

令和元年6月20日現在

機関番号：82610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10979

研究課題名(和文) 自己血液製剤の輸血関連有害反応への関与が想定される分子薬理学的機構の解析

研究課題名(英文) Molecular pharmacological analysis for mechanisms of action of monocytes implicating adverse effects related to autologous blood transfusion

研究代表者

東 俊晴 (Azma, Toshiharu)

国立研究開発法人国立国際医療研究センター・その他部局等・医師

研究者番号：60284197

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：自己血液製剤に混入する白血球の輸血関連有害作用については不明な点が多い。本研究は「白血球による炎症性病態が輸血に起因する有害反応を惹起する」との仮説を検証するために立案された。フローサイトメトリーにより、ヒト単球系細胞THP-1を冷蔵保存後体温まで加温することでアポトーシスが誘導され、組織因子を発現した凝固活性を有するアポトーシス小胞やマイクロパーティクルが発生することを確認した。また白血球を含有する自己血液製剤の血漿中にはTNF- α のほか複数の白血球走化因子や成長因子、喘息等アレルギー疾患との関連が指摘されているTh2サイトカインなどが増加することが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

同種血輸血は周術期患者の生命予後を悪化させると報告されており、血液製剤に含まれる白血球の関与が指摘されている。一方、周術期に使用される自己血液製剤に混入している白血球の有害作用について詳細な検討はなされていない。本研究により、冷蔵保存された単球を体温まで加温すると血栓性を有するマイクロパーティクルを発生させ、いくつかの急性期サイトカインを増加させることが確認できた。これらの研究成果をもとに、血栓傾向や喘息等アレルギー症状を観察項目とし白血球を含有する自己血液製剤と輸血関連有害事象との関連を調査するための前向き臨床研究が必要であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Involvement of leukocytes in adverse events related to autologous blood transfusion remain to be clarified. Flow cytometric analysis demonstrated that the incubation of human monocytic cells THP-1 at body temperature after the cold storage of these cells induced apoptosis and provoked the release of procoagulant apoptotic vesicles and microparticles with surface expression of tissue factor. Several cytokines including TNF- α , leukocyte chemotactic factors, growth factors, and Th2 cytokines appeared to be increased by such change in environmental temperature around packages of blood component without leukocyte reduction.

研究分野：麻酔科学

キーワード：自己血輸血 温度感受性受容体 白血球 単球 マイクロパーティクル アポトーシス

1. 研究開始当初の背景

日本麻酔科学会が主催した調査によると、術中に発生し周術期死亡の要因となった危機的偶発症の約半数は出血に関連する事象であったと報告されている (http://partners.kyodokodo.jp/info/action/organization/101125_5.pdf). また比較的大規模の後方視的観察研究には、周術期患者の術前貧血は周術期死亡の独立した危険因子であり、周術期患者への同種血輸血は死亡率を増加することが報告されている(Anesthesiology 2009;110:574-81). これらのことから、安全な周術期輸血戦略が特に予定手術患者の生命予後を改善することに関しては論をまたない。

必要以上の同種血輸血が集中治療中の急性期患者の生命予後に与える影響について多施設共同無作為化比較試験が行われている。輸血の意思決定のためのヘモグロビン値を二群で個別に設定し、輸血を制限する群と、そうでない群の介入後死亡率を比較した。冠動脈疾患を有する患者を対象としたサブ解析ではヘモグロビンを高めに設定した同種血輸血が死亡率を改善する傾向が認められたが、対象全体では輸血を制限することで介入後死亡率が低下する傾向がより強く示された(N Engl J Med 1999;340:409-17, Crit Care Med 2001;29:227-34).

この研究の報告に続き、集中治療中の急性期患者に対する同種血輸血がその患者の生命予後に及ぼす影響について、多施設が参加した複数の前向き観察研究が施行されている。輸血を受けた集中治療中の患者は、背景因子を補正した輸血を受けなかった対照患者と比較して有意に死亡率が高いことが報告されている(Crit Care Med 2004; 32:39-52). この観察結果は、ほぼ同様な研究手法を用いた別の観察研究においても確認された(JAMA 2002; 288:1499-507). しかしながらこれらの研究は、それぞれの観察対象地域において、同種赤血球製剤から採血時に白血球が除去されていなかった時代に施行されている。その後、血液製剤の採血時白血球除去が標準的に行われるようになり、改めて同様な観察手法の前向き臨床研究が計画された。以前の観察結果と異なり、この研究では、集中治療中の急性期患者に同種血輸血を施行したほうが、施行しなかった患者より生命予後が改善するという結論が得られている(Anesthesiology 2008; 108:31-9).

これらの研究結果を総合すると、同種血輸血による有害作用の多くは血液製剤に含まれる同種白血球に起因することが示唆される。上記に引用した臨床研究からは、白血球がどのような分子薬理学的機構を介してレシピエントに影響を及ぼしているのかについては不明である。しかしながら、引用した文献の対象観察期間や有害事象の発生頻度から、拒絶反応や輸血後移植片対宿主病のような獲得免疫を介した病態の関与は考えにくい。そこで研究代表者らは「顆粒球や単球・マクロファージなどによる自然免疫を介する炎症性病態が輸血に起因する有害反応を惹起する」との仮説のもと本研究計画を立案した。

現在、本邦で入手可能な血液製剤は採血時白血球除去が施されているため、上記に引用した観察的研究で指摘された、成分輸血に含まれる同種白血球による有害反応について対策を講じる必要性は乏しいと考えられる。一方、同種血輸血を回避することを目的として、自己血輸血が周術期に使用されている。自己血輸血の利点として、同種血輸血を受けることに起因する肝炎ウイルスや HIV ウイルスなどへの感染がないことその他、同種白血球が成分輸血に際して輸注されてしまう危険性を完全に除去できることが挙げられる。しかしながら、上記の「自然免疫を介する炎症性病態が輸血に起因する有害反応を惹起する」という本研究の作業仮説が検証されていない現在、自己血輸血に際して、採血時白血球除去は行われていない。また、現在の本邦での保健医療上の制約から、周術期に自己血輸血用の血液製剤を確保した症例の多くは、輸血前検査のヘモグロビン値に関わらず、輸血開始の意思決定を受けていると考えられる。仮に成分輸血による有害反応が、上記の仮説により説明可能であれば、術前に採血された自己血液製剤でも、同種血輸血と同様な有害反応を惹起する可能性が示唆される。

2. 研究の目的

現在のところ、自己血輸血は同種血輸血を防ぐ有効な方法と考えられており、保存された自己白血球を輸注することの有害作用は強調されていない。本研究により、貯血された自己血に混入している白血球が自己血輸血に関連する有害作用の一因であることが明らかとなれば、周術期輸血治療の安全性がさらに高まることが予測される。そこで本研究は「自己血輸血に際して、血液製剤に混入している白血球が輸

血にともなう有害事象の原因となり得る」との作業仮説を検討することを目的として計画された。

3. 研究の方法

(1) 培養白血球を用いた血液保存温度変化に起因する細胞障害の観察

ヒト好中球は低温保存の後、37°C に再加温すると、1~2 時間程度の短時間で急速にブルブを形成し、アポトーシス状態に陥るとした報告がある(J Biol Chem 2005;280:5843-53)。また同時に様々な大きさの微小粒子が発現する。これらの粒子は細胞膜表面の陰性荷電リン脂質ホスファチジルセリンのマーカである Annexin V と結合することから、アポトーシス細胞膜の特徴を有している。直径が 1~5 μm のものはアポトーシス小胞、1 μm 未満のものはマイクロパーティクル(あるいは微小小胞 microvesicle)と定義される。ホスファチジルセリンはプロトンビナーゼ複合体と結合する性質を有するため、ホスファチジルセリンを細胞膜表面に発現した粒子は凝固活性を持つと言える。またヒト単球から発生するアポトーシス小胞やマイクロパーティクルは組織因子を発現すると言われている。組織因子は外因系凝固の発動起点であることから単球からアポトーシス刺激により発生するアポトーシス小胞やマイクロパーティクルは強力な凝固活性を有することが示唆される。本研究ではヒト単球系細胞 THP-1 浮遊液を血液製剤を保存する環境と同様に 4°C で 90 分間保存し、引き続き 37°C で 60 分間保温した後、細胞浮遊液をフローサイトメトリーで解析した。また 25°C で 90 分間保存し、引き続き 37°C で 60 分間保温した細胞浮遊液を対照として解析した。

(2) 低温貯蔵された自己血血漿に含まれる急性炎症性サイトカインの網羅的発現解析

現在本邦で入手可能な赤血球製剤は採血時に白血球除去が施行された後、低温(2~6°C)で保存されている。一方、術前の血液製剤準備として貯血式自己血輸血が計画される場合、血液は白血球を含む全血の状態低温保存される。輸血が終了した両製剤の残差血液を回収し、遠心(1000 g)により血漿を採取した。フローサイトメトリーを利用したマルチプレックスアッセイによりこれらの試料に含まれる急性炎症性サイトカイン 27 項目を網羅的に測定した(Bio-Plex Pro ヒト サイトカイン GI 27-plex パネル #M500KCAF0Y, Bio-Rad, Hercules, CA)。また THP-1 浮遊液を 4°C で 24 時間保温後に 37°C で保温を継続した細胞上清のサイトカイン濃度も同様に測定した。ここでは、終始 37°C で保温を継続した細胞浮遊液を対照とした。

(3) 周術期自己血輸血にともなう体温変化に関する後方視的観察研究

顎変形症に対する顎骨骨切り手術の周術期輸血計画において貯血式自己血輸血が施行されている施設において、実際に自己血輸血が施行された症例と施行されなかった症例の周術期体温の変化を後方視的に観察した。

4. 研究成果

(1) ヒト単球系細胞 THP-1 のアポトーシス発生やマイクロパーティクル発生に対する環境温度の影響

4°C で 90 分間保温した後、37°C に加温した THP-1 は対照(25°C 保温後 37°C に加温)と比較して多くのアポトーシス細胞を発生させた。4°C で保温後の THP-1 細胞浮遊液には 25°C で保温後の細胞浮遊液より多くの組織因子陽性凝固活性小胞が含まれていた。またミトコンドリア膜電位の指標となる蛍光指示薬(tetramethylrhodamine methyl ester TMRM)で細胞を前処理したところ、4°C で保温後のアポトーシス細胞は 25°C で保温後のアポトーシス細胞と比較してミトコンドリア膜電位が低下していた細胞比率が多かった。また 4°C で保温後の normal 細胞も 25°C で保温後の normal 細胞と比較してミトコンドリア膜電位が低下していた細胞比率が多かった。これらのことから、ヒト単球系細胞の低温保存はアポトーシスを誘導し、組織因子陽性凝固活性小胞を発生させると考えられるため、白血球除去を行っていない血液製剤においても、製剤保存期間中に同様な小胞の発生・増加が示唆される。これらの小胞に含まれているマイクロパーティクルは急性冠症候群や静脈血栓塞栓症などの血栓性病態に関与すると考えられており(Thromb Haemost 2009;101:439-51)。採血時白血球除去施行前の同種血赤血球輸血に関連する生命予後悪化との関連についてさらなる臨床研究の必要性が示唆された。

(2) 低温貯蔵された自己血血漿中に白血球除去赤血球製剤血漿より多く含まれるサイトカイン

術前希釈式自己血液製剤と白血球除去赤血球製剤の両群で測定可能であった 13 項目中 IFN- γ を除く全てのサイトカイン濃度が自己血液製剤で有意に高かった。急性炎症性サイトカインである TNF- α のほか複数の白血球走化因子(MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , IP-10, RANTES, Eotaxin)や成長因子(FGF, PDGF-BB), 喘息等アレルギー疾患との関連が指摘されている Th2 サイトカインのうち IL-4 と-9 がそこに含まれていた。先行研究に従い本研究成果(1)で実証したように、白血球の冷蔵保存は自身のアポトーシスを誘導する。このような刺激が白血球除去赤血球製剤と比較した自己血液製剤血漿中サイトカイン濃度増加の原因であると考えられる。TNF- α による白血球のアポトーシス誘導は、本研究成果(1)で指摘された白血球含有血液製剤の血栓傾向をさらに助長する可能性が指摘される。また白血球走化因子や Th2 サイトカインの増加はそれぞれ白血球が関与する炎症反応の増強やアレルギー反応を惹起する可能性を示唆している。

(3) 周術期自己血輸血にともなう体温変化に関する後方視的観察研究

今回、小規模の後方視的観察研究を行い、白血球除去を行っていない術前希釈式自己血液製剤の周術期輸血が施行された患者体温の時系列変化を輸血が実施されなかった患者のそれと比較したが、両群に周術期体温の有意な差は認められなかった。このことは本研究成果としてすでに示された上記の白血球、特に単球の環境温度変化にともなう病態生理学的変動が臨床の有害事象に有意な影響を与えないことを示している可能性がある。しかし将来、上記の研究成果をもとに、観察項目を血栓傾向や喘息等アレルギー-症状として前向き観察研究を行うことで白血球含有血液製剤と輸血関連有害事象との関連が明らかとなる可能性も否定できない。周術期輸血の安全性をより確かなものとするためにさらなる研究が必要だと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

