

solid line)処理で血清中 IgG の有意に高い LME への結合が見られた。(shadows: negative control)。

[5] 単層 LME、DS 301、HLA class II DR2 陽性単球、および好中球の共培養上清を LME に処理(37°C、1 時間)した後、軽度ではあるが LME への Annexin V の結合が認められた(Figure 8, solid line; shadow: Annexin V 処理無し)。

D. 考察

TRALI を診断基準に従って分類、診断し、過去 8 年間の日本赤十字社に報告された呼吸困難症例の中より TRALI 確診例、TRALI 疑診例を抽出し、それぞれについて詳細な検討を行った。以前に行った検討では、診断基準に照らし合わせると TRALI とは診断できなくなってしまうものもあり、この規模の後方視的研究は世界的に見ても初の試みである。抗白血球抗体は TRALI 確診例ではドナーの半数が陽性であり、有意に他の副作用症例におけるドナーの陽性率より高かった。TRALI 疑診例のドナーの陽性率もやや高い傾向があった。逆に患者側の抗体の抗白血球抗体陽性率はどの場合でも約 3 割であり、これは頻回に輸血を受けている患者が、輸血により感作されていることが多いためではないかと推察される。ドナーの血清と患者の白血球のクロスマッチもできる限り行うようにしているが、症例数が少なくさらなる検討が必要である。患者の抗体とドナーの白血球のクロスマッチを行うためにはもう一度ドナーを呼び出して採血させて頂くこととなり、現実的にはなかなか難しい。TRALI 確診例の約半数、TRALI 疑診例の約 4 分の 3 が抗白血球抗体陰性であり、このことは Silliman らが提唱するような非免疫的 TRALI の存在を暗示するものなのか、もしくは同じような病態を示す他の現象を見ているのか、TRALI の発症要因を明らかにすることにより今後検討していかねばならない課題である¹⁰。これまで報告された Lookback study の結果を見ると特異的抗体を持ったドナーでも受血者に TRALI をおこ

す確率はそれほど高くないことが示唆されており、なかには特異性が一致していたにもかかわらず発症していないような例もあり、患者側の要因として原疾患、喫煙歴、治療方法、投薬内容などを詳しく調べていくことも今後重要になっていくと考えられる¹¹⁻¹⁴。

TRALI 発症の仮説の実験的検証において以下のような可能性が示唆された。抗 HLA class II DR 抗体陽性血清は、対応する HLA class II DR を発現する単球存在下、LME との相互作用で LTB₄ 遊離を促し、好中球の遊走を促進する可能性が示唆された。しかも TRALI を発症させた血清は有意に高い単球刺激作用を有しており、この反応性の違いが TRALI 発症の引き金の強さに関与しているかどうかは今後例数を増やして検討していかねばならない。また、抗 HLA class II DR 抗体陽性血清は、単球、LME 両者の細胞表面接着因子の発現を増加させ、これらの相互作用を効率良く促進させることが考えられる。以前よりエンドトキシン

(Lipopolysaccharide:LPS)を使用した急性肺障害の動物モデルでは単球の肺への集積、さらに TNF- α (tumor necrosis factor α)、特に膜型の TNF- α による血管内皮の傷害が重要な役割を果たしていることは知られているが、TRALI の原因としてもこのような機序が関わっている可能性が示唆された^{15, 16}。さらに、好中球を加えた共培養上清が軽度ではあるが LME のアポトーシスを引き起こすことから、この系において LME の脆弱化が誘起されることが示唆された。血管内皮の傷害は血管透過性亢進のみならず、血管内皮細胞由来の血管内皮保護作用を持つ物質の産生減少にもつながり、急性肺障害の進展に寄与する可能性がある。

E. 研究発表

1) 論文発表

1. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺傷害の病態, 早期診断, 予防と治療: 日本集中治療医学会雑誌 13: 3-6, 2006

2. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害: 検査と技術、医学書院 33(13): 1536-1539, 2005
 3. 岡崎 仁: わが国における輸血関連急性肺障害 (TRALI) の発生状況とその原因についての解析 (第 22 回急性呼吸不全に関する研究会: 研究会抄録) 呼吸、レスピレーション リサーチ ファウンデーション 24(12): 1051-1054, 2005
 4. 岡崎 仁, 高橋孝喜: 輸血関連急性肺障害 (TRALI): 総合臨牀、永井書店 54(6): 1744-1751, 2005
 5. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害: 日本輸血学会雑誌 (印刷中, 2006)
 6. H Okazaki: International Forum, Haemovigilance Vox Sang (in press, 2006)
- 2) 学会、研究会発表
1. H Okazaki, Y Watanabe, T Mazda, S Hashimoto, H Kamata, K Ikeda, K Tadokoro, T Juji: Reevaluation of TRALI cases based on the recommended criteria. 15th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Europe (Athens, Greece) (July/4/2005) (Abstract M-PA-016), Vox Sang 89(Supple 1): 13, 2005
 2. Y Watanabe, HN Kamata, S Hashimoto, T Mazda, H Okazaki, S Inaba, T Juji: White Blood Cell Antibodies Detected In Donor Blood In Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) Cases In Japan. 58th Annual Meeting of the American Association of Blood Banks (aaBB) (Seattle, USA) (Oct/15-18/2005) (Abstract SP179) Transfusion 45(Supple 3): 83A, 2005
 3. S Hashimoto, F Nakajima, Y Watanabe, H Kamada, T Matsuda, H Okazaki, T Juji: Approaches to anti-HLA antibody screening system for transfusion-related acute lung injury. 16th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Asia (Bangkok, Thailand) (Nov/12-15/2005) (Abstract 5P-121) Vox Sang 89(Supple 2): 58, 2005
 4. H Okazaki, T Juji: Clinical Haemovigilance in Japan. 8th European Haemovigilance Seminar (Porto, Portugal) (Feb/9/2006) 2006
 5. 岡崎 仁: スポンサーシップシンポジウム 4 免疫性輸血副作用について, S4-1 TRALI (センターの解析). 第 53 回日本輸血学会総会 (千葉) (平成 17 年 5 月 26 日)
 6. 橋本志歩, 中島文明, 中村淳子, 渡辺嘉久, 鎌田裕美, 松田利夫, 赤座達也, 岡崎 仁, 十字猛夫: 一般演題 O18 抗 HLA 抗体の特異性決定の同定における LABScreenPRA 法と LCT, AHG-LCT 法との比較. 第 53 回日本輸血学会総会 (千葉) (平成 17 年 5 月 28 日)
 7. 西村元子, 高梨美乃子, 岡崎 仁, 佐竹正博: 一般演題 O34 健常人中のイムノグロブリン M(IgM) と好中球による肺毛細血管内皮細胞の傷害: 輸血関連急性肺傷害発症機序のモデルとして. 第 53 回日本輸血学会総会 (千葉) (平成 17 年 5 月 28 日)
 8. 鎌田裕美, 渡辺嘉久, 玉井豊広, 橋本志歩, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫: 一般演題 P133 磁性体粒子を使用した MPHA 法 (M-MPHA) による抗顆粒球抗体の検出. 第 53 回日本輸血学会総会 (千葉) (平成 17 年 5 月 27 日)

