

発作性夜間ヘモグロビン尿症診療の参照ガイド 平成 28 年度改訂版

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) の診断基準と診療の 参照ガイド改訂版作成のためのワーキンググループ

(責任者)

金倉 譲 (大阪大学)

(メンバー)

西村 純一 (大阪大学)

植田 康敬 (大阪大学)

二宮 治彦 (筑波大学)

中熊 秀喜 (鹿児島徳洲会病院)

七島 勉 (福島県立医科大学)

川口 辰哉 (熊本大学)

中尾 眞二 (金沢大学)

岡本 真一郎 (慶應義塾大学)

神田 善伸 (自治医科大学)

森下 英理子 (金沢大学)

木下 タロウ (大阪大学)

黒川 峰夫 (東京大学)

荒井 俊也 (東京大学)

(協力者)

高森 弘之 (大阪大学)

櫻井 政寿 (慶應義塾大学)

野地 秀義 (福島県立医科大学)

村上 良子 (大阪大学)

井上 徳光 (大阪府立成人病センター)

杉盛 千春 (石川県立中央病院)

石山 謙 (金沢大学)

小原 直 (筑波大学)

池添 隆之 (福島県立医科大学)

千葉 滋 (筑波大学)

大屋敷 一馬 (東京医科大学)

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

研究代表者 荒井俊也

平成 29 年 (2017 年) 3 月

1. 緒 言
 - 1) はじめに
 - 2) 作成法
 - (1) 構成メンバー
 - (2) 信頼度 (エビデンスレベル)
2. 定義 (疾患概念)
3. 診断基準
病型分類
4. 重症度基準
5. 疫 学
 - 1) 発生頻度
 - 2) 臨床病歴と自然歴
 - 3) 自然寛解
 - 4) 死因
 - 5) 長期予後
 - 6) 予後因子
6. 病因・病態
 - 1) 溶血機序
 - 2) 病因遺伝子
 - 3) PNH クローン拡大機序
7. 症状および臨床経過
 - 1) 溶血 (へモグロビン尿) および関連事項
 - 2) 造血不全
 - 3) 異常造血 (MDS あるいは白血病への移行)
 - 4) 血栓症
 - 5) 感染症
8. 検 査
 - 1) フローサイトメトリー
 - (1) PNH タイプ血球の検出法
 - (2) PNH タイプ血球の推移と臨床症状
 - (3) 微少 PNH タイプ血球の意義
9. 治療指針
 - 1) 治療薬・治療法
 - (1) エクリズマブ
 - (2) 副腎皮質ステロイド薬
 - (3) 輸血療法
 - (4) 鉄剤・葉酸
 - (5) ハプトグロビン
 - (6) 免疫抑制剤
 - (7) G-CSF
 - (8) 蛋白同化ステロイド薬
 - (9) 造血幹細胞移植
 - (10) 血栓溶解剤・ヘパリン
 - (11) ワルファリン

参考文献

1. 緒言

1) はじめに

発作性夜間ヘモグロビン尿症 (PNH) は、昭和 49 (1974) 年に溶血性貧血が特定疾患に指定されたことに伴い研究対象疾患として取り上げられ、「溶血性貧血調査研究班」(班長 三輪史朗) によって組織的な研究が開始された。それから今日に至る 30 年間にわたって歴代班長により疫学、病因、病態、診断、治療、予後など幅広い領域に関する調査研究が重ねられてきた。PNH は頻度は低いが特徴的な臨床像によってとらえられ定義づけられてきた。溶血性貧血の一病型としてのみでなく、骨髄不全をきたす幹細胞異常としての側面を併せ持つ。平成 5 (1993) 年の木下らのグループによる PIGA 遺伝子変異の発見とそれに引き続く分子生物学的な研究は、この謎に満ちた疾患の理解を一変させたといつてよいであろう。平成 13 (2001) 年には国際シンポジウム「PNH と近縁疾患：分子病態の視点から」が東京で開催され、世界の代表的研究者が一堂に会し、国際協調の気運が生まれた。平成 15 (2003) 年には、Duke Symposium on PNH が持たれ、国際研究協力を目的とした国際 PNH 専門家会議 (International PNH Interest Group, I-PIG) が組織された I-PIG はまず、国際的に共通する診断基準と診療ガイドラインの作成をめざし、それをコンセンサス・ペーパーとして公表した⁹⁾。

この「PNH の診療の参照ガイド」は、このような国際的な潮流と同調する形で作成された経緯があるが、平成 11 年度～16 年度に行われた「厚生労働科学研究 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」(小峰班) の 6 年間の調査研究活動を総括する意味合いも併せ持っており、その意味で我が国独自のものでもある(平成 17 年 3 月)。その後、小澤班(平成 17 年度～22 年度)、黒川班(平成 23 年度～26 年度)、荒井班(平成 27 年度、28 年度)に引き継がれ、数回の改定を経て、今回平成 29 年 3 月に全面改訂を行うものである。

2) 作成法

厚生労働科学研究「特発性造血障害に関する調査研究班」(班長 小澤敬也) の研究者を中心に、我が国の PNH 研究者の参加を得て、診断基準と診療の参照ガイド作成のためのワーキンググループを編成し、Evidence-based Medicine (EBM) の考え方に沿ってできるだけ客観的なエビデンスを抽出するように文献評価作業を進めた。

ワーキンググループで作成された案は、上記研究班の平成 28 年度合同班会議総会に提示され、検討のうえ改訂された。

(1) 構成メンバー

PNH 診療の参照ガイド作成のためのワーキンググループのメンバーは表紙に記載した通りである。

(2) 信頼度 (エビデンスレベル)

引用した文献は、Agency for Healthcare Research and Quality (AHRQ) のエビデンスレベルの定義に従い、該当する本文中に注記した。

また、4. 疫学 に関しては、厚生労働省 疫学班(班長 大野良之) による平成 10 年度全国調査の成績を用い、臨床病態等については平成 11 年度に開始した日米比較調査研究の成績を中心に用いた。

PNH は希な疾患であり、これまでにエビデンスレベルの高い臨床研究は極めて少ないことに留意が必要である。治療に記載されている薬剤には、保険適応外使用が含まれていることにも留意頂きたい。また、PNH の臨床像は欧米白人例と我が国を含むアジア人とは、一定の差異を認めることも明らかにされているので、欧米からの報告を我が国の症例にそのまま適用するのは不適切である可能性が残される。

AHRQ (Agency for Healthcare Research and Quality) の Evidence Level 定義

Level of Evidence Study Design

Level Ia	複数のランダム化比較試験のメタ分析によるエビデンス
Level Ib	少なくとも一つのランダム化比較試験によるエビデンス
Level IIa	少なくとも一つのよくデザインされた非ランダム化比較試験によるエビデンス
Level IIb	少なくとも一つの他のタイプがよくデザインされた準実験的研究によるエビデンス
Level III	よくデザインされた非実験的記述的研究による (比較研究や相関研究, ケースコントロール研究など) エビデンス
Level IV	専門家委員会の報告や意見, あるいは権威者の臨床経験によるエビデンス

2. 定義（疾患概念）

発作性夜間ヘモグロビン尿症（paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, PNH）は、*PIGA* 遺伝子に後天的変異を持った造血幹細胞がクローン性に拡大した結果、補体による血管内容血（クームス陰性）を主徴とする造血幹細胞疾患である。再生不良性貧血（aplastic anemia, AA）を代表とする後天性骨髄不全疾患としばしば合併・相互移行する。血栓症は本邦例では稀ではあるが、PNH に特徴的な合併症である。また稀ではあるが、急性白血病への移行もある。

3. 診断基準（平成 28 年度改訂）

1. 臨床所見として、貧血、黄疸のほか肉眼的ヘモグロビン尿（淡赤色尿～暗褐色尿）を認めることが多い。ときに静脈血栓、出血傾向、易感染性を認める。先天発症はないが、青壮年を中心に広い年齢層で発症する。
 2. 以下の検査所見がしばしばみられる。
 - 1) 貧血および白血球、血小板の減少
 - 2) 血清間接ビリルビン値上昇、LDH 値上昇、ハプトグロビン値低下
 - 3) 尿上清のヘモグロビン陽性、尿沈渣のヘモジデリン陽性
 - 4) 好中球アルカリホスファターゼスコア低下、赤血球アセチルコリンエステラーゼ低下
 - 5) 骨髄赤芽球増加（骨髄は過形成が多いが低形成もある）
 - 6) Ham(酸性化血清溶血)試験陽性または砂糖水試験陽性
 3. 上記臨床所見、検査所見より PNH を疑い、以下の検査所見により診断を確定する。
 - 1) 直接クームス試験が陰性
 - 2) グリコシルホスファチジルイノシトール (GPI) アンカー型膜蛋白の欠損血球 (PNH タイプ赤血球) の検出と定量
 4. 骨髄穿刺、骨髄生検、染色体検査等によって下記病型分類を行うが、必ずしもいずれかに分類する必要はない。
 - 1) 臨床的 PNH(溶血所見がみられる)
 - (1) 古典的 PNH
 - (2) 骨髄不全型 PNH
 - (3) 混合型 PNH
 - 2) 溶血所見が明らかでない PNH タイプ血球陽性の骨髄不全症（臨床的 PNH とは区別する）
 5. 参 考
 - 1) 確定診断のための溶血所見としては、血清 LDH 値上昇、網赤血球増加、間接ビリルビン値上昇、血清ハプトグロビン値低下が参考になる。PNH タイプ赤血球(III 型)が 1%以上で、血清 LDH 値が正常上限の 1.5 倍以上であれば、臨床的 PNH と診断してよい。
 - 2) 直接クームス試験は、エクリズマブ投与中の患者や自己免疫性溶血性貧血を合併した PNH 患者では陽性となることがある。
 - 3) 混合型 PNH とは、古典的 PNH と骨髄不全型 PNH の両者の特徴を兼ね備えたり、いずれの特徴も不十分で、いずれかの分類に苦慮する場合に便宜的に用いる。
-

4. 溶血所見に基づいた重症度分類（平成 28 年度改訂）

軽 症	下記以外
中等症	以下のいずれかを認める
	溶血
	・中等度溶血、または時に溶血発作を認める
	溶血に伴う以下の臓器障害・症状
	・急性腎障害、または慢性腎障害の stage の進行
	・平滑筋調節障害：胸腹部痛や嚥下障害（嚥下痛、嚥下困難）などはあるが日常生活が可能な程度、または男性機能不全
	妊娠
重 症	以下のいずれかを認める
	溶血
	・高度溶血、または恒常的に肉眼的ヘモグロビン尿を認めたり頻回に溶血発作を繰り返す
	・定期的な輸血を必要とする
	溶血に伴う以下の臓器障害・症状
	・血栓症またはその既往を有する（Budd-Chiari 症候群を含む）
	・透析が必要な腎障害
	・平滑筋調節障害：日常生活が困難で、入院を必要とする胸腹部痛や嚥下障害（嚥下痛、嚥下困難）
	・肺高血圧症

- 注1 中等度溶血の目安は、血清 LDH 値で正常上限の 3～5 倍程度
高度溶血の目安は、血清 LDH 値で正常上限の 8～10 倍程度
- 注2 溶血発作とは、肉眼的ヘモグロビン尿を認める状態を指す。
時にとは年に 1～2 回程度、頻回とはそれ以上を指す。
- 注3 定期的な赤血球輸血とは毎月 2 単位以上の輸血が必要なときを指す。
- 注4 妊娠は溶血発作、血栓症のリスクを高めるため、中等症として扱う。

5. 疫 学

1) 発生頻度

厚労省の平成 10 年度疫学調査班（大野班）の層化無作為抽出法によるアンケート調査によると、わが国における PNH の推定有病者数は 430 人であった¹⁾【II】。発症頻度に関しては、中国で 17,600,344 人の住人に対して 1975 年から 1984 年の 10 年間にわたり追跡された調査によると、この間に 22 名が PNH を発症し、100 万人あたりの発症頻度は 1.2 人（range: 0-2.8）、罹患率は 6.93 人と推定された²⁾【II】。性差については、近年の報告では各国とも男女比がほぼ 1:1 である（表 1）。

表 1 PNH の地域的性差・年齢の比較

著者	国	症例数	男性数/女性数	男女比	診断年齢中央値(歳)
Hillmen P et al ³⁾	イギリス	80	33/47	0.7	42
de Latour RP et al ⁴⁾	フランス	460	210/250	0.8	34
Nishimura J et al ⁵⁾	アメリカ	176	77/99	0.8	30
	日本	209	118/91	1.3	45
Chou WL et al ⁶⁾	台湾	63	32/31	1.0	37.5
Jang JH et al ⁷⁾	韓国	301	152/149	1.0	37
Muñoz-Linares C et al ⁸⁾	スペイン	56	36/20	1.8	38
Schrezenmeier H et al ⁹⁾	25 か国	1610	753/857	0.9	32

診断時（初診時）年齢中央値は、特発性造血障害に関する研究班の共同研究「PNH 患者における臨床病歴と自然歴の日米比較調査」のデータによると、日本が 45 歳（range: 10-86）でアメリカが 30 歳（range: 4-80）に対して有意に高かった⁵⁾【III】。診断時年齢分布は、日本では 20～60 歳代にまんべんなく発症するのに対し、アメリカでは 10～30 歳代にピークをむかえその後徐々に減少する（図

1)。この差はおそらく、欧米の青少年期のPNHの多くはAAから移行してくる例が多いこと¹⁰⁾【Ⅲ】、またアジア症例では血栓症をはじめとするPNH症状が著明でないために診断が遅れやすいからではないかと考えられている。なお、表1に示した通り、他国の診断年齢中央値も30-40歳代であり、日本も一応この範疇には入っている。

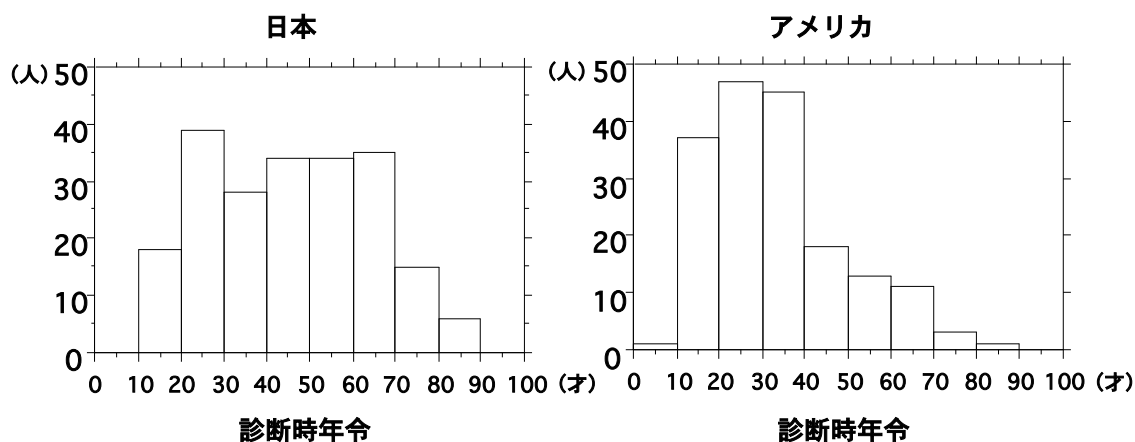


図1 日本とアメリカにおけるPNH患者の診断時年齢⁷⁾

2) 臨床病歴と自然歴

当班の日米比較調査による診断時の臨床所見と検査所見の比較を表2に示す⁵⁾【Ⅲ】。

表2 日本とアメリカにおける診断時の臨床所見と検査所見⁵⁾

	日本	アメリカ
先行病変	症例数 (%)	症例数 (%)
再生不良性貧血	79 (37.8)	51 (29.0)
骨髄異形成症候群	10 (4.8)	9 (5.1)
初発症状		
ヘモグロビン尿	* 70 (33.5)	88 (50.0)
貧血	* 197 (94.3)	155 (88.1)
白血球 (好中球) 減少	* 151 (72.3)	80 (45.5)
血小板減少	* 132 (63.2)	92 (52.3)
感染症	* 7 (3.4)	24 (13.6)
血栓症	* 13 (6.2)	34 (19.3)
検査所見	Mean ± S.E.	Mean ± S.E.
HGB (g/dL)	* 8.2 ± 0.2	9.7 ± 0.2
網状赤血球数 (X 10 ⁶ /L)	* 78.3 ± 6.2	195.3 ± 13.1
白血球数 (X 10 ⁶ /L)	* 3475.3 ± 137.5	4947 ± 198.6
好中球数 (X 10 ⁶ /L)	* 1781.6 ± 132.5	3005.1 ± 156.4
血小板数 (X 10 ⁹ /L)	* 96.0 ± 5.8	140.1 ± 8.6
LDH (U/L)	1572.3 ± 91.7	2337.2 ± 405.6

*; P<0.05

先行病変としてAAを伴う頻度は、日本が37.8%に対しアメリカが29.0%と日本がやや高かったが、骨髄異形成症候群 (myelodysplastic syndrome, MDS) の頻度は5%前後で差はなかった。

診断時初発症状の頻度は、造血不全症状と考えられる貧血、白血球 (好中球) 減少、血小板減少は日本で有意に高かったが、PNHの古典的症状と考えられるヘモグロビン尿、感染症、血栓症はアメリカで有意に高かった。

診断時検査所見も同様に、造血不全を反映するヘモグロビン、白血球数、好中球数、血小板数は日本でより低値の傾向を示したのに対し、溶血を反映する網状赤血球、LDHはアメリカでより高値の傾向を示した。

当班の日米比較調査による臨床経過の比較についても同様に表3に示す⁵⁾【Ⅲ】。

表3 日本とアメリカにおける臨床経過⁵⁾

	日本	アメリカ
合併症	症例数 (%)	症例数 (%)
造血不全	76 (36.4)	58 (33.0)
血栓症	* 9 (4.3)	56 (31.8)
重症感染症	* 19 (9.1)	32 (18.2)
骨髄異形成症候群	8 (3.8)	6 (3.4)
白血病	6 (2.9)	1 (0.6)
腎不全	22 (10.5)	16 (9.1)

*: $P < 0.05$

経過中の合併症としては、PNHの古典的症状である血栓症、重症感染症は有意にアメリカに多かったものの、造血不全の頻度には差はなかった。

以上のことは、アジア症例では造血不全症状が主体であるのに対し、欧米例では古典的なPNH症状が前面に出ていることを示しているものと思われた。

また、国際レジストリデータ (25か国 1610例) によると、16%が血栓症、14%が腎機能障害の既往を有していた。PNHクローンサイズが大きい群ほど、あるいはLDH高値群ほど血栓症を発症する頻度が有意に高かったことが示されている⁹⁾ 【II】。

3) 自然寛解

PNHでは自然寛解が起こり得るというのも特徴の一つであるが、その頻度に関しては、イギリスの15%という非常に高い報告もあるものの³⁾ 【III】、フランスの報告¹¹⁾ 【II】でも当班の日米比較調査⁵⁾ 【III】でもせいぜい5%までであった。これは、診断基準および寛解基準の曖昧さによる差異と考えられ、これらの国際的な基準の整備が求められる。イギリスの80例の報告では、自然寛解と診断された12例について可能な限り詳細に解析して、赤血球や好中球でPNHタイプ細胞が消失しても、少数のPNHタイプ細胞がリンパ球には残ることが指摘されている³⁾。おそらくこれは、リンパ系細胞の寿命が長いために、PNH幹細胞クローンが死滅しても、リンパ系PNHクローンは生き残るものと理解される¹²⁾。

