

201447023A

厚生労働科学研究委託費

新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業

梅毒の新たな検査手法の開発等に関する研究

平成 26 年度 委託業務成果報告書

研究代表者 大西 真

平成 27 年 (2015 年) 3 月

## もくじ

梅毒の新たな検査手法の開発等に関する研究 総括報告書 大西 真 国立感染症研究所 細菌第一部 . . . . .	01
核酸検査系に関わる技術開発 中山 周一 国立感染症研究所 細菌第一部 . . . . .	30
核酸検査手法の確立 三宅 啓文 東京都健康安全研究センター 微生物部 . . . . .	38
核酸検査系に関わる技術開発と、発生動向に即した梅毒発病初期患者の 効果的な把握の試み 川畑 拓也 大阪府公衆衛生研究所 感染症部ウイルス課 . . . . .	41
梅毒感染症における早期診断のための検査診断法における核酸診断の有用性 尾上 智彦 東京慈恵会医科大学 葛飾医療センター皮膚科 . . . . .	47
国内における梅毒の発生状況と罹患リスクの検討 山岸 拓也 国立感染症研究所 感染症疫学センター . . . . .	50

平成26年度厚生労働科学研究委託費  
(新興・再興感染症に対する革新的医薬品等開発推進研究事業)  
委託業務成果総括報告書

梅毒の新たな検査手法の開発等に関する研究

研究代表者 大西 真 国立感染症研究所・細菌第一部 部長

研究要旨

近年の梅毒報告数の増加をうけて、その発生動向調査の整理を行った。男性の増加が顕著であり、また男性間の伝播をうかがわせる特徴が見いだされている。2014年も引き続き報告数の増加が認められたが、2013年同様男性が占める割合が高かった。梅毒トレポネーマは他の一般細菌と異なり一般の培養が不能である。そのため、特徴的な皮膚病変をもとに梅毒を疑い、パーカーインク染色による顕微鏡検査をするか、暗視野顕微鏡を用いたらせん菌体の確認を行うことと、血清学的検査が診断のもととなる。しかしながら、顕微鏡観察実施可能な医療機関が減少してきたことから、早期の第I期梅毒を診断することが困難なこともある。そこで、PCR法等を用いた梅毒トレポネーマ核酸診断系を国立感染症研究所において確立し、臨床診断に応用した。東京都健康安全研究センター、大阪府公衆衛生研究所においても実施出来る体制を確立した。早期の梅毒(抗体価上昇前)の診断には利用可能であることが示唆された。感度の面では十分ではないため補助的な診断ツールとして活用することが重要であると考えられた。より簡便な核酸検出手法であるLAMP法による梅毒特異的遺伝子検出系の開発が進められ、プライマーセットを構築した。

MSMにおける梅毒の拡散を抑えるためには早期診断・治療が必要であり、その啓発活動のためのツール、診断機会の提供のための体制を考察した。本研究の経過の中で、大阪府では平成26年(2014年)後半には男性同性間の性的接触を感染経路とする発生届出件数が頭打ちとなり、異性間性的接触を感染経路とする届出件数が急増していることが明らかとなった。感染伝播の特徴を理解し、啓発対象をきめ細かく検討することが重要である。

分担研究者

中山周一 感染研 細菌第一部  
三宅啓文 東京都健康安全研究センター  
川畑拓也 大阪府公衆衛生研究所  
尾上智彦 東京慈恵医大 葛飾医療センター  
山岸拓也 感染研 感染症疫学センター

研究協力者

高野弘紀 (東京都健康安全研究センター)  
島田信子 (東京都健康安全研究センター)  
平井昭彦 (東京都健康安全研究センター)  
貞升健志 (東京都健康安全研究センター)

甲斐明美 (東京都健康安全研究センター)  
小島洋子(大阪府立公衆衛生研究所)  
森 治代(大阪府立公衆衛生研究所)  
古林啓一(そねざき古林診療所)  
要友紀子(SWASH (Sex Work And Sexual Health))  
石金正裕 (同 実地疫学専門家養成コース)  
金山敦宏 (同 実地疫学専門家養成コース)  
加藤博史 (同 実地疫学専門家養成コース)  
高橋琢理 (同 感染症疫学センター)  
有馬雄三 (同 感染症疫学センター)  
加納和彦 (同 感染症疫学センター)  
砂川富正 (同 感染症疫学センター)  
井戸田一朗 (しらかば診療所 院長)

A. 研究目的

梅毒の発生動向から、近年報告数の増加が指摘されている。また、男性間性交渉者(MSM: Men who have sex with men)のコミュニティー等での感染伝播増加も指摘されている。梅毒罹患はHIV感染を促進することが知られており、その対策は梅毒以外の疾患対策にも影響を及ぼす可能性がある。これらの状況に鑑み、特定の集団間において、感染源となる潰瘍性病変をより早期に捉え、病原体を同定し、正確な診断に結びつけることにより、梅毒の病態や疫学情報等の理解を深め、より有効な感染対策に結びつけることが求められる。

梅毒は梅毒トレポネーマ (*Treponema pallidum*) による慢性感染症である。主に性行為により感染し、潜伏期を経て感染局所の皮膚病変(初期硬結、硬性下疳(潰瘍))を形成する(第I期梅毒)。一旦、局所病変は消失し、一見治癒したようにみえるが血液中に梅毒トレポネーマが侵入し全身に散布され、感染局所以外の病変(手掌・足底を含む全身に多彩な皮疹、粘膜疹、扁平コンジローマ、梅毒性脱毛等)を形成する(第II期梅毒)。第I期および第II期の特有の臨床症状と問診から梅毒を疑い検査を行う。しかしながら、梅毒症例が数十年前と比較すると減少したこと、皮膚病変は多彩であることから、経験のある医師であってはじめて梅毒を疑うことが可能である状況も存在する。特徴的な病変の図譜等を利用して臨床医の教育はなされているが、必ずしも臨床症状だけで診断するのは容易ではない症例も存在する。プライマリケア医においては困難な場合がある。

検査診断法としては、梅毒血清診断が主に利用されている。血清抗体は感染後、初めにカルジオリピンに対する抗体価が上昇し、次いでトレポネーマに対する特異的抗体価(が上昇する。抗カルジオリピン抗体価は治療に反応して下降するため、治療効果の判定にも利用される。一方、抗トレポネーマ抗体測定の特異性は高いが、治療後も抗体価は漸減するものの継続的に陽性となるため、過去の梅毒感染との区別が付きにくい。つまり、抗カルジオリピン抗体価陽性には潜伏梅毒あるいは梅毒既往を含む可能性を示す。

