

アナフィラキシーを発症した骨髄移植患者血液と当該血小板残余試料を用いた好塩基球活性化試験および受身好塩基球活性化試験の継時的検討

式 (岡村) 郁恵¹⁾ 松山 宣樹²⁾ 保井 一太²⁾ 平山 文也²⁾ 池田 宇次¹⁾

好塩基球活性化試験 (BAT) は特異的 IgE (sIgE) 依存性アレルギーの診断目的で確立され、近年アレルギー性輸血副作用 (ATR) 検査に利用されている。さらに骨髄抑制期の患者のための検査法として受身 BAT (pi-BAT) も検討されている。

我々は、骨髄移植 (BMT) 後の血小板輸血で重篤な ATR を発症した患者を経験した。同患者検体と当該製剤残余を用いた BAT 及び pi-BAT はいずれも陽性を示した。さらに、本研究では BMT 前後 2 年間の患者血漿と全血を用いて sIgE の由来解明を試みた。BAT は、BMT 後 34 日と 106 日は陽性、573 日は陰性だった。pi-BAT は、BMT の 146 日前は陰性、BMT の 34 日後は陽性で、106 日後と 573 日後は陰性だった。

本事例の結果として、ATR に関与した sIgE の由来は、BMT 後にドナー由来の造血幹細胞が分化し、sIgE が産生された可能性が示唆されるが、BAT と pi-BAT の結果の不一致から、骨髄移植時に輸注されたドナー由来細胞が一時的に sIgE を産生した可能性も否定できない。

キーワード：アレルギー性輸血副作用、好塩基球活性化試験、受身好塩基球活性化試験、骨髄移植、血小板輸血

はじめに

アレルギー性輸血副作用 (ATR) の発症数は輸血副作用の中で最も多い^{1)~3)}。大半は蕁麻疹などの皮膚症状だが、一部は重篤なアナフィラキシーに至り、命に関わることもある⁴⁾⁵⁾。しかし、発症機序については研究が進んでおらず、多くは不明である。近年、即時型アレルギー反応に重要な役割を果たす好塩基球活性化を直接定量する好塩基球活性化試験 (BAT) が、副作用検査として利用されている^{5)~12)}。また、IgE 経路を介するシグナルを特異的に阻害する薬剤 (ダサチニブ) で処理した好塩基球を BAT に使用することにより、ATR がアレルゲン/IgE 依存的経路を介するか否かの判別も可能である⁹⁾¹³⁾。さらに、健常人好塩基球上の IgE を患者 IgE に置換した“擬似好塩基球”による受身 BAT (pi-BAT) も開発され¹¹⁾、BAT 検査に必要な好塩基球数が得られない骨髄抑制患者などの ATR 検査への利用が進められている。

これまでに、非血縁者間骨髄移植 (BMT) 後 19 日目に血小板製剤 (PC) 輸血直後にアナフィラキシーを発症した症例を BAT、pi-BAT で検査し、輸血と副作用との因果関係を証明している¹⁰⁾¹¹⁾。本研究では、BMT

前後 2 年間の患者血漿と全血を BAT、pi-BAT で経時的に解析し、ATR 発症の原因となった特異的 IgE (sIgE) の由来解明を試みたので報告する。

症 例

53 歳男性でアレルギー歴はない。急性リンパ性白血病の第一寛解期に HLA 一抗原不一致非血縁ドナーから BMT を行った。血液型一致で、骨髄輸注時に細胞処理は行っていない。BMT 実施後 19 日目に血小板減少に対して輸血を行った際、輸血開始 30 分で全身の蕁麻疹、顔面浮腫、低酸素血症を呈するアナフィラキシーを発症した。それまでに 20 回以上 PC 輸血を行い、前投薬なしで副作用は見られなかった。当該 ATR 発症以降は、洗浄 PC を自施設で調剤し、抗ヒスタミン薬と副腎皮質ステロイドを前投薬して輸血を行い、以降の ATR は認めなかった。また、移植片の着生は順調で、BMT 後 1、3、6 カ月、1、2 年目の骨髄は完全ドナー型で、BMT 後 1 カ月、1 年目の末梢血 CD3 陽性細胞キメリズムも完全ドナー型だった。再発はなく、慢性 GVHD は軽度の口腔粘膜炎のみであった。ATR 発症前後の臨床経過を Fig. 1 に示す。