9. 岡崎 仁:TRALIについて. 第8回石川県輸血懇話会(金沢)(平成17年6月11日)
10. 岡崎 仁:シンポジウムⅢ 非溶血性輸血副作用の現状 SYⅢ-4 わが国におけるTRALIの現状. 第29回日本血液事業学会総会(仙台)(平成17年10月14日)
11. 西村元子, 高梨美乃子, 石川善英, 岡崎 仁, 佐竹正博, 中島一格:R10 輸血製剤中の液性因子が関わる輸血関連急性肺障害の発生機序に関する検討. 第29回日本血液事業学会総会(仙台)(平成17年10月14日)
12. 鎌田裕美, 渡辺嘉久, 橋本志歩, 中島文明, 嶋田英子, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫:一般演題 99 非溶血性輸血副作用惹起症例における抗顆粒球(好中球)抗体の検査. 第29回日本血液事業学会総会(仙台)(平成17年10月13日)
13. 岡崎 仁:輸血関連急性肺傷害(TRALI)について. 第17回長野県輸血懇話会(長野)(平成17年11月5日)
14. 岡崎 仁:TRALIの臨床像. 第14回赤十字血液シンポジウム(岡山)(平成18年2月25日)
3. Goldman M, Webert KE, Arnold DM, Freedman J, Hannon J, Blajchman MA. Proceedings of a consensus conference: towards an understanding of TRALI. *Transfus Med Rev* 2005; 19:2-31.
4. Hansch GM, Wagner C. Expression of MHC class II antigen and coreceptor molecules in polymorphonuclear neutrophils. *Chem Immunol Allergy* 2003; 83:45-63.
5. Kopko PM, Paglieroni TG, Popovsky MA, Muto KN, MacKenzie MR, Holland PV. TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion* 2003; 43:177-84.
6. Kopko PM, Popovsky MA, MacKenzie MR, Paglieroni TG, Muto KN, Holland PV. HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2001; 41:1244-8.
7. Kao GS, Wood IG, Dorfman DM, Milford EL, Benjamin RJ. Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion* 2003; 43:185-91.
8. Varela M, Mas A, Nogues N, Escorsell A, Mazzara R, Lozano M. TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion* 2002; 42:1102.
9. Flesch BK, Neppert J. Transfusion-related acute lung injury caused by human leucocyte antigen class II antibody. *Br J Haematol* 2002; 116:673-6.
10. Silliman CC, Boshkov LK, Mehdizadehkashi Z, et al. Transfusion-related acute lung injury: epidemiology and a prospective analysis of etiologic factors. *Blood* 2003; 101:454-62.
- 参考文献
1. Holness L. Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI) - The FDA Current View: Food and Drug Administration Blood Products Advisory Committee, 2004.
2. Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al. Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 2004; 44:1774-89.

11. Kopko PM, Marshall CS, MacKenzie MR, Holland PV, Popovsky MA. Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. *Jama* 2002; 287:1968-71.
12. Win N, Ranasinghe E, Lucas G. Transfusion-related acute lung injury: a 5-year look-back study. *Transfus Med* 2002; 12:387-9.
13. Nicolle AL, Chapman CE, Carter V, Wallis JP. Transfusion-related acute lung injury caused by two donors with anti-human leucocyte antigen class II antibodies: a look-back investigation. *Transfus Med* 2004; 14:225-30.
14. Toy P, Hollis-Perry KM, Jun J, Nakagawa M. Recipients of blood from a donor with multiple HLA antibodies: a lookback study of transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 2004; 44:1683-8.
15. Doherty DE, Downey GP, Schwab B, 3rd, Elson E, Worthen GS. Lipopolysaccharide-induced monocyte retention in the lung. Role of monocyte stiffness, actin assembly, and CD18-dependent adherence. *J Immunol* 1994; 153:241-55.
16. O'Dea KP, Young AJ, Yamamoto H, Robotham JL, Brennan FM, Takata M. Lung-marginated monocytes modulate pulmonary microvascular injury during early endotoxemia. *Am J Respir Crit Care Med* 2005; 172:1119-27.

図 1. TRALI 確診例と TRALI 疑診例の年次推移

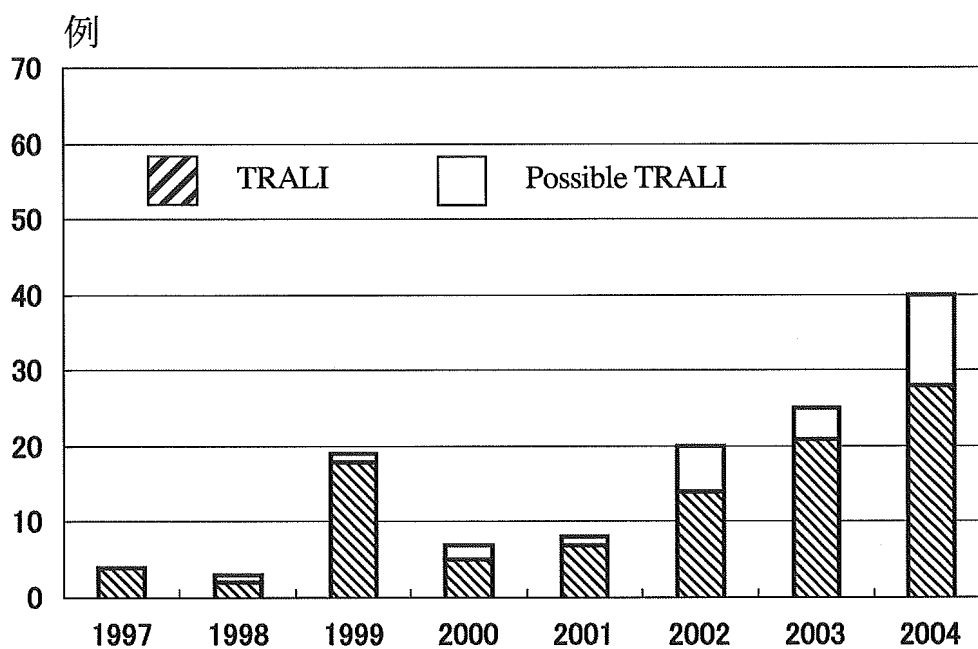


図 2. TRALI 確診例における発症時間

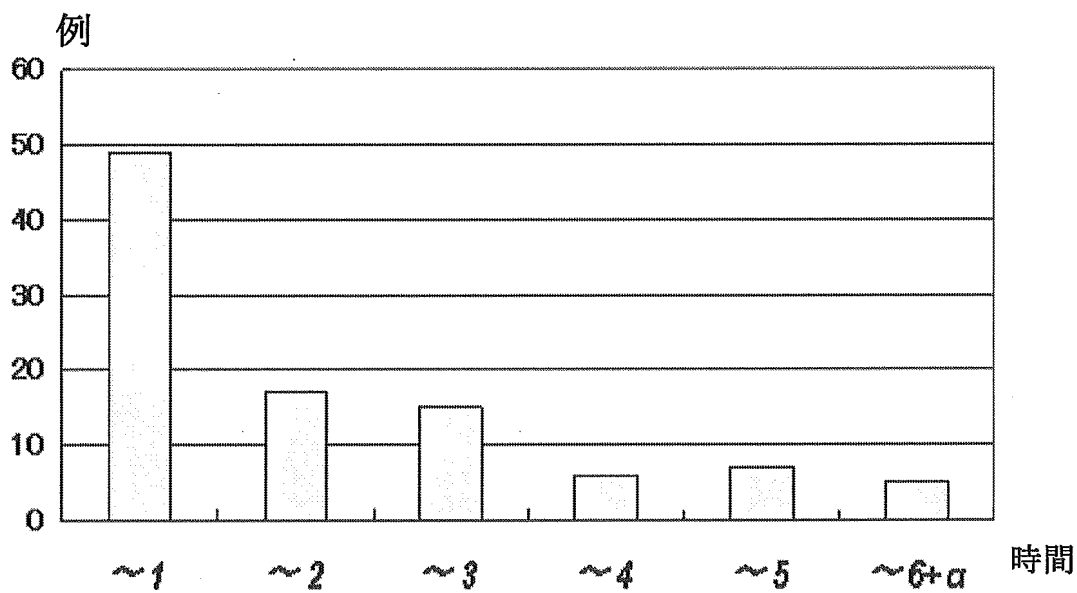


表 1. ドナーと患者に認められた抗白血球抗体の頻度

	TRALI	Possible TRALI	Other transfusion reactions
Donor	46/92(50%)	7/25(28%)	52/352(15%)
Recipient	36/95(38%)	5/24(21%)	160/442(36%)