4) 死因

当班の日米比較調査による死因別統計を表4に示す⁵⁾ 【III】。

表4 日本とアメリカにおける死因別統計⁵⁾

	日本	アメリカ
死因	症例数 (%)	症例数 (%)
出血	9 (23.7)	4 (10.5)
重症感染症	14 (36.8)	14 (36.8)
血栓症	* 3 (7.9)	16 (42.1)
骨髄異形成症候群/白血病	6 (15.8)	3 (7.9)
腎不全	7 (18.4)	3 (7.9)
癌	2 (5.3)	2 (5.3)
原因不明	0	2 (5.3)

*: $P < 0.05$

死因別統計の内訳はアジアと欧米では大きく異なっており、アジア症例では出血が多く (10-40%)、血栓症が少ない (10%未満)^{2,5)}。一方欧米例では、血栓症が多く (30%以上)、出血が少ない (20%未満) という特徴がある^{3,5,11)}。しかし、近年の韓国からの報告によれば、死因として重症感染症 (32.6%) の次に多いのは血栓症 (16.3%)、次いで出血 (9.3%) となっており、治療や生活様式の変化が影響を及ぼしている可能性がある⁷⁾。

以上のデータはいずれもエクリズマブ導入前であるが、エクリズマブは血栓症の発症を抑制する効果があり¹³⁾ 【II】、今後死因は大きく変化する可能性がある。

5) 長期予後

長期予後に関しては、エクリズマブの導入前後によって、大きく変化している。

■エクリズマブ導入前

当班の日米比較調査による診断後の生存率曲線 (Kaplan-Meier 法) を図 2 に示す⁵⁾【Ⅲ】。

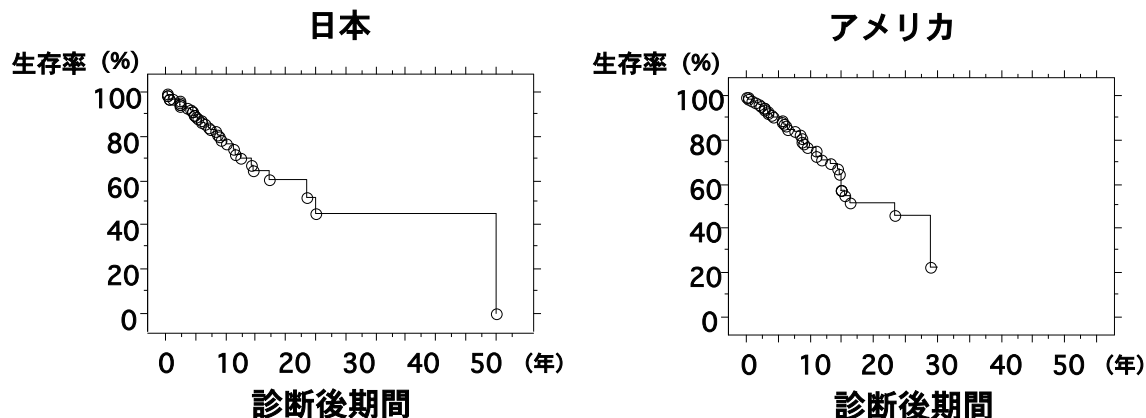


図 2 日本とアメリカにおける診断後の生存率曲線 (Kaplan-Meier 法)⁵⁾

診断後の平均生存期間は、日本が 32.1 年とアメリカの 19.4 年に対し長かったが、50%生存期間では、日本が 25.0 年、アメリカが 23.3 年と差はなく、Kaplan-Meier の生存曲線でも統計的に有意差はなかった。いずれも、これまでに報告された 50%生存期間と比べると、比較的長いものであった (フランス (14.6 年)¹¹⁾【Ⅱ】、イギリス (10.0 年)³⁾【Ⅲ】、アメリカ小児例 (13.5 年)¹⁰⁾【Ⅲ】、フランス (22 年)⁴⁾。

■エクリズマブ導入後

25 개국から登録されている国際レジストリデータ (2356 例; エクリズマブ使用例はこのうち 25.5%) では、10 年間で死亡率は 5.24%であった。なかでも AA-PNH 症候群 (374 例) の死亡率は 18.36%と古典的 PNH と比較し有意に高い値であった¹⁴⁾【Ⅱ】。エクリズマブの導入により古典的 PNH の予後が改善していると考えられる。

さらに、エクリズマブ治療患者 (79 例) のフォローアップデータ (治療期間中央値 39 か月) では、英国において年齢・性別を整合させた健康な対照集団の生存率を比較したところ、エクリズマブ投与群と対照集団との間に死亡率の差は認められなかった【Ⅱ】¹⁵⁾。まだ短い期間のデータではあるものの、エクリズマブは PNH の予後を劇的に改善させたことが裏付けられた。

6) 予後因子

予後因子に関しては、エクリズマブ導入前のデータとなる。

フランスの予後因子の多変量解析 (220 例) によると、1) 血栓症の発症 (相対死亡危険率 (RR)=10.2)、2) 汎血球減少症への進展 (RR=5.5)、3) MDS/急性白血病 (acute leukemia, AL) の発症 (RR=19.1)、4) 診断時年齢 55 才以上 (RR=4.0)、5) 複数の治療必要症例 (RR=2.1)、6) 診断時の血小板減少 (RR=2.2) の 6 項目が予後不良因子として示された¹¹⁾【Ⅱ】。また、AA から発症の PNH は予後良好であった (RR=0.32)。

韓国における予後因子の多変量解析 (301 例) によると、1) 血栓症の発症 (RR=7.1)、2) 腎機能障害 (RR=3.0)、3) 骨髄不全症の合併 (RR=2.5) の 3 項目が予後不良因子として示された⁷⁾【Ⅱ】。

また、当班の日米比較調査によると、日米に共通する予後不良因子は、1) 診断時年齢 50 才以上、2) 診断時重症白血球 (好中球) 減少症、3) 重症感染症の合併であった (表 5)⁵⁾【Ⅲ】。米国例のみの因子は 1) 診断時血栓症の既往、2) 診断時 MDS の既往、3) 血栓症の発症で、本邦例のみの因子は 1) MDS の発症、2) 腎不全の発症であった。血栓症は本邦例においても重篤な合併症であるが、頻度が低く予後不良因子として検出するには至らなかったと思われる。

表5 日本とアメリカにおける生命予後不良因子⁵⁾

	日本		アメリカ	
	P 値	寄与度	P 値	寄与度
診断時				
50 才以上	<0.0001	9.5	<0.0001	14.4
重症白血球（好中球）減少症	<0.0001	16.3	<0.0001	30.5
血栓症	0.2	1.3	0.0072	6.1
骨髓異形成症候群の既往	0.7	0.1	0.005	7.7
合併症				
血栓症	0.052	3.6	0.004	5.4
重症感染症	0.0007	10.1	0.03	3.7
骨髓異形成症候群	0.03	4.6	0.9	1.4
腎不全	0.003	7.7	0.4	0.5

6. 病因・病態

1) 溶血機序

PNH の最初の報告は 1866 年の Gull にさかのぼり¹⁶⁾、1882 年 Strübing によって就寝後の血管内容血によるヘモグロビン尿症としての疾患概念が確立された¹⁷⁾。その後 Ham により患者赤血球の補体に対する感受性亢進が指摘されたが¹⁸⁾、溶血の詳細な機序は長らく不明であった。1983 年になり補体制御因子である CD55 (decay-accelerating factor, DAF) が患者赤血球で欠損していることが明らかになり^{19,20)}、続いて補体活性化の後期段階を制御している CD59 (membrane inhibitor of reactive lysis, MIRL) の欠損も判明し^{21,22)}、PNH の溶血は補体制御因子の欠損によることが判明した。元来、CD55 は C3/C5 転換酵素の崩壊を促進することによって補体活性化経路の前半の段階を調節し²³⁾、CD59 は補体活性化の終末段階で C9 の結合を抑制することで C5b-9(n) から成る膜侵襲複合体 (membrane attack complex, MAC) の形成を阻害している (図 3)^{24,25)}。CD55 および CD59 を同時に欠損する PNH 赤血球膜上では、わずかな補体活性化でも容易に MAC が形成されるために溶血すると理解される。CD55 の遺伝的な欠損症 (Inab 表現型) で、CD59 の正常な個体においては補体感受性亢進による溶血はみられない²⁶⁾。また、逆に CD59 の先天性欠損症で、CD55 が正常な個体では PNH と識別できない溶血症状がみられる²⁷⁻³⁰⁾。これらのことから、PIGA 変異により CD55 と CD59 の両者が欠損する PNH 血球の溶血には CD59 欠損が決定的な役割を果たすと考えられる。PNH 患者で、たまたま C9 欠損を伴った患者では PNH 赤血球が 95% であっても溶血症状を伴わなかったこともこのことを支持する³¹⁾。

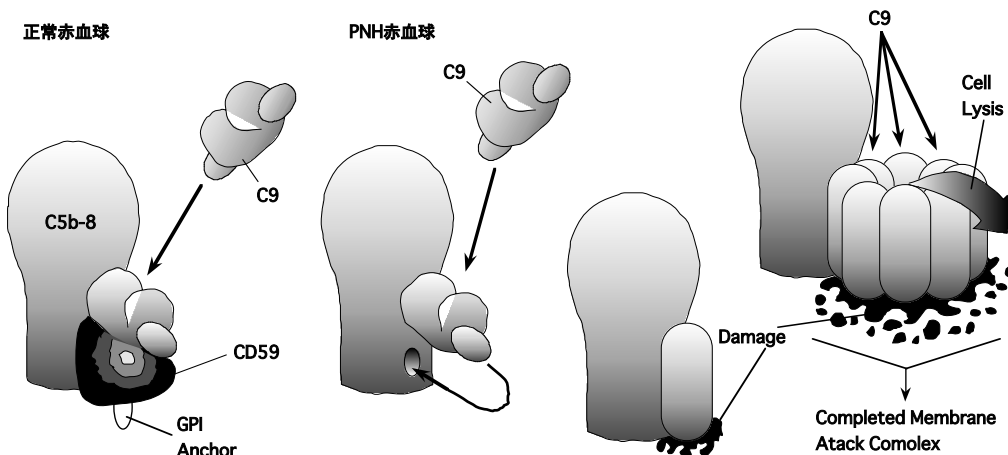


図3 補体溶血のメカニズム

このように、補体に弱い PNH 血球の膜異常の詳細は明らかにされたが、補体溶血を誘導する補体活性化機構については不明な点が多い。患者では、平常でもわずかな補体活性化による持続的な溶血がみられるが、感染症、睡眠、手術、妊娠、ビタミン C 大量摂取³²⁾、鉄剤投与、輸血など様々な誘因により強い補体活性化が起こると、短時間で大量溶血 (溶血発作) をきたす。これら誘因の中でも、臨床的にしばしば問題となるのは感染症である。補体活性化の程度は必ずしも感染症の重症度とは関係なく、軽い上気道炎や胃腸炎でも重篤な溶血発作が誘発される事があり注意を要する。この感染症誘

発性溶血は、感染に伴う赤血球膜抗原の変化から隠蔽抗原が露出され、これに対する自己血清中の自然抗体が結合することで補体の古典経路が活性化されるために PNH 血球が選択的溶血をおこすと説明されている³³⁾。

夜間の溶血亢進に関しては、睡眠中の呼吸数減少により血中 CO₂ が蓄積し酸性に傾くために補体が活性化されるという説や^{34,35)}、夜間の腸蠕動運動低下により Lipopolysaccharide (LPS) などエンドトキシン吸収が増大し、これが補体を活性化するという説³⁶⁾で説明されてきた。また、鉄剤投与による溶血亢進は、血管内溶血による鉄欠乏状態で鉄剤を投与すると造血が促進され、補体に弱い PNH 赤血球が増大するためであると理解される。

2) 病因遺伝子

PNH 血球では glycosylphosphatidylinositol (GPI) といわれる糖脂質を利用して細胞膜に結合する GPI アンカー型蛋白 (GPI-AP) 全てが欠落していることが判っていたが、個々の GPI-AP の構造遺伝子は正常であったので^{37,38)}、PNH 血球における GPI-AP 欠損の原因はアンカー部分の合成に関わる遺伝子変異と考えられた。木下らは、PNH 患者から樹立した B リンパ芽球株の詳細な解析から³⁹⁾、PNH の異常はホスファチジルイノシトールに N-アセチルグルコサミンを付加する最初のステップに異常を持つ相補性 Class A の変異であることを突き止め⁴⁰⁻⁴²⁾、発現クローニング法を用いこの異常を相補する遺伝子 *phosphatidylinositolglycan-classA* (*PIGA*) を PNH の責任遺伝子として報告した⁴³⁻⁴⁵⁾。現在までに報告された各国の PNH147 例全例で、178 の *PIGA* 変異が同定されている (図 4)⁴⁶⁾。1 塩基置換と 1 塩基挿入・欠失が多く、2 塩基までの異常が 82%を占めた (表 6)。変異様式は多種多様で翻訳領域とスプライス部位に広く分布し hot spot は存在せず、変異の結果フレームシフトを起こす例が 57%と大部分を占めた (表 6)。23 例で複数の異常クローンを認め、うち 2 例では 4 種の異常クローンが同一患者から同定され、PNH は従来理解されていたような単クローン性というよりはむしろオリゴクローン性の疾患であることが判った (表 6)。

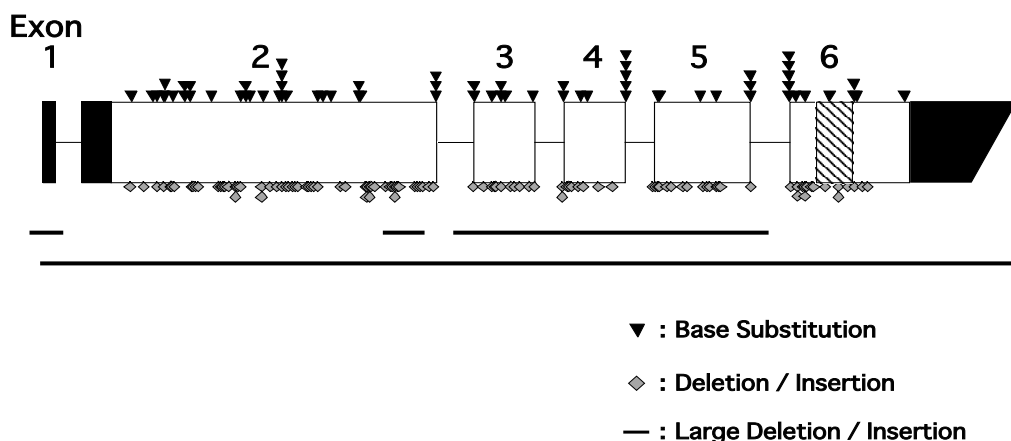


図 4 各国の PNH 患者 147 例で同定された 178 の *PIGA* 遺伝子変異の分布⁴⁶⁾

表 6 各国の PNH 患者 147 例で同定された 178 の *PIGA* 遺伝子変異サマリー⁴⁶⁾

I. Type		II. Consequence		III. Clonality	
Type	Number	Consequence	Number	Clonality	Number
Base substitution	65	Frameshift	102	Mono	121
Deletion		Missense	32	Oligo	
1 nt	48	Nonsense	18	Two	19
2 nt	10	Altered splicing	22	Three	2
3 nt	13	In-frame		Four	2
Insertion		deletion/insertion	4		
1 nt	20				
2 nt	3				
3 nt	8				
Others	11				
Total	178	Total	178	Total	144

nt=nucleotide

近年、*PIGA* と同様に GPI アンカー型タンパク質の生合成に必要な *PIGT* 遺伝子の変異によって起こる PNH 症例が報告された⁴⁷⁾。*PIGT* 遺伝子は、20番染色体にあるため GPI アンカー欠損をもたらすには両アレルに変異が起こる必要がある。この症例では、片方のアレルには生殖系列の変異があり、もう一方のアレルに造血幹細胞において体細胞変異が起こっていた。

また溶血機序の項で記したように CD59 遺伝子変異により小児期より PNH と同様の溶血をきたす先天性 CD59 欠損症が知られている。溶血以外にギラン・バレー症候群や慢性炎症性脱髄性多発神経炎 (Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy) 様の神経症状を呈する例のあることが特徴である²⁸⁻³⁰⁾。

3) PNH クローン拡大機序

PIGA 変異を持った PNH 造血幹細胞クローンが拡大してはじめて PNH 特有の様々な症状を発現するわけであるが、マウス相同遺伝子 *piga* を破壊した PNH モデルマウスを作成し、長期間観察しても異常クローンの拡大は観察されないことから、PNH の発症には *PIGA* 変異だけでは不十分だと考えられる⁴⁸⁻⁵²⁾。PNH は汎血球減少を示す例が多く、何らかの造血不全を伴っている。AA の経過中に PNH の発症をみる AA-PNH 症候群は古くから知られ、AA と PNH の関連が指摘されてきた⁵³⁾。従来長期生存が不可能であった重症 AA に、抗胸腺細胞グロブリン (antithymocyte globulin, ATG)、抗リンパ球グロブリン (antilymphocyte globulin, ALG) 等の免疫抑制療法が開発され、長期生存可能となった。これらの AA 患者は免疫学的機序により幹細胞が傷害を受け造血不全が生じたと考えられるが、これらの患者の多くは(13-52%)、PNH 血球(1%以上)を持っていることが 1990 年代に入り相次いで報告されている⁵⁴⁻⁶⁰⁾。

【Ⅲ】。このことから、PNH クローンは免疫学的障害を受けにくく相対的に増加すると考えられた。

現在考えられている PNH クローンの拡大機序を図 5 に示す。まず造血幹細胞に *PIGA* 変異が起こる (Step1)。これは健常人でも比較的良好に起こっていることが最近示されているが⁶¹⁾、これだけでは PNH クローンは拡大せず PNH の症状も見えてこない。そこに AA で起こるような免疫学的攻撃が加わると、おそらく GPI 陰性幹細胞はこの攻撃から逃れ、PNH クローンの全体に占める割合は相対的に増加する (Step2)。しかしながら、AA から発症してきた PNH や高度な造血不全を伴う PNH では PNH 細胞の割合がせいぜい 30% くらいまでで、その後も急激な増加をすることもなく長期に渡り安定している例がほとんどであることを考えると、これだけでは古典的な PNH (Florid PNH) を説明することは不十分である。おそらく、Step2 で相対的に増加した PNH 幹細胞が造血を支持するために増殖を繰り返す過程で、良性腫瘍的に増殖を誘導するような付加的な異常が加わり、さらなる増加を誘導し最終的に骨髓、末梢血ともに PNH 細胞に凌駕されて病態は完成する (Step3)。

