

非溶血性輸血副作用発生時の患者の血中補体濃度の検討

嶋田 英子 下山田高茂 穴沢 雅子 村岡 正人 松田 利夫
岡崎 仁 十字 猛夫 田所 憲治

非溶血性輸血副作用発生時の患者の血清補体 C4 値および C3 値の変化を観察して、補体系の活性化の有無を検討した。血清トリプターゼ値の変化も併せて観察して、補体値の変化とマスト細胞の脱顆粒の関連を検討した。

Anaphylactic shock, Anaphylactoid reaction, Urticaria 等の症状を呈した患者群では、副作用発生前後での血清 C4 値および C3 値の有意な減少が認められた。これらの患者では、副作用発生時に、古典的経路を介した補体系の活性化が推察された。一方、Anaphylactic shock 等の症状を呈した患者群では、血清トリプターゼ値の増加も認められ、マスト細胞の活性化も示唆された。しかしながら、トリプターゼ値の増加と補体値の減少との間に相関関係は認められなかった。

非溶血性輸血副作用発生には、複数の異なる作用機序が関与する可能性が示唆された。

キーワード：非溶血性輸血副作用、アナフィラキシー、補体活性化、古典的経路、血清トリプターゼ

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

はじめに

免疫複体の形成に起因する補体の古典的経路の活性化は、非溶血性輸血副作用発生の機序の一つと想定されているが、本邦での観察例は少ない^{1)~4)}。そこで、国内の非溶血性輸血副作用発生症例を対象に、患者の血清 C4 値および C3 値の副作用発生直後の変化を観察して、古典的経路の活性化の有無を検討した。同時に、マスト細胞の脱顆粒の指標となる血清トリプターゼ値の増加の有無も検討して、副作用発生の機序に関する知見を得ることを試みた。

対 象

2005 年に医療機関より発生が報告された非溶血性輸血副作用症例で、以下の 4 条件を満たした 197 例を対象とした。1. 輸血前 (3 日前から当日) と輸血直後 (当日中) の患者検体の測定が可能である。2. 輸血前の血清補体値が、C4 : 10~80mg/dl かつ C3 : 30~250mg/dl で、著しい異常が認められない。3. 輸血前後の血清アルブミン値の減少率 ($([\text{輸血前}] - [\text{輸血後}]) / [\text{輸血前}] \times 100\%$) が 20% 以下であって、著しい血清希釈がない。4. 副作用症状が、以下の 6 群の分類 (症状) に属する。1) Anaphylactic shock (収縮期血圧が $\Delta 30$ mmHg 以上の低下あるいは 80mmHg 以下への急激な血

圧の低下や意識障害を伴う、咽頭浮腫、喘鳴、呼吸困難、蕁麻疹などの皮膚症状、嘔吐、下痢などの消化器症状等のうちの複数が合わせて発現した全身性症状)、2) Anaphylactoid reaction (血圧の低下を伴わない上記の複数が合わせて発現した全身性症状)、3) Urticaria (主に蕁麻疹等の皮膚症状)、4) Hypotension (蕁麻疹や咽頭浮腫等のアレルギー様反応を伴わない急激な血圧低下反応)、5) Dyspnea (呼吸困難、チアノーゼ、喘鳴、呼吸状態悪化等の症状)、6) Fever (前後の差が 1℃ 以上で 38℃ 以上の発熱)。対象の内訳は 1) 56 例 2) 26 例 3) 63 例 4) 6 例 5) 15 例 6) 22 例であった。

患者血清は、採取後、常温以下で移送され、測定までの期間が一週間以内の場合は 4℃ で、それ以降は -80℃ で保管した。患者検体は、検査番号を付与され、これのみで管理された。

方 法

血清中の C4, C3, 血清アルブミンは、ピークレートネフェロメトリー法で、トリプターゼは、CAP-FEIA 法で、各抗原タンパク質濃度 (血清値) を測定した。各血清値の副作用発生前後の増減を観察し、副作用症状別に解析した。

