

アレルギー性副作用の発症機序解析法としての好塩基球活性化試験の有用性

平山 文也¹⁾ 保井 一太¹⁾ 松山 宣樹¹⁾ 式 (岡村) 郁恵²⁾

アレルギー性副作用 (ATR) は輸血副作用の中で最も多く発生する。大部分は軽度の皮膚症状などを含む穏やかなものであるが、一部は生命を脅かすアナフィラキシーのような症状が起こる場合もある。ATR の発症メカニズムについては、その研究が進んでいないため、多くは不明である。その一因として、ATR の発症過程を解析する検査法の不在が挙げられる。好塩基球や肥満細胞は、即時型アレルギー反応発症において重要な役割をする細胞である。これらは膜結合型の高親和性 IgE 受容体を発現し、同レセプター上の IgE にアレルゲンが結合すること、もしくはアレルゲンによる直接刺激 (高親和性 IgE 受容体を介さない) によって脱顆粒する独特の性状を有する。肥満細胞が組織に存在するのに対して、好塩基球は末梢血中に存在するため、アレルギーの臨床検査に使用するには好塩基球が有用である。実際、好塩基球を用いた好塩基球活性化試験 (BAT) が、食物、吸入物質、薬剤、(ヘビや蜂などが分泌する) 毒液に対するアレルギー反応を診断する簡易な血液検査として展開されており、10 年前からは、輸血医療にも適用されている。これまでの 5 件の先行研究で 13 症例の ATR について BAT が実施され、好塩基球が原因製剤上清添加によって活性化し、すなわち、ATR と輸血との因果関係が示唆される結果が報告されている。この総説では、ATR の原因調査を実施するリファレンスラボラトリーでの BAT の有用性について解説する。併せて、BAT の弱点、盲点、未解決問題についても解説する。

キーワード：輸血、アレルギー反応、好塩基球活性化試験 (BAT)、アレルゲン、ダサチニブ

本論文内容は、Elsevier 社の許可のもと Transfusion Medicine Reviews 誌 (2018, 32 (1) p43-51) に最初に掲載された論文に基づき作成したものである。(Possible utility of the basophil activation test for the analysis of mechanisms involved in allergic transfusion reactions)

緒言

好塩基球および肥満細胞は、即時型アレルギー反応に重要な役割を果たす細胞である。これらは膜結合型の高親和性 IgE 受容体を発現し、同レセプターに結合している IgE に、さらにアレルゲンが結合することにより脱顆粒する独特の性状を有する。肥満細胞が組織に存在するのに対して、好塩基球は末梢血中に存在する。このため、アレルギーの臨床検査に使用するには好塩基球が有用である。実際、好塩基球を用いた好塩基球活性化試験 (BAT) が、食物、吸入物質、薬剤、(ヘビや蜂などが分泌する) 毒液に対するアレルギー反応を診断する簡易な血液検査として展開されてきている^{1)~3)}。少量の患者血液と被疑アレルゲンを反応させると、抗原に感作された患者好塩基球は活性化し、脱顆粒によって種々の化学伝達物質を放出する。この脱顆粒プロセスにおいて、好塩基球活性化マーカー (CD63 および CD203c) の細胞表面での発現も上昇する。BAT

では、これら活性化マーカーの発現上昇を指標にして、好塩基球の活性化を識別する。

アレルギー性副作用 (ATR) は輸血副作用の中で、とりわけ血小板製剤 (PC) において、最も多く発生する。PC 輸血における ATR の発症頻度は 1%~4% である^{4)~6)}。しかし、ATR の発症メカニズムについては、詳細な研究がされていないため、多くは不明である^{7)~17)}。その一因として、ATR の発症過程を解析する検査法の不在が挙げられる。ATR の原因調査にトリプターゼ試験が使用されているが、多くの場合、同試験では、ATR と輸血との因果関係を確認できないため^{18)~20)}、ATR の発症機序の解明には不向きである。これらの問題を克服するため、最近の輸血医療では好塩基球の活性化を直接定量する BAT が利用されている^{7)17)21)~27)}。先行研究では、BAT が輸血と ATR との因果関係の解明とともに、ATR の発症メカニズムの解析にも有用であることが示唆されている。大部分の軽症の ATR について

1) 日本赤十字社近畿ブロック血液センター

2) 静岡県立静岡がんセンター血液・幹細胞移植科

〔受付日：2018 年 1 月 18 日、受理日：2018 年 2 月 26 日〕

は、輸血との因果関係の解明および発症メカニズムの解析に臨床的重要性はほとんどない。しかし、重篤な ATR をすでに発症した患者がその後更なる輸血が必要となった場合、将来の輸血における ATR の潜在的危険性の評価は重要である。BAT は次の輸血において何をすべきかのヒントを提供することができる。BAT 実施施設としては、重篤な ATR の発症頻度が低いこと、実施するために必要な機材と技術力を合わせて考えると、血液センターもしくはリファレンスラボラトリーが妥当と考えられる。この総説では、先行研究の詳細および ATR 解析のための BAT の潜在的有用性について解説する。

アレルギー疾患における BAT

患者 IgE 抗体のアレルゲン特異性検査はアレルギー疾患の診断には有用であるが、患者 IgE 抗体の特異性と合致する当該アレルゲンに曝された場合において、同 IgE 抗体を有する患者が常に発症するわけではない。患者が曝されるアレルゲン量によってその発症経路 (IgE 依存的もしくは非依存的) が影響され、また、当該アレルゲンに対する IgG 抗体の存在とその量もアレルギー発症に影響を及ぼす²⁸⁾²⁹⁾。その他のアレルギー診断方法としてスキントテストがあげられるが、腫れ、赤斑、湿疹といった副作用も伴う。稀ではあるが、同テストによって重篤な即時型アナフィラキシーが発症することもある。特異 IgE 抗体検査やスキントテストで陰性もしくは曖昧な結果が出た場合、追加検査としてチャレンジテストを行う場合もある。しかし、この検査は特異 IgE 検査やスキントテストよりも大きなリスクを伴う³⁰⁾。

それに対して、試験管内で患者血液を用いて検査する BAT は安全である。BAT は機能試験であり、患者 IgE の特異性を調べる特異 IgE 検査に比べて患者の臨床状態をより良く反映する。BAT は、スキントテストに用いる患者の皮膚、もしくは食物アレルギー診断のためのチャレンジテストに用いる患者の口に代わって試験管内で患者血液をアレルゲンに曝露する検査法と位置付けられる³¹⁾。

BAT には大別して 2 種類の方法が存在する。一つは、アレルギー反応で最も重要な化学伝達物質の一つであるヒスタミンの放出を直接測定する方法である。患者全血を用いても測定可能であるが、検査の正確性を期するためには精製した好塩基球を用いるのが望ましい。しかし、臨床検査としてはその過程は煩雑である。もう一方は、フローサイトメーターを用いる検査法で、細胞表面マーカーの発現変化を指標に好塩基球活性化を評価する。

