

[原 著]

Real-time PCR 法を用いた, *Mycoplasma pneumoniae* イムノクロマト
迅速診断キットに最適な検体採取部位の検討

島田康司¹⁾・皆川温子¹⁾・平山由美子¹⁾・杉山和之¹⁾・板垣はつえ¹⁾
伊藤正樹²⁾・武山 彩²⁾・富田陽一²⁾・佐久間弘子³⁾・三田村敬子⁴⁾
大石智洋⁵⁾・斉藤 匡⁶⁾・湊 通嘉⁷⁾・塚原雄器⁸⁾・細矢光亮⁹⁾

¹⁾ 株式会社 LSI メディエンス研究開発・学術部

²⁾ 公立相馬総合病院小児科

³⁾ 公益財団法人星総合病院小児科

⁴⁾ 公益財団法人ライフ・エクステンション研究所付属永寿総合病院小児科

⁵⁾ 新潟大学医歯学総合病院小児科

⁶⁾ 国保多古中央病院小児科

⁷⁾ みなと小児科

⁸⁾ しんめいこどもクリニック

⁹⁾ 福島県立医科大学小児科学講座

(平成 26 年 10 月 7 日受付, 平成 27 年 1 月 21 日受理)

Mycoplasma pneumoniae の抗原検出迅速診断キットに最適な検体採取部位を, Real-time PCR 法による遺伝子量を測定することにより検討した。同一患者の咽頭後壁および、口蓋扁桃周辺部位をそれぞれ綿棒にて擦過, 採取した検体内の *M. pneumoniae* 遺伝子量を Real-time PCR 法にて測定した結果, PCR 法陽性咽頭後壁採取検体の *M. pneumoniae* 遺伝子量 ($2.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^8$ copies/mL) は, 口蓋扁桃採取検体 ($4.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL) より高値の傾向を示した。次に, 咽頭後壁を採取部位としたグループと, 口蓋扁桃を採取部位としたグループそれぞれの *M. pneumoniae* 遺伝子量を測定した結果, 咽頭後壁採取グループ ($1.0 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^8$ copies/mL) は, 口蓋扁桃採取グループ ($6.8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL) より有意 ($p < 0.01$) に高値であった。*M. pneumoniae* 遺伝子量が高値を示した場合, その菌数も多く存在すると推測されたため, PCR 法と *M. pneumoniae* 抗原検出迅速診断キットとの相関を確認した結果, 咽頭後壁採取グループの陽性一致率 (79.5%) は, 口蓋扁桃採取グループの陽性一致率 (22.9%) よりも高い値を示した。以上の結果から, *M. pneumoniae* は, 咽頭後壁から採取した場合, 菌量が高くなり抗原検出迅速診断キットにて陽性となる可能性が示された。

Key words: *M. pneumoniae*, 抗原検出迅速診断キット, Real-time PCR

はじめに

Mycoplasma pneumoniae 感染症は, 市中非定型肺炎に分類され, 非定型肺炎の約 30~40%, 流行年には約 60% が *M. pneumoniae* を起因菌とし, クラミジア肺炎と共に高い割合を占めている¹⁾。感染経路としては, 飛沫感染による経気道感染や, 接触感染によって伝播すると言われている。感染には濃厚接触が必要と考えられており, 保育施設, 幼稚園, 学校などの閉鎖施設内や家庭などでの感染伝播はみられるが, 短時

著者連絡先: (〒289-2247) 千葉県香取郡多古町水戸字水戸台 1460-6
株式会社 LSI メディエンス研究開発・学術部
試薬開発第 1 グループ第 3 チーム
島田康司
TEL: 0479-76-3666
FAX: 0479-76-3663
E-mail: Shimada.Yasushi@mm.medience.co.jp
p

