

NT-pro BNP 測定の有用性. 第 49 回日本呼吸器学会学術講演会 (東京) (平成 21 年 6 月 12-14 日)

27. 岡崎 仁: TRALI 診断と対策～白血球高抗体～. 富山県輸血懇話会学術講演会 (富山) (平成 21 年 11 月 12 日)

28. 岡崎 仁: TRALI・TACO の病態と診断. 神奈川県臨床衛生検査技師会 第 4 回輸血検査研修会 (横浜) (平成 21 年 12 月 4 日)

29. 岡崎 仁: TRALI・TACO の病態と診断. 愛媛県輸血療法委員会合同会議 (松山) (平成 22 年 1 月 31 日)

30. 岡崎 仁: TRALI & TACO: An Update. シンポジウム 4 TRALI と TACO. 第 58 回日本輸血・細胞治療学会 (名古屋) (平成 22 年 5 月 29 日)

31. 岡崎 仁: TRALI と TACO の病態と診断. 東京慈恵会医科大学附属病院 医療安全研修会 (東京) (平成 22 年 9 月 13 日)

32. 岡崎 仁: TRALI 対策へのアプローチ. ワークショップ 5 輸血副作用対策と製剤の効率化. 第 34 回日本血液事業学会総会 (福岡) (平成 22 年 9 月 23 日)

33. 岡崎 仁: 非溶血性輸血副作用. 宮城県臨床輸血研究会 (仙台) (平成 22 年 11 月 20 日)

図 1

2008-2010年のTRALI及びpossible(p-)TRALIの症例数

(ドナーの白血球抗体陽性=Ab+、ドナーの白血球抗体陰性=Ab-)

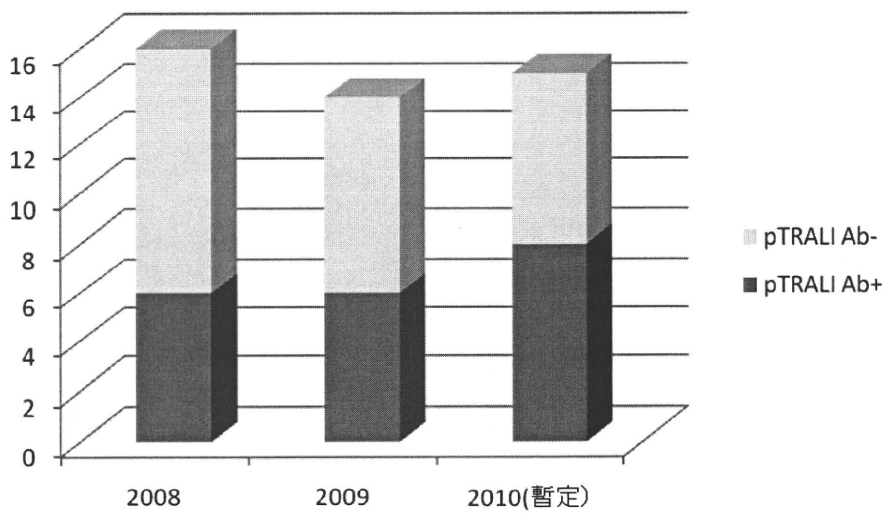
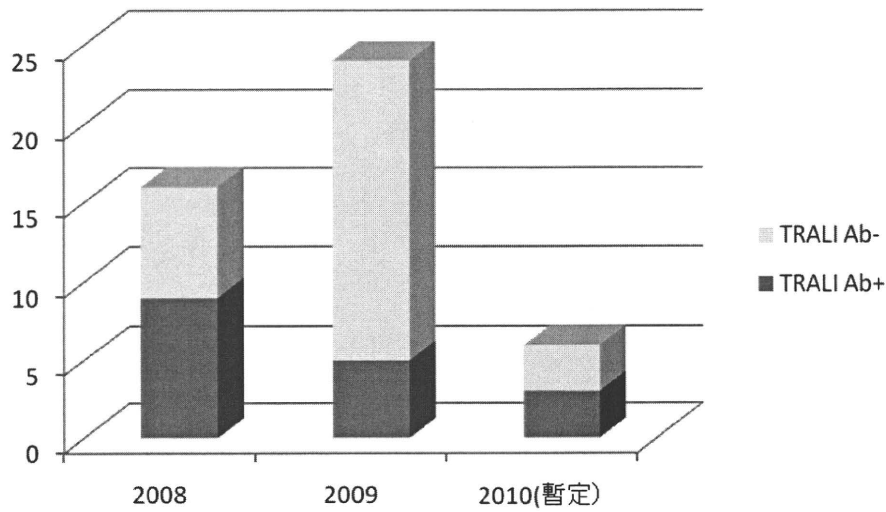


图 2

HLA Class I 抗体 (n=40)

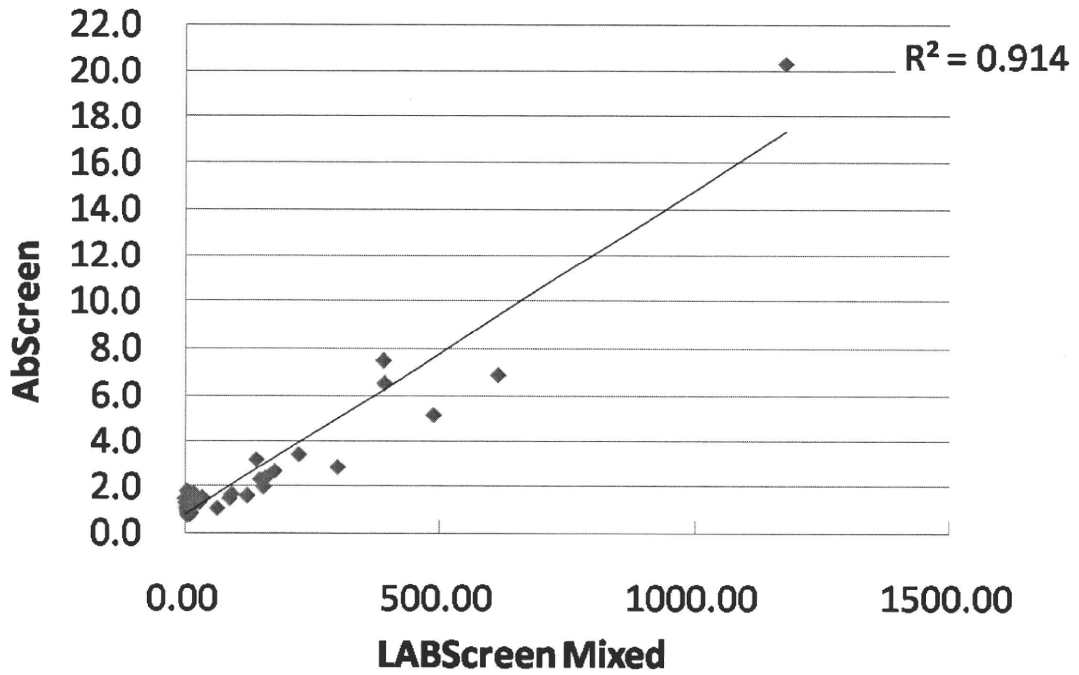


图 3

HLA Class II 抗体 (n=18)

