

[原 著]

全自動遺伝子解析装置 GENECUBE を利用した *Mycoplasma pneumoniae* の  
マクロライド耐性遺伝子変異検出法の構築および評価

川嶋洋介<sup>1)</sup>・上倉佳子<sup>2)</sup>・山下計太<sup>3)</sup>・野竹重幸<sup>3)</sup>  
中村浩司<sup>3)</sup>・木全伸介<sup>2)</sup>・曾家義博<sup>1)</sup>・鈴木広道<sup>4)5)</sup>

<sup>1)</sup> 東洋紡株式会社診断システム事業部

<sup>2)</sup> 東洋紡株式会社敦賀バイオ研究所

<sup>3)</sup> 筑波メディカルセンター病院臨床検査科

<sup>4)</sup> 筑波メディカルセンター病院臨床検査医学科

<sup>5)</sup> 筑波メディカルセンター病院感染症内科

(平成 29 年 7 月 18 日受付, 平成 29 年 10 月 19 日受理)

近年マクロライド耐性を有する *M. pneumoniae* が増加している。マクロライド耐性化には 23S rRNA の構造変化に関与する遺伝子変異が関わる。*M. pneumoniae* のマクロライド耐性を確認する方法として、ダイレクトシーケンスや融解曲線解析による 23S rRNA 遺伝子変異の検出が用いられる。我々は全自動遺伝子解析装置 GENECUBE を使用し、PCR-Quenching Probe (QProbe) 法により *M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子を検出し、主要なマクロライド耐性遺伝子変異である 2063 位および 2064 位の置換変異の有無を確認する検出系を構築した。本検出系を用いた融解曲線解析によって、23S rRNA 遺伝子の 2063 位または 2064 位の変異の有無は明確に区別された。最小検出感度は 25 コピーであり、*M. pneumoniae* 以外の *Mycoplasma* 属細菌 5 種および *Mycoplasma* 属以外の細菌 15 種との交差反応を示さなかった。この検出系を用いて 832 例の咽頭後壁擦過物を測定したところ、*M. pneumoniae* 陽性は 261 例、陰性は 571 例であった。*M. pneumoniae* 陽性例のうち検体抽出液の保管が可能であった 217 例を対象にダイレクトシーケンスによる 23S rRNA 遺伝子の変異解析を行った。シーケンス解析が可能であった 173 例のうち野生型であると確認された 82 例について、本検出系で得られた融解曲線の検出ピークの温度は  $57.5 \pm 1.16^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) であり、変異型であった 91 例について、本検出系で得られた融解曲線の検出ピークの温度は  $47.8 \pm 1.85^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) であった。本検出系の測定結果から推測された遺伝子型はダイレクトシーケンスによる 23S rRNA 遺伝子の解析結果と 100% 一致した。

**Key words:** *Mycoplasma pneumoniae*, PCR, macrolide resistance, GENECUBE, QProbe

序 文

*Mycoplasma pneumoniae* は非定型肺炎の代表的な

原因菌の一つであり、若年性の非定型肺炎では最も多い原因菌である<sup>1)</sup>。*M. pneumoniae* 感染症は  $\beta$  ラクタム系の抗菌薬が奏効せず、治療は主にマクロライド系抗菌薬を使って行われる。使用できる抗菌薬に限られる *M. pneumoniae* 感染症を迅速かつ正確に特定することは臨床的に重要であるが、細菌検出において確定的な検査法である培養法で *M. pneumoniae* を検出するには数日から数週間を必要とする。早期診断を目的とした *M. pneumoniae* の検出は主に抗原検出、抗体検出、そして遺伝子検査によって行われる<sup>2)</sup>。

著者連絡先：(〒530-8230) 大阪府大阪市堂島浜二丁目 2 番 8 号  
東洋紡株式会社診断システム事業部  
川嶋洋介  
TEL: 06-6348-3335  
FAX: 06-6348-3833  
E-mail: yosuke\_kawashima@toyobo.jp

