

非溶血性輸血副作用を誘導した抗 HLA Class II 抗体陽性血漿と末梢血単核細胞との反応上清による血管内皮細胞の透過性亢進作用

若本志乃舞¹⁾ 藤原 満博¹⁾ 阪川 久子¹⁾ 高橋 大輔¹⁾ 丹羽 光一²⁾
森岡 正信³⁾ 佐藤進一郎¹⁾ 加藤 俊明¹⁾ 東 寛¹⁾ 池田 久實¹⁾

【背景】非溶血性輸血副作用 (nonhemolytic transfusion reactions : NHTRs) の病因において、抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化と、その結果放出される炎症性メディエーターが重要な役割を果たしていると考えられる。また、NHTRs の症状である発疹、蕁麻疹、血管浮腫、肺水腫等の病態には血管透過性の亢進が関与している。

【方法】抗 HLA Class II 抗体の作用により単球から放出された炎症性メディエーターが血管透過性亢進作用を有するか否かについて検討した。重篤な NHTRs の原因製剤となった抗 HLA Class II 抗体陽性血漿 (抗 HLA-DR 血漿) とヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell : PBMNC) とをインキュベートし、得られた反応上清をヒト血管内皮細胞に添加した。デキストラン分子の透過性の変化を測定することにより、血管透過性亢進の有無を評価した。

【結果】抗 HLA-DR 血漿と PBMNCs を 3 時間以上インキュベーションして得た反応上清は血管透過性亢進作用を示した。この作用は抗体の特異性に依存していた。反応上清に抗 TNF- α 中和抗体及び、抗 IL-1 β 中和抗体の両方を添加することにより、血管透過性亢進作用は抑制された。また、TNF- α 及び IL-1 β により活性化される転写因子、nuclear factor κ B (NF- κ B) の阻害剤を血管内皮細胞細胞に作用させることにより、血管透過性亢進は抑制された。一方、アポトーシス阻害剤の影響はみられなかった。

【考察】抗 HLA Class II 抗体の特異性に依存して単球が活性化され、その結果、産生・放出された TNF- α 及び IL-1 β により血管透過性亢進作用が誘導された。従って、抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化と、その結果放出される炎症性メディエーターが、輸血副作用の発疹、蕁麻疹、血管浮腫及び肺水腫等の病態に関与することが示唆された。

キーワード：抗 HLA Class II 抗体、非溶血性輸血副作用、ヒト末梢血単核細胞の活性化、血管内皮細胞の透過性亢進

第 55 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

本論文内容は、Blackwell Publishing 社の許可のもと、Transfusion 誌 (第 48 巻 第 10 号 2060-2068 2008 年) に掲載された論文に基づき作成したものである。(Wakamoto S, Fujihara M, Sakagawa H, Takahashi D, Niwa K, Morioka M, Sato S, Kato T, Azuma H, Ikeda H : Endothelial permeability is increased by the supernatant of peripheral blood mononuclear cells stimulated with HLA Class II antibody. Transfusion 48 (10) : 2060-2068, 2008)

はじめに

血管内皮細胞の重要な機能の一つに、血液の血漿や血球を血管外に漏れないようにすること、及び、血管内外に必要な物質を輸送する血管透過性の制御がある。この機能が損なわれ、血管透過性が亢進すると、血液成分が血管外の組織に漏出してしまい、様々な炎症反

応の病態の一つである浮腫が引き起こされる¹⁾。輸血副作用では、副作用症状として高頻度に見られる発疹、蕁麻疹や血管浮腫²⁾、また、輸血関連急性肺障害(transfusion related acute lung injury : TRALI) の診断基準の一つである肺水腫に血管透過性が関与している^{3)~5)}。血管透過性の変化を評価するための in vitro モデルとし

1) 北海道赤十字血液センター

2) 東京農業大学生物産業学部 食品科学科

3) 愛育病院

〔受付日：2009 年 5 月 14 日、受理日：2009 年 11 月 20 日〕

て、単層培養した血管内皮細胞の透過性を測定する実験系が汎用されている。しかし、輸血による発疹、蕁麻疹、血管浮腫及び肺水腫の病因を調べる目的で、この *in vitro* モデルを用いて解析を行う試みはなされていない。

輸血副作用の病因は十分に明らかにされていないが、TRALI については、血液製剤中に含まれるドナー由来の抗顆粒球抗体（抗 HNA 抗体）^{6)~8)}、抗 HLA Class I 抗体³⁾⁸⁾、抗 HLA Class II 抗体^{9)~13)}、または、生理活性物質 (biologic response modifiers : BRMs)¹⁴⁾ が輸血され、患者細胞がこれらに暴露されることが一因と考えられている。患者が保持している抗白血球抗体が TRALI の原因となっている例も報告されている³⁾¹⁵⁾。これらの抗体や BRMs による TRALI の発症機序は以下のように考えられている。血液製剤中の抗体や BRMs は患者白血球を、患者抗体は血液製剤の混入白血球をそれぞれ活性化し、その結果として産生・放出された炎症性メディエーターが肺血管内皮細胞に障害を与え、血液成分が血管外に漏出して肺水腫が形成され、TRALI が発症する⁵⁾¹⁴⁾。これまで、特に抗 HNA 抗体による好中球活性化、または、抗 HNA 抗体と BRMs との相乗作用による好中球活性化と TRALI 発症との関連性について、*ex vivo* または *in vitro* で検証した結果が多く報告されている^{14)16)~20)}。

