

Mycoplasma pneumoniae 感染症に関する研究

——特に血清の補体依存性 mycoplasmacidal 抗体価の有用性について——

小川 説子

札幌医科大学小児科学講座 (主任 中尾 亨教授)

Studies on Mycoplasma pneumoniae Infections with Special References to the Usefulness of Complement Mediated Mycoplasmacidal Serum Antibodies

Setsuko OGAWA

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College
(Chief. Prof. T. Nakao)

Pneumonia associated with Mycoplasma pneumoniae (M. pneumoniae) infection is said to occur most commonly among Children of 5 to 15 years of age and is uncommon in infants. The reason for this unusual age distribution as reported is still unknown. In order to clarify this, M. pneumoniae infection was investigated in children of various age groups. The methods employed to detect the infection are the commonly used complement fixation (CF) test for M. pneumoniae and mycoplasmacidal (MC) test which is considered to be more sensitive than the former.

The following results were obtained:

- 1) Complement mediated MC test was superior in its specificity and sensitivity to detect M. pneumoniae infection compared with CF test.
- 2) Because of its insensitivity, CF test could not detect the M. pneumoniae infection in infants, although positive tests resulted in older children by this method. On the other hand, remarkable positive results were obtained by MC test even in infants. Based on this result, it was concluded that the age distribution mentioned above could be explained not by infectious status but the method employed to determine M. pneumoniae infections.
- 3) MC antibody belongs mainly to IgM in the initial period of the infection, and thereafter changes to IgG in 2 or 3 weeks. This MC antibody in IgG fraction may be transplacental.

結 言

マイコプラズマ肺炎に代表される Mycoplasma pneumoniae (以下 M. pneumoniae と略) 感染症の発生頻度は年齢により異なり、乳児期および幼児期には非常に少なく、学童期から思春期に高くなるという他のウイルス性気道感染症とは違った型を示すことが知られている¹⁻⁷⁾。また血中抗体の保有率および平均抗体価においても、ほぼ同じ傾向の年齢による違いが認められる事が文献的に報告されている^{1,2,6-8)}。しかしながら、この様な疫学的特徴が何故認められるのかという問題は未だ解明されていない。著者はこの問題に対して、M. pneumoniae 感染の成立には個体の免疫機能が関与し、低年齢層には不顕性感染が多く存在し、抗体上昇率が低い可能性があるのではないかと推測してみた。この可能性を検討するために ① 各年齢層の気道

感染症患者の咽頭からの M. pneumoniae の分離を試み、また ② 現在広く使用されている補体結合試験などより鋭敏な血清抗体検出法として最近報告されている⁹⁻¹²⁾ 補体依存性の血清 mycoplasmacidal 抗体を測定し、既知の抗体測定法による成績と比較するという方法が考えられた。著者はこの2つの方法により実験を進め、前記した問題の解明の手がかりとなり得る若干の成績を得たので報告する。さらにこれ等の実験の間に M. pneumoniae 感染の流行に遭遇したが、流行期、非流行期における M. pneumoniae 感染に対する比較検討成績、特に臨床面における有用性についての資料が乏しい mycoplasmacidal 抗体測定法での比較検討成績については、いまだ報告がないので、この成績もあわせて報告する。

実験材料

対象は1974年10月から1976年1月までに札幌医大小児科および札幌通信病院小児科を受診した異型肺炎患者とその家族、および種々の気道感染症と診断された患者を対象とした。また、分娩のため札幌通信病院産科に入院した気道感染症状のない健康妊婦からの血清と臍帯血を分娩時に採取し、対象とした。材料として、これ等の対象から採取した血清は使用時まで -20°C に凍結保存し、実験に際しては融解して使用した。咽頭ぬぐい液は上記の対象の咽頭を綿棒で擦過し、ただちにChanock¹³⁾の記載によるTrypticase soy broth 20%, 馬血清 10%, Penicillin G Na 500 単位/ml からなる液 2~3 ml にて洗い、できるだけ凍結保存することなく分離材料として用いた。また1部の材料はアセトンドライアイスで凍結したのち使用時まで -70°C に保存した。

実験方法

1. *M. pneumoniae* の分離、継代および同定

a) 培地

使用した培地はHayflickの記載¹⁴⁾に従い、Difco PPLO Broth (または Agar) 70%, 25% 酵母エキス 10%, 非加熱ウマ血清 20% の割合に混合し、Penicillin G Na 500 単位/ml, 酢酸タリウム 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ を加えて作製した。また液体培地にはグルコース 1% とフェノールレッド 0.002% を加えた。

b) 培養法

咽頭ぬぐい液を寒天培地と液体培地からなる2相性培地^{4,15)}に接種し、 37°C で培養開始後5日目と21日目にこの液体培地 0.1 ml を他の寒天培地に接種した。またこの間、2相性培地の液体培地が黄変したものは、その時期に他の寒天培地に接種した。液体培地を接種した寒天培地は 37°C 、高湿度の条件で培養し、5日毎に検鏡によってmycoplasmaのコロニーの出現を調べた。また接種後3週間コロニーの出現が認められないものは陰性とした。寒天上にコロニーの出現が見い出された場合には、そのコロニーを含む寒天ブロックを切り出し、直接他の寒天培地の表面に擦過する方法により、少なくとも3代以上継代できたものを分離が陽性と判定した。

c) 同定

M. pneumoniae とヒトの口腔内より分離される他のmycoplasmaとの鑑別には*M. pneumoniae*の選択培地として有用である事が報告されている¹⁶⁾ 0.002% のメチレンブルーを加えた培地上で増殖可能であるかどうかを検討するとにより同定した。

2. 補体結合試験 (以下 CF テストと略)

a) 抗原作製

抗原作製のためにはなるべく培地成分の含まない大量の*M. pneumoniae* 浮遊液が必要である。この目的のために液体培地による増殖にはSomersonら¹⁷⁻¹⁹⁾の方法を採用した。

