原 著

Mycoplasma pneumoniae 感染症における血中 IgG および IgM 抗体の変動

梅 津 征 夫* 千 葉 峻 三
小 川 説 子 中 尾 亨

IMMUNE RESPONSES IN MYCOPLASMA PNEUMONIAE INFECTIONS

Masao UMETSU, Shunzo CHIBA, Setsuko OGAWA and Tooru NAKAO

Department of Pediatrics, Sapporo Medical College

〔受付：5月27日，1974年〕

総 括

Mycoplasma pneumoniae (以下 *M. pneumoniae*) の感染を受けた小児における血清抗体価、とくに蛍光抗体間接法により測定した IgG および IgM 抗体価を検討した。

IgG 蛍光抗体価の感染後の経時変動は補体結合抗体価のそれとよく一致していた。一方、IgM 蛍光抗体価の経時的変動には個体差が認められ、感染後の観察期間中、この抗体が1度も検出されない症例も存在した。対象中に存在した *M. pneumoniae* の家族内感染例の検討により、上記した IgM 蛍光抗体価の個体差の出現には宿主側の因子が影響していると考えられた。また今回 *M. pneumoniae* 感染症と診断された対象中には、以前に採取された血清中にすでに *M. pneumoniae* に対する抗体が存在することより今回の感染が再感染であると考えられた症例が数例含まれていた。これらの再感染例においても IgM 蛍光抗体の出現は一樣でなく、したがってこの抗体の変動の個体差には再感染の有無が関与していないことが推定された。

序 文

M. pneumoniae 感染に際して上昇する血中抗体はウ

イルス感染の場合と同様に (Pike 1967)¹⁴⁾、主として IgG と IgM に分類されることが知られている (Schmidt et al. 1966¹⁵⁾, Fernald et al. 1967¹⁶⁾, Biberfeld 1968¹⁷⁾, Nakao et al. 1970¹²⁾, Biberfeld 1971²⁰⁾)。またこれらの論文により、IgG と IgM 抗体の比率は感染後の時間的経過により一定の変化を示すのではなく、この変動には明らかに個体差が存在することが知られている。すなわち、ある個体においては感染成立後長期にわたって IgM 抗体の占める比率が高く、他の個体においては IgG 抗体の占める比率が早期から高いことが観察されており、このような個体差は結局 IgM 抗体の反応の違いによるものと考えられている。Biberfeld (1971²⁰⁾) は、*M. pneumoniae* 感染の成人例において、その多くが咽頭からの *M. pneumoniae* の早期消失と血中 IgG 抗体の早期からの高比率が認められることを報告し、このような成人例において *M. pneumoniae* の再感染が成立した可能性が考えられ、前記した IgM 抗体の反応の個体差には再感染の有無が関与していると推論した。しかしながら、著者等が以前に報告した成績 (梅津1968²³⁾, Nakao et al. 1970¹²⁾) においては患者の年齢と IgM 抗体の反応の違いとの間に相関々係を認めることができなかった。

今回の実験において著者らは *M. pneumoniae* の感染を受けた小児における抗体価の変動を補体結合法および、まだその報告がない蛍光抗体間接法を使用して検討

* 札幌医科大学小児科学教室

した。また、対象中には今回の感染が *M. pneumoniae* の再感染であると考えられた症例が存在したので、これらの症例が Biberfeld (1971)²⁾ の推論のように、一様に低い IgM 抗体の反応を示すかどうか検討した。

材料および方法

札幌通信病院小児科を受診した異型肺炎患者より急性期および回復期の血清を採取し、血清学的にマイコプラズマ肺炎と診断された13名を対象として選んだ。これら対象患者中には、今回の肺炎罹患の1～3年前に採取、保存された血清中に *M. pneumoniae* の抗体が証明されたことより、今回の肺炎発症が *M. pneumoniae* の再感染であると考えられた症例が4名含まれている。また残る9名中には、*M. pneumoniae* の家族内感染によ

る肺炎発症と考えられた2名の同胞例が存在した。

補体結合試験 (CF 試験)

