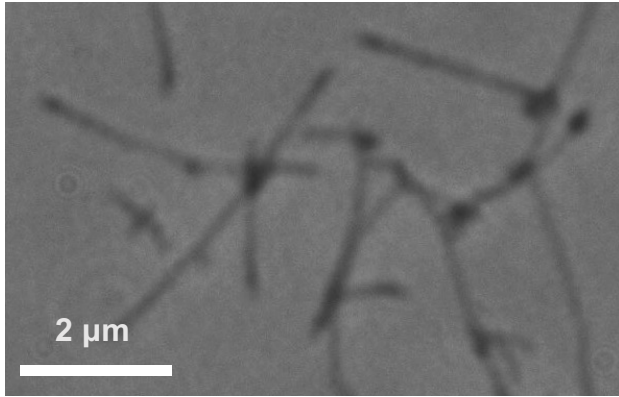


令和 4 年度 希少感染症診断技術研修会
令和 5 年 2 月 15 日

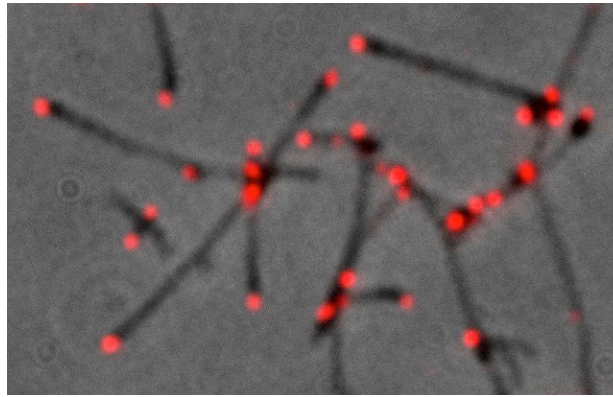
肺炎マイコプラズマ

国立感染症研究所 細菌第二部
見理 剛

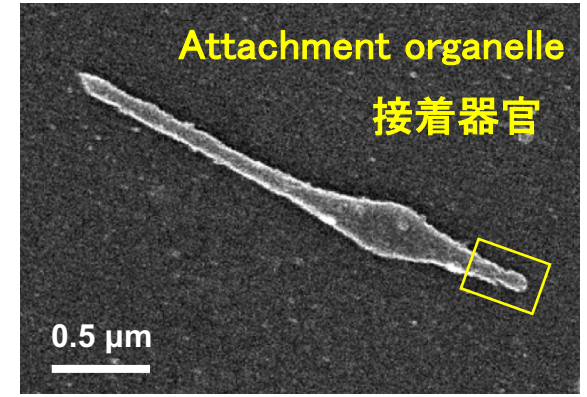
Mycoplasma pneumoniae (肺炎マイコプラズマ)



位相差顕微鏡像 (x 1,000)



抗 P1 抗体による免疫蛍光染色



Mycoplasma 属の真正細菌 (系統的にはグラム陽性菌に近縁)

ヒトの気管支炎、肺炎の主要な病原体 (流行期には市中肺炎の 20~30% を占めることも)

ペプチドグリカン細胞壁を持たない (β-ラクタム剤は無効)