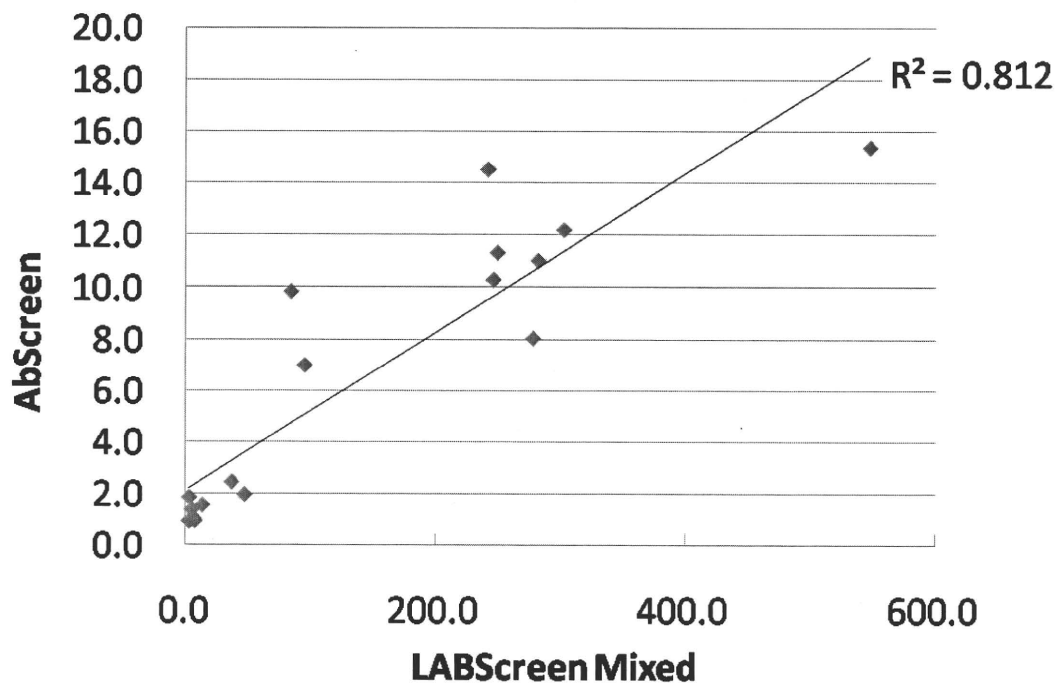


図 4. ELISA 法 (Biotest 自動化) による抗 HLA 抗体(classI,II)陽性率
(カットオフは OD 比=2.0) 男性 548 人、女性 179 人の結果。

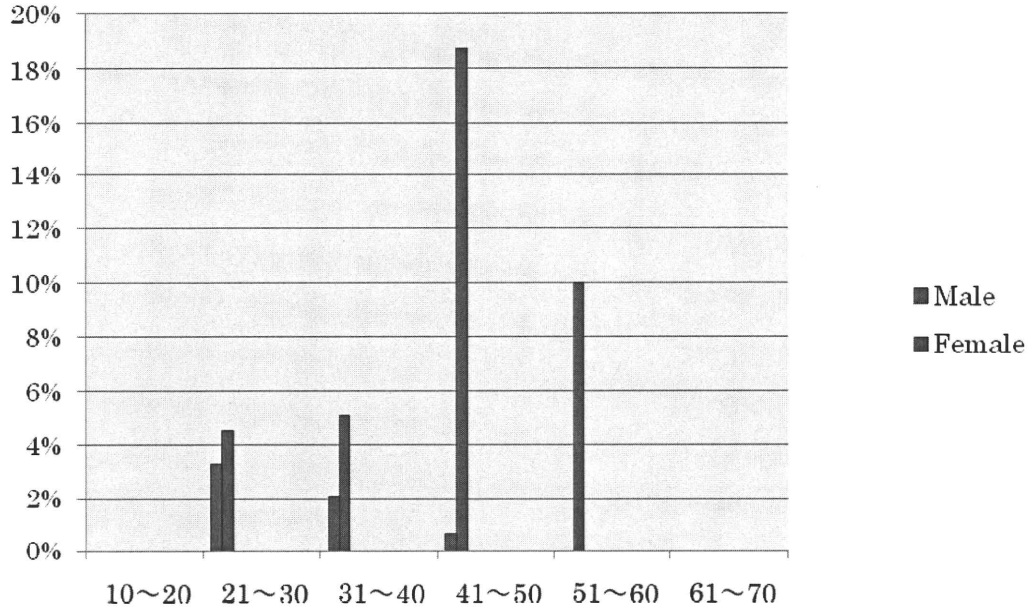
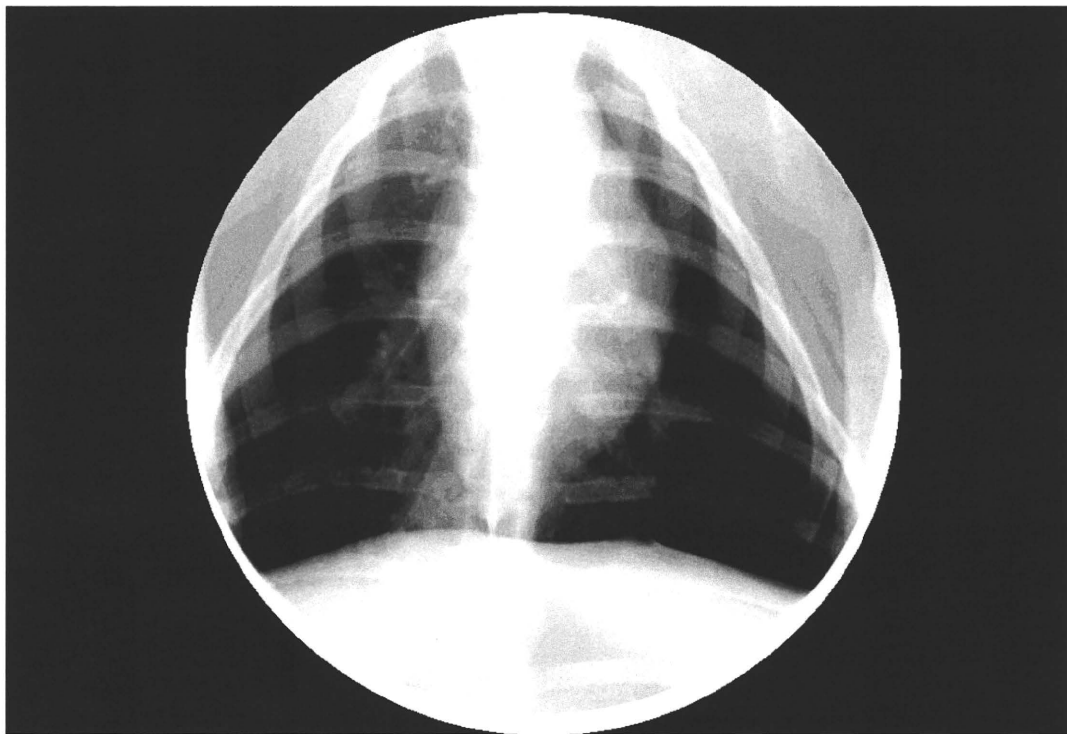


