

特発性好中球減少症より転化した急性骨髄性白血病に対する同種末梢血幹細胞移植後に好中球減少が再燃し，ドナーリンパ球輸注を行った成人例

緒方 正男¹⁾²⁾ 今村 朋之³⁾ 池脇 淳二²⁾ 大塚 英一²⁾ 立川 良明¹⁾
 宮子 博¹⁾ 菊池 博⁴⁾ 門田 淳一²⁾ 犀川 哲典¹⁾

59歳，男性。1998年発症の原因不明の好中球減少症に対し，G-CSFの投与を継続した。2003年に急性骨髄性白血病に移行し，HLA一致同胞をドナーとして，骨髄破壊的前処置による末梢血幹細胞移植を行った。移植後day 24に生着が確認されたが，day 53に再び好中球が選択的に低下し，敗血症性ショックを来した。骨髄検査では著明な細胞融解像と顆粒球系細胞の消失が認められ，キメリズム解析ではホスト由来CD3陽性細胞を48.3%認めた。Full chimerismへの転換を目的にDonor lymphocyte infusions (DLI) (CD3陽性細胞 1×10^7 /kg)を行った。DLI後full chimerismへの到達に一致して好中球は速やかに回復し，敗血症症状も改善した。しかし同時に間質性肺炎を来しday 92に死亡した。

患者は移植前に原因不明の好中球減少が長期経過していた。今回移植後に残存した患者由来リンパ球がドナー由来顆粒球系細胞を選択的に障害したと考えられた。DLIによる患者由来リンパ球の排除により，免疫性好中球減少の病態の改善が得られた。

キーワード：特発性好中球減少症，同種造血細胞移植，ドナーリンパ球輸注

はじめに

Donor lymphocyte infusions (DLI)はドナー細胞による免疫学的効果を期待する同種細胞療法であり，抗腫瘍作用¹⁾²⁾や，Epstein-Barr virus関連移植後リンパ増殖症候群に対する治療効果を目的として行われるほかに，mixed chimerismをfull donor chimerismに転換させる方法としても用いられる³⁾⁴⁾。

我々は原因不明の好中球減少症より移行した急性骨髄性白血病(AML)に対し同種末梢血幹細胞移植を行い，移植後に無顆粒球症が再燃した症例を経験した。骨髄検査にて細胞融解像と顆粒球系細胞の著減を認め，キメリズム解析でmixed chimerismが証明された。ホスト由来リンパ球の排除を目的としてDLIを行い，full chimerismへの転換とともに急速に好中球が増加した。

同種造血細胞移植後にホスト由来リンパ球による免疫性血球減少を来した場合，DLIはホスト由来リンパ球の排除により，血球減少を改善することが期待される。

症 例

59歳，男性。家族歴：父親が脳梗塞，母親が慢性関節リウマチ，心筋梗塞。血液疾患の家族歴なし。既往歴：58歳時胃痛にて幽門側胃切除術。現病歴：生来健康であったが1998年6月(54歳時)に好中球減少を指摘され，当科を紹介受診。末梢血好中球数の著減を認め，骨髄検査では前骨髄球以降の細胞が著明に減少してした(Table 1)。骨髄細胞に異形成を認めず，染色体解析では正常核型が示された。好中球減少の原因として自己免疫性の機序も疑ったが，抗顆粒球抗体は陰性であり，ステロイドやシクロスポリンは無効であった。感染を繰り返すためG-CSFの投与を要した。1998年中は感染併発時にはG-CSF 300 μ g/日連日皮下注射にて好中球数を1,000/ μ lまで上昇させることが可能であったが，次第に反応性が低下し，2001年よりは好中球数を500/ μ lに至らせるためにG-CSF 600 μ g/日投与継続を要した。費用面より，G-CSFの投与は不定期に行われた。2003年2月より貧血の進行と血小板数の低下傾向が認められた。2003年6月に施行した骨髄検査にて急性白

