別紙１

輸血による抗血漿タンパク抗体出現に関する検討
－ observational study －

実験計画書

慶應義塾大学医学部輸血センター、血液内科学教室
（2002年10月1日）

別紙１

1　背景

輸血施行患者の一部で血漿中に抗血漿タンパク抗体が存在することが観察されることが知られており、輸血関連合併症の原因のひとつと推定されている。しかしながら、輸血後の抗血漿タンパク抗体の出現状況については詳細に検討されておらず、また非溶血性副作用と抗血漿タンパク抗体との関連性を示唆する報告もなされていない。

2　目的

輸血歴のある患者の抗血漿タンパク抗体の有無を測定し、その出現状況について詳細に検討する。

3　対象および方法

3.1　対象

平成14年10月から12月までの3ヶ月間に慶應義塾大学病院血液内科で治療中の者のうち輸血歴を有する症例で、文書で同意が得られた例。悪性／非悪性、造血幹細胞移植の有無、入院／外来、を問わない。ただし、輸血歴の詳細が不明確な例は除外する。

3.2　登録時に必要な患者情報

年令、性別、妊娠歴、輸血歴、輸血副作用歴、造血幹細胞移植歴、診断名、病期、現在の治療内容、投与中の薬剤、不規則抗体の有無など。

3.3　検体の採取・保存

3.3.1 患者検体

輸血オーダー時に提出されたクロスマッチ用検体の一部を採血後6時間以内に遠心分離し、得られた血清をセラムチューブに分注して冷凍保存する(-20℃以下)。

3.3.2 輸血血液製剤

クロスマッチ用として準備されているサンプルの残りを遠心分離し、得られた血清をセラムチューブに分注して冷凍保存する(-20℃以下)。

3.4　抗血漿タンパク抗体の検査

後日サンプルを用いて日本赤十字中央血液センターで抗血漿タンパク抗体を測定する。

3.4.1 オクタロニー法(スクリーニング検査)

患者血清と輸血血液製剤との間でオクタロニー法を行う。沈降線が観察された場合は免疫電気泳動により確認検査を行う。

3.4.2 ELISA 法による抗体の同定

オクタロニー法が陽性であった場合、以下の 15 種類の精製抗原を用いた ELISA を行い、精製抗原に対する抗体の有無を確認する。

＊ 精製抗原：Haptoglobin, Transferrin(Tf), α1-Acid Glycoprotein(AAG), IgA, C4, C9, Ceruloplasmin, Fibrinogen, α2-macroglobulin, Protein C, Protein S, Plasminogen, Anti-thrombin III, β2-Glycoprotein, α2-HS-Glycoprotein。

3.4.3 ウエスタンブロット法による検出抗体の確認

ELISA 法が繰り返し陽性であった場合、精製抗原をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後 PVDF 膜に転写し、患者血清と混ぜ、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体との反応および ECL 反応により抗体を検出する。

3.5　血漿タンパク量の測定

3.5.1 ピークレートネフェロメトリー法によるタンパク量の測定

BECKMAN IMAGE を用いた血漿タンパク質量の検査を行う。具体的に測定するタンパク質は、IgG, IgA, IgM, C3, C4, α1-Anti-tripcin, Transferrin(Tf), α1-Acid Glycoprotein(AAG), Haptoblobin, Ceruloplasmin, α2-macroglobulin。

3.5.2 ELISA 法による血漿タンパク質欠損の確認

3.4.4 のピークレートネフェロメトリー法が検出限界以下であった場合に行う。

3.6　登録後に収集する患者情報

原病、治療内容、妊娠歴、輸血前後の末梢血データ、輸血関連合併症に対する予防処置の内容、製剤への処置（白血球除去、洗浄、濃縮、放射線照射など）、輸血関連合併症の有無とその程度。

