

特発性慢性寒冷凝集素症におけるカラム凝集法を用いた疾患活動性の評価

富田 孝子¹⁾ 橋本ひろみ¹⁾ 小西 和吾¹⁾ 藤本ひろみ¹⁾ 森本 和秀¹⁾
 久保田義則¹⁾ 平山 園子²⁾ 南 陽介³⁾ 大幡 真也⁴⁾ 顔 邦男⁵⁾
 杉本 健⁴⁾

【背景】カラム凝集法での裏検査の偽陽性反応の程度が特発性慢性寒冷凝集素症の疾患活動性を表すかどうかについて、症例の経過を観察することにより検討した。【症例】80歳、女性。貧血と胸部の紅斑を主訴とした。特発性慢性寒冷凝集素症の診断のもと、治療としてステロイド投与及びシクロスポリンの投与を行った。経過中に胸部の紅斑は一過性に減少し、再びやや増加した。補体値は一過性の増加を認めたが、この時期に寒冷凝集素価の変動は限定的であるにも関わらず、カラム凝集法での裏検査の偽陽性判定値は大きく低下した。その後補体値が再び低下するとともに裏検査の偽陽性判定値は再上昇した。【考察】冷式抗体による溶血は、抗体の作用温度域が重要とされている。今回我々はカラム凝集法で裏検査の検討を行ったが、測定温度は室温(25℃~28℃)であった。室温付近での赤血球と抗体との反応態度を観察することは、臨床上有用な温度領域での抗体結合能を評価していると考えられる。そのため寒冷凝集素価よりも裏検査偽陽性の程度の方が疾患の活動性をより正確に反映している可能性がある。

キーワード：特発性慢性寒冷凝集素症，カラム凝集法

本論文の要旨は、第58回 日本輸血・細胞治療学会近畿支部総会にて発表した。

緒言

赤血球型検査において裏検査での偽陽性反応を認める原因の一つに寒冷凝集素症(Cold activation disease : CAD)などに認められる寒冷凝集素の存在があり、血液型検査を行う上でも障害になりうる¹⁾。この偽陽性反応は手法のみならず血液型自動判定機を用いて行われるカラム凝集法(Column agglutination technology : CAT)においても認められる²⁾。我々は特発性慢性寒冷凝集素症(Primary chronic CAD)の症例においてカラム凝集法での裏検査の偽陽性反応を認める症例を経験した。CATでの裏検査の偽陽性反応の程度が疾患活動性を表すかどうかを検討したので報告する。

症例と経過

症例は80歳、女性。既往歴に高血圧症、心不全、胆石症がある。貧血は以前より他院で指摘されており、当院循環器内科で高血圧症、心不全と共に経過をみら

れていた。貧血の進行を認め、精査目的にて2013年11月に当院血液腫瘍内科に紹介となる。寒冷暴露と共に足先の色調が紫になるとの訴えがあった。他覚所見では眼瞼結膜に貧血を認め、前胸部と背部に類円形の紅斑を多数認めた(Fig. 1-A)。紹介時の検査所見をTable 1に示す。検尿では潜血を認めず。血液検査ではHb 9.1g/dlと貧血を認め、網赤血球数は $13.9 \times 10^4/\mu\text{l}$ (網赤血球比率は5.1%)と増加していた。生化学検査では、間接ビリルビン 1.89mg/dl, LD 201IU/l, ハプトグロビンは感度以下であり、溶血の可能性が示唆された。補体はCH50が33U/ml(基準値32~58)であったが、C4は10mg/dl(基準値13~35)と低下を認めた。直接抗グロブリン試験は陽性(IgG陰性、補体C3d陽性)、間接抗グロブリン試験は陰性であった。Donath-Landsteiner(DL)抗体は陰性であった。寒冷凝集素価は4,096倍であり、クリオグロブリンは検出しなかった。蛋白分画や免疫電気泳動はM蛋白その他の異常を認め

