

ある。また、本研究に不参加の場合においても、従来の標準治療を受けることに変わりはなく、患者の不利益にはならないと考える。

(5) 同意の撤回：

一度、文章による説明・同意を得た場合でも、また、研究の途中であっても本人の希望により同意を撤回することが可能であることを十分説明する。

(6) 禁忌薬剤等：

抗ヒスタミン剤、ステロイド剤の常用以外は、研究デザインとして禁忌薬剤は特に設けない。

(7) プライバシーの保護：

研究の解析には個人情報が入らないよう匿名化処理を行う。また、情報の入ったメディア、パソコンは院外に持ち出さず、極力患者のプライバシーの保護に努める。

【研究実施場所】

愛知医科大学病院（病棟）
研究協力施設

【研究実施期間】

実施期間は平成 21 年度より 2 年間で予定している。

【研究内容の公開方法】

本研究の成果は学会での報告、論文への掲載等の形で公開する可能性がある。ただし、氏名、住所など患者個人が特定できるような形での公開はしない。

【他の治療法の有無】

本研究で使用する PC は、通常の未洗浄製剤と M-sol で調整した洗浄製剤の 2 種類であり、他のものは選択できない。

【費用負担】

本研究に係わる、洗浄液の材料、器具、保存バッグ、特殊検査は厚労省の班研究費で負担する。ただし、投与した血小板製剤及び原疾患の治療上必要とされる検査は従来どおり保険診療とする。従って、本研究による患者費用負担の増はないものとする。

【研究担当者】

愛知医科大学医学部 輸血部 教授 高本 滋 （内線 2839）
愛知医科大学医学部 輸血部 准教授 加藤 栄史 （内線 2846）
愛知医科大学医学部 輸血部 技師長 安藤 高宣 （内線 2847）
愛知医科大学医学部 内科学講座（血液内科） 教授 仁田 正和

(内線 2383)

愛知医科大学医学部 内科学講座 (血液内科) 准教授 三輪 啓志

(内線 3543)

愛知医科大学医学部 内科学講座 (血液内科) 講師 渡会雅也

(内線 3540)

【引用文献】

1. 日本赤十字社、輸血情報：0807-114
2. 高本滋：免疫学的輸血副作用の把握とその対応に関する研究（平成 17～19 年度 総合研究報告書）医薬品・医療機器等レギュラーサイエンス総合研究事業
3. 愛知医科大学病院における輸血副作用（平成 19 年度）、未発表資料
4. 麻田真由美、菅野知恵美、川本佳代、伊藤志保、峯佳子、藤田往子、金光靖、芦田隆司、椿和央、金丸昭久（2002）：洗浄血小板による輸血副作用の防止、日本輸血学会雑誌、46(1): 32-36.
5. Rock G, Sweson SD (1985): Platelet storage in a plasma-free medium. *Transfusion*, 26: 551-556
6. 山本定光(2007)：洗浄血小板に関するアンケート調査の結果報告、血液事業、30(1):101-103
7. Gulliksson H (2000): Additive solutions for the storage of platelets for transfusion. *Transfusion Medicine*, 10: 257-264.
8. Shimizu T (1993): Roles of acetate and phosphate in the successful storage of platelet concentrates prepared with an acetate-containing additive solution. *Transfusion*, 33, 304-310
9. Cardigan R, Williamson LM (2003): The quality of platelets after storage for 7 days. *Transfusion Medicine*, 13: 173-187
10. Ringwald J, Zimmerman R, Eckstein R (2006): The new generation of platelet additive solution for storage at 22 C: Development and current experience. *Transfusion Medicine Reviews*, 20(2): 158-164
11. Dekkers DWC, De Cuyper IM, van der Meer PE, Verhoeven AJ, de Korte D (2007): Influence of pH on stored human platelets. *Transfusion*: 47: 1889-1895
12. Cardigan R, Sutherland J, Garwood M, Bashir S, Turner C, Smith K, Hancock V, Wiltshire M, Pergrande C, Williamson LM (2008): In vitro function of buffy coat-derived platelet concentrates stored for 9 days in CompoSol, PASII or 100% plasma in three different storage bags. *Vox Sanguinis*, 94: 103-112.
13. Hirayama J, Azuma H, Fujihara M, Homma C, Yamamoto S, Ikeda H (2007): Storage of platelets in a novel additive solution (M-sol), which is prepared by mixing solutions approved for clinical use that are not especially for platelet storage. *Transfusion*, 47: 960-965

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（東京都赤十字血液センター
兼 日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
研究協力者： 橋本志歩（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
中島文明（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）

研究要旨

【背景・目的】 輸血関連急性肺障害（TRALI）は重篤な非溶血性輸血副作用のひとつであり、時として致命的となることがある。原因の解明は未だ道半ばであるが、抗白血球抗体が原因の一つといわれている。抗白血球抗体は経産婦に多く認められることから、イギリスをはじめとするヨーロッパ諸国やアメリカでは血漿成分を多く含む製剤（新鮮凍結血漿など）において女性献血者からの血液をできるだけ使用しないようにして、TRALIの予防策としており、一定の効果を上げている。我が国においては使用量の多い400ml献血由来の新鮮凍結血漿は男性の献血者の比率が約4分の3を占めており、この比率を上げる方策を検討中である。しかし、我が国の血小板製剤はすべて成分採血由来であり、女性献血者からの採血をなくすことは、安定供給に支障を来すことになる。前回までの研究において強度が高い抗体がTRALIを引き起こしやすい傾向が認められたため、強い抗体を持っている献血者から血小板製剤を作らないようにすることは血小板製剤によるTRALIの予防に有益な可能性がある。実際特定の献血者に対する白血球抗体スクリーニングはすでに欧米では実施可能かどうかの検討に入っており、献血者の中にどれくらい白血球抗体保有者がいるかのデータもそろいつつある。現在使用しているHLA抗体検出のための鋭敏なビーズを用いた方法は比較的高価であり、よりスクリーニングに適した簡便なELISA法の導入可能性について検討した。

【方法】 1. 副作用を起こした検体のうちTRALI症例、その他の副作用を起こした症例のうち、供血者のHLA抗体が陽性と判定された症例を選択し、ビーズ法で測定した抗体の強度と、ELISA法(AbScreen-HLA)を使用して測定した抗体の強度に相関があるかどうかを検討した。

2. 東京都赤十字血液センターにおける献血者につき、ELISA法(DONORSCREEN-HLA)を用いて、抗HLA抗体をスクリーニングする。

3. 抗HLA抗体陽性となった献血者の抗体の特異性を検討する。

【結果と考察】 HLA Class I抗体、HLA Class II抗体ともにLABScreen Mixedを用いたビーズ法とELISA法を比較したところ、良い相関を示した。今後、より安価で簡便な方法で、ビーズ法における抗体の強さを反映出来るHLA抗体スクリーニングの方法が必要であり、自動化されたELISA法はその一つの候補となると思われる。

