

表1 先天性溶血性貧血の分類

1) 赤血球膜異常症	
遺伝性球状赤血球症	(Hereditary spherocytosis, HS)
遺伝性楕円赤血球症	(Hereditary elliptocytosis, HE)
遺伝性熱変形性赤血球症	(Hereditary pyropoikilocytosis, HPP) など
2) 赤血球酵素異常症	(G6PD deficiency, PK deficiency, P5N deficiency) など
3) ヘモグロビン異常症	
鎌状赤血球症	(Sickle cell disease)
不安定ヘモグロビン症	(Unstable hemoglobinopathy)
サラセミア	(Thalassemia) など

表2 先天性溶血性貧血の主要徴候

■慢性溶血	61.4%
■急性溶血発作	46.7%
■早発・重症新生児黄疸	44.6%
■脾腫	9.8%
■胆石	4.9%

表3 先天性溶血性貧血の患者背景

■溶血の家族歴あり	33.7%
■両親のいずれか（先祖）が外国人	14.1%
■IUGR, 早産	6.0%
■先天異常の合併	4.9%
■血族結婚	1.6%

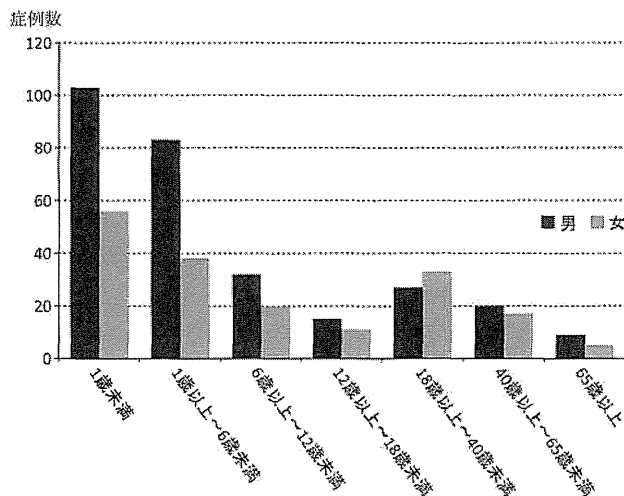


図1 先天性溶血性貧血の年齢分布

先天異常の合併は4.9%であり、胎児期の異常所見を認めた例は少なかった。両親に血縁を認める例は全体の1.6%に過ぎないことも明らかになった。

先天性溶血性貧血の診断フローチャート（図2）

我々の検査室では、直接抗グロブリン試験（DAT）陰性で赤血球表面IgG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2のチャートで示す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、平均赤血球容積はやや大きく、正球形～大球形貧血を示す。網赤血球数を含む血算、AST, ALT, LD, ビリルビン（直接・間接）、血清鉄、総鉄結合能、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。急性溶血発作の有無を判断するには、ヘモグロビン尿や尿中ヘモジデリンの検出が参考になる。

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。小型球状赤血球は遺伝性球状赤血球症（HS）の特徴的な所見だが、自己免疫性溶血性貧血（AIHA）でも観察されることに注意が必要である。不安定ヘモグロビン（Hb）が赤血球内で変性した場合、Heinz小体と呼ばれる封入体構造が赤血球内に出現し、赤血球変形能が障害されるため、網内系で赤血球膜の一部がHeinz小体と共に失われる。結果として、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や機械的機序で生じる溶血性貧血でも認められる。

赤血球酵素異常症のなかではビリミジン5'-ヌクレオチダーゼ（P5N）異常症における好塩基性斑点（basophilic stippling）が特徴的である。P5Nは網赤血球中のRNAを処理する過程でCMP, UMPから脱リン酸化して、シチジン、ウリジンを産生する酵素である（図3）。シチジン・ウリジンは赤血球膜を通過して細胞外に排泄されるが、P5Nの活性が低下すると赤血球中にビリミジンヌクレオチドが蓄積する¹⁾。これが赤血球の細胞質内に微細な封入体を形成する。蓄積したビリミジンヌクレオチドが解糖系を阻害することが溶血の病因と考えられている。P5Nは鉛により阻害を受けるため、好塩基性斑点は鉛中毒の際にも現れる。

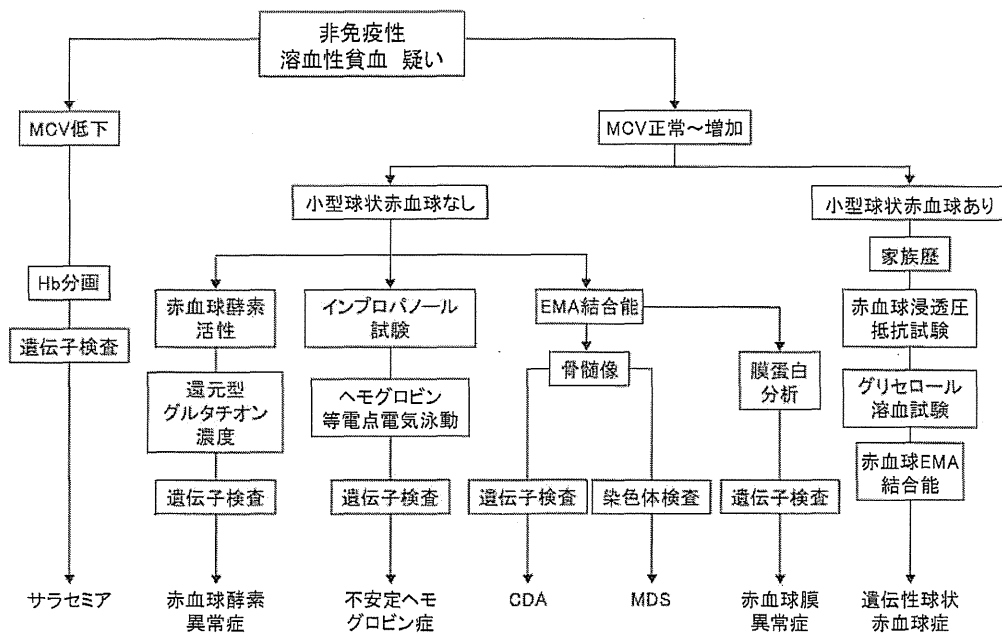


図2 先天性溶血性貧血の診断フローチャート

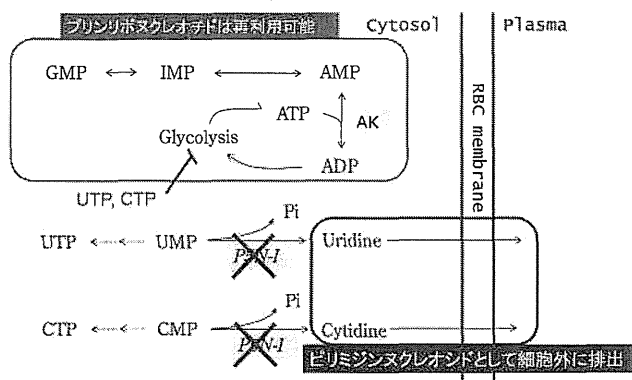


図3 赤血球におけるリボヌクレオチド代謝系とP5N異常症

その他の赤血球酵素異常症では赤血球形態に異常を認めないが、摘脾後のピルビン酸キナーゼ (PK) 異常症では赤血球内 ATP の低下により Na/K ポンプ機能が低下した結果生じる、ウニ状ないし金平糖状の赤血球 (echinocyte, spiculated erythrocyte) が観察される。

赤血球膜骨格蛋白異常による先天性溶血性貧血 (表4)

赤血球の直径は7~9 μ mであり、2 μ m程度と遙かに狭い直径の毛細血管や脾臓の類洞内皮細胞間隙を通過することが可能なのは、赤血球膜が変形能を備え、機械的な刺激でも断片化することのない安定性を有することに依る。これら膜の変形能・安定性は赤血球膜の脂質二重層と裏打ち

する膜骨格蛋白 (membrane cytoskeleton) により担われている。我が国の先天性溶血性貧血症例の約70%を占める遺伝性球状赤血球症 (Hereditary spherocytosis: HS) は代表的な赤血球膜異常症であり、その病因は 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) 遺伝子のいずれかに生じた変異に依る。また、遺伝性楕円赤血球球症 (Hereditary elliptocytosis: HE) は、SPTA1, SPTB, 4.1 蛋白 (EPB41) およびグリコフォリンC (GPC) 遺伝子変異によって生じることが明らかになっている (表4)。また、我が国ではほとんど報告の無かった遺伝性熱変形性赤血球球症 (Hereditary pyropoikilocytosis: HPP) は SPTA1 遺伝子の複合ヘテロ接合体として発症するケースが多いことが知られている²⁾。表4に示すように HS, HE の確定診断には、それぞれ5種、4種の遺伝子検査が必要となる。

赤血球酵素異常症による先天性溶血性貧血 (表5)

我が国の先天性溶血性貧血の原因となる赤血球酵素異常症では、解糖系酵素異常症として PK, グルコースリン酸イソメラーゼ (GPI) 異常症、ペントースリン酸経路では G6PD 異常症そしてヌクレオチド代謝系では P5N 異常症の頻度が高い。

溶血性貧血では網赤血球増多を伴うことから、網赤血球や幼若な赤血球で活性が高く、赤血球の加齢に伴い活性が急速に低下する酵素 (age-dependent enzyme) については、変異酵素の活性低下が判定困難な場合がある。赤血球酵素

表4 赤血球膜タンパクと溶血性貧血

膜タンパク質	遺伝子	赤血球膜異常症			
		HS	HE	HPP	NIHF
アンキリン	<i>ANK1</i>	○			
バンド3	<i>SLC4A1</i>	○			○
α-スペクトリン	<i>SPTA1</i>	○	○	○	○
β-スペクトリン	<i>SPTB</i>	○	○	○	○
4.1 タンパク質	<i>EPB41</i>		○		
4.2 タンパク質	<i>EPB42</i>	○			
グリコフォリンC	<i>GPC</i>		○		

HS：遺伝性球状赤血球症，HE：遺伝性橢円赤血球症，HPP：遺伝性熱変形性赤血球症，NIHF：非免疫性胎児水腫

表5 先天性溶血性貧血の原因となる赤血球酵素異常症の病因遺伝子と遺伝形式

酵素名	遺伝子 (OMIM)	遺伝形式
1 ヘキソキナーゼ	<i>HK1</i> (*142600)	AR
2 グルコースリン酸イソメラーゼ	<i>GPI</i> (*172400)	AR
3 ホスホフルクトキナーゼ	<i>PFKM</i> (*610681)	AR
4 アルドラーゼ	<i>ALDOA</i> (*103850)	AR
5 三炭糖リン酸イソメラーゼ	<i>TPI1</i> (+190450)	AR
6 ホスホグリセリン酸キナーゼ	<i>PGK1</i> (*311800)	XR
7 エノラーゼ	<i>ENO1</i> (*172430)	AR
8 ビルビン酸キナーゼ	<i>PKLR</i> (*609712)	AR
9 グルコース-6-リン酸脱水素酵素	<i>G6PD</i> (+305900)	XR
10 6-ホスホグルコン酸脱水素酵素	<i>PGD</i> (*172200)	AR
11 アデニル酸キナーゼ	<i>AK1</i> (*612631)	AR
12 アデノシンデアミナーゼ	<i>ADA</i> (102730)	AD
13 ビリミジン 5'-ヌクレオチダーゼ	<i>NTSC3</i> (*606224)	AR
14 γグルタミルシステイン合成酵素	<i>GCLC</i> (#230450)	AR
15 グルタチオン合成酵素	<i>GSS</i> (#231900)	AR
16 グルタチオン還元酵素	<i>GSR</i> (+138300)	AR
17 グルタチオンペルオキシダーゼ	<i>GPX1</i> (*138320)	AR

