

全自動リアルタイム PCR および次世代シーケンサー を用いた人工股関節周囲感染の診断と病態の解明

横浜市立大学 整形外科
崔 賢民

研究の背景

さまざまな運動器で感染症が起り得るが、特に整形外科手術によりインプラント固定された部位での感染は、診断に難渋し難治化しやすいことが特徴として挙げられる[1-3]。整形外科手術の中でも人工股関節全置換術 (THA) は、安定した術後成績が期待できる優れた手術方法であり、高齢化とともにその需要は上昇を続けている。一方で、人工関節周囲感染 (PJI) は、THA 患者における重篤な合併症であり、一定数に発生する PJI の完全な予防は困難である[4]。PJI の問題点として、確定診断が困難なために治療に難渋することが多いことが挙げられる。PJI のように、バイオフィームが形成されやすい環境での感染は、細菌培養検査が信頼性に欠けることが環境感染診断の領域で以前より報告されており、そのような環境では、細菌性遺伝子の同定は細菌培養検査に代わる重要な感染診断技術であることが検証されている[5, 6]。遺伝子診断による細菌の同定方法には、細菌特異的な遺伝子をターゲットとした診断方法と、抗菌薬耐性遺伝子をターゲットとした診断方法が存在しており、患者を対象とした臨床領域では、細菌特有の 16sRNA 遺伝子領域をターゲットとした 16sRNA-PCR およびメチシリン耐性遺伝子である *mecA* 遺伝子領域を対象とした MRS-PCR などの、リアルタイム PCR 法の有用性に関する報告が多い[7]。また、近年の遺伝子診断技術の進歩に伴い、

膨大な量の遺伝子配列の解析が迅速に可能となった。このような遺伝子の網羅的な解析は、次世代シーケンサーと呼ばれ、ヒトゲノムと疾患との関係の解明に広く用いられている。次世代シーケンサーは、細菌性 DNA の網羅的な解析を可能としており、16sRNA 領域を対象とした遺伝子解析は、これまで定性的な判定であった感染に対する遺伝子診断において、原因菌の同定を可能とするが、これらの遺伝子診断方法を整形外科感染症に応用した報告は少ない。一方で、細菌培養が陰性のため原因菌が不明となる PJI は多く、原因菌の種類によって手術方法や術後の抗菌薬の効果が大きく異なるため、原因菌の同定は、診断だけでなく治療においても重要な要素であり、次世代シーケンサーなどの遺伝子診断を応用した PJI の原因菌の同定方法の確立が求められている。

当院ではこれまで、整形外科領域の感染症の診断にリアルタイム PCR を用いた細菌性 DNA の同定を行ってきた[8, 9]。本方法では、MRS 特異的 PCR および全細菌に共通する 16s RNA 遺伝子を同定する 16sRNA-PCR を使用しており、細菌培養検査と比較して迅速性および感度に優れることを検証してきた[7-11]。一方で、従来のリアルタイム PCR 法の欠点として、A. コンタミネーションでの偽陽性の確率が高いこと、B. DNA 抽出や試薬調整などの手技が煩雑であること、C. 検査費用が高いが保険適応でないためコストを取れないこ

とや D. 用いる試薬により結果が左右されること、そして E. 原因菌の同定ができないことなどが挙げられる。

今回われわれは、日本股関節研究財団の助成を受け、

1. 腸腰筋膿瘍患者における 16sRNA-PCR および MRS-PCR の診断精度の検証
2. PJI における MRS 耐性菌遺伝子をターゲットとした全自動リアルタイム PCR の精度の検証
3. ショートリードシーケンサーを用いた細菌性 DNA 解析による原因菌の同定
4. ロングリードシーケンサーを用いた細菌性 DNA 解析による原因菌の同定

について研究を行ったので報告する(図 1)。

研究内容 1：腸腰筋膿瘍患者における 16sRNA-PCR および MRS-PCR の診断精度の検証

骨軟部組織感染症の治療において、適切な抗菌薬の使用は感染の鎮静化においても、耐性菌の助長を減らす意味でも重要である。腸腰筋膿瘍は、体の深部に位置する腸腰筋や脊椎椎間板から感染から生じる骨軟部組織感染症であり、非特異的な症状から診断および治療に難渋することが多い。患部が体内の深部に位置するため組織の採取も難渋することがあり、原因菌が不明なまま抗菌薬治療が開始されることも多い。一方で、本疾患においては長期間の抗菌薬治療が必要となることも多く、原因菌の同定が重要であり、特にメチシリン耐性の有無は、抗菌薬の選択において最も重要な要素である。そのためわれわれは、腸腰筋膿瘍に対する遺伝子感染診断として、16sRNA-PCR と MRS-PCR の感染診断における精度について検証した。

