

令和6年度希少感染症診断技術研修会
2024年12月18日（水）



百日咳

国立感染症研究所 細菌第二部第一室

大塚菜緒

百日咳の基礎知識

- 主に百日咳菌(*Bordetella pertussis*)によって引き起こされる急性呼吸器感染症
 - 百日咳類縁菌もヒトに百日咳様症状を引き起こすが、臨床頻度が最も高いのは百日咳菌である
 - 感染症法では「百日咳菌による百日咳」だけが届出対象となっている
→臨床診断は困難。検査診断では病原体の鑑別が必要

- 主な症状は長期の咳（遷延性咳嗽）であり、乳幼児は重篤化し易い

- ワクチン予防可能疾患（VPDs）のひとつ

- 5種混合ワクチン（DPT-IPV-Hib）を生後2, 3, 4ヶ月と1歳頃に合計4回接種する（ただし免疫持続期間は4~12年程度と推定されている）

- 治療の第一選択薬はマクロライド系抗菌薬である



小児百日咳治療の処方例

（年齢に応じて調整）

エリスロマイシン（EM）

40 mg/kg/日, 14日間

クラリスロマイシン（CAM）

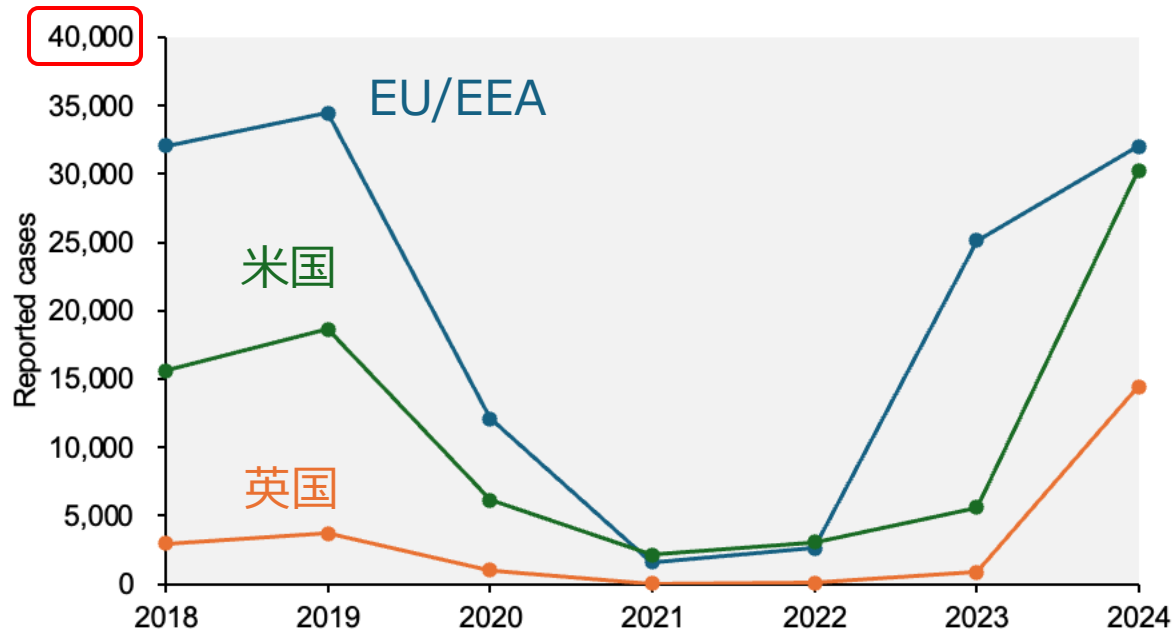
15 mg/kg/日, 7日間

アジスロマイシン（AZM）

10 mg/kg/日, 5日間

百日咳の流行状況（海外）

- 世界的にCOVID-19流行で一時的に患者数が減少したが、2023年頃から患者数の大規模なリバウンド現象が報告されている
- 特に隣国の**中国では百日咳の爆発的な流行**が見られており、死亡者数も増えている



<参考>

EU/EEA (~2024 Mar 31): ECDC Surveillance Atlas of infectious diseases

米国 (~2024 Dec 7 (week 49): CDC, Pertussis surveillance report

英国 (~2024 Oct 31) UK.GOV, Confirmed cases of pertussis in England by month, to end Oct 2024



