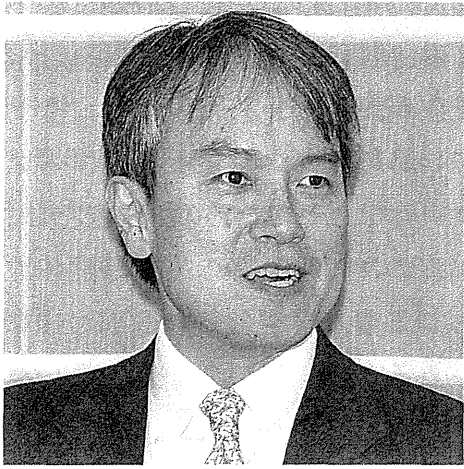


THE ROUND TABLE MEETING

変形性膝関節症の治療 —現状と展望—



関矢 一郎 先生

東京医科歯科大学大学院軟骨再生学



赤木 将男 先生

近畿大学医学部整形外科学

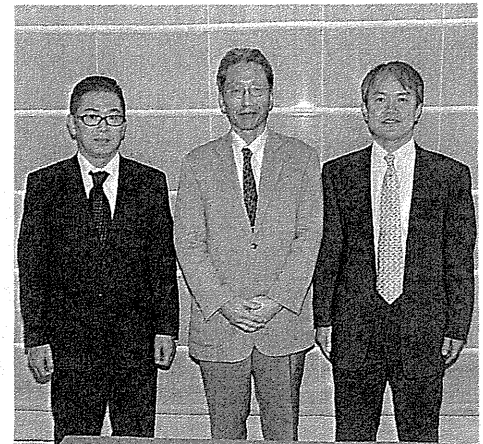
鼎

談



出家 正隆 先生

広島大学大学院運動器機能医科学



左より、
出家正隆先生、赤木将男先生、関矢一郎先生

2011年10月8日

東京都内にて

変形性膝関節症の治療：現状と展望

関矢 本日のテーマは「変形性膝関節症の治療：現状と展望」です。変形性膝関節症治療のエキスパートとして私が尊敬しているお二人の先生にご出席いただきました。多彩な病態を呈する変形性膝関節症の患者さんを目にするとき、先生方の臨床経験に基づいたアルゴリズムがあり、その結果に従って治療方針が決定するものと推察されます。前半は変形性膝関節症の治療の現状として先生方が実際に行っている治療とその判断についてお話しいたします。

問診・診察のポイント

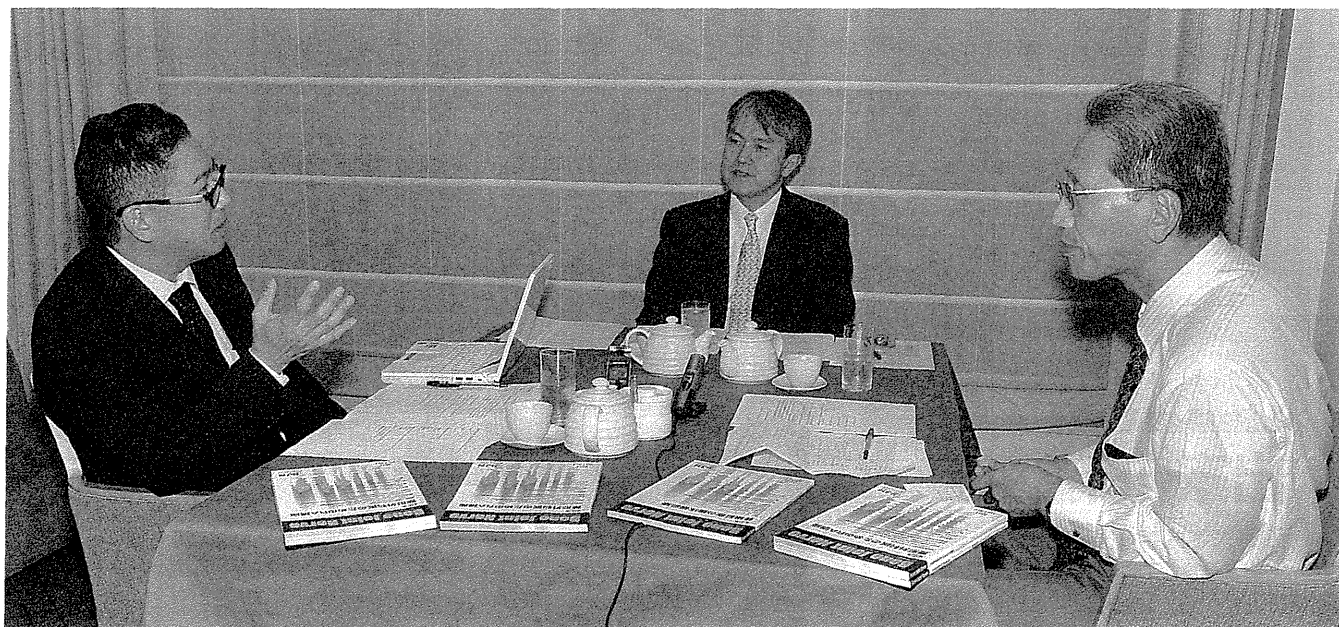
関矢 まず治療前の問診や診察、検査のポイントなどについてお聞きします。問診では主訴や原因、発症時期などということになると思いますが、特に問診に関して重要視することは何でしょうか。

赤木 基本的には一次性のものなのか、それとも二次性のものかを聞かなければいけません。加齢とともに膝が変形してくる、あるいは腫脹して疼痛を伴い、歩行困難になるという一次性の方がほとんどですが、その中には外傷が過去にある方、感染症・骨髄炎、稀には血友病性の

感染症による方など、二次性のもが含まれていることがあります。そういった情報を逃さずに聞くということは治療方針を立てるうえで大事です。そして治療方針を決めていくうえで、その方のニーズも重要です。膝が痛いということと来られるのは共通ですが、膝の痛みをとることによってその方が何を求めているのか知ることが治療方針を決定するのに大事です。

関矢 一次性、二次性を含めるととても広範囲になりますので、本日は一次性についてのみおろうかがいします。出家先生はいかがでしょう。出家 赤木先生がおっしゃったように、なぜ痛みが起こっているのかということをもまず考えなくてはいけないので、そのための問診をします。変形性膝関節症の次に、高齢の方で膝痛の原因に骨壊死があります。骨壊死との鑑別も頭に入れ、階段を下りるときに痛いのか、あるいは夜痛いのかなど、いつ痛いかということをも、鑑別診断をする意味で、重点的に聞くことがあります。さらに治療方針を決めていくうえで生活様式を聞くことにしています。

赤木 出家先生がおっしゃった特発性膝骨壊死(spontaneous osteonecrosis of the knee;



SPONK)は最近非常に多いですね。高齢女性で、軟骨下骨の硬化や骨棘形成などの骨の反応や、関節裂隙の著しい狭小化を伴っていないのに、痛みを訴えて来られ、脆弱性骨折が基盤になっていると思われる方が非常に増えています。出家先生がおっしゃったように、骨壊死などが隠れていないかということ念頭において問診を進めることは非常に大事だと思います。

関矢 夜間の痛みを訴える患者さんはかなりの確率で骨壊死ということになるのでしょうか。

出家 一般的に、一次性的場合は階段を下りるときや、立ち上がる時に痛みを感じます。それ以外の要素があったときに何か違うと考えます。夜間に痛みを感じるというだけでは、現実には教科書に載っているような典型例は少ないですね。複合的な要素があると思います。

赤木 患者さんは誘因がないとはじめにおっしゃるけれど、段を踏み外したり、階段で足がちょっとガクッとなったときに急激な痛みが起こり、しばらくのあいだ跛行があったというような患者さんが結構いらっしゃいます。軽微な外傷なのに強い痛みを訴える場合、骨壊死を疑います。そして夜間痛がその頃あり、それが治癒してくる傾向もありながら、また増悪を繰り返す。そのときにさらに陥没が進行することがあるのだと思います。普通の一次性的のOAでは急性の発症ということほとんどありません。

関矢 今回の主題から外れますが、骨壊死の病態として、従来は血行不全、最近では骨折が原因と考えられるようになってきています。先生方のお考えはいかがでしょう。

出家 MRIや生検をしても骨壊死がないという話も聞きますので、印象としては疲労骨折のようなもの、microfractureのようなものがずっと起きているのではないかと考えています。

赤木 私も同じ意見で、極論をいえば、

osteonecrosisと括ってしまうならsecondaryなものとして考えていいのではないのでしょうか。つまり、ステロイド性ですね。ステロイド性のものは明らかに骨壊死だと思います。画像のパターンも異なります。高齢者の顆部骨壊死は大腿骨・脛骨ともに脆弱性骨折を基盤にして生じるものと考えています。

関矢 OAの場合、問診で動き始めに痛いと言くと、私は筋肉とか腱の柔軟性の低下によるものと考えて、リハビリをしていただくとよくなることがあります。問診だけでも治療方針が決まることもあるかと思います。

