症 例

肺炎球菌敗血症に伴って発現した赤血球の Th 活性

秋林 建¹⁾ 近藤 誠司¹⁾ 大瀧 幸哉¹⁾²⁾

宮崎医科大学医学部附属病院輸血部¹⁾, 病態検査学講座²⁾

(平成 6 年 3 月 22 日受付)

Th ACTIVATION OF RBC ASSOCIATED WITH PNEUMOCOCCEMIA

Ken Akibayashi¹⁾, Seiji Kondoh¹⁾ and Sachiya Ohtaki¹⁾²⁾

¹⁾Blood Transfusion Division, ²⁾Central Laboratory for Clinical Investigation,
Miyazaki Medical College

This report described (1) a case of *Streptococcus pneumoniae* bacteremia whose erythrocytes showed Th and T polyagglutination in different conditions, and (2) a further investigation indicating that Th transformation was the “prestage” of T activation caused by desialylation from red cell membrane with bacterial enzyme at least in the case of infection.

A screening test with *Arachis hypogaea* happened to find erythrocyte-polyagglutination in a sample from a 55-year-old man with pneumonia and septicemia of the bacteria. An immunohematological study demonstrated Th activation (Bird's classification) on the red cells obtained directly from the patient. This contrasted with T activation of the patient's red cells taken from a culture bottle.

Erythrocytes from a healthy donor revealed Th transformation, when incubated with the patient's serum at 37°C only for more than 5 hours, and T transformation, easily when incubated with the undiluted supernatant of the blood culture. Interestingly, 10 times dilution of the supernatant brought about Th activity on the red cells after 30 minutes incubation, followed by T activation after 60 minutes or more. The 100 times dilution induced solely Th phenomenon.

The experiments using bacterial N-acetylneuraminic acid successfully transformed normal erythrocytes into either Th or T red cells, showing that the difference depended on the amount of sialic acid hydrolyzed: 4—21 $\mu\text{g}/10^{10}$ RBC for Th and $>21 \mu\text{g}/10^{10}$ RBC for T transformation.

はじめに

Th polyagglutination は、1978年に Bird ら¹⁾や Veneziano ら²⁾によりそれぞれ細菌感染症患者から見いだされ、*Arachis hypogaea* (Peanut extract) レクチンと凝集を呈する第 3 型として報告されている。

今回我々は、*Arachis hypogaea* レクチンによるスクリーニングから肺炎・重度の呼吸不全で緊急入院となった患者の赤血球に血清学的に Th 活性を示す polyagglutination の症例を経験した。この患者の血液培養で *Streptococcus pneumoniae* が確認されたが、血液培養ボトル中に含まれてい

た赤血球は T 活性を示していたことから、Th 化と T 化活性との関係について検討したので報告する。

症 例

患者：TT, 65歳, 男性。

主訴：咳, 喀痰, 右胸痛, 呼吸困難。

既往歴：昭和62年頃より、町立検診で肝機能障害が指摘され開業医を受診し、C 型慢性肝炎にて通院加療されていた。

現病歴：平成 4 年 6 月 27 日夕方より悪寒と 38.2°C 台の発熱があったが放置していた。6 月 29 日近医を受診し右肺野の異常陰影を指摘され、肺

表1 Laboratory results on admission

RBC	383×10 ⁴ /μl	TP	6.53 g/dl
Hb	13.0 g/dl	BUN	39.7 mg/dl
Hct	40.6 %	Glu	26 mg/dl
WBC	900 /μl	Na	136 mEq/l
Plt	6.4×10 ⁴ /μl	K	4.2 mEq/l
		Cl	99 mEq/l
CRP	4 +	T. Bil	3.5 mg/dl
pH	7.210	D. Bil	2.4 mg/dl
PO ₂	38.5	GOT	75 IU/l
PCO ₂	34.6	GPT	67 IU/l
HCO ₃ ⁻	13.8	LDH	540 IU/l
Blood culture			
Streptococcus pneumoniae			

炎及び重症呼吸不全の診断にて本院（第2内科）に緊急入院となる。

入院時現症：体重50kg，体温36℃，血圧90/40 mmHg，脈拍96/分，起座呼吸（+），チアノーゼ（+），貧血（+），黄疸（+），右肺に湿性ラ音を聴取。

入院時検査所見（表1）：末梢血液検査では白血球数と血小板数の減少を認めた。血液生化学検査では血清蛋白，血糖が低下し，一方血中尿素窒素，総ビリルビン，直接型ビリルビンの増加が認められた。

入院後臨床経過：患者の検査所見や臨床所見から心，肺，腎，肝などの多臓器不全と診断された。また血液培養から *Streptococcus pneumoniae* が

同定され抗生物質が投与された。しかし患者は呼吸不全により第2病日に死亡した。

材料及び方法

I. 患者検体を用いた検討

1. polyagglutination の分類は，表2に示すように各種レクチン（Gamma 社製及び自家製）を使用し，凝集の有無で行った。

2. 血清中の抗 T，抗 Tk 抗体の有無については，正常赤血球を処理した T 化及び Tk 化赤血球との凝集反応で行った。T 化处理赤血球の調製³⁾は，予め乾燥 RDE（receptor destroy enzyme：武田薬品製コレラ菌異型558株培養濾液）1パイアルを生理食塩水20ml に溶解後，溶解液と正常赤血球沈層とを等量混ぜ，37℃，15分間反応させた。また Tk 化处理赤血球は，赤血球1容量と *Bacteroides fragilis* 株（ATCC25285）培養上清液3容量とを混合し37℃，6時間反応させた⁴⁾。これらの処理赤血球の確認は，Bird¹⁾の分類に基づきレクチンとの反応性で行った。

3. 患者の血清中や血液培養上清液に菌体由来の酵素が存在するかを確認するために，次の方法で正常赤血球と反応させた。即ち，患者血清や1倍，10倍，100倍に希釈した細菌培養上清液を等容量の正常赤血球沈層に加えて37℃で最高29時間まで加温し，洗浄した。このように処理した各々の反応時間における赤血球について，*Arachis hypogaea*，*Salvia sclarea*，*Salvia horminum*，

表2 Lectin reactivity of the patient's RBC

		Polyagglutinated red cell types					Patient (TT) RBC in	
		T	Tk	Th	Tx	Tn	Peripheral blood	Blood culture
L e c t i n s	Arachis hypogaea	+	+	+	+	—	4+	4+
	Arachis hypogaea on papain, Ficin treated	+	↑	↓	+	—	—	4+
	Salvia sclarea	—	—	—	—	+	—	—
	Salvia horminum	—	—	—	—	+	—	—
	Glycine soja	+	—	—	—	+	—	4+
	Dolichos biflorus(O,B)	—	—	—	—	+	—	—
	BS II (Bandeiraea simplicifolia)	—	+	—	—	—	—	—
	Vicia cretica	+	—	+	—	—	nt	nt
	Polybrene (1%)	—	+	+	—	mf	+	—

mf: mixed field

Glycine soja, BSIIなどのレクチンと反応させた。polyagglutinationの分類はBird¹⁾に準じ、このうち *Arachis hypogaea* や *Glycine soja* レクチンとの赤血球凝集価をスコア⁵⁾で求めた。

II. 正常赤血球を用いた実験的検討

1. 種々のノイラミニダーゼ (シグマ社) 濃度における正常赤血球の Th または T 化形成試験を行った。ノイラミニダーゼを100mU, 10mU, 1mU, 0.1mU に希釈し、等容量の正常 O 型赤血球沈層に加え37°Cで15分間から24時間まで種々の加温時間で反応させた (今回の実験では、37°C, pH 5.0 N-アセチルノイラミンラクトースを基質として1分間に1 μ mole の N-アセチルノイラミン酸を遊離する酵素量をノイラミニダーゼ1U と定義した)。これらの赤血球を洗浄後、3%赤血球とし、レクチン (*Arachis hypogaea*, *Salvia sclarea*, *Salvia horminum*, *Glycine soja*, BSII) との反応性を Bird¹⁾の分類で確認した。このうち *Arachis hypogaea* と *Glycine soja* レクチンとの赤血球凝集価をスコア⁵⁾で求めた。

2. 1で示したノイラミニダーゼ処理後に赤血球から遊離したシアル酸を、Warren⁶⁾によるチオバルビツール酸法で定量した。即ち、上記1の反応上清液0.2ml に過ヨウ素酸ナトリウム0.1ml を加え振盪し、20分間放置した。亜ヒ酸ナトリウム

溶液1.0ml を加えて、さらに激しく振盪し褐色調が消えた後に、チオバルビツール酸液を3.0ml 加え、沸騰浴中で15分間加熱した。冷却後シクロヘキサノン4ml を加え、振盪抽出した。遠心(3,000 rpm, 5分間)した上清分画を550nm の吸光度で測定した。

