

感染性人工関節再置換術における超迅速メチシリン耐性ブドウ球菌診断法の開発

—超音波処理とマイクロフィルター濾過を用いたリアルタイムPCR法の応用—

横浜市立大学 整形外科 小林 直実

はじめに

人工関節置換術後の感染は最も重篤な合併症の一つであり、その治療には難渋することが多い。感染の確定診断として、細菌培養法は現在一般的に行われている方法であるが、問題点として迅速性が十分ではない点が挙げられる。また近年、通常の細菌培養だけでは菌の存在が証明できない、いわゆる“low grade infection”と言われる不顕性の人工関節周囲感染の存在が注目されている^{10,14,21,22}。

Polymerase Chain Reaction (PCR) 法はその迅速性や簡便性から多くの研究がなされており、整形外科領域での臨床応用も増加している²⁰。Real-time PCR法の迅速性は従来の細菌培養法と比べ極めて優れているが、検体の準備段階でのDNA抽出には2-3時間を要し、術中診断は不可能であった。われわれは超音波処理によるDNA遊離効果に注目し、簡易的で迅速性に優れた前処置を行い、その後メチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) に特異的なPCRを施行するという新しい方法により感染の術中判断を可能とした。

本研究の目的は、1. 超音波処理と Real-time PCRによる細菌同定法の検出限界を明らかにすること、2. 本方法を実際に臨床応用しその有用性を検討することである。

対象および方法

<超音波処理による検出限界>

細菌培養により起炎菌が同定されている組織または貯留液26検体を用いて、超音波処理後にPCRを行った群(超音波群)と従来のDNA抽出後にPCRを行った群(DNA抽出群)に分けそれぞれのPCR増幅開始点(Crossing Point)について比較した。対象とした組織の培養結果はmethicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA)が6検体、methicillin-resistant *Staphylococcus epidermidis* (MRSE)

が2検体、その他のMRS (*Staphylococcus hominis*) が4検体、*S. aureus* が6検体、*Streptococcus* が8検体であった。それぞれの検体を同一量(組織:1辺約5mm、貯留液:約200ul)に2分割し、1つは滅菌水1000ulと共に滅菌プラスチック袋に入れ超音波処理を5分間行い(超音波処理群)、もう1つはDNA抽出を行った(DNA抽出群)。その後MecA-geneをターゲットとするMRS特異的 Real-time PCR (MRS-PCR) を施行した。超音波処理群とDNA抽出群におけるCrossing Pointの相

違を比較した。

＜術中診断の臨床応用＞

2007年1月から2008年4月までに当科で手術を施行した感染性人工関節30例を対象とした。手術の内訳は人工股関節(THA)抜去が12例、THA再置換が9例、人工膝関節(TKA)抜去が3例、TKA再置換が3例、その他が3例であった。これらの手術中に検体を採取し、超音波処理後にマイクロフィルターを用いた purification を行い、その後 Real-time PCR を行った (Figure 1)。

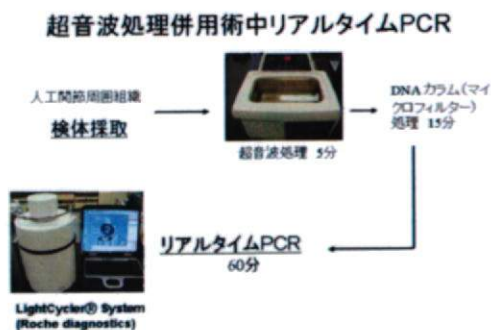


Figure 1

また同一部位の検体に対し病理組織評価および細菌培養を施行した。Real-time PCRの結果はその他の検査結果と合わせて人工関節再置換か抜去かの判断の材料とした。基本的にMRS感染陽性と判断された場合は人工関節再置換術を施行せずにバンコマイシン充填ハイドロキシアパタイトブロックまたはセメントスペーサーの留置を行い2期的再置換術を第一選択とした。

結果

＜超音波処理による検出限界＞

超音波処理群とDNA抽出群との Crossing Pointの相違は、MRS-PCRで平均2.8(0.4~4.1)サイクルであり、超音波処理群では検出サイクルの遅延を認めた。DNA抽出群で陽性となったにもかかわらず超音波処理群で陰性となった

