

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

2 年間の研究期間中、1 年目は唾液検体を得ることができなかったため、予備的検討として、検体からできるだけ 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。今期 H29 年度は、当初想定していた口腔病変とペアになった唾液検体収集が予想以上に困難なことが判明し、その条件を外して唾液検体を収集しての検討を行い、PCR 陽性例を複数得ることができた。今後、今回入手できた物を含め患者の病態、口腔病変状態の情報をリンクした検体集団でのデータ再収集を行い、唾液での PCR 陽性期待率に関する検討が必要である。

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（日本では推奨されていない）が行われるケースで問題となる 23S rRNA のマクロライド耐性型変異の検出を時系列的に行い、2016 年以降国内でも耐性型梅毒トレポネーマが急激に増加し、その主たる部分は最頻分子型 14d/f での増加によるものである状況が今年度も依然継続している実態を確認した。

また、精緻な分子疫学解析法確立の一環として、少量の DNA しか含まない病変漿液スワブの TE 懸濁物からの総体 DNA の試験管内均一増幅後、梅毒トレポネーマゲノム情報を持つキャプチャー分子で検体内梅毒トレポネーマ DNA を選択濃縮し、そのゲノム解析を行う方法を試行、検討し、いくつかの検体はゲノム情報を獲得できた。

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有り、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による病変不特定のままの病原体検出による確定診断率向上の可能性」の検討、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

子型別をこの研究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。

また分子型別解析の究極の形式と位置付けられる各検体での全ゲノム解析法のプロトコル確定、いくつかの検体での実際のゲノム情報採集とを行い、現在日本でサーキュレートしている梅毒トレポネーマ株群の分類及びそれらの間の遺伝的距離関係について部分的であっても情報を抽出することを目指した。

## 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、H28 年度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ず、他の検体種を用いての DNA 抽出法の最適化を先行試行しておいた。H29 年度には唾液検体収集法を見直し、血清学的に梅毒と診断された患者の唾液を網羅的に収集していただける病院 1 箇所を設定できたため、口腔病変、病態等の情報は無いながら、39 例の唾液検体が得られ、それらについて梅毒トレポネーマ DNA 検出 PCR (1, 2)を試行し、陽性判定例が得られるか検討した。

また、今年度においては、2014 年以降国内でサーキュレートする *Treponema pallidum* のゲノム解析と国外株との比較目的で、微量の *Treponema pallidum* DNA しか含まない検体からの DNA をも解析対象とできるプロトコル試行を兼ねて解析を行なった。分子型別が成功したもの、という条件を満たした検体を選択し、Genomi-Phi kit (GE Health Care) という検体内 DNA を均一に増幅できるキットで処理した増幅後 DNA を Agilent Sure Select Target Enrichment system (Agilent) という目的生物ゲノム情報を持つキャプチャー分子で濃縮精製した後に次世代イルミナシーケンサーで解析を行なった。

この際、Genomi-Phi kit、及び Sure Select Target Enrichment system、それぞれの試薬キットの指定するプロトコルに従って作業工程を進めたが、Genomi-Phi kit の指定する出発 DNA 材料の濃度に達していない場合でも DNA 量のみ厳守して DNA 均一増幅を行い、次いで増幅サンプルが Agilent Sure Select Target Enrichment system が指定する出発材料の DNA 濃度に達していればキャプチャーでの濃縮精製へ進んだ。解析は Mi-seq 600 試薬により次世代イルミナシーケンサーで行い、*Treponema pallidum* Strain Nichols のゲノム配列を reference とし、ゲノムカバー率 90 %以上で重複リード深度が 10 以上となった検体につき解析データを採用し、系統樹と Minimum spanning tree を作成した。

## (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、まずまとめて記述する。2018 年 3 月 16 日現在の、2012 年以來梅毒トレポネーマ DNA 陽性検体 208 例での全体のまとめについては複数年度報告書に記述する。

H29 年度では梅毒トレポネーマ DNA 陽性検体 96 例中 69 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 49 例(71.0%)を占める。14d/g、14j/f が各 3 例、10b/a、14l/f、14p/f が各 2 例でそれに次ぐ。他に 8 種類の単一例が検出された。