表 2. 抗白血球抗体の詳細

	TRALI	possible TRALI	Other transfusion reactions
HLA class I	4	2	12
HLA class II	10	0	7
HLA class I+II	14	2	13
HNA	9	2	17
HNA+HLA class I	4	1	0
HNA+HLA class II	1	0	2
HNA+HLA class I+II	4	0	1
Total	46	7	52

Figure 1

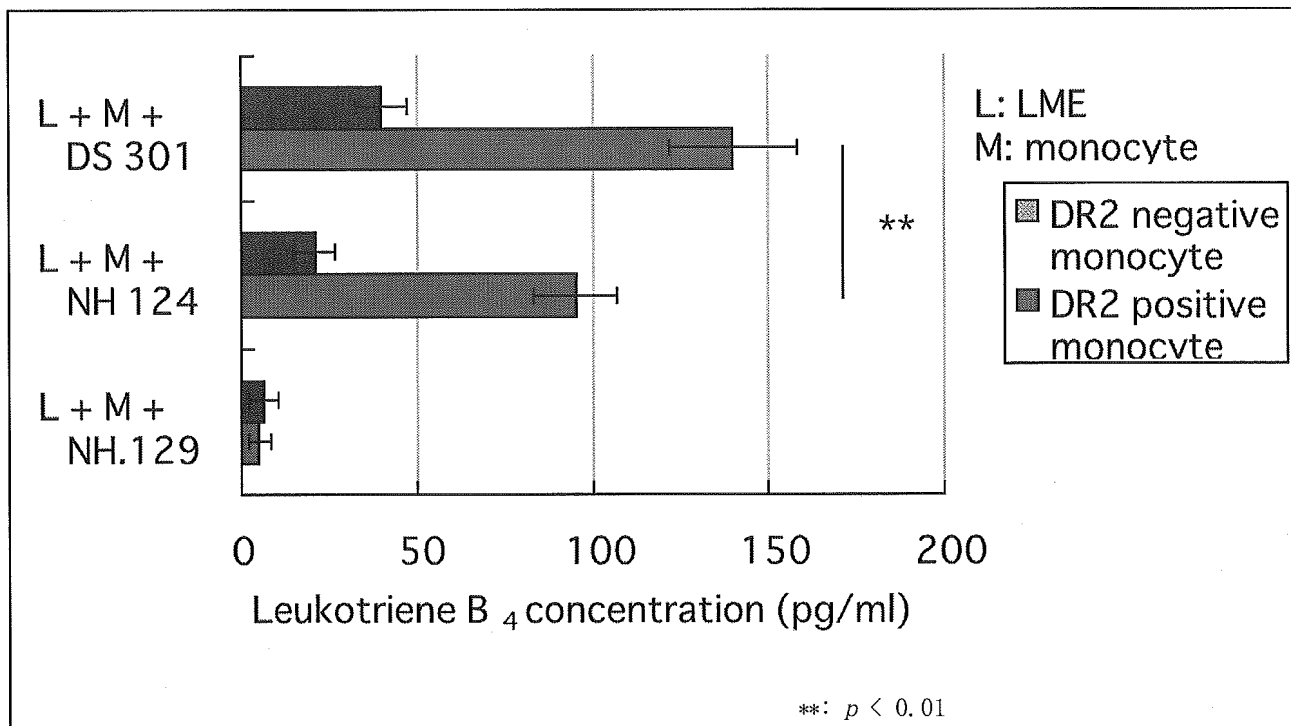


Figure 2

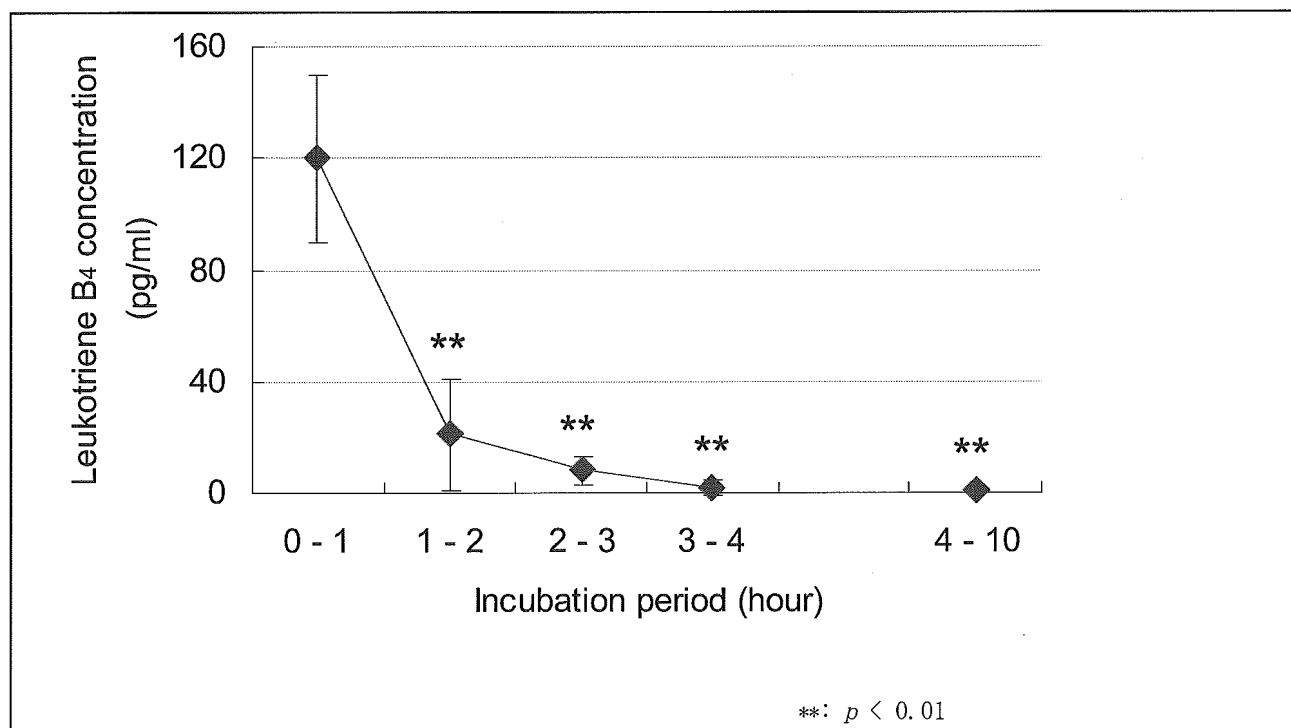


Figure 3

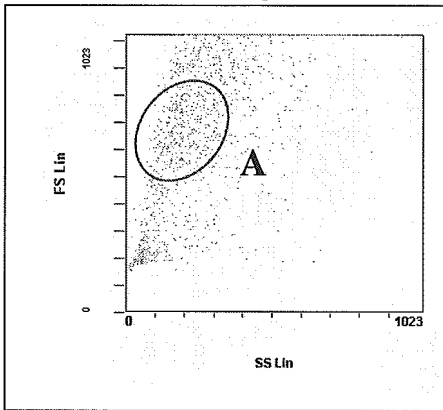


Figure 4

CD11/CD18 expression

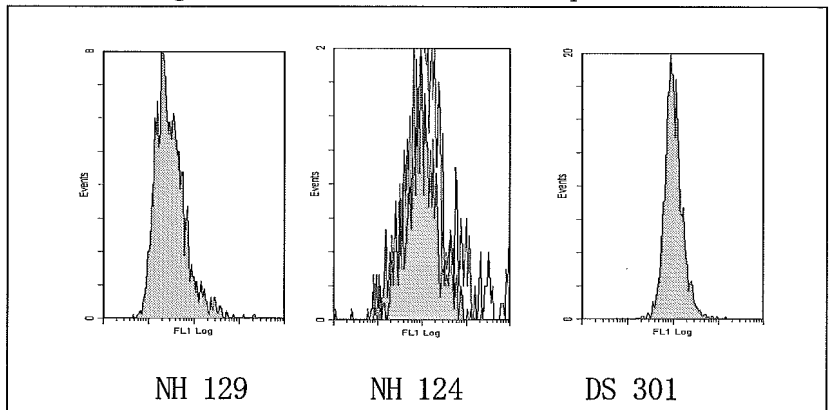


Figure 5

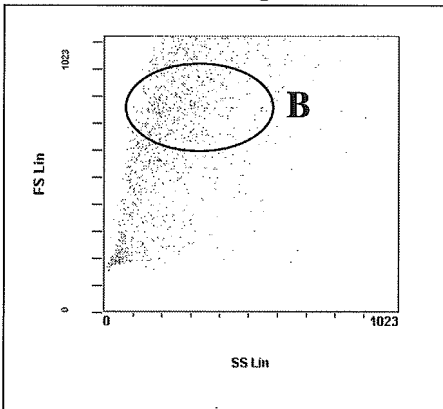


Figure 6

VCAM-1 expression

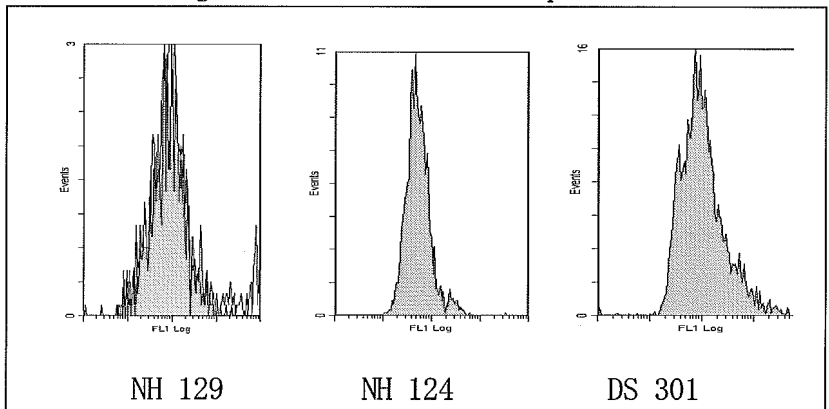


Figure 7

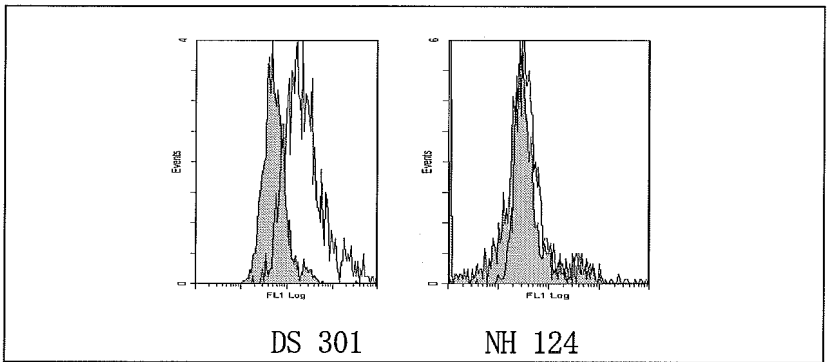
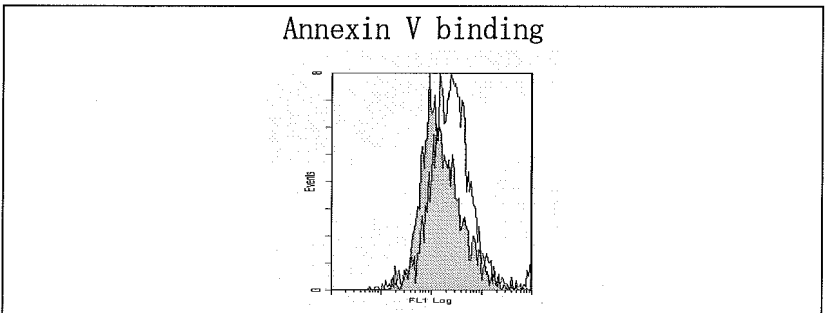


Figure 8

Annexin V binding



分担研究報告書

TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の樹立(好中球、T/Bリンパ球、単球、血小板の5細胞系統を対象とした FCM 法による白血球抗体の検出系の樹立)

研究協力者: 平山文也(大阪府赤十字血液センター)

研究要旨

【目的】 TRALI などの輸血副作用の原因のひとつとして抗白血球抗体の存在が報告されており、その検出系として FCM 法が広く用いられている。これまでに報告されている FCM 法は好中球、単球においてはバックグラウンドが高く、特に単球では高バックグラウンドの原因となる Fc γ RI の除去が前処置として必要と言われ、欠点も多い検出系である。また、抗体の特異性の確認には、好中球、単球のみならず T/B リンパ球や血小板に対する反応性の確認もしばしば必要となる。本研究では、低バックグラウンドでしかも前述5系統の細胞を同時に試験対象とできる改良 FCM 法の樹立を試みた。

【方法】 1) EDTA 採血した全血に試験血清を加え反応させ、洗浄後、FITC-ヤギ抗ヒト IgG で染色する。2) 同検体を洗浄後、2次抗体の残余結合部位をマウス血清でブロックし、PE-抗 CD4、PE-抗 CD20、PerCP-抗 CD14 で更に染色する。3) 溶血剤で赤血球を溶血させた後に FACSCalibur で抗体の有無を測定する。

【結果と考察】 本法は何れの細胞においても低バックグラウンドを実現し、抗体測定を容易とした。しかも本法では、5系統の細胞を同時に解析する事ができ、抗体の特異性の同定に役立つものと考えられる。

研究目的

抗白血球抗体は非溶血性輸血副作用、その中でも特に輸血関連急性肺障害(TRALI)の主たる原因の一つと考えられている(1,2)。これまで、HLA Class I 抗体、HLA Class II 抗体や好中球抗体の存在と TRALI との関わりが報告されているのみならず(1-8)、最近では単球抗体(9)の関与も指摘されている。これら白血球抗体を検出したり、その特異性を同定するための方法としてはフローサイトメリー(FCM)法が一般的に使われているが(10)、既知の FCM 法にはいくつかの欠点がある。そのひとつとして、好中球抗体や単球抗体の存在を検討する際、パネル細胞として用いる好中球、単球の高いバックグラウンド蛍光により、抗体の存在を判定することがしばしば困難となることである。特に単球のバックグラウンド蛍光を抑え

