

## 白血球抗体検出のための5系統の血液細胞を同時に測定する 新たなフローサイトメトリー法

松山 宣樹<sup>1)</sup> 小島 芳隆<sup>1)</sup> 平山 文也<sup>1)</sup> 保井 一太<sup>1)</sup> 谷上 純子<sup>1)</sup>  
 福森 泰雄<sup>1)</sup> 吉村 敬次<sup>1)</sup> 田端 信忠<sup>2)</sup> 坂田 尚己<sup>2)</sup> 谷 慶彦<sup>1)</sup>  
 柴田 弘俊<sup>1)</sup>

白血球抗体を検出する方法として、フローサイトメトリー (FCM) 法が一般的に用いられているが、同方法にはいくつかの欠点がある。その一つは、好中球や単球抗のバックグラウンド蛍光が高い事、また、抗体の特異性の同定には好中球、単球のみならず T-リンパ球、B-リンパ球、血小板といった他の血液細胞との反応性も同時に検討する必要がある事である。その為、我々は低バックグラウンドで、かつ、4系統の白血球と血小板を同時に測定する方法の樹立を試みたので報告する。FCM 解析にはエチレンジアミン 4 酢酸 (EDTA) 採血した全血を試料として用い、5系統細胞の識別は FSC/SSC 分布と CD4、CD20、CD14 の発現の有無を基に行なった。その結果、抗 HNA (human neutrophil antigen) 1b 血清を HNA 1b 陽性細胞と反応させた場合には、好中球のみが陽性となり、抗 Nak<sup>a</sup> (抗 CD36) 血清と反応させた場合には、血小板と単球が陽性となった。好中球と単球のバックグラウンドは十分に低くなった。また、HLA Class II の抗血清を用いたところ、B リンパ球と単球が陽性となり、HLA Class I の抗血清では5系統の細胞が陽性であった。

**キーワード：**5系統細胞、フローサイトメトリー、白血球抗体、全血

本論文内容は、Transfusion Medicine 誌編集長および Blackwell Publishing 社の許可のもと、Transfusion Medicine 第16巻 第2号 111頁-118頁、2006年に最初に掲載された論文に基づき作製したものである。(This article is based on a study first reported in the paper : N. Matsuyama, Y. Kojima, F. Hirayama, K. Yasui, A. Taniue, Y. Fukumori, K. Yoshimura, N. Tabata, N. Sakata, Y. Tani and H. Shibata : Simultaneous five cell-lineage flow cytometric analysis system for detection of leucocyte antibodies. Transfusion Medicine. 16(3)111-118, 2006)

### はじめに

白血球抗体は非溶血性輸血副作用、とりわけ輸血関連急性肺障害 (TRALI) の主な原因の一つと考えられている<sup>1)2)</sup>。これまで HLA Class I 抗体、HLA Class II 抗体と TRALI との関わりが主に報告されているが<sup>3)~9)</sup>、最近では、単球抗体の関与も指摘されており<sup>10)</sup>、それらを検索することは重要である。現在、白血球抗体の検出、同定および交差試験を行う方法としてフローサイトメトリー (FCM) 法が一般的に用いられているが<sup>11)</sup>、同方法にはいくつかの欠点がある。その一つは、好中球抗体や単球抗体を検出する際に、同細胞の高いバックグラウンド蛍光により、その検出がしばしば困難になることである。特に、単球のバックグラウンドは高く、これを抑えるには、その原因となる FcγRI を予め

除去する処置が必要である<sup>10)12)</sup>。また、抗体の特異性の同定には好中球、単球のみならず T-リンパ球、B-リンパ球、血小板といった他の血液細胞との反応性も同時に検討する必要がある。そのため我々は、上記欠点を克服した新規 FCM 法の樹立を試みたので報告する。

従来法では赤血球と血漿を除去した試料 (解析対象の血液細胞を精製または粗精製した試料) を用いるが、本研究では、以下の理由により、全血そのものを試料としている。1) パネル細胞由来陰性コントロール (パネル自己血清) と白血球抗体陽性血清 (陽性コントロール) を用いて染色したところ、好中球や特に単球において、陰性コントロールの値が高くなり、陽性コントロールとの差が認められなくなる現象が少なからずあった。我々はこの現象について、試料から血漿を除去し

1) 大阪府赤十字血液センター

2) 近畿大学医学部付属病院小児科

〔受付日：2006年5月30日、受理日：2007年2月23日〕

た事が、高バックグラウンドを招いたのであり、全血を試料として用いる事により、全血に含まれる血漿成分が、バックグラウンドが高くなるのを抑制するのではないかと推測した。尚、全血試料は検査操作を簡便にするとともに、種々の血液細胞の機能評価試験に既に用いられている<sup>13)14)</sup>。2) HLA Class I 抗体や HLA Class II 抗体、HNA-1 抗体等の白血球抗体は、血液細胞上に発現する抗原だけでなく、血漿中に存在する可溶性抗原とも反応する可能性があり<sup>15)16)</sup>、より本来の輸血の状況を再現できる事になると考えた。

## 方 法

### 1) 全血試料の準備

用いた全血試料は、予め HLA Class I, HLA Class II および HNA-1 タイプ既知の大阪府赤十字血液センター職員由来のものを使用し、その採血時には抗凝固剤として acid citrate dextrose (ACD) もしくは ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) を用いた。また、一部の実験では同職員由来の血液より精製した血小板および好中球を用いた。血小板は ACD 採血した全血を 200×g 20 分間、遠心分離し、得られた Platelet-rich plasma (PRP) より回収した。一方、好中球は Polymorphprep (AXIS-SHIELD PoC ASOslo, Norway) を用いた比重遠心法により精製し、0.1% ウシ血清アルブミンを添加した PBS (PBS/BSA) に浮遊させ、実験に用いた。

### 2) 被検血清

非溶血性輸血副作用症例、血小板輸血不応答症例患者、新生児同種免疫性血小板減少症例あるいは possible TRALI 症例 (1) 由来の白血球抗体陽性血清を被検血清として用いた。被検血清中に含まれる白血球抗体の特異性は、予め抗ヒトグロブリンリンパ球細胞毒試験 (AHG-LCT)<sup>17)</sup>、MPHA<sup>18)</sup>、LABScreen<sup>®</sup> (One Lambda Inc, Canoga Park, CA, USA) を用いて決定した。また、陰性血清はパネル細胞由来の血清 (自己血清) を用いた。

### 3) FCM による 5 系統血液細胞の解析

EDTA 採血した全血 50μl と被検血清 (もしくは陰性血清) 10μl を 0.8ml 96-well storage plate (Nippon Genetics Co Ltd, Tokyo, Japan) 中で混合し、4℃、15 分間反応させた (別途記載がない場合はこの条件で実験を行い、被検血清を希釈する場合は PBS/BSA に 10mM EDTA を添加した PBS/BSA/EDTA を用いた)。反応後、PBS/BSA/EDTA にて 2 回洗浄し、FITC 標識ウサギ抗ヒト IgG F(ab')<sub>2</sub> (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark) を 20μl 加え、4℃、15 分間染色した。次に、赤血球を溶血させる為に、700μl の BD FACS<sup>™</sup> Lysing Solution (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) を加

え、室温にて 10 分間反応させ、PBS/BSA/EDTA で 1 回洗浄後、2 次抗体の残余結合部位をブロックする為に、マウス血清 (DAKO Cytomation) を 10μl 加え、4℃、10 分間反応させた。その後、PE 標識抗ヒト CD4 モノクロナール抗体 (BD Biosciences)、PE 標識抗ヒト CD20 モノクロナール抗体 (BD Biosciences)、PerCP 標識抗ヒト CD14 モノクロナール抗体 (BD Biosciences) で更に 4℃、15 分間染色し、FACS Calibur (BD Biosciences) を用いて、測定を行なった。

また、一部の実験では、試料を ACD 採血した全血とし、洗浄バッファーとして PBS/BSA を用いた。

本法において、T-リンパ球マーカーとして抗ヒト CD3 モノクロナール抗体を使用せずに、抗ヒト CD4 モノクロナール抗体を使用している。その理由は予備実験において、CD8 陽性 T-リンパ球は、しばしば、高バックグラウンドであったが、それに対し、CD4 陽性 T-リンパ球は低バックグラウンドで安定していた為である。

上記方法による代表的な FCM プロファイルを Fig. 1 に、そこで用いた各種血液細胞の識別ゲートを Table 1 にそれぞれ示した。R1 領域を血小板、R2 領域を好中球とし、R3 および R5 領域の両方に属する血液細胞を CD4 陽性 T-リンパ球、R3 および R6 領域の血液細胞を CD20 陽性 B-リンパ球とした。T-リンパ球と B-リンパ球を識別する為に、PE-抗ヒト CD4 モノクロナール抗体、PE-抗ヒト CD20 モノクロナール抗体を用いているが、これは予め検討を行い、FL2(PE)領域が 3 ポピュレーション (CD4 陽性群、CD20 陽性群、CD4、CD20 陰性群) になるように、各抗体濃度を調整した (data not shown)。単球については、FSC/SSC で決定した R4 領域と CD14 抗原が陽性の R7 領域の双方に属する血液細胞とした。

一部の実験では、上記条件を以下の通りに部分的に変更し、実験を行った。FITC 標識 isotype control (BD biosciences)、FITC 標識抗ヒト CD36 モノクロナール抗体 (BD biosciences)、FITC 標識抗ヒト CD41a モノクロナール抗体 (BD biosciences) を用いて血液細胞を染色した。96-well round bottom plate (Corning Incorporated, Corning, NY, USA) を用い、血液細胞を各抗体で染色後、BD FACS<sup>™</sup> Lysing Solution を 200μl 加え、赤血球を溶血させた。

### 4) 好中球と immune complex の結合

EDTA 採血した全血 50μl とビオチン標識マウス抗ヒト HLA-DR モノクロナール抗体 (Beckman Coulter, CA, USA) を混合し、4℃、15 分間反応後、リンパ球および好中球に、それぞれ直接および間接的 (全血の血漿成分に含まれる可溶性 HLA-DR 抗原が、添加された HLA-DR 抗体と反応し、immune complex を形成し、それが FcγR を介して好中球に間接的に結合) に結合し

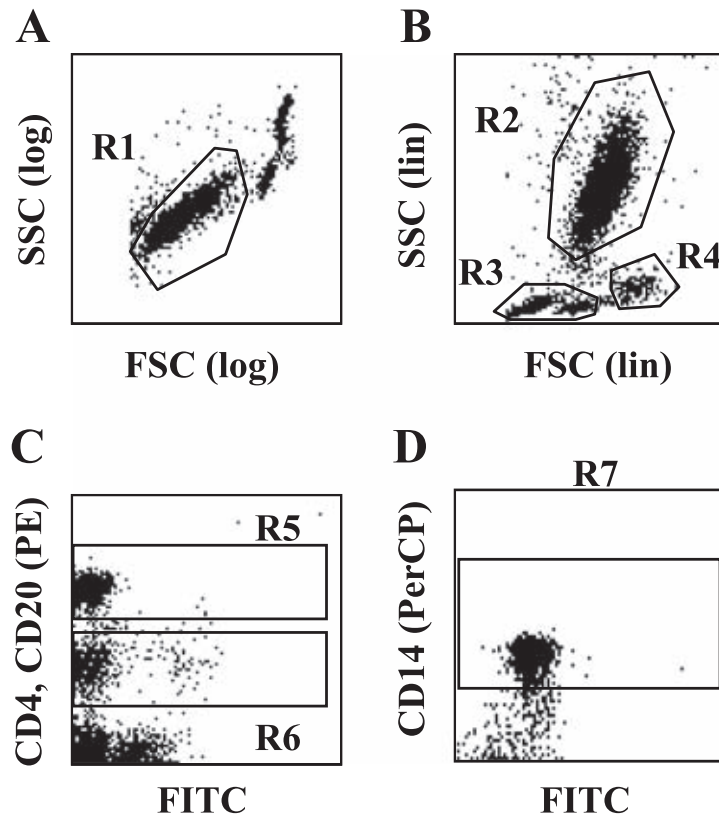


Fig. 1 Gates utilized to determine 5 lineage cells. Cells in the region R1 and R2 were regarded as platelets and neutrophils, respectively. Cells in the regions R3 and R5 were regarded as CD4<sup>+</sup> T-cells, where are cells in the region R3 and R6 as CD20<sup>+</sup> B-cells. Cells in the regions R4 and R7 were regarded as monocytes, as summarized in Table 1.

Table 1 Blood cell subsets defining dot-plot regions and expressed cell surface molecules

Cells	Dot-Plot Regions	Expressed Cell Surface Molecules
Platelets	R1	HLA I, Nak <sup>a</sup> (CD36), HNA-3a
Neutrophils	R2	HLA I, HNA-1, HNA-2a, HNA-3a, HNA-4a, HNA-5a
CD4 <sup>+</sup> T-cells	R3 + R5	HLA I, HNA-3a, HNA-5a
CD20 <sup>+</sup> B-cells	R3 + R6	HLA I, HLA II, HNA-3a, HNA-5a
Monocytes	R4 + R7	HLA I, HLA II, Nak <sup>a</sup> (CD36), HNA-3a, HNA-4a, HNA-5a

た, 同 HLA-DR 抗体を PerCP 標識ストレプトアビジン (BD Biosciences) を用いて染色し, その有無を確認した.

**結 果**

1) ダメージを受けた血小板ないしその断片が, 非特異的に好中球や CD20 陽性 B-リンパ球に結合する現象に対する EDTA の効果

我々は 5 系統の血液細胞との反応パターンから, 被検血清中に含まれる白血球抗体の特異性を類推する FCM 法の開発を目的とし, まず, その条件の検討を行った. ACD 採血した全血をパネル細胞とし, PBS/BSA を洗

浄バッファーとしてそれぞれ用い, 前述の FCM 法(方法<sup>3)</sup>参照)にて測定した (Fig. 2, Exp. 1, 1st panel). 細線はパネル細胞由来血清 (陰性血清) のヒストグラムであり, 太線は新生児同種免疫性血小板減少症例由来の Nak<sup>a</sup> (CD36) に対する抗体を含む血清 (特異性は MPHA 法で決定) のそれである. 陰性血清ではバックグラウンドを低く抑えることができたが, Nak<sup>a</sup> の抗体を含む血清は, 本来 Nak<sup>a</sup> 抗原を発現している血小板と単球だけではなく, 本来 Nak<sup>a</sup> 抗原を発現していない好中球や CD20 陽性 B-リンパ球にも反応を示した (Fig. 2, Exp. 1, 1st panel). この原因について, 我々は, 溶血過程において, 血小板 (血小板は Nak<sup>a</sup> 抗原を強く発

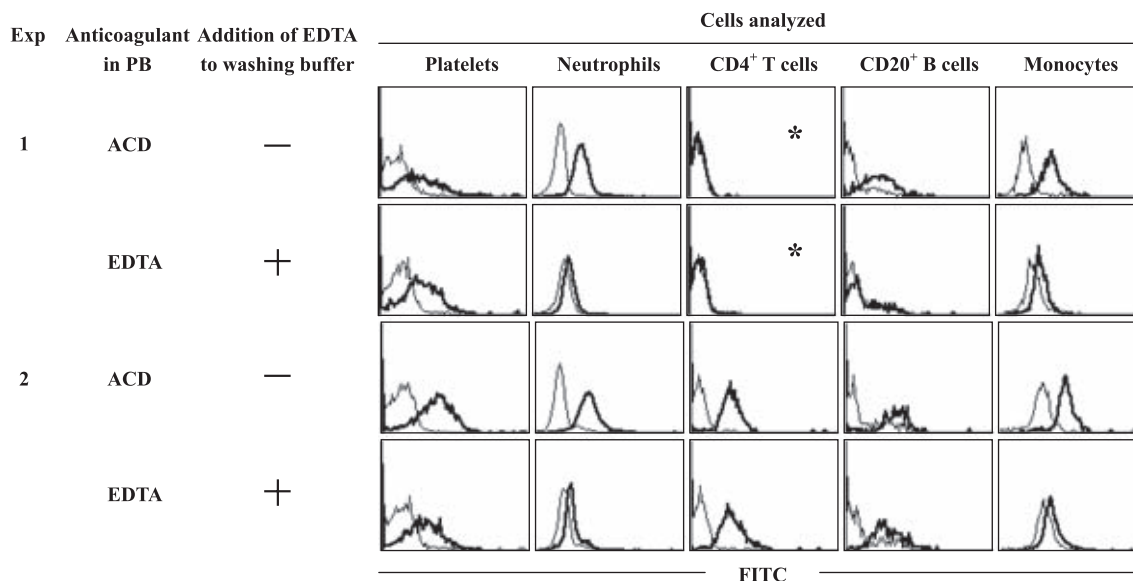


Fig. 2 Effects of ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) on nonspecific binding of putative-damaged platelets and/or their debris to neutrophils and CD20<sup>+</sup> B-cells. Thin lines and bold lines represent autologous negative-control serum and test serum, respectively. Asterisks mean that the thin line and the bold line were almost completely overlapped. The test serum was derived from the mother of a neonatal alloimmune thrombocytopenia case.

現している) がダメージを受け、その血小板ないしその断片が直接、好中球やB-リンパ球に付着したのではないかと考えた。そして、この現象を検証する為、次の実験を行った。精製した好中球に血小板を添加し、溶血操作を行った場合と、血小板を添加せずに溶血操作を行った場合とで、好中球に対する抗ヒト CD36 モノクロナール抗体および抗ヒト CD41a モノクロナール抗体の反応性の違いを比較した。その結果、血小板を添加しなかった場合、抗ヒト CD36 モノクロナール抗体、抗ヒト CD41a モノクロナール抗体ともに反応しなかったが、血小板を添加した場合は、両抗体ともに強く反応した (Fig. 3)。すなわち、Fig. 2, Exp. 1, 1st panel の好中球に対する陽性反応は、溶血過程でダメージを受けた血小板ないし、その断片の付着が原因と考えられた。そこで、この血小板付着の問題を解決する為に、試料を ACD 採血から EDTA 採血に変更し、さらに洗浄バッファーである、PBS/BSA に 10mM EDTA を加えたところ、この問題は解決した (Fig. 2, Exp. 1, 2nd panel)。この条件下では、血小板および単球と上記 Nak<sup>+</sup> 抗血清との反応性を残したまま、好中球、CD20 陽性 B-リンパ球との反応のみを抑えることが出来た。その際、単球の反応性は減弱しているが、これは、おそらく単球への血小板付着が抑えられたことに起因すると考えられる。ただし、好中球に非常に弱く残る反応性の原因については不明である。次に上記改良した条件で、他のパネル細胞と同血清との反応性についても調べたところ (Fig. 2, Exp. 2)、このパネル細胞では血小板、

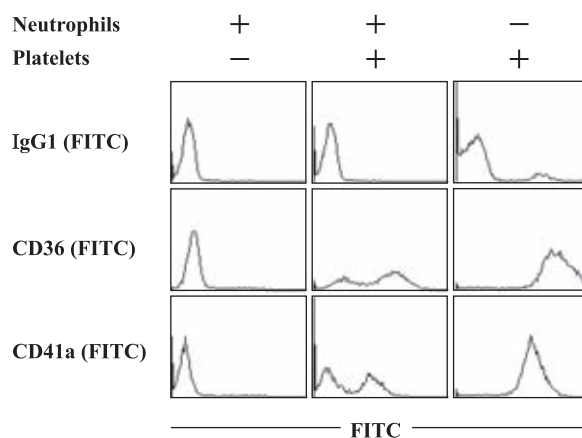


Fig. 3 Effects of the presence of platelets on neutrophil staining with anti-CD36 and anti-CD41a. Isolated neutrophils, isolated platelets or their combination were treated with red cell lysing solution and then stained with (FITC)-conjugated antibodies against CD36 and CD41a. In the left and middle columns, neutrophils were analyzed, while in the right column, platelets were analyzed.

単球のみならず、CD4 陽性 T-リンパ球と CD20 陽性 B-リンパ球は強く、好中球には弱く反応した。この結果から、同血清には Nak<sup>+</sup> 抗体のみならず、HLA Class I 抗体も含まれていると類推され、LABScreen<sup>®</sup>法で HLA 抗体検査を実施したところ、HLA-A11, A26, B7, B48, B60, B61 の特異性を持つ抗体が検出された。2nd panel の HLA Class I タイプは HLA-A24, 30 ; B13, 48 ; Cw8, 15 であった為に、好中球や CD4 陽性 T-リン

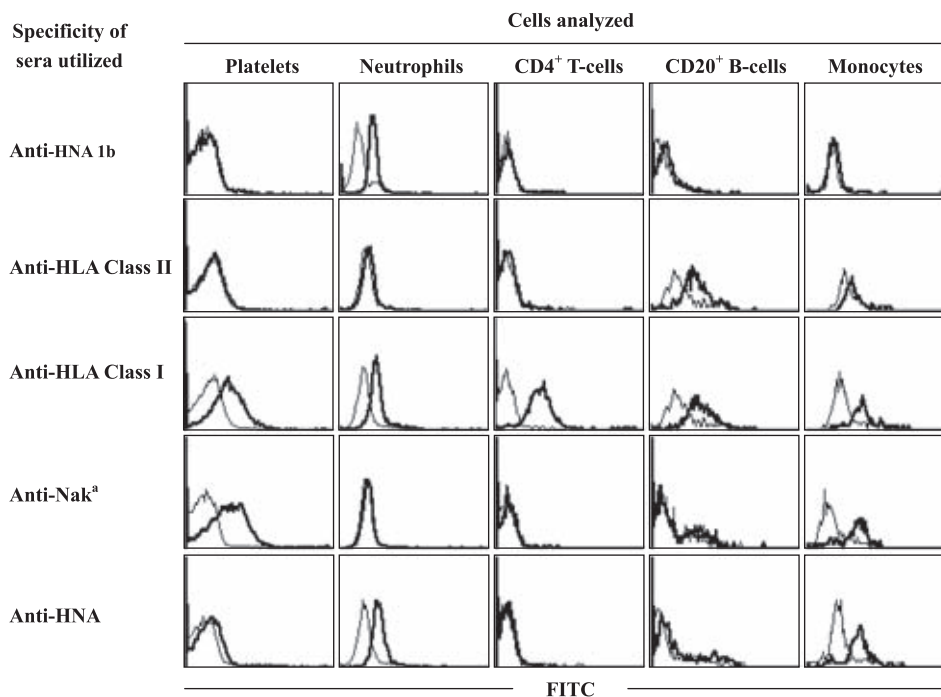


Fig. 4 Representative examples of simultaneous whole blood five cell lineage staining analysis. The test serum samples were derived from a patient of nonhemolytic transfusion reaction (1st panel), a patient of nonhemolytic transfusion reaction (2nd panel), a patient refractory to platelet transfusion (3rd panel), the mother of a case of neonatal alloimmune thrombocytopenia (4th panel), and a case of possible transfusion-related acute lung injury (5th panel).

パ球, CD20 陽性 B-リンパ球に反応し, 1st panel の HLA Class I タイプは HLA-A24, -; B5102, 54; Cw6, 8 であった為に, 好中球, CD4 陽性 T-リンパ球, CD20 陽性 B-リンパ球に反応しなかったと考えられる.

以上の結果から, EDTA を用いることにより, 非特異的結合が抑制された事が示唆された. 従って, 以降の実験は, 試料を EDTA 全血に, 洗浄バッファーは PBS/BSA/EDTA にして行なった.

## 2) 白血球抗体の検出

Fig. 4 に本法における各種白血球抗体陽性血清の反応を示した. 1 段目のヒストグラムは, 非溶血性輸血副作用症例由来の血清を用いた. LABScreen<sup>®</sup>法により, この血清から HLA-B37, B38, B51, B52, B27, B44, B53, B49 の特異性を持つ HLA Class I 抗体が検出された. その為, 同血清中の HLA Class I 抗体と反応しないパネル細胞を用いて本法を実施した. その結果, HNA-1b 抗原陽性パネル細胞の好中球との反応は観察されたが (Fig. 4 1st panel), HNA-1b 抗原陰性パネル細胞の好中球との反応は観察されなかった (data not shown). 尚, Fig. 4 1st panel に使用したパネル細胞は HNA-1b 抗原陽性で, HLA Class I タイプは HLA-A26-; B35, 60; Cw9, - である. 2 段目のヒストグラムは前述とは別の非溶血性輸血副作用症例由来の血清を用いた. LABScreen<sup>®</sup>法により, この血清から HLA-DR52 の特異性を

持つ HLA Class II 抗体が検出された. そして, 同血清を本法で測定したところ, HLA-DR52 抗原陽性パネル細胞においては, CD20 陽性 B-リンパ球と単球に反応が観察され, 血小板, 好中球, CD4 陽性 T-リンパ球には反応が観察されなかった (Fig. 4 2nd panel).

また, HLA-DR52 抗原陰性パネル細胞の CD20 陽性 B-リンパ球や単球において, 反応が観察されなかった (data not shown). 3 段目のヒストグラムは血小板輸血不応答症例患者由来の血清を用いた. この血清は B51 と B61 の特異性を持つ HLA Class I 抗体を有しており (特異性は AHG-LCT 法で決定), HLA B51 または B61 抗原陽性パネル細胞では, 5 系統全ての血液細胞との反応が観察されたが (Fig. 4 3rd panel), B51 または B61 抗原陰性パネル細胞の血液細胞では, その反応は観察されなかった (data not shown). 4 段目のヒストグラムは Fig. 2 に示した血清とは異なる, 新生児同種免疫性血小板減少症例より検出された Nak<sup>a</sup> の特異性を有する血清を用いた. この血清は Nak<sup>a</sup> 抗原陽性パネル細胞の血小板と単球に, その反応性が観察された (Fig. 4 4th panel). そして, 今回データは示さないが, HPA-1a の特異性を持つ血清においては, HPA-1a 抗原陽性パネル細胞の血小板にのみ, その反応性が観察された. 5 段目のヒストグラムは possible TRALI 症例由来の血清を用いた. LABScreen<sup>®</sup>法による HLA 抗体検査の結果



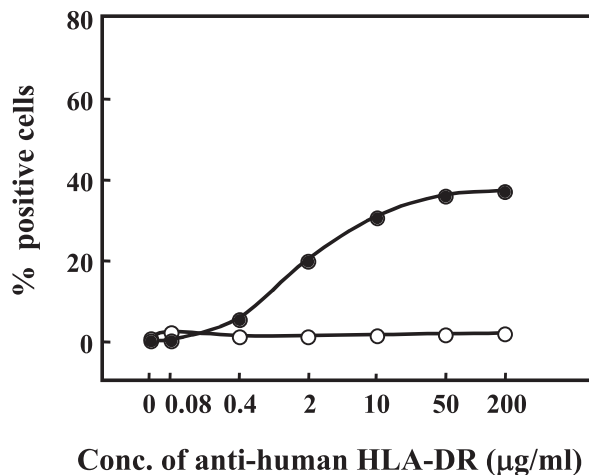


Fig. 5 Binding of putative immune complex to neutrophils.

Ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) whole blood was incubated with biotin-conjugated mouse anti-human leucocyte antigen (HLA) DR monoclonal antibody. The amounts of the anti-HLA DR antibody bound on neutrophils (open circle) and lymphocytes (closed circle) were identified by streptavidin-PerCP.

果, 同血清中から HLA Class I, HLA Class II 抗体は検出されなかった. また, 本法において, 10 種類以上のパネル細胞を用いた測定の結果, 約半分のパネル細胞においては好中球と単球に, 1/3 のパネル細胞においては単球にのみ反応したが, 同血清の特異性の同定には至らなかった. 今後, 更なる検討を続けたい.

### 3) 細胞表面に付着した immune complex の検出

本法は試料として, 多数の血漿タンパク質や可溶性 HLA 分子を含んだ全血<sup>16)</sup>を用いる検査法である. それ故, それら血漿タンパク質や可溶性 HLA 分子と被検血清中の抗体が immune complex を形成し, その形成された immune complex が, 細胞表面上の FcγRIIA を介して, 好中球に結合することは, 十分に考えられる<sup>19)20)</sup>. これは, 抗体特異性を決定する際に, 大きな問題となる. そこで我々は, パネル細胞として用いる EDTA 採血した全血に, マウス由来抗ヒト HLA-DR モノクロナール抗体を加え, 血漿中に含まれる可溶性 HLA-DR 抗原と同抗体により, immune complex を形成させ, それが好中球に結合するか否かを測定した<sup>21)</sup>. その結果, 全血に抗ヒト HLA-DR モノクロナール抗体を添加することで, 同抗原を発現するリンパ球では抗体の結合が観察され, その結合は添加した抗体濃度依存的なものであった (Fig. 5). 一方, HLA-DR 抗原の発現のない好中球では同抗体もしくは, immune complex の結合は認められなかった (Fig. 5). 以上の結果より, 本法は全血と血清を混合することで生じるであろう immune complex の影響を受けないと考えられた.

## 考 察

我々は, 全血を試料とし, 低バックグラウンドで, FcγRI 除去操作が不要でかつ, 5 系統の血液細胞を同時に測定する FCM 法の樹立に成功した. 今回の研究では IgG 性の白血球抗体の検出に焦点を絞ったが, 本法において, 2 次抗体を抗ヒト IgM に替えることで, IgM 性の抗体の検出も可能であった (data not shown). しかし, 本法には克服しなければならない問題もある. 1 つ目の問題点として, 被検血清中に HLA Class I 抗体と, それ以外の特異性を有する白血球抗体が混在した場合, HLA Class I 抗体は全ての血液細胞と反応するため, 混在するその他の HLA Class II 抗体や単球抗体等の検出が困難になることである. この問題を解決する方法として, 最初に, 本法以外の検査法で, 被検血清中に含まれる HLA Class I 抗体の特異性を予め同定し, 同抗体と反応しない HLA タイプのパネル細胞を選択し準備する必要がある. 本研究において, HLA Class I 抗体に反応しないパネル細胞を選択し, 本法を実施した例は Fig. 4 1st panel である. この例においては, HLA Class I 抗体に反応しないパネル細胞の入手が可能であったが, 被検血清中に含まれる HLA Class I 抗体の特異性が広範囲で, その抗体に反応しないパネル細胞の入手が困難である場合, プール血小板を用いて HLA Class I 抗体を吸収するのも解決方法の一つである<sup>22)</sup>.

2 つ目の問題点として, 本法を用いて解析した TRALI 症例が possible TRALI 1 例のみであった事や, Fig. 4 5th panel に示した様に, 特異性が同定できない例が存在する事である. この問題点を解決すれば, 本法が TRALI 関連抗体の検出およびその特異性の同定に有用な検査法として, 支持されると期待している.

我々は白血球抗体のスクリーニングを実施するにあたり, まず, 最初に LABScreen<sup>®</sup>法で HLA 抗体検査を実施している. その結果, HLA Class I 抗体が検出された場合は, その特異性を同定し, 次に本法で被検血清に含まれる HLA Class I 抗体に反応しない, HNA-1 および HNA-2a 既知パネル細胞を用いて好中球や単球等に対する抗体検査を実施している. 当センターは HLA Class I タイプ既知の成分献血登録済献血者を 2 万人以上保有し, その中から, 1 日に 30 から 40 人以上の成分献血登録済献血者に献血のご協力を頂いている. その為, 被検血清中に HLA Class I 抗体が含まれる場合においても, その抗体に反応しないパネル細胞を選択する事は, ほとんどの事例において可能である. しかし, 前述した様に, パネル細胞の入手が困難な場合はプール血小板で HLA Class I 抗体を吸収する事が必要になると考えられる.

現在, 本法以外にも白血球抗体, とりわけ好中球抗

体を検出する方法として、GAT法<sup>23)</sup>、MAIGA法<sup>24)</sup>、MPHA法<sup>25)</sup>等が知られている。しかし、いずれの方法も好中球にのみ注目しており、他の血液細胞に対する反応性を確認することはできない。他の血液細胞に対する反応性のプロファイル情報は、その抗体の特異性の同定に非常に有用である。例えば、HNA抗体のうちHNA-3、HNA-4、HNA-5、等がそれに当たる (Table 1)。

一方、本法は50 $\mu$ lの全血に被検血清を10 $\mu$ l加えて、この条件は循環血液量5lの患者に対して、白血球抗体を含んだ1lの新鮮凍結血漿 (FFP) または血小板製剤を輸血した事になり、この割合は非現実的である。循環血液量5lの患者が輸血する血液製剤の量はFFP 2単位であれば約160ml、血小板製剤であればおよそ150から200ml ( $\pm$ 50ml)である。輸血の状況を再現するのであれば、50 $\mu$ lの全血に対して、被検血清が1~2 $\mu$ lもしくは10倍希釈した被検血清を10~20 $\mu$ l加える事となり、この条件下で、好中球や単球、血小板上に抗体が結合するなら、この抗体は生体内でも当該血液細胞に結合しうるのであろう。実際、Fig. 4の1st panel, 4th panel, 5th panelに用いた血清は、上記条件において、標的となる血液細胞との結合が認められた (data not shown)。さらに、標的細胞に抗体が結合した場合には、細胞の活性化が起こり、TRALIを含めた非溶血性輸血副作用に繋がって行く可能性が考えられる。この事に関連する報告として、TRALI関連抗体が単球を活性化させ、IL-1、TNF- $\alpha$ 等を放出させた報告<sup>10)</sup>、好中球抗体が好中球を活性化させた報告<sup>3)4)26)</sup>、さらに、血小板抗体が血小板を活性化させた報告<sup>27)28)</sup>があり、これらは血液製剤中の白血球抗体の特異性を同定するより、むしろ抗体と患者血液細胞との結合を明らかにすることが重要であることを示している。

現在、我々は、上記血清以外でも、同条件で抗体の結合が認められるHLA Class I抗体を保有しており、これらの血清が血液細胞を活性化する否かを検討しているところである。

## 文 献

- 1) Kleinman S, Caulfield T, Chan P, et al: Toward an understanding of transfusion-related acute lung injury: statement of a consensus panel. *Transfusion*, 44: 1774—1789, 2004.
- 2) Goldman M, Webert KE, Arnold D.M, et al: Proceedings of a consensus conference: Towards an understanding of TRALI. *Transfusion Med Rev*, 19: 2—31, 2005.
- 3) Popovsky M.A, Abel M.D, Moore S.B, et al: Transfusion-related acute lung-injury associated with passive transfer of antileukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis*, 128: 185—189, 1983.
- 4) Popovsky M.A, Moore S.B: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 25: 573—577, 1985.
- 5) Kopko P.M, Popovsky M.A, MacKenzie M.R, et al: HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 41: 1244—1248, 2001.
- 6) Flesch B.K, Neppert J: Transfusion-related acute lung-injury caused by human leucocyte antigen class II antibody. *Br J Haematol*, 116: 673—677, 2002.
- 7) Varela M, Mas A, Nogues N, et al: TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion*, 42: 1102, 2002.
- 8) Nishimura M, Mitsunaga S, Ishikawa Y, et al: Possible mechanisms underlying development of transfusion-related acute lung injury: roles of anti-major histocompatibility complex class II DR antibody. *Transfusion Med*, 13: 141—147, 2003.
- 9) Win N, Brown C, Navarrete C, et al: TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion*, 43: 545—546, 2003.
- 10) Kopko P.M, Paglieroni T.G, Popovsky M.A, et al: TRALI correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion*, 43: 177—184, 2003.
- 11) Verheugt F.W, von dem Borne A.E, Decary F, et al: The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol*, 36: 533—544, 1977.
- 12) Kuijpers R.W, Dooren M.C, von dem Borne A.E, et al: Detection of human monocyte-reactive alloantibodies by flow cytometry after selective downmodulation of the Fc receptor I. *Blood*, 78: 50—56, 1991.
- 13) Nerad J.L, Griffiths J.K, van der Meer J.W, et al: Interleukin-1b (IL-1b), IL-1 receptor antagonist, and TNF- $\alpha$  production in whole blood. *Journal of Leukocyte Biology*, 52: 687—692, 1992.
- 14) Bouma M.G, Jeunhomme T.M, Boyle D.L, et al: Adenosine inhibits neutrophil degranulation in activated human whole blood. *Journal of Immunology*, 158: 5400—5408, 1997.
- 15) Huizinga T.W, de Haas M, Kleijer M, et al: Soluble Fc $\gamma$  receptor III in human plasma originates from release by neutrophils. *Journal of Clinical Investigation*, 86: 416—423, 1990.
- 16) Ghio M, Contini P, Mazzei C, et al: Soluble HLA class I, HLA class II, and Fas ligand in blood components: a possible key to explain the immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions. *Blood*, 93: 1770—1777, 1999.
- 17) Johnson A.H, Rossen R.D, Butler W.T, et al: Detection of

- alloantibodies using a sensitive antiglobulin microcytotoxicity test: identification of low levels of pre-formed antibodies in accelerated allograft rejection. *Tissue Antigens*, 2: 215—216, 1972.
- 18) Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, et al: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sanguinis*, 41: 25—31, 1981.
- 19) Ravetch J.V, Kinet J.P: Fc receptors. *Annual Review of Immunology*, 9: 457—492, 1991.
- 20) Hart S.P, Alexander K.M, Dransfield I: Immune complexes bind preferentially to FcγRIIA (CD32) on apoptotic neutrophils, leading to augmented phagocytosis by macrophages and release of proinflammatory cytokines. *Journal of Immunology*, 172: 1882—1887, 2004.
- 21) Hart S.P, Jackson C, Kremmel LM, et al: Specific binding of an antigen-antibody complex to apoptotic human neutrophils. *American Journal of Pathology*, 162: 1011—1018, 2003.
- 22) Prou O, Kaplan C, Muller J.Y: Freeze dried platelets for HLA alloantibodies absorption. *Tissue Antigens*, 16: 105—107, 1980.
- 23) Jiang A.F, Lalezari P: A micro-technique for detection of leukocyte agglutinins. *Journal of Immunological Methods*, 7: 103—108, 1975.
- 24) Bux J, Kober B, Kiefel V, et al: Analysis of granulocyte-reactive antibodies using an immunoassay based upon monoclonal antibody-specific immobilization of granulocyte antigens. *Transfusion Medicine*, 3: 157—162, 1993.
- 25) Araki N, Nose Y, Kohsaki M, et al: Anti-granulocyte antibody screening with extracted granulocyte antigens by a micro-mixed passive hemagglutination method. *Vox Sanguinis*, 77: 44—51, 1999.
- 26) Silliman C.C, Thurman G.W, Ambruso D.R: Stored blood components contain agents that prime the neutrophil NADPH oxidase through the platelet-activation factor receptor. *Vox Sanguinis*, 63: 133—136, 1992.
- 27) Taylor S.M, Reilly M.P, Schreiber A.D, et al: Thrombosis and shock induced by activating antiplatelet antibodies in human FcγRII transgenic mice: the interplay among antibody, spleen, and Fc receptor. *Blood*, 96: 4254—4260, 2000.
- 28) Wakamoto S, Fujihara M, Urushibara N, et al: Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reaction. *Vox Sanguinis*, 88: 41—51, 2005.

## **SIMULTANEOUS FIVE CELL-LINEAGE FLOW CYTOMETRIC ANALYSIS SYSTEM FOR DETECTION OF LEUCOCYTE ANTIBODIES**

*Nobuki Matsuyama*<sup>1)</sup>, *Yoshitaka Kojima*<sup>1)</sup>, *Fumiya Hirayama*<sup>1)</sup>, *Kazuta Yasui*<sup>1)</sup>, *Atsuko Taniue*<sup>1)</sup>, *Yasuo Fukumori*<sup>1)</sup>, *Keiji Yoshimura*<sup>1)</sup>, *Nobutada Tabata*<sup>2)</sup>, *Naomi Sakata*<sup>2)</sup>, *Yoshihiko Tani*<sup>1)</sup> and *Hirotooshi Shibata*<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Japanese Red Cross Osaka Blood Center

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Kinki University School of Medicine

### **Keywords:**

five-cell lineage, flow cytometry, leucocyte antibody, whole blood