

## 骨髓異形成症候群に合併したクームス陰性自己免疫性溶血性貧血

永井 正<sup>1)6)</sup> 上原 英輔<sup>1)</sup> 齊藤 桐子<sup>2)</sup> 亀崎 豊実<sup>3)</sup> 小澤 敬也<sup>4)</sup>

室井 一男<sup>5)</sup> 神田 善伸<sup>1)2)</sup>

骨髓異形成症候群 (MDS) は、造血不全と造血腫瘍の特徴を併せ持つ疾患である。造血不全の一因として免疫機構の異常が指摘されており、実際、10~30% の症例で自己免疫疾患の合併を認める。一方、自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) は成熟赤血球に対する自己抗体産生に起因しており、通常は直接クームス試験が陽性となる。しかしながら、一部に直接クームス試験陰性の AIHA が存在し、その場合は赤血球結合 IgG 分子数の決定が診断に重要である。今回、MDS にクームス陰性 AIHA を合併した症例を経験した。MDS に対して DNA メチル化阻害薬 azacitidine の投与を行ったところ、造血不全の著明な改善、末梢血芽球の消失および MDS の進行マーカーである WT1 mRNA の低下を認めた。興味深いことに、azacitidine 療法の過程で溶血所見が著明に改善し、azacitidine により AIHA も同時に改善したものと考えられた。MDS に溶血性貧血を合併した例では、直接クームス試験陰性の場合もクームス陰性 AIHA を疑う必要がある。また、azacitidine が AIHA を改善する可能性があり、その機序の解明が期待される。

キーワード：骨髓異形成症候群，クームス陰性自己免疫性溶血性貧血，アザシチジン，赤血球結合 IgG

### 緒言

骨髓異形成症候群 (MDS) は造血幹細胞レベルの異常に起因する造血器疾患の一つである。無効造血による血球減少と異常クローンの存在による前白血病状態という特徴を有しており、造血不全に対しては免疫機構の障害の関与が指摘されている<sup>1)</sup>。免疫抑制療法により血球減少が改善する場合があるが、芽球比率の高い高リスク例に対しては DNA メチル化阻害薬である azacitidine あるいは抗白血病薬による化学療法が主として考慮される。また、造血幹細胞移植も有力な選択肢の一つである。

自己免疫性溶血性貧血 (AIHA) は成熟赤血球に対する自己抗体産生に起因する溶血性貧血であり、基礎疾患を有しない特発性と自己免疫性疾患、リンパ増殖性疾患、感染症などの基礎疾患を有する続発性とに分類される。一般的には副腎皮質ステロイドが治療の中心となるが、治療抵抗例に対しては免疫抑制剤や脾摘も考慮される<sup>2)</sup>。多くの AIHA 症例では直接クームス試験

が陽性となるが、一部、直接クームス試験陰性例が存在する。クームス陰性 AIHA では、自己抗体のレベルが低いために、通常の血清学的方法で自己抗体を検出することができない。従って、診断には赤血球結合 IgG 分子数の増加を証明することがきわめて重要である<sup>3)</sup>。一方、クームス陽性例はクームス陰性例と比較して赤血球結合 IgG 分子数が非常に多く、また溶血も高度であることが報告されている<sup>4)</sup>。

MDS 患者では免疫機構の障害が指摘されており、10~30% の MDS 症例で AIHA など様々な自己免疫疾患の合併が認められる<sup>1)5)~7)</sup>。しかしながら、クームス陰性 AIHA の合併例は極めて稀である<sup>8)</sup>。今回、クームス陰性 AIHA を合併した MDS 症例を経験した。興味深いことに、azacitidine 療法のみで MDS のみならず AIHA による溶血所見も著明に改善した。

### 症例

70 歳、女性。平成 25 年 3 月、全身倦怠感、息切れを

1) 自治医科大学附属病院血液科  
2) 自治医科大学附属さいたま医療センター血液科  
3) 自治医科大学地域医療学センター  
4) 東京大学医科学研究所附属病院  
5) 自治医科大学附属病院輸血・細胞移植部  
6) 現：日本赤十字社中央血液研究所  
〔受付日：2015 年 1 月 8 日，受理日：2015 年 4 月 8 日〕

