

## モノクロナール抗体を用いた *Mycoplasma pneumoniae* の迅速検出法

岡山大学医学部細菌学教室 (主任: 金政泰弘教授)

寺 坂 薫

(昭和63年11月24日受稿)

**Key words:** *Mycoplasma pneumoniae*, 迅速診断法, モノクロナール抗体, 間接蛍光抗体法

### 緒 言

*Mycoplasma pneumoniae* (以下 Mp と略す) は細胞壁を有していないために、細胞壁の合成阻害剤である  $\beta$ -lactam 系抗生剤は無効であり、in vitro の成績からはテトラサイクリン系、マクロライド系、lincomycin, clindamycin が有効とされている。Mp がおこす疾患にマイコプラズマ肺炎 (Mp 肺炎と略す) があるが、現在、この診断方法として血清学的検査、培養法がある。しかし、これらの検査では結果を得るために2~3週間を要し、確定診断は retrospective にならざるを得ず、抗生物質の選択などのために発症早期に確実に診断する方法が必要となってくる。そこで、当教室では抗 Mp ウサギ IgG を作製し、間接蛍光抗体法により Mp 肺炎感染患者の咽頭拭い液より、Mp 抗原を発症早期に診断する方法を開発した<sup>1)</sup>。しかし、この使用抗体は Mp 抗原をウサギに免疫した後、血清を精製し得たポリクロナール抗体であり、その特異性や lot による抗体価の相違などの問題があり、間接蛍光抗体法での判定が困難な場合もあった。このため、より特異性の高いモノクロナール抗体を使用すれば、さらに判定が正確になるのではないかと考えた。そして Mp 抗原を BALB/c マウスに免疫し、このマウスの B-cell 由来のリンパ球と myeloma cell とを融合させてクローニングを行い、Mp に対するモノクロナール抗体を作製した。このモノクロナール抗体の Mp に対する特異性が高いことを ELISA で確認し、蛍光抗体法による患者の咽頭拭い液からの Mp 抗原の検査成績

をポリクロナール抗体の結果と比較し検討を行った。

### 材 料 と 方 法

#### 1. モノクロナール抗体の作製

##### 1) Mp 抗原の作製

Mp FH-Liu 株を Hayflick の培地で1週間培養後、15000×g 20分間遠沈で集菌し、phosphate buffered saline (PBS) で繰り返し洗浄した。最終的に PBS で100倍濃縮液とし、免疫用抗原として使用した。

##### 2) 免疫スケジュール

Mp 抗原と incomplete adjuvant を同量に混和し、0.1ml ずつ3日毎に2回、BALB/c マウスの皮下および筋肉内に注射を行った。さらに Mp 抗原を0.1ml ずつ3日毎に皮下および筋肉内に注射した。この時点で蛍光抗体法により抗体価が上昇している事を確認し、8日後ブースターとして Mp 抗原を0.2ml 静脈内に投与した (Fig. 1)。

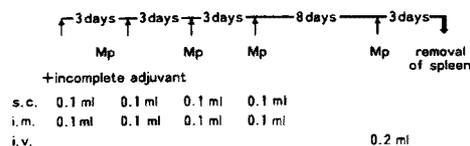


Fig. 1 Schedule of immunization  
Mp: *Mycoplasma pneumoniae*,  
s. c.: subcutaneous injection,  
i. m.: intramuscular injection,  
i. v.: intravenous injection

### 3) Myeloma cell の調製

Myeloma cell として X 63-Ag 8-6. 5. 3. を使用した。この細胞は10% dimethyl sulfoxide+60% RPMI1640培地 (ニッスイ)+30% fetal calf serum (FCS) に懸濁され、1 mlずつ凍結されている。この凍結 myeloma cell を37°C に急速に暖め溶解し、10ml PBS でよく混和した後に4°C で150×g 5分間遠沈し、上清を吸引除去した。この細胞をRPMI1640+10% FCS 5 ml で混和し、3日間、37°C の5% CO<sub>2</sub> incubator で培養した。

### 4) 脾細胞の調製

Mp 抗原で免疫したマウスを最終注射から3日後クロロホルムで麻酔し、70%メタノールでマウスの体表面を消毒し、脾臓を摘出した。PBS の中で脾臓をよくつぶし、4°C で1000×g 5分間遠沈した。上清を除き、赤血球を溶血させるために0.83% NH<sub>4</sub>C120ml で混和し遠沈を行った。さらに上清を除き、得られた脾細胞をPBS で懸濁した後、EAGLE-MEM (ニッスイ) 10ml に混和した。

### 5) 細胞融合

上記の如く細胞を調製し Fig. 2 の操作順序で細胞融合を行った<sup>23)34)</sup>。まず、myeloma cell および脾細胞を0.2%トリパンブルーで染色を行い、細胞数の計測をした。myeloma cell  $1.3 \times 10^6$ 個と脾細胞 $1.3 \times 10^7$ 個を混合し室温で100×g 5分間遠沈した。上清を除き、沈渣を37°C の water bath で温め、45% polyethyleneglycol (分子量4000) を約1分間かけて注入混和した。その後、4分間37°C の water bath で温め、Eagle-MEM を手早く入れた。この溶液を室温で300×g 7分間遠沈後、上清を捨て、脾細胞  $2 \times 10^8$ 個に対し100mlの割合に HAT 培地を加え懸濁した。

