

小川慎也 学位論文審査要旨

主 査 藤 井 潤
副主査 永 島 英 樹
同 千 酌 浩 樹

主論文

Evaluation of infections in orthopedic patients using next-generation sequencing
(次世代シーケンサーを用いた整形外科領域における感染性疾患の評価)
(著者：小川慎也、千酌浩樹、谷島伸二、林育太、三原徳満、永島英樹)
令和3年 Journal of Infection and Chemotherapy 27巻 1626頁～1633頁

参考論文

1. 遅発性の椎体転移を来した平滑筋肉腫の1例
(著者：小川慎也、山家健作、谷島伸二、三原徳満、武田知加子、南崎剛、永島英樹)
平成30年 整形外科と災害外科 67巻 181頁～184頁
2. 80歳以上の高齢者における脊椎感染症の手術成績
(著者：小川慎也、谷島伸二、谷田敦、武田知加子、三原徳満、永島英樹)
平成30年 中部日本整形外科災害外科学会雑誌 61巻 331頁～332頁
3. Bilateral facet effusion is a risk factor for segmental instability with cervical injury without vertebral fracture
(両側性椎間関節水腫は椎体骨折のない頸椎外傷における頸椎不安定性の危険因子である)
(著者：谷島伸二、三原徳満、小川慎也、武田知加子、藤原聖史、永島英樹)
令和3年 Scientific Reports 11巻 12531

学位論文要旨

Evaluation of infections in orthopedic patients using next-generation sequencing

(次世代シーケンサーを用いた整形外科領域における感染性疾患の評価)

近年、医学の進歩により高齢者や易感染性宿主は増加傾向にあり、整形外科領域の感染症患者も増加している。感染症治療の基本は、治療に先立ち培養検査を主体とした細菌学的検査により起炎菌を同定することである。しかし、骨関節感染症に対する培養検査は感度が低く偽陰性となる場合も少なくない。近年、感染症の起炎菌同定に対して次世代シーケンス解析（NGS解析）が注目されている。NGS解析では検体内の全構成細菌種の16SリボソームRNAの一部をポリメラーゼ連鎖反応（PCR）で一括増幅し、得られた16SアンプリコンをNGS解析で配列解析を行い、得られた16S配列データから細菌情報を取得するため網羅的な解析が可能となる。一方で、NGS解析は感度が高すぎるため細菌汚染の影響を大きく受けることが知られており、様々な陽性基準の設定が試みられているがいまだ確立されたものはない。そこで今回の研究では、整形外科領域における感染症において、NGS解析が培養検査の補助的検査となりうるかということに加え、有用な陽性基準の設定方法を調査することとした。

方法

2016年から2017年に鳥取大学医学部附属病院整形外科を初診し、感染症の疑いがあると判断した23例を対象とした。最終的な感染症と非感染症の判断は、身体所見、血液・画像検査所見、治療経過などを総合的に判断して複数の整形外科医によって行った。感染症の内訳は、化膿性関節炎、化膿性脊椎炎、人工関節周囲感染、骨髓炎、術後創部感染、腸腰筋膿瘍、硬膜外膿瘍、蜂窩織炎であった。検体は手術もしくは組織生検で採取し、培養検査に提出した後に残ったものをNGS解析に使用した。検体内の全DNAは、QIAamp DNA Mini Kit（キアゲン社、ヒルデン市、ドイツ）を用いて抽出し、最終濃度を30 ng/ μ Lに調整したものを理研ジェネシス社（川崎市、日本）に提出してDNA検体の品質評価を行い、その後Miseq Sequencer（イルミナ社、サンディエゴ市、カリフォルニア州、米国）で解析した。得られた遺伝子配列は、CL CommunityTM Version 3.30（Chunlab社、ソウル市、韓国）の細菌遺伝子データベースで検索して起炎菌同定を行った。NGS解析での感染症の判断は、Tarabichiらの論文を参照して、検体内の全細菌遺伝子のうち特定の細菌遺伝子が59.5%以上の割合で検出された場合を感染症と判断した。探索的調査として α 多様性の指

標となる多様度指数 (Shannon index, Simpson index) とOperational taxonomic units (OTUs) も算出し、それら陽性基準の設定に有用かどうかを調査した。また検体間のβ多様性の評価において主座標分析 (PCoA解析) も行った。

結 果

23例のうち最終的に感染症と判断された症例は20例、非感染症と判断された症例は3例であった。従来の培養検査で陽性となった症例は、感染症群では14例 (70%) あったが、非感染症群ではなかった。NGS解析ではTarabichiらの基準を用いると、感染症群の中で培養検査が陽性となった14例のうち8例が陽性 (57.1%)、培養検査が陰性となった6例のうち2例 (33.3%) が陽性となり、非感染症群ではすべて陰性であった。このNGS解析と培養検査との陽性一致率は57.1%、陰性一致率は77.8%、総合一致率は65.2%となった。全体では培養検査の陽性率は70%、NGS解析の陽性率は50%となり、培養検査の方が感度は高い結果となった。NGS解析で検出された細菌遺伝子のOTUsを比較すると、感染症群では有意に高値となり、分類組成図を作成すると非感染群ほど少量の細菌遺伝子が多数含まれる傾向があった。多様度指数 (Shannon index, Simpson index) についても調査したところ、Simpson indexは感染症群で有意に高値となった。β多様性の評価としてPCoA解析を行ったところ、感染症群と非感染症群では検体間の多様性に異なる分布傾向が見られた。そこで、新たな指標としてNGS index (OTUs×Simpson index) を算出し、従来の多様度指数 (Shannon index, Simpson index) とともにROC解析でcut-off値設定における有用性を比較検討したところ、曲線下面積 (AUC) はNGS indexで0.93と最も高くなり、cut-off値を6.0とすると感度は90%、特異度は100%であった。

考 察

整形外科領域の感染症におけるNGS解析では、感染症群ほど多様度が低く、多様度指数をcut-off値設定に用いた解析では培養検査より高い感度と特異度を示した。また今回、考案したNGS indexは、従来の多様度指数を用いたNGS解析よりも優れたAUCが得られ、NGS解析における新たなcut-off値設定として期待できる。培養が陰性であってもNGS解析を行うと陽性となった症例があったことから、従来の培養検査では培養条件によっては偽陰性となっている可能性があり、その一方でNGS解析では細菌遺伝子を検出するため、このような培養検査の欠点を補完できる可能性がある。

結 論

NGS indexが6.0以上であれば、感度は90%、特異度は100%であったので、感染症の診断に有用であると考えられる。NGS解析は培養検査の欠点を補完できる可能性が示された。