

## 第27回 シスメックス血液学セミナー / 質疑応答

### 2. 前白血病としての発作性夜間血色素尿症 (PNH) の分子病態

中熊 秀喜

【司会・朝長】中熊先生，ありがとうございました。

一見複雑に見えるパズルを解いていくような面白みがこのPNHの現在の研究の状況ではないかと思いますが，その中であって，中熊先生のグループが非常に面白い増殖優位性の研究を展開しておられるというようなお話で終わられました。溶血で発症した典型的なPNHの方の骨髄造血不全というのは，ほぼ確実に存在するということですね。ということは，残っている，PNHクローン以外のstem cellも，もう異常なのですね。

【中熊】そのように考えたいと思います。

【司会】それは，先生のお考えでしょうか。あるいは国際的にも大体そう考えられつつあるのでしょうか。

【中熊】私の考えです。増殖異常遺伝子とかが徐々に分かってくればもう少しははっきりご説明できるかもしれませんが，今後，その方向で研究を進めたいと考えています。

【司会】PIG-A変異を起こしていない，一見正常に見えるstem cellも抑制されているのですね。

【中熊】はい。

【司会】あるいは，障害されているのですね。

【中熊】そう考えています。アメリカのグループが，FasがPNHクローンにも正常クローンにも発現が亢進しているということを報告しており，支持する所見の一つと考えております。

【司会】では，もう一つ，MDSクローンが出てくるということでご質問したいのですが，PNHクローンがあまり多くない再生不良性貧血も，10%ないし15%はMDSに進展しますよね。そうすると，この三つの疾患の共通点というのは，先生は現在の段階ではどのように整理しておられるのでしょうか。

【中熊】大変難しいご質問ですね。一つの考え方ととらえていただきたいのですが，自己免疫的な造血細胞傷害のある患者さんの造血組織には，PNHの

PIG-A変異の細胞も，MDSクローンの基盤となる細胞も，白血化するクローンも共存しているのではないかと考えております。その中で，量的に優位なクローンが前面に出てくると，病気としての診断がつく。この優位クローンは，入れ替わることがあってもいいと思います。

実例として，PNHの患者さんに色々なMDSクローンがよく見つかります。経過を見ておると，例えばmonosomy 7を持ったクローンが増えてMDSさらには付加的異常を得て leukemiaへ進展します。病初期には，PNHだけの所見が前面に出ているのですが，共存するMDSクローンが大きくなって，典型的な白血病に到った例を経験しております。勢いのあるクローンによって病名が決まってくるのではないかと考えております。

【司会】昔から，この三つの病気というのはそれぞれのプロトタイプといいますか，表現型がきちりあるように思いますが，根っこはかなり共通点を持っているということになりますか。

東京会場からご質問が二つほど出てまいりましたので，それでは，別所教授，よろしくお願いたします。

【東京会場・別所】それでは，東京会場からの質問です。一つは，内科の先生からのハムテストについてのご質問です。これはおそらく経験されたご症例についてだと思います。

(質問)シビア，あるいはrefractoryのAIHA，クームス陽性症例でハムテストを行うと，低濃度でも陽性となります。本テストはPNHに特異性が高いと理解していますが，こういうものは偽陽性と考えてよいのでしょうか。そうだとしますと，偽陽性は他にどんな病態があるのか。あるいは，クローン異常と関係がありますか。ちなみに，本例の高感度のフローサイトメトリーの検査は，金沢医科大学第三内科で施行していただいたものですが，正常パターンです。染色体は正常です。どのように

考えたらよいでしょうか。

**【中熊】**ありがとうございます。ちょっと考えたのですが、答えが見付からないですね。ハム試験は溶血度が10%以上をもって古典的な陽性とうたわれて、そこまで溶血するものはPNHしかないと言われております。ところが、試験管の中で5%溶血でも非常に真っ赤に見えますし、もっと少ない1%以下でも赤い色が付きます。それをハム試験陽性とは言えませんが「溶血あり」としますと、この溶血はPNH以外にもたくさんの病気で認めます。例えば白血病の一部、MDSの一部でも認めることがあります。つまり溶血度を正確に把握することが大事であると思います。今の患者さんが10%以上の溶血であったかどうか、確認されることをお勧めします。ハム試験で陽性だった方の血球をフローサイトメトリー分析いたしますと、福島県立医科大学の七島先生たちのデータを参考に考えますと、必ずフローサイトメトリーでPNH赤血球が検出されます。つまり、フローサイトメトリー陰性でハム試験陽性ということは考えにくいのです。