M. pneumoniae (標準株, Mac 株) を Hayflick (1965)⁹⁾ の記載による PPLO 液体培地に接種し、連続振動法 (Jansson 1964)¹⁰⁾ により3日間培養した。マイコプラズマが 10^9 colony forming unit (CFU)/ml. まで増殖した時点 (梅津1968)²³⁾ で phenol 処理 (Low et al. 1965)¹¹⁾ 後、遠心、生理的食塩水で沈渣を再浮遊させることにより抗補体作用のない CF 抗原を作製した。CF 試験は微量法 (Sever 1962)¹⁹⁾ により、2単位の補体、および溶血素、4単位の抗原を使用して施行した。

蛍光抗体試験 (IMF 試験)

抗原作製の目的で、液体培地を加えたシャーレにカバースリップを入れ、*M. pneumoniae* を接種後、37°C

表1 Chronological change of serum antibodies in 13 patients with *M. pneumoniae* pneumonia.

Case number and age	Days after clinical onset	CF antibody titer	IgG IMF antibody titer	IgM IMF antibody titer	CHA antibody titer
1. 6 yr.	5	32	4	< 4	128
	13	≥ 128	≥ 128	< 4	64
2. 11 yr.	2	16	≥ 128	< 4	32
	58	≥ 128	≥ 128	< 4	4
3. 10 yr.	3	32	≥ 128	16	128
	10	≥ 128	≥ 128	4	512
4. 7 yr.	11	32	≥ 128	≥ 128	128
	16	≥ 128	≥ 128	≥ 128	32
5. 9 yr.	5	8	4	4	128
	9	NT	16	32	128
	12	NT	≥ 128	64	512
	16	≥ 128	≥ 128	8	256
	51	NT	64	4	8
	72	NT	64	< 4	8
6. 12 yr.	3	8	4	< 4	64
	10	64	≥ 128	< 4	128
	26	NT	≥ 128	< 4	8
	47	NT	≥ 128	< 4	4
7. 7 yr.	3	< 4	4	4	512
	12	64	≥ 128	64	1024
	27	32	≥ 128	64	8
	60	64	≥ 128	16	256
8. 10 yr.	6	8	32	8	256
	18	≥ 128	≥ 128	16	512
9. 10 yr.	6	4	4	8	4
	17	64	≥ 128	8	256
10. 6 yr.	4	4	< 4	< 4	16
	11	≥ 128	64	< 4	256
11. 8 yr.	3	< 4	4	8	8
	18	≥ 128	128	8	256
12. 8 yr.	4	< 4	4	4	< 4
	14	≥ 128	≥ 128	4	32
13. 8 yr.	5	< 4	< 4	8	4
	12	≥ 128	64	8	128

NT=not tested

で静置培養を行なった (Ertel and Ertel 1970)⁴⁾. 10% NaOH で pH を補正しながら培養をつづけ、顕微鏡下でカバースリップ上にコロニーを確認できる時期に、カバースリップを取り出し、乾燥後アセトンで固定した (梅津ら1971)²⁴⁾. IMF 試験は間接法により施行した (Ertel and Ertel 1970)⁴⁾, 梅津ら1971²⁴⁾, Rosendal et al. 1972¹⁵⁾). すなわち、燐酸緩衝液 (PBS pH 7.2) で希釈した患者血清および標識血清で、1次、2次染色を37°C、1時間の条件下で行なった後に、エルバノールで包埋、蛍光顕微鏡下で鏡見した。標識血清には蛍光色素 (Fluorescein Isothiocyanate) を標識した抗ヒト IgG または IgM ウサギ血清 (Bechringwercke 製) を使用した。血清対照としては既知の抗体陽性および陰性のヒト血清を、また *M. hominis* のコロニーを陰性抗原対照として使用した。

寒冷凝集試験 (CHA 試験)

2倍階段希釈をした患者血清に、同量の0.2%ヒトO型血球浮遊液を加え、4°Cで1晩静置後、血球凝集の有無を判定した。

結 果

CF 抗体価の測定成績は表1に示すように、対象の全例が4倍以上の抗体上昇を示した。急性期の CF 抗体価は32倍より4倍以下まで分布していたが、16倍、32倍の比較的高い抗体価を示した症例 (症例1, 2, 3, 4) は、今回の肺炎発症が *M. pneumoniae* の再感染と考えられた症例であった。

