

衛生微生物技術協議会第46回研究会
百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議
2026年7月15日（水） 10:00~10:55

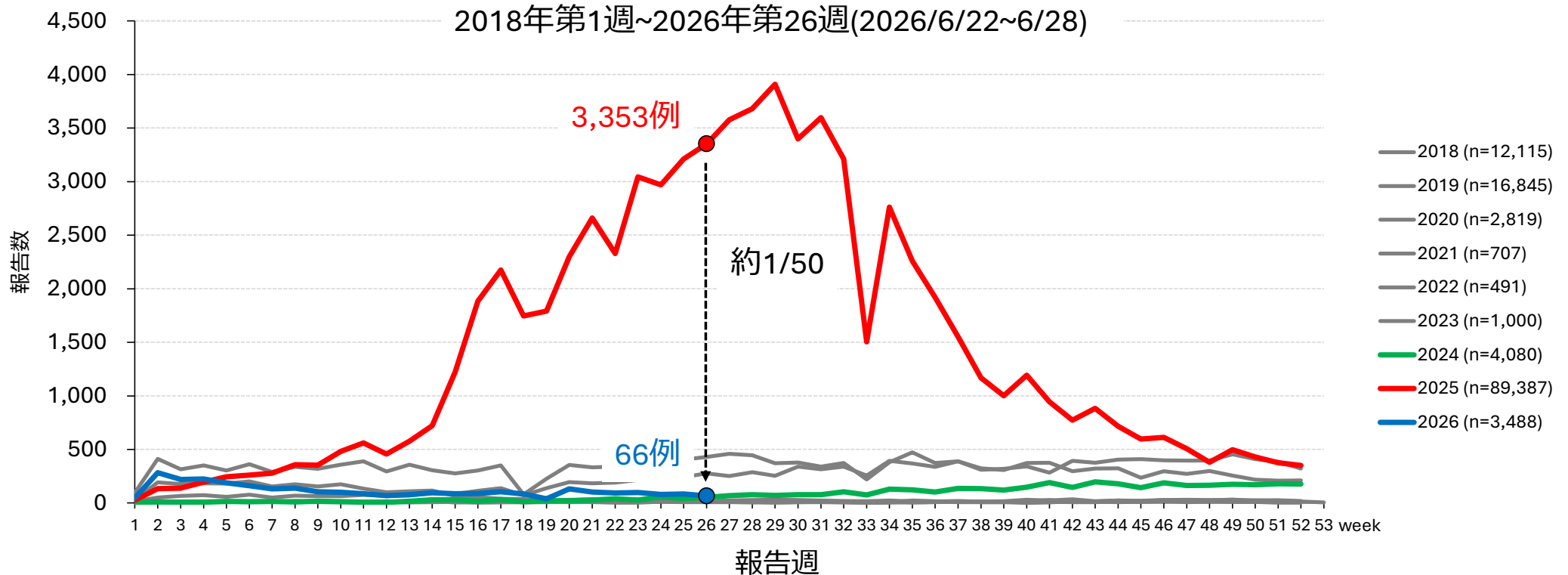


百日咳レファレンスセンター会議

1. 活動報告と計画
2. レファレンス試薬（4Plex qPCR）の更新
3. 令和8年度百日咳外部精度評価

国立健康危機管理研究機構
国立感染症研究所 細菌第二部
○大塚菜緒、小出健太郎、後藤雅貴

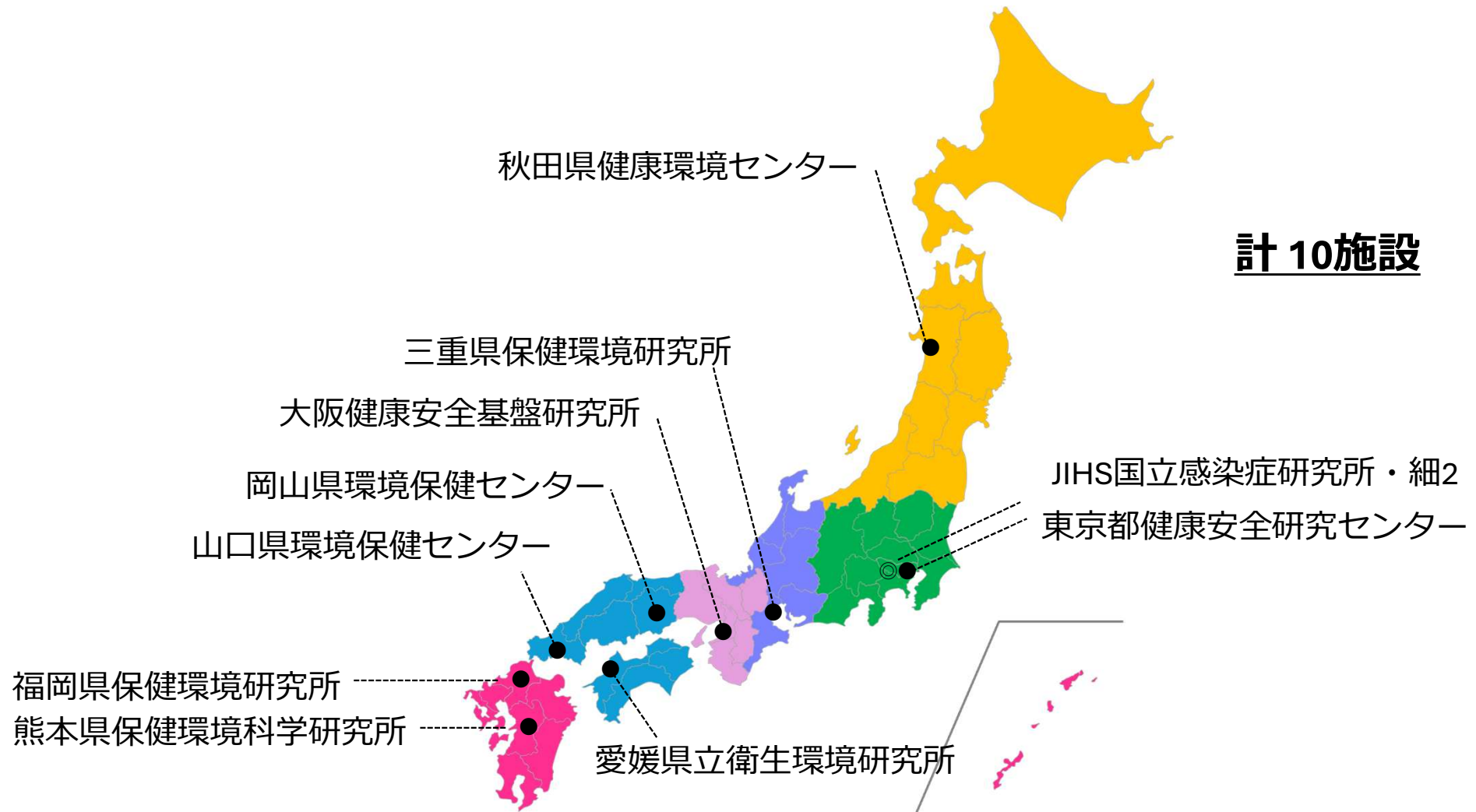
百日咳-感染症発生動向調査



感染症発生動向調査事業年報確定値または週報 (IDWR <https://www.niid.go.jp/niid/ja/idwr.html>) 速報値をもとに作成
※百日咳は感染症法5類疾患。2017年まで小児科定点把握、2018年より全数把握疾患

- 2025年はマクロライド耐性百日咳菌(MRBP)を中心とした過去最大規模の百日咳流行が発生した（速報値89,387例）
- 今年2026年は第4週報告数まで2025年同時期を上回っていたが、その後は報告数が減少している
- 第26週の週あたり報告数は、2025年は3,353例であったが、2026年は66例にとどまっている

