				100% (血漿),50%(髄液)
42	Molecular characterization of syphilis in patients in Canada: azithromycin resistance and detection of **Treponema pallidum** DNA in whole-blood samples versus ulcerative swabs.	Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al.	J Clin Microbiol. 2009 Jun;47(6):1668-73.	"In primary syphilis cases, PCR was positive exclusively (75% sensitivity rate) in ulcerative swabs but not in blood specimens, while in secondary syphilis cases, 50% of the blood specimens were positive by PCR."
43	Molecular subtyping of **Treponema pallidum** subsp. **pallidum** in Lisbon, Portugal.	Castro R, Prieto E, Aguas MJ, et al.	J Clin Microbiol. 2009 Aug;47(8):2510-2.	サブタイピング/ポルトガル
44	Macrolide resistance and molecular types of **Treponema pallidum** causing primary syphilis in Shanghai, China.	Martin IE, Gu W, Yang Y, Tsang RS.	Clin Infect Dis. 2009 Aug 15;49(4):515-21.	上海のアジスロマイシン耐性梅毒トレポネーマの検出
45	Molecular detection of T. **pallidum** by **PCR** in seronegative cases.	Talha E, Juhász E, Kanizsai S, Nagy K.	Acta Microbiol Immunol Hung. 2009 Jun;56(2):181-9.	血清学的に陰性症例における梅毒トレポネーマ核酸検出
46	Visual DNA microarrays for simultaneous detection of human immunodeficiency virus type-1 and **Treponema pallidum** coupled with multiplex asymmetric polymerase chain reaction.	Tang J, Zhou L, Gao W, Cao X, Wang Y.	Diagn Microbiol Infect Dis. 2009 Dec;65(4):372-8.	HIV-1 と梅毒の同時検出技術の開発
47	Syphilitic panuveitis with retinal necrosis in an HIV positive man confirmed by **Treponema pallidum PCR.**	Booth J, Rodger A, Singh J,	J Infect. 2009 Nov;59(5):373-5.	梅毒の眼病変における PCR の利用

		Alexander S, Hopkins S.		
48	Clinical value of Treponema pallidum real-time PCR for diagnosis of syphilis.	Heymans R, van der Helm JJ, de Vries HJ, et al.	J Clin Microbiol. 2010 Feb;48(2):497-502.	"The T. pallidum real-time PCR is a fast, efficient, and reliable test for the diagnosis of primary syphilis in an STI outpatient clinic and a general practitioner setting, but it has no added diagnostic value for the diagnosis of secondary syphilis."
49	**Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis.**	Marra CM, Sahi SK, Tantalo LC, et al.	*J Infect Dis* 2010, 202(9):1380-1388.	新しいサブタイピング法 (Tp0548配列決定を追加)
50	**Molecular epidemiology of syphilis-San Francisco, 2004-2007.**	Katz KA, Pillay A, Ahrens K, et al.	*Sex Transm Dis* 2010, 37:660-663.	サブタイピング・サンフランシスコ
51	Molecular typing of Treponema pallidum strains in western Canada: predominance of 14d subtypes.	Martin IE, Tsang RS, Sutherland K, et al.	Sex Transm Dis. 2010 Sep;37(9):544-8.	サブタイピン・カナダ
52	A new multiplex real-time PCR test for HSV1/2 and syphilis: an evaluation of its impact in the laboratory and clinical setting.	Scott LJ, Gunson RN, Carman WF, Winter AJ.	Sex Transm Infect. 2010 Dec;86(7):537-9.	"The PCR test was more sensitive than both dark ground microscopy and serological testing for the diagnosis of primary syphilis."
53	Getting the measure of syphilis: qPCR to better understand early infection.	Tipple C, Hanna MO, Hill S, et al.	Sex Transm Infect. 2011 Oct;87(6):479-	"Quantifying T pallidum provides insight into syphilis infection kinetics: Ulcers of primary disease

			85.	in HIV-1-positive patients are perhaps more infectious and the presence and load of T pallidum bacteraemia is variable, with a peak in the secondary stage.”
54	Evaluation of a new multiplex polymerase chain reaction assay STDFinder for the simultaneous detection of 7 sexually transmitted disease pathogens.	Muvunyi CM, Dhont N, Verhelst R, et al.	Diagn Microbiol Infect Dis. 2011 Sep;71(1):29-37.	多病原体同時検出
55	Evaluation of a PCR test for detection of **treponema pallidum** in swabs and blood.	Grange PA, Gressier L, Dion PL, et al.	J Clin Microbiol. 2012 Mar;50(3):546-52.	潰瘍性病変のスワブを用いた核酸検査（TpN47) a sensitivity of 82% and a specificity of 95%
56	Evaluation of macrolide resistance and enhanced molecular typing of **Treponema pallidum** in patients with syphilis in Taiwan: a prospective multicenter study.	Wu H, Chang SY, Lee NY, et al.	J Clin Microbiol. 2012 Jul;50(7):2299-304.	台湾でのサブタイピング。硬性下疳において63%の陽性率。血漿は49%. 40 検体からの型別結果で 14f/f が最頻型。他国、日本とは異なる。
57	Macrolide resistance testing and molecular subtyping of **Treponema pallidum** strains from southern Africa.	Müller EE, Paz-Bailey G, Lewis DA.	Sex Transm Infect. 2012 Oct;88(6):470-4.	南アフリカにおけるサブタイピング
58	Protocols for detection and typing of **Treponema pallidum** using PCR methods.	Bruisten SM.	Methods Mol Biol. 2012;903:141-67.	方法論についても記述
59	Sequencing-based molecular typing of ***Treponema pallidum*** strains in the Czech Republic: all identified genotypes are related to the sequence of	Flasarová M, Pospíšilová P, Mikalová L, et	*Acta Derm Venereol* 2012, 92:669-674.	チェコにおけるサブタイピング

