

梅毒トレポネーマの核酸検出法及び核酸型別法

三宅 啓文^a

Treponema pallidum subsp. *pallidum* (梅毒トレポネーマ) を起因菌とする梅毒は、近年、東京都を含む全国で報告数の顕著な増加がみられている。従来より梅毒の診断は血清を用いた抗体検査が行われてきた。一方で、陽性であっても被験者から梅毒菌体を補足するのは難しく、核酸検出法を含めた抗原検査法は一般的ではなかった。しかしながら、梅毒の届出基準には検査方法としてPCR検査等による病原体の検出が挙げられており、有症状の初期梅毒の診断において有効となる場合がある。また、梅毒トレポネーマの核酸型別法からは、特定の地域での感染拡大の主流となっている型、集団間の関係性や伝播の様態や、薬剤耐性変異の有無といった疫学的な知見が得られることが知られている。本報では、梅毒トレポネーマの核酸検出法の実験室の手法や市販試薬及び核酸型別法についての概要を紹介する。

キーワード：梅毒, *Treponema pallidum*, 核酸検出法, 核酸型別法, ECDCT, SBMT

はじめに

梅毒は、*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (梅毒トレポネーマ) を起因菌とする代表的な性感染症であり、東京都では性感染症に関する特定感染症予防指針¹⁾に基づき対策を行っている。また感染症法における5類感染症であり、活動性梅毒と診断しかつ届出基準に合致する場合は、医療機関は7日以内に最寄りの保健所に発生届を提出することが義務付けられている²⁾。

梅毒の届出数は2015年以降、東京都³⁾、全国⁴⁾ともに顕著な増加がみられており、とりわけ、女性の届出数の増

加の伸びが大きい(図1)。そのため、妊娠前あるいは妊娠中の梅毒感染による先天梅毒の増加が危惧されている⁵⁾。妊婦が梅毒に感染すると、母親だけでなく胎盤を通じて胎児も感染し、死産や早産を引き起こしたり、生まれてくる子どもの神経や骨などに異常をきたすことがあるため、特に感染拡大防止対策が求められている。

梅毒は特異な臨床経過を示すことが特徴的^{6,7)}であり、粘膜や皮膚の微細な傷から侵入した梅毒トレポネーマは血行性およびリンパ行性に全身に移行し様々な組織、臓器に急性・慢性の症状を引き起こすことが知られている。

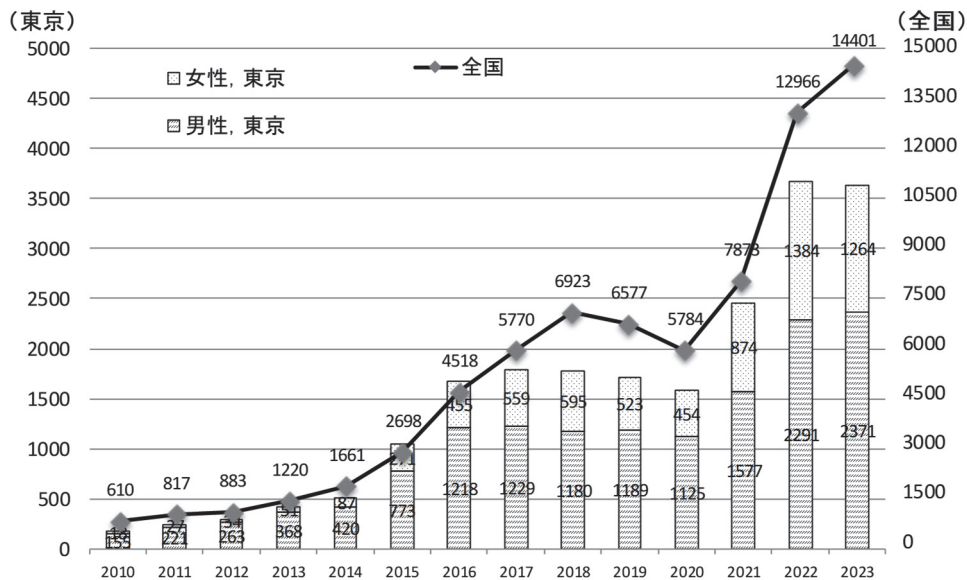


図1. 梅毒届出数年次推移(東京都と全国)

^a 東京都健康安全研究センター微生物部食品微生物研究科
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

