

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）  
平成 28 年度 分担研究報告書

梅毒感染リスクと報告数の増加の原因分析と効果的な介入手法に関する研究  
分担課題 口腔梅毒病変の核酸検査の検討に関する研究

研究分担者 中山 周一 （国立感染症研究所 細菌第一部 主任研究官）

### 研究要旨

今年度の研究期間では唾液検体を得ることができなかつたため、予備的検討としてできるだけ検体から DNA 濃度が高い画分を得る条件を検討して標準プロトコルを仮固定した。今後実際の唾液検体での同プロトコルでの DNA 濃縮精製が行えるかを検討していくことが必要である。

また付随的に、従来から行っている検体由来梅毒トレポネーマの分子型別を進行させると共にマクロライド製剤による治療が行われるケースで問題となる（日本では推奨されていない）23S rRNA のマクロライド耐性型変異の検出を時系列に行い、2016 年以降国内でも耐性型梅毒トレポネーマが急激の増加していること、それが最頻分子型 14d/f での増加によるものであることを明らかにした。

### A. 研究目的

梅毒は 2010 年以降増加しており、感染リスクと報告数の増加の原因分析を踏まえ対策を講じることが急務となっている。

この目的のためには、できるだけ多くの症例で従来の主流な血清抗体診断法とは別に起因菌梅毒トレポネーマの核酸検出による早期確定診断試行による迅速な患者把握が重要である。さらにそれに続く個々の症例での梅毒トレポネーマの分子型別試行によって流行型推定、感染ルート推定とともに患者情報との組み合わせによってリスク集団の科学的根拠を伴う方法での推定を行い、説得力のある介入につなげる必要がある。

このことから、できるだけ幅広く核酸検出を行う検体を収集することが必要である。

近年、口腔内の病変を呈する梅毒の症例が増加しており、従来収集してきた性器関連病変のみでは疫学調査に用いるターゲットとしては不足することが考えられることから口腔内の病変も多数収集する必要がある。

ここで問題となるのは、一般に梅毒病変は無痛性の場合が多く、病変やそれ由来漿液の採取は患者にそれほどの負担を与えないのだが、口腔病変に関しては有痛性の場合には比較的によく、擦過を行うと患者 QOL 低下につながる可能性があり、その点についての配慮が最終的に収集検体の絶対数低下をもたらす可能性である。

このため、できるだけ患者負担を和らげるやり方での口腔内病変、それ由来漿液採取法を考え、「唾液の採取」を着想し、その有効性を検討することを目的とした。基礎科学的視点からは採取した唾液中に梅毒トレポネーマ DNA が検出された場合、それがもともと唾液中に存在したのか、採取時に病変に触れることで混入したのかの区別がつかないという問題があるが、当面の目的として QOL 低下をできるだけ避ける検体採取法検討、に目標を絞ることとした。

また、従前より検討調査を続けている梅毒疑い病変からの PCR による梅毒トレポネーマ DNA 検出とそれに続く多型遺伝子の PCR 産物解析による分子型別をこの課題の一部としても続行した。近年海外では梅毒症例数の増加とともにマクロライド耐性型梅毒トレポネーマの増加が報告されていることから、過去の検体の再解析を含めて、できるだけ多くのものについて 23S rRNA の遺伝子を解析し、年次ごとの耐性型梅毒トレポネーマの分布について情報を得ることを目的とした。

### B. 研究方法

従前より共同研究を行なっている医療機関からの疑い検体、及び梅毒トレポネーマ DNA 検出 PCR 試行の個別相談機関からのそれら、口腔病変がある場合にはともに採取可能であれば唾液サンプルも同時採取を依頼し、それらを材料とした。

基本的に梅毒トレポネーマ DNA 検出 PCR は(1,2)の方法に、梅毒トレポネーマ多型遺伝子の PCR 産物を用いた分子型別は(3)の方法に、23S rRNA のマクロライド耐性変異解析は(4)の方法にそれぞれ従った。