A. 研究目的

輸血関連急性肺障害 (TRALI: Transfusion-related acute lung injury) は近年注目され始めている重篤な非溶血性副作用のひとつであり、本邦の報告、海外の報告からすると、死亡率は約 10-15% と推定されている。輸血中もしくは輸血後数時間で発症する急性の呼吸不全を特徴とし、臨床的には acute lung injury (ALI) /acute respiratory distress syndrome (ARDS) の概念の中に含まれる病態である。原因についてはすべてが解明されたわけではないが、これまでわかっていることは、血液製剤中の抗白血球抗体、活性脂質、CD40L などの生理活性物質が、患者血液中の白血球を活性化し、肺毛細血管内皮細胞の透過性を亢進させ、急性肺障害を引き起こすというものである。抗白血球抗体は一般的には同種血輸血を受けて感作されたり、妊娠出産を契機に母体が胎児の抗原により感作されたり、することで生じる抗体であり、活性脂質、CD40L は保存された血液製剤中に蓄積されてくる物質である。TRALI を起こした患者に輸血されたドナーの血液中に抗白血球抗体が検出される頻度は、統計的に有意に高いことがわかっており、海外の報告でも抗白血球抗体が TRALI 発症に関与していることはまず間違いないと考えられている。実験的にも TRALI を惹起した抗白血球抗体陽性のドナーの血液を用いた実験系で、特異性の一致した単球を用い、活性化が見ら

れることを報告しており、TRALI の initiation に抗白血球抗体が関与している傍証を示した。しかし、妊婦の 2-3 割程度に抗白血球抗体が認められるという報告もあり、患者抗原とドナーの抗体が一致する確率は、TRALI の発生率と比べるとかなり高く、すべての抗白血球抗体が TRALI を惹起するとは考えられない。昨年までの研究により TRALI を起こしたと考えられるドナー血液中の抗白血球抗体の特異性と患者の白血球抗原の一致した例についての詳細な検討の結果、抗 HLA 抗体の強さは TRALI 発症と相関がある可能性が示唆された。

抗白血球抗体は経産婦に多く認められることから、イギリスをはじめとするヨーロッパ諸国やアメリカでは血漿成分を多く含む製剤 (新鮮凍結血漿など) において女性献血者からの血液をできるだけ使用しないようにして、TRALI の予防策としており、一定の効果を上げている。我が国においては使用量の多い 400ml 献血由来の新鮮凍結血漿は男性の献血者の比率が約 4 分の 3 を占めており、この比率を上げる方策を検討中である。これに対して、血小板製剤に関しては世界的にみても対策が遅れているのが現状である。我が国の血小板製剤はすべて成分採血由来であり、女性献血者がそのうち約 3 割を占めていることから、女性からの採血をなくすことは、安定供給に支障を来すことになる。昨年までの研究において強度が高い抗体が TRALI を引

き起こしやすい傾向が認められたため、強い抗体を持っている献血者から血小板製剤を作らないようにすることは血小板製剤による TRALI の予防に有益な可能性がある。実際特定の献血者に対する白血球抗体スクリーニングはすでに米国では実施可能かどうかの検討に入っており、献血者の中にどれくらい白血球抗体保有者がいるかのデータもそろいつつある。現在使用している HLA 抗体検出のための鋭敏なビーズを用いた方法は比較的高価であり、よりスクリーニングに適した簡便な ELISA 法の導入可能性について検討した。

B. 研究方法

1. 副作用を起こした検体のうち TRALI 症例、その他の副作用を起こした症例のうち、供血者の HLA 抗体が陽性と判定された症例を選択し、ビーズ法の抗体の強度 (LABScreen Mixed による Intensity) を ELISA Kit (AbScreen-HLA) による OD 値と比較し、HLA 抗体 Class I, Class II それぞれにつき、測定値に相関があるかどうかを検討した。ELISA 法は一つのウェルに数十種類の細胞からとった HLA 抗原をコートしてあり、Sample OD/negative control OD の Ratio を AbScreen で測定した抗体の強度とした。LABScreen Mixed は一つのビーズに 3-7 個のセルライン由来の HLA 抗原がコートされているので、それぞれから (Sample Fluorescence Intensity(FI) - Sample background(BG)) /

(Negative control FI - Negative control BG) を計算しその総和をビーズ法で測定した抗体の強度とした。

2. 東京都赤十字血液センターにおける献血者につき、ELISA 法 (DONORSCREEN-HLA) を用いて、抗 HLA 抗体をスクリーニングする。

3. 抗 HLA 抗体陽性となった献血者の抗体の特異性を検討する。

C. 研究結果

1. 図 1, 図 2 に示すとおり、HLA Class I 抗体、HLA Class II 抗体ともに LABScreen Mixed を用いたビーズ法と ELISA 法を比較したところ、だいたいにおいて良い相関を示していることがわかった。

2. 現在 DONORSCREEN に用いられている HLA が日本人特異的なものでないため、日本人の HLA の特異性に適するかどうかの検討も含め、自動化 ELISA の機械を使用して解析中である。

3. 現在、解析中である。

D. 考察

HLA 抗体の検査法は従来の LCT 法にかわり、生の細胞を用いないビーズ法による鋭敏な検査方法が主流になりつつある。検査方法におけるビーズ法の優位性は、ほぼ確立されてはいるが、検査にかかる費用などの面において、献血者のスクリーニング検査として適当かどうか

かは、検討されていない。また、以前の報告で Intensity が高い抗体は比較的 TRALI を起こしやすい傾向も見られたため、強い抗体を持っている献血者に関して TRALI を起こす可能性が高い群として献血をご遠慮頂く方法も、血小板製剤の安定供給を保ちながら安全性をより高くするためには、今後選択すべき方法の一つと考えることができる。そのためには、より安価で簡便な方法で、ビーズ法における抗体の強さを反映出来る HLA 抗体スクリーニングの方法が必要であり、自動化された ELISA 法はその一つの候補となる。

今回の検討結果で ELISA 法とビーズ法の相関が比較的良いものと判断されたため、今後は ELISA 法を用いたより感度の低い方法で強い抗体を中心に検出できる系を確立することを今後の課題としたい。

E. 研究発表

1) 論文発表

1. Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, Okazaki H, Tadokoro K: Role of anti-Naka antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury Vox Sang 95: 4: 318-323, 2008
2. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害(傷害)：日本集中治療医学会雑誌 15: 291-300, 2008
3. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害：呼

吸 27: 225-233, 2008

4. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害：現在の輸血療法 適正な輸血療法の実施に向けて：稲葉頌一編 真興交易医書出版部 143-151, 2008
5. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害：臨床検査 52: 205-209, 2008
6. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害 (TRALI): 別冊日本臨床 新領域別症候群シリーズ No.9 呼吸器症候群 (第2版) II -その他の呼吸器疾患を含めて-V 肺循環の異常 A.肺障害 210-213, 2009 日本臨牀社

2) 学会、研究会発表

1. Okazaki H, Hashimoto S, Nakajima F, Tadokoro K: The Role of HLA Antibody Specificity and Strength in Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI). American Thoracic Society annual meeting (Toronto, Canada) (May/20/2008)
2. Okazaki H, Hashimoto S, Nakajima F, Tadokoro K: NT-pro BNP as a marker for differential diagnosis between TRALI and TACO. European Haemovigilance Seminar (Rome, Italy) (Feb/26/2009)
3. Okazaki H, Hashimoto S, Nakajima F, Tadokoro K: NT-pro BNP as a marker for differential diagnosis between TRALI and TACO. XIXth Regional Congress Eastern Mediterranean &

