

別冊

病原体検出マニュアル

## **マクロライド耐性百日咳菌の検査**

2026 年 1 月 初版

## 目次

<b>(1) マクロライド耐性百日咳菌の概要</b> .....	p. 4
<b>(2) 検査材料の採取</b> .....	p. 5
Q. 百日咳検査に適した検体の採取部位は？	
Q. 百日咳の検査検体採取に適したスワブを選択する上での注意点はありますか？	
Q. ウイルス輸送培地の検査残液で百日咳検査は可能か？	
<b>(3) 検体の保管・輸送</b> .....	p. 9
Q. 検体の保管温度の検査への影響は？	
Q. 検体の輸送にドライアイスが必要か？	
<b>(4) 百日咳菌の検出・同定</b> .....	p. 10
Q. 検体種別の検査の進め方について教えてほしい	
4-1. 菌培養検査	
Q. 菌培養：百日咳菌の培養に用いる培地の種類と使い分けは？	
4-2. 遺伝子検査	
4-2-1. 臨床検体からの DNA 抽出	
Q. 遺伝子検査：臨床検体からの DNA 抽出について注意点はありますか？	
4-2-2. 4Plex qPCR 法	
Q. 遺伝子検査：4Plex qPCR 法でのカットオフ基準はあるか？	
<b>(5) マクロライド耐性検査</b> .....	p. 17
5-1. 23S rRNA 遺伝子のサンガーシーケンス解析	
5-2. 分離菌株の A2047G-Cycleave PCR 法	
5-3. 分離菌株の薬剤感受性試験	
<b>(6) その他</b> .....	p. 24
Q. キャピラリーシーケンサーを保有していない、または機器が故障したが、百日咳菌の耐性検査を依頼され、サンガーシーケンス解析をする必要がある場合どうしたら良いか？	
Q. 耐性検査の結果を医療機関に知らせる上で注意すべき点はあるか？	
Q. 百日咳の行政検査について教えてほしい	
<b>(7) Appendices 自家調製培地の組成と調製方法</b> .....	p. 26
<b>(8) 参考文献</b> .....	p. 29

(9) 執筆者一覧 .....	p. 30
(10) 令和 7 年度 百日咳レファレンスセンター .....	p. 30

## (1) マクロライド耐性百日咳菌の概要

百日咳は主に百日咳菌(*Bordetella pertussis*)によって引き起こされる急性呼吸器感染症である。感染症発生動向調査では、2018年から感染症法5類の全数把握対象疾患となり年間1万5,000例程度の患者届出があった(2018年12,115例, 2019年16,845例)。2020年からは新型コロナウイルス感染症(COVID-19)の流行により、非医療的感染対策(non-pharmaceutical intervention, NPI)が徹底されたため、他の呼吸器感染症と同様に百日咳の届出数も激減していた。ところが、COVID-19流行が落ち着き、海外からのインバウンド客が増加するとともに、2024年9月ごろから百日咳患者数も増加傾向に転じ、流行の兆しが見られた。その後、2025年になると急速に患者数の増加を認め、過去最大級の百日咳流行が発生した。2025年第1週～第52週の累計患者届出数は89,387例(暫定速報値)となった。

百日咳治療の第一選択薬にはマクロライド系抗菌薬が使用されるが、2024～2025年流行ではこれに耐性を示すマクロライド耐性百日咳菌(macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, MRBP)が国内で急速に拡大したことも医療現場での混乱を引き起こす要因となった。マクロライド系抗菌薬は細菌リボソームの構成成分である23S rRNA domain Vを標的としており、リボソームの働きを阻害するため細菌の増殖を静菌的に抑制する。百日咳菌の既知のマクロライド耐性機構は、この23S rRNAをコードする遺伝子の2047番目塩基がAからGに点変異する(A2047G)機構のみが報告されている。したがって、百日咳患者の感染株におけるマクロライド感受性は、臨床検体DNAや分離株の当該遺伝子変異の有無で推定するか、分離菌株の薬剤感受性試験により確認する。

百日咳菌感染を同定する検査としては①菌培養、②遺伝子検査(LAMP法, PCR法)、③抗体検査、④抗原検査、と各種利用可能である。一方、感染株の耐性検査に関しては民間検査会社で受託できるものがなく、現在は一般のクリニックでは実施が困難な状況である。地方衛生研究所においても、これまで百日咳検査の依頼や経験がほとんどない中で、2025年の百日咳流行を迎え、検査体制を整備するのは手探りの状況であった。本マニュアルでは、病原体検出マニュアル「百日咳」の記載情報を現状に合わせて一部更新し、マクロライド耐性百日咳菌の検査に関連して受けた質問事項を中心にまとめた。なお、本マニュアルの記載情報も今後状況に応じて内容が変更される可能性がある。

## (2) 検査材料の採取

Q. 百日咳検査に適した検体の採取部位は？

A. 後鼻腔（鼻咽頭）から採取したぬぐい液が適している

百日咳菌検査には、主に Nasopharyngeal swab（鼻咽頭スワブ）が用いられ、とりわけ後鼻腔から採取した検体が適しているとされる。乳幼児患者は保菌量が多い傾向にあり、鼻腔ぬぐい液の採取が困難な場合は咽頭スワブや吸引喀痰などを用いることもできる。ただし、鼻咽頭スワブと比較すると咽頭スワブでは菌培養陽性率が低下することが報告されている（鼻咽頭スワブ 95% vs 咽頭スワブ 44%, Marcon MJ-JCM-1987）。なお、百日咳菌は気道上皮細胞のうち、繊毛細胞に定着して増殖するため、鼻腔の浅い部分を擦過したスワブ検体は検査に適さない。

○鼻腔底に沿ってスワブを挿入し行き止まりの最奥部（上咽頭）で数秒留置して拭液を吸い取る

×鼻腔の浅い部位からの採取は検査効率が悪い

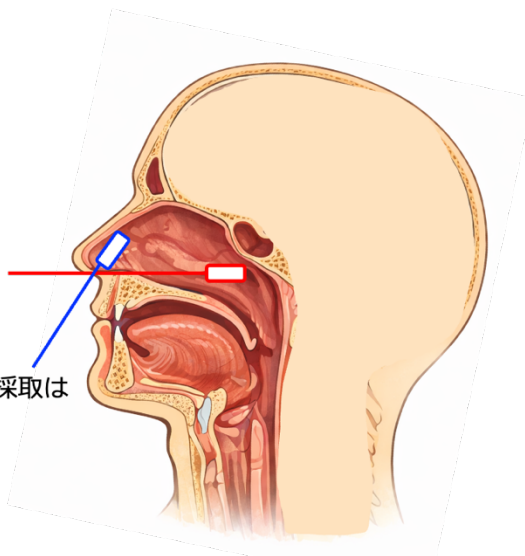


図. 百日咳検査のための後鼻腔ぬぐい液の採取方法

検査材料の採取に関する詳細は病原体検出マニュアル第 4.0 版 p.2「検査材料の採取」を参照すること。

Q. 百日咳の検査検体採取に適したスワブを選択する上での注意点はありますか？

A. 綿球素材が綿（コットン）のものは避ける

百日咳菌は植物由来の不飽和脂肪酸により生育阻害を受けることが知られているため、特に菌培養を実施する場合はスワブの綿球素材に綿（コットン）を使用したものは避けることが望ましい。レーヨンやポリエステル素材のものを利用すると良い。近年では小児科領域で「フロックスワブ」と呼ばれるポリエステル製の繊維を植毛したブラシ

のような形状をしたスワブがよく使用されており、検体の採取効率・放出効率が良いと言われている。

百日咳検査の目的で患者からスワブをあらためて採取する場合は、スワブを空のスπιツ管などに入れて冷蔵保管する。特に、何らかの抗菌薬が投与された後では保菌量が低下する可能性が考えられるため、スワブを保管する際に、スワブを緩衝液に浸漬すると、スワブに付着した菌体が拡散してしまい、検査への持ち込み量がさらに減少する恐れがある。