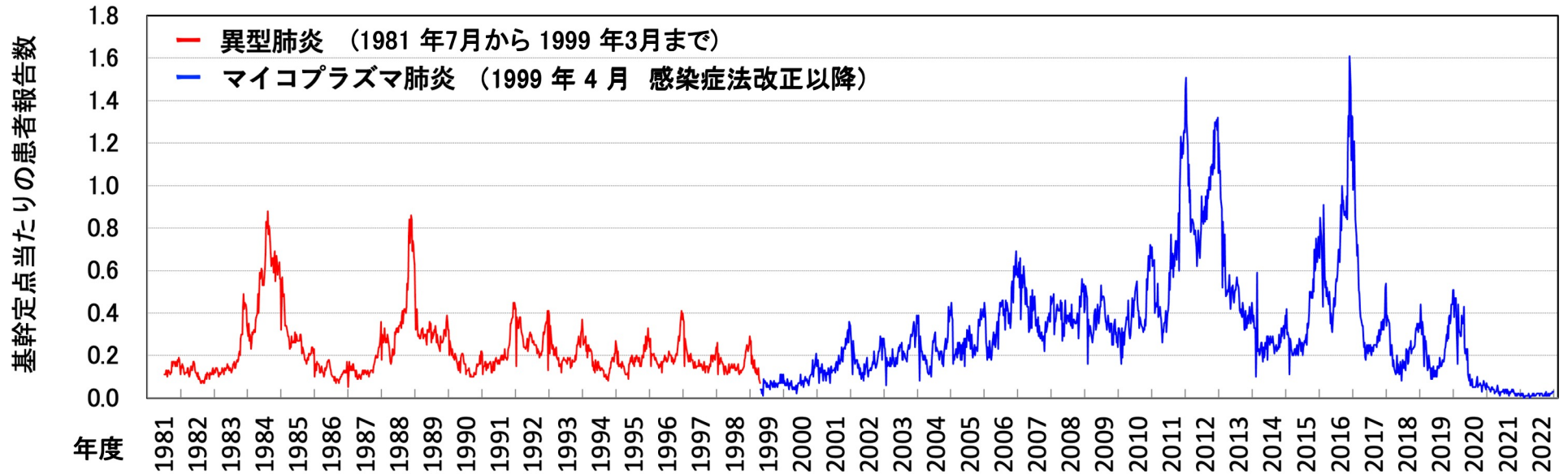
0.45 μm メンブランフィルターを通過する

ゲノムサイズが小さく (約 800 kb)、UGA コドンを Trp に翻訳する

P1 タンパク質による細胞接着は病原性を発揮するための重要な要素

マイコプラズマ肺炎の感染症発生動向調査

5 類感染症 定点把握疾患（基幹定点： 全国約 500 カ所 300 床以上の病院）

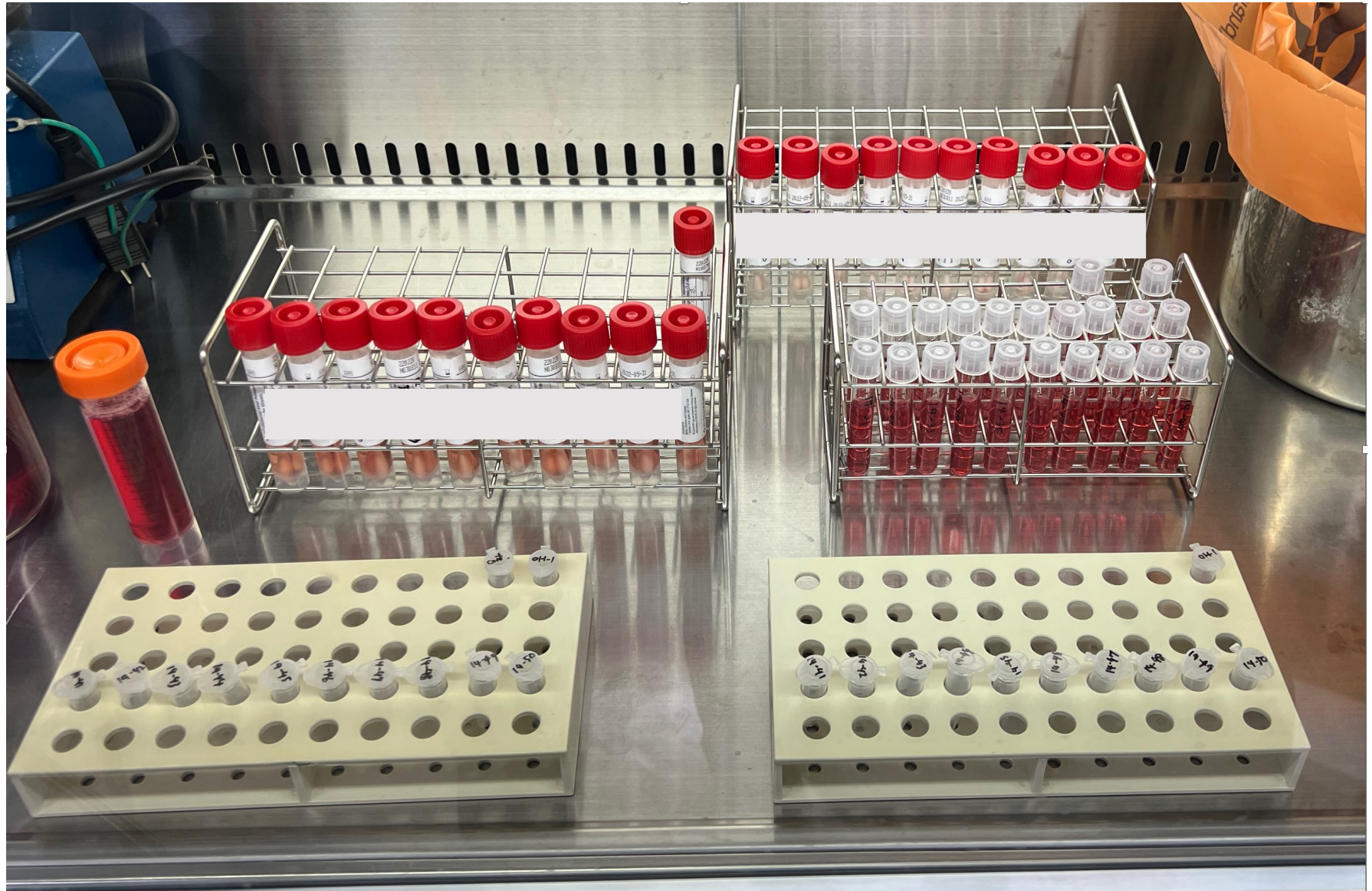


季節性があり秋冬期に発生数が多い。

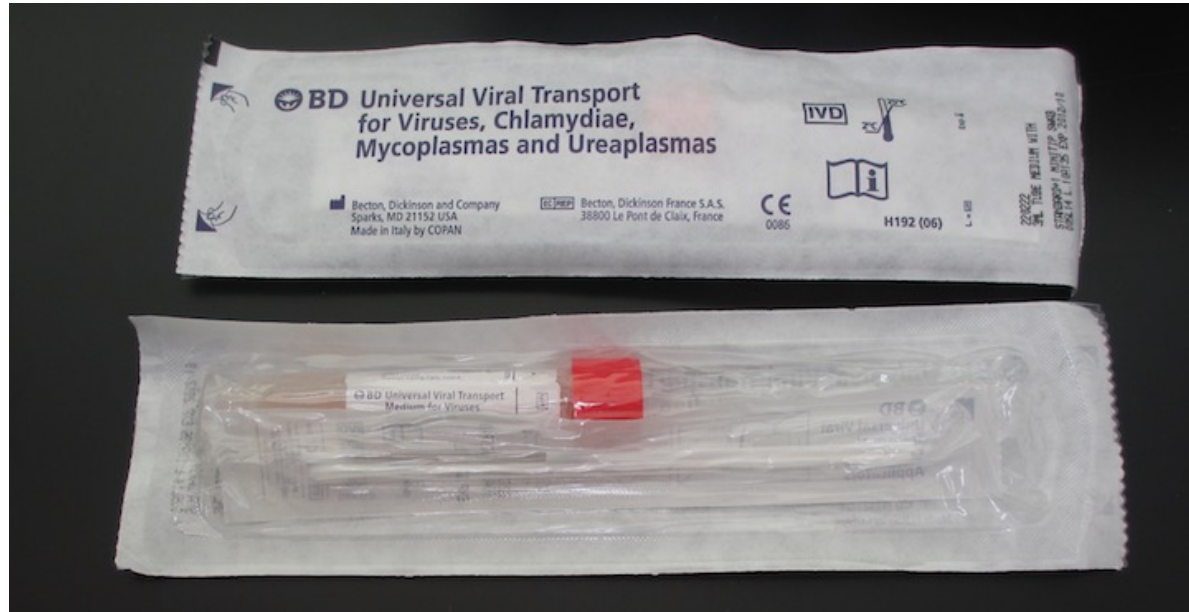
数年ごとに大きな流行が起こることがある（オリンピック肺炎）。

COVID-19 パンデミック後は、発生数が激減、季節性の流行もなくなっている。

M. pneumoniae の検査法

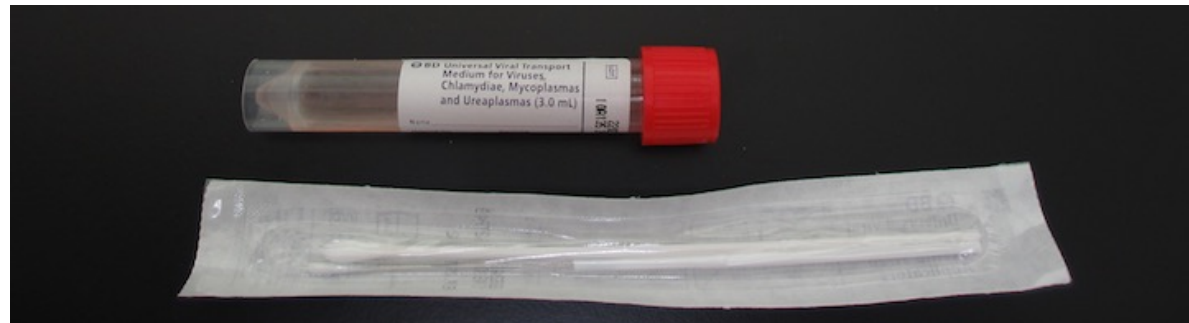


M. pneumoniae の検体採取 (咽頭スワブ)



3、4日なら
室温で輸送可能

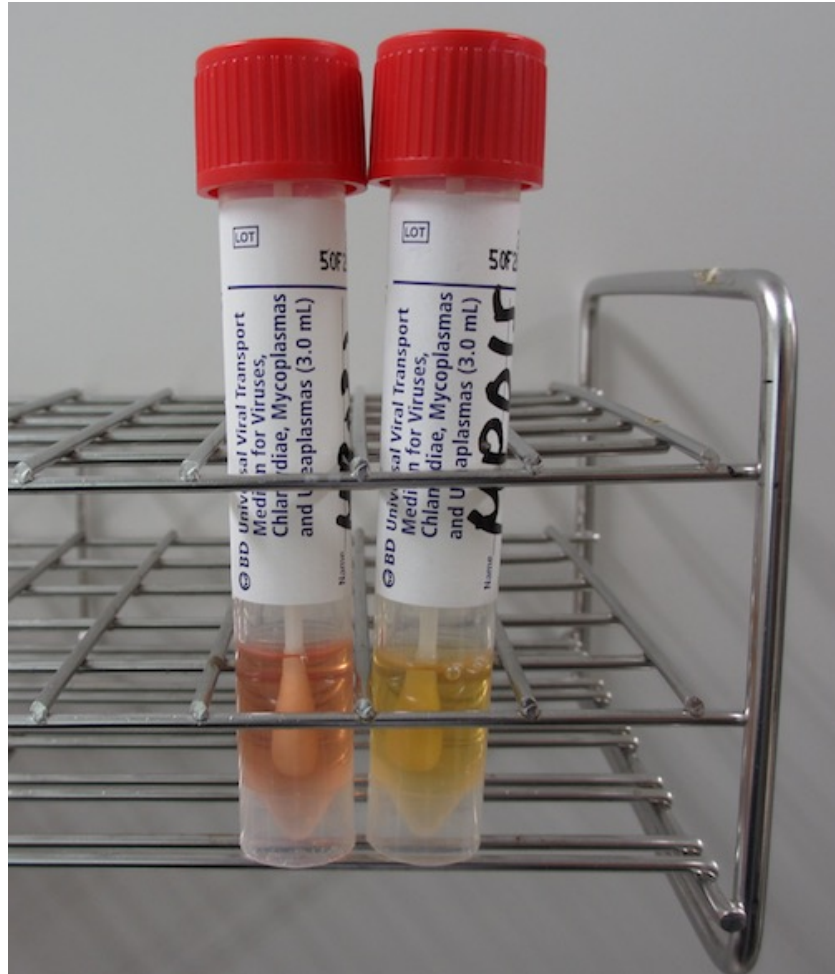
-80°Cで凍結すれば
長期保存可能



このキットではなく
培地での代用も可能

BD社 Universal Viral Transport for Viruses, Chlamydiae,
Mycoplasmas and Ureaplasmas

M. pneumoniae の検体採取 (咽頭スワブ)



3、4日なら
室温で輸送可能

-80°Cで凍結すれば
長期保存可能

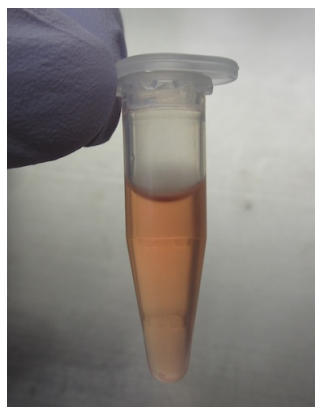
このキットではなく
培地での代用も可能

BD社 Universal Viral Transport for Viruses, Chlamydiae,
Mycoplasmas and Ureaplasmas

検体



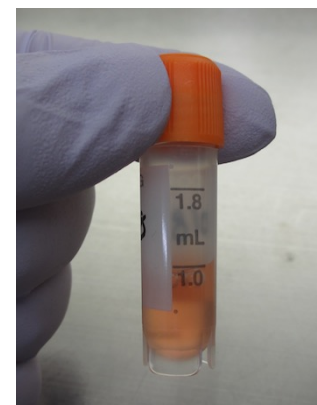
3等分
(約0.9 ml)



培養法



DNAを抽出し
核酸増幅検査
(LAMP, PCR)



凍結保存
- 80°C

培養法

PPLO 液体培地 (Hayflick 培地の変法)

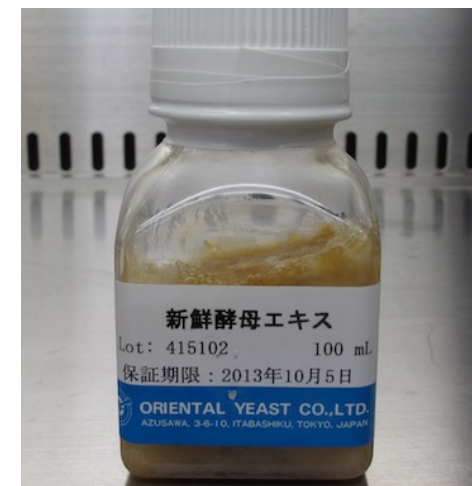
500ml あたり

PPLO Broth (Difco/BD)	10.5 g
粉末酵母エキス (Difco/BD)	2.5 g
フェノールレッド	10 mg
精製水	420 ml



添加物

ウマ血清 (Gibco) (非動化)	50 ml
新鮮酵母エキス	25 ml
25% ブドウ糖 溶液	5 ml
アンピシリン (50 mg/ml)	2 ml
(アンピシリン 終濃度 200 µg/ml)	



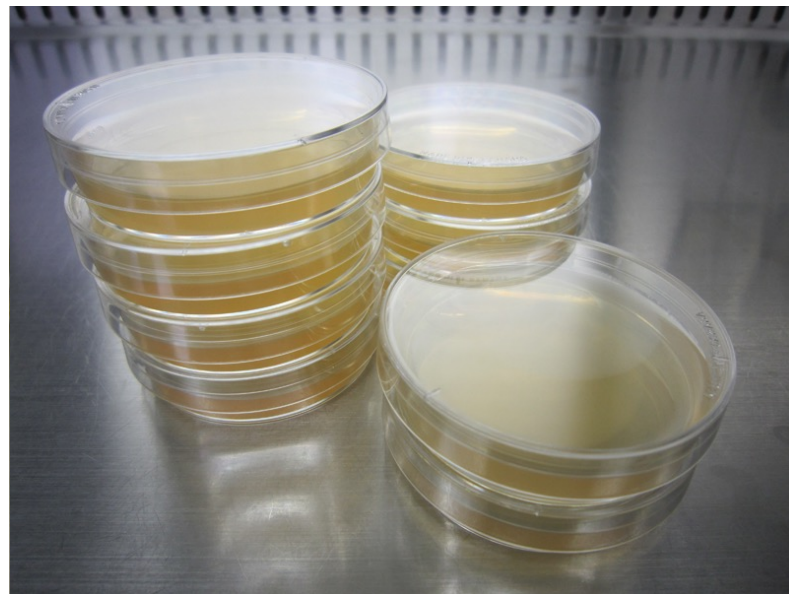
雑菌の増殖抑制のため酢酸タリウムやメチレンブルーを加えることもあるが感染研では使用していない。

培養法

PPLO 寒天培地 (Hayflick 培地の変法)

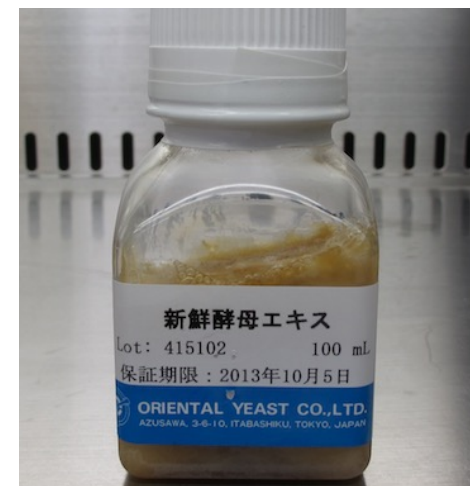
500ml あたり

PPLO Agar (Difco/BD)	17.5 g
粉末酵母エキス (Difco/BD)	2.5 g
精製水	420 ml



添加物

ウマ血清 (Gibco) (非動化)	50 ml
新鮮酵母エキス	25 ml
25% ブドウ糖 溶液	5 ml
アンピシリン (50 mg/ml)	2 ml
(アンピシリン 終濃度 200 µg/ml)	



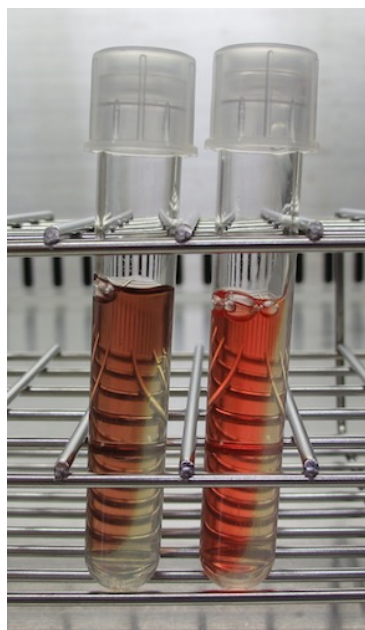
培養法

メチレンブルー添加 二層培地

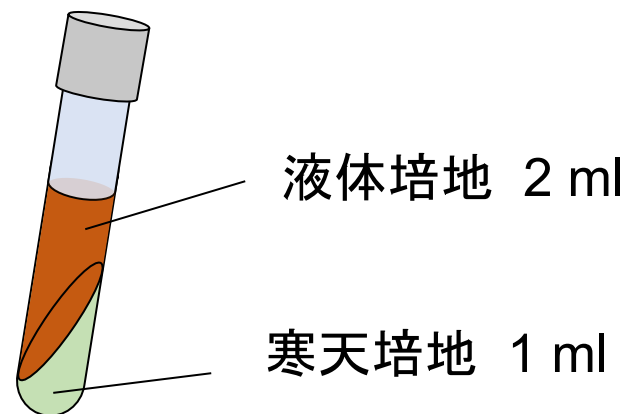
小試験管に寒天培地 1 ml を入れて固め、その上に液体培地 2 ml を重層した培地。

