

マイコプラズマ肺炎の診断

—殊にスコア表, PCR 法を用いた診断の試みについて—

田野 吉彦

マイコプラズマ肺炎 (マ肺炎) の診断について, 自験例を基に以下の事柄を中心に述べた。スコアによるマ肺炎診断の試み: マ肺炎の臨床的特徴と考えられた流行期, 年齢, 基礎疾患, 発熱, 白血球数, 胸部 X 線像の各項目に点数をつけスコア表を作製した。6 点以上の場合, マ肺炎では 83.9% を占めたのに対して, 細菌性肺炎はわずか 2.2% であった。スコア表は, マ肺炎以外の非定型肺炎との鑑別は困難であるが, 初診時に細菌性肺炎と鑑別するのに有用であると考えられた。血清学的検査の検討: マ肺炎 80 例に施行した補体結合反応 (CF) と粒子凝集反応 (PA) について retrospective な検討を行った。ペア血清で 4 倍以上の抗体価変動を評価するには, CF の場合 onset から 3 日以内と 11 日以後のペア血清を測定することが理想と考えられた。PA に抗体価変動なく CF $4 \geq \rightarrow 16$ 程度の抗体価変動を 11 例に認めた。これらは血清学的にマ肺炎と確定されるべきか迷う症例であった。PCR 法を用いたマ肺炎の迅速診断: PCR 法によるマ肺炎の診断は感度, 特異度共に優れており, 血清抗体価の上昇しないマ肺炎の診断にも有用と考えられた。(平成 6 年 5 月 2 日採用)

Diagnosis of Mycoplasmal Pneumonia

—Diagnosis by Scoring and Polymerase Chain Reaction—

Yoshihiko Tano

The diagnosis of mycoplasmal pneumonia was made by scoring. The clinical characteristics of mycoplasmal pneumonia were investigated and the following parameters served as the basis for scoring: epidemic status, age, underlying disease, fever, WBC, and chest x-ray results. A score table for diagnosing mycoplasmal pneumonia was made. A score of six points or more was recorded for 83.9% of the mycoplasmal pneumonia patients, but for only 2.2% of the bacterial pneumonia patients. This method for diagnosing mycoplasmal pneumonia was considered to be useful for distinguishing it from bacterial pneumonia, but it was difficult to distinguish mycoplasmal pneumonia from other atypical pneumonia. The complement fixation test (CF) and passive agglutination test (PA) results for 80 patients with mycoplasmal pneumonia were retrospectively studied. We found it was best to obtain paired serum samples 3 days or earlier after infections and 11 days or later after infections for the CF. In 11 paired serum samples obtained during acute and convalescent periods, there was a fourfold or greater rise in CF titers. Specifically

川崎医科大学附属川崎病院 内科(II)
〒700 岡山市中山下2-1-80

Second Department of Medicine, Kawasaki Hospital,
Kawasaki Medical School: 2-1-80 Nakasange, Okayama,
700 Japan

they were 1 : \leq 4 to 1 : 16. It was difficult to diagnose mycoplasmal pneumonia definitely from these titers. Throat swabs obtained from 58 patients were examined for detection of *M. pneumoniae* by the polymerase chain reaction (PCR). The results showed good sensitivity and specificity. The PCR assay was considered to be useful for the rapid diagnosis of mycoplasmal pneumonia and for diagnosing mycoplasmal pneumonia with an unelevated serum antibody titer. (Accepted on May 2, 1994) *Kawasaki Igakkaishi 20 Suppl : 175-181, 1994*

Key Words ① **Mycoplasma pneumoniae** ② **Score table**
③ **Polymerase chain reaction** ④ **Rapid diagnosis**