参考として下記に、最近当室の菌培養・遺伝子検査とともに百日咳菌陽性となった検体で使用されていたスワブ商品を紹介する。

**表. 百日咳検査のための検体採取スワブ商品例**

製品名	メーカー	製品番号
Puritan Dry transport system	Puritan (スギヤマゲン)	25-3317-H BT
Puritan Dry transport system	Puritan (スギヤマゲン)	25-3319-H BT
シードスワブ γ2 号 '栄研'	栄研化学	E-MS62

Q. ウイルス輸送培地（Viral Transport Medium, VTM）の検査残液で百日咳検査は可能か？

A. 菌培養・遺伝子検査とともに VTM 残液検体を用いた検査ができる

近年、呼吸器病原体マルチスクリーニング遺伝子検査（FilmArray, SpotFire, Genecube など）の利用が広がっている。これら遺伝子検査法では鼻咽頭ぬぐい液をスワブで採取し、直ちにウイルス輸送培地(viral transport medium, VTM)又は生理食塩液（最大量 3 mL）に入れることが推奨されており、多くはウイルス、クラミジア、マイコプラズマ、ウレアプラスマの保存・輸送に適した液相培地が用いられる。VTM の組成は製品によって異なるが、百日咳菌が感受性を示す抗菌薬が含まれることがある。

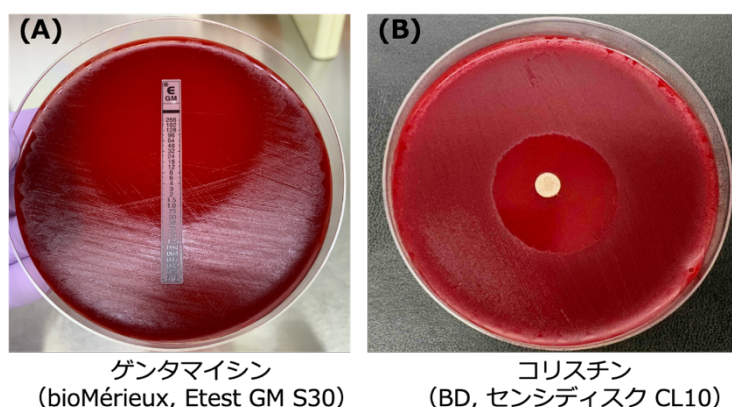
**表. 検体輸送培地と含まれる抗菌薬・抗真菌薬**

製品名	含有抗菌薬・抗真菌薬
生理食塩液	-
Copan eSwab108SRL 小児用 FLOQ スワブ	-
シードスワブ γ2 号'栄研'	-（変法アミーズ培地）
Puritan UniTranz-RT	バンコマイシン、 <b>コリスチン</b> 、アンホテリシン B
Copan UTM	バンコマイシン、 <b>コリスチン</b> 、アンホテリシン B

BD ユニバーサル バイラルトランスポート	バンコマイシン、 <b>コリスチン</b> 、アンホテリシン B
エルメックス ウイルス輸送培地	<b>ゲンタマイシン</b> 、ナISTアチン、アンホテリシン B

\*百日咳菌が感受性を示す抗菌薬を**太字**で示した

Etest, Disk 法で薬剤感受性を確認すると、百日咳菌はゲンタマイシン、コリスチンに感受性を示す（下図）。しかしながら、輸送培地中に含まれる濃度では死滅せず、むしろ抗菌薬・抗真菌薬が雑菌の生育を阻害して百日咳菌の分離を容易にする傾向が見られている。当室では長期-80℃凍結保管（最長 153 日間）されていた VTM 検体からも菌分離されている。従って、百日咳患者から再度鼻腔スワブを採取せずとも、初回検査で百日咳菌が検出された VTM 残液検体を冷凍保管していれば、これを用いて菌分離も可能である。



**図. 百日咳菌Tohama I株のゲンタマイシン、コリスチン感受性試験**

いずれもBG培地にマクファールランド濁度0.5の菌液を塗布し、36℃で4日間培養した。  
ゲンタマイシンはMIC: 0.038 µg/mL, コリスチンは阻止円直径31 mmとなり感受性が確認された。  
(なお、コリスチンはEtestストリップでの取り扱いがない)

また、VTM 検体を遺伝子検査に用いるのも問題がない。通常、FimlArray や SpotFire では 300 µL の VTM から DNA 抽出して供試するため、VTM 残液検体を用いて遺伝子検査をする場合は、残液検体 300~500 µL から市販の DNA 精製キットを用いて DNA を抽出し、遺伝子検査を実施すると良い。

施設によってはスワブを生理食塩水に懸濁させ、多項目 PCR に供試する場合がある。しかし、生理食塩水は雑菌の生育を阻害できないため検査までできるだけ低温で保管する。

VTM 残液検体を保管する場合は、検体採取に使用したスワブ綿棒を廃棄せずに浸漬させたままの状態での保管することを推奨する。百日咳菌陽性が確認された VTM 残液検体では、検体採取スワブにも菌体が残存しており、培地への直接塗布により効率よ

く菌分離を行うことができる。

下表に鼻腔スワブの採取タイミングとスワブ検体の保存容器についてまとめた。ただし、被験者の保菌量によってはこの限りではないため参考として見ていただきたい。

**表. 鼻腔スワブの採取タイミングと保存容器**

鼻腔スワブの採取タイミング	スワブ (ウイルス輸送液)*	スワブ (空チューブ)
初回のスワブ採取 または 抗菌薬投与前	○	○
2回目以降のスワブ採取 または 抗菌薬投与後	△	○

\*ウイルス輸送液にスワブを懸濁させると検査への持ち込み菌量が減少する可能性があるが、遺伝子検査で百日咳菌 DNA が検出された検体は菌分離や耐性検査に用いることができる

### (3) 検体の保管・輸送

Q. 検体の保管温度の検査への影響は？

A. 通常は、検体の保存は 4℃ 冷蔵で行う。

冷凍保管したスワブ検体（VTM 懸濁液ではなく、ここではスワブ単体を指す）は遺伝子検査に用いるには問題がないが、菌培養に用いるには注意が必要である。1%カザミノ酸液懸濁液を長期保存した場合の生菌率は-20℃ > 4℃ >>室温との報告があるが、PBS 懸濁液の場合は冷凍保管でも百日咳菌はすぐに死滅してしまうようである（Cassidy PK-JCM-1994）。生菌率は保存培地の有無・種類、凍結条件によって異なるため、凍結検体からの菌培養を考える場合は個々の組み合わせについて検討が必要である。

また、スワブが乾燥すると菌分離率が低下する傾向にあり、保管の際には容器を密閉することを心がける。乾燥による菌分離率の低下が確認された場合には、ファルコンチューブに 1～2 滴の滅菌生理食塩水を添加して湿度を保ち、スワブを保管する方法も考えられる[山形県衛生研究所・瀬戸]。

