

令和元年6月19日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16707

研究課題名(和文)超音波処理法と次世代シーケンサーによるインプラント周囲感染の新規診断法の構築

研究課題名(英文) Sonication and Next-Generation Sequencing for Clinical Diagnosis of implant associated infection

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) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：抜去インプラントの超音波処理後液の培養検査は、バイオフィルムを破砕することにより整形外科インプラント周囲感染時の細菌検出率が向上する(Ueda N, Oe K et al. Journal of arthroplasty 2019)。複数の陽性・陰性コントロールを用い人工関節や骨接合材料など整形外科インプラント超音波処理液のmetagenomic sequencingと培養検査および定量PCR法を比較検証した(解析方法：ION REPORTER, QIIME)。本研究結果より、培養検査で検出できなかった細菌が検出可能であったが、細菌量が少ないと、コンタミネーションと区別が困難であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

人工関節周囲感染症(PJI)を含む整形外科インプラント周囲感染(OIAI)は、治療が困難な合併症である。世界中で行われているインプラントを用いた手術が増加していることを考えると、OIAIの相対的発生率は1%-2%と低くとも重大な医療負担および費用の原因である。個々の患者にとっても複数手術、長期間の治療・リハビリテーションを必要とする。OIAIの迅速かつ正確な診断は、特に抗菌薬治療や外科的治療を開始するためにも必要である。しかし、培養検査は、既に抗菌薬治療をうけている場合や難培養細菌の場合は検出や診断できないことも多く、NGSにより原因菌の検出が向上すれば、すみやかに診断、治療へ移行できる。

研究成果の概要(英文)：Culture of sonication fluid from explanted prostheses with our protocol may improve microbiological yield in Orthopedic related associated infection (OIAI) by disrupting the bacterial biofilm (Ueda N, Oe K et al. Journal of arthroplasty 2019). We assessed if metagenomic sequencing from sonication fluid can provide an alternative rapid and sensitive tool for diagnosis of OIAI. We compared metagenomic sequencing with standard culture in sonication fluid samples from prosthetic joint and other OIAI. The analysis method was analysis using ION REPORTER and QIIME. From the results of this study, it was possible to identify bacteria that could not be detected by culture tests, but when the amount of bacteria was small, discrimination from contamination was difficult.

研究分野：股関節外科

キーワード：人工関節周囲感染(PJI) 整形外科インプラント周囲感染(OIAI) 超音波処理法 PCR NGS

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

インプラント周囲感染は診断・治療ともに困難なため、長期間の加療と耐性菌の出現、高額医療が問題となる。人工関節周囲感染は、従来のインプラント周囲組織の培養検査（従来法）における細菌検出率が低く、複数検体を採取する必要があるが、どの箇所よりどれだけ採取し検査するか経験を要し、判断に迷うことも多い。しかし、培養検査は同定まで長い場合は2週間以上の時間が必要にも関わらず、限られた細菌しか検出できない。また、インプラント周囲感染診断と治療の難渋する要因はバイオフィームとバイオフィーム内細菌である。従来法では浮遊細菌の検出しかできないが、我々はバイオフィーム内細菌の検出を目的として、抜去したインプラントの超音波処理によりバイオフィームを破砕することで、培養法における生菌の検出率を向上させた（植田成実ほか 整・災外 2015）。しかし、培養検査は、休眠状態の細菌（viable but non-culturable: VBNC）や既に抗菌薬加療をされていた場合に原因菌を同定できないため、更なる細菌検出、病態の把握、診断にも遺伝子レベルにおける細菌検出が必要と考えた。

2. 研究の目的

我々はバイオフィーム内細菌の遺伝子レベルでの検出を目的として抜去したインプラントの超音波処理後に次世代シーケンサー（Next Generation Sequencing: NGS）を用いて細菌種を同定することを考えた。本研究目的は、超音波処理法・PCR・NGSを用い、遺伝子レベルでの細菌検出法を検証・構築することである。

