

患者由来抗 E 出現後に Evans 症候群を発症した同種造血幹細胞移植の 1 例

山崎 理絵¹⁾ 上村 知恵¹⁾ 五十嵐靖浩¹⁾ 藤村 亮介¹⁾ 森 文香¹⁾
 中山 瞳²⁾ 甲田 祐也²⁾ 加藤 淳²⁾ 森 毅彦²⁾ 田野崎隆二¹⁾

同種造血幹細胞移植後 Evans 症候群発症の前に、患者由来不規則抗体の陽性化を認めた症例を経験したため報告する。【症例】28 歳女性，O 型 Rh (+)。慢性骨髄性白血病（急性転化）に対し，HLA 一致非血縁ドナー（男性，A 型 Rh (+)）より骨髄移植を施行した。移植後急性移植片対宿主病および器質化肺炎を合併し，ステロイドにより加療し改善した。1 カ月に 1 度不規則抗体スクリーニングを実施していたが，ステロイド減量中の移植後 1 年の定期外来受診時，はじめて抗 E が陽性となった。その 1 カ月後に高度の貧血および血小板減少を認め，Evans 症候群と診断された。ドナーおよび患者の Rh 血液型は DCcEe および DCCee であり，発症時に患者由来 B 細胞の残存を認めた。患者残存 B リンパ球による同種抗体産生をきっかけに，赤血球・血小板に対する自己抗体が産生されたものと考えられた。【結語】同種造血幹細胞移植後に不規則抗体が出現した場合は，同定を速やかに行うとともに，病態変化の可能性を念頭に入れて，注意深く経過を追う必要がある。

キーワード：免疫性溶血性貧血，Evans 症候群，同種造血幹細胞移植，不規則抗体

はじめに

同種造血幹細胞移植 (allogeneic hematopoietic stem cell transplantation : allo-HSCT) 後には，原病，薬剤，感染，ドナー・患者間の血液型不一致，微小血管血栓など，様々な要因により溶血をきたす¹⁾。自己抗体あるいは同種抗体による免疫性溶血性貧血 (immune-mediated hemolytic anemia) もその一つである。自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia : AIHA) は allo-HSCT 後 1.5~4.4% に発症すると報告されている^{2)~4)}。しかし，AIHA に特発性血小板減少性紫斑病 (idiopathic thrombocytopenic purpura : ITP) を合併する Evans 症候群の allo-HSCT 後の発症については数例報告があるのみである⁵⁾⁶⁾。今回我々は，非血縁者間骨髄移植 1 年後に Evans 症候群を合併し，リツキシマブ投与後のステロイド治療により軽快した症例を経験した。本症例では，症状出現前に定期的な不規則抗体スクリーニング検査で抗 E が陽性化した。AIHA 発症との関連性について考察し報告する。

症 例

患者：28 歳女性 O 型 Rh (+) 不規則抗体無し。
 既往歴・妊娠歴：なし。
 経過：某年 8 月より動悸や頭痛を自覚するようにな

り近医受診，血液検査で白血球 105,000/ μ l，芽球 44%，ヘモグロビン (Hgb) 9.2g/dl，血小板 6.5 万/ μ l を指摘され，当院紹介受診となった。骨髄検査で芽球 95.7%，Major BCR-ABL 陽性，染色体検査では，解析した 20 細胞全てに t(9;22)(q34;q11.2) を認め，慢性骨髄性白血病急性転化期（リンパ芽球性）と診断された。プレドニゾン (PSL) 先行投与後にダサチニブ 140mg/日にて加療し，翌年 2 月に HLA 一致非血縁ドナー（男性，A 型 Rh (+)）より骨髄移植を施行した。前処置は全身放射線照射 12Gy + シタラビン 8g/m² + シクロホスファミド 120mg/kg，移植片対宿主病 (graft-versus-host disease : GVHD) 予防は，タクロリムス + メトトレキサートとして，Day 17 に生着を確認した。生着期に急性 GVHD (Grade II : 皮膚) を認めたが，PSL 1 mg/kg/日で改善した。Day100 前後に器質化肺炎を発症し，メチルプレドニゾン 2mg/kg/日で加療開始し，改善を認めた。Day130 よりステロイドの減量を開始した。Day 138 を最後に赤血球輸血 (O 型) が不要となり，血小板輸血も Day 152 で不要となったが，Hgb 値は 8 g/dl 台後半で推移していたため，1 カ月ごとの外来受診時に輸血に備えて不規則抗体スクリーニングを行っていた。PSL 4mg/日まで減量していた外来受診日 (Day 335) の不規則抗体スクリーニングで抗 E が検出された。

