●症例報告●

ネフローゼ症候群に対するリツキシマブ投与後の 遅発性好中球減少における骨髓所見と末梢血 CD20 細胞の検討

倉田 悟子¹・田中 征治¹・日吉 祐介¹・荒木潤一郎¹江崎 拓也¹・財津亜友子¹・小松 誠和²・久野 敏³

(受付日：2019 年 9 月 12 日 採用日：2020 年 1 月 8 日)

要 旨

リツキシマブ(RTX)の晩期合併症として遅発性好中球減少症(late-onset neutropenia: LON)が知られているが、ネフローゼ症候群においてその骨髓所見の報告はない。また、RTX 投与後の LON(R-LON)の発症機序も未知である。難治性ネフローゼ症候群に対し RTX 投与 3 か月後に LON を来した症例に骨髓検査を施行した。その骨髓所見と末梢血 CD20 細胞の推移より R-LON の発症機序について考察した。症例は 7 歳女兒。難治性ネフローゼに対し、RTX(1 回 375 mg/m²)を 4 回投与した。最終投与の 2 か月半後に発熱と Grade IV の無顆粒球症を認めた。骨髓検査では骨髓球系のみに分化停止所見がみられた。このときの末梢血 CD20 細胞は 0.05%であったが、1 か月後には 1.5%となり、2 か月後には 7%と正常化した。以上より B 細胞回復直前に LON が発症したといえる。RTX 投与後は B 細胞回復前の白血球数、白血球分画に注意を払う必要がある。

序 言

リツキシマブ(rituximab: RTX)は CD20 に対するキメラモノクローナル抗体であり、B 細胞性非ホジキンリンパ腫の治療薬として 1997 年に米国で承認されて以降、悪性新生物、自己免疫疾患、移植免疫などの分野で適応を広げてきた¹⁾。RTX-associated late-onset neutropenia(R-

LON)の報告はこれまで悪性リンパ腫、関節リウマチ、SLE、腎移植、ANCA 関連血管炎などにおいて多数なされてお²⁾⁻⁴⁾、ネフローゼ症候群においては R-LON の報告は 2009 年に平本らにより初めて報告された⁵⁾。2014 年には本邦において小児難治性ネフローゼ症候群に対する使用が承認され⁶⁾、使用頻度が増加したことに伴い R-LON の報告も散見されるようになった。他疾患において、骨髓所見はほぼ全例で骨髓球系の左方移動がみられ、半数以上が分化停止を示しているという報告があるが⁷⁾、ネフローゼ症候群における骨髓所見の報告はない。今回、難治性ネフローゼ症候群に対する RTX 投与 3 か月後に無顆粒球症を呈した症例に対し骨髓検査を施行した症例を経験したため、骨髓所見と末梢血中 CD20 細胞の推移を含めて報告する。

症 例

7 歳女兒。家族歴に特記事項なし。5 歳時にステロイド感受性ネフローゼ症候群を発症した。頻回の再発を認め、シクロスポリン(CYA)を併用したが再発を繰り返したため、小児難治性ネフローゼ症候群に対し、添付文書に従い X 年 8 月に RTX(375 mg/m²/回)を 1 週間間隔で 4 回投与した。以後寛解維持しており、PSL は漸減中止され CYA も漸減予定であった。4 週間毎に定期的に白血球数、白血球分画を測定していたが低下は認めなかった。RTX 最終投与から 2 か月半後(最終受診日より 3 週間後)に発熱した。発熱時には速やかに受診するように指導していたが、発熱 2 日目の日中に解熱していたため患者判断により、発熱 3 日目での受診となった。受診時の血液検査で、WBC 4200/μl(好中球 0%、リンパ球 45%、

¹久留米大学医学部小児科、²久留米大学医学部免疫学講座、³産業医科大学第二病理学教室

連絡著者：〒830-0011 久留米市旭町 67

久留米大学医学部小児科 田中征治

E-mail: tanaka_seiji@kurume-u.ac.jp

doi.org/10.3165/jjpn.cr.2019.0160

Key words: 遅発性好中球減少症 / リツキシマブ / ネフローゼ症候群 / 骨髓 / CD20

表 1 入院時検査結果

【血算】		【生化学】		【迅速検査】	
白血球	4200 / μ l	AST	32 U/L	インフルエンザ	陰性
桿状核球	0 %	ALT	24 U/L	アデノウイルス	陰性
分葉核球	0 %	LDH	190 U/L	溶連菌	陰性
好酸球	0.5 %	T.P	6.99 g/dl		
好塩基球	0.5 %	Alb	3.89 g/dl	【培養】	
リンパ球	45 %	BUN	10.4 mg/dl	静脈血	陰性
単球	54 %	Cre	0.27 mg/dl	咽頭	1. Staphylococcus.sp Coagulase(-) 2. Corynebacterium sp.
芽球	(+)	Na	134 mmol/L		
赤血球	4.55×10^6 / μ l	K	4.4 mmol/L		
Hb	12.7 g/dl	Cl	99 mmol/L	【画像検査】	
Hct	34.7 %	CRP	12.54 mg/dl	胸部レントゲン	肺炎像(-)
Plt	466×10^3 / μ l	フェリチン	369 ng/ml	腹部エコー	膿瘍(-)
		TG	89 mg/dl	心エコー	疣贅(-)
【凝固】		IL2R	766 U/L		
PT-INR	1.2	PCT	2.1 ng/ml		
APTT	58 sec	IgG	760 mg/dl		
Fib	631 mg/dl	CD3	72 %		
FDP	4.1 μ g/ml	CD4	40.5 %		
		β -D グルカン	<1.4 pg/ml		
【尿所見】		HSV IgM	0.35		
潜血	(-)	HSV IgG	<2.0		
蛋白	(-)	HSV PCR	陰性		
白血球	(-)				
UP/Cr	0.36 g/g Cr				

単球 54%), CRP 12.54 mg/dl と Grade IV の無顆粒球症を認めた。

入院時現症：身長：129.4 cm(+1.7 SD), 体重：29.1 kg (+1.3 SD), 体温：40.4°C, 血圧：105/76 mmHg, 心拍数：125/min, 呼吸数：30/min, 酸素飽和度：100%, 咽頭発赤, 口腔内潰瘍, 歯肉腫脹を認めた。胸腹部には異常なく, 皮疹や神経学的異常所見も認めなかった。

検査所見(表 1, 図 1)：WBC 4200/ μ l, 好中球 0%, CRP 12.54 mg/dl と無顆粒球症と炎症反応の高値を認めた。貧血や血小板減少はなく, 凝固は正常であった。血液培養, 咽頭培養, インフルエンザ迅速検査, 溶連菌迅速検査, アデノウイルス迅速検査, ヘルペスウイルス抗体価はすべて陰性であった。胸部レントゲン検査では肺炎像なく, 心エコー検査でも冠動脈病変や疣贅は認めなかった(表 1)。

入院 3 日目の血液検査で末梢血中に初めて芽球が観察されたため悪性疾患の鑑別目的に骨髓検査を行った。骨髓の細胞密度は 40~50% で正形成骨髓, M:E 比 3:1, リンパ球, 単球, 巨核球, 赤芽球の系統においては異形性を認めなかった。しかしながら, 骨髓系細胞において, 後骨髓球以降の成熟傾向が認められず, 骨髓球系のみに

分化停止所見を認めた(図 1)。骨髓の免疫染色では CD10 陽性, CD19 陽性, CD20 陰性であった(図 2)。

経過(図 3, 図 4)：入院後は広域スペクトラムの抗菌薬タゾバクタム/ピペラシン(TAZ/PIPC), およびトブラマイシン(TOB)を併用し加療開始した。しかしながら, 治療への反応が乏しく, 入院 3 日目に抗菌薬 TOB をバンコマイシン(VCM)に変更し, 顆粒球コロニー刺激因子(granulocyte-colony stimulating factor: G-CSF 3 μ g/kg/dose)を 1 日間, γ グロブリン製剤(150 mg/kg/dose)を 2 日間投与した。その後, 速やかに好中球は増加し, 同時に解熱と炎症反応の改善を示した。G-CSF 製剤投与 5 日後には好中球は 2000/ μ l 台と正常範囲まで回復し, 以後無顆粒球症の再発はなかった(図 3)。

RTX 投与直前の末梢血 CD20 細胞は 7.60% と正常であったが, 1 回目投与後には 0.40% まで減少し, 以後 0.10~0.30% で推移した。発熱時は 0.05% であったが, 1 か月後には 1.50%, 2 か月後には 7.67% と回復した。好中球は RTX 投与後から 2 か月後までは 2000/ μ l 台を維持しており, R-LON 発症 3 週間前の好中球は 2250/ μ l であったが, 発熱時には 0/ μ l であった。G-CSF 製剤を一度投与した後, 好中球は速やかに回復し 2000/ μ l 以上を維持した(図 4)。

図1 骨髄 メイギムザ染色
細胞密度 40～50% M:E 比 3:1 リンパ球, 単球, 巨核球, 赤芽球の系統には異形を認めない。後骨髄球以降の成熟がなく, 骨髄球系の方に分化停止を認める。

a

c

b

図2 骨髄免疫染色 光学顕微鏡 ×400 倍

- a: CD10 免疫染色 陽性
b: CD19 免疫染色 陽性 CD10 染色よりも弱い陽性像を示す
c: CD20 免疫染色 陰性

図3 入院後の経過

G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor, IVIG: intravenous immunogloblin, TOB: Tobramycin
TAZ/PIPC: Tazobactam/Piperacillin, VCM: Vancomycin, AMPC/CVA: Amocillin/Clavlanate

図4 好中球とCD20の推移

PSL: prednisolone, CYA: cyclosporin A, RTX: rituximab,
G-CSF: granulocyte-colony stimulating factor

図5 B細胞の分化と細胞表面マーカー

CLP(リンパ系共通前駆細胞)はB細胞, T細胞, NK細胞の前駆細胞へそれぞれ分化する。
 CD10はCLPからImmature B cellまで主に発現する。
 CD19はPro B cell以降, ほとんどすべての段階で発現する。
 CD20はPre B cellからMemory B cellまで発現する。

考 察

近年, ネフローゼ症候群に対する RTX の使用頻度の増加に伴い, R-LON の報告が散見されるようになった⁸⁾。しかしながらネフローゼ症候群における R-LON の骨髄所見の報告はこれまでない。また, R-LON の発症機序については未だ明確なことはわかっていない。ネフローゼ症候群に合併した R-LON での骨髄所見の報告は本症例が初めてであり, R-LON の機序を推測するうえでも貴重な一例といえる。

これまで R-LON の骨髄所見が報告されている疾患のほとんどは悪性リンパ腫などの血液疾患であるが, 自己免疫疾患での R-LON の骨髄所見の報告もある⁹⁾。ネフローゼ症候群における R-LON の骨髄所見と, 血液疾患や自己免疫疾患における骨髄所見を比較した。骨髄球系の左方移動や分化停止所見という点では合致していた。しかしながら骨髄の細胞密度はネフローゼ症候群や自己免疫疾患と, 悪性リンパ腫などの血液疾患で異なっていた。ネフローゼ症候群や自己免疫疾患では正形成骨髄であるのに対し, 血液疾患では低形成骨髄の所見がより多くみられた¹⁰⁾。これは血液疾患においては RTX の他に抗がん剤治療が併用されている症例が多く, それが低形成骨髄の要因であると考えられた。RTX は B 細胞系統に広範に発現する分子抗原 CD20 に対するモノクローナル抗体である³⁾。CD20 は B 細胞に特異的な蛋白分子であり, PreB 細胞の前期と形質細胞を除く未成熟 B 細胞,

成熟 B 細胞に発現がみられる。本症例の骨髄を免疫染色し分化段階を検索したところ, CD10 陽性, CD19 陽性, CD20 陰性であった。CD10 はリンパ系共通前駆細胞から未熟 B 細胞まで主に発現し, 成熟 B 細胞になると消失する。CD19 は ProB 細胞以降, ほぼ全段階で出現することを考慮すると(図5), R-LON 発症時点では骨髄中には PreB 細胞前期以前の B 細胞しか存在していなかったと考えられる。しかしながら, 1 か月後の末梢血中 CD20 細胞が陽転化したことを考慮すると, LON 発症時はまさに B 細胞が回復する直前であったと考えられる。

R-LON の発症機序としては未だ明確なことはわかっていないが, 好中球に対する自己抗体の形成¹¹⁾, リンパ球サブセットの不均衡¹²⁾¹³⁾, FcγRIIIa 158V/F といった遺伝子多型¹⁴⁾ や骨髄における顆粒球系のホメオスタシスの崩壊¹⁵⁾ 等, 様々な説が報告されている。

CD20 は幹細胞や好中球には発現していないため RTX による直接的な細胞毒性については否定的である。一方で, RTX が持つ抗体依存性細胞介在性細胞傷害活性(antibody dependent cell cytotoxicity: ADCC)の作用による直接毒性の可能性に関しては理論上否定できないが, 現在においてこの機序を証明する報告はなされていない¹⁰⁾。Voog らは, R-LON の患者 8 例中 2 例に好中球表面に結合する自己抗体(IgG)を証明し, 好中球に対する自己抗体が形成されると示唆した¹¹⁾。しかしながら, これ以降, 同様の結果は報告されていない。Stamatopoulos らと Papadaki らは骨髄中の B 細胞と T 細胞の不均衡に

より、FAS リガンドによって好中球のアポトーシスが引き起こされると示唆した¹²⁾¹³⁾。また近年、特異的な遺伝子多型の関与も指摘されている。Keane らは B 細胞性リンパ腫の患者において IgG レセプターの遺伝子多型である FcγRIIIa 158V/F が R-LON 発症のリスク因子と言及している¹⁴⁾。Dunleavy らは B 細胞回復時に必要となるケモカインの一つ stromal derived factor-1 (SDF-1) の関与を報告している¹⁵⁾。SDF-1 は B 細胞分化に必要となるケモカインであると同時に好中球が骨髄から静脈洞へ遊走する際に必要となるケモカインでもある。B 細胞回復時において SDF-1 はより B 細胞分化へ使われるため好中球に作用する SDF-1 が枯渇し、そのため骨髄中では骨髄球系の分化が停止する。本症例の R-LON 発症のタイミングは骨髄の免疫染色、CD20 細胞の推移より Dunleavy らが示唆した通り、B 細胞が回復する直前に LON を発症したと証明された。

1 か月毎に定期的に血液検査をしていたにもかかわらず LON が捉えられなかったのは、急速にこの病態が生じたためと考えられる。これまでの報告によると R-LON によって重症感染症を発症する例は比較的少数である。特に抗がん剤を併用しない自己免疫疾患での R-LON の持続期間は短く、無治療で好中球が回復する症例がほとんどである⁹⁾¹⁰⁾。そのため、本症例は当初好中球の自然回復を想定し G-CSF 製剤を使用しなかったが、好中球の回復がない状態での感染症のコントロールには難渋した。G-CSF 製剤投与後は速やかに好中球は増加し解熱した。したがって R-LON に重症感染症を合併した場合は比較的早期に G-CSF 製剤の投与を行うべきと考えられた。また、RTX 投与後、特に B 細胞が回復するまでは感染兆候には常に注意を払い、発熱時には速やかな受診を促すように患者に指導する必要がある。

結 論

ネフローゼ症候群における R-LON の骨髄所見と CD20 細胞の推移を検討した。今回の結果、R-LON の発症機序は B 細胞回復時に骨髄のホメオスタシスが崩壊することで骨髄球系の分化が停止するためと推測され、さらにこの病態は B 細胞が骨髄で回復する直前に急速に起こったと考えられた。つまり、RTX 投与回数の多少にかかわらず、B 細胞が枯渇し回復する過程においては常に LON 発症のリスクがあるため、特に B 細胞が回復する前の白血球、白血球分画の推移には注意を払う必要がある。

本論文の要旨は、第 54 回「小児腎臓病学会学術集会 (2019 年 6 月 7 日、大阪)」で発表した。

「日本小児腎臓病学会の定める基準に基づく利益相反に関する開示事項はありません。」

文 献

- 1) Coiffier B: Rituximab therapy in malignant lymphoma. *Oncogene* 2007; 26: 3603-3613.
- 2) van Oers MH, Klasa R, Marcus RE, Wolf M, Kimby E, Gascoyne RD, Jack A, Van't Veer M, Vranovsky A, Holte H, van Glabbeke M, Teodorovic I, Rozewicz C, Hagenbeek A: Rituximab maintenance improves clinical outcome of relapsed/resistant follicular non-Hodgkin lymphoma in patients both with and without rituximab during induction: results of a prospective randomized phase 3 intergroup trial. *Blood* 2006; 108: 3295-3301.
- 3) Salmon JH, Cacoub P, Combe B, Sibilia J, Pallot-Prades B, Fain O, Cantagrel A, Dougados M, Andres E, Meyer O, Carli P, Pertuiset E, Pane I, Maurier F, Ravaud P, Mariette X, Gottenberg JE: Late-onset neutropenia after treatment with rituximab for rheumatoid arthritis and other autoimmune diseases: data from the AutoImmunity and Rituximab registry. *RMD Open* 2015; 1: e000034. doi: 10.1136/rmdopen-2014-000034.
- 4) Jones RB, Ferraro AJ, Chaudhry AN, Brogan P, Salama AD, Smith KG, Savage CO, Jayne DR: A multicenter survey of rituximab therapy for refractory antineutrophil cytoplasmic antibody-associated vasculitis. *Arthritis Rheum* 2009; 60: 2156-2168.
- 5) 平本龍吾, 松本真輔, 江口広宣, 三好義隆, 小森功夫, 秋草文四郎, 柴田佐和子, 亀井宏一, 飯島一誠: リツキシマブ投与 3 ヶ月後に無顆粒球症を呈したステロイド依存性頻回再発型ネフローゼ症候群の 7 歳男児例. *日小児腎臓病会誌* 2009; 22: 97-101.
- 6) Iijima K, Sako M, Nozu K: Rituximab treatment for nephrotic syndrome in children. *Curr Pediatr Rep* 2015; 3: 71-77.
- 7) Stamatopoulos K, Papadaki T, Pontikoglou C, Athanasiadou I, Stavroyianni N, Bux J, Batsis I, Pyrovolaki K, Paterakis G, Anagnostou D, Anagnostopoulos A, Papadaki HA: Lymphocyte subpopulation imbalances, bone marrow hematopoiesis and histopathology in rituximab-treated lymphoma patients with late-onset neutropenia. *Leukemia* 2008; 22: 1446-1449.
- 8) Yamazaki M, Sugiura H, Iwatani Y, Kyoda M, Nokiba H, Amemiya N, Nitta K, Tsuchiya K: Late-onset neutropenia after rituximab treatment for adult-onset nephrotic syndrome. *Case Rep Nephrol* 2019; 2019: 3580941. doi: 10.1155/2019/3580941.
- 9) Tesfa D, Ajeganova S, Hägglund H, Sander B, Fadeel B, Hafström I, Palmblad J: Late-onset neutropenia following rituximab therapy in rheumatic diseases: association with B lymphocyte depletion and infections. *Arthritis Rheum* 2011; 63: 2209-2214.
- 10) Wolach O, Bairey O, Lahav M: Late-onset neutropenia after rituximab treatment: case series and comprehensive review of the literature. *Medicine (Baltimore)* 2010; 89: 308-318.
- 11) Voog E, Morschhauser F, Solal-Célgny P: Neutropenia in patients treated with rituximab. *N Engl J Med* 2003; 348: 2691-2694; discussion 2691-2694.
- 12) Stamatopoulos K, Papadaki T, Pontikoglou C, Athanasiadou I, Stavroyianni N, Bux J, Batsis I, Pyrovolaki K, Paterakis G, Anagnostou D, Anagnostopoulos A, Papadaki HA: Lymphocyte

- subpopulation imbalances, bone marrow hematopoiesis and histopathology in rituximab-treated lymphoma patients with late-onset neutropenia. *Leukemia* 2008; 22: 1446–1449.
- 13) Papadaki T, Stamatopoulos K, Stavroyianni N, Paterakis G, Phisphos M, Stefanoudaki-Sofianatou K: Evidence for T-large granular lymphocyte-mediated neutropenia in Rituximab-treated lymphoma patients: report of two cases. *Leuk Res* 2002; 26: 597–600.
- 14) Keane C, Nourse JP, Crooks P, Nguyen-Van D, Mutsaers H, Mollee P, Lea RA, Gandhi MK: Homozygous FCGR3A-158V alleles predispose to late onset neutropenia after CHOP-R for diffuse large B-cell lymphoma. *Intern Med J* 2012; 42: 1113–1119.
- 15) Dunleavy K, Hakim F, Kim HK, Janik JE, Grant N, Nakayama T, White T, Wright G, Kwak L, Gress R, Tosato G, Wilson WH: B-cell recovery following rituximab-based therapy is associated with perturbations in stromal derived factor-1 and granulocyte homeostasis. *Blood* 2005; 106: 795–802.

Bone marrow findings and examination of peripheral blood CD20 cells in late-onset neutropenia after rituximab administration for nephrotic syndrome

Satoko Kurata¹, Seiji Tanaka¹, Yusuke Hiyoshi¹, Junichiro Araki¹,
Takuya Esaki¹, Ayuko Zaito¹, Nobukazu Komatsu², Satoshi Hisano³

¹Department of Pediatrics and Child Health, Kurume University School of Medicine

²Department of Immunology, Kurume University School of Medicine

³Department of Pathology and Cell Biology, School of Medicine, University of Occupational and Environmental Health

Although late-onset neutropenia (LON) is known as a late complication after administration of rituximab (RTX), there is no report for the bone-marrow findings in nephrotic syndrome. In addition, the pathogenic mechanism of LON or Rituximab-associated late-onset neutropenia (R-LON) still remains unknown. In this study, we conducted bone marrow examination for the case with LON three months after RTX administration for refractory nephrotic syndrome. Later, we discussed the pathogenic mechanism of R-LON by the bone marrow findings and the transition of peripheral blood CD20 cells. The case was for a 7-year-old girl who received RTX administration (375 mg/m²/administration) four times for FRNS/SDNS. Yet, she had fever and Grade 4 agranulocytosis two and a half months after the last administration. We also found differentiation arrest findings only for myelocyte series in the bone marrow examination. The percentage of CD20-positive cells in peripheral blood was 0.05%, but it was changed to 1.5% after one month and 7% after two months as normal. From the above-described results, LON has developed right before B-cell recovery. Thus, after RTX administration, it needs to pay attention to leucocyte and differential leukocyte count before B-cell recovery.

Key words: late-onset neutropenia, rituximab, nephrotic syndrome, bone marrow, CD20