

輸血関連急性肺障害に関与した抗 HLA Class II 抗体陽性血漿と末梢血単核細胞及び血管内皮細胞の共培養による内皮細胞の透過性亢進

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

【背景】輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury : TRALI) の病因に、抗 HLA Class II 抗体による標的抗原陽性単球の活性化が関与していると考えられる。また、TRALI の特徴的な症状である肺水腫は血管透過性の亢進により誘導される。

【方法】TRALI における肺水腫の形成に抗 HLA Class II 抗体と単球が関与する可能性を調べるため、TRALI の原因製剤となった抗 HLA Class II 抗体陽性血漿 (抗 HLA-DR 血漿) 存在下で、ヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cell : PBMNC) とヒト肺微小血管内皮細胞 (human lung microvascular endothelial cells : HMVEC) を共培養し、血管透過性亢進の有無を調べた。同様の実験を正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVEC) を用いて行った。血管透過性は、共培養に添加した蛍光標識デキストランの透過性を測定することにより評価した。

【結果】抗 HLA-DR 血漿存在下で PBMNCs と HMVECs または HUVECs を共培養することにより、血管内皮細胞の透過性が亢進した。この作用は抗体の特異性に依存していた。共培養に platelet activating factor (PAF) のアンタゴニストである CV-3988 を添加することにより、血管透過性亢進作用はほぼ完全に抑制された。抗 TNF- α 中和抗体単独及び同抗体と抗 IL-1 β 中和抗体の両方を共培養に添加することにより、HMVECs と HUVEC の透過性亢進作用はそれぞれ部分的に抑制された。

【考察】抗 HLA Class II 抗体の存在下で標的抗原を発現する単球と血管内皮細胞を共培養することにより、血管透過性亢進が誘導された。この反応に PAF, TNF- α または IL-1 β が関与していると考えられた。従って、抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化は、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。

キーワード：抗 HLA Class II 抗体, TRALI, 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

本論文内容は、Blackwell Publishing 社の許可のもと、Transfusion 誌 (第 51 巻 第 5 号 993—1001 2011 年) に掲載された論文に基づき作成したものである。(Shinobu Wakamoto, Mitsuhiro Fujihara, Daisuke Takahashi, Koichi Niwa, Shinichiro Sato, Toshiaki Kato, Hiroshi Azuma, and Hisami Ikeda: Enhancement of endothelial permeability by coculture with peripheral blood mononuclear cells in the presence of HLA Class II antibody that was associated with TRALI. Transfusion 51 (5): 993—1001, 2011)

はじめに

輸血関連急性肺障害 (transfusion-related acute lung injury : TRALI) は、輸血後 6 時間以内に急性呼吸困難、低酸素血症及び非心原性肺水腫などの主症状を呈する重篤な輸血副作用である¹⁾。TRALI の特徴的な症状の一つである肺水腫は、肺毛細血管の透過性の制御が破綻して血管透過性が亢進し、血液の血漿成分や血球が血管外の組織に漏出することにより引き起こされる^{2,3)}。

TRALI は、患者細胞が血液製剤中に含まれるドナー

由来の抗白血球抗体や生理活性物質 (biologic response modifiers : BRMs) に暴露されることにより引き起こされると考えられている^{2,3)}。これまでの研究結果から、抗 HLA Class II 抗体が TRALI の病態形成において重要な役割をしていることが示唆されており^{4)~11)}、下記の機序で TRALI が発症すると考えられている。抗 HLA Class II 抗体を保有する血液製剤が輸血されると、抗体は標的抗原を発現している患者の単球を活性化し、TNF- α ⁹⁾¹¹⁾、IL-1 β ⁹⁾、tissue factor 及び leukotriene B₄¹⁰⁾¹¹⁾ 等

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

〔受付日：2011 年 8 月 8 日，受理日：2011 年 8 月 15 日〕

の炎症性メディエーターの産生を誘導する。さらにこれらのメディエーターが TRALI の症状を引き起こすというものである。しかしながら、抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化が TRALI における肺水腫の形成に関与しているということの直接的な証明はなされていない。

これまでに我々は、重篤な非溶血性輸血副作用 (non-hemolytic transfusion reactions : NHTRs) の原因製剤となった抗 HLA Class II 抗体陽性血漿が *in vitro* において抗体の標的抗原を発現するヒト末梢血単核細胞 (peripheral blood mononuclear cells : PBMCs) を活性化し、サイトカインの産生・放出を誘導すること¹²⁾¹³⁾、さらに、この抗体と単球との反応上清は、主に反応上清中に放出された TNF- α と IL-1 β を介して正常ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells : HUVECs) 及びヒト肺微小血管内皮細胞 (human lung microvascular endothelial cells : HMVECs) の透過性を亢進させることを報告している¹³⁾¹⁴⁾。これらの結果は TRALI 症例由来の抗体を用いて行った検討によるものではないが、抗 HLA Class II 抗体が抗体の特異性に依存して単球を活性化し、その結果、放出された炎症性メディエーター (TNF- α , IL-1 β) が TRALI に特徴的な症状である肺水腫の形成に寄与する生理活性を有することを示唆している。しかしながら、さらに輸血副作用の状況を反映させた *in vitro* モデルを構築するために、以下の点を考慮する必要があった。(1) 上述の検討では、抗 HLA Class II 抗体により単球を活性化させる操作と、得られた反応上清の血管透過性亢進作用を調べる操作を別々に行ったため、抗体陽性血液製剤の輸血開始から副作用が発症するまでの時間を正確に反映していないこと。(2) TNF- α 及び IL-1 β といった比較的安定なメディエーターが血管透過性亢進に関与していることを見出したが、短い半減期のメディエーターが関与している可能性も否定できないこと。これらの点を考慮して、生体での TRALI の状況を *in vitro* にて模擬するには、抗 HLA-DR 血漿存在下で血管内皮細胞と PBMCs とを共培養する実験系が必要と考えられる。