1～8が解糖系，9・10がペントースリン酸経路，11～13がプリン・ビリミジン代謝，14～17がグルタチオン合成・代謝系の酵素

OMIM: On-line Mendelian Inheritance in Man, <http://omim.org/search/advanced/entry>, AR；常染色体劣性，AD；常染色体優性，XR；X染色体劣性

異常症で頻度の最も高いG6PD異常症，PK異常症に関しては，G6PDとPKが共にage-dependent enzymeであることからその活性の相対比を参考にすることで，診断に至る例もある。また，赤血球輸血依存例では輸血された正常赤血球由来の酵素活性により，変異酵素の活性低下がマスクされてしまうこともある。したがって赤血球酵素活性を網羅的に検討し，各々の酵素活性を相対的に評価することが必要である。

G6PD異常症は，赤血球酵素異常症の中で最も頻度の高い疾患である。我々が病因を確定し得た症例の約28%がG6PD異常症であった。本症はX連鎖劣性遺伝によるため，臨床上問題となるのはほとんどがヘミ接合体の男性であり，女性の変異G6PD遺伝子ヘテロ接合体の10%は溶血

性貧血を発症するとされているが，自験例においても男女比は7.6対1であった。母親または祖先に外国人を持つ症例が全体の約半数に達した。新生児期に早発・重症黄疸を認めた例は全体の約6割を占め，その半数には慢性溶血を認めた。全体では慢性溶血を認めた例が約50%，急性溶血発作を認めた例は70%以上に達していた。急性溶血発作の誘因は感染・薬剤が約50%，ソラマメ摂取(favism)が約35%であった。急性溶血発作のトリガーとなる薬剤には解熱消炎鎮痛剤(NSAIDs)，抗生剤(セフェム系，ニューキノロン系，ST合剤)，抗けいれん剤(アレピアチン，カルバマゼピン)などの頻度が多いが，適応疾患が拡大したことから最近ではインターフェロンでの発症例も増えており，注意が必要である。早発・重症黄疸を認めた

新生児溶血性疾患の病型診断でG6PD異常症の有無を確認することは、急性溶血発作や無形成発作による重症化のリスクを予測し、患児（家族）への生活指導を行う上で極めて重要である。国際結婚の増加を反映してG6PD異常症患者数も増えており、今後、我が国においても新生児スクリーニングの導入を考慮すべきと考えられる。

著明なHbFの増加、赤血球PK活性の低下を伴う原因不明の先天性溶血性貧血8症例について病因解析を行った³⁾。新生児期重症黄疸にて光線療法既往があり、1歳時までに赤血球輸血が必要であり、8例のうち5例はその後赤血球輸血依存性の重症慢性溶血を認めた。サラセミア様の小球性低色素性貧血であり、著しいhypochromasia、大小不同を伴うpoikilocytosis、標的赤血球、破碎赤血球などが観察された。EMA結合能は全例で基準値内であった。赤血球酵素活性のスクリーニングではPK活性の低下を全例で認めたが、翻訳領域およびエクソン-イントロン接合部分の遺伝子変異は同定し得なかった。βグロビンおよび赤血球型PKに同時に発現異常が存在する事実より、両遺伝子に共通のトランス活性化因子である転写因子EKLF (erythroid Krüppel-like factor)の活性低下を疑い、その構造遺伝子である*KLF1*の変異解析を実施したところ、全例、変異*KLF1*の複合ヘテロ接合体であった。

*KLF1*遺伝子多型が赤血球内HbF量を増加させるHPFH (hereditary persistence of fetal hemoglobin)と関連することは既に明らかになっている⁴⁾。一方EKLFの2つめのzinc fingerにおけるミスセンス変異(E325K)はヘテロ接合体マウスが先天性赤血球異形成貧血 (congenital dyserythropoietic anemia: CDA)様の表現型を示すことも最近明らかになった⁵⁾。今回の検討結果から、*KLF1*遺伝子変異は胎芽〜胎児型グロビンの出現およびβグロビン発現低下、赤血球型PK活性の低下という2つの遺伝子異常による赤血球寿命の短縮を来し、重症先天性溶血性貧血を惹起することが明らかになった。