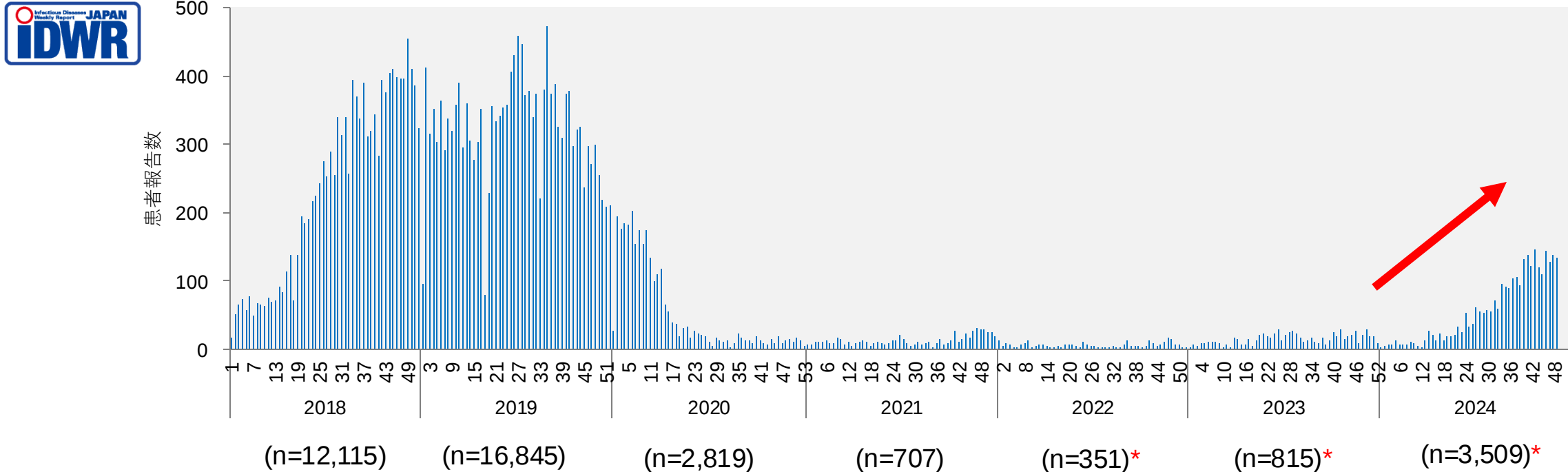
<参考>

中国: China CDC Weekly (~2024 Sept 30)

さらに、中国の百日咳菌流行株はマクロライド耐性率が非常に高い

百日咳の流行状況（国内）

- 日本でもCOVID-19流行で百日咳患者報告数は激減し、2022年には全数報告対象となって以来で最少の351件の報告となった。しかし、2024年は第22週あたりから増加傾向が見られている



<参考> 感染症発生動向調査 週報 (IDWR)(~2024年第49週)

*暫定値

今年は百日咳地域流行報告や検査依頼が増えている

5類
全数把握

百日咳届出のために必要な検査所見

検査分類	検査法	届出基準
分離・同定による病原体の検出	菌分離	菌が分離され、百日咳菌と同定された場合
核酸増幅法による病原体の遺伝子の検出	PCR, リアルタイムPCR, LAMP法など	百日咳菌の標的遺伝子の検出
イムノクロマト法による病原体の抗原の検出	イムノクロマト法 (リボテスト百日咳)	陽性となった場合
抗体の検出	抗PT IgG測定	1) 単一血清 : > 100 EU/mL 2) ペア血清 : ・ 初回10 EU/mL未満→10 EU/mL以上 ・ 初回10 EU/mL以上100 EU/mL未満 →2倍以上の上昇
	抗百日咳菌IgA測定 抗百日咳菌IgM測定 (ノバグノスト百日咳)	IgAもしくはIgMが ノバグノスト単位で ≥ 11.5 NTU

[百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン（第二版）](#)

地衛研での

百日咳検査の進め方

菌分離

(約 1 週間)

※輸送ではスワブを輸送液体培地に浸さない
(空のスπιッツ管にスワブを入れる等)



検体採取
(後鼻腔スワブ)



培地に直接
スワブを塗布

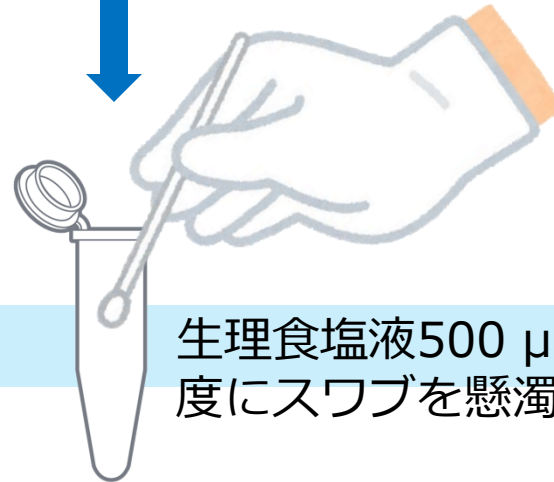
36~37℃で7日間

培養

菌同定

- 抗血清
- MALDI TOF-MS
- 遺伝子検査

同じスワブでもOK



生理食塩液500 μ L程
度にスワブを懸濁



DNA抽出

遺伝子検査

- リアルタイムPCR
- LAMP など

遺伝子検査

(2~3日)

