
総説

マイコプラズマ肺炎の検査と疫学

岡崎則男

Laboratory diagnosis and
epidemiological studies of
Mycoplasma pneumoniae pneumonia

Norio OKAZAKI

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia,
epidemiology, laboratory diagnosis, P1
cytadhesin gene, macrolide-resistance

総説

マイコプラズマ肺炎の検査と疫学

岡崎則男

Laboratory diagnosis and epidemiological studies of *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*

Norio OKAZAKI

Key Words : *Mycoplasma pneumoniae pneumonia*,
epidemiology, laboratory diagnosis, P1
cytadhesin gene, macrolide-resistance

はじめに

ヒトのマイコプラズマ肺炎は肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) の感染で引き起こされる疾患で、感染症の予防及び感染症の患者に対する医療に関する法律（感染症法）においては5類感染症に分類されており、この法律に基づく感染症発生動向調査事業実施要綱の中では定点把握疾患となっている。感染症発生動向調査事業は1982年に開始された感染症サーベイランス事業が継続したもので、感染症法が施行された1999年から実施されているものである。1998年までの感染症サーベイランス事業においては、マイコプラズマ肺炎は異型肺炎として調査が実施され、病原体定点病院で採取された患者検体からの *M. pneumoniae* 培養検査を地方衛生研究所で行うことになっていた。しかし、実際に培養検査を実施した機関は神奈川県衛生研究所（神奈川衛研）を含めて数箇所であった。1999年に施行された感染症法では、病原体検査の対象疾患からは除外され、定点病院からの届出に基づき、地方感染症情報センター、国立感染症研究所感染症情報センターなどが連携し、患者数及び疾患情報の把握による全国的な調査が進められている。

神奈川衛研では、1976年から培養検査を主体としたマイコプラズマ肺炎の調査研究を開始し、1982年以降は上述の感染症サーベイランス事業に基づく検査を併せ

て実施してきた。また、1999年の感染症法施行後においても、神奈川県は本疾患の継続的な病原体検査の必要性を認め、県独自に病原体検査の対象疾患とし、神奈川衛研で *M. pneumoniae* の培養検査を実施している。*M. pneumoniae* は特殊な細菌で、その培養検査には一般の細菌とは異なる技術と感覚を要するため、国内で長期間にわたりこの検査を実施している機関は希であり、当所は数少ないマイコプラズマ肺炎の検査・調査研究機関となっている。一方で、最近、マイコプラズマ肺炎においては薬剤耐性 *M. pneumoniae* の出現¹⁾、劇症型症例及び高齢者における重症例²⁾ などが報告され、加えて、*M. pneumoniae* の慢性的感染が喘息や慢性閉塞性肺疾患（Chronic obstructive pulmonary disease, COPD）の増悪に関連する³⁾ ことも注目されており、本疾患に関する検査・調査研究の重要性が高まってきた。このような状況から、国内でも *M. pneumoniae* を取り扱う機関が若干ではあるが増えてきており、その中には山形県衛生研究所などの地方衛生研究所も含まれている。

マイコプラズマ肺炎の診断においては、培養検査などにより患者から *M. pneumoniae* を検出することが最も確実であり、これに基づく疫学調査が本疾患の動向を正確に把握することになる。また、培養検査で確保された *M. pneumoniae* を利用し、細菌学的解析を行うことで、病原性の変化や薬剤耐性などの情報を得ることが可能となる。しかし、通常、病院の検査室で *M. pneumoniae* 検出が実施されることは殆どなく、マイコプラズマ肺炎の臨床診断は主に血清抗体検査で行われていること及び抗体検査による本疾患の疫学調査（血清疫学）も可能であることから、抗体検査法の検討も重要である。

著者は、長年にわたり、神奈川衛研でマイコプラズマ肺炎の検査・調査研究に携わり、*M. pneumoniae* 検出及び血清抗体検査の両面から本疾患の調査研究を進め、特に、疫学的検討に力を注いできた。その立場から、今後の検査と疫学に関わる課題解決の一助にして頂きたい、在職中の成果を概説する。

M. pneumoniae とマイコプラズマ肺炎

1 *M. pneumoniae*

M. pneumoniae は *Mollicutes* 綱、*Mycoplasma* 属の細菌で、細胞壁を持たないため多形態性であり、最小増殖単位は $0.3\mu\text{m}$ 以下と小さく、ポアサイズ $0.45\mu\text{m}$ の細菌濾過器を通過する。DNA全塩基配列も既に解明されており、そのサイズは816kb(キロベース)と大腸菌のほぼ5分の1で、GC含量は40%である⁴⁾。このように、細菌でありながら、一般の細菌とは大きな隔たりのある形態学的及び遺伝学的特徴を有し、自己増殖可能な最小ク

ラスの生物とされている。また、*M. pneumoniae*を含む *Mycoplasma* 属細菌における遺伝学上の特異な性質として、以下のような遺伝暗号の変化もあげられる。通常、ほとんどの生物ではメッセンジャーRNA上のUGAコドンは蛋白質合成の停止を意味するが、*Mycoplasma* 属細菌ではトリプトファンを指定しているのである⁵⁾。このため、遺伝子組み換えによって *M. pneumoniae* の蛋白質を大腸菌などで生産しようとした場合、UGAコドンの位置で合成が停止することになる。

M. pneumoniae は人工培地に増殖するが、一般の細菌に比べて栄養要求が厳しく、動物の血清や酵母エキスなどを添加しないと増殖しない。しかし、増殖しても液体培地が混濁することはなく、寒天平板培地に形成されるコロニーは極めて小さいことから、肉眼的に増殖を確認することは困難である。寒天培地上のコロニーは直径が0.1mm程度で、その形態を実体顕微鏡などで観察すると、目玉焼き状を呈していることが特徴である。図1のAに、*M. pneumoniae* の標準株 (Mac株)、同Bに患者から検出された *M. pneumoniae* のコロニーを示す。患者由来株は、検出当初は増殖が遅く、多くは目玉焼き状の形態を呈するが、目玉の部分 (ニップル) が比較的大きく、目玉焼き状が明瞭でないこともある。

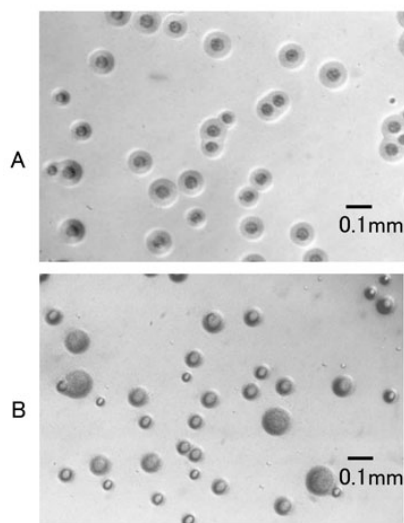


図1 寒天平板培地における *M. pneumoniae* 標準株 (A, 7日間培養) 及び患者由来株 (B, 14日間培養) のコロニー

本細菌の病原因子については長い間明らかにされてなかったが、現在では、菌体表面に存在するP1蛋白が重要であることが分かっている⁶⁾。P1蛋白は分子量170 kDa(キロダルトン)の接着因子で、これによりヒトの呼吸器細胞表面に付着して病原性を発揮する^{6,7)}。従って、P1蛋白に変異が起こると、接着能が無くなり、病原性も失われることになる。また、感染して細胞表面に付着

した *M. pneumoniae* は細胞表面を滑走することが知られており⁸⁾、この運動でより条件の良い場所に移動し、病原性を発揮すると考えられている。

2 マイコプラズマ肺炎

M. pneumoniae はヒトに感染して主に呼吸器疾患 (*M. pneumoniae* 感染症) を起こし、その代表的なものがマイコプラズマ肺炎である。尚、マイコプラズマ肺炎は種々の動物の疾患としても存在し、これらは *M. pneumoniae* 以外の *Mycoplasma* 属細菌が原因となっていることから、ヒトの疾患としては肺炎マイコプラズマ肺炎もしくは *M. pneumoniae* 肺炎との表現が妥当である。しかし、感染症法においては疾患名としてマイコプラズマ肺炎が記載されていることから、本稿ではこの表現を使用する。従来、この肺炎は異型肺炎 (非定型肺炎) であり、肺炎球菌などによる細菌性肺炎とは胸部X線所見で区別できると言われてきたが、異型肺炎像を呈する疾患はウイルス、クラミジアなどによるものもあり⁹⁾、これらとの鑑別は困難なようである。*M. pneumoniae* の感染は患者の咳やくしゃみで飛び散る飛沫が周囲のヒトに吸い込まれて起こり、感染力はインフルエンザウイルスのように強いものではなく、家族内などの閉鎖的集団における濃厚接触により感染が進行するとされる¹⁰⁾。発症までの潜伏期間は2~3週間で、頭痛、倦怠感、発熱、咽頭痛、咳などのいわゆる感冒様症状を呈し⁹⁾、マイコプラズマ肺炎に特有な症状はないが、感冒性疾患と比べ症状が長引き、頑固な咳が続く傾向が見られる¹⁰⁾。患者は小児に多く、通常は比較的軽症に止まるものの、成人では呼吸不全などを呈する重傷、劇症型に発展する例も知られている^{2,11)}。

