

[原著]

アレルギー性副作用検査のための新規好塩基球交差試験の開発

日本赤十字社近畿ブロック血液センター

保井一太, 松山宣樹, 尼岸悦子, 網中良太, 古田里佳, 平山文也

Clinical utility of a passive immune basophil activation test
for the analysis of allergic transfusion reaction*Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center*Kazuta Yasui, Nobuki Matsuyama, Etsuko Amakishi, Ryota Aminaka,
Rika A Furuta and Fumiya Hirayama本論文内容は、Wiley社の許可のもとTransfusion誌(DOI: 10.1111/
trf.14208, 2017)に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。

(Kazuta Yasui)

抄 録

好塩基球活性化試験(BAT)は、アレルギー性副作用(ATR)と輸血との因果関係の検証に有用と考えられている。しかし、BATの大きな問題の一つは、好塩基球のソースとして用いる新鮮患者全血を容易に入手できないことである。とりわけ、血小板輸血を必要とする患者の約半数は白血病を含む血液疾患であり、検査に必要な数の白血球を得ることは困難である。我々は、末梢血好塩基球表面のIgEレセプター上に結合している自己のIgEを酸処理によって解離させ、新たに第三者由来のIgEを再結合させることで患者擬似好塩基球の作成に成功した。患者擬似好塩基球を用いた受身BATは、患者血漿(血清)のみを必要とし、血液疾患等で検査に必要な数の白血球を得られない患者でも検査可能である。

Key words: passive immune basophil activation test,
allergic transfusion reaction, myelosuppression

【はじめに】

非溶血性輸血副作用は輸血副作用の中で最も多く、アレルギー性副作用(ATR)、発熱反応などのさまざまな症状が報告されている^{1)~7)}。日本赤十字社に報告されるATRの発生頻度は輸血副作用全体の約60%を占め、製剤別では血小板製剤、血漿製剤、赤血球製剤の順にその頻度が高い^{8), 9)}。

また、ベットサイドからの報告も同様にATRの発生頻度が最も高い⁹⁾。しかし、製剤別の差が製剤の特性に起因するのか、基礎疾患や輸血歴などの患者因子に起因するのかは不明である。ATRを引き起こすアレルゲンとしてIgAやハプトグロビンなどの血漿タンパク質欠損に起因すると考えられたアナフィラキシー反応の症例が複数報告さ

れ、その多くが重篤である⁸⁾。しかしながら、血漿タンパク質欠損および血漿タンパク質抗体はほぼ全数検査されているが、精査された場合でも陽性を示す事例はまれであり、さらにIgAに関しては患者IgA欠損および同抗体保有が実際にATRに関係するかについて疑問視する声が高まっている。したがって、ATRと輸血との因果関係は多くの場合は不明である。ATRの多くは、自然消失するか治療によく反応するが、生命を危うくする副作用については、製造販売業者としてその原因を究明する必要がある。

好塩基球活性化試験 (Basophil Activation Test, BAT) はアレルギー疾患領域にて開発され^{8), 10), 11)}、最近、輸血領域でも応用されてきている^{12), 13)}。この試験方法は、患者全血をアレルギー (原因製剤の上清) と培養し、その後起こる好塩基球の活性化を脱顆粒・活性化マーカーであるCD203cの発現上昇を指標としてフローサイトメーターを用いて測定する。我々は、本試験がATR検査に有用であることを、後方視的研究によって示している¹⁴⁾。また、ATRの発症機序としてIgE依存的経路、IgE非依存的経路の2種類が存在するが、これまで本試験では両者の判別は困難であったが、我々はアレルギー依存的経路を介した好塩基球の活性化を選択的に阻害する薬剤 (ダサチニブ) を用いることで両者の判別にも成功しており¹⁵⁾、さらに、副作用患者検体の検査にも成功している¹⁶⁾。BATはATRと輸血との因果関係の検証に有用な検査法であると考えられる。

一方、BATには好塩基球のソースとして用いる新鮮患者全血を容易に入手できないという大きな問題が存在する。とりわけ、血小板輸血を必要とする患者の約半数は白血病を含む血液疾患であり、これら患者から検査に必要な白血球数を入手することは困難である。この問題を克服するため、健康人好塩基球表面のIgEレセプター上に結合している自己のIgEを酸処理によって解離させ、患者IgEに置換した擬似好塩基球を作成し、同細胞と当該製剤とで行う受身BATの開発を行ってきた。今回、受身BATがATR検査への応用可能であることを示す結果が得られたので報告する。

【材料・方法】

1. 血液および血清試料

血球試料は、健康な近畿ブロック血液センター職員から採血 (抗凝固剤としてEDTAを使用) した。血漿試料も同様に、健康職員由来のものを使用した。なお、本研究は日本赤十字社血液事業研究倫理審査委員会の手承を得て行ったものである。

2. 試薬

FCM分析用モノクローナル抗体 (MoAb) はFITC-anti-HLA-DR (Beckman Coulter 社)、PE-anti-CD203c (BD Bioscience 社)、PE-Cy5-anti-CD123 (BD Bioscience 社)、PE-anti-human IgE (BioLegend 社) を使用した。陰性コントロールとして、FITC-mouse IgG1, PE-mouse IgG1, PE-Cy5-mouse IgG1 (Becton Dickinson 社) をそれぞれ用いた。好塩基球活性化に用いる anti-human IgE は Beckman Coulter 社から、スギ花粉標品およびハウスダスト標品は鳥居薬品からそれぞれ購入した。また、N-Formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine (fMLP) および lipopolysaccharide (LPS) は Sigma-Aldrich 社から、recombinant human IL-3 (rhIL-3)、rhIL-33 は R&D Systems からそれぞれ購入した。全血から有核細胞の分離に使用する HES-40 は ニプロ社のものを使用した。FCM用の溶血試薬は BD Bioscience 社の BD FACS Lysing Solution を用いた。

3. 擬似好塩基球の作製

好塩基球表面のIgEレセプター上に結合している自己のIgEを酸処理によって解離させ、新たに第三者由来のIgEを再結合させた。すなわち、健康人全血に1/5量のHES-40を添加し、遠心分離後 (室温, 600g, 5分間)、白血球分画を分取し、同分画を2倍量のPBS (-) で洗浄した (室温, 1,200g, 5分間)。次に、 5×10^6 個の白血球を1 mLの乳酸緩衝液 (13.4 mM lactate, 140 mM NaCl, and 5 mM KCl) に懸濁し、氷上で5分間インキュベート後、同量のヒトアルブミン溶液 (RPMI-1640 medium [pH 8.0] supplemented with 0.5% HAS and 12 mM Tris-HCl) で中和後、上清

を除去し(室温, 1,200g, 5分間), PBS(-)で洗浄した。上記処理を施した白血球を0.5mLの第三者由来のヒト血漿(10 U/mL heparin sodium, 10 mM CaCl_2)に懸濁し, 37°Cで1時間インキュベートすることで, 細胞表面のIgEが再懸濁した血漿由来のものに置換された擬似好塩基球が得られた。

4. 受身好塩基球活性化試験(受身BAT)

50 μL の擬似好塩基球懸濁液に種々の刺激剤(anti-human IgE MoAb, fMLP, LPS, rhIL-3, rhIL-33, スギ花粉標品, ハウスダスト標品)を5 μL 添加し, 37°Cで30分間インキュベートした。氷冷によって活性化を停止させた後, 200 μL のPBS/BSA/EDTA (PBS(-)に0.5 % bovine serum albumin (BSA), 10 mM EDTAを添加した溶液)で洗浄した。擬似好塩基球の活性化は, 活性化マーカーであるCD203c抗原の発現上昇をフローサイトメーター (FCM)で測定することで求めた。

5. FCM測定

活性化反応終了後の擬似好塩基球をFITC-anti-HLA-DR MoAb, PE-anti-CD203c MoAbおよびPE-Cy5-anti-CD123 MoAbで染色し(4°C, 15分間), PBS/BSA/EDTAにて洗浄後, BD FACS Lysing Solutionで溶血させ, FACSCant2 (Becton Dickinson社)で測定した。好塩基球は, リンパ球中のCD123⁺, HLA-DR⁺の細胞をゲートし, その活性化はCD203cの発現上昇を指標とした。受身BATの活性化は, 無刺激擬似好塩基球のCD203c発現の95%をカバーする領域にゲートを設け, それを超えるものを活性化細胞と定義した。また, 受身BATの陽性は, これまでの経験から, 全擬似好塩基球のうち活性化細胞が20%を超えるものを定義した。

6. 統計処理

統計学的検討はWilcoxon signed-ranks test with Bonferroni correctionを用いて行い, $p < 0.05$ である場合に有意差ありとした。

【結 果】

1. 受身BATの評価

受身BATは, 好塩基球表面のIgEを第三者のものに置換し擬似好塩基球を作成する過程(前処理プロセス)と, 作成した擬似好塩基球を用いたクロスマッチテストの過程(機能評価プロセス)の2段階に大別された(図1)。まず, 前処理プロセス(図1a)において, 好塩基球表面のIgEレセプター上に結合している自己のIgEが酸処理によって解離し, 第三者由来のヒト血漿に再懸濁し, インキュベートすることで, 細胞表面のIgEが再懸濁した血漿由来のものに置換されることを確認した(図2)。また, このプロセスでの好塩基球の生存率は98%以上であった。次に, 擬似好塩基球がIgEを介したシグナル(いわゆるI型アレルギー)によって活性化するか否かを確認した(図3a)。IgEレセプターの活性化は, 抗ヒトIgE抗体(IgEレセプターを介して好塩基球, 肥満細胞を活性化させる陽性コントロール)を用い, 異なる6種類の擬似好塩基球をそれぞれ活性化させた。また, 擬似好塩基球と健常人好塩基球との活性化能(CD203cの陽性率)は, 同濃度の抗ヒトIgE抗体では有意差は認められなかったが, 抗ヒトIgE抗体濃度0.5~5 $\mu\text{g/mL}$ では健常人好塩基球の方が強く反応する傾向が見られた。

2. 受身BATの特異性の確認

IgE / IgEレセプターを介したアレルギー反応は, 好塩基球(肥満細胞)上のIgEにアレルゲンが特異的に結合し, 免疫複合体を形成することで発生する。ATR検査として受身BATを行うにあたり, 自己IgEを第三者IgEに置換した擬似好塩基球が, アレルゲン特異性も第三者のものに置換されたかを確認する必要がある。そこで, アレルゲン特異性の異なる3種類の健常人血漿(スギ花粉およびハウスダストに反応する特異IgEを有さない血漿: TypeA, スギ花粉に反応しハウスダストと反応しない特異IgEを有する血漿: TypeB, スギ花粉およびハウスダストに反応する特異IgEを有する血漿: TypeC)を準備し, それぞれの血漿中のIgEに置換した擬似好塩基球を作成した。TypeA~C血漿中のスギ花粉およびハウスダスト

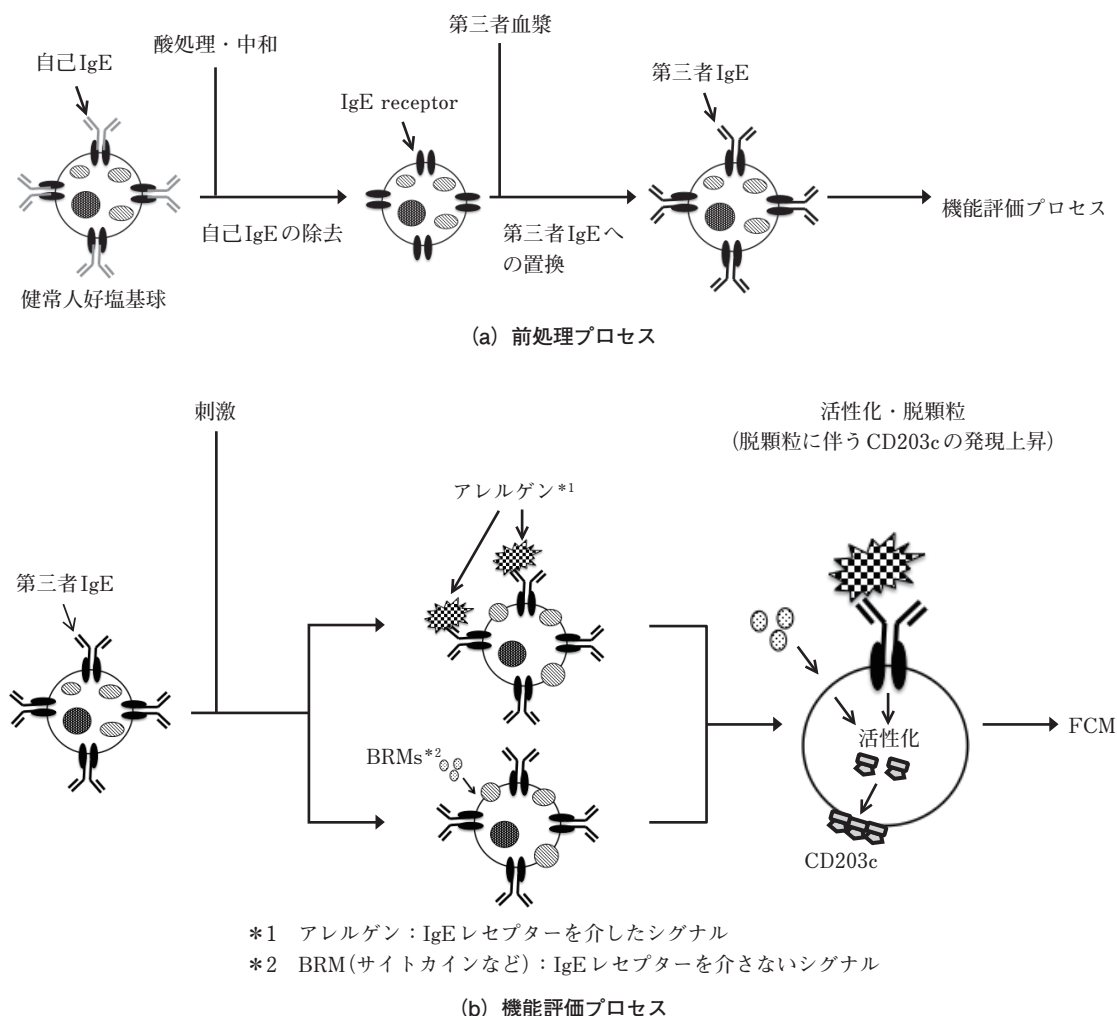


図1 擬似好塩基球の作成手順

に反応する特異IgE濃度をPhadia ImmunoCapで測定したところ、スギ花粉IgEは<0.34UA/mL, <0.34UA/mL, 4.01UA/mLで、ハウスダストIgEは<0.34UA/mL, 5.45UA/mL, 6.11UA/mLであった。同擬似好塩基球にアレルゲンとしてスギ花粉もしくはハウスダストを添加し、特異的な活性化が起こるか否かを確認した(図4)。TypeA血漿に置換した擬似好塩基球では、スギ花粉、ハウスダスト添加による活性化は観察されなかった。一方、TypeB血漿に置換したものでは、スギ花粉特異的な活性化がみられ、TypeC血漿

に置換したものでは、スギ花粉、ハウスダスト両方に対する活性化が観察された。以上の結果から、受身BATで使用する擬似好塩基球は、置換した血漿由来のアレルゲン特異性を再現していることが確認できた。

3. 受身BATによるアレルゲン非依存的活性化の検出

ATRには、IgE/IgEレセプターを介したアレルゲン刺激によるものと、IgE/IgEレセプターを介さない非アレルゲン刺激(炎症性サイトカ

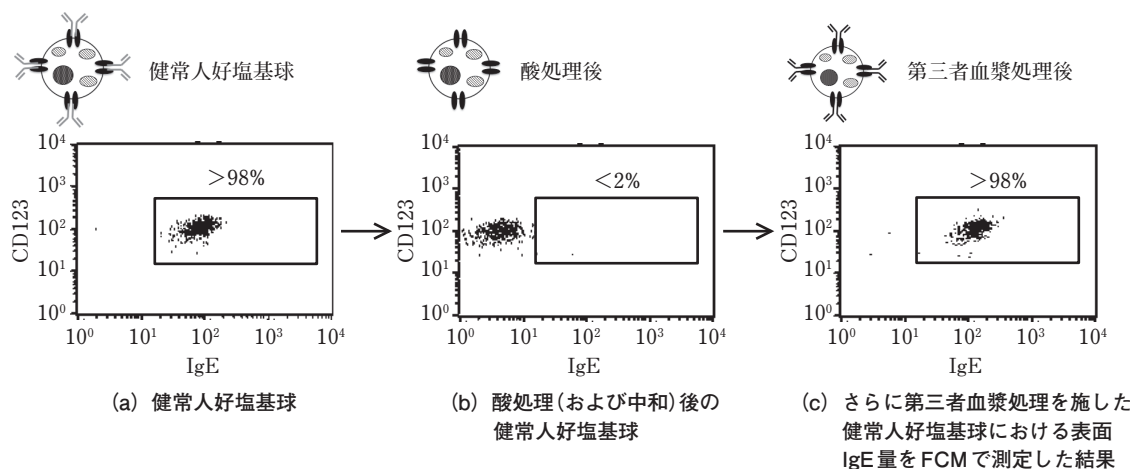


図2 酸処理および第三者血漿処理による擬似好塩基球表面IgEの置換

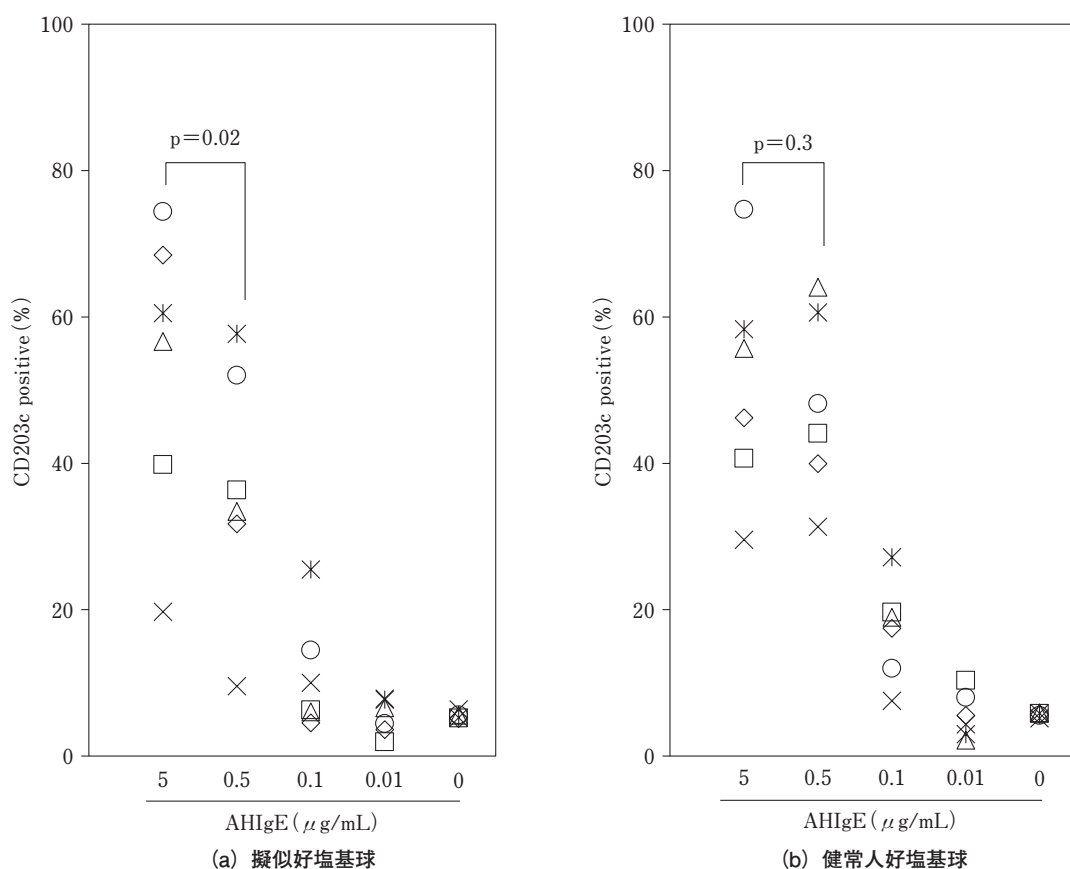


図3 擬似好塩基球と健康人好塩基球とのIgEレセプター刺激による活性化能の比較 (抗ヒトIgE抗体をAHlgEと略した)

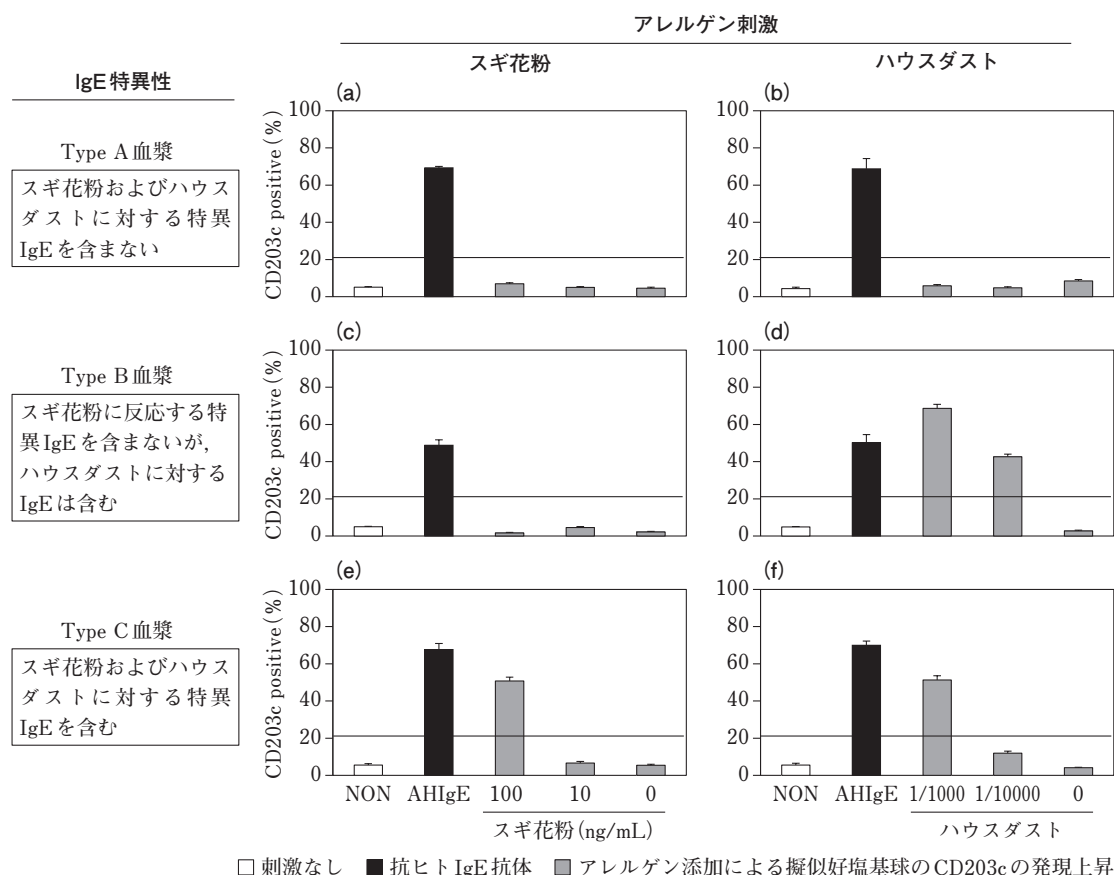


図4 擬似好塩基球のアレルゲン特異的活性化

インなど) によるものに大別される。アレルゲン刺激によって擬似好塩基球が特異的に活性化したので、次に、非アレルゲン刺激によって活性化するか否かを検討した (図5)。非アレルゲン刺激としてはrhIL-3, rhIL-33, LPS, fMLPを用い、各刺激に対する擬似好塩基球と健常人好塩基球との活性化の違いを比較した。健常人好塩基球は、rhIL-3, rhIL-33に対して濃度依存的に活性化したが、擬似好塩基球ではその活性化は見られなかった (図5a, 5b)。それに対してLPS刺激では、健常人好塩基球と比較して擬似好塩基球の方が強く活性化した (図5c)。また、fMLP刺激に対しては両者が同等の活性化能を示した (図5d)。これらの結果より、非アレルゲン刺激に対しては刺激物質の種類によって健常人好塩基球と擬似好

塩基球との反応性が異なり、受身BATによるそれらの検出にはさらなる検討が必要である。

【考 察】

副作用患者好塩基球と当該製剤上清とのクロスマッチ検査であるBATは、ATRと輸血との因果関係を明確にするのに適した検査法である。また、IgE / IgE レセプターを介したシグナルを特異的に阻害するダサチニブを添加することで、発症したATRがアレルゲン刺激によるものか否かも判定することも可能である。しかし、ATRを発症した患者、とりわけPC輸血後のATR患者の過半数は、固形がん、白血病、その他血液疾患に罹患しており、その多くは骨髓抑制状態である。これらの患者からBATに必要な数の白血球 (好塩基

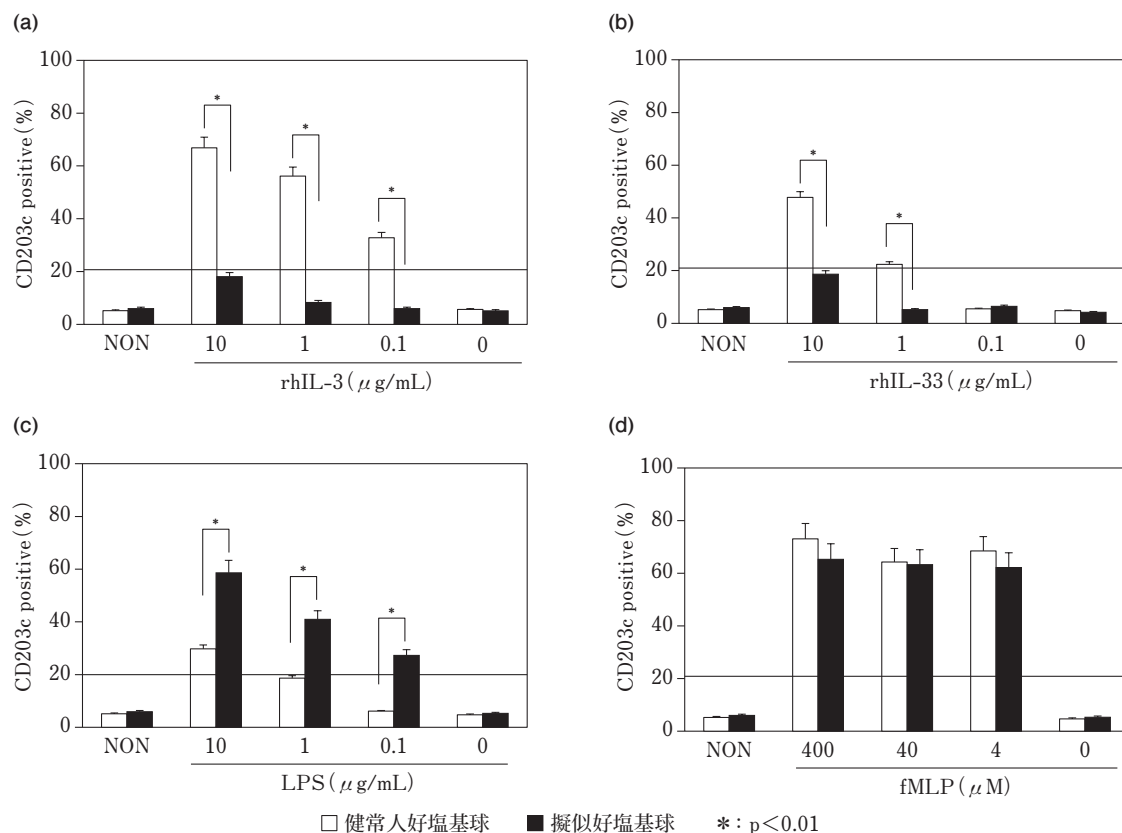


図5 擬似好塩基球と健康人好塩基球とのアレルギー非依存的活性化能の比較

球)を採取することは困難である。そこで、健康人好塩基球表面のIgEを患者IgEに置換した擬似好塩基球を作成し、これを患者好塩基球の代替として用いた受身BAT法を開発した。受身BAT法は、患者白血球を必要とせず患者血漿(血清)のみで検査可能なため、血液疾患等で検査に必要な数の白血球を得られない患者でもATR原因解明のための検査が可能である。

健康人好塩基球表面のIgEを患者由来のIgEに置換し、同細胞をアレルギー疾患の検査に応用したのは、Pruzanskyらが初めてである¹⁷⁾。彼らの置換条件では、好塩基球の活性化能は維持されるが、表面IgEの置換率は50～90%と再現性は高くない。一方、Santosらはリンパ球を精製し、4℃で5分間の乳酸処理(直後に中和)することで、表面IgEのほとんどすべてを置換することに

成功している¹⁸⁾。彼らの方法の再現実験を行ったところ、表面IgEの置換率は98%以上で、好塩基球の生存率は約70%であった。我々は、好塩基球の細胞生存率を上昇させることで、死細胞によるバックグラウンド上昇を防ぎ、受身BAT法の検査感度のさらなる向上を試みた。乳酸処理する細胞集団(好塩基球を含む)をリンパ球から有核細胞に変更したことで、表面IgEの置換率は98%以上を維持したまま、好塩基球の生存率が98%以上に向上した。これらのまとめを表1に示す。

これまでにアレルギー性輸血副作用調査において、受身BATが有用な検査法になる可能性を示してきたが、同法にはいくつか克服すべき課題もある。1) 輸血副作用調査のための検査法としての有用性を評価する場合、実際の臨床検体を用いた検討が必要であるが、現状ではそれができてい

表1 好塩基球処理方法の改良

| | 細胞分画 | 解離薬剤 | IgEの解離率 (%) | 好塩基球生存率 (%) | 擬似好塩基球の活生可能 |
|----------------|--------|--------------------|----------------|----------------|-------------|
| Pruzansky らの方法 | リンパ球分画 | Lactic acid buffer | 50～90% | NT | + |
| Santos らの方法 | リンパ球分画 | Lactic acid | NT | NT | + |
| 本研究 | 有核細胞分画 | Lactic acid | >98% | >98% | + |

ない。今後、できるだけ多くの臨床検体を用いた受身BATの評価研究を行う必要がある。2) IgE / IgE レセプターを介したアレルギー刺激に関しては、受身BATとBATとの検出感度に有意差は見られなかった (図3)。しかし、IgE / IgE レセプターを介さない非アレルギー刺激では、刺激の種類によっては両者の検出感度に有意差が見られた (図5)。受身BATによる非アレルギー刺激

の検出には、さらに検討が必要である。3) 受身BAT検査を実施するには健常人血球が必要である。本研究では、採血同意が得られた健常職員血液を用いて検討を行ったが (倫理審査番号: #2015-48)、受身BATによる継続的な副作用調査を行う場合、職員採血に依存しないシステムの確立が望まれる。現在、検査終了後の残存検体を用いた検討を実施している。

参考文献

- 1) Kluter H, Bubel S, Kirchner H, *et al.* Febrile and allergic transfusion reactions after the transfusion of white cell-poor platelet preparations. *Transfusion* 1999; 39: 1179-84.
- 2) Pruss A, Kalus U, Radtke H, *et al.* Universal leukodepletion of blood components results in a significant reduction of febrile non-hemolytic but not allergic transfusion reactions. *Transfus Apher Sci* 2004; 30: 41-6.
- 3) Tamagawa-Mineoka R, Katoh N, Kishimoto S. Platelets play important roles in the late phase of the immediate hypersensitivity reaction. *J Allergy Clin Immunol* 2009; 123: 581-7.
- 4) Paglino JC, Pomper GJ, Fisch GS, *et al.* Reduction of febrile but not allergic reactions to RBCs and platelets after conversion to universal prestorage leukoreduction. *Transfusion* 2004; 44: 16-24.
- 5) Muylle L, Joos M, Wouters E, *et al.* Increased tumor necrosis factor alpha (TNF alpha), interleukin 1, and interleukin 6 (IL-6) levels in the plasma of stored platelet concentrates: relationship between TNF alpha and IL-6 levels and febrile transfusion reactions. *Transfusion* 1993; 33: 195-9.
- 6) Muylle L, Wouters E, Peetermans ME. Febrile reactions to platelet transfusion: the effect of increased interleukin 6 levels in concentrates prepared by the platelet-rich plasma method. *Transfusion* 1996; 36: 886-90.
- 7) Heddle NM. Febrile nonhemolytic transfusion reactions to platelets. *Curr Opin Hematol* 1995; 2: 478-83.
- 8) Hirayama F. Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *Br J Haematol* 2013; 160: 434-444.
- 9) Kato H, Uruma M, Okuyama Y, *et al.* Incidence of transfusion-related adverse reactions per patient reflects the potential risk of transfusion therapy in Japan. *Am J Clin Pathol* 2013; 140: 219-24.
- 10) Buhring HJ, Simmons PJ, Pudney M, *et al.* The monoclonal antibody 97A6 defines a novel surface antigen expressed on human basophils and their multipotent and unipotent progenitors. *Blood* 1999; 94: 2343-56.
- 11) Boumiza R, Debard AL, Monneret G. The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clinical and Molecular*

- Allergy 2005; 30: 9.
- 12) Dewachter P, Castro S, Nicaise-Roland P, *et al.* Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *Br J Anaesthesia* 2011; 106: 687-89.
- 13) Nubret K, Delhoume M, Orsel I *et al.* Anaphylactic shock to fresh-frozen plasma inactivated with methylene blue. *Transfusion* 2011; 51: 125-28.
- 14) Matsuyama N, Hirayama F, Wakamoto S, *et al.* Application of the basophil activation test in the analysis of allergic transfusion reactions. *Transfus Med* 2009; 19: 274-277.
- 15) Matsuyama N, Yasui K, Amakishi E, *et al.* The IgE-dependent pathway in allergic transfusion reactions: involvement of donor blood allergens other than plasma proteins. *Int J Hematol* 2015; 102: 93-100.
- 16) Okamura I, Matsuyama N, Yasui K, *et al.* Clinical utility of the basophil activation test for analysis of allergic transfusion reactions: A pilot study. *Vox Sang* 2017; 112: 114-21.
- 17) Pruzansky JJ, Grammer LC, Patterson R, *et al.* Dissociation of IgE receptors on human basophils. I. Enhanced passive sensitization for histamine release. *J Immunol* 1983; 131: 1949-1953.
- 18) Santos AF, James LK, Bahnson HT, *et al.* IgG4 inhibits peanut-induced basophil and mast cell activation in peanut-tolerant children sensitized to peanut major allergens. *J Allergy Clin Immunol* 2015; 135: 1249-1256.