今のところ、フローサイトメトリーのほうが定量性もあって客観的なデータが得やすく、テクニカルにも技術者の個人差が出ません。ハム試験は補体の活性化の程度、pHの程度、また、非常にまれな疾患ですから、患者さんを発見した経験のある技術者が少ないということもあり、なかなか再現性のあるデータが出にくいようです。診断を確定するためには、フローサイトメトリーを、初期のスクリーニングとしてはシュガーウォーター・テスト、もしくはハム試験でもよろしいかと思っています。

**【東京会場・別所】**溶血の程度によってということですね。

**【中熊】**はい、そうです。

**【東京会場・別所】**ですから、フローサイトメトリーで確定してほしいと思います。それでは、もう一題ご質問が出ております。

(質問) PNHを疑う場合、スクリーニング的な意味でフローサイトメトリーによるCD55, CD59を行いますが、その有用性、信頼性は高いと考えてよ

いでしょうか。また、CD55, CD59は全血球に発現しており、PNHにおける欠損を認めるとありましたが、フローサイトメトリーによるCD55, CD59の検査は通常赤血球をターゲットにしています。白血球をターゲットにしてもよいということでしょうか。もし可能ならば、リンパ球, 単球, 顆粒球の集団のうち、いずれが適しているのでしょうか。

**【中熊】**フローサイトメトリーの信頼性は高く診断に有用です。溶血が亢進している場合は、PNH赤血球は通常よりも減っており、検出しにくくなってきます。そのような場合は顆粒球を調べることが、診断には有用です。

今のところ陽性と判断するPNH細胞の割合を3%にするのか5%にするのが決まっておりません。ハム試験を基準に考えますと10%という数値がありますが、そこまでなくてもいいと考えているのが趨勢です。問題なのは、再生不良性貧血で見付かる0.003%より多くて1%未満というような人たちの場合は果たしてPNHとっていいのかどうか。臨床的に潜在性PNHというのか、別の命名にするのか、今後の課題です。リンパ球はCD55の表現が弱いので診断用には不向です。

**【東京会場・別所】**溶血がひどい場合には赤血球のパーセントが低く出る可能性があるということで、顆粒球でやるのがいいだろうということでもよろしいでしょうか。

**【中熊】**はい、そうです。

**【東京会場・別所】**どうもありがとうございました。

**【司会】**ありがとうございました。それでは、神戸会場から一つご質問が出ています。

(質問) PNHの患者さんでは輸血をする機会が多いと思いますが、HLA-DRB1\*1501, あるいはGPIアンカーたんぱく質の欠損による白血球系の機能異常によって、輸血による不規則性抗体が産生しやすいということはあるのでしょうか。

**【中熊】**検討したことがありませんし、聞いたこともありませんね。金丸先生の方がたくさん症例をお持ちだと思いますが、先生はいかがでしょう。

**【司会】**金丸先生も随分PNHを研究しておられますから。

**【神戸会場・金丸】**冒頭で先生がおっしゃいましたように、むしろ輸血を推奨するようなお話をちょっとなさったのですが、教科書的には輸血をすることで溶血を促進するような、そういう懸念もありますので、そういうことをこの先生は考慮してご質問なさったのではないかなと思うのです。輸血で実際に溶血を誘発するといいますが、私はあまり経験がないのですが、その辺は補体の問題でしょうか。それとも、それ以外の問題でしょうか。例えば、こういうことの可能性についてはいかがですか。輸血で入ってくるドナー補体が溶血の直接の原因とは考えにくいと思います。

**【中熊】**補体は患者さん自らも持ち合わせており、輸血に伴う溶血の機序としては他に、ドナーからの血漿成分の中に赤血球抗体があるかと思えますので、これが溶血を助長する可能性をと考えています。PNH赤血球をたくさん持っている患者さんに輸血するときは、やはり血漿成分を除くことが望まれると考えています。

