また、*M. pneumoniae* 感染症以外の感染症が診断された 10 症例においても二つの方法にて測定を行い、非特異産物やプライマーダイマーの有無などを比較した。

### (5) PCR 反応後 DNA 増幅産物の確認

臨床検体を用いた PCR 反応後の DNA 増幅産物は 3% アガロースゲル電気泳動にて確認を行い、融解曲線解析結果の妥当性を確認した。また、direct DNA sequence を行い、塩基配列の確認を行った。

### (6) PCR 阻害物質の検討

本検査は DNA 未抽出検体を用いるため、検体中に抗菌薬や血液が混入した際の PCR への影響を確認した。抗菌薬は CEZ, CAM, MINO, LVFX, ST, および VCM を用いた。各薬剤の終濃度が 1  $\mu$ g/ml および 10  $\mu$ g/ml になるよう薬液を 500  $\mu$ l 調整し、MacF0.5 に調整した *M. pneumoniae* 標準菌株液に綿棒を浸し、その後前述した前処理を行い各薬剤について測定した。また、血液については全血 1  $\mu$ l, 5  $\mu$ l, および 10  $\mu$ l を滅菌精製水 500  $\mu$ l に添加しその後同様に前処理を行い、それぞれを測定した。

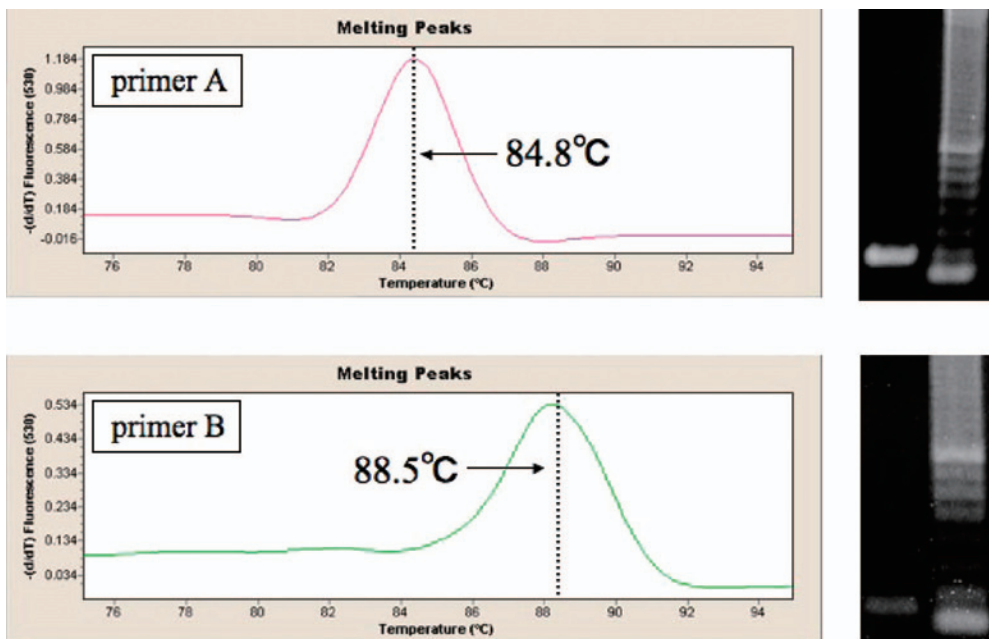


Fig. 1. 16S rRNA 遺伝子 primer (primer A) および P1 遺伝子 (primer B) を用いた融解曲線解析結果および 3% アガロースゲル電気泳動写真