しかし近年、日本ではマクロライド系抗菌薬に耐性を有する *M. pneumoniae* が増加しており<sup>3)~5)</sup>、これが *M. pneumoniae* 感染症の治療が難渋する原因の一つになっている。*M. pneumoniae* のマクロライド耐性化には 23S rRNA のドメイン V の変異によるリボソームの構造変化が関係することが報告されており、薬剤耐性の確認には 23S rRNA ドメイン V 領域の遺伝子変異の確認が有効である<sup>6)7)</sup>。これまでに、23S rRNA の 2063 位、2064 位、2617 位のいずれかの塩基の置換変異が生じた株はマクロライド系抗菌薬に耐性を有することが明らかにされている。変異の頻度は 2063 位または 2064 位のいずれかが多く、2617 位は少数である<sup>8)</sup>。2063 位または 2064 位に変異が生じた株はマクロライド系抗菌薬に対して高度耐性を示す一方、2617 位に変異が生じた株は軽度耐性であることが報告されている<sup>7)</sup>。変異解析の方法には、シーケンス法の他、融解曲線解析により 23S rRNA 遺伝子の変異を検出する方法も報告されている<sup>7)9)~11)</sup>。これらの方法は 1 日以内に *M. pneumoniae* の遺伝子検出と薬剤耐性の推測を同時に行えるため、臨床的な意義は大きい。一方で、これらの方法は専用の装置および試薬が必要であることに加え、分子生物学検査のスキルを有する人員が実施することが求められるため、医療施設で広く実施されるには至っていないのが本邦の現状である。

筆者らは試料からの核酸抽出、試薬の分注混和、核酸増幅、検出までの工程を全て自動的にかつ 1 時間以内に実施することが可能な全自動遺伝子解析装置 GENECUBE (東洋紡株式会社) を利用して、*M. pneumoniae* を迅速に検出し、さらに 23S rRNA 遺伝子の 2063 位または 2064 位の変異の有無を確認することを目的とした PCR-QProbe 法を構築し、基礎性能確認を行った。さらに、構築した検出系を用いて臨床検体からマクロライド耐性 *M. pneumoniae* の検出を試みたので報告する。

## 材料と方法

### 試薬組成および標的遺伝子検出方法

*M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子のドメイン V 領域を PCR によって増幅するように設計したプライマーと、増幅された領域のうち 23S rRNA 遺伝子の 2063 位および 2064 位を含む部分的な塩基配列を有する QProbe を用いて、*M. pneumoniae* の検出系を構築した。QProbe とは蛍光色素がグアニン塩基に接近することで消光する現象を利用した消光プローブである<sup>12)</sup>。

この検出系はプライマー、QProbe、およびジーンキューブテストベーシック (東洋紡株式会社) の KOD Mix, PPD Mix の組成をベースとして構築した。1 反応系あたりの液量は、試薬組成 9.2  $\mu$ L と核酸試料 4  $\mu$ L とした。PCR および融解曲線解析による PCR 産物検出は GENECUBE を用いて行った。PCR は、まず 94°C で 30 秒間加温し、PCR の 1 サイクルを、変性が 97°C 1 秒間、アニーリングが 58°C 3 秒間、伸長が 63°C 5 秒間として、60 サイクル行った。PCR 終了後は、反応系を 94°C で 30 秒間加温し、次に 39°C で 30 秒間冷却した。30 秒間の冷却後は 0.09°C/秒の昇温速度で 75°C まで上昇させた。等温昇温反応中の蛍光量をモニタリングし、GENECUBE の専用解析ソフトウェアを用いて融解曲線解析を行った。本検出系は、ジーンキューブテストピロリ 23S rRNA (東洋紡) による 23S rRNA 遺伝子変異の検出と同様の構築思想に基づいて、マイコプラズマ用に設計されたプライマーと QProbe を用いて構築され、ジーンキューブマイコプラズマ・ニューモニエとして、東洋紡株式会社より販売されている<sup>13)</sup>。

