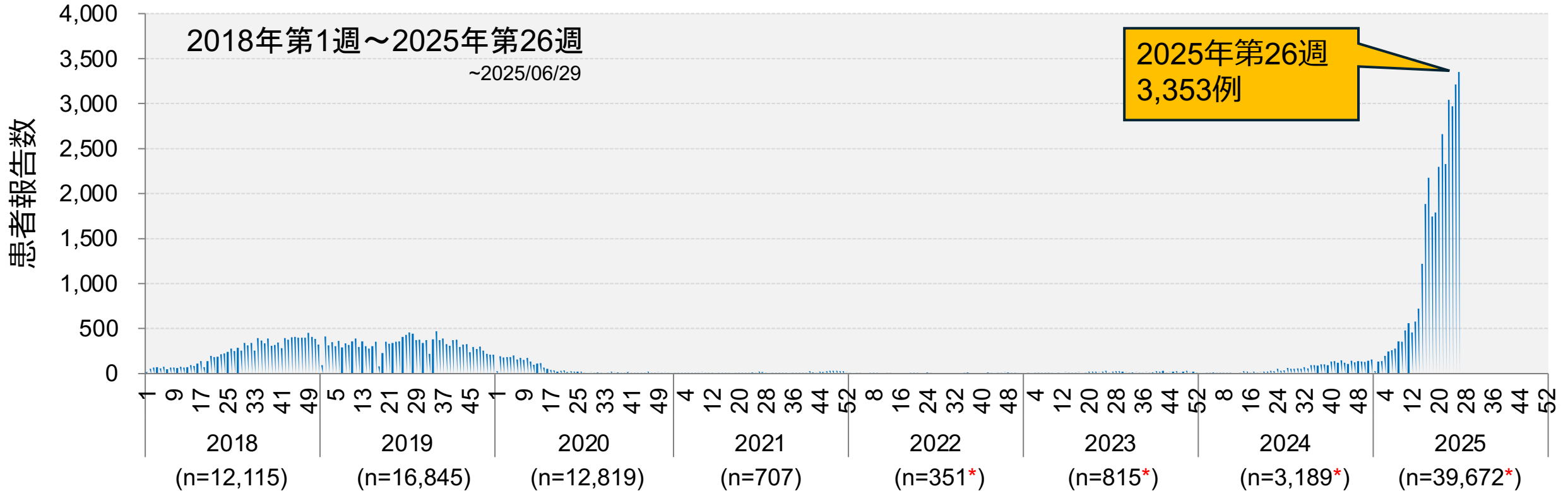


百日咳レファレンスセンター

1. 活動報告と計画
2. 2023年度 感染症流行予測調査事業：百日咳感受性調査
3. マクロライド耐性百日咳菌検査の進め方と注意点
4. 大阪府の百日咳菌（大阪健康安全基盤研究所・山口貴弘 先生）

ただいま百日咳が大流行中です！

国内百日咳患者報告数の推移



*暫定値



感染症発生動向調査 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

- 2020～2023年はCOVID-19感染対策により患者報告は激減していた
- 2024年から報告数が増加傾向を示し、2025年は毎週のように週あたり報告数最多を更新している
- 2025年第26週現在は、累積患者報告数が既に2018-2019年の年間報告数を超え**39,672例**となった

