

生菌免疫および受身免疫マウスにおける *Mycoplasma pneumoniae* 感染に対する防御効果について

浦和学院

彌 吉 眞 澄

北里研究所

早 津 栄 蔵

東京女子医大微生物学教室

吉 岡 守 正

(昭和63年12月6日受付)

(平成元年1月10日受理)

Key words : *Mycoplasma pneumoniae*, *Protective effect*, *85KDa protein*,
non-hemolysis mutant

要 旨

*Mycoplasma pneumoniae*感染により、菌分離ならびに免疫応答のみられることが確認されたBALB/cマウスを実験モデルとして、*Mycoplasma pneumoniae* FH-P24および非溶血弱毒変異株 P24-S1, P24-S11で生菌免疫した生菌免疫群、またそれらの抗血清での受身免疫群において感染防御実験を行った。

生菌免疫による防御効果は免疫回数に関係なく、免疫8週後ではFH-P24, P24-S1免疫群ともに70%、12週後ではFH-P24 80%、P24-S1 60%であった。一方P24-S11と非免疫対照群との間に差は認められなかった。

受身免疫ではIgG抗体価と感染防御効果とは必ずしも平行しなかった。親株抗血清による防御効果は20%にすぎなかったが、これと同じ結果を得るためには、P24-S1, P24-S11ともにその10倍濃度の抗血清が必要であった。また、ヒトマイコプラズマ肺炎患者血清とのWestern immunoblottingによると、P1抗体に対しては親株、変異株ともに強い反応を示したが、およそ85KDaの強いbandはP24-S11には全くみられなかった。

序 文

ヒトの気管支炎、肺炎の重要な病原体として知られている *Mycoplasma pneumoniae* (以下、*M. pneumoniae* と略す) は、ガラス、プラスチック、細胞、赤血球などに付着し易く^{1)~4)}、また寒天培地上でヒト、モルモット等の赤血球を溶血する⁵⁾ という生物学的性状を有する。

われわれはこの *M. pneumoniae* から非溶血弱毒変異株 (*M. pneumoniae* P24-S1, P24-S11) を得て、その生物学的性状および病原性について報

告した^{6)~8)}。

M. pneumoniae に感受性の強いハムスターを実験モデルとしてP24-S1の生菌ワクチンの可能性についても報告した⁹⁾。この際、防御効果の高かった免疫群のIgG抗体および細胞性免疫は、その他の群に比べて有意に高いことが認められた。

さらにBALB/cマウスの本菌に対する感受性ならびに免疫応答についても検討し、実験モデルとしてBALB/cマウスも使用し得ることを確認した¹⁰⁾。そこで今回はBALB/cマウスを生菌免疫および受身免疫して、*M. pneumoniae* 攻撃に対する感染防御効果について検討したので報告する。

別刷請求先：(〒337) 浦和市代山172番地
浦和学院高等学校 彌吉 眞澄

材料と方法

1. 使用菌株

M. pneumoniae FH-P24¹¹⁾ (ハムスター24代継代病原株, 親株, 以下FH-P24と略す), *M. pneumoniae* FH-P24-S1⁸⁾ (非溶血弱毒変異株, 以下P24-S1と略), *M. pneumoniae* FH-P24-S11 (非溶血弱毒変異株, 以下P24-S11と略)

2. 免疫方法

1) 生菌免疫

SPF-BALB/c 5週齢マウスに親株および変異株を集菌洗浄し, PBS pH 7.2に浮遊して, それぞれ経鼻感染した.

Single dose ; 1回のみ経鼻接種

Two doses ; 1週間隔, 2回経鼻接種

2) 受身免疫

SPF-BALB/c 5週齢マウスの尾静脈より各菌株で免疫して得たモルモット血清(抗FH-P24, 抗P24-S1, 抗P24-S11)を0.1ml宛接種した. 抗血清の濃度はELISAにてIgG値が等しくなるように調整したものを1/10とし, 1はその10倍濃度の血清を意味する.