- (1) [Azma T](#), Nishioka A, Ogawa S, Nagasaka H, Matsumoto N. Enhanced expression of gene coding for β -endorphin in human monocytic cells exposed to pulsed radio frequency electric fields through thermal and non-thermal effects. *J Pain Res.* 2018;11:2887-2896. doi:10.2147/JPR.S171974. PubMed PMID: 30532582; PubMed Central PMCID: PMC6247966.
- (2) Kinoshita H, [Azma T](#). A possible role of decreased human serum albumin in the endothelial dysfunction caused by albuminuria. *J Hypertens.* 2018;36:1947-1948. doi:10.1097/HJH.0000000000001830. PubMed PMID: 30192312.
- (3) [東 俊晴](#). 循環領域の輸液・輸血管理. *麻酔* 2018;67:S60-72.
- (4) [東 俊晴](#). パルス高周波の基礎メカニズム:抗サイトカイン作用から遺伝子エピジェネティクスまで. *ペインクリニック* 2018;39:707-720.
- (5) [Azma T](#), Ogawa S, Nishioka A, Kinoshita H, Kawahito S, Nagasaka H, Matsumoto N. Involvement of superoxide generated by NADPH oxidase in the shedding of procoagulant vesicles from human monocytic cells exposed to bupivacaine. *J Thromb Thrombolysis.* 2017;44:341-354. doi:10.1007/s11239-017-1531-z. PubMed PMID: 28819812.
- (6) Kinoshita H, Watanabe K, [Azma T](#), Feng GG, Akahori T, Hayashi H, Sato M, Fujiwara Y, Wakatsuki A. Human serum albumin and oxidative stress in preeclamptic women and the mechanism of albumin for stress reduction. *Heliyon.* 2017;3:e00369. doi:10.1016/j.heliyon.2017.e00369. PubMed PMID: 28808694; PubMed Central PMCID: PMC5544496.
- (7) [Azma T](#), Nishioka A. Are techniques for general anesthesia less invasive than procedures for cataract surgery? *Eye (Lond).* 2017;31:1744-1745. doi:10.1038/eye.2017.131. PubMed PMID: 28707674; PubMed Central PMCID: PMC5733288.

〔学会発表〕(計 21 件)

招聘講演

- (1) [東 俊晴](#). シンポジウム「周術期血管拡張薬」 up to date. 日本臨床麻酔学会第 39 回大会, 軽井沢, 2019.
- (2) [東 俊晴](#). シンポジウム「症例報告: 症例をどう選ぶ? どう管理する?」. 日本心臓血管麻酔学会第 24 回学術集会, 京都, 2019.
- (3) [東 俊晴](#). 招請講演「循環器領域の輸液・輸血管理」. 日本麻酔科学会第 65 回学術集会, 横

浜, 2018.

- (4) 東 俊晴. シンポジウム「臨床における ECT の疑問」. 静脈血栓塞栓症の診断と治療 その重症度に応じた ECT 実施に関する意思決定について. 第 114 回日本精神神経学会学術集会, 神戸, 2018.
- (5) 東 俊晴. シンポジウム「何故, 臨床医に症例報告や研究が必要か=こんな素朴な疑問に答えます=」. わたくし (機関紙編集委員) は麻酔科専修医にこんな研究指導をしています. 日本心臓血管麻酔学会第 22 回学術大会. 栃木県下野市, 2017.
- (6) 東 俊晴. シンポジウム「疼痛治療におけるパルス療法の有用性」. パルス療法はなぜ効果を示すのか? 日本ペインクリニック学会 第 51 回大会. 岐阜, 2017.

国際発表

- (7) Azma T, Ito T, Nishioka A, Nagasaka H, Matsumoto N. A Case Series of Radio-Frequency Ablation of Lumbar Sympathetic Trunks as a Minimally Invasive Adjunctive Intervention for Patients with Chronic Visceral Pain Associated with Colonic Dysmotility. The 16th World Congress on Pain, Yokohama, 2016.
- (8) Azma T, Nishioka A, Ito T, Nagasaka H, Matsumoto N. Effects of Prolonged Pulsed Radio Frequency Current on Cytotoxicity, Microvesicle Shedding, and mRNA Expression for Proopiomelanocortin (POMC) in Human Monocytic Cells. The 16th World Congress on Pain, Yokohama, 2016.
- (9) Azma T, Nishioka A, Ito T, Nagasaka H, Matsumoto N. Comparative Effects of Continuous Radio Frequency Current at 50°C and Pulsed RF on Cytotoxicity, Microvesicle Shedding, and mRNA Expression for proopiomelanocortin (POMC) in Human Monocytic Cells. The 35th Annual ESRA Congress. Maastricht, 2016.

