

間接蛍光抗体法を用いた咽頭スメアーよりの *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)

塩 出 純 二

(昭和62年11月5日受稿)

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, マイコプラズマ肺炎, 間接蛍光抗体法, 咽頭スメアー

結 言

Mycoplasma pneumoniae (Mp) は, 細菌壁を欠如する細菌であり本菌によって惹起される感染症の治療に対しては, マクロライド系やテトラサイクリン系など蛋白合成阻害を作用点とする薬剤が著効を示し, β -ラクタム剤は無効である。一般の感染症に対して β -ラクタム剤が第一選択薬として多く用いられている現状から, Mp に有効な抗生剤を選択するには, まず本症の診断が不可欠となる。従来より, 本症は菌の分離同定または血清学的検査法によって診断されてきたが, Mp の分離培養には特定の培地を必要とし, 少なくとも2~3週間を要し, 血清抗体価の上昇にも発症後1~2週間以上かかる。このためこれらに基づく本症の診断は, 通常 retrospective なものになってしまうことから, 新たな早期診断法の開発が望まれていた¹⁾。

教室の平井ら²⁾は, 婦人性器における *Mycoplasma* を検索するために, 膺スメアーを用いた間接蛍光抗体法による *M. hominis* の検出法を開発し, 培養法に比べ迅速でしかも検出率の勝ることを報告した。著者は同じ理論・技法に基づいて, マイコプラズマ肺炎 (Mp 肺炎) 患者の呼吸器系から早期に Mp を検出する方法の確立を目途した。このために Mp に対する特異抗体を作製し, それによる間接蛍光抗体法で Mp 肺炎患者の咽頭スメアーからの Mp の迅速検出法を確立しようとした。本報では基礎的な検討とともに臨床材料について試験を行い, 期待する結

果が得られたので報告する。

材 料 と 方 法

1. 抗体の作製

Mp FH 株を Hayflick の培地 (Table 1) で1週間培養後, 10,000rpm20分間遠沈で集菌し, phosphate buffered saline (PBS) で繰り返し洗浄後, 最終的に PBS で100倍濃縮液としたものを免疫用抗原とした。この抗原を用いて Fig. 1 のスケジュールに従って免疫を行った。まずウサギの皮下および筋肉内に Freund's complete adjuvant と混和したものを3回注射し, 2週間後, 抗原液のみを耳静脈に3回注射した。最終注射から7日目に全採血を行い, 塩析にて IgG 分画まで精製して抗体 (抗 Mp ウサギ IgG) とした。

この抗体の特異性は Growth Inhibition Test (GIT)³⁾ と間接 epi-immunofluorescence 法⁴⁾ で判定した。すなわち GIT は, 10⁵CFU/ml の Mp 液を固形培地に接種し, この培地上に抗体0.03

Table 1 Culture medium for Mycoplasmales (Hayflick's medium)

PPLO Broth (Difco)	2.1 g
Distilled Water	65ml
Yeast Extract	5ml
10% Glucose	5ml
0.06% Phenol Red	3ml
2.5% Thallium Acetate	1ml
Penicillin-G (100,000U/ml)	1ml
Horse Serum	20ml
Total	100ml

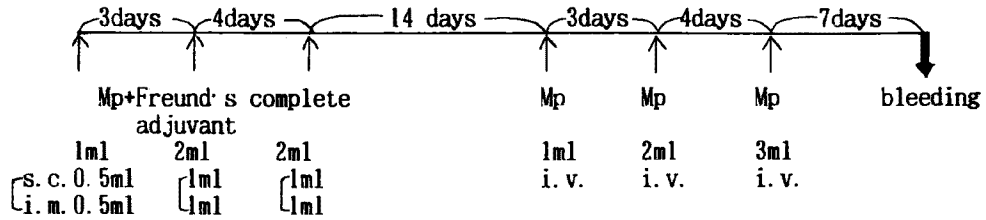
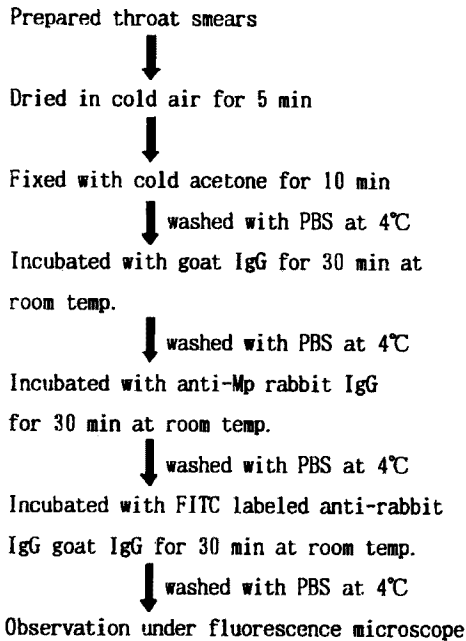