寒天表面で *M. pneumoniae* の増殖がよく、分離率があがるとされている。

メチレンブルーは雑菌の増殖を抑える。

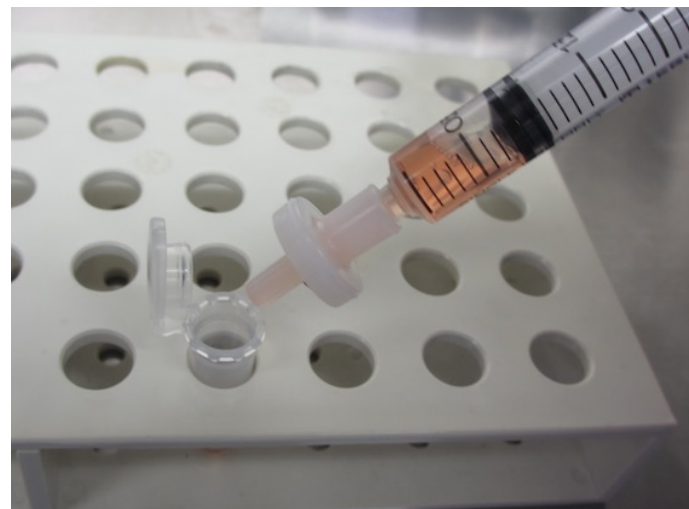


有 無
メチレンブルー



培養法

検体液の培地への接種



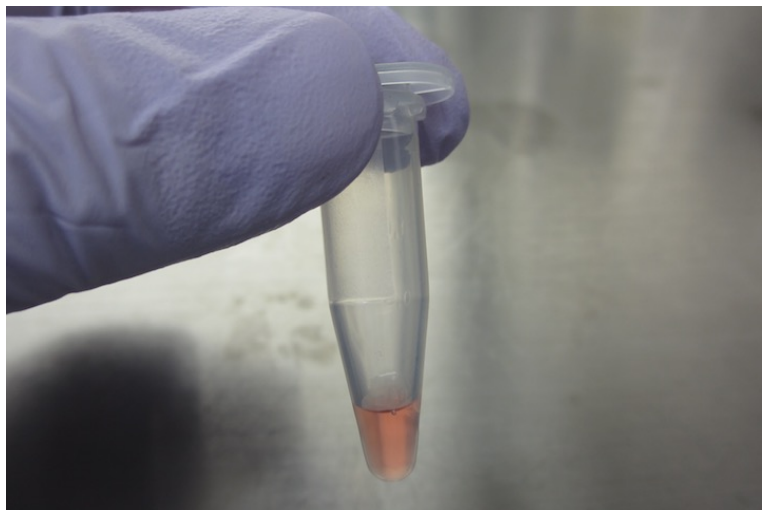
検体液を注射器でとり、 $0.45\ \mu\text{m}$ メンブランフィルターを通す。
(検体液が濁っている場合は、注射器にとる前に遠心器で軽く落とす。)

検体液をフィルターに通すことで、検出感度を少し下げる可能性もあるが、
雑菌の増殖をおさえる効果は大きい。

培養法

検体液の培地への接種

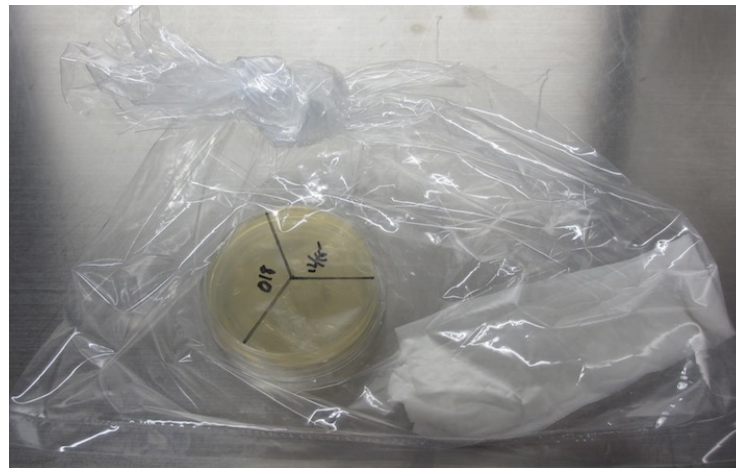
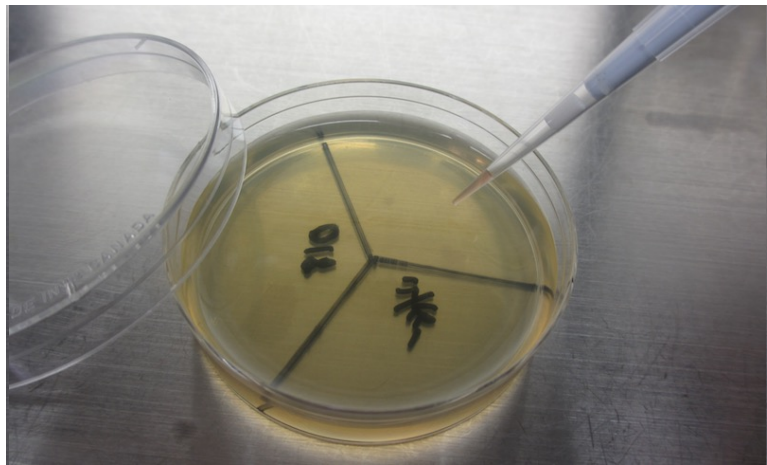
ろ過した検体を遠心 (卓上遠心器 15,000 rpm、10分)。
上清を捨て、沈渣を 100 μ l の PPLO 液体培地で懸濁。



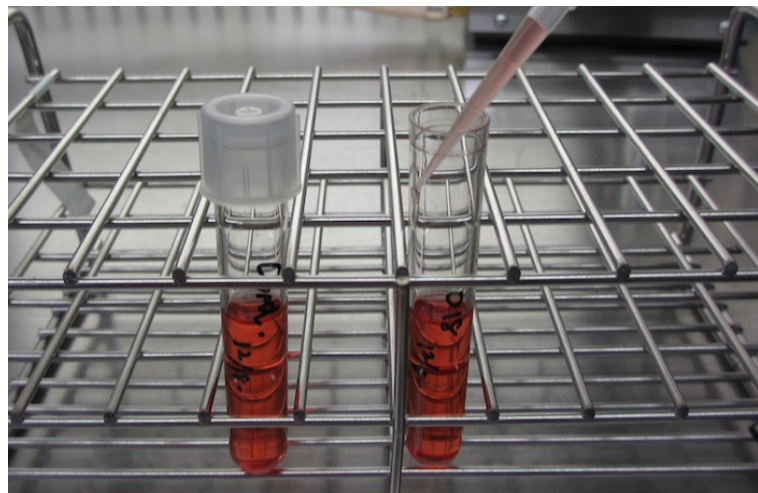
1/10 濃縮 検体液

培養法

1/10 濃縮検体液 5 μ l を PPLO 寒天培地にスポット接種



残りの濃縮検体液は 2~3 ml の PPLO 液体培地へ

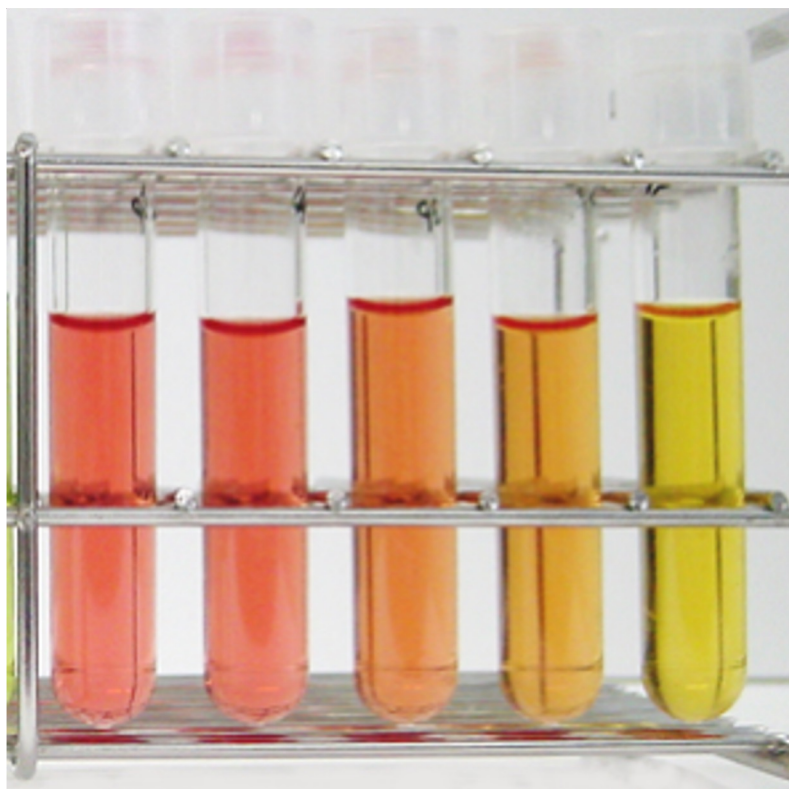


- ・ 培養が長期間なので、培地を乾燥させないようにする。
- ・ 液体培地は、色調変化の比較のため、菌を接種しない対照培地も培養する。

培養法

M. pneumoniae の増殖による PPLO 液体培地の色調変化

培養日数



検体から菌の増殖が見られるまでは少なくとも1週間、長い場合は1ヶ月程度かかる。

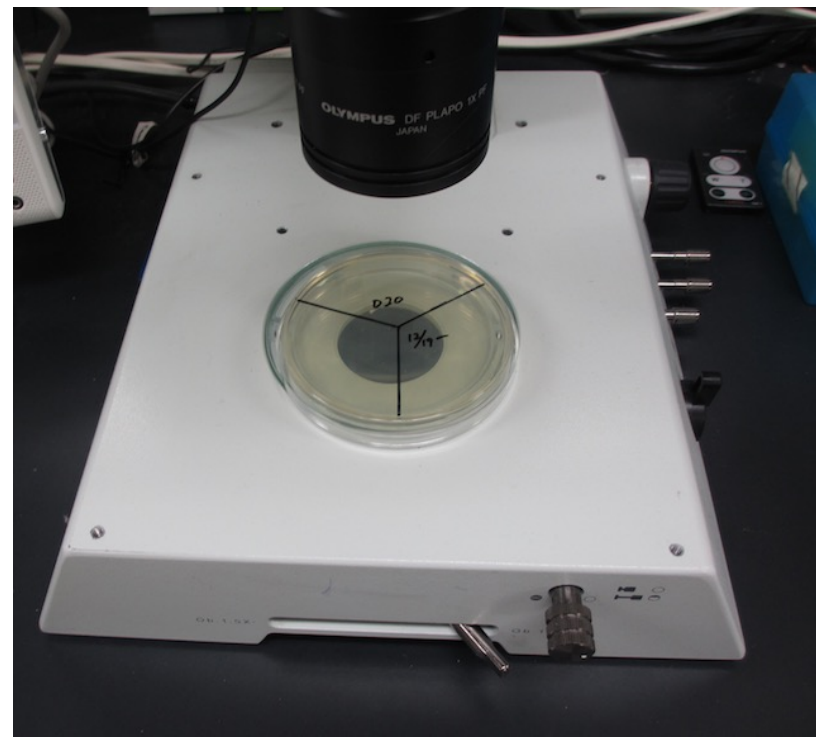
M. pneumoniae のグルコース代謝によって pH が下がり、培地が赤から黄色に変色する。