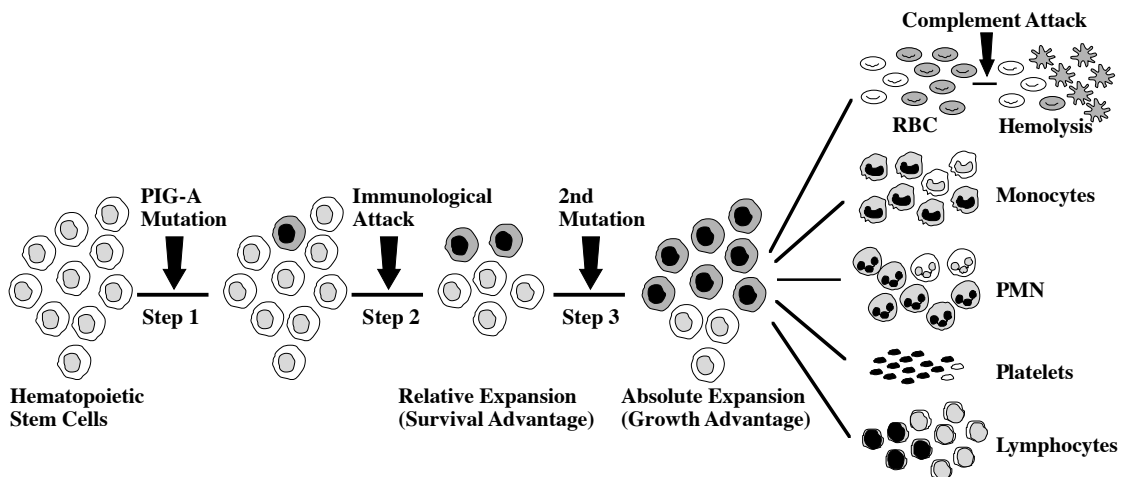


図 5 PNH クローンの拡大機序 - 多段階説

PNH クローンが拡大して症状を呈するには複数の step が必要である。

Step1: *PIGA* 変異が造血幹細胞に起こる

Step2: 免疫学的攻撃による正常幹細胞の減少と PNH 幹細胞の相対的増加

Step3: 第 2 の異常による PNH 幹細胞のクローン性拡大

造血障害を引き起こす免疫学的傷害のターゲットとして GPI-AP を介していれば、GPI-AP を発現する正常幹細胞は傷害されるのに対し、GPI-AP を欠損する幹細胞はこの傷害を免れることになり、PNH クローンの拡大機序を説明する上で大変魅力的な説である。

Maciejewski らは、PNH だけでなく GPI 陰性細胞を持つ AA や MDS において、MHC クラス II の DR2 型を持つ症例の頻度が健常者と比較して高いことを報告した⁶²⁾ 【Ⅲ】。さらに、七島らは、日本の PNH21 症例を調べ、DR2 に含まれる遺伝子型のうち DRB1*1501 と DRB1*1502 遺伝子型をそれぞれ 13 例と 6 例の PNH 症例が持つことを報告した⁶³⁾ 【Ⅲ】。また、これらの症例のうち、13 例は DRB1*1501-DQA1*0120-DQB1*0602 のハプロタイプを持っていた。中尾らは、0.003%以上の GPI 陰性細胞をもつ MDS (RA) 症例 21 例のうち、19 例が DRB1*1501 または 1502 遺伝子型を持ち、シクロスポリン療法に対し反応性であることを報告した⁶⁴⁾ 【Ⅲ】。以上より、PNH、AA、MDS において、GPI 陰性細胞が免疫学的な機序により増加する原因の遺伝的背景に、MHC クラス II 遺伝子型の関与があり、それらを認識する CD4 陽性 T 細胞が関わっている可能性が示唆された。

木下らは、標的細胞の抗原が GPI-AP の場合と GPI-AP が cofactor として機能している場合についてのモデル実験を組み立て、GPI 欠損細胞は、GPI-AP 由来のペプチドを効率よく MHC クラス II の上に呈示できないこと、GPI 欠損細胞は、コファクターである未知の GPI-AP が欠損するために、陽性細胞に比し CD4 陽性の細胞傷害性 T リンパ球 (CTL) に対して抵抗性であることを示した⁶⁵⁾。一方、中熊らは自己細胞傷害性リンパ球として NK 細胞を想定し、GPI 陰性細胞は陽性細胞に比し NK 細胞による傷害を受けにくいことを示した⁶⁶⁾。この NK 攻撃の標的分子として GPI-AP の ULBP が候補に挙げられ⁶⁷⁾、さらに ULBP および MICA/B を認識する NKG2D 受容体陽性免疫細胞による造血障害が提唱されている⁶⁸⁾。しかしながら、CTL に対して GPI 陰性細胞と陽性細胞の間で差がないという報告もあり⁶⁹⁾、GPI-AP 陰性幹細胞が CTL に対して抵抗性であるかどうかについては結論が出ていない。

Brodsky らにより、GPI 陰性細胞は陽性細胞に比しアポトーシス耐性であるとの報告がなされ、この現象は解決されたかにみえたが⁷⁰⁾、その後耐性の程度は GPI-AP 発現の有無には関係なく、このアポトーシス耐性は PNH クローン特有のものではなく AA や MDS など造血不全症候群に共通の現象であるとの報告が相次いだ^{71,72)}。その後、アポトーシス耐性についても、PNH 患者細胞と健常人細胞との間で差がないとの報告もあり⁷³⁾、この点についても未だ混沌としている状態である。

また、七島らはウィルムス腫瘍遺伝子 (Willms' tumor gene, *WT1*) が PNH 患者の骨髓細胞において、健常者および AA 患者と比較して有意に高発現していることを見出した⁶³⁾ 【Ⅲ】。さらに PNH クローンの増殖 (生存) 優位性を説明し得る遺伝子として、Schubert らは *early growth response factor 1 (EGR-1)* 遺伝子と *TAX-responsive enhancer element binding protein (TAXREB107)* 遺伝子を⁷⁴⁾、Ware らは *human A1*, *hHR23B*, *Mcl-1*, *RhoA* 遺伝子をそれぞれ報告している⁷⁵⁾。井上らは、12 番染色体異常を有し、PNH 細胞のクローン性拡大のみられた患者の詳細な解析から、この拡大には良性腫瘍の原因遺伝子として知られている *HMG2* 遺伝子の異所性発現が関与している可能性を示した⁷⁶⁾。さらに 20 症例の好中球を解析した結果約 40% の症例で *HMG2* 遺伝子の高発現が見られた⁷⁷⁾。興味深いことに、これらの遺伝子のうち、*EGR-1* 遺伝子と *HMG2* 遺伝子が *RhoA* 遺伝子により調節されているという報告がなされ⁷⁸⁾、個別に候補遺伝子として同定されていた 3 つの遺伝子が 1 つの現象としてつながる可能性もでてきた。杉盛らは、真性多血症で見られる *JAK2*^{V617F} 変異を持つ PNH 症例を報告した⁷⁹⁾。Shen らは 12 人の PNH 患者血球に全エクソーム解析を行ったが、高発現が報告された上記遺伝子には体細胞変異は認められなかった。さらに骨髓異形成症候群で体細胞変異が見られる 61 遺伝子のターゲットシーケンスを 36 人の PNH 患者に行ない、全エクソーム解析の結果と合わせ分析したところ、*PIGA* 変異に加え平均 2 個程度の体細胞変異が存在したが、クローン拡大の共通機序を示すデータは得られていない⁸⁰⁾。

7. 症状および臨床経過

1) 溶血 (ヘモグロビン尿) および関連事項

古典的な記載では、早朝の赤褐色尿 (ヘモグロビン尿) が特徴とされる。溶血が軽度の場合は尿の着色のみで無症状のこともあるが、大量の溶血では急性腎不全を起し透析が必要となる場合もあり、同一個体内であっても溶血の程度は変化する。また、肉眼的ヘモグロビン尿を認める患者でも、その程度は変化する。溶血の重症度は異常赤血球の絶対量と補体活性化の程度に依存し、溶血量は血清 LDH に反映される。間接型ビリルビン優位の軽微な黄疸をみとめる。感染症などが溶血発作の誘因となることもある。日米比較によると、診断時にヘモグロビン尿を呈する例は米国例では 50% であるのに対し本邦例では 34% と低率であった (表 2) 7) 【Ⅲ】。

PNH では高頻度に貧血を認める。先の日米比較調査では、本邦での貧血の頻度は 94% (米国 88%)、ヘモグロビン濃度は平均 8.2 g/dl (米国 9.7g/dl) であった。米国に比べ本邦の PNH は貧血傾向が強

いが、これは本邦症例で造血不全の合併頻度が高いことを反映していると考えられる。また、ヘモグロビン尿による体外への鉄喪失や、赤血球造血亢進に伴う消費性の葉酸欠乏が貧血を助長することがあり、PNHにおける貧血の間接的要因として注意が必要である。

血管内容血により放出される遊離ヘモグロビンは、PNH の様々な症状に少なからず影響している。PNH 患者が嚥下困難と上胸部の痛み（食道痙攣）を訴えることがあり、しばしば溶血発作（ヘモグロビン尿）と連動する。従来は上部消化管の微小血栓によると理解されてきたが、現在では溶血による遊離ヘモグロビンが一酸化窒素（NO）を吸着するためと考えられている。NO には平滑筋を弛緩させる作用があるが、溶血によりヘモグロビンが遊離すると、大量の NO を容易に吸着し、その結果として平滑筋の収縮をもたらすわけである⁶⁵⁾。事実、このような患者では食道内圧の上昇が確認されている。NO の供給源となるニトログリセリン製剤や NO 産生を促進する Sildenafil (Viagra) の投与によって症状が軽快する症例が多いことから、NO 原因説は支持される。また男性患者によく尋ねてみると、ヘモグロビン尿を来たしている時に勃起障害になっていることが多い。これも遊離ヘモグロビンによる NO の吸着が原因と考えられる。

補体性溶血に起因する PNH 赤血球膜変化や遊離ヘモグロビンによる NO 吸着は、後述の血栓症の発症の病因としても重要である。PNH の他、鎌型赤血球症や血栓性血小板減少性紫斑病など血管内容血性疾患における易血栓性には NO 欠乏の機序が関与していると考えられる^{65a)}。

2) 造血不全

PNH における造血障害は古くから知られており、Dacie と Lewis は AA として発症し、その経過中に PNH に特徴的な症状を示す症例が少なからず存在することに注目し、これを AA-PNH 症候群と命名した⁵³⁾。免疫抑制療法の進歩に伴い長期生存が可能となった AA 患者の 10%前後は、晩期合併症として PNH を発症してくることが判ってきた。

井上が、1988 年から 1990 年の間に報告された 3 編の論文内容を検討したところ⁸³⁾、総計 700 例を超す AA 患者の 4-9%が古典的診断法による PNH に進展していた⁸⁴⁻⁸⁶⁾。1994 年から 1995 年になるとフローサイトメトリーによる PNH 細胞の同定法が普及したが、この方法を用いて行われた 118 例（3 報告の合計）の検討では、経過観察中、1%以上の PNH 血球（好中球ないしは赤血球）を有する AA の割合は 35-52%と非常に高いことが明らかになった⁵⁴⁻⁵⁶⁾。1998 年から 1999 年にも同様に検討されているが、この報告では 15-29%というものであった⁵⁷⁻⁵⁹⁾。さらに最近になり、微少 PNH タイプ細胞を検出するための鋭敏な方法（0.003-1%を微少 PNH 細胞陽性と判定）を用いると、約 60%の未治療 AA 患者が PNH タイプ細胞を有していると報告されている^{60,87)}。

日米比較によると、診断時に AA の既往のある症例は、診断時の白血球（好中球）減少、血小板減少とともに本邦例に多かった（表 2）⁵⁾ 【Ⅲ】。このことはアジア症例では AA との関連性がより深いという従来の報告と一致するものであるが、その一方晩期の造血不全の合併頻度には差がなかった（表 2）。西村らによる 9 例の PNH 症例における PNH クローン の 6-10 年後の追跡調査によると、晩期造血不全を伴う症例の経過観察期間はその他の症例に比して有意に長く、PNH タイプ細胞の割合も低下していた。したがって、晩期の造血不全は PNH クローンの増殖寿命が尽きた果ての終末像とも考えられる⁸⁸⁾ 【Ⅲ】。

3) 異常造血（MDS あるいは白血病への移行）

朝長らは 40 例の自験 MDS 症例を解析し、4 例（10%）に明らかな PNH 赤血球および好中球（10%以上）を見いだした⁸⁹⁾ 【Ⅲ】。中尾らは上述の鋭敏法（0.003%以上）を用いて検索したところ、119 例の MDS (RA) 症例中 21 例（17.6%）に PNH タイプ細胞を検出した⁶⁴⁾ 【Ⅲ】。

日米比較によると、MDS からの移行率（5%前後）（表 2）ならびに MDS の合併率（3-4%）（表 3）ともに日米間で差はなかった⁵⁾ 【Ⅲ】。Araten らは 46 例の自験 PNH 症例を後方視的に解析したところ、11 例（24%）に染色体異常を認めた⁹⁰⁾ 【Ⅲ】。しかしながら、この 11 例のうち 7 例では経過とともに染色体異常クローンの割合は減少していった。さらに、de novo MDS と比較すると程度は軽いものの、染色体異常の有無に関わらず、大多数の PNH では骨髓造血細胞に形態異常が認められた。また、これらの症例から白血病に移行したものはなかった。以上のように、PNH における MDS 所見は必ずしも悪性を意味するものではないようである。その一方で、PNH から白血病への移行も多いわけであるが、PNH における形態異常と白血病進展との関連ははっきりしない。

PNH からの白血病への進展については、これまで 5-15%程度と考えられてきたが、日米比較ではいずれも 3%程度と従来の報告より低率であった（表 3）⁵⁾ 【Ⅲ】。Harris らによる、1962 年以降に報告された PNH から白血病を発症した 119 例のまとめによると、うち 104 例が非リンパ性と圧倒的に多かった。経過の追うことのできた 1760 例の PNH 症例のうち、白血病を発症したのは 16 例（1%）で、死

亡した 288 例中白血病死は 13 例 (5%) であった⁹¹⁾ 【Ⅲ】。染色体検査の行われた 32 例中、染色体異常を持つものは 7 例で、この 7 例中 5 例が PNH クローンであった。PNH からの白血病発症例では、白血病細胞は GPI 陰性であることが多く、PNH 赤血球の消失がまず先行し、一定期間の骨髓異形成期が同定できる例が多かった。

4) 血栓症

血栓症は他の溶血性貧血にはない PNH に特異的な合併症で、その多くは深部静脈血栓症の形をとる。頻度が高く重篤な血栓部位としては、腹腔内 (Budd-Chiari 症候群、腸間膜静脈) や頭蓋内 (脳静脈) であるが、特殊な部位 (皮膚静脈、副睾丸静脈) にも起こる。日米比較によると、米国例では初発症状の 19%が血栓症であるのに対して、本邦例では 6%に過ぎなかった (表 2)。International PNH Registry によると、登録時に血栓の既往を有した症例は 15.5%であり、PNH 顆粒球クローンサイズが 50%以上、あるいは、血管内容血を反映する LDH の高値群でより血栓の合併比率が高い (図 6)⁹²⁾。

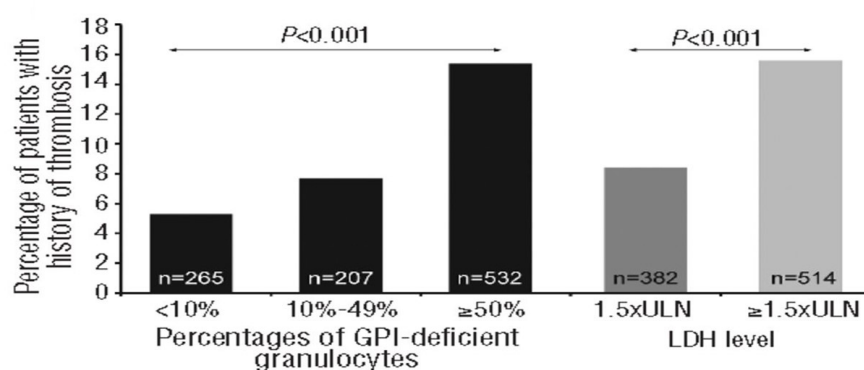


図 6 血栓症の既往と顆粒球 PNH クローンサイズ、LDH との関係⁹²⁾

血栓症発症の機序については、今のところ十分に解明されているとはいえない。赤血球が溶血すると、phosphatidyl serine (PS) が露出し血栓形成の引き金となり得る⁹³⁾。また、血小板自身も CD59 等の補体制御因子を欠損しており、血小板表面で補体が活性化されると容易に血栓傾向に傾く⁹⁴⁾。さらに、PNH の単球や好中球では GPI-AP であるウロキナーゼ・レセプターが欠損するが、その反面可溶性のウロキナーゼ・レセプターが血中に増加しており、これが競合的に働き線溶系を抑制し、血栓傾向に傾くという報告もある⁹⁵⁾。また、PNH を代表とする血管内容血性疾患では遊離ヘモグロビンの血中増加が NO の吸着を介して易血栓性に寄与していると考えられる。以上のどれもがおそらく正しいと思われるが、International PNH Registry の結果においても、血栓症を発症した例のほとんどは 50%以上の異常好中球を有する症例であった⁹²⁾。それでは本邦例ではどうかというと、50%以上の異常好中球が存在しても、決して血栓症を起こし易いということはなく、おそらく人種間で血栓症関連遺伝子群の先天性変異等によりリスクに違いがあるものと思われる。

臨床的にエクリズマブ (ソリリス) の PNH 症例への投与が溶血のみならず血栓症の発症リスクを低下させることが報告された^{96,97)} 【Ⅲ】。このことは、補体活性化とそれに伴う血管内容血が血栓症の発症に深く関与していることを示していると考えられる。

5) 感染症

発症時に感染症を呈することは比較的低頻度 (本邦で 3.4%、米国で 13.6%) ながら、経過中に重症感染を発症することがある (本邦で 9.1%、米国で 18.2%)⁵⁾ 【Ⅲ】。顆粒球や単球における GPI-AP (FcγR-III や CD14) の欠失は顆粒球や単球の機能的な異常を示唆しているものの、多くの症例においては白血球の数的減少が感染症の合併リスクとしては重要であると考えられている。

8. 検査

1) フローサイトメトリー

(1) PNH タイプ血球の検出法

PNH タイプ赤血球（補体感受性赤血球）の検出には、Ham 試験（酸性化血清溶血試験）と砂糖水試験（または蔗糖溶血試験）が主に用いられてきた。Ham 試験は、酸性化（pH6.5-7.0）することにより補体を活性化した血清を用い、補体による溶血度を測定する検査である⁹⁸⁾。砂糖水試験というのは、イオン強度を下げることにより赤血球に吸着された補体と赤血球膜との結合性を高め、補体溶血を測定する検査である⁹⁹⁾。いずれも、5-10%以上の溶血で陽性と判定し、古典的な PNH 症例の場合は 10-80%の溶血を示す。Ham 試験の方が特異性は高く、砂糖水試験では、巨赤芽球性貧血、自己免疫性溶血性貧血などで偽陽性を示すことがある。また、hereditary erythroblast multinuclearity associated with a positive acidified serum test (HEMPAS) という極めて稀な先天性貧血（CDA II 型）で Ham 試験陽性、砂糖水試験陰性を呈することは有名である。これは、患者赤血球が HEMPAS 抗原を持ち、健常者血清中には HEMPAS 抗体（IgM）が存在するため、自己血清か、自己赤血球で吸着した血清を用いると反応は陰性化するので、PNH とは鑑別可能である。

