

## 重症複合免疫不全症 2 例における同種骨髄細胞移植後のキメリズム解析

道野 淳子<sup>1)</sup> 中出 祥代<sup>1)</sup> 佐竹伊津子<sup>1)</sup> 西野 主真<sup>1)</sup> 安村 敏<sup>1)</sup>  
 芳村 直樹<sup>1)</sup> 野村 恵子<sup>2)</sup> 金兼 弘和<sup>2)</sup>

重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency : SCID) の根治療法として同種造血幹細胞移植は欠かせない。今回、当院で経験した SCID の 2 例 (X 連鎖 SCID およびアデノシンデアミナーゼ欠損症) について、前者は前処置なしで、後者は弱い前処置後に HLA 適合同胞からのマイナーミスマッチ同種骨髄移植 (bone marrow transplantation : BMT) を行い、BMT 後の赤血球抗原検査および白血球のマイクロサテライト (MS) 多型を用いたキメリズム検査を経時的に行った。2 例とも BMT 後の免疫機能が改善されたという点では、本来の目的を達成することができた。移植後の経時変化を追ったところ、症例 1 (X 連鎖 SCID) は、2 年半後の現在も赤血球はレシピエント型のままであり、白血球は、T 細胞以外の他の細胞は混合キメラの状態であった。症例 2 (アデノシンデアミナーゼ欠損症) は、1 年後の現在、赤血球、白血球はほぼドナー型となった。症例 1 については、今後も経過観察を行っていく必要がある。

キーワード：同種骨髄移植、重症複合免疫不全症、キメリズム

## はじめに

重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency : SCID) の根治療法として同種造血幹細胞移植は欠かせない<sup>1)~3)</sup>。今回、当院で経験した SCID の 2 例について、HLA 適合同胞からの骨髄移植 (bone marrow transplantation : BMT) を行い、移植後の赤血球抗原検査および白血球のマイクロサテライト (MS) 多型を用いたキメリズム検査<sup>4)~6)</sup>を経過時に調べたので報告する。

## 方 法

## 【症例】

症例 1 : 3 カ月男児 A 型 Rh+ X 連鎖 SCID.

他院にて肺炎、リンパ球数ならびに血小板数減少、肝機能障害から免疫不全症が疑われ、当院へ紹介入院となった。フローサイトメトリーにて T 細胞欠損 SCID と診断し、遺伝子解析にて *IL2RG* 遺伝子変異を認め、X 連鎖 SCID と診断した。同種造血幹細胞移植の適応と考えられ、家族の HLA 検査を行ったところ、姉 (2 歳 6 カ月、O 型 Rh+) が HLA 一致と判明した。そこで姉をドナーとして ABO マイナーミスマッチ同種 BMT を施行した。全身性サイトメガロウイルス感染症を合併していたため、前処置を行わなかった。移植細胞数

は有核細胞数  $6.84 \times 10^8$  個/kg であった。

移植 7 日に血尿を伴う溶血性貧血を認めた。マイナーミスマッチ移植によるドナーリンパ球の免疫抗体獲得に伴う反応と考えられ<sup>7)8)</sup>、O 型洗浄赤血球を 1 単位輸血した。

移植前の血清免疫グロブリン値 (IgG 527mg/dl, IgA 16mg/dl, IgM 16mg/dl) は、移植後 8 日 (888, 20, 9), 14 日 (1,088, 5, 104), 28 日 (1,184, 3, 215) と徐々に回復し、移植後 64 日に退院となった。IgG 値は 24 カ月頃から現時点の 30 カ月にかけ、若干の低下傾向 (24 カ月 927, 27 カ月 818, 30 カ月 716) を示しているが、易感染性なく、免疫グロブリン補充療法は行っていない。

異性間 FISH を行ったところ、移植後 35 日にはドナー型の XX シグナルが 342/500 (68.4%) 認められた (Fig. 1)。

移植後生着確認を行うため、赤血球抗原検査およびキメリズム検査にて経過を観察した。

症例 2 : 4 歳男児 AB 型 Rh+ 遅発型アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase : ADA) 欠損症。

肺炎のため当院受診。気管支炎・肺炎を繰り返していたことから免疫不全症を疑い精査を行ったところ、リンパ球数減少、B 細胞ならびにナイーブ T 細胞の欠

1) 富山大学附属病院輸血・細胞治療部

2) 富山大学附属病院小児科

〔受付日：2012 年 3 月 30 日、受理日：2012 年 6 月 26 日〕

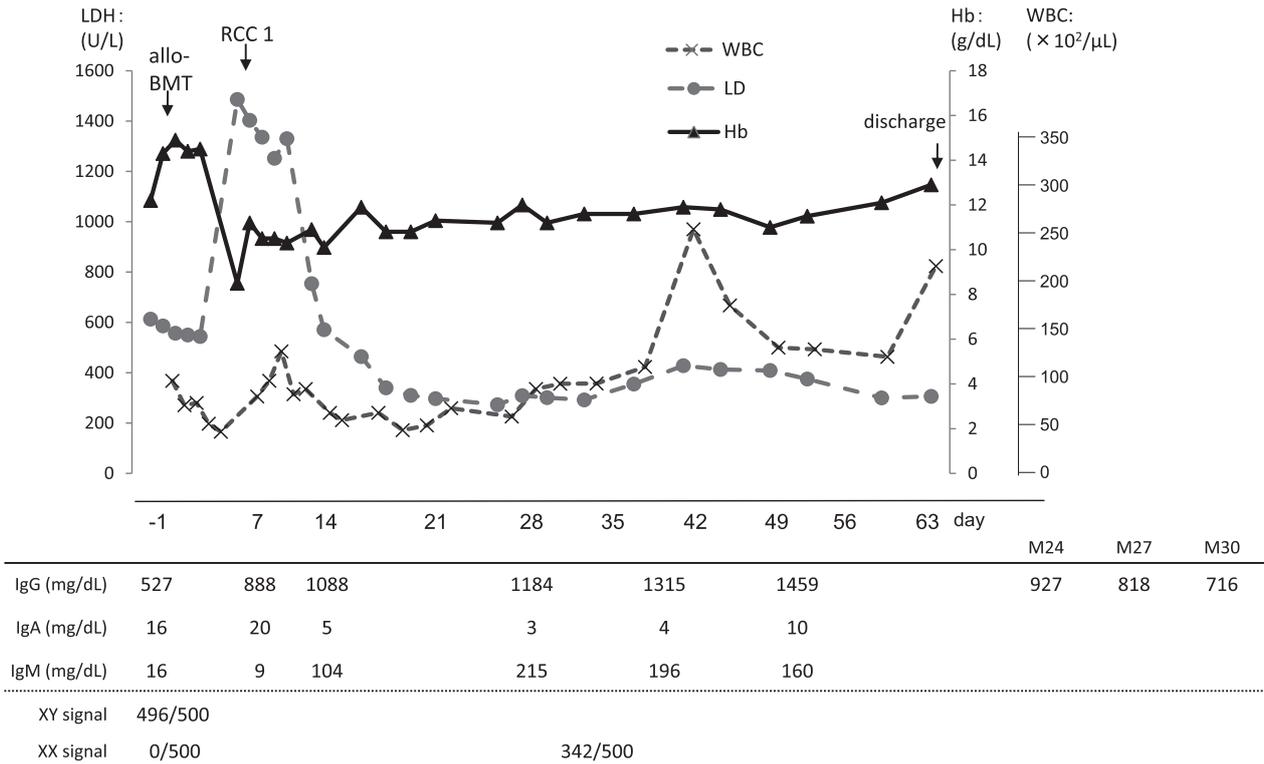


Fig. 1 Sequential data of serum immunoglobulin and FISH analysis in case 1.

Hemolysis which was possibly related with a minor mismatch BMT was observed. Serum IgG levels gradually decreased.