検体採取から検査開始まで 1 週間以上かかる場合は、検体を冷凍保存する。

Q. 検体の輸送にドライアイスが必要か？

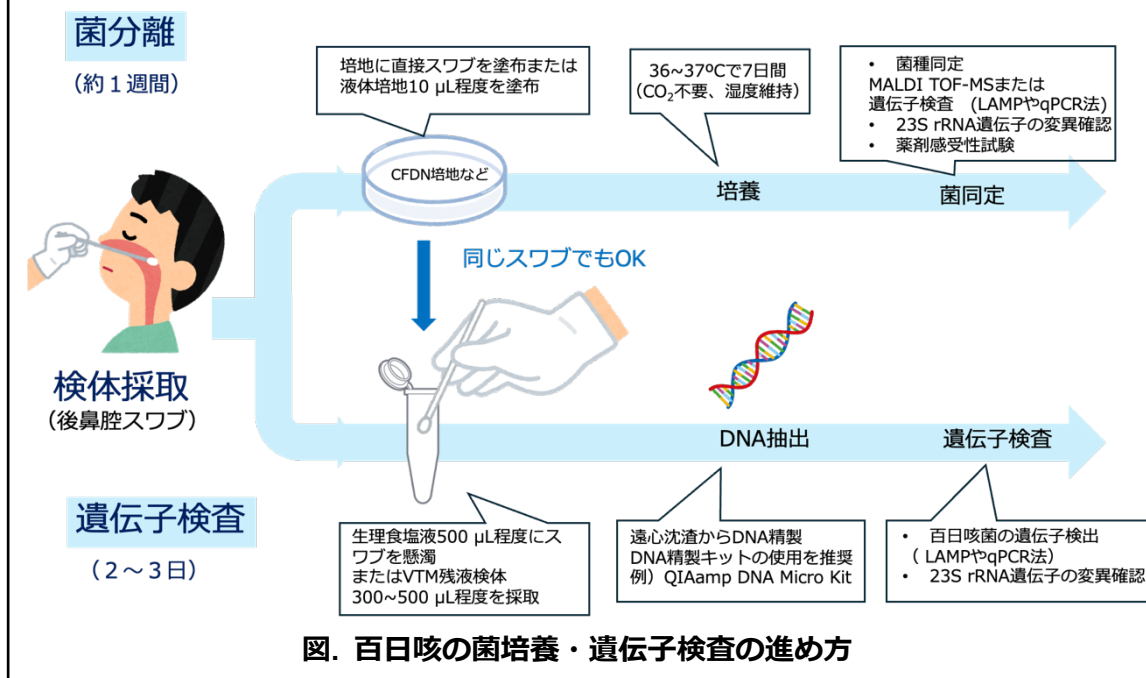
A. ドライアイスの使用は必須ではない。

医療機関から検査機関への輸送は、冬季は常温輸送、外気温が高い夏季は雑菌の繁殖を抑えるため冷蔵温度帯で輸送する（ゆうパックチルド冷蔵便）。夏季に中 1 日以上かかる地域間の輸送を行う場合は保冷剤を同梱すると良い。現在のところ検体の冷蔵保管・冷蔵輸送で雑菌やカビの繁殖などが原因で検査に支障が出た経験はない。

#### (4) 検査方法：百日咳菌の検出・同定

Q. 検体種別の検査の進め方について教えてほしい

A. 下図に検査の流れを示した。鼻腔スワブやVTM 残液検体は菌培養検査と遺伝子検査の両方に供試することが可能である。



#### 4-1. 菌培養検査

Q. 菌培養：百日咳菌の培養に用いる培地の種類と使い分けは？

A. Bordet-Gengou 血液寒天培地（市販・自家調製）、CFDN 寒天培地（市販）、Regan-Lowe チャコール血液寒天培地(自家調製)、CSM 寒天培地（自家調製）等が利用可能であり、臨床検体の直接塗布にはCFDN 寒天培地やセファレキシン含有の自家調製培地が適している。

百日咳菌の分離に関する詳細は病原体検出マニュアルを参照すること。ここでは菌分離に用いる培地の特徴と調製方法について概説する。

臨床検体の直接塗布により菌分離を行う場合は、培地に雑菌の生育を抑制するため百日咳菌が自然耐性を有するセファレキシン(Cefalexin, CEX)を添加する。近年、鼻腔常在細菌の薬剤耐性化が進み、CEXの添加効果が低くなっている。国外では40 μg/mL CEX添加のBG培地が推奨されているが、その濃度では百日咳菌の増殖速度も遅くなる。そのため、通常CEXは20 μg/mLで使用する。

分離培地にはそれぞれ特徴があるため、細菌第二部第一室では、臨床検体からの菌分離にCFDN寒天培地とBG培地（抗菌薬不含）を併用して行うことが多い（VTM残液検体の場合は夾雑菌の生育が抑制されており、CEX不含のBG培地でも菌分離ができ

ている)。各培地の組成と調製方法については本マニュアル末尾の Appendices 項に記載した。

前項でも記載したとおり、近年ではウイルス輸送培地にスワブ検体を懸濁させて検査に使用する機会が増えた。ウイルス輸送培地も製品によっては、スワブと輸送培地がセットになったものがあるが、この場合はスワブを輸送培地に浸漬したまま保管するとよい。菌培養には分離培地に直接塗布した方が、スワブを懸濁した輸送培地を播種するよりも菌分離率が良いようである。

**表. 百日咳菌の分離培養に用いられる平板培地**

培地	抗菌薬	販売元	備考
Bordet-Gengou 血液寒天培地	-	極東製薬	5 枚包装 (商品コード No.551-05255-8)
ボルデテラ CFDN 寒天培地	8 µg/mL vancomycin 4 µg/mL cefdinir	日研生物	10 枚包装 (製品コード P96511-010)
Bordet-Gengou 血液寒天培地	- (抗菌薬添加は自由)	自家調製	BD Difco ボルデージャング寒天基礎培地(型番 248200)
チャコール寒天培地 (Regan-Lowe Charcoal Blood Agar)	- (抗菌薬添加は自由)	自家調製	OXOID Charcoal Agar Base (Dehydrated) 製品番号 : CM0119B
シクロデキストリン寒天培地 (CSM)	- (抗菌薬添加は自由)	自家調製	-

#### (1) Bordet-Gengou 血液寒天培地

Bordet-Gengou 血液寒天培地 (BG 培地) はジャガイモ澱粉を主成分とした百日咳菌培養の標準的な培地である。BG 培地の組成は研究室ごとに幾つかのバリエーションが存在するが、1906 年に Bordet J らが発表した組成では "lapin"、すなわちウサギの血液が使用されていた (Bordet J et al., 1906)。現在では、ウマやヒツジの無菌脱繊維血液が用いられることが多い。ただし、ヒツジは百日咳類縁菌であるパラ百日咳菌が感染するため、パラ百日咳菌感染個体では繊維状赤血球凝集素(FHA)に対する抗体が産生される。このため、ごく稀に抗 FHA IgG を含むヒツジ脱繊維血液を利用してしまった場合は、百日咳菌が生育しないことがある。

百日咳菌は溶血活性を持つアデニル酸シクラーゼ毒素(Adenylate cyclase toxin, ACT または CyaA)を産生するため、菌分離の際に百日咳菌コロニーの周囲には溶血環が形成される。生育コロニーの菌種同定には遺伝子検査か質量分析 MALDI TOF-MS を用いるが、培地を光にかざした際に見られる溶血環の形成も菌種鑑別の目安になる(下

図)。BG 培地は自家調製するほか、抗菌薬不含の BG 培地であれば極東製薬から購入可能である。動物血を使用するため使用期限が短く、培地作製から 1 ヶ月程度が使用期限目安となる。

