

紅血球生成素引起之抗體導致的純紅血球再生不良：一病例報告

黃千惠^{1,3} 王明誠² 高雅慧¹ 莊善安³ 黃群超² 張孔昭⁴ 黃建鐘²

國立成功大學 ¹臨床藥學研究所

國立成功大學醫學院附設醫院 ²內科部腎臟科 ³藥劑部 ⁴病理部

摘要

基因重組人類紅血球生成素 (Recombinant human erythropoietin, rHuEpo, epoetin) 所造成之純紅血球再生不良 (pure red cell aplasia, PRCA) 是發生於腎性貧血患者的一種罕見血液疾病，其臨床特徵是使用rHuEpo治療時，仍有嚴重貧血。血液檢查方面，除紅血球母細胞數目偏低外，其餘的血球和數目均為正常，推測可能致病機轉與製劑之賦型劑成份和注射投予的方式有關。目前的全球發生的案例數大多為使用epoetin- α 劑型，其他的劑型（如：epoetin- β ）較少。目前文獻探討改變賦型劑成份或注射投予的方式，可降低PRCA病例。本病例為一接受血液透析的腎性貧血女性透析患者，使用epoetin- β 製劑後，發生了嚴重貧血，經由骨髓抽吸檢查與血清中epoetin的中和性抗體檢驗，顯示為由epoetin造成之純紅血球再生不良。該患者併有糖尿病，在停止使用epoetin和接受類固醇治療一星期後，因血糖難以控制和對類固醇的耐受性差而停止使用，之後改用mycophenolate mofetil (MMF)治療三個月，但未見良好療效，後不幸死於敗血性休克與肝衰竭。所以，腎性貧血患者臨床使用epoetin時，若施打epoetin- α ，應以靜脈方式投予；若使用期間，患者的貧血未改善並出現加重的情形，則需作進一步相關性檢查（如：骨髓抽吸和中和性抗體）以確定是否為epoetin造成的純紅血球再生不良，再行適當之治療。

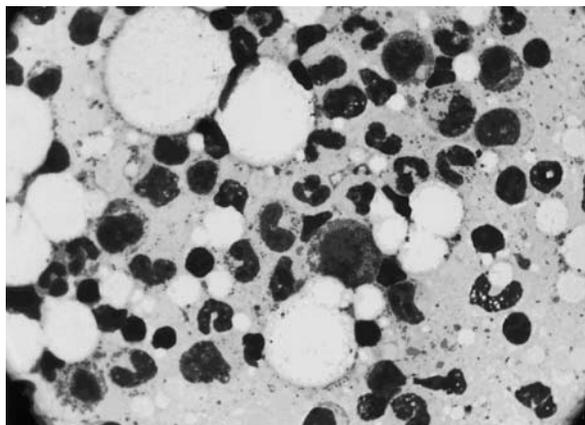
關鍵詞：腎性貧血 (Renal anemia)
紅血球生成素 (Erythropoietin)
基因重組人類紅血球生成素 (Recombinant human erythropoietin, rHuEpo, epoetin)
純紅血球再生不良 (Pure red cell aplasia, PRCA)
賦型劑 (Excipient)
穩定劑 (Stabilizer)

前言

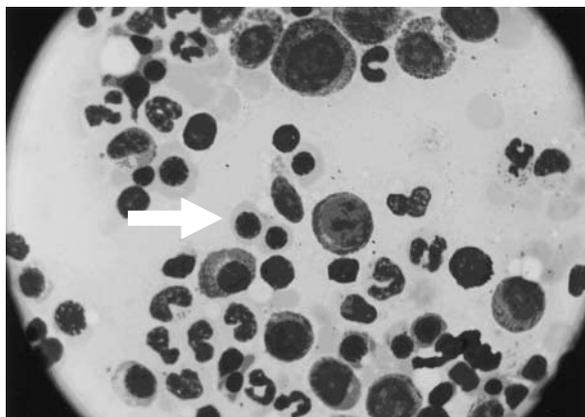
紅血球生成素(Erythropoietin)為一種多醣蛋白質(sialoglycoprotein)，在人體內由腎臟製造後，作用於骨髓的紅血球前驅母細胞(erythroid progenitor)，促使成熟的紅血球生成；而基因重組人類紅血球生成素(recombinant human Epo, rHuEpo或epoetin)是以基因重組生物工程技術合成，是一種在結構及功能上與內生性Epo很相似的治療性蛋白製劑，臨床上可有效治療腎病與癌症患者的貧血。目前在台灣上市的rHuEpo的劑型，包括：epoetin- α (Eprex[®])、epoetin- β (Recormon[®])和darbepoetin- α (Aranesp[®])，其主要差異在於分子結構上的醣鏈數、鍵結的位置以及賦型劑的不同¹。使用rHuEpo導致的副作用以頭痛、噁心、嘔吐與血壓升高較為常見²，然而近年來發現少數使用epoetin- α 治療之腎性貧血患者，卻產生更嚴重的貧血現象，這種罕見現象的可能致病機轉為人體內產生一種內生性中和型epoetin抗體(neutralizing antibody)，病患即使投予rHuEpo後也無法改善貧血且需仰賴輸血治療，此罕見嚴重貧血疾病稱為抗體造成的純紅血球再生不良(antibody-mediated pure red cell aplasia, Ab-mediated PRCA)¹。

病例報告

一位48歲女性小兒麻痺患者，併有高血壓、糖尿病、冠心病、慢性肝炎、慢性腎病與貧血。患者在88年4月進入透析階段，後定期在某透析診所接受規則血液透析治療，並開始皮下注射epoetin- β (Recormon[®]) 2000 IU每星期三與輸血治療。在接受藥物治療前病患接受貧血相關的檢查，以發現可能造成的病因。血液學檢查結果，發現平均紅血球容積(Mean corpuscular volume, MCV)正常，但紅血球數目、血色素(Hemoglobin, Hb)和血比容(Hematocrit, Hct)均低於正常值，屬於正常大小和顏色貧血(normocytic和normochromic anemia)；而膽紅素(bilirubin)、庫姆氏試驗(Coombs' test)以及腹部超音波檢查均為正常，排除了溶血性貧血和脾腫大的原因。90年8月至12月，患者的



圖一：在1,000倍油鏡下病患之骨髓抹片圖(染色法：Liu's stain)。如圖所示，幾乎無紅血球母細胞存在，導致其骨髓細胞/紅血球細胞的比例(myeloid cells/erythroid cells, M/E, ratio)超過正常(3~4:1)，達12:1，其主要原因為正紅血球母細胞(normoblast)，幾乎不存在或過少(只有一個)所致。



圖二：正常M/E ratio下之骨髓抹片圖(染色法：Liu's stain)，與本病例相比較。箭頭指的血球是正紅血球母細胞(normoblast)，其M/E ratio是4:1(圖一及圖二為成大醫院血液腫瘤科陳雅萍醫師提供)。

Hb由9.0降低至5.9 g/dL；由於慢性腎病造成之貧血，因接受epoetin- β 治療而更嚴重，並需每星期接受輸血1單位，故建議患者接受骨髓抽吸(bone marrow aspiration)檢查，以釐清病因。在91年8月的檢查結果顯示低細胞性且紅血球再生不良(hypocellularity with erythroid hypoplasia)，骨髓/紅血球細胞的比例(myeloid cells/erythroid cells, M/E)超過正常值(約12:1；正常值約3:1)，而骨髓細胞和巨核細胞(megakaryocytes)之數量與型態為正常(見圖一，並比較正常之圖二)。因

此初步診斷為疑似epoetin- β 造成的純紅血球再生不良(PRCA)，而暫時停止epoetin- β 治療，改以輸血方式改善貧血。因患者常感虛弱無力，在輸血下的Hb，僅能維持約7 g/dL，而儲鐵素(ferritin)不斷升高且間斷性發生胃腸道出血，而無法確診由PRCA導致的貧血，92年間再度投予epoetin- β ，改以每星期靜脈注射5000 IU一次。94年7月病患的血液檢體經由德國Humboldt大學實驗室(Univ. Klinikum Charite Hals-Nasen-Ohrenklinik, Molekularbiol. Forschungslabor)免疫螢光法檢驗證實患者血清中含有高效價的抗epoetin- β 之中和性抗體，因此才再度停止epoetin製劑的使用。

病患曾接受類固醇以治療PRCA，因類固醇治療後使血糖值難以控制且有腸胃道出血現象，經過一星期後，因無法耐受類固醇副作用而停止使用。95年3月患者開始接受mycophenolate mofetil (MMF) 250 mg一天兩次治療，三星期後病患回診時血液相關檢查結果為：白血球：6,300/cmm、Hb: 9.5 g/dL、Hct 26.7%和儲鐵素：22,703 ng/ml，之後增加MMF劑量至500 mg每天兩次，6月的血液學追蹤檢查也無明顯改善，但病患仍每一至二週需接受二單位濃縮紅血球(packed RBC)輸血治療。病患於95年8月因格蘭氏陰性菌(*Aeromonas hydrophila*)菌血症(bacteremia)併敗血性休克和肝衰竭再度入院，四天後死亡。

