

マイコプラズマ肺炎の新知見とマクロライドの可能性



コメンテーター

札幌鉄道病院小児科医長
成田 光生 氏



小児や若年者に多いマイコプラズマ肺炎の病態は、宿主の免疫機構により形成されることが明らかになりつつある。そこで、マイコプラズマ肺炎の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる炎症性サイトカインの関与や、14員環マクロライド系薬の抗炎症作用による治療の有効性などについて、マイコプラズマ感染症の病態を研究している札幌鉄道病院小児科医長の成田光生氏に聞いた。

マイコプラズマ肺炎の発症メカニズム

近年マイコプラズマ肺炎の病態形成において、直接的傷害に加え宿主の免疫応答による間接的傷害が大きく関与することが明らかになり注目されている。

体内の気道に侵入したマイコプラズマは、気道上皮細胞の線毛間に吸着し、その部位で宿主の栄養分を吸収しながら増殖を繰り返す。そのプロセスで活性酸素を放出し、上皮細胞の傷害を引き起こす(直接的傷害)。また、マイコプラズマの菌体成分が宿主免疫を刺激して、炎症反応を引き起こし、細胞傷害を増強させる(間接的傷害)(図1)。

重要な役割果たすIL-18, 8

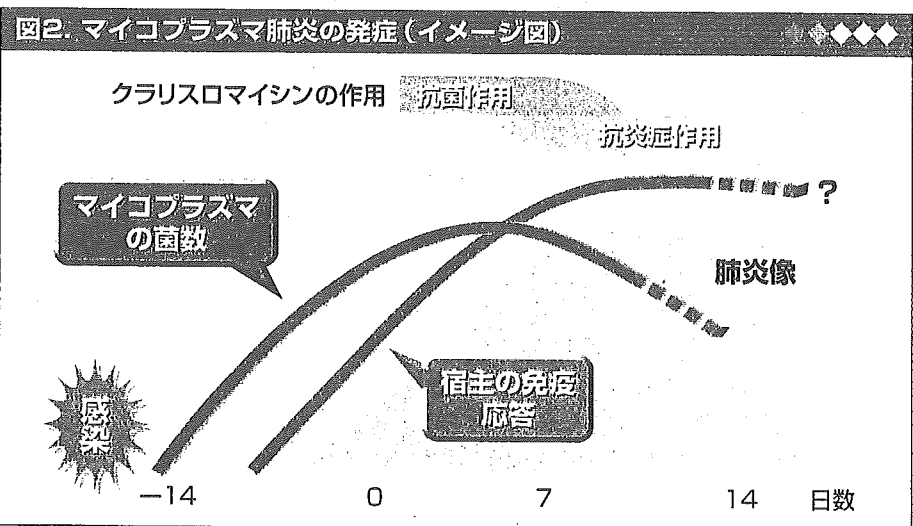
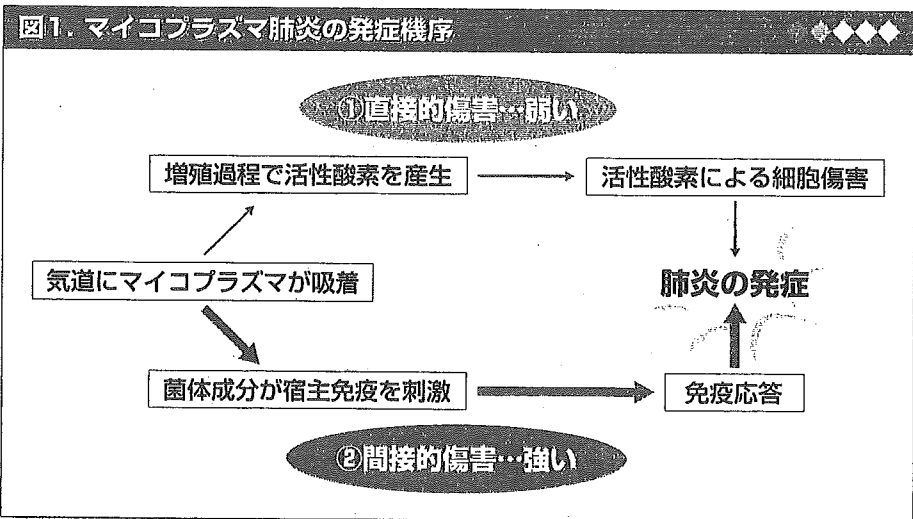
成田氏は、この免疫機構による細胞傷害の作用機序を明らかにするため、10種類近くのサイトカインの関与について検討した。それによると、マイコプラズマ肺炎の発症機序として、ヘルパーT細胞1型(Th1)にかかわるIL-18が重要な役割を果たしていることがわかった。IL-18はマクロファージなどからのサイトカインの産生を刺激していると考えられている。マイコプラズマ感染によりマクロファージから産生されたIL-18は、マクロファージに働いて炎症性サイトカインIL-8の分泌を促進させる。IL-8は好中球の遊走能を促進させ、病巣に好中球を中心とした炎症性細胞を集積させる。その結果、好中球などが産生する酵素などの傷害因子が気道上皮細胞を傷害してマイコプラズマ肺炎を成立させると考えられる。

免疫応答により病態が形成される

このように、マイコプラズマ肺

炎の病態形成には、宿主の免疫系の深い関与が示唆される。成田氏はマイコプラズマ感染から治癒に至るまでの免疫系の関与について次のような仮説を立てる。

「感染が成立する病初期にはマイコプラズマが増殖するが、その後宿主の免疫応答が立ち上がってくるとマイコプラズマは排除され始め、その一方で肺炎の病像が形成される」(図2)



マイコプラズマ肺炎の治療

このため、抗菌薬としての作用が期待されるのは、主として発症初期の感染成立から増殖過程までということになる。その後の過程では抗菌作用よりもむしろ抗炎症作用が治療効果の主体となってくると考えられる。

抗菌作用、抗炎症作用の面から第一選択はクラリスロマイシン

細胞壁を持たないマイコプラズマには、β-ラクタム系薬は効かないため、マクロライド系薬やテトラサイクリン系薬などが用いられる。なかでも、クラリスロマイシン(CAM)は、IL-8などの炎症性サイトカインの産生を抑制する作用がある。成田氏は「CAMは、抗菌作用のみならず抗炎症作用の面からも効果が期待でき(図2)、マイコプラズマ肺炎の第一選択薬にふさわしい薬剤と言える」と強調する。

耐性菌感染例でも奏効

成田氏の経験した9歳女児のマイコプラズマ肺炎のケースでは、39°C台の発熱が出現し、近医受診当初から外来でクリンダマイシン(CLDM)の点滴を7日間行ったが改善せず、胸部X線の所見が悪化し続けた。このため、同患者は札幌鉄道病院に入院した。同氏は、CLDM耐性マイコプラズマ肺炎と考え、CAM単剤に切り換えたところ、2日間で解熱し、全身状態も改善した。しかし、この患者から分離したマイコプラズマを遺伝子解析した結果、この株はCLDMのみならずCAMをはじめエリスロマイシンやアジスロマイシンにも耐性を示していた。このため同氏は「CAMの抗炎症作用により、免疫応答が速やかに抑制されたため、治療効果が現れたのかもしれない」との見方をしている。