1) 大分大学医学部附属病院輸血部

2) 大分大学医学部附属病院血液内科

3) 大分記念病院血液内科

4) 国立病院機構西別府病院

〔受付日：2008年11月4日，受理日：2009年7月31日〕

Table 1 Hematological findings

	1998/6	2003/6	2003/10 post transplant day 53	2003/11 post transplant day 70
Peripheral Blood				
RBC ($10^4/\mu\text{l}$)	518	192	283	241
Hb (g/dl)	14.4	6.2	10.2	8.3
Ht (%)	43.5	18.3	28.7	23.5
Reticulocyte (%)	NE	NE	5.5	NE
Reticulocyte ($10^4/\mu\text{l}$)	NE	NE	15.5	NE
WBC ($/\mu\text{l}$)	1,560	1,200	400	10,790
Blast	0%	2%	0.0%	0.0%
Promyelo.	0%	0%	0.0%	0.0%
Myelo.	0%	0%	0.0%	4.0%
Metamyelo.	0%	0%	0.0%	3.0%
Stab.	4%	0%	45.2% *	11.0%
Seg.	4%	1%		73.0%
Eosino	3%	0%	0.0%	0.0%
Baso.	3%	0%	0.4%	0.0%
Mono	3%	8%	2.1%	8.0%
Lymph	82	89%	52.3%	1.0%
Atypical lymph	1%	0%	0.0%	0.0%
PLT ($10^4/\mu\text{l}$)	22.6	10.1	4.4	3.8
Bone Marrow				
NCC ($10^4/\mu\text{l}$)	18.7	9.7	12.6	NE
Mgk ($/\mu\text{l}$)	120	30	0	NE
Myeloblast	3.6%	51.2%	1.2%	0.8%
Promyelocyte	0.8%	0.0%	0.0%	3.2%
Myelo.	0.4%	0.0%	0.0%	24.8%
Metamyelo.	0.0%	0.0%	0.0%	21.6%
Stab.	0.0%	0.0%	0.0%	14.0%
Seg.	0.4%	0.0%	0.0%	12.8%
Eosino	2.4%	0.0%	0.8%	0.0%
Mono.	1.2%	4.8%	0.0%	0.0%
Plasma cells	5.2%	0.8%	0.0%	0.4%
Lymph	15.6%	0.0%	7.2%	3.6
Erhythroid	70.4%	19.6%	90.8	18.8

NE: not evaluated. *Stab and segmented neutrophils

血病へ移行が確認され、同種造血細胞移植目的で2003年7月に当科入院となる。

入院時現所見：身長158.0cm、体重48.5kg、血圧122/77mmHg、脈拍93/分・整、体温36.9℃、眼瞼結膜貧血あり、眼球結膜黄疸なし。神経学的所見に異常なし。皮膚所見に異常なく、表在リンパ節腫脹なし。胸部に異常所見なし。腹部平坦、軟で脾臓を3横指触知。

骨髄所見：入院直前に外来で2003年6月に施行した骨髄検査では骨髄芽球を52.5%に認め、芽球以降の分化段階の細胞はごく少数であった(Table 1, Fig. 1A)。骨髄芽球はペルオキシダーゼ陽性、非特異的エステラーゼ陰性であった。フローサイトメトリーによる骨髄細胞の表面抗原解析ではCD7:14.2%、CD19:38.2%、CD13:98.8%、CD14:4.4%、CD33:38.3%、CD34:97.5%、HLA-DR 98.9%であった。染色体解析は20細胞にて解析され、46, XY, add(7)(q22), add(14)(q32)[3], 46, idem, add(5)(q31)[5], 47, XY, del

(5)(q?), +21[1], 46, XY[9]であった。AML, M1(AML without maturation)へ移行したと診断した。

入院後経過：化学療法を行った場合には治療後の好中球回復が期待出来ないと考え、寛解導入療法は行わずに同種造血細胞移植を行う選択が考えられた。同種造血細胞移植の効果とリスクについてInformed Consent(IC)を行い、患者本人の文書での同意のもと、施行を決定した。ドナーはHLA一致、血液型メジャーミスマッチ(Table 2)の実姉であり、「同種末梢血幹細胞移植のための健常人ドナーからの末梢血幹細胞動員・採取に関するガイドライン」に従って適格性の検討およびICを行い、文書での同意を得た。移植前処置はbusulfan(4mg/kg/d、経口×4)とcyclophosphamide(60mg/kg/d×2)、移植片対宿主病(GVHD)予防はcyclosporineとshort-term methotrexateを使用した。2003年8月に姉より採取された末梢血幹細胞(CD34陽性細胞 $4.2 \times 10^6/\text{kg}$)を移植した。移植後経過をFig. 2に示す。