3. 病原株攻撃

生菌免疫群では最終免疫から8週後および12週後に, 受身免疫群では抗血清接種18時間後にそれぞれ, FH-P24を10⁶CFU/mouse宛経鼻接種した. 同時に非免疫マウスにも同様接種し, 攻撃対照群とした.

4. 菌の分離および感染防御効果の判定

病原株攻撃1週後に屠殺解剖し, 気管および肺をホモジナイザーで破碎し, 遠心上清をPPLO寒天培地に接種した. そのいずれからも菌が分離されなかった場合のみ防御効果があると判定した.

5. 免疫状態の測定

1) ELISA⁹⁾¹²⁾

マイクロタイタープレート(Flow社, Virginia, USA)のウェルに付着させた抗原に被検血清を反応させた後, アルカリフォスファターゼ標識抗体を加え, 基質としてp-ニトロフェニルリン酸を用いた. 反応後の吸光度を405nmで測定した.

2) マクロファージ遊走阻止試験(Macrophage Migration Inhibition Test: MIT)

各群毎にマウスの腹腔渗出細胞を集め, アガロース小滴法⁹⁾¹³⁾により, マクロファージ遊走阻止率をもとめた. すなわち, 組織培養用チャンバー(Lab Tek Products, Ill., USA)内にマウス腹腔細胞を含むアガロース小滴を滴下し, MEMイーグル(Flow社, Va., USA)を満たして37℃炭酸ガスふ卵器内(5%CO₂)で培養し, アガロース小滴からのマクロファージの遊走距離を測定した. 阻止率は次の式により算出した.

$$\text{遊走阻止率}\% = 100 -$$

$$\frac{\text{抗原加培地中の遊走距離の平均}}{\text{抗原無添加培地中の遊走距離の平均}} \times 100$$

6. Western immunoblotting

抗原をSDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)¹⁴⁾で泳動後, Towbin等の方法¹⁵⁾に従い, ニトロセルローズ膜へ転写し, ヒトのマイコプラズマ肺炎患者血清と反応, ペルオキシダーゼ標識抗ヒトIgGをジアミノペンチンで発色させ, blotting bandを観察した.

実験成績

1. 生菌免疫による感染防御効果

最終免疫から8週後のマウスに対する病原株攻撃の結果をTable 1に, 12週後の結果をTable 2に示した.

最終免疫8週後のFH-P24 1回免疫群では, 70%, 2回では80%, P24-S1免疫群においては免疫回数にかかわらず70%の防御効果を示した. 防御効果のなかった数匹についても, その分離菌数は僅少であり, 非免疫対照群に比べて明らかに有意差が認められた.

これに反してP24-S11免疫群は2回免疫しても完全な防御効果を示すものは1匹もなかった.

12週後でも8週後と同様の防御効果を認め, P24-S1免疫群の5匹中2匹の肺から, 親株は5匹中1匹の肺からのみ菌が分離された. P24-S11免疫群は8週後の結果と同様, 対照群と全く変らなかった.

2. 生菌免疫(感染)後の液性免疫および細胞性免疫(MIT)の経時的変化

BALB/cマウスが*M. pneumoniae*感染によって免疫応答を示すことは, すでに報告¹⁰⁾したが, 親

Table 1 Protective effect in BALB/c mice of immunization with parent strain and hemolysis mutants of *M. pneumoniae*

	<i>M. pneumoniae</i> isolated from : (n=10)			% of protection	Recovery (Mean CFU/ml) (n=10)	
	trachea	lung	total		trachea	lung
8 weeks after last vaccination						
Single dose						
FH-P24	3	0	3	70*	4.7×10^1 *	0*
P24-S1	2	2	3	70*	2.0×10^2 *	3.0×10^2 *
P24-S11	9	7	10	0	3.1×10^3	1.9×10^2 *
None	10	8	10	0	6.2×10^3	1.3×10^4
Two doses						
FH-P24	2	0	2	80*	4.0×10^2 *	0*
P24-S1	3	1	3	70*	9.2×10^2 *	1.0×10^3 *
P24-S11	10	7	10	0	1.4×10^4	2.7×10^3
None	9	10	10	0	8.8×10^3	1.5×10^4

