

## リアルタイム PCR を用いた小児化膿性股関節炎の診断

崔 賢 民<sup>1)</sup>・稲 葉 裕<sup>1)</sup>・小 林 直 実<sup>1)</sup>  
青 木 千 恵<sup>2)</sup>・上 杉 昌 章<sup>2)</sup>・町 田 治 郎<sup>2)</sup>  
奥 住 成 晴<sup>2)</sup>・齋 藤 知 行<sup>1)</sup>

1) 横浜市立大学医学部整形外科学教室

2) 神奈川県立こども医療センター整形外科

**要 旨** 小児化膿性股関節炎の治療は迅速な診断と起炎菌の同定が要求される。今回我々は化膿性股関節炎が疑われ切開排膿術を施行した6例において、術中採取組織に対し細菌培養検査より感度と迅速性に優れるリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) を施行した。リアルタイム PCR にはメチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) に特異的な PCR と全細菌を検出する Universal PCR を使用し、細菌培養検査の結果と比較した。細菌培養検査では2例でインフルエンザ桿菌を同定したが、その他の4例は陰性であった。MRS 特異的 PCR は1例で陽性であり、Universal PCR は5例で陽性であった。Universal PCR の融解曲線によるグラム陽性、陰性菌の鑑別では1例がグラム陽性菌、4例がグラム陰性菌感染と診断した。リアルタイム PCR による細菌感染診断は細菌培養検査よりも感度に優れ、MRS の特異的診断やグラム陽性、陰性の判定が可能であり、本疾患の診断、治療に有用な検査であると考えた。

### 序 文

小児化膿性股関節炎の治療には迅速な診断と起炎菌の同定が要求される。一方で細菌培養検査では結果が出るまでに2日以上を要し、さらに抗菌薬投与後の症例では菌の同定が困難であることが多い。本研究の目的は、従来確定診断として施行されている細菌培養検査よりも迅速性および感度に優れたリアルタイム polymerase chain reaction (PCR) の小児化膿性股関節炎の診断における有用性を評価することである。

### 対象・方法

対象は股関節の痛み、または歩行困難を訴え、

MRI 所見より股関節液の貯留を認めたため化膿性股関節炎の疑いにて切開排膿術を施行した6例であった。5例が紹介受診であり、そのうち4例が来院時に既に抗菌薬投与後であった。平均年齢は7歳(0~14)で、症状出現から手術までの平均期間は14日(2~39)であった。術前発熱の有無、血液検査結果と術中所見、術中採取組織に対する細菌培養検査、病理組織検査、リアルタイム PCR 結果を調査した。

Kocher および Caird の診断基準<sup>1)6)</sup>を用いて、術前体温 38.5℃以上を発熱と定義し、血液検査値は術前血液中の白血球数が 12000/ml 以上、C 反応性蛋白 (CRP) が 2.0 mg/dl 以上、赤血球沈降速度 (ESR) が 40 mm/h 以上であった場合、化膿性

Key words : septic arthritis of the hip in children (小児化膿性股関節炎), identification of bacterium (起炎菌同定), real-time PCR (リアルタイム PCR), melting curve (融解曲線)

連絡先 : 〒 236-0004 神奈川県横浜市金沢区福浦 3-9 横浜市立大学整形外科 崔 賢 民 電話 (045) 787-2655

受付日 : 平成 23 年 6 月 6 日

表 1. 術前, 術中所見, 術後組織検査結果

症例	年齢	術前所見			術中所見			術後所見		
		術前 抗菌薬 投与	38.5℃以上 の発熱	白血球数 (/m <sup>l</sup> )	CRP (mg/d <sup>l</sup> )	ESR (mm/h)	膿の貯留	細菌培養	病理 組織 検査	リアルタイム PCR
1	14y	+	-	10.800	※5.8	N/A	-	-	+	-
2	11y	+	+	11.200	1.3	※42	-	-	+	+
3	10y	+	-	2.700	※10.5	※94	-	-	-	+
4	3y6m	-	+	※13.800	※11.3	N/A	+	インフルエンザ桿菌	+	+
5	2y10m	+	-	※13.700	1.6	※62	-	-	-	+
6	9m	-	+	※16.900	※17.2	※97	+	インフルエンザ桿菌	+	+

※白血球数は 12,000/m<sup>l</sup> 以上を, CRP は 2.0 mg/d<sup>l</sup> 以上を, ESR は 40 mm/h 以上を陽性と定義した.