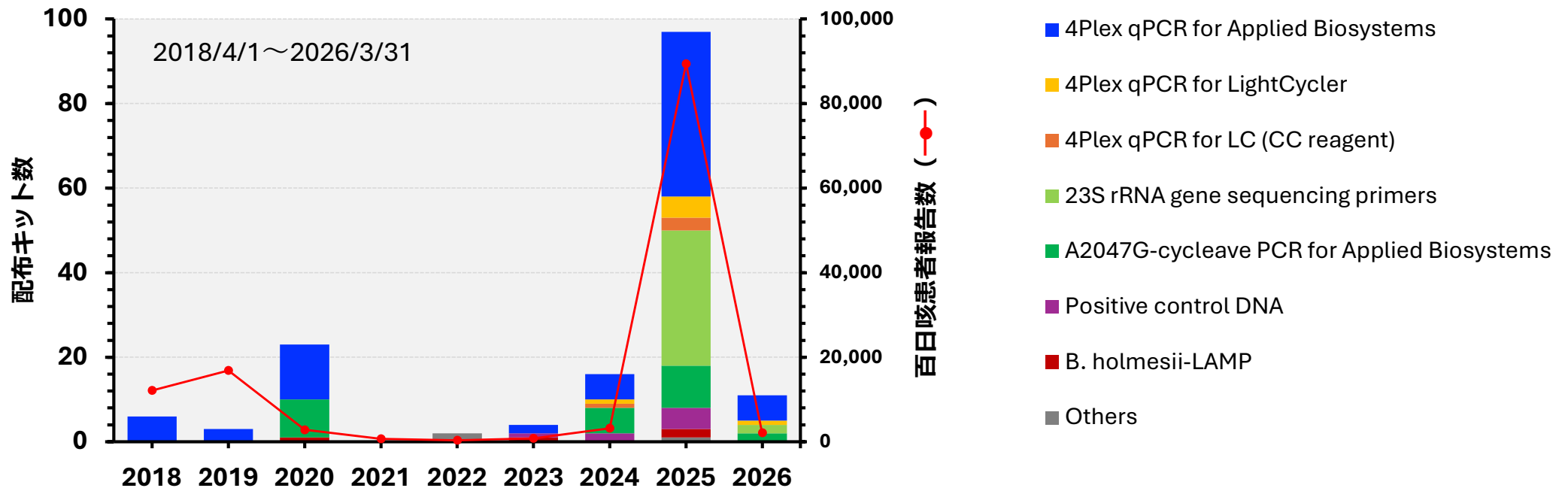
令和8年度 百日咳レファレンスセンター



1. 活動報告と計画

令和7年度の活動報告

1. レファレンス関係の分与実績



※百日咳患者報告数は2026年第13週（3/23-3/29）までの報告数

※キット配布数は年度ではなく年でカウント。配布数は2026年3月31日までの実績

- 令和7年度(2025年度)は百日咳患者報告数の増加に対応して、百日咳検査キットの配布依頼が増加した
- 令和7年度は全配布109キットのうち、百日咳菌検出4Plex qPCR for Applied Biosystems（45キット）とマクロライド耐性遺伝子変異プライマー（36キット）の配布希望が全体の74%を占めた

令和7年度の活動報告

2. マクロライド耐性百日咳菌の検出状況調査

- 地方衛生研究所でのマクロライド耐性百日咳菌(macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, **MRBP**)検出状況について、2025年1月1日～12月31日を四半期に分けて計4回のアンケート調査を実施した
- アンケート調査は、百日咳レファレンスセンターに加え、百日咳検査試薬の配布実績があった地方衛生研究所に協力依頼した

