

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08446

研究課題名(和文) PNAを用いたLAMP法によるマクロライド耐性梅毒トレポネーマの検出系の開発

研究課題名(英文) Development of detection procedure for macrolide-resistant *Treponema pallidum* with peptide nucleic acid-mediated loop-mediated isothermal amplification assay

研究代表者

樽本 憲人 (Tarumoto, Norihito)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：00746993

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)：*Treponema pallidum*の23S rRNAの2058/2059番目の変異を検出するよう loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primerおよびpeptide nucleic acid (PNA)プローブを設計し、*T. pallidum*のPCR陽性の臨床検体(n=66)において検討した。結果、LAMP法による検出感度は93.9%であり、PNAプローブ存在下で、野生型検体に対しては完全にLAMP反応は阻害された。以上より、PNAを用いたLAMP法により、梅毒トレポネーマの迅速同定に加えマクロライド耐性を確認することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、梅毒罹患者が急激に増加しており、マクロライド耐性を示す23S ribosomal RNAのA2058G、A2059G変異株が流行しているため、培養法によらないマクロライド耐性のスクリーニング検査法の確立は急務の課題である。LAMP法は特別な遺伝子抽出ステップを必要とせず、結果を目視で判定できることから、検査体制が整備されない医療機関における梅毒検査を実現できると考えられ、本研究の成果は、抗菌薬選択を含めた迅速な病原体診断を可能とするPoint Of Care Testing (POCT)として、抗菌薬適正使用の推進の一助となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：We designed loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers and peptide nucleic acid (PNA) probes to detect 2058/2059th mutation in 23S rRNA *Treponema pallidum*. The assay showed specificity against 42 pathogens. In the presence of probe, LAMP amplified up to 10 copies/reaction using plasmids harbouring the complementary mutant sequences (A2058G or A2059G), whereas amplification was completely blocked for the wild-type sequence up to a concentration of 1000 copies/reaction. For the 66 PCR-positive clinical specimens, the overall detection rate via LAMP was 93.9% (62/66). Amplification was successful for all 53 mutant samples and was incomplete for all nine WT samples by the PNA-mediated LAMP assays. In conclusion, we constructed a method for rapidly identifying *Treponema pallidum* and confirming macrolide resistance by using loop-mediated isothermal amplification (LAMP) with peptide nucleic acids (PNAs).

研究分野：感染症学

キーワード：梅毒トレポネーマ マクロライド 23S rRNA LAMP peptide nucleic acid

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界保健機関 (WHO) の報告によると、2012 年の世界の母体感染の数は 930,000 件にも上っており、近年、本邦においても、梅毒罹患者が急激に増加している。梅毒治療における第一選択は今でも「ペニシリン」であり、doxycycline、azithromycin は代替薬として使用される。しかし、マクロライド耐性を示す 23S ribosomal RNA の A2058G、A2059G 変異株が流行している。培養法に基づく *Treponema pallidum* (Tp) の薬剤感受性試験は不可能であるため、培養法以外の方法で、医療施設で簡単に実施できるマクロライド耐性のスクリーニング検査法の確立は急務の課題である。

2. 研究の目的

ベッドサイドでも使用可能な LAMP (lamp loop mediated isothermal amplification) 法により梅毒トレポネーマを迅速に検出し、かつペプチド核酸 (PNA, peptide nucleic acid) 併用下で、マクロライド耐性に関連する上記の一塩基置換を、精緻に区別できる変異検出技術の開発を目的とした。

3. 研究の方法

(1) LAMP プライマーと PNA プローブの設計と LAMP 反応の感度・特異性の確認

LAMP primer は、PrimerExplorer5 ソフトウェア (<https://primerexplorer.jp/e/>) を使用して、Tp の 23S rRNA 遺伝子を検出するように設計した。また、野生型 (WT) 配列に相補的になり、LAMP B1 プライマーの末端で結合を阻害するように PNA プローブを設計した (図 1)。

まず、各 23S rRNA gene の LAMP 増幅領域をサブクローニングした pEX-A2J1 プラスミドを用いて LAMP primer および PNA を評価した。LAMP 反応はリアルタイム濁度測定装置 (LA-200[®]; 栄研化学) を用いて行った。反応の至適温度を決定したのち、10 倍に段階希釈した鋳型 DNA を用いて LAMP 反応検出感度を確認した。

(2) LAMP 反応の特異性は、*Treponema denticola* (JCM 8153T) からのゲノム DNA と、ナショナル バイオリソース プロジェクトから取得した以下の DNA を使用し、各 DNA を 1ng/反応で反応溶液に加えて検証した (表 1)。

