

binding protein ϵ . *J. Biol. Chem.* 273,14796-14804,
1998.

Identification of a novel mutation of C/EBP ϵ in a patient with specific granule deficiency

Masaaki Shiohara¹⁾, Syo Houkibara¹⁾, Kazunaga Agematsu¹⁾, Atsushi Komiyama¹⁾, H. Phillip Koeffler²⁾

¹⁾ Department of Pediatrics, Shinshu University School of Medicine,

²⁾ Division of Hematology/Oncology, Cedars-Sinai Medical Center/UCLA

Neutrophil-specific granule deficiency (SGD) is a rare congenital immunodeficiency which is characterized by frequent bacterial infection. The neutrophils of the patient show abnormalities such as deformity of the nucleus (Pelger-Heute abnormality), lack of specific granules in the cytoplasm, and defective bactericidal activity. Novel myeloid specific transcriptional factor CCAAT/Enhancer binding protein ϵ (C/EBP ϵ) is a member of C/EBP family, which shares basic DNA binding region and a leucine zipper dimerization domain. C/EBP ϵ gene has been shown to be critical in myelopoiesis. We identified a homozygous mutation (1,113insA) of C/EBP ϵ gene in a SGD patient. The predicted frameshift results in a truncation of the 32-kD major C/EBP ϵ isoform, with loss of the dimerization domain, DNA binding region, and transcriptional activity. Parents of the patient have heterozygous mutation, which indicates that SGD is inherited in autosomal recessive manner.

EBウイルスDNA量とEBウイルス特異的免疫能の消長を モニタリングし得たWiskott-Aldrich症候群骨髄移植例

柘 植 郁 哉 (名古屋大学小児科)
木 村 宏 (名古屋大学小児科)
葛 島 清 隆 (愛知県ガンセンターウイルス部)
小 島 勢 二 (名古屋大学成長発達医学)
森 島 恒 夫 (名古屋大学保健学科)

EBウイルス関連リンパ増殖性疾患 (LPD) と髄膜脳炎の経過中に、EBウイルスのDNA量とEBV特異的細胞障害性T細胞 (CTL) 活性の推移を経時的に観察し得たWiskott-Aldrich症候群 (WAS) 骨髄移植例を報告する。

症例は1歳6カ月男児で、出血傾向が強く、輸血抵抗性となったため、HLA-A座DNA型不一致の非血縁ドナーより、骨髄移植を施行した。第46病日より発熱と、全身リンパ節腫脹を認め、リンパ節生検にてEBウイルス関連LPDと診断した。第51病日より傾眠傾向が出現、髄液中にEBウイルスDNAが検出され、EBウイルス髄膜脳炎と考えられた。EBウイルス特異的CD8⁺T細胞の著明な増加と、CTL活性の出現を認めたため、免疫抑制剤の減量にて経過観察したところ、発熱、リンパ球腫脹、意識障害ともに改善した。骨髄移植後のEBウイルス感染免疫能の再生に関する貴重な知見と考えられた。

【はじめに】

EBVによるリンパ増殖性疾患 (以下LPD) は、骨髄移植後の免疫不全時に出現する合併症で、HLAの不一致、骨髄細胞からのT細胞除去、抗胸腺細胞グロブリンなどの強力な免疫抑制剤の使用が危険因子として知られてる。Wiskott-Aldrich症候群の骨髄移植療法においても留意すべき合併症とされ、早期診断して、ドナーリンパ球輸注などの治療を早期より行うことが必須の、予後不良な病態である¹⁾。

今回我々は、Wiskott-Aldrich症候群患児に対する非血縁骨髄移植経過中に発症したLPDとEBウイルス髄膜脳炎において、EBウイルスとEBV特異的細胞障害性T細胞の消長を綿密に観察し得たので報告する。

【方法】

1. EBV特異的CD8陽性細胞の検出

患者末梢血単核球と自己EBV形質転換リンパ芽球

様細胞株 (LCL) を混合培養し、1時間後にBrefeldin Aを加えさらに5時間培養を継続した。培養終了後細胞固定した後、CD8、CD69、IFN γ 抗体で3重染色して、フローサイトメトリーを行った²⁾。

2. EBV特異的細胞障害活性の検出

患者末梢血単核球を、リンパ球混合培養により細胞障害性T細胞を誘導することなく、直接⁵¹Cr標識細胞と4時間培養し、培養上清中の放射活性を測定した。

【症例】

症例は1才6カ月の男児で、家族歴、妊娠歴に特記すべきことはなかった。生後1カ月時より難治性の湿疹出現。生後10カ月時にサルモネラ腸炎に罹患し、血小板減少を指摘され、これを契機にWiskott-Aldrich症候群と診断された。

当初は7-10日程度の間隔での血小板輸血でコントロール可能であったが、平成11年5月頃から血小板輸血に不応となり、血漿除去血小板の24時

表1 入院時検査所見

Hb	7.4	g/dl	BUN	4	mg/dl	PHA	44418cpm
Plt	0.9×10^4	/ μ l	CRE	0.2	mg/dl	ConA	19375cpm
WBC	4900	/ μ l	BS	102	mg/dl		
Neu	82.0	%	CRP	0.9	mg/dl		
Lym	10.0	%	Na	139	mEq/L	CD3	40.0%
GOT	25	IU/L	K	3.6	mEq/L	CD4	36.2%
GPT	16	IU/L	Cl	107	mEq/L	CD8	9.6%
LDH	263	IU/L	PT	108.9	%	CD20	16.2%
ALP	480	IU/L	APTT	82.2	%		
γ -GTP	18	IU/L	Fib	297	mg/dl		
LAP	32	IU/L	IgG	1420	mg/dl		
			IgM	36	mg/dl		
			IgA	36	mg/dl		

間持続輸血が必要となった。

平成11年6月29日骨髓移植目的で当院転院した。転院時全身状態は良好であったが、紫斑が著明で、皮膚のびらん部や粘膜に出血傾向を認めた。体重9900g、身長74.2cm、頭囲44.0cm、体温36.9℃、脈拍128/分、整、呼吸数36/分で、胸部にラ音を聴取せず、腹部は平坦で肝は1横指、脾は触知しなかった。

検査所見はHb 7.4g/dl、血小板数9000/ μ l以外特記すべきことはなく(表1)、免疫能は比較的保たれ、特に易感染性も認めなかった。

骨髓移植の詳細は表2に示した。平成11年7月22日、HLA-A locusのDNAタイピング1座不一致、血型一致の非血縁ドナーより、 4.3×10^8 /kgの骨髓細胞を移植した。前処置はエンドキサン、ATG、全身照射で行い、GVH予防はMTXとタクロリムスを用いた。

移植後の経過を図1に示した。day18で好中球は500/ μ l以上となった。day26より皮疹、軽度の肝機能異常、下痢を認め、進行したため急性GVHDとしてday34よりプレドニンを開始した。day39に末梢血中にリアルタイムPCR法³⁾にて有意なEBV-DNAが検出され、day46に発熱し、両側頸部に径3cmまでのリンパ節腫脹を認めた。EBV-LPDを疑いプレドニンとタクロリムスの減量を行ったが、EBV-DNA量はさらに増加し、リンパ球増多も出現した。リンパ節生検では多クローン性のB細胞増殖が認められた。ドナー白血球輸注や養子免疫療法を考慮したが、末梢血中にEBV特異的CD8陽性細胞の

表2 骨髓移植

患者	HLA	A:24/26(2603),B:52/61,DR:9/15
ドナー		48才女性非血縁
	HLA	A:24/26(2602),B:52/61,DR:9/15
前処置		CY; 50 mg/kg x 4 days ATG; 2 mg/kg x 5 days TBI; 2.5 Gy x 4 days
移植細胞数		4.3×10^8 /kg
GVH 予防		taclolimus, sMTX