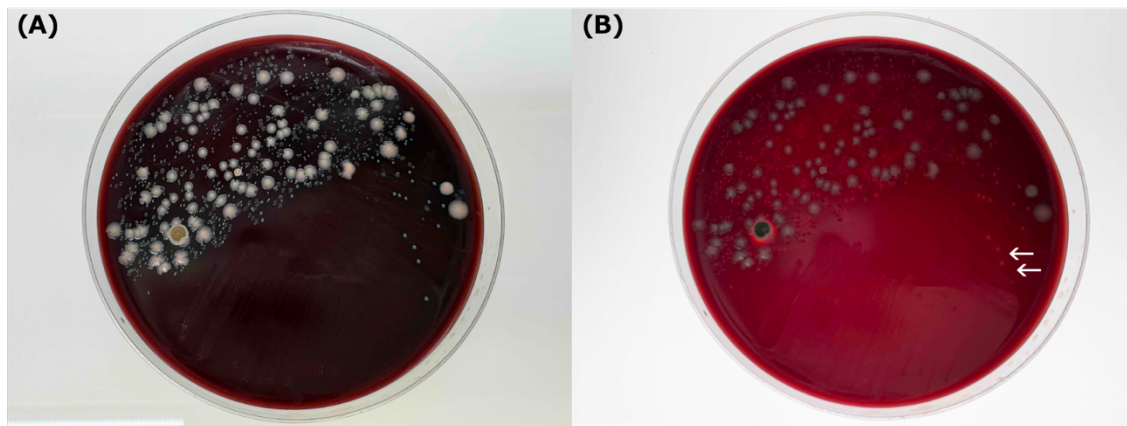


図. 臨床検体の直接塗布によりBG培地に生育した百日咳菌の様子

鼻腔スワブをBG培地（抗菌薬不含）に直接塗布し、36℃で5日間培養した。  
(A)落射光での様子。3～4種類の細菌の生育が認められる、(B)下から蛍光灯を照射した様子。  
矢印で示したコロニーの周囲に溶血環が認められる。遺伝子検査においても、これらが百日咳菌であることが同定された。

## (2) ボルデテラ CFDN 寒天培地

人工合成培地であり、動物血液を使用しない。抗菌薬としてバンコマイシン(終濃度 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )およびセフジニル（終濃度 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）を含有するため、臨床検体の直接塗布の際にも夾雑菌（*Moraxella catarrhalis* や MRSA、鼻咽頭・上気道の常在菌）の生育を抑制し、百日咳菌を選択的に発育させることができる。場合によっては *M. catarrhalis* が生育することもあるが、*M. catarrhalis* のコロニー形状が R 型（粗い表面）を示すのに対し、百日咳菌コロニーは S 型（滑らかな表面）のため鑑別が容易である。株式会社 日研生物から購入可能で、使用期限は製造から 4 ヶ月となっている。

## (3) チャコール寒天培地（Regan-Lowe Charcoal Blood Agar）

[神戸市健康科学研究所・小松ら]

チャコール寒天培地(RL 培地)は百日咳菌・パラ百日咳菌およびインフルエンザ菌の培養に用いられる。動物血液を含むが、BG 培地と比べると使用量が少なく済む利点がある。また、本培地は、BG 培地やボルデテラ CFDN 寒天培地と比較して、百日咳菌の発育支持能および夾雑菌抑制能に優れていることが報告されている（河内 誠ら, 2018）。現在のところ、生培地が市販されておらず、自家調製する必要がある。また、チャコール寒天培地は血液を含むため、血液を含まない培地と比べると使用期限が短い。神戸市健康科学研究所では作製後 3 ヶ月以内を使用期限としている。また、本培地の自家調製では CEX を終濃度 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  となるよう添加しているが、百日咳菌の生育に特段の抑制がかかっている様子は認められていない。

#### (4) シクロデキストリン寒天培地(Cyclodextrin Solid Medium, CSM)

シクロデキストリン寒天培地(CSM 培地)は、人工合成培地であり動物血液を使用しない(Imaizumi A et al, 1983)。シクロデキストリン(Me beta CD)を終濃度 1%含み、これが百日咳菌の生育を妨害するオレイン酸やパルミチン酸などの飽和脂肪酸を吸着する働きがあるため菌の生育が良好である。組成がやや複雑であるという難点があるが、血液培地と比べて長期に使用できるため実験室ではよく用いられている。

また、CSM 培地ではカザミノ酸を 0.5 g/1,000 mL 添加するところを、10.0 g/1,000 mL と増量し、さらに Bacto Agar を添加しないことで液体培地として使用することができる(modified Steiner-Sholte liquid medium, mSS)。

## 4-2. 遺伝子検査

Q. 遺伝子検査：臨床検体からの DNA 抽出について注意点はるか？

A. 百日咳患者における保菌量は患者の年齢とともに減少する傾向にあるため、青年以降の百日咳患者では特に高感度な遺伝子検査が求められる。そのためには検体をボイル処理するだけではなく、DNA 精製キット等を用いてより高収率で高純度の DNA 検体を供試することが望ましい。各社から DNA 精製キットが市販されているが、百日咳患者の臨床検体を扱う際には可能であれば少量の検体から高収率で DNA 抽出できるキットを選択すると良い(参考：QIAamp DNA Micro Kit, QIAGEN)。各機関では、その他の検査業務でも汎用性の高い DNA 精製キットのうち利用可能な製品を選択することを推奨する(参考：令和 6 年度厚労科研・宮崎班研究報告書)。

### 4-2-1. 臨床検体からの DNA 精製

臨床検体からの DNA 抽出には市販の DNA 精製キットを使用する。当室では微量 DNA サンプルを抽出するのに適した QIAamp DNA Micro kit (QIAGEN)の使用を推奨している。以下に、本キットを使用した際の流れを示す。

A) 鼻腔スワブ(スワブ単品)：滅菌生理食塩水 500  $\mu$ L 程度に懸濁させ、最高速度で 1 分間遠心した遠心沈渣を得る。

B) VTM 残液検体：300~500  $\mu$ L を採取し、最高速度で 1 分間遠心した遠心沈渣を得る。

↓

A)または B)で得られた遠心沈渣に Buffer ATL 180  $\mu$ L と ProK 20  $\mu$ L を加えてボルテックスで 15 秒間混和する。56°C で一晚(16 時間程度)インキュベートする。

※加温時間を極端に短くすると DNA 回収率が大幅に低下するので注意

↓

以降はプロトコール「組織サンプルからのゲノム DNA 分離」操作手順 5 以降に従って、DNA 精製作業を進める。

通常、DNA 精製の際にはプロトコールに従いキャリアーRNA を加え、最終的にカラムに 25  $\mu$ L 溶出バッファーAE を加えて DNA を溶出する（約 20  $\mu$ L の DNA 溶液が得られる）。

4-2-2. 4Plex qPCR

本法の詳細は病原体検出マニュアルを参照すること。ここでは補足的な情報を記載する。

Q. 遺伝子検査：4Plex qPCR 法でのカットオフ基準はあるか？

A. IS481, IS1001, *recA*, *atpD* いずれも、35 cycles までに $\Delta Rn$  値が 0.3 を超えたとき陽性と判定する

本邦のリアルタイム PCR 検査では 40 サイクル反応行う場合、40 サイクルまでにマーカーの増幅が認められれば陽性と判定する場合が多い。しかし、百日咳菌の標的である挿入配列 IS481 は百日咳菌ゲノムに 200 コピー以上存在するため非常に高感度となる。ラボコンタミ等の影響を受けやすく、非特異反応が生じやすいため、40 サイクル反応の 35 サイクル時点で $\Delta Rn$  値が規定値を超えた場合に陽性と判断し、35 サイクル以降の増幅は考慮しない。仮に 35 サイクル以上の増幅が真の百日咳菌感染を示していたとしても、その時点での被験者の保菌量はかなり少ないものと考えられ、治療は抗菌薬投与よりも対症療法が中心になる。判定に迷う増幅が見られた場合は、可能であれば LAMP 法との併用により複合的に判定するのも良い。4Plex qPCR は百日咳菌ゲノムの IS481 挿入配列を標的としているのに対し、LAMP 法は百日咳毒素遺伝子のプロモーター領域(*ptxP*)を標的としている。当室では Ct 値 30~35 Cycles で判定が困難な場合には、陰性（厳密には判定不能）とするか LAMP 法を併用して結果を総合的に判断している。

