

PCR 法と振盪培養法 (RSC 法) による献腎ドナー感染および 臓器汚染の迅速診断を行い腎摘出ならびに移植を 断念した 3 ドナーと 6 献腎の検討

内藤 和彦, 樋口 徹, 佐々木ひと美, 桑原 勝孝
日下 守, 石川 清仁, 白木 良一, 星長 清隆
藤田保健衛生大学泌尿器科

RAPID DIAGNOSIS OF DONOR INFECTION AND RENAL ALLOGRAFT CONTAMINATION USING A POLYMERASE CHAIN REACTION TECHNIQUE AND RAPID SHAKING CULTURE

Kazuhiko NAITOH, Toru HIGUCHI, Hitomi SASAKI, Yoshitaka KUWAHARA,
Mamoru KUSAKA, Kiyohito ISHIKAWA, Ryoichi SHIROKI and Kiyotaka HOSHINAGA
The Department of Urology, Fujita Health University School of Medicine

Post transplant infection is one of the serious complications of the organ recipients.

We detected the donor infections and allograft contaminations in a limited period of time by polymerase chain reaction (PCR) and rapid shaking culture (RSC). The pre-procurement blood from 86 possible renal donors as well as the preservation solution (PS) and renal pelvic urine (PU) from 158 grafts were examined in order to detect highly virulent organisms such as methicillin resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA), *Pseudomonas aeruginosa*, and fungi. The average age of donors was 48.8 years old. The average period between the admission and brain death was 4.9 days, and the average period between the brain death and cardiac arrest was 3.6 days. The inflammatory indices such as body temperature, white blood cell count and C-reactive protein increased to $37.9 \pm 1.1^\circ\text{C}$, $12,600 \pm 6,300/\mu\text{l}$, and $20.2 \pm 11.6 \text{ mg/dl}$, respectively. Following PCR and RSC, procurement operations of the three possible donors were cancelled because of systemic bacterial infections by MRSA or *Bacteroides fragilis*. Six out of 158 grafts were discarded due to the diagnoses of MRSA or *Candida albicans* in PS and/or PU. All the other 148 grafts were transplanted.

Following transplant, no single infectious complication transmitted by the graft was noted. We conclude that PCR combined with RSC is very accurate and useful for detecting donor infections and allograft contaminations, which may cause severe complications in the recipients.

(Hinyokika Kijo 51 : 715-718, 2005)

Key words : Cadaver transplantation, Donor infection, Renal allograft contamination, PCR

緒 言

腎移植においては、免疫抑制療法、移植技術の進歩により早期に腎生着率は飛躍的に向上したが、移植後に発症する種々の感染症は慢性拒絶反応とともに現在でも未解決の重要な問題点である。特に献腎移植ではドナーからの持ち込み感染がレシピエントの生命予後を左右する大きな問題となりうる。本邦では1997年に臓器移植法が制定され脳死移植が可能となったが、現在でも献腎移植はいまだに心停止ドナーからの腎に依存しているのが現状である¹⁾ また、脳死ドナーと異なり心停止ドナーの場合には、入院期間が長期に及ぶ傾向があり、中心静脈カテーテル、気管チューブ、尿道カテーテルなど各種留置カテーテルを介して細菌や真菌による重症感染症を誘発する可能性がより増加す

るため、献腎ドナー対象者の感染あるいは摘出後の臓器汚染を移植直前に診断することが必要となってくる。

われわれは、1993年よりドナーからレシピエントへの持ち込み感染の予防のため、迅速診断が可能な polymerase chain reaction (PCR) 法ならびに振盪培養 (RSC) 法を用いて移植前にドナーの感染症や臓器汚染を診断してきた。本報告ではこれらを用いることにより MRSA またはカンジダによる感染あるいは汚染の診断が付き最終的に結果的に腎提供を断念した 3 ドナーならびに摘出後に破棄された 6 腎につき報告する。

対 象 と 方 法

1993年7月から2003年12月までに当院にて献腎提供

Table 1. Clinical characteristic of available donors

年 齢	: 1-70歳 (平均48.8)
性 別	: 男/女 56/30
原疾患	: 脳血管障害 59例 頭部外傷 13例 窒 息 10例 その他 4 例
入院より脳死判定までの期間	: 0-44日 (平均4.9)
脳死から心臓死までの期間	: 0-14日 (平均3.6)
体 温	: 34.6-40.4°C (平均37.9)
白血球数	: 3,100-33,700/ μ l (平均12,600)
CRP	: 0.1-53 mg/dl (平均20.2)