Fig. 1 Schedule of immunization

Fig. 2 Detection procedure of *Mycoplasma pneumoniae* from throat swabs by indirect immunofluorescence

mlを染み込ませた disc をのせ、7日間培養後 disc 周囲に形成される阻止帯の有無を見た。間接 epi-immunofluorescence 法は、Mp を 1 週間培養した固形培地を PBS で洗浄後、作製した抗体を加え室温 30 分間作用させ、PBS で洗浄後、10 倍希釈 FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (MBL) を加え室温 30 分間静置後 PBS で洗浄し落射式蛍光顕微鏡でコロニーを観察した。

2. 咽頭スマアの採取および血清抗体価

Mp 肺炎患者 10 名、他の呼吸器感染症患者 15

名、健常者 5 名を対象とした。被検者に強く咳をさせた後、咽頭後壁を滅菌スワブで強く擦過し採取粘液をスライドガラスに薄く均一に塗抹し、風乾後、冷アセトンにて 10 分間固定した。Mp 肺炎が疑われる患者については初診時にスマア採取と同時に血清抗体価として寒冷凝集素価 (CHA)、受身赤血球凝集反応 (PHA)、補体結合反応 (CF) を測定した。PHA は SERODIA-MYCO (富士レビオ株式会社 FD401) で、CF は CF-KIT (デンカ生研株式会社) で各々測定し、ペア血清で 4 倍以上の上昇あるいは単独なら PHA320 倍以上、CF64 倍以上を陽性と判定した。

3. 間接蛍光抗体法 (Fig. 2)

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 洗浄後、一次抗体として 20 倍希釈の抗 Mp ウサギ IgG を加えて室温 30 分間反応させた。PBS 洗浄後、二次抗体として 50 倍希釈の FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG (MBL) を加えて室温 30 分間反応させた。これを十分に 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. 精製抗体とその特性

1) 抗 Mp ウサギ IgG は、塩析、透析後 PBS で希釈し、1.5 g/dl とした。電気泳動法で γ グロブリン濃度 93.6% であった。凍結保存し以後の実験にはそのつど少量ずつ解凍供試した。

2) 本抗体は GIT 法では幅 7.5mm の發育阻止帯を明瞭に形成した (Fig. 3)。間接 epi-immunofluorescence 法では Mp コロニーから明瞭な蛍

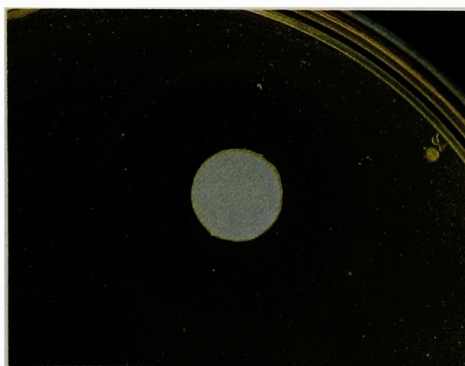


Fig. 3 Growth inhibition test for *Mycoplasma pneumoniae* with anti-Mp rabbit IgG showing an inhibition zone around the disc

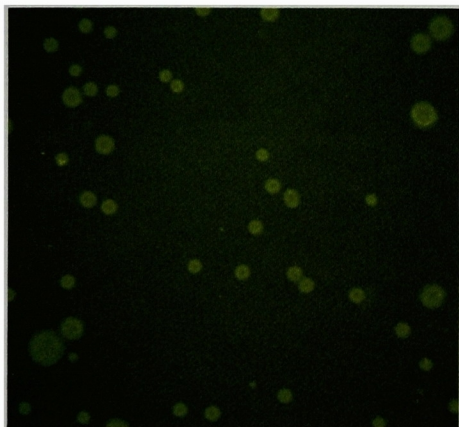


Fig. 4 Indirect epi-immunofluorescence of Mp colonies with anti-Mp rabbit IgG

光が検出された (Fig.4)。対照として、*M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii* を用い、両法における本抗体との反応性をみたが、いずれにおいても全く反応しなかった。以上の結果から本抗体は Mp に特異的に反応し、しかも GIT で強い阻止を認めることから高力価の抗体と考えられた。

