

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 27 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462346

研究課題名(和文)インプラント感染における新しい術中迅速メチシリン耐性ブドウ球菌感染診断法の開発

研究課題名(英文)Development of new multiplex PCR assay for preprosthetic joint infection

研究代表者

小林 直実 (KOBAYASHI, Naomi)

横浜市立大学・附属病院・講師

研究者番号：20453045

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：現在使用しているリアルタイムPCR法の最大の特徴はメチシリン耐性菌、グラム陽性菌、陰性菌の判別が可能であることであり、人工関節周囲感染における治療方針決定の際に重要な情報となり得る。細菌培養陰性例では起炎菌を推定する唯一の情報ともなり得る。検査としての精度、迅速性ともに改善の余地があり、さらにより一般的な普及に向けて、手技の簡便化、再現性の高いプロトコルの作成も急務である。

研究成果の概要(英文)：Molecular diagnostic techniques can contribute to the diagnosis of periprosthetic joint infection (PJI). We have developed a new multiplex real-time polymerase chain reaction (PCR) assay. The most prominent feature of our PCR assay is specific detection of methicillin-resistant staphylococcus (MRS) and distinguish between Gram-positive and -negative bacteria. This novel multiplex real-time PCR system has several advantages compared to previously reported methods and has potential uses in the diagnosis of PJIs, particularly those caused by viable but non-culturable organisms.

研究分野：整形外科学

キーワード：人工関節周囲感染 診断 PCR

1. 研究開始当初の背景

人工関節置換術は変形性関節症や関節リウマチなどに広く施行され、その手術件数は年々増加傾向にある。インプラントデザインや材料の改良により安定した長期成績が実現されているが、一方で人工関節周囲感染 (periprosthetic joint infection; PJI) は依然困難な問題として存在する。PJI に関わる問題として大きく予防、診断、治療があるが、中でも診断は予防や治療の効果や成績を評価する上でも重要である。細菌培養検査では検出されない、いわゆる viable, but non-culturable (VNC) と呼ばれる状態の細菌が存在することが報告されており、主に環境衛生や食中毒に関わる細菌において研究されてきたが、近年ではインプラント感染で最も問題となる *Staphylococcus* でも VNC 感染を生じることが報告されている。われわれがこれまでに PJI の診断に臨床応用してきたリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) 法は細菌性 DNA を検出するため、細菌培養に依存せず、原理的にも VNC 感染を検出し得る。

2. 研究の目的

本研究の目的は PJI を中心とする整形外科領域の感染症に対して、新たに導入した Multiplex リアルタイム PCR 法の有用性を検討し、さらに臨床分離菌株を用いて、現在使用しているプライマー、プローブの菌種の検出範囲を検討することである。

3. 研究の方法

2012年4月～2015年3月に採取した71例 (感染30例、非感染41例) の関節液および組織152検体 (感染60検体、非感染92検体) を対象とした。感染の診断基準は MSIS 基準を基本として、関節液が採取不可の場合、それ以外の小項目2つ以上を満たすものを感染と診断した。さらに2014年11月～2015年4月に当院検査室より分離された臨床分離菌株27種類 (表3) に対して PCR を施行し検出範囲とグラム陽性菌および陰性菌の判別能について調査した。

PCR は LightCycler nano® (Roche Diagnostics) を使用し、反応条件は 95 600s で DNA の熱変性を行ったのち、60 30s でアニーリング、伸長反応、95 10s で DNA の熱変性を合計 40 サイクル行った。本 PCR 法の特徴は 2 種類の PCR を同時に施行することであり、一つは *mecA* 遺伝子をターゲットにしてメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) を特異的に検出する MRS-PCR で、もう一方は multiplex プライマー、プローブを用いて一般細菌を検出しグラム陽性および陰性を判別する Universal-PCR である。Universal-PCR の陽性判定は陰性コントロールとの増幅開始サイクルの差 (Ct) による定量評価を行い、receiver operating characteristic (ROC) 解析を用いカットオフ