我々は以前、抗 HLA Class II 抗体陽性血小板製剤の輸血により TRALI が発症した症例を報告している¹⁵⁾。そこで本検討では、抗 HLA Class II 抗体によって TRALI が発症する機序の解明に取り組むため、TRALI 症例由来の抗 HLA-DR 血漿の存在下で PBMCs と HMVECs を共培養することにより、HMVECs 及び HUVECs の透過性が亢進されるかどうかを検討した。さらに血管透過性亢進作用を誘導する因子として、サイトカインの関与に加え、platelet activating factor (PAF) 及び cysteinyl leukotrienes (CysLTs) 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

抗 HLA Class II 抗体陽性血小板製剤の輸血により TRALI が発症した症例を経験し、既に報告している¹⁵⁾。本症例の原因製剤となった血液ドナーの血清と患者血清について、抗 HLA Class I, II 抗体、抗 human platelet antigen (HPA) 抗体、抗 Human neutrophil antigen (HNA) 抗体の有無をそれぞれ、Flow-PRA 法¹⁶⁾ (One Lambda 社)、MPHA (mixed passive haemagglutination) 法¹⁷⁾ (Olympus 社)、GIFT-FCM (granulocyte immunofluorescence test-flow cytometry) 法¹⁸⁾ でスクリーニングした。抗血漿タンパク抗体は、*in-house* の ELISA で、抗 IgG 抗体は passive haemagglutination (PHA) 法で検出した。血液ドナーの血清は抗 HLA Class II 抗体が強陽性であり、HLA-DR4 をはじめ複数の HLA-DR 抗原に反応したが、HLA-DR8 と HLA-DR12 には反応しないことを見出している¹⁵⁾。また、同血清は、A24 に対する抗 HLA Class I 抗体が弱陽性であった。TRALI を発症した患者は HLA-DR1, 4, HLA-A24 が陽性であった。血液ドナー及び患者血清のいずれにおいても、抗 HPA, HNA 抗体及び抗血漿タンパク抗体は検出されなかった。本検討では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) を使用した。

2. PBMCs の調整

健康人全血 (ヘパリン加) から同意を得て、PBMCs を採取し¹²⁾¹⁴⁾、RPMI に浮遊した (2.5×10^6 /ml)。抗 HLA-DR 血漿は、HLA-A24, 31 と HLA-DR4, 10 を有する PBMCs (subject 1)、HLA-A2, 26 と HLA-DR4, 15 を有する PBMCs (subject 2)、及び HLA-A2, 11 と HLA-DR4, 4 を有する PBMCs (subject 3) の 3 人の被験者由来 PBMCs と交差反応するが、HLA-A2, 24 と HLA-DR8, 12 を有する PBMCs (subject 4)、及び HLA-A24, 26 と HLA-DR8, 12 を有する PBMCs (subject 5) の 2 人の被験者由来 PBMCs とは反応しないことをフローサイトメトリーで確認した。前者 3 人の PBMCs を交差反応陽性 PBMCs とし、後者 2 人の PBMCs を交差反応陰性 PBMCs とした。

3. 血管内皮細胞の透過性アッセイ

血管内皮細胞は、HUVEC 及び HMVEC (共に Cambrex Bio Science 社) を使用した¹⁴⁾。

血管内皮細胞の透過性アッセイは、Seynhaeve ら¹⁹⁾ の方法を一部改変して行った。血管内皮細胞をトランズウェル (6.5mm diameter, 0.4 μ m pore size, polyester membrane ; Corning 社) に播種し (2.5×10^4 /上室)、5 日間培養してコンフルエントとした。

抗 HLA-DR 血漿存在下にて血管内皮細胞と PBMCs を共培養する際、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。

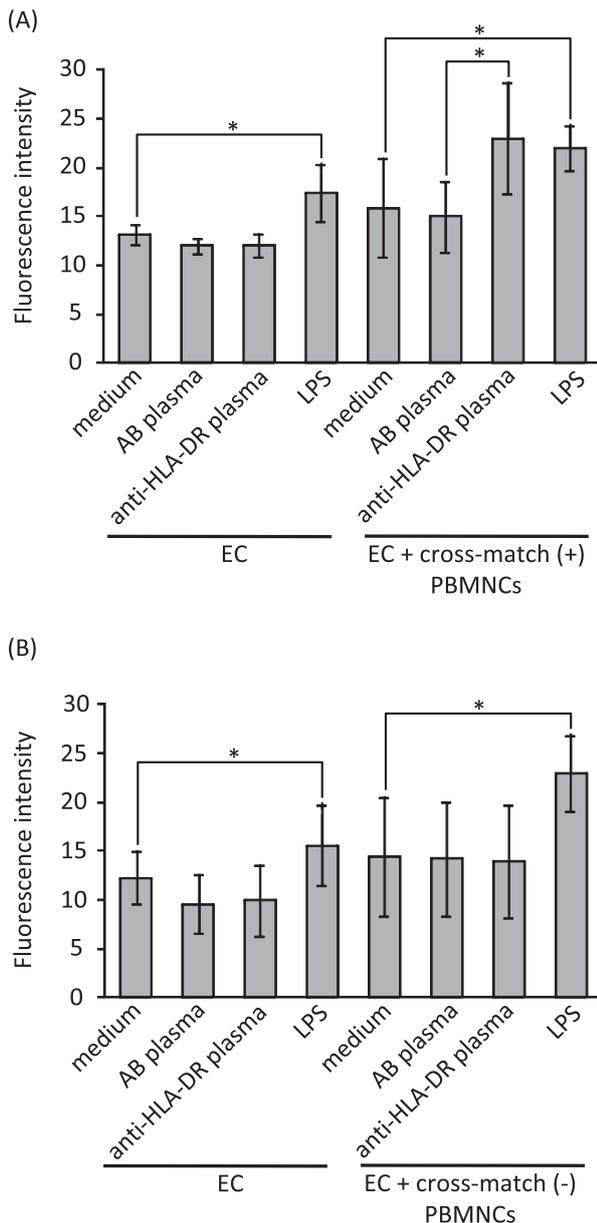


Fig. 1 Effect of coculture of HMVECs with PBMNCs in the presence of anti-HLA-DR plasma on endothelial permeability.