	the SS14 strain.	al.		
60	Sensitivity, specificity and likelihood ratios of PCR in the diagnosis of syphilis: a systematic review and meta-analysis.	Gayet-Ageron A, Lautenschlager S, Ninet B, Perneger TV, Combescure C.	Sex Transm Infect. 2013 May;89(3):251-6.	"T. pallidum PCR was more efficient to confirm than to exclude syphilis diagnosis in lesions. PCR is a useful diagnostic tool in ulcers, especially when serology is still negative and in medical settings with a high prevalence of syphilis."
61	PCR detection in diagnosis of early syphilis: a preliminary result from China.	Peng RR, Yin YP, Wei WH, et al.	Sex Transm Infect. 2013 Jun;89(4):333-5.	中国における初期梅毒の PCR の利用
62	High prevalence of azithromycin resistance to **Treponema pallidum** in geographically different areas in China.	Chen XS, Yin YP, Wei WH, et al.	Clin Microbiol Infect. 2013 Oct;19(10):975-9.	中国においてアジスロマイシン耐性型の梅毒トレポネーマが高率で検出（91.9%）されることを報告。2008-2011 年の検体。
63	A longitudinal evaluation of **Treponema pallidum PCR** testing in early syphilis.	Shields M, Guy RJ, Jeoffreys NJ, Finlayson RJ, Donovan B.	BMC Infect Dis. 2012 Dec 17;12:353.	"T pallidum PCR is a potentially powerful tool for the early diagnosis of primary syphilis, particularly where a serological response has yet to develop."
64	Molecular **subtyping** of **Treponema pallidum** during a local syphilis epidemic in men who have sex with men in Melbourne, Australia.	Azzato F, Ryan N, Fyfe J, Leslie DE.	J Clin Microbiol. 2012 Jun;50(6):1895-9.	サブタイピング・オーストラリア・MSM 地域性があることが示唆。ビクトリアでは 14e が最頻型
65	Polymerase chain reaction testing of vitreous in atypical ocular syphilis.	Troutbeck R, Chhabra R, Jones NP.	Ocul Immunol Inflamm. 2013; 21:227-30	非典型的な眼梅毒における硝子体の梅毒トレポネーマ核酸の存在証明
66	Etiology of genital ulcer disease in a sexually	Gomes Naveca	PLoS One. 2013	ブラジルにおける性器潰瘍性疾患の

	transmitted infection reference center in Manaus, Brazilian Amazon.	F, Sabidó M, Amaral Pires de Almeida T, et al.	May 21;8(5):e63953.	原因の検証
67	Syphilis in the AIDS era: diagnostic dilemma and therapeutic challenge.	Scythes JB, Jones CM.	Acta Microbiol Immunol Hung. 2013 Jun;60(2):93-116.	"In light of the overwhelming association between a past history of syphilis and HIV seroconversion, more sensitive tools, including recombinant antigen-based immunological tests and direct detection (PCR) technology, are needed to adequately assess the role of latent syphilis in persons with HIV/AIDS."
68	Comparison of CDC and sequence-based molecular typing of syphilis treponemes: tpr and arp loci are variable in multiple samples from the same patient.	Mikalová L, Pospíšilová P, Woznicová V, et al.	BMC Microbiol. 2013 Jul 30;13:178.	サブタイピング手法の比較検証
69	Molecular subtyping of Treponema pallidum in Paris, France.	Grange PA, Allix-Beguec C, Chanal J, et al.	Sex Transm Dis. 2013;40(8):641-4.	フランスにおけるサブタイピングの結果報告。
70	Current trend on syphilis diagnosis: issues and challenges.	Morshed MG.	Adv Exp Med Biol. 2014;808:51-64	"Reverse Algorithm"について言及。神経梅毒、先天梅毒の診断の困難さ、point of care or rapid tests の必要性に言及。
71	Confirmation of tertiary Treponema pallidum infection by polA polymerase chain reaction (PCR).	Chean R, Kwong JC, Ciciulla J, Leslie D.	Pathology. 2014;46:259-60.	後期顕症梅毒における核酸検査の利用

72	Azithromycin-resistant syphilis-causing strains in Sydney, Australia: prevalence and risk factors.	Read P, Jeoffreys N, Tagg K, et al.	J Clin Microbiol. 2014;52:2776-81.	アジスロマイシン耐性株が増加 オーストラリア。
73	Molecular typing of **Treponema pallidum** in the Czech Republic during 2011 to 2013: increased prevalence of identified genotypes and of isolates with macrolide resistance.	Grillová L, Pětrošová H, Mikalová L, et al.	J Clin Microbiol. 2014 ;52(10):3693-700.	サブタイピングの結果報告。アジスロマイシン耐性株が増加. チェコ
74	2014 European guideline on the management of syphilis.	Janier M, Hegyi V, Dupin N, et al.	J Eur Acad Dermatol Venereol. 2014;28:1581-93.	ヨーロッパにおける梅毒コントロールガイドラインの紹介
75	Syphilis testing, typing, and treatment follow-up: a new era for an old disease.	Tipple C, Taylor GP.	Curr Opin Infect Dis. 2015;28:53-60.	核酸検査の今後の利用について考察。菌量を評価することが感染源としてのリスク評価につながる可能性を指摘
76	Performance of the 47kDa protein membrane versus DNA polymerase I genes for detection of **Treponema pallidum** by polymerase chain reaction in ulcers.	Gayet-Ageron A, Laurent F, Schrenzel J, et al.	J Clin Microbiol. 2014 17. pii: JCM.03444-14.	潰瘍性病変の TpN47 と polA と標的とした場合の核酸検査の比較。同等の正確性をもち、結果は一致することが報告されている
77	Use of **Treponema pallidum PCR** in testing of ulcers for diagnosis of primary syphilis.	Gayet-Ageron A, Sednaoui P, Lautenschlager S, et al.	Emerg Infect Dis. 2015 Jan;21(1):127-9.	フランス、スイスにおける PCR 法の評価。暗視野顕微鏡検査よりも正確な診断が可能であることが報告

彼氏ができて
幸せ絶頂のサトシくん…
一意外と身近な性感染症一
梅毒
みなさんこんにちは！梅毒啓発キャラクターばいど君だよ！
今日は最近彼氏ができて幸せ絶頂のコチラの彼のお話をお送りするよ！
いちゃ
いちゃ
まんが：SUV
一なぁなぁ 2週間前にアプリで知り合った人とはどうなった？
んふふ~ 続いてるよ~
デレ~~~
わぁ！いいね 幸せそうで！
チッ
チッってなに？
あれ？
どしたのその手
なんかできてる
あぁこれ？
2日くらい前から発疹が出てきてさー

