

令和 6 年 9 月 5 日現在

機関番号：82603

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K09388

研究課題名（和文）系統的に近縁関係の梅毒トレポネーマ株間を細分化する塩基置換候補の評価とその応用

研究課題名（英文）Evaluation and application of putative SNPs that can define the lineages of *T. pallidum*

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） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：2020年3月以降の127検体でTP_0705内3 SNPsのデータを取得した。3 SNPs特定127例での仮説による予想系統分布はSS14-East Asia系統111、SS14-Omega系統5、Nichols C&E 系統 6、TEN 系統 5であった。このデータからの予想系統が正しいかをゲノム解析で確認することが直近の課題となる。これまでの調査報告では国内株の、SS14-East Asia以外の3系統はMSM患者由来に限定されていたが、今回のデータでは女性患者由来の予想Nichols C&E系統 1例、予想SS14-Omega系統 1例がそれぞれ検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的な流行が継続、拡大している梅毒の制御に当たっては、検体からの迅速な系統分類を通じた科学的根拠を持った感染ルート推定を行うことが必須である。試験管内培養が基本的に不能な本菌では系統を確定するためのゲノム解析は、その成功率が低い。我々は特定1遺伝子TP_0705のPCR産物内の3箇所の1塩基置換が系統と対応するという仮説を提出した。このことが実証されれば、飛躍的に多数の検体での系統決定が可能となり、また、その結果が判明するまでの期間も大幅に短縮できる。これは冒頭の課題に足して多大な貢献を与える。

研究成果の概要（英文）：With the 127 specimens since March 2020, 3 SNPs within the single gene TP_0705 were defined. Based on these data, their predicted phylogenies were tentatively assigned. The distributions were as follows. SS14-East Asia: 111, SS14-Omeg: 5, Nichols C&E: 6, TEN: 5. Whole genome analyses of these specimens are required for the verifications of our phylogeny prediction, and our hypothesis that the 3 SNPs above is truly coordinated with the phylogeny that is convinced through the genome analyses.

研究分野：細菌遺伝学

キーワード：梅毒トレポネーマ 系統分類 感染ルート推定

1. 研究開始当初の背景

(1) 梅毒の世界的再興の状況で病原体またはその DNA 検出による迅速診断と DNA 検出の波及効果としての病原体型別や全ゲノムシーケンス解析による系統分類と各系統の拡散状況把握の重要性が高まっていた。

(2) しかるに起因菌梅毒トレポネーマは試験管内培養が基本不可能なため、上記解析の成功率が低く、基本的に全ゲノムシーケンス結果を元に抽出される系統分類のデータ蓄積が進んでいなかった。

2. 研究の目的

(1) 全ゲノムシーケンス解析が成功し系統分類が可能であった例を収集し、系統分類結果に反映される特定の 1 塩基置換(以下 SNPs)候補を選び、その SNPs パターンによる系統分類結果と全ゲノムシーケンス解析による系統分類結果との一致性を検証する。一致率が十分高い SNPs を系統反映 SNPs として提唱する。

3. 研究方法

申請者の課題の主たるものは、

(文献)で我々が報告提起した「特定 1 遺伝子、TP_0705 内の 3 箇所の single nucleotide polymorphisms (以下、3 SNPs)の組み合わせとのゲノム解析によっ

て決定される菌株系統が国内株については一意対応関係にあり、従って前者の結果により後者が予測可能である」という仮説が現在依然成立しているかの検討を実地検体によって行うことであった。

文献 で、我々は、世界的な梅毒トレポネーマのゲノム解析プロジェクトにしてそれに供した 2019 2020 年 2 月までの日本国内株 52 株のゲノムデータを得るとともに、それを元にそれらの系統を決定し、さらに、系統分類で決定因となり得る塩基置換 (SNPs) を探索した。その結果、上記国内検出の 52 株については 1 遺伝子 TP_0705 の 3 箇所 SNPs の組み合わせと後述する国内流通中の 4 系統との間に一意対応が成立していることを発見した。