- Europe ISBT (Cairo, Egypt)
(Mar/23/2009)
4. 岡崎 仁：一般演題 輸血関連急性肺障害における供血者白血球抗体強度と発症の関連. 第48回日本呼吸器学会学術講演会(神戸)(平成20年6月16日)
 5. 岡崎 仁：教育講演3 TRALIの新知見. 第56回日本輸血細胞治療学会(福岡)(平成20年4月25日)
 6. 岡崎 仁, 橋本志歩, 中島文明, 田所憲治：ワークショップ2 非溶血性輸血副作用：TRALIの鑑別診断のためのNT-pro BNP測定の有用性. 第56回日本輸血・細胞治療学会(福岡)(平成20年4月26日)
 7. 岡崎 仁：シンポジウム4 日本のヘモビジランスの新しい展開 世界のヘモビジランスと日本の今後. 第56回日本輸血・細胞治療学会(福岡)(平成20年4月25日)
 8. 橋本志歩, 中島文明, 鎌田裕美, 河村久美子, 岡崎 仁, 田所憲治：一般演題 輸血関連急性肺障害TRALIと輸血製剤中のHLA抗体反応性との関係. 第56回日本輸血・細胞治療学会総会(福岡)(平成20年4月25日)
 9. 阿部高秋, 玉井豊広, 渡辺嘉久, 谷口菊代, 松田利夫, 岡崎 仁, 田所憲治：一般演題 M-MPHA法による顆粒球抗原のタイピング. 第56回日本輸血・細胞治療学会(福岡)(平成20年4月26日)
 10. 氏家和明, 石川 泉, 岡崎 仁, 中島文明, 橋本志歩：輸血血液製剤中の抗HLA抗体が原因と考えられた輸血関連急性肺障害の1例. 第56回日本輸血・細胞治療学会(福岡)(平成20年4月26日)
 11. 平田康司, 石丸文彦, 中島文明, 橋本志歩, 田邊奈美子, 近行正昭, 直木恭子, 岡崎 仁, 土岐博信：一般演題 TRALI症例由来検体にみられた抗MICA抗体について. 第32回日本血液事業学会総会(大阪)(平成20年10月3日)
 12. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害-TRALI-について. 広島県輸血懇話会(広島)(平成20年11月22日)
 13. 岡崎 仁：教育講演11 輸血のアレルギー(TRALIを中心として). 第58回日本アレルギー学会秋季学術大会(東京)(平成20年11月28日)
 14. 岡崎 仁：TRALI日本の現状. 第23回Transfusion Medicine Conference(神奈川)(平成21年1月30日)
 15. 岡崎 仁：海外におけるヘモビジランス. 第17回赤十字血液シンポジウム(福岡)(平成21年2月14日)

图 1

HLA Class I 抗体 (n=40)

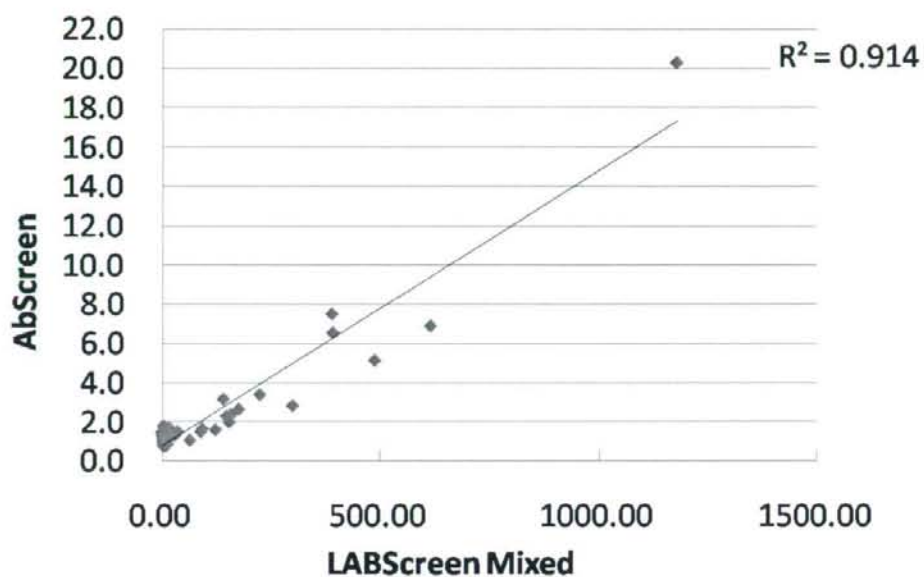
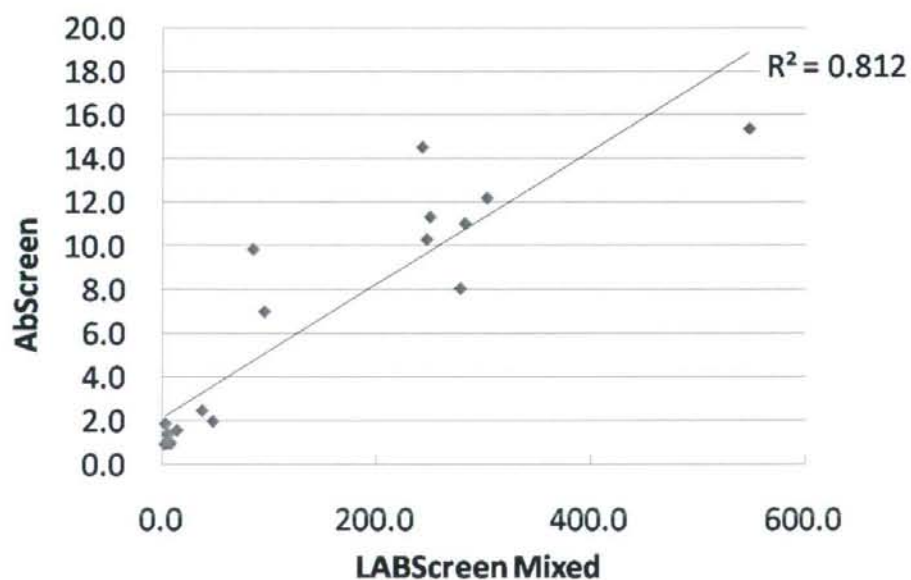


图 2

HLA Class II 抗体 (n=18)



分担研究報告書

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明
2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析
3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明

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

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明：白血球抗原に対する抗体は、TRALI などの非溶血性副作用の原因となる可能性が高い。これまでに我々は、非溶血性輸血副作用が報告された血液製剤（副作用検体）中の白血球抗体検査を行い、顆粒球および単球表面上の抗原と結合し、既知の HLA、HNA に特異性を示さない抗体が多数存在することを報告している。今回、これら HLA、HNA 抗原に結合しない抗白血球抗体の特異性について調べた。傾向標識モノクローナル抗体との競争反応を利用してその同定を試みたところ、候補抗原が見出された。今後はその同定を計画している。また、白血球抗原の一つであり、重篤な非溶血性副作用の原因となりうる NaK^a 抗原に関して、抗体スクリーニングに使用可能な発現細胞株を樹立した。