解糖系酵素異常による先天性溶血性貧血で最も頻度の高いPK異常症においては、片アレルに赤血球型PK遺伝子変異を同定できない症例が一部に存在する。今後赤血球PK活性の低下を来した先天性溶血性貧血症例では、*PKLR*遺伝子に加えて*KLF1*遺伝子変異の解析も必要と考えられた。

赤血球 eosin 5'-maleimide 結合能検査の有用性

赤血球浸透圧抵抗試験 (osmotic fragility test: OF) はHSのスクリーニング検査として手技が簡単である反面、摘脾前のHSでは約1/3の症例でOFは正常であり、感度が低いことが問題となっていた。また院内検査としてOFが実施できない医療機関が多くなっている。特に家族歴が無く、赤血球形態で典型的な小型球状赤血球が確認できないよう

な非定型的HS疑い例では、現在赤血球 eosin 5'-maleimide (EMA) 結合能測定検査がHSのスクリーニング検査として最も有用と考えられている⁶⁾。このEMAは赤血球膜貫通蛋白バンド3の細胞外ドメインに位置するLys430残基と結合する蛍光色素であり、EMA結合能検査はHSにおける赤血球表面積の減少を定量することで、HSの診断を行う検査である。血漿を除き、生理的食塩水で洗浄した赤血球5μLをリン酸緩衝生理的食塩水 (PBS) で溶解した0.5mg/mL EMA液と混合後、暗所で1時間孵置し、PBS/BSA (0.5%牛血清アルブミンを含むPBS) で3回洗浄後、FL-1チャンネル (緑色蛍光) を用いたフローサイトメトリー (FCM) で平均チャンネル蛍光強度 (mean channel fluorescence; MCF) を測定する。

HSにおいてはその分子異常がアンキリン、スペクトリン (α・β)、バンド3、4.2タンパクのいずれであっても結果として赤血球表面積の減少を来すため、バンド3に結合するEMA量が減少することが示されており、その他赤血球表面積の減少を起こすHPP、東南アジア卵形赤血球症 (Southeast Asia ovalocytosis; SAO)、II型CDA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、不安定ヘモグロビン症、PNHなどなどの病態では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、臨床所見や他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。最近の総説では、HS診断におけるEMA結合能の感度は93%、特異性は98%であり、OFの68% (新鮮血)、81% (孵置血) を大きく上回ることが示されている⁷⁾。

このEMA結合能を先天性溶血性貧血に対するスクリーニング検査として取り入れた結果、依頼元医療機関においては赤血球形態異常を認めず、「非球状性」溶血性貧血として検索依頼されてきた症例に有意のEMA低下を示す例が認められることが明らかとなった。家族歴が無く、赤血球形態で明らかな小型球状赤血球を観察できない症例にEMA結合能低下を認めた場合には、もう1つのHSスクリーニング検査である、酸グリセロール溶血試験 (acidified glycerol lysis test; AGLT) を併用し、AGLTの明らかな短縮を確認している。文献的には、AGLTの感度は95%、特異性は91%であり、感度の点ではEMA結合能を凌駕することが示されている。

未知の病因遺伝子探索〜全エクソーム解析による解析

先天性骨髄不全症、赤芽球癆、先天性溶血性貧血などの診断未確定症例を対象にした次世代型シーケンサー

(NGS)を用いたエクソーム解析が厚労省研究班（研究代表者 小島勢二教授）により進められている。我々は非免疫性溶血性貧血のうち、家族歴、赤血球形態、OF、EMA結合能、AGLT、赤血球酵素活性、イソプロパノール試験などの検査結果から診断未確定の非球状赤血球性溶血性貧血症例を対象にして検索を進めている。