こうした耐性菌による感染が確認されたマイコプラズマ肺炎例で、臨床的にマクロライド系薬が奏効したケースは神奈川県下でも報告されている。

こうしたことを踏まえて、同氏はマイコプラズマ肺炎に対する治療の基本方針について次のようにまとめる(表)。

①現在のところ、耐性菌が過半数を占めた流行は観察されてお

らず、また耐性菌感染による肺炎が必ずしも重症化するという傾向も認められていないことから、やはり第一選択はCAMなどのマクロライド系薬が基本となる。
②発熱から4、5日経過した例では、耐性菌感染による肺炎であっても臨床的にはマクロライド系薬が奏効する場合がある(抗炎症作用か)
③肺炎の重症例、あるいは肺外発症でマクロライド系薬が無効の場合には、耐性菌に対し抗菌力が確定している薬剤(ミノサイクリン、マイコプラズマに感受性を持つキノロン系薬など)の使用と一部症例においては短期間ステロイド薬の併用も考慮する。

わが国の過去5年間の感染症定点観測によると、マイコプラズマ肺炎の発生は2001年から3年連続増加している。今年もこれまで以上に非定型病原体を念頭に置いた診療が必要と言える。

表. マイコプラズマ感染症治療の基本方針

- ① 第一選択はクラリスロマイシンなどのマクロライド系薬が基本
- ② 耐性菌感染による肺炎であっても臨床的にはマクロライド系薬が奏効する場合がある(抗炎症作用か)
- ③ 肺炎の重症例やマクロライド系薬が無効の場合には、ミノサイクリン、マイコプラズマに感受性を持つキノロン系薬などの使用と一部症例においては短期間ステロイド薬の併用も考慮



マクロライド系抗生物質製剤(薬価基準収載)

クラリス®錠200
錠50小児用
ドライシロップ小児用

指定医薬品・要指示医薬品^{注)} クラリスロマイシン製剤
注) 注意—医師等の処方せん、指示により使用すること

※「効能・効果」、「用法・用量」、「禁忌」、「使用上の注意」等については、添付文書をご参照ください。



販売元[資料請求先]
大正富山医薬品株式会社
東京都豊島区高田3-25-1



製造元
大正製薬株式会社
東京都豊島区高田3-24-1

2003.04
CL114MTU

日本臨牀 63 卷 増刊号 7 (2005 年 7 月 28 日発行) 別刷

広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査

—その数値をどう読むか—

[第 6 版]

(3)

VIII. 免疫学的検査

E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

百日咳菌

蒲地一成

VIII 免疫学的検査 E. 非ウイルス性感染症関連検査(抗原および抗体を含む)

百日咳菌

Bordetella pertussis

蒲地一成

Key words: 百日咳菌, 百日咳毒素, 線維状赤血球凝集素, *Bordetella pertussis*, pertussis toxin, filamentous hemagglutinin

1. 概 説

百日咳は百日咳菌(*Bordetella pertussis*)の気道感染によって引き起こされる小児の急性呼吸器感染症であり, 主にワクチン未接種の乳幼児が感染する。百日咳菌は好気性のグラム陰性短桿菌で, その病原因子として百日咳毒素(PT), 線維状赤血球凝集素(FHA), パータクチン(PRN), アデニル酸シクラーゼ毒素(ACT)などが同定されている¹⁾。百日咳菌は患者の上気道分泌物の飛沫や直接接触により経気道的に伝播され, その感染力は極めて強い。本疾病対策にはワクチン接種による予防が最も効果的であり, 現在,

我が国ではPTおよびFHAを主要抗原とする精製百日咳ワクチン(acellular vaccine)が接種されている。

1950年のワクチン接種開始以来, 我が国の百日咳届出患者数は激減した。しかし, 百日咳は菌培養や抗体価検査による確定診断が難しく, 小児科定点から報告される‘百日咳様疾患数’は減少傾向にあるものの, 2002年では1,458例を示した(図1)。ワクチン接種により, 我が国では百日咳の大規模な集団発生を認めることは既になくなったが, 産科や小児病棟などでの小規模な集団発生はいまも散発している²⁾。また, 最近では青少年や成人が百日咳菌の保菌者とな

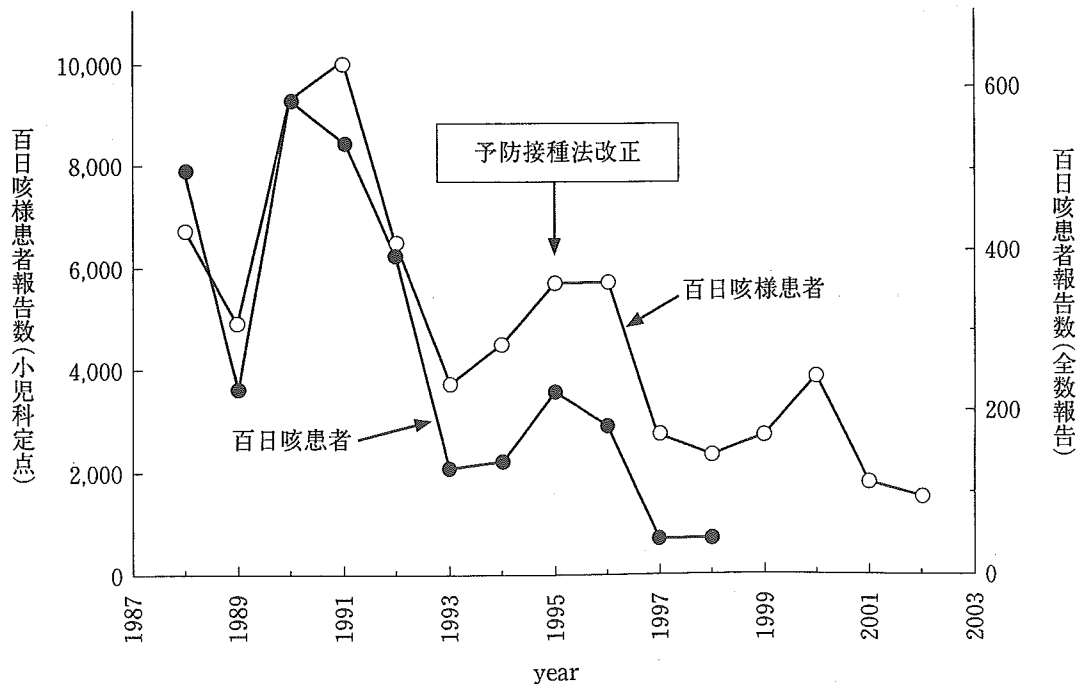


図1 我が国の百日咳様患者と百日咳患者の推移(1988-2002年)

百日咳様患者は小児科定点報告数, 百日咳患者は全数報告数(厚生労働省感染症発生動向調査事業による)。1999年以降, 全数報告は中止。

Kazunari Kamachi: Department of Bacterial Pathogenesis and Infection Control, National Institute of Infectious Diseases 国立感染症研究所 細菌第二部

り、乳幼児への感染源となることが指摘されている³⁾。

百日咳の確定診断には細菌学的または血清学的検査を必要とするが、近年、感染症の検査法として遺伝子診断が広く導入されるようになり、百日咳診断でも菌の挿入配列 (IS481) や PT 遺伝子を標的とした PCR 診断法⁴⁾が検討されている。Dragstedt ら⁵⁾は臨床症状から百日咳と診断された患者 3,096 人について PCR 検査を行い、患者からの菌培養陽性率は 9%、PCR 法による陽性率は 15%と報告している。現在のところ、PCR の検出感度は十分とはいえず、まだ研究室レベルで菌培養検査と合わせて行われている状況である。なお、遺伝子診断で簡便かつ迅速とされる LAMP 法 (loop mediated isothermal amplification) は百日咳菌検査ではまだ確立されていない。