すなわちシャーレに入れた液体培地に、*M. pneumoniae*の標準株の1つであるMac株を接種し⁸⁾、 37°C の炭酸ガス培養器で培養を開始した。この培地には*M. pneumoniae*の増殖に伴う培地pHの変化がなるべく*M. pneumoniae*の増殖に影響を与えないようにする目的で、HEPES buffer (SIGMA) を0.05 M 加えた^{18,20,21)}。培養開始後4~5日を経て培地pHが低下しはじめ、シャーレの底のガラス面に*M. pneumoniae*のコロニーが十分に附着増殖したことを確認できた時期に液体培地を除去し、シャーレ底面のコロニーをphosphate buffered saline (以下PBSと略) pH 7.2で十分に洗い、最終的に培養液の1/25量のPBS中にこのコロニーを剥離、浮遊させ、高濃度の*M. pneumoniae* 浮遊液を得た。この*M. pneumoniae* 浮遊液はBiberfeldら²²⁾の報告に従い10 KCで30分間超音波処理することにより*M. pneumoniae*を破壊し、13000×Gで30分間超速心後、上清をCF抗原として使用した。

b) 血清のCF抗体価の測定

CF試験はSeverの方法にもとづいた微量法により行なった^{23,24)}。この際、抗原は4単位、溶血素は2単位、補体は2単位使用した。先に記載した方法で作製した抗原は抗補体作用がなく、抗*M. pneumoniae* ウサギ血清より検討した抗原価は64~128倍であった。またこの抗原は使用時まで -20°C に保存したが凍結、融解により抗原価の変動は認められなかった。

3. 補体依存性 mycoplasmacidal 試験 (以下 MC 試験と略)

a) 抗原としての *M. pneumoniae* 浮遊液の作製

M. pneumoniae 浮遊液の作製には先に記載したCF抗原と同様にSomerson^{17,18)}の方法を採用して*M. pneumoniae*を培養した。ただしこの際の液体培地に加える血清はその後のMC試験の過程で補体に対する影響を考慮して、Brunnerらの報告に従い¹⁰⁻¹²⁾、agamma馬血清(Flow Lab.)を 56°C 30分間非動化した後使用した。*M. pneumoniae* (Mac株)がシャーレの底のガラス面で十分に附着増殖した時期に、液体培地の3/5を捨て、残りの培地中に附着マイコプラズマのコロニーを剥離、浮遊させ、抗原としての*M. pneumoniae* 浮遊液として使用した。またこの浮遊液は、以下のMCテストの経過中に血清沈体および補体

の作用を mycoplasma が均等に受けることを目的として 450 m μ pore size の Millipore filter を通し¹¹⁾ 使用時まで -70°C に分注, 保存した。

b) MC テストの方法

MC テストの方法は Brunner らの方法⁹⁻¹²⁾ に従った。すなわち 10⁷ Colony Forming Unit./ml の M. pneumoniae 浮遊液 0.4 ml に 56°C 30 分間非動化した被検血清 0.2 ml を加え, 4°C で 60 分作用させたのち, 稀釈した市販の乾燥補体 (東芝) 0.2 ml を加え, 37°C で 60 分マイコプラズマ, 血中抗体, 補体を作用させる。この際抗原, 補体, 血清を稀釈する稀釈液は補体の作用を充分にする目的で Ca⁺⁺, Mg⁺⁺ を加えた¹¹⁾ TES buffer (SIGMA)^{20,21)} を使用した。反応終了後は充分に冷やした稀釈液で稀釈することにより上記反応を停止させたのちに寒天培地に接種し, コロニー数を測定し, MC 効果を判定した。MC 効果は

$$\text{減少率} = \frac{\text{コントロールのコロニー数} - (\text{血清} + \text{補体}) \text{ のコロニー数}}{\text{コントロールのコロニー数}} \times 100$$

によって計算し, 表現した。この際コントロールとして, 血清コントロール, 補体コントロール, 稀釈液のみのコントロールをおいた。

c) 方法の検討

この方法を採用するにあたり, 予備実験として血清単独の MC 効果, 補体単独の MC 効果, MC 効果における補体と血清抗体との相互関係を各々検討した。その結果血清稀釈は 25 倍から開始し, 補体稀釈を 60~80 倍の一定濃度に固定する場合には, その稀釈血清に MC 効果が存在するかどうかを判定が可能であることが明らかであった。この様な成績は, Brunner⁹⁻¹¹⁾ らの報告とほぼ一致していた。また血清の MC 抗体価はコントロールと比較して 90% 以上のコロニーの減少率を示す血清の最高稀釈濃度を抗体価とすることに決めた。この方法により測定される MC 抗体の特異性は抗 M. pneumoniae ウサギ血清, 抗 M. hominis ウサギ血清, 非免疫ウサギ血清を使用して検討したが, その結果, 充分に特異的な抗体が検出されていることが確かめられた。

4. 2-mercaptoethanol 処理の方法

血清の 2-mercapthanol (以下 2-ME と略) 処理は Wiedermann ら²⁵⁾, Schmidt ら²⁶⁾ の報告にしたがって PBS で 0.2 M に稀釈した 2-ME と血清とを等量に混合し, 最終濃度が 0.1 M の 2-ME で, 37°C, 120 分間作用させた。これら 2-ME で処理した血清サンプルと 0.2 M の 2-ME の代わりに血清に PBS を等量に加え, 同様に操作したコントロールとを, セロファンチューブに移し, 4°C でマグネチックスタラーを用いて攪拌しながら PBS に対して 48 時間透析した。これら 2-ME を透析した被検血清およびコントロールについて抗体価を測定した。