1) 静岡県立静岡がんセンター血液・幹細胞移植科

2) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

第 65 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

〔受付日：2018 年 2 月 14 日、受理日：2018 年 6 月 5 日〕

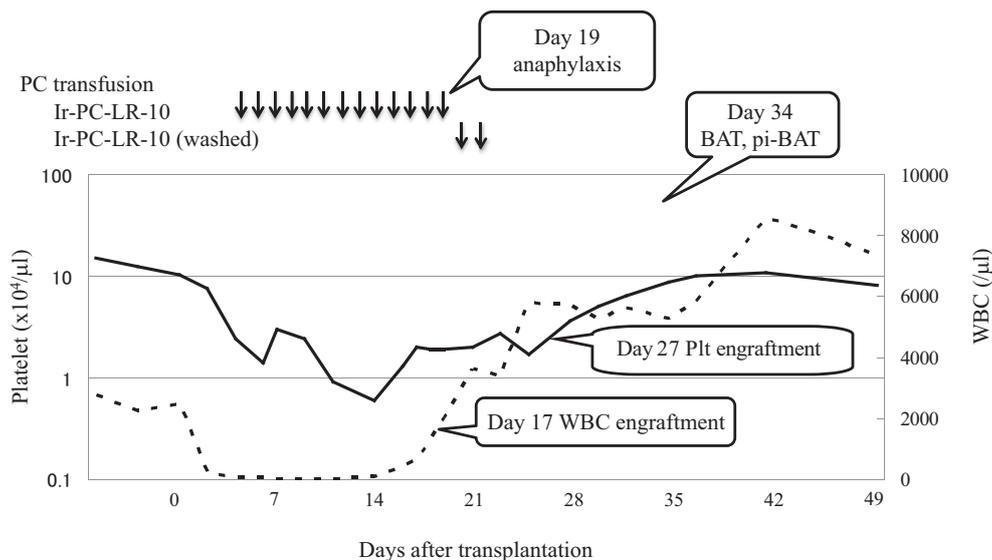


Fig. 1 Clinical course

BAT: basophil activation test; Ir-PC-LR-10: 10 units of Irradiated Platelet Concentrate, Leukocytes Reduced, NISSEKI®; PC: platelet concentrate; pi-BAT: passive immune basophil activation test; Plt: platelet; Plt engraftment: platelets $>20 \times 10^4/\mu\text{l}$ without transfusion; WBC: white blood cell; WBC engraftment: the first of three days with neutrophil count $500/\mu\text{l}$

検査方法および試薬

本研究は、日本赤十字社倫理審査委員会の承認を得て実施した。

1. ATR 原因血小板製剤

血小板製剤は日本赤十字社血液センターから供給されたもので、シングルドナー由来、白血球除去と照射が行われている。ATR 原因製剤残余は、発症後すみやかに $3,000 \times \text{g}$, 30 分間で遠心分離し、上清を -40°C で保存した。このように調整保存した ATR 原因製剤残余上清を PC-SN とする。

2. 患者全血

患者全血は EDTA 採血したものを、冷蔵で近畿ブロック血液センターへ配送し、翌日 BAT 検査を行った。検体は BMT 後 34, 106, 573 日の 3 回採取した。また、同全血を $3,000 \times \text{g}$, 10 分間で遠心分離し、回収した患者血漿を pi-BAT 検査に使用した。pi-BAT は前述の 3 時点に加え、BMT 前 146 日の保存血漿（輸血後感染症検査目的で保管し廃棄予定のもの）を患者の承諾を得て使用し、合計 4 ポイントで解析した。