*: p<0.01

Table 2 Protective effect in BALB/c mice of immunization with parent strain and hemolysis mutants of *M. pneumoniae*

	<i>M. pneumoniae</i> isolated from : (n=5)			% of protection	Recovery (Mean CFU/ml) (n=5)	
	trachea	lung	total		trachea	lung
12 weeks after vaccination						
FH-P24	0	1	1	80*	0*	1.0×10^2 *
P24-S1	2	1	2	60*	1.5×10^3 *	2.8×10^3 *
P24-S11	5	5	5	0	2.3×10^5	5.8×10^5
None	5	5	5	0	1.3×10^4	2.7×10^5

*: p<0.01

株および変異株による生菌免疫後の抗体価および MIT の変化を Fig. 1, Fig. 2 に示した。

抗体価は免疫初期から12週後にいたるまで IgA, IgM とともに正常値よりやや上昇したにすぎなかったが, IgG は FH-P24, P24-S1 両免疫群とも 8 週後には著しく上昇し, 12 週ではさらに高い値を示した。P24-S11 免疫群は 8 週後, 12 週後ともに有意な上昇はみられなかった (Fig. 1)。

MIT は, FH-P24, P24-S1 免疫群では, 6 週後から, P24-S11 免疫群では 8 週以後に上昇し, 親株, 変異株とも免疫 8 週後に 40% を越えて最高の阻止率を示したが, それ以後は徐々に減少し, 12 週後では全ての免疫群が 23% まで下がった (Fig. 2)。

3. 病原株攻撃時の免疫状態

生菌免疫 8 週後の病原株攻撃時の抗体価と MIT は Table 3 に示すように, IgA と IgM は全免疫群ともほとんど差がなく, FH-P24, P24-S1 免疫群の IgG のみが免疫回数にかかわらず高かった。MIT はいずれの免疫群にも差がなく, 阻止率 40% 以上で非免疫対照群より有意に高かった。

免疫12週後では FH-P24, P24-S1 免疫群の IgG 抗体価は一層上昇していたが, MIT は 22% まで各群とも低下していた (Table 4)。

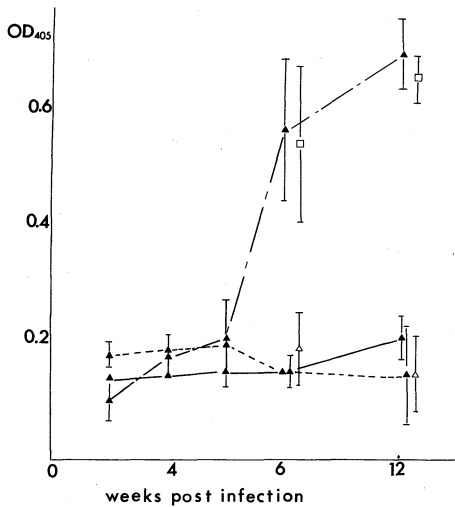
4. 受身免疫による感染防御

抗血清接種後のマウス血清中の IgG の推移は, 例えば 18 時間後の吸光度 1.509 のものが, 1 週後には 0.365 に低下した。

ELISA にて IgG 値が等しくなるように調整した各抗血清で受身免疫した場合の感染防御効果は

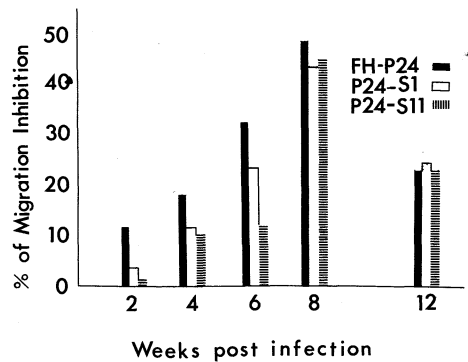
Fig. 1 Humoral immune responses. The mean ELISA OD is represented by each point.