実験成績

1. M. pneumoniae の分離成績

1974 年 10 月から 1976 年 1 月までの間に, 札幌医大小児科および札幌通信病院小児科を受診した気道感染症患者 338 人中 M. pneumoniae が咽頭ぬぐい液から分離されたものは 38 人 (11.2%) であった。この分離例を年齢別にみると (表-1) 乳児では分離例がなく, 幼児では 188 人中 13 人 (6.9%), 学童では 97 人中 25 人 (25.8%) であった。またこれを臨床診断名より分類してみると, 異型肺炎患者 83 人からの分離例は 30 人 (36.1%) であった。いっぽう上気道炎患者からも 131 人の対象者のうち 6 人 (4.6%) において分離された。これらの成績の経時的な推移をみるため, 月別気道感染例数と M. pneumoniae の咽頭からの分離数を棒グラフであらわすと (図-1) 1975 年 9 月から対象の中での異型肺炎患者の占める比率が高くなり, またその時期に分離数も増加した。従ってこの時期に M. pneumoniae 感染症の流行が存在したと考えられた。また分離により M. pneumoniae 感染症と診断したもののうち, 臨床診断が異型肺炎であったものは, 1975 年 9 月~1976 年 1 月までの流行期では 29 人中 7 人, それ以前の非流行期では 8 人中 1 人であった。

異型肺炎患者およびその家族を対象とした 15 家族 45 人の咽頭ぬぐい液からは 22 人 (48.9%) から M. pneumoniae が分離された (表-2)。年齢別にみると幼児では 16 人中 7

表-1 気道感染症患者からの M. pneumoniae 分離成績

臨床診断	1 歳未満		1~6 歳		7~15 歳		合計	
	対象	分離	対象	分離	対象	分離	対象	分離
上気道炎	15	0	80	3	36	3	131	6
下気道炎	25	0	72	2	17	0	114	2
異型肺炎	3	0	36	8	44	22	83	30
合計	43	0	188	13	97	25	338	38

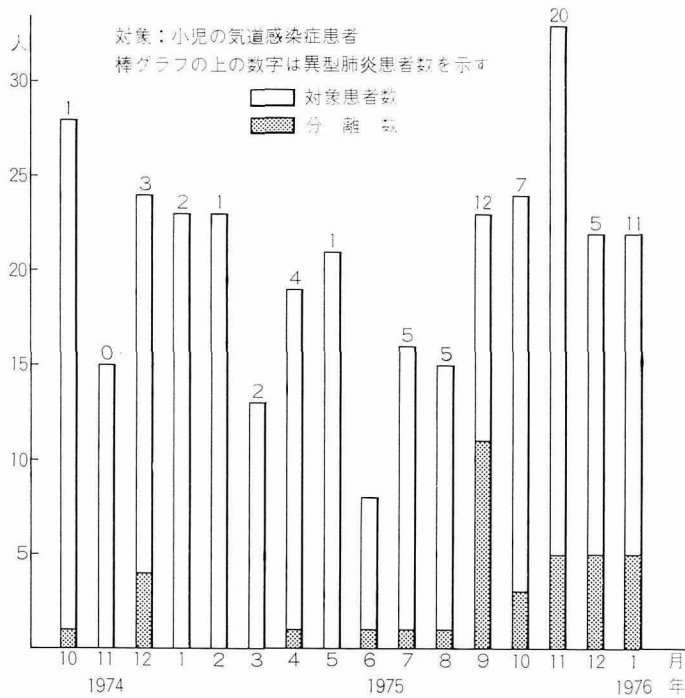


図-1 M. pneumoniae の月別分離成績

表-2 異型肺炎患者および家族からの M. pneumoniae 分離成績

臨床診断	1歳未満		1~6歳		7~15歳		16歳以上		合計	
	対象	分離	対象	分離	対象	分離	対象	分離	対象	分離
上気道炎	1	0	4	2	2	2	1	1	8	5
下気道炎	0	0	1	0	0	0	4	4	5	4
異型肺炎	0	0	10	5	9	7	0	0	19	12
健康	0	0	1	0	2	1	10	0	13	1
合計	1	0	16	7	13	10	15	5	45	22

人(43.8%), 学童では12人中10人(76.9%)から M. pneumoniae が分離され、しかも症状別にみると全く無症状の人からも1人分離され、また上気道炎患者8人中5人

(62.5%) からも分離された。

2. CF 試験による血中抗体測定成績

症状、年齢別より血中 CF 抗体価をみると(表-3) 気道

表-3 気道感染症患者における血清 CF 抗体価の測定成績

臨床診断	1歳未満		1~6歳		7~15歳		合計	
	対象	CF 抗体価有意上昇数	対象	CF 抗体価有意上昇数	対象	CF 抗体価有意上昇数	対象	CF 抗体価有意上昇数
上気道炎	0	0	7	2	3	0	10	2
下気道炎	3	0	9	3	2	1	14	4
異型肺炎	2	0	20	7	34	21	56	28
合計	5	0	36	12	39	22	80	34