3. 試薬

マウス由来抗ヒト IgE モノクローナル抗体 (MoAb), FITC 標識マウス抗 HLA-DR MoAb, PE 標識マウス抗 CD203c MoAb はベックマンコールター社から購入した。PE-Cy5 標識マウス抗 CD123 MoAb, FACS Lysing Solution は BD バイオサイエンス社のものを使用した。ダサチニブはトロントリサーケミカルズ社, Dimethyl sulphoxide (以下 DMSO) はサーモフィッシュサイ

エンティフィック社のものをそれぞれ使用した。

4. BAT および pi-BAT

BAT⁹⁾¹⁰⁾ および pi-BAT¹¹⁾ は既報に従いクロスマッチ反応を実施した。クロスマッチ反応終了後の好塩基球 (擬似好塩基球) を FITC-anti-HLA-DR MoAb, PE-anti-CD203c MoAb および PE-Cy5-anti-CD123 MoAb で染色し (4°C , 15 分間), PBS/BSA/EDTA にて洗浄後, BD FACS Lysing Solution で溶血させ, FACSCant2 (Becton Dickinson 社) で測定した。好塩基球は、リンパ球分画中の CD123⁺, HLA-DR⁻ の細胞をゲートし、その活性化は CD203c の発現上昇を指標とした。pi-BAT の活性化は、無刺激擬似好塩基球の CD203c 発現の 95% をカバーする領域にゲートを設け、それを超えるものを活性化細胞とした。また、BAT 及び pi-BAT 共に、これまでの経験から、好塩基球のうち活性化細胞が 20% を超えるものを陽性と定義した。

結 果

1. 血清トリプターゼ値、血漿タンパク質欠損、抗血漿タンパク質抗体

血清トリプターゼ値上昇、血漿タンパク質欠損の確認、抗血漿タンパク質抗体の確認のため、ATR 発症約 1 時間後に患者全血を採取した。患者血清のトリプターゼ値は 6.1mg/l (基準値 $<9.0 \text{mg/l}$) と上昇は認めなかった。また、患者は血漿タンパク質 (IgA, ハプトグロビン (Hp), 補体 C4, $\alpha 2$ -マクログロブリン, セルロプラスミン) を欠損しておらず、患者血漿中からは血漿タ

