

〈企業特集：検査機器・試薬・技術の新たな展開〉

新規マイコプラズマ抗原検査キット—プロラスト® Myco

大島 匠平、島田 康司、皆川 温子、杉山 和之、平山 由美子

New immunochromatographic assay kit for *Mycoplasma pneumoniae* infection 'PRORAST® Myco'

Shohei Ohshima, Yasushi Shimada, Atsuko Minagawa,
Kazuyuki Sugiyama and Yumiko Hirayama

Summary *Mycoplasma pneumoniae* infection is one of the contagious respiratory infections, and in case of a severe condition it develops into pneumonia. An appropriate antibiotic such as macrolide antibiotics must be selected because β -lactam antibiotics are not effective for mycoplasma pneumonia. Since conventional diagnostic methods such as a cultural method or PCR are time-consuming or require specific instruments, diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection at POC should be valuable. We have developed an immunochromatographic assay kit for *Mycoplasma pneumoniae*, called 'PRORAST® Myco.' In this review, we evaluate the 'PRORAST® Myco' kit in comparison with other methods, and show how the way to collect samples at the right position is critical for detection.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, Pneumonia, Immunochromatographic assay

I. 緒言

肺炎マイコプラズマ感染症は、気管支炎の原因となり、約3%の重症例では肺炎を呈する。臨床症状は長期間の乾いた咳が特徴的であり、発熱、頭痛、咽頭痛、悪寒、全身倦怠感などを伴う場合もある。肺炎マイコプラズマの感染経路は経気道のため、学校などの施設や家族内での感染拡大を起こすことが知られている。また、

肺炎マイコプラズマ感染症は、市中非定型肺炎に分類され、市中肺炎のうち成人では30~40%、15~25歳の若年成人では60~70%を占めるとされている^{1),2)}。肺炎マイコプラズマ感染症の起原菌であるマイコプラズマ・ニューモニエはペプチドグリカン細胞壁を欠いているため、 β -ラクタム系抗菌薬が無効であり、マクロライド系、テトラサイクリン系、ニューキノロン系の抗菌薬投与が推奨されている³⁾。

株式会社LSIメディエンス 研究開発・学術部
〒101-8517 東京都千代田区内神田一丁目13番4号
THE KAITEKIビル

LSI Medience Corporation, Research & Development/
Clinical Development.
THE KAITEKI Bldg., 13-4, Uchikanda 1-chome,
Chiyoda-ku Tokyo 101-8517, Japan

一般的に、肺炎マイコプラズマ感染症の確定診断は、発症時（急性期）における臨床症状の把握に加え、胸部X線写真像、末梢白血球数（WBC）やCRPの検査所見を参照し、急性期と2週間以降の回復期のペア血清による抗体価の上昇によって判断する抗体検査法や培養法によって行われている。抗体検査法ではペア血清を必要とするため診断までに長時間を要すること、必ずしも急性期の血清が得られないという問題を有している。また、培養法にてマイコプラズマ・ニューモニエを検出することも可能だが、特殊な培地を用いる必要があり、さらに発育が遅く診断までに2～3週間を要するため、ほとんど実施されていないのが現状である⁹⁾。また、マイコプラズマ・ニューモニエの遺伝子を増幅して検出するPCR法は、現在最も高い感度を有する検査法であるが、保険収載されていないことや操作が煩雑であることが問題点として挙げられる⁹⁾。同様に、遺伝子増幅を行うLAMP法は感度、特異性においてPCR法と同等の性能を示し、診断薬（Loopamp[®]マイコプラズマP検出試薬キット 栄研化学株式会社）が発売されている¹⁰⁾。しかし、外来の臨床現場において機器、設備等の面で解決しなければならない課題も多い。近年、迅速検査キットとして、特異的IgM抗体検出キット（イムノカードマイコプラズマ抗体 富士レジオ株式会社）が発売され、臨床現場において活用されてきているが、IgM抗体は発病日から7日以降に出現することから発症初期に陽性とならないことや、IgM抗体が長期間体内で産生されるために偽陽性を呈することに注意が必要となる⁹⁾。