DNA精製キットの使用を推奨
例) QIAamp DNA Micro Kit

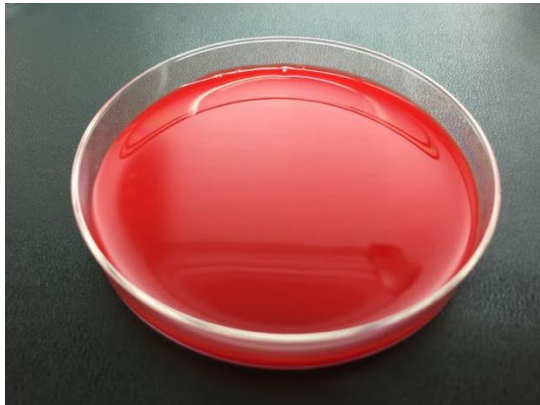
菌分離

百日咳菌の菌分離は分離率が低いが意義が大きい！

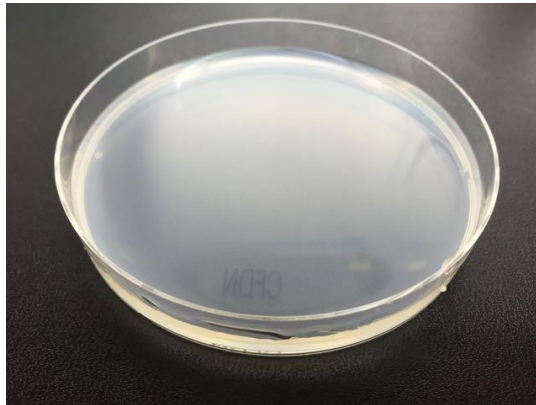
(確定診断、薬剤感受性・表現型の確認、ゲノム解析ができるなど情報量が圧倒的に増える)

市販培地	販売	含有抗菌薬
Bordet-Gengou血液寒天培地 (BG培地)	極東製薬	-*
★ ボルデテラCFDN寒天培地 (CFDN培地)	日研生物	4 µg/mL CFDN 8 µg/mL VCM