性器感染の場合、一般的には初期症状として感染後約2週間後に感染部位の近くに初期硬結や潰瘍病変を生じたり、鼠径部のリンパ節の腫れを引き起こし、自然に消失後バラ疹と呼ばれる特徴的な発疹を全身に生じるが特に痛みや痒みや発熱といった自覚症状を引き起こすことが多く、また初期症状が無症状なことも少なくない。この、自覚症状が乏しいために他者への感染源となる前に診断・治療を行うことが、必ずしも容易ではない点が、梅毒の感染拡大防止対策のうえで障壁となっていると考えられる。また、この他にも多様な臨床経過をたどることが少なくなく、また感染部位も性器だけでなく咽頭や直腸などによりそれら感染部位に様々な臨床症状を呈することも少なくない疾患である⁹⁾。なお、感染防御のための免疫を獲得できないため、治療後の再感染もありうる点にも注意しなければならない。

梅毒トレポネーマは、通常の培養法では培養ができないため、一般的な細菌検査の流れのように、臨床検体から分離培養を行い、型別や薬剤感受性について決定することができない。そのため、梅毒感染の検査は、抗原抗体反応による血清検査が一般的に行われている。カルジオリピン（非特異的だが、治療に反応が追従するため活動性の指標となる）に対する抗体を捉える検査法であるRPR (Rapid Plasma Reagin)と、TP抗原（梅毒トレポネーマに特異的だが、新規感染と既往との区別ができないため、活動性の指標にはならない）に対する抗体を捉える検査法のTPLA法(Treponema pallidum Latex Agglutination,

TPHA法 (Treponema pallidum Hamagglutination) , イムノクロマト法などを組み合わせて検査を行う。一方、梅毒の核酸検査を行うためには、梅毒トレポネーマを捉えるために初期硬結や潰瘍病変といった症状が発生している時期に検査検体を採取する必要があり、それ以外の時期において尿や血液や膣擦過物といった臨床検体から検査で陽性となるのに必要な十分な数の梅毒トレポネーマを捉えることは困難である。しかし、抗体が検査で陽性となるまで十分に産生されるようになるまでには、感染が成立してから4週間程度を要し、感染直後の被験者では偽陰性となることから、感染初期の患者においては、病変部位から検出が可能な核酸検査法は有効と考えられる。

表1に示すように、医療機関が保健所に届出を提出する際の届出基準²⁾には、PCR検査が含まれている。本報では研究機関で用いられることの多い実験室的手法と、市販されている核酸検査試薬について紹介する。なお、PCR検査は現在のところ国立感染症研究所や一部の地方衛生研究所で試験的に行われているのみであり、また後述するように、市販されている核酸検出法の試薬も保険適応外であり、今後の普及が待たれる。

一方、近年世界各国の主に研究機関でPCR法による梅毒トレポネーマDNAの検出と型別解析が急速に普及してきている。核酸検出法で陽性の場合、次いで核酸型別解析を行うことでサブタイプの決定が可能となり、分子疫学解析に用いることのできる知見が得られる。本報では4種類の核酸型別法について紹介する。

表1. 梅毒発生届届出基準

届出基準

ア 患者（確定例）

医師は、（2）の臨床的特徴を有する者を診察した結果、症状や所見から梅毒が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、梅毒患者と診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を7日以内に行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

イ 無症状病原体保有者

医師は、診察した者が（2）の臨床的特徴を呈していないが、次の表の左下欄に掲げる検査方法により、抗体（1）カルジオリピンを16倍以上又はそれに相当する抗体価）を保有する者で抗原とする検査では無症状病原体保有者と見なされる者（陳旧性梅毒と見なされる者を除く。）を診断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を7日以内に行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

ウ 感染症死亡者の死体

医師は、（2）の臨床的特徴を有する死体を検察した結果、症状や所見から、梅毒が疑われ、かつ、次の表の左欄に掲げる検査方法により、梅毒により死亡したと判断した場合には、法第12条第1項の規定による届出を7日以内に行わなければならない。

この場合において、検査材料は、同欄に掲げる検査方法の区分ごとに、それぞれ同表の右欄に定めるもののいずれかを用いること。

検査方法	検査材料
染色法またはPCR検査等による病原体の検出	病変（初期硬結、硬性下疳、扁平コンジローマ、粘膜疹）
・次の1)、2)の両方の抗体検査による血清抗体の検出	血清
1) カルジオリピンを抗原とする検査	
例) RPRカードテスト、凝集法、自動化法 等	
2) <i>T. pallidum</i> を抗原とする検査	
例) TPLA法、TPPA法、CLIA法、FTA-ABS法 等	