1. 活動報告と計画

令和7年度 百日咳レファレンスセンター

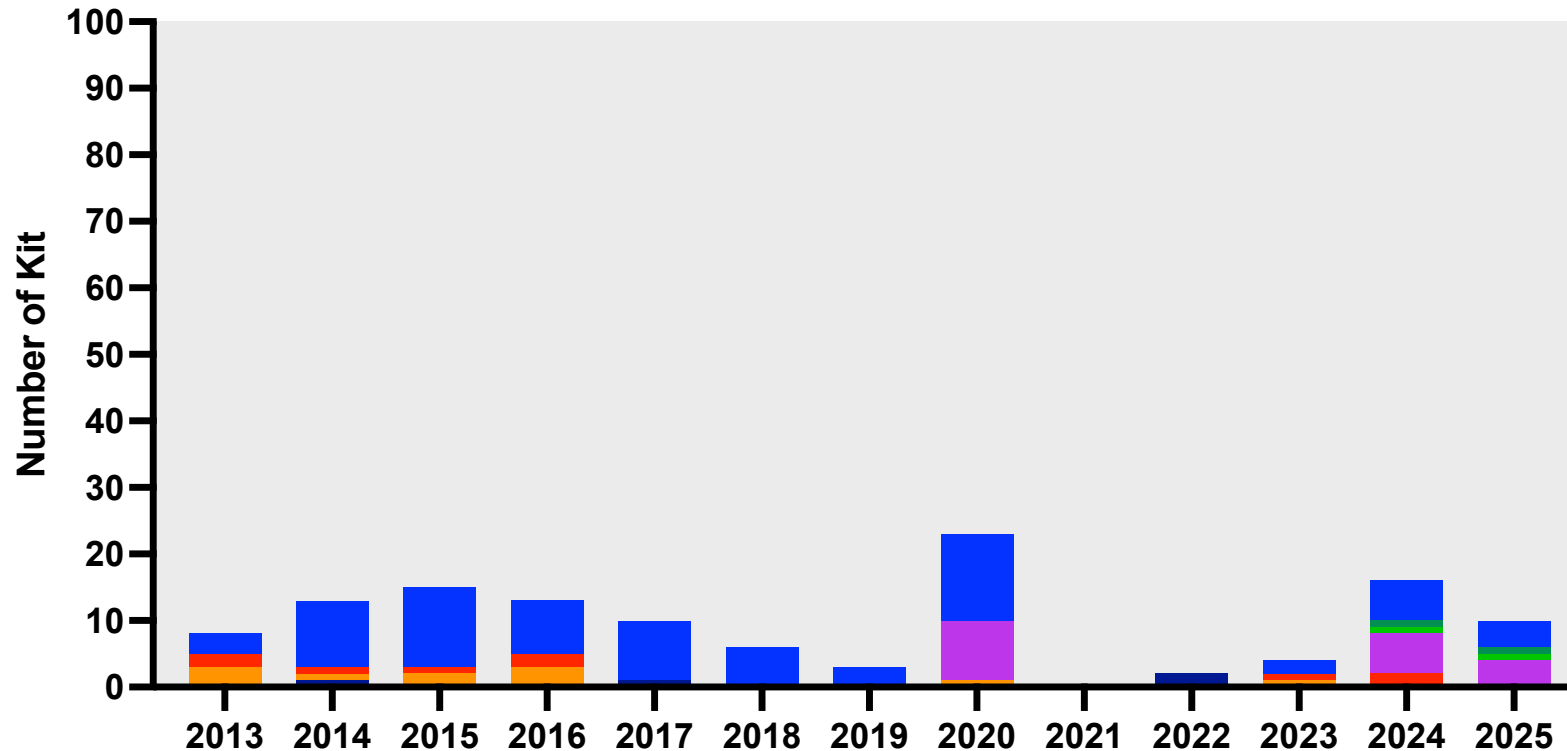
計 10施設



令和6年度の活動報告

1. レファレンス関係の分与実績

2013.8.22~2025.3.31



- 4Plex qPCR for Applied Biosystems
- 4Plex qPCR for LC480
- 4Plex qPCR for LC480 (CC reagent)
- A2047G-cycleave PCR for Applied Biosystems
- 23S seq primers, MSBP/MRBP gDNA
- Positive control DNA
- B. holmesii-LAMP
- Others

