

平成 30 年 6 月 10 日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10489

研究課題名(和文) 感染人工関節におけるPCRラテラルフロー法を用いた迅速遺伝子細菌検査法の確立

研究課題名(英文) Establishment of rapidly testing bacterial gene using PCR lateral flow assay in periprosthetic joint infection

研究代表者

内山 勝文(Uchiyama, Katsufumi)

北里大学・医学部・准教授

研究者番号：90286310

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：一般的な細菌検査は結果が得られるまでに、数日を要するが、われわれは人工関節周囲感染の原因菌を手術中に迅速に診断するための方法として、細菌の遺伝子を調べる方法につき検討した。PCRラテラルフロー法はインフルエンザの判定キットと同様で、femA、mecA の遺伝子が陽性の場合、試験紙に線が出現する。その組み合わせからブドウ球菌系3菌種(MRSA, MSSA, MR-CNS)の感度の高い検出が可能になった。

研究成果の概要(英文)：The gold standard for diagnosing periprosthetic joint infections (PJI) is bacterial culture. Unfortunately, it usually takes a few days for the results of these cultures to be obtained. In this study, the objective was to determine whether PCR-lateral flow (PCR-LF) tests could be used to effectively diagnose PJI. We used PCR-LF to diagnose common causes of PJI and compared the results to those from conventional bacterial cultures of the same samples. Two genetic markers specific to MRSA were being detected during this analysis. PCR results were interpreted as follows MRSA, MSSA, MR-CNS or negative. Our data indicate that PCR-LF was superior to bacterial culture tests in terms of sensitivity, particularly for PJI samples. In conclusion, our results showed that PCR-LF is a useful tool for identifying pathogenic bacteria in PJI.

研究分野：整形外科

キーワード：人工関節周囲感染 PCRラテラルフロー法 迅速細菌遺伝子検査 シーケンス解析 16S-rRNA MRSA

## 1. 研究開始当初の背景

日本における人工関節の手術件数は、年々増加の一途を辿っている。一方で日本における人工関節登録制度のデータでは、術後感染症を原因とした再手術の頻度が股関節で17%、膝関節で25%の割合を占めており、人工関節周囲に発生した細菌感染はバイオフィルムを形成し、その治療には難渋する。術後感染症を疑った場合、いかにして早期に診断し、最良の治療を選択するかが重要な課題となるが、一般細菌培養検査では結果が得られるまでに2~3日を要するのが現状である。近年、人工関節置換術のインプラント周囲感染における新たな迅速診断法としてリアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction: PCR) 法が臨床応用されている。迅速で有用な検査ではあるがこの方法では様々な菌種の同定は困難であり、治療に必要な至適抗菌薬の選択は難しい。

われわれはすでに臨床検体からメチシリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA) を検出可能なPCRラテラルフロー法 (PCR-LF法) における基礎的検討および臨床的評価を行っており、CLSI法を用いた細菌検査を基準とした比較検討では感度91.7%、特異性92.9%を示したことを報告した。これまでにわれわれは人工関節置換術後におけるインプラント周囲感染の迅速遺伝子細菌検査を行うための予備実験として、関節液や手術中に採取された組織検体におけるPCR-LF法を用いた *femA* と *mecA* 遺伝子との組み合わせによる黄色ブドウ球菌 (MSSA)、MRSA、薬剤耐性コアグラーゼ陰性ブドウ球菌 (MR-CNS) の原因菌種の迅速同定を試みており、51関節の関節液のうち、臨床経過において感染ありと診断した20関節におけるPCR-LF法の感度は100%、特異度は87.1%であったことを報告した (2014年、第87回日本整形外科学術総会・第37回日本骨関節感染症学会)。

## 2. 研究の目的

そこで本研究では人工関節周囲感染の早期診断・菌種同定のためにPCR-LF法を用いた迅速遺伝子細菌検査法を確立する。一般細菌培養検査では結果が得られるまでに数日を要することや、弱毒菌感染や抗菌薬が投与されている場合は偽陰性となる可能性が高い。PCR-LF法ならば短時間で感度の高い結果が期待できることから、整形外科領域で検出頻度の高いMSSA、MRSA、MR-CNSの菌種を同定し、手術中に迅速診断を行うことができれば、適切な手術方法を選択することが可能になると考える。