3.7　抗血漿タンパク抗体の推移について

可能であれば実施期間内の範囲で引き続き抗体の有無の推移について観察を続ける。

4　実施期間

平成14年10月１日一平成14年12月31日

5　倫理面への配慮ならびに患者への利益と負担について

5.1　倫理面への配慮

患者情報および検体は番号で管理し、個人情報が外部に漏れることはない。また、プライバシーの保護に最大限努める。

本研究への同意は患者の自由意思によるものであり、同意されない場合でも不利益を被ることはない。また、同意された後でも取り消すことが可能である。

5.2　患者への利益と負担について

本研究内容は、非溶血性副作用に対する予防法ならびに治療法を確立していく上で非常に重要な情報になり得るものであるが、登録患者に直接利益をもたらすものではない。本研究に必要な検体は、患者の輸血治療に必要な検査用検体の残りで代用することが可能であり、研究による患者への身体的苦痛、精神的負担、経済的負担は全くない。

別紙1

6　研究参加施設、研究代表者、研究メンバー

6.1　研究参加施設

慶応義塾大学病院輸血センター

同医学部内科

日本赤十字社東京都赤十字血液センター

同中央血液センター

6.2　研究代表者

研究代表者:半田誠

研究メンバー:上村知恵、石田明、森毅彦、横山健次、岡本真一郎、池田康夫
高橋雅彦、中島一格

連絡先:慶應義塾大学病院　輸血センター
住所:〒160-8582　新宿区信濃町35
電話:03-3353-1211(ext62123)FAX:03-3353-9706
e-mail:ishida@sc.itc.keio.ac.jp

別紙1

輸血による抗血漿タンパク抗体出現に関する検討(1)
(観察試験)
患者さんへの説明文書

慶應義塾大学医学部輸血センター
石田　明
半田　誠
慶應義塾大学医学部血液内科
森　毅彦
横山　健次
岡本真一郎
池田　康夫

別紙１

1　本研究の目的と概要

輸血を行うと発熱やじんましんなどのアレルギー症状が出ることがあります。これらの副作用は非溶血性副作用とよばれ、輸血製剤の中に含まれる血液細胞や血しょうと呼ばれる血液の液体成分に含まれるタンパク質（血漿タンパク）が原因になっている可能性がありますが、まだはっきりとしたことはわかっていません。慶應義塾大学病院の輸血センターでは、この非溶血性副作用の原因を調べるために、当病院に輸血製剤を供給している日本赤十字社（中央血液センター、東京都赤十字血液センター）と協力して、輸血を受けられた患者さんの血液に血漿タンパクに対する抗体が産生されているかどうか、またそれが非溶血性輸血副作用に関わっているかどうか、を調べる研究を行っています。

つきましては、あなたの血液を先に述べました研究に使わせていただくようお願い致します。本研究に同意していただいた場合は、あなたの血液の一部をまず当院輸血センターで冷凍保存し、後日、日本赤十字社血液センターでの本研究の検査に使わせていただきます。なお、この研究には、輸血の際にあなたの血液に輸血血液が適合するかどうかを調べるために行う交差適合検査として採血させていただく血液の一部を使わせていただきますので、研究のためだけに採血させていただく必要はありません。また、この研究に関する費用のご負担は全くございません。

2　同意は本人の自由意志によること

本研究に参加されるかどうかの判断は患者さんの自由意思で決めていただきます。強制的なものは全くありません。

3　同意しない場合でも不利益を受けないこと

本研究に参加されることに同意されない場合でも、患者さんに不利益となることは全くありません。

4　同意した後でもいつでも撤回できること

本研究に同意された後でも、いつでも取り消すことが出来ます。

5　個人情報の保護について

研究に提供されました試料からあなたの個人情報が漏れることはありませんし、プライバシーの保護に最大限の努力を払います。

6　研究結果の非通知について

研究結果は通常はお知らせしません。ただし、あなたの血液を用いた研究結果が輸血副作用予防に役立つと考えられた場合は、主治医を通して結果をお知らせすることも考慮させていただきます。

以上の点について不明な点やご質問がございましたら、下記までお問い合わせ下さい。

慶應義塾大学医学部輸血センター 電話:03-3353-1211（代表） 内線 62123
半田　誠　または　石田　明　まで

別紙１

同意書（患者さん保管用）

慶應義塾大学医学部長
北島　政樹　殿

説明を受け理解した項目の□の中に、ご自分でレを付けて下さい。

1　□　本研究の目的と概要
2　□　同意は本人の自由意志によること
3　□　同意しない場合でも不利益を受けないこと
4　□　同意した後でもいつでも撤回できること
5　□　個人情報の保護について
6　□　研究結果の非通知について

私は、本研究の内容について＿＿＿＿＿＿＿＿より、説明文書を用いて上記のレ項目について説明を受けました。つきましては、本研究のために試料を提供ことに同意致します。

同意年月日：　平成　　年　　月　　日

患者住所：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者電話番号：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

所属長：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

説明医師氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

連絡先：　慶應義塾大学医学部（輸血センター、内科学教室）

電話番号：　０３―３３５３―１２１１（内線　＿＿＿　）

別紙１

同意書（診療録保管用）

慶應義塾大学医学部長
北島　政樹　殿

説明を受け理解した項目の□の中に、ご自分でレを付けて下さい。

1　□　本研究の目的と概要
2　□　同意は本人の自由意志によること
3　□　同意しない場合でも不利益を受けないこと
4　□　同意した後でもいつでも撤回できること
5　□　個人情報の保護について
6　□　研究結果の非通知について

私は、本研究の内容について＿＿＿＿＿＿＿＿＿より、説明文書を用いて上記のレ項目について説明を受けました。つきましては、本研究のために試料を提供ことに同意致します。

同意年月日：　平成　　年　　月　　日

患者住所：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者電話番号：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

所属長：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

説明医師氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

連絡先：　慶應義塾大学医学部（輸血センター、内科学教室）

電話番号：　０３―３３５３―１２１１（内線　＿＿＿　）

別紙2

輸血による抗血漿タンパク抗体の出現と推移に関する検討
－ prospective study －

実験計画書

慶應義塾大学医学部輸血センター、血液内科学教室
（2002年10月1日）

別紙２

1　背景

輸血患者では、一定の頻度で血漿中に抗血漿タンパク抗体が出現することが知られており、非溶血性副作用の原因のひとつと考えられている。しかしながら、輸血後の抗血漿タンパク抗体の出現およびその後の推移について詳細に検討した報告はない。

2　目的

輸血歴による抗血漿タンパク抗体の発現の経緯、ならびに輸血関連合併症との関連について検討する。

3　方法

3.1　対象

慶應義塾大学病院血液内科に通院加療中の血液疾患患者のうち、過去に輸血歴がなく、今後複数回の輸血を受ける可能性が高い、文書で同意の得られた例。

3.2　登録時に必要な患者情報

年令、性別、妊娠歴、輸血歴（輸血副作用歴）、造血幹細胞移植歴、診断名、病期、現在の治療内容、投与中の薬剤、不規則抗体の有無など。

3.3　検体の採取・保存

3.3.1患者検体

輸血オーダー時に提出されたクロスマッチ用検体の一部を採血後６時間以内に遠心分離し、得られた血清をセラムチューブに分注して冷凍保存する(-20℃以下)。

3.3.2輸血血液製剤

クロスマッチ用として準備されているサンプルの残りを遠心分離し、得られた血清をセラムチューブに分注して冷凍保存する（-20℃以下)。

3.4　抗血漿タンパク抗体の検査

後日サンプルを用いて日本赤十字中央血液センターで抗血漿タンパク抗体を測定する。

3.4.1オクタロニー法（スクリーニング検査)

患者血清と輸血血液製剤との間でオクタロニー法を行う。沈降線が観察された場合は免疫電気泳動により確認検査を行う。

3.4.2ELISA法による抗体の同定

オクタロニー法が陽性であった場合、以下の 15 種類の精製抗原を用いたELISAを行い、精製抗原に対する抗体の有無を確認する。

＊精製抗原：Haptoglobin, Transferrin(Tf), α1-Acid Glycoprotein(AAG), IgA,C4, C9, Ceruloplasmin, Fibrinogen, α2-macroglobulin, Protein C, Protein S, Plasminogen, Anti-thrombin III, β2-Glycoprotein, α2-HS-Glycoprotein。

3.4.3ウエスタンブロット法による検出抗体の確認

ELISA 法が繰り返し陽性であった場合、精製抗原をポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離後 PVDF 膜に転写し、患者血清と混ぜ、HRP 標識抗ヒト IgG 抗体との反応およびECL反応により抗体を検出する。

3.5　血漿タンパク量の測定

3.5.1ピークレートネフェロメトリー法によるタンパク量の測定

BECKMAN IMAGE を用いた血漿タンパク質量の検査を行う。具体的に測定するタンパク質は、IgG, IgA, IgM, C3, C4, α1-Anti-tripcin, Transferrin(Tf), α1-Acid Glycoprotein(AAG), Haptoblobin, Ceruloplasmin, α2-macroglobulin。

3.5.2ELISA 法による血漿タンパク質欠損の確認

3.4.4 のピークレートネフェロメトリー法が検出限界以下であった場合に行う。

3.6　登録後に収集する患者情報

原病、治療内容、妊娠歴、輸血前後の末梢血データ、輸血関連合併症に対する予防処置の内容、製剤への処置（白血球除去、洗浄、濃縮、放射線照射など）、輸血関連合併症の有無とその程度。

4　実施期間および目標登録患者数

4.1　実施期間

平成１４年１０月１日～平成１５年３月３１日予定

4.2　登録症例数

５０例。ただし副作用陽性例が２０例に満たない可能性がある場合は、引き続き研究を継続することを検討する。

5　倫理面への配慮ならびに患者への利益と負担について

5.1　倫理面への配慮

患者情報および検体は番号で管理し、個人情報が外部に漏れることはない。また、プライバシーの保護に最大限努める。

本研究への同意は患者の自由意思によるものであり、同意されない場合でも不利益を被ることはない。また、同意された後でも取り消すことが可能である。

5.2　患者への利益と負担について

本研究内容は、非溶血性副作用に対する予防法ならびに治療法を確立していく上で非常に重要な情報になり得るものであるが、登録患者に直接利益をもたらすものではない。本研究に必要な検体は、患者の輸血治療に必要な検査用検体の残りで代用することが可能であり、研究による患者への身体的苦痛、精神的負担、経済的負担は全くない。

別紙２

6　研究参加施設、研究代表者、研究メンバー

6.1　研究参加施設

慶応義塾大学病院輸血センター

同医学部内科

日本赤十字社東京都赤十字血液センター

日本赤十字社中央血液センター

6.2　研究代表者、研究メンバー、連絡先

研究代表者：半田　誠

研究メンバー：上村知恵、石田明、森毅彦、横山健次、岡本真一郎、池田康夫
高橋雅彦、中島一格

連絡先：慶應義塾大学　輸血センター

住所：〒160-8582　新宿区信濃町３５

電話：03-3353-1211(ext62123)FAX：03-3353-9706

e-mail：ishida@sc.itc.keio.ac.jp

別紙２

輸血による抗血漿タンパク抗体出現に関する検討（２）

（前方視的試験）

患者さんへの説明文書

慶應義塾大学医学部輸血センター

石田　明

半田　誠

慶應義塾大学医学部血液内科

森　毅彦

横山　健次

岡本真一郎

池田　康夫

別紙２

1　本研究の目的と概要

輸血を行うと発熱やじんましんなどのアレルギー症状が出ることがあります。これらの副作用は非溶血性副作用とよばれ、輸血製剤の中に含まれる血液細胞や血しょうと呼ばれる血液の液体成分に含まれるタンパク質（血漿タンパク）が原因になっている可能性がありますが、まだはっきりとしたことはわかっていません。慶應義塾大学病院の輸血センターでは、この非溶血性副作用の原因を調べるために、当病院に輸血製剤を供給している赤十字血液センターと協力して、輸血を受けられた患者さんの血液に血漿タンパクに対する抗体が産生されているかどうか、またそれが非溶血性輸血副作用に関わっているかどうか、を調べる研究を行っています。

これからあなたがお受けになる治療過程で、輸血が必要となる可能性があります。あなたの血液を輸血前後に調べていくことで、輸血製剤中の血漿タンパクに対する抗体の出現状況やその経緯、非溶血性副作用との関係を明らかにできればと考えています。つきましては、あなたの血液を先に述べました研究に使わせていただくようお願い致します。本研究に同意していただいた場合は、あなたの血液の一部をまず当院輸血センターで冷凍保存し、後日、日本赤十字社血液センターでの本研究の検査に使わせていただきます。なお、この研究には、輸血の際にあなたの血液に輸血血液が適合するかどうかを調べるために行う交差適合検査として採血させていただく血液の一部を使わせていただきますので、研究のためだけに採血させていただく必要はありません。また、この研究に関する費用のご負担は全くございません。

2　同意は本人の自由意思によること

本研究に参加されるかどうかの判断は患者さんの自由意思で決めていただきます。強制的なものは全くありませんので心配ありません。

3　同意しない場合でも不利益を受けないこと

本研究に参加されることに同意されない場合でも、患者さんに不利益となることは全くありませんので、心配ありません。

4　同意した後でもいつでも撤回できること

本研究に同意された後でも、いつでも取り消すことが出来ます。

5　個人情報の保護について

研究に提供されました試料からあなたの個人情報が漏れることはありませんし、プライバシーの保護に最大限の努力を払います。

6　研究結果の非通知について

研究結果は通常はお知らせしません。ただし、あなたの血液を用いた研究結果が輸血副作用予防に役立つと考えられた場合は、主治医を通して結果をお知らせすることも考慮させていただきます。

以上の点について不明な点やご質問がございましたら、下記までお問い合わせ下さい。

別紙２

慶應義塾大学医学部輸血センター 電話：03-3353-1211（代表）　内線 62123
半田　誠　または　石田　明　まで

別紙２

同意書（患者さん保管用）

慶應義塾大学医学部長
北島　政樹　殿

説明を受け理解した項目の□の中に、ご自分でレを付けて下さい。

1　□　本研究の目的と概要
2　□　同意は本人の自由意志によること
3　□　同意しない場合でも不利益を受けないこと
4　□　同意した後でもいつでも撤回できること
5　□　個人情報の保護について
6　□　研究結果の非通知について

私は、本研究の内容について＿＿＿＿＿＿＿＿＿より、説明文書を用いて上記のレ項目について説明を受けました。つきましては、本研究のために試料を提供ことに同意致します。

同意年月日：　平成　　年　　月　　日

患者住所：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者電話番号：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者氏名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

所属長：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

説明医師氏名：＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

連絡先：　慶應義塾大学医学部（輸血センター、内科学教室）

電話番号：　０３－３３５３－１２１１（内線　＿＿＿　）

別紙２

同意書（診療録保管用）

慶應義塾大学医学部長
北島　政樹　殿

説明を受け理解した項目の□の中に、ご自分でレを付けて下さい。

1　□　本研究の目的と概要
2　□　同意は本人の自由意志によること
3　□　同意しない場合でも不利益を受けないこと
4　□　同意した後でもいつでも撤回できること
5　□　個人情報の保護について
6　□　研究結果の非通知について

私は、本研究の内容について＿＿＿＿＿＿＿＿＿より、説明文書を用いて上記のレ項目について説明を受けました。つきましては、本研究のために試料を提供ことに同意致します。

同意年月日：　平成　　年　　月　　日

患者住所：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者電話番号：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

患者氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

所属長：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

説明医師氏名：　＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿＿

連絡先：　慶應義塾大学医学部（輸血センター、内科学教室）

電話番号：　０３―３３５３―１２１１（内線　＿＿＿　）

分担研究報告書

輸血関連急性肺障害(TRALI)に関する基礎的、臨床的研究

分担研究者： 岡崎　仁(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)
研究協力者： 西村元子(東京都赤十字血液センター)
　　　　　　渡辺嘉久(日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所)

研究要旨

【目的】輸血、特に緊急時の大量輸血は急性肺障害の原因としてかなり以前より認識されていたが、その原因についてははっきりとした究明はなされていなかった。近年の検査精度の向上による輸血感染症の減少、適正な輸血医療の推進による輸血過誤の減少とともに、非溶血性副作用の中でも時には死に至る可能性もある輸血関連急性肺障害(TRALI: Transfusion Related Acute Lung Injury)がクローズアップされてきている。世界的に見ても TRALI の認識度はかなり高まってきており、アメリカでは FDA(Food and Drug Administration)が 2001 年に TRALI に関する警告文を発しており、TRALI は 2001 年から 2003 年の 3 年間では輸血関連死亡の第 1 位にランクされている。さらに 2004 年には Towards an understanding of TRALI Consensus Conference と題された国際会議がカナダで開かれ、そこで議論された TRALI の診断基準が発表された。今年度はその診断基準に沿った TRALI 症例の詳細な検討を行うこととした。

TRALI の成因に好中球が重要な役割を果たしていることはまず間違いないが、もともと何の炎症もない肺に急性の傷害が起こるためには、好中球が肺毛細血管に捕捉される様な機序が働くか、もしくは肺毛細血管周辺において好中球を引きつけるような機序が働く必要がある。HLA class I 抗原や HNA 抗原は好中球表面上に発現しており、抗体の特異性が一致し反応をおこすことで、好中球表面上の接着分子の発現や好中球の変形能の低下を招き、肺毛細血管に捕捉された好中球は血管内皮を傷害し、肺水腫を引き起こす可能性がある。それに反して、HLA class II 抗原は通常好中球表面上には発現していない。HLA class II 抗体のみ認められるドナーの血液で起こった TRALI 症例も存在することより、HLA class II 抗原を発現している血球として単球に注目し、肺毛細血管内皮細胞との相互作用も含め、実験的検討も併せて行うこととした。

【方法】1. 1997 年より 2004 年までに報告された非溶血性副作用のうち呼吸困難を呈し、肺障害が考えられる症例を新たに提唱された診断基準に従って、TRALI 確診例、および TRALI 疑診例に再分類し、それぞれにおいてその臨床的特徴、抗白血球抗体の種類と頻度について再検討した。HLA 抗体に関しては従来の Lymphocyte Cytotoxicity Test(LCT)で検出できなかった抗体がビーズ法により鋭敏に検出できるようになってきており、過去の検体も含め再検査を行い、より正確な抗体検出の頻度を算出した。

2. TRALI 機序の解明のための *in vitro* の実験系を構築し、その詳細について検討した。好中球遊走を促進する物質として、比較的早期に産生、放出される Leukotriene B_4 を指標とした。その産生細胞として HLA class II 抗原を表面上に発現しており、輸血後に流血中で反応する可能性がある単球を HLA DR2(もしくは DR15)に特異性のある抗体をもつ血清を使用し、肺毛細血管内皮細胞との相互作用により産生の亢進が見られるかどうかを検討した。

【結果と考察】1997 年より 2004 年の間に日本赤十字社に報告された呼吸困難症例を、診断基準に従って再分類し、99 例の TRALI 確診例と 27 例の TRALI 疑診例を診断した。TRALI の診断基準では輸血後 6 時間以内に起こるとされているが、TRALI 確診例、TRALI 疑診例とも発症時間は輸血後 2 時間以内が多かった。TRALI 確診例のドナーの半数に抗白血球抗体が認められたが、TRALI 疑診例ではドナーの抗白血球抗体の陽性率は約 30%であり、TRALI 確診例の陽性率よりやや低めであった。
TRALI の発症機序についての *in vitro* の実験系を構築した。特異性の決定している HLA class Ⅱ抗体を含む血清をその抗原を発現している単球と、肺毛細血管内皮細胞と共培養すると有意に Leukotriene B_4 の上清中への遊離が見られ、さらに単球表面上の接着分子の発現も有意に上昇した。肺毛細血管内皮細胞上の接着分子の発現も併せて上昇が見られた。肺毛細血管内皮細胞の傷害の程度はそれほどでもなかったが、一部 apoptosis が認められた。

A.研究目的

輸血、特に緊急時の大量輸血は急性肺障害の原因としてかなり以前より認識されていたが、その原因についてははっきりとした究明はなされていなかった。近年の検査精度の向上による輸血感染症の減少、適正な輸血医療の推進による輸血過誤の減少とともに、非溶血性副作用の中でも時には死に至る可能性もある輸血関連急性肺障害(TRALI: Transfusion Related Acute Lung Injury)がクローズアップされてきている。世界的に見ても TRALI の認識度はかなり高まってきており、アメリカでは FDA(Food and Drug administration)が 2001 年に TRALI に関する警告文を発しており、TRALI は 2001 年から 2003 年の 3 年間では輸血関連死亡の第 1 位にランクされている [1]。さらに 2004 年には Towards an understanding of TRALI Consensus Conference と題された国際会議がカナダで開かれ、そこで議論された TRALI の診断基準が発表された [2,3]。今年度はその診断基準に沿った TRALI 症例の詳細な検討を行うこととした。

TRALI の成因に好中球が重要な役割を果たしていることはまず間違いないが、もともと難の炎症もない肺に急性の傷害が起こるためには、好中球が肺毛細血管に捕捉される様な機序が働くか、もしくは肺毛細血管周辺において好中球を引きつけるような機序が働く必要がある。抗白血球抗体が TRALI の発生機序に関わっている可能性が指摘されているが、その詳細については未解明な部分も多い。HLA class Ⅰ抗原や HNA 抗原は好中球表面上に発現しており、抗体の特異性が一致し反応をおこせば、好中球表面上の接着分子の発現や好中球の変形能の低下を招き、肺毛細血管に捕捉された好中球は血管内皮を傷害し、肺水腫を引き起こす可能性がある。それに反して、HLA class Ⅱ抗原は通常好中球表面上には発現していない [4]。しかし最近、HLA class Ⅱ抗体を TRALI の原因とする報告が相次いでいる [5-9]。日本でも HLA class Ⅱ抗体のみ認められるドナーの血液で起こった TRALI 症例も存在することより、HLA class Ⅱ抗原を発現している血球として単球に注目し、肺毛細血管内皮細胞との相互作用も含め、実験的検討を行うこととした。

また、TRALI をおこす可能性の高い好中球抗体の一つである HNA-3a 抗体に関してその対応抗原が未だ同定されておらず、その抗原同定に関する検討も施行中である。

B.研究方法

1. 1997 年より 2004 年までに報告された非溶血性副作用のうち呼吸困難を呈し、肺障害が考えられる症例を新たに提唱された診断基準に従って、TRALI 確診例、および TRALI 疑診例に再分類し、それぞれにおいてその臨床的特徴、抗白血球抗体の種類と頻度について再検討した。

HLA 抗体に関しては従来の LCT で検出できなかった抗体がビーズ法（FlowPRA®）により鋭敏に検出できるようになってきており、過去の検体も含め再検査を行い、より正確な抗体検出の頻度を算出した。