好塩基球活性化に伴い細胞表面の CD63 分子の発現量が上昇することが発見されたことにより³²⁾、臨床検査法

としての BAT が新たなアレルギー診断方法として発展してきた¹⁾²⁾。ヒスタミン放出を指標とする BAT に対して、CD63 分子の発現量を指標とする BAT では好塩基球の精製を必要とせず、全血でも検査可能である。また、CD63 はヒスタミンと同じ分泌リソソームに局在する膜タンパク質で、CD63 の発現上昇とヒスタミン放出量には相関関係があることが報告されている³²⁾³³⁾。その一方で、CD63 発現上昇とヒスタミン放出量とは相関しないとの報告もあり³⁴⁾、まだ明確でない部分も存在するが、フローサイトメーターで表面抗原の発現を測定する BAT は、その簡便さから、アレルギー反応の測定に広く用いられている。CD203c 抗原は、E-NPP (ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase) ファミリーに属する II 型膜貫通型タンパクで、細胞外のオリゴヌクレオチドやヌクレオチドリン酸、NAD などを分解する膜型酵素で、CD63 とは別の好塩基球活性化マーカーとしても知られている。通常、CD203c は好塩基球及び肥満細胞表面に低レベルかつ特異的に発現しており、同細胞の活性化に伴い発現増強する。CD63 及び CD203c は現在最も一般的に用いられている好塩基球活性化マーカーであるが、両者の好塩基球活性化に伴う発現増強のメカニズムは若干異なる³⁴⁾。

輸血医療における BAT

健常人全血中の好塩基球を用いた BAT

Table 1, 2 で要約されるように、BAT は ATR 検査のために輸血医療に適用されてきた。2009 年に、我々は輸血後に ATR が発生した 9 例の血小板製剤上清 (PC-SN, supernatant of residual transfused platelet concentration) 及び輸血後に副作用が発生しなかった 12 例の PC-SN について BAT を行った²¹⁾。後方的研究であったため、好塩基球のソースとしては ATR 患者ではなく健常人を用いている。ATR が発生した 9 例の PC-SN のうちの 3 例では、少なくとも健常人 5 人のうち 1 人の好塩基球を活性化させたが (Table 1, case N1~N3)、その一方で、輸血後に副作用が発生しなかった PC-SN 全例で好塩基球の活性化は観察されなかった。この報告は、ATR と輸血との因果関係を調べる機能検査としての BAT を提唱した初めてのものである。また、健常人好塩基球を用いた BAT は、最近の ATR 原因製剤中の原因因子の解析研究からも²⁵⁾、その有用性が再確認されている (Table 1, case N4~N6)。

機能的クロスマッチ検査としての BAT

2011 年に、Nubret ら及び Dewachter らはメチレンブルー処理した血漿製剤で発症した ATR3 症例について、それぞれ 1, 2 例ずつ、合計 3 例について報告した (Table 2)。ATR 患者の好塩基球は、3 例全てにおいて、メチレンブルー処理した同一ドナー由来の血漿製剤、

Table 1 Summarized profile of non-cross-match BAT cases

serial case No.	reference		transfused blood products		patients		non-cross-match BAT				suspected allergen
	reference No	case No in the reference	products	elicited symptoms	plasma protein		SN of residual product vs. normal subject basophils			activation by suspect allergen	
					deficiency	antibody	no dasatinib	+ dasatinib	inhibition by Ab against suspect antigen		
N1		A4	PC	anaphylaxis	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from all of 5 normal subjects				
N2	Matsuyama, 2009 (21)	A8	PC	urticaria	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from 3 of 5 normal subjects				
N3		A9	PC	anaphylaxis	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from 1 of 5 normal subjects				
N4		case 1	PC	anaphylactic shock	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from 1 ^o of 5 normal subjects	inhibited	inhibited by fish collagen I Ab ^{##}	activated by mackerel extract	fish collagen I [#]
N5	Matsuyama, 2015 (25)	case 2	PC	anaphylactic shock	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from 1 of 5 normal subjects	inhibited			
N6		case 3	PC	anaphylactic shock	(-)	(-)	The PC-SN activated basophils from 1 of 5 normal subjects	inhibited			

^othe normal subject whose basophils were activated by the SN of the residual blood products possessed anti-mackerel IgE

[#] fish collagen I is a major allergen of mackerel.

^{##}anti-mackerel Ab was detected in one normal subject, and the BAT between the subject and case 1 PC-SN were inhibited in the presence of fish collagen type I.

またはメチレンブルーそのものによって活性化した(Table 2, case C1~C3). Iwamoto らは 2014 年に、ホモ接合体でハプトグロビンを欠損している患者で輸血によるアナフィラキシーが発症したことを報告している²⁴⁾ (Table 2, case C4). この症例では、患者好塩基球がハプトグロビンによって活性化されることを BAT によって証明している。2017 年に我々は、輸血直後に発症した重篤なアナフィラキシーについて、原因となった PC-SN と患者好塩基球との BAT を実施し、患者好塩基球が当該 PC-SN によって活性化されることを確認した²⁶⁾ (Table 2, case C5, C6). BAT は輸血が行われた臨床条件を模倣するため、患者全血と当該 PC-SN を 20 : 1 の割合で混合した。これは体重 70kg の患者(全血液量は 5l)に 250ml の PC を輸血した場合に相当する。これらの症例解析の結果から、BAT は機能的クロスマッチテストとして ATR と輸血との因果関係の調査に有用と考えられる。しかし、これらはまだ、予備検討段階であって、クロスマッチテストとしての BAT の最終的な評価はもう少し検討が必要である。この点については、【未解決問題】の章で再度解説する。

将来の輸血における ATR 発症リスクについての BAT による評価

将来の輸血における ATR 発症リスクを推定することは、たとえそれが十二分な根拠に基づいていない場合

でも、すでに重篤な ATR を発症し、今後も輸血を必要としている患者にとっては有益である。BAT は、このような患者の次回輸血で、少なくとも何に注意を払うべきかについてのヒントを示すことが可能である。この章では、次回輸血における ATR リスク評価について紹介する。ただし、実際の臨床成績を基にして行った評価ではなく、将来、ある程度の臨床成績が得られた時点で再評価する必要がある。Fig. 1 に要約を示すが、ATR を発症した患者好塩基球が、当該製剤上清を添加した場合には活性化するが、その他の製剤上清(別の患者の ATR に関与)では活性化しなかった場合、当該患者の次回輸血での ATR 発症リスクは低いと考えられる。一方、当該製剤上清でもその他の ATR 製剤でも患者好塩基球が活性化した場合は、次回輸血の ATR リスクは高いと予想される。最近、Okamura らは上記仮説に当てはまる症例をそれぞれ 1 例ずつ報告している²⁶⁾。前者に当てはまる症例では、ATR 患者好塩基球を当該製剤以外の 3 例の製剤上清で刺激したが、患者好塩基球の活性化は観察されなかった (Table 2, case C5)。一方、後者に当てはまる症例では ATR 患者好塩基球を当該製剤以外の 12 例の製剤上清で刺激したところ 8 例で活性化が観察された (Table 2, case C6)。これらの患者の次回以降の輸血には洗浄 PC を使用したため、その後の ATR 発症はみられなかったが、後者の患者で