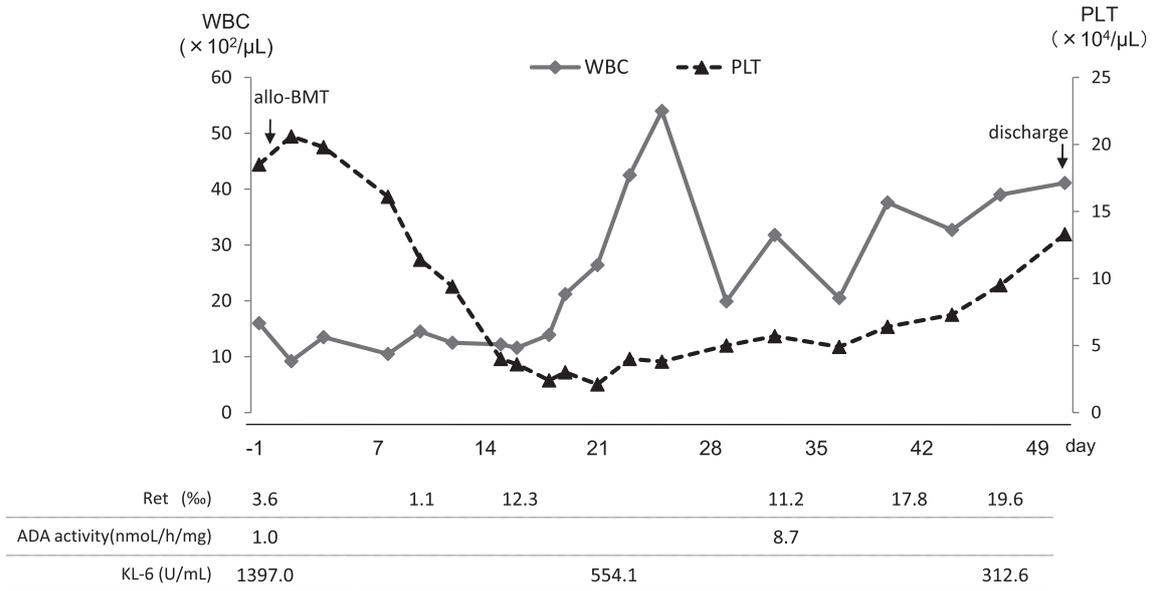


Fig. 2 Laboratory data in case 2 after BMT.

WBC, platelets and reticulocytes were sequentially examined post BMT in case 2. After BMT, ADA level increased and KL-6 level decreased, indicating good immunological reconstitution. The patient was discharged on day 51.

損, リンパ球 ADA 活性値の低下を認め, ADA 欠損症と診断された.

姉 (7歳, A型 Rh+) と HLA が完全一致したことより, 姉をドナーとして ABO マイナーミスマッチ同種

BMT を施行した. フルグラビン 180mg/m<sup>2</sup>+ブスルファン 8.8mg/kg による前処置を行い, 移植細胞数は有核細胞数 3.1×10<sup>8</sup>/kg であった.

移植後 16 日には, 白血球, 網状赤血球が増加傾向を

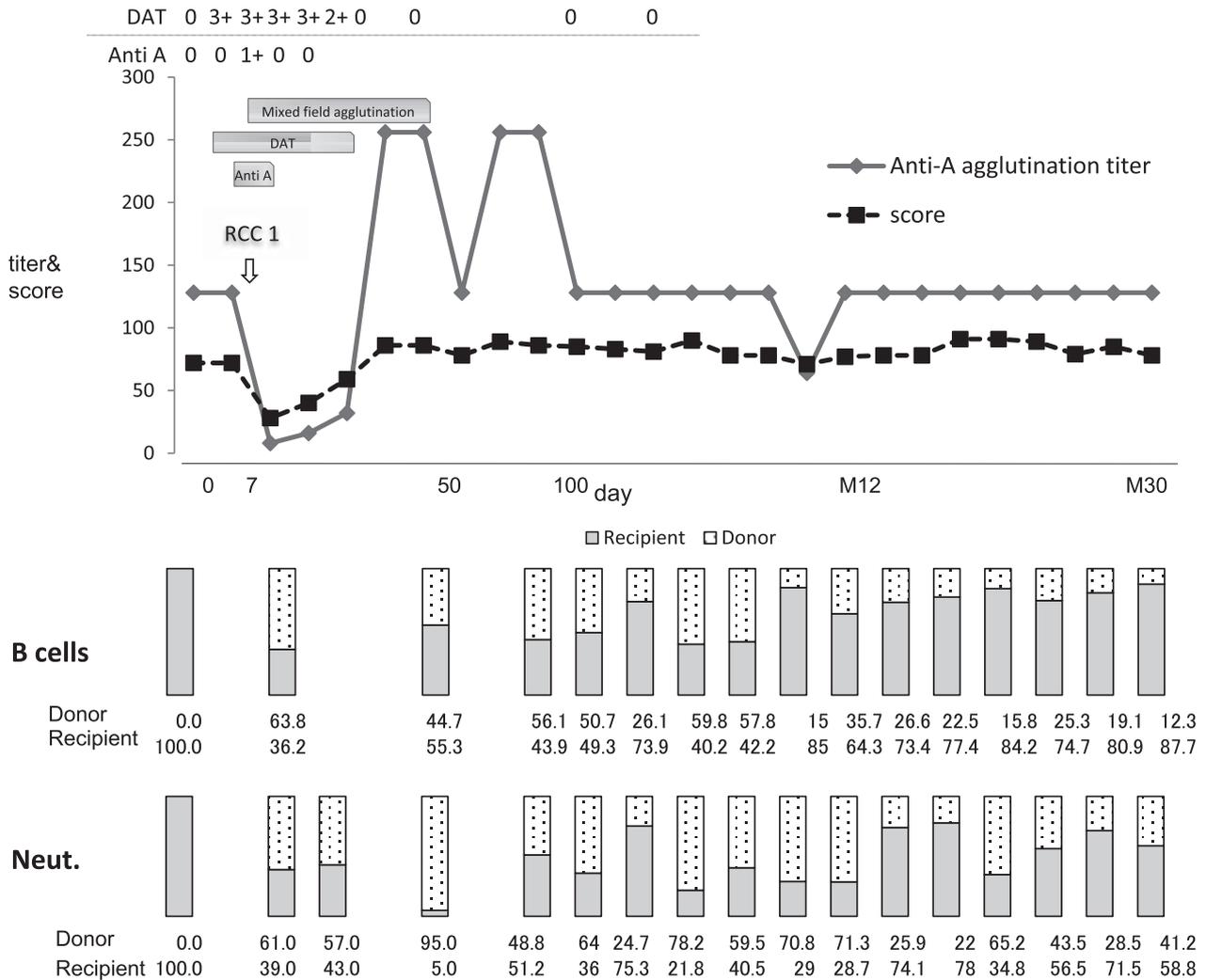


Fig. 3 Sequential analysis of red blood cell A antigen and chimerism of B cells and neutrophils from case 1. At 25 years after BMT, RBC still showed A-type, which was the recipient-type. Soon after BMT, mixed field agglutination which might have been related with anti-A, DAT and RBC transfusion was observed. Microsatellite analysis of D9S304 revealed that donor-type cells were dominant on day 259, but recipient-type cells were dominant since then.

Table 1 ABO DNA typing by r-SSO method

		ABO 1 allele	ABO 2 allele	
patient 1	pre transplantation	A101	O01	
	month 30	Whole	A101	O01
		CD3	O01	—
		B cells	A101	O01
		Neutrophils	A101	O01
Donor	O01	—		
patient 2	pre transplantation	A102	B101	
	day 83	Whole	A102	O02
		Donor	A102	O02

示し、生着の兆しを認めた。移植後の ADA 活性も正常化し、移植 51 日に退院となった (Fig. 2).

症例 1 と同様、移植後赤血球抗原検査とキメリズム検査を経時的に確認した。

【白血球分離・抽出】

移植後の末梢血からリンホセパール I (IBL) を用いてリンパ球を分離し, EasySep Selection beads (STEM-CELL Technologies 社) を用いて, CD3 陽性 T 細胞および B 細胞を回収し, リンパ球層以外の白血球を顆粒球とした。抽出には QuickGene-Mini80 (Fuji Film) を使用し, DNA 濃度を 20ng/μl に調整し使用した。

【ABO 血液型抗原検査】

マイナーミスマッチによるレシピエント型 ABO 抗原の減弱は, 倍々希釈した抗血清 (和光: 動免) を用いて被凝集価とスコアを経時的に確認した。症例 1 では ABO 異型によるドナーリンパ球の免疫抗体獲得に伴い出現した抗 A および直接抗グロブリン試験 (Direct antiglobulin test: DAT) についても経時的に調べた。

また, 移植前後の白血球について ABO 遺伝子型の確認を r-SSO (reverse-sequence specific oligonucleotide)

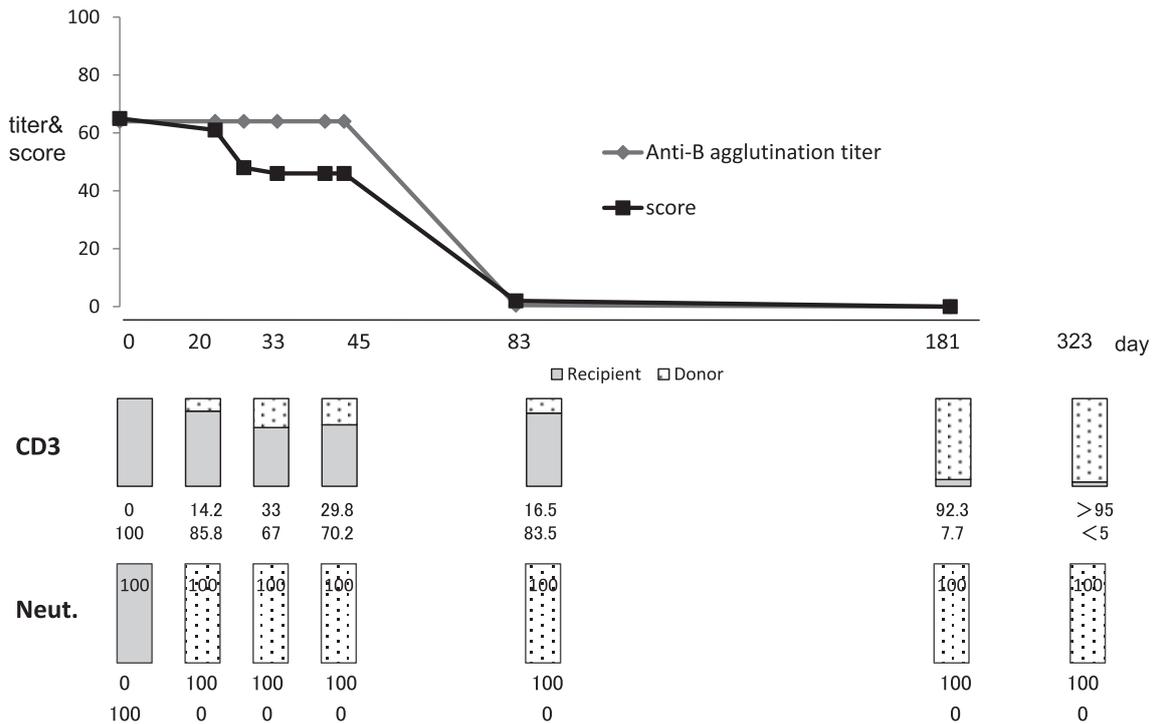


Fig. 4 Sequential analyses of agglutination titer, score of red blood cell B antigen and chimerism of CD3<sup>+</sup> T cells and neutrophils from case 2.

B antigen on recipient RBC rapidly decreased after BMT, and RBC type was completely changed to the donor type on day 181. Microsatellite analysis of D8S1179 revealed that neutrophils showed a complete donor-type on day 33, but a few CD3<sup>+</sup> T cells showed recipient-type on day 323.

法で行った。反応試薬は ABO タイピング試薬 (MBL 研究用試薬) を用い、Luminex にて測定し、専用解析ソフトにて判定を行った。

**【MS 多型によるキメリズム検査】**

MS は、症例 1 は D9S304, 症例 2 は D8S1179 を使用し、移植前のレシピエントおよびドナーの DNA とともに PCR を行った。PCR 産物を 10% ポリアクリルアミドゲルで 15V 2 時間 30 分泳動後、SYBR Gold (Invitrogen) で染色した。ChemiDoc XRS (BIO-RAD) にて検出したバンドは、解析ソフト Quantity One (BIO-RAD) を用いて濃度の定量を行った。

**結 果**

**【赤血球抗原検査】**

症例 1：移植 7 日に Hb14.5 から 8.5g/dl, LDH 544 から 1,486U/l と急激な溶血反応および血漿中に抗 A を認め、O 型洗浄赤血球 1 単位の輸血を行った。抗 A は生食法でのみ反応する微弱な抗体で、その後すぐに消失した。DAT は移植直後より出現し、30 日には消失した。輸血した O 型赤血球により 46 日までは Mixed field agglutination を認めたが、それ以降レシピエント型である A 型を示しており、抗原の被凝集素価は 128 倍、スコアは、80 前後の値を維持している (Fig. 3)。

移植 30 カ月の ABO 遺伝子型は、CD3 陽性細胞は O01 のホモとなり、完全ドナー型であることが確認された。B 細胞、顆粒球は、A101/O01 とレシピエント型の A101 を有していることより、混合キメラであることが示唆された (Table 1)。

症例 2：移植 20 日頃より B 抗原のスコアが減少傾向を示し、83 日には赤血球上に B 抗原を認めず、完全ドナー型となった (Fig. 4)。移植後、溶血や DAT の陽転は認めなかった。181 日の ABO 遺伝子型は A102/O01 と、完全ドナー型が確認された (Table 1)。

**【MS によるキメリズム検査】**

症例 1 は、免疫グロブリンの回復時期を生着と判断し、各細胞についてレシピエントとドナーの割合を確認した。T 細胞欠損のため、移植後 CD3 陽性 T 細胞は、100% ドナー型を示した。B 細胞および顆粒球は、いったんはドナー型に傾きつつも、30 カ月の現時点では、レシピエントとドナーの割合は全血 42.3/57.7, B 細胞 87.7/12.3, 顆粒球 58.8/41.2 と、レシピエント優位の傾向にある (Fig. 3)。

症例 2 は、全血では 33 日 49.3/50.7, 83 日 19.5/80.5, 108 日 5>/95<となったが、細胞ごとで見ると、顆粒球が移植 12 日ですでに完全ドナー型となったのに対し、CD3 陽性細胞は 12 日 85.8/14.2, 33 日 67/33, 40 日 70.2/

29.8, 83日83.5/16.5, 181日7.7/92.3, 323日5>/95<と, 約1年後に漸くほぼドナー型となった (Fig. 4).

## 考 察

症例1の赤血球は移植後2年3カ月の現在, レシピエント型であるA型を示し, 白血球は, T細胞以外のB細胞, 顆粒球は混合キメラの状態である. X連鎖SCIDはT細胞の欠損より起こるため, 移植後に検出されたT細胞はすべてドナー由来である. その他の細胞は, 現在レシピエント優位の傾向があり, その原因として前処置なしのBMTであったためと思われる.

症例2では, 赤血球は移植後83日に完全ドナー型となり, 白血球はB細胞, 顆粒球が早期にドナー型に移行したのに対し, T細胞は, 323日の時点でおおむねドナー型を示したが, レシピエント型が若干確認された. 治療強度を弱めた前処置により, レシピエントのTリンパ球が長期生存していたためと考えられる.

SCIDはリンパ球の発生障害により, T細胞やB細胞の欠損や欠陥に起因し, 原因としてインターロイキン(IL)-2, IL-4, IL-7などのサイトカイン受容体に共有する $\gamma$ c鎖の変異によるX連鎖SCIDが約半数を占める. その他にも $\gamma$ c鎖受容体からのシグナル伝達に関わるJAK3遺伝子異常, 遺伝子再構成に関わるRAG1/2ならびにArtemis遺伝子変異, ADA欠損症など10数種類以上の原因がある<sup>9)</sup>. 臨床的には生直後よりさまざまな重症感染や日和見感染を起こし, 造血幹細胞移植を行うことが唯一の治療法とされている.

ADA欠損症は, 典型的にはT細胞, B細胞, NK細胞が減少するSCIDとして発症するが<sup>9)10)</sup>, 時に遅発型として発症し, 自験例は本邦初の症例と考えられる<sup>11)</sup>. 遅発型ADA欠損症比較的症状が軽いことから見落とされている可能性がある.

今回経験したSCID2例のBMTは, 移植後の免疫機能はほぼ回復し, 移植の成果は得られた. 移植後の赤血球抗原と白血球キメラリズムを追跡したところ, 症例1は, 赤血球はレシピエント型のままで, 白血球は混合キメラ状態を保っており, 症例2は, 赤血球, B細胞, 顆粒球は約2カ月半で完全ドナー型となったが, T細胞は323日の時点でわずかにレシピエント型を残している.

症例1は, B細胞および顆粒球が一時はドナー型に向うも, 移植後2年半経過した現在は, レシピエント型に傾いている傾向があり, とくにB細胞はその傾向が強く, 血清IgG値も低下傾向にあり, 今後動向を確認していく必要がある. また輸血に関しては, 赤血球製剤, 血漿製剤とも, 現時点ではレシピエント型を選択すべきである. 症例2は, 赤血球はドナー型の生着が確認されていることより, 輸血の必要性があればドナー

型の赤血球を選択する.

## おわりに

SCIDの2症例(X連鎖SCIDおよび遅発型ADA欠損症)に対して, マイナーミスマッチHLA適合同胞からのBMTを行った. 両者とも免疫機能が改善されたという点では, 本来の目的を達成することができた. 赤血球型および白血球のキメラリズムを経時的に観察した結果, 症例1は, 2年半後の現在, 赤血球はレシピエント型のままであり, T細胞はドナー型であるがその他の細胞は混合キメラの状態である. 症例2は, 遅いながらも赤血球, 白血球はほぼドナー型となっている. 症例1については, 今後も経過観察を行っていく必要がある.

## 文 献

- 1) Grunebaum E, Mazzolari E, Porta F, et al: Bone marrow transplantation for severe combined immune deficiency. *JAMA*, 295: 508—518, 2006.
- 2) Cavazzana-Calvo M, André-Schmutz I, Dal Cortivo L, et al: Immune reconstitution after haematopoietic stem cell transplantation: obstacles and anticipated progress. *Curr Opin Immunol*, 21: 544—548, 2009.
- 3) Buckley RH: B-cell function in severe combined immunodeficiency after stem cell or gene therapy: a review. *J Allergy Clin Immunol*, 125: 790—797, 2010.
- 4) 吉場史朗, 土田文子, 佐藤 薫, 他: マイクロサテライトDNA (STR) を用いた造血幹細胞移植後のキメラリズム解析の有用性に関する研究. *日本移植学会誌*, 39: 556—563, 2004.
- 5) Frankel W, Chan A, Corringham RE, et al: Detection of chimerism and early engraftment after allogeneic peripheral blood stem cell or bone marrow transplantation by short tandem repeats. *Am J Hematol*, 52: 281—287, 1996.
- 6) Nuckols JD, Rasheed BK, McGlennen RC, et al: Evaluation of an automated technique for assessment of marrow engraftment after allogeneic bone marrow transplantation using a commercially available kit. *Am J Clin Pathol*, 113: 135—140, 2000.
- 7) Rowley SD, Liang PS, Ulz L: Transplantation of ABO-incompatible bone marrow and peripheral blood stem cell components. *Bone Marrow Transplant*, 26: 749—759, 2000.
- 8) Bolan CD, Childs RW, Procter JL, et al: Massive immune haemolysis after allogeneic peripheral blood stem cell transplantation with minor ABO incompatibility. *Br J Haematol*, 112: 787—795, 2001.

- 9) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al: Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the international union of immunological societies expert committee for primary immunodeficiency. *Front Immunol*, 2: 54, 2011.
- 10) Hirschhorn R: Adenosine deaminase deficiency: Molecular basis and recent developments. *Clin Immunol Immunopathol*, 76: 219–227, 1995.
- 11) Nakaoka H, Kanegane H, Taneichi H, et al: Delayed onset adenosine deaminase deficiency associated with acute disseminated encephalomyelitis. *Int J Hematol*, 2012 Mar 24. [Epub ahead of print].

## ANALYSIS OF CHIMERISM AFTER BONE MARROW TRANSPLANTATION IN TWO PATIENTS WITH SEVERE COMBINED IMMUNODEFICIENCY

*Junko Michino*<sup>1)</sup>, *Sachiyo Nakade*<sup>1)</sup>, *Itsuko Satake*<sup>1)</sup>, *Kazuma Nishino*<sup>1)</sup>, *Satoshi Yasumura*<sup>1)</sup>,  
*Naoki Yoshimura*<sup>1)</sup>, *Keiko Nomura*<sup>2)</sup> and *Hirokazu Kanegane*<sup>2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Transfusion Medicine and Cell Therapy, Toyama University Hospital

<sup>2)</sup>Department of Pediatrics, Toyama University Hospital

### **Abstract:**

Allogeneic hematopoietic stem cell transplantation is the only curative treatment for severe combined immunodeficiency (SCID). Recently, we treated two children with SCID (X-linked SCID and adenosine deaminase (ADA) deficiency) who underwent bone marrow transplantations (BMT) from HLA-identical minor mismatch donors. Conditioning was not performed in the patient with X-linked SCID, whereas reduced-intensity conditioning was done in the patient with ADA deficiency. In this study, antigens on red blood cells (RBC) and chimerism of subpopulations of white blood cells (WBC) were sequentially examined. Immunological status of both patients was completely improved. The patient with X-linked SCID showed that RBCs were derived from the donor, and subpopulations of WBCs except for T cells had mixed chimerism at 2.5 years after BMT. The patient with ADA deficiency showed that all cells were derived from the donor at one year after BMT. The patient with X-linked SCID requires follow-up for a long period.

### **Keywords:**

allogeneic bone marrow transplantation, severe combined immunodeficiency, chimerism