1) 北播磨総合医療センター中央検査室

2) 北播磨総合医療センター循環器内科

3) 神戸大学医学部附属病院輸血部

4) 北播磨総合医療センター血液腫瘍内科

5) 北播磨総合医療センター心臓血管外科

〔受付日：2014年10月3日，受理日：2015年1月28日〕

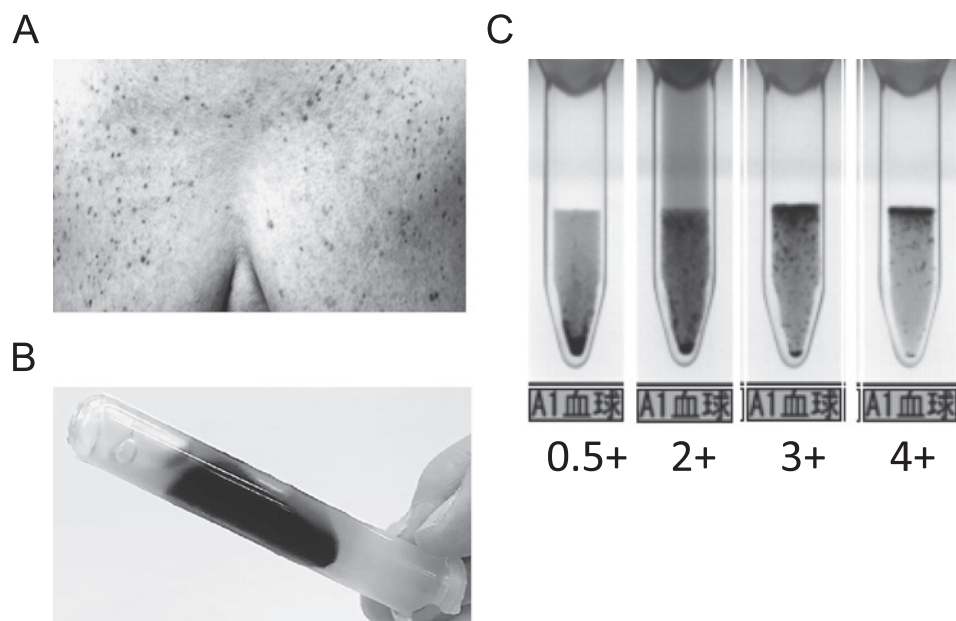


Fig. 1

A: Erythema of the breast.
 B: Cold agglutination of red blood cells.
 Paste-like clotting blood floats in the middle layer of plasma.
 C: Evaluation of false positive results in the column agglutination technology (CAT).
 Agglutination in the micro-bead matrix area is interpreted as a false positive. The grade of false positive reaction is expressed by a semi-quantitative scale (0.5+ — 4+). Representative pictures are shown.

Table 1 Clinical data on consultation

Urine		TP	7.2 g/dl
Protein	(-)	Alb	4.4 g/dl
Sugar	(-)	T.Bil	2.01 mg/dl
Occult blood	(-)	D.Bil	0.12 mg/dl
Urobilinogen	normal	ALP	286 IU/l
		AST	20 IU/l
Blood		ALT	16 IU/l
WBC	7,810 / μ l	LD	201 IU/l
RBC	275×10^4 / μ l	CK	62 IU/l
Hb	9.1 g/dl	BUN	25 mg/dl
Ht	26.8 %	Creatinine	0.8 mg/dl
MCV	$97.5 \mu\text{m}^3$	UA	5.6 mg/dl
Plt	25.4×10^4 / μ l	Haptoglobin	<10 mg/dl
Reticulocyte	13.9×10^4 / μ l	CRP	0.07 mg/dl
PT	91.3 %	IgG	1,229 mg/dl
APTT	26.9 sec.	IgA	225 mg/dl
Blood Type	Type A, RhD (+)	IgM	197 mg/dl
DAT	IgG (-), C3d (+)	CH50	33 U/ml
IAT	(-)	C3	93 mg/dl
Mycoplasma antibody	<40 titer	C4	10 mg/dl
Cold agglutinin	4,096 titer	ANA	<40 titer

