

令和 6 年 4 月 10 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09419

研究課題名(和文) 超小型シーケンサーを用いた周術期感染症のオンサイト迅速モニタリング技術の開発

研究課題名(英文) Development of monitoring system for rapid detection of orthopaedic SSI using the portable DNA sequencer MinION

研究代表者

串田 剛俊 (Kushida, Taketoshi)

関西医科大学・医学部・非常勤講師

研究者番号：70411527

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)：報告者らはMinIONを活用した細菌の迅速同定法を確立し感染症診断に大きな変革をもたらすことを目標に、頸椎術後早期の患者を対象に検体の採取、sequencingを行い、術後早期感染の検出に有効であるかの検証を行なう予定であった。しかし新型コロナウイルス感染症の蔓延による手術症例数の低下および当院の手術法の特色である低侵襲脊椎手術によるインプラント感染の発生の低下により対象症例の確保が困難で、感染症例のデータ蓄積が困難であった。以上から、MinIONを用いた周術期インプラント感染の早期診断法は確立できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、インプラント感染症例がほとんど発生しなかったことによりMinIONを用いた周術期インプラント感染の早期診断法は確立できなかったが、当院で行われている低侵襲脊椎固定手術手技はインプラント感染の予防に大きく貢献していることが明らかであり、80歳以上の高齢者、糖尿病、アレルギー性皮膚炎、抗リウマチ薬、免疫抑制薬の内服などの免疫機能低下を来す併存症を有する患者には非常に有用であることが本研究が成立しなかった点からも実証されたとと言える。

研究成果の概要(英文)：The authors planned to collect specimens from patients in the early postoperative period after cervical spine surgery, perform sequencing, and verify the effectiveness of MinION in detecting early postoperative infection with the goal of establishing a rapid identification method for bacteria using MinION and bringing about a major change in the diagnosis of infectious diseases. However, due to the decrease in the number of surgical cases caused by the spread of new coronary infections and the decrease in the occurrence of implant infections caused by minimally invasive spine surgery, which is a feature of our surgical method, it was difficult to secure the target patients and accumulate data on the infected cases. Therefore, we were unable to establish a method for early diagnosis of perioperative implant infections using MinION.

研究分野：整形外科

キーワード：次世代シーケンサー MinION インプラント感染

## 1. 研究開始当初の背景

感染症対策および施設環境の整った今日においても、手術部位感染を完全に防ぐことは困難であり、術後感染の予防は整形外科手術領域の最重要課題の一つである。特に人工関節や脊椎固定材料などのインプラント感染は抗菌剤治療では難治化することも多く、抜去により生じる機能障害も大きい。インプラント感染の予防を目的として抗菌剤を常用することは菌交代や耐性菌出現の問題がありガイドラインも否定的である。術後インプラント感染が発生した際には現在の標準的な検査である細菌培養法では結果を得るのに数日を要するため、経験的に抗菌薬を選択、使用することが多いのが現状である。また培養が困難な細菌には対応できないことから、病態形成に関わる病原微生物について得られる情報も断片的とならざるを得ない。そのため早期から細菌感染の拡大を防ぐことが肝要であり、適切な抗菌治療のため迅速かつ高精度な感染診断ツールが求められている。

## 2. 研究の目的

従来の培養検査による感染症診断の欠点を補う新技術として、病原菌の遺伝子解析に基づく検査法が開発され、検体中に含まれる細菌の遺伝子配列を取得・解読することによって、幅広い種類の細菌を客観的かつ高精度に同定し、さらに DNA を解析対象とすることから培養不可能な細菌の同定も可能になった。このように遺伝子解析による細菌同定法は、感染症診断において従来の培養法にはない優位性を備えているものの、解析のために高額な大型の次世代シーケンサーを必要とし、配列情報の取得からその後のデータ解析に最低でも 1～2 日を要し迅速性に欠けるなど、臨床応用を実現するためには多くの制約が存在している。

最近、これらの欠点を克服する全く新しい原理に基づく超小型ナノポアシーケンサー MinION (Oxford Nanopore Technologies) が開発され注目を集めている。申請者らは MinION の特徴である長鎖 DNA シークエンシング技術がもたらす解像度の高さ、並びにリアルタイムデータ解析 (遺伝子配列の取得と配列検索・菌種同定を平行して実行する) による迅速性を活用し、検体の取得から最短で 3 時間以内に細菌を種レベルで同定することに成功した。

そこで申請者らが確立した MinION による病原細菌同定法を更に発展させ、整形外科手術において直面する様々な術後感染症の迅速診断法としての有用性を検証し、臨床的アウトカムの向上に繋がる技術基盤の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