(3) PNA-LAMP の反応性確認

WT 配列をクランプする PNA を LAMP 反応に添加し、反応に対する阻害効果を確認した。反応鋳型として、WT 株 3 株と変異株 (MT) 3 株 (A2058G、マクロライド耐性株) から抽出したゲノム DNA を用いた。

(4) 臨床検体を用いた検査

2014 年 10 月から 2018 年 3 月まで、外来にて梅毒が疑われた患者の病変に対して、綿棒によるぬぐい検体が採取された。Tris-EDTA 液に浸漬し、これを 95 で 10 分間煮沸し、使用直前まで -80 で保存された (埼玉医科大学倫理委員会承認済 (申請番号 885))。使用前には、*po1A* 遺伝子を標的にした PCR にて Tp 遺伝子の存在を確認したのち 23S rRNA のマクロライド耐性に関連する領域について、DNA ダイレクトシーケンスにて配列を確認した。PNA プローブを使用せずに LAMP 反応で Tp を検出した後に、PNA-LAMP 法で WT が増幅されないことを確認することで、本方法の有効性が検証された。

4. 研究成果

(1) 23S rRNA 遺伝子の部分配列を含むプラスミドを 10 倍段階希釈して増幅し、検出下限を決定したところ、至適温度は 62 °C であった。また、リアルタイム濁度における DNA の最小量は、 1.0×10^2 (コピー/反応)

JNBP no.	Strain	JNBP no.	Strain
5252	<i>Staphylococcus aureus</i>	2885	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>
5279	<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	3693	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
5340	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	3828	<i>Mycobacterium microti</i>
5681	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	614	<i>Mycobacterium intracellulare</i>
5653	<i>Streptococcus mutans</i>	603	<i>Mycobacterium avium</i>
5698	<i>Streptococcus pyogenes</i>	612	<i>Mycobacterium africanum</i>
5521	<i>Streptococcus agalactiae</i>	613	<i>Mycobacterium bovis</i>
2146	<i>Escherichia coli</i>	JCM no.	Strain
2775	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	8153T	<i>Treponema denticola</i>
2720	<i>Haemophilus influenzae</i>	11026	<i>Gardnerella vaginalis</i>
1922	<i>Enterobacter cloacae</i>	1185	<i>Lactobacillus crispatus</i>
1568	<i>Citrobacter farmeri</i>	12513	<i>Lactobacillus iners</i>
1112	<i>Acinetobacter baumannii</i>	ATCC no.	Strain
1443	<i>Burkholderia pseudomallei</i>	UW-3/Cx	<i>Chlamydia trachomatis</i>
3104	<i>Moraxella catarrhalis</i>		Serovar D strain
4211	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	BOUR	<i>Chlamydia trachomatis</i>
4166	<i>Proteus mirabilis</i>		Serovar E strain
5051	<i>Serratia marcescens</i>	UW-57/Cx	<i>Chlamydia trachomatis</i>
5488	<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>		Serovar G strain
4079	<i>Pasteurella multocida</i>	25285	<i>Bacteroides fragilis</i>
1754	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Strain no.	Strain
3925	<i>Mycoplasma pneumonia</i>	HM-1	<i>Entamoeba histolytica</i>
		Portland	<i>Giardia intestinalis</i>
		N.A.	<i>Trichomonas vaginalis</i>

表 1 特異性評価のための菌種リスト

であった(図 1)。反応は再現性が確認された。

(2)また、特異性の評価として、*Treponema denticola* (JCM 8153T)および表 1 の 42 株の DNA は、いずれも反応がみられず、100%の特異性が確認された。

(3) PNA プローブの非存在下では、すべての WT および MT (A2058G) 株で増幅が確認された(図 2 左)。しかし、PNA プローブの添加により、すべての WT 株で LAMP 増幅が阻害された(図 2 右)。これらの LAMP 反応は 62 °C で再現性が確認された。

(4) 臨床検体は 81 検体採取され、*polA* 遺伝子を標的にした PCR にて、このうち 66 検体で陽性となった(表 2)。これに対して、23S rRNA 遺伝子配列をシーケンスしたところ、A2058G 変異は、55/66 株 (83.3%) で確認され、これらの株がマクロライド耐性であることが示唆された。さらに、残り

の 11 サンプル (16.7%) では、A2059 を含む耐性関連残基をコードするすべての関連

配列が WT であった。これらの臨床分離株のうち、LAMP 陽性であったのは、93.9%(62/66) であった。4 検体陰性だったのは、DNA を簡易的に抽出した検体であり、LAMP 反応を阻害する夾雑物が入り込んでいた可能性もあるが、検体中に含まれる菌数が少なかった可能性も考えられた。