Symbols: ▲, FH-P24, —, IgA, ---, IgG, ·····, IgM, □, P24-S1 IgG, △, P24-S11 IgG.



FH-P24受身免疫群のみ20%の防御率を示したが、他は全く効果がみられなかった。しかし、この10倍濃度の抗 P24-S1, 抗 P24-S11血清で免疫すると、上記 FH-P24群と同じ防御率を示した (Table 5)。防御率20%を得た3群の平均分離菌数は、それ以外の群のものより有意に低かった (Table 6)。

Fig. 2 Cell mediated immune responses (MIT-agarose droplet method). Each column represented % of macrophage migration inhibition.



5. 患者血清との Western immunoblotting
親株および変異株を抗原としてヒトのマコプラズマ肺炎患者血清と反応させた immunoblotting pattern を Fig. 3 に示した。FH-P24, P24-S1では強く反応する2本の band がいずれの患者血清に対してもみられた。一本は165KDa の P1であり、もう一本はおよそ85KDa の蛋白に対するものであるが、P24-S11では85KDa の蛋白に対する反応は全くみられなかった。

考 察

ハムスターでの実験から、生菌ワクチンとして

Table 3 Immunological status of BALB/c mice at the time of challenge 8 weeks after last vaccination

	Serum antibody titer : ELISA ¹⁾			Cell-Mediated % of MI ²⁾
	IgA	IgG	IgM	
Single dose				
FH-P24	0.134±0.009	0.468±0.085*	0.106±0.020	48.7*
P24-S1	0.145±0.022	0.224±0.066*	0.096±0.029	48.1*
P24-S11	0.141±0.004	0.056±0.010	0.103±0.004	38.9*
None	0.122±0.004	0.069±0.010	0.132±0.052	7.6
Two doses				
FH-P24	0.152±0.016	0.567±0.132*	0.150±0.034	47.6*
P24-S1	0.139±0.021	0.548±0.174*	0.134±0.021	42.7*
P24-S11	0.127±0.047	0.194±0.060	0.138±0.015	44.4*
None	0.127±0.060	0.090±0.027	0.150±0.025	5.4

* : p<0.01

1) Mean optical density at 405nm±SD

2) % of migration inhibition : Macrophage migration inhibition test by agarose droplet method.

Table 4 Immunological status of BALB/c mice at the time of challenge
12 weeks after vaccination

	Serum antibody titer: ELISA ¹⁾			Cell-mediated ²⁾ % of MI
	IgA	IgG	IgM	
FH-P24	0.214±0.034	0.697±0.062*	0.141±0.092	22.5
P24-S1	0.129±0.016	0.659±0.044*	0.124±0.097	23.8
P24-S11	0.139±0.072	0.149±0.046	0.175±0.141	22.8
None	0.125±0.019	0.090±0.027	0.132±0.089	11.2

*: $p < 0.01$

1) Mean optical density at 405nm±SD

2) % of migration inhibition: Macrophage migration inhibition test by agarose droplet method.

Table 5 Protective effect in BALB/c mice after transfer of antiserum *M. pneumoniae* FH-P24 and mutant strains

Antiserum ¹⁾ against to	ELISA ²⁾ activity	<i>M. pneumoniae</i> isolated from (n=10)			% of protection
		trachea	lung	total	
FH-P24	1/10	8	4	8	20
P24-S1	1	8	8	8	20
P24-S1	1/10	10	8	10	0
P24-S11	1	8	6	8	20
P24-S11	1/10	9	10	10	0
None	/	10	10	10	/

1) Antiserum was prepared by injection of strain FH-P24 or mutant strains into guinea-pigs.

2) Antiserum was adjusted to equal ELISA IgG values and ten-fold dilution.