抗 HLA Class I 抗体または抗 HLA Class II 抗体が関与した TRALI について、Kopko ら¹⁵⁾ は、TRALI 症例で検出された抗 HLA Class I または Class II 抗体が標的抗原を有する単球を活性化し、IL-1 β 、TNF- α 及び tissue factor の細胞内濃度を上昇させることを報告している。Nishimura ら²¹⁾²²⁾ は、TRALI 症例で検出された抗 HLA Class II 抗体と標的抗原を有する単球、及びヒト肺微小血管内皮細胞を共培養することにより、内皮細胞のアポトーシスが誘導されることを報告している。この反応は、共培養により産生された TNF- α や leukotriene B4 によるものと推測されている。従来より、IL-1 β と TNF- α は血管透過性誘導因子として知られているため^{23)~25)}、これらのサイトカインは、輸血副作用における発疹、蕁麻疹、血管浮腫及び肺水腫の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられる。しかし、抗 HLA Class II 抗体の作用により、単球から放出されたメディエーターが、血管透過性亢進を誘導するという直接的な証明はなされていない。従って抗 HLA Class II 抗体による標的細胞の活性化及び、その結果として放出されたメディエーターが血管内皮細胞の透過性に影響を与えるか否かを検討することは輸血による浮腫の発症機序の理解に、有用であると考えられる。

最近我々は、抗 HLA Class II 抗体陽性の血小板製剤の輸血により、重篤な非溶血性輸血副作用 (nonhemo-

lytic transfusion reactions : NHTRs) が発症した例を報告した。我々は、この症例に関与した抗 HLA Class II 抗体が、*in vitro* で、標的抗原を発現するヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells : PBMNCs) から IL-1 β 、TNF- α 等のサイトカインの産生・放出を誘導することを見出している。そこで本検討では、さらに、抗 HLA Class II 抗体で刺激した PBMNCs の反応上清が血管内皮細胞の透過性を亢進させるかどうか、及び、この現象におけるサイトカインの役割について調べた。

材料と方法

1. 抗 HLA Class II 抗体陽性血漿

重篤な NHTRs (症状 : 呼吸困難, 悪寒, 発熱, 低酸素血症) 症例の原因製剤中に抗 HLA Class II 抗体を検出した²⁶⁾。本症例の血液ドナーの抗 HLA Class II 抗体陽性血漿 (抗 HLA-DR 血漿) を、同意を得て使用した。抗 HLA-DR 血漿は HLA-DR13 をはじめ複数の HLA-DR 抗原に対して反応したが²⁶⁾、HLA-DR1 と HLA-DR15 には反応しなかった²⁶⁾。NHTRs を発症した患者の HLA-DR のタイプは HLA-DR4, 13 であった²⁶⁾。

2. 活性化 PBMNCs の反応上清の調整

同意を得て、健康人全血 (ヘパリン加) から、PBMNCs を採取した。抗 HLA-DR 血漿は、HLA-DR4, 13, HLA-DR13, 14, HLA-DR13, 15 (各 subject 1, 2, 3) を有する 3 人の被験者由来 PBMNCs と反応し、HLA-DR1, 15 (subject 4, 5) を有する 2 人の被験者由来 PBMNCs とは反応しないことを Monoclonal antibody-specific immobilization of lymphocyte antigens procedure assay (MAILA 法) で確認した²⁶⁾。前者 3 人の PBMNCs を陽性 PBMNCs とし、後者 2 人の PBMNCs を陰性 PBMNCs とした。陽性 PBMNCs は、抗 HLA-DR 血漿で刺激することによりサイトカインを産生・放出するが、陰性 PBMNCs ではこの反応は起こらなかった²⁶⁾。活性化 PBMNCs の上清は、PBMNCs (4×10^5 個) と抗 HLA-DR 血漿 (終濃度 20%) をインキュベーション (37 $^{\circ}$ C, 5% CO₂) し、30 分、1, 2, 3, 6, 20 時間後に遠心して採取した。上清は、血管内皮細胞の透過性亢進アッセイに使用するまで、-40 $^{\circ}$ C にて保存した。反応の陰性対照として、ヒト AB 型血漿を、陽性対照として、lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/ml) を用いた。

3. 血管内皮細胞の透過性アッセイ

血管内皮細胞は、正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (Human umbilical vein endothelial cells : HUVEC)、及び正常ヒト肺微小血管内皮細胞 (Human lung microvascular endothelial cells : HMVEC) (共に Cambrex Bio Science 社) を使用した。

血管内皮細胞の透過性アッセイは、Nooteboom ら²³⁾²⁴⁾

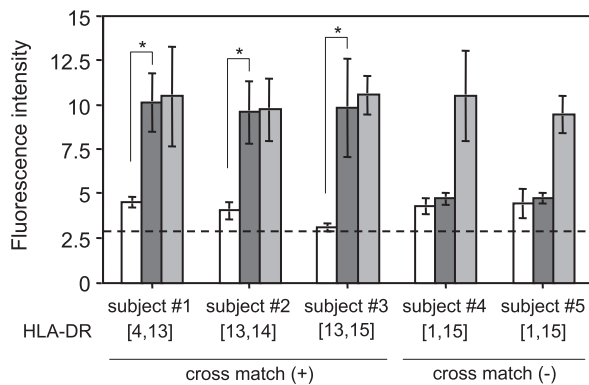


Fig. 1 Effect of activated PBMNC supernatant on the permeability of HUVEC monolayers. Cross-match-positive (n=3) or -negative (n=2) PBMNCs were incubated with AB plasma (□) or anti-HLA-DR plasma (■) for 20 hours. HUVECs in each transwell were exposed to PBMNC supernatant for 6 hours to measure the induction of endothelial permeability. The dotted line shows fluorescence intensity, which represents the spontaneous permeability of HUVEC monolayers incubated with culture medium (2.84 ± 0.85 , mean \pm standard deviation [SD], seven separate experiments). The results of activated PBMNC supernatants are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three separate experiments for each subject. (■) Supernatant from LPS (1mg/ml), *p < 0.05.