世界各国の検査機関で実施されているリアルタイム PCR 検査は標的遺伝子・蛍光色素・PCR 酵素・リアルタイム PCR 装置などが様々で、一概にカットオフ Ct 値は比較できないが、参考例として下表に米国 CDC と当室で運用している判定基準を比較した。Applied Biosystems のリアルタイム PCR 装置を使用した場合、上述したように IS481 標的は $\Delta Rn=0.3$  を threshold に設定するが、非特異反応の発生が少ない IS1001, *recA*, *atpD* 標的は Auto threshold (通常 $\Delta Rn=0.3$  より低い値)を用いて判定しても良いかもしれない。

表. *Bordetella* 属細菌の標的遺伝子増幅カットオフ Ct 値

	米国 CDC*				感染研(QS5)**			
	IS481	<i>ptxS1</i>	pIS1001	hIS1001	IS481	IS1001	<i>recA</i>	<i>atpD</i>
陽性	<35	<40	<40	<40	≤35	≤35	≤35	≤35
不確定	35~<40	-	-	-	-	-	-	-
陰性	≥40	≥40	≥40	≥40	>35	>35	>35	>35
PCR cycle	50				40			

\*参考文献：Acosta AM et al., J Pediatric Infect Dis Soc. 2024 Jan 29;13(1): 105-109. Threshold はおそらく自動で設定される auto threshold 値を用いていると思われる。

\*\*感染研基準：QuantStudio5 (QS5)で $\Delta Rn = 0.3$ に設定した Ct 値。陰性コントロールである DW で非特異増幅が発生した場合は Threshold を $\Delta Rn = 0.5$ に上げて判定する場合もある。Roche LC を用いた場合は、2<sup>nd</sup> Derivative max 法で自動判定し、DW 陰性コントロールで非特異増幅が発生した場合は FitPoint 法にて手動で DW での増幅を拾わない下限 Fluorescence 値を Threshold に設定する。2<sup>nd</sup> Derivative max 法では設定サイクルのラスト 5 サイクルは Cq 値を算出しないため、カットオフ Cq 値は 35 Cycles としている。

また、参考までに現在、細菌第二部第一室で使用している 4Plex qPCR のプライマー・プローブ情報は下表の通りである。

**表. 4Plex qPCR 法のプライマー、プローブ情報**

標的遺伝子	(プライマーF/R, プローブ P) 名称	標識と修飾	合成委託先
IS481	(F) PPertM	None	ThermoFischer scientific: TaqMan MGB 遺伝子発現 検出 キット (TaqMan MGB プローブ 1本、ノンラベルプライマー2本)
	(R) APPart	None	
	(P) SPertM	FAM, MGB, NFQ	
IS1001	(F) PParaP	None	ThermoFischer scientific: TaqMan MGB 遺伝子発現 検出 キット (TaqMan MGB プローブ 1本、ノンラベルプライマー2本)
	(R) APParaP	None	
	(P) SParaM	NED, MGB, NFQ	
	(P) LC Cyan500- SParaM-LNA*	LC Cyan500, LNA, BHQ1	日本遺伝子研究所
BHrecA	(F) BHrecA-F	None	ThermoFischer scientific: TaqMan MGB 遺伝子発現 検出 キット (TaqMan MGB プローブ 1本、ノンラベルプライマー2本)
	(R) BHrecA-R	None	
	(P) BHrecA-P	VIC, MGB, NFQ	
atpD	(F) Mp3-F**	None	ThermoFischer scientific: スタンダードオリゴ合成, カートリッジ精製
	(R) Mp3-R**	None	
	(P) Mp3-P	Cy5, BHQ3	Sigma: Custom qPCR Probes (両末端標識プローブ)

\*Roche LightCycler480 では NED 蛍光を識別できないので、LC Cyan500 蛍光標識した本プローブを用いる。

\*\*ThermoFischer の TaqMan MGB 遺伝子発現検出キットのノンラベルプライマーは脱塩精製とのことであるが、Mp3-F, Mp3-R プライマーを E 社の脱塩精製プライマーにしたところ BHrecA の非特異増幅が発生した。プライマー・プローブの合成会社と精製グレードには注意が必要である。

## (5) マクロライド耐性検査

### 5-1. 23S rRNA 遺伝子のサンガーシーケンス解析

細菌のマクロライド耐性機構は主に、①標的部位の修飾（23S rRNA 変異、メチル化）、②薬剤排出ポンプ、③分解酵素が報告されているが、百日咳菌のマクロライド耐性では現在までに 23S rRNA 変異(23S rRNA 遺伝子の A2047G 変異)の報告しかない。また、分離菌株の調査では当該遺伝子変異を有する百日咳菌は薬剤感受性試験においてもマクロライドに対して高度耐性を示すことが報告されている。そこで、百日咳菌感染者の臨床検体 DNA または分離菌株のボイル上清を対象に当該遺伝子変異の有無をサンガーシーケンス法にて解析することで、感染株のマクロライド感受性が推定できる。

当室では中国の耐性変異解析に用いられているサンガーシーケンス解析方法を準用しており、以下にその方法を紹介する。

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

#### ● プライマー配列

プライマー名称	Primer sequence (5' to 3')	Product size
1505F	GGCACGAGCGAGCAAGTCTC	615-bp
2118R	TCTGGCGACTCGAGTTCTGC	

#### ● 反応組成

2xPCR Buffer for KOD FX Neo	7.5	μL
2 mM dNTPs	3.2	μL
Primer_1505F (3 pmol/μl)	1.0	μL
Primer_2118R (3 pmol/μl)	1.0	μL
Template DNA	2.0	μL
KOD FX Neo (1U/μL)	0.3	μL
Total	15.0	μL

#### ● PCR 条件

※アニーリング温度に変更を加えて、PCR による非特異増幅を抑制するタッチダウンプログラムを推奨する

Hold (初期変性)	Cycle: 1	94°C (2 min)
タッチダウン PCR	Cycle: 5	98°C (10 sec), 68°C (30 sec), 68°C (45 sec)
	Cycle: 5	98°C (10 sec), 66°C (30 sec), 68°C (45 sec)
	Cycle: 5	98°C (10 sec), 64°C (30 sec), 68°C (45 sec)
	Cycle: 5	98°C (10 sec), 62°C (30 sec), 68°C (45 sec)
	Cycle: 5	98°C (10 sec), 60°C (30 sec), 68°C (45 sec)

	Cycle: 10	98°C (10 sec), 58°C (30 sec), 68°C (45 sec)
伸長反応	Cycle: 1	68°C (7 min)

- PCR 産物の ExoI-SAP 処理

※反応組成および条件は ExoI-SAP 酵素キットのプロトコールに従う

ExoSAP-IT Express (Applied Biosystems, #75001.40.UL)を用いる場合

PCR product	5.0	μL
ExoSAP-IT	2.0	μL
Total	7.0	μL

反応条件 (37°C 4 min, 80°C 1 min)

- シーケンス反応

- PCR に用いたプライマーを用いてシーケンス反応を行う

BigDye XTerminator ver 3.1 ready reaction mix	2.0	μL
5× Sequencing buffer	1.0	μL
3 pmol/μL primer	0.5	μL
ExoI-SAP 処理 PCR 産物	0.5	μL
DW	6.0	μL
Total	10.0	μL

- PCR 条件

Hold (初期変性)	Cycle: 1	96°C (1 min)
3 Step PCR	Cycle: 25	96°C (10 sec), 50°C (5 sec), 60°C (4 min)

- シーケンス PCR 産物を精製する。シーケンス用 96 ウェルプレートに下記の組成にしたがって反応液を調製する。

PCR product	10.0	μL
SAM solution	45.0	μL
XTerminator solution	10.0	μL
Total	65.0	μL

- プレートシールで密閉し、プレートボルテックスミキサーで 30 分間ボルテックスをかける。その後、プレートを遠心する(1,000×g, 2 min)