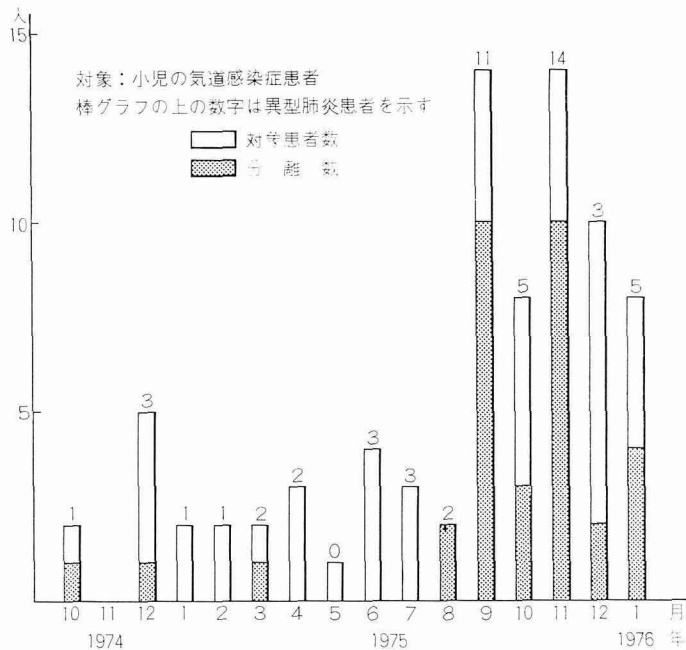


図-2 血清 CF 抗体価測定成績による月別の M. pneumoniae 感染症患者数

表-4 異型肺炎患者およびその家族における血清 CF 抗体価の測定成績

臨床診断	1歳未満		1~6歳		7~15歳		16歳以上		合計	
	対象	CF抗体価有意上昇数	対象	CF抗体価有意上昇数	対象	CF抗体価有意上昇数	対象	CF抗体価有意上昇数	対象	CF抗体価有意上昇数
上気道炎	0	0	2	1	2	0	0	0	4	1
下気道炎	0	0	0	0	0	0	1	1	1	1
異型肺炎	0	0	8	5	7	6	0	0	15	11
健康者	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0
合計	0	0	11	6	9	6	1	1	21	13

感染症患者 338 人のうち pair 血清で CF 抗体価を測定したものは 80 人であった。このうち抗体価が有意上昇したものは 34 人 (42.5%) であった。年齢別にみると乳児では CF 抗体価の有意上昇したものは 1 例もなく、幼児では 36 人中 12 人 (33.3%), 学童では 39 人中 22 人 (56.4%) が CF 抗体価の有意上昇をしめた。いっぽう臨床診断別にみると、上気道炎が 10 人中 2 人、下気道炎が 14 人中 4 人であるのに対し、異型肺炎では 56 人中 28 人と半数が CF 抗体価の有意上昇をしめた。

これ等の成績の経時的推移をみるため月別に pair 血清採取者と CF 抗体価有意上昇数をグラフに棒線であらわすと (図-2) 1975 年 9 月から CF 抗体の有意上昇数が多かった。また CF 抗体価の有意上昇により M. pneumoniae 感

染症と診断したもののうち臨床診断が異型肺炎であったものは流行期では 29 人中 25 人、非流行期では 5 人中 3 人であった。

異型肺炎患者およびその家族を対象として (表-4) 15 家族 45 人の対象者のうち pair 血清を採取できた 21 人のうち CF 抗体価が有意上昇したものは 13 人 (61.9%) であり、年齢別にみると乳児では対象がなく、幼児では 11 人中 6 人 (54.5%), 学童では 9 人中 6 人 (66.7%), 成人では対象が 1 人のみであったが、この例では抗体価の有意上昇をみた。

3. MC 試験による血中抗体測定成績

a) M. pneumoniae 感染症における MC 抗体価

M. pneumoniae が咽頭ぬぐい液から分離されかつ CF 抗体価が有意上昇した患者 18 人を対象に MC 抗体価の変

動を検索した(図-3)。その結果、全例の pair 血清で MC 抗体価が上昇したが、2例のみは有意の上昇ではなかった。しかし16例では CF 抗体価有意上昇例では確実に MC 抗体価も有意上昇していた。

いっぽう異型肺炎患者およびその家族で pair 血清を採取した21人を対象にして MC 抗体価を測定したが(表-5) MC 抗体価の有意上昇例は17例であった。この成績は CF 抗体価有意上昇例が13例、分離例が15例という成績と比較すると、多い数字であった。また臨床診断で分類してみると上気道炎4人いづれもが MC 抗体価は有意上昇して、症状が軽くても MC 抗体価の有意上昇がみられた。

いっぽうこれを年齢別にみると(表-6)、乳児の対象は1

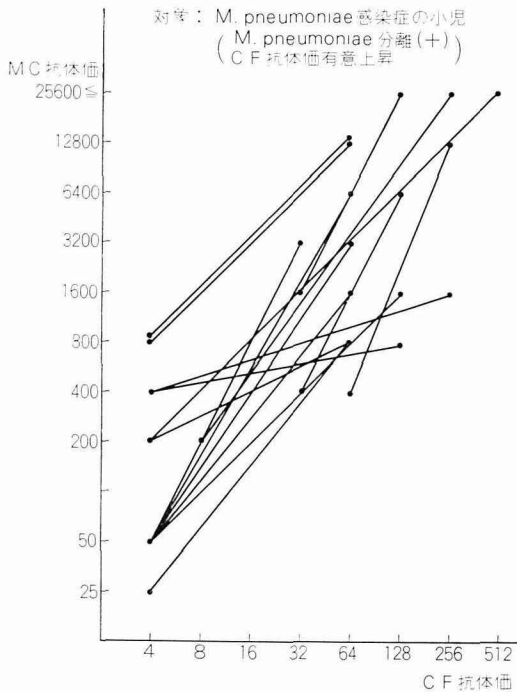


図-3 M. pneumoniae 感染症患者の MC 抗体価

表-5 異型肺炎患者およびその家族における臨床診断名別の MC 抗体価の検討

臨床診断	症例数	MC 抗体価有意上昇	CF 抗体価有意上昇	M. pneumoniae 分離
上気道炎	4	4	1	3
下気道炎	1	0	1	1
異型肺炎	15	13	11	11
健常者	1	0	0	0
合計	21	17	13	15

表-6 異型肺炎患者およびその家族における年齢別の MC 抗体価の検討

年齢	症例数	MC 抗体価有意上昇	CF 抗体価有意上昇	M. pneumoniae 分離
1歳未満	0	0	0	0
1~6歳	11	9	6	6
7~15歳	9	8	6	8
16歳以上	1	0	1	1
合計	21	17	13	15