上記と同様の原理で、希釈血清補体系列を用いた溶血反応により得られた補体溶血感受性曲線を解析する補体溶血感受性試験（complement lysis sensitivity test, CLS テスト）が、Rosse & Dacie により開発され¹⁰⁰⁾、かなりの症例で補体感受性赤血球（type III）と正常赤血球（type I）との中間の感受性を持つ赤血球（type II）が存在することが示された。このことは PNH がオリゴクローン性の疾患であることを示唆するものであるが、実際に *PIGA* 遺伝子変異の解析からもこのことが支持されている⁴⁶⁾。

上述のように PNH 赤血球では補体感受性が亢進していることが古くからわかっていたが、なぜ補体感受性が亢進するのかという機序は長らく不明であった。1983 年になり補体制御因子である CD55 (DAF) が患者赤血球で欠損していることが明らかになり^{19,20)}、続いて CD59 の欠損も判明し^{21,22)}、PNH の溶血は補体制御因子の欠損によることが判明した。ほぼ同時期に、PNH 血球ではこれらの蛋白のみならず様々な蛋白が欠損していることが相次いで判明し、これらの欠損蛋白は全て GPI といわれる糖脂質を介して細胞膜に結合する GPI-AP と呼ばれる蛋白群であった。PNH 血球で欠損している GPI-AP を表 7 に示す。

表 7 PNH 血球で欠損している GPI-AP

蛋白	発現分布
補体制御因子	
Decay accelerating factor (DAF, CD55)	All
Membrane inhibitor of reactive lysis (MIRL, CD59, MACIF, HRF20)	All
酵素	
Acetylcholinesterase (AChE)	E
Neutrophil alkaline phosphatase (NAP)	G
5'-ectonucleotidase (CD73)	L
ADP ribose hydrase (CD157, Ecto-enzyme)	Str, G, Mo
レセプター	
Fcγ receptor IIIB (CD16B)	G
Urokinase-type plasminogen activator receptor (UPAR, CD87)	G, Mo
Endotoxin binding protein receptor (CD14)	Mo, Ma
接着因子	
Lymphocyte function-associated antigen-3 (LFA-3, CD58)	E, G, L
Blast-1 (CD48)	L, Mo
CD66b (formerly CD67), CD66c	G
CD108 (JHM blood group antigen)	E
GPI-80	G
その他	
Campath-1 (CD52)	L, Mo
CD24	G, L
Thy-1 (CD90)	Stm
CD109	L, P

p50-80	G
GP500	P
GP175	P
Eosinophil-derived neurotoxin	G
Cellular prion protein	G, Mo, P

(All：全血球系統、E：赤血球、G：顆粒球、L：リンパ球、Mo：単球、Ma：マクロファージ、P：血小板、Stm：骨髄幹細胞、Str：骨髄ストローマ)

これらの蛋白に対する標識抗体を用いて PNH タイプ血球を検出するフローサイトメトリー法が、1990年代に入り普及し、世界的に診断の主流となりつつある。用いる抗体としては、DAF と CD59 が全血球に発現しており、汎用されている。七島らと Rosse らのグループはそれぞれ、これらの抗体を用いて、CLS テストで検出される Type II 赤血球とほぼ対応する中間型発現赤血球が検出されることを示した^{101,102}。GPI 欠損細胞の割合は各血球系統でまちまちであるが、一般的には顆粒球、赤血球、リンパ球の順に欠損細胞の割合が高いと報告されている¹⁰³。実際に日米比較でも、初回解析時（診断時）の CD59 の欠損率は、日本では顆粒球で $42.8 \pm 3.7\%$ (n=90)、赤血球で $37.8 \pm 2.4\%$ (n=151)、リンパ球で $18.1 \pm 3.3\%$ であった (図7)⁵ 【III】。アメリカでは顆粒球で $68.6 \pm 3.3\%$ (n=98)、赤血球で $45.0 \pm 2.3\%$ (n=164)、リンパ球で $21.6 \pm 2.7\%$ であった。各血球系統別に欠損率を比較してみると、日米いずれにおいても、顆粒球、赤血球、リンパ球の順に高かったが、日本とアメリカを比較すると赤血球と顆粒球においてアメリカが有意に高かった (赤血球; $P=0.03$, 顆粒球; $P<0.0001$)。また中熊らは、AA から PNH を発症したまさにその瞬間をとらえ、一般的に PNH タイプ血球は、骨髄細胞、末梢血白血球、赤血球の順に出現すると報告している¹⁰⁴。すなわち、PNH タイプ血球を早期に検出するためには、末梢血顆粒球を用いることが推奨される。さらに、顆粒球は輸血の影響を受けないので、PNH タイプ血球の比率を経過観察する上でも推奨される。

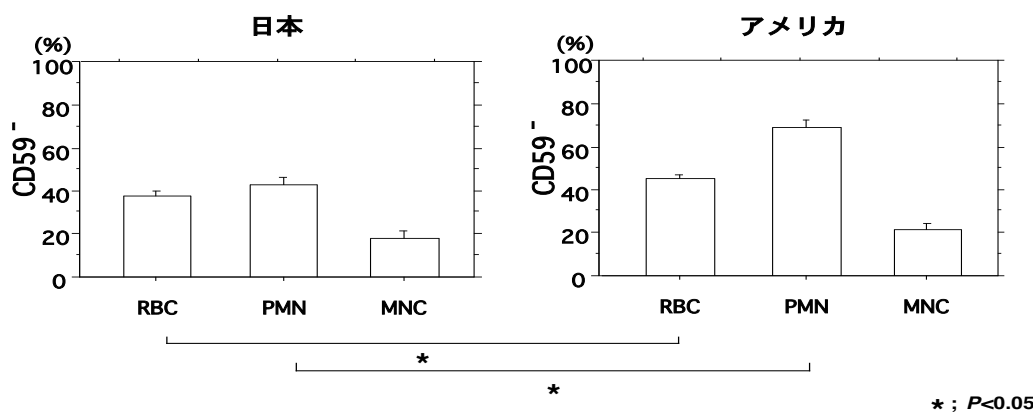


図7 日本とアメリカの PNH 患者における初回解析時の CD59 欠損率⁵⁾

ある貧血または骨髄不全患者において明らかな溶血所見がみられる場合、それが PNH によるものかどうかを診断するために行うフローサイトメトリーは、検査会社で委託検査として行われている従来法で十分である。一方、ある患者の骨髄不全が、PNH タイプ血球の増加を伴うものか、そうでないかを判断するためには、0.01%前後の PNH タイプ血球を正確に定量できる高精度法を用いる必要がある^{64,105,106}。これは、PNH タイプ顆粒球陽性骨髄不全症例における PNH タイプ顆粒球割合の中央値が 0.2%前後であり、陽性と判定される症例の約 8 割では、PNH タイプ顆粒球の割合が 1%に満たないためである¹⁰⁷。PNH タイプ顆粒球が 1%以上検出される場合にのみ「陽性」と判定する従来法では、これらの PNH タイプ血球陽性症例が「陰性」と判定されてしまう。

血球系統に特異的なマーカー (例えば顆粒球では CD11b、赤血球ではグリコフォリン A) に対する抗体と、抗 CD55 および抗 CD59 に対する抗体を用い、死細胞を除いて慎重にゲーティングすれば、健常コントロールと「PNH タイプ顆粒球増加例」「PNH タイプ赤血球増加例」との境界をそれぞれ 0.003%、0.005%まで下げることができる。ただし、採血から時間が経過した検体では、CD11b やグリコフォリン A の発現レベルが低い「偽」の CD55 陰性 CD59 陰性血球が左上の分面に出ることがある。この偽 PNH タイプ血球は、系統マーカーの発現レベルが均一であるためドットがほぼ水平に並ぶ真の PNH タイプ血球とは異なる分布パターンを示す。このため習熟した検査担当者であれば容易に除外す

ることができる。偽 PNH 型血球の出現は、抗 GPI-AP 蛋白抗体の代わりに fluorescent-labeled inactive toxin aerolysin (FLAER) を用いることによって大幅に軽減することができる¹⁰⁶⁾。FLAER は、遺伝子組換えエロリジンを蛍光標識したもので、細胞表面上の GPI-AP のアンカー部分に特異的に結合する^{0,86d-g)}。ただし、FLAER はそれ自身が溶血を起こすため、赤血球の解析には使えないという難点がある。

PNH 形質の血球は、1%以下の場合でも通常は顆粒球 (G)、赤血球 (E)、単球 (M)、T 細胞 (T)、B 細胞 (B)、NK 細胞 (NK)、血小板 (P) など多系統の血球に、種々の組み合わせで検出されるが、もっとも頻度が高いのは GEM パターンである。PNH タイプ血球の増加の有無を決定する場合、少なくとも GE の 2 系統は同時に調べる必要がある。GE の片側だけが陽性であった場合は、別に再度検体を採取し、採血から 48 時間以内に再検する。同じ結果が得られた場合にのみ PNH タイプ血球陽性と判定する。赤血球だけが陽性の場合、通常は単球にも PNH タイプ血球が認めらるので、再検の際に CD33 をマーカーとして単球も同時に検索することが重要である。

(2) PNH タイプ血球の推移と臨床症状

日米比較において、先行病変、初発症状、合併症などの諸症状を伴うものと伴わないものとで、赤血球と顆粒球における初回解析時の CD59 欠損率を比較したところ、造血不全症状と考えられる AA の先行、初発時白血球減少、血小板減少を伴う症例は欠損率が低い傾向にあり、一方 PNH の古典的症状と考えられる初発時ヘモグロビン尿、感染症、血栓症、貧血や血栓症合併例では欠損率が高い傾向を認めたが、診断時年齢や造血不全の合併には、明らかな傾向は認めなかった (図 8)⁵⁾ 【III】。

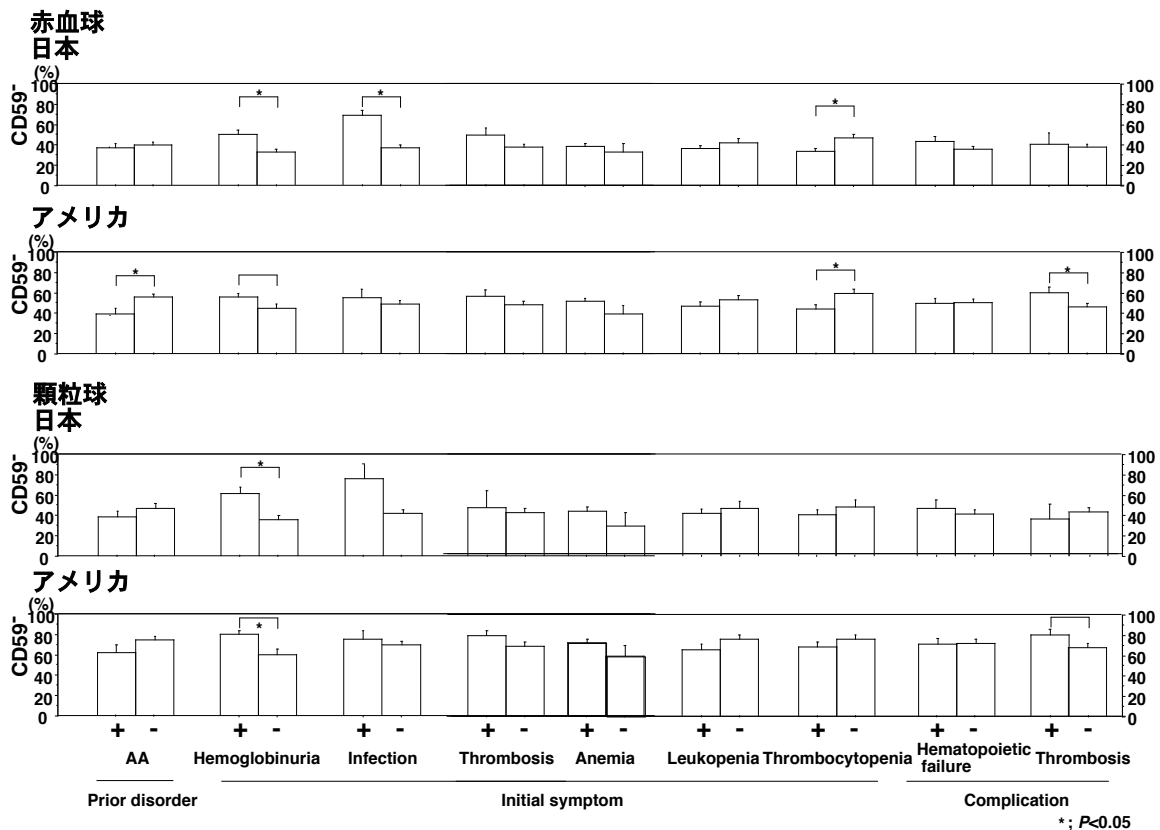


図 8 日本とアメリカにおける CD59 欠損率と各種臨床所見⁵⁾

発症後の PNH タイプ血球の拡大過程を検証するために、初回解析と最終解析の期間が少なくとも 1 年以上 (range:1-9 年) あいている症例について CD59 欠損率の増減を比較した (図 9)⁵⁾ 【III】。日本の赤血球と顆粒球における欠損率は、それぞれ初回解析時が 39.6±3.7% (n=56) と 40.0±8.3% (n=22)、最終解析時が 40.5±4.5% (P=NS) と 50.7±8.6% (P=NS) と有意な増減は示さなかった (図 9)。アメリカの赤血球と顆粒球においても、それぞれ初回解析時が 55.3±4.0% (n=52) と 75.2±4.2% (n=42)、最終解析時が 58.3±4.3% (P=NS) と 74.1±4.7% (P=NS) と有意な増減は示さなかつ

た(図9)。しかし、症例ごとにPNH細胞の割合は様々で、その増減も赤血球で72%増加したのから99%減少したのものまで、顆粒球で98%増加したのものから99%減少したのものまでであった。

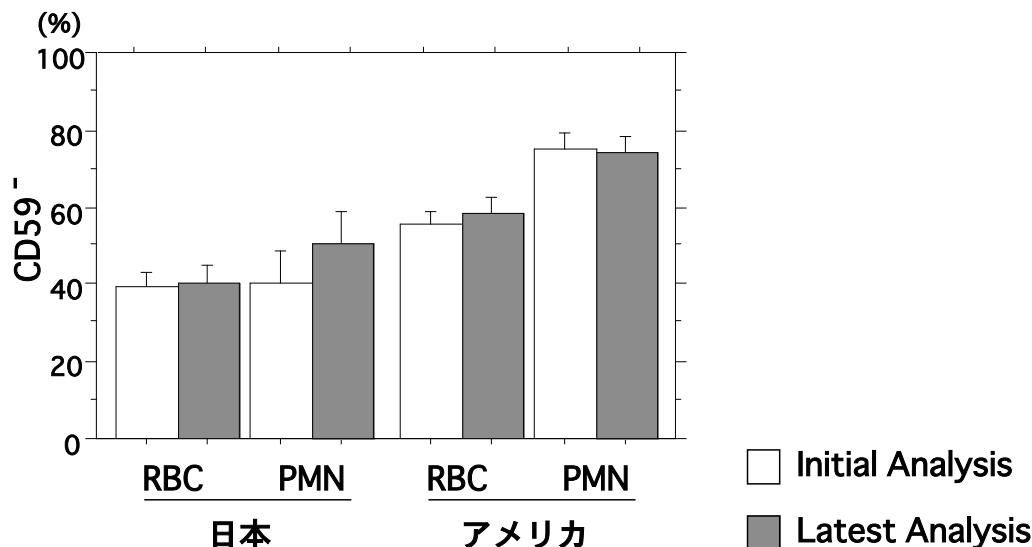


図9 日本とアメリカにおけるPNH患者のCD59欠損率の変遷⁵⁾

PNHタイプ血球は、患者全集団で見るとこれまでの予想に反して発症後には拡大傾向を示さなかったため、図8と同様の先行病変、初発症状、合併症などの因子別にPNHタイプ血球のCD59欠損率の増減を比較した。すると、経過中に造血不全を合併した症例(骨髄不全型PNH)とそうでない症例(古典的PNH)に分けて比較した時、顆粒球における欠損率の増減は、骨髄不全型PNHでは日本で $8.9 \pm 10.1\%$ ($n=22$)の減少、アメリカで $14.7 \pm 8.3\%$ ($n=42$)と減少したのに対し、古典的PNHでは日本で $21.8 \pm 9.7\%$ の増加、アメリカで $5.0 \pm 3.1\%$ 増加した(図10)⁵⁾【Ⅲ】。またこの2群の増減の間には、日本($P=0.02$)とアメリカ($P=0.04$)とともに有意な差を認めた(図10)。このことは、一般的にはPNHタイプ血球は緩やかな増加傾向を示すが、その終末像として(または再燃により)造血不全を伴ってくると逆に減少傾向を示し、全体としては横ばいになるものと理解される⁷⁾。

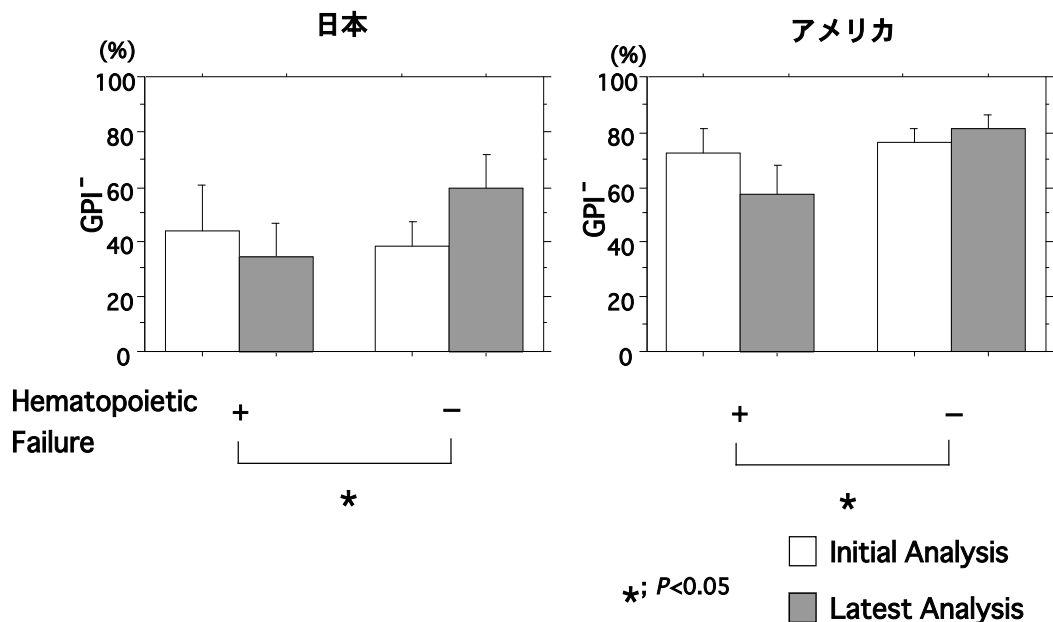


図10 日本とアメリカのPNH患者における造血不全合併の有無とCD59欠損率の変遷⁵⁾

(3) 微少 PNH タイプ血球の意義

これまで述べてきたように、AA の経過中に PNH の発症をみる AA-PNH 症候群は古くから知られ、AA と PNH の関連が指摘されてきた⁵³⁾。治療法の進歩に伴い長期生存が可能となった AA 患者の多く (13-52%) は、1%以上の PNH 血球を持っていることが判っていた⁵⁴⁻⁶⁰⁾。Araten らは、血球系統のマーカー (顆粒球では CD11b、赤血球ではグリコフォリン A) と CD59 と DAF・CD59 の二重染色法を用いたより鋭敏なフローサイトメトリー法を確立し、9 人の健常人から平均 $22/10^9$ 細胞の GPI 陰性細胞を検出した⁶¹⁾ 【Ⅲ】。比較的 *PIGA* 遺伝子変異の頻度の高いエクソン 2 と 6 のみの解析で、9 例中 6 例に *PIGA* 変異を同定した。そのうちの 1 例では、164 日後にも同じ遺伝子変異が確認されたことから、健常人に存在する *PIGA* 変異細胞の中にも、長期にわたって造血を支持できる造血幹細胞があることが示唆される。一方、Hu らによるその後の検討では、PNH 型の異常血球は健常者の末梢血中にもごくわずかに存在するが、これらは正常造血幹細胞の増殖・分化の過程で発生した *PIGA* 変異造血前駆細胞由来であるため、一定の割合 (0.003%) 以上に増えることはなく、また短命であることを報告している¹⁰⁸⁾。しかし、正常造血幹細胞に対する免疫学的な傷害が存在する環境においては、元々骨髄中に存在する静止期の *PIGA* 変異幹細胞が、何らかの機序によって活性化または選択された結果、造血に寄与するようになるとする考えもある¹⁰⁷⁾。

