

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：34417  
研究種目：基盤研究(C)（一般）  
研究期間：2021～2023  
課題番号：21K09287  
研究課題名（和文）次世代シーケンサーによる椎間板・椎体および脊椎インプラントに存在する細菌叢の探究  
  
研究課題名（英文）The intervertebral disc, vertebral body and spinal implant microbial flora by next-generation sequencing  
  
研究代表者  
足立 崇（ADACHI, Takashi）  
  
関西医科大学・医学部・講師  
  
研究者番号：20460793  
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）：本研究では、生体組織による影響と思われるコンタミネーション、遺伝子反応阻害がみられ、典型的な感染であった場合、培養検査結果と一致した結果が検出されたが、細菌量が少ない場合に、解析精度がよくなかった。非感染インプラントでは定量的限界値以下が多く、NGS前に定量的解釈が必要であることや、DNA抽出、濃縮工程が課題となった。今後、コンタミネーションに配慮し、検出限界以上のサンプルを収集できるかが課題であり、細菌定量の重要性とDNA抽出、精製、コンタミネーション細菌の除外が必要である。

#### 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究成果は、人工股関節などのインプラント超音波処理検体以外にも生体組織（インプラント周囲組織）や脊椎インプラントなどの整形外科検体に応用できることである。本シーケンスの学術的、社会的意義としては、培養検査であきらかでない細菌検出が次世代シーケンスによって可能となるが、PCRベースでシーケンスを行うため、遺伝子片が増幅されることによるコンタミネーションなどの影響が強く、今後も詳細な検討を要することである。今後、整形外科感染症全体の原因不明の疾患の病態や原因菌が明らかになると期待されるが、あやまった結果を解釈しないような慎重な検討が必要である。

研究成果の概要（英文）：In this study, contamination and gene reaction inhibition were observed, which may have been caused by biological tissue. In the case of typical infection, the results were consistent with culture test results, but the accuracy of the analysis was not good when the amount of bacteria was low. Many non-infected implants were below the quantitative limit, and the need for quantitative interpretation prior to NGS, DNA extraction and enrichment process was an issue. In the future, it will be a challenge to collect samples above the limit of detection considering contamination, and the importance of bacterial quantification, DNA extraction, purification, and exclusion of contaminating bacteria is necessary.

研究分野：脊椎外科、脊椎感染症

キーワード：脊椎インプラント バイオフィルム 超音波処理 PCR インプラント周囲感染 次世代シーケンサー  
コンタミネーション

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、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 (Kurtz et al. JBJS 89: 2007, A. Patel et al. Bone Joint J 97:2015) とともに感染数も増加している。また、人工関節再置換術の理由で最も多い“無菌性ゆるみ”は多くの感染性ゆるみが含まれる (Moojen et al. Acta Orthopaedica 2010)。これまで植田助教の NGS による検証により、感染および非感染患者からとりだしたインプラントを超音波処理後に NGS を用いて解析し、長期留置された感染以外の治療目的でとりだしたインプラントからも細菌遺伝子の検出を認めている (<https://kaken.nii.ac.jp/grant/KAKENHI-PROJECT-17K16707/>)。インプラントに関する治療デバイスの他科の研究に注目すると、非感染例で抜去されたペースメーカーに超音波処理を行い培養した結果、複数の細菌が検出され、細菌は感染兆候なしに付着しているのではないかと推測された報告 (Rohacek et al. Circulation. 2010) や、腰椎手術において Modic Type 2 椎間板変性をきたした患者 6/16 (37.5%) は Modic 変化のない患者 1/23 (4.3%) に比べて有意に細菌検出を認め、椎間板変性と感染は関連している可能性など指摘されており (Drago et al. J Neurosurg Sci. 2017)、非感染疾患における細菌叢の存在も考えられる。しかし、培養検査には限界があり、既に抗菌薬加療をされている場合など休眠状態の細菌 (viable but non-culturable: VBNC) は同定できない上、限られた細菌しか検出できず (Amann et al. Microbiol Rev. 1995)、NGS などの遺伝子解析による細菌検査が臨床においても期待され (Didelot et al Nature. 2012)、病態の解明と、臨床へ展開できる。

