

技 術**マイコプラズマ肺炎における2種類のマイコプラズマ迅速診断キットとLAMP法の比較**

吉田 愛美 高橋 一人 齋藤 泰智
中河 知里 丸岡 祐子 佐藤 正幸

Comparison between two kinds of rapid diagnostic kit and LAMP method in mycoplasma pneumonia.

Manami YOSHIDA, Kazuto TAKAHASHI, Yasutomo SAITO
Chisato NAKAGAWA, Yuko MARUOKA, Masayuki SATO

Key words : Mycoplasma pneumoniae — rapid diagnostic kit —
Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) —
DNA extraction

はじめに

Mycoplasma pneumoniae (以下 M.pneumoniae) によるマイコプラズマ肺炎は、市中肺炎の主な起因病原体の一つである。原発性異型肺炎の30-40%がマイコプラズマ肺炎であり、患者は若年層に多いがすべての年齢層で発症する¹⁾。

診断法には培養法、血清学的検査法、PCR法などがあるが、感度・特異度のほか、検査工程、経済性、迅速性などに問題があった²⁾。

そこで今回我々は、新たに発売されたマイコプラズマ抗原迅速診断キット2製品とLoop-mediated Isothermal Amplification (以下LAMP法)を比較し、加えてLAMP法におけるQIAGEN抽出と簡易DNA抽出試薬のDNA抽出法の比較検討を行ったので報告する。

対 象

2013年10月～2014年3月までのマイコプラズマ肺炎が疑われた症例46件を対象とした。

原 理 ・ 方 法**1) マイコプラズマ抗原迅速診断キット**

プライムチェックマイコプラズマ(アルフレッサファーマ社、以下プライムチェック)とリボテストマイコプラズマ(旭化成ファーマ社、以下リボテスト)

の2社を使用した。

①プライムチェック

イムノクロマト法を原理とし、M.pneumoniaeのP1蛋白を認識する。付属の綿棒で採取した咽頭拭い液を検体として、専用の抽出液に浸し、規定量をテストプレートへ滴下、15分後に陽性ラインを目視判定した。

②リボテスト

イムノクロマト法を原理とし、M.pneumoniae内のリボソーム蛋白L7/L12を認識する。付属の綿棒で採取した咽頭拭い液を検体とし、専用の抽出液中で2分間静置後規定量をテストプレートに滴下、15分後に陽性ラインを目視判定した。

2) LAMP法

LAMP法は、6領域を認識する4種類のプライマーと鎖置換活性を有するDNA合成酵素との組み合わせにより、65℃付近の一定温度において標的遺伝子配列を高感度に効率よく増幅する方法である³⁾。

DNA抽出は従来法のQIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN、以下QIAGEN抽出)と新しく発売された簡易DNA抽出試薬SR DNA抽出キット(栄研化学、以下SR DNA抽出)の2種類で行った。

①QIAamp DNA Mini KitによるDNA抽出

2種の抗原キットの抽出液の残りを混合し、SR DNA抽出キット用のサンプルを採取したのち遠心、沈渣を含む検体200μlを採取し、核酸抽出精製

装置 QIAcube (QIAGEN) にて DNA 抽出を行った。

② SR DNA 抽出キットによる DNA 抽出

2 種の抗原キットの抽出液の残りを混合したものに綿棒を浸し、300 μ l の生理食塩水に再懸濁したものをサンプルとし、DNA 抽出を行った。

LAMP 反応には Loopamp リアルタイム濁度測定装置 RT-160C (栄研化学) を用い、反応副産物であるピロリン酸マグネシウム (白色沈殿物質) の濁度を測定し、M.pneumoniae を検出した。また、内部標準物質としてリアルタイム PCR にて β -globin の検出も行った。

各法の特性を表 1 に示した。

表 1 各検査法の比較

	プライムチェック マイコプラズマ	リボテスト マイコプラズマ	LAMP 法
原理	イムノクロマト法	イムノクロマト法	LAMP 法
検体	咽頭拭い液	咽頭拭い液	咽頭拭い液または 鼻咽頭拭い液
認識部位	P1 蛋白	リボソーム蛋白 L7/L12	SDC1 遺伝子の 一部
反応時間	15 分間	15 分間	60 分間

表 2 マイコプラズマ抗原迅速診断キットと LAMP 法の比較 (n=46)

A. プライムチェックマイコプラズマ

		LAMP 法		合 計
		陽 性	陰 性	
プライムチェック マイコプラズマ	陽 性	4	0	4
	陰 性	12	30	42
合 計		16	30	46

感度 25.0% (4/16) 特異度 100.0% (30/30) 一致率 73.9% (34/46)

B. リボテストマイコプラズマ

		LAMP 法		合 計
		陽 性	陰 性	
リボテスト マイコプラズマ	陽 性	7	4	11
	陰 性	9	26	35
合 計		16	30	46

感度 43.8% (7/16) 特異度 86.7% (26/30) 一致率 71.7% (33/46)

表 3 QIAGEN 抽出と SR DNA 抽出の比較 (n=46)

		QIAGEN		合 計
		陽 性	陰 性	
SR DNA 抽出 キット	陽 性	13	0	13
	陰 性	3	30	33
合 計		16	30	46

感度 81.3% (13/16) 特異度 100.0% (30/30) 一致率 93.5% (43/46)

結 果

1) マイコプラズマ抗原迅速診断キットと LAMP 法の比較 (表 2)

46 件中、プライムチェックの陽性件数は 4 件 (8.7%) であり、LAMP 法との一致率は 73.9%、感度 25.0%、特異度 100.0% であった。また、リボテストでは陽性件数 11 件 (23.9%)、LAMP 法との一致率は 71.7%、感度 43.8%、特異度 86.7% であった。