**【神戸会場・金丸】**今のところは以上です。

**【司会】**ありがとうございました。それでは、福岡会場から二つご質問がありますので、ご紹介します。一つは先ほどすでに東京のほうのご質問にも出た問題だと思います。

(質問) stem cell レベルでの異常なので、好中球、赤血球のほかに、リンパ球ですが、リンパ球はT・BともにDAF (CD55) とCD59はダブル陰性でしょうか。

**【中熊】**ご指摘どおり、T・Bリンパ球を含めて全血球系にダブルネガティブの血球が見つかります。ただ、顆粒球や赤血球、網赤血球に異常クローンを検出しやすいものですから、それをお使いになるほうが望ましいと考えています。リンパ球などにおいてはDAFの発現がもともと弱いものですから、診断用の検査であれば、リンパ球より顆粒球、網赤血球、赤血球などを調べる方が望ましいと思います。

**【司会】**この方の二つめの質問です。

(質問) PNHの血球膜上のDAF, CD59の欠損についてですが、正常では好中球の核膜やミトコンドリア膜にDAF, CD59は存在しているのでしょうか。

細胞質内にあると先生はおっしゃっていましたけれども、これはどういう存在形態であるのでしょうか。

**【中熊】**私が申し上げましたのは、細胞の中で作られているという意味です。ER膜などで合成されているという意味です。また、核膜やミトコンドリア膜にあるかどうかは私の知識では分かりませんので、調べさせて下さい。

**後日いただいたご回答** CD59が補体制御因子として働くには細胞の外からの補体攻撃に備える必要がありますので、細胞膜での局在が好都合と思われれます。調べた限りではCD59が細胞内で働いているという報告はないようです。CD59も細胞内で合成されますので、合成過程のCD59が細胞内で検出されることはあると思います。なお、CD59が細胞内小器官の膜に存在して、補体制御以外の未知の働きを持つ可能性は否定できません。DAFについても同様です。

**【司会】**今の1番目の質問に関連して、私も個人的にいつもお聞きしたいと思っていたことがあるのですが、先生はMDSになってAMLに進展した例をお見せになりましたね。リンパ系にも異常があるということで、ALLの発症というのは起こりうるのでしょうか。慢性骨髄性白血病は2~3割はALLに急性転化いたしますね。そういう多能性幹細胞としてのどのレベルの異常かという問題と絡むかと思うのですが、もしお知りでしたら教えてください。

**【中熊】**スライドの中でちょっとお話ししたHarrisらが、多くのペーパーをまとめたものでは、たしかALLもあったように思います。発生頻度はmyeloid-leukemiaが圧倒的に多く、その中で私どもが意外に思ったのは、M6が結構あったことです。**後日いただいたご回答** 骨髄性白血病が主であるが、時に急性および慢性のリンパ性白血病が報告されています。他に悪性リンパ腫も発生していません。詳細は文献「Harris JW, et al.: Leukemia and Lymphoma, 32: 401-426, 1999」をご参照下さい。

**【司会】**そうですね。M6は我々も1例経験しています、確かに多いような感じがいたしますね。それでは次に、染色体異常についての非常に重要な

ご質問です。

(質問)再生不良性貧血と違いましてPNHの場合、治療前(初診時)より、染色体異常、特にmonosomy 7が10~20%に見られるというご講演でした。MDSではmonosomy 7は予後不良因子の一つですが、PNHの場合はいかがでしょう。そして、白血病化の因子となりうるのでしょうか(予見できるのでしょうか)。それから、治療後に出現するmonosomy 7と初診時に存在するものとの違いはあるのでしょうか。

【中熊】ありがとうございます。PNHではさまざまな染色体異常がありまして、それらを総合して10~20%と申し上げました。monosomy 7だけが出ているのが何割かは分かりません。ただ、白血病化した症例にはmonosomy 7がよく出現していません。治療前からあるのと治療後に登場したのと比較したことがありませんので、違いがあるかどうかは分かりません。白血病に移行したPNH症例は私どものところで20年間のうちに3例ぐらいあり、そのうち2例がmonosomy 7だったと記憶しております。