なお、後述するように今次期間内においては入手できた唾液サンプルがセットとなった口腔病変検体が 1 検体のみであり病変そのもの、唾液とも梅毒トレポネーマ DNA 陰性であったため、実際の検討には至らなかった。

そこで、他の検体種を用いての DNA 抽出法の最適化を試行した。詳細は研究結果の項に記述する。

#### (倫理面への配慮)

入手した検体は全て連結不可能匿名化済みでヒト由来材料を用いた研究に関する倫理審査対象とはならない。ただし、検体採取に際して現在は実施頻度が低下しているのが現状である病変部擦過を行う場合があり、これが QOL 低下に繋がる可能性を鑑み、担当医師が研究の内容を説明、病変検体提供の患者同意書が得られた場合のみ採取をお願いすることは最低のルールとして維持している。

### C. 研究結果

従前より行なってきたおり、今次研究期間においても継続、時系列変化を注視している梅毒トレポネーマ DNA 検出 PCR、陽性検体での分子型別、23S rRNA 解析に関して、まずサマライズする。

2017 年 3 月 10 日現在、2012 年以来梅毒トレポネーマ DNA 陽性検体 110 例中 71 例で分子型別成功となった。世界的に最頻型の 14d/f が日本でも優勢で 46 例を占める。11o/c と 14d/c が各 4 例でそれに次ぐ。これまで国際誌に 1 例しか報告の無かった 11o/c が 4 例あることは日本の流行型サーキュレーションを特徴づけるものとなる可能性があり、今後とも注視する必要がある。以下、14e/f が 3 例、10b/a、14b/c、14d/g

が各 2 例、他に 8 種の単一例が検出された。型別成功 71 例につき 23S rRNA マクロライド耐性型変異検出を試行し、39 例について成功した。全体の分布は 29 例が野生型、10 例が耐性型であり、2012 年～2017 年 3 月上旬の総耐性率は単純には約 1/4、25.6%となった。

しかし、耐性率及び耐性変異を有する梅毒トレポネーマの分子型についてその分布を年次ごとにまとめるとその時系列変化には際立った特徴が認められた。簡単のため、便宜的に 2012 年～2015 年までと 2016 年～2017 年 3 月との 2 期に分けて比較記述する。

2012 年～2015 年は分子型別、23S rRNA 変異検出とも成功した 27 例中 3 例 (11.1%) が耐性型、これに対して 2016 年～2017 年 3 月は同上 12 例中 7 例 (58.3%) と急激に上昇した。

さらに耐性変異を持つ梅毒トレポネーマの分子型にも 2012 年～2015 年と 2016 年～2017 年 3 月とでは際立った違いが観察できた。

すなわち、2012 年～2015 年の 3 例は 11o/c が 1 例と 14d/g が 2 例であった (我々が検出した 2 例の 14d/g は両方ともに耐性型であったことになる)。11o/c は世界的に検出例が少なくこの型の耐性保有の原因、意義に関しては今後の検討を待つ必要がある。分子型 14d/g は米シアトル市域で 2005 年以降、それまで主流であった 14d/f 型を凌駕し、またマクロライド耐性変異保有と強くリンクすることが報告されている型であり(5)、その出現と拡散はロンドンにおいても確認されている(6)。

我々の検出した 2 例の分子型 14d/g の耐性型はこの海外で成立したクローナルな株が輸入された事例と捉えるのが妥当である。

2016 年～2017 年 3 月の 7 例の耐性型は 1 例の例外(10d/f)を除いて他の 6 例は全て 14d/f であった。また、注目すべきことに、この期間においては型別、23S rRNA 変異検出とも成功した 14d/f は全て耐性型であり、野生型の検出は皆無であった。(上述 11o/c 同様 10d/f も世界的に検出例が少なく、その耐性保持の意義は今後の検討を待つ必要が有る。)