る為には、その原因となる単球上の Fc γ RI を予め除去する前処置が必要とされている(11,9)。その他に抗体の特異性を同定する為には、好中球や単球のみならず、T-リンパ球、B-リンパ球、血小板といった他の血球細胞に対する抗体の反応性も同時に検討する必要がある。そこで、我々は、低バックグラウンドで、Fc γ R I 除去操作が不要でかつ上記5系統の血球細胞を同時に試験細胞として検討できる FCM 法の樹立を試みた。

研究方法

1) 抗血清: 用いた抗血清は、非溶血性輸血副作用症例、血小板輸血不応答症例、新生児血小板減少症例、possible TRALI 症例に由来し、予め特異性が同定されている抗血清を用いた。一部の抗血清は広島大学小児科、小林正夫教授から

分与された。2)染色方法:EDTA 採血された全血 50ml に試験血清 10ml を加え4°C、15分間反応させ、EDTA 加 PBS にて洗浄後、FITC-ヤギ抗ヒト IgG で4°C、15分間染色した。洗浄後に2次抗体の残余結合部位をマウス血清で4°C、10分間ブロックし、PE-抗 CD4、PE-抗 CD20、PerCP-抗 CD14 で更に4°C15分間染色した。その後、溶血剤で赤血球を溶血させた後に FACSCalibur で抗体の有無を測定した。なお、全血は大阪府赤十字血液センター職員あるいは献血者由来のものを使用した。また、全血試料と由来をいつにする血清を陰性コントロール血清とした。3)FCM 解析:5系統の血球細胞の区別は、Table 1 と Figure 1 に示すように、FSC/SCC 分布と CD4、CD20、CD14 の発現の有無をもとに行った。

研究結果

特異性がすでに同定されている白血球抗体を含む種々の抗血清を用いて、5系統の血球細胞との反応性を検討した。Figure 2 にその代表的な結果を示した。最初の血清は、非溶血性輸血副作用症例から得られた血清で、HLA-B37, 38, 51, 52, 27, 44, 53, 49 に対する抗体と HNA-1b に対する抗体を含んである。全血試料は、上記 HLA 抗体が反応しない HLA タイプ (HLA-A26,-; B35, 60; Cw9 を持ち、HNA-1 のハプロタイプが“b”の職員から調整した。HNA-1 は好中球のみに発現しているので、予想される反応は HNA-1b 抗体と好中球との反応のみである。FCM 解析によるヒストグラムを Figure 2 の上段に示したが、予想通り、好中球のみが陽性となった。それに対して、上記 HLA 抗体が反応しない HLA タイプを持つが、HNA-1 のハプロタイプが“a”の職員の好中球には反応しなかった (data not shown)。ここで、陰性コントロール血清に対する反応は、5血球細胞いずれも非常に低かった。2番目の血清は、非溶血性輸血副作用症例から得られた血清で、HLA-DR52 に対する抗体を含む。これを HLA-DR52 を持つ職員の細胞試料に反応させると、Figure 2 の2段目に示すように、本来 HLA-DR を発現している B-リンパ球単球とのみが陽性となった。HLA-DR52 を持たない職員の細胞試料には反応しなかった (data not shown)。3番目の血清は、血小板不応答症例

からの血清で、HLA-B51, B61 に対する抗体を含んでおり、HLA Class I は全ての血球細胞で発現されている。この血清を HLA タイプが HLA-B51,61 である職員由来試料に反応させると、全ての血球が陽性となった (3段目)。HLA-B51, B61 を持たない職員の血液試料には全く反応しなかった (data not shown)。4番目の血清は、新生児血小板減少症例からのもので、Nak^a に対する抗体を含む。Nak^a は、血小板と単球に発現する抗原である。この血清を Nak^a 陽性細胞試料と反応させると血小板と単球のみが陽性となった (4段目)。最後の血清は、最近大阪府赤十字センターで経験した“possible TRALI”症例の血清である。この血清には、HLA Class I および Class II に対する抗体は含まれないことを予め確認している。この血清を10数パネルの血球試料と反応させた所、半数以上の血球試料と反応し、好中球と単球が陽性となった。残念ながら、この血清に含まれる抗体の特異性の同定には未だ至っていない。今後の検討が必要である。

考察

全血試料を使って、低バックグラウンドで、FcγR I 除去操作が不要でかつ5系統の血球細胞を同時に試験細胞として検討できる FCM 法を樹立した。使用した2次抗体が、FITC-ヤギ抗ヒト IgG のため、上に示した結果は全て IgG クラスの抗体であるが、2次抗体を抗ヒト IgM に変更することにより、IgM クラスの白血球抗体も検出することができることを確認している (data not shown)。

本 FCM 法には克服しなければならない問題点もある。第一に、試験血清中に HLA Class I 抗体が含まれる場合、全ての血球細胞が陽性となるので、HLA Class II 抗体、HNA 抗体、単球抗体の検出が困難となる。この問題を回避するには、その試験血清中に含まれる HLA Class I 抗体の特異性を予め同定し、それと反応しない HLA ハプロタイプを持つパネル血球細胞を用いることである。この手法は、Figure 2、一段目で用いた方法である。また、その HLA Class I 抗体の特異性が広く、適した細胞試料が入手できない場合には、プール血小板を用いて HLA Class I 抗体を吸収しなければならない (12)。第二の問題は、TRALI 症例に

ついては、一症例でしか検討していないことである。今後症例を重ねて検討してみる必要がある。

本法以外にも白血球抗体、特に好中球抗体を検出するための方法がある(10,13-16)。しかし、いずれの方法も好中球にのみ注目にし、他の血球細胞に対する反応性を見ることができない。HNA-3a は全ての血球細胞に発現しているという点では、HLA Class Iと同様であるが、HNA-3a は好中球に強く発現されているのに対して、HLA Class I は好中球上の発現が弱く、本法を用いれば、HNA-3a 抗体とHLA Class I 抗体の鑑別は容易である。また、HNA-4とHNA-5の発現はTable 1に示した通り、特定の血球にしか発現されない。従って、各血球の染色パターンから、おおよそ抗体特異性が類推できる場合が多く、これも本法の利点である。

なお、本研究結果は、Transfusion Medicine 誌に掲載予定である(17)。

参考文献

1. Kleinman, S., Caulfield, T., Chan, P., Davenport R., McFarland J., McPhedran, S, Meade, M., Morrison, D, Pinsent, T., Robillard, P. & Slinger, P. (2004) Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion* 44, 1774-1789.
2. Goldman, M., Webert, KE., Arnold, D.M., Freedman, J., Hannon, J. & Blajchman, M.A. (2005) Proceedings of a consensus conference: Towards an understanding of TRALI. *Transfusion Med Rev* 19, 2-31.
3. Popovsky, M.A., Abel, M.D. & Moore, S.B. (1983) Transfusion-related acute lung-injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis* 128, 185-189.
4. Kopko, P.M., Popovsky, M.A., MacKenzie, M.R., Paglieroni T.G., Muto K.N. & Holland, P.V. (2001) HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*

41, 1244-1248.

