

## 27. 梅毒トレポネーマサブタイピング法の簡便・迅速化について

○小島 洋子 (大阪健康安全基盤研究所)

### 【研究目的】

梅毒は世界的にも再流行している疾患である。日本でも 2011 年以降、患者数が増加しており、全体の 7 割を占める男性では各年齢層から偏りなく報告されているが、女性では 20 歳代が 5 割超を占める。日本での近年の流行の特徴は女性における感染が急増していることである。しかしながら、日本では詳細な疫学的な情報は少なく、疫学的な解析手段として簡便・迅速な梅毒トレポネーマの型別方法を確立することを目的とした。

### 【研究の必要性】

これまでも世界中で報告されてきた ECDCT 法 (enhanced CDC typing ; CDC subtype/tp0548 sequence type ; *arp* 遺伝子における 60bp の繰り返し配列の数と、*tprE*, *tprG*, *tprJ* 遺伝子の PCR 産物を制限酵素処理後に泳動してみられる切断パターン、および tp0548 遺伝子のシーケンス結果により分類する方法) は煩雑でかつ判定に困る例もあるため、本研究では、これまでに報告されている論文やデータベースをもとに、短時間で簡便に行えるサブタイピングの方法を確立し、実際の検体を用いて検討を加えていく必要があると感じた。

### 【研究計画】

1. 性感染症関連医療機関が採取した患者検体の浸出液や尿より核酸を抽出する。
2. *poIA* および TpN47 遺伝子を PCR で増幅し、どちらか一方でも陽性の検体についてサブタイピングを行う。
3. ECDCT 法以外の方法についての検討を行う。これまでに報告されている論文やデータベースより、遺伝学的に系統樹解析が可能であると思われる領域を探る。
4. 実際の検体を用い、それぞれの方法でサブタイピングを行う。
5. 解析結果をまとめる。

【実施内容・結果】

*poIA*、TpN47 遺伝子どちらか一方でも陽性の検体 36 例について、サブタイピングを行った。ECDCT 法以外の方法として、SBMT 法 (sequence-based molecular typing) での解析方法を見つけた事より、ECDCT 法と SBMT 法の 2 種類の方法での解析を行うこととした。

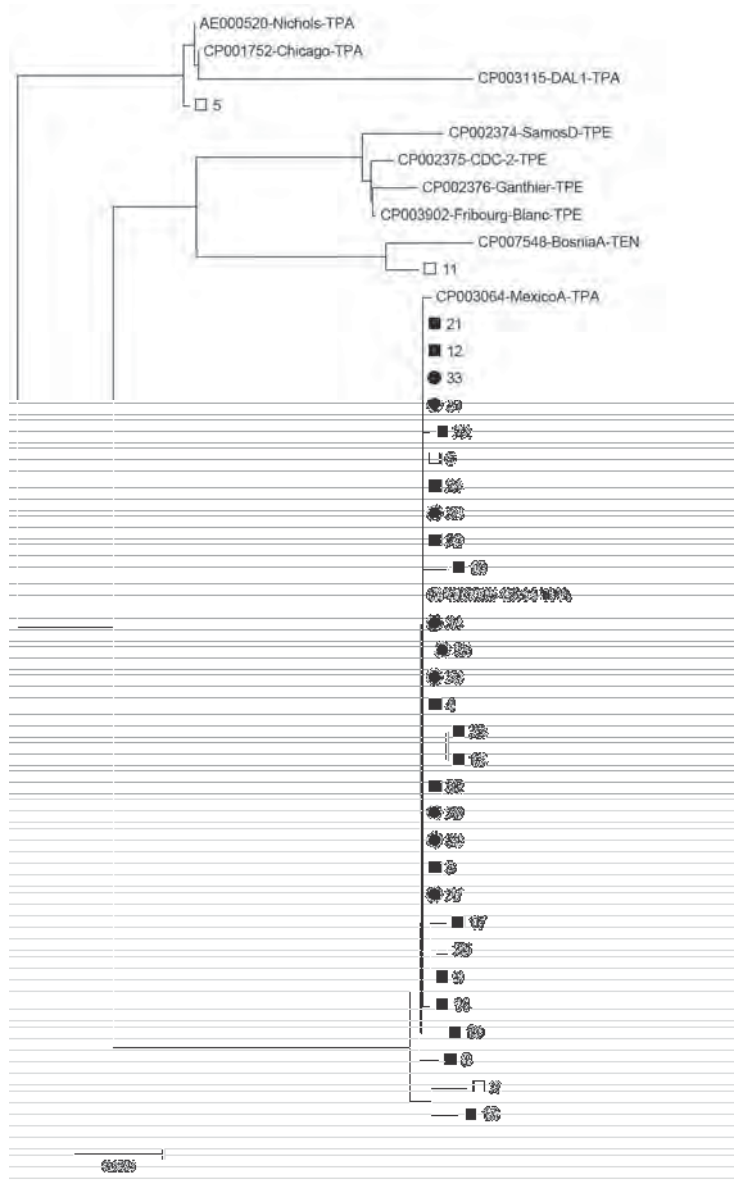
ECDCT 法は *arp* 遺伝子を PCR で増幅したのち、電気泳動を行う事により繰り返し配列の数を調べた。*tprE*、*tprG*、*tprJ* 遺伝子は PCR で増幅し、制限酵素処理をした後、電気泳動を行い制限酵素切断パターンを決定した。tp0548 遺伝子は PCR で増幅したのち、塩基配列解析を行い、サブタイピングを行った。