上記の懸濁液をそれぞれ0.2mlずつ96well plate にピペティングし、約7日間 CO<sub>2</sub> incubator で培養し、その後、0.1mlずつ HT 培地に置き換えた (fluid change)。この3日後 HT 培地0.1 ml で fluid change を行い、さらに4日後 normal medium (RPMI1640+10% FCS) に全量をかえ2週間培養を行った。

### 6) ELISA による抗 Mp 抗体のスクリーニング

ELISA の抗原蛋白は各マイコプラズマの膜面

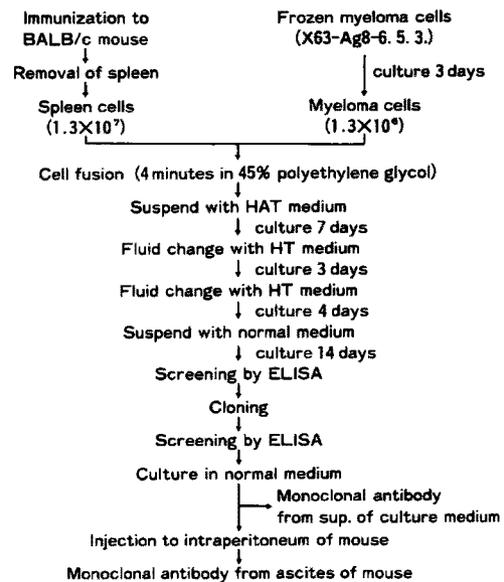


Fig. 2 Preparation of anti-Mp monoclonal antibody

分を使用し、その量はローリー法により蛋白量を計測した。この膜面分としては、PBS に入れた菌体を超音波破壊装置で破壊した後、17000×g、20分遠沈した上清をさらに100000×g、60分遠沈して得た沈渣を使用した。

Mp 抗原蛋白が10μg/0.1mlになるように調製し、ELISA 用の96well plate に0.1mlずつ加えた。4°C で1晩放置後、PBS+0.05% Tween20で3回洗浄した。次にPBS+0.5% Bovine serum albumine (BSA)+10% FCS を0.1ml ずつ各wellに加え、37°C で2時間保温後洗浄した。前項で得られた融合細胞の上清を0.05mlずつ加え、37°C で1時間保温後洗浄し、PBS+0.5% BSA+10% FCS で400倍に希釈した peroxidase 標識抗マウス IgG (Goat IgG) を0.05mlずつ加え、37°C で1時間保温後洗浄をした。最後に基質として citrate diluent (0.1M C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub> · H<sub>2</sub>O 48.6ml, 0.2M Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 51.4ml, d. w. 100ml) 10ml+o-phenylenediaminedihydrochloride 20μl+H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1/30) 40μl を0.1mlずつ各wellに加え、37°C で20分間反応させた。停止液として6 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> を0.05mlずつ加え色調の変化を見た。さらに、口腔内常在菌である *Mycoplasma*

*orale* (以下 Mo と略す) との交差反応を調べるため, Mo を抗原として ELISA を行った.

#### 7) クローニング

ELISA により Mp に対し強陽性で Mo に対し反応の弱い well の融合細胞を用いクローニングを行った. 直径 5 cm の plate に融合細胞が 5 ml に対し約 50 個になるよう normal medium で希釈した. 顕微鏡下に融合細胞をマイクロピペットで 1 個ずつ吸引し, 96well plate の各 well にそれぞれ移し, normal medium 0.1ml を加え, 約 2 週間培養を行った. この上清を用いて ELISA を行い, Mp に対し陽性で, Mo に対し陰性の well を選んだ.

#### 8) モノクローナル抗体の採取

##### (1) 培養上清

300ml culture bottle に RPMI1640+10% FCS を 30ml 入れ, 約 7 日間抗 Mp モノクローナル抗体産生の hybridoma を培養した. この上清液を 30% 硫酸塩析を行った. その後 PBS に透析し上清液を最終的に 7 倍に濃縮し IgG 画分を得た.

##### (2) 抗体の腹水化

生後 2~3 週齢の BALB/c マウスの腹腔内に pristane (Aldrich Milwaukee WIS U. S. A.) を 0.1ml 投与した. 7 日後に 0.5ml 中に約  $1 \times 10^7$  個の hybridoma が含まれるように濃縮し, 腹腔内に投与した. 7 日から 10 日後, 腹水が大量に貯留した時点で, 開腹し腹水を回収, 30% 硫酸塩析を行った. その後 PBS に透析し最終的にもとの腹水と同量の IgG 画分を得た.

#### 2. 蛍光抗体法における Mp 抗原の検出

Mp, Mo を薄く濁る程度に PBS に懸濁し, スライドガラスの上に薄く塗りつけ乾燥させ, アセトン固定を 10 分間行った.

