

## 非溶血性輸血副作用に対する検査方法の最近の進歩

平山 文也

非溶血性輸血副作用は輸血副作用の中で最も多く、輸血関連急性肺障害 (TRALI)、アレルギー性反応や発熱などが含まれる。血液製剤中に存在するヒト白血球抗原 (HLA) やヒト好中球抗原 (HNA) に対する白血球抗体は、非溶血性輸血副作用、その中でも特に TRALI の発症にしばしば関与する。最近、我々は、HNA-1~HNA-5 に対する抗体およびそれ以外の好中球抗原に対する抗体を効率的に検出するために、granulocyte immunofluorescence test (GIFT) 法の変法である、5 cell-lineage immunofluorescence test (5 cell-lineage IFT) 法および HNA を恒常的に発現する一連の細胞株を樹立した。これらの系を用いて、非溶血性輸血副作用事例で検出される非 HLA 白血球抗体の殆どは HNA-1~HNA-5 以外の抗原に対するものであることを明らかにした。また、白血球抗体や免疫複合体などの免疫学的な刺激により惹起される好中球の活性化を捉えることのできる、好中球活性化試験 (neutrophil activation test : NeuAT) を新たに樹立し、Heparin-Binding-Protein が、TRALI を含む非溶血性輸血副作用を誘導する最終エフェクター因子である可能性も明らかとした。さらに、アレルギー性疾患の領域でアレルゲンを特定するために開発された好塩基球活性化試験 (basophil activation test : BAT) が、輸血医学の領域にも応用できることを報告した。この総説では、これらの新しい技術と関連する他の検査方法を紹介するものである。

**キーワード：**非溶血性輸血副作用、白血球抗体、好中球、Heparin-Binding-Protein、好塩基球

本論文内容は、Blackwell Publishing 社の許可のもと Transfusion 誌 (第 50 巻 第 1 号 252—263, 2010) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。(Fumiya Hirayama Recent advances in laboratory assays for non-hemolytic transfusion reactions. 50(1) : 252—263, 2010)

### 非溶血性輸血副作用と想定されている発生機序

非溶血性輸血副作用は輸血副作用の中で最も頻度が高く、その内訳として輸血関連急性肺障害 (TRALI)、アレルギー性反応、発熱、血圧低下、敗血症、循環負荷などが挙げられる。TRALI は、その中でも最も重篤な副作用のひとつで、約 0.02% の頻度で生じ、その致死率は 5~10% である<sup>1)~4)</sup>。TRALI 発症に関わる血液製剤には、全血製剤、赤血球製剤、新鮮凍結血漿、クリオプレシピテートや血小板製剤などがある<sup>12)</sup>。赤血球製剤に含まれる僅かな量の血漿でも TRALI が発症することもある<sup>12)4)5)</sup>。多くの TRALI においては、血液製剤に存在する抗体あるいは好中球を活性化させる物質が肺障害を誘導する<sup>4)</sup>。献血者由来の HLA 抗体はこれまでに多くの報告があり、最初に TRALI が報告された 1985 年にまで遡る<sup>6)</sup>。実際に、HLA クラス I 抗体は、TRALI 致死事例で最も高頻度で見出される原因である<sup>7)</sup>。西村らは、免疫複合体も TRALI 発症のメディエーターになることを報告している<sup>8)</sup>。また、保存中に血液製剤

に貯留していく脂質<sup>9)10)</sup>、可溶性 CD40 ligand (sCD40L)<sup>11)</sup> などが好中球を活性化する可能性についての研究も進められている。

活性化好中球は、TRALI 発症に重要と思われるいくつかの生理活性物質を放出する。西村らは、好中球を granulocyte-macrophage colony stimulating factor で刺激すると細胞表面に HLA class II の発現が誘導され、その後、抗 HLA class II 抗体処理すると TNF- $\alpha$ 、interferon- $\gamma$  や IL-18 が好中球から産生されることを明らかにしている<sup>12)</sup>。さらに、同グループは、好中球を免疫複合体で刺激すると、好中球からの TNF- $\alpha$  や Fas ligand の産生が増強されることも示している<sup>8)</sup>。同様に、Kopko らは、TRALI を惹起した献血者血清を全血に作用させると、単球の細胞質内 IL-1 $\beta$  や TNF $\alpha$  の発現が上昇することを見出している<sup>13)</sup>。これらの生理活性物質が単独ないし共同でもたらす有害な効果は TRALI 発症において重要であると想定されているが、その正確な発症機序は未だ明確にはされていない。

アナフィラキシー反応は、IgA 欠損の患者が IgA 抗体を産生し、その後 IgA を正常に持った献血者由来の血液製剤を輸血された事例で報告されている<sup>14)~16)</sup>。同様の事例が C4 欠損者やハプトグロビン欠損者でも報告されている<sup>17)18)</sup>。このような事例では、通常 IgG クラスの抗体が検出されるが、ハプトグロビン欠損者では IgG クラスの抗体に加えて IgE クラスの抗体も検出されることが多い<sup>21)</sup>。この場合には、IgE 依存的なアレルギー反応がアナフィラキシー反応発症の主たる機序であろう。血漿蛋白量が正常な患者にも輸血後に発赤、掻痒感、蕁麻疹などのアレルギー反応の臨床症状が現れることを考えると、その患者は血液成分に含まれる何らかの物質に既に感作されていたのかも知れない。献血者が献血の直前にナッツやトマトなどの何らかの食物あるいはペニシリンなどの何らかの薬剤を摂取していたが為に、輸血と共にこれらの物質が患者に輸注され、もし患者がこれらの物質にアレルギーを持っていれば、輸血後にアレルギー反応を起こすと想定されるが、そのような物質、アレルゲンが通常同定されない。I 型アレルギーが想定される唯一の例は、IgE クラスのハプトグロビン抗体を保有するハプトグロビン欠損者である<sup>21)</sup>。

血小板製剤は非溶血性輸血副作用を惹起する最も典型的な製剤である<sup>22)23)</sup>。洗浄血小板が非溶血性輸血副作用の予防にしばしば効果を発揮することから、血小板製剤中に含まれるあるいは蓄積されて行く生理活性物質が、非溶血性輸血副作用の発症に重要な役割を果たしていると考えられる。混入する白血球から保存中に放出された炎症性サイトカインによって一部の非溶血性輸血副作用が惹起されることが古い研究により示されている<sup>27)~31)</sup>、アレルギー性輸血副作用は白血球除去血小板製剤でも依然として生じている<sup>26)32)</sup>。最近では血小板由来生理活性物質が血小板製剤輸血後の非溶血性輸血副作用の原因物質の候補として注目を集めている。例えば、CD40L は血小板表面上に発現されているが、血小板の活性化により sCD40L として放出され、その結果血小板製剤中にはある程度の sCD40L が貯留されることとなる<sup>11)33)</sup>。この sCD40L が非溶血性輸血副作用、特に発熱反応に関与していることが既に報告されている<sup>33)34)</sup>。しかし、アレルギー性副作用との関係は不明である<sup>34)</sup>。CC ケモカインのひとつである RANTES は血小板  $\alpha$  顆粒に存在し、血小板の活性化により放出されることが知られている<sup>35)36)</sup>、その作用として好塩基球のケモアトラクタントであり<sup>37)38)</sup> ヒスタミンの放出を誘導することから<sup>39)</sup>、RANTES も非溶血性輸血副作用を惹起する血小板由来原因物質の候補因子である。しかし、血小板製剤中の RANTES 濃度は好塩基球の遊走を引き起こすには十分であるものの、ヒスタミン放出を誘導するには不十分である<sup>40)</sup>。このように、血小板製剤