一般的な細菌が増殖した時と違い、培地はほとんど濁らない(透明なまま)。

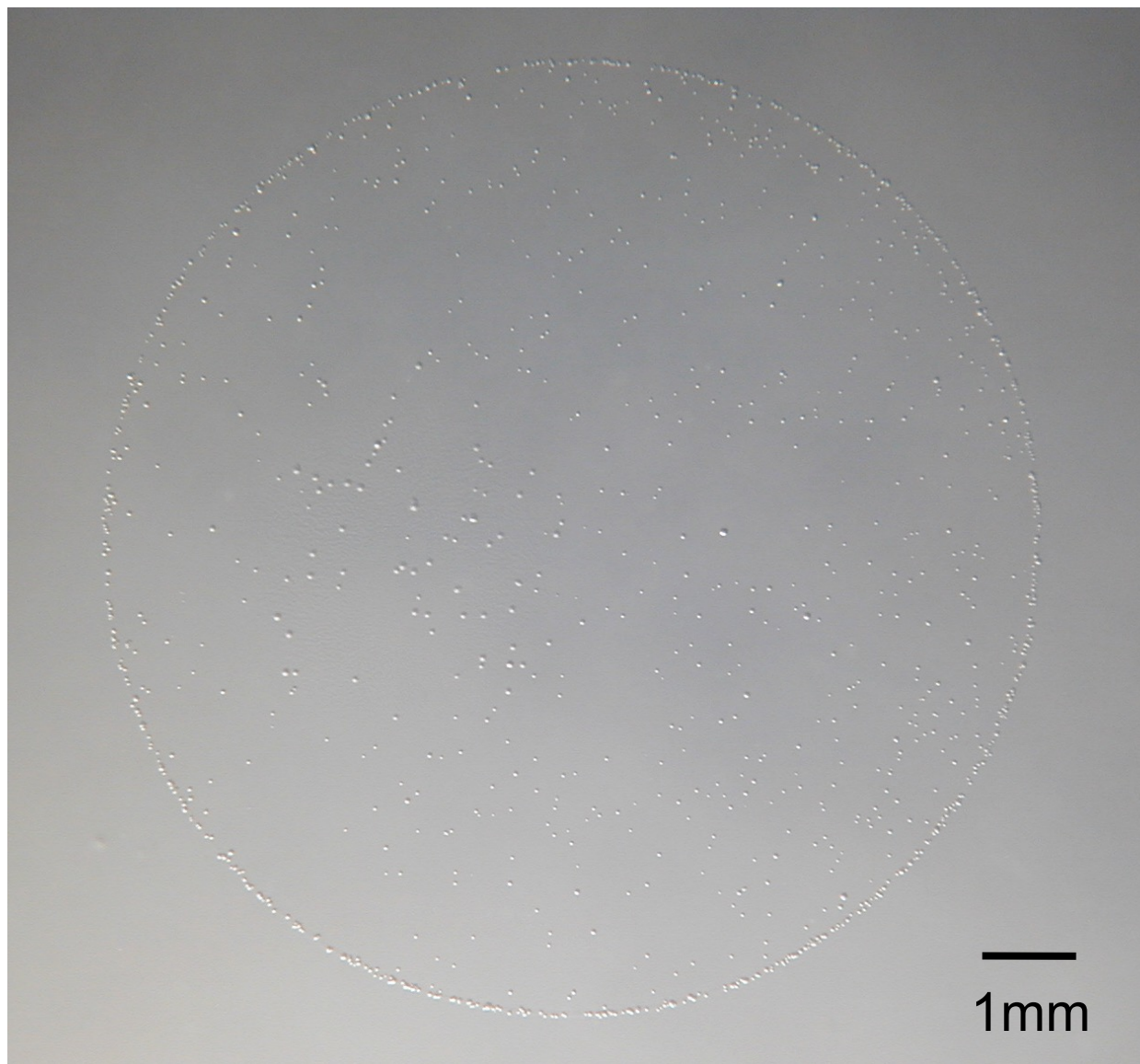
このくらいの色調になったら保存する。そのまま -80°C で凍結保存すればよい。

培養法

寒天培地に出現する *M. pneumoniae* のコロニーは、大きくても 0.1 ~ 0.2 mm 程度。実体顕微鏡で観察する。



培養法



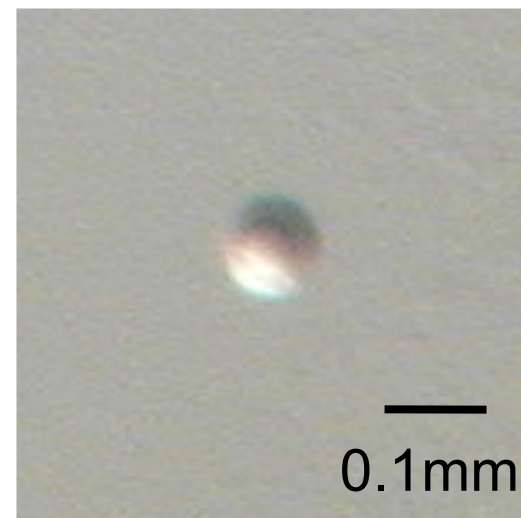
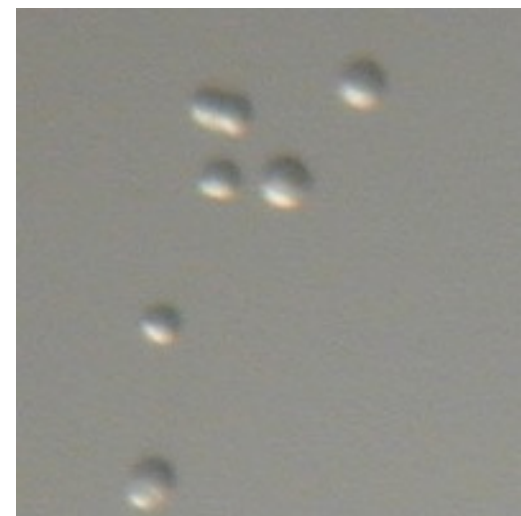
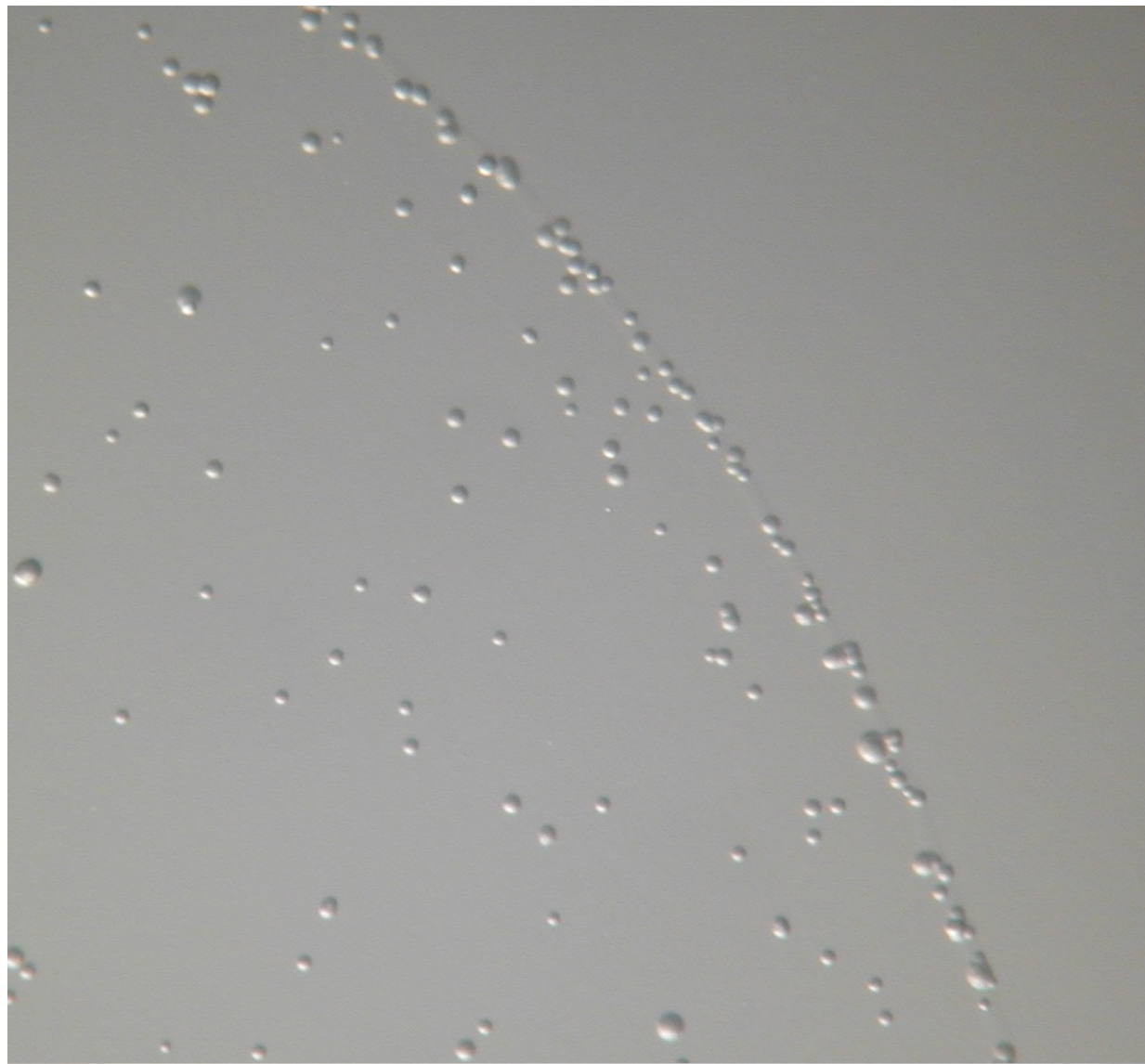
濃縮検体 5 μ l のスポットで 500個程度のコロニーが出現したとすれば、