図5

LPS 処置前



LPS 処置後

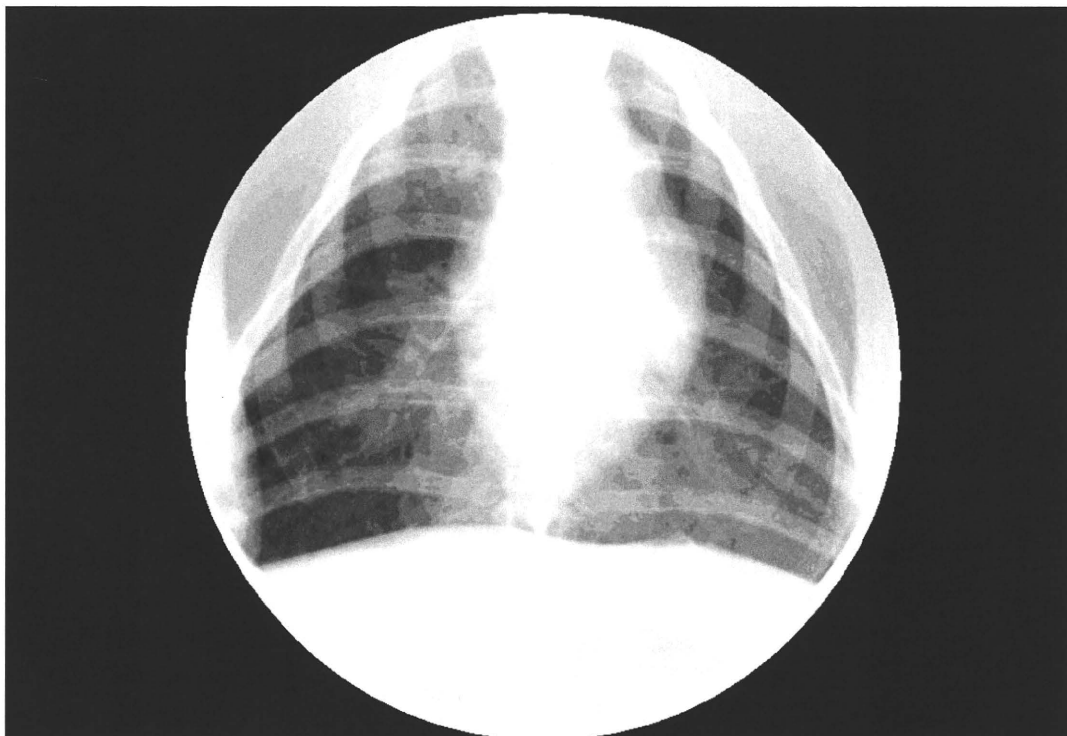


図 6

LPSのみ

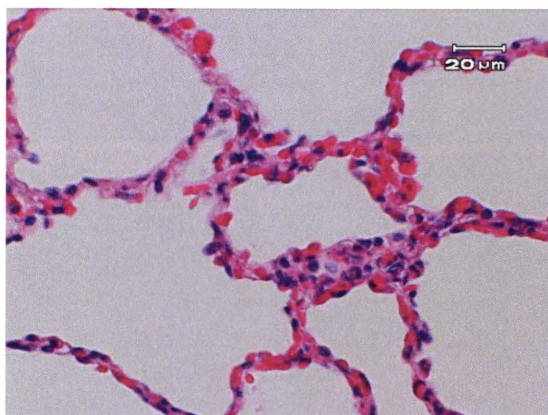
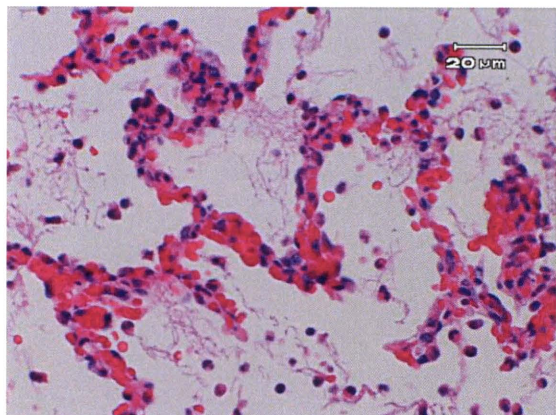