- 反応プレートを DNA アナライザにセットし、シーケンス解析を行う

- 得られたシーケンスデータを元に①blast 検索して百日咳菌 23S rRNA 遺伝子配列を読んでいることを確認する。次に②23S rRNA 遺伝子の A2047 における変異の有無を確認する。③SNP position のシーケンス波形が単一波形であることを目視で確認する

#### ※注意

- 23S rRNA 遺伝子配列は多くの細菌で保存性が高い。PCR 増幅長・シーケンス判読長を短くすればするほど同一配列を有する他菌種が増えるため、本プロトコールに記載の通り 600-bp 程度の領域で判定することを推奨する
- 臨床検体 DNA を対象としてシーケンス解析した場合、稀に夾雑菌 DNA 由来のシーケンスを読んでしまうことがあるため、得られた配列データが百日咳菌のものであることを blast 検索により必ず確認する
- 参照配列（例）： *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。
- 現在、国内ではマクロライド感受性株と耐性株が混合して流行しているため、1名の患者においてこれらが共感染している事例があった。**分離菌株の耐性変異確認は複数コロニーについて実施する**と良い。当室では百日咳菌が複数コロニー得られた場合は4コロニー以上を検査することになっている。臨床検体 DNA のシーケンス波形が A/G ヘテロに見える場合は、①夾雑菌（通常 A2047）と MRBP(A2047G)のシーケンスが混ざっている、②百日咳菌感受性株と耐性株が混合感染している、③テンプレート DNA 量が十分でないなどの理由で、シーケンス解析の quality が低く波形が乱れている可能性が考えられる。

#### 5-2. 分離菌株の A2047G-Cycleave PCR

国立感染症研究所では MRBP の迅速検出法として新たなリアルタイム PCR 法（A2047G-cycleave PCR）を開発した(Kamachi K, 2020)。本法はサイクリングプローブ法によりマクロライド耐性に関与する 23S rRNA の SNP 変異を検出する。標的遺伝子は百日咳菌 23S rRNA の A2047\*（2047 番目のアデニン）であり、2 種類のサイクリングプローブを用いて A2047G の変異導入を確認する。

本法は分離菌以外に臨床検体 DNA を用いた直接検出にも使用することを目的に開発されたが、2025 年の百日咳流行で使用経験が増加すると、臨床検体 DNA への直接利用では鼻腔夾雑菌 DNA による 1. Wild type(A2017)-FAM 蛍光の非特異増幅や 2. Mutant type (A2047G)-HEX 蛍光の増幅阻害が認められるようになった。そのため現在では、**分離菌株の 23S rRNA 遺伝子における SNP 変異を想定する目的のみ**で利用を推奨している（サンガーシーケンス解析の代替利用）。

Applied Biosystems リアルタイム PCR 装置用に調製した試薬キットは国立感染症研究所から地方衛生研究所に分与可能である。

#### 方法

1. 分離菌からボイル法などを用いて DNA を抽出し、遠心操作により上清を得る。
2. PCR 反応には下記のプライマーとプローブの混合液を使用する

Name	Sequence	Quencher/Reporter
------	----------	-------------------

BP_23S_rRNA-PrimerF	GAATGGCGTAACGATG	
BP_23S_rRNA-PrimerR	TGCAAAGCTACAGTAAAGG	
BP_A2047_ProbeG	gacgg(G)aag*	5'-Eclipse / 3'-HEX
BP_A2047_ProbeA	agacgg(A)aag*	5'-Eclipse / 3'-FAM

\*括弧内の塩基は RNA を示す

#### 反応組成

2 × CycleavePCR Reaction Mix (CY505A, Takara)	10.0	μL
Mixed primers & probes*	3.2	μL
Template DNA	2.0	μL
50 × ROX reference dye II (Takara)	0.4	μL
DW	4.4	μL
Total	20.0	μL

\*終濃度はプライマー、プローブともに 0.2 μM になる

#### 反応条件

Hold (初期変性)	Cycle: 1	95°C (20 sec)
3 Step PCR	Cycle: 40	95°C (3 sec), 60°C (10 sec), 72°C (25 sec)

\*START ボタンをクリックすると「Step 2 の incubation time が 15 sec より短いが良いか?」と聞いてくるが[OK]を選択してランを開始する

3. template DNA を除いたマスターミックス (18 μL) を各チューブに入れ、次いで検体 DNA、2 種類の陽性コントロール (A2047-DNA fragment、A2047G-DNA fragment)、陰性コントロール (DW を使用) を入れる。

4. プレートをシールまたはチューブの蓋を閉め、リアルタイム PCR 装置のマニュアルに従って Run を行う。蛍光検出の設定は以下に従い、Y 軸のΔRn は真数表示とする

Target	Reporter	Quencher
野生型 A2047	FAM	none
変異型 A2047G	VIC*	none

\*HEX の代わりに波長の近い VIC チャンネルを利用する

5. Run 終了後、陽性コントロール (FAM、VIC) の増幅を確認する。検体のうち VIC の蛍光増加が認められた場合、マクロライド耐性菌 (A2047G) と判定する (下表)。FAM と VIC の蛍光増加が同時に認められた場合はヘテロ型と判定する。なお、ヘ

テロ型の耐性菌は極めて稀であり、1994 年に米国の百日咳患児から分離された 1 株だけである。分離菌株でヘテロ型であるものはこれまで当室では分離経験がない。

蛍光増加	判定
FAM	野生型(A2047)
VIC	変異型(A2047G)
FAM+VIC	ヘテロ型 (A2047+ A2047G) *

\*百日咳菌はゲノム中に 3 コピーの 23S rRNA 遺伝子を有し、ヘテロ型は 1 ないし 2 コピーが A2047G となっている

#### ※注意点

1. 融解後の CycleavePCR Reaction Mix は凍結せず、冷蔵庫（4℃）に保存する
2. 解析終了後はプレートシールを剥がしたり、チューブの蓋を開けたりしない。実験室汚染を防ぐために、オートクレーブをせずにそのまま廃棄する
3. サイクル数の増加とともに変異型 A2047G のバックグラウンドが増加するが、判定には影響しない
4. 環境からのコンタミネーションなどにより、野生型 A2047 の増幅を示すピークが 35 サイクル以降に認められることがある。陰性コントロールで認められた場合、**35 サイクル以降のシグナル増幅は判定に使用しない**。分離菌株のボイル上清をテンプレートにした場合はほぼ 20 サイクルまでに増幅が認められるはずである。なお、変異型 A2047G の非特異的増幅はほとんど認められない
5. *Bordetella* 属では 23S rRNA 遺伝子が高度に保存されているため、本法はパラ百日咳菌や *Bordetella holmesii* にも適用できる

### 5-3. 分離菌株の薬剤感受性試験

百日咳菌の抗菌薬感受性はディスク拡散法(Disk Diffusion)や MIC 測定により調べられる。いずれの方法においても、CLSI（Clinical and Laboratory Standards Institute: 臨床検査標準協会）または EUCAST（The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing: 欧州抗菌薬感受性試験法検討委員会）では標準的な作業手順方法は定められていない。また、各種薬剤のブレイクポイントの設定もないため、他施設の測定結果との比較は注意が必要である。ただし、23S rRNA 遺伝子に A2047G 変異を有するマクロライド耐性百日咳菌の場合、マクロライドに対して高

