

〈原 著〉

肺炎マイコプラズマ感染症迅速診断としての
マイコプラズマ rRNA 検出試薬 TRCReady MP の臨床評価石和田稔彦¹⁾・長澤耕男²⁾・菱木はるか²⁾・阿部克昭³⁾・静野健一⁴⁾・北田清悟⁵⁾・込山 修⁶⁾・森 伸晃⁷⁾¹⁾ 千葉大学真菌医学研究センター感染症制御分野²⁾ 千葉大学医学部附属病院小児科³⁾ 千葉市立海浜病院小児科⁴⁾ 千葉市立海浜病院臨床検査科⁵⁾ 国立病院機構刀根山病院呼吸器内科⁶⁾ 国立病院機構東京医療センター小児科⁷⁾ 国立病院機構東京医療センター総合内科

(2018年8月6日受付)

自動遺伝子検査装置 TRCReady-80 システムを利用し、新規に開発された肺炎マイコプラズマ・リボゾーム試薬 (TRCReady MP) を用いて、小児及び成人呼吸器感染症患者における肺炎マイコプラズマ感染症迅速診断の有用性評価を行った。290 例に関して検討したところ、TRCReady MP 法の PCR 法との一致率は 96.2% (感度 98.2%, 特異度 95.7%), LAMP 法との一致率は 96.2% (感度 100%, 特異度 95.3%) であった。TRCReady MP は検体処理後 1 時間以内に結果を得ることが出来る。以上の結果より、TRCReady MP 法は、肺炎マイコプラズマ感染症迅速診断法として有用と考えられた。

序文

Mycoplasma pneumoniae (肺炎マイコプラズマ) は、ヒトに感染すると気管支炎や肺炎などの呼吸器感染症を惹起する代表的な病原微生物である^{1,2)}。特に学童から比較的若い成人の市中肺炎の原因微生物としての頻度が高い。従来、肺炎マイコプラズマは 4 年周期での流行がみられたが、近年この状況は変化し、毎年小流行が認められるように

なっている³⁾。肺炎マイコプラズマは、一般細菌と異なり細胞壁を有しないことから、 β -ラクタム系の抗菌薬が無効であること、ときに呼吸不全などを呈する重症化や髄膜炎などの合併症を伴うこともあることから、迅速な病原診断が望まれる感染症の 1 つである。一方、一般細菌と異なりグラム染色が利用できず、かつ培養には特殊培地を必要とし分離までに時間がかかるため、従来は抗体測定が病原診断の主体であった。しかし、最近、迅速抗原キットや Loop-mediated Isothermal

Amplification (LAMP) 法が開発、市販され、保険収載されるようになってきている^{4,5)}。東ソーが開発した転写-逆転写協奏反応 (Transcription reverse transcription concerted reaction : TRC 反応) を原理とした TRCReady は、PCR 法よりも速く核酸を増幅・検出できる方法である⁶⁾。さらに今回、煩雑であった核酸精製から核酸増幅・検出を自動化した TRCReady システムを利用し、開発したマイコプラズマ・リボソーム RNA (rRNA) 試薬 (TRCReady MP) を用い、本試薬の臨床的有用性を評価したので、報告する。

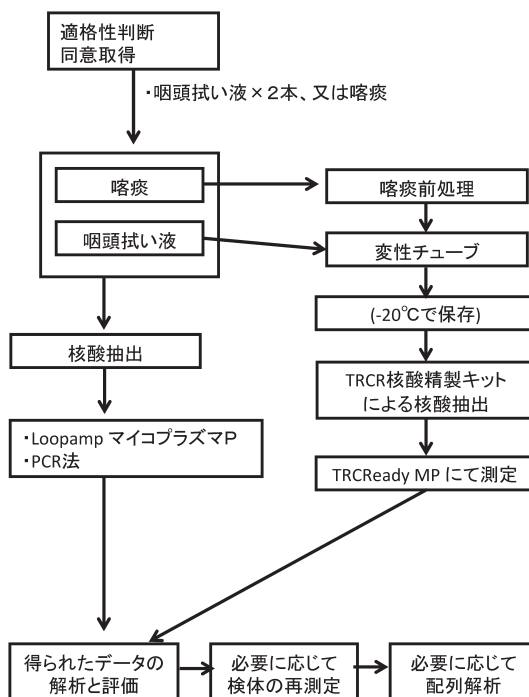
材料と方法

対象は、千葉大学医学部附属病院小児科、千葉市立海浜病院小児科、刀根病院呼吸器内科、東京医療センター総合内科・小児科を受診し、臨床的に肺炎マイコプラズマ感染症が疑われた症例を含む急性呼吸器感染症と診断した患者とした。そのうち、研究への同意が取得できた者 (小児の場合には、本人 and/or 代諾者) から咽頭ぬぐい液あるいは喀痰を採取した。採取した検体の一部を Loopamp マイコプラズマ P 検出試薬 (栄研化学) (以下、LAMP) 法ならびに PCR 法 (株式会社ビー・エム・エル) により肺炎マイコプラズマの遺伝子検出を行った。細菌培養検査が必要と判断した症例に関しては、細菌培養検査も同時に実施した。残りの検体は必要な場合 -20°C に保存し、TRCR 核酸精製キットにより核酸抽出を行い、TRCReady MP にて測定を行った。TRCReady MP の測定結果を PCR 法ならびに LAMP 法と比較した。検査の流れを図 1 に示す。

本試験は、各医療機関における倫理審査委員会の承認を得て、ヘルシンキ宣言に基づいた倫理原理を遵守し、「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。

承認番号：千葉大学：T28003、千葉市立海浜病

図 1. 検査のフローチャート



院：第 2017-8、刀根山病院：1621、東京医療センター小児科 28-15、総合内科 28-16。

結果

検査対象とした患者の内訳は、小児 100 例、成人 190 例であった。検体別では、咽頭ぬぐい液 112 検体 (小児 78 検体・成人 34 検体)、喀痰 178 検体 (小児 22 検体・成人 156 検体) であった。

全 290 例の TRCReady MP キット (以後本キット) と PCR 法の解析結果の比較を表 1 に示す。PCR 法を基にした本キットの感度は 98.2%、特異度は 95.7%、全体一致率は 96.2% であった。表 2 に本キットと LAMP 法の解析結果比較を示す。LAMP 法を基にした本キットの感度は 100%、特異度は 95.3%、全体一致率は 96.2% であった。

つぎに小児・成人例でのキットと PCR 法の比較を表 3・表 4 に示す。小児例を対象とした本

表1. TRCReady MPとPCR法との比較 (全数)

PCR 法 TRCReady MP	陽性	陰性	合計
陽性	55	10	65
陰性	1	224	225
合計	56	234	290

感度：98.2% 特異度：95.7% 全体一致率：96.2%

表2. TRCReady MPとLAMP法との比較 (全数)

LAMP 法 TRCReady MP	陽性	陰性	合計
陽性	54	11	65
陰性	0	225	225
合計	54	236	290

感度：100% 特異度：95.3% 全体一致率：96.2%

表3. TRCReady MPとPCR法の比較 (小児例)

PCR 法 TRCReady MP	陽性	陰性	合計
陽性	42	4	46
陰性	1	53	54
合計	43	57	100

感度：97.7% 特異度：93.0% 全体一致率：95.0%

表4. TRCReady MPとPCR法の比較 (成人例)

PCR 法 TRCReady MP	陽性	陰性	合計
陽性	13	6	19
陰性	0	171	171
合計	13	177	190

感度：100% 特異度：96.6% 全体一致率：96.8%

キットの感度は97.7%，特異度93.0%，全体一致率95.0%であった。成人例を対象とした感度は100%，特異度：96.6%，全体一致率96.8%であり，いずれも成人の方が高い感度・特異度・全体一致率を示した。

最後に検体別の本キットとPCR法の比較を表5，

表6に示す。上咽頭ぬぐい液でのキットとPCRの比較では感度97.6%，特異度88.7%，全体一致率92.0%であった。喀痰でのキットとPCR法の比較の感度100%，特異度98.8%，全体一致率98.9%であり，感度・特異度・全体一致率いずれも喀痰の方が咽頭ぬぐい液に比べ高い値を示した。

表5. TRCReady MPとPCR法の比較（上咽頭ぬぐい液検体）

PCR法	陽性	陰性	合計
TRCReady MP			
陽性	40	8	48
陰性	1	63	64
合計	41	71	112

感度：97.6% 特異度：88.7% 全体一致率：92.0%

表6. TRCReady MPとPCR法の比較（喀痰検体）

PCR法	陽性	陰性	合計
TRCReady MP			
陽性	15	2	17
陰性	0	161	161
合計	15	163	178

感度：100%、特異度：98.8% 全体一致率：98.9%

図2. TRCReady-80の外観



考察

TRCReady-80システムは、核酸精製から核酸増幅・検出工程を自動化し迅速・簡便に結核菌群と非結核性抗酸菌症を検出するシステムであり、2014年9月から市販されている（図2）。その測定原理は、TRC法といい、一定温度で微生物特異的なrRNAを増幅し検出する方法である⁷⁾。検体の前処理は咽頭ぬぐい液であれば5分程度、喀痰の

場合10分程度で精製から検出まで自動化されており、検体を機器にセットして40分程度で結果が得られるため、Point of Care Testingに準じた形での臨床応用が可能である。今回開発された試薬は、肺炎マイコプラズマのrRNAを標的とした遺伝子検査試薬であり、基礎的な検討において、10コピー程度のrRNA量で検出可能であり、肺炎マイコプラズマ以外のマイコプラズマ属菌、肺炎クラミジアとの交差反応性は認められていない（表7）（表8）。実際に今回臨床検体を用いて検討

表7. 交差反応性に関する検討結果

菌種	判定	菌種	判定
<i>Achromobacter xylosoxidans</i>	陰性	<i>Acinetobacter baumannii</i>	陰性
<i>Acinetobacter lwoffii</i>	陰性	<i>Escherichia coli</i>	陰性
<i>Alcaligenes faecalis</i>	陰性	<i>Haemophilus influenzae</i>	陰性
<i>Chryseobacterium indologenes</i>	陰性	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	陰性
<i>Empedobacter brevis</i>	陰性	<i>Legionella pneumophila</i>	陰性
<i>Flavobacterium odoratum</i>	陰性	<i>Pseudomonas stutzeri</i>	陰性
<i>Moraxella catarrhalis</i>	陰性	<i>Serratia marcescens</i>	陰性
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	陰性	<i>Staphylococcus aureus</i>	陰性
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	陰性	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	陰性
<i>Mycoplasma hominis</i>	陰性	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	陰性
<i>Mycoplasma salivarium</i>	陰性	<i>Streptococcus pyogenes</i>	陰性
<i>Mycoplasma fermentans</i>	陰性	<i>Mycoplasma genitalium</i>	陰性
<i>Mycoplasma orale</i>	陰性	<i>Chlamydia pneumoniae</i>	陰性

1,000,000 CFU/testまたは10,000,000,000 copies RNA/testを測定

表8. *Mycoplasma pneumoniae* RNA量 (コピー数) と検査感度に関する検討結果

<i>Mycoplasma pneumoniae</i> RNA量 (コピー数)	陽性数/検査数
1000	12/12
300	12/12
100	12/12
30	12/12
10	12/12
0	0/12

したところ、保険収載されているLAMP法と比較した場合、95%以上の感度、特異度であった。また、汎用されているPCR法との比較においても95%以上の高い感度、特異度を有しており、検査診断薬としては問題ないと思われた。PCR法との乖離例に関しては、PCR法陽性、本キット陰性となった1例はLAMP法においても陰性であり、検体中にごく微量しか肺炎マイコプラズマが含まれていなかったため偽陰性となったと考えられた。一方、PCR法陰性、本キット陽性であった10例のうち8例に関してはTRC反応産物の配列解析により肺炎マイコプラズマの配列が確認できたため

非特異増幅反応ではないことが示された。残りの2例については配列解析を行うことが出来ず、評価不能であった。LAMP法の結果と乖離した11例のうち、9例に関してはTRC反応産物の配列解析により肺炎マイコプラズマの配列が確認できたため非特異増幅反応でないことが示された。残りの2例については配列解析を行うことが出来なかったため、評価不能であった。

今回、小児と成人を対象としたが、いずれも高い感度、特異度であった。また、検体として咽頭ぬぐい液と喀痰と比較したところ、いずれも高い感度、特異度を示したが、喀痰検体の方がより高

い値を示した。肺炎マイコプラズマ診断においては下気道からの検体の方が菌量が多いため、検体採取にあたっては本法においても留意する必要があると思われた⁸⁻¹⁰⁾。今回発熱などの臨床症状の出現時期と検査実施時期の検討や、肺炎マイコプラズマの定量的な評価は個々の症例に関しては行っておらず、今後の検討課題である。現在、市販されている迅速抗原キットのPCR法と比較した際の感度は57.6%、特異度は91.6%と報告されており¹¹⁾、LAMP法との比較データを合わせるとTRCReadyは専用機器を必要とはするものの、迅速抗原診断より感度が良く、LAMP法と同等の感度・特異度を有することから汎用性が期待できるものと考えられた。

利益相反

本研究は東ソーとの受託・共同研究契約に基づき実施され、研究費用は東ソー株式会社が負担した。

引用文献

- 1) Yamasaki K, Kawanami T, Yatera K, *et al.*: Significance of anaerobes and oral bacteria in community-acquired pneumonia. *Plos ONE* 2013; 8: e63103.
- 2) 中村 明：気管支肺感染症病因診断の問題点 EBMの時代を迎えて。日本小児科学会雑誌 2003; 107: 1067-73.
- 3) 成田光生：感染症 現状の問題点と未来への展望 マイコプラズマ感染症の診断と治療。臨床と微生物 2017; 44: 174-7.
- 4) 山崎 勉, 黒木春郎, 板垣 勉, 他：肺炎マイコプラズマ感染症の診断におけるリボソームタンパクL7/L12抗原検出試薬の検討。日本感染症学会雑誌 2015; 89: 394-9.
- 5) 山口恵三, 館田一博, 中森祥隆, 他：LAMP法を用いた *Mycoplasma pneumoniae* と *Legionella* spp. による呼吸器感染症の迅速診断試薬の評価。医学と薬学 2007; 58: 565-71.
- 6) 田村 卓, 富永健司, 坂本和美, 他：TRC法を用いた結核菌検出法 (TRCRapid M.TB 東ソー) の有用性に関する検討。日本臨床微生物学会雑誌 2008; 18: 15-9.
- 7) 保川 清：新しい遺伝子検査法の進歩③ TRC反応によるRNA増幅とリアルタイム検出。医学のあゆみ 2003; 206: 479-83.
- 8) Kakuya F, Kinebuchi T, Okubo H, Matsuo K.: Comparison of oropharyngeal and nasopharyngeal swab specimens for the detection of *Mycoplasma pneumoniae* in children with Lower respiratory tract infection. *J Pediatr.* 2017; 189: 218-21.
- 9) Rätty R, Rönkkö E, Kleemola M: Sample type is crucial to the diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia by PCR. *J Med Microbiol.* 2005; 54: 287-91.
- 10) Brunner H: Adherence and pathogenicity of *Mycoplasma pneumoniae*: a review, Microbial surface components and toxins in relation to pathogenesis, 81-9, EZ Ron and S Rottem, Plenum Press, New York, 1991.
- 11) Sano G, Itagaki T, Ishiwada N, *et al.*: Characterization and evaluation of a novel immunochromatographic assay for pharyngeal *Mycoplasma pneumoniae* ribosomal protein L7/L12 antigens. *J Med Microbiol.* 2016; 65: 1105-10.

Clinical evaluation of TRCReady MP for rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection

Naruhiko Ishiwada¹⁾, Koo Nagasawa²⁾, Haruka Hishiki²⁾, Katsuaki Abe³⁾, Kenichi Shizuno⁴⁾, Seigo Kitada⁵⁾, Osamu Komiyama⁶⁾ and Nobuaki Mori⁷⁾

¹⁾ Department of Infectious Diseases,
Medical Mycology Research Center, Chiba University

²⁾ Department of Pediatrics, Chiba University Hospital

³⁾ Department of Pediatrics, Chiba Municipal Kaihin Hospital

⁴⁾ Department of Clinical Laboratory, Chiba Municipal Kaihin Hospital

⁵⁾ Department of Respiratory Medicine, National Hospital Organization,
Toneyama National Hospital

⁶⁾ Department of Pediatrics, National Hospital Organization,
Tokyo Medical Center

⁷⁾ Department of General Internal Medicine,
National Hospital Organization, Tokyo Medical Center

Tosoh TRCReady MP is a newly developed automatic *Mycoplasma pneumoniae* rapid detection method using a transcription reverse-transcription concerted reaction. We analyzed the performance of the TRCReady MP assay by comparing with polymerase chain reaction (PCR) method and Loop mediated isothermal amplification (LAMP) method with clinical samples. As for the result of 290 clinical samples in which detection of *M. pneumoniae* was targeted, the rate of concordance between TRCReady MP and PCR method was 96.2% (sensitivity, 98.2%; specificity, 95.7%), and that between TRCReady and LAMP method was 96.2% (sensitivity, 100%; specificity, 95.3%). It takes within one hour for detection using TRCReady MP after sample preparation processing. These results indicate that TRCReady MP is useful for the rapid diagnosis of *M. pneumoniae* infection.