Table 1 Laboratory data of the patient before azacitidine treatment

WBC	3,300 / $\mu$ l	CRP	0.11 mg/dl	Fe	286 $\mu$ g/dl
Bl.	4.0 %	TP	7.0 g/dl	Ferritin	369.1 ng/ml
Stab.	3.0 %	Alb	4.1 g/dl	Vit B12	653.8 pg/ml
Seg.	45.0 %	Cr	0.47 mg/dl	Folic acid	6.5 ng/ml
Mono.	4.0 %	UA	5.1 mg/dl	IgG	1,355 mg/dl
Lym.	44.0 %	Total-bilirubin	4.82 mg/dl	IgA	306 mg/dl
RBC	$191 \times 10^4$ / $\mu$ l	Direct-bilirubin	0.18 mg/dl	IgM	83 mg/dl
Hb	6.9 g/dl	AST	54 mU/ml	WT1 mRNA	21,000 copies/ $\mu$ g RNA
Ht	20.8 %	ALT	35 mU/ml		
Platelets	$7.1 \times 10^4$ / $\mu$ l	LDH	484 mU/ml		
Reticulocyte	4.6 %	ALP	174 mU/ml		
IPF	5.1 %	Na	142 mmol/ml		
APTT	27.6 sec.	K	3.6 mmol/ml		
Fib.	259 mg/dl	Cl	109 mmol/ml		
FDP	2.0 $\mu$ g/ml	Ca	8.6 mg/dl		
D-dimer	0.4 $\mu$ g/ml				

IPF: Immature platelet fraction WT1: Wilms tumor gene

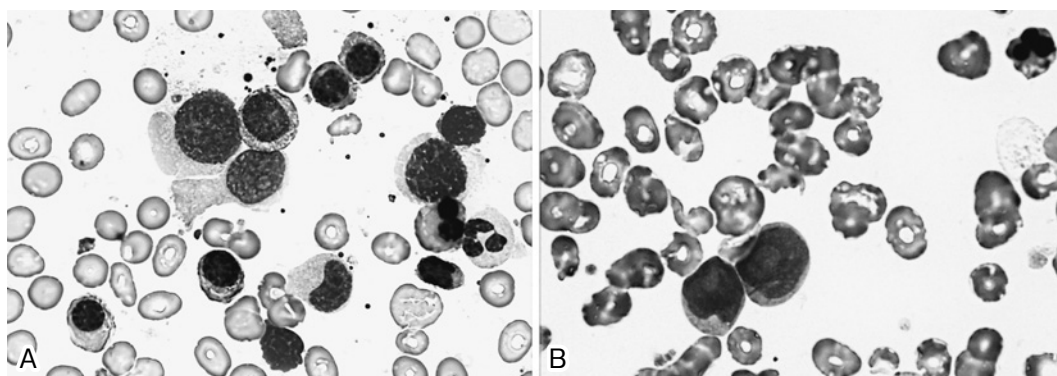


Fig. 1 Bone marrow aspiration at the time of diagnosis. (A) The bone marrow showed an increase in numbers of erythroblasts (Wright-Giemsa, original magnification  $\times 600$ ). (B) An erythroblast containing three nuclei and two myeloblasts are shown (Wright-Giemsa, original magnification  $\times 600$ ).

Table 2 Hemolysis-related examination findings

Direct Coombs test	(-)
Indirect Coombs test	(-)
Specific direct-coombs	
anti-IgG	(-)
anti-IgA	(-)
anti-IgM	(-)
anti-C3b3d	(-)
Cold agglutinin	$\times 64$
Ham test	(-)
Sugar-water test	(-)
Haptoglobin	$< 10$ mg/dl
Erythrocyte-associated IgG	203 molecules/RBC
	(normal range: $33 \pm 13$ molecules/RBC)

主訴に近医受診し、血液検査および骨髄検査により骨髄異形成症候群(MDS)が疑われて当科紹介受診した。当科入院時所見では汎血球減少を認め、末梢血に芽球を4%認めた(Table 1)。また、骨髄検査の結果は赤芽球過形成で、芽球を10.5%認めるとともに多核赤芽球

