

免疫抑制療法とサイトカイン療法により寛解に導入した 再生不良性貧血の犬の1例

高橋義明[†] 平川 篤 山本直人 田中美礼 浦 亜沙美
猪狩和明 吉原俊平 大塚浩平

ペットクリニック ハレルヤ (〒815-0071 福岡市南区平和1-30-63)

(2020年1月7日受付・2020年6月22日受理)

要 約

近医にて汎血球減少を指摘された1歳2カ月齢、未去勢雄のトイ・プードルが紹介受診し、骨髄検査を含む各臨床検査により、特発性再生不良性貧血と診断した。プレドニゾロンとシクロスポリンによる免疫抑制療法と顆粒球コロニー刺激因子とエリスロポエチンによるサイトカイン療法を実施したところ、第32病日に寛解に導入することができた。その後、良好に推移し、第89病日にはプレドニゾロンを休薬し、第395病日現在、シクロスポリン単独投与により寛解を維持されている。——キーワード：再生不良性貧血、サイトカイン療法、免疫抑制療法。

-----日獣会誌 73, 585～589 (2020)

再生不良性貧血 (aplastic anemia: AA) は、末梢血における汎血球減少と骨髄の低形成と脂肪髄を特徴とする血液疾患群である。病因により先天性と後天性に分けられ、後天性はさらに特発性 (一次性) と二次性に分類される。人の特発性 AA の発生機序には、造血幹細胞の質的異常と免疫学的機序による造血幹細胞の障害の2つが重要と考えられている。特に免疫学的機序に関しては、骨髄中の抗原特異的 T 細胞の増殖が認められ、T 細胞による造血幹細胞への直接的障害が疑われている (再生不良性貧血診療の参照ガイド 2018年改訂, 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班, http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H30/02.pdf)。

一方、犬の特発性 AA の発生はきわめてまれであり、発生機序は不明であるが、人と同様の機序が考えられている。二次性は薬剤、化学物質、放射線、感染症 (パルボウイルス, エールリヒア), エストロジェン中毒などが原因となる [1]。

今回われわれは、汎血球減少を呈した犬を骨髄検査を含む各臨床検査により特発性 AA と診断した。骨髄リンパ球の免疫表現型を検査するとともに、プレドニゾロン (PSL) とシクロスポリン (CsA) による免疫抑制療法

と顆粒球コロニー刺激因子 (G-CSF) と、エリスロポエチン (EPO) によるサイトカイン療法を実施したところ、寛解に導入することができたのでその概要を報告する。

症 例

症例はトイ・プードル、未去勢雄、1歳2カ月齢。混合ワクチン接種済み、フィラリア予防済みであり、特別な投薬歴はなかった。1週間前から食欲低下を示し、前日からの食欲廃絶と元気消失を主訴に近医を受診したところ、発熱 (40.0℃) と汎血球減少が認められた。抗生剤とプレドニゾロンを含む皮下輸液を受けた後、当日に当院へ紹介受診した。

身体検査所見：体重 2.2kg, BCS 3/5, 体温 38.1℃, 心拍数 112 回/分, 呼吸数 28 回/分。体表リンパ節の腫大や脾腫は認められなかった。両側精巣は陰囊内に下降しており、異常は認められなかった。

血液検査所見：CBC では PCV 28% の非再生性貧血 (網赤血球 0%), 白血球減少 (490/ μ l: 好中球 18/ μ l), 血小板減少 (18 $\times 10^3$ / μ l) の汎血球減少が認められた。血液化学検査では血糖値 (Glu) とアルカリフォスファターゼ (ALP) の上昇, 総蛋白 (TP) とアルブミン (Alb)

[†] 連絡責任者：高橋義明 (ペットクリニック ハレルヤ)