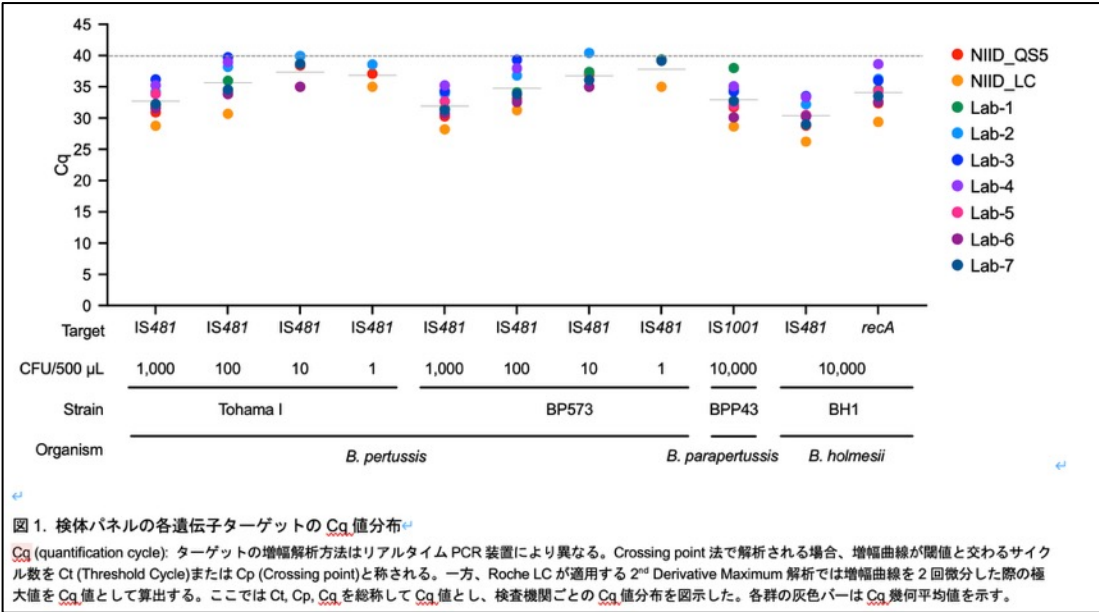
➤ 令和6年度分与実績

4Plex qPCR for Applied Biosystems	9 kits
4Plex qPCR for LC480	2 kits
4Plex qPCR for LC480 (CC reagent)	1 kit
A2047G-cycleave PCR	9 kits
Positive control DNA	2 kits

➡ 2021～2023年度は試薬の配布希望がほとんどなかったが
2024年に国内患者数が増加し始めるとともに依頼が増加した

2. 百日咳遺伝子検査外部精度評価プログラム（レファレンスセンター対象）

令和6年度 厚生労働科学研究費補助金（新興・再興感染症及び予防接種政策推進研究事業）「わが国の病原体検査の標準化と基盤強化、ならびに、公衆衛生上重要な感染症の国内検査体制維持強化に資する研究」（宮崎班） 分担研究報告書「百日咳：百日咳遺伝子検査の外部精度評価」



いずれの施設においてもリアルタイムPCRによる病原体検査の手技、類縁菌の鑑別は問題なく実施できていた



一方、検出感度に課題がある施設があった。これには臨床検体からのDNA精製方法が大きく影響していると考えられ、適切なDNA精製キットを用いた検体調製が重要であると考察された

3. 百日咳関連の情報還元

- 乳児MRBP死亡症例の報告：Iwasaki T, Koide K, Kido T, Nakagawa S, Goto M, Kenri T, Suzuki H, Otsuka N, Takada H. 2025. Fatal case of macrolide-resistant *Bordetella pertussis* infection, Japan, 2024. J Infect Chemother 31:102727.
- リスク評価「百日咳の発生状況について」2025年4月22日時点. 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,応用疫学研究センター, 実地疫学専門家養成コース (FETP), 感染症疫学研究分野 感染症危機管理研究センター (https://id-info.jihs.go.jp/diseases/ha/pertussis/020/2504_pertussis_RA.html)

令和7年度の活動計画

1. レファレンス試薬の配布

- ◆ 百日咳菌同定用：4Plex qPCR試薬（Applied Biosystems用, Roche LC480用があります）
- ◆ 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)サーベイランスを目的とした試薬配布は行っていません

2. 分離菌株の収集と分子疫学的解析

国内百日咳菌流行株の情報を集約する必要があるため、地衛研で収集された分離株のご提供もぜひ宜しくお願いいたします！！

3. マクロライド耐性百日咳菌検査マニュアルの作成

マクロライド耐性百日咳菌の検査需要が高まっているため、従来の病原体検査マニュアルに加えてQ&A形式の別冊「マクロライド耐性菌検査マニュアル」を作成する予定

2. 2023年度 感染症流行予測調査事業 百日咳感受性調査

2023年度 感染症流行予測調査事業 百日咳感受性調査

（1）調査目的

ヒトの百日咳菌に対する抗体保有状況を調査し、百日せきワクチンの免疫効果を把握するとともに、今後の流行予測ならびに予防接種計画の資料とする。

（2）調査対象

8都道県：北海道、東京都、富山県、福井県、愛知県、愛媛県、高知県、福岡県
各都道県につき原則として1地区を選定し、0～4歳、5～9歳、10～19歳、20～29歳、30～39歳、40～49歳、50歳以上の7年齢区分より各20名ずつ、計140名、全国で1,120名を予定対象数とした。