IgG IMF 価に関しても CF 抗体価の経時的変動と同様に4倍以上の有意の抗体上昇を示す例が多く (表1)、有意の抗体上昇を示さなかった症例はいずれも急性期から128倍以上の高い抗体価を示した症例である。またこれら急性期から高い抗体価を示した症例はいずれも、今回の肺炎発症が *M. pneumoniae* の再感染によると考えられた症例であった。一方、IgM IMF 抗体の反応に関しては個体差が多く、CF 抗体価や IgG IMF 抗体価に観察されたような一定の感染後の変動を認めることはできなかった。すなわち、4倍以上の抗体上昇や、急性期、回復期ともに高い IgM IMF 抗体価を認めた症例は対象者の1/4に過ぎず、観察期間中、IgM IMF 抗体を1度も検出できない症例も存在した。このような IgM IMF 抗体価における個体差は *M. pneumoniae* の同胞感染例にも認められ、症例5は有意の IgM IMF 抗体価の上昇を認めたにもかかわらず、3週間後に発症した姉の症例6は、観察期間中、IgM IMF 抗体の検出がされなかった。

CHA 価に関しては、CF および IMF 抗体価の変動

図1 Complement-fixing (▨), IgG immunofluorescent (■) and IgM immunofluorescent (□) antibody titers to *Mycoplasma pneumoniae* and cold agglutinin titers (●) in sera collected from case 1 at different times before and after onset of pneumonia.

図2 Complement-fixing (▨), IgG immunofluorescent (■) and IgM immunofluorescent (□) antibody titers to *Mycoplasma pneumoniae* and cold agglutinin titers (●) in sera collected from case 2 at different times before and after onset of pneumonia.

と比較すると短期間に変動する傾向が認められた。また CHA 価の変動と他の抗体価の変動との間に相関関係を認めることはできなかった。

M. pneumoniae 肺炎発症後の抗体の数週間にわたる変動は3症例 (症例5, 6, 7) において観察された (表1)。CF および IgG IMF 抗体価の経時的変動は類似しており、比較的早期に最高値に達し、この抗体価が少なくとも7~10週間持続することが明らかであった。一方、IgM IMF 抗体価に関しては抗体上昇が認められた2例において検討された。その抗体価の変動は、抗体上昇時期に関しては一致していたが、抗体持続期間は異なっていた。CHA 価に関しては検討した抗体中いざばん早期に上昇し、その抗体の持続は短期間であった。したがって感染後3~4週間ですでに抗体価の下降が観察された。

図3 Complement-fixing (▨), IgG immunofluorescent (■) and IgM immunofluorescent (□) antibody titers to *Mycoplasma pneumoniae* and cold agglutinin titers (◻) in sera collected from case 3 at different times before and after onset of pneumonia.

図4 Complement-fixing (▨), IgG immunofluorescent (■) and IgM immunofluorescent (□) antibody titers to *Mycoplasma pneumoniae* and cold agglutinin titers (◻) in sera collected from case 4 at different times before and after onset of pneumonia.

M. pneumoniae 肺炎発症以前の血清にすでに *M. pneumoniae* に対する抗体が存在することが証明されたために、今回のマイコプラズマ肺炎が、*M. pneumoniae* の再感染によるものと考えられた4症例(症例1, 2, 3, 4)における抗体の反応、とくに IgM 抗体の反応の個体差を検討したが、症例1に関しては第1図に示すとおりである。すなわち、マイコプラズマ肺炎発症1年以前に採血された血清中に CF および IgG IMF 抗体が検出された。肺炎発症後の抗体価は CF および IgG IMF 抗体価で有意の上昇が観察されたが、IgM IMF 抗体は観察期間中検出されなかった。症例2に関しては(図2)、マイコプラズマ肺炎発症2年6か月前の血清中に低値ではあるが CF および IgG IMF 抗体が検出された。その1年後には CF, IgG IMF 抗体価は上昇しており、IgM IMF 抗体価も16倍であつた。さらに1年後にはこれら抗体価はいずれも下降していた。肺炎発症後の抗体価は CF 抗体価は有意の上昇を示し、IgG IMF 抗体価は急性期より高値を示していた。また IgM IMF 抗体価は以前の再感染時期には上昇が認められたが肺炎発症時の再感染の際には検出されなかった。症例3においては(図3)、マイコプラズマ肺炎発症の3年5か月前の血清中に CF, IgG IMF, IgM IMF 抗体が検出されており、その3か月後に採取された血清においては持続す