実際に、0.001%レベルの微少 PNH 血球を検出できる高感度のフローサイトメトリーを用いると、再生不良性貧血患者の 50%、RA または RCMD 患者の 20%に 0.003%以上の PNH 型血球が検出される^{105,107)}。しかし、造血幹細胞異常の存在が確実な RARS や RAEB などでは検出されることはほとんどない。このような PNH 血球増加 RA・RCMD 例は非増加例に比べて CsA 療法の奏効率が高く、白血病への移行率が低い傾向がみられる⁶⁴⁾。また、PNH 型血球陽性の再生不良性貧血は陰性の再生不良性貧血に比べて ATG・CsA 併用療法の奏効率が有意に高く、また長期予後も良好であることが示されている¹⁰⁹⁻¹¹²⁾。

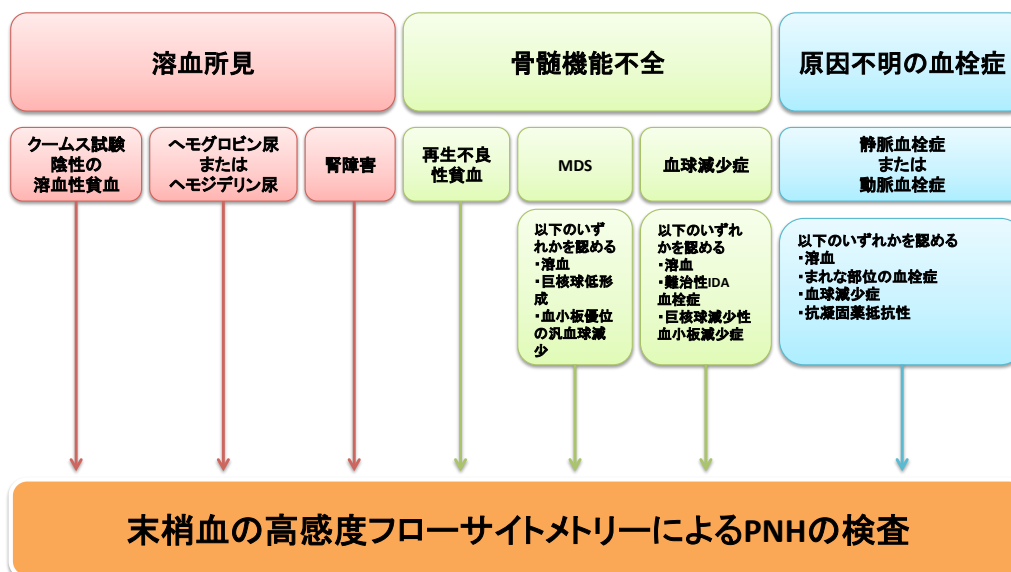
骨髄不全患者 75 例における PNH タイプ顆粒球の推移を長期間観察した Sigimori らの報告では、全体の約 15%で徐々に拡大 (このうち半数が溶血型 PNH に移行)、約 20%で徐々に減少・消失、残りの 6 割強の患者では 5 年以上に渡って PNH タイプ顆粒球の割合は不変であった¹⁰⁷⁾。PNH タイプ顆粒球割合は免疫抑制療法に対する反応性とは無関係に推移し、また診断時から PNH タイプ血球陰性であった症例が経過中に陽性化する例はほとんどなかった。ある陽性患者の PNH タイプ顆粒球が増大・縮小・不変の何れのパターンを取るかは、診断後 1-2 年の推移をみることによって予想可能であった。

したがって、骨髄不全患者を対象として PNH タイプ血球を検出することには、①免疫病態による良性の骨髄不全を迅速に診断できる、②若年で HLA 一致同胞ドナーを有する患者において、移植を積極的に勧める根拠となる (PNH タイプ血球陰性の場合、免疫抑制療法後の長期予後は陽性例に比べると不良)、③初回 ATG 療法不応例に対して ATG の再投与を行うか否かの判断の指標となる可能性がある、④溶血型 PNH に移行するリスクが明らかになる、などの臨床的意義があると考えられる。

(4) PNH スクリーニングとフォローアップ

実際の臨床現場で、どのような患者に対して PNH 血球のスクリーニングを行うかをフローチャートに示す (フローチャート 1)。まず血清 LDH 値上昇、網状赤血球数の増加や血清ハプトグロビン値の低下など、血管内溶血を疑う所見を認めた場合は、クームス試験により AIHA を除外診断し、フローサイトメトリーによる PNH 血球のスクリーニングを行う。尿中にヘモグロビンやヘモジデリンを認めた場合や、腎障害を認める患者においても、同様に溶血の評価を行い PNH 血球のスクリーニングを行う。骨髄不全患者における微少 PNH クローン検出の意義については上述した。時に見過ごされるのが、原因不明の血栓症患者における PNH の存在である。肝静脈 (Budd-Chiari syndrome) や腹腔内静脈 (門脈、皮静脈、内臓静脈)、脳静脈洞、皮膚静脈などにおける血栓症を来した患者では、血清 LDH や網状赤血球、ハプトグロビンなど溶血に関する検査を行い、血管内溶血の存在が疑わしい場合は PNH スクリーニングを行う必要がある。

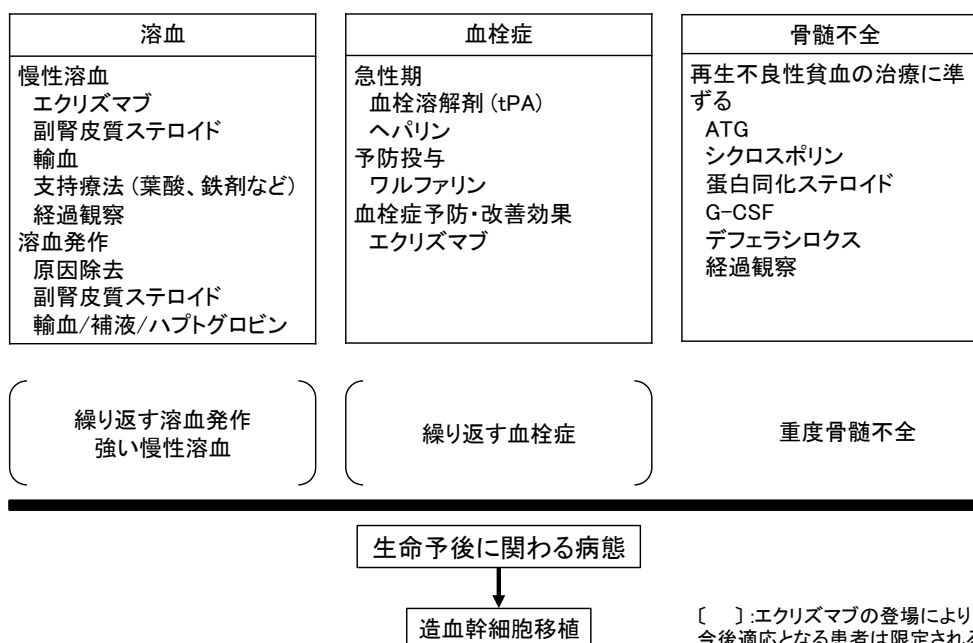
PNH クローンが検出された場合は、定期的にそのサイズをフォローすることが必要である。クローンサイズが安定的に推移する症例の一方で、急速に拡大する症例、また自然寛解となる症例など、診断時には予測できない臨床上的変化を来す場合があるためである。保険適応の問題はあるが、PNH クローンサイズをより正確に評価する上では、赤血球だけでなく顆粒球においても高感度フローサイトメトリーでフォローすることが望ましい。臨床所見の変化がなくても、概ね 6 ヶ月～1 年程度の間隔でのフォローが推奨される。



IDA:鉄欠乏性貧血、MDS:骨髄異形成症候群
 ※まれな部位とは、肝静脈(Budd-Chiari症候群)、他の腹腔内静脈(門脈、脾静脈、内臓静脈)、脳静脈洞、皮膚静脈など。
 現行の医科診療報酬制度においては、赤血球表面抗原検査はPNH妊娠の参照ガイドの鑑別診断のため2種類のモノクローナル抗体を用いた場合に診療報酬を算定できるとされており、顆粒球検査は算定の対象外です(2017年1月現在)。

PNHスクリーニングのフローチャート1

9. 治療指針(フローチャート2)



PNHの病態別治療指針(フローチャート2)

注1 溶血に対する副腎皮質ステロイド使用に関しては一定の効果が期待できるが、信頼できる明確なエビデンスはない。溶血に対して副腎皮質ステロイドを軸にするか、輸血にて対処

するかは議論の分かれるところである。感染症が溶血発作の原因の場合、副腎皮質ステロイドの使用が感染症を増悪させる事があるので、使用に当たっては十分に注意する必要がある。

1) 治療薬・治療法

(1) エクリズマブ

エクリズマブ（ソリリス®）は、補体 C5 に対するヒト化単クローン抗体であり、終末補体活性化経路を完全に阻止することで溶血を効果的に防ぐことができる【Ib】。エクリズマブ治療は、溶血のため赤血球輸血が必要と考えられ、今後も輸血の継続が見込まれる患者が対象となる。治療開始の基準となる明確な値は設定されていないが、GPI 欠損赤血球クローン（PNH タイプ III）が 10%以上の PNH 症例で、補体介在性の溶血所見（LDH 値が基準値上限の 1.5 倍以上）を有し、溶血のため赤血球輸血の必要性が見込まれる患者に投与されることが望ましい。エクリズマブ投与により、髄膜炎菌による感染症のリスクが高まるため、治療開始 2 週間前までに髄膜炎菌ワクチンを接種する。エクリズマブの投与方法は、導入期となる最初の 1 ヶ月は、毎週 1 回 600mg を 25～45 分かけて独立したラインより点滴静注する（計 4 回）。さらに 1 週間からは 1 回 900mg に増量し、これを維持量として隔週で投与する。

2002 年の 11 例を対象としたパイロット試験以来⁹⁶⁾、国内外で 3 つの主要な多施設共同臨床試験（87 例を対象とした二重盲検の第 III 相試験 TRIUMPH¹¹³⁾、97 例を対象としたオープンラベルの第 III 相試験 SHEPHERD¹¹⁴⁾、国内の 29 例を対象としたオープンラベルの第 III 相試験（AEGIS）¹¹⁵⁾が実施された。それぞれの試験におけるエクリズマブの溶血抑制効果を、血清 LDH の変化として図 11 に示した。TRIUMPH 試験では、投与前に平均 2000U/L 台であった LDH 値は、初回投与後から急速に減少し、2 回目投与以降は基準値を若干上回る 300 前後で安定し、26 週まで維持された。26 週までの LDH の平均曲線下面積をプラセボ群と比較すると、エクリズマブ投与群では実に 85.8%の減少を示した。この顕著な溶血抑制効果により溶血発作回数や輸血回数が減少し、遊離ヘモグロビンによる一酸化窒素 (NO) 除去作用に伴う平滑筋攣縮関連の臨床症状（嚥下困難、腹痛、呼吸困難、勃起不全など）も改善した。このようなエクリズマブによる良好な溶血抑制効果および患者 QOL の改善効果は、全ての臨床試験で再現され、市販後調査によっても確認された¹¹⁶⁾【IIb】。さらに、一部の症例では血栓症発生リスクの軽減⁹⁷⁾、慢性腎機能障害の改善¹¹⁷⁾、潜在的肺高血圧症の改善¹¹⁸⁾などの副次的効果が期待されることも明らかとなった。

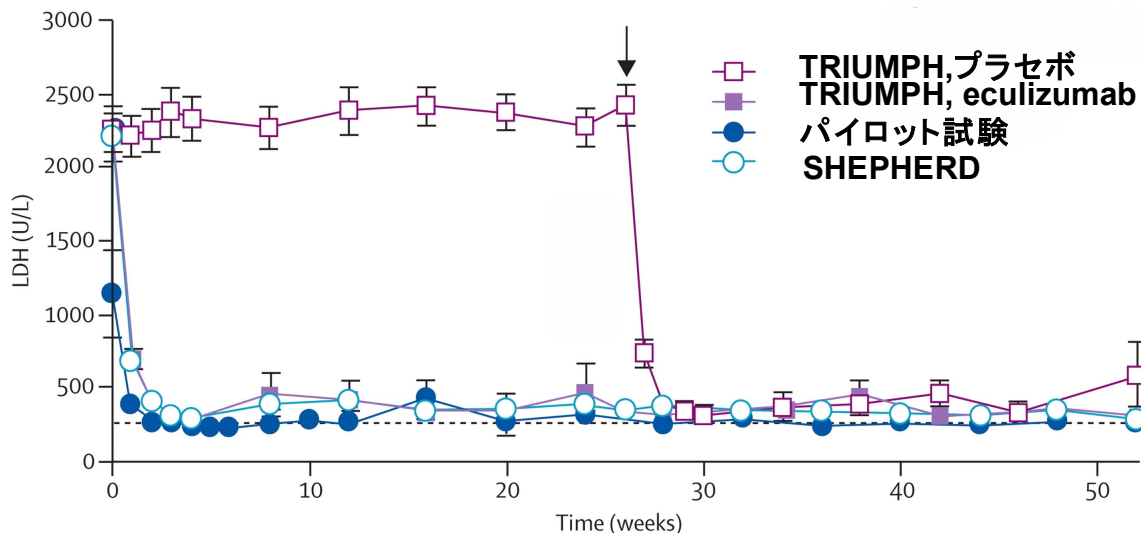


図 11 エクリズマブによる血管内溶血 (LDH) 抑制効果

本邦におけるエクリズマブの適応は、指定難病の認定基準が中等症以上となっていることから、ほぼこれに準ずることになる。妊娠により血栓のリスクが高まるが、エクリズマブ投与により血栓症の予防効果が期待できる^{119, 120)}。その使用にあたっては、妊娠 PNH 症例個々に判断する必要がある（PNH 妊娠の参照ガイド参照）。

副作用に関しては、頭痛（約 5 割）、鼻咽頭炎（約 4 割）、悪心（約 2 割）などが比較的高頻度に認められる。海外のみならず本邦においても、ワクチン接種にもかかわらず、重篤な髄膜炎菌感染症の合併患者が報告されており注意が必要である。

エクリズマブはPNH治療を一変させたが、課題も残されている。例えばエクリズマブはPNHクローンを減少させることはできず、治療によりむしろPNH赤血球は蓄積・増加するため、薬剤中止により激しい溶血が起こる可能性も懸念されている。さらに、残存するPNH赤血球の膜上にはC3が蓄積することで、血管外溶血が顕性化する^{121,122}。また、骨髄不全に対する改善効果は認めず、本質的なPNH治療とはならない。患者は、定期的なエクリズマブの静脈投与を長期間にわたり受ける必要があることから、精神的負担や高額な医療費負担（個人および社会の）への配慮も必要となろう。

また、C5変異(Arg885His)によるエクリズマブ不応例が、本邦では11/345の頻度で認められることに留意しなければならない¹²³。

(2) 副腎皮質ステロイド薬

プレドニゾロンによる治療が骨髄不全型PNHではなく、古典的PNHの慢性期の血管内溶血に対して有効であるとした論文がある¹²⁴⁻¹²⁶。Issaragrisilらは、Rosseが提唱したプレドニゾロンの大量・隔日投与方法¹²⁴に準じ、肉眼的ヘモグロビン尿がみられ、かつ赤血球輸血を要するPNH19例（男性：女性=16:6；年齢中央値26歳）を対象としてプレドニゾロン60mg/日の隔日投与を行った¹²⁵。8例はヘモグロビン濃度の改善および赤血球輸血の非依存性を認め、3例ではヘモグロビン濃度の増加のみを認めた。しかし、正常のヘモグロビン濃度に達した症例はなかった。PNHの診断からプレドニゾロン開始までの期間が長い症例では、血液学的効果が得られ難く、また不応例の治療開始時の年齢は有効例と比較して高かった【Ⅲ】。Shichishimaらは補体感受性赤血球の割合が50%以上で肉眼的ヘモグロビン尿を認める3例においてプレドニゾロンの継続投与を行った結果、いずれの症例においても肉眼的ヘモグロビン尿の頻度が低下し、2例では補体感受性赤血球割合が減少した¹²⁶【Ⅲ】。ステロイドが血管内溶血に有効な作用機序は補体第二経路による補体活性化を抑えるためと推測されて来たものの詳細は不明であり¹²⁴、慢性期PNH症例に対するステロイド治療には副作用の観点からも反対する専門家がいます。

副腎皮質ホルモンの大量投与（プレドニゾロン30-60mg/日）は溶血発作に対し、その程度の軽減と期間の短縮に有用とされる¹²⁴【Ⅳ】。ただし感染症が溶血発作の誘因の際には、プレドニゾロンの大量投与が感染症を増悪させる可能性もあり、十分な注意を要する。

(3) 輸血療法

PNHにおける血管内溶血や骨髄不全に由来する高度な貧血（通常7g/dl以下）に対しては、赤血球輸血を要する事がある。PNHの赤血球輸血には血漿中に含まれる補体や免疫グロブリンなどを除いた洗浄赤血球が慣習的に用いられてきた。しかし、メイヨークリニックでのPNH23症例に対する様々な種類の赤血球輸血による38年間の経験から、ABO式血液型が一致した輸血を行う限りはPNHに対する洗浄赤血球輸血は不要であると結論付けられた¹²⁷【Ⅲ】。従って、現在ではPNHに対する赤血球輸血では一般的に使用される赤血球濃厚液（RCC）で良いとされる。ただ稀ではあるが、輸血液の白血球抗体がPNHの溶血を誘発する可能性がある^{128,129}、この場合には洗浄赤血球の使用が望ましいと考えられる。

様々な誘因に伴ってPNHの溶血発作はもたらされるが、鉄剤投与などによる過度な補体感受性赤血球造血による溶血発作の場合には、赤血球輸血が溶血発作の抑制に有効な場合がある¹²⁴【Ⅳ】。

(4) 鉄剤・葉酸

PNHでは慢性の血管内溶血によりヘモグロビン尿やヘモジデリン尿を来し、鉄の喪失が起こる。その結果、鉄欠乏性貧血を合併する場合もある。一般的に鉄欠乏性貧血の治療に用いられる鉄剤には経口薬と非経口薬とがあるが、PNHの鉄欠乏性貧血に非経口薬を用いた場合、急速に骨髄への鉄の供給がなされるため赤血球造血が亢進し、重症の溶血発作を起こす事が報告された^{130,131}【Ⅲ】。保険適応上、PNHに対する鉄剤投与は慎重投与となつてはいるが、貧血の自覚症状が強い症例や赤血球輸血量を減らす必要のある症例ではやむを得ず経口鉄剤の投与がなされる¹²⁴。経口鉄剤の投与でも赤血球造血亢進が起こるので¹³²【Ⅲ】、経口鉄剤の投与は少量から開始し、たとえヘモグロビン濃度が十分に回復しなくとも貧血による自覚症状が消失すれば中止すべきである。もし鉄剤投与による溶血発作が起きた場合には、赤血球輸血やハプトグロビン点滴投与などで対処する。

古典的PNHの様に、血管内溶血が慢性的に強い場合には赤血球造血が亢進し、葉酸が減少する場合もある。その場合には、葉酸を経口的に補給する⁰【Ⅳ】。

(5) ハプトグロビン

PNH の溶血発作に伴う急性腎障害や血栓症の合併を予防する目的でハプトグロビンを使用する¹³³⁾【Ⅲ】。通常、成人では 1 回 4,000 単位を緩徐に点滴静注する。原則として点滴は肉眼的ヘモグロビン尿が消失するまで、連日投与する。ハプトグロビン (ベネシス)は血漿分画製剤であり、ヒトパルボウイルス B19 等のウイルスを完全には不活化・除去する事は出来ないので、投与後の経過観察は十分注意して行う。分娩後の溶血発作や溶血発作による急性腎障害に対しハプトグロビン投与が有効であったとする報告がある^{134,135)}【Ⅲ】。ハプトグロビンの副作用はほとんどなく、極まれに血圧低下と嘔吐を認めるのみである。

(6) 免疫抑制剤

Panquette らは PNH7 例 (骨髄不全型 3 例、古典的 PNH4 例) を対象として ATG 20mg/kg/day を 8 日間投与し、反応群と不応群との臨床像の特徴を検討した (観察期間は 0.4~2.75 年)¹³⁶⁾。ATG に反応した 3 例はいずれも骨髄不全型で、古典的 PNH 例では反応がみられなかった。前者の治療前のデータは血小板数 $<30 \times 10^9/L$ 、網状赤血球数 $<100 \times 10^9/L$ 、LDH $<1,000$ IU/L、総ビリルビン <17 mmol/L であり、骨髄低形成および慢性の軽度溶血が示唆される。ATG に反応した後も、慢性の溶血所見は治療前と同程度に存在した【Ⅲ】。PNH の少数例での cyclosporine 単独ないし ATG との併用での報告はいずれもほぼ同様の結果であり¹³⁷⁻¹³⁹⁾、免疫抑制療法により PNH クロウンの割合に変化を認めていない¹³⁷⁾【Ⅲ】。仲宗根らは古典的 PNH3 例に対して ATG 15mg/kg 5 日間と cyclosporine 6 mg/kg による免疫抑制療法を行い、投与後 1 年には全例で貧血の改善を認めたものの、2 例で再燃したと報告している¹⁴⁰⁾。また、ATG 投与期間中に急激な溶血発作と血小板減少を認め、3 例とも赤血球および血小板輸血を要した【Ⅲ】。骨髄不全型 PNH の場合、ATG 療法を行ったとしても、重篤な溶血発作を起こすことは稀であり、治療効果も良好であることが報告されている¹⁴¹⁾。ただし、重篤な溶血発作を起こすこともあるので¹⁴²⁾、PNH タイプ赤血球の割合が高い場合には、ソリリスの併用を考慮すべきである【Ⅲ】。

Schubert らは著明な汎血球減少を伴う骨髄不全型 PNH 症例に対して、cyclosporine と G-CSF との併用療法を行い、全例で三血球系統の改善を認めただけでなく、PNH クロウンの割合も減少したと報告した¹³⁹⁾【Ⅲ】。骨髄不全型 PNH の実態は、PNH タイプ血球の増加を伴う再生不良性貧血であることから、その重症度に応じて速やかに免疫抑制療法を行うことが望ましい。

(7) G-CSF

Ninomiya らは細菌感染症を合併したあるいは外科手術の感染予防のため、PNH2 例に対して G-CSF の投与を行い、臨床的に有用であったと報告した¹⁴³⁾【Ⅲ】。Fujimi らは反復する腸炎に関連した溶血発作を伴う PNH 症例に G-CSF を投与したところ、いずれの病態も改善し、T 細胞数の増加と T 細胞機能の正常化を観察した¹⁴⁴⁾【Ⅱb】。Jego らは好中球減少に伴う反復性の感染症を合併する PNH 症例に対して長期にわたり G-CSF を継続投与したところ、感染症は軽減し、溶血発作も輸血が不要な程度に軽快したと報告した¹⁴⁵⁾【Ⅲ】。前述のように、骨髄不全型 PNH の実態は PNH タイプ血球陽性再生不良性貧血であることから、重症再生不良性貧血に相当する高度の好中球減少があり、重症感染症を合併している場合には併用すべきである。ただし、長期投与は予後不良の MDS を誘発する可能性があるため、造血能の回復を目指した投与は行うべきではない。

(8) 蛋白同化ステロイド薬

蛋白同化ステロイド薬は骨髄不全型 PNH に有効であるとされており、少なくとも約 50%の症例で何らかの有効性がみられている^{125,146)}【Ⅲ】。本邦の厚生省 (当時) 特発性造血障害調査研究班の結果では、fluoxymesterone 投与群 (最初の 2 週間は 20-30mg/日、3-4 週は 15-20mg/日、それ以降は 5-15mg/日) の有効率は 45%であり、無治療群と比べ有意な赤血球数の増加が認められた¹⁴⁷⁾【Ⅲ】。

また、蛋白同化ステロイド薬の長期投与例においては補体感受性赤血球の割合が増加する症例があるので、その割合をモニターすることも重要である¹²⁷⁾。Danazole は fluoxymesterone が無効の骨髄不全型 PNH 症例に有効であったとする報告 (5 例中 4 例で貧血や血小板減少の改善) があり¹⁴⁸⁾【Ⅲ】、他の蛋白同化ステロイド薬が無効であった骨髄不全型 PNH 例に対して試みる価値がある。ただし保険適応がないことから、有用性は臨床試験で確認する必要がある。

(9) 同種・同系造血幹細胞移植 (HSCT)

Eculizumab の使用が可能となった現時点においても HSCT は PNH に対する唯一の根治療法であるが、2004 年までの主な治療成績の報告を表 8 に示す。2005 年以降の報告を含めても、いずれも少数例を対象としたものであり、PNH に対する移植適応・至適な移植法と造血幹細胞ソースに関しては十分なエビデンスが蓄積されていないのが現状である。

最も多数例をまとめた International Bone Marrow Transplantation Registry (IBMTR) の registry data の解析では、骨髄破壊的前処置を用いた HLA 適合血縁者間移植が大多数を占め、その 2 年生存率は 58% である¹⁴⁹⁾ 【Ⅲ】。生着の有無が移植後の生存率に及ぼす影響は大きく、持続的な生着が得られた症例の生存率 70%、それ以外の症例の生存率 10% であった。一方で、非血縁者間移植を受けた 7 例では、生存は僅か 1 例であり graft failure を含む様々な移植関連合併症がその主な理由であった。

しかし、この成績の評価には、移植法の多様化・様々な支持療法の進歩といった最近の移植医療の進歩が反映されていない事、血栓症の既往のある症例は除外して骨髄破壊的移植のみ施行されていることを考慮する必要がある。最近では、少数例ではあるが HLA 適合同胞間移植に加えて、HLA 不適合移植を含む alternative donors (臍帯血を除く) を用いた HSCT の良好な移植成績も報告されている^{151, 159)} 【Ⅲ】。

Reduced-intensity conditioning (RIC) による移植についても幾つかの少数例での検討結果が報告されている^{152, 153, 160)} 【Ⅲ】。移植前処置、幹細胞ソースは様々であるが、殆どの症例で生着と PNH 細胞の根絶が達成されている。また、PNH に特徴的な合併症である血栓症を抱えての移植に於いても、比較的安全に移植が施行され、抗凝固療法が中止となり、血栓の再発が認められない事が報告されている¹⁵³⁾ 【Ⅲ】。RIC を用いた場合は移植後早期に PNH クローンが検出されることがあるが、移植後 100 日程度で消失し、長期的な予後も良好である¹⁶¹⁾。

これらの報告から現時点で結論できることは、(1) 若年者で血栓症やその他の合併症を認めない症例では通常の骨髄破壊的前処置か RIC、血栓症やその他の合併症を認める症例では RIC が妥当な選択であること¹⁶²⁾、(2) 造血幹細胞ソースとしては HLA 適合血縁者を第一選択とし、それ以外の場合は alternative ドナーからの移植も検討の余地があること、(HLA 不適合移植や臍帯血に関しては十分なデータがないので、やむを得ず施行する場合は、HLA 抗体等の存在を十分に検討して慎重に施行すべきである) である。

ただし、PNH は一部の症例を除き、一般的に長期予後良好な疾患であり、その経過中に自然寛解することも報告されているので、移植が適応となる患者は極めて限定される。以前は、血球減少症の進行 (+それに伴う合併症の出現=感染、出血など)、溶血による頻回の輸血、そして一部の症例では繰り返す血栓・塞栓症などが PNH に於いて移植を適応とする主な理由とされてきた。しかし、eculizumab の導入によって、これらの移植適応(理由)は「Eculizumab を投与したにもかかわらずこのような合併症が認められる症例」とすべきかもしれない。また、若年者で life-long な eculizumab の治療への経済的負担が大きい場合も移植の相対的適応となるかもしれない。なお、症例報告レベルながら、同種移植前の eculizumab の投与は移植後の経過に影響を与えないようである^{163, 164)}。

表 8 PNH に対する造血幹細胞移植成績 (2004 年までの報告)

著者	患者数	ドナー	生存者数
Szer J et al ¹⁵⁴⁾	4	HLA 適合同胞	3
		一卵性同胞	1
Antin JH et al ¹⁵⁵⁾	4	HLA 適合同胞	4
Kolb HJ et al ¹⁵⁶⁾	2	HLA 適合同胞	1
		一卵性同胞	1
Kawahara K et al ¹⁵⁷⁾	9	HLA 適合同胞	6
		一卵性同胞	2
		HLA 非適合血縁者	1
Bemba M et al ¹⁵⁸⁾	16	HLA 適合同胞	9
Saso R et al ¹⁴⁹⁾	57	HLA 適合同胞	48
		一卵性同胞	2
		HLA 適合血縁者	1
		HLA 適合非血縁者	6
Raiola AM et al ¹⁵⁰⁾	7	HLA 適合同胞	7
Woodard P et al ¹⁵¹⁾	3	HLA 適合非血縁者	3
Suenaga K et al* ¹⁵²⁾	1	HLA 適合同胞	1

Takahashi Y et al* ¹⁵³⁾	5	HLA 適合同胞	4	4
		HLA 適合血縁者	1	1
総計	108	HLA 適合同胞	90	62
		一卵性同胞	6	6
		血縁者	3	1
		HLA 適合非血縁者	9	4

*骨髓非破壊的末梢血幹細胞移植、その他は全て骨髓移植

(10) 血栓溶解剤・ヘパリン

PNH の血栓症は、動脈系より静脈系に起こりやすく、エクリズマブ治験に参加した 195 名の治療前の評価では、動脈血栓が 15%に対して、静脈血栓は 85%であった¹³⁾。急性の血栓イベントに対しては、ヘパリン（または低分子ヘパリン）による抗血栓療法が必要である。さらに、生命予後を左右する Budd-Chiari 症候群などの重篤な血栓症に対しては、より積極的な血栓溶解療法（組換え型組織プラスミノゲンアクチベーター）を考慮する^{0,165,166)}【III】。その際、骨髓不全による血小板低下を認める場合は、出血の合併症に配慮する必要がある。

(11) ワルファリン

Hall らは PNH163 例において血栓症のリスクを後方視的に検討したところ、29 例が血栓症を合併していたと報告した（観察期間の中央値 6 年）¹⁶⁷⁾。PNH 顆粒球の割合が 50%以上および 50%以下の血栓症合併の 10 年危険率は各々、44%および 5.8%であり、前者の頻度は有意性をもって高かった。ワルファリンの投与禁忌がなくかつ PNH 顆粒球の割合が 50%以上で、初期の段階からワルファリンの予防投与を受けた 39 例では、血栓症の合併は全く観察されなかったが、一方、ワルファリンの予防投与をうけなかった 56 例での 10 年血栓症発症率は 36.5%であり、前者の頻度は有意性をもって低かった【IIa】。PNH 顆粒球の割合が高い場合、静脈血栓症の発症の危険性が高くなるので、ワルファリンによる初期段階からの予防を要する。

しかし、Audebert ら¹⁶⁸⁾【III】や Moyo ら¹⁶⁹⁾【III】の報告によれば、ワルファリンおよび/ないしは抗血小板薬の投与にもかかわらず、血栓塞栓症の進行や新たな血栓塞栓症の出現が観察される事もある。また、ワルファリン投与による致死性出血も含む出血傾向の出現の頻度は PNH では約 5%以上ある事も報告されている^{167,168)}。また、低分子ヘパリンおよび直接型経口抗凝固薬(DOAC)（ダビガトラン、リバーロキサバン、アピキサバン、エドキサバン）による一次予防の有効性についても明らかになっていない。したがって、静脈血栓症一次予防治療としてのワルファリン投与は、PNH クロウンの割合が高い PNH 症例においてワルファリンの投与禁忌がない場合、出血傾向に十分に注意を払ってなされて良い治療と考えられる。ただ、最近の Hillmen らの報告ではエクリズマブによる血栓症発症に対する予防効果はワルファリンをしのぐ効果であるとしており、その選択にはさらなるデータの集積が望まれる¹³⁾【Ia】。

一方、血栓症発症例に対する治療は致死的な血栓でない限り、通常抗凝固療法を行う。抗凝固薬としては、ワルファリン、未分画ヘパリン、低分子ヘパリン、DOAC があるが、現時点ではどの薬剤が PNH の血栓症治療に最適であるかはまだ明らかになっていない。いずれを用いるにせよ、出血の危険性に十分配慮しながら使用する必要がある。急性血栓症に対して速やかなエクリズマブの投与が血栓の増大や再発予防に有効であったとの報告がみられるが、今後の症例蓄積と詳細な検討が待たれる。

参考文献

0. Parker C, Omine M, Richards S, Nishimura J, Bessler M, Ware R, Hillmen P, Luzzatto L, Young N, Kinoshita T, Rosse W, Socié G; International PNH Interest Group. Diagnosis and management of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 106: 3699-3709, 2005.
1. 大野良之: 「特定疾患治療研究事業未対象疾患の疫学像を把握するための調査研究班」平成11年度研究業績集-最終報告書- 平成12年3月発行(2000年)。
2. Le X, Yang T, Yang X, Wang X. Characteristics of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in China. *Chinese Med J* 103: 885-889, 1990
3. Hillmen P, Lewis SM, Bessler M, Luzzatto L, Dacie JV. Natural history of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 333: 1253-1258, 1995
4. de Latour RP, Mary JY, Salanoubat C, Terriou L, Etienne G, Mohty M, Roth S, de Guibert S, Maury S, Cahn JY, Socié G; French Society of Hematology; French Association of Young Hematologists. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: natural history of disease subcategories. *Blood*. 112:3099-106, 2008
5. Nishimura J, Kanakura Y, Ware RE, Shichishima T, Nakakuma H, Ninomiya H, Decastro CM, Hall S, Kanamaru A, Sullivan KM, Mizoguchi H, Omine M, Kinoshita T, Rosse WF. Clinical course and flow cytometric analysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in the United States and Japan. *Medicine* 83: 193-207, 2004
6. Chou WC, Huang WH, Wang MC, Chang CS, Yeh SP, Chiou TJ, Chen YC, Lin TH, Shen MC; Taiwan PNH study group. Characteristics of Taiwanese patients of PNH in the international PNH registry. *Thromb J*. 14(Suppl 1):39, 2016
7. Jang JH, Kim JS, Yoon SS, Lee JH, Kim YK, Jo DY, Chung J, Sohn SK, Lee JW. Predictive Factors of Mortality in Population of Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria (PNH): Results from a Korean PNH Registry. *J Korean Med Sci*. 31:214-21, 2016
8. Muñoz-Linares C, Ojeda E, Forés R, Pastrana M, Cabero M, Morillo D, Bautista G, Baños I, Monteserín C, Bravo P, Jaro E, Cedena T, Steegmann JL, Villegas A, Cabrera JR. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: a single Spanish center's experience over the last 40 yr. *Eur J Haematol*. 93:309-19, 2014
9. Schrezenmeier H, Muus P, Socié G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, Brodsky RA, Bessler M, Kanakura Y, Rosse W, Khursigara G, Bedrosian C, Hillmen P. Schrezenmeier H1, Muus P, Socié G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, Brodsky RA, Bessler M, Kanakura Y, Rosse W, Khursigara G, Bedrosian C, Hillmen P. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica*. 99:922-9, 2014
10. Hall SE, Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with onset in childhood and adolescence. *N Engl J Med* 325: 991-996, 1991
11. Socié G, Mary JY, de Gramont A, Rio B, Leporrier M, Rose C, Heudier P, Rochant H, Cahn JY, Gluckman E. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: long-term follow-up and prognostic factors. *Lancet* 31: 573-577, 1996
12. Nakakuma H, Nagakura S, Kawaguchi T, Iwamoto N, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, Tsuruzaki R, Takatsuki K. Persistence of affected T lymphocytes in long-term clinical remission in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 84: 3925-3928, 1994
13. Hillmen P, Muus P, Dührsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socié G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood*. 110(12):4123-8, 2007
14. Socié G, Schrezenmeier H, Muus P, Lisukov I, Röth A, Kulasekararaj A, Lee JW, Araten D, Hill A, Brodsky R, Urbano-Ispizua A, Szer J, Wilson A, Hillmen P; PNH Registry. Changing prognosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria disease subcategories: an analysis of the International PNH Registry. *Intern Med J*. 46:1044-53, 2016
15. Kelly RJ, Hill A, Arnold LM, Brooksbank GL, Richards SJ, Cullen M, Mitchell LD, Cohen DR, Gregory WM, Hillmen P. Long-term treatment with eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: sustained efficacy and improved survival. *Blood*. 117:6786-92, 2011
16. Gull WW. A case report of intermittent haematuria, with remarks. *Guy's Hosp Rept* 12: 381-392, 1866
17. Strubing P. Paroxysmale haemoglobinurie. *Deutsche Med Wochenschrift* 8: 1-3, 1882
18. Ham TH. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. Study of the mechanism of hemolysis in relation to acid-base equilibrium. *N Engl J Med* 217: 915-917, 1937
19. Nicholson-Weller A, March JP, Rosenfeld SI, Austen KF. Affected erythrocytes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria are deficient in the complement regulatory protein, decay accelerating factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5066-5070, 1983