1) 慶應義塾大学医学部輸血・細胞療法センター

2) 慶應義塾大学医学部血液内科

〔受付日：2020 年 3 月 17 日，受理日：2020 年 5 月 14 日〕

Table 1 Laboratory data on admission

CBC		Chemistry	
WBC	6,800 / μ l	T. Bilirubin	0.9 mg/dl
Seg	75 %	D. Bilirubin	0.1 mg/dl
Lymphocytes	9 %	AST	27 U/l
Monocytes	9.5 %	ALT	20 U/l
Eosinophils	3.5 %	LDH	413 U/l
RBC	142×10^4 / μ l	BUN	31.6 mg/dl
Hgb	5.5 g/dl	Cre	1.04 mg/dl
PLT	2.7×10^4 / μ l	CRP	0.06 mg/dl
Reticulocytes	8.8 %	Haptoglobin	<10 mg/dl
Other			
		HLA antibody	negative
		PA-IgG	186 ng/ 10^7 cells
		Elispot (GPIIb/IIIa)	14 cells/ 10^5 PBMC
Bone marrow			
NCC	217,800 / μ l	Eosinophils	2 %
Megakaryocytes	40 / μ l	Basophils	0.4 %
M/E ratio	1.1	Monocytes	1.6 %
Blasts	1.2 %	Lymphocytes	3.2 %
Promyelocytes	0.4 %	Plasma cells	0.2 %
Myelocytes	5.8 %	Pronormoblasts	1.0 %
Metamyelocytes	9.2 %	Normoblasts (baso)	1.4 %
Band	11.8 %	Normoblasts (poly)	43.6 %
Seg	18.2 %		
		chromosome	46XY (50 cells)
		XY-FISH	XY 498 cells XX 2 cells

FISH: Fluorescence in situ hybridization; PA-IgG: Platelet-associated IgG; M/E ratio: myeloid/erythroid ratio

後方視的に確認したところ移植前後に計8回E抗原陽性の赤血球製剤が輸血されており、最後のE抗原陽性輸血はDay119であったが、その後のスクリーニングで不規則抗体は一貫して陰性であった。臨床症状はなく、血液検査も変化なかったため、PSL 4mg/日を2mg/日へ減量し経過観察となった。Day 356 労作時呼吸苦にて来院、白血球 5,500/ μ l、Hgb 5.5g/dl、血小板 2.7万/ μ l と2系統の血球減少を認め入院となった。

入院時身体所見：体重 50.7kg、血圧 86/51mmHg、脈拍 93/min、体温 37.2℃、酸素飽和度 98%、眼瞼結膜貧血様、眼球結膜黄染認めず。表在リンパ節触知せず、心音整、肺野清。肝脾触知せず。下腿浮腫なし。

入院時検査所見 (Table 1)：末梢血では高度な貧血、血小板減少を認め、網状赤血球の増加、間接ビリルビン、LDH の上昇から溶血が疑われた。ハプトグロビンは感度以下、エリスロット検査で Glycoprotein (GP) IIb/IIIa 抗体産生細胞を認めた。骨髓は軽度過形成で赤芽球系細胞および巨核球の増加を認め、原病の再発所見は認めなかった。骨髓の XY-FISH にて 500 細胞中 2 細胞の患者由来細胞を認めた。

輸血検査所見：血液型オモチ検査では、A 抗原陽性

であったが一部にフリーセルを認め、O 型血球の残存が疑われた。フローサイトメトリー解析では、A 型血球は 90.2% であった (Fig. 1)。不規則抗体スクリーニングで抗 E 陽性、広スペクトラム抗血清による直接クームス試験にて IgG および補体が赤血球表面に存在することが確認された。赤血球自己抗体解離試験後の血清は、各種血球に広範囲に反応したが、特に E 抗原陽性血球に 3+ から 4+ と強く反応した。移植後の Rh 血液型は、カラム凝集法にて DCCeE であった。患者の Rh 血液型は、保存していた患者の移植前末梢血単核球を用いて PCR-SSP 法にて RHCE 遺伝子を解析し⁷⁾、DCCee と判定した。