で非溶血性輸血副作用が最も高頻度にかかる正確な機序は概ね不明である。最後に、発熱反応は、患者が保有する HLA class I 抗体が関与することが多い。しかし、患者保有 HLA class I 抗体と他の非溶血性輸血副作用の関わりは明らかではない。

最近、我々は非溶血性輸血副作用、特に TRALI、血圧低下、アレルギー反応を理解するうえで補助的な手段となる新しいアッセイ法を樹立した。そこで、それらアッセイ法とそれに関わる他の検査法を以下に概説する。

## 非 HLA 白血球抗体の検出方法

### 1) 抗体スクリーニングにおける 5 cell-lineage immunofluorescence test (5 cell-lineage IFT)

HLA class I<sup>6)43)44)</sup>、HLA class II<sup>12)46)~48)</sup>、HNA-1a<sup>49)</sup>、-1b<sup>50)</sup>、-2a<sup>51)</sup>、-3a<sup>52)53)</sup> に対する抗体は TRALI 事例でしばしば検出される。更に、単球抗体も TRALI の一部の事例で報告されている<sup>45)</sup>。HLA class I、HLA class II 抗体に関しては、Luminex のような蛍光ビーズを基とした新たな検査法が導入され、その検出は容易となっているものの、非 HLA 抗体の検出に関しては同様の効果的な検出方法はない。非 HLA 白血球抗体のスクリーニングには granulocyte immunofluorescence test (GIFT) 法のようなフローサイトメーターを用いる方法が広く用いられているが<sup>54)</sup>、好中球はフローサイトメーター解析上高いバックグラウンドを示し、抗体の存在を検討することがしばしば困難となる。さらに、単球も高いバックグラウンドを示し、それを低減化させるためには Fc gamma receptor type I (Fc $\gamma$ RI) を低減化させるという複雑な作業工程が必要となる<sup>44)45)</sup>。白血球抗体に加えて血小板抗体も非溶血性輸血副作用に関与している。例えば、human platelet antigen (HPA)-1a 抗体は試験管の中でヒト血小板から RANTES を放出させることができる<sup>56)</sup>。さらに、CD36 (Nak<sup>a</sup>抗体とも呼ばれる) 抗体が輸血と共に輸注されたために血小板減少とともに生命を脅かすような重篤な副作用が現れた症例が報告されている<sup>57)58)</sup>、CD36 抗体が輸注され TRALI を発症した症例もある<sup>39)</sup>。CD36 は GPIV としても知られ<sup>60)</sup>、血小板上の主要な糖タンパクであるが、単球上にも発現されている。CD36 欠損者は輸血や妊娠により感作され CD36 抗体を産生する。このように、血小板抗体の有無の検討をするための検査法を樹立することも重要である。

非 HLA 白血球抗体をスクリーニングするために、我々は最近 5 cell-lineage immunofluorescence test (5 cell-lineage IFT) という、4 つの系統の白血球と血小板を同時に解析対象にできるフローサイトメーターを用いた新たな検査方法を樹立した<sup>61)</sup> (Fig. 1)。バックグラウン

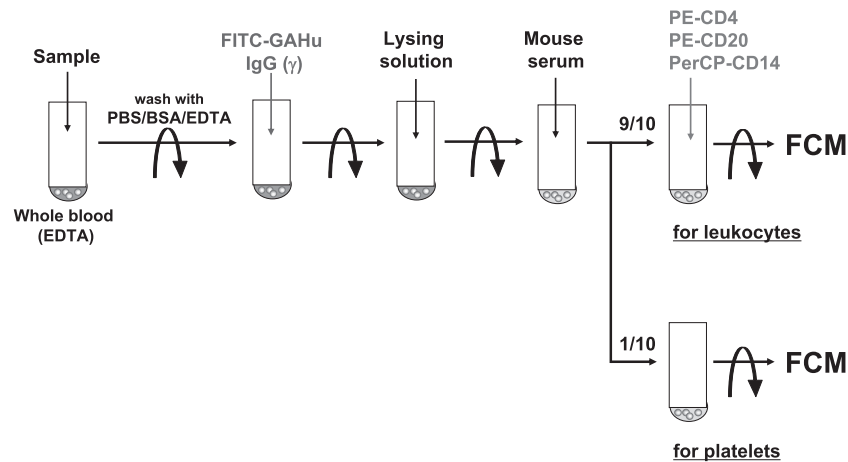


Fig. 1 Schematic presentation of staining procedure in 5 cell-lineage IFT.

PBS: phosphate balanced saline, BSA: bovine serum albumin, EDTA: ethylenediaminetetraacetic acid, FITC-GAHu IgG ( $\gamma$ ): FITC-conjugated goat-anti-human IgG ( $\gamma$ -chain-specific), FCM: flow cytometry

Table 1 Expression of leukocyte antigens on five lineages of blood cells

		Neutrophil	Monocyte	CD20+ B-cell	CD4+ T-cell	Platelet
	allotype					
HNA-1	a, b, c	+				
HNA-2	a	+				
HNA-3*	a	+	+	+	+	+
HNA-4	a, b	+	+			
HNA-5	a, b	+	+	+	+	
HLA Class I	numerous	+	+	+	+	+
HLA Class II	numerous		+	+		
CD36 (Nak)	—		+			+

\*: the expression pattern of HNA-3 is controversial

ドを低下させるために細胞源を全血とした。各血球上の HLA や HNA などの代表的な白血球抗原の発現を 5 cell-lineage IFT 法で検討した代表的な結果を Table 1 に示した。例えば、HNA-1 と HNA-2 は共に好中球のみに発現されており、HNA-4 は好中球と単球、HNA-5 は血小板以外のすべての血球に、CD36 は血小板と単球に発現されている。このような発現特異性は抗体の特異性の同定に役立つ。HNA-3 の発現には議論があることには注意しなければならない。我々の実験では、HNA-3 は全ての系統の血球に発現が認められたが、それに対してこれまでの報告では好中球、リンパ球、血小板に限った発現しか認められていない<sup>62)</sup>。このような相反する知見が得られるのは、HNA-3 の遺伝子が同定されておらず、従ってそのバイオケミカルな性状が概ね不明であることが原因となっている。

我々は 5 cell-lineage IFT 法と標準的な検査方法である GIFT 法との比較は現在まで行えていない。その為に 5 cell-lineage IFT の感度に関するデータはない。そ

れは GIFT 法を試行した際に好中球のバックグラウンドが余りにも高く GIFT 法の評価が出来なかったからである。また、副作用を起こさなかった患者サンプルも検討できていないので、特異性に関するデータも乏しい。今後、副作用を起こさなかった患者サンプルを用いた検討を行い、5 cell-lineage IFT 法の特異性の評価も行って行きたい。