および軽度の巨赤芽球様変化を認めた(Fig. 1)。Qバンド分染法による染色体分析では正常核型であった。以上よりMDS(RAEB-2)と診断した。一方、間接ビリルビン優位の血清ビリルビン値の増加、網状赤血球増加およびハプトグロビン値の低下を認め、骨髄所見でも赤芽球の著明な増加を認めたことから、MDSに伴う無効造血あるいは溶血性貧血の合併が疑われた。Ham test, Sugar-Water test および Flowcytometry による好中球あるいは赤血球中CD55/CD59陰性細胞の解析の結果から、発作性夜間血色素尿症は否定的であった。さらに、球状赤血球や楕円赤血球等の形態異常も認めず、脾腫も認めなかった。一方、直接・間接クームス試験は共に陰性であり、特異的 direct クームス試験でも陽性所見が得られなかった。しかしながら、immunoradiometric assay 法<sup>9)</sup>で赤血球結合IgG分子数を測定したところ、203分子/赤血球と著明に増加していた(成人正常値： $33 \pm 13$ 分子/赤血球)(Table 2)。この結果から、クームス陰性AIHAを合併しているものと結論された。

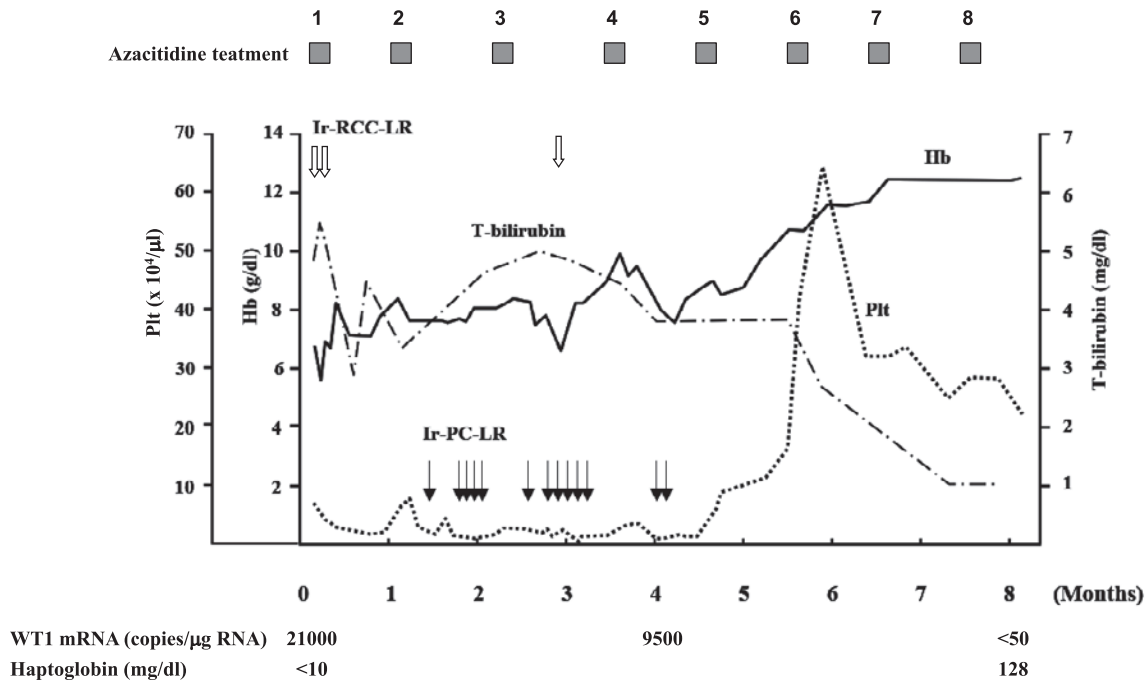


Fig. 2 Clinical course  
 Ir-RCC-LR: Irradiated red cells concentrates-leukocytes reduced  
 Ir-PC-LR: Irradiated platelet concentrates-leukocytes reduced  
 Plt: Platelet

