

人工関節周囲穿刺液の PCR 検査で原因菌が *Pseudomonas aeruginosa* と診断され、治療に成功した人工股関節感染の 1 症例

¹⁾ 聖路加国際病院内科感染症科, ²⁾ 東京医科大学微生物学分野, ³⁾ 聖路加国際病院臨床検査科

古川恵太郎¹⁾²⁾ 松尾 貴公¹⁾ 森 信好¹⁾
見上裕美子³⁾ 大楠 清文²⁾ 古川 恵一¹⁾

(令和元年 7 月 1 日受付)

(令和 2 年 3 月 11 日受理)

Key words: *Pseudomonas aeruginosa*, prosthetic joint infection, PCR

序 文

人工関節感染は人工関節のインプラント表面に細菌が少しずつ増殖することで成立し、臨床症状、身体所見、血液検査、関節液検査、細菌培養検査、画像検査などを総合して診断する。特に原因菌を同定することが適切な抗菌薬治療を行うために重要である。しかし症状や身体所見が軽微な感染初期には診断が難しく、また診断に至る前にすでに抗菌薬投与が行われている場合には、関節液培養を行っても原因菌が同定されないことがある。

今回われわれは、左大腿骨頭人工関節置換手術後 11 日目に発熱と左股関節部の軽度疼痛で発症し、人工股関節感染と診断され、穿刺液培養検査は陰性であったが、穿刺液遺伝子検査 (PCR) によって原因菌が *Pseudomonas aeruginosa* と診断され、本菌をターゲットにした長期の抗菌薬治療により治癒できた 1 症例を経験したので報告する。

症 例

患者：58 歳，女性。

主訴：発熱，左股関節痛。

既往歴：49 歳：急性腎盂腎炎，50 歳：糖尿病（入院時 HbA1c 6.9%），53 歳：高血圧症（食事療法）。

生活歴：喫煙歴なし，飲酒歴なし，専業主婦。

内服薬：メトホルミン，シタグリプチンリン。

現病歴：入院の約 6 カ月前から歩行時に左股関節部痛が出現し，左股関節変形性関節症と診断された。左股関節部痛が増悪してきたために，手術目的で当院整形外科に入院し，左人工股関節置換手術が施行された（術前に cefazolin 投与）。第 11 病日に悪寒を伴う 38°C

台の発熱があり，軽度の排尿時違和感と軽度の左股関節部痛を随伴していた。当初急性腎盂腎炎が疑われ，piperacillin/tazobactam 4.5g 8 時間毎投与が開始された。数日後に解熱し，症状は軽快した。第 11 病日の尿培養の結果 *Escherichia coli* 10⁵/mL (cefazolin, cefmetazole, piperacillin, levofloxacin に薬剤感受性良好) が陽性であり，第 15 病日に抗菌薬は cefmetazole 1g 8 時間毎投与に変更された。しかし第 20 病日に再度 38°C 台の発熱があったために当院感染症科にコンサルトされた。

身体所見：意識清明，血圧 120/72mmHg，脈拍 100/分（整），体温 38.4°C，呼吸数 18/分，SpO₂ 98%（室内気）。

頭頸部：異常なし，呼吸音：清，心音：異常なし，腹部：平坦，軟，圧痛なし，肋骨脊柱角部：圧痛なし，腸管雑音：正常，四肢：浮腫なし，左股関節手術創部に明らかな発赤・腫脹・熱感はないが（Fig. 1），深い触診で軽度圧痛を認めた。血液検査および尿一般検査結果（Table 1）：白血球数，CRP，赤血球沈降速度の増加あり。臓器障害なし。尿一般検査は有意な所見なし。尿培養：陰性。股関節部単純 X 線：明らかな異常なし。単純 CT：左人工股関節周囲に脂肪織濃度の軽度上昇あり。頭頸部，胸部，腹腔内，腎尿路，骨盤内に異常所見なし。

経過：発熱の原因として腎盂腎炎の可能性は低く，左人工股関節感染を疑った。原因菌不明であり，抗菌薬は cefmetazole を中止し，cefepime 1g 8 時間毎および vancomycin 1g 12 時間毎の併用投与に変更した。第 23 病日に発熱が持続していたため薬剤熱も考慮し，cefepime を ciprofloxacin 400mg 12 時間毎投与および vancomycin を daptomycin 500mg 24 時間

別刷請求先：(〒104-8560) 東京都中央区明石町 9-1

聖路加国際病院内科感染症科 古川恵太郎

Fig. 1 Appearance of the surgical site
No redness and swelling is seen around the surgical sites. But, when the surgical sites were palpated digitally, there was an incompatibility.