討論

第一個rHuEpo製劑於1986年開始臨床使用，上市後的10年間發生抗epoetin抗體所致的PRCA之案例報告僅有三位，在1999年至2002年間病例報告卻明顯上升，發現這些患者均屬於腎性貧血患者。另外，發現大多數PRCA病例以歐洲地區佔較大比例³，其中大於90%以上患者均為皮下注射epoetin- α 。根據2002年Casadevall等人之研究，收集1998至2001年間發生PRCA的案例，也發現這些患者均以皮下注射方式投予epoetin⁴。由PRCA發生率、地區性、rHuEpo的製劑以及投予方式推測，可能的致病機轉與製劑賦型劑成分有關。美洲地區用於蛋白質製劑

之穩定劑(stabilizer)為人類血清白蛋白(human serum albumin, HSA)，由於HSA可能會傳播感染性病毒，自1998年起，歐盟禁止HSA的使用。故美洲以外地區，以polysorbate 80和glycine取代HSA作為epoetin- α 之穩定劑³，研究推測關於epoetin- α (Eprex[®])導致PRCA之免疫機轉可能與polysorbate 80和預充填針筒之橡膠推進器會產生一種釋出物(leachates)³有關，在動物實驗中leachates會降低體內epoetin的造血功能，若在橡膠推進器前鍍上一層含氟化物(flurotec)成分物質，則與polysorbate 80不會產生釋出物。另外，可能導致anti-epoetin抗體形成的機轉為微膠體(micelles)產生之免疫反應。推測由於epoetin- α 含有的高濃度polysorbate 80(0.03%)⁵，投藥後會形成微膠體，使得epoetin分子易於微膠體的表面形成免疫複合物，誘發體內免疫反應的發生(epoetin- β 含polysorbate 20，濃度0.01%，形成微膠體的機率較小)；此外，皮下投予也是導致免疫致病原因之一；在儲存方式上，溫度及放置方式也都可能會提高免疫反應，因此臨床使用上建議在2至8℃下存放，不可冷凍、搖晃且需避光儲存；若使用epoetin- α ，腎性貧血患者僅限於靜脈注射方式³。Epoetin分子結構上，醯鏈的鍵結也被推測會影響免疫活性，醯鏈鍵結越多可減低epoetin投予人體後引起之免疫反應，此種作用稱作「遮蔽效應(shielding effect)」⁶，因此近年來研發之epoetin長效劑型(如：darbepoetin- α)，其醯鏈數與鍵結相較於epoetin- α 和epoetin- β 佔較高的比例⁷。此外，探討病人的因素是否會導致PRCA，研究發現epoetin導致PRCA的病患過去均無免疫疾病或曾經使用藥物導致的免疫反應；在基因檢測方面，內生性epoetin基因序列與患者體內原存在的抗體，與導致PRCA之間並無相關性，因此可排除病患本身的因素³。因此，由目前文獻回顧由epoetin造成PRCA最主要原因與製劑的劑型(安定劑與注射針筒推進器的成分)和投予的方式有關，所以現有epoetin製劑中含polysorbate成分，其注射針筒推進器外層另鍍上一層氟化物成分，或是epoetin- α 投予腎性貧血患者僅限靜脈方式注射。

紅血球生成素引起PRCA的診斷，而由本文之病患出現之情形，符合標準有以下幾點⁸：在主要診斷標準方面，患者使用epoetin- β 超過至少一個月、需每週輸血1 U維持Hb值、及白血球與血小板數目為正常值，但網狀紅血球 (reticulocyte)數目因當初發病時並未檢查，不得而知；確定診斷的標準方面，包括：骨髓檢查：除紅血球母細胞(erythroblast)數小於5% 外，其他細胞數均為正常及血清中有具有中和性epoetin之抗體存在(通常使用放射免疫沉澱法或酵素吸附分析法作抗體檢定)⁹。因此由病患的臨床表現與檢查結果，高度懷疑病患是使用epoetin- β 後造成之PRCA。

使用epoetin治療產生的PRCA，首先停止使用所有epoetin製劑，根據Verhelst文獻及案例報告回顧¹⁰，有以下幾種治療的方式：(1)免疫抑制劑治療：如：corticosteroid (CS)、cyclosporin A (CsA)、cyclophosphamide (CyP)、intravenous immunoglobulins (IVIg)等；(2)輸血治療：緩解症狀；(3)血漿置換術；(4)腎臟移植¹⁰。其中大部分患者在停用免疫抑制劑後均未復發PRCA，也未再度使用epoetin製劑。根據這篇病例分析，對於epoetin造成PRCA的治療建議停止所有epoetin的相關製劑，使用CsA作為第一線藥物治療，若患者無法耐受CsA或沒有療效，則考慮其他免疫抑制劑（如：CS加上CyP）或是接受腎臟移植手術。目前臨床上的案例報告大多為使用epoetin- α ，關於epoetin- β 相關的案例報告則較少。根據Tolman等人的病例報告¹¹，4名平均年齡約58歲的血液透析病患，皮下投予epoetin- β ，使用epoetin至發生PRCA由23個月至40個月間不等，治療方式為停用epoetin- β 並使用prednisolone治療(1 mg/kg)，3個月後3名患者均有良好療效，且不需依靠輸血治療。Shinohara等人之病例報告¹²，一名68歲男性日本病患，併有糖尿病、高血壓和腎絲球腎炎，皮下注射epoetin- β 約9個月後發生PRCA，治療方式為停用epoetin及使用CsA 200 mg/day和輸血治療，經過六個月後，病患不需再接受輸血治療。

綜合上述兩案例，本病例從起初皮下注射

投予epoetin- β 至診斷為PRCA約40個月；經骨髓抽吸與抗體檢查確認後，停用epoetin- β 後使用類固醇治療，但病患無法耐受類固醇的副作用及難以控制的高血糖，改以MMF治療；病例未以CsA治療是因無法自費負擔費用而改用MMF治療，3個月後其血色素值仍在8-9 g/dL間，未有明顯改善，後續治療建議患者採用每天CsA 200 mg以及至少使用半年以上，但未來得及使用CsA，她即因敗血性休克和肝衰竭死亡。

參考文獻

1. Casadevall N. What is antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA)? *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (Suppl 4): iv3-8.
2. RK(Ed) K. DRUGDEXR System. Thomson Micromedex, Greenwood Village, Colorado (Edition expires [07/2006]).
3. Macdougall IC. Antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA): epidemiology, immunogenicity and risks. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (Suppl 4): iv9-15.
4. Casadevall N, Nataf J, Viron B, et al. Pure red-cell aplasia and antierythropoietin antibodies in patients treated with recombinant erythropoietin. *N Engl J Med* 2002; 346: 469-75.
5. Schellekens H. Factors influencing the immunogenicity of therapeutic proteins. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (Suppl 6): vi3-9.
6. Sinclair AM, Elliott S. Glycoengineering: the effect of glycosylation on the properties of therapeutic proteins. *J Pharm Sci* 2005; 94: 1626-35.
7. Deicher R, Horl WH. Differentiating factors between erythropoiesis-stimulating agents: a guide to selection for anaemia of chronic kidney disease. *Drugs* 2004; 64: 499-509.
8. Rossert J, Casadevall N, Eckardt KU. Anti-erythropoietin antibodies and pure red cell aplasia. *J Am Soc Nephrol* 2004; 15: 398-406.
9. Thorpe R, Swanson SJ. Assays for detecting and diagnosing antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA): an assessment of available procedures. *Nephrol Dial Transplant* 2005; 20 (Suppl 4): iv16-22.
10. Verhelst D, Rossert J, Casadevall N, Kruger A, Eckardt KU, Macdougall IC. Treatment of erythropoietin-induced pure red cell aplasia: A retrospective study. *Lancet* 2004; 363: 1768-71.
11. Tolman C, Duja S, Richardson D, et al. Four cases of pure red cell aplasia secondary to beta, with strong temporal relationships. *Nephrol Dial Transplant* 2004; 19: 2133-6.
12. Shinohara K, Mitani N, Miyazaki M, et al. Pure red-cell aplasia caused by the antibody to recombinant erythropoietin, epoetin-beta, in a Japanese patient with chronic renal failure. *Am J Hematol* 2005; 78: 15-20.

表一：患者的系列血液和生化檢驗

生化檢查 (單位)	日期 正常值	1999	2000	2001 07/28	2001 12/27	2002 03/28	2002 06/27	
WBC (K/cmm)	3.4 - 9.1	5.27	7.1	5.1	5.7	5.4	4.8	
RBC (10 ⁶ /ml)	4.24 - 5.56	3.19	3.13	2.87	1.94	2.38	2.8	
Hb (g/dl)	13.5 - 17.0	10.07	10.9	9.0	5.9	7.0	8.0	
Hct (%)	39.1 - 48.9	28.28	33.5	27.9	18.7	20.9	23.8	
MCV (cmm)	82.6 - 97.4	88.59	107	97.2	96.4	87.8	85	
MCH (pg/cell)	28.5 - 34	31.55	34.8	31.4	30.4	29.4	28.6	
MCHC (g/dl)	33.8 - 35.6	35.61	32.5	32.3	31.6	33.5	33.6	
Plt (10 ³ /ml)	138.1 - 353.4	246	196	228	263	201	163	
SCr (mg/dl)	0.5 - 1.2	2.0	2.2	1.6	—	2.0	1.8	
BUN (mg/dl)	7 - 21	95.7	101.7	105.2	—	162	124	
Ferritin (ng/ml)	15 - 300	—	1492	1173	3896	1650	2000	
Iron (ug/dl)	65 - 165	296	229	199	171	242	207	
TIBC (ug/dl)	245 - 419	464	279	406	269	314	290	
Fe/TIBC (%)	—	64%	82%	49%	63%	77%	71%	
生化檢查 (單位)	2003 06/26	2003 12/25	2004 03/25	2005 06/23	2005 08/25	2005 12/5	2006 03/18	2006 06/20
WBC (K/cmm)	5.6	9.2	6.9	5.2	7.1	—	6.3	7.0
RBC (10 ⁶ /ml)	2.33	1.78	3.12	2.17	3.13	2.54	3.13	1.81
Hb (g/dl)	6.1	8.3	8.2	6.3	9.1	7.6	9.5	7.3
Hct (%)	19.1	16.4	24.1	18.9	27.9	21.7	26.7	19.8
MCV (cmm)	82	92.1	77.2	87.1	89.1	85.3	85.2	109.2
MCH (pg/cell)	26.2	29.8	26.3	29	29	29.7	30.2	40.2
MCHC (g/dl)	31.9	32.3	34	33	32	34.8	35.5	36.8
Plt (10 ³ /ml)	265	327	194	168	106	191	175	52
SCr (mg/dl)	1.7	1.7	1.7	1.5	1.5	6.3	—	0.7
BUN (mg/dl)	74.7	50.1	110	105	124	120	—	19
Ferritin (ng/ml)	1991	2000	2000	2000	—	—	22703	72000
Iron (ug/dl)	222	247	182	182	—	—	—	—
TIBC (ug/dl)	289	291	271	380	—	—	—	—
Fe/TIBC (%)	68%	85%	67%	48%	—	—	—	—

Epoetin-Related Antibody-Mediated Pure Red Cell Aplasia (PRCA) : A Case Report

Chien-Huei Huang^{1,3}, Ming-Cheng Wang², Yea-Huei Kao Yang¹, Shan-An Chuang³,
Chun-Chao Huang², Kung-Chao Chang⁴, and Jeng-Jong Huang²

*¹Institute of Clinical Pharmacy, National Cheng Kung University;
²Departments of Internal Medicine, ³Pharmacy, and ⁴Pathology,
National Cheng Kung University Hospital, Tainan, Taiwan*

Epoetin-related antibody-mediated pure red cell aplasia (PRCA) is a rare hematological disorder in patients with renal anemia. This disorder results in progressively severe anemia even under epoetin therapy. The conformational investigations of PRCA include normal cellularity and the number of erythroblasts was lower than 5%. The immunological mechanism of developing antibody-mediated PRCA is unclear, but a certain of factors may increase the risk of immunogenicity, including the components and properties of product formulation and route of administration. The majority of cases of epoetin-induced PRCA were associated with use of formulation of epoetin- α , and the other formulation associated with the PRCA was relatively lower. This 48-year-old uremic female received hemodialysis therapy and subcutaneous (sc) injections of epoetin- β for her renal anemia. But she still showed severe anemia (hemoglobin around 7 g/dl) in spite of frequent blood transfusion 2 wks. After bone marrow aspiration and serum neutralizing IgG antibody examinations, the diagnosis of PRCA was confirmed. Subsequently, we discontinue the use of Epo and treat her with corticosteroid. Because she had diabetic history and can't tolerate the adverse effects of steroid. Since March 2006, she received mycophenolate mofetil (MMF) therapy for three months. But her anemia did not improve, and other immunotherapy is necessary. Unfortunately, she died of septic shock and liver failure. In brief, we need further examinations to confirm the underlying causes of PRCA and receive appropriate immunotherapy or kidney transplantation if dialysis patients on Epo therapy became transfusion-dependent (J Intern Med Taiwan 2009; 20: 86-91)