

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09184

研究課題名(和文)少量ゲノム含有検体に解析対象を広げた梅毒トレポネーマゲノム多様性の体系的再評価

研究課題名(英文) Systematic re-estimation of polymorphism of *T. pallidum* genome from wider range of specimens including *T. p* DNA of lower copy numbers

研究代表者

中山 周一 (Nakayama, Shu-ichi)

国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官

研究者番号：80280767

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：2017年、2018年の国内梅毒トレポネーマ検体につき、分子型別、マクロライド耐性分布に関して検討を実施しMSM由来とheterosexuals由来とで大きな差異が有ることが判明し、報告した。2014～2018年の検体につき全ゲノム解析を試行し、計20検体で成功した。世界各国検体でのデータと比較解析を行い、日本株は中国株と最近縁の関係にあることを示すと同時にこの2国の株をほぼ細分化できる一塩基置換候補を抽出することに成功した。型別、マクロライド耐性分布で差異の見られた国内のMSM由来とheterosexuals由来株の差はこの全ゲノム解析によっても裏付けられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

性感染症の制御においては、科学的根拠に立脚したりスクグループごとへの介入がとくに重要である。この観点で今回、分子型別、全ゲノム解析結果ともMSMとheterosexualsとが基本的には互いに分離できるコミュニティであることが示された意義は大きい。全ゲノム解析から抽出された、近縁関係にある日本、中国株を細分化できる一塩基置換候補は、近隣国からの輸入例を簡便に検出するマーカーツールとして活用できる可能性があり、今後は今回の全ゲノム解析には成功しなかった検体を含め、この塩基置換の有無を網羅的に解析し、まずその有用性を確定させることが重要であることが示された。

研究成果の概要(英文)：Among the *T. pallidum* strains detected in Japan during 2017, the macrolide resistant strain type 14d/f was found in significantly more cases of syphilis among heterosexuals than in those among men who have sex with men (MSM); i.e., 79% (31/39) of the strains from heterosexuals were 14d/f compared to 37% (7/19) of those from MSM. In addition, 83% (50/60) of the strains were identified as macrolide resistant. 90% (35/39) of the strains from heterosexuals were macrolide resistant compared to 58% (11/19) of those from MSM. The whole genome sequencing analyses using the strains detected between 2014 and 2018 in Japan showed that these strains were closely related to reported strains in China. However, those strains in these countries evolved independently after diverging from their most recent common ancestor. The genetic difference between the strains in these countries was characterized by single-nucleotide-polymorphism analyses of their penicillin binding protein genes.

研究分野：細菌遺伝学

キーワード：近縁株を細分化できる1塩基置換候補 詳細な菌株系統解析 MSMとheterosexuals

1. 研究開始当初の背景

梅毒トレポネーマのゲノム解析は、この菌が培養不能であることが主たる原因で、進んでいない実態があった。また、分解能に優れた分子型別法の開発、改良も同じ理由に起因してか有用性の高いものは未だ確立していないのが実情であった。

しかし、これらの問題の解決は 2010 年ころからの全世界における梅毒の再興、流行を受けた急務であった。

2. 研究の目的

申請者が従来進めていた梅毒トレポネーマ疑い病変からの病原体 DNA の PCR による検出に依拠した病原体ベースの抗体陽転前の早期診断有用性検討で用いた検体群を対象として、国内で現在流行拡散している株のゲノム解析を実施し、その系統的位置を知り、海外株との近縁関係を把握する。その情報を元に、精度、分解能に優れた塩基置換候補をリストアップし、その有用性の検討へと繋げる。

3. 研究の方法

2014 年～2018 年の期間に連携協カクリニックから梅毒疑い病変検体の供与を受け、梅毒トレポネーマ DNA 検出 PCR が陽性で、分子型別法の 1 つ、ECDC 法の 3 項目ともで型別が成功した 49 例をゲノム解析の材料とした。これらの DNA サンプル(含まれる DNA のほとんどの画分はヒト DNA)を先ず random hexamer primer とバクテリオファージ DNA polymerase を用いて均一に増幅した。ついで増幅サンプルを梅毒トレポネーマの標準株である Nichols 株ゲノムの情報を持つキャプチャーRNA とハイブリダイゼーション、洗浄を繰り返し、サンプル内の梅毒トレポネーマ DNA 画分を純化した。以上の 2 ステップは培養可能菌での分離培養と菌体からの DNA 調製に相当する。

以降は通常通りの DNA 断片化と Tag 付加再生 PCR を行い、産物を次世代シーケンサーで解析した。

解析の結果、90%以上の Nichols 株ゲノム領域をカバーし、かつどの領域での最低でデータ深度 10 以上を満たしたサンプルを信頼性有り、と判定してゲノムデータを採用した。

このデータと現在データベースまたは公表論文で開示されアクセス可能な諸外国の梅毒トレポネーマゲノムデータとを比較解析した。

4. 研究成果

日本の国内株は外国株中では中国の株群と最も近縁の位置になることが示された。この近縁関係にある大多数中国株とも日本株を細分できる可能性の有るものとして TPANIC_0760 遺伝子内、I415F/M 変異 1 塩基置換多型性を提出できた。これはそのまま非常に分解能の高い分子型別法の 1 ターゲットになり得る可能性があり、その簡便、迅速な検出法の開発検討を行う価値がある。また、この変異のモニタリングを通して、近隣国からのクローナルな株流入の迅速な検知に活かせる可能性が有る。