Table 2 Summarized profile of cross-match BAT cases

serial case No.	reference (No)	reference case No in reference	transfused blood products			patients			BAT			pi-BAT	suspected allergen		
			products	elicited symptoms	plasma protein deficiency	antibody	skin test	sIgE	cross-match	susceptibility of the patient basophils to PC-SNs of other ATR cases	basophil-activating ability of the PC-SN to other subjects			activation by suspect allergen	no dasatinib + dasatinib
C1	Nubret 2011 (22)		MB-FFP	anaphylactic shock				(+) to MB			(+) to MB			MB	
C2	Dewachter 2011 (23)	case 1	MB-FFP	anaphylactic shock				(+) to MB			(+) to MB-FFP			MB	
C3		case 2	MB-FFP	anaphylactic shock				(+) to MB			(+) to MB			MB	
C4	Iwamoto, 2011 (24)		RBC	anaphylactic shock	haptoglobin	anti-haptoglobin								Haptoglobin	
C5	Okamura-Shiki 2017 (26)	case 1	PC	anaphylaxis	(-)	(-)					(+) to the PC-SN	inhibited	0/3	0/2	unknown
C6*		case 2*	PC	anaphylaxis	(-)	(-)					(+) to the PC-SN	inhibited	8/12	0/2	unknown
C6*	Yasui 2017 (27)	case 1*													unknown
C7		case 2	PC	anaphylaxis	(-)	(-)					(+) to the PC-SN	inhibited	0/2	0/2	unknown
C8	unpublished data		PC	urticaria	(-)	(-)					(+) to the PC-SN	inhibited		(+)	unknown
														(+)	inhibited

* case 2 of Okamura 2017 and case 1 of Yasui 2017 are the same case

#IgE class of Ab was not detected

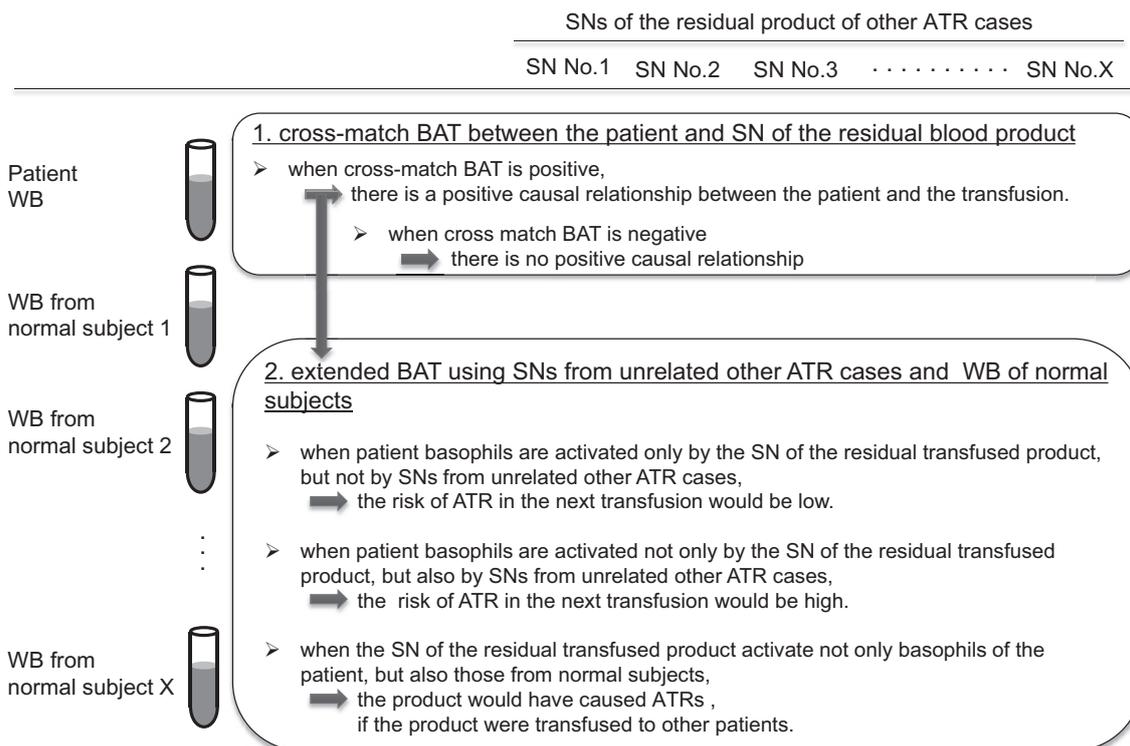


Fig. 1 Identification of causal relationship and estimation of potential ATR risk in future transfusion(s)

The causal relationship between ATRs and transfusion is to be first tested by the cross-match basophil activation test (BAT) using patient whole blood and the supernatant (SN) of the residual ATR blood product. If it is positive, potential risk in the future transfusions is to be assessed using SNs of products from other unrelated ATR cases. To assess the potential risk of the ATR product to other patients, the BAT is to be performed between the SN of the ATR product and whole blood from unrelated normal subjects.