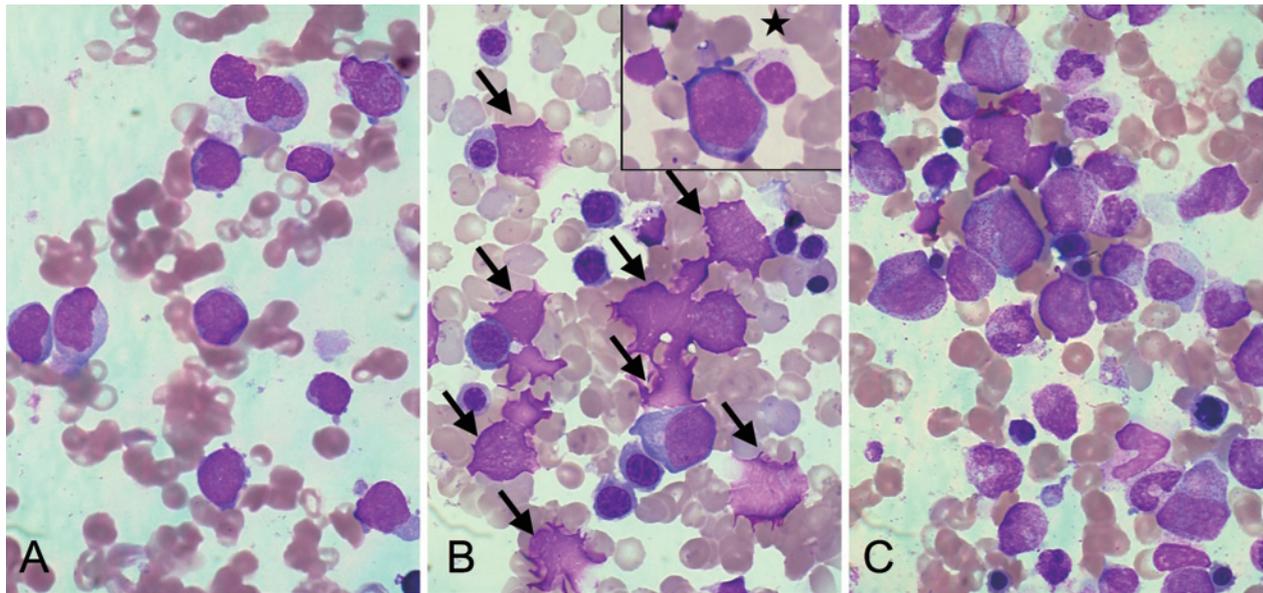


Fig. 1 Bone marrow (BM) aspiration (May-Giemsa staining $\times 1,000$).

- A. BM findings at the time of transformation into acute myeloid leukemia (June, 2003). There are no findings of maturation beyond the myeloblast stage.
- B. BM findings at 53 days after transplantation (October, 2003). Large granular lymphocytes (indicated by asterisk), marked cytolysis (indicated by arrows) and a marked decrease in myeloid lineage cells were observed. Erythropoiesis remained intact.
- C. BM findings at 70 days after transplantation (November, 2003). Granulocytic proliferation, which shows maturation, was observed.

Table 2 Profiles of recipient and donor

	Recipient	Donor
Age in years/Sex	59/Male	62/Female
Relation		Sibling of recipient
Blood type	O +	B +
HLA		
Antigens	A11/A31 (19) B54 (22) / - Cw1 / -	A11/A31 (19) B54 (22) / - Cw1 / -
DNA typing	DRB-1 0405 / -	DRB-1 0405 / -

生着に先行した day 16 より発熱と、顔面から全身に広がる紅斑を来した。day 18 に鼻翼付近より皮膚生検を行い、GVHD と病理診断された。GVHD の重症度は Grade II GVHD (skin stage 3) と診断し、day 18 より methylprednisolone を開始した (2mg/kg より漸減)。GVHD のステロイドへの反応は良好であった。移植後 Day 24 に生着に至った。その後良好に経過していたが、Day 53 に突然白血球数が低下した (Fig. 2)。骨髓検査では著明な細胞融解像を認め、顆粒球系の細胞が著減していたが、赤芽球は保たれていた (Table 1, Fig. 1 B)。骨髓でのリンパ球は 7.2% であり、その多くは形態的に顆粒リンパ球であった (Fig. 1B)。異性間 FISH 法による骨髓細胞のキメリズム解析では host 型である XY を有する細胞の割合は 5.8% であった。Day 54 での末梢血を用いた STR 法によるキメリズム解析ではホス

ト由来 CD3 陽性細胞を 48.3% に認めた。以上よりホスト由来リンパ球による、ドナー顆粒球系細胞に対する免疫的障害を原因とする顆粒球減少が疑われた。

Mixed chimerism を full chimerism へ転換することを目的に cyclosporine 投与を中止したが、好中球数の回復はみられず、敗血症性ショックを来した。Day 58, 59 にドナー由来顆粒球輸血 (total 2.5×10^{10} /kg, 放射線照射後投与) を施行し、敗血症症状はやや改善した。早期の full chimerism への転換を目的に day 59 に CD3 陽性細胞で 1×10^7 /kg の DLI を行った。DLI 後、速やかに好中球は回復し、骨髓像でも顆粒球系の良好な造血が確認された (Table 1, Fig. 1C)。敗血症も速やかに改善した。Day 68 のキメリズム解析ではホスト由来 CD3 陽性細胞は 0% で、full chimerism に至った。しかし好中球の回復と同時に急速に進行する呼吸不全を来とし、胸部 CT (day 69) では全肺野のすりガラス状陰影と crazy-paving pattern を認めた (Fig. 3)。種々の検査にて原因を同定出来ず、idiopathic pneumonia syndrome (IPS) と考えた。KL-6 は day 74 で 635U/ml (正常値 ≤ 500 U/ml) であった。人工呼吸器管理下にステロイドパルス療法や抗 TNF α 抗体製剤の投与を行うも効果なく、Day 92 に死亡に至った。

考 察

本症例は長期にわたる好中球減少に引き続いて AML

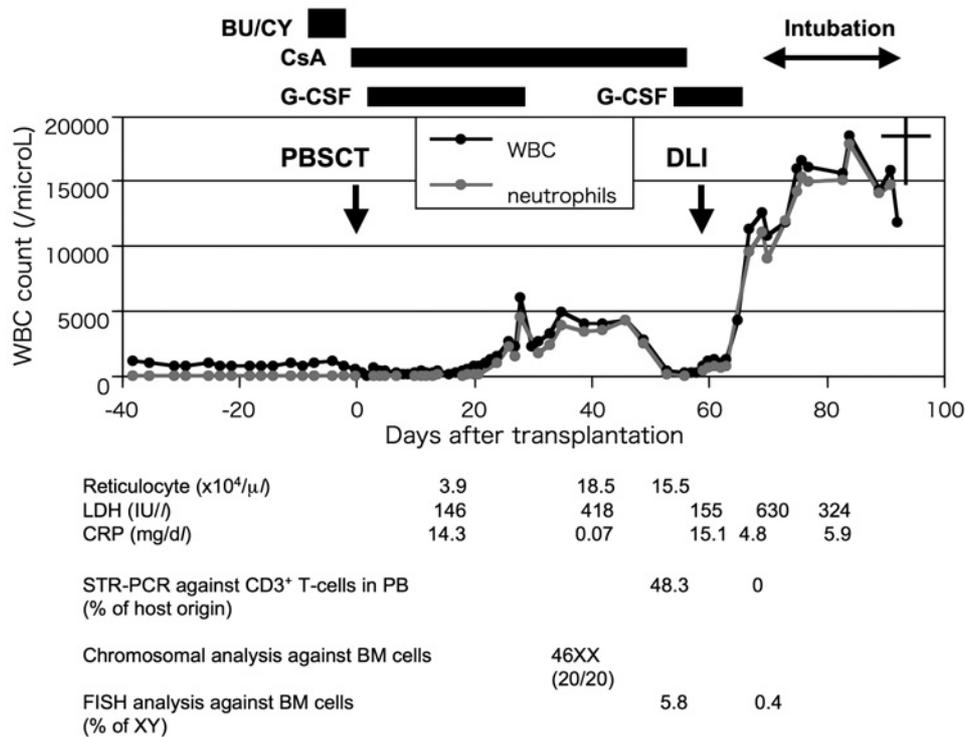


Fig. 2 Clinical course after stem cell transplantation. Engraftment of neutrophils was documented on day 24 after PBSCT. On day 53, severe neutropenia recurred. PCR analysis of short tandem repeat loci revealed the presence of host T cells in peripheral blood. After one course of DLI, his neutropenia improved. However, the patient developed idiopathic pneumonia syndrome concurrent with neutrophil recovery, and he died of respiratory failure 92 days after PBSCT.

BU/CY; busulfan and cyclophosphamide, CsA; cyclosporine, PBSCT; peripheral blood stem cell transplantation, DLI; donor lymphocyte infusions, LDH; lactate dehydrogenase (normal range: 212-410 IU/l), BM; bone marrow, STR; short tandem repeat, PB; peripheral blood, FISH; fluorescence in situ hybridization.

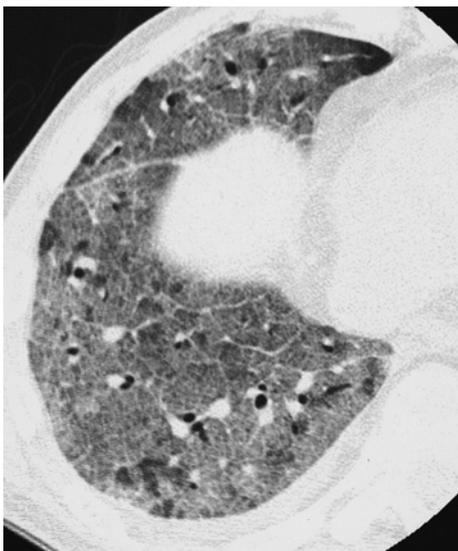


Fig. 3 High-resolution computed tomography findings on day 69 after transplantation. The main findings consisted of extensive ground-glass opacities superimposed on interlobular septal thickening ("crazy-paving" pattern).

に転化した。同胞間末梢血幹細胞移植後に、ホスト由来リンパ球の出現に一致して好中球減少を来した。DLIは好中球減少の改善には有効であり、致命的敗血症を改善することが出来た。しかし同時に間質性肺炎を合併して死亡に至った。

本症例は移植前に高度の好中球減少が持続したが、その病態は不明な点が多い。好中球減少のみを来した骨髓異形成症候群の可能性も考えられるが、初診時骨髓細胞に異形成は指摘出来ず、またAMLへの移行まで貧血や血小板減少を来さなかったことは骨髓異形成症候群として非定型的である。先天性の好中球減少症においては現在まで多くの解析が進み、多くの責任遺伝子が明らかにされている⁵⁾。またそのいくつかのタイプは本症例のようにAMLへの移行が認められており⁶⁾⁷⁾、G-CSFの使用は白血病への移行の危険を高める可能性も指摘されている⁸⁾。もし後天的に同様の遺伝子異常を来した場合、類似の病態を来す可能性や、本患者で使用されたG-CSFが白血病化を促進した可能性も考えられる。現在遺伝学的検討を行っている。また、好中球

のみの減少を来した点より、自己免疫性好中球減少症の可能性も考えられる。抗顆粒球抗体は陰性で、膠原病、薬剤、ウイルス感染症、リンパ増殖性疾患などの二次性自己免疫性好中球減少症の原因となる疾患⁹⁾は有しておらず、またステロイドや免疫抑制剤も好中球減少に効果を示さなかった。しかし、移植後に好中球特異的な減少が再燃し、骨髄で顆粒球系細胞の融解を認めるときにホスト由来リンパ球の存在が証明されたことは興味深い。

本例における移植後の好中球減少の再燃時にはホスト由来リンパ球の存在が確認されており、ホストのリンパ球がドナーの顆粒球系細胞を特異的に障害することにより来された可能性がある。移植後に免疫性の機序による好中球減少症を来した症例は過去に少数報告されている^{10)~13)}。しかし本症例において、移植前にも好中球減少を有していたことは特徴的である。患者由来リンパ球は同種抗原のみならず、顆粒球に共通する抗原に選択的に強い反応性を有していたのかもしれない。移植前には自己免疫的機序により好中球減少を来していたことを示すものかもしれない。

移植後の免疫性の白血球減少に対してはステロイド、血漿交換、免疫グロブリン¹²⁾やリツキシマブ¹⁴⁾の効果が報告されているが、これらは抗体が原因となる好中球減少により有効かもしれない。本症例はホスト由来リンパ球による細胞障害性の好中球減少を来してしていると考え、その排除が必要と考えてDLIを選択した。投与量はDLI療法のガイドライン(厚生省がん研究班、小寺班)を参考にして、CD3陽性細胞 $1.0 \times 10^7/\text{kg}$ とした。DLI後GVHDの悪化は認めずfull chimerismへ転換に伴い好中球は速やかに増加した。ホスト由来リンパ球を原因とする免疫性の血球減少を来している場合には、DLIはホスト由来リンパ球の排除により病態を改善し得ることが示された。しかし、本症例は移植前より好中球減少が先行していたなど、特異な症例であり、また結果的には血球回復に一致して発症した間質性肺炎で死亡していることを考慮すると、このような場合でのDLIの適応あるいは初期投与量などについては慎重であるべきとも考えられた。

DLIに引き続いて発症した間質性肺炎はIPSと判断した。IPSは造血細胞移植後の非感染性の間質性肺炎であり、免疫細胞介在性の障害、炎症性サイトカイン、潜在性の感染症が原因となる¹⁵⁾。病態は異なるが、輸血関連急性肺障害では、顆粒球に対する免疫反応の存在が肺の血管内皮障害や毛細血管透過性亢進を引き起こし急性肺障害が来される¹⁶⁾。患者はドナー顆粒球に対する免疫的障害性が存在していたことが疑われており、本例において好中球が増加した時期に一致して肺障害を来したことは興味深い。

まとめ

同種造血幹細胞移植後にホストリンパ球による免疫学的な白血球減少が来された場合のDLIの有効性が示唆された。

文 献

- 1) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, et al: Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: lower incidence of acute graft-versus-host disease and improve outcome. *Bone Marrow Transplant*, 26: 769—774, 2000.
- 2) Shiobara S, Nakao S, Ueda M, et al: Donor leukocyte infusion for Japanese patients with relapsed leukemia after allogeneic bone marrow transplantation: indications and dose escalation. *Ther Apher*, 5: 40—45, 2001.
- 3) Peggs KS, Thomson K, Hart DP, et al: Dose-escalated donor lymphocyte infusions following reduced intensity transplantation: toxicity, chimerism, and disease responses. *Blood*, 103: 1548—1556, 2004.
- 4) Jillela AP, Shafer D, Klumpp TR, et al: Mixed chimerism and graft failure following conditioning with the fludarabine and cyclophosphamide nonablative regimen; conversion to full donor chimerism. *Am J Hematol*, 82: 419—426, 2007.
- 5) Berliner N, Horwits M, Loughran TP Jr: Congenital and acquired neutropenia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 63—79, 2004.
- 6) Freedman MH, Alter BP: Risk of myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia in congenital neutropenia. *Semin Hematol*, 39: 128—133, 2002.
- 7) Link DC, Kunter G, asai Y, et al: Distinct patterns of mutations occurring in de novo AML versus AML arising in the setting of severe congenital neutropenia. *Blood*, 110: 1648—1655, 2007.
- 8) Freedman MH, Bonilla MA, Fier C, et al: Myelodysplastic syndrome and acute leukemia in patients with congenital neutropenia receiving G-CSF therapy. *Blood*, 96: 429—439, 2000.
- 9) Capsoni F, Sarzi-Puttini P, Zanella A: Primary and secondary autoimmune neutropenia. *Arthritis Res Ther*, 7: 208—214, 2005.
- 10) Klumpp TR, Herman JH, Macdonald JS, et al: Autoimmune neutropenia following peripheral blood stem cell transplantation. *Am J Hematol*, 41: 215—217, 1992.
- 11) Klumpp TR, Herman JH: Autoimmune neutropenia after bone marrow transplantation. *Blood*, 82: 1035, 1993.

- 12) Klumpp TR: Antibody-mediated neutropenia following bone marrow transplantation. *Int J Clin Lab Res*, 23: 4—1, 1993.
- 13) Tosi P, Bandini G, Tazzari P, et al: Autoimmune neutropenia after unrelated bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 14: 1003—1004, 1994.
- 14) Raj K, Narayanan S, Augustson B, et al: Rituximab is effective in the management of refractory autoimmune cytopenia occurring after allogeneic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 35: 299—301, 2005.
- 15) Fukuda T, Hackman RC, Guthrie KA, et al: Risks and outcomes of idiopathic pneumonia syndrome after non-myeloablative and conventional conditioning regimens for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood*, 102: 2777—2785, 2003.
- 16) Silliman CC, Ambruso DR, Boshkov LK, et al: Transfusion-related acute lung injury. *Blood*, 105: 2266—2273, 2005.

DONOR LYMPHOCYTE INFUSION FOR POST-TRANSPLANT NEUTROPENIA ACCOMPANIED BY MIXED CHIMERISM IN A PATIENT WITH IDIOPATHIC NEUTROPENIA WHICH LATER TRANSFORMED INTO ACUTE MYELOID LEUKEMIA

Masao Ogata^{1,2)}, *Tomoyuki Imamura*³⁾, *Junji Ikewaki*²⁾, *Eiichi Ohtsuka*²⁾, *Yoshiaki Tatsukawa*¹⁾, *Hiroshi Miyako*¹⁾, *Hiroshi Kikuchi*⁴⁾, *Jun-ichi Kadota*²⁾ and *Tetsunori Saikawa*¹⁾

¹⁾Blood Transfusion Center, Oita University Hospital

²⁾Department of Hematology, Oita University Hospital

³⁾Department of Hematology, Oita Memorial Hospital

⁴⁾Nishibeppu National Hospital

Abstract:

Donor lymphocyte infusions (DLI) are often used to convert mixed to full donor chimerism. Here, we present the case of a patient who developed agranulocytosis accompanied by mixed chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation (PBSCT) and then responded to DLI.

In 1998, a 59-year-old man presented with unexplained neutropenia. Although immunosuppressive therapies were ineffective, his neutropenia responded moderately to high-dose G-CSF, with which he was treated for 5 years. In 2003, transformation to acute myeloid leukemia occurred. He received allogeneic PBSCT from an HLA-identical sister. The conditioning regimen consisted of busulfan and cyclophosphamide. Engraftment of neutrophils was documented on day 24 after PBSCT. However, on day 53, severe neutropenia recurred. Bone marrow examination revealed marked cytolysis and a specific decrease in myeloid lineage cells. T-cell chimerism was assessed against peripheral blood mononuclear cells by PCR analysis of short tandem repeat loci, and the presence of recipient CD3-positive T cells was demonstrated (recipient type: 48.3%). DLI was performed to convert mixed to full donor chimerism. After one course of DLI (CD3-positive dose of 1×10^7 /kg of recipient body weight), his neutropenia improved. However, the patient developed idiopathic pneumonia syndrome concurrent with neutrophil recovery, and he died of respiratory failure 92 days after PBSCT.

This case emphasizes the importance of recipient cells in transplant-associated immune neutropenia, and the effectiveness of DLI in converting mixed to full donor chimerism.

Keywords:

idiopathic neutropenia, allogeneic stem cell transplantation, donor lymphocyte infusions