3. 研究の方法

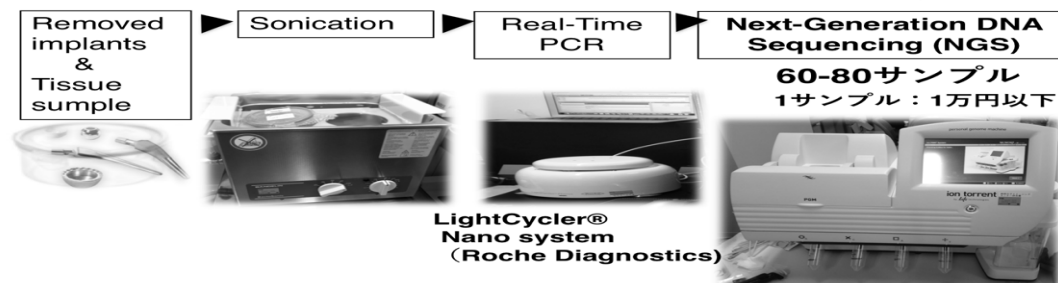
超音波処理法・PCR・NGS：腐骨や関節包、癒痕組織などの生体組織、また、インプラント周囲感染以外の整形外科感染症を対象として以下項目を検証する。

16S rRNA 可変領域（V1、V2）をターゲットに定量PCR（Perez et al. 2014 JCM）を *E. coli* ATCC 25922 株の吸光度測定して希釈系列を作成、相対および絶対評価にて定量する。

NGS は DNA 抽出後にタグ付け PCR 後に精製する。作成したライブラリは電気泳動を Agilent2100 バイオアナライザー（Agilent Technologies）により行い、ライブラリの確認と測定値から希釈して均一濃度に調整後 Ion Torrent™ Next-Generation Sequencing Ion Chef™ System（Thermo Fisher Scientific Inc.）を用い約15時間で2ラン分調整する。その後 ION PGM（Thermo Fisher Scientific Inc.）で318チップを用いてNGSし（約5～6時間）。得られた結果を ION REPORTER™ SOFTWARE で解析し、QIIME でも検証を行う。

(1) インプラント周囲感染診断のための超音波処理法で検出された細菌の検出

(図1)



(2) 解析方法（ソフト）の検証（QIIME と ION REPORTER™ SOFTWARE の比較）を行う。

(3) 再現性の検証、陽性・陰性コントロールの検証を行う。

4. 研究成果

(1) インプラント周囲感染診断のための超音波処理法で検出された細菌の検出（NGS）感染例（人工膝関節感染・人工股関節感染例、骨接合後感染例）における検証結果（日本整形外科学会 2019.5 発表）

(i) 術前・術中培養検査による同一細菌が2検体以上で検出された細菌の検出結果

* 培養法（従来法+超音波処理法）6/6例(100%): 27検体中 12検体 (44%)