2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析：血小板活性化因子 (PAF) は血管内皮透過性を亢進させる作用を有し、PAF の分解酵素である血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) の活性とアナフィラキシー発生頻度との間に逆相関があり、日本人に PAF-AH の欠損者が多い（人口の 4%）などのことから、PAF は非溶血性副作用のエフェクター分子の有力な候補の一つと考えられる。そこで、PAF-AH 活性の低下がアナフィラキシー反応を含む非溶血性輸血副作用（non-hemolytic transfusion reaction、NHTR）の誘発に関与しているかを解析することにした。まず、製剤中の PAF-AH 活性の検討を行なったが、TRALI/pTRALI 原因 PC 群の PAF-AH 活性はコントロール群と比べて有意に ($P<0.05$) 低かったものの、NHTR 原因 PC 群とコントロール PC 群との間には明らかな差を認めなかった。また、NHTR の各症状（発熱、発疹、血圧低下、アナフィラキシー反応）と PAF-AH 活性低下との因果関係も見出せなかった。従って、今後は患者要因としての PAF-AH 活性を検討していく予定である。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明：非溶血性輸血副作用の中で最も高頻度でみられるアレルギー性副作用の新検査方法を樹立し、更にその検査方法を用いて、アレルギー性副作用を引き起こす血液製剤中の生理活性物質の検索を試みた。その結果、喘息やアトピーなどのアレルギー疾患の領域でアレルゲンの特定の目的のために用いられている「好塩基球活性化試験」が非溶血性輸血副作用の解析に有用であることが明らかとなった。

A. 研究目的

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明:

白血球抗原に対する抗体は、TRALI などの非溶血性副作用の原因となる可能性が高い。これまでに我々は、非溶血性輸血副作用が報告された血液製剤（副作用検体）中の白血球抗体検査を行い、顆粒球および単球表面上の抗原と結合し、既知の HLA、HNA に特異性を示さない抗体が多数存在することを報告している。そこで今回、これら HLA、HNA 抗原に結合しない抗白血球抗体の特異性について調べた。

HLA、HNA 以外の白血球抗原で、顆粒球もしくは単球に発現しており、同抗原に対する抗体と非溶血性輸血副作用との関連が報告されているものとして NaK^a 抗原 (CD36 抗原) があげられる。そこで、これまでに報告してきた方法と同様に、NaK^a 抗原を発現するパネル細胞株を作製し、同細胞株による抗 NaK^a 抗体の測定能を評価した。さらに、NaK^a 抗原以外の標的抗原の検索も行ったところ、顆粒球および単球表面上に発現するいくつかの候補抗原を見出した。

2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析:

血小板活性化因子 (PAF) は、さまざまな血球からのケミカルメディエーターの放出や血管透過性更新をひきおこす生理活性リン脂質である。また、PAF は加水分解酵素である PAF アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) によって代謝されその生理活性を失う。PAF-AH 活性の欠失は日本人の約 4% に認められるが、重症小児喘息、各種自己免疫疾患、アナフィラキシー反応との関連性が強く示唆されている。そこで、PAF-AH 活性の低下がアナフィラキシー反応を含む非

溶血性輸血副作用 (non-hemolytic transfusion reaction, NHTR) の誘発に関与しているかを解析した。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明:

アレルギー性輸血副作用は非溶血性輸血副作用の中で最も頻度の高い副作用であり、血小板製剤で惹起されることが多い。肥満細胞や好塩基球の関与が示唆され、肥満細胞からの脱顆粒物質であるトリプターゼの上昇が診断の一助となっているが、上昇の見られない事例も多く、これを補う検査法が求められている。また輸血との因果関係を特定する方法は未だ確立されていない。そこで、喘息やアトピーなどのアレルギー疾患の領域でアレルゲンの特定のために用いられている「好塩基球活性化試験」が、アレルギー性輸血副作用の診断検査として応用できないかを検討した。また、アレルギー性輸血副作用を惹起する物質に関しては、血小板製剤でアレルギー性輸血副作用が多いことから、血漿中に含まれる生理活性物質や血小板由来生理活性物質が原因と推定されているものの、原因物質の特定には至っていない。そこで、「好塩基球活性化試験」を用いて検討を行った。

B. 研究方法

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明

(1) NaK^a 抗原発現パネル細胞株の作製: これまでに、我々は HNA 抗原発現パネル細胞株を作製しており、今回も同様の手法を用いて NaK^a 抗原発現パネル細胞株を作製した。すなわち、NaK^a 抗体が認識する分子である CD36 の cDNA をクローニングし、レトロウイルスベクターに組み込み、K562 細胞に同遺伝子を導入した。Puromycine 添加による限界希

積法により導入遺伝子の高発現クローンを選択し、培養した。次に、樹立した Nak^a 抗原発現パネル細胞を用いて間接免疫蛍光法により血清中の Nak^a 抗体の検出について検討を行なった。

(2) 抗白血球抗体の特異性の同定：非溶血性輸血副作用が報告された血液製剤に含まれており、HLA、HNA および Nak^a 以外の顆粒球表面抗原と結合する抗体の特異性同定を行った。健常人血液から好中球を精製した後、検体を2つに分けた。一方は、蛍光ラベル付きの顆粒球表面抗原 (CD13、CD15、CD17、Siglec-5 など) に対するモノクローナル抗体でのみ染色した。残りの一方は、被検血清を反応させ洗浄後に、モノクローナル抗体で染色した。これらの検体を FCM で測定し、好中球分画での平均蛍光強度を比較した。

2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析：

非溶血性副作用を惹き起こした濃厚血小板 (PC) および対照として正常 PC から上清 (血漿) をそれぞれ回収し、PAF-AH 活性 (μ mol/min/mL) を市販の PAF-AH Assay Kit (Cayman Chemical 社) を用いて測定した。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明：

(1) 好塩基球活性化試験 (BAT)：健常人からヘパリン採血した全血に血小板製剤上清や HLA MoAb、rhCD40L、rhRANTES などの試験サンプルを添加し、37°C 30 分間インキュベートし、FITC 標識抗ヒト HLA DR、PE 標識抗ヒト CD203c、PE-Cy5 標識抗ヒト CD123 MoAb で染色し、赤血球を溶血後、フローサイトメーターを用いてその蛍光を測定した。好塩基球の識別は FSC/SSC 分布にてリンパ球分画をゲーティングし、リンパ球分画かつ HLA DR

陰性分画かつ CD123 陽性分画を好塩基球群とした。また、好塩基球細胞表面上の CD203c 発現上昇を同細胞活性化の指標とした。

アレルギー性輸血副作用に関与した血小板製剤上清を用いた好塩基球の活性化 (北海道赤十字血液センターとの共同研究)：北海道赤十字血液センターより分与された蕁麻疹やアナフィラキシー (様) 反応などを呈したアレルギー性輸血副作用症例の残余血小板製剤上清 9 例と、その陰性対象として非溶血性輸血副作用を認めなかった残余血小板製剤上清 12 例を用いて調べた。同副作用を起こした患者全血が入手できなかった為、5 人の健常人由来ヘパリン全血に残余血小板製剤上清を全血の 1/20 量の割合で添加した。これ以降の操作は (1) と同様に行なった。また、一部の実験においては、好塩基球の活性化およびヒスタミン放出の指標でもある CD63 を好塩基球活性化の指標とした。なお、添加した残余血小板製剤上清の割合は体重 70kg の患者に 250ml の血小板製剤を輸血した場合を想定した。(製剤容量 250ml/5,000ml 循環血液量)