著明な増加を認め(図2)、また、EBV特異的細胞障害活性も認められたため(図3)、経過観察したところ症状もウイルス量も漸減した。day53より傾眠傾向となり、翌日30秒ほどの全身痙攣を認めた。day61で行った髄液検査(表3)で、EBV-DNAが検出され、細胞数が448/3で、その70%がCD8陽性、さらにその37%がEBV特異的であったため、EBVによる髄膜脳炎と診断した。頭部CTや脳波では特記すべき所見は見られなかった。意識障害も経過観察のみで改善した。

血小板減少は骨髓移植後も持続し、輸血に対する反応は改善したものの、退院までの時点で輸血依存性の回復には至らなかった。

【考案】

Wiskott-Aldrich症候群患児に対する非血縁骨髓移植経過中に、EBV-LPDとEBV髄膜脳炎を発症した1例を報告した。

造血幹細胞移植はWiskott-Aldrich症候群に対する唯一の根治療法であり、HLA一致同胞からの移植では良好な成績が得られている^{4,5)}。しかしながら、HLA一致同胞が得られない場合には、両親からのハプロタイプ一致移植の成績は不良であり、HLA一致非血縁ドナーからの移植は、5-6才までの早期に行うことが必須であるとされているが、生着を得るのに必要な前処置法など確立されるには至っていない⁶⁾。

今回の症例は、移植前血小板輸注に対する不応性が強く、24時間輸血を継続することが必要であったため、アロ抗原に対し極めて強く感作されている可能性が存在し、また、ドナーがDNAタイピング1座不一致の非血縁であり、拒絶のリスクが

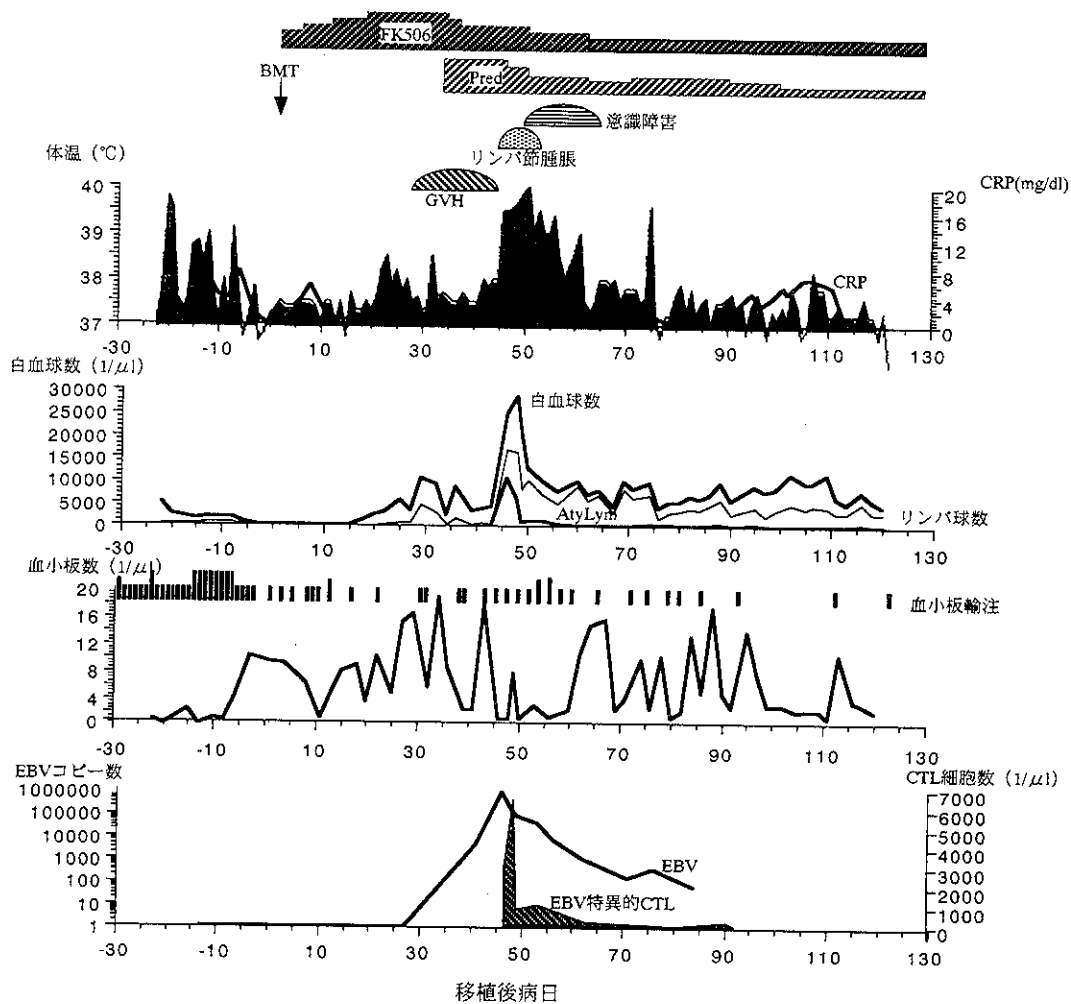


図1 移植後経過表.

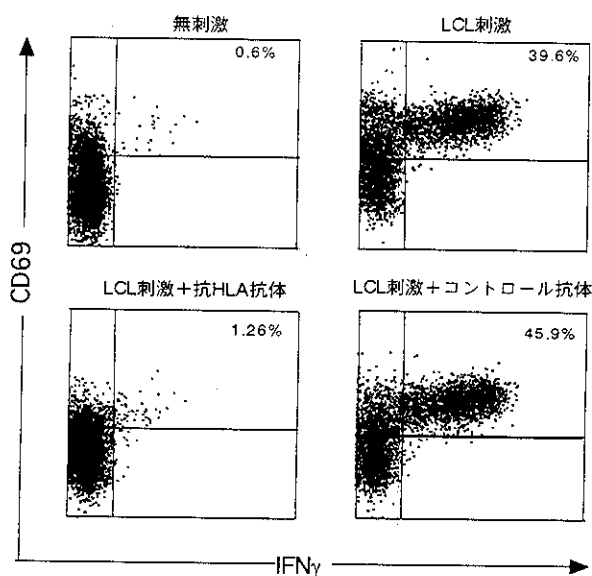


図2 EBV特異的CD8陽性細胞の検出. 自己のEBV感染リンパ芽球様細胞株(LCL)刺激でCD69, IFN γ が共に陽性の細胞が出現し, 抗HLA-classI抗体でブロックされ, コントロール抗体ではブロックされない.

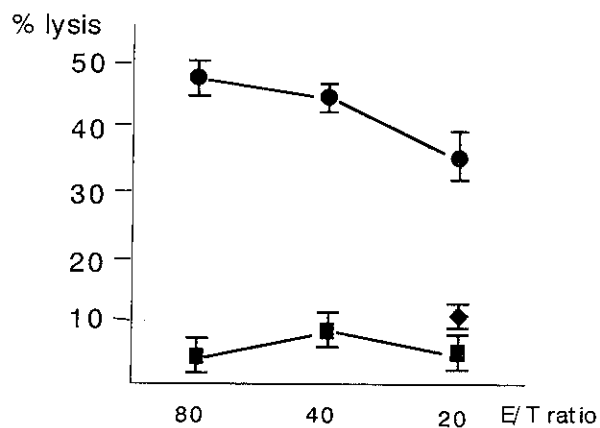


図3 末梢血単核球のEBV特異的細胞障害活性. 自己のLCLは傷害するが(J), 抗HLA-classI抗体でブロック(F)される. また, HLAに拘束され, HLA不一致のLCLは障害しない(B). 患者末梢血中には極めて高頻度にEBV特異的キラーT細胞が出現していると考えられる.