値を決定した。

4. 研究成果

細菌培養検査陽性は 52 検体で、*Staphylococcus aureus* が 21 検体と最も多く、MRS は 11 検体、その他のグラム陽性菌は 29 検体、グラム陰性菌は 12 検体であった (表1)。これらのうち混合感染を 4 検体に認めた。

MRS-PCR の感度は 91%、特異度は 98% で Ct カットオフ値を 2.4 とすると Universal-PCR の感度は 87%、特異度は 83% であった (表2)。

表3に臨床分離菌株における PCR の結果を示す MRS-PCR の感度、特異度は共に 100% でありグラム陽性菌、グラム陰性菌は全て検出可能であったが、*Stenotrophomonas maltophilia* のみ判別が不能であり、グラム陽性陰性の判別一致率は 96% であった。

表1 培養陽性例の分離同定菌種

菌種	検体数
MRSA	8
MRSE	3
<i>Staphylococcus aureus</i>	21
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	2
<i>Streptococcus agalactiae</i>	5
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
<i>E. coli</i>	4
<i>Proteus mirabilis</i>	3
<i>Corynebacterium</i>	2
<i>Bacteroides fragilis</i>	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
total	52

MRSA; methicillin resistance
staphylococcus aureus
MRSE; methicillin resistance
staphylococcus epidermidis

表2

	感度	特異度	陽性的中率	陰性的中率
MRS-PCR	0.91	0.98	0.83	0.99
Universal-PCR	0.87	0.83	0.78	0.89

表3 臨床分離株27菌種におけるPCRのグラム陽性、陰性判別

菌種	PCR 判定 (グラム陽性・陰性)
<i>Staphylococcus epidermidis</i> (MRSE)	陽性
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA)	陽性
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> (MRS)	陽性
<i>Staphylococcus aureus</i>	陽性
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	陽性
<i>Staphylococcus hominis-hominis</i>	陽性
<i>Streptococcus agalactiae</i>	陽性
<i>Streptococcus sanguis</i>	陽性

グラム陰性菌	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	陽性
	<i>Enterococcus casseliflavus</i>	陽性
	<i>Enterococcus faecalis</i>	陽性
	<i>Enterococcus faecium</i>	陽性
	<i>Escherichia coli</i>	陰性
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	陰性
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	陰性
	<i>Enterobacter cloacae</i>	陰性
	<i>Haemophilus influenzae</i>	陰性
	<i>Moraxella catarrhalis</i>	陰性
	<i>Serratia marcescens</i>	陰性
	<i>Enterobacter aerogenes</i>	陰性
	<i>Klebsiella oxytoca</i>	陰性
	<i>Haemophilus parainfluenzae</i>	陰性
	<i>Citrobacter freundii</i>	陰性
	<i>Citrobacter amaloniticus</i>	陰性
<i>Proteus mirabilis</i>	陰性	
<i>Morganella morganii</i>	陰性	
<i>Stenotrophomonas maltophilia</i>	陽性*	

* *Stenotrophomonas maltophilia* のみ PCR でグラム陽性菌と誤判定

われわれはこれまでにメチシリン耐性遺伝子の特異的検出や超音波処理を併用した術中迅速診断など PJI 診断におけるリアルタイム PCR 法の有用性について報告してきた。リアルタイム PCR 法の有用性の一つである定量評価は感染の程度を把握することが可能であり 1 期的または 2 期的再置換術の選択や感染沈静化の判断の補助的診断となり得る。現在用いている multiplex PCR では臨床分離株 27 菌種で検出可能であり、そのうち 26 菌種 (96%) でグラム陽性、陰性の判別が可能であった。このように広範囲のグラム陽性および陰性菌を検出範囲としてカバーしており、PJI のみでなく脊椎感染や小児化膿性関節炎への応用も可能で、整形外科領域感染症全般における迅速診断法として今後の普及が期待される。