このように、2016 年以降、分子型別最頻型の 14d/f と強いリンクを有する急激な耐性型梅毒トレポネーマ増加が国内で進行していることが判明した。

唾液検体を用いての梅毒トレポネーマ DNA 検出法開発の検討に関しては、今次期間内においては入手できた唾液サンプルがセットとなった口腔病変検体が 1 検体のみであり病変そのもの、唾液とも梅毒トレポネーマ DNA 陰性であったため、実際の検討には至らなかった。

そこで、他の検体種を用いての DNA 抽出法の最適化を試行した。

これには以下の背景がある。すなわち、従来我々は病変由来漿液の綿棒スワブの場合、その TE バッファーでの懸濁液をそのまま梅毒トレポネーマ PCR の鋳型としてきた。この検体種では DNA 総量が少ないものの検体中の PCR 反応阻害要因となる物質も少ないと考えられ、実際に加熱処理上清やそのエタノール沈殿サンプルを使用するより懸濁液を直接使用する方が PCR 産物のバンドが強くなることを当初いくつかの検体で経験したこ

とによる。

これに対して、他の検体、すなわち、血液、血清、鼻汁、髄液や病変組織肉片では PCR 反応阻害要因となる夾雑物が多く含まれると考えられることから、検体から Qiagen 製の DNeasy Blood & Tissue Kit を用いて、DNA 精製を行い、それを PCR 反応の鋳型としてきた。この際、プロトコルはこの Kit の推奨に準じて、最終抽出バッファー量 100  $\mu$ l で行ってきた。この条件は「DNA の回収率と DNA の回収総量」が最良となる事を企図したプロトコルである。

しかし、今後検査対象とする唾液は上に挙げた血液、血清、鼻汁、髄液や病変組織肉片以上に、特に蛋白質性の阻害夾雑物が多いと考えられる上に、目的とする DNA 量は極めて微量であると考えなければならない。このような条件では検出 PCR での感度を可能な限り向上させる上では、「DNA の回収率と DNA の回収総量」よりも「最終抽出サンプル中の DNA 濃度」を最大化することが必要である。

このため、通常のプロトコルを変更し、最終抽出バッファー量を減少させることを着想した。

この予備検討のため漿液スワブサンプルの 1 つを選び、DNeasy Blood & Tissue Kit で抽出バッファー量を 100  $\mu$ l とした場合と 20  $\mu$ l とした場合、および後者ではカラム抽出ボイドピークのずれを考慮してさらに同じカラムから計 3 回の 20  $\mu$ l 抽出物それぞれを回収し、それぞれの DNA 濃度を比較した。なお、20  $\mu$ l よりさらに最終抽出バッファー量を減らすとカラムデッドボリュームが大きくなり、実際の回収サンプル量が場合によっては 5  $\mu$ l 未満となるためこれ以上の減量は断念した。

結果はこの検体では 100  $\mu$ l 抽出、20  $\mu$ l 抽出 1 回目、20  $\mu$ l 抽出 2 回目、20  $\mu$ l 抽出 3 回目の順に、サンプル DNA 濃度がそれぞれ 4.1 ng/ $\mu$ l、7.9 ng/ $\mu$ l、0.2 ng/ $\mu$ l、検出限界未満であった。

以上より最終抽出は 20 ng/ $\mu$ l の 1 回目を使用することが最善と判断した。

今後、最初に入手される唾液検体で同様の予備検討を行った後、最終的に唾液検体 DNA 抽出プロトコルを固定し、実際の PCR での検出試行へと進む事を予定している。

#### D. 考察

既述のように、今次期間中には「梅毒トレポネーマ DNA 陽性の口腔検体と同時採取の唾液検体」が 1 例も入手できなかったため、結果の項に記したような予備検討を行うに留まった。今後そのような検体が入手できた際に再度、現時点での予備的

