

原 著

Mycoplasma pneumoniae 感染症における DNA プローブ法の検討

東京女子医科大学 小児科学教室(主任: 福山幸夫教授)

1) ラジオアッセイ科, 2) 微生物学免疫学教室

エバトケイコ ・ イトウチカコ ・ ヨコタ カズコ ・ フクヤマ ユキオ
 江波戸景子 ・ 伊藤知賀子 ・ 横田 和子 ・ 福山 幸夫
 イワチカチズコ¹⁾ ・ デムラ レイコ¹⁾ ・ アラアケミナコ²⁾ ・ ウチヤマ タケヒコ²⁾
 岩近千津子¹⁾ ・ 出村 黎子¹⁾ ・ 荒明美奈子²⁾ ・ 内山 竹彦²⁾

(受付 平成4年7月31日)

Evaluation of DNA Probe-Assay for Detection of *Mycoplasma pneumoniae*

Keiko EBATO, Chikako ITO, Kazuko YOKOTA, Yukio FUKUYAMA,
 Chizuko IWACHIKA¹⁾, Reiko DEMURA¹⁾, Minako ARAAKE²⁾
 and Takehiko UCHIYAMA²⁾

Department of Pediatrics, ¹⁾Radioassay Center, ²⁾Department of Microbiology and Immunology,
 Tokyo Women's Medical College

A DNA probe-assay with Gen-Probe kit was used to detect *Mycoplasma pneumoniae* infections. Thirty-three patient who visited our out-patient clinic complaining of cough and fever were suspected to have *Mycoplasma pneumoniae* infection based on clinical course, chest X-ray and blood examination findings. Throat swabs taken from these patients were examined for *Mycoplasma pneumoniae* ribosomal RNA using the DNA probe-assay. Twenty-four of the 33 patients were positive for DNA assay. The positivity rate was higher in cases not receiving effective antibiotics against *Mycoplasma pneumoniae* than in cases receiving appropriate medications.

The positivity rate was not affected by patient age or clinical severity. Our investigation has demonstrated that DNA probe-assay can be applied to rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection.

緒 言

Mycoplasma pneumoniae (*M.pn*) 感染症は幼児から学童を中心に流行し、肺炎、気管支炎等の気道炎症や、時に肝障害、脳炎等の多彩な症状を呈する。*M.pn* は細胞壁を有さないため、細胞壁合成阻害作用のペニシリン系抗生剤や、セファロスポリン系抗生剤に感受性を示さず、マクロライド系抗生剤やテトラサイクリン系抗生剤が有効である。そこで早期に診断し、有効抗生剤を使用することが重要である。現在、*M.pn* 感染の診断は、咽頭ぬぐい液からの病原体の分離培養、または補体結合反応 (complement fixation; CF)、受働赤血球凝集反応 (passive hemagglutination; PHA)

などの血清診断によって行われている。しかし、*M.pn* は遅発育性で、分離培養には5から30日を要し、また血清抗体価の上昇にも7から14日が必要で、早期診断には適さない。我々は、DNAプローブを用いた *M.pn* 検出キットにより、*M.pn* 感染診断の臨床的検討を行った。

対象および方法

1. 対象

1991年9月から1992年1月までに、咳、発熱などを主訴に、東京女子医科大学小児科外来を受診し、臨床経過、血液検査、胸部X線検査等より *M.pn* 感染と考えられた33例である。年齢は8カ月から15歳で、平均年齢は5.3歳であった。胸部

X線診断は、肺炎16例、気管支炎17例であった。問診より、咳、発熱等の症状出現日を第1病日とし、検体採取は第2病日から第40病日の間で行った。

2. 方法

1) DNAプローブ法

Gen-Probe社開発の *M. pn* 検出キットは、咽頭ぬぐい液中の *M. pn* を核酸ハイブリダイゼーション法を利用して直接検出するものである。核酸ハイブリダイゼーション法は、相補的な一本鎖核酸同士が適当な条件下で、安定な二本鎖核酸複合体を形成することを利用した方法で、本キットは標的とする *M. pn* が持つ16SリボゾームRNA (rRNA) に相補的な¹²⁵I標識DNAプローブを用いている。

