

原 著 低形成骨髓異形成症候群と再生不良性貧血の
鑑別に関する免疫組織化学的検討

阿部 真麻^{*1,2)} 塩沢 英輔¹⁾ 服部 憲路²⁾
村 井 聡^{1,2)} 本間まゆみ¹⁾ 佐々木陽介¹⁾
三浦 咲子¹⁾ 矢持 淑子¹⁾ 楯 玄秀¹⁾
中 牧 剛²⁾ 瀧本 雅文¹⁾

抄録：骨髓異形成症候群（MDS）と再生不良性貧血（AA）は、ともに汎血球減少を特徴とする骨髓不全症である。骨髓病理組織診断による細胞密度の判定、骨髓塗抹標本による血球形態観察、芽球増加の有無が両者の形態学的鑑別点であるが、低形成 MDS（Hypo-MDS）は、造血細胞絶対数が少なく AA との形態学的鑑別が困難な場合がある。Hypo-MDS と AA は治療方針、急性白血病へ移行するリスクを含めた予後が異なり、治療開始までの期間が重要であるため適切で迅速な病理診断が要求される。骨髓病理組織診断による Hypo-MDS と AA の鑑別において、腫瘍細胞および非腫瘍細胞における免疫組織化学的検討の有用性を検討した。Hypo-MDS と AA、計 40 症例を対象とした。Hypo-MDS 症例は、単一血球系統および多血球系統の異形成を伴った MDS のうち、70 歳未満の患者では細胞密度が 30% 未満、70 歳以上の患者では細胞密度が 20% 未満である基準を満たす症例を Hypo-MDS とした。骨髓病理組織を用いた Hematoxylin-eosin 染色標本で組織形態を評価し、抗 p53 抗体、抗 HbF 抗体、抗 CD34 抗体、抗 c-kit 抗体、抗 CD42b 抗体、抗 CD4 抗体、抗 CD8 抗体、抗 CD68 抗体、抗 CD163 抗体、抗 MCT 抗体、抗 MCTC 抗体を用いた免疫組織化学で細胞抗原の発現を評価した。統計解析は χ^2 乗検定および Fisher 直接確率計算を用いて、Hypo-MDS と AA の 2 群間の独立性を検定した。p53、HbF、CD34、c-kit および巨核球異形成に関する指標は Hypo-MDS と AA で有意差を認め、造血腫瘍細胞に関する指標として Hypo-MDS に発現の異常が集積する傾向がみられた。免疫学的背景を示唆すると考えられる CD8-positive T-lymphocyte の指標は AA に集積する傾向がみられた。今回の検討においては骨髓肥満細胞のサブタイプ解析と、骨髓組織内の単球 / 組織球の分布と増生は Hypo-MDS と AA の鑑別に有用な所見はなかった。今回検討した免疫組織化学的指標において単独で Hypo-MDS と AA を鑑別できるものはみられなかった。しかし、造血細胞に関する指標と骨髓背景に関する指標を組み合わせることによって、造血細胞絶対数が少ない Hypo-MDS と AA の鑑別に利し、骨髓病理診断の精度向上に役立つと考えられた。

キーワード：骨髓異形成症候群、再生不良性貧血、低形成骨髓、免疫組織化学、骨髓病理組織

緒 言

骨髓異形成症候群（myelodysplastic syndrome: MDS）と再生不良性貧血（aplastic anemia: AA）は、ともに汎血球減少を特徴とする骨髓不全症であ

る。両者の形態学的鑑別は骨髓塗抹標本および骨髓病理組織診断による。MDS は一般に骨髓過形成（hypercellular）であるのに対し、AA は高度な低形成（hypocellular）もしくは無形成（aplastic）な骨髓であり、骨髓病理組織診断による細胞密度の判定が

¹⁾ 昭和大学医学部臨床病理診断学講座

²⁾ 昭和大学医学部内科学講座（血液内科学部門）

* 責任著者

〔受付：2019 年 10 月 17 日、受理：2019 年 11 月 12 日〕

有用である。また骨髓塗沫標本による血球形態観察で、MDS では造血細胞に異形成を認め、芽球増加を伴うことが多いが、AA では異形成は認めず、芽球増加はみられない。細胞密度、異形成の有無、芽球増加の有無は MDS と AA の形態学的鑑別点である。

しかし MDS の 15% 程度存在する低形成 MDS (hypocellular MDS : Hypo-MDS) は、70 歳未満の患者では細胞密度 (造血細胞と脂肪細胞の面積比) が 30% 未満、70 歳以上の患者では細胞密度が 20% 未満と定義され¹⁾、観察対象となる造血細胞が少なく AA との形態学的鑑別が困難な場合が少くない。Hypo-MDS と AA の骨髓病理組織診断において、芽球増加があれば Hypo-MDS を示唆するが、芽球数が少ないときには鑑別困難である。また Hypo-MDS における造血細胞絶対数の減少は、異形成の有無の判断を困難にする²⁾。しかし、リンパ球、単球 / 組織球や肥満細胞は細胞密度の低い造血巣の中でも比較的保たれ観察しやすい。骨髓腫瘍性疾患において、免疫学的機序を反映すると考えられる非腫瘍性 T リンパ球の CD4/CD8 subset 比の相違に関する報告がある^{3,4)}。Hypo-MDS と AA における T リンパ球の CD4/CD8 subset 比が flow cytometry とともに低下するとの報告がある³⁻⁵⁾、免疫組織化学での意義は明らかでない。骨髓組織内の単球 / 組織球 (monocyte/histiocyte) の分布と増生が、腫瘍性および非腫瘍性造血疾患において特異的な所見を呈するものがある⁶⁾、Hypo-MDS と AA の相違についての報告はない。骨髓肥満細胞 (Mast cell) には、chymase-positive mast cell (MCTC) と tryptase-positive mast cell (MCT) があり、MDS においてその存在比が報告されている⁷⁾。AA の病理組織における検討の報告はない。

これらの骨髓病理組織における免疫組織化学を用いた腫瘍細胞および非腫瘍細胞の所見は、Hypo-MDS と AA の鑑別においても有用である可能性があり、治療方針、予後が異なる Hypo-MDS、AA の診療において適切で迅速な病理診断に寄与すると考えられる。

今回、骨髓病理組織診断による Hypo-MDS と AA の鑑別において、腫瘍細胞および非腫瘍細胞における免疫組織化学的検討の有用性を検討する。

研究方法

2005 年から 2017 年までに昭和大学病院 (東京) 血液内科で初診時に診断された Hypo-MDS と AA、計 40 症例を対象とした。AA は再生不良性貧血診療の診断基準に従って診断した⁸⁾。Hypo-MDS 症例は、不応性貧血 (骨髓異形成症候群) の診断基準に従って診断された MDS 症例から、造血器腫瘍の WHO 腫瘍分類第 4 版改訂版 (2017)⁶⁾に記載されている、特徴的な細胞所見および染色体異常の有無に診断が依存する重型、すなわち芽球増加を伴う骨髓異形成症候群 (MDS with excess of blasts)、5q-染色体異常を有する骨髓異形成症候群 (MDS with isolated del (5q))、環状鉄芽球を伴う骨髓異形成症候群 (MDS with ring sideroblasts) を除外した⁹⁾。巨核球系細胞などの 1 系統のみに形態異常を伴うと定義される、単一血球系統の異形成を伴った MDS (MDS with Single Lineage Dysplasia : MDS-SLD) および 2 系統以上の形態異常を伴うと定義される、多血球系統の異形成を伴った MDS (MDS with multilineage dysplasia : MDS-MLD) のうち、70 歳未満の患者では細胞密度が 30% 未満、70 歳以上の患者では細胞密度が 20% 未満である基準¹⁾を満たす症例を Hypo-MDS として対象とした。

病理診断は造血器病理を専門とする病理専門医 3 名 (E.S., M.H. および M.T.) と筆頭著者が行った。対象症例の骨髓組織 (生検またはクロットによる) のホルマリン固定後のパラフィン包埋ブロックを用い、Hematoxylin-eosin 染色標本 (Fig. 1)、Giemsa 染色標本、ASD (Naphthol AS-D chloroacetate) 染色標本を作製し、免疫組織化学は 3 μm の薄切標本で以下のモノクローナル抗体を用いた。一次抗体: 抗 p53 抗体 (DO7, Dako, Denmark, 50 倍希釈)、抗 HbF 抗体 (polyclonal, MBL, Japan, 100 倍希釈)、抗 CD34 抗体 (NU-4A1, Nichirei, Japan, 100 倍希釈)、抗 c-kit 抗体 (T595, Leica, Germany, 100 倍希釈)、抗 CD42b 抗体 (MM2/174, Leica, Germany, 100 倍希釈)、抗 CD4 抗体 (1F6, Leica, Germany, 40 倍希釈)、抗 CD8 抗体 (clone C8/144B, Dako, Denmark, 50 倍希釈)、抗 CD68 抗体 (KP-1, Dako, Denmark, 100 倍希釈)、抗 CD163 抗体 (clone 10D6, Leica, Germany, 100 倍希釈)、抗 MCT 抗体 (10D11, Leica, Germany, 希釈済み)、抗 MCTC 抗体 (CC1,

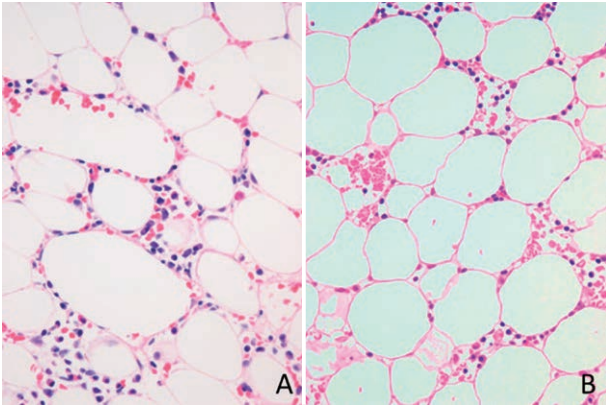


Fig. 1

(A) Hematoxylin and eosin (HE) stain of a Hypo-MDS case (Hypo-MDS-7). (B) HE stain of an AA case (AA-4) (objective, 40 x).

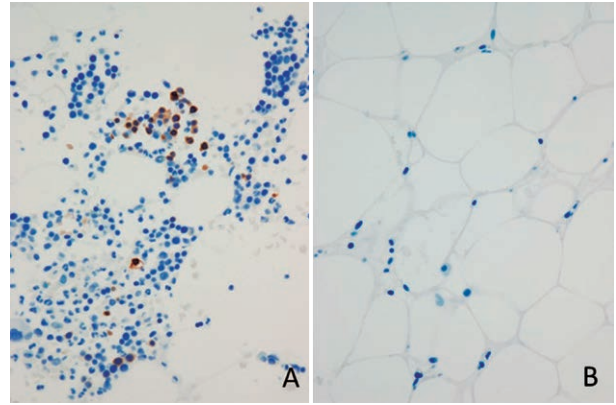


Fig. 3

(A) shows HbF-positive erythroblasts is increasing in Hypo-MDS (Hypo-MDS-17). (B) is a case of AA (AA-2) without an increase in HbF-positive erythroblasts (objective, 40 x).

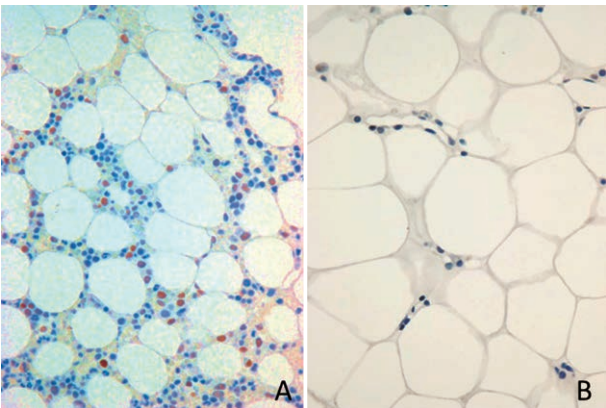


Fig. 2

(A) shows p53-positive myeloblasts is increasing in Hypo-MDS (Hypo-MDS-16). (B) is a case of AA (AA-2) without an increase in p53-positive myeloblasts (objective, 40 x).

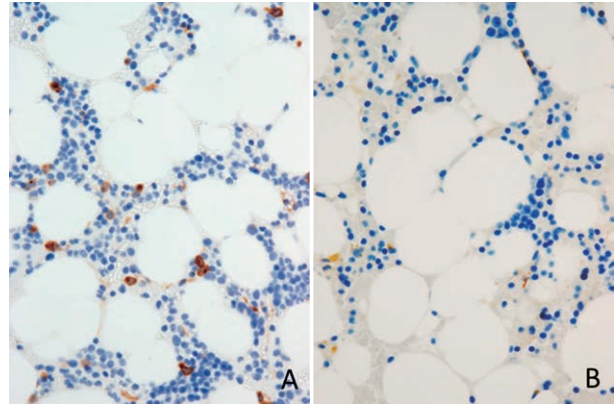


Fig. 4

(A) shows CD34-positive blasts is increasing in Hypo-MDS (Hypo-MDS-9). (B) is a case of AA (AA-9) without an increase in CD34-positive blasts (objective, 40 x).

abcam, UK, 20,000 倍希釈). 二次抗体: ニチレイ ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULT I) 424154 またはニチレイ ヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (G) 414162. 免疫染色は推奨プロトコールに従い, 自動免疫染色装置 ('Histostainer 36 A', Nichirei Biosciences Inc.) を使用し, 染色性の均一化と再現性を担保した.

一般的に, 抗 p53 抗体は一部の腫瘍性疾患で陽性となり, 抗 HbF 抗体は異常な赤芽球の検出のために用いられる. 抗 CD34 抗体, 抗 c-kit 抗体は一部の腫瘍細胞の細胞膜に染まる. 抗 CD4 抗体, 抗 CD8 抗体は T リンパ球を, 抗 CD68 抗体, 抗 CD163 抗体

は単球 / 組織球の同定に用いられる. 抗 MCT 抗体, 抗 MCTC 抗体は 2 種類の Mast cell の判別のために使用した. 細胞同定のために施行した免疫組織化学は以下の判定基準で発現を評価した. p53 骨髄芽球 (p53-positive myeloblast), HbF 陽性赤芽球 (HbF-positive erythroblast) は全細胞中の陽性細胞比率が 0.3% 以上を陽性 (増加) とし, 3 高倍率視野 (HPF) の平均値を計測した^{2,10,11)} (Fig. 2, 3). CD34 陽性骨髄芽球 (CD34-positive myeloblast), c-kit 陽性骨髄芽球 (c-kit-positive myeloblast) は 10 HPF 中, 陽性細胞数の合計数が 3 個以上の症例を陽性 (増加) と判定した^{7,12)} (Fig. 4, 5). 巨核球は CD42b 陽性

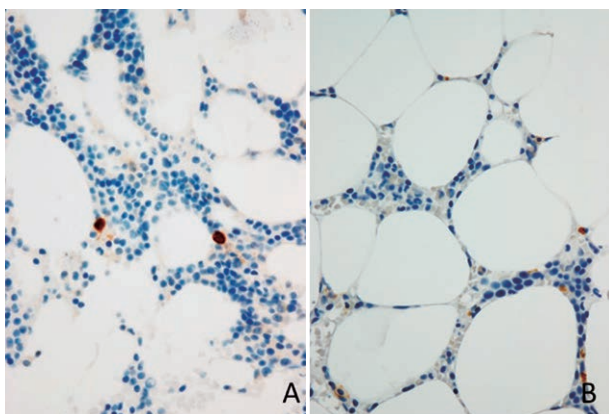


Fig. 5

(A) shows c-kit-positive blasts is increasing in Hypo-MDS (Hypo-MDS-20). (B) is a case of AA (AA-9) without an increase in c-kit-positive blasts (objective, 40 x).

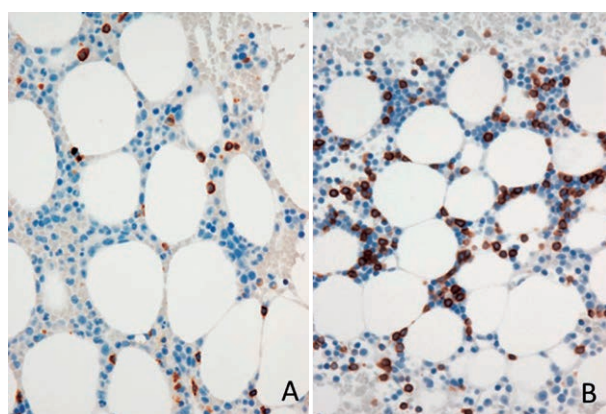


Fig. 7

(A) is a case of Hypo-MDS (Hypo-MDS-20) without an increase in CD8-positive T-lymphocyte. (B) shows CD8-positive T-lymphocyte is increasing in AA (AA-18) on the other hand (objective, 40 x).

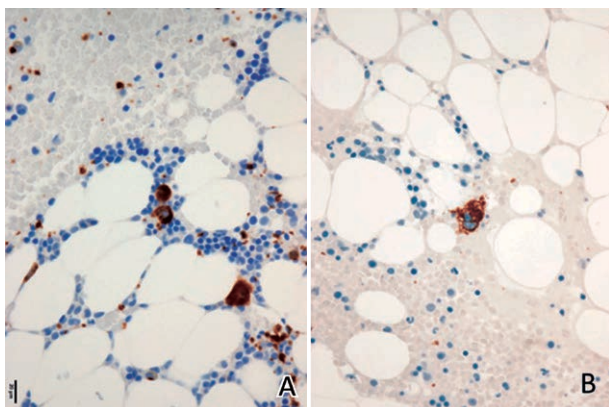


Fig. 6

(A) is a case of Hypo-MDS (Hypo-MDS-2) with a Dysplasia of CD42b-positive megakaryocytes. (B) shows non-dysplastic CD42b-positive megakaryocytes of an AA case (AA-6) (objective, 40 x).

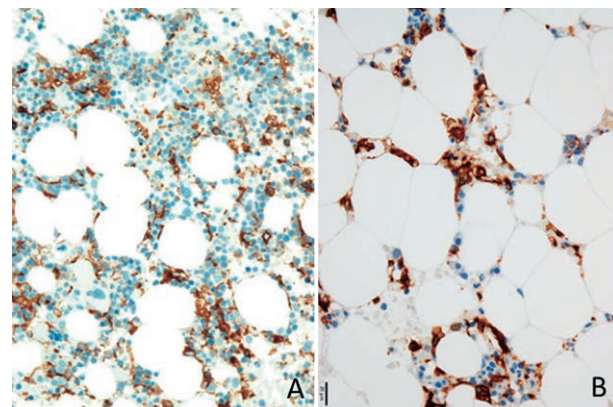


Fig. 8

(A) is a case of -MDS (Hypo-MDS-20). (B) is a case of AA (AA-4). (A) (B) are both positive cases. Although they are hypocellular bone marrow, but relatively monocyte/histiocyte are maintained (objective, 40 x).

細胞として同定できる巨核球のうち、病理組織所見として判別できる微小巨核球、単核巨核球、分離多核巨核球が認められる症例を形態異常ありと判断した¹³⁾(Fig. 6). CD4 陽性 T リンパ球 (CD4-positive T-lymphocyte), CD8 陽性 T リンパ球 (CD8-positive T-lymphocyte) は全細胞中の陽性細胞が 10%以上を陽性 (増加) とし、3 HPF の平均値を計測した^{3,5,14)}(Fig. 7). CD68 陽性 / CD163 陽性 単球・組織球 (CD68/CD163-positive monocyte/histiocyte) は全細胞中の陽性細胞が 5%以上を陽性 (増加) とし、3 HPF の平均値を計測した¹⁴⁾(Fig. 8). 骨髓肥満細胞

の免疫学的サブタイプ MCT, および MCTC は 3 HPF 中、陽性細胞数の合計数が 10 個以上を陽性 (増加) とした⁷⁾.

統計解析は χ 二乗検定および Fisher 直接確率計算を用いて、Hypo-MDS と AA の 2 群間の独立性を検定した。

本研究は昭和大学医学部「人を対象とする研究等に関する倫理委員会」で承認されている (2018 年, 承認番号 2650).

Table 1 Clinical features of the patients of hypocellular MDS and AA (n=40)

No. of subjects	Hypo-MDS (n=22) (%)	AA (n=18) (%)	P value*	
Age (years)				
	Average	70	64	0.248
	Range	23-90	33-87	
Sex				
	Male	12 (55)	9 (50)	0.775
	Female	10 (45)	9 (50)	
Diagnosis (WHO2017)				
	MDS-SLD	14 (64)		
	MDS-MLD	8 (36)		
Sample				
	clot	18 (82)	12 (67)	
	biopsy	4 (18)	6 (33)	

Hypo-MDS : hypocellular MDS, AA : aplastic anemia, SLD : single lineage dysplasia, MLD : multilineage dysplasia, *Chi-squared test

結 果

対象症例の臨床属性を Table 1 に示す. Hypo-MDS 22 症例, AA 18 症例の計 40 症例を対象とした. 診断時患者年齢は Hypo-MDS 平均 70.0 歳 (範囲 23-90 歳), AA 平均 64.0 歳 (範囲 33-87 歳) で有意差はみられなかった ($P=0.248$). 性別は Hypo-MDS では男性 12 例 (54.5%), 女性 10 例 (45.5%), AA では男性 9 例 (50%), 女性 9 例 (50%) で, 有意差はみられなかった ($P=0.775$). 22 症例の Hypo-MDS 患者のうち, 14 症例 (63.6%) が MDS-SLD, 8 症例 (36.4%) が MDS-MLD) だった. 免疫組織化学による検討の結果を Table 2 に示す. P 値が 0.05 未満を統計的に有意であるとみなし, 統計解析には GraphPad Prism を使用した. p53-positive myeloblast ($P<0.05$), HbF-positive erythroblast ($P<0.05$), CD34-positive myeloblast ($P<0.05$), c-kit-positive myeloblast ($P<0.05$), 巨核球異形成 ($P=0.001$) は AA ではほとんどみられない所見で, Hypo-MDS で有意に高かった (Table 2). 背景の T リンパ球は, CD8-positive T-lymphocyte が AA に有意に多くみられた ($P<0.05$) (Table 2). CD163-positive monocyte/histiocyte は AA が有意に多くみられた ($P<0.05$) (Table 2). MCT 数と MCTC 数は Hypo-MDS と AA で有意差はみられな

かった (Table 2).

上記の結果から免疫組織化学による複数の指標に Hypo-MDS と AA の両群において有意差を認めたことから, 免疫組織化学による指標が, 両群においてどのような傾向を示すのか検討するため, 症例毎に免疫組織化学による指標を配列して一覧化し, 分布傾向を可視化した (Table 3). p53, HbF, CD34, c-kit および巨核球異形成に関する指標は, いずれも造血細胞に関する指標として Hypo-MDS に異常な発現が集積する傾向がみられた. 免疫学的背景を示唆すると考えられる CD8-positive T-lymphocyte の指標は AA に集積する傾向がみられた.

考 察

MDS は無効造血を主体とし, 骨髄では正もしくは過形成の状態が一般的である. しかし Hypo-MDS は, 成人に発症する MDS のうち 15% を占めると報告されており, これらの患者では汎血球減少が多くみられる¹⁾. これらは AA を含む血液疾患にも同様の所見を認めることがあるため, Hypo-MDS に特異的とは言えず臨床的に AA との鑑別に有用ではない. さらに細胞密度が極めて低く (特に 20% 未満の場合), 異形成の乏しい場合には病理組織診断で免疫染色を施行せずに Hypo-MDS と AA を区別するのは非常に困難である. また診断基準

低形成 MDS と再生不良性貧血の鑑別

Table 2 Ratio of positive case in Hypo-MDS and AA by immunohistochemistry

	Hypo-MDS (n=22)	AA (n=18)	P value*
p53-positive myeloblast			0.0279
increased (positive)	11	3	
not-increased (negative)	11	15	
HbF-positive erythroblast			0.039
increased (positive)	7	1	
not-increased (negative)	15	17	
CD34-positive myeloblast			0.0042
increased (positive)	8	0	
not-increased (negative)	14	18	
c-kit-positive myeloblast			0.0163
increased (positive)	6	0	
not-increased (negative)	16	18	
Dysplasia of CD42b -positive megakaryocyte			0.001
positive	10	0	
negative	12	18	
CD4-positive T-lymphocyte			0.2472
increased (positive)	2	4	
not-increased (negative)	20	14	
CD8-positive T-lymphocyte			0.0313
increased (positive)	6	11	
not-increased (negative)	16	7	
CD68-positive monocyte/histiocyte			0.2671
increased (positive)	17	11	
not-increased (negative)	5	7	
CD163-positive monocyte/histiocyte			0.0358
increased (positive)	13	16	
not-increased (negative)	9	2	
chymase-positive mast cell			0.676
increased (positive)	12	11	
not-increased (negative)	10	7	
tryptase-positive mast cell			0.8322
increased (positive)	2	2	
not-increased (negative)	20	16	

Hypo-MDS : hypocellular MDS, AA : aplastic anemia, SLD : single lineage dysplasia
MLD : multilineage dysplasia *Chi-squared test

では AA ではヘモグロビン <10g/dl, 好中球 <1,500/ μ l, 血小板 <10 万のうち 2 項目以上を満たすもの, MDS ではヘモグロビン <13g/dl (男性), <12g/dl (女性), 好中球 <1,800/ μ l, 血小板 <15 万/ μ l のうち 1 項目以上を満たすものと定義されており, 血球減少のみでの両者の鑑別は困難である。しかし MDS が AA と比較し急性白血病へ移行するリスクが高く¹⁵⁾, 治療内容も異なるため確実な診断が望まれる。両疾患は推奨される治療方針や予後は

異なり, MDS では保存的療法や免疫抑制療法に加え, より高リスクな症例では年齢やドナーの有無を考慮し造血幹細胞移植を選択する^{9,16)}。対して AA は MDS と同様に, 保存療法や造血幹細胞移植が治療の選択肢に挙がり^{8,17)}, 40 歳未満の患者で HLA 適合同胞が存在する場合には, 骨髄移植が第一選択である¹⁷⁾。生存率の差は少ないが免疫抑制療法施行時は再発や MDS への移行のリスクが高いと報告があり¹⁸⁾, また非血縁ドナーからの骨髄移植の場合に

Table 3 Morphological and immunohistological features of bone marrow in Hypo-MDS and AA

case diagnosis		hematopoietic cells					backgrounds	
No.		p53	HbF	CD34	c-kit	Dysplasia of Megakaryocyte	CD163-positive monocyte/histiocyte	CD8-positive T-lymphocyte
1	AA-1							
2	AA-2							
3	AA-3							
4	AA-4	■						
5	AA-5							
6	AA-6							
7	AA-7							
8	AA-8	■						
9	AA-9							
10	AA-10							
11	AA-11							
12	AA-12							
13	AA-13							
14	AA-14	■						
15	AA-15							
16	AA-16							
17	AA-17		■					
18	AA-18							
19	Hypo-MDS-1							
20	Hypo-MDS-2	■						
21	Hypo-MDS-3	■						
22	Hypo-MDS-4	■						
23	Hypo-MDS-5					■		
24	Hypo-MDS-6				■		■	
25	Hypo-MDS-7			■		■		
26	Hypo-MDS-8			■	■			■
27	Hypo-MDS-9	■			■			
28	Hypo-MDS-10			■		■	■	
29	Hypo-MDS-11						■	
30	Hypo-MDS-12			■		■		
31	Hypo-MDS-13	■					■	
32	Hypo-MDS-14	■	■					
33	Hypo-MDS-15					■		
34	Hypo-MDS-16	■				■		
35	Hypo-MDS-17	■				■		
36	Hypo-MDS-18	■		■		■		
37	Hypo-MDS-19		■					
38	Hypo-MDS-20			■			■	
39	Hypo-MDS-21	■				■		
40	Hypo-MDS-22	■			■		■	

Hypo-MDS : hypocellular MDS, AA : aplastic anemia

において、発症から移植までの期間が短いほど生存率が高かった¹⁹⁾。このように MDS, AA はリスクや治療方針が異なるだけでなく、治療開始までの期間が重要なこともあるため、適切な鑑別のみならず、早急な診断確定が望まれる。

MDS や AA を含む造血器疾患の確定診断に骨髓塗沫標本による血球形態観察は必須である。しかし骨髓病理組織診断については十分な評価が行われているとは言えず、施設によってその扱いが異なるのが現状である。造血器病理を専門とする病理医がい