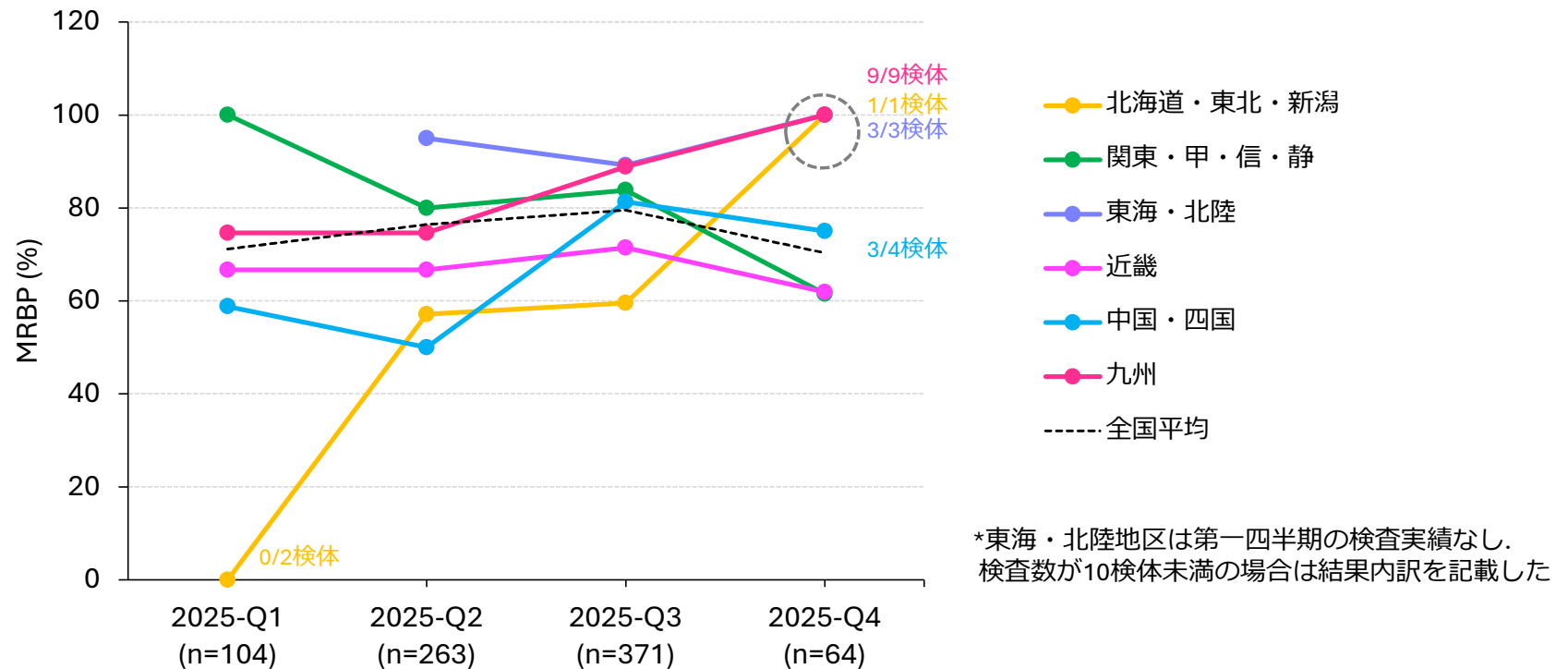
表. マクロライド耐性百日咳菌の検出状況調査アンケート

対象期間	アンケート実施期間	回答施設数*	検査検体 合計数	全国平均 MRBP検出率
2025-Q1 (2025年1月1日～3月31日)	2025年4月3日～4月18日	13	104	71.2%
2025-Q2 (2025年4月1日～6月30日)	2025年6月30日～7月31日	37	263	76.4%
2025-Q3 (2025年7月1日～9月30日)	2025年10月1日～10月31日	41	371	79.5%
2025-Q4 (2025年10月1日～12月31日)	2026年1月16日～3月6日	43	64	70.3%

* 2026年4月現在、86機関が全国地方衛生研究所名簿に登録がある

令和7年度の活動報告

2. マクロライド耐性百日咳菌の検出状況調査



- 地区によって多少は検出率に差があるものの、全国平均では**2025年第1四半期（2025-Q1）から既にMRBP検出率は71.2%**となっていた
- 2025年の最も患者報告数が多かった**第3四半期（2025-Q3）**には、**79.5%**となり最大値を示した
- 2025年は百日咳流行の初期から**年間を通してMRBP検出率が70~80%の間を推移していた**

令和7年度の活動報告

3. 情報還元

(1) 病原体検出マニュアル

5類感染症 全数把握

- 百日咳 第4.0版 (2024年3月改訂)

<https://id-info.jihs.go.jp/manuals/pathogen-detection/Pertussis20240327.pdf>



もしも違うことを書いていたら
コッチの方が新しい情報です



- 付属資料 「(別冊) マクロライド耐性菌検査マニュアル初版」 (2026年1月版)

<https://id-info.jihs.go.jp/manuals/pathogen-detection/Pertussis-appendix-macrolide-resistance20260202.pdf>

(2) 病原微生物検出情報 (IASR) 月報

<特集> 「百日咳 2025年11月現在」 Vol.47 No.1 (No.551) 2026年1月発行

<https://id-info.jihs.go.jp/surveillance/iasr/pathogens/vol47/551/vol.47-1-no551.pdf>