この処理スマア-を 20 倍希釈の正常ヤギ IgG と室温で 20 分間反応させた. PBS で 3 回洗浄後, 一次抗体として抗 Mp モノクローナル抗体を 37°C で 20 分間反応させ, PBS で 3 回洗浄し更に, 二次抗体として anti-mouse IgG FITC を反応させた. PBS で洗浄した後, glycerine buffer で封入し, 落射式蛍光顕微鏡 (Olympus Tokyo) を用いて鏡検した.

#### 3. モノクローナル抗体に対する特異抗原の解析

最初に Mp, Mo の膜蛋白および Horse serum の SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE) を行った. SDS-PAGE は Laemmli らの方法に従った<sup>31)</sup>. ゲルは 10% (W/V) polyacrylamide gel を使い, 16cm×16cm, 厚さを 1.5mm とし, 泳動は 35mA の定電流, 4 時間で行った. このゲルから, Trans-Blot Cell (Bio-Rad) を使い Western blotting を行った. Blotting buffer は 20mM Tris-HCl+192mM Glycine+15% Methanol (pH8.3) を使い, 泳動条件は 200 mA, 16 時間で, PVDF Transfer Membrane (Immobilon8p: Millipore Bedford MA U. S. A.) にトランスファーした.

まず 1% スキンミルク (20mM Tris-HCl+250mM NaCl, pH7.5 で溶解) で membrane を 1 時間, コーティングし, ブロッキングを行った. 次に一次抗体として抗 Mp ポリクローナル抗体および抗 Mp モノクローナル抗体の 50 倍希釈を 2 時間反応させた. 二次抗体として前者には Goat anti-rabbit IgG Horseradish Peroxidase Conjugate (MBL) を, 後者には Western Blotting Grade Affinity Purified Goat anti-mouse IgG (H+L) Horseradish Peroxidase Conjugate (Bio-Rad Richmond CA U. S. A.) の 800 倍希釈を用い, 1 時間反応させた. 最後に過酸化水素水を含む HRP Color Development Reagent (Bio Rad Richmond CA U. S. A.) を membrane に反応させて発色させた.

#### 4. Mp 感染患者の咽頭拭い液における蛍光抗体法 (Fig. 3)

Mp 肺炎と思われる患者に強く咳をさせた後に, 咽頭後壁を滅菌スワブで強く擦過して得た採取粘液をスライドガラスに薄く均一に塗抹し, 風乾後, アセトンで 10 分間固定した. この標本を PBS で洗浄後, 前処置として 20 倍希釈の正常ヤギ IgG と室温で 30 分間反応させた. PBS で洗浄後, 一次抗体として 20 倍希釈の抗ウサギポクリクローナル IgG と抗マウスモノクローナル IgG を室温で 30 分間反応させた. さらに PBS で洗浄後, 二次抗体として前者には 50 倍希釈の FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (MBL) を, 後者には

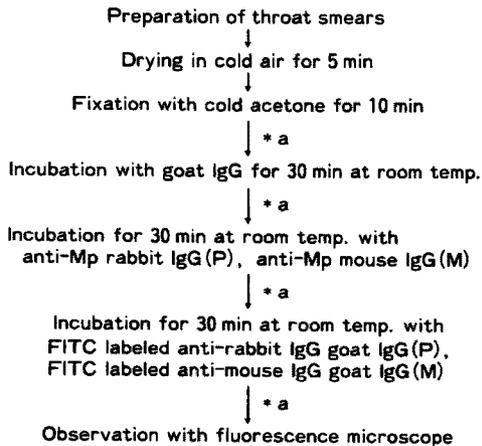


Fig. 3 Detection procedure of Mp from throat swabs by indirect immunofluorescence  
\* a : rinsing with PBS at 4 °C  
(P) : polyclonal antibody  
(M) : monoclonal antibody

50倍希釈の FITC 標識抗マウス IgG ヤギ IgG (KPL Gaithersburg Maryland) を室温で30分間反応させた。十分に PBS で洗浄後 glycerine buffer で封入し、落射式蛍光顕微鏡を用いて鏡検した。

## 結 果

### 1. モノクロナール抗体の作製

#### 1) ELISA による融合細胞のスクリーニング

Mp で免疫された BALB/c マウス 4 匹の脾細胞と、myeloma cell との細胞融合を行い、それぞれ 96well plate の well に分配した。そして各 well の上清を用い ELISA を行った。スクリーニングおよびクローニングの Mp, Mo の抗原蛋白量は  $10\mu\text{g}/0.1\text{ml}$  で行った。赤褐色になったものを陽性とし、色調の変化により +++、++、+、± とし、変化のなかったものを - とした。384well 中、51well が Mp に対し陽性であった。この 51well 中、Mp に対して +++ であった well は 20well あり、この中で Mo に対して ++ は 3well、+ は 14well、± は 2well、- は 1well であった。また Mp に対して ++ であった well は 21well であり、この中で Mo に対して ++ は 2well、+ は 7well で、± は 6well、- は 6well あ

った。

#### 2) クローニング

ELISA により Mp 抗原に対し +++ あるいは ++ で、Mo に対し ± あるいは - の 7well (1-4, 1-35, 1-71, 2-24, 2-47, 2-66, 2-85) の融合細胞を用いてクローニングを行った。融合細胞を希釈し、マイクロピペットで 1 個ずつ吸引し 96well plate の各 well にピペティングした。3 日間、培養を行い細胞上清の抗体価を ELISA で検討した。この結果、402well 中、35well にモノクロナール抗体産生の hybridoma が得られた。