3) 咽頭スマアに先だち各種培養菌の塗抹標本作製し、間接蛍光抗体法を行なったところ、Mp のみならず *M. orale* などにおいても蛍光を認めることが判明した。この原因が Mp と他菌種との交差反応によるものか、あるいは培地成

分に対する抗体によるものかを明らかにするためにラテックス凝集反応を行った。すなわち抗 Mp ウサギ IgG で感作した感作ラテックスを調製し、抗原として人血清、牛血清、馬血清、Yeast extract および Mp 菌体と各々反応させたところ、馬血清、Yeast extract、Mp 菌体に強い凝集を示し、人血清、牛血清では全く凝集しなかった。そこで次に十分量の馬血清、Yeast extract でラテックスを感作しておき、これと抗 Mp ウサギ IgG とを反応させることで抗馬血清抗体、抗 Yeast extract 抗体を各々吸収した。この吸収後の抗体を用いて再び菌塗抹標本の間接蛍光抗体法を行なうと、Mp にのみ蛍光を認め、*M. orale* などの蛍光は殆ど消失した。したがってこの蛍光抗体法における非特異反応は培地成分に対する抗体に起因するものであり、*M. orale* などとの交差反応ではないと考えられた。

4) 抗体の至適濃度を決めるために、一次抗体は 4, 10, 20, 40, 100 倍に、二次抗体は 10, 20, 50, 100, 200 倍に各々 PBS で希釈して検討した。その結果、抗体の lot によっても異なるが一次抗体は 20~40 倍、二次抗体は 50~100 倍希釈したものが最も蛍光が強く、しかも background の非特異蛍光が少なく、適当であった。

2. 咽頭スマアにおける間接蛍光抗体法

1) 対照とする健常者の咽頭スマアにおいて前処置なしで行なうと background に非特異蛍光を認めたため、前処置として正常ヤギ IgG、ヤギ血清、ウサギ血清または Bovine serum albumin (BSA) との反応を加えた。その結果 BSA 以外はこれを明らかに減弱でき、中でも正常ヤギ IgG が最もその効果が著しかったので臨床例には正常ヤギ IgG による前処置を加えたものを検討した。

2) Mp 肺炎例の咽頭スマアから 2 型の蛍光パターンを認めた。第 1 型は粘液中に凝集塊あるいは細胞断片上に認める大小顆粒状の蛍光であり (Fig. 5-a)、第 2 型は小型上皮細胞のほぼ全表面より diffuse に観察される蛍光である (Fig. 5-b)。この 2 型は独立してではなく症例により種々の割合に混在して観察された。これらの蛍光パターンが標本中数か所以上はかなり広く存在しているものを Indirect Immunofluorescence