## 2) HNA-1a, -1b, -1c, -2a, -4a, -4b, -5a, -5b 及び CD36 を安定的に発現するパネル細胞株を用いた抗体特異性の同定法

非 HLA 白血球抗体の特異性を明確に同定するために、我々は各 HNA 及び CD36 を発現するパネル細胞株を樹立した。長期間にわたる抗原の発現を担保する為に、我々は各 HNA 及び CD36 の遺伝子導入の際にレトロウイルスベクターを用い、導入した遺伝子を宿主細胞のゲノム DNA に組み込ませた<sup>63)64)</sup>。それに加えて、薬剤耐性遺伝子と抗原遺伝子の間に internal ribosome entry site (IRES) を挟み込み、薬剤耐性遺伝子と抗原遺伝子

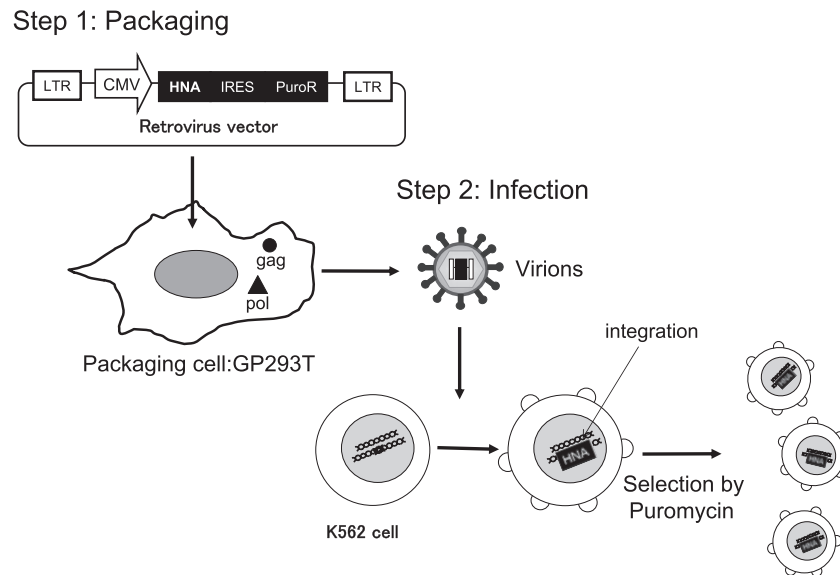


Fig. 2 Schematic presentation of retrovirus vector transfection.

が同時に発現される構造を持つベクターを設計した。ベクターの全体構造を模擬的に Fig. 2 に示した。次に、パネル細胞株のバックグラウンド反応を抑制する為に、ヒト赤白血病細胞株である K562 を親細胞株として選択した。K562 を選択した理由は、同細胞株は HLA, HNA, HPA いずれも発現しておらずかつヒト血清に対するバックグラウンド反応が元々低いからである<sup>(67)</sup>および未発表データ。このようにして我々は HNA-1a, -1b, -1c, -2a, -4a, -4b, -5a, -5b を発現するパネル細胞株 (KY-1a, -1b, -1c, -2a, -4a, -4b, -5a, -5b) を樹立した<sup>(67)(68)</sup>。HNA-3a はその遺伝子が同定されていないので、HNA-3a を発現する細胞株は未樹立である。KY 細胞に加えて、CD36 を発現する細胞株 (HP-Nak) も同様に樹立している<sup>(69)</sup>。HNA-1, -2 と CD36 は単鎖糖タンパクであり、HNA-4, -5 は  $\alpha$  鎖,  $\beta$  鎖の 2 つの糖タンパクサブユニットからなるインテグリンである。従って、単鎖糖タンパクとヘテロダイマー糖タンパクを発現するパネル細胞株の樹立方法が確立されたことになり、それは HPA を発現するパネル細胞を樹立する準備が完了したことを意味する。ただし、このようなパネル細胞株は有用であるものの、フローサイトメーターが必要であり、それは限られた施設でしか使用できないという制限がある。従って、エンドアッセイ法としてビーズ法, ELISA 法, マイクロアレイ法などの他の方法への応用が将来的に必要であろう。

### 3) 非溶血性輸血副作用事例で検出される非 HLA 白血球抗体

我々のセンターでは、白血球抗体をスクリーニングする為に、まず HLA 抗体をマイクロビーズ法 (LABScreen, One Lambda, Inc. Canoga Park, CA, USA)

で調べる。HLA 抗体が検出される場合には、その特異性を決定する。次に、非 HLA 白血球抗体に関して 5 cell-lineage IFT でスクリーニングを行い、特異性を KY 細胞で決定する。KY 細胞で検出できない唯一の HNA 抗体として HNA-3a 抗体があげられるが、HNA-3a 抗体は 5 cell-lineage IFT を用いて検出することができる。なぜなら、前述のように HNA-3a 抗体は好中球以外に少なくともリンパ球と反応しおそらくすべての血球細胞と反応するという特徴を有し、さらに HNA-3a 陰性者の頻度が 10 人ないし 20 人に一人おり、当センターにもいるからである。このプロトコルを用いて我々は最近、2003 年から 2007 年にかけて当センターに報告された重篤な非溶血性輸血副作用症例 85 例の患者検体と当該血液製剤を再検討した<sup>(70)</sup>。TRALI が 9 例、possible TRALI が 6 例、他の重篤な非溶血性輸血副作用が 70 例(その内訳は、呼吸困難単独 37 例、呼吸困難と血圧低下の合併 18 例、血圧低下 9 例、アナフィラキシー反応 6 例)である。検討の結果、患者血清の 26% と血液製剤の 6% に HLA class I または class II 抗体が検出された。驚くべきことにそれ以上の高頻度で非 HLA 白血球抗体が検出された。即ち、患者血清の 36% と血液製剤の 18% にである。多くの非 HLA 白血球抗体は好中球にのみあるいは好中球と他の血球に反応した。更に 5 cell-lineage IFT と KY 細胞を用いて非 HLA 白血球抗体の特異性を調べたところ、1 例を除き HNA-1a, -1b, -1c, -2a, -3a, -4a, -4b, -5a, -5b 抗体は検出されなかった。このことは、既知の好中球抗原以外にも新たな好中球抗原が存在し、それらは免疫反応ひいては非溶血性輸血副作用を惹起する可能性があることを示唆している。従って、そのような新たな好中球抗

原の同定が今後重要な課題となる。

## 好中球活性化試験

### 1) 好中球活性化試験 (Neutrophil Activation Test : NeuAT)

TRALI の発生機序について多くのことが不明であるが、多くの研究が好中球の活性化が重要であることを示している<sup>1)~4)8)~10)</sup>。好中球の関与を検討するために我々は最近、試験管内で全血を用いて検討できる好中球活性化試験 (Neutrophil Activation Test : NeuAT) を樹立した。この検査法では、ヘパリン加全血を試験サンプルや血液製剤で刺激し、好中球の活性化を細胞表面マーカーである Mac-1 をモニターすることで推量するものである。Mac-1 は接着因子としての機能を持つ細胞膜タンパクであると同時に好中球の活性化マーカーでもある<sup>71)72)</sup>。Mac-1 は分泌小胞膜にも発現しており、炎症性のメディエーターによる刺激により脱顆粒とともに細胞表面上に移動していき、結果的に細胞表面上のその発現量が上昇するため好中球の活性化マーカーになりうるのである<sup>73)</sup>。この検査系を用いて我々は、HLA 抗血清や免疫複合体の刺激が好中球細胞表面上の CD16 や CD32 といった Fc $\gamma$  受容体を介して好中球に伝わりその活性化を短時間で (30 分以内) 惹起することを示した<sup>74)</sup>。活性酸素産生等の好中球の他の活性化様態は検討できないが、この検査法では好中球の脱顆粒をモニターすることが可能である。また、この検査法では、全血 200 $\mu$ l を血清あるいは血漿サンプル 10 $\mu$ l と混合するため、5l の血液を持った患者が白血球抗体を含む 250 ml の新鮮凍結血漿あるいは血小板製剤を輸血された状態を試験管内で再現することが可能となる。

### 2) Heparin-binding protein (HBP) が非溶血性輸血副作用、特に TRALI に関与している可能性

Heparin-binding protein (HBP) は好中球のアズール顆粒や分泌小胞に貯留されている<sup>75)76)</sup>、そして  $\beta$ 2 インテグリンを介する好中球の活性化によって引き起こされる血管壁透過性亢進に、HBP が重要な役割を果たしていることが最近明らかにされた<sup>77)78)</sup>。 $\beta$ 2 インテグリンは好中球が血管内皮細胞に遊走する際にキーとなるインテグリンであり、このインテグリンを介して好中球は血管内皮細胞に接着する。 $\beta$ 2 インテグリンのサブユニットである CD18 を抗体でクロスリンクすると好中球/血管内皮細胞間の接着を擬似再現できる<sup>77)</sup>。Herwald らは、 $\beta$ 2 インテグリンを介する好中球の活性化は HBP の放出を引き起こし、結果的に引き起こされる血管壁透過性を亢進させることを示した<sup>77)78)</sup>。最近、彼らは、血漿のリークと多臓器不全を特徴とする streptococcal toxic shock syndrome において HBP が同様の働きをしていることを報告した<sup>79)</sup>。彼らの報告から、我々は好中球活

性化試験において HLA 抗体や免疫複合体の刺激により好中球から HBP が放出されるのではないかと考えるに至った。その可能性を検討してみると、HLA 抗体や免疫複合体の刺激後 30 分以内に Mac-1 の発現上昇とともに HBP が好中球から放出された。これらの結果は、Mac-1 に加えて HBP も好中球活性化のマーカーとなりうることを示している。そして好中球活性化を検討するために好中球活性化試験を用いることができることを示している。しかし、その確認の為に臨床研究が今後必要である。また、Mac-1 の発現上昇や HBP の放出は好中球活性化の際に起こる唯一の事象ではなく、また HBP も TRALI 発症に関わる唯一の好中球由来生理活性物質ではない。活性酸素<sup>11)</sup>や leukotrien B<sub>4</sub><sup>80)</sup>などの他の生理活性物質も同時に計測できるように好中球活性化試験を改良して行かなければならない。

## 肥満細胞や好塩基球が関与する非溶血性輸血副作用

### 1) アレルギー性輸血副作用アレルギー依存的、非依存的経路

肥満細胞や好塩基球の活性化とそれに引き続いて起こるヒスタミン放出にはアレルギー依存的経路と非依存的経路がある (Fig. 3A)。アレルギー非依存的経路においては、活性化補体、サイトカインやケモカインなどが肥満細胞や好塩基球を活性化する。血液製剤に混在しうるアレルギーとしては献血者が献血直前に摂取した食物や薬剤などが考えられるが、そのようなアレルギーが同定された例はない。血液製剤内に存在しアレルギー性輸血副作用を惹起しうる唯一のアレルギーは、IgA、haptoglobin や C4 などの血漿タンパクであり、そのような血漿タンパクを欠損する患者に輸血を行うと重篤なアレルギー反応が起こる。アレルギー性副作用が血小板輸血に伴う輸血副作用で最も頻度の高い副作用であることを考えると、血小板輸血後のアレルギー反応はアレルギー非依存的経路で惹起していると考えられる。しかし、どのような生理活性物質が関与しているのかは未だ概ね不明である<sup>34)40)81)</sup>。

### 2) アレルギー性疾患領域における検査法

喘息やアトピー性皮膚炎のようなアレルギー疾患においては、肥満細胞や好塩基球が発症に関与していると一般的には考えられている。皮内反応や特異的 IgE は、アレルギー性疾患の診断に広く使われている。トリプターゼは肥満細胞の分泌小胞に非常に豊富に含まれるセリンプロテアーゼで、血清、血漿あるいは他の体液中のトリプターゼレベルは全身性のアナフィラキシーや他の即時型アレルギー反応における肥満細胞の活性化とよく呼応するので、トリプターゼ試験も有用である<sup>82)83)</sup>。最近多くの研究が示しているように、フローサイトメーター法はアレルギー刺激による好塩基球活



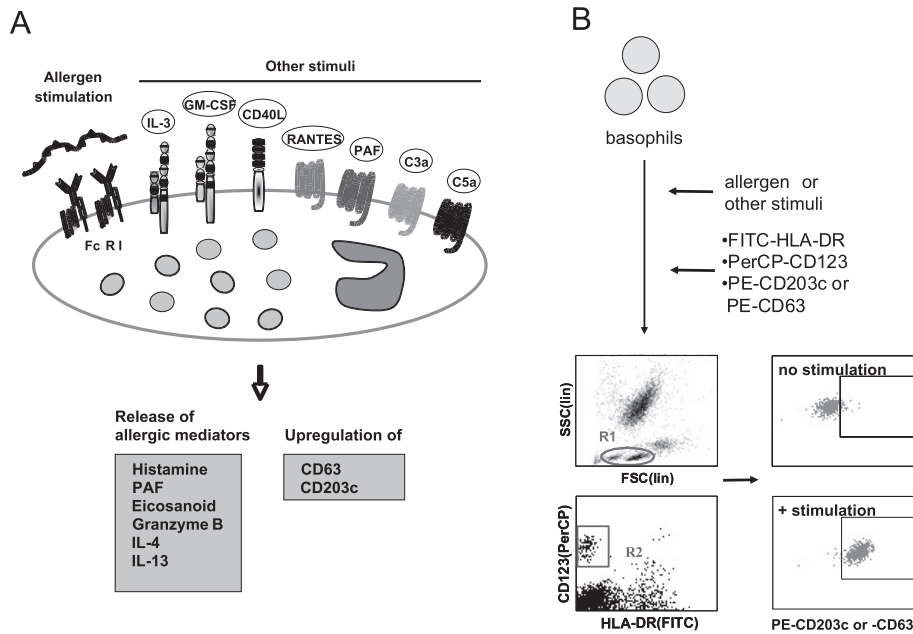


Fig. 3 Principle of the basophil activation and basophil activation test. (A) Allergen and non-allergen extracellular stimuli, surface receptors, and events which occurred upon basophil activation are presented. (B) Basophils are identified on the basis of FSC vs. SSC location and the expression of HLA-DR and CD123. The rise in CD203c expression before and after the stimulation challenge reflects the basophil activation/degranulation in response to the challenge.