はじめに

マイコプラズマ肺炎(以下マ肺炎)は *Mycoplasma pneumoniae* (以下 *M. pneumoniae*) の感染による肺炎で、市中肺炎の中で5~18%を占め、日常よく遭遇する疾患である^{1),2)}。 *M. pneumoniae* は自己増殖能を持つ最小微生物であるが、細菌と異なり細胞壁がないため、細胞壁合成障害を主作用とする β -ラクタム系抗菌剤は無効とされ、マ肺炎の治療にはマクロライド系、テトラサイクリン系抗菌剤の選択が必要である³⁾。従って、治療上細菌性肺炎との鑑別が重要であるが、現在 *M. pneumoniae* 感染症診断の検査法として、分離培養法と血清学的方法が行われている。分離培養法は一般に咽頭ぬぐい液を検体とするが、特定の培地 (PPLO agar) を必要とし、分離までに少なくとも2~3週間かかると言われて^{4),5)}。血清学的診断法は临床上よく用いられ、補体結合反応 (CF) や受身赤血球凝集反応 (PHA) などが一般的に行われている⁶⁾。しかし、急性期と回復期のペア血清による抗体価の上昇で診断されるため、約2週間を必要とする。すなわち、現在行われている分離培養法、血清学的方法共に、確定診断までに時間を要するため、診断が回顧的になることが多い。従って、迅速診断法の確立が望まれており、近年 *M. pneumoniae* 特異的モノクローナル抗体を用いた直接蛍光抗体法^{5)~7)} や DNA プローブ法、PCR 法 (Polymerase Chain Reaction) を用いた遺伝学的診断法が注目されてい

る^{8)~12)}。本稿では自験例を基に、1) 著者らの作製したマ肺炎診断スコア表の紹介、2) 血清学的検査の検討、3) PCR 法の有用性について言及する。

マ肺炎診断スコア表の紹介¹³⁾

1) マ肺炎診断スコア表の作製

直接蛍光抗体法や PCR 法を用いた迅速診断法は未だ一般に普及し実用化するまでに至っておらず、現在における初診時のマ肺炎の診断は、症状、理学所見、白血球数、胸部 X 線写真などを総合的に評価した臨床的診断で行われている。しかし、臨床所見の総合評価は診察者の直感や主観によるため、常に正しい判断がなされているとは言えず、またその正確さは専門医と非専門医で当然ながら異なると思われる。そこで著者らは、マ肺炎の臨床的診断にあたって、種々の臨床所見を客観的に評価する目的で点数化を試み、**Table 1** に示すスコア表を作製した。過去8年間 (1985・4~1992・12) に経験したマ肺炎62例を対象に、その臨床的特徴を検討した。マ肺炎の確定診断は、*M. pneumoniae* に対する血清抗体価を測定し、急性期と回復期のペア血清でその抗体価が4倍以上の上昇とした。重要と考えられた項目は、1) 流行期、2) 年齢、3) 基礎疾患、4) 発熱、5) 白血球数、6) 胸部 X 線写真の6項目で、さらに各項目について、-1, 0, 1, 2 点のいずれかを配点した。各項目の配点については、例えば年齢は若年者に好発し50歳以上は10%以下、特に70歳以上は

Table 1. Score table of mycoplasmal pneumonia

<p>(1) Epidemic</p> <p><input type="checkbox"/> Yes : 1</p> <p><input type="checkbox"/> No : 0</p> <p>(2) Age</p> <p><input type="checkbox"/> 29 ≧ : 2</p> <p><input type="checkbox"/> 30 ≦ ~ 49 : 1</p> <p><input type="checkbox"/> 50 ≦ ~ 69 : 0</p> <p><input type="checkbox"/> 70 ≧ : -1</p> <p>(3) Underlying disease</p> <p><input type="checkbox"/> Normal lung : 2</p> <p><input type="checkbox"/> Impaired lung : -1</p> <p><input type="checkbox"/> Any other disease : 0</p> <p>(4) Fever</p> <p><input type="checkbox"/> none : -1</p> <p><input type="checkbox"/> 38°C > : 0</p> <p><input type="checkbox"/> 38°C ≦ ~ < 39 : 1</p> <p><input type="checkbox"/> 39°C ≦ : 2</p>	<p>(5) WBC</p> <p><input type="checkbox"/> 7000 > : 2</p> <p><input type="checkbox"/> 7000 ≦ ~ < 9000 : 1</p> <p><input type="checkbox"/> 9000 ≦ ~ < 11000 : 0</p> <p><input type="checkbox"/> 11000 ≦ : -1</p> <p>(6) Chest x-ray</p> <p><input type="checkbox"/> Multiple shadows : 1</p> <p><input type="checkbox"/> Homogeneous shadows : 1</p> <p><input type="checkbox"/> Visualized vascular marking in homogeneous shadows : 1</p> <p><input type="checkbox"/> Others : 0</p> <p>Total score ()</p> <p>Notes :</p> <p>1. Patients 70 years of age and older are not classified as having normal lung.</p> <p>2. 'Fever' represents the highest temperature recorded from the onset of the illness to the initial visit.</p>
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