の方法を一部改変して行った。血管内皮細胞(5継代目)をトランズウェル(6.5mm diameter, 0.4 μ m pore size, polyester membrane, obtained from Corning社)に播種した(2.5×10^4 /上室)。HUVECは3~5日間、HMVECは5~6日間培養してコンフルエントとした。

血管内皮細胞とPBMNCsの反応上清とをインキュベーションする際、血漿の凝固を阻害するため、終濃度0.25U/mlのヘパリンを内皮細胞の培養液に添加した。PBMNCsの反応上清を終濃度20%となるよう内皮細胞の培養液で希釈し、トランズウェルの上室に添加して、6時間のインキュベーションを行った(37°C, 5% CO₂)。反応系における、サイトカイン中和抗体の影響を見る場合には、PBMNCsの反応上清に各種サイトカイン中和抗体(100 μ g/ml)を添加して1時間のプレインキュベーションを行った後、同反応上清を内皮細胞に添加した。また、反応系における、nuclear factor κ B (NF- κ B)阻害剤である pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC) (200 μ M)、またはアポトーシス阻害剤である N-acetylcysteine (NAC) (100 μ M) (Sigma Chemical社)、あるいは benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp-fluoromethylketone (Z-VAD-fmk) (100 μ M) (Calbiochem社)の影響を見る場合には、血管内皮細胞をこれらの薬剤にて1時間処理した後、PBMNCsの反応上清を添加した。

上記のインキュベーションの後、上室の培養液を、

FITC-標識デキストラン(0.5mg/ml) (Sigma Chemical社)を含む培養液に、下室の培養液は新鮮なものにそれぞれ交換し、1時間45分のインキュベーションを行った(37°C, 5% CO₂)。下室の溶液の蛍光強度を蛍光プレートリーダー(GMI社)にて測定した。

4. 統計学的解析

活性化PBMNCs上清による血管内皮細胞の透過性亢進と陰性対照との有意差検定は、paired Student's t-testにて行った。サイトカイン中和抗体や、NF- κ B阻害剤、またはアポトーシス阻害剤の影響にはFisher's protected least significant difference testにて有意差検定を行った。有意差水準はp < 0.05を用いた。

結 果

1. 抗 HLA-DR 血漿で刺激した PBMNCs の反応上清による HUVEC の透過性亢進作用

我々はこれまでに、陽性PBMNCsと抗HLA-DR血漿を20時間インキュベーションすることにより、炎症性サイトカインのTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、及びIL-8が産生されることを報告している²⁶⁾。そこで、はじめに、陽性PBMNCsと抗HLA-DR血漿を20時間インキュベーションして得た反応上清がHUVECの透過性を亢進させるかどうかについて検討した。Fig. 1に示すように、陽性PBMNCsと抗HLA-DR血漿との反応上清は、陰性対照のAB型血漿の場合と比較して、有意な透過性亢進作用を示した。一方、陰性PBMNCsの反応上清では、HUVECの透過性亢進作用はみられなかった(Fig. 1)。本実験で使用した陽性PBMNCs及び陰性PBMNCsを陽性対照のLPSで刺激して得た反応上清は、いずれも同じ程度に、HUVECの透過性亢進作用を示した(Fig. 1)。

2. 活性化 PBMNCs の上清による HUVEC の透過性亢進作用：抗 HLA-DR 血漿と PBMNCs とのインキュベーション時間の影響

血管透過性亢進作用を有するPBMNCsの反応上清を得るために必要な、抗HLA-DR血漿とPBMNCsとのインキュベーション時間を調べた。陽性PBMNCsを抗HLA-DR血漿と30分、1、2、3、6、20時間インキュベートし、それぞれのタイムポイントで採取した上清をHUVECに作用させた。Fig. 2に示す通り、抗HLA-DR血漿とPBMNCsとを、最低3時間インキュベーションすることにより、血管透過性亢進作用を有する反応上清が得られた。

3. 活性化 PBMNCs の上清による HUVEC の透過性亢進に対する、サイトカイン中和抗体の影響

炎症性サイトカインのTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、及びIL-8は、透過性亢進を誘導する因子であることが報告されている^{23)~25)27)~29)}。そこで、これらのサイトカインの中和

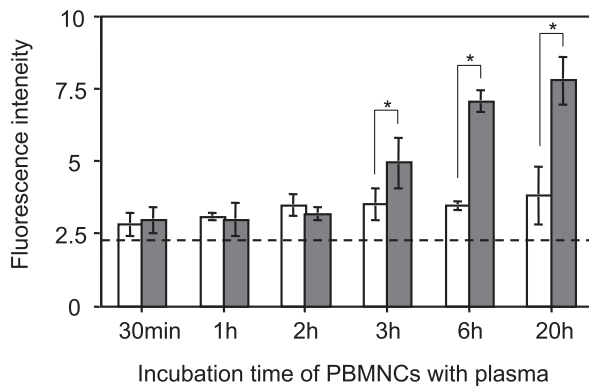


Fig. 2 Induction of HUVEC permeability by activated PBMC supernatants: effect of different incubation times of PBMCs with anti-HLA-DR plasma. Cross-match-positive PBMCs ($n=3$) were incubated with AB plasma (\square) or anti-HLA-DR plasma (\blacksquare) for increasing time periods. The resulting supernatants were added to HUVECs in a transwell and incubated for 6 hours to measure the induction of endothelial permeability. The dotted line shows fluorescence intensity, which represents the spontaneous permeability of HUVEC monolayers incubated with culture medium (2.22 ± 0.06 , mean \pm SD, three separate experiments). The data are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects. * $p < 0.05$.