赤木 それは一次性的のOAで、比較的早期の方にありますね。付着部炎的な痛みを訴える方は一次性的のOAで結構いらっしゃいますね。そういう方はストレッチとか、運動療法によく反応してくれることが多いと思います。

関矢 続いて診察のことをお聞きします。診察をするうえでこれが大事だとか、何かこだわっているようなことがあれば教えてください。歩容、アライメント、水腫、可動域などが基本になるかと思います。

出家 どんなに忙しくても膝を出して、横になっていただくのが基本です。自分で膝を触って、アライメントをみて、曲げ伸ばしをしてもらいます。患者さんの痛い場所をはっきりとみつけることが、治療方針を決めていくうえで重要だと思います。

関矢 痛い場所を患者さん自身が意識していない場合がありますね。

出家 「全部です」とかいうことがあります。この場合、圧痛点を探していきます。

関矢 圧痛点のポイントはありますか。

出家 内側型OAの場合、半月板損傷と変性断裂との兼ね合いもあるかと思います。関節裂隙に圧痛点が限局しているような場合は変形性関

変形性膝関節症の治療：現状と展望

節症というよりも半月板の断裂を、それよりも脛骨側に圧痛がある場合はOAによるものと考えます。

関矢 赤木先生はいかがでしょう。

赤木 患者さんは診察の前、しばらく座ってまですよね。それから立って入って来られます。そのときの歩き始めの痛みでよくわかる場合が多く、注意して観察しています。問診を行って、その間腰掛けられていて、診察台に移ってくださいといわれて、診察台へ移っていくときの動作です。椅子からベッドに移るまでの動作や、実際にベッドに寝るときの動作をよく観察し、患者さんの訴えていることと、その動作がどれくらい一致するかということをよく考えます。圧痛点の話がでしたが、基本的には関節裂隙の圧痛だと思います。それが本当に関節裂隙なのか、やや脛骨側にあるのか、あるいは大腿骨側にあるのか、大腿骨側にある場合は顆部壊死の可能性も考えられます。もちろん脛骨側でも顆部壊死はあります。先ほど付着部炎の話がでしたが、驚足の付着部にも圧痛点があります。予想外に関節裂隙に圧痛点がないと思うときは、どこが痛いかということを探ねながら圧痛点を探していくようにしています。外側の牽引痛を訴える人も、内側型の場合に多いですね。この場合外側にも圧痛点がないかどうか、ストレスをかけながら牽引痛が生じないかどうかという痛みの再現性を追求して診察しています。

関矢 外側の牽引痛というのはどのあたりになりますか。

赤木 やはり後外側だと思います。基本的にはITTの付着部からLCLの付着部、LCLの走行にそった辺りや、腓腹筋のlateral headの辺りに牽引痛があります。なかなか圧痛点が見つからないことが多いのです。患者さんは牽引痛を訴えるけれど圧痛点がなかなか見つからないことも

あります。内側型OAのひとつの特徴かもしれませんが、もちろん、すべての人がそうではないですが、結構あると思います。

関矢 先ほど、動作開始時の痛みの話がでしたが、待ち時間が長い患者さんほどその痛みを訴えることが多く、待ち時間が影響を与えてしまうということも感じます。続いて検査についてお聞きします。先生方の施設ではどのような膝の撮影方法がスタンダードになっているのでしょうか。

出家 4～5年前までは臥位で普通に正面、側面で撮っていました。現在では、立位正面、立位側面、軸写、ローゼンバーグ撮影をルーチンで行っています。若い患者さんの場合は異なりますが、50歳以上で、OAが疑われるような場合、この方法を基本にしています。側面は、片足で立って最大伸展位で撮影しています。技師さんはちょっと大変みたいですけど。

関矢 技師さんがチェックして、技師さんが満足いくまで撮り直すわけですか。

出家 そうらしいですね。

関矢 特に変形のある患者さんは難しいですね。側面を荷重立位で撮ることのメリットはどのようなことがありますか。

出家 しっかり伸びているかどうかみることで、われわれの前では伸びているようにみえても、レントゲン上でみると伸びていない場合もあります。検査のときには無理しても立てる。車椅子で来られた場合でも、無理をすれば立てるのだなと思う場合もあります。臥位で撮ると30度から40度くらい屈曲位になってしまう場合があります。OAの場合、膝蓋骨低位の方も多く、注意しています。

関矢 赤木先生はいかがでしょう。

赤木 当院は少しゆるく、立位正面、臥位側面、45度のskyline viewと、立位長尺正面像がスク

リーニングの基本になっています。手術の適応がある場合には、さらにストレステストを追加します。立位での最大伸展位というストレステストをすることもあります。ローゼンバーグ撮影も手術の適応がある場合には順次追加していきます。

関矢 枚数はかなり多くなりますか。

赤木 手術となるとかなりの枚数になります。いろいろな情報を集めたいという理由です。大学病院という特性があるかもしれません。

関矢 ストレス撮影は内反、外反を含めてということですか。

赤木 そうです。特にHTOとか、UKAの場合は必須になります。

関矢 内外反のストレス撮影は何か特別な機器を使っていますか。

赤木 いいえ、主治医が徒手でやっています。

関矢 私たちは側面の撮影を、臥位ですが、最大伸展位で行っています。伸展位のほうが多くの情報が得られると感じています。赤木先生のところは屈曲位ですか。

赤木 ほどほどの屈曲位です。

関矢 屈曲位でやるメリットは何でしょうか。

赤木 きれいに大腿骨顆部のラインを合わせやすく、技師さんにとって撮影が容易な点でしょうか。機能的なこととか、病態を知るという意味ではやや不足かなと思います。

関矢 レントゲン以外にMRIも有効な手段だと思います。OAの患者さんのMRIを撮るような機会は多いでしょうか。

赤木 典型的なOA、たとえば「私は20年前から膝が痛いです」「長期間OAがあっというところなどで治療を受けてきています」「手術を受けに来ました」という方に対して、基本的には撮影していません。初診で来られて顆部壊死の可能性や、半月性の因子、あるいは二次性の

OAでACL断裂を昔起こしたことがあるような方に対してはMRIを行います。側面のレントゲン像で、脛骨が前方にでていられるような患者さんもなかにはいらっしゃいます。手術の関連でいえばHTO、UKAを予定し、関節内の構造物をぜひ知りたい場合には、必ず撮るようにしています。

関矢 出家先生はいかがでしょう。

出家 ほぼ全員撮っているのではないのでしょうか。もちろん手術する人は全員です。「他の病院にたくさん行ったけどよくなるらない」方や、レントゲンではOAに見えても、骨壊死や半月板の問題などを否定する意味で、また患者さんに納得してもらう理由で、撮ることもあります。それでいいかどうかは問題あるかもしれません。

関矢 MRIを撮ることによって痛みの原因がはつきりすることもありますか。

出家 もちろんあります。骨壊死が見つかることもあります。半月板の原因が明らかになることもあります。OAプラスそういった要因があり、痛みを感じるのだと患者さんに説明します。説明の手段として必須とっていいのではないかと思います。

関矢 OAの患者さんの半月板に特徴はあるのでしょうか。全例、半月板の変性を伴っているのでしょうか。内側型のOAであれば、さらに内側の方に半月板が逸脱している例が多いでしょうか。

出家 明らかに関節の中央のほうにずれているものは、痛みの原因と考えます。内側半月板がより内側にずれ、脱臼しているような状態では、OAもひどく、半月板も悪いだろうと思います。この場合戻すことは不可能で、薬などの保存療法では治療が難しく、手術を行うということになると思います。

関矢 レントゲンでは軟骨がしっかりあるよう

変形性膝関節症の治療：現状と展望

に見えても、MRIでは軟骨が意外にないケースもあると思います。

出家 そういう意味では、MRIをある程度の病院でしたら持っていますので、レントゲンに次ぐひとつの武器ではないかと思っています。

関矢 その他に重要視している検査機器はありますか。

赤木 検査というべきかどうかわかりませんが、当院では術前計画にCTを用いています。TKAとなれば必ずCTは撮るようにしています。大学病院ですので、手術症例が多く、手術的治療に必要な情報を集めるために検査を適宜選んで行くというかたちで行っています。痛みとの関連で、研究目的では全例にMRIを撮ります。半月性の因子の場合もありますし、OAがなぜ痛いのかを考えるとMRIは骨の情報を与えてくれます。特にbone marrow edemaに関心を持っています。痛いOAと、痛くないOAの差について、MRIで何か情報が得られないかと常々考えています。

関矢 出家先生はどうでしょうか。

出家 CTは骨情報が欲しいときには必須だと思っています。人工関節の場合、術前にMRIを撮っても術後に何かあったときにMRIを撮ることができないので、CTも一緒に撮るようにしています。

関矢 先ほど全例にMRIということでしたが、大学で撮影されるのですか。

出家 これは関連病院の先生にお願いしています。変形性関節症の場合はそれほど焦ることはないのでじっくり行えばいいと思っています。

関矢 エコーの利用などはどうでしょうか。

赤木 私は使用していません。

出家 エコーは取り組んではいますけど、よくわかりません。MRIやCTのほうが有用と考えています。ただガングリオン、半月板cyst、

Baker's cystなどに対して、最近エコー下で穿刺することを試みてはいます。

変形性膝関節症の手術療法

関矢 変形性膝関節症の患者さんを診て、治療方針を決定する際には、先生方独自のアルゴリズムがあるのではないかと思います。そのあたりを詳しくお話いただけないでしょうか。まず内側型OAに対して、どういう考え方で治療を決定するのでしょうか。

赤木 手術的治療として、自分独自のものとは思いませんが、関節鏡、HTO、UKA、TKAの4段階があると思います。鏡視下デブリードマンは、症例をある程度限定しています。鏡視下洗浄だけでもよくなるという話を聞きますが、私は信じていません。関節鏡手術の対象は、基本的に機械的なsymptomがある場合で、特に半月板断裂に対してです。比較的OA Gradeが低く、Grade 2ぐらいまでで、半月兆候や明らかな遊離体があり、関節内のロッキングやキャッチングを起こすことがあるだろうと思われる方にのみ、鏡視下での半月形成や遊離体摘出を行っています。

関矢 滑膜切除はどうでしょうか。

赤木 滑膜切除は基本的には行いません。内側半月の周りがずいぶん充血していて痛そうだと思うときには、coagulatorで滑膜を灼くこともあります。術前の診断をもとにし、これは半月板が切れているだろう、これは遊離体のキャッチングだろうと判断した場合は鏡視下手術を行います。内反の程度が強くてOA Grade 3以上になる場合は骨切り術の適応を考えます。そのとき鏡視下手術を合併して行う場合もあり、軟骨の修復が可能な場合は骨軟骨柱移植術を追加して行います。その次の段階で、HTOでは完全に治せるかどうかわからない、治療期間が長くな

る、あるいは高齢であって適応でない場合にはUKAを行います。UKAは基本的にACLの残っている人が適応になります。ACLの再建を合併して行うことも時にはあります。UKAは関節内だけの操作ですので、脛骨の内湾が強く関節外での変形がある場合、関節内操作だけでは変形矯正に限界があると思われるような症例や、ストレステストをしてFTAが180度以下に矯正することができない場合はTKAを行います。

関矢 出家先生、いかがでしょうか。

出家 当院ではUKAを行っておりません。できるだけ自家組織を温存するという方針で、人工物をあまり入れません。50歳前後の患者さんの場合、最初の段階で思った以上に軟骨内側が悪い場合にはopenのHTOで対応できます。またFTAが180度を超え、矯正角が15度を超えるような場合はclosedで対応します。大体60歳後半の患者さんまではそれで対応できますが、70歳を超える患者さんで、内側がかなり悪い場合は、どちらにしますかと患者さんにうかがうことが多いです。それでも、外側がきれいな場合は70歳を超えていてもHTOを行うこともあります。最終手段としてTKAがありますが、なるべくHTOで対応したいというのが当院の方針です。その中の方法として、closed, openの選択肢を用意しています。内側がひどい場合、50～60歳の患者さんで外側の骨軟骨柱がとれそうな場合は、鏡視下の骨軟骨移植術を併用して行うこともあります。デブリードマンだけでは行っていません。HTOを行うときに関節鏡検査を必ずして、内側のmicrofractureなど、軟骨修復を促すことを試みています。

関矢 軟骨の操作に関して、例えば残存しているような変性した軟骨をきれいにするようなことはされていますか。

出家 剥がれそうであれば削っています。剥

がれている場合は、変性ということで掃除し、bone marrow stimulationを行っています。

関矢 HTOに関して赤木先生のところでは、軟骨操作は先ほど追加して行うこともあるとうかがいましたが……。

赤木 軟骨変性の範囲が狭ければ、microfractureの適応を行っています。HTOは私達は60代後半の患者さんまでで、これまで最高齢が68歳くらいです。70歳を超えると、HTOの選択をしていません。

出家 たしかに、軟骨の変性などがあり、外側はどうかと思うときもあります。成績は落ちますが、最終手段としてTKAがあるということが心の中にあります。

赤木 われわれもopening HTOを行っています。出家先生が矯正は15度までとおっしゃいましたが、15度というのはスタンダードだと思います。他の先生方も15度までくらいがいいのではないかと、それ以上の矯正を行うとpatellaが低位になるとおっしゃっています。私達の場合、openingは10度くらいまでにしていきます。closing wedgeは安心して荷重できますし、骨癒合について失敗するということがまず起こり得ないという利点があります。腓骨の操作が必要とか、手技的な面を斟酌しても十分行う値打ちのある手術だと思っています。opening wedgeは10度くらいのちょっとした矯正に非常に有用だと思います。

出家 opening wedgeになったことにより手術操作が比較的楽になり、デブリードマンだけ行うということが減ったと思います。手技的にも簡単になりました。

関矢 私達のところではあまりHTOを行っていません。TKAに比べて痛みをとる点で少し劣るのではないかとこの考えがあり、あまり積極的ではありません。HTOで多くの患者さんが確實

変形性膝関節症の治療：現状と展望

に除痛できると考えてよろしいですか。

出家 私も先生がおっしゃるように少し劣るかなと思っていました。いたみがとれるのは、手術後3カ月、半年ぐらいかかるとの説明が重要かと思います。今年のJOSKASでHTOのセッションが非常に多かったことに驚きました。HTOも一時すたれていましたが、手技が改良されたり、いい固定道具ができてきて、自家組織を温存する方法が見直されている気がします。

関矢 赤木先生はいかがでしょうか。

赤木 除痛効果については、UKAは回復も早いですし、確実な除痛が得られます。しかし、例えば10代の人でもO脚で疼痛を訴え、将来内反型のOAに進行する可能性が高いと判断した場合、HTOを行うこともあります。HTOは年代の適応の範囲が広く、成長終了の段階から60代後半の方まで手術の適応があります。除痛効果の点では時間もかかりますし、確実ということがなかなかいえない面もあるとは思いますが、なくなる手術ではないと思います。

関矢 最終的にはTKAという手段がありますが、HTOからTKA、あるいはUKAからTKAというのは手技的にはとても大変なことなのか、それほど苦労しないで行うことができるのか、経験があれば教えてください。

赤木 HTOからTKAのコンバートは、難渋する場合があります。関節面の中央ポイントと、骨軸とが比較的一致している程度のHTOがなされている場合はいいですが、過外反でそこにオフセットができてしまっているような場合は、人工関節の設置に苦労します。場合によってはもう一度骨切りをしてlong stemを用いて固定することもあります。膝蓋骨が低位になっている場合もあります。少し苦労することがありますが、工夫すればTKAは可能です。HTOをしたからTKAができなくなるということはまずありま

せん。

関矢 Open wedge後の場合はいかがでしょうか。

赤木 Open wedge後でTKAを行ったことはありません。

出家 私もありません。closed HTOのあとにTKAを行った症例がすべてです。closed HTOのあと行うときも皮切が心配なときがあります。横に皮切りの場合、もう少し外側に切ってくれたらと思うときがあります。また、手技的には後ろを剥がされたあとに癒着しているので、脛骨が前にでてこないことはありますが、注意して行えばできないことはないと思います。

関矢 UKA後、TKAにコンバートされた経験はありますか。

赤木 UKA後のTKAは何例か経験したことがあります。ほとんどが脛骨側の問題です。脛骨側が沈下していると骨欠損ができるので、脛骨側にstem extensionが必要ですし、内側に5～10mmのaugmentを入れなければならない症例が多いですね。CCKまで使う必要はありませんし、基本的にはPSでいけるでしょう。CRを行う先生はCRでも大丈夫だと思います。少し部品の追加が必要ですが、UKAからTKAにコンバートすることはそれほど難しいことではありません。通常の手術時間で終わります。

関矢 数はそれほど多くないと思いますが、外側型のOAに対する治療方針はいかがでしょうか。

出家 難しいですね。外側型で年齢が高ければ人工関節が確実かなと思いますが、問題は40代後半～50代、60代前半の患者さんの場合、どうしたものかといつも悩みます。骨切りでは難しいこともありますし、アライメントもそれほど悪くなければ、デブリードマンで逃げたいという気持ちが半分あります。外側の軟骨が痛んで

いる症例で、外側の discoid や半月板を切除したあとのものは、distraction arthroplasty のいい適応かなという印象を持っています。

関矢 内側より外側がいい適応になるのか、あるいは内側なら他の治療方法があるからということですか。

出家 内側なら HTO, いい治療法がないので、UKA でも可能だと思いますが、外側の場合は distraction arthroplasty が人工関節の手前ぐらいでは適応ではないかと思っています。

関矢 赤木先生、いかがでしょうか。

赤木 外側も内側型と基本的に一緒に、ただ、HTO がない点が異なります。大腿骨側の骨切りを昔行ったことがあります。論文などを調べてみても成績はよくないようです。外側型の OA に対しては半月性因子のある場合は鏡視下で対応します。それが無理であれば、外側の UKA を行い、TKA の適応になる方には TKA を行います。軽度の OA でしたら UKA で十分対応できますね。

出家 外側型の UKA はありますか。

赤木 外側型というよりインプラントとして外側用ということですか。それはありません。

出家 右と左を替えるのですね。

赤木 そうです。適合性に少し不安な面がありますが、なんとかできますね。他に UKA をかなり積極的にされている先生の話聞いても外側の UKA は決して成績は悪くないとおっしゃいます。むしろ、脛骨板が沈み込むことが少ないです。重要なのは、過矯正してしまうと内側側の OA が一気に進行してしまう場合があります。例えば FTA が 171 度ぐらいの外反型の OA だった場合、それをできるだけ矯正しないで 172 ~ 173 度ぐらいまでで止めておきます。やや外反位で止めておき、177 度や 176 度までには絶対に矯正しません。4 ~ 5 度を超えると過矯

正だと思います。外反型 OA で UKA は決して成績が悪くありませんが、過矯正だけは避けないといけません。そのためには思い切って骨を切除しないといけません。術前にどれくらい骨を切除するのかをきちんと計測して、FTA をどこに持って行くか。そのためにはどれくらい骨を切除しなければいけないかというのを術前にきちんと決めてその通り行うことが必要です。

関矢 PF 型 OA に関してはいかがでしょうか。

赤木 PF の人工関節がありますが、現在のところ私は使ってみようという気にはならないですね。

関矢 それはなぜでしょうか。

赤木 PF に対してだけにフォーカスを当てて、疼痛を除く、そういう症例があまりに少ないと思います。OA Grade が低ければ、私たちは lateral release で対応するとか、Fulkers on 手術を行っています。自家組織を残した手術でかなり対応できると私は信じていますのでわざわざ人工物で置換することはあまり考えていません。

関矢 出家先生はいかがでしょうか。

出家 そうですね。赤木先生がおっしゃるように PF 型だけで困っているというのは症例として少ないと思います。わざわざそこに異物を入れる必要はなくて、PF の除圧をかけるということでもなんとか対応できるのではないかと思います。考え方のひとつとして人工関節で膝蓋骨を替えない方も半分くらいいらっしゃるということです。ある程度痛んでいても除圧をしてあげれば患者さんにとっては少し痛みがとれるのではないかと思います。

関矢 PF 型 OA で手術になる方というのは全体の何割ぐらいでしょうか。

赤木 あまり手術を希望される患者さんはいらっしゃいません。階段の上りはじめとか、下りはじめにすべりが悪い、ギシギシという感じ

変形性膝関節症の治療：現状と展望

がして不愉快など、歩ける程度で、手術をするほどまでは痛くないという患者さんが多いです。多分PFのすべりが悪くて牽引痛が起きているのではないかと思います。最初は上がりにくいですが、手すりをつかって上っているうちに上れるようになるという訴えを患者さんはなさいます。患者さんに手術を勧めても「イエス」とはなかなかいってくれない方が多いですね。「あなたはここが悪いです」「原因はこういうことが考えられます」というと、「ああ、そうですか」と納得していただけます。

関矢 患者さんとしては原因がわかればということですね。

赤木 日常生活における障害の程度も手術を希望する程ではないのかなという感じはします。

変形性膝関節症の保存療法

関矢 次は保存療法についてお聞きします。保存療法でも運動療法、ヒアルロン酸の関節内への注射、装具、NSAIDsを代表とした薬剤、理学療法など保存療法で重視するものは何でしょうか。

出家 これらはやはり組み合わせです。運動療法はもちろんのこと、ヒアルロン酸の関節内投与、最近私は装具療法に力を入れていますので装具・理学療法、この3つは重要ではないかと思えます。

関矢 最初からその3つですか。

出家 いいえ。最初は運動療法をベースにしています。

関矢 運動療法に関して具体的にどこまで指導していますか。

出家 外来のとき、理学療法の資格を持つ大学院生に指導してもらい、家でも行ってもらいます。

関矢 患者さんには何種類くらいの指導をしま

すか。

出家 四頭筋訓練、patella settingなど2～3種類ですね。

関矢 赤木先生、運動療法に関してはいかがでしょうか。

赤木 私も当然お勧めします。まずは運動療法から始まるものだと思っています。四頭筋訓練を主に勧めますが、SLRのように仰臥して行うタイプです。仰臥になって片膝を立てて、膝を伸ばして、数秒間30～45度くらい上げてもらう。あまり高く上げず、下ろしてもらう。それを20回くらい繰り返す動作を1日3回行っていただきます。腰掛けて行いたいとおっしゃる方には、椅子に腰掛けて膝を伸ばしてもらいます。全力で伸ばして10秒間保持し、下ろすという動作を10回、1日に2～3回行っていただきます。その2種類のうち、いずれかを行ってくださいと説明します。あとはウォーキングです。急性期の痛みがとれたらできるだけ坂道や階段を避けて平地を歩くことをお勧めしています。その他にNSAIDsは急性期の痛みに対して使います。最近ノルспан[®]テープという貼付剤がでましたけど、出家先生は使われましたか？

出家 いいえ。使っていません。

赤木 レパタン[®]（ブプレノルフィン）を含有したものを1週間に1回、これからちょっと使ってみようとしているところです。実は術後鎮痛に使い始めています。術後鎮痛の適応は認可されていません。海外の話聞いてみますとデュロテップなどフェンタニルの入ったテープを術後鎮痛によく使っています。

関矢 もう使われているのですか。感触としてはいかがでしょうか。

赤木 感触はいいですね。

出家 鎮痛効果としては強いと思います。術後ですと炎症があるので、オピオイド系のかたち

だと消炎という意味では少し弱いと思います。

赤木 そうですね。私どもではTKAなどの術後でしたら局所のカクテル注射をしています。モルヒネ、長時間作用性の局麻薬、ステロイド、それとエピネフリン入りキシロカインです。トータル50ccにして関節周囲の組織に注入します。関節前面の皮下組織は血行を阻害しますので使用しません。関節の中の比較的深部の靭帯や腱組織に浸潤させます。randomized studyをやっていますが、かなり効果があると感じています。効いているのは3日間ぐらいで、3日目ぐらいになり、リハビリを行うなど活動性が高くなるとリバウンドを訴える患者さんがいらっしゃいます。そこを何とか抑えたいということから、手術翌日からテープを使用しています。3日目以降はコントロールと差がありません。そこをもう少し下げたい。コントロールともっと明らかな差をつけたいということです。炎症を抑えるという意味では、セレコキシブですが、ベースラインとして入院中は飲んでいただいています。

出家 術前から飲んでいただいていますか。

赤木 術前は飲んでいただいております。それもこれからの試みで面白い話だと思っています。海外では結構積極的に使用しています。通常のNSAIDsからプレガバリン(リリカ®)といった製剤を術前から投与することも行っています。

周術期鎮痛ということに関しては日本はずいぶん遅れているかと思います。

関矢 オピオイド系の副作用に関して何か問題になるようなことはありますか。

赤木 少し嘔吐を訴える患者さんがいますが、硬膜外ブロックでモルヒネを入れていたときに比べると格段に少ないです。嘔吐の頻度を、コントロールで局所浸潤を行わなかった群と、行った群で比較した場合、モルヒネ10mgを入

れると少し高いという印象です。海外ではモルヒネ8mgを使っていることが多いですが、日本の場合ですと麻酔の取り扱いが非常に厳しくて、2mgを捨てるというわけにいきません。ですから10mg注入していますが、それだとちょっと嘔吐がでる。コントロール群との差ですね。それについては何か対応していかなくてはいけないかもしれません。

関矢 患者さんの減量についてはいかがですか。

赤木 減量は非常に重要ですが、難しい。しっかりしたエビデンスもあります。しかしそれが難しいというのが現状だと思います。関矢先生はいかがですか。

関矢 私も肥満の方には勧めますが、実際にはなかなか難しいですね。私と一緒に頑張りましょうということで。

赤木 膝を治す医者は太れないということですね。

関矢 そうですね。逆に患者さんが減量に成功すると非常に嬉しいですね。

出家 減量に成功した患者さんに、「どうやって減量したのですか」と聞くことがあります。

関矢 膝痛に対する減量の効果というのは確実だと思います。

赤木 私たちがいくら口を酸っぱくしていてもなかなか難しいところがありますので、ドクター1人の力ではなく、栄養士、栄養相談室、あるいは理学療法士などと連携して根気よく粘り強くやっていくことが重要ですね。体重計に乗っていただき、フィードバックを患者さんに与えてモチベーションを維持していただくことが大事です。減量のためのシステムを何か組まない限り難しく、減量してもすぐ元に戻ることの繰り返しも多いですね。