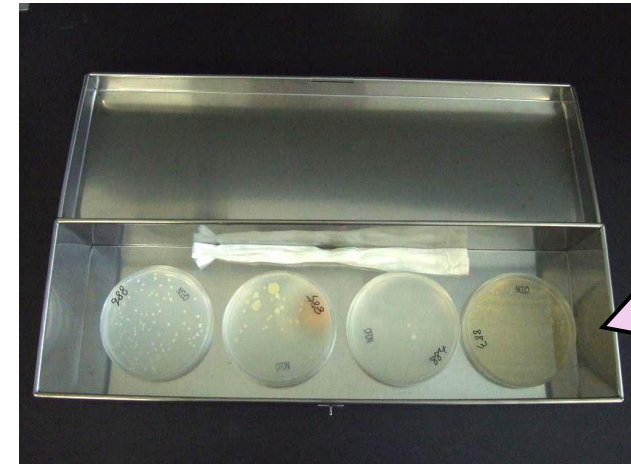
*自家調製する場合は40 µg/mLのセファレキシン(CEX)を加える



BG培地



CFDN 培地



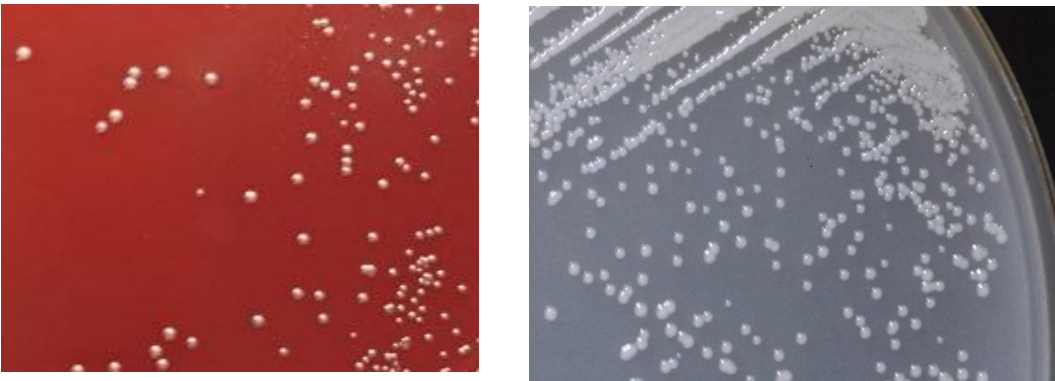
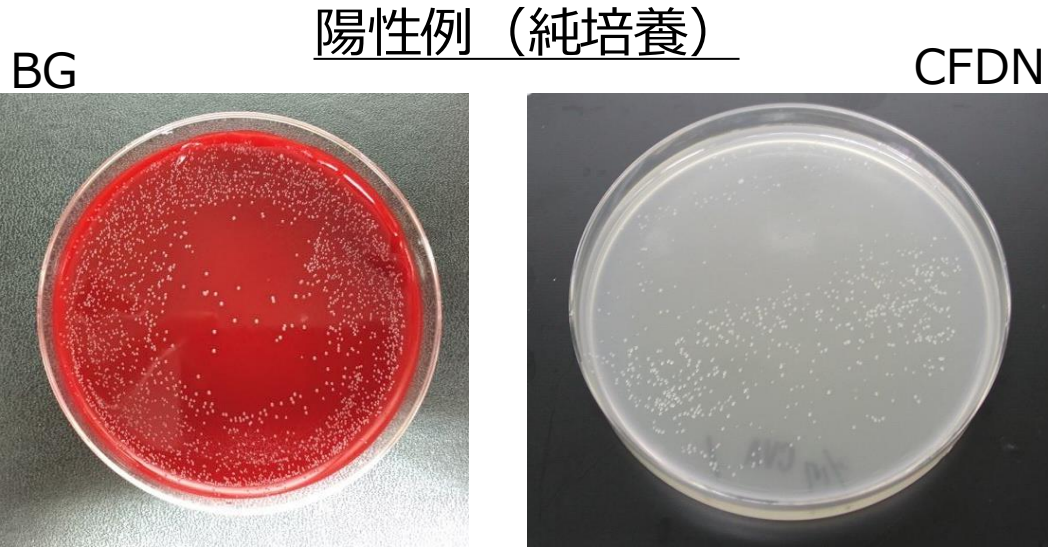
コロニー形成に
4-5日かかる！

培養1-2日で生育
したものは、
百日咳菌ではな
いと考えて良い

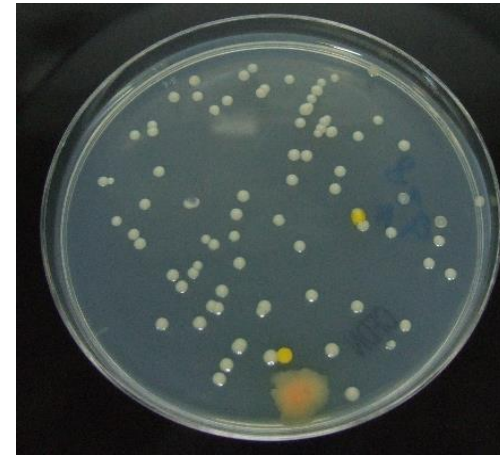
密閉容器に濡れたキムワイプを容器に入れるなど湿潤条件を保ち
36～37℃で7日間培養する

菌分離

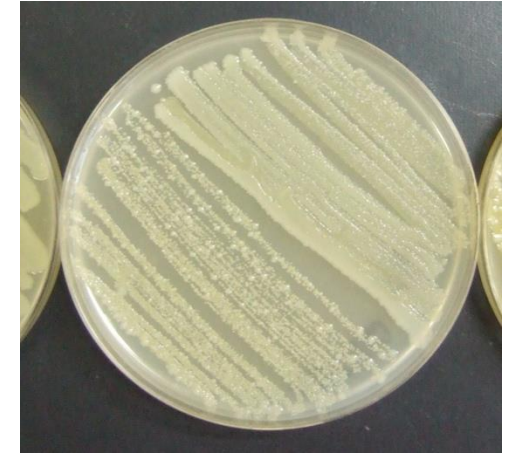
■ 培養検査の実施例



陽性例（典型的）



陰性例（雑菌多）



注意

百日咳菌は培養陽性率が低い（＜10%以下）
ため、培養検査が陰性となっても百日咳感染
を否定することはできない！

培養5日程度で直径1 mmほどの「真珠様コロニー」が認められる

遺伝子検査：リアルタイムPCR

- 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

反応組成 (Applied Biosystems装置の場合 ver.3.2)