抗体が、活性化PBMCsの上清によるHUVECの透過性亢進を抑制するかどうかを検討した。陽性PBMCsと抗HLA-DR血漿とを3または20時間インキュベーションして得られた反応上清にTNF- α 、IL-1 β 、IL-6、またはIL-8の中和抗体を添加してプレインキュベーションし、この混合液をHUVECに作用させた。TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、またはIL-8の中和抗体はそれぞれ単独では、HUVECの透過性亢進を有意に抑制しなかったものの、TNF- α またはIL-1 β の中和抗体は、それぞれ単独で、わずかに抑制する傾向がみられた (Fig. 3)。TNF- α とIL-1 β の中和抗体の両方を同時に活性化PBMCsの上清に添加した場合には、HUVECの透過性亢進がほぼ完全に抑制された (Fig. 3)。

4. 活性化PBMCsの上清によるHUVECの透過性亢進に対する、細胞内シグナル伝達阻害剤またはアポトーシス阻害剤の影響

TNF- α とIL-1 β によって誘導される転写因子、NF- κ Bの阻害剤と、アポトーシスの阻害剤が、活性化PBMCsの上清によるHUVECの透過性亢進に与える影響をみた。HUVECをNF- κ B阻害剤PDTC、またはアポトーシス阻害剤であるNACとZ-VAD-fmkにてプレインキュベーションした後、陽性PBMCsを抗HLA-DR血漿で20時間刺激して得た反応上清を添加した。PDTCにより、HUVECの透過性亢進は有意に抑制された (Fig. 4)。一方、NAC及びZ-VAD-fmkはHUVEC

の透過性亢進に影響を与えなかった (Fig. 4)。

5. 抗HLA-DR血漿で刺激したPBMCsの反応上清によるHMVECの透過性亢進作用

HUVECでみられた、活性化PBMCsの反応上清による透過性亢進が、他の種類の血管内皮細胞でもみられるかについて、HMVECを使用して検討した。HMVECにおける血管透過性の亢進は、急性肺障害の病態を反映すると考えられている¹⁾。Fig. 5Aで示すように、陽性PBMCsと抗HLA-DR血漿とを20時間インキュベーションして得た反応上清により、陰性対照のAB型血漿の場合と比較して、HMVECの透過性が有意に亢進した。PBMCsと抗HLA-DR血漿とを3または6時間インキュベーションして得た反応上清では、統計学的な有意差はないものの、HMVECの透過性が亢進される傾向がみられた (Fig. 5A)。一方、陰性PBMCsの反応上清では、HMVECの透過性亢進作用はみられなかった (Fig. 5B)。本実験で使用した陽性PBMCs及び陰性PBMCsを陽性対照のLPSで刺激して得た反応上清は、いずれも同じ程度に、HMVECの透過性亢進作用を示した (Fig. 5A)。

さらに、サイトカインの中和抗体が、活性化PBMCsの上清によるHMVECの透過性亢進に与える影響を検討した。上述のHUVECの結果と同様に、TNF- α とIL-1 β の中和抗体の両方を同時に活性化PBMCsの上清に添加することにより、HMVECの透過性亢進は有意に抑制された (Fig. 5C)。一方、TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、またはIL-8の中和抗体それぞれ単独では、有意な抑制効果はみられなかった (Fig. 5C)。

考 察

血管透過性の亢進は輸血副作用の発疹、蕁麻疹、血管浮腫またはTRALIにおける肺水腫の病態形成に関与している。抗HLA Class II抗体陽性血液製剤が輸血されると、抗体が単球を活性化し、結果として産生・放出された炎症性メディエーターが、輸血副作用の病態形成に重要な役割を果たしていると考えられている。この仮説を検証するために、抗体により活性化された単球が放出したメディエーターが血管内皮細胞の透過性亢進を誘導するかどうかを、我々のin vitroモデル、すなわち、単層培養した血管内皮細胞と、NHTRs症例由来の抗HLA-DR血漿で刺激したPBMCsの反応上清とをインキュベートする方法を用いて検討した。本検討において、我々は、抗HLA-DR血漿により、抗体の特異性に依存して活性化されたPBMCsの反応上清がHUVEC及びHMVECの透過性を亢進させることを示すことができた。さらに、この反応は、活性化PBMCsの上清にTNF- α とIL-1 β の中和抗体の両方を添加することにより、有意に抑制されたことから、PBMCs

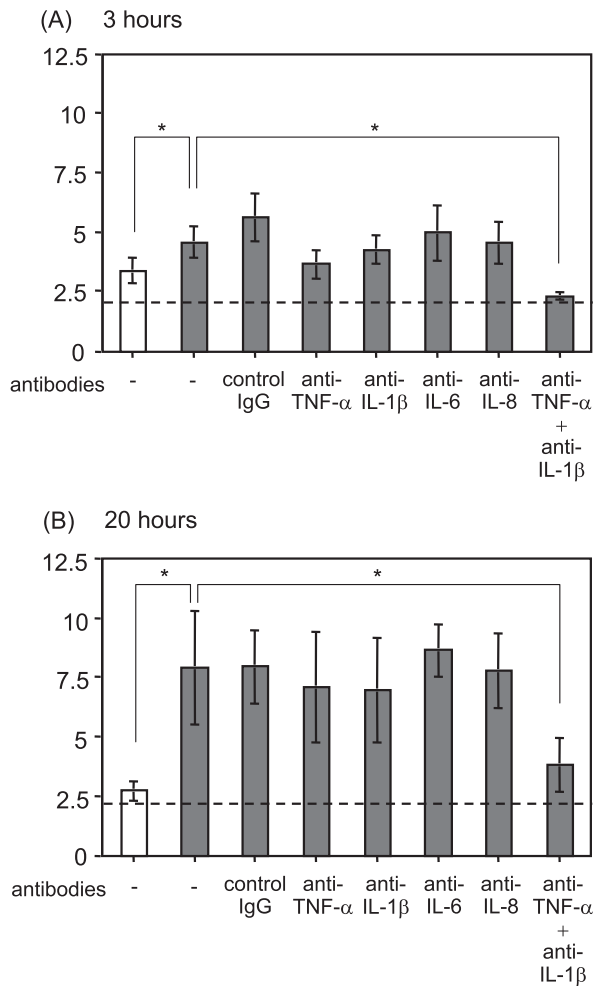


Fig. 3 Effects of cytokine neutralizing antibodies on increased HUVEC permeability induced by activated PBMC supernatants. The supernatants of cross-match-positive PBMCs (n=3) stimulated with anti-HLA-DR plasma for 3 hours (A) or 20 hours (B) were treated with cytokine neutralizing antibodies or control antibody for 1 hour before addition to HUVECs. The dotted line shows fluorescence intensity, which represents the spontaneous permeability of HUVEC monolayers incubated with culture medium (2.02 ± 0.43 [A] and 2.16 ± 0.30 [B], mean ± SD, three separate experiments). The data are expressed as mean ± SD of duplicate determinations of three subjects. (□) Supernatant from AB plasma; (■) supernatant from anti-HLA-DR plasma. * p < 0.05.

由来のメディエーターの中でも、TNF-α と IL-1β が主体となって誘導していると考えられた。

これまでの我々の検討から、本検討で使用した抗 HLA-DR 血漿は DR13, DR8, DR9, DR12 を含む広範囲な特異性を示すもので、DR8, DR9, または DR12 を有するいずれの個体由来の PBMCs においても、サイトカインの産生・放出を誘導すること²⁶⁾、これらの抗 HLA-DR 血漿と対応抗原陽性の PBMCs との反応上清は、HUVEC の透過性亢進を誘導することを見出している

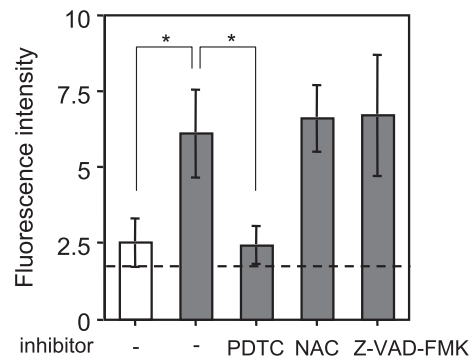


Fig. 4 Effects of pyrrolidine dithiocarbamate (PDTC), NAC, and Z-VAD-fmk on increased HUVEC permeability induced by activated PBMC supernatants. HUVECs were treated with 200 mmol per L PDTC, 100 mmol per L NAC, or 100 mmol per L Z-VAD-fmk for 1 hour before incubation with the supernatant of the cross-match-positive PBMCs (n=3) stimulated with anti-HLA-DR plasma for 20 hours. The dotted line shows fluorescence intensity that represents the spontaneous permeability of HUVEC monolayers incubated with culture medium (1.67 ± 0.15, mean ± SD, three separate experiments). The data are expressed as mean ± SD of duplicate determinations of three subjects. (□) Supernatant from AB plasma; (■) supernatant from anti-HLA-DR plasma. * p < 0.05.

(結果示さず)。従って、本検討でみられた現象は、DR 13 を介した PBMCs の活性化に限定した反応ではないといえる。しかし、使用した抗 HLA-DR 血漿は 1 例のみであるため、今後、NHTRs に関与した他の抗体についても同様の作用がみられるか、検討を行う必要がある。少なくとも、Kopko ら¹⁵⁾が、TRALI 症例由来の抗 HLA Class II 抗体陽性血清により、抗体の特異性に依存して単球が活性化され、TNF-α と IL-1β の細胞内濃度が高まることを報告していることから、本検討で使用した抗体以外の抗 HLA Class II 抗体によっても血管内皮細胞の透過性亢進が誘導されると推測される。

血管内皮細胞の透過性亢進が誘導されるメカニズムとして、本検討では、(1) TNF-α 及び IL-1β によるシグナル伝達を担う転写因子、NF-κB を介した反応²⁴⁾、(2) サイトカインによる血管内皮細胞のアポトーシスの関与³¹⁾に着目した。Fig. 4 で示すとおり、血管内皮細胞の透過性亢進は NF-κB の阻害剤により、ほぼ完全に抑制されたのに対し、アポトーシスの阻害剤による影響は見られなかった。従って、活性化 PBMCs の上清による血管内皮細胞の透過性亢進に、TNF-α 及び IL-1β による NF-κB の活性化が重要な役割を果たしていると考えられた。TNF-α はアポトーシス誘導因子として知られているが、この作用は、腫瘍細胞、ウイルス感染細胞に対するもので、正常細胞では、TNF-α による