変形性膝関節症の治療：現状と展望

今後の展望

関矢 最後に今後の展望をお聞きします。出家先生には今回、distraction arthroplastyの原稿をお願いしていますが、簡単にお話いただけますか。

出家 人工膝関節に行くまでのtimesavingを兼ねたひとつの方法です。40～50代が主な対象です。内側の軟骨だけが悪い場合には適応することはありません。内外側が悪くレントゲンを診て、人工関節には若いなと思う症例がターゲットです。年に1～2例しか行なっていませんが、実際に8年ぐらい前から始めています。結果をみると、外側のdiscoid切除後の外側型OAの方は8年経過しても非常に良好です。残念なことにobesityが強く、内外側が悪い人で人工膝関節になった症例もあります。一番よい適応は、若年の外側型のOAの方で、方法がない症例にはよいと思います。今年9月、サンディエゴで行われたOARSIでは、他の大学もdistractionだけを膝に付けて2カ月行うという効果の報告をされていました。われわれの器具には可動域があります。ただ、もう少し器具を改良が必要で、一般に拡がるには少し時間を要するかもしれません。

関矢 去年のICRSでもdistraction arthroplastyのセッションができたりして、世界的にも拡がりつつあるのかなという印象を受けました。先生が使われている器具は他の施設でも使用できるようになっていますか。

出家 市販はまだされていません。もう少し使いやすくなるように改良を加えています。簡単な手技ですが、装着が大変なのです。

関矢 ポイントを決めるのが大変ですね。

出家 そうですね。ピンをさしたところが関節から離れたところ、筋肉を貫通してしまうこと

が、創外固定器の問題点だと思います。ピンの刺入部が感染を起こしやすかったり、あるいは関節が動きますのでどうしても筋肉が引っ張られそこに痛みが生じたりします。筋力がない女性とか、痛み弱い人などは上手く可動域が最初に得られないという問題点があると思います。

関矢 軟骨は非常に厚くなりますね。

出家 軟骨はびっくりするくらいきれいになります。

関矢 半月板も再生することを期待したいのですが、軟骨のほうがより再生しやすいということになりますか。

出家 半月板のある部位はおそらく癒痕化しているのではないのでしょうか。関節鏡で触ってみたり、組織をとってみますが半月板ということはありません。

関矢 半月板を切除し、長期間経過後に観察すると、件数は多くないですが、空間を埋めるように半月板様の組織がでてきたりするのを目にします。ポテンシャルはあるとは思いますが……。

出家 それが上手く機能するかどうかは問題があると思います。少なくとも十数例全例できれいな半月板のようなものがでてきたことはありません。レントゲン上でもジョイントスペースが保たれているので、何かがない限り、空隙を埋めるといったことは起こらないはずです。大腿骨顆部、脛骨顆部あたりは軟骨様組織だと思いますし、半月板あたりは線維組織、癒痕組織ではないかという気がします。

関矢 赤木先生に人工膝関節置換術の展望についてお聞きしたいと思います。

赤木 人工膝関節もずいぶん歴史のある治療法で、おおかた実用に耐え得るだろうというものができてもう40年になりますね。かなり完成された治療法であることは間違いありませんが、満足度という観点から考えてみると決して優れて

いるとはいえません。THAとTKAの満足度調査を比較すると、THAのほうが圧倒的に満足度が高く、THAを行った患者さんは手術をしたことを忘れてしまうという方が大多数です。それに比べるとTKAのほうはそういつてくれる患者さんはかなり少ない印象です。これは人工関節なんだという感覚を持って日常生活を送っている患者さんが多いということですね。そういう点でまだまだ改良の余地はあるかと思います。満足度をどうしたら上げられるかいろいろな検討がされています。少し抑うつ傾向にある患者さんや、手術後に日常生活を送るうえでの痛みが残っている患者さんは満足度が低く、また、手術後にどれくらい自分の膝はよくなるだろう、という期待がどれくらい満たされているかという点が、術後の満足度に関係するといわれています。客観的に医者からみた膝の機能については決して悪くなく、ADLのレベルをみてみると決して悪いものではないにもかかわらず、満足度はあまり高くない。その点に何かパラドックスがあるような気がします。現実には調査してみるとそういった結果がでますし、海外などではいまだたくさんそのような調査が行われています。日本ではずいぶん遅れていると思うので、私たちもそういった調査や満足度の向上に取り組んで行かなくてはいけないと思っています。患者さんの膝関節機能を高めることは重要なことです。それに加え、患者さん自身が手術の結果をどう感じているのか。その取り組みがTKAの世界では必要だと思っています。先ほど手術直後の鎮痛についてお話しましたが、そういうことも患者さんの満足度の向上に役に立ってくれるのではないかと期待しています。TKAでの日本人の満足度を研究テーマとして調べていきたいと思っています。

関矢 最後に出家先生に細胞治療のお話をし

ていただきたいと思います。広島大学では日本でいち早く細胞治療、軟骨再生に向けて研究されていると思います。

出家 これは1996～1997年から行っていて、治験も終わっていますが、なかなか日本では認可されません。遅れてスタートした韓国や台湾にすでに遅れをとっています。細胞治療でしか治らない症例もありますので、よい適応もあると思います。赤木先生がおっしゃるように、人工関節はやっぱり人工関節だなど思われて過ごされている方も多く、70～80歳になっても「細胞治療や培養軟骨でどうにかなりませんか」という問い合わせをされる患者さんがいらっしゃいます。30～40代から培養軟骨や細胞治療を用いて上手く治療できれば、将来的にも人工関節にかかる医療費を削減することができると思います。今のところ、二段階手術になってしまうという問題や、培養する軟骨細胞を採取しなければならないという問題がありますが、一般に広く使えるようにならない限り、進歩しないのではないかと思います。ただ普通の手術として認めてもらいたいというのがわれわれの願いです。

関矢 現在はJapan Tissue Engineeringが申請されていて、そろそろ認可されるのではないかと聞いていますが……。

出家 そろそろというのがもう大分……。

関矢 まず認可されて日本で普及してもらいたいですね。

出家 そうです。決して悪い手術ではないですし、「よかった」と思う症例がたくさんあります。これでない駄目だという症例には非常にいいと思います。

関矢 ありがとうございます。大変有意義な座談会でした。

Broad-range real-time PCR assay for detection of bacterial DNA in ocular samples from infectious endophthalmitis

Manabu Ogawa · Sunao Sugita · Norio Shimizu ·
Ken Watanabe · Ichiro Nakagawa ·
Manabu Mochizuki

Received: 18 January 2012 / Accepted: 5 July 2012
© Japanese Ophthalmological Society 2012

Abstract

Background To evaluate a broad-range real-time polymerase chain reaction (PCR) targeting the bacterial 16S rRNA gene for detection of bacterial DNA in infectious endophthalmitis.

Methods The bacterial 16S rRNA gene was measured by quantitative real-time PCR. For the assay, bacterial DNA was prepared from 12 Gram-positive and 4 Gram-negative strains. To determine the optimum method for DNA extraction, four extraction procedures were selected by using DNA extraction program cards with and without the use of lysozyme. To evaluate PCR sensitivity, PCR fragments were amplified from *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* DNA.

Results DNA extraction using the Bacteria card[®] without enzymes resulted in detection of all the tested strains at concentrations $\geq 10^7$ copies/mL. Extraction with the

Bacteria card[®] with lysozyme resulted in detection of all the tested strains at concentrations $\geq 10^6$ copies/mL, indicative of no significant difference between the two procedures. DNA extraction using the Virus card[®], both with and without enzymes, resulted in reduced efficiency of detection of all strains compared with use of the Bacteria card[®]. The PCR could detect as few as 1–10 colony-forming units (CFU) in diluted vitreous samples per reaction, and all tested bacterial species known to cause endophthalmitis were detected.

Conclusions Bacterial 16S-specific PCR can comprehensively detect the main causative bacteria of clinically suspected endophthalmitis.

