

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）
「百日咳とインフルエンザに関するサーベイランス手法及びワクチン効果の
評価に資する研究」
分担研究報告書

百日咳：百日咳疑い患者における病原体調査

研究分担者	大塚菜緒	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
	後藤雅貴	国立感染症研究所	細菌第二部
	蒲地一成	国立感染症研究所	細菌第二部

研究要旨 2022年10月1日～2025年1月31日の対象期間に、百日咳疑い患者の鼻腔スワブ由来DNA (n=303)を用いて、病原体の鑑別および感染百日咳菌株における23S rRNA遺伝子マクロライド耐性変異の保有率を調査した。臨床検体DNA303検体のうち、51検体から百日咳菌、パラ百日咳菌、肺炎マイコプラズマのいずれかを検出した。2022-2023年には一過性のパラ百日咳菌流行を認め、2024年7月以降の検体では百日咳菌の陽性率が上昇した。また、百日咳菌の検出率の上昇に伴い、マクロライド耐性遺伝子変異を有する検体の割合が増加しており、現在では約4割の百日咳菌がマクロライド耐性百日咳菌に置き換わっていることが示唆された。

A. 研究目的

急性呼吸器感染症である百日咳は感染症法5類の全数把握対象疾患である。百日咳の主な原因菌は百日咳菌 (*Bordetella pertussis*)であり、国内サーベイランスの届出対象は百日咳菌による百日咳のみとなっている。しかし、類縁菌であるパラ百日咳菌 (*Bordetella parapertussis*) や *Bordetella holmesii* も百日咳様症状を引き起こすことが知られている。また細菌感染症では、肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*) や肺炎クラミジア (*Chlamydia pneumoniae*)なども百日咳菌同様に咳嗽を主訴とする疾患を引き起こすため、これらを臨床症状から診断することは困難である。そのほか、ウイルス性疾患や喘息等の非感染症による呼吸器疾患とも鑑別するために検査診断が必須となっている。

2022～2023年はCOVID-19の流行によって呼吸器感染症に対する感染対策が強化されたことで国内百日咳患者報告数は激減した。しかし、2024年第37週から週当たり報告数が100例を越えるようになり、2025年にかけて急増している。また、百日咳患者報告数の増加に伴い、百日咳菌のマクロライド耐性株 (macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, MRBP)の出現が報告される様になった。百日咳菌の第一選択薬はマクロライド系抗菌薬であり、これら薬剤が標的とする細菌リボソーム23S rRNA遺伝子にA2047G変異が生じることでマクロライドに対し高度耐性化することが知られている。日本では2018年に大阪府と東京都で各1株ずつ

MRBPが分離されたが、その後約5年間はMRBPの検出報告がなかった。ところが、2024年後期に日本各地でMRBPの検出報告が相次いだ。

本研究では、①百日咳疑い患者における原因病原体の鑑別及び②感染百日咳菌株におけるマクロライド耐性遺伝子変異の保有率について調査することを目的とした。

B. 研究方法

1. 被験者と臨床検体

2022年10月1日～2025年1月31日の対象期間に、国内19医療機関の研究協力を得て百日咳疑い患者303名から臨床検体を収集した。医療機関では、被験者から後鼻腔スワブを採取し、百日咳抗原検査キット・リボテスト百日咳（極東製薬）を実施した。抗原検査のために調製したスワブ抽出液の残検体は病原体調査のため国立感染症研究所に提供された。

2. 病原体検索

リボテスト残検体からQIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)を用いてDNAを精製した。得られた臨床検体DNAを対象に、リアルタイムPCR法による病原体検索を行った。本研究で実施した4Plex Real-Time PCR法では百日咳菌 (*B. pertussis*, Bp)、パラ百日咳菌 (*B. parapertussis*, Bpp)、*Bordetella holmesii* (Bh)および肺炎マイコプラズマ (*Mycoplasma pneumoniae*, Mp)の4菌種を鑑別することができる。方法の詳細はKamachi K, New Microbes New Infect. 2015 または病原体検出マニュアル「百日咳」