(厚生労働省HPより転載)

梅毒トレポネーマの核酸検出法

1. 実験室的手法

梅毒の核酸検出法として、一般的に用いられているのは、細菌のDNA polymerase遺伝子内の菌種特異的な領域 *polA* (DNA polymerase I遺伝子)⁸⁾と、主要特異抗原とされる産物のうち、47kダルトンの膜タンパクをコードする遺伝子を *T. pallidum* 特異配列TpN47遺伝子⁹⁾をそれぞれターゲットとする方法である。これらのターゲット部位に設計したプライマーを用いて臨床検体からの核酸抽出液から特異的断片の増幅を試み、両方あるいはどちらかで増幅がみられれば梅毒陽性とする。

表2にそれぞれのPCR増幅に使用するプライマーと増幅産物のサイズを示す。

なお、特異性については、*polA*の文献⁸⁾はspecies *pallidum* まで、TpN47の文献⁹⁾はsubspecies *pallidum* までの特異性が調べられている。PCR条件は、98°C 2 min-(98°C 10 sec - 68°C 30 sec) x 45 サイクル - 68°C 10min 後、3% Agaroseを用いて100 V, 30 min泳動し、*polA*では377bpバンドを、TpN47では261bpのバンドを確認する。

Palmerら¹⁰⁾は初期梅毒の診断に対する核酸検出法の有用性を報告し、TpN47をターゲットとしたプライマーセットKO3AとKO4を用いて95名のMSMやHIV陽性者を含む被験者からPCR増幅を試み、臨床経過や血清検査と比較した結果、感度94.7%、特異性98.6%としている。国内例においても、RPRが陰性を示した第一期梅毒の早期診断に有用であったとする報告¹¹⁾やPCR法で陽性と診断された未治療患者の23%がTPHA, RPRともに陰性であったという報告¹²⁾がある。

なお、病変部位から組織液を採み出すなど、検体採取を適切に行わなければ、核酸検出法は偽陰性を示す可能

性があることに留意する必要がある^{13,14)}。

また、Leslieら¹⁵⁾は*polA*遺伝子をターゲットとしたリアルタイムPCR法について報告している。*T. pallidum*の*polA*遺伝子内の67bp配列をターゲットとしている。表3にプライマーとプローブの配列を示す。この配列(ヌクレオチド2001~2067) (GenBankアクセッション番号TPU57757)は、Liuら⁸⁾の報告のプライマーF1およびR1によって増幅される領域内にあり、この67bpフラグメントのBLAST検索は*T. pallidum polA*遺伝子を除いて、GenBankデータベースに類似の配列がないことを示している。検出限界については、Ct値が38.4で反応あたり1.75個のターゲットコピー数としている。

2. 梅毒トレポネーマの核酸検出が可能な市販検査試薬

いずれも研究用試薬(RUO)であり、保険適用はされていない。また、ターゲット領域については各製品とも非公開である(表4)。

①GeneSoC 梅毒トレポネーマ検出キット(杏林製薬株式会社)

本製品はマイクロ流路型遺伝子解析装置「GeneSoC mini」またはマイクロ流路型リアルタイムPCR装置「GeneSoC mini R」を用いて、ターゲットとする梅毒トレポネーマの核酸を約16分で検出することができ、核酸増幅検査が短時間で実施可能となる。

②ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット(島津製作所)

チューブ内に酵素等を固定化しており、検体と反応液を混合して分注するだけでアッセイが可能となる。汎用のPCR用8連チューブであり、汎用の96穴リアルタイムPCR装置を使用することができる。

表2. *polA*, TpN47領域増幅による同定法

	Target	Primer	Sequence	Product Length (bp)
<i>polA</i>	DNA polymerase I gene	F1	TGCGCGTGTGCGAATGGTGTGGTC	377
		R1	CACAGTGCTCAAAAACGCCTGCACG	
TpN47	47-kDa membrane immunogen gene	KO3A	GAAGTTTGTCCAGTTGCGGTT	261
		KO4	CAGAGCCATCAGCCCTTTTCA	

Liuらの報告⁸⁾, Orleらの報告⁹⁾

表3. *polA*領域のリアルタイムPCR

	Target	Primer/Probe	Sequence	Product Length (bp)
<i>polA</i> リアルタイムPCR	DNA polymerase I gene	SyphTF primer	AGG ATC GCC CAT ATG TCC AA	67
		SyphTR primer	GTG AGC GTC TCA TCA TTC CAA A	
		MGB probe SyphTP	ATG CAC CAG CTT CGA-MGB	

Leslieらの報告¹⁵⁾

表4. 梅毒トレポネーマ同定用市販試薬

製品名	製造者	検出原理	使用機器
GeneSoC 梅毒トレポネーマ検出キット	杏林製薬	マイクロ流路型リアルタイム PCR	専用機器
ヘルペス・梅毒・トキソプラズマ症 病原体検出キット	島津製作所	リアルタイムPCR	汎用機器
シングルプレックスキット/シングルプレックス qPCRキット トレポネーマ・パリダム	フィルジェン (販売), Primerdesign社/YouSeq社 (製造)	リアルタイムPCR	汎用機器

③シングルプレックスキット/シングルプレックス qPCR キット トレポネーマ・パリダム (販売: フィルジェン株式会社, 製造: Primerdesign 社/Youseq 社)

一般的なリアルタイムPCRの装置で使用可能で, 同定用と定量用の二種類が発売されている。

梅毒トレポネーマの核酸型別法

1. Enhanced Centers for Disease Control and Prevention-Typing (ECDCT) 法

Pillayら¹⁶⁾が報告した*arp*遺伝子における60bpのリピート数の測定 (variable number tandem repeat, VNTR) と *tpREGJ*遺伝子における制限酵素切断パターンの解析 (restriction fragment length polymorphism, RFLP) によるタイピングを組み合わせて梅毒トレポネーマの型別を決定する方法に加え, Marra ら¹⁷⁾の報告に基づいて*tp0548*遺伝子のシーケンス解析の結果から得られたタイピングを組み合わせて3種類の手法から遺伝子型を決定する方法をEnhanced Centers for Disease Control and Prevention-Typing (ECDCT) 法と称する。

ECDCT法は, 臨床検体から抽出したDNAを用いて, 3種の手法各々に対応したプライマーにより増幅したPCR産物についてリピート数の測定, 制限酵素切断パターン, シーケンス解析といった解析をそれぞれ行い, 各々の型を決定する。

ECDCT法における遺伝子型の標記法を例示すると, *arp*のリピート数が14, *tpREGJ*のRFLPパターンがd, *tp0548*の塩基配列パターンがfの場合, 「14d/f」となる。

以下にECDCTを構成する3つの手法を紹介する。また

表5に ECDCT法を構成する3種の手法のターゲットとプライマー配列を示す。

1) VNTRによるタイピング

arp (acidic repeat protein gene) 中のターゲット領域をPCR増幅し, 得られた増幅産物の60bpの反復数でタイピングを行う¹⁶⁾。PCR条件は, 98°C 2 min-(98°C 10 sec - 68°C 2 min) x 35サイクル - 68°C 10min 後, 2% Agaroseを用いて100 V, 50 min泳動し, バンドのサイズから6-21のコピー数を決定する。

2) RFLPによるタイピング

tp (Treponema pallidum repeat gene) *EGJ*遺伝子のターゲット領域をnested PCRにより増幅し, PCR productを精製した後に制限酵素 MseI で消化し, 3% Agarose21を用い, 100 V, 45 min泳動を行う¹⁶⁾。1st PCR条件は, 98°C 2 min-(98°C 10 sec - 68°C 2 min) x 45サイクル - 68°C 10min であり, 2nd PCR条件は, 98°C 2 min-(98°C 10 sec - 68°C 2 min) x 35サイクル - 68°C 10min である。a~pのタイプの判定は, バンドのパターンにより決定する¹⁸⁾。

3) *tp0548*シーケンス解析によるタイピング

梅毒トレポネーマの外膜タンパクをコードする*tp0548*遺伝子のターゲット領域をPCR増幅し, 得られたPCR産物を増幅に使用したプライマーを使用してサンガー法シーケンス解析を行い, 図2に示す点変異や欠失のパターンからa~nのタイプに分類する¹⁹⁾。PCR条件は, 98°C 2 min-(98°C 10 sec - 68°C 30sec) x 45サイクル - 68°C 10min である。なお, 各タイプの配列の出典は次のとおりである。a-i: Senaら¹⁸⁾, j: Grangeら²⁰⁾, k,l: Grillováら²¹⁾, m,n: Readら²²⁾。

表5. ECDCT法を構成する3種の手法のターゲットとプライマー配列

	Target	Primer	Sequence	Product Length (bp)*
VNTR	<i>arp</i> (acidic repeat protein gene)	ARP-1 ARP-2	CAAGTCAGGACGGACTGTCC GGTATCACCTGGGGATGC	1,171
RFLP 1st PCR	<i>tpr</i> (Treponema pallidum repeat gene)EGJ	B1 A2	ACTGGCTCTGCCACACTTGA CTACCAGGAGAGAGGGTGACGC	2,196/2,178
RFLP 2nd PCR	<i>tpr</i> (Treponema pallidum repeat gene)EGJ	IP6 IP7	CAGGTTTTGCCGTTAAGC AATCAAGGGAGAATACCGTC	1,931/1,848
Sequencing Analysis	<i>tp0548</i> (outer-membrane protein gene)	S2 AS3	GGTCCCTATGATATCGTGTTCG CGTTTCGGTGTGTGAGTCAT	346

*Nichols strain (CP004010.2)

Pillayらの報告¹⁶⁾, Daiらの報告¹⁹⁾

type	1 3 0	2 1 0
a	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
b	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
c	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
d	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
e	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
f	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
g	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
h	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
i	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
j	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
k	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
l	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
m	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
n	CAGGCGGCAGTGGCCACAGCCGC	AGGGTCCAGTGGTTCCGGCAGTGATGGCAAGCACCCCGGCAAGGAACAGTTTCTCCAGTT
SS14	T G G	G A G A C
Nichols	- - -	C G A G G

Daiらの報告¹⁹⁾

図2. *tp0548*シーケンス解析による *T. pallidum* の型別

Kanaiら²³⁾は、国内の梅毒例についてECDCTによる分子タイピングとマクロライド耐性解析を行い、マクロライド耐性株14d/f型 (SS14様クレード) は、男性同性愛者 (MSM) の梅毒症例よりもheterosexualの梅毒症例で有意に多く見られ、heterosexual由来の株の79% (31/39) が14d/fであったのに対し、MSM由来の株では37% (7/19) であったとしている。さらに、83% (50/60) の株が 23S rRNA 遺伝子の A2058G 変異によるマクロライド耐性であった。さらに、heterosexual由来の株の 90% (35/39) がマクロライド耐性であったのに対し、MSM 由来の株では 58% (11/19) であったとしている。heterosexualの女性とheterosexualの男性は同様の分布を示した。タイピングの傾向とマクロライド耐性変異の保有率は、heterosexual症例と MSMの梅毒株間で大幅に異なり、2つのコミュニティの異なる疫学的プロファイルを示した。

2. Sequencing-based Molecular Typing (SBMT) 法

Flasarováら²⁴⁾が報告した*tp0136*遺伝子、*tp0548*遺伝子のターゲット領域をnested PCRにより増幅し (プライマー配列は後述のMLSTのものと同様、表5を参照)、シーケンス解析により各々の型を決定し、また23SrRNA遺伝子の2058番目および2059番目の塩基 (大腸菌を基準とした塩基番号) におけるA→Gへの変異によるマクロライド耐性を検出し、それらの組み合わせにより遺伝子型を決定する手法である。

Kojimaら²⁵⁾は、ECDCTとSBMTを用いて国内の梅毒患者の臨床検体を用いて型別を行った結果について報告している。2013年から2017年にかけて、大阪で梅毒が疑われる成人男性25名と成人女性11名 (うちMSM 7名) の臨床検体を用いた解析の結果、heterosexual患者の大多数 (男性66.7%, 女性90.9%) が14d/f-SSR8陽性であった。対照的に、MSM群で同定された遺伝子型は有意に異なっていた。さらに、梅毒トレポネマの近縁種であり、アフリカ西部のサヘル地域やボツワナ、ジンバブエ、アラビア半島の一部等の乾燥地域で見られる風土病性トレポネマ症Bejel²⁶⁾の原因菌として知られる *T. pallidum* subsp. *endemicum*が2名のMSM患者で同定された。これは両者の相同性が比較的低い*tp0548*遺伝子と*tp0856*遺伝子の塩基配列を用いて系統樹解析を行い、Bejelの病原体であることを見出した例である。一方、マクロライド感受性株またはNichols株は、MSM群と有意に関連していた。この報告も同様に異性愛者グループと MSM グループで異なる *T. pallidum* 株が循環していることを示唆しており、heterosexualと MSM 集団における梅毒の有病率の上昇には独立した要因が寄与している可能性があるかと推測されると述べている。