2×Premix Ex Taq (#RR039A, Takara)	10.0 μL
Mixed primers and probes	2.0 μL
テンプレートDNA	2.0 μL
10×ROX reference dye I*	0.2 μL
DW	5.8 μL
Total	20.0 μL

*50×ROX Dye IIと50×ROX Dye Iの1/5希釈 (10 × ROX Dye I) の蛍光値がほぼ同等

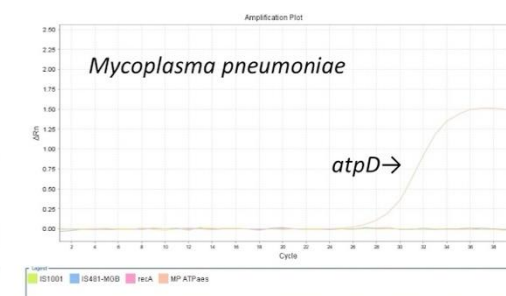
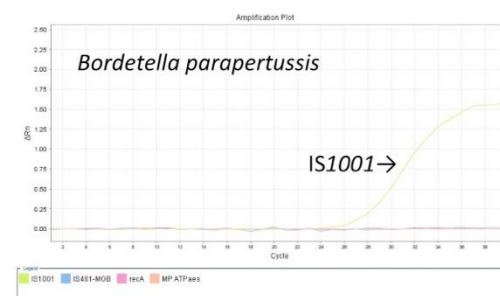
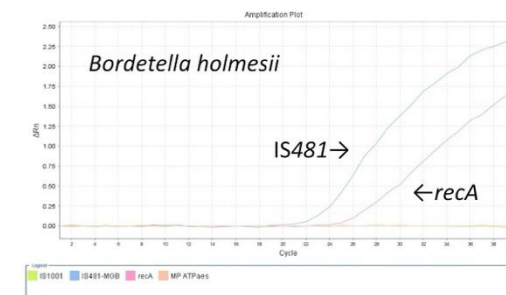
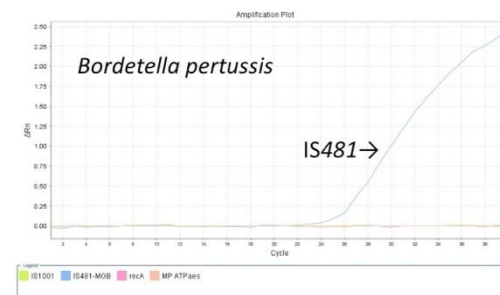
PCR反応

Stage 1 (Reps: 1)	95°C, 15 sec
Stage 2 (Reps: 40)	95°C, 3 sec; 60°C, 30 sec

陽性の目安
(QuantStudio5) 34-35 CycleまでにThreshold $\Delta Rn=0.2$ を
超えれば陽性と判定
※IS481-FAMが非特異増幅する場合があります

※リファレンスセンターにはキットを無償で配布しています
※Roche LightCycler用キットも今年度から配布開始しました

病原体 \ 標的遺伝子	IS481 (FAM)	recA (VIC)	IS1001 (NED or LC Cyan)	atpD (Cy5)
百日咳菌	+	-	-	-
パラ百日咳菌	-	-	+	-
<i>B. holmesii</i>	+	+	-	-
<i>M. pneumoniae</i>	-	-	-	+



遺伝子検査：その他

■ 百日咳LAMP法



栄研化学ホームページより引用
<https://loopamp.eiken.co.jp/product/loopamp-ivd/bp.html>

Loopamp 百日咳菌検出試薬キットD (栄研化学, #LMP542)

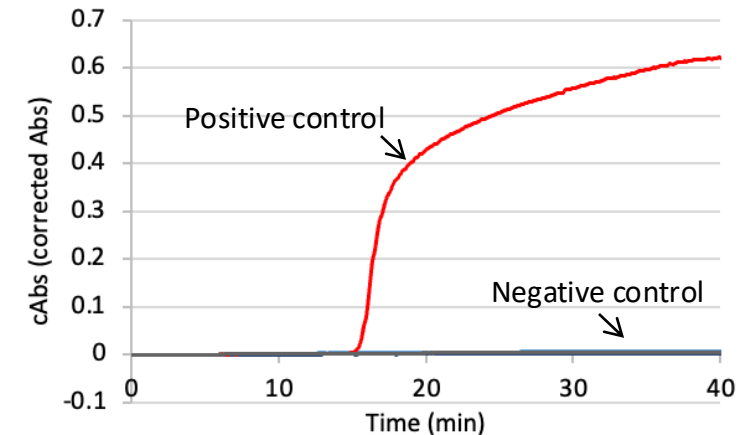
- 百日咳菌特異的な遺伝子配列(*ptxP*)をターゲットとする
- 最小検出感度：6.25コピー/アッセイ
- 対象検体：後鼻腔ぬぐい液*