第 4.0 版（2024 年 3 月改訂）に記載されている。

3. マクロライド耐性遺伝子変異の同定

4Plex Real-Time PCR により、百日咳菌もしくはパラ百日咳菌が同定された臨床検体 DNA に対しては、感染株の 23S rRNA 遺伝子における A2047G 変異の有無を調べた。変異の同定はシーケンス解析により行った。PCR 酵素には KOD FX Neo (Takara)を用い、1505F (5'-GGCACGAGCGAGCAAGTCTC-3') および 2118R (5'-TCTGGCGACTCGAGTTCTGC-3')プライマーを用いてタッチダウン PCR プログラムを実施し、標的配列を増幅した。また、同プライマーを用いてサンガーシーケンス解析を実施した(参考文献: Wang Z, Clin Microbiol Infect. 2014)。

(倫理面への配慮)

本研究は国立感染症研究所・人倫理審査委員会の承認を得て実施され(承認番号: 1750)、被験者からの検体採取及び臨床情報の取得は本人または保護者から文書による同意を得ている。被験者から得られた臨床情報は医療機関にて連結可能匿名化を施し、個人情報に配慮した上で国立感染症研究所に提供された。

C. 研究結果

1. 病原体検出の経時的変化

対象期間の病原体検出状況を四半期ごとにまとめて図 1A に示した。なお、本研究で、四半期とは 1 年間で 3 ヶ月ごとに Q1 (1-3 月)、Q2 (4-6 月)、Q3 (7-9 月)、Q4 (10-12 月)と 4 分割した 1 つの期間を指す。臨床検体 303 検体のうち、51 検体で 4Plex Real-Time PCR が鑑別対象とする 4 菌種のいずれかが検出された。内訳は Bp: 24 検体(検出率 7.9%)、Bpp: 12 検体(検出率 4.0%)、Bh: 0 検体(検出率 0.0%)、Mp: 15 検体(検出率 5.0%)であり、1 検体で Bp と Mp の重複感染が認められた。それぞれの病原体の検出時期は特徴的な傾向を示した。まず、2022 年 Q4~2023 年 Q4 は百日咳菌がほぼ検出されなかったのに対し、通常は百日咳菌に比べて臨床頻度がかなり低いとされるパラ百日咳菌が検出された。これと置き換わるように、2023 年 Q4~2024 年 Q4 は肺炎マイコプラズマが顕著に検出された。また、2024 年 Q3 以降は百日咳菌の検出数が増加した。

図 1B に感染症法に基づく百日咳とマイコプラズマ肺炎の国内発生動向調査結果を示した。百日咳、マイコプラズマ肺炎はともに感染症法 5 類に分類され、百日咳は全数把握対象、マイコプラズマ肺炎は全国約 500 カ所の基幹定点医療機関からの報告による定点把握対象疾患である。パラ百日咳菌による百日咳は発生動向調査の対象になっていない

ため、実態は不明であるが、百日咳とマイコプラズマ肺炎に関しては本調査結果と発生動向調査の検出状況が同様の傾向を示していた。発生動向調査では、マイコプラズマ肺炎は 2024 年 Q4 に報告数のピークがあり、百日咳は 2024 年 Q3 以降増加傾向が続いていた。

2. 百日咳菌感染株におけるマクロライド耐性遺伝子変異の保有率

これまで、百日咳菌のマクロライド耐性機構としては、23S rRNA 遺伝子の 2047 番目塩基が A から G に変異する機構のみが知られている(図 2A)。本調査で検出された百日咳菌 DNA (n=24)及びパラ百日咳菌 DNA (n=12)検体に対して、当該遺伝子変異の有無をシーケンス解析した。その結果、パラ百日咳菌検体は全て感受性型配列(A2047A)を有していたのに対し、百日咳菌検体では 38%が耐性型配列(A2047G)、58%が感受性型配列を有していた(図 2B)。なお、本調査期間中に初めて耐性型配列が検出されたのは、2024 年 Q3 の滋賀県における百日咳患者であった。