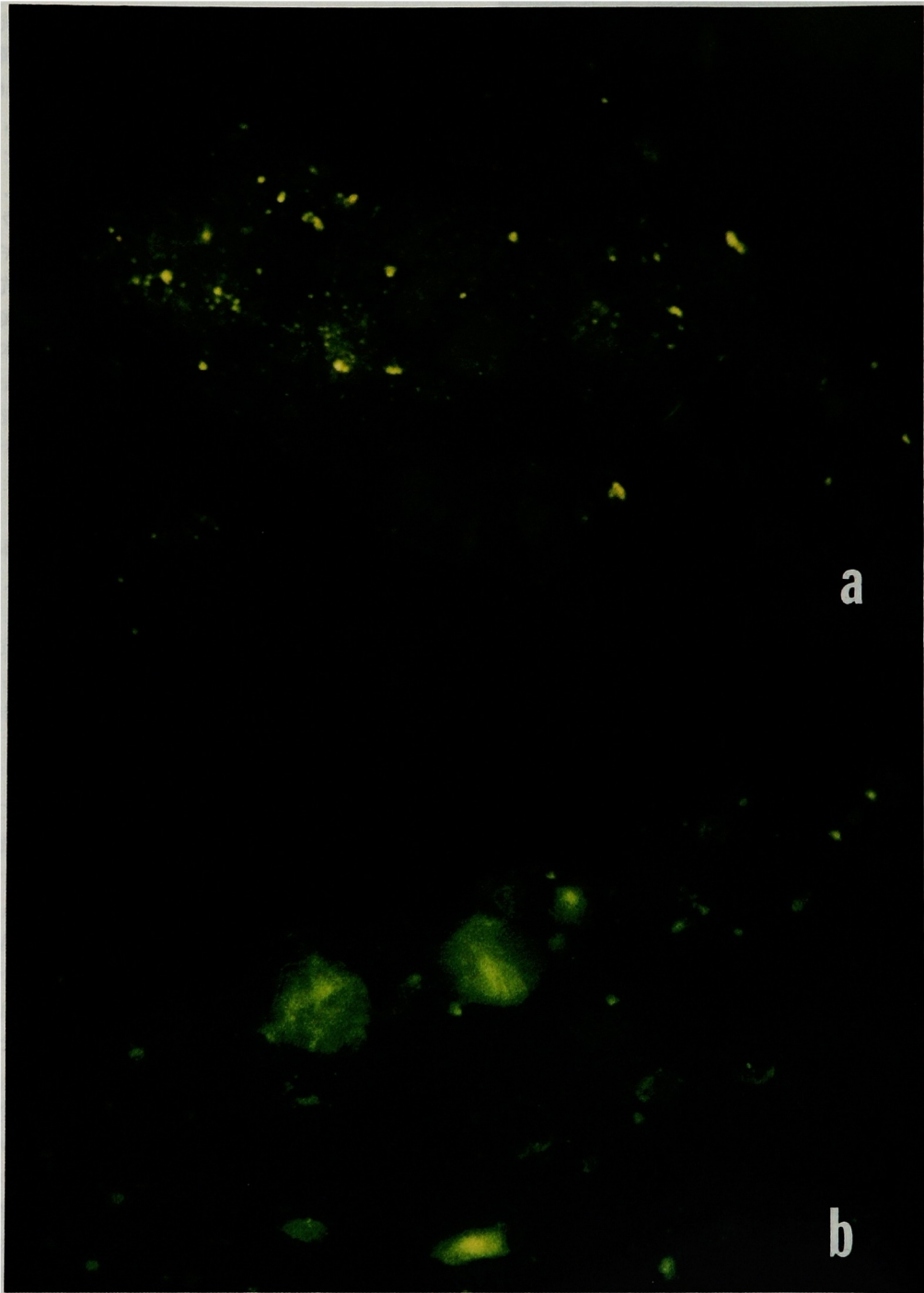


Fig. 5 Indirect immunofluorescence pattern of the throat smears from mycoplasma pneumoniae patients
a : The granular fluorescence was observed mainly in the mucus.
b : The diffuse fluorescence was observed on the entire surface of the epithelium.

Table 2 The indirect immunofluorescence and the serological data of the clinical cases.

Case	Sex/Age	Day	CHA	PHA	CF	Diagnosis	IF
1. R. M.	F/37	14	256→512	<40→2560	64	M.P.	+++
2. T. K.	M/15	10	1024	640	16→64	M.P.	+++
3. M. M.	F/18	5	1024→2048	<40→>1280	8→>256	M.P.	+++
4. K. T.	M/8	4	512→2048	640	32	M.P.	+++
5. Y. M.	F/31	6	512	160→320	16→32	M.P.	++
6. N. Y.	F/6	11	2048	80→320	32	M.P.	++
7. K. M.	F/11	4	512	<40→320	16	M.P.	++
8. M. K.	M/9	6	2048→8192	40→320	8→>256	M.P.	+
9. K. K.	F/9	7	512	40→1280	4	M.P.	+
10. N. N.	M/8	3	512→2048	40→640	<8→64	M.P.	-
11. S. M.	M/81		256	<40	<4	COPD	-
12. M. K.	M/68		256	<40	<4	COPD	-
13. T. S.	M/77		8	<40	<4	Pneumonia	-
14. H. Y.	F/32		256	<40	4	Pneumonia	-
15. T. Y.	M/69		16	<40	4	Silicosis	-

CHA : Cold haemagglutinin. PHA : Passive haemagglutination.
 CF : Complement fixation. IF : Indirect immunofluorescence.
 M.P. : Mycoplasmal pneumonia. COPD : Chronic obstructive pulmonary disease.
 → indicates the results of paired sera.