HMVECs on transwell were incubated with cross-match-positive (n=3) or -negative (n=2) PBMNCs, anti-HLA-DR plasma or AB plasma, and FITC-labeled dextran for 6 hours. After the incubation, the passage of FITC-labeled dextran into the lower chamber of the transwell was measured. The results of cross-match-positive PBMNCs are expressed as mean \pm SD of six independent experiments performed on three subjects in duplicate (A). The data from cross-match-negative subjects represent the mean of four independent experiments performed on two subjects in duplicate (B).

. *p<0.05

PBMNCs (1×10^5), 抗 HLA-DR 血漿 (終濃度 0.5%, vol/vol) 及び FITC-標識デキストラン (0.5mg/ml ;

Sigma Chemical 社) をトランズウェルの上室に添加し, 下室は新鮮な培養液に交換して 6 時間のインキュベーションを行った (37°C, 5% CO₂). 陰性対照として, 抗体陰性ヒト AB 型プール血漿 (AB 型血漿) を, 陽性対照として lipopolysaccharide (LPS) (1 μ g/ml) を用いた. 血管透過性亢進に対するサイトカイン, PAF 及び CysLT の影響を見る場合には, 各種サイトカイン中和抗体 (100 μ g/ml), PAF レセプターアンタゴニスト (CV-3988 ; Biomol 社) または CysLT レセプターアンタゴニスト (BAY-u9773 ; Biomol 社) を共培養に添加した. 上記の阻害剤の使用濃度は, これまでに報告されている文献データを基にした (サイトカイン中和抗体¹⁴⁾, CV-3988^{20)~22)}, BAY-u9773²³⁾²⁴⁾).

血管透過性の変化を測定するため, 共培養の後, 上室を除き, 下室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. 実験は全て duplicate で行った. 抗 HLA-DR 血漿及び AB 型血漿のエンドトキシン濃度は比濁時間分析法 (Endotoxin-Single Test Wako, Wako Chemical 社) にて行った.

4. 統計学的解析

統計学的解析には KareidaGraph 4.01 (Sinergy Software 社) を使用した. 抗 HLA-DR 血漿または LPS による血管内皮細胞の透過性亢進と陰性対照における血管透過性との有意差検定は, paired Student's t-test にて行った. 血管透過性亢進に対するサイトカイン中和抗体, PAF レセプターアンタゴニスト, または CysLT レセプターアンタゴニストの影響を見る場合には, 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 血漿存在下で PBMNCs と HMVECs を共培養することによる血管透過性亢進作用

はじめに, 抗 HLA-DR 血漿存在下で PBMNCs と HMVECs を共培養することにより, HMVECs の透過性が亢進されるかどうかを検討した. 抗 HLA-DR 血漿及び陰性対照の AB 型血漿のいずれも, それぞれ単独で HMVECs に添加した場合には, 透過性に影響を与えなかった (Fig. 1). 抗 HLA-DR 血漿存在下で交差反応陽性 PBMNCs と HMVECs を 6 時間, 共培養することにより, 陰性対照の AB 型血漿の場合と比較して, 有意な血管透過性亢進がみられた (Fig. 1A). 6 時間未満のインキュベーション (1.5, 3, 4.5 時間) では, 有意な透過性亢進は見られなかった (結果示さず). 一方, 交差反応陰性 PBMNCs を用いて 6 時間の共培養を行った場合には, 透過性亢進はみられなかった (Fig. 1B). 抗 HLA-DR 血漿は A24 に対する抗 HLA Class I 抗体も弱陽性であったため, 同抗体の血管透過性亢進反応へ

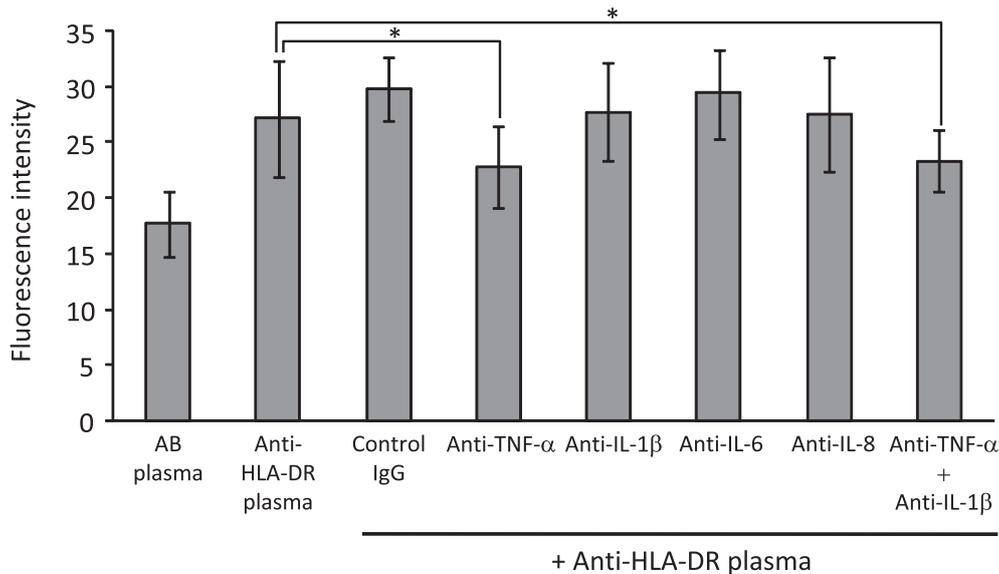


Fig. 2 Effects of anti-cytokine neutralizing antibodies on increased HMVEC permeability induced by the coculture of HMVECs with PBMCs in the presence of anti-HLA-DR plasma. Anti-cytokine neutralizing antibodies or control antibody were added to the coculture of HMVECs with cross-match-positive PBMCs, anti-HLA-DR plasma or AB plasma, and FITC-labeled dextran. After 6 hour incubation, the passage of FITC-labeled dextran into the lower chamber of the transwell was measured. The results are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects. * $p < 0.05$

の関与を考慮する必要があった。しかしながら、交差反応陰性 PBMCs は 2 例とも A24 陽性であったのに、血管透過性亢進はみられず (Fig. 1B), また、交差反応陽性 PBMCs は 3 例中 2 例が A24 陰性であったが、透過性亢進が誘導された (Fig. 1A)。従って A24 抗原と抗体の特異性に依存した HMVECs の透過性亢進は見られなかったため、共培養による血管透過性亢進に抗 HLA Class I 抗体は関与していないと考えられた。陽性対照の LPS は、単独で HMVECs に添加することにより HMVECs の透過性を亢進させたが (Fig. 1), LPS 存在下において交差反応陽性 PBMCs または陰性 PBMCs と HMVEC 共培養することにより、単独の場合よりも有意に高い透過性亢進作用を示した (Fig. 1)。抗 HLA-DR 血漿及び AB 型血漿中のエンドトキシン濃度は 6pg/ml 以下で、共培養中の終濃度は 0.03pg/ml 以下であるため、炎症性作用を引き起こさない、低いレベルに保たれていると考えられた。

2. 共培養による HMVECs の透過性亢進に対する抗サイトカイン中和抗体の影響

我々及び他の研究者により、輸血副作用に関与した抗 HLA Class II 抗体が、抗体の特異性に依存して単球を活性化し、TNF- α 、IL-1 β ¹²⁾、IL-6、または IL-8¹²⁾等のサイトカインの産生を誘導することが示されている。さらに我々は抗 HLA Class II 抗体陽性血漿によって活性化された PBMCs の上清が HUVECs や HMVECs

の透過性を亢進させることを見出している¹⁴⁾。この反応上清に TNF- α と IL-1 β に対する中和抗体の両方を同時に添加すると、血管透過性亢進作用はほぼ完全に抑制された¹⁴⁾。そこで、本検討の共培養において血管透過性亢進を誘導する因子を特定するため、サイトカインの関与を調べた。抗 HLA-DR 血漿存在下における交差反応陽性 PBMCs と HMVECs の共培養に TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、または IL-8 の中和抗体を添加し、血管透過性亢進抑制作用の有無を測定した。IL-1 β 、IL-6、または IL-8 の中和抗体それぞれ単独では、血管透過性亢進に対し、有意な抑制効果を示さなかったが、TNF- α の中和抗体は部分的ではあるが、有意な抑制作用を示した (Fig. 2)。抗 TNF- α 、IL-1 β 中和抗体の両方を同時に共培養に添加しても、抗 TNF- α 中和抗体単独の作用と比較して、抑制効果の増強はみられなかった。

3. 共培養による HMVECs の透過性亢進に対する PAF または CysLT レセプターアンタゴニストの影響

抗 TNF- α 中和抗体は、共培養による血管透過性亢進を完全に抑制しなかったため、TNF- α 以外の因子が血管透過性亢進作用に関与していると考えられた。PAF は肺水腫の誘導において重要な役割を担うメディエーターである²⁵⁾²⁶⁾。また、CysLTs も血管透過性亢進に関与することが報告されている²⁷⁾。PAF と CysLTs は活性化された単球において合成される^{26)~28)}。そこで、交差反応陽性 PBMCs 及び HMVECs の共培養に PAF レ

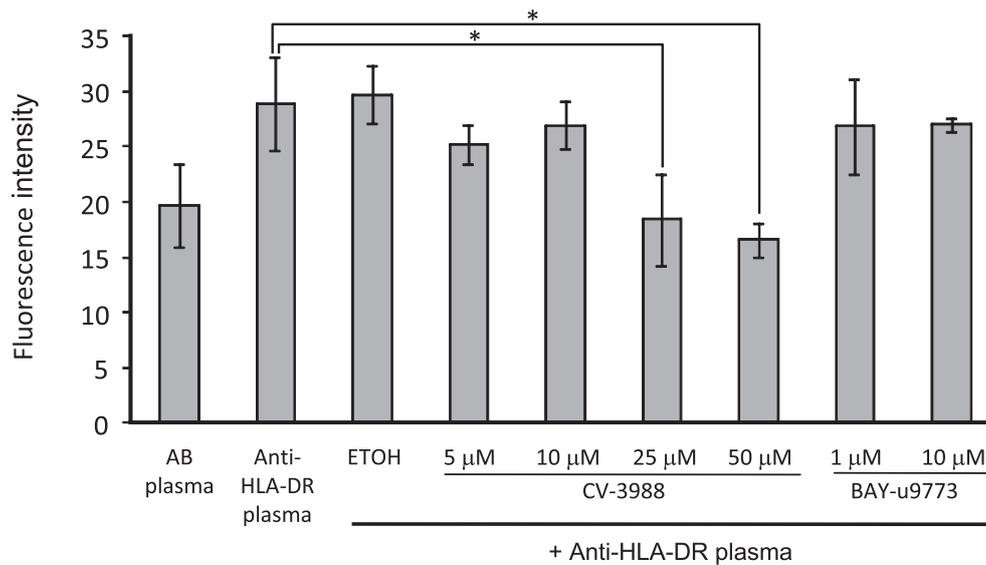


Fig. 3 Effects of antagonists of PAF or CysLT receptor on increase in endothelial permeability induced by coculture of HMVECs with PBMC in the presence of anti-HLA-DR plasma. CV-3988, a PAF receptor antagonist, or BAY-u9773, a CysLT receptor antagonist were added to the coculture of HMVECs with cross-match-positive PBMCs, anti-HLA-DR plasma or AB plasma, and FITC-labeled dextran. After 6 hour incubation, the passage of FITC-labeled dextran into the lower chamber of the transwell was measured. The results are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects. * $p < 0.05$

セプターのアンタゴニスト (CV-3988) または CysLT レセプターアンタゴニスト (BAY-u9773) を添加して、血管透過性亢進に対する影響を調べた。CV-3988 (25, 50 μ M) はほぼ完全に HMVECs の透過性亢進反応を抑制したが、BAY-u9773 は透過性亢進反応に影響を与えなかった (Fig. 3)。