Kojimaらの調査の過程で見出された *T. pallidum* subsp. *endemicum*について、Kawahataら²⁷⁾は5例がMSMで検出された事例について報告し、*T. pallidum* subsp. *endemicum*がMSM によって日本国内で伝播していることを示唆した。

表6. MLSTターゲットとプライマー配列

Target	Primer	Sequence	Product Length (bp)*	Number of Types
tp0136	forward (1st)	AACCCGTTAGCGCCAACAT	1,789	38
	reverse (1st)	TCCCAGCTCAGCCGAATCTC		
	forward (2nd)	AGTGTCTTCTCGTCCGTTTC	1,206	
	reverse (2nd)	CACGTGGTGGTGTCAAACCT		
tp0548	forward (1st)	TGGGGCACTAAACCGGAAGA	1,567	81
	reverse (1st)	TACGGGCATTTGCGGATAGG	1,065	
	forward (2nd)	GCGGTCCCTATGATATCGTGT		
	reverse (2nd)	GAGCCACTTCAGCCCTACTG		
tp0705	forward (1st)	GGTCTATATGCAGCCCTTCTTC	1,181	21
	reverse (1st)	GCTTGAGAACGATACCGGATAC	803	
	forward (2nd)	TGCGGCTTATCCTGATGAATAG		
	reverse (2nd)	TATTCTGCGGCGTTGGATAG		

*Nichols strain (CP004010.2)

Grillováらの報告³²⁾

なお、これらの病原体は少なくとも99%のゲノムDNA配列の相同性を有していると報告され²⁸⁾、性病梅毒とBejelの臨床症状は類似しており特に初期段階では診断が困難であること²⁹⁾、また性病性梅毒の治療は、Bejelにも有効であることが報告されている。

3. Multilocus Sequence Typing (MLST) 法

MLST法は多くの細菌の型別に用いられている方法である³⁰⁾。各菌種間で多様性をもつ複数の遺伝子の一部をPCRで増幅後、シーケンズ解析を行い、得られた配列パターンの組み合わせによってSequence Type (ST)を決定する。STは国際的なデータベースを用いて決定することができ、また、同じSTが過去に報告されているかを調べることが可能である³¹⁾。

現在用いられている梅毒トレポネーマのMLST法は、Sequencing-based molecular typing (SBMT) 法で用いられたtp0136遺伝子、tp0548遺伝子およびtp0705遺伝子の3遺伝子をターゲットとしている³²⁾。表6に各々のプライマー配列を示す。Grillováら³²⁾は、MLST法による解析は梅毒トレポネーマのNichols, SS14の二系統を反映したものであるが、SBMTに比べてSS14株系統をより詳細に系統解析することが可能としている。

4. 次世代シーケンサーによる全ゲノム解析

全ゲノム解析は梅毒トレポネーマの全ゲノム1,138kbの塩基配列を決定し解析する、最も解像度の高い方法である。一般的に、細菌の全ゲノム解析には目的とする生物以外を由来とするDNA、とりわけヒト由来のコンタミネーションが分析の妨げになるため菌の分離が欠かせない。臨床検体からの *in vitro* 分離培養ができない梅毒トレポネーマは、全ゲノム解析の実施が立ち遅れてきた。しかし近年、臨床検体から直接、参照株全ゲノム情報を持つターゲットキャプチャー分子を用いた選択濃縮法を実施するTarget enrichment法が開発された (SureSelect Target Enrichment システム, Agilent Technologies)。具

体的には複数の生物由来の配列が混在した中からRNAベイトと呼ばれるキャプチャーRNAプローブとのハイブリダイゼーションにより、梅毒トレポネーマ由来の配列を特異的に回収する方法であり、これを用いることにより、梅毒に対しても多くのゲノムデータが得られるようになってきた³³⁻³⁵⁾。

Nishikiら³⁴⁾は、2014~2018年の国内検体を対象に全ゲノム解析を行い、データ取得ができた20例についてそのデータを元に系統樹を作成し、国内heterosexual患者由来検体が外国株では中国株と最も近縁であることを示した。さらに、Bayesian maximum credibility phylogenetic analysis を用いた計算³⁶⁾で、両国株群の仮想共通祖先株の存在時期は2007年と算出し、日本でインバウンドが盛んになってきた2015年よりもかなり以前に両国の株が分岐完了していると推定している。

