

症例報告

末梢血の EB ウィルス感染細胞同定解析に基づき早期に 治療開始できた心臓移植後リンパ増殖性疾患の 1 例

石橋 誠二郎¹⁾, 中野 克俊¹⁾, 浦田 晋¹⁾, 中川 良¹⁾, 朝海 廣子¹⁾, 平田 陽一郎¹⁾,
樋渡 光輝¹⁾, 今留 謙一²⁾, 池村 雅子³⁾, 犬塚 亮¹⁾

¹⁾東京大学医学部附属病院小児科

²⁾国立研究開発法人国立成育医療研究センター 高度感染症診断部

³⁾東京大学医学部附属病院病理部

Identification of Peripheral Blood Cells Infected with Epstein–Barr Virus: A Practical Method for Choosing the Initial Treatment for Post-Transplantation Lymphoproliferative Disease

Seijiro Ishibashi¹⁾, Katsutoshi Nakano¹⁾, Susumu Urata¹⁾, Ryo Nakagawa¹⁾, Hiroko Asakai¹⁾,
Yoichiro Hirata¹⁾, Mitsuteru Hiwatari¹⁾, Kenichi Imadome²⁾,
Masako Ikemura³⁾, and Ryo Inuzuka¹⁾

¹⁾Department of Pediatrics, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

²⁾Division of Advanced Medicine for Virus Infections, National Center for Child Health and Development, Tokyo, Japan

³⁾Department of Pathology, The University of Tokyo Hospital, Tokyo, Japan

Using rituximab for treating post-transplantation lymphoproliferative disease (PTLD) is generally decided according to the clinical presentation and pathology. We report a PTLD case treated with rituximab on the basis of the detected peripheral blood cells infected with Epstein–Barr virus. A 2-year-old boy diagnosed with PTLD 3 months after heart transplantation manifested fever, respiratory symptoms, and diarrhea. Identification of peripheral blood cells infected with the virus showed that such cells were of B cell origin, indicating that the patient may benefit from rituximab treatment. This result enabled us to use rituximab before the biopsy results came out. Therefore, identification of peripheral blood cells infected with Epstein–Barr virus may help quickly decide whether to use rituximab in patients with PTLD whose biopsy results may be delayed.

Keywords: post-transplantation lymphoproliferative disease, heart transplant, Epstein–Barr virus, flowcytometry

移植後リンパ増殖性疾患（post transplantation lymphoproliferative disease: PTLD）の治療において、リツキシマブの適応は一般的に臨床像および生検結果に基づいて決定する。今回、末梢血の Epstein–Barr (EB) ウィルス感染細胞同定解析に基づき、生検結果が判明するよりも早くリツキシマブの適応があるかを調べられた PTLD の症例を経験した。本症例は 2 歳男児で、心臓移植の 3 か月後に発熱・気道症状・下痢症状で PTLD を発症し入院した。入院中に行った末梢血の EB ウィルス感染細胞同定解析により、感染細胞が B 細胞由来で、リツキシマブの適応があることがわかった。これに基づき、生検結果が判明するより先にリツキシマブを投与開始できた。末梢血の EB ウィルス感染細胞同定解析は、生検結果が判明するまで待てない PTLD 症例において、リツキシマブの適応があるかを早期に把握する有効な手立てとなる可能性がある。

2020 年 9 月 23 日受付, 2020 年 12 月 21 日受理

著者連絡先：〒963-8558 福島県郡山市西ノ内 2-5-20 太田西ノ内病院 石橋誠二郎

doi: 10.9794/jspccs.37.133

はじめに

移植後リンパ増殖性疾患（PTLD）とは、 固形臓器や造血幹細胞移植後の患者で起こる多様なリンパ増殖性疾患の総称で、 伝染性单核球症様の良性疾患から、 悪性リンパ腫まで多様な病理像を包括する¹⁾。 PTLD の症状は、 発熱、 体重減少、 リンパ節腫脹、 倦怠感などの非特異的な全身症状に代表され、 消化器症状、 皮膚症状、 神経症状などが見られることがある。 発症には Epstein-Barr (EB) ウィルスによる感染細胞の腫瘍化、 そして増殖した異常細胞をアポトーシスに導く免疫機構を移植後投与される免疫抑制剤が抑制する機序が関わっていることが多い。 このため、 固形臓器移植後の患者では移植後の血中 EB ウィルス-DNA のモニタリングが推奨されている²⁾。 増殖細胞は B 細胞由来であることが多いが、 T 細胞や NK 細胞由来の PTLD も知られている³⁾。

PTLD の治療は、 臨床像および病理像によって免疫抑制薬の調整・リツキシマブ投与・化学療法などの単独療法あるいは併用療法から選択される。 リツキシマブは抗 CD20 モノクローナル抗体で、 B 細胞由来の PTLD に有効とされている。 固形臓器移植患者の PTLD に対して、 リツキシマブを免疫抑制薬の減量後、 あるいは同時に投与した時に、 その奏効率は 44~79% とされている⁴⁻⁷⁾。 2019 年にアメリカ移植学会が発表した固形臓器移植患者の PTLD に関するガイドラインにおいても、 免疫抑制薬を減量した後も進行する CD20 抗原陽性の PTLD に対する使用が推奨されている²⁾。 ただし、 リツキシマブは CD20 抗原陽性の PTLD 以外では無効であり、 PTLD の免疫表現型については、 組織の切除生検（困難であれば針生検）を行い、 免疫染色やフローサイトメトリーを用いて調べることが推奨されている^{2,8)}。

今回我々は、 小児心臓移植後の PTLD において、 末梢血のフローサイトメトリーおよび EB ウィルス感染細胞同定解析を用いて増殖細胞が B 細胞由来であることを証明し、 生検結果が判明するより前にリツキシマブを投与開始できた症例を経験した。

なお、 本論文については東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を得ている。

症 例

患者：2 歳 2 か月男児

主訴：発熱・鼻汁・咳嗽・下痢

現病歴：1 歳 10 か月時、 拡張型心筋症に対して心臓

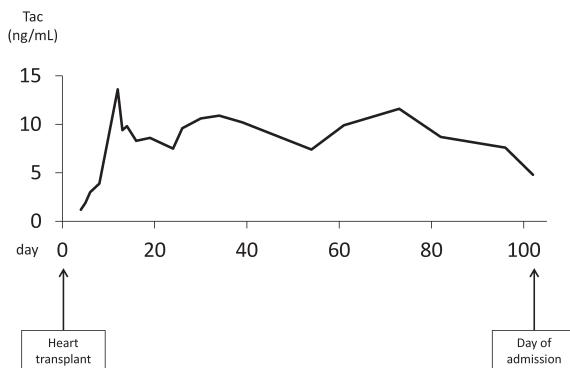


Fig. 1 Tacrolimus trough levels after heart transplantation

The target trough level was 10–12 ng/mL until 3 months after transplantation, and 8–10 ng/mL from 3 to 6 months after transplantation. Tac, tacrolimus.

移植を施行された。 2 歳 2 か月時、 発熱・気道症状・下痢が出現したため当院受診した。 血液検査で好中球数減少があり、 発熱に対する精査加療目的で当院入院となった。

既往歴：拡張型心筋症。 その他特記すべき既往なし
心臓移植施行時の Serostatus : EB ウィルス： Donor (+), Recipient (-), CMV: Donor (-), Recipient (+)

内服薬：バルガンシクロビル (VGCV), ST 合剤, タクロリムス (Tac : 目標血中濃度 10~12 ng/mL であり、 移植後から当科入院までの血中濃度の推移は Fig. 1 参照), ミコフェノール酸モフェチル (MMF), エナラブリル, ジルチアゼム, フロセミド, アスピリン、 その他 (鉄剤、 酸化マグネシウム製剤、 整腸剤、 去痰薬)

入院時現症：身長 81.3 cm, 体重 11.34 kg

体温 37.7°C, 血圧 108/48 mmHg, 脈拍 110 bpm, 酸素飽和度 97% (室内気)

頭部：咽頭発赤なし

頸部：リンパ節腫脹なし

胸部：呼気性喘鳴聴取

腹部：平坦 軟 腸蠕動音正常

四肢：浮腫なし 末梢冷感なし

入院時血液検査所見：好中球減少・貧血のほか、 CRP の上昇を認めた (Table 1 入院後の血液検査)。

胸部 X 線画像：移植後と比して心拡大の増悪、 肺野の透過性低下を認めない。

心電図：電位変化、 不整脈の出現を認めない。

心臓超音波検査：心室壁増加率・心収縮・拡張能の低

Table 1 Blood test results. This shows atypical lymphocytes and elevation of transaminase have appeared during the clinical course

	<Day 1 of hospitalization>		<Day 22 of hospitalization>
【Complete blood cell counts】			
WBC	2800/ μ L	WBC	5700/ μ L
Neu	616/ μ L	Neu	2394/ μ L
Lym	2072/ μ L	Lym	2451/ μ L
Aty. Lym	0/ μ L	Aty. Lym	399/ μ L
Hgb	7.3 g/dL	Hgb	7.6 g/dL
Plt	$43.5 \times 10^4/\mu$ L	Plt	$33.9 \times 10^4/\mu$ L
【Blood chemistry】			
TP	5.1 g/dL	TP	6.4 g/dL
Alb	3.3 g/dL	Alb	3.5 g/dL
LDH	241 U/L	LDH	383 U/L
AST	26 U/L	AST	129 U/L
ALT	22 U/L	ALT	140 U/L
BUN	20 mg/dL	BUN	20.7 mg/dL
Cre	0.38 mg/dL	Cre	0.54 mg/dL
CRP	2.23 mg/dL	CRP	1.07 mg/dL
β -D	9 pg/dL	β -D	6 pg/dL
PCT	0.16 ng/mL	PCT	0.14 ng/mL
EBV-VCA IgG	Not detected		
EBV-VCA IgM	Not detected		

Alb, albumin; ALT, alanine transaminase; AST, aspartate transaminase; Aty. Lym, atypical lymphocytes; BUN, blood urea nitrogen; Cre, creatinine; CRP, C-reactive protein; Hgb, hemoglobin; LDH, lactate dehydrogenase; Lym, lymphocytes; Neu, neutrophils; PCT, procalcitonin; Plt, platelet; TP, total protein; WBC, white blood cells; β -D, β -D glucan.

下を認めない。弁逆流の増悪、心嚢水の出現も見られない。

入院後経過 (Fig. 2)：入院時の画像検査、生理検査からは拒絶反応は強く疑わず、上気道症状および下痢症状からは急性上気道炎が疑われた。一方、貧血および好中球減少があり、炎症による骨髄抑制のほか、薬剤による発熱・好中球減少の可能性も考慮し、MMFを漸減しVGCVを中止した。易感染性のため、ピペラシリン/タゾバクタム (PIPC/TAZ) を投与開始した。

入院3日目以降、体温は37.1~37.7°Cで推移し、気道症状・下痢症状は改善傾向だった。CRPも低下傾向だったため、入院5日目にPIPC/TAZを中止した。貧血、好中球減少についても、入院6日目にHb 6.2 mg/dL、好中球数 168/ μ Lまで低下したが、入院10日目にはHb 6.4 mg/dL、好中球数 840/ μ Lと改善傾向だった。同日よりMMF減量に伴い、エベロリムスを内服開始した。しかし、その後も解熱は維持できず、気道症状・下痢症状は再増悪し、入院10日目にはCRPの再上昇を認めた。入院22日目に行った血液検査では、それまで見られていなかった異型

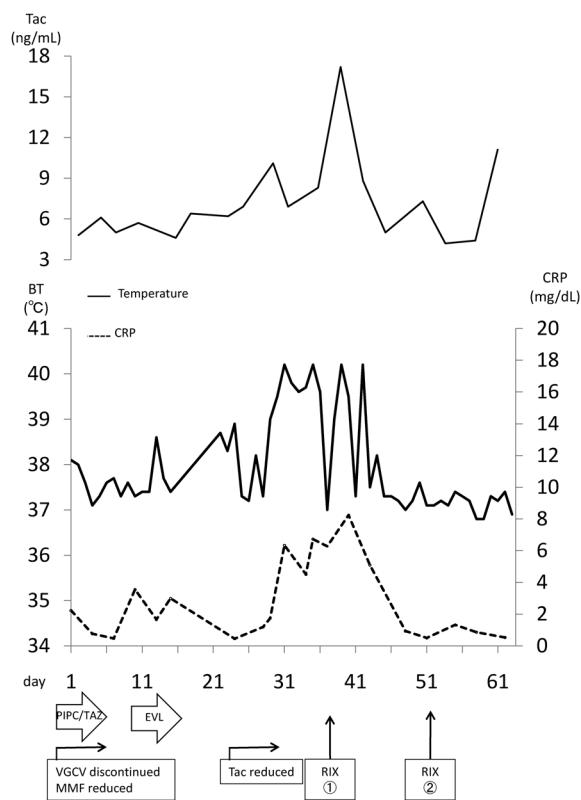


Fig. 2 Tacrolimus trough levels, body temperature and CRP during hospitalization
EVL, everolimus; PIPC/TAZ, piperacillin/tazobactam; RIX, rituximab; Tac, tacrolimus trough levels.

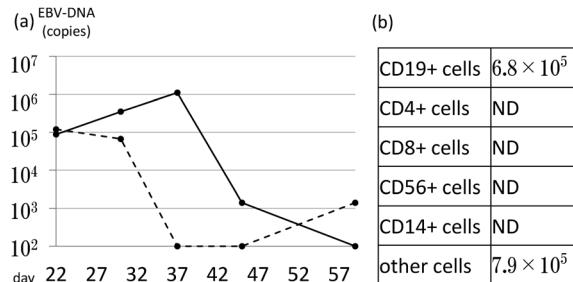


Fig. 3 Copies of EBV-DNA in patient's peripheral blood

(a) Solid line shows the amount of EBV-DNA in blood cells (copies/ μ g). Broken line shows the amount of EBV-DNA in blood plasma (copies/mL). No EBV-DNA was detected in blood cells on day 59, in blood plasma on day 37 and 45. (b) Amount of EBV-DNA in each fractions of peripheral blood cells on day 30 (copies/ μ g).

リンパ球の出現、および肝逸脱酵素の上昇を認め (Table 1)，追加で行った血中EBウイルス-DNA定量ではDNA量の増加を認めたため、EBウイルス感染症と診断した (Fig. 3(a))。末梢血のフローサイト

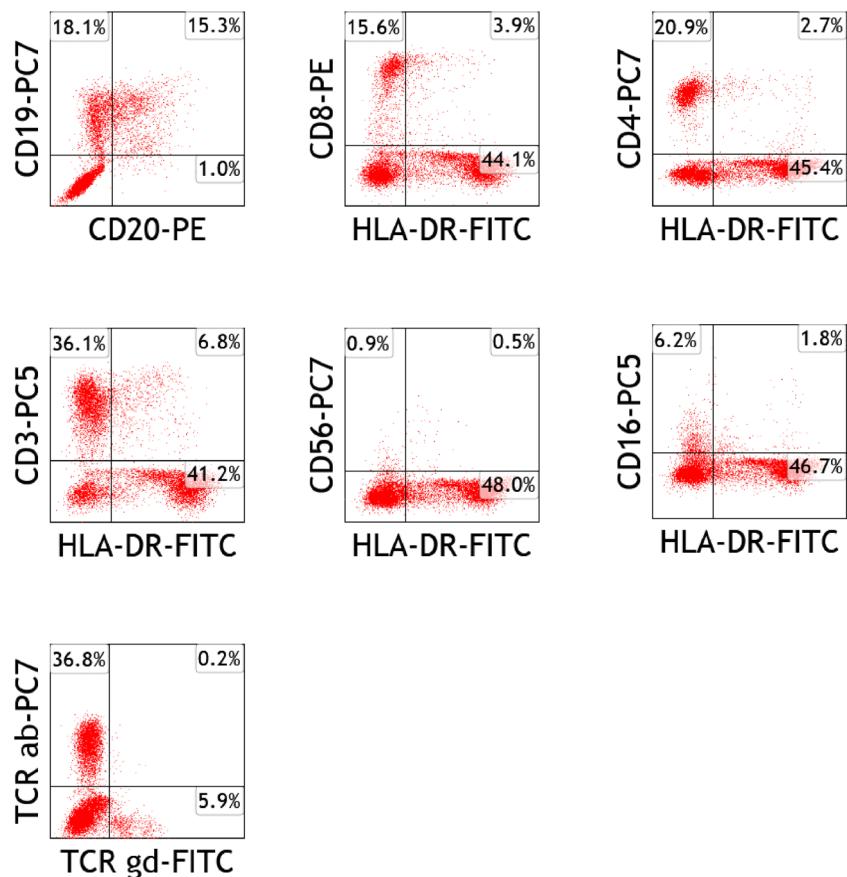


Fig. 4 Flowcytometry of patient's peripheral blood mononuclear cells on day 22 of admission shows increase in CD19+ cells, but not in CD3+ cells, CD 56+ cells, nor CD16+ cells

メトリーでは、CD19陽性細胞の増加を認めた一方、CD3陽性細胞、CD56陽性細胞、CD8陽性細胞は増えていなかった。このことから感染細胞はB細胞が疑われ、また細胞障害性T細胞が誘導されていないと考えられた(Fig. 4)。同時期に頸部リンパ節腫脹を指摘され、PTLDが疑われたためTacを減量した。入院29日目以降は39°C以上の発熱が持続し、入院30日目に末梢血の感染細胞同定解析を施行したところ、Fig. 3(b)の結果が得られた。その他の分画については、 $\gamma\delta$ -T細胞とCD56-CD16+NK細胞が考えられたが、FCMではこれらの増加ではなく、感染細胞の主体がCD19陽性細胞であることが判明した。入院31日に撮像した全身のFDG-PETにて右頸部リンパ節への異常集積を認め(Fig. 5(a))、入院35日に同部位のリンパ節生検を施行した。入院37日目、発熱・気道症状・下痢症状に加え、経口摂取不良・傾眠傾向も進行し全身状態の悪化を認めたため、リツキシマブを投与開始した。同日より解熱する日が出現し、各症状の改善を認めた。入院43日目、生検病理では、核小体が明瞭で、やや歪んだ核を有する中～大型の異型リ

ンパ球の増殖あり、CD20が陽性だった。また、免疫染色ではEBER-ISH、LMP-1、EBNA2が陽性であり、以上から単形性PTLD、特にびまん性大細胞型B細胞性リンパ腫と確定診断した(Fig. 6)。入院45日目以降は解熱が維持されるようになり、入院51日目に2回目のリツキシマブ投与を行い、入院61日目以降はリツキシマブおよび化学療法の併用療法(R-THPCOP療法)で加療継続する方針となった。

なお、発症後約4か月後に撮像したFDG-PETでは、初回に見られた右頸部リンパ節への集積は消失していた(Fig. 5(b))。

考 察

感染細胞同定解析の手法は、主に二つあり、一つは、末梢血中の单核球の免疫染色、およびEBウイルス-encoded small RNA(EBER)と結合するペプチド核酸プローブを用いたin situ hybridizationを行い、フローサイトメトリーでそれぞれの細胞分画におけるEBERの発現頻度を見る方法である⁹⁾。もう一つは、

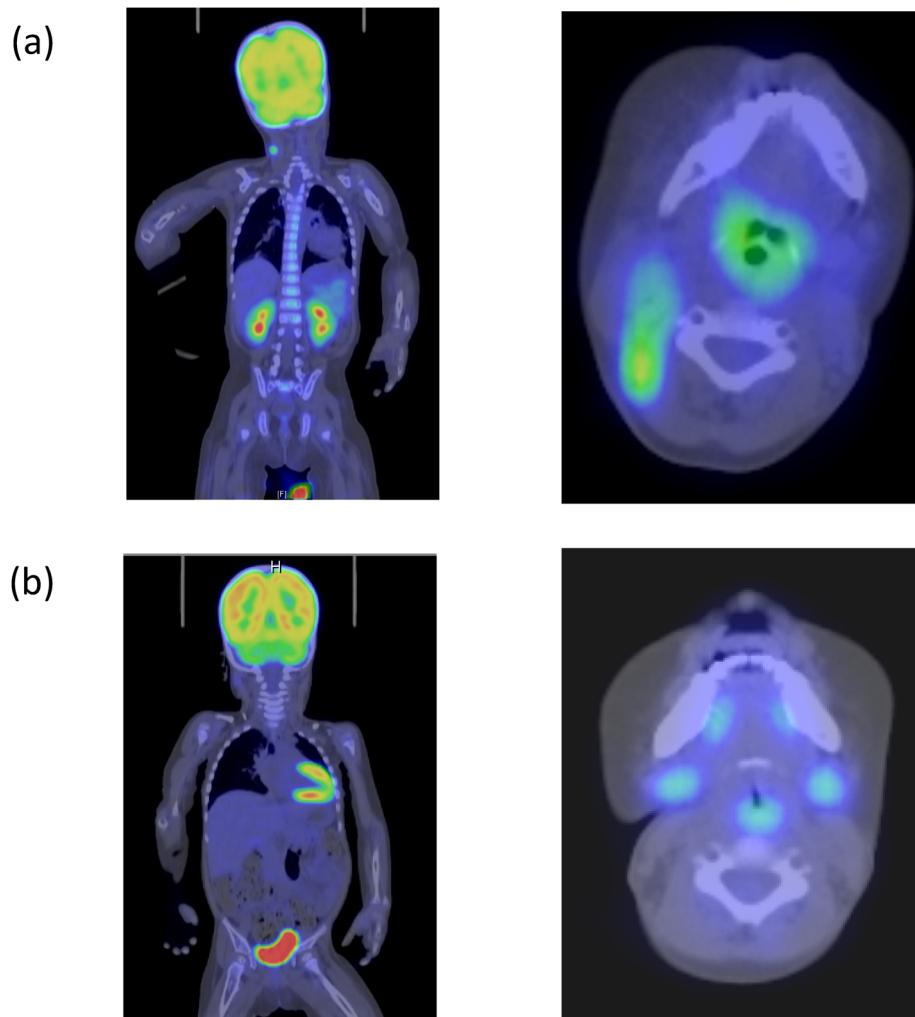


Fig. 5 Fluorodeoxyglucose-positron emission tomography (FDG-PET)

(a) Taken on day 31 of hospitalization. FDG accumulation are seen in the right cervical nodes. (b) Taken on day 121 of hospitalization. FDG accumulation seen in the right cervical nodes earlier had disappeared.

末梢血の単核球を磁気細胞分離装置を用いて表面抗原ごとに分けて、それぞれの分画からDNAを抽出してリアルタイムPCRを行う方法である¹⁰⁾。今回は後者の手法が行われた。

小児心臓移植後のPTLDにおいて、末梢血の感染細胞同定解析により感染細胞がB細胞由来であることを調べられ、これによりリツキシマブの適応があることがわかった。リツキシマブは固体臓器移植後のPTLDに対して奏効率が高く、リツキシマブを早期から使用した方がセカンドラインで導入するより予後が良い可能性も指摘されている¹¹⁾。その一方、リツキシマブの有害事象として、アレルギー反応や好中球減少のほか、心臓・肺・腎臓・皮膚などの臓器障害が知られており、安易なリツキシマブの投与は望ましくない¹²⁾。これらのことからPTLDの初期治療におい

て、リツキシマブ投与の適応があるかを早めに把握することは臨床的に重要であると言える。

また、感染細胞同定解析は、早急な生検の実施が困難なPTLD症例に対しても有用である。PTLDは病理結果によって確定診断するが、本症例のように生検結果がわかる前に治療介入が必要なケースもある。具体的には、発熱と血圧低下を特徴とする劇症型のPTLDのときや致死的な合併症で生検が安全に行えないときなどである¹³⁾。本症例は劇症型PTLDではないものの、傾眠傾向を呈しており、生検結果がわかる前の早急の治療介入が必要と判断した。これらのように生検結果が判明することに先んじて治療介入が必要なPTLD症例において、末梢血の感染細胞同定解析はリツキシマブの適応があるかを検討する良い判断材料になると考えられる。

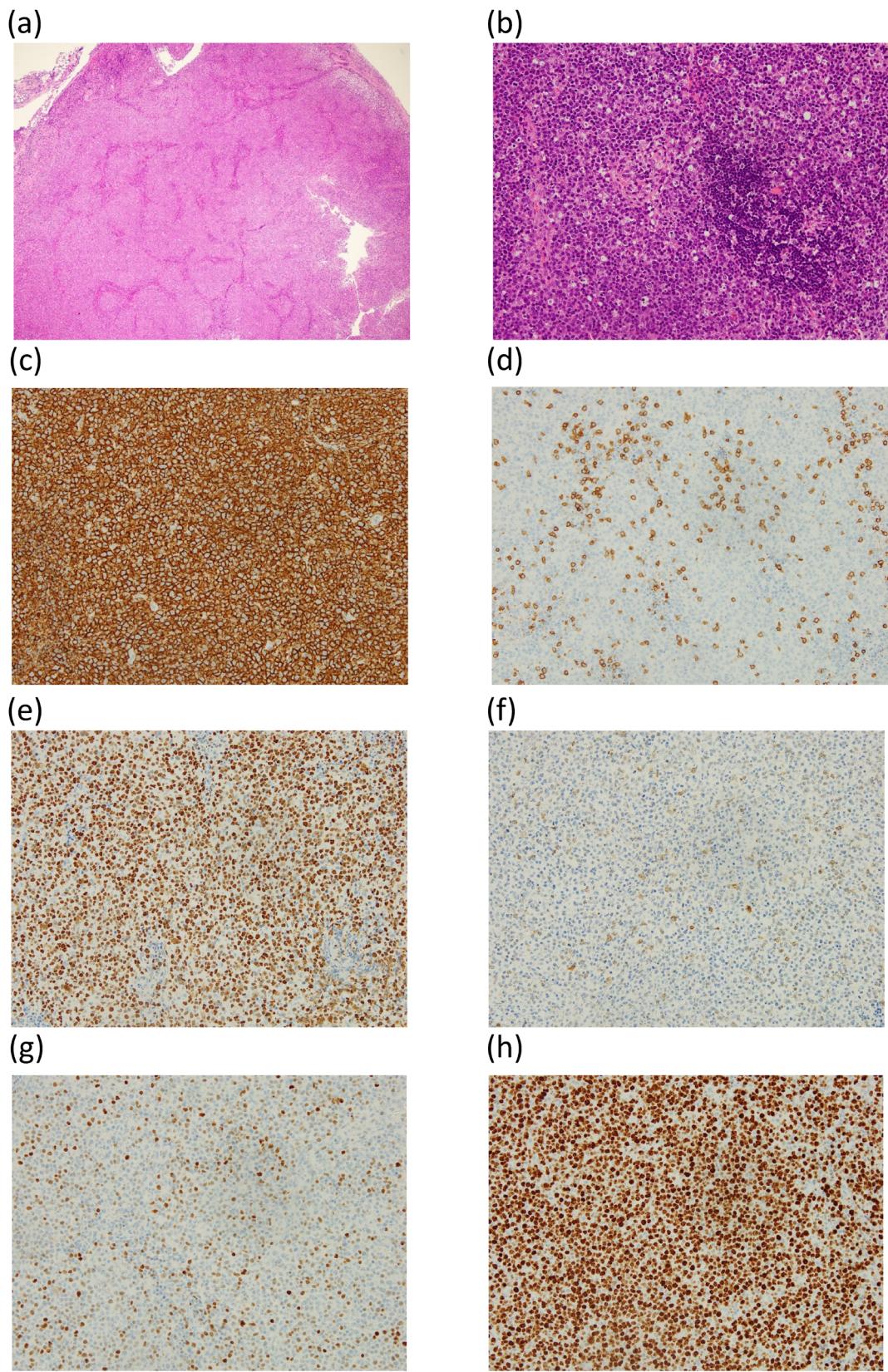


Fig. 6 Microscopic images of the patient's lymph node tissue

(a, b) H & E staining shows diffuse proliferation of mid-to-large-sized atypical cells with enlarged nucleus and prominent nucleoli. (c) CD20 positive. (d) CD3 negative. (e) MIB-1 positive. (f) EBER-ISH positive. (g) LMP-1 weakly positive. (h) EBNA positive.

ただ、臨床応用についての課題がいくつかある。一つは、末梢血の感染細胞同定解析で確認される増殖細胞と、生検組織の増殖細胞との間に乖離がないかという疑問はある。2019年に行われた先行研究では、末梢血中にEBウイルスが高値で検出された様々な血液疾患の患者291人について末梢血の感染細胞同定解析を行い、それぞれの患者で診断された疾患との関連を調べている¹⁴⁾。この関連を調べた包括的な研究はこれが初であり、この研究に含まれるPTLD患者3人では感染細胞と病態は一致していた。さらに、同研究のリンパ腫の患者でも末梢血の感染細胞とリンパ腫の細胞の系統は概ね一致していたが、例外的に血管免疫芽球性T細胞リンパ腫の患者6人では感染細胞は主にB細胞であり、系統が一致していなかった。本症例では、末梢血の感染細胞と生検組織の増殖細胞とは一致しており、後方視的にはリツキシマブ投与の適応はあった。あらゆるPTLDで増殖する細胞と、末梢血の感染細胞が一致するかは未解明であり、前述の研究をPTLDに限定して、大人数の規模で行う必要があるだろう。

もう一つには、感染細胞同定解析だけではリツキシマブの適応の有無がわかったとしても、PTLDの悪性度まではわからず、化学療法の必要性の有無やレジメン、予後予測、腫瘍崩壊症候群などの合併症のリスクについては評価できない。感染細胞同定解析は組織生検に比べ得られる情報が少なく、組織生検の補助検査という位置づけであり、正確な診断および管理のためには組織生検は必須である。

移植後患者に対しては、定期的にEBウイルス-DNA定量を行い、コピー数の増加が見られた場合は可能な限り早期に感染細胞同定解析および組織生検を行い、それらに基づき治療を決定すべきである。ただし生検結果が待てず、早期介入が必要な重症例では、感染細胞同定解析がリツキシマブの適応の有無を判断するうえで有用であると考えられる。末梢血の感染細胞と組織の増殖細胞との関連についての更なる研究が望まれる。

結語

本症例を通して、小児心臓移植後のPTLD患者に対する末梢血の感染細胞同定解析はリツキシマブの適応を判断するうえで有用な可能性が示唆された。今後、PTLD患者における末梢血の感染細胞と組織の増殖細胞に乖離がないかについての研究が望まれる。

利益相反

本論文について、開示すべき利益相反(COI)はない。

著者の役割

石橋誠二郎：論文の構想、データ収集、分析に関与し、論文を執筆

中野克俊、浦田晋、犬塚亮：論文の構想、データ収集、分析に関与し、論文執筆を直接指導

今留謙一：感染細胞同定解析の実施、批判的推敲に関与

池村雅子：病理診断、データ収集、批判的推敲に関与

中川良、朝海廣子、平田陽一郎、樋渡光輝：診療に関連したデータ収集、分析、批判的推敲に関与

引用文献

- 1) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, et al: WHO Classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues 4th edition. France, International Agency for Research on Cancer, 2017
- 2) Allen UD, Preiksaitis JK; AST Infectious Diseases Community of Practice: Post-transplant lymphoproliferative disorders, Epstein-Barr virus infection, and disease in solid organ transplantation: Guidelines from the American society of transplantation infectious diseases community of practice. Clin Transplant 2019; **33**: 1-22
- 3) Maecker B, Jack T, Zimmermann M, et al: CNS or Bone marrow involvement as risk factors for poor survival in post-transplantation lymphoproliferative disorders in children after solid organ transplantation. J Clin Oncol 2007; **25**: 4902-4908
- 4) Blaes AH, Peterson BA, Bartlett N, et al: Rituximab therapy is effective for posttransplant lymphoproliferative disorders after solid organ transplantation: Results of a phase II trial. Cancer 2005; **104**: 1661-1667
- 5) González-Barca E, Domingo-Domenech E, Capote FJ, et al: GEL/TAMO (Grupo Español de Linfomas); GELCAB (Grupo para el Estudio de los Linfomas Catalano-Balear); GOTEL (Grupo Oncológico para el Tratamiento y Estudio de los Linfomas): Prospective phase II trial of extended treatment with rituximab in patients with B-cell post-transplant lymphoproliferative disease. Haematologica 2007; **92**: 1489-1494
- 6) Oertel SH, Verschuuren E, Reinke P, et al: Effect of anti-CD 20 antibody rituximab in patients with post-transplant lymphoproliferative disorder (PTLD). Am J Transplant 2005; **5**: 2901-2906
- 7) Choquet S, Leblond V, Herbrecht R, et al: Efficacy and safety of rituximab in B-cell post-transplantation lymphoproliferative disorders: Results of a prospective multicenter phase 2 study. Blood 2006; **107**: 3053-3057
- 8) Parker A, Bowles K, Bradley JA, et al: Haemato-oncology Task Force of the British Committee for Standards in Haematology and British Transplantation Society: Diagnosis of post-transplant lymphoproliferative disorder in solid organ transplant recipients: BCSH and BTS guidelines. Br J Haematol 2010; **149**: 675-692

- 9) Kimura H, Miyake K, Yamauchi Y, et al: Identification of Epstein–Barr virus (EBV): Infected lymphocyte subtypes by flow cytometric *in situ* hybridization in EBV-associated lymphoproliferative diseases. *J Infect Dis* 2009; **200**: 1078–1087
- 10) Koizumi Y, Imadome K, Ota Y, et al: Dual threat of Epstein–Barr virus: An autopsy case report of HIV-positive plasmablastic lymphoma complicating EBV-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *J Clin Immunol* 2018; **38**: 478–483
- 11) Evens AM, David KA, Helenowski I, et al: Multicenter analysis of 80 solid organ transplantation recipients with post-transplantation lymphoproliferative disease: Outcomes and prognostic factors in the modern era. *J Clin Oncol* 2010; **28**: 1038–1046
- 12) Kasi PM, Tawbi HA, Oddis CV, et al: Clinical review: Serious adverse events associated with the use of rituximab: A critical care perspective. *Crit Care* 2012; **16**: 1–10
- 13) Absalon MJ, Khouri RA, Phillips CL: Post-transplant lymphoproliferative disorder after solid-organ transplant in children. *Semin Pediatr Surg* 2017; **26**: 257–266
- 14) Zhang P, Zeng C, Cheng J, et al: Determination of Epstein–Barr virus-infected lymphocyte cell types in peripheral blood mononuclear cells as a valuable diagnostic tool in hematological diseases. *Open Forum Infect Dis* 2019; **6**: 1–9