

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2021

課題番号：20K18013

研究課題名（和文）NGSと新規迅速PCRによる骨軟部組織感染症迅速診断法の研究

研究課題名（英文）Study of Rapid Diagnostic Method for Bone and soft Tissue Infection by Post-Sonication Next-Generation Sequencing and Rapid PCR

研究代表者

外山 雄康 (TOYAMA, Takeyasu)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：50829306

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）：次世代シーケンサー（NGS）は、培養されていない微生物の検出に役立ちます。ただし、NGSデータの品質はDNA量に依存し、整形外科分野などでNGSによる正確な診断が困難になる場合があります。この研究は、DNA濃度抽出メカニズムを備えた自動抽出後、NGSによる細菌感染における迅速なPCRによる定性的および定量的診断の能力と限界を検証しました。その結果、magLEADによるクラス内相関係数の単一測定値はQiagen法よりも高く、NGSの結果も含めると、自動化されたデバイスによるDNA濃縮抽出が、感染の臨床遺伝子診断ツールとして安定した結果と検出限界の増加に貢献できることを示しています。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在課題として挙げられる遺伝子抽出問題に関し、DNA抽出の一般的な方法であるQIAamp DNA mini kit (Qiagen)(QIAGEN法)を用いたものでは、時間と手間を要し、全自動機器 magLEADでは、作業効率の改善および精度の向上が確認できた。本研究は、骨軟部組織感染症における超音波処理法の有用性の成果報告に至った。迅速PCRの検討は、既存の特異的領域PCRに加え、変異遺伝子を多く含む16sDNAの定量PCRを行えるようプロトコル構築を行った。nanoporeシーケンサーはコントロールを用いたプロトコル検討を行ない、整形外科骨軟部組織感染症NGSへ発展できる。

研究成果の概要（英文）：The next-generation sequencer (NGS) is useful for the detection of uncultured microbes. However, the quality of NGS data depends on the amount of microbial DNA, and accurate diagnosis with NGS sometimes becomes difficult such as in the field of orthopedics. The purpose of this research was to verify the ability and limit of qualitative and quantitative diagnoses with rapid PCR in bacterial infection by NGS with automatic extraction device with DNA concentration extraction mechanism. The single measurement value of the intraclass correlation coefficient of Cq by magLEAD method was higher than the Qiagen method. Our findings show that the concentrated extraction of DNA by an automated device can contribute to stable results and an increase in the detection limit as a clinical genetic diagnostic tool for infection.

研究分野：整形外科（手の外科）

キーワード：骨軟部組織感染症 迅速 PCR 次世代シーケンサー 超音波処理法 骨髄炎 化膿性腱鞘炎 全自動遺伝子抽出装置

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

切傷、咬傷、挫傷など感染が併発した場合、外科的治療が必要となる症例が存在する。感染が長期化すると、恒久的に著しい機能障害を残すため、機能再建は困難を極め、早期に適切な治療が必要である。治療に難渋する症例や血流が乏しい組織が残存（腐骨・不良肉芽・瘢痕組織など）している場合、腱が傷より露出された状態などもバイオフィームが形成され、原因菌を同定できないことが多く、適切な抗菌薬選択が困難となる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、超音波処理後に Next Generation Sequencing (NGS)を用いた骨軟部組織に形成されるバイオフィーム内細菌叢の解明、骨・関節・軟部組織感染症の迅速診断法を確立することである。我々は抜去されたインプラントの超音波処理により従来培養検査よりも細菌検出感度が上昇すること (Ueda et al. JOA 2019)と、PCR や NGS による細菌叢研究 (Science. 311, 2006, Tabichi et al. JBJS Br/Am 2018)に注目し、超音波処理を用いた感染症迅速診断の検証、骨・関節・軟部組織感染症のバイオフィーム内細菌の病態解明（細菌叢・薬剤耐性遺伝子の有無）、NGS にて細菌叢を解析し、PCR による新規骨軟部組織感染症迅速遺伝子診断を構築する。