梅毒トレポネーマ DNA 陽性 96 例につき 23S rRNA マクロライド耐性型変異検出を試行し、74 例について成功した。

全体の分布は 8 例が野生型、66 例が耐性型であり、H29 年度総耐性率は 89.2%で、2012 年～2018 年 3 月前半の総耐性率約 67% (複数年度報告書)を上回り、耐性率上昇が継続している実態を把握した。耐性変異を有する梅毒トレポネーマの分子型、及び耐性率について H29 年度でのその分布をま

とめると、分子型別、23S rRNA 変異検出とも成功した 64 例中 58 例 (90.6%) が耐性型であった。これら 58 例の耐性型のうち 45 例、耐性総数の 77.6%までを分子型 14d/f が占める。複数年度報告書に記した全期間トータルでの総耐性率は 67%、最頻分子型 14d/f での耐性率は 69.4%なので、これらについて H29 年度もさらにこれらの上昇進行していることがわかった。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傾向が H28 年度よりさらに強まった。複数年度報告にまとめて記述したように H28～H29 年度に見られた少数の感受性型はその全てが MSM 患者由来であることは特筆すべき特徴的な分布状態である。

唾液検体を用いての梅毒トレポネーマ DNA 検出方開発の検討に関しては、H28 年度に固定したことは既述の通りである。

なお、このプロトコルは後述するゲノム解析の出発材料調製のステップにも流用した。

H29 年度には最終的に固定した唾液検体 DNA 抽出プロトコルにより、実際の PCR での検出試行を行った

口腔病変と唾液とのペア検体が 3 組得られ、うち 2 組で病変、唾液ともで PCR 陽性、1 組で病変、唾液ともで PCR 陰性の結果であった。これらについては病変と唾液とで検査結果が一致するという結果であったが絶対例数が少なすぎるため評価は暫定的であった。期待以上に上記のようなペア検体が入手できにくいことが判明したため、病変とのペアにこだわらず、梅毒と診断された患者の唾液サンプルを試行的に収集し、PCR に供するトライアルを施行した。

血清学的に梅毒と診断された患者の唾液を網羅的に収集していただける病院 1 箇所を設定できたため、口腔病変、病態等の情報が付加されない形ではあったが、39 例の唾液検体を得た。ほとんどの例で治療現状情報は付加されており、治療前 13、治療中 8、治療後 15、不明 3 という分布であった。全体で 15 例 (15/39=38.5%) での PCR 陽性判定ができた。これらの唾液採取時の治療現状は治療前 8、治療中 3、治療後 3、不明 1 であった。治療前検体で (8/13) =61.5%という比較的良い陽性判定率が見られた。治療中 (3/8) =37.5%と治療後では (3/15)=20.0%と陽性判定率は低下し、病原体またはその DNA 検出による診断には治療前検体を使う重要性が再確認できた。

重要な制限要因としてこの検出率については検討にエンロールした検体、患者の病態等での選択バイアスが無かったかが不明なため、現時点で全ての病態の梅毒での唾液を用いた PCR 法

の有用性は暫定的であり、今後規模を増やしての再検討と再評価が必要である。

しかし、トライアルとして行ったこのプロジェクトでは、唾液サンプルで比較的良い感度での梅毒トレポネーマ陽性判定がなされ、病原体ベース検出に期待が持てる予備的結果であった。

次いで、現在国内でサーキュレートしている梅毒トレポネーマの全ゲノムスケール解析を行い、国内株間、及びそれらと海外株との差異、類縁関係を総体的に把握するため、方法の項に述べた方法を用いて、培養を要しない方法での梅毒トレポネーマ DNA 増幅と選択濃縮を行い、次世代イルミナシーケンサーでゲノム配列を取得し、株間比較を MEGA7 解析ソフトで行った。

日本株の材料として、分子型別、23S rRNA 解析とも成功したものから、由来患者の性別、性的嗜好をできるだけ均衡化させることも目指し最終的に 39 検体を選んで実際の実験に供した。