図 7

mAb(4G8)のみ

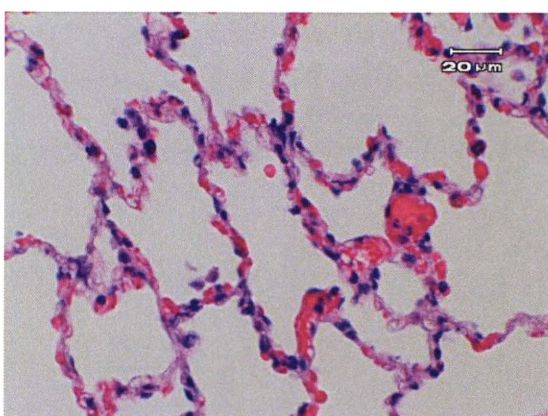
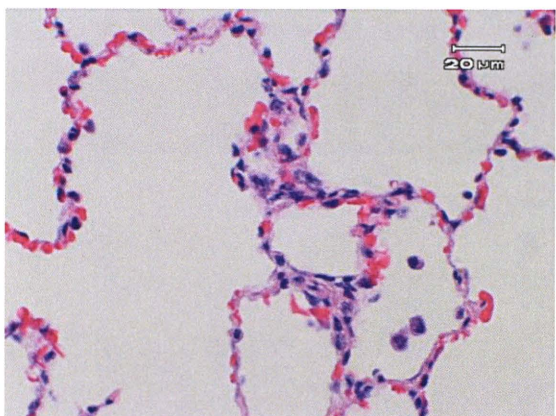
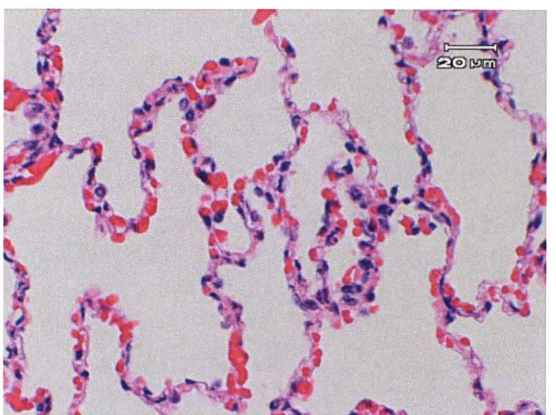


図 8

LPS+mAb



分担研究報告書

1. 非溶血性輸血副作用における Siglec-14 抗体の重要性
2. Nak^a 抗原発現細胞株の樹立
3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発

研究分担者： 平山 文也（大阪府赤十字血液センター）

研究協力者： 保井 一太（大阪府赤十字血液センター）

松山 宣樹（大阪府赤十字血液センター）

研究要旨

1. 非溶血性輸血副作用における Siglec-14 抗体の重要性

非溶血性輸血副作用の一部では、輸血用血液製剤に混在する白血球抗体が原因となる場合がある。最近、白血球などの免疫担当細胞の表面上に Siglec-14 と呼ばれるシアル酸受容体が発現しており、Siglec-14 を欠損する健常者が存在するところが明らかとなった。Siglec-14 を欠損する健常者が妊娠、出産などで感作され抗体を持つに至り、そのようなヒトが献血者になれば輸血に伴って Siglec-14 抗体が患者に輸注され、ひいては非溶血性輸血副作用を惹起する可能性が想定される。そこで本研究では、献血者における Siglec-14 欠損率、献血者における Siglec-14 抗体保有率、非溶血性輸血副作用原因製剤中の Siglec-14 抗体陽性率、Siglec-14 抗体による好中球活性化能を検討した。その結果、1) 10.8% (54/502)の献血者で Siglec-14 欠損し、2) 献血者の 0.8% (4/500)が Siglec-14 抗体保有し、3) 非溶血性輸血副作用原因製剤の 5.3% (11/207)で Siglec-14 抗体陽性で、TRALI 事例ではその陽性率が 17.2% (5/29)と有意に高く、TRALI 以外の事例では 3.4% (6/178)と低いことが明らかとなった。また、5) Siglec-14 抗体陽性の TRALI 事例のうち、3 例で検討可能であったが、そのうち 1 例で好中球の活性化が認められ、同様の好中球の活性化は Siglec-14 モノクローナル抗体でも認められた。以上より、Siglec-14 抗体は非溶血性輸血副作用、特に TRALI の原因になる可能性が示唆された。

2. Nak^a 抗原発現細胞株の樹立

日本では Nak^a 抗体に起因する TRALI やショックなどの非溶血性輸血副作用が散見される。そこで、Nak^a 抗体を特異的に検出できる Nak^a 抗原発現細胞株を樹立した。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発

非溶血性輸血副作用の中で最も高頻度で見られるアレルギー性副作用の新たな検査方法を樹立するために、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」が非溶血性輸血副作用の解析に転用できるか否かを検討し、可能であることを明らかとなった。

A. 研究目的

非溶血性輸血副作用の一部では、輸血用血液製剤に混在する白血球抗体が原因となる場合がある。最近、白血球などの免疫担当細胞の表面上に Siglec-14 と呼ばれるシアル酸受容体が発現しており、Siglec-14 を欠損する健常者が存在するところが明らかとなった。Siglec-14 を欠損する健常者が妊娠、出産などで感作され抗体を持つに至り、そのようなヒトが献血者になれば輸血により Siglec-14 抗体が輸注され、ひいては非溶血性輸血副作用を惹起する可能性が想定される。そこで本研究では、献血者における Siglec-14 欠損率、献血者における Siglec-14 抗体保有率、非溶血性輸血副作用原因製剤中の Siglec-14 抗体陽性率、Siglec-14 抗体による好中球活性化能を検討した。

次に、日本では Nak^a 抗体に起因する TRALI やショックなどの非溶血性輸血副作用が散見される。そこで、Nak^a 抗体を特異的に検出できる Nak^a 抗原発現細胞株を樹立した。

最後に、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たな検査方法を樹立するために、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」が非溶血性輸血副作用の解析に転用できるか否かを検討した。

B. 研究方法

1. 献血者における Siglec-14 欠損率：Siglec-14 モノクローナル抗体が献血者末梢血白血球に結合するか否かをフローサイトメーターを用いて検討した。2. 献血者における Siglec-14 抗体保有率：献血者血漿を試料として、Siglec-14 発現細胞株と反応させ