また、日本、中国に共通しながら、他の国の株はほとんど保有していない TPANIC_0705 遺伝子内 A506V 変異 1 塩基置換も見出した。これは「東アジア特有マーカー」として利用できる可能性を提出できた。この 1 塩基置換多型性も高分解能型別法のターゲットになる可能性があり、今後の検討に加えて、実際の流用試行を通じての有用性の検証が必要である。

この成果のまとめ図を下記、図 1 に示す。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Y. Koizumi, T. Watabe, Y. Ota, S. Nakayama, N. Asai, M. Hagihara, Y. Yamagishi, H. Suematsu, T. Tsuzuki, M. Takayasu, M. Ohnishi, and H. Mikamo.	4. 巻 45
2. 論文標題 Cerebral Syphilitic Gumma can arise within months of reinfection: a case of histologically proven <i>Treponema pallidum</i> Strain Type 14b/f infection with Human Immunodeficiency Virus positivity.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Sex Transm. Dis.	6. 最初と最後の頁 e1-e4
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Igawa, G., Yamagishi, Y., Dorin, M., Shimuta, K., Suematsu, H., Nakayama, S., Mikamo, H., Unemo, M., and Ohnishi, M.	4. 巻 62
2. 論文標題 <i>Neisseria cinerea</i> with high ceftriaxone MIC is a source of ceftriaxone and cefixime resistance-mediating <i>penA</i> sequences in <i>Neisseria gonorrhoeae</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Antimicrob. Agents Chemother.	6. 最初と最後の頁 e02069-17
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Yahara, K., Nakayama, S., Shimuta, K., Lee, K-I., Morita, M., Kawahata, T., Kuroki, T., Watanabe, Y., Ohya, H., Yasuda, M., Deguchi, T., Didelot, X., and Ohnishi, M.	4. 巻 4
2. 論文標題 Genomic surveillance of <i>Neisseria gonorrhoeae</i> to investigate the distribution and evolution of antimicrobial resistance determinants and lineages.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Microb. Genom.	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/mgen.0.000205.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Kanai, M., Arima, Y., Nishiki, S., Shimuta, K., Itoda, I., Matsui, T., Oishi, K., Ohnishi, M., and Nakayama, S.	4. 巻 57
2. 論文標題 Molecular typing and macrolide resistance analyses of <i>Treponema pallidum</i> in heterosexuals and men who have sex with men in Japan, 2017.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J. Clin. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 e01167-18.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JCM.01167-18.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hijikata, S., Hongo, I., Nakayama, S., Yamaguchi, T., Sekikawa, Y., and Nozato, T.	4. 巻 35
2. 論文標題 Infective endocarditis due to <i>Treponema pallidum</i> : A case diagnosed by polymerase chain reaction analysis of aortic valve.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Can. J. Cardiol.	6. 最初と最後の頁 104.e9-104.e11.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.cjca.2018.11.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiki, S., Arima, Y., Kanai, M., Shimuta, K., Nakayama, S., and Ohnishi, M.	4. 巻 26
2. 論文標題 Epidemiology, Molecular Strain Types, and Macrolide Resistance of <i>Treponema pallidum</i> in Japan, 2017-2018.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Infect. Chemother.	6. 最初と最後の頁 1042-1047.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jiac.2020.05.022.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tarumoto, N., Imai, K., Nakayama, S., Itoda, I., Sakai, J., Murakami, T., Maesaki, S., Hayakawa, S., Ohnishi, M., and Maeda, T.	4. 巻 69
2. 論文標題 A novel peptide nucleic acid-and loop-mediated isothermal amplification assay for the detection of mutations in the 23S rRNA gene of <i>Treponema pallidum</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 J. Med. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 339-1345.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jmm.0.001275.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nishiki, S., Lee, K., Kanai, M., Nakayama, S., and Ohnishi, M.	4. 巻 11
2. 論文標題 Phylogenetic and Genetic Characterization of <i>Treponema pallidum</i> Strains from Syphilis Patients in Japan by Whole-genome Sequence Analysis from Global Perspectives.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Sci. Rep.	6. 最初と最後の頁 3154
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-82337-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 中山周一、井戸田一朗、大西 真
2. 発表標題 比較的稀な分子型梅毒トレポネーマの短期間内での複数回検出例
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 樽本憲人、前崎繁文、前田拓哉、中山周一、大西 真、早川 智、井戸田一朗
2. 発表標題 PNA-LAMP法を用いたマクロライド耐性梅毒トレポネーマの検出に関する検討
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 花岡 希、中山周一、尾上泰彦、錦 信吾、萬田和志、大西 真
2. 発表標題 梅毒核酸検査における唾液やうがい液の有用性についての検討
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hijikata, S., Hongo I., Nakayama, S., Sekikawa, Y., Iwai, T., Yamaguchi J., Sagawa, Y., Watanabe, K., Masuda, R., Miyazaki, R., Miwa, N., Hara, N., Yamaguchi, T., Nagata, Y., Nozato, T., and Hirano, K.
2. 発表標題 Infective endocarditis due to <i>Treponema pallidum</i> : A case diagnosed by polymerase chain reaction analysis of aortic valve.
3. 学会等名 The 82nd Annual Scientific Meeting of the Japanese Circulation Society. (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中山周一
2. 発表標題 梅毒の迅速診断の方向性 検査手技時間の短縮化と感染成立後陽性判定可能までのタイムラグの短縮化を目指す。
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会。シンポジウム 1。
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安田 満、志牟田 健、中山周一、小林寅詒、大澤佳代、陳内理生、三宅啓文、濱砂良一、荒川創一、大西 真。
2. 発表標題 2015～2017年にわが国で分離された淋菌の薬剤感受性報告。
3. 学会等名 日本性感染症学会第31回学術大会。
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関