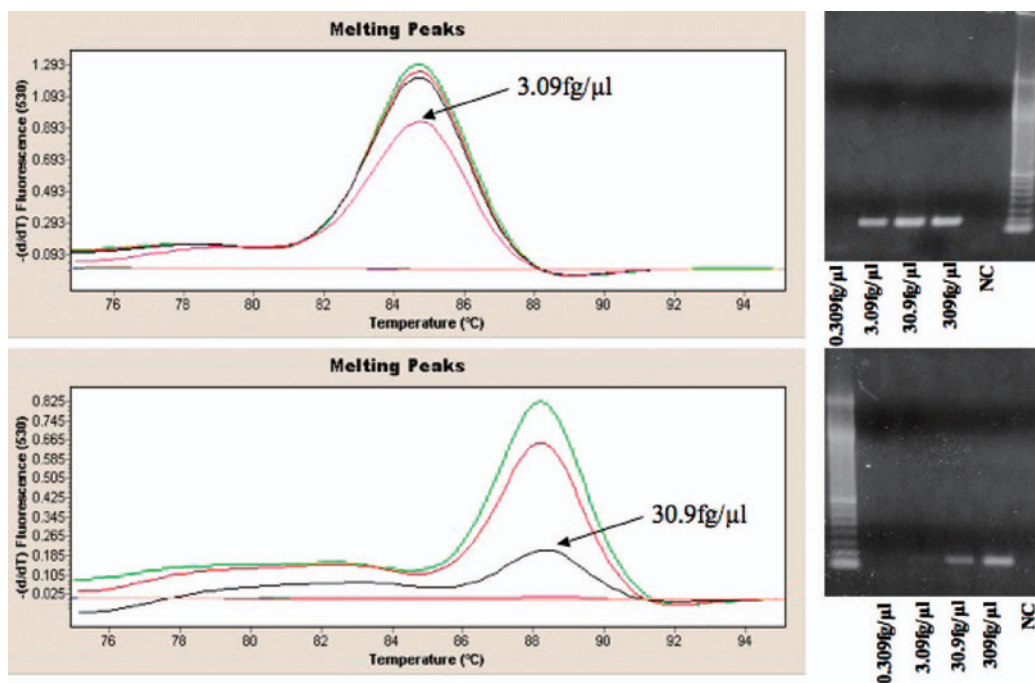


Fig. 2. 16S rRNA 遺伝子 primer (primer A) および P1 遺伝子 primer (primer B) の検出感度

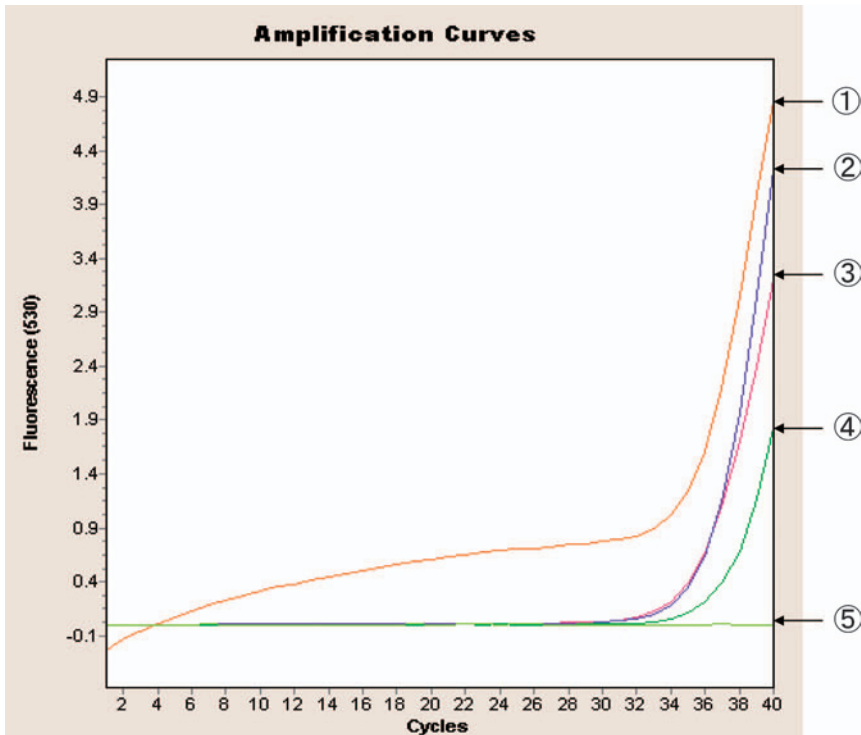


Fig. 3. 遠心条件の違いによる PCR への影響  
 ① 12,000 G 2 min 遠心後、沈渣部をミキシングしたサンプルを使用  
 ② 12,000 G 15 s 遠心後、沈渣部の上清を使用  
 ③ 12,000 G 30 s 遠心後、沈渣部の上清を使用  
 ④ 12,000 G 1 min 遠心後、沈渣部の上清を使用  
 ⑤ 12,000 G 2 min 遠心後、沈渣部の上清を使用