まとめ

PJI 診断におけるリアルタイム PCR 法の有用性と今後の課題について論述した。われわれが用いている multiplex PCR はこれまでの方法と比べて遜色のない感度および特異度を示し、MRS の特異的検出とグラム陽性菌、陰性菌の判別という特徴を有する。今後の課題としては PJI における VNC 感染の実態について解明する必要があり、VNC 細菌の確実な検出方法としての PCR 法やその他の分子生物学的手法のさらなる進歩が待たれる。

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1件)

1. 小林直実、小林秀郎、稲葉 裕、齋藤知行：人工関節置換術後感染に対する診断と治療戦略. Bone Joint Nerve アークメデア 2015. vol.5 181-188

[学会発表](計9件)

1. 小林直実、稲葉 裕、齋藤知行 Periprosthetic Joint Infection 新たな診断法へのチャレンジ 第4回 Tokyo Knee and Hip Forum 招待講演、2015年、11月24日、科研製薬株式会社社会議室(東京)
2. 小林直実、稲葉 裕、川村正樹ほか 人工関節周囲感染の診断 第43回日本関節病学会 シンポジウム 2015年、11月6日、札幌コンベンションセンター(北海道)
3. 小林直実、稲葉 裕、川村正樹ほか 人工関節周囲感染の診断 Polymerase Chain Reaction (PCR)と Positron Emission Tomography (PET)の役割 第42回日本関節学会学術総会 シンポジウム 2015年、10月29日、グランフロント大阪(大阪)
4. 小林直実、稲葉 裕、川村正樹ほか 人工関節周囲感染の診断 ~VNC 感染検出のために~ 第64回東日本整形災害外科学会 シンポジウム 2015年、9月12日、福島ビューホテル(福島)
5. 小林直実、稲葉 裕、齋藤知行 人工関節周囲感染の診断アプローチ ~基本と update~ 東海 Joint Surgery Meeting 特別講演 2015年、7月25日、名古屋ルーセントタワー(愛知)
6. 川村正樹、稲葉 裕、小林直実、ほか：人工関節周囲感染診断における multiplex リアルタイム PCR の有用性、日本骨関節感染症学会、2015年、7月4日、香川国際会議場(香川)
7. Kawamura M. Inaba Y. Kobayashi N. Miyamae Y. Ike H. Tezuka T. Kubota S and Saito T.: The Usefulness of New Multiplex Real-Time PCR in Diagnosing Periprosthetic Joint Infection, Orthopaedic Research Society, 2015. 3. 24-28, Las Vegas(USA)
8. 川村正樹、稲葉 裕、小林直実、ほか：multiplex リアルタイム PCR の人工関節周囲感染(PJI)診断における有用性、日本人工関節学会、2015年、2月28日、福岡国際会議場(福岡)
9. 川村正樹、稲葉 裕、小林直実ほか：人工関節周囲感染(PJI)診断における新たな multiplex リアルタイム PCR の有用性、日本整形外科学会、神戸、2015年、2月26日、グランフロント大阪(大阪)

〔図書〕(計 1 件)

1. Bauer TW, Kobayashi N. The Hip: Preservation, Replacement, and Revision. Vol 2, Chapter 111 Diagnosis of Infection: Frozen section and Molecular techniques. Data trace publishing company 2015, 111-1-111-8.

〔その他〕

Musculoskeletal Infection Society,
Delegate of International Consensus
Meeting, 2013

6. 研究組織

- (1)研究代表者 小林 直実
(KOBAYASHI, Naomi)

横浜市立大学・附属病院・講師
研究者番号：20453045

- (2)研究分担者 稲葉 裕
(INABA, Yutaka)
横浜市立大学・附属病院・准教授
研究者番号：40336574

(平成 26 年度より研究分担者)

- (3)連携研究者
()

研究者番号：