間の曝露による感染拡大の可能性はそれほど高くはない。潜伏期間は2~3週間とインフルエンザウイルスやRSウイルス感染症等の他の小児を中心に大きく流行する呼吸器疾患と比べて長く、初発症状は発熱、全身倦怠、頭痛などである。本症の特徴的な症状である咳は、初発症状発現後3~5日より始まることが多く、乾性の咳が経過に従って徐々に増強し、解熱後も長期にわたって(3~4週間)持続する。鼻炎症状は本疾患では典型的ではないが、幼児では頻繁にみられる。嘔声、耳痛、咽頭痛、消化器症状、胸痛、さらに皮疹が見られる場合もある。喘息様気管支炎を呈することは比較的多く、急性期には40%で喘鳴が認められる。以前はマイコプラズマによる肺炎は、比較的元気で一般状態も悪くないことが特徴であるといわれていたが、重症肺炎となることもあり、胸水貯留は珍しいものではない。他に合併症としては、中耳炎、無菌性髄膜炎、脳炎、肝炎、膵炎、溶血性貧血、心筋炎、関節炎、ギラン・バレー症候群など多彩なものが含まれる²⁾。

M. pneumoniae 感染症の検査として、患者咽頭ぬぐい液からの培養検査、患者血清を用いた抗体検査が一般的である。培養検査はM. pneumoniae 自体が特殊な培地でしか発育しないこと、手技が煩雑で経験を要することや、最終的な同定は、コロニーへの赤血球付着試験、PCR法、抗M. pneumoniae 血清を用いた代謝阻害試験等を実施する必要があることから、限られた施設でしか検査できないのが現状であり、また培養には数週間が必要となる。抗M. pneumoniae 抗体測定法には、受身凝集反応(PA)法、補体結合反応(CF)法、酵素抗体(ELISA)法、間接蛍光抗体(IFA)法、ウェスタンブロット法などがある。血清診断法では、ペア血清による抗体価の有意上昇により判定することが望ましいが、臨床経過の中で回復期の血清が採取できないことも多い³⁾。PCR法を用い、M. pneumoniae の検出を行う研究がすでに報告されているが、それらの方法の多くは、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⁴⁾。このような現状から、M. pneumoniae を簡便・迅速に検出する検査法が求められていた。

イムノクロマト迅速診断キットは感染症の簡便・迅速検出試薬として注目され、インフルエンザウイルス、RSウイルス、アデノウイルス、ヒトメタニューモウイルス等の診断に広く用いられている^{5)~9)}。近年、M. pneumoniae イムノクロマト迅速診断キットも開発に至り、現在3社(プロラストMyco((株)LSIメディエンス 東京)、プライムチェック[®]マイコプラ

ズマ抗原(アルフレッサファーマ(株)大阪)、リボテスト[®]マイコプラズマ(旭化成ファーマ(株)東京)より発売されている。

佐々木は、患者の咽頭粘膜細胞にM. pneumoniae が付着しているのを、咽頭からM. pneumoniae を分離する場合には、滅菌綿棒で咽頭の後壁を力強くこすりとることに注意を喚起しており¹⁾、国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルにおいても咽頭の後壁を強くこすりとることを留意点としている¹⁰⁾。

そこで今回我々は、同一患者の咽頭後壁、口蓋扁桃より検体を採取し、Real-time PCR法により、両検体中のM. pneumoniae 遺伝子量を比較することおよび、咽頭後壁から採取したグループと、口蓋扁桃から採取したグループそれぞれのReal-time PCR法によるM. pneumoniae 遺伝子量とM. pneumoniae イムノクロマト迅速診断キットであるプロラストMycoの結果を比較することによって、M. pneumoniae イムノクロマト迅速診断キットのより最適な採取部位を検討した。

材料と方法

2010年11月から、2013年3月までの東京都、千葉県、新潟県、福島県の総合病院および、富山市のクリニックにて発熱、乾燥咳嗽が認められ、肺炎マイコプラズマ感染症が疑われた患者を含む小児呼吸器感染症患者で、本研究に参加の同意が得られた461名を対象とした。肺炎マイコプラズマ感染症の診断は、病原体検出マニュアル記載のM. pneumoniae pl 遺伝子Nested PCR法にてM. pneumoniae のDNAが検出された場合、確定診断とした。

①MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit による

M. pneumoniae 遺伝子定量

M. pneumoniae 遺伝子定量に用いるReal-time PCR法は、MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit(Nanogen, Italy)を使用した。スタンダードDNAとして、M. pneumoniae FH株(ATCC No. 15531)より、スマイテストEX-R&Dキット((株)医学生物学研究所、長野)を用いて抽出したゲノムDNAを用いた。スタンダードDNAのコピー数は、M. pneumoniae FH株のゲノム全長811,088 bp(GenBank Acc. No. NC_017504)より1 fg=1.1コピーと換算した。Real-time PCR法の測定機器はABI PRISM[®] 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, Calif.)を用い、反応条件はキットの操作説明書に従った。

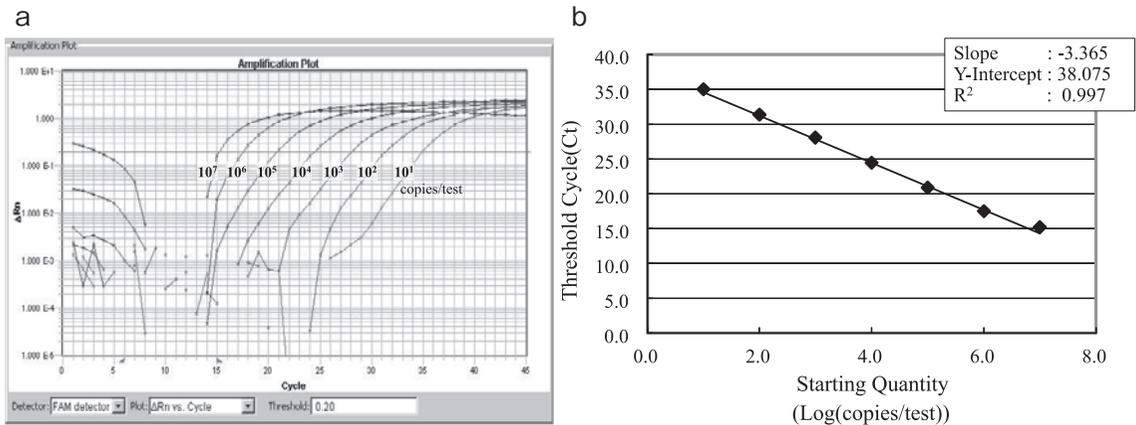


図1. MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit を用いた *M. pneumoniae* FH 株ゲノム DNA の Real-time PCR 増幅曲線と標準曲線

- a) 増幅曲線
b) 標準曲線

②同一患者の咽頭後壁採取検体と口蓋扁桃採取検体の *M. pneumoniae* 遺伝子量の比較

284名(0~15歳平均5.1歳)の同一患者から咽頭後壁および、口蓋扁桃をそれぞれ綿棒で擦過し、(株)LSIメディエンス成田研究所にて *M. pneumoniae* *pl* 遺伝子 Nested PCR 法による遺伝子検出および、Real-time PCR 法による遺伝子定量を実施した。

③咽頭後壁採取グループおよび、口蓋扁桃採取グループにおけるイムノクロマト迅速診断キット(プロラスト Myco)と PCR 法との相関と、*M. pneumoniae* 遺伝子量

患者咽頭後壁より検体を採取したグループ(93名0~17歳平均7.8歳)または、口蓋扁桃より採取したグループ(84名0~14歳平均6.1歳)の各施設にて、プロラスト Myco による迅速検査を実施した。抽出液残検体を-20℃以下にて凍結保存し、(株)LSIメディエンス成田研究所にて Nested PCR 法および、Real-time PCR 法を実施した。

結 果

①MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit による *M. pneumoniae* 遺伝子定量

MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit を用いて、 $10^7 \sim 10$ copies/test の10倍階段希釈 *M. pneumoniae* FH 株ゲノム DNA の Real-time PCR 法を実施した結果、遺伝子の濃度に準じて増幅曲線が描かれた(図1a)。また、MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit の検出感度である10 copies/test に希釈した *M. pneumoniae*

FH 株のゲノム DNA は、Ct 値が34.966を示し、 $10^7 \sim 10$ copies/test の10倍階段希釈 DNA を元に作成した標準曲線は、傾き-3.365、相関係数0.997の直線となった(図1b)。