本来ならば、皮膚病変中に存在する梅毒トレポ

ネーマの検出により、病原体診断がなされるべきであるが、梅毒トレポネーマは動物を用いて増殖させることは可能であるが、培養不能である。そのため、他の一般細菌とは異なり分離同定することが事実上不可能である。そのため古くから梅毒病変を疑う場合はその検体をパーカーインクにより染色し、顕微鏡観察を行使せん状の梅毒トレポネーマ菌体を観察するか、暗視野顕微鏡を用いてらせん菌体を観察することが行われてきた。しかしながら、現実臨床現場では実施されていない。また、口腔には類似のらせん菌が存在することから、その診断的価値は認められない。

事実上、病原体(あるいは抗原を用いた菌体の存在を示唆する)診断系が存在しないことの最も大きな問題は、血清抗体価が上昇するまで確定的な診断ができないことが挙げられる。抗トレポネーマ抗体の上昇までには約6週間程度かかることとされ、症状が認められるが(つまり感染源になりうる)診断出来ない時期が極早期の梅毒には存在することとなる。このことは、梅毒の増加傾向(つまり感染源の増加)が認められた際には、特に大きな問題となる可能性がある。

MSMの梅毒を早期発見し、適切な治療につなげ、疫学情報を対策に資することを目的とする。そのため、国内における医療機関で発生した梅毒について、早期の診断方法に関する検討(潰瘍性病変を対象とした梅毒トレポネーマ核酸検査法及び感染対策に資する梅毒の疫学的な特徴について解析する。

早期診断により感染伝播を抑止することが必要であると考えられ、疫学調査と検査診断系開発を試みる。また、MSMポピュレーションにおける疫学調査ならびに啓発活動に資する情報の取得と、受診しやすい体制の仕組みを検討する。

## B. 研究方法

1 梅毒感染症における早期診断のための検査診断法の開発及び確立:

梅毒トレポネーマDNAの調整

PCR法

リアルタイムPCR法

核酸クロマトグラフィー法

LAMP 法

梅毒トレポネーマ分子タイピング

多施設間比較

についての詳細は、分担報告書（中山周一、三宅啓文、川畑拓也）に詳細が記述されている。

これまで報告されてきた論文を PubMed において “Treponema” and “pallidum” and “PCR”あるいは “Treponema” and “pallidum” and “molecular” and “subtyping”で検索し、その内容を精査し、関連する論文リスト（資料1）を作成した。

## 2 感染経路や感染のリスク等の疫学情報の把握：

感染症発生動向調査から見た梅毒発生状況：

感染症発生動向調査事業により 2007 年から 2014 年に診断され報告された梅毒を対象とした（2012 年までのデータは感染症発生動向調査年報、2013 年のデータは 2014 年 1 月 10 日現在の暫定報）。感染経路に関しては、同性間性的接触と異性間性的接触のいずれもありとされたものは同性間性的接触とした。年齢群は 5 歳間隔とした。

本研究で用いた感染症発生動向調査のデータには個人情報が含まれるが、データ解析は国立感染症研究所内で行われ、また個人を特定できる情報を除外して利用しており、倫理上の問題が発生する恐れはない。

症例対照研究質問紙の妥当性評価：

2015 年 1 月 7 日にしらかば診療所を受診した MSM で研究内容を説明し同意を得た患者に質問紙を記入してもらいその場で回収した。しらかば診療所は MSM 等の性的少数者が多く通院している都内の診療所である。質問紙の内容は、基本属性、性生活、健康状態、知識と予防から成り、分かりにくい点なども記載してもらった。

本研究は、患者から同意書を得て行われた。質問紙は国立感染症研究所感染症疫学センターで厳重に管理されている。本研究で扱う情報には、個人を同定できる情報を収集していないため、倫理上の問題が発生する恐れはない。

## 3 感染リスクの高い集団における効果的かつ効率

的な感染予防対策の検討：

○ インターネットを用いた梅毒予防啓蒙活動のためのウェブサイトの制作

○ 予防啓蒙活動のためのリーフレット作成

○ 梅毒予防に対する対面カウンセリング、情報提供

○ MSM 向けの自発的梅毒/HIV/B 型肝炎 即日検査相談と梅毒予防啓蒙活動

○ 保健所等での即日検査プロモーション

○ 全国保健所・支所等へ梅毒検査体制について アンケート調査

については、特定非営利活動法人 SHIP に委託し実施した。

## C. 研究結果

1 梅毒トレポネーマ DNA 検出コンベンショナル PCR 法のプロトコールの策定：

国立感染症研究所保存の Nichols 株から lysozyme 溶解、フェノール抽出法で調整し、OD 260 nm で定量後、 $1\sim 10^5$  copy genome/ $\mu$ l の 10 倍ステップ希釈系列液を作製し、核酸診断系の確立、開発に利用可能とした。

梅毒トレポネーマゲノム DNA を利用して、既報の 2 種の PCR 法 (polA 遺伝子、TpN47 遺伝子を標的としている)を国立感染症研究所において検証し、いずれも実施可能であることを確認した。梅毒疑い皮膚病変からの検体での経験を何例かで踏まえ、非特異産物生成を抑制する PCR サイクル条件を設定し、プロトコール化して分担研究者である三宅（東京都）、川畑（大阪府）に提示した本プロトコールを用いて梅毒トレポネーマゲノム DNA に対する検出限界は 10 copy genome/反応までであることが示された。

本試験は三宅（東京都）、川畑（大阪府）によって、それぞれの地方衛生研究所において問題なく実施されることが確認された。検出限界についてはそれぞれ 10, 50 copy genome/反応であった。作業量、使用する試薬や機器も大きな影響があるので、より詳細な検討が必要である。

## 2 リアルタイム PCR 法の検出限界検討：

研究用 RT-PCR キット試薬、Genital ulcer (理研ジェネシス FTD-19) を測定機器として ABI 7500 を用いてその性能を評価した。

梅毒トレポネーマゲノム DNA の 10 倍希釈系列 (1000~1 copy genome) で検討した結果、全ての希釈サンプルで反応陽性、0.1 copy genome (計算値) / 反応で陰性であった。梅毒皮膚病変検体 (PCR 陰性検体) に対するスパイク実験は未実施であるが、コンベンショナル PCR (*polA*) より約 10 倍程度、RT-PCR 系の potentiality が高いことが示唆された。

本試験は三宅 (東京都)、川畑 (大阪府) によって、それぞれの地方衛生研究所において検討を試みた。設置されている機器によって、対応できないことが明らかになり、今後対応機器に併せて in house 試験法の確立が求められる。

### 3 核酸クロマトグラフィー法:

コンベンショナル PCR 後のアガロースゲル電気泳動法は実験室内では容易な手技であるが、臨床場面 (外来や保健所) での利用は不可能である。そのため、PCR 後の検出系に核酸クロマトグラフィー法を利用することを検討した。東北大学発アドベンチャー、TBA のコンサルトに依拠して STH-PAS クロマトでの、Tp 検出用 *polA* 遺伝子、TpN47 遺伝子 PCR、及び多型解析用 *tp0548* 遺伝子 PCR (後述、J Infect Dis (2010) 202: 1380-1388) での primer 情報を基にラベル付加 primer の最適化デザインを行った。