次世代シーケンサーでのデータ取得後に *Treponema pallidum* Strain Nichols のゲノム配列を reference とし、ゲノムカバー率 90%以上で重複リード深度が 10 以上となった検体は 16 例得られた。この 16 例と、先行する海外株集団でのゲノム解析報告 (7) で使用され、解析 1 次データにアクセス可能な株のうち上述と同じ基準を満たした 29 株、計 45 株間での連関を解析し、系統樹及び、相互の塩基置換関係が把握しやすい Minimum Spanning Tree を作成した。Minimum Spanning Tree を図 1 として示す。図 1 から読み取れることとして、日本の異性間性的接触で感染した男性、及び女性由来株は SS14 グループに属する比較的均一な遺伝的集団であることと考えられた。しかしながら、国外で得られたゲノムデータと一致するものはなかった。一方、ゲノム解析で区別できない同一クローンが異性間性的接触で感染したと考えられる男性および女性から得られていた。同様に東京および大阪で取得された検体に、同一クローンが存在していた。これに対して、日本 MSM 由来株は図 1 の複数のエリアに散在し、比較的多様性に富む集団であった。

#### D. 考察

既述のように、H28 年度に擬似検体を用いての唾液検体からの DNA 抽出法確立を先行していた。「口腔検体と同時採取の唾液検体」を入手することが予想外に困難であったため、H29 年度は「口腔検

体とのペア」に拘らずに唾液を収集する軌道修正を実施し、治療前唾液検体で (8/13) =61.5%という比較的良い陽性判定率が得られたが、今回検討にエンロールした検体、患者の病態等での選択バイアスがなかったかどうか不明なため、この陽性判定率については、今後それらの情報を同時取得しながらの検体収集を行う必要があると判断した。また、口腔検体とペアでの検体収集が進まなかった原因はそのような検体が少ないというよりも診察現場での失念が多い印象が有ったため、繰り返しのアナウンスによっても改善が期待できると考える。

従前より継続し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て、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有る。

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。

2016 年以降、全体として非常に高いマクロライド耐性率が明らかになったが、その中で MSM 由来株での耐性率及び 14d/f 型の分布は異性間性的接触で感染したと考えられる男性、女性由来株のそれらと比べて比較的 low、ある程度多様性のある集団であることが示された。

この日本の MSM 由来株のある程度の多様性に関しては、ゲノム解析結果からも裏付けられた。これに対して、日本の異性間性的接触で感染したと考えられる男性、女性由来株は比較的均一で中国株集団に近縁な集団としてクラスターを形成することが判明した。

これらの結果は現在の国内の梅毒パンデミックに参画している梅毒トレポネーマは単一集団ではなく、複数の集団が同期的にサーキュレートしていることを強く示唆している。

## E. 結論

昨年度、唾液からの DNA 抽出法プロトコールを決定した。この方法に従い、真の唾液サンプルを用いた本プロトコールの有効性検討、確認を行い、比較的良い陽性判定率が得られた。予備的データとしては今後の有用性が期待できる。今次予備検討にエンロールした検体群の由来する患者の口腔病変状態を含む情報確認などでの再評価が必要である。

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。特に異性間性的接触で感染したと考えられる男性、女性由来検体では現在ほとんどが耐性である実態が判明した。

全ゲノム解析を試行し、国際的に現在拡散していると考えられている SS14 グループが国内の拡散でも主流であることが示された。これは特に異性間性的接触で感染したと考えられる男性および女性由来検体群で明確であり、これに対して MSM 由来株は比較的多様性を有する集団であること、現在国内では少なくともそれら 2 つの集団が同期サーキュレートしていることが強く示唆された。

## 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.
- (7) **Arora N, Schuenemann VJ, et al.** Origin of modern syphilis and emergence of a pandemic *Treponema pallidum* cluster. Nature Microbiol. 2016; 2: DOI:10.1038.

#### 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. **56**:1753.
2. Cerebral Syphilitic Gumma can arise within months of reinfection: a case of histologically proven *Treponema pallidum* Strain Type 14b/f infection with Human Immunodeficiency Virus positivity. (2018) Koizumi, Y., Watabe, T., Ota, Y., Nakayama, S., Asai, N., Hagihara, M., Yamagishi, Y., Suematsu, H., Tsuzuki, T., Takayasu M., Ohnishi, M., and Mikamo, H. **Sex Transm. Dis. Accepted.**

