

***Pseudomonas aeruginosa* 感染による Polyagglutination の 1 症例**

領家 敬子¹⁾ 糸賀 真人¹⁾ 福田 芳美¹⁾ 園山 京子¹⁾ 角森 正信¹⁾
 小早川義貴²⁾ 吾郷 浩厚³⁾

汎血球凝集反応 Polyagglutination は、潜在していた赤血球抗原が感染症や血液疾患などにより血球表面に露出し、新鮮な正常成人血清と反応する現象であり、その種類も成因により様々である。成人 T 細胞白血病と緑膿菌感染症に関連し、汎血球凝集反応を認めたと考えられる患者を報告する。患者は 53 歳女性。非血縁者間骨髄移植と化学療法施行後であった。腰椎圧迫骨折にて入院中、突然心肺停止状態に陥った。蘇生後、集中治療室 (ICU) 入室となったが、心停止から 9 日後に死亡した。入室時の検査で血液培養から緑膿菌が検出され、その後の交差適合副試験で非特異凝集を認めた。血液センターで行われた検査で汎血球凝集反応 Tk 型と報告があったが確定には至らなかった。当院において、患者血液由来の緑膿菌株を用い追加試験を行った。菌株を培養し、培養液と正常 O 型赤血球を 37℃ にて反応させた。この赤血球を成人 AB 型血清と反応させたところ、反応開始から 4 日後に凝集反応を認め、緑膿菌による凝集誘導が示唆された。

キーワード：汎血球凝集反応，緑膿菌感染，敗血症

はじめに

汎血球凝集反応 polyagglutination (PA) は、赤血球の異常により血液型には関係なくほとんど全ての成人血清と凝集反応を起こす現象として定義される。ABO 血液型検査でのオモテ・ウラ試験の不一致や、交差適合試験の副試験での凝集反応で発見されることがほとんどであり、感染症や血液疾患などにより潜在化していた抗原が血球表面に露出することで反応する現象と理解されている^{1)~3)}。

PA は、その成因から後天性と遺伝性に大別される。後天性のものは発現原因から細菌等の感染による一過性の T, Tk, Th, Tx, VA, acquired B と、血液疾患による Tn, Th に分けられている。遺伝性によるものは Cad, NOR, HEMPAS などに分類される²⁾³⁾。

今回、われわれは、*Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) による細菌感染が原因と思われる Polyagglutination の症例を経験した。本邦では *P. aeruginosa* による PA の報告はなく、PA 化の確認に菌株を利用した報告もない。

患者の血液培養より分離同定後、凍結保存されていた菌株を用いて、正常 O 型赤血球の PA 化を確認することが出来たので報告する。

症 例

53 歳女性。平成 18 年、成人 T 細胞白血病と診断され、同種骨髄移植が行われた。移植により血液型は、移植前 B 型、移植後は O 型 (オモテのみ) であった。その後、再燃に対して化学療法が行われ寛解状態であった。自宅療養していたが、腰椎圧迫骨折を来し平成 20 年 4 月 3 日に入院となった。

入院時の血液検査は、WBC, $39 \times 10^2/\mu\text{l}$; RBC, $337 \times 10^4/\mu\text{l}$; Hb, 11.7g/dl; Ht, 34.4%; Plt, $5.0 \times 10^4/\mu\text{l}$; Na, 137.3mmol/l; K, 4.9mmol/l; Cl, 100.5mmol/l; Ca, 9.4mg/dl; T-bil, 0.8mg/dl; AST, 27IU/l; ALT, 33IU/l; LDH, 420U/l; γ -GTP, 259IU/l; BUN, 54.5mg/dl; creatinine, 1.09mg/dl; CRP, 3.3mg/dl であり、心停止まで重症感染症を疑わせる血液検査データはなかった。

4 月 14 日、病棟で心停止に陥り蘇生行為によって自己心拍は再開したが、集中治療管理にもかかわらず、9 日後に死亡した。蘇生中の血液検査では、WBC, $111 \times 10^2/\mu\text{l}$; RBC, $328 \times 10^4/\mu\text{l}$; Hb, 11.3g/dl; Ht, 34.8%; Plt, $4.6 \times 10^4/\mu\text{l}$; Na, 123.7mmol/l; K, 9.7mmol/l; Cl, 89.1mmol/l; Ca, 9.5mg/dl; T-bil, 1.2mg/dl; AST, 101IU/l; ALT, 76IU/l; LDH, 92IU/l; γ -GTP, 156