Keywords Endophthalmitis · Bacteria · Polymerase chain reaction

M. Ogawa · S. Sugita · M. Mochizuki
Department of Ophthalmology and Visual Science,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

S. Sugita (✉)
Laboratory for Retinal Regeneration, RIKEN Center for
Developmental Biology, 2-2-3 Minatojima-minamimachi,
Chuo-ku, Kobe 650-0047, Japan
e-mail: sunaoph@cdb.riken.jp

N. Shimizu · K. Watanabe
Division of Medical Science, Department of Virology,
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

I. Nakagawa
Department of Section of Bacterial Pathogenesis,
Graduate School of Medicine and Dental Sciences,
Tokyo Medical and Dental University, Tokyo, Japan

Introduction

Infectious bacterial endophthalmitis can result both from exogenous infections, for example exposure to infectious agents, trauma, and intraocular surgery, and endogenous infections, for example systemic infectious disorders. It is often difficult to differentiate between inflammation in ocular inflammatory disorders, for example infectious endophthalmitis caused by non-infectious and infectious agents. The standard for diagnosis of invasive bacterial infections used to be microscopic examination and conventional bacterial culture. Although microscopic examination is rapid, the smear test requires a relatively large concentration of bacteria, $\geq 10^4$ colony-forming units (CFU)/mL, to give a positive result [1]. Moreover, identification based solely on morphology is often not possible. Bacterial cultures are often used for differential diagnosis,

but there are several disadvantages, for example cultivation time (24–72 h) and low sensitivity. Inappropriate treatment because of misdiagnosis of infectious endophthalmitis can result in severe tissue damage and vision loss. Because of the difficulty of making proper diagnoses on the basis of the small amounts of ocular samples available, there is a need to consider the collection and preservation of clinical samples, including bacterial DNA, available for diagnostic use. Moreover, some cases involve rapid progression of the ocular infectious disease; therefore, accurate, rapid and comprehensive diagnosis is of great importance.

Polymerase chain reaction (PCR) is used for detection of bacteria in suspected intraocular infections [2–4]. Bacterial PCR is a diagnostic tool that can be used for detection in intraocular specimens, and can be used as an alternative tool for subsequent examination of specimens found to be bacteriologically negative by use of conventional methods, for example cultures and smear tests. Several studies report the presence of the bacterial ribosomal RNA gene (16S rRNA gene) in ocular fluid from patients with infectious endophthalmitis [2–4]. This broad-range PCR can detect a variety of bacterial DNA by use of primers for conserved regions [5, 6], and the combination of broad-range PCR and quantitative PCR for infectious bacterial endophthalmitis is now available [4]. Real-time PCR enables quantification of bacterial loads in a sample. However, the efficiency of extraction of bacterial DNA from ocular fluid by use of a robotic extraction machine is not yet established. Therefore, establishment of a precise extraction procedure is needed for diagnostic clinical use. In addition, broad-range real-time PCR assays are rarely designed to identify bacterial DNA in clinical samples and are not widely used for ophthalmologic diagnosis.

The objectives of this study using broad-range real-time PCR assays were:

1. to determine optimum methods of DNA extraction;
2. to evaluate the sensitivity of the real-time PCR assay in vitreous samples; and
3. to include and test several main causative agents of infectious bacterial endophthalmitis.

Methods

This study was performed in accordance with the tenets of the Declaration of Helsinki and approved by the Institutional Ethics Committees of Tokyo Medical and Dental University.

Bacterial strains

Reference bacterial strains were provided by the National Institute of Technology and Evaluation (NITE, Tokyo,

Japan), the NITE Biological Resource Center (NBRC, Chiba, Japan), the Research Institute for Microbial Diseases (RIMD; Osaka University, Osaka, Japan), and the Japan Collection of Microorganisms (JCM, Saitama, Japan). Frequently reported pathogenic bacteria of endophthalmitis were tested, including 12 Gram-positive strains: *Staphylococcus aureus*, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pyogenes*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Corynebacterium diphtheriae*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Propionibacterium acnes*, and *Nocardia asteroides* and 4 Gram-negative strains: *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, and *Moraxella lacunata* [7–14].

Before PCR assay, *S. aureus* and *S. epidermidis* strains were cultured in Trypticase soy broth (Difco; BD Diagnostic Systems, Sparks, MD, USA). *S. pyogenes* and *S. sanguinis* strains were cultured in Todd Hewitt broth (Difco) containing 2 % yeast extract (Difco). *E. coli* and *B. cereus* strains were cultured in LB broth (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan). The *K. pneumoniae* strain was cultured in nutrient broth (Difco). All bacterial strains were grown until the mid-log phase at 37 °C. Bacterial cells were washed twice with PBS, and then re-suspended in PBS at appropriate concentrations. The remaining strains were dissolved in physiological salt solution without culture.

DNA extraction

DNA extraction was performed using a DNA extraction card (Qiagen EZ1 Advanced card; Bacteria card[®] or Virus card[®]; Qiagen, Valencia, CA, USA) and a DNA Kit (Qiagen DNA tissue kit or Qiagen Virus Mini kit; Qiagen) installed on a robotic workstation set for automated purification of nucleic acids (BioRobot E21, Qiagen). Four extraction procedures were used, as follows:

DNA extraction procedure I	Sample preparation: bacterial culture 180 µl + nuclease-free water 20 µl, and extraction method: Bacteria card [®] + DNA tissue kit
DNA extraction procedure II	Sample preparation: bacterial culture 180 µl + lysozyme 20 µl (50 mg/ml, Nacalai Tesque), and extraction method: Bacteria card [®] + DNA tissue kit. Bacterial cultures were pretreated with lysozyme

	and incubated for 30 min at 37 °C
DNA extraction procedure III	Sample preparation: bacterial culture 180 µl + nuclease free water 20 µl, and extraction method: Virus card [®] + Virus Mini kit
DNA extraction procedure IV	Sample preparation: bacterial culture 180 µl + lysozyme 20 µl (50 mg/ml; incubation for 30 min at 37 °C), and extraction method: Virus card [®] + Virus Mini kit

After DNA extraction, the DNA concentration was measured by use of the Nano drop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), using between 1 and 10 ng/mL bacterial DNA.

Real-time PCR

The primer pairs and TaqMan probe for conserved bacterial 16S rRNA genes and PCR conditions were as described elsewhere [5]. The sense primer (Bac349F) was 5'-AGG CAGCAGTDRGGAAT-3', the antisense primer (Bac 806R) was 5'-GGACTACYVGGGTATCTAAT-3', and the TaqMan probe was 5'-FAM-TGCCAG CAGCCGCGG TAATACRDAG-TAMRA-3'. The products were subjected to 45 cycles of PCR amplification (<500 bp), with cycling conditions set at 95 °C for 10 min, followed by 45 cycles at 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min. The real-time PCR was performed using Ampliqaq Gold (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and the Light Cycler 480 II system (Roche, Rotkreuz, Switzerland). Data analysis was performed by using the program of absolute quantification by the Second Derivative Maximum Method installed in Light Cycler 480 II. Standard curves were constructed from serial tenfold dilutions of linearized plasmid DNA as in our previous report [4].

Sensitivity of real-time PCR assay

After informed consent had been obtained, vitreous fluid was collected from 11 patients who received vitreous surgery for non-infectious eye diseases, for example rhegmatogenous retinal detachment, macular edema by branch retinal vein occlusion, and proliferative diabetic retinopathy. The vitreous samples were diluted threefold with saline before use as a bacterial dilution. The vitreous fluids were centrifuged at 20,000×g for 10 min, then the cell pellets were removed.

To evaluate the sensitivity of the real-time PCR assay, bacterial cell numbers were determined by optical density measurements at 600 nm (OD₆₀₀) in the mid-log phase, and serial dilutions of bacterial culture were plated on the appropriate agar plates, then colony numbers were determined on agar plates. For example, the cell number of *E. coli* at OD₆₀₀ = 1.0 was determined to be 8 × 10⁸ CFU/mL, and the cell number of *S. aureus* at OD₆₀₀ = 1.0 was determined to be 4 × 10⁸ CFU/mL.

200 µl of a tenfold dilution series from 2.5 × 10⁷ CFU/mL to 2.5 × 10¹ CFU/mL of *S. aureus* and *E. coli* bacterial culture were centrifuged at 20,000×g for 10 min, and pelleted bacteria samples were re-suspended in the same amount of diluted vitreous samples. The bacterial DNA was extracted from 50 µl, from 200 µl of diluted vitreous sample and bacterial pellet, and 10 µl (equivalent to 10⁶ CFU/PCR tube to 10⁰ CFU/PCR tube) of 50 µl bacterial DNA was used in PCR reactions. The diluted vitreous samples without bacterial cells were used as a negative control.

Results

Analytical sensitivity of broad-range real-time PCR in relation to the four DNA extraction procedures

Four DNA extraction procedures (I–IV) were compared and analyzed. As described in Table 1, the analytical sensitivity of the broad-range real-time PCR was assessed by use of seven representative bacterial strains including five Gram-positive strains (*S. aureus*, *S. epidermidis*, *S. pyogenes*, *S. sanguinis*, and *B. cereus*) and two Gram-negative strains (*E. coli* and *K. pneumoniae*). For negative control samples levels were undetectable for all extraction methods. DNA extraction using Bacteria card[®] without enzymes resulted in the detection at concentrations of ≤10⁷ copies/mL for all strains. Extraction with the Bacteria card[®] with lysozyme detected concentrations of ≤10⁶ copies/mL, indicating there was no significant difference between the two procedures (Table 1). In contrast, DNA extraction with the Virus card[®] both with and without enzymes resulted in the detection of 10⁴–10⁸ copies/mL for all strains, which was much less than the detection obtained with the Bacteria card[®]. Therefore, procedures using Bacteria card[®] could be used to treat samples of clinically suspected infectious endophthalmitis. In addition, lysozyme treatment is not needed even for detection of Gram-positive bacteria in ocular samples.