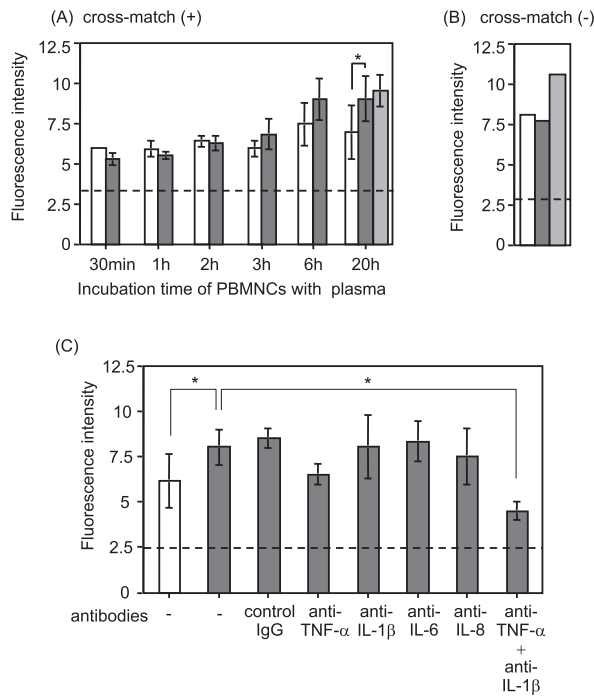


Fig. 5 Effect of activated PBMNC supernatant on the permeability of HMVEC monolayers. Cross-match-positive (A; $n=3$) PBMNCs were incubated with AB plasma or anti-HLA-DR plasma for the indicated time periods. Cross-match-negative PBMNCs (B; $n=2$) were incubated with AB plasma or anti-HLA-DR plasma for 20 hours. HMVECs in each transwell were exposed to the PBMNC supernatant for 6 hours to measure the induction of endothelial permeability. The supernatant of the crossmatch-positive PBMNCs ($n=3$) stimulated with anti-HLA-DR plasma for 20 hours was treated with cytokine neutralizing antibodies or control antibody for 1 hour before the addition to HMVECs (C). The dotted line shows fluorescence intensity that represents the spontaneous permeability of HMVEC monolayers incubated with culture medium (3.32 ± 0.73 [A] and 2.39 ± 0.22 [C], mean \pm SD, three separate experiments; 2.95 [B], mean of two experiments). The data from cross-match-positive subjects represent the mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects (A, C). The data from cross-match-negative subjects represent the mean of duplicate determinations of two subjects (B). (□) Supernatant from AB plasma; (■) supernatant from anti-HLA-DR plasma; (■) supernatant from LPS (1mg/ml).

抗アポトーシス作用により³⁵⁾³⁶⁾、細胞死耐性を示す^{32)~34)}ことが報告されている。IL-1 β もHUVECに対して、抗アポトーシス作用を示すことが報告されている³⁵⁾。従って、これらの報告は、血管内皮細胞の透過性亢進へのアポトーシスの関与が見られなかった、我々の結果を支持しているといえる。

本検討において、HUVECとHMVECの透過性亢進の反応性に違いがみられた。HMVECに対し、透過性亢進作用を有するPBMNCsの反応上清を得るには、抗

HLA-DR血漿とPBMNCsとを20時間インキュベーションする必要があったが、HUVECでは3時間であった(Fig. 5A)。また、HMVECでは、陰性対照による透過性がHUVECの場合よりも高く、結果として、活性化PBMNCsの上清による透過性亢進の増加がHUVECより小さかった(Fig. 5A)。血管内皮細胞は、由来する臓器、組織、及び血管のサイズや種類によって性質に違いがあることが知られていることから^{1)37)~42)}、組織特異的な遺伝子発現の差異⁴²⁾や、サイトカインに対する反応性の違いが両者の反応性の違いに寄与しているものと推測される。

本検討において、抗HLA-DR血漿により活性化されたPBMNCsの上清の生理活性を評価するin vitroモデルを確立することができた。このモデルは、輸血による発疹、蕁麻疹、血管浮腫、及びTRALIにおける肺水腫等の病因を明らかにする一助となる。しかし、in vitroモデルには、in vivoの環境を十分に再現できないという限界もある。我々の結果とin vivo、即ち、輸血副作用発症時の状況とで乖離している点は、輸血開始から副作用が発症するまでの時間よりも、in vitroで抗HLA-DR血漿によるPBMNCsの活性化及び血管透過性亢進反応が誘導されるまでの時間が長いことである。この時間の乖離が生じる理由として、in vivoでは、TNF- α やIL-1 β に加えて、ロイコトリエン、プロスタグランジンまたは、活性酸素などの半減期の短いPBMNCs由来の炎症性メディエーターが、血管内皮細胞に作用している可能性が考えられる。このことを考慮し、より、生理的な条件を模擬するためには、血管内皮細胞とPBMNCsを共培養する実験系が必要である。また、本検討で使用したPBMNCsと血管内皮細胞は、健康人由来であるため、患者の原疾患または遺伝的背景を反映していないことも理由の一つと考えられる。Sillimanら¹⁴⁾は、TRALI発症機序として、two-event pathogenesis for TRALIを提唱し、患者側の因子がTRALI発症に重要であることを強調している。この説におけるfirst eventは、患者の血管内皮細胞や好中球が原疾患などに起因して活性化状態にあること、second eventは、輸血により抗HNA抗体やBRMsに患者細胞が暴露されることであり、second eventによってfirst eventが増幅された結果、血管内皮細胞の障害及び浮腫が誘導され、TRALIが発症するという説である。彼らは、ヒト好中球と、LPSで刺激したヒト肺微小血管内皮細胞との共培養に、抗HNA-3a抗体を添加すると、内皮細胞の障害が誘導されることを報告している²⁰⁾。この系にてLPSが無い場合には、抗HNA-3a抗体は、生理活性を發揮しない。一方、Sachsら¹⁷⁾はTRALIのex vivoラット肺モデルにおいて、抗HNA-2a抗体とHNA-2a陽性ヒト好中球をラット肺に灌流させると、浮腫が誘導さ