### 2. 精製されたモノクロナール抗体の特性

#### 1) ELISA におけるモノクロナール抗体の特性の検討

ELISA をさらに詳しく検討するため抗原および一次抗体の box titration を行った。Mp 抗原は  $20.0$  から  $0.3125\mu\text{g}/0.1\text{ml}$ 、一次抗体は 2 から 1024 倍希釈で ELISA を行った。抗原は 1.25, 2.5,  $5.0\mu\text{g}/0.1\text{ml}$  で、一次抗体は 16 から 64 倍希釈で反応がわかりやすかった。

そこで抗原として Mp, Mo, *M. hominis* (Mh), *M. salivalium* (Ms), *Acholeplasma laidlawii* (Al) を、一次抗体として上清より得たモノクロナール抗体を用い ELISA を行った。ELISA の結果はマイクロプレート光電光度計を用い 414nm の吸光度で測定し、OD 0.4 以上を +++、0.3 から 0.4 を ++、0.2 から 0.3 を +、0.2 から 0.1 を ±、0.1 以下を - とした。コントロールとして、抗原の代わりに PBS を用いた。

まず Mp, Mo, Mh, Ms, Al を抗原として  $2.5\mu\text{g}/0.1\text{ml}$  を用い、一次抗体 (1-4-10, 1-4-11, 1-4-12, 1-4-18, 1-4-21, 1-35-11, 1-35-20 の上清) と二次抗体を反応させた。この結果 1-4-18 および 1-35-11 が特異性が高かったので以下にこの結果を記す (Table 1)。

1-4-18 (上清) では Mp に対して +++ が 4 倍希釈まで、+ が 16 倍希釈まで見られた。他の抗原に対しては Mh で + が 4 倍希釈までみられるのみでそれ以外はすべて ± あるいは - であった。また、1-35-11 (上清) では Mp に対して +++ が 256 倍希釈まで、+ が 512 倍希釈ま

でみられた。Mo に対しては 4 倍希釈まで、Mh に対しては 16 倍希釈まで ++ がみられたが、他はすべて + あるいはそれ以下であった。供試した中では特異性が高く抗体価そのものが高いのは 1-35-11 であったが、1-4-18 は抗体価は低いものの特異性は高かった。

上記の結果をふまえ、さらに腹水より得た 1-4-18、1-35-11 のモノクローナル抗体の ELISA を行った (Table 2)。抗原は Mp, Mo, Al を用いたが 2.5 $\mu$ g/0.1ml では過剰反応を起こし、抗原濃度を 1.25 $\mu$ g/0.1ml として実験を行った。1-4-18 では Mp に対して +++ が 2048

Table 1 ELISA of monoclonal antibody (supernatant) with mycoplasmas

(1-4-18)									
Ag. Ab.	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1024
Mp	##	+	+	±	-	-	-	-	-
Mo	±	±	-	-	-	-	-	-	-
Mh	+	±	-	-	-	-	-	-	-
Ms	±	±	-	-	-	-	-	-	-
Al	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(1-35-11)									
Ag. Ab.	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1024
Mp	##	##	##	##	##	##	##	##	+
Mo	##	+	+	+	+	+	±	±	±
Mh	##	##	##	+	+	+	+	+	±
Ms	+	+	+	±	±	±	±	±	±
Al	±	±	±	-	-	-	-	-	-

Mp : Mycoplasma pneumoniae. Mo : Mycoplasma orale.  
Mh : Mycoplasma hominis. Ms : Mycoplasma salivalium.  
Al : Acholeplasma laidlawii  
Ag : Antigen Ab : Antibody

Table 2 ELISA of monoclonal antibody (ascites) with mycoplasmas

(1-4-18)												
Ag. Ab.	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1024	× 2048	× 4096	× 8192
Mp	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
Mo	##	##	##	##	##	+	+	+	+	±	±	±
Al	##	##	##	+	+	±	±	±	±	±	-	-

(1-35-11)												
Ag. Ab.	× 4	× 8	× 16	× 32	× 64	× 128	× 256	× 512	× 1024	× 2048	× 4096	× 8192
Mp	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##	##
Mo	+	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±	±
Al	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Mp : Mycoplasma pneumoniae. Mo : Mycoplasma orale. Al : Acholeplasma laidlawii  
Ag : Antigen Ab : Antibody

倍希釈までみられたが, Mo に対しては16倍希釈, Al に対しては4倍希釈までみられるにすぎなかった。また1-35-11ではMpに対して+++が128倍希釈までみられたが, Mo に対して+はわずかに4倍希釈までみられるのみで他はすべて±以下であった。この結果1-35-11はもちろんのこと1-4-18でも腹水では抗体価は高く, この2種類のどちらかを間接蛍光抗体法の一次抗体として使用した。