〒815-0071 福岡市南区平和1-30-63

☎ 092-521-3267 FAX 092-521-3291

E-mail: fisherman29690@me.com

表 血液検査所見

RBC ($\times 10^6/\mu\text{l}$)	4.43	BUN (mg/dl)	9	TAT (ng/ml: ~0.2)	<0.1
PCV (%)	28	Cre (mg/dl)	1.0	D-dimer ($\mu\text{g}/\text{ml}$: ~2.0)	0.85
Hb (g/dl)	9.2	Ca (mg/dl)	11.5	*Direct Coombs test	
MCV (fl)	63.2	P (mg/dl)	3.5	37°C (-) 4°C (-)	
MCHC (g/dl)	32.9	Fe ($\mu\text{g}/\text{dl}$: 61~240)	142	*ベクター媒介性疾患検査	
Ret (%)	0	TIBC ($\mu\text{g}/\text{dl}$: 303~526)	195	(リアルタイム PCR)	
WBC (/ μl)	490	Tf-S (%: 16~40)	72.8	<i>Anaplasma</i> spp. (-)	
Band-N	0	CRP (mg/dl)	8.7	<i>Babesia</i> spp. (-)	
Seg-N	18	LDH (U/l)	16	<i>Bartonella</i> spp. (-)	
Lym	451	LDH 1 (%)	16.8	<i>Ehrlichia</i> spp. (-)	
Mon	21	LDH 2 (%)	1.6	<i>Hepatozoon</i> spp. (-)	
Eos	0	LDH 3 (%)	46.3	<i>Leishmania</i> spp. (-)	
Plat ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	18	LDH 4 (%)	21.0	<i>Neorickettsia risticii</i> (-)	
TP (g/dl)	4.8	LDH 5 (%)	14.3	<i>Rickettsia rickettsii</i> (-)	
Alb (g/dl)	2.0	Na (mmol/l)	143	<i>Mycoplasma haemocanis</i> (-)	
AST (U/l)	40	K (mmol/l)	3.6	<i>Candidatus Mycoplasma haematoparvum</i> (-)	
ALT (U/l)	75	Cl (mmol/l)	110	*重症熱性血小板減少症候群ウイルス検査	
ALP (U/l)	713	PT (sec: 6.8~8.6)	9.4	ウイルス遺伝子検査: (-)	
TBil (mg/dl)	<0.2	APTT (sec: 13.1~26.9)	31.7	抗体検査: IgM 0.13 IgG 0.11	
TCho (mg/dl)	100	Fib (mg/dl: 88~336)	373	(>0.5で陽性判定)	
Glu (mg/dl)	138				

の低下、総鉄結合能 (TIBC) の低下とトランスフェリン飽和度 (Tf-S) の上昇、C 反応性蛋白 (CRP) の上昇が認められた。凝固線溶系検査ではプロトロンビン時間 (PT) と活性化部分トロンボプラスチン時間 (APTT) の軽度な延長が認められたが、トロンビン・アンチトロンビン複合体 (TAT) 及び D ダイマー (D-dimer) は正常であった。直接クームス試験は 37°C 陰性、4°C 陰性であり、リアルタイム PCR によるベクター媒介性疾患検査 (アイデックスラボトリーズ^株, 東京) ではエールリヒアも含めてすべて陰性であった。また、重症熱性血小板減少症候群 (SFTS) ウイルスの遺伝子検査及び抗体検査はともに陰性であった (表)。

画像検査所見: 胸腹部 X 線検査及び腹部超音波検査では異常所見は認められなかった。

骨髄検査所見: 骨髄検査は、ミダゾラムとブトルファンールの前処置後、プロポフォール導入による全身麻酔下で上腕骨と大腿骨の 2 カ所で行った。いずれの部位でも、骨髄細胞診検査では脂肪が 90% 以上を占め、細胞充実性は非常に低かった。造血細胞はほとんどみられず、残存するおもな細胞はリンパ球、形質細胞、マクロファージであった。骨髄コア生検では脂肪髄 (90% 以上) で細胞数は著減し、その多くはリンパ球と形質細胞であり、線維化は認められなかった。骨髄リンパ球の免疫表現型を調べるため、T 細胞マーカーである CD3 と B 細胞マーカーである CD20 の免疫組織化学染色を実施したところ、CD3 陽性細胞と CD20 陽性細胞の数に大きな差は認められなかった (図 1)。