表3 髄液所見

	Day61	Day68
細胞数 (／3)	448	292
単核	428	192
多形核	20	100
CD4+ (%)	19	ND
CD8+ (%)	73	ND
内EBV特異的	37.1	ND
CD19+ (%)	0.18	ND
EBV DNA (copy/106cell)	4739	3

高かった。このため、ATG、全身照射を含む強い前処置が必要と判断した。

こうした強力な前処置により、免疫抑制状態が持続すれば、LPD発症の危険が増大する。今回我々は、リアルタイムPCR法を用いたEBV-DNAの定量を経時的に行い、EBVの活性化を早期診断し、免疫抑制剤の減量を行った。さらに、DLTや養子免疫療法を考慮したが、EBV特異的細胞障害性T細胞の出現が認められたため、経過観察したところ、LPDは自然消退した。

骨髄移植後のEBV関連髄膜脳炎は希であるが^{7,8)}、本症例は、意識障害と痙攣を発症し、髄液細胞と髄液中EBV-DNAの増加を認めEBV関連髄膜脳炎と診断した。LPD同様髄液細胞中にもEBV特異的CD8陽性T細胞の出現が確認され、経過観察のみで改善した。

このように、綿密にEBV-DNA量と特異的CTLをモニタリングすることにより、EBV-LPDの早期診断と病勢の把握が可能であり、Wiskott-Aldrich症候群に対するhigh riskな骨髄移植の成績改善に役立つと考えられた。

【文献】

- 1) Sasahara Y, Kawai S, Itano M, et al. Epstein-Barr virus-associated lympho-proliferative disorder after unrelated bone marrow transplantation in a young child with Wiskott-Aldrich syndrome. *Pediatr Hematol Oncol.* 1998; 15: 347-352.
- 2) Kuzushima K, Hoshino Y, Fujii K, et al. Rapid

determination of Epstein-Barr virus-specific CD8(+) T-cell frequencies by flow cytometry. *Blood.* 1999; 94: 3094-3100.

- 3) Kimura H, Morita M, Yabuta Y, et al. Quantitative analysis of Epstein-Barr virus load by using a real-time PCR assay. *J Clin Microbio.* 1999; 37: 132-136.
- 4) Fischer A, Landais P, Friedrich W, et al. Bone marrow transplantation (BMT) in Europe for primary immunodeficiencies other than severe combined immuno-deficiency: a report from the European Group for BMT and the European Group for Immunodeficiency. *Blood* 1994; 83: 1149-1154.
- 5) Ozsahin H, Le Deist F, Benkerrou M, et al. Bone marrow transplantation in 26 patients with Wiskott-Aldrich syndrome from a single center. *J Pediatr* 1996; 129: 238-244.
- 6) Filipovich AH. Stem cell transplantation from unrelated donors for correction of primary immunodeficiencies. *Immunol Allergy Clin North Am* 1996; 16: 377-392.
- 7) DelleMijn PL, Brandenburg A, Niesters HG, et al. Successful treatment with ganciclovir of presumed Epstein-Barr meningo-encephalitis following bone marrow transplant. *Bone Marrow Transplant.* 1995; 16: 311-312.
- 8) Davis K, Hinrichs S, Fidler J, et al. Post-transplant Epstein-Barr virus-associated meningoencephalitis and lymphoid interstitial pneumonitis. *Bone Marrow Transplant.* 1999; 24: 443-444.

Close monitoring of EB virus (EBV) DNA and EBV specific T cell response after a bone marrow transplantation for a patient with Wiskott-Aldrich syndrome

Ikuya Tsuge ¹⁾, Hiroshi Kimura ¹⁾, Kiyotaka Kuzushima ⁴⁾, Seiji Kojima ²⁾, Tsuneo Morishima ³⁾

Department of Pediatrics ¹⁾, Department of Developmental Pediatrics ²⁾, Department of Health science ³⁾, Nagoya University School of Medicine, Laboratory of Viral Oncology, Aichi Cancer Center Research Institute ⁴⁾

We report here a successful bone marrow transplantation (BMT) for a Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) patient. Close monitoring of Epstein-Barr virus (EBV)-DNA and EBV specific cytotoxic T cell activity were performed during EBV-related lymphoproliferative disease (LPD), and EBV related meningo-encephalitis after BMT.

The patient, 1-year 6-month old boy, who were refractory to platelet transfusion and needed 24 hours continuous infusion before BMT, were transplanted from HLA genotypically one-locus-mismatched unrelated donor (URD). On day 46, he was febrile and cervical lymph node swelling were noticed. A lymph node biopsy revealed an EBV-LPD. He became drowsy on day 51. The cerebrospinal fluid (CSF) showed 448/3 WBC (L/N=428/20), and quantitative PCR detected 4739 copies/10⁶ cells of EBV DNA in CSF. The dose of tacrolimus was reduced by 25%, and prednisolone was tapered. As increased number of EBV specific cytotoxic T cells were detected at that time, other special treatments were postponed. Lymph node swellings were improved, and he returned alert gradually. These findings indicated importance to monitor EBV-DNA and EBV-specific immunity closely after BMT for WAS patients.

ADA欠損症におけるPEG-ADA療法

川 村 信 明 (北海道大学医学部小児科)
小 野 暁 (北海道大学医学部小児科)
小 林 邦 彦 (北海道大学医学部小児科)
崎 山 幸 雄 (北海道大学遺伝子治療)

我々の施設で2例のADA欠損症患者に実施したPEG-ADA療法における免疫学的再建過程、問題点等について報告した。生後8ヶ月時発症で1才2ヶ月時よりPEG-ADA療法を開始した症例では2-3ヶ月頃よりB細胞、CD3陽性の成熟T細胞ともに増加が認められた。しかし、生後1ヶ月時発症で4ヶ月時よりPEG-ADA療法を開始した症例では、B細胞の増加は早期から認められたが、CD3陽性の成熟T細胞の増加は非常に悪かった。特に生後早期から発症するearly onsetの重症例では、末梢血における成熟T細胞の再建が悪く、胎内での胸腺における非可逆的障害が推測された。

【はじめに】

ADA欠損症に対する治療としては、現在のところ骨髄移植が最も確実な治療法である。HLA一致の血縁ドナーがない場合や、患者の全身状態が悪い場合には、ウシ由来ADAをpolyethylene glycolで修飾したPEG-ADA (ADAGEN) による酵素置換療法が有効な治療法となっているが、これまで本邦ではほとんど実施されていない。我々の施設ではこれまでに2例のADA欠損症患者にPEG-ADA療法を実施したので、その免疫学的再建過程、問題点等について報告した。

【対象と方法】

対象は、当科にてPEG-ADA療法を施行したADA欠損症患者2例である。

症例1は、生後8ヶ月時に発症し1才2ヶ月時よりPEG-ADA療法を開始した患者で、遺伝子解析ではmissense mutation, splicing site mutationが確認された。治療開始前の検査では、peripheral lymphocyte count: 525 /ml, FCM: CD3 (24.1%) CD4 (11.9%) CD20 (4.8%), plasma ADA: 0.14 mmol/h/ml, RBC-dAXP: 0.506 mmol/ml RBC, %dAXP: 37.2%であった。PEG-ADAは、38 U/kgを毎週1回筋注で投与

した。

症例2は、生後1ヶ月時に発症し4ヶ月時よりPEG-ADA療法を開始した患者で、遺伝子解析ではmissense mutation, nonsense mutationが確認された。治療開始前の検査では、peripheral lymphocyte count: 74 /ml, FCM: CD3 (35.5%) CD4 (23.3%) CD20 (6.6%), plasma ADA: 0.28 mmol/h/ml, RBC-dAXP: 0.079 mmol/ml RBC, %dAXP: 8.4%であった。PEG-ADAは、42 U/kgを毎週1回筋注で投与した。以上、2症例について、治療後の末梢血でのADA活性、ADAの代謝蓄積物質、リンパ球各分画等の推移について経時的に検査した。