は、洗浄PCを使用していなければ、しばしばATRが発症したと予想される。このように、患者好塩基球と当該製剤以外の製剤上清とのBATは、将来の輸血におけるATRリスク評価と適切な輸血の実施において有用である。

ATRの原因となった製剤上清によって、当該患者好塩基球のみならず健常人好塩基球も活性化されたならば、この製剤は、患者特異性なく当該以外の患者にもATRを発症させたと考えられる。我々が最初のBAT研究で使用した9例のATR製剤上清のうち3例では、5人の健常人のうち少なくとも1人の好塩基球を活性化させた²¹⁾。これら3例(Table 1, case N1~N3)のATR製剤のうちの1つの製剤(case N1)は、健常人5人全ての好塩基球を活性化させた。後方視的研究であったため当該患者好塩基球(case N1)の活性化を調べることは出来ないが、この製剤の好塩基球活性化能の患者特異性は低く、仮に別の患者に輸血された場合でもATRを発症させたと考えられる。これとは対照的に、前述したATR製剤(Table 2, case C5~C7)では、健常人好塩基球を活性化させなかった。

BATによるATR原因アレルゲンの評価

先行研究において、Nubretら及びDewachterらは、ATRの原因アレルゲンとしてMB処理したFFPを特定した。Nubretらの症例(Table 2, case C1)及びDewachterらの症例(Table 2, case C3)のそれぞれにおいて、患者好塩基球はMBそのものでも活性化されたことから、アレルゲンはMBと同定された。また、Iwamotoらの症例においては、患者が血清中のハプトグロビンを欠損していたため、ハプトグロビンがアレルゲンであることが容易に推定された。しかし、このような症例は稀で、多くの場合、アレルゲンを同定することもしくは推定することは困難である。アレルゲンの同定には、患者IgE抗体の特異性検査が出発点となる。症例N4(Table 1)において、ATRの原因となったPC-SNによって健常人好塩基球が偶然にも活性化された。興味深いことに、この健常人はサバに対するIgE抗体を有し、実際にサバ抽出物(スキントテストに使用する試薬)によって同健常人の好塩基球が活性化された。さらに、魚コラーゲンI(サバアレルギーの主要抗原の一つ)抗体で当該PC-SNを前処理し、そのPC-SNを同健常人好塩基球に添加した場合には好塩基球の活性化

は観察されなかった³⁵⁾。当該患者ではなく健常人の好塩基球を用いた研究ではあるが、これらの結果から、ATRの原因アレルゲンが魚コラーゲンIであることが示唆された。この手法を用いれば、ATRの原因と疑われるアレルゲンが存在した場合、同アレルゲンもしくは同アレルゲンに対する抗体を添加するBATによって、アレルゲンを推定することも可能である。

アレルギー反応のメカニズム：アレルゲン/IgE 依存の・非依存の経路，抗体依存の・非依存の経路

IgE/FcεRI を介したシグナルがアナフィラキシー発症の主要な経路と考えられているが、近年、マウスにおいてIgG/FcγR を介するアナフィラキシーも報告されている³⁶⁾。ヒトにおけるこの経路を介したアナフィラキシーは証明されていないが、それを支持する症例報告は存在する。例えば、薬剤投与によって全身性アナフィラキシーを発症した患者において、プロタミン、デキストラン、組換えIgG、組換えTNFαに対するIgG抗体が認められたがIgE抗体は認められなかったとする報告がある^{37)~40)}。輸血後に発症したアナフィラキシーにおいて、前述したハプトグロビン欠損症例ではハプトグロビンに対するIgG抗体だけが検出されている (Table 2, case C4)。ただ、ハプトグロビンに対するIgE抗体を検出できなかっただけで、患者血中には存在し、ATR発症に関与した可能性もありうる²⁴⁾。

もう一つのATR発症メカニズムとして血液製剤中の生理活性物質 (biologic response modifiers : BRMs) が考えられる。BRMsには血液製剤の保管中に蓄積される炎症性サイトカインやケモカインなどが含まれ、それらが輸注されることでアレルギー反応を引き起こすことが考えられる。PC-SNには保存中に蓄積されたVEGFや、soluble CD40L、ヒスタミン、TGF-β1、RANTESなどのBRMsが高濃度に含まれている^{10)~12)41)}。これらの分子が臨床的に有意な量を輸注された場合、患者の免疫機能に影響を及ぼす可能性がある。アレルギー反応へのBRMsの関与については未知の部分が多く、今後の研究の成果が期待される。

最近、可溶性血小板タンパクによって健常人好塩基球が活性化され、ヒスタミンを放出するという報告がなされた⁴²⁾。ここでアレルゲンとなる血小板タンパクは、イムノグロブリン経路を介して好塩基球を活性化させるが、これまでに報告されている血小板タンパクとは一致しない。これはATR発症に関与する4番目の経路の可能性があるが、それには、より詳細な情報が必要である。

患者IgEもしくはIgGの特異性の同定、アレルゲンもしくはBRMsの同定とは異なり、好塩基球の活性化経路を判別することは比較的容易である。その判別には2種類の手順によって行われる。第一に、BATの反

応系に dasatinib を添加した場合としなかった場合とで患者好塩基球活性化の有無を確認する実験系である。すなわち、dasatinib などの Bcr-Abl チロシンキナーゼ及び Src ファミリーチロシンキナーゼ抑制剤は FcεRI 下流のシグナル分子に作用し、そのシグナル伝達を阻害する。そのことによって、IgE/FcεRI を介した好塩基球の活性化が阻害される⁴³⁾⁴⁴⁾。一方、dasatinib は LPS, fMLP, PMA, IL-3, IL-33, ミトコンドリア DNA (一種の DAMPs), 及び抗 HLA 抗体などの BRMs による好塩基球活性化は阻害しない¹⁷⁾²⁵⁾⁴⁴⁾。第二に、ATR 原因製剤上清は患者好塩基球を特異的に活性化させるのか、それとも健常人好塩基球も活性化させるのかを確認する。第一は、アレルゲンによる好塩基球活性化が IgE 依存のか非依存のかを判別し、第二は、好塩基球活性化が、抗体依存の経路 (患者特異的) か抗体非依存の経路かを判別する。

アレルゲンが同定された症例 C1 から C4 では、IgE もしくは IgG 抗体依存のシグナルによって ATR が発症したと考えられる (Table 2)。症例 C4 でハプトグロビンに対する IgG クラスの抗体が検出されていることから、同症例の ATR は IgG 依存の経路で発症した可能性もある。症例 C5~C8 では、dasatinib 添加によって好塩基球の活性化が阻害されたことから、IgE 依存の経路を介した活性化と判別される。一方、症例 N1 (Table 1, case N1) では、ATR の原因となった PC-SN によって検査した全ての健常人 (n=5) の好塩基球が活性化されたことから、原因製剤中に含まれていた BRMs によって ATR が発症したと考えられる。このように、BAT は ATR のメカニズムの評価に有用である。

受身 BAT による骨髄抑制患者の検査

ATR 患者には原疾患が、造血器腫瘍、再生不良性貧血、固形がんと診断された患者が多数存在する。これら患者においては、原疾患治療によって骨髄抑制が発生する場合があります。そのような場合、BAT に必要な数の好塩基球を入手することは困難である。症例 C5~C8 (Table 2) では、患者が骨髄抑制状態にあり、その回復を待ち、結果的に症例 C5~C7 では ATR 発症後 30, 15, 40 日後にそれぞれ BAT を実施した。また、症例 C8 に関しては BAT は未実施のままである。ATR 調査のための BAT 検査において、骨髄抑制患者からの好塩基球採取は主要な克服すべき問題の一つである。

1970 年に Ishizaka らはヒト血清 IgE で受動感作させた猿の肺組織片を用いた研究を実施した。同組織片は、感作させたヒト IgE 特異のアレルゲンもしくは抗ヒト IgE 抗体添加によってヒスタミン及びロイコトリエンを放出した⁴⁵⁾。その後、Pruzansky らは試験管内で第三者 IgE をヒト好塩基球に受動感作させ、この手法をアレルギー分野の研究に適用させた⁴⁶⁾。すなわち、健常人好塩

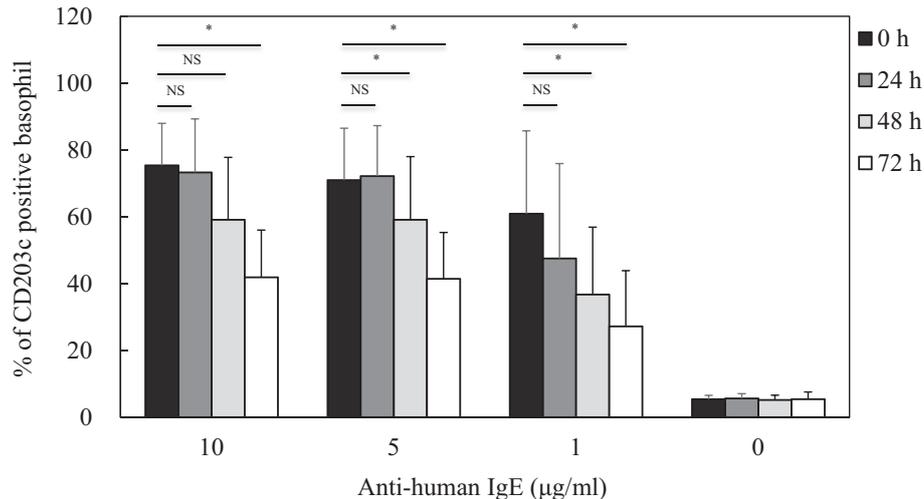


Fig. 2 Storage time and basophil activation

Blood samples from 6 healthy individuals were stored for up to 72 h at 4 °C prior to the basophil activation test (BAT). Data are shown as mean \pm 2SD. Comparisons between groups were performed using the Wilcoxon t-test with Bonferroni correction. Probability values of $P < 0.01$ were considered statistically significant. Storage from 48 to 72 h resulted in significantly reduced basophil activation. * $P < 0.01$ vs 0 h.

基球表面に結合している自身の IgE をアレルギー疾患の患者 IgE に置換することで、患者特異的なアレルゲンによって置換した好塩基球が活性化されることを明らかにしたものである。我々はこの手法を改良し、『passive immune BAT (pi-BAT)』と名付け、ATR と輸血との因果関係を評価するため輸血医療分野（とりわけ骨髄抑制患者において）での有用性を検討した²⁷⁾。症例 C6, C7 において (Table 2), 健康人好塩基球表面の IgE を ATR 患者 IgE に置換した擬似患者好塩基球では、当該 PC-SN 添加による活性化が観察されたが、第三者健康人 IgE に置換した同細胞では、そのような活性化は観察されなかった。さらに、pi-BAT によって症例 C8 (BAT 未実施症例) の検査も実施することが可能となった (未発表データ)。これらの結果から、pi-BAT は骨髄抑制下の患者であっても、ATR と輸血との因果関係を調査することが可能と考えられる。

未解決問題

BAT 及び pi-BAT の一般化とその検証

BAT が輸血医療に適用されてから未だ 10 年も経過しておらず、その間に調べられた症例数も十分ではない。さらに、pi-BAT に関しては、2017 年に初めて輸血医療に適用されたばかりの検査法である。したがって、これら検査法の実用性は、多くの検査施設の ATR 調査結果を待ってから判断すべきあり、そのためには、ATR 症例に対する BAT 及び pi-BAT の前方視的研究が必要である。

好塩基球の保存時間と活性化能

BAT は患者血液を採血後可能な限り速やかに実施すべきであるが、しばしば、採血後数時間もしくは数日後（採血した医療機関と検査実施施設の距離が離れている場合）にしか実施できない場合もある。Sturm らは、好塩基球活性化能に及ぼす血液検体の保存時間の影響を調べた⁴⁷⁾。血液検体を 4°C で、0, 4, 24, 48 時間保存し、保存後のそれぞれの検体に抗 IgE 抗体を添加することで好塩基球活性化能を調べたところ、それは保存時間依存的に低下した。抗 IgE 抗体の添加濃度低減実験から、血液検体を 24 時間保存することで好塩基球活性化能は 35.1~54.4% 低減することを算出しており、48 時間保存ではさらに低減した。我々も類似した保存時間と好塩基球活性化能との相関を調べたが (Fig. 2), Sturm らの結果ほど顕著ではなかった。抗 IgE 抗体の添加濃度に関係なく、保存 0 時間と 24 時間との間で好塩基球活性化能に有意な差は認められなかった。また、好塩基球活性化能は保存 48 時間から 72 時間の間で低下傾向を認めたが、Sturm らが報告したほど顕著な低下はしなかった。これらの結果から、我々の施設では通常、採血翌日の検体を用いて BAT を実施している。ただし、我々及び Sturm らが使用した抗 IgE 抗体は好塩基球を最も強く刺激する薬剤の一つであり、通常のアレルゲン刺激と比較して好塩基球を過剰に活性化する可能性があることには注意を払わなければならない。したがって、両者の検討いずれにおいても、好塩基球の活性化能を過大評価している可能性があり、可能であれば採血直後の全血中の好塩基球を用いた BAT

を実施することが望ましい。そうでない場合は、とりわけBATの結果が陰性であった場合、その結果の解釈には、採血後時間が経過した好塩基球を使用したことを考慮し、慎重になる必要がある。

ATR発症後における患者好塩基球の反応性の経時変化

現状では、クロスマッチ検査としてのBATを実施する至適なタイミングは不明である。そのため、複数のATR症例の患者から異なるタイミングで採血し、それぞれについて好塩基球の反応性をBATで調べた(Table 2, case C3, C5, C6, C7)。ATR患者好塩基球とそれに対応する原因製剤上清とのBATを実施したところ、症例C3ではATR発症後7週間目の検体で陽性であった。症例C5では30, 118日目の検体で、症例C6では15, 87日目の検体でそれぞれ陽性を示した(未発表データ)。症例6においては554日目の検体が陰性であり、症例C7では40, 151日目の検体が陽性であった(未発表データ)。このように、ATR患者好塩基球の原因製剤に対する反応性が安定して数カ月続くこともあれば、消失することもある。そのため、偽陰性を再検査するのも一法である。BATの結果が陰性の場合には、最初のBAT検査において患者好塩基球がたまたま不応状態であったために陰性判定になる可能性も考えられ、それを回避するために採血のタイミングを変えたBAT実施するのが望ましい。しかし、残念ながら、BAT陰性症例での追跡検査は実施されておらず、不応状態による偽陰性の問題は未解決のままである。