5. Popovsky, M.A. & Moore, S.B. (1985) Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 25, 573-577.
6. Flesch, B.K. & Neppert, J. (2002) Transfusion-related acute lung-injury caused by human leucocyte antigen class II antibody. *Br J Haematol* 116, 673-677.
7. Varela, M., Mas A., Nogues N., Escorsell, A. Mazzara, R. & Lozano M. (2002) TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion* 42, 1102.
8. Nishimura, M., Mitsunaga, S., Ishikawa, Y. & Satake, M. (2003) Possible mechanisms underlying development of transfusion-related acute lung injury: roles of anti-major histocompatibility complex class II DR antibody. *Transfusion Med* 13, 141-147.
9. Kopko, P.M., Paglieroni, T.G., Popovsky, M.A., Muto, K.N., MacKenzie M.R. & Holland, P.V. (2003) TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion* 43, 177-184.
10. Verheugt, F.W., von dem Borne, A.E, Decary, F. & Engelfriet C.P. (1977) The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol* 36, 533-544.
11. Kuijpers, R.W., Dooren, M.C., von dem Borne, A.E. & Ouwehand, W.H. (1991) Detection of human monocyte-reactive alloantibodies by flow cytometry after selective downmodulation of the Fc receptor I. *Blood* 78, 50-56.
12. Prou, O., Kaplan, C. & Muller, J.Y. (1980) Freeze dried platelets for HLA alloantibodies

absorption. *Tissue Antigens* 16, 105–107.

13. Jiang, A.F. & Lalezari, P. (1975) A micro-technique for detection of leukocyte agglutinins. *J Immunol Methods* 7, 103–108.

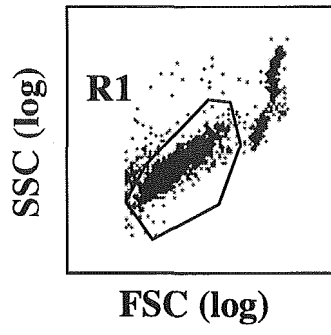
14. Bux, J., Kober, B., Kiefel, V. & Mueller-Eckhardt, C. (1993) Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfus Med* 3, 157–162.

15. Araki, N., Nose, Y., Kohsaki, M., Mito, H. & Ito, K. (1999) Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination method. *Vox Sang* 77, 44–51.

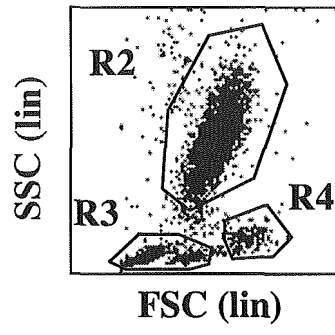
16. Shibata, Y., Juji, T., Nishizawa, Y., Sakamoto, H. & Ozawa, N. (1981) Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang* 41, 25–31.

17. Matsuyama N, Kojima Y, Hirayama F, Yasui K, Taniue A, Fukumori Y, Yoshimura K, Tabata N, Sakata N, Tani Y, Shibata H. Simultaneous 5 cell-lineage flow cytometric analysis system for detection of leukocyte antibodies. *Transfusion Med*, in press.

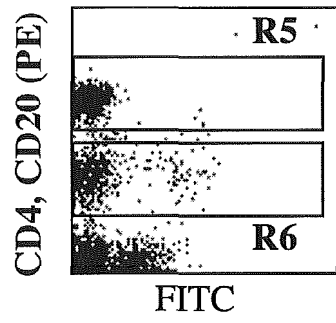
A



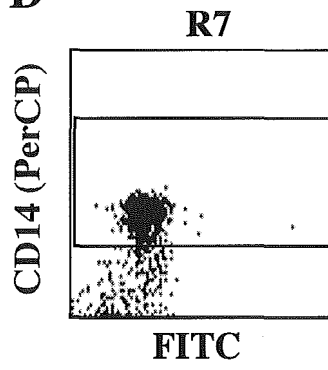
B

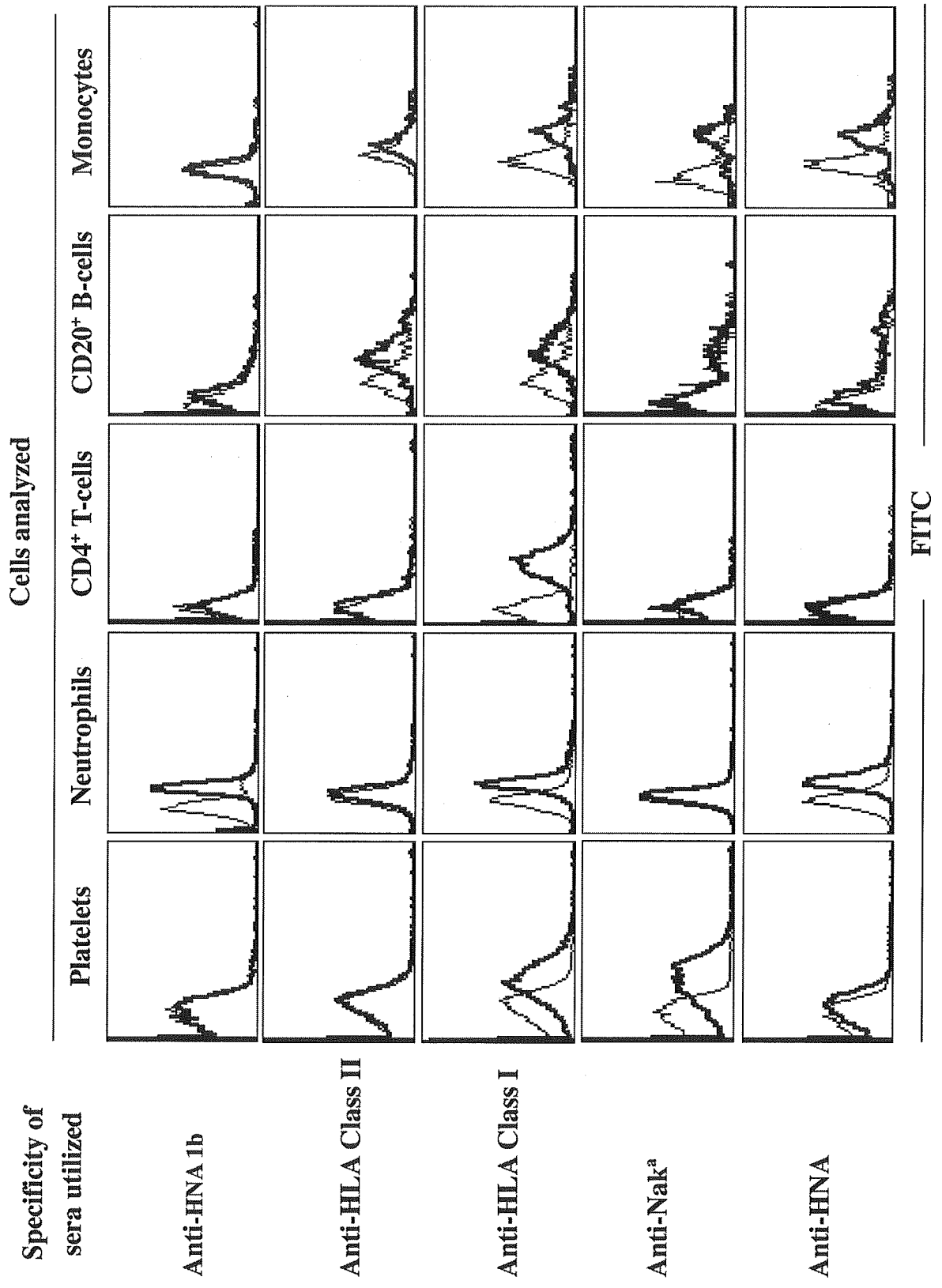


C



D





FITC

Table 1 Blood cell subsets, defining dot-plot regions, and expressed cell surface molecules.