②同一患者の咽頭後壁採取検体と口蓋扁桃採取検体の *M. pneumoniae* 遺伝子量の比較

呼吸器感染症罹患患者284名の咽頭後壁採取検体からは、25例が Nested PCR 法および、Real-time PCR 法にて *M. pneumoniae* の遺伝子増幅が確認された(陽性率8.8%)。また、本25例の口蓋扁桃採取検体においても25例全例が PCR 法陽性となり、咽頭後壁と、口蓋扁桃で PCR 法による *M. pneumoniae* の遺伝子検出結果は全て一致した。*M. pneumoniae* 遺伝子量は、咽頭後壁採取検体で $2.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^8$ copies/mL (中央値 3.0×10^6 copies/mL)、口蓋扁桃採取検体で $4.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL (中央値 1.7×10^6 copies/mL) で、25例中14例(56.0%)において、咽頭後壁が口蓋扁桃より高い遺伝子量を示した。また、咽頭後壁が、口蓋扁桃部位より10倍以上高値を示した例は、7例(28.0%最大70.3倍)認められた一方で、口蓋扁桃部位が10倍以上高値を示した例は認められなかった。Student の t 検定において検体群間には有意差は認められなかった($p=0.13$)ものの咽頭後壁が口蓋扁桃より高値の傾向を示していた(図2)。

③咽頭後壁採取グループおよび、口蓋扁桃採取グループにおける *M. pneumoniae* 遺伝子量と、プロラスト Myco と PCR 法との相関

Nested PCR 法および、Real-time PCR 法を実施し

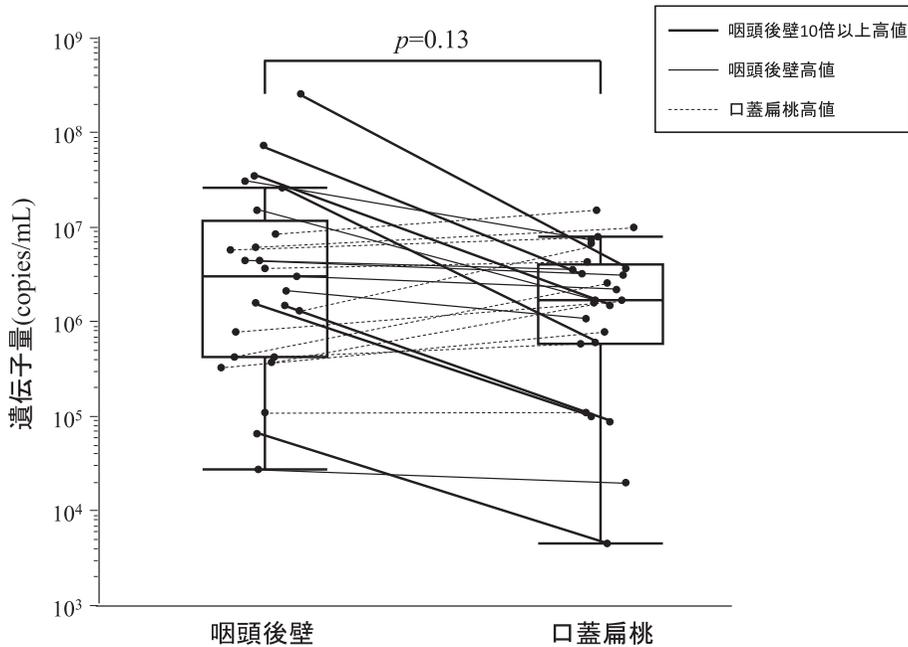


図2. 同一患者の咽頭後壁と口蓋扁桃採取検体の *M. pneumoniae* 遺伝子量

た結果、咽頭後壁採取グループ 93 例中 44 例（陽性率 47.3%）、口蓋扁桃採取グループ 84 例中 35 例（陽性率 41.7%）で *M. pneumoniae* 遺伝子の増幅が認められ、Nested PCR 法および、Real-time PCR 法の遺伝子検出結果はすべて一致した。それぞれの *M. pneumoniae* 遺伝子量は、咽頭後壁採取グループ 44 例が $1.0 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^8$ copies/mL（中央値 9.1×10^6 copies/mL）、口蓋扁桃採取グループ 35 例が $6.8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL（中央値 9.5×10^5 copies/mL）で、有意差 ($p < 0.01$) が認められた（図 3）。