しかしながら、目的産物が無い陰性コントロール PCR でもクロマトシグナルが出現する事態を経験した。より詳細なコンベンショナル PCR 条件の検討が必要であることが示された。

### 4 LAMP 法:

3 遺伝子 4 種の LAMP 用の最適化 primer をデザインし、精製梅毒トレポネーマ DNA の増幅を試みた。その結果、TpN47 遺伝子の検出が可能なプライマーセットを見いだした。検出限界は、200 copy genome/反応であった。

### 5 臨床検体での PCR 検討

2 カ所の協力病院からの梅毒疑い皮膚病変検体入手し、検出 PCR 法での陽性・陰性判定と入手可能だった場合の検体採取時の血清抗体のデータとを比較し、PCR 法の診断に於ける有用性を検討した。

現在までに採取時の抗体データが採られている 68 イベントの疑い病変について PCR で梅毒トレポネーマ DNA 陽性・陰性判定を行った (図 1)。うち PCR 陽性/血清陽性例が 32 例、PCR 陰性/血清陰性例が 10 例であった。PCR 陰性/血清陽性例が 15 例で、PCR 陰性は梅毒除外診断に繋がらない可能性が示唆された。このうち 6 例は臨床症状的にも梅毒に典型的な症例であり、十分な梅毒トレポネーマが採取出来なかった可能性がある。残りの 9 例については臨床症状からは典型的とはいえず、血清学的検査によってはじめて梅毒を示唆する症例であった。適切な検体の採取が重要であることを示唆する。

一方で PCR 陽性/血清陰性例を 11 例経験した。これらは核酸診断を受け即時治療を開始した症例が含まれるが、うち 2 例ではその条件でも 4 週後の再検時に抗体陽転が確認された。残りの 9 例においても、7 例は臨床症状的には硬性下疳あるいは初期硬結として矛盾のない所見であり、梅毒トレポネーマ DNA の存在が示されたことから、早期の梅毒であったことが示唆された。

注目すべきは 11 例中 4 例において抗カルジオリピン抗体陰性で、抗梅毒特異的抗体陽性であった症例が存在したことである。一般的に抗カルジオリピン抗体は抗梅毒特異的抗体より先んじて上昇し、治療に反応して減弱する。また、過去の感染で上昇した抗梅毒特異的抗体は治療後も抗体価が維持されるため、抗カルジオリピン抗体陰性/抗梅毒特異的抗体陽性症例は既往の梅毒の可能性を示唆する。しかしながら、本研究における抗カルジオリピン抗体陰性/抗梅毒特異的抗体陽性の 4 症例については梅毒トレポネーマ DNA 陽性であったことから、過去の感染を反映した抗体測定値であったとは言い難い。ここにも梅毒トレポネーマ核酸検査の有用性があるかもしれない。

同様の検討が大阪府において検討され、発病初期患者の潰瘍性病変から採取された臨床検体からも検出が可能であり、早期の診断に応用可能あること、逆に明らかな梅毒病変異においても陰性結果となることが経験されている。

## 6 分子タイピング PCR 条件の最適化:

梅毒トレポネーマ陽性例での分子タイピングは、病原体の流行タイプ把握や感染経路、リスク集団特定、それを以て行政施策決定にも繋がる重要な作業である。

J Infect Dis. (2010) 202: 1380-1388 に於いて3種類の多型遺伝子のPCR産物を検体DNAから増幅し、そのタイプを組み合わせる方法が提案され、諸外国でのデータが報告されつつある。梅毒トレポネーマDNA陽性例での分子タイピングのプロトコールの最適化した。

コンベンショナルPCRで梅毒トレポネーマDNA陽性例のうち31例でタイピングに成功した。

方法および結果については中山分担報告に詳述したが、14d/fというタイプが最頻型であることが示された。

## 7 マクロライド耐性型 23S rRNA 変異を持つ梅毒トレポネーマの国内での初同定:

今回の検討で1例のみ検出した分子タイプ14d/gはアメリカ、シアトル市では2008年以降、マクロライド耐性型23S rRNA変異保持と強くリンクしているとの報告が有る (Sex Transm. Dis. (2012) 39: 954-958)。そこで、その検体、及び他の分子タイプを示した検体での23S rRNA遺伝子の塩基配列決定を行った。23S rRNA10例の検体について配列決定し、1例のみ存在した14d/gタイプのみ2座位ともマクロライド耐性型A2058G変異が認められ、他の9例では2座位とも野生型配列であった。日本にもマクロライド耐性型梅毒トレポネーマが頻度は高くないものの、分子タイプ14d/gとして存在することを初めて示した。

## 8 感染経路や感染のリスク等の疫学情報の把握 感染症発生動向調査事業の情報を整理し、山岸

分担報告書に詳述した。性別に関しては、2014年の報告の中で男性が77%と大半を占めていた。2014年の人口10万当たり報告数は全体で1.32、男性が2.09、女性が0.59であった。年齢は男性では10代後半以降のあらゆる年齢層で増加を認めており、女性では10代後半から30代までの若年層で増加を認めていた。

感染経路別に関しては、男性では、同性間性的接触は2008年から一貫した増加傾向を示し、それに追従する形で2011年以降異性間性的接触の報告数が増加に転じていた。女性では特に2014年に異性間性的接触による感染が著しく増加した。MSM等の性的少数者が多く通院している都内の診療所において、少数の患者から質問紙を用いて情報収集を実施し、リスク因子解析のための症例対象研究のための質問紙を修正し、より効率的な研究が実施可能となった。最終的な質問紙は山岸分担報告書に添付した。

## 9 感染リスクの高い集団における効果的かつ効率的な感染予防対策の検討

啓発活動: インターネットを用いた梅毒予防啓蒙活動のためのウェブサイトを制作し公開した。

「梅毒 — 意外と身近な性感染症」(資料2) <http://www.std-navi.net>。また、併せて首都圏(東京・神奈川・埼玉・千葉)の検査場リストを掲載した(資料3)。受診行動を促すために、ゲイ向け出会い系アプリ「9monsters」で広告掲載を行った(資料4)。加えて、予防啓蒙活動のためのリーフレットを作成し、保健所など関連機関に送付した。これらの受診行動促進効果の評価については、今後の検討課題である。

一方で梅毒予防に対する対面カウンセリングおよび情報提供を実施した結果、梅毒の感染ルートや予防方法、検査の方法についての相談項目が多く、これらの対応策について検討が必要であることが示された。その一つの対応策として、MSM向けの自発的梅毒/HIV/B型肝炎 即日検査相談と梅毒予防啓蒙活動を実施した。匿名であること、単一疾患だけでなくリスク行動が共通する複数の疾患を併せて相談・検診可能であることが重要で