このような現状から、マイコプラズマ抗原を簡便に検出する診断薬が望まれ、金コロイド標識抗体を用いた、イムノクロマト法による抗原検出キットが3社から発売されている。今回、マイコプラズマ抗原検出キットであるプロラスト[®]Myco（株式会社LSIメディエンス）の性能を、同抗原検出キットのリボテスト[®]マイコプラズマ（旭化成ファーマ株式会社）およびプライムチェック[®]マイコプラズマ抗原（アルフレッサファーマ株式会社）、PCR法、LAMP法との比較ならびに、検体採取部位による抗原検出キットへの影響についての報告を解説する。

Ⅱ. 方法と材料

1. 抗原検出キットの比較

成瀬らによるプロラスト[®]Mycoとプライムチェック[®]マイコプラズマ抗原との比較検討では、2013年9月から2014年5月までの間に東京、千葉および富山の5施設を受診した呼吸器感染症患者172例が対象である⁶⁾。松本らによるプロラスト[®]Mycoとリボテスト[®]マイコプラズマとの比較検討は、2013年10月から2014年6月末までの間に大分の2施設において咳嗽・発熱などの症状から呼吸器感染症を疑われた患者182例が対象である⁷⁾。

それぞれの検討では、プロラスト[®]Mycoとプライムチェック[®]マイコプラズマ抗原、または、リボテスト[®]マイコプラズマの各キット付属の綿棒を2本同時に使い、咽頭後壁を擦過したぬぐい液を試料とした。各キットの抽出液を用いて綿棒からマイコプラズマ・ニューモニエ抗原を抽出し、添付文書に従い抗原検出キットを用いた測定を実施している。プロラスト[®]Mycoと他法の判定結果が乖離した検体について、残検体液10 μ Lを用いて国立感染症研究所病原体検出マニュアル「肺炎マイコプラズマ」記載の*pl*遺伝子nested PCR法に従って⁸⁾、マイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子の存在をアガロースゲル電気泳動のバンドの有無で判定している。

2. プロラスト[®]MycoとLAMP法との比較

岡田らによる検討は、2014年7月から2014年11月までの間に香川の2施設を受診し、マイコプラズマ感染症が疑われた患者のうち、リボテスト[®]マイコプラズマとLAMP法の2つの測定法での検討がされた44例と、同様に2014年12月から2015年1月までの間に同施設にてプロラスト[®]MycoとLAMP法の2つの測定法での検討がされた35例が対象である⁹⁾。

各抗原検出キット付属の綿棒とLAMP法での測定用の綿棒を2本同時に使い、咽頭後壁を擦過したぬぐい液を試料とし、各測定法の添付文書に従ってマイコプラズマ・ニューモニエ抗原を抽出後、測定を実施している。

3. 検体採取部位による検査結果の比較

島田らによる検討は、2010年11月から2013年3月までの東京、千葉、新潟、福島および富山において、発熱、乾性咳嗽が認められ、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461例が対象である。肺炎マイコプラズマ感染症の診断は、PCR法によってマイコプラズマ・ニューモニエの遺伝子検出がされた場合、確定診断としている¹⁰⁾。

プロラスト® Myco付属の綿棒を用いた検体採取部位として、咽頭後壁から検体を採取したグループ (93名、0~17歳、平均7.8歳)、または、口蓋扁桃から検体を採取したグループ (84名、0~14歳、平均6.1歳)に分け、それぞれの検体を用いてプロラスト® Mycoを用いた検査を行った。残検体を用いてPCR法による測定を実施し、遺伝子量を比較している。

Ⅲ. 結果

1. 抗原検出キットの比較

1) プロラスト® Mycoとプライムチェック®マイコプラズマ抗原の比較

呼吸器感染症患者172例の内、プロラスト® Myco陽性は36例、陰性は136例であり、同様に、プライムチェック®マイコプラズマ抗原陽性は29例、陰性は143例であった (表1 A)。プロラスト® Mycoのプライムチェック®マイコプラズマ抗原に対する陽性一致率は82.8%、陰性一致率は

91.6%、全体一致率は90.1%となった。

各キットの判定が乖離した検体をPCR法で測定した結果、「プロラスト® Myco陽性、かつ、プライムチェック®マイコプラズマ抗原陰性」の12例は全例PCR法で陽性と判定された。また、「プロラスト® Myco陰性、かつ、プライムチェック®マイコプラズマ抗原陽性」の5例は全例PCR法で陰性と判定された。

2) プロラスト® Mycoとリボテスト®マイコプラズマの比較

マイコプラズマ・ニューモニエ感染症を含む、呼吸器感染症を疑われた患者182例のうち、プロラスト® Myco陽性は32例、陰性は150例であり、リボテスト®マイコプラズマ陽性は50例、陰性は132例であった (表1 B)。プロラスト® Mycoのリボテスト®マイコプラズマに対する陽性一致率は48.0%、陰性一致率は93.9%、全体一致率は81.3%となった。

各キットの判定が乖離した検体をPCR法で測定した結果「プロラスト® Myco陽性、かつ、リボテスト®マイコプラズマ陰性」の8例中7例がPCR法陽性となった。また、「プロラスト® Myco陰性、かつ、リボテスト®マイコプラズマ陽性」の26例中25例がPCR法陰性となった。

2. LAMP法との比較

1) リボテスト®マイコプラズマとLAMP法の比較

マイコプラズマ感染症が疑われた患者44例の

表1 マイコプラズマ・ニューモニエ抗原検出キットの相関

A)					B)				
		プライムチェック® マイコプラズマ抗原		総数			リボテスト® マイコプラズマ		総数
		陽性	陰性				陽性	陰性	
プロラスト	陽性	24	12	36	プロラスト	陽性	24	8	32
Myco	陰性	5	131	136	Myco	陰性	26	124	150
総数		29	143	172	総数		50	132	182
					陽性一致率：82.8%				
					陰性一致率：91.6%				
					全体一致率：90.1%				
					陽性一致率：48.0%				
					陰性一致率：93.9%				
					全体一致率：81.3%				

内、リボテスト[®]マイコプラズマ陽性は32例、陰性は12例、LAMP法陽性は30例、陰性は14例であった(表2 A)。リボテスト[®]マイコプラズマのLAMP法に対する陽性一致率は90.0%、陰性一致率は64.3%、全体一致率は81.8%となった。

2) プロラスト[®] MycoとLAMP法の比較

マイコプラズマ感染症が疑われた患者35例の内、プロラスト[®] Myco陽性は15例、陰性は20例、LAMP法陽性は17例、陰性は18例であった(表2 B)。プロラスト[®] MycoのLAMP法に対する陽性一致率は88.2%、陰性一致率は100%、全体一致率は94.3%となった。

3. 検体採取部位による検査結果の比較

咽頭後壁採取グループ93例では、プロラスト[®] Myco陽性は36例、陰性は57例、そしてPCR法陽性は44例、陰性は49例であった(表3 A)。このとき、プロラスト[®] MycoのPCR法に対する陽性一致率は79.5%、陰性一致率は98.0%、全体一致率は89.2%であった。これに対し、口蓋扁桃採取グループ84例では、プロラスト[®] Myco陽性は8例、陰性は76例、そしてPCR法陽性は35例、陰性は49例であった(表3 B)。このとき、プロラスト[®] MycoのPCR法に対する陽性一致率は22.9%、陰性一致率は100%、全体一致率は67.9%であった。

咽頭後壁採取グループ93例中44例、口蓋扁桃採取グループ84例中35例において、Real-time PCR法でマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子量を測定した(図1)。それぞれのマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子量は、咽頭後壁採取グループ44例で $1.0 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^8$ copies/mL(中央値 9.1×10^6 copies/mL)、口蓋扁桃採取グループ

表2 マイコプラズマ・ニューモニエ抗原検出キットとLAMP法との相関

A)					B)				
		LAMP法		総数			LAMP法		総数
		陽性	陰性				陽性	陰性	
リボテスト [®]	陽性	27	5	32	プロラスト	陽性	15	0	15
マイコプラズマ	陰性	3	9	12	Myco	陰性	2	18	20
総数		30	14	44	総数		17	18	35
				陽性一致率：90.0%					陽性一致率：88.2%
				陰性一致率：64.3%					陰性一致率：100%
				全体一致率：81.8%					全体一致率：94.3%

表3 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

A)					B)				
		PCR法		総数			PCR法		総数
		陽性	陰性				陽性	陰性	
咽頭後壁	陽性	35	1	36	口蓋扁桃	陽性	8	0	8
採取グループ	陰性	9	48	57	Myco	陰性	27	49	76
総数		44	49	93	総数		35	49	84
				陽性一致率：79.5%					陽性一致率：22.9%
				陰性一致率：98.0%					陰性一致率：100%
				全体一致率：89.2%					全体一致率：67.9%