本課題開始後で得た梅毒陽性検体は 2020 年 3 月以降のもの、計 264 検体でゲノム解析は試行未実施である。

そこで上記の計 264 陽性検体につき、TP_0705 内 3 SNPs のデータ収集を試行した。

4 . 研究成果

実際には、データ採取が見込めなかった ECDC 型別法 (文献) 不成功例 51 を除く 213 例を対象とし、うち 127 例で 3 箇所 SNPs とともに決定に成功した (成功率 59.6 %)。この成功率は期待を下回るもので、TP_0705 遺伝子 PCR 産物

を Sanger 法にてシーケンスし、3 SNPs 部位の塩基を読み取るという方法では波形に ambiguity が残ることが原因と考えられ、今後は他の研究者が開発中の特定部位判別 LAMP 法に切り替えまたは併用することを予定している。

3 SNPs 特定 127 例での上記仮説による予想系統分布は SS14-East Asia 系統 111(87.4 %)、SS14-Omega 系統 5(3.9 %)、Nichols C&E 系統 6(4.7 %)、TEN 系統 5(3.9 %)であった。この予想系統が正しいかをゲノム解析で確認することが直近の課題となる。

文献 1 の報告では国内株の、SS14-East Asia 以外の 3 系統は MSM 患者由来に限定されていたが、今回のデータでは女性患者由来の予想 Nichols C&E 系統 1 例(2022 年 3 月)、予想 SS14-Omega 系統 1 例(2022 年 10 月)がそれぞれ検出された。系統確定にはこれらのゲノム解析を待たねばならないが、国内で 2022 年頃から MSM 限定系統がそれ以外の性指向者へ伝播し始めた可能性が提起された。このことの真偽を確認する上でもゲノム解析によるこの仮説の確認は重要である。

また、この仮説が実証されれば、特に試験管内培養が基本的に不可能で、ゲノム解析成功率が低い梅毒トレポネーマにおいても 1 遺伝子 TP_0705 の PCR 産物を用いての SNPs 決定によって簡便、安価、迅速に系統を決めることが可能

となり、我々が当面目指す科学的根拠のある感染ルート推定に大きく寄与できることが期待される。

<引用文献>

Nicole A. P. Lieberman , et al. *Treponema pallidum* genome sequencing from six continents reveals variability in vaccine candidate genes and dominance of Nichols clade strains in Madagascar. **PLoS Negl. Trop. Dis.** 2021 Dec 22;15(12):e0010063.

doi: 10.1371/journal.pntd.0010063.eCollection 2021 Dec.

Cristina M. Marra, et al. Enhanced molecular typing of *Treponema pallidum*: geographical distribution of strain types and association with neurosyphilis. **J. Infect. Dis.** 2010 Nov 1;202(9):1380-8. doi: 10.1086/656533.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nicole AP Lieberman, et al. Shu-ichi Nakayama, Kenichi Lee, Makoto Ohnishi, et al.	4. 巻 13
2. 論文標題 High-throughput nanopore sequencing of <i>Treponema pallidum</i> tandem repeat genes arp and tp0470 reveals clade-specific patterns and recapitulates global whole genome phylogeny.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front. Microbiol.	6. 最初と最後の頁 1007056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2022.1007056. eCollection 2022.	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 Nicole A.P. Lieberman, Michelle J. Lin, Hong Xie, Lasata Shrestha, Tien Nguyen, Meei-Li Huang, Austin M. Haynes, Emily Romeis, Qian-Qiu Wang, Rui-Li Zhang, Cai-Xia Kou, Giulia Ciccarese, Ivano Dal Conte, Marco Cusini, Francesco Drago, Shu-ichi Nakayama, et al.	4. 巻 15
2. 論文標題 Genome Sequencing of 196 <i>Treponema pallidum</i> strains from six continents reveals additional variability in vaccine candidate genes and dominance of Nichols clade strains in Madagascar.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS Negl. Trop. Dis.	6. 最初と最後の頁 12 e0010063.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pntd.0010063.	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中山周一
2. 発表標題 梅毒：迅速診断の展望とゲノム解析結果から見える国内株の系統位置
3. 学会等名 第36回日本エイズ学会学術集会・総会（招待講演）
4. 発表年 2022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
---------	---------