Table 6 ELISA IgG value and recovery from trachea and lung of passively BALB/c mice after challenged with *M. pneumoniae* FH-P24

Passively immunized with	Antiserum ELISA activity	ELISA IgG (n=10) Mean OD±SD	Recovery (Mean CFU/ml)(n=10)	
			trachea	lung
FH-P24	1/10	0.863±0.096	2.1×10 ³	5.3×10 ²
P24-S1	1	0.578±0.061*	1.1×10 ⁴	9.8×10 ³
P24-S1	1/10	0.843±0.089	9.3×10 ⁴	2.7×10 ⁵
P24-S11	1	0.568±0.089*	7.2×10 ²	1.8×10 ²
P24-S11	1/10	0.485±0.024	4.3×10 ⁵	3.3×10 ⁵
None	/	0.069±0.034	1.6×10 ⁵	4.8×10 ⁵

*: $p < 0.01$

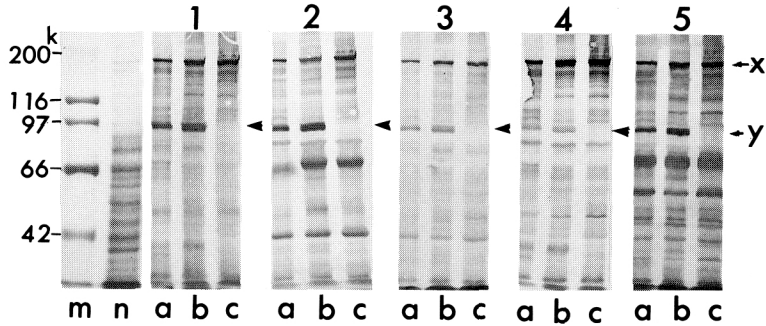
の条件をそなえていると考えられる P24-S1 の感染防御因子を追求するうえでの手段の一つとして、*M. pneumoniae* 感染により免疫応答が認められ、菌も分離することが可能な BALB/c マウスを用いた。

生菌免疫ハムスターで感染防御効果の高かった

群の IgG 抗体価、細胞性免疫 (MIT) の両者が、防御効果の低い群や非免疫対照群に比べて有意に高かったことから、感染防御には IgG とともに細胞性免疫も重要な因子であると推論した。しかし、本実験では防御効果のない P24-S11 免疫群でも、免疫 8 週後には細胞性免疫が他の群と同程度成立

Fig. 3 IgG-immunoblots developed with sera from patients of *M. pneumoniae* infection.

M: marker proteins, n: *M. pneumoniae* (Coomassie blue stained), a: *M. pneumoniae* FH-P24, b: *M. pneumoniae* P24-S1, c: *M. pneumoniae* P24-S11, x: P1 (165-KDa), y: 85-KDa



し、また細胞性免疫がこれより低下した12週後でも防御率は低下しなかったという結果が得られた。さらに免疫23週後のP24-S1生菌免疫群では、IgG抗体価は上昇、細胞性免疫は対照群と同じ値にまで低下したにもかかわらず、防御効果に変化はなかった(データ不示)。IgA、IgMについては生菌免疫8週後、12週後ともに対照群との差はみられなかった。このことから菌の分離を指標にした感染防御では、細胞性免疫よりはむしろIgGが重要であろうと考えられる。そこで、IgG抗体価の高い抗血清で受身免疫したマウスを同様に実験した結果、FH-P24の抗血清では20%の防御効果を得た。一方生菌免疫では親株と変らない防御効果を示したP24-S1の抗血清で受身免疫した群と、効果のなかったP24-S11受身免疫群とはほぼ同じ結果を示した。すなわちFH-P24と同じ防御効果を得るためには、両者とも10倍濃度の抗血清を接種しなければならなかった。病原株攻撃時において生菌免疫による血清中のIgG値より高い値を示す免疫状態であってもわずかに20%の防御効果にとどまった。このことから、たんにIgG値が高いことだけが感染防御と一致するのではなく、IgGに対応する抗原の違いを検討することの重要性が再確認された。

M. pneumoniae の蛋白については、付着因子、病原因子等に関与するものとして非常に多くの報告がある。なかでも attachment protein とよばれ

るP1については、とくに多くの報告^{16)~18)}がなされているが、それ以外にも43KDa¹⁹⁾、32KDa²⁰⁾、92KDa、62KDa²¹⁾等の報告もみられる。本実験でも、ヒトのマイコプラズマ肺炎患者とのWestern immunoblottingにより、親株とP24-S1では強く反応しているbandのうち、およそ85KDaに対するbandがP24-S11にはみられなかったという違いがみられた。これが、生菌免疫によるP24-S1とP24-S11の間の差を生じさせる原因の一つである可能性を示唆している。

生菌免疫の実験の結果から細胞性免疫よりもむしろIgGが重要であると考えられ、受身免疫をしたが、防御効果とIgG値が平行するものではないという結果となった。細胞性免疫についてはMITによる結果のみで判定したものであるため他の検定法では異なる結果が得られる可能性も否定できない。

BALB/cマウスは*M. pneumoniae*により肺病変はおこさないため、感染防御を菌の分離のみを指標として判定したが、再度、本菌に対する感受性動物であるハムスターを用いて、肺病変も合わせて検討し、85KDa蛋白をはじめとして感染防御に関わる因子を追求してゆきたい。

文 献

- 1) Sobeslavsky, O., Prescott, B. & Chanock, R.M.: Adsorption of *Mycoplasma pneumoniae* to neuraminic acid receptors of various cells and

- possible role in virulence. *J. Bacteriol.*, 96 : 695—705, 1968.
- 2) Collier, A.M. & Clyde, W.A. Jr.: Relationship between *Mycoplasma pneumoniae* and human respiratory epithelium. *Infect. Immun.*, 3 : 694—701, 1971.
 - 3) Powell, O.A., Hu, P.C., Wilson, R.M., Collier, A. M. & Baseman, J.B. Attachment of *Mycoplasma pneumoniae* to respiratory epithelium. *Infect. Immun.*, 13 : 959—966, 1976.
 - 4) Gabridge, M.G. & Taylor-Robinson, D.: Interaction of *Mycoplasma pneumoniae* with human lung fibroblasts: Characterization of the in vitro model. *Infect. Immun.*, 25 : 446—454, 1979.
 - 5) Cohen, G. & Sommerson, N.L.: *Mycoplasma pneumoniae*: Hydrogen peroxide secretion and its possible role in virulence. *Ann. NY Acad. Sci.*, 143 : 85—87, 1967.
 - 6) 彌吉眞澄, 荒明美奈子, 早津栄蔵, 吉岡守正: *Mycoplasma pneumoniae* FH の溶血能変異—変異株の分離とその性状について—. *東女医大誌*, 51 : 1487—1479, 1981.
 - 7) Yayoshi, M.: Association between *Mycoplasma pneumoniae* hemolysis, attachment, and pulmonary pathogenicity. *Yale J. Biol. Med.*, 56 : 685—689, 1983.
 - 8) Yayoshi, M., Araake, M., Hayatsu, E., Kawakubo, Y. & Yoshioka, M.: Characterization and pathogenicity of hemolysis mutants of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.*, 28 : 303—310, 1984.
 - 9) Yayoshi, M., Araake, M., Hayatsu, E., Takezawa, T. & Yoshioka, M.: Immunogenicity and protective effect of hemolysis mutants of *Mycoplasma pneumoniae*. *Microbiol. Immunol.*, 29 : 1029—1037, 1985.
 - 10) 彌吉眞澄, 荒明美奈子, 吉岡守正, 早津栄蔵: BALB/c マウスの *Mycoplasma pneumoniae* 感染に対する感受性および免疫応答について. *東女医大誌*, 56 : 239—243, 1986.
 - 11) Hayatsu, E.: Acquired immunity to *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in hamsters. *Microbiol. Immunol.*, 22 : 181—185, 1978.
 - 12) Voller, A., Bidwell, D. & Bartlett, A.: In *Manual of clinical immunology* (Rose, N.R. & Fiedman, M. ed.) p. 506. *Am. Soc. Microbiol.*, Washington D.C. 1976.
 - 13) Harrington, J.T. Jr. & Stastny, P.: Macrophage migration from an agarose droplet: Development of a micromethod for assay of delayed hypersensitivity. *J. Immunol.*, 110 : 752—759, 1973.
 - 14) Laemmli, U.K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227 : 680—685, 1970.
 - 15) Towbin, H., Staehlin, T. & Gordon, J.: Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 76 : 4350—4354, 1979.
 - 16) Hu, P.C., Huang, C., Collier, A.M. & Clyde W. A. Jr.: Demonstration of antibodies to *Mycoplasma pneumoniae* attachment protein in human sera and respiratory secretions. *Infect. Immun.*, 41 : 437—439, 1983.
 - 17) Brunner H., Feldner J. & Brecht W.: Effect of monoclonal antibodies to the attachment-tip on experimental *Mycoplasma pneumoniae* infection of hamsters: A preliminary report. *Isr. J. Med. Sci.*, 20 : 878—881, 1984.
 - 18) Jacobs, E., Drews, M., Stuhler, A., Buttner, C., Klein, P.J., Kist, M. & Brecht, W.: Immunological reaction of guinea-pigs following intranasal *Mycoplasma pneumoniae* infection and immunization with the 168 KDa adherence protein. *J. Gen. Microbiol.*, 134 : 473—479, 1988.
 - 19) Madsen, D.R., Weiner, L.B., Mcmillan, J.A., Saeed, F.A., North, J.A. & Coates, S.R.: Direct detection of *Mycoplasma pneumoniae* antigen in clinical specimens by a monoclonal antibody immunoblot assay. *Am. J. Clin. Pathol.*, 89 : 95—99, 1988.
 - 20) Baseman, J.B., Morrison-plummer, J., Drouillard, D., Puleo-Schepke, B., Tryon, V.V. & Holt, S.C.: Identification of a 32-Kilodalton protein of *Mycoplasma pneumoniae* associated with hemadsorption. *Isr. J. Med. Sci.*, 23 : 474—479, 1987.
 - 21) Vu, A.C., Foy, H.M., Cartwright, F.D. & Kenny, G.E.: The principal protein antigens of isolates of *Mycoplasma pneumoniae* as measured by levels of immunoglobulin G in human serum are stable in strains collected over a 10-year period. *Infect. Immun.*, 55 : 1830—1836, 1987.