2. 検査の目的

我が国では、百日咳の診断は長期間持続する咳や末梢血リンパ球の増多を中心とする臨床的診断と、細菌学的・血清学的診断を組み合わせで行われているのが現状である。細菌学的検査は百日咳菌の存在、血清学的検査は百日咳菌感染による抗体価上昇をそれぞれ証明するものである。いずれの検査も、事後診断となることは否定できないが、確定診断のための重要な検査となる。

3. 試料の採取方法、保存条件

a. 菌培養検査

百日咳菌分離のための検体採取方法として、咳嗽平板法、鼻咽頭分泌物培養法、喀痰培養法の3法が用いることができる⁶⁾。しかし、咳嗽平板法および喀痰培養法ともに百日咳菌用分離培地を常備しておく必要があるため、検査材料には鼻咽頭分泌物が一般的に用いられる傾向がある。

鼻咽頭分泌物の採取はまず患者の頭を動かさないようによく押さえ、その後、滅菌綿棒を患者の後鼻腔に静かに挿入して粘液を採取する。なお、検体採取では綿棒を1分間程度鼻腔に留

置ることが望ましい。検体を保存する場合、翌日に菌培養を行うのであれば冷蔵保存する。また長期 (1-2 週間程度) に保存するのであれば -80°C で凍結保存する。

b. 血清学的検査

抗体価測定には血清を採取する。直ちに測定しない場合は -20°C 以下で凍結保存する。乳び血清の場合は脂肪分および沈殿物を取り除いておく。なお、凝集素価を測定する場合、非働化処理 (56°C, 30 分) が必要となる。

4. 細菌学的検査法

a. 百日咳菌の分離法

百日咳菌の分離には抗生物質 (cephalexin: 20 μg/ml) を添加した Bordet-Gengou 寒天培地 (BG 培地) またはサイクロデキストリン固形寒天培地 (CSM 培地)⁷⁾を使用する。百日咳菌は上記培地で 36°C, 4-5 日間培養すると、直径約 1 mm 以下の小さなコロニーを形成する。真珠または水銀様の光沢のあるコロニーを選択し、菌同定のため再度新しい培地に植え継ぐ。

BG 培地は市販の基礎培地 (Difco, BBL) を用いて自作可能であるが、脱繊維血を含むため長期保存 (>1 カ月以上) はできない。一方、CSM 培地は合成培地のため長期保存が可能であり、日研生物医学研究所から百日咳菌分離培地 (ボルデテラ CVA 寒天培地) として購入可能である。なお、雑菌の増殖を抑制するために、ボルデテラ CVA 寒天培地には cefdinir, vancomycin, amphotericin B が cephalixin の代わりに添加されている。

b. 百日咳菌の同定法

百日咳菌の同定は、抗百日咳菌血清 (市販品; 百日せき I 相菌免疫血清, デンカ生研) を用いたスライド凝集反応または百日咳毒素を標的にした PCR 法⁸⁾により行う。スライド凝集反応は簡便な方法であり、約 1 時間で結果を得る利点を有しているが、百日咳臨床分離株の中には凝集し難い菌株があり判定には注意を要する。

菌同定の際、検査対象菌株を一度抗生剤無添加の BG 培地などに植え継ぐことを勧める。被菌株が雑菌ならば、集落を 1 日で形成するため

検査対象から除外することができる。一方、被菌株が集落形成に数日を要する場合は、百日咳菌の可能性が極めて高い。

5. 血清学的検査法

a. 百日咳菌凝集素価の測定法

精製百日咳ワクチンの接種開始後、百日咳菌感染の血清学的診断の簡便な方法として広く活用されている。現在、百日咳菌東浜株(凝集原：1, 2)と山口株(凝集原：1, 3)が百日咳凝集用反応抗原としてデンカ生研より購入可能である。本法はマイクロプレート凝集反応法を測定原理とし、東浜株と山口株の両抗原に対する凝集素価をそれぞれ測定する。なお、測定の際には百日咳菌免疫血清(市販品；デンカ生研)を用いて、試験ごとに測定感度を確認することが重要となる。

b. 百日咳菌抗体価の測定法

本法は血清中の抗 PT IgG および抗 FHA IgG 抗体価を酵素免疫測定法(ELISA)の原理を用いて測定するものである。現在、百日咳菌抗体価測定試薬キット(製造元：武田薬品工業、発売元：和光純薬工業)として購入可能である。本キットは PT と FHA 抗原がそれぞれビーズに固相化されており、24穴プレートを用いて測定を行う。本法は簡便かつ短時間で測定でき、高感度で特異性が高く、再現性のよい測定が可能である。

本キットはワクチン接種による免疫評価にも使用され、我が国の感染症流行予測調査において統一的に使用されている。なお、一部の民間検査機関でも本キットによる抗体価測定が実施されている。

6. 診断基準と影響因子

a. 菌培養検査

培養開始後6日目になっても百日咳菌様集落が見つからない場合、菌培養は陰性とする。しかし、百日咳様患者からの百日咳菌の分離率は10-20%程度であるため、本検査結果から百日咳感染を直ちに否定することはできない。また、患者に抗生物質が既に投与されている場合、百

日咳菌の分離率は低下し、投与3-4日後ではほとんどが陰性となることを考慮する⁹⁾。

b. 抗体価測定

凝集素価を用いた診断では、ペア血清で4倍以上の抗体価上昇があるか、シングル血清で40倍以上であれば診断価値は高いとされている。しかし、確実な診断を下すためには、患者から異なる時期に採血したペア血清を用い、抗体価が有意に上昇していることを確認する必要がある。

Ball-ELISA法を用いたPTおよびFHAに対する抗体価測定法では、診断となる基準値はまだ定められていない。本法も凝集素価と同様にペア血清による測定が重要となり、当研究室では4倍以上の変動を一つの判断基準としている。なお、百日咳ワクチンはPTとFHAが主要抗原であるため、ワクチン接種によりPTおよびFHA抗体価は上昇する。そのため、ワクチン接種歴のある被験者では、その判定に注意を要する。

表1には百日咳患児の抗体価変動を示した。患児2人とも百日咳菌の分離により確定診断された症例である。両患児とも抗PT IgG抗体価は有意に上昇し、血清学的にも百日咳菌の感染が証明された。しかし、抗FHA IgG抗体価と凝集素価の変動は小さく、唯一患児1で山口株に対する凝集素価が4倍に増加した。この成績は感染後の採血日が診断に大きく影響することを意味し、特にシングル血清を用いた診断では感染からの時間経過を考慮しなくてはならない。

おわりに

近年、高いワクチン接種率を維持する欧米諸国において百日咳患者数の増加が認められ、臨床より分離される百日咳菌の多くはワクチン株と異なる抗原遺伝子をもつことが報告されている。我が国でも抗原変異株の出現は認められており⁹⁾、今後の百日咳患者の発生動向には注意が必要である。患者発生動向を正しく評価するためには、医療現場での正確な臨床診断に合わせ、血清学的検査による診断が重要な鍵となる。

表 1 百日咳患児の抗体価と凝集素価の変動

			病日(入院からの日数)			
			0	7	13	60
患児 1 (1カ月, 女児)	抗体価 (EU/ml)	anti-PT IgG	0.5	25.0	53.0	—
		anti-FHA IgG	20.0	17.0	16.0	—
	凝集素価	東浜株	320	320	320	—
		山口株	20	80	40	—
患児 2 (2カ月, 男児)	抗体価 (EU/ml)	anti-PT IgG	0.5	55.0	87.0	450.0
		anti-FHA IgG	0.7	0.8	1.1	22.0
	凝集素価	東浜株	<20	<20	<20	<20
		山口株	<20	<20	<20	<20

中野ら(国立病院機構三重病院), 未発表データ

■ 文献

- 1) 佐藤勇治, 佐藤博子: ワクチンハンドブック(国立予防衛生研究所学友会編), p59-70, 丸善, 1994.
- 2) 狩野孝之ほか: 感染症誌 75: 916-922, 2001.
- 3) von König CH, et al: Lancet Infect Dis 2: 744-750, 2002.
- 4) Farrell DJ, et al: J Clin Microbiol 37: 606-610, 1999.
- 5) Dragsted DM, et al: J Med Microbiol 53: 749-754, 2004.
- 6) 佐藤勇治: 微生物検査必携 細菌・真菌検査(3)(金井興美編), pF62-F75, 日本公衆衛生協会, 1987.
- 7) Aoyama T, et al: J Clin Microbiol 23: 1046-1048, 1986.
- 8) Houard S, et al: Res Microbiol 140: 477-487, 1989.
- 9) Kodama A, et al: J Clin Microbiol 42: 5453-5457, 2004.