ピークレートネフェロメトリー法の測定には、

Table 1 Serum C3 and C4 concentrations before and after transfusion reactions

Transfusion reaction	Number of cases	Sample	C4 (mg/dl) Mean \pm SD	C3 (mg/dl) Mean \pm SD
1) Anaphylactic shock	56	Before	30.9 \pm 10.6	104.8 \pm 38.7
		After	26.4 \pm 10.4	91.1 \pm 36.5
2) Anaphylactoid reaction	26	Before	29.6 \pm 13.4	104.3 \pm 39.0
		After	25.9 \pm 12.6	93.1 \pm 33.3
3) Urticaria	63	Before	26.3 \pm 10.5	104.6 \pm 36.4
		After	24.6 \pm 10.9	97.9 \pm 36.3
4) Hypotension	6	Before	23.9 \pm 8.0	83.3 \pm 28.1
		After	27.0 \pm 12.5	83.6 \pm 30.8
5) Dyspnea	15	Before	28.7 \pm 15.7	80.3 \pm 42.4
		After	27.8 \pm 14.8	73.4 \pm 36.5
6) Fever	22	Before	37.2 \pm 15.2	94.7 \pm 54.7
		After	36.9 \pm 24.0	83.6 \pm 50.9

Serum C3 and C4 concentrations before and after transfusion reactions were compared using the Paired *t* test

***: $p < 0.001$

**: $p < 0.01$

*: $p < 0.05$

NS: $p \geq 0.05$

IMMAGE800 Immunochemistry system (ベックマンコールーター社)を使用した。CAP-FEIA法の測定には、UniCAP100 (ファディア社)を使用した。統計解析には、SPSSソフトウェア (SPSS社)を使用し、 $P < 0.05$ を有意と判定した。

結 果

非溶血性輸血副作用発生前後の血清補体 C4 値および C3 値の変化

副作用発生前後の患者血清 C4 値および C3 値を、副作用症状別に集計し、前後の変化の有無を、対応のある *t* 検定を用いて検討した (Table 1)。Anaphylactic shock, Anaphylactoid reaction, Urticaria の各群で、発生前後での血清 C4 値および C3 値の有意な減少が認められた。一方、血清アルブミン値の有意な変化は、全ての群で認められなかった。血清 C4 値と C3 値の減少量 (Mean \pm SD, mg/dl) は、Anaphylactic shock 群 (C4 値: 4.5 ± 6.7 , C3 値: 13.6 ± 18.4) が最も大きかった。次いで Anaphylactoid reaction 群 (C4 値: 3.7 ± 7.3 , C3 値: 11.2 ± 18.0)、Urticaria 群 (C4 値: 1.6 ± 4.6 , C3 値: 6.7 ± 19.4) の順であった。

血清 C4 値と C3 値は同時に減少する傾向が認められた。1 例として、最も減少の大きかった Anaphylactic shock 群で認められた結果を Fig. 1a) に示した。血清 C4 値の減少量と血清 C3 値の減少量との間に、有意な正の相関 ($r = 0.70$, $p < 0.001$) が認められた。一方、血清 C4 値の減少量と血清アルブミン値の減少量との間には、有意な相関が認められなかった ($r = 0.25$, $p \geq 0.05$)。

血清 C4 値と C3 値の副作用発生前後の差が、輸血前

平均値の約 20% 相当量 [以上 (C4 値: ≥ 6 mg/dl かつ C3 値: ≥ 20 mg/dl)] の症例数と割合は、以下の通りであった。Anaphylactic shock 群が、14/56 例 (25%, 95% CI [13~37%]) と最も高率で、次いで、Anaphylactoid reaction 群; 4/26 例 (15%, 95% CI [1~30%])、Urticaria 群; 5/63 例 (8%, 95% CI [1~15%]) の順であった。

副作用発生前後の補体値の減少と血清トリプターゼ値の増加との関係

血清トリプターゼ値は、Anaphylactic shock 群等の患者で、副作用発生前後での増加が認められた。前後の差が $10 \mu\text{g/l}$ 以上と明らかな増加がみとめられた症例の数と割合は、Anaphylactic shock 群で 17/56 例 (30%, 95% CI [18~43%])、Anaphylactoid reaction 群; 1/26 例 (4%, 95% CI [0~12%])、Urticaria 群; 2/63 例 (3%, 95% CI [0~8%])、Hypotension 群; 1/6 例 (17%, 95% CI [0~60%]) であった。補体の減少と同様に、Anaphylactic shock 群で最も高率であった。