国内発表

- (10) 東 俊晴, 西岡 慧, 星島 宏, 松本 延幸, 長坂 浩. ヒト単球系細胞の室温(25°C)保存がアポトーシス小胞とマイクロパーティクル発生に及ぼす影響の検討. 日本麻酔科学会第 66 回学術集会, 神戸, 2019.
- (11) 西岡 慧, 坂元 枝里子, 木村麻衣子, 白石成二, 東 俊晴. 腎機能評価における好中球ゼラチナーゼ結合性リポカイン(NGAL)の尿中濃度に対する尿フローサイトメトリー所見の優位性の検討. 日本麻酔科学会第 66 回学術集会, 神戸, 2019.
- (12) 東 俊晴, 西岡 慧, 木村麻衣子, 白石成二, 長坂浩, 松本延幸. ヒト単球系細胞への電気穿孔遺伝子導入に関するパルスラジオ波電界曝露効果の検討. 日本ペインクリニック学会第 52 回大会, 東京, 2018.
- (13) 西岡 慧, 坂元枝里子, 木村麻衣子, 白石成二, 東 俊晴. 定量的フローサイトメトリーを用いた単球由来凝固活性マイクロパーティクル発生のニューロキニン 1 受容体阻害薬による抑制効果の観察. 日本麻酔科学会第 65 回学術集会, 横浜, 2018.
- (14) 東 俊晴, 西岡 慧, 星島 宏, 西澤 秀哉, 長坂 浩, 松本 延幸. ヒト単球系細胞の低温保存が組織因子陽性凝固活性小胞の発生に及ぼす影響の検討. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 神戸, 2017.
- (15) 西岡 慧, 東 俊晴. 電気痙攣療法期間中の肺動脈塞栓症の危険因子に関する後方視的検討. 日本麻酔科学会第 64 回学術集会, 神戸, 2017.
- (16) 西岡 慧, 坂元枝里子, 東 俊晴. 未診断軽症血友病に対する周術期止血戦略に関する一考察. 日本心臓血管麻酔学会第 22 回学術大会, 下野, 2017
- (17) 東 俊晴, 西岡 慧, 長坂 浩, 松本 延幸. ヒト血管内皮細胞の凝固活性小胞放出と単層膜透過性に対するリポ多糖とニューロキニン 1 受容体阻害薬の影響. 日本心臓血管麻酔学会第 21 回学術大会, 横浜, 2016
- (18) 東 俊晴, 西岡 慧, 伊藤大真, 松本延幸. ヒト単球系細胞の proopiomelanocortin (POMC) 遺伝子発現に対するパルス高周波の時間依存性効果. 日本ペインクリニック学会第 50 回大会, 横浜, 2016.
- (19) 東 俊晴, 小川さおり, 西岡 慧, 竹内菊子, 長坂浩, 松本延幸. セリンプロテアーゼ阻害薬と比較したニューロキニン 1 受容体阻害薬によるトリプシン惹起血管内膜透過性亢進に対する抑制効果. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡, 2016.
- (20) 西岡 慧, 竹内菊子, 伊藤大真, 東 俊晴. 電気痙攣療法における痙攣持続時間, 誘発成功率に対する鎮静薬の影響. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡, 2016.
- (21) 竹内菊子, 西岡 慧, 東 俊晴. 眼科手術を計画された経口抗凝固薬内服患者の術前評価に関する遡及的解析. 日本麻酔科学会第 63 回学術集会, 福岡, 2016.

〔図書〕（計 1 件）

- (1) 東 俊晴. パルス高周波の基礎メカニズム:抗サイトカイン作用から遺伝子エピジェネティクスまで. ペインクリニック・別冊春号 痛みのインターベンショナル治療 up to date 2019;40:S151-S164.

〔その他〕

ホームページ等

https://www.researchgate.net/profile/Toshiharu_Azma

6. 研究組織

(1) 連携研究者

連携研究者氏名：西岡 慧

ローマ字氏名：Nishioka Akira

連携研究者氏名：竹内菊子

ローマ字氏名：Takenouchi Kikuko

連携研究者氏名：星島 宏

ローマ字氏名：Hoshijima Hiroshi

連携研究者氏名：西澤秀哉

ローマ字氏名：Nishizawa Syuya

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。