特に本研究ではグラム陽性菌11種類、グラム陰性菌9種類、MRSA、基質特異性拡張型ラクタマーゼ産生菌 (ESBL) に対応する特異的プローブの開発によりさらに多くの菌種を同定し、至適抗菌薬の選択による抗

菌薬の適正使用を目標にする。さらに生菌と死菌の分別測定法であるpropidium monoazide (PMA) 処理を導入し、PCR法の欠点である死菌の遺伝子増幅による偽陽性を減らし、正確な診断を行うことも目標とする。

## 3. 研究の方法

臨床現場で採取された検体のDNA増幅を行い、PCR-LF法を用いて菌種の同定が可能であるか検討する。同時に一般細菌培養検査、関節液検査 (細胞数、糖、CRP値、黄色ブドウ球菌が産生する外毒素など) 結果との相関や解離を臨床データや経過と比較し妥当性を検証する。死菌由来のDNA増幅による偽陽性を減少させる手段として、PMA処理の有用性を明らかにする。

研究の継続のほかに、手術中の迅速検査に対応できる環境や運用の整備および臨床現場での検証。医師、看護師、臨床検査技師との連携による、臨床現場での有用性および治療効果の検討を行う。

### 【平成27年度】

#### 1) 関節液および術中組織検体におけるPCR-LF法による菌種同定の試み

##### 検体の採取

無菌的に採取可能であった関節液あるいは手術中の術野から採取した関節液、軟部組織を対象とする。人工関節 (股関節、膝関節) インプラントの細菌感染の場合、なるべく人工物周囲の組織を異なる3カ所以上から組織を採取する (内山)。関節液はEDTA管に採取し、組織検体は滅菌スピッツに封入し検査室にて超音波洗浄機 (既存設備: W-113MK型: 本多電子) で処理する。

##### 検体の処理 (内山・櫻井)

前処理法: 関節液はNalc処理 (NALC-NaOH法) により粘性を取り除く。DNAの抽出は、検体前処理液にリゾスタフィン (SIGMA) を添加し、37・10分加温する。その反応液から、QIA Amp DNA Mini Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出する。

##### 核酸の増幅 (内山・櫻井)

サーマルサイクラー装置によりDNAの増幅を行うと同時に、バックアップとしてリアルタイムPCR装置 (既存設備: LightCycler® Nano システム: Roche社) を用いて *femA*、*mecA*、16S-rRNA 遺伝子をuniversal-PCRを用いて同一プログラムにより検出する。

##### 死菌と生菌との鑑別 (櫻井)

PMAのような選択的膜透過性試薬は、死細胞・死菌に入るとDNAを修飾し、死細胞・死菌由来のDNAを不活化する。これにより、生細胞・生菌由来のDNAだけがPCR増殖可能となる。PhAST blue: (株) リライオン (既存設備) で前処理し、DNA増幅の差異や感度、有用性につき検討する。この処理は検体採取後なるべく早期の処理が必要になるため研究代表者が手術を行っている間に研究協力

者により DNA の抽出、増幅処理が施される。  
PCR-L 法による菌の検出と至適抗菌薬の選択（内山・櫻井）

一般的に Universal-PCR は DNA 増幅後の融解曲線解析による融解ピーク温度の違いによりグラム陽性、陰性の分類が可能である。しかし本研究では PCR-LF 法を用いて、グラム陽性菌 11 種類、グラム陰性菌 9 種類、MRSA、ESBL のスクリーニングに対応するオリジナルの特異的プローブを使用することで、マルチプレックス PCR 化により同時増幅し、菌の検出の迅速判別を行うことが可能になるか検討を行う。細菌の universal primer を用いて各菌種における遺伝子を、ピオチン化プライマーを用いて PCR 産物を作成する。そして、一本鎖ピオチン PCR 産物と特異的に結合するキャプチャープローブを固相化したメンブレン上で、一本鎖ピオチン化 PCR 産物とキャプチャープローブおよびストレプトアビジン標識金コロイド複合体を形成させる。その結果、各菌種固有の PCR 遺伝子バンドを目視により判定することができる。