※特集関連情報11報、国内情報1報が百日咳関連の報告

(3) 衛生微生物技術協議会第46回研究会

7/16 (木) トピックスII (細菌関連の話題) : 百日咳「2025年の百日咳流行を考える」

令和8年度の活動計画

1. レファレンス試薬の配布（継続）

- 百日咳菌同定用：4Plex qPCR試薬（Applied Biosystems用 ver3.2, Roche LC480用ver1.0があります）
- 陽性コントロールDNA: 百日咳菌, パラ百日咳菌, *Bordetella holmesii*, *Mycoplasma pneumoniae*
- マクロライド耐性遺伝子変異同定用：A2047G-cycleave PCR試薬（分離菌株への適用に限る）
- （お試しサイズ）23S rRNA遺伝子シーケンス用プライマー, MSBP/MRBPLレファレンスゲノムDNA
- *Bordetella holmesii*-LAMP試薬キット

※現在、地衛研が行う病原体サーベイランスには積極的に試薬提供を行っています（希望があれば全ての地衛研が対象）
厚生労働省の急性呼吸器感染症(ARI)サーベイランス用にも可能な限り供出します

2. 4Plex qPCR試薬の更新

- 百日咳類縁菌*B. holmesii*標的遺伝子を $recA_{BH}$ から複数コピー保有されるhIS1001に変更
- *M. pneumoniae*標的遺伝子 $atpD$ のprobeをMGB probeに変更

3. 令和8年度 百日咳検査 外部精度評価

4Plex qPCR のバージョンアップ試薬による病原体菌種鑑別と百日咳菌のマクロライド耐性遺伝子変異同定（サンガーシーケンス）を訓練する

2. レファレンス試薬(4Plex qPCR)の更新

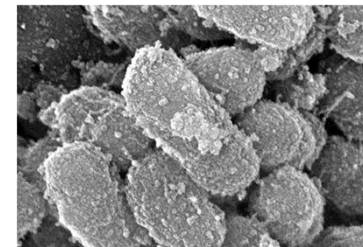
百日咳菌同定用4Plex qPCR試薬

百日咳菌、パラ百日咳菌、*Bordetella holmesii*、肺炎マイコプラズマの4菌種を鑑別する

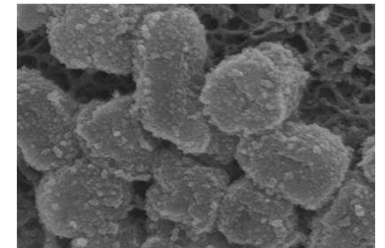
- Premix Ex Taq (Perfect Real Time), Takara
- Mixed Primers and Probes

Target gene	Applied Biosystems Ver.3.2	Roche LC Ver1.0
IS481	FAM/NFQ-MGB	FAM/NFQ-MGB
pIS1001	NED/NFQ-MGB	LC Cyan500/BHQ1
recA _{BH}	VIC/NFQ-MGB	VIC/NFQ-MGB
atpD	Cy5/BHQ3	Cy5/BHQ3

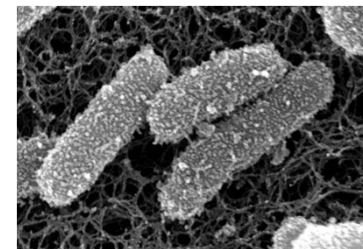
- 陽性コントロールDNA (Bp, Bpp, Bh, Mp)
- ROX Reference Dye (Applied Biosystems用キットのみ)



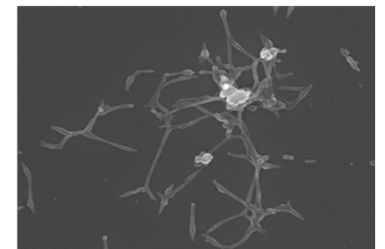
百日咳菌



B. holmesii



パラ百日咳菌



M. pneumoniae

- *B. holmesii*検出の感度が低い（「マクロライド耐性百日咳菌と*Bordetella holmesii*共感染の2症例—神戸市」 IASR Vol. 47 p99-100: 2026年5月号）
- *M. pneumoniae*検出のプロンプがMGB修飾されていない