Table 1 Laboratory Findings on the day 20

<u>Blood count</u>		<u>BUN</u>	8.3 mg/dL
WBC	11,700 / μ L	Cr	0.48 mg/dL
RBC	313×10^4 / μ L	Na	137 mEq/L
Hb	9.0 g/dL	K	4.0 mEq/L
Ht	27.5 %	CRP	15.46 mg/dL
Plt	54.9×10^4 / μ L	ESR	>100 mm/h
		HbA1c	6.9 %
<u>Biochemistry</u>		<u>Coagulation</u>	
AST	15 U/L	D-dimer	6.6 μ g/mL
ALT	20 U/L		
LDH	153 U/L	<u>Urine</u>	
ALP	327 U/L	Protein	-
γ -GTP	76 U/L	Glucose	-
T-bil	0.4 mg/dL	Occult blood	-
BUN	8.3 mg/dL		
Cr	0.48 mg/dL		
Na	137 mEq/L		
K	4.0 mEq/L		

毎の併用投与に変更した。第 25 病日になっても発熱が持続していたため、創部深部の精査のために造影 MRI 検査を行った。その結果、左人工股関節周囲に液体貯留を認め、周囲軟部組織の炎症所見も認めた。人工股関節感染と診断し、人工股関節周囲膿瘍も疑われた (Fig. 2)。第 28 病日、左股関節周囲の液体貯留部にエコーガイド下で穿刺して、できる限り排液した。穿刺液 (Fig. 3) は混濁した赤褐色であり、グラム染色で多数の多核白血球を認めたが細菌は認めなかった。培養検査が陰性であったため、第 32 病日に穿刺液の残余検体を用い、人工関節感染の原因として頻度が高い細菌についてそれぞれ菌種特異的な Conventional PCR 検査を施行した¹⁾²⁾。その結果、*P. aeruginosa* のみが陽性となり、*Staphylococcus aureus*, Group A *Streptococcus*, Group B *Streptococcus*, Group G *Streptococcus* はすべて陰性であった。また *Staphylococcus* sp.

令和 2 年 5 月 20 日

Fig. 2 MRI findings (STIR: short TI inversion recovery)

There is fluid collection around the left hip joint.

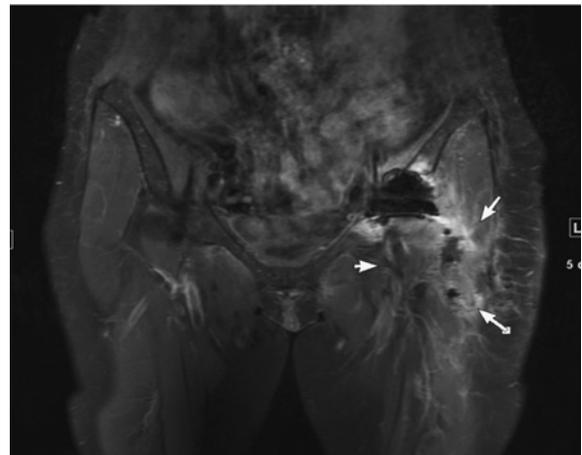
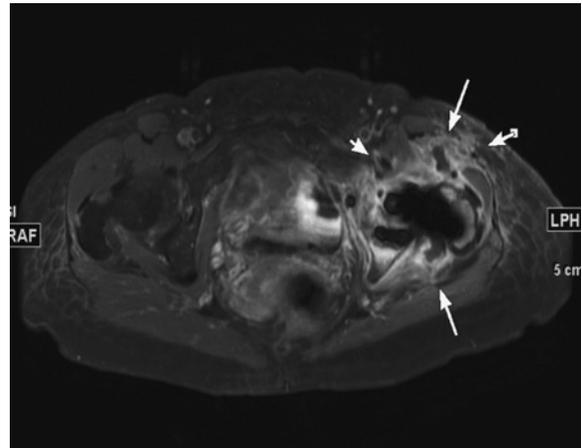