2) QIAGEN 抽出と SR DNA 抽出の比較 (表 3)

QIAGEN 抽出と SR DNA 抽出における一致率は 93.5%、感度 81.3%、特異度 100.0% であった。また、リアルタイム PCR にて β -globin の検出では、SR DNA 抽出が QIAGEN 抽出に比べ、平均 3 から 4 サイクル増幅曲線の立ち上がりが遅かった。

考 察

マイコプラズマ肺炎は、肺炎球菌を代表とする「細菌性肺炎」に対し、異型肺炎と呼ばれることが多い。治療にはマクロライド系抗菌薬を第一選択薬とすることが推奨され、早期診断が重要となる^{4), 5)}。しかし、マイコプラズマ肺炎の診断として一般的な血清抗体価検査法では、感染初期には抗体価の上昇が見られない症例や既往感染で高力価の抗体価が持続している症例などがあり、感度・特異度の面で問題があった。一方、PCR 法や培養法においては検査結果報告まで数日を要するため、早期診断が難しかった。

マイコプラズマ抗原迅速診断キットによるマイコプラズマ抗原の検出は、咽頭拭い液を検体とするため患者にとって低侵襲であり、操作も簡便で検査所要時間も約 20 分程度と短い。波多野らによると、プライムチェックと PCR 法の一致率は 89.8%、感度 90.0%、特異度 89.5% と報告されている⁶⁾。しかし、今回の我々の LAMP 法と比較した検討では、一致率は約 2 割、感度は約 4 割低かった。マイコプラズマ肺炎は、下気道に分布する線毛上皮に接着することで感染が成立し増殖するため、上気道は下気道と比較すると菌量が少なくなってしまう。さらに、波多野らによると、病日別の PCR とプライムチェックの相関性で第 1 ～ 2 病日では感度の低下が見られたと報告している⁶⁾。よって、検索の結果には検体採取法の相違や検査を行うタイミングが重要と考えられる。

LAMP 法は PCR 法と同様、連続的に遺伝子の増幅反応を行い、検体中の微量の標的遺伝子を検出する高感度の遺伝子診断法であり、結核菌やレジオネラ属菌の検索にも利用されている。近年では、M.pneumoniae の検出にも応用され、2011 年 10 月より保険収載されている。PCR 法と比較すると、反応時間は約 1 時間と短く、操作手順が簡便でコンタミネーションによる偽陽性の可能

性が少ない。また、反応温度が一定であるため、増幅に必要な機器が簡略で安価なこと、増幅が進むと反応液が濁るため目視でも結果が判定できることなどが利点として挙げられる⁷⁾。しかし、簡略で安価とはいえ、LAMP法には専用の測定機器が必要となるため、検査を行うことができる施設は限られてしまう。また、DNA抽出工程を含めるとさらに1時間程度要するため、マイコプラズマ抗原迅速診断キットと比較すると迅速性に欠けてしまう。SR DNA抽出を利用することでDNA抽出を約20分程度に短縮することが可能であったが、今回の検討ではQIAGEN抽出で陽性、SR DNA抽出で陰性となる症例が3例みられた。同一サンプルから検出した内部標準物質の β -globinの結果から、SR DNA抽出はQIAGEN抽出の1/10程度のテンプレートDNA量と推測される。このことからマイコプラズマの菌量が少ない検体の場合、SR DNA抽出で偽陰性となってしまったと考えられる。一方、SR DNA抽出のみ陽性となった症例が1例みられたが、LAMP反応で不規則な増幅曲線を描き、さらに再測定では陰性となったことから偽陽性反応と考えられた。

リボテストはプライムチェックより2割程度高い感度を示したが、やや特異性が低く、偽陽性と思われる症例が4例みられた。リボテストを利用する場合は、臨床症状やその他の検査結果も併せて、総合的な判断が必要と思われた。

ま と め

M. pneumoniaeの検出には、それぞれの検査法の特徴を理解し、施設の運用に合わせた検査法を選択することが重要と考えられた。

文 献

- 1) 堀野敦子, 見理剛, 佐々木裕子ほか. 国立感染症研究所 肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) 検査マニュアル. 2011年度版.
- 2) 武田英紀, 加藤純大, 小出卓ほか. マイコプラズマ肺炎の迅速診断—成人におけるマイコプラズマ IgM 抗体迅速検査の有用性の検討—. 日胸臨. 2005; 64: 932-939.
- 3) 吉野学, 安中敏光, 小島禎ほか. LAMP (Loop-Mediated Isothermal Amplification) 法による *Mycoplasma pneumoniae* の高感度迅速検出. 感染症誌. 2008; 82: 168-176.
- 4) 和田裕雄, 後藤元. マイコプラズマ感染症の診断: 新しいLAMP法による診断について. Lab. Clin. Pract. 2012; 29: 91-98.
- 5) 小児呼吸器感染症診療ガイドライン作成委員会. 小児呼吸器感染症診療ガイドライン2011追補版 (平成25年2月19日) 「小児肺炎マイコプラズマ肺炎の診断と治療に関する考え方」. 小児感染免疫. 2013; 25: 105-109.
- 6) 波多野修一, 駒澤克孝, 西村真一郎ほか. マイコプラズマ感染症検査法の検討—マイコプラズマ抗原迅速診断キットの有用性について—. 小児臨. 2013; 66: 2105-2115.
- 7) 成田光生, 續木康伸, 大島美保ほか. 当科における肺炎マイコプラズマ遺伝子検出 loop-mediated isothermal amplification 法の使用経験. 臨小児医. 2012; 60: 43-45.