対象は 26 例の腸腰筋膿瘍疑い患者で、腸腰

筋膿瘍が疑われる患部から穿刺または外科的手術による検体の採取を行った患者である。これらの患者において、臨床所見、血液検査、検体に対する細菌培養検査と病理組織検査、リアルタイム PCR 検査結果の調査を行った。感染性腸腰筋膿瘍は、細菌培養、病理組織、血液検査結果から判定した。これらの検査結果とリアルタイム PCR 結果について比較を行いその有用性について評価した。結果として、26 例中 22 例が感染性腸腰筋膿瘍の診断となり、4 例は非感染性と診断した。非感染性患者の内訳は特発性血腫が 2 例と腫瘍性病変が 2 例であった。感染性腸腰筋膿瘍患者では、細菌培養検査は 12 例で陽性であり、うち 2 例はメチシリン耐性黄色ブドウ球菌であった。また細菌培養が陰性であった 10 例中、8 例ではリアルタイム PCR で細菌性遺伝子が同定され、うち 2 例ではメチシリン耐性遺伝子も同定された。その結果、リアルタイム PCR の診断精度は感度 0.91、特異度 1.00、陽性的中率 1.00、陰性的中率 0.67 であった。腸腰筋膿瘍では原因菌の同定が困難であることも多く、細菌性 DNA をターゲットとした感染診断は細菌培養偽陰性症例の診断に有用であり、特にメチシリン耐性遺伝子の同定は、抗菌薬の選択にも有用であることが示唆された。本研究内容は、2022 年度日本整形外科学会学術総会にて発表し、BioMed Research International に英語論文報告を行った[12]。

研究内容 2：PJI における MRS 耐性菌遺伝子をターゲットとした全自動リアルタイム PCR の精度の検証

リアルタイム PCR 法の欠点として、DNA 抽出や調整試薬などの手技が煩雑であることと、それらのハンズオンタイムが長く、医原

的な. コンタミネーションの確率が高いことなどが挙げられる。近年、特に MRS-PCR のような特異的な遺伝子を対象として、全自動化されたリアルタイム PCR による遺伝子診断の有用性が報告される。そこでわれわれは、PJI 患者における MRS 感染の診断方法として、メチシリン耐性遺伝子 (*mecA* gene) をターゲットとした全自動リアルタイム PCR (*mecA* PCR) の有用性の検証を行った。

対象は PJI 症例と化膿性関節炎疑い患者 74 例 (関節液検体 99 検体) で、全自動リアルタイム PCR には、全自動 RT-PCR 機器ジーンキューブ (TOYOBO, Japan) を使用した。国際コンセンサスマーケティング 2018 の診断基準を用いて感染の有無の診断を行い [6]、MRS-PCR の診断精度について検証した。結果として、27 検体を感染と診断し、そのうち MRS-PCR は 13 検体で陽性であった。細菌培養は 6 検体で陽性であり、この 6 検体は全てで MRS-PCR が陽性であった。本結果から、細菌培養が偽陰性となる感染症例においても、MRS-PCR は MRS 感染の診断が可能となることが示唆された。

本内容は、2021 年度日本整形外科学会学術総会にて発表し *Journal of Orthopaedic Research* に英語論文報告を行った [13]。全自動リアルタイム PCR は DNA 抽出から PCR 反応までを一連の操作として検査が自動で行われるため、コンタミネーションの懸念がないことや、ハンズオンタイムが少ないため煩雑な手技に伴う精度の誤差が少ないことが利点としてあげられる。また *mecA* 遺伝子を対象としたメチシリン耐性の検出は、既に血液培養陽性検体において本法で保険適応を受けている汎用性と再現性に優れた遺伝子診断方法であり、今後関節液でなく、骨軟部

組織など整形外科特有の検体における有用性についても、検証を行なっていく予定である。

研究内容 3: ショートリードシーケンサーを用いた細菌性 DNA 解析による原因菌の同定

次世代シーケンサー MiSeq (イルミナ社, CA) を用いて遺伝子配列の解析による原因菌の同定の精度について、検証を行った。対象は、当院にて診断および治療をおこなった PJI 症例のうち、細菌培養検査により原因菌が同定された 28 例である。これらの症例において、MiSeq (イルミナ社, CA) を用いて 16srRNA V3 領域のメタゲノム解析を施行して原因菌の同定を行い、細菌培養結果との比較をおこなった。