1) 島根県立中央病院検査技術科

2) 島根県立中央病院救命救急科

3) 島根県立中央病院血液腫瘍科

〔受付日：2009 年 10 月 30 日，受理日：2010 年 8 月 6 日〕

IU/l ; BUN, 41.9mg/dl ; creatinine, 1.45mg/dl ; CRP, 26.4mg/dl であった。

心停止の直接的な原因は高カリウム血症と推定されたが、ICU 入室時に採取された血液培養からは *P. aeruginosa* が培養され、*P. aeruginosa* 敗血症による臓器障害がその基礎にあると考えられた。また、心停止前に発熱やショック状態は確認されず、敗血症の可能性を示唆するものは 110~120bpm の洞性頻脈のみであった。

ICU 入室 4 日目、血小板減少 (Plt : $0.8 \times 10^4/\mu\text{l}$) を認めため濃厚血小板 (Ir-PC) 20 単位を輸血、さらに ICU 入室 7 日目、血小板減少 (Plt : $2.0 \times 10^4/\mu\text{l}$) および貧血進行 (Hb : 5.9g/dl) を認めため、濃厚血小板 (Ir-PC) 10 単位と赤血球濃厚液 (Ir-RCC-LR) 2 単位が依頼された。この時の Ir-RCC-LR との交差適合試験の副試験において凝集がみられたため、複数の赤血球製剤と交差適合試験をおこなったところ、どの赤血球製剤においても副試験で同程度の凝集 (W+~1+) がみられた。また、患者赤血球と ABO 式血液型が異なる成人血清との反応を確認すると、移植後 O 型 (オモテのみ) である患者赤血球と本来ならば凝集を認めない成人 AB 型血清との凝集 (3+)、成人 A 型血清との凝集 (W+)、成人 B 型血清との凝集 (1+) がみられた。また H レクチン (1+)、不規則抗体陰性、直接抗グロブリン試験陰性であった (Table 1)。

重症敗血症であることから PA を疑い、血液センターに精査を依頼した。また、ICU 入室 7 日目の輸血を中止し、その翌日 ICU 入室 8 日目の使用予定として洗浄

赤血球 (Ir-WRC-LR) 2 単位を、血液センターに依頼した。

ICU 入室 8 日目、さらに貧血進行 (Hb : 4.4g/dl, Plt : $1.0 \times 10^4/\mu\text{l}$) し、依頼していた洗浄赤血球 (Ir-WRC-LR) 2 単位の供給が間に合わず Ir-RCC-LR 2 単位と Ir-PC 10 単位を輸血した。

血液センター精査結果

患者赤血球は各種レクチンのうち *Arachis hypogea* と強く反応を示した (Table 2)。

各種モノクローナル抗体との反応では、抗 Tk (4+)、抗 T (w+) であった。患者赤血球と AB 型血清との反応は 30 例中 27 例で凝集がみられ、A 型血清との反応では 30 例中 26 例で凝集、B 型血清との反応では 30 例中 26 例で凝集がみられた (Table 3)。

さらに正常 O 型赤血球に等量の患者血清を加え、37°C 24 時間感作後、O 型赤血球が、患者血球に見られたのと同様に各種レクチンのうち *Arachis hypogea* と強く反応し、各種モノクローナル抗体との反応では、抗 Tk に強く凝集がみられ Tk 化と思われた。

また、Tk の他に Th、弱い T 化も考えられたが、レクチンとの反応が凝集しないはずのところ凝集したり、一部異なり、断定は出来なかった。

追加試験

T や Tk など、細菌感染により起こる PA の起病菌を判断する検査方法として、患者の血液培養や髄液培養の培養液を濾過滅菌し正常 O 型赤血球と 37°C で反応させ、赤血球を洗浄し市販のレクチンシステムと反応させる方法がある。患者に感染症以外の因子がない場合は、この方法で患者血球にみられたのと同様の反応を認めれば、検出された細菌を PA の起病菌とすることができる。また培養液の代わりに患者血清を使って、同様に検査を行なうことでも起病菌を決定することができる⁴⁾⁵⁾。

今回、患者の血液培養から検出され、分離同定後凍結保存していた菌株を利用することで、血液培養液や患者血清などに含まれていると考えられる、宿主因子を除外した場合でも、PA 化が起こるか観察した。

Table 1 Reaction of the patient's blood on admission to the intensive care unit

Red blood cells		Serum	
Anti-A (monoclonal)	-	A1 red cells	4+
Anti-B (monoclonal)	-	B red cells	-*
Anti-D	4+	O red cells	-
Anti-H	1+		
A serum	W+	IAT	-
B serum	1+		
AB serum	3+		
DAT	-		

* After ABO incompatible bonemarrow transplantation

Table 2 Reaction of the patient's red blood cells to lectins

Lectins	Polyagglutination						Patient's blood cells
	T	Tn	Cad	Tk	Th	Acq B	
<i>Arachis hypogea</i>	+	0	0	+	+	0	4+
<i>Glycine soja</i>	+	+	+	0	0	0	1+
<i>Salvia sclarea</i>	0	+	0	0	0	0	0
<i>Salvia horminum</i>	0	+	+	0	0	0	1+
<i>Dolichos biflorus</i>	0	+	+	0	0	0	0

Table 3 Reaction of the patient's red blood cells to monoclonal antibody and adult serum

Monoclonal antibody	Patient's blood cells
Anti-Tk	4+
Anti-Tn	0
Anti-AcqB	0
Anti-T	W+
Adult serum	
A adult serum	positive (26/30 samples)
B adult serum	positive (26/30 samples)
AB adult serum	positive (27/30 samples)

今回のように、菌株を利用した報告は今までになく、分離同定された菌そのものを利用する事でPAと起原因菌を直接的に結びつける事が出来ると考えた。

1. 方法

1) *P. aeruginosa* 菌株(患者由来)を極東ミューラーヒントンプロス(極東製薬工業(株), 東京)にて37°C 24時間培養し、濾過滅菌せずこれを培養液とした。

2) 培養液と、生理食塩水で数回洗浄した正常O型赤血球を等量混和し37°Cで加温反応させた。陰性対照として、正常O型赤血球と菌を添加していない極東ミューラーヒントンプロスを等量混和し同条件にて加温反応させた。

3) 加温反応後、12時間後、1日後、2日後、3日後、4日後の時点で、反応させた正常O型赤血球を洗浄し、正常AB型ヒト血清と反応させ、凝集の有無よりPA化を観察した。

2. 結果

実験開始4日目で正常O型赤血球のPA化を確認した(Fig. 1)。

考 察

Tkは、Birdら(1972)によって初めて報告され、酵素処理によってピーナツレクチンによく凝集するほか、GSIIレクチンとも反応することや、赤血球膜のシアル酸量が正常なためポリブレンと凝集することが特徴とされている。通常 *Bacteroides fragillis* が発現の原因菌とされている。その他の菌としては、*Serratia marcescens*, *Candida albicans*, *Aspergillus niger*, *Escherichia coli*, *Streptococcus pneumoniae*, *Klebsiella spp.*, MRSAなども報告されている。これらの細菌が産生するガラクトシダーゼ(β -galactosidase)の作用によって、末端のガラクトースが切断されTk抗原の決定基であるグルコサミン(N-acetylglucosamine)が露出するため、成人の正常ヒト血清に含まれる抗Tk凝集素と反応するとされている^{1)~3)}。

Thは、Birdら(1978)が報告し、レクチンとの反応

は、TやTkと良く似た反応性を示すが、酵素処理によりピーナツレクチンとの反応が弱くあるいは陰性化すること、Glycine sojaレクチンとGSIIレクチンに陰性になることが特徴である^{1)~3)}。Thは特発性血小板減少性紫斑病(ITP)、不応性貧血、骨髄異型性症候群(MDS)、急性白血病(ALL)などの血液疾患に伴う持続的な現象として報告されている^{12)~14)}。それは、血液疾患などによる赤血球膜の糖鎖合成の異常によって発現すると考えられている。一方細菌感染症例として、*Streptococcus pneumoniae*による報告がある¹⁵⁾。それは、細菌が産生する酵素によって赤血球膜のシアル酸が遊離されて起こるとされる。このように、Thの発現には2種考えられているが、Thの抗原決定基は明らかにされていない。そして細菌感染による場合は、初めにTh化が起こり、シアル酸の遊離がさらに進むとT化が起こるとの報告がある²⁾。

当症例は、*P. aeruginosa*を起原因菌とするTk化が起きたと示唆されたが、患者が血液疾患であることや、各種レクチンとの反応からもTkの他にTh、Tの可能性も考えられた。確定するには、GSIIレクチンとの反応性や、赤血球の酵素処理後のピーナツレクチンとの反応性で確認する方法がある。PAのレクチンは市販されているものは1社4種類しかなく、GSIIレクチンは、すでに市販されておらず入手が困難なため、PA分類の確定に至らなかった。

今回の追加試験ではPAを確認するために4日間を要したが、血液培養液や患者血清を使用した報告では、長くても37°C24時間程度が一般的である。菌株を利用したことで、菌が産生する酵素の量が赤血球膜を修飾するまでに時間がかかるのではと考え、菌液の濃度を変えて同様の試験を行った結果PAの確認までの時間は同じであった。このことから、酵素の量が関与したものではなく、患者血清中に、その他の細菌や真菌が存在しており、それらの関与があった可能性も否定できない。

また、酵素とPA化の関係を説明するためには、実際に培養液中の各酵素を測定することが必要と思われた。

少なくとも、当院での追加試験では宿主因子の影響がない凍結保存されていた患者由来分離菌株を利用したため、正常O型赤血球のPA化が*P. aeruginosa*の直接作用によるものであると言える。

PA患者に対する輸血は、溶血性副作用を防止する観点から、血漿中に含まれるPA凝集素(抗T、抗Tk、抗Th、抗Tn)の影響を避けるため全血や血漿製剤の輸血は行うべきではないとの報告が多く、わが国の症例でも洗浄赤血球や洗浄血小板の輸血が行われている^{6)~8)}。一方、細菌感染が原因で起こるPolyagglutination-Tはシアル酸の遊離が大量に起きており、輸血の際に