細菌培養検査における菌種同定と薬剤感受性（二本柳）

一般細菌培養検査を施行する。また臨床検体から分離された細菌の生化学的性状は、Pos Combo 3.1J パネル (SIEMENS) を用いて解析する。薬剤感受性試験は、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) の推奨する微量液体希釈法に準拠した全自動細菌システム MicroScan WalkAway-96SI (SIEMENS) を使用し、最小発育阻止濃度を測定する。

臨床的な最終診断との整合性の評価（内山・櫻井）

一般細菌培養検査および関節穿刺液検査（細胞数、糖、CRP 値など）と臨床経過（白血球数、CRP 値、病理検査結果）を比較し臨床的な最終診断との整合性につき調査する。細菌培養検査の結果と PCR-LF 法による各菌種同定の迅速判別の感度、特異度につき検証する。また、当院で蓄積されている菌種別の抗菌薬感受性データより、菌種に対応した効果的な抗菌薬の選択と、細菌培養検査での抗菌薬感受性との一貫率につき検討する。

【平成 28 年度以降】

上記研究を継続しながら、手術中の迅速検査に対応できる環境の整備を行う。術中報告体制、人材の育成、人員配置、機器の整備や臨床検査代行企業との連携が不可欠である。また試験使用の機器や試薬の準備や、運用のための環境づくりの問題点につき検証し、PCR-L 法の臨床現場での有用性および治療効果の検討を行う。

2) 手術中人工関節感染の迅速遺伝子細菌検査の運用整備の試み（内山・櫻井・二本柳）

以下のスケジュールに沿って運用の整備を行う。

院内における合同管理者会議での承認  
細菌スクリーニングに対応するオリジナルの特異的プローブの開発

当院および神奈川県相模原地区の疫学を調査し決定したグラム陽性菌 12 種類、グラム陰性菌 9 種類、MRSA、ESBL のスクリーニングに対応するオリジナルの特異的プローブを開発。

PMA 処理による生菌と死菌の分別

手術中人工関節感染の迅速検査には、報告時間の制約 (2 時間以内) の制限があるため PMA 処理 (約 40 分) まで行えるか検討が必要である。

関節液を用いた PCR-LF 法の運用試験

手術中迅速検査想定試験・人材育成

人材育成は病院内の臨床検査技師だけでなく、臨床検査代行企業からの出向による支援協力者にも行い、連携作業で運用する。

手術中検査のバックアップ整備

手術中 PCR-L 法のバックアップ体制として、リアルタイム PCR 装置による細菌スクリーニング検査を整備する。

整形外科との最終調整（結果の解釈と整合性の検討）

運用開始と運用に伴う問題点の抽出と解決

PCR-LF 法の有用性の検討と臨床現場での治療成績の検討

PCR-LF 法の結果は治療法の決定のための参考とし、最終的には主治医の判断で一般細菌培養検査、関節穿刺液検査値、および術中迅速病理結果から一期的な手術を行うか、抗菌薬含有人工骨やセメントを使用した再置換術を行うか、感染を鎮静化させ二期的に手術を行うかを判断する。

#### 4. 研究成果

人工関節術後細菌感染の術中の迅速細菌遺伝子検査の運用を目的に、整形外科関連感染症の検体を、PCR-LF 法を用いてブドウ球菌系 3 菌種 (MSSA、MRSA、MR-CNS) の検



出を試みた。

同時に臨床データや経過、関節液検査（細胞数、糖、CRP 値など）病理組織像から診断した感染陽性例と判断した検体の一般細菌培養検査結果と比較し、PCR-LF 法の感度が高いことが分かったが、特異度は一般細菌培養検査が優れていた。