### M. pneumoniae 23S rRNA 遺伝子検出確認試験

構築した検出系が *M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子を検出できることを確認するため、*M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子のうち、本検出系で増幅される塩基配列を含むプラスミドを構築し、確認試験の試料とした。プラスミドの構築は以下の通り実施した。*M. pneumoniae* M129 株から抽出された DNA を試料として、23S rRNA 遺伝子の 2063 位、2064 位を含む領域を PCR によって増幅した。PCR 産物は T4 Polynucleotide Kinase (東洋紡株式会社) でリン酸化した。プラスミドベクター pUC19 を SmaI で制限酵素処理し、*E. coli* Alkaline Phosphatase (東洋紡株式会社) で脱リン酸化した。リン酸化した PCR 産物と脱リン酸化した pUC19 とを Ligation high (東洋紡株式会社) を用いて 16°C で 45 分間処理しライゲーションを行った。ライゲーション反応物を Competent high DH5 $\alpha$  (東洋紡株式会社) に添加して形質転換を行い、アンピシリンを含む LB 寒天培地を用いて 37°C で一晚培養し、形質転換体のセクションを行った。セクションで得られたコロニーを LB 液体培地 3 mL を用いて 37°C で一晚培養し、培養液を全量回収して QIAprep Spin Miniprep Kit (株式会社キアゲン) を用いてプラスミドを精製、回収した。これを野生型 23S rRNA 遺伝子の部分的塩基配列を有するプラスミドとした。また、このプラスミドを鋳型とし、KOD-Plus-Mutagenesis DH5 $\alpha$  Set (東洋紡株式会社) および 23S

Table 1. Primers for sequencing the 23S rRNA gene of *M. pneumoniae*. These primers have been described previously<sup>7)</sup>

Primer name	Sequence (5' to 3')	Position
MN23SDVF	GCAGTGAAGAACGAGGGG	1758-1775
MN23SDVR	GTCCTCGCTTCGGTCCTCTCG	2664-2684

rRNA 遺伝子の 2063 位または 2064 位のアデニンがグアニンに置換されるよう設計した inverse PCR 用プライマーを用いて、inverse PCR による置換変異導入を行い、23S rRNA 遺伝子の部分的塩基配列のうち 2063 位がアデニンからグアニンに置換されたプラスミド、および 2064 位がアデニンからグアニンに置換されたプラスミドを得た。

これらのプラスミドを各 500 コピー/μL に調製して試料とし、構築した検出系を用いて測定した。また、陰性対照として、ジーンキューブテストベーシックに含まれている PP Sol を試料として、同様の測定を行った。

#### 感度試験

野生型 23S rRNA 遺伝子の部分的塩基配列を有するプラスミドを 6.25 コピー/μL および 5 コピー/μL となるよう調製したものを試料として測定した。

#### 特異性試験

*Mycoplasma* 属として、*M. pneumoniae*, *M. bovis*, *M. fermentans*, *M. genitalium*, *M. orale*, *M. salivarium*, および *Mycoplasma* 属以外の細菌で呼吸器感染の起因菌になりうる *Bordetella pertussis*, *Chlamydia pneumoniae*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Haemophilus influenzae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Legionella pneumophila*, *Moraxella catarrhalis*, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Serratia marcescens*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae* の合計 21 種について、それぞれの菌から抽出された DNA を 10,000 コピー/μL に調製したものを試料として測定した。

#### 臨床検体およびシーケンス解析用試料

筑波メディカルセンター病院において、2016 年 9 月 26 日より 2017 年 3 月 31 日の期間、*M. pneumoniae* 感染症が疑われる患者より診療目的で FLOQ スワブ 5 U005S デュアル (コパン社イタリア) を用いて採取された咽頭後壁擦過物を本研究の対象検体とした。さらに、各検体から調製したアルカリ性の検体抽出液を -30°C で保管し、シーケンス解析用試料とした。

2016 年 9 月 26 日から 2016 年 11 月 30 日の期間に得られた試料 140 例については、シーケンス解析のプロトコル精度を確認する目的で、GENECUBE における解析結果を確認後シーケンス解析を実施した。2016 年 12 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日の期間に得られた検体 77 例については、GENECUBE における解析結果を考慮せずにシーケンス解析を実施した。臨床検体の取扱いについては筑波メディカルセンター病院倫理委員会で承認済み (承認番号 2016-043) であることを確認して実施した。

#### 核酸抽出

咽頭後壁擦過物を採取したスワブはジーンキューブマイコプラズマ・ニューモニエの添付文書に記載されている検体抽出法に従って処理し前処理済み試料を得た。前処理済み試料からの核酸抽出は GENECUBE の取扱説明書に従い実施した。

#### 臨床検体中の *M. pneumoniae* DNA 検出

臨床検体より抽出された核酸を試料として、GENECUBE 及びジーンキューブマイコプラズマを用いて *M. pneumoniae* DNA の検出を行った。測定条件は前述の試薬組成および標的遺伝子検出方法に記載の条件に準じた。

#### シーケンス解析

本法で測定し *M. pneumoniae* 陽性となった臨床検体を対象に、23S rRNA 遺伝子の塩基配列を確認する目的で PCR ダイレクトシーケンスを行った。GENECUBE を用いたマイコプラズマの検出工程で得られた抽出液の残液を試料として Table 1 に掲載したプライマーを用いた PCR を行った。PCR 反応液の一部を Exo-SAP IT (Thermo Fisher Scientific Inc.) で処理した後、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてサイクルシーケンス反応を実施し解析用試料とした。試料は 3730 DNA Analyzer (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いてシーケンス解析を行った。得られたシーケンスデータから 23S rRNA 遺伝子の 2063 位、2064 位、および 2617 位の塩基を確認した。

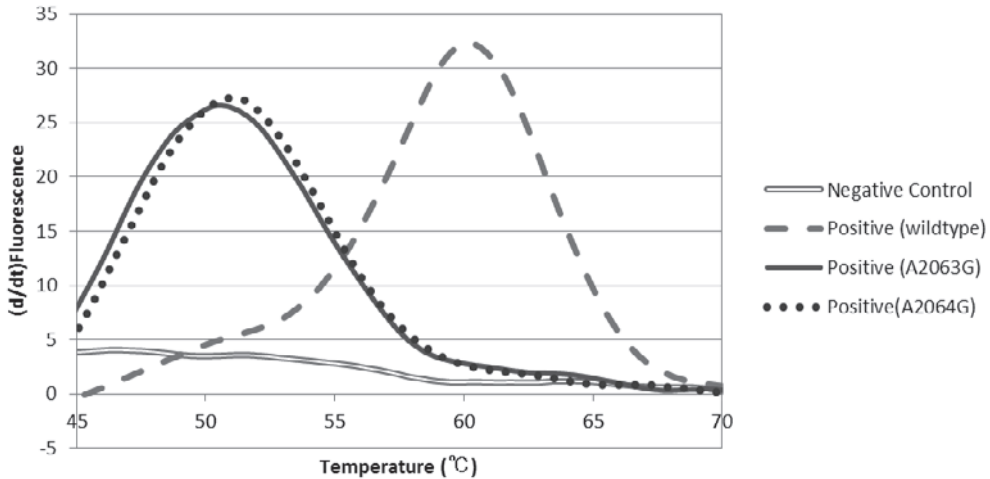


Figure 1. Melting curve analyses for detecting plasmids and negative controls

“Negative Control” is the result of the melting curve analysis obtained after detecting the negative control sample. “Positive (wild-type)” is the result of detecting a plasmid containing a partial region of the wild-type 23S rRNA gene of *M. pneumoniae*. “Positive (A2063G)” is the result of detecting a plasmid containing a partial region of *M. pneumoniae* 23S rRNA gene of the A2063G type. “Positive (A2064G)” is the result of detecting a plasmid containing a partial region of *M. pneumoniae* 23S rRNA gene of the A2064G type.

## 結 果

### PCR-QProbe 法による *M. pneumoniae* の検出

*M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子の部分配列を含むプラスミドを試料として測定した結果を Figure 1 に示した。野生型の配列は、融解曲線解析の検出ピークの温度が  $60.2 \pm 0.16^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) であった。これに対して、変異型の配列は、検出ピークの温度が  $50.9 \pm 0.92^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) となり、野生型の試料の検出ピークと比較して約  $10^\circ\text{C}$  低下していた。塩基置換がある場合、その箇所によらず融解曲線解析で得られる検出ピークの温度は変わらなかった。以上の結果から、本検出系は *M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺伝子の 2063 位または 2064 位の塩基がアデニンからグアニンに置換された場合に、融解曲線解析によって野生型と区別して検出されることが示された。

### 感度および再現性試験

野生型の 23S rRNA 遺伝子の部分配列を含むプラスミド試料を用いて、本検出系の検出感度確認試験 ( $n=16$ ) を行った。その結果、Table 2 に示した通り、濃度を  $6.25$  コピー/ $\mu\text{L}$  ( $25$  コピー/テスト) に調製したプラスミド試料は、全て陽性として検出された。より低濃度である  $5$  コピー/ $\mu\text{L}$  ( $20$  コピー/テスト) に調製したプラスミド試料では、 $5$  テストは陰性として検出され、検出率は  $68.8\%$  であった。本検討結果か

ら、構築された検出系では 1 反応液中に  $25$  コピー以上存在すれば再現性良く検出できることを確認した。

### 特異性試験

*M. pneumoniae* を含む *Mycoplasma* 属 6 種、および *Mycoplasma* 属以外の細菌で呼吸器感染の起原菌となりうる 15 種から抽出された DNA をそれぞれ  $10,000$  コピー/ $\mu\text{L}$  ( $40,000$  コピー/テスト) に調製したものを試料として測定し、本検出系の特異性試験を行った。結果は Table 3 に掲載した通り、*M. pneumoniae* は検出され、それ以外の細菌種は本検出系では一切検出されなかった。

### 臨床検体の測定およびシークエンス解析

筑波メディカルセンター病院にて咽頭後壁擦過物 832 例を試料として、本検出系による *M. pneumoniae* 遺伝子検出を行い、261 例が *M. pneumoniae* 陽性、571 例が *M. pneumoniae* 陰性となった。

2016 年 9 月 26 日から 2016 年 11 月 30 日の期間に本検出系で *M. pneumoniae* 陽性となった試料のうち、シークエンス解析試験が可能であった 140 例を対象として 23S rRNA 遺伝子のシークエンス解析を行い、2063 位、2064 位、2617 位の塩基配列を確認した。解析を行った 140 例のうち 121 例は配列解析が可能な波形シグナルが得られたが、19 例は、明瞭な波形シグナルが得られず解析不能だった。解析可能例のうち、23S rRNA 遺伝子に変異が認められたものは 61

Table 2. Results of the sensitivity and repeatability tests for the detection method

Content of sample	Detected / Tested
25 copies/test	16 / 16
20 copies/test	11 / 16

例 (50.4%) あり, 変異は全て 2063 位に生じていた。3 か所に変異が認められない野生型は 60 例 (49.6%) であった。同様に, 2016 年 12 月 1 日から 2017 年 3 月 31 日の期間に本検出系で *M. pneumoniae* 陽性となった試料のうち, シークエンス解析試験が可能であった 77 例を対象として 23S rRNA 遺伝子のシークエンス解析を行った結果, 52 例は配列解析が可能であり, 25 例は解析不能だった。解析可能例のうち, 23S rRNA 遺伝子に変異が認められたものは 30 例 (57.7%) あり, うち 2063 位の変異が 29 例, 2064 位の変異が 1 例であった。3 か所に変異が認められない野生型は 22 例 (42.3%) であった。

両期間におけるシークエンス解析可能例 173 例中, 変異型は 91 例 (52.6%), 野生型は 82 例 (47.4%) であった。変異が認められた塩基の内訳は 2063 位が 90 例, 2064 位が 1 例, 2617 位が 0 例であった (Table 4)。解析された範囲において複数の塩基が同時に変異した試料は認められなかった。

シークエンス解析により 23S rRNA 遺伝子の 2063 位および 2064 位がアデニンであると確認された試料は, GENECUBE による測定で検出ピークが生じた温度が  $57.5 \pm 1.16^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) であった。一方, シークエンス解析により 2063 位または 2064 位がグアニンに置換していることが確認された試料は, GENECUBE による測定で検出ピークが生じた温度は  $47.8 \pm 1.85^\circ\text{C}$  (平均  $\pm 2 \times$  標準偏差) であり, 野生型試料を測定した場合よりも検出ピークが約  $10^\circ\text{C}$  低温に現れていた。GENECUBE による測定での検出ピーク温度から推測される遺伝子型と, ダイレクトシークエンスによる塩基配列確認結果とに乖離はなく, GENECUBE による測定結果とダイレクトシークエンスの結果とが 100% 一致したことを確認した。

## 考 察

本研究では, 核酸抽出から検出までを全自動で行う GENECUBE に適合した PCR-QProbe 系を開発することで, 核酸抽出から遺伝子増幅および検出までの工程が自動的に実施される *M. pneumoniae* の 23S