(2) HLA モノクローナル抗体および sCD40L、RANTES による好塩基球の活性化：好塩基球を活性化させる刺激因子として、アレルギー性 IgE 抗体・IgE レセプター複合体や IL-3 などが知られているが、これら以外の刺激因子の候補としては、非溶血性輸血副作用症例の代表的な原因の一つである HLA 抗体が挙げられる。そこで、HLA-A、B、C モノクローナル抗体 (HLA MoAb) を用いて検討を行なった。また、蕁麻疹などのアレルギー性の輸血副作用は血小板製剤に最も多く認められることから、血小板製剤中に蓄積される血小板製剤由来生理活性物質である sCD40L、RANTES についても検討した。

C. 研究結果

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明:

(1) 抗白血球抗体の特異性同定: 我々は血清中の抗白血球抗体の特異性を、市販の蛍光標識モノクローナル抗体との競争反応を利用してその同定を試みた。すなわち、被検血清中の抗白血球抗体の特異性と洗浄後に染色するモノクローナル抗体のそれとが一致した場合、両者は抗原のエピトープを取り合うため、モノクローナル抗体単独で染色した場合と比べ、その平均蛍光強度は減弱する。我々は抗血清とモノクローナル抗体の組み合わせにおいて、上記の平均蛍光強度の減弱を観察しており (data not shown)、現在、その分子について確認実験を行っている。

(2) パネル細胞株による抗 Nak^a 抗体の検出: 作製したパネル細胞株は少なくとも8カ月間以上 Nak^a 抗原の安定した発現を示した。また、8種類の Nak^a 抗体含有血清 (このうち2種類は抗 HLA 抗体も含有) とパネル細胞株との反応性を調べたところ、Nak^a 抗原発現パネル細胞株は、全ての血清に対して陽性反応を示した。なお、HLA 抗体のみを含有する血清および健常人血清には全て陰性を示した。

2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析:

コントロール PC 群 (41 例)、NHTR 原因 PC 群 (86 例)、TRALI/pTRALI 原因 PC 群 (21 例) について PAF-AH 活性をそれぞれ測定した。その結果、TRALI/pTRALI 原因 PC 群の PAF-AH 活性はコントロール群と比べて有意に ($P < 0.05$) 低かったものの、NHTR 原因 PC 群とコントロール PC 群との間には明らかな差を認めなかった (図 1)。また、

NHTR の各症状 (発熱、発疹、血圧低下、アナフィラキシー反応) と PAF-AH 活性低下との因果関係も見出せなかった。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明:

(1) アレルギー性輸血副作用に関与した血小板製剤上清を用いた好塩基球の活性化: アレルギー性輸血副作用症例の残余血小板製剤上清 (A 群) と非溶血輸血副作用を認めなかった残余血小板製剤上清 (B 群) を、5 人の健常人からヘパリン採血した全血を用いて BAT を行なった。B 群 12 例の平均値+3SD をカットオフ値とした結果、A 群 9 例中、1 例が 5 人陽性、1 例が 3 人陽性、1 例が 1 人陽性となった。一方、B 群では 1 例のみで陽性となった。しかもその一例では 5 人中 1 人のパネル血球のみで陽性で、しかもその CD203c 陽性好塩基球の比率はカットオフ値に極めて近く、非特異反応とも考えられた。(図 2) これにより、好塩基球活性化試験は、アレルギー性輸血副作用症例の診断および因果関係の特定に有用であると考えられた。

(2) HLA モノクローナル抗体および CD40L、RANTES による好塩基球の活性化: 7 人の健常人由来ヘパリン全血に、HLA MoAb を各濃度 (終濃度 50、25、10、5、0 $\mu\text{g/ml}$) で添加した結果、濃度依存的に好塩基球の活性化が認められた (10 $\mu\text{g/ml}$ 、 $n=7$ 、 $P < 0.05$)。次に CD40L および RANTES をそれぞれ、または、両者を三日間保存した血小板製剤中に蓄積される濃度 (前者は 0.5ng/ml、後者は 5ng/ml) を基準に最大 10 倍濃度を添加した。その結果、CD40L および RANTES については、それぞれ、または、両者を混合しても好塩基球の活性化は認められなかった。それは基準の 10 倍濃度であっても同様であった。しかし、単体で好塩基球を活性化させる濃度の HLA MoAb

(25 μ g/ml) に、生理的な濃度の CD40L (0.5ng/ml) および RANTES (5ng/ml) をそれぞれ、または、両者を混合したところ、好塩基球活性化が増強され、3者の間で相乗効果が認められた (n=7、P<0.05)。これにより、HLA クラス I 抗体は好塩基球を活性化させる刺激因子の一つである事と生理的濃度の sCD40L および RANTES は好塩基球を直接、活性化させる因子ではなかったが、HLA クラス I 抗体などの直接、好塩基球を活性化させる因子に対して、相乗的に働く事が明らかになった。

D. 考察

1. TRALI 関連抗白血球抗体の新たな検出系の開発と TRALI 発症機序の解明：

今回作製したパネル細胞株による抗 Nak^a 抗体の検出は、抗 HLA 抗体の有無に関わらずその判別が可能であったことから、同細胞株による検査法は抗 Nak^a 抗体検査法として偽陽性所見の少ない優れた方法である。今後、同細胞株を用いて輸血副作用検体での抗 Nak^a 抗体の存在頻度を調べていく予定である。また、モノクローナル抗体との競争反応から検出された顆粒球抗原についても、同抗原を発現させたパネル細胞株を作製し、その陽性頻度を調べる。さらに、顆粒球活性化試験などの機能的クロスマッチを行い、非溶血性副作用との因果関係を明らかにする予定である。

2. 非溶血性輸血副作用と血小板活性化因子アセチルヒドラーゼ (PAF-AH) 活性の関連性についての解析：

製剤中とくに PC 製剤中の PAF-AH 活性を測定した結果、NHTR と PAF-AH 活性低下に明らかな因果関係を示唆する所見は得られなかったが、対象 PC 製剤数をさらに追加する必要があると考えられる。また、輸血を受ける患者側の背

景因子とも考えられることから、患者血漿中の PAF-AH 活性の測定が必要であると考えられる。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発と発症機序の解明：

アレルギー性輸血副作用については、患者側に特異的な IgE 抗体が存在し、製剤に含まれる抗原 (アレルゲン) と結合する事により、アレルギー反応が誘発される事例の報告が数多く報告されているが、今回、我々が見いだした事例は製剤側に直接的な要因が含まれていると類推している。今後、その原因物質について検討していく予定である。

一方、本検討により、HLA クラス I 抗体を含む製剤が輸血される事により、患者好塩基球が活性化し、アレルギー性の輸血副作用が誘発される事が示唆されたが、MoAb を用いた実験では、有意に好塩基球の活性化が認められる濃度は 10 μ g/ml からであり、製剤中に HLA クラス I 抗体が検出される事例はしばしば認められるが、その様な高濃度の HLA クラス I 抗体を含む製剤はまれであると類推される。しかし、トリガーとなる何らかの因子が製剤に含まれる場合には、血小板製剤中に蓄積される sCD40L や RANTES が相乗効果を与え、反応を増強させる事は十分に考えられる。

発表論文

1. Yasui, K, Furuta, RA, Matsuyama N, Fukumori Y, Kimura, T, Tani, Y, Shibata H, Hirayama, F Possible involvement of Heparin-Binding Protein in transfusion related acute lung injury. Transfusion 2009; 48: 978-987..
2. Yasui, K, Hirayama, F, Matsuyama, ., Furuta, RA, Kimura, T, Odagiri, ., Watanabe, Y, Tani, Y & Shibata, H New cell lines express HNA-1c, -4a, -4b, -5a,

or -5b for identification of HNA antibodies. Transfusion 2009;48:1037-1039.