百日咳菌同定用4Plex qPCR試薬

現行バージョン試薬

Target gene	Applied Biosystems Ver.3.2	Roche LC Ver1.0
IS481	FAM/NFQ-MGB	FAM/NFQ-MGB
pIS1001	NED/NFQ-MGB	LC Cyan500/BHQ1
recA _{BH}	VIC/NFQ-MGB	VIC/NFQ-MGB
atpD	Cy5/BHQ3	Cy5/BHQ3
Reaction		
Pre-incubation	95°C, 15 s	95°C, 30 s
Amplification	40 Cycles (95°C, 3 s; 60°C, 30 s)	40 Cycles (95°C, 3 s; 60°C, 30 s)
Cut-off		
Cycle	一律35 Cycles	一律35 Cycles
Threshold	一律 $\Delta Rn=0.2\sim0.3$	- Threshold (Auto) - FAMのみ - Threshold(Manual): 8.000

NEW 新バージョン試薬

Target gene	Applied Biosystems Ver.4.0	Roche LC Ver2.0
IS481	FAM/NFQ-MGB	FAM/NFQ-MGB
pIS1001	NED/NFQ-MGB	LC Cyan500/BHQ1
hIS1001	VIC/NFQ-MGB	VIC/NFQ-MGB
atpD	Cy5/NFQ-MGB	Cy5/NFQ-MGB
Reaction		
Pre-incubation	95°C, 30 s	95°C, 30 s
Amplification	40 Cycles (95°C, 3 s; 60°C, 30 s)	40 Cycles (95°C, 3 s; 60°C, 30 s)
Cut-off		
Cycle	一律35 Cycles	一律35 Cycles
Threshold	- Threshold (Auto) - FAMのみ - Threshold $\Delta Rn=0.2$	- Threshold (Auto) - FAMのみ - Threshold(Manual): 8.000

百日咳菌同定用4Plex qPCR試薬

■ 新バージョン試薬での変更点

変更点	内容	理由
<i>B. holmesii</i> 標的遺伝子	<i>recA_{BH}</i> → <i>hIS1001</i> に変更*	感度の向上（ゲノムあたりコピー数: 1コピー → >50コピー）
<i>M. pneumoniae</i> 検出Cy5プローブ	3'-BHQ3 → 3'-NFQ/MGBに変更	識別精度の向上、S/N比向上
Applied Biosystems用試薬の反応	Pre-incubation : 95°C, 15s → 95°C, 30sに変更	Takara Premix Ex Taq (Perfect Real Time)の標準プロトコールに準拠
Applied Biosystems用試薬のCut-off Threshold	一律 $\Delta Rn=0.2\sim0.3$ ↓ FAMのみThreshold $\Delta Rn=0.2$, その他はAuto Threshold用いる ※NTCで非特異が出た場合は適宜手動でthreshold設定	- 非特異反応が出やすいFAMに比べて、その他マーカ（NED, VIC, Cy5）では問題にならない - Dyeにより蛍光強度が異なるため一律でcut-off ΔRnを設定できない（長波長のCy5は最大蛍光強度が低め）

*Ref: Tatti KM et al., J Clin Microbiol. 2011 Dec;49(12):1059-66

百日咳菌同定用4Plex qPCR試薬

■ 増幅マーカ―と同定菌種

Target gene	<i>B. pertussis</i>	<i>B. parapertussis</i>	<i>B. holmesii</i>	<i>M. pneumoniae</i>
IS481	+		+	
pIS1001		+		
hIS1001			+	
<i>atpD</i>				+

※臨床頻度は非常に低いが、本検査系では下記のパターンを識別できない

- IS481⁺/pIS1001⁺の場合：Bp/Bpp共感染または*B. bronchiseptica*感染
- IS481⁺/hIS1001⁺の場合：Bh感染またはBp/Bh共感染