ることにより抗体の有無を検討した。3. 非溶血性輸血副作用原因製剤中の Siglec-14 抗体陽性率：日本赤十字社中央血液研究所より非溶血性輸血副作用原因製剤の上清を入手し、Siglec-14 発現細胞株と反応させることにより抗体の有無を検討した。また、非溶血性輸血副作用の種類別の検討も行った。4. Siglec-14 抗体による好中球活性化能：好中球活性化試験（厚生労働科学研究費補助金：免疫学的輸血副作用の把握とその対応に関する研究 H17-医薬一般-053 にて報告、平成 18 年度）により、Mac-1 の発現上昇および heparin binding protein (HBP) の放出を指標に検討した。5. Siglec-14 抗体の除去：Siglec-14 抗体保有 TRALI 原因製剤上清 100 μl を 1 × 10⁶ 個の KY-mock 細胞あるいは KY-Siglec-14 細胞と混和し、37°C で 30 分間インキュベートし、上清を得るという操作を 3 回繰り返した。6. Nak^a 抗原発現細胞株の樹立：厚生労働科学研究費補助金：免疫学的輸血副作用の把握とその対応に関する研究 H17-医薬一般-053 にて報告（平成 18 年度）したように、親細胞株としては K563 細胞を、ベクターとしてはレトロウィルスベクターを用いた。6. 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。

C. 研究結果

1. 非溶血性輸血副作用における Siglec-14 抗体の重要性

1) 献血者における Siglec-14 欠損率: 10.8% (54/502) 2) 献血者における Siglec-14 抗体保有率: 0.8% (4/500) (図 1) 3) 非溶血性輸血副作用原因製剤中の Siglec-14 抗体陽性率: 5.3% (11/207)、TRALI 事例での陽性率: 17.2% (5/29)、TRALI 以外の事例での陽性率: 3.4% (6/178) (図 1) 4) Siglec-14 抗体による好中球活性化能: Siglec-14 抗体陽性の TRALI 事例のうち、3 例で検討可能であった。うち 1 例は、健常人血しょうに比べ Siglec-14 陽性の好中球を有意に活性化させ、その顆粒タンパクである HBP を放出させた。一方、siglec-14 陰性の好中球ではこの活性化は見られなかった。(図 2) 5) Siglec-14 抗体除去による好中球活性化能への影響: Siglec-14 抗体を保有する TRALI 原因製剤上清から Siglec-14 抗体を除去すると好中球活性化能が著しく減弱した (図 3) 6) Siglec-14 抗体モノクローナル抗体の好中球活性化能: 陰性コントロールとして mouse IgG ($1 \mu\text{g/ml}$)、陽性コントロールとして fMLP ($0.1 \mu\text{M}$) をそれぞれ用いた。検査試料としては、3 種類の濃度 (1、0.1、 $0.01 \mu\text{g/ml}$) の Siglec-14 に対するモノクローナル抗体を用いた。被検全血として Siglec-14 抗原陽性のものを 3 種類 (Blood A~C)、Siglec-14 抗原陰性のものを 3 種類 (Blood D~F) それぞれ用意した。これら 5 種類の血漿と 6 種類の被検全血をそれぞれ混和し、 37°C で 30 分間インキュベートした後、好中球分画での Mac-1 (好中球活性化マーカー) の発現を FCM で測定し、その

平均蛍光強度 (MFI) を求めたところ、 $0.01 \sim 1 \mu\text{g/ml}$ の Siglec-14 モノクローナル抗体は Siglec-14 抗原陽性血液中の好中球を活性化させた。(図 4)

2. Nak^a 抗原発現細胞株の樹立

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。

3. アレルギー性輸血副作用の新たな検出系の開発

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と混和し、好塩基球の活性化を CD203c の発現変化を指標に調べた。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 例のみで陽性を示した。しかもその一例の陽性もカットオフ値に極めて近いので非特異反応とも考えられるものであった。(図 5) 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。

D. 考察

Siglec-14 抗体は非溶血性輸血副作用、特に TRALI の原因になる可能性が示唆された。

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。

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。

E. 発表論文

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. *Transfus Med.* 2009 19: 274-7.
6. Hirayama F. Recent advances in laboratory assays for nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion.* 2010 50: 252-63.
7. Yasui K, Angata T, Matsuyama N, Furuta RA, Kimura T, Tani Y, Nakano S, Okazaki H, Narimatsu H, Hirayama F. Identification of anti-Siglec-14 alloantibodies in blood components implicated in non-hemolytic transfusion reactions *Br J Haematology*, in press.

図1 Siglec-14 抗体の陽性率

① 血液製剤全体 vs 副作用製剤
 献血者 0.8% (4/500)
 副作用製剤 5.3% (11/207) } p<0.01

→ Siglec-14 抗体は副作用発症の原因となりうる

② TRALI vs TRALI 以外
 TRALI 17.2% (5/29)
 TRALI 以外 3.4% (6/178) } p<0.01
 蕁麻疹 5.9% (2/34)
 発熱 2.3% (1/43)
 アナフィラキシー 5.8% (3/52)
 その他 0% (0/49)

→ Siglec-14 抗体はTRALI 発症の原因となりうる

図4 Siglec-14 MoAbによる好中球の活性化

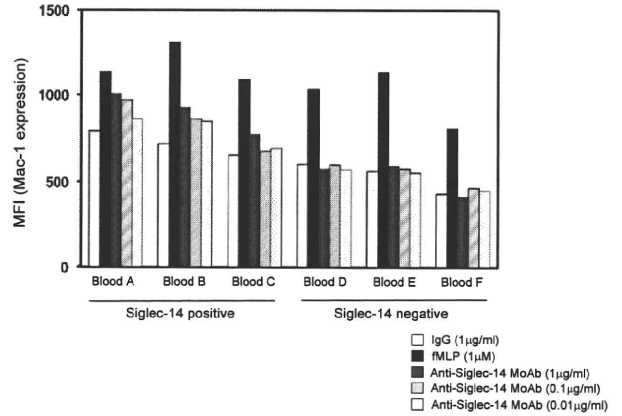


図2 Siglec-14抗体による好中球顆粒放出

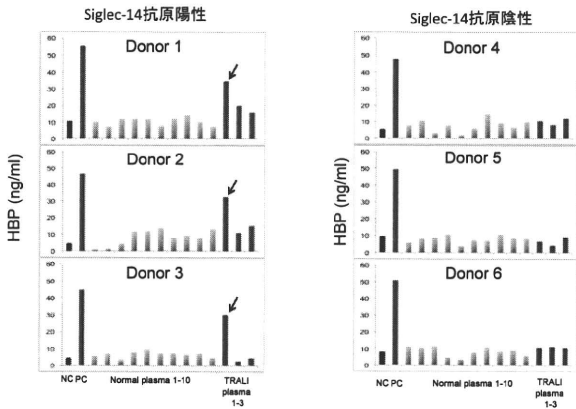


図3 Siglec-14抗体による好中球活性化

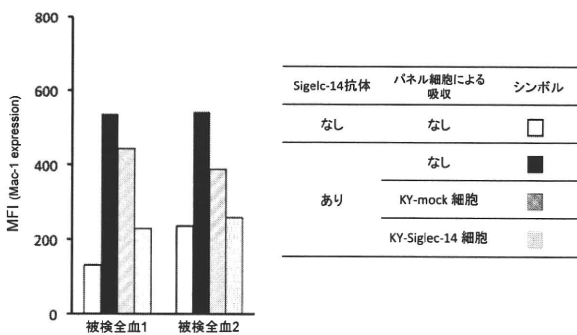
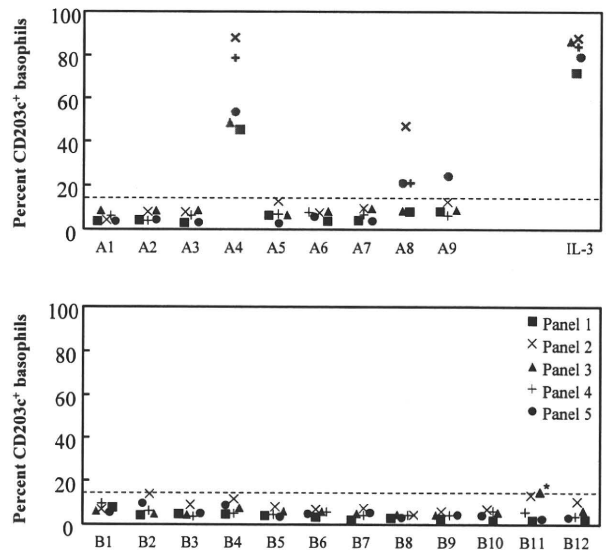


図5 好塩基球活性化試験



分担研究報告書

血漿製剤による輸血後呼吸障害に関する臨床的研究

研究分担者： 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）
金井 理一郎（杏林大学医学部麻酔科学）
満田 真吾（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）
堀田 一（元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）
岡崎 仁（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）
橋本 志歩（日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所）
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）
中村 圭太（東京都赤十字血液センター）
矢富 裕（東京大学医学部医学系研究科臨床病態検査医学）
大川 龍之介（東京大学医学部医学系研究科臨床病態検査医学）
清水 勝（西城病院）

研究要旨

【目的】輸血関連急性肺障害（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。供血者をコントロールすることにより TRALI の発症を抑制する試みがなされているが、女性由来の血漿製剤の供給を抑制するべきか、あるいは抗白血球抗体を含む血漿製剤を分別して、それらのみを除外するか議論のあるところである。そのためには血漿製剤の安全性について臨床的な調査が必要である。本研究では新鮮凍結血漿に関しては供血者の性別の違いによる輸血後の呼吸不全の発症に違いがあるかを調査した。また、新鮮凍結血漿以上に輸血後呼吸障害の発症率の高い血小板濃厚液による TRALI の発症についても臨床的な調査が必要であり、血小板濃厚液に含まれている免疫学的活性物質との関連についての臨床研究を施行した。

【方法】1.男性由来の新鮮凍結血漿の安全性に関する臨床研究

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。抗白血球抗体は日本赤十字社中央血液研究所、Lysophosphatidylcholine (LysoPC)は東京大学臨床検査医学にて測定を行った。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。

2. 血小板濃厚液の輸血後呼吸障害と免疫活性物質に関する臨床研究

平成21年10月1日から平成22年9月30日までの外科手術中あるいはICUに入室時に血小板濃厚液を投与した患者を対象とした。血小板濃厚液に付属しているセグメントおよびバッグ内に残った製剤を遠心分離し、血漿を冷凍保存した。投与された患者の6時間以内の血液ガス所見を記録保存した。新鮮凍結血漿の調査と同様に呼吸障害(P/F比($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 300未満)、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。また、血小板製剤中に含まれる抗白血球抗体、およびを測定し、観察された投与後の呼吸状態との関連を検討し、血小板製剤の呼吸機能に影響を及ぼす因子を検討した。セグメント中の免疫活性物質は新鮮凍結血漿と同様に抗白血球抗体は日本赤十字社中央血液研究所、LysoPCは東京大学臨床検査医学にて測定を行った。対象患者の手術、麻酔記録のデータ、患者背景をもとに血小板輸血後、呼吸機能の低下した症例の因子分析を行った。

【結果と考察】

1. 男性由来の新鮮凍結血漿の安全性に関する臨床研究

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 classI抗体の陽性率はmale群で9.6%、mix群で22.2%であった。LysoPC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。possibleTRALI の 5 例では、4 例に HLA classI 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。

2. 血小板濃厚液の輸血後呼吸障害と免疫活性物質に関する臨床研究

対象症例は 86 例であり、心臓外科 69 例(大血管 35 例、冠動脈バイパス 27 例、弁置換 7 例 : on pump 56 例、off pump 13 例)、脳神経外科 4 例、産婦人科 3 例、泌尿器科 3 例、消化器外科 3 例、その他 4 例であった。男性 56 名、女性 30 名であった。患者の平均年齢は 67.6±13 歳、身長 159.9±14cm 体重 58.1±12.0kg であった。輸血後に P/F<300 となった症例は 54 例であった。そのうち、胸部レントゲン像から呼吸不全を分類し、レントゲン像の変化が見られなかったもの 26 例、心原性肺水腫 23 例、浸潤性肺水腫 5 例であった。これらの呼吸不全の分類群において群間に有意差があったものは年齢 (P<0.05) のみであった。各呼吸不全を従属因子としてのロジスティック回帰分析による分析では、呼吸不全を起こす有意な因子は年齢 (オッズ比 1.093(95%CI: 1.023~1.167), p=0.008) であった。そのうち、TACO を起こす有意な因子は血小板製剤に含まれる抗白血球抗体 ClassII (オッズ比 18.4(95%CI: 1.987~170.074), p=0.010) 年齢(オッズ比 1.146(95%CI: 1.028~1.279), p=0.014) であった。possibleTRALI を起こす有意な因子は抗顆粒球抗体 (オッズ比 13.0(95%CI: 1.428~118.279), p=0.023) であった。