MDSについては国際予後判定基準 (IPSS) の Intermediate-2(Int-2)に該当しており、ただちに azacitidine 75mg/m<sup>2</sup>(day1~7, 第二クールより day1~5)の投与を開始した。一方、クームス陰性 AIHA に対しては感染症のリスクを考慮し、副腎皮質ステロイド剤や免疫抑制剤の投与を行わずに経過をみることにした。Azacitidine 療法第2クール施行後より、汎血球減少の増悪がみられて頻回の血小板輸血を必要としたが、第4クール施行後からは血小板数の著明な改善を認めた (Fig. 2)。同様に、好中球数および Hb 値についても第5クール施行後より改善傾向を認めた。濃厚赤血球輸血は3回 (計6単位)行ったが、輸血反応性は良好であった。経過とともに、当初より末梢血に認められていた芽球も消失し、著明な高値を示していた WT1 mRNA 量も感度以下にまで低下した (Fig. 2)。一方, azacitidine 療法第6クール終了後に総ビリルビン値および網状赤血球数の改善を認め、第7クール施行後からは共に正常値となった。さらに、ハプトグロビン値も第8クール終了後の再検で 128mg/dl と正常値に回復していた。従って、azacitidine 療法により、MDSのみならず溶血所見も著明に改善したと考えられた。第22クールを終了した時点で、白血球数 7,200/ $\mu$ l (芽球 0%), 赤血球数  $434 \times 10^4$ / $\mu$ l, Hb 値 12.9g/dl, 網状赤血球 0.8%, 血小板数  $14.4 \times 10^4$ / $\mu$ l, 総ビリルビン値 1.2mg/dl と MDS および溶血所見の再燃を認めておらず、また、赤血球

結合 IgG 分子数も 20 分子/赤血球と基準値内になっている。

考 察

MDS の病態には免疫機構の異常が深く関わっている。従って、MDS は自己抗体が比較的産生されやすい病態と理解されており、実際、34% の MDS 症例で自己抗体が検出されると報告されている<sup>5)</sup>。MDS 患者における自己抗体産生の詳細な機序は明らかではないが、炎症性サイトカインの過剰産生など免疫応答システムの障害に起因すると類推されている<sup>5)10)</sup>。また、国内外の報告では 10~30% の MDS 症例に様々な自己免疫疾患の合併が認められている<sup>5)~7)</sup>。合併しうる自己免疫疾患には AIHA も含まれ、国内における MDS153 症例の解析では、AIHA の合併例は 3.3% と報告されている<sup>7)</sup>。

一方、クームス陰性 AIHA を合併した MDS 症例は極めて稀であり、本症例の他には限られた報告しかない<sup>6)8)</sup>。しかしながら、一部の MDS 症例において、クームス陰性 AIHA を発症しうる自己赤血球抗体の存在が示唆されている。直接クームス試験が陽性となるには赤血球結合 IgG 分子数が 250 分子/赤血球以上必要と考えられるが、一方、赤血球結合 IgG 分子数が 150 分子/赤血球前後あればクームス陰性 AIHA を起こし得ると推測されている<sup>9)</sup>。Shichishima らは 52 例の MDS 症例を解析し、血清ハプトグロビン値 42mg/dl 未満であっ

た20例のうち17例について赤血球結合IgG分子数を検討した。全例がクームス陰性であったが、5例で赤血球結合IgG分子数が100分子/赤血球を超えていた<sup>11)</sup>。従って、臨床的にクームス陰性AIHAと診断されない場合であっても、実際にはAIHAの病態を有しているMDS症例が一定数存在していることが推測される。本症例は、クームス試験が陰性ではあったが、赤血球結合IgG分子数が203/赤血球と高値であり、十分にAIHAを発症しうるレベルであった。さらにAIHA以外の溶血性貧血を示唆する所見も認められなかった。MDSに対するAIHAの合併頻度を考慮すると、たとえクームス試験陰性であっても、AIHAを疑う所見が認められる場合には赤血球結合IgG分子数を検討することが重要と思われる。

本症例では、総ビリルビン値が高値を示した時期でも輸血を必要とするほどの貧血は稀であり、実際、赤血球輸血は3回施行したのみであった。しかしながら、Hb値は8g/dl前後と低いレベルであり、azacitidine療法第5クール以降はビリルビン値の低下と共にHb値の著明な改善を認めている。従って、総ビリルビン値が高値を示していた時期は、溶血の影響により低いHb値が続いていたものと考えられる。

また、3回の赤血球輸血に対する反応は良好であった。自己抗体陽性の場合、自己抗体のドナー血球に対する反応や不規則抗体の存在によって、ドナー血球が溶血する可能性が指摘されている。一方で、実際のAIHA症例では、赤血球輸血直後の溶血頻度の増加を認めなかったとの報告もなされている<sup>12)</sup>。本症例でも、赤血球輸血直後における高度の溶血が誘発されなかったと思われる。