【結果】

症例1では、治療開始後速やかに、plasma ADA活性が上昇し、RBC-dAXPが減少した。それに伴って、末梢血中リンパ球数の増加が認められた (Fig.1)。2-3ヶ月頃にplasma ADA活性と末梢血中リンパ球数の減少が認められたが、その時期に一致してPEG-ADAに対する抗体が確認された。しかし、その変化は一時的で、4-5ヶ月以降plasma ADA活性、末梢血中リンパ球数ともに再度改善が認められた。この症例の末梢血中リンパ球では、

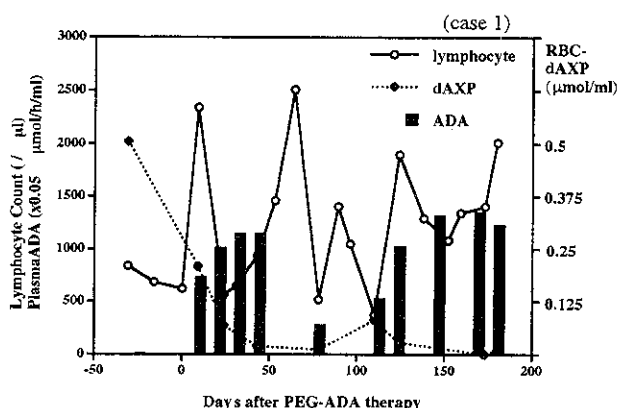


Fig 1. Plasma ADA activity and RBC-dAXP

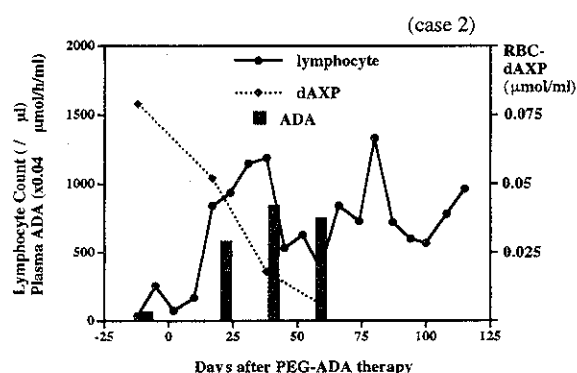


Fig 3. Plasma ADA activity and RBC-dAXP

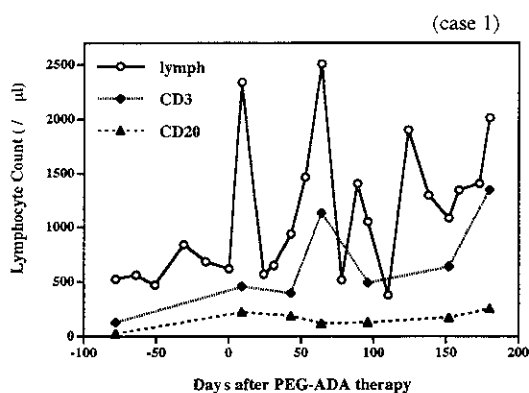


Fig 2. Chronological change of peripheral lymphocyte subsets

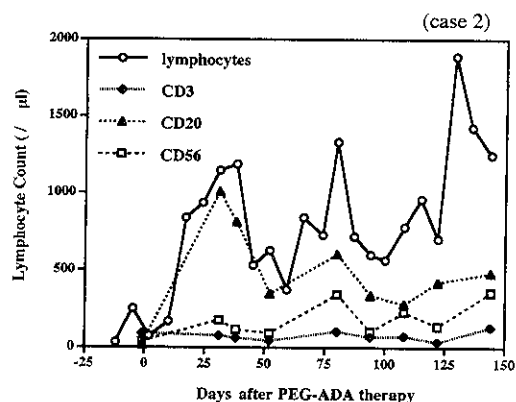


Fig 4. Chronological change of peripheral lymphocyte subsets

B細胞と共にCD3陽性の成熟T細胞が正常の比率で徐々に増加していた (Fig. 2). 一方, 症例 2 でも, 症例 1 と同様に治療開始早期より plasma ADA活性の上昇, RBC-dAXPの減少, 末梢血中リンパ球数の増加が認められた (Fig. 3). この症例の末梢血中リンパ球では, 特にB細胞は早期から増加し, CD2陽性T細胞も徐々に増加したものの, CD3陽性の成熟T細胞の増加は非常に悪かった (Fig. 4).

【考案・結論】

我々が経験した 2 例の ADA欠損症患者に対する PEG-ADA療法では, リンパ球の再建過程に明らかな相違が認められた. 特に生後早期から発症する early onsetの重症例では, 末梢血における成熟T細胞の再建が悪く, 胎内胸腺における非可逆的細胞障害が推測された. PEG-ADA療法は, 細胞内に蓄

積した細胞毒性代謝産物を細胞外で処理する治療法であるため効率が悪く, 重症例ではその効果が不十分である可能性がある. この様な症例でも, PEG-ADA療法を継続することであまり重大な感染症もなく経過しているとの報告もあるが, これは主に非特異的免疫機能の改善によるものと考えられ, 今後更なる検討が必要と考えられる. 一方, PEG-ADA治療で免疫能が改善した症例では, PEG-ADAに対する抗体が産生され, PEG-ADA療法の効果が減弱するケースが多いと報告されている. 成熟T細胞の改善が比較的良好であった症例 1でも, 一旦免疫能の改善が認められた後に一時的に末梢血中リンパ球が低下し, PEG-ADAに対する抗体が検出された. この症例では最終的に成熟T細胞を長期に維持することはできなかった. 以上のことから, PEG-ADA療法の臨床効果は,

ADA遺伝子の異常の程度に依存する可能性が示唆された。いずれにしても、PEG-ADA療法によりある程度の免疫能の改善が認められる症例が多く、有効な治療法と考えられる。さらに、骨髄移植、遺伝子治療等の前段階の治療法としても広く有用と考えられるが、実際的にはその製品価格が非常に高額であることが大きな問題となっている。

【参考文献】

- 1) 仲西正憲, 多米 淳, 古田博文, 小林一郎, 川村信明, 有賀 正, 岡野素彦, 高橋 豊, 崎山幸雄, 松本脩三, 日児会雑誌 98: 1738-1746, 1994
- 2) Onodera M, Ariga T, Kawamura N, Kobayashi I, Ohtsu M, Yamada M, Tame A, Furuta H, Okano M, Matsumoto S, Kotani H, McGarrity GJ, Blaese RM, Sakiyama Y, Successful peripheral T-lymphocyte-directed gene transfer for a patient with severe combined immune deficiency caused by adenosine deaminase deficiency., *Blood* 91: 30-36, 1998
- 3) Hershfield MS, Adenosine deaminase deficiency: clinical expression, molecularbasis, and therapy., *Seminars in Hematology* 35: 291-298, 1998
- 4) Hershfield MS, PEG-ADA replacement therapy for adenosine deaminase deficiency: an update after 8.5 years., *Clin Immunol Immunop* 76: S228-S232, 1995
- 5) Weinberg K, Hershfield MS, Bastian J, Kohn D, Sender L, Parkman R, Lenarsky C, T lymphocyte ontogeny in adenosine deaminase-deficient severe combined immune deficiency after treatment with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase., *J Clin Invest* 92: 596-602, 1993
- 6) Hershfield MS, Chaffee S, Sorensen RU, Enzyme replacement therapy with polyethylene glycol-adenosine deaminase in adenosine deaminase deficiency: overview and case reports of three patients, including two now receiving gene therapy., *Pediatr Res* 33: S42-48, 1993
- 7) Hershfield MS, Buckley RH, Greenberg ML, Melton AL, Schiff R, Hatem C, Kurtzberg J, Markert ML, Kobayashi RH, Kobayashi AL, Abuchowski A: Treatment of adenosine deaminase deficiency with polyethylene glycol-modified adenosine deaminase., *N Engl J Med* 316: 589-596, 1987

