

D. 考察

1. TRALI はその病態が認識されるにつれ今まで見落とされてきたと思われる症例の報告が相次いでおり、実際の発生数はさらに増える可能性もある。と同時に、TACO（輸血による心不全に伴う呼吸障害）などの病態との鑑別が重要になってきている。TRALI の発症機序の一つとされているドナー血液に含まれる抗白血球抗体は、女性ドナーでは2-3割に見いだされるが、男性ドナーに見出されることは少ない。この研究でも示されているように、TRALI のドナーの白血球抗体陽性率は4割以上にのぼり、原因の一つと考えられる。白血球抗体を含む血液のすべてが悪さをしているわけではないので、そのほかにも抗体の特異性、強さ、患者の状態など様々な因子がTRALI 発症に関わっている可能性があり、原因の究明は道半ばである。

血漿成分を多く含む製剤がTRALI 発症と関わっていることは、イギリスなど海外の男性由来血漿の優先的使用の施策がTRALI の発生率減少に有効であることから、推測されている。アメリカでは血漿製剤を男性由来血液から製造する方針をとっており、さらに今後成分採血の血小板ドナーに対する抗白血球抗体のスクリーニングを視野に入れた検討が進行中である。

欧米のTRALI が血漿製剤でより多く起きていることから、欧米では、国によりまちまちではあるが、まず血漿製剤を男性由来とする方向で導入をしているところがある。日本では血小板製剤はすべて成分採血になっているため、欧米のようにプール血小板を使用しているところとはおのずと対策も異なってくる。現状においてTRALI 発生頻度の高い血小板製剤についての予防対策を今後とっていくにあたり、日本におけるこれまでのTRALI 症例の検討から、ドナーに見いだされる抗白血球抗体、特に抗HLA抗体の特異性や、抗体の強さの検討は重要である。今後さらに、抗体のス

クリーニングを自動化できるような検査法での検討や、白血球抗体強陽性のドナーを献血不適にした場合の血小板の安定供給とのバランスの問題を考え、TRALI のリスクを低減する方策について検討する必要がある。

2. TRALI の発症機序についての *in vitro* の実験系を構築し、特異性の決定しているHLA class II 抗体を含む血清をその抗原を発現している単球と、肺毛細血管内皮細胞とを共培養すると有意にLTB₄、TNF- α の上清中への遊離が見られ、さらに単球表面上の接着分子の発現も有意に上昇した。このことより、TRALI の initiation におけるドナー血液中の抗白血球抗体の重要性は単なる coincidence ではなく、実験的結果に裏付けられた原因物質の可能性が高いことが証明された。

E. まとめ

この3年間の研究でTRALI の発症機序の基礎的な検討、副作用報告の症例の詳細な検討を行い、TRALI の実態の解明と、その予防対策のための基礎的データの集積に努めてきた。今後は、TRALI 症例の発症を見逃さないような全国的なヘモビジランスの体制整備や、予防対策のための具体的な検討が必要になるであろう。

F. 研究発表

1) 論文発表

1. 岡崎 仁：輸血関連急性肺傷害の病態，早期診断，予防と治療：日本集中治療医学会雑誌 13: 3-6, 2006
2. 岡崎 仁：輸血関連急性肺障害：検査と技術、医学書院 33(13): 1536-1539, 2005
3. 岡崎 仁：わが国における輸血関連急性肺障害 (TRALI) の発生状況とその原因についての解析(第22回急性呼吸不全に関する研究会：研究会抄録) 呼吸、レスピレーションリサーチ ファウンデーション 24(12): 1051-1054, 2005

4. 岡崎 仁, 高橋孝喜: 輸血関連急性肺障害 (TRALI): 総合臨牀、永井書店 54(6): 1744-1751, 2005
5. H Okazaki: International Forum, Haemovigilance **Vox Sang** 90: 207-241, 2006
6. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害: 日本輸血学会雑誌 52: 26-35, 2006
7. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害: 医学の歩み、医師薬出版 6: 636-641, 2006
8. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害の問題点: 臨床と研究、大道学館出版部 83(9): 78-81, 2006
9. Okazaki H: International Forum, Measures to prevent TRALI **Vox Sang** 92: 258-277, 2007
10. Nishimura M, Hashimoto S, Satake M, Okazaki H, Tadokoro K: Interference with TRALI-causing anti-HLA DR alloantibody induction of human pulmonary microvascular endothelial cell injury by purified soluble HLA DR. **Vox Sang** 93(1): 78-82, 2007
11. Nishimura M, Hashimoto S, Takanashi M, Okazaki H, Satake M, Nakajima K: Role of anti-human leucocyte antigen class II alloantibody and monocytes in development of transfusion-related acute lung injury. **Transfus Med** 17: 129-34, 2007
12. Nishimura M, Takanashi M, Okazaki H, Satake M: Detection of anti-CD32 alloantibody in donor plasma implicated in development of transfusion-related acute lung injury. **Cell Biochem Funct** 25: 179-83, 2007
13. Nishimura M, Takanashi M, Okazaki H, Satake M, Nakajima K: A model of transfusion-related acute lung injury-Roles of IL-8, RANTES, IL-18, and histamine in the development of cultured human lung microvascular endothelial cell injury in vitro. **Allergy Clin Immunol Int** 19: 2: 65-69, 2007
14. Okazaki H: The benefits of the Japanese haemovigilance system for better patient care. **Vox Sang ISBT Science Series** 2(2):104-109, 2007
15. Imoto S, Araki N, Shimada E, Saigo K, Nishimura K, Nose Y, Bouike Y, Hashimoto M, Mito H, Okazaki H: Comparison of acute non-haemolytic transfusion reactions in female and male patients receiving female or male blood components. **Transfusion Med** 17: 455-65, 2007
16. 岡崎 仁: 輸血関連急性肺障害: 臨床検査、医学書院 52: 205-209, 2008
- 2) 学会、研究会発表
1. H Okazaki, Y Watanabe, T Mazda, S Hashimoto, H Kamata, K Ikeda, K Tadokoro, T Juji: Reevaluation of TRALI cases based on the recommended criteria. **15th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Europe** (Athens, Greece) (July/4/2005) (Abstract M-PA-016), **Vox Sang** 89(Supple 1): 13, 2005
2. Y Watanabe, HN Kamata, S Hashimoto, T Mazda, H Okazaki, S Inaba, T Juji: White Blood Cell Antibodies Detected In Donor Blood In Transfusion-Related Acute Lung Injury (TRALI) Cases In Japan. **58th Annual Meeting of the American Association of Blood Banks (aaBB)** (Seattle, USA) (Oct/15-18/2005) (Abstract SP179) **Transfusion** 45(Supple 3): 83A, 2005
3. S Hashimoto, F Nakajima, Y Watanabe, H Kamada, T Matsuda, H Okazaki, T Juji: Approaches to anti-HLA antibody screening system for transfusion-related acute lung injury. **16th Regional Congress of the International Society of Blood Transfusion (ISBT), Asia** (Bangkok, Thailand) (Nov/12-15/2005) (Abstract 5P-121) **Vox Sang** 89(Supple 2): 58, 2005
4. H Okazaki, T Juji: Clinical Haemovigilance in Japan. **8th European Haemovigilance Seminar** (Porto, Portugal) (Feb/9/2006) 2006

5. 岡崎 仁：スポンサードシンポジウム 4 免疫性輸血副作用について，S4-1 TRALI（センターの解析）．第 53 回日本輸血学会総会（千葉）（平成 17 年 5 月 26 日）
6. 橋本志歩，中島文明，中村淳子，渡辺嘉久，鎌田裕美，松田利夫，赤座達也，岡崎 仁，十字猛夫：一般演題 O18 抗 HLA 抗体の特異性決定の同定における LABScreenPRA 法と LCT,AHG-LCT 法との比較．第 53 回日本輸血学会総会（千葉）（平成 17 年 5 月 28 日）
7. 西村元子，高梨美乃子，岡崎 仁，佐竹正博：一般演題 O34 健常人中のイムノグロブリン M(IgM)と好中球による肺毛細血管内皮細胞の傷害：輸血関連急性肺傷害発症機序のモデルとして．第 53 回日本輸血学会総会（千葉）（平成 17 年 5 月 28 日）
8. 鎌田裕美，渡辺嘉久，玉井豊広，橋本志歩，松田利夫，岡崎 仁，十字猛夫：一般演題 P133 磁性体粒子を使用した MPHA 法 (M-MPHA)による抗顆粒球抗体の検出．第 53 回日本輸血学会総会（千葉）（平成 17 年 5 月 27 日）
9. 岡崎 仁：TRALI について．第 8 回石川県輸血懇話会（金沢）（平成 17 年 6 月 11 日）
10. 岡崎 仁：シンポジウム III 非溶血性輸血副作用の現状 SY III-4 わが国における TRALI の現状．第 29 回日本血液事業学会総会（仙台）（平成 17 年 10 月 14 日）
11. 西村元子，高梨美乃子，石川善英，岡崎 仁，佐竹正博，中島一格：R10 輸血製剤中の液性因子が関わる輸血関連急性肺障害の発生機序に関する検討．第 29 回日本血液事業学会総会（仙台）（平成 17 年 10 月 14 日）
12. 鎌田裕美，渡辺嘉久，橋本志歩，中島文明，嶋田英子，松田利夫，岡崎 仁，十字猛夫：一般演題 99 非溶血性輸血副作用惹起症例における抗顆粒球(好中球)抗体の検査．第 29 回日本血液事業学会総会（仙台）（平成 17 年 10 月 13 日）
13. 岡崎 仁：輸血関連急性肺傷害 (TRALI) について．第 17 回長野県輸血懇話会（長野）（平成 17 年 11 月 5 日）
14. 岡崎 仁：TRALI の臨床像．第 14 回赤十字血液シンポジウム（岡山）（平成 18 年 2 月 25 日）
15. H Okazaki, M Nishimura, M Satake, T Juji: The Mechanism of Transfusion Related Acute Lung Injury (TRALI): Involvement of Anti HLA Class II Antibody and Interaction between Monocyte and Lung Microvascular Endothelial Cells. American Thoracic Society (ATS) 2006 International Conference (San Diego, USA) (May/21/2006), Proceedings of the American Thoracic Society Volume 3: A201, 2006
16. H Okazaki : Haemovigilance in Japan. 9th European Haemovigilance Seminar (Dublin, Ireland) (Feb/28/2007) 2007
17. 岡崎 仁：教育講演 5 輸血関連急性肺障害．第 54 回日本輸血学会総会（大阪）（平成 18 年 6 月 10 日）
18. 西村元子，岡崎 仁，高梨美乃子，佐竹正博，中島一格：シンポジウム 3 重要な非溶血性副作用：発症機序と対応策 SY3-3 ヒト肺毛細血管内皮細胞と単球の共培養で産生される液性因子：TRALI の誘因因子として．第 54 回日本輸血学会総会（大阪）（平成 18 年 6 月 10 日）
19. 小田切美紀，渡辺嘉久，鎌田裕美，谷口菊代，嶋田英子，松田利夫，岡崎 仁，大島広行，十字猛夫：一般演題 O-7 顆粒球(好中球)抗原 HNA-2a (CD177) 欠損の原因解明 2.欠損メカニズムの解明．第 54 回日本輸血学会総会（大阪）（平成 18 年 6 月 9 日）
20. 渡辺嘉久，小田切美紀，鎌田裕美，谷口菊代，嶋田英子，松田利夫，岡崎 仁，大島広行，十字猛夫：一般演題 O-8 顆粒球(好中球)抗原 HNA-2a (CD177) 欠損の原因解明 1.遺伝子変異の同定およびその遺伝子頻度の推定．第 54 回日本輸血学会総会（大阪）（平成 18 年 6 月 9 日）

21. 中島文明, 橋本志歩, 鎌田裕美, 渡辺嘉久, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫: 一般演題 O-49 献血者保有の抗HLA抗体が輸血副作用に關与する確率の検討. 第54回日本輸血学会総会(大阪)(平成18年6月11日)

22. 橋本志歩, 中島文明, 鎌田裕美, 渡辺嘉久, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫: 一般演題 O-50 輸血關連急性肺障害 (TRALI) に関する抗HLA抗体の存在と血液製剤との關連について. 第54回日本輸血学会総会(大阪)(平成18年6月11日)

23. 岡崎 仁: 一般演題 輸血關連急性肺障害の発症機序についての考察. 第46回日本呼吸器学会学術講演会(東京)(平成18年6月2日)

24. 岡崎 仁: シンポジウム3 非溶血性副作用—現状と今後の課題— 3-2 輸血副作用の診断とその病理—TRALIを中心として—. 第30回日本血液事業学会総会(札幌)(平成18年10月5日)

25. 中島文明, 橋本志歩, 河村久美子, 鎌田裕美, 松田利夫, 岡崎 仁, 田所憲治: 一般演題 59 TRALI確定症例に認められた輸血製剤中の高力価CD36(Nak^a)抗体について. 第30回日本血液事業学会総会(札幌)(平成18年10月5日)

26. 西村元子, 橋本志歩, 岡崎 仁, 高梨美乃子, 佐竹正博: TRALIを誘発した抗HLAクラスIIDR15抗体陽性ドナー血清について. 第30回日本血液事業学会総会(札幌)(平成18年10月4日)

27. 岡崎 仁: 教育講演15 輸血關連急性肺障害. 第68回日本血液学会・第48回日本臨床血液学会合同総会(福岡)(平成18年10月7日)

28. Okazaki H, Hashimoto S, Kamada H, Kawamura K, Nakajima F, Fujiwara K, Tanaka H, Tadokoro K: Detailed Analysis of Donor's HLA Antibody Specificity in TRALI

Cases in Japan (2004-2006). AABB annual meeting and TXPO (Anaheim, CA, USA) (Oct/20/2007)

29. Watanabe Y, Odagiri M, Kamada H, Taniguchi K, Shimada E, Mazda T, Okazaki H, Juji T, Tadokoro K: Human Neutrophil Antigen (HNA) -2a Deficiency Caused by a Nonsense Mutation in the Carboxyl-Terminal Signal for GPI Modification. AABB annual meeting and TXPO (Anaheim, CA, USA) (Oct/20/2007)

30. Okazaki H: The Benefit of the Japanese Haemovigilance System for Better Patient Care. XVIIIth Regional Congress of the ISBT, Asia (Hanoi, Vietnam) (Nov/12/2007)

31. Hashimoto S, Nakajima F, Kamada H, Kawamura K, Okazaki H, Tadokoro K: Strength of HLA Antibody with Positive Cross Match Test in the Donors of TRALI. XVIIIth Regional Congress of the ISBT, Asia (Hanoi, Vietnam) (Nov/12/2007)

32. 岡崎 仁: 一般演題 輸血關連急性肺障害の発生動向と白血球抗体の詳細解析. 第47回日本呼吸器学会学術講演会(東京)(平成19年5月10日)

33. 岡崎 仁: 教育講演IV わが国におけるTRALI(輸血關連急性肺障害)の現状. 第56回日本医学検査学会(宮崎)(平成19年5月18日)

34. 阿部高秋, 渡辺嘉久, 松田利夫, 岡崎 仁, 稲葉頌一, 十字猛夫, 田所憲治: 一般演題 HNA-3a抗原タンパク質の解析. 第54回日本細胞治療・輸血学会総会(名古屋)(平成19年5月31日)

35. 松本千恵子, 岡崎 仁, 田所憲治: 一般演題 顆粒球のポア通過能評価法の検討. 第54回日本細胞治療・輸血学会総会(名古屋)(平成19年6月1日)

36. 岡崎 仁, 橋本志歩, 鎌田裕美, 河村久美子, 中島文明, 田所憲治, 十字猛夫: 一般演題 輸血關連急性肺障害の派生動向と白

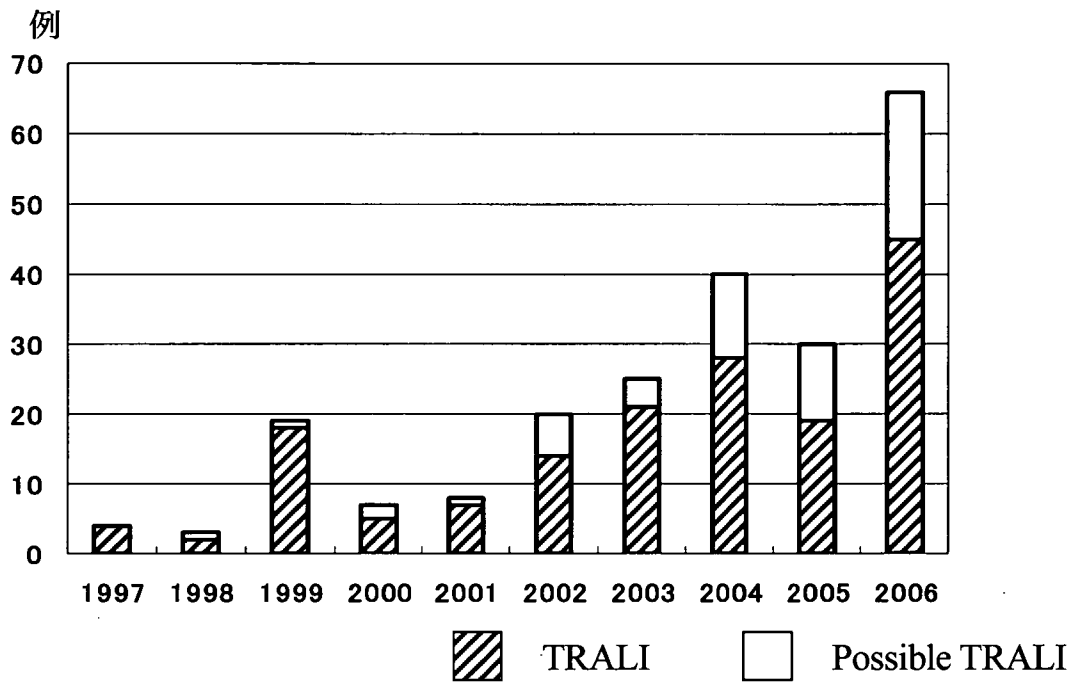
血球抗体の詳細解析. 第 54 回日本細胞治療・輸血学会総会 (名古屋) (平成 19 年 5 月 31 日)

37. 岡崎 仁: シンポジウム 1 TRALI 総論. 第 31 回日本血液事業学会総会 (高松) (平成 19 年 10 月 3 日)

38. 中島文明, 橋本志歩, 鎌田裕美, 河村久美子, 松田利夫, 岡崎 仁, 田所憲治: 一般演題 発熱性副作用症例における HLA 抗体の検出率と反応陽性率について. 第 31 回日本血液事業学会総会 (高松) (平成 19 年 10 月 4 日)

39. 岡崎 仁: シンポジウム 2 ヘモビジランス—採血から輸血まで—. 第 14 回日本細胞治療・輸血学会秋季シンポジウム (高松) (平成 19 年 10 月 6 日)

Figure 1. TRALI と possible TRALI 症例の年次推移と抗白血球抗体陽性率



	TRALI	Possible TRALI	Other transfusion reactions
Donor の抗白血球抗体陽性率	69/156 (44%)	15/58 (26%)	52/352 (15%)

(検査可能であったものについての結果)

Figure 2. TRALI 発症の製剤別頻度(2004-2006年) (100,000 供給バッグ数あたり)
(複数の製剤が関与するものは除く)

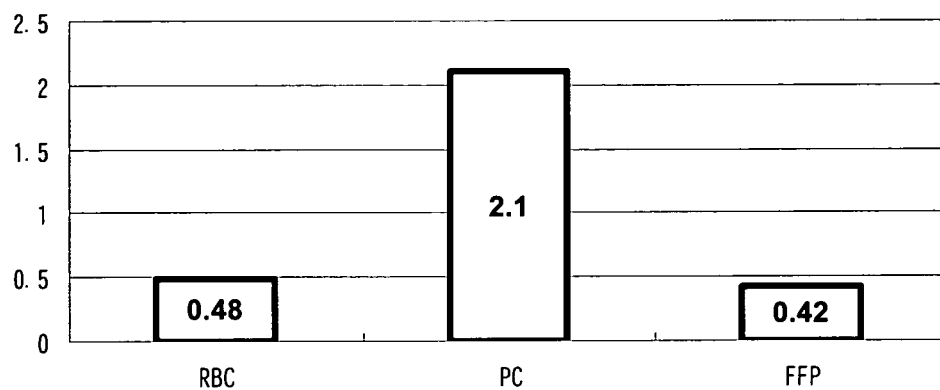


Figure 3. 患者抗原と特異性が合致した抗白血球抗体の intensity (TRALI と possible TRALI を含むその他の非溶血性副作用との比較)

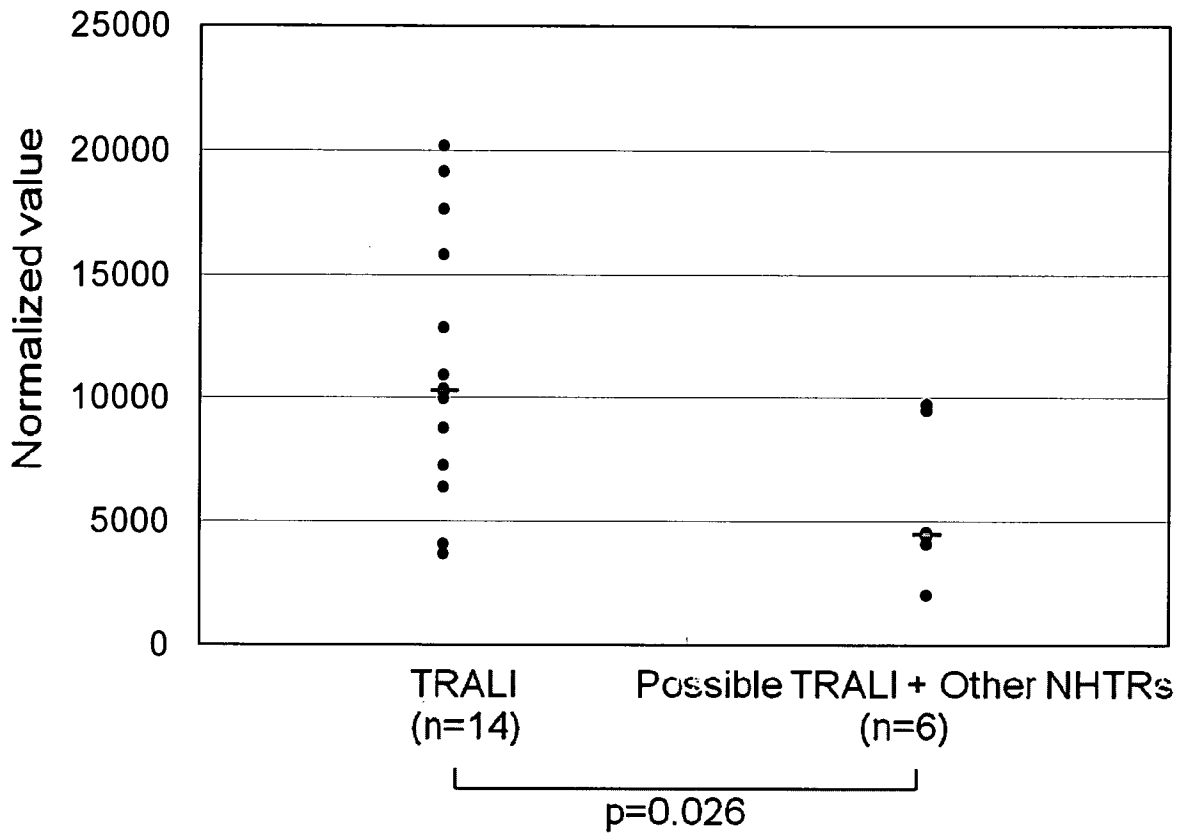


Figure 4. TRALI を惹起した抗 HLA 抗体陽性血清での単球、肺毛細血管内皮細胞との共培養における LTB₄、TNF- α の産生

L: 培養ヒト肺毛細血管内皮細胞 (lung microvascular endothelial cells)

M: 単球

S: TRALI 惹起血清

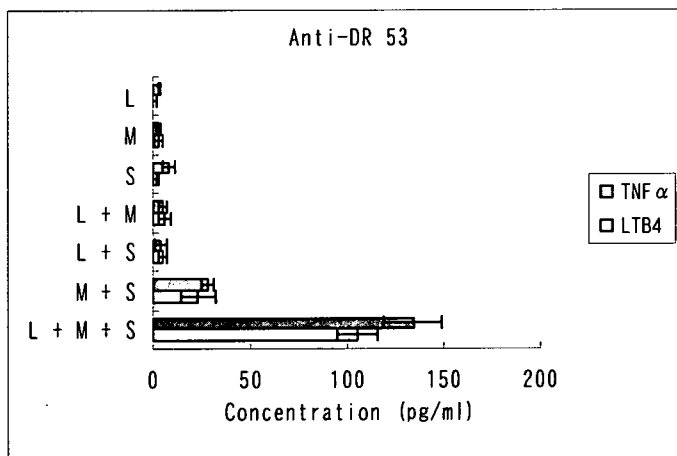
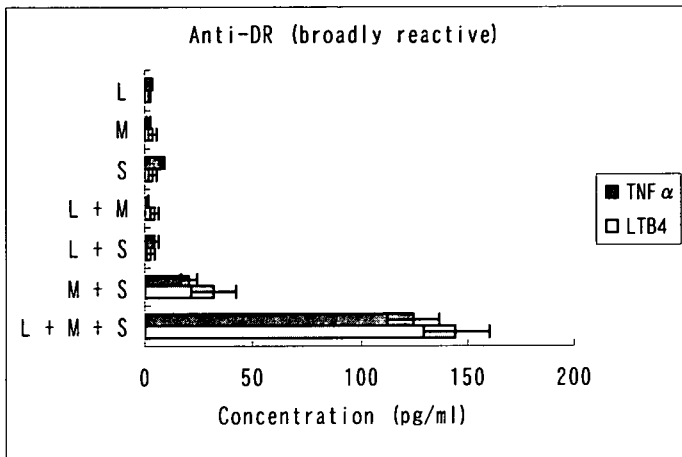
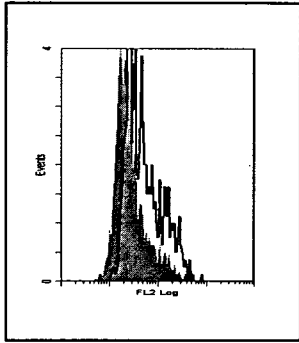
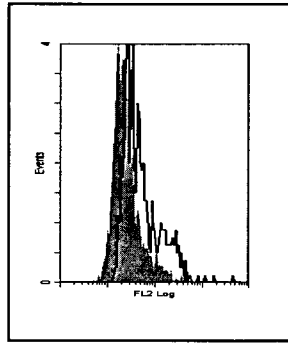


Figure 5. 培養ヒト肺毛細血管内皮細胞のアポトーシス

Anti-DR (broadly reactive)

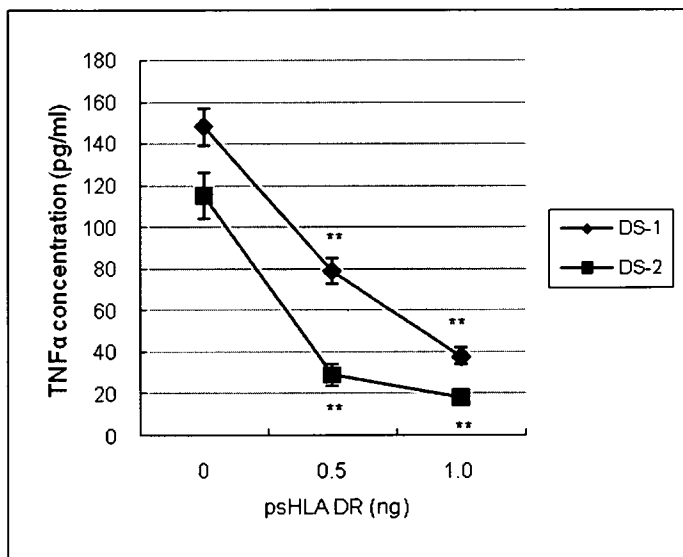
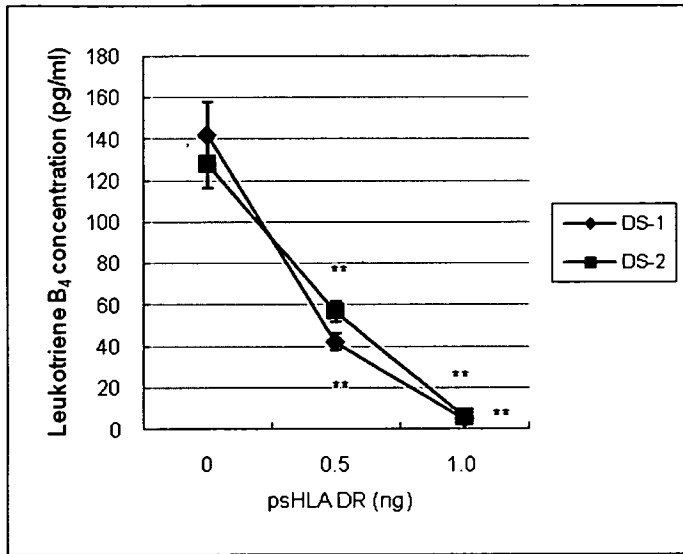


Anti-DR53



Solid line: Annexin V-binding
Shadows: Negative control

Figure 6. 可溶性 HLA-DR 抗原 (psHLADR) による LTB₄、TNF- α 産生抑制



分担研究報告書

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

(平成 17～19 年度 総合研究報告)

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

【目的】 TRALI などの非溶血性輸血副作用の原因のひとつとして HLA 抗体が挙げられるが、それ以外の特異性を持つ白血球抗体の関与が報告されており、後者の検出系としては FCM 法が広く用いられている。これまでに報告されている FCM 法は好中球、単球を検査対象細胞とした場合はバックグラウンドが高く、特に単球では高バックグラウンドの原因となる Fc γ RI の除去が前処置として必要であり、欠点も多い検出系である。また、抗体の特異性の確認には、好中球、単球のみならず T/B リンパ球や血小板に対する反応性の確認もしばしば必要となる。本研究では、まず (1) 低バックグラウンドでしかも前述 5 系統の細胞を同時に試験対象とできる改良 FCM 法 (5 cell-lineage IFT 法) の樹立を試みた。次に、5 cell-lineage IFT 法での結果の確認用パネル細胞株として (2) HNA-1a、-1b、1c、-2a、4a、4b、5a、5b 抗原のみをそれぞれ単独で発現し、半永久的に使用可能な細胞株の開発を試みた。また、(3) 重篤な非溶血性輸血副作用症例での HLA 抗体および HLA 抗体以外の白血球抗体の存在、頻度を LABScreen Bead 法および上記 2 法にて調べた。さらに、(4) 副作用発生に関わる液性因子についても、健常人血液を白血球抗体もしくは免疫複合体で刺激し、放出される種々の液性因子の放出量の経時変化および、その刺激を伝える受容体について調べた。

【方法】 (1) 5 cell-lineage IFT 法：EDTA 採血した全血に試験血清を加え反応させ洗浄後 FITC-ヤギ抗ヒト IgG で染色後、2 次抗体の残余結合部位をマウス血清でブロックし、PE-抗 CD4、PE-抗 CD20、PerCP-抗 CD14 で更に染色した。最終的に溶血剤で処理した後に FACSCalibur で試験血清中の抗体が反応した 5 系統の細胞分画を測定した。(2) 抗体検出用パネル細胞株：HLA、HNA の発現がなく、正常血清との反応性も極めて低い K562 (ヒト赤白血病細胞株) 細胞を親株とし、HNA-1a、-1b、1c、-2a、-4a、-4b、-5a、-5b 遺伝子をレトロウイルスベクターで導入し遺伝子発現させた。抗原の

発現はモノクローナル抗体を用いた FCM 法および RT-PCR 法でタンパクレベル、mRNA レベルの両方で調べた。(3) TRALI、呼吸困難、血圧低下、アナフィラキシー反応を起こした 85 例の非溶血性輸血副作用症例の患者血清および製剤中の HLA 抗体を LABScreen 法、5 cell-lineage IFT 法で調べた。また、HNA 抗体の特異性の確認は前述のパネル細胞株を用いて行った。(4) 液性因子の同定：健常人血液に HLA class I 抗体もしくは擬似免疫複合体(熱重合させたヒト IgG)を加え 37°C でインキュベートした後、遠心分離にて上清と血球をそれぞれ分取した。血球部分を用いて好中球上の CD11b の発現量を FCM で測定した (CD11b の発現量は好中球活性化の指標の 1 つとされている)。また、反応上清中に含まれる種々の液性因子量 (Perforin、IL-6、TNF- α 、HBP: Heparin-Binding Protein) を経時的に ELISA 法で測定した。さらに、液性因子放出に働くレセプターを調べる目的で、Fc γ レセプター IIIb、Fc γ レセプター IIa、もしくはその両方のリガンド結合能をモノクローナル抗体でブロックした場合の上清中液性因子量も測定した。

【結果および考察】(1) 全血試料を使って、低バックグラウンドで、Fc γ R I 除去操作が不要でかつ 5 系統の血球細胞を同時に試験細胞として検討できる FCM 法を樹立した。使用した 2 次抗体が FITC-ヤギ抗ヒト IgG のため、上に示した結果は全て IgG クラスの抗体であるが、2 次抗体を抗ヒト IgM に変更することにより、IgM クラスの白血球抗体も検出することができることも確認している(2) HNA-1a、-1b、-1c、-2a、-4a、-4b、-5a、-5b 遺伝子を導入した細胞株は低バックグラウンドで、細胞を 1 年以上培養しても発現抗原の低下はなかった。これにより、遺伝子が同定されていない HNA-3a 以外の全ての HNA に関して抗原発現パネル細胞株の樹立に成功した。(3) 85 件の重篤な非溶血性輸血副作用症例の患者および製剤中の白血球抗体の有無を検討したところ (症例の内訳は、TRALI 15 例 [確診 9 例、疑診 6 例]、呼吸困難 37 例、呼吸困難および血圧低下 18 例、血圧低下 9 例、アナフィラキシー反応 6 例であり、検体数は患者血清 81 例、製剤 66 例)、HLA 抗体が検出された例は、患者 21 例 (26%)、製剤 4 例 (6%) であったのに対し、HLA 以外の白血球抗体は患者 29 例 (36%)、製剤 12 例 (18%) と予想外に多く検出された。パネル細胞株および 5 cell-lineage IFT 法を用いた検討から、これら非 HLA 白血球抗体は 1 例を除き (この 1 例は HNA-1b 抗体) HNA-1a、-1b、-1c、-2a、-3a、-4a、-4b、-5a、-5b 以外の抗原を認識する抗体である事が判明した。既知の HNA 抗原以外にも多数の未同定 HNA が存在すると推察された。(4) HLA class I 抗体もしくは擬似免疫複合体の刺激により放出される液性因子のうち、とりわけ HBP の急激な (刺激後 30 分以内) 放出が観察された。また、Fc γ レセプター IIIb と Fc γ レセプター IIa の両方をブロックすることで、その放出は有意

に抑制された。HBP は、血管内皮細胞の血管透過性亢進、単球の活性化を誘発すると考えられており、TRALI をはじめとする非溶血性輸血副作用発症の重要な因子の1つになると考えられる。

A. 研究目的

顆粒球抗原 (HNA) に対する抗体は、TRALI などの非溶血性輸血副作用の原因となる臨床的意義の高い抗体である。これらの抗体の検出には、granulocyte immunofluorescence test (GIFT) が広く使われている。これまでに報告されている GIFT で代表される FCM 法は好中球、単球においてはバックグラウンドが高く、特に単球では高バックグラウンドの原因となる Fc γ RI の除去が前処置として必要となり、欠点も多い検出系である。また、抗体の特異性の確認には、好中球、単球のみならず T/B リンパ球や血小板に対する反応性の確認もしばしば必要となり、新たな検出方法の樹立が望まれていた。そこで、本研究では、新たな FCM 法 (5 cell-lineage IFT 法) の樹立を試みた。しかしこの方法においても、測定ごとにパネル顆粒球の準備が必要である、あるいは HLA 抗体と HNA 抗体が混在する場合 HLA 抗体と反応しないパネル顆粒球を準備するか、もしくは検査検体中の HLA 抗体をプール血小板などを用いて吸収しなければならないといった欠点が残る。従って、5 cell-lineage IFT 法の樹立と並行して、現在国際的に公認されている HNA (-1a、-1b、-1c、-2a、-3a、-4a、-4b、-5a、-5b) のうち、遺伝子が

未同定の NHA-3a を除く残りの全ての HNA 抗原をそれぞれ発現するパネル細胞株の開発を試みた。さらに上記2法を用い、重篤な非溶血性輸血副作用症例で HLA 抗体および HLA 抗体以外の白血球抗体がどの程度検出されるかも併せて検討した。

一方、非溶血性輸血副作用症例の多くは輸血後短時間のうちに発症することが特徴である。また、その発症に抗体分子 (白血球抗体、血小板抗体、免疫複合体など) が関与し、その抗体分子によって活性化された白血球とりわけ好中球が種々の液性因子 (サイトカイン、ケモカインなど) を産生し、炎症反応や細胞障害反応を起こすという報告もあるが (13, 14)、詳細な機序については不明である。そこで、非溶血性輸血副作用に関わる液性因子の同定も試みた。即ち、健常人血液を白血球抗体もしくは免疫複合体で刺激し、放出される種々の液性因子の量を経時的に測定し、さらにその刺激を伝える受容体についても調べた。

B. 研究方法

(1) 5 cell-lineage IFT: 1) 抗血清: 用いた抗血清は、非溶血性輸血副作用症例、血小板輸血不応答症例、新生児血小板減少症症例、possible TRALI 症例に由来し、予め特異性が同定されている抗血

清を用いた。一部の抗血清は広島大学小児科、小林正夫教授から分与されたものを用いた。2) 染色方法：EDTA 採血された全血 50ml に試験血清 10ml を加え 4℃、15 分間反応させ、EDTA 加 PBS にて洗浄後、FITC-ヤギ抗ヒト IgG で 4℃、15 分間染色した。洗浄後に 2 次抗体の残余結合部位をマウス血清で 4℃、10 分間ブロックし、PE-抗 CD4、PE-抗 CD20、PerCP-抗 CD14 で更に 4℃ 15 分間染色した。その後、溶血剤で赤血球を溶血させ、FACSCalibur で抗体の有無を測定した。なお、全血は大阪府赤十字血液センター職員あるいは献血者由来のものを使用した。また、全血試料と由来をいつにする血清を陰性コントロール血清とした。3) FCM 解析：5 系統の血球細胞の区別は、Table 1 と Figure 1 に示すように、FSC/SCC 分布と CD4、CD20、CD14 の発現の有無をもとに行なった。

(2) パネル細胞の作成：HLA、HNA の発現がなく、正常血清との反応性も極めて低い K562 (ヒト赤白血病細胞株) 細胞を標的とし、HNA-1a、HNA-1b、HNA-2a 遺伝子をレトロウイルスベクターで同細胞に導入し、その遺伝子発現を HNA-1a、HNA-1b、HNA-2a に対するモノクローナル抗体で調べた。さらに、患者血清中に含まれる抗 HNA 抗体 (特異性既知) の同定も HNA-1a、-1b、-2a パネル細胞株を用いて行なった。なお、HNA に対するモノクローナル抗体は広島医学技術専門学校、谷口菊代博士から、一部の抗血清は

広島大学小児科、小林正夫教授からそれぞれ分与されたものである。HNA-1c、-4a、-4b、-5a、-5b 発現細胞株についても同様にレトロウイルスベクターを用いた系で作成した。しかし、多型を認識するモノクローナル抗体が存在しないため、まず抗原タンパクの発現を HNA-1、HNA-4、HNA-5 に対するモノクローナル抗体でそれぞれ調べた。さらに、それぞれの細胞から total RNA を分取し、RT-PCR 後に制限酵素反応を行い、目的抗原の多型性を確認した。

(3) 非溶血性輸血副作用症例での患者血清/製剤中に含まれる抗体の有無の検討：TRALI、呼吸困難、血圧低下、アナフィラキシー反応を起こした 85 例の非溶血性輸血副作用症例の患者血清および製剤中に存在する HLA 抗体を含めた白血球抗体を 5 cell-lineage IFT 法、パネル細胞株、および LABScreen で測定した。

症例の内訳は、TRALI 15 例 (確診 9 例、疑診 6 例)、呼吸困難 37 例、呼吸困難および血圧低下 18 例、血圧低下 9 例、アナフィラキシー 6 例であり、検査数は患者 81 例、製剤 66 例であった。(Table 2) 症例の内訳は、TRALI 15 例 (確診 9 例、疑診 6 例)、呼吸困難 37 例、呼吸困難および血圧低下 18 例、血圧低下 9 例、アナフィラキシー 6 例であり、検査数は患者 81 例、製剤 66 例であった。(Table 2)

(4) 液性因子の同定：健常人血液に HLA

class I 抗体もしくは擬似免疫複合体(熱重合させたヒト IgG) を加え、37°Cでインキュベートし、好中球の CD11b の発現量の増加の有無を FCM で測定した(CD11b の発現量増加は好中球活性化の指標の1つとされている)。また、反応上清を採取し、そこに含まれる種々の液性因子量 (Perforin、IL-6、TNF- α 、HBP: Heparin-Binding Protein) を経時的に ELISA 法で測定した。さらに、Fc γ レセプター-IIIb、Fc γ レセプター-IIa、もしくはその両方のリガンド結合能をモノクローナル抗体でブロックした場合の上清中液性因子量も調べた。

C. 研究結果

(1) 5 cell-lineage IFT: 特異性がすでに同定されている白血球抗体を含む種々の抗血清を用いて、5系統の血球細胞との反応性を検討した。Figure 2 にその代表的な結果を示した。最初の血清は、非溶血性輸血副作用症例から得られた血清で、HLA-B37, 38, 51, 52, 27, 44, 53, 49 に対する抗体と HNA-1b に対する抗体を含んである。全血試料は、上記 HLA 抗体が反応しない HLA タイプ (HLA-A26, -; B35, 60; Cw9 を持ち、HNA-1 のハプロタイプが “b” の職員から調整した。HNA-1 は好中球のみに発現しているので、予想される反応は HNA-1b 抗体と好中球との反応のみである。FCM 解析によるヒストグラムを Figure 2 の上段に示したが、予想通り、好中球のみが陽

性となった。それに対して、上記 HLA 抗体が反応しない HLA タイプを持つが、HNA-1 のハプロタイプが “a” の職員の好中球には反応しなかった (data not shown)。ここで、陰性コントロール血清に対する反応は、5血球細胞いずれも非常に低かった。2番目の血清は、非溶血性輸血副作用症例から得られた血清で、HLA-DR52 に対する抗体を含む。これを HLA-DR52 を持つ細胞に反応させると、Figure 2 の2段目に示すように、本来 HLA-DR を発現している B-リンパ球単球とのみが陽性となった。HLA-DR52 を持たない細胞には反応しなかった (data not shown)。3番目の血清は、血小板不応答症例からの血清で、HLA-B51, B61 に対する抗体を含んでおり、HLA Class I は全ての血球細胞で発現されている。この血清を HLA タイプが HLA-B51, 61 細胞に反応させると、全てが陽性となり (3段目)、HLA-B51, B61 を持たない細胞には全く反応しなかった (data not shown)。4番目の血清は、新生児血小板減少症例からのもので、Nak^a に対する抗体を含む。Nak^a は、血小板と単球に発現する抗原である。この血清を Nak^a 陽性細胞と反応させると血小板と単球のみが陽性となった (4段目)。最後の血清は、我々が経験した “possible TRALI” 症例の血清である。この血清には、HLA Class I および Class II に対する抗体は含まれないことを予め確認している。この血清を 10数パネルの血球と反応させた所、半数

以上の血球と反応し、好中球と単球が陽性となった。残念ながら、この血清に含まれる抗体の特異性の同定には未だ至っていない。今後の検討が必要である。

(2) パネル細胞の作成：親株となる細胞の選択を行なうに当たり、我々は6種類の浮遊細胞株と5種類の付着細胞株を候補とし、これらから健常人血清との反応性がなく（極めて低く）、HLA、HNA抗原の発現もない細胞株を検索したところ、K562細胞のみがこれに該当した（data not shown）。そこでK562細胞を親株とし、HNA-1a、-1b、-2a抗体検出用パネル細胞の作成を試みた。レトロウイルスベクターを用いてHNA-1a、-1b、-2a遺伝子を導入し、パネル細胞を作成した（KY-1a細胞、KY-1b細胞、KY-2a細胞）。本研究に用いたレトロウイルスベクターは目的遺伝子とマーカー遺伝子（puromycin耐性遺伝子）をIRESシステムによって同時に発現させ、安定した目的遺伝子の発現が期待される。我々は、上記細胞をpuromycin存在下で培養し、一年以上安定したHNA-1a、-1b、-2aの発現を観察している（Figure 3）。さらに、上記モノクローナル抗体を段階希釈しKY-1a、-1b、-2a細胞と反応させたところ、その検出限界は $1\mu\text{g/ml}$ であった（data not shown）。以上の結果から、我々が作成したKY-1a、-1b、-2a細胞は低バックグラウンドかつ特異的にHNA-1a、-1b、-2a抗原を発現していた。