性化を捉える信頼性のある検査法であり、脱顆粒/活性化マーカーである CD63 や CD203c の発現上昇を検出する方法で、共に好塩基球活性化試験 (basophil activation test : BAT) として用いられている<sup>83)</sup> (Fig. 3)。簡潔に説明すると、好塩基球活性化試験ではまずヘパリン加全血にテストサンプルを混和する。次に HLA-DR 抗体と CD123 抗体と CD63 抗体あるいは CD203c 抗体を添加し、HLA-DR 陰性、CD123 陽性でプラストウィンドーに入る細胞 (リンパ球と同程度あるいはやや大型の細胞) を好塩基球とし、最終的にその CD63 あるいは CD203c の発現上昇を解析するものである。以下に述べるように、これらの検査法はアレルギー性輸血副作用の検討に応用できる可能性がある。

3) トリプターゼ試験の輸血医学への応用

日本では非溶血性輸血副作用を発症した患者の血清トリプターゼ値がしばしば測定されている。ImmunoCAP Tryptase kit (Phadia, Sweeden, <http://www.phadia.se/>) を用いた測定である。輸血前に比して輸血後に 5µg/l 以上の上昇が認められた場合に陽性と判定される。日本赤十字社、中央血液研究所、研究開発部の松田博士からの、以下のような情報が得られている。1,165 症例を対象として検査がなされ、蕁麻疹症例 438 例中 50 例 (11%)、アナフィラキシー反応症例 177 例中 23 例 (13%)、アナフィラキシーショック症例 286 例中 137 例 (48%)、血圧低下症例 69 例中 8 例 (12%)

Table 2 Summarized data of BAT performed on supernatants of PCs with and without allergic transfusion reactions

Allergic Transfusion Reactions	PC-SNs tested, No.	BAT-positive PC-SNs, No.
+	9	3 (5/5, 3/5, 1/5)
-	12	1 (1/5)

In parentheses, the number of BAT-positive panel blood per total of 5 panel blood tested is presented with respect to each of BAT-positive PC-SNs.

Adapted from Matsuyama et al (ref. 106).

で本試験が陽性となった。輸血副作用を生じなかった患者検体については検討されていないが、発熱反応や TRALI のような非アレルギー性の輸血副作用を陰性コントロールと考えられ、そのような症例では実際に本試験陽性例は少なく、それぞれ 154 例中 1 例 (0.6%)、41 例中 1 例 (2.4%) であった。この結果は、アレルギー性副作用の一部に肥満細胞が関与していることを示唆している。しかし、トリプターゼの血中半減期は 2 時間と短く<sup>85)</sup>、輸血後の患者サンプルを得ることはしばしば困難である。さらに、好塩基球から放出されるトリプターゼ量はわずかである<sup>86/87)</sup>。幸い、好塩基球活性化試験は患者検体採取に際して時間的制約はない。従って、トリプターゼ試験と好塩基球活性化試験は相互に補完的な試験となるであろう。

Table 3 Summary of the assays

test	purpose	methodology	sensitivity and specificity		clinical correlation	
					current status	in future
5 cell-lineage IFT using KY cells (ref. 61)	to screen for non-HLA leukocyte Abs	FCM analysis, a modified GIPT assay using whole blood as blood cell source	There are no data available. Data of samples from patients without reactions need to be obtained in a future study to define the specificity.	In a study examining 85 NHTR cases, 36% patients sera (29/81) and 18% blood components (12/66) contained non-HLA Abs. In contrast, approximately 2 to 3% of normal donor samples were non-HLA leukocyte Ab-positive. (ref. 70)	It needs to be clarified whether the presence of non-leukocyte Abs leads to neutrophil activation and initiate NHTRs. NeuAT would help to approach this issue.	
FCM analysis using KY cells (ref. 67, 68)	to determine the specificity of non-HLA leukocyte Abs	FCM using K562 cell lines transfected with genes encoding HNA-1a, -1b, -1c, 2a, 4a, 4b, 5a, and 5b.	The information is limited. Only two, one, one, and one antisera against HNA-1a, -1b, -2a, and 4a, were available whose specificity had been determined in other laboratories. The presence of HNA Abs and their specificity were confirmed by KY cells. All the KY cells can detect MoAbs at the level of , at least, 1µg/ml. (ref. 67 and unpublished data)	Among the above 85 NHTR cases 41 samples in total contained non-HLA leukocyte Abs, but only one sample contained HNA-1b Ab. None of the remaining samples had reactivity to HNA-1a, 1b, 1c, 2a, 4a, 4b, 5a, and 5b. (ref. 70)	Since it is likely that neutrophil antigens other than HNA-1 to 5 are supposed to be involved in NHTRs, those antigens need to be identified, and KY cells expressing those antigens are required to be established.	
Neutrophil activation test (NeuAT) (ref. 74)	to examine the involvement of neutrophil activation	Whole blood is stimulated by test reagents, and the activation of neutrophils was monitored by upregulation of Mac-1 expression and the release of HBP.	There are no data available.	There is no clinical evidence. In a pre-clinical study, HLA MoAb and immune complex activated neutrophils. (ref.74)	More convenient detection system s, like bead-based technology, ELISA or microarray technology needs to be introduced. Experiments using patient blood and transfused blood components needs to be performed to show the usefulness of this assay in clinical settings.	
Trypsinase level in patient serum	to examine whether the reaction is allergic in nature and to examine the involvement of mast cells	measured using ImmunoCAP Trypsinase (Phadia, Sweden, <a href="http://www.phadia.se/">http://www.phadia.se/</a> ). When elevation more than 5µg/l was observed after transfusion as compared to before transfusion, it was classified as positive.	see the web site of Phadia and "current status" column. The measuring range of the kit is 1-200µg/l.	Serum trypsinase was elevated in 11% (50/438) of urticaria, 13% (23/177) of anaphylactic reaction, 48% (137/286) of anaphylactic shock, and 12% (8/69) of hypotension cases. In contrast, elevation was scarcely observed in non-allergic cases, that is, in 0.6% (1/154) of febrile reaction and 2.4% (1/41) of TRALI cases.	Mac-1 upregulation and HBP release are not the only events that occur upon neutrophil activation, and, therefore, other biologic response modifiers, such as reactive oxygen species, should be simultaneously examined to improve the reliability of NeuAT.	
Basophil activation test (B-AT) (ref. 88)	to examine whether the reaction is allergic in nature and to examine the involvement of basophils	Whole blood was stimulated by blood components, and the activation of neutrophils was monitored flow cytometrically by upregulation of CD203c	There are no data available.	There is no clinical evidence. The only supporting evidence is that 3 of 9 SNs from PCs which caused allergic reactions activated basophils of healthy volunteers, while only 1 of 12 SNs from PCs, which caused no transfusion reaction marginally activated basophils. (ref. 88)	A larger scale of silimar study as well as a study using patient blood instead of normal persons' blood are necessary to assess the issues of the sensitivity and specificity and the clinical application.	

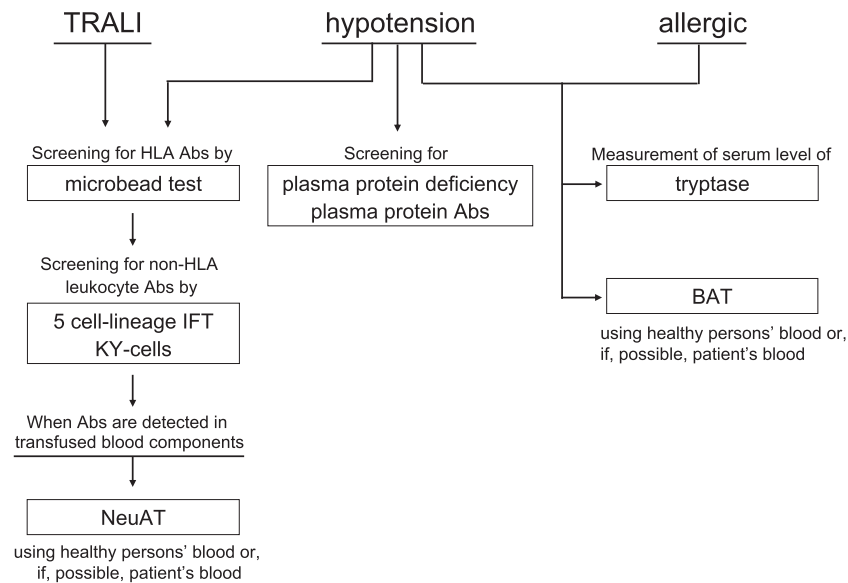


Fig. 4 Flow chart indicating the order in which assays should be performed upon clinical suspicion of TRALI, hypotension, and allergic reaction.