ものを5検体認め、いずれも組織検体であった。

＜術中診断の臨床応用＞

術中リアルタイムPCR、細菌培養、病理所見の全結果を Table 1 に示す。細菌培養ではMRSAが2例、MRSEが2例、MRSが2例検出され、これらのうち4例で術中PCRは陽性を示した。術中PCRが陽性で細菌培養陰性であったものを2例認めたが、これらはいずれも病理所見で急性炎症反応の所見を認めた。細菌培養でMRS以外の細菌が確認されたものが5例認められたが、これらのいずれもPCRは陰性であった。

細菌培養でMRSが確認された例をMRS感染ありと診断した場合、超音波処理後Real-time PCRの感度は67%、特異度は92%であった。

＜代表症例＞

73歳の女性で、他院にて人工骨頭置換術後の近位migrationに対して人工股関節再置換術が施行されたが、術後数年でゆるみを認め当科紹介受診となった。初診時の単純X線像にて白蓋コンポーネント周囲の骨透亮像を認めた。血液検査上CRP値は3.04mg/dlと上昇を認めたが、局所炎症所見や全身熱発など感染を疑わせる所見は認めなかった。人工股関節ゆるみの診断で手術を施行した。術中に採取した検体に対して超音波処理後にReal-time PCRを施行した。MRS-PCRにおいて陽性であったため(Figure 2)、人工関節抜去術を施行した。

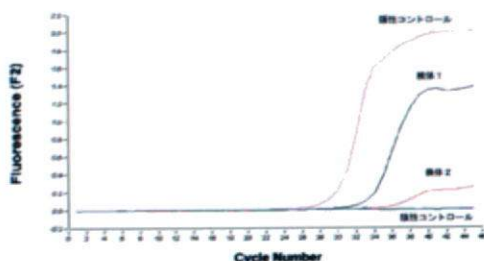


Figure 2

Table 1 全症例におけるPCR、細菌培養、病理所見結果

No.	Prosthesis	Operation	PCR	Culture	Histopathology
1	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
2	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
3	Hip	Implant removal	-	MRS	+
4	Hip	Implant removal	+	MRSA	+
5	Hip	Implant removal	+	MRSE	+
6	Hip	Implant removal	+	MRSE	+
7	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
8	Hip	Implant removal	-	-	+
9	Knee	Implant removal	+	MRSA	+
10	Knee	Revision (two-stage)	-	-	-
11	Hip	Revision (one-stage)	-	-	-
12	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
13	Hip	Revision (one-stage)	-	-	-
14	Hip	Implant removal	-	Streptococcus	+
15	Knee	Revision (two-stage)	-	-	-
16	Knee	Implant removal	-	Streptococcus	+
17	Hip	Implant removal	-	S. aureus	+
18	Hip	Implant removal	+	-	+
19	Knee	Implant removal	-	S. aureus	+
20	Knee	HA block replacement	-	-	-
21	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
22	Knee	HA block replacement	-	MRS	-
23	Hip	Implant removal	+	-	+
24	Hip	Revision (one-stage)	-	-	-
25	Hip	Implant removal	-	-	-
26	Hip	Implant removal	-	-	+
27	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-
28	Knee	Revision (two-stage)	-	-	-
29	Knee	Debridement	-	CNS	+
30	Hip	Revision (two-stage)	-	-	-

人工関節抜去時 術中 Real-time PCR 結果 2 検体で PCR 陽性が確認され、MRS 感染と診断した

約 6 ヶ月の待機期間の後、術中 Real-time PCR および迅速病理診断により感染が沈静化していることを確認し、再置換術を施行した。術後 6 ヶ月現在、感染の再燃は認めていない。

< 考 察 >

人工関節周囲感染の診断は時に困難な場合があり、いくつかの検査所見を合わせた慎重な判断を要する^{1,16}。特に再置換術の際には 1 期的再置換を行うか、または 2 期的再置換として人工関節抜去を行うかの判断や、感染が沈静化しているか否かの判断は非常に重要である。本研究では Real-time PCR 法を臨床応用し、MRS 感染の有無について術中に判断を行った。