20. Pangburn MK, Schreiber RD, Muller-Eberhard HJ. Deficiency of an erythrocyte membrane protein with complement regulatory activity in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80: 5430-5434, 1983
21. Holguin MH, Fredrick LR, Bernshaw NJ, Wilcox LA, Parker CJ. Isolation and characterization of a membrane protein from normal human erythrocytes that inhibits reactive lysis of the erythrocytes of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 84: 7-17, 1989
22. Okada N, Harada R, Fujita T, Okada H. A novel membrane glycoprotein capable of inhibiting membrane attack by homologous complement. *Int Immunol* 1: 205-208, 1989
23. Nicholson-Weller A, Burge J, Austen KF. Purification from guinea pig erythrocyte stroma of a decay-accelerating factor for the classical c3 convertase, C4b,2a. *J Immunol* 127: 2035-2039, 1981
24. Sugita Y, Nakano Y, Tomita M. Isolation from human erythrocytes of a new membrane protein which inhibits the formation of complement transmembrane channels. *J Biochem* 104: 633-637, 1988
25. Davies A, Simmons DL, Hale G, Harrison RA, Tighe H, Lachmann PJ, Waldmann H. CD59, an LY-6-like protein expressed in human lymphoid cells, regulates the action of the complement membrane attack complex on homologous cells. *J Exp Med* 170: 637-654, 1989
26. Telen MJ, Hall SE, Green AM, Moulds JJ, Rosse WF. Identification of human erythrocyte blood group antigens on decay-accelerating factor (DAF) and an erythrocyte phenotype negative for DAF. *J Exp Med* 167: 1993-1998, 1988
27. Yamashina M, Ueda E, Kinoshita T, Takami T, Ojima A, Ono H, Tanaka H, Kondo N, Orii T, Okada N, et al. Inherited complete deficiency of 20-kilodalton homologous restriction factor (CD59) as a cause of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 323: 1184-1189, 1990
28. Nevo Y, Ben-Zeev B, Tabib A, Straussberg R, Anikster Y, Shorer Z, Fattal-Valevski A, Ta-Shma A, Aharoni S, Rabie M, Zenvirt S, Goldshmidt H, Fellig Y, Shaag A, Mevorach D, Elpeleg O. CD59 deficiency is associated with chronic hemolysis and childhood relapsing immune-mediated polyneuropathy. *Blood* 121: 129-135, 2013
29. Höchsmann B, Dohna-Schwake C, Kyrieleis HA, Pannicke U, Schrezenmeier H. Targeted therapy with eculizumab for inherited CD59 deficiency. *N Engl J Med* 370: 90-92, 2014
30. Haliloglu G, Maluenda J, Sayinbatur B, Aumont C, Temucin C, Tavit B, Cetin M, Oguz KK, Gut I, Picard V, Melki J, Topaloglu H. Early-onset chronic axonal neuropathy, strokes, and hemolysis: inherited CD59 deficiency. *Neurology* 84: 1220-1224, 2015
31. Yonemura Y, Kawakita M, Koito A, Kawaguchi T, Nakakuma H, Kagimoto T, Shichishima T, Terasawa T, Akagaki Y, Inai S. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria with coexisting deficiency of the ninth component of complement: lack of massive haemolytic attack. *Br J Haematol* 74: 108-113, 1990
32. Iwamoto N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Hidaka M, Kagimoto T, Takatsuki K, Nakakuma H. Haemolysis induced by ascorbic acid in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Lancet* 343: 357, 1994
33. Nakakuma H, Hidaka M, Nagakura S, Nishimura Y, Iwamoto N, Horikawa K, Kawaguchi T, Kagimoto T, Takatsuki K. Expression of cryptantigen Th on paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes in association with a hemolytic exacerbation. *J Clin Invest* 96: 201-206, 1995
34. Ham TH. Studies on destruction of red blood cells. I. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: an investigation of the mechanism of hemolysis, with observations of five cases. *Arch Intern Med* 64: 1271-1305, 1939
35. Crosby WH. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: relation of the clinical manifestations to underlying pathogenic mechanisms. *Blood* 8: 769-812, 1953
36. Rosse WF, Nishimura J. Clinical manifestations of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: present state and future problems. *Int J Hematol* 77: 113-120, 2003
37. Stafford HA, Tykocinski ML, Lublin DM, Holers VM, Rosse WF, Atkinson JP, Medof ME. Normal polymorphic variations and transcription of the decay accelerating factor gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 880-884, 1988
38. Rambaldi A, Terao M, Bettoni S, Bassan R, Battista R, Barbui T, Garattini E. Differences in the expression of alkaline phosphatase mRNA in chronic myelogenous leukemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria polymorphonuclear leukocytes. *Blood* 73: 1113-1115, 1989
39. Ueda E, Nishimura J, Kitani T, Nasu K, Kageyama T, Kim YU, Takeda J, Kinoshita T. Deficient surface expression of glycosylphosphatidylinositol-anchored proteins in B cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int Immunol* 4: 1263-1271, 1992
40. Takahashi M, Takeda J, Hirose S, Hyman R, Inoue N, Miyata T, Ueda E, Kitani T, Medof ME, Kinoshita T. Deficient biosynthesis of N-acetylglucosaminyl-phosphatidylinositol, the first intermediate of glycosyl phosphatidylinositol anchor biosynthesis, in cell lines established from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Exp Med* 177: 517-521, 1993
41. Hidaka M, Nagakura S, Horikawa K, Kawaguchi T, Iwamoto N, Kagimoto T, Takatsuki K, Nakakuma H. Impaired glycosylation of glycosylphosphatidylinositol-anchor synthesis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria leukocytes. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 571-579, 1993

42. Hillmen P, Bessler M, Mason PJ, Watkins WM, Luzzatto L. Specific defect in *N*-acetylglucosamine incorporation in the biosynthesis of the glycosylphosphatidylinositol anchor in clones cell lines from patients with paroxymal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 90:5272-5276, 1993
43. Miyata T, Takeda J, Iida Y, Yamada N, Inoue N, Takahashi M, Maeda K, Kitani T, Kinoshita T. The cloning of PIG-A, a component in the early step of GPI-anchor biosynthesis. *Science* 259: 1318-1320, 1993
44. Takeda J, Miyata T, Kawagoe K, Iida Y, Endo Y, Fujita T, Takahashi M, Kitani T, Kinoshita T. Deficiency of the GPI anchor caused by a somatic mutation of the PIG-A gene in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Cell* 73: 703-711, 1993
45. Miyata T, Yamada N, Iida Y, Nishimura J, Takeda J, Kitani T, Kinoshita T. Abnormalities of PIG-A transcripts in granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 330: 249-255, 1994
46. Nishimura J, Murakami Y, Kinoshita T. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: An acquired genetic disease. *Am J Hematol* 62: 175-182, 1999
47. Krawitz PM, Höchsmann B, Murakami Y, Teubner B, Krüger U, Klopocki E, Neitzel H, Hoellein A, Schneider C, Parkhomchuk D, Hecht J, Robinson PN, Mundlos S, Kinoshita T, Schrezenmeier H. A case of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria caused by a germline mutation and a somatic mutation in PIGT. *Blood* 122: 1312-1315, 2013
48. Kawagoe K, Kitamura D, Okabe M, Taniuchi I, Ikawa M, Watanabe T, Kinoshita T, Takeda J. GPI-anchor deficient mice: Implications for clonal dominance of mutant cells in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 87: 3600-3606, 1996
49. Rosti V, Tremmi G, Soares V, Pandolfi PP, Luzzatto L, Bessler M : Murine embryonic stem cells without pig-a gene activity are competent for hematopoiesis with the PNH phenotype but not for clonal expansion. *J Clin Invest* 100: 1028-1036, 1997
50. Murakami Y, Kinoshita T, Nakano T, Kosaka H, Takeda J. Different roles of glycosylphosphatidylinositol in various hematopoietic cells as revealed by model mice of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 94: 2963-2970, 1999
51. Tremml G, Dominguez C, Rosti V, Zhang Z, Pandolfi PP, Keller P, Bessler M. Increased sensitivity to complement and a decreased red cell life span in mice mosaic for a non-functional Piga gene. *Blood* 94: 2945-2954, 1999
52. Keller P, Tremml G, Rosti V, Bessler M. X inactivation and somatic cell selection rescue female mice carrying a Piga-null mutation. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 7479-7483, 1999
53. Lewis SM, Dacie JV. The aplastic anaemia--paroxysmal nocturnal haemoglobinuria syndrome. *Br J Haematol* 13: 236-251, 1967
54. Schubert J, Vogt HG, Zielinska Skowronek M, Freund M, Kaltwasser JP, Hoelzer D, Schmidt RE. Development of the glycosylphosphatidylinositol-anchoring defect characteristic for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in patients with aplastic anemia. *Blood* 83: 2323-2328, 1994
55. Griscelli-Bennaceur A, Gluckman E, Scrobahaci ML, Jonveaux P, Vu T, Bazarbachi A, Carosella ED, Sigaux F, Socie G. Aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: search for a pathogenetic link. *Blood* 85: 1354-1363, 1995
56. Schrezenmeier H, Hertenstein B, Wagner B, Raghavachar A, Heimpel H. A pathogenetic link between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria is suggested by a high frequency of aplastic anemia patients with a deficiency of phosphatidylinositol glycan anchored proteins. *Exp Hematol* 23: 81-87, 1995
57. De Lord C, Tooze JA, Saso R, Marsh JC, Gordon-Smith EC. Deficiency of glycosylphosphatidyl inositol-anchored proteins in patients with aplastic anaemia does not affect response to immunosuppressive therapy. *Br J Haematol* 101: 90-93, 1998
58. Azenishi Y, Ueda E, Machii T, Nishimura J, Hirota T, Shibano M, Nakao S, Kinoshita T, Mizoguchi H, Kitani T. CD59-deficient blood cells and PIG-A gene abnormalities in Japanese patients with aplastic anaemia. *Br J Haematol* 104: 523-529, 1999
59. Dunn DE, Tanawattanacharoen P, Boccuni P, Nagakura S, Green SW, Kirby MR, Kumar MS, Rosenfeld S, Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria cells in patients with bone marrow failure syndromes. *Ann Intern Med* 131: 401-408, 1999
60. Wang H, Chuhjo T, Yamazaki H, Shiobara S, Teramura M, Mizoguchi H, Nakao S. Relative increase of granulocytes with a paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype in aplastic anaemia patients: the high prevalence at diagnosis. *Eur J Haematol* 66: 200-205, 2001
61. Araten DJ, Nafa K, Pakdeesuwan K, Luzzatto L. Clonal populations of hematopoietic cells with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria genotype and phenotype are present in normal individuals. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 5209-5214, 1999

62. Maciejewski JP, Follmann D, Nakamura R, Sauntharajah Y, Rivera CE, Simonis T, Brown KE, Barrett JA, Young NS. Increased frequency of HLA-DR2 in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the PNH/aplastic anemia syndrome. *Blood* 98: 3513-3519, 2001
63. Shichishima T, Okamoto M, Ikeda K, Kaneshige T, Sugiyama H, Terasawa T, Osumi K, Maruyama Y. HLA class II haplotype and quantitation of WT1 RNA in Japanese patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 100: 22-28, 2002
64. Wang H, Chuhjo T, Yasue S, Omine M, Nakao S. Clinical significance of a minor population of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria-type cells in bone marrow failure syndrome. *Blood* 100: 3897-3902, 2002
65. Murakami Y, Kosaka H, Maeda Y, Nishimura J, Inoue N, Ohishi K, Okabe M, Takeda J, Kinoshita T. Inefficient response of T lymphocytes to glycosylphosphatidylinositol anchor-negative cells: implications for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 100: 4116-4122, 2002
66. Nagakura S, Ishihara S, Dunn DE, Nishimura J, Kawaguchi T, Horikawa K, Hidaka M, Kagimoto T, Eto N, Mitsuya H, Kinoshita T, Young NS, Nakakuma H. Decreased susceptibility of leukemic cells with PIG-A mutation to natural killer cells in vitro. *Blood* 100: 1031-1037, 2002
67. Hanaoka N, Kawaguchi T, Horikawa K, Nagakura S, Mitsuya H, Nakakuma H. Immunoselection by natural killer cells of *PIGA* mutant cells missing stress-inducible ULBP. *Blood* 107:1184-1191, 2005
68. Hanaoka N, Nakakuma H, Horikawa K, Nagakura S, Tsuzuki Y, Shimanuki M, Kojima K, Yonemura Y, Kawaguchi T. NKG2D-mediated immunity underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related bone marrow failure syndromes. *Br J Haematol* 146:538-545, 2009
69. Karadimitris A, Notaro R, Koehne G, Roberts IA, Luzzatto L. PNH cells are as sensitive to T-cell-mediated lysis as their normal counterparts: implications for the pathogenesis of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 111: 1158-1163, 2000
70. Brodsky RA, Vala MS, Barber JP, Medof ME, Jones RJ. Resistance to apoptosis caused by PIG-A gene mutations in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 8756-8760, 1997
71. Horikawa K, Nakakuma H, Kawaguchi T, Iwamoto N, Nagakura S, Kagimoto T, Takatsuki K. Apoptosis resistance of blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria, aplastic anemia, and myelodysplastic syndrome. *Blood* 90: 2716-2722, 1997
72. Ware RE, Nishimura J, Moody MA, Smith C, Rosse WF, Howard TA. The PIG-A mutation and absence of glycosylphosphatidylinositol-linked proteins do not confer resistance to apoptosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 92: 2541-2550, 1998
73. Yamamoto T, Shichishima T, Shikama Y, Saitoh Y, Ogawa K, Maruyama Y. Granulocytes from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and normal individuals have the same sensitivity to spontaneous apoptosis. *Exp Hematol* 30: 187-194, 2002
74. Lyakisheva A, Felda O, Ganser A, Schmidt RE, Schubert J. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: Differential gene expression of *EGR-1* and *TAXREB107*. *Exp Hematol* 30: 18-25, 2002
75. Heeney MM, Ormsbee SM, Moody MA, Howard TA, DeCastro CM, Ware RE. Increased expression of anti-apoptosis genes in peripheral blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Mol Genet Metab* 78: 291-294, 2003
76. Inoue N, Izui-Sarumaru T, Murakami Y, Endo Y, Nishimura J, Kurokawa K, Kuwayama M, Shime H, Machii T, Kanakura Y, Meyers G, Wittwer C, Chen Z, Babcock W, Frei-Lahr D, Parker CJ, Kinoshita T. Molecular basis of clonal expansion of hematopoiesis in 2 patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 108:4232-4236, 2006
77. Murakami Y, Inoue N, Shichishima T, Noji H, Nishimura J, Kanakura Y, Kinoshita T. Wnt pathway is upregulated in blood cells from patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 114: 786a, 2009
78. Teramoto H, Malek RL, Behbahani B, Castellone MD, Lee NH, Gutkind JS. Identification of H-Ras, RhoA, Rac1 and Cdc42 responsive genes. *Oncogene* 22: 2689-2697, 2003
79. Sugimori C, Padron E, Caceres G, Shain K, Sokol L, Zhang L, Tiu R, O'Keefe CL, Afable M, Clemente M, Lee JM, Maciejewski JP, List AF, Epling-Burnette PK, Araten DJ. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and concurrent JAK2(V617F) mutation. *Blood Cancer J* 2: e63, 2012
80. Shen W, Clemente MJ, Hosono N, Yoshida K, Przychodzen B, Yoshizato T, Shiraiishi Y, Miyano S, Ogawa S, Maciejewski JP, Makishima H. Deep sequencing reveals stepwise mutation acquisition in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *J Clin Invest* 124: 4529-4538, 2014
81. Reiter CD, Wang X, Tanus-Santos JE, Hogg N, Cannon RO, 3rd, Schechter AN, Gladwin MT. Cell-free hemoglobin limits nitric oxide bioavailability in sickle-cell disease. *Nat Med* 8: 1383-1389, 2002
82. Cappelini MD. Coagulation in the pathophysiology of hemolytic anemias. *Hematology 2007 (Am Soc Hematol Educ Prog Book)* 74-78, 2007
83. Kinoshita T, Inoue N. Relationship between aplastic anemia and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 75: 117-122, 2002
84. Tichelli A, Gratwohl A, Wursch A, Nissen C, Speck B. Late haematological complications in severe aplastic anaemia. *Br J Haematol* 69: 413-418, 1988

85. de Planque MM, Bacigalupo A, Wursch A, Hows JM, Devergie A, Frickhofen N, Brand A, Nissen C. Long-term follow-up of severe aplastic anaemia patients treated with antithymocyte globulin. Severe Aplastic Anaemia Working Party of the European Cooperative Group for Bone Marrow Transplantation (EBMT). *Br J Haematol* 73: 121-126, 1989
86. Najean Y, Haguenaer O. Long-term (5 to 20 years) Evolution of nongrafted aplastic anemias. The Cooperative Group for the Study of Aplastic and Refractory Anemias. *Blood* 76: 2222-2228, 1990
87. Nagarajan S, Brodsky RA, Young NS, Medof ME. Genetic defects underlying paroxysmal nocturnal hemoglobinuria that arises out of aplastic anemia. *Blood* 86: 4656-4661, 1995
88. Nishimura Ji, Hirota T, Kanakura Y, Machii T, Kageyama T, Doi S, Wada H, Masaoka T, Kanayama Y, Fujii H, Inoue N, Kuwayama M, Inoue N, Ohishi K, Kinoshita T. Long-term support of hematopoiesis by a single stem cell clone in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 99: 2748-2751, 2002
89. Iwanaga M, Furukawa K, Amenomori T, Mori H, Nakamura H, Fuchigami K, Kamihira S, Nakakuma H, Tomonaga M. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes. *Br J Haematol* 102: 465-474, 1998
90. Araten DJ, Swirsky D, Karadimitris A, Notaro R, Nafa K, Bessler M, Thaler HT, Castro-Malaspina H, Childs BH, Boulad F, Weiss M, Anagnostopoulos N, Kutlar A, Savage DG, Maziarz RT, Jhanwar S, Luzzatto L. Cytogenetic and morphological abnormalities in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 115: 360-368, 2001
91. Harris JW, Koscick R, Lazarus HM, Eshleman JR, Medof ME. Leukemia arising out of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymphoma* 32: 401-426, 1999
92. Schrezenmeier H, Muus P, Socié G, Szer J, Urbano-Ispizua A, Maciejewski JP, Brodsky RA, Bessler M, Kanakura Y, Rosse W, Khursigara G, Bedrosian C, Hillmen P. Baseline characteristics and disease burden in patients in the International Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria Registry. *Haematologica* 99: 922-929, 2014
93. Hugel B, Socie G, Vu T, Toti F, Gluckman E, Freyssinet JM, Scrobohaci ML. Elevated levels of circulating procoagulant microparticles in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and aplastic anemia. *Blood* 93: 3451-3456, 1999
94. Wiedmer T, Hall SE, Ortel TL, Kane WH, Rosse WF, Sims PJ. Complement-induced vesiculation and exposure of membrane prothrombinase sites in platelets of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 82: 1192-1196, 1993
95. Ronne E, Pappot H, Grondahl-Hansen J, Hoyer-Hansen G, Plesner T, Hansen NE, Dano K. The receptor for urokinase plasminogen activator is present in plasma from healthy donors and elevated in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 89: 576-581, 1995
96. Hillmen P, Hall C, Marsh JC, Elebute M, Bombara MP, Petro BE, Cullen MJ, Richards SJ, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP. Effect of eculizumab on hemolysis and transfusion requirements in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 350: 552-559, 2004
97. Hillmen P, Muus P, Duhrsen U, Risitano AM, Schubert J, Luzzatto L, Schrezenmeier H, Szer J, Brodsky RA, Hill A, Socie G, Bessler M, Rollins SA, Bell L, Rother RP, Young NS. Effect of the complement inhibitor eculizumab on thromboembolism in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 110:4123-4128, 2007
98. Ham TH, Dingle JH. Studies on destruction of red blood cells. II. Chronic hemolytic anemia with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: certain immunological aspects of the hemolytic mechanism with special reference to serum complement. *J Clin Invest* 18: 657-672, 1939
99. Hartmann RC, Jenkins DE. The "sugar-water" test for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 275: 155-157, 1966
100. Rosse WF, Dacie JV. Immune lysis of normal human and paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH) red blood cells. I. The sensitivity of PNH red cells to lysis by complement and specific antibody. *J Clin Invest* 45: 736-748, 1966
101. Shichishima T, Terasawa T, Hashimoto C, Ohto H, Uchida T, Maruyama Y. Heterogenous expression of decay accelerating factor and CD59/membrane attack complex inhibition factor on paroxysmal nocturnal haemoglobinuria (PNH) erythrocytes. *Br J Haematol* 78: 545-550, 1991
102. Rosse WF, Hoffman S, Campbell M, Borowitz M, Moore JO, Parker CJ. The erythrocytes in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria of intermediate sensitivity to complement lysis. *Br J Haematol* 79: 99-107, 1991
103. Tseng JE, Hall SE, Howard TA, Ware RE. Phenotypic and functional analysis of lymphocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 50: 244-253, 1995
104. Nakakuma H, Nagakura S, Iwamoto N, Kawaguchi T, Hidaka M, Horikawa K, Kagimoto T, Shido T, Takatsuki K. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone in bone marrow of patients with pancytopenia. *Blood* 85: 1371-1376, 1995
105. Wang SA, Pozdnyakova O, Jorgensen JL, Medeiros LJ, Stachurski D, Anderson M, Raza A, Woda BA. Detection of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in patients with myelodysplastic syndromes and