脊椎手術の症例を対象とし、留置されたドレーンより経時的に (術直後、術後 1 日目、術後 2 日目など) 排液を採取する。得られた検体は分割し、MinION による遺伝子解析と並行して一般細菌培養検査による菌種同定を行う。

MinION シークエンシングによる細菌同定の手順を以下に記す。検体の性状 (固体系、液体系、粘度) に応じ DNA 抽出法の最適化を図る。遠心操作によるヒト由来組織や夾雑物の分離のほか、細菌 DNA を効率よく抽出するためセラミックビーズによる物理的破碎と酵素消化を組み合わせた前処理を行う。得られた細菌ライセートについてスピンカラムを用いたアフィニティー精製により細菌 DNA を抽出し、サンプル調整を行なった。既に設計済みのプライマーと反応条件に基づき、検体より抽出した DNA を鋳型として PCR により 16SrRNA 遺伝子を増幅する。使用するユニバーサルプライマーは 16SrRNA 遺伝子のほぼ全長領域 (約 1500 塩基) をカバーしており、幅広い種類の細菌の 16SrRNA 遺伝子を網羅的に増幅することが可能である。さらにプライマーには検体を識別可能な人工配列 (バーコード) が付加されており、複数の検体 (最大 12 サンプル) の同時シークエンシングに対応している。長鎖 DNA のシークエンシングに対応した MinION を用いることにより、1 回のシークエンスランで 16SrRNA 遺伝子の全長配列 (約 1500 塩基) を決定することができる。断片的な塩基配列 (300 塩基程度) しか得られなかった従来のシークエンサーに比べて遺伝子配列の情報が格段に増すため、より高精度な細菌の判別・同定が可能である。既に導入済みの細菌ゲノム配列データベースと半自動化された配列検索プログラムを用いて、シークエンスデータの解析を行い、菌種を同定する。本システムでは外部データベースへのアクセスなどインターネットを介したデータの送受信を必要とせず、配列解析の高速化を実現した。さらに MinION シークエンシングでは読まれた塩基配列がリアルタイムに出力されるため、シークエンシングの途中でも随時データを回収し配列解析に移ることができる。以上より細菌同定に要する時間を大幅に短縮することに成功している。

感染症検査において起炎菌として想定される細菌の種類は限られていることから、シークエンシング時間、解析に供する配列数について検証し、細菌種の迅速同定に必要な十分な条件設定を行う。MinION による遺伝子解析法と培養検査により得られた結果を比較し、陽性一致率、同定細菌の種類について整合性を検討する。さらに術後経過に伴う細菌プロファイルの変動につい

て、血液検査 による炎症マーカー（CRP 値や白血球数など）や患者病態との関連性を明らかにする。

以上より MinION シークエンシングによる迅速細菌同定法の感染症診断ツールとしての有用性を証明する。

#### 4．研究成果

2020 年度のパイロット研究で非感染例における偽陽性検出がなく、特異度が高い検査手法である可能性を示した。しかし新型コロナ感染症の流行により手術症例数の低下により、2020、2021 年度でインプラント感染例がなかった。インプラント感染症例のデータ蓄積を目的に対象手術を拡大したが、当院の脊椎手術の特色として最小侵襲脊椎固定手術(MISt)を用いることから、インプラント感染例の発生をほとんど認めなかった。2023 年度も前年度と同様に研究対象が得られなかった。今回、インプラント感染症例がほとんど発生しなかったことにより、予定していた MinION を用いた周術期における早期インプラント感染診断法を確立できずに終了となった。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                    |
|---|--------------------|
| 1. 著者名<br>Komiya Shinnosuke, Matsuo Yoshiyuki, Nakagawa So, Morimoto Yoshiharu, Kryukov Kirill, Okada Hidetaka, Hirota Kiichi | 4. 巻<br>15         |
| 2. 論文標題<br>MinION, a portable long-read sequencer, enables rapid vaginal microbiota analysis in a clinical setting            | 5. 発行年<br>2022年    |
| 3. 雑誌名<br>BMC Medical Genomics  | 6. 最初と最後の頁<br>1-10 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1186/s12920-022-01218-8   | 査読の有無<br>有         |
| オープンアクセス<br>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<br>-          |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号）                         | 所属研究機関・部局・職<br>（機関番号）                | 備考 |
|-------|---|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 松尾 禎之<br><br>(Matsuo Yoshiyuki)<br><br>(50447926) | 関西医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(34417) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |