

## 症例報告

## フローサイトメトリを用いて骨髄移植後の微小残存病変を検出した急性骨髄性白血病

岡 智子<sup>1,2)</sup>, 室井 一男<sup>1,2)</sup>, 森 政樹<sup>1,2)</sup>, 松山 智洋<sup>1,2)</sup>,  
藤原慎一郎<sup>1)</sup>, 翁 家國<sup>1)</sup>, 佐藤 一也<sup>1)</sup>, 上田 真寿<sup>1)</sup>,  
鈴木 隆浩<sup>1)</sup>, 尾崎 勝俊<sup>1)</sup>, 永井 正<sup>1)</sup>, 小澤 敬也<sup>1,2)</sup>

## 要 約

急性骨髄性白血病 (acute myeloblastic leukemia: 以下 AML) の微小残存病変 (minimal residual disease: 以下 MRD) の検出は, 骨髄移植後の再発を予測する重要な検査である。AML の細胞は, 様々な抗原発現異常を呈することが知られている。今回, AML の患者にみられた CD34+CD15+CD7+ 細胞を指標として, flow cytometry を用いて骨髄移植後の MRD を検査し, MRD の陽性化が続いた後, 骨髄再発を来した例を経験したので報告する。

(Key words: 微小残存病変, 急性骨髄性白血病, flow cytometry, 骨髄移植)

## I はじめに

急性骨髄性白血病 (acute myeloblastic leukemia: 以下AML) に対する標準的な初期治療は, 一部の病型を除けば, 現在でも抗癌剤による寛解導入療法である。完全寛解に到達しても体内には白血病細胞が残存しているため, 地固め療法によって微小残存病変 (minimal residual disease: 以下MRD) を減らす方策がとられる。AMLの再発とMRDとの関係は良く知られており, MRDが増加するまたは陽性となるとAMLの再発に繋がると報告されている<sup>1,2)</sup>。寛解後療法の中で, 最も強力な治療法は同種造血幹細胞移植である。同種造血幹細胞移植は, 骨髄破壊的な移植前処置による白血病細胞に対する殺細胞効果と移植片対白血病 (graft-versus-leukemia: 以下GVL) の両者でAMLを治療に導く治療法である。抗癌剤治療と同じように, 移植後のMRDの増加または陽性化とAMLの再発との関係が報告されている<sup>3,4)</sup>。今回, flow cytometry (FCM) を用いて骨髄移植 (bone marrow transplantation: 以下BMT) 後のAMLのMRDを継時的に検査し, MRD陽性が続いた後

にAMLの再発を来した例を経験したので報告する。

## II 症例

症 例: 24歳男性。

主 訴: 全身倦怠感。

既往歴: 特記すべき事項なし。

現病歴: 2006年12月初旬より感冒様症状出現。症状が改善しないため12月下旬に近医受診し, 血液検査で白血球増多, 貧血, 血小板減少指摘され当院を紹介された。12月29日, 精査加療目的に当院に入院となった。

入院時現症: 眼瞼結膜貧血あり, 眼球結膜黄染なし。表在リンパ節腫脹なし。心音と肺音に異常なし。腹部は平坦で圧痛なし。肝脾触知せず。下腿に浮腫なし。

入院時検査所見: 末梢血は, 白血球 $393 \times 10^3 / \mu\text{L}$ , Hb 9.6 g/dL, 血小板 $7.8 \times 10^4 / \mu\text{L}$ で, 白血球分画では未熟な芽球が99.9%を占めていた。骨髄検査では, 骨髄は過形成で, 未熟な芽球が96.4%を占めていた。芽球は, 核の異型性を示し細胞質に空胞を有し, ベルオキシ

1) 自治医科大学附属病院血液科

2) 自治医科大学附属病院輸血・細胞移植部

ダーゼ (myeloperoxidase: 以下MPO) 染色陽性 (95%), プチレートエステラーゼ染色陰性であった。当部の3重染色FCM<sup>5)</sup>では、芽球は、CD33 81.3%, CD34 59.6%, CD117 40.3%, CD15 84.6%, CD7 78.9%, HLA-DR 61.1%, MPO 98.0%, 他の抗原 (CD5, CD7, CD2, CD19, CD20, CD10, CD13, CD14, CD41, CD11b, CD56,

CD235a, CD36, TdT) は陰性 (陽性率20%以下), CD34+CD7+を呈する細胞を認めた (図1のaとb)。染色体検査では、46,XY,addition(9)(q13) (20/20細胞)。以上から、French-American-British (FAB)分類のAML-M1と診断した。

入院後経過: 2007年1月6日より寛解導入療

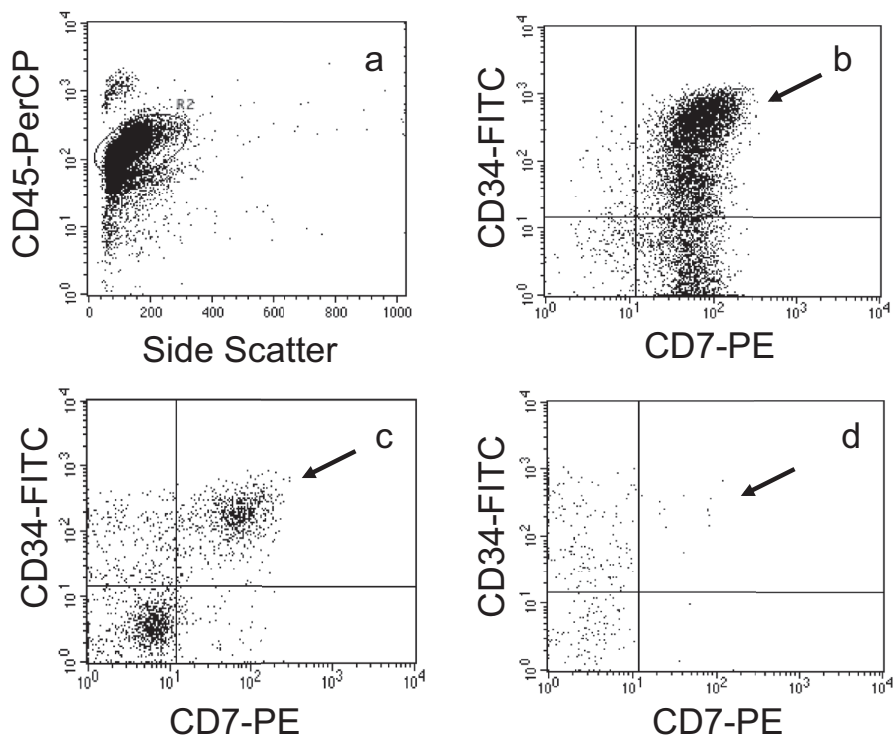


図1 3重染色 flow cytometry

- a, CD45 と side scatter で展開した初診時の骨髄細胞。円の領域に白血病細胞の集団を認める。  
 b, 初診時の白血病細胞に、CD34+CD7+ 細胞を認める (矢印)。  
 c, 寛解導入療法後、CD34+CD7+ 細胞の残存を認める (矢印)。  
 d, 再寛解導入療法後、僅かであるが CD34+CD7+ 細胞の残存を認める (矢印)。

法を行った。1月31日の骨髄穿刺では、芽球を9.0%を認め、FCMでもCD34+CD7+の細胞の残存を認め (図1c), 部分寛解と判断した。再度寛解導入療法を行い、白血病芽球は消失したが (骨髄芽球は1.4%), FCMではCD34+CD7+の芽球の僅かな残存を認めた (図1d)。染色体分析は正常核型であった。形態学的には完全寛解 (CR)と判断した。その後地固め療法を行い、2007年4月16日の骨髄穿刺の

FCMでは、CD34+CD7+細胞の消失を認め、MRD陰性と判断した。BMT前の2007年6月28日の骨髄穿刺でも、CR (FCMでMRDも陰性)を確認した (図2のa, e, i)。

初診時の白血球が $393 \times 10^3 / \mu\text{L}$ と極めて多く、寛解に到達するまでに2回の寛解導入療法を必要としたことから、再発の危険性が高く骨髄移植の適応と判断した。HLA一致の血縁者ドナーがないため、骨髄バンクに登

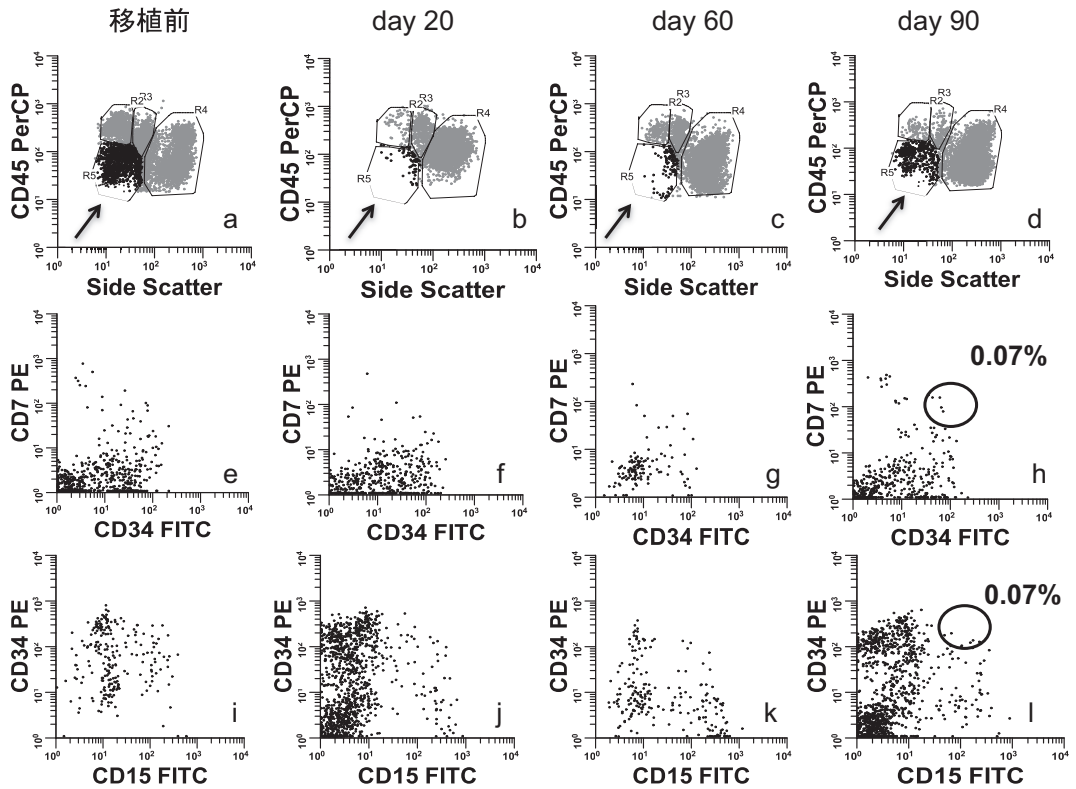


図2 4重染色 flow cytometry (1)

矢印は白血病細胞が存在する領域 (R5 の領域) を示す。移植前 (a, e, i), 移植後 20 日 (b, f, j), 移植後 60 日 (c, g, k), 移植後 90 日 (d, h, l)。円は、CD34+CD15+CD7+ 細胞を示す。

録した。適合ドナーが見つかり、2007年7月10日、HLAの遺伝子型一致 (8/8)、血液型一致の男性ドナーから非血縁者間BMTを行った (図3)。移植前処置はcyclophosphamide 60 mg/kgを1日1回、計2日間 (120mg/kg) 点滴投与し、全身放射線照射は1回2Gyを1日2回、計3日間 (12Gy) 行った。移植片対宿主病 (graft-versus-host disease: 以下GVHD) 予防は、短期methotrexateとtacrolimusで行った。移植前に、臨床試験 (臨06-70号、同種造血幹細胞移植における造血回復の評価に関する研究) を説明し、参加の同意を得た。申請書に従い、移植直前と移植後の4重染色FCMは、リプロセル (横浜市) に委託した。芽球分画にCD34+CD15+CD7+細胞が0.01%以上存在する時、MRD陽性と判断した。

day 20の骨髓穿刺で、生着を確認 (short

tandem repeat-polymerase chain reaction 法で100%ドナー型) した。FCMでは、逸脱抗原を有する異常細胞は検出されなかった (図2のb, f, j)。day 21より嘔気、下痢などの消化器症状認め、消化管GVHD (stage 1, grade 2) と診断した。prednisolone (PSL) 1 mg/kgの経口投与を行い、症状の改善を認めたためPSLを漸減し、day 118でPSLの投与を中止した。day 60の骨髓検査では、検鏡上異常細胞は認めず、FCMでもMRDは陰性であった (図2のc, g, k)。day 90からday 360の骨髓検査では、検鏡上異常細胞を認めなかったが、FCMではCD34+CD15+CD7+細胞を0.07%から0.15%認めた (図2のd, h, lと図4のaからl)。day 90の染色体検査は、正常核型 (46, XY; 20/20細胞) であった。day 33にtacrolimusを経口剤に変更したが、day 90にFCMでMRD陽性と

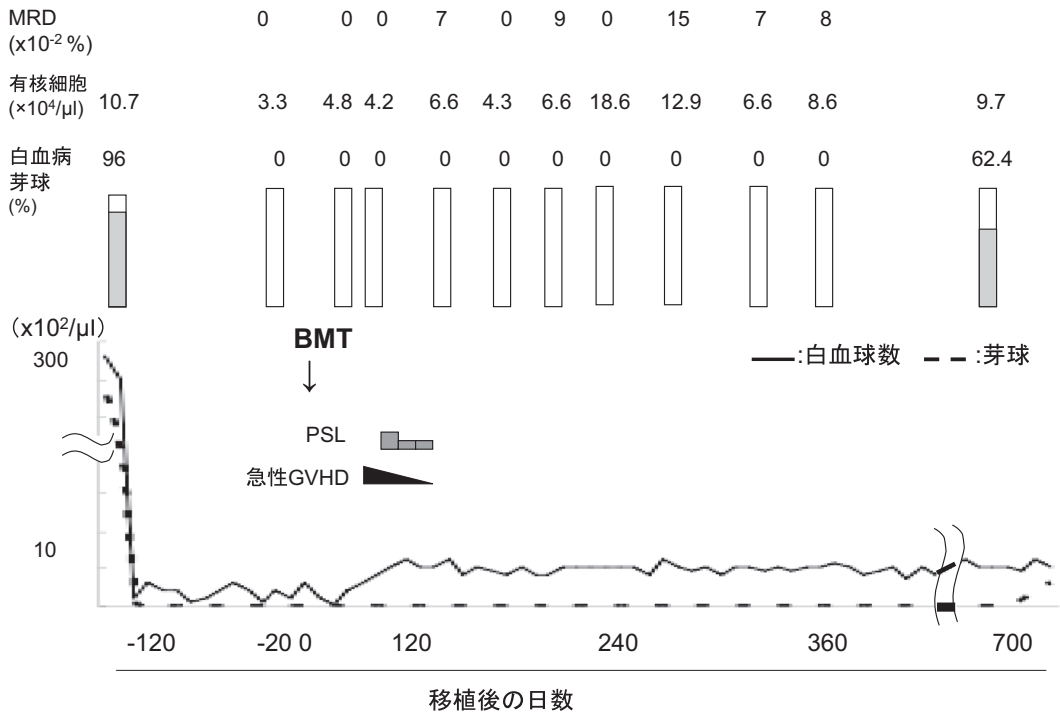


図3 臨床経過

BMT, bone marrow transplantation; PSL, prednisolone; GVHD, graft-versus-host disease. 円柱は、骨髓中の芽球の%を示す。

判断されたため、以後tacrolimusを早めに漸減し、day 223にtacrolimusの投与を中止した。day 360以降、FCMを用いたMRD検査は行われなかった。day 700に末梢血で芽球の出現を認め、骨髓検査で再発を確認した。抗癌剤による寛解導入療法で、再度CRに到達し、2010年1月29日2回目の非血縁者間BMTを行い、現在経過を観察している。

### III 考察

MRDの検査方法には、光学顕微鏡による塗抹標本の観察、染色体分析、fluorescence in situ hybridization (FISH)、FCM、polymerase-chain reactionがある。各々の検出感度は、5%、1-5%、0.1-5%、0.1-1%、0.0001-1%とされている<sup>1)</sup>。FCMを用いた急性白血病のMRDの検出は、染色体分析やFISHと同等以上の感度を有し、白血病の病型に関わらず検査できる、迅速に結果が判明する、再解析が可能、結果が定量

的である利点を有している<sup>1,6)</sup>。AML細胞には、抗原の過剰発現、抗原の欠損または発現低下、逸脱抗原、抗原の非同調性発現 (asynchronous expression) が見られ、これらの抗原発現異常をFCMで調べることによって多くのAML症例のMRDを検出することは可能であると言われている<sup>6-10)</sup>。AMLでしばしばみられる逸脱抗原に、CD2, CD7, CD19, CD56がある<sup>11)</sup>。正常のCD34+細胞には、CD7とCD15の発現はほとんどみられないので、CD34+CD15+CD7+細胞はAMLのMRDと判断することができる<sup>12,13)</sup>。本例では、CD34+CD15+CD7+細胞を指標としてMRDを検査した。抗原の発現低下や過剰発現と異なり、CD15やCD7の様な逸脱抗原をFCMで検査することは比較的容易である。従って、AML細胞に逸脱抗原がある場合には、FCMを用いて日常診療としてMRD検査を行うことは、どの施設でも可能と思われる。

造血幹細胞移植を行ったAML患者のMRDを

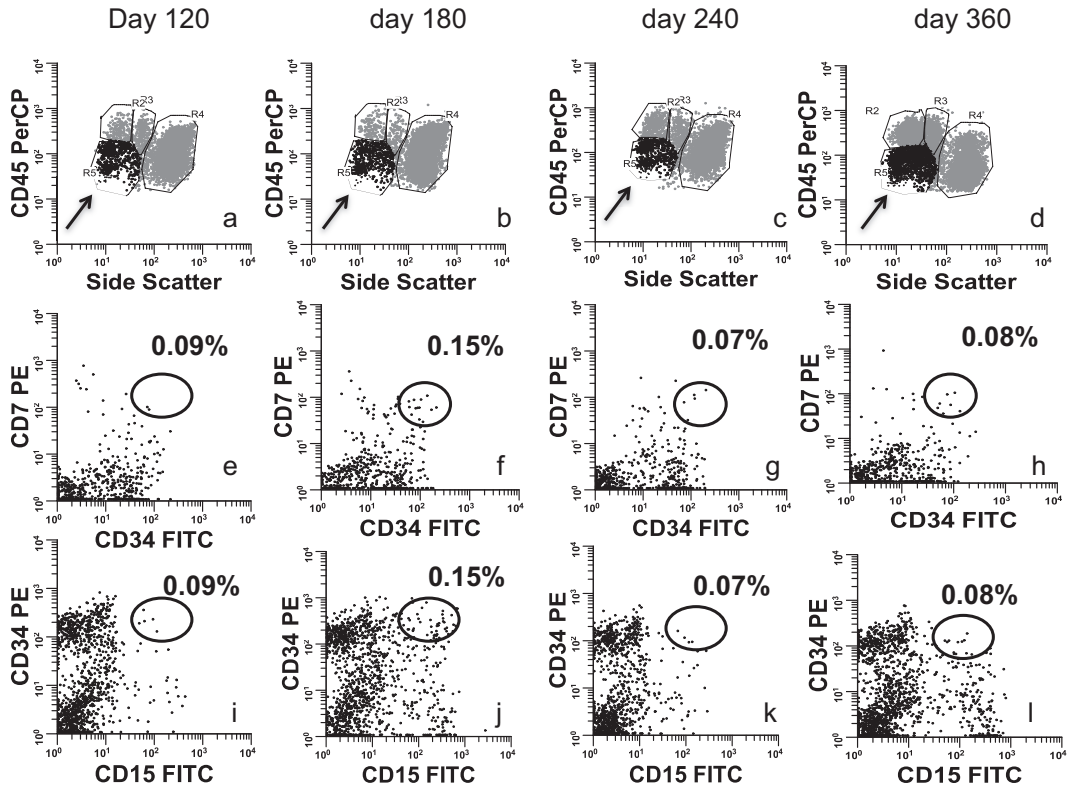


図4 4重染色 flow cytometry (2)

矢印は白血病細胞が存在する領域 (R5 の領域) を示す。移植後 120 日 (a, e, f), 移植後 180 日 (b, f, j), 移植後 240 日 (c, g, k), 移植後 360 日 (d, h, l)。円は, CD34+CD15+CD7+ 細胞を示す。

FCMで検査した報告は少ない。Neglerらは、BMT前とBMT 3-4 ヶ月のMRDを検討し、BMT前のMRD陰性患者のBMT後の再発率は25% (8人中2人が再発)であるが、BMT前のMRD陽性患者では46% (13人中6人が再発)と増加することを示した<sup>14)</sup>。Vendittiらは、自家造血幹細胞移植 (EORTC/GIMEMA AML-10) を行った31人のAML患者のMRDを検討し、移植前にAML細胞が $3.5 \times 10^{-4}$ %以上存在する場合には、移植後中央値7ヶ月で全例再発したこと、移植後にMRDが増加した5人中の3人が再発したことを報告した<sup>15)</sup>。Laaneらは、31人の第1寛解期のAML患者の造血幹細胞移植前のMRDを検査し、MRD陽性の場合の移植5年後の無再発生存率は、自家造血幹細胞移植では53%、同種造血幹細胞移植では80%、移植を受けなかった患者では0%であることを報告した<sup>16)</sup>。

最近、Díez-Campeloらは、41人のAML (MDSを含む)の同種造血幹細胞移植のMRDを検討し、移植後100日のMRDを $10^{-3}$ %以上と $10^{-3}$ %未満に分けた場合、4年の無イベント生存率は、前者が25%、後者が15% ( $p=0.002$ )であること、多変量解析でも移植後100日のMRDは、無イベント生存率の独立予後因子であることを報告した<sup>17)</sup>。

FCMを用いて白血病のMRD検出を行う上で注意すべき点に、抗原発現の変化がある。AMLでは、再発時にCD13, CD33, CD34, CD117の発現が増強する、CD7, CD14, CD19の発現が低下するとの報告がある<sup>18, 19)</sup>。FCMを用いてMRDの検出を行う場合、化学療法による抗原発現の修飾や白血病細胞のクローン変化によって抗原発現が変化する可能性があり、MRDの判定時に注意を要する。

今回、我々はCD34陽性細胞におけるCD7とCD15の発現を指標にして、BMT後のMRDを検査し、MRDが継続的に陽性を示した後、血液学的な再発を来した例を経験した。本例では、残念ながらMRD陽性が最後に確認された移植後360日から血液学的再発を認めた移植後700日までの間のMRD検査が行われていないので、その間のMRDのレベルの変化は不明である。骨髓移植後、FCMで検出されたMRDのレベルが増加する場合は、再発に到るとの報告がある<sup>20, 21)</sup>。骨髓移植後、MRDが陽性化した場合には、頻回に骨髓検査を行いMRDのレベルの変化を調べる必要がある。末梢血の検体でもAMLのMRDをFCMで測定できるとの報告があり<sup>22)</sup>、骨髓検体でMRDが陽性となった場合には、末梢血の検体でMRDのレベルを頻回に検査することも有用と思われる。MRDのレベルが増加した場合には、免疫抑制剤の減量・中止やドナーリンパ球輸注療法を行い、GVLを誘導しMRDを陰性化させることが必要である。bcr/ablキメラ遺伝子やPML/RARAキメラ遺伝子が存在する場合には、GVL誘導とともに、または単独でそれらのキメラ遺伝子に対する分子標的治療が必要である<sup>23)</sup>。また、これらの治療によってもMRDが陰性化しない場合には、2回目の造血幹細胞移植を考慮する必要がある。

#### IV 結語

FCMを用いたAMLのMRD検査は、BMT後の早期再発を予測する可能性がある。今後、さらに症例を重ね、BMT後のFCMを用いたMRD検査の有用性を検証する必要がある。

#### V 参考文献

- 1) Chung NG, Buxhofer-Ausch V and Radich JP: The detection and significance of minimal residual disease in acute and chronic leukemia. *Tissue Antigens* 68: 371-385, 2006.
- 2) Cilloni D, Renneville A, Hermitte F et al.: Real-time quantitative polymerase chain reaction detection of minimal residual disease by standardized WT1 assay to enhance risk stratification in acute myeloid leukemia: a European LeukemiaNet study. *J Clin Oncol* 27: 5195-5201, 2009.
- 3) Bacher U, Badbaran A, Fehse B et al.: Quantitative monitoring of NPM1 mutations provides a valid minimal residual disease parameter following allogeneic stem cell transplantation. *Exp Hematol* 37: 135-142, 2009.
- 4) Candoni A, Tiribelli M, Toffoletti E et al.: Quantitative assessment of WT1 gene expression after allogeneic stem cell transplantation is a useful tool for monitoring minimal residual disease in acute myeloid leukemia. *Eur J Haematol* 82: 61-68, 2009.
- 5) Oka S, Muroi K, Matsuyama T et al.: Correlation between flow cytometric identification of CD33-positive cells and morphological evaluation of myeloblasts in bone marrow of patients with acute myeloblastic leukemia. *Hematology* 14: 133-138, 2009.
- 6) 室井一男. Flow cytometryを用いた微小残存病変の検出. *臨床血液* 49:397-407, 2008.
- 7) Reichle A, Rothe G, Krause S et al.: Transplant characteristics: minimal residual disease and impaired megakaryocytic colony growth as sensitive parameters for predicting relapse in acute myeloid leukemia. *Leukemia* 13: 1227-1234, 1999.
- 8) Sievers EL, Lange BJ, Alonzo TA et al.: Immunophenotypic evidence of leukemia after induction therapy predicts relapse: results from a prospective Children's Cancer Group study of 252 patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 101: 3398-3406, 2003.
- 9) MRD-AML-BFM Study Group, Langebrake C, Creutzig U et al.: Residual disease monitoring in childhood acute myeloid leukemia by multiparameter flow cytometry: the MRD-AML-BFM Study Group. *J Clin Oncol* 24: 3686-3692, 2006.
- 10) San Miguel JF, Vidrales MB, López-Berges C et al.: Early immunophenotypical evaluation of minimal residual disease in acute myeloid

- leukemia identifies different patient risk groups and may contribute to postinduction treatment stratification. *Blood* 98: 1746-1751, 2001.
- 11) 室井一男：急性骨髄性白血病。フローサイトメトリーを用いた造血器腫瘍の診断 (室井一男, 小澤敬也 編) 医薬ジャーナル社, 2006, pp. 45-74.
  - 12) Macedo A, Orfao A, Ciudad J, et al.: Phenotypic analysis of CD34 subpopulations in normal human bone marrow and its application for the detection of minimal residual disease. *Leukemia* 9: 1896-1901, 1995.
  - 13) Kosugi N, Ebihara Y, Nakahata T, et al.: CD34+CD7+ leukemic progenitor cells may be involved in maintenance and clonal evolution of chronic myeloid leukemia. *Clin Cancer Res* 11 (2 Pt 1): 505-511, 2005.
  - 14) Nagler A, Condiotti R, Rabinowitz R et al.: Detection of minimal residual disease (MRD) after bone marrow transplantation (BMT) by multi-parameter flow cytometry (MPFC). *Med Oncol* 16: 177-187, 1999.
  - 15) Venditti A, Maurillo L, Buccisano F et al.: Pretransplant minimal residual disease level predicts clinical outcome in patients with acute myeloid leukemia receiving high-dose chemotherapy and autologous stem cell transplantation. *Leukemia* 17: 2178-2182, 2003.
  - 16) Laane E, Derolf AR, Björklund E et al.: The effect of allogeneic stem cell transplantation on outcome in younger acute myeloid leukemia patients with minimal residual disease detected by flow cytometry at the end of post-remission chemotherapy. *Haematologica* 91: 833-836, 2006.
  - 17) Díez-Campelo M, Pérez-Simón JA, Pérez J et al.: Minimal residual disease monitoring after allogeneic transplantation may help to individualize post-transplant therapeutic strategies in acute myeloid malignancies. *Am J Hematol* 84: 149-152, 2009.
  - 18) Baer MR, Stewart CC, Dodge PK et al.: High frequency of immunophenotype changes in acute myeloid leukemia at relapse: implications for residual disease detection (Cancer and Leukemia Group B Study 8361). *Blood* 97: 3574-3580, 2001.
  - 19) Langebrake C, Brinkmann I, Teigler-Schlegel A, et al.: Immunophenotypic differences between diagnosis and relapse on childhood AML: Implications for MRD monitoring. *Cytometry B Clin Cytom* 63: 1-9, 2005.
  - 20) Sánchez J, Serrano J, Gómez P et al.: Clinical value of immunological monitoring of minimal residual disease in acute lymphoblastic leukaemia after allogeneic transplantation. *Br J Haematol* 116: 686-694, 2002.
  - 21) Björklund E, Mazur J, Söderhäll S et al.: Flow cytometric follow-up of minimal residual disease in bone marrow gives prognostic information in children with acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia* 17: 138-148, 2003.
  - 22) Maurillo L, Buccisano F, Spagnoli A et al.: Monitoring of minimal residual disease in adult acute myeloid leukemia using peripheral blood as an alternative source to bone marrow. *Haematologica* 92: 605-611, 2007.
  - 23) Ikeda A, Shankar DB, Watanabe M, et al.: Molecular targets and the treatment of myeloid leukemia. *Mol Genet Metab* 88: 216-224, 2006.

## Flow cytometry to detect minimal residual disease after bone marrow transplantation in a patient with acute myeloblastic leukemia

Satoko Oka<sup>1, 2)</sup>, Kazuo Muroi<sup>1, 2)</sup>, Masaki Mori<sup>1, 2)</sup>, Tomohiro Matsuyama<sup>1, 2)</sup>,  
Iekuni Oh<sup>1)</sup>, Shin-ichiro Fujiwara<sup>1)</sup>, Kazuya Sato<sup>1)</sup>, Masuzu Ueda<sup>1)</sup>,  
Takahiro Suzuki<sup>1)</sup>, Katsutoshi Ozaki<sup>1)</sup>, Tadashi Nagai<sup>1)</sup>, Keiya Ozawa<sup>1, 2)</sup>

### Abstract

Detection of minimal residual disease (MRD) in acute myeloblastic leukemia (AML) after bone marrow transplantation is important to predict relapse. It is well known that AML cells show various abnormal antigen expressions. MRD was detected in an AML patient after BMT by flow cytometry measurements of CD34+CD15+CD7+ cells. Subsequently, the patient's AML relapsed.

---

1) Division of Hematology, Department of Medicine, Jichi Medical University Hospital

2) Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical University Hospital