臨床化学　28：104-110, 1999

特集●骨髄移植と臨床検査

生着不全/移植片拒絶

中尾眞二*

1．はじめに

移植されたドナー由来の造血幹細胞の生着は，同種骨髄移植（以下BMT）を受けた患者が乗り越えなければならない最初のハードルである。BMTでは，患者自身の造血幹細胞を破壊するための強力な移植前処置が通常行われるので，生着の不成功（生着不全）は多くの場合患者の死につながる。このため，過去40年のBMTの歴史において，生着不全を予防するためのさまざまな工夫が行われてきた。その結果現在では，HLA一致同胞からの古典的なBMTにおいて生着不全が問題になることはほとんどなくなった。しかし，同種の造血幹細胞移植の適応が拡がり，HLA不一致血縁ドナーや非血縁ドナー，あるいは臍帯血などのいわゆる代替ドナーからのBMTが増えるにつれて，生着不全の重要性が再認識されつつある。本稿では生着不全の病態と，これを診断するための臨床検査について概説する。

* 金沢大学医学部附属病院第三内科

2．生着不全とは

移植前処置により末梢血から消失した好中球が，移植後2～3週で500/μlを越え，これが3日間以上連続した場合に，臨床的には移植骨髄が生着したと判断される。このような生着の所見が最初から全くみられない状態がprimary graft failure（一次性生着不全）である[1]。これに対して，一度生着の所見がみられたのちに好中球が1週間以上にわたって1,000/μl以下に低下し，かつ骨髄が低形成を示す場合をsecondary（late）graft failure（二次性または晩期生着不全）と呼ぶ[2]。生着不全の成因が，患者の免疫担当細胞による移植片への攻撃である場合をとくに「拒絶」と呼ぶ。

Primary graft failureはほんどの場合，残存するホストの免疫担当細胞によるドナー骨髄の拒絶が原因である。その危険因子を**表1**に示す。全身X線照射（total body irradiation, TBI）を含む前処置後に，HLAの一致する血縁ドナーからBMTを行った場合には拒絶はまれ（0.1%）である。しかしHLA不一致ドナーからのBMTでは，不一致の程度が増すにしたがって拒絶の頻度も高くなる[3]。非血縁ドナーからの

表1　生着不全の危険因子

1) HLA 不一致ドナー，または HLA 一致非血縁ドナーからの移植
2) 大量の輸血歴のある再生不良性貧血患者への移植
3) X 線照射を含まない移植前処置の使用
4) 移植造血幹細胞数の不足（CD34 陽性細胞として 1×10^6/kg 以下）
5) T 細胞除去骨髄の使用

表2　生着の診断に利用できるマーカー

遺伝子多型
VNTR，STR
種々の遺伝子の RFLP
HLA
性染色体
蛋白レベルでの多型
赤血球抗原，白血球酵素
凝固因子 XIIIA
免疫グロブリンアロタイプ

移植の場合は HLA がすべて合致していても拒絶の頻度が高く，わが国の骨髄バンクの成績では白血病に対する移植後の拒絶の頻度は約 4％と報告されている。

日常臨床において拒絶がもっとも問題になるのは再生不良性貧血に対する移植後である。かつてシクロフォスファミドのみによる前処置で BMT が行われていた時代には，輸血の既往がある患者の拒絶率は 30～60％であった。最近では抗胸腺細胞グロブリンが移植前処置に併用されるようになり，HLA 一致血縁ドナーからの BMT では拒絶の頻度は 6％以下となっている。しかし，血縁ドナーからの移植であっても総輸血量の多い例や，非血縁ドナーからの移植例ではなお拒絶の頻度が高いので，通常は TBI や全身リンパ節照射が併用される。

HLA 不一致ドナーや非血縁ドナーからの骨髄移植にブスルファン＋シクロフォスファミドのような非照射前処置レジメンを用いると拒絶の頻度が高くなる。このような弱い移植前処置後の BMT の場合には，骨髄移植後早期に自己造血が回復することもある[4]。

また，急性移植片対宿主病（graft-versus-host disease）の予防のために，T 細胞を除去した移植片を用いた場合にも拒絶の頻度が高くなる[5]。これは，拒絶を起こす患者由来の T 細胞に拮抗して生着を促進するドナーの T 細胞が輸注されないためと想像されている。

移植された造血幹細胞数が少ないことも拒絶のリスクになる[6]。骨髄移植の場合，再生不良性貧血に対する移植の経験から，患者の体重あたり 3×10^8/kg の有核細胞が一つの目安とされている。同種末梢血幹細胞の場合には造血幹細胞の末梢血への動員の程度に個人差があるので，総細胞数ではなく CD34 陽性細胞数が指標として用いられる。従来 2×10^6/kg が目安とされていたが，最近では 10^6/kg 以上あれば許容できると考えられている。臍帯血幹細胞移植では少なくとも 10^7/kg 以上の有核細胞を輸注する必要がある。

Late graft failure の場合には，いわゆる拒絶以外にウイルスとくにサイトメガロウイルス感染，慢性移植片対宿主病，抗サイトメガロウイルス剤のガンシクロビル投与などのさまざまな原因が考えられる。

3．生着不全の診断

BMT 後 28 日（G-CSF 使用時には 21 日）目までに好中球が 100/μl に達しない場合は primary graft failure が疑われる。生着不全は，原因が拒絶か拒絶以外の原因かによって治療方針がまったく異なる。このため，血液中に存在する細胞がドナー由来かホスト由来かを早急に決定することがもっとも重要である。ドナーとホストを識別するためのマーカーには**表2**のようなものがある。とくに利用頻度の高いのは遺伝子多型である。これは「同一集団内に特定の遺伝子座の対立遺伝子（アレル）が 2 種類以上存在し，少なくとも変異遺伝子の頻度が 1％以

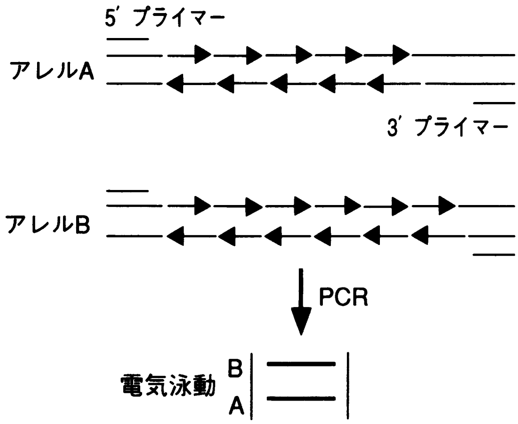

図1 VNTR 部位増幅による多型性検出の原理
繰り返し数の違いによって長さの異なるアレルが増幅される。

上の割合で存在すること」と定義されている。

3.1. VNTR，STR

体染色体の DNA には，ミニサテライト領域と呼ばれる数 10 bp の DNA の繰り返し配列が存在する。この繰り返しの数は染色体のハプロタイプによってさまざまであるため，これを指標として個体を識別することができる。ミニサテライトのうち，ある特定の単座位にしか存在しない配列は variable number of tandem repeats（VNTR）部位と呼ばれる[7]。さらに小さな数 bp の繰り返し配列は short tandem repeat（STR）部位またはマイクロサテライトと呼ばれている[8]。VNTR，STR のアレルはいずれもメンデルの法則にしたがって親から子に引き継がれる。それぞれが繰り返しの数によって高度の多型性を示すため，HLA の一致する BMT のドナーとホストの間であっても，アレルの組み合わせが異なるミニサテライト領域を容易に見つけることができる。

生着や生着不全の診断に現在もっとも汎用されているのが，PCR による VNTR 部位の増幅である。**図1** にその原理を示す。この場合には，白血球をごく少数しか含まない少量の血液についても，ラジオアイソトープを用いずに細胞の由来を決定することができる。

個体識別に頻用される VNTR 部位には YNZ-22（D17S5），MCT-118（D1S80），APO-B，33.1，33.6 などがあり[9-11]，STR 部位には VWF，ApoA2，ApoC2，TPOX[12,13] などがある。現在筆者らは市販のキット（AmpliFLP™，Perkin Elmer 社および Quick-Type™ Multiplex-I，Lifecodes Corporation 社）を使用している。**図2** に Quick-Type™ Multiplex-I を用いた解析例を示す。患者は重症再生不良性貧血に対して同胞より骨髄移植を受け，いったん生着したのち汎血球減少を起こした。PCR で増幅した三つの STR 部位のうち，バンドのパターンが異なる D3S1744 を指標としてホストとドナーを識別できた。この例では移植後の白血球はドナー型のバンドを示したため拒絶は否定された。