股関節炎を疑う陽性所見とした. 術中所見としては股関節内の膿貯留を感染の陽性所見とした.

採取組織に対する病理組織検査では組織内への好中球の浸潤を急性炎症反応の所見とし, 感染を示唆する陽性所見とした<sup>8)</sup>. リアルタイム PCR では DNA 自動抽出機 Bio Robot EZ1 DNA investigator kit (Qiagen Inc., Valencia, CA) を用いて DNA を抽出し, LightCycler® system (Roche diagnostics, Mannheim, Germany) を用いて, メチシリン耐性ブドウ球菌 (MRS) 特異的 PCR および全細菌を検出する Universal PCR を同時施行した<sup>4)7)</sup>. Universal PCR では, ターゲットとした DNA の PCR 反応中の一本鎖状態の割合を温度に対して示す融解曲線から, グラム陽性, 陰性菌の判別を行った<sup>4)</sup>.

## 結 果

全例における術前抗菌薬の投与の有無, 術前体温, 血液検査結果と術中所見, 術中採取組織に対する細菌培養検査, 病理組織検査, リアルタイム PCR 結果を表 1 に示す.

細菌培養検査では 2 例にてインフルエンザ桿菌を同定したが, その他の 4 例においては細菌培養検査による起因菌の同定はできなかった. 細菌培養陰性の 4 例は術前に抗菌薬の投与が行われていた症例であり, 細菌培養陽性の 2 例は術前の抗菌薬投与が行われていない症例であり, この 2 例では術前体温, 血液検査結果のいずれにおいても感染を示唆する値であった.

リアルタイム PCR の結果として, MRS 特異的 PCR は 1 例において陽性となり, Universal PCR

は 5 例において陽性となった. Universal PCR における融解曲線の解析結果から, MRS 特異的 PCR が陽性であった 1 例をグラム陽性菌と診断し, 4 例をグラム陰性菌であると診断した (図 1).

## 考 察

細菌培養検査は結果が出るまでに数日を要するため, 迅速性を要する化膿性股関節炎の診断は主に臨床所見や血液検査結果, MRI 所見によって行われてきた<sup>1)6)</sup>. 一方で, 菌の同定は確定診断および投与する抗菌薬の選択に重要であるが, 細菌培養検査の感度は 34% から 82% と報告され, 確定診断として十分な感度ではない<sup>2)</sup>. さらに術前抗菌薬投与例では, 細菌培養のみではなく, 術前臨床所見, 血液検査結果も偽陰性となりうる.

近年, 小児化膿性股関節炎の診断において, リアルタイム PCR が有用であると報告されており, 従来行われてきた細菌培養検査単独での診断よりも, より迅速に高い感度で起因菌の同定が可能であると報告されている<sup>2)3)</sup>. リアルタイム PCR 法はターゲットとする DNA の特定の領域を同定する事が可能であるため, MRS が有する mec A 遺伝子領域の同定による MRS 感染の診断や, 全細菌が有する 16srRNA 遺伝子領域の同定による細菌感染の診断が可能である. 我々はこれまでに人工関節周囲感染の診断において, リアルタイム PCR は細菌培養検査では陰性となる例においても起因菌の検出が可能であること, リアルタイム PCR は抗菌薬の投与による殺菌後の死菌由来の DNA も検出するため抗菌薬投与後の症例においても細菌感染の診断が可能であること, また融解