結果として、本方法で行った 16srRNA V3 領域のメタゲノム解析は、通常骨軟部感染領域で原因菌となる菌種と比較したところ、一致率が 50%未満という信頼性に欠ける結果であった。イルミナ社の次世代シーケンサーは、国際データベースの解析データの 90%以上を占めており汎用性が高いことや、MiSeq を用いた 16S メタゲノム解析は、高い再現性で病原菌の同定が可能であることが報告されているが [14]、今回のわれわれの方法では、PJI の原因菌の同定に MiSeq による遺伝子解析の活用が困難であることが示唆された。原因として、PJI 症例から得られた関節液中の細菌性 DNA が少量であることや、また本方法でおこなった解析は、16srRNA 領域の中でも V3 領域の限られた領域のみを解析するショートリードシーケンサーであることが考えられた。

研究内容 4: ロングリードシーケンサーを用いた細菌性 DNA 解析による原因菌の同定

ショートリードシーケンサーは、16srRNA 領域の中でも限られた領域のみを解析する遺伝子診断方法であることが、PJI 診断への応用における欠点の一つであると考えたため、ロングリードシーケンサーであるナノポアシーケンサー(Oxford Nanopore Technologies 社, UK)を用いて、より広範な領域の遺伝子配列を解析することで、PJI 症例における原因菌の同定が可能かどうかについて検証を行った。

対象は人工股関節周囲感染の診断で細菌培養検査により原因菌が同定された 52 例である。まず組織から DNA を抽出後に 16srRNA 遺伝子領域を PCR にて増幅後バーコーディングし、ナノポアシーケンサー MinION MK1C を用いて、遺伝子配列の解析と菌種の同定を行った。MinION MK1C の結果について、細菌培養結果と比較して、菌種一致率について検証した。PJI 患者の原因菌の内訳として、ブドウ球菌属が 36 例、連鎖球菌属が 5 例、エンテロコッカス属が 3 例、エスケリア属が 2 例、コリネバクテリウム属が 2 例、その他が 5 例であった(図 2A)。52 例中 16srRNA 遺伝子の増幅が可能であった症例は 46 例(88%)であり、それらの症例における MinION MK1C と細菌培養検査結果の菌種一致率は 76%であった(図 2B)。一方で、増幅後の 16srRNA 遺伝子量と、MinION MK1C と細菌培養検査結果の菌種一致率に有意な関連を認めており、ロングリードシーケンサーによる遺伝子診断においても、検体中に含まれる細菌性 DNA 量および 16srRNA 遺伝子の増幅効率が、原因菌同定における診断の精度に影響することが示唆された(図 2B)。本研究で用いたナノポ

アシーケンサー MinION MK1C(Oxford Nanopore Technologies 社, UK)は、DNA がポリマー製の膜に埋め込まれたナノポアを通過する際に起こる電流の変化を計測し、塩基配列を解析する方法で、装置自体も小型化され比較的安価に購入が可能である。従来のシーケンサーで使用されている蛍光色素などを使用せずに長い配列の遺伝子を短時間で解析することが特徴であり、PJI における遺伝子診断への応用にむけて、今後さらなる検証を行なっていく予定である。

考察

PJI では、原因菌が不明な感染症例で診断および治療に難渋することが多く、遺伝子診断を応用した原因菌の同定方法の確立が期待される[5, 15]。これまで遺伝子診断は、検査機器の導入や試薬にかかる費用が高いことや、手技が複雑で解析結果の判定が煩雑であることから、臨床応用と汎用化が困難なことが問題点として挙げられてきた。しかし近年では、Covid-19 感染に対する検査方法として、リアルタイム PCR 法の迅速性と高い精度が明らかにされており、感染診断におけるゴールドスタンダードの検査となっている。さらに全自動リアルタイム PCR を応用することで、コンタミネーションの軽減だけでなく検査における感染リスク自体も軽減でき、検査結果も容易に判定が可能となった。このように、現在の医療において、遺伝子診断方法による感染診断の有用性は明確になっており、PJI 診断においても、診断精度の上昇とそれに伴う治療成績の向上に寄与することが期待される。

本研究において、全自動リアルタイム PCR および次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断が、PJI 診断において有用であることを

