

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：20K18045

研究課題名(和文)次世代シーケンサーと遺伝子解析装置によるバイオフィルム内細菌・薬剤耐性菌検出法

研究課題名(英文)Detection of bacteria in biofilms and drug-resistant bacteria using next-generation sequencer and nucleic acid amplification machine

研究代表者

植田 成実 (UEDA, Narumi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：30632757

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在、手術検体の細菌検査には多くの課題があり、一般的な診断技術は、細菌が浮遊性の形ではなく、インプラント表面にバイオフィルムとして存在するため、低悪性度の感染を検出する能力に制限がある。我々は感染症に対処するためのループ媒介等温増幅(LAMP)プライマーを独自に作成することが可能であるため、細菌定量を目的としたPCR以外に、臨床現場で問題となるメチシリン耐性(mecA)遺伝子の検出やブドウ球菌の迅速検出を目的としたLAMPプライマーを設計した。本研究は、複数のコアグラウゼ陰性ブドウ球菌(CNS)による人工関節周囲感染例に独自LAMPプライマーを使用し検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

インプラント周囲感染や慢性骨髄炎などは、通常の培養検査による検出がバイオフィルムなどの理由により困難である。遺伝子検査は現在、人工関節周囲感染ガイドライン(MSIS 2018年)で記載されており、確定診断には不可欠であるものの不明な点が多い。しかし、今後、治療のために必要な情報は、診断を目的とした遺伝子検査以外にも、狭域かつ効果的な抗菌薬の選択が即時に判定できるような抗菌薬耐性遺伝子の情報である。本研究は、特に臨床で問題とされることの多い、mecAをもつブドウ球菌を標的としたサンプル間の抗菌薬感受性や耐性遺伝子の検証であり、病態の解明と同時に診断から治療への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Currently, bacterial testing using surgical specimens has many challenges. General diagnostic techniques are limited in their capacities to detect low-grade infection because the bacteria are not present in planktonic form but biofilms on implant surfaces. Because of our experiment of any study, we can create Loop-mediated isothermal amplification (LAMP) primers to deal with various infectious diseases. So, we developed PCR method for quantity of bacteria and LAMP method such as rapid detection of mec A gene which is problematic in clinical settings. Using a next-generation sequencer, we conducted a study using original LAMP primer in cases of peri-articular joint infection caused by multiple coagulase-negative staphylococcal (CNS).

研究分野：股関節外科

キーワード：次世代シーケンサー インプラント周囲感染 人工関節周囲感染

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

インプラントを用いた治療は年々増加し、合併症である感染症は一定の割合で生じ (Rabih O. Darouiche CID 33:2001)、人工関節手術数の増加 (A. Patel et al. Bone Joint J 97:2015) と同様に一定の割合で合併する感染例も増加している。また、人工関節再置換術の理由で最も多い“無菌性ゆるみ”には、未診断の感染が含まれていることが以前から指摘され (Moojen et al. Acta Orthopaedica 2010)、当科の検証より抜去したインプラントに超音波処理法を行うことで検出率 (60%) が向上している (Ueda et al. J ARTHROPLASTY 2019)。

しかし、培養検査は限界があり、既に抗菌薬加療をされている場合は、休眠状態の細菌 (viable but non-culturable: VBNC) を同定できない上、限られた細菌しか検出できない (Amann et al. Microbiol Rev. 1995)。細菌検査は今後、培養検査から遺伝子解析に変わると期待されており (Didelot et al Nature. 2012)。これまでの研究より当科では定量 PCR と NGS 共通遺伝子配列による同定困難な細菌検出・定量が 1 検体 1 万円以下で可能となった (<https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-17K16707/>)。しかし、感染症遺伝子診断の解決すべき課題は ①「再現性」②「検査時間」③「煩雑さ・技術」④「偽陽性≒検出限界」で、特に遺伝子増幅工程を含む検査は、原因細菌が占める DNA 量が少ない場合、試薬などに存在する細菌 DNA を原因菌と誤診断 (偽陽性)する可能性がある。確実な診断は、遺伝子定量検査を軸とした簡便かつ迅速に行う手法の確立が早急に必要である。