サンプルはイルミナ社 HiSeq2000 で全エクソーム解析後、各種データベース等を用い病因候補遺伝子変異を同定した。現時点で全体の約 1/6 で 8 種の赤血球膜骨格蛋白遺伝子変異 (*SPTA1*, *SPTB*, *ANK1*, *SLC4A1*) を同定した（新規 6 種、既報 2 種）。症例 1 は Hb10.2, MCV67.5, 奇形赤血球が観察され、EMA 結合能で異常低値を示し、HPP が疑われた。この例には *SPTB* の新規変異が同定された。症例 2 は新生児期に頻回の交換輸血を必要とし、破碎赤血球が確認された。本例には *SPTA1* c.G83A:p.R28H が同定されたが、この変異はスペクトリン四量体形成障害を来し、HPP または HE に報告されている⁸⁾。症例 3 は輸血依存性で著しい大小不同、奇形赤血球が目立ち、*ANK1* c.1605delA:p.K535fs が同定された⁹⁾。以上、奇形・破碎赤血球などの特徴的な赤血球形態異常を示す重症の先天性溶血性貧血症例に対しては網羅的遺伝子解析で赤血球膜骨格蛋白遺伝子変異が同定できることが明らかになってきた。交換輸血後の新生児例や輸血依存例には赤血球膜骨格蛋白遺伝子をターゲットとした NGS 解析が極めて有用であると考えられる。

先天性溶血性貧血診断精度の向上と今後の課題

非免疫性溶血性貧血という診断のもと、我々が 2004～2013 年に検索した症例の最終診断結果は全体の約 67% を診断し得た。米国の Beutler ら¹⁰⁾ によって 1982～88 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、先天性溶血性貧血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。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

1/3% は未だ原因不明であり、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。

文 献

- 1) Kanno H, Fujii H, Miwa S: Physiological significance and molecular genetics of red cell enzymes involved in the ribonucleotide metabolism. *Proc Jpn Acad*, 78: 287–292, 2002.
- 2) Ramos MC, Schafernak KT, Peterson LC: Hereditary pyropoikilocytosis: a rare but potentially severe form of congenital hemolytic anemia. *J Pediatr Hematol Oncol*, 29: 128–129, 2007.
- 3) Viprakasit V, Ekwattanakit S, Rioueang S, et al: Mutations in Kruppel-like factor 1 cause transfusion-dependent hemolytic anemia and persistence of embryonic globin gene expression. *Blood*, 123: 1586–1595, 2014.
- 4) Satta S, Perseu L, Moi P, et al: Compound heterozygosity for KLF1 mutations associated with remarkable increase of fetal hemoglobin and red cell protoporphyrin. *Haematologica*, 96: 767–770, 2011.
- 5) Esteghamat F, Gillemans N, Bilic I, et al: Erythropoiesis and globin switching in compound Klf1::Bcl11a mutant mice. *Blood*, 121: 2553–2562, 2013.
- 6) King MJ, Zanella A: Hereditary red cell membrane disorders and laboratory diagnostic testing. *Int J Lab Hematol*, 35: 237–243, 2013.
- 7) 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.
- 8) Garbarz M, Lecomte MC, Féo C, et al: Hereditary pyropoikilocytosis and elliptocytosis in a white French family with the spectrin alpha I/74 variant related to a CGT to CAT codon change (Arg to His) at position 22 of the spectrin alpha I domain. *Blood*, 75: 1691–1698, 1990.
- 9) Gallagher PG, Ferreira JD, Costa FF, et al: A recurrent frameshift mutation of the ankyrin gene associated with severe hereditary spherocytosis. *Br J Haematol*, 111: 1190–1193, 2000.
- 10) Hirano A, Forman L, Beutler E: Enzymatic diagnosis in non-spherocytic hemolytic anemia. *Medicine (Baltimore)*, 67: 110–117, 1988.