## 2. 研究の目的

本研究目的は、超音波処理後に非感染症例の椎体、椎間板組織、関節内およびインプラント細菌叢の解明を行う。そして、整形外科領域骨軟部組織感染症やインプラント周囲感染における遺伝子感染症診断を確立させることである。

## 3. 研究の方法

本研究は、初年度・次年度は、骨軟部組織細菌叢、および PCR による細菌定量の測定  
次年度以後：前年度データの検証、統計的解釈、培養検査や臨床経過との相関、診断プロトコール構築を目的として以下の方法で行った。

超音波処理法後に培養、PCR、NGS を行った。

腱・滑膜・骨、椎間板や椎体などの整形外科軟部組織検体に超音波処理による培養検査を行い、下記手法で残検体に PCR/NGS で検証を行った。化膿性疾患の場合、他感染症検査を追加し比較検討した。

NGS による検証 (植田らの方法に準じ解析) (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)

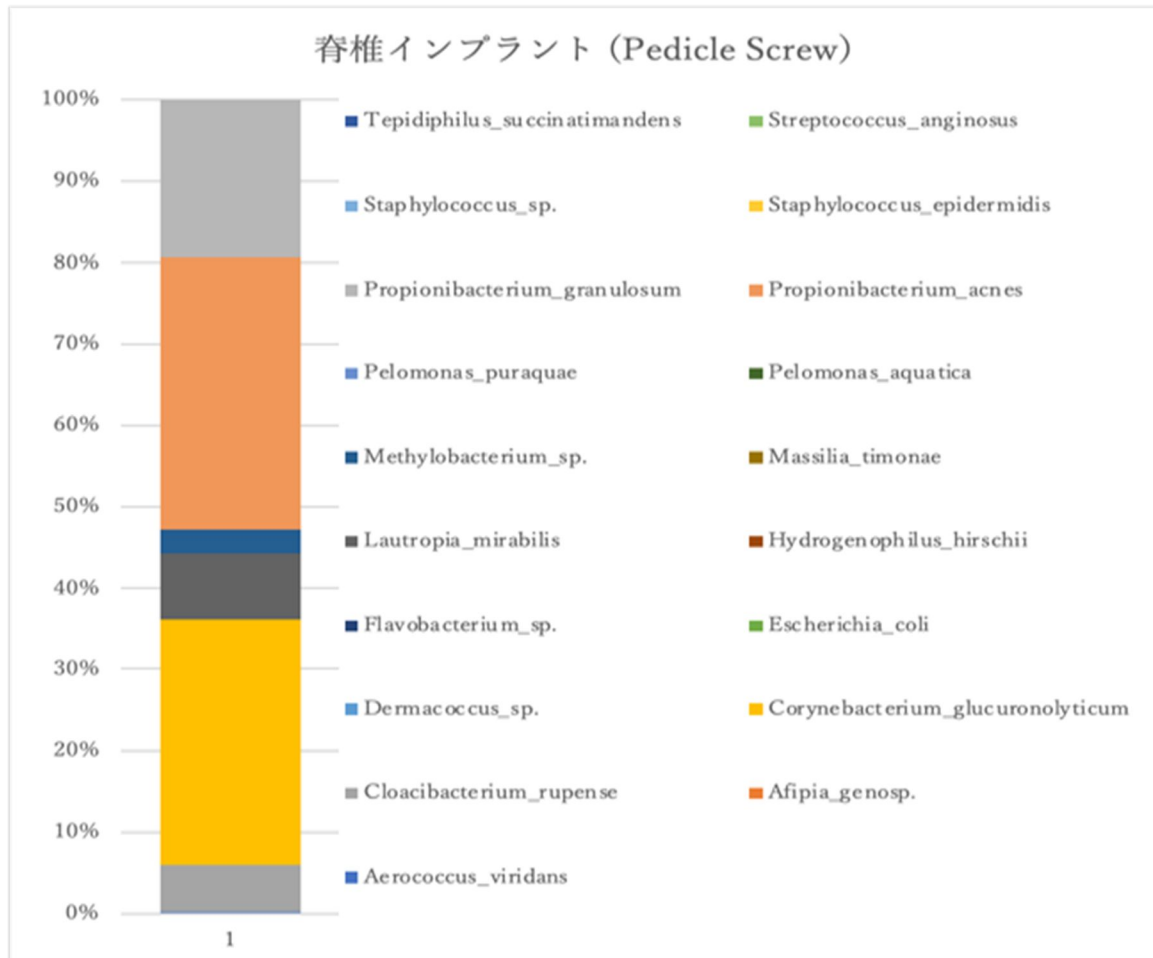
## 4. 研究成果 (代表例による結果と考察)

骨軟部組織細菌叢、および PCR による細菌定量の測定、データ検証、培養検査や臨床経過との相関、診断プロトコールを考察し、感染症診断の基盤を構築した。

### (3) 臨床検体の検討

#### (脊椎インプラント)

脊椎早期 SCREW ゆるみ例に超音波処理法をおこなった結果、超音波処理法のみ細菌検出を認めた。抜去した脊椎インプラントから複数の弱毒細菌の存在が示唆され、培養検査と一致していた。インプラント検体における定量 PCR の結果は、陰性コントロールに比べて多く、細菌の存在が示唆され、定量的に細菌の存在が示された。



(足/骨髄炎 (インプラント周囲腫瘍))

#### NGS 解析結果

(PC:陽性コントロール、NC:陰性コントロール、*E. coli* は定量的陽性コントロール)

	1 <i>E. coli</i> $1.0 \times 10^7$ CFU/ml : $10^7$ (PC)	2 足 骨	3 足 骨	4 <i>E. coli</i> $10^6$ (PC)	5 足 骨	6 <i>E. coli</i> $10^6$ (PC)	7 NC
<i>g__Propionibacterium</i>	0%	0%		4%	0%	17%	34%
<i>;g__Sediminibacterium</i>	0%	1%	0%	1%	2%		2%
<i>o__MLE1-12;f__;g__</i>	0%	0%	0%	1%	1%		4%
<b><i>c__Bacilli</i></b>		<b>11%</b>	<b>7%</b>		<b>7%</b>		
<b><i>o__Bacillales</i></b>		<b>57%</b>	<b>60%</b>		<b>56%</b>		
<b><i>g__Staphylococcus</i></b>		<b>29%</b>	<b>29%</b>		<b>28%</b>	6%	
<i>g__Streptococcus</i>	0%		0%	4%		14%	25%
<i>f__Bradyrhizobiaceae;Other</i>	0%		0%			2%	6%
<i>f__Bradyrhizobiaceae;g__</i>	0%	0%	1%	1%	2%	7%	3%
<i>f__Sphingomonadaceae;g__</i>	0%		0%		1%	2%	3%
<i>f__Enterobacteriaceae;g__</i>	99%			85%		35%	13%
<i>f__Sinobacteraceae;g__</i>	0%	0%		0%	0%	1%	6%
<i>Others</i>	0%	2%	2%	4%	3%	16%	3%

2.3.4 検体ではバシラス属が検出された。ブドウ球菌も一つのコントロール検体からみとめたが細菌叢の比率が高く、検体として存在していることが示唆された。定量陽性コントロールと陰性コントロールである程度判別ができることが確認された。培養検査ではブドウ球菌の検出であったので一部の結果が NGS 結果と一致したが培養検査で検出できなかったバシラス属を検出した。