→標的の異なる百日咳菌遺伝子検査（LAMP法, FilmArray等）や菌分離を併用した確認が必要

今年度試してみて、
問題なさそうであれば
レファレンス試薬を
バージョンアップする

臨床検体での使用実績がないため、レファレンス試薬として更新するために評価が必要

3. 令和8年度 百日咳外部精度評価

厚労科研・レファレンスセンター班
病原体検査体制訓練事業費

により実施する

概要

目的	- 令和6年度にリファレンスセンター対象で実施した評価研究の参加機関拡大版 - 地方衛生研究所における百日咳検査対応として、菌種同定およびマクロライド耐性遺伝子変異の同定技術を訓練・評価する
対象	- 百日咳レファレンスセンターならびに希望する地方衛生研究所 - リアルタイムPCR機種：Applied Biosystems 7500Fast, QuantStudio5以上, 12K Flexなど Roche LightCycler 480 II ※FAM, NEDまたはLC Cyan500, VIC, Cy5, (Applied Biosystems装置はROXも) が識別できるモデル
方法	Formsにて新バージョンの4Plex qPCR試薬・23S rDNA seq primersの配布と精度評価研究への参加をアンケートする ↓ 試薬送付 4Plex qPCR試薬 (Primer/probe mix, Positive control DNA, 2xPremix Ex Taq) 23S rDNA seq primer (3 pmol/μL of 1505F, 2118R primers) パネルDNA検体 (菌種同定10検体、23S rDNA変異同定4検体) ↓ Formsにて検査結果を回答
期間	令和8年度後期 (2026/10~2027/1月頃実施予定)

配布検体は病原体の精製ゲノムDNAです。
バイオセーフティー手続きについては所属機関の規定をご確認ください。

パネルDNA検体

■ 使用予定の菌株リスト

菌種	株名	分離年	遺伝子型	23S rDNA seq
<i>B. pertussis</i>	Tohama I	1950's	MT83	WT
<i>B. pertussis</i>	BP769	2025	MT28	A2047G
<i>B. parapertussis</i>	BPP32	2018	MT19	WT
<i>B. holmesii</i>	BH01	2011	Not applicable	WT
<i>M. pneumoniae</i>	NBRC14401	1959	<i>p1</i> Type 2, ST2	WT

① 菌種同定”P”パネル：10検体

P26-01
P26-02
P26-03
P26-04
P26-05
P26-06
P26-07
P26-08
P26-09
P26-10

Bp, Bpp, Bh, Mp, **DW**

※病原体陰性となる「**水**」も
含まれます

② 23S rDNA変異同定”M”パネル：Bp DNA, 4検体

M26-01
M26-02
M26-03
M26-04

DNA濃度の異なるMRBP, MSBP

検査方法

■ 測定方法を指定するために検査試薬キットを配布する

①菌種同定パネル

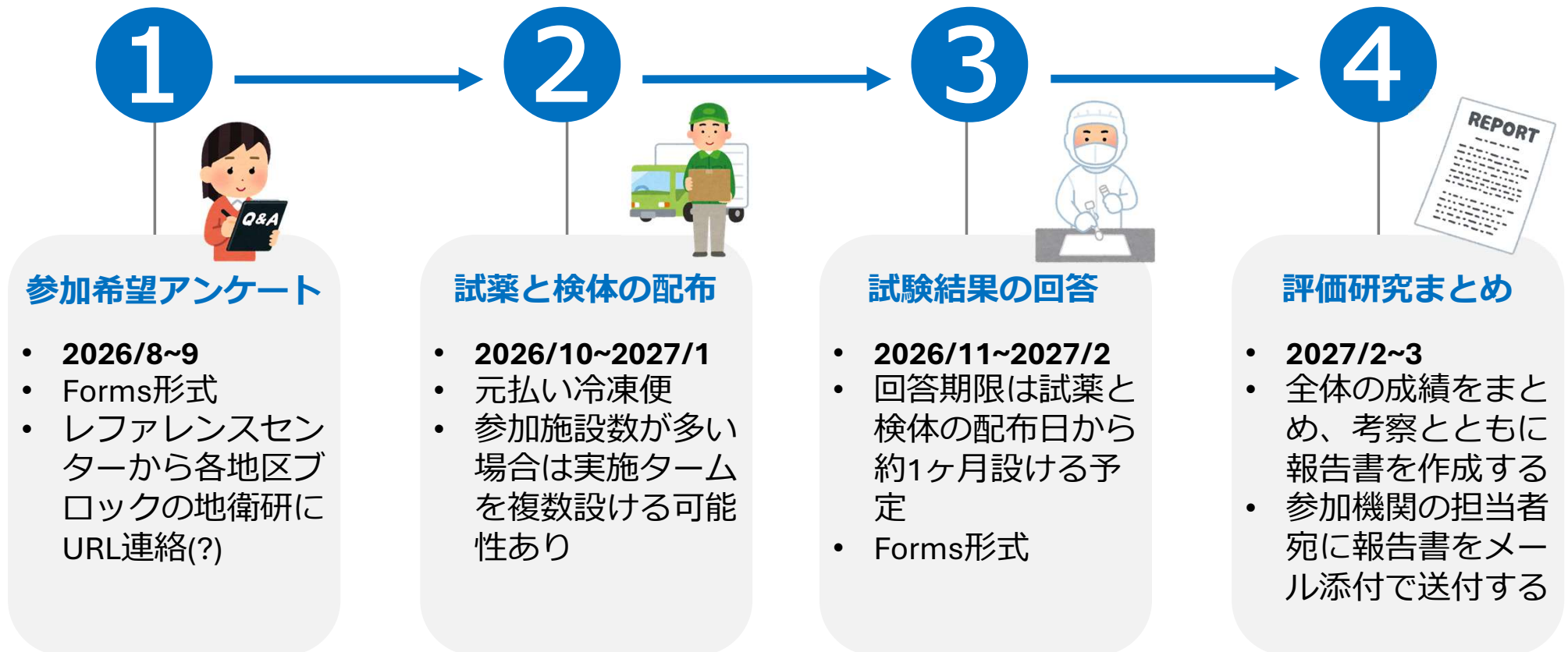
- ・ 試薬キット：4Plex qPCR ver4.0 (Applied Biosystems)またはver 2.0 (Roche LC)
- ・ PCR反応条件、Threshold蛍光強度、Cut-off Cycle数を統一する