3. 研究の方法

超音波処理後に培養検査を行い、残検体の超音波処理液より遺伝子を抽出し、PCR および NGS を行った以下の検討を行う。

(1) 骨軟部組織検体における超音波処理法

① 腱・滑膜・骨などの従来法と超音波処理法で培養検査を行い、超音波処理による臨床的有用性を培養法において検証する。

② 上記超音波処理後の保存検体を PCR/NGS で検証し、培養検査結果と比較する。

(2) DNA 抽出法の検討: 8F-338R primer (16S rRNA 定量 PCR, NGS) を用いた検証。

(3) 臨床検体を用いた定量 PCR の検証。

(4) NGS 結果と PCR および培養法との比較検証。

4. 研究成果

(1) 腱・滑膜・骨など従来法と超音波処理法で培養検査を行った臨床的有用性

① 人工股関節周囲感染

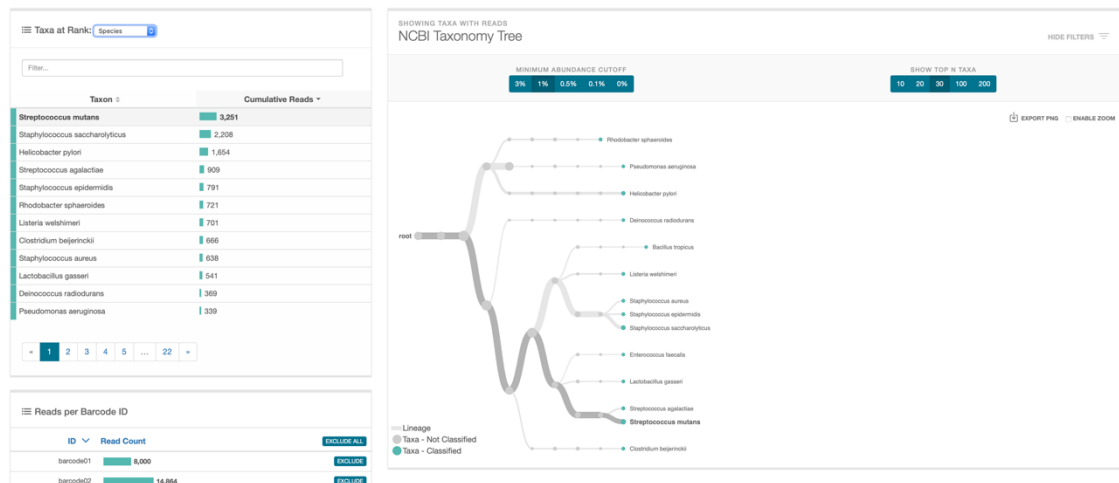
検体検出率は、インプラント 71% (10/14 検体)、生体組織 76% (25/33 検体)に原因菌の検出を認め、同等であった (pearson χ^2 検定, $p = 0.756$)。以前の当科報告より骨軟部組織検体の原因菌検出率は向上し、インプラント周囲組織における超音波処理法の有用性が示唆された。

② 骨軟部組織感染症

採取した罹患部位は、手・指 18 例、肘 2 例、足 4 例、従来法による感染例 38 検体、および超音波処理法 41 検体を検証し、超音波処理法の感度 83% (20/24 例)は、従来法 54% (13/24 例)に比べて高く (pearson χ^2 検定, $p = 0.006$)、検体検出率も超音波処理法 80% (33/41 検体)は、従来法 53% (20/38 検体)に比べ高かった (pearson χ^2 検定, $p = 0.006$)。超音波処理法のみ原因菌が検出された症例を 7 例認めたことから超音波処理法の有用性が示唆された。

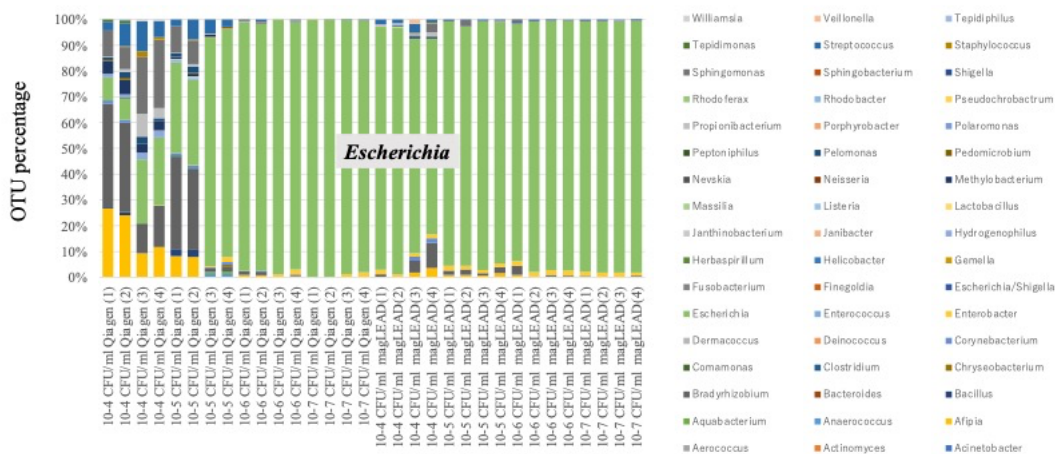
③ 迅速抽出法の検討: 標準菌株・臨床分離株を複数抽出法による定量 PCR の検討