PEG-ADA replacement therapy in ADA deficiency

Nobuaki Kawamura ¹⁾, Satoru Ono ¹⁾, Kunihiro Kobayashi ¹⁾, Yukio Sakiyama ²⁾

Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine ¹⁾,

Department of Human Gene Therapy, Hokkaido University School of Medicine ²⁾

We report the immunological reconstitution-process during PEG-ADA replacement therapy in two ADA-deficient patients. The first patient, who had become sick after the age of 8 months and received PEG-ADA replacement therapy since he was one-year and two-months old, showed good response of both B cells and mature CD3-expressing T cells after the therapy. In the other hand, the next patient, who had become sick at the age of 1 month and received PEG-ADA replacement therapy since she was four-months old, showed good response of B cells but not mature CD3-expressing T cells after the therapy. In the severe case of early onset, the reconstitution of mature T cells was not apparent, suggesting the irreversible tissue damage of thymus during the fetus.

IFN- γ が有効であったgp91-*phox*欠損型慢性肉芽腫症

布 井 博 幸 (熊本大学医学部 助教授)

IFN- γ 投与により明らかに好中球活性酸素産生能の改善が得られた世界で第2例目のgp91-*phox*欠損型慢性肉芽腫症を経験した。患者は第3エクソンの3'末端のミスセンス変異であったがアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であり、スプライス異常を示していた。IFN- γ 投与後25日目をピークに20–30%の活性酸素産生の上昇が認められ、正常なgp91-*phox* mRNAも僅かに認められた。この事から、この症例では、IFN- γ が造血幹細胞の選択的スプライス機構に作用し、わずかながら正常なmRNA合成し、活性酸素産生能の再構築を促したものと考えられた。

【研究目的】

慢性肉芽腫症は好中球を含む食細胞活性酸素産生能の欠損が原因である。この活性にかかわるNADPHoxidaseを構成する5蛋白質の解明と遺伝子のクローニングもすでに報告されている。治療としては、ST合剤の予防内服、IFN- γ による感染減少など患者のQOLを改善する対策がなされてきている。さらに、根治的治療法としての骨髄移植も技術の進歩により成功率も上昇し、また、より安全で確実な遺伝子治療技術を求めて研究が進んでいる。我々も、これまで、患者の状態を知るため日本における患者のQOLを含めた基礎的統計、遺伝子解析や遺伝子治療の安全性と有用性に必要な技術の研究を報告してきた。

今回我々は、IFN- γ が臨床的効果はあっても好中球活性酸素産生能の改善が認められないとの報告が多かった中で、明らかに好中球活性酸素産生能の改善する世界で第2例目の症例を経験したので、その機序について考察した。

【研究方法】

1 家系3名のgp91-*phox*欠損型慢性肉芽腫症患者に、インフォームドコンセントを取り、IFN- γ 25 \times 10⁴ JU/M²一回皮下注を行い、活性酸素産生能とgp91-*phox*の発現の経時的変化を追った。

1) 活性酸素産生能検査はDHR-123法を用いてFACS

解析を行った。

2) gp91-*phox*発現については7D5モノクローナル抗体を用いてFACS解析を行った。

3) 塩基配列決定はDye-terminator法で行った。

4) 末梢血好中球からmRNAをAGPC法にて抽出し、gp91-*phox*遺伝子の第3エクソンを含むprimer (第1エクソン:

TGCCACCATGGGGAACTGGGCTGTGAATGAG, 第6エクソン:

GTACCAAAAAGACTTCAAAGTAAGACCTCCGGAT, を設定し、RT-PCR法にて遺伝子解析を行った。

【結果】

1) これら同一家系3名の慢性肉芽腫症患者の遺伝子解析から、図1の様な第3エクソンの3'末端でGからAへの塩基置換が確認された。この変異によるアミノ酸置換はなく、サイレント変異が考えられたため、第三エクソンを含む第1、第6エクソン上のprimerを用いて、RT-PCR法にて解析を行った結果、図2の様に、スプライス変異を起こしていることが確認された。

2) IFN- γ 投与前、患者の好中球活性酸素産生能は正常の1–2%であったが、gp91-*phox*の発現は正常の20–40%であった。IFN- γ 投与後2–4週後には、図3の様に好中球活性酸素産生能

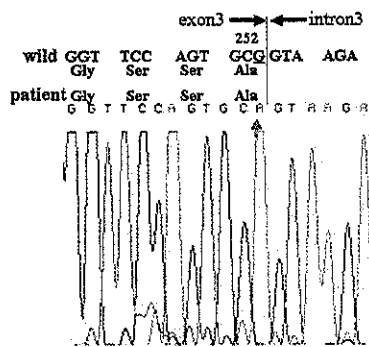


図1 患者の塩基配列決定
gp91-phox遺伝子の第3エクソン3'末端の変異が認められた。

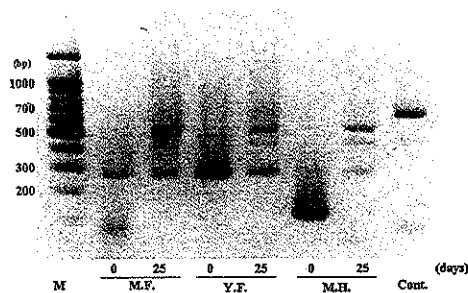


図2 gp91-phox遺伝子のRT-PCR法による解析：
INF- γ 投与前と投与後25日目に、3名(MF, YF, MH)の患者の好中球からmRNAを抽出し、エクソン1と6のprimerによりRT-PCR産物をアガロース電気泳動して解析した。

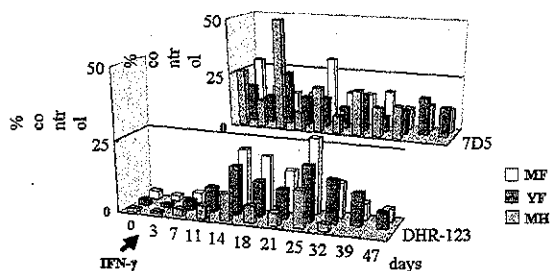


図3 FACSによる患者の活性酸素産生能とgp91-phox蛋白の発現の解析

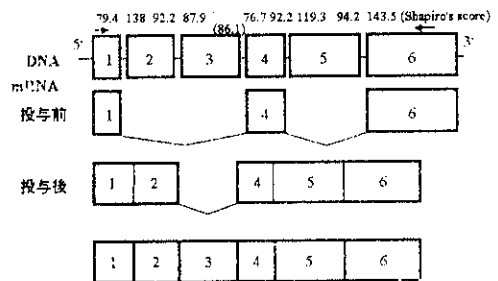


図2 INF- γ 投与前後におけるスプライス異常の解析：
INF- γ 投与前後で得られたRT-PCR産物について、解析できたバンドの塩基配列決定を行った。

が正常の20-30%も上昇が認められたが、gp91-phoxの発現はむしろ低下していた。

- gp91-phox遺伝子のRT-PCR解析から、INF- γ 投与前と投与後25日目でスプライス・パターンには図2のように明らかな変化が認められた。
- これらのバンドの塩基配列決定したところ、図4のような色々なスプライス変異が認められたと同時に、わずかながらの正常なgp91-phox塩基配列を持つバンドも認められた。

【考察】

今回の患者で確認されたスプライス変異は世界で8家系、日本で2家系が知られている比較的多く認められるが、INF- γ を使用した症例の報告はない。これまでINF- γ 使用による活性酸素産生能の回復を明らかにした症例はNewburgerらが報告した1家系だけであり(1)、変異は違うがスプライス異常であったと報告されている(2)。我々の症例の好中球活性酸素産生能の回復パターンも、Newburgerらの症例と同様に、2-4週であった。しかし、活性の回復は彼らの症例が正常まで回復しているのに対し、我々の症例は20-30%の回復に留まっていた。

gp91-phoxの発現が活性酸素産生能と比例しなかったことから、INF- γ 投与前と投与後25日目の好中球からmRNAを抽出し、RT-PCR法にて解析を行った。その結果、投与前後で図2の様にINF- γ 投与前後でスプライスパターンに大きな変化が認められた。これまで、選択的スプライトの変化

により異なったスプライスパターンが起こる遺伝子も多く知られているが、IFN- γ によりスプライスパターンが変化するものとして、iNOS (3), tryptophanyl-tRNA synthetase(4) 等が報告されている。従って、今回の症例でもIFN- γ によりgp91-*phox* 遺伝子の選択的なスプライスの機構に何らかの変化が生じ、スプライスパターンに変化が起こったものと考えられる。IFN- γ 投与後、好中球活性酸素産生能の回復は、正常なcDNA合成が僅かでも認められたことから、正常なgp91-*phox* 蛋白が合成された為ではないかと考えられた。

また、図3の様に、IFN- γ 投与前のgp91-*phox* 発現については、使用した7D5モノクローナル抗体がエクソン5-6にコードされるアミノ酸配列を認識している(私報による)ことから、一部第3エクソンが存在しなくても、抗体の認識部位を変異gp91-*phox*が含まれていた可能性も考えられる。実際、第4と5エクソン間のスプライスが正常に行われ第5と6エクソンを含むmRNAであれば、理論上は全てin frameの組み合わせとなり、正常なgp91-*phox*が合成されることになる。ただ、7D5モノクローナル抗体の認識部位の立体構造の問題があり必ずしも理論通りgp91-*phox*発現を認識するとは限らないので、予測は難しい。

さらに、IFN- γ 投与後2~4週間後に活性の再構築された好中球が出現したことについては、Newburgerらの症例も同様な経過を辿ったこと、IFN- γ が造血幹細胞にSCF存在下では幼若細胞増加的な作用をしていること(5)を考え合わせると、造血幹細胞にIFN- γ が作用してスプライスパターンの変化を促した可能性が高いと考えている。

【結論】

サイレント変異でスプライス異常を示した同一家系3名の患者さんにIFN- γ を投与し30%前後の活性酸素産生能の再構築を認めた。この症例では、IFN- γ が造血幹細胞の選択的スプライス機構に作用し、正常なmRNA合成を促し、活性酸素産生能を再構築した可能性が示唆された。

【参考文献】

- 1) Ezekowitz RA, Dinanuer MC, Jaffe HS, Orkin SH, Newburger PE., Partial correction of the phagocyte defect in patients with X-linked chronic granulomatous disease by subcutaneous interferon gamma. *New England Journal of Medicine*.319(3):146-51, 1988
- 2) Rae J, Newburger PE, Dinanuer MC, Noack D, Hopkins PJ, Kuruto R, Curnutte JT., X-Linked chronic granulomatous disease: mutations in the CYBB gene encoding the gp91-*phox* component of respiratory-burst oxidase. *American Journal of Human Genetics*. 62(6):1320-31, 1998
- 3) Eissa NT, Strauss AJ, Haggerty CM, Choo EK, Chu SC, Moss J. Alternative splicing of human inducible nitric-oxide synthase mRNA. tissue-specific regulation and induction by cytokines. *Journal of Biological Chemistry*. 271(43):27184-7, 1996
- 4) Tolstrup AB, Bejder A, Fleckner J, Justesen J. Transcriptional regulation of the interferon-gamma-inducible tryptophanyl-tRNA synthetase includes alternative splicing. *Journal of Biological Chemistry*. 270(1):397-403, 1995
- 5) Shiohara M, Koike K, Nakahata T. Synergism of interferon-gamma and stem cell factor on the development of murine hematopoietic progenitors in serum-free culture. *Blood*. 81(6):1435-41, 1993

Interferon-gamma partially corrects a variant X-linked chronic granulomatous disease phenotype by improving a splicing mechanism of CYBB gene

Nunoi Hiroyuki, Ishibashi Fuminari, Mizukami Tomoyuki

Department of Pediatrics, Kumamoto University School of Medicine

X-linked chronic granulomatous disease(CGD) is caused by the defects in CYBB gene, which encodes the component gp91-*phox* of the NADPH oxidase. We studied 3 patients in a kindred with a variant X-linked CGD due to a single base substitution at the 3' end of CYBB 3rd exon:GAG/gta-GCA/gta. This nucleotide substitution result in a silent mutation but an alternative splicing. The patients' neutrophils showed a litter superoxide generation (1-2% of normal) by DHR-123 method but a quantitative gp91-*phox* expression (30-40% of normal) by FACS analysis using 7D5 monoclonal antibody. At 11 to 32 days after an administration of gamma-interferon (IFN- γ), a superoxide generation activity of the patients' neutrophils apparently increase (20 to 30 % of normal at the peak) but a gp91-*phox* expression did not. By a RT-PCR analysis of patient's mRNA from the neutrophils, 1 to 2% of normal gp91-*phox* PCR products was detected only after interferon treatment. These facts suggested that a hematopoietic stem cell was induce to make a normal gp91-*phox* mRNA by IFN- γ through some changes of selective splicing mechanism and reconstituted a superoxide generation activity.

IV. 発表文献リスト

研究成果の刊行に関する一覧

(小宮山 淳)

1. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Komiyama A. CD27: a memory B-cell marker. *Immunology Today* 21: 204-206, 2000.
2. Nakazawa T., Koike K., Agematsu K., Komiyama A. Cytogenetic clonality analysis in monosomy 7 associated with juvenile myelomonocytic leukemia: clonality in B and Nk cells. *Leukemia Research* 22: 887-892, 1999.
3. Yasui K, Agematsu K, Komiyama A Recombinant human granulocyte colony-stimulating factor therapy for sepsis in infants with neutropenia.. *Pediatrics* 103: 1310-1, 1999
4. Shiohara M, Dawson MI, Hobbs PD, Sawai N, Higuchi T, Koike K, Komiyama A, Koeffler HP. Effects of novel RAR- and RXR-selective retinoids on myeloid leukemic proliferation and differentiation in vitro. *Blood* 93:2057-66, 1999.
5. Yasui K, Shinozaki K, Nakazawa T, Agematsu K, Komiyama A. Presenility of granulocytes in Down syndrome individuals. *Am J Med Genet* 84:406-12, 1999.
6. Nakazawa T, Agematsu K, Yasui K, Onodera T, Inoue R, Kaneko K, Kondo N, Yamamoto Y, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, and Komiyama A. Cytolytic Mechanisms Involved in Non-MHC-Restricted Cytotoxicity in Chediak-Higashi Syndrome. *Clin Exp Immunol* 118:108-114, 1999.
7. Agematsu K, Hokibara S, Nagumo H, Shinozaki K, Yamada S, and Komiyama A. Plasma cell generation from B-lymphocytes via CD27/CD70 interaction. *Leukemia and lymphoma* 35:219-225, 1999.
8. Inaba Y, Ichikawa M, Koh CS, Inoue A, Itoh M, Kyogashima M, Komiyama A. Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by dermatan sulfate. *Cell Immunol* 198:96-102, 1999.
9. Sawai N, Koike K, Kato T, Miyazaki H, Yamashita T, Komiyama A. Thrombopoietin augments stem cell factor-dependent growth of human mast cells from bone marrow multipotential hematopoietic progenitors. *Blood* 93: 3703-12, 1999.
10. Ichikawa M, Koh CS, Inoue A, Tsuyusaki J, Yamazaki M, Inaba Y, Sekiguchi Y, Itoh M, Yagita H, Komiyama A. Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of multiple sclerosis-like relapsing--remitting demyelinating disease in NOD mice induced with myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide. *J Neuroimmunol* 102:56-66 1999.
11. Yasui K, Agematsu K, Shinozaki K, Hokibara S, Nagumo H, Nakazawa T, and Komiyama A. Theophylline induces neutrophil apoptosis through adenosine A2A receptor antagonism. *J Leukocyte Bio.* 67: 529-535. 2000
12. Hokibara S, Agematsu K, and Komiyama A. B-cell development and primary immunodeficiencies with hypogammaglobulinemia. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis.* in press.
13. Kanegane H., Tsukada S., Iwata T., Futatani T., Nomura K., Yamamoto J., Yoshida T., Agematsu K., Komiyama A., and Miyawaki T. : Detection of Bruton's tyrosine kinase mutations in hypogammaglobulinemic males registered as common variable immunodeficiency in the Japanese immunodeficiency registry. *Clin. Exp. Immunol.* in press
14. Yasui K, Agematsu K, Shinozaki K, Hokibara S, Nagumo H, Hagumo, H, Yamada S, Kobayashi N and Komiyama A. Theophylline's effect on human functions: comparative study with neutrophil functions. *J Leukocyte Bio.* In press

(谷内江昭宏)

1. Zeng, W., S. Nakao, H. Takamatsu, A. Yachie, A. Takami, Y. Kondo, N. Sugimori, H. Yamazaki, Y. Miura, S. Shiobara and T. Matsuda. Characterization of T-cell repertoire of the bone marrow in immune-mediated aplastic anemia: evidence for the involvement of antigen-driven T-cell response in cyclosporine-dependent aplastic anemia. *Blood* 93: 3008-3016,

1999.

2. Ohta, T., H. Tajima, A. Yachie, K. Yokoyama, A. Elnemr, S. Fushida, H. Kitagawa, M., Kayahara, G. Nishimura, K. Miwa, M. Yamamoto, Tadashi Terada and Shoji Ohkuma. Activated lansoprazole inhibits cancer cell adhesion to extracellular matrix components. *Int. J. Oncol.* 15: 33-39, 1999.
3. Kanegane, H., T. Miyawaki, A. Yachie, T. Oh-Ishi, H. Bhatia and G. Tosato. Development of EBV-positive T-cell lymphoma following infection of peripheral blood T cells with EBV. *Leukemia and Lymphoma* 34: 603-607, 1999.
4. Wada, T., T. Toma, S. Shimura, M. Kudo, Y. Kasahara, S. Koizumi, C. Ra, H. Seki and A. Yachie. Age-dependent increase of IgE-binding and FcεRI expression on circulating basophils in children. *Pediatr. Res.* 46: 603-607, 1999.
5. Wada, T., K. Takei, M. Kudo, S. Shimura, Y. Kasahara, S. Koizumi, K. Kawa-Ha, Y. Ishida, S. Imashuku, H. Seki and A. Yachie. Characterization of immune function and analysis of RAG gene mutations in Omenn syndrome and related disorders. *Clin. Exp. Immunol.* 119: 148-155, 2000.
6. 谷内江昭宏：RAG 遺伝子の異常と免疫不全 —SCID と Omenn 症候群— 免疫 *Immunology Frontier* 9: 51-56, 1999.
7. 和田 泰三, 谷内江昭宏：Omenn 症候群と RAG 遺伝子異常 矢田 純一, 奥村 康, 佐藤 昇志 編 Annual Review 免疫 2000 p328-334 中外医学社 (東京) 1999.
8. 太田 哲生, Ayman Elnemr, 北川 裕久, 伏田 幸夫, 西村 元一, 藤村 隆, 萱原 正都, 清水 康一, 三輪 晃一, 谷内江昭宏：N-ethylmaleimide (NEM) による癌細胞膜表面の phosphatidylserine externalization と, その後のマクロファージの貪食による腫瘍免疫療法の可能性 *医学のあゆみ* 188: 285-286, 1999.

(岩田 力)

1. Junko Kizu, Motoki Arakawa, Yoshihiro Arakawa, Fusako Komoda, Masaru Takamizawa, Tsutomu Iwata, Tetsuo Hayakawa and Kazuhiro Imai : Enhanced theophylline metabolism in patients with bronchial asthma at age 4 and under. *Biomedical Chromatography* 13:462-464, 1999
2. Takashi Igarashi, Jun Inatomi, Akiko Wake, Masaru Takamizawa, Hajime Katayama, and Tsutomu Iwata: Failure of pre-diarrheal antibiotics to prevent hemolytic uremic syndrome in serologically proven *Eshelichia coli* O157:H7 gastrointestinal infection. *Journal of Pediatrics* 135:768-9, 1999
3. J. Kizu, S. Watanabe, N. Yasuno, Y. Arakawa, S. Uzu, S. Kanda, F. Komoda, T. Iwata, H. Hayakawa, T. Hayakawa, and K. Imai : Development and clinical application of high performance liquid chromatography for the simultaneous determination of plasma levels of theophylline and its metabolites without interference from caffeine. *Biomed Chromatogr* 13: 15-23, 1999
4. 高見沢 勝, 岩田 力, 渡辺 薫, 十字 猛夫, 長田 卓也, 柴田 洋一, Edgar G. Engleman : 末梢血樹状細胞による active immunotherapy *日本皮膚科学会雑誌* 108 (12):1677-1699, 1998
5. 岩田 力：急性気管支炎, 喘息性気管支炎 今日の治療指針1999年版 (vol.41) (総編集 多賀須 幸男, 尾形 悦郎) p.788-789 医学書院, 1999年1月1日
6. 十字 文子, 狩野 博嗣, 成田 雅美, 渋谷 紀子, 成高 信一, 北浦 次郎, 菅原 由人, 笹川 秋彦, 岩田 力：低アレルゲン米の有用性について—CAST法を用いての検討. *アレルギー* 48(1): 56-63, 1999
7. 岩田 力：日常よくみる疾患のプライマリーケア 食物アレルギー *臨床と研究* 76(3): 494-498, 1999
8. 岩田 力：その他のウイルスによる免疫抑制の機序 (講座：ウイルスと免疫不全) *アレルギー・免疫* 6(4): 580-583, 1999

9. 岩田 力：アレルギー性疾患におけるいわゆる抗アレルギー薬の意義 小児内科 31(3):313-316, 1999
10. 岩田 力：アトピー性皮膚炎－小児科の立場から－ 小児科診療62巻増刊号 小児の治療指針 pp.142-144, 1999
11. 岩田 力：免疫グロブリン 今日の小児診断指針（編集：前川 喜平，白木 和夫，安次嶺 馨）第3版 pp.339-342 医学書院，東京，1999
12. 森川 昭廣，岩田 力，永倉 俊和：ぜんそく（喘息） 小児慢性特定疾患治療マニュアル（監修：柳澤 正義）診断と治療社，pp90-99，東京，1999
13. 岩田 力：気管支拡張薬 小児科研修医ノート（監修：柳澤 正義，編集：山中龍宏，五十嵐 隆，渡辺 博）診断と治療社，pp.605-609，東京，1999
14. 岩田 力：上気道炎 外来患者の素朴な疑問に応える一家庭でのケアとその指導Q&A－小児科 40(7): 770-775, 1999
15. 岩田 力：気管支喘息の管理 小児科臨床 52(11): 2119-2123, 1999
16. 岩田 力：アレルギー・免疫疾患による血液学的変化 小児内科 31(10): 1391-1393, 1999
横山 美貴，太神 和廣，岩田 力：9) 呼吸器 特集 診断基準と治療の基本－最近の進歩－ 小児科臨床 52(12): 2255-2260, 1999

(小林邦彦)

1. Yamada, M., Ariga, T., Ohtsu, M., Kobayashi, I., Kawamura, N., Tsuruta, S., Anakura, M., Ishikawa, N., Nelson, D.L., Sakiyama, Y. and Kobayashi, K.: Flow cytometric analysis of Wiskott-Aldrich syndrome (WAS) protein in lymphocytes from WAS patients and their familial carriers. *Blood* 93:756-759, 1999
2. Hagiwara, K., Ouchi, K., Tashiro, N., Azuma, M. and Kobayashi, K.: An Epidemic of a Pretties-like Illness Caused by Chlamydia Pneumoniae. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18(3):271-5, 1999
3. Okamura, A., Yoshioka, M., Kubota, M., Kikuta, H., Ishiko, H., and Kobayashi, K.: Detection of a Novel DNA Virus (TTV) Sequence in Peripheral Blood Mononuclear Cells. *J. Med. Virology* 58:174-177, 1999
4. Kawamura, N., Ariga, T., Ohtsu, M., Kobayashi, I., Yamada, M., Tame, A., Furuta, H., Okano, M., Egashira, M., Niikawa, N., Kobayashi, K. and Sakiyama, Y.: In vivo kinetics of transduced cells in peripheral T cell-directed gene therapy: Role of CD8+ cells in improved immunological function in an adenosine deaminase (ADA)-SCID patient. *J. Immunol.* 163:2256-2261, 1999
5. Kobayashi, I., Imamura, K., Kubota, M., Ishikawa, S., Yamada, M., Tonoki, H., Okano, M., Moriuchi, T., Sakiyama, Y. and Kobayashi, K.: Identification of An Autoimmune Enteropathy-related 75 kDa Antigen. *Gastroenterology*. 117(4):823-830, 1999;
6. Mafune, M., Kobayashi, K., Nishioka, M., Watanabe, M. and Sasaki, M.: Autoantibody to the Liver Arginase Present in Sera of Patients with Autoimmune Hepatitis and Chronic Hepatitis. *Autoimmunity* 30(3):147-155, 1999
7. Takahashi, T., Iwase, T., Tachibana, T., Komiyama, K., Kobayashi, K., Chen, C-L.H., Mestecky, J. and Moro, I.: Cloning and expression of the chicken immunoglobulin joining (J)-chain cDNA. *Immunogenetics* 51(2), 85-91, 2000
8. Yamada, M., Ariga, T., Kawamura, N., Ohtsu, M., Imajoh-Ohmi, S., Ohshika, E., Tatsuzawa, O., Kobayashi, K., Sakiyama, Y.: Genetic studies of three Japanese patients with p-22-phox deficient chronic granulomatous disease; Detection of a possible common mutant CYBA allele in Japan and genotype-phenotype correlation in these patients. *Br J Haematol.* in

press

9. 草薙睦子, 藤田清貴, 桜林郁之介, 鈴木徳和, 寺邑能美, 岡本恵智子, 小林邦彦, 吉岡尚文, 荒川正明: セルロースアセテート膜 (Separax-SP) と反応するIgA1- κ 型-蛋白の免疫化学的特性. 生物物理化学43:147-151, 1999
10. 岡野素彦, 小林邦彦: 原発性免疫不全症の病理. 臨床検査43(4):388-398, 1999

(小安重夫)

1. Matsuda, S., Minowa, A., Suzuki, S. and Koyasu, S. (1999) Differential activation of JNK and p38 pathways during FTY720 induced apoptosis of T lymphocytes that is suppressed by ERK pathway. *J. Immunol.* 162:3321-3326.
2. Ohteki T., Maki, C., Koyasu, S., Mak, T. W. and Ohashi, P. S. (1999) Requirement of LFA-1 for liver NKT cell development: evidence for heterogenous origin of liver NKT cells. *J. Immunol.* 162:3753-3756.
3. Ohteki, T., Fukao, T., Suzue, K., Maki, C., Ito, M., Nakamura, M. and Koyasu, S. (1999) Interleukin-12 dependent interferon production by CD8+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189:1981-1986.
4. Matsuda, S., Suzuki-Fujimoto, T., Minowa, A., Ueno, H., Katamura, K. and Koyasu, S. (1999) Temperature-sensitive ZAP70 mutants degrading through a proteasome-independent pathway: restoration of a kinase domain mutant by Cdc37. *J. Biol. Chem.* 274:34515-34518.
5. Ueno, H., Matsuda, S., Katamura, K., Mayumi, M. and Koyasu, S. (2000) ZAP70 is required for calcium mobilization but is dispensable for MAPK superfamily activation in human T cells stimulated via CD2. *Eur. J. Immunol.* 38:71-76.
6. Fukao, T., Matsuda, M. and Koyasu, S. (2000) Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12 dependent interferon production by dendritic cells. *J. Immunol.* 164:64-71.

(近藤直実)

1. Shimozawa.N, Suzuki.Y, Zhang.Z, Miura.K, Matsumoto.A, Nagaya.M, Taucher.S.C, Kondo.N. A novel nonsense mutation of the PEX7 gene in a patient with rhizomelic chondrodysplasia punctata. *J Hum Genet* 44 :123-125, 1999.
2. Matsuzono.Y, Kinoshita.N, Tamura.S, Shimozawa.N, Hamasaki.M, Ghaedi.K, Wanders.R.J.A, Suzuki.Y, Kondo.N, Fujiki Y. Human PEX19: cDNA cloning by functional complementation, mutation analysis in a patient with Zellweger syndrome, and potential role in peroxisomal membrane assembly. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 96 : 2116-2121, 1999.
3. Orii.KE, Orii.KO, Souri.M, Orii.T, Kondo.N, Hashimoto.T, Aoyama.T. Genes for the human mitochondrial trifunctional protein α - and β -subunits are divergently transcribed from a common promoter region. *J Biol Chem* 274 :8077-8084, 1999.
4. Suzuki.Y, Zhang.Z, Shimozawa.N, Muro.M, Shono.H, Toda.S, Miyahara.S, Hashimoto.T, Usuda.N, Ito.M, Takashima.S, Kondo.N, Prenatal diagnosis of peroxisomal D-3-hydroxyacyl-CoA dehydratase / D-3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase bifunctional protein deficiency. *J Hum Genet* 44 : 143-147, 1999.
5. Shimozawa.N, Suzuki.Y, Zhang.Z, Imamura.A, Toyama.R, Mukai.S, Fujiki.Y, Tsukamoto.T, Osumi.T, Orii.T, Wanders.R.J.A, Kondo.N, Nonsense and temperature-sensitive mutations in PEX13 are the cause of complementation group H of peroxisome biogenesis disorders. *Hum Mol Genet* 8 : 1077-1083, 1999.
6. Ghaedi.K, Itagaki.A, Toyama.R, Tamura.S, Matsumura.T, Kawai.A, Shimozawa.N, Suzuki.Y, Kondo.N, Fujiki.Y. Newly identified chinese hamster ovary cell mutants defective in peroxisome assembly represent complementation group A of human peroxisome biogenesis disorders and one novel group in mammals. *Experimental Cell Research* 248: 482-488, 1999.

7. Ghaedi.K, Kawai.A, Okumoto.K, Tamura.S, Shimozawa.N, Suzuki.Y, Kondo.N, Fujiki.Y. Isolation and characterization of novel peroxisome biogenesis-defective chinese hamster ovary cell mutants using green fluorescent protein. *Experimental Cell Research* 248: 489-497, 1999.
8. Zhang.Z, Suzuki.Y, Shimozawa.N, Fukuda.S, Imamura.A, Tsukamoto.T, Osumi.T, Fujiki.Y, Orii.T, Wanders.R.J.A, Barth.P.