Sensitivity of the PCR assay for vitreous samples

PCR results for the prepared vitreous samples showed sensitivity of detection was highest for *S. aureus* bacterial

Table 1 Summary of the analytical sensitivity of broad-range real-time PCR assays in relation to DNA extraction methods

Strain	Number of bacteria DNA (copies/mL)			
	Procedure I	Procedure II	Procedure III	Procedure IV
Gram-positive strains				
<i>Staphylococcus aureus</i>	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁷
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁸
<i>Streptococcus pyogenes</i>	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁴	10 ⁷
<i>Streptococcus sanguinis</i>	10 ⁷	10 ⁸	10 ⁶	10 ⁸
<i>Bacillus cereus</i>	10 ⁸	10 ⁸	10 ⁷	10 ⁷
Gram-negative strains				
<i>Escherichia coli</i>	10 ⁷	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁵
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	10 ⁷	10 ⁷	10 ⁵	10 ⁶
Negative control	<10	<10	<10	<10

DNA extraction procedure I: sample: bacterial culture 180 μ l + nuclease-free water 20 μ l, and extraction method: Bacteria card[®] + DNA tissue kit. procedure II: sample: bacterial culture 180 μ l + lysozyme 20 μ l, and extraction method: Bacteria card[®] + DNA tissue kit. procedure III: Sample: bacterial culture 180 μ l + nuclease free water 20 μ l, and extraction method: Virus card[®] + Virus Mini kit. procedure IV: sample: bacterial culture 180 μ l + lysozyme 20 μ l, and extraction method: Virus card[®] + Virus Mini kit

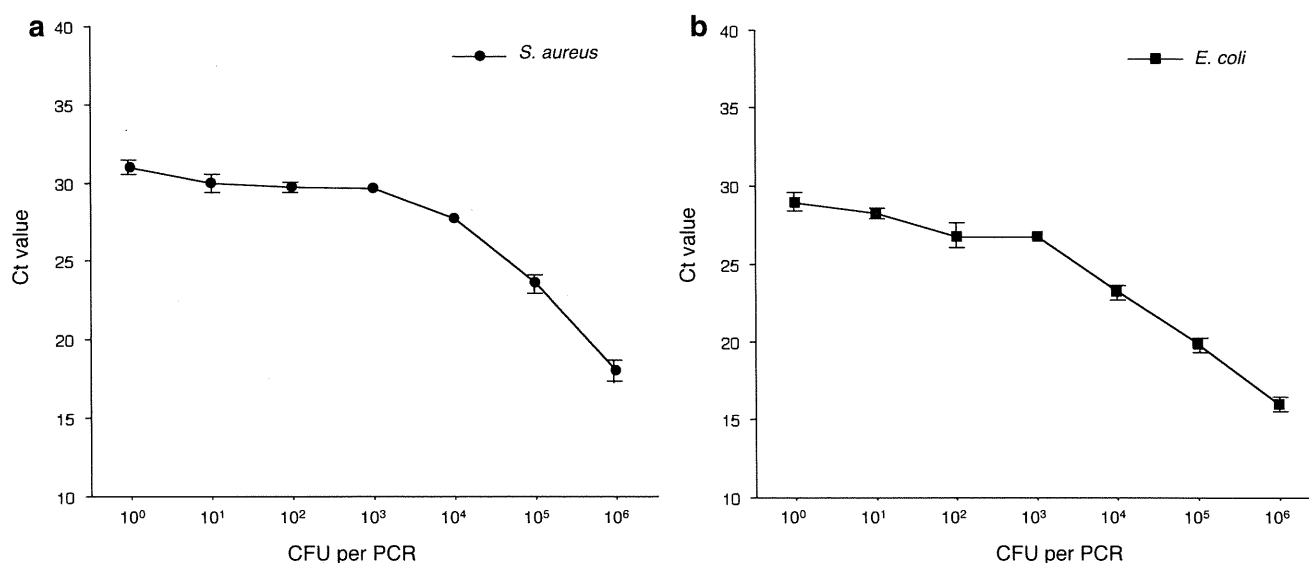


Fig. 1 Analytical detection ranges and sensitivities of a broad-range real-time PCR assay in diluted vitreous samples. **a** Detection of *S. aureus*. **b** Detection of *E. coli*. Results shown are the means and standard deviations of three independent experiments

DNA (concentration $\geq 10^1$ CFU per PCR; Fig. 1a). There was no detection in the negative controls of nuclease-free water. PCR of vitreous sample mixed with *E. coli* resulted in C_t values similar to those for *S. aureus*, i.e., concentration of 10^0 per PCR (Fig. 1b), and there was no detection in the negative controls.

Detection of bacterial DNA of the main causative agents of infectious endophthalmitis by broad-range real-time PCR

For the assay, bacterial DNA was extracted from 200 μ l bacterial culture using DNA extraction procedure I. Use of

DNA extraction with the Bacteria card[®] without enzymes and broad-range real-time PCR assay resulted in the detection of concentrations between 5.8×10^3 and 3.5×10^5 copies/mL for all 16 strains. There was no detection in the negative controls of nuclease-free water. Results are shown in Table 2.

Discussion

In this study, we evaluated a broad-range real-time PCR targeting bacterial 16S rRNA genes for detection of bacterial DNA in ocular samples of infectious endophthalmitis.

Table 2 Broad-range real-time PCR detection of bacterial DNA in main causative agents of infectious endophthalmitis

	Strain	Clone no.	DNA (ng/mL)	C_t value	Copies/mL
	Gram-positive strains				
	<i>Staphylococcus aureus</i>	NBRC12732	7.3	28.7	1.3×10^4
	MRSA	JCM8702	7.0	29.1	1.0×10^4
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	JCM2414	6.0	27.9	1.7×10^4
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	RIMD 3123004	7.2	28.0	1.6×10^4
	<i>Streptococcus sanguinis</i>	JCM5708	3.6	29.1	9.7×10^3
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	NBRC102642	8.2	25.7	9.4×10^4
	<i>Enterococcus faecalis</i>	JCM20313	2.0	24.0	1.1×10^5
	<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	JCM1310	4.4	25.2	6.1×10^4
	<i>Bacillus cereus</i>	JCM20266	4.9	26.8	2.9×10^4
	<i>Clostridium perfringens</i>	JCM1290	6.1	29.9	5.8×10^3
	<i>Propionibacterium acnes</i>	JCM6425	1.4	28.3	1.5×10^4
	<i>Nocardia asteroides</i>	NBRC14403	8.0	28.7	1.3×10^4
	Gram-negative strains				
	<i>Escherichia coli</i>	JCM20135	8.7	23.2	1.5×10^5
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	JCM1662	7.5	26.8	2.9×10^4
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	JCM6425	5.6	23.7	3.5×10^5
	<i>Moraxella lacunata</i>	JCM20914	3.2	25.8	8.9×10^4
Levels were undetectable in the negative control sample (<10 copies/mL) on PCR assay					
MRSA methicillin-resistant					
<i>Staphylococcus aureus</i>					

Using this broad-range PCR, we are able to measure amplification of the bacteria 16S target ribosomal RNA genes. To detect different bacterial species, we choose the PCR primers and probe which were constructed within the conserved region of bacterial 16s ribosomal RNA. We evaluated four DNA extraction procedures used for broad-range real-time PCR assays in the detection of bacterial DNA. The broad-range real-time PCR described herein detected as few as 1–10 CFU in diluted vitreous per reaction. In addition, the bacterial 16S-specific broad-range real-time PCR assay could detect the presence of 16 causative bacterial species of infectious endophthalmitis. Thus, the broad-range real-time PCR could comprehensively detect the main causative bacteria in suspected infectious endophthalmitis cases.

The appropriate DNA extraction procedure for verification of bacterial infection by PCR is still controversial. Most studies of broad-range real-time PCR for bacterial infection detection have reported use of commercial kits, enzyme treatment, freezing and thawing or boiling, mechanical disruption, or a combination of these methods [6, 15–17]. In general, pretreatment using bactericidal enzyme is needed for bacterial cell-wall destruction, and several investigators report the presence of lysozyme resistance in Gram-negative bacteria species such as *E. coli* [18] and *P. aeruginosa* [18], and Gram-positive bacteria such as *S. pneumoniae* [19]. However, this study found no significant difference between use of the Bacteria card[®] procedure and the Bacteria card[®] plus lysozyme-pretreatment procedure for extraction of DNA from the samples.

The reasons for this are not clear, but it is assumed it may depend on:

1. the kind of enzyme used; and
2. which bacteria species are treated.

Thus, a combination of several enzyme treatments should be tried whenever possible.

Diagnosis of ocular infectious diseases, including bacterial endophthalmitis and other forms of ocular inflammatory diseases, is often difficult because of the difficulty in obtaining results from the small amounts of ocular samples, extracted from aqueous humor and vitreous fluids, available. There are insufficient amounts of the samples to enable PCR testing and additional examination to determine whether the infectious antigens causing the ocular inflammatory diseases are from a bacterial, viral, fungal, or parasitic infection.