#### 4) 好塩基球活性化試験の輸血医学への応用

最近、我々は、アレルギー性輸血副作用9症例と輸血副作用を生じなかった症例12例の当該血小板残余製剤の上清(PC-SN)を用いて、好塩基球活性化試験が輸血医学に応用できるかを検討した<sup>88)</sup>(Table 2)。用いたPC-SNは北海道赤十字血液センターの若本らが以前の研究で使用した後に凍結保管していたサンプルである<sup>40)</sup>。いずれのPC-SNにも血漿タンパク抗体は検出されず<sup>40)</sup>、従ってアレルゲン非依存性アレルギー反応が生じたと推察され、更にアレルゲン非依存性アレルギー反応の場合には特定のヒトと健常人との間で好塩基球の反応性には大きな差がないものと思われるので、本実験での好塩基球のソースとして当該患者の血液ではなく、無関係な健常人の全血を用いた。5 $\mu$ lのPC-SNを100 $\mu$ lの全血と混合した(PC-SN:全血=1:20)。この混合比は、5lの血液を持つ患者に250mlの血小板製剤が輸血された状況に相当する。次に、HLA-DR陰性、CD123陽性でプラスチックウィンドーに入る細胞を好塩基球とし、そのCD203cの発現を検討した。CD203c陽性好塩基球を算出する為には、無刺激の際のCD203c陽性好塩基球率が5%になるようにフローサイトメーター上のカーソルを設定した。副作用なしのPC-SN12検体で刺激した際のCD203c陽性好塩基球率の[mean+3SD]を刺激後のCD203c陽性好塩基球率が上回った場合に、好塩基球活性化試験陽性と判定した。

アレルギー性反応を惹起した9検体のPC-SNのうち3検体は、5人の健常人好塩基球の少なくともひとりの好塩基球を活性化させた。3検体中1検体は、5人すべての好塩基球を活性化させた。他の2検体はそれぞれ

3人、1人の好塩基球を活性化させた。5人すべての好塩基球を活性化させた検体は非常に顕著なCD203c発現上昇を惹起したが、1人の好塩基球しか活性化させなかった検体によるCD203c発現上昇は僅かであった。2検体がなぜ必ずしも5人全ての好塩基球を活性化させなかったのかは不明である。同様に、アレルギー性反応を惹起した残りの6検体が好塩基球を活性化させなかった理由も不明である。一方、アレルギー性反応を惹起しなかった12検体のPC-SNのうち1検体が、予期しない結果ではあるが、好塩基球活性化試験陽性となった。しかし、陽性となったのは、5人の好塩基球のうち1人の好塩基球のみであり、CD203c発現上昇の程度も僅かであったことから、好塩基球活性化試験擬陽性と思われる。

以上をまとめると、感度や特異性あるいは統計学的検討などの問題点は残るものの、好塩基球活性化試験はアレルギー性輸血副作用を解析するに当たり有用な手段となるであろうことが示されたと考えられる。残された問題点を解決する為には、より大きな規模の同様な検討が必要である。同時に、好塩基球ソースとして当該患者の血液を使った検討も必要である。

#### 結 論

非溶血性輸血副作用の原因に対するより良い理解を得る為には有用な新たな検査方法をいくつか概説した。しかし、解決しなければならない問題点もあり、現時点では、いずれの検査法もまだレファレンスラボにおいて研究手段として用いられるべき段階にある。まず、トリプターゼ試験は感度や特異性などの細かな情報も



得られた検査法であるが、それ以外の検査は全てハンドメイドで感度や特異性などの基本的情報や臨床データにも乏しい。さらに、トリプターゼ試験以外は様々な必要性からルーチン検査としては行えない。例えば、パネル血液の準備、パネル細胞株の維持、フローサイトメーターなどが必要であり、HBPの場合にはin-houseのELISAシステムを構築しなければならない。各検査法の基本的な情報をTable 3にまとめた。Fig. 4には、臨床上TRALI、血圧低下、アレルギー反応などを疑った場合にどの検査法をどのような順で行うべきかを示した。TRALIが疑われる場合には、HLA抗体や非HLA白血球抗体のスクリーニングをすべきである。抗体が検出された場合には、患者血液と当該製剤を用いた好中球活性化試験を行い、好中球の活性化の有無を調べるべきである。患者血液が入手不能の場合には、健常人血液で代替可能である。アレルギー反応が疑われる場合には、患者の血清トリプターゼ値を輸血前後で比較すべきである。同時に、患者血液と当該製剤を用いた好塩基球活性化試験をおこなうべきである。患者血液が入手不能の場合には、健常人血液で代替可能である。血圧低下の場合には、TRALIやアレルギー反応の際に行うべき検査を全て行うべきである。それに加えて、患者の血漿タンパクレベルと血漿タンパク抗体の有無も調べるべきである。

非溶血性輸血副作用の原因をより理解するためには、更なる検討が必要であり、それによって初めて非溶血性輸血副作用のリスクを低減化する新たなストラテジーが生まれて来るのであろう。

謝辞：本論文作成に際して多くの有益な議論をして下さいましたことに対して、木村貴文先生、古田里佳先生、保井一太先生、松山宣樹先生に深謝致します。なお、今研究は厚生労働省科学研究班（20340801）からの補助を一部受けた。

## 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*, 43: 177—189, 2004.
- 2) Webert KE, Blajchman MA: Transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*, 17: 252—262, 2003.
- 3) Bux J: Transfusion-related acute lung injury (TRALI): a serious adverse event of blood transfusion. *Vox Sang*, 89: 1—10, 2005.
- 4) Bux J, Sachs UJ: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*, 136: 788—799, 2007.
- 5) Win N, Chapman CE, Bowles KM, et al: How much residual plasma may cause TRALI? *Transfus Med*, 18: 273—275, 2008.
- 6) Popovsky MA, Moore SB: Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 25: 573—577, 1985.
- 7) Holness L, Knippen MA, Simmons L, et al: Fatalities caused by TRALI. *Transfus Med Rev*, 18: 184—188, 2004.
- 8) Nishimura M, Ishikawa Y, Satake M: Activation of polymorphonuclear neutrophils by immune complex: possible involvement in development of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med*, 14: 359—367, 2004.
- 9) Silliman CC, Paterson AJ, Dickey WO, et al: The association of biologically active lipids with the development of transfusion-related acute lung injury: a retrospective study. *Transfusion*, 37: 719—726, 1997.
- 10) Silliman CC, Voelkel NF, Allard JD, et al: Plasma and lipids from stored packed red blood cells cause acute lung injury in an animal model. *J Clin Invest*, 101: 1458—1467, 1998.
- 11) 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.
- 12) 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. *Transfus Med*, 13: 141—147, 2003.
- 13) 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.
- 14) Vyas GN, Perkins HA, Fudenberg HH: Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *Lancet*, 2: 312—315, 1968.
- 15) Schmidt AP, Taswell HF, Gleich GJ: Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-IgA antibody. *N Engl J Med*, 280: 188—193, 1969.
- 16) Sandler SG, Mallory D, Malamut D, et al: IgA anaphylactic transfusion reactions. *Transfus Med Rev*, 9: 1—8, 1995.
- 17) Lambin P, Le Penec PY, Hauptmann G, et al: Adverse transfusion reactions associated with a precipitating anti-C4 antibody of anti-Rodgers specificity. *Vox Sang*, 47: 242—249, 1984.