咽頭後壁採取グループ 93 例のプロラスト Myco 陽性は 36 例（陽性率 38.7%）で、PCR 法との陽性一致率は 79.5%、陰性一致率は 98.0%、全体一致率は 89.2% であった。一方、口蓋扁桃採取グループ 84 例のプロラスト Myco 陽性は 8 例（陽性率 9.5%）で、PCR 法との陽性一致率は 22.9%、陰性一致率は 100.0%、全体一致率は 67.9% であった。この結果、それぞれのグループのプロラスト Myco と PCR 法の陽性一致率は、咽頭後壁採取グループが高値を示した（表 1）。

考 察

M. pneumoniae を培養や遺伝子増幅法にて検出する場合の臨床材料として、気管支肺胞洗浄液、鼻咽頭吸引液、鼻腔ぬぐい液、咽頭ぬぐい液、上咽頭吸引液、

痰、気管吸引液、経胸腔針吸引液等が用いられる¹¹⁾。咽頭ぬぐい液を用いた PCR 法の陽性率は、3.9~52.4% と差が大きく¹¹⁾、Real-time PCR 法を用いた鼻咽頭ぬぐい液からの *M. pneumoniae* の検出においては、上気道感染より、下気道感染の場合に *M. pneumoniae* 菌量が多いと報告がある¹²⁾。マイコプラズマは、基本的に咽頭・扁桃などの上気道で盛んに増殖しているわけではなく、これらの部位で検出されるマイコプラズマは、たまたま痰や咳によって下気道や、肺から運ばれてきたものであり、そもそも上気道に存在する菌の量は多くはないとの報告がある¹³⁾。

M. pneumoniae を分離する場合には、滅菌綿棒で患者咽頭の後壁を力強くこすりとることに注意を喚起しているため¹⁾、PCR 法の陽性率の差は、同じ咽頭ぬぐい液といっても採取する場所が異なることに起因するのではないかと考えられた。そこで我々は、同一患者の咽頭後壁、口蓋扁桃より検体を採取し、Real-time PCR 法により両検体中の *M. pneumoniae* 遺伝子量を比較することによって、採取部位差を確認した。

病原体検出マニュアル¹⁰⁾に記載の肺炎マイコプラズマ感染症の確定診断は、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、1. 培養法により、*M. pneumoniae* が分離同定されたとき、2. 抗体検査法により、抗体価の上昇が認められた場合の