【司会】それでは、東京会場の別所先生からご質問があるようです。

【東京会場・別所】先生のご講演の中でシクロスポリンで有効例があったと思いますが、こういった場合に回復してくるのは正常なクローンでしょうか。あるいは、PNHのクローンが再生してきて、そういう場合は溶血がひどくなって困るとか、そういったところはいかがでしょう。

【中熊】ありがとうございます。この症例に限っては、治療前後、免疫抑制剤シクロスポリンを使って造血が回復した前後で、パーセンテージとしては変わっておりません。異常クローンも正常クローンも同じ率で増えていました。

【東京会場・別所】一般的に、治療奏功した場合には、やはり同じように両方とも増えてくると考えてよろしいでしょうか。

【中熊】変わらないという率がいちばん多いかと思いますが、中には治療した後PNHクローンがどんどん増えてくるという報告も実際あります。それから、逆に減っていったというのもあります。一概

に言えないようです。どうしてそういうことが起こるのかについては、不明です。

【東京会場・別所】どうもありがとうございました。

【司会】別所先生、よろしいでしょうか。それでは、仙台会場からご質問が一つ出ているようです。よろしく願いいたします。

(質問者)先ほど輸血の話が出たのですが、洗浄赤血球が望ましいということでしたが、もしかりにそれが手に入らない場合、MAP血を輸血してどの程度効果があるか。それで溶血が助長したり、増えた例があったのでしょうか。

【中熊】最近、MAP血はその調整過程に洗浄操作が入っております。MAP血輸血によって溶血が亢進したという報告は臨床的には最近見ておりません。過去には輸血との絡みでよく論文にはなっているようです。したがって、一部のペーパーではMAP血でよろしいという主張をされる方も出てまいりました。ただ、PNHという病気自体は溶血性疾患ですから、PNH赤血球が多い症例ほど、わずかな刺激でも溶血が誘発されやすいと考えており、洗浄赤血球輸血の方が望ましいと思います。

(質問者)ありがとうございます。

【司会】続きまして、神戸会場の金丸先生からご質問があるようです。金丸先生、どうぞ。

【神戸会場・金丸】それでは、私のほうから一つご質問させていただきます。白血病化の移行、そのあたりは大変興味深いのですが、PNHは飽くまでも良性のクローンで、100%異常クローンに置き換わるということはありません。そこが、leukemia、腫瘍と違う大きなポイントなのですが、比較的白血病化が多いわけですが、その機序について、その症例のクローンはやはり大半がPNHクローンだろうと思うのですが、PIG-A遺伝子そのものが遺伝子不安定性といえますか、ジェネティックな変異を起こすような要素を持っていると考えてよろしいでしょうか。その辺はいかがですか。

【中熊】PNH患者さんに発生する白血病について、割合は不明ですが、PNHクローンが腫瘍化して白血病を発症する場合と、PNHクローン以外のクローンが腫瘍化して白血病が発症する場合が報告されております。つまり、PIG-A変異と白血病発

生の中に直接の関係はなさそうです。また、PIG-A変異細胞にのみ様々な変異が集積しやすいということもなく、白血病化を促進するような特別なPIG-A変異も報告されておりません。白血病発生の基盤として、血液細胞に無差別に様々な変異が発生しやすい造血環境が存在するという仮説があります。今後、病因、造血障害、変異の誘発、変異クローンの拡大などの機序が解明されるにつれ、白血病化の機序に関する理解も深まると考えております。

**【神戸会場・金丸】**ありがとうございました。

**【司会】**私のほうから最後に質問があります。病気というのは特有の発症の年齢の幅、あるいは好発年齢というのがありますが、先ほど小島先生が小児でのPNHクローンの頻度を出されましたが、小児では典型的なPNHは、あまりないですね。先ほどの先生のデータにも、例えば10歳以下とかに限りますとないですね。それから、PNHの症例はずっと成人期の発症が続いていましたね。それに対してMDSは、若い人にもありますが、かなり低頻度で、55歳から60, 70, 80歳となってきましたと急速に上がってまいりますね。もちろんMDSが現在の日本では多発しておりまして、再生不良性貧血は従来からそう大きく増加しているという感じはなくて、PNHは非常に少ない疾患ですね。