感染と抗菌薬

Infection and Antimicrobials

別刷

Vol.8 No.4 2005

ヴァンメディカル

マイコプラズマ属

見理 剛*

▶マイコプラズマ属とは

マイコプラズマ (*Mycoplasma*) 属の菌は動物の粘膜部位に生息する寄生細菌である。細胞壁をもたないため形態は多様で、球形やフラスコ形またはフィラメント状などを示す。ゲノムが小さく (0.58~1.5Mb 程度), GC 含量は25~30%である。栄養要求性は高いが、馬血清を加えた専用の培地で純培養することができ、寒天培地上では直径0.1~0.2mm 程度の微小な目玉焼き状のコロニーを形成する(図1)。グルコース分解性とアルギニン分解性の菌種に分類できる。 β -ラクタム薬には非感受性である。

▶マイコプラズマ属の菌

ヒトから分離されるマイコプラズマ種は十数種知られている¹⁾。このうち临床上特に重要なのは、マイコプラズマ肺炎の原因菌 *M. pneumoniae* である。また近縁種の *M. genitalium* は非淋菌性尿道炎の原因となる。*M. pneumoniae* のゲノムは約800kb だが *M.*

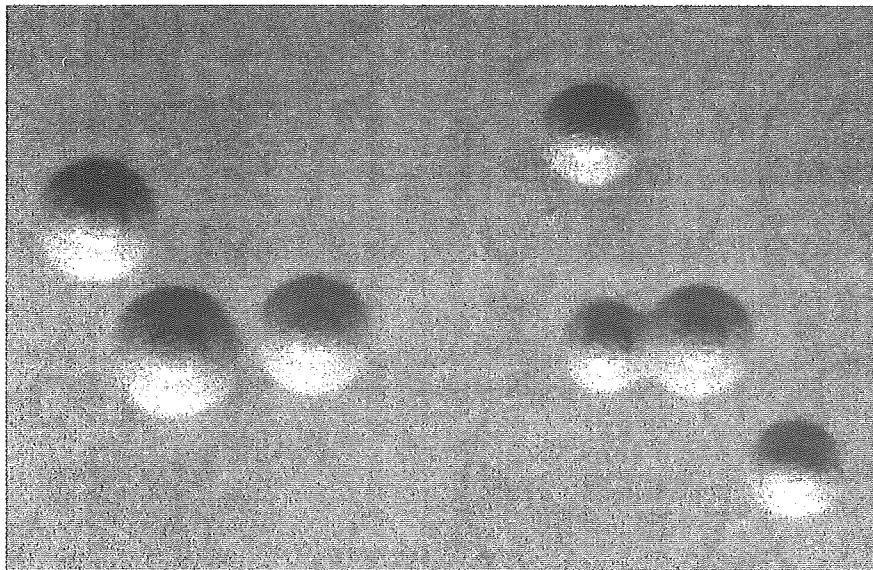


図1 寒天培地上のマイコプラズマのコロニー

M. pneumoniae のコロニー。

* 国立感染症研究所細菌第二部・主任研究官 (けんり・つよし)

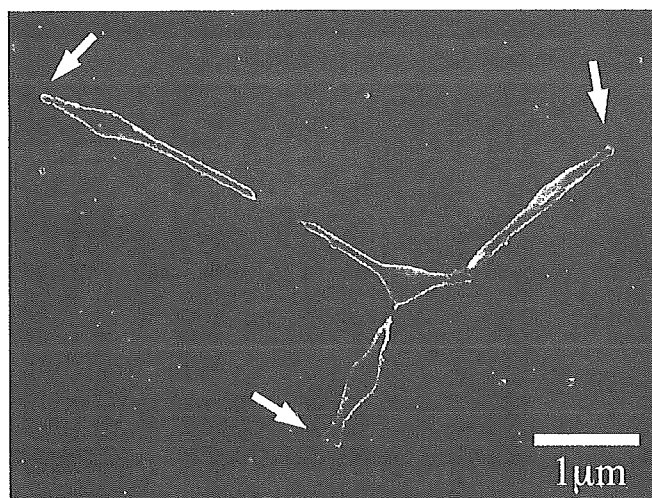


図2 *M. pneumoniae* の走査電顕像

培養液中でガラス表面に付着した *M. pneumoniae*。細胞の片方の末端に強い付着能力があり接着器官とよばれている (矢印)。

genitalium のゲノムは580kb しかなく、既知のすべての細菌の中で最も小さい。その他、ヒトに対して病原性があるとされる種に *M. hominis*, *M. fermentans*, *M. penetrans* がある。

▶ *M. pneumoniae*

培養した *M. pneumoniae* は細長い形態をしており (図2)、その片方の末端でヒトの細胞に付着し運動性を示す²⁾。この部分には付着性と運動性に必要な P1タンパク質が集まっている (図3)。*M. pneumoniae* の GC 含量は約40%とマイコプラズマ属の中では例外的に高い。*M. pneumoniae* による肺炎や気管支炎は小児および青年期年齢に多発する。症状は比較的軽い場合が多いが、様々な合併症を起こして重症化する例もある。*M.*

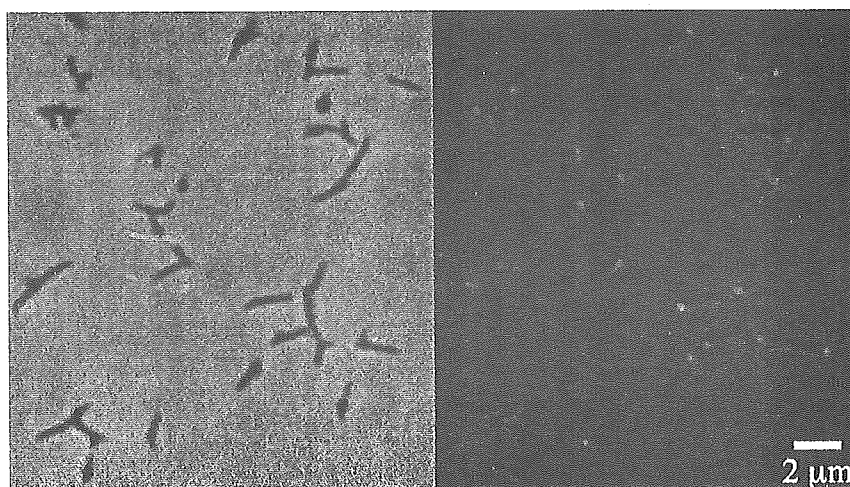


図3 *M. pneumoniae* の光学顕微鏡像 (位相差検鏡)