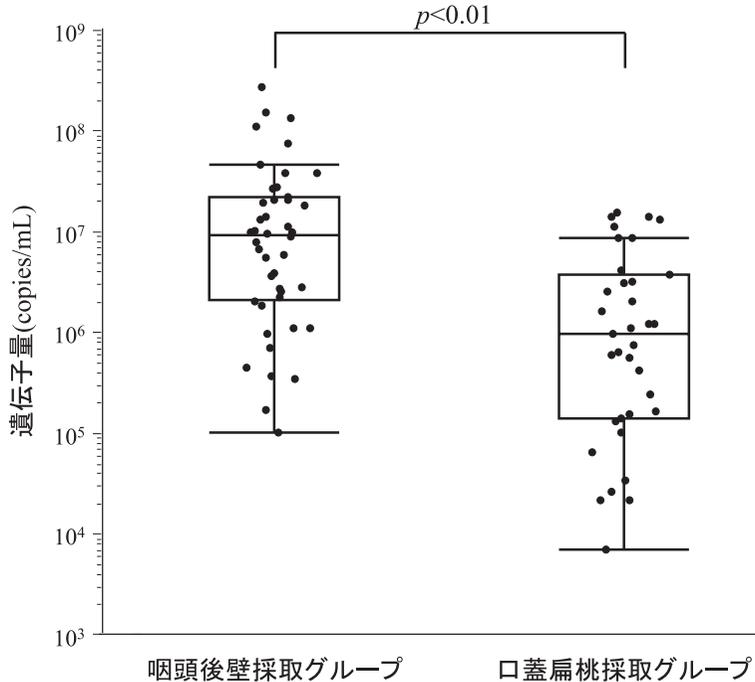


図3. 咽頭後壁採取グループおよび、口蓋扁桃採取グループの *M. pneumoniae* 遺伝子量

表1. 咽頭後壁採取グループと口蓋扁桃採取グループの
プロラスト Myco と PCR 法との相関

咽頭後壁採取グループ	PCR 法		総数
	陽性	陰性	
プロラスト Myco	陽性	35	36
	陰性	9	57
総数	44	49	93
		陽性一致率	79.5%
		陰性一致率	98.0%
		全体一致率	89.2%

口蓋扁桃採取グループ	PCR 法		総数
	陽性	陰性	
プロラスト Myco	陽性	8	8
	陰性	27	76
総数	35	49	84
		陽性一致率	22.9%
		陰性一致率	100.0%
		全体一致率	67.9%

他に、3. 遺伝子検出法で *M. pneumoniae* の DNA が検出された場合とある。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を認めた場合は、*M. pneumoniae* 感染によるものと診断できる。」との記載もあることから、今回病原体検出マニュアル記載の *M. pneumoniae* *p1* 遺伝子 Nested PCR 法による *M. pneumoniae* 遺伝子検出を確定診断とした。

M. pneumoniae の Real-time PCR 法キットは既に数製品が発売されており、今回我々は、感度に優れた¹⁴⁾ MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit を選択した。MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit は、*M. pneumoniae* *p1* 遺伝子を測定する Real-time PCR 法のキットであるが、キットにスタンダードが付属していないため、キットのみで *M. pneumoniae* 遺伝子量を定量することはできない。そこで我々は、*M. pneumoniae* ゲノム DNA 量と塩基配列数から遺伝子コピー数を算出し、ゲノム DNA をスタンダードに用いることとした。

MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit の仕様は、検出感度 10 copies/test、測定対象の Ct 値が 35 以下の場合陽性と判定するとなっている。我々が算出したコピー数から希釈調製した *M. pneumoniae* FH 株ゲノ

ム DNA 10 copies/test を MYCOPLASMA pn. Q-PCR Alert kit にて測定すると、Ct 値が 34.966 となり、キットの使用説明書の示す検出感度と Ct 値が一致した。また、 $10^7 \sim 10$ copies/test に 10 倍階段希釈した *M. pneumoniae* FH 株ゲノム DNA の標準曲線は、傾き -3.365、相関係数 0.997 の直線となったため、このゲノム DNA をスタンダードに用いることが可能であると判断された。

呼吸器感染症患者 284 名の咽頭後壁および、口蓋扁桃から採取した検体それぞれの Nested PCR 法および、Real-time PCR 法を実施した結果、25 名より *M. pneumoniae* 遺伝子が検出された。これら 25 名の咽頭後壁および、口蓋扁桃検体の Nested PCR 法および、Real-time PCR 法の結果は全例一致し、咽頭後壁のみまたは、口蓋扁桃のみから *M. pneumoniae* 遺伝子が検出された例は認められなかった。

それぞれの定量値は、咽頭後壁採取検体で $2.8 \times 10^4 \sim 2.6 \times 10^8$ copies/mL (中央値 3.0×10^6 copies/mL)、口蓋扁桃採取検体で $4.5 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL (中央値 1.7×10^6 copies/mL) であり、検体群間において遺伝子量に有意差は認められなかったものの ($p = 0.13$)、咽頭後壁採取検体に遺伝子量が多い傾向を示していた。さらに、個々を比較すると、咽頭後壁採取検体が、口蓋扁桃採取検体より 10 倍以上高値を示した例は、7 例 (28.0% 最大 70.3 倍) 認められた一方で、口蓋扁桃採取検体が 10 倍以上高値を示した例は認められなかったことから、咽頭後壁により多くの *M. pneumoniae* が存在している可能性が示された。本 Real-time PCR の感度は、10 copies/test と高感度であるため、今回は、咽頭後壁採取検体および、口蓋扁桃採取検体のいずれも陽性となったが、定量値から換算すると、例えば、感度が 200 copies/test 程度の PCR 法であれば両者の陽性率に差が生じ、PCR 法において咽頭後壁からの採取の陽性率が高くなる可能性が示唆された。これらの結果から、各 PCR 法の感度差と採取場所の差が、Loen らの報告した PCR 法の陽性率の差を示しているのではないかと考えられた。