昨日ネット見てたらゲイの間で梅毒が増えてるって書いてあったけど
症状似てない？
うわホントだ…
検査受けに行ってみなよ ついでにHIV検査もさ
そうする~
その後 彼はクリニックで梅毒検査を受け
1週間後…
クリニック
梅毒でした
念の為にHIV検査もしましょうか
は~いお願いします…
とほほ
ばいど君のワンポイントアドバイス
もし先生からHIV検査を勧められなかった時は自分から言おう！
梅毒と診断されている場合健康保険が使えます。検査代は800円程度。
※この他に診察料が800円程度かかります。
また、一部の保健所では無料で検査ができます。

先生~なんで梅毒になったんですか?
それはね、エッチしてる時に粘膜同士の接触で感染するんですよ
例えばペニス同士の接触
コンドーム無しでのアナルセックスやフェラチオでもうつる事があるよ!
コンドーム使おうね
2週間前から付き合ってる彼氏がいるんですけど…
えっ
あなたの症状だと梅毒に感染したのは3ヶ月くらい前です
今の相手にうつしている事も考えられるのでパートナーの方にも検査を勧める方がいいですね
抗生物質を出しておきますので飲んでくださいね
あなたの場合第2期梅毒ですので念の為8週間治療しておきましょう
梅毒の治療は進行具合で期間が違うんだ
第1期で2~4週間
第2期で4~8週間
治療を始めて24時間以内に一時的に熱が出る事があるけど驚かないでね

そして過去半年以内にエッチした相手には梅毒だった事を伝えよう!
梅毒でした…
先生に完治したって言われるまでエッチはおあずけだね
俺も検査受けるよ~
そして
治療を続けること8週間…
治った!
彼氏に感染させてないか心配だったけどうつしてなかった!
HIVも感染してなくて良かったね
これからは気をつけようっと!
梅毒は治ってもまたかかることがあるから定期的(約1年ごと)にHIVと一緒に検査を受けるのがオススメ★
梅毒は感染しても症状が出ないことがあるから検査は大事だよ!
それじゃばいばい!

首都圏・梅毒検査一覧（夜間・休日のみ）

掲載基準・・・人口30万人以上の市区町村で、夜間・休日に梅毒検査を実施している検査機関（医療機関を含む）

WEBサイトに掲載する項目　　即日　即日検査

	都道府県	市町村名	機関名	時間帯	検査結果	料金	曜日・時間	備考	リンク先 URL （HIV検査・相談マップ）	TEL	住所
1	東京都	新宿区	しらかば診療所	夜間・休日	即日	HIV+梅毒+B肝の即日検査 3,780 円	水・木・金曜日18:00～21:00 土・日曜日 10:00～12:00、14:00から17:30		http://shirakaba-clinic.jp/index.html	03-5919-3127	東京都新宿区住吉町8-28 B・STEPビル 2階
2	東京都	新宿区	東新宿こころのクリニック	夜間・休日	即日	有料	月～金曜日 15:00～19:00 土曜 10:00～15:00		http://www.higashishinjuku-kokoro.com/access.html	03-5155-5556	東京都新宿区新宿6−28−12
3	東京都	新宿区	ねぎし内科診療所	夜間・休日	即日	梅毒・即日 5,400 円	夜間/金・月曜日16:30～19:00まで 土日/土・日曜日13:30～15:00、16:30～19:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=126	03-5369-2041	東京都 新宿区 四谷3-9 光明堂ビル5F
4	神奈川県	横浜市	SHIP・性感染症即日検査	夜間	即日	無料	夜間/月曜日 18:00～20:00		http://hiv.ship-web.com	045-306-6769	
5	神奈川県	横浜市	横浜AIDS市民活動センター	夜間	1週間後	無料	夜間/火曜日 18:00～19:30		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=136	045-201-8830	神奈川県 横浜市中区 尾上町3-39 尾上町ビル9F
6	神奈川県	川崎市	川崎市検査・相談室	休日	1週間後	無料	日曜日　10:00～12:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=167	044-200-1466	神奈川県 川崎市川崎区 砂子1-7-5 タカシゲビル4F
7	神奈川県	川崎市	宮本町中央診療所	休日	即日	4,500 円	土曜日 9:30～12:30		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=159	044-211-6581	神奈川県 川崎市川崎区 宮本町4-1
8	神奈川県	相模原市	相模原市保健所 シティ・プラザはしもと	休日	2週間後	無料	隔週土曜日 14:00～16:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=133	042-769-8260	神奈川県 相模原市緑区 橋本6-2-1 イオン橋本店6階
9	神奈川県	横須賀市	横須賀市保健所	夜間	1週間後	無料	夜間/第2水曜日 17:30～19:30		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=135	046-825-6117	神奈川県 横須賀市 西逸見町1-38-11
10	埼玉県	さいたま市	さいたま市保健所	夜間	1週間後	無料	夜間/原則第1第3火曜日 17:30～18:30		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=207	048-840-2220	埼玉県 さいたま市中央区 鈴谷7-5-12
11	埼玉県	川越市	川越市保健所	夜間	翌週の火曜日	無料	夜間/第4月曜日 18:00～19:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=196	049-227-5102	埼玉県 川越市 大字小ケ谷817-1
12	千葉県	市川市	千葉県市川健康福祉センター	夜間	約2週間後	無料	夜間/第1木曜日17:30～19:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=183	047-377-1103	千葉県 市川市 南八幡5-11-22
13	千葉県	松戸市	千葉県松戸健康福祉センター	夜間	約2週間後	無料	夜間/第3火曜日 17:30から19:00		http://www.hivkensa.com/search/?enc=あ&mode=detail&id=182	047-361-2139	千葉県 松戸市 小根本7

●●●●● SoftBank 3G 17:34 61%
ロケーション
Menu
あなたとの距離 2.769 km ～ 3.066 km
ゲイに身近な性感染症
梅毒に!?
あなたとの距離 3.067 km ～ 3.336 km
Home
Message
Location
History
Audition

保健所における梅毒検査体制に関する調査

本アンケートは、保健所・保健センターで HIV 相談・検査と一緒に実施している梅毒検査について実施状況等を調査することにより、より良い HIV/STI 検査事業のあり方を検討する際の参考にしたいと思っております。ご協力の程どうぞよろしくお願いいたします。

（アンケート集計結果は研究班の報告書としてまとめ、報告するとともに、学会・学会誌等に発表することがあります。原則として発表データは集計結果のみを使用し、個別の保健所が分かる形では特別に許可を得た場合を除き公表することはありません。）

保健所名:　　　　　　　　　　　　**所属**:

連絡担当者名:　　　　　　　　　　**職種**: 医師 ・ 保健師 ・ 事務 ・ その他（　　　　）

連絡先: TEL　　　　　　FAX　　　　　　E-mail

1. 全保健所にお伺いします。
   （1） **梅毒の即日検査**を実施していますか？ → （ **実施している** ・ **実施していない** ）
   （2） （1）で**梅毒の即日検査を「実施していない」と回答された場合のみ**、下記にお答えください。
   ↓
   梅毒の迅速検査キットが販売されていますが、どのような条件があれば、即日検査の実施が可能となるでしょうか？当てはまるものに○を付けてください。（複数回答可）
   ① **自治体本庁の方針であれば実施する**　② **職員の増員**
   ③ **予算の増額**　④ **受検者の定員削減**
   ⑤ **梅毒迅速検査キットの信頼性の保証**　⑥ **医療機関の協力・連携**
   ⑦ **梅毒即日検査相談のマニュアル配布**　⑧ **梅毒即日検査の必要性を感じていない**
   ⑨ **その他**（　　　　　　　　　　　）

2. 別紙「保健所における HIV 検査・相談体制に関する調査」の設問「2. ② HIV 検査事業と一緒に実施している性感染症検査項目」の中で、**「梅毒」を選択した保健所のみ**、下記にお答え下さい。
   （1）1年間（平成 26 年 1-12 月）の梅毒の検査数と陽性数を教えてください。
   検査数（　　　　件）　**陽性数**※（　　　　件）※ TP 抗体検査もしくは STS 法のいずれかが陽性
   （2） 梅毒検査の方法を教えてください。
   （ア） 脂質（カルジオリピン）を抗原とする検査（STS 法）
   （ **RPR カードテスト** ・ **自動化法** ・ **実施していない** ）
   （イ） *T. pallidum* を抗原とする検査（TPHA 法、TPPA 法、IC 法などの TP 抗体検査）
   （ **通常検査で実施** ・ **即日検査で実施** ）
   （3） 梅毒即日検査を実施されている保健所にお伺いします。即日検査が陽性であった場合、どのような対応をしますか？
   （ **医療機関を紹介** ・ **STS 法を実施し後日結果を通知** ・ **その他**＿＿＿＿＿＿）
   （4）梅毒検査を行っている曜日と時間をご記入下さい。
   （ **定期** ・ **イベント** ）**検査**:＿＿＿**曜日**/（ **月** ・ **年** ）＿＿＿**回**　**受付時間**:＿＿:＿＿～＿＿:＿＿
   （ **定期** ・ **イベント** ）**検査**:＿＿＿**曜日**/（ **月** ・ **年** ）＿＿＿**回**　**受付時間**:＿＿:＿＿～＿＿:＿＿
   （ **定期** ・ **イベント** ）**検査**:＿＿＿**曜日**/（ **月** ・ **年** ）＿＿＿**回**　**受付時間**:＿＿:＿＿～＿＿:＿＿
   （5） 予約制ですか？（ **はい** ・ **いいえ** ）
   （6） 費用は？（ **無料** ・ **有料**＿＿＿＿＿＿**円** ）
   （7） 結果返しは？（ **即日** ・ **1 週間後** ・ **2 週間後** ・ ＿＿＿**日後以降** ）

3. 梅毒検査相談を実施する上で、問題点や課題等がありましたら、ご記入ください。（裏面でも可）

ご協力ありがとうございました。

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）
委託業務成果報告書

梅毒の新たな検査手法の開発等に関する研究

核酸検査系に関わる技術開発

担当責任者　中山周一　国立感染症研究所・細菌第一部　主任研究官
協力　井戸田一朗　しらかば診療所　・院長
小泉信夫　国立感染症研究所・細菌第一部　主任研究官

研究要旨

梅毒の抗体陽転前における早期診断（早期治療による感染拡大防止に寄与する）法の開発、汎用化を企図し、原因菌 *Treponema pallidum* 遺伝子検出法として、Mighty Amp Polymerase による PCR 法、RT-PCR 法、PCR 法産物を使った核酸クロマト法、LAMP 法の検討を行った。PCR 法、RT-PCR 法での精製 DNA を用いた場合の検出限界を示し、PCR 法での検体を鋳型とした機能性を示し、陽性検体での *Treponema pallidum* 分子タイピングを行い、データ収集を開始した。

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、男性間性交渉者(MSM: Men who have sex with men)のコミュニティーの内等での感染伝播増加が指摘されている。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。

梅毒トレポネーマは人工培養が出来ないため、染色法による検体内に存在するらせん菌の証明（パーカーインク法、暗視野顕微鏡法）が重要な検査法であったが、現在では臨床現場これらの方法が用いられることはほとんどない。そのため、血清診断によって診断がなされてきたが、発病初期の患者では抗体価の上昇は認められない。

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。

そのため、核酸検査の利用可能性を検討した。手法として、PCR、RT-PCR、核酸クロマトグラフィー、LAMP、の各方法についてその条件等の検討を行うことを企図した。

また、梅毒トレポネーマ検出用 PCR の他、多型遺伝子をターゲットとした PCR とその産物の解析による梅毒トレポネーマの分子タイピングが提案され、諸外国でのデータが報告されつつあるので、国内検体で梅毒トレポネーマ陽性例について分子タイピングを試み、その分布を諸外国例と比較することを目指した。また、タイピングの応用として薬剤耐性梅毒に関連し、23S rRNA のマクロライド耐性型変異についても探索の試行を目指した。

B. 研究方法

梅毒トレポネーマ DNA: 国立感染症研究所保存の Nichols 株から lysozyme 溶解、プェノール抽出法で調整し、OD 260 nm で定量後、1～10^5 copy genome/μl の 10 倍ステップ希釈系列液を作製した。臨床の陽性および陰性検体については２カ所の協力クリニックから連結不可能匿名化されたものを提供され、使用した。

PCR 法：*polA* 遺伝子検出は J. Clin. Microbiol. (2001) **39:** 1941-1946.の方法を検討した。TpN47 遺伝子検出は J. Clin. Microbiol. (1996) **34:** 49-54.の方法を検討した。本研究での PCR 法は、迅速簡便な汎用検査法提案を企図し、臨床検体をそのまま鋳型として使用できる PCR キット､TAKARA Mighty

Amp Ver.2（宝酒造、R071）を使用した。本 PCR 法に於いては臨床検体での検討も行った。その場合疑い病変からの漿液を滅菌綿棒に吸収したものを輸送、綿棒の TE 400 µl 懸濁液 1 µl を 20 µl スケール PCR 反応の鋳型とした。Nichols 株 DNA、及び臨床検体を用いて PCR のサイクル条件の最適化を行った。

リアルタイム PCR 法：理研ジェネシスの研究用 RT-PCR キット試薬、Genital ulcer (理研ジェネシス FTD-19)（HSV-1、HSV-2、*Treponema pallidum* 同時鑑別検出）を製品説明書に準じて使用し、Nichols 株 DNA で検出限界を検討した。

核酸クロマトグラフィー法：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、*Treponema pallidum*（以下、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）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。最適化の結果、*polA* 遺伝子、*tp0548* 遺伝子については上記原著論文とおりの、TpN47 遺伝子については Rv primer の 5'側（遺伝子下流側）が 5bp 延長された配列となった。

上述、Mighty Amp Ver.2 での PCR 産物 10 µl に STH-PAS 展開液 150m M Nacl 10 µl (final 75 mM Nacl)とラテックス懸濁液 1 µl とを添加し、クロマトストリップで展開し、検討を行った。

LAMP 法：栄研化学のコンサルトに依拠して LAMP 用の最適化 primer を３遺伝子計４種デザインし、Nichols 株 DNA を鋳型に Bst Warmstart DNA polymerase を用い、リアルタイム濁度測定装置 Loopamp EXIA によって濁度変化を測定して検討した。

Tp 分子タイピング：上述、Mighty Amp Ver.2 を用いて Nicols 株 DNA、Tp-DNA 陽性検体からの PCR で多型解析に用いる３遺伝子、*arp*、*tprEGJ*、*tp0548* の遺伝子増幅を試行し、産物が得られたものついて J. infect. Dis. (2010)**202:** 1380-1388 の方法に従ってタイピングを行った。

また、タイピングの発展応用としての 23S rRNA のマクロライド耐性型変異検出についても Nichols 株 DNA、Tp-DNA 陽性検体からの PCR を N. Engl. J. Med. (2004)**351:** 154-158.の方法に従って試行し、産物が得られたものについてその塩基配列を決定した。

協力病院の設定：２カ所のクリニック、しらかば診療所（東京都新宿区）院長、井戸田一朗先生、及び武蔵野赤十字病院（東京都武蔵野市）感染症科医師、本郷偉元先生の協力を仰ぎ、疑い病変検体の提供を受けた。

C. 研究結果

1) Tp-DNA 検出 PCR 法のプロトコールの策定:

polA、TpN47 の PCR をそれぞれ J. Clin. Microbiol. (2001) **39:** 1941-1946.の F1、R1 primer、
(F1: TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC、
R1: CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG)
J. Clin. Microbiol. (1996) **34:** 49-54.の KO3、KO4 primer、（KO3: GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT、KO4: CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA）を用いて、Mighty Amp Ver 2.で検討した。検体での経験を何例かで踏まえ、非特異産物生成をかなり抑制できた、アニーリングとエクステンションを 68℃で同時進行させるシャトルサイクルが最適と判断した。PCR 機器は Biometra T-professional を使用した。PCR 条件は以下に示す。

Mix

H_2O	7.4 µl
2X Buffer (in kit)	10 µl
FWD primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
REV primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
Template (TE suspended specimen)	1.0 µl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 µl
	Total 20 µl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	30 sec
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 45 サイクル実施した。

当該機器ではこのサイクルは約１時間で終了する。

以降、これを標準プロトコルとして固定し、産物のアガロース泳動で、*polA* 産物 377bp、TpN47 産物 261bp のいずれか一方でも目視できた場合

をTp-DNA陽性確定とした。陽性検体はさらに後述のタイピングに供した。

2) PCR法の検出限界の検討:

上記PCR系での精製Nichols株 Tp-DNA希釈系列でのPCR産物泳動観察での検出限界を検討した。J. Clin. Microbiol. (2001) **39:** 1941-1946.の検討では*polA* PCRの感度がTpN47 PCRより優れているとされるため、*polA* PCRでのみでこの検討を行った。結果、安定して377 bp産物が観察されるのは10 copy genome/反応までであり、1 copy genome/反応では産物生成は見られる場合と見られない場合とがあり不安定で、再現性に乏しかった。

計算上の1 copy genome/反応は、一定確率で反応チューブ内にゲノムDNAが入っていない状態になることから、これは妥当な結果とえられる。

翻って、このPCR法はすでに理論的にほぼ感度は最上限に達しており、実際の検体を用いる場合、検体中DNA量を如何に多く確保できるかの方法論が課題となると判断される。

3) 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)を用いて、精製Nichols株 Tp-DNA希釈系列1000 copy genome~0.1 copy genome/反応での陽性・陰性判定を見た。当キットの標的遺伝子はTpN47である。PCR mixture調製、サイクル条件は試薬説明書に従った。但し、精製DNAを使った検討であり、potentialityの限界を知る目的で、内部コントロール添加を省略した。測定機器はABI 7500を使用した。実際のPCR条件は、

Mix

Primer probe mix (in kit)	1.5 µl
2X Buffer (in kit)	12.5 µl
Template (diluted Tp Nichols DNA)	10 µl
FTD PCR enzyme (in kit)	1 µl
	Total 25 µl

Cycle

STEP 1	42℃	15 min
STEP 2	94℃	3 min
STEP 3	94℃	8 sec
STEP 4	60℃	34 sec

STEP3－4を40サイクル実施した。

本キットのTpN47検出probeはCy-5ラベル化されているので、670 nmの発光量のΔRn vs Cycle numberのプロットで40サイクル目までに指数増殖が認められた場合を陽性とした。

結果は10倍ステップ1000~1 copy genome/反応で陽性、0.1 copy genome （計算値）/反応で陰性であった。

1000、100、10、1 copy genome/反応でのそれぞれのCt値は25.5061、28.3705、32.1162、34.7696であった。このうちの1 copy genome/反応でのCt値34.7696は35に極めて近いことから安定した再現性は期待できないと判断される。結論的に安定した陽性判定には10 copy genome/反応以上が必要と考えられる。本キットは性能として160 copy genome/反応を検出限界として公称している。今回の検討では、実際の臨床検体ではなく、他の生物種DNA共存が無い精製Tp-DNAを用いたこと、また省略した内部コントロールPCR反応に酵素は奪われず、Tp-DNA PCRのみに集中することから、公称よりも1オーダー程度低い検出限界を得ることができたと考えられる。結論的に、このRT-PCR系のpotentialityとしての検出限界は10 copy genome/反応程度、と判断される。