例もなかったが、幼児は11例、学童は9例であり、低年齢でも MC 抗体価の有意上昇がみられた。

b) MC 抗体価と CF 抗体価の比較

ヒト血清中の各 CF 抗体価と MC 抗体価とを比較してみた(図-4)。対象は各年齢層にわたる気道感染症患者と異型肺炎患者の家族から得た174検体である。

その結果 CF 抗体価が検出される検体では MC 抗体価は CF 抗体価の10~100倍の値を示し両抗体価間に比例関係を認めることが明らかになった。また CF 抗体価が検出されない検体では、その約半数は MC 抗体価も検出されないが、残りは MC 抗体価が検出され、中には12,800倍と、

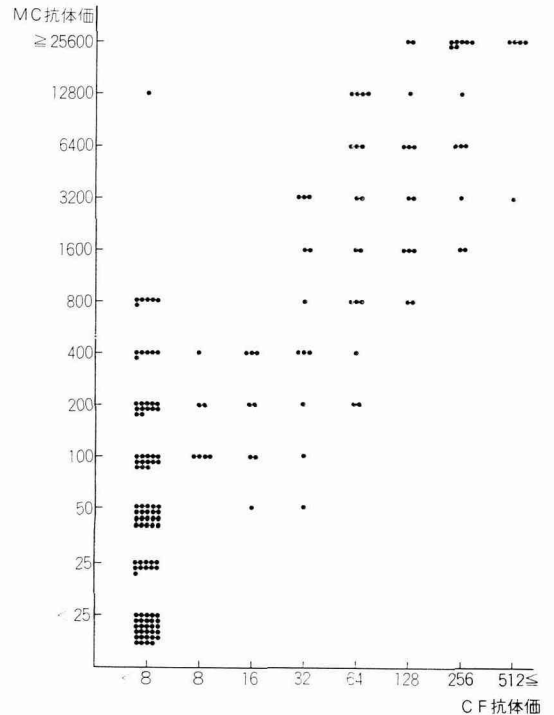


図-4 ヒト血清中の M. pneumoniae に対する MC 抗体価と CF 抗体価の相関

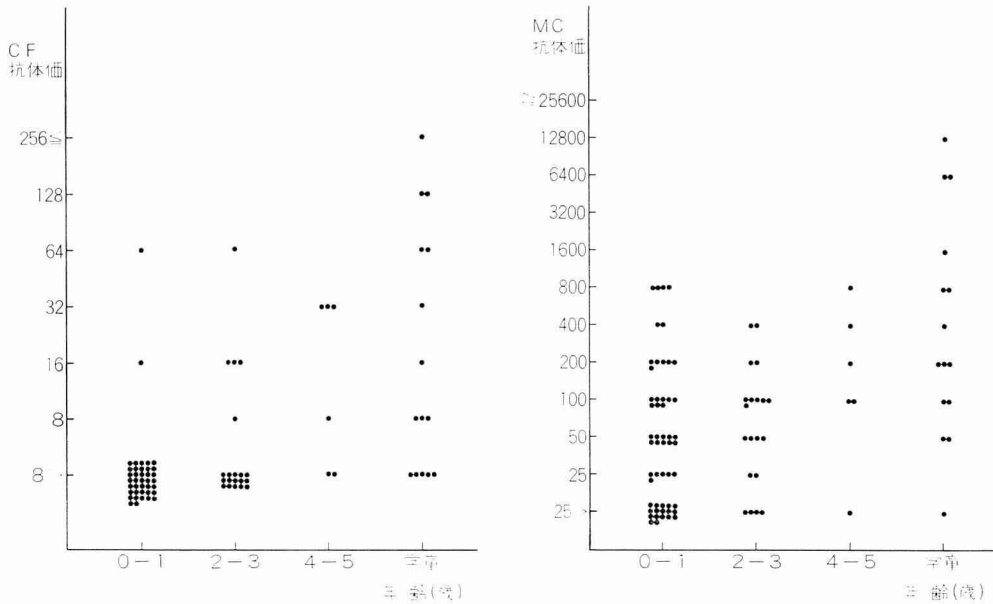


図-5 M. pneumoniae 感染以外の気道感染症患者における年齢別の CF および MC 抗体保有状況

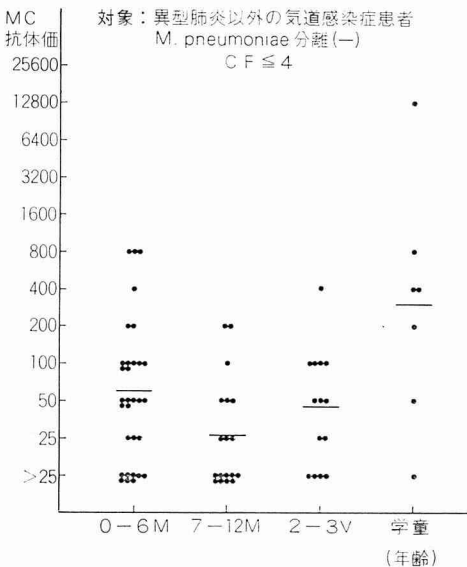


図-6 M. pneumoniae に対する年齢別 MC 抗体価

かなり高い値をしめすものもあった。

また M. pneumoniae の分離が陰性で、臨床的にも異型肺炎以外の気道感染症患者から得た血清について各々 CF および MC 抗体価を測定し、年齢別 CF 抗体価と MC 抗体価を比較検討した(図-5)。CF 抗体価も MC 抗体価も共に年齢が大きくなるにつれて平均抗体価が上昇する傾向に

あるが、特に両者の中で相違がみられるのは、乳児期および幼児期の前半である。乳児期から幼児期の前半では、ほとんど CF 抗体価は検出されないが、MC 抗体価ではかなり高いものも見出される。