次に、咽頭後壁採取グループおよび、口蓋扁桃採取グループのそれぞれの施設にて、プロラスト Myco による迅速検査を行い、残検体を凍結保存した後 PCR 法を実施した。その結果、PCR 法の陽性率は、咽頭後壁採取グループ 93 例で 47.3%、口蓋扁桃採取グループ 84 例で 41.7% と大差は認められなかった。一方で、プロラスト Myco と PCR 法の陽性一致率は、咽頭後壁採取グループで 79.5%、口蓋扁桃採取グループで 22.9% と明らかに咽頭後壁採取グループの陽性一

致率が高値を示した。

この異なる採取部位の陽性一致率の差は、PCR 法がプロラスト Myco に比較し、100~1000 倍高感度であることに加え、咽頭後壁から採取したグループの *M. pneumoniae* 遺伝子量が $1.0 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^8$ copies/mL (中央値 9.1×10^6 copies/mL)、口蓋扁桃部位を採取したグループが $6.8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL (中央値 9.5×10^5 copies/mL) で、有意に咽頭後壁に多くの *M. pneumoniae* が存在していた ($p < 0.01$) ことに起因したと考えられる。

増幅工程のある PCR 法はイムノクロマト法に比較して検出感度が高いことは言うまでもないが、イムノクロマト法はその簡易性、迅速性において PCR 法より優れており、陽性となった場合は早期治療に貢献することができる。イムノクロマト法を実施するにあたり、*M. pneumoniae* がより多く存在する部位から採取することで、陽性率が上がり、PCR 法との一致率に飛躍的な上昇が認められた。

PCR 法の結果の通り、口蓋扁桃部位にも *M. pneumoniae* は存在するため、菌量が十分であれば *M. pneumoniae* イムノクロマト迅速診断キットでも検出は可能である。また、小児の咽頭は狭いため咽頭後壁の擦過には技量を要するかもしれない。しかしながら、イムノクロマト迅速診断キットを用いた *M. pneumoniae* 感染診断において、より正しい検査結果を得るには、検体採取の際、咽頭後壁を力強くこすり取ることを推奨したい。

利益相反：「申告すべき利益相反なし」

文 献

- 1) 佐々木次雄. 2003. マイコプラズマ肺炎の細菌学的診断法. 日本臨床微生物学雑誌 13 (2): 101-106.
- 2) Infectious Diseases Weekly Report Japan. 2012. 第 39 週 : 7-9.
- 3) 山崎 勉. 2008. マイコプラズマ・クラミジアの病原診断. 日本小児呼吸器疾患学会雑誌 19 (1): 42-47.
- 4) 諸角美由紀, 岩田 敏, 遠藤廣子, 他. 2003. 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—. 日本化学療法学会雑誌 51 (5): 289-299.
- 5) 今井正樹, 高下恵美, 岸田典子, 他. 2012. 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「インフルエンザ診断マニュアル (第 2 版)】. p. 1-85.
- 6) 三田村敬子, 山崎雅彦, 石崎昌実, 他. 2010. パンデミック (H1N1) 2009 に対するインフルエンザウ