*QIAamp DNA Micro Kit(QIAGEN)などで抽出したDNA溶液をサンプル溶液とする

<測定方法>

反応チューブ (CAP乾燥試薬)
プライマーミックス dBP: 15 μ l
サンプル溶液：10 μ l

反応：66°C, 40分間
測定：リアルタイム濁度測定装置



■ FilmArray (bioMérieux)

「呼吸器パネル2.1」で百日咳菌(*ptxP*)?とパラ百日咳菌(*IS1001*)の識別検出が可能

■ SpotFire (bioMérieux)

「BioFire SpotFire Rパネル」で百日咳菌(*fim2*)とパラ百日咳菌(*IS1001*)の識別検出が可能

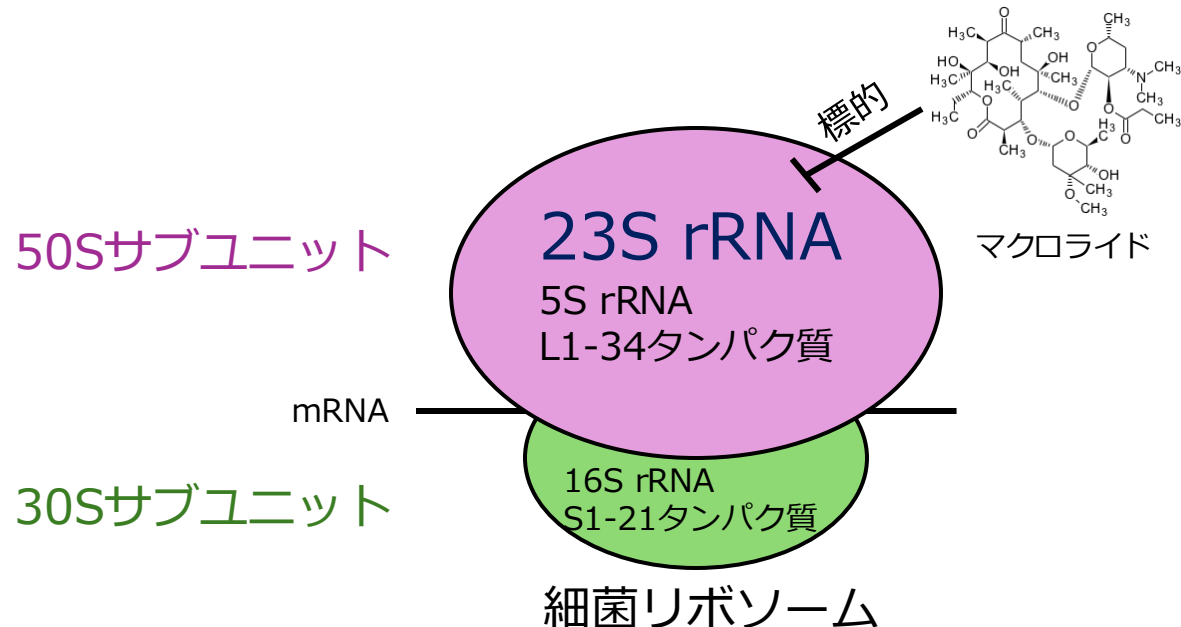
■ GENECUBE (極東製薬/東洋紡)

「ジーンキューブ百日咳」で百日咳菌とパラ百日咳菌の識別検出が可能 (QProbe法を利用)

マクロライド耐性百日咳菌

(Macrolide-resistant Bordetella pertussis, MRBP)

- 百日咳の第一選択薬であるマクロライド系抗菌薬に耐性を示す百日咳菌
- 中国ではMRBPが蔓延しており、~~周辺諸国~~世界各国への拡散が危惧されている
2024年はヨーロッパでも中国由来と推定される~~ptxP3-MRBP~~ *ptxP3-MRBP* (MT28)の分離が急増している
- 日本では2018年に大阪府と東京都で1株ずつ分離されているが、その後の検出報告はなかった。2024年は単発例に加え、MRBP地域流行の報告がある



百日咳菌のマクロライド耐性機構

23S rRNA遺伝子の点変異 (A2047G)