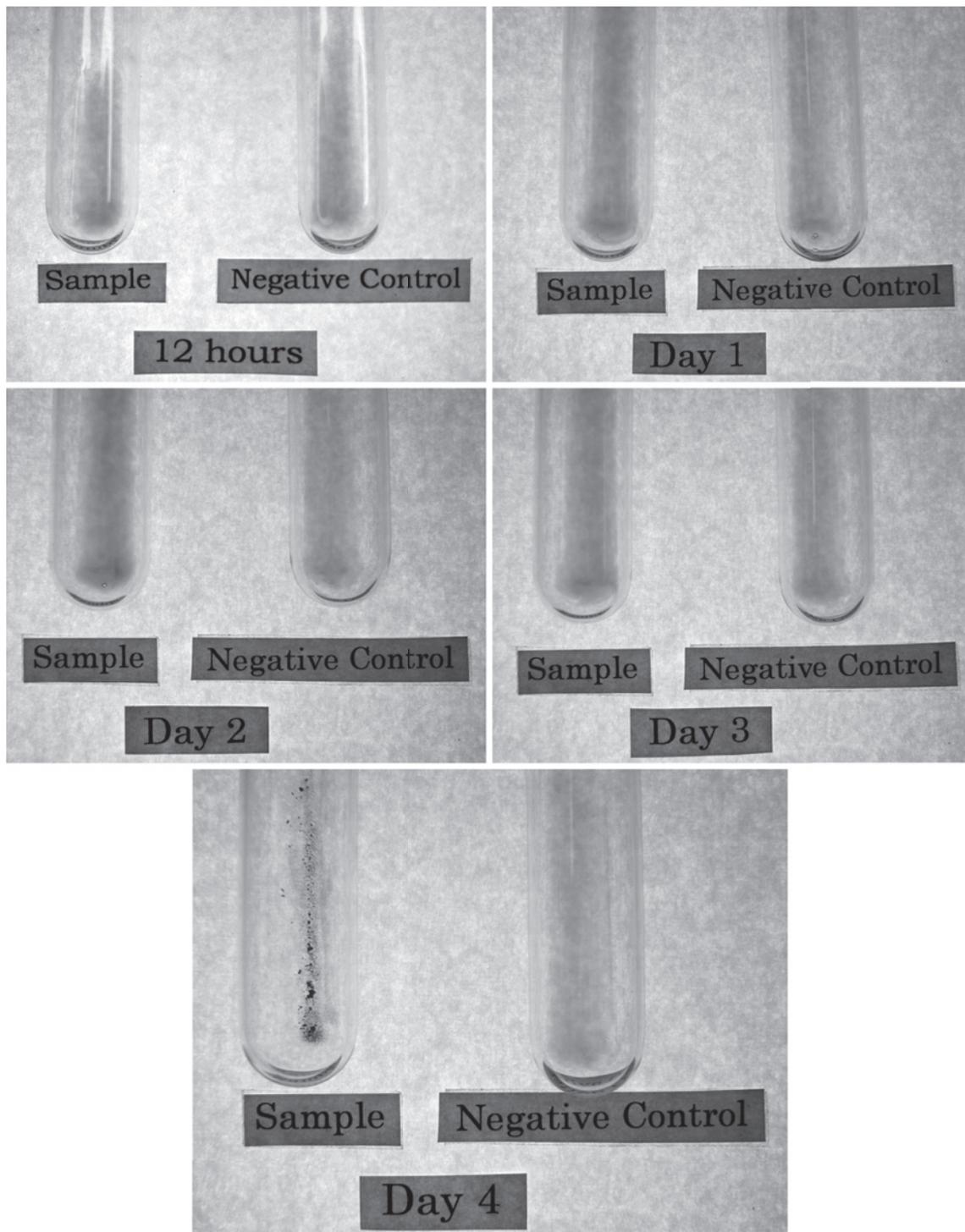


Fig. 1 Results of polyagglutination testing.
Sample and Negative Control

新鮮凍結血漿（FFP）は禁忌であり，他の血液製剤は洗淨赤血球，洗淨血小板を選択する必要があるがTk，Thなどは通常の製剤を使用しても溶血を起こさなかったという報告がある⁹⁾．一般にPA症例は貧血を伴うことが多いが，PA自身が溶血の原因となることは実証されていない¹⁰⁾¹¹⁾．

PA症例に対する輸血と溶血性副作用との関係は必ずしも明らかではなく，本邦では血漿成分を輸血した小児で，重篤な溶血性副作用が1例報告されているのみである⁸⁾．当症例においても，患者が敗血症発症後にIr-PC 30単位 Ir-RCC-LR 2単位の輸血をおこなったが溶血性副作用は認められなかった．ICU入室9日目にLDH

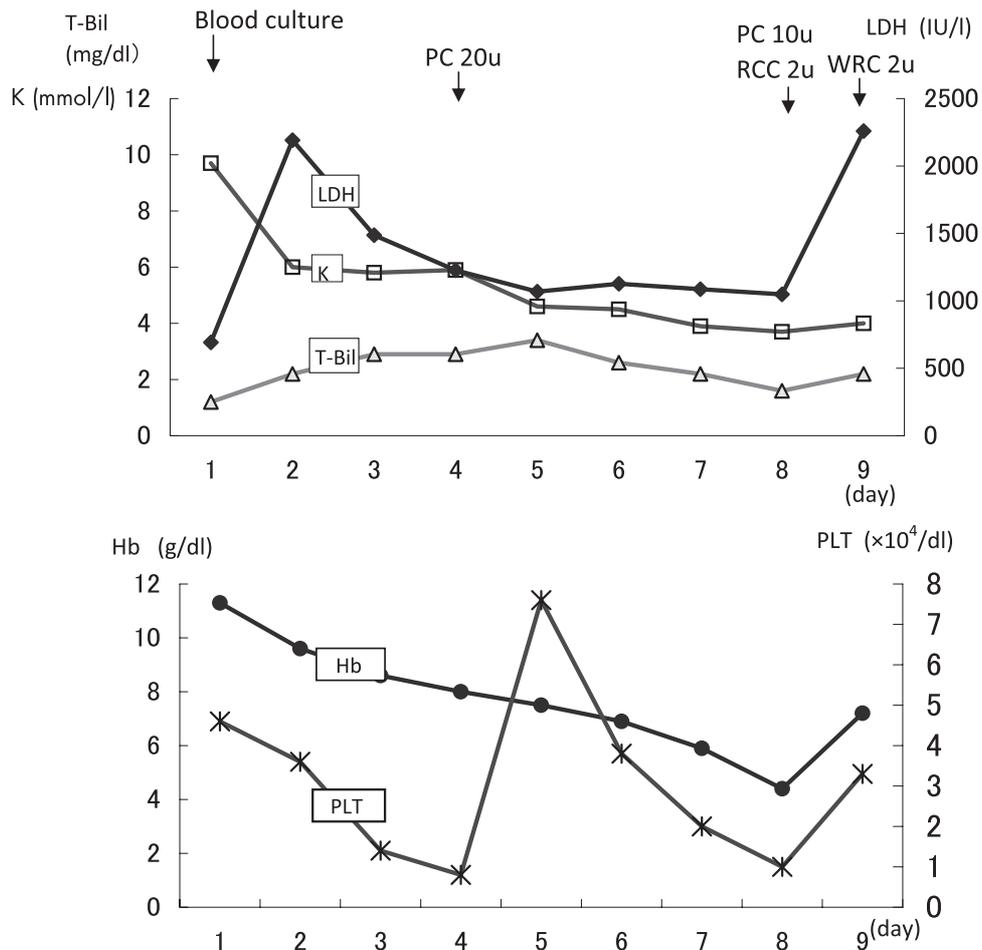


Fig. 2 Clinical course in the intensive care unit.

Day 1 means the day of admission to intensive care unit.

T-Bil: total bilirubin, LDH: lactic dehydrogenase, Hb: hemoglobin, PLT: platelets, PC: platelet concentrate, RCC: red cell concentrate, WRC: washed red cells

の上昇がみられるが、溶血によるものではなく、敗血症による臓器障害のためと思われる (Fig. 2)。

近年、交差適合試験副試験は省略される傾向にあるが、当院では血液型の確認を兼ねて、慣例的に副試験の生食法のみ実施している。副試験を省略し輸血をおこなっても臨床的には問題がないが、PA と溶血に関してはまだ十分に解明されていない部分もあり、副試験がPA の発見の一助になり、PA の解明につながれば意義があると思われる。

結 語

緑膿菌による敗血症患者の交差適合試験副試験に、非特異凝集がみられ、血液センターによる精査の結果、Polyagglutination-Tk と思われたが確定には至らなかった。菌株を利用した当院での追加試験より原因菌のひとつは *P. aeruginosa* であることが証明できた。

また、血漿成分を含む製剤の輸血を行ったが、著明な副反応は認められなかった。

謝辞：広島血液センター検査課の皆様には、Polyagglutination の同定をしていただきましたこと、また検査データの使用を快諾いただきましたことに深謝いたします。

文 献

- 1) 大久保康人：血液型と輸血検査 第2版，医歯薬出版，東京，1997，137—143。
- 2) 加藤俊明，石丸 健，関口定美：Polyagglutination (汎血球凝集) を原因とする誤判定。日本臨床，55：194—199，1997。
- 3) 大久保康人：Polyagglutination (汎血球凝集) はどうしておこりますか。またどのようなときにおこりますか。編者 福岡良男，清水 勝，中嶋八良，教科書では知り得ない免疫血液学(輸血)の知識，近代出版，東京，1988，162。