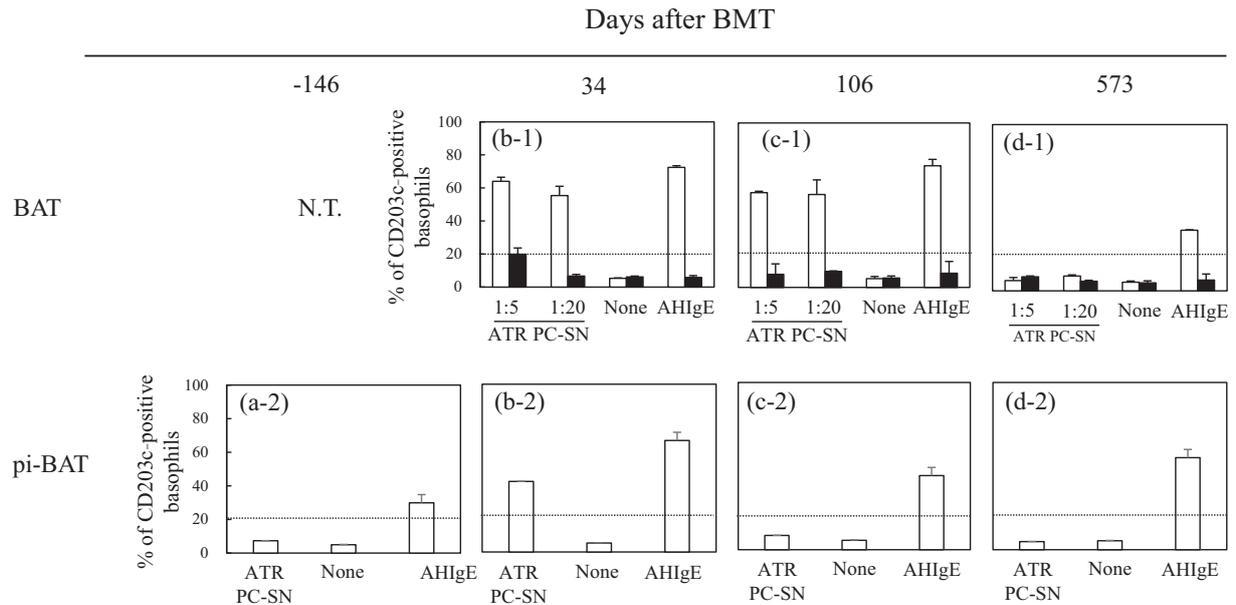


Fig. 2 Activation of basophils or quasi-basophils using the supernatants of platelet concentrates (PC-SN) from the patient. The basophil activation test (BAT) was not conducted (not tested, N.T.) 146 days before bone marrow transplantation (BMT) because the patient's whole blood (WB) was not available. WB from the patient was pre-incubated in the absence (white columns) or presence (black columns) of dasatinib and was subsequently incubated with ATR PC-SN at dilution ratios of 1:5 or 1:20. WB samples were then stained with anti-HLA-DR, anti-CD123, and anti-CD203c monoclonal antibodies (mAb). HLA-DR-negative CD123-positive cells in the Forward Scatter vs. Side Scatter lymphoid cell window were identified as basophils, and CD203c expression was determined. When the percentage of CD203c-positive basophils exceeded 20% (dashed line), the PC-SN was categorized as BAT positive. Anti-human IgE mAb (AHlgE) was used as a positive control, the stimulation ability of which is inhibited by dasatinib. (b-1) ATR PC-SN activated the patient's basophils 34 days after BMT, and the activation was inhibited by dasatinib. (c-1) ATR PC-SN activated the patient's basophils 106 days after BMT, and the activation was inhibited by dasatinib. (d-1) ATR PC-SN did not activate the patient's basophils 573 days after BMT. In passive immune BAT (pi-BAT), lactic acid-treated basophils were resuspended in the patient's plasma. ATR PC-SN or AHlgE stimulated quasi-basophils. (a-2) ATR PC-SN did not stimulate quasi-basophils 146 days before BMT. (b-2) ATR PC-SN stimulated quasi-basophils 34 days after BMT but not 106 days after BMT (c-2), or 573 days after BMT (d-2). Duplicates were performed for all combinations described.

ンパク質 (IgA, Hp, 補体 C4, C9, α 2-マクログロブリン, セルロプラスミン, HLA class I, HLA class II, ヒト血小板抗原) に対する抗体も検出されなかった。ラテックスアレルギーや薬剤に対するアレルギーも認めなかった。

2. BAT

患者好塩基球の回復を待って, BMT 後 34 日目 (ATR 発症後 15 日目) に 1 回目の BAT を実施した¹⁰⁾。当該 PC-SN は患者全血中の好塩基球を活性化した (Fig. 2 (b-1))。この活性化は, ダサチニブの存在下で抑制された¹⁰⁾。本研究では, BMT 後 106 日目でも同様に患者好塩基球の活性化が観察された (Fig. 2 (c-1))。一方, BMT 後 573 日目の患者全血では, 当該 PC-SN による好塩基球活性化は認められなかった (Fig. 2 (d-1))。