$$= 10^2 \text{ CFU}/\mu\text{l}$$

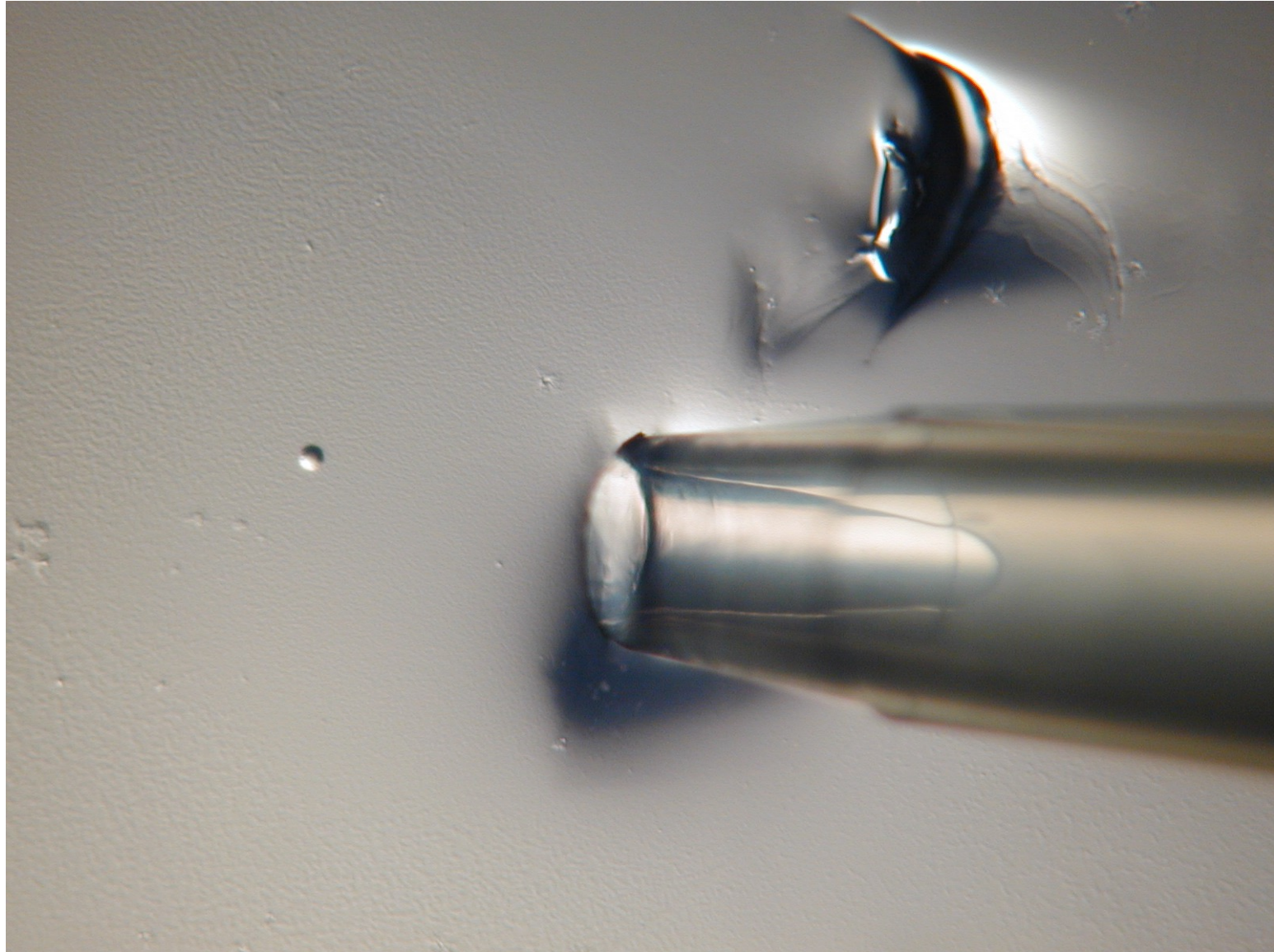
スワブ懸濁液中の推定菌数は

$$10^2 \times 1000 \div 10 \\ = 10^4 \text{ CFU}/\text{ml}$$

培養法



培養法



培養法

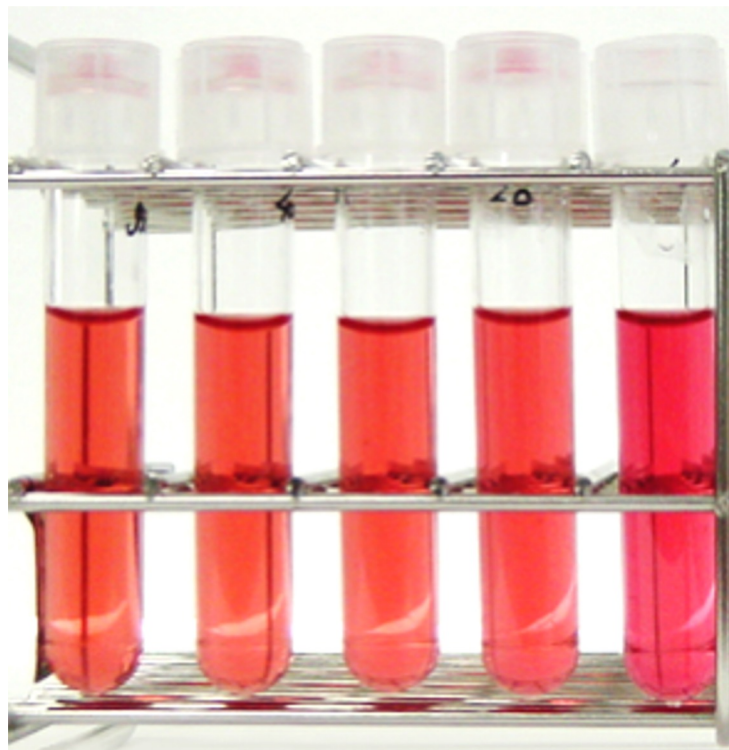


培養法



培養法

培養日数



口腔常在菌の

M. orale

M. salivarium

などはアルギニン分解性のマイコプラズマ

アルギニンの代謝によって pH が上がり
培地の赤色が強くなる。

寒天培地上のコロニー観察だけでは、
M. pneumoniae と区別できないこと
もある。

アルギニン分解性マイコプラズマの分離を目的とする場合は、PPLO液体培地の
グルコースをアルギニンに置き換えた培地を使用する（検出マニュアル 参照）。

培養法

血球付着試験 (hemadsorption test : HA test)



野生株
HA⁺

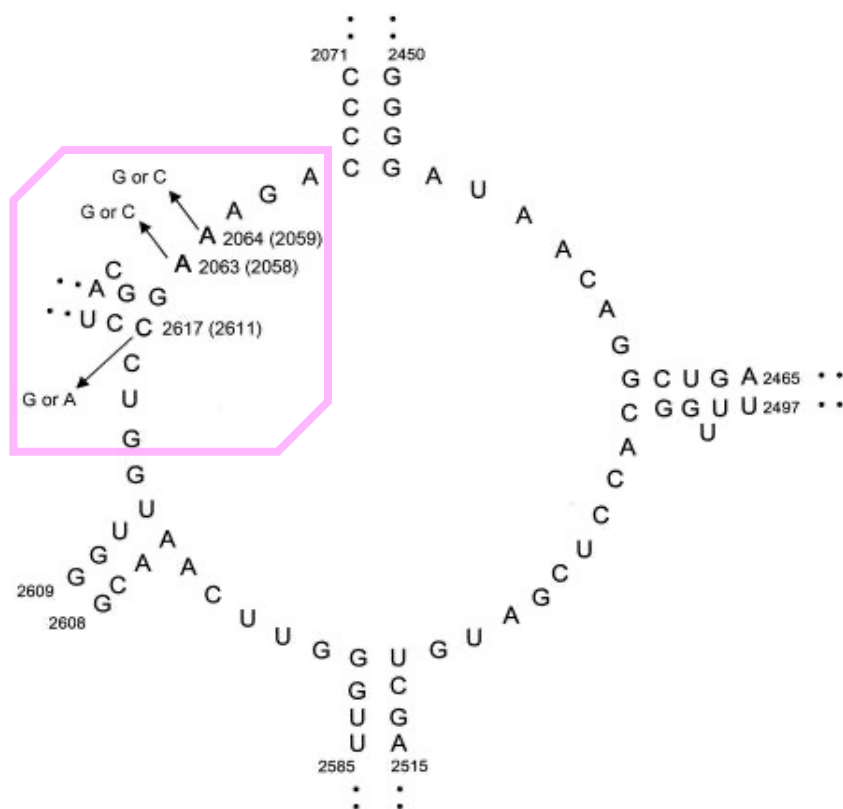
変異体
(非接着性株)
HA⁻

ヒトから分離される *M. pneumoniae*、*M. genitalium* は細胞接着性があるため、コロニーに赤血球などの細胞が付着する。
M. orale、*M. salivarium* などはこの性質がない。

分離株のマクロライド 耐性検査

臨床で特に問題となる *M. pneumoniae* の薬剤耐性はマクロライド耐性。

この菌のマクロライド耐性化機構は 23S rRNA 遺伝子の点変異のみ。



<i>M. pneumoniae</i> マクロライド耐性菌の 23S rRNA 遺伝子 既知の変異パターン	A2063G	高度耐性
	A2063C	
	A2064G	
	A2064C	中度耐性
	A2063T	
	C2617A	弱耐性
C2617G		

耐性株の大部分は **A2063G** 変異

分離株のマクロライド 耐性検査

M. pneumoniae 23S rRNA 遺伝子 (ドメイン V 領域部位 nt 1759-2685)

GCAGTGAAGAACGAGGGGGGACTGTTTAACTAAAACACAACCTCTATGCCAAACCGTAAGGTGATGTATATGGG
GTGACACCTGCCCAGTGCTGGAAGGTTAAAGAAGGAGGTTAGCGCAAGCGAAGCTTTTAACTGAAGCCCCAGT
GAACGGCGGCCGTA**ACTATAACGGTCCTAAGGTA**AGCGAAATTCCTAGTCGGGTAAATTCCGTCCCGCTTGAAT
GGTGTAAACCATCTCTTGACTGTCTCGGCTATAGACTCGGTGAAATCCAGGTACGGGTGAAGACACCCGTTAGG
CGCAACGGGACGGAAAGACCCCGTGAAGCTTTACTGTAGCTTAATATTGATCAGGACATTATCATGTAGAGAA
TAGGTAGGAGCAATCGATGCAAGTTCGCTAGGACTTGTGATGCGAAAGGTGGAATACTACCCTTGGTTGTGT
GCTGTTCTAATTGTTTCTTATCCAGTTTCAAGACAGTGTTAGGTGGGCAGTTTGACTGGGGCGGTTCGCCT
CCTAAAAGGTAA**2063**CGGAGGGCGTACAAAGGTACCTTCAGTACGGTTGGAAATCGTATGTAGAGTGTAATGGTGTA
AGGGTGCTTGAC**2064**ATACAGGTCGAACAGGTGAGAAATCAGGTCATA**2617**GTGGTCCAGTAT
GGAATGGCCATCGCTCAACGGATAAAAGCTACTCCGGGGATAACAGGCTGATACTGCCCAAGAGTTCATATCG
ACGGCAGTGTTTGGCACCTCGATGTCGACTCATCTCATCCTCGAGCTGAAGCAGGTCGAAGGGTTCGGCTGT
TCGCCGATTAAAGAGATACGTGAGTTGGGTTCAAACCGTCGTGAGACAGGTTGGTCCCTATCTATTGTGCCCG
TAGGAAGATTGAAGAGTGTGCTTCTAGTAC**CGAGAGGACCGAAGCGAGGAC**

