

百日咳レファレンスセンター

- 1.活動報告と計画
- 2.百日咳の発生動向
- 3.マクロライド耐性菌の検出状況

国立感染症研究所 細菌第二部 第一室

小出健太郎 kkoide@nih.go.jp

大塚菜緒 notsuka@nih.go.jp

蒲地一成 kamachi@nih.go.jp

TEL: 042-848-7101（直通）

1. 活動報告と計画

百日咳レファレンスセンター



令和2年度の活動報告

● レファレンス関係の分与実績

レファレンス	地方衛生研究所	
	レファレンスセンター	その他
<i>Bordetella holmesii</i> -LAMPキット	0	1
4PlexリアルタイムPCRキット	2	2
マクロライド耐性菌遺伝子検出キット	9	0
計	11 (9施設)	3 (2施設)

● 百日咳に関する情報還元

1. 病原微生物検出情報 (IASR) 百日咳特集号 IASR Vol. 42. No.6 (発刊予定)
2. 病原体検出マニュアル 百日咳 第3.0版 2020年9月改訂
3. 論文発表

- Yamaguchi et al., The First Report of Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis* Isolation in Japan. Jpn J Infect Dis. 2020 73(5):361-362.
- Kamachi et al., Macrolide-Resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016-2017. Emerg Infect Dis. 2020 26(10):2511-2513.
- Kamachi et al., Rapid and simple SNP genotyping for *Bordetella pertussis* epidemic strain MT27 based on a multiplexed single-base extension assay. Sci Rep. 2021 1;11(1):4823.