3. pi-BAT

BMT 前 146 日目の保存血漿を用いた pi-BAT は陰性を示した (Fig. 2 (a-2))。一方, BMT 後 34 日目の pi-BAT では陽性を示した (Fig. 2 (b-2))¹¹⁾が, 本研究で検討した BMT 後 106 日目 (Fig. 2 (c-2)) と 573 日目

(Fig. 2 (d-2)) ではいずれも陰性であった。これら BAT と pi-BAT の結果を経時的にまとめたものを Table 1 に示す。

考 察

本事例は, BMT 前の 10 回以上の PC 輸血で ATR はなく, BMT 後に初めて PC 輸血による重篤な ATR を発症したこと, 及び, BMT 後の末梢血 CD3 陽性細胞キメリズムが完全ドナー型であることから, BMT ドナー由来のアレルギーである可能性を考えた。臓器移植を介して, ドナーからレシピエントにアレルギーが移行する現象は複数報告されているが, レシピエントのアレルギー反応がドナー由来細胞により惹起されたことの証明は難しい¹⁴⁾。それを検証した数少ない報告として以下の 2 つがある。アレルギーを有する同胞ドナーからの BMT 後にピーナッツアレルギーを発症した事例では, 発症時期と両者がピーナッツ抗原に対して高度に特異的な IgE を有することから, BMT を介してドナー由来アレルギー特異的リンパ球がレシピエント

Table 1 Kinetics of basophil reactivity following activation by residual transfused PC-SN before and after the BMT

	Days before or after the BMT (Days before or after the ATR)						
	-146 (-165)	0 (-19)	1 to 18* (-18 to -1)	19# (ATR day 0)	34 (15)	106 (87)	573 (554)
BAT	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.	Positive	Positive	Negative
pi-BAT	Negative	n.t.	n.t.	n.t.	Positive	Negative	Negative

* Eighteen units of PCs were transfused between day 1 and day 18 after the BMT.

Occurrence of ATR

PC-SN: supernatant of the residual platelet concentrates, BMT: bone marrow transplantation, ATR: allergic transfusion reaction, n.t.: not tested, BAT: basophil activation test, pi: passive immune

へ移行したと推察している¹⁵⁾。また、アレルギーを有する同胞ドナーからの BMT 後にキウイアレルギーを発症した事例では、両者の ImmunoCAP Specific IgE 検査、末梢血単核球キメリズム、BAT、T cell proliferation assay を行い、ドナー由来のアレルゲン特異的 T 細胞および B 細胞の関与を示唆している¹⁶⁾。造血幹細胞移植を介してアレルギーが移行する機序は、アレルギーを起こしやすいリンパ系細胞へ分化する傾向を持ったドナー造血前駆細胞の移行や、もしくはドナー由来のアレルゲン特異的成熟 B 細胞や T 細胞の移行が考えられている¹⁴⁾¹⁷⁾。本事例は、骨髄バンクドナーのためドナー検体が得られないこと、また、PC 製剤中の何がアレルゲンとなったか同定できていないという制約があるが、BMT 前後の患者検体を用いて経時的に BAT、pi-BAT を検討することで、ATR 発症の原因となった sIgE の由来解明を試みた。

理論上、本事例の ATR 発症に関与した sIgE の由来は、以下の 4 つが考えられる。(1) BMT 前から患者が保有していた。(2) 骨髄輸注時に sIgE を産生するドナー由来細胞が患者へ輸注され、一時的に sIgE を産生した。(3) ATR 発症前に実施した輸血時 (BMT 後 0~18 日目に PC 10 単位を 12 回実施) に、供血者由来の sIgE が患者へ輸注された。(4) BMT 後にドナー由来の造血幹細胞が分化し、sIgE が産生されるようになった。本報告では、BAT が sIgE の結合した好塩基球 (sIgE 結合好塩基球) を検出する一方、pi-BAT は血漿中の遊離 sIgE を検出するという違いがあることを利用して、上記 4 つの仮説を BAT と pi-BAT の結果 (Table 1) から検証した。