極めて稀であったので、20歳代2点、70歳代以上は-1点とした。白血球数の場合、11000以上は6%に過ぎなかったので-1点とした。胸部X線像については、多彩な像を呈していたのでマイナス点は作らなかった。胸部X線像の分析に関しては、今回複数で検討しておらず、著者が一貫して読影したため、適切な調査方法であったかどうか問題が残る。また、マ肺炎の胸部X線像の解析について種々の研究報告があり^{14),15)}、今回取り上げた胸部X線の所見および配点について今後検討すべき余地が残っていると思われる。スコア表を利用する時の注意事項として流行期とは、“周囲で明らかに流行しているとき”としたが、厳密な定義は困難である。従って、明らかに流行していると判断できる場合のみを1点とし、判断に迷う時期は0点とした。健常と思われる肺でも70歳以上の症例については、老年者肺と考えて、健常肺とも障害肺ともせず0点とした。発熱はonsetから初診時までの最高体温で評価した。胸部X線写真は平面写真のみで評価した。Table 1の(1)~(5)の項目は、あてはまるものを1つのみ選択し、(6)の項目は複数の選択可とした。

2) マ肺炎診断スコア表の評価

マ肺炎62例 (I群)、細菌性肺炎45例 (II群)を対象にTable 1の各項目について点数化を試みた。対象とした細菌性肺炎は、当科へ入院し細菌性肺炎と診断されていた症例の中から無作為に抽出し、血清学的検査によりマ肺炎とクラミジア肺炎が否定されており、第1選択薬として使用されたβ-ラクタム系抗菌薬が明らかに有効であったことを必須条件として選択した。各項目についてI群とII群の有意差を検討した結果をTable 2に示した。有意差の検定にはStudentのt検定を用いた。各項目の平均得点において両群間で最も大きい差を示したのは白血球数で、次いで年齢、基礎疾患であった。これらの項目はいずれもP<0.001、胸部X線像はP<0.025であった。いずれにせよ有意差検定では、全項目が5%未満の危険率で有意差を認めた。各項目を合計した総合得点分布をTable 3に示した。3点以下はI群では1例も認めなかったのに対して、II群では45例中38例(84.4%)を占めていた。6点以上についてみると、I群で62例中52例(83.9%)を占めたのに対して、II群は45例中わずか1例(2.2%)であった。従っ

Table 2. Comparison in groups I and II on score of individual items

	Items No.	Age	Underlying disease	Fever	WBC	Chest x-ray
Group I	62	1.32	1.58	1.57	1.42	1.02
Group II	45	-0.20	0.09	1.09	-0.18	0.69
Significant difference		p < 0.001	p < 0.001	p < 0.01	p < 0.001	p < 0.025

The numerical value of individual items is mean score.

Table 3. Comparison in groups I and II on total scores

Group I	Points No.	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
		62	0	0	6	4	11	12	13	13	2
		100 %			83.9 %						

Group II	Points No.	≤-1	0	1	2	3	4	5	6	7	8	
		45	9	4	7	12	6	4	2	0	1	0
		84.4 %				97.8 %						

て、3点以下はマ肺炎は否定的で、6点以上の場合、sensitivity 83.9%, specificity 97.8%とマ肺炎の可能性が極めて高いと考えられた。