る CF および、IgG IMF 抗体が検出され、IgM IMF 抗体はすでに検出されなかつた。肺炎発症後の抗体価は CF 抗体価が有意の上昇を示し、IgG IMF 抗体価は急性期から高値を示すことが観察された。IgM IMF 抗体価は急性期に16倍を示したが回復期にはすでに低値に下降していた。症例4においては(図4)、マイコプラズマ肺炎発症の8か月前に採取した血清に CF および IgG IMF 抗体が検出されており、これらの低い抗体価はその7か月後で、肺炎発症直前に採取された血清にも検出されている。一方、肺炎発症後の抗体価は CF 抗体価が有意の上昇を示し、IgG および IgM IMF 抗体価は急性期より高い抗体価を示すことが観察された。

考 按

M. pneumoniae 感染を受けた個体においてその上昇が観察される CF 抗体、間接赤血球凝集抗体、発育阻止抗体が IgG および IgM に分けられ、この IgG と IgM 抗体の比率が感染成立後に変動することはすでに報告されている(Schmidt et al. 1966¹⁸⁾, Fernald et al.¹⁹ 1967, Biberfeld 1968²⁰, Biberfeld 1971²¹)。しかしながら間接法による IMF 法により検出される IgG および IgM 抗体に関する経時的变化の報告はない。したがって、著者らは IgG および IgM IMF 抗体価の変動を

CF および CHA 抗体の変動と比較検討した。

IgG IMF 抗体の経時的変動は、検討した症例において CF 抗体の変動と時間的によく類似していた。この結果より検出される CF 抗体は主として IgG に属することが推定された。また少数の症例は同一血清において高い IMF 抗体価と低い CF 抗体価が検出されることが観察されたが、この結果より、*M. pneumoniae* には異なつた抗原グループが存在するために (Taylor-Robinson et al. 1966²²⁾, Soběslavský et al. 1966²⁰⁾, Biberfeld 1968¹⁹⁾), CF および IMF 試験で検出される抗体は完全に同一のものでないことが推測された。IgM IMF 抗体に関しては、今回の実験において、肺炎発症後抗体が検出されない症例が4例と、低値で継続する抗体しか検出されない症例が5例存在した。これらの症例は全例が CF および IgG IMF 抗体で有意の上昇を示すことが観察されており、この成績は *M. pneumoniae* 感染症の際に IgG 抗体のみが上昇する症例が存在するという報告 (Biberfeld 1968¹⁹⁾, Biberfeld 1971²⁰⁾) とよく一致する。また、IgM IMF 抗体が検出されなかつた症例において、その抗体が IgM 抗体によつてのみ形成されると考えられている (Fernald et al. 1967)¹⁾ CHA 抗体が変動を示したことは、*M. pneumoniae* 感染に際して特異抗体は IgG のみが反応する症例においても非特異的な IgM 抗体は上昇するという報告 (Feizi 1967²³⁾, Oxelius 1969¹³⁾, Biberfeld 1971²⁰⁾) とよく一致する。

IgM IMF 抗体の反応と持続における個人差が今回の実験において観察されたが、この個人差はすでに報告されている IgM CF 抗体における個体差 (Fernald et al. 1967¹⁾, Biberfeld 1968¹⁹⁾, Biberfeld 1971²⁰⁾) の出現と同様であつた。この IgM IMF 抗体の出現に関する個体差は *M. pneumoniae* の家族内感染によるマイコプラズマ肺炎の同胞例においても認められた。これら同胞例は *M. pneumoniae* の同一株により感染を受けたと考えられることから IgM IMF 抗体反応の個体差には感染因子ではなく宿主側の因子がその出現に関与するものと推定される。Biberfeld (1971)²⁰⁾ はこの IgM 抗体反応の個体差に関与する宿主側の因子として、再感染の有無を挙げている。すなわち、*M. pneumoniae* の再感染を受けた症例において、早期から IgG 抗体優位の反応を示すと推論した。*M. pneumoniae* の再感染に関しては、低い抗体価を保持する症例に再感染が認められること (Dowdel et al. 1967²⁴⁾, Saliba et al. 1967¹⁷⁾, Steinberg et al. 1968²¹⁾), マイコプラズマ肺炎の再発症例の存在 (Foy et al. 1970⁷⁾, Foy et al. 1971⁸⁾) などが報告されており、まれなものでないことがすでに明らかにされている。今回の著者らの実験において、マイコプラズマ肺炎発