我々は、遺伝子検出機器による検査を臨床で使用するため、悪性腫瘍のリンパ節転移診断に既に用いられている遺伝子定量機器の感染症分野への応用 (OSNA (One Step Nucleic Acid Amplification)法)を考案した。また、これまでバイオフィルム内耐性菌 (薬剤耐性遺伝子の有無)の検出を NGS と同時に行う報告は認めないが、培養できない細菌の感受性検査は当然のごとくできないために経験的投与に限られ、細菌種同定以外にも薬剤耐性遺伝子の有無を調べることで、抗菌薬の選択が可能になると考えた。

2. 研究の目的

本研究は細菌定量 PCR・OSNA 法、培養検査・NGS を用いて検証する。標準菌株、インプラント周囲感染より得られた定量 PCR・培養検査・感受性試験後の保存臨床検体 (500 検体)のうちバイオフィルム形成能にすぐれるインプラント周囲感染臨床分離株を中心に行う。薬剤耐性遺伝子は (MEC A & spa (Koide et al. Applied Microbiology.2010))を参考にプライマー作成後、原因細菌として多く、臨床上問題となることの多い MRSA/MRCNS/MSSA/CNS は当科の検証から(下左図 Ueda et al. JOA 2019)も原因菌の 6-9 割を占めており、独自開発したプライマーを用いて標準菌株および保存臨床検体による検証を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は、以下の 3 つの項目に分けて研究を進めた。

(1) DNA 抽出方法を OSNA 法 (リノアーク試薬) と LAMP 法 DNA 抽出キットを用いた検証: プライマー濃度の調整、試薬等の配合検討。

(2) mecA および spa プライマーを以下の手順で独自に作成して検証: プライマーペア、作成した複数プライマーの中より精度、検出速度など最も優れたものを選別した。

(プライマーの作成: DNA 塩基配列データを NCBI GenBank より FASTA 形式にて入手、菌種の DNA 塩基配列を公開ソフト DDBJ (DNADATE Bank of Japan)、ClustalW (<http://clustalw.ddbj.nig.ac.jp/>)にて多重整列し、DNA 塩基配列の相同箇所を調査後、LAMP プライマーを設計する (PrimerExplorerV5 (栄研化学株式会社))。

(3) PCR・OSNA・NGS によるバイオフィルム内細菌定量・耐性菌遺伝子検出と臨床非感染疾患関節内および非感染インプラント細菌叢の定量・NGS 検証: 診断プロトコールの検証。

【方法】標準菌株・臨床分離株・臨床保存検体を用いた検証: MRSA/MRCNS を対象に Mec A、spa 遺伝子プライマー併用、およびその他プライマーを作成し、標準菌株や臨床分離株・臨床検体の対する検討を行なった。

4. 研究成果

(1) プライマー配列検討のための前処理法検討

英文で報告をされている LAMP プライマーを既存の OSNA 機器を用いて検証し、試薬前処理法の検討を行ったところ、標準菌株を測定する場合、超純水または生理食塩水の熱処理 (95°C、5 分間) (図 1) が良いと確認した。また、独自に設計した LAMP プライマーにより全ての工程を 15-20 分以内に実現可能で、検査合計時間は 25 分以内で実現可能と考えた。

(2) 独自に設計したプライマーの検討 (図 2) : 過去に報告されたプライマーによる測定時間は 20 分程度であったが、10 分以内へ時間短縮が可能となり、MRSA や MSSA などを対象としたプ

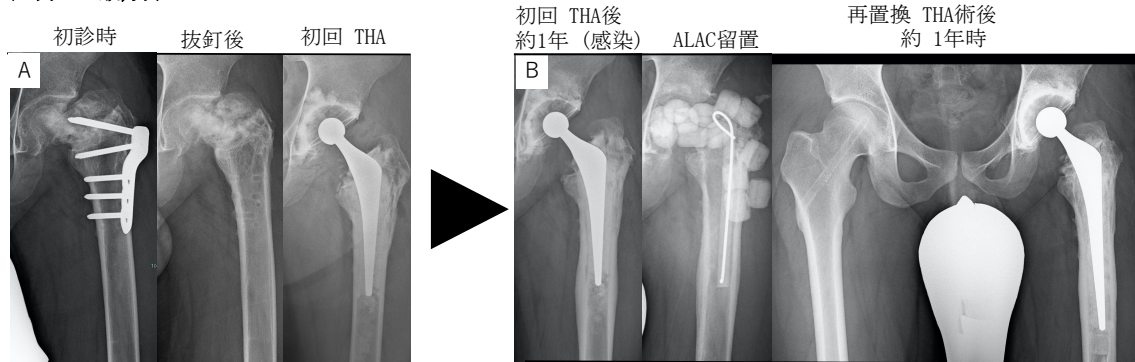
プライマーが自由に設計可能であること、プライマー作成時の工夫によって反応時間の短縮が可能であった。

