血小板濃厚液保存中のサイトカイン産生，ヒスタミン遊離 および補体の活性化

柴 雅之 田所 憲治 徳永 勝士 十字 猛夫

日赤中央血液センター

(平成6年4月26日受付)

HISTAMINE, CYTOKINE AND ANAPHYLATOXIN LEVELS IN STORED PLATELET CONCENTRATES

M. Shiba, K. Tadokoro, K. Tokunaga and T. Juji

The Japanese Red Cross Central Blood Center

We measured the plasma levels of histamine, cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α , and IL-8) and anaphylatoxin (C3a) in platelet concentrates (PCs) during storage.

Increased TNF- α levels were found in PCs after 120 hours of storage. However, the PCs stored for 120 hours contained TNF- α in amounts well below those which induce fever, chills and other symptoms in most patients treated with recombinant TNF- α .

Increased IL-8 levels were also found in stored PCs. Thus, it is important to note that a critical IL-8 threshold might be reached in a patient upon infusion of stored PCs containing high levels of IL-8.

Plasma histamine levels were below 1 nmol/2U PCs after 120 hours of storage.

Anaphylatoxin (C3a and C3a-desArg) levels were increased to 56 μ g/2U (1.6×10^{-7} M) after 72 hours of storage, a level reportedly sufficient to induce platelet activation, suppress NK activity and induce IL-1 release from macrophages.

These results may help explain some of the unexpected reactions in patients receiving PCs transfusions.

1. 緒 言

輸血により発熱・蕁麻疹・悪寒等の非溶血性の副作用を認める場合がある。これらの患者の中には輸血あるいは妊娠歴があり、それを契機に産生された抗白血球抗体、抗血漿蛋白抗体等が原因と推定される例もあるが、原因が不明なものも多い。特に、血小板輸血において初回に非溶血性輸血副作用（発熱）を呈する患者は27%と比較的多く¹⁾、このような場合には上記の抗体が原因となっている可能性は少ないと思われる。また一方では、これらの副作用の発症は製剤中の白血球数を減少させることで発生頻度が低下することから、白血球の関与は明らかとなっている。

最近、血小板濃厚液（PC）の保存時間と輸血副

作用の発現頻度および重篤度に関連性があり²⁾、その原因がPC保存中のサイトカイン産生である可能性を示唆する報告がなされた³⁾。また輸血による発熱反応を呈した患者血清中のインターロイキン-6（IL-6）レベルの増大⁴⁾等輸血副作用におけるサイトカインの関与が注目されている⁵⁾。これらのサイトカインは、I) 輸血による患者白血球からの産生、II) 輸血後のドナー白血球による産生、および、III) 輸血前の血液保存中における産生等が考えられている。特に、PCのように、室温で震盪保存する場合には保存中に白血球が発熱を誘導するサイトカインを産生している可能性がある。

そこで今回、PC保存中における発熱性サイトカイン^{6)~8)}であるインターロイキン-1 β （IL-1 β ），

インターロイキン-6(IL-6)、腫瘍壊死因子(TNF- α) およびインターロイキン-8(IL-8)の産生、白血球崩壊による上清中のヒスタミンの遊離、および補体の活性化を日赤血液センターから供給されるPCを用いて調べたので報告する。

2. 材料および方法

検体は検査落ちランダムPC(400ml採血)を用いた。混在する白血球数はF-800(Sysmex)を用いて測定した。

室温で震盪保存しながら、保存24, 48, 72, 96, 120時間後に2~2.5mlをサンプリングし、血小板および白血球を遠心分離後、上清を-80°Cで凍結保存した。

サイトカインの測定(IL-1 β , IL-6, IL-8, TNF- α)は各々ELISA system(Amersham)で、ヒスタミンはRIA法(栄研化学)、C3aおよびC3a-desArgはRIA法(Amersham)で測定した。

3. 結 果

3-1. サイトカイン産生

各保存時間におけるPC上清中のIL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-8測定の結果を示した(図1)。TNF- α のみ保存96時間で明らかな増大を認めた($p < 0.05$)。しかし、そのレベルは120時間保存後でも4pg/mlという低レベルであった。IL-8は、1検体のみ(1/9)保存72時間で、110pg/ml、保存120時間で290pg/mlと高値を示すものが認められた。

3-2. 遊離ヒスタミン

上清中の遊離ヒスタミンの結果を図2に示す。120時間保存後でも1nmol/2単位以下と影響量に至るとは考えにくいレベルであった。

3-3. 補体活性化

PC保存中には補体系が活性化し、保存72時間では56 μ g/2単位、保存120時間では72 μ g/2単位のC3a(C3a-desArg)産生が認められた(図3)。こ

図1 PC保存中のサイトカイン産生

図2 PC 保存中の histamine 遊離. Mean±SD (n=9)

図3 PC 保存中の補体活性化. Mean±SD (n=9)

れらは、各々 $1.6 \times 10^{-7} \text{M}$, $2.0 \times 10^{-7} \text{M}$ に相当する濃度であった。

4. 考 察

保存120時間における $\text{TNF-}\alpha$ の産生量は 4pg/ml で、ランダム PC2単位は 40ml であるからこれは約 $160 \text{pg}/2$ 単位に相当する。一方、 $\text{TNF-}\alpha$ の影響量は $1,000 \text{ng}/\text{m}^2$ と言われている⁹⁾。従って、今回測定したレベルの $\text{TNF-}\alpha$ では発熱等の副作用に直接的に関与するとは考えにくい。また、 $\text{IL-1}\beta$ および IL-6 も保存により増大する傾向を認めた。しかし、そのレベルは $\text{TNF-}\alpha$ 以下で影響量には至らなかった。

Muyllé 等は、CPDA-1液で採血、調製した PC を保存中 (白血球数 $6 \times 10^6/\text{ml}$) に発熱性サイトカインである $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 のレベルから 3

～5日保存で影響量⁹⁾¹⁰⁾ ($\text{TNF-}\alpha$; $1,000 \text{ng}/\text{m}^2$, $\text{IL-1}\beta$; $1 \sim 10 \text{ng}/\text{kg}$) まで上昇し、特に、 IL-6 と $\text{TNF-}\alpha$ レベルと発熱性輸血副作用に関連性があると報告した³⁾。彼らの実験では採血後、3日以後に急激なサイトカインレベルの増大を認めている。また、これらのサイトカインの産生は PC 中から白血球を除去することで低下し、補体系の活性化あるいはトロンビンにより、単球が活性化され産生したとしている。また Stack らの検討によると好中球走化因子である IL-8 を測定したところ $1,000 \text{pg}/\text{ml}$ 以上を示したものが30検体中保存3日で27%、保存5日で50%と高頻度に認めている¹¹⁾。しかし、我々の検討では $100 \text{pg}/\text{ml}$ 以上の IL-8 を認めたのは、保存3日で9検体中1検体のみであった。

サイトカイン産生に関する Mylle および Stack の報告と我々の結果が異なったのは、我々の検討に用いた PC 中に混在した白血球数が $1.5 \times 10^6/\text{ml}$ と、彼らの検体に比べ白血球の混入が少なかったためと思われる。Mylle の検討でも白血球の混入が $3 \times 10^6/\text{ml}$ 以下の場合にはほとんどサイトカインの産生を認めていない。さらに、エンドトキシンによってもサイトカインが誘導されることからコンタミネーションの可能性も否定できない。

また欧米で用いられている CPDA-1液にはアデニンが添加されている。アデニンは白血球減少症の治療薬としても使用されているので、白血球機能を亢進し、サイトカイン産生が増大していることも考えられる。今回使用した PC には MAP 採血由来は含まれていないので、この点については不明であり今後の検討を要する。

PC 中の白血球数に関しては、ランダム PC とアフエレーシス PC で異なり、また使用する機種によっても白血球の混入数は大きく異なる。中央血液センターのデータによると、一針法のアフエレーシス機種である MCS (HAEMONETICS) では $5 \times 10^5 \sim 1 \times 10^6/\text{ml}$ とランダムとほぼ同程度白血球を混入するが、二針法の CS-3000 (Baxter) では $1 \times 10^2/\text{ml}$ と白血球の混入の極めて少ない PC が製造可能となっている。今回の検討では

通常の輸血単位数で影響量に至るほどのサイトカイン産生は認められなかったが、PC中に多量の白血球が混入した場合、発熱性のサイトカインの産生が保存中に誘導される可能性はある。このような場合には、輸血前の白血球除去フィルター処理では副作用の原因物質を除去することはできないことになる。従って、アフェレーシス由来の白血球混入のより少ないPCを輸血することは、同種免疫の防止の他に不快感・副作用を与えないと言う意味においても有用と考えられる。

PC中の遊離ヒスタミンは、赤血球の結果と異なり、120時間保存後でも1nmol/2単位以下と影響量に至るとは考えにくいレベルであった。Muyllらは5日保存PCにおいて遊離ヒスタミンが22ng/ml (8nmol/2単位)を示す検体を認めたと報告し¹²⁾、このようなPCを輸血した場合には輸血副作用の原因となる可能性があることを示唆した。しかし、これもPC中に混入した白血球数に依存し、今回我々が検討したレベルの白血球数では遊離ヒスタミンレベルは影響に達するとは思われなかった。

PC保存中には補体系が活性化し、保存72時間で、56 μ g/2単位のC3a (C3a-desArg)産生が認められた。これは、 1.6×10^{-7} Mに相当する濃度であった。この補体系の活性化は白血球を除去しても、C3aの産生は抑えられないことから alternative pathwayを介していると考えられている¹³⁾。アナフィラトキシン活性のあるC3aは血漿中のcarboxypeptidase Nにより速やかにC末端のarginine残基が除去され不活性型であるC3a-desArgとなる。C3aの測定法としてはEIA法、RIA法が用いられているが、いずれの方法も抗体の特異性の問題からC3a、C3a-desArgと反応し、アナフィラトキシン活性のあるC3aのみを定量的に求めることは難しい。しかしながら、C3a-desArgはアナフィラトキシン活性こそ認めないが、 10^{-11} Mで血小板凝集及びセロトニン放出¹⁴⁾を、また 10^{-8} Mで単球からIL-1の産生および放出を誘導する¹⁵⁾などの生理活性を有する。さらに、C3a-desArgによりNK活性が抑制されるという報告もある¹⁶⁾。従って、PC輸血、特に血漿量の多

いアフェレーシスPCを輸血する場合は、多量のC3a-desArgが体内に入ることになり、免疫系への何らかの影響を与えている可能性もあり今後は考慮する必要もあると思われる。

我が国においては、混入白血数も少なく、血小板の保存期間も採血後72時間で、欧米より短いことからこれらのサイトカイン産生は、欧米より少ないと考えられた。しかしながら、白血球混入が多い場合あるいはエンドトキシン等が混入した場合にはサイトカインの産生も誘導される。このような場合、ベッドサイドで白血球除去フィルター処理しても除去できないので、今後はこのような抗原-抗体反応が関与しない機序による非溶血性輸血副作用の発生も十分に考慮する必要があると思われる。

5. 結 語

PC保存中のIL-1 β 、IL-6、TNF- α およびIL-8の産生、白血球崩壊による上清遊離ヒスタミン、および補体活性化を調べた。

PC保存により発熱性サイトカイン (TNF- α 、IL-1、IL-6)の産生を認めたが、発熱等の副作用に直接的に関与するとは考えにくいレベルであった。しかし、好中球走化因子であるIL-8の産生を認めた例もあり、注意が必要と思われた。