Images 411: cold haemagglutination in bone marrow

Nobuyoshi Hanaoka, Department of Haematology/Oncology, Wakayama Medical University, Wakayama, Japan, nhanaoka@wakayama-med.ac.jp, edited by Barbara Bain

A 64-year-old man presented with Raynaud's disease in his fingers and toes in winter. When he visited our department in spring, laboratory findings were normal for leucocytes and platelets; however, he was slightly anaemic (RBC $3.18 \times 10^9/l$, haemoglobin concentration 107 g/l, mean corpuscular haemoglobin concentration 345 g/l) with intra- and extravascular haemolysis, a direct antiglobulin test positive for C3b and C3d, cold agglutinin titers of 1:512, hypocomplementaemia, and IgMκ clonal gammopathy without lymphocytosis, but with no cryoglobulin or anti-neutrophil cytoplasmic antibodies. These results led to a diagnosis of chronic idiopathic cold haemagglutinin disease. He has only mild symptoms that required no therapy.

A bone marrow examination revealed marked cold haemagglutination with temperature-dependent reversibility (Figure 1). Of interest, haemagglutination was prominently visible in orthochromatic normoblasts and mature erythrocytes, but was absent in immature normoblasts prior to the orthochromatic stage. Therefore, most nucleated cells including myeloid cells were surrounded with few erythrocytes and appeared to be virtually 'undressed' at room temperature. These results suggested that an erythrocyte surface antigen related to cold haemagglutination arose at the polychromatic/orthochromatic stage and was maintained into erythrocytes, which promoted a better understanding of erythrocyte antigens responding to cold agglutinin, which currently remains largely unknown in cold agglutinin disease.

Chronic cold haemagglutinin disease

Can be associated with a polyclonal B lymphocytosis

Can have cause factitious results with automated blood cell counters (true)

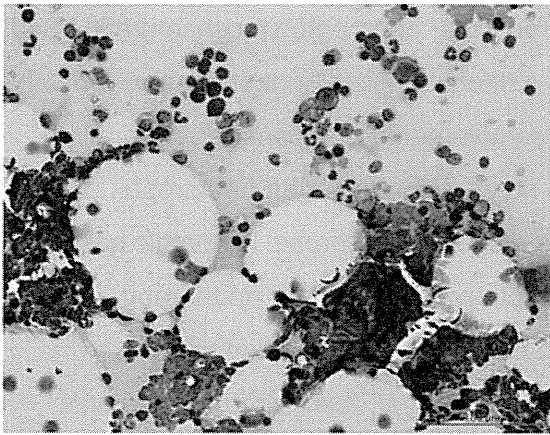
Can cause livedo reticularis (true)

Can occur in children following infection

May respond to rituximab (true)

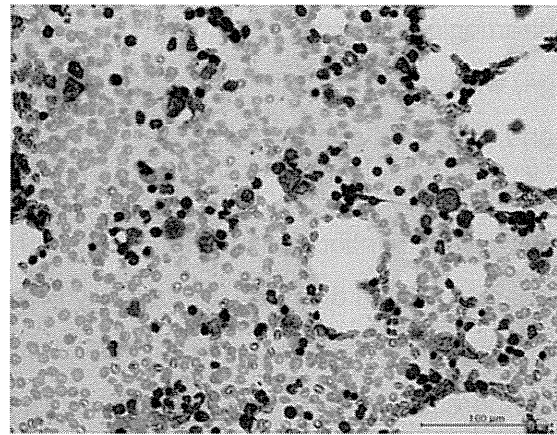
Chronic cold haemagglutinin disease is a clonal neoplastic condition of B lymphocytes associated with production of a monoclonal IgM cold agglutinin. It is a disease of the middle aged and elderly. Clinical features can include livedo reticularis, Raynaud phenomenon, acrocyanosis and cutaneous necrosis.

Swiecicki PL, Hegerova LT and Gertz MA (2013) Cold agglutinin disease. *Blood*, **122**, 1114–1121. PMID: 23757733



Room temperature

Fig. 1 Bone marrow aspirate at room temperature



Reheating to 37° C

Fig. 2 Bone marrow aspirate after warming at 37° centigrade