## 整形外科領域のPCR-LF法の精度

対象：感染例 (MSSA, MRSA, MR-CNSのみ) 40例73検体  
非感染例 74例102検体

	細菌培養	PCR-LF法
感度(%)	56.2	<b>95.1</b>
特異度(%)	95.9	<b>94.1</b>

しかし、この結果は臨床的に問題ない死菌の核酸を増幅している可能性も考えられたため結果の解釈には臨床医の経験的な診断も必要である。そこで生菌と死菌の分別測定法である propidium monoazide (PMA) 処理を導入したが、希釈感度試験で菌量が  $10^4$  CFU/ml 以上、混合試験より死菌と生菌が  $10^2$  CFU/ml 以上の菌量の差がないと分別することが出来なかったため、別の臨床応用可能な方法の導入が必要であると考えられた。

また、*femA*、*mecA* の両者が陰性の場合、その他の菌が存在していても(偽)陰性になってしまうという欠点があった。そこで 16S-rRNA 遺伝子を増幅することで細菌の存在を確認し、さらにシーケンス解析による塩基配列情報から細菌の種類を類推し、一般細菌培養結果とシーケンス解析の相同検索結果と比較したところ、菌種の検索が十分可能になった。

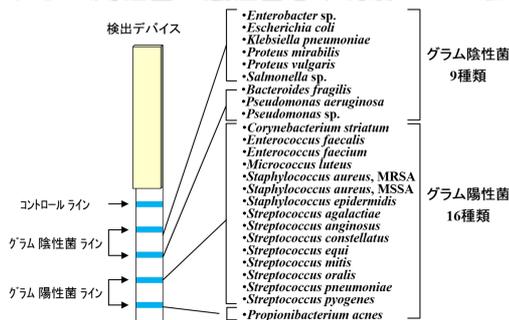
だが一般細菌培養陰性例の検体の中には、16S-rRNA 遺伝子が陽性であってもシーケンス解析で菌種の検索が不可能な検体も存在した。原因として、16S-rRNA 遺伝子の検出には大腸菌由来の酵素を使用しており、PCR のサイクル数を増やすと大腸菌の遺伝子が検出されてしまうためであった。そこで、真核細胞由来の eukaryote-made thermostable DNA polymerase (E-Taq) に着目し(Niimi H, et al. J Clin Microbiol, 49: 3316-3320, 2011) その酵素の提供を受け PCR のサイクル数を上昇させることが可能になりシーケンス解析での再評価を行ってきた。その結果、従来の PCR 酵素を用いた材料からの細菌遺伝子検査よりも E-Taq 法からの検出率は 2.8 倍高く、シーケンス解析にて 20 菌種の推定が可能になった。しかしシーケンス解析の手法は簡便でなく、結果を得るのに時間を要してしまう。

そこで PCR-LF 法を用いて、グラム陽性菌 16 種類、グラム陰性菌 9 種類の細菌 16S-rRNA 遺伝子の universal プライマーを用いた PCR 法と耐性菌で検出頻度が高い MRSA、ESBL の同時スクリーニングに対応するオリジナルの特異的プローブを用いた PCR-LF 法の開発を勧め、完成させた。

関節液におけるグラム陽性菌・陰性菌感染判別 PCR ラテラルフロー法の臨床的有用性を検討するために、臨床診断との整合性を検討した。結果として頻度の高い検出菌は十分診断可能であることがわかった。しかし同定

できる菌種の数に限界があるため、検出頻度の低い菌の診断は困難であり、さらに新たな診断法の導入も必要であると考えられた。

## グラム陽性菌・陰性菌感染判別 PCR-LF法



## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

峯岸洋次郎, 内山勝文 他: PCR ラテラルフロー法を用いた股関節細菌検査の有用性について - 細菌培養検査との比較 - . Hip joint. 査読無, 41,2015:763-768.

内山勝文, 櫻井慶造 他: 人工関節周囲感染 PJI 診断における新しい分子生物学的手法の試み - PCR ラテラルフロー法による迅速遺伝子細菌検査法 - . 関節外科. 査読無, 34,2015:28-34.