まず、BMT 前の pi-BAT が陰性であることから (1) は否定される。また、血液中の sIgE 結合好塩基球の寿命は 7 週間と報告されており¹⁸⁾、BMT 後 106 日目 (ATR 発症前に最後の輸血を行った日から 12 週間以上経過) でも BAT が陽性であることから (3) も否定的である。一方、仮説 (2) および (4) の可能性を除外することはできない。仮説 (2) では遊離の IgE 抗体の半減期が

1~2 日であるのに対して、好塩基球 (前駆細胞も含む) に結合した IgE 抗体の寿命は 7 週間と長いことから¹⁸⁾、遊離 IgE 抗体と好塩基球結合 IgE 抗体との分解速度の差が、pi-BAT (遊離 IgE 抗体の特異性に依存) と BAT (結合 IgE 抗体の特異性に依存) の BMT day106 の結果不一致の一因と考えられる。さらに、IgE 抗体を長期間 (1 年以上) 産生し続ける形質細胞はほとんど存在しないこと¹⁹⁾ から仮説 (2) を否定することは難しい。また、仮説 (4) では、BMT 後にドナー由来造血幹細胞が IgE 抗体産生細胞に分化し、輸血等の感作により sIgE を産生したが、時間経過とともにその産生が減弱したと考えられる。

通常の PC 輸血後の ATR 発症機序としては、当該 PC 輸血以前に輸血された血液製剤によって患者免疫細胞が感作され⁴⁾、sIgE が産生され、それらが好塩基球/肥満細胞表面に結合することで発症すると推定されることから、仮説 (4) の機序が有力である。しかし、本事例は BMT 後に ATR を発症しており、仮説 (2) および (4) の判別は難しい。仮に、ATR を発症した時点でドナー末梢血を入手できていれば、当該 PC との BAT を実施することで仮説 (2) の可能性を検証できたかもしれない。

結 語

BAT および pi-BAT は ATR の機序解明に有用である可能性を示した。今後、ATR 臨床症例をこれら検査法で解析し、アレルゲンの同定やドナーのアレルギー評価を行うことが望まれる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Heddle NM, Blajchman MA, Meyer RM, et al: A randomized controlled trial comparing the frequency of acute reactions to plasma-removed platelets and prestorage WBC-reduced platelets. *Transfusion*, 42: 556-566, 2002.