AIHAに対しては副腎皮質ステロイドが主に試みられ、治療抵抗例に対してはシクロスポリンなどの免疫抑制剤や脾摘が選択肢となる。また、抗体産生B細胞の抑制を目的としたrituximabの有効性も注目されている<sup>2)</sup>。MDSに合併したAIHAに対しても同様の治療が選択される。そもそも血球減少が病態の中心である低リスクMDS症例に対しては、抗ヒト胸腺細胞免疫グロブリンやシクロスポリン等による免疫抑制療法が有力な治療選択肢であることから、免疫抑制療法によりMDSとAIHAが同時に改善する可能性がある。しかしながら、本症例はIPSS基準でInt-2に分類されたMDSであるため、免疫抑制療法ではなくDNAメチル化阻害薬のazacitidineを選択した。さらに、致死的感染症の合併リスクを考慮した結果、AIHAに対しても免疫抑制療法を行わなかった。本症例においてazacitidineはMDSに対する大きな効果を示し、汎血球減少の改善、末梢血芽球の消失およびMDSの進行マーカーであるWT1 mRNAの著明な低下がみられた。さらに、azaci-

tidine療法の過程でAIHAによる溶血所見も著明に改善した。本症例における貧血の改善についてはMDSに対する効果が影響している可能性があるが、溶血所見の著明な改善も大きく寄与していると思われる。一方、診断当初より幼若血小板の増加を認めなかったことから、血小板減少については自己免疫性の機序は考えにくい。従って、azacitidine療法後の血小板数の回復はMDSの改善によるものと思われる。

本症例におけるazacitidine療法開始後のAIHA改善機序はたいへん興味深い。Azacitidine療法により造血が3系統とも改善していることから、azacitidineの抗腫瘍細胞効果によって造血クローンの変化が生じたと考えられる。さらに、造血の回復とともに溶血所見が改善していることから、造血クローンの変化に伴い自己抗体が反応しない赤血球が増加した可能性がある。

一方、azacitidineについては、腫瘍細胞に対する直接的な細胞傷害の他に免疫系への作用も注目されている。実際、限られた数ではあるが、azacitidine投与によりMDSに合併した自己免疫疾患が改善した例が報告されている<sup>13)14)</sup>。また、azacitidineがT細胞の増殖・活性化を抑制することや<sup>15)</sup>、FOXP3発現制御性T細胞の増加を誘導し、結果としてヘルパーT細胞による炎症性サイトカインの産生を抑制することも報告されている<sup>16)</sup>。残念ながら、本症例ではazacitidine療法前後におけるT細胞数やサイトカイン濃度の変化を確認していないが、azacitidineによる免疫機構への作用が最終的にAIHAの改善をきたした可能性も否定できない。

クームス陰性AIHAを合併したMDSは稀ではあるが、MDSにおける自己赤血球抗体産生例は一定の頻度で存在すると考えられ、その病態の解明が待たれる。また、本症例はazacitidine療法によってAIHAも同時に改善する可能性を示しており、今後の治療戦略を考える上で興味深い。さらなる症例の積み重ねによって、MDSにおけるAIHA合併の詳細な機序とazacitidineのMDSに合併したAIHAに対する作用機序を明らかにすることが重要と思われる。

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) Voulgarelis M, Giannouli S, Ritis K, et al: Myelodysplasia-associated autoimmunity: clinical and pathophysiological concepts. *Eur J Clin Invest*, 34: 690–700, 2004.
- 2) Zanella A, Barcellini W: Treatment of autoimmune hemolytic anemias. *Haematologica*, 99: 1547–1554, 2014.