ある。継続的な費用負担が問題として残るため、同様の活動を行政サービスの一貫として実施することも検討に値する。同様の即日検査を保健所等（神奈川県、横浜市、川崎市、藤沢市、相模原市、横須賀市、HIV情報センター、東新宿こころのクリニック）に紹介し、その実施に何が障害になっているかヒアリングした。即日検査は受検者が多く、現状の時間中で梅毒検査を入れることは時間的に厳しく、またTP（+）時の対応について戸惑いを感じていることから、これらの問題を解決すること必要性が示唆された。

また、さらに全国保健所・支所等577カ所へ梅毒検査体制についてアンケート調査（資料5）を実施し、457カ所から有効回答を得た。467回答中308の保健所においてはHIV検査事業の中で梅毒検査を実施していた。そのうち梅毒陽性結果を得ていた保健所は171カ所であった。H26年中に総計49,335の検査実績があり、うち698件の陽性結果が得られていた（図2）。即日検査が実施されていることは61カ所であることが判明した（図3）。自治体本庁の方針、職員の増強、予算の増額、迅速検査の信頼性、マニュアル配布等の条件が整うことが必要であることが示唆された（図4）。

#### D. 考察

##### 核酸検出系開発のはじまり

梅毒の核酸診断は25年前から利用が検討さはじめている。当初は神経梅毒の確定診断のために、髄液中の梅毒トレポネーマの検出の応用法の検討であった。また新生児梅毒の診断への応用が検討された。このように病原体診断が特に困難な病型において梅毒トレポネーマの核酸診断の利用が検討された。既存の顕微鏡観察では確認できない梅毒トレポネーマの存在を示唆することが出来ることが示されることとなった。

##### 暗視野顕微鏡観察法との比較

血清診断における標的抗原であるTpN47の遺伝子を検出するPCR法の開発とその評価が進んだ。性器潰瘍においても暗視野顕微鏡を用いたらせん菌体観察法との比較において、同等の検出感度があることが示された（Jethwa HSらJ Clin

Microbiol. 1995 資料1論文7）。TpN47遺伝子は梅毒トレポネーマ特異的であり、そのPCR法による検出は特異性をもつ検査法であると考えられる。暗視野顕微鏡観察は特異的検査ではないため、梅毒に特異的病変であると臨床診断された場合には利用可能である。暗視野顕微鏡観察法は、検出感度としては核酸検査法と同等で、特異性には劣ることから、その優越性は診察の際の即時性のみと考えられる。

##### 他の核酸検出法の開発とその応用

検出感度を高めるためにreverse transcriptaseとreal time PCR法を利用したRNA検出（16S rRNA）法が開発された（Centurion-Lara AらJ Clin Microbiol. 1997 資料1論文12）。梅毒トレポネーマに対する核酸検査利用の可能性が示されることとなり、他の性器潰瘍病変を形成する他の疾患（性器ヘルペス、軟性下疳）の原因病原体（HSV type 1, type2およびH. ducreyi）を同時検出する系が開発されその応用研究が進められた（Orle KAらJ Clin Microbiol. 1996）（Suntoke TらSex Transm Infect. 2009）が開発された。これらの方法は性器潰瘍性病変の病原体の鑑別とその罹患率の検証等に用いられてきた。

核酸検出法には一般的には暗視野顕微鏡観察法で可能な即時性がない。PCR法では機器を設置してもそのPCR増幅産物検出が煩雑であること、RT-PCR法では増幅産物の検出の煩雑性は解消されるが機器自体を保健所等の検診場所等に設置することは難しい。これらの問題点を解決する方向での開発が求められる。

本研究では核酸クロマト法を用いた検出法の迅速簡便化を試みた。非特異的反応を抑えることが必要であることが示された。また、LAMP法による梅毒トレポネーマDNA検出が可能となった。TpN47遺伝子は梅毒トレポネーマに特異的に存在することが知られているが、感度、特異度を確認し、PCR法に対して非劣勢であるか検討する必要がある。

##### 核酸診断系はI期梅毒の初期に有用

国内では現状ではパーカーインク法ならびに暗視野顕微鏡観察は、一般には利用されていない。



なんらかの病原体を直接的あるいは間接的に検出する検査系(特異的顕微鏡観察、特異的抗原検出、特異的核酸診断など)は、国内の現状ではその開発価値が認められる。特にI期梅毒において、血清抗体価が上昇する以前においては、血清診断のみでは偽陰性となる症例の診断に利用する価値は高い。本研究においても、血清抗体価陽転前に梅毒トレポネーマ核酸を検出することが可能な症例を経験した。

#### 核酸検出系は万能ではない

核酸検出系の開発とその検証の歴史から、梅毒トレポネーマ核酸の検出は潰瘍性病変からは高く、血液検体からの検出率は低下することが示されている。暗視野顕微鏡観察法(あるいはパーカーインク法による顕微鏡観察法)の代替法として、核酸検出系をとられる場合に、血液検体の検出率の低下は問題とならない(血液検体からの顕微鏡観察による菌体の確認は困難である)。しかしながら、本研究においても、梅毒血清診断陽性例のうち皮膚病変検体から梅毒トレポネーマ核酸が検出されない症例を経験した。いくつかの理由が考えられるが、現段階では核酸検査陰性結果をもって梅毒の除外診断を行なうてはいけないことを示唆する。ただし、核酸検査陽性例においては臨床症状および問診との総合的に判断し、必ずしも血清学的検査結果に影響されなくともよいと判断される。

#### 核酸検査からの発展

耐性株が出現した際には治療抵抗例(失敗例)の確認のためには核酸検査は必須の検査法となることが予想される。そのためには適切な分子型別法によって梅毒トレポネーマの感染株の異同を明らかにする必要がある。核酸検査で陽性であった検体については、梅毒トレポネーマの分子型別が可能となる。また、これは梅毒トレポネーマの国内での伝播、国際間伝播を推察することを可能とする。本研究においても、国内では使用されていないと考えられるアジスロマイシンに対して耐性を示すことが示唆される株が存在することが示された。同様の株は欧米においては既に優先株になっている地域もあり、これらの株が国内に侵入し

ていることを示唆する。

#### 疫学

発生動向調査から、近年の梅毒増加は男性と性交する男性(Men who have sex with men: MSM)での増加から始まり、現在も流行の中心であることが示されている。しかし、MSMを超えたヘテロセクシャルなコミュニティにも感染が拡大してきていることが懸念される。特に、欧米との比較から、梅毒の女性での増加傾向は日本における流行に特徴的であり、これは今後の先天梅毒増加が懸念される事態にもつながりうる。