そういう頻度と年齢分布から言うと、これは私の個人的な印象なのですが、共通点もありますけれども、それぞれ特有の病態のバックグラウンドの違いを持っているのではないかと。そのように今日感じたのですが、先生、いかがでしょうか。

**【中熊】**いずれの疾患とも病因、変異クローンの発生や拡大のしくみが不明です。臨床的観察からみて共通部分と違う部分がありますので、先生のご意見に賛成です。病因レベルではっきりしてくると非常にうれしいのですが、今後、変異の内容の解析などでもう少し分かってくるとと思います。自己

免疫としての造血細胞障害が起こるときの自己抗原や、その作用機序がはっきりすると、もう少しその辺が見えてくるのではないかと期待しております。

**【司会】**そして、自己抗原の問題なのですが、標的になる、細胞障害性のT細胞が誘導されてやられているということは間違いないだろうと思うのですが、普通、例えば甲状腺の自己免疫疾患の橋本病から甲状腺がんにはならず、甲状腺の悪性リンパ腫が出るのですね。それから、シェーグレン症候群などもよく悪性リンパ腫が出て、これはリンパ球系側の異常が生じるように思うのです。Aplastic Anemia, MDS, PNHに関しては、どうも標的の細胞ががん化してくるように思うのです。そこに大きな違いを感じているのですが、いかがでしょうか。

**【中熊】**PNHを越えて大変難しい質問ですね。変異細胞が出やすいという意味では、リンパ臓器といえますかリンパ球の多いところで炎症がありますと、やはりリンパ球が巻き込まれると予想しております。骨髄の場合ですとミエロイド系細胞がやはり量的に多いですから、そこでもし変異が起こるとすれば、やはりミエロイド系の細胞を中心に起こるだろうと思います。このような量的に多い細胞に変異が入りやすく、また変異誘発に対する感受性の高い細胞に変異が入りやすいと考えます。

**【司会】**ありがとうございました。PNHという病気は考えれば考えるほど、非常に興味深い病気ですので、フローサイトメーターでPNHクローンが非常に精密に微量でも測れるようになってまいりましたので、ぜひ皆さんこれに注目して、今後広く見ていっていただければと思います。

中熊先生、長時間にわたりましてご講演と質疑応答に懇切丁寧にお答えいただき、ありがとうございました（拍手）

## 【後日ご回答をいただいた質問】

**【質問】**PNH患者でCD55とCD59抗原の発現に差が認められることはあるのでしょうか。また、感度は特異性からは、どちらの抗原検出が良いのでしょうか。

**【回答】**発作性夜間血色素尿症（PNH）は血球の病気であり、PNH血球ではglycosyl phosphatidyl inositol（GPI）を合成できず、そのため本来はGPIに結合して血球膜に発現すべきGPI結合型膜蛋白（GPI蛋白）が多数血球膜から失われます。この膜異常は三血球系にみられますが、各種GPI蛋白の発現は血球の種類や分化により影響を受けます。その意味でPNH血球の検出には、どの血球にも発現するGPI蛋白であるdecay-accelerating factor（DAF, CD55）やCD59の解析が優れています。これらは補体制御因子であり、その活性はCD59の方がDAFよりも高いためPNH溶血に関する病的意義はCD59欠損の方が深く、また血球当たりの発現量もCD59の方が多いため検出しやすいようです。つまり、PNH診断にはCD59欠損を捉える方がよいと思います。しかし、先天性CD59蛋白単独欠損症の症例報告もありますので、欠損するGPI蛋白の種類が多いほどPNH診断の精度が増します。通常は、two-color flow cytometryによりDAFとCD59を同時欠損する血球を検出できればPNH血球（厳密にはGPI欠損血球）と診断できます。PNH血球がどのくらいあればPNHと診断するか、現在国際的基準作りが進行中です。