位相差検鏡像 (1000倍)。右側は P1 接着タンパク質を蛍光抗体で染色して観察した。P1 は細胞の一端 (接着器官) に集まっている。

pneumoniae は乾燥に弱く、感染は保菌者からの飛沫を直接吸い込むことによって起こると考えられている。

➤ *M. pneumoniae* の診断

患者の咽頭スワブや喀痰の培養で *M. pneumoniae* が分離されれば確定診断となる。しかし *M. pneumoniae* の培養法はやや煩雑で培養期間も 1～2 週間必要である。臨床診断の多くは血清診断で行われている (PA 抗体価で 320 倍以上, ペア血清の場合は 4 倍以上の上昇)。早期診断には PCR 法が有効である。

➤ *M. pneumoniae* の病原因子

M. pneumoniae の病原性にはヒトの呼吸器上皮細胞への付着性が必要である。毒素は産生しないが、細胞表面で *M. pneumoniae* が増殖するときに出す過酸化水素や活性酸素が細胞に傷害をあたえたとされている。また、*M. pneumoniae* の菌体成分が免疫細胞を刺激して炎症を悪化させ肺炎を起こすと考えられている。

➤ *M. pneumoniae* の治療

M. pneumoniae は細胞壁を持たないため β -ラクタム薬が無効であり、治療にはマクロライドなど他の系列の薬剤が用いられる。以前は *M. pneumoniae* の耐性菌の報告はほとんどなかったが、近年はマクロライドに耐性を示す菌が日本で分離されている^{3,4)}。

●文献

- 1) Waites KB, Talkington DF : *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen. Clin Microbiol Rev 17 : 697-728, 2004
- 2) Krause DC, Balish MF : Structure, function, and assembly of the terminal organelle of *Mycoplasma pneumoniae*. FEMS Microbiol Lett 198 : 1-7, 2001
- 3) Matsuoka M, Narita M, Okazaki N, Ohya H, Yamazaki T, Ouchi K, Suzuki I, Andoh T, Kenri T, Sasaki Y, Horino A, Shintani M, Arakawa Y, Sasaki T : Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan. Antimicrob Agents Chemother 48 : 4624-4630, 2004
- 4) Morozumi M, Hasegawa K, Kobayashi R, Inoue N, Iwata S, Kuroki H, Kawamura N, Nakayama E, Tajima T, Shimizu K, Ubukata K : Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation. Antimicrob Agents Chemother 49 : 2302-2306, 2005

耐性

マクロライド耐性マイコプラズマ感染症に関する研究

佐々木次雄¹⁾ 久保田眞由美¹⁾ 成田光生²⁾ 岡崎則男³⁾ 荒川宜親¹⁾

はじめに

マイコプラズマは自己増殖可能な最小の微生物で、生物学的には細菌に分類されるが、他の細菌と異なり細胞壁を欠くため多形態性を示し、ペニシリン、セフェム等の細胞壁合成阻害剤には感受性を示さない。マイコプラズマ肺炎は、*M. pneumoniae*感染者の約3～5%に起こり、細菌性感染の場合に見られる膿性の喀痰は伴わず、症状はかなり遷延して頑固な乾性咳嗽が続く特徴がある。また、発熱、頭痛、咽頭痛、悪寒、全身倦怠など通常の呼吸器感染症状以外に、下痢、嘔吐などの消火器症状が認められることが多い。*M. pneumoniae*感染患者は、小児で年齢とともに増加し、5～8歳が最も多く、15歳以上では少ない。以前、日本におけるマイコプラズマ肺炎はオリンピック開催年に流行したことより、「五輪病」とも呼ばれていたが、1984年及び1988年の流行ピークを最後に、1992年以降4年毎の大流行は見られなくなった。

マイコプラズマ肺炎起因菌である*M. pneumoniae*は、接着タンパク質P1の遺伝子配列を基にI型とII型に分類され、興味あることにI型とII型がほぼ10年周期で流行を繰り返していることが過去のデータより裏付けられている¹⁾。マイコプラズマ肺炎は臨床的にクラミジア肺炎と類似しているため、治療においては両者に有効なテトラサイクリン系やマクロライド系の抗生物質が一般に使用されているが、小児に対してはその副作用の危惧からテトラサイクリン系薬剤は第一選択剤とはならない。これまで*M. pneumoniae*臨床分離株のマクロライド耐性については国内外ともに報告はなかった。事実、1983～1998年に分離された*M. pneumoniae* 296株を調べた結果、1株も耐性菌は検出されなかった²⁾。その後、2000～2003年の臨床分離株中に複数のエリスロマイシン (EM) 耐性株が認められた。本研究では、マクロライド耐性*M. pneumoniae*の耐性機構解析を目的とし、作用部位であ

Table 1. Macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains isolated from patients and patients' information.

Strain no.	patient		antimicrobial agents	
	age	symptoms/disease	1st choice/effect*	2nd choice/effect
350	9	Pneumonia	Clindamycin/-	Clarithromycin/+
374	3	Pneumonia	unknown	unknown
375	4.5	Pneumonia	unknown	unknown
376	12	Pneumonia	Clarithromycin/-	Azithromycin/+
377	7	fever and cough	Azithromycin/+	
378	2	fever and cough	Cefditoren pivoxil/-	Azithromycin/+
379	9	Pneumonia	Clarithromycin/-	Azithromycin/-
380	11	Pneumonia	Clarithromycin/-	Minocycline/+
381	11	Pneumonia	Azithromycin/+	
382	7	Pneumonia	Rokitamycin/-	Azithromycin/-
383	5	Bronchitis	Cefaclor/-	Erythromycin/+
384	7	Pneumonia	Cefdinir, Fosmicin/-	Erythromycin/+
385	no information	Pneumonia, pleurisy	Clarithromycin/+	

* : - indicates no effect of antimicrobial agent, + indicates improvement of symptoms.

1) 国立感染症研究所, 2) 札幌鉄道病院, 3) 神奈川県衛生研究所

Table 2. Primers used for PCR amplification and sequencing of domains II and V of 23S rRNA and ribosomal proteins of L4 and L22 in *M. pneumoniae*.

PCR and primer designation	Sequence 5' to 3'	Position*	Amplicon size (bp)
Domain II of 23S rRNA			
MN23SDIIF	AGTACCGTGAGGGAAAGGTG	491-510	816 bp
MN23SDIIR	TCCAAGCGTTACTCATGCC	1287-1306	
Domain V of 23S rRNA			
MN23SDVF	GCAGTGAAGAACGAGGGG	1758-1775	927 bp
MN23SDVR	GTCTCGCTTCGGTCTCTCG	2664-2684	
Ribosomal protein L4			
MNL4F	AAAAGCAGCACCAGTTGTAG	1231-1250	722 bp
MNL4R	GGTTAGAAGTGGTTTTAGCA	1933-1952	
Ribosomal protein L22			
MNL22F	GTACATAACGGCAAGACCTT	3640-3659	627 bp
MNL22R	GCAAGCCGTTGGAGTTTACT	4247-4266	

* : The positions of domain II and V of 23S rRNA are based on accession no. X68422 of *M. pneumoniae* gene, and those of ribosomal proteins L4 and L22 are based on accession no. AE000061 of *M. pneumoniae* M129 section 19 of 63 of the complete genome.

Table 3. MICs of macrolide, lincosamide, and streptogramin antibiotics for *M. pneumoniae* isolated from patients and reference strains.