濃度調整した大腸菌 (ATCC 25922) を 16S リボソーム RNA 遺伝子可変領域に対して設計したプライマーを使用し、NGS および qPCR を施行した。 *E. coli* $10^4 - 10^7$ CFU / ml を 1 セットとして 16S rRNA 遺伝子可変領域に対し 2 つの方法 (magLEAD 法 (magLEAD12gC; magDEADx 抽出キット; Precision System Science, Chiba, 日本) VS Qiagen 法, 手順を繰り返すことで精度検証し、qPCR (Cq) の Cq 値を分析した。4 セット (16 サンプル、4 (*E. coli* $10^4 - 10^7$ CFU/ml)) で NGS を実施した。2 つの抽出方法で同領域プライマーを使用し、NGS の検出限界、細菌濃度 (CFU/ml) と細菌遺伝子の相対量の関連について比較を行った。結果は magLEAD 法による Cq のクラス内相関係数の単一の測定値は Qiagen 法より高く、安定した検査結果を確認し、Cq 値は従来の方法より自動抽出装置を用いた方が低く、DNA 濃縮効果を確認した。総リード数は抽出法による違いを認めず、NGS における自動抽出装置法を用いた検体中、特に低濃度サンプルで大腸菌の相対存在量が高く、他の細菌相対存在量は Qiagen 法より低かった。さらに、Cq が増加するにつれ、大腸菌を除く細菌の割合が増加し、自動化機器による DNA 濃縮抽出は、感染症の臨床遺伝診断ツールとしての安定した結果、遺伝子検査における



遺伝子濃度を指標とした検出限界を拡大できる（図1）。

（図1）magLEAD法/Qiagen法による抽出後のNGS結果



(2) 臨床検体を用いた定量PCRの検証

関西医科大学総合医療センターで治療を行った整形外科骨軟部組織感染症（化膿性腱鞘炎 1例、手指化膿性関節炎 2例、上肢骨髄炎 2例）を感染群とし、2018年～2019年に施行された初回人工股関節置換術 3例を非感染群とした。術中採取した骨軟部組織検体を血液培養ボトル併用による超音波処理を用いた培養検査を行い（超音波処理法）、超音波処理後残検体に対し16S rDNA遺伝子可変領域 V1-V2 (8F-338R) を標的として LightCycler®Nano (Roche Diagnostics, Switzerland)を用いた qPCR を行った。LightCycler®NanoSoftware (Roche Diagnostics, Switzerland)による Cq 値を使用し、感染群における培養検査結果との比較、非感染群における Cq 値および陰性コントロールの検討を行った。qPCRによる Cq 値（中央値）は（培養陽性検体：培養陰性検体= 20.9：25.4）(Mann-Whitney 検定, P=0.056)であった。一方、初回 THA 検体の Cq 値（中央値）は 22.9、陰性コントロール 3 検体の Cq 値(中央値)は 32.4 であった。感染群 Cq 値（中央値）：非感染群（人工股関節置換術検体）Cq 値（中央値）= 22.0：22.9 (Mann-Whitney 検定, P=0.35)と感染群と非感染群はほぼ同等の結果であった。また、培養陰性群 Cq 値（中央値）：非感染群 Cq 値（中央値）= 25.4：22.9 と培養検査陰性例と非感染群はほぼ同等の結果であった。これより培養陽性検体における Cq 値の高い検体は、細菌遺伝子量が少なく、超音波処理による希釈の要因や採取箇所の問題などが要因として考えられた。また、陰性コントロール群に比べ非感染群 Cq 値が低い要因とし、生体組織による PCR 反応の影響が考えられた。

(3) Nanopore シーケンスを用いた陽性コントロールによる検討

mock DNA (HM-782D, BEI resources; 既知細菌 20 種 17 属の細菌 DNA より均等な割合で構成される)を用い EPI2ME を使用し、概ね 1 時間程度でリード数をとれることが確認でき

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 外山雄康
2. 発表標題 手指骨髓炎に対する Masquelet 法
3. 学会等名 第63回日本手の外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外山雄康
2. 発表標題 骨軟部組織感染症における超音波処理法の有用性
3. 学会等名 第135回中部整形災害外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeyasu Toyama
2. 発表標題 Usefulness of culture using Sonication Fluid into Blood Culture Bottles for diagnosis of soft tissue and bone infection
3. 学会等名 1st Virtual EFFORT Congress (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 外山雄康
2. 発表標題 超音波処理法と血液培養ボトルを用いた骨・軟部組織感染症の診断
3. 学会等名 第43回日本骨・関節感染症学会学術集会
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
---------	---------