トピックス

Ⅲ. 診断と治療

6. 再生不良性貧血

中尾 眞二

要 旨

後天性再生不良性貧血（再不貧）は末梢血でのすべての血球の減少（汎血球減少）と骨髄の細胞密度の低下（低形成）を特徴とする曖昧な疾患群であるが、その多くがT細胞を標的とする免疫抑制療法によって改善することから、一種の自己免疫疾患と考えられている。再不貧の病態研究の過程で見いだされた「免疫病態の存在を反映するマーカー」は、類縁疾患の骨髄異形成症候群や巨核球減少性血小板減少症でもしばしば見いだされることから、これらは同じ機序によって起こる自己免疫性骨髄不全の一群と考えられる。慢性的な血小板減少症や、血小板減少を含む2血球系統以上の血球減少症をみた場合にはそのようなマーカーを積極的に利用することにより、T細胞を介した免疫異常が病態に関与しているか否かを判定し、免疫病態が関与している場合には診断名にこだわることなく積極的に免疫抑制療法を行うことが望ましい。

〔日内会誌 103：1631～1638, 2014〕

Key words 血小板減少, PNH型血球, HLAアレル欠失血球, トロンボポエチン

はじめに

再生不良性貧血は（以下再不貧）は、末梢血でのすべての血球の減少（汎血球減少）と骨髄の細胞密度の低下（低形成）を特徴とする一つの症候群である¹⁾。同様の骨髄不全を呈する骨髄異形成症候群（myelodysplastic syndrome：MDS）、発作性夜間ヘモグロビン尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria：PNH）、有毛細胞性白血病などを除外することによって初めて診断することができる。再不貧はこのような一種

の除外診断であるため、その中には様々な病態による骨髄不全が含まれるはずである。しかし、好中球減少（500/ μ l未満）や血小板減少（2万/ μ l）が明らかで貧血が顕著ではない急性型の重症再不貧は、抗胸腺細胞グロブリン（antithymocyte globulin：ATG）とシクロスポリンによる免疫抑制療法によって改善することから、「T細胞病」と考えてまず間違いはない。一方、同じ重症再不貧であっても、高度の貧血を伴う（病像完成までに長期間を経過している）慢性型再不貧や、好中球数が500/ μ l以上の非重症再不貧では免疫病態以外の病態が存在している可能性がある。

金沢大学医薬保健研究域医学系細胞移植学（血液・呼吸器内科）

Recent Progress of Diagnosis and Treatment for Immune-mediated Hematological Diseases. Topics: III. Diagnosis and Treatment; 6. Aplastic anemia.

Shinji Nakao: Cellular Transplantation Biology (Hematology/Respirology), Kanazawa University Institutes of Medical Pharmaceutical and Health Sciences, Japan.

トピックス

図 1. 骨髄穿刺でMDS1 と診断された 36 歳・男性の骨髄所見

骨髄塗抹標本 (A) では過形成であり、一部の顆粒球に脱顆粒や核異型がみられた (B) ためMDSと診断されたが、胸腰椎のMRI (T1 強調画像, C) ではほとんどが脂肪髄であり、腸骨 (D) も骨髄穿刺部位に一致して造血巣がみられるものの、それ以外の部位は脂肪髄であった。

このため、骨髄不全の診療にあたっては、免疫病態を反映するマーカーを利用することにより、その患者の骨髄不全が免疫抑制療法によって改善するかどうかを予測することが重要である。本稿では骨髄不全における免疫病態の診断に有用なマーカーを紹介する。

1. 再不貧における定義上の問題点

前述のように、再不貧は血球数の低下や「骨髄低形成」「MDSにみられるような形態異常がない」などの形態学によって定義される症候群であるが、この診断基準そのものに大きな矛盾がある。

1) 骨髄の細胞密度を正確に評価することがほとんど不可能である

もっとも大きな問題点は、骨髄が低形成であ

ることを正確に診断することが難しい点である。最重症例を除く多くの再不貧では、ほとんどの例で造血巣が残っており、さらにその造血巣が代償性に過形成になっていることが多いため、たまたまその部位が穿刺されると骨髄が正～過形成と誤認されてしまう。図1はそのような誤解が生じやすい典型例を示している。MRIで腸骨を調べると、穿刺部位だけを含む一部の箇所だけに造血巣が残っていることが分かる。

MRIによる骨髄細胞密度の評価はこのような一部の骨髄からの生検によって生じる誤解を避けるために有用ではあるが、それでも完全とは言えない。骨髄生検やMRIの結果が脂肪髄であった場合にはそれによって骨髄が低形成であるとは言えるが、それらの結果が正～過形成であっても免疫病態による骨髄不全（再不貧）を否定することはできない。このような不確実な検査

所見が再不貧の診断における必須項目として国際的に定着しているのは非常に不思議である。

2) 形態異常のない中等症再不貧は存在しない
再不貧と診断するためには類縁疾患のMDSを否定する必要がある。しかし、前述のように残存する造血系から骨髓穿刺が行われた場合、再不貧であっても塗抹標本上で形態異常がないことはむしろ稀である。図1Bのように、赤芽球だけでなく顆粒球にも核異型をみることがしばしばある。この例はATG療法後4年を経過しているがMDSや急性骨髄性白血病に移行する兆候はまったくみられておらず、次世代シーケンスを用いたゲノム解析でもMDSにみられるようなゲノムの変異はみられていない。

3) 血球減少の程度が診断基準を満たさない軽症骨髓不全に対しては診断名を付けられない

再不貧と診断するためには、①ヘモグロビン<10 g/dl, ②好中球<1,500/ μ l, ③血小板<5万/ μ l(日本では<10万/ μ l)の3項目のうち二つ以上を満たす必要がある²⁾。一方、慢性型再不貧の中にはこのような再不貧の診断基準を満たす前に軽度の血球減少が見つかることがある。その場合、後述する免疫病態マーカーが仮に陽性であったとしても、診断基準を満たしていないため再不貧と診断することができず、治療も行えない。その結果、早期に免疫抑制療法を開始すれば速やかに改善する可能性がある骨髓不全でありながら、診断不能の汎血球減少として無治療で経過が観察されることになる。

2. 免疫病態の存在を示唆する骨髓不全の臨床検査所見

以上のように既存の診断基準や重症度分類に従っているだけでは骨髓不全を適切に管理できないことが多い。このため、血球減少患者をみた場合には、診断名に囚われることなく、臨床検査や特殊検査の結果を参考にして病態を診断

する必要がある。

1) 血小板減少が先行するか、その他の血球減少よりも血小板減少の程度が強い骨髓不全である

骨髓不全における免疫病態のマーカーとして信頼度の高いものの一つが、CD55やCD59などのglycosylphosphatidylinositolアンカー膜蛋白の発現を欠くPNH型血球の増加である³⁾。PNH型血球が増加している場合には、それだけで免疫病態の関与する骨髓不全と診断できる。ただし、PNH型血球は、PIG-A変異幹細胞が自然発症していない個体では出現し得ないため、これが陰性であるからと言って免疫病態を否定することはできない。一方、PNH型血球が陽性の骨髓不全には、①血小板減少が顕著である、②骨髓巨核球が減少している、③MCVが大きい、などの共通の特徴があるため、PNH型血球を検出しなくても、その存在をおおよそ予測することができる。逆にこれらの特徴が揃っていればPNH型血球が陰性であっても免疫病態が関与している可能性が高い。

血小板減少が優位であることが免疫病態のマーカーとして重要なことは、PNH型血球が再不貧だけでなく、巨核球減少性の血小板減少症でもしばしば検出されることからもうかがえる。図2Aはプレドニゾン抵抗性の特発性血小板減少性紫斑病と診断された73歳男性の臨床経過を示している。骨髓巨核球が減少していたためPNH型血球を調べたところ図2Bのように陽性であった。このためシクロスポリンを投与したところ速やかな血小板増加が得られた。

2) 末梢血におけるPNH型血球の増加

精度の高いフローサイトメトリーによって検出されるPNH型血球の増加は、その患者でみられる血球減少がT細胞異常によって起こっていることを示すもっとも確実な証拠の一つである。PNH型血球の増加のみられる再不貧例が増加のない例に比べてATG療法に対する反応性や生存

トピックス

図 2. PNH型血球陽性血小板減少症 (78 歳・男性) の臨床経過

A. プレドニゾン、シクロスポリン投与後の血球数の推移。シクロスポリン投与に急速な血小板数の回復がみられた。B. シクロスポリン投与前の末梢血に検出されたPNH型血球。顆粒球、赤血球ともに0.01%前後のCD55・CD59陰性のPNH型血球が検出された。

率が高いことは、我が国の後方視的解析⁴⁾や最近の前方視的解析 (図3)⁵⁾で示されている。

このようなPNH型血球の意義を示す重要な所見が、同種造血幹細胞移植後のドナー型生着不全で時に検出されるドナー由来のPNH型血球である。図4は、再不貧に対するHLA一致同胞からの造血幹細胞移植後に起こったドナー型生着不全の治療経過を示している⁶⁾。この例では、移植前の患者・ドナーともにPNH型血球は検出されておらず、患者のPNH型血球で同定されたPIG-A変異配列はドナーの骨髓中に検出されたことから、患者の体内で再生したドナーの造血幹細胞に対する免疫学的攻撃が起こった結果、ドナー

造血に新たに再不貧が発症したと考えられた。

このため造血幹細胞を補充することなくATG療法を行ったところ寛解が得られた。このようなPNH型血球陽性のドナー型再不貧は、再不貧だけでなく急性リンパ性白血病や悪性リンパ腫に対する同種造血幹細胞移植後にも同定されている。

したがってPNH型血球が検出されればその骨髓不全は免疫病態によるものと考えてよい。ただし、前述のようにPNH型血球は、免疫病態による骨髓不全であってもPIG-A変異幹細胞が生じていない個体では出現しえない。実際に、再不貧におけるPNH型血球陽性患者の割合を年齢別

図 3. PNH型血球増加の有無別にみた再生不良性貧血の生存率（文献5より引用）
高精度のフローサイトメトリーによりPNH型血球が検出される例は検出されない例に比べて全生存率（A）が高い傾向にあり，failure-freeの生存率（B）は有意に高かった。

図 4. ドナー型生着不全で検出されたPNH型顆粒球とその由来（文献6より引用）
生着不全発症時に，ドナー，2回目の移植前の患者にはみられなかったPNH型の顆粒球（A）が検出された。ソートしたこのPNH型顆粒球はドナー由来であり（B），*PIG-A*遺伝子のexon2 position 654 にAの挿入がみられた。

トピックス

図5. 第6染色体短腕の片親性2倍体(6pUPD)によるHLAアレルの欠失(文献7より引用)

代表的な陽性例におけるSNPアレイ解析結果(A), 6pUPDの概念図(B), フローサイトメトリーによるHLA-A2欠失の検出(C)を示している。

にみると, 60代以上では80%以上であるのに対して, 20歳未満では高々20%台である。このためPNH型血球が陰性であったとしても免疫病態を否定できる訳ではない。

3) 末梢血におけるHLAクラスIアレル欠失血球の増加

再不貧では免疫寛容の破綻により, 造血幹細胞由来の自己抗原に対する細胞傷害性T細胞(cytotoxic T cell: CTL)が誘導され, その結果造血幹細胞が傷害されるのではないかと想像されてきた。しかし, 標的と考えられる造血幹細胞がごく少数しか存在しないうえ, ヒト幹細胞に対するCTLの影響を評価するための良いアッセイ系が存在しないため, 実際にCTLが再不貧の発病に関与しているかどうかは不明であった。

筆者らは, 多数例の再不貧症例を対象として, 白血球ゲノムのコピー数異常およびコピー数の不均衡をSNPアレイでスクリーニングした結果, 約13%の症例において, 6番染色体短腕(6p)の

HLA遺伝子領域に片親性2倍体(uniparental disomy: UPD)がみられることを明らかにした⁷⁾。この6pUPD(+)例では, 片方のHLA-Aアレルを欠失した白血球が様々な血球系統に検出される(図5)。この所見は, 再不貧患者の骨髓に元々少数発生していた6pUPD(+)造血幹細胞のうち, 自己抗原を提示するHLAを欠いた6pUPD(+)造血幹細胞がCTLの攻撃を免れて生き残り, それが造血に寄与するようになったことを示唆している。

6pUPD(+)症例のHLAハプロタイプを決定したところ, 欠失ハプロタイプに有意に高頻度に含まれるHLAアレルはA*02:01, A*02:06, A*31:01, B*40:02の4アレルに限られていた。また, 407例の再不貧全体におけるこのアレルの頻度は6,206例の非再不貧例に比べてオッズ比2前後の高頻度を示したことから, 6pUPDによって欠失を来しやすい上記の4アレルは, 再不貧の疾患感受性遺伝子そのものであること

図 6. 低リスクMDS例の無進行性生存率（文献9より引用）

A. TPOが高値のRCUD・RCMD例は、TPO低値例に比べて、骨髄不全や白血病移行により死亡する確率が有意に低い。

B. TPO高値例はTPO低値例に比べて免疫抑制療法に対する反応性が有意に高い。

が明らかになった。B*40:02については、造血幹細胞におけるnon-sense変異の結果、顆粒球がHLA-B61を発現できなくなった再不貧例も報告されている⁸⁾。このようなHLAクラスIアレル欠失造血幹細胞は健常者の骨髄中にも存在するが、ごく少数であるため静止期の状態に留まり、一生の間造血に寄与することはない。一方、CTLによる造血幹細胞の攻撃が存在する環境においては、正常幹細胞は破壊されるのに対して、自己抗原を提示できないHLAクラスIアレル欠失造血幹細胞は生き残り、造血に寄与するようになると考えられる。

4) 血漿トロンボポエチンが高値である

前述したように、骨髄中の巨核球が減少して

いることは免疫病態による骨髄不全のもっとも重要な特徴である。しかし、骨髄の細胞密度を正確に評価するのが難しいと同様に、巨核球の多寡を評価することは難しい。一方、全身の骨髄における巨核球数を反映しているのが血漿のトロンボポエチン(thrombopoietin:TPO)値である。巨核球が増加しているITPや、進行期のMDSではTPOは正常からやや増加している程度(≤ 320 pg/ml)であり、典型的な再不貧であればTPOは例外なく高値(> 320 pg/ml)を示す⁹⁾。低リスクのMDSと診断される例の中でTPOが高い例は白血病に移行するリスクが低く、免疫抑制療法に対する反応性が高いことから、実際には再不貧と考えられる(図6)。PNH型血球陽性

トピックス

例は全例TPOが高値を示すことから、TPOが高値であれば敢えてPNH型血球を調べる必要はない。ただし、TPOの測定には時間がかかるため、高精度のフローサイトメトリーが測定できる環境であればPNH型血球も調べた方が迅速に免疫病態の有無を判断できる。

おわりに

これまでみてきたように、汎血球減少や骨髓低形成の存在という従来の診断基準で再不貧を診断しようとする、様々な矛盾が生じ得る。再不貧を始めとする骨髓不全の診療においても重要なことは、骨髓不全の成り立ちに免疫病態が関与しているか否かを早期に診断し、その関与が疑われる場合には、骨髓不全に対して早期に免疫抑制療法を施行することである。このためには、再不貧を「免疫病態による骨髓不全」と定義し、免疫病態の存在を示唆するマーカーが陽性であった場合、血球減少の程度、形態異常の有無、骨髓の細胞密度などにはこだわらずに積極的に再不貧と診断できるように定義を変えることが望ましい。ただし、これらのマーカーはいずれもエビデンスレベルが低いものであるため、今後の前向きな臨床試験によって各マーカーの意義を確立する必要がある。

著者のCOI(conflicts of interest)開示：中尾真二；研究費・助成金（アレクシオンファーマ）

文 献

- 1) 再生不良性貧血の診断基準と診療の参照ガイド改訂版作成のためのワーキンググループ：再生不良性貧血診療の参照ガイド，厚生労働科学研究費補助金難治性疾患克服研究事業特発性造血障害に関する調査研究班：特発性造血障害疾患の診療参照ガイド（平成22年度改訂版）. 2011, 3-32.
- 2) Marsh JC, et al: Guidelines for the diagnosis and management of aplastic anaemia. *Br J Haematol* 147: 43-70, 2009.
- 3) Sugimori C, et al: Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 147: 102-112, 2009.
- 4) Sugimori C, et al: Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 107: 1308-1314, 2006.
- 5) Kulagin A, et al: Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol* 2013, in press.
- 6) Mochizuki K, et al: Expansion of donor-derived hematopoietic stem cells with PIGA mutation associated with late graft failure after allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 112: 2160-2162, 2008.
- 7) Katagiri T, et al: Frequent loss of HLA alleles associated with copy number-neutral 6pLOH in acquired aplastic anemia. *Blood* 118: 6601-6609, 2011.
- 8) Osumi T, et al: Nonsense mutation in HLA-B*40:02 in a case with acquired aplastic anaemia: a possible origin of clonal escape from autoimmune insult. *Br J Haematol* 162: 706-707, 2013.
- 9) Seiki Y, et al: Increased plasma thrombopoietin levels in patients with myelodysplastic syndrome: a reliable marker for a benign subset of bone marrow failure. *Hematologica* 98: 901-907, 2013.