れたことを報告している。この反応は好中球の HNA-2a の発現量に依存し、高発現の場合には抗体単独の作用で、低発現の場合には抗体と formyl-Met-Leu-Phe (fMLP) との相乗作用により誘導される。また、HNA-2a 高発現の好中球と fMLP との組み合わせでは、fMLP 非存在下よりも、浮腫の出現が速くなる。我々の結果では、抗 HLA Class II 抗体単独の作用により、PBMNCs の活性化、これに引き続き血管内皮細胞の透過性亢進が誘導されたため、Sachs ら¹⁷⁾の報告と一致するものであり、Silliman ら¹⁴⁾²⁰⁾の報告とは異なるものと考えられる。さらに、Sachs ら¹⁷⁾の報告から、我々の系においても、PBMNCs や血管内皮細胞をプライミングすることにより、血管内皮細胞の透過性亢進反応が速くなり、in vitro と in vivo における時間の乖離を解決できる可能性が考えられる。

おわりに

本検討結果から、抗 HLA Class II 抗体による標的細胞の活性化が輸血副作用の発疹、蕁麻疹、血管浮腫または、TRALI における肺水腫の病態形成に関与することが示唆された。我々の in vitro モデルは、抗 HLA Class II 抗体だけでなく、抗 HLA Class I 抗体及び、抗 HNA 抗体による白血球の活性化が血管内皮細胞の透過性亢進を誘導するかどうかを検証するためにも有用な方法と考えられる。

文 献

- 1) Mehta D, Malik AB: Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol. Rev.*, 86: 279—367, 2006.
- 2) Geiger TL, Howard SC: Acetaminophen and diphenhydramine premedication for allergic and febrile non-hemolytic transfusion reactions: good prophylaxis or bad practice? *Transfus. Med. Rev.*, 21: 1—12, 2007.
- 3) Popovsky MA, Moore SB: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 25: 573—577, 1985.
- 4) Holness L, Knippen MA, Simmons L, et al: Fatalities caused by TRALI. *Transfus. Med. Rev.*, 18: 184—188, 2004.
- 5) Bux J, Sachs UJ: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br. J. Haematol.*, 136: 788—799, 2007.
- 6) Van Buren NL, Stroncek DF, Clay ME, et al: Transfusion-related acute lung injury caused by an NB 2 granulocyte-specific antibody in a patient with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Transfusion*, 30: 42—45, 1990.
- 7) Davoren A, Smith OP, Barnes CA, et al: Case report: four donors with granulocyte-specific or HLA class I antibodies implicated in a case of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Immunohematol.*, 17: 117—121, 2001.
- 8) Kopko PM, Marshall CS, MacKenzie MR, et al: Transfusion-related acute lung injury: report of a clinical look-back investigation. *JAMA*, 287: 1968—1971, 2002.
- 9) Kopko PM, Popovsky MA, MacKenzie MR, et al: HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 41: 1244—1248, 2001.
- 10) Flesch BK, Neppert J: Transfusion-related acute lung injury caused by human leucocyte antigen class II antibody. *Br. J. Haematol.*, 116: 673—676, 2002.
- 11) Kao GS, Wood IG, Dorfman DM, et al: Investigations into the role of anti-HLA class II antibodies in TRALI. *Transfusion*, 43: 185—191, 2003.
- 12) Wallis JP, Lubenko A, Wells AW, et al: Single hospital experience of TRALI. *Transfusion*, 43: 1053—1059, 2003.
- 13) Nicolle AL, Chapman CE, Carter V, et al: Transfusion-related acute lung injury caused by two donors with anti-human leucocyte antigen class II antibodies: a look-back investigation. *Transfus. Med.*, 14: 225—230, 2004.
- 14) Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK: Transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 105: 2266—2273, 2005.
- 15) Kopko PM, Paglieroni TG, Popovsky MA, et al: TRALI: correlation of antigen-antibody and monocyte activation in donor-recipient pairs. *Transfusion*, 43: 177—184, 2003.
- 16) Seeger W, Schneider U, Kreisler B, et al: Reproduction of transfusion-related acute lung injury in an ex vivo lung model. *Blood*, 76: 1438—1444, 1990.
- 17) Sachs UJ, Hattar K, Weissmann N, et al: Antibody-induced neutrophil activation as a trigger for transfusion-related acute lung injury in an ex vivo rat lung model. *Blood*, 107: 1217—1219, 2006.
- 18) Wyman TH, Bjornsen AJ, Elzi DJ, et al: A two-insult in vitro model of PMN-mediated pulmonary endothelial damage: requirements for adherence and chemokine release. *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, 283: C1592—1603, 2002.
- 19) Khan SY, Kelher MR, Heal JM, et al: Soluble CD40 ligand accumulates in stored blood components, primes neutrophils through CD40, and is a potential cofactor in the development of transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 108: 2455—2462, 2006.