Fig. 3 Fluid sample taken from the surgical site

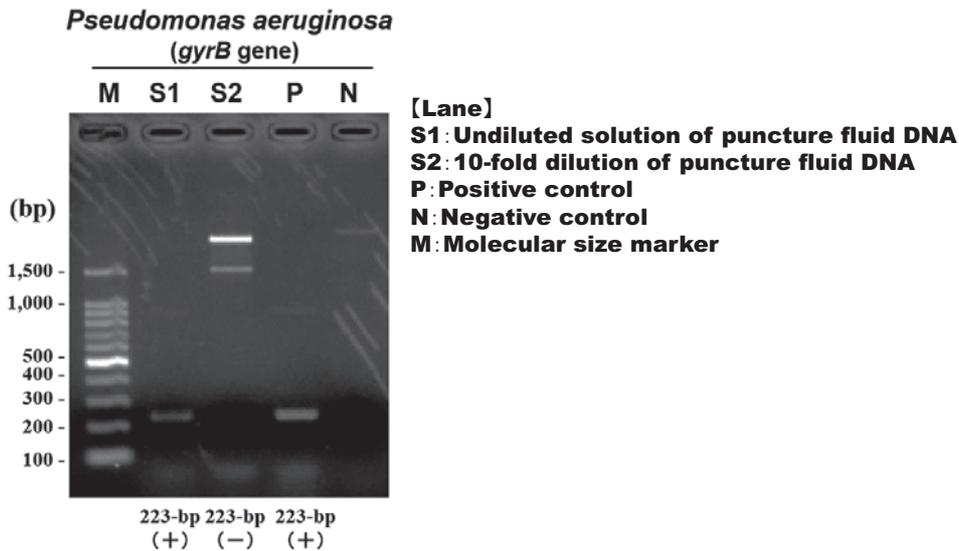
Gram stain showed there is no bacteria except White Blood Cells.



が有するメチシリン耐性遺伝子である *mec A* も陰性であった (Fig. 4)。以上の結果から、*P. aeruginosa* による人工股関節および周囲感染と診断した。

Fig. 4 Polymerase chain reaction (PCR) of the punctured fluid for *Pseudomonas aeruginosa* (*gyrB* gene, 223 bp). Other PCRs which detect *S. aureus*, *mecA*, group A, B and G streptococci specifically were negative.

1. Extraction of DNA from joint fluid was performed using a Mora Extract Kit (Kyoto Pharmaceutical Company). Bead crushing and phenol chloroform ethanol precipitation were performed to purify the extracted DNA.
2. As a positive control, the extracted DNA from a confirmed strain of *P. aeruginosa* was used.
3. The amplification product of PCR corresponds to DNA extracted from *P. aeruginosa* by sequence analysis.
4. The long band noted in S2 (10-fold dilution of puncture fluid DNA) is a nonspecific band to human DNA.



薬剤感受性は不明であったが、第33病日から *P. aeruginosa* 感染に対して十分に治療するために、また相乗的殺菌効果を期待して抗菌薬を cefepime 2g 8時間毎および tobramycin 180mg 24時間毎 (4mg/kg/日) の併用投与に変更した。この抗菌薬治療開始後、数日で解熱して症状は軽快した。穿刺排液と抗菌薬治療のみで経過良好であったことから、整形外科主治医の判断により、外科的治療は行わなかった。上記抗菌薬2剤を計28日間投与した。その後は組織透過性の良い ciprofloxacin 800mg/日 分2内服に変更して、第62病日に軽快退院した。以後外来で ciprofloxacin を継続し、順調に経過して計280日間の内服治療を行った。診断後2年半経過したが、人工関節感染の再燃はなく、治癒した状態である (Fig. 5)。