以上の各検査所見より、特発性 AA と診断した。

治療及び経過: 第 1 病日より入院下にて輸液とエンロフロキサシンの投与を開始するとともに、骨髄検査により AA と診断し、PSL 4mg/kg/day SC、遺伝子組換えヒト G-CSF (ノイトロジン[®], 中外製薬^株, 東京) 2 $\mu\text{g}/\text{kg}$ IV、遺伝子組換えヒト EPO (エスポー[®], 協和キリン^株, 東京) 200 IU/kg IV を開始した。G-CSF と EPO は第 9 病日まで連日投与した。第 2 病日からは CsA (アトピカ[®], 共立製薬^株, 東京) 9mg/kg/day PO と蛋白同化ステロイドであるメテノロン酢酸エステル (プリモボラン[®], バイエル薬品^株, 大阪) 0.5mg/kg/day PO を開始した。第 8 病日には PCV が 15% に低下したため全血輸血 70ml を実施した。第 10 病日には PCV 34%、白血球数 2,370/ μl (好中球 501/ μl)、血小板数 51 $\times 10^3/\mu\text{l}$ と改善がみられたため退院とし、PSL 2mg/kg/day、CsA 9mg/kg/day、メテノロン酢酸エステル 0.5mg/kg/day の経口投与を継続した。第 15 病日には白血球数が 8,270/ μl (好中球 3,010/ μl) に増加し、第 22 病日には血小板数が 295 $\times 10^3/\mu\text{l}$ に増加した。第 32 病日には PCV 34%、白血球数 8,800/ μl (好中球 4,532/ μl)、血小板数 271 $\times 10^3/\mu\text{l}$ であり、骨髄検査にて正常かつ活発な造血が確認され寛解と判断した。その後、良好に推移し第 63 病日にはメテノロン酢酸エステルを休薬、第 89 病日には PSL を休薬した。第 179 病日より CsA を 4mg/kg/day に減量、第 303 病日より 4mg/kg/day 隔日投与に減量したが、第 395 病日現在、寛解を維持されている (図 2)。

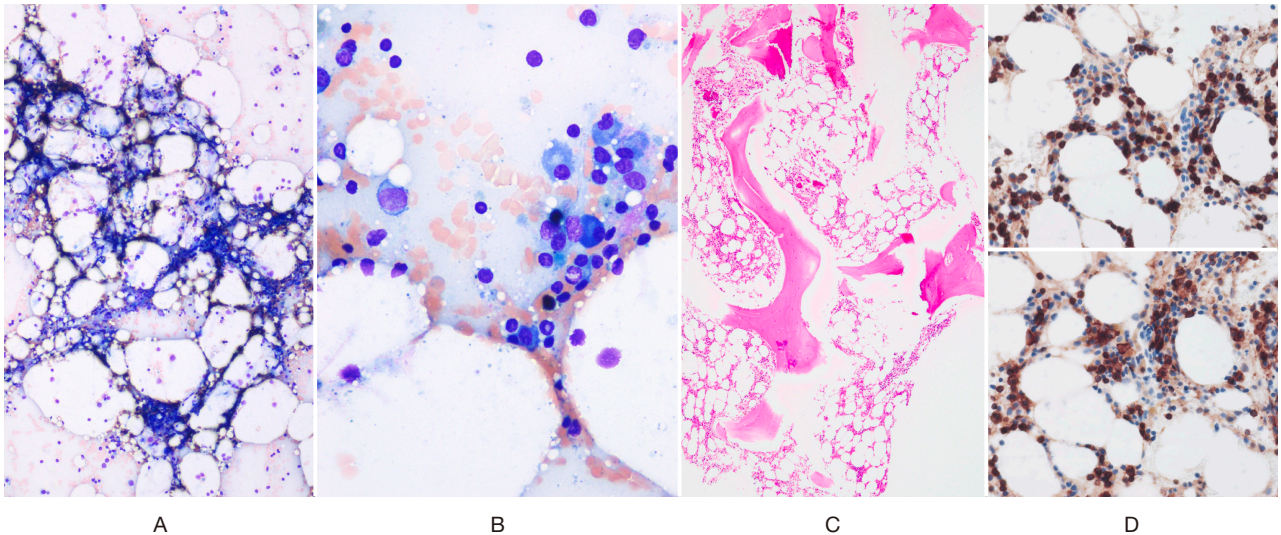


図1 骨髄検査所見

- A: 骨髄細胞診 (ライトギムザ染色, 弱拡大) 脂肪が90%以上を占め, 細胞充実性は著しく低い.
- B: 骨髄細胞診 (ライトギムザ染色, 強拡大) 造血細胞はほとんどみられず, 残存するおもな細胞はリンパ球, 形質細胞, マクロファージ.
- C: 骨髄コア生検 (HE染色, 弱拡大) 脂肪随で細胞数は著減, その多くがリンパ球と形質細胞であり, 線維化は認められなかった.
- D: 骨髄コア免疫組織化学染色(上段 CD3, 下段 CD20) CD3陽性細胞とCD20陽性細胞の数に大きな差は認められなかった.