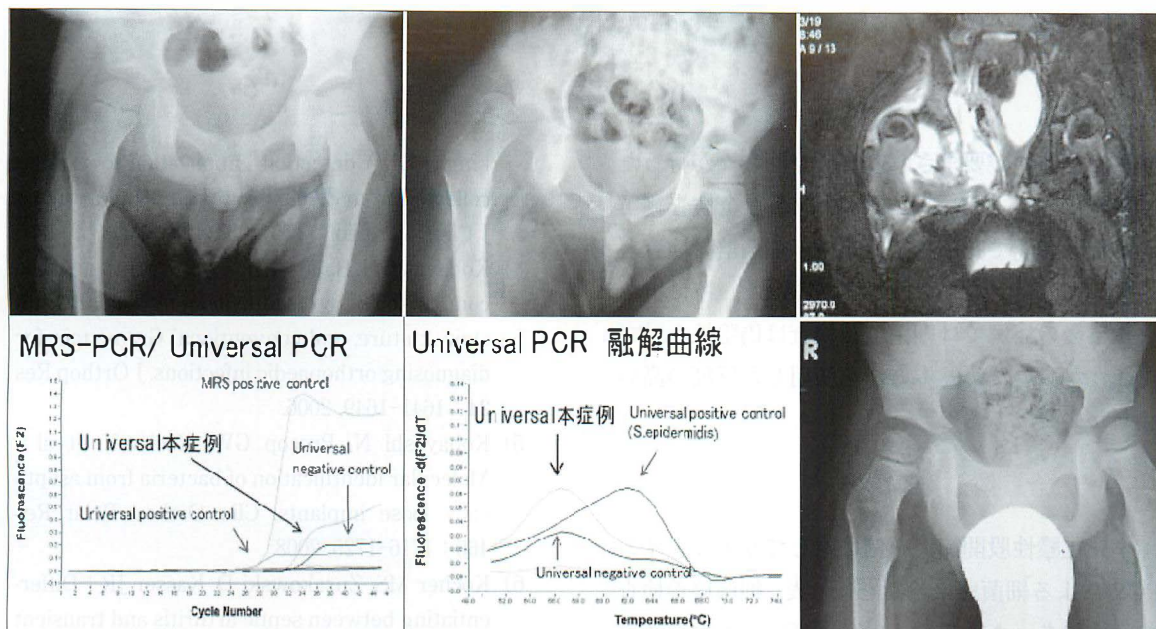


図 1. 症例：2歳10か月，男児

a | b | c  
d | e | f

近医より他院へ紹介受診後に当院へ紹介受診した。

- a：近医受診時両股関節正面単純 X 線像，大腿骨頭に骨透亮像を認める。
- b：他院紹介受診時両股関節正面 X 線像，大腿骨頭の外方への亜脱臼を認める。
- c：当院来院時 MRI T2 強調像：股関節および周囲軟部組織に高信号な領域を認める。
- d：切開排膿術後リアルタイム PCR 結果，細菌培養検査結果および病理検査結果は陰性で MRS-PCR 結果も陰性であるが，Universal PCR で陽性を認める。
- e：Universal PCR 融解曲線，融解曲線のピーク温度は 56℃であり，起因菌をグラム陰性菌と診断する。
- f：術後 4 か月両股関節 X 線像，明らかな続発症を認めない。

曲線を用いることで，起因菌のグラム陽性，陰性の判別が可能であることを報告した<sup>5)10)</sup>。さらに本方法では MRS 特異的 PCR と Universal PCR を同時に施行することが可能であり，迅速に起因菌のグラム陽性，陰性の判別，さらには MRS であるかどうかの判定が可能である。

本研究では，6 例中 4 例において細菌培養検査が陰性で，起因菌の同定が行えなかった。しかし，4 例中 3 例ではリアルタイム PCR による感染の診断が可能であり，2 例はグラム陰性菌，1 例は MRS 感染と診断することができたため，投与抗菌薬の決定に有用であった。一方で 1 例では細菌培養検査とリアルタイム PCR による起因菌の同定は出来ず病理組織検査のみ陽性であった。この症例では，術前の画像，血液学的，理学的所見からは感染が強く示唆されたが，細菌培養検査またはリアルタイム PCR による起因菌の同定を確定診断とした場合，細菌感染の診断とならなかった。

しかし，菌量が少ない場合，また採取した組織が感染している部位から採取されなかった場合は，感染例においても細菌培養やリアルタイム PCR が陰性になる可能性があるため，より確実な組織診断には術中組織のマルチプルサンプリングが必要であると考えられる。

小児化膿性股関節炎は感染の診断に難渋することが多いため，様々な検査を組み合わせて行う必要がある。臨床症状，血液検査所見や画像所見は非侵襲的に感染による炎症所見を同定できる検査であり，感染の判定に有用である一方で，治療に必要な菌の同定は困難である。リアルタイム PCR 法は細菌培養検査と同様に関節液や検体採取のために患部への侵襲的な処置を必要とするが，細菌培養検査と比較して高い感度で感染の診断が可能であり，MRS 特異的 PCR や Universal PCR を用いることにより，起因菌の判別が可能で抗菌薬の決定に有用である。またさらに本疾患の診断，治