#### 2. 学会発表

1. 中山周一、金井瑞江、井戸田一朗、本郷偉元、亀岡 博、澤村正之、濱田 貴、錦 信吾、大西 真。国内における 2016 年からのマクロライド耐性型 *Treponema pallidum* の急激な増加。日本性感染症学会第 30 回学術大会 2017 年 12 月 札幌。
2. 金井瑞江、中山周一、李 謙一、志牟田 健、大西 真。近年本邦で流行する梅毒トレポネーマのゲノム解析法の検討。日本性感染症学会第 30 回学術大会 2017 年 12 月 札幌。
3. 梅毒患者の受診行動と診断経緯に関する検討。澤村正之、中山周一、錦 信吾、有馬雄三、大西 真。日本性感染症学会第 30 回学術大会 2017 年 12 月 札幌。

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

#### 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

図 1 A. ゲノム情報が得られた国内外(日本 16 株、海外 29 株) Minimum Spanning Tree による遺伝的連関図。株間の SNP 数を株間の連結実線に数字で付した。丸の大きさは同一ゲノム型を示す検体数によって異なる。基本的に同一ゲノム型を示すものは、2つの例外を除いて存在しなかった。紫色および黄色で示した大きな丸は 4 検体が同一ゲノム型を示した。東アジアの検体 (紫色、黄色) のうち、黄色が今回の研究で明らかにされた、国内検体から得られたデータとなる。