次に、7種類のHNA抗体を含む血清（その中に含まれるHNA抗体の特異性は、予め5 cell-lineage IFT法で同定済みで、5種類はIgG、2種類はIgM）を用い、上記パネル細胞の実用性を検証した。5種類のIgG性抗体を含む抗血清のうち#1と#2はHNA-1a抗体を含んでいた。これら抗血清はKY-1a細胞とのみ反応し、KY-1b、KY-2aとは反応しなかった（Figure 4, columns 1 and 2）。HNA-1b抗体は抗血清#3と#4に含まれ、KY-1b細胞とのみ強く反応した（Figure 4, columns 3 and 4）。抗血清#5に含まれるHNA-2a抗体はKY-2a細胞とのみ強く反応した（Figure 4, columns 5）。なお、抗体のHNA-1（Fc γ R IIIb）への非特異的結合を阻害するため、Fc γ RのFc部位に結合する3G8抗体で処理したパネル細胞を用いて測定を行った。次に、抗血清#2と#4を段階希釈し我々の検出系の検出限界を調べた。両抗血清を1/1000に希釈してもその中に含まれる抗体を同定することが可能であった（data not shown）。また、上記IgM性抗体を含む抗血清（#6、#7）についても、二次抗体をanti-human IgMに換えることでその特異性を同定することが可能であった（data not shown）。以上の結果より、我々のパネル細胞は、患者血清中に含まれる臨床的意義の高いHNA-1、-2抗体を明確に同定することが可能であった。

同様に、HNA-1c、-4a、-4b、-5a、-5bを発現するパネル細胞も作成した

(KY-1c、KY-4a、KY-4b、KY-5a、KY-5b 細胞)。現在、HNA-1c、-4a、-4b、-5a、-5b をそれぞれ認識するモノクローナル抗体が存在しないため、まず KY-1c 細胞には HNA-1 抗体を、その他の細胞には HNA-4 抗体、HNA-5 抗体、CD18 抗体（共通の鎖を認識する抗体）を反応させ、それぞれの抗原発現を確認した (Figure 5)。さらに、それぞれのパネル細胞株での多形性を RNA レベルで確認した (Figure 6)。以上より、我々の作成したパネル細胞株は、HNA 抗体が原因で発症する疾患の診断に有用と考えられる。

(3) 非溶血性輸血副作用症例での患者血清／製剤中に含まれる抗体の有無の検討

HLA 抗体が検出された例は、患者 21 例 (26%)、製剤 4 例 (6%) であったのに対し、HLA 以外の白血球抗体は患者 29 例 (36%)、製剤 12 例 (18%) であった。5-cell lineage IFT で検出された HLA 抗体以外の白血球抗体 41 例の内訳を Table 3 に示した。多くの例は好中球単独もしくは好中球と他の細胞に反応した。これらについて、KY 細胞を用いて特異性の同定を行なったが、1 例を除き、HNA-1a、-1b、-1c、-2a、-4a、-4b、-5a、-5b に特異性を示すものはなかった。これ以外に HNA-3a の可能性もあるが、HNA-3a は好中球、リンパ球、血小板に発現していると考えられており、その様な反応パターンは存在しない。さらに、HNA-3a 陰性

パネルと反応した事から、HNA-3a でもないと考えた。

これらにより、今回検出された HLA 以外の白血球抗体の多くは国際的に公認されている HNA-1a、-1b、-1c、-2a、-3a、-4a、-4b、-5a、-5b 以外の特異性を持つ抗体である事が判明した。また、検出された抗体は患者由来のものは様々なパターンが存在しているが、製剤由来の抗体は 12 例中 11 例が好中球のみに反応している。

(4) 液性因子の同定：我々は TRALI 発症の引き金となる事象を解明するため、全血を用いた活性化試験を行った。具体的には、熱重合させたヒト IgG (疑似免疫複合体)、HLA 抗体、患者血漿 (血清) をそれぞれ全血に加えてインキュベートし、好中球活性化マーカーの一つである Mac-1 の発現上昇を FCM 法で調べた。熱重合させたヒト IgG (疑似免疫複合体)、HLA 抗体、患者血漿 (血清) のいずれにおいても有意な Mac-1 の発現上昇が観察され、またその刺激は Fc γ レセプター IIIb および Fc γ レセプター IIa を介していた (data not shown)。さらに、これらの刺激によって活性化された好中球から放出される液性因子のうち、TRALI の臨床症状と一致して短時間のうちに放出されたのは HBP のみであった (data not shown)。HBP は血管内皮細胞の血管透過性亢進、単球の活性化の誘発など生理機能を有しており、TRALI をはじめとする非溶血性輸血副作用発症の重要な

因子の一つになりうると考えられた。

D. 考察

現在、大阪府赤十字血液センターでは、HLA class I 抗体、HLA class II 抗体のスクリーニングおよび特異性の同定は LABScreen を用いて行っている。HNA 抗体は、5-cell lineage IFT 法で同定し、さらに HNA-1a、-1b、-1c、-2a、-4a、-4b、-5a、-5b 発現パネル細胞株を用い、その存在と特異性の確認も行っている。同細胞株は、極めて低いバックグラウンドで、導入遺伝子の発現も長期間安定し、HLA 抗体の影響も受けないなどの長所を持ち、日々の検査に使用できる有用なものである。上記検出系を用いて、重篤な非溶血性輸血副作用症例での HLA 抗体およびそれ以外の白血球抗体の検出を試みると、意外にも HLA 抗体以外の白血球抗体が多数検出され、しかもその大半は国際的に公認されている HNA-1-5 に対するものではなく、未知の顆粒球抗原に対する抗体であった。従って、今後は、(1) この未同定顆粒球抗原の同定、(2) 未同定顆粒球抗原に対する抗体の存在と副作用との因果関係を検討していく必要があると考えられた。副作用発症の機序としては、HBP が大きくかかわる可能性も示唆された。

発表論文

1. Matsuyama N, Kojima Y, Hirayama F, Yasui K, Taniue A, Fukumori Y,

Yoshimura K, Tabata N, Sakata N, Tani Y, Shibata H. Simultaneous 5 cell-lineage flow cytometric analysis system for detection of leukocyte antibodies. *Transfus Med.* 2006;16:111-118.

2. Yasui K, Miyazaki T, Matsuyama N, Kojima Y, Furuta RA, Fujisawa J-I, Tani Y, Shibata H, Sato S, Kato T, Ikeda H, Hirayama F. Establishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b, and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. *Transfusion* 2007; 47: 478-485
3. Yasui, K, Hirayama, F, Matsuyama, ., Furuta, RA, Kimura, T, Odagiri, ., Watanabe, Y, Tani, Y & Shibata, H New cell lines selectively expressing HNA-1c, -4a, -4b, -5a, and -5b antigen established for the detection of HNA antibodies. *Transfusion*, in press.
4. Matsuyama N, Hirayama F, Yasui K, Kojima Y, Furuta RA, Kimura T, Taniue A, Fukumori Y, Tani Y, Shibata H. Frequent occurrence of non-HLA leukocyte Abs with unidentified specificity in non-hemolytic transfusion reaction cases including TRALI. *Transfusion*, in press.
5. 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, in
press.

知的所有権の出願

顆粒球抗体の検出に用いられるパネ
ル細胞（国際出願番号：
PCT/JP2007/054986）