さらにこの成績をくわしく検討する目的で、これらの対象の中から CF 抗体価が4倍以下のものだけを集め、年齢別に MC 抗体価を検討した(図-6)。その結果0~6カ月の乳児より7~12カ月の乳児の方が平均 MC 抗体価が低く、さらに2~3歳になると7~12カ月よりは少し平均 MC 抗体価は上昇し、学童期にはさらに平均 MC 抗体価が上昇していた。

c) 母親と臍帯血間の MC 抗体価の比較

出産時の母親と臍帯血間で pair で採取した血清のうち母親が M. pneumoniae の CF 抗体を持つ5対の血清について MC 抗体価を検討した。また参考データとして同時に CF 抗体価も測定した(表-7)。この対象となった母親は全例分娩時に気道感染症を呈していなかった。CF 抗体価は臍帯血に抗補体作用があり判定不能のものが2検体あったが、ほぼ母血清と臍帯血清とは同じ抗体価をしめした。いっぽう MC 抗体価は症例1, 4, 5ではほぼ母、臍帯血間で同じ値を示したが、症例2, 3ではCF 抗体価がいずれも8倍であるにもかかわらず MC 抗体価は低値をしめしていた。この成績から、母親と臍帯血間で M. pneumoniae に対する MC 抗体価はいずれもほぼ同値をしめすといえる。

表—7 MC 抗体の胎盤通過性の検討

症 例	MC 抗体価	CF 抗体価
1	母	400
	臍 帯 血	400
2	母	25 以下
	臍 帯 血	25 以下
3	母	50
	臍 帯 血	25 以下
4	母	100
	臍 帯 血	100
5	母	200
	臍 帯 血	100

d) 2-ME 処理による血清 MC 抗体価の検討

M. pneumoniae 感染後の各時期における抗体価中の 2-ME 感受性抗体の占める比率を知る目的で、2-ME 処理血清と、処理前血清の MC 抗体価を測定した。対象とした 11 名の患者は M. pneumoniae が分離され、CF 抗体価が有意上昇したためマイコプラズマ肺炎と診断した学童である。

実験成績は(表-8)のごとくで、発病 1 週間前後の血清では 2-ME 処理によってほとんどの MC 抗体価が低下し、2-ME 感受性であると考えられる。しかし発病 2 週間あるいはそれ以上の血清では MC 抗体価は 2-ME 処理前の抗体価とほぼ同様であったため、2-ME 抵抗性であると考えられた。

表—8 血清 MC 抗体価の 2-ME 処理による影響

症例 No.	病 日 (日)	MC 抗体価	2-ME 処理 MC 抗体価	CF 抗体価
1	5	200	50 \geq	4 \geq
2	7	1600	400	32
3	7	400	50 \geq	64
4	8	400	50 \geq	4 \geq
5	13	12800	6400	256
6	14	12800	6400	256
7	15	25600 \leq	25600 \leq	256
8	17	6400	6400	256
9	21	12800	12800	64
10	30	6400	3200	128
11	35	25600	12800	512 \leq

考 按

1. M. pneumoniae の分離と CF 抗体価測定の成績

M. pneumoniae 感染症の発生頻度をみると乳児期、幼児期前半には非常に少なく、学童期から思春期には非常に多くなるということがすでに知られている¹⁻⁷⁾。今回の分離および CF 抗体価の検討からはほぼ同じ成績が得られている。すなわち、乳児期は M. pneumoniae 感染症が証明されず、幼児期、学童期と年齢が高くなるにつれ、その数が増加している。またこれらの症例を疾患別にみると M. pneumoniae の診断をされた症例は、すでに文献的にも知られているように^{2,6)} 異型肺炎で非常に多く、上気道感染、下気道感染では少なかった。この成績の経時的推移をみると、1975 年 9 月から 1976 年 1 月までに M. pneumoniae 感染症が多発し、流行期に遭遇したことがわかる²⁷⁾。この流行に関しては我国の他の地域でもほぼ同現象が認められた事が報告されている²⁸⁾。この時期と非流行期での成績を比較してみると、1975 年の流行期には臨床的に異型肺炎以外で M. pneumoniae の分離あるいは CF 抗体価の上昇のあるものは他の時期と比較すると増加していることが注目される。

いっぽう異型肺炎患者およびその家族を対象とした成績では M. pneumoniae 感染症の患者が一般の気道感染症患者を対象とした場合に比べて非常に高率で、しかも異型肺炎の患者で高率なだけでなく、上気道炎、下気道炎の患者にも M. pneumoniae 感染が存在することが、分離および CF 抗体価の成績から証明された。また全く臨床的には無症状の人からも M. pneumoniae が分離されているのが注目される。またこれを年齢別にみると、マイコプラズマ肺炎患者の同胞に乳幼児が存在する例が少なかったため乳児の対象者が少なかったが、幼児でも接触による感染が濃厚におこると考えられる。以上の M. pneumoniae の分離および血中 CF 抗体価の変動を検討した成績をまとめてみると以下のごとくとなる。すなわち家族内 M. pneumoniae 感染の検討の成績に加えて、先に述べた流行期の成績を考えると M. pneumoniae 感染は一般にその数が少ないと考えられる乳幼児にも患者との接触により感染が成立すると考えられる。さらにはこの場合必ずしも異型肺炎ばかりでなく、上気道炎の型をしめす事も多いことが推測される。このような成績は、元来 M. pneumoniae の感染例が少ないと考えられていた低年齢層においても十分にその感染が存在することを推測させるといえるが、その感染の存在を証明する方法としての M. pneumoniae の分離は現存の方法では必ずしも最良の方法とは考えられなかった。即ち CF 抗体価有意上昇により診断される例が咽頭からの分離

により、*M. pneumoniae* 感染症と診断される例よりその比率が高かった著者のこの成績は既に報告されている成績^{1,2,6)}と良く一致するが、これは *M. pneumoniae* の分離技術の改善に伴い、その成績が変わってくるものと予想される。

2. MC 試験によるマイコプラズマ感染症患者の

抗体価測定成績

MC 試験により *M. pneumoniae* の特異的な抗体が検出できる事は Gale と Kenny⁹⁾ によりはじめて報告された。その後 Brunner^{11,12)} によりこの抗体測定法が今までの抗体測定法より鋭敏な方法であることが報告された。しかしこの方法により臨床面での MC 抗体価成績の検討の報告はいまだにない。