末梢血 B リンパ球由来解析：追加検討として後日デジタル PCR で入院時の患者末梢血中の B リンパ球の由来解析を行った。単核球より CD3 陽性細胞および CD 19 陽性細胞を単離し、DNA を抽出した。QuantStudio™ 3D Digital PCR System (Thermo Fisher Scientific) により SRY (sex determining region on Y) 陽性細胞を男性由来細胞としてドナー由来細胞の割合を解析することとし、VIC 標識 TaqMan™ Copy Number Reference Assay human RNase P を全細胞数カウントに、FAM

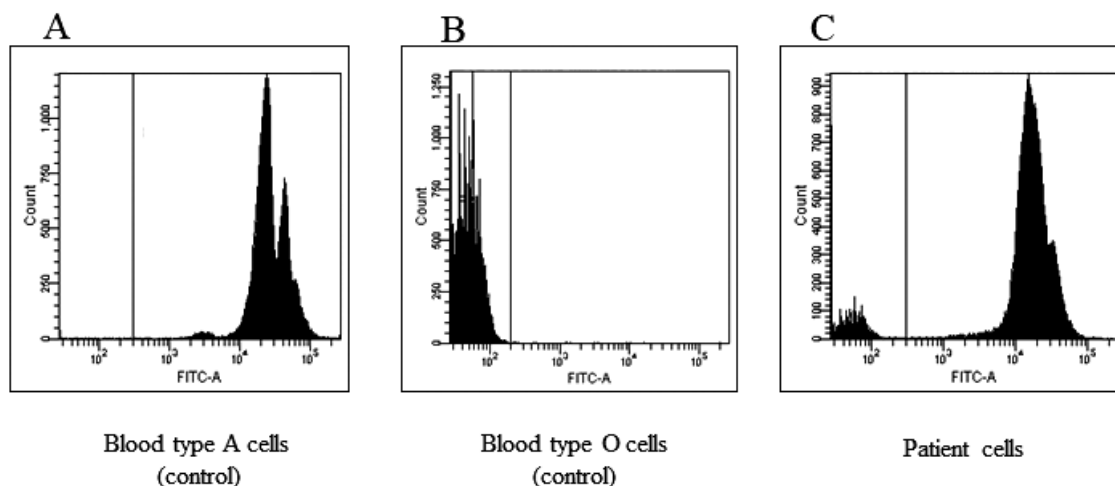


Fig. 1 Flow cytometry analysis of red blood cells on admission. In the histograms, FITC-derived fluorescence is displayed on the X axis and the number of cells on the Y axis. Fig. 1-A and 1-B show controls. Two populations of cells, group A and group O, were detected (Fig. 1-C). Almost 10% of the patient's red blood cells did not express A antigens. These cells were considered to be remaining recipient-derived red cells.

Table 2 Digital PCR analysis of patient lymphocytes on admission

Sample	Cell count*/ μ l	SRY copies/ μ l	Ratio of SRY-positive cells
male control	169.10	170.72	1.01
patient CD3-positive cells	184.57	176.57	0.96
patient CD19-positive cells	199.81	177.50	0.89
patient PBMC	118.01	112.02	0.95

PBMC: peripheral blood mononuclear cells; SRY: sex-determining region on Y

*Cell count was calculated by one-half copies of RNase P.

標識 Taqman[®] gene expression assays SRY をドナー由来細胞のカウントに用いた。CD19 陽性細胞の 89% がドナー由来の SRY 陽性細胞であり、約 10% の患者由来 B 細胞が残存していることが確認できた (Table 2)。なお、本検討は慶應義塾大学医学部倫理委員会の承認を受け、患者より同意を取得の上実施している。

入院後経過 (Fig. 2)：直接 Coombs 試験が陽性であること、および GP IIb/IIIa 抗体産生細胞の存在から Evans 症候群と診断した。抗 E が患者由来の同種抗体である可能性を考え、輸血は E 抗原陰性血で対応した。

ステロイド加療中の発症であったため Day366 よりリツキシマブ (375mg/m²) を週 1 回、計 4 回投与した。効果不十分であったため、Day396 より PSL 0.5mg/kg/day を追加したところ速やかにデータの改善を認めた。Day416 より輸血が不要となり、Day426 に退院、ステロイドは漸減し Day650 に中止した。Day713 には不規則抗体も陰性化した。

考 察

今回我々は、同種骨髄移植後に Evans 症候群を合併した症例を経験した。本症例で特記すべきは、発症時

患者 B リンパ球が残存しており、ドナー特異血液型抗原である E に対する不規則抗体が同定されている点である。

今回の溶血および血小板減少の機序を推測する。溶血および血小板減少の原因抗体は、ドナー由来自己抗体と思われ、ステロイド減量後の免疫能亢進に伴い、自己抗体が産生されたと考えられる。同種移植後には自己免疫疾患が起こりやすいことが知られるが、その中でも AIHA の発症率が高い。Chen らは B リンパ球と T リンパ球の免疫再構築のアンバランスにより、oligoclonal な抗体産生が促進されることが AIHA 発症の原因と考察している⁸⁾。

最初に検出された抗 E もドナー由来自己抗体で、発症の初期段階を見ていた可能性がある。Issitt らは、直接クームス陽性患者に検出される同種抗体の約半数は、特定の抗原に対する特異性を示してはいるが、実は別の抗原を認識している mimicking 自己抗体であると報告している⁹⁾。しかし本症例に関しては、E 抗原を認識していることが明らかであること、E 抗原がドナーの特異抗原であったこと、患者 B 細胞の残存が確認されていることから、最初に検出された抗 E は患者由来同種

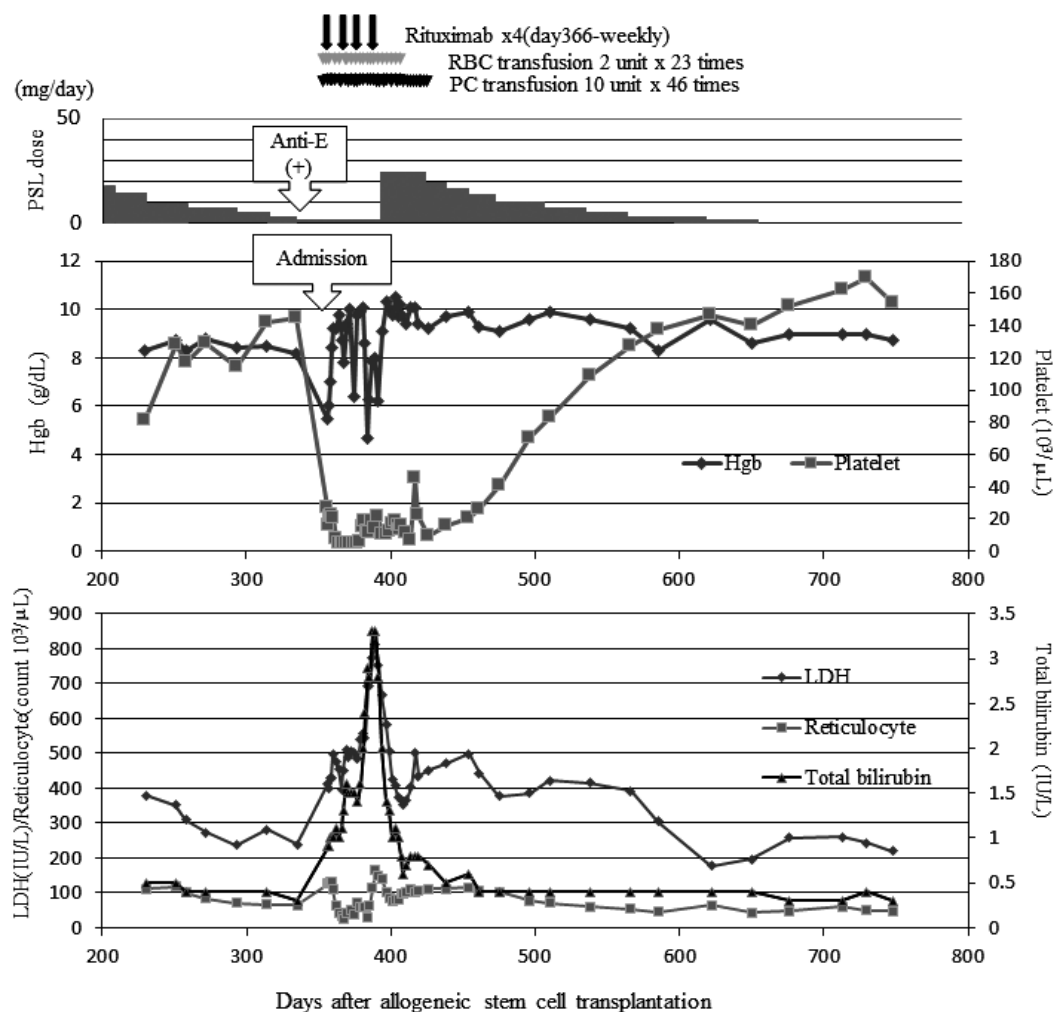


Fig. 2 Clinical course

Treatments including transfusions are shown in the top chart. Changes in hemoglobin titers and platelet counts are shown in the middle chart and those in reticulocyte counts, LDH, and total bilirubin values are shown in the bottom chart.

Abbreviations; PSL: prednisolone; RBC: red blood cell; PC: platelet concentrate; Hgb: hemoglobin

抗体であったと推測した。

また本症例では臨床的に明らかな溶血を認めなかったものの、器質化肺炎の加療中より LDH と網状赤血球の軽度上昇を伴う貧血が持続していた。移植後早期から抗 E 産生患者由来 B 細胞は存在しており、ステロイド減量に伴い抗体産生が顕著となり、抗 E が検出できるようになった可能性もある。

同種移植例については、AIHA だけでなく同種抗原を起因とする移植後溶血反応についてもいくつか報告がある。Sokal らは、患者由来抗 D によるドナー赤血球の溶血を認めた後に、AIHA をきたした症例を報告した¹⁰⁾。Wang は移植後 AIHA の患者の 58% に Rh 抗原や Kell 抗原などに対する同種抗体が認められたと報告し、残存する患者免疫機構がどの程度関与しているのかについては、まだわかっていないことが多いとしている⁴⁾。Franchini¹¹⁾らは同種移植後の不規則抗体の出現

率について、1~8.7% 程度と報告しており、治療抵抗性の溶血反応につながる可能性を示唆している。

また、同種移植後に限らず、赤血球自己抗体保有患者が同種抗体を同時に保有する割合は 8~40% で通常の同種抗体の検出頻度より高いと報告されており¹²⁾¹³⁾、全般的な免疫能の亢進により自己抗体と同種抗体が同時に存在することは珍しくない。

自己抗体陽性患者への輸血に際しては、基本的に患者と一致する赤血球製剤を選択することが推奨されるが、自己抗体と同種抗体の両方を持つ患者に対しては、同種抗体に対する抗原陰性血液の輸血を優先することがガイドライン¹⁴⁾上推奨されている。本症例においては同種抗体である可能性が否定できないことから、このガイドラインに則り、最初から E 抗原陰性血の輸血を行った。同種移植後の AIHA 症例においては、このように複雑な病態を呈する可能性があり、あらゆる側面

から検討してより安全な輸血を選択することが必要と考える。

直近の輸血など明らかな誘因なく、同種移植後に突然不規則抗体が陽性化した場合には、抗体の特異性、ドナーと患者の赤血球抗原との反応性、直接クームス試験などを確認するとともに、その後の溶血イベントの発症に注意する必要がある。

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：RHCE 遺伝子解析を実施して下さった日本赤十字社中央血液研究所血液型チーム小笠原健一先生、伊佐和美先生のご協力を深謝いたします。

文 献

- 1) Holbro A, Passweg JR: Management of hemolytic anemia following allogeneic stem cell transplantation. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 2015: 378—384, 2015.
- 2) Sanz J, Arriaga F, Montesinos P, et al: Autoimmune hemolytic anemia following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in adult patients. *Bone Marrow Transplant*, 39: 555—561, 2007.
- 3) González-Vicent M, Sanz J, Fuster JL, et al: Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (HSCT): A retrospective analysis and a proposal of treatment on behalf of the Grupo Español De Trasplante de Medula Osea en Niños (GETMON) and the Grupo Español de Trasplante Hematopoyetico (GETH). *Transfus Med Rev*, 32: 179—185, 2018.
- 4) Wang M, Wang W, Abeywardane A, et al: Autoimmune hemolytic anemia after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation: analysis of 533 adult patients who underwent transplantation at King's College Hospital. *Biol Blood Marrow Transplant*, 21: 60—66, 2015.
- 5) Ryeon Lee S, Lee SY, Nam MH, et al: Successful control of steroid-intolerant Evans' syndrome associated with allogeneic peripheral blood hematopoietic stem cell transplant by rituximab. *Leuk Lymphoma*, 52: 528—530, 2011.
- 6) Faraci M, Zecca M, Pillon M, et al: Autoimmune hematological diseases after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in children: an Italian multicenter experience. *Biol Blood Marrow Transplant*, 20: 272—278, 2014.
- 7) Kikuchi G, Kurita R, Ogasawara K, et al: Application of immortalized human erythroid progenitor cell line in serologic tests to detect red blood cell alloantibodies. *Transfusion*, 58: 2675—2682, 2018.
- 8) Chen FE, Owen I, Savage D, et al: Late onset haemolysis and red cell autoimmunisation after allogeneic bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant*, 19: 491—495, 1997.
- 9) Issitt PD, Combs MR, Bumgarner DJ, et al: Studies of antibodies in the sera of patients who have made red cell autoantibodies. *Transfusion*, 36: 481—486, 1996.
- 10) Sokol RJ, Stamps R, Booker DJ, et al: Posttransplant immune-mediated hemolysis. *Transfusion*, 42: 198—204, 2002.
- 11) Franchini M, Gandini G, Aprili G: Non-ABO red blood cell alloantibodies following allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant*, 33: 1169—1172, 2004.
- 12) Branch D. R., Petz L. D.: Detecting alloantibodies in patients with autoantibodies. *Transfusion*, 39: 6—10, 1999.
- 13) 山口 瞳, 杉本達哉, 前沢由美子, 他: 赤血球自己抗体陽性患者への赤血球輸血の解析. *日本輸血細胞治療学会誌*, 63 (2): 95—104, 2017.
- 14) 日本輸血・細胞治療学会ホームページ: 赤血球型検査 (赤血球系検査) ガイドライン (改訂 2 版). <http://yuketsu.jstmct.or.jp/wp-content/uploads/2016/10/5bc721e299263f6d44e2215cbdfbfaf.pdf> (2020 年 4 月 20 日現在).

EVANS SYNDROME AFTER ALLOGENEIC STEM CELL TRANSPLANTATION FOLLOWING DEVELOPMENT OF RECIPIENT-DERIVED ANTI-E

Rie Yamazaki¹⁾, Tomoe Uemura¹⁾, Yasuhiro Igarashi¹⁾, Ryosuke Fujimura¹⁾, Ayaka Mori¹⁾, Hitomi Nakayama²⁾, Yuya Koda²⁾, Jun Kato²⁾, Takehiko Mori²⁾ and Ryuji Tanosaki¹⁾

¹⁾Center for Transfusion Medicine and Cell Therapy, Keio University School of Medicine

²⁾Division of Hematology, Department of Medicine, Keio University School of Medicine

Abstract:

Immune-mediated hemolytic anemia including Evans syndrome, is known to be a complication of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation (allo-HSCT). We recently experienced a 28-year-old female patient with chronic myelogenous leukemia (CML) in blastic crisis who developed Evans syndrome after allogeneic bone marrow transplantation from an unrelated male donor (blood type A, Rh +). She developed acute graft-versus-host disease (GVHD) and organizing pneumonia, which was treated with steroid therapy. One year after allo-HSCT, anti-E appeared during a regular checkup for irregular antibody following withdrawal of the steroid. One month later, she developed severe hemolytic anemia and thrombocytopenia. The Rh blood types of the donor and recipient were DCCeE and DCCee, respectively. At the onset of hemolysis, recipient-derived B cells remained in her peripheral blood. These observations led us to speculate that allo-antibody production by the remaining recipient-derived B cells triggered the generation of autologous antibodies against red blood cells and platelets, resulting in Evans syndrome. We suggest that an irregular antibody screening test might be helpful in predicting hemolytic events after allo-HSCT.

Keywords:

Immune-mediated hemolytic anemia, Evans syndrome, allogeneic stem cell transplantation, irregular antibodies