本研究で用いた迅速診断法における最も大きな特徴は、検体に対して通常の DNA 抽出を行わず、超音波処理により簡易的に細菌性 DNA を遊離させ、それを精製することにより微量な DNA を検出する点である。Real-time PCR としては MRS に特異的な MRS-PCR を用いた。

検体採取から結果を得るまでに約 80~90 分という迅速性を実現させ、一般的な人工関節再置換術の術中に感染の有無、起炎菌 (MRS) の確認を行うことができる。MRS 感染が確定すればバンコマイシン充填アパタイトブロックなどを留置し、術直後よりバンコマイシン、または感染程度によってはリネゾリドの全身投与を開始する。

整形外科領域感染症における PCR 法の臨床応用としては Mariani による報告¹¹が最初であり、TKA 後の関節液に対して PCR の有用性を述べている。その後いくつかの研究が報告されており^{2,19}、従来の Conventional Universal PCR 法については否定的なもの^{4,15}を散見するものの、近年は様々な新しい方法と組み合わせた方法による臨床応用の可能性が注目されている^{5,7,13}。Real-time PCR 法は比較的近年に開発された PCR 法であるが、その迅速性と簡便性の点で様々な分野での臨床応用が報告されている。特に血液培養ボトルにおける MRSA 迅速

診断に関する研究は盛んに行われている^{17,18}が、整形外科領域における臨床応用は少なく^{6,8,9}、Real-time PCR 法を用いて術中に起炎菌同定を行うという試みは本研究が初めてであると思われる。

超音波処理により細菌性 DNA が遊離されることは過去に報告されているが^{3,12}、本研究では従来の DNA 抽出法と比較した場合は感度が低下することが示され、本方法の限界の一つである。膿や関節液などの液状検体においては超音波の効果は波及しやすく、感度低下は少なかったが、組織検体では感度の低下により検出不能であった症例を認めた。また PCR 法は細菌性 DNA を検出するので、既に活性を失った死菌を検出する可能性がある。そのため抗菌薬投与下で細菌培養が陰性となる場合でも、PCR は陽性となる可能性は十分にある。Real-time PCR の結果はあくまで一つの判断材料であり、必ず病理組織、肉眼所見、その他の術前検査所見を加味することが重要である。本方法では DNA 抽出を行わないために感度は若干低下するものの、術中診断という画期的な迅速性を得ることが可能となり、感度 90%、特異度 78% は臨床応用において十分許容されるものであると考える。今後さらに迅速性を高める工夫とともに高い感度、特異度を実現するための研究が必要である。

< ま と め >

超音波処理後に MRS に特異的な Real-time PCR を施行し、人工関節再置換術中に起炎菌同定を試みた。感度は 67%、特異度は 92% であった。DNA 抽出を行った場合と比べ、感度の低下を認めるが、高い特異性を示し、その迅速性による術中起炎菌同定は臨床的意義が高く、今後のさらなる感度、迅速性改善のための研究が必要である。