Strain no.	23S rRNA mutation ^a	MIC (μg/ml) ^b							
		EM	RXM	CAM	AZM	JM	RKM	CLDM	Q-D
350	A2063G	>256	>256	256	32	8	0.5	>256	1
374	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
375	A2063G	>256	>256	>256	32	16	0.5	256	0.5
376	A2063C	>256	>256	>256	16	64	4	32	1
377	C2617G	8	8	1	0.031	0.25	0.0625	2	0.25
378	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
379	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
380	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
381	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	0.5
382	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
383	A2064G	256	128	32	16	256	32	32	0.25
384	A2063G	>256	>256	>256	64	8	0.5	256	1
385	A2063G	>256	>256	>256	64	16	1	256	1
M129		0.0156	0.0156	0.0156	0.00195	0.125	0.0625	4	0.25

a : *M. pneumoniae* numbering

b : Abbreviations : EM, erythromycin ; RXM, roxythromycin ; CAM, clarithromycin ; AZM, azithromycin ; JM, josamycin ; RKM, rokitamycin ; CLDM, clindamycin ; Q-D, quinupristin-dalfopristin.

る23S rRNAのdomain II及びdomain V(ペプチジルトランスフェラーゼ領域), 23S ribosomal protein L4, L22の変異と耐性発現との関連を検討した。

材料及び方法

(1) 使用菌株

感受性標準株として*M. pneumoniae* M129, Mac, FHの3株。2000~2003年に北海道, 神奈川県, 高

知県で分離されたEM耐性*M. pneumoniae* 13株(Table 1)。EM感受性の臨床分離*M. pneumoniae*から作製したEM耐性変異株1020-EMR3, 1020, 1253, 1552, 1653の5株³⁾。

(2) 最小発育阻止濃度(MIC)

NCCLSに準拠し微量液体希釈法により行った。すなわち, 0.5%グルコース添加PPLO培地中で2段階希釈した薬剤に $10^4\sim 5$ cfu/mlの被検菌を加え

Table 4. Nucleotide substitution by point mutation of genes of ribosomal protein and 23S rRNA for macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains and *M. pneumoniae* FH, Mac compared with *M. pneumoniae* M129.

strain no.	ribosomal protein						23S rRNA		Type of PI gene
	position of L4		position of L22				domain II	domain V	
	162	430	62	279	341	508			
M129	C	A	C	T	C	T	-	-	I
350	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
374	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
375	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
376	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063C	II
377	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	- / C2617G	II
378	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
379	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	A2063G	II
380	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
381	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
382	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
383	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
384	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
385	-	-	-	-	-	T→C	-	A2063G	I
1020-EMR3	-	-	-	-	-	T→C	-	- / C2617G	I
1020	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
1253	-	-	C→A	-	C→T	T→C	-	A2064G	I
1552	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064C/ C2617A	I
1653	-	-	-	-	-	T→C	-	A2064G	I
FH	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	-	II
Mac	C→A	A→G	-	T→C	-	T→C	-	-	II

"-" indicates no mutation compared with the sequence of *M. pneumoniae* M129.

37℃にて培養。菌の増殖はグルコース分解による培地の色変化によって判定した³⁾。

(3) 23S rRNA domain IIとV, ribosomal protein L4とL22のPCRと塩基配列

被検菌の培養液0.5mlを17,500×g, 20min遠心後、菌体をTE緩衝液20μlに懸濁し、PCR用試料とした。PCRにはTable 2に示したprimerを用い、94℃ 2 min, (94℃ 45sec, 55℃ 1 min, 72℃ 80sec) ×30cycles, 72℃ 5 minの条件で行った。増幅DNAを精製した後、Big Dye Terminator V3.1 cycle sequencing kitでシーケンス反応し、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem)にて塩基配列を行った。

結果

(1) 最小発育阻止濃度 (MIC)

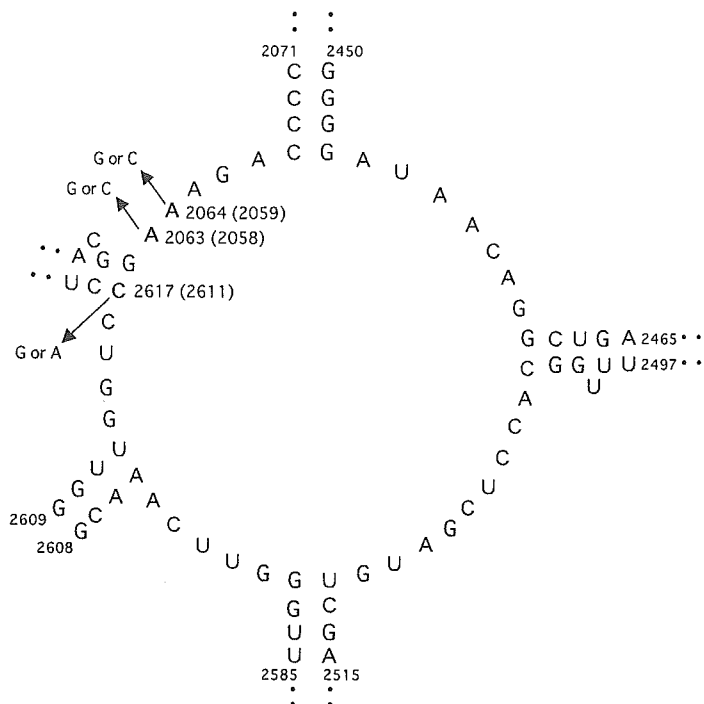
2000～2003年に分離された76株のうちEM耐性を示した13株 (17%) の各薬剤に対するMIC値をTable 3に示した。標準株M129ではクリンダマイシン4 μg/mlを除いて全てに感受性を示した。臨床分離EM耐性株のうち、No. 377株はどの薬剤にも

弱い耐性を示した。他の臨床分離EM高度耐性菌では、16員環マクロライドよりも14, 15員環マクロライドに対して高いMIC値を示した。しかし、No.376, No.383の2株では、A2063G変異とは異なる耐性パターンを示した。

(2) 23S rRNAとribosomal protein L4, L22の塩基配列

23S rRNAのdomain II, V及びribosomal protein L4, L22の塩基配列を調べ、標準株M129 (X68422)と比較した (Table 4)。マクロライド抗生物質の作用部位の1つ752位を含むdomain IIにおいては、全ての耐性菌において塩基変異は認められなかった。しかし、domain Vでは全ての臨床分離EM耐性菌で塩基置換があり、13株中10株 (77%) がA2063G transition変異、残り3株ではA2064G transition (No.383株), A2063C transversion (No.376株), C2617G transversion (No.377株) が1株ずつであった。なお、*in vitro*で得られたEM耐性菌では、主要変異である2063位, 2064位に加え、C2617G変異 (1020-EM 3株) とC2617A変異 (1552株) が確認された (Table 4)。*M. pneumoniae* 23S rRNA

Fig. 1. Secondary structure of the peptidyltransferase loop in domain V of *M. pneumoniae* 23S rRNA.