- 3) Kamesaki T, Oyamada T, Omine M, et al: Cut-off value of red-blood-cell-bound IgG for the diagnosis of Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia. *Am J Hematol*, 84: 98—101, 2009.
- 4) Kamesaki T, Toyotsuji T, Kajii E: Characterization of direct antiglobulin test-negative autoimmune hemolytic anemia: A study of 154 cases. *Am J Hematol*, 88: 93—96, 2013.
- 5) Braun T, Fenaux P: Myelodysplastic Syndromes (MDS) and autoimmune disorders (AD): cause or consequence? *Best Pract Res Clin Haematol*, 26: 327—336, 2013.
- 6) Saif MW, Hopkins JL, Gore SD: Autoimmune phenomena in patients with myelodysplastic syndromes and chronic myelomonocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*, 43: 2083—2092, 2002.
- 7) Shimamoto T, Ohyashiki K: Immunosuppressive treatments for myelodysplastic syndromes. *Leuk Lymphoma*, 44: 593—604, 2003.
- 8) 田村 周, 紺屋浩之, 宮崎栄二, 他: Coombs 陰性自己免疫性溶血性貧血を合併した Myelodysplastic Syndrome の 1 例. *臨床血液*, 32: 132—136, 1991.
- 9) 亀崎豊実, 梶井英治: 自己免疫性溶血性貧血の免疫学的検査. *臨床検査*, 47: 1177—1185, 2003.
- 10) Oren H, Uçar C, Gülen H, et al: Autoimmune hemolytic anemia occurring with myelodysplastic syndrome: report of a pediatric case and review of the literature. *Ann Hematol*, 80: 540—542, 2001.
- 11) Shichishima T, Ikeda K, Takahashi N, et al: Low concentration of serum haptoglobin has impact on understanding complex pathophysiology in patients with acquired bone marrow failure syndromes. *Int J Hematol*, 91: 602—610, 2010.
- 12) Salama A, Berghofer H, Mueller-Eckhardt C: Blood transfusion in warm-type autoimmune haemolytic anaemia. *Lancet*, 340: 1515—1517, 1992.
- 13) Pilorge S, Doleris LM, Dreyfus F, et al: The autoimmune manifestations associated with myelodysplastic syndrome respond to 5-azacytidine: a report on three cases. *Br J Haematol*, 153: 664—665, 2011.
- 14) Tanaka H, Shimizu N, Tougasaki E, et al: Successful treatment by azacitidine therapy of intestinal Behçet's disease associated with myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*, 97: 520—524, 2013.
- 15) Sánchez-Abarca LI, Gutierrez-Cosio S, Santamaría C, et al: Immunomodulatory effect of 5-azacytidine (5-azaC): potential role in the transplantation setting. *Blood*, 115: 107—121, 2010.
- 16) Aggarwal S, van de Loosdrecht AA, Alhan C, et al: Role of immune responses in the pathogenesis of low-risk MDS and high-risk MDS: implications for immunotherapy. *Br J Haematol*, 153: 568—581, 2011.

## COOMBS-NEGATIVE AUTOIMMUNE HEMOLYTIC ANEMIA ASSOCIATED WITH MYELODYSPLASTIC SYNDROME

Tadashi Nagai<sup>1)6)</sup>, Eisuke Uehara<sup>1)</sup>, Kiriko Saito<sup>2)</sup>, Toyomi Kamesaki<sup>3)</sup>, Keiya Ozawa<sup>4)</sup>, Kazuo Muroi<sup>5)</sup> and Yoshinobu Kanda<sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>Division of Hematology, Jichi Medical University Hospital

<sup>2)</sup>Division of Hematology, Saitama Medical Center, Jichi Medical University

<sup>3)</sup>Center for Community Medicine, Jichi Medical University Hospital

<sup>4)</sup>Research Hospital, The Institute of Medical Science, The University of Tokyo

<sup>5)</sup>Division of Cell Transplantation and Transfusion, Jichi Medical University Hospital

<sup>6)</sup>Present address: Central Blood Institute, Japanese Red Cross Society

### **Abstract:**

Myelodysplastic syndrome (MDS) is a hematopoietic disorder characterized by both bone marrow failure and hematopoietic malignancies. It has been shown that autoimmune diseases accompany MDS in 10%-30% of patients. Autoimmune hemolytic anemia (AIHA) is caused by production of autoantibodies against mature erythrocytes, and is diagnosed using the direct Coombs test. Although rare, there are Coombs-negative AIHA patients. In these cases, determination of the level of erythrocyte-associated IgG is critical for diagnosis. Here, we present a case of Coombs-negative AIHA associated with MDS. We treated the patient with the DNA demethylating agent azacitidine for MDS, and consequently, pancytopenia was markedly improved. In addition, myeloblasts in peripheral blood disappeared and the level of Wilms tumor gene mRNA, a marker of MDS progression, became undetectable. Interestingly, during the courses of azacitidine treatment, hemolysis markedly improved, suggesting that azacitidine was also effective in treating AIHA. Coombs-negative AIHA is rare, but it is important to evaluate erythrocyte-associated IgG if the direct Coombs test is negative in patients with hemolytic anemia associated with MDS. Our findings in the present case also suggest the efficacy of azacitidine for AIHA, and thus it is of interest to clarify the mechanism underlying the effect of azacitidine.

### **Keywords:**

myelodysplastic syndrome, Coombs-negative autoimmune hemolytic anemia, azacitidine, erythrocyte-associated IgG