## Treponema pallidum ゲノム解析

● アメリカ大陸 ● ヨーロッパ ● 東アジア

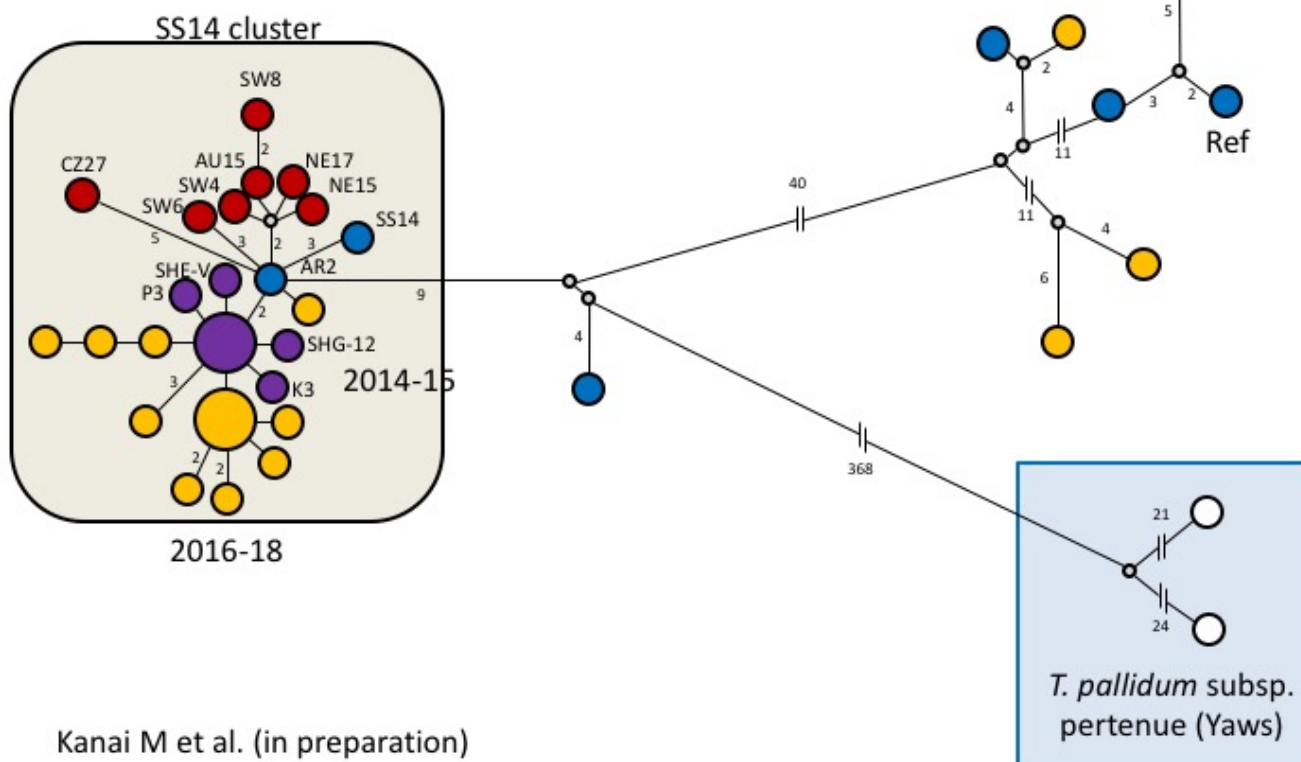


図 1B. 国内検体から得られら 16 株の由来別（性別）  
国内検体から得られたデータの患者の性別を下の図に示した。

## Treponema pallidum ゲノム解析

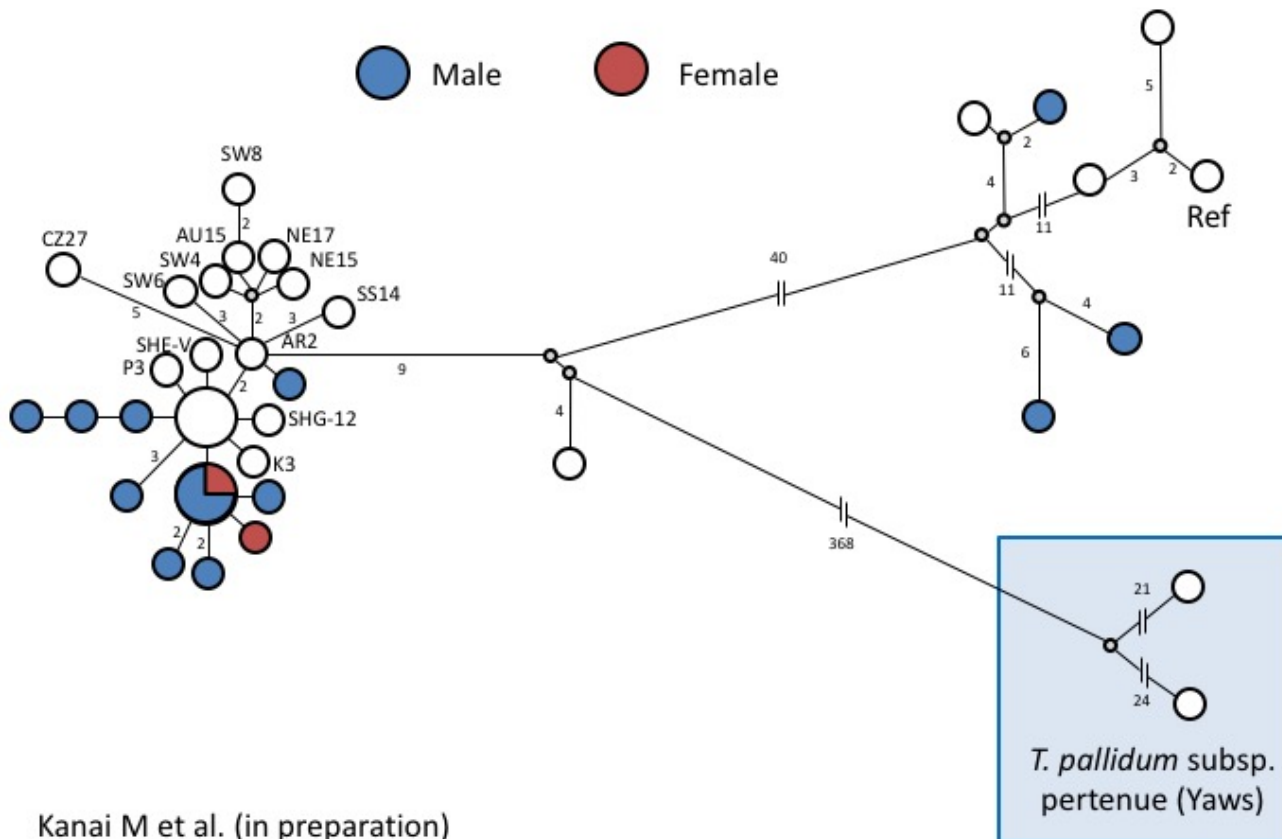






図 1D. 国内検体から得られら 16 株の由来別 (同性間・異性間)

国内検体から得られたデータの患者の Sex Orientation との関連を下の図に示した。同性間性的接触による感染事例から得られたゲノム型を黄色、異性感性的接触による感染事例から得られたゲノムがたは緑色で示した。

## Treponema pallidum ゲノム解析