(IF) +, 全体に観察されるものを++, 全体的に多量検出されるものを+++として判定した。このような判定基準で臨床例について検討した結果を Table 2 に示す。症例1-10は血清抗体価の上昇により Mp 肺炎と診断した症例であるが、この10例中9例が IF 陽性であった。一方、表には5症例しか記していないが、健康者および他の呼吸器感染症20例においては全て陰性であった。すなわち間接蛍光抗体法陽性と病期進行にともなう血清抗体価 CF, PHA の上昇とは非常によく相関した。

3) 症例3, 7, 8, 9では初診時には PHA, CF 抗体価の上昇は認めず, 1~2週間後のペア血清で初めて本症と診断されたものであるが IF では初診時の咽頭スマア一で直ちに陽性と判定し得た。

次に代表的な症例を1例呈示する。

[症例3]

18歳, 女性, 昭和60年1月4日より38℃の発熱, 咳嗽, 喀痰が出現, 1月8日初診。胸部 X-P (Fig. 6) で左下葉に浸潤影を認め, 肺炎の診断で入院した。左背部にラ音を聴取。WBC6800/cmm, 赤沈1時間値53mm, CRP 8+, Mycoplasma 抗体価 PHA40倍以下, CF 8倍, 寒冷凝集素価1024倍。咽頭スマア一の間接蛍光抗体法では全視野に顆粒状の蛍光を認め IF(+++)と判定した。Mp 肺炎と考え Minocycline

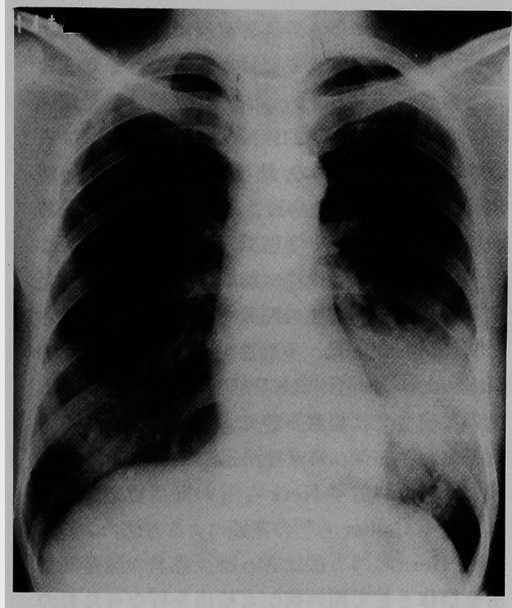


Fig. 6 Chest X-ray film of case 3 An infiltrative shadow was observed in the left lower lung field.

cline200mg/日を投与したところ翌日より下熱傾向となり, 咳嗽も次第に減少してきた。4日目, 7日目の咽頭スマア一においても IF 陽性であった。10日目, PHA1280倍以上, CF256倍以上と上昇し Mp 肺炎と確定した。

考 察

Mp 肺炎に対する血清学的診断法としては, 補体結合反応(CF), 受身赤血球凝集反応(PHA), 寒冷凝集素価 (CHA), 代謝阻止試験 (MIT) などが現在頻用されている検査法である。これらを組み合わせることにより抗体の検出率は高まるが, 特異性においてなお問題を残している⁹⁾⁻¹¹⁾。近年, Busolo ら¹²⁾により Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用いた特異的 IgG および IgM 抗体の測定法が開発された。その後, Räisänen ら¹³⁾は ELISA の抗原に Tween-80-ether 処理し精製した蛋白抗体を用いる方法を, また Jacobs ら¹⁴⁾は Mp の附着性蛋白 (分子量168kd) を抗原とした dot ELISA 法を報告するなど特異性を高めるためのいくつかの改良が試みられてきた。一方, 培養法における新たな試みとしては Tulley の方法¹⁵⁾¹⁶⁾が