感度と特異性

食品、吸入系、薬、毒物(蜂毒など)に対するアレルギー疾患は、病歴、スキントテスト、血清IgE検査、必要な場合は経口検査などの補助的検査法によって容易に診断できる。また、これらアレルギー疾患診断に用いるBATの感度と特異度に関しても多くの研究結果が報告されている²³⁾³¹⁾。ATR診断はその他のアレルギー疾患のように有用な補助的検査法が存在しない。したがって、ATR症例においては検査法の感度、とりわけ特異度を正確に算定することは困難である。もし、それらを算定できたとしても、次章の【BAT及びpi-BATの弱点、盲点】で説明するが、BATで用いる患者好塩基球及びpi-BATの擬似患者好塩基球は、原因アレルゲン以外の様々な要因によって活性化するため、検査法としての特異度は低くなる。

BAT及びpi-BATの弱点、盲点

擬似患者好塩基球の不確実な反応性

好塩基球の反応性には個人差が存在する。pi-BATは健常人好塩基球表面のIgEを患者IgEに置換した擬似患者好塩基球を用いるが、pi-BAT検査ごとに好塩基

球ソースが違えば、検査の反応性がソースとなる細胞の個人差の影響を受ける。そのため、安定したpi-BAT検査のためには特定の健常人から採取した好塩基球を用いる必要がある。我々は複数の健常人血球から擬似好塩基球を作成し、活性化能及び再現性(反応の安定性)を比較し、pi-BATに適した性状の好塩基球を有する4人の健常人を選出した。我々は、現状のpi-BATには、この4人のうちから作成した擬似患者好塩基球を用いて運用している。また、健常人好塩基球の代用として、好塩基球もしくは肥満細胞系の細胞株を用いる方法もある。

患者因子と製剤因子

ATRの発症にさまざまな製剤因子が関与すると考えられるが、原因製剤上清を添加するBAT及びpi-BATは、真にその製剤因子を解析できる検査系である。実際に、製剤因子であるアレルゲンの有無をdasatinib添加検査の結果から推定できる。一方、患者因子については以下の理由により検査結果に反映されない場合もある。一つは、患者の生理状態がATR発症日と検査実施日とで異なる可能性がある。すなわち、検査実施日に採血した患者好塩基球では当該製剤による活性化が起こらない可能性がある。さらに、pi-BATを実施する場合、患者好塩基球と擬似患者好塩基球のソースとなった健常人好塩基球とで反応性が異なる可能性がある。したがって、陰性の検査結果の中に偽陰性が含まれている可能性を常に考慮する必要がある。

今後の検討課題

BATによるATR症例調査手順

BATによるATR症例の調査手順を提案する(Fig. 3)。BATを実施するための最も重要な条件の一つは、患者が検査に必要な好塩基球数を有しているか否かである²⁶⁾²⁷⁾。十分な好塩基球数を有していた場合、採血された患者血液量に応じて、クロスマッチ検査、当該以外の製剤との反応性、dasatinibによる抑制効果をBATで検討する²⁶⁾。検査に必要な好塩基球数が得られない場合は、代替法としてpi-BATを実施する²⁷⁾。その後、検査に必要な好塩基球数にまで回復した場合は、pi-BATの結果を確認する意味も込めてBATを実施しても良い。BATもしくはpi-BAT検査が陽性を示した場合、ATRの原因となったアレルゲン同定のために患者IgEの特異性を調査する²⁵⁾。高力価の特異IgEが検出された場合、候補アレルゲン添加による活性化、もしくは、当該製剤を候補アレルゲンに対する抗体で前処理することによる活性化抑制をBATもしくはpi-BATで確認し、アレルゲンを推定する。

血漿タンパク欠損

1968年にVyasらは、全血、血漿、またはガンマグ

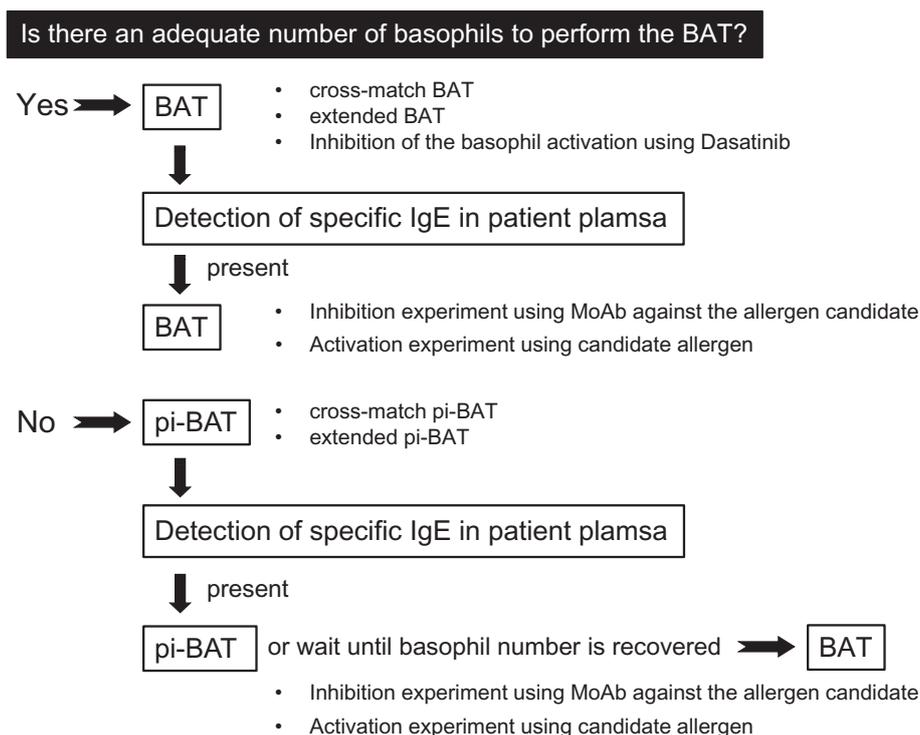


Fig. 3 Proposed flow chart to elucidate the mechanism underlying ATR

For cases with an adequate number of basophils, the basophil activation test (BAT) including cross-match BAT, extended BAT and inhibition experiments using dasatinib are to be performed. If the subsequent test for specific IgE is positive, inhibition experiments are to be performed. For cases with an inadequate number of basophils, the passive immune (pi)-BAT should be performed in place of the BAT.