（3）調査時期

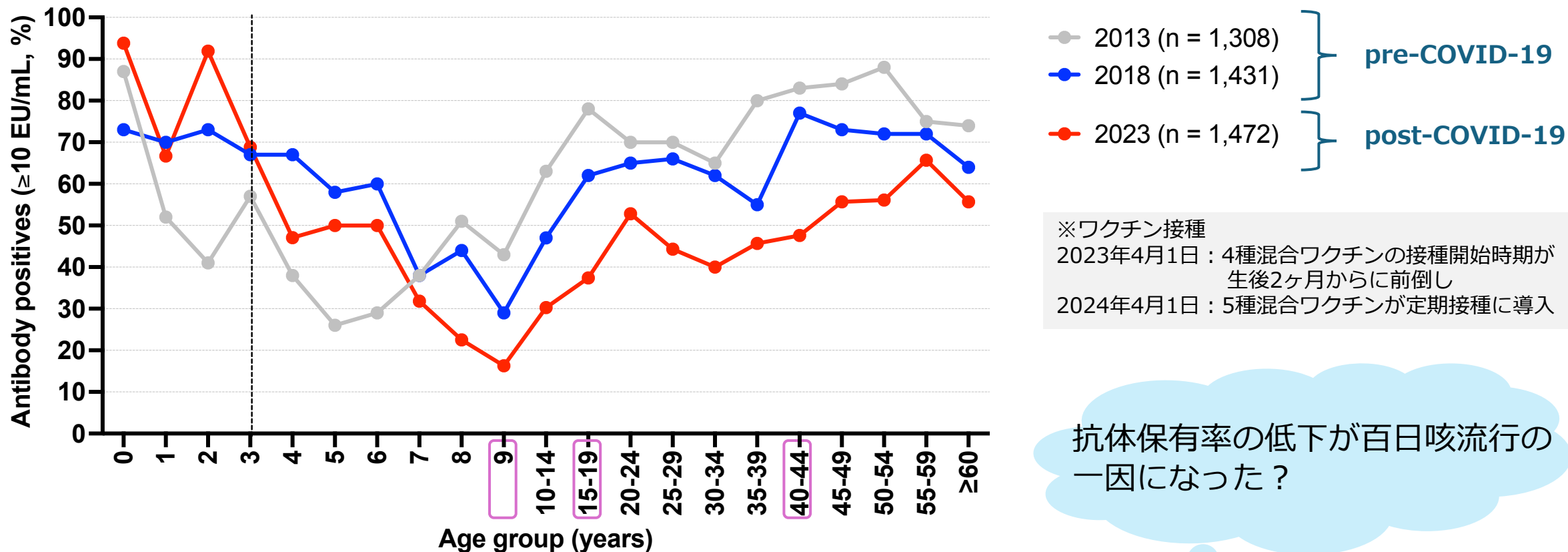
原則として2023年の7月～9月。

（4）調査内容

調査対象者から採血し、血清中の抗PT IgG抗体価と抗FHA IgG抗体価を市販のEIAキットを用いて、キットの添付文書に従って測定した。抗体価測定に際し、市販のコントロール血清を標準血清として用いた。

年齢/年齢群別百日咳抗体保有状況の年度別比較

■ 抗PT（百日咳毒素）抗体



- 3歳までは高い抗体保有率を維持していた
- 2018年度に比べて、2023年度調査では4歳以上の全ての年齢・年齢群で抗体陽性率が低下していた
- 2023年度調査では9歳 (16.3%)で最も抗体陽性率が低かった
- 2013年度調査に比べて15-19歳群(▲40.6%), 2018年度調査に比べて40-44歳群(▲29.8%)抗体陽性率の下落幅が大きかった

3. マクロライド耐性百日咳菌検査 進め方と注意点

百日咳菌の検査依頼があったら？

菌分離

(約 1 週間)



検体採取
(後鼻腔スワブ)

遺伝子検査

(2 ~ 3 日)

培地に直接スワブを塗布または
液体培地10 μ L程度を塗布

CFDN培地など

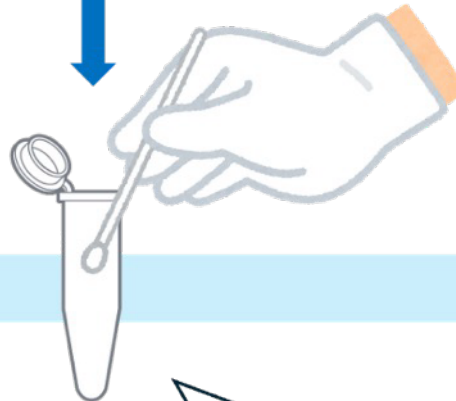
36~37°Cで7日間
(CO₂不要、湿度維持)