り、SP-4培地による分離と直接蛍光抗体法による同定との併用によって検出率が著しく向上したと報告している。

このように血清学的診断法や培養法における進歩は見られるものの、最も早期に上昇するIgM抗体の出現でさえ発病後1週間以降であり¹⁷⁾、菌の培養同定には2~3週間が必要である。そこで著者は病初期に迅速に診断することを目的として菌の直接同定法の開発を行なった。

Mycoplasma は、多形性で大きさは300~800 nm と最小の細菌¹⁸⁾であり通常の染色などによる光顕レベルでは観察不能である。文献的に臨床材料におけるMpの直接同定法に関する報告は、現在までに1967年Hersら¹⁹⁾の間接蛍光抗体法と1974年Collierら²⁰⁾の電顕による方法の2つがある。Hersらの方法はMp肺炎患者の回復期血清を抗体として用い痰から検出を行なったものであるが、非特異蛍光が多いためその後は行なわれなかった。これは人血清中には常在菌である*M. orale*, *M. salivarium* などに対するある程度の抗体が含有されているためと考えられる。最近になって動物実験ではあるが、1986年石山²¹⁾はハムスターの実験系でavidin-biotin-peroxidase complex methodを用いた方法を開発し臨床応用への可能性を示唆した。

今回、著者はまず抗Mp抗体をウサギへの接種で作製し、GITと間接epi-immunofluorescenceで特異性を確認した後、培地成分に対する抗体を吸収して特異抗体を精製した。そして前処置として正常ヤギIgGによるblocking操作を加えることでbackgroundの非特異蛍光を減弱させることができた。スメアーは、咳嗽後の咽頭後壁の擦過物を薄く塗抹したものが非特異蛍光が少なくしかも十分量の上皮細胞を採取でき良好な検体であった。痰の塗抹標本では、粘液成分が多くなり非特異蛍光の排除が困難なため検体としては不適であった。なおMpと他のMycoplasma間における抗原交差性の問題であるが、佐々木ら²²⁾は口腔内常在の種々のMycoplasmaとMpとの共通抗原の存在を指摘している。この点につき著者は間接蛍光抗体法とラテックス凝集反応で検討した結果、培地成分に対する抗体を吸収後の抗MpウサギIgGは、両法

のレベルでは*M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii*との交差反応を示さなかった。また咽頭スメアーにおける検討でも対照例には偽陽性を認めずMp肺炎例のみに特異蛍光を認めた。したがって、この間接蛍光抗体法はかなり特異性の高いMpの検出法であると考えられる。しかも所要時間は2~3時間と短く、手技も比較的簡便であることによりMp肺炎の迅速診断法として極めて有用である。

ところでMpが異型肺炎を惹起することは周知のことであるが、本菌の感染病態にはなお不明な点が多い^{12,23)}。ハムスターや器官培養系、細胞培養系における感染実験によれば、Mpはその特有の末端構造terminal structureによって線毛上皮細胞表面の線毛基底部に付着し感染を惹起させることが観察されている^{24)~26)}。菌の細胞内侵入はなく、上皮細胞の全表面を覆うように非常に多数の菌が付着し、さらに集塊形成や細胞間隙のmicrocolony形成へと進展する。Collierら²⁰⁾は患者痰の電顕像もこれと同様の所見であることから感染実験と臨床例の病態との一致を指摘した。このことから今回の蛍光像の第1型は細胞断片に付着したMp菌集塊あるいはmicrocolonyを、第2型は小型細胞全表面に付着したMpを示すものと思われる。石山²¹⁾の観察したclusterと思われる不整形構造物は前者であり、染色陽性線毛上皮細胞は後者に相当する。平井ら²⁾は同じ間接蛍光抗体法を用いて腔スメアーから*M. hominis*を検出したが、その際の蛍光像は細胞表面にmicrocolonyと考えられる明瞭な粒状蛍光の散在したものであり今回の所見とは異なる像であった。これはMpと*M. hominis*の存在形態の違いすなわち*M. hominis*が腔常在菌として上皮細胞上でcolonyを形成して生息しているのに対して、Mpは上皮細胞への感染および増殖状態を示しているためと考えられる。この点からも本検出法はMpの存在の有無の判定のみならず、その感染病態解明への一助となることが期待される。