#### 2) モノクロナール抗体に対する特異抗原の解析

Western blotting によればポリクロナール抗体では Mp 抗原に対し膜上に多数のバンドが見られたが, Mo 抗原に対してはバンドは数本しか見られなかった。さらに Horse serum でも数本のバンドが見られ, Mo 抗原との反応は Horse serum の contamination の影響が考えられた。

モノクロナール抗体 (1-4-18, 1-35-11) では Mp 抗原に対し膜上に一本の淡いバンドが見られた。1-4-18では分子量約80000, 1-35-11では分子量約50000の位置に反応が見られ, それぞれ違う種類の抗原に対する抗体と考えた。

#### 3) モデル型での蛍光抗体法による Mp 抗原の検出

抗原として Mp および Mo の培養菌体を, 一次抗体として1-35-11(モノクロナール抗体)を使用した。一次および二次抗体の至適濃度が

不明なため, 一次抗体は5倍から640倍を, 二次抗体は20倍から200倍を, 組み合わせて実験を行った。Mp, Mo を比較すると一次抗体は640倍, 二次抗体は200倍の最高希釈濃度まで蛍光発色に差がみられた。いずれも Mp に対しては細胞の部に一致して蛍光発色がみられたが, Mo に対しては発色はみられなかった。なお最終的には, 一次抗体は40倍希釈, 二次抗体は100倍希釈で Mp の蛍光発色が強く見易かった。

#### 4) Mp 患者の咽頭拭い液における蛍光抗体法に対する反応

患者のスマア採取と同時に血清抗体価として受身赤血球凝集反応 (PHA) を測定し, .ベア血清で4倍以上, 単独であれば320倍以上を Mp 肺炎陽性と判定した。陽性と判定された患者の咽頭拭い液は4例あり, 症例1ではPHAで320倍以上, 症例2では640倍以上, 症例3では320倍以上の抗体価があった。症例4では寒冷凝集反応 (CHA), PHA, 補体結合反応 (CF) のベア血清の検索を行っており, それぞれ初回検査に対し, 16倍, 8倍, 16倍の上昇が見られた (Table 3)。4症例とも咽頭拭い液の蛍光抗体法を行っているが, モノクロナール抗体では症例1, 2では細胞表面に diffuse に光っている部分と細胞外の部分に顆粒状に光っている部分とが観察された。症例3, 4では細胞表面に diffuse に光っている部分は見られたが細胞外の顆粒状の蛍光は見られなかった (Fig. 4)。一次抗体は1-4

Table 3 Indirect immunofluorescence and serological data of clinical cases.

Case	Sex	Age	Day	CHA	PHA	CF	Diagnosis	IF			
								(titer)		(type)	
								P	M-18	M-11	
1. A. S.	F	9	7		320		M. P.	+	+	+	1+2
2. K. F.	M	9	7		80→640		M. P.	##	##	##	1+2
3. T. S.	F	16	4		80→320		M. P.	+	+	+	2
4. K. I.	M	15	4	4→64	40→320	8→128	M. P.	+	+	+	2
5. N. M.	F	25					control	-	-	-	
6. K. T.	M	32					control	-	-	-	

PHA : Passive hemagglutination. CHA : Cold hemagglutinin. M-18 : Monoclonal antibody (1-4-18). CF : Complement fixation. IF : Indirect immunofluorescence. M-11 : Monoclonal antibody (1-35-11). M. P. : Mycoplasmal pneumonia. P : Polyclonal antibody.

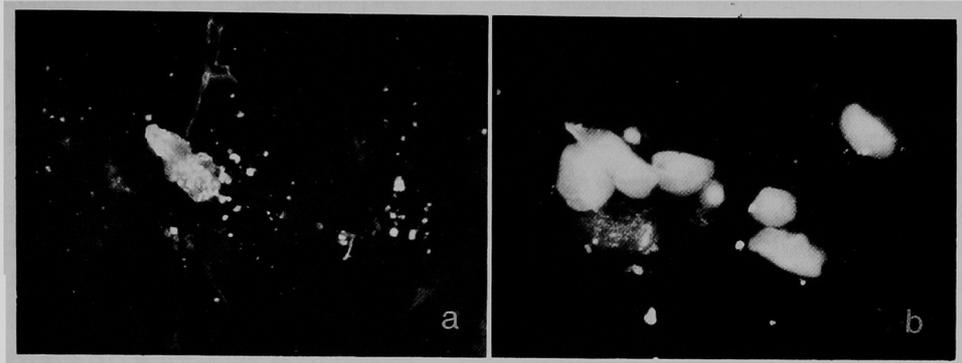


Fig. 4 Indirect immunofluorescence patterns of the throat smears from mycoplasmal pneumonia patients

a : The diffuse fluorescence on the entire surface of the epithelium and granular fluorescence in the mucus were observed (type 1 and 2).

b : The diffuse fluorescence was observed only on the entire surface of the epithelium (type 2).