(3) 臨床検体の検討

次世代シーケンサーを用いて検討した人工関節周囲感染例より分離された臨床分離株 10 株の CNS に対し、Genelyzer FII (Cannon medical systems corporation) を用いた耐性遺伝子の有無、反応時間を調査し、遺伝子検査結果、mecA (30%)、ブドウ球菌属は 100%陽性を認め、反応時間は mecA が平均 7 分 6 秒、ブドウ球菌属検出は平均 8 分 30 秒であった。本検査は 10 分以内の反応時間で検査可能であることから、迅速な薬剤耐性遺伝子検出による適切な抗菌薬選択が期待できる結果となった。

次世代シーケンサーによる PJI の分析 (症例・培養陰性検体の PCR およびシーケンス結果)
(引用：植田成実 他 細菌培養陰性例への対応：Next-generation sequencing の現状と可能性, 医学書院, 臨床整形外科, 2022:57, 233-240)

症例：18歳, 男性



単純X線

A: 初診時から初回人工股関節置換術

B: 人工関節周囲感染時から再置換手術 (二期的置換) 後1年

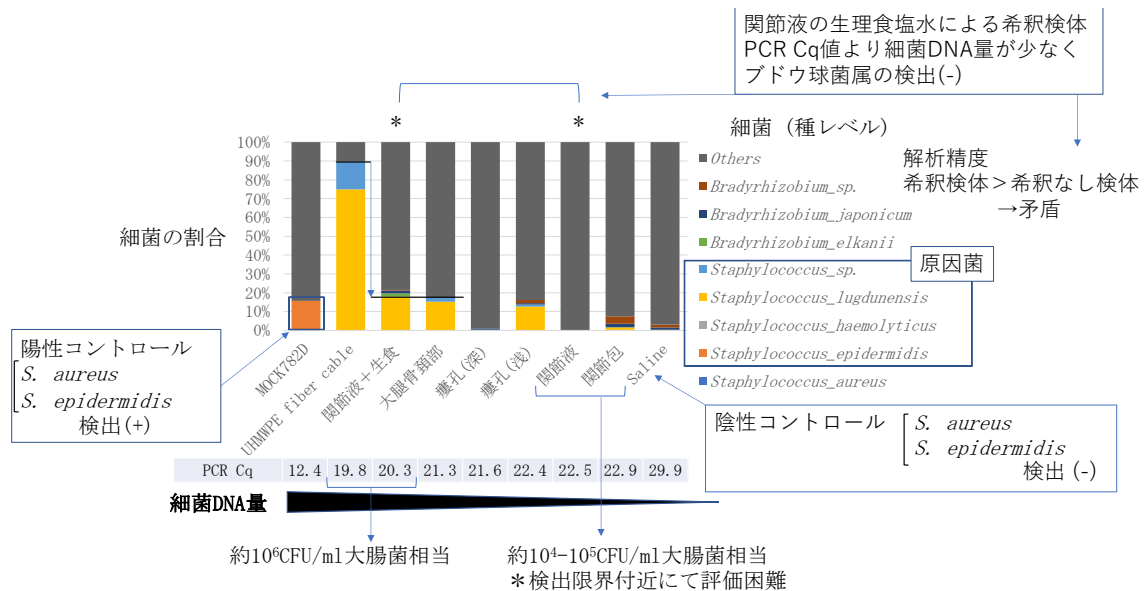


図 1: OSNA 機器による LAMP プライマー前処理法の検討

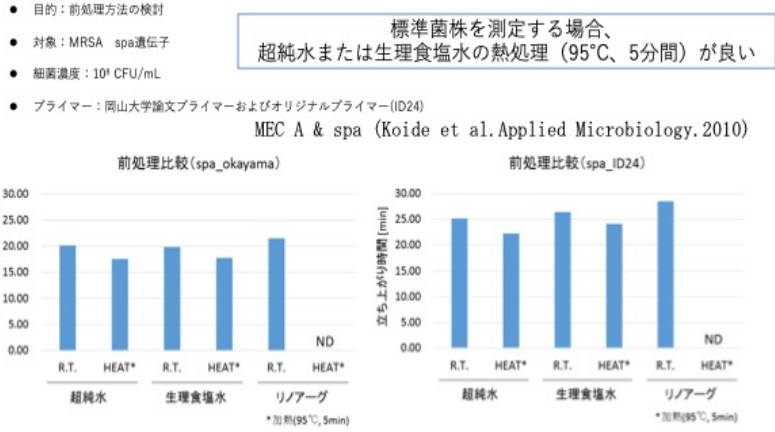
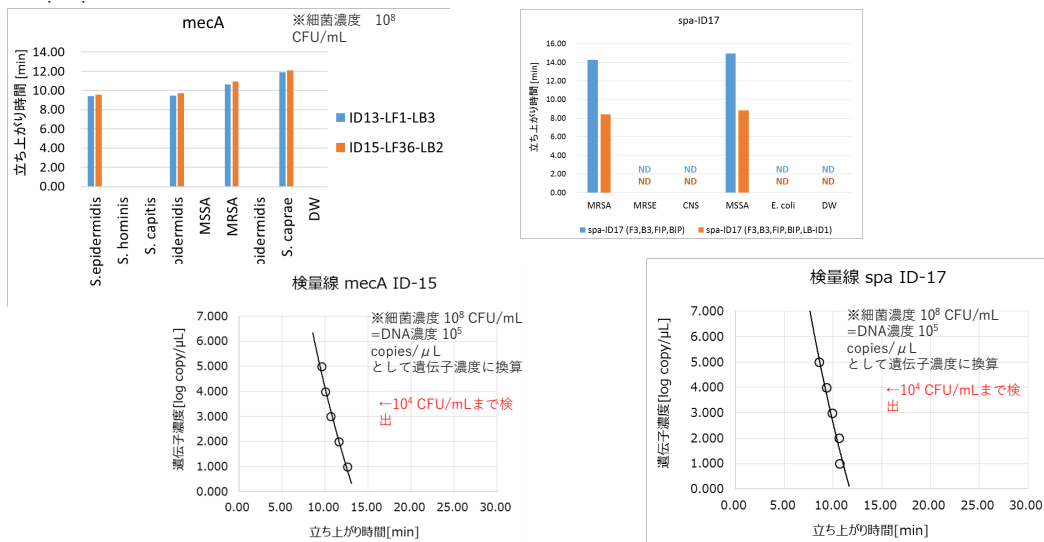


図 2: 独自設計した LAMP プライマーの検討 (検出限界と時間) (OSNA 機器による計測)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 人工股関節周囲感染患者より提出されたインプラント・骨軟部組織検体超音波処理液の次世代シーケンサーを用いた検証
3. 学会等名 32回日本臨床微生物学会総会・学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田 成実
2. 発表標題 次世代シーケンサー (NGS: Next-Generation Sequencing)を用いた整形外科術後感染症診断
3. 学会等名 第43回日本骨・関節感染症学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 次世代シーケンサー (NGS)による術中検体を用いた インプラント周囲感染の診断を目的とした検証
3. 学会等名 第135回中部災害整形外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 次世代シーケンサー (NGS: Next-Generation Sequencing)と定量PCR (qPCR)を用いた 超音波処理法による新規整形外科インプラント周囲感染症診断法
3. 学会等名 日本整形外科基礎学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 「骨軟部組織とインプラント超音波処理検体を用いた次世代シーケンサーによる新規遺伝子感染症検査の基礎的検討」
3. 学会等名 関節病学会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 サンプルの品質の予測方法、核酸配列解析の精度の予測方法、 サンプルの品質の予測装置、および核酸配列解析の精度の予測装置	サ 発明者 植田成実	権利者 関西医科大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-105623	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------