の承諾を得た86症例と、当院にて摘出した158腎を対象とした。

ドナーおよびドナー候補の背景を Table 1 に示す年齢の平均は 48.8歳で、男56例、女30例であった。死亡の直接原因は、くも膜下出血や脳出血などの脳血管障害59例、頭部外傷13例、縊頸や喘息重積などによる脳虚血10例、脳腫瘍3例、髄膜炎1例であった。入院より脳死判定までの期間は平均4.9日、脳死から心臓死に至る期間は平均3.6日、平均在院期間は8.5日であった。また、ドナーの炎症反応に関連する心停止直前の体温の平均は $37.9 \pm 1.1^\circ\text{C}$ 、末梢白血球数の平均値は $12,600 \pm 6,300/\mu\text{l}$ 、Cerum reactive protein (CRP) の平均値は $20.2 \pm 11.6 \text{ mg/dl}$ であった。

PCR 法と RSC 法は同時に並行して行い、メシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA)、緑膿菌、真菌属の難治性感染の有無を検索した。

PCR 法では、標的遺伝子を黄色ブドウ球菌が保有する *fem A*、メシチリン耐性菌が保有する *mec A*、緑膿菌が保有する *P. aeruginosa* *Gyr A*、真菌類が保有する 18s-rDNA とした (Table 2)²⁻⁵⁾ PCR の所用時間は4時間もしくは6時間で、検出感度は 10 cfu/ml であった。

Table 2. In PCR, appropriate primers were used to detect the following genes

<i>mecA</i> gene
(MRZ1)5'-GAAGATGGCTATCGTGTCAC-3'
(MRZ2)5'-CTGGAACCTTGTTGAGCAGAG-3'
<i>femA</i> gene
(MRF1)5'-CGAGGTCATTGCAGCTTGCTTAC-3'
(MRF2)5'-CTAGACCAGCATCTTCAGC-3'
<i>P. aeruginosa gyrA</i> gene
(PGA1)5'-TTATGCCATGAGCGAGCTGGGCAACGACT-3'
(PGA2)5'-AACCGTTGACCAGCAGGTTGGGAATCTT-3'
18S-rDNA
(FUN1)5'-ACTTTCGATGGTAGGATAG-3'
(FUN2)5'-TGATCGTCTTCGATCCCCTA-3'

RSC 法は Brain Heart Infusion broth 変法培地を用い、37°C で shaking culture を開始し、混濁の程度を MRSA では6時間後に、緑膿菌では12時間後に、真菌では24時間後に増菌の有無を判定した。また、これらとは別に定量培養を、マンニット食塩寒天培地に各検体 100 μ l を塗布して行い、PCR 法、RSC 法の補助とした。

結 果

当院でドナー候補となった86例のうち、2例は心停止直前の血液に、PCR 法で *mec A*、*fem A* 両遺伝子が検出され、RSC 法 (6時間) で細菌の増殖を認めたため、MRSA による敗血症と診断した。48時間後の定量培養の結果でも MRSA 感染が確認された。また、1例は PCR 法は陰性であったが非特異的バンドを認め、RSC 法 (6時間) にて細菌の増殖を認めたため腎摘出を断念した。定量培養の結果、起因菌が同定され *Bacteroides* による敗血症と診断された。

また、83ドナーから摘出された158腎の内、4腎は萎縮腎や腎の灌流不良など感染以外の理由により使用を断念したため、残りの154腎に対し検討を行った。

まず、1症例から得られた2腎の腎灌流液より PCR 法で *mec A*、*fem A* 両遺伝子が検出され、RSC 法で細菌増殖を認めたため、MRSA による腎汚染と診断した。48時間後の定量培養の結果でも MRSA 感染が確認された。

また、2症例から得られた4腎の腎盂尿ならびに腎灌流液より PCR 法にて 18s-rDNA 遺伝子が検出され、RSC 法で真菌の増殖を認めたため4腎の使用を断念した。定量培養の結果では、*Candida* を検出した。