度に耐性を示すため薬剤感受性試験では容易に結果を判別できる（下図）。

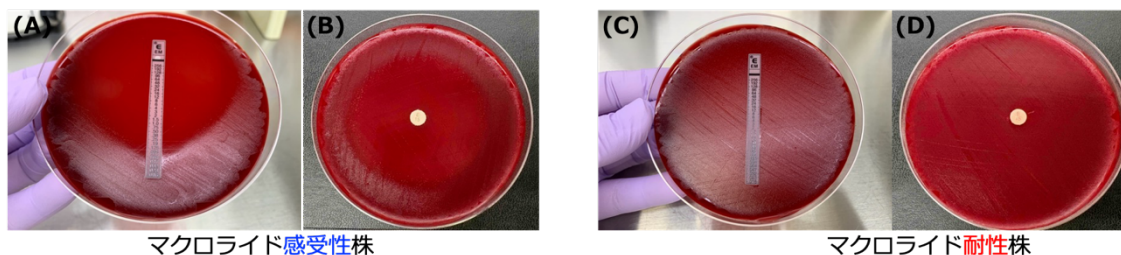


図. Etestまたはディスク法による百日咳菌の薬剤感受性試験

マクファーランド濁度(McF)0.5に調製した百日咳菌液をBG培地（抗菌薬不含）塗布して36℃で4日間培養した。  
(A)マクロライド感受性株+エリスロマイシンEtestストリップ、(B)マクロライド感受性株+エリスロマイシンディスク、  
(C)マクロライド耐性株+エリスロマイシンEtestストリップ、(D)マクロライド耐性株+エリスロマイシンディスク  
マクロライド感受性株では大きな阻止円が観察されるが、マクロライド耐性株ではエリスロマイシンによる生育阻害が全く認められない。

これまでの報告では、百日咳菌のマクロライド感受性株では MIC の範囲が< 0.016~0.25  $\mu\text{g/mL}$  と様々であるが、MRBP ではほぼ全ての菌株で MIC が> 256  $\mu\text{g/mL}$  と高度耐性を示している(Ivaska L, 2022)。ここでは、E-test を用いた簡易的な MIC 測定法を解説する。

- 試薬等

薬剤感受性試験用 Etest (バイオメリュー) : エリスロマイシン (0.016–256  $\mu\text{g/mL}$ )

培地 : 抗菌薬不含の BG 培地

滅菌綿棒 : メンディップ 片綿綿径約 4.1mm・1 本包装・木軸 15cm タイプ(品番 : 1A1503H)など

濁度計・分光光度計、または標準濁度管

インキュベーター

- 方法

1. BG 培地などに百日咳菌を接種し、36–37℃ で 3–4 日間培養する
2. 使用する培地および Etest ストリップを室温に戻す
3. 菌を生理食塩液に懸濁し、0.5 マクファーランド (McF) 濁度に合わせる
4. 滅菌綿棒等を用いて菌液を培地に均一に塗布する
5. 培地表面が十分に乾いていることを確認し、Etest ストリップを MIC 値目盛を表にして培地表面に配置する
6. 好気条件下 36–37℃ で 3–4 日間培養し、MIC 値エンドポイントを読み取る

※注意点

1. 菌液調製は濁度計もしくは吸光度測定により行う。0.5 McF は Abs. 600 nm で約 0.13 とされるが、菌種により含まれる菌数は異なる。分光光度計 Ultrospec 2000

(Pharmacia Biotech)を用いて 0.5 McF 標準濁度液を測定すると Abs. 600 $\approx$ 0.12 (Abs. 650 $\approx$ 0.10) となる (当室の検討)。BG 培地で生育させた百日咳菌の 0.5 McF 濁度溶液は約  $4.0 \times 10^8$  CFU/mL の菌数を含む。CLSI M02 ドキュメント: Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests では 0.5 McF は Abs. 625 nm = 0.08~0.13 と記載されている。基本的には濁度計、分光光度計を用いることを推奨するが、この他、マクファーランド標準濁度管 (McF0.5, 1.0) との比較による目視調製でも良い。

2. 自家調製した培地を用いる場合は、**培地の厚みにも注意**が必要である。Etest 添付文書では、寒天培地の厚さが  $4.0 \pm 0.5$  mm のものを使用するとの記載がある。極端に厚みの薄い培地を用いると、Etest ストリップからの薬剤の拡散に影響が生じ、MIC が低値になる可能性がある。

## (6) その他

Q. キャピラリーシーケンサーを保有していない、または機器が故障したが、百日咳菌の耐性検査を依頼され、サンガーシーケンス解析をする必要がある場合どうしたら良いか？

A. (5)マクロライド耐性検査「5-1. 23S rRNA 遺伝子のサンガーシーケンス解析」に示した手順のうち、PCR 産物の ExoI-SAP 処理まで自施設で実施ができるのであれば、シーケンス反応以降は外部受託も可能です。利用可能な受託サービスを検索の上、ご検討ください。

Q. 耐性検査の結果を医療機関に知らせる上で注意すべき点があるか？

A. 「(5)マクロライド耐性検査」の項に記載した通り、臨床検体 DNA のサンガーシーケンス解析では不明瞭な結果が得られ、判定に迷う場合がある。下記に耐性検査の報告手順の参考例を示す。

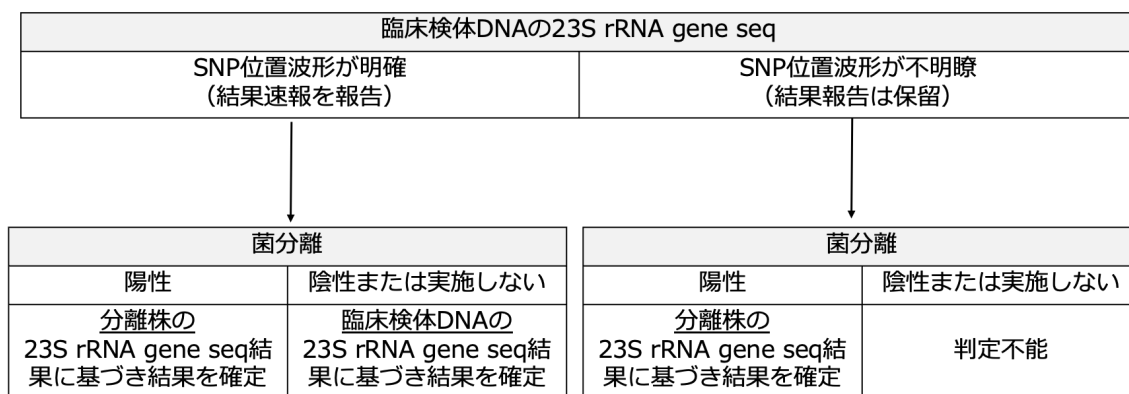


図. 耐性検査の報告手順（例）

臨床検体DNAを対象としたサンガーシーケンス解析は、分離菌株の23S rRNA gene seqが明らかになるより早く同定が可能であるが、波形が不明瞭な場合がある。シーケンス波形が不明瞭な場合は結果報告を保留とし、菌分離の結果に基づき報告を確定させる。菌分離が陰性または菌分離を行わない場合は、判定不能となる。  
乳幼児患者の場合、感受性株感染の場合はマクロライド系抗菌薬の投与で良いが、耐性株感染の可能性がある場合は（耐性検査が確定するまで）マクロライドとST合剤の併用を勧める。ST合剤の副反応が懸念されるため、投与を中止できるか否かの判断のためにも耐性検査は重要となる。

Q. 百日咳の行政検査について教えてほしい

A. 「感染症法に基づいて国立感染症研究所で実施する病原体の行政検査について」（令和6年11月14日付）に基づき、国立感染症研究所で百日咳菌のマクロライド耐性検査を含む行政検査の実施が可能です。詳細は上記課長通知をご覧ください。  
(<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001473498.pdf>)

百日咳行政検査の依頼については当室まで電話またはメールでご相談ください。当室の行政検査の受け入れ条件としては、下記3点を目安にしています。

- ① 乳幼児症例
- ② 重症例（年齢問わず、入院加療が目安）
- ③ 集団感染事例（多検体が採取され地衛研での対応が難しい場合）

## (7) Appendices. 自家調製培地の組成と調製方法

### 1. ボルデ・ジャング血液寒天培地 (Bordet-Gengou Blood Agar)

20 mL/plate で約 15 枚作製可能。ウマ脱繊維血液が約 17%含まれる

グリセロール	試薬特級グレード	3.0 g
Difco™ Bordet Gengou Agar Base	BD#248200, 500 g	9.0 g
DW		250.0 mL