プ35例で $6.8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL (中央値 9.5×10^5 copies/mL) となった。この各グループ間の遺伝子量には有意差が認められた ($p < 0.01$)。

IV. 考察

今回、3つのマイコプラズマ・ニューモニエ抗原検出キット間の性能比較、2つの抗原検出キットとLAMP法との比較、さらに検体採取部位によるマイコプラズマ・ニューモニエの遺伝子量の違いに関する報告について考察する。

PCR法やLAMP法は遺伝子を数百万倍に増幅することから、検出感度がイムノクロマト法の数~100倍高いことが知られている¹³⁾。このことから、抗原検出キットの性能比較ではキット間の判定が乖離した検体を解析するために、抗原検出キットで使用した同一の残検体液を用いたPCR法による測定を行い、マイコプラズマ・ニューモニエの存在を確認している。プロラスト® Mycoとプライムチェック®マイコプラズマ抗原の検討では、「プロラスト® Myco陽性、かつ、プライムチェック®マイコプラズマ抗原陰性」の乖離検体の12例中全例(100%)がPCR法で陽性、「プロラスト® Myco陰性、かつ、プライムチェック®マイコプラズマ抗原陽性」の乖離検体の5例中全例(100%)が、PCR法で陰性となった。同様に、松本らによるプロラスト® Mycoと

リボテスト®マイコプラズマの検討では「プロラスト® Myco陽性、かつ、リボテスト®マイコプラズマ陰性」の乖離検体の8例中7例(87.5%)がPCR法で陽性、「プロラスト® Myco陰性、かつ、リボテスト®マイコプラズマ陽性」の乖離検体の26例中25例(96.2%)がPCR法で陰性となった。PCR法で乖離検体の解析を行っているため、PCR法の偽陽性、偽陰性の可能性は否定出来ないが、抗原検出キットの中ではプロラスト® Mycoがより正確にマイコプラズマ・ニューモニエ抗原を検出している可能性が示されている。

LAMP法を対照とした抗原検出キットの性能評価では、リボテスト®マイコプラズマのLAMP法に対する陽性一致率は90.0%、陰性一致率は64.3%、全体一致率は81.8%である。また、プロラスト® MycoのLAMP法に対する陽性一致率は88.2%、陰性一致率は100%、全体一致率は94.3%である。プロラスト® Mycoとリボテスト®マイコプラズマの添付文書に記載されている最小検出感度は、それぞれ 1.0×10^4 cfu/mLと 1.1×10^4 cfu/mLであり大きな差はない。しかし、このように抗原検出キット間でLAMP法との一致率に差が認められるのは、臨床検体ではマイコプラズマ・ニューモニエの菌株や遺伝子型によって感度や特異性に違いが生じるのかもしれない。

咽頭後壁と口蓋扁桃におけるマイコプラズ

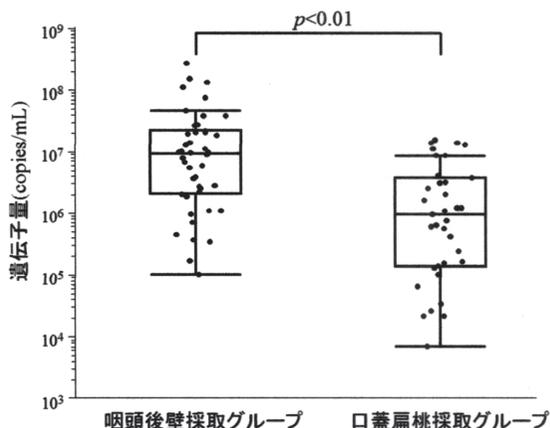


図1 咽頭後壁採取グループおよび、口蓋扁桃採取グループのマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子量

