

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)  
「国内の病原体サーベイランスに資する機能的なラボネットワークを強化するための研究」  
分担研究報告書

百日咳:マクロライド耐性百日咳菌の監視体制強化

研究分担者 蒲地一成 国立感染症研究所 細菌第二部

研究協力者 小出健太郎 国立感染症研究所 細菌第二部  
大塚菜緒 国立感染症研究所 細菌第二部

研究要旨 マクロライド耐性百日咳菌(MRBP)の国内監視体制を強化するため、病原体検出マニュアルの改訂ならびにMRBP遺伝子検査の国内整備を進めた。昨年度に開発した新規遺伝子検査法(A2047Gサイクリングプローブ法)を検査マニュアルに加筆し、2020年9月に第3.0版を国立感染症研究所のホームページ上に公開した。また、MRBP遺伝子検査をキット化し、地方衛生研究所の百日咳レファレンスセンター9施設に配布・整備した。本検査キットは臨床検体にも適用できることから、菌分離の難しい百日咳菌にとって有用な検査法となることが期待できる。

#### A. 研究目的

2010年代初頭から中国ではマクロライド耐性百日咳菌(MRBP)の流行が認められ、近年の分離率は61~91%にまで増加した。マクロライド耐性は百日咳菌の23S rRNAのSNP変異(A2047G)に起因し、この変異によりマクロライド系抗生物質(アジスロマイシン、クラリスロマンシンなど)に対し高度耐性を示す。アジアでは中国以外にベトナムと台湾でMRBPが検出・分離されており、日本では2018年に大阪府で1株が臨床分離された(図1)。上記3カ国で検出されたMRBPは中国のMRBPと同様な遺伝子型を持つことから、中国からアジア地域に拡散した可能性が指摘されている(Yamaguchi et al, Jpn J Infect Dis, 2020; Kamachi et al, Emerg Infect Dis, 2020)。MRBPは公衆衛生上の脅威となるため、アジア地域ではMRBPに対する病原体サーベイランスが必要となっている。

昨年度の本研究班では、MRBPの迅速検査法としてサイクリングプローブ法を用いたリアルタイムPCR法(A2047Gサイクリングプローブ法)を開発した。本法はMRBPのA2047G変異を検出する遺伝子検査であり、1時間以内に結果が得られるという利点がある。また、分離菌以外に臨床検体にも適用可能であり、菌分離が難しい百日咳菌には有用な検査法となる。本研究ではMRBPの監視体制強化を目的に以下の検討を行った。

- 1) 病原体検出マニュアルにMRBPの遺伝子検査法を記載し、Web上に公開する
- 2) 百日咳レファレンスセンターにMRBP検査キットを配布し、国内の検査体制を整備する

#### B. 研究方法

1. 病原体検出マニュアルの改訂  
新規検査法として、MRBPの遺伝子検査法

を加筆した「(3)検査方法、9. マクロライド耐性菌の検出、p28-31」。ABI7500Fast Real-time PCR systemを用いた実施例を示すとともに、サイクリングプローブ法の原理、反応組成、Run条件、判定法などを詳細に記載した。また、検査マニュアルは前回の改訂から5年が経過しているため、文書全体の記載整備も併せて行った。百日咳レファレンスセンター内で改訂内容を確認したのち、国立感染症研究所ホームページ上に第3.0版を公開した。

#### 2. MRBP検査キットの作製

検査キットは下記の試薬類から構成され、2種類のプローブはそれぞれ野生型A2047と変異型A2047Gを特異的に検出する(図2)(Kamachi et al, EID, 2020)。キットは-20°Cに保存し、融解後のCyclevePCR Reaction Mixは再凍結せず冷蔵保存とした。

- 2× CyclevePCR Reaction Mix (CY505A, Takara Bio)
- Mixed primers & probes
- 50× ROX reference dye II (Takara Bio)
- A2047-DNA fragment(野生型陽性コントロール)
- A2047G-DNA fragment(変異型陽性コントロール)

#### 3. MRBP検査キットの送付

2020年9月に国立感染症研究所から百日咳レファレンスセンター9施設にキットを送付した。輸送は-15°C以下の冷凍状態で行った。

#### C. 研究結果

##### 1. 病原体検出マニュアルの公開

百日咳の検出マニュアル第3.0版は下記のサイトに公開され、2020年9月版としてpdfがダウンロード可能となっている。

<https://www.niid.go.jp/niid/images/lab-manual/Pertussis20200910.pdf>

## 2. MRBP 検査キットの性能確認

検査キットは MRBP 陽性検体 (n=4) と陰性検体 (n=4) を用いて性能確認を行った。MRBP 陽性検体はすべて A2047G 陽性/A2047 陰性を示し、一方 MRBP 陰性検体はすべて A2047G 陰性/A2047 陽性を示した。また、2 種類の陽性コントロールに対する検出感度 (Ct 値) は従来品と同等であり、作製した検査キットが一定の品質にあることを確認した。