症以前の血清中に抗体が証明されることにより、この肺炎発症が *M. pneumoniae* の再感染の結果によると考えられた症例が4例存在した。これらの症例中2例はマイコプラズマ肺炎発症後 IgM IMF 抗体が検出されなかつた。残りの2例においては肺炎発症後 IgM IMF 抗体の変動が観察されたが、その抗体の持続期間は異なつていた。この成績から、著者らは IgM 抗体の反応の個体差出現に影響する宿主側因子として、Biberfeld (1971)²⁰⁾ が推測した再感染を挙げることはできず、また *M. pneumoniae* 感染に際して、再感染の場合においても IgM 抗体の関与を認める症例が存在すると考えた。一般に、ウイルス感染の再免疫が成立した場合には IgM 抗体が検出されないと考えられていたが (Pike 1967)¹⁴⁾、最近、带状疱疹患者の血中より水痘ウイルスに対する IgM 抗体が検出されたという報告 (Ross and McDaid¹⁶⁾ 1972) が存在し、感染因子による再免疫が成立した場合に IgM 抗体の反応が関与する可能性は十分に推測できる。

この論文の要旨は第21回日本ウイルス学会において発表した。

Summary

It was reported previously that serum antibodies against *Mycoplasma pneumoniae* mainly belonged to IgG and IgM and that these immunoglobulins appeared subsequently to infection with this organism. The ratio of IgG to IgM antibodies showed a considerable individual variation even when compared at approximately the same time after the onset of illness. There was no definite explanation for this individual variation.

The present study was carried out on the serum immunoglobulin response of children with *M. pneumoniae* infection, especially the chronological change of specific IgG and IgM titers measured by the indirect immunofluorescent (IMF) technique. The chronological change of IgG and IgM IMF titers was compared with that of complement-fixing (CF) and cold hemagglutination (CHA) antibody titers. Many patients showed an apparent subsequent appearance of IgG IMF antibody, and this appearance was similar to that of CF antibody. An individual variation was observed in specific IgG IMF antibody response and in the persistence of this antibody.

There were some patients who had no detectable IgM IMF antibody. All of them exhibited a significant rise in CF and IgG IMF titers. These results agreed with those obtained from some cases which responded to *M. pneumoniae* infection with the production of antibodies of

IgG class almost exclusively. All those patients presented a significant change in titer of CHA antibody which belonged to the IgM class. The results agreed with those reported by previous authors that some patients showed an increase of nonspecific serum IgM level during infection with *M. pneumoniae*, whereas they had specific antibodies belonging almost exclusively to the IgG class. The patients studied in the present investigation included some who possessed pre-existing specific antibody. An individual variation in IgM IMF antibody response was also proved in these patients. It was considered that the experience of reinfection with *M. pneumoniae* might have no important effect upon the individual variation, and that after the secondary immune response to *M. pneumoniae* infection IgM antibody might be detectable in some patients.

