

# Detection of Residual Host Blood Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Using DNA Markers

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/8325">http://hdl.handle.net/2297/8325</a>

## DNA マーカーを用いた同種骨髄移植後の 残存宿主血液細胞の検出

金沢大学医学部内科学第三講座 (主任: 松田 保教授)

中 積 智 子

(平成4年2月8日受付)

同種骨髄移植 (allogeneic bone marrow transplantation, BMT) 後のキメリズム (血液細胞のドナー型への転換) を確認し、かつ残存宿主細胞の有無を検討するため、Y染色体特異的反復DNA (Y chromosome-specific repetitive DNA, YDNA) と高多型性反復配列構造 (variable number of tandem repeat, VNTR) のDNA長の多型性をマーカーとして、当院でBMTをうけた18症例について血液細胞の起源を検索した。女性のドナーからBMTをうけた6例の男性患者骨髄について、YDNAをプローブとするドットプロット法およびサザンプロット法で検討したところ、4例に宿主細胞の残存が確認された。このうち3例では顆粒球・マクロファージ系造血前駆細胞の20~38%が宿主由来であることが示された。この3例のうち2例は慢性骨髄性白血病であったが、逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) によってもフィラデルフィア染色体に特異的な bcr-abl メッセンジャー RNA が検出されなかったことから、残存する宿主細胞は正常クローンと考えられた。VNTR部位増幅による検索では、検討したBMT患者の全例でドナー細胞と宿主細胞の識別が可能であった。14例中5例に宿主細胞の残存が示された。1例が拒絶の初期と診断され、その後免疫抑制療法により寛解となった。3例は再発が判明したが、そのうち骨髄異形成症候群の1例は後に2回目のBMTを受け寛解となった。1例は宿主細胞の残存を認めながら拒絶や再発の徴候を認めない、いわゆる混合造血キメラと考えられた。以上のようなDNAマーカーを利用したBMT後の残存宿主細胞の検出は、拒絶・再発の診断のみならず、ドナーの免疫担当細胞と宿主細胞間の相互作用を明らかにするうえできわめて有用と考えられた。

**Key words** bone marrow transplantation, Y chromosome-specific repetitive DNA, polymerase chain reaction, variable number of tandem repeat, mixed hematopoietic chimerism

近年、大量の化学放射線療法を併用した同種骨髄移植 (allogeneic bone marrow transplantation, BMT) は、再生不良性貧血などの造血障害や造血器悪性腫瘍に対する治療法として確立されたものとなっている。BMTの成否を知るためには、BMT後に患者の血液細胞の起源を明らかにする必要がある。特に宿主細胞の残存を検出することは、拒絶や再発を早期に診断する上で非常に重要と考えられる。

このような細胞の起源の分析法としては、これまでは赤血球抗原や組織適合抗原 (human leukocyte antigen, HLA) の検索、染色体分析などが用いられてきた。しかし、これらの検査法は、ドナー細胞に混在する少数の宿主細胞を検出するには感度が低いうえ、検索にかなりの細胞数を必要とするため、移植後早期の血球数の低い時期には適用できない。また、個々の造血前駆細胞レベルでの検討は不可能であった。

このような問題を克服するため、DNAマーカーを用いた細胞起源の検索方法が考案され、BMT後のキメリズム (血液細胞のドナー型への転換) の証明に用いられてきている。Y染色体

特異的反復DNA (Y chromosome-specific repetitive DNA, YDNA) は男性細胞にのみ特異的に検出されるため、異性間のBMTでは有用なマーカーとなる<sup>1)2)</sup>。また、近年開発されたポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) による高多型性反復配列構造 (variable number of tandem repeat, VNTR) 部位のDNA長の多型性の検索は個体識別に非常に有用であることから<sup>3)4)</sup>、BMT後のキメリズムの証明への応用が期待されてきた<sup>5)6)</sup>。

著者は、BMT後のキメリズムを証明し、かつ残存宿主細胞の有無を検討するため、これらの2種類のDNAマーカーを用いてBMT後の血液細胞の起源を検索した。

### 対象および方法

#### 1. 対 象

当病院で造血器悪性腫瘍および造血障害のためにBMTを施行した18症例を対象とした (表1)。このうち17例はHLAが一致したドナーから、登録患者番号 (unique patient number,

Abbreviations: BFU-E, erythroid burst-forming unit; BMT, allogeneic bone marrow transplantation; BSA, bovine serum albumin; cDNA, complementary DNA; CFU-GM, colony forming unit-granulocyte-macrophage; CML, chronic myelogenous leukemia; FCS, fetal calf serum; GVHD, graft-versus-host disease; GVL, graft-versus-leukemia; mRNA, messenger RNA; LGF, late graft failure; PCR, polymerase chain reaction;

UPN) 82 の 1 例は HLA の一座位不適合の父親から移植を受けた。検索時、14 例では血液学的問題はみられず、完全寛解の状態であった。4 例 (UPN 76, 77, 82, 83) では、一度回復した後、汎血球減少が進行する晩期移植片生着不全 (late graft failure, LGF) を認めた。UPN66 では再発が疑われていた。UPN83 は、1 回目の BMT 後に不応性貧血の再発と診断されたため、2 回目の BMT をおこなった。BMT 後の免疫抑制療法には、全例でシクロスポリン (ザンド薬品、東京) とメソトレキセート (日本レダリー、東京) を用いた。移植片対宿主病 (graft-versus-host disease, GVHD) の重症度はシアトルグループの診断基準に従った<sup>10)</sup>。

## II. 高分子 DNA の抽出

移植前・後の患者およびドナーからヘパリン加末梢血または骨髓血を採取し、リンホプレップ (Nycomed Pharma AS, Oslo, Norway) に重層後 3000rpm で 8 分間遠心し単核細胞を得た。一部の患者については、父・母についても同様に血液を採取し単核細胞を分離した。この単核細胞から直接、または後に述べる条件で培養後以下の方法で DNA を抽出した。分離した細胞を Tris-EDTA (TE) 緩衝液 (10mM Tris-HCl pH8.3, 1mM EDTA) に浮遊させ、等量の 2 倍濃度の溶解緩衝液 (1% ドデシル硫酸ナトリウム (sodium dodecyl sulfate, SDS), 0.6M NaCl, 20mM EDTA, 20mM Tris-HCl pH7.4) を加えて細胞を溶解させた。プロティナーゼ K (ベーリンガー・マンハイム山之内、東京) を 10 μg/ml となるように加え、37°C 16 時間でイン

キュベーションを行なった後、等量のフェノールを加えて攪拌後、4000rpm で遠心し水層部分を抽出した。同様の抽出をフェノール・クロロホルム、クロロホルムの順で繰り返し行なった。ついで 10 分の 1 量の 3M 酢酸ナトリウムと 2.5 倍量の冷エタノールを加えた後、-20°C で 1 時間以上放置し DNA を折出させた。4000rpm で 15 分間遠心後、DNA のペレットを回収し 70% エタノールで洗浄し TE 緩衝液に溶解した。吸光度計を用いて DNA の回収量を測定した。