他方では、2019~2020年の国内検体57例を含む世界各地の株196例の全ゲノム解析を行った結果³⁷⁾、国内のheterosexual患者由来検体の系統の均質性と中国株との近縁性、およびMSM由来の系統では多様性を持つことが示された。この解析で国内株のみに着目すると、大きく4系統「SS14-East Asia」、「SS14-Omega'」、「TEN」、「Nichols-C&E」に分類され、heterosexual患者由来はすべて「SS14-East Asia」に属することが明らかとなった。

Target enrichment法の登場により、現在のところ、高コスト、低成功率ではあるものの、梅毒トレポネーマの全ゲノム解析を臨床検体から実行することが可能になった。これにより個々の患者由来の詳細プロファイルと菌由来の詳細な分子疫学的情報の獲得と蓄積が行えるようになると考えられ、感染ルートの推定、それによるリスク集団の特定と感染拡大防止を目的とした介入といった行政対応へと繋げることが期待できる。

ま と め

核酸検出法は、有症状の初期梅毒の診断において有効となりうる。また、梅毒トレポネーマの核酸型別法から

は、特定の地域での感染拡大の主流となっている型、集団間の関係性や伝播の様態や、薬剤耐性変異の有無といった疫学的な知見が得られると考えられる。本報では、梅毒トレポネーマの核酸検出法の実験室の手法や市販試薬及び現在研究施設や学術機関で実施されている核酸型別法について概要を示した。核酸検出法は早期梅毒での梅毒トレポネーマ直接的な同定を可能とし、また核酸型別法から分子疫学的な情報が得られ、梅毒の感染拡大防止に有用と考えられる。

文 献

- 1) 性感染症に関する特定感染症予防指針，平成三十年一月十八日厚生労働省告示第十号
- 2) 感染症法に基づく医師及び獣医師の届出について「梅毒」厚生労働省 <https://www.mhlw.go.jp/bunya/kenkou/kekaku-kansenshou11/01-05-11.html> (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 3) 東京都感染症発生動向調査 東京都感染症情報センター：<https://survey.tmiph.metro.tokyo.lg.jp/epidinfo/epimenu.do> (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 4) IDWR感染症発生動向調査 感染症週報 国立感染症研究所 <https://www.niid.go.jp/niid/images/idwr/pdf/latest.pdf> (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 5) 感染症発生動向調査に基づく妊娠中の女性における梅毒の届出，2022～2023年 国立感染症研究所感染症疫学センター 2024年4月12日掲載 <https://www.niid.go.jp/niid/ja/syphilis-m-3/syphilis-idwrs/12628-syphilis-20240411.html> (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 6) 一般社団法人 日本性感染症学会：性感染症 診断・治療 ガイドライン 2020, 2020. 診断と治療社，東京。
- 7) 「梅毒診療の基本知識」日本性感染症学会 令和6年3月6日公開 https://jssti.jp/news_syphilis-medical_guide.html (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 8) Liu, H., Rodes, B., Chen, C. Y., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* **39**: 1941–1946, 2001.
- 9) Orle, K., Gates, C., Martin, D., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* **34**, 49–54, 1996.
- 10) Palmer, H., Higgins, S., Herring, A., *et al.*: *Sex Transm Infect.* **79**, 479–483, 2003.
- 11) 古林敬一，小島洋子，川畑拓也：日本性感染症学雑誌，**29**，141–142，2018.
- 12) 澤村正之：日本性感染症学雑誌，**30**，87–93，2019.
- 13) 中山周一，大西 真：国立感染症研究所 病原微生物検出情報 (IASR)，**36**，21–22，2015.
- 14) 井戸田一朗，加藤康幸：国立感染症研究所 病原微生物検出情報 (IASR)，**44**，193–194，2023.
- 15) Leslie, D., Azzato, F., Karapanagiotidis, T., *et al.*: *J. Clin. Microbiol.* **45**, 93–96, 2007.
- 16) Pillay, A., Liu, H., Chen, C. Y., *et al.*: *Sex Transm. Dis.* **25**, 408–414, 1998.
- 17) Marra, C., Sahi, S., Tantalo, L., *et al.*: *J. Infect. Dis.* **202**, 1380–1388, 2010.
- 18) Sena, A., Pillay, A., Cox, D., *et al.*: *Manual of Clinical Microbiology*, 11th Edition, Chapter 60, 1055–1081, 2015, <https://doi.org/10.1128/9781555817381.ch60>
- 19) Dai, T., Li, K., Lu, H., *et al.*: *J Clin Microbiol* **50**, 3674–3677, 2012.
- 20) Grange, P., Allix-Beguec, C., Chanal, J., *et al.*: *Sex Transm Dis.* **40**, 641–644, 2013.
- 21) Grillová, L., Strouhal, M., Mikalová, L., *et al.*: *Sex Transm Dis.* **42**, 53, 2015.
- 22) Read, P., Tagg, K., Jeoffreys, N., *et al.*: *J Clin Microbiol.* **54**, 2172–2174, 2016.
- 23) Kanai, M., Arima, Y., Nishiki, S., *et al.*: *J Clin Microbiol* **57**, e01167–18, 2019.
- 24) Flasarová, M., Pospíšilová, P., Mikalová, L., *et al.*: *Acta Derm Venereol.* **92**, 669–674, 2012.
- 25) Kojima, Y., Furubayashi, K., Kawahata, T., *et al.*: *J Clin Microbiol.* **57**, 10.1128, 2019. doi:10.1128/JCM.01148-18
- 26) WHO Data; http://apps.who.int/neglected_diseases/ntddata/treponematoses/treponematoses.html (URLは2024年9月8日現在。なおURLは変更または抹消の可能性がある)
- 27) Kawahata, T., Kojima, Y., Furubayashi, K., *et al.*: *Emerg Infect Dis*, **25**, 2019., <https://doi.org/10.3201/eid2508.181690>
- 28) Staudova, B., Strouhal, M., Zbanikova, M., *et al.*: *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3261, 2014.
- 29) Bennett, J., Dolin, R., Blaser, M., Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 8th ed, Saunders, Philadelphia, 2015.; p2710–2713.
- 30) Maiden, M.C., Bygraves, J.A., Feil, E., *et al.*: *Proc Natl Acad Sci USA*, **95**, 3140–3145, 1998.
- 31) PubMLST: Public databases for molecular typing and microbial genome diversity. <https://pubmlst.org/>
- 32) Grillová, L., Bawa, T., Mikalová, L., *et al.*: *PLoS One.* **13**,