・従来法 : 2/6例(33%):16検体中 3検体

・超音波処理法 : 5/5例(100%):11検体中 9検体

* NGS（超音波処理液（培養検査使用時検体）） : 6/6例(100%):12検体中 11検体

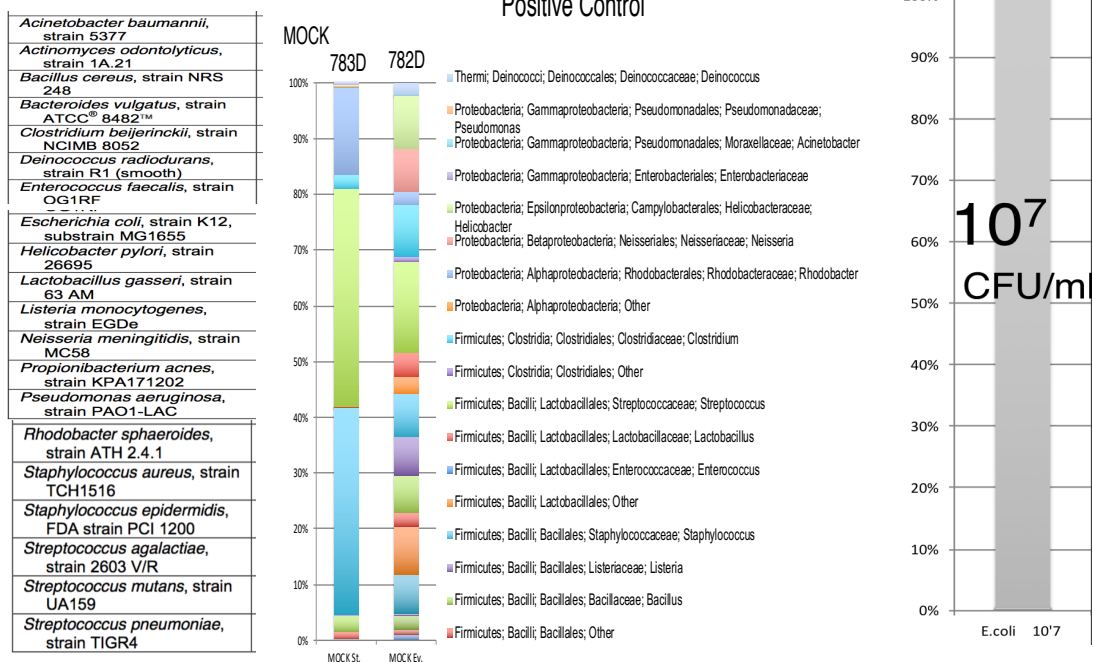
(2) 解析法の検証（QIIME と ION REPORTER™ SOFTWARE の比較）（NGS）

ION REPORTER の大腸菌解析および MOCK の QIIME による検証の結果、大腸菌を検出できていた（図2・図3）。

(3) 陽性・陰性コントロールの検証（PCR/NGS）

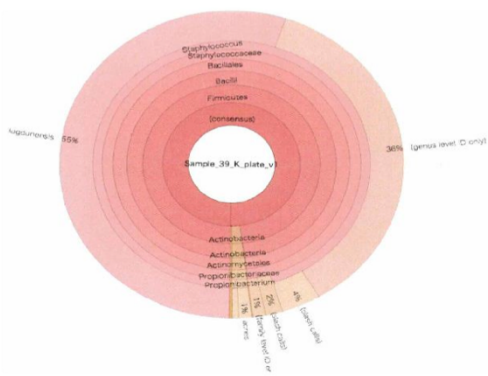
(i) 17属細菌 DNA（20種細菌）を含む BEI リソース社 Mock Cominity 782D/783D を用いて検証し、16/17属（94%）同定できた。属レベルまで解析できており、大腸菌単独も同様に解析された（図2）。

(図 2)



(ii) 大腸菌による検証は、定量 PCR 約 10⁷CFU/ml で NGS は約 100%の一致を認めた (図 3)。

(症例提示)



2019.6 (Lisbon) EFORT 口頭発表

(症例) : 52 歳男性、骨髄炎・インプラント周囲感染 (検査結果)

- ①超音波処理法 : CNS (1)/1
 - ②インプラント周囲組織培養 : MSSA (2)/7
 - ③ NGS : 89% *Staphylococcus* 属、11% 他細菌 DNA
- Staphylococcus* 属
55% : *Staphylococcus lugdunensis*
44% : 細菌種不明