3 マイコプラズマ肺炎の発生状況

図2に、国立感染症研究所感染症情報センターから提供される感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者の報告数 (1982~2006年)¹²⁾を示す。1998年までの疾患名は異型肺炎となっているが、異型肺炎の4割程度をマイコプラズマ肺炎が占め、流行期には6割を占めるとされている¹³⁾ことから、異型肺炎の動向がマイコプラズマ肺炎のそれを反映していると考えられる。1984年、1988年に患者報告数の明瞭なピークが見られ、1984年以前においても、地域的にはマイコプラズマ肺炎流行の4年周期性が報告^{14,15)}されていることから、1980年代までは、国内におけるマイコプラズマ肺炎の大規模な流行は4年周期で起こっていたものと推測される。また、流行は急激に拡大するものではなく、流行のピークを示す年及びその前後年において、比較的緩やかに進行する傾向が見られる。1990年以降、患者報告数が減少すると共に、4年周期性は不明瞭になり、2000年以降は

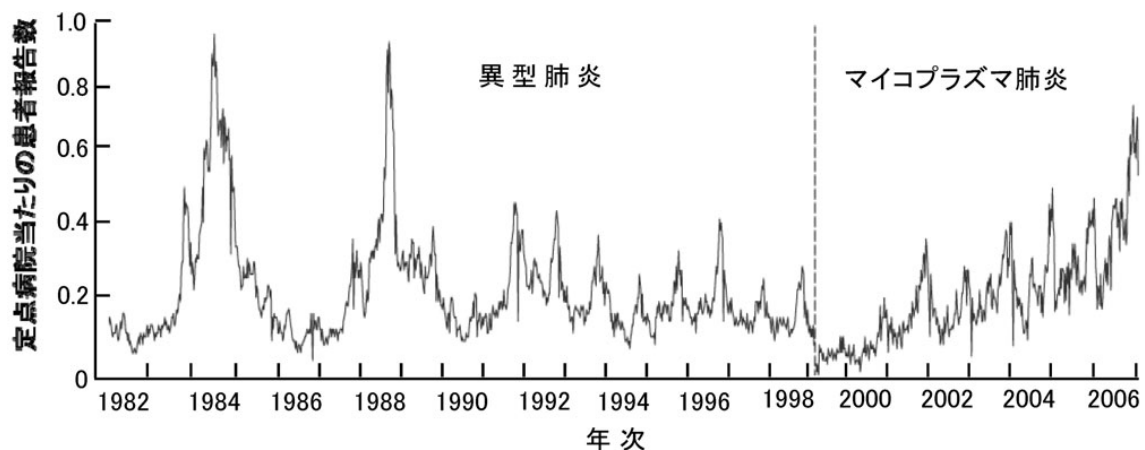


図2 感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者報告数（各週）の推移（国立感染症研究所感染症情報センター、1999年第14週までは感染症サーベイランスによる異型肺炎患者報告数）

周期性が消失し、不定期に各地で小規模な流行が発生している状況になっている⁹⁾。しかし、1988年の流行を過ぎてから減少していた患者報告数は、2000年から次第に増加する傾向が見られることから、今後の動向を注視する必要がある。

マイコプラズマ肺炎の検査

1 *M. pneumoniae* の検出

マイコプラズマ肺炎を診断するには、患者から *M. pneumoniae* を検出することが最も確実である。*M. pneumoniae* 検出法には、培養検査法、遺伝子増幅法 (Polymerase chain reaction, PCR)、DNAプローブ法などがあり、酵素抗体法も検討されてはきたが、感度及び特異性などの問題から、現在、主に使用されているのは培養検査法とPCR法である。

1) 培養検査

M. pneumoniae の培養検査は煩雑な技術が必要とし、その上に結果の判明までに通常1~2週間の日数を要することから、臨床診断をする上での適切な検査法とはいえない。しかし、本菌の病原性、薬剤耐性、遺伝子変異などの検討をするためには、培養検査により菌株を確保し、保存することが重要である。

神奈川衛研では、患者から採取した咽頭スワブの絞り液を検査材料として使用し、これを寒天平板培地と二層培地に接種して培養している^{16,17)}。培地には様々な成分が添加されるが、中でもウマ血清と酵母エキ스가重要であり¹⁸⁾、これらを添加しないと *M. pneumoniae* は増殖しない。このウマ血清については、従来、非加熱で使用することが定説^{19,20)}となっていたが、非加熱ウマ血清にはマイコプラズマ発育阻害作用があり、この作用は56℃ 30分間の加熱で消失する^{21,22)}ことから、加熱処理をし

て使用するのが適切である。また、酵母エキスについては、パン酵母などから抽出した自家製のものを使用した方がよいと思われる⁹⁾。

寒天平板培地と二層培地に検査材料を接種し、37℃で7~14日間培養すると、寒天平板培地に *M. pneumoniae* が増殖した場合にはコロニーが形成され、これを実体顕微鏡下で40~80倍に拡大して観察すると、特徴的形態が確認される (図1参照)。また、二層培地に *M. pneumoniae* が増殖すると、図3のBに示すように、培地が変色する。二層培地は *M. pneumoniae* 用の選択増菌培地で、図3のAに示すように小試験管において寒天培地に倍量の液体培地を重層したものである。培地にはブドウ糖、フェノールレッド及びメチレンブルーが添加されており、*M. pneumoniae* が増殖すると、ブドウ糖分解による酸の産生及びメチレンブルーの還元により変色する。メチレンブルーは、*M. pneumoniae* 以外のヒトに寄生する *Mycoplasma* 属の発育を抑制する作用も有

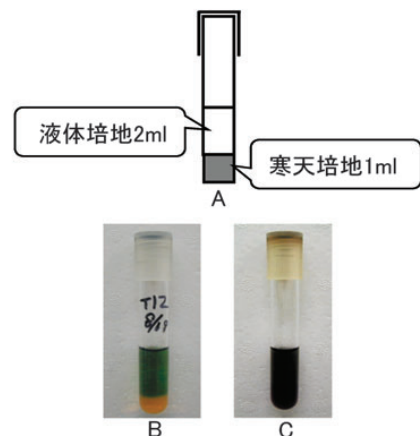


図3 二層培地 (A、培地の構造; B、*M. pneumoniae* 培養陽性; C、同陰性)

する。 *M. pneumoniae* は二層培地の液体層と寒天層の界面に良く増殖するため、下部の寒天層から変色し、熟練すると、その界面における僅かな変色で早期の増殖が判断できるようになる。寒天平板培地でのコロニーと二層培地における変色が確認されれば、 *M. pneumoniae* 培養陽性と推定して良いが、同定は、基本的には生化学的性状試験及び抗血清による発育阻止試験により行う。生化学的性状試験の代表的なものである赤血球吸着試験²³⁾を図4に示す。上述のように、 *M. pneumoniae* は接着因子であるP1蛋白により細胞に吸着する性質があり、

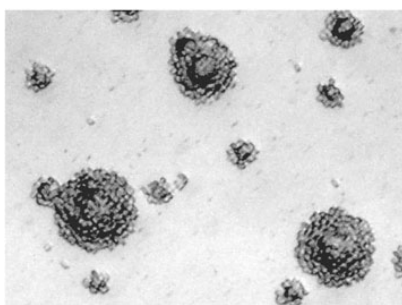


図4 赤血球吸着試験(寒天培地上の *M. pneumoniae* コロニーに、ニワトリ赤血球浮遊液を滴下し、室温で30分間反応)

これを利用した試験法で、寒天平板培地に形成されたコロニーに、ヒツジ、モルモットあるいはニワトリなどの動物赤血球浮遊液を滴下し、コロニーへの吸着を実体顕微鏡下で観察する。発育阻止試験²⁴⁾による同定は、図5に示すように、被検菌液を塗布した寒天平板培地に抗血清をしみ込ませたディスクを置いて培養し、被検菌が *M. pneumoniae* である場合にはディスク周囲に発育阻止帯が観察される。しかし、抗血清の入手が困難で、自家調整する必要があるため、最近では、PCR法で *M. pneumoniae* の同定を行うことが多い。

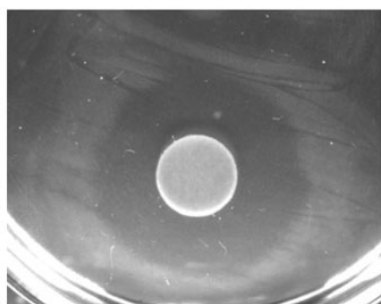


図5 発育阻止試験(寒天平板培地に *M. pneumoniae* 菌液を塗布後、抗血清を染みこませたディスクを置き、37℃で7日間培養)

2) PCR法

PCR法は、現在、様々な感染症の迅速且つ正確な診断法として急速に普及しつつある。マイコプラズマ肺炎診

断におけるPCR法に関しては、神奈川県が国立感染症研究所などと共同で16SリボソームRNA遺伝子の一部を増幅するPCR法を検討し²⁵⁾、感染症発生動向調査などにおける *M. pneumoniae* の検出に利用して成果を上げてきた^{26,27)}。一方で、PCR法は迅速化と微量化が推進され、国内外で多くの研究がされてきており、現在、神奈川県では従来のPCR法に代えてIevenら²⁸⁾が報告した方法を若干修正して採用している²⁹⁾。このPCR法も16SリボソームRNA遺伝子を標的としており、 *M. pneumoniae* 培養液を使用して調べた検出感度は、従来から神奈川県で使用していたものと同程度 (1.7 CFU/10 μ l; CFU, colony forming unit) であり²⁶⁾、PCRサンプルの作成からPCR増幅産物の確認までの作業は3時間程度で終了する。しかし、患者咽頭スワブから調整したサンプルに使用した場合、PCR法の検出感度はやや低くなり²⁶⁾、表1に示すように、1～<10 CFUのPCRサンプルで8件中3件、10～<10² CFUでも11件中1件が陰性となった。これらの検体はいずれも培養検査により *M. pneumoniae* 陽性となっている。原因としては、検体中のPCR阻害物質などの影響が考えられ、今後この点の改善を図ることができればPCR法の価値は更に高まることが期待される。

表1 臨床検体中の *M. pneumoniae* 数 (CFU) とPCR検査成績

CFU/10 μ l ¹⁾	検査数	陽性数 (%)
1～<10	8	5(62.5)
10～<10 ²	11	10(90.9)
10 ² ～<10 ³	14	14(100)
≥10 ³	36	36(100)

¹⁾ 咽頭スワブから調整したPCR用サンプル10 μ l中のCFU数(CFU数は培養検査における寒天平板培地のコロニー数から算出)

臨床検体に利用した際のPCR法と培養検査法の比較を表2に示す。マイコプラズマ肺炎を疑われた患者から採取された214件の咽頭スワブにつき、PCRと培養検査の両者を実施した結果、培養陽性でPCR陰性あるいは培養陰性でPCR陽性が共に3例ずつあり、これらは検体中のPCR阻害物質の影響あるいは薬剤治療により *M. pneumoniae* の生物活性が低下していたことによる可能性があるが、両方法における陽性率に差はほとんど見られなかった。一方、雑菌増殖により培養検査では判定できなかった12件の全てがPCR法で判定され、しかも4件が陽性であった。これはPCR法の優れた点である。これらの12件を除いて算出したPCRと培養検査法の陽性一致率は93.6%で、両者の成績は良く一致した。培養検査法はマイコプラズマ肺炎を診断する上で最も確実な方法

表2 培養検査法とPCR法の比較

PCR	培 養 検 査			計 (%)
	陽性	陰性	判定 不可	
陽性	88	3	4	95 (44.4)
陰性	3	108	8	119
計 (%)	91 (42.5)	111	12	214

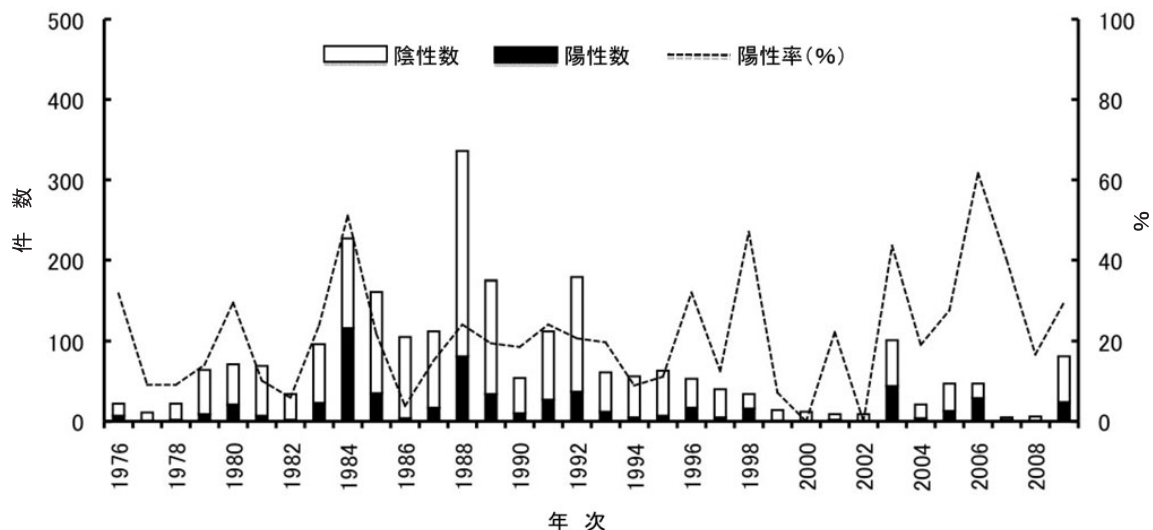
であることから、以上の結果はPCR法の本疾患診断における有用性を示すものと言える。

このように、PCR法は臨床検体中の阻害物質など、若干の課題はあるものの、マイコプラズマ肺炎の迅速診断に極めて有用と考えられる。しかし、これを実施するには検査の正確性を確保するための設備、機器及び技術が必要となるため、現段階では一部の研究機関や大学病院

など、限られた機関でしか実施されていない。今後、マイコプラズマ肺炎の重症例、*M. pneumoniae*の薬剤耐性などが問題視される中で、迅速診断法としてのPCR法の普及が強く望まれる。

3) 過去34年間の*M. pneumoniae*の検出成績

図6に、神奈川県における1976～2009年までの調査研究などで、培養検査やPCR法により*M. pneumoniae*を検出した成績の年次推移を示す。検体総数2,509件、陽性数615件、陽性率は24.5%であった。年次による検体数に大きな差があることを考慮する必要はあるが、1980年、1984年及び1988年には陽性数と陽性率が共にピークを示しており、これらに加えて、既報^{14,15)}により1976年もピークと推定されることから、*M. pneumoniae*検出成績においても1980年代までのマイコプラズマ肺炎流行の4年周期性が伺える。一方で、1990年以降のピークに周期性は見られず、2000年以降は、2003年及び2006年のピークと共に次第に上昇する様相を呈

図6 神奈川県における*M. pneumoniae*検出成績の年次推移

している。これらは、国の感染症サーベイランスあるいは感染症発生動向調査におけるマイコプラズマ肺炎患者報告数の推移（図2参照）とほぼ一致しており、患者発生の動向が病原体検出成績から裏付けられたものと考えられる。

培養検査により、患者から*M. pneumoniae*が検出される期間を調べた成績を表3及び4に示す³⁰⁾。患者は1983から1984年の期間に培養検査あるいは血清抗体検査でマイコプラズマ肺炎と診断された例である。表3のように、薬剤治療前では、発病後7日以内の患者の多く(92.7%)が培養陽性であり、1ヶ月程度後においても検出が可能であった。薬剤治療後においても、表4に示すように、検出率は低くなる傾向があるものの、2ヶ月程度は*M. pneumoniae*が検出され、最長で発病後112日

目に検出された例があった。このように、マイコプラズマ肺炎患者では、治療後においても速やかに菌が消失するのではなく、数ヶ月間にわたり排菌する例が少なくな

表3 薬剤治療前の患者における病日と培養検査による*M. pneumoniae*検出成績

病日 ¹⁾	検査数	陽性数(%)
1～7	55	51(92.7)
8～14	60	50(83.3)
15～21	11	10(90.9)
22～28	6	5(83.3)
29～35	4	3(75)
計	136	119(87.5)

¹⁾ 担当医師の診断による発病日と検体採取日から算出

表4 薬剤治療後の患者における病日と培養検査による *M. pneumoniae* 検出成績

病 日 ¹⁾	検査数	陽性数(%)
1～28	5	4(80)
29～56	8	6(75)
57～84	10	4(40)
85～112	3	1(33.3)
113～140	3	0(0)
計	29	15(51.7)

¹⁾ 表3を参照

いようである。1980年代までの本疾患流行が緩やかに、年余にわたって進行していった理由の一つとしてこのことが上げられるように思われる。

4) *M. pneumoniae* の月別及び年齢別検出成績

1976～2009年までの月別による *M. pneumoniae* 検出成績を図7に示す。検体数は10～12月の秋から冬にかけて多くなるが、検出陽性率は8月をピークとして、夏季に高い値を示した。この傾向は、4年周期でマイコプラズマ肺炎流行が起こっていた1980年代、その周期性が不明瞭となった1990年代以降の集計結果においてほぼ同じものであった。秋から冬にはマイコプラズマ肺炎を含めた呼吸器疾患が多くなり、検体数もそれに比例しているものと思われるが、*M. pneumoniae* 検出結果は、マイコプラズマ肺炎が夏季に多発することを示すものであった。