- 2) Savage WJ, Tobian AA, Fuller AK, et al: Allergic transfusion reactions to platelets are associated more with recipient and donor factors than with product attributes. *Transfusion*, 51: 1716—1722, 2011.
- 3) Kato H, Uruma M, Okuyama Y, et al: Incidence of transfusion-related adverse reactions per patient reflects the potential risk of transfusion therapy in Japan. *American journal of clinical pathology*, 140: 219—224, 2013.
- 4) Savage WJ, Tobian AA, Savage JH, et al: Scratching the surface of allergic transfusion reactions. *Transfusion*, 53: 1361—1371, 2013.
- 5) Hirayama F: Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *British journal of haematology*, 160: 434—444, 2013.
- 6) Nubret K, Delhoume M, Orsel I, et al: Anaphylactic shock to fresh-frozen plasma inactivated with methylene blue. *Transfusion*, 51: 125—128, 2011.
- 7) Dewachter P, Castro S, Nicaise-Roland P, et al: Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *British journal of anaesthesia*, 106: 687—689, 2011.
- 8) Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, et al: Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. *Pediatric blood & cancer*, 61: 1160—1161, 2014.
- 9) Matsuyama N, Yasui K, Amakishi E, et al: The IgE-dependent pathway in allergic transfusion reactions: involvement of donor blood allergens other than plasma proteins. *International journal of hematology*, 102: 93—100, 2015.
- 10) Okamura I, Matsuyama N, Yasui K, et al: Clinical utility of the basophil activation test for analysis of allergic transfusion reactions: a pilot study. *Vox sanguinis*, 112: 114—121, 2017.
- 11) Yasui K, Matsuyama N, Okamura-Shiki I, et al: Clinical utility of a passive immune basophil activation test for the analysis of allergic transfusion reactions. *Transfusion*, 57: 2084—2095, 2017.
- 12) Hirayama F, Yasui K, Matsuyama N, et al: Possible Utility of the Basophil Activation Test for the Analysis of Mechanisms Involved in Allergic Transfusion Reactions. *Transfusion medicine reviews*, 32: 43—51, 2018.
- 13) Kneidinger M, Schmidt U, Rix U, et al: The effects of dasatinib on IgE receptor-dependent activation and histamine release in human basophils. *Blood*, 111: 3097—3107, 2008.
- 14) Khan F, Hallstrand TS, Geddes MN, et al: Is allergic disease curable or transferable with allogeneic hematopoietic cell transplantation? *Blood*, 113: 279—290, 2009.
- 15) Ip W, Cale C, Veys P, et al: Peanut allergy transferred by BMT. *Bone marrow transplantation*, 49: 993—994, 2014.
- 16) Garzorz N, Thomas J, Eberlein B, et al: Newly acquired kiwi fruit allergy after bone marrow transplantation from a kiwi-allergic donor. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology*. *JEADV*, 30: 1136—1139, 2016.
- 17) Shalit M, Amar A, Or R: Allergy development after bone marrow transplantation from a non-atopic donor. *Clinical and experimental allergy: journal of the British Society for Allergy and Clinical Immunology*, 32: 1699—1701, 2002.
- 18) Johansson SG, Nopp A, van Hage M, et al: Passive IgE-sensitization by blood transfusion. *Allergy*, 60: 1192—1199, 2005.
- 19) Haniuda K, Fukao S, Kodama T, et al: Autonomous membrane IgE signaling prevents IgE-memory formation. *Nature immunology*, 17: 1109—1117, 2016.

SEQUENTIAL ANALYSIS OF THE BASOPHIL ACTIVATION TEST AND PASSIVE IMMUNE BASOPHIL ACTIVATION TEST IN A PATIENT WITH TRANSFUSION-RELATED ANAPHYLAXIS FOLLOWING ALLOGENEIC BONE MARROW TRANSPLANTATION

Ikue Okamura-Shiki¹⁾, Nobuki Matsuyama²⁾, Kazuta Yasui²⁾, Fumiya Hirayama²⁾ and Takashi Ikeda¹⁾

¹⁾Division of Hematology and Stem Cell Transplantation, Shizuoka Cancer Center

²⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

Abstract:

The basophil activation test (BAT) was developed for the diagnosis of specific immunoglobulin E (sIgE)-dependent allergy, and was recently used to analyze allergic transfusion reactions (ATRs). Subsequently, passive immune BAT (pi-BAT) was developed for patients under myelosuppression.

We recently encountered a serious platelet transfusion-induced ATR case after bone marrow transplantation (BMT). We performed BAT and pi-BAT on the patient and residual blood products and found that both test results were positive. In this study, we attempted to elucidate the source of the sIgE using the patient's plasma and whole blood obtained during the 2-year period encompassing the entire BMT course. BAT was positive on days 34 and 106 but negative on day 573 after BMT. pi-BAT was negative 146 days before BMT, but was positive on day 34 and negative on days 106 and 573 after BMT.

In conclusion, to explain the origin of sIgE, which is responsible for ATR, studies have suggested that sIgE-producing cells may be differentiated from transplanted hematopoietic progenitor cells. However, our findings suggest that the discrepancy between BAT and pi-BAT results may indicate that sIgE-producing cells are infused along with bone marrow infusion.

Keywords:

Allergic transfusion reaction, basophil activation test, passive immune basophil activation test, bone marrow transplantation, transfusion of platelet concentrates