D. 考察

本研究では調査期間中に百日咳疑い患者の鼻腔スワブ由来 DNA を 303 検体解析し、51 検体で Bp, Bpp, Mp のいずれかの病原体を同定した。臨床症状から百日咳を疑ったとしても、百日咳菌の遺伝子検出率は 7.9%であったことから特に百日咳の非流行期においては、臨床診断は非常に困難であることが指摘された。百日咳菌の非流行期に、一過性のパラ百日咳菌流行が認められた。通常、パラ百日咳菌の臨床頻度は百日咳菌に比べてかなり低く年間 3.4 例/10 万人程度とされるが、2022~2023 年には米国およびフランスでも百日咳菌の検出が低い状況下でパラ百日咳菌の一時的な流行が認められている(Nobile BA, Emerg Infect Dis.2024, Bouchez V, J Med Microbiol. 2024)。この現象の原因は不明であるが、COVID-19 感染対策が強化された影響で集団免疫が低下したことにより百日咳菌とパラ百日咳菌の菌種間相互作用に変化が生じたことなどが一因として考察されている(Nobile BA, Emerg Infect Dis.2024, 令和 5 年度 感染症流行予測調査事業報告書 第 12 百日咳)。

2022 年 10 月 1 日~2025 年 1 月 31 日の調査期間に同定された百日咳菌のうち、すでに 38%が MRBP に置き換わっていることが示唆された。MRBP の検出は 2024 年 Q3 以降の百日咳患者報告数の増加とともに上昇しており、今後さらに上昇していくと考えられる。全国的にマクロライド感受性百日咳菌(macrolide-susceptible B. pertussis, MSBP)から MRBP への置き換えが進行

するなかで、マクロライド系抗菌薬に代わる治療薬の選択について検討する必要がある。本研究で MRBP が検出された百日咳患者（患者年齢：生後 2 ヶ月～17 歳，中央値：11 歳）はいずれもマクロライド系抗菌薬による治療で症状軽快しており、ある程度は自然免疫による回復も見込むことができると考えられた。しかし、百日咳が重症化しやすい乳幼児の初期治療では、今後 MRBP 感染の可能性を念頭においた治療薬の選択が重要になると考察された。

本研究の制限としては、分離菌株に対する薬剤感受性試験は実施していないことが挙げられる。病原体サーベイランスを別途実施し、分離菌株を用いた薬剤感受性試験も並行して行う必要がある。

E. 結論

2022 年 10 月 1 日～2025 年 1 月 31 日の調査期間のうち、2022～2023 年にパラ百日咳菌の一過性の流行を検知した。また、2024 年 Q3 以降の百日咳患者の増加に伴い、マクロライド耐性百日咳菌の検出が上昇した。現時点で国内百日咳菌流行株のうち、約 4 割が MRBP に置き換わっていることが示唆され

た。

F. 研究発表

論文発表

該当なし

学会発表

1. Otsuka N, Matsui M, Koide K, Goto M, Kamachi K, Kenri T. Evaluation of MALDI-TOF MS species identification on FHA-deficient *Bordetella pertussis*. 14th International *Bordetella* symposium. June 24-28, 2024. Prague, Czech Republic.