著者はまず実際の *M. pneumoniae* 感染症患者での MC 抗体価を調べてみた。*M. pneumoniae* の咽頭からの分離および CF 抗体の有意上昇の両方が証明されたものを *M. pneumoniae* の急性感染と考えた場合、*M. pneumoniae* 感染症患者は、すべての例で MC 抗体価が上昇していた。また *M. pneumoniae* の家族内感染を検討した成績では、分離、CF 抗体価有意上昇のどちらよりも MC 抗体価有意上昇で検討した方が家族内感染を証明する確率が高く、CF 試験と比較すると MC 試験の方が鋭敏であるといえる。この成績を対象の年齢別に検討した成績では特に幼児期前半において、CF 抗体価の有意上昇を認めない症例においても MC 抗体が有意上昇をしめしている例が数多くあった。これらの結果から著者が採用した MC 試験の方法では *M. pneumoniae* 感染を十分に証明できるといえる。また今回証明されたその鋭敏さを考えると、先に述べた *M. pneumoniae* の分離および CF 抗体価の成績とから得られた結論と同様に、乳幼児でも *M. pneumoniae* の感染が十分に成立し、しかもその症状が必ずしも異型肺炎像を呈さないといえる。

3. MC 抗体価と CF 抗体価の比較

M. pneumoniae 感染の場合の血中抗体測定法としての試験の鋭敏さをさらに検討する目的で行なった、同一血清での MC 抗体価と CF 抗体価の比較成績では、CF 抗体価が検出される血清では全例に MC 抗体価が検出され、その抗体価は約 10～100 倍であるといえる。また CF 抗体価が検出されない血清においても MC 抗体価が検出される事は、MC 試験はより鋭敏な方法で、この方法で抗体を測定するならば、年齢による抗体保有率および平均抗体価が異なった結果になることが考えられる。その成績では、対象となった各年齢層特に乳児、幼児期において、抗体が検出不能例が CF 試験と MC 試験では明らかに異なり、CF 試験の方が抗体検出不能例が多いといえる。さらに CF 抗体

価が検出されない血清での年齢別 MC 抗体価をみると、0～6 カ月では平均抗体価が高く、7～12 カ月でいったん下がりが、2～3 歳、学童と次第に平均 MC 抗体価が上昇している。この成績の中で 0～6 カ月における平均 MC 抗体価高値の意味を考えてみた。即ち *M. pneumoniae* 感染時の CF 抗体に関与している免疫グロブリンの性質の報告^{29,30)} は存在するが MC 抗体に関しての報告がないため、母児間の抗体の移行と、2-ME 処理による抗体の値の変化について検討した。その結果、母親の抗体価と臍帯血の抗体価は CF 抗体と同様にほぼ同じ値をしめし、少なくとも *M. pneumoniae* の急性感染期でない場合に証明される抗体は、胎盤通過性があるといえる。また 2-ME 処理によって感染後の経時的な MC 抗体価を検討した。この結果からは、急性期の抗体は 2-ME 感受性であり、回復期の抗体は 2-ME 抵抗性であるといえ、ほぼ *M. pneumoniae* 感染の CF 抗体と同じ経過をとる傾向にあるといえる⁵⁾。これらの成績をまとめると、少なくとも急性感染の回復期以後から持続する MC 抗体はその大部分に IgG が関与していると考えられる。この成績は著者の調べた範囲で、*Mycoplasma* の MC 抗体に関してこのような検討を加えている唯一の報告である Lin³¹⁾ の *M. hominis* に関する成績とほぼ一致している。従って年齢別平均 MC 抗体価の成績から、*M. pneumoniae* は他のウイルス性気道感染症と同じ様に、乳児期後半から幼児期前半に、その最初の感染を受けている可能性が考えられる。この意味において MC 試験は *M. pneumoniae* の分離および CF に代表される既知の血中抗体検出法と比較すると、より正確な *M. Pneumoniae* の感染を証明できる方法といえる。

結 語

M. pneumoniae 感染の発生頻度および血中抗体保有率の年齢別の違いの理由の一端を解明するために、各年齢層での気道感染症患者からの *M. pneumoniae* の分離と、現在までに使用されている抗体検出法より更に鋭敏な方法といわれる MC 試験により *M. pneumoniae* の抗体価測定を行ない、以下のことが明らかになった。

1) *M. pneumoniae* 感染は家族内感染などにより幼児期から既に感染が起きていると思われる。しかしこの事は今まで広く採用されていた感染の証明方法、即ち分離と CF 試験などの抗体検出法では正確に証明できない。

2) 血清の補体依存性 *mycoplasmacidal* 試験は現在広く使用されている CF 試験などの抗体測定法より鋭敏な方法であり、この方法によって 1) が証明される。また *M. pneumoniae* の急性感染症を証明する場合にも MC 試験はより有用である。

3) MC 試験により検出される抗体には、感染初期には IgM、感染後期には IgG が関与していると考えられる。従って IgG 抗体としての MC 抗体は胎盤通過性である。

本論文の要旨は、第3回マイコプラズマ研究会(昭和51年、東京都)、第7回小児ウイルス病研究会、第8回小児感染免疫研究会合同集会(昭和51年、札幌市)において発表した。

稿を終えるにあたり、実験に際しご指導下さるとともに論文作製に御助言下さいました小児科学教室梅津征夫講師に感謝いたします。(昭和51.8.12受理)