↓

オートクレーブ (121°C, 20 min)

↓

50°C 水浴槽で静置<sup>1</sup>

↓

ウマ脱繊維血液 50 mL (株式会社ジャパン・バイオシーラム<sup>2</sup>) を添加し攪拌

↓

17~25 mL ずつ滅菌シャーレに分注

ジップ付きビニール袋などに入れて 4°C で保管

(約 1 ヶ月使用可能)

#### <注意>

1. のちに加えるウマ脱繊維血の赤血球を高温で破裂させないため 50°C まで冷やす必要がある。赤血球が破裂すると培地が透けて見えるようになる。赤血球が破裂してしまっても百日咳菌は生育するが、生育が悪くなるため温度管理に注意が必要である。
2. ジャパン・バイオシーラムでは 50 mL (#003-00013-01), 100 mL (#003-00014-01) の取り扱いがある。完全受注生産となっており納期に 3 週間程度かかる。

### 2. チャコール寒天培地 (Regan-Lowe Charcoal Blood Agar)

20 mL/plate で約 20 枚作製可能。ウマ脱繊維血液が約 10%含まれる。

Oxoid Charcoal Agar	Oxoid #CM0119B, 500g	20.4 g
DW		400.0 mL

↓

オートクレーブ (121°C, 15 min)

↓

50°C 水浴槽で静置

↓

セファレキシン溶液 1 本（4 mL）※<sup>1</sup> とウマ脱繊維血液 40 mL（株式会社ジャパン・バイオシーラム）を添加し攪拌

↓

17～25 mL ずつ滅菌シャーレに分注

ジップ付きビニール袋などに入れて 4°C で保管

（約 3 ヶ月使用可能）

#### ※1 セファレキシン溶液の作製方法

Cefalexin monohydrate	LGC Standards GmbH #DRE-C11064000	250.0 mg
DW		50.0 mL

↓

4 mL ずつ分注

↓

使用時まで冷凍保存

#### <注意>

1. 本法では Oxoid #CM0119B の製品マニュアルと組成が異なり、セファレキシンの終濃度が 50 µg/mL となる。Oxoid #CM0119B の製品マニュアルではサプリメント (Oxoid Bordetella Selective Supplement, CEX 20 mg/vial, #SR0082E) を使用する記載があり、これに従うと CEX の終濃度は 40 µg/mL となるが、本法では当該サプリメントは使用せず自家調製した CEX 溶液を使用している。

### 3. シクロデキストリン寒天培地 (Cyclodextrin Solid Medium, CSM)

20 mL/plate で約 50 枚作製可能。人工合成培地のため動物血液を使用しない

参考文献：Imaizumi A et al., J Clin Microbiol 1983;17:781-786.

(for 1,000 mL)

Sodium Hydrogen L(+)-Glutamate Monohydrate	10.7 g
L-proline	0.24 g
NaCl	2.5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5 g
KCl	0.2 g
MgCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	0.1 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0.02 g
Tris(hydroxymethyl)aminomethane,	6.1 g

[2-Amino-2-hydroxymethyl-1,3-propanediol]			
Casamino acid		0.5	g
Heptakis(2,6-di-O-methyl)- $\beta$ -cyclodextrin*	Sigma#H0513-5G <sup>1</sup>	1.0	g
DW		800.0	mL

↓

HCl で pH7.4 に合わせる

↓

DW	Up to 1,000		mL
BD Bacto™ Agar	BD#214010, 500 g	15.0	g

↓

オートクレーブ（121°C, 20 min）

↓

100x supplement solution <sup>2</sup>	10.0		mL
---------------------------------------	------	--	----

攪拌

↓

17～25 mL ずつ滅菌シャーレに分注

ジップ付きビニール袋などに入れて 4°C で保管

（約 4 ヶ月使用可能）

#### <注意>

1. シクロデキストリンは Sigma の他、CAS RN: 51166-71-3 として、Fujifilm (MP Biomedicals)等 で取り扱いがある。
2. 100x supplement solution の調製方法は以下の通り：

L-cysteine monohydrochloride	40.0	mg
FeSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	10.0	mg
Ascorbic acid	20.0	mg
Niacin	4.0	mg
Reduced glutathione	150.0	mg
DW	10.0	mL

↓

フィルター滅菌（0.22  $\mu$ m）

↓

-20°C で冷凍保存

（100 mL 作製して、10 mL 程度に小分け分注すると良い）

## (8) 参考文献

- Marcon MJ, Hamoudi AC, Cannon HJ, Hribar MM. 1987. Comparison of throat and nasopharyngeal swab specimens for culture diagnosis of *Bordetella pertussis* infection. J Clin Microbiol 25:1109-10.
- Cassiday PK, Sanden GN, Kane CT, M'Boup S, Barbaree JM. 1994. Viability of *Bordetella pertussis* in four suspending solutions at three temperatures. J Clin Microbiol 32:1550-3.
- Bordet J, Gengou O. Le microbe de la coqueluche. Ann Inst Pasteur (Paris). 1906;20:731-41.
- 河内 誠, 及川加奈, 魚住佑樹, 他. 2018. 3 種類の百日咳菌分離用培地の比較検討. 医学検査 67: 755-759.
- Imaizumi A, Suzuki Y, Ono S, Sato H, Sato Y. Heptakis (2,6-O-dimethyl)beta-cyclodextrin: a novel growth stimulant for *Bordetella pertussis* phase I. J Clin Microbiol 1983;17:781-786.
- 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」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」分担：大塚菜緒
- Wang Z, Cui Z, Li Y, Hou T, Liu X, Xi Y, et al. High prevalence of erythromycin-resistant *Bordetella pertussis* in Xi'an, China. Clin Microbiol Infect. 2014;20(11):O825-30.
- Ivaska L, Barkoff AM, Mertsola J, He Q. Macrolide Resistance in *Bordetella pertussis*: Current Situation and Future Challenges. Antibiotics (Basel). 2022;11(11).
- Kamachi K, Duong HT, Dang AD, Do DH, Koide K, Otsuka N, Shibayama K, Hoang HTT. Macrolide-resistant *Bordetella pertussis*, Vietnam, 2016–2017. Emerg Infect Dis. 2020 Oct;26(10):2511–2513.
- 感感発 1114 第 4 号, 感染症対策部感染症対策課長通知「感染症法に基づいて国立感染症研究所で実施する病原体の行政検査について」令和 6 年 11 月 14 日 (<https://www.mhlw.go.jp/content/10900000/001473498.pdf>)

### (9) 執筆者一覧

所属	担当者	連絡先*
国立健康危機管理研究機構	大塚菜緒	otsuka.n@jihs.go.jp
国立感染症研究所・細菌第二部	小出健太郎	koide.k@jihs.go.jp
	後藤雅貴	goto.ma@jihs.go.jp
山形県衛生研究所	瀬戸順次	setoj@pref.yamagata.jp
神戸市健康科学研究所	小松頌子	shoko_komatsu@city.kobe.lg.jp
	中西典子	noriko_nakanishi@city.kobe.lg.jp

\*2025 年 12 月より国立感染症研究所職員のメールアドレスが変更されました

### (10) 令和 7 年度 百日咳レファレンスセンター

北海道・東北・新潟ブロック	秋田県健康環境センター
関東・甲・信・静ブロック	東京都健康安全研究センター
近畿ブロック	地方独立行政法人大阪健康安全基盤研究所
東海・北陸ブロック	三重県保健環境研究所
中国・四国ブロック	愛媛県立衛生環境研究所
	岡山県環境保健センター
	山口県環境保健センター
九州ブロック	福岡県保健環境研究所
	熊本県保健環境科学研究所