Cells	Dot-Plot Regions	Expressed Cell Surface Molecules
Platelets	R1	HLA I, Nak ^a (CD36), HNA-3a
Neutrophils	R2	HLA I, HNA-1, HNA-2a, HNA-3a, HNA-4a, HNA-5a
CD4 ⁺ T-cells	R3+R5	HLA I, HNA-3a, HNA-5a
CD20 ⁺ B-cells	R3+R6	HLA I, HLA II, HNA-3a, HNA-5a
Monocytes	R4+R7	HLA I, HLA II, Nak ^a (CD36), HNA-3a, HNA-4a, HNA-5a

分担研究報告書

TRALI 診断基準の検討

分担研究者：清水 勝（杏林大学医学部臨床検査医学）
研究協力者：飯島毅彦（杏林大学医学部麻酔科学）
安田博之（杏林大学医学部麻酔科学）
堀田 一（杏林大学医学部中央検査部）

研究要旨

【目的】 TRALI の診断基準には、血液ガス検査値より求められる $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F) 比が唯一の定量的パラメータとして用いられているが、手術後は輸血の有無にかかわらず、血液ガスの悪化がしばしば認められる。本研究では P/F 比の TRALI 診断基準としての特異性、有用性を検討することを目的とする。また、TRALI 発生の一因と考えられている抗白血球抗体についても、手術患者を対象とし、呼吸不全の発生との関係を検討する。

【方法】 1. 輸血後の血液ガス標準値の取得および低酸素血症患者での抗白血球抗体検査：術後 ICU 入室予定症例を対象に、術中および ICU 入室後の血液ガスを測定した。さらに TRALI の強く疑われる症例については抗血漿蛋白抗体、血漿蛋白欠損の有無、抗 HLA 抗体、抗顆粒球抗体の検査を行った。2. 手術患者の術後抗白血球抗体の調査：術中輸血が予想される患者を対象に、手術前と手術後 1 週間の抗 HLA 抗体を検索した。

【結果と考察】 1. 検索対象は一般外科 6 症例、心臓外科 18 症例である。TRALI の診断基準となる P/F 比 300mmHg 以下を示した例は、術前では心臓外科にのみ 2 例 (11%)、術後では一般外科に 1 例 (17%)、心臓外科に 11 例 (61%) 認められた。ただし、検索例中に TRALI 症例はなく、P/F 比は呼吸不全の程度を把握するための指標と考えられた。また、TRALI が疑われた 2 症例の抗白血球抗体を検索した結果、共に陰性であった。また、抗血漿蛋白抗体、血漿蛋白欠損の有無、いずれも陰性であった。2. 手術患者の術後抗白血球抗体の調査：検索患者 24 例中、術前検体 24 本、術後検体 (輸血例) 11 本につき抗 HLA 抗体を検索した結果、術前では class I 抗体が 2 例に、術後では 1 例に検出されたが、class II 抗体は検出されなかった。結果として、抗 HLA 抗体の認められた症例も含め対象症例に呼吸機能障害は認められず、今調査では患者血中の抗 HLA 抗体と TRALI 発症との相関は認められなかった。

【結論】 TRALI の診断における P/F 比および抗白血球抗体検査の特異度について検討した。P/F 比は術後には低下し、症例によっては 300mmHg 以下になる場合も多数あることから、P/F 比はあくまで呼吸不全の程度の指標とはなるものの、単独で TRALI の診断基準とすることは困難と考えられた。また、抗白血球抗体は、TRALI でなくとも陽性率がある程度認められることから、診断上の意義をさらに検討する必要があると考えられた。

目的

TRALI の診断基準には、血液ガス検査値より求められる $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ (P/F) 比が用いられ

ている。手術後は、輸血の有無にかかわらず、血液ガスの悪化がしばしば見られる。手術前後での血液ガスの変化を調べ、TRALI の診

断基準としての P/F 比の特異性を検討する。また、TRALI の発生要因として抗白血球抗体の関与が考えられている。妊娠歴あるいは、輸血歴のある患者では抗白血球抗体が検出されることがあり、これらの患者では、輸血に伴い、抗白血球抗体が産生されやすくなっていると考えられる(2-event model)。手術患者での抗白血球抗体の存在、および輸血後の抗白血球抗体の発生を調査し、呼吸不全の発生との関係を検討する。

方法

1 輸血後の血液ガス標準値の取得および低酸素血症患者での抗白血球抗体検査
ICU 入室者を対象にして、術前に研究内容の説明を行い、患者より承諾を得た。麻酔導入後、橈骨動脈に動脈ラインを留置し、採血した動脈血液の血液ガスを測定した。手術中の輸血の有無にかかわらず、ICU 入室当日あるいは翌日に同じく動脈血液の血液ガスを測定した。さらに TRALI の強く疑われる症例については東京都赤十字血液センターに依頼して、抗血漿蛋白抗体(ELISA 法)、血漿蛋白欠損(ネフェトリー法)、抗 HLA 抗体(LCT, AHG-LCT, FlowPRA)、抗顆粒球抗体(GIFT 法)の検査を行った。なお、本研究の実施については院内の倫理委員会の承認を得た。

2. 手術患者の術後抗白血球抗体の調査

手術中に輸血することが予想される患者を対象に麻酔導入後、輸血前と手術後 1 週間の時点で採血を行い、抗 HLA 抗体を Flow-PRA 法(VERITAS 社製)を用いて行った。対象症例からは、術前に検査内容を説明し、同意を得た。

結果

1 輸血後の血液ガス標準値の取得および低酸素血症患者での抗白血球抗体検査

対象症例は、一般外科患者 6 人、心臓外科患者 18 人であった。

①術後の血液ガス所見

手術中及び ICU での血液ガス検査の成績を表 1 に示す。一般外科患者の P/F 比をみると、手術室での平均値は 442.9 ± 65.2 (平均値 \pm 標準偏差) であり、術前より 300 未満であった症例は認められなかった。術後 ICU では平均 379.7 ± 150.2 であり、300 未満の患者は 1 例(17%)であった。心臓外科患者の P/F 比の術前の平均値は 430.6 ± 94.1 であり、術前から 300 未満であったものは 2 例(11%)であったが、術後に 18 例中 13 例の P/F 比が 100 以上低下した。いずれの症例でも検査値上、呼吸機能を低下させるほどの心不全の兆候は認められなかった。術後 ICU での平均値は 279.3 ± 123.9 あり、300 未満に低下したのは 11 例(61%)であった。P/F 比の度数分布を見ると(図 1)一般外科では、術前、術後に変化がないが、心臓外科では、明らかに P/F 比の悪化が見られている。

②低酸素血症症例での抗白血球抗体検査

今回の調査では、心臓血管外科患者の低酸素血症は、術後の心機能の低下などが原因と考えられ、TRALI の疑われた症例は認められなかった。また、一般外科患者でも手術中に低酸素血症をきたし、輸血に伴う TRALI が疑われた症例はなかった。しかし、院内で輸血後に低酸素血症が発生し、TRALI が疑われた 2 症例について抗白血球抗体の調査した。