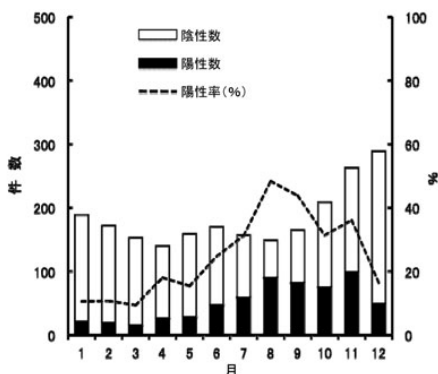
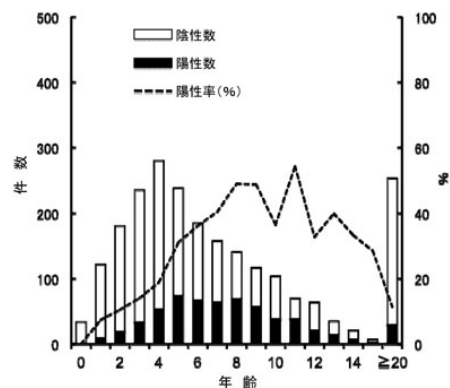
図7 *M. pneumoniae* の月別検出成績 (1976～2009年)

図8に年齢別に見た検出成績を示す。マイコプラズマ肺炎は小児に多く、本稿の調査成績も主に小児科における患者を対象としたものであるため、12歳以下の患者年齢層が多くなっている。図のように、0歳児では検出されず、11歳までの年齢層においては、検出陽性率が概ね加齢と共に上昇し、12歳以降は次第に低下していき、成人になると著しく低くなる傾向が見られた。マイコプラズマ肺炎が年長児ほど多くなることについては、本疾患に細胞性免疫が関与し、感染機会の増加と共にそ

図8 *M. pneumoniae* の年齢別検出成績 (1976～2009年)

の獲得率が高くなる年長児ほど肺炎を発症し易くなるとする³¹⁾免疫学的背景を支持する成績と思われる。また、マイコプラズマ肺炎が学齢児童に多いことから、小学校内が主な感染の場となっているようにも考えられるが、著者ら^{16,32)}が1984年の流行年及びその前後年における年齢層別 *M. pneumoniae* 侵淫状況を調べたところでは、*M. pneumoniae* 感染が家族内を中心に進行し、感染年齢層を拡大させながら、小学校との間で相互に感染持ち込みが繰り返され、マイコプラズマ肺炎の流行につながって行く様相が伺えた。上述のように、*M. pneumoniae* の月別検出成績から見ると、マイコプラズマ肺炎は8月を中心とした夏休みの時期に多発しており、このことも家族内感染が本疾患の流行に大きな役割を果たしていることを示しているように思われる。家族内感染の詳細な検討についてはプライバシーなどの問題もあり、容易には進められない状況にはあるが、今後、マイコプラズマ肺炎の大きな流行を防止する意味においては重要な課題と思われる。

2 血清抗体検査

血清抗体検査は、現在のマイコプラズマ肺炎の臨床診断における主流を占め、受身凝集反応法、補体結合反応法、酵素抗体法、間接蛍光抗体法、寒冷凝集反応法、イムノカード法、代謝阻止抗体法、mycoplasma-cidal法など、多くの方法がある。最近、簡便且つ迅速な抗体検査が可能であるイムノカード法に大きな期待が寄せられているが、*M. pneumoniae* の既感染を捉えることが少なくないとの指摘がなされており³³⁾、簡便性、検体処理数及び検査結果の信頼性などから受身凝集反応 (Particle agglutination, PA) 法が国内では広く普及している。また、感染防御に関与するとされる^{34,35)}代謝阻止抗体は、血清疫学的視点から重視されている。従って、本稿ではPA法と代謝阻止抗体法の二つの方法に関する検討成績を記載する。

1) PA法

M. pneumoniae 抗原を赤血球、ラテックス粒子ある

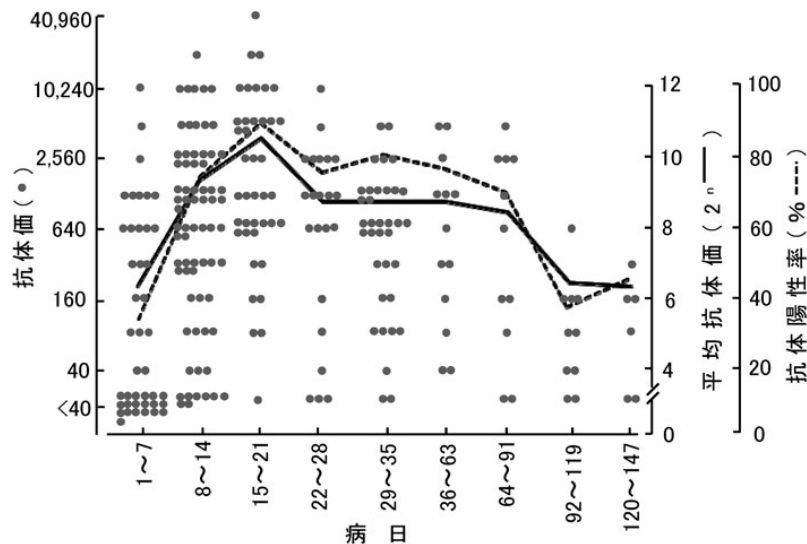


図9 病日に伴うIHA抗体価の分布と推移 (n=247, 平均抗体価は相乗平均値, 抗体陽性率は ≥ 320 を示す例の比率)

いはゼラチン粒子などの凝集体に結合させ、これに患者血清を加えて反応させ、凝集の強さにより判定を行うものである。凝集体として赤血球を用いた場合が間接赤血球凝集反応 (Indirect hemagglutination, IHA) 法であるが、現在ではラテックス粒子、ゼラチン粒子などの凝集体が主体となっており、特異性と感度の向上が図られている。

図9に、神奈川県衛研で実施した247例の患者血清 (1982~1986年に採取) の病日に伴うIHA抗体価分布、平均抗体価 (相乗平均; 2^n) 及び抗体陽性率 (≥ 320) を示す³⁰⁾。抗体価は発病後8~14日から高くなり、15~21日で最高値を示し、以後、2~3ヶ月まで比較的高い値を維持するが、それを過ぎると低下し、 ≥ 320 以上の抗体価を示す例も少なくなる傾向が見られる。従って、IHA抗体価が半年ないしは1年以上にわたり ≥ 320 の値を維持することはないように思われる。このような観点及び既報³⁶⁾から、シングル血清で測定した時のIHA抗体陽性値を ≥ 320 とした場合、発病後7日以内の陽性率は38.1%で、8~14日で73.9%と高くなり、15~21日では87.5%と最も高い値を示した。IHA法では主にIgM抗体を捕捉するとされ³⁷⁾、発病後7日以内でも ≥ 320 の抗体価を示す例が少なくないものの、シングル血清で測定する場合には発病後15日以降の血清を用いるのが適切であり、この時期に採取した血清と発病後7日以内の血清をペアで供試して抗体検査を行うことが好ましい。

また、抗体陽性率 (38.1%) が低い発病後7日以内の患者では、IHA抗体検査による診断が難しい例が多く、一方で、同時期の患者について *M. pneumoniae* 培養検査を行うと、上述のように、多くが陽性となる (表3参照)。培養検査は臨床診断の上では実用的ではないが、

PCRなどによる迅速な *M. pneumoniae* 検出法を併せて実施することで、より確実な診断が可能になると思われる。

2) 代謝阻止抗体法

代謝阻止抗体の測定は液体培地での *M. pneumoniae* の培養を伴い、抗体によるブドウ糖発酵阻止 (Fermentation inhibition, FI) あるいはテトラゾリウム還元阻止を指標として測定される。後者は遮光の必要性など、手技が煩雑であるため、前者により実施するのが一般的である。しかし、測定用培地に添加するウマ血清の品質が結果に大きく影響すること及び判定に熟練を要することなどの問題があった。特に、ウマ血清は含まれる補体が重要な役割を果たすとされ³⁸⁾、非加熱で用いることとなっていたが、上述のように非加熱ウマ血清にはマイコプラズマ発育阻害作用があることから、抗体測定に大きな影響を及ぼすことが懸念されていた。

これらの問題を解決するため、著者ら^{39,40)}はウマ血清に代えて γ -グロブリン除去ウマ血清とモルモット補体を抗体測定用培地に添加することで、高感度で再現性のあるFI抗体測定法 (補体添加FI法) を開発した。この方法で測定した健常者を含む *M. pneumoniae* 非感染者の血清 (1985~1990年採取) における年齢層別FI抗体価分布及び平均抗体価 (相乗平均, 2^n) を図10に示す。0歳児の平均抗体価は1~3歳児と比べて高く、これは母体由来の抗体が残存するためと思われ、これ以上の年齢層では年齢とともに高くなり、10~12歳から急上昇し、成人では小児と比べて著しく高い値を示した。上述の図8で示したように、*M. pneumoniae* の年齢別検出成績から見ると、マイコプラズマ肺炎は0歳児では少なく、11歳までは年齢と共に増加し、12歳から減少傾向を辿り、成人になると著減している。また、FI抗体はIgM