考 察

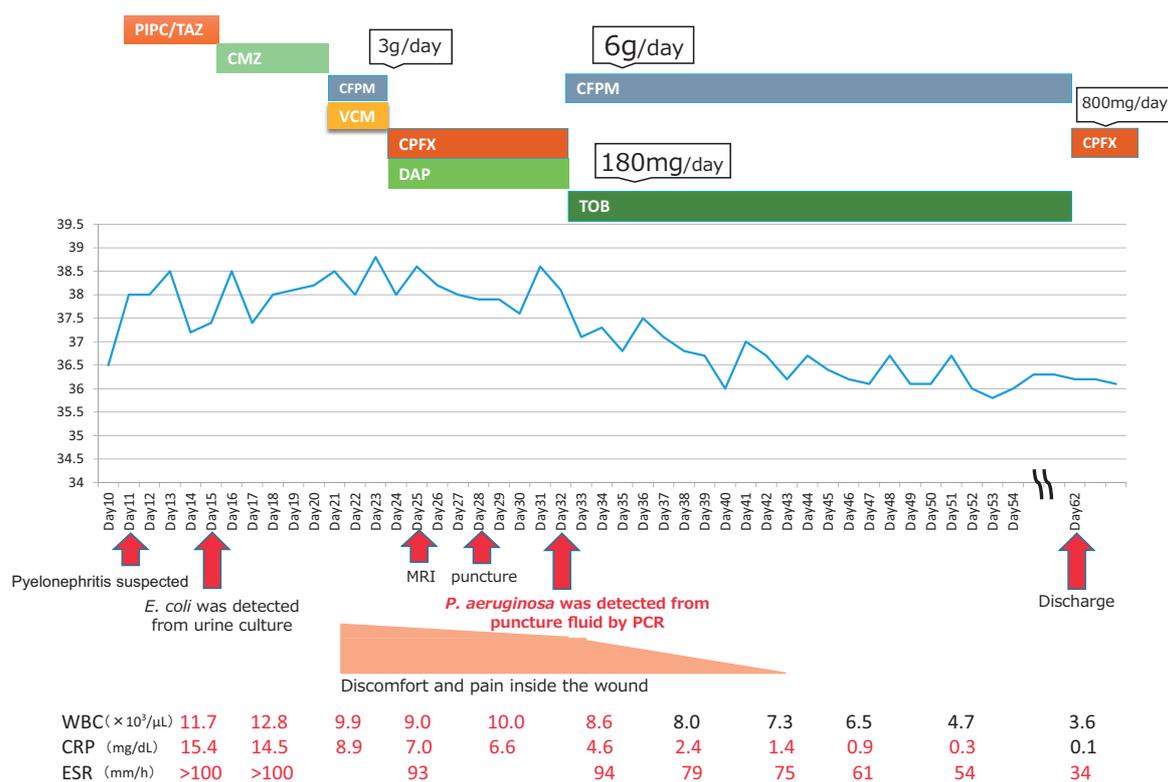
(1) 人工関節感染と原因菌診断のための遺伝子検査の意義

今日、人工関節手術の件数は増加している³⁾。人工関節感染は人工関節置換手術後の1~12%の患者に合併するとされ、術後合併症の中で最も重要なものである⁴⁾。人工関節感染の場合は、人工充填物表面でバイ

オフィウムに包まれて増殖する細菌を抗菌薬で殺菌することが必要である。合併する骨髓炎の治療も必要である。多くの抗菌薬はバイオフィウム透過性が不良であるために、治療効果が得られにくい⁵⁾。したがって、デブリドマン、ドレナージ、人工関節再置換手術または切除・関節形成術などの外科的治療が必要となる例もしばしばある⁶⁾。また合併した骨髓炎の治療も含めて比較的長期間の適切な抗菌薬治療を必要とする⁷⁾。

人工関節感染の診断と適切な抗菌薬治療を行うためには、原因菌の同定が非常に重要である。関節液や関節周囲貯留液のほか、術中に採取した感染部位の組織検体の培養検査が実施される。人工関節感染において、関節液や組織の細菌培養検査は、診断前に抗菌薬が投与されていた場合、細菌が異物周囲でバイオフィウムに覆われている場合、および培養されるまで日数を要する細菌の場合は、原因菌が検出されず偽陰性となる場合がある。Quらのメタアナリシスによれば、人工関節感染の関節液培養検査で原因菌を検出する感度は約72%、特異度約95%と報告されている³⁾⁴⁾。また関節液培養検査の感度は急性期感染(手術後3カ月以内)では91%、慢性期感染(手術後3カ月以後)では79%

Fig. 5 Clinical course



であり、特に慢性期感染では培養検査の感度が低下する³⁾。本症例は急性期感染で、関節周囲貯留液は血性で膿性であったが、抗菌薬投与下であったために塗抹陰性かつ培養検査陰性になったと考えられる。