今回の対象症例は心臓外科症例が大半を占め、手術後呼吸機能が一過性に悪化する症例が多く、胸部レントゲン所見と左房負荷のパラメータのみでは TACO と possibleTRALI の区別をつけるのは困難であった。TACO と診断されたもので抗白血球抗体 ClassII が抽出されたのは、このなかに TRALI が含まれる可能性が推定される。TACO 疑い、TRALI 疑いと診断された患者血清と血小板濃厚液が実際に交差反応を起こすかを検討する必要がある。LysoPC は赤血球濃厚液および血小板濃厚液の貯蔵時に蓄積するものであり、以前 FFP 製剤で測定したものよりも高値であった。しかしながら、血小板濃厚液中の LysoPC と輸血後呼吸障害の関係は認められなかった。

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。このうち、抗白血球抗体は妊娠により産生されることから女性は男性と比較して保有率が高い。そのため、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。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、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、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。また、血小板製剤は apheresis 由来であり、男性のみの製剤とすると供給に支障をきたす。したがって、血小板製剤に含まれる抗白血球抗体やその他の免疫学的活性物質のスクリーニングを行い、危険性のある製剤の実を除外する方策あるいは、血漿成分の置換により対処することがより現実的である。血小板濃厚液には白血球の priming activity を上昇させると考えられている lysophosphatidylcholine (LysoPC) も含まれており、この免疫活性物質の関与も調査する必要がある。本研究では血小板濃厚液投与後に呼吸機能を観察し、血小板濃厚液に含まれている免疫学的活性物質との関連についても同様に検討した。

B. 研究方法

1. 男性由来の新鮮凍結血漿の安全性に関する臨床研究

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 (PaO₂/FiO₂ 300 未満)、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 未満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。抗白血球抗体は日本赤十字社中央血液研究所、LysoPC は東京大学臨床検査医学にて測定を行った。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 未満」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。

2. 血小板濃厚液の輸血後呼吸障害と免疫活性物質に関する臨床研究

平成 21 年 10 月 1 日から平成 22 年 9 月 30 日までの外科手術中あるいは ICU に入室時に血小板濃厚液を投与した患者を対象とした。血小板濃厚液に付属しているセグメントおよびバッグ内に残った製剤を遠心分離し、血漿を冷凍保存した。投与された患者の 6 時間以内の血液ガス検査所見を記録保存した。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。血小板製剤中に含まれる抗白血球抗体、および LysoPC を測定し、観察された投与後の呼吸状態との関連を検討し、血小板製剤の呼吸機能に影響を及ぼす因子を検討した。

抗白血球抗体は日本赤十字社中央血液研究所、LysoPC は東京大学臨床検査医学にて測定を行った。対象患者の手術、麻酔記録のデータ、患者背景をもとに血小板輸血後、呼吸機能の低下した症例の因子分析を行った。

C. 研究結果

1. 男性由来の新鮮凍結血漿の安全性に関する臨床研究

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 (Table1)。術中出血量、術中輸血量は mix 群のほうが多かった (Table2)。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 (Table2)。投与された FFP 中の HLA classI 抗体の陽性率は male 群で 9.6%、mix 群で 22.2%であった。HLA classII 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 (Table2)。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。(Table3)。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 (Table4)。possible TRALI の 5 例では、4 例に HLA classI 抗体陽性、1 例に HNA 抗体陽性が認められた (Table4)。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 (Table5)。

2. 血小板濃厚液の輸血後呼吸障害と免疫活性物質に関する臨床研究

対象症例は 86 例であり、心臓外科 69 例(大血管 35 例、冠動脈バイパス 27 例、弁置換 7 例: on pump 56 例、off pump 13 例)、脳神経外科 4 例、産婦人科 3 例、泌尿器科 3 例、消化器外科 3 例、その他 4 例であった。男性 56 名、女性 30 名であった。患者の平均年齢は 67.6 ± 13 歳、身長 $159.9 \pm 14\text{cm}$ 体重 $58.1 \pm 12.0\text{kg}$ であった。輸血後に P/F<300 となった症例は 54 例であった。そのうち、胸部レントゲン像から呼吸不全を分類し、レントゲン像の変化が見られなかったもの 26 例、心原性肺水腫 23 例、浸潤性肺水腫 5 例であった。これらの呼吸不全の分類群において群間に有意差があったものは年齢 ($P<0.05$) のみであった。各呼吸不全を従属因子としてのロジスティック回帰分析による分析では、呼吸不全を起こす有意な因子は年齢 (オッズ比 1.093(95%CI: 1.023~1.167), $p=0.008$) (Table7) であった。そのうち、TACO を起こす有意な因子は血小板製剤に含まれる抗白血球抗体 ClassII (オッズ比 18.4(95%CI: 1.987~170.074), $p=0.010$) 年齢 (オッズ比 1.146(95%CI: 1.028~1.279), $p=0.014$) であった (Table7)。TRALI を起こす有意な因子は抗顆粒球抗体 (オッズ比 13.0(95%CI: 1.428~118.279), $p=0.023$) であった (Table7)。血小板に含まれる LysoPC と P/F の低下度には関係は認められなかった (Fig.1)。

D. 考察

2003 年 10 月より英国において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以来、TRALI の発症は減少している[1]¹ ことから、男性由来の血漿製剤は相対的に安全であると考えられる。しかし、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[3]。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 HLAclassI、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 HLAclassI 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える。

TRALI の発症頻度を血液製剤別に比較すると本邦の統計では RBC 0.48, FFP 0.42, PC 2.1 (10 万バッグ当たり) と血小板濃厚液での発症頻度が高くなっている[6]。米国の統計では、RBC での TRALI 発症のオッズ比を 1.0 とし、血漿製剤 12.5, Apheresis 由来血小板 7.9, 全血由来血小板 1.2, クリオ製剤 2.0 となっており、やはり apheresis 由来血小板製剤による TRALI 発症頻度は高いと報告されている[7]。これは同一ドナーからの血漿を多く含むため、免疫活性物質を持つドナーからの製剤では希釈されることはなく患者へ投与されてしまうからと考えられる。オランダ、フランス、ケベックでの統計においても血小板製剤の TRALI 発症頻度は 0.18 (10 万例の輸血症例に対して) であるが、血小板製剤では 0.46 と高

い頻度で TRALI が発症すると報告されている [8]。SHOT の報告では血小板濃厚液の TRALI 発症は 68000 単位に 1 例と報告されている [1]。以上のことから女性由来の apheresis 血小板濃厚液をいかにコントロールするか議論のあるところである。米国での試算によれば、すべての女性由来の apheresis 血小板濃厚液の生産を取りやめると 37.1% の減産になり、妊娠経験のある妊婦からのもののみをやめると 22.5% の減産になり、さらにこのうち HLA 陽性患者からのもののみを取りやめると減産は 5.4% にとどまる [9]。このように血小板濃厚液の供給を保ちながら、疑いのある製剤の生産を中止するには、血小板濃厚液における抗白血球抗体による呼吸不全の発生頻度とその原因因子の特定が必要である。現在、血小板濃厚液の血漿を置換液に置き換える方法も検討されているが導入には至っていない。前者の新鮮凍結血漿に関する臨床研究では、供血者の性別で製剤をコントロールすることは現実的に可能であるため男性由来製剤を選択的に投与し、呼吸機能に及ぼす影響を調査した [10]。一方、血小板濃厚液では供血者の性別を制限することは適正な供給に支障をきたすため、現実的ではない。したがって、血小板製剤では、特定の免疫活性物質を持つ製剤の供給を除外することが現実的な対処法となる。本研究では、製剤中の免疫活性物質のうち、呼吸障害を引き起こす可能性のあるものを特定することを目的とし、その関連を検討した。その結果、ロジスティック回帰分析では、抗顆粒球抗体が TRALI と診断される呼吸不全の原因因子として抽出された。これは統計的に有意ではあるものの、実際に患者血清と含まれていた抗顆粒球抗体に交差反応が見られるかを確認しなければならない。TACO の疑いと診断された症例においては抗 HLA Class II が有意な原因因子として抽出された。これは TACO の病態としては原因因子として抽出されるものではないが、免疫学的

メカニズムにより発症している呼吸不全の症例において、心負荷の所見も伴っており、TACO と診断されたものが含まれている可能性もある。本研究の症例は心臓血管外科症例が大半であり、多くの症例の胸部レントゲン写真では心拡大がみられるため、両者を区別するのは困難であり、TRALI+心負荷の所見は TACO と診断される可能性は高いと考えられる。これらの症例でも患者血清との交差反応により免疫学的な関連がないかを追跡調査する必要がある。血小板濃厚液には抗白血球抗体のほかに、常温保存で出現する LysoPC も TRALI 発症の原因と考えられている [11]。LysoPC は貯蔵中に増加してくるので血漿製剤よりも血小板濃厚液の方が濃度が高い。今回の測定でも $359 \pm 59 \mu\text{mol/L}$ であり、FFP における濃度 (男性由来のみ: $258 \pm 44 \mu\text{mol/L}$ 、男性女性両者の区別なし: $270 \pm 53 \mu\text{mol/L}$) と比較しても有意に高い値であった。LysoPC は dose-dependent に白血球を prime することは示されているが [12]、実際のどの程度の濃度の LysoPC を含む製剤が TRALI を発症させるかは明らかではない。本研究ではその濃度と呼吸障害の関係は明らかではなかった。Gajic の前向き研究では血小板濃厚液中の LysoPC が輸血後呼吸機能低下の有意な因子として抽出されている [13] が、その際の LysoPC の測定レンジは $180 \sim 1090 \mu\text{mol/L}$ であった。今回の新鮮凍結血漿や血小板濃厚液の測定では Gajic らの統計と比較して LysoPC の高い濃度は検出されていない。LysoPC は経時的に濃度が上昇することが考えられ、今回の調査では保存期間の短いものが使用されたのかもしれない。調査された製剤は投与された製剤の一部であったため、統計的には十分な検出力はなかったかもしれない。

E まとめ

手術患者を対象に血漿製剤 (新鮮凍結血漿お

よび血小板濃厚液)の術後呼吸不全の原因因子を検討した。術後呼吸不全は人工心肺や術前の肝障害など血液製剤以外の因子に影響を受けるが、新鮮凍結血漿に関しては男性由来のものが女性由来のものと比較して有利であることが示された。血小板濃厚液では含まれている抗 HLA 抗体や抗顆粒球抗体の関与が疑われたが、実際に交差反応を含めた因果関係については更なる検討が必要である。

参考文献

1. Chapman, C.E., 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*, 2009. **49**(3): p. 440-52.
2. Palfi, M., et al., A randomized controlled trial of transfusion-related acute lung injury: is plasma from multiparous blood donors dangerous? *Transfusion*, 2001. **41**(3): p. 317-22.
3. Gajic, O., et al., Transfusion-related acute lung injury in the critically ill: prospective nested case-control study. *Am J Respir Crit Care Med*, 2007. **176**(9): p. 886-91.
4. Rana, R., et al., Transfusion-related acute lung injury and pulmonary edema in critically ill patients: a retrospective study. *Transfusion*, 2006. **46**(9): p. 1478-83.
5. Wright, S.E., 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): p. 1796-802.
6. 岡崎 仁, 西.元., 渡辺 嘉久, 中島 文明, 橋本 志歩 輸血関連急性肺障害 (TRALI) に関する基礎的、臨床的研究 (H17-医薬一般-053) 平成 17-19 年度報告書 厚生労働省科学研究費補助金 医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業. 2007.
7. Eder, A.F., et al., Transfusion-related acute lung injury surveillance (2003-2005) and the potential impact of the selective use of plasma from male donors in the American Red Cross. *Transfusion*, 2007. **47**(4): p. 599-607.
8. Norda, R., E. Tynell, and O. Akerblom, Cumulative risks of early fresh frozen plasma, cryoprecipitate and platelet transfusion in Europe. *J Trauma*, 2006. **60**(6 Suppl): p. S41-5.
9. Rios, J.A., et al., Blood donations from previously transfused or pregnant donors: a multicenter study to determine the frequency of alloexposure. *Transfusion*, 2010.
10. Nakazawa, H., et al., Impact of fresh-frozen plasma from male-only donors versus mixed-sex donors on postoperative respiratory function in surgical patients: a prospective case-controlled study. *Transfusion*, 2009. **49**(11): p. 2434-41.
11. Silliman, C.C., et al., Plasma and lipids from stored platelets cause acute lung injury in an animal model. *Transfusion*, 2003. **43**(5): p. 633-40.
12. Silliman, C.C., et al., Lysophosphatidylcholines prime the NADPH oxidase and stimulate multiple neutrophil functions through changes in cytosolic calcium. *J Leukoc Biol*, 2003. **73**(4): p. 511-24.
13. Gajic, O., et al., Transfusion from male-only versus female donors in critically ill recipients of high plasma volume components. *Crit Care Med*, 2007. **35**(7): p. 1645-8.

Fig.1