培養

菌同定

- 菌種同定
MALDI TOF-MSまたは
遺伝子検査 (LAMPやqPCR法)
- 23S rRNA遺伝子の変異確認
- 薬剤感受性試験

同じスワブでもOK



DNA抽出

遺伝子検査

生理食塩液500 μ L程度にス
ワブを懸濁
または液体培地300~500 μ L
程度を採取

遠心沈渣からDNA精製
DNA精製キットの使用を推奨
例) QIAamp DNA Micro Kit

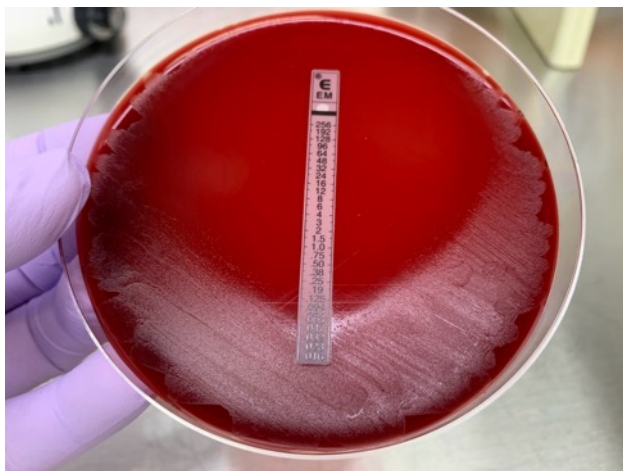
- 百日咳菌の遺伝子検出
(LAMPやqPCR法)
- 23S rRNA遺伝子の変異確認

感染株のマクロライド耐性検査

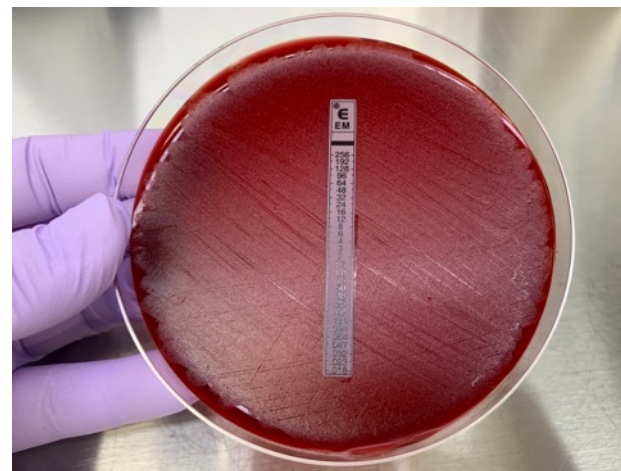
マクロライド耐性検査の信頼性は「分離菌株の薬剤感受性試験」が第一です

菌分離ができた場合

1. Etestまたはディスク法によりマクロライド感受性を調べる
※23S rRNA 遺伝子のA2047G変異によりマクロライドに対し高度耐性化する
2. 分離株の23S rRNA遺伝子におけるSNP position (A2047)の変異有無を確認する
 - سانガーシーケンス解析
 - A2047G-cycleave PCR法（分離菌株への適用に限る）



マクロライド感受性株



マクロライド耐性株

感染株のマクロライド耐性検査

菌分離を実施しない or
菌分離が陰性の場合

サンガーシーケンス解析により23S rRNA遺伝子におけるSNP position (A2047)の変異の有無を確認する

臨床検体（鼻腔スワブなど）からDNA精製キットを用いてDNA精製を行う
（例）QIAGEN QIAamp DNA Micro kit 「組織サンプルからのゲノムDNA分離」

↓

- ・ LAMP法やqPCRによる百日咳菌DNAの検出
- ・ サンガーシーケンス解析

（例）Wang Z et al, Clin Microbiol Infect. 2014; 20(11): 00825-30.

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Product size
1505F	GGCACGAGCGAGCAAGTCTC	614 bp
2118R	TCTGGCGACTCGAGTTCTGC	

※PCRプログラムはタッチダウンPCRを推奨

1. Blast検索等により、得られたDNA塩基配列が百日咳菌由来であることを確認する
2. MSBP, MRBPの23S rRNA遺伝子配列と比較してSNP positionの変異を確認する
3. SNP positionの波形がAまたはG単一波形であることを目視確認する