Table 3. Results of the specificity test for the detection method

Species name	The detection method
<i>Mycoplasma pneumoniae</i>	+
<i>Mycoplasma bovis</i>	-
<i>Mycoplasma fermentans</i>	-
<i>Mycoplasma genitalium</i>	-
<i>Mycoplasma orale</i>	-
<i>Mycoplasma salivarium</i>	-
<i>Bordetella pertussis</i>	-
<i>Chlamydomphila pneumoniae</i>	-
<i>Corynebacterium diphtheria</i>	-
<i>Haemophilus influenzae</i>	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-
<i>Legionella pneumophila</i>	-
<i>Moraxella catarrhalis</i>	-
<i>Mycobacterium avium</i>	-
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	-
<i>Neisseria meningitidis</i>	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	-
<i>Serratia marcescens</i>	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	-

rRNA 遺伝子検出系を構築した。構築した検出系に使用した QProbe は 2063 位周辺の配列を含む野生型と完全相補配列であるため, 試料中の 23S rRNA 遺伝子中の 2063 位または 2064 位に塩基置換が生じた場合, 標的遺伝子と QProbe とに 1 塩基のミスマッチが生じる。そのため, 融解曲線解析において, 2063 位, 2064 位に変異が生じた試料は, 野生型試料に比して約  $10^\circ\text{C}$  検出ピーク温度が低下することを確認した (Figure 1)。また, 本研究では, 検出系の検出感度が 25 コピー/テストであることを確認した (Table 2)。これはプラスミド試料を用いた検討であり, 実際の検体あるいは *M. pneumoniae* の分離株を用いた検出感度評価は実施しなかった。日馬らによって報告された臨床検体を用いた本検出系の感度評価では, *M. pneumoniae* 感染症と診断された症例由来の咽頭検体 32 例のうち, 30 例から本検出系により *M. pneumoniae* が検出されており, 臨床診断を基準とした本検出系の感度は 93.8% であった<sup>13)</sup>。また, 中嶋らの報告では, 微粒子凝集 (PA) 法との陽性一致率が 82.5%, Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP) 法との陽性一致率が 97.5% であり, PA 法との陽性一致率はやや低値であったが, LAMP 法との相関は良好であっ

Table 4. Correlation between the results of direct sequencing and the temperature at which the peak was detected by the GENE CUBE assay

Genotype of 23SrRNA gene and the number of samples.	The number of obtained temperature of detecting peak with the detection method.		
	Not detected	57.5 ± 1.16°C (mean ± 2SD)	47.8 ± 1.85°C (mean ± 2SD)
Wild-type (82)	0	82	0
A2063G (90)	0	0	90
A2063C (0)	0	0	0
A2063T (0)	0	0	0
A2064G (1)	0	0	1
A2064C (0)	0	0	0
A2064T (0)	0	0	0
C2617G (0)	0	0	0
C2617A (0)	0	0	0
C2617T (0)	0	0	0
Total (173)	0	82	91

た<sup>11)</sup>。本研究および既報では、検体を用いた検出限界感度の評価が行われていないため、検体を用いた検出限界感度評価を実施することによって、本検出系の性能評価が可能となる。

ダイレクトシーケンシング法により 23S rRNA 遺伝子変異が解析された臨床検体 173 例全てで、2063 位および 2064 位の置換変異の有無が、本検出系で得られた検出ピークの温度から推測される遺伝子型と 100% 一致した。シーケンシング解析により遺伝子型が解析された 173 例のうち 91 例は 23S rRNA 遺伝子のドメイン V 領域に変異を有する変異型、82 例は変異を有しない野生型であり、変異型が占める割合は 52.6% だった (Table 4)。2013 年に日本国内の複数地域で実施されたマクロライド耐性型 *M. pneumoniae* 調査では、耐性型 *M. pneumoniae* の比率は 50~93%<sup>4)</sup>、2012 年から 2014 年にかけて北海道で実施された同様の調査でも耐性型 *M. pneumoniae* は 53.7% であった<sup>5)</sup>。また、本研究で報告した検出系を用いた先行研究では、本検出系を用いて咽頭検体中の *M. pneumoniae* を検出した際の検出ピーク温度からマクロライド耐性変異の有無を推測してマクロライド耐性率を算出しており、耐性率はそれぞれ、91.0%、76.7% であった<sup>11)13)</sup>。本研究で確認された変異率もこれら既報と同様の水準であり、依然としてマクロライド耐性型 *M. pneumoniae* の比率は高いことが示唆された。

本研究で 23S rRNA 変異が確認できた臨床検体 91 例のうち、A2063G は 90 例 (98.9%)、A2064G は 1 例 (1.1%) で、解析した範囲においてそれ以外の変異は認められなかった。*M. pneumoniae* の 23S rRNA 遺

伝子変異のうち 2063 位の変異が多数を占める結果であったことは過去の報告と一致するが<sup>4)5)7)8)</sup>、既報では変異率や置換変異の種類に地域差が認められている<sup>4)5)</sup>。本研究で使用された QProbe の配列には 2617 位周辺の配列が含まれていないため、2617 位が変異した試料は、本検出系で構築した検出系では野生型と判定される。本検出系では検出できない 2617 位の塩基置換も、2063 位および 2064 位の置換変異と同様にマクロライド耐性を有するため<sup>7)8)</sup>、本検出系で検出できないマクロライド耐性変異が存在することには留意する必要がある。

マクロライド耐性株による *M. pneumoniae* 感染症に罹患した患者と、マクロライド感受性株による感染症に罹患した患者とに対してマクロライド系抗菌薬を投与すると、前者は後者よりも有熱期間が約 3 日間長いことが知られている<sup>14)</sup>。マクロライド耐性株による感染症に罹患した患者に対しては、ミノサイクリンやトスフロキサシンの投与により有熱期間が 1~2 日間短縮され、*M. pneumoniae* の菌量も早期に減少するため<sup>15)~17)</sup>、短期間での治療が可能である。従来は医療機関を受診した *M. pneumoniae* 感染症患者の臨床所見や通常の検査所見のみで、患者が感染した *M. pneumoniae* のマクロライド耐性を推測し、適切な治療薬を選択することは困難であった。本研究で構築した検出系を用いて *M. pneumoniae* の検出および 23S rRNA 遺伝子変異の有無の確認を行うことで、日常診療の中でマクロライド耐性を考慮した *M. pneumoniae* 感染症の治療薬選択を行える可能性が考えられる。本研究は *M. pneumoniae* の検出系構築および当

該検出系の性能評価を行った研究であるため、本検出系の臨床的効果について今後検討が必要である。

本研究では、PCR および QProbe を用いた *M. pneumoniae* 23S rRNA 遺伝子の検出系構築および性能評価を行った。臨床検体を用いた性能評価では、ダイレクトシーケンスによる 23S rRNA 遺伝子の変異解析結果と、本検出系の結果から推測される遺伝子型とが 100% 一致した。そのため、本検出系はマクロライド耐性を引き起こす主要な遺伝子変異の迅速検出系としても使用できる可能性があると考えられた。一方で、本研究で用いた臨床検体は 1 施設のみで採取されたためサンプルサイズが十分ではなく、またダイレクトシーケンス法の対象とした臨床検体 217 例中、解析不能例が 44 例 (20.3%) 発生したが、その原因として、試料を -30℃ で保管したことと、凍結融解を行ったことによる影響を否定できないことから、本検出系の臨床性能評価にはさらなる検討が必要であると考えられる。

**利益相反：**川嶋洋介、および共著者である上倉佳子、木全伸介、曾家義博は東洋紡株式会社の社員である。その他、申告事項なし。

## 文 献

- 1) Korppi, M., T. Heiskanen-Kosma, M. Kleemola. 2004. Incidence of community-acquired pneumonia in children caused by *Mycoplasma pneumoniae*: serological results of a prospective, population-based study in primary health care. *Respirology* 9: 109-114.
- 2) Loens, K., M. Ieven. 2016. *Mycoplasma pneumoniae*: current knowledge on nucleic acid amplification techniques and serological diagnostics. *Front Microbiol* 7: 448.
- 3) Morozumi, M., S. Iwata, K. Hasegawa, et al. 2008. Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in pediatric patients with community-acquired pneumonia. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 348-350.
- 4) Kawai, Y., N. Miyashita, M. Kubo, et al. 2013. Nationwide surveillance of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 4046-4049.
- 5) Ishiguro, N., N. Koseki, M. Kaiho, et al. 2016. Regional differences in prevalence of macrolide resistance among pediatric *Mycoplasma pneumoniae* infections

in Hokkaido, Japan. *Jpn J Infect Dis* 69: 186-190.

- 6) Okazaki, N., M. Narita, S. Yamada, et al. 2001. Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol Immunol* 45: 617-620.
- 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) 成田光男. 2007. 薬剤耐性マイコプラズマの現状と今後の展望. *モダンメディア* 53: 297-305.
- 9) Wolff, BJ., WL. Thacker, SB. Schwartz, et al. 2008. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* by real-time PCR and high-resolution melt analysis. *Antimicrob Agents Chemother* 52: 3542-3549.
- 10) 吉田愛美, 高橋一人, 齋藤泰智, 他. 2016. QP 法によるマクロライド耐性マイコプラズマの検出. *医学検査* 65: 166-171.
- 11) 中嶋英子, 石井栄三郎, 松岡大輔, 他. 2016. Quenching Probe PCR 法によるマクロライド耐性肺炎マイコプラズマの診断. *小児科学会誌* 120: 736-743.
- 12) Kurata, S., T. Kanagawa, K. Yamada, et al. 2001. Fluorescent quenching-based quantitative detection of specific DNA/RNA using a BODIPY(R) FL-labeled probe or primer. *Nucleic Acids Res* 29: E34.
- 13) 日馬由貴, 小柴 学, 佐野克典. 2016. 富士市における 2015-2016 年流行 *Mycoplasma pneumoniae* のマクロライド耐性状況. *日臨徴誌* 26: 244-247.
- 14) Suzuki, S., T. Yamazaki, M. Narita, et al. 2006. Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrob Agents Chemother* 50: 709-712.
- 15) Okada, T., M. Morozumi, T. Tajima, et al. 2012. Rapid effectiveness of minocycline or doxycycline against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infection in a 2011 outbreak among Japanese children. *Clin Infect Dis* 55: 1642-1649.
- 16) Kawai, Y., N. Miyashita, M. Kubo, et al. 2013. Therapeutic efficacy of macrolides, minocycline, and tosylfloxacin against macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in pediatric patients. *Antimicrob Agents Chemother* 57: 2252-2258.
- 17) 河合泰宏. 2014. マクロライド耐性マイコプラズマの疫学と抗菌薬の有効性に関する検討. *日治療会誌* 62: 110-117.

## Construction and evaluation of a method for detecting genetic mutations for macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* with an auto gene analyzer, GENECUBE

Yosuke Kawashima<sup>1)</sup>, Yoshiko Uekura<sup>2)</sup>, Keita Yamashita<sup>3)</sup>, Shigeyuki Notake<sup>3)</sup>,  
Koji Nakamura<sup>3)</sup>, Shinsuke Kimata<sup>2)</sup>, Yoshihiro Soya<sup>1)</sup>, Hiromichi Suzuki<sup>4) 5)</sup>

<sup>1)</sup>Diagnostic System Department, TOYOBO CO., LTD.

<sup>2)</sup>Tsuruga Institute of Biotechnology, TOYOBO CO., LTD.

<sup>3)</sup>Department of Clinical Laboratory, Tsukuba Medical Center Hospital

<sup>4)</sup>Department of Clinical Laboratory Medicine, Tsukuba Medical Center Hospital

<sup>5)</sup>Division of Infectious Diseases, Department of Medicine, Tsukuba Medical Center Hospital

The incidence of macrolide-resistant *M. pneumoniae* has increased in recent years. Mutations in the 23S rRNA gene are known to cause changes in the ribosome structure, which are related to macrolide resistance. Therefore, detection of mutations in the 23S rRNA gene using direct sequencing or melting curve analysis is the method of choice for confirming macrolide resistance in *M. pneumoniae* samples. In this study, we developed a detection method using the fully automated gene analysis GENECUBE and the PCR-Quenching Probe (QProbe). This method can be used for detecting the 23S rRNA gene of *M. pneumoniae* and identifying 2063 and 2064 base mutations, which are the main mutations responsible for macrolide resistance. The presence or absence of mutations at the position 2063 or 2064 of 23S rRNA gene can be clearly distinguished using the melting curve analysis. Utilizing this method, we examined 832 posterior pharyngeal wall samples and found that 261 were *M. pneumoniae*-positive and 571 were negative. We analyzed mutations in the 23S rRNA gene by direct sequencing of the 217 samples that were preserved from the extracted *M. pneumoniae*-positive samples. Among the 173 samples that were successfully analyzed by direct sequencing, 82 were found to be wild-type by direct sequencing. The mean fluorescence peak temperature of these samples was  $57.5 \pm 1.16^\circ\text{C}$  (mean  $\pm$  2SD). The remaining 91 samples were found to be mutants. The mean fluorescence peak temperature of these samples was  $47.8 \pm 1.85^\circ\text{C}$  (mean  $\pm$  2SD). The genotype obtained using our detection method was 100% consistent with the results obtained by direct sequencing of the 23S rRNA gene.