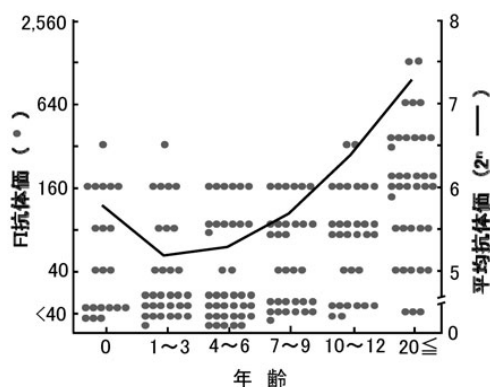


図10 健常者を含む*M. pneumoniae* 非感染者 (n=191) における年齢層別F I 抗体価分布と平均抗体価(平均抗体価は相乗平均値)

及びIgG抗体の両者を含み、血液中に長期間残存することが知られている^{40,41,42)}。これらのことから、*M. pneumoniae* 感染を繰り返すことで加齢と共に本菌に対する免疫能が充実し、12歳以降はそれによる感染防御能が発揮されてマイコプラズマ肺炎が減少していくものと推察される。しかし、感染防御能を発揮できるFI抗体価レベルについては明確ではなく、また、本抗体以外に様々な因子が感染防御に関わっているものと考えられ、FI抗体とマイコプラズマ肺炎の発生疫学との関連性については推察の域を出ない。今後、補体添加FI法を利用した検討成績を積み重ねることにより、本疾患に関するより明確な血清疫学的見解が得られることを期待したい。

FI抗体及びIHA抗体法はIgGとIgMの両者を補足し、前者は主にIgGを補足するため、長期間にわたり患者血清から抗体検出が可能とされる^{41,42)}。著者らは、長期的な観察が可能であった2例(1984～1986年)のマイコプラズマ肺炎患者について、両方法による抗体検査を実施した経験があり、その成績を表5に示す。発病後200～300日程度において、いずれの患者もFI抗体が検出され、IHA抗体は検出されなかった。殊に、1名の患者におけるFI抗体価は212日後も1,280を示した。この結果からも、IHA抗体は年余にわたり残存するものではなく、

表5 マイコプラズマ肺炎患者の長期観察例における病日と検査成績

患者 年齢	病日 ¹⁾	培養	抗体価	
			IHA	FI
7	10	+	2,560	5,120
	20	+	2,560	1,280
	308	—	<40	160
	12	+	320	1,280
13	20	+	2,560	5,120
	212	—	<40	1,280

¹⁾ 表3を参照

一方で、FI抗体は長期間残存し、感染防御にも関与するものと推察される。

M. pneumoniae の分子疫学

1 *M. pneumoniae* の遺伝子型別

M. pneumoniae は、従来、抗原型あるいは遺伝子型に分類できないとされてきた。しかし、最近、本菌の接着因子であるP1蛋白の遺伝子塩基配列に多型が存在し、I型とII型に分類できることが明らかにされた^{43,44)}。神奈川衛研では国立感染症研究所との共同研究により、その遺伝子型別について検討してきた。

P1蛋白遺伝子型別はPCRと制限酵素処理を組み合わせたPCR-RFLP (RFLP, restriction fragment length polymorphism) 法^{29,44)}で行い、*M. pneumoniae* のP1蛋白遺伝子塩基配列の前半部と後半部の可変領域をPCRで増幅し、増幅産物を制限酵素(*Hae*Ⅲ)で切断後、アガロースゲルなどによる電気泳動で切断パターンを観察する。現在、遺伝子型としてI型及びII型が知られており、II型には亜型が存在する。図11は、それらのアガロース電気泳動パターンを示したものである。P1蛋白遺伝子塩基配列の前半部及び後半部ともにI型パターンを示す菌をI型、同様にII型パターンを示すものをII型とし、前半部はII型パターンで、後半部がI型でもII型パターンでもない菌をII型亜型としている。

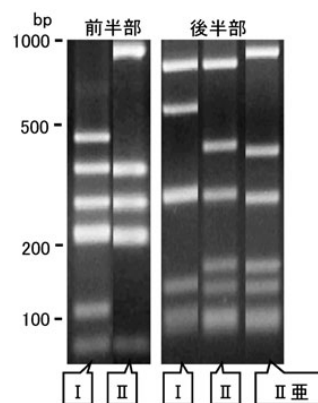


図11 *M. pneumoniae* P1蛋白遺伝子型のアガロース電気泳動パターン

2 過去33年間におけるP1遺伝子型の推移

1976～2008年に神奈川衛研で検出された432株の*M. pneumoniae* についてP1蛋白遺伝子を解析し、年次によるI型とII型の推移を調べた結果を図12に示す。この結果から、国内ではI型とII型が一定期間(8～10年)をもって入れ替わっていることが明らかになった^{44,45,46)}。このような現象の正確な理由は不明であるが、それぞれの遺伝子型に対するヒトの免疫レベルが関与していると

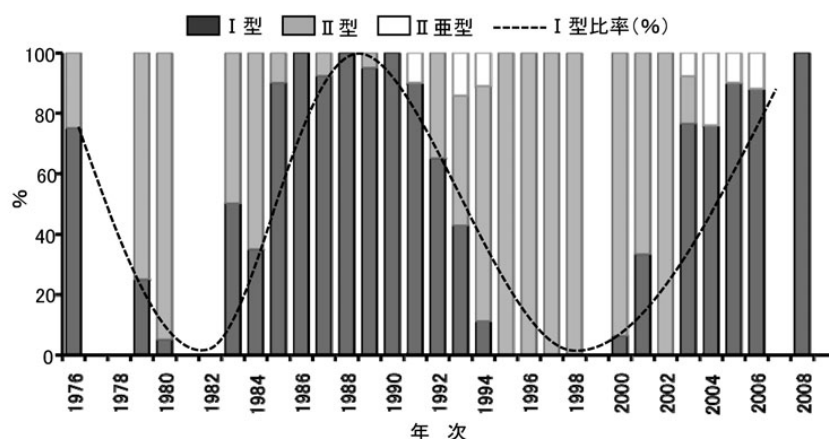


図12 *M. pneumoniae* P1蛋白遺伝子型の推移 (1977, 1978, 1981, 1982, 1999及び2007年については遺伝子解析を実施せず)

推測され^{47,48)}, 1980年代までのマイコプラズマ肺炎の周期的流行にも何らかの関連性があるのではないかと考えられる。また, 最近の数年間はI型が優勢であり, II型の殆どがII型垂型であることが特徴である。

*M. pneumoniae*の薬剤耐性

1 薬剤耐性*M. pneumoniae*の出現

*M. pneumoniae*は細胞壁を欠くため, 細菌性肺炎の治療に汎用されるペニシリン, セフェム系などのβ-ラクタム系薬剤は無効であり, マイコプラズマ肺炎の治療にはマクロライド系 (MLs) 薬剤が第一選択薬剤として使用されている^{9,36)}。テトラサイクリン (TC) 系及びニューキノロン系薬剤も本症の治療に有効とされるが, これらは小児に対する副作用が発現する場合があります, 使用が制限されている^{36,49)}。従来, これらの薬剤に対する耐性*M. pneumoniae*が患者から検出されることはなく, 治療において薬剤耐性が問題視されることもなかった。しかし, 2000年に, 札幌市内の病院から神奈川衛研に送付された*M. pneumoniae*がMLs耐性と確認され¹⁾, 以後, 引き続き北海道で, 更に, 高知県, 千葉県, 神奈川県など, 国内のいくつかの地域で耐性*M. pneumoniae*が検出されるようになってきている^{50,51)}。

神奈川衛研で最初に検出された上述のMLs耐性*M. pneumoniae*は, 国立感染症研究所との共同研究により23SリボゾームRNA遺伝子に点変異を起こしていることが判明し¹⁾, これをきっかけに, 国内における薬剤耐性*M. pneumoniae*の遺伝子変異に関する研究が進み, 現在に至っている。

2 薬剤感受性試験

患者から検出された*M. pneumoniae*の薬剤耐性については, 薬剤感受性試験を実施して詳細を調べる。その方法として, 寒天平板希釈法及び液体培地希釈法があり,

前者では, 感受性判定のためのコロニー発育の観察が容易でないことから, 神奈川衛研では後者を利用し, マイクロプレート (96ウェル) を利用した微量液体培地希釈法で行っている^{52,53)}。この方法ではブドウ糖とフェノールレッドを添加した液体培地を用い, 薬剤による*M. pneumoniae*のブドウ糖発酵阻止反応による培地色の変化から最小発育阻止濃度 (Minimal inhibition concentration, MIC/ml) を測定する。

3 *M. pneumoniae*の試験管内における薬剤耐性化

従来, *M. pneumoniae*は抗生物質などに対して耐性化し難いとされていた。そこで, 著者ら^{1,54)}は, 患者から検出された141株の*M. pneumoniae*につき, エリスロマイシン (EM) 100 μ g/mlを添加した液体培地に接種して培養し, 試験管内での耐性化を試みた。その結果, 11株が耐性化した。これらの耐性株及び親株のMLs6薬剤, リンコマイシン (LCM), TCに対するMIC値と遺伝子解析結果を表6に示す。耐性化した*M. pneumoniae*は, 供試した全てのMLs薬剤とLCMに交差耐性を示したが, TCには感受性であった。また, 23SリボゾームRNAドメインV遺伝子の塩基配列における2063位あるいは2064位に点変異が見られ, 3株がA2063G (2063位のアデニンがグアニンに置換), 5株がA2064G, 他の3株はA2064Cの塩基置換が確認された。遺伝子変異と各薬剤に対する交差耐性パターンとの関係を見ると, 2063位変異株はEM, オレアンドマイシン (OM), クラリスロマイシン (CAM), ロキシスロマイシン (RXM) などの14員環MLs薬剤及びLCMに高度耐性 (MIC: 200~ $\geq$ 400 μ g/ml) であり, ジョサマイシン (JM), スピラマイシン (SPM) などの16員環MLs薬剤にはより低い耐性 (MIC: 6.25~25 μ g/ml) を示した。一方, 2064位変異株は16員環MLs薬剤にも高度耐性 (MIC: 200~ $\geq$ 400 μ g/ml) であった。このように, 23Sリボゾーム