一方、PCR 法、RSC 法にて感染が診断されなかった検体の定量培養では、すべてに菌の増殖は認められなかった。

6症例の背景 (Table 3) は、平均年齢 48歳、性別は男性4例、女性2例で、脳死に至った原疾患は、4例が脳血管障害、2例が脳虚血であった。入院より脳

Table 3. Clinical characteristic of non-available donors

年 齢	: 48-61歳 (平均48.0)
性 別 (男/女)	: 4/2
原疾患	: 脳血管障害 4 例 窒 息 2 例
入院より脳死判定までの期間	: 1-13日 (平均8.1)
脳死から心臓死までの期間	: 1-10日 (平均4.5)
体 温	: 36.0-39.2°C (平均37.8)
白血球数	: 7,300-19,900/ μ l (平均15,000)
CRP	: 14.3-36.4 mg/dl (平均21.8)

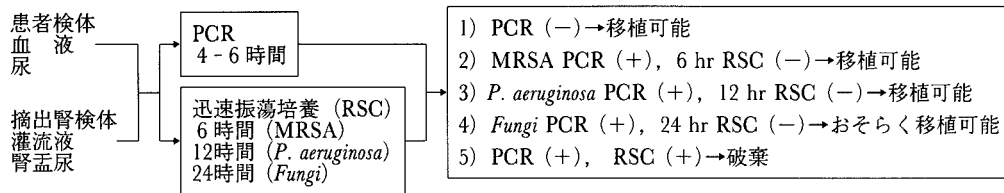


Fig. 1. The strategy for grafts harvested from marginal donors is listed

死判定までの期間は平均8.1日, 脳死から心臓死に至る期間は平均4.5日, 平均在院期間は12.6日であった。また, 心停止直前の体温の平均は $37.8 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$, 末梢白血球数の平均値は $15,000 \pm 4,300/\mu\text{l}$, CRP の平均値は $21.8 \pm 7.3 \text{ mg/dl}$ であった。

考 察

通常, ドナー候補のほとんどが救命救急センターおよび集中治療室で管理されている重症患者であり, この様な場合患者は宿主免疫の低下した compromised host となり, 細菌, 真菌, ウイルスなどに対するバリアー機能の破綻, 白血球やマクロファージの食細胞機能の障害, 補体レベルの低下などの障害がみられることが多い。さらに, 気管チューブ挿入による人工呼吸器の使用, 中心静脈カテーテル, 尿道カテーテルなど各種留置カテーテルの留置などの集中治療室での治療行為自体が新たな原因となり, 重症感染症や敗血症に陥る場合も少なくない。田中らの報告⁶⁾では救命救急センターおよび集中治療室に入院となった患者の約65%で2週間以内に何らかの医原性感染が認められ, 入院期間の遷延化によりメシチリン耐性黄色ブドウ球菌 (MRSA), 耐性緑膿菌, 真菌類, *Enterubactor* 属, *Serratia* 属による感染が増加するとしている。一方, 欧米と比べ脳死からの献腎移植が極端に少ないわが国の現状から marginal donor と呼ばれる心停止後の献腎移植に頼らざるを得ないのが現状である。脳死下の臓器提供に比し心停止後の臓器摘出では, ドナーの入院期間がかなり長期に及ぶ傾向があり, これらの感染症を誘発する可能性が増加するため, レシピエントへの持ち込み感染のリスクが増加すると考えられる。

Gottesdiener らの報告によると献腎ドナー腎の細菌汚染の可能性は2.1から23.4%といわれている⁶⁾がすべての菌種が重大な合併症をおこすとは限らない。ドナーからレシピエントへの持ち込み感染の中でも特に MRSA, 緑膿菌, カンジダを代表とする真菌属によるものは重症化することが多く, 場合によっては移植腎摘出が必要となったり, 移植患者の救命すら困難となることもある⁸⁻¹²⁾ したがって長期入院後のドナー候補の発熱や末梢白血球数の増加, CRP 値上昇などにより, 重症細菌感染の併発が疑われる場合には, 持ち込み感染の原因となりうる感染症があるか否かを正確

かつ迅速に判定し, ドナーとして適切か否かを判別する必要がある。われわれが行っている迅速感染診断法では, PCR 法によって, これらの菌の混入を4時間から6時間で診断し, より確実な診断のため RSC 法も並行して行っている。これらを定量培養も同時に行い確認しているが, 今回の検討では PCR 法, RSC 法とすべて一致した結果が得られた。