2. TRALI 機序の解明のための *in vitro* の実験系を構築し、その詳細について検討した。使用した血清は、1)TRALI の原因製剤由来、抗 HLA class II DR15(DR2 subtype)特異的抗体陽性血清(DS 301)、2)健常人由来血清プール中から検出した抗 HLA class II DR2 特異的抗体陽性血清(NH 124)、および 3) 抗 HLA class II 抗体陰性健常人由来血清(NH 129)の 3 種である。HLA class II DR2 陽性あるいは陰性単球は健常人末梢血よりプラスチックシャーレ吸着法にて分離した。単層培養ヒト肺毛細血管内皮細胞(human Lung Microvascular Endothelial cells: LME)、血清および単球の共培養（37℃、1 時間）上清中の Leukotriene B_4(LTB_4)の濃度は ELISA で測定した。37℃、1 時間血清処理による単球細胞表面上の接着因子(CD11/CD18)の発現、及び単球存在下での 37℃、1 時間血清処理による LME 表面上の接着因子(VCAM-1)の発現はマウス抗ヒトモノクローナル抗体と蛍光標識抗マウス IgG を用いてフローサイトメトリーで調べた。室温 30 分処理による血清中 IgG の LME への結合は、蛍光標識ヤギ抗ヒト IgG を用いてフローサイトメトリーにて調べた。単層 LME、DS 301 および HLA class II DR2 陽性単球に、単球と同一ドナー由来の好中球を加え 37℃、1 時間培養後の上清を浮遊 LME に処理（37℃、1 時間）した時の LME のアポトーシスは、蛍光標識 Annexin V の結合を指標とし、フローサイトメトリーで測定した。

C.研究結果

1. 1997 年から 2004 年までに報告された呼吸困難症例のうち TRALI の診断基準に従って再分類した。過去 8 年間で、99 例の TRALI 確診例と 27 例の TRALI 疑診例を診断した。（図 1）TRALI の診断基準では発症時間は輸血終了後6時間以内とされているが、TRALI 確診例における解析では発症時間は輸血後 2 時間以内が多かった。（図 2）TRALI 確診例については患者の年齢は中央値 66 才、男女比は 61:38、症状として多かったのは呼吸困難以外では発熱、低血圧、咳および喀痰であった。TRALI 確診例ではそのドナーの半数に抗白血球抗体が認められ、そのドナーの約 8 割は 30 代以上の女性であった。TRALI 疑診例では患者の年齢の中央値は 69 才、男女比は 14:13、疑診例とした際の ALI の危険因子は、肺炎、敗血症がほとんどを占め、外傷と心肺バイパスの例もあった。TRALI 疑診例ではドナーの抗白血球抗体の陽性率は約 30% であり TRALI 確診例のドナーの陽性率よりはやや低めであった。抗体の詳細は表1，2に示す。

2. TRALI の発生機序に関する実験的検討の結果を次に述べる。

〔1〕単層 LME、血清および単球の共培養上清中の LTB_4 濃度は、HLA class II DR2 陽性単球を用いた場合、DS 301 で有意に高かった(Figure 1)。これに対し、HLA class II DR2 陰性単球を用いた場合、LTB_4 濃度は有意に低かった(Figure 1)。

〔2〕単層 LME、DS 301 および HLA class II DR2 陽性単球の共培養上清への LTB_4 遊離は培養開始から3時間以内でほぼ完結していた(Figure 2)。

〔3〕LME 存在下、37℃1 時間血清処理による単球 (Figure 3, Region A) 細胞表面上の接着因子(CD11/CD18)の発現は、DS 301 処理で有意に高かった(Figure 4, solid lines; shadows: negative control)。また、HLA class II DR2 陽性単球存在下、DS 301 処理（37℃、1 時間）で LME (Figure 5, Region B) 表面上の接着因子(VCAM-1)の有意に高い発現が認められた(Figure 6, solid lines; shadows: negative control)。

〔4〕室温 30 分処理により、NH 124(Figure 7, right solid line)に比較し DS 301(Figure 7, left