Protective Effects of *Mycoplasma pneumoniae* Live Vaccine or its Hyperimmune Serum on the Experimental Infection in Mice

Masumi YAYOSHI

Urawa Gakuin

Eizo HAYATSU

The Kitasato Institute

Morimasa YOSHIOKA

Department of Microbiology, Tokyo Women's Medical College

SPF-BALB/c mice in which *Mycoplasma pneumoniae* cell proliferation accompanied by immunological responses had been confirmed, were immunized with live vaccines or with hyperimmune sera of *M. pneumoniae* FH-P24 and its mutant strains (P24-S1, P24-S11), were then assayed for infection-protection.

Eight weeks after the last vaccination, 70 percent protection was obtained by inoculation once or twice with live FH-P24 and P24-S1 vaccines, respectively. After 12 weeks, 80% protection was achieved by FH-P24 and 60% by P24-S1 live vaccine, while protectivity was not obtained by P24-S11 live vaccine.

In case of passively immunized mice, IgG antibody titers and protective effect were not always found to be parallel. Namely, mice which were passively immunized with anti-FH-P24 serum, showed only 20% protection. However to get the above results, it was necessary that the anti-mutant strain serum be ten times higher than anti-FH-P24 serum in IgG titer.

In the immunoblot analysis, sera from patients infected with *M. pneumoniae* immunoblotted the 168-KDa (P1 protein) and the 85-KDa protein of FH-P24 and P24-S1, but not the 85-KDa protein of P24-S11.