表6 試験管内 (100 μ g/ml EM) において耐性化した *M. pneumoniae* (11株) の遺伝子変異及びMLs薬剤, LCM, TCに対するMIC値, 並びに親株の各薬剤に対するMIC値

変 異 ¹⁾	菌 株	MIC (μ g / ml) ²⁾							
		E M	O M	J M	SPM	RXM	CAM	LCM	T C
A2063G	1225EMR			6.25	6.25		200		0.195
	1436EMR	>400	>400	∫	∫	400	∫	400	∫
	2043EMR			12.5	25		400		0.39
A2064G	1020EMR								
	1026EMR	200	400	400		50	25	50	0.195
	1046EMR	∫	∫	∫	>400	∫	∫	∫	∫
	1224EMR	>400	>400	>400		100	50	200	0.39
	1653EMR								
A2064C	1253EMR	200	200	200	200		25		0.195
	1255EMR	∫	∫	∫	∫	100	∫	50	∫
	1552EMR	>400	400	400	>400		50		0.39
親 株		0.006		0.024		0.012		0.195	0.195
		∫	0.098	∫	0.098	∫	0.006	∫	∫
		0.012		0.098		0.024		0.39	0.39

¹⁾ 23SリボゾームRNAドメインV遺伝子における点変異

²⁾ 薬剤感受性試験はデュプリケート(duplicate)で実施し, MICを測定

RNAドメインV遺伝子における塩基置換の位置により耐性パターンが異なる傾向が伺えた。

図13に, 後述する変異 (C2617G) を含めて, 2008年までに神奈川衛研で検出されたMLs耐性 *M. pneumoniae* の23SリボゾームRNAドメインVにおける変異(表現型)を示す。MLs薬剤の作用機序は, 細菌の23SリボゾームRNAに薬剤が結合し, 蛋白合成を阻害することであり, 図に示すような変異が起こると, 23SリボゾームRNAに結合できなくなるため作用を発揮できなくな

り, 細菌は耐性を発現する。これらの変異は, 従来, 23SリボゾームRNAドメインV遺伝子の塩基配列を解析して検出され⁵⁵⁾, これには高価な機器と煩雑で高度な技術を要していたが, 最近では, PCR-RFLP法による迅速な検出法が確立されており⁵⁶⁾, 神奈川衛研でも実施可能となっている。

100 μ g/mlのEM存在下で耐性化した11株の *M. pneumoniae* の親株 (感受性株) を供試し, EM濃度別に耐性化を試みた結果を表7に示す。4株 (1026, 1225, 1436, 1552) が0.024~50 μ g/mlの全濃度において耐性化し, 全般的に幅広いEM濃度域において耐性化が認められ, 計110株の耐性 *M. pneumoniae* が得られた。これらの結果は, *M. pneumoniae* のEM耐性化がEM濃度に依存していないことを示すものであり, 23SリボゾームRNA遺伝子の突然変異により出現した耐性 *M. pneumoniae* が, EM存在下において選択的に増殖して耐性が確立するものと推定される。

EM濃度別に得られた110株の耐性 *M. pneumoniae* の内12株について, 23SリボゾームRNAドメインVの遺伝子変異を調べた結果を表8に示す。EM濃度と遺伝子変異との間に一定の関連性は見られなかったが, A2063Gの変異を示すものが7株と最も多く, A2063G, A2064G及びA2064C以外にC2617Gの変異が新たに見出された。A2063G, A2064G及びA2064C変異株は各薬剤に対し, 上述と同様の耐性パターンを示したが, C2617G変異株は, 表9に示すように, EM, OM, RXM, CAMなどの14員環MLs薬剤及びLCMには低いMIC値な

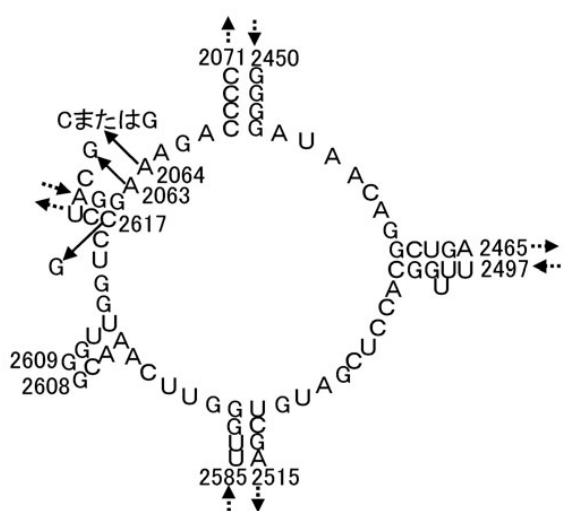


図13 MLs耐性化に伴う *M. pneumoniae* の23SリボゾームRNAドメインVにおける点変異の表現型(耐性化すると, 2063位のAがG, 2064位のAがCまたはG, 2617位のCがGに置換することを示す)

表7 試験管内 (100 μ g/ml EM) において耐性化した *M. pneumoniae* (11株) の親株を供試したEM濃度別による耐性化試験成績

菌 株	E M 濃 度 (μ g / ml)											
	0.024	0.049	0.098	0.195	0.39	0.78	1.56	3.125	6.25	12.5	25	50
1020	- ¹⁾	+ ²⁾	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-
1026	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1046	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
1224	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+
1225	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1253	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	-	-
1255	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
1436	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1552	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1653	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2043	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-

¹⁾ 耐性化しなかったもの²⁾ 耐性化したもの

がらも耐性 (0.78~12.5 μ g/ml) を示したものの、他の MLs薬剤に対してはむしろ感受性 (0.049~0.39 μ g/ml) とも言えるMIC値を示した。

これらのことから、*M. pneumoniae* のMLs耐性は、23SリボゾームRNAドメインV遺伝子の主に2063あるいは2064位の変異により発現し、これらの位置に変異が起こった場合には高度耐性となり、他の位置の変異によっても耐性となることはあるが、2063あるいは2064位から遠ざかるほど、耐性度はより低く発現するようと思われる。また、0.049 μ g/mlのEM濃度で耐性化が認

められたことは、EM投与中の患者においても、体内で *M. pneumoniae* の耐性化、即ち、変異により生じた耐性菌が選択的に増殖することがあり得ることを示唆するものである。

尚、その後の神奈川衛研での検討により、試験管内においてEM以外のMLs薬剤による *M. pneumoniae* の耐性化が認められており、A2063C、A2063Tなどの新たな変異が見出されている。

4 薬剤耐性 *M. pneumoniae* の検出成績

MLs耐性 *M. pneumoniae* の検出については、上述のようなPCR-RFLP法で可能であり、神奈川衛研ではこの方法を患者の咽頭スワブから抽出したDNAサンプルに直接利用する迅速法も検討している。しかし、PCR-RFLP法では既知の遺伝子変異を持つ耐性菌の検出はで

表8 各EM濃度の試験管内において耐性化した *M. pneumoniae* の遺伝子変異

菌 株	EM濃度 (μ g/ml)	変 異 ¹⁾
1020EMR1	0.049	A2063G
1020EMR2	1.56	A2064G
1020EMR3	3.125	C2617G
1020EMR4	12.5	A2064G
1225EMR1	0.195	A2064G
1225EMR2	1.56	A2063G
1225EMR3	25	A2063G
1255EMR1	0.049	A2063G
1255EMR2	12.5	A2064C
2043EMR1	0.098	A2063G
2043EMR2	1.56	A2063G
2043EMR3	25	A2063G

¹⁾ 表6を参照

表9 C2617G変異株のMLs薬剤、LCM及びTCに対するMIC値

薬 剤	MIC (μ g/ml) ¹⁾
E M	3.125~6.25
O M	12.5
J M	0.049~0.098
SPM	0.195~0.39
RXM	1.56~3.125
CAM	0.78
LCM	12.5~25
T C	0.195~0.39

¹⁾ 表6を参照

きるものの、それら以外の耐性菌は検出できない。従って、培養検査で検出された *M. pneumoniae* につき、薬剤感受性試験を行い、MIC値を調べた上で耐性を確認する必要がある。