23S rRNA 遺伝子はゲノムに 1 コピーのみ。

MN23SDVF: GCAGTGAAGAACGAGGGG

MN23SDVR: GTCCTCGCTTCGGTCCTCTCG

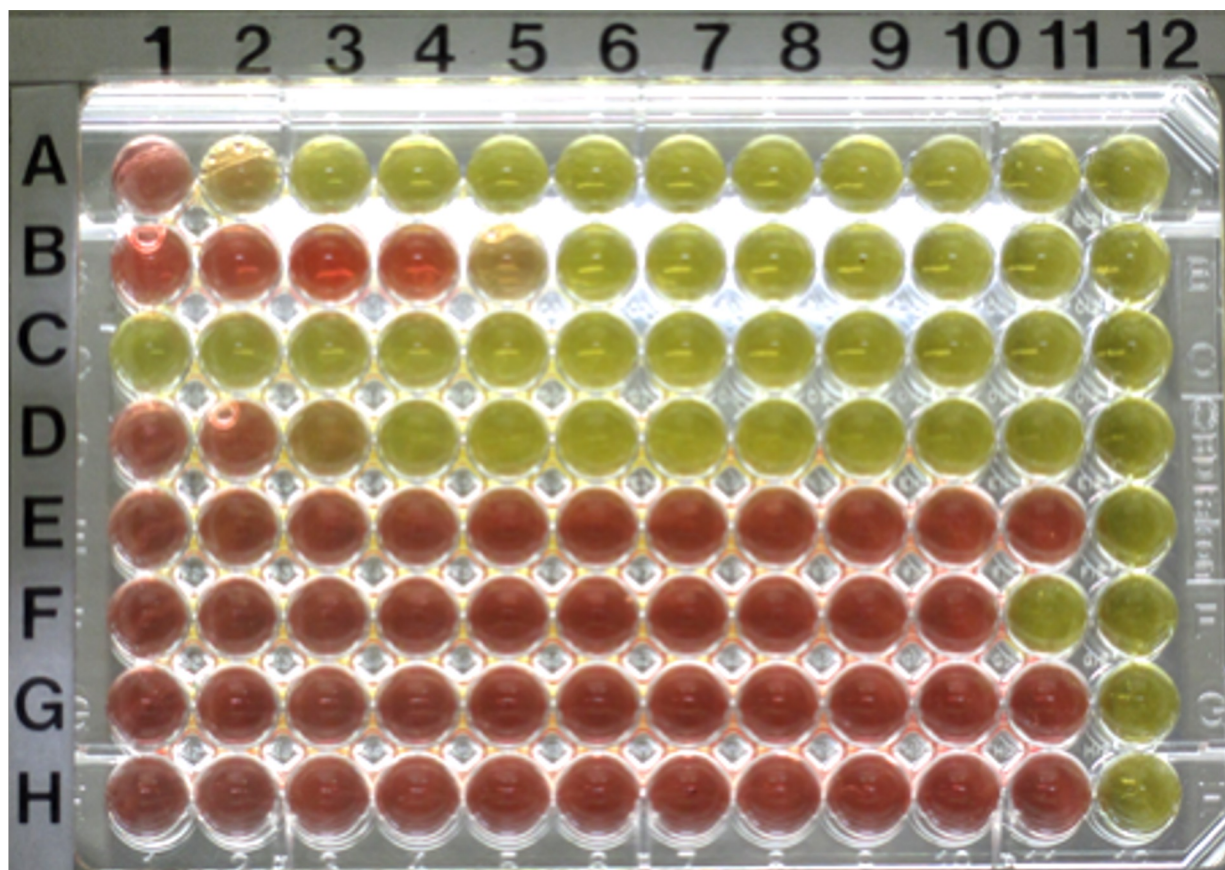
MN23SF1937 : ACTATAACGGTCCTAAGGTA

PCR用

Sequencing用

分離株のマクロライド耐性検査

MIC 測定：微量液体希釈法



クラリスロマイシン
アジスロマイシン
エリスロマイシン
クリンダマイシン
レボフロキサシン
シプロフロキサシン
ミノサイクリン
テトラサイクリン

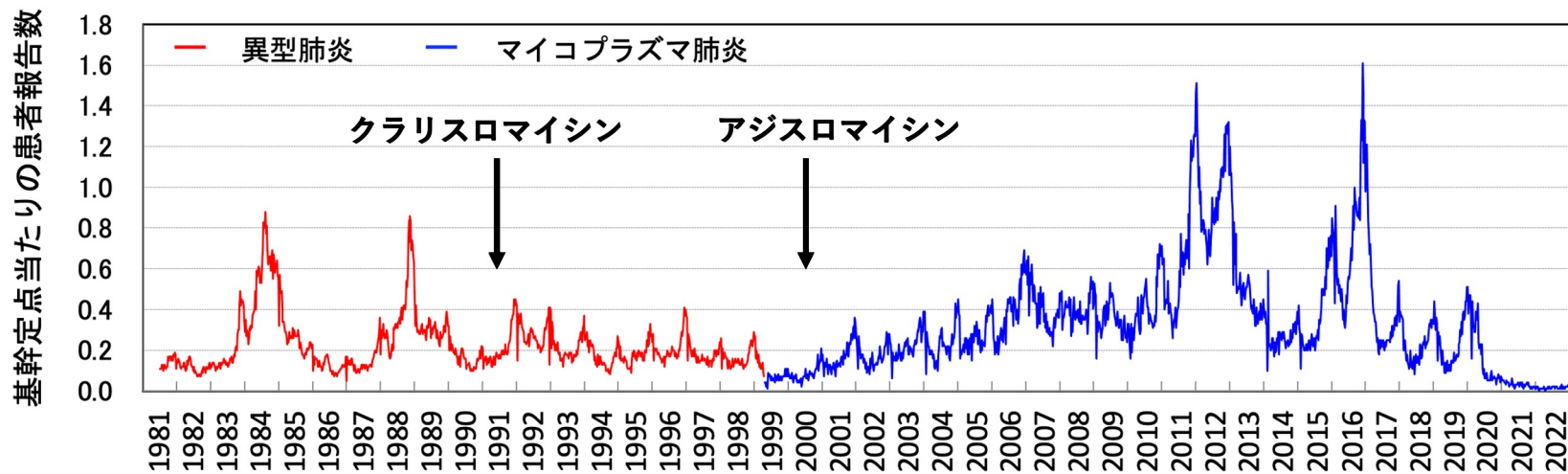
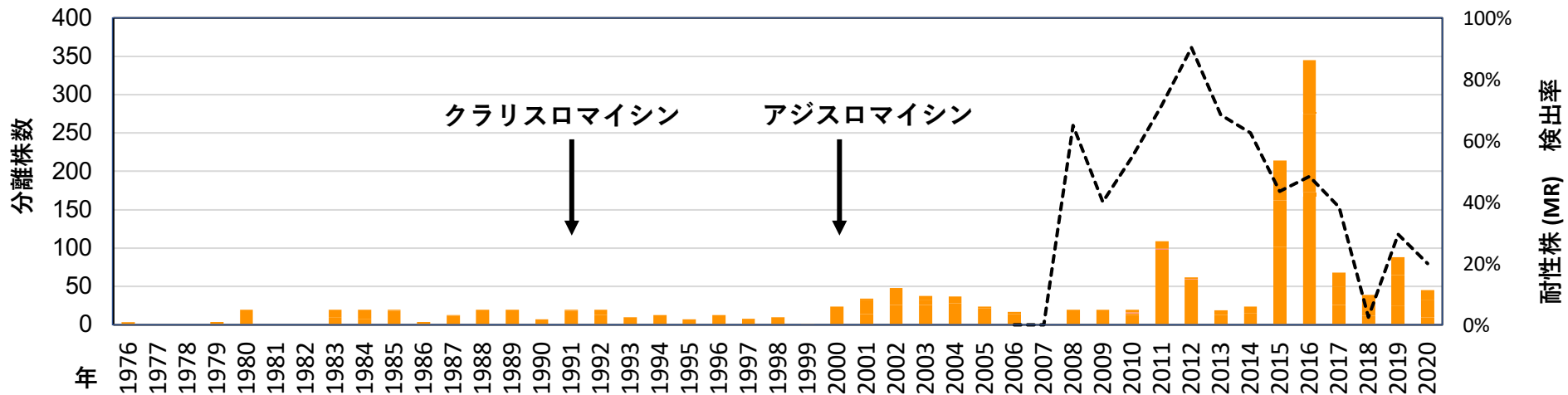
256 128 64 32 16 8 4 2 1 0.5 0.25 0

薬剤濃度 $\mu\text{g/ml}$

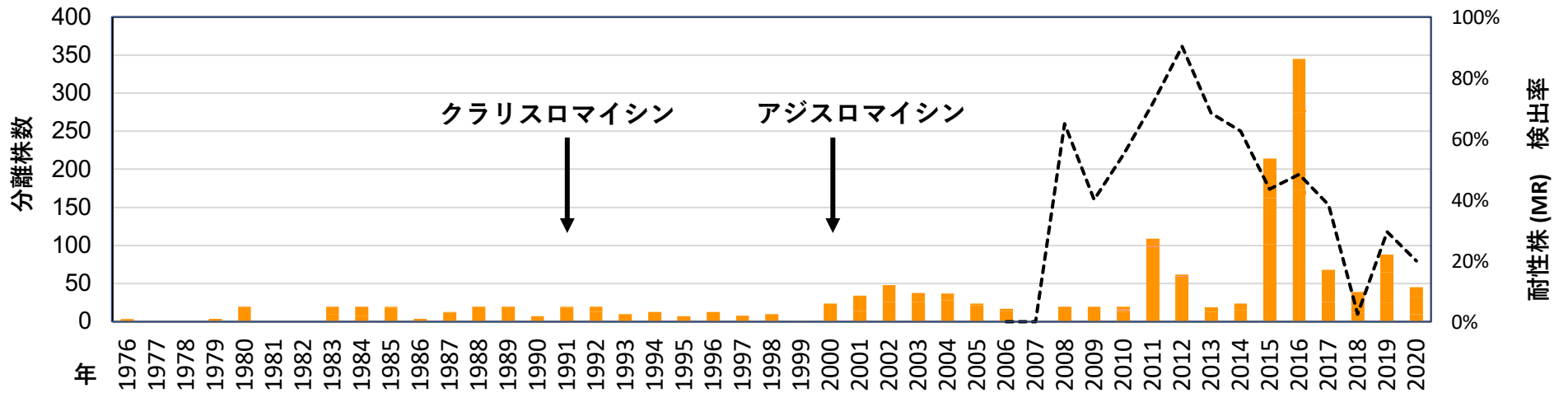
薬剤希釈系列の各ウエルに 菌を $10^4 \sim 10^5$ CFU/ml 程度になるように接種する。
37°C で一週間程度培養し、MIC値を判定する。

ドライプレートの利用なども可能。

日本国内における *M. pneumoniae* 分離株のマクロライド耐性と疫学的状況



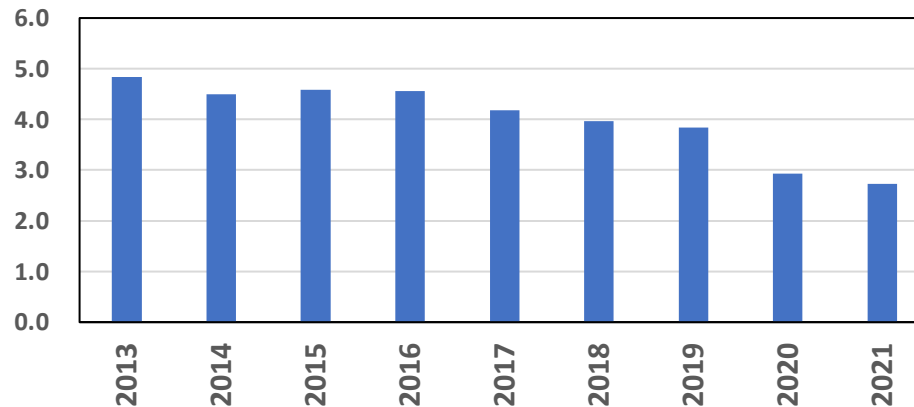
日本国内における *M. pneumoniae* 分離株のマクロライド耐性と疫学的状況



全国抗菌薬販売量サーベイランス

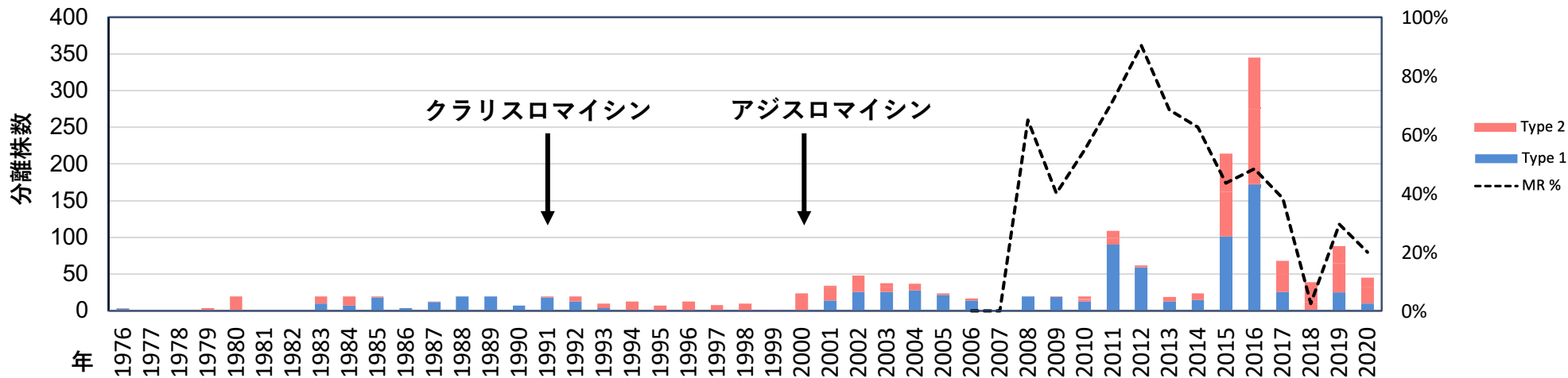
マクロライド

人口1000人1日あたりの使用力価



マクロライドは
販売量ベースで
2013年に比べて
2021年は46%減

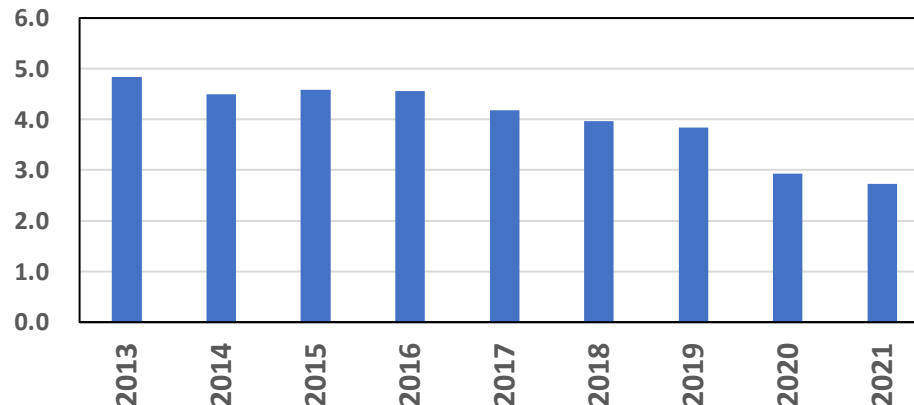
M. pneumoniae 分離株の 2 つの系統とマクロライド耐性、疫学的状況