考 察

犬の特発性AAの発生はきわめてまれであり, 717例の犬の骨髄標本を回顧的に調査した報告では, AAは16例(2.2%)であった. そのうち特発性が12例(75%), 二次性が4例(25%/エストロゲン誘発性1例, 薬剤性1例, エールリヒア症2例)であり, 特発性AAの中央年齢は2.9歳で若齢での発生傾向を示した[2]. また, 犬のAA9例の報告では, うち6例(67%)が特発性であり, 9例中6例は21日以内に死亡あるいは安楽死となっているが, 2例(22%)は回復している[3]. 本症例は1歳2カ月齢の若齢犬に汎血球減少及び骨髄低形成と脂肪髄が認められAAと診断し, 各臨床検査より二次性が除外されたことから特発性AAと診断した. 人のAAでは骨髄中の抗原特異的T細胞の増殖が認められ, T細胞による造血幹細胞への直接的障害が疑われている. 本症例では, 発症時の骨髄リンパ球はT細胞とB細胞ともに同程度認められ, その数に大きな差は認められなかった. 犬の特発性AAの病態が人と同様なのかを調べるためには, 今回実施できなかったT細胞の詳細な分類や細胞障害性T細胞が抗原特異的なかどうかを検査する必要がある, 今後の検討課題である.

人のAAでは重症度によって予後や治療方針が異なるため, stage 1(軽症), stage 2(中等症/網赤血球 $60,000/\mu\text{l}$ 未満, 好中球数 $1,000/\mu\text{l}$ 未満, 血小板 $50,000/\mu\text{l}$ 未満のいずれか2項目を満たす. a: 輸血不要. b: 毎月2単位未満の輸血必要), stage 3(やや重

症/stage 2+毎月2単位以上の輸血必要), stage 4(重症/網赤血球 $40,000/\mu\text{l}$ 未満, 好中球数 $500/\mu\text{l}$ 未満, 血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 未満のいずれか2項目を満たす), stage 5(最重症/好中球 $200/\mu\text{l}$ 未満, かつ網赤血球 $20,000/\mu\text{l}$ 未満か血小板 $20,000/\mu\text{l}$ 未満のいずれか1項目を満たす)の5段階に分類されている. stage 2aまでは, PSLとCsAを主体に反応が悪ければ抗胸腺グロブリン(ATG)を追加する. stage 2b以上では, 治療はPSLとCsAとATGとの併用が標準治療であり, その治療反応性に応じてトロンボポエチン受容体作動薬のエルトロンボパグの追加が検討され, 感染症合併時にはG-CSFを使用する. ATG/CsA併用療法により, 寛解率は約70%とされている(再生不良性貧血診療の参照ガイド2018年改訂, 厚生労働科学研究費補助金 難治性疾患政策研究事業 特発性造血障害に関する調査研究班, http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H30/02.pdf). 一方, 犬では報告が少なく, 特発性AAの犬にPSL, 蛋白同化ステロイド, テストステロン, EPO(50 IU/kg SC 連日6日間)を投与した報告では, 反応することなく第26病日に死亡している[4]. また, 特発性AAの犬にPSLを1カ月間投与した報告では, 反応がみられずCsAとアザチオプリン(AZA)に変更したことで回復している[5]. 人の重症度基準にも照らし合わせて, コルチコステロイドのみの免疫抑制療法では寛解導入は難しい可能性がある. 免疫抑制療法(PSL, CsA)とサイトカイン療法(G-CSF $10\mu\text{g}/\text{kg}$ SC 連日 第3~7病日, EPO $300\text{ IU}/\text{kg}$ SC 48時間間隔 第3~15病日)を実施した特発性AAの犬