3. Matsuyama N, Hirayama F, Yasui K, Kojima Y, Furuta RA, Kimura T, Taniue A, Fukumori Y, Tani Y, Shibata H. Non-HLA white cell antibodies in nonhemolytic transfusion reactions. Transfusion 2009;48: 1526-1528.
4. Hayashi T, Yasui K, Matsuyama N, Furuta RA, Hori Y, Tanaka S, Hirayama F, Tani Y, Shibata H, Inoue M. Establishment of a novel method for detecting Nak^a antibodies by using a panel cell line. Transfusion 2009;49:90-392.
5. Matsuyama N, Hirayama F, Wakamoto S, Yasui K, Furuta RA, Kimura T, Taniue A, Fujihawa M, Azuma H, Ikeda H, Tani Y, Shibata H. Application of the basophil activation test in analysis of allergic transfusion reaction. Transfusion Medicine, in press.

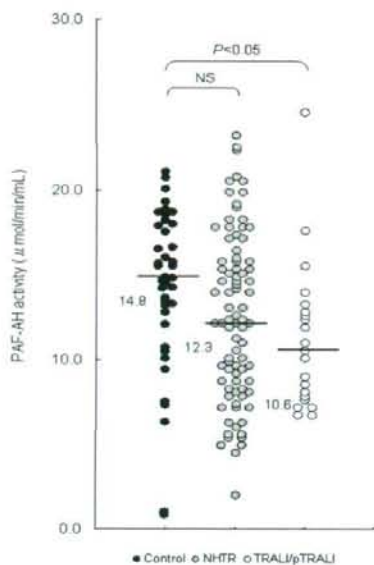


図1 PC製剤中 PAF-AH 活性の比較

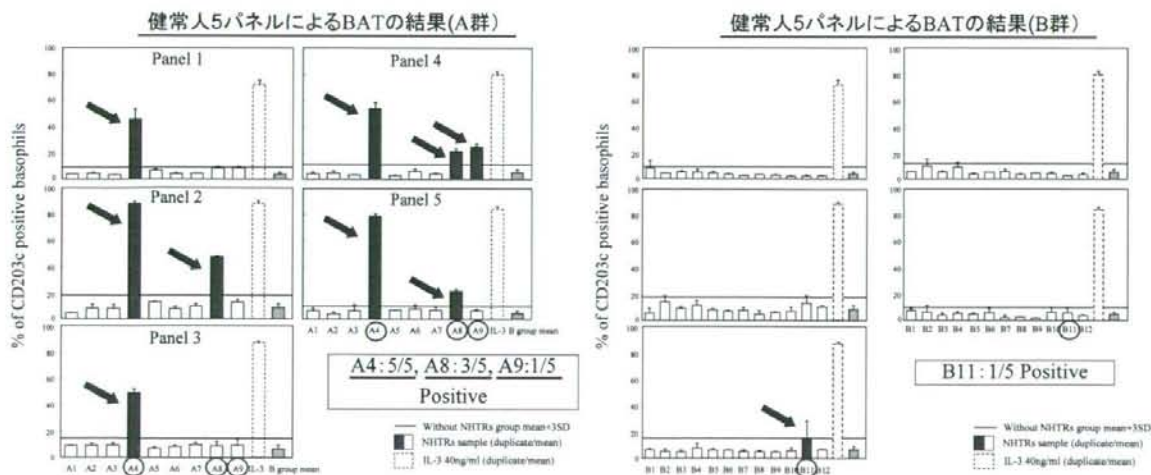


図2 残余血小板製剤上清を用いた好塩基球活性化試験

分担研究報告書

輸血後呼吸障害に対する新鮮凍結血漿の影響に関する研究

- 分担研究者： 飯島 毅彦（杏林大学医学部麻酔科学）
研究協力者： 中澤 春政（杏林大学医学部麻酔科学）
大西 宏明（杏林大学医学部臨床検査医学）
岡崎 仁（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
橋本 志歩（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
中島 文明（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
矢富 裕（東京大学医学部医学系研究科臨床病態検査医学）
高梨 美乃子（東京都赤十字血液センター）
中島 一格（東京都赤十字血液センター）
堀田 一（杏林大学医学部臨床検査医学）
渡邊 卓（杏林大学医学部臨床検査医学）
清水 勝（杏林大学医学部臨床検査医学）

研究要旨

【目的】 TRALI 発症の原因因子として抗白血球抗体やその他の免疫学的活性物質が関与していると考えられている。女性は男性と比較して同種免疫される機会が多いため、女性由来の血液製剤の使用は男性由来の血液製剤の使用と比較して TRALI を発症しやすいと推測され、男性由来の血漿製剤に切り替えている国もみられる。本研究では男性由来の新鮮凍結血漿の投与が輸血後の呼吸不全の発症予防に効果があるかを調査した。

【方法】 予定手術を受ける患者で手術中に FFP を投与される患者を対象とした。2007 年 10 月から 2008 年 1 月まで期間には、術前準備血としての FFP をすべて男性由来とした。2008 年 2 月から 5 月までの期間は従来通り、donor の性別の区別ない FFP が供給された。結果として男性由来の FFP のみ投与された症例を male 群、女性由来の FFP を投与された症例を mix 群とした。呼吸障害（P/F 比（ $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 300 以下）、循環不全の患者（収縮期血圧 80 以下、コントロール不良の不整脈）は除外した。輸血終了後 3～6 時間の間に動脈血液ガス分析、胸部 X 線撮影を行った。輸血後 P/F 比 300 以下の症例では放射線科医師に胸部 X 線写真の読影を依頼し、心原性を思われる肺うっ血を認めた症例は TACO、両側浸潤影を認めた症例は possible TRALI とした。male 群、mix 群の両群間で輸血後の呼吸機能障害出現率や TRALI、TACO の発生率を比較した。また、患者の術前状態や、術中状態などの患者因子、血液製剤中の抗白血球抗体などの血液製剤因子のうちで輸血