今後は、元来、検体から抽出・精製したDNAを鋳型として使用する本RT-PCR系が検体のTE懸濁液を鋳型として機能するか否か、否として、完全精製が必要か、PCR阻害物質除去のみの粗精製で十分なのかを検討する予定である。

4) 核酸クロマトグラフィー法： 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。最適化の結果、*polA*遺伝子、*tp0548*遺伝子については上記原著論文とおりの配列を持ったラベル付加primer setとなり、TpN47遺伝子についてはRv primerの5'側（遺伝子下流側）が5bp延長された配列となった。

実際には、

polA PCR
5'-[F-1]- TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC
5'-biotin- CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG

TpN47 PCR
5'-[F-2]- GAAGTTTGTCCCAGTTGCGGTT
5'-biotin- CAGCTCAGAGCCATCAGCCCTTTTCA

tp0548 PCR
5'-[F-3]- GGTCCCTATGATATCGTGTTCG
5'-biotin- CGTTTCGGTGTGTGAGTCAT

の各 primer set となった。

先ず、各 singlet PCR を **1) Tp-DNA 検出 PCR 法**に記述した条件で行い、産物泳動とクロマトストリップ展開でのシグナル検出とを比較し、PCR-クロマトグラフィーでの Tp-DNA 検出限界の検討を試みた。
しかしながら、陰性コントロールでの PCR 産物泳動で～150bp 近辺の位置に primer dimer と思われる産物が目視された場合、末端にラベルを持つ２本差 DNA を検出する本クロマトグラフィー系では、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。
この現象の回避のため、今後 **1) Tp-DNA 検出 PCR 法**に記述した Mighty Amp での PCR 条件の改良や、本クロマトグラフィー系で推奨されている Cyber Ex-Taq (TAKARA)での検討を行い、primer dimer と思われる産物の産生抑制法を探索する予定である。
PCR 後、泳動、染色を必要とせず、約 10 分のクロマト展開で結果が得られる本法は迅速簡便法としての期待が特に高く。このトラブルシューティングが非常に重要である。

5) LAMP 法：
polA 遺伝子、TpN47 遺伝子、Tp0548 遺伝子を対象にした LAMP 用の最適化 primer をデザインした。精製 Tp-DNA での検出限界検討を行った結果、TpN47 遺伝子および Tp0548 検出が可能であった。さらに TpN47 遺伝子検出系について、温度、プライマー組成比、dNTP 濃度、Mg 濃度について検討した結果、200 copy genome/ 反応が検出限界であった。

6) 臨床検体での PCR 検討、及び抗体検査データとの比較：
上述、２カ所の協力病院からの梅毒疑い皮膚病変検体を入手し、**1) Tp-DNA 検出 PCR 法**での Tp-DNA 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 Tp-DNA 陽性・陰性判定を行った。うち PCR 陽性／血清陽性が 32 例、PCR 陰性／血清陰性が 10 例であった。PCR 陰性／血清陽性が 15 例で、PCR 陰性は梅毒除外診断に繋がらないという従来の概念が再確認された。
一方で PCR 陽性／血清陰性を 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または抗体価上昇が確認された。
このことから、抗体陽転前の極く早期での迅速診断、結果としての早期治療開始、最終的に早期の感染拡大に PCR による陽性診断は大きく寄与できると判断される。
このことから近年の、特に MSM 間での、初期梅毒感染の拡大を鑑みた時、この診断法の重要性,有用性は増していると考えられる。
陰性結果が梅毒除外診断にならないことに留意、周知しつつも、この検査の普及に努めていく必要が有ると考えられる。

7) 分子タイピング PCR 条件の最適化:
Tp-DNA 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。培養不能菌 Tp に於いては抗体検査と臨床所見とによる診断が主流のため、このことが非常に立ち遅れている。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て表記する方法が提案され、諸外国でのデータが報告されつつある。上述のように、我々は、迅速簡便な汎用検査法提案を企図し、臨床検体をそのまま鋳型として使用できる PCR キット、TAKARA Mighty Amp Ver.2（宝酒造、R071）を使用しての PCR 法を検討している。Tp-DNA 陽性例

での分子タイピングでも、検体を直接鋳型として迅速簡便に産物を得るべく、このキットを用いての分子タイピング PCR プロトコルの最適化を試みた。以下多型遺伝子それぞれの PCR について最適化した PCR 条件を列挙する。

① *arp* 遺伝子

primers

ARP-1　CAAGTCAGGACGGACTGTCC

ARP-2　GGTATCACCTGGGGATGC

Mix

H_2O	7.4 µl
2X Buffer (in kit)	10 µl
ARP- 1primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
ARP-2 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
Template (TE suspended specimen)	1.0 µl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 µl
	Total 20 µl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	2 min
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 35 サイクル実施した。

ここでのポイントは 45 サイクルでは臨床検体を用いた場合、ラダー状に非特異産物が出現する場合が多かったため 35 サイクルに減らすことでこれを軽減させたことである。

② *tprEGJ* 遺伝子

本 PCR は Nest PCR、２段で行う

Nest PCR 1st.

primers

B1　ACTGGCTCTGCCACACTTGA

A2　CTACCAGGAGAGGGTGACGC

Mix

H_2O	7.4 µl
2X Buffer (in kit)	10 µl
B1 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
A2 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
Template (TE suspended specimen)	1.0 µl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 µl
	Total 20 µl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	2 min
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 45 サイクル実施した。

この PCR 産物を primer 除去用カラム High pure PCR product purification kit (Roche, 11 732 676 001) で精製し、最終100倍希釈したサンプルを Nest 2nd PCR の鋳型とした。

Nest PCR2nd.

primers

IP6　CAGGTTTTGCCGTTAAGC

IP7　AATCAAGGGAGAATACCGTC

Mix

H_2O	7.4 µl
2X Buffer (in kit)	10 µl
IP6 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
IP7 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl
Template (column-purified, diluted product of the Nest 1st PCR)	1.0 µl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 µl
	Total 20 µl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	2 min
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 35 サイクル実施した