- イルス抗原検出試薬プロラストFluの反応性評価.
医学と薬学 64 (5): 785-789.
- 7) 田代真人, 一戸貞人, 加瀬哲男, 他. 2008. 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「RSウイルス」. p. 1-35.
 - 8) 藤本嗣人, 花岡 希, 小長谷昌未, 他. 2012. 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「咽頭結膜熱・流行性角結膜炎検査, 診断マニュアル (第2版)」. p. 1-42.
 - 9) Kikuta, H, T Ebihara, R Endo, et al. 2007. Development of a rapid chromatographic immunoassay for detection of human metapneumovirus using monoclonal antibodies against nucleoprotein of hMPV. *Hybridoma* 26 (1): 17-21.
 - 10) 大屋日登美, 堀野敦子, 見理 剛, 他. 2011. 国立感染症研究所病原体検出マニュアル「マイコプラズマ肺炎」. p. 1-45.
 - 11) Loens, K, D Ursi, H Goossens, et al. 2003. Molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* respiratory tract infections. *J. Clin. Microbiol.* 41 (11): 4915-4923.
 - 12) Chalker, VJ, T Stocki, M Mentasti, et al. 2011. *Mycoplasma pneumoniae* infection in primary care investigated by real-time PCR in England and Wales. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 30: 915-921.
 - 13) 成田光生. 2004. マイコプラズマ肺炎の迅速診断—IgM検査法を含めて—アボット感染症アワー.
 - 14) Touati, A, A Benard, A Ben Hassen, et al. 2009. Evaluation of five commercial real-time PCR assays for detection of *mycoplasma pneumoniae* in respiratory tract Specimens. *J. Clin. Microbiol.* 47 (7): 2269-2271.

A study using a Real-time PCR to determine optimal specimen collection sites for detecting *Mycoplasma pneumoniae* antigen by a rapid immunochromatographic assay kit

Yasushi Shimada¹⁾, Atsuko Minagawa¹⁾, Yumiko Hirayama¹⁾, Kazuyuki Sugiyama¹⁾, Hatsue Itagaki¹⁾, Masaki Ito²⁾, Aya Takeyama²⁾, Youichi Tomita²⁾, Hiroko Sakuma³⁾, Keiko Mitamura⁴⁾, Tomohiro Ooishi⁵⁾, Tadashi Saito⁶⁾, Michiyoshi Minato⁷⁾, Yuuki Tsukahara⁸⁾, Mitsuaki Hosoya⁹⁾

¹⁾Research & Development/Clinical Development, LSI Medience Corporation

²⁾Department of Pediatrics, Soma General Hospital

³⁾Department of Pediatrics, Hoshi General Hospital

⁴⁾Department of Pediatrics, Eiju General Hospital

⁵⁾Department of Pediatrics, Niigata University Medical & Dental Hospital

⁶⁾Department of Pediatrics, Tako Central Hospital

⁷⁾Minato Pediatric Clinic

⁸⁾Shinmei Kodomo Clinic

⁹⁾Department of Pediatrics, Fukushima Medical University School of Medicine

To consider the optimal specimen collection site in the pharyngeal region when using a rapid immunochromatographic assay kit (*Prorast Myco*) to detect *Mycoplasma pneumoniae* antigen, we quantified the number of *M. pneumoniae* genes obtained or prepared from the posterior pharyngeal wall and palatine tonsil collection sites of patients by real-time PCR. Comparison of the number of *M. pneumoniae* genes of the same patient group (N = 25) positive for *M. pneumoniae* by nested PCR showed a trend toward a higher number of genes obtained from posterior pharyngeal wall specimens than from palatine tonsil specimens. Next, comparison of the number of genes obtained from the posterior pharyngeal wall collection group (N = 44) with those from the palatine tonsil collection group (N = 35) showed significantly higher concentrations of *M. pneumoniae* genes in the posterior pharyngeal wall collection group (1.0×10^5 – 2.7×10^8 copies/mL) compared with the palatine tonsil collection group (6.8×10^3 – 1.5×10^7 copies/mL) ($p < 0.01$). In addition, the positive concordance rates between *Prorast Myco* and PCR of the posterior pharyngeal wall collection group and the palatine tonsil collection group were 79.5% and 22.9%, respectively. The positive concordance rate of the posterior pharyngeal wall collection group was significantly higher than that of the palatine tonsil collection group. For the detection of *M. pneumoniae* antigen using *Prorast Myco*, the optimal specimen collection site appears to be the posterior pharyngeal wall.