文 献

- Hayflick, L. and Chanock, R. M.: Mycoplasma species of man. *Bacteriol. rev.* **29** (2), 185-221 (1965).
- Grayston, J. T., Alexander, E. R., Kenney, G. E., Clarke, E. R., Fremont, J. C. and Maccoll, W. A.: Mycoplasma pneumoniae infections. Clinical and epidemiological studies. *J. Amer. Med. Ass.* **191** (5), 369-374 (1965).
- 菊地尚子, 豊口昭夫, 渡辺信彦, 梅津征夫: 団地に発生せる Mycoplasma pneumoniae 感染症の流行. 1) 臨床的観察, 日児会誌 **73** (4), 429-432 (1968).
- 梅津征夫, 菊地尚子, 豊口昭夫, 渡辺信彦: 団地に発生せる Mycoplasma pneumoniae 感染症の流行. 2) 病原検索特に血清抗体価についての検討, 日児会誌 **73** (4), 433-437 (1968).
- 梅津征夫: Mycoplasma pneumoniae 感染症に関する研究. 第2編 Mycoplasma pneumoniae 感染症の集団発生例に対する検討, 札幌医誌 **34** (6), 371-377 (1968).
- Foy, H. M., Kenny, G. E., McMahan, H., Mansy, A. M. and Grayston, J. T.: Mycoplasma pneumoniae pneumonia in a urban area. *J. Ame Med. Ass.* **211**, 1666-1668 (1970).
- 梅津征夫: マイコプラズマ感染—Mycoplasma pneumoniae による気道感染性疾患の発症機転について—小診 **39** (1), 12-19 (1976).
- 梅津征夫: Mycoplasma pneumoniae 感染症に関する研究. 第1編 Mycoplasma pneumoniae の北海道における浸淫度ならびに小児気道感染症における病因的役割. 札幌医誌 **34** (6), 362-370 (1968).
- Gale, J. L. and Kenny, G. E.: Complement dependent killing of Mycoplasma pneumoniae by antibody: kinetics of the reaction. *J. Immunol.* **106** (5), 1175-1183 (1970).
- Brunner, H., Razin, S., Kalica, A. R. and Chanock, R. M.: Lysis and death of Mycoplasma pneumoniae by antibody and complement. *J. Immunol.* **106** (4), 907-916 (1971).
- Brunner, H., James, W. D., Horswood, R. L. and Chanock, R. M.: Measurement of Mycoplasma pneumoniae micoplasmacidal antibody in human serum. *J. Immunol.* **108** (6), 1491-1498 (1972).
- Brunner, H., Horswood, R. L. and Chanock, R. M.: More sensitive methods for detection of antibody to Mycoplasma pneumoniae. *J. Infect. Dis.* **127** (Sup.), 52-55 (1973).
- Chanock, R. M., Hayflick, L. and Barile, M. F.: Growth on artificial medium of an agent associated with atypical pneumonia and its identification as a PPLO. *Proc. Nat. Acad. Sci.* **48**, 41-49 (1962).
- Hayflick, L.: Tissue cultures and mycoplasmas. *Texas Rept. Biol. Med.* **23** (Sup.), 295-303 (1965).
- 石田名香雄, 荒井澄夫: Mycoplasma pneumoniae の分離. *Modern media* **11**, 26-30 (1965).
- Kraybill, W. H. and Crawford, Y. E.: A selective medium and color test for Mycoplasma pneumoniae. *Proc Soc. Exp. Biol.* **118**, 965-970 (1965).
- Somerson, N. L., James, W. D., Walls, B. E. and Chanock, R. M.: Growth of Mycoplasma pneumoniae on a glass surface. *Ann. N.Y. Acad. Scie.* **143** (1), 384-389 (1964).
- Somerson, N. L., SE Senterfit, L. B. and Hamparian, V. V.: Development of a Mycoplasma pneumoniae vaccine. *Ann. N.Y. Acad. Scie.* **225**, 425-435 (1973).
- 梅津征夫, 小川説子, 中尾 亨: Mycoplasma pneumoniae 感染症と細胞性免疫. 医学のあゆみ **97** (6), 293-294 (1976).
- Good, N. E., Winget, G. D., Winter, W., Connolly, T. N., Izawa, S. and Singh, S. M. M.: Hydrogen iron buffers for biological research. *Biochemistry* **5** (2), 467-477 (1966).
- Eagle, H.: Buffer combinations for mammalian cell culture. *Science* **174**, 500-503 (1971).
- Biberfeld, G.: Cell-mediated immune response following Mycoplasma pneumoniae infection in man. *Clin. Exp. Immunol.* **17** (1), 29-41 (1974).
- Sever, J. L.: Application of a microtechnique to viral serological investigations. *J. Immunol.* **88**, 320-329 (1962).
- ウイルス実験学総論: 国立予防衛生研究所学友会編. 補体結合反応, 丸善, 22-259 (1973).
- Wiedermann, G., Ovary, Z. and Miescher, P. A.: Influence of mercaptoethanol treated on skin sensitizing and complement binding ability of 7S

- antidinitrophenol-bovine gamma globulin antibody. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. **116**, 448-452 (1964).
- 26) Schmidt, N. T., Lennette, E. H., Dennis, J. and Gee, P. S.: On the nature of complement-fixing antibody to Mycoplasma pneumoniae. J. Immunol. **97**, 95-99 (1966).
- 27) 小川説子, 梅津征夫: 日本小児科学会北海道地方会 148 回例会にて発表, 札幌 (1976).
- 28) 池田信彦, 小島好文, 堀田昌宏, 浦野 隆: 第 3 回マイコプラズマ研究会にて発表, 東京 (1976).
- 29) 梅津征夫, 千葉峻三, 小川説子, 中尾亨: Mycoplasma pneumoniae 感染症における血中 IgG および IgM 抗体の変動. ウイルス, **24**(2), 157-163 (1974).
- 30) Umetsu, M., Ogawa, S. Chiba, S. and Nakao, T.: Immune responses in Mycoplasma pneumoniae infections. Tohoku. J. Exp. Med. **116**, 213-218 (1975).
- 31) Lin, J. S. and Kass, E. H.: Serological reactions of Mycoplasma hominis: Differences among micoplasmacidal, metabolic inhibition and growth agglutination tests. Inf. Immu. **10**(3), 535-540 (1974).