3) マ肺炎診断スコア表使用時の留意点

マ肺炎以外の非定型肺炎と考えられた48例をスコア表に基づいて検討したところ、総合得点が4点以上で93.8%、6点以上で79.2%を占め、マ肺炎と極めて類似した。すなわち、著者らの作製したスコア表は、細菌性肺炎との鑑別には有用であるが、マ肺炎以外の非定型肺炎との鑑別は困難であることに留意しておく必要がある。治療の面から考えると、マ肺炎以外の非定型肺炎も抗菌剤の選択は、マ肺炎に準じてよいと考えられるので、初診時の empiric therapy として抗菌剤を選択する場合にスコア表は有用であろうと思われる。しかし、スコア表はあくまで補助的診断法として利用すべきで、臨床経過や身体所見などスコア表に取り上げられていない所見も十分に考慮したうえで、最終診断すべき

である。

血清学的検査の検討

マ肺炎の確定診断に対して最もよく行われているのが血清学的検査である。主な血清検査に、補体結合反応 (Complement Fixation, CF), 受身赤血球凝集反応 (Passive Hemagglutination test, PHA), 粒子凝集反応 (Particle Agglutination, PA), 高比重粒子凝集反応 (High Density Particle Agglutination, HDPA) 等がある⁶⁾。著者らは SRL 社に依頼して補体結合反応と粒子凝集反応を利用している。そこで、現在まで著者らが経験したマ肺炎80例を対象に CF と PA について retrospective な検討を行

った。

CF と PA 共にペア血清による抗体価変動の検討が可能であったのは76例であった。抗体価変動が4倍以上の場合を陽性とする両者共に陽性は38例 (50.0%), いずれか一方陽性が32例 (42.1%), 両者共に陰性は6例 (7.9%) であった。両者共に陰性は、第1回目の検査時に既に CF 64倍以上, PA 640倍以上の高値を示していた。これら6例の onset から検査までの期間は、4例が11日以上であるが、他の2例は各々6日目、7日目であった。そこで血清抗体価上昇の時期について検討した。血清抗体価と onset から検査までの期間との関係を、CF 158件について **Table 4** に PA 155件について **Table 5** にそれぞれ示した。CF, PA 共に3日以内はすべて上昇しておらず、11日以後はCFの場合はすべて16倍以上の上昇を示し、PAの場合は160倍以上の上昇が84件中60件 (71.4%) であった。4~10日はCF16倍以上の上昇率34.4%, PA160倍以

Table 4. Relation between CF antibody titers and days after onset

		days after onset					
		0-3	4-7	8-10	11-14	15-20	≥ 21
CF antibody titers	≤ 4	●●●●●●●●	●●●●●●●● ●●●●●●●●	●●●●●●●●			
	8		●●●				
	16		●●●●●●	●●●●●●	●●●●●●	●●●●●●	●
	32		●●●	●●●	●●●●●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●
	64		●	●	●●●●	●●●●	●●
	≥ 128		●	●●	●●●●	●●●●●●●●	●●●●●●●●

Table 5. Relation between PA antibody titers and days after onset

		days after onset					
		0-3	4-7	8-10	11-14	15-20	≥ 21
PA antibody titers	≤40	●●●●●●●●	●●●●●●●● ●●●●●●●●	●●●●●●●●	●●●●●●	●●●●●●●●	●●●
	80		●●●	●	●●●	●●●●●●	
	160		●	●	●	●●●	●●●●
	320		●	●●	●●●	●●●●●●●●	●●●●●●
	640				●●●●●●	●●●●●●●●	●●●●●●
	≥1280				●	●●●●●●●●	●●●●

上の上昇率7.9%であった。すなわち、CFの場合 onset から3日以内と11日以後の血清抗体価の変動を評価するのが最も理想と言える。PAの場合、全く上昇しない者が76例中17例(22.4%)に認められた。しかし、CFに血清抗体価の変動がなく、PAに4倍以上の変動が認められ診断に役立ったのが10.5%にみられたので、やはり両者同時の検査は有用と考えられる。

次に血清抗体価の上昇程度について検討した。その結果PAに変動並びに上昇なく、CFの上昇程度が4倍以下から16倍程度の者が11例に認められた。いずれも臨床像はマ肺炎と考えられ、因みにマ肺炎診断スコア表によるスコアは全例6点以上であった。しかし、この場合抗体価の上昇が低い場合血清学的にマ肺炎と確定してよいものかどうか迷うところである。この症例の中にはマ肺炎の家族内感染例でしかも咽頭ぬぐい

液からPCR法によりM. pneumoniaeを検出(PCR陽性)し、明らかにマ肺炎と診断して良い例が含まれていた。また、最近著者らは、PCR陽性で血清学的に陰性である例を経験している。後述する如くPCR法は特異度が極めて高いこと、この症例も臨床像はマ肺炎に矛盾しなかったことからマ肺炎ではなかったかと考えている。これらの例は、血清抗体価の上昇しないマ肺炎の存在を推測させる。この点に関しては 現在著者らが施行しているPCR法によるマ肺炎の診断を、さらに発展させ検討してゆきたいと考えている。

PCR法を用いたマ肺炎の迅速診断

マ肺炎の迅速診断として、最も注目されているのが、

DNAプローブ法やPCR法を用いた遺伝的診断法である⁸⁾⁻¹²⁾。DNAプローブ法は、アイソトープを使用する煩雑さや感度の面でやや問題があり¹⁰⁾ 現在ではPCR法の方が一般により関心が強いように思われる。著者らもPCR法を用いたマイコプラズマ肺炎診断の有用性について検討中である。

1) 方法

患者の咽頭ぬぐい液を検体とし、DNAの抽出は煮沸法で行った。既に甲斐ら¹⁷⁾によって報告されている16S ribosomal RNAの遺伝子配列の中で、M. pneumoniaeに特異的な部分とされているオリゴヌクレオチドプライマー、Mp-8 (5'-CAAAGTTGAAAGGACCTGCAAG-3')、Mp-6 (5'-ATTGCCCTTGGTAGGCC-GTTACCCAC-3')を用いた。反応条件は、熱変性94°C 60秒、アニーリング62°C 60秒、伸長

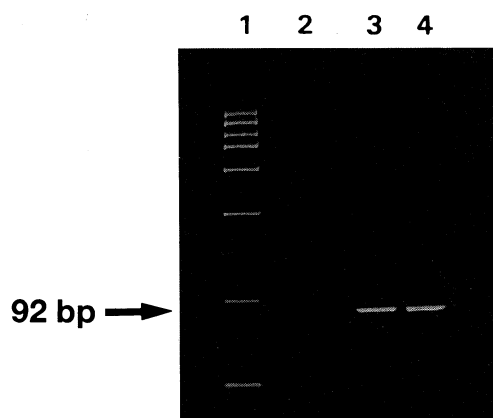


Fig. 1. Polyacrylamide gel electrophoretic analysis of the PCR products obtained from throat swab samples, Lane 1: Molecular weight markers, Lane 2: Negative control, Lane 3: Throat swab sample, Lane 4: Positive control

72°C 120秒で35サイクルとした。PCR産物はポリアクリルアミドゲル電気泳動後 ethidium bromide 染色し、紫外線照射下で 92 bp の DNA 断片を観察した (Fig. 1)。

2) PCR法の有用性について

現在著者らが行っている PCR法による検査時間は、DNA抽出に約1時間、PCR反応に約3.5時間、電気泳動法によるDNA検出に約1.5時間を要する。従って、検体を採取してから検

査結果がでるまで約6時間かかる。しかし、従来の血清学的診断法や分離培養法では2週間以上を要するので、極めて優れた迅速診断法と言える。著者らは現在まで肺炎患者52例に施行しているが、マ肺炎の診断を血清学的検査から確定した場合、PCR法による診断の感度は87%、特異度は91%の結果を得ており信憑性も高かった。マ肺炎であるにもかかわらず、血清抗体価の上昇しない例も認めており、このような症例に対して、PCR法は分離培養法と共に有用性が高いと思われる。特に免疫反応が未熟な状態である乳幼児の場合有用と考える¹⁹⁾。さらにPCR法の場合、分離培養法の場合と異なり *M. pneumoniae* の遺伝子の検出であるので生菌、死菌にかかわらず検出可能である。診断面のみでなく、治療面においても抗菌剤の適切な中止時期を判断するために有用であることが期待できる。また、検体の採取法が簡便で検体保存も容易なので疫学的調査にも利用できると考えている。PCR法は特殊な機械と設備を必要とするので、現在のところどこでも実施可能とは言えないが今後益々発展していく検査法であろう。

稿を終えるにあたり、PCR法の研究にご協力をいただいた川崎医科大学附属川崎病院研究室主任技師 中田敬一氏に深謝いたします。

文 献

- 1) Tuazon CU, Murray HW: Atypical pneumonia. *In* Respiratory Infection, Diagnosis and Management, ed by Pennington JE, 2nd. ed. New York, Raven Press. 1983, pp 251-276
- 2) 斎藤 厚: 呼吸器感染症の変貌と治療の進歩. 臨床医 15: 2-9, 1989
- 3) 小林宏行: マイコプラズマ肺炎. 日本医事新報 3130: 10-14, 1984
- 4) 中村昌弘: 呼吸器疾患と臨床検査, マイコプラズマ肺炎. 臨床検査 35: 709-714, 1991
- 5) 岩沢篤郎, 中村良子, 藤田京子, 吉田勝彦, 田沢節子, 佐藤純一, 宮井一浩, 西村忠洋, 河原隆一: マイコプラズマ感染症の迅速診断. 臨床と微生物 19: 95-103, 1992
- 6) 富山哲夫: マイコプラズマ感染症診断の進歩. 日本医師会雑誌 104: 521-525, 1990
- 7) 目黒英典, 寺嶋 周: 直接蛍光抗体法によるマイコプラズマ感染症の迅速診断. 小児科雑誌 46: 77-82, 1993
- 8) Dular R, Kajioka R, Kasatiya S: Comparison of Gen-Probe commercial kit and culture technique for the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *J Clin Microbiol* 26: 1068-1069, 1988
- 9) 松岡幸雄, 矢ヶ崎満郎, 福島政文, 河合 忠: DNAプローブ (Gen-Probe®) 法による *Mycoplasma pneumoniae* の検出. 臨床と微生物 17: 109-114, 1990

- 10) 奈良信雄, 室橋郁生, 松本文枝, 西堀眞弘, 繁田龍雄: マイコプラズマ感染症の診断における DNA プローブ法の有用性に関する研究. 感染症 65: 1527-1532, 1991
- 11) Bernet C, Garret M, Barbeyrac BD, Bebear C, Bonnet J: Detection of Mycoplasma pneumoniae by using the polymerase chain reaction. J Clin Microbiol 27: 2492-2496, 1989
- 12) 川山智隆, 矢野敬文, 時澤史郎, 田中泰之, 本田順一, 市川洋一郎, 大泉耕太郎: Capillary PCR 法による迅速診断が有用であったマイコプラズマ肺炎の 1 例. 日胸 53: 261-265, 1994
- 13) 田野吉彦, 小橋吉博, 安達倫文, 木村 丹, 田辺 潤, 松島敏春: スコアによるマイコプラズマ肺炎診断の試み. 呼吸 12: 1388-1392, 1993
- 14) 夏井坂徹, 奈良祐次, 高橋保博, 三上徹成, 小場弘之, 田垣 茂: マイコプラズマによる肺病変の進展様式 - X 線像の解析を中心に -. 臨放 26: 343-353, 1981
- 15) 森 拓二, 関根球一郎, 中島茂夫, 森 祐二, 藤田昭久, 森 雅樹, 今井純生, 鈴木 明: マイコプラズマ肺炎とウィルス性肺炎の X 線像. 画像診断 7: 382-388, 1987
- 16) 富山哲雄: 肺炎マイコプラズマの血清検査. 衛生検査 37: 951-956, 1988
- 17) 甲斐雅規, 山ノ内 泉, 神谷 茂, 小澤 敦: PCR 法による Mycoplasma pneumoniae の直接迅速検出法. 日本臨床 (特別号) 50: 433-436, 1992
- 18) 田野吉彦, 松島敏春, 小橋吉博, 安達倫文, 木村 丹, 田辺 潤: PCR 法を用いたマイコプラズマ肺炎の診断並びに治療経過に関する検討. 第68回日本感染症学会総会発表, 1994
- 19) 桜井信清, 永山洋子: 乳幼児における肺炎マイコプラズマ感染症. 日児誌 86: 1035-1046, 1982