- e0200773. 2018.
- 33) Beale, M., Marks, M., Sahi, S., *et al.*: *Nat. Commun.* **10**, 3255, 2019.
- 34) Nishiki, S., Lee, K., Kanai, M., *et al.*: *Sci Rep.* **11**, 3154, 2021. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82337-7>
- 35) 中山周一：国立感染症研究所 病原微生物検出情報 (IASR), **44**, 190–191, 2023.
- 36) Bouckaert, R., Vaughan, T., Barido-Sottani, J., *et al.*: *PLoS Comput. Biol.* **15**, e1006650, 2019.
- 37) Lieberman, N., Lin, M., Xie, H., *et al.*: *PLoS Negl. Trop. Dis.* **15**, 2021. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0010063>

Nucleic acid detection and typing of *Treponema pallidum*Hirofumi MIYAKE^a

Syphilis, is a typical sexually transmitted disease caused by *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, that has been increasingly reported throughout Japan, including Tokyo, in recent years. It has been traditionally diagnosed with antigen-antibody testing using serum, and nucleic acid detection methods are not commonly used because of the difficulty of capturing syphilis bacteria in patients and a negative result cannot be ruled out. However, the reporting criteria for syphilis include detection using polymerase chain reaction as a testing method, which may be effective in diagnosing early symptomatic syphilis. Furthermore, nucleic acid typing of *T. pallidum* can provide epidemiological information, such as the type prevalent in a particular area, the relationship between groups, the mode of transmission, and the presence or absence of drug- resistance mutations. Therefore, this report provides, an overview of laboratory methods and commercially available reagents for nucleic acid detection of *T. pallidum*, and nucleic acid typing methods currently used in research facilities and academic institutions. Nucleic acid detection methods can directly identify *T. pallidum* in early syphilis, and nucleic acid typing methods provide molecular epidemiological information, useful in preventing the spread of syphilis infection.

Keywords: syphilis, *Treponema pallidum*, nucleic acid detection methods, nucleic acid typing methods, ECDCT, SBMT

^a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan