

令和 4 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K16669

研究課題名（和文）全自動リアルタイムPCRによるインプラント周囲感染の迅速診断への有用性の評価

研究課題名（英文）Utility of fully automated real-time PCR for the rapid diagnosis of implant infection

研究代表者

崔 賢民（CHOE, Hyonmin）

横浜市立大学・医学部・講師

研究者番号：20760888

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）：全自動リアルタイムPCRによるインプラント周囲感染の迅速診断への有用性について評価した。全自動リアルタイムPCRは、メチシリン耐性遺伝子をターゲットとするMRS-PCRと、全細菌が保有する16sRNA遺伝子をターゲットとする16sRNA-PCRを使用し、インプラント周囲感染患者から採取された関節液・組織に対して、全自動MRS-PCRと16sRNA-PCRは細菌培養検査と比較して、迅速性優れ、同等の感度・特異度を持つ検査であることを検証した。新しい知見として、関節液や組織内に含まれる物質がPCR反応を阻害することがあり、そのようなPCR反応の阻害物質は、PCR結果が偽陰性となる可能性を検証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全自動PCRは迅速性と精度にすぐれ、遺伝子検査にて懸念される偽陽性の可能性も提言することが期待できる。全自動PCRを用いた細菌感染の診断は、整形外科感染症領域における診断・治療において患者へ負担提言が、治療の適正化、耐性菌における医療負担の低減といった面での良い効果が期待できる

研究成果の概要（英文）：Fully automated real-time PCR: GENE QUBE was used to evaluate its usefulness for rapid diagnosis of periprosthetic infection. Fully automatic real-time PCR included MRS-PCR targeting methicillin resistance genes and 16sRNA-PCR targeting 16sRNA genes possessed by all bacteria. They were used for the joint fluid and tissues collected from patients with periprosthetic infection. We demonstrated that the fully automatic MRS-PCR and 16sRNA-PCR provides rapid and accurate diagnosis compared with microbiological culture result. As a new finding, uncertain substances in synovial fluid and tissues has possibility to inhibit the PCR reaction and is possibly responsible to the false negative PCR results.

研究分野：整形外科

キーワード：全自動リアルタイムPCR、メチシリン耐性遺伝子、16sRNA、遺伝子診断、インプラント周囲感染、人工関節周囲感染、整形外科感染

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

整形外科領域における重篤な術後合併症の一つにインプラント周囲感染がある。インプラント感染の治療には、確実な診断が重要であるが、インプラント周囲にバイオフィームが形成された場合、細菌培養検査が陰性となることが多く診断に難渋することが多い。また感染巣は深部の骨軟部や関節腔に存在するため、術前に組織診断が行えないこと、術中迅速診断法としてグラム染色や凍結切片を用いた病理診断があるが、診断精度が低いことが問題である。リアルタイム PCR は bacterial DNA を同定することで、細菌培養で陰性となる感染でも診断が可能であり、迅速性に優れるため術中診断への応用が期待できる。全自動 RT-PCR では DNA 抽出から PCR 反応まで一連の操作として検査が自動で行われるため、人手を要さないこと、時間短縮が可能であること、手技に伴う精度の誤差やコンタミネーションの懸念がないことが利点としてあげられ、インプラント感染にて最も原因菌となることが多い黄色ブドウ球菌やメチシリン耐性遺伝子の特異的な同定が可能である。一方で、インプラント周囲感染における全自動リアルタイム PCR の有用性を評価した報告はない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、インプラント周囲感染の迅速診断機器として、全自動リアルタイム PCR の有用性を評価し、細菌感染に対するリアルタイム PCR の汎用化に必要な課題を模索し解決策を検証していくことである。

3. 研究の方法

リアルタイム PCR には全自動リアルタイム PCR 機器ジーンキューブ (TOYOBO, Japan) を使用する。本機器は DNA 抽出から PCR 反応まで一連の操作として検査が自動で行われるため、人手を要さないこと、時間短縮が可能であること、手技に伴う精度の誤差やコンタミネーションの懸念がないことが利点としてあげられる。本機器は血液培養陽性検体に対するメチシリン耐性の遺伝子検査法として保険適応を受けているが、血液培養陰性検体や組織検体には保険適応がない。当院にてこれまで行ってきた研究では、RT-PCR は細菌培養陰性検体からでも bacterial DNA の同定を行うことで細菌感染が可能であること、また細菌培養を介さずに組織から直接 DNA 抽出を行うことでも優れた精度で細菌感染の診断が可能であることを報告している。本研究では、血液や関節液、またホモジナイズした組織を検体として使用して、全自動 RT-PCR 機器ジーンキューブ (TOYOBO, Japan) にて bacterial DNA の同定を行う。その有用性を検証し、RT-PCR の血液培養陰性検体や組織検体に対する保険適応の拡大を目指す。ターゲットとする遺伝子はメチシリン耐性遺伝子と黄色ブドウ球菌特異的遺伝子および pan bacteria DNA (16srRNA gene) とする。

4. 研究成果

全自動リアルタイム PCR: GENE QUBE を用いて、インプラント周囲感染の迅速診断への有用性について評価した。全自動リアルタイム PCR は、メチシリン耐性遺伝子をターゲットとする MRS-PCR と、全細菌が保有する 16sRNA 遺伝子をターゲットとする 16sRNA-PCR を使用し、インプラント周囲感染患者における関節液および組織に対する診断精度と有用性について検証を行った。

まず、全自動MRS-PCRと16sRNA-PCRは、インプラント周囲感染患者から採取された関節液に対して、細菌培養検査と比較して、迅速性に優れ、同等の感度・特異度を持つ検査であることを検証した。これらの内容は米国整形外科基礎学会オフィシャルジャーナルに英文報告した。新しい知見として、関節液内に含まれる物質がPCR反応を阻害することで、PCR結果が偽陰性となる可能性を検証し、同英文誌に報告した。さらに、全自動PCRではPCR反応が阻害された場合に、偽陰性ではなく検査不可の形で結果がでることを検証し、全自動PCRを用いることで、リアルタイムPCRにおける偽陰性の可能性を排除できることを検証した。また、全自動PCRではPCR反応が阻害された場合に、偽陰性ではなく検査不可の形で結果がでることを検証し、全自動PCRを用いることで、リアルタイムPCRにおける偽陰性の可能性を排除できることが検証された。

次に、インプラント周囲感染患者の組織に対するMRS-PCRと16sRNA-PCRの精度を評価した。結果として、MRS-PCRは感度と特異度に優れ、16sRNA-PCRは感度に優れる検査であることを検証した。一方で、細菌培養が陽性となる症例で、16sRNA-PCRが偽陰性を認める症例を認めた。本内容は、国内の日本整形外科学術集会にて発表し、現在英文誌への投稿を準備中である。16sRNA-PCRが偽陰性となる原因については、DNAを抽出した際に、DNA断片の大きさが不揃いであることが原因となっている可能性を検証した。またDNA抽出の精度を高めることでPCRの偽陰性を減少することができるかどうかについて検証を行い、本内容は国内の学会にて発表を行った。

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 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yang Fan, Choe Hyonmin, Kobayashi Naomi, Tezuka Taro, Oba Masatoshi, Miyamae Yushi, Morita Akira, Abe Koki, Inaba Yutaka | 4. 巻 39 |
| 2. 論文標題 An automated real time PCR assay for synovial fluid improves the preoperative etiological diagnosis of periprosthetic joint infection and septic arthritis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Orthopaedic Research | 6. 最初と最後の頁 348 ~ 355 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jor.24959 | 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 該当する |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 崔賢民 |
| 2. 発表標題 整形外科感染の診断における関節液中の細菌DNA検出の有用性 |
| 3. 学会等名 日本整形外科基礎学術集会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|