

溶血性貧血として筆者らの検査室に検査の依頼がある赤血球膜異常症症例が増えていることなど、

現在実施している CNSHA のスクリーニング検査について概説する。

先天性溶血性貧血の診断チャート

表 1¹⁾に溶血性貧血の診断基準を示す。筆者らの検査室では、直接抗グロブリン試験(direct antiglobulin test ; DAT)陰性で赤血球表面 IgG(im-

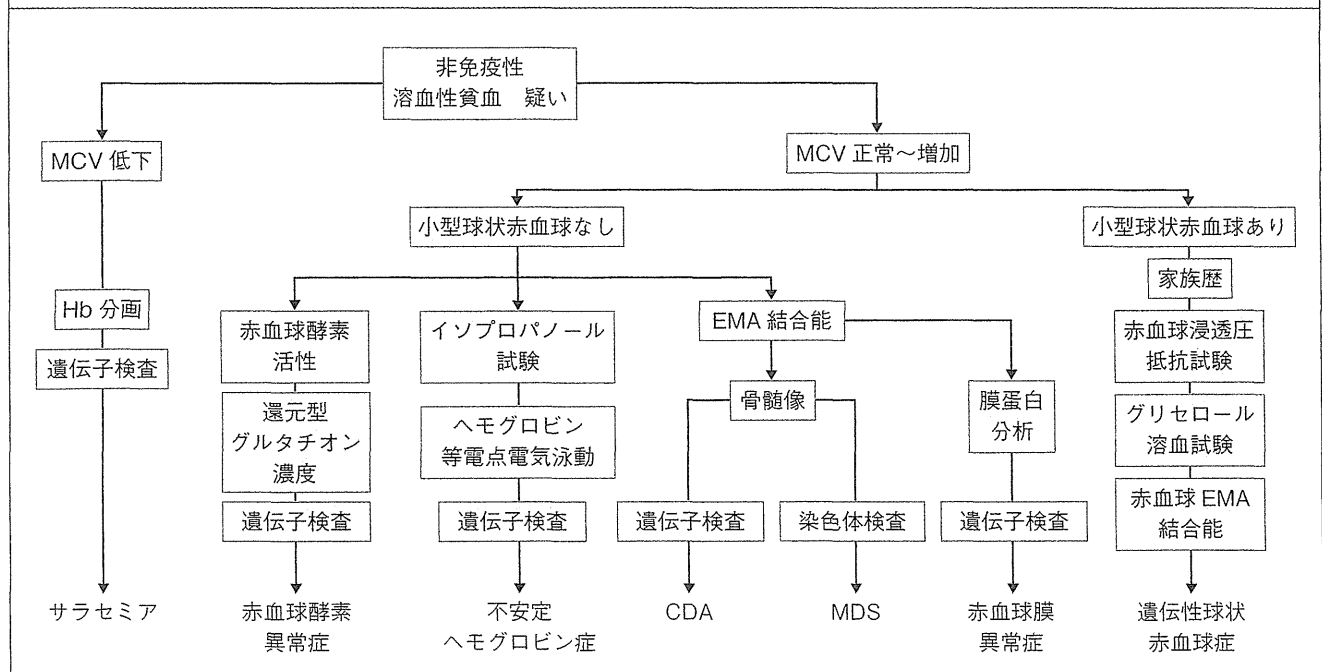
munoglobulin G)分子数の増加も認めず、CD55/CD59 二重陰性赤血球数増加が認められない非免疫性溶血性貧血を対象に、図 1 のチャートで示す

表 1 溶血性貧血の診断基準(厚生労働省研究班による 2004 年度改訂版)

1. 臨床所見として、通常、貧血と黄疸を認め、しばしば脾腫を触知する。ヘモグロビン尿や胆石を伴うことがある。
2. 以下の検査所見がみられる。
 - 1) ヘモグロビン濃度低下
 - 2) 網赤血球増加
 - 3) 血清間接ビリルビン値上昇
 - 4) 尿中・便中ウロビリニン体増加
 - 5) 血清ハプトグロビン値低下
 - 6) 骨髓赤芽球増加
3. 貧血と黄疸を伴うが、溶血を主因としない他の疾患(巨赤芽球性貧血、骨髓異形成症候群、赤白血病, congenital dyserythropoietic anemia, 肝胆道疾患, 体質性黄疸など)を除外する。
4. 1., 2. によって溶血性貧血を疑い, 3. によって他疾患を除外し, 診断の確実性を増す。しかし, 溶血性貧血の診断だけでは不十分であり, 特異性の高い検査によって病型を確定する。

[特発性造血障害に関する調査研究班：自己免疫性溶血性貧血. 特発性造血障害疾患の診療の参照ガイド, p144, 2010(<http://zoketsushogaihan.com/file/AIHA.pdf>)より転載]

図 1 非免疫性溶血性貧血診断フローチャート



直接抗グロブリン試験, 赤血球表面 IgG 分子数, CD55/CD59 二重陰性赤血球検出などの検査項目により非免疫性溶血性貧血がほぼ否定された症例について, 上記のようなフローチャートで診断を進めていく。

MCV : mean corpuscular volume(平均赤血球容積), Hb : hemoglobin, EMA : eosin 5'-maleimide, CDA : congenital dyserythropoietic anemia(先天性赤血球異形成貧血), MDS : myelodysplastic syndrome(骨髓異形成症候群)。

ような諸検査を実施している。

溶血性貧血では、骨髓における赤芽球過形成を反映して網赤血球増加を認めるため、通常平均赤血球容積(mean corpuscular volume; MCV)は正球性～大球性貧血を示す。申込時には、網赤血球数を含む血算、血液生化学検査としてAST (aspartate aminotransferase), ALT (alanine aminotransferase), LDH (lactate dehydroge-

nase), ビリルビン(総・間接), Fe, TIBC (total iron-binding capacity), フェリチン, ハプトグロビンなどを参考にして、慢性溶血の有無を確認する。グルコース-6-リン酸脱水素酵素 (glucose-6-phosphate dehydrogenase; G6PD) 異常症など急性溶血発作で発症する症例では、ヘモグロビン尿や尿中ヘモジデリンの検出が重要である。

末梢血塗抹標本による赤血球形態の確認

溶血性貧血に共通した赤血球形態として、大小不同 (anisocytosis), 多染性 (polychromatophilia) がある。小型球状赤血球は HS や自己免疫性溶血性貧血 (autoimmune hemolytic anemia; AIHA) で観察される。不安定ヘモグロビンが赤血球内で変性して沈殿すると、Heinz 小体と呼ばれる構造が赤血球内に出現する。UHD の重症例では、Heinz 小体の出現により赤血球は変形能が障害され、網内系で赤血球膜の一部が Heinz 小体とともにちぎりとられる。機械的機序で生じる溶血性貧血で認められるような奇形赤血球、破碎赤血球 (schistocyte) が観察される。奇形赤血球、破碎赤血球は赤血球膜異常症の重症型でも認

められる²⁾。

赤血球酵素異常症では、特徴的な赤血球形態を示すことが少ない。ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ (pyrimidine-5'-nucleotidase; P5N) 異常症では、赤血球中にピリミジンヌクレオチドが蓄積し、Wright 染色で赤血球の細胞質に好塩基性斑点 (basophilic stippling) と呼ばれる微細な封入体を観察できる。P5N は鉛により阻害を受けるため、後天性疾患としては鉛中毒の際にも観察される。摘脾後のピルビン酸キナーゼ (pyruvate kinase; PK) 異常症では、ウニ状ないし金平糖状の赤血球 (echinocyte, spiculated erythrocyte) が観察される。

CNSHA 病型診断のための検体採取から検査までの流れ—血液検体の処理

1. 採血量・方法

抗凝固剤(無菌ヘパリン)存在下で発端者(5~10 mL)および健康成人対照(5 mL, 血縁者は不可, 年齢と性別を明記してもらう)から採取した静脈血をすぐに冷所(4°C)に移す。患者と同時に必ず正常対照から採血し、サンプル調製までの保存・輸送条件による測定値の解釈における内的標準とすることで、人為的な検査値の異常の発生をチェックすることができる。120日という赤血球の寿命を考えて、被検者は最低1カ月以上赤血球輸血を受けていないことが必要である。輸血を受けている場合、測定した赤血球酵素活性は輸血された正常赤血球の酵素活性の影響を受け、見掛け上正常活性を呈する可能性があるからである。

2. 輸送

測定場所が遠方の場合には、翌日必着の宅配便

を利用して蓄冷材とともに発泡スチロールの箱に検体を入れてもらう。昨今、宅配便のクール指定が必ずしも確かな温度管理をされていない事例が散見されることから、“4°C指定”のクール便よりも上記の方法が確実である。患者が測定医療機関に直接来院できる際には、受診を促すことも必要である。

検体が蓄冷材に直接接触すると凍結する恐れがあるので、ガーゼなどの緩衝材を入れてもらう。全血のまま4°Cの冷蔵保存では、採血後5日間は酵素活性の低下は認められない。到着後すぐに検体の状態を確認する。夏場など発泡スチロールにドライアイスを入れてしまう例もあり、その場合には赤血球が溶血してしまい、測定不能となるので注意が必要である。

1. イソプロパノール試験

1) 測定意義

異常ヘモグロビン症は、グロビン鎖におけるアミノ酸配列異常の結果、ヘモグロビンの質的変化をきたして発症する一連の疾患群を示す。このなかには、熱あるいはイソプロパノールに対する感受性の亢進を示す例が含まれ、その異常ヘモグロビンを不安定ヘモグロビンと呼ぶ。異常ヘモグロビンのうち、赤血球内での安定性が非常に低く、変性して沈殿することにより溶血を促進させる病態をUHDといい、過去にはHeinz小体溶血性貧血と表現されていた。

従来、自己溶血試験で48時間後に血清が茶褐色になり、孵置後の赤血球にHeinz小体を多数観察する場合、不安定ヘモグロビンの存在が強く疑われるが、現在CNSHAのスクリーニング検査として全例にイソプロパノール試験を行い、不安定ヘモグロビンの有無を確認している。

2) 測定の実際

ヘパリン血からセルロースカラムで白血球・血小板を除去した赤血球沈渣を用いる。

- (1) 赤血球沈渣 500 μ L をガラス製試験管に移し、蒸留水 250 μ L を加えてソニケーションした後、トルエンを 250 μ L 加え、1 分間 vortex する。
- (2) 5 分間室温に放置し、さらにもう 1 回 1 分間 vortex する。
- (3) 3,500 回転、20 分間室温で遠心する。
- (4) 上層のトルエン、中間層の赤血球膜成分を混入しないように溶血液をパスツールピペットで別の試験管に移す。
- (5) イソプロパノール試験用バッファー(イソプロパノール 17 mL, 1M トリス-塩酸バッファー, pH 7.4, 83 mL を混合したもの) 2 mL を分注し、37°C で 5 分間以上保温したガラス製試験管に溶血液 200 μ L を加え、転倒混和する。
- (6) 37°C で孵置し、5 分後、15 分後、30 分後に沈殿の有無を観察する。
- (7) 5 分後に沈殿を認める場合を(+), 15 分後以降に沈殿の析出が観察されたら(±), 30 分で沈殿を認めなかったら(-)と判定する。

3) 結果の解釈

1 歳未満の乳児やサラセミア症例など、ヘモグロビン F(hemoglobin F; Hb F) 濃度の高いサンプルでは 15 分で沈殿を形成することがあり、偽陽性となることがある。東南アジアで高頻度に観察される。

UHD の病態は、代償性溶血、慢性溶血性貧血あるいは急性溶血発作例など多彩な症状をきたす。両親由来の対立遺伝子のどちらか一方に変異がある場合に溶血を起こすため、常染色体優性遺伝形式をとるが、新生変異による発症例では家族歴で溶血性貧血は認められない。

イソプロパノール試験で陽性の場合には、等電点電気泳動(isoelectric focusing; IEF)や遺伝子検査による確定診断が必要である。

2. 還元型グルタチオン定量

1) 測定意義

グルタチオンは、赤血球で最も重要なアンチオキシダントである。図 2 のように初段階でシステイン、グルタミン酸からグルタミルシステイン、次の段階でグリシンが加わり、グルタチオンが形成される。この 2 段階の反応を触媒する酵素が、 γ グルタミルシステイン合成酵素およびグルタチオン合成酵素である。この 2 つの生合成系酵素に異常がある場合には、還元型グルタチオン(glutathione; GSH) 定量で著減が認められる。また、グルタチオン還元酵素(glutathione reductase; GR) 反応の補酵素であるニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NADP) の産生障害を生じる G6PD 異常症でも GSH 濃度は低下する。

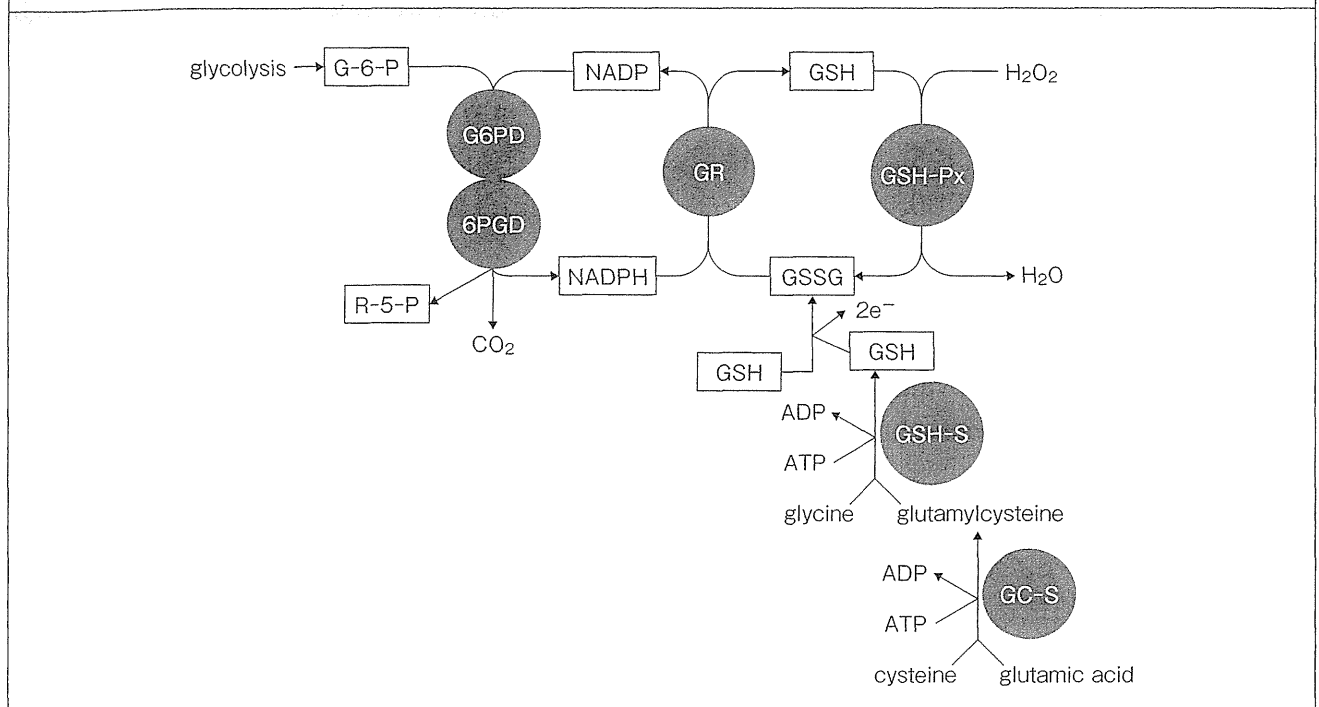
2) 測定原理

SH(sulfhydryl) 基を有する化合物に DTNB [5,5'-dithiobis(2-nitrobenzoic acid)] を加えると DTNB の定量的還元反応が起こり、412 nm に吸収を有する黄色を呈することを利用する。GSH は過剰の DTNB により酸化型グルタチオン(glutathione disulfide; GSSG) となる。

3) 結果の解釈

筆者らの検査室での GSH 正常値は 65.9~88.5

図2 活性低下が先天性溶血性貧血の原因となるグルタチオン生成・還元系酵素



青地白抜きで示す6種の酵素活性低下が先天性溶血性貧血の原因となることが知られている。

G-6-P: glucose-6-phosphate, NADP: nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, NADPH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, GSH: glutathione, GSSG: glutathione disulfide, R-5-P: ribose 5-phosphate, G6PD: glucose-6-phosphate dehydrogenase, 6PGD: 6-phosphogluconate dehydrogenase, GR: glutathione reductase, GSH-Px: glutathione peroxidase, GSH-S: glutathione synthetase, GC-S: γ -glutamylcysteine synthetase.

(M \pm SD)である。前述の通り、グルタチオン合成系、還元系障害で低下する以外にも、赤血球内酸化ストレスの増大をきたすさまざまな病態で低下するため、特異性は低い。一方、P5N異常症、一部のMDSではその赤血球内含量が増加することが知られている。また、GSH還元系の機能が正常な赤血球では、アセチルフェニルヒドラジンのような酸化剤を加えてもGSH量はほとんど変化しないが、G6PDおよびGR異常症では酸化刺激によりGSH量の低下をきたす。

3. 赤血球EMA結合能

1) 測定意義

わが国の先天性溶血性貧血症例の約70%を占めるHSは、 α ・ β スペクトリン(*SPTA1*, *SPTB*), バンド3(*SLC4A1*), アンキリン(*ANK1*)およびバンド4.2(*EPB42*)遺伝子の変異により、これら膜骨格を形成する蛋白の質的・量的な異常をきたし、発症する。赤血球浸透圧抵抗試験は手技が簡単である反面、その感度および特異性の低さから非定型的HSや軽症HSを見逃すことが臨床的に問題となっている。実際摘脾前のHSにおいて

は、約1/3の症例で浸透圧抵抗の低下が認められない。また、妊娠や腎不全患者、免疫性溶血性貧血例などで偽陽性を呈することもある。

現在、HSのスクリーニング検査として最も有用なのは、赤血球EMA(eosin 5'-maleimide)結合能測定検査である³⁾。EMAは赤血球膜貫通蛋白の1つ、バンド3の細胞外ループにあるLys430残基と結合する蛍光色素であり、HSにおける赤血球表面積の減少に伴い、1つの赤血球当たりのバンド3分子数が減少することを検出する。

2) 測定の実際

血漿を除き、生理的食塩水で洗浄した赤血球5 μ Lをリン酸緩衝生理的食塩水(phosphate buffered saline; PBS)で溶解した0.5 mg/mL EMA液に懸濁して暗所で1時間静置、時々攪拌する。その後、遠心操作により非結合色素を除き、PBS/BSA(phosphate buffered saline/bovine serum albumin, 0.5%牛血清アルブミンを含むPBS)で3回洗浄後、500 μ LのPBS/BSAで再懸濁する。そのうちの100 μ LにPBS/BSAを1,400 μ L加えたものをサンプルとし、FL-1チャンネル(緑色

蛍光)を用いてフローサイトメトリーを行い、平均チャンネル蛍光強度(mean channel fluorescence; MCF)を測定する。

3) 結果の解釈

HSにおいては、その分子異常がアンキリン、スペクトリン($\alpha \cdot \beta$)、バンド3、4.2蛋白のいずれであっても、結果として赤血球表面積の減少をきたすため、バンド3に結合するEMA量が減少する。したがって、赤血球表面積の減少を起こすほかの疾患、HPP(hereditary pyropoikilocytosis)、SAO(Southeast Asia ovalocytosis)、CDA2(congenital dyserythropoietic anemia type II)などの病態においてもEMA結合能の低下を認める。自験例において、HS以外の溶血性貧血、G6PDやPK異常症などの赤血球酵素異常症、サラセミア、鎌状赤血球貧血、UHD、発作性夜間ヘモグロビン尿症(paroxysmal nocturnal hemoglobinuria; PNH)などの病態では、EMA結合

能の低下は認められなかった。正常対照とHS症例との比較ではMCFは80%以下に低下することが多く、軽度のEMA低下例では、臨床所見やほかの検査データを参考にしながら慎重に病型診断する必要がある。

EMA結合能が極端に低下している症例で、赤血球形態上HPP⁴⁾様の奇形赤血球、破碎赤血球が観察される場合は、 α スペクトリン遺伝子変異の複合ヘテロ接合体であるHPP、あるいはスペクトリン・アンキリンの複合異常を考慮する。

最近のレビュー⁵⁾によるHS診断におけるEMA結合能の感度は93%、特異性は98%であり、酸性化グリセロール溶血試験(acidified glycerol lysis test; AGLT)では感度が95%、特異性が91%とされ、感度面ではややAGLTのほうが上回る結果となっている。いずれの方法も浸透圧抵抗試験の68%(新鮮血)、81%(孵置血)を大きく上回っていた。

溶血液で検討する項目—赤血球酵素活性測定

1. 測定意義

赤血球代謝異常によって赤血球寿命が短縮する一連の先天性溶血性貧血では、赤血球酵素活性を測定することで診断が可能である^{6,7)}。解糖系酵素異常症(図3)の場合、活性低下を示した酵素より上位の中間代謝産物が赤血球内に蓄積していることを証明する。あるいは表3に示す遺伝様式を参考にして両親の酵素活性も測定することが望ましい。さらに構造遺伝子の変異を確認することが確定診断となる。

2. 測定の実際

1) 白血球、血小板の除去による赤血球精製

ほとんどの酵素は赤血球より白血球・血小板のほうが1細胞当たりの酵素活性が高く、それらの細胞を分離除去してから赤血球溶血液を作製しないと、赤血球酵素活性は正確に測定することはできない。筆者らはmicrocrystalline cellulose/ α -celluloseのカラムを通すことで白血球、血小板などほかの血球を除いている。

①生理食塩水にSigmacell cellulose type 50 (Sigma-Aldrich[®]社)、 α -Cellulose powder (Sigma-Aldrich[®]社)を等量混合し、生理的食

塩水に懸濁する。上澄みに残って沈殿しない細かいセルロース粒子は丁寧に取り除いておき、4°Cに保存する。10 mL ディスポシリンジの外筒に定性濾紙 No.2(ADVANTEC[®]社)を敷き、約1.5~2 cmの高さまで用意したセルロース懸濁液を詰める。

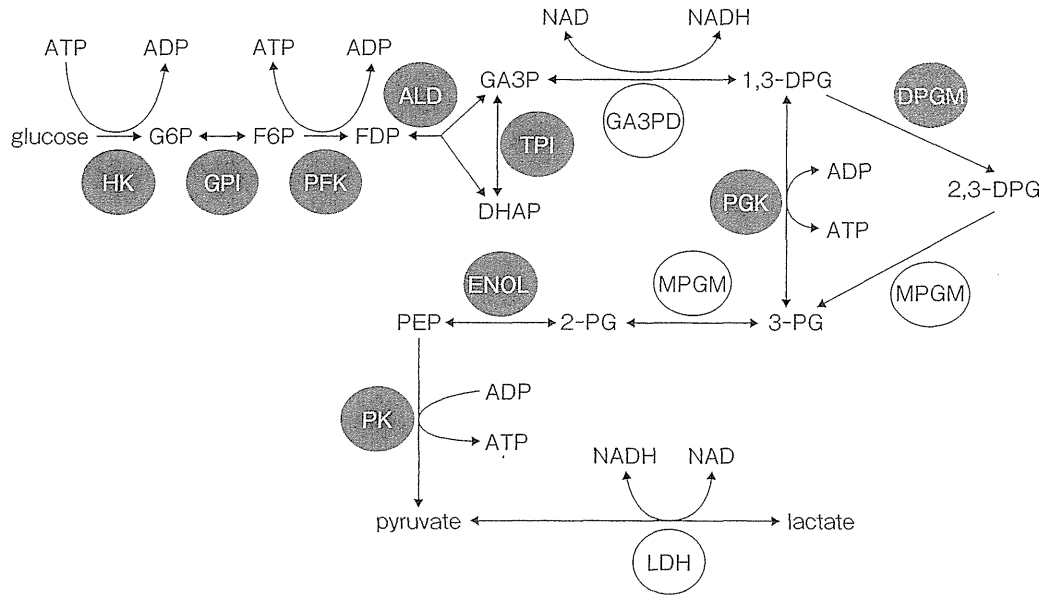
②ヘパリン採血して得た全血を1,500 g、4°C、10分間遠心して、血漿・バッフィーコートを除いた後、赤血球層に等量の生理食塩水を加えて赤血球浮遊液とする。これを①で用意したセルロースカラムに通し、その上から冷生理食塩水を加えて赤血球を濾過する。

③濾過した赤血球浮遊液を冷生理食塩水で3回洗浄後、赤血球層を生理食塩水で約2倍に希釈し、これを測定用血球浮遊液とする。当日すぐに測定しない場合は、赤血球層にグリセロール/ソルビトールの1:1混合液を等量加え、よく混合してから液体窒素または-80°Cに保存する。

2) 溶血液作製

血漿、白血球、血小板を除いた後、低張液中で超音波破碎して得られる赤血球溶血液を用いて、

図3 活性低下が先天性溶血性貧血の原因となる解糖系酵素



青地白抜きで示す8種の酵素活性低下が先天性溶血性貧血の原因となることが知られている。DPGM異常症は赤血球2,3-DPG濃度低下により、ヘモグロビンの酸素親和性が高くなり、赤血球増加症の原因となる。

NAD: nicotinamide adenine dinucleotide, NADH: reduced nicotinamide adenine dinucleotide, 2,3-DPG: 2,3-diphosphoglyceric acid, G6P: glucose-6-phosphate, F6P: fructose-6-phosphate, FDP: fructose 1,6-bisphosphate, GA3P: glyceraldehyde-3-phosphate, DHAP: dihydroxyacetone phosphate, 1,3-DPG: 1,3-diphosphoglycerate, 3-PG: glycerate 3-phosphate, 2-PG: glycerate 2-phosphate, PEP: phosphoenolpyruvate, HK: hexokinase, GPI: glucose phosphate isomerase, PFK: phosphofructokinase, ALD: aldolase, TPI: triosephosphate isomerase, GA3PD: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, PGK: phosphoglycerate kinase, DPGM: diphosphoglycerate mutase, MPGM: monophosphoglycerate mutase, ENOL: enolase, PK: pyruvate kinase, LDH: lactate dehydrogenase.

酵素活性を測定する。

測定用血球浮遊液 0.2 mL に安定化液 1.8 mL を加え混和した後、約 5 秒間超音波破碎器にてソニケーションし、1:20 溶血液とする。これをさらに 10 倍あるいは 100 倍希釈することにより、1:200, 1:2,000 倍溶血液を作製する。

3) 代表的な赤血球酵素活性の測定法

①グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD)

キュベット A: 0.1M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADP, 0.6 mM G-6-P (glucose-6-phosphate), 0.6 mM 6-PGA (6-phosphogluconic acid).

キュベット B: 0.1M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 0.2 mM NADP, 0.6 mM 6-PGA, 1:20 溶血液 20 μL, ブランク・キュベット A で溶血液なし。

340 nm, 37°C, 10 分間スキャンする。キュベット A とキュベット B の吸光度変化の差が G6PD 活性となる。

②ピルビン酸キナーゼ(PK)

0.1M Tris-HCl/0.5 mM EDTA pH 8.0, 10 mM MgCl₂, 100 mM KCl, 0.2 mM NADH, 1.5 mM ADP (adenosine 5'-diphosphate), 5 mM PEP (phosphoenolpyruvate), 6U LDH (lactate dehydrogenase), 1:20 溶血液 20 μL, ブランク・溶血液なし。

340 nm, 37°C, 10 分間スキャンする。ブランクとの吸光度変化の差が PK 活性となる。

3. 結果の解釈

溶血性貧血では網赤血球増多を伴うことが多く、結果の解釈には十分な注意が必要である。すなわち、赤血球寿命に伴い活性が徐々に低下する酵素 (age-dependent enzyme) については、網赤血球における酵素活性が成熟赤血球の数倍から 10 倍以上を示すために、溶血性貧血では酵素活性低下がマスクされてしまうことがある。表 2 には健康成人対照と赤血球酵素異常症以外の網赤血球増加例における酵素活性基準値の比較を示す。

表2 正常対照と網赤血球増加例の赤血球酵素活性比較

酵素名	基準値 (IU/gHb)	網赤血球増加例 (IU/gHb)
HK	1.08~1.46	2.86~5.86
PK	13.0~19.8	23.6~39.0
G6PD	7.61~9.81	12.8~22.6
AK	165~307	187~305

HK : hexokinase, PK : pyruvate kinase, G6PD : glucose-6-phosphate dehydrogenase, AK : adenylate kinase.

赤血球酵素異常症で頻度の高いPK異常症, G6PD異常症はPK, G6PDがage-dependent enzymeであることから, 網赤血球増加例で活性が高いこと, 一方アデニル酸キナーゼ(adenylate kinase; AK)活性は赤血球寿命に伴い活性低下がないことから, 正常対照と網赤血球増加例で基準値がほぼ重なることが分かる.

酵素の高次構造や発現機構, 蛋白の構造と機能の関連がすでに判明した酵素では, 遺伝子DNAや網赤血球RNAを用いた遺伝子解析(表3)が生化学的手法に代わる新たな診断法になりつつある.

表3 活性低下が先天性溶血性貧血の原因となる赤血球酵素の構造遺伝子と遺伝形式

	酵素名	遺伝子(OMIM)	遺伝形式
1	ヘキソキナーゼ	HK1(*142600)	AR
2	グルコースリン酸イソメラーゼ	GPI(*172400)	AR
3	ホスホフルクトキナーゼ	PFKM(*610681)	AR
4	アルドラーゼ	ALDOA(*103850)	AR
5	三炭糖リン酸イソメラーゼ	TPI1(*190450)	AR
6	ホスホグリセリン酸キナーゼ	PGK1(*311800)	XR
7	エノラーゼ	ENO1(*172430)	AR
8	ビルビン酸キナーゼ	PKLR(*609712)	AR
9	グルコース-6-リン酸脱水素酵素	G6PD(*305900)	XR
10	6-ホスホグルコン酸脱水素酵素	PGD(*172200)	AR
11	アデニル酸キナーゼ	AK1(# 612631)	AR
12	アデノシンデアミナーゼ	ADA(102730)	AD
13	ピリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ	NT5C3(*606224)	AR
14	γ グルタミルシステイン合成酵素	GCLC(# 230450)	AR
15	グルタチオン合成酵素	GSS(# 231900)	AR
16	グルタチオン還元酵素	GSR(+138300)	AR
17	グルタチオンペルオキシダーゼ	GPX1(*138320)	AR

1~8: 解糖系, 9・10: ペントースリン酸経路, 11~13: プリン・ピリミジン代謝, 14~17: グルタチオン合成・代謝系の酵素. OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man (<http://omim.org/search/advanced/entry>), AR: autosomal recessive (常染色体劣性), AD: autosomal dominant (常染色体優性), XR: X-linked recessive (X染色体劣性).

CNSHA 検査精度の向上

非免疫性溶血性貧血という仮診断のもと, 筆者らが2005~2010年に検索した244例の最終診断は, G6PD異常症62例, HS41例, サラセミア14例, PK異常症11例, その他のまれな赤血球酵素異常症11例, UHD5例, その他PNH, AIHA

など8例であり, 全体の約60%を診断し得た. 米国のBeutlerら⁸⁾によると1982~1988年, 722例を対象にした結果が診断率28.1%, 2000~2004年の自験212例に対しては24.5%であり, 過去のスクリーニング結果と比較して, 赤血球膜異常

症のスクリーニング検査として赤血球 EMA 結合能を導入したことにより、CNSHA として検索を依頼される症例に赤血球膜異常症を診断すること

ができるようになり、結果として診断率が向上している。

おわりに

先天性溶血性貧血症例の多くは、新生児期の重症黄疸や遷延する溶血性貧血により気付かれるが、成人発症例も散見される。赤血球形態に典型的な異常を認めない非球状性溶血性貧血症例のなかにも赤血球 EMA 結合能の低下例があり、赤血球膜異常症のスクリーニング検査としての有用性が確認できた。一方、解析した溶血性貧血症例の約 40% はいまだ原因不明であり、溶血性貧血を惹起する新規病因遺伝子の変異が示唆されるため、今後は、網羅的遺伝子検査を含めた診断システムの構築が急務と考えられる。

筆者らは、先天性溶血性貧血に関する診療サポートを目的とした NPO 法人を設立し、2013 年 12 月からこの NPO を窓口とした検査受託を開始している(血液難病診療サポート：<http://anemia-support.org/index.html>)。DAT 陰性 AIHA の検査を実施している自治医科大学地域医療学センター亀崎豊実先生、ヘモグロビン異常症の解析を受託している福山臨床検査センター社と連携して、溶血性貧血症例の担当医からの症例相談や検査依頼を受け付け、治療方針や日常生活の注意点など患者や家族への情報提供も進めている。

文献

- 1) 特発性造血障害に関する調査研究班：自己免疫性溶血性貧血。特発性造血障害疾患の診療の参照ガイド、p144, 2010 (<http://zoketsushogaihan.com/file/AIHA.pdf>)
- 2) Palek J, Sahr KE : Mutations of the red blood cell membrane proteins: from clinical evaluation to detection of the underlying genetic defect. *Blood* 80 : 308-330, 1992
- 3) King MJ, Smythe JS, Mushens R : Eosin-5-maleimide binding to band 3 and Rh-related proteins forms the basis of a screening test for hereditary spherocytosis. *Br J Haematol* 124 : 106-113, 2004
- 4) King MJ, Jepson MA, Guest A, et al : Detection of hereditary pyropoikilocytosis by the eosin-5-maleimide (EMA)-binding test is attributable to a marked reduction in EMA-reactive transmembrane proteins. *Int J Lab Hematol* 33 : 205-211, 2011
- 5) Bianchi P, Fermo E, Vercellati C, et al : Diagnostic power of laboratory tests for hereditary spherocytosis: a comparison study in 150 patients grouped according to molecular and clinical characteristics. *Haematologica* 97 : 516-523, 2012
- 6) Hirono A, Kanno H, Miwa S, et al : Pyruvate kinase deficiency and other enzymopathies of the erythrocyte. *In: The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Diseases*, 8th ed (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, ed), McGraw-Hill, New York. pp4637-4664, 2001
- 7) 菅野仁：先天性溶血性貧血。血液専門医テキスト(日本血液学会編)，南江堂。pp154-158, 2011
- 8) Hirono A, Forman L, Beutler E : Enzymatic diagnosis in non-spherocytic hemolytic anemia. *Medicine (Baltimore)* 67 : 110-117, 1988

MEDICAL BOOK INFORMATION

医学書院

がん臨床試験テキストブック 考え方から実践まで

編集 公益財団法人パブリックヘルスリサーチセンター
がん臨床研究支援事業(CSPOR)教育研修小委員会
責任編集 大橋靖雄・渡辺 亨・青谷恵利子・齋藤裕子

●B5 頁248 2013年
定価：本体5,000円＋税
[ISBN978-4-260-01645-2]

CRCをはじめ医師、薬剤師、看護師など、がん臨床試験に携わる医療者が必ず知っておくべき情報を理解しやすくまとめた。法規制、倫理ガイドライン、臨床試験デザイン、QOL評価、研究組織などの基礎的知識から、プロトコル・レビュー、管理、治療効果判定、有害事象の評価・報告などCRC業務の実際に至るまで、臨床現場ですぐに役立つ内容となっている。

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.21 (2013年1月20日発行) 別刷

血液症候群(第2版)

—その他の血液疾患を含めて—

I

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系

ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症

菅野 仁

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系

ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症

Molecular basis of human pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency associated with congenital hemolytic anemia

Key words : 先天性溶血性貧血, 赤血球酵素異常症, ヌクレオチド代謝系

菅野 仁

II

赤血球の異常

1. 概念・定義

ピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ(cytosolic 5'-nucleotidase 3, P5N-I, EC 3.1.3.5)は, ピリミジン5'-ヌクレオシドリン酸に特異的に働くヌクレオチダーゼである。ほとんどのヌクレオチダーゼはプリン, ピリミジンヌクレオチドの両方に作用するが, P5N-Iの基質特異性はUMP, CMPに限定される。P5N-Iは細胞質に局在する分子量36kDaの単量体酵素である。P5N-I異常症は我が国でグルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PD), ピルビン酸キナーゼ(PK)異常症について頻度の高い赤血球酵素異常症で, 常染色体劣性遺伝疾患である。

2. 赤血球代謝におけるP5N-Iの生理的意義

骨髄中で分化・成熟した赤芽球は最終成熟プロセスで脱核し, ミトコンドリア, リボソーム, 小胞体, ゴルジ体も失うため, 成熟赤血球はタンパク質と同様, 新たに核酸も合成することが不可能となる。脱核後約3日間は赤血球内にリボソームRNAが残存し, 網赤血球と呼ばれる。赤血球の成熟に伴い, リボソームRNAは生化学的に崩壊し, 赤血球中にはヌクレオシドモノリン酸が蓄積する。プリンヌクレオチドはアデニンヌクレオチドプールに再利用されるが, ピリミジンヌクレオチドはヌクレオシドに変換し

た後, 赤血球外に排出される。このプロセスで働くのがP5N-Iである。赤血球中には基質特異性がより広いアイソザイムP5N-II活性が存在する¹⁾。

P5N-I活性の低下は, 赤血球内でピリミジンヌクレオチドの蓄積を招き, 特にCDP, CTP, UDP, UTPなどのピリミジンヌクレオシド2リン酸, 3リン酸はADP, ATPが関与する反応を阻害することにより, 陽イオンの能動輸送, 膜タンパクのリン酸化および解糖系の維持に支障を生じるため, 赤血球寿命が短縮すると考えられている^{2,3)}。

3. ヒトP5N-I遺伝子

ヒトP5N-I遺伝子座は染色体7p14.3にあり, P5N-I遺伝子(GenBank J04809)は全長48kbpで, 11個のエクソンにより構成される。ヒトP5N-Iは分子量36kDa, 297アミノ酸から構成され, モノマーが活性を有する^{4,5)}。

4. 赤血球P5N-I活性低下による先天性溶血性貧血例(OMIM#266120)

赤血球P5N活性低下による先天性溶血性貧血症例は現在までに世界で60家系以上の報告があり⁶⁾, 25種の遺伝子変異が同定されている⁵⁻¹³⁾。25種の変異の内訳は, ミスセンス変異9, スプライス部位変異6, フレームシフト変異4, 1~数個のアミノ酸欠失3, および330bpのAlu反

Hitoshi Kanno: Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科

表1 我が国のピリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症症例の臨床像と遺伝子変異(文献⁵⁾より引用)

	年齢/性別	Hb (g/dL)	網赤血球数 (%)	赤血球 P5N 活性 (%)	allele 1	allele 2
1	28/F	10.1	6.0	23.6	c.721GGA>CGA (p.Gly241Arg)	
2	12/M	12.5	6.1	48.4		
3	27/M	15.2	4.4	63.8		
4	24/M	10.6	8.0	9.7		
5	5/M	11.3	ND	40.2		
6	53/F	11.1	5.6	52.3	c.425T>C (p.Leu142Pro)	
7	16/M	10.8	23.1	11.1	c.339G>C* (p.Trp113Cys)	
8	57/M	9.0	3.9	27.5	c.251-252insA (frameshift)	
9	48/F	9.6	14.2	45.8	c.192-200del (3AA del)	

*網赤血球P5N-ImRNAの構造解析から、スプライスアクセプター部位変異によるエクソン・スキッピングが生じ、結果として30アミノ酸欠失が起こることが示されている。

復配列の挿入が1であり、一次構造の大きな変化を伴う遺伝子変異の割合が多い。このことはP5N-I活性の完全喪失があっても、17q25.1に遺伝子座のあるP5N-II(5',3'-nucleotidase, cytosolic, EC 3.1.3)活性が残存するため、赤血球P5N活性が完全欠損とならないためと考えられている。

5. 診断と鑑別診断

よく代償された軽症から中等度の慢性溶血を認める症例のうち、直接抗グロブリン試験が陰性かつCD55/CD59二重陰性赤血球の増加がなく自己免疫性溶血性貧血や発作性夜間ヘモグロビン尿症が否定された場合、先天性溶血性貧血を疑う。小型球状赤血球、楕円赤血球などの赤血球形態に異常を認めない場合、赤血球酵素異常症や不安定ヘモグロビン症を考慮に入れる。表1に示すように、発症年齢はG6PD異常症、PK異常症に比べて遅く、平均30歳前後である。新生児期重症黄疸や胆石症などのエピソードに乏しいことも特徴的である。

P5N-I異常症では、赤血球に好塩基性斑点

(basophilic stippling)を観察できる点が特徴的である。Wright染色で赤血球の細胞質が認められる微細な封入体であり、リボゾームRNAが凝集変性して青色の斑点として観察される。先天的にはP5N-I異常症に特徴的であるが、P5N-Iは鉛により阻害を受けるため、後天性疾患としては鉛中毒の際に指摘される。

P5N-I異常症は常染色体劣性遺伝疾患のため、両親に血縁関係を認めて常染色体劣性遺伝が疑われるという点では、ピルビン酸キナーゼ異常症、グルコースリン酸イソメラーゼ異常症などの他の赤血球酵素異常症に近似している。

診断は赤血球P5N活性測定および赤血球内ピリミジンヌクレオチドの蓄積を証明することによる。P5N-I異常症は常染色体劣性遺伝形式であることから、両親の赤血球酵素活性も同時に施行することが望ましい。

6. 治療と予後

赤血球酵素異常症の中では重症例が少なく、必要に応じて赤血球輸血などの対症療法を行う。

文献

- 1) Hirono A. et al: Chromatographic analysis of human erythrocyte pyrimidine 5'-nucleotidase from five patients with pyrimidine 5'-nucleotidase deficiency. Br J Haematol 65: 35-41. 1987.
- 2) Lachant NA, Tanaka KR: Red cell metabolism in hereditary pyrimidine 5'-nucleotidase defi-

- ciency: effect of magnesium. *Br J Haematol* **63**: 615–623, 1986.
- 3) Oda E. et al: Hemolytic anemia in hereditary pyrimidine 5′-nucleotidase deficiency. II. Effect of pyrimidine nucleotides and their derivatives on glycolytic and pentose phosphate shunt enzyme activity. *Clin Chim Acta* **141**: 93–100, 1984.
 - 4) Amici A. et al: Human erythrocyte pyrimidine 5-nucleotidase, PN-I, is identical to p36, a protein associated to lupus inclusion formation in response to alpha-interferon. *Blood* **96**: 1596–1598, 2000.
 - 5) Kanno H. et al: Molecular basis of Japanese variants of pyrimidine 5′-nucleotidase deficiency. *Br J Haematol* **126**: 265–271, 2004.
 - 6) Zanella A. et al: Hereditary pyrimidine 5′-nucleotidase deficiency: from genetics to clinical manifestations. *Br J Haematol* **133**: 113–123, 2006.
 - 7) Marinaki AM. et al: Genetic basis of hemolytic anemia caused by pyrimidine 5′ nucleotidase deficiency. *Blood* **97**: 3327–3332, 2001.
 - 8) Balta G. et al: Molecular characterization of Turkish patients with pyrimidine 5′ nucleotidase-I deficiency. *Blood* **102**: 1900–1903, 2003.
 - 9) Bianchi P. et al: Molecular characterization of six unrelated Italian patients affected by pyrimidine 5′-nucleotidase deficiency. *Br J Haematol* **122**: 847–851, 2003.
 - 10) Escuredo E. et al: The genetic basis of the interaction between pyrimidine 5′ nucleotidase I deficiency and hemoglobin E. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* **23**: 1261–1263, 2004.
 - 11) Manco L. et al: Molecular characterization of five Portuguese patients with pyrimidine 5′-nucleotidase deficient hemolytic anemia showing three new P5′ N-I mutations. *Haematologica* **91**: 266–267, 2006.
 - 12) Chiarelli LR. et al: Two new mutations of the P5′ N-1 gene found in Italian patients with hereditary hemolytic anemia: the molecular basis of the red cell enzyme disorder. *Haematologica* **91**: 1244–1247, 2006.
 - 13) Chiarelli LR. et al: Molecular basis of pyrimidine 5′-nucleotidase deficiency caused by 3 newly identified missense mutations (c.187T>C, c.469G>C and c.740T>C) and a tabulation of known mutations. *Blood Cells Mol Dis* **40**: 295–301, 2008.

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.21 (2013年1月20日発行) 別刷

血液症候群(第2版)

—その他の血液疾患を含めて—

I

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系

アデニル酸キナーゼ異常症

菅野 仁

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系

アデニル酸キナーゼ異常症

Molecular basis of human adenylate kinase deficiency associated with congenital hemolytic anemia

Key words : 先天性溶血性貧血, 赤血球酵素異常症, ヌクレオチド代謝系

菅野 仁

1. 概念・定義

アデニル酸キナーゼ(ATP:AMP phosphotransferase, AK, EC 2.7.4.3)は, $MgATP + AMP \leftrightarrow MgADP + ADP$ の相互転換を触媒する酵素であり, AK1-3の3アイソザイムが存在する. AK1は細胞質に局在し, 骨格筋, 脳および赤血球において発現する. AK2, AK3はともにミトコンドリア内酵素であり, AK2の発現が普遍的に検出できる一方, AK3は心臓, 骨格筋, 肝臓, 脊髄, 胸腺などで高い. AK異常症はAK1遺伝子変異による先天性溶血性貧血の一型で, 極めてまれな常染色体劣性遺伝疾患である.

2. 赤血球代謝におけるAKの生理的意義

骨髄中で分化・成熟した赤芽球は最終成熟プロセスで脱核し, ミトコンドリア, リボソーム, 小胞体, ゴルジ体も失うため, 成熟赤血球はタンパク質と同様, 新たに核酸も合成することが不可能となる. 脱核後約3日間は赤血球内にリボソームRNAが残存し, 網赤血球と呼ばれる. 赤血球の成熟に伴い, リボソームRNAは生化学的に崩壊し, 赤血球中にはアデノシン1リン酸(AMP), アデノシン2リン酸(ADP)およびアデノシン3リン酸(ATP)から構成されるアデニルヌクレオチドプールが形成される.

AK1は赤血球内でAMPをリン酸化してADP

を生成する唯一の酵素であり, ADPは解糖系によりATPに変換されて, 陽イオンの能動輸送, 膜タンパクのリン酸化および解糖系の維持に寄与する. このような理由で赤血球が120日生存するためにはAK1によるAMP, ADPおよびATPの相互変換が必須である.

3. ヒトAK1遺伝子とAK1アイソザイム

ヒトAK1遺伝子座は染色体9(9q34.1)の上であり, AK1遺伝子(GenBank J04809)は全長12 kbpで, 7つのエクソンにより構成される. ヒトAK1は分子量22 kDa, 194アミノ酸から構成され, モノマーが活性を有する.

4. AK1活性低下による先天性溶血性貧血例(OMIM*103000)

赤血球AK活性低下例は現在までに世界で13家系の報告があるが, AK活性低下と溶血性貧血に直接の関連がないと考えられている1家系¹⁾を除く12家系がAK異常症であり, 更にそのうちの6家系で遺伝子変異が同定されている(表1).

最初の報告はアラブ人家系で同定された症例²⁾で, Hb 8-9 g/dLと中等症~重症の溶血性貧血を認めた. 一部の症例はG6PD異常症を合併しており, AK/G6PD異常症合併例ではHb 6 g/dL前後と更に重症の溶血性貧血が認められ

Hitoshi Kanno: Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科

表1 分子異常が同定されたアデニル酸キナーゼ異常症

	allele 1	allele 2	Hb(g/dL)	網赤血球数	文献
1	382C>T(Arg128Trp)		9.6	7.2%	4), 7)
2	319C>T(Arg107Stop)		10.8	272e9/L	8)
3	118G>A(Gly40Arg)	190G>A(Gly64Arg)	9-10	5.3%	9)
4	418-420delGAC(del Asp140)		7.0	145e9/L	
5	138delG(frameshift)		7.3	255e9/L	10)
6	491A>G(Tyr164Cys)		7.5	6-9%	11)

た。残存赤血球AK活性は正常対照の1-9%に低下しており、一部の患者には知能低下を認めた。家系内の一部症例には治療として摘脾術が施行されており、溶血所見がほぼ消失し、著効したとされている。

次に報告されたフランス人症例³⁾では、赤血球AK活性が正常対照の3.5%にまで低下していたものの、代償性赤血球造血により溶血性貧血は軽症だった。この症例には精神運動発達遅滞が観察された。

我が国から報告された日本人家系⁴⁾では、赤血球AK活性は正常対照の約44%と比較的保たれていたものの、Hb 10g/dL前後の溶血性貧血が認められた。

Beutlerらによる米国黒人兄妹例の報告¹⁾では、ほとんど残存AK活性が認められないものの、2人のうち1人のみに溶血性貧血が観察されたことから、赤血球AK活性の低下と溶血性貧血との関連が懐疑的であった。

Lachanらによる症例報告は、シリア人女児にHb 8.7g/dLの慢性溶血と感染により誘発される反復性の急性溶血発作が認め、しばしば赤血球輸血を施行されていた⁵⁾。両親には血族結婚が認められた。患児の赤血球AK活性は検出感度以下に低下し、両親とも約50%のAK活性低下を認めた。

我が国で診断された第二例⁶⁾は生後2カ月に著明な貧血を指摘され、以後先天性溶血性貧血の診断で、2カ月に1回の頻度で赤血球輸血を受けていた。8歳時に胆石発作で入院し、著明な脾腫が認められた。血液検査所見では、Hb

11.0g/dL、網赤血球4.8%、間接ビリルビン4.5mg/dL、LDH 2,220IU/L、ハプトグロビン1.8mg/dL未満と溶血所見を認めた。赤血球形態には異常なく、直接抗グロブリン試験陰性、赤血球浸透圧抵抗も正常であった。赤血球AK活性は基準値の16%程度に低下しており、AK異常症と診断された。両親はいとこ結婚であった。

5. 診断と鑑別診断

以上のように、中等度から重症の慢性溶血を認めるが赤血球形態に異常を認めない点でAK異常症は先天性非球状性溶血性貧血の一型に分類される。両親にしばしば血縁関係を認めて常染色体劣性遺伝が疑われるという点では、ピルビン酸キナーゼ異常症、グルコースリン酸イソメラーゼ異常症、プリミジン5'-ヌクレオチダーゼ異常症などの他の赤血球酵素異常症の臨床像と近似している。精神運動発達遅滞に溶血性貧血を伴う点では、トリオースリン酸イソメラーゼ異常症、ホスホグリセリン酸キナーゼ異常症などの解糖系酵素異常症との鑑別が必要である。

診断は赤血球酵素活性測定による。AK異常症は常染色体劣性遺伝形式であることから、両親の赤血球酵素活性も同時に施行することが望ましい。

6. 治療と予後

他の赤血球酵素異常症と同様に、赤血球輸血、脾臓摘出術などの対症療法を行う。赤血球造血

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.21 (2013年1月20日発行) 別刷

血液症候群(第2版)

—その他の血液疾患を含めて—

I

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 ヌクレオチド代謝系

アデノシンデアミナーゼ過剰産生症

菅野 仁

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 スクレオチド代謝系

アデノシンデアミナーゼ過剰産生症

Molecular basis of hereditary overproduction of human adenosine deaminase associated with congenital hemolytic anemia

菅野 仁

Key words : 先天性溶血性貧血, 赤血球酵素異常症, スクレオチド代謝系

1. 概念・定義

アデノシンデアミナーゼ (adenosine deaminase: ADA, EC 3.5.4.4) は, プリン代謝経路の酵素であり, アデノシン, デオキシアデノシンを基質にした脱アミノ化反応によりイノシン, デオキシイノシンを生成する不可逆的な反応を触媒する.

赤血球アデノシンデアミナーゼの活性亢進による先天性溶血性貧血症例は現在までに世界で4家系のみが報告されている極めてまれな常染色体優性遺伝疾患である¹⁻⁴⁾.

2. ヒト ADA と ADA 遺伝子

ヒト ADA 遺伝子座は染色体 20q13.12 にあり, ADA 遺伝子 (GenBank NC 000020) は全長 32 kbp で, 10 個のエクソンにより構成される. ヒト ADA は分子量 40 kDa, 363 アミノ酸から構成され, モノマーが活性を有する. ADA はユビキタスな酵素であるが, 細胞間でその活性は大きく異なり, 血液細胞における ADA 活性は赤血球 \ll B リンパ球 \ll T リンパ球である.

ADA は腎臓など一部の組織では ADA 結合タンパク (ADBP) に結合して存在することが知られており, ADBP の本体がジペプチジルペプチダーゼ IV (DPP4, EC 3.4.14.5) であることが明らかになっている. DPP4 は膜結合型セリンエクソペプチダーゼであり, CD26 と同一分子である⁵⁾.

3. 血液細胞における ADA 活性と疾患

ADA 遺伝子変異により ADA 活性の低下が生じると T リンパ球内に細胞毒性のあるデオキシアデノシンが蓄積する. この ADA 活性の低下は重症複合免疫不全症の原因となる (OMIM # 102700).

赤血球 ADA 活性の上昇は先天性溶血性貧血 (OMIM 102730), ダイアモンドブラックファン貧血 (DBA, OMIM # 105650)⁶⁾, そして MDS の一例⁷⁾で認められるが, 先天性溶血性貧血例では基準値の 100 倍もの活性上昇が報告されているのに対し, DBA では約 8 割の症例で数倍 (mean+3SD 以上) の活性上昇を認める. 一方, MDS における検討例 (primary acquired sideroblastic anemia) では, 約 17 倍の赤血球 ADA 活性上昇を認めた.