②23S rDNA変異同定パネル

- ・ Primers: 1505F, 2118R primer (Ref: Wang Z, Microbiol. Infect. 2014;20:825–830)
- ・ PCR反応条件は「（別冊）マクロライド耐性菌検査マニュアル初版」（2026年1月版）に記載のとおり（touch-down PCR programを推奨）
- ・ PCR酵素、シーケンス反応酵素は各自お持ちの試薬
- ・ キャピラリーシーケンス装置は任意
（PCR反応まで自施設で行い、シーケンス解析を外部受託してもOK）

＜参考＞本マニュアルに記載の方法(1505F, 2118R primers)では、*B. pertussis*と*B. parapertussis*の23S rDNAの変異同定ができますが、*B. holmesii*と*M. pneumoniae*はPCR増幅ができません

今後のスケジュール



Forms形式アンケートの質問（予定）

①参加希望アンケートForms

- (1) 回答者に関する質問
 - ・ 地区ブロック
 - ・ 所属機関名
 - ・ 担当者氏名
 - ・ 担当者連絡先E-mailアドレス
- (2) 評価研究への参加に関する質問
 - ・ R8年度 百日咳外部精度評価に参加希望しますか？
 - ・ 使用予定のリアルタイムPCR装置機種
(qPCR試薬がApplied Biosystems or Roche LCで異なるため)
- (3) 実施時期の希望調査

③検査結果回答Forms

- (1) 回答者に関する質問
 - ・ 地区ブロック
 - ・ 所属機関名
 - ・ 担当者氏名
 - ・ 担当者連絡先E-mailアドレス
- (2) 検査装置に関する質問
 - ・ リアルタイムPCR装置機種
 - ・ シーケンスPCRに使用したPCR酵素、サイクルシーケンス反応酵素、未反応色素の除去方法、キャピラリーシーケンサー機種
- (3) 検査結果に関する質問**変異同定Mパネル**
 - 1. 菌種同定Pパネル**
 - ・ 同定菌種
 - ・ IS481 Threshold, Ct
 - ・ plS1001 Threshold, Ct
 - ・ hIS1001 Threshold, Ct
 - ・ *atpD* Threshold, Ct
 - ・ 23S rRNA遺伝子の2047番目塩基野生型(A)または変異型(G)

ぜひご協力をよろしくお願いします！

- 2025年は百日咳の大きな流行が発生して、地方衛生研究所での百日咳検査需要が急速に増加した
- 今年は流行が落ち着いているが、（今のうちに）次の流行に備えて検査体制の見直しを行う必要がある

<ご注意 ⚠>

次の場合は来年度も同様の内容で精度評価を実施する可能性があります

- ・ 試薬調製・配布等で大失敗するなど計画の遂行が困難な状況になった
- ・ 参加機関が20施設未満しか集まらなかった
- ・ 正答率が低すぎる
- ・ 来年度も精度評価研究を実施する予算がある etc

百日咳検査の練習になりますので
ぜひご参加ください♪