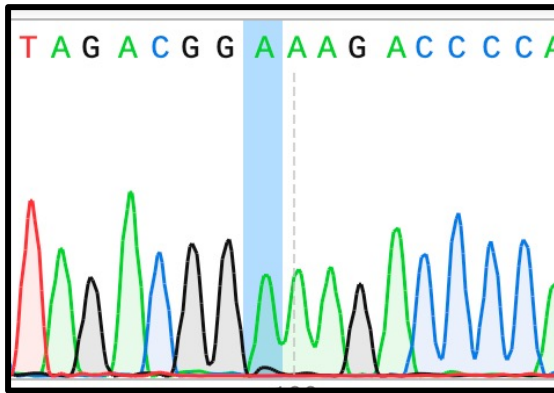
難しい事例

- ・ 乳児百日咳症例
- ・ 検体：Puritan Uni-Tranz RT + スワブ (FilmArray検査の残検体)
- ・ 臨床検体DNA: VTM 300 μ LよりQIAGEN QIAamp DNA micro kitによりDNA精製, Buffer AE: 25 μ L溶出
- ・ 菌培養：スワブをCFDN培地に直接塗布

臨床検体DNA

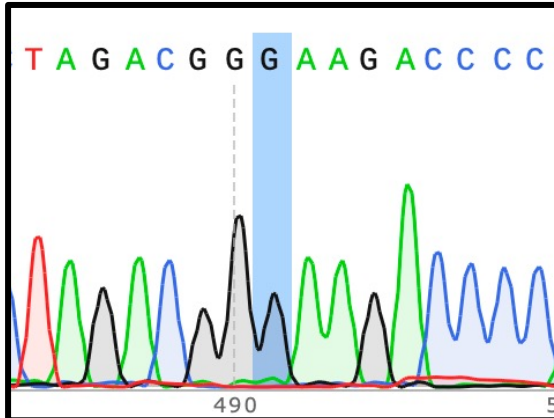
Sanger seq #1

野生型
A2047?



Sanger seq #2

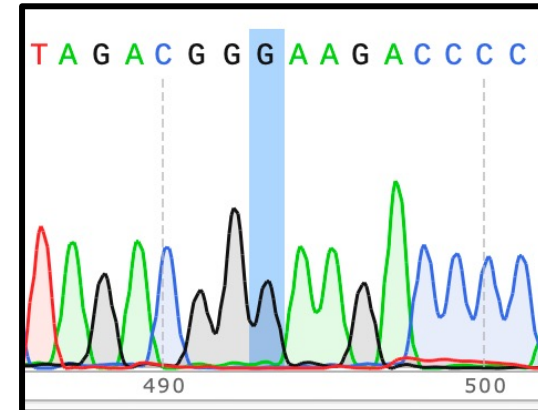
変異型
A2047G



分離菌株

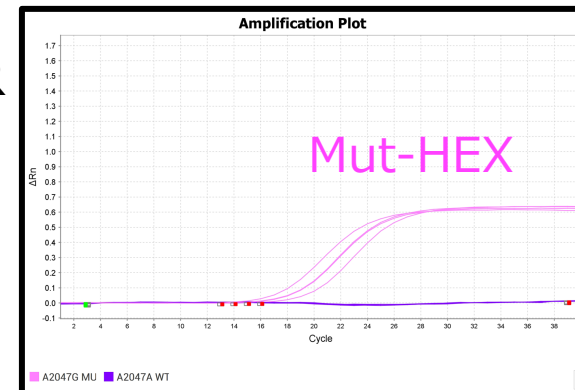
Sanger seq

変異型
A2047G



Cycleave PCR

変異型
A2047G



判定

MRBP感染

夾雑菌の23S rRNA gene
seqがA2047A?

MRBPとMSBPの混合感染?

まとめ



➤ 現在、日本国内では百日咳の大流行期にある

患者の増加に加えて、マクロライド耐性菌が拡大しており
地方衛生研究所では病原体調査、医療機関からの検査需要が増加している

➤ COVID-19感染対策により国民の百日咳菌に対する免疫が低下した

(平時は自然感染が青年・成人の集団免疫をあげていたのかも?)

Post-COVID19になると訪日客が増加し、海外から病原体が持ち込まれた
→現在の百日咳流行・耐性株増加の一因となっている

➤ 百日咳菌感染株のマクロライド耐性検査

1. 分離菌株に対する薬剤感受性試験
2. 臨床検体DNA・分離菌株の23S rRNA遺伝子A2047G変異の同定
 - ※A2047G-Cycleave PCR法は分離菌株に対してのみ適用可能
 - ※臨床検体DNAのサンガーシーケンス解析の結果解釈には注意