一般に、Mp肺炎例からの培養法によるMpの検出率は70~80%とされている²³⁾。本検出法では菌の生死に関わらず、また抗生剤投与にも影

響されないので検出頻度はより高率になることが予測される。しかし定量性に乏しいため判定には慎重でなければならない。症例10は対照例に比較すれば細胞表面に弱い蛍光を認めるが陽性例ほどの顕著なものを欠くため陰性と判定した。スメア採取の仕方や病期によりこのような判定困難例に遭遇すると考えられるので、今後訪れるであろう Mp 肺炎の多発年に症例を集積し新たな判定基準の設定を行ないたいと考えている。

結 論

咽頭スメアから *Mycoplasma pneumoniae* (Mp) を迅速に検出することを目的として間接蛍光抗体法を行ない以下の結果を得た。

1. Mp FH 株の培養濃縮液でウサギを免疫し抗 Mp ウサギ IgG を精製した。本抗体には培地成分に対する抗体も含まれていたが、それを吸収後は *M. orale*, *M. salivarium*, *M. hominis*, *Acholeplasma laidlawii* との交差反応をほとんど認めなかった。

2. 咽頭スメアを用い、20倍希釈の抗 Mp ウサギ IgG を一次抗体として、50倍希釈の FITC 標識抗ウサギ IgG ヤギ IgG を二次抗体として間接蛍光抗体法を行なった。健常者例の検討から

この操作に先立ち正常ヤギ IgG との反応を前処置として加えることにより background の非特異蛍光を抑制し得た。

3. マイコプラズマ肺炎 (Mp 肺炎) 10例中 9例に特異蛍光を認めた。蛍光パターンは粘液中の顆粒状蛍光と上皮細胞表面の diffuse な蛍光の 2型に分類された。一方健常者や他の呼吸器感染症例からはこれらの特異蛍光を認めなかった。

4. 症例においては血清抗体価の上昇よりも早期にすでに蛍光を検出した。

4. 本法は Mp の特異的検出法であり、所要時間 2～3時間で結果が判明することと上記のことを考えあわせると Mp 肺炎における迅速診断法として有用である。

謝 辞

稿を終えるにあたり、終始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、多大なる御協力、御助言を戴きました寺坂薫先生、細菌学教室の諸先生ならびに貴重な資料を提供していただきました岡山済生会総合病院 安田英己博士、鏡野町立病院 西林尚祐先生に厚く御礼申し上げます。

文 献

1. Tully JG and Whitcomb RF : The Mycoplasmas vol II, Academic Press, New York (1979) pp275—306.
2. Hirai Y, Shiode J, Terasaka K, Mori N, and Kanemasa Y : Rapid detection of *Mycoplasma hominis* in vaginal smear by indirect immunofluorescence. The 2nd China-Japan international congress of microbiology Shanghai symposium (1986) pp63—64.
3. Clyde WA : *Mycoplasma* species ; Identification based upon growth inhibition by specific antisera. J Immunol (1974) 92, 958—965.
4. Barile MF and RA Del Giudice : Isolations of mycoplasmas and their rapid identification by plate epi-immunofluorescence. "Pathogenic Mycoplasmas" Ciba Foundation Symposium, Amsterdam, Elsevier (1972) pp165—185.
5. Taylor-Robinson D and Shirai A : Serologic response to mycoplasma pneumoniae infection. Am J Epidemiol (1966) 84, 301—313.
6. Taylor P : Evaluation of an indirect haemagglutination kit for the rapid serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infections. J Clin Pathol (1979) 32, 280—283.
7. Kenny GE and Newton RM : Close serological relationship between glycolipids of *mycoplasma*