- 20) Silliman CC, Curtis BR, Kopko PM, et al: Donor antibodies to HNA-3a implicated in TRALI reactions prime neutrophils and cause PMN-mediated damage to human pulmonary microvascular endothelial cells in a two-event in vitro model. *Blood*, 109: 1752—1755, 2007.
- 21) Nishimura M, Hashimoto S, Takanashi M, et al: Role of anti-human leucocyte antigen class II alloantibody and monocytes in development of transfusion-related acute lung injury. *Transfus. Med.*, 17: 129—134, 2007.
- 22) Nishimura M, Hashimoto S, Satake M, et al: Interference with TRALI-causing anti-HLA DR alloantibody induction of human pulmonary microvascular endothelial cell injury by purified soluble HLA DR. *Vox Sang.*, 93: 78—82, 2007.
- 23) Nootboom A, Van Der Linden CJ, Hendriks T: Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate endothelial permeability induced by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Crit. Care. Med.*, 30: 2063—2068, 2002.
- 24) Nootboom A, Bleichrodt RP, Hendriks T: Modulation of endothelial monolayer permeability induced by plasma obtained from lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Clin. Exp. Immunol.*, 144: 362—369, 2006.
- 25) Burke-Gaffney A, Keenan AK: Modulation of human endothelial cell permeability by combinations of the cytokines interleukin-1 α/β , tumor necrosis factor-alpha and interferon- γ . *Immunopharmacology*, 25: 1—9, 1993.
- 26) Sakagawa H, Miyazaki T, Fujihara M, et al: Generation of inflammatory cytokines and chemokines from peripheral blood mononuclear cells by HLA Class II antibody-containing plasma unit that was associated with severe nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 47: 154—161, 2007.
- 27) Maruo N, Morita I, Shirao M, et al: IL-6 increases endothelial permeability in vitro. *Endocrinology*, 131: 710—714, 1992.
- 28) Fukumoto T, Matsukawa A, Yoshimura T, et al: IL-8 is an essential mediator of the increased delayed-phase vascular permeability in LPS-induced rabbit pleurisy. *J. Leukoc. Biol.*, 63: 584—590, 1998.
- 29) Sedgwick JB, Menon I, Gern JE, et al: Effects of inflammatory cytokines on the permeability of human lung microvascular endothelial cell monolayers and differential eosinophil transmigration. *J. Allergy. Clin. Immunol.*, 110: 752—756, 2002.
- 30) Ferrari G, Yan CY, Greene LA: N-acetylcysteine (D- and L-stereoisomers) prevents apoptotic death of neuronal cells. *J. Neurosci.*, 15: 2857—2866, 1995.
- 31) Stefanec T: Endothelial apoptosis: could it have a role in the pathogenesis and treatment of disease? *Chest*, 117: 841—854, 2000.
- 32) Wallach D: Cell death induction by TNF: a matter of self control. *Trends. Biochem. Sci.*, 22: 107—109, 1997.
- 33) Pohlman TH, Harlan JM: Human endothelial cell response to lipopolysaccharide, interleukin-1, and tumor necrosis factor is regulated by protein synthesis. *Cell. Immunol.*, 119: 41—52, 1989.
- 34) Madge LA, Li JH, Choi J, et al: Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase sensitizes vascular endothelial cells to cytokine-initiated cathepsin-dependent apoptosis. *J Biol Chem*, 278: 21295—21306, 2003.
- 35) Madge LA, Pober JS: A phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway, activated by tumor necrosis factor or interleukin-1, inhibits apoptosis but does not activate NF- κ B in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 275: 15458—15465, 2000.
- 36) Xia P, Wang L, Gamble JR, et al: Activation of sphingosine kinase by tumor necrosis factor-alpha inhibits apoptosis in human endothelial cells. *J. Biol. Chem.*, 274: 34499—34505, 1999.
- 37) Beck GC, Yard BA, Breedijk AJ, et al: Release of CXC-chemokines by human lung microvascular endothelial cells (LMVEC) compared with macrovascular umbilical vein endothelial cells. *Clin. Exp. Immunol.*, 118: 298—303, 1999.
- 38) Burg J, Krump-Konvalinkova V, Bittinger F, et al: GM-CSF expression by human lung microvascular endothelial cells: in vitro and in vivo findings. *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.*, 283: L460—467, 2002.
- 39) Hillyer P, Mordelet E, Flynn G, et al: Chemokines, chemokine receptors and adhesion molecules on different human endothelia: discriminating the tissue-specific functions that affect leucocyte migration. *Clin. Exp. Immunol.*, 134: 431—441, 2003.
- 40) Otto M, Bittinger F, Kriegsmann J, et al: Differential adhesion of polymorphous neutrophilic granulocytes to macro- and microvascular endothelial cells under flow conditions. *Pathobiology*, 69: 159—171, 2001.
- 41) Shelton JL, Wang L, Cepinskas G, et al: Albumin leak across human pulmonary microvascular vs. umbilical vein endothelial cells under septic conditions. *Microvasc. Res.*, 71: 40—47, 2006.
- 42) Furuhata S, Ando K, Oki M, et al: Gene expression profiles of endothelial progenitor cells by oligonucleotide microarray analysis. *Mol. Cell. Biochem.*, 298: 125—138, 2007.

ENDOTHELIAL PERMEABILITY IS INCREASED BY THE SUPERNATANT OF PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS STIMULATED WITH HLA CLASS II ANTIBODY

*Shinobu Wakamoto*¹⁾, *Mitsuhiro Fujihara*¹⁾, *Hisako Sakagawa*¹⁾, *Daisuke Takahashi*¹⁾, *Koichi Niwa*²⁾, *Masanobu Morioka*³⁾, *Shinichiro Sato*¹⁾, *Toshiaki Kato*¹⁾, *Hiroshi Azuma*¹⁾ and *Hisami Ikeda*¹⁾

¹⁾Hokkaido Red Cross Blood Center

²⁾Department of Food Science and Technology, Faculty of Bioindustry, Tokyo University of Agriculture

³⁾Aiiku Hospital

Keywords:

anti-HLA Class II antibody, nonhemolytic transfusion reactions, activation of PBMNCs, increase in EC permeability

©2010 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

Journal Web Site: <http://www.jstmct.or.jp/jstmct/>