SBMT 法では tp0136、tp0548、23S rRNA の各遺伝子を PCR で増幅後、ダイレクトシーケンスにより塩基配列を解析し、ジェノタイピングを行った。

これらタイピングを行った結果、ECDCT 法では 29 例で完全なサブタイピングを、7 例で部分的なサブタイピングを行う事ができた。また、SBMT 法では 31 例で完全なジェノタイピングを、3 例で部分的なジェノタイピングを行う事ができた。2 例については SBMT 法ではジェノタイプができなかった。

36 例中、31 例は SS14-like、1 例は Nichols-like、2 例は分からなかった。残り 2 例については *Treponema pallidum* の亜種であることが推測された。23S rRNA の遺伝子を解析することにより、近年増加しているマクロライド耐性であるかを調べることができ、31 例 (86.1%) がマクロライド耐性であることが分かった。

2 種類の解析を行うことにより、簡便、迅速という言葉からは遠ざかってしまったが、より詳細な解析を行うことが可能となった。



●heterosexual-女性, ■heterosexual-男性, □MSM-男性

図. MEGAを用いた複数遺伝子の結合データに基づく分子系統樹解析

## 【考察と今後の課題】

今回、2種類の解析を行うことにより、異性間性的接触でECDCT法では14d/fであり、かつSBMT法でSSR8にあてはまる検体が多く（75.9%）を占めることがわかった。世界的な流行と同様に、日本でもSS14-likeの検体が多かった。症例解析数は少ないが、MSMでは異性間と異なる型がみられた。今回の解析で、*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* (TPA)の型別を行っているつもりであったが、*Treponema pallidum*の亜種である*Treponema pallidum* subsp. *endemicum* (TEN)が含まれていることが推測される結果を得た。今後はこれらの解析も合わせて行っていかなければならない。

課題としては、これらの方法をよりスムーズに行えるように改良を加えつつ、*Treponema pallidum*の分子疫学情報を発信していきたいと考えている。

## 【参考文献】

- Liu, H., B. Rodes, C. Y. Chen, and B. Steiner. 2001. 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* 39:1941-6.
- Orle, K. A., C. A. Gates, D. H. Martin, B. A. Body, and J. B. Weiss. 1996. Simultaneous PCR detection of *Haemophilus ducreyi*, *Treponema pallidum*, and herpes simplex virus types 1 and 2 from genital ulcers. *J Clin Microbiol* 34:49-54.
- Grillova, L., H. Petrosova, L. Mikalova, R. Strnadel, E. Dastychova, I. Kuklova, M. Kojanova, M. Kreidlova, D. Vanousova, J. Hercogova, P. Prochazka, H. Zakoucka, A. Krchnakova, V. Vasku, and D. Smajs. 2014. Molecular typing of *Treponema pallidum* in the Czech Republic during 2011 to 2013: increased prevalence of identified genotypes and of isolates with macrolide resistance. *J Clin Microbiol* 52:3693-700.
- Marra, C., S. Sahi, L. Tantaló, C. Godornes, T. Reid, F. Behets, A. Rompalo, J. D. Klausner, Y. Yin, F. Mulcahy, M. R. Golden, A. Centurion-Lara, and S. A. Lukehart. 2010. Enhanced molecular typing of *treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. *J Infect Dis* 202:1380-8.

【経費使途明細】

使 途	金 額
試薬費（制限酵素、核酸増幅試薬、DNA抽出試薬）	280,168 円
消耗品費（文具、写真用紙等）	16,052 円
振込手数料	3,780 円
合 計	300,000 円
大同生命厚生事業団助成金	300,000 円