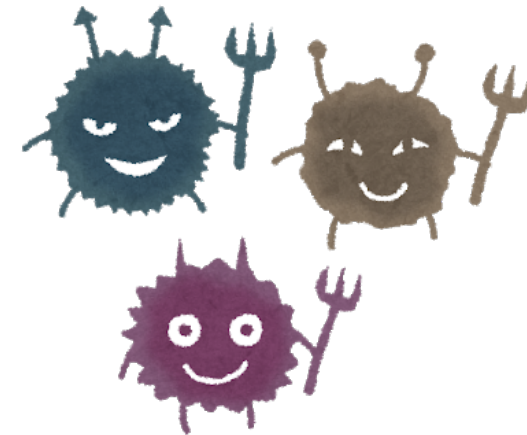
令和3年度の活動計画

1) 百日咳検査体制の強化・拡充（継続）

- 地方衛生研究所にレファレンスと検査キットの配布

2) 百日咳病原体サーベイランス

- 百日咳流行株の分子疫学
- マクロライド耐性百日咳菌



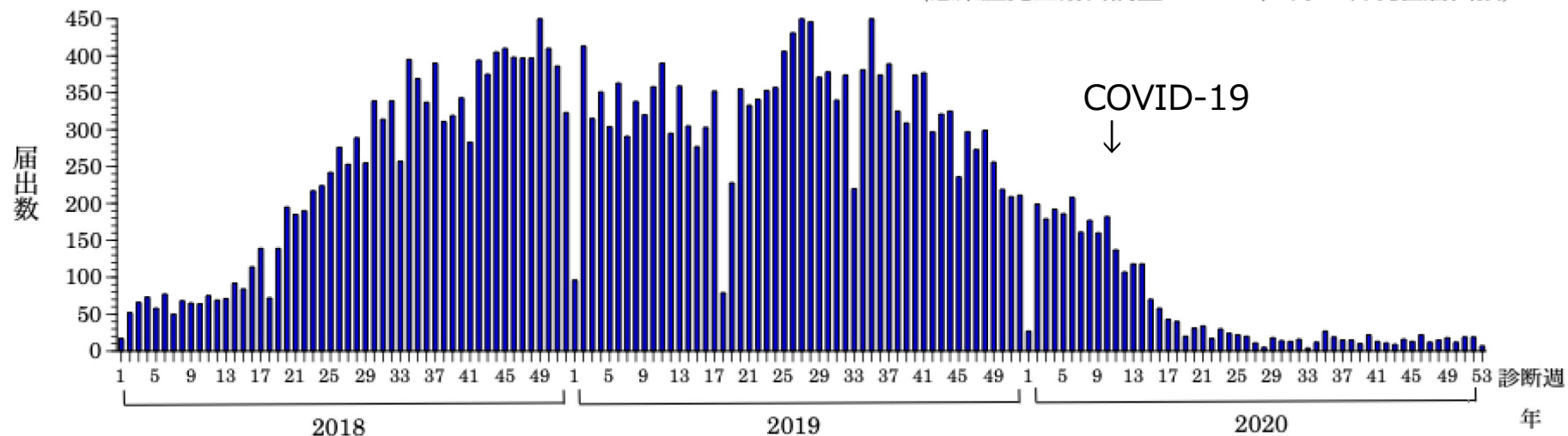
百日咳菌・百日咳
類縁菌の収集にぜ
ひご協力ください

2. 百日咳の発生動向

百日咳患者届出数の推移（2018年～）

図1. 診断週別百日咳患者届出数，2018年第1週～2020年第53週 (n=31,909)

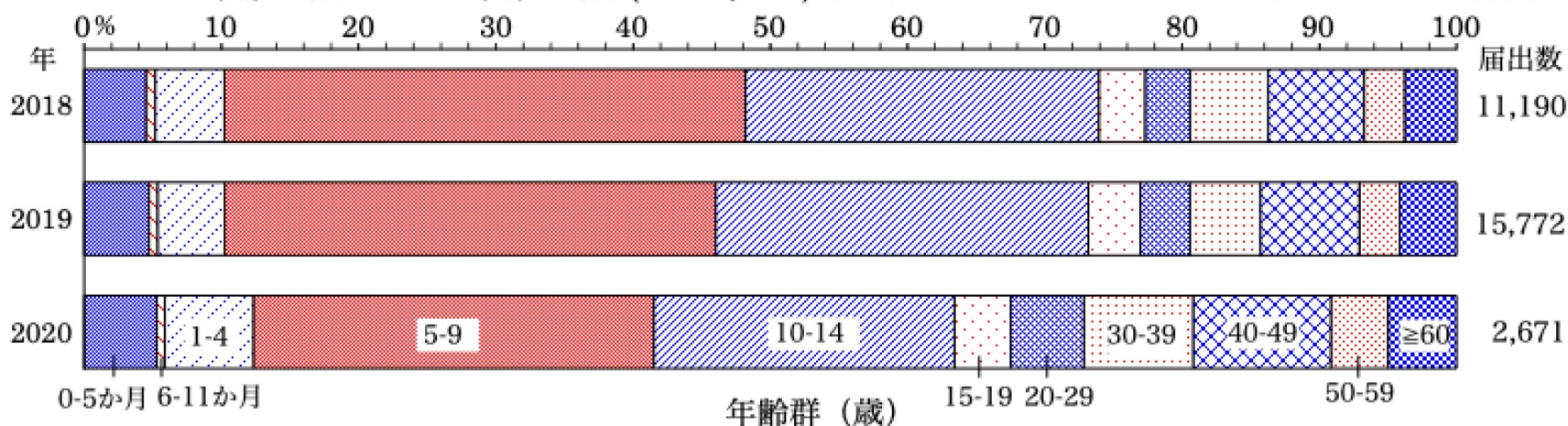
(感染症発生動向調査：2021年4月13日現在届出数)



IASR Vol. 42, No.6から転載

百日咳患者の年齢分布

図2. 届出ガイドラインの診断基準を満たした百日咳患者症例*の各年齢群の割合,
2018年第1週～2020年第53週 (n=29,633) (感染症発生動向調査：2021年1月8日現在届出数)



*百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン (初版) に則った症例のみを抽出

<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/610-disease-based/ha/pertussis/idsc/7994-pertussis-guideline-180425.html>

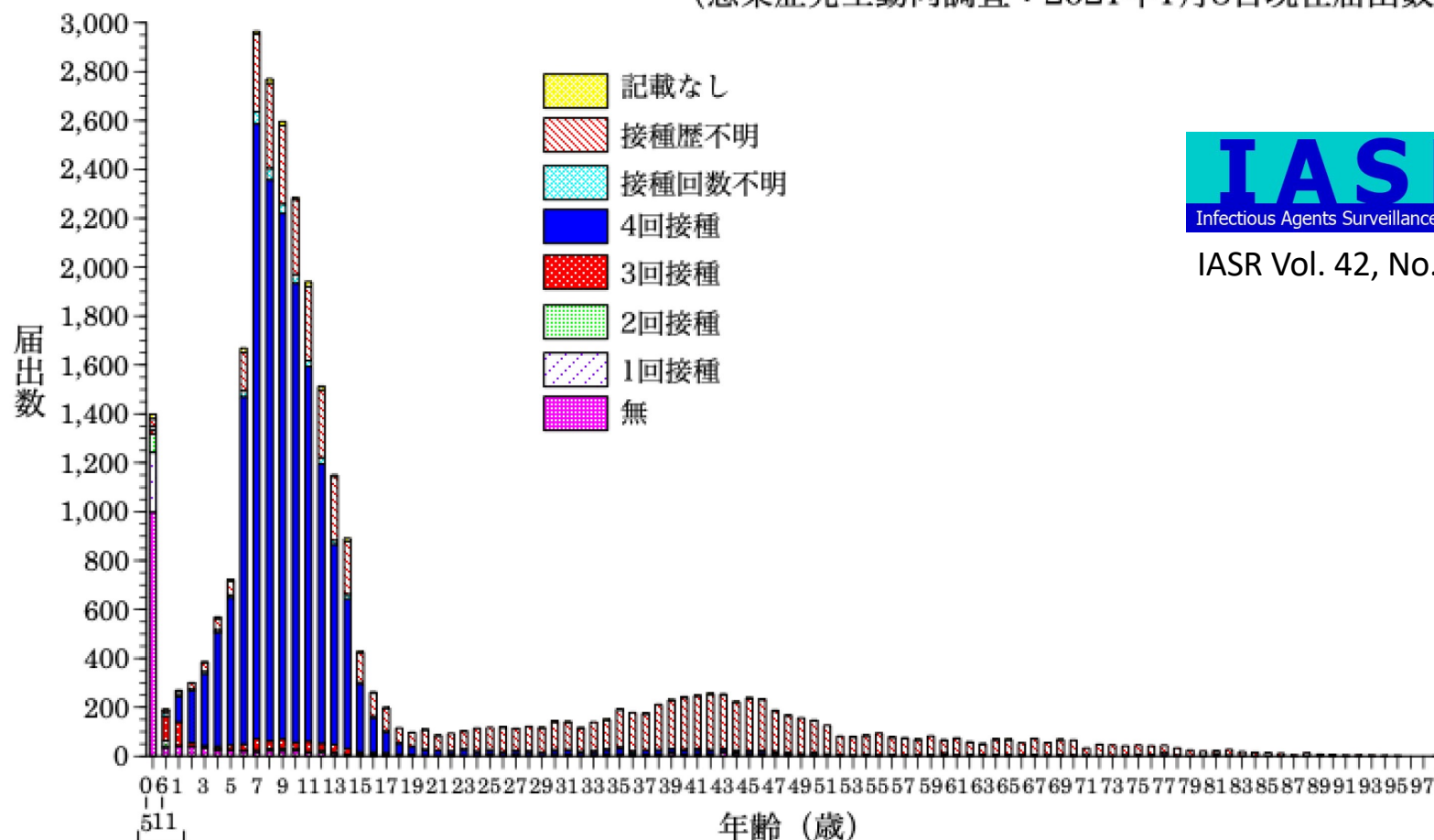


IASR Vol. 42, No.6から転載

小・中学校の休校により、5-9歳、10-14歳の患者割合が減少した可能性が高い

百日咳患者の年齢とワクチン接種歴

図3. 年齢・予防接種歴別百日咳症例届出数*, 2018年第1週～2020年第53週 (n=29,833)
 (感染症発生動向調査：2021年1月8日現在届出数)



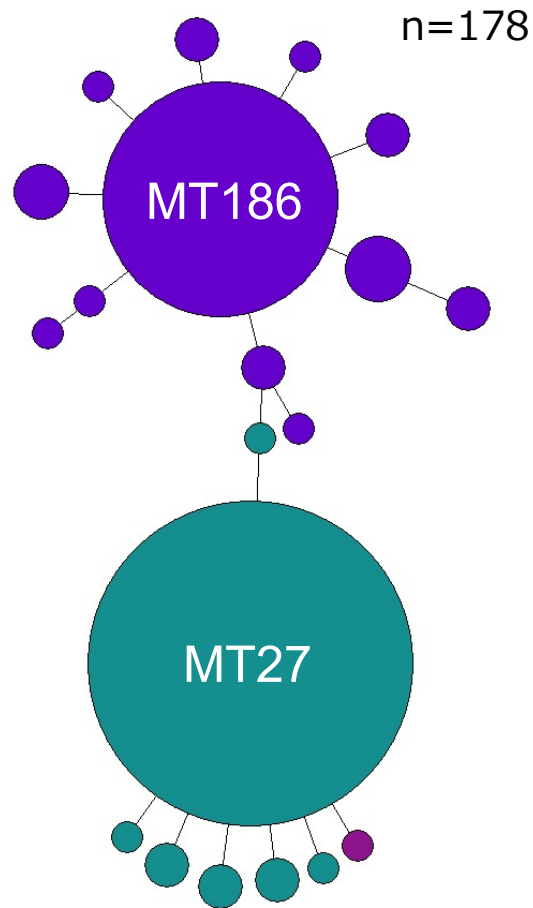
IASR Vol. 42, No.6から転載

0歳児の月齢 (か月) *百日咳 感染症法に基づく医師届出ガイドライン (初版) に則った症例のみを抽出

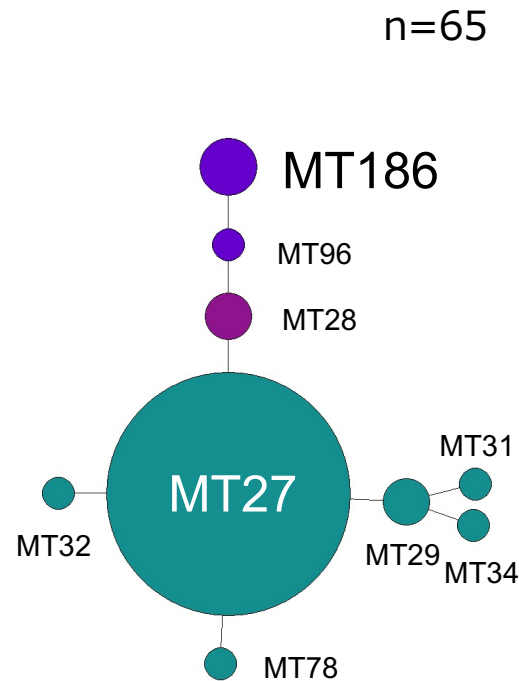
<https://www.niid.go.jp/niid/ja/id/610-disease-based/ha/pertussis/idsc/7994-pertussis-guideline-180425.html>

日本における百日咳菌の遺伝子型変化 (MLVA法)

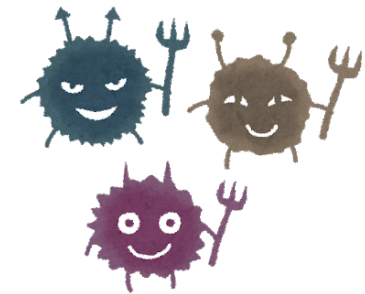
2005-2013年



2014-2017年



ポストコロナ

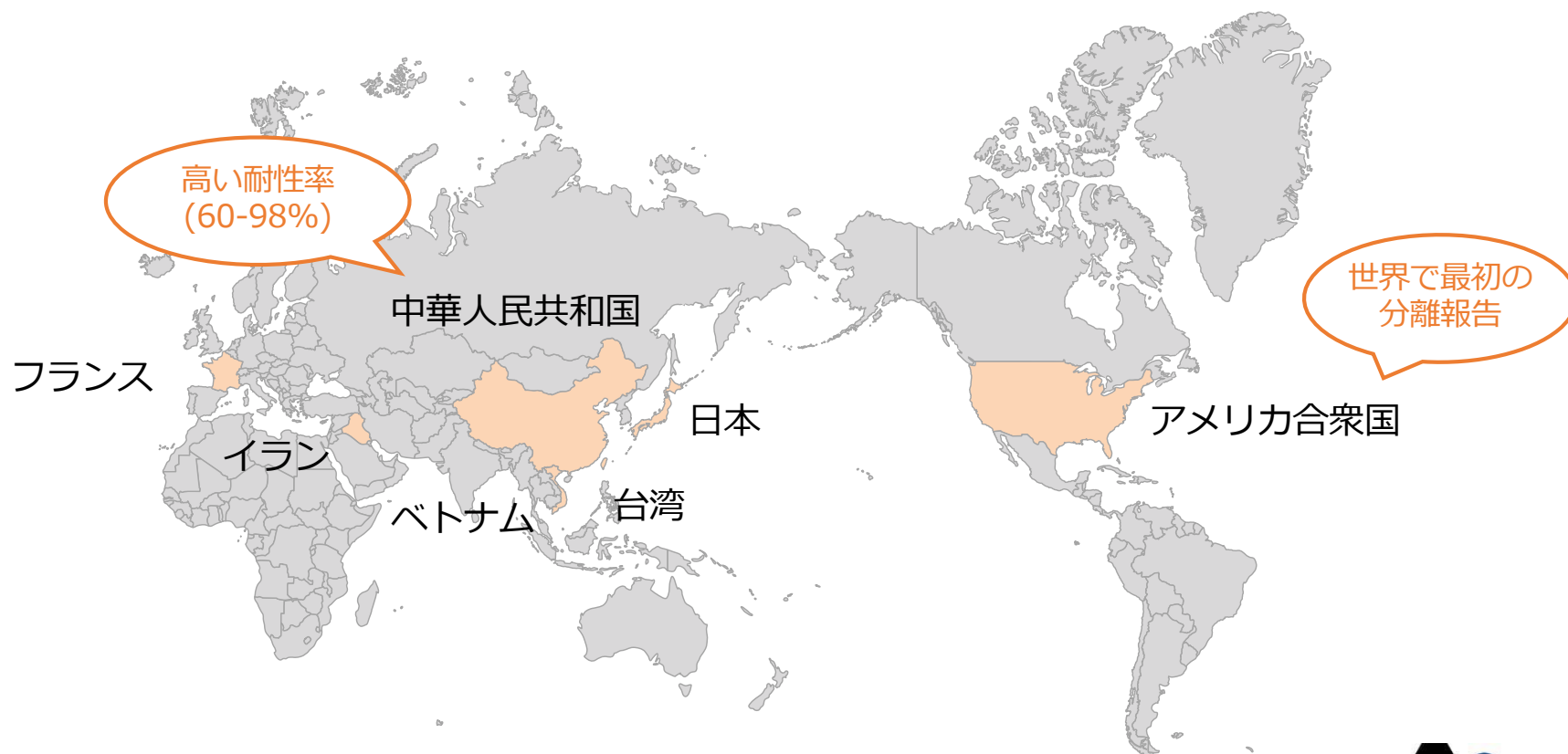


耐性菌は？
欧米の流行株
MT27は？

3. マクロライド耐性菌の検出状況

マクロライド耐性百日咳菌とは？

- 百日咳の治療薬であるマクロライド系抗菌薬（エリスロマイシンやアジスロマイシンなど）に対して耐性を示す百日咳菌
- 治療薬が効かないことで重症化や治療期間の延長等につながるため、耐性菌の出現は公衆衛生上重要な問題のひとつ



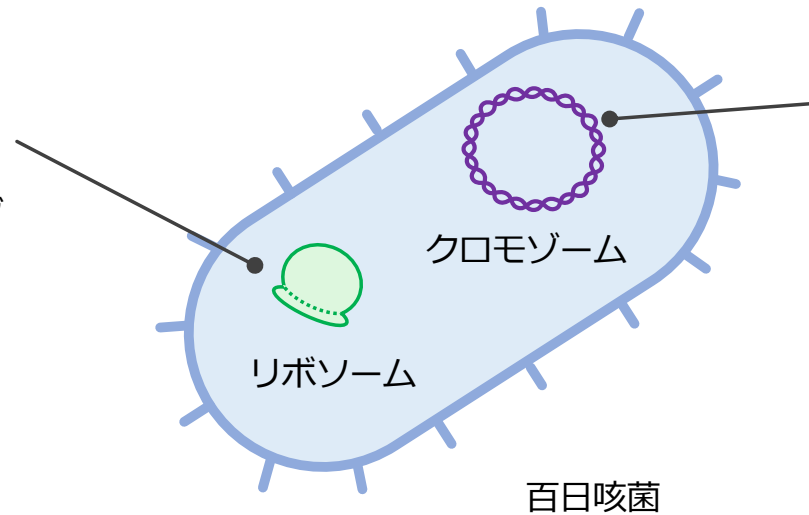
マクロライド耐性百日咳菌の出現が報告されている国や地域

マクロライド耐性百日咳の特徴

A2047G変異

23S rRNA配列の2047番目の塩基がアデニン(A)からグアニン(G)に置換した

マクロライド耐性菌遺伝子検出キットの標的



MLVAタイプ

中国で分離されている耐性菌のMLVAタイプは、MT55、MT104、MT195の3つが大多数を占める

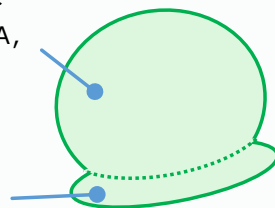
※マクロライド作用機序

リボソームの50Sサブユニットに結合しタンパク質合成を阻害することで細菌の増殖を抑制する

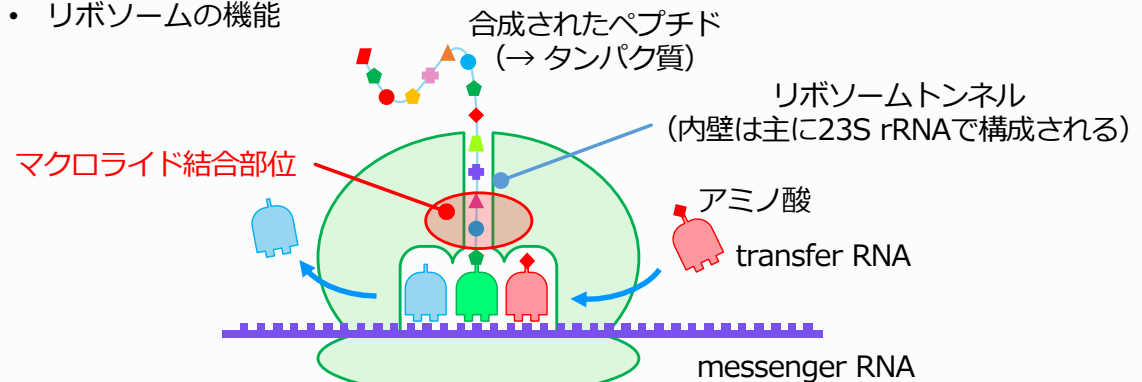
・ リボソームの構造

50S サブユニット
(5S rRNA, 23S rRNA,
多数のタンパク質)

30S サブユニット
(16S rRNA,
多数のタンパク質)



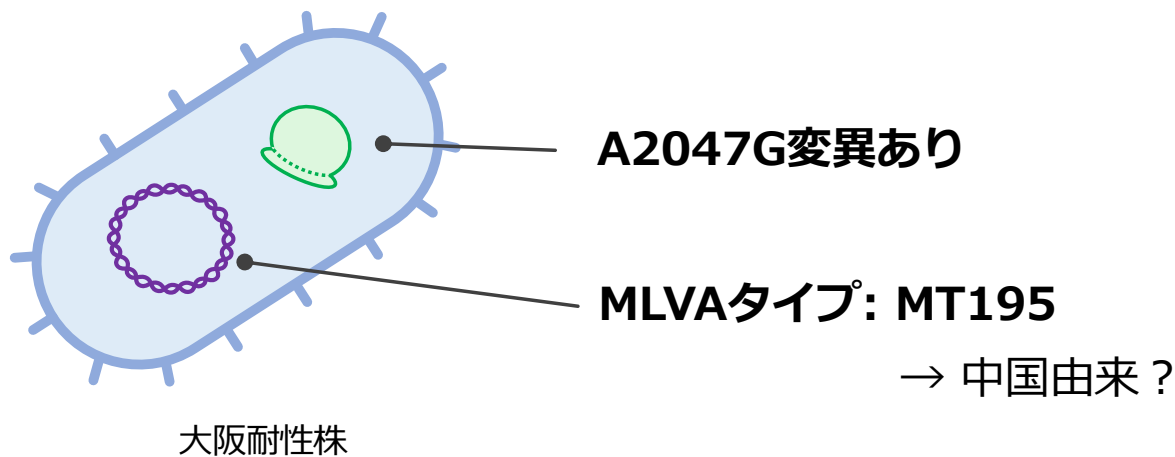
・ リボソームの機能



日本で分離されたマクロライド耐性百日咳菌

- 2018年大阪で2ヶ月齢の男の子から採取された1株のみ
- マクロライド系抗菌薬の最小発育阻止濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)

抗菌薬	耐性株	Tohama (基準株)
エリスロマイシン	> 256	0.064
クラリスロマイシン	> 256	0.032
アジスロマイシン	32	0.064



(T. Yamaguchi., et. al. 2020. Jpn J Infect Dis.)

マクロライド耐性百日咳菌のゲノム解析

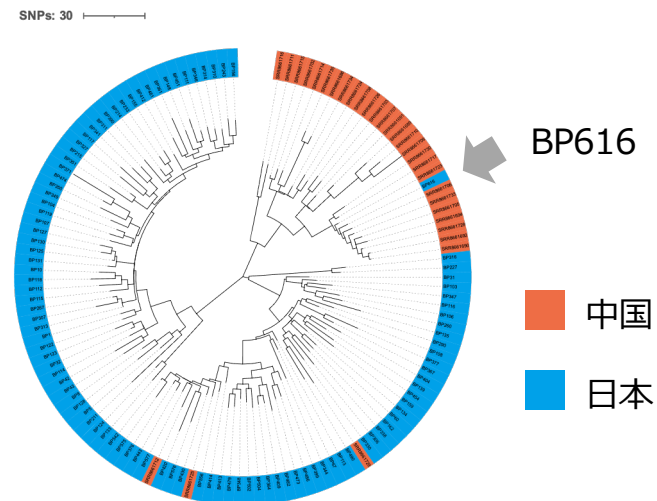
大阪で分離された耐性株（感染研ID：BP616）の全ゲノム解析を実施

分子系統解析

- BP616は中国の分離株と遺伝的に近縁であった
- BP616は、中国で採取されたマクロライド耐性菌と共通の遺伝子型 (*ptxP1*, *fhaB3*など) を持つ



大阪で分離された耐性株は中国由来と考えられる



完全長配列データの取得

- ショートリード (NovaSeq 6000)とロングリード (PacBio RS II)を組み合わせて完全長の配列データを取得

	BP616	Tohama (基準株)
Size (bp)	4,130,169	4,086,189
G+C content (%)	67.7	67.7
Total number of Coding sequences (CDSs)	3,967	3,839
Number of rRNAs (5S, 16S, 23S)	3, 3, 3	3, 3, 3

日本におけるマクロライド耐性百日咳菌の現状（まとめ）

1. 日本のマクロライド耐性百日咳菌は，2018年に大阪で分離された1株のみ
2. A2047G変異によってマクロライドに対して高度耐性化
3. 大阪の耐性株は中国から流入してきた可能性が高い

重要！（お願い）

菌分離やA2047G変異の検査を行っている数が少ないので，

『現在日本にマクロライド耐性百日咳菌はいない』

『日本でマクロライド耐性百日咳菌は蔓延しない』

『日本で百日咳菌はマクロライド耐性化しない』

} とは言えない

百日咳菌の収集およびマクロライド耐性菌遺伝子検出キットによるA2047G変異調査のご協力をお願いいたします



百日咳・ボツリヌスレファレンスセンター会議

2021.6.25

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
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**

**福島県衛生研究所
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（ボツリヌス食中毒）

ボツリヌス食中毒は、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、瓶詰め、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	1995	青森県	1	コハダのいずし	E
1984	青森県	1	鯛のいずし	E	1995	青森県	3	ウグイのいずし	E
1984	足利市	1	不明	B	1995	北海道	6	鮭のいずし	E
1984	釧路市	6	ハタハタ・鮭のいずし	E	1996	茂原市	1	不明	A
1985	函館市	1	鯛のいずし	E	1997	福島県	3	ハヤのいずし	E
1988	備前市	1	不明	A	1997	福島県	1	イワナのいずし	E
1988	札幌市	3	自家製鮭の調味乾燥品	E	1998	東京都	18	グリーンオリーブ（瓶詰）	B
1989	釧路市	1	ニシンのいずし	E	1999	大阪市	1	不明	A
1989	滋賀県	3	ハスずし	E	1999	柏市	1	ハヤシライスの具（真空パック）	A
1989	名寄市	2	カレイのいずし	E	1999	東京都	1	不明	A
1991	青森県	1	ウグイのいずし	E	2007	岩手県	1	アユのいずし	E
1991	広島市	1	不明	A	2012	鳥取県	2	あずきぱっとう（真空パック）	A
1991	青森県	1	アユのいずし	E	2016	奈良市	1	不明	A
1993	秋田県	4	里芋（缶詰）	A	2017	福山市	1	不明	B
1993	高槻市	1	不明	不明	2019	埼玉県	1	不明	A

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：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			
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		
計	42	13	26	3	25	11	2	4

* 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。

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、2016年から2020年までに計3例の成人腸管定着ボツリヌス症の届出があり、2例は、各々5歳および4歳の基礎疾患を持つ小児で、残る1例は臓器移植歴のある成人であった。3例ともA型ボツリヌス菌による感染であった。

1996	1		1		1				2017	3	1	2		3			
1999	1		1		1				2018	1		1			1		
2004	1		1				1*		2019	1		1			1		
2005	2		2		1	1			2020	2		2			2		
2006	2		2		1	1			計	42	13	26	3	25	11	2	4

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

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。

患者が**1歳以上**の場合、まず**食中毒**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！

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。

「細菌学的検査」

検体： **血清（抗毒素投与前）**
糞便（便秘のため取り難いが、わずかでもいいのでなんとか取ってもらう）

試験：

＜マウス試験法＞

- ①処理した検体（血清、糞便）について、診断用抗毒素と混合したサンプル（中和サンプル）と混合していないサンプル（非中和サンプル）を調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。
- ②糞便を培地に播種し、30℃（もしくは37℃）で5日間静置培養した培養上清について中和サンプルと非中和サンプルを調製し、マウス腹腔へ接種し、症状を観察する。



＜リパーゼ産性能の確認＞

糞便を培養した培地をブルセラHK卵黄寒天培地に播種し、嫌気的条件下で30℃（もしくは37℃）、48時間培養し、リパーゼ産性能を確認する。

＜毒素遺伝子の検出＞

ブルセラHK卵黄寒天培地上のコロニーのDNAを抽出し、毒素遺伝子の有無をPCRにて確認する。



ボツリヌス症の細菌学的検査に関する講習会

1. 稀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。
2. 毎年「動物実験」を中心に講習会を開催。
3. 2018年度より、参加者によるマウス接種実施開始。
4. 参加をご希望の場合は、細菌第二部第三室 妹尾(senoh@nih.go.jp)まで

第8回講習会

2021年11月10日から11月12日まで

参加自治体：北海道、福島県、大阪府、愛媛県

第9回講習会

参加者募集中（実験室の都合上4名まで）

基本的に年1回秋頃の開催ですが、早期に参加希望者が4名に達した場合、年2回の開催などを検討します。

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。

問い合わせ先は、**細菌第二部第三室 妹尾(senoh@nih.go.jp)**です。