- related bone marrow diseases, with emphasis on diagnostic pitfalls and caveats. *Haematologica* 94: 29-37, 2009
106. Borowitz MJ, Craig FE, Digiuseppe JA, Illingworth AJ, Rosse W, Sutherland DR, Wittwer CT, Richards SJ; Clinical Cytometry Society. Guidelines for the diagnosis and monitoring of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and related disorders by flow cytometry. *Cytometry B Clin Cytom* 78: 211-230, 2010
 107. Sugimori C, Mochizuki K, Qi Z, Sugimori N, Ishiyama K, Kondo Y, Yamazaki H, Takami A, Okumura H, Nakao S. Origin and fate of blood cells deficient in glycosylphosphatidylinositol-anchored protein among patients with bone marrow failure. *Br J Haematol* 147: 102-112, 2009
 108. Hu R, Mukhina GL, Piantadosi S, Barber JP, Jones RJ, Brodsky RA. PIG-A mutations in normal hematopoiesis. *Blood* 105: 3848-3854, 2005
 109. Sugimori C, Chuhjo T, Feng X, Yamazaki H, Takami A, Teramura M, Mizoguchi H, Omine M, Nakao S. Minor population of CD55-CD59- blood cells predicts response to immunosuppressive therapy and prognosis in patients with aplastic anemia. *Blood* 107: 1308-1314, 2006
 110. Kulagin A, Lisukov I, Ivanova M, Golubovskaya I, Kruchkova I, Bondarenko S, et al. Prognostic value of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria clone presence in aplastic anaemia patients treated with combined immunosuppression: results of two-centre prospective study. *Br J Haematol* 164: 546-554, 2014
 111. Tutelman PR, Aubert G, Milner RA, Dalal BI, Schultz KR, Deyell RJ. Paroxysmal nocturnal haemoglobinuria phenotype cells and leucocyte subset telomere length in childhood acquired aplastic anaemia. *Br J Haematol* 164: 717-721, 2014
 112. Narita A, Kojima S. Biomarkers for predicting clinical response to immunosuppressive therapy in aplastic anemia. *Int J Hematol* 104: 153-158, 2016
 113. Hillmen P, Young NS, Schubert J, Brodsky RA, Socié G, Muus P, Röth A, Szer J, Elebute MO, Nakamura R, Browne P, Risitano AM, Hill A, Schrezenmeier H, Fu CL, Maciejewski J, Rollins SA, Mojcik CF, Rother RP, Luzzatto L. The complement inhibitor eculizumab in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *N Engl J Med* 355: 1233-1243, 2006
 114. Brodsky RA, Young NS, Antonioli E, Risitano AM, Schrezenmeier H, Schubert J, Gaya A, Coyle L, de Castro C, Fu CL, Maciejewski JP, Bessler M, Kroon HA, Rother RP, Hillmen P. Multicenter phase 3 study of the complement inhibitor eculizumab for the treatment of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 111: 1840-1847, 2008
 115. Hillmen P, Elebute M, Kelly R, Urbano-Ispizua A, Hill A, Rother RP, Khursigara G, Fu CL, Omine M, Browne P, Rosse W. Long-term effect of the complement inhibitor eculizumab on kidney function in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 85: 553-559, 2010
 116. Ninomiya H, Obara N, Chiba S, Usuki K, Nishiwaki K, Matsumura I, Shichishima T, Okamoto S, Nishimura JI, Ohyashiki K, Nakao S, Ando K, Kanda Y, Kawaguchi T, Nakakuma H, Harada D, Akiyama H, Kinoshita T, Ozawa K, Omine M, Kanakura Y. Interim analysis of post-marketing surveillance of eculizumab for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria in Japan. *Int J Hematol* 104: 548-558, 2016
 117. Hill A, Rother RP, Wang X, Morris SM Jr, Quinn-Senger K, Kelly R, Richards SJ, Bessler M, Bell L, Hillmen P, Gladwin MT. Effect of eculizumab on haemolysis-associated nitric oxide depletion, dyspnoea, and measures of pulmonary hypertension in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 149: 414-425, 2010
 118. Hill A, Rother RP, Arnold L, Kelly R, Cullen MJ, Richards SJ, Hillmen P. Eculizumab prevents intravascular hemolysis in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and unmasks low-level extravascular hemolysis occurring through C3 opsonization. *Haematologica* 95: 567-573, 2010
 119. Kelly RJ, Höchsmann B, Szer J, Kulasekararaj A, de Guibert S, Röth A, Weitz IC, Armstrong E, Risitano AM, Patriquin CJ, Terriou L, Muus P, Hill A, Turner MP, Schrezenmeier H, Peffault de Latour R. Eculizumab in Pregnant Patients with Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria. *N Engl J Med* 373: 1032-1039, 2015
 120. Miyasaka N, Miura O, Kawaguchi T, Arima N, Morishita E, Usuki K, Morita Y, Nishiwaki K, Ninomiya H, Gotoh A, Imashuku S, Urabe A, Shichishima T, Nishimura J, Kanakura Y. Pregnancy outcomes of patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria treated with eculizumab: a Japanese experience and updated review. *Int J Hematol* 103: 703-712, 2016
 121. Risitano AM, Notaro R, Marando L, Serio B, Ranaldi D, Seneca E, Ricci P, Alfinito F, Camera A, Gianfaldoni G, Amendola A, Boschetti C, Di Bona E, Fratellanza G, Barbano F, Rodeghiero F, Zanella A, Iori AP, Selleri C, Luzzatto L, Rotoli B. Complement fraction 3 binding on erythrocytes as additional mechanism of disease in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria patients treated by eculizumab. *Blood* 113: 4094-4100, 2009
 122. Rondelli T, Risitano AM, Peffault de Latour R, Sica M, Peruzzi B, Ricci P, Barcellini W, Iori AP, Boschetti C, Valle V, Frémeaux-Bacchi V, De Angioletti M, Socié G, Luzzatto L, Notaro R, Rondelli T, Risitano AM,

- Peffault de Latour R, Sica M, Peruzzi B, Ricci P, Barcellini W, Iori AP, Boschetti C, Valle V, Frémeaux-Bacchi V, De Angioletti M, Socie G, Luzzatto L, Notaro R. *Haematologica* 99: 262-266, 2014
123. Nishimura J, Yamamoto M, Hayashi S, Ohyashiki K, Ando K, Brodsky AL, Noji H, Kitamura K, Eto T, Takahashi T, Masuko M, Matsumoto T, Wano Y, Shichishima T, Shibayama H, Hase M, Li L, Johnson K, Lazarowski A, Tamburini P, Inazawa J, Kinoshita T, Kanakura Y. Genetic variants in C5 and poor response to eculizumab. *N Engl J Med* 370: 632-639, 2014
124. Rosse WF. Treatment of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 60: 20-23, 1982
125. Issaragrisil S, Piankijagum A, Tang-naitrisorana Y. Corticosteroids therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 25: 77-83, 1987
126. Shichishima T, Saitoh Y, Noji H, Terasawa T, Maruyama Y. In vivo effects of various therapies on complement-sensitive erythrocytes in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Int J Hematol* 6: 291-302, 1996
127. Brecher ME, Taswell HF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and the transfusion of washed red cells. A myth revisited. *Transfusion* 8: 681-685, 1989
128. Sirchia G, Ferrone S, Mercuriali F. Leukocyte antigen-antibody reaction and lysis of paroxysmal nocturnal hemoglobinuria erythrocytes. *Blood* 36: 334-336, 1970
129. Zupanaka B, Uhrynowska M, Konopka L. Transfusion-related acute lung injury due to granulocyte-agglutinating antibody in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Transfusion* 39: 944-947, 1999
130. Mengel CE, Kann HE, Jr. O'Malley. Increased hemolysis after intramuscular iron administration in patients with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 26: 74-81, 1965
131. Rosse WF, Gutterman LA. The effect of iron therapy in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Blood* 36: 559-565, 1970
132. Shichishima T, Yoshida M, Yokoyama A, Terasawa T, Uchida T, Kariyone S, Sanpei M. Erythropoiesis of complement-sensitive cells in a PNH patient with iron deficiency anemia during iron therapy. *Eur J Haematol* 42: 310-311, 1989
133. Alayash AI. Haptoglobin: Old protein with new functions. *Clinica Chimica Acta* 412: 493-498, 2011
134. Shibasaki T, Matsuda H, Furuya K. Haptoglobin therapy during pregnancy for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with renal failure. *Int J Gynaecol Obstet* 98: 267-268, 2007
135. Hattori K, Hirano T, Oshimi K. Protease inhibitors and haptoglobin for treatment of renal failure in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 63: 61-62, 2000
136. Paquette RL, Yoshimura R, Veisoh C, Kunkel L, Gajewski J, Rosen PJ. Clinical characteristics predict response to antithymocyte globulin in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 96: 92-97, 1997
137. van Kamp H, van Imhoff GW, de Wolf JT, Smit JW, Halie MR, Vellenga E. The effect of cyclosporine on haematological parameters in patients with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 89: 79-82, 1995
138. Stoppa AM, Vey N, Sainty D, Arnoulet C, Camerlo J, Cappiello MA, Gastaut JA, Maraninchi D. Correction of aplastic anaemia complicating paroxysmal nocturnal haemoglobinuria: absence of eradication of the PNH clone and dependence of response on cyclosporin A administration. *Br J Haematol* 93: 42-44, 1996
139. Schubert J, Scholz C, Geissler RG, Ganser A, Schmidt RE. G-CSF and cyclosporin induce an increase of normal cells in hypoplastic paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Ann Hematol* 74: 225-230, 1997
140. 仲宗根秀樹, 飯島喜美子, 浅野大樹, 中村文彦, 木田理子, 伊豆津宏二, 浦部晶夫, 臼杵憲祐. 発作性夜間ヘモグロビン尿症に対する抗胸腺細胞グロブリンおよびシクロスポリンによる免疫抑制療法. *臨床血液* 49: 498-504, 2008
141. Scheinberg P, Marte M, Nunez O, Young NS. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clones in severe aplastic anemia patients treated with horse anti-thymocyte globulin plus cyclosporine. *Haematologica* 95: 1075-1080, 2010
142. Tran MH, Fadeyi E, Scheinberg P, Klein HG. Apparent hemolysis following intravenous antithymocyte globulin treatment in a patient with marrow failure and a paroxysmal nocturnal hemoglobinuria clone. *Transfusion* 46: 1244-1247, 2006
143. Ninomiya H, Muraki Y, Shibuya K, Nagasawa T, Abe T. Induction of Fc gamma R-III (CD16) expression on neutrophils affected by paroxysmal nocturnal haemoglobinuria by administration of granulocyte colony-stimulating factor. *Br J Haematol* 84: 497-503, 1993
144. Fujimi A, Matsunaga T, Kogawa K, Ohnuma T, Takahira N, Abe T, Kitaoka K, Kogawa T, Tanaka I, Morii K, Terui T, Sakamaki S, Kato J, Kura T, Maeda T, Niitsu Y. A patient with paroxysmal nocturnal haemoglobinuria in whom granulocyte colony-stimulating factor administration resulted in improvement of recurrent enterocolitis and its associated haemolytic attacks. *Br J Haematol* 11: 858-862, 2002
145. Jégo P, Le Strat A, Girard L, Sébillot M, Grosbois B, Le Blay R, Drénou B. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: efficacy of prolonged treatment with granulocyte colony-stimulating factor. *Blood* 90: 2841-2843, 1997

146. Rosse WF. Paroxysmal nocturnal hemoglobinuria--present status and future prospects. *West J Med* 132: 219-228, 1980
147. 藤岡成徳他. 発作性夜間血色素尿症の治療と病態 (第1報) 共通プロトコールによる貧血に治療成績の分析と関連事項の検討. 厚生省特発性造血障害調査研究班昭和56年度研究業績報告書. p209, 1982
148. Harrington WJ Sr, Kolodny L, Horstman LL, Jy W, Ahn YS. Danazol for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 54: 149-154, 1997
149. Saso R, Marsh J, Cevreska L, Szer J, Gale RP, Rowlings PA, Passweg JR, Nugent ML, Luzzatto L, Horowitz MM, Gordon-Smith EC. Bone marrow transplants for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 104: 392-396, 1999
150. Raiola AM, Van Lint MT, Lamparelli T, Gualandi F, Benvenuto F, Figari O, Mordini N, Berisso G, Bregante S, Frassoni F, Bacigalupo A : Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Haematologica* 85: 59-62, 2000
151. Woodard P, Wang W, Pitts N, Benaim E, Horwitz E, Cunningham J, Bowman L. Successful unrelated donor bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Bone Marrow Transplant* 27: 589-592, 2001
152. Suenaga K, Kanda Y, Niiya H, Nakai K, Saito T, Saito A, Ohnishi M, Takeuchi T, Tanosaki R, Makimoto A, Miyawaki S, Ohnishi T, Kanai S, Tobinai K, Takaue Y, Mineishi S. Successful application of nonmyeloablative transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Exp Hematol* 29: 639-642, 2001
153. Takahashi Y, McCoy JP Jr, Carvallo C, Rivera C, Igarashi T, Srinivasan R, Young NS, Childs RW. In vitro and in vivo evidence of PNH cell sensitivity to immune attack after nonmyeloablative allogeneic hematopoietic cell transplantation. *Blood* 103: 1383-1390, 2004
154. Szer J, Deeg HJ, Witherspoon RP, Fefer A, Buckner CD, Thomas ED, Storb R. Long-term survival after marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria with aplastic anemia. *Ann Intern Med* 101: 193-195, 1984
155. Antin JH, Ginsburg D, Smith BR, Nathan DG, Orkin SH, Rapoport JM. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria: eradication of the PNH clone and documentation of complete lymphohematopoietic engraftment. *Blood* 66: 1247-1250, 1985
156. Kolb HJ, Holler E, Bender-Gotze C, Walther U, Mittermuller J, Clemm C, Bauchinger M, Gerhartz HH, Brehm G, Ledderose G, et al. Myeloablative conditioning for marrow transplantation in myelodysplastic syndromes and paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Bone Marrow Transplant* 4: 29-34, 1989
157. Kawahara K, Witherspoon RP, Storb R. Marrow transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Am J Hematol* 39: 283-288, 1992
158. Bemba M, Guardiola P, Garderet L, Devergie A, Ribaud P, Esperou H, Noguera MH, Gluckman E, Socie G. Bone marrow transplantation for paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *Br J Haematol* 105: 366-368, 1999
159. Tian H, Liu L, Chen J, Xu Y, Jin Z, Miao M, Fu Z, Qiu H, Sun A, Wu D. Haploidentical hematopoietic stem cell transplant in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Leuk Lymph* 57: 835-841, 2016
160. Hegenbart U, Niederwieser D, Forman S, Holler E, Leiblein S, Johnston L, Ponisch W, Epner E, Witherspoon R, Blume K, Storb R. Hematopoietic cell transplantation from related and unrelated donors after minimal conditioning as a curative treatment modality for severe paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant* 11: 689-697, 2003
161. Pantin J, Tian X, Geller N, Ramos C, Cook L, Cho E, Scheinberg P, Vasu S, Khoo H, Stroncek D, Barrett J, Young NS, Donohue T, Childs RW. Long-term outcome of fludarabine-based reduced-intensity allogeneic hematopoietic cell transplantation for debilitating paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant* 20: 1435-1439, 2014
162. Matos-Fernandez NA, Abou Mourad YR, Caceres W, Kharfan-Dabaja MA. Current status of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Biol Blood Marrow Transplant* 15: 656-661, 2009
163. Göker H, Uz B, Büyükaşık Y, Aksu S, Haznedaroğlu İ, Sayınalp N, Karacan Y, Tekin F, Özcebe Oİ. Eculizumab before and after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Turk J Haematol* 28: 223-227, 2011
164. Oshiro H, Goi K, Akahane K, Inukai T, Sugita K. Effective eculizumab therapy followed by BMT in a boy with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria. *Pediatr Int* 57: e27-e29, 2015
165. McMullin MF, Hillmen P, Jackson J, Ganly P, Luzzatto L. Tissue plasminogen activator for hepatic vein thrombosis in paroxysmal nocturnal haemoglobinuria. *J Intern Med* 235: 85-89, 1994
166. Hauser AC, Brichta A, Pabinger-Fasching I, Jager U. Fibrinolytic therapy with rt-PA in a patient with paroxysmal nocturnal hemoglobinuria and Budd-Chiari syndrome. *Ann Hematol* 82: 299-302, 2003
167. Hall C, Richards S, Hillmen P. Primary prophylaxis with warfarin prevents thrombosis in paroxysmal nocturnal hemoglobinuria (PNH). *Blood* 102: 3587-3591, 2003
168. Audebert HJ, Planck J, Eisenburg M, Schrezenmeier H, Haberl RL. Cerebral ischemic infarction in

- paroxysmal nocturnal hemoglobinuria report of 2 cases and updated review of 7 previously published patients. *J Neurol* 252:1379-1386, 2005
- 169.Moyo VM, Mukhina GL, Garrett ES, Brodsky RA. Natural history of paroxysmal nocturnal haemoglobinuria using modern diagnostic assays. *Br J Haematol* 126: 133-138, 2004