Abbreviation: ANA; anti-nuclear antibody, DAT, direct antiglobulin test; IAT, indirect antiglobulin test

ず、また骨髓検査では細胞形態異常を認めなかった。患者血液検体は冷蔵(4℃)保存にて凝集し、一塊となってペースト状を呈した (Fig. 1-B)。これは常温への再

加温で再びほぐれ、連鎖形成やフィブリン凝固塊とは異なったものと判断した。

これらの結果から、溶血性貧血の診断基準 (厚生労

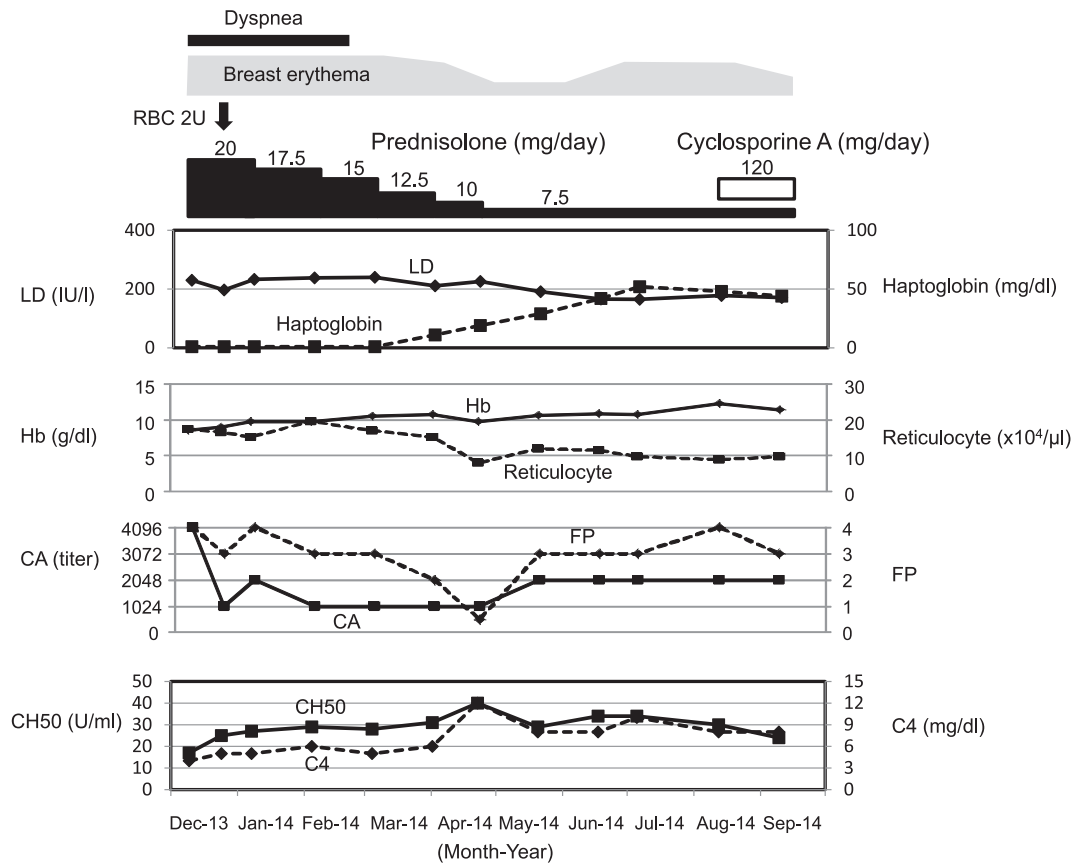


Fig. 2 Clinical course

Horizontal axis shows date (month/year).