表10に、神奈川県衛研で実施された薬剤感受性試験によるMLS耐性 *M. pneumoniae* の検出成績を示す。1979～2008年に患者から検出された *M. pneumoniae* の内、1999年までの505株中にMLS耐性株は検出されなかったが、2000年に札幌鉄道病院から送付された *M. pneumoniae* が耐性株であった。この耐性株は9歳の女児から検出されたもので、患者はクリンダマイシン（CLI）を7日間投与されても症状の改善が見られず、CLI耐性 *M. pneumoniae* の感染と推定されていた⁴⁹⁾。薬剤感受性試験結果から、MLS薬剤及びCLIと同系のLCMに高度の耐性を有し、遺伝子解析の結果、A2063Gの変異が確認された。著者及び共同研究者の知り得る範囲では、患者から検出され、遺伝子変異が確認された国内外における最初のMLS耐性 *M. pneumoniae* がこの菌株である。

表10 患者からのMLS耐性 *M. pneumoniae* 検出成績

年	検査 株数	耐性株数 (%)
1979～1985	200	0
1986～1990	171	0
1991～1995	87	0
1996～2000	48	1(2.1)
2001～2005	97	13(13.4)
2006～2008	82	19(23.2)
計	685	33(4.8)

以後、北海道、高知県、山形県、山梨県などから当所に送付された臨床検体あるいは *M. pneumoniae* からMLS耐性株が検出され、神奈川県内においても検出されている^{17,50)}。2008年の段階で、神奈川県衛研では33株のMLS耐性 *M. pneumoniae* を検出しており、表10のように、ほぼ5年ごとに整理すると、耐性株の検出率が上昇しているように見えるが、最近、当所に送付されてくる検体は耐性菌感染が疑われる患者から採取されたものが多いことを考慮する必要がある、必ずしも数値通りに解釈はできないように思われる。患者から検出された33株のMLS耐性 *M. pneumoniae* の遺伝子変異を調べた結果、表11のように、A2063Gが25株と最も多く、A2064Gが5株、A2063C、A2064C及びC2617Gが各1株であった。A2063Gが多かったことは上述の試験管内

耐性化試験の結果と類似していたが、A2063Cは耐性化試験では検出されなかった変異である。また、これらの耐性 *M. pneumoniae* のMLS薬剤、LCM及びTCに対するMIC値は試験管内で耐性化したものと同一であった。

表11 患者から検出されたMLS耐性 *M. pneumoniae* の遺伝子変異

変 異 ¹⁾	株 数
A2063C	1
A2063G	25
A2064C	1
A2064G	5
C2617G	1

¹⁾ 表6を参照

2000年以降、MLS耐性 *M. pneumoniae* が検出され始めた理由は現在不明であるが、様々な細菌感染症などへのMLS薬剤の汎用がその背景になっているであろうことは想像に難くない。現在、マイコプラズマ肺炎において、MLS耐性 *M. pneumoniae* が関与した重症例が増加している状況ではなく、治療においても深刻な問題となることはないようである。一方で、国内におけるMLS耐性 *M. pneumoniae* の検出率は15%程度と推定され¹²⁾、耐性菌感染患者においては症状改善の遅延など、薬剤治療効果の低下を招いていることも事実であり⁵⁷⁾、今後の耐性菌拡大の防止は必須である。

まとめ

マイコプラズマ肺炎は、現時点においては重症例や死亡例こそ少ないものの、小児科領域では重要な疾患であり、毎年多数の患者が発生していることは国の感染症発生動向調査による成績が示している通りである。本疾患を含めて最近の感染症は、抗菌・抗ウイルス薬などの開発・普及によりその治療法が大きく進歩したが、一方で、病原体の遺伝子変異に伴う病原性の変化や薬剤耐性化などが脅威になってきていることも事実である。*M. pneumoniae* は一般細菌に比べ遺伝子構造がより単純であるが故に、変異を起こし易いとも考えられ、MLS耐性菌が2000年以降突然出現し始めたように、今後、新たな薬剤耐性や病原性の変化が起こる可能性は否定できない。また、*M. pneumoniae* を取り扱う機関が極めて少なかったため、本細菌の病原性を含めた細菌学的性状は不明な点が少なくないことから、今後、それらが解明されると、既存の疾患などとの新たな関係が見出される可能性もあろう。いずれにしても、病原体の変化を迅速に

把握し、適切な治療と予防対策を講ずるには、*M. pneumoniae*の培養検査を国内のどこかの機関で今後も実施し、同時に検出菌株の保存を継続していく必要がある。長年、マイコプラズマ肺炎の検査・調査研究に携わった1人として、将来もその機関の一つが神奈川衛研であることを望みたい。

尚、本稿の内容は、著者が平成21年度日本マイコプラズマ学会北本賞を受賞した際に講演したものである。

謝辞

稿を終わるに当たり、著者の長年にわたるマイコプラズマ肺炎に関する調査研究において、懇篤なる指導と助言をいただいた元国立感染症研究所細菌第二部第四室長佐々木次雄博士、元札幌鉄道病院小児科医長成田光生博士（現札幌徳州会病院小児科医長）及び元埼玉医科大学第二小児科学教室講師山崎 勉博士（現若葉こどもクリニック院長）、検査・調査研究業務を進める上でご協力いただいた国立感染症研究所細菌第二部主任研究官佐々木裕子博士、同主任研究官見理 剛博士、神奈川県衛生研究所微生物部（旧細菌病理部を含む）及び同微生物部旧呼吸器系細菌グループの皆様に深謝する。また、検体の採取などにご協力をいただいた神奈川県感染症発生動向調査（旧感染症サーベイランスを含む）病原体定点病院、神奈川県立循環器呼吸器病センター（現神奈川県立病院機構神奈川県立循環器呼吸器病センター）、神奈川県立こども医療センター（現神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター）及び茅ヶ崎市立病院小児科の皆様に深謝する。

（平成23年8月5日受理）

参考文献

- 1) Okazaki, N., Narita, M., Yamada, S., Izumikawa, K., Umetsu, M., Kenri, T. *et al* : Characteristics of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains isolated from patients and induced with erythromycin in vitro, *Microbiol. Immunol.*, **45**, 617-620 (2001)
- 2) 泉川欣一：重症マイコプラズマ肺炎の病態，病原微生物検出情報，**28**，33-35（2007）
- 3) 永山洋子：肺炎マイコプラズマと喘息・喘鳴との関係について，病原微生物検出情報，**28**，37-38（2007）
- 4) Dandekar, T., Huynen, M., Regula, J.T., Ueberle, C., Zimmermann, C.U., Andrade, M.A. *et al* : Re-annotating the *Mycoplasma pneumoniae* genome sequence: adding value, function and reading frames, *Nucleic Acids Res.*, **28**, 3278-3288(2000)
- 5) Inagaki, Y., Bessho, Y. and Osawa, S. : Lack of peptide-release activity responding to codon UGA in *Mycoplasma capricolum*, *Nucleic Acids Res.*, **21**, 1335-1338 (1993)
- 6) Waites, K.B. and Talkington, D.F. : *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen, *Clin. Microbiol. Rev.*, **17**, 697-728 (2004)
- 7) Razin, S. and Jacob, E. : *Mycoplasma adhesin*, *J. Gen. Microbiol.*, **138**, 407-422(1992)
- 8) Seto, S., Kenri, T., Tomiyama, T. and Miyata, M. : Involvement of P1 adhesin in gliding motility of *Mycoplasma pneumoniae* as revealed by the inhibitory effects of antibody under optimized gliding conditions, *J. Bacteriol.*, **187**, 1875-1877 (2005)
- 9) 岡崎則男，見理 剛，佐々木次雄，成田光生：肺炎マイコプラズマ，荒川宜親，渡辺治雄監修，佐々木次雄編，呼吸器系細菌感染症，pp. 45-65，じほう，東京（2006）
- 10) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，感染症発生動向調査週報，第9週（2003）
- 11) 田中裕士：重症マイコプラズマ肺炎の機序，病原微生物検出情報，**28**，35-37（2007）
- 12) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，2006年現在，病原微生物検出情報，**28**，31-32（2007）
- 13) 国立感染症研究所感染症情報センター：マイコプラズマ肺炎，感染症発生動向調査週報，第31週（1999）
- 14) 新津泰孝，長谷川純男，堀川雅浩，小松茂夫，州崎 健，末武富子：肺炎マイコプラズマ感染症流行の規則正しい4年周期性，抗研誌，**30**，57-64（1978）
- 15) 岩崎博圓，真崎美矢子，山下景子，須山尚史，富田弘志，小森宗敬ほか：過去15年間の長崎市における *Mycoplasma pneumoniae* 感染症の発生状況についての検討，第11回日本マイコプラズマ学会記録，p.93-96（1984）
- 16) 岡崎則男，明間鯉一郎，滝沢金次郎：分離検査による *Mycoplasma pneumoniae* 肺炎の追跡，感染症学雑誌，**61**，47-554（1986）
- 17) Okazaki, N., Ohya, H. and Sasaki, T. : *Mycoplasma pneumoniae* isolated from patients with respiratory infection in Kanagawa prefecture in