しかしながら、血清トリプターゼ値の増加量と血清 C4 値および C3 値の減少量との間には、有意な相関は認められなかった。Fig. 1b) に 1 例として、Anaphylactic shock 群における結果を示した。血清 C4 値の減少量と血清トリプターゼ値の増加量の間には、有意な相関は認められなかった ($r = 0.03$, $p \geq 0.05$)。加えて、Fig. 2 に示される様に、前述の血清 C4 値と C3 値が、輸血前平均値の約 20% 相当量以上減少した症例のうち、血清トリプターゼ値の増加 ($10 \mu\text{g/l}$ 以上) も同時に認められた症例は、Anaphylactic shock 群の 4/56 例 (7%, 95% CI [0~14%]) のみであった (Fig. 2)。この結果が

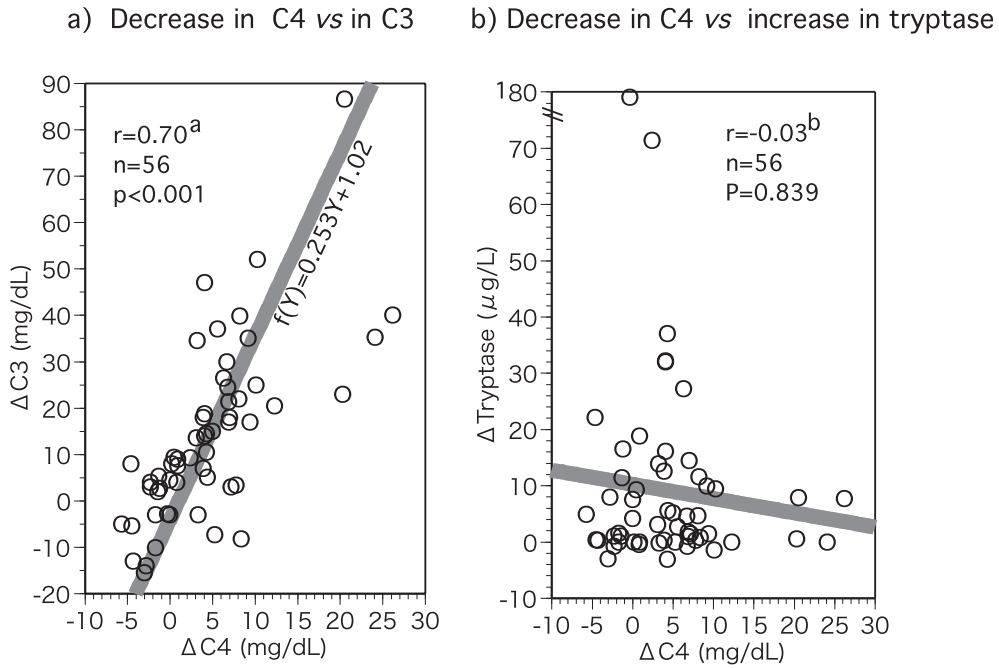


Fig. 1 Correlation of decrease in serum C4 and C3 or increase in serum tryptase concentrations in patients experiencing anaphylactic transfusion reactions.

ΔC4; decrease in patient's serum C4 concentrations calculated as "before" minus "after" transfusion reactions

ΔC3; decrease in patient's serum C3 concentrations calculated as "before" minus "after" transfusion reactions

ΔTryptase; increase in patient's serum tryptase concentrations calculated as "after" minus "before" transfusion reactions

a; Pearson's correlation coefficient

b; Spearman's correlation coefficient

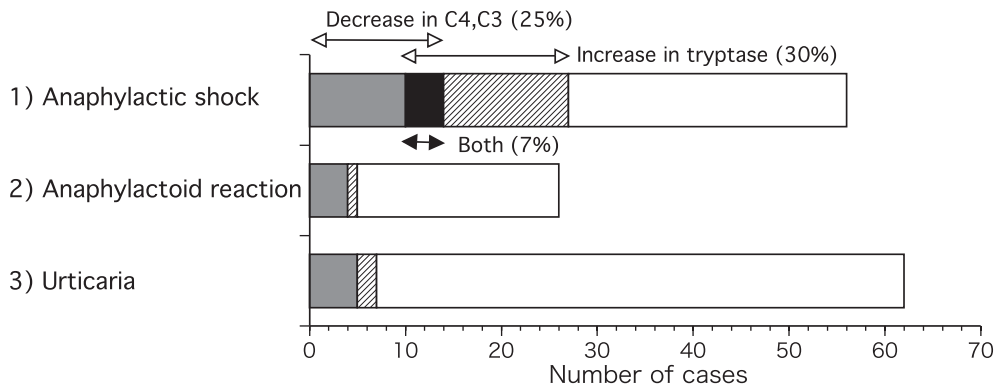


Fig. 2 Cases showing marked decreases in C4, C3 and/or increase in tryptase concentrations in sera during nonhemolytic transfusion reactions.

Serum C4 and C3 concentrations were simultaneously decreased by more than 6 mg/dl and more than 20 mg/dl, respectively, Serum tryptase concentration was increased by more than 10 μg/dl,

Both a decrease in complement and increase in tryptase concentrations were observed,

Neither was observed,

ら、副作用症状毎に2×2分割表を作成し、さらに、Fisherの直接法で検定したが、血清トリプターゼ値の明らかな増加(10μg/l以上)と血清補体値の一定量の同時減少(C4値; ≥6mg/dl かつ C3値; ≥20mg/dl)の間に、

有意な相関は認められなかった。

考 察

患者の産生したIgGやIgM抗体と輸血タンパク質との免疫複合体形成に起因する補体古典的経路の活性化

は、即時型非溶血性輸血副作用発生機序の一つと想定されている。輸血で Anaphylactic shock を発症した IgA 欠損者の血液中に、抗 IgA (IgG クラス) 抗体が検出され、in vitro で調整された IgA-IgG 免疫複合体は、補体結合能を有すると報告された¹⁾²⁾。輸血で Anaphylactic shock を発生した患者から採血された血液で、補体 C3、C4 値の低下と C3 分解物の産生が観察された³⁾。血液製剤の投与による Anaphylactic shock 発生時に採血された、抗 vWF (IgG クラス) 抗体産生 vWD 患者の血液で、補体 C3、C4 値の大幅な減少と anaphylatoxin (C3a、C4a) や C1、C3、C4 を結合した vWF-IgG 免疫複合体の産生が観察された⁴⁾。これらの報告は、免疫複合体の形成を起因とする補体古典的経路の活性化が副作用の発生に関与した可能性を示唆する。また、これらの報告は国外の症例に関するものであるが、著者らは、国内の抗ハプトグロビン (IgG クラス) 抗体産生ハプトグロビン欠損者で、血小板輸血時の Anaphylactic shock 発生で、血清補体値 (C1q、C4、C3、C5) の減少を観察した⁵⁾⁶⁾。

本研究では、国内で発生した非溶血性輸血副作用症例を対象に、患者血中の補体の活性化について、以下の方法で検討した。副作用発生時に血管作動性物質として作用すると想定される anaphylatoxin (C3a、C5a 等) は、不安定で、現行の収集法による患者検体からの検出は困難と推定される⁷⁾。そこで、熱安定性の高い血清補体 C4 値および血清 C3 値を、副作用発生前後で採血された患者検体で測定した。予備検討では、健常人血清の C4 値および C3 値は、4°C 1 週間、20°C 4 日、37°C 1 日、56°C 30 分の保存や、凍結融解を 10 回繰り返しても安定であった。したがって、検体の採取から、測定に至る保存条件下での安定性は確保されることが示唆された。また、既報において、補体値の減少は、Anaphylactic shock 発生直後から約 40 時間後の間に採血された患者血で観察されている^{3)~6)}。そこで、輸血前と副作用発生後当日中に採血された血液について、血清補体値を測定し、その差から、補体成分の消耗の有無を検討した。測定値への副作用発生時の血漿成分の漏出や輸液投与による希釈等の影響を排除するため、血清アルブミン値の減少例を検討から除外した。加えて、炎症等による産生や代謝の亢進の影響を排除するため、輸血前の補体値が異常値を示す症例も検討から除外した。

結果に示したように、Anaphylactic shock 群、Anaphylactoid reaction 群および Urticaria 群において、患者血中の C4 と C3 の同時減少が観察され、補体系の活性化が示唆された。これらの 3 群は、重篤度が異なるアレルギー性輸血副作用と認識される。補体系の活性化は、アレルギー性輸血副作用の発生に関連するもの

と推察される。なかでも Anaphylactic shock 群において、補体値の減少量は最も大きく、最も顕著に補体系が活性化したことが示唆された。C3 は古典的経路、代替経路、レクチン経路のいずれにも関与し、C4 は古典的経路およびレクチン経路に関連する。しかしながら、今回対象とした症例では細菌感染等の兆候は指摘されていない。そこで、副作用発生時に観察された補体の消耗は、未知の経路や代替経路による軽度の活性化も同時に起きた可能性は否定できないものの、主に古典的経路を介した活性化に由来するものと推察された。

本研究では、患者の血清トリプターゼ値の変化も測定した。トリプターゼ値は、C4、C3 値と同様に、熱安定性が高く、ヒスタミンに比べて血中半減期が長いので、その増加はマスト細胞脱顆粒の有用な指標となる⁸⁾⁹⁾。輸血時の Anaphylactic shock 発生患者血での上昇も報告されている⁶⁾¹⁰⁾。結果に示すように、Anaphylactic shock 群等の患者で血清トリプターゼ値の増加が観察され、マスト細胞活性化も、補体系の活性化と同様に、副作用発生に関与したことが示唆された。しかしながら、補体値の減少との間には相関が認められなかった。従って、補体系の活性化で産生された C3a、C5a が直接マスト細胞に作用して脱顆粒を促すという仮説では、今回得られた結果を説明できない。IgE 抗体と外来抗原との結合による高親和性受容体 (FcεRI) を介したマスト細胞の脱顆粒、すなわち I 型反応は、anaphylaxis の主要な発生機序とされる。これに対し、抗体非依存性の anaphylaxis を、anaphylactoid (アナフィラキシー様) と表記し、前者の anaphylactic と区別する場合がある¹¹⁾。免疫グロブリン製剤、レントゲン造影剤、ある種の薬剤の静注などによる anaphylaxis は後者に含まれ、補体系の活性化は、その発生に関与するとされる^{12)~14)}。輸血時の anaphylaxis は、これらと症状は類似するが、発生の作用機序は不明な例が多い。複数回輸血を受けた患者に発生する傾向が認められることから、抗原抗体反応の関与が推察されるが、原因となる IgE 抗体の検出例は少ない。故に、同一症状の患者群に、複数の異なる発生機序の症例が含まれる可能性が考えられる。血液製剤の投与で Anaphylactic shock を発生した抗 vWF (IgG クラス) 抗体産生 vWD 患者では、免疫複合体の産生と補体成分の著明な消耗は観察されたが、血清トリプターゼ値の増加は認められなかったと報告された¹⁵⁾。Anaphylaxis の発生に、補体の活性化が関与する患者群と、マスト細胞の活性化が関与する患者群との混在を想定すれば、今回観察された、補体値の変化とトリプターゼ値の変化の乖離の説明が可能と思われる。

日本赤十字社は、血液監視の一環として輸血副作用発生情報の収集と検査を行ってきた¹⁶⁾。報告された副作用のなかで最も多いのは、非溶血性輸血副作用で、現

状で年間約 1,600 症例, うち重篤な Anaphylaxis も約 300 例の報告がある¹⁷⁾. これらの副作用の発生機序の解明は, 安全な輸血治療を実施するうえで重要な課題と思われる. 今回得られた結果から, 補体系の活性化は, アレルギー性輸血副作用発生に密接に関連するものと考えられた. 今後とも症例数を集積し, より詳細な患者血の分析を行うとともに, 抗原の同定や, 好塩基球, 血小板等の血液中の細胞の関与の可能性についても検討したい.

謝辞: 本研究を行うにあたり, 輸血副作用発生情報と検体の収集にご協力いただきました, 全国の医療関係者の皆様, 血液センターの皆様に, 深謝致します.

文 献

- 1) Schmidt AP, Taswell HF, Gleich GJ: Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-IgA antibody. *N Engl J Med*, 280: 188—193, 1969.
- 2) Leikola J, Koistinen J, Lehtinen M, et al: IgA-induced anaphylactic transfusion reactions: a report of four cases. *Blood*, 42: 111—119, 1973.
- 3) Teisner B, Brandslund I, Grunnet N, et al: Acute complement activation during an anaphylactoid reaction to blood transfusion and the disappearance rate of C3c and C3d from the circulation. *J Clin Lab Immunol*, 12: 63—67, 1983.
- 4) Bergamaschini L, Mannucci PM, Federici AB, et al: Post-transfusion anaphylactic reactions in a patient with severe von Willebrand disease: role of complement and alloantibodies to von Willebrand factor. *J Lab Clin Med*, 125: 348—355, 1995.
- 5) 嶋田英子, 下山田高茂, 松田利夫, 他: 非溶血性輸血副作用発生前後に観察された患者の血中補体レベルの変動. ハプトグロビン欠損者に発生したアナフィラキシーを中心に. *日本輸血学会雑誌*, 52: 252, 2006.
- 6) Shimada E, Watanabe Y, Mazda T, et al: A simple sensitive ELISA for the detection of haptoglobin deficiency and the characteristics of the identified cases. *Vox Sang*, 91 (S3): 229—230, 2006.
- 7) Goldstein IM: Complement Biologically Active Products. In: Gallin JI, Goldstein IM, Snyderman R, eds, *Inflammation: Basic Principles and Clinical Correlates*, 2nd ed, Raven Press, New York, 1992, 63—80.
- 8) Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, et al: Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*, 316: 1622—1626, 1987.
- 9) Schwartz LB, Yunginger JW, Miller J, et al: Time course of appearance and disappearance of human mast cell tryptase in the circulation after anaphylaxis. *J Clin Invest*, 83: 1551—1555, 1989.
- 10) Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, et al: Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 42: 766—773, 2002.
- 11) Ring J, Brockow K, Behrendt H: History and classification of anaphylaxis. In *Anaphylaxis*, Novartis Foundation Symposium 257, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2004, 6—50.
- 12) Barandun S, Kistler P, Jeunet F, et al: Intravenous administration of human γ -globulin. *Vox Sang*, 7: 157—174, 1962.
- 13) Lasser EC, Lang JH, Lyon SG, et al: Changes in complement and coagulation factors in a patient suffering a severe anaphylactoid reaction to injected contrast material: some considerations of pathogenesis. *Invest Radiol*, 15 (S6): S6—12, 1980.
- 14) Chanan-Khan A, Szebeni J, Savay S, et al: Complement activation following first exposure to pegylated liposomal doxorubicin (Doxil): possible role in hypersensitivity reactions. *Ann Oncol*, 14: 1430—1437, 2003.
- 15) Bergamaschini L, Santangelo T, Faricciotti A, et al: Study of complement-mediated anaphylaxis in humans. The role of IgG subclasses (IgG1 and/or IgG4) in the complement-activating capacity of immune complexes. *J Immunol*, 156: 1256—1261, 1996.
- 16) Engelfreit CP, Reesink HW, Brand B, et al: Haemovigilance systems. *Vox Sang*, 77: 110—120, 1999.
- 17) 日本赤十字社輸血情報 0807-114: 赤十字血液センターに報告された非溶血性輸血副作用—2007年—, 2008.

SERUM COMPLEMENT C4 AND C3 LEVELS IN PATIENTS EXPERIENCING NONHEMOLYTIC TRANSFUSION REACTIONS

Eiko Shimada, Takashige Shimoyamada, Masako Anazawa, Masahito Muraoka, Toshio Mazda, Hitoshi Okazaki, Takeo Juji and Kenji Tadokoro

Central Blood Institute, Blood Service Headquarters, The Japanese Red Cross Society

Abstract:

Background: Activation of the complement system induced by the formation of immune complex is assumed to be a possible developmental mechanism of nonhemolytic transfusion reactions.

Materials and methods: Serum C4 and C3 concentrations of 197 patients who experienced nonhemolytic transfusion reactions were measured before and after the transfusion reactions and compared. Serum tryptase concentrations were also measured as an indicator of the activation of the mast cells to examine its relation to the complement activation.

Results: Simultaneous decreases in serum C4 and C3 concentrations were observed in patients who experienced non-hemolytic transfusion reactions classified as anaphylactic shock, anaphylactoid reactions or urticaria according to their symptoms. Increases in serum tryptase levels were also observed in these patients. However, no significant correlations were observed between the decrease in complement concentration and the increase in tryptase levels.

Conclusions: Activation of the complement system via the classical pathway during transfusion reactions is suggested in patients with anaphylactic shock, anaphylactoid reactions and urticaria. However, a correlation between the activation of complement and mast cells was not observed. These findings suggest the possibility that nonhemolytic transfusion reactions develop via different mechanisms.

Keywords:

Nonhemolytic transfusion reactions, complement, activation