百日咳菌ゲノムに3コピー存在する

MRBPの確認3点セット

- ① A2047G-cycleave PCRによるスクリーニング
- ② 23S rRNA遺伝子のシーケンス解析
- ③ 分離菌の薬剤感受性試験

①A2047G-cycleave PCR

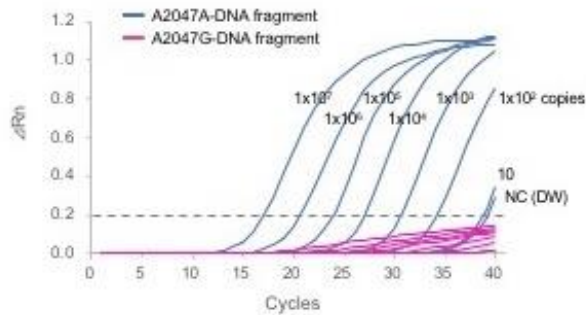
■ リアルタイムPCR（サイクリングプローブ法）で23S rRNA遺伝子(A2047G)変異を検出する

プローブ	配列	Quencher/Reporter
野生型検出プローブ	agacgg(A)aag*	5'-Eclipse/3'-FAM
変異型検出プローブ	gacgg(G)aag*	5'-Eclipse/3'-HEX

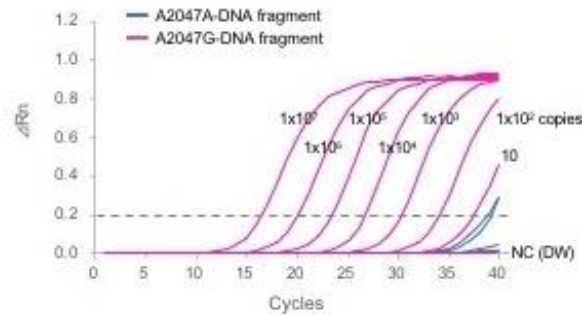
*括弧内の塩基はRNAを示す

蛍光増加	判定
FAM	マクロライド感受性(野生型 : A2047)
HEX	マクロライド耐性(変異型 : A2047G)
FAM+HEX	ヘテロ型(A2047+A2047G)

野生型の検出



変異型の検出



- 臨床検体DNAや分離菌を対象にスクリーニング検査として使用できる！

- 地衛研には無償で検査キットを配布しています

2×CycleavePCR Reaction Mix (CY505A, Takara)
Mixed primers & probes for ver.1
50×ROX Reference Dye II (Takara)
A2047A- DNA fragment (wild type)
A2047G- DNA fragment (mutant type)

※現在、Applied Biosystems社リアルタイムPCR装置用試薬のみ配布しています（近々、Roche LightCycler用試薬も調製予定）

陽性の目安
(QuantStudio5) 32 CycleまでにThreshold $\Delta R_n = 0.2$ を超えれば陽性と判定
※野生型FAMが非特異増幅する場合があります

②23S rRNA遺伝子のシーケンス解析



a) 分離菌の懸濁液ボイル上清を対象検体とする場合

＜参考文献＞Bartkus JM., J Clin Microbiol. 2003;41(3):1167-72.

Primer	Primer sequence (5' to 3')	Product size
1907U	TTCCTTGTCGGGTAAGTTCC	521 bp
2408L	GCGGTATCAGCCTGTTATCC	



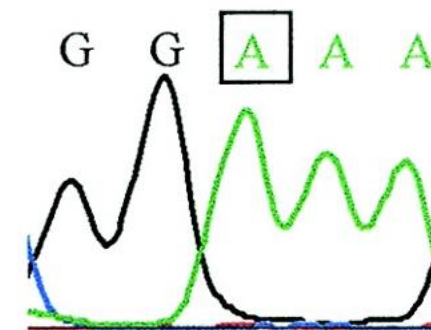
b) 鼻腔スワブ懸濁液の精製DNAを対象検体とする場合

＜参考文献＞Wang Z., Clin Microbiol Infect. 2014;20(11):O825-30.

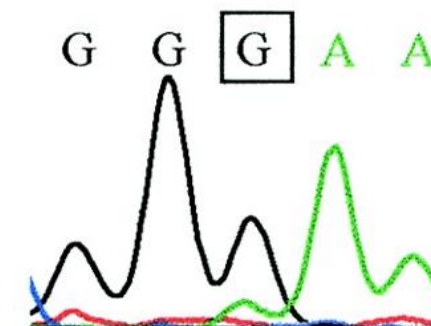
Primer	Primer sequence (5' to 3')	Product size
1505F	GGCACGAGCGAGCAAGTCTC	614 bp
2118R	TCTGGCGACTCGAGTTCTGC	