③ *tp0548* 遺伝子

primers

S2　GGTCCCTATGATATCGTGTTCG

AS3　CGTTTCGGTGTGTGAGTCAT

Mix

H_2O	7.4 µl
2X Buffer (in kit)	10 µl
S2 primer (10 pmol/ µl)	0.6 µl

AS3 primer (10 pmol/ μl) 0.6 μl
Template (TE suspended specimen) 1.0 μl
Mighty Amp DNA polymerase 0.4 μl

Total 20 μl

Cycle
STEP 1 98℃ 2 min
STEP 2 98℃ 10 sec
STEP 3 68℃ 30 sec
STEP 4 68℃ 10 min
STEP 5 25℃ soak
STEP2－3 を 45 サイクル実施した。

以降、これを標準プロトコルとして固定した。産物をアガロース泳動で確認し、後述の各タイピング方法で型別して、菌（検体）のタイプとして記述した。

8) 臨床検体の分子タイピング：

前項で得られた PCR 産物を J. infect. Dis. (2010)**202:** 1380-1388.の方法に従い、タイピングを行った。

arp 遺伝子については得られた産物長から遺伝子内の 60 bp 単位の繰り返し配列のリピート数を数字で表記した。

（例）産物長が 1155 bp の場合、リピート数は 14 となり、*arp* タイプを「14」と記す。

tprEGJ 遺伝子については目的産物 1836 bp が得られた場合、エタノール沈殿で濃縮精製し、制限酵素 *Mse*I で消化した時に出現するバンドの組み合わせにより、アルファベットでタイプ名が指定されている。それに従って表記した。

（例）911 bp+、901 bp+、804 bp+、722 bp+、524 bp+、425 bp-、382 bp+、320 bp-のパターンはタイプ「d」

tp0548 遺伝子については目的産物 360 bp が得られた場合、その塩基配列決定を行いその配列によりアルファベットでタイプ名が指定されている。それに従って表記した。

以上３つのタイプを *arp*、*tprEGJ*、*tp0548* の順に列挙するルールに従った

現在まで PCR で Tp-DNA 陽性例のうち 31 例で３種遺伝子ともでのフルタイピングに成功している。その分布は、14d/f が 20 例、14d/c と 11o/c がそれぞれ 4 例ずつ、14d/g、14e/f、11d/f がそれぞれ 1 例ずつで、6 種類のタイプが検出された。J. Infect. Dis. (2010) **202:** 1380-1388.及び Sex Transm. Dis. (2012) **39:**42-45.の検討で 14d/f は多くの地域で最頻型、14d/c も比較的多くマダガスカルでは最頻型である。今回の検討でもこの２つが１位，２位を占め、全体に諸外国での報告と似た傾向が認められた。英文誌報告の中では中国に於ける１例のみの報告が有る少数例 11o/c が、今回の検討では４例であり、14d/c と同数であった。まだ検討数が少ないため結論づけはできないが 11o/c が比較的多いことが日本の特徴となる可能性がある。これを念頭に置きながら今後の解析を続行する予定である。

9) マクロライド耐性型 23S rRNA 変異を持つ Tp 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、それまで最頻型であった 14d/f を凌駕し、また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い、本邦での耐性型変異の存在の有無、分布、及び分子タイプとの相関について知見を得ることを試みた。Tp ゲノム上２座位に存在する 23S rRNA 遺伝子それぞれの PCR、及び塩基配列決定を N. Engl. J. Med. (2004)**351:** 154-158.の方法に従って行った。ここでも検体の TE 懸濁液を鋳型とし、Mighty Amp での PCR を用いるため条件最適化を行った。

即ち、先ず *tp0226* 隣接座、*tp0267* 隣接座それぞれに特異的な primer set で座位特異的 23S rRNA の 1.5 kb PCR 産物を得た。この段階は Nest PCR 1st である。

Nest PCR 1st

Primers *tp0226* locus

Tp-23S-F GTACCGCAAACCGACACAG

Tp-23S-0226R GCGCGAACACCTCTTTTTAC

Primers *tp0267* locus

Tp-23S-F GTACCGCAAACCGACACAG

Tp-23S-0267R GAACCGTCCCTGAAAACTCA

Mix

H_2O	7.4 μl
2X Buffer (in kit)	10 μl
Tp-23S-Fprimer (10 pmol/ μl)	0.6 μl
Tp-23S-0226R, or	
Tp-23S-0267R primer (10 pmol/ μl)	0.6 μl
Template (TE suspended specimen)	1.0 μl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 μl
	Total 20 μl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	2 min
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 45 サイクル実施した。

1593 bp 産物が確認出来た場合、Nest 1st PCR 成功と判定し、産物を 100 倍希釈して Nest PCR 2nd の鋳型とした。Nest PCR 2nd では２座位由来産物それぞれを鋳型に、同一の 23S rRNA 内部 primer で増幅する。

Nest PCR 2nd

Primers

Tp-23S-F GTACCGCAAACCGACACAG

Tp-23S-2nd-R AGTCAAACCGCCCACCTAC

Mix

H_2O	7.4 μl
2X Buffer (in kit)	10 μl
Tp-23S-Fprimer (10 pmol/ μl)	0.6 μl
Tp-23S-2nd R primer (10 pmol/ μl)	0.6 μl
Template (diluted product of 1st PCR)	1.0 μl
Mighty Amp DNA polymerase	0.4 μl
	Total 20 μl

Cycle

STEP 1	98℃	2 min
STEP 2	98℃	10 sec
STEP 3	68℃	1 min
STEP 4	68℃	10 min
STEP 5	25℃	soak

STEP2－3 を 35 サイクル実施した。

628 bp 産物の生成が有った場合最終 PCR 成功とし、産物の塩基配列を決定した。

現在まで 31 例の分子タイピング成功例から 10 例の検体についてそれぞれ２座位ともで 23S rRNA の PCR 産物が得られ、塩基配列決定に成功した。10 成功例の分子タイプの内訳は 14d/f ６例、14d/c ２例、11d/f、14d/g 各１例ずつであった。

このうち 14d/g タイプ１例でのみ２座位ともで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 Tp 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。

D. 考察

近年報告数が増加している梅毒の感染拡散を制御していくためには早期診断、早期治療が必須である。現在、診断の主流を占めている血清抗体検査では抗体陽転まで４週程度のタイムラグが有り、簡便迅速な病原体、病原体遺伝子ベースの診断法の開発と普及とが必要な状況になっている。