結 果

(1) Primer の比較

①融解曲線の明瞭さ

*M. pneumoniae* 標準菌株を DNA 抽出後、2 種類の primer について融解曲線の明瞭さの比較を行った。各 primer を用いて PCR を行った際の融解曲線解析結果を Fig. 1 に示した。primer A の  $T_M$  値は  $84.8^{\circ}\text{C}$  付近、primer B の  $T_M$  値は  $88.5^{\circ}\text{C}$  付近となった。融解曲線のピークは両 primer ともに一峰性を示したが、primer A は primer B より若干明瞭なピークを示した。

②primer dimer および非特異増幅産物の有無

2 種類の primer における増幅産物の 3% アガロースゲル電気泳動写真を Fig. 1 に示した。両 primer ともに明瞭な単一バンドを示し明らかな primer dimer および非特異増幅産物の形成は認めなかった。

③検出感度

*M. pneumoniae* 標準菌株を DNA 抽出後、2 種類の

primer について検出感度を測定した。RNA MS2 (Roche) を用いて DNA 希釈系列を作成し PCR を実施した融解曲線解析結果および電気泳動写真を Fig. 2 に示した。primer A では  $3.09\text{ fg}/\mu\text{l}$  まで明瞭な曲線ピークを示したが、primer B では  $30.9\text{ fg}/\mu\text{l}$  が検出限界であった。電気泳動結果も同様の結果であった。

以上の結果より本 PCR 検査系の使用 primer は 16S rRNA 上をターゲットとした primer A とした。

(2) PCR 反応後 DNA 増幅産物の確認

Primer A を使用し臨床検体を用いた際の PCR 反応後 DNA 増幅産物は 3% アガロースゲル電気泳動にて確認を行い、融解曲線解析結果の妥当性を確認した。また、direct DNA sequence にて塩基配列の確認を行い、*M. pneumoniae* 16S rRNA 遺伝子の塩基配列と完全に一致していることを確認した。

(3) 検体からの DNA 抽出操作の省略

本法の前処理における遠心条件の違いによる PCR への影響を Fig. 3 に示した。条件①では感度は良好で

Table 1. *M. pneumoniae* 肺炎症例 15 症例における DNA 抽出操作の有無による CP 値と TM 値の比較

症例	血清抗体価	CP 値		TM 値	
		DNA 抽出なし	DNA 抽出あり	DNA 抽出なし	DNA 抽出あり
A	5,120 倍	34.45	>35.00	84.90	85.07
B	640 倍	30.56	29.64	84.78	84.65
C	<40 倍→1,280 倍	33.44	31.80	84.85	84.61
D	2,560 倍	31.13	30.25	84.65	84.59
E	80 倍→10,240 倍	32.22	32.91	84.99	85.16
F	640 倍	34.60	30.87	85.42	84.66
G	640 倍	33.91	34.73	84.95	84.84
H	320 倍	30.38	32.42	84.69	84.69
I	320 倍	30.67	29.72	84.94	84.82
J	5,120 倍	30.84	29.72	84.96	84.75
K	160 倍	28.74	26.76	84.79	84.68
L	1,280 倍	33.32	31.95	84.95	84.84
M	ND	35.00	31.98	85.34	84.80
N	5,120 倍	31.02	28.82	84.84	84.67
O	ND	34.51	31.58	85.03	84.72

CP 値: crossing point. 閾値と増幅曲線の交点.

TM 値: melting temperature. 増幅産物の融解温度.

Table 2. *M. pneumoniae* 以外の感染症症例 10 症例における DNA 抽出操作の有無による CP 値と TM 値比較

症例	血清抗体価	CP 値		TM 値	
		DNA 抽出なし	DNA 抽出あり	DNA 抽出なし	DNA 抽出あり
P	ND	>35.00	—	77.26	—
Q	<40	>35.00	—	—	—
R	80	>35.00	—	—	—
S	ND	—	—	—	—
T	ND	>35.00	—	—	—
U	<40	—	—	—	—
V	<40	>35.00	—	76.52	—
W	<40	>35.00	—	—	—
X	<40	>35.00	—	—	—
Y	<40	>35.00	>35.00	—	—

CP 値: crossing point. 閾値と増幅曲線の交点.