- 1976-2006: emergence of macrolide-resistant strains, Jpn. Infect. Dis., **60**, 325-326 (2007)
- 18) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 宮本 泰: 肺炎マイコプラズマの発育に及ぼす馬血清, 鶏卵黄液および酵母エキスの濃度の影響, 神奈川衛研報告, **9**, 37-39 (1979)
- 19) Chanock, R.M., Hayflic, L. and Barile, M. : Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO, Proc. Nat. Acad. Soc. U.S.A., **48**, 41-49 (1962)
- 20) 中村昌弘, 尾形 学: PPLO寒天培地, 佐々木正五, 尾形 学, 中村昌弘編, マイコプラズマ, pp. 154-158, 講談社, 東京 (1975)
- 21) 早津栄蔵, 吉岡守正, 木原光城, 有馬重純: 正常ウマ血清中のMycoplasma 発育阻害因子, 医学と生物学, **73**, 141-14 (1966)
- 22) Okazaki, N. and Fujiwara, K. : Some observations on Mycoplasma-cidal activity of horse serum, J. Vet. Med. Sci., **54**, 359-361 (1992)
- 23) 中村昌弘, 伊藤 亨, 市丸弘子: ヒト・マイコプラズマの分離と同定, 日本細菌学会教育委員会編, 細菌学技術叢書2, ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, pp.2-39, 菜根出版, 東京 (1982)
- 24) 輿水 馨, 小谷 均: 動物マイコプラズマの分離と同定, 日本細菌学会教育委員会編, 細菌学技術叢書2, ヒト・動物および植物マイコプラズマの分離と同定, pp.42-96, 菜根出版, 東京 (1982)
- 25) 岡崎則男, 佐々木次雄: 呼吸器感染症, マイコプラズマ, 臨床とウイルス, **23**, 247-250 (1995)
- 26) 岡崎則男, 山井志朗, 佐々木次雄, 佐々木裕子, 小島幸司, 矢野靖子: PCR法による咽頭スワブからの *Mycoplasma pneumoniae* の検出, 感染症学雑誌, **69**, 723-728 (1995)
- 27) 岡崎則男, 山井志郎, 佐々木裕子, 佐々木次雄: 二段階PCR法による咽頭スワブからの *Mycoplasma pneumoniae* 検出, 感染症学雑誌, **72**, 742-746 (1998)
- 28) Ieven, M., Uris, D., Van Bever, H., Quint, W., Niesters, H.G.M. and Goossens, H. : Detection of *Mycoplasma pneumoniae* by two polymerase chain reactions and role of *M. pneumoniae* in acute respiratory tract infections in pediatric patients, J. Infect. Dis., **173**, 1445-1452 (1996)
- 29) 岡崎則男, 大屋日登美, 見理 剛, 佐々木次雄: 肺炎マイコプラズマの培養検査, PCR法による検出及びP1蛋白遺伝子型別法, 病原微生物検出情報, **28**, 38-40 (2007)
- 30) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 滝沢金次郎, 広岡義郎, 小島幸司: *Mycoplasma pneumoniae* 感染患者における *M. pneumoniae* 分離とIHA抗体価, 感染症学雑誌, **63**, 714-719 (1989)
- 31) Fernald, G.W., Collier, A.M. and Clyde, W.A. Jr. : Respiratory infections due to *Mycoplasma pneumoniae* in infants and children, Pediatrics, **55**, 327-335 (1975)
- 32) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 滝沢金次郎, 矢野靖子, 小島幸司, 広岡義郎: 肺炎マイコプラズマ感染症の家族内発生について, 神奈川衛研報告, **21**, 16-18 (1991)
- 33) 成田光生: マイコプラズマ感染症診断におけるIgM抗体迅速検出法の有用性と限界, 感染症学雑誌, **81**, 149-154 (2007)
- 34) Smith, C.B., Fernald, W.T. and Chanock, R.M. : Inactivated *Mycoplasma pneumoniae* vaccine. Evaluation in volunteers, J.M.C.A., **199**, 353-358 (1967)
- 35) Taylor-Robinson, D., Purcell, R.H., Wong, K.G. and Chanock, R.M. : A color test for the measurement of antibody to certain mycoplasma species based upon the inhibition of acid-production, J. Hyg. Cambridge, **64**, 91-104 (1966)
- 36) 泉川欣一: マイコプラズマ肺炎の診断と治療, 病原微生物検出情報, **19**, 3-5 (1998)
- 37) Fernald, G.W., Clyde, W.A. Jr. and Denny, F.W. : Nature of the immune response to *Mycoplasma pneumoniae*, J. Immunol., **98**, 1028-1038 (1967)
- 38) Fernald, G.W., Clyde, W.A., Jr. and Denny, F.W. : Factors influencing growth inhibition of *Mycoplasma pneumoniae* by immune sera, Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **126**, 161-166 (1967)
- 39) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 滝沢金次郎: モルモット補体を利用した *Mycoplasma pneumoniae* の代謝阻止抗体測定法, 日細菌誌, **45**, 931-935 (1990)
- 40) Okazaki, N., Akema, R. and Takizawa, K. : A sensitive method for detecting the fermentation-inhibition antibody to *Mycoplasma pneumoniae*, Microbiol. Immunol., **35**, 871-878 (1991)
- 41) Gordero, L., Florey, C. du V. and Horstmann, D.M. : Persistence of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* following naturally acquired

- infections, Amer. J. Epidemiol., **98**, 428-432 (1968)
- 42) 岡崎則男, 山井志朗, 佐々木次雄: ヒト血清の抗肺炎マイコプラズマ発育阻止抗体分布, 神奈川衛研報告, **27**, 31-33 (1997)
- 43) Su, C.J., Dallo, S.F. and Baseman, J.B.: Molecular distinction among clinical isolates of *Mycoplasma pneumoniae*, J. Clin. Microbiol., **28**, 1538-1540 (1990)
- 44) Sasaki, T., Kenri, T., Okazaki, N., Iseki, M., Yamashita, R., Shintani, M. *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)
- 45) Kenri, T., Okazaki, N., Yamazaki, T., Narita, M., Izumikawa, K., Matsuoka, M. *et al.*: Genotyping analysis of *Mycoplasma pneumoniae* clinical strains in Japan between 1995 and 2005: type shift phenomenon of *M. pneumoniae* clinical strains, J. Med. Microbiol., **57**, 469-475 (2008)
- 46) 大屋日登美, 岡崎則男: 肺炎マイコプラズマ感染症の疫学と実験室診断法, 化学療法の領域, **26**, 20-27 (2010)
- 47) 岡崎則男, 見理 剛, 佐々木祐子, 佐々木次雄: 最近の *Mycoplasma pneumoniae* 分離成績, 分離株のP1蛋白遺伝子及び血清代謝阻止抗体保有の動向, 日本マイコプラズマ学会雑誌, **24**, 131-133 (1997)
- 48) 見理 剛, 山崎 勉, 岡崎則男, 成田光生, 佐々木次雄: マイコプラズマ肺炎患者の血清に見られる菌型特異的な血球吸着阻害活性, 日本マイコプラズマ学会雑誌, **32**, 10-12 (2006)
- 49) 成田光生, 中山雅之, 山田 諭, 岡崎則男, 佐々木次雄: 肺炎マイコプラズマ感染症における臨床的クリンダマイシン耐性について, 臨床小児医学, **48**, 123-127 (2000)
- 50) 岡崎則男, 大屋日登美, 佐々木次雄, 成田光生: 肺炎マイコプラズマの分離培養と薬剤感受性, 日本マイコプラズマ学会雑誌, **33**, 60-63 (2006)
- 51) Morozumi, M., Hasegawa, K., Kobayashi, R., Inoue, N., Iwata, S., Kuroki, H. *et al.*: Emergence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* with a 23S rRNA gene mutation, Antimicrob. Agents Chemother., **49**, 2302-2306 (2005)
- 52) 岡崎則男, 明間鯉一郎, 広岡義郎, 滝沢金次郎: *Mycoplasma pneumoniae* の抗生物質感受性について, 神奈川衛研報告, **17**, 8-13 (1987)
- 53) 岡崎則男, 大屋日登美, 渡辺祐子, 佐々木次雄: 肺炎マイコプラズマの凍結保存温度と凍結保存株の薬剤感受性試験への利用, 神奈川衛研報告, **34**, 32-33 (2004)
- 54) 岡崎則男, 佐々木次雄: *Mycoplasma pneumoniae* 分離株の試験管内におけるエリスロマイシン耐性獲得と遺伝子変異, 日本マイコプラズマ学会雑誌, **28**, 84-87 (2006)
- 55) Ludwig, W., Kirchof, G., Klugbauer, N., Weizenegger, M., Betzl, D., Ehrmann, M. *et al.*: Complete 23S ribosomal RNA sequence of gram-positive bacteria with a low DNA G+C content, Syst. Appl. Microbiol., **15**, 487-501 (1992)
- 56) Matuoka, M., Narita, M., Okazaki, N., Ohya, H., Yamazaki, T., Ouchi, K. *et al.*: Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan, Antimicrob. Agents Chemother., **48**, 4624-4630 (2004)
- 57) Satowa, S., Yamazaki, T., Narita, M., Okazaki, N., Suzuki, I., Andoh, T. *et al.*: Clinical evaluation of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*, Antimicrob. Agents Chemother., **50**, 709-712 (2006)