4. 抗 HLA-DR 血漿の存在下で PBMCs と HUVECs を共培養することによる血管透過性亢進作用

抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化は肺水腫だけでなく、発疹、蕁麻疹及び血管浮腫などの非溶血性輸血副作用で頻繁にみられる症状にも関与している可能性が考えられる。このことから、HMVECs 以外の血管内皮細胞と PBMCs とを抗 HLA-DR 血漿存在下で共培養した場合にも血管透過性が亢進されると推測される。そこで、HUVECs を用い、共培養における血管透過性亢進の有無を調べた。抗 HLA-DR 血漿及び陰性対照の AB 型血漿のいずれも、それぞれ単独で HUVECs に添加した場合には、血管透過性に影響を与えなかった (Fig. 4)。抗 HLA-DR 血漿存在下で交差反応陽性 PBMCs と HUVECs を 6 時間、共培養することにより、陰性対照の AB 型血漿の場合と比較して、有意な透過性亢進がみられた (Fig. 4A)。6 時間未満のインキュベーション (1.5, 3, 4.5 時間) では、有意な透過性亢進は見られなかった (結果示さず)。一方、交差反応陰性 PBMCs を用いて 6 時間の共培養を行った場合には、透過性亢進はみられなかった (Fig. 4B)。陽性対照の LPS

存在下における PBMCs と HUVEC 共培養は、PBMCs と抗 HLA-DR 血漿との交差反応性に関係なく、有意に高い血管透過性亢進を誘導した (Fig. 4)。LPS 単独による血管透過性亢進作用はわずかであった (Fig. 4)。

さらに、本検討でみられた HUVECs の透過性亢進に対し、サイトカインに対する中和抗体及び PAF または CysLTs のレセプターアンタゴニストが与える影響を調べた。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、血管透過性亢進に対し、有意な抑制効果を示さなかったが、TNF- α と IL-1 β に対する中和抗体を同時に共培養に添加することにより、血管透過性亢進は部分的ではあるが、有意に抑制された (Fig. 5A)。CV-3988 (50 μ M) はほぼ完全に血管透過性亢進反応を抑制したが、BAY-u9773 は透過性亢進反応に影響を与えなかった (Fig. 5B)。

考 察

TRALI における肺水腫は肺血管の透過性が亢進することにより誘導される。TRALI の病態形成には、血液製剤中の抗 HLA Class II 抗体による患者の単球の活性化が重要な役割を果たしている^{9)~11)}、すなわち、抗体による単球活性化が血管透過性亢進作用の誘導に関与すると考えられている。本検討において、我々は、TRALI 症例由来の抗 HLA-DR 血漿存在下で PBMCs と HMVECs または HUVECs を共培養することにより、抗体の特異性に依存して血管透過性が亢進されること

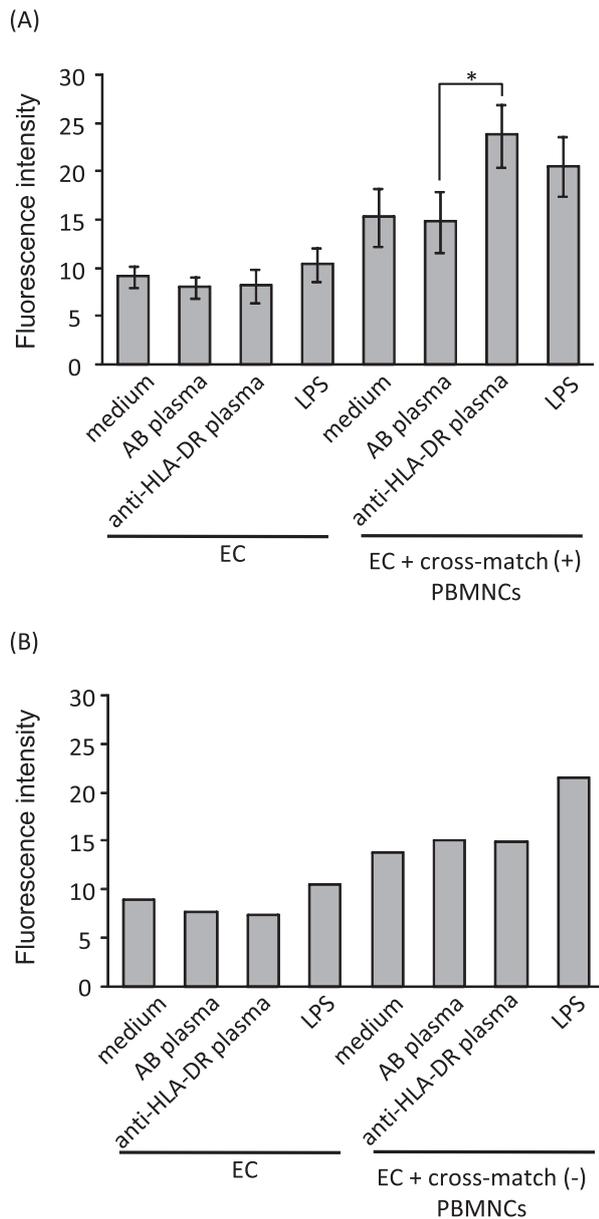


Fig. 4 Effect of coculture of HUVECs with PBMNCs in the presence of anti-HLA-DR plasma on endothelial permeability.

HUVECs on transwell were incubated with cross-match-positive ($n=3$) or -negative ($n=2$) PBMNCs, anti-HLA-DR plasma or AB plasma, and FITC-labeled dextran for 6 hours. After the incubation, the passage of FITC-labeled dextran into the lower chamber of the transwell was measured. The results of cross-match-positive PBMNCs are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects (A). The data from cross-match-negative subjects represent the mean of duplicate determinations of two subjects (B). * $p<0.05$

を初めて示した。

我々の共培養モデルは、培養の開始から血管内皮細胞の透過性亢進が誘導されるまでに6時間を要した。この反応時間は、一般的に TRALI において肺水腫が出

現するといわれている輸血後6時間の範囲内に入っている。しかしながら、多くの TRALI は輸血後2時間以内に発症するという見解もある。in vitro の我々の結果と in vivo の副作用発症時間に乖離が生じることの理由の一つとして、我々の共培養モデルは TRALI の「Two-event model」で提案されている因子を含んでいないことが考えられる。「Two-event model」は TRALI が発症する機序を理解するために提唱されている説である^{31,29}。「Two-event model」の first event は、患者の原疾患に起因して、肺血管内皮細胞が炎症の誘発につながる活性化状態にあり、好中球が肺に集積していることを指す。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、肺血管でプライミングされた状態にある好中球は second event によって活性化される。引き続き活性化好中球が血管内皮細胞の障害及び血管透過性亢進を誘導し、TRALI が発症すると考えられている。好中球は正常状態では HLA Class II 抗原を発現していないため、同抗体は直接好中球を活性化しないと考えられる。しかし、抗 HLA Class II 抗体によって活性化された単球から放出される TNF- α や IL-1 β ^{9,11,12} が好中球を活性化する可能性がある。したがって、抗 HLA Class II 抗体による単球活性化が「Two-event model」の second event になり得ることが示唆される。我々の共培養モデルでは抗 HLA Class II 抗体単独の刺激により、6時間のインキュベーションで血管透過性亢進反応が出現したため、この実験系に血管内皮細胞をプライミングする操作を加え、さらに好中球を添加すると、血管透過性亢進が出現する時間が早まる、あるいは反応が増強されると推測される。