当院における心停止ドナーならびに摘出腎に対する対処方法は Fig. 1 に示すごとくで, ①各種検体の PCR 法の結果が陰性であった場合はそのまま腎移植を行う。② *mec A/fem A* の両遺伝子が検出された場合6時間の RSC 法で増菌がなければ腎移植を行う。③ *P. aeruginosa gyr A* 遺伝子が検出された場合, 12時間の RSC 法にて増菌がなければ腎移植を行う。④ 18S-DNA 遺伝子が検出された場合には, 24時間の RSC 法の結果を待って判断する。⑤ PCR 法, RSC 法とも陽性となり, MRSA, 緑膿菌, 真菌類などが検出されれば腎の使用を断念することになっている。

現在までにこの方法と方針により移植された腎からの感染は1例も認めていない。

現在, わが国の献腎移植の件数は1989年をピークに, 以後年々減少を続けており非常に厳しい状況におかれている¹³⁾ また, 欧米とくらべ脳死からの献腎移植が極端に少ないわが国では, marginal donor と呼ばれる心停止後の献腎移植に頼らざるを得ないのが現状である。従来はその貴重なドナー候補の中でも, 発熱や末梢白血球数の増加, CRP 値上昇などの全身感染を疑わせる臨床所見のみでドナーの対象から除外されたことも少なくない。本法の導入により MRSA や緑膿菌, 真菌などによる全身感染や腎汚染がなければほぼ安全に腎提供が可能であることが確認されており, わが国の献腎移植を増加させるための一方策として有用であると考えられる。

結 語

PCR 法ならびに RSC 法を使用したドナー感染の迅速診断法により, 限られた時間内に, 長期入院により発生するハイリスクドナーの中からより安全なドナーを選択することが可能となり, 移植後に重大な影響を与える持ち込み感染を予防できるということが判明した。また, 心停止前に重症感染症が疑われるドナーでも, 本法により感染が否定できれば臓器ドナーとなり

うと考えられ、臓器移植件数の増加につながるものと思われた。

文 献

- 1) 日本臨床腎移植学会, 日本移植学会 (2003) 腎移植臨床登録集計報告: 2002年腎移植件数報告. 移植 **38**: 137-142, 2003
- 2) Berger Bachi B, Barberis Maino L, Strassle A, et al.: Fem A, a host-mediated factor essential for methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*: molecular cloning and characterization. Mol Gen Genet **219**: 263-269, 1989
- 3) Song MD, Wachi M, Doi M, et al.: Evolution of an inducible penicillin-target protein in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by gene fusion. FEBS Lett **221**: 167-171, 1987
- 4) Kureishi A, Diver JM, Beckthold B, et al.: Cloning and nucleotide sequence of *Pseudomonas aeruginosa* DNA gyrase gyrA gene from strain PAO1 and quinolone-resistant clinical isolates. Antimicrob Agents Chemother **38**: 1944-1952, 1994
- 5) Makimura K, Murayama S, Yamaguchi H, et al.: Detection of a wide range of medically important fungi by the polymerase chain reaction. J Med Microbiol **40**: 358-364, 1994
- 6) 田中秀治, 吉沢美枝, 尾造由美子, ほか: 救急集中治療分野での感染症の起因菌とその対策. 救急集中治療 **13**: 363-379, 2001
- 7) Gottesdiener KM: Transplanted infections: donor-to-host transmission with the allograft. Ann Intern Med **110**: 1001-1016, 1989
- 8) Doig RL, Boyd PJR, Eykyn S, et al.: *Staphylococcus aureus* transmitted in transplanted kidneys. Lancet **2**: 243-245, 1975
- 9) Kakaiya R, Miller WV, Gudino MD et al.: Tissue transplant-transmitted infection. Transfusion **31**: 277-284, 1991
- 10) Spees EK, Light JA, Oakes DD, et al.: Experience with cadaver renal allograft contamination before transplantation. Br J Surg **69**: 482-485, 1982
- 11) Johnston L, Chui L, Chang N, et al.: Cross-Canada Spread of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* via transplant organs. Clin Infect Dis **29**: 819-823, 1999
- 12) Hoshinaga K, Higuchi T, Shiroki R, et al.: Rapid diagnosis of donor and renal allograft infection using a polymerase chain reaction technique. Transplant Proc **31**: 1258-1259, 1999
- 13) 寺岡 慧, 大島伸一, 平野哲夫, ほか: わが国における献腎移植の現状と今後の課題. 泌尿器外科 **15**: 539-547, 2002

(Received on March 2, 2005)

(Accepted on May 30, 2005)