- pneumoniae* and glycolipids of spinach. Ann NY Acad Sci (1973) 225, 54—61.
8. Berdal BP and Eng J : Coreactivity of *Legionella pneumophila* immune sera in the *Mycoplasma pneumoniae* complement fixation test. J Clin Microbiol (1982) 16, 794—797.
 9. Rousseau SA and Tettmar RE : The serological diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection : a comparison of complement fixation, haemagglutination and immunofluorescence. J Hyg Camb (1985) 95, 345—352.
 10. Taylor-Robinson D and Sobeslavsky O : Serologic response to *Mycoplasma pneumoniae* infection. Am J Epidemiol (1966) 83, 287—298.
 11. Lind K, Lindhardt B, Schutten H, Blom J, and Christiansen C : Serological cross-reactions between *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. J Clin Microbiol (1984) 20, 1036—1043.
 12. Busolo F, Tonin E, and Conventi L : Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Mycoplasma pneumoniae* antibodies. J Clin Microbiol (1980) 12, 69—73.
 13. Räsänen S, Suni J, and Vaheri A : *Mycoplasma pneumoniae* protein involved in the antibody response in human infection. J Clin Pathol (1984) 37, 1129—1133.
 14. Jacobs E, Fuchte K, and Bredt 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.
 15. Tully JG : New laboratory techniques for isolation of *Mycoplasma pneumoniae*. Yale J Biol and Medicine (1983) 56, 511—515.
 16. Tully JG, Rose DL, Whitcomb 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.
 17. van Griethuysen AJA, Graaf R and van Druten JAM : Use of the enzymelinked immunosorbent assay for the early diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* infection. Eur J Clin Microbiol (1984) 3, 116—121.
 18. Razin S and Freundt EA : The mycoplasmas; in Bergey's manual of systematic Bacteriology vol I Krieg and Holt eds, Williams & Wilkins, Baltimore (1984) pp740—770.
 19. Hers JF and Masurel N : Infection with *Mycoplasma pneumoniae* in civilians in the Netherlands. Ann NY Acad Sci (1967) 143, 447—460.
 20. 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.
 21. 石山業弘 : モノクローナ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.
 22. 佐々木次雄, 伊藤建一郎, 木原光城 : *Mycoplasma pneumoniae* ELISA 抗体価に及ぼす *M. pneumoniae* 非特異抗体の影響について. 日細菌誌 (1987) 42, 146.
 23. Rollins S, Colby T and Clayton F : Open lung biopsy in *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia. Arch Pathol Lab Med (1986) 110, 34—41.
 24. 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.
 25. Collier AM, Clyde WA and Denny F : *Mycoplasma pneumoniae* in hamster tracheal organ culture : immunofluorescence and electron microscopic studies. Proc Soc Exp Biol Med (1971) 136, 569—573.
 26. Gabridge MG : A review of the morphological and biochemical features of the attachment process in infections with *Mycoplasma pneumoniae*. Rev Infect Dis (1982) 4, Supp, 179—184.

27. Collier AM and Clyde WA : Relationship between *Mycoplasma pneumoniae* and human respiratory epithelium. *Infect Immun* (1971) 3, 694-701.
28. Collier AM and Baseman JB : Organ culture techniques with Mycoplasmas. *Ann NY Acad Sci* (1973) 149, 277-289.
29. 新津泰孝, 堀川雅浩, 小松茂夫ら: 肺炎マイコプラズマ感染症; 小児科MOOK27, 馬場一雄, 小林登編, 金原出版, 東京 (1983) pp169-196.

**Rapid detection of *Mycoplasma pneumoniae* in throat smears
by indirect immunofluorescence**

Junji SHIODE

Department of Microbiology, Okayama University Medical school,

Okayama 700, Japan

(Direct : Prof. Y. Kanemasa)

In mycoplasmal pneumonia, both bacteriological and serological diagnoses are retrospective and, therefore, offer little help to clinicians. The isolation and identification of *M. pneumoniae* (Mp) require more than 1-2 weeks, and the serum antibody titer takes 1-2 weeks to rise after onset of the disease.

I have developed a rapid test which applies the indirect immunofluorescent technique, for patient throat smears.

Anti-Mp rabbit IgG was prepared by immunizing a rabbit with a concentrated cell suspension of Mp. Purified anti-Mp rabbit igG (primary antibody) and FITC-labeled anti-rabbit IgG goat IgG were applied to the throat smears which were pretreated with normal goat IgG to eliminate background non-specific fluorescence.

Specific immunofluorescence was seen in 9 out of 10 throat smears from patients with Mp infection. Both granular and diffuse types of fluorescence were seen in the smears; the former was found in mucus and the latter on the entire surface of the epithelium. No specific immunofluorescence was seen in smear taken from patients with other respiratory infections or from normal volunteers.

I consider that the method is useful for the early and rapid diagnosis of mycoplasmal infection.