ない施設では、多くの場合、骨髓病理組織診断で免疫組織化学は実施されない。そのため芽球増加が明らかな症例では「急性白血病疑い」などの病理診断が行われることがあるが、造血細胞の異形成の評価が求められる MDS では、細胞密度と血球三系統の造血状態のみが記載される所見診断にとどまることも少なくない。それは骨髓病理組織診断で形態学的に造血細胞の異形成を評価することが困難であるからに他ならない。一方、血液内科医も骨髓塗抹標本による血球形態観察、Flow cytometry による血球解析、染色体・遺伝子診断によって MDS を診断することから、情報量の少ない骨髓病理組織診断への期待値は高くない。これらが骨髓病理診断の価値が十分に評価されていない背景と考えられる。近年、造血管器病理医は詳細な免疫組織化学の解析を必要とするリンパ腫病理診断での経験を活かし、その手法を骨髓病理組織診断に導入してきた。CD34, c-kit による骨髓芽球の同定、CD71, Glycophorin による赤芽球系細胞の同定、MPO による顆粒球系細胞の同定、CD42b, CD61 による巨核球の形態異常の評価などがある²⁰⁾。これらの免疫組織化学を用いた骨髓病理診断はその診断における価値を高めていくことが期待される。

CD34, c-kit を用いた骨髓芽球の同定は、急性白血物の病理組織診断における有用性が報告されている²¹⁻²³⁾。しかし細胞密度が低く骨髓芽球の絶対数が少ない Hypo-MDS においては CD34, c-kit による骨髓芽球数の評価は、AA との鑑別には有用でない可能性があった。しかし今回われわれの検討では AA では CD34, c-kit-positive myeloblast の出現はみられず、少数であっても CD34, c-kit-positive myeloblast の出現は Hypo-MDS を強く示唆し、鑑別に有用であると考えられた。

正常巨核球は大型であり、Hematoxylin-eosin 染色標本、Giemsa 染色標本でも容易に同定できる。しかし MDS における巨核球異形成で最も重要な所見である微小巨核球の出現は、その小型故に形態的な同定は必ずしも容易ではない。CD42b は形態的に鑑別が困難な微小巨核球を確実に同定することが可能であり、造血細胞の異形成の評価に有用である。今回の検討で CD42b 陽性巨核球の異形成の評価は造血細胞の絶対数が少ない Hypo-MDS においても半数近い症例 (10/22 症例, 45.4%) で可能で

あり、CD42b による巨核球の異形成の評価は Hypo-MDS と AA の鑑別に有用であると言える。

HbF は新生児期の赤血球で発現し、少数の赤芽球にも散在性の発現が見られる。1 歳をこえて HbF を発現することは病的と考えられており、MDS では HbF を発現した赤芽球が集簇性に観察されることがある^{2, 24, 25)}。HbF は AA と比較し Hypo-MDS で陽性となりやすく HbF が Hypo-MDS と後天性 AA を区別するのに有用であることが報告されている^{2, 10)}。今回の検討では Hypo-MDS における HbF-positive erythroblast の出現は 7/22 症例 (31.8%) にとどまった。しかし AA では 1/18 症例 (5.6%) のみであり、Hypo-MDS と AA の鑑別においては有用な所見であると考えられた。

p53 は 17 染色体短腕に位置する癌抑制遺伝子 TP53 の産物である p53 蛋白質に対する抗体である。正常細胞では正常の p53 蛋白質は非常に半減期が短く免疫染色で陽性となるような量は存在しないが、細胞の癌化などにより生じた変異 p53 蛋白質は wash out されず核内に蓄積され免疫組織化学で検出できる。p53 蛋白質の過剰発現と p53 遺伝子異常は有意に相関し、高い割合で p53 蛋白質の過剰発現がある場合は p53 遺伝子異常を伴う。免疫組織化学における p53 蛋白質発現は種々の悪性腫瘍で報告されている^{26, 27)}。MDS 患者の骨髓は正常骨髓と比較し有意に p53 蛋白質の過剰発現を認めている。また MDS 患者において p53 蛋白質の過剰発現には、細胞遺伝学的奏効率の低下、二次性急性骨髄性白血病への移行のリスク、5q- 症候群の患者にレナリドミドを用いた時の全生存期間の短縮に関連があると報告されている²⁸⁾。次世代シーケンズを使用した p53 遺伝子異常の検出方法は、現時点でコストや簡便性、再現性の面で臨床での汎用性に乏しい²⁹⁾。病理組織を用いた免疫組織化学で MDS の診断を補助することで、簡便かつ迅速な診断が得られるだけでなく、低い奏効率や急性骨髄性白血病への移行が起こりうることを示し、治療の選択を広げる²⁹⁾。Hypo-MDS における意義についてもいくつかの報告があり、Elghetany らの研究では Hypo-MDS 患者の 57% であったのに対し、正形成から過形成の MDS 患者の 79% が p53 染色陽性で、AA 患者は染色陰性であったとされる³⁰⁾。Iwasaki らの研究では AA において p53 染色陽性症例は無かった

とされる¹⁰⁾。これらの報告から Hypo-MDS と AA の鑑別には p53 免疫組織化学が有用である可能性が考えられた。今回の検討では Hypo-MDS では 11/22 例 (50%) で p53 発現がみられた一方で、AA においても 3/18 例 (6%) で p53 発現が認められた。両者の発現には有意差 ($P=0.0279$) がみられるものの、p53 発現の有無のみで両者の鑑別をすることは困難と考えた。

前述した CD34, c-kit による骨髓芽球, CD42b による巨核球, HbF による赤芽球, p53 発現造血細胞は、いずれも造血器悪性腫瘍における骨髓造血細胞異常の観点から行った検討である。一方で AA は自己免疫性溶血性貧血, 赤芽球癆, 血小板減少性紫斑病などとともに、免疫介在性血液疾患と考えられている。今回、骨髓の免疫学的背景を検討するにあたり T リンパ球, 骨髓肥満細胞, 単球/組織球に注目した。

免疫学的機序を反映すると考えられる非腫瘍性 T リンパ球の CD4/CD8 subset 比は AA と MDS において検討されている³⁻⁵⁾。これらの研究においては両者の鑑別において有用ではないとの報告であったが、今回の検討では CD8-positive T-lymphocyte の優位性は Hypo-MDS に対して AA において認められた ($P=0.0313$)。これは造血細胞の絶対数が少ない場合には背景の免疫学的所見が診断における補助的な意義も持つ可能性を示唆すると考えられた。肥満細胞は骨髓造血幹細胞由来の細胞で全身に広く分布している。Tryptase, chymase のどちらか、もしくは双方を含有する。サブタイプのどちらが多く存在するかは臓器により異なり、また同臓器においても疾患により分布に差がある。MDS において報告がある骨髓肥満細胞のサブタイプ解析⁷⁾は、今回の検討においては Hypo-MDS と AA に存在比率の有意差はみられず、鑑別において有用性は見いだせない。