Positions of the newly found mutations (A2063C and C2617G) in clinical isolates are indicated by using the numbering for *M. pneumoniae* 23S rRNA (accession no. X68422), as well as previously reported *in vitro* mutations (A2063G, A2064G and A2064C). The numbers in parentheses indicate *E. coli* numbering.

domain Vの塩基置換部位をFig. 1にまとめた。L4, L22 proteinでは感受性株 (FH, Mac) にも認められない変異は、1253株でC62A, C341T変異があったものの臨床分離株での同部位における変異は認められなかった。

考 察

*M. pneumoniae*感染症において、通常エリスロマイシン、クラリスロマイシン、アジスロマイシンが第一次選択薬剤として用いられる。我々が分離した*M. pneumoniae*76株は、北海道、神奈川県、高知県という離れた場所から分離されたもので、その中から13株の耐性菌が得られているものの地域的な偏りはみられない。1999年以前のサーベイにおいてはEM耐性菌が検出されなかったことから、このような耐性菌は2000年を境として全国的に広がっていると考えられる。その耐性機構は塩基配列の結果よりマクロライド抗生物質の作用部位である23S rRNA domain Vの2063位、2064位（それ

ぞれ大腸菌の2058位、2059位に対応) におけるA2063G, A2063C, A2064Gが主であり、*E. coli*, *H. pylori*, *Mycobacterium spp.*, *S. pneumoniae*においても同様の変異が報告されている⁴⁾。一方、高度耐性菌とは異なりEMに弱い耐性を示した株では、今回新たに23S rRNA domain V内のC2617G変異が認められ、この塩基置換は *Neisseria gonorrhoeae*⁵⁾, *Streptococcus pyogenes*⁶⁾, *Mycoplasma hominis*⁷⁾, *Chlamydia trachomatis*⁸⁾, *Escherichia coli*⁹⁾ においてEM耐性化が報告されている。今回、*in vitro*からのEM耐性菌 (1253菌) においてL22 proteinのC62A, C341T変異があり、耐性ほどの程度寄与しているかは明らかではないものの、本菌は同時にA2064G変異を持っていることから、A2064G変異が優位に発現している可能性が高い。

Table 1で示したように、マイコプラズマ肺炎患者からはEM耐性*M. pneumoniae*が検出されたにもかかわらず、エリスロマイシン、クラリスロマイ

シン, アジスロマイシンによって治癒した例がみられる。このことはマクロライド抗生物質が抗微生物作用の他に proinflammatory tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-8 のようなサイトカイン産生を抑制するという抗炎症作用¹⁰⁻¹³⁾ もマイコプラズマ肺炎治癒の一因であることを示唆している。

文 献

- 1) SASAKI T., KENRI T., OKAZAKI N., *et al.* : Epidemiological study of *Mycoplasma pneumoniae* infections in Japan based on PCR-restriction fragment length polymorphism of the P1 cytoadhesin gene. *J. Clin. Microbiol.* 34 : 447~449, 1996
- 2) 成田光生 : 薬剤耐性マイコプラズマは普遍に野生に存在する。医学のあゆみ 209 : 545~549, 2004
- 3) OKAZAKI, N., NARITA M., YAMADA S., *et al.* : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin *in vitro*. *Microbiol. Immunol.* 45 : 617~620, 2001
- 4) VESTER B. and DOUTHWAITE S. : Macrolide resistance conferred by base substitutions in 23S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 1~12, 2001
- 5) NG L.-K., MARTIN I., LIU G., *et al.* : Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 : 3020~3025, 2002
- 6) MALBRUNY B., NAGAI K., COQUEMONT M., *et al.* : Resistance to macrolides in clinical isolates of *Streptococcus pyogenes* due to ribosomal mutations. *J. Antimicrob. Chem.* 49 : 935~939, 2002
- 7) PEREYRE S., GONZALEZ P., DE BARBEYRAC B., *et al.* : Mutations in 23S rRNA account for intrinsic resistance to macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for acquired resistance to macrolides in *M. hominis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46 : 3142~3150, 2002
- 8) MISYURINA O. Y., CHIPITSYNA E. V., FINASHUTINA Y. P., *et al.* : Mutations in a 23S rRNA gene of *Chlamydia trachomatis* associated with resistance to macrolides. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 : 1347~1349, 2004
- 9) VANNUFFEL P., DI GIAMBATTISTA M., MORGAN E. A., *et al.* : Identification of a single base change in ribosomal RNA leading to erythromycin resistance. *J. Biol. Chem.* 267 : 8377~8382, 1992.
- 10) ABE, S., NAKAMURA H., INOUE S., *et al.* : Interleukin-8 gene repression by clarithromycin is mediated by the activator protein-1 binding site in human bronchial epithelial cells. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 22 : 51~60, 2000
- 11) ICHIYAMA, T., NISHIKAWA M., YOSHITOMI T., *et al.* : Clarithromycin inhibits NF- κ B activation in human peripheral blood mononuclear cells and pulmonary epithelial cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* 45 : 44~47, 2001
- 12) KOHYAMA T., TAKIZAWA H., KAWASAKI S., *et al.* : Fourteen-member macrolides inhibit interleukin-8 release by human eosinophils from atopic donors. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43 : 907~911, 1999
- 13) TAKIZAWA H., DESAKI M., OHITOSHI T., *et al.* : Erythromycin suppresses interleukin 6 expression by human bronchial epithelial cells : a potential mechanism of its anti-inflammatory action. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 210 : 781~786, 1995

THE JOURNAL OF THE JAPANESE ASSOCIATION
FOR INFECTIOUS DISEASES
July, 2005, p457—463
0387—5911

小児期マイコプラズマ感染症診断におけるマイコプラズマ特異的
IgG, IgA, IgM 抗体検出 enzyme-linked immunosorbent assay キット
の有用性に関する検討

札幌鉄道病院小児科

成田 光生

感染症学雑誌 第79巻 第7号 別刷

小児期マイコプラズマ感染症診断におけるマイコプラズマ特異的 IgG, IgA, IgM 抗体検出 enzyme-linked immunosorbent assay キット の有用性に関する検討

札幌鉄道病院小児科

成田 光生

(平成 17 年 3 月 23 日受付)

(平成 17 年 5 月 19 日受理)

Key words : *Mycoplasma pneumoniae*, respiratory tract infection, rapid diagnosis, child, enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)

要 旨

マイコプラズマ特異的 IgG (定量), IgA (定量), IgM (定性) 抗体を分別して検出する ELISA キット (*Mycoplasma pneumoniae*—ELISA medac, ドイツ) の有用性を検討した。対象は急性呼吸器疾患と診断された 16 歳未満の小児 113 例の血清 159 検体で, 第 I 群 (マイコプラズマ確定例), 第 II 群 (同・疑似例), 第 III 群 (同・否定例) と分類した。測定はキット添付の説明書に従って行った。IgG, IgA, IgM 抗体それぞれの測定結果は添付文書の interpretation に従い, early stage of infection (カテゴリー 1, 2), acute-(3, 4, 5), current-(6), past-(7), no-infection (8) と判定した。結果として, 発症直後は no-infection (3 者とも陰性) から early stage of infection のカテゴリー 1 (IgM 単独陽性) に, その後 acute-infection のカテゴリー 4 (IgM, IgG の 2 者が陽性) あるいはカテゴリー 5 (3 者とも陽性) の順に抗体反応が進行することが示された。とりわけカテゴリー 1 が認められたのは概ね発熱 4 日目から 21 日目までに限られており, 単一血清による急性期診断として意義が高いと考えられた。本キットはマイコプラズマ感染症診断に関して有用な方法論を提供するものと考えられる。

[感染症誌 79: 457~463, 2005]

序 文

マイコプラズマ感染症においては, 培養法あるいは PCR 法などを用いた菌自体の検出を目的とした診断法には一定の限界が有るため, やはり血清診断が Gold standard である¹⁾。近年, イムノクロマトグラフ法によるマイコプラズマ特異的 IgM 抗体検出を簡便化した迅速診断キット (イムノカードマイコプラズマ抗体, テイエフビー) も

使用されているが, 血清 IgM 抗体検出のみに基づく早期診断に関する問題点としては, IgM 抗体は発症早期 (1 週間以内) にはまだ血清中に充分量産生されないこと, さらに成人ではこの IgM 抗体の反応自体が非常に弱い場合が有るため見逃される可能性が有ること, 一方小児では IgM の抗体反応が強く, 実際の感染から長期に渡り IgM 抗体が血中に存在する場合が有るため既往感染を見ている可能性が有ること, などが挙げられる²⁾³⁾。この点, 年齢に関わらず急性感染であると確かに言えるのは, やはりペア血清を用いた定量法による測定結