TM 値: melting temperature. 増幅産物の融解温度.

あったが基線に乱れが生じた。条件④および⑤では基線は安定していたが感度が不良であった。よって、本法の遠心条件は条件②の 12,000 G 15 s とした。

次に臨床的に *M. pneumoniae* 感染症を診断された 15 症例の咽頭ぬぐい液材料を QIAamp DNA Mini Kit を用いて DNA 抽出した場合と DNA 抽出をしなかった場合の CP 値と TM 値を比較した結果を Table 1 に示す。DNA 抽出なしの方にて CP 値が低値であった症例は A, E, G および H の 4 症例であり、その他の 11 症例においては DNA 抽出ありの方にて CP 値が低値を示した。DNA 抽出なしと DNA 抽出あり

の間で CP 値に 3.00 以上の大きな差を認めた症例は F (差 3.73) および M (差 3.02) でありともに DNA 抽出ありの方で CP 値が低値であった。TM 値についてはすべてにおいて  $85.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  であり、明瞭な一峰性のピークを認めた。一方、*M. pneumoniae* 以外の感染症が診断された 10 症例における CP 値と TM 値の比較を Table 2 に示す。DNA 抽出ありではほとんどの症例において蛍光強度の上昇は認めなかったが、DNA 抽出なしでは 10 症例中 8 症例において 35 cycle 以降に蛍光強度の上昇を認めた。TM 値はすべてにおいて  $85.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  付近にピークは認めなかった。

Table 3. 抗菌剤混入による PCR への影響

抗菌剤	CP 値 (二重測定平均値)	
	1 $\mu\text{g/ml}$	10 $\mu\text{g/ml}$
CEZ	25.96	25.46
CAM	24.62	23.68
MINO	25.51	24.45
LVFX	25.63	24.78
ST	24.55	23.93
VCM	24.79	24.34
対照	25.20	

Table 4. 血液混入による PCR への影響

血液添加量	CP 値 (二重測定平均値)
対照	24.04
1 $\mu\text{l}$	24.17
5 $\mu\text{l}$	26.26
10 $\mu\text{l}$	29.77

(4) PCR 阻害物質の検討

抗菌剤混入による PCR への影響を Table 3, 血液混入による PCR への影響を Table 4 に示す。各抗菌剤を添加した CP 値と対照の CP 値を比較するとすべての抗菌剤において 1  $\mu\text{g/ml}$  および 10  $\mu\text{g/ml}$  ともに CP 値に差を認めなかった。一方, 血液を添加した場合には, 添加血液量が増加するに従って CP 値が上昇した。

(5) 喀痰グラム染色から一貫した *M. pneumoniae* 肺炎迅速診断検査体系の試み

当院の *M. pneumoniae* 肺炎迅速診断のための検査体系を Fig. 4 に示す。成人市中肺炎診療ガイドラインに基づき, 年齢, 基礎疾患の有無, 臨床症状および末梢血白血球数等で非定型肺炎を疑った際には, 咽頭ぬぐい液を採取後, 本検査を実施する。一方, 当院では臨床医が細菌性肺炎を疑い喀痰一般細菌検査が依頼された際に, グラム染色にて非定型肺炎を疑う症例では, 臨床医へ *M. pneumoniae* PCR 検査を実施していただくよう積極的にコメントしている。非定型肺炎を疑うグラム染色所見とは, 単核球優位な炎症像を示しかつ有意な起炎菌を認めない場合である。グラム染色