- 18) Westhoff CM, Sipherd BD, Wylie DE, et al: Severe anaphylactic reactions following transfusions of platelets to a patient with anti-Ch. *Transfusion*, 32: 576—579, 1992.
- 19) Morishita K, Shimada E, Watanabe Y, et al: Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-haptoglobin in patient with ahaptoglobinemia (letter). *Transfusion*, 40: 120—121, 2000.
- 20) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al: Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anahaptoglobine-mic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95: 1138—1143, 2000.
- 21) Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, et al: Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 42: 766—773, 2002.
- 22) Chambers LA, Kruskall MS, Pacini DG, et al: Febrile reaction after platelet transfusion: The effect of single versus multiple donors. *Transfusion*, 30: 219—221, 1990.
- 23) Heddle NM, Klama LN, Griffith L, et al: A prospective study to identify the risk factors associated with acute reactions to platelet and red cell transfusion. *Transfusion*, 33: 794—797, 1993.
- 24) Vo TD, Cowles J, Heal JM, et al: Platelet washing to prevent recurrent febrile reactions to leukocyte-reduced transfusions. *Transfus Med*, 11: 45—47, 2001.
- 25) Buck SA, Kickler TS, McGuire M, et al: The utility of platelet washing using an automated procedure for severe platelet allergic reactions. *Transfusion*, 27: 391—393, 1987.
- 26) Azuma H, Hirayama J, Akino M, et al: Reduction in adverse reactions to platelets by the removal of plasma supernatant and resuspension in a new additive solution (M-sol). *Transfusion 2009* (published on line 2008 Sep 16).
- 27) Muylle L, Wouters E, De Bock R, et al: Reactions to platelet transfusion: The effect of the storage time of the concentrate. *Transfus Med*, 2: 289—293, 1992.
- 28) Muylle L, Joos M, Wooters 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*, 33: 195—199, 1993.
- 29) Heddle NM, Klama L, Singer J, et al: The role of plasma from platelet concentrates in transfusion reactions. *N Engl J Med*, 331: 625—628, 1994.
- 30) Aye MT, Palmer DS, Giulivi A, et al: Effect of filtration of platelet concentrates on the accumulation of cytokines and platelet release factors during storage. *Transfusion*, 35: 117—124, 1995.
- 31) Stack G, Snyder EL: Cytokine generation in stored platelet concentrates. *Transfusion*, 34: 20—25, 1994.
- 32) Wilhelm D, Klouche M, Fiebelkorn A, et al: Non-haemolytic transfusion reactions after platelet substitution. *Lancet*, 342: 364, 1993.
- 33) Phipps R, Kaufman J, Blumberg N: Platelet derived CD154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*, 357: 2023—2024, 2001.
- 34) Blumberg N, Gettings KF, Turner C, et al: An association of soluble CD40 ligand (CD154) with adverse reactions to platelet transfusions. *Transfusion*, 46: 1813—1821, 2006.
- 35) Klinger MH: Platelets and inflammation. *Anat Embryol*, 196: 1—11, 1997.
- 36) Bagglioni M, Dahinden CA: CC chemokines in allergic inflammation. *Immunol Today*, 15: 127—133, 1994.
- 37) Bischoff SC, Krieger M, Brunner T, et al: RANTES and related chemokines activate human basophil granulocytes through different G protein-coupled receptors. *Eur J Immunol*, 23: 761—767, 1993.
- 38) Hartmann K, Beiglbock F, Czarnetzki BM, et al: Effect of CC chemokines on mediator release from human skin mast cells and basophils. *Int Arch Allergy Immunol*, 108: 224—230, 1995.
- 39) Kuna P, Reddigari SR, Schall TJ, et al: RANTES, a monocyte and T lymphocyte chemotactic cytokine releases histamine from human basophils. *J Immunol*, 149: 636—642, 1992.
- 40) Wakamoto S, Fujihara M, Kuzuma K, et al: Biologic activity of RANTES in apheresis PLT concentrates and its involvement in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 43: 1038—1046, 2003.
- 41) de Rie MA, van der Plas-van Dalen CM, Engelfriet CP, et al: The serology of febrile transfusion reactions. *Vox Sang*, 49: 126—314, 1985.
- 42) Petrányi GG, Réti M, Harsányi V, et al: Immunologic consequences of blood transfusion and their clinical manifestations. *Int Arch Allergy Immunol*, 114: 303—315, 1997.
- 43) Popovsky MA, Haley NR: Further characterization of transfusion-related acute lung injury: demographics, clinical and laboratory features, and morbidity. *Immunohematology*, 16: 157—159, 2000.