赤血球 ADA 活性の異常な上昇により, アデノシンからイノシンへの反応が進むため, 同じアデノシンを基質とするアデノシンキナーゼ反応が阻害され, 赤血球 ATP の低下をきたすことが原因⁸⁾と考えられているが, 症例が少なく詳細な解析が進んでいない.

4. 赤血球 ADA 活性上昇のメカニズム

藤井らは, 日本における ADA 過剰産生症患者末梢血から得た単核球を EB ウイルスでリンパ芽球化することで ADA を過剰に産生する細胞株を樹立した. 大量培養した患者由来リンパ

芽球からADAを精製し、その一次構造を解析した結果、患者ADAは正常の構造を有しており、ADA過剰産生症が正常タンパクの過剰産生による極めてまれなヒト遺伝性疾患であることを明らかにした³⁾。

米国ミシガン大学のグループはヒトADA-cDNAを用いた網赤血球mRNAのNorthern blot解析により、患者赤芽球ではADA活性上昇はADAmRNA量の増加によること、クローン化した患者ADAcDNAには非翻訳領域も含めて変異が認められないことから、その背景には遺伝子転写量の亢進があることを示唆した⁸⁾。

菅野らは、日本人ADA過剰産生症患者からgenomic DNAライブラリーを作成し、クローン化した患者ADA遺伝子について転写開始部位から上流1kbpまでの塩基配列を決定し、short tandem repeat多型以外には正常ADA遺伝子と同一の塩基配列であることを示した⁹⁾。

その後米国グループは患者ADA遺伝子の10.6kbpに及ぶ5'-flanking sequenceと12.3kbpの第1イントロンを含むレポーター(CAT)遺伝子コンストラクトを用いてトランスジェニック

マウスを作製した¹⁰⁾。このADAトランスジェニックマウスのCAT活性は胸腺で高い発現をみたことから、生理的な組織特異性を再現できていたが、骨髄・赤血球のCAT活性は野生型と比して相違はなく、このレポーター遺伝子コンストラクトに含めたADA遺伝子配列には転写活性を亢進する変異が含まれていないと結論した。

5. 診断と鑑別診断

ADA過剰産生による先天性溶血性貧血は、赤血球酵素異常症で唯一常染色体優性遺伝形式により発症する。赤血球形態に異常を認めない先天性溶血性貧血患者では赤血球酵素異常症や不安定ヘモグロビン症を考慮に入れ、専門機関への検索を依頼する。診断は赤血球ADA活性測定および赤血球内アデニンヌクレオチド定量による。

6. 治療と予後

必要に応じて赤血球輸血などの対症療法を行う。

■ 文 献

- 1) Valentine WN, et al: Hereditary hemolytic anemia with increased red cell adenosine deaminase (45- to 70-fold) and decreased adenosine triphosphate. *Science* **195**: 783-785, 1977.
- 2) Miwa S, et al: A case of red-cell adenosine deaminase overproduction associated with hereditary hemolytic anemia found in Japan. *Am J Hematol* **5**: 107-115, 1978.
- 3) Fujii H, et al: Overproduction of structurally normal enzyme in man: hereditary haemolytic anaemia with increased red cell adenosine deaminase activity. *Br J Haematol* **51**: 427-430, 1982.
- 4) Pérignon JL, et al: Biochemical study of a case of hemolytic anemia with increased (85 fold) red cell adenosine deaminase. *Clin Chim Acta* **124**: 205-212, 1982.
- 5) Kameoka J, et al: Direct association of adenosine deaminase with a T cell activation antigen, CD26. *Science* **261**: 466-469, 1993.
- 6) Glader BE, et al: Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in congenital hypoplastic anemia. *N Engl J Med* **309**: 1486-1490, 1983.
- 7) Kanno H, et al: Elevated erythrocyte adenosine deaminase activity in a patient with primary acquired sideroblastic anemia. *Am J Hematol* **27**: 216-220, 1988.
- 8) Chottiner EG, et al: Erythrocyte adenosine deaminase overproduction in hereditary hemolytic anemia. *Blood* **74**: 448-453, 1989.
- 9) Kanno H, et al: Adenosine deaminase(ADA) overproduction associated with congenital hemolytic anemia: case report and molecular analysis. *Jpn J Exp Med* **58**: 1-8, 1988.
- 10) Chen EH, Mitchell BS: Hereditary overexpression of adenosine deaminase in erythrocytes: studies in erythroid cell lines and transgenic mice. *Blood* **84**: 2346-2353, 1994.

別冊日本臨牀 新領域別症候群シリーズ No.21 (2013年1月20日発行) 別刷

血液症候群(第2版)

—その他の血液疾患を含めて—

I

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 Embden-Meyerhof回路

アルドラーゼA異常症

菅野 仁

II 赤血球の異常

貧血 溶血性貧血 先天性溶血性貧血

赤血球酵素異常による溶血性貧血 Embden-Meyerhof回路

アルドラーゼA異常症

Molecular basis of human aldolase A deficiency associated with congenital hemolytic anemia

Key words : 先天性溶血性貧血, 赤血球酵素異常症, 解糖系

菅野 仁

1. 概念・定義

アルドラーゼ(EC 4.1.2.13)は解糖系の第4番目の酵素でフルクトース-1,6-2リン酸(FBP)をジヒドロアセトンリン酸とグリセルアルデヒド3-リン酸に変換する反応を触媒する。アルドラーゼにはアルドラーゼA, B, Cの3つのアイソザイムが存在する。アルドラーゼAは胎児組織や赤血球・筋など広範な組織に発現する。肝・腎・小腸ではアルドラーゼBが、更に中枢神経系にはアルドラーゼAとCほぼ同レベルの発現が認められる。このアイソザイムがそれぞれ別の構造遺伝子にコードされており、それぞれのアイソザイム発現には組織特異性が認められるため、それぞれのアイソザイム遺伝子変異は異なる遺伝性疾患の原因となる(表1)。

アルドラーゼA(ALDOA)遺伝子は第16番染色体短腕にその遺伝子座があり(16p11.2), 全長が約17kbp, 転写されるmRNAは約1.6kbp

で363アミノ酸をコードする。分子量約40kDaのサブユニットからなる四量体が酵素活性を有する。ALDOA遺伝子は12エクソンで構成されているが、3'-側8個のエクソンがアミノ酸をコードしており、5'-側の4つのエクソンは異なる転写開始部位をもつプロモーターを有することが明らかになっている。アルドラーゼB(ALDOB)遺伝子は第9染色体, アルドラーゼC(ALDOC)遺伝子は第17番染色体に座位が存在する。それぞれのアイソザイムは異なる構造遺伝子にコードされている。

2. 現在までに報告されたアルドラーゼA異常症の4家系(表2)

アルドラーゼA異常症は先天性溶血性貧血およびミオパチーのいずれか、あるいは両方を示す先天代謝異常であり、現在まで4家系のみが報告されている極めてまれな常染色体劣性遺伝疾患である。1973年、米国のBeutlerらによ

表1 アルドラーゼアイソザイム

	アルドラーゼA	アルドラーゼB	アルドラーゼC
遺伝子座	16p11.2	9q31.1	17q11.2
構造遺伝子	ALDOA	ALDOB	ALDOC
発現組織	赤血球・骨格筋・胎児組織	肝・腎・小腸	中枢神経系
活性低下による疾患	先天性溶血性貧血	果糖不耐症	知られていない

Hitoshi Kanno: Department of Transfusion Medicine and Cell Processing, Tokyo Women's Medical University 東京女子医科大学 輸血・細胞プロセッシング科