**【質問】**PNHの症状において血栓症が欧米で多く、本邦では少ない理由として生活習慣が関係しているのではないのでしょうか。例えば肺塞栓症も同様ですが、W3系脂肪酸とW6の摂取状態の違いは考えられないのでしょうか。

**【回答】**欧米と日本のPNH患者の間における血栓症の発生率の違いは関心の高い問題ですが、なお未解決のようです。食事を含めた環境因子及び遺伝的素因などが注目されています。日本における食生活も生活習慣病も欧米化して来たといわれていますが、そのような背景でも日本のPNH患者における血栓症の発生は増加していません。例えば、

PNH患者の全国規模の集計で血栓症の発生は1976年に7%、1989年に5.8%、2002年に4.3%と報告され、むしろ減少傾向にあります。因に、欧米におけるPNH血栓症の発生率は30～50%と報告されています。ご指摘の可能性を否定することはできませんが、現時点でPNH血栓症の発生率の差を摂取脂肪酸組成で説明することは困難と思います。

**【質問】**昭和49年12月にヘモグロビン尿症を主訴に来院された当時48歳の男性です。当時、骨髓検査にて赤芽球系の過形成、ハム試験陽性、砂糖水試験陽性、好中球アルカリフォスファターゼ低値、染色体検査正常で、PNHと診断されました。

昭和50年より、月1回の輸血でフォローされていましたが、昭和51年に不規則性抗体(抗E, 抗c, 抗Diaa, 抗P1, 抗体)が検出されました。おそらく輸血により抗体が産生されたのではないかと思います。PNHによる免疫異常で抗体が産生されやすいとは、考えられないのでしょうか。

現在は、MDSに移行してきています。末梢血に芽球が1～2%認められるようになりました。

**【回答】**PNH患者さんはウイルス感染症等を繰り返して、その度に溶血亢進を招き、容態が悪化することがあり臨床的に重要な課題です。PNH患者の白血球では各種GPI蛋白が欠損することから顆粒球やリンパ球の機能低下が予想されています。しかし、これを支持する免疫異常は実証されておらず、また抗体生産亢進も知られておりません。造血不全に伴う白血球減少及び治療に用いられるステロイド剤も易感染を助長している可能性があります。

我々も溶血や造血不全の治療としてPNH患者さんに輸血を実施していますが、抗体生産が特別に亢進する症例にはめぐり合っておりません。なお、ご紹介の患者さんは白血病への進展が心配です。

**【質問】**数日前、来院された患者で、重症再生不良性貧血で発症され、金沢大学でPNHクローンを検索していただいたところ、PNHクローンが30%弱陽性でした。

尿の溶血も軽度で、Ham, Sugerwaterは、後日検査する予定ですが、NAPが異常高値でした。染

染色体検査も現在提出中ですが，NAP score から leukemic change のリスクが高いといえるのでしょうか（骨髓生検標本上，芽球増加は認められません）。

また，PNH クローンのフォローはどれくらいですべきでしょうか。

**【回答】**再生不良性貧血（AA）の患者さんからPNH が発症すること（AA-PNH 症候群）はよく知られ，両疾患は免疫機序による造血細胞傷害を共有していると考えられています。一般にAA-PNH 症候群は古典的PNH に比べると造血不全が強いためにPNH 血球が少なく溶血も軽いことが多いようです。ご質問にある「尿の溶血も軽度」は溶血も血色素尿も軽度を示していると考えられます。残念ながら「PNH クローンが30%弱陽性」は，PNH 赤血球やPNH 顆粒球が30%であるのか，または，

GPI 蛋白の膜発現程度が弱陽性（II型）の血球の割合が30%であるのか，意味するものがはっきりしません。もしPNH 赤血球が30%存在すれば溶血は明瞭になり，またNAPは減少することはあっても増加することはないと思います。もしII型血球が30%の場合は溶血が軽く，NAP減少が認められなくてもよいと思います。その場合，NAP異常高値からPNH クローン以外のクローンによる白血病への進展が危惧されます。異常クローンの性状を，細胞形態に加え，染色体，表面抗原等で確かめることをお勧めします。血球フローサイトメトリーによる「PNH クローンのフォロー」は病期や病勢の判断に有用です。例えば，容態が悪化する入院時に実施し，また外来で病状が安定しておれば年に1回で十分だと思います。