別刷請求先: (〒060-0033) 札幌市中央区北 3 条東 1 丁目

札幌鉄道病院小児科 成田 光生

平成 17 年 7 月 20 日

果に依らざるを得ない。一方でマイコプラズマ感染症においては、急性期においてはIgA抗体のほうがIgM抗体よりも出現率が高く、またIgA抗体のほうがIgM抗体より先に血中から消失するため、IgA抗体検出のほうが早期診断としての有用性は高いとする報告があった⁴⁾⁵⁾。これまでマイコプラズマ特異的IgA抗体検出法は一般的ではなかったが、最近、マイコプラズマ特異的IgG, IgA, IgM抗体を分別して検出するenzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)キットがドイツのMedac社より発売された(*Mycoplasma pneumoniae*—ELISA medac[®])。今回、その有用性を検討する機会を得たのでその結果を報告する。

対象と方法

本研究はretrospective studyであり、37.5℃以上の発熱と咳嗽を認め、急性呼吸器疾患として「気管支炎」「肺炎」「喘息様気管支炎」などの診断を受けた16歳未満の小児113例(159検体)を対象とした。微粒子凝集(PA)法による血清マイコプラズマ抗体価測定結果を基に、以下の3群に分類した。なおここで急性期検体とは呼吸器症状を発症してから最初に得られた血清であり、回復期検体とは急性期検体から4日以後に採取された検体である。また37.5℃以上の発熱日が明らかな場合には、その発熱初日を0日とした。

第I群(マイコプラズマ確定例):I-a群(26例のペア血清・52検体);急性期80倍以下の抗体価から4倍以上の上昇を認めた場合。主に初感染に近い状態(免疫学的一次応答)で発症初期の患者が多く含まれると考えられる。I-b群(6例のペア血清・12検体);急性期160倍以上の抗体価から4倍以上の上昇を認めた場合。初感染と、再感染(免疫学的二次応答)の患者が混じて含まれると考えられる。I-c群(10例のペア血清20検体を含む38例,48検体);急性期あるいはまた回復期において単一で640倍以上の抗体価を認めた場合。初感染の場合も再感染の場合も有り得ると考えられる。640倍という数字に特別な根拠は無いが、小児においてはIgM抗体(PA法は主としてIgM抗体を検出する)が血中に高く長く残存する傾向が有るため、変動を伴わない320倍までの抗

体価では急性感染としての「確定例」とするには根拠が不十分と考え、このような場合は下記の第II群に含めた。第II群(マイコプラズマ疑い例;17例,18検体):急性期あるいは回復期に160倍以上の抗体価は認められたが、上記第I群のいずれの基準も満たさなかった全ての場合。例えば320倍から4倍以上の「下降」が認められた場合もここに含めた。マイコプラズマによる急性感染例であってもIgM抗体の応答が弱かった場合(成人に近い状態など)、あるいは近い過去にマイコプラズマの感染が有った場合、などが含まれると考えられる。第III群(マイコプラズマ否定例;26例,29検体):急性期および回復期のいずれにおいても80倍以下の抗体価しか認められず、マイコプラズマによる最近の感染はほぼ否定的な場合。

Mycoplasma pneumoniae—ELISA medac(Medac Diagnostika, ドイツ)はIgGとIgA抗体測定キットが定量キットで、IgM抗体測定キットは定性キットである。前2者における定量原理は、標準曲線を用いた単一希釈法である。本法ではまず血清検体を100倍に希釈し、キット添付の陰性対照、陽性対照、補正対照(calibrator)とともに50μLずつduplicateで、マイコプラズマ接着器官のリコンビナント蛋白が抗原として固相化されている96穴プレートに添加する。ELISA測定の定法どおり37℃での検体インキュベーション、洗浄、酵素標識抗体添加、洗浄、TMB基質添加、反応停止液添加などを順次行い、最終的に450nmで吸光度(OD)を測定する。反応開始から停止までの所要時間は約3時間である。反応終了後まずブランク、陰性対照、陽性対照におけるOD測定値で反応の妥当性を確認する。補正対照(calibrator)のOD実測値と、ロットごとに決められている補正対照基準値を用いて、検体のOD実測値を補正する。最後に、標準曲線から得られた近似式に検体のOD補正值を代入し、検体の抗体価測定値(単位はarbitrary unit, AU/mL)を求める。標準曲線も添付されているので、OD補正值を直接照らし合わせて抗体価を求めても良い。IgG, IgA抗体ともにカットオフ値は10AU/mLで、9~11AU/mLの範囲はgrey zoneとして再検査、それ以下は「陰

Table 1 *Mycoplasma pneumoniae*- specific IgM-/IgA-/IgG- interpretation

Possible results			Interpretation
IgM	IgA	IgG	
+	-	-	1. Indication of early stage of infection. Retest IgM, IgA and IgG after 14 days. ¹⁾²⁾
-	+	-	2. Indication of early stage of infection or solitary, persisting IgA. Retest IgA and IgG after 14 days.
+	+	-	3. Indication of acute infection. ¹⁾²⁾ Retest after 14 days.
+	-	+	4. Indication of acute infection. ¹⁾²⁾
+	+	+	5. Indication of acute infection. ¹⁾²⁾
-	+	+	6. Indication of current infection. ³⁾
-	-	+	7. Indication of past infection. In case of clinical suspicion, retest second serum sample after 14 days for IgA and IgG antibodies.
-	-	-	8. No serological indication of current or past infection. In case of clinical suspicion, retest second serum sample after 14 days for IgM, IgA and IgG antibodies.

¹⁾ Current, acute infections are best detectable by parallel determination of IgM and IgA antibodies.

²⁾ Simultaneous detection of IgM and IgA antibodies is particularly frequent in children.

³⁾ In adults, IgA antibodies are more reliable markers for current infections than IgM antibodies.

Table 2 Classification by interpretation of results determined by *Mycoplasma pneumoniae* — ELISA medac (Medac Diagnostika)

Category	Early-		Acute-			Current-	Past-	No-	Total
	1. ¹⁾	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	
Group I -a ²⁾									
Acute	5			1			1	19	26
Convalescent	12		1	9	4				26
Group I -b									
Acute	5			1					6
Convalescent				3	3				6
Group I -c									
Acute	5			12	8			1	26
Convalescent	3			7	12				22
Group II									
Acute	4			3	1			3	11
Convalescent	1			4	1			1	7
Group III									
	3						1	25	29
Total	38		1	40	29		2	49	159

1) Number of subdivision below the category is deduced from Table 1.

2) Group I (*Mycoplasma*- definite cases): Group I -a; a four-fold or greater rise of antibody from an acute phase PA titer of $\neq < 1:80$, Group I -b; a four-fold or greater rise of antibody from an acute phase PA titer of $\neq > 1:160$, Group I -c; a single high PA titer of $\neq > 1:640$ either or both in acute or convalescent serum, Group II (*Mycoplasma*- probable cases): a PA titer of 1:160 or 320 was observed either or both in acute or convalescent serum, but the above serological criteria for Group I were not fulfilled, Group III (non-cases): a PA titer of any sample was $\neq < 1:80$.

性」となっている。IgM 抗体定性キットは上記と比較して、固相化抗原がマイコプラズマ全菌体からの抽出物であること、リウマチ因子の除去作業が含まれることなどの相違点は有るが、基本的に

は同様の手順にて操作される。最終的にカットオフ値は陰性対照の OD 実測値 + 0.380, そしてそのカットオフ値 +/- 10% が grey zone とされている。なお製造元における標準血清を用いた特異性