※タッチダウンPCRによりアニーリング温度を下げていき
特異性と収量を確保すると良い

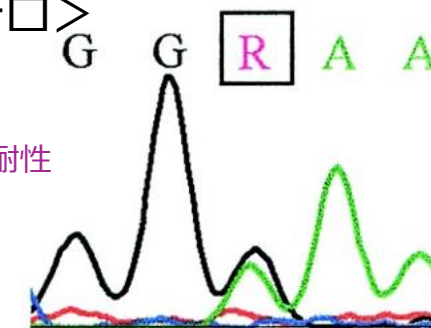
＜感受性ホモ＞



＜耐性ホモ＞



＜感受性/耐性ヘテロ＞



非常にまれ
菌はマクロライドに高度耐性

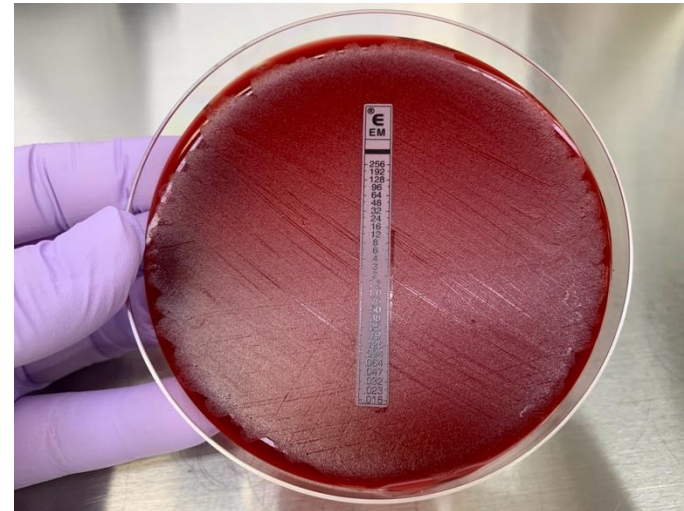
(注意) 参照配列*B. pertussis* Tohama I 23S rRNA gene (Genbank Accession No. X68323.1)ではA2027,
B. pertussis H640 23S rRNA gene (Genbank Accession No. NZ_CP025371)ではA2037がSNP箇所に該当する

③薬剤感受性試験 (Etest)

- 菌を生理食塩液に懸濁し、0.5 マクファーランド濁度(McF)*に合わせる
 - *McF濁度計での測定、標準濁度液との目視比較のほか吸光度測定で合わせても良い
 - 0.5 McFはAbs.625 nm = 0.08~0.13 (CLSI M02)もしくはAbs.650 nm = 0.1, Abs. 600 nm = 0.12 (当室の検討)
- 綿棒を用いてBG培地*に菌液を塗布する
 - * CSM合成培地ではMICが低めに出る薬剤があるので注意
- 培地表面が乾いたらEtestストリップをのせる
- 36-37°Cで3-4日間培養し、MICを目視判定する



マクロライド感受性株



マクロライド耐性株

まとめ



- 百日咳は乳幼児、特に生後6ヶ月未満は重篤化しやすい
- ワクチン免疫の減弱により、小学校高学年以降は百日咳菌に感染する
- 百日咳菌の菌分離率は低い
→散発例では遺伝子検査(リアルタイムPCR、LAMPなど)を活用する
- 集団感染疑い事例では、遺伝子検査による迅速診断が有用
菌分離もされれば確定的！
- 国内でも百日咳菌のマクロライド耐性株が相次いで検出されている
→臨床検体DNA, 分離菌株の23S rRNA遺伝子のA2047G変異を確認する。できれば分離菌で薬剤感受性も確認！

Appendix. Bordet-Gengou (BG)血液寒天培地

①市販品を購入する（受注生産）

Bordet-Gengou血液寒天培地（極東製薬, 商品コードNo. 551-05255-8）

5枚包装

有効期限：1.5ヶ月

②基礎培地を使って自家調製する

グリセロール	試薬特級グレード	3.0 g
Difco™ Bordet-Gengou Agar Base	(BD, #248200)	9.0 g
蒸留水		250 mL

オートクレーブ処理（121°C, 20 min）



50°C水浴に静置

ポイント

高温だと、この後加える馬脱繊維血の赤血球が破裂し溶血する。溶血すると菌の生育が悪くなるため50°Cまでしっかり温度を下げるのが重要



馬脱繊維血液50 mLを添加し攪拌（ジャパンバイオシーラム, 50 mL#003-00013-01, 100 mL#003-00014-01）



滅菌ディスポピペットで17 mL/plateずつシャーレに分注（17枚程度作製できる）



4°C冷蔵庫で保管（約1ヶ月間使用可能）