## III. 造血前駆細胞の培養

骨髓単核細胞中の造血前駆細胞の培養は既報の方法でおこなった<sup>11)</sup>。10<sup>6</sup> 個の骨髓単核細胞を、1.2% メチルセルロース、1 単位/ml リコンビナントエリスロポイエチン (中外製薬、東京)、5% フィトヘムアグルチニン刺激リンパ球培養上清 (Sigma, St. Louis, USA)、10% ウシ血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA) (Sigma)、30% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum, FCS) (M. A. Bioproducts, Maryland, USA) を含むイスコブ改変ダルベッコ培地 (Iscove's modified Dulbecco's medium) (Sigma) に浮遊させ総量を 1ml とした。この細胞浮遊液を、ファルコン #1108 培養皿 (Becton Dickinson Labware, New Jersey, USA) に入れ、炭酸ガス培養器 (37°C, 5%CO<sub>2</sub>) で 2 週間培養した。2 週間後に形成された顆粒球・マクロファージ系造血前駆細胞 (colony forming unit-granulocyte-macrophage, CFU-GM) 由来のコロニーおよび赤血球系造血前駆細胞 (erythroid burst-forming unit, BFU-E) 由来のコロニーを倒立顕

Table 1. Clinical data on patients

UPN	Age/sex	Diagnosis	Conditioning therapy	Acute GVHD	Chronic GVHD	Months after BMT	Clinical diagnosis at sampling
47	12/M	ALL/Resist.	Ara-C+CY+TBI	1	(-)	50	Remission
53	27/M	CML/2ndCP	Ara-C+CY+TBI	1	Extensive	42	Remission
56	17/M	AMoL/1stCR	Ara-C+CY+TBI	1	(-)	39	Remission
59	14/F	ALL/1CR	Ara-C+CY+TBI	0	(-)	34	Remission
62	23/M	CML/CP	Ara-C+CY+TBI	1	Extensive	31	Remission
64	29/F	CML/CP	Ara-C+CY+TBI	0	(-)	27	Remission
66	20/M	ALL/1stCR	Ara-C+CY+TBI	1	(-)	18	Relapse
68	31/M	CML/CP	BU+CY	0	(-)	22	Remission
70	39/M	APL/1stCR	BU+CY	0	Extensive	19	Remission
72	1/F	ALL/1stCR	BU+CY	0	(-)	17	Remission
75	36/M	ALL/1stCR	BU+CY	1	Extensive	5	Remission
76	24/M	CML/AP	BU+CY	0	Extensive	11	Late graft failure
77	15/F	SAA	CY+TLI	0	(-)	3	Late graft failure
78	42/F	CML/CP	BU+CY	0	(-)	8	Remission
81	32/M	CML/CP	BU+CY	0	(-)	6	Remission
82	16/M	CML/CP	BU+CY	0	Extensive	1	Late graft failure
83	14/M	RA	BU+CY	0	(-)	1	Late graft failure
		Relapse of RA	CY+TBI	0	(-)	1	Remission
84	12/M	ALL/1stCR	BU+CY	0	(-)	1	Remission

Abbreviations UPN, unique patient number; ALL, acute lymphocytic leukemia; Resist., resistance to chemotherapy; CML, chronic myelogenous leukemia; APL, acute promyelocytic leukemia; AMoL, acute monocytic leukemia; SAA, severe aplastic anemia; RA, refractory anemia; CP, chronic phase; CR, complete remission; AP, acute phase; Ara-C, cytosine arabinoside; CY, cyclophosphamide; TBI, total body irradiation; TLI, total lymphoid irradiation; BU, busulfan; GVHD, graft-versus-host disease; BMT, bone marrow transplantation; M, male; F, female.

Ph<sup>1</sup>, Philadelphia chromosome; RT-PCR, reverse transcriptase-polymerase chain reaction; SDS, sodium dodecyl sulfate; SSC, standard saline citrate; TE, Tris-EDTA; UPN, unique patient number; VNTR, variable number of tandem repeat; YDNA, Y chromosome-specific repetitive DNA

顕鏡下で同定し、マイクロピペットをもちいて個々のコロニーをつりあげた。回収したコロニーは、後に述べるコロニーダイレクトプロットにもちいた。一部の試験では、前述の方法で各コロニーから DNA を抽出した。

#### IV. YDNA の検出用プローブの調整

東京医科大学長井博士より供与された pKY-2 クローン<sup>10</sup>を JM109 (宝酒造, 東京) を用いて増幅させ、精製後、Hind III (宝酒造) で消化して 3.5Kb の YDNA プローブを得た。オリゴラベリングキット (Pharmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Sweden) を用いて<sup>32</sup>P デオキシチジン三リン酸 (Amersham International plc, Buckinghamshire, UK) で標識し、プローブとして用いた。

#### V. ドットプロットおよびサザンプロットハイブリダイゼーション

精製した高分子 DNA を NaOH で変性させた後、Dot Manifold (Bethesda Research Laboratories, Gaithersburg, USA) と吸引ポンプを用いてナイロンメンブレンフィルター (Hybond<sup>TM</sup>, Amersham International plc) に吸着させた。一部の試験では高分子 DNA を Hae III (宝酒造) で消化した後、各検体の 3.0 μg を 0.8% のアガロースゲルを用いて 15V で 16 時間電気泳動した。電気泳動での分子量マーカーにはラムダ DNA-Hind III 消化物 (宝酒造) とファイエックス 174 DNA-Hae III 消化物 (宝酒造) を用いた。ゲルを 0.25M HCl, ついでアルカリ液 (0.4N NaOH, 0.6M NaCl), 中和液 (0.5M Tris-HCl pH 7.5, 1.5M NaCl) でそれぞれ 15 分ずつ 2 回処理した後、Southern の方法<sup>10</sup>に従ってゲル中の DNA をナイロンメンブレンフィルターに転写した。DNA を吸着させたナイロンメンブレンフィルターは 80°C でベーキングを行なった。シールドバックに入れ、ハイブリダイゼーション液 (0.6M NaCl, 60mM Tris-HCl pH 7.6, 5 倍濃度のデンハート溶液 (0.1% FCS, 0.1% ポリビニルピロリドン, 0.1% フィコール), 2mM EDTA, 0.5% SDS, 100 μg/ml 変性サケ精子 DNA) を加え 65°C で 1 時間以上プレハイブリダイゼーションを行なった。パック内の液を廃棄後、新しいハイブリダイゼーション液と標識プローブ (0.01 μg/ml) を加えた後、65°C で一晩ハイブリダイゼーションを行なった。フィルターは 2 倍濃度の standard saline citrate (SSC) (1 倍濃度の SSC=0.15M NaCl, 0.015 M ぐえん酸ナトリウム) で数回室温で洗浄した後、2 倍濃度の SSC, 1% SDS, ついで 0.1% SSC, 1% SDS を用いて 66°C で 30 分ずつ洗浄を繰り返した。洗浄後のフィルターを -80°C で X 線フィルムに感光させ、オートラジオグラフィを行なった。

#### VI. コロニーのダイレクトプロット

マイクロピペットで採取した個々の CFU-GM および BFU-E 由来のコロニーを 100 μl の 0.05M リン酸緩衝液に浮遊させ、Dot Manifold と吸引ポンプを用いてナイロンメンブレンフィルターに直接吸着させた。乾燥させた後、0.5mM NaOH に 7 分、1.5M NaCl・0.5M Tris-HCl pH 7.5 に 5 分浸した後、

70% エタノールで固定した。ついでプロテイナーゼ K (2mg/ml) を含む TE 緩衝液中で 37°C で 1 時間インキュベーションを行い、クロロホルム, 0.3M NaCl ですすぎ風乾した後、80°C でベーキングを行なった。ハイブリダイゼーション後は前述のドットプロットと同様に行なった。

#### VI. bcr-abl メッセンジャー RNA (mRNA) の検出

慢性骨髄性白血病 (chronic myelogenous leukemia, CML) 患者のうち、培養細胞で YDNA の存在が確認された 2 例については Roth らの報告した逆転写酵素ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcriptase-polymerase chain reaction, RT-PCR)<sup>11</sup>を用いてフィラデルフィア染色体 (Philadelphia chromosome, Ph<sup>1</sup>) に特異的な bcr-abl mRNA の有無を検討した。患者骨髄単核細胞からグアニジウムチオンアネート法で総 RNA を抽出した。abl mRNA に相補的なプライマーと逆転写酵素を用いて相補的 DNA (complementary DNA, cDNA) を合成後、bcr-abl cDNA の一部を bcr-abl cDNA の接合部をはさむ特異的なプライマーを用いて PCR で増幅した。増幅産物は、前述したサザンプロット法でナイロンメンブレンフィルターに転写した後、bcr-abl cDNA 接合部に特異的なオリゴヌクレオチドプローブを用いてハイブリダイゼーションを行なった。

#### VII. PCR による VNTR 部位の増幅

2 種類の VNTR 部位 (YNZ22, MCT118) をそれぞれ Kasai らと Horn らの方法<sup>9b</sup>に準じて増幅した。まず、2 組のオリゴヌクレオチドプライマーを DNA 合成器 (Applied Biosystems, Foster, USA) を用いて作成した。反応は 0.5ml 用チューブ (Treff AG., Bern, Switzerland) を用いた。YNZ22 部位の増幅では、約 1 μg の試料 DNA を反応液 (100mM Tris-HCl, pH 8.3, 500mM KCl) と 1.1mM の 4 種のデオキシ三リン酸 (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (宝酒造), 0.5 μM の各プライマーとあわせて純水で 100 μl とした。MCT118 部位の増幅では、4ng~10ng の試料 DNA を 2.5mM の各デオキシ三リン酸, 各 2 μM のプライマーとあわせて反応液 (6.7mM MgCl<sub>2</sub>, 67mM Tris-HCl pH 8.3, 16.6mM 硫酸, 10mM 2-メルカプトエタノール, 170 μg/ml BSA, 10% ジメチルスルフォキシド) に入れ純水で全量を 40 μl とした。増幅反応は、1.25 単位の耐熱性 DNA ポリメラーゼ (宝酒造) を加え、蒸発を防ぐためミネラルオイル (Sigma) を一滴重層し、DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer Cetus, Norwalk, USA) を用いて表 2 の条件でおこなった。PCR の産物は、YNZ22 の場合は 2% のアガロースゲル, MCT118 の場合は 4% のポリアクリルアミドゲルを用いて電気泳動後、ゲルをエチジウムブロマイド (1 μg/ml) で染色し、紫外線照射下で DNA のバンドの有無を検討した。

### 成 績

#### I. YDNA プローブを用いた残存ホスト細胞の検出

女性ドナーから BMT を受けた 6 例の長期生存中の男性患者 (UPN47, 53, 62, 68, 70, 75) の骨髄単核細胞をメチルセルロース

Table 2. DNA sequences of primers used for amplification of variable number of tandem repeat (VNTR) loci and conditions for polymerase chain reaction

VNTR locus	5'Primer (5' to 3')	3'Primer (3' to 5')	Denaturation		Annealing		Extension		Number of reaction cycles
			Temp. (°C)	*Time (min)	Temp. (°C)	Time (min)	Temp. (°C)	Time (min)	
YNZ22	GGTCGAAGAGTGAAGTGACAG	GCCCCATGTATCTTGTGCACTG	94	1	55	2	72	2	30
MCT118	GAAACTGGCCCTCCAACAACACTGCCCGCCG	GTCTTGTGGAGATGCACGTGCCCTTGC	94	1	64	1	70	8	30-35

\* temperature.

法を用いて培養し、回収された培養細胞の DNA を YDNA をプローブとするドットブロットハイブリダイゼーションで検索した。この結果は図 1 に示すように、4 例 (UPN47, 53, 62, 70) で YDNA が検出された。骨髓単核細胞の培養の前後で YDNA の量を比較したところ、同量の DNA についての検索であるにもかかわらず、2 例で培養後の YDNA が相対的に増加していることが示された (図 2)。

造血因子の存在下での培養で YDNA の増幅がみられたことから、造血因子に反応して増殖する造血前駆細胞の中に宿主細胞が含まれている可能性が考えられた。そこで培養により得られた個々の CFU-GM 由来のコロニーの起源を、ダイレクトブロットングにより検索した。BFU-E 由来のコロニーはプローブとの非特異的な結合のため、本法では起源の判定はできなかった。図 3 に UPN62 についての結果の 1 例を示す。正常女性由来の CFU-GM コロニー (C1~7) では YDNA はまったく検出されないのに対し、正常男性のコロニー (B1~7) では全てに検出された。患者 (UPN62) の CFU-GM コロニー (A1~7, A'1~7) では 6 個のコロニー (A1, A4, A'1, A'2, A'3, A'7) に YDNA が示された。3 例 (UPN53, 62, 70) の CFU-GM コロニーを数回に渡って調べたところいずれにも宿主由来の CFU-GM が検出され、全 CFU-GM の中の宿主 CFU-GM の比率はそれぞれ平均 26%, 38%, 20% であった。

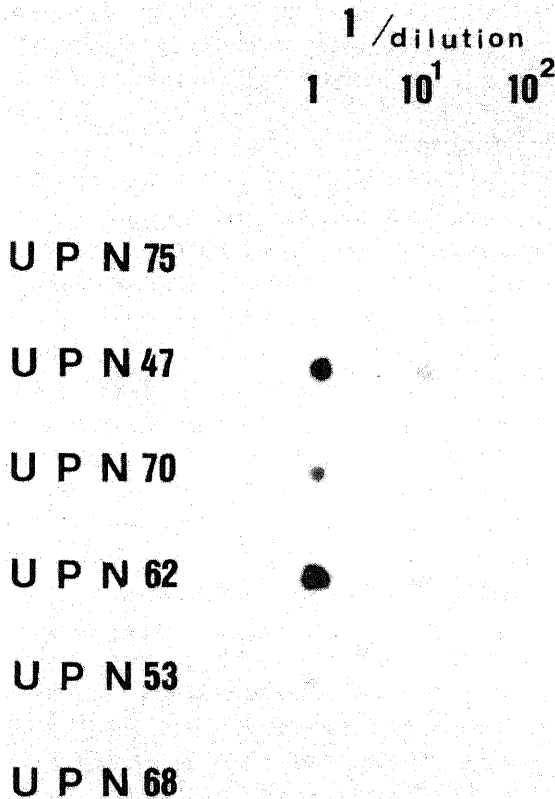


Fig. 1. Dot blot hybridization for detecting YDNA. The amount of  $3.0\mu\text{g}$  of DNA prepared from cultured bone marrow mononuclear cells (BMMC) of each patient was spotted with its dilutions on the nylon membrane and hybridized with the  $^{32}\text{P}$ -labeled Y chromosome-specific DNA probe. Each sample was diluted 1:1, 1:10, 1:10<sup>2</sup>, respectively.

II. 残存白血病細胞の分析

宿主由来の造血前駆細胞の残存が示された 3 例のうち 2 例は Ph<sup>+</sup>陽性の CML 患者であった。このため、残存している宿主細胞の性格を明らかにする目的で、BMT 後の骨髓細胞中の bcr-abl キメラ mRNA の有無を検討した。図 4 に bcr-abl mRNA の RT-PCR 法による検出結果を示した。この方法では 10<sup>5</sup> 個の正常細胞に 1 個以上の Ph<sup>+</sup>陽性細胞が存在すれば、bcr-abl mRNA の検出が可能であったが、2 例のいずれにも bcr-abl キメラ mRNA に特有なバンドは認められなかった (レーン 8, 9)。

III. VNTR 部位増幅による残存宿主細胞の検索

ドナー細胞中に混在する宿主細胞の検出感度は各ドナー・ホストの組合せによって異なるため、個々の症例についてドナー細胞と宿主細胞の混合実験により検討する必要があっ

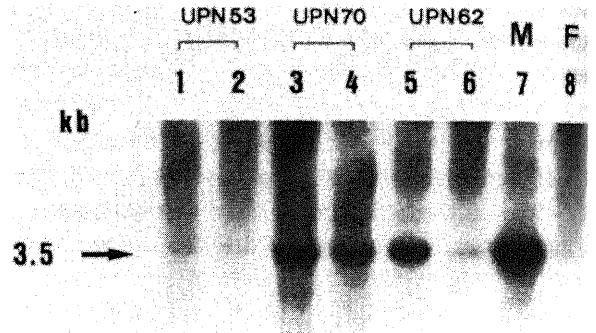


Fig. 2. Change of relative amounts of YDNA in BMMC after methylcellulose cultures. The relative amounts of YDNA were compared between non-cultured BMMC (lanes 2, 4, and 6) from 3 mixed chimeras and the corresponding cultured cells (lanes 1, 3, and 5) using Southern blot hybridization. The amount of  $3.0\mu\text{g}$  of DNA was applied to each lane. Lane 7, a normal male; lane 8, a normal female. The band of 3.5Kb was specific to Y chromosome.

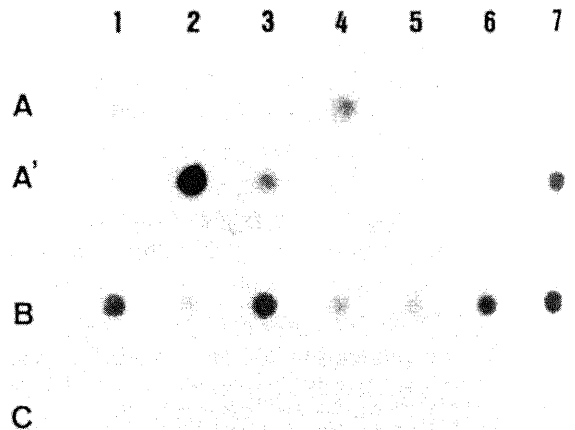


Fig. 3. Direct blotting analysis of CFU-GM derived colonies for detecting host-derived CFU-GM. Each dot corresponds to a single CFU-GM-derived colony plucked from day 14 methylcellulose cultures of BMMC from UPN62. A and A', UPN62; B, a normal male; C, a normal female; 1-7, different samples of each CFU-GM-derived colony.

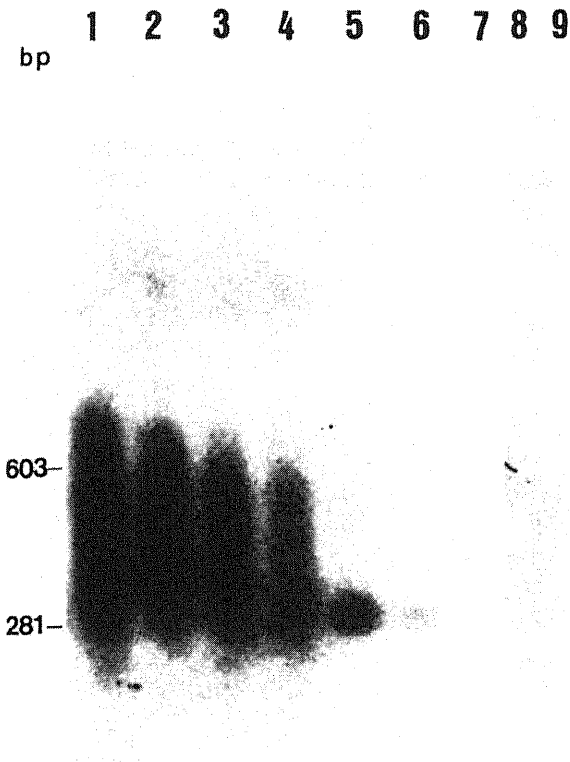


Fig. 4. Detection of bcr-abl chimeric messenger RNA by means of reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR). Various numbers of Ph<sup>1</sup>-positive cells obtained pretransplant from UPN62 were mixed with 10<sup>6</sup> peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from a normal individual, and total RNA was extracted from these cell mixtures. BMMC from UPN53 and UPN62 were tested for the presence of bcr-abl chimeric mRNA using RT-PCR followed by Southern blot analysis. Lanes 1 to 7, diluted Ph<sup>1</sup>-positive cells at 10<sup>6</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>5</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>4</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>3</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>2</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>1</sup>/10<sup>6</sup>, 10<sup>0</sup>/10<sup>6</sup>, in normal cells; lane 8, UPN53; lane 9, UPN62; 603 and 281, size markers.

た. 図5はUPN82について, MCT118 部位増幅によりドナー細胞中のホスト細胞の検出感度を検討したものである. この例では, ドナー細胞中にホスト細胞が1%以上あれば, ホスト細胞の検出が可能であった. 全症例のドナーと移植前の患者細胞(ホスト細胞)について YNZ22, MCT118 の2種類の VNTR 部位を増幅した結果, YNZ22 では14例中11例, MCT118 では13例中11例でドナーとホストの対立遺伝子(アレル)のDNA長が異なることから, ドナー細胞とホスト細胞の識別が可能だっ

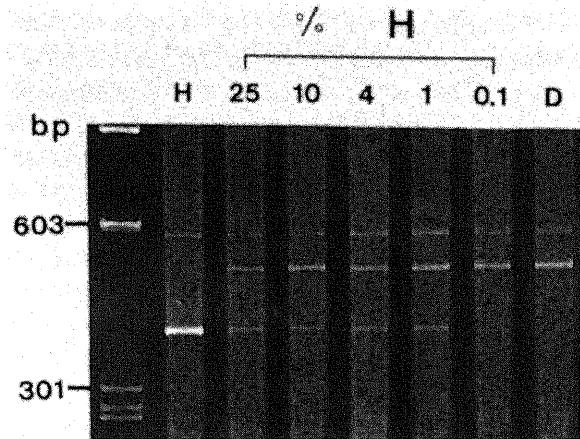


Fig. 5. Sensitivity of PCR-based variable number of tandem repeat (VNTR) analysis on UPN83. DNA from donor (D) and pretransplant patient (host, H) were mixed in the proportions of 25, 10, 4, 1, 0.1 H, and were subjected to PCR amplification of MCT118. Amplified products were analysed by using polyacrylamide gel electrophoresis. The left lane, size markers that were consisted of the HindIII fragments of lambda DNA and HaeIII fragments of ΦX 174 DNA. One percent host DNA in a background of donor DNA could be detected.

Table 3. Chimeric status determined by PCR analysis of VNTR loci

UPN	Chimeric status*		Clinical status
	YNZ22	MCT118	
56	C. C.	C. C.	Remission
59	C. C.	C. C.	Remission
64	C. C.	C. C.	Remission
66	N. D.	M. C.	Relapse
68	C. C.	C. C.	Remission
72	N. D.	M. C.	Remission
75	N. D.	M. C.	Relapse
76	C. C.	C. C.	Remission
77	M. C.	N. D.	Remission
78	C. C.	N. D.	Remission
81	C. C.	N. T.	Remission
82	C. C.	C. C.	Remission
83 <sup>a</sup>	M. C.	M. C.	Relapse
83 <sup>b</sup>	C. C.	C. C.	Remission after second BMT
84	C. C.	C. C.	Remission

\*YNZ22, amplification of YNZ22 locus; MCT118, amplification of MCT118 locus. C. C., complete chimera; M. C., mixed chimera; N. T., not tested; N. D., not distinguishable.

<sup>a</sup>, first BMT.

<sup>b</sup>, second BMT.

た。移植後に得られた患者単核細胞の検索結果を表3に示した。14例中5例で少数の宿主細胞の残存が検出された。UPN66では宿主型の再発が確認されたが、化学療法による寛解導入後、再びドナー型となった。UPN72では宿主細胞の残存が示唆されたが再発や拒絶の徴候は全くみられなかった。UPN75でも宿主細胞の残存が示されたが、血液学的には寛解を維持していた。しかしBMT後180日頃に髄膜白血病で再発した。UPN77では、移植後90日より骨髓低形成と汎血球減少症が進行し、LGFの状態となった。頻回輸血の既往のある再生不良性貧血患者であったため、拒絶が疑われた。図6にUPN77の家族とLGF発症時の患者骨髓単核細胞のYNZ22での検索結果を示した。BMT後90日の患者骨髓ではわずかながら宿主に特有なバンドが検出され、宿主細胞の残存が示唆された。そこでこの骨髓細胞を、X線照射したドナーの末梢血単核細胞とインターロイキン2の存在下で4週間以上培養したところ、レーン6のように最終的に得られた培養細胞は完全な宿主型となった。残存している患者リンパ球によるドナー骨髓の拒絶が強く疑われたため、メチルプレドニゾン大量療法を施行したところ汎血球減少は著しく改善した。回復後の移植後180日に骨髓単核細胞を再度検索したところ、宿主に特有なバンドは消失していた(レーン7)。UPN82では移植後70日頃より、皮膚の慢性GVHDと汎血球減少症が出現した。MCT118部位増幅による検索では、移植後11日の骨髓で一時的に

的に宿主特有のバンドが認められたが、72日の骨髓単核細胞、およびUPN76と同様の方法で培養した骨髓単核細胞由来のリンパ球においても宿主に特有なバンドは検出されなかった(図7)。この例ではシクロスポリンの増量により、慢性GVHDが改善するにつれて汎血球減少も回復した。UPN83ではBMT後の血液学的回復が非常に遅れていた。図8のよう

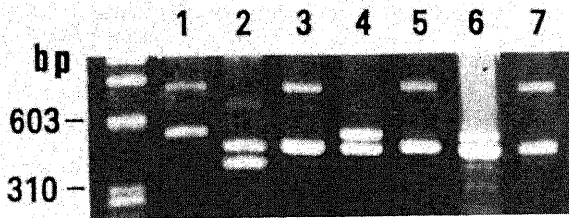


Fig. 6. Analysis of YNZ22 amplified with PCR in DNA from UPN77 and her family. Lane 1, father PBMC; lane 2, mother PBMC; lane 3, donor PBMC; lane 4, host PBMC; lane 5, patient PBMC obtained on day 90 after BMT; lane 6, cultured lymphocyte derived from the patient BMMC on day 90 after BMT; lane 7, patient BMMC obtained on day 180 after BMT; the left lane, refer to Fig. 5. The host specific allele in lane 5 and lane 6 indicates persistence of host host cells.

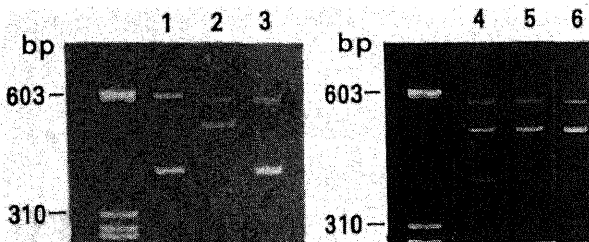


Fig. 7. Analysis of MCT118 amplified with PCR in DNA from UPN82 and his family. Lane 1, mother PBMC; lane 2, father PBMC; lane 3, host PBMC; lane 4, patient BMMC obtained on day 11 after BMT; lane 5, patient BMMC on day 72 after BMT; lane 6, cultured lymphocytes derived from the patient day 72 BMMC; the left lane, refer to Fig. 5. Among posttransplant samples, host-specific allele was only detected in lane 4.

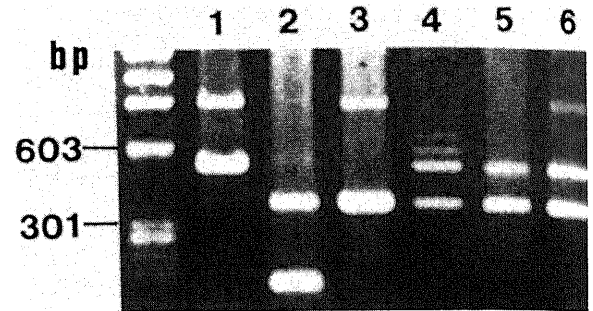


Fig. 8. Analysis of YNZ22 amplified with PCR in DNA from UPN83 and his family. Lane 1, father PBMC; lane 2, mother PBMC; lane 2, mother PBMC; lane 3, donor PBMC; lane 4, host PBMC; lane 5, BMMC day 14 after BMT; lane 6, BMMC day after 28; the left lane, refer to Fig. 5. The presence of the different alleles indicates mixed hematopoietic chimerism.

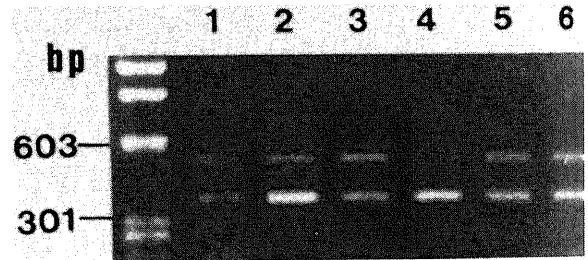


Fig. 9. Analysis of YNA22 amplified with PCR in DNA from UPN83 peripheral blood leukocytes. Lane 1, day 45 after BMT mononuclear cells (MC); lane 2, day 45 polymorphonuclear leukocytes (PMN); lane 3, day 63 MC; lane 4, day 63 PMN; lane 5, day 94 MC; lane 6, day 94 PMN; the left lane, refer to Fig. 5. The donor-specific allele seen in lane 2 is undetectable either in MC or in PMN of day 94.

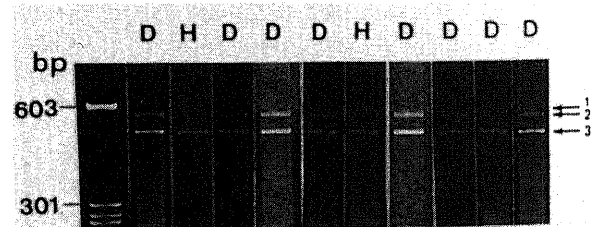


Fig.10. Origin of individual CFU-GM colonies after BMT. Each CFU-GM derived colony was individually plucked from day 14 methylcellulose cultures of BMMC from UPN 83, who was received second BMT. DNA extracted from each colony was subjected to PCR amplification of MCT118 loci. D and H represent donor-derived CFU-GM, and host-derived CFU-GM, respectively. 1, host-specific allele; 2, donor-specific allele; 3, a common allele between the host and donor; the left lane, refer to Fig. 5.

に、BMT 後14日の骨髄はまだ完全なホスト型であり、28日でドナーに特有のバンドの出現がみられるものの、ホスト細胞の残存が顕著であった。BMT 後45日以後、末梢白血分画を経時的に検査したところ、ドナーに特有なバンドは45日の多核球分画に認められるが、63日には減少し、94日には消失していた。単核球は終始ホスト型であった(図9)。不応性貧血の再発と診断し、全身 X 線照射とサイクロフォスファミドで前処置後、2回目のBMTを施行した。その結果、BMT 後22日の末梢白血球は完全にドナー型となった。しかしながら、2回目のBMT 後25日に得られた骨髄単核細胞を培養し、個々のCFU-GMコロニーの起源を検索したところ、図10のようにホスト型とドナー型のCFU-GMが混在していることが示された。

### 考 察

BMT 後にドナー細胞の生着を証明する手段として、従来赤血球抗原型や染色体分析などが用いられてきた。これらの検索法は検討可能な血球系統が限られていることや、分裂細胞の検査には多くの検体量を要することなどの問題がある。また感度が低いため、種々の病態でBMT後に残存する少数のホスト細胞を検出することは困難であった。一方、サザンブロット法を用いた制限酵素断片長多型の解析はキメラを証明するうえで有用な方法であるが、相当量のDNAを必要とするため、造血幹細胞に由来する単一コロニーのような少数の細胞集団の起源を明らかにすることはできない<sup>19)</sup>。著者はこのような欠点を克服し、迅速・鋭敏なキメラの証明と残存ホスト細胞の検出を可能にするため、YDNAと2種類のVNTR部位をマーカーとして、ハイブリダイゼーションおよびPCRをおこなった。

従来、BMT 前処置の大量の化学放射線療法でホストの造血幹細胞は完全に死滅すると考えられていた。しかし最近、長期間寛解を維持しているBMT患者の中にドナー細胞とホスト細胞の両方が検出される混合造血キメラの報告がなされ、現在の前処置はホスト由来の造血幹細胞に必ずしも致死的ではないと考えられてきている<sup>19)~23)</sup>。一方、このような混合造血キメラの状態を造血前駆細胞レベルで証明した報告はみられない。本研究では、YDNAを用いた6例の培養骨髄細胞の検索の結果、4例でホスト細胞の残存が示され、このうち3例では造血前駆細胞の残存が示された。これらのBMT後のホスト由来のCFU-GMの割合は、全体の20~38%と予想した以上に高率であった。メチルセルロースのような半固形培地で骨髄単核細胞を培養した場合、細胞間の接触がないため生体内であるような細胞間の相互作用が働きにくいと考えられる。このため、生体内ではなんらかの機序により抑制されていたホスト由来のCFU-GMが増殖可能となった結果、ホスト由来のCFU-GMが高率となった可能性が考えられる。骨髄単核細胞の培養後にYDNA量の相対的な増加が認められたことも、この可能性を示唆している。

ホスト由来の造血前駆細胞の残存が示された例のうちCMLの2例は、BMT前の骨髄細胞の染色体分析で100%Ph<sup>+</sup>陽性細胞であった。このためPh<sup>+</sup>陽性細胞の残存が懸念されたが、BMT後の骨髄単核細胞を高感度の高いRT-PCR法で調べたところ、bcr-ablキメラmRNAは全く認められなかった。従って残存するホスト由来の造血前駆細胞はPh<sup>-</sup>陰性の正常クローンと考えられた。BMT後のPh<sup>-</sup>陰性のホスト細胞による今後造血

キメラ例については他にも報告がある<sup>20)~22)</sup>。この機序としては、BMT前の前治療によってPh<sup>+</sup>陽性クローンが選択的に死滅し、BMT前に少数残っていたPh<sup>-</sup>陰性の正常クローンが回復した可能性が考えられる。あるいは、Ph<sup>+</sup>陽性クローンのみを認識する移植片対白血病(graft-versus-leukemia, GVL)効果の結果、Ph<sup>+</sup>陽性クローンのみが完全に除かれ正常クローンが残存していた可能性も考えられる<sup>14)19)23)~28)</sup>。このようなPh<sup>-</sup>陰性の正常クローンによる混合造血キメラ例の検出は、GVL効果のメカニズムを明らかにするうえで重要と考えられる。

VNTR部位のDNA長は各個人で非常に多型性が高いことから個体識別に非常に有用とされ、法医学的な捜査にも頻用されている<sup>30)~32)</sup>。著者がMCT118とYNZ22の2種類のVNTR部位<sup>5)~6)</sup>を増幅して検討したところ、14例全例でドナー細胞とホスト細胞の識別が可能であった。このようなVNTR部位の検索は同性間のBMTでも応用できるうえ、感度も高く、極少量の検体についても起源の検索が可能であった。

残存ホスト細胞が検出された5例のうちUPN76, 77, 82, 83の4例はLGFを呈していた。LGFはBMT後の重大な合併症の一つであるが、汎血球減少の原因として感染、薬剤、GVHDなどの種々の因子が考えられるため原因を特定するのは困難なことが多い<sup>19)23)~25)</sup>。しかし、このような例で残存ホスト細胞が検出された場合には、ホストリンパ球による拒絶や再発の可能性があるため早期の治療が必要である。UPN77では、残存する骨髄単核細胞中のホスト細胞がドナーリンパ球とインターロイキン2に反応して増殖したことから、拒絶が強く疑われた。実際にメチルプレドニゾン大量療法を施行したところ、患者の汎血球減少は著しく改善し、寛解後には残存ホスト細胞は検出されなくなった。一方、UPN82ではLGFの極期にはホスト細胞は検出されなかった。またシクロスポリンの増量によりGVHDが改善するのにしたがって汎血球減少も改善したことから、この患者のLGFは残存するホストリンパ球によるものではなく、慢性GVHDに関係したものと考えられた。UPN83では当初よりドナー細胞とともにホスト細胞の残存が認められていたが、次第にホスト細胞が優勢となり、最終的には完全にホスト型となった。もともと特徴的な染色体異常がなかったため、異常クローンの再出現か正常ホストクローンの回復かは鑑別が困難であったが、BMT前の細胞形態異常をとどめていたことから不応性貧血の再発と診断した。BMTの前処置を変えて再BMTを行なったところ、ドナー細胞は無事生着し患者は社会復帰している。UPN72はホスト細胞が検出されたにもかかわらず寛解を維持していることからいわゆる、混合キメラ状態と考えられた。UPN83では2回目のBMT後25日の時点でホストに特有なバンドは認められなかった。しかし、同じ骨髄を培養して得られた造血前駆細胞由来のコロニーの検索では、ホスト由来のCFU-GM細胞の残存が示された。この例ではCMLのbcr-abl遺伝子のような適当なマーカーがないため、残存するホスト細胞の性質は不明だが、その後の臨床経過で再発の徴候は全くみられないことから、正常クローンの可能性が高い。このような正常ホスト細胞による混合造血キメラについては、GVHDの発生率が低いことやTリンパ球除去BMTでは高率に認められるとことから、ドナーの免疫担当細胞のホスト抗原に対する寛容と関係があると考えられている<sup>18)19)23)25)26)</sup>。しかし拒絶や再発については関連があるという説<sup>18)19)</sup>と関連はないとする説<sup>20)</sup>があり、その病的意義はまだ明ら



かではない。今後 VNTR 部位の解析などにより、更に検討を重ねていく必要があると思われる。

このような DNA マーカーを用いた検索方法は、BMT 後の生着や拒絶・再発の迅速な診断のみならず、病態を把握し、早期に適切な治療を行なううえで非常に有用と考えられた。BMT 後の宿主由来の造血前駆細胞の残存を直接証明し得たのは本研究が最初である。今回用いたような検索方法により残存宿主細胞を検出することは、ドナーの免疫担当細胞とホストの造血前駆細胞間の相互作用を理解するのに役立つと思われる。

### 結 論

同種骨髄移植後患者を2種類の DNA マーカーを用いて検索し以下の結果を得た。

1. 女性から骨髄移植を受けた男性患者6例の骨髄培養細胞を、YDNA をプローブとしたドットプロットで検索した結果、4例に宿主細胞の残存が認められた。サザンプロットで3例の培養前後の YDNA を比較したところ、2例で培養による YDNA 量の相対的な増加が認められた。

2. YDNA の残存が認められた症例で、CFU-GM 由来の個々のコロニーについて YDNA を検索したところ、20~38% のホストの造血前駆細胞が示された。このうち2例の Ph<sup>+</sup>陽性慢性骨髄性白血病患者では RT-PCR によっても bcr-abl mRNA が検出されなかったことから、残存する宿主細胞は正常クローンと考えられた。

3. MCT118, YNZ22 の2種類の VNTR 部位増幅による検索は、高感度で簡便・迅速に施行でき、検討した全例でドナー細胞と宿主細胞の識別が可能だった。14例中5例に宿主細胞の残存が示され、1例は拒絶、3例は再発と診断された。

4. 他の1例は無症候性の混合造血キメラと診断された。完全キメラの1例についても、骨髄培養で個々の CFU-GM の起源を検討したところ、ホストの造血前駆細胞の残存が認められた。この2例については、YDNA の検索により宿主造血前駆細胞の残存が示された症例と同様に、正常クローンによる混合造血キメラと考えられた。

5. 以上のような DNA マーカーを用いた細胞の起源の検索方法は、骨髄移植後の少数の残存宿主細胞の検出とキメリズムの証明にきわめて有用であることを示唆するものである。

### 謝 辞

稿を終るにあたり、御指導、御校閲を賜りました恩師松田 保教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに終始、直接ご指導、ご助言をいただきました金沢大学医学部高密度無菌治療部講師、中尾真二先生に厚く御礼申し上げるとともに、本研究の遂行に際し多大な御協力をいただきました金沢大学医学部第三内科免疫グループの各位に感謝の意を表します。またプローブに用いた pKY-2 クローンを提供して下さった東京医科大学長井光三博士に深謝いたします。

なお本研究の要旨は、第32回臨床血液学会総会および第52回日本血液学会総会において発表した。

### 文 献

1) Durnam, D. M., Anders, K. R., Fisher, L., O'Quigley, J., Bryant, E. M. & Thomas, E. D.: Analysis of the origin of marrow cells in bone marrow transplant recipients using a Y-chromosome-specific in situ hybridization assay. *Blood*, 74,

2220-2226 (1989).

2) Morisaki, H., Morisaki, T., Nakahori, Y., Ogura, H., Kanno, H., Tani, K., Kondo, H., Fujii, H., Asano, S. & Miwa, S.: Genotypic analysis using a Y-chromosome-specific probe following bone marrow transplantation. *Am. J. Hematol.*, 27, 30-33 (1988).

3) Saiki, R. K., Geifand, D. H., Stoffel, S., Scarf, S. J., Higuchi, R., Horn, G. T., Mullis, K. B. & Erlich, H. A.: Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, 239, 487-491 (1988).

4) 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).

5) Kasai, K., Nakamura, Y. & White, R.: Amplification of a variable number of tandem repeats (VNTR) locus (pMCT118) by the polymerase chain reaction (PCR) and its application to forensic science. *J. Forensic Sci.*, 35, 1196-1200 (1990).

6) Horn, G. T., Richards, B. & Klinger, K. W.: Amplification of highly polymorphic VNTR segment by the polymerase chain reaction. *Nucleic Acids Res.*, 17, 2140 (1989).

7) Chalmers, E. A., Sproul, A. M., Mills, K. I., Gibson, B. E. S. & Burnett, A. K.: Use of the polymerase chain reaction to monitor engraftment following allogeneic bone marrow transplantation. *Bone Marrow Transplant.*, 6, 399-403 (1990).

8) Roth, M. S., Antin, J. H., Bingham, E. L. & Ginsburg, D.: Use of polymerase chain reaction-detected sequence polymorphisms to document engraftment following allogeneic bone marrow transplantation. *Transplantation*, 49, 714-720 (1990).

9) Ugozzoli, L., Yam, P., Petz, L. D., Ferrara, G. B., Champlin, R. E., Forman, S. J., Koyal, D. & Wallace, R. B.: Amplifications 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).

10) Thomas, E. D.: Bone marrow transplantation. *N. Engl. J. Med.*, 292, 895-902 (1975).

11) Nakao, S., Harada, M., Ueda, M., Kondo, K., Odaka, K., Ohtake, S., Matsue, K., Shiobara, S., Mori, T. & Matsuda, M.: Enhancement of in vitro erythropoiesis by peripheral blood mononuclear cells from allogeneic marrow recipients in the early post-transplant period. *Scand. J. Haematol.*, 36, 180-185 (1986).

12) 長井光三: 出生前性別判定と DNA 診断. *日本臨床*, 47, 827-834, (1989).

13) Southern, E. M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503-517 (1975).

14) Roth, M. S., Antin, J. H., Bringham, E. L. &

- Ginsburg, D.: Detection of Philadelphia chromosome-positive cells by the polymerase chain reaction following bone marrow transplant for chronic myelogenous leukemia. *Blood*, **74**, 882-885 (1989).
- 15) Ginsburg, D., Antin, J. H., Smith, B. R., Orkin, S. H. & Rapoport, J. M.: Origin of cell populations following bone marrow transplantation: Analysis using DNA sequence polymorphism. *J. Clin. Invest.*, **75**, 596-603 (1985).
- 16) Walker, H., Singer, C. R. J., Patterson, J., Goldstone, A. H. & Prentice, H. G.: The significance of host hematopoietic cells detected by cytogenetic analysis of bone marrow from recipients of bone marrow transplants. *Br. J. Haematol.*, **62**, 385-391 (1986).
- 17) Schmitz, N., Godde-Salz, E. & Loffler, H.: Cytogenetic studies on recipients of allogeneic bone marrow transplants after fractionated total body irradiation. *Br. J. Haematol.*, **60**, 239-244 (1985).
- 18) Petz, L. D., Yam, P., Wallace, R. B., Stock, A. D., de Lange, G., Knowlton, R. G., Brown, V. A., Donis-Keller, H., Hill, L. R., Forman, S. J. & Blume, K. G.: Mixed hematopoietic chimerism following bone marrow transplantation for hematologic malignancies. *Blood*, **70**, 1331-1337 (1987).
- 19) Hill, R. S., Perterson, F. B., Storb, R., Applebaum, F. R., Doney, K., Dahlberg, S., Ramberg, R. & Thomas, E. D.: Mixed hematologic chimerism after allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia is associated with a higher risk of graft rejection and a lessened incidence of acute graft-versus-host disease. *Blood*, **67**, 811-816 (1986).
- 20) Becher, R., Beelen, D. W., Graeven, U., Schaefer, U. & Schmidtr, C. G.: Triple chimerism after allogeneic bone marrow transplantation for Philadelphia chromosome positive chronic granulocytic leukemia. *Br. J. Haematol.*, **67**, 373-374 (1987).
- 21) Bacigalupo, A., Frassoni, F., Van Lint, M. T., Occhini, D., Pittaluga, P. A., Repetto, M., Piaggio, G., Sessarego, M., Caimo, A., Conjuu, A. & Marmont, A.: Bone marrow transplantation for chronic granulocytic leukemia. *Cancer*, **58**, 2307-2311 (1986).
- 22) Spitzer, T. R., Himoe, E., Cottler-Fox, M., Cahill, R. & Deeg, H. J.: Long-term stable mixed chimerism following allogeneic marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Br. J. haematol.*, **76**, 146-147 (1990).
- 23) Bertheas, M. F., Maraninchi, D., Lafage, M., Fraise, J., Blaise, D., Stoppa, A. M., Michel, G., brizard, C. P., Gaspard, M. H., Novakovitch, G., G., Mannoni, P., Viens, P. & Carcassone, Y.: Partial chimerism after T-cell-depleted allogeneic bone marrow transplantation in leukemic HLA-matched patients: A cytogenetic documentation. *Blood*, **72**, 89-93 (1988).
- 24) Apperley, J. F., Mauro, F. R., Goldman, J. M., Gregoly, W., Arthur, C. K., Hows, J., Arcese, W., Papa, G., Mandelli, F., Wardle, D., Gravett, P., Franklin, I. M., Bandini, G., Ricci, P., Tura, S., Iacone, A., Torlontano, G., Heit, W., Champlin, R. and Gale, R. P.: Bone marrow transplantation for chronic myeloid leukemia in first chronic phase: Importance of a graft-versus-leukemia effect. *Br. J. Haematol.* **69**, 239-245 (1988).
- 25) Bretagne, S., Vidaud, M., Kuentz, M., Cordonnier, C., Henni, T., Vinci, G., Goossens, M. & Vernant, J. P.: Mixed blood chimerism in T cell-depleted bone marrow transplant recipients: Evaluation using DNA polymorphisms. *Blood*, **70**, 1692-1695 (1987).
- 26) Scattenberg, A., De witte, T., Salden, M., Vet, J., Dijk, B. V., Smeets, D., Hoogenhort, J. & Haanen, C.: Mixed hematopoietic chimerism after allogeneic transplantation with lymphocyte-depleted bone marrow is not associated with a higher incidence of relapse. *Blood*, **73**, 1367-1372 (1989).
- 27) Holowitz, M. M., Gale, R. P., Sondel, P. M., Goldman, J. M., Kersey, J., Koib, H. J., Rimm, A. A., Ringden, O., Rozman, C., Truitt, R. L., Zwaan, F. E. & Bortin, M.: Graft-versus-leukemia reactions after bone marrow transplantation. *Blood*, **75**, 555-562 (1990).
- 28) Truitt, R. L., Shih, C. Y., Lefever, A. V., Tempelis, L. D., Andreani, M. & Bortin, M. M.: Characterization of alloimmunization-induced T lymphocytes reactive against AKR leukemia in vitro and correlation with graft-vs-leukemia activity in vivo. *J. Immunol.*, **131**, 2050-2058 (1983).
- 29) Hows, J. M., Palmer, . & Gordon-Smith, E. C.: Use of cyclosporin A in allogeneic bone marrow transplantation for severe aplastic anemia. *Transplantation*, **33**, 382-386 (1982).
- 30) Baird, M., Balazs, I. & Ginsti, A.: Allele frequency distribution of two highly polymorphic DNA sequences in three ethnic groups and its application to determination of paternity. *Am. J. Hum. Genet.*, **39**, 489-501 (1986).
- 31) 塩野 寛: 臨床医のための法医学マニュアル, 第1版, 195-199頁, 新興医学出版者, 東京, 1987.
- 32) 木内政寛, 佐藤弥生, 木村 康: HLA 系の親子鑑定への応用について, 法医学の実際と研究, **31**, 19-25 (1988).
- 33) Storb, R., Prentice, R. L., Thomas, E. D., Applebaum, F. R., Deeg, H. J., Doney, K., Fefer, A., Goodel, B. W., Mickelson, E., Stewart, P., Sullivan, K. M. & Witherspoon, R. P.: Factors associated with graft rejectin after HLA identical marrow transplantation for aplastic anemia. *Br. J. Haematol.*, **55**, 573-575 (1983).
- 34) Kernan, N. A., Bordignon, C. A., Keever, I., Cunningham, H., Castro-Malaspina, H., Collins, N. H., Small, T. N., Brochstein, J., Emanuel, D., Laver, J., Shank, B., Burns, J., Flomenberg, N., Gulati, S., Dupont, B. & O'Reilly, R. J.: Graft failures after T cell depleted marrow transplants for leukemia: Clinical and in vitro characteristics. *Transplant. Proc.*, **19**, (Suppl 7), 29-22 (1987).
- 35) Torok-Storb, B., Simmons, P. & Przepiora, D.: Impairment of hematopoiesis in human allografts. *Transplant. Proc.*, **19** (Suppl 7), 33-37 (1987).

**Detection of Residual Host Blood Cells after Allogeneic Bone Marrow Transplantation Using DNA Markers**  
Tomoko Nakatsumi, Department of Internal Medicine (III), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J.  
Juzen Med Soc., **101**, 375 - 384 (1992)

**Key words** bone marrow transplantation, polymerase chain reaction, variable number of tandem repeat, Ychromosome-specific repetitive DNA, mixed hematopoietic chimerism

#### Abstract

In order to document the engraftment of donor cells (chimerism) and examine whether or not residual host cells can be detected after allogeneic bone marrow transplantation, the origin of blood cells from 18 marrow transplant recipients was determined. The method a Ychromosome-specific repetitive DNA (YDNA) probe, and analysis of variable number of tandem repeat (VNTR) loci amplified with polymerase chain reaction (PCR). Cultured bone marrow mononuclear cells (BMMC) from 6 male patients who received marrow grafts from female donors, were examined for the presence of YDNA using dot blotting analysis and Southern blotting analysis. YDNA was detectable in DNA from 4 out of the 6 patients, indicating the presence of residual host cells (mixed hematopoietic chimerism). YDNA was also detectable in some (20-38%) of CFU-GM-derived colonies individually isolated from cultures of the BMMC from the 3 documented mixed hematopoietic chimeras. Although two of the three mixed chimeras had CML before BMT, bcr-abl chimeric messenger RNA (specific for Philadelphia chromosome-positive cells) was not detected in their posttransplant BMMC in analysis using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. This suggested that the residual host cells documented in these two patients were Philadelphia chromosome-negative normal clones. Analysis of VNTR loci using PCR allowed the author to distinguish donor and host cells in all 14 different pairs studied. Residual host cells were detected in 5 of 14 patients. One of the 5 patients was diagnosed as being in an early stage of graft rejection, and was successfully treated later with immunosuppressive therapy. Three patients were proved to have a recurrence of their pretransplant diseases. One of them, who had myelodysplastic syndrome, received a second marrow graft and achieved a sustained engraftment of donor cells. Another patient remained in remission without any evidence of rejection or relapse after the detection of residual host cells in her BMMC. These findings indicate that determination of the origin of blood cells using DNA markers is very useful not only in diagnosing graft rejection or relapse at the early stage following BMT, but also in understanding cell-cell interactions involving donor-derived immune competent cells and host-derived hematopoietic progenitor cells.