3. *Arachis hypogaea* レクチンの各種単糖類 (Galactose, N-acetylgalactosamine, D-mannose, Maltose, Lactose, L-fucose, N-acetyl D (+) glucosamine, D-glucose : 0.25M) による赤血球凝集抑制試験としては、予めレクチンと各単糖類とを等量混合し室温15分間反応させてから、T 化処理または Th 化処理赤血球を加えて、凝集阻止反応を行った。

4. *Arachis hypogaea* レクチンの赤血球結合部位を確認するために、T 化, Th 化, 正常赤血球をそれぞれ NP-40 で可溶化し、*Arachis hypogaea* 固相化カラムにより精製した。これらの膜蛋白を10%SDS-PAGE 電気泳動法で泳動した。

結 果

1. 患者の血液型は, B, CCDee, Le(a-b-), MNss, P₂, kk, Kp(a-b-), Fy(a+b+), Jk(a-b+), Lu(a-b+), Js(a-b+), Di(a-) 型であった。

2. 患者赤血球における polyagglutination の

表3 Th transformation of normal RBC on incubation with the patient's serum in vitro.

Lectins Incub. time	with the serum on day 1		with the serum on day 2	
	※ <i>Arachis hypogaea</i> (score)	<i>Glycine soja</i>	※ <i>Arachis hypogaea</i> (score)	<i>Glycine soja</i>
1 h	0	0	0	0
3 h	0	0	0	0
5 h	0	0	1 + (5)	0
7 h	0	0	2 + (5)	0
10 h			2 + (13)	0
15 h			4 + (17)	0
18 h	1 + (5)	0		
20 h	1 + (5)	0	4 + (20)	0
24 h	1 + (5)	0	4 + (25)	0
28 h	1 + (17)	0	4 + (25)	0
29 h	2 + (21)	0		

※ Th transformed RBC has been obtained by incubation with the patient's serum for longer incubation time.

性状について各種レクチンとの凝集反応は、入院 1 日目の赤血球については Th 活性を認めなかったが、2 日目の赤血球には Th 活性を認めた。一方、血液培養液中の患者赤血球と培養上清液で処理した正常赤血球は、共に T 活性を示し、polyagglutination の型に相違が見られた (表 2)。

3. 患者血清中には、抗 T、抗 Tk 抗体が存在を

認めた。

4. 患者血清と正常赤血球との反応については、入院1日目の患者血清では18時間加温で、入院2日目の患者血清では5時間加温でTh活性を認めたが、T活性は確認できなかった(表3).

5. 患者の血液培養上清液を希釈し, 正常赤血球と反応させると, 100倍希釈では24時間まで反応さ

☒ 1 Th and T transformation of normal RBC incubated with the supernatant of the patient's blood culture : agglutination score

表4 Th和T transformation of normal RBC incubated with the diluted supernatant of the patient's blood culture

[illegible]

図2 Quantification of sialic acid in the supernatant of normal RBC after neuraminidase treatment
○ : Th transformed RBC, □ : T transformed RBC, ■ : Th activated area : 4~21μg/10¹⁰RBC

表5 Agglutination of RBC by Arachis hypogaea after incubation with monosaccharides

Monosaccharides	T h transformed RBC	T transformed RBC
Galactose	—	—
N-Acetylgalactosamine	4 +	4 +
D-mannose	4 +	4 +
Maltose	4 +	4 +
Lactose	—	—
L-fucose	4 +	4 +
N-Acetyl D(+)glucosamine	4 +	4 +
D-glucose	4 +	4 +
PBS control	4 +	4 +

図3 SDS-PAGE of NP-40 soluble RBC membrane protein purified by Arachis hypogaea lectin affinity column.

せても Th 活性が持続した。10倍希釈では30分までの加温では Th 活性を、それ以後の加温では T 活性が誘導された (図1, 表4)。

6. ノイラミニダーゼが0.1mU では24時間の反応でも Th 活性が持続したが、1.0mU では3時間までの反応で、10.0mU では15分間の反応で、それぞれ赤血球が Th 活性を示し、さらに反応時間を延長すると T 活性の誘導を認めた (図2)。

7. *Arachis hypogaea* レクチンの各種単糖類における赤血球凝集抑制試験では、T 化处理赤血球、Th 化处理赤血球ともに galactose, lactose のみにより抑制が認められた (表5)。