〔学会発表〕(計 15 件)

内山勝文 他: 人工股関節手術における SSI 予防の実際 . ISEHARA INFECTION CONTROL SEMINAR (特別講演) . 2018 年 3 月 23 日, 伊勢原

峯岸洋次郎, 内山勝文 他: 整形外科領域感染症における保険適用外検査法の有用性の検討. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 27 日, 沖縄

内山勝文, 櫻井慶造 他: 関節液におけるグラム陽性菌・陰性菌感染判別 PCR ラテラルフロー法の臨床的有用性の検討. 第 32 回日本整形外科学会基礎学術集会. 2017 年 10 月 26 日, 沖縄

Yojiro Minegishi, Katsufumi Uchiyama, The effective evaluation of measurement of  $\alpha$ -Defensin derived from synovial fluids in orthopedic area infection. 36th Annual meeting of the European Bone and Joint Infection Society (国際学会ポスター) 2017 年 9 月 7 日, France

Katsufumi Uchiyama, Keizou Sakurai, Shin Nihonyanagi 他: Clinical evaluation of efficacy using PCR lateral-flow assay for Gram-positive and Gram-negative bacterial infection detection in joint fluid. 36th Annual meeting of the European Bone and Joint Infection Society (国際学会口演) . 2017 年 9 月 7 日, France

峯岸洋次郎, 内山勝文 他: PCR ラテラルフロー法を用いた整形外科領域 MRSA 感染症

診断の有用性の検討. MRSA フォーラム  
2017.2017年7月15日,東京

内山勝文 他: 当院での人工股関節置換術  
における SSI の予防・診断・治療. 第 160 回  
神奈川整形災害外科研究会. 2017年7月1日,  
横浜

内山勝文 他: 人工関節周囲感染の予防と  
早期診断の試み. 第 43 回日本股関節学会学  
術集会. 2016年11月5日, 大阪

内山勝文, 櫻井慶造 他: PCR ラテラルフロ  
ー法と 16S rRNA 陽性例のシーケンス解析を  
用いた細菌感染診断の役割 - 細菌培養検査  
との比較 -. 第 31 回日本整形外科学会基礎  
学術集会. 2016年10月13日, 福岡

内山勝文 他: 人工股関節周囲感染に対す  
るステムを温存した治療法の工夫. 第 39 回  
日本骨・関節感染症学会. 2016年7月8日, 岡  
山

峯岸洋次郎, 内山勝文, 二本柳伸 他: PCR  
ラテラルフロー法を用いた MRSA 感染症診  
断 - 評価法・臨床像・その意義について -. 第  
64 回日本化学療法学会. 2016年6月9日, 神  
戸

峯岸洋次郎, 内山勝文, 二本柳伸 他: 関節  
液 CRP 値測定は人工関節周囲感染の診断に  
有用か? 第 90 回日本感染症学会総会・学術  
講演会. 2016年4月16日, 宮城

内山勝文, 櫻井慶造, 二本柳伸 他: 16S  
rRNA 遺伝子配列を用いたシーケンス解析に  
おける問題点の改善策 - 人工関節周囲感染  
の起炎菌検索 -. 第 90 回日本感染症学会総  
会・学術講演会. 2016年4月16日, 宮城

内山勝文, 櫻井慶造 他: 人工関節周囲感  
染における 16S リボソーム RNA 陽性例のシ  
ーケンス解析による起炎菌検索の試み. 第 64  
回東日本整形災害外科学会. 2015年9月11日,  
福島

内山勝文 他: propidium monoazide 処理に  
より治療効果を判定できた人工股関節術後  
MRSA 感染の 1 例. 第 38 回日本骨・関節感染  
症学会. 2015年7月4日, 香川

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :

権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

〔その他〕  
ホームページ等なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

内山 勝文 (UCHIYAMA KATSUFUMI)  
北里大学・医学部・准教授  
研究者番号 : 90286310

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号 :

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号 :

##### (4) 研究協力者

櫻井 慶造 (SAKURAI KEIZOU)  
北里大学病院・臨床検査部・主任

二本柳 伸 (NIHONYANAGI SHIN)  
北里大学病院・臨床検査部・感染管理室