療には迅速性が要求されるが、今回我々が行ったリアルタイム PCR 法は検体採取から全検査終了までを3時間で完了できるため、細菌培養検査と比較して迅速性に優れた検査である<sup>9)</sup>。特に抗菌薬投与後の症例では細菌培養検査は偽陰性を示す可能性が高いため、本方法を使用した感度の高い診断が必要であると考える。

### まとめ

小児化膿性股関節炎6例に対してリアルタイム PCR による細菌感染診断を行った。細菌培養検査で陰性であった4例中、3例において本方法での診断が可能であった。本方法では MRS 感染、グラム陽性、陰性菌の判別が可能であり、細菌培養検査と比較して迅速性に優れているため、本疾患の診断および治療に有用な検査である。

### 文献

- 1) Caird MS, Flynn JM, Leung YL et al : Factors distinguishing septic arthritis from transient synovitis of the hip in children. A prospective study. *J Bone Joint Surg Am* 88 : 1251-1257, 2006.
- 2) Ceroni D, Cherkaoui A, Ferey S et al : Kingella kingae osteoarticular infections in young children : clinical features and contribution of a new specific real-time PCR assay to the diagnosis. *J Pediatr Orthop* 30 : 301-304, 2010.
- 3) Ilharreborde B, Bidet P, Lorrrot M et al : New real-time PCR-based method for Kingella

kingae DNA detection : application to samples collected from 89 children with acute arthritis. *J Clin Microbiol* 47 : 1837-1841, 2009.

- 4) Kobayashi N, Bauer TW, Tuohy MJ et al : The comparison of pyrosequencing molecular Gram stain, culture, and conventional Gram stain for diagnosing orthopaedic infections. *J Orthop Res* 24 : 1641-1649, 2006.
- 5) Kobayashi N, Procop GW, Krebs V et al : Molecular identification of bacteria from aseptically loose implants. *Clin Orthop Relat Res* 466 : 1716-1725, 2008.
- 6) Kocher MS, Zurakowski D, Kasser JR : Differentiating between septic arthritis and transient synovitis of the hip in children : an evidence-based clinical prediction algorithm. *J Bone Joint Surg Am* 81 : 1662-1670, 1999.
- 7) Levi K, Towner KJ : Rapid detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from screening enrichment broths by real-time PCR. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 24 : 423-427, 2005.
- 8) Lonner JH, Desai P, Dicesare PE et al : The reliability of analysis of intraoperative frozen sections for identifying active infection during revision hip or knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg Am* 78 : 1553-1558, 1996.
- 9) Nunn TR, Cheung WY, Rollinson PD : A prospective study of pyogenic sepsis of the hip in childhood. *J Bone Joint Surg Br* 89 : 100-106, 2007.
- 10) 崔賢民, 稲葉裕, 小林直実ほか : リアルタイム PCR による死菌 DNA の検出期間. *日本骨・関節感染症学会雑誌* 23 : 58-63, 2009.

## Abstract

### Septic Arthritis in the Hip in Children Diagnosed Using Real-Time PCR

Hyonmin Choe, M. D., et al.

Department of Orthopaedic Surgery, Yokohama City University School of Medicine

The aim of this study was to evaluate the efficiency of real-time PCR as a technique instead of microbiological culture, to diagnose septic coxitis in children. A total of 6 children with suspected septic arthritis in the hip who underwent surgical treatment were prospectively enrolled in this study. The intraoperative tissue specimens were examined using microbiological culture and real-time PCR including methicillin-resistant *Staphylococcus* specific PCR and pan-bacterial universal PCR. Microbiological culture found only two cases of *Haemophilus influenzae*, while MRS-PCR was positive in one case and universal PCR was positive in the other five cases. The analysis of the melting peak in the five cases of positive universal PCR found that one case was Gram-positive and the other four were Gram-negative. These findings suggested that real-time PCR could be a sensitive tool for the diagnosis of septic arthritis in children-even in those with negative culture results. Moreover, real-time PCR was effective in identifying MRS infection and in differentiating between Gram-positive and Gram-negative cases.