8. T 化处理赤血球、Th 化处理赤血球、正常赤血球の *Arachis hypogaea* 固相化カラムにより精製した膜蛋白は、galactose による凝集抑制を認め、10%SDS-PAGE 電気泳動を行った泳動像は、70kd~80kd のブロードなバンドが共にみられた (図3)。

考 察

Th-polyagglutination は、種々のレクチンとの反応性により血清学的に特異性が確認されている¹⁾が、その発現機構は Judd⁷⁾の総説によると、(1)細菌由来の酵素によりシアル酸が遊離することで発現するもの、(2)新生児や妊娠に発現が認められ、前者は i 抗原の如く胎児抗原として発現が増加したものであり、後者は妊娠中の代謝変化による抗原変化で alkali-labile tetrasaccharides のシアル酸残基が欠如する不完全な合成によるもの、(3)先天性低形成貧血患者 (Fanconi 貧血患者, Diamond-Blackfan 患者等) にみられるものとされている。これらは感染症例を除き主に赤血球膜糖類の合成系異常によって生じるものと推定されている。

本邦における Th-polyagglutination の報告例は、特発性血小板減少性紫斑病患者⁸⁾、Myelodysplastic syndrome 患者⁹⁾、不応性貧血患者¹⁰⁾、溶血性貧血患者¹¹⁾、急性骨髄性白血病病患者¹²⁾などに認められるものの、その発現理由に関しては詳細に検討されていないが、何れも感染は否定されているため、合成系の異常によるものと推察される。

しかし、本邦においては本症例のような感染症

による報告例は著者らの調べた限りでは現在のところ見当たらない。本症例に認められた赤血球異常は、起因菌である *Streptococcus pneumoniae* 菌体酵素により血清学的に Th 活性を発現したと推定された。患者赤血球の Th 化は入院1日目には認められず、入院2日目に認められた。その理由として入院1日目の血清と正常赤血球を *in vitro* で18時間ふ置すると赤血球の Th 化の発現が生じることから、入院1日目ですでに血清中に酵素が存在しており、入院2日目で赤血球の Th 活性に至ったものと考えられた。

Streptococcus pneumoniae 培養液に存在する酵素としてはノイラミニダーゼが指摘されている¹³⁾ことから、患者における Th 活性と T 活性との相違は、培養上清に含まれている酵素濃度と反応時間が異なる事により生じることが示唆された。そして両者の違いは、酵素反応により赤血球から遊離されるシアル酸量の違いに基づくものと考えた。患者からの赤血球遊離シアル酸量の測定は、第2病日に死亡のため直接測定は出来なかった。

シアル酸の減少と関連した汎凝集現象では、T-polyagglutination が Th より頻度も高く、よく知られている。しかも、この二つの抗原の関連について、生化学的に二つの異なった意見が発表されてきた。一つは、T 活性の発現と Th のそれとの差異を脱シアル酸の程度とみなす見解である Sondag-Thull ら¹⁴⁾がその代表で、「Th 転換は T 化の前段階もしくは低活性状態である」との主張を *Corynebacterium aquaticum* の培養上清の実験で裏付けている。一方、Herman ら¹⁵⁾によれば Fanconi 貧血患者の Th 抗原構造を、¹²⁵I 標識 *Arachis hypogaea* レクチンを用いて赤血球膜蛋白のウェスタンブロッティングを行った結果や、³H シアル酸と精製 sialyltransferase による T 抗原の比較検討などから、T と Th 抗原は質的に異なっていたと述べている。

本症例においては、両赤血球における *Arachis hypogaea* レクチンの単糖類による凝集抑制は同一であったこと、また各々の赤血球を NP-40 で可溶化した10%SDS-PAGE の泳動像が一致していたことから、*Arachis hypogaea* レクチンの反応

部位は同一と推定された。言いかえれば, Th 発現と T 転換との違いはシアル酸遊離の量的な差に起因すると考えられた。このことは, 図 2 に示す如く実験的に赤血球からシアル酸量が $4\mu\text{g}/10^{10}$ RBC 遊離しはじめると Th 活性が始まり $21\mu\text{g}/10^{10}$ RBC まで持続していたが, それ以上のシアル酸量が遊離すると T 活性が誘導されることによって確認された。なおこれらの閾値は, Sondag-Thull ら¹⁴⁾の報告値 $20\mu\text{g}/10^{10}$ RBC とほぼ類似した数値であった。