近年原因菌不明の各種感染症に対して、各種の遺伝子検査による原因菌検索が行われるようになった。こうした遺伝子検査が優れている点としては、①半日程度の検査で結果が判明し早期診断に有用であること、②抗菌薬の先行投与後でも原因微生物の診断が可能であること、③培養困難・不能な菌や遅発育性の菌の検出が可能であること、④各種薬剤耐性遺伝子の検出が可能であること、⑤病原因子や毒素の検出が可能であることなどが挙げられる^{8)~11)}。人工関節感染においても原因微生物診断のために関節液または感染組織の各種遺伝子検査が用いられ、その有用性を評価する報告が増加している^{12)~14)}。

PCR 検査法にもいくつかの種類があり、1 組のプライマーを用いて想定される病原体を標的にする Conventional PCR 法、1 組のプライマーを用いてあらゆる病原体が検出可能な Broad-range PCR 法、2 組以上のプライマーを用いて、1 回の反応で複数の病原体が検出可能な Multiplex PCR 法などが代表的である⁹⁾。本症例では、人工関節感染の原因微生物の診断のために関節周囲貯留液の PCR 検査を行った。Conventional PCR 法を用いた理由は、原因の可能性があ

る微生物を個別に狙い撃ちして PCR 反応のサイクル数を増やすことができる（筆者らは 45~48 サイクルの増幅としている）ため、抗菌薬投与下で検体を採取した本症例においては Broad-range PCR 法や Multiplex PCR 法よりも高い検出感度が得られると考えたからである。本症例では原因微生物として頻度の比較的高いもの、すなわち *S. aureus*, Group A *Streptococcus*, Group B *Streptococcus*, Group G *Streptococcus*, *P. aeruginosa*, そしてメチシリン耐性ブドウ球菌が多い Coagulase-negative staphylococci の推定のための *mec A* 遺伝子について菌種特異的な Conventional PCR 検査を行った²⁾。その結果 *P. aeruginosa* の PCR のみが陽性となり、他の PCR はすべて陰性であった。ゆえに本症例は先行抗菌薬投与下でも *P. aeruginosa* による人工関節感染と診断することができた。

本症例のような人工関節感染において、培養検査が陰性であった場合などには、原因微生物診断のために穿刺液や感染組織の各種 PCR 検査などの遺伝子検査を実施することは重要な意義があると考えられる。ただし、注意すべきこととしては、遺伝子検査で微生物が検出されたとしてもその微生物が必ずしも原因微生物とは限らないことである。コンタミネーションによる菌が検出される場合もありうる。また複数菌感染ではすべての菌を検出できない場合もある。したがって患者背景や病態などと照らし合わせたうえで総合的に判断す

る必要がある¹⁵⁾¹⁶⁾。また遺伝子検査の問題点としては、コストや保険適応などから実施可能な施設に限られること、菌名は同定できても、抗菌薬感受性は不明なことなどが挙げられる¹¹⁾。例えば米国感染症学会の人工関節感染のガイドラインでは、人工関節感染の診断には培養検査が必要であり、遺伝子検査などによる迅速診断検査はルーチン検査としては推奨されていない⁸⁾¹⁷⁾。

以上から、原因菌診断のための遺伝子検査は単独での使用ではなく、必ず細菌培養検査との併用が必要と考えられる。

(2) *P. aeruginosa* による人工関節感染の治療と予後

P. aeruginosa による人工関節感染の頻度は、全体の8.8%と報告されている³⁾⁵⁾。特に人工関節手術後3カ月以内に生じた感染症の原因菌の中では *P. aeruginosa* は比較的多く、15%という報告がある¹⁸⁾。*P. aeruginosa* による人工関節感染患者の基礎疾患については、糖尿病22%、関節リウマチ22%、消化器系または泌尿器系の手術歴のある患者が22%、副腎皮質ステロイド剤または免疫抑制剤内服者が16%であった³⁾¹⁹⁾。本症例は術後3カ月以内に発症しており、糖尿病もあることから、原因菌が *P. aeruginosa* であるリスクが高い状態であったと言える。