- 4) 児玉 健：感染症における菌種と赤血球 Polyagglutination 形成の関係. 編者 久田正直, 輸血 月刊 300号記念特集号, 輸血新聞広報室, 福岡県, 2007, 42—43.
- 5) 尾崎牧子, 松田幸子, 西山政孝, 他： *Escherichia coli* 敗血症に合併した Acquired B および Tk-Polyagglutination の 1 症例. 日本輸血学会誌, 49 : 50—56, 2003.
- 6) 佐藤千秋, 松島弘子, 日高琢二, 他： Th-polyagglutination 発現の 1 症例. 日本輸血学会雑誌, 31 : 580—581, 1985.
- 7) 佐藤千秋, 平山美津江, 渋谷 温, 他： 不応性貧血の一症例にみられた Th-polyagglutination. 日本輸血学会雑誌, 36 : 462—468, 1990.
- 8) 佐々木正照, 大水幸雄, 黒川一郎, 他： 赤血球 T-polyagglutination の一例. 日本プライマリ・ケア学会抄録集, 10 : 267—271, 1987.
- 9) Mollison PL: Red Cell Antibodies Against Self Antigens, Bound Antigens and Induced Antigens. In: Engelfe CP, Cortreras M, eds, Blood Transfusion in Clinical Medicine 10thed, Blackwell Science Publications, Oxford, 1997, 233—239.
- 10) Beck ML: Red blood cell polyagglutination clinical aspects Semin. Hematol, 37: 186—196, 2000.
- 11) Crookston KP, Reiner AP, Cooper LJJ, et al: RBC T activation and hemolysis implications for pediatric transfusion management. Transfusion, 40: 801—812, 2000.
- 12) 深井寛治, 加藤敏明, 金子園明, 他： polyagglutination Th の 1 症例. 日本輸血学会雑誌, 31 : 582—583, 1985.
- 13) 赤保内良和, 谷村章子, 仲川尚明, 他： Th-polyagglutination を伴った Myelodysplastic Syndrome. 臨床血液, 27 : 54—59, 1986.
- 14) 東谷孝徳, 川野洋之, 小川美津子, 他： 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髄性白血病の症例. 日本輸血学会雑誌, 36 : 147, 1990.
- 15) 秋林 健, 近藤誠司, 大瀧幸哉, 他： 肺炎球菌敗血症に伴って発現した赤血球の Th 活性. 日本輸血学会雑誌, 40 : 730—736, 1994.

POLYAGGLUTINATION CAUSED BY *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* INFECTION

Keiko Ryouke¹⁾, Masato Itoga¹⁾, Yoshimi Fukuda¹⁾, Kyoko Sonoyama¹⁾, Masanobu Tsunomori¹⁾,
Yoshitaka Kohayagawa²⁾ and Hiroatsu Ago³⁾

¹⁾Department of Clinical Laboratory, Shimane Prefectural Central Hospital

²⁾Department of Critical Care and Emergency Medicine, Shimane Prefectural Central Hospital

³⁾Department of Hematology and Oncology, Shimane Prefectural Central Hospital

Abstract:

In polyagglutination, erythrocytes agglutinate with almost all samples of normal serum due to erythrocyte expression of cryptic antigens caused by infectious disease or blood disease. There are many types and reasons for polyagglutination.

We report a fatal case of polyagglutination related to adult T-cell leukemia and *Pseudomonas aeruginosa* infection. A 53-year-old female patient had received a bone marrow transplantation from an unrelated donor as well as chemotherapy. She was admitted to our hospital because of back pain caused by lumbar compression fracture. Eleven days later, she suddenly experienced cardiopulmonary arrest. She was resuscitated and admitted to intensive care unit. *P. aeruginosa* was detected by blood culture. In spite of intensive care, she died 9 days after admission. We observed non-specific agglutination in a minor cross-match test after *P. aeruginosa* infection. The patient's erythrocytes did not agglutinate with her own serum, but agglutinated with almost all serum samples of the same blood type. On analysis of the patient's blood sample at the Hiroshima Red Cross Blood Center, Tk polyagglutination was strongly suspected. We therefore conducted an additional test using a strain of *P. aeruginosa* cultured in the patient's blood sample. This strain was cultured and reacted with normal blood type O erythrocytes at 37°C. These erythrocytes reacted to blood type AB serum and agglutination was identified after 4 days. These results indicate that the agglutination was caused by the direct effect of erythrocytes of blood type O reacting with *P. aeruginosa*.

Keywords:

polyagglutination, *Pseudomonas aeruginosa* infection, sepsis