以上のことから本症例のような感染症における Th 活性の発現は, T 化の前段階もしくは低活性状態にあるものと思われた。すなわちノイラミニダーゼにより赤血球膜上の glycophorin (GPA) の Gal-GalNAc に結合している N-acetylneuraminic acid (NANA) の脱シアル化が Th 活性はマイルドに起きた状態であり, 大量にシアル酸が遊離されると T 化が誘導されるものと推察された。

結 語

Arachis hypogaea [Peanut extract] レクチンによるスクリーニングから肺炎・呼吸不全で緊急入院となった患者の赤血球に Th 活性が発現しているのが検出された。この発現は, *Streptococcus pneumoniae* 感染による菌体酵素によるものであった。種々の検討をした結果, 感染症における Th 発現は, T 活性への前段階もしくはシアル酸遊離の弱い状態であると考えられた。

謝辞 本症例の検討に際し, *Bacteroides fragilis* 株 (ATCC25285) 培養上清を恵与下さいました岐阜大学嫌気性菌実験施設渡辺教授及び本院検査部梅木一美主任技師, 山本成郎技師に深謝致します。

また, 本論文の要旨は, 第41回日本輸血学会総会(東京)で報告した。

文 献

- 1) Bird, G.W.G. Wingham, J., Beck, M.L., Pierce, S.R., Oates, G.D. and Pollock, A.: Th, a "new" form of erythrocyte polyagglutination (letter). *Lancet*, 1: 1215—1216, 1978.
- 2) Veneziano, G., Rasore-Quartino, A. and Sansone, G.: Th erythrocyte polyagglutination (letter). *Lancet*, 2: 483, 1978.
- 3) Haynes, C.R., Dorner, I., Leonard, G., Arrowsmith, W.R. and Chaplin, H.: Persistent polyagglutination in vivo unrelated to T-antigen activation. *Transfusion*, 10: 43—51, 1970.
- 4) Moulds, J.: Polyagglutination: Overview and resolution. Polyagglutination a technical workshop. p. 1—22, 1980.
- 5) Widmann, F.: A code for scoring agglutination reactions. Technical Manual of the AABB, 9th ed., p. 462—462, 1985.
- 6) Warren, L.: The thiobarbituric acid assay of sialic acids. *J. Biol. Chem.*, 234: 1971—1975, 1959.
- 7) Judd, W.J.: Review: Polyagglutination. *Immunohematology*, 8: 58—69, 1992.
- 8) 大久保康人, 瀬尾たい子, 山口英夫, 塩田喜代子, 高井正治: 持続性 polyagglutination Th の 1 症例. *血液事業*, 7: 13—16, 1984.
- 9) 赤保内良和, 谷村章子, 仲川尚明, 森田正光, 川崎君王, 小林壮光, 谷内 昭, 石井禎郎: Th-polyagglutination を伴った Myelodysplastic Syndrome. *臨床血液*, 27: 54—59, 1986.
- 10) 佐藤千秋, 松島弘子, 日高琢二, 高崎富美子, 市川洋一, 塩見善作, 新井義夫, 伏見隆子, 前川孝子, 村田 愿, 児崎宣夫: Th-polyagglutination 発現の 1 症例. *日輸血会誌*, 31: 580—581, 1985.
- 11) 深井寛治, 加藤俊明, 金子園明, 関口定美, 佐々木正昭: Polyagglutination Th の 1 症例. *日輸血会誌*, 31: 582—583, 1985.
- 12) 東谷孝徳, 川野洋之, 小川美津子, 吉本孝治, 南野隆一, 横山三男: Th 抗原による Polyagglutination と A 抗原の発現が一過性に消失した急性骨髓性白血病の症例. *日輸血会誌* 36: 147, 1990.
- 13) Wilson, J.: A review of serologic problems caused by polyagglutinable red cells. *Am. J. Med. Technol.*, 43: 147—155, 1977.
- 14) Sondag-Thull, D., Levene, N.A., Levene, C., Manny, N., Liew, Y.W., Bird, G.W.G., Schechter, Y., François-Gérard, Ch., Huet, M. and Blanchard, D.: Characterization of a neuraminidase from *Corynebacterium aquaticum* responsible for Th polyagglutination. *Vox Sang.*, 57: 193—198, 1989.
- 15) Herman, J.H., Whiteheart, W., Shirey, R.S., Johnson, R.J., Kickler, T.S. and Ness, P.M.: Red cell Th activation: Biochemical studies. *Br. J. Haematol.*, 65: 205—209, 1987.