マ・ニューモニエの遺伝子量を比較することで、適切な検体採取部位の検討を行った。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461例の中で、検体を咽頭後壁から採取したグループ93例と、口蓋扁桃から採取したグループ84例で比較している。咽頭後壁採取グループでは、プロラスト® MycoのPCR法に対する陽性一致率は79.5%、陰性一致率は98.0%、全体一致率は89.2%であり、口蓋扁桃採取グループでは、陽性一致率22.9%、陰性一致率は100%、全体一致率は67.9%であった。咽頭後壁採取グループと比べて口蓋扁桃採取グループはプロラスト® MycoとPCR法の陽性一致率が低く、マイコプラズマ・ニューモニエを十分に採取出来ていない可能性が唆された。また、咽頭後壁採取グループと口蓋扁桃採取グループのうち、PCR法でマイコプラズマ・ニューモニエ遺伝子の増幅が認められた検体で、それぞれのグループ間の遺伝子量を検討している。咽頭後壁採取グループ44例で $1.0 \times 10^5 \sim 2.7 \times 10^6$ copies/mL（中央値 9.1×10^6 copies/mL）、口蓋扁桃採取グループ35例で $6.8 \times 10^3 \sim 1.5 \times 10^7$ copies/mL（中央値 9.5×10^5 copies/mL）となり、グループ間の遺伝子量には有意差が認められた（ $p < 0.01$ ）。このことから、マイコプラズマ・ニューモニエは口蓋扁桃よりも咽頭後壁に存在しているため、抗原検出キットを用いた肺炎マイコプラズマ感染症の診断の際には、咽頭後壁から検体を採取することを推奨したい。国立感染症研究所発行の病原体検出マニュアルでは、検体の採取方法として「咽頭の後壁を強くこすり取るようにすることや「粘膜細胞がたくさん綿棒でこすり取られるようにする」ことに留意する旨が記載されている。以上より、検体の採取方法としてプロラスト® Mycoの添付文書には「滅菌綿棒（咽頭用）を口腔から咽頭にゆっくり挿入し、咽頭後壁又は口蓋扁桃をしっかりと数回擦過して咽頭ぬぐい液を採取します。（口蓋扁桃から採取した場合、検出率が低下することがあります。）」と

記載した。

参考文献

- 1) 田口晴彦: マイコプラズマの細菌学. 日本胸部臨床, 67: 541-549, 2008.
- 2) 田中裕士: マイコプラズマ肺炎の発症病態. 日本胸部臨床, 67: 550-560, 2008.
- 3) 尾内一信: 小児呼吸器感染症ガイドライン: 小児. 小児感染免疫, 24(3): 297-302, 2012.
- 4) 諸角美由紀, 岩田敏, 遠藤廣子, 大石智洋, 大成滋, 川村尚久, 黒木春郎, 小林正明, 斎藤洪太, 酒井律子, 砂川慶介, 田島剛, 新田雅彦, 野々山勝人, 小林玲子, 千葉菜穂子, 生方公子: *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: 289-299, 2003.
- 5) Infectious Diseases Weekly Reported Japan, 39: 7-9, 2012.
- 6) 成瀬清子, 塚原雄器, 畑崎喜芳, 黒木春郎, 斉藤匡: 2つのマイコプラズマ・ニューモニエ抗原検出迅速診断キットの比較. 医学と薬学, 71: 2151-2156, 2014.
- 7) 松本重孝, 熊埜御堂義昭: マイコプラズマ・ニューモニエ抗原検出による迅速診断キットの性能評価. 医学と薬学, 71: 2145-2150, 2014.
- 8) 大屋日登美, 堀野敦子, 見理剛, 佐々木裕子: 国立感染症研究所病原体検出マニュアル[肺炎マイコプラズマ], 1-45, 2011.
- 9) 岡田隆滋, 岡田隆文: 肺炎マイコプラズマ感染症の診断—LAMP法と2種類のマイコプラズマ抗原キット（リボテスト、プロラストMyco）の比較検討—. 香川・岡山小児感染免疫懇話会, 2015.
- 10) 島田康司, 皆川温子, 平山由美子, 杉山和之, 板垣はつえ, 伊藤正樹, 武山彩, 富田陽一, 佐久間弘子, 三田村敬子, 大石智洋, 斉藤匡, 湊通嘉, 塚原雄器, 細矢光亮: 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. 日本臨床微生物学会, 25(3): 196-203, 2015.
- 11) 吉野学, 安中敏光, 小島禎, 池戸正成: LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification)法による *Mycoplasma pneumoniae*の高感度迅速検出. 感染症学雑誌, 82: 168-176, 2008.