In this study, we conducted various DNA extraction procedures to determine the best DNA extraction method. Compared with the use of the Virus card[®], DNA extraction using the Bacteria card[®] had higher detection efficiency for all the representative strains tested. DNA extraction performed with the Virus card[®] detected bacterial DNA, but was not as efficient for strains that have a thick cell wall and a capsule, for example *S. aureus*, *S. pyogenes*, and *K. pneumoniae*. Thus, DNA extraction with the Bacteria card[®] should be considered for detection of clinically suspected intraocular bacterial infection.

The minimum detection limits of our broad-range real-time PCR assay after DNA extraction using the Bacteria

card[®] without enzymes was between 10^0 and 10^6 CFU per PCR for the bacterial species investigated. The PCR results from the prepared vitreous sample had the best sensitivity for detection of selected bacterial DNA, for example *S. aureus* and *E. coli* at concentrations of $\geq 10^0$ – 10^1 CFU per PCR. Zucol et al. [6] report that the sensitivity of their broad-range real-time PCR assay targeting the bacterial 16S rRNA gene was a concentration of $\geq 10^3$ CFU per PCR for detection of *S. aureus* and a concentration of $\geq 10^2$ CFU per PCR for detection of *E. coli*. In addition, the minimum detection limits for *S. aureus* and *E. coli* were determined to be in the range 10 – 10^3 CFU or CFU equivalents per PCR. Thus, the minimum detection limit of our PCR assay is among the lowest reported so far for these two bacterial species.

In a previous report by Vollmer et al. [20], serum and urine samples were shown to have at least an equal effect on the C_t values, whereas blood and tracheal secretion samples had stronger effects. They suggest that the delayed C_t values of blood sample (EDTA-anti-coagulated) are mainly affected by background human DNA, whereas the viscous character of samples primarily affected the C_t values of tracheal secretion samples. Because our vitreous samples included less human DNA and the diluted sample was actually non-viscous, detection of bacterial DNA from prepared vitreous samples was shown to be highly sensitive.

Recently, we reported that broad-range real-time PCR of the bacterial 16S rRNA gene is a useful tool for clinically diagnosing suspected bacterial endophthalmitis [4]. In an earlier clinical study, we successfully detected bacterial 16S DNA in all cases of bacterial endophthalmitis ($n = 18$), with the exception of one patient. The single PCR-negative patient was suspected of having infectious endophthalmitis but had no bacteria in his ocular sample; *K. pneumoniae* was detected by biopsy culture of liver infection. However, as described in this study, our bacterial 16S-specific broad-range real-time PCR can detect candidate bacterial DNA including *K. pneumoniae* (Table 2). *K. pneumoniae* is a common cause of endogenous infectious endophthalmitis, a disease that frequently results in poor vision. *K. pneumoniae* endophthalmitis is strongly associated with the presence of liver abscesses and an underlying diabetic condition. We collected aqueous humor samples from the patient after informed consent had been obtained. Had a vitreous sample also been obtained, we might have been able to detect the bacterial DNA, because *K. pneumoniae*-associated endophthalmitis often results from hematogenous dissemination. To make an accurate diagnosis, sample preparation of clinical specimens is very important. A vitreous or retinal biopsy sample should be collected in such cases because inflammation often occurs in the subretinal area around the choroid because of endogenous infections.

In conclusion, we were able to use a broad-range real-time PCR method to measure the amplification of target ribosomal RNA genes, for example the bacterial 16S rRNA gene, indicating the suitability of this assay for screening for increased levels of bacterial genes in samples. Importantly, these PCR assays may be used for detection of candidate bacterial species that cause infectious endophthalmitis. The detection limit of our real-time PCR assay is one 16S rRNA gene copy per PCR. Thus, this PCR assay enables rapid screening for bacterial infection in a variety of clinical specimens from the eye.

Acknowledgments The authors thank Ikuyo Yamamoto, Shizu Inoue, and Chizuru Kato for providing technical assistance and the doctors of the Uveitis Group at Tokyo Medical and Dental University Hospital for sample collection. This work was supported by the Comprehensive Research on Disability, Health and Welfare, Health and Labor Sciences Research Grants, Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan.

References

1. Brun-Buisson C, Fartoukh M, Lechapt E, Honoré S, Zahar JR, Cerf C, et al. Contribution of blinded, protected quantitative specimens to the diagnostic and therapeutic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest*. 2005;128:533–44.
2. Therese KL, Anand AR, Madhavan HN. Polymerase chain reaction in the diagnosis of bacterial endophthalmitis. *Br J Ophthalmol*. 1998;82:1078–82.
3. Chiquet C, Cornut PL, Benito Y, Thuret G, Maurin M, Lafontaine PO, et al. Eubacterial PCR for bacterial detection and identification in 100 acute postcataract surgery endophthalmitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2008;49:1971–8.
4. Sugita S, Shimizu N, Watanabe K, Katayama M, Horie S, Ogawa M, et al. Diagnosis of bacterial endophthalmitis by broad-range quantitative PCR. *Br J Ophthalmol*. 2011;95:345–9.
5. Takai K, Horikoshi K. Rapid detection and quantification of members of the archaeal community by quantitative PCR using fluorogenic probes. *Appl Environ Microbiol*. 2000;66:5066–72.
6. Zucol F, Ammann RA, Berger C, Aebi C, Altwegg M, Niggli FK, et al. Real-time quantitative broad-range PCR assay for detection of the 16S rRNA gene followed by sequencing for species identification. *J Clin Microbiol*. 2006;44:2750–9.
7. Usui N, Uno T, Oki K, Oshika T, Ohashi Y, Ogura Y, et al. Nationwide surveillance of postoperative endophthalmitis related to cataract surgery. *Jpn J Ophthalmic Surg*. 2006;19:73–9.
8. Aaberg TM Jr, Flynn HW Jr, Schiffman J, Newton J. Nosocomial acute-onset postoperative endophthalmitis survey. A 10-year review of incidence and outcomes. *Ophthalmology*. 1998;105:1004–10.
9. Vafidis G. Propionibacterium acnes endophthalmitis. *Br J Ophthalmol*. 1991;75:706.
10. Boldt HC, Pulido JS, Blodi CF, Folk JC. Rural endophthalmitis. *Ophthalmology*. 1989;96:1722–6.
11. Jackson TL, Eykyn SJ, Graham EM, Stanford MR. Endogenous bacterial endophthalmitis: a 17-year prospective series and review of 267 reported cases. *Surv Ophthalmol*. 2003;48:403–23.
12. Chen YJ, Kuo HK, Wu PC, Kuo ML, Tsai HH, Liu CC, et al. A 10-year comparison of endogenous endophthalmitis outcomes: an east Asian experience with *Klebsiella pneumoniae* infection. *Retina*. 2004;24:383–90.

13. Callegan MC, Engelbert M, Parke DW 2nd, Jett BD, Gilmore MS. Bacterial endophthalmitis: epidemiology, therapeutics, and bacterium–host interactions. *Clin Microbiol Rev.* 2002;15: 111–24.
14. Callegan MC, Gilmore MS, Gregory M, Ramadan RT, Wiskur BJ, Moyer AL, et al. Bacterial endophthalmitis: therapeutic challenges and host–pathogen interactions. *Prog Retin Eye Res.* 2007;26:189–203.
15. Tomaso H, Kattar M, Eickhoff M, Wernery U, Al Dahouk S, Straube E, et al. Comparison of commercial DNA preparation kits for the detection of *Brucellae* in tissue using quantitative real-time PCR. *BMC Infect Dis.* 2010;10:100.
16. Tsai YL, Olson BH. Rapid method for direct extraction of DNA from soil and sediments. *Appl Environ Microbiol.* 1991;57: 1070–4.
17. Lee YK, Kim HW, Liu CL, Lee HK. A simple method for DNA extraction from marine bacteria that produce extracellular materials. *J Microbiol Methods.* 2003;52:245–50.
18. Callewaert L, Aertsen A, Deckers D, Vanoirbeek KG, Vanderkelen L, Van Herreweghe JM, et al. A new family of lysozyme inhibitors contributing to lysozyme tolerance in gram-negative bacteria. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000019. doi:10.1371/journal.ppat.1000019.
19. Davis KM, Akinbi HT, Standish AJ, Weiser JN. Resistance to mucosal lysozyme compensates for the fitness deficit of peptidoglycan modifications by *Streptococcus pneumoniae*. *PLoS Pathog.* 2008;4:e1000241. doi:10.1371/journal.ppat.1000241.
20. Vollmer T, Störmer M, Kleesiek K, Dreier J. Evaluation of novel broad-range real-time PCR assay for rapid detection of human pathogenic fungi in various clinical specimens. *J Clin Microbiol.* 2008;46:1919–26.