## 3. MRBP 検査キットの整備状況

検査キットは下記の百日咳レファレンスセンター9 施設に整備された (図3)。

- 秋田県健康環境センター 保健衛生部
- 東京都健康安全研究センター 微生物部病原細菌研究科
- 三重県保健環境研究所 微生物研究課
- 大阪健康安全基盤研究所 微生物部微生物課
- 岡山県環境保健センター 細菌科
- 愛媛県立衛生環境研究所 微生物試験室
- 山口県環境保健センター 保健科学部細菌グループ
- 福岡県保健環境研究所 病理細菌課
- 熊本県保健環境科学研究所 微生物科学部

## D. 考察

中国では 2012 年に地方都市である西安市で初めて MRBP が臨床分離され、その後急速に北京や上海などの都市部にまで拡大した。中国の MRBP 株の主な遺伝子型は MT55、MT104、MT195 であり、ベトナム、台湾、日本の MRBP 株も同様な遺伝子型を示した。このことから MRBP のアジア地域への拡散が指摘され、本研究では MRBP に対する国内監視体制を強化した。MRBP 検査キットの整備後、これまでに国内における MRBP の検出報告はないが、2021 年は百日咳患者報告数が激減したため精度の高いサーベイランスは実施できていない。そのため、引き続き MRBP の監視体制を維持するとともに、アジア地域における MRBP の発生動向に注視していく必要がある。

百日咳レファレンスセンターは地方衛生研究所 9 施設と国立感染症研究所から構成され、毎年 1 回レファレンスセンター会議が開催されている。会議では百日咳の発生動向や検査法について情報交換が行われるが、2020 年は新型コロナウイルス感染症の影響により不開催となった。2021 年は Web 会議が開催される予定で

あり、同会議では MRBP の流行状況と検査に関する情報提供を予定している。また、同時に MRBP 検査の改良点、検査体制ならびに検査データの情報共有について意見交換を行う予定である。

## E. 結論

マクロライド耐性百日咳菌の国内監視体制を強化するため、病原体検出マニュアルの改訂ならびに遺伝子検査の国内整備を進めた。遺伝子検査キットは地方衛生研究所の百日咳レファレンスセンター9 施設に配布・整備された。

## F. 健康危険情報

マクロライド耐性百日咳菌はマクロライド系抗菌薬による除菌効果が有意に低下するため、二次感染による感染拡大のリスクが高くなる。そのため、本菌の発生動向には継続した監視が必要である。

## G. 研究発表

論文発表

1. Kamachi K, Yao SM, Chiang CS, Koide K, Otsuka N, Shibayama K. Rapid and simple SNP genotyping for *Bordetella pertussis* epidemic strain MT27 based on a multiplexed single-base extension assay. *Sci Rep.* 11(1):4823, 2021.
2. Kamachi K, Duong HT, Dang AD, Hai T, Do D, Koide K, Otsuka N, Shibayama K, Hoang HTT. Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016-2017. *Emerg Infect Dis.* 26(10):2511-2513, 2020.

学会発表

なし

## H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

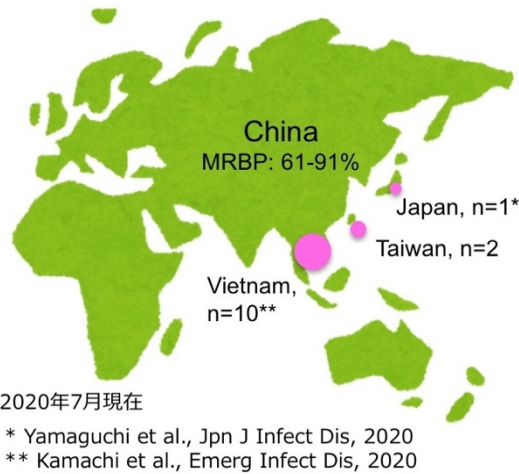


図1. アジアにおけるマクロライド耐性百日咳菌の検出状況. 日本では2018年に1株、台湾では2011年と2012年に各1株が分離された. ベトナムでは2016-2017年の患者検体(10人)からMRBPのA2047G変異が検出された.

サイクリングプローブを用いたリアルタイムPCR法：  
マクロライド耐性に関する23S rRNAのSNP変異 (A2047G)  
を検出する (A2047G cyclecleave real-time PCR)

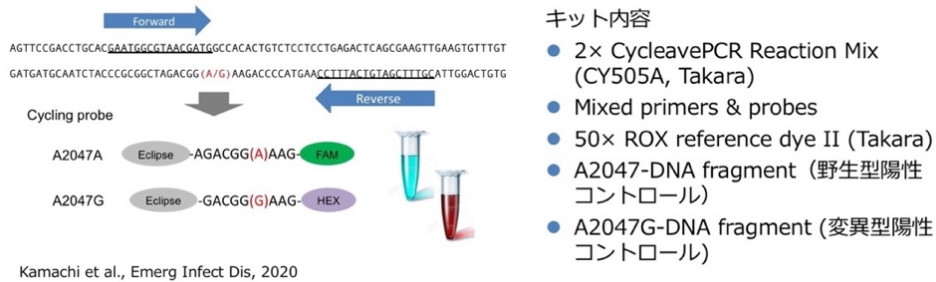


図2. マクロライド耐性百日咳菌の遺伝子検査キット

2020年9月, 百日咳レファレンスセンター9施設に  
マクロライド耐性菌検出キットを送付し, 国内の  
監視体制を整備した



図3. MRBPの遺伝子検査キットと百日咳レファレンスセンター