また、MSM等の性的マイノリティーが受診する診療所でのパイロット調査では、調査協力を得たMSMの一部は女性との性行為の経験も持ち、女性への梅毒の広がりに関連する可能性が示唆されている。今後、本研究で構築した調査票をもちいた症例対照研究に活かされる。

WHOが2014年に公開したHIV感染症と梅毒の母子感染排除の評価確認「GLOBAL GUIDANCE ON CRITERIA AND PROCESSES FOR VALIDATION :Elimination of Mother-to-Child Transmission of HIV and Syphilis」をWHOの許可のもと翻訳した(山岸分担報告書別添2)。日本では10万出生あたり0.1前後であり、impact targetである50を大きく下回っていたが、梅毒に関係した死産、早産、低出生体重児の把握が十分ではなく、過小評価であると考えられた。

#### 効果的効率的診断機会の提供

現状では核酸検査は研究段階であり、一般に普及させることは困難である。血清学的検査を心理的に容易に受診する機会を増やすことが重要な課題となる。速やかな診断と治療が開始されることが患者自身にとっても、そのパートナーに対する感染リスクの抑制にも重要であることは論をまたない。現状では、夜間/休日に検査をうけることが出来る体制の整備が期待される。

感染者数の増加がみとめられる首都圏において夜間/休日の受検が可能な施設を資料2に添付した。

保健所における梅毒検査は67.4%の308カ所の保険所で実施されていた。そのうち、83%は無料で行なわれていた。抗カルジオリピン抗体測定のためのRPRカードテストが224カ所で実施されていた。抗梅毒特異的抗体測定は通常検査で226カ所(73%)、即日検査が54カ所(18%)で実施されていた。

梅毒血清診断は、抗カルジオリピン抗体測定と抗梅毒特異的抗体測定の種類が存在する。これまでは抗カルジオリピン抗体による抗体価測定でスクリーニングし、抗梅毒特異的抗体測定で確定することが伝統的に行なわれてきた。しかしながら、現在では“Reverse Algorithm”、つまり抗梅毒特異的抗体測定でスクリーニングし、抗カルジオリピン抗体価測定を行なう手順が世界的に広がりつつある。抗梅毒特異的抗体測定は、短時間で結果が判明するインムノクロマト法によるキットが存在することで確定検査への導入へ結びつけやすいことが関与する。本研究において、即日検査を実施する施設は少ないことが示された。これは、まだ十分に本キットの存在が周知されていない可能性があることが示唆された。即日検査の普及と公的機関等での行政サービスの強化することは、迅速な確定診断および治療への導入に重要な役割を果たすことが予想される。

公的機関による検診において核酸検査が利用できるようになるためには、梅毒疑い病変の診察とその検体採取が必要であり、事実上困難である。そのため、抗梅毒特異的抗体価上昇に先んじて上昇する可能性がある抗カルジオリピン抗体を測定するためにインムノクロマト法の開発が望まれる。

#### MSMにおける梅毒

梅毒は世界的にMSMにおいて患者数の増加が認められ、重要な問題と捉えられている(Syphilis & MSM (Men Who Have Sex With Men) – CDC Fact Sheet: <http://www.cdc.gov/std/syphilis/STDFact-MSM-Syphilis.htm>)。国内の梅毒増加の一因になっているとの考察もあり、今後の動向を注視する必要がある。特にMSMにおける口腔内病変は感染源としてリスクが高いことが想定されるとともに、臨床診断が困難な症例も多いことが推定される(IASR

vol 36 p 23-24 井戸田ら)。迅速で正確な梅毒診断は患者とその接触者が時機をえた治療を受け、さらなる感染伝播を減少させるために極めて重要である。Shields Mらによると55名の臨床症状および血清学的検査によりI期梅毒と診断されたMSM梅毒患者のうち、49名はPCRでも陽性結果が得られた。また、5名は初診時の血清検査では陰性であった例が存在する。その中の2名は血清検査陰性から陽性への転換(Seroconversion)が遅れたHIV陽性者のケースと(3ヶ月程度)、14ヶ月間のフォローアップ期間において陽性化しなかったHIV陽性者であったことが報告されている(Shields M et al. BMC Infect Dis. 2012 Dec 17;12:353. A longitudinal evaluation of Treponema pallidum PCR testing in early syphilis.).ただし、この2例はPCR陽性結果が得られたのち速やかに治療が開始されているため、治療開始が早い場合には血清検査陽性への転換が認められないかもしれない。いずれにしても、PCR検査はI期梅毒における早期診断のために役立つこと、特に血清学的陰性であるが皮膚病変が発症している期間が存在するため(特にHIVの共感染では)その有用性が想定されてきた。国内におけるエイズ診療拠点病院等と公的試験機関との連携において、HIV/AIDSとの梅毒の合併症例のより迅速な診断に結びつけることも視野に入れて今後の体制について検討することも有用であろう。

#### E. 結論

梅毒の第I期皮膚病変を標的とした核酸診断は重要なツールである。特に、梅毒トレポネーマの直接的・間接的検出を試みない医療機関が増えている状況では、第I期の早期(血清診断陽転前)の梅毒を見逃している可能性がある。これらの症例がしばらくの間、感染源として未治療で残されている可能性は否定できない。血清学的検査は、今後も重要な診断ツールであるが、核酸検査の開発とその利用に向けて体制を構築していく必要がある。PCR法に関しては、国立感染症研究所、東京都健康安全研究センター、大阪府公衆衛生研究所の3カ所で実施可能な体制となった。異性間性

的接触による感染の増加が見られることにも注意が必要である。

また、LAMP 法の開発の初期検討が完了しているが、更なる検討を進めることが重要である。

本研究の一部は病原微生物検出情報 月報 VOL36 No2 17-26 の作成に利用した。

#### F. 健康危機情報

特に無し。

#### G. 研究発表

##### 学会発表

(1) 山岸拓也 【シンポジウム】性感染症としての HIV/AIDS を巡る最近の話題広がりつつある梅毒 -感染症発生動向調査からの報告-第28回日本エイズ学会 大阪 2014年12月

(2) 山岸拓也 【教育講演】梅毒のリバイバル -発生動向調査から-日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月  
2014年12月7日 梅毒の感染症発生動向調査届出における問題点

(3) 高橋琢理、山岸拓也、有馬雄三、金山敦宏、石金正裕、加藤博史、加納和彦、砂川富正、大石和徳: 梅毒の感染症発生動向調査届出における問題点 日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月