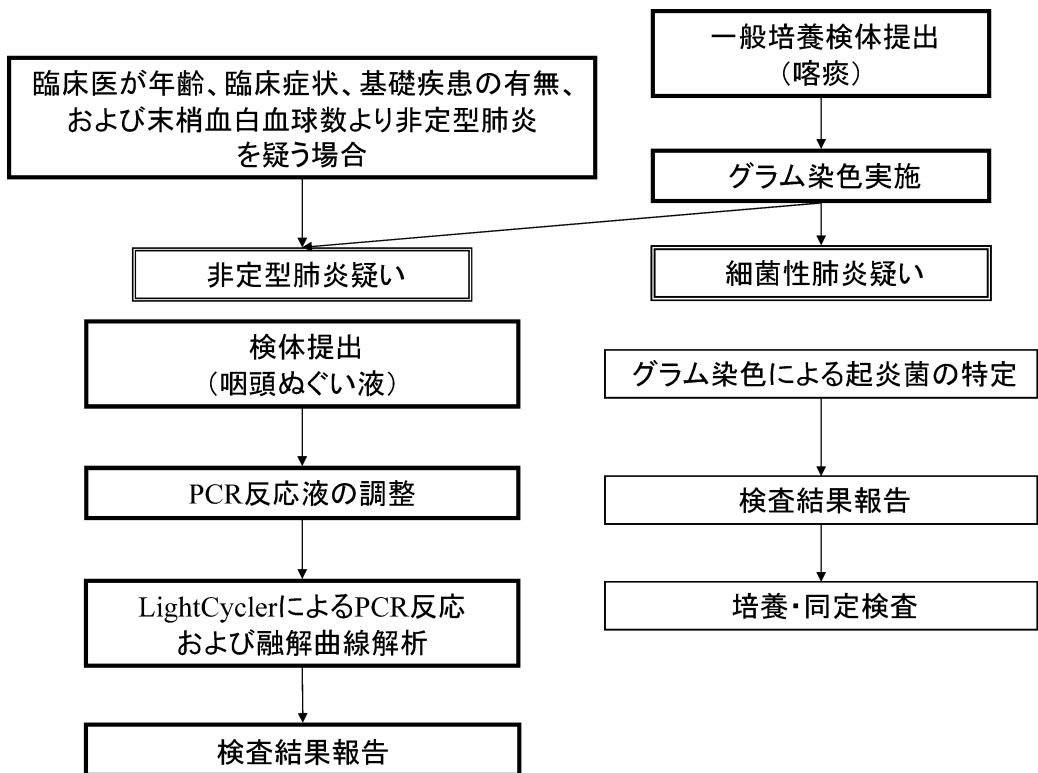


Fig. 4. 当院における *Mycoplasma* 肺炎診断のためのフローチャート

にて細胞分類が特定困難な場合は積極的に Diff-Quik 染色 (SYSMEX) を併用するようにしている。PCR 検体は原則咽頭ぬぐい液とし、検体の前処理後 PCR 反応溶液を調整し、LightCycler にて PCR 反応および融解曲線解析を実施する。結果報告までの総所要時間はおよそ 45 分である。

## 考 察

現在の *M. pneumoniae* 感染症を迅速に診断する方法として本邦ではイムノカードマイコプラズマ抗体が市販されているが抗体上昇には数日を要するため急性期には検出できないのが現状である<sup>11)</sup>。したがって、今日迅速にマイコプラズマ抗原を検出する方法が求められている。そこで近年、real-time PCR 法、LAMP 法や NASBA 法といった遺伝子学的検査を用いた *M. pneumoniae* 病原体そのものを迅速検出する方法が注目されている<sup>12-16)</sup>。

われわれは外来診療における微生物迅速検査の一つとして real-time PCR 法を用いた *M. pneumoniae* 病原体迅速検出方法を確立した。われわれが用いた real-time PCR 機器 LightCycler 2.0 は、熱伝導率を高めたガラスキャピラリー型容器を用い、空気での温度コントロールを行っているため、30~40 サイクルの PCR 反応を 20~30 分と大幅に反応時間を短縮可能とした。また、PCR 増幅産物解析に融解曲線解析を用いることにより従来のアガロースゲル電気泳動が不要となり、さらなる時間短縮につながった。本検査の総所要時間は検体提出よりわずか 45 分であり、外来初期治療に貢献できるとされる検査体系が確立できた。また、real-time PCR の蛍光検出フォーマットは一般的に SYBR Green I, Hybridization Probe, Simple Probe および TaqMan Probe の四つの方法があるが、本 PCR 検査系では SYBR Green I を用いた。SYBR Green I 色素を用いた検査ではプローブを必要としないため他の遺伝子検査に比べ安価に実施可能であることも本法の利点の一つである。