- 44) Popovsky MA, Abel MD, Moore SB: Transfusion-related acute lung injury associated with passive transfer of anti-leukocyte antibodies. *Am Rev Respir Dis*, 128: 185—189, 1983.
- 45) 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.
- 46) Kopko PM, Popovsky M, MacKenzie MR, et al: HLA class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 41: 1244—1248, 2001.
- 47) Win N, Brown C, Navarrete C: TRALI associated with HLA class II antibodies. *Transfusion*, 43: 545—546, 2003.
- 48) Flesch BK, Neppert J: Transfusion-related acute lung injury caused by human leukocyte antigen class II antibody. *Br J Haematol*, 116: 673—677, 2002.
- 49) Leach M, Vora AJ, Jones DA, et al: Transfusion-related acute lung injury (TRALI) following autologous stem cell transplant for relapsed acute myeloid leukemia: a case report and review of the literature. *Transfusion Medicine*, 8: 333—337, 1998.
- 50) Yomtovian R, Kline W, Press C, et al: Severe pulmonary hypersensitivity associated with passive transfusion of neutrophil-specific antibody. *Lancet*, 1: 244—246, 1984.
- 51) Bux J, Becker F, Seeger W, et al: Transfusion-related acute lung injury due to HLA-A2-specific antibodies in recipient and NB1-specific antibodies in donor blood. *Br J Haematol*, 93: 707—713, 1996.
- 52) Nordhagen R, Conradi M, Dromtorp SM: Pulmonary reaction associated with transfusion of plasma containing anti-5b. *Vox Sanguinis*, 51: 102—107, 1986.
- 53) Davoren A, Curtis BR, Shulman IA, et al: TRALI due to granulocyte-agglutinating human neutrophil antigen-3a (5b) antibodies in donor plasma: a report of 2 fatalities. *Transfusion*, 43: 641—645, 2003.
- 54) Verheugt FW, von dem Borne AE, Decary F, et al: The detection of granulocyte alloantibodies with an indirect immunofluorescence test. *Br J Haematol*, 36: 533—544, 1977.
- 55) Kuijpers RW, Dooren MC, von dem Borne AE, et al: Detection of human monocyte-reactive alloantibodies by flow cytometry after selective downmodulation of the Fc receptor I. *Blood*, 78: 50—56, 1991.
- 56) Dettke M, Dreer M, Hocker P, et al: Human platelet antigen-1 antibodies induce the release of chemokine RANTES from human platelets. *Vox Sang*, 81: 199—203, 2001.
- 57) Morishita K, Wakamoto S, Miyazaki T, et al: Life-threatening adverse reaction followed by thrombocytopenia after passive transfusion of frozen plasma containing anti-CD36 (Naka) isoantibody. *Transfusion*, 45: 803—806, 2005.
- 58) Wakamoto S, Fujihara M, Urushibara N, et al: Heterogeneity of platelet responsiveness to anti-CD36 in plasma associated with adverse transfusion reactions. *Vox Sang*, 88: 41—51, 2005.
- 59) Nakajima F, Nishimura M, Hashimoto S, et al: Role of anti-Nak (a) antibody, monocytes and platelets in the development of transfusion-related acute lung injury. *Vox Sang*, 95: 318—323, 2008.
- 60) Tomiyama Y, Take H, Ikeda H, et al: Identification of the platelet-specific alloantigen, Naka, on platelet membrane glycoprotein IV. *Blood*, 75: 684—687, 1990.
- 61) Matsuyama N, Kojima Y, Hirayama F, et al: Simultaneous five cell-lineage flow cytometric analysis system for detection of leukocyte antibodies. *Transfus Med*, 16: 111—118, 2006.
- 62) Stroncek D: Neutrophil alloantigens. *Transfusion*, 16: 67—75, 2002.
- 63) Yasui K, Furuta RA, Matsumoto K, et al: HIV-1-derived self-inactivating lentivirus vector induces megakaryocyte lineage-specific gene expression. *Microbes Infect*, 7: 240—247, 2005.
- 64) Sabatino DE, Seidel NE, Cline AP, et al: Development of a stable retrovirus vector capable of long-term expression of gamma-globin mRNA in mouse erythrocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 938: 246—261, 2001.
- 65) Adam MA, Ramesh N, Miller AD, et al: Internal initiation of translation in retroviral carrying picornavirus 5' nontranslated regions. *J Virol*, 65: 4985—4990, 1991.
- 66) Ghattas IR, Sanes JR, Majors JE: The encephalomyocarditis virus internal ribosome entry site allows efficient coexpression of two genes from a recombinant provirus in cultured cells and in embryos. *Mol Cell Biol*, 11: 5848—5859, 1991.
- 67) Yasui K, Miyazaki T, Matsuyama N, et al: Establishment of cell lines stably expressing HNA-1a, -1b, and -2a antigen with low background reactivity in flow cytometric analysis. *Transfusion*, 47: 478—485, 2007.
- 68) Yasui K, Hirayama F, Matsuyama N, et al: New cell lines selectively expressing HNA-1c, -4a, -4b, -5a, and -5b antigen established for the detection of HNA antibodies. *Transfusion*, 48: 1037—1039, 2008.

- 69) Hayashi T, Yasui K, Matsuyama N, et al: Establishment of a novel method for detecting Nak<sup>a</sup> antibodies by using a panel cell line. *Transfusion*, 49: 390—392, 2009.
- 70) Matsuyama N, Hirayama F, Kojima Y, et al: Non-HLA white cell antibodies in nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 48: 1526—1528, 2008.
- 71) Klugewitz K, Ley K, Schuppan D, et al: Activation of the  $\beta 2$  integrin Mac-1 (CD11b/CD18) by an endogenous lipid mediator of human neutrophils and HL-60 cells. *J Cell Sci*, 110: 985—990, 1997.
- 72) Diez-Fraile A, Meyer E, Paape MJ, et al: Analysis of selective mobilization of l-selectin and Mac-1 reservoirs in bovine neutrophils and eosinophils. *Vet Res*, 34: 57—70, 2003.
- 73) Jones DH, Anderson DC, Burr BL, et al: Quantitation of intercellular Mac-1 (CD11b/CD18) pools in human neutrophils. *J Leukoc Biol*, 44: 535—544, 1988.
- 74) Yasui K, Furuta RA, Matsuyama N, et al: Possible involvement of heparin-binding protein in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 48: 978—987, 2008.
- 75) Tapper H, Karlsson A, Morgelin M, et al: Secretion of heparin-binding protein from human neutrophils is determined by its localization in azurophilic granules and secretory vesicles. *Blood*, 99: 1785—1793, 2002.
- 76) Watorek W: Azurocidin-inactive serine proteinase homolog acting as a multifunctional inflammatory mediator. *Acta Biochim Pol*, 50: 743—752, 2003.
- 77) Gautam N, Herwald H, Hedqvist P, et al: Signaling via  $\beta 2$  integrins triggers neutrophil-dependent alteration in endothelial barrier function. *J Exp Med*, 191: 1829—1839, 2000.
- 78) Gautam N, Olofsson AM, Herwald H, et al: Heparin-binding protein (HBP/CAP37): a missing link in neutrophil-evoked alteration of vascular permeability. *Nat Med*, 7: 1123—1127, 2001.
- 79) Herwald H, Cramer H, Morgelin M, et al: M protein, a classical bacterial virulence determinant, forms complexes with fibrinogen that induce vascular leakage. *Cell*, 116: 367—379, 2004.
- 80) 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.
- 81) Cognasse F, Boussoulade F, Chavarin P, et al: Release of potential immunomodulatory factors during platelet storage. *Transfusion*, 46: 1184—1189, 2006.
- 82) Schwartz LB, Metcalfe DD, Miller JS, et al: Tryptase levels as an indicator of mast-cell activation in systemic anaphylaxis and mastocytosis. *N Engl J Med*, 316: 1622—1626, 1987.
- 83) Schwartz LB, Sakai K, Bradford TR, et al: The alfa form of human tryptase is the predominant type present in blood at baseline in normal subjects and is elevated in those with systemic mastocytosis. *J Clin Invest*, 96: 2702—2710, 1995.
- 84) Boumiza R, Debard A-L, Monneret G: The basophil activation test by flow cytometry: recent developments in clinical studies, standardization and emerging perspectives. *Clin Mol Allergy*, 3: 9—16, 2005.
- 85) Schwartz LB: Tryptase from human mast cells: biochemistry, biology and clinical utility. *Monogr Allergy*, 27: 90—113, 1990.
- 86) Castells MC, Irani AM, Schwartz LB: Evaluation of human peripheral blood leukocytes for mast cell tryptase. *J Immunol*, 138: 2184—2189, 1987.
- 87) Foster B, Schwartz LB, Devouassoux G, et al: Characterization of mast-cell tryptase-expressing peripheral blood cells as basophils. *J Allergy Clin Immunol*, 109: 287—293, 2002.
- 88) Matsuyama N, Hirayama F, Wakamoto S, et al: Application of the basophil activation test in the analysis of allergic transfusion reactions. *Transfus Med*, 19: 274—277, 2009.

## **Recent advances in laboratory assays for non-hemolytic transfusion reactions**

*Fumiya Hirayama*

Japanese Red Cross Osaka Blood Center

**Keywords:**

non-hemolytic transfusion reaction, leukocyte antibody, neutrophil, heparin-binding protein, basophil

---

©2010 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

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