プロトコルでの DNA 抽出法の有効性を確認する必要がある。また、今次期間中に気づいたことで、検体を送付していただく協力医療機関としては、疑い口腔検体を採取する場合に唾液採取まで気が回らないケースが多いことが判明したため、この場合の同時採取願いを折に触れ繰り返す必要がある事を認識した。

従前より継続してきている梅毒トレポネーマ DNA 検出、分子型別を続行し、近年のか海外でのマクロライド耐性型梅毒トレポネーマ増加報告に鑑み過去検体の再検討を含め 23S rRNA 解析を行った結果、国内では 2016 年から分子型 14d/f と強くリンクして耐性型が急激に増加している実態が明らかになった。

14d/f は世界的にも最頻型である。上記観察結果を説明する要因として、海外で成立した 14d/f 型耐性株が日本に 2016 年初頭ころに上陸した可能性と国内にすでにサーキュレートしていた 14d/f 型がマクロライド耐性変異を獲得した可能性とがある。

日本の性感染症治療ガイドラインは過去に梅毒に対するアジスロマイシン治療を認可したことはない。しかし、このガイドラインへの国内臨床医のコンプライアンスの実態、それと認識せず、他の病原体への治療と認識しての結果的な梅毒トレポネーマ感染者へのアジスロマイシン等マクロライド系薬剤の投与機会頻度の実態は不明である。

アジスロマイシン不使用の性感染症治療ガイドライン遵守の再アナウンス、及び、上記のコンプライアンスの実態調査が必要と考えられる。

#### E. 結論

擬似サンプルを用いて唾液サンプルからの DNA 抽出法の最適化を検討し、暫定的にプロトコルを決定した。今後真の唾液サンプルを用いた本プロトコルの有効性検討、確認が必要である。

梅毒トレポネーマ分子型別とマクロライド耐性変異の分布調査を引き続き行い、2012~2015 年に比較して 2016 年以降、最頻型 14d/f と強いリンクを持ってマクロライド耐性梅毒トレポネーマが急激に増加している実態を明らかにした。

#### 引用文献：

(1) Orle KA, Gates CA, Martin DH, et al. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and Herpes Simplex Virus type 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol.* 1996; 34:49-54.

(2) Liu H, Rodes B, Chen C-Y, et al. New tests for Syphilis: rational design of a PCR method for detection of *Treponema pallidum* in clinical specimens using unique regions of the DNA polymerase I gene. *J Clin Microbiol.* 2001; 39:1941-1946.

(3) Marra CM, Sahi SK, Tantaló LC, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. *J Infect Dis.* 2010; 202:1380-1388.

(4) Lukehart SA, Godornes C, Molini BJ, et al. Macrolide resistance in *Treponema pallidum* in the United States and Ireland. *N Engl J Med.* 2004, 351:154-158.

(5) Grimes M, Sahi SK, Godornes BC, et al. Two mutations associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum*: increasing prevalence and correlation with molecular strain type in Seattle, Washington. *Sex Transm Dis.* 2012; 39:954-958.

(6) Tipple C, McClure MO, and Taylor GP. High prevalence of macrolide resistant *Treponema pallidum* strains in a London centre. *Sex Transm Infect.* 2011; 87:486-488.

#### F. 健康危険情報

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) N. Itoh, H. Katano, S. Nakayama, H. Kurai. Gastric syphilis. *Internal Medicine.* 2017. (accepted, in press)

##### 2. 学会発表

1) Ichiro Itoda, Jutaro Hata, Kayoko Hayakawa, Satoshi Kutsuna, Yasuyuki Kato, Shu-ichi Nakayama, Tomoko Morita-Ishihara, Ken Shimuta, Makoto Ohnishi. Clinical features of syphilis patients detected by polymerase chain reaction and molecular typing of *Treponema pallidum* at an urban community-based STI clinic in Japan. 19th IUSTI-AP, Dec 2016, Okayama.

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### 1. 特許取得

##### 2. 実用新案登録

##### 3. その他