百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議

2025.7.16

ボツリヌス症レファレンスセンター

**北海道立衛生研究所
神奈川県衛生研究所
岡山県環境保健センター
福岡県保健環境研究所
国立医薬品食品衛生研究所**

**東京都健康安全研究センター
大阪健康安全基盤研究所
山口県環境保健センター
熊本県保健環境科学研究所
国立健康危機管理研究機構**

**千葉県衛生研究所
三重県保健環境研究所
愛媛県立衛生環境研究所
沖縄県衛生環境研究所
国立感染症研究所**

ボツリヌス症： **ボツリヌス神経毒素**によって起こる全身の神経麻痺を生じる神経中毒疾患である。

原因菌： *Clostridium botulinum* (A-F型毒素)
Clostridium argentinense (G型毒素)
Clostridium butyricum (E型類似毒素)
Clostridium baratii (F型類似毒素)

症状： ボツリヌス神経毒素はコリン作動性神経末端からのアセチルコリンの放出を抑制し、その結果、神経から筋肉への伝達が障害され、麻痺に至る。典型的な臨床症状は、**眼瞼下垂、複視、嚥下障害、構音障害、口内乾燥**等がある。意識は鮮明であり、感覚障害はなく、**通常発熱はない**。嘔吐、腹痛、下痢等があってもすぐに**便秘**になる。

病型：

- 1) **食餌性ボツリヌス症**
- 2) **乳児ボツリヌス症**
- 3) **創傷ボツリヌス症**
- 4) **成人腸管定着ボツリヌス症**
- 5) その他（医療行為による感染、実験室内感染、バイオテロによる感染）

治療： 乾燥ボツリヌスウマ抗毒素の投与。ただし、乳児ボツリヌス症の場合は対症療法を行い、乾燥ボツリヌスウマ抗毒素は使用しない。

ヒトでボツリヌス症を引き起こすボツリヌス神経毒素は、主に**A型、B型、E型**、まれに**F型**である。

食餌性ボツリヌス症

食品内に混入したボツリヌス菌芽胞が、嫌気状態の食品内で発芽、増殖し、産生された**ボツリヌス毒素を食品とともに摂取**することにより発症する。ボツリヌス菌芽胞は、土壌、湖沼などに広く分布し、果物、野菜、肉、魚が汚染され得る。

原因食品：**真空パック詰め食品、缶詰、瓶詰、発酵食品**

発生年	発生場所	患者数	原因食品	毒素型	発生年	発生場所	患者数	原因食品	毒素型
1984	14都府県	36	カラシレンコン（真空パック）	A	1996	茂原市	1	不明	A
1984	青森県	1	鰯のいずし	E	1997	福島県	3	ハヤのいずし	E
1984	足利市	1	不明	B	1997	福島県	1	イワナのいずし	E
1984	釧路市	6	ハタハタ・鮭のいずし	E	1998	東京都	18	グリーンオリーブ（瓶詰）	B
1985	函館市	1	鰯のいずし	E	1999	大阪市	1	不明	A
1988	備前市	1	不明	A	1999	柏市	1	ハヤシライスの具（真空パック）	A
1988	札幌市	3	自家製鮭の調味乾燥品	E	1999	東京都	1	不明	A
1989	釧路市	1	ニシンのいずし	E	2007	岩手県	1	アユのいずし	E
1989	滋賀県	3	ハスずし	E	2012	鳥取県	2	あずきばっとう（真空パック）	A
1989	名寄市	2	カレイのいずし	E	2016	奈良市	1	不明	A
1991	青森県	1	ウグイのいずし	E	2017	福山市	1	不明	B
1991	広島市	1	不明	A	2019	埼玉県	1	不明	A
1991	青森県	1	アユのいずし	E	2021	東京都	1	不明（真空パック食品）	F*
1993	秋田県	4	里芋（缶詰）	A	2021	熊本県	3	不明（白米もしくは市販の惣菜）	C
1993	高槻市	1	不明	不明	2022	東京都	1	アユのいずし	E
1995	青森県	1	コハダのいずし	E	2024	富山県	4	不明	A
1995	青森県	3	ウグイのいずし	E	2024	川崎市	1(+1)	不明	A
1995	北海道	6	鮭のいずし	E					

*F型毒素産生性 *Clostridium baratii* による感染

乳児ボツリヌス症

生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：蜂蜜の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

発生年	患者数	蜂蜜摂取歴			毒素型			
		あり	なし	不明	A	B	E	不明
1986	1	1			1			
1987	9	9			6			3
1989	2	2			2			
1990	1			1				1
1992	1			1	1			
1995	1		1			1		
1996	1		1		1			
1999	1		1		1			
2004	1		1				1*	
2005	2		2		1	1		
2006	2		2		1	1		
2007	2		2		2			