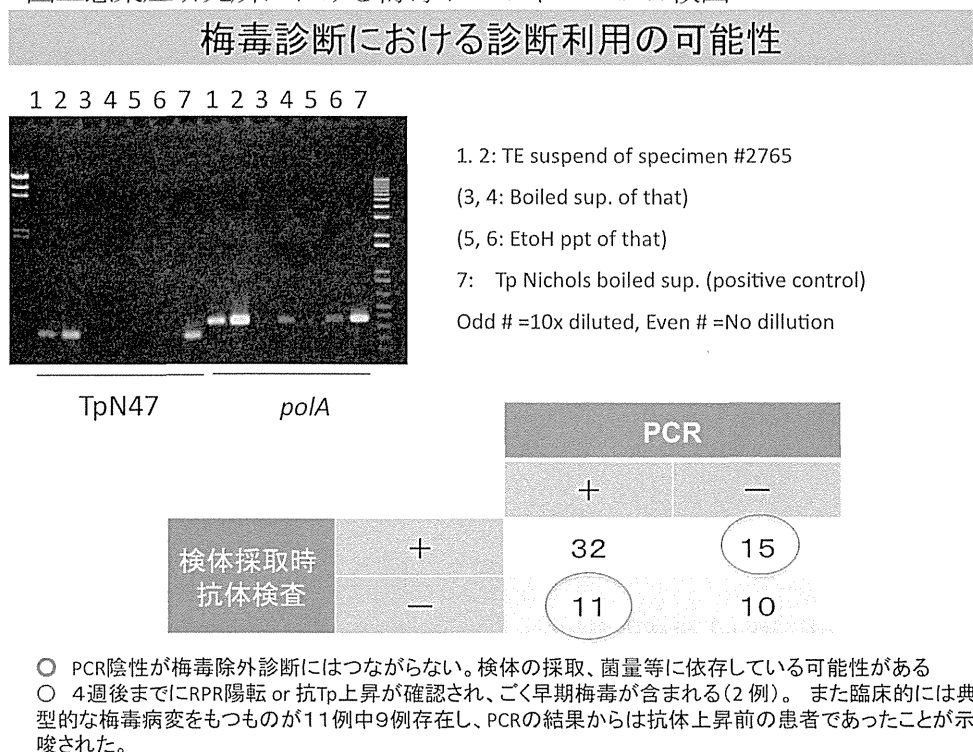
(4) 中山周一、井戸田一朗、本郷偉元、大西 真: 本邦初報告と思われる、Macrolide 耐性型 23S rRNA 変異を保持する分子タイプ14d/gの *T. pallidum* の同定。日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月

(5) 尾上智彦: 性感染症検査の標準化-梅毒の診断と検査法について 日本性感染症学会第27回学術大会 神戸 2014年12月

#### H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し

図1 国立感染症研究所における梅毒トレポネーマ PCR 検出



## 図2 保健所等における梅毒検査体制に関する 全国調査の結果 (2015年2月19日現在)

保健所・支所等アンケート 回答数 463/ 577箇所 (80%)  
 有効回答数 457/ 577箇所 (79%)

HIV検査事業と一緒に梅毒検査を行っている保健所  
308/ 457箇所 (67.4%)

梅毒陽性結果のあった保健所 171/ 308箇所 (56%)

陽性件数 698/ 49,335 (陽性率 1.41%)

図3

(2014年)

### 貴保健所では梅毒の即日検査を行っていますか？

(457件中)

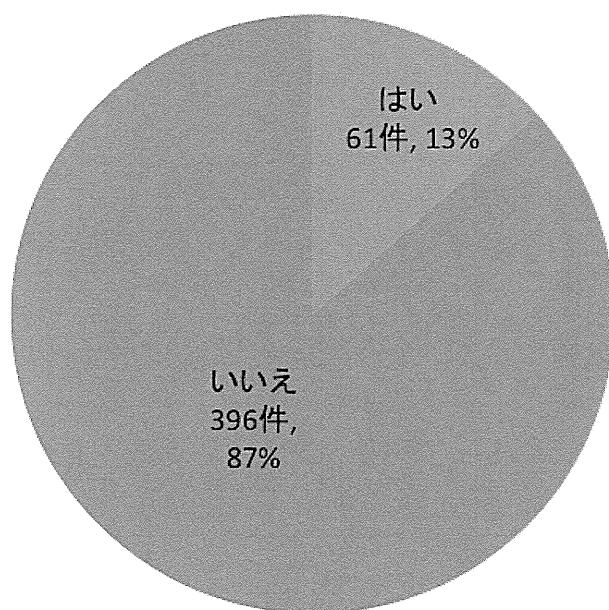
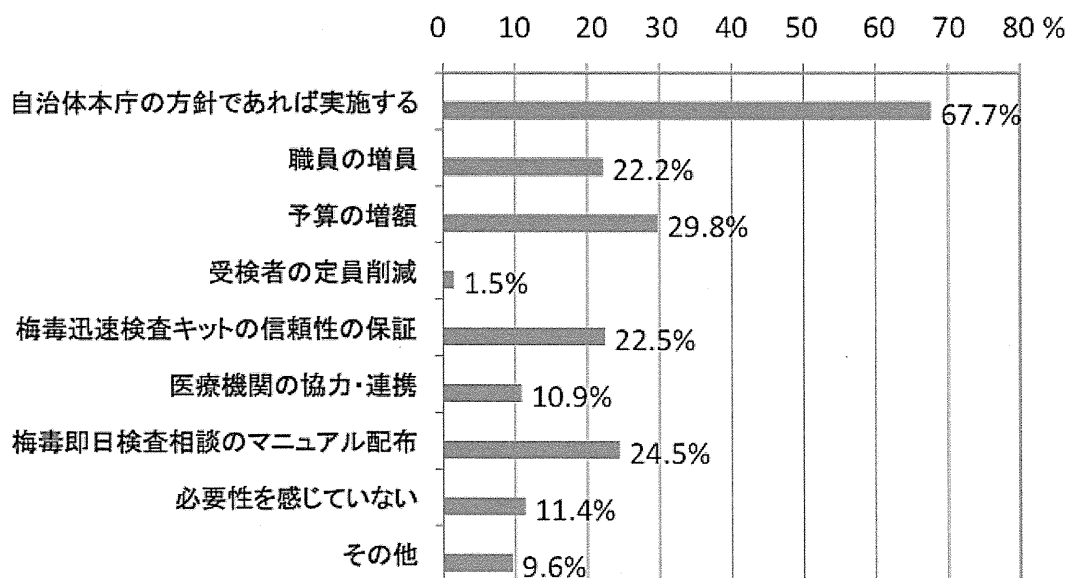


図4

(2014年)

### どのような条件があれば即日検査が可能となりますか？

(n=396)