P. aeruginosa による人工関節感染の予後は選択された治療法により異なるが、一般には人工関節の抜去が望ましいと考えられている。2段階人工関節再置換手術治療を受けた例で治療開始後2年間に感染の再燃がない例は83%、切除・関節形成術を受けた例では80%、デブリドマンのみで人工関節を温存する治療を受けた例では26%であった¹⁹⁾。人工関節の温存が難しいことを示すデータである。一方で、手術後3カ月以内に発症した早期の *P. aeruginosa* 人工関節感染にデブリドマン手術を行って人工関節を温存し、手術後 ciprofloxacin 1,500mg/日 分2内服を3カ月間投与した報告では、治療開始後平均36カ月間で75%は再燃なく治療に成功した²⁰⁾。この結果は、人工関節を温存して長期抗菌薬投与を行う方法による治療成功の可能性を示すものでもある。本症例は手術を行わずに、関節周囲貯留液を穿刺排液したのちに、*P. aeruginosa* 感染に対して cefepime 2g 8時間毎および tobramycin 180mg (4mg/kg/日) 24時間毎の併用投与を計4週間継続して急性期に十分な治療を行った。*P. aeruginosa* による人工関節感染の適切な治療期間については現時点ではまだガイドラインは定まっていないが、点滴加療終了後は骨組織などへの移行性に優れた ciprofloxacin 800mg/日 分2内服に変更し退院、ciprofloxacin 内服は計280日間継続した。自覚症状が軽快して安定した状態が続いていること、また人工関節周囲の貯留

液の消失を画像で確認し、白血球数、CRP、赤沈が基準範囲内で維持されていることを確認して抗菌薬治療を終了した。その後2年半の経過観察で感染の再燃は起こっていない。

結 語

本症例は関節周囲穿刺液の遺伝子検査により診断できた *P. aeruginosa* による人工関節感染であり、穿刺液や感染組織の培養陰性の場合、遺伝子検査は原因菌診断のために有用であると示唆された。穿刺排液後は *P. aeruginosa* をターゲットにして、急性期に *P. aeruginosa* に対する治療効果をより高めるための静注抗菌薬治療を実施、その後は長期間の内服抗菌薬治療を行うことで人工関節を抜去せずに治癒することができた。

謝辞：論文の修正に際してご協力いただいた聖路加国際病院臨床検査科上原由紀先生に深謝いたします。

利益相反自己申告：申告すべきものなし

文 献

- 1) 大楠清文：いま知りたい臨床微生物検査実践ガイド、珍しい細菌の同定・遺伝子検査・質量分析。医歯薬出版、東京、2013；p. 149-51。
- 2) Werner Z, Parham S : Orthopedic Implant-associated Infections. In : Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. ELSEVIER AG, Netherlands, 2019 ; p. 1430-42.
- 3) Benito N, Esteban J, Horcajada JP, Ribera A, Soriano A, Sousa R : Epidemiology of Prosthetic Joint Infection. In : Trisha P, ed. Prosthetic Joint Infections. Springer International Publishing AG, Switzerland, 2018 ; p. 5-53.
- 4) Qu X, Zhai Z, Wu C, Jin F, Li H, Wang L, et al. : Preoperative aspiration culture for preoperative diagnosis of infection in total hip or knee arthroplasty. J Clin Microbiol. 2013 ; 51 : 3830-4.
- 5) Gbejuade HO, Lovering AM, Webb JC : The role of microbial biofilms in prosthetic joint infections. Acta Orthop. 2015 ; 86 : 147-58.
- 6) Lora-Tamayo J, Murillo O : Management of Periprosthetic Joint Infection. In : Trisha P, ed. Prosthetic Joint Infections. Springer International Publishing AG, Switzerland, 2018 ; p. 137-92.
- 7) Osmon DR, Berbari EF, Berendt AR, Lew D, Zimmerli W, Steckelberg JM : Diagnosis and Management of Prosthetic Joint Infection : Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America. Clin Infect Dis. 2013 ; 56 : e1-e25.
- 8) 大楠清文, 江崎孝行 : 遺伝子およびシグナル増幅法。臨と微生物 2007 ; 34 : 459-78.
- 9) 大楠清文：いま知りたい臨床微生物検査実践ガイド、珍しい細菌の同定・遺伝子検査・質量分析。医歯薬出版、東京、2013；p. 100-17。