検証した。一方で、PJI 患者に対するシーケンサーによる遺伝子配列の解析においては、十分な量の細菌性 DNA の抽出と 16srRNA 遺伝子領域の増幅が、より精度を向上するために重要であることが示唆された。今後 PJI における遺伝子診断に特異的な DNA の抽出方法および増幅方法についての模索と検証を行い、より効率的な遺伝子診断を行うことで診断精度をより向上させることが可能であると考える。

まとめ

今回われわれは、日本股関節研究財団の助成を受け、PJI 診断における全自動リアルタイム PCR および次世代シーケンサーを用いた遺伝子診断の有用性について検証を行った。全自動 MRS-PC およびロングリードナノポアシーケンサー MinION MK1C は、PJI の遺伝子診断方法として有用である可能性が示唆された。

謝辞

本研究の計画にあたりご指導を賜った、横浜市立大学 整形外科 稲葉裕先生、横浜市立大学附属市民総合医療センター 整形外科 小林直実先生に深謝致します。また本研究の遂行にあたり、多大なご協力をいただいた横浜市立大学 整形外科 研究助手 石川喜美氏、横浜市立大学 整形外科 安部晃生先生、稗田裕太先生に感謝いたします。

参考文献

- [1] Parvizi, J. and C.J. Della Valle, AOS Clinical Practice Guideline: diagnosis and treatment of periprosthetic joint infections of the hip and knee. *J Am Acad Orthop Surg*, 2010;18(12):p. 771-2.
- [2] Zimmerli, W., A. Trampuz, and P.E. O

- chsner, Prosthetic-joint infections. *N Engl J Med*, 2004;351(16):p. 1645-54.
- [3] 術後感染予防抗菌薬適性使用に関するガイドライン作成委員会, 日. 日., 術後感染予防抗菌薬適性使用に関するガイドライン. *日化療会誌*, 2016;64(153-232).
- [4] 日本骨・関節感染症学会, 日., 骨・関節術後感染 予防ガイドライン. 2015.
- [5] Parvizi, J., et al., Introduction: Proceedings of International Consensus on Orthopedic Infections. *J Arthroplasty*, 2019;34(2S):p. S1-S2.
- [6] Parvizi, J., et al., The 2018 Definition of Periprosthetic Hip and Knee Infection: An Evidence-Based and Validated Criteria. *J Arthroplasty*, 2018;33(5):p. 1309-1314 e2.
- [7] Choe, H., et al., Molecular diagnostics. *J Am Acad Orthop Surg*, 2015;23 Suppl (S26-31).
- [8] Choe, H., et al., Rapid sensitive molecular diagnosis of pyogenic spinal infections using methicillin-resistant Staphylococcus-specific polymerase chain reaction and 16S ribosomal RNA gene-based universal polymerase chain reaction. *Spine J*, 2014;14(2):p. 255-62.
- [9] Choe, H., et al., Use of real-time polymerase chain reaction for the diagnosis of infection and differentiation between gram-positive and gram-negative septic arthritis in children. *J Pediatr Orthop*, 2013;33(3):p. e28-33.
- [10] Miyamae, Y., et al., Quantitative evaluation of periprosthetic infection by real-time polymerase chain reaction: a comparison with conventional methods. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 2012;74(2):p. 125-30.

- [11] Kobayashi, N., et al., Simultaneous intraoperative detection of methicillin-resistant Staphylococcus and pan-bacterial infection during revision surgery: use of simple DNA release by ultrasonication and real-time polymerase chain reaction. J Bone Joint Surg Am, 2009;91(12):p. 2896-902.
- [12] Choe, H., et al., Detection of mecA and 16S rRNA Genes Using Real-Time PCR Can Be Useful in Diagnosing Iliopsoas Abscess, Especially in Culture-Negative Cases: RT-PCR for Iliopsoas Abscess. Biomed Res Int, 2022;2022(209609).
- [13] Yang, F., et al., An automated real-time PCR assay for synovial fluid improves the preoperative etiological diagnosis of periprosthetic joint infection and septic arthritis. J Orthop Res, 2020.
- [14] Tarabichi, M., et al., Diagnosis of Periprosthetic Joint Infection: The Potential of Next-Generation Sequencing. J Bone Joint Surg Am, 2018;100(2):p. 147-154.
- [15] Parvizi, J., T. Gehrke, and I. International Consensus Group on Periprosthetic Joint, Definition of periprosthetic joint infection. J Arthroplasty, 2014;29(7):p. 1331.