Abbreviation: RBC, Red blood cell concentration; LD, Lactate dehydrogenase; Hb, Hemoglobin; CA, Cold agglutinin; FP, Grade of false positive using column agglutination technology

働省 特発性造血障害に関する調査研究班, 平成 16 年度改定)において溶血性貧血と診断した³⁾. また直接抗グロブリン試験陽性, 検体の冷却時の凝集と加温での可逆的消失, 寒冷凝集素価の上昇より, 自己免疫性溶血性貧血の診断基準 (厚生労働省 特発性造血障害に関する調査研究班, 平成 22 年度一部改定)を踏まえて CAD と診断した³⁾. 鑑別では発作性寒冷血色素尿症 (Paroxysmal cold hemoglobinuria: PCH) があげられるが, 検尿所見と DL 抗体陰性から同疾患は否定的と判断した. なお慢性の経過であり, 造血器悪性腫瘍や膠原病, 感染症などの基礎疾患を認めないことから, 特発性慢性寒冷凝集素症と診断した.

治療 (Fig. 2) では免疫抑制療法として 2013 年 12 月よりステロイド投与 (Prednisolone: PSL 20mg/日) を開始するも, 直後には息切れが目立ち, 溶血性貧血の進行 (Hb 8.5g/dl, 間接ビリルビン 3.32mg/dl) と胸部紅斑の悪化を認めた. そのため赤血球濃厚液 2 単位の投与を 12 月下旬に行った. 2014 年に入り溶血所見の軽減と貧血の改善を認めており, PSL 投与量は漸減とした. 同年 4 月下旬には胸部紅斑の軽減を認め, PSL は 7.5mg/日まで減量できた. しかし同年 6 月には胸部

紅斑の再出現を認めた. 夏季であるため, また PSL の副作用を懸念して同薬を増量せず経過を観察したが, 同年 8 月にて明らかな紅斑の改善を認めなかったため Cyclosporine A 120mg/日の内服を追加した. その後同年 9 月に胸部紅斑はやや軽減を認めた.

免疫抑制療法開始後の検査値については, 溶血所見のうちハプトグロビンは 2014 年 4 月より検出可能でありその後は上昇を認め, また LD は低下傾向を認めた. Hb 値も概ね上昇を認めており, 溶血性貧血はコントロールできていると判断した. 2014 年 4 月下旬には網赤血球数 $7.8 \times 10^4/\mu\text{l}$ (網赤血球比率 2.8%) と著しく低下した. その後網赤血球数はやや増加し $10 \times 10^4/\mu\text{l}$ 前後で推移した (網赤血球比率は 3~4% で推移). 補体値の変動については, 2014 年 4 月下旬に CH50 は 40U/ml, C4 は 12mg/dl と一過性に増加を認めている. その後補体値はやや低下傾向のまま推移している. 一方寒冷凝集素価の変動は 1,024~2,048 倍を推移した.

本症例での ABO 血液型判定は一晚冷蔵にて冷式抗体を自己赤血球にて吸着させて裏検査を行い, 表・裏検査一致で A 型と判定した. CAT での裏検査の偽陽性判定値の評価法は, 検体を血液型検査裏検査として Auto-

Vue Innova[®] (Ortho Clinical Diagnostics, USA) を用いて行い、メーカー推奨の方法で判定した。本症例の患者血液型は A 型 RhD 陽性であり、通常では A₁ 赤血球試薬のカラムには凝集がみられない。しかし本症例では A₁ 赤血球試薬のカラムに凝集が見られており、その程度を偽陽性反応として半定量評価を試み 0.5+~4+ の段階で表したが、判定は ACD カメラ下での自動機器による判定のもと行われた。今回用いた CAT での偽陽性の代表的な判定例を Fig. 1-C に示す。症例経過では治療開始時に 3+~4+ であったが、2014 年 4 月下旬では 0.5+ と著明に低下し、その後は 3+ 程度で推移している (Fig. 2)。以上の結果から裏検査の偽陽性値の低下は補体上昇と関連していると判断した。

考 察

自己免疫性溶血性貧血の原因となる抗体のうち冷式抗体による溶血は主に CAD と PCH で見られる。特発性の CAD は溶血性貧血全体の 13~15% 程度を占める⁴⁾⁵⁾。CAD の症状は先端チアノーゼ (acrocyanosis) やレイノー様症状及び貧血などであり、これらは血管外もしくは血管内溶血を反映したものである。CAD の溶血の原因は IgM 型の自己抗体である寒冷凝集素が高濃度に存在し、体温以下の温度で赤血球を凝集させることにある⁴⁾⁶⁾。治療はステロイドを含む免疫抑制療法の効果は乏しく、ステロイド治療の奏効率は 14% 以下と報告されている⁷⁾。しかし有効な治療薬が少ないことから同治療が試行されることがあり、本例では寒冷暴露を避ける指導をしつつステロイドを含む免疫抑制療法を施行した。なお Rituximab は半数以上の症例で奏効率が期待できるが⁴⁾、現在では国内での保険適応がないため施行しなかった。

寒冷凝集素は一般に 0°C~4°C で最大活性を示し、四肢末端部にて補体と共に赤血球表面と結合する。赤血球が体幹部に戻るにつれて結合していた寒冷凝集素は離れるが、補体は結合したままであり古典経路の活性化を介して血管外溶血を起こす。補体の中でも特に C4 の消費が著しい⁸⁾。寒冷凝集素価と溶血所見との関連については、両者は必ずしも相関しないとされる。寒冷刺激で補体が消費されると補体は枯渇するが、この時期にはむしろ溶血所見は乏しいこともある。その原因として C4 の枯渇が補体系全体の活性を抑制して顕性の溶血発作が抑制され、その後の補体の回復時期に溶血発作が促進されると推測されている⁹⁾¹⁰⁾。

本症例の症状は紅斑及び貧血であった。溶血所見ならびに貧血の状態は免疫抑制療法開始後にやや改善傾向を認めたが、補体値の変動は貧血が改善したあとも変動した。寒冷暴露がなくなる 2014 年 5 月以降においても補体 C4 は基準値以下であり補体の活性化が示唆さ

れることや、網赤血球数が高値であることから軽度の溶血は遷延していると考えられる。裏検査偽陽性反応の程度は網赤血球や補体値 (CH50, C4) と連動する傾向にあった。この結果は補体測定が CAD の病勢把握に有用であるとの報告⁸⁾を支持する。赤血球抗原と結合している寒冷凝集素の多い状態では補体消費が亢進して補体低下を認めると推測される。そのため裏検査偽陽性の程度を評価することは疾患活動性を把握する上で有用であると推測する。寒冷凝集素が溶血を引き起こす条件としては、寒冷凝集素の作用温度域が重要とされ、22°C±10°C が最も溶血を起こしやすい温度とされる¹¹⁾。なお寒冷凝集素の反応温度域が広い場合は寒冷凝集素価が低くても溶血症状が強い場合があり、低力価寒冷凝集素症 (low titer cold agglutinin disease) として知られる¹²⁾。今回我々は CAT で裏検査の検討を行ったが、実際の測定温度は検査室の温度 (25°C~28°C の間でほぼ一定) であり、それは機械が正常に作動する範囲であった。室温付近での赤血球と抗体との反応態度を観察することは、臨床的に有意義な温度領域での抗体結合能を評価していると考えられる。そのため CAT を用いた裏検査偽陽性の程度評価は寒冷凝集素価よりも疾患の活動性をより正確に反映していると推定され、同指標は機器での測定であるために検査者による差異が無い点で優れていると考えられる。一症例の検討であるため、今後症例数を重ねた解析が必要と考えられる。

著者の COI 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

文 献

- 1) Gertz MA: Cold hemolytic syndrome. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 19—23, 2006.
- 2) *Blood Bank Procedures (OCD-809E7)*, オートン・クリニカル・ダイアグノスティック, 東京.
- 3) 小澤敬也：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の参照ガイド. 平成 22 年度改訂版, 2011, 141—176.
- 4) Berentsen S: How I manage cold agglutinin disease. *Br J Haematol*, 153: 309—317, 2011.
- 5) Sokol RJ, Hewitt S, Stamps BK: Autoimmune haemolysis: an 18-year study of 865 cases referred to a regional transfusion centre. *Br Med J (Clin Res Ed)*, 282: 2023—2027, 1981.
- 6) Nydegger UE, Kazatchkine MD, Miescher PA: Immunopathologic and clinical features of hemolytic anemia due to cold agglutinins. *Semin Hematol*, 28: 66—77, 1991.

- 7) Swiecicki PL, Hegerova LT, Gertz MA: Cold agglutinin disease. *Blood*, 122: 1114—1121, 2013.
- 8) Ulvestad E, Berentsen S, Bo K, et al: Clinical immunology of chronic cold agglutinin disease. *Eur J Haematol*, 63: 259—266, 1999.
- 9) Ulvestad E: Paradoxical haemolysis in a patient with cold agglutinin disease. *Eur J Haematol*, 60: 93—100, 1998.
- 10) Ulvestad E, Berentsen S, Mollnes TE: Acute phase haemolysis in chronic cold agglutinin disease. *Scand J Immunol*, 54: 239—242, 2001.
- 11) Schubothe H: The cold hemagglutinin disease. *Semin Hematol*, 3: 27—47, 1966.
- 12) Schreiber AD, Herskovitz BS, Goldwein M: Low-titer cold-hemagglutinin disease. Mechanism of hemolysis and response to corticosteroids. *N Engl J Med*, 296: 1490—1494, 1977.

EVALUATION OF CHRONIC PRIMARY COLD AGGLUTININ DISEASE ACTIVITY BY MEANS OF COLUMN AGGLUTINATION TECHNOLOGY

*Takako Tomita*¹⁾, *Hiromi Hashimoto*¹⁾, *Kazuko Konishi*¹⁾, *Hiromi Fujimoto*¹⁾, *Kazuhide Morimoto*¹⁾, *Yoshinori Kubota*¹⁾, *Sonoko Hirayama*²⁾, *Yousuke Minami*³⁾, *Shinya Ohata*⁴⁾, *Kunio Gan*⁵⁾ and *Takeshi Sugimoto*⁴⁾

¹⁾Division of Laboratory Medicine, Kita-Harima Medical Center

²⁾Department of Cardiology, Kita-Harima Medical Center

³⁾Division of Transfusion Medicine, Kobe University Hospital

⁴⁾Department of Hematology and Oncology, Kita-Harima Medical Center

⁵⁾Department of Cardiovascular Surgery, Kita-Harima Medical Center

Abstract:

Background: We investigated the clinical course of one case to determine whether or not the level of false positive reaction detected with column agglutination technology (CAT) reflects the activity of primary chronic cold agglutinin disease (CAD).

Case: An 80-year old woman was diagnosed with primary chronic CAD, complicated with anemia and erythema of the breast. Oral prednisolone and cyclosporine A were used for immunosuppressive therapy. During the clinical course, erythema of the breast improved transiently but then became exacerbated again. The complement titer increased transiently, and the change in the complement level was linked with the activity of erythema. False positive levels on reverse typing test detected with CAT decreased when the complement level was suppressed, whereas the cold agglutinin titer showed limited change.

Discussion: We detected a false positive reaction on reverse typing test by means of CAT, the temperature of which was between 25 and 28°C. Investigation of the reaction between red blood cells and antibodies in this thermal range seems to be effective and feasible for the evaluation of the capability of the antigen-antibody complex. We speculate that detection of a false positive reaction on reverse typing test by means of CAT does indeed reflect the activity of primary chronic CAD.

Keywords:

Primary chronic cold agglutinin disease, Column agglutination technology