PNA を添加した LAMP 反応では、MT の 53 検体すべてで増幅がみられ、一方 WT の 9 検体は反応がみられなかった。なお、PCR が陰性であった 15 検体において、LAMP 反応は観察されなかった。これらの結果は、いずれも再現性が確認された。

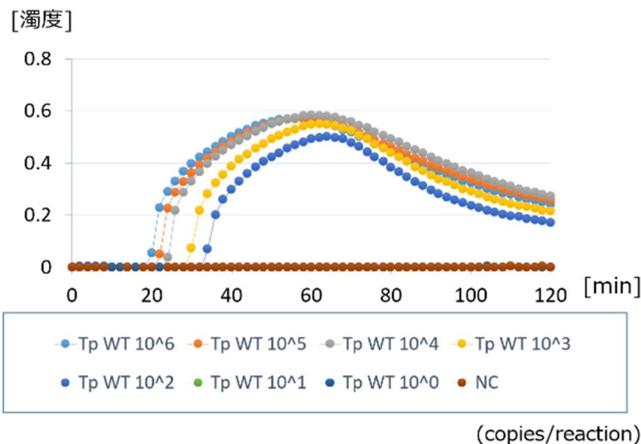


図 1 LAMP 反応の感度

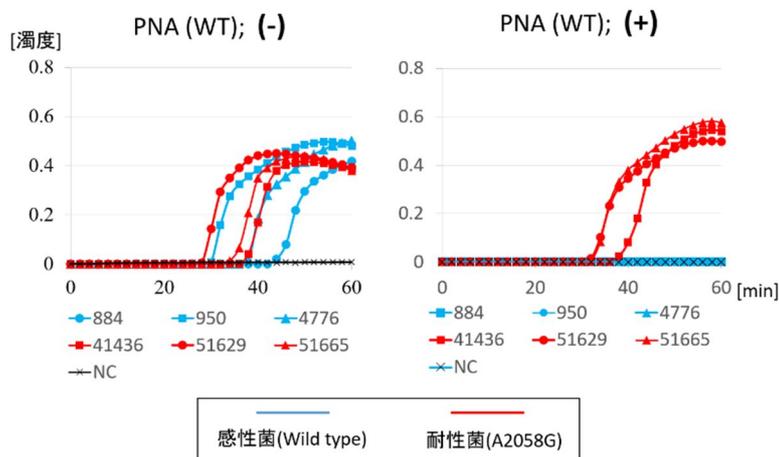


図 2 PNA-LAMP 反応の感度

Methods	PCR (<i>polA</i>) for clinical specimens (n = 81)					
	Positive (n = 66)				Negative (n = 15)	
	WT (n = 11, 16.7%)		MT (n = 55, 83.3%)		Reactive	Non-reactive
LAMP	Reactive	Non-reactive	Reactive	Non-reactive	Reactive	Non-reactive
	9 (81.8%)	2 (18.2%)	53 (96.4%)	2 (3.6%)	0	15 (100%)
PNA-mediated	Reactive	Non-reactive	N/A		N/A	
	0	9 (100%)	53 (100%)	0	N/A	

表 2 各核酸増幅法の結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tarumoto Norihito, Imai Kazuo, Nakayama Shu-ichi, Itoda Ichiro, Sakai Jun, Murakami Takashi, Maesaki Shigefumi, Hayakawa Satoshi, Ohnishi Makoto, Maeda Takuya	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 Journal of Medical Microbiology	6. 最初と最後の頁 1339 ~ 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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 樽本憲人、中山周一、井戸田一朗、前崎繁文、早川智、大西真、前田卓哉
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32回学術大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Norihito Tarumoto, Kazuo Imai, Jun Sakai, Kazuhisa Misawa, Shuichi Nakayama, Shigefumi Maesaki, Makoto Ohnishi, Takuya Maeda
2. 発表標題 A novel detection procedure for mutations in the 23S rRNA gene of <i>Treponema pallidum</i> with peptide nucleic acid-mediated loop-mediated isothermal amplification assay
3. 学会等名 the 29th European Congress of Clinical Microbiology & Infectious Diseases (国際学会)
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
研究分担者	前田 卓哉 (Maeda Takuya) (20383763)	埼玉医科大学・医学部・教授 (32409)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	早川 智 (Hayakawa Satoshi) (30238084)	日本大学・医学部・教授 (32665)	
研究分担者	中山 周一 (Nakayama Shu-ichi) (80280767)	国立感染症研究所・細菌第一部・主任研究官 (82603)	

	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
研究協力者	井戸田 一郎 (Itoda Ichiro)	院長	

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