2) 測定法 (図1)

(1) 滅菌綿棒で患者咽頭部を十分にぬぐい、咽頭ぬぐい液を採取し、ハンクスBBS培地1mlの入った試験管にいれ、-70℃で凍結保存した。

(2) 凍結保存しておいた咽頭ぬぐい液を37℃で解凍後、15,000Gで10分間遠心分離した。

(3) 上清を除去し、37℃で予備加温していた溶菌液(ラウリル硫酸ナトリウム、PBS他)150 μ lを加え、菌体からrRNAを溶出させた。

(4) *M. pn* のrRNAに相補的な¹²⁵I標識DNAプローブを含むプローブ液150 μ lを加え、72℃1時間インキュベートし、菌体から溶出したrRNA

と、¹²⁵I標識DNAプローブのハイブリダイゼーションを行った。

(5) 分離液(ハイドロキシアパタイト懸濁液)4.5mlを加え、¹²⁵I標識DNA-rRNAハイブリッドを吸着させた。

(6) 3,000G1分間遠心し、未反応のDNAプローブを除去した。

(7) 洗浄液(PBS)4.5mlを加え洗浄後、カウンターでハイドロキシアパタイトに吸着した、¹²⁵I標識DNA-rRNAハイブリッドの放射活性を測定した。測定カウントの、陰性コントロールに対する比を求め、3.0以上を陽性と判定した。

結 果

1. 臨床像

測定を行った33例中、陰性コントロール比3.0以上の陽性例は24例、陰性例は9例であった。各々の臨床像を表1、2に示す。

1) 陽性例 (表1)

陽性例24例の平均年齢は5.6歳で、肺炎9例、気管支炎15例であった。検査以前に抗生剤の投与を受けていた例が17例あった。このうち *M. pn* に有効なマクロライド系またはテトラサイクリン系の抗生剤が投与されていたものは4例で、他の13例はセファロスポリン系抗生剤が投与されていた。半数の12例では、白血球増多を認め、9例でCRP増加、血沈促進を認めた。CF、PHA施行例17例中、有意に高値となった例は3例で、8例はCF、PHAとも低値陽性、6例は陰性であった。

2) 陰性例 (表2)

陰性例9例の平均年齢は4.6歳で、肺炎7例、気管支炎2例であった。抗生剤投与例は7例で、有効抗生剤投与例は4例であった。白血球増多2例、CRP増加4例、血沈促進6例であった。CF、PHA有意高値は3例で、いずれも *M. pn* に有効な抗生剤が投与され、症状の改善がみられた。他は軽度の上昇であった。

DNAプローブ法陽性例と陰性例で、白血球数、CRP、血沈等の血液検査所見に有意差は認められなかった。

3) 患者年齢 (図2)

患者年齢とDNAプローブ法陽性率に関連があ

咽頭ぬぐい液を採取

↓

輸送培地(ハンクス液1ml) -70℃で凍結保存

↓

37℃にて解凍

15,000Gにて10分間遠心分離

↓

上清をすてる

溶菌液(ラウリル硫酸ナトリウム他)にて溶菌

↓

37℃

¹²⁵I標識DNAプローブ液150 μ lを加える

↓

72℃ 1時間

分離液(ハイドロキシアパタイト懸濁液)4.5ml

↓

72℃ 5分間

3,000Gにて1分間遠心

↓

γ -カウンターにて1分間測定

図1 DNAプローブ法

表1 DNAプローブ法陽性例の臨床像

No.	年齢	性	診断	検査前 使用抗生剤	WBC (/μl)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	CF	PHA	DNA プローブ法	病日
1	0y8mo	F	肺炎	(-)	7,000	0.1	8	<4	<40	3.4	12
2	1	F	肺炎	CPDX-PR CTX	10,500	0.3	0	ND	ND	7.1	25
3	2	M	肺炎	CCL	12,700	4.3	40	4	40	3.2	9
4	2	F	肺炎	CFIX MINO	18,700 11,000	4.2 0	23 13	8 4	40 40	15.6 2.1	17 31
5	3	F	肺炎	CCL	12,800	5.1	58	<4	<40	3.9	24
6	7	M	肺炎	CFIX	8,800	5.1	58	ND	<40	3.7	3
7	9	M	肺炎	(-)	6,000	0	18	<4	<40	3.5	12
8	9	M	肺炎	CDZM	11,700	7.0	32	64	2,560	4.0	30
9	12	M	肺炎	(-) MINO	18,400 7,800	0.2 0	73 21	1,024 512	5,120 5,120	3.7 4.1	11 25
10	0y8mo	M	気管支炎	CCL	19,200	0.1	7	<4	<40	3.7	4
11	0y9mo	M	気管支炎	JM	9,800	0	ND	ND	ND	9.1	6
12	1	F	気管支炎	CXD, EM	11,200	0	9	ND	ND	3.6	12
13	2	F	気管支炎	CFIX	8,400	1.8	19	ND	ND	3.5	2
14	2	F	気管支炎	MINO	11,000	0.1	5	8	40	3.4	2
15	3	M	気管支炎	CCL	10,000	1.6	21	4	160	4.2	5
16	4	F	気管支炎	CCL	5,300	ND	42	16	40	3.4	3
17	4	F	気管支炎	FMOX	17,700	0	6	ND	ND	3.6	3
18	5	F	気管支炎	(-)	7,900	0	8	<4	<40	3.0	7
19	5	M	気管支炎	(-)	11,100	2.6	ND	ND	160	3.9	1
20	8	M	気管支炎	(-)	6,500	3.3	33	ND	ND	3.1	20
21	10	F	気管支炎	CFIX	6,500	0.1	12	ND	80	3.5	6
22	12	F	気管支炎	(-)	ND	ND	ND	ND	ND	3.4	15
23	12	F	気管支炎	EM	5,100	0	ND	4	40	3.0	11
24	15	M	気管支炎	CFTP•PL	8,100	1.1	ND	2,048	5,120	5.4	18

ND=not determined

CDZM: cefuzonam, CFTP•PL: ceftoram pivoxil, CPDX-PR: cefpodoxime proxetil, CTX: cefotaxime,

CXD: cefroxadine, FMOX: flomoxef, JM: josamycin

るかを検討した。図2に示すごとく、加齢による陽性率の変化はなく、いずれの年齢でも有効抗生剤投与例では陰性例が多かった。

4) 検査病日 (図3)

咽頭ぬぐい液採取の病日と、陽性率について検討した。第6病日までの測定例では全例陽性であった。以後は57%の陽性率であった。

5) 有効抗生剤投与の有無 (表3)

*M. pn*に有効な、マクロライド系またはテトラ

サイクリン系の抗生剤投与の有無と陽性率について検討した。重症度による有意差はなく、有効抗生剤非投与例では陽性率80%、投与例では50%と、有効抗生剤投与例では陽性率が低下した。

2. 臨床経過

2組4例の家族内感染例の臨床経過を示す。

1) 症例1 (図4)

肺炎の姉妹例である。咳そう、発熱によりほぼ同じ時期に発症し、セファロスポリン系の抗生剤

表2 DNAプローブ法陰性例の臨床像

No.	年齢	性	診断	検査前 使用抗生剤	WBC (/μl)	CRP (mg/dl)	ESR (mm/hr)	CF	PHA	DNA プローブ法	病日
1	1	M	肺炎	EM	19,800	0	7	ND	40	2.6	17
2	1	F	肺炎	(-)	5,200	1.2	53	32	160	2.4	7
3	2	F	肺炎	FMOX	15,800	16	118	16	160	1.5	7
4	2	M	肺炎	(-)	9,000	ND	36	16	40	2.8	11
5	7	M	肺炎	CFIX	6,100	0.3	12	32	160	1.3	9
6	8	F	肺炎	MINO	7,100	5.4	31	128	2,560	2.5	8
7	10	F	肺炎	JM	3,800	2.9	37	256	1,280	1.4	9
8	5	F	気管支炎	CFIX	6,000	0.1	12	<4	<40	2.6	39
9	5	F	気管支炎	EM	8,200	1.3	25	128	1,280	1.0	17

ND=not determined

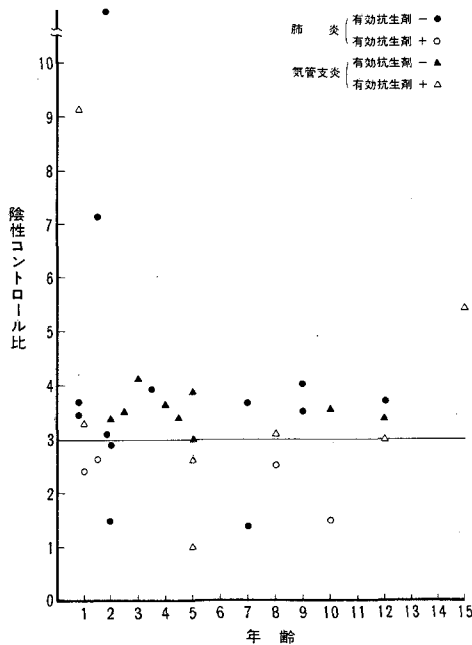


図2 年齢とDNAプローブ法

○：肺炎，有効抗生剤投与，●：肺炎，有効抗生剤非投与，△：気管支炎，有効抗生剤投与，▲：気管支炎，有効抗生剤非投与

を投与されたが，改善不良のため胸部X線，血液検査，DNAプローブ法を行った。DNAプローブ法陽性により抗生剤をマクロライド系に変更し，どちらも順調に治癒した。CF，PHAはどちらも有意高値にはならなかった。

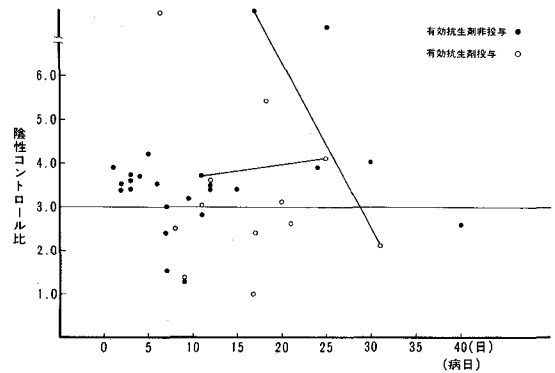


図3 病日とDNAプローブ法

○：有効抗生剤投与，●：有効抗生剤非投与

表3 DNAプローブ法陽性率と使用抗生剤の関連

検査前使用 抗生剤	診断	DNAプローブ法		陽性率 (%)
		陽性	陰性	
M, pn 有効 抗生剤 使用 (n=8)	肺炎 (n=3)	0	3	0
	気管支炎 (n=5)	4	1	80
非使用 (n=25)	肺炎 (n=13)	9	4	69
	気管支炎 (n=12)	11	1	92
計		24	9	73

症例2 (図5)

5歳の姉とほぼ同時期に妹も発症し，セファロ

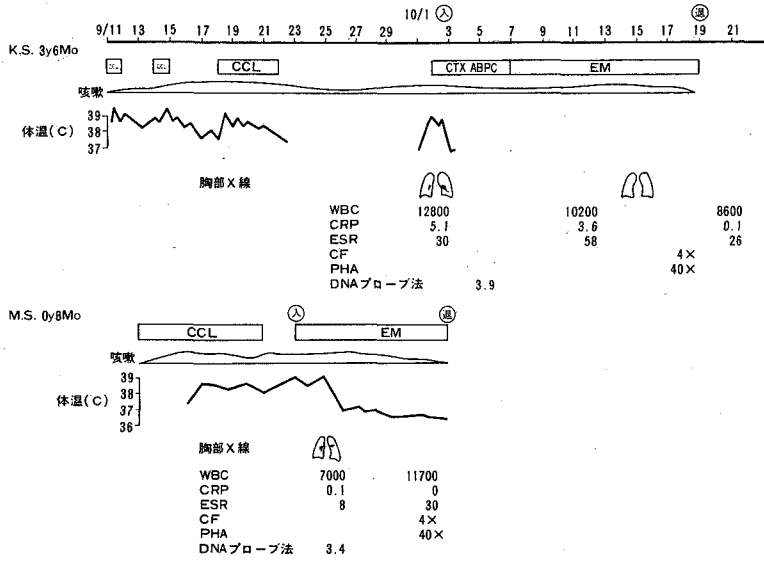


図4 臨床経過 (症例1)

CCL: cefaclol, CTX: cefotaxim, AB-PC: ampicillin, EM: erythromycin

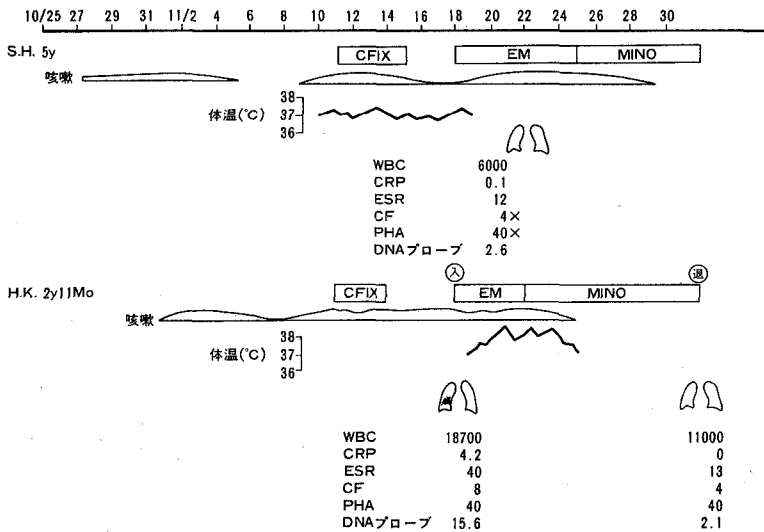


図5 臨床経過 (症例2)

CFIX: cefixime, MINO: minomycin

スポリン系抗生剤投与を受けたが解熱せず、胸部X線にて肺炎あり、DNAプローブ法も高値のため抗生剤を有効抗生剤に変更した。治癒に伴いDNAプローブ法も陰性化した。姉は有効抗生剤投与後のDNAプローブ法は陰性であった。CF、PHAはどちらも低値であった。

考案

M. pn 感染の診断は、咽頭などからの *M. pn* の分離培養、またはCF、PHAなどの血清学的検査によって行われてきたが、*M. pn* は遅発育性で、専用の選択重層培地を必要とし、判定には5から30日を要する。血清診断も抗体上昇に1から2週を要し、乳幼児例では抗体上昇不良例もあると

いわれている²⁾。今回我々の検討した対象症例においても、血清診断のみでは *M. pn* 感染と判定できない症例があった。これらでは、家族内における *M. pn* 感染患者の存在や、臨床症状(強い咳そら、比較的良好な全身状態など)、胸部 X 線所見等より *M. pn* 感染を疑った。他のウイルスまたは細菌感染との混合感染は否定できないが、臨床経過では、マクロライド系またはテトラサイクリン系抗生剤が有効であり、*M. pn* 感染が最も考えられた。*M. pn* 感染は集団での流行や³⁾⁴⁾、家族内感染もあり⁵⁾、早期に有効抗生剤による治療を行う必要がある。DNA プローブ法による *M. pn* 感染の診断は、病初期にも高い陽性率を示し、血清抗体価非上昇例でも陽性例が多く認められた。陽性率は、有効抗生剤投与例では低値となったが、松岡らによると DNA プローブ法陽性となるのは菌数 2×10^4 CFU/ml 以上とされ、陰性コントロール比は菌数増加により上昇した⁶⁾。我々の検討で、血清抗体価上昇にかかわらず陰性であった 3 例は、いずれも *M. pn* に有効な抗生剤の投与後であり、菌数が減少したためと考えた。一方、Shaw らの報告によれば、本方法では、他のマイコプラズマ属やスピロプラズマ属のうち、*M. pn* 以外は *Mycoplasma genitalium* のみ陽性となり、*Mycoplasma genitalium* は泌尿器からのみ分離され、咽頭から分離されることはないため臨床上問題にならない。また、気道より分離される他の細菌でも陽性となるものはないと報告されている⁷⁾。よって DNA プローブ法は *M. pn* 感染症の特異的な診断法として早期診断に有用と考えられた。本方法は、放射性同位元素を使用しているため、今後は検査法の改良により、より簡便な標識物質の開発が待たれるところである。

結 語

M. pn 感染における、DNA プローブ法について検討し、以下の結果を得た。

1. *M. pn* 感染と考えられた 33 例中、24 例で陰性コントロール比 3.0 以上の陽性となった。

2. 陽性例では血清抗体価高値例は 3 例で、他は低値陽性または陰性例であった。

3. 陰性例では、血清抗体価高値例はいずれも、*M. pn* 有効抗生剤投与後であった。

4. 陽性例、陰性例では、血液検査所見、患者年齢、重症度、検査病日に差を認めなかった。

5. *M. pn* 有効抗生剤投与例では、非投与例に比し、陽性率が低値であった。

6. DNA プローブ法は、病初期で高い陽性率を示し、早期診断に有用と考えられた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲をいただいた福山幸夫教授に深謝いたします。また、検体採取にご協力いただいた医局の諸先生がたに感謝いたします。

この論文を、福山幸夫教授開講 25 周年記念論文として、福山教授に捧げます。

なお、本論文の要旨は、第 19 回日本マイコプラズマ学会 1992 年 6 月 24 日於東京において報告した。

文 献

- 1) 新津康孝, 長谷川純男, 久保田秀雄ほか: *Mycoplasma pneumoniae* 分離用選択重層培地の性能. 日胸疾会誌 27: 635-641, 1990
- 2) 桜井信清, 永山洋子: 乳幼児における肺炎マイコプラズマ感染症. 日小児会誌 76: 1035-1046, 1982
- 3) 金本康生, 妹尾正登: 小学校における *Mycoplasma pneumoniae* による上気道感染症の集団発生. 感染症誌 63: 1291-1295, 1990
- 4) 新津康孝, 堀川雅治, 小松茂夫ほか: 肺炎マイコプラズマ感染症. 小児科 Mook 27: 169-196, 1983
- 5) 江波戸景子, 横田和子, 荒明美奈子ほか: *Mycoplasma pneumoniae* による家族内感染の臨床的検討. 東女医大誌 57: 562-567, 1987
- 6) 松岡幸雄, 矢ヶ崎満郎, 福島政文ほか: DNA プローブ (Gen Probe) 法による *Mycoplasma pneumoniae* の検出. 臨床と微生物 17: 477-482, 1990
- 7) Dular R, Kajioka R, Kasatiya S: Comparison of Gen-Probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 26: 1068-1069, 1988