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

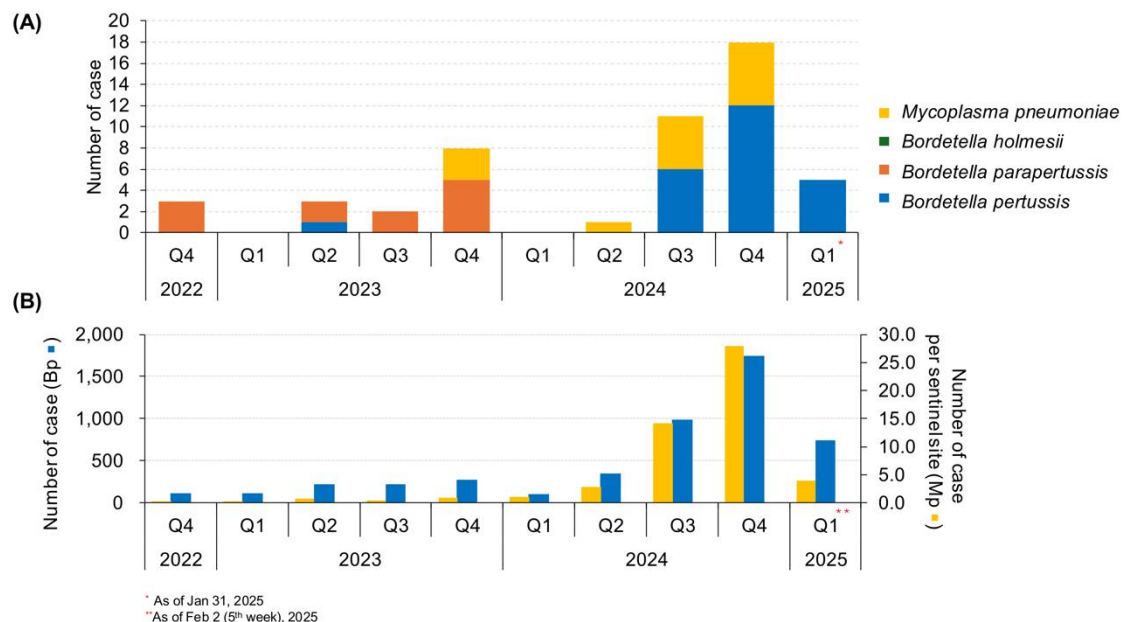


図1. 百日咳菌および百日咳類似疾患の病原体の国内流行状況

(A)本研究での調査結果、(B)百日咳とマイコプラズマ肺炎の国内発生動向調査。百日咳は対象期間での患者報告数全数、マイコプラズマ肺炎は対象期間での定点医療機関あたり累積患者報告数を示した。

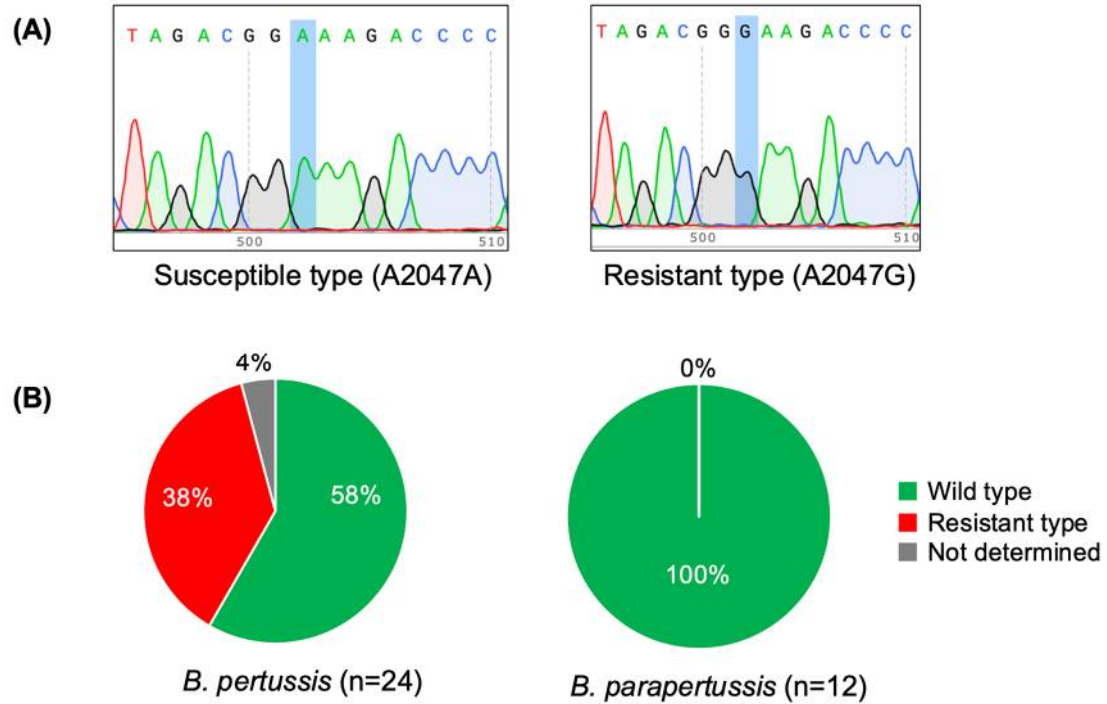


図2. 百日咳菌およびパラ百日咳菌のマクロライド耐性遺伝子変異
 (A)百日咳菌23S rRNA遺伝子のSNP箇所周辺のシーケンス波形：水色で示した2047番目塩基が感受性型ではAであるのに対して耐性型ではGに変異している、(B)百日咳菌とパラ百日咳菌DNAが検出された検体におけるマクロライド耐性遺伝子変異の保有率