文 献

- 1) Biberfeld, G. (1968) : Distribution of antibodies within 19S and 7S immunoglobulins following infection with *Mycoplasma pneumoniae*. J. Immunol., **100**, 338-347.
- 2) Biberfeld, G. (1971) : Antibody responses in *Mycoplasma pneumoniae* infection in relation to serum immunoglobulins, especially IgM. Acta Patho. Microbiol. Scand. Section B, **79**, 620-634.
- 3) Dowdel, W. R., Stewart, J. A., Heyward, J. T. and Robinson, R. O. (1967) : *Mycoplasma pneumoniae* infections in a children's population. A five-years study. Amer. J. Epid., **85**, 137-146.
- 4) Ertel, R. Y., Ertel, I. J., Somerson, N. L. and Pollack, J. D. (1970) : Immunofluorescence of mycoplasma colonies grown on coverslips. Proc. Soc. Exper. Biol. Med., **134**, 441-446.
- 5) Feizi, T. (1967) : Cold agglutinins, the direct Coombs' test and serum immunoglobulins in *Mycoplasma pneumoniae* infection. Ann. N.Y. Acad. Sci., **143**, 801-812.
- 6) Fernald, G. W., Clyde, W. A. and Denney, F. W. (1967) : Nature of the immune response to *Mycoplasma pneumoniae*. J. Immunol., **98**, 1028-1037.
- 7) Foy, H. M., Kenny, G. E., McMahan, R., Mansy, A. M. and Grayston, J. T. (1970) : *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in an urban area. Five years of surveillance. J.A.M.A., **214**, 1666-1672.
- 8) Foy, H. M., Nugent, C. G., Kenny, G. E., McMahan, R. and Grayston, J. T. (1971) : Repeated *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia after 4 1/4 years. J.A.M.A., **216**, 671-672.
- 9) Hayflick, L. (1965) : Tissue cultures and mycoplasmas. Texas Rept. Biol. Med., **23** (suppl. 1), 295-303.
- 10) Jansson, E. (1964) : Preparation of complement-fixing antigen for routine use in diagnosis of Eaton-pneumonia. J. Clin. Path., **17**, 458-460.
- 11) Low, I. E. and Eaton, M. D. (1965) : Replication of *Mycoplasma pneumoniae* in broth culture. J. Bacteriol., **89**, 725-728.
- 12) Nakao, T., Umetsu, M., Watanabe, N. and Kikuchi, N. (1970) : An outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection in a community. Tohoku J. exp. Med., **102**, 23-31.
- 13) Oxelius, V. (1969) : Quantitation of immunoglobulins in human serum from patients with mycoplasma infection. Acta Pediat. Scand., **58**, 97.
- 14) Pike, R. M. (1967) : Antibody heterogeneity and serological reactions. Bact. Rev., **31**, 157-174.
- 15) Rosendal, S. and Block, F. T. (1972) : Direct and indirect immunofluorescence of unfixed and fixed mycoplasma colonies. Acta Path. Microbiol. Scand. Section B, **80**, 615-622.
- 16) Ross, C. A. and McDaid, R. (1972) : Specific IgM antibody in serum of patients with Herpes zoster infections. Brit. med. J., **4**, 522-523.
- 17) Saliba, G. S., Glezen, W. P. and Chin, T. D. Y. (1967) : *Mycoplasma pneumoniae* infection in a resident boy's home. Amer. J. Epid., **85**, 408-418.
- 18) Schmidt, N. J., Lennette, E. H., Dennis, J. and Gee, P. S. (1966) : On the nature of complement-fixing antibodies to *Mycoplasma pneumoniae*. J. Immunol., **97**, 95-99.
- 19) Sever, J. L. (1962) : Application of a microtechnique to viral serologic investigations. J. Immunol., **88**, 320-329.
- 20) Soběslavský, O., Prescott, B., James, W. D. and Chanock, R. M. (1966) : Isolation and characterization of fraction of *Mycoplasma pneumoniae*, II. Antigenicity and immunogenicity. J. Bacteriol., **91**, 2123-2138.
- 21) Steinberg, P., White, R. J., Fuld, S. L., Gutekunst, R. R., Chanock, R. M. and Senterfit, L. B. (1969) : Ecology of *Mycoplasma pneumoniae* infections in marine recruits at Parris Island, South Carolina. Amer. J. Epid., **89**, 62-73.
- 22) Taylor-Robinson, D., Shirai, A., Soběslavský, O. and Chanock, R. M. (1966) : Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection, II. Significance of antibody meas-

ured by different techniques. Amer. J. Epid.,
84, 301-313.

- 23) 梅津征夫(1968): *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, 371-377.

- 24) 梅津征夫, 中尾 亨(1971): マイコプラズマ肺炎患者における蛍光抗体価の検討. 日伝染会誌, 45, 399-405.