全国抗菌薬販売量サーベイランス

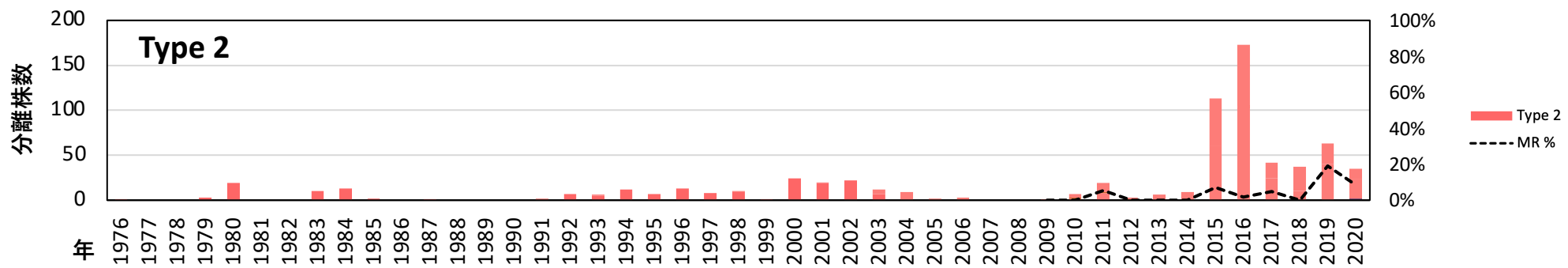
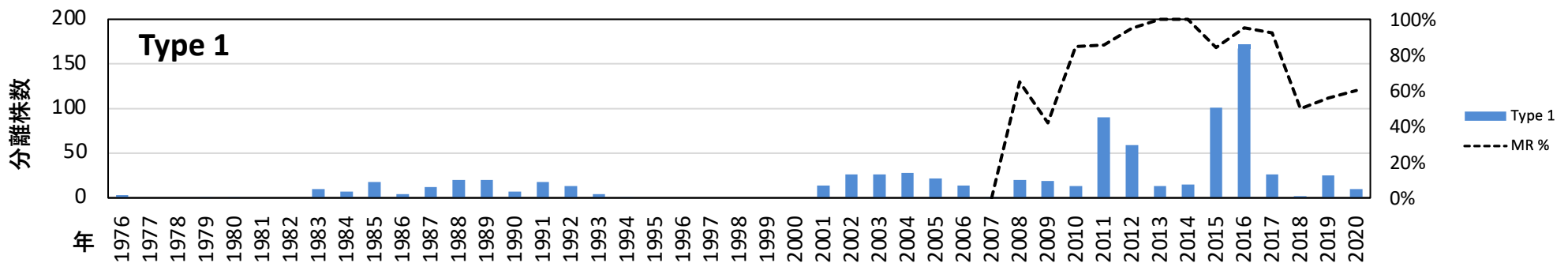
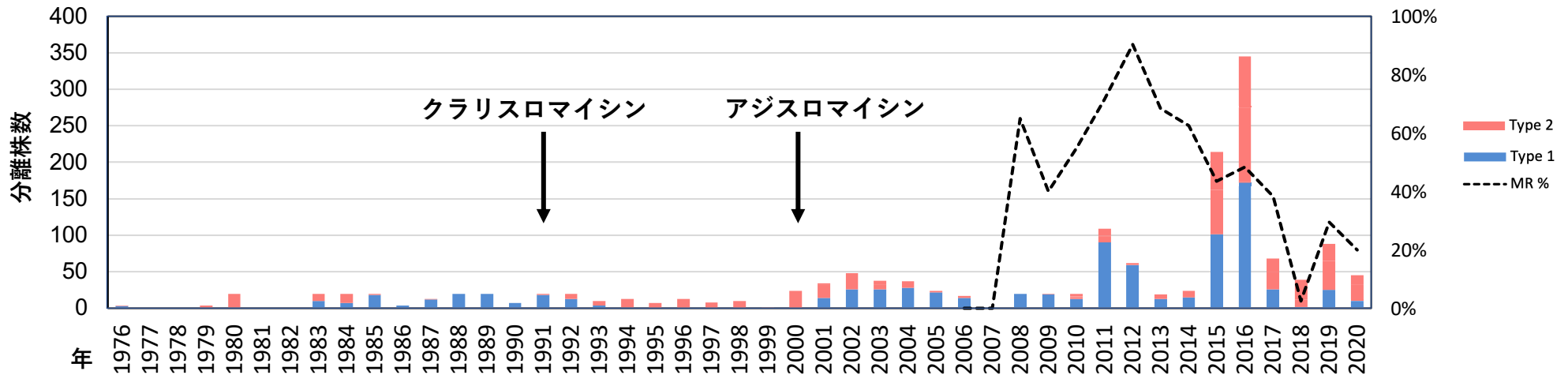
マクロライド

人口1000人1日あたりの使用力価

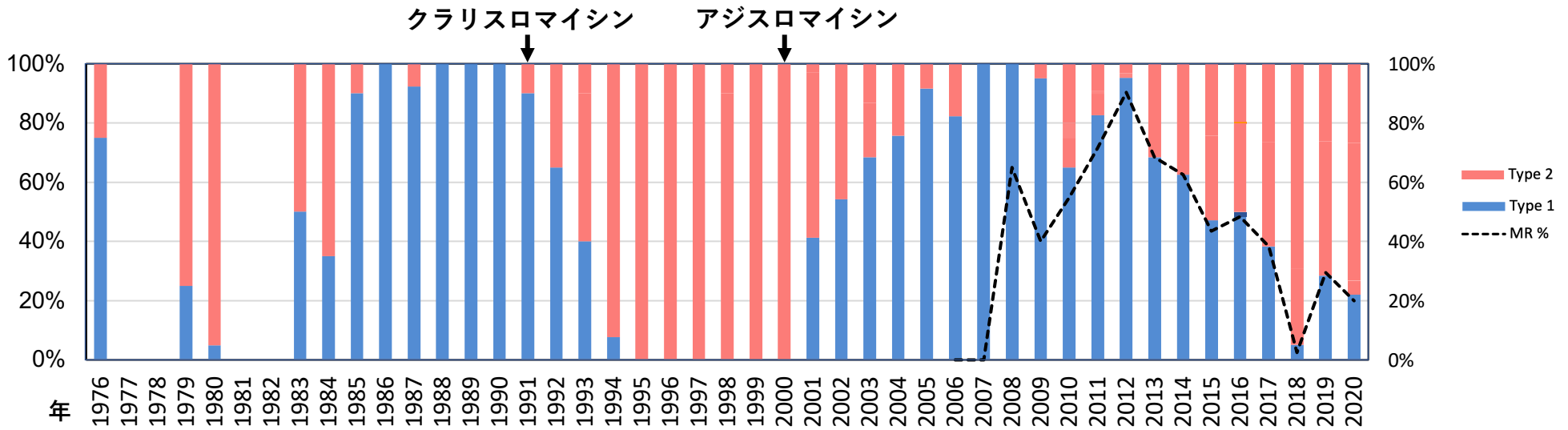


マクロライドは
販売量ベースで
2013年に比べて
2021年は46%減

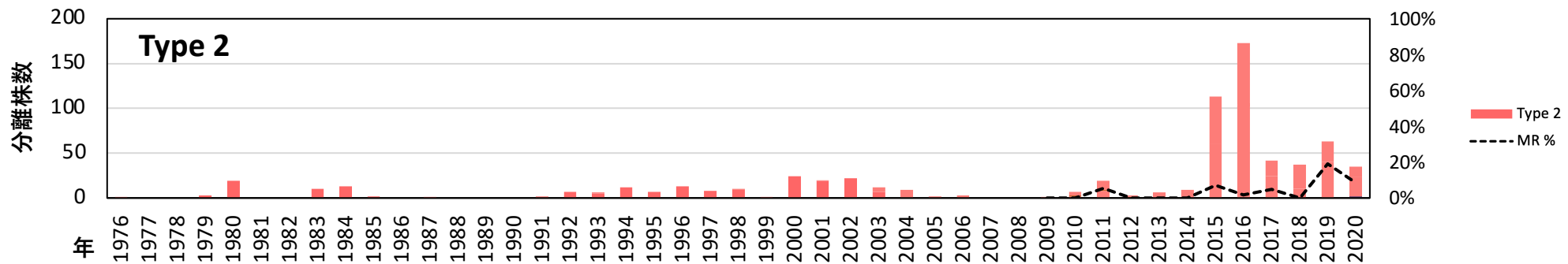
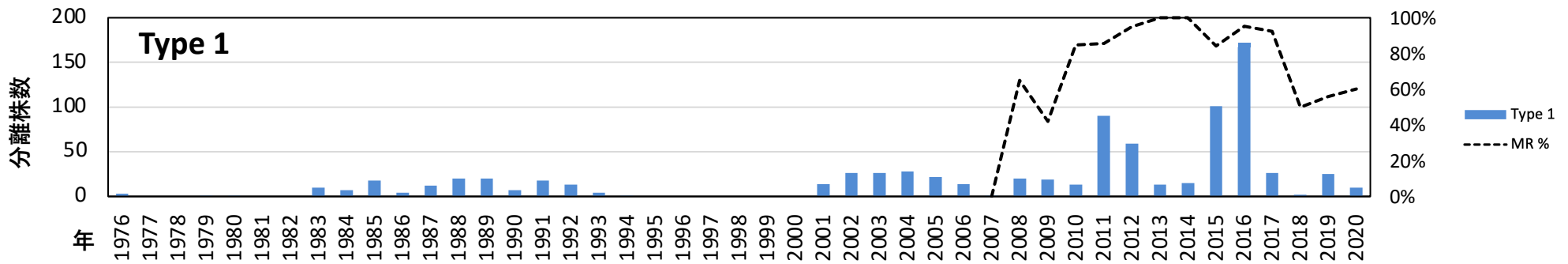
M. pneumoniae 分離株の 2 つの系統とマクロライド耐性、疫学的状況



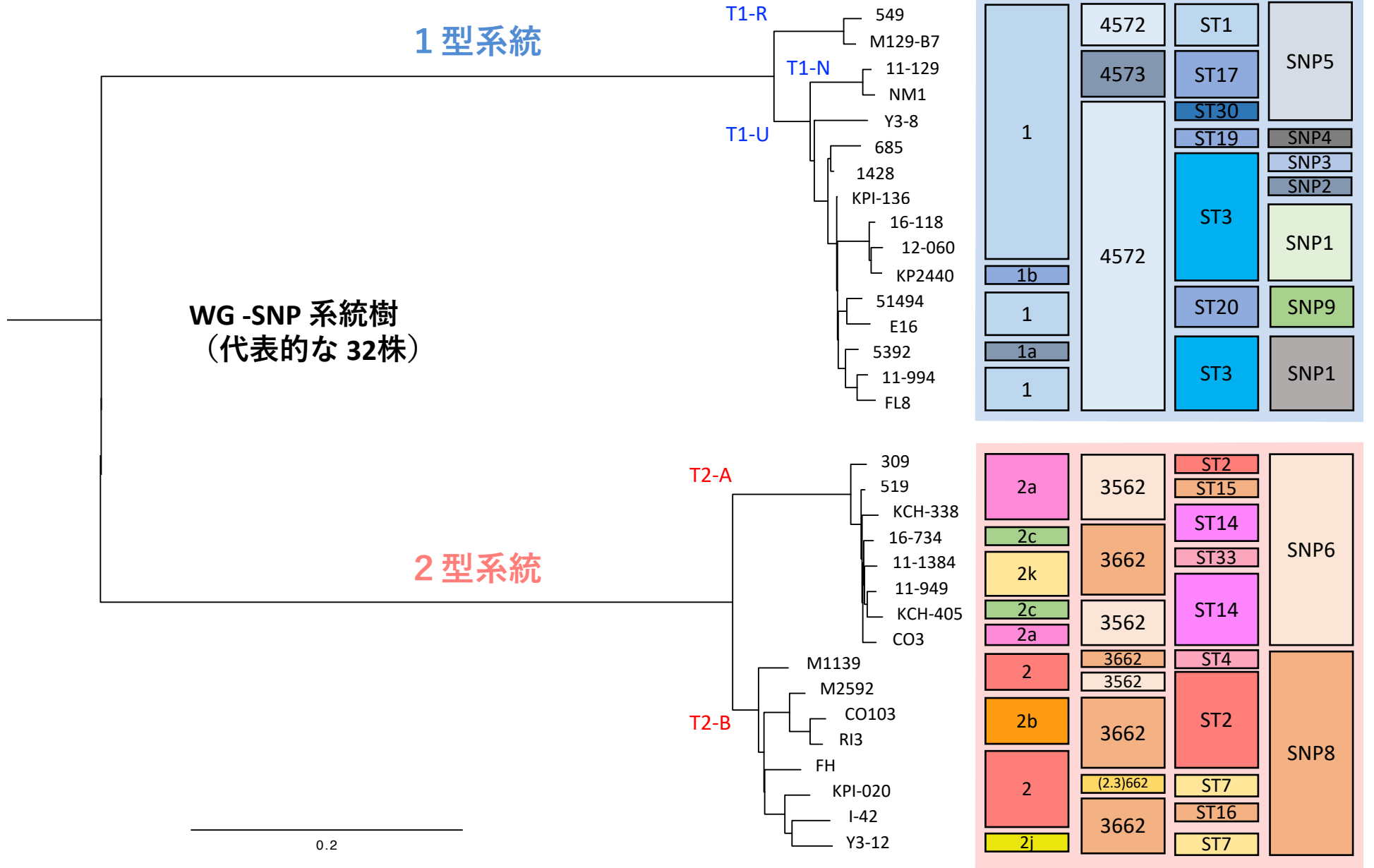
M. pneumoniae 分離株の 2 つの系統とマクロライド耐性、疫学的状況



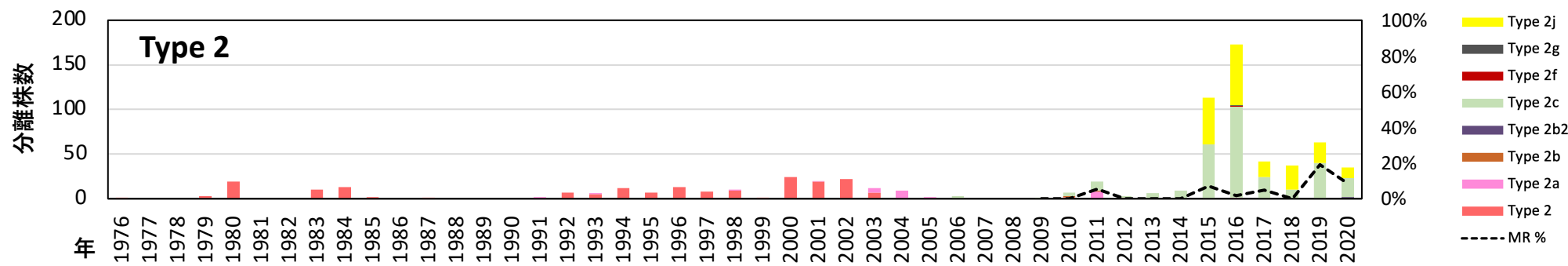
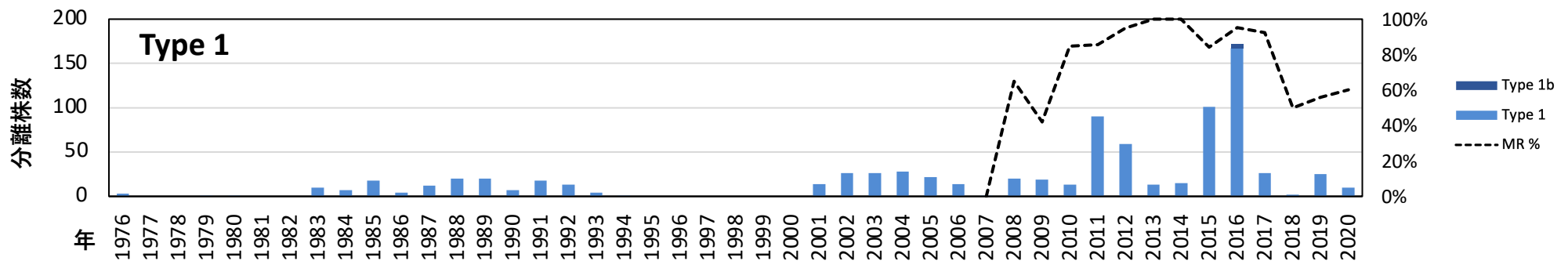
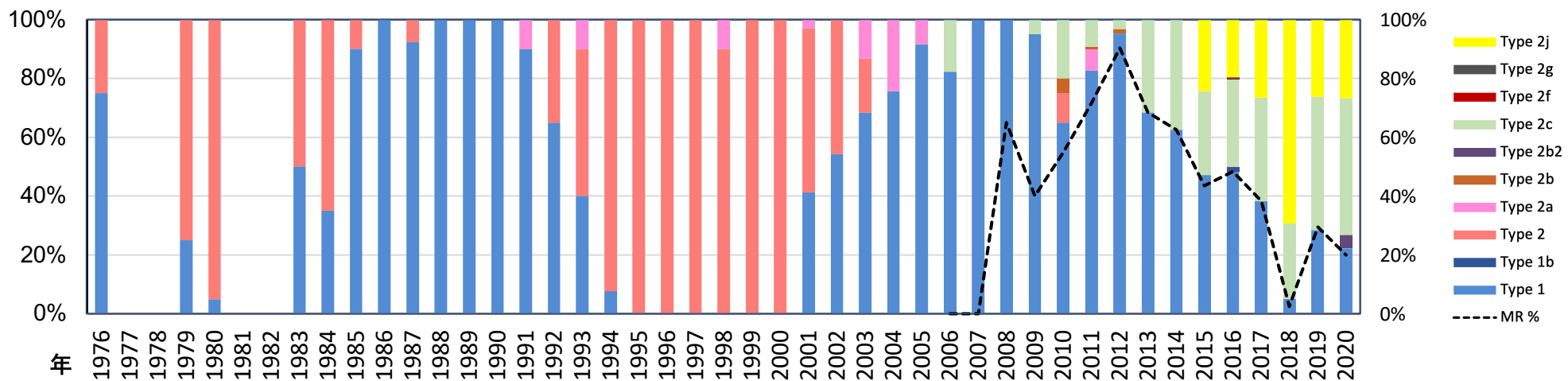
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/basic-science/bacteriology/9793-bac-2020-003.html>



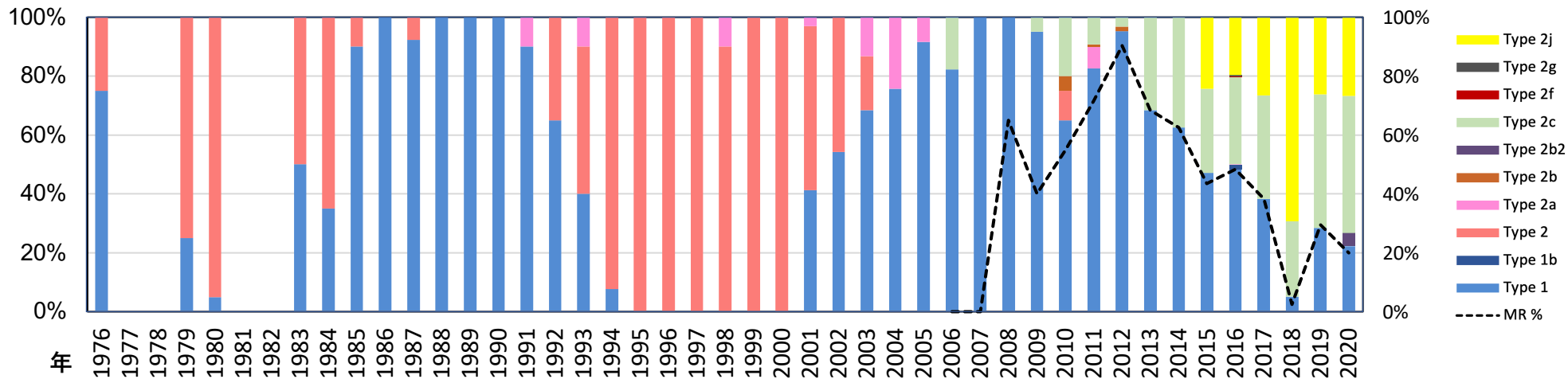
M. pneumoniae 分離株の遺伝子型



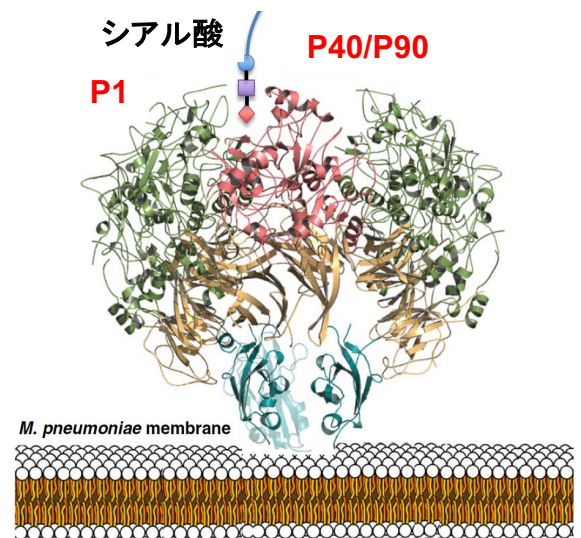
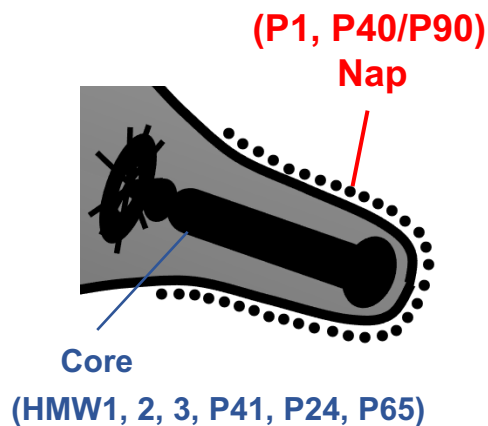
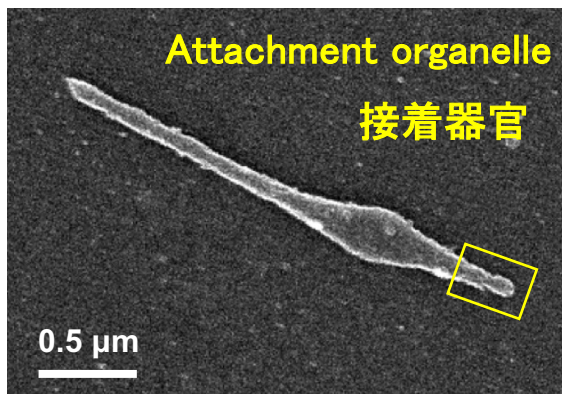
p1 遺伝子型で見た分離株の状況



p1 遺伝子型で見た分離株の状況



P1 タンパク質複合体 (細胞接着タンパク質)



Vizarraga, D. et al. (2020) Nat. Commun. 11, 5188

まとめ

COVID-19 パンデミックの影響でマイコプラズマ肺炎の発生は激減し、*M. pneumoniae* も分離されなくなっている。

今後、マイコプラズマ肺炎が再び発生してきたときは、

- ・ 2型系統の株の耐性状況はどうなっているのか？
- ・ 海外から耐性菌の流入は起きていないか？

など、調査を行う上で考えておくべきことがある。

M. pneumoniae の分離培養は、技術的には難しくないが、時間を要する。

検出診断だけが目的ならば、核酸増幅検査だけでよいが、分離株が得られれば、より詳しい疫学や細菌学的な調査が行える。

お問い合わせは、感染研 細菌第二部 見理 剛 にお願ひします。
kenri@niid.go.jp