本検討において、我々は PAF レセプターアンタゴニストである CV-3988 を共培養に添加することにより、ほぼ完全に HMVECs 及び HUVECs の透過性亢進が抑制されたことを示した。PAF は様々な炎症反応を引き起こす生理活性脂質であり^{26,30,31}、単球、マクロファージ、顆粒球、肥満細胞及び血管内皮細胞等の種々の細胞の活性化に伴って合成される^{26,28,32~35}。その生理活性は多様で、血小板や白血球に対する活性化作用、及び血管透過性亢進作用を発揮する^{26,36}。急性肺障害の動物モデルにおいては、PAF の投与によって肺の血管透過性亢進による肺水腫が誘導されること^{26,30}、さらに、LPS 投与による急性肺障害の動物モデルでは、CV-3988 を投与することにより、肺水腫の形成が抑制されることが報告されている³¹。従って、我々の結果から、抗 HLA-DR 血漿存在下で交差反応陽性 PBMNCs と血管内皮細胞を共培養することにより、PAF が産生され、血管透過性を亢進させる因子の一つとなっている可能性が考えられる。in vitro の実験は正確に in vivo の TRALI の状況を反映することはできないが、本検討結果から、

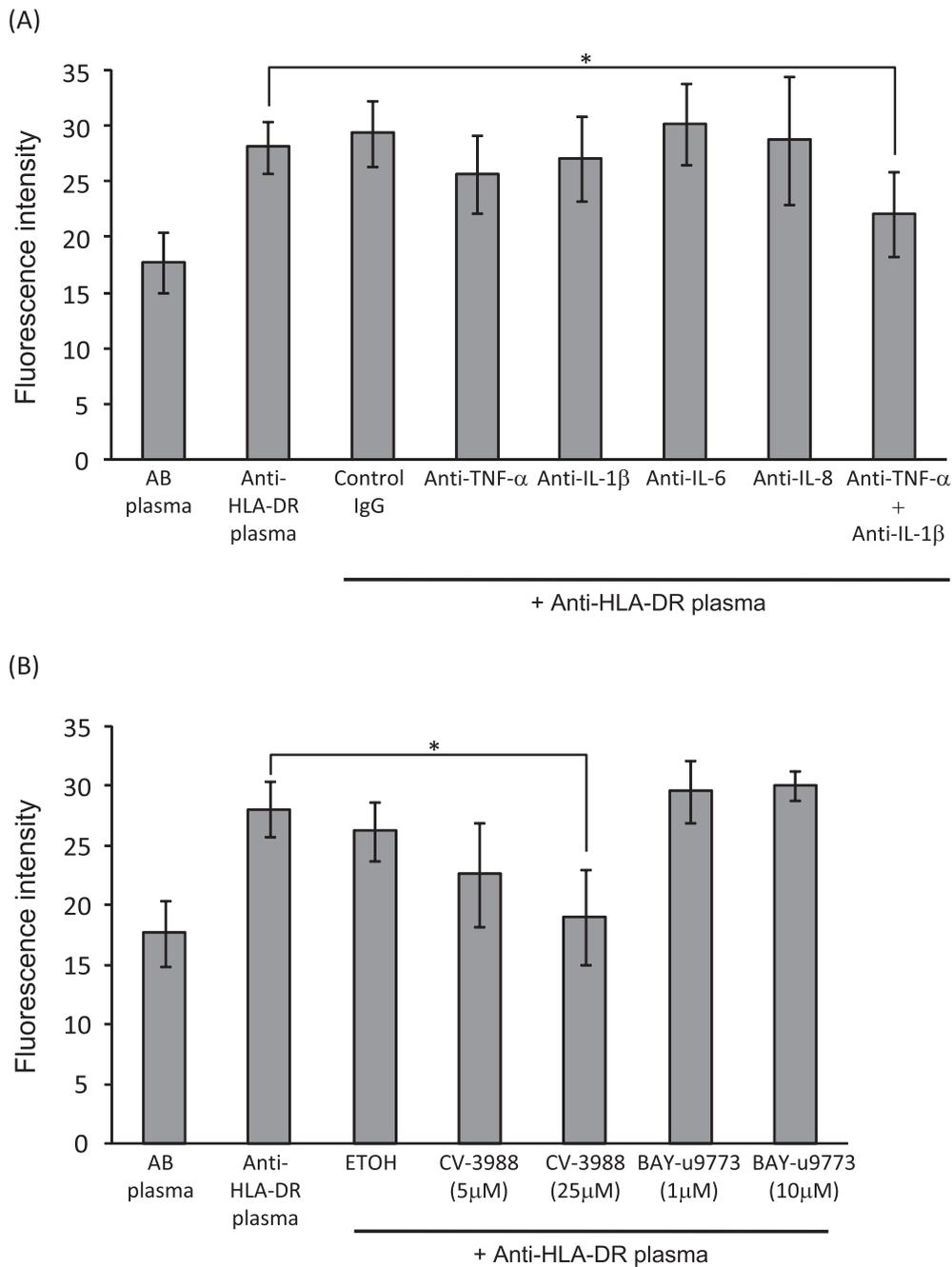


Fig. 5 Effects of neutralizing antibodies to cytokines anti-cytokine neutralizing antibodies and antagonists of PAF or CysLT receptor on the increase in HUVEC permeability.

Anti-cytokine neutralizing antibodies or control antibody (A), and CV-3988, BAY-u9773, or Ethanol (ETOH, a vehicle control) (B) were added to the coculture of HUVECs with cross-match-positive PBMNCs, anti-HLA-DR plasma or AB plasma, and FITC-labeled dextran. After 6 hour incubation, the passage of FITC-labeled dextran into the lower chamber of the transwell was measured. The results are expressed as mean \pm SD of duplicate determinations of three subjects. * $p < 0.05$

抗 HLA Class II 抗体が原因となって誘導される TRALI に PAF が関与している可能性が示唆される。しかしながら、PAF の関与を裏付けるには我々の検討には以下に記す限界があった。一つは、共培養における PAF の産生の検出を市販の ELISA kit にて試みたが、検出

できなかったことである。PAF は半減期が短いため検出が難しい分子とされており³⁷⁾³⁸⁾、我々の実験系における PAF の測定方法を改善する必要があると考えられた。二つめは、in vitro で PAF を HMVECs に添加し、外因性 PAF の血管透過性亢進作用及び、この反応に対

する CV-3988 の競合作用の測定を試みたが、外因性 PAF による HMVECs の透過性亢進及び CV-3988 の競合作用のいずれも検出できなかったことである。従って、今後、TRALI 発症における PAF の役割を明らかにするため、さらなる検討が必要である。

本検討において、抗 TNF- α 中和抗体または TNF- α 及び IL-1 β の中和抗体の両方を同時に共培養に添加することにより、HMVECs または HUVECs の血管透過性亢進が、それぞれ部分的に抑制されたことを示した。共培養において、TNF- α または IL-1 β が産生され、血管透過性亢進の誘導に関与していることが示唆されるが、これらのサイトカインは共培養においては、中心的なメディエーターとは考えにくい。以前に我々が報告した結果は、本結果とは異なり、抗 HLA Class II 抗体によって活性化された PBMNCs の上清中に放出された TNF- α と IL-1 β の作用により HMVECs または HUVECs の透過性亢進が誘導された¹⁴⁾。我々の今回の結果と、前回の結果において、血管透過性亢進に対する TNF- α と IL-1 β の関与の程度が異なるのは、下記に記す実験条件の違いが一因となっていると考えられる。前回の検討では、予め、血管内皮細胞非存在下で PBMNCs に抗 HLA Class II 抗体陽性血漿を作用させて反応上清を採取し、この上清を血管内皮細胞に添加して6時間後に透過性亢進を検出した。透過性亢進作用を有する反応上清を得るには HMVECs の場合に20時間、HUVECs の場合には3時間を要した。このことから、前回の検討では、抗 HLA Class II 抗体陽性血漿と PBMNCs とのインキュベーションによって産生された TNF- α と IL-1 β の濃度が、これらサイトカインの作用のみで血管透過性亢進を誘導するのに十分な濃度であったのに対し、本検討の6時間の共培養で産生された TNF- α と IL-1 β の濃度は、サイトカイン単独で透過性亢進作用を誘導するには不十分であったと考えられる。もう一つの理由として、本検討の共培養は TNF- α と IL-1 β などの比較的安定したメディエーターに加え、半減期の短い PAF の関与を評価できる実験系であることが考えられる。PAF、TNF- α 及び IL-1 β は急性肺障害の病態を誘導する因子であることが知られている³⁹⁾。本検討において TNF- α 及び IL-1 β の血管透過性亢進反応に対する寄与は部分的であったが、抗 HLA Class II 抗体によって発症する TRALI の病態形成に、これらのサイトカインと PAF が相乗的に働いている可能性が示唆される。

抗 HLA Class II 抗体の TRALI 発症への関与を調べるため、本検討では、TRALI 症例の原因製剤となったドナー由来抗 HLA-DR 血漿を用いた。予備試験において、我々は本検討で使用した抗血漿とは別の、TRALI ではない輸血副作用症例由来の抗 HLA Class II 抗体陽

性血漿⁴⁰⁾存在下にて PBMNCs と HUVECs を共培養することによっても抗体の特異性 (DR13) に依存して HUVECs の透過性が亢進することを見出している(データ示さず)。この結果は、本検討でみられた血管透過性亢進が、TRALI 症例由来の抗 HLA Class II 抗体だけに限定される作用ではないことを示している。また、本検討では、HMVECs だけでなく、HUVECs の透過性亢進も誘導されたことから、抗 HLA Class II 抗体による単球の活性化は、TRALI における肺水腫だけでなく、発疹、蕁麻疹及び血管浮腫などの非溶血性輸血副作用で頻繁にみられる症状にも関与する可能性が示唆される。TRALI 症例由来と他の輸血副作用由来の抗 HLA Class II 抗体との性質の違いは、現時点では不明である。どのような抗 HLA Class II 抗体が TRALI を発症させるのかを解明するためには、今後、TRALI 症例、他の輸血副作用症例、経産婦由来の抗 HLA Class II 抗体の性質の解析が必要である。

おわりに

TRALI 症例の抗 HLA-DR 血漿存在下にて PBMNCs と HMVECs または HUVECs を共培養することにより、抗体の特異性に依存して、血管透過性亢進反応が誘導された。共培養において、PAF、TNF- α 、あるいは IL-1 β が産生され、これらのメディエーターが血管透過性亢進を誘導していると考えられる。我々の結果は抗 HLA Class II 抗体による標的細胞の活性化と TRALI 発症との関連性を裏付けるものであると考えられる。

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) Bux J, Sachs UH: The pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI). *Br J Haematol*, 136: 788—799, 2007.
- 3) Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK: Transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 105: 2266—2273, 2005.
- 4) Kopko PM, Popovsky MA, MacKenzie MR, et al: HLA Class II antibodies in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion*, 41: 1244—1248, 2001.
- 5) Flesch BK, Neppert J: Transfusion-related acute lung injury caused by human leucocyte antigen Class II antibody. *Br J Haematol*, 116: 673—676, 2002.

- 6) 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.
- 7) Wallis JP, Lubenko A, Wells AW, et al: Single hospital experience of TRALI. *Transfusion*, 43: 1053—1059, 2003.
- 8) 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.
- 9) 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.
- 10) 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.
- 11) 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.
- 12) 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.
- 13) Fujihara M, Wakamoto S, Azuma H, et al: Involvement of human leukocyte antigen Class II antibody in pathogenesis of transfusion-related acute lung injury (TRALI): vascular permeability enhancement. *Vascular Disease Prevention*, 6: 170—177, 2009.
- 14) Wakamoto S, Fujihara M, Sakagawa H, et al: Endothelial permeability is increased by the supernatant of peripheral blood mononuclear cells stimulated with HLA Class II antibody. *Transfusion*, 48: 2060—2068, 2008.
- 15) Shigematsu A, Yonezumi M, Imai K, et al: Transfusion-related acute lung injury caused by anti-HLA antibody in a patient with myelodysplastic syndrome and gastric cancer. *J Jpn Transfus Med*, 50: 720—725, 2004.
- 16) Moses LA, Stroncek DF, Cipolone KM, et al: Detection of HLA antibodies by using flow cytometry and latex beads coated with HLA antigens. *Transfusion*, 40: 861—866, 2000.
- 17) Shibata Y, Juji T, Nishizawa Y, et al: Detection of platelet antibodies by a newly developed mixed agglutination with platelets. *Vox Sang*, 41: 25—31, 1981.
- 18) Nishimura M, Mitsunaga S, Juji T: Frozen-stored granulocytes can be used for an immunofluorescence test to detect granulocyte antibodies. *Transfusion*, 41: 1268—1272, 2001.
- 19) Seynhaeve AL, Vermeulen CE, Eggermont AM, et al: Cytokines and vascular permeability: an in vitro study on human endothelial cells in relation to tumor necrosis factor-alpha-primed peripheral blood mononuclear cells. *Cell Biochem Biophys*, 44: 157—169, 2006.
- 20) Terashita Z, Tsushima S, Yoshioka Y, et al: CV-3988—a specific antagonist of platelet activating factor (PAF). *Life Sci*, 32: 1975—1982, 1983.
- 21) Terashita Z, Imura Y, Nishikawa K: Inhibition by CV-3988 of the binding of [³H]-platelet activating factor (PAF) to the platelet. *Biochem Pharmacol*, 34: 1491—1495, 1985.
- 22) Bossi F, Fischetti F, Pellis V, et al: Platelet-activating factor and kinin-dependent vascular leakage as a novel functional activity of the soluble terminal complement complex. *J Immunol*, 173: 6921—6927, 2004.
- 23) Nothacker HP, Wang Z, Zhu Y, et al: Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol*, 58: 1601—1608, 2000.
- 24) Sjöström M, Johansson AS, Schröder O, et al: Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 23: e37—41, 2003.
- 25) Miotla JM, Jeffery PK, Hellewell PG: Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 18: 197—204, 1998.
- 26) Montrucchio G, Alloatti G, Camussi G: Role of platelet-activating factor in cardiovascular pathophysiology. *Physiol Rev*, 80: 1669—1699, 2000.
- 27) Henderson WR Jr: The role of leukotrienes in inflammation. *Ann Intern Med*, 121: 684—697, 1994.
- 28) Valone FH, Epstein LB: Biphasic platelet-activating factor synthesis by human monocytes stimulated with IL-1 β , tumor necrosis factor, or IFN- γ . *J Immunol*, 141: 3945—3950, 1988.
- 29) Fung YL, Silliman CC: The role of neutrophils in the pathogenesis of transfusion-related acute lung injury. *Transfus Med Rev*, 23: 266—283, 2009.

- 30) Clavijo LC, Carter MB, Matheson PJ, et al: PAF increases vascular permeability without increasing pulmonary arterial pressure in the rat. *J Appl Physiol*, 90: 261—268, 2001.
- 31) Chang SW, Feddersen CO, Henson PM, et al: Platelet-activating factor mediates hemodynamic changes and lung injury in endotoxin-treated rats. *J Clin Invest*, 79: 1498—1509, 1987.
- 32) Sisson JH, Prescott SM, McIntyre TM, et al: Production of platelet-activating factor by stimulated human polymorphonuclear leukocytes. Correlation of synthesis with release, functional events, and leukotriene B₄ metabolism. *J Immunol*, 138: 3918—3926, 1987.
- 33) Schleimer RP, MacGlashan DW Jr, Peters SP, et al: Characterization of inflammatory mediator release from purified human lung mast cells. *Am Rev Respir Dis*, 133: 614—617, 1986.
- 34) Bussolino F, Camussi G, Baglioni C: Synthesis and release of platelet-activating factor by human vascular endothelial cells treated with tumor necrosis factor or interleukin 1 α . *J Biol Chem*, 263: 11856—11861, 1988.
- 35) Bussolino F, Camussi G: Platelet-activating factor produced by endothelial cells. A molecule with autocrine and paracrine properties. *Eur J Biochem*, 229: 327—337, 1995.
- 36) Poubelle PE, Gingras D, Demers C, et al: Platelet-activating factor (PAF-acether) enhances the concomitant production of tumor necrosis factor- α and interleukin-1 by subsets of human monocytes. *Immunology*, 72: 181—187, 1991.
- 37) Venable ME, Zimmerman GA, McIntyre TM, et al: Platelet-activating factor: a phospholipid autacoid with diverse actions. *J Lipid Res*, 34: 691—702, 1993.
- 38) Imaizumi TA, Stafforini DM, Yamada Y, et al: Platelet-activating factor: a mediator for clinicians. *J Intern Med*, 238: 5—20, 1995.
- 39) Bhatia M, Moochhala S: Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*, 202: 145—156, 2004.

ENHANCEMENT OF ENDOTHELIAL PERMEABILITY BY COCULTURE WITH PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS IN THE PRESENCE OF HLA CLASS II ANTIBODY THAT WAS ASSOCIATED WITH TRALI

*Shinobu Wakamoto*¹⁾, *Mitsuhiro Fujihara*¹⁾, *Daisuke Takahashi*¹⁾, *Koichi Niwa*²⁾, *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

Keywords:

HLA Class II antibody, TRALI, monocyte activation, increase in endothelial cell permeability

©2011 The Japan Society of Transfusion Medicine and Cell Therapy

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