#	Title	Authors	Journal	Comment
1	Use of the polymerase chain reaction to detect DNA sequences specific to pathogenic treponemes in cerebrospinal fluid.	Hay PE, Clarke JR, et al.	FEMS Microbiol Lett. 1990 Mar 15;56(3):233-8	TmpA and 4D genes 65 organism/0.5 ml
2	Detection of treponemal DNA in the CSF of patients with syphilis and HIV infection using the polymerase chain reaction.	Hay PE, et al.	Genitourin Med. 1990 Dec;66(6):428-32.	
3	<u>Sensitive detection of <i>Treponema pallidum</i> by using the polymerase chain reaction.</u>	Burstain JM, et al.	J Clin Microbiol. 1991 Jan;29(1):62-9	A 658-bp portion of the gene encoding TpN47 immunogen 0.01 pg of purified <i>T. pallidum</i> DNA /probe-hybridization
4	<u>Use of polymerase chain reaction and rabbit infectivity testing to detect <i>Treponema pallidum</i> in amniotic fluid, fetal and neonatal sera, and cerebrospinal fluid.</u>	Grimprel E, et al.	J Clin Microbiol. 1991 Aug;29(8):1711-8.	TpN47
5	<u>Evaluation of molecular methodologies and rabbit infectivity testing for the diagnosis of congenital syphilis and neonatal central nervous system invasion by <i>Treponema pallidum</i>.</u>	Sánchez PJ, et al.	J Infect Dis. 1993;167(1):148-57.	
6	<u>Detection of <i>Treponema pallidum</i> by polymerase chain reaction in the cerebrospinal fluid of syphilis patients.</u>	Chung KY, Lee MG, Lee JB.	Yonsei Med J. 1994;35(2):190-7.	
7	<u>Comparison of molecular and microscopic techniques for detection of <i>Treponema pallidum</i> in genital ulcers.</u>	Jethwa HS, Schmitz JL, Dallabetta G, et al.	J Clin Microbiol. 1995;33(1):180-3.	“DFA and PCR are equivalent methods for detection of <i>T. pallidum</i> on touch preparations of genital lesions.” TpN47
8	<u>Simultaneous PCR detection of <i>Haemophilus ducreyi</i>,</u>	Orle KA, Gates	J Clin	TpN47

	<u>Treponema pallidum, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers.</u>	CA, Martin DH, Body BA, Weiss JB.	Microbiol. 1996;34(1):49-54.	
9	<u>Diagnosis of congenital syphilis from placental examination: comparison of histopathology, Steiner stain, and polymerase chain reaction for Treponema pallidum DNA.</u>	Genest DR, Choi-Hong SR, Tate JE, et al.	Hum Pathol. 1996; 27(4):366-72.	胎盤の病理所見をPCR結果が裏付ける可能性。病理所見が明らかでない場合でも、先天梅毒の診断に有効かもしれない
10	<u>Gastric syphilis: polymerase chain reaction detection of treponemal DNA in pseudolymphomatous lesions.</u>	Inagaki H, Kawai T, Miyata M, et al.	Hum Pathol. 1996;27(8):761-5.	
11	<u>Molecular detection of Treponema pallidum in secondary and tertiary syphilis.</u>	Zoechling N, Schluepen EM, Soyer HP, Kerl H, Volkenandt M.	Br J Dermatol. 1997;136(5):683-6.	
12	<u>Detection of Treponema pallidum by a sensitive reverse transcriptase PCR.</u>	Centurion-Lara A, Castro C, Shaffer JM, et al.	J Clin Microbiol. 1997 35:1348-52.	A reverse transcriptase PCR (RT-PCR) that targets a 366 bp region of the 16S rRNA of T. pallidum. The test was demonstrated to detect 10(-2) T. pallidum RNA equivalents in cerebrospinal fluid.
13	<u>Effects of various handling and storage conditions on stability of Treponema pallidum DNA in cerebrospinal fluid.</u>	Villanueva AV, Podzorski RP, Reyes MP.	J Clin Microbiol. 1998 36(7):2117-9.	
14	<u>Molecular methods for the diagnosis of genital ulcer disease in a sexually transmitted disease clinic population in northern Thailand: predominance of herpes simplex virus infection.</u>	Beyrer C, Jitwatcharanan K, Natpratan C, et al.	J Infect Dis. 1998;178(1):243-6.	

15	<u>An investigation of genital ulcers in Jackson, Mississippi, with use of a multiplex polymerase chain reaction assay: high prevalence of chancroid and human immunodeficiency virus infection.</u>	Mertz KJ, Weiss JB, Webb RM, et al.	J Infect Dis. 1998 178(4):1060-6.	
16	<u>The etiology of genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction and relationship to HIV infection among patients attending sexually transmitted disease clinics in Pune, India.</u>	Risbud A, Chan-Tack K, Gadkari D, et al.	Sex Transm Dis. 1999 Jan;26(1):55-6 2.	
17	<u>Diagnostic relevance of polymerase chain reaction technology for <i>T. pallidum</i> in subjects with syphilis in different phases of infection.</u>	Pietravallo M, Pimpinelli F, Maini A, et al.	New Microbiol. 1999 Apr;22(2):99-1 04.	“This test (PCR) could, therefore, be useful to analyze difficult situations, especially when a seropositivity for a previous infection may complicate the serology of a reinfection “
18	<u>Chancroid, primary syphilis, genital herpes, and lymphogranuloma venereum in Antananarivo, Madagascar.</u>	Behets FM, et al.	J Infect Dis. 1999;180(4):13 82-5.	
19	<u>Human immunodeficiency virus infection and genital ulcer disease in South Africa: the herpetic connection.</u>	Chen CY, Ballard RC, Beck-Sague CM, et al.	Sex Transm Dis. 2000 Jan;27(1):21-9 .	
20	<u>Diagnosing genital ulcer disease in a clinic for sexually transmitted diseases in Amsterdam, The Netherlands.</u>	Bruisten SM, Cairo I, Fennema H, et al	J Clin Microbiol. 2001;39(2):601 -5.	
21	<u>New tests for syphilis: rational design of a PCR method for detection of <i>Treponema pallidum</i> in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene.</u>	Liu H, Rodes B, Chen CY, Steiner B.	J Clin Microbiol. 2001;39(5):194 1-6.	polA: “The detection limit is about 10 to 25 organisms when analyzed on gel.”