後呼吸機能障害の原因となる因子を統計学的に検討した。

【結果と考察】症例数は male 群 55 例、mix 群 27 例であった。患者因子として年齢、性別、身長、体重、術前の肝、腎機能障害、感染兆候の有無、手術時間、麻酔時間、術中尿量、術中輸液量に両群間で有意差はなかった。術中出血量、術中輸血量、RCC、FFP、PC の投与量は mix 群のほうが多かった。投与された FFP 中の HLA class I 抗体の陽性率は male 群で 9.6%、mix 群で 22.2%であった。Lyso PC の平均値は male 群 $258 \pm 44 \mu\text{mol/L}$ 、mix 群 $270 \pm 53 \mu\text{mol/L}$ と有意差は認めなかった。輸血後に P/F が 300 以下になったものは 19 例であり、mix 群で有意に多かった (male 群 16.3%、mix 群 37%)。うっ血性肺水腫と診断されたもの (TACO) は 7 例、浸潤性の肺水腫 (possible TRALI) として診断されたものは 5 例であった。それ以外の 7 例は、異常陰影は認められなかった。possible TRALI の 5 例では、4 例に HLA class I 抗体陽性、1 例に HNA 抗体陽性が認められた。LysoPC 測定値と呼吸機能の間には関連は認められなかった。「輸血後 P/F300 以下」を従属因子として上述の患者因子、血液製剤因子を独立因子としてロジスティック回帰分析を行ったところ、人工心肺の有無 (OR(オッズ比)8.950, 95%CI(信頼区間) 1.98~40.51)、肝機能障害の有無 (OR:6.543, 1.78~24.02)、男性由来の FFP (OR:0.219, 0.06~0.80) が有意な因子として抽出された。

A. 研究目的

TRALI 発症の原因因子として抗白血球抗体やその他の免疫学的活性物質が関与していると考えられている。女性は男性と比較して同種免疫される機会が多いため、女性由来の血液製剤の使用は男性由来の血液製剤の使用と比較して TRALI を発症しやすいと推測される。この仮説によりイギリスでは、2003 年 10 月より新鮮凍結血漿の製造を男性由来のみに限定する施策がとられており、以降 TRALI の発症は抑えられていると報告されている¹。このイギリスでの施策は TRALI の予防に効果的であると思われるが、それを裏付けるような研究報告はあまりされていない。これらの報告を受け、米国でも AABB が 2006 年 11 月に同種免疫されていることが疑われる製剤の使用を制限するよう勧告している。このように女性由来の血液製剤の投与は輸血後の呼吸機能障害に影響を与える可能性があるが、男性由来の血液製剤が有利であるかの case control study は行われていない。本研究では本邦においてまた男性由来の新鮮凍結血漿の投

与が輸血後の呼吸不全の発症予防に効果があるかを検討した。

B. 研究方法

本研究は杏林大学医学部倫理委員会の承認を得て行った。また対象となる患者には研究内容、目的について説明を行い、承認を得、同意書に署名を取得した。

予定手術を受ける患者で手術中に FFP を投与される患者を対象とした。2007 年 10 月から 2008 年 1 月まで期間には、術前準備血としての FFP をすべて男性由来とした。不足分の FFP はドナーの性別不明の製剤を使用した。2008 年 2 月から 5 月までの期間は従来通り、ドナーの性別の区別ない FFP が供給された。この間に投与された FFP のドナーを調査し、結果として男性由来の FFP のみ投与された症例を male 群、女性由来の FFP を投与された症例を mix 群とした。呼吸障害 (P/F 比 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 300 以下)、循環不全の患者 (収縮期血圧 80 以下、コントロール不良の不整脈) は除外した。輸血終了後 3~6 時間の間に動

脈血液ガス分析、胸部 X 線撮影を行った。輸血後 P/F 比 300 以下の症例では放射線科医師に胸部 X 線写真の読影を依頼し、心原性を思われる肺うっ血を認めた症例は TACO、両側浸潤影を認めた症例は possible TRALI とした。male 群、mix 群の両群間で輸血後の呼吸機能障害出現率や TRALI、TACO の発生率を比較した。「P/F300 以下」を従属因子として、性別、年齢、身長、体重、術式、人工心肺の有無、人工心肺時間、手術時間、麻酔時間、出血量、尿量、輸液量、輸血量、濃厚赤血球、血小板製剤、FFP のそれぞれの投与量およびドナーの性別、投与前の P/F 比、術前の肝逸脱酵素の異常値、腎機能障害の有無、感染の有無を独立因子として、ロジスティック回帰分析を行った。

C. 研究結果

症例数は male 群 55 例、mix 群 27 例であった (Figure 1)。患者因子として年齢、性別、身長、体重、術前の肝、腎機能障害、感染兆候の有無、手術時間、麻酔時間、術中尿量、術中輸液量に両群間で有意差はなかった (Table 1)。術中出血量、術中輸血量は mix 群のほうが多かった (Table 2)。血液製剤因子としては、RCC、FFP、PC の投与量は mix 群で多かった (Table 2)。投与された FFP 中の HLA class I 抗体の陽性率は male 群で 9.6%、mix 群で 22.2%であった。HLA class II の陽性率は male 群で 0%、mix 群で 7.4%であった。Lyso PC の平均値は male 群 $258 \pm 44 \mu\text{mol/L}$ 、mix 群 $270 \pm 53 \mu\text{mol/L}$ と有意差は認めなかった (Table 2)。輸血後に P/F が 300 以下になったものは 19 例であり、mix 群で有意に多かった (male 群 16.3%、mix 群 37%)、輸血前後の P/F 比および TRALI、TACO の発症率に関しては male 群、mix 群の両群間において有意差は認めなかった。(Table 3)。うっ血性肺水腫と診断されたもの (TACO) は 7 例、浸潤性の肺水腫 (possible TRALI) として診断されたも

のは 5 例であった。それ以外の 7 例は、異常陰影は認められなかった。これら 4 群間では、輸血量などの諸因子に有意な差は認められなかった (Table 4)。possible TRALI の 5 例では、4 例に HLA class I 抗体陽性、1 例に HNA 抗体陽性が認められた (Table 4)。LysoPC 測定値と呼吸機能の間には関連は認められなかった。「輸血後 P/F300 以下」を従属因子として上述の患者因子、血液製剤因子を独立因子としてロジスティック回帰分析を行ったところ、人工心肺の有無 (OR(オッズ比)8.950, 95%CI(信頼区間) 1.98~40.51)、肝機能障害の有無 (OR:6.543, 1.78~24.02)、男性由来の FFP (OR:0.219, 0.06~0.80) が有意な因子として抽出された (Table 5)。

D. 考察

英国では、2003 年 10 月より新鮮凍結血漿の製造を男性由来のみに限定する施策がとられており、その結果、TRALI の発症は減少していると報告している¹。この英国での施策は TRALI の予防に効果的であると思われるが、ドナーの性別を区別した血液製剤を選択的に投与する実験デザインが困難であるため、それを裏付けるような研究報告はあまりされていない。Palfi らは 1997 年に女性由来の FFP を選択的に投与し、輸血後の呼吸機能が有意に低下することを報告した²。また、Mayo Clinic の Gajic らは 2005 年に重症患者を対象として輸血後の急性肺障害の原因、女性由来の血液製剤と抗白血球抗体の影響に関して prospective および retrospective に調査をおこなった^{3,4}。結果、女性由来の輸血製剤を投与された群では輸血後の呼吸機能の低下が認められたが、女性由来の血液製剤や抗白血球抗体は呼吸機能を悪化させる因子としては抽出されていない。以上の結果から、女性由来の血液製剤が呼吸機能を悪化させる可能性は示されたが、その原因因子は特定されていない。倫理的な観点から女性由来の血液製剤を選択