< 謝 辞 >

本研究は財団法人日本股関節研究財団の研究助成により行われた。

<参考文献>

1. Bauer, T. W., Parvizi, J., Kobayashi, N. et al: Diagnosis of Periprosthetic Infection. *J Bone Joint Surg Am*, 88(4): 869-82, 2006.
2. Clarke, M. T., Roberts, C. P., Lee, P. T. et al: Polymerase chain reaction can detect bacterial DNA in aseptically loose total hip arthroplasties. *Clin Orthop Relat Res*, (427): 132-7, 2004.
3. Fykse, E. M., Olsen, J. S., and Skogan, G.: Application of sonication to release DNA from *Bacillus cereus* for quantitative detection by real-time PCR. *J Microbiol Methods*, 55(1): 1-10, 2003.
4. Ince, A., Rupp, J., Frommelt, L. et al: Is "aseptic" loosening of the prosthetic cup after total hip replacement due to nonculturable bacterial pathogens in patients with low-grade infection? *Clin Infect Dis*, 39(11): 1599-603, 2004.
5. Kalogianni, D. P., Goura, S., Aletras, A. J. et al: Dry reagent dipstick test combined with 23S rRNA PCR for molecular diagnosis of bacterial infection in arthroplasty. *Anal Biochem*, 361(2): 169-75, 2007.
6. Kobayashi, N., Bauer, T. W., Sakai, H. et al: The Use of Newly Developed Real-Time PCR for the Rapid Identification of Bacteria in Culture-Negative Osteomyelitis - A Case Report -. *Joint Bone Spine*, 73(6): 745-7, 2006.
7. Kobayashi, N., Bauer, T. W., Togawa, D. et al: A molecular gram stain using broad range PCR and pyrosequencing technology: a potentially useful tool for diagnosing orthopaedic infections. *Diagn Mol Pathol*, 14(2): 83-9, 2005.
8. Kobayashi, N., Bauer, T. W., Tuohy, M. J. et al: The Comparison of Pyrosequencing Molecular Gram Stain, Culture and Conventional Gram Stain for Diagnosing Orthopaedic Infections. *J Orthop Res*, 24(8): 1641-9, 2006.
9. Kobayashi, N., Fraser, T. W., Bauer, T. W. et al: The Use of Real-Time PCR for Rapid Diagnosis of Skeletal Tuberculosis - A Case Report -. *Arch Pathol Lab Med*, 130(7): 1053-6, 2006.
10. Kobayashi, N., Procop, G. W., Krebs, V. et al: Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clin Orthop Relat Res*, 466(7): 1716-25, 2008.
11. Mariani, B. D., Martin, D. S., Levine, M. J. et al: The Coventry Award. Polymerase chain reaction detection of bacterial infection in total knee arthroplasty. *Clin Orthop*, (331): 11-22, 1996.
12. Millar, B. C., Jiru, X., Moore, J. E. et al: A simple and sensitive method to extract bacterial, yeast and fungal DNA from blood culture material. *J Microbiol Methods*, 42(2): 139-47, 2000.
13. Moojen, D. J., Spijkers, S. N., Schot, C. S. et al: Identification of orthopaedic infections using broad-range polymerase chain reaction and reverse line blot hybridization. *J Bone Joint Surg Am*, 89(6): 1298-305, 2007.
14. Nelson, C. L., McLaren, A. C., McLaren, S. G. et al: Is aseptic loosening truly aseptic? *Clin Orthop Relat Res*, (437): 25-30, 2005.
15. Panousis, K., Grigoris, P., Butcher, I. et al: Poor predictive value of broad-range PCR for the detection of arthroplasty infection in 92 cases. *Acta Orthop*, 76(3): 341-6, 2005.
16. Parvizi, J., Ghanem, E., Menashe, S. et al: Periprosthetic infection: what are the diagnostic challenges? *J Bone Joint Surg Am*, 88 Suppl 4: 138-47, 2006.
17. Stratidis, J., Bia, F. J., and Edberg, S. C.:

- Use of real-time polymerase chain reaction for identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* directly from positive blood culture bottles. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 58(2): 199-202, 2007.
18. Tan, T. Y.,Corden, S.,Barnes, R. et al.: Rapid identification of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from positive blood cultures by real-time fluorescence PCR. *J Clin Microbiol*, 39(12): 4529-31, 2001.
 19. Tarkin, I. S.,Henry, T. J.,Fey, P. I. et al.: PCR rapidly detects methicillin-resistant staphylococci periprosthetic infection. *Clin Orthop Relat Res*, (414): 89-94, 2003.
 20. Trampuz, A.,Osmon, D. R.,Hanssen, A. D. et al.: Molecular and antibiofilm approaches to prosthetic joint infection. *Clin Orthop*, (414): 69-88, 2003.
 21. Trampuz, A.,Piper, K. E.,Jacobson, M. J. et al.: Sonication of removed hip and knee prostheses for diagnosis of infection. *N Engl J Med*, 357(7): 654-63, 2007.
 22. Tunney, M. M.,Patrick, S.,Curran, M. D. et al.: Detection of prosthetic hip infection at revision arthroplasty by immunofluorescence microscopy and PCR amplification of the bacterial 16S rRNA gene. *J Clin Microbiol*, 37(10): 3281-90, 1999.