本検査系に用いた primer は *M. pneumoniae* 16S rRNA 遺伝子上をターゲットとし、感度は 3.09 fg/μl まで検出可能であった。これはコピー数に換算すると約  $10^2 \sim 10^3$  コピーに相当し、菌量の多い急性期 *M. pneumoniae* 肺炎症例には十分対応可能であると思われる。

本検査を構築するにあたり、通常遺伝子検査で行われる DNA 抽出操作などの省略を試みた。遠心条件は 12,000 G 2 min 遠心後ミキシングした sample では感度が良好であったが夾雑物質の影響で基線に乱れが

あったため、12,000 G 15 s 遠心後の沈渣部上清を使用することとした。また、臨床的に *M. pneumoniae* 肺炎と診断された 15 症例においては、DNA 抽出操作なしで若干感度が低下した症例も存在したがほとんどの症例で 3 サイクル以内の乖離であり、DNA 抽出操作の時間およびコストを考慮すると外来診療を目的とした検査には不向きと考える。症例によっては抽出操作を行うことで CP 値が上がってしまった症例も存在したが、これは DNA 抽出操作の回収率が関与しているものと考えられる。一方、*M. pneumoniae* 以外の感染症が診断された 10 症例においては DNA 抽出なしでは 35 cycle 以降に蛍光強度の上昇を認めた症例が大半であったが、TM 値にて増幅産物の特定が可能であった。したがって、外来診療を目的とした本検査系では DNA 抽出操作を省略した前処理を行うこととした。

PCR 阻害物質としては従来からの遺伝子検査と同様に血液混入により明らかな感度低下を認めしたが、検査材料は原則として咽頭ぬぐい液を使用するため、材料中に血液が混入することは少ないと考える。また、抗菌剤による影響は認めなかったが、本検査では DNA 抽出操作を行わないためさまざまな PCR 阻害物質が混入する可能性が考えられる。そのため、本検査の前処理を行った臨床検体に *M. pneumoniae* positive control を添加し同時測定することで阻害物質の有無を確認することが望ましい。

現在の外来診療における呼吸器感染症診断は成人市中肺炎診療ガイドラインに基づき、年齢、基礎疾患の有無、臨床症状および末梢白血球数などの情報により細菌性肺炎と非定型肺炎を鑑別する方法が汎用されている。この鑑別方法は良好な感度と特異度が証明されているが<sup>8)</sup>、この方法をもって臨床的に細菌性肺炎を疑い一般細菌検査が依頼されるケースが存在する。当院では一般細菌検査依頼時にグラム染色にて非定型肺炎を疑う所見を認めた症例では積極的に臨床医に非定型肺炎を疑う旨をコメントし、本検査を実施するように試みている。

本検査は PCR を実施するための特殊な装置を必要とする。これらの装置は高価であり、通常の検査室では実施できないのが現状である。しかし、近年 LAMP 法や NASBA 法といった等温核酸増幅法が開発され、今後特殊な装置を必要としない核酸増幅法が実現されることが望まれる。

現在、病院検査室で検出困難な非定型肺炎病原体には *M. pneumoniae* 以外に *C. pneumoniae* などがあり、これらの菌を 1 アッセイで同時検出可能な Multiplex PCR 体系を構築できれば、さらに外来診療への貢献

が可能となる。今後、従来からの塗抹検査、分離培養検査および血清学的検査に加え本法のような迅速検出可能な遺伝子検査を導入することで早期診断に寄与できるものとする。

### 文 献

- 1) Miyashita, N., H. Fukano, K. Mouri, et al. 2005. Community-acquired pneumonia in Japan: A prospective ambulatory and hospitalized patient study. *J. Med. Microbiol.* 54: 395-400.
- 2) 高柳 昇, 原健一郎, 徳永大道, 他. 2006. 市中肺炎入院症例の年齢別・重症度別原因微生物と予後. *日本呼吸器学会雑誌* 44: 906-915.
- 3) 宮原庸介, 高柳 昇, 窪田素子, 他. 2006. マイコプラズマ肺炎 90 例の重症度・治療・予後に関する検討. *日本呼吸器学会雑誌* 44: 607-612.
- 4) 児玉孝秀, 富岡真一郎, 遠藤健夫, 他. 2006. 移動する浸潤影を呈しステロイドパルス療法が著効した重症マイコプラズマ肺炎の 1 例. *日胸疾会誌* 65: 280-286.
- 5) 高柳 昇. 2006. マイコプラズマ肺炎の重症症例. *治療学* 40: 223-225.
- 6) Takiguchi, Y., N. Shikama, N. Aotsuka, et al. 2001. Fulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *Internal. Medicine* 40: 345-348.
- 7) Chan, E. D., C. H. Welsh. 1995. Eulminant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. *West. J. Med.* 162: 133-142.
- 8) 日本呼吸器学会呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会. 2007. 成人市中肺炎診療ガイドライン. 日本呼吸器学会, 東京.
- 9) Kessler, H. H., D. E. Dodge, K. Pierer, et al. 1997. Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* by an assay based on PCR and probe hybridization in a nonradioactive microwell plate format. *J. Clin. Microbiol.* 35: 1592-1594.
- 10) Templeton, K. E., S. A. Scheltinga, A. W. Graffelman, et al. 2003. Comparison and evaluation of real-time PCR, real-time nucleic acid sequence-based amplification, conventional PCR, and serology for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Clin. Microbiol.* 41: 4366-4371.
- 11) 布施 閔, 源馬 均, 佐藤 雅樹, 他. 2007. マイコプラズマ感染における診断法の問題点. *日本呼吸器学会誌* 45: 936-942.
- 12) Raggam, R. B., E. Leitner, J. Berg, et al. 2005. Single-run, parallel detection of DNA from three pneumonia-producing bacteria by real-time polymerase chain reaction. *J. Mol. Diagn.* 7: 133-138.
- 13) 諸角美由紀, 岩田 敏, 遠藤廣子, 他. 2003. *Mycoplasma pneumoniae* の迅速検出を目的とした PCR—小児呼吸器感染症検体を用いて—. *日本化学療法学会雑誌* 51: 289-299.
- 14) Loens, K., T. Beck, D. Ursi, et al. 2008. Development of real-time multiplex nucleic acid sequence-based amplification for detection of *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, and *Legionella* spp. in respiratory specimens. *J. Clin. Microbiol.* 46: 185-191.
- 15) Saito, R., Y. Misawa, K. Moriya, et al. 2005. Development and evaluation of a loop-mediated isothermal amplification assay for rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae*. *J. Med. Microbiol.* 54: 1037-1041.

## Construction of Inspection System for *M. pneumoniae* Rapid Detection Method in Outpatients, Using Real-Time PCR Method

Akihiro Nakamura, Noriyuki Abe, Hisashi Kono, Yoshiko Fujimoto, Saori Fukuda, Noriko Hatanaka, Syuji Matsuo

Department of Clinical Bacteriology, Clinical Pathology, Tenri Hospital

Atypical pneumonia pathogens hold about 10 to 30% among community-acquired pneumonia pathogens in Japan. The quick and accurate detection of atypical pneumonia pathogens, such as *M. pneumoniae*, is difficult by the routine outpatient-based laboratory inspections. We established the *M. pneumoniae* rapid detection method in outpatients, using real-time PCR method. For the purpose of establishing the inspection methods, we focused on three points as follows. First of all we used SYBR Green I as a fluorescence detection format and 2.0 Light Cycler system, which enabled us to make up a 45-minutes rapid detection method from specimen presentation to report of results. The primer on *M. pneumoniae* 16S rRNA gene was used for this PCR method, and sensitivity for *M. pneumoniae* in the minimum was showed to be 3.09 fg/ $\mu$ l,



which is equivalent to about  $10^2$ – $10^3$  copies in number. It seems that we could be able to sufficiently cope with an acute phase of *M. pneumoniae* pneumonia, although in which period numbers of bacteria could be abundant. Next, we tried to omit the DNA extraction used in common genetic diagnostic examinations. We compared crossing point values between two situations, one is performing DNA extraction and the other is not, in 15 cases diagnosed as *M. pneumoniae* pneumonia. As a result, the PCR sensitivity did not show any estrangement in both methods. Finally we examined about PCR inhibitors. Antibacterial agents did not influenced the PCR process, but blood did lower the sensitivity of the PCR. We believe that introduction of this genetic methodology into routine bacteriological examinations, such as Gram staining, bacteriological culture tests and serological examination, can contribute to quicker and accurate bacteriological diagnosis.