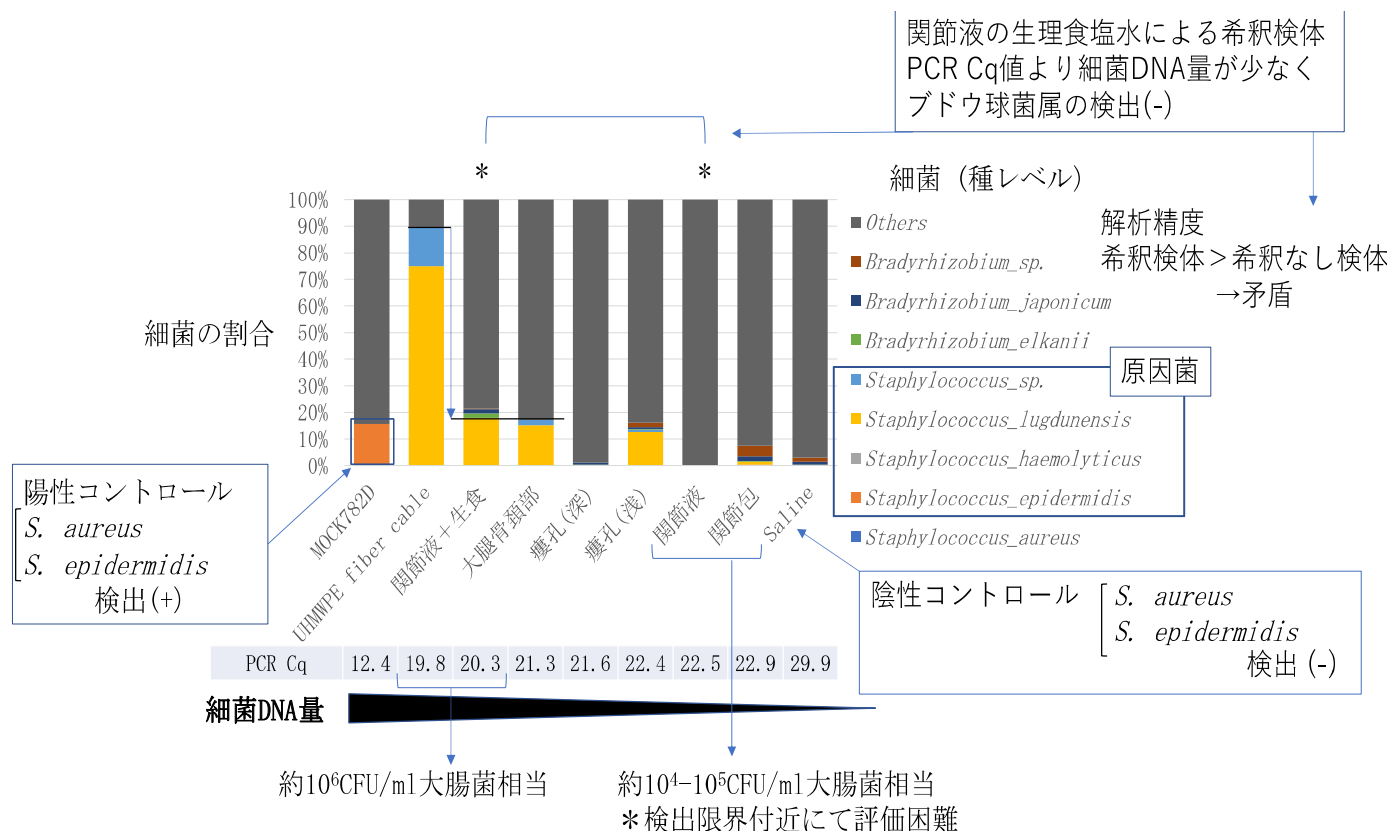
### (股関節 (PJI))

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) 培養検査と一致した以外の細菌検出も認めた。ブドウ球菌の複数検出が可能であったが、同時に共通して検出されるコンタミネーション細菌を認めた。コンタミネーションと考えた背景は、陰性コントロールで検出され、定量評価とあわせて検討した場合、検体に含まれる細菌量が少なくなるにつれ優勢となっていたことによる。これにより、細菌定量とシーケンス結果の比較にて、複数サンプルの同時解析を陰性コントロールとともに行うことで、コンタミネーション細菌が判別できることが証明された。

(引用: Ueda, N. Method for predicting sample quality, method for predicting accuracy of nucleic acid sequence analysis, device for predicting sample quality, and device for predicting accuracy of nucleic acid sequence analysis. Japanese Patent Application Disclosure 2021-193981.)