発生年	患者数	蜂蜜摂取歴			毒素型			
		あり	なし	不明	A	B	E	不明
2008	1		1		1			
2010	1		1		1			
2011	5		5		3	2		
2015	1		1				1*	
2016	3		2	1	1	2		
2017	3	1	2		3			
2018	1		1			1		
2019	1		1			1		
2020	2		2			2		
2021	1		1		1			
2024	1		1			1		

* 2例ともE型毒素産生性*Clostridium butyricum*による感染

乳児ボツリヌス症

乳児ボツリヌス症は、生後1年未満の乳児がボツリヌス菌芽胞を経口的に摂取した場合、乳児の消化管内で増殖した菌により産生されたボツリヌス神経毒素の作用により発症する。典型的な症状に加え、不活発、哺乳力低下、泣き声の減弱等の症状が認められる。

原因：母乳の摂取、環境中のボツリヌス菌の摂取

成人腸管定着ボツリヌス症

成人や1歳以上の小児において、乳児ボツリヌス症と同様の病態で、ボツリヌス毒素産生菌が消化管内で増殖し産生されたボツリヌス毒素の作用により発症する。消化管に器質的あるいは機能的異常がある場合や、抗菌薬使用等による消化管で腸内細菌叢の攪乱が認められる場合が多い。

日本では、現在までに計2例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、1例は5歳の基礎疾患を持つ小児で、もう1例は臓器移植歴のある成人であった。2例ともA型ボツリヌス菌による感染であった。

1993	1	1	1	1			
1996	1		1		1		
1999	1		1		1		
2004	1		1			1*	
2005	2		2		1	1	
2006	2		2		1	1	
2007	2		2		2		

2017	3	1	2	3			
2018	1		1		1		
2019	1		1		1		
2020	2		2		2		
2021	1		1		1		
2024	1		1		1		

* 2例ともE型毒素産生性*Clostridium butyricum*による感染

レトルト食品と真空パック詰め食品は違う！

- レトルト食品は加圧加熱処理されているが、真空パック詰め食品は加圧加熱処理されていない。“酸素のない状態”、“栄養豊富な状態”であることから、さらに“増殖に適した温度”が満たされるとなると増殖を始め、毒素を産生する。この毒素を食すことにより、“食餌性ボツリヌス症”が引き起こされることから、**常温保存が可能か、それとも要冷蔵なのか**を確認することが重要！

患者が1歳以上の場合、まず食餌性ボツリヌス症を疑う！

- 第二、第三の症例を出さないため、食歴調査を行い、原因食品を突き止める必要がある。患者が食べた**食品の残りを廃棄せず、保管することが大事！**

ボツリヌスといえば蜂蜜ではない！

- 食餌性ボツリヌス症の原因に蜂蜜は含まれない。蜂蜜は乳児ボツリヌス症の明らかな原因食品であるが、蜂蜜を食べていない症例の方が多数のため、**蜂蜜を食べていない＝ボツリヌス症ではない**、とはならない。また、蜂蜜からボツリヌス菌が分離されても、その蜂蜜を市場から回収する必要はない。

乳児ボツリヌス症の患児は回復後の排泄ケアに注意！

- 乳児ボツリヌス症では、乳児の腸内でボツリヌス菌が増殖するため、乳児が回復したあとも、数週間から数ヶ月間、便とともにボツリヌス菌が排泄される。そのため、保育園など他に1歳未満の乳児がいる場では、**オムツ交換時に周囲の環境を便で汚さない**ようにする。ボツリヌス菌は、芽胞を作るため、アルコールなどの消毒薬が無効のため、石けんと流水での手洗いが必須。

ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

- ・ 希少感染症であること、動物実験を必要とすることから、検査の技術継承が難しい
- ・ 「動物実験」を中心に講習会を開催。
- ・ 参加者によるマウス試験を実施。
- ・ 参加をご希望の場合は、**細菌第二部第三室 妹尾 (senoh@niid.go.jp)**

第11回講習会
2025年11月予定
参加者募集中

ボツリヌス症の細菌学的検査に必要な試薬の配布

- **A、B、E、F型の診断用抗毒素**は、ご要望に応じて配布していますので、ご連絡ください。
- **C、D、G型の診断用抗毒素**は国立感染症研究所に保存してあります。**C、D、G型毒素産生性ボツリヌス症を疑う**場合はご連絡ください。
- **ボツリヌス毒素遺伝子検出用PCRのための、陽性コントロール**が必要な場合はご連絡ください。

問い合わせ先： **細菌第二部第三室 妹尾 (senoh@niid.go.jp)**