的に投与する研究デザインは組むことができないが、優位性が示唆されている男性由来の血液製剤を投与することは可能である。Wrightらは腹部大動脈瘤の手術患者において投与された血液製剤のドナーの性別をretrospectiveに特定し、呼吸機能に及ぼす影響を調べた。その結果、男性由来の血液製剤は呼吸機能が有意に良好であったと報告している⁵。これが、男性由来の血液製剤の選択的投与の優位性を示した初めての報告である。本研究はprospectiveに男性由来のFFPを投与し、その優位性を示した初めての報告である。本研究では、male群とmix群の両群間で輸血後P/F比300以下となった症例数に有意差が認められたが、術中出血量、輸血量が影響を与えた可能性がある。そのため、輸血後P/F比300以下を従属因子、その他を独立因子としてロジスティック回帰分析したところ、術中出血量、輸血量は有意な因子として抽出されず、男性由来のFFPの投与が抽出された。そのため、これらの群間のバックグラウンドの差が男性由来のFFPの優位性を示すものではないことが示された。一方、術前肝機能障害が呼吸機能障害の有意な因子として抽出された。Gajicらの報告においてもTRALI発症には患者のsepsisやalcohol abuse、liver diseaseといった全身状態が有意な影響因子として抽出されており、本研究の結果と一致している。TRALIの発症には抗白血球抗体などの血液製剤因子だけではなく、患者因子も関与しているとするtwo hit theoryのメカニズムを支持する結果といえよう。

In vitroの研究では、抗白血球抗体やLysoPCといった免疫関連物質がTRALI発症にほぼ間違いなく関与しているとされているが、本研究においては輸血後呼吸機能障害の因子としてHLAclass I、II抗体、LysoPCは抽出されなかった。TRALI患者のこれらの抗体陽性率が40%程度にとどまっていることを考えるとこのような臨床研究で有意な因子として示

すことは極めて今年であると考えられる。今回の研究ではTRALI症例5例のうち4例はHLAclass I抗体陽性のFFPを投与されており、残り1例も抗顆粒球抗体陽性であったが、この結果からは安易に抗白血球抗体の関与を結論付けることはできない。このメカニズムを明らかにするには、研究デザインの工夫あるいは極めて大きな臨床研究が必要であると考えられる。

参考文献

1. Chapman CE, Stainsby D, Jones H, et al. Ten years of hemovigilance reports of transfusion-related acute lung injury in the United Kingdom and the impact of preferential use of male donor plasma. *Transfusion* 2008.
2. Palfi M, Berg S, Emerudh J, Berlin G. A randomized controlled trial of transfusion-related acute lung injury: is plasma from multiparous blood donors dangerous? *Transfusion* 2001;41(3):317-22.
3. Rana R, Fernandez-Perez ER, Khan SA, et al. Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study. *Transfusion* 2006;46(9):1478-83.
4. Gajic O, Rana R, Winters JL, et al. Transfusion Related Acute Lung Injury in the Critically Ill: Prospective Nested Case-Control Study. *Am J Respir Crit Care Med* 2007.
5. Wright SE, Snowden CP, Athey SC, et al. Acute lung injury after ruptured abdominal aortic aneurysm repair: the effect of excluding donations from females from the production of fresh frozen plasma. *Crit Care Med* 2008;36(6):1796-802.

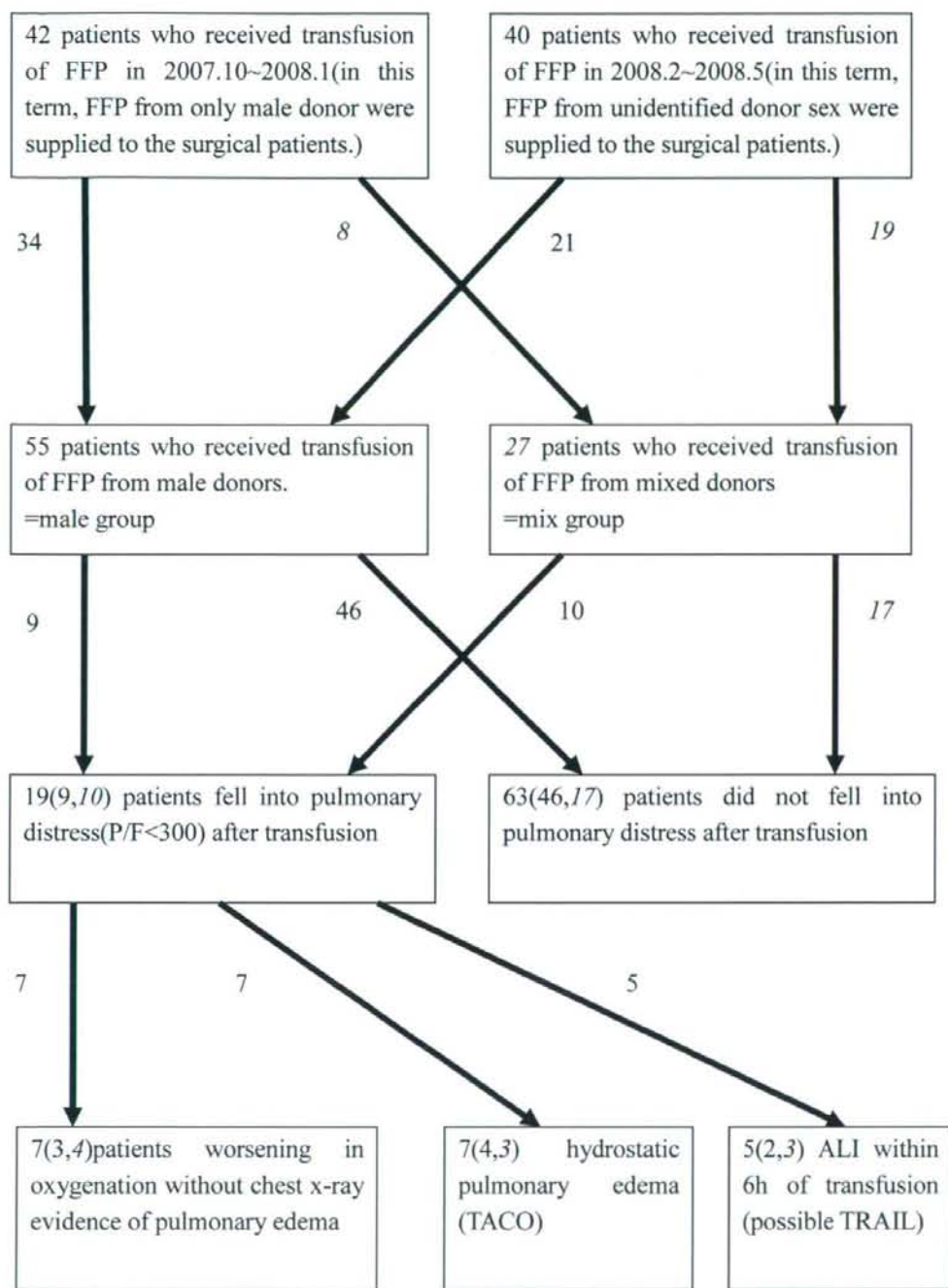


Figure 1 Outline of patients