抗 CD68 抗体, 抗 CD163 抗体は単球/組織球の同定に用いられる。CD163 の発現は単球/組織球に限局されるのに対し、CD68 は好中球や一部のリンパ球でも見られる。固形癌の一部や急性骨髄性白血病では CD163-positive monocyte/histiocyte は CD68-positive monocyte/histiocyte と比較し増加している、といった腫瘍性および非腫瘍性造血疾患において特異的な所見を呈することがある⁶⁾。しか

し今回の検討では Hypo-MDS と AA の鑑別に有用な知見は見いだせなかった。

今回の検討した免疫組織学的指標において単独で Hypo-MDS と AA を鑑別できるものはみられない。複数の指標による総合的な判断が求められる場合に指標を症例毎に一覧化し、分布傾向を可視化することは有用な手段である (Table 3)。造血細胞に関する指標 (p53, HbF, CD34, c-kit, CD42b) と骨髓背景に関する指標 (CD8) を組み合わせることによって、造血細胞絶対数が少ない Hypo-MDS と AA の鑑別に利し、骨髓病理診断の精度向上に役立つと考えられた。

結 語

免疫組織化学を用いた骨髓病理診断による Hypo-MDS と AA の鑑別は p53, HbF, CD34, c-kit, CD42b による造血細胞の増殖, 異形成の評価と, CD4/CD8 による背景の T-lymphocyte 組成が有用であり、免疫組織化学的指標の一覧化を用いて総合的な判断を行うことが有用であった。

利益相反

本研究に関し開示すべき利益相反はない。

文 献

- 1) Yue G, Hao S, Fadare O, *et al.* Hypocellularity in myelodysplastic syndrome is an independent factor which predicts a favorable outcome. *Leuk Res.* 2008;32:553-558.
- 2) Choi JW, Fujino M, Ito M. F-Blast is a useful marker for differentiating hypocellular refractory anemia from aplastic anemia. *Int J Hematol.* 2002;75:257-260.
- 3) Lv YF, Yan ZY, Chen NY, *et al.* Analysis of lymphocyte subsets in peripheral blood of patients with aplastic anemia or hypoplastic myelodysplastic syndrome. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi.* 2016;24:1505-1510.
- 4) Zhang HF, Huang ZD, Wu XR, *et al.* Comparison of T lymphocyte subsets in aplastic anemia and hypoplastic myelodysplastic syndromes. *Life Sci.* 2017;189:71-75.
- 5) Xiao Li, Feng Xu, Qi He, *et al.* Comparison of immunological abnormalities of lymphocytes in bone marrow in myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia (AA). *Intern Med.* 2010;49:1349-1355.
- 6) Swerdlow SH, Campo E, Harris NL, eds. WHO

- classification of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. rev. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017.
- 7) Homma M, Takimoto M, Ariizumi H, *et al.* Mast cell infiltration is associated with myelofibrosis and angiogenesis in myelodysplastic syndromes. *Showa Univ J Med Sci.* 2010;**22**:51-61.
 - 8) 中尾眞二, 小島勢二, 濱 麻人, ほか. 再生不良性貧血診療の参照ガイド 2016 年改訂. 平成 29 年 3 月 28 日改訂. (2019 年 8 月 1 日アクセス) http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H28/02.pdf
 - 9) 市川 幹, 小澤敬也, 川端 浩, ほか. 骨髓異形成症候群診療の参照ガイド. 平成 28 年度改訂版. 平成 29 年 (2017 年) 2 月. (2019 年 8 月 1 日アクセス) http://zoketsushogaihan.com/file/guideline_H28/04.pdf
 - 10) Iwasaki T, Murakami M, Sugisaki C, *et al.* Characterization of myelodysplastic syndrome and aplastic anemia by immunostaining of p53 and hemoglobin F and karyotype analysis: differential diagnosis between refractory anemia and aplastic anemia. *Pathol Int.* 2008;**58**:353-360.
 - 11) Choi JW, Kim Y, Fujino M, *et al.* A new anti-hemoglobin F antibody against synthetic peptides for the detection of F-cell precursors (F-blasts) in bone marrow. *Int J Hematol.* 2001;**74**:277-280.
 - 12) Cha CH, Park CJ, Chi HS, *et al.* CD34 and p53 immunohistochemical stains differentiate hypocellular myelodysplastic syndrome (hMDS) from aplastic anemia and a CD34 immunohistochemical stain provides useful survival information for hMDS. *Ann Lab Med.* 2014;**34**:426-432.
 - 13) 朝長万左男, 松田 晃編. 不応性貧血 (骨髓異形成症候群) の形態学的異形成に基づく診断確度区分と形態診断アトラス. 平成 20 年 1 月. (2019 年 8 月 1 日アクセス) <http://www.jshem.or.jp/uploads/files/former/MDS.pdf>
 - 14) Okamoto N, Homma M, Kawaguchi Y, *et al.* Increased expression of interleukin-17 is associated with macrophages in chronic immune thrombocytopenia. *Int J Clin Exp Pathol.* 2018;**11**:2419-2429.
 - 15) Tuzuner N, Cox C, Rowe JM, *et al.* Hypocellular myelodysplastic syndromes (MDS): new proposals. *Br J Haematol.* 1995;**91**:612-617.
 - 16) Tobiasson M, Kittang AO. Treatment of myelodysplastic syndrome in the era of next-generation sequencing. *J Intern Med.* 2019;**286**:41-62.
 - 17) Bacigalupo A. How I treat acquired aplastic anemia. *Blood.* 2017;**129**:1428-1436.
 - 18) Bacigalupo A, Brand R, Oneto R, *et al.* Treatment of acquired severe aplastic anemia: bone marrow transplantation compared with immunosuppressive therapy: the European group for blood and marrow transplantation experience. *Semin Hematol.* 2000;**37**:69-80.
 - 19) Bacigalupo A, Socie G, Lanino E, *et al.* Fludarabine, cyclophosphamide, antithymocyte globulin, with or without low dose total body irradiation, for alternative donor transplants, in acquired severe aplastic anemia: a retrospective study from the EBMT-SAA working party. *Haematologica.* 2010;**95**:976-982.
 - 20) 定平吉都, 北川昌伸編. 造血器腫瘍 腫瘍病理鑑別診断アトラス. 東京: 文光堂; 2013.
 - 21) Bennett JM, Orazi A. Diagnostic criteria to distinguish hypocellular acute myeloid leukemia from hypocellular myelodysplastic syndromes and aplastic anemia: recommendations for a standardized approach. *Haematologica.* 2009;**94**:264-268.
 - 22) Jain S, Mahapatra M, Pati HP. CD34 immunohistochemistry in bone marrow biopsies for early response assessment in acute myeloid leukemia. *Int J Lab Hematol.* 2015;**37**:746-751.
 - 23) Arai N, Homma M, Abe M, *et al.* Impact of CD123 expression, analyzed by immunohistochemistry, on clinical outcomes in patients with acute myeloid leukemia. *Int J Hematol.* 2019;**109**:539-544.
 - 24) Reinhardt D, Haase D, Schoch C, *et al.* Hemoglobin F in myelodysplastic syndrome. *Ann Hematol.* 1999;**76**:135-138.
 - 25) Choi JW, Kim Y, Fujino M, *et al.* Significance of fetal hemoglobin-containing erythroblasts (F blasts) and the F blast/F cell ratio in myelodysplastic syndromes. *Leukemia.* 2002;**16**:1478-1483.
 - 26) Karim S, Ari A. Correlation of p53 over-expression and alteration in p53 gene detected by polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism in adenocarcinoma of gastric cancer patients from India. *World J Gastroenterol.* 2009;**15**:1381-1387.
 - 27) Noroozina F, Fahmideh AN, Yekta Z, *et al.* Expression of CD44 and P53 in renal cell carcinoma: association with tumor subtypes. *Saudi J kidney Dis Transpl.* 2014;**25**:79-84.
 - 28) Muller-Thomas C, Rudelius M, Rondak IC, *et al.* Response to azacytidine is independent of p53 expression in higher-risk myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica.* 2014;**99**:e179-e181. (accessed 2019 Aug 1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4181264/pdf/099e179.pdf>