この背景で、今回我々は、Tp-DNA 検出系として、１）検体自体を直接鋳型として使用できる Mighty

Amp DNA polymerase を使う PCR 法、
２）potentiality として最高の感度が期待できる RT-PCR 法、
３）１）の PCR 法での産物増幅後のゲル泳動ステップをスキップし、短時間で産物確認を行えると期待される核酸クロマト法、
４）サーマルサイクラー、RT−PCR アナライザー、泳動装置を必要とせず、汎用化、普及効率が高いと考えられる LAMP 法
を検討することとした。
このうち、１）、２）について精製 DNA を用いた場合の検出限界を検討し、*polA* を標的とした PCR 法、TpN47 を標的とした RT−PCR 法で約 10 copy genome/反応の結果を得た。
１）についてはさらに検体を用いた検討を行い、抗体陽転前の早期診断が可能であるケースの実証ができた。本研究の目標の中心であった遺伝子検査の有用性を示すことができた。同時に、抗体検査に感度的に劣る場合があり遺伝子検出での陰性結果を以ての除外診断は不可能であるという従来の知見も再確認した。

２）の RT-PCR 法については今後、検体自体を鋳型として系が機能するか否かの検討を要する。
３）の PCR 後の核酸クロマト法については、場合により primer dimer が産生することでのクロマトシグナルの非特異発色が起こることを経験し、このトラブルシューティングを今後検討する必要がある。
４）の LAMP 法については最適化 primer をデザインし、TpN47 検出系は利用可能性があると判断された。感度、特異度の検証と、臨床検体をもちいた PCR 法との一致度を確認する必要がある。

遺伝子検出法での診断は陽性検体を使用しての病原体の分子タイピングに繋げることができる。実際、諸外国からは J. infect. Dis. (2010)**202:** 1380-1388.の方法によるタイピング結果が報告されてきている。
今回、我々も Mighty Amp polymerase を用いた検体からの直接の多型遺伝子増幅とそのタイピングを行い、国内で初めての Tp の分子タイプ分布を提出できた。今後とも例数を増やし、逐次国内データと諸外国データを比較し、科学的根拠を伴った流行タイプ検知、感染経路推定、リスク集団把握に繋げて行く必要が有る。
今回我々は国内で１例のみだが、分子タイプ 14d/g、23S rRNA A2058G マクロライド耐性型変異保持 Tp を検出した。Sex Transm. Dis. (2012)**39:**954-958. の報告でアメリカ、シアトルでの 2008 年以降分子タイプ 14d/g、23S rRNA A2058G 変異型 Tp が拡散していることから、この１例についての感染経路が根拠を以て推定が可能であった。このことは分子タイプ解析とデータ発信、諸外国との情報共有が非常に重要であることを如実に示した。

E. 結論
Tp 遺伝子検出検査法の検討を行い、Mighty Amp PCR 法、RT-PCR 法での検出限界を示した。Mighty Amp PCR 法で検体を使用した機能性を示し、分子タイピングを試行し、国内で初のデータを提出した。
今後 RT-PCR 法での検体を使用した機能性の検討、核酸クロマトでの非特異シグナルの解消、LAMP 法の詳細な検討が必要である。

F. 健康危機情報
特に無し。

G. 研究発表

中山周一、井戸田一朗、本郷偉元、大西　真 (2014)「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 *Treponema pallidum* の同定。」日本性感染症学会第 27 回学術大会　2014 年 12 月　神戸

H. 知的財産の出願・登録状況

特に無し

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）
委託業務成果報告書

梅毒の新たな検査手法の開発等に関する研究

核酸検査手法の確立

研究分担者　三宅　啓文（東京都健康安全研究センター・微生物部）
研究協力者　高野　弘紀（東京都健康安全研究センター・微生物部）
島田　信子（東京都健康安全研究センター・微生物部）
平井　昭彦（東京都健康安全研究センター・微生物部）
貞升　健志（東京都健康安全研究センター・微生物部）
甲斐　明美（東京都健康安全研究センター・微生物部）

研究要旨：
梅毒は、近年報告数の増加がみられており、より有効な感染対策が求められている。そのためには早期に感染を捉え、正確な診断を行うことが不可欠である。新たな梅毒検査診断法の開発・確立を行い、梅毒感染の早期診断に役立てるため、梅毒トレポネーマ DNA や試験用検体を用い、PCR 法およびリアルタイム PCR 法による梅毒核酸検査の検討を行った。その結果、両手法とも簡便、迅速に梅毒の検出を行うことができ、梅毒の確定検査に有用であると考えられた。

A. 研究目的

梅毒は、近年報告数の増加が感染症発生動向調査で指摘され、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が指摘されている。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。

梅毒トレポネーマは人工培養が出来ないため、検体内に存在するらせん菌の染色法による証明（パーカーインク法、暗視野顕微鏡法）が重要な検査法であったが、現在では臨床現場においてこれらの方法が用いられることはほとんどない。そのため、RPR: rapid plasma regain や TPLA: *Treponema pallidum* latex agglutination、TPHA: *Treponema pallidum* hemagglutination test などの血清検査によって診断がなされてきた。しかし、感染初期の患者では抗体価の上昇は認められないことや、梅毒トレポネーマ抗体は治癒後も長期間産生され続けるといった問題点を有する。

これらの状況に鑑み、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手法の確立が求められている。

本研究では、梅毒トレポネーマ DNA や陽性・陰性の試験用検体を用いて、PCR 法およびリアルタイム PCR 法による梅毒核酸検査の検討を行った。

B. 研究方法

1）検査材料

国立感染症研究所（感染研）から梅毒トレポネーマ DNA 標準品の提供をうけた。また、感染研から提供された陽性および陰性の試験用検体各 5 検体を供試した。さらに、潰瘍病変部位の擦過物 1 検体を供試した。

2）PCR 法

polA 遺伝子検出法は、Liu ら（*J. Clin. Microbiol.* **39**: 1941-1946, 2001）、TpN47 遺伝子検出法は Orle ら（*J. Clin. Microbiol.* **34**: 49-54, 1996）に基づく感染研プロトコールに依った。

PCR 機器は PC-808-02（ASTEC）、PCR 酵素は Mighty Amp DNA polymerase ver. 2（TaKaRa）を使用した。PCR 条件は以下に示す。

STEP 1 98℃　2 min
STEP 2 98℃　10 sec