症例 1. 74 歳 男性 輸血歴無し。
薬剤(メキシチール)による皮疹のため皮膚科受診し、PSL50mg/日を投与され、皮疹は消退しつつあり、PSL20mg/日へ減量されていた。突然、 38.9°C の発熱に伴い、意識消失をきたした。血中ヘモグロビン 3.9g/dl と低下を認め、血圧低下したため、消化管出血を疑い、MAP 加濃厚赤血球液 8 単位の輸血を行った。投与前の血液ガス所見は、正常であったが、投与後、経皮的酸素飽和度が低下したため、血液

ガスを測定したところ、著明な低酸素血症を認めた。

	輸血前	輸血後
体温	36.6(4/29)	38.5(4/30)
血圧	105/60	120/70
脈拍	80	120
FiO ₂	0.21	0.21
pH	7.559	7.576
PaO ₂	113	31.5
PaCO ₂	25.7	24.1
SpO ₂	95.9	77.2
P/F 比	538	150

直ちに気管挿管され、呼吸管理となった。胸部レントゲン上すりガラス陰影が出現し、心不全が疑われた。その後、徐々に呼吸機能は改善し、挿管後 11 日目に抜管した。

呼吸機能が低下した際の採血した血液の抗白血球抗体価を東京都赤十字血液センターにて測定した結果は、以下のごとく、いずれも陰性であった。

- 抗血漿蛋白質抗体(ELISA 法): 陰性
- 血漿蛋白質欠損検査(ネフェトリー法): 欠損なし
- 抗 HLA 抗体(LCT、AHG-LCT、FlowPRA): 陰性
- 抗顆粒球抗体(GIIFT 法): 陰性

症例 2. 71 歳 男性 消化器外科 胆管癌 輸血歴あり AB 型 RhD(+)

手術中の出血に対し MAP 加濃厚赤血球液 6 単位の輸血後に、呼吸機能が低下したが、心不全の兆候は認められなかった。

	輸血前	輸血後
体温	36.8	36.9
血圧	120/76	110/66
脈拍	65	70
FiO ₂	0.33	1.00
pH	7.463	7.377
PaO ₂	191	274
PaCO ₂	37.5	34.9

SpO ₂	99	99
P/F 比	579	274

術後、気管挿管のまま帰室、呼吸管理を行う。翌日、症状改善したため、抜管し、以後経過は良好であった。

呼吸機能が低下した際に採血した血液の抗白血球抗体価を東京都赤十字血液センターにて測定した結果は、以下のごとく、いずれも陰性であった。

- 抗血漿蛋白質抗体(ELISA 法): 陰性
- 血漿蛋白質欠損検査(ネフェトリー法): 欠損なし
- 抗 HLA 抗体(LCT、AHG-LCT、FlowPRA): 陰性
- 抗顆粒球抗体(GIIFT 法): 陰性

2. 手術患者の術後抗白血球抗体の調査

検査患者数は 24 例であった(一般外科 13 例、心臓外科 6 例、泌尿器科 4 例、整形外科 1 例)。抗白血球抗体検査は、輸血前の検体 24 例および、輸血後の 11 例について行った。

輸血前の抗体は、抗 HLA class I 抗体が 2 例に検出された。抗 HLA class II 抗体は検出されなかった。抗 HLA class I 抗体が検出された患者は妊娠歴および輸血歴のあるもの 1 例、妊娠歴はなく、明らかな輸血歴のないもの 1 例であった(表 2)。輸血後に抗体の検出されたのは抗 HLA class I 抗体の 1 例であり、抗 HLA class II 抗体は検出されなかった。輸血後に抗体の検出された症例では術前に抗体が検出されていなかった(表 2)。この患者は以前に輸血歴があり、FFP が 16 単位投与されていた。

抗白血球抗体の認められた症例でも呼吸機能障害は認められなかった。

考察

術後患者の酸素化は輸血の有無にかかわらず、低下することがある。特に心臓外科手術患者では P/F 比の低下は全例に認められ、

TRALIの診断基準である300以下を示した患者は61%にのぼった。いずれの症例でも心不全が呼吸機能低下の主たる原因であるとは考えにくかった。心臓外科手術後の呼吸機能低下は、肺炎の合併¹⁾、無気肺の増加による機能的残気量の低下²⁾が関与していると考えられる。このように手術後の呼吸機能の低下には、さまざまな原因が関与している。呼吸不全の診断には、P/F比を用いるのが妥当であるが、P/F比のみからTRALIを診断することは困難であると考えられた。P/F比は呼吸不全のレベルを示す指標と考えられるが、TRALIの診断には輸血後の経過など総合的な判断が重要と考えられる。

今回の調査対象症例中には、手術時の輸血後にTRALIが疑われた症例は見られなかったが、病棟の患者でTRALIの疑われる症例を調査対象にした。この患者では、消化管出血直後の輸血により急激な呼吸機能の悪化が見られ、ショック状態での輸血後であり、その後心不全が疑われた。呼吸機能悪化が心不全によるものであるかは不明であり、このように臨床症状からでは、TRALIの確診は困難であり、特異的な検査が期待される。その候補の一つが抗白血球抗体であるが、この患者では、抗白血球抗体は陰性であった。

TRALIが疑われた患者での抗白血球抗体の陽性率は63%と報告されており³⁾、輸血が契機となって発症する呼吸障害のうちに抗白血球抗体の関与しない呼吸器障害が存在する可能性がある。本症例では、呼吸機能の低下の原因が特定できなかったが、輸血に起因するものであるとすれば、抗白血球抗体の関与しないメカニズムで発症した可能性も否定できない。

抗白血球抗体のTRALIの診断に対する有用性を検討するため、手術患者の抗白血球抗体の発現率、および輸血後の発生率を調査した。その結果、抗白血球抗体が認められた1例では輸血歴が認められたが、他の3例では抗白血球抗体が認められなかったことか

ら、輸血歴があるからといって抗白血球抗体が存在するとは限らないと考えられる。妊娠歴、および輸血歴のある患者では、術後に抗白血球抗体が認められたとしても術前から存在していた可能性があり、診断をする上での抗白血球抗体の特異度は、低いと考えられる。1例ではあるが、輸血歴のある患者で輸血後に抗白血球抗体が陽性化した例が見られた。輸血の経験により、患者の白血球が感作されやすくなっており、いわゆるsecond hitにより抗体が作られた可能性(2-event model)が考えられる。輸血製剤中に同型の抗白血球抗体の有無については、現在調査中である。

結論

本研究はTRALIの診断におけるP/F比および抗白血球抗体検査の特異度について検討した。術後にはP/F比は低下することが認められ、診断基準に当てはまる300以下の症例も多数あることから、P/F比はあくまで呼吸不全の程度を把握するための指標であると考えられた。抗白血球抗体は、TRALIでなくとも陽性率がある程度認められることから、診断上の意義をさらに検討する必要があると考えられた。本研究は未だ始まったばかりであり、今後の症例の蓄積を踏まえて、さらに検討を加えることにしたい。

参考文献

- 1) Nozawa E, Azeka E, Ignez Z M, Feltrim Z, Auler Junior JO. Factors associated with failure of weaning from long-term mechanical ventilation after cardiac surgery. *Int Heart J.* 2005;46(5):819-31.
- 2) Reis Miranda D, Struijs A, Koetsier P, van Thiel R, Schepp R, Hop W, Klein J, Lachmann B, Bogers AJ, Gommers D. Open lung ventilation improves functional residual capacity after extubation in cardiac surgery.

Crit Care Med. 2005;33(10):2253-8.

3) Goldman M, Webert KE, Freedman AJ, Hannon J, Blajchman MA Proceedings of a consensus conference: Towards an understanding of TRALI. Transfusion Medicine Reviews 2005;19(1) 2-31