AmpliFLP™ は VNTR の D1S80，Quick-Type™ Multiplex-I，は D18S489，D3S1744，D12S1090 の 3 種類の STR を増幅するので，これらを組み合わせれば 90% 以上の例で細胞の由来を同定できる。患者の血液細胞が凍結保存されていない場合には，生食の含嗽で得られた頬粘膜細胞や爪から DNA を抽出してホストの DNA とする。由来の異なる細胞の検出感度はアレルの長さによって異なるが，PCR のみでは 0.1～1%，PCR 産物をサザンブロット法で検出した場合には約 0.1% である。混在する細胞の正確な定量は困難だが，ホストとドナーの DNA をさまざまな割合で混合したものを増幅することによって標準曲線を作れば，混在するマイナーな細胞を半定量することができる[14]。

DNA フィンガープリント法は，いくつものミニサテライトに共通する塩基配列をプローブとして，サザンブロットにより多型性を検出する方法である。長さの異なる多数のミニサテライト DNA が同時に検出されるため，一卵性双生児でない限りほぼ 100% 異なるパターンを呈する。すべての組み合わせでドナーとホストを識別できるという利点はあるが，サザンブロッティングによる検出であるため，由来の異なる

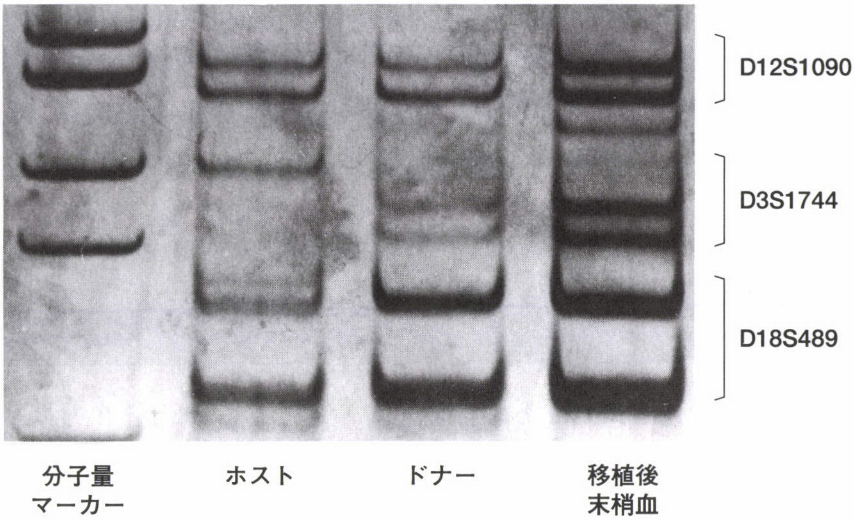

図2　STR部位増幅による生着の診断
D3S1744のみがドナーとホスト間で異なるバンドのパターンを示した。移植後の末梢血白血球はドナー由来と考えられた。

細胞の混在を検出する感度は高々2%である[8]。

3.2. 性染色体

ドナーとホストとの間に性の不一致がある場合には，もっとも確実な生着あるいは生着不全のマーカーになる。Y染色体DNAに特異的なプライマーを用いてPCRを行い，患者が男性でドナーが女性の場合にはDNAの増幅，逆の組み合わせの場合にはDNAが増幅されないことを指標として拒絶を診断できる[15]。ただしVNTRのように，ドナーとホストの両者に特異的なマーカーを増幅している訳ではないので，偽陽性や偽陰性と判定される危険性がある。Late graft failureの診断には，PCR法に加えて核型分析とFISH（fluorescence *in situ* hybridization）法が利用できる。

FISH法では，ビオチン化またはジゴキシゲニン化したXまたはY染色体特異的プローブと，蛍光でラベルしたアビジンまたは抗ジゴキシゲニン抗体を用いて，個々の細胞が男性由来か女性由来かを決定する。染色体が標識された細胞を顕微鏡下で直接算定することによって，ドナー由来の細胞の比率を正確に測定することができる。Najfeldらが，2種類の異なる蛍光で標識されたX，Yプローブを用いたFISH法の特異性を検討したところ，コントロールの男性細胞17,349個のうち偽陽性のXX細胞はわずかに2個（偽陽性率は0.011%）のみであり，コントロール女性細胞7,354個のうちXY細胞と判定される細胞は皆無であった[16]。感度はカウントする細胞数によるが，500個以上をカウントすることは比較的容易であり，判定に要する時間も短い。免疫組織染色とFISHを組み合わせれば，特定の形質を持つ細胞の由来を決定することも可能である[17]。

3.3. 血液型

血液型はドナーとホストのABO式血液型が不一致の場合もっとも簡便なマーカーであるが，赤血球自身の寿命が長く，また白血球に比べて赤血球は元々回復が遅いためprimary graft failureの診断には利用できない。しかし，濃度勾配を利用して集めた網状赤血球を調べれば，ある程度早期に生着を診断することは可能である[18]。自己造血の回復を伴う晩期の拒絶は，フローサイトメトリーを用いてホスト型の赤血

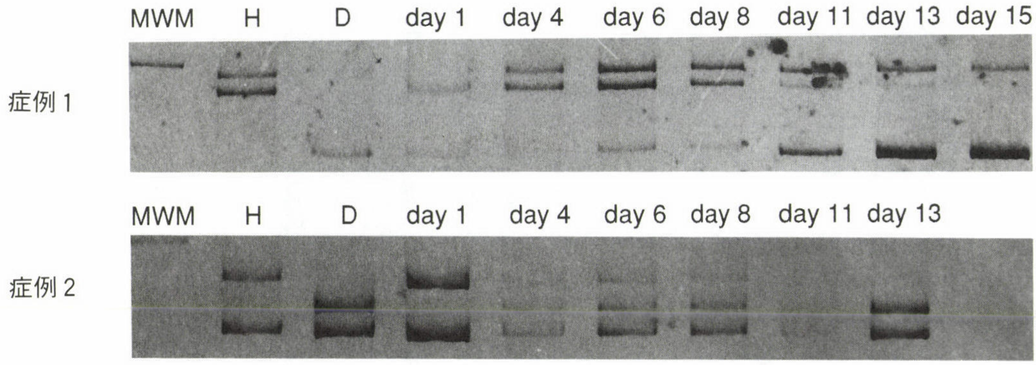

図 3 BMT 後の末梢血におけるキメリズムの経時的観察
BMT を受けた 2 症例について末梢血 DNA から VNTR 部位の DIS80 を増幅し，アガロース電気泳動後銀染色を行った。両例ともに，ドナーに特有のバンドが day 4 に出現後，日を追って強くなったことから，day 11 までに生着と診断された。H，ホスト； D，ドナー； MWM，分子量マーカー

球を検出することにより診断することができる。ABO 式血液型以外では MNSs 型，Kidd 型，Duffy 型，Rh 型などが同胞間での不一致率が比較的高いため，ドナーとホストの識別に利用できる。

3.4. 蛋白レベルの多型

赤血球の酵素のうち，日本人において個体によるタイプの違いの頻度が高いものには alanine aminotransferase（ALT），phosphoglucomutase（PGM），acid phosphatase などがある。このうち PGM は白血球でも検討できる。凝固因子 XIIIA サブユニットは骨髄巨核球や血小板からも産生されるため生着の確認に利用できる。同様に免疫グロブリンのアロタイプは B 細胞の生着の指標になる。ただしこれらのアロタイプが決定できるのは通常移植後 1 か月以降であるため primary graft failure の診断には利用できない。

4. 生着不全の診断の実際

生着不全が疑われる場合には血液中の白血球数がほとんど無いか，極度に減少している場合が多いので，実際の検索は PCR による VNTR（または STR）か，性差のある場合には Y 染色体特異的 DNA の増幅が中心になる。この際骨髄細胞を検索すると，ホスト由来の骨髄支持細胞が増幅され，誤って拒絶と判定される可能性があるので，可能な限り末梢血を用いることが重要である。拒絶のリスクの高い症例では，**図 3** のように経時的にホストの細胞の推移を観察することによって生着か拒絶を早期診断することもできる[19]。

増幅の結果，ドナー細胞のみが検出された場合は完全キメラ（complete chimera）（生着），ドナーとホストの両細胞が混在している場合を混合キメラ（mixed chimera），ホスト細胞のみしか検出されなかった場合には拒絶と診断される。

5. 生着不全の治療

検索の結果ドナー型の白血球が検出されない場合には早急に再移植を計画する。患者にはドナーの骨髄を特異的に攻撃する T 細胞が残存しているので，再移植前にこれを根絶する必要がある。しかし遷延する好中球減少のため，多くの場合患者は何らかの感染症を併発している。このため，抗胸腺細胞グロブリンを含めた細胞毒性の弱い前処置が通常は試みられる。重症感染症を併発している場合には，G-CSF を投与しながら白血球の回復を待つ。G-CSF や

GM-CSF 投与によってホスト型の正常造血が一時的に回復し，感染克服後に再移植に成功した例も報告されている[20)]。また最近，慢性骨髄性白血病に対する HLA 一座不一致ドナーから BMT 後に起こった late graft failure に，ドナーリンパ球輸注（donor leukocyte infusion, DLI）を行ったところ拒絶が克服されたという例が報告された[21)]。追試が必要ではあるが，従来の再移植に比べると毒性がはるかに低いことから，注目すべき結果と思われる。

一方，ドナー型の白血球しか検出されない場合には，G-CSF の投与で経過をみるか，またはドナーの造血幹細胞を前処置なしに輸注する。末梢血幹細胞の採取は骨髄採取に比べてドナーへの負担が少ないので，協力が得られれば積極的に施行すべきである[22)]。ドナーとホストの両者の血球が混在する混合キメラ状態では，一時的に正常造血が回復するので，感染や臓器障害が改善した時点で再移植を計画する。また，遺伝性疾患に対する移植後に観察された混合キメラ状態や，前処置を弱めることにより意図的に誘導した混合キメラが DLI によって完全キメラに戻ることも報告されている[23,24)]。GVHD の発症に注意が必要ではあるが，DLI は今後混合キメラに対する治療の中心になっていくと思われる。

■文　献

1) Bolger GB, Sullivan KM, Storb R, Witherspoon RP, Weiden PL, Stewart P, Sanders J, Meyers JD, Martin PJ, Doney KC : Second marrow infusion for poor graft function after allogeneic marrow transplantation, Bone Marrow Transplant, **1** : 21-30, 1986.
2) Nemunaitis J, Singer JW, Buckner CD, Durnam D, Epstein C, Hill R, Storb R, Thomas ED, Appelbaum FR : Use of recombinant human granulocyte macrophage colony-stimulating factor in graft failure after bone marrow transplantation, Blood, **76** : 245-253, 1990.
3) Anasetti C, Amos D, Beatty PG, Appelbaum FR, Bensinger W, Buckner CD, Clift R, Doney K, Martin PJ, Mickelson E, Nisperos B, O'Quigley J, Ramberg R, Sanders JE, Stewart P, Storb R, Sullivan KM, Witherspoon RP, Thomas ED, Hansen JA : Effect of HLA compatibility on engraftment of bone marrow transplants in patients with leukemia or lymphoma, N Engl J Med, **320** : 197-204, 1989.
4) Yamaguchi M, Nakao S, Ueda M, Takamatsu H, Tamaru Y, Shiobara S, Masauji N, Matsue K, Matsuda T : Early recovery host-derived hematopoiesis in marrow transplant recipients conditioned with high-dose busulfan and cyclophosphamide, Bone Marrow Transplant, **15** : 787-789, 1995.
5) Kernan NA, Bordignon C, Heller G, Cunningham I, Castro-Malaspina H, Shank B, Flomenberg N, Burns J, Yang SY, Black P, Collins NH, O'Reilly RJ : Graft failure after T-cell-depleted human leukocyte antigen identical marrow transplants for leukemia : I. Analysis of risk factors and results of secondary transplants, Blood, **74** : 2227-2236, 1989.
6) Nakao S, Yamaguchi M, Takamatsu H, Shiobara S, Matsuda T : Clonal hematopoiesis detected in an allogeneic marrow transplant recipient with poor graft function, Transplantation, **57** : 1266-1268, 1994.
7) Nakamura Y, Leppert M, O'Connell P, Wolff R, Holm T, Culver M, Martin C, Fujimoto E, Hoff M, Kumlin E, White R : Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping, Science, **235** : 1616-1622, 1987.
8) Min GL, Hibbin J, Arthur C, Apperley J, Jeffreys A, Goldman J : Use of minisatellite DNA probes for recognition and characterization of relapse after allogeneic bone marrow transplantation, Br J Haematol, **68** : 195-201, 1988.
9) Nakao S, Nakatsumi T, Chuhjo T, Ohtaguro M, Tsuchiya H, Niki T, Shiobara S, Mori T, Matsuda T : Analysis of late graft failure after allogeneic bone marrow transplantation : detection of residual host cells using amplification of variable number of tandem repeats loci, Bone Marrow Transplant, **9** : 107-111, 1992.
10) Elmaagacli AH, Beelen DW, Becks HW, Mobascher A, Stockova J, Trzensky S, Opalka B, Schaefer UW : Molecular studies of chimerism and minimal residual disease after allogeneic peripheral blood progenitor cell or bone marrow transplantation, Bone Marrow Transplant,

18 : 397-403, 1996.

11) Ugozzoli L, Yam P, Petz LD, Ferrara GB, Champlin RE, Forman SJ, Koyal D, Wallace RB : Amplification by the polymerase chain reaction of hypervariable regions of the human genome for evaluation of chimerism after bone marrow transplantation, Blood, **77** : 1607-1615, 1991.

12) Roth MS, Antin JH, Bingham EL, Ginsburg D : Use of polymerase chain reaction-detected sequence polymorphisms to document engraftment following allogeneic bone marrow transplantation, Transplantation, **49** : 714-720, 1990.

13) Lawler M, Humphries P, McCann SR : Evaluation of mixed chimerism by *in vitro* amplification of dinucleotide repeat sequences using the polymerase chain reaction, Blood, **77** : 2504-2514, 1991.

14) Scharf SJ, Smith AG, Hansen JA, McFarland C, Erlich HA : Quantitative determination of bone marrow transplant engraftment using fluorescent polymerase chain reaction primers for human identity markers, Blood, **85** : 1954-1963, 1995.

15) Nakatsumi T, Nakao S, Ohtaguro M, Chujo T, Tsuchiya H, Niki T, Shiobara S, Mori T, Nagai K, Matsuda T : Origin of hematopoietic progenitor cells after bone marrow transplantation : analysis by means of a Y-chromosome specific DNA probe, Am J Hematol, **38** : 178-183, 1991.

16) Najfeld V, Burnett W, Vlachos A, Scigliano E, Isola L, Fruchtman S : Interphase FISH analysis of sex-mismatched BMT utilizing dual color XY probes, Bone Marrow Transplant, **19** : 829-834, 1997.

17) Hessel H, Mittermüller J, Zitzelsberger H, Weier HU, Bauchinger M : Combined immunophenotyping and FISH with sex chromosome-specific DNA probes for the detection of chimerism in epidermal Langerhans cells after sex-mismatched bone marrow transplantation, Histchem Cell Biol, **106** : 481-485, 1996.

18) Yam PY, Petz LD, Knowlton RG, Wallace RB, Stock AD, de Lange G, Brown VA, Donis-Keller H, Blume KG : Use of DNA restriction fragment length polymorphisms to document marrow engraftment and mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation, Transplantation, **43** : 399-407, 1987.

19) Nakao S, Zeng W, Yamazaki H, Wang H, Takami A, Sugimori N, Miura Y, Shiobara S, Matsuda T, Shinagawa Y, Harada M : Early establishment of hematopoietic chimerism following allogeneic peripheral blood stem cell transplantation in comparison with allogeneic bone marrow transplantation, Eur J Haematol, **62** : 265-270, 1999.

20) Weisdorf DJ, Verfaillie CM, Davies SM, Filipovich AH, Wagner JE Jr, Miller JS, Burroughs J, Ramsay NK, Kersey JH, McGlave PB, Blazar BR : Hematopoietic growth factors for graft failure after bone marrow transplantation : a randomized trial of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) versus sequential GM-CSF plus granulocyte-CSF, Blood, **85** : 3452-3456, 1995.

21) Godder KT, Abhyankar SH, Lamb LS, Best RG, Geier SS, Pati AR, Gee AP, Henslee-Downey PJ : Donor leukocyte infusion for treatment of graft rejection post partially mismatched related donor bone marrow transplant, Bone Marrow Transplant, **22** : 111-113, 1998.

22) Dreger P, Suttorp M, Haferlach T, Loffler H, Schmitz N, Schroyens W : Allogeneic granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood progenitor cells for treatment of engraftment failure after bone marrow transplantation, Blood, **81** : 1404-1407, 1993.

23) Akioka S, Itoh H, Ueda I, Matsumoto Y, Iwami H, Tsunamoto K, Hibi S, Todo S, Sawada T, Imashuku S : Donor lymphocyte infusion at unstable mixed chimerism in an allogeneic BMT recipient for chronic granulomatous disease, Bone Marrow Transplant, **22** : 609-611, 1998.

24) McSweeney PA, Wagner JL, Maloney DG, Radich J, Shizuru J, Bensinger WI, Bryant E, Chauncey TR, Flowers MED, Kauffman M, Minor CS, Nash RA, Blume K, Storb R : Outpatient PBSC allografts using immunosuppression with low-dose TBI before, and cyclosporine and mycophenolate mofetil after transplant, Blood, **92** (suppl) : 519a, 1998.

Graft Failure/Graft Rejection

Shinji Nakao*

* *Third Department of Medicine Kanazawa School of Medicine*