- 29) McGraw KL, Nguyen J, Komrokji RS, *et al.* Immunohistochemical pattern of p53 is a measure of TP53 mutation burden and adverse clinical outcome in myelodysplastic syndromes and secondary acute myeloid leukemia. *Haematologica*. 2016;101:e320–e323. (accessed 2019 Aug 1) <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4967580/pdf/101e320.pdf>
- 30) Elghetany MT. P53 overexpression in bone marrow biopsies in refractory anemia and aplastic anemia: impact of antibody selection. *Leuk Res*. 2000;24:975–977.

IMMUNOHISTOCHEMICAL STUDY ON THE DIFFERENTIATION OF HYPOPLASTIC MYELOYDYSPLASTIC SYNDROME AND APLASTIC ANEMIA

Maasa ABE^{*1,2)}, Eisuke SHIOZAWA¹⁾, Norimichi HATTORI²⁾,
So MURAI^{1,2)}, Mayumi HONMA¹⁾, Yosuke SASAKI¹⁾,
Sakiko MIURA¹⁾, Toshiko YAMACHI¹⁾, Genshu TATE¹⁾,
Tsuyoshi NAKAMAKI²⁾ and Masafumi TAKIMOTO¹⁾

Abstract — Both myelodysplastic syndrome (MDS) and aplastic anemia (AA) are types of bone marrow (BM) failure characterized by pancytopenia. Hypocellular-MDS (Hypo-MDS) is observed in approximately 15% of MDS cases, however, the number of hematopoietic cells is small, and morphological differentiation between MDS and AA is often difficult. The identification of tumor cells and non-tumor cells using immunohistochemistry in BM pathological tissues can aid in the differentiation of Hypo-MDS and AA. An appropriate and rapid pathological diagnosis of Hypo-MDS and AA is critical because of their varying treatments and prognosis; moreover, the time period prior to treatment is important. We investigated the usefulness of immunohistochemical (IHC) studies in the differentiation of Hypo-MDS and AA using BM pathological tissue diagnosis. BM clot sections or BM biopsy specimens were obtained from 40 Hypo-MDS/AA patients. Hypo-MDS had a BM cellularity of <30% in patients less than 70 years and <20% in those over 70 years. IHC and hematoxylin-eosin staining were performed. Indicators of p53, HbF, CD34, c-KIT, and megakaryocytic dysplasia may result in abnormal Hypo-MDS expression. In contrast, indicators of CD8-positive T-cells tended to accumulate in AA. The subtype analysis of mast cells showed no significant difference between the two diseases. The distribution of monocytes/histiocyte in BM tissue identified by CD68 and CD163 was not useful in the differentiation of Hypo-MDS and AA. We suggest that combining the indicators related to hematopoietic cells with those related to a BM background can improve differentiation of Hypo-MDS and AA in cases with a small number of hematopoietic cells, thus improving the accuracy of BM pathological diagnosis.

Key words: myelodysplastic syndrome, aplastic anemia, hypocellular bone marrow, immunohistochemistry, bone marrow tissue

[Received October 17, 2019 : Accepted November 12, 2019]

¹⁾Department of Pathology, Showa University School of Medicine

²⁾Division of Hematology, Department of Medicine, Showa University School of Medicine

* To whom corresponding should be addressed