Ion reporter を用いて種レベルまで解析した結果、CNS は 55% (*Staphylococcus lugdunensis*) を認めた。*Staphylococcus* 属のうち 44% を占める細菌は菌種特定に至らなかった。菌量は定量 PCR にて 10⁶ - 10⁷ CFU/ml、大腸菌定量 PCR・NGS による同程度の遺伝子定量付近の検出率は 100% 近く (図 2)、検出された解析結果は信用できると考えた。11% 他細菌 DNA は、原因細菌、試薬や超音波処理液の生理食塩水に含まれている細菌 DNA などのコンタミネーションの可能性を考えた。これら結果は *Staphylococcus* 属の複数菌種の感染を示唆していた。本症例は、インプラント周囲組織培養検査結果と超音波処理法検査が一致しておらず解釈が難しく、超音波処理法と従来培養法における検査結果が異なる場合、両方とも原因菌である可能性があるが、一方でコンタミの可能性も念頭に置く必要がある。インプラント周囲組織培養検査は従来法による培養検査のため、浮遊細菌検出が中心である、しかし超音波処理法はバイオフィルム内細菌を標的としている。超音波処理法における培養検査結果と NGS による結果を詳細まで調べると、培養検査では検出しえなかった細菌叢が明らかになるとともに様々なコンタミネーションの可能性を考えて検討する必要がある。

まとめ

本研究から、次世代シーケンサーは培養法で検出できていない細菌を検出できると考えられるが、解析結果から判明した細菌叢が病的なものであるかどうかなどの検証が課題である。今後、臨床的に NGS が使用されるために感染と非感染の境界ラインにある症例を NGS により解析し、臨床的経過を追っていく必要と、感染原因菌と細菌の colonaization、コンタミネーションに関し引き続き検証が必要である。また、NGS による検体そのものだけの解析評価は、それらが真に正しいかどうか証明はできない (DNA コンタミネーションの鑑別はできない)。今後、複数の陽性・陰性コントロールを含め解析して評価を行う必要がある。

5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ①. 植田成実, 稟 賢一, 奥田和之, 中村知寿, 飯田寛和, 蔦 幸治, 齋藤貴徳「超音波処理による整形外科インプラント周囲感染診断と今後の展望」(超音波処理後培養検査・PCR・次世代シーケンサー (Next Generation Sequencing: NGS) による新規診断法)」第 42 回日本骨・関節感染症学会奨励賞 第 12 回大正富山 Award 受賞者記念講演、2019 年 7 月 19 日 (横浜)
- ②. Narumi Ueda, Hirokazu Iida, Handa Takehito, Tokunaga Hirohiko, Saito Takanori Chronic Osteomyelitis After Proximal Femoral Fracture Treated With Antibiotic-Impregnated Bone Grafts; Pathogen Detected With Next-Generation Sequencing Using Sonication、EFORT (欧州整形外科学会)、2019 年 6 月 5 日 (Lisbon)
- ③. 植田成実, 稟 賢一, 飯田寛和, 小川将史, 阿部瑛紀子, 中村知寿, 齋藤貴徳 次世代シーケンスを用いた超音波処理法によるインプラント周囲感染診断法 Diagnosis using next-generation sequencing (NGS) with sonication for implant-associated infection、日本整形外科学会、2019 年 5 月 12 日 (横浜)
- ④. 植田成実, 飯田寛和, 徳永裕彦, 半田剛士, 齋藤 貴徳 Antibiotic-impregnated bone grafts (AIBGs)を用いた大腿骨近位部骨折骨接合術後の慢性骨髓炎の治療経験 (超音波処理法併用 Next-generation sequencing (NGS)による原因菌同定)、中部災害整形外科、2019 年 4 月 5 日 (三重)

6. 研究組織

研究協力者

飯田 寛和 (IIDA, Hirokazu)
奥田 和之 (OKUDA, Kazuyuki)
小川 将史 (OGAWA, Masashi)
阿部瑛紀子 (ABE Akiko)
稟 賢一 (OE, Kenichi)
中村 知寿 (NAKAMURA, Tomohisa)
齋藤 貴徳 (SAITO, Takanori)
蔦 幸治 (TSUTA Koji)

※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、研究者個人に帰属されます。