寛解に導入した再生不良性貧血の犬の1例

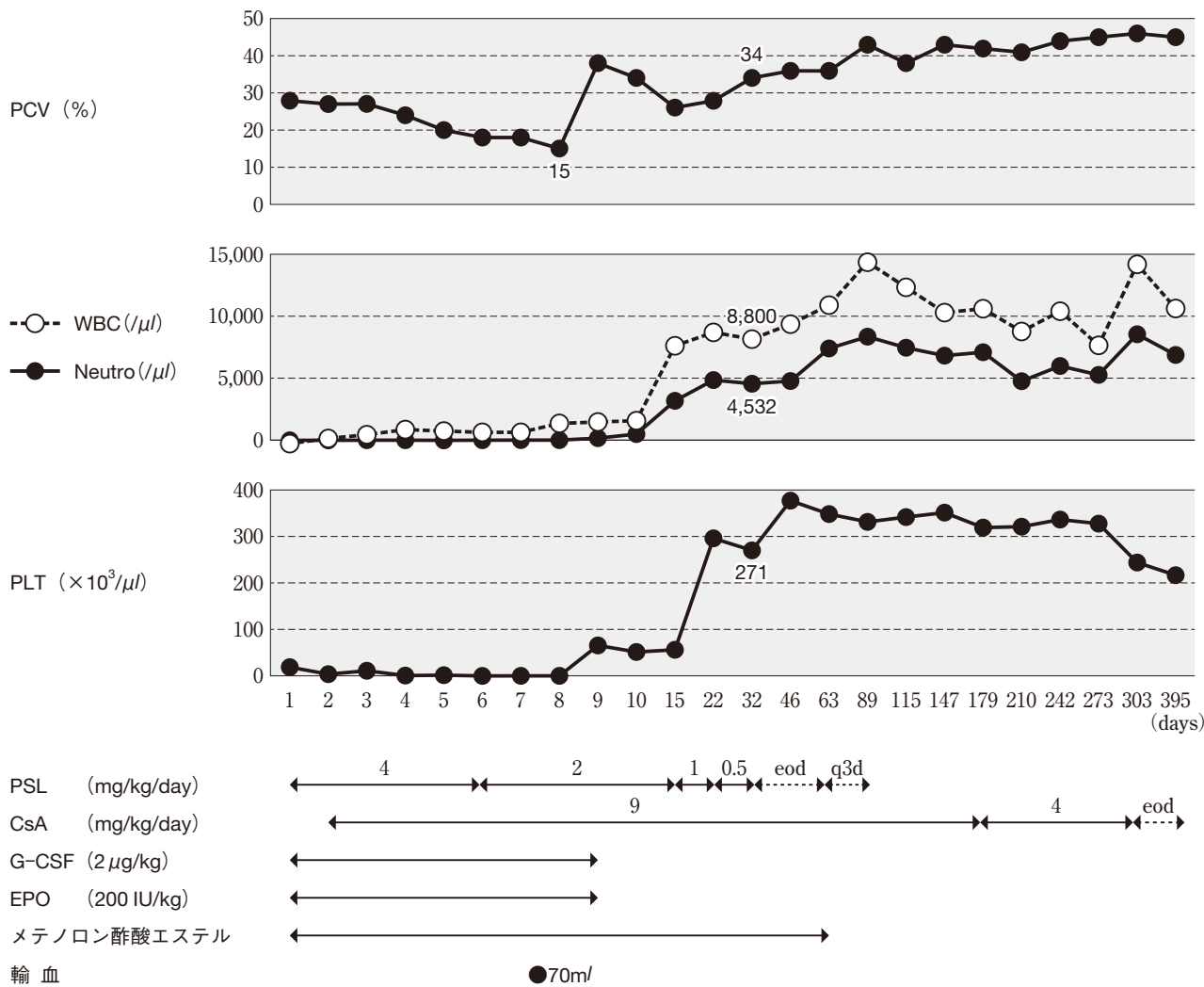


図2 治療経過

の報告では、貧血と血小板減少が改善せず、第17病日にミコフェノール酸モフェチル (MMF) に変更したことで、第39病日には回復している [6]。また、免疫抑制療法 (メチルプレドニゾンパルス療法, MMF) とサイトカイン療法 (G-CSF 2μg/kg SC 連日 第2~22病日) により第15病日には好中球の増加が認められたものの、第20病日に免疫介在性溶血性貧血を併発したことからヒト免疫グロブリン製剤の投与と AZA に変更したところ、第57病日に回復した犬の特発性 AA の報告もある [7]。

本症例は、PSL と CsA による免疫抑制療法と G-CSF と EPO によるサイトカイン療法を実施したところ、第15病日には好中球数の増加が確認され、第22病日には血小板数の増加が確認された。第32病日には貧血も改善し、骨髓検査にて正常かつ活発な造血が確認され寛解と判断した。サイトカイン療法として G-CSF 2μg/kg の静脈内投与と EPO 200 IU/kg の静脈内投与を第1病日~第9病日に連日投与した。G-CSF は獣医領域では皮下投与が一般的であるが、人では疾患などに応じて2

~5μg/kg を皮下投与や静脈内投与されており、とりわけ AA では静脈内投与が一般的であることから、本症例はそれに準じて静脈内投与を行った (ノイトロジン医薬品インタビューフォーム 2020年4月改訂, https://chugai-pharm.jp/content/dam/chugai/product/neu/inj/if/doc/neu_if.pdf)。EPO も同様に獣医領域では皮下投与が一般的であるが、人では腎性貧血において静脈内投与されている (エスポー医薬品インタビューフォーム 2020年6月改訂, https://medical.kyowakirin.co.jp/site/drugpdf/interv/espo_iv_in.pdf)。本症例は、人の重症度基準に当てはめると最重症 (stage5) であることを考慮するとともに、付随する血小板増加作用も期待して 200 IU/kg の高用量の静脈内投与を連日行った。良好な治療反応性を示した要因として、基本的治療となる免疫抑制療法に対して良好な反応を示すとともに、これらサイトカイン療法が造血を促進し、比較的速やかな血球の回復の一助となった可能性が考えられるが、その正確な評価は難しい。また、人由来の製剤であることから抗体産生などの問題もあり、犬の特発性 AA における

使用に際しては、投与量、投与経路、投与期間などのさらなる検討が必要であると考えられる。

犬の特発性 AA において、免疫抑制薬を用いた免疫抑制療法とサイトカイン療法の併用は一定程度の効果が期待できると推察され、速やかな確定診断と早期の積極的な導入治療が重要であると考えられた。

SFTS ウイルス検査を実施していただいた鹿児島大学共同獣医学部附属 TAD センターの松嶋 彩先生に深謝する。

引用文献

- [1] Weiss DJ : Aplastic Anemia, In Weiss DJ, Wardrop KJ eds, Schalm's Veterinary Hematology, 6th ed, 256-260, Wiley-Blackwell, Washington (2011)
- [2] Weiss DJ : A retrospective study of the incidence and the classification of bone marrow disorders in the dog at a veterinary teaching hospital (1996-2004), J Vet Intern Med, 20, 955-961 (2006)
- [3] Brazzell JL, Weiss DJ : A retrospective study of aplastic pancytopenia in the dog: 9 cases (1996-2003), Vet Clin Path, 35, 413-417 (2006)
- [4] 薄田治夫 : 犬の特発性骨髓無形成の 1 例, 日獣会誌, 48, 585-587 (1995)
- [5] Kim JH, Kim JW, Lim CY, Park HM : Clinical and magnetic resonance imaging (MRI) findings of idiopathic aplastic pancytopenia in a dog treated with cyclosporine and azathioprine, Can Vet J, 53, 419-422 (2012)
- [6] Yuki M, Sugimoto N, Otsuka H, Tanahashi S, Katoh M, Hirano T, Nishii N, Suzuki K : Recovery of a dog from aplastic anaemia after treatment with mycophenolate mofetil, Aust Vet J, 85, 495-497 (2007)
- [7] 森本寛之, 安川邦美, 小路祐樹, 羽迫広人, 中村勇太, 片山龍三, 西森大洋, 下田哲也 : 頻回の G-CSF 投与とミコフェノール酸モフェチルが有効であった再生不良性貧血の犬の 1 例, 動物臨床医学, 25, 143-147 (2016)

A Case of a Canine with Aplastic Anemia Induced into Remission by Immunosuppressive Therapy and Cytokine Therapy

Yoshiaki TAKAHASHI[†], Atsushi HIRAKAWA, Naoto YAMAMOTO, Mirei TANAKA,
Asami URA, Kazuaki IGARI, Syunpei YOSHIHARA and Kouhei OHTSUKA

* *Pet Clinic HALLELUYA, 1-30-63 Heiwa, Minami-ku, Fukuoka, 815-0071, Japan*

SUMMARY

A 14-month old, male toy poodle with a history of pancytopenia was referred to our hospital. The dog was diagnosed with idiopathic aplastic anemia through laboratory examination, including bone marrow examination. Immunosuppressive therapy with prednisolone and cyclosporine, and cytokine therapy with granulocyte colony-stimulating factor and erythropoietin were successfully induced into remission on the 32nd day. Subsequently, the dog maintained a good condition and prednisolone was stopped on 89th day. As of the 395th day, remission has been maintained through the single administration of cyclosporine.

— Key words : aplastic anemia, cytokine therapy, immunosuppressive therapy.

[†] *Correspondence to : Yoshiaki TAKAHASHI (Pet Clinic HALLELUYA)*

1-30-63 Heiwa, Minami-ku, Fukuoka, 815-0071, Japan

TEL 092-521-3267 FAX 092-521-3291 E-mail : fisherman29690@me.com

J. Jpn. Vet. Med. Assoc., 73, 585 ~ 589 (2020)