遊離ヒスタミンは、120時間保存後でも1nmol/2単位以下と影響量に至るとは考えにくいレベルであった。

アナフィラトキシン (C3a および C3a-desArg) の産生は、保存72時間で56 μ g/2単位 (1.6×10^{-7} M) と免疫系への影響量に達するものであった。

References

- 1) Chambers, L.A., Kruskall, M.S., Pacini, D.G. and Donovan, L.M.: Febrile reactions after platelet transfusion: the effect of single versus multiple donors. *Transfusion*, 30: 219-221, 1990.
- 2) Muyll, L., Wouters, E., De Bock, R. and Peetermans, M.E.: Reactions to platelet transfusion, the effect of storage time of the concentrate. *Transfusion Medicine*, 2: 289-293, 1992.
- 3) Muyll, L., Joos, M., Wouters, E., De Bock, R. and Peetermans, M.E.: Increased tumor ne-

- crosis factor α (TNF α), interleukin 1, and interleukin 6(IL-6)levels in the plasma of stored platelet concentrates: Relationship between TNF α and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion*, 33: 195—199, 1993.
- 4) Boyle, L., McLeskys, S., Freter, C. and Sacher, R.A.: High circulating interleukin-6 levels associated with acute transfusion reaction. Cause or effect? (abstract). *Blood*, 78(Suppl. 1): 355a, 1991.
 - 5) Dzik, W.H.: Is the febrile response to transfusion due to donor or recipient cytokine? (letter). *Transfusion*, 32: 594, 1992.
 - 6) Okusawa, S., Gelfand, J.A., Ikejima, T., Connolly, R.J. and Dinarello, C.A.: Interleukin 1 induces a shock-like state in rabbits. Synergism with tumor necrosis factor and the effect of cyclooxygenase inhibition. *J. Clin. Invest.*, 81: 1162—1172, 1988.
 - 7) Le, J. and Vilcek, J.: Interleukin 6: a multifunctional cytokine regulating immune reactions and the acute phase protein response. *Lab. Invest.*, 61: 588—602, 1989.
 - 8) Le, J. and Vilcek, J.: Tumor necrosis factor and interleukin-1: cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.*, 56: 234—248, 1987.
 - 9) Blick, M.B., Sherwin, S.A., Rosenblum, M.G. and Gutterman, J.U.: A phase I trial of recombinant tumor necrosis factor (rTNF) in cancer patients. *Proc. Am. Soc. Clin. Oncol.*, 5: 14, 1986.
 - 10) Tewari, A., Buhles, W.C. Jr. and Starnes, H.F. Jr.: Preliminary report: effects of interleukin-1 on platelet counts. *Lancet*, 336: 712—714, 1990.
 - 11) Stack, G. and Snyder, E.L.: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 34: 20—25, 1994.
 - 12) Muylle, L., Laekeman, G., Herman, A.G. and Peetermans, M.E.: Histamine levels in stored platelet concentrates. Relationship to white cell count. *Transfusion*, 28: 226—229, 1988.
 - 13) Schleuning, M., Schmid-Hasbeck, M., Utz, H., Jochum, M., Heim, M., Mempel, W. and Wilmanns, W.: Complement activation during storage of blood under normal blood bank conditions. Effects of proteinase inhibitors and leukocyte depletion. *Blood*, 79: 3071—3075, 1992.
 - 14) Polly, M.J. and Nachman, R.L.: Human platelet activation by C3a and C3a des-arg. *J. Exp. Med.*, 158: 603—615, 1983.
 - 15) Haeffner-Cavaillon, N., Cavaillon, J.-M., Laude, M. and Kazatchkine, M.D.: C3a(C3a des Arg) induces production and release of interleukin 1 by cultured human monocytes. *J. Immunol.*, 139: 794—799, 1987.
 - 16) Charriant, C., Senik, A., Kalb, J.P. and Frade, R.: Inhibition of in vitro natural killer activity by the third component of complement: role for the C3a fragment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 79: 6003—6007, 1982.
-