—18と1—35—11の両者を使用した蛍光抗体法においては特に差はなかった。また、ポリクローナル抗体でもモノクローナル抗体と同様の所見であったが、バックグラウンドとのコントラストはモノクローナル抗体がはるかに強かった。さらにモノクローナル抗体では細胞表面からのdiffuseな蛍光は顆粒状の蛍光の集合体として見られるものも多数存在した。

コントロールとして健康人の咽頭拭い液の蛍光抗体法も行っているが、上記のような特異的な蛍光の発色は全く観察されなかった。

#### 考 察

Mp肺炎に対する血清学的診断法として、CHA, PHA, CFなどが行われている<sup>9)~11)</sup>のは周知の通りであるが、これらの検査もその特異性や感度という意味では、なお問題を残している。そこで抗Mp抗体の検出の感度および特異性を向上させるため、ELISA<sup>12)~15)</sup>、さらにはJacobら<sup>16)</sup>のM. P.の付着性蛋白(分子量168—kilodalton)を抗原として用いるdot ELISAなどの開発が行われている。特に最近、Mpに対するIgMがMp肺炎の早期診断に有用であるという文献が報告されており、IgMに対するELISA、間接蛍光抗体法、radioimmunoassayなどの有用性も論じられている<sup>17)~21)</sup>。

一方、咽頭拭い液の培養によりMpの分離を

行う方法も以前より行われている。この検出率を向上させる方法として、Tullyら<sup>22)23)</sup>はSP—4培地を用いて培養し、これを直接蛍光抗体法により観察する方法を考案しているが、この方法ではnormal mediumで培養した時より高い検出率があり不顕性感染の可能性も示している。

しかし、一般的な血清学的診断法および培養による菌の検出法は、いずれも約2週間から3週間以上の期間を要し、最も早く上昇するIgM抗体の検出にも1週間を要し<sup>18)</sup>、治療上これらの検査は有用とは言い難い。

最近になってMp肺炎に対する迅速診断法が望まれるようになり<sup>24)</sup>、石山<sup>25)26)</sup>のモノクローナル抗体を用いたavidin-biotin-peroxidase complex method(以下ABCと略す)による診断法、当教室の塩出<sup>1)</sup>によるポリクローナル抗体を用いた蛍光抗体法による診断法などの報告が散見されるようになってきた。

著者の方法は、Mpに対するモノクローナル抗体を用いた間接蛍光抗体法によってMp肺炎の迅速診断を行うものであるが、その結果を上述した石山および塩出らの方法と、比較しながら考察する。

石山の報告では、ハムスターをMpに感染させ、この咽頭拭い液を用いたABCにより迅速診断を行っている。この方法では、(1)多くの煩雑な操作過程を要すること、(2)咽頭拭い液の細胞が

剝離しやすく poly-L-lysine-coated slide を使用しなければならないこと、(3)細胞塗抹標本であり細胞同士の重なり合い等により background staining を生じ易いことなどの問題もあり、また実際に臨床で患者の診断を行ってはいない。著者のモノクロナール抗体を用いた Mp の迅速診断法は、塩出の方法をさらに発展させたものであり、非特異蛍光の問題は残しているが、操作は石山らの方法より簡便で、細胞同士の重なり合いによる background staining も比較的生じにくかった。一方、塩出の用いた抗 Mp 抗体は、ウサギに感染後の血清を塩析して得ているが、この抗体を作製するには約3週間の期間を要し、さらに、個々のウサギの感染の状態も異なり、得られたポリクロナール抗体の抗体価は一定ではなく、その組成が変化してくる可能性がある。

著者は、最終的に2種類の Mp に特異性の高いモノクロナール抗体産生の hybridoma を作製したが、hybridoma は凍結により保存ができ、ポリクロナール抗体に比べて特異性、抗体価、双方の面で一定した抗体が得られる。

Mp 肺炎では細胞内に菌の侵入はなく、線毛上皮細胞の全表面を覆うように多数の菌が付着すると言われている<sup>27)28)29)</sup>。塩出は、蛍光像のパターンより、細胞断片に付着した Mp 菌集塊あるいは microcolony を示すと考えられる第1型と、小型細胞全表面に付着した Mp を示すと考えられる第2型に分類している。今回の症例でも、症例1、2では第1型と2型との混在したパターンがみられ、症例3、4では第2型のみが観察された。

ポリクロナール抗体使用例とモノクロナール抗体使用例とで比較してみると、モノクロナール抗体を用いた方が background の蛍光がかなり低く判定が容易であった。さらにモノクロナール抗体では細胞表面からの diffuse な蛍光は顆粒状の蛍光の集合体として見られるものも多数存在し、この diffuse な蛍光はおそらく細胞表面上の Mp の microcolony の集合体であろうと考えられた。

佐々木<sup>30)</sup>らは、ELISA を用い Mp と種々の Mycoplasma との共通抗原の存在について指摘

しており、特に抗 Mp モノクロナール抗体はポリクロナール抗体に比べ交差反応がより強く出現すると報告している。著者も Mp, Mo, Mh, Ms, Al の膜抗原に対しモノクロナール抗体を用いて ELISA を行ったが、Mp 以外のマイコプラズマでも若干の交差反応がみられた。しかし、蛍光抗体法では Mp に対しては反応を示しても Mo では無反応の結果が得られ、間接蛍光抗体法での交差反応はとくに問題にならないと考えられた。