22	Molecular subtyping of <i>Treponema pallidum</i> subspecies <i>pallidum</i> .	Pillay A, Liu H, Chen CY, et al.	Sex Transm Dis 1998;25:408-14	CDC original typing method
23	<u>Molecular subtyping of <i>Treponema pallidum</i> in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood.</u>	Sutton MY, Liu H, Steiner B, et al.	J Infect Dis. 2001; 183(11):1601-6	
24	<u>Amplification of the DNA polymerase I gene of <i>Treponema pallidum</i> from whole blood of persons with syphilis.</u>	Marfin AA, Liu H, Sutton MY, et al.	Diagn Microbiol Infect Dis. 2001;40(4):163-6.	全血からの polA 遺伝子検出で、潜伏期でも (incubating syphilis) でも血中に梅毒トレポネーマが存在することを示唆
25	<u>Prevalence of circulating <i>Treponema pallidum</i> DNA and RNA in blood donors with confirmed-positive syphilis tests.</u>	Orton SL, Liu H, Dodd RY, Williams AE; ARCNET Epidemiology Group.	Transfusion. 2002 Jan;42(1):94-9	RESULTS: One hundred sixty-nine samples (including rapid plasma reagin [RPR]+ and RPR-) tested for <i>T. pallidum</i> DNA and/or RNA were negative. CONCLUSIONS: A lack of demonstrable <i>T. pallidum</i> DNA or RNA suggests that blood donors with confirmed-positive results in STS are unlikely to have circulating <i>T. pallidum</i> in their blood and that that their blood is unlikely to be infectious for syphilis.
26	<u>Molecular diagnosis of syphilis: the Schaudinn-Hoffmann lymph-node biopsy.</u>	Kouznetsov AV, Prinz JC.	Lancet. 2002 Aug 3;360(9330):388-9.	血清診断が難しい症例において生検材料を用いて PCR 等の検査を試み成功した報告

27	<u>Detection of treponema pallidum DNA in cutaneous lesions of secondary syphilis and characterization of the inflammatory infiltrate.</u>	Li W, Zhang J.	Beijing Da Xue Xue Bao. 2003;35(5):485-7.	
28	<u>Use of PCR in the diagnosis of early syphilis in the United Kingdom.</u>	Palmer HM, Higgins SP, Herring AJ, Kingston MA.	Sex Transm Infect. 2003 Dec;79(6):479-83.	第I期梅毒診断にPCRを実施して、98例中95例で臨床診断と一致した。治療により、血清抗体価が上昇しない例あるいはHIV陽性者で抗体価上昇が通常より遅れる場合があることが報告されている。
29	<u>Detection of the 47-kilodalton membrane immunogen gene of Treponema pallidum in various tissue sources of patients with syphilis.</u>	Kouznetsov AV, Weisenseel P, Trommler P, et al.	Diagn Microbiol Infect Dis. 2005 Feb;51(2):143-5.	“skin lesions and PBMCs may serve as the most reliable sources for a PCR-based diagnosis of syphilis.”
30	<u>Molecular subtyping of Treponema pallidum from North and South Carolina.</u>	Pope V, Fox K, Liu H, et al.	J Clin Microbiol. 2005 Aug;43(8):3743-6.	サブタイピング・米国
31	<u>Detection of pathogens causing genital ulcer disease by multiplex polymerase chain reaction.</u>	Liu AY, Jiang MJ, Yin YP, Sun JF.	Chin Med Sci J. 2005 Dec;20(4):273-5.	
32	<u>Development of a real-time PCR assay to detect Treponema pallidum in clinical specimens and assessment of the assay's performance by comparison with serological testing.</u>	Leslie DE, Azzato F, Karapanagiotidis T, Leydon J, Fyfe J.	J Clin Microbiol. 2007;45(1):93-6. Erratum in: J Clin Microbiol.	“Directly compared with serology, TpPCR showed 95% agreement, with a sensitivity of 80.39% and a specificity of 98.40%. Potential factors leading to the discrepant results are discussed. Concurrent

			2008;46(5):189 5.	serology on 21 patients with TpPCR-positive primary syphilitic lesions demonstrated that a panel of current syphilis serological tests has high sensitivity for the detection of early syphilis. We found that TpPCR is a useful addition to serology for the diagnosis of infectious syphilis. Direct comparison with other T. pallidum PCR assays will be required to fully assess the limitations of the assay.”
33	<u>Specific and sensitive diagnosis of syphilis using a real-time PCR for <i>Treponema pallidum</i>.</u>	Koek AG, Bruisten SM, Dierdorp M, van Dam AP, Templeton K.	Clin Microbiol Infect. 2006 Dec;12(12):123 3-6.	RT-PCR polA をターゲットとしたもの の 評 価 sensitivities and specificities of 94-100%
34	<u>Detection of <i>Treponema pallidum</i> subsp. <i>pallidum</i> from skin lesions, serum, and cerebrospinal fluid in an infant with congenital syphilis after clindamycin treatment of the mother during pregnancy.</u>	Woznicová V, Smajs D, Wechsler D, Matějková P, Flasarová M.	J Clin Microbiol. 2007 Feb;45(2):659- 61.	先天梅毒診断への PCR の応用。tmpC (TP0319) and DNA sequencing of the genes TP0136 and TP054 を用いている
35	<u>Molecular typing of <i>Treponema pallidum</i> strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa.</u>	Molepo J, Pillay A, Weber B, Morse SA, Hoosen AA.	Sex Transm Infect. 2007 Jun;83(3):189- 92.	サブタイピング 南アフリカ
36	<u>Diagnosing <i>Treponema pallidum</i> in secondary syphilis by PCR and immunohistochemistry.</u>	Buffet M, Grange PA,	J Invest Dermatol. 2007	

		Gerhardt P, Carlotti A, Calvez V, Bianchi A, Dupin N.	Oct;127(10):23 45-50.	
37	<u>PCR testing for <i>Treponema pallidum</i> in paraffin-embedded skin biopsy specimens: test design and impact on the diagnosis of syphilis.</u>	Behrhof W, Springer E, Bräuninger W, Kirkpatrick CJ, Weber A.	J Clin Pathol. 2008 Mar;61(3):390- 5.	パラフィン包埋ブロックからのPCRを利用した梅毒診断
38	<u>Detection of azithromycin resistance in <i>Treponema pallidum</i> by real-time PCR.</u>	Pandori MW, Gordones C, Castro L, et al.	Antimicrob Agents Chemother. 2007 Sep;51(9):3425 -30.	アジスロマイシン耐性梅毒トレポネーマの検出
39	<u>Detection of <i>Treponema pallidum</i> sp <i>pallidum</i> DNA in latent syphilis.</u>	Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al.	Int J STD AIDS. 2007 Dec;18(12):842 -5.	
40	<u>Evaluation of multiplex real-time PCR for detection of <i>Haemophilus ducreyi</i>, <i>Treponema pallidum</i>, herpes simplex virus type 1 and 2 in the diagnosis of genital ulcer disease in the Rakai District, Uganda.</u>	Suntoke TR, Hardick A, Tobian AA, et al.	Sex Transm Infect. 2009 Apr;85(2):97-1 01.	4種病原体のマルチプレックスPCR法を用いた性器潰瘍疾患の病原体検出
41	<u>Assessment of a real-time PCR test to diagnose syphilis from diverse biological samples.</u>	Gayet-Ageron A, Ninet B, Toutous-Trell u L, et al.	Sex Transm Infect. 2009 Aug;85(4):264- 9.	様々な検体をもちいた real-time PCR 法の評価 TpN47. I 期梅毒: 感度 80% (皮膚病変), 28% (全血), 55% (血清) 29% (尿) II 期梅毒: it was 20%(皮膚病変), 36%(全血), 47% (血清), 44% (尿),