ロブリン輸注後に重篤な副作用を発症した3人の患者がIgAを欠損していたことを報告した⁸⁾。また、IgAに対する抗体も患者血清中から検出された。それ以降、IgAに関連する類似した40症例以上のアナフィラキシー性輸血副作用が報告されている。これらより、IgA欠損患者にはIgAを含まない血液製剤及びIgA量の少ないガンマグロブリン製剤を輸注すると結論付けられた。さらに、IgA欠損の献血者は世界中で登録されている。しかし、Sandlerらが、最近、輸血に関する研究を実施している施設からの報告、血液センターからの報告、及びヘモビジランス調査報告について公開及び未公開を問わず再検討したところ、アナフィラキシー性輸血副作用の発症にIgAが関与しているという医学的根拠は立証できないと報告した⁴⁸⁾。このように、輸血もしくはガンマグロブリン輸注時に発症したアナフィラキシー性副作用へのIgAの関与については論争中である⁴⁹⁾。全人口中に含まれるIgA欠損者の割合を欧米と我が国を含む東アジア・東南アジアとで比較すると欧米の方が高く⁵⁰⁾、一方、ハプトグロビン欠損者は東アジア・東南アジアの方が高い⁵¹⁾。ハプトグロビン欠損かつ同抗体を保有する患者が輸血時にアナフィラキシー性副作用を発症したという報告もある⁹⁾⁵²⁾。したがって、我が国

ではハプトグロビン欠損の献血者登録も行っており、IgA欠損の場合と同様に、ハプトグロビン欠損患者にはハプトグロビンを含まない血液製剤を提供している。アナフィラキシー性輸血副作用の原因因子の一つとしてIgA及びハプトグロビンが関与するか否かを確認するためにも、将来的には、血漿タンパク欠損者で発症したATR調査にもBATを導入する必要がある。

まとめ及び未来予想

BATは、ATRと輸血との因果関係を明らかにするばかりでなく、ATRの発症メカニズムの解析にも有用と考えられる。しかし、BATに関する臨床データが少ないことも事実である。BATの真の有用性を証明するためにも、さらなる臨床症例の研究は必要不可欠である。

ATRを繰り返し発症する患者への輸血は、通常、洗浄操作したPC及びRBCを用いてその発症を防止している。2016年、日本赤十字社は、世界に先駆けて洗浄PCの製造と販売の許可を取得した。洗浄製剤はATRの再発を防止することで患者にとっては有益であるが、将来的には、ATRの明確なメカニズムを解明することで本質的な問題解決をする必要がある。すなわち、ATR

の明確なメカニズムこそがその予防につながる。

著者のCOI開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

謝辞：本論文作成に際して多くの有益な助言を頂いたことに対して、静岡県立静岡がんセンターの池田宇次先生、日本赤十字社近畿ブロック血液センターの木村貴文先生、古田里佳先生、田中光信先生に深謝するものである。

文 献

- 1) MacGlashan D.W. Jr: Basophil activation testing. *J Allergy Clin Immunology*, 132: 777—787, 2013.
- 2) McGowan EC, Saini S: Update on the performance and application of basophil activation tests. *Curr Allergy Asthma Rep*, 13: 101—109, 2013.
- 3) Hoffmann HJ, Santos AF, Mayorga C, et al: The clinical utility of basophil activation testing in diagnosis and monitoring of allergic disease. *Allergy*, 70: 1393—1405, 2015.
- 4) 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.
- 5) 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.
- 6) 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. *Am J Clin Pathol*, 140: 219—224, 2013.
- 7) Hirayama F: Current understanding of allergic transfusion reactions: incidence, pathogenesis, laboratory tests, prevention and treatment. *Br J Haematol*, 160: 434—444, 2013.
- 8) Vyas GN, Perkins HA, Fudenberg HH: Anaphylactoid transfusion reactions associated with anti-IgA. *Lancet*, 2 (7563): 312—315, 1968.
- 9) 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.
- 10) Wadhwa M, Seghatchian MJ, Lubenko A, et al: Cytokine levels in platelet concentrates: quantitation by bioassays and immunoassays. *Br J Haematol*, 93: 225—234, 1996.
- 11) Edvardsen L, Taaning E, Mynster T, et al: Bioactive substances in buffy-coat-derived platelet pools stored in platelet-additive solutions. *Br J Haematol*, 10: 445—448, 1998.
- 12) 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.
- 13) Abe T, Matsumoto C, Shimada E, et al: Immunoglobulin E oligomers identified in blood components activate mast cells: relevance to anaphylactic transfusion reaction. *Transfusion*, 51: 2327—2336, 2011.
- 14) Garraud O, Hamzeh-Cognasse H, Cognasse F: Platelets and cytokines: How and why? *Transfus Clin Biol*, 19: 104—108, 2012.
- 15) Savage WJ, Tobian AA, Savage JH, et al: Scratching the surface of allergic transfusion reactions. *Transfusion*, 53: 1361—1371, 2013.
- 16) Abe T, Shimada E, Takanashi M, et al: Antibody against immunoglobulin E contained in blood components as causative factor for anaphylactic transfusion reactions. *Transfusion*, 54: 1953—1960, 2014.
- 17) Yasui K, Matsuyama N, Kuroishi A, et al: Mitochondrial damage-associated molecular patterns as potential proinflammatory mediators in post-platelet transfusion adverse effects. *Transfusion*, 56: 1201—1212, 2016.
- 18) 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.
- 19) Hirayama F: Recent advances in laboratory assays for nonhemolytic transfusion reactions. *Transfusion*, 50: 252—263, 2010.
- 20) Schwartz LB: Tryptase from human mast cells: biochemistry, biology and clinical utility. *Monogr Allergy*, 27: 90—113, 1990.
- 21) 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.
- 22) Nubret K, Delhoume M, Orsel I, et al: Anaphylactic shock to fresh-frozen plasma inactivated with methylene blue. *Transfusion*, 51: 125—128, 2011.
- 23) Dewachter P, Castro S, Nicaise-Roland P, et al: Anaphylactic reaction after methylene blue-treated plasma transfusion. *Br J Anaesth*, 106: 687—689, 2011.
- 24) Iwamoto S, Yonekawa T, Azuma E, et al: Anaphylactic transfusion reaction in homozygous haptoglobin deficiency detected by CD203c expression on basophils. *Pediatr Blood Cancer*, 61: 1160—1161, 2014.

- 25) 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. *Int J Hematol*, 102: 93—100, 2015.
- 26) Okamura-Shiki I, Matsuyama N, Yasui K, et al: Clinical utility of the basophil activation test for analysis of allergic transfusion reactions: a pilot study. *Vox Sang*, 112: 114—121, 2017.
- 27) 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.
- 28) Strait RT, Morris SC, Finkelman FD: IgG-blocking antibodies inhibit IgE-mediated anaphylaxis in vivo through both antigen interception and Fc gamma RIIb cross-linking. *J Clin Invest*, 116: 833—841, 2006.
- 29) Finkelman FD, Khodoun MV, Strait R: Human IgE-independent systemic anaphylaxis. *J Allergy Clin Immunol*, 137: 1674—1680, 2016.
- 30) Perry TT, Matsui EC, Conover-Walker MK, et al: Risk of oral food challenges. *J Allergy Clin Immunol*, 114: 1164—1168, 2004.
- 31) Santos AF, Lack G: Basophil activation test: food challenge in a tube or specialist research tool? *Clin Transl Allergy*, 15:6: 10, 2016.
- 32) Knol EF, Mul FP, Jansen H, et al: Monitoring human basophil activation via CD63 monoclonal antibody 435. *J Allergy Clin Immunol*, 88: 328—338, 1991.
- 33) Furuno T, Teshima R, Kitani S, et al: Surface expression of CD63 antigen (AD1 antigen) in P815 mastocytoma cells by transfected IgE receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 219: 740—744, 1996.
- 34) MacGlashan D Jr: Expression of CD203c and CD63 in human basophils: relationship to differential regulation of piecemeal and anaphylactic degranulation processes. *Clin Exp Allergy*, 40: 1365—1377, 2010.
- 35) Sakaguchi M, Toda M, Ebihara T, et al: IgE antibody to fish gelatin (type I collagen) in patients with fish allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 106: 579—584, 2000.
- 36) Tsujimura Y, Obata K, Mukai K, et al: Basophils play a pivotal role in immunoglobulin-G-mediated but not immunoglobulin-E-mediated systemic anaphylaxis. *Immunity*, 28: 81—89, 2008.
- 37) Weiss ME, Nyhan D, Peng ZK, et al: Association of protamine IgE and IgG antibodies with life-threatening reactions to intravenous protamine. *N Engl J Med*, 320: 886—892, 1989.
- 38) Adourian U, Shampaine EL, Hirshman CA, et al: Jr. High-titer protamine-specific IgG antibody associated with anaphylaxis: report of a case and quantitative analysis of antibody in vasectomized men. *Anesthesiology*, 78: 368—372, 1993.
- 39) Kraft D, Hedin H, Richter W, et al: Immunoglobulin class and subclass distribution of dextran-reactive antibodies in human reactors and non reactors to clinical dextran. *Allergy*, 37: 481—489, 1982.
- 40) Cheifetz A, Smedley M, Martin S, et al: The incidence and management of infusion reactions to infliximab: a large center experience. *Am J Gastroenterol*, 98: 1315—1324, 2003.
- 41) Phipps RP, Kaufman J, Blumberg N: Platelet derived CD 154 (CD40 ligand) and febrile responses to transfusion. *Lancet*, 357: 2023—2024, 2001.
- 42) Lee DD, Muskaj I, Savage W: Platelet proteins cause basophil histamine release through an immunoglobulin-dependent mechanism. *Transfusion*, 57: 1709—1716, 2017.
- 43) Falcone FH, Haas H, Gibbs BF: The human basophil: a new appreciation of its role in immune responses. *Blood*, 15: 4028—4038, 2000.
- 44) 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.
- 45) Ishizaka T, Ishizaka K, Orange RP, et al: The capacity of human immunoglobulin E to mediate the release of histamine and slow reacting substance of anaphylaxis from monkey lung. *J Immunol*, 104: 335—343, 1970.
- 46) Pruzansky JJ, Grammer LC, Patterson R, et al: Dissociation of IgE receptors on human basophils. I. Enhanced passive sensitization for histamine release. *J Immunol*, 131: 1949—1953, 1983.
- 47) Sturm EM, Kranzelbinder B, Heinemann A, et al: CD203c-based basophil activation test in allergy diagnosis: characteristics and differences to CD63 upregulation. *Cytometry B Clin Cytom*, 78: 308—318, 2010.
- 48) Sandler SG, Eder AF, Goldman M, et al: The entity of immunoglobulin A-related anaphylactic transfusion reactions is not evidence based. *Transfusion*, 55: 199—204, 2015.
- 49) Rachid R, Bonilla FA: The role of anti-IgA antibodies in causing adverse reactions to gamma globulin infusion in immunodeficient patients: a comprehensive review of the literature. *J Allergy Clin Immunology*, 129: 628—634, 2012.

- 50) Ropars C, Muller A, Paint N, et al: Large scale detection of IgA deficient blood donors. *J Immunol Methods*, 54: 183—189, 1982.
- 51) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al: Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhapto-globinemic patients with anti-hapto-globin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95: 1138—1143, 2000.
- 52) Shimode N, Yasuoka H, Kinoshita M, et al: Severe anaphylaxis after albumin infusion in a patient with ahapto-globinemia. *Anesthesiology*, 105: 425—426, 2006.

POSSIBLE UTILITY OF THE BASOPHIL ACTIVATION TEST FOR THE ANALYSIS OF MECHANISMS INVOLVED IN ALLERGIC TRANSFUSION REACTIONS

Fumiya Hirayama¹⁾, Kazuta Yasui¹⁾, Nobuki Matsuyama¹⁾ and Ikue Okamura-Shiki²⁾

¹⁾Japanese Red Cross Kinki Block Blood Center

²⁾Division of Hematology and Stem Cell Transplantation, Shizuoka Cancer Center

Abstract:

Allergic transfusion reactions (ATRs) are the most common adverse reactions occurring during transfusion of blood components. Although most reactions are mild and involve cutaneous manifestations, severe ATRs including life-threatening anaphylaxis may also occur. The mechanisms of ATRs are largely unknown because they have not been well studied. One of the reasons for this may be the absence of a standard assay system for investigating these processes. Basophils and/or mast cells are key effector cells in immediate-type allergic reactions. They possess the unique ability to degranulate upon cross-linking of specific IgE bound on the membrane-bound, high-affinity IgE receptor or upon direct stimulation by exposure to allergens. Basophils are present in peripheral blood, unlike mast cells which are located in tissues. Therefore, basophils are valuable for the clinical testing of allergy. Consequently, the basophil activation test (BAT) was developed as a simple blood test for the diagnosis of allergic reactions to substances such as foods, inhalants, medicines and venom. In the last decade, the BAT has also been applied to transfusion medicine; 5 pilot studies revealed that the supernatants of the responsible blood products activated basophils in the BAT in 13 ATR cases, suggesting a causal relationship between ATRs and transfusion.

In this review, we describe those cases and explore the potential utility of the BAT as a test performed in reference laboratories for the analysis of ATRs. We also describe the weaknesses, pitfalls, and unanswered issues of this assay.

Keywords:

Transfusion, Allergic reaction, Basophil activation test, Allergen, Dasatinib