一方で、培養検査と一致している細菌は、細菌量の増加とともに占める割合が増加しており、骨軟部組織感染症、インプラント周囲感染において NGS の際には、**定量的評価とともに、陽性、陰性コントロールを含む複数サンプルの同時解析が必要である。逆に、単一のサンプルでコントロールが提出されていないシーケンス結果では真偽を証明できない。**

(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)



以上より、整形外科領域全般において NGS を用いた評価が可能である。複数サンプル、定量的評価、陽性、陰性コントロールがシーケンスに必要なことが示唆された。また、**細菌量が少ないサンプルのシーケンス結果は現時点では信頼性にかける。**現状では、感染症診断ガイドラインにおいても、判別不可能な感染症の最終判断は、検体の細菌量が多いものにおいてシーケンスがなされるべきである。

結論として、感染症診断は、感染か否か、細菌の存在は、NGS でなく定量 PCR によって事前に判別でき、シーケンス前の定量 PCR が感染症診断の中心となる。シーケンス検体として適切な検

体かどうか、精度予測が定量 PCR でおこなえる上、迅速診断が行える。今後、整形外科検体の蓄積が相当数必要で、コンタミネーションの課題から陽性、陰性コントロールを含む、複数サンプルの解析による結果を慎重に分析すべきであり、単純な単一サンプルのシーケンス結果では、不確かな結果による結論を導く危険性が高い。

最後に、本研究の定量 PCR と NGS に用いたプライマーが同一領域である。涉猟しえた限りこのような検討はなく、本結果がこれまでの NGS 報告と一致するのかが必要である。今後の整形外科領域の感染症例の質の良い検体の蓄積が必要である。NGS による感染症診断に定量 PCR との組み合わせは良いと考えられ、コントロールおよび複数検体の検討は必須である。今後、NGS による病態解析と臨床への応用が期待できる。

( 引用 : Ueda N et al. Verification of a New Pathogen Detection Method by PostSonication Next- Generation Sequencing with Quantitative Real-Time PCR for the Diagnosis of Orthopedic Biofilm Infection. Researchsquare.2023 <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-3469124/v1>[[Accessed 1 May 2024] )

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 植田成実, 飯田寛和, 齋藤貴徳.	4. 巻 57
2. 論文標題 細菌培養陰性例への対応 Next-generation Sequencingの現状と可能性	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 臨床整形外科	6. 最初と最後の頁 233-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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, 井上 潤, 外山 雄康, 奥田 和之, 飯田 寛和, 齋藤 貴徳
2. 発表標題 次世代シーケンサーと定量PCRによる新規人工関節周囲感染およびインプラント周囲感染症診断法
3. 学会等名 日本整形外科学会雑誌 2022年3月 (公社)日本整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植田 成実, 奥田 和之, 飯田 寛和, 齋藤 貴徳
2. 発表標題 人工関節周囲感染の診断と治療を目的とした迅速薬剤耐性遺伝子検出法の検討
3. 学会等名 日本整形外科学会雑誌 2022年9月 (公社)日本整形外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 澤田 允宏, 植田 成実, 外山 雄康, 齋藤 貴徳
2. 発表標題 人工関節周囲感染および骨軟部組織感染症診断を目的とした骨軟部組織における超音波処理の有用性
3. 学会等名 日本骨・関節感染症学会 2022年7月
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 次世代シーケンサーによる整形外科バイオフィルム感染症診断を目的としたqPCR併用による新規診断法の基礎的検証
3. 学会等名 第36回日本整形外科学会基礎学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 植田成実
2. 発表標題 人工関節周囲感染診断のための次世代シーケンサーによる原因菌検出法
3. 学会等名 第44回日本骨・関節感染症学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 安達伸生	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 230
3. 書名 骨・関節感染症の治療戦略	

1. 著者名 安達伸生	4. 発行年 2022年
2. 出版社 南江堂	5. 総ページ数 230
3. 書名 骨・関節感染症の治療戦略	

〔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	植田 成実  (UEDA Narumi)  (30632757)	関西医科大学・医学部・助教    (34417)	
研究分担者	外山 雄康  (TOYAMA Takeyasu)  (50829306)	関西医科大学・医学部・助教    (34417)	
研究分担者	石原 昌幸  (ISHIHARA Masaaki)  (60509470)	関西医科大学・医学部・助教    (34417)	
研究分担者	谷 陽一  (TANI Youichi)  (10509839)	関西医科大学・医学部・助教    (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