一般に、小児では Mp 肺炎が疑われる場合は、検査結果を待たずマクロライド系やテトラサイクリン系がまず投与される。このため、検査結果は血清学的方法にしる培養法にしる患者が治癒した頃に得られることが多い。しかし、他の肺炎の場合には上記の抗生剤では効果が無い場合もあり、Mp 肺炎との鑑別が問題になる。一方成人では肺炎の場合壁合成阻害剤である  $\beta$ -lactam 系抗生剤が first choice として使用され、Mp 肺炎の治療が遅延する人が多い。著者の方法では発症早期に確実に診断をくだすことができ、咽頭拭い液を用いるため非侵襲的な検査法であり、モノクロナール抗体を使用するためポリクロナール抗体に比べ判定が容易となった。しかし、蛍光抗体法で検査を行うため定量性に乏しく、判定を行うためにある程度の熟練を要し、検査後の資料を長期に保存することができないという欠点もある。このため、今後さらに症例を重ね、誰でも即座に判定できるよう新たな判定基準の設定を行いたいと考えている。

## 結 論

1. Mp FH-Liu 株の培養濃縮液で BALB/c マウスを免疫し、Mp 抗原に対するモノクロナール抗体産生の hybridoma を2種類作製した。本 hybridoma から得られたモノクロナール抗体は ELISA では Mp に対して高い特異性を示し、他のマイコプラズマに若干の交差性がみられた程度であった。しかし、Mp および Mo を抗原として、間接蛍光抗体法を行うと Mp 抗原は強く蛍光発色を示したが、Mo 抗原は反応を示さなかった。
2. モノクロナール抗体を用いてマイコプラズ

マ肺炎患者4例の咽頭拭い液の蛍光抗体法を行った。症例1, 2では塩出の分類の第1型と2型の混在が, 症例3, 4では第2型が観察された。ポリクローナル抗体に比べると, background の非特異蛍光は非常に弱く, 判定がより容易であった。

3. モノクローナル抗体産生の hybridoma より, いつでも大量に一定の抗体価を持った抗体が得られ, Mp 肺炎の迅速検出法をより正確に行うことが可能と考えられた。

稿を終えるにあたり, 御指導と御校閲を賜りました金政泰弘教授に深甚なる感謝の意を表します。また本研究の遂行に際して終始温かい御指導を戴きました平井義一講師, モノクローナル抗体の作製に御指導を戴きました横浜市立大学医学部 奥田研爾教授ならびに斉藤勝江先生に, また多大なる御協力, 御助言を戴きました塩出純二先生, 森徳子先生, 細菌学教室の諸先生ならびに患者材料を提供していただきました岡山済生会病院 安田英紀博士, 岡山セントラルシティー病院 木林文子先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 塩出純二: 間接蛍光抗体法を用いた咽頭スマアーよりの *Mycoplasma pneumoniae* の迅速検出法. 岡山医誌 (1988) 100, 79-88.
- 2) 奥田研爾他: モノクローナル抗体の作製法: 微生物関連抗原を主として; 細菌学技術叢書7, 日本細菌学会教育委員会編, 菜根出版, 東京, (1986) pp 1-37.
- 3) 岩崎辰夫, 安東民衛, 市川かおる, 保井孝太郎: 単クローン抗体: ハイブリドマと ELISA; 講談社サイエンティフィック編, 講談社, 東京, (1986) pp 1-183.
- 4) 桑原健介, 重岡秀信, 滝井昌英, 村上紀之: *Mycoplasma pneumoniae* に対するモノクローナル抗体の作製. 第12回マイコプラズマ学会記録 (1985) 66-68.
- 5) Doudle and Robinson RQ: An indirect hemagglutination test for diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Pro Soc Exp Biol Med* (1964) 116, 947-950.
- 6) Emmons J, Schluederberg and Cordero L: An aid to the rapid diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Infect Dis* (1969) 119, 650-653.
- 7) Rousseau SA: The serological diagnosis of *Mycoplasma Pneumoniae* infection: a comparison of complement fixation, haemagglutination and immunofluorescence. *J Hyg Camb* (1985) 95, 345-352.
- 8) Robinson DT, Shirai A, Sobeslavsky O and Chanock RM: Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection: significance of antibody measured by different techniques. *Am J Epidemiol* (1966) 84, 301-313.
- 9) Mizutani H and Mizutani H: Immunologic responses in patients with *Mycoplasma pneumoniae* infections. *Am Rev Respir Dis* (1983) 127, 175-179.
- 10) Robinson DT, Sobeslavsky O, Jensen KE Senterfit LB and Chanock RM: Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection: evaluation of immunofluorescence, complement fixation, indirect hemagglutination and tetrazolium reduction inhibition tests for the diagnosis of infection. *Am J Epidemiol* (1966) 83, 287-298.
- 11) Taylor P: Evaluation of an indirect haemagglutination kit for the rapid serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. *J Clin Pathol* (1979) 32, 280-283.
- 12) Dussaix E, Slim A and Tournier P: Comparison of enzymelinked immunosorbent assay (ELISA) and complement fixation test for detection of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. *J Clin Pathol* (1983) 36, 228-232.

- 13) Raisanen SM, Suni JI and Leinikki PO : Serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection by enzyme immunoassay. *J Clin Pathol* (1980) **33**, 836—840.
- 14) Busolo F, Tonin E and Conventi L : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. *J Clin Microbiol* (1980) **12**, 69—73.
- 15) Busolo F and Meloni GA : Serodiagnosis of *M. pneumoniae* infections by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). *Yale J Biol Med* (1983) **56**, 517—521.
- 16) Jacobs E, Fuchte K and Brecht W : A 168—kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* used as antigen in a dot enzyme-linked immunosorbent assay. *Eur J Clin Microbiol* (1986) **5**, 435—440.
- 17) Wreghitt TG and Sillis M : A  $\mu$ -capture ELISA for detecting *Mycoplasma pneumoniae* IgM : comparison with indirect immunofluorescence and indirect ELISA. *J Hyg Camb* (1985) **94**, 217—227.
- 18) von Griethuysen AJA, Graaf R, Druten JAM, Heessen FWA, Logt JTM and Loon AM : Use of the enzyme-linked immunosorbent assay for the early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. *Eur J Clin Microbiol* (1984) **3**, 116—121.
- 19) Skaug K, Eng J, Orstavik and Haug KW : The diagnostic value of determination of IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* by the indirect immunofluorescent antibody test. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1976) **84**, 170—176.
- 20) Price PC : Direct radioimmunoassay for the detection of IgM antibodies against *Mycoplasma pneumoniae*. *J Immunol Methods* (1980) **32**, 261—273.
- 21) Biberfeld G : Antibody responses in *Mycoplasma pneumoniae* infection in relation to serum immunoglobulins, especially IgM. *Acta Pathol Microbiol Scand* (1971) **79**, 620—634.
- 22) Tully JG, Rose DL, Witcomb RF and Wenzel RP : Enhanced isolation of *Mycoplasma pneumoniae* from throat washings with a newly modified culture medium. *J Infect Dis* (1979) **139**, 478—482.
- 23) Tully JG : New Laboratory techniques for isolation of *Mycoplasma pneumoniae*. *Yale J Biol Med* (1983) **56**, 511—515.
- 24) Tully JG and Whitcomb RF : *The Mycoplasmas vol II*, Academic press, Now York (1979) pp275—306.
- 25) 石山業弘 : モノクロナール抗体による肺炎マイコプラズマ症の早期迅速診断のためのハムスター系を用いた実験的研究. *杏林医会誌* (1986) **17**, 431—442.
- 26) 金森政人, 石山業弘, 田口晴彦, 桂 卓也, 山口博之, 前川栄子, 緒方幸雄 : 新たに作製した肺炎マイコプラズマに対するモノクロナール抗体の反応性について. *第12回マイコプラズマ学会記録* (1985) 81—84.
- 27) Collier AM and Clyde WA : Appearance of *Mycoplasma pneumoniae* in lungs of experimentally infected hamsters and sputum from patients with natural disease. *Am Rev Respir Dis* (1974) **110**, 765—773.
- 28) Muse KE, Powell DA and Collier AM : *Mycoplasma pneumoniae* in hamster tracheal organ culture studied by scanning electron microscopy. *Infect Immun* (1976) **13**, 229—237.
- 29) Collier AM and Baseman JB : Organ culture techniques with Mycoplasmas. *Ann NY Acad Sci*, 277—289.
- 30) 佐々木次雄, 木原光城, Bonissol C : *Mycoplasma pneumoniae* ELISA 抗体価に及ぼすマイコプラズマ共通抗原の影響. *第12回マイコプラズマ学会記録* (1985) 62—65.
- 31) Laemmli UK : Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* (1970) **227**, 680—685.

## Rapid diagnosis of early *Mycoplasma pneumoniae* infection by indirect immunofluorescence with monoclonal antibody

Kaoru TERASAKA

Department of Microbiology,

Okayama University Medical School,

Okayama 700, Japan

(Director : Prof. Y. Kanemasa)

Although serological methods or culture methods of *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) from throat washings are used for diagnosis of Mp infection, the patient is often discharged from the hospital before definitive results can be obtained. Therefore we have developed a rapid detection from patients' throat smears by immunofluorescence with anti-rabbit IgG. Antibody specificity to Mp and the difference of titers between each lot have been a problem, because of polyclonal antibody which is prepared by immunizing a rabbit.

Two hybridoma cell lines producing monoclonal antibodies to Mp were obtained by fusion of spleen cells from BALB/c mice immunized by Mp antigen with myeloma cells (X63-Ag8-6.5.3.). The high specificity to Mp of these monoclonal antibodies produced by the hybridomas was affirmed ELISA, immunofluorescence, and Western blot. A few cross-reactions were recognized by ELISA between Mp antigen and other *Mycoplasma* antigens. No cross-reactivity was found by indirect immunofluorescence.

Throat smears from 4 patients suffered from Mp infection were examined by immunofluorescence with monoclonal antibody. Specific immunofluorescence was seen in all smears. Both granular and diffuse types of fluorescence were seen in smears from case 1 and 2. Only diffuse type was found in smears from case 3 and 4.

Monoclonal antibodies can be obtained at any time and amount. The method may be useful and convenient for the rapid diagnosis of Mycoplasmal pneumonia.