- 10) 大楠清文：感染症診療における遺伝子検査の進歩. 外来小児科 2015 ; 18 : 151-9.
- 11) 柳原克紀, 賀来敬仁, 鈴木広道, 仁井見英樹, 三鴨廣繁, 松本哲哉, 他：感染症遺伝子検査についてのアンケート調査結果. 感染症誌 2018 ; 92 : 331-8.
- 12) Liu K, Fu J, Yu B, Sun W, Chen J, Hao L : Meta-analysis of sonication prosthetic fluid PCR for diagnosing periprosthetic joint infection. PLoS One. 2018 Apr 27 ; 13 (4), <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0196418>.
- 13) Marin M, Garcia-Lechuz JM, Alonso P, Vilanueva M, Alcalá L, Gimeno M, *et al.* : Role of universal 16S rRNA gene PCR and sequencing in diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2012 ; 50 : 583-9.
- 14) Qu X, Zhai Z, Li H, Li H, Liu X, Zhu Z, *et al.* : PCR-based diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2013 ; 51 : 2742-6.
- 15) Tunney MM, Patrick S, Curran MD, Ramage G, Hanna D, Nixon JR, *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. 1999 ; 37 : 3281-90.
- 16) Huang Z, Wu Q, Fang X, Li W, Zhang C, Zeng H, *et al.* : Comparison of culture and broad-range polymerase chain reaction methods for diagnosing periprosthetic joint infection: analysis of joint fluid, periprosthetic tissue, and sonicated fluid. Int Orthop. 2018 ; 42 : 2035-40.
- 17) Cazanave C, Greenwood-Quaintance KE, Hanssen AD, Karau MJ, Schmidt SM, Gomez Urena EO, *et al.* : Rapid molecular microbiologic diagnosis of prosthetic joint infection. J Clin Microbiol. 2013 ; 51 : 2280-7.
- 18) Hsieh PH, Lee MS, Hsu KY, Chang YH, Shih HN, Ueng SW : Gram-negative prosthetic joint infections: risk factors and outcome of treatment. Clin Infect Dis. 2009 ; 49 : 1036-43.
- 19) Shah NB, Osmon DR, Steckelberg JM, Sierra RJ, Walker RC, Tande AJ, *et al.* : *Pseudomonas* Prosthetic Joint Infections: A Review of 102 Episodes. J Bone Jt Infect. 2016 ; 1 : 25-30.
- 20) Veltman ES, Vos FJ, Meis JF, Goosen JH : Debridement, antibiotics and implant retention in early postoperative infection with *Pseudomonas aeruginosa*. J Infect. 2015 ; 70 : 307-9.

A Successfully Treated Patient with Prosthetic Joint Infection Caused by *Pseudomonas aeruginosa* Diagnosed from PCR of Periprosthetic Joint Fluid

Keitaro FURUKAWA^{1,2)}, Takahiro MATSUO¹⁾, Nobuyoshi MORI¹⁾, Yumiko MIKAMI³⁾, Kiyofumi OOKUSU²⁾ & Keiichi FURUKAWA¹⁾

¹⁾Department of Infectious Diseases, St. Luke's International Hospital, ²⁾Department of Microbiology, Tokyo Medical University Hospital, ³⁾Department of Laboratory Medicine, St. Luke's International Hospital

Most of prosthetic joint infection (PJI) cases require surgical treatment and appropriate antimicrobial therapy over a long period, so identification of the causative microorganisms is very important to give appropriate antimicrobial therapy for affected patients. However, the utility of joint fluid cultures has been questioned based on relatively high false negative rates because of previous antimicrobial therapy and biofilm formation in PJI. In PJI patients with negative results of joint fluid cultures, PCR testing of the infected joint fluid or tissue is reported to be useful to identify the causative microorganisms.

We report herein on a case of PJI caused by *Pseudomonas aeruginosa* which was detected with PCR of periprosthetic joint fluid. The patient was treated successfully with intravenous, combined antimicrobial therapy followed by long-term oral antimicrobial therapy, which targeted *P. aeruginosa*, without surgery. In cases with high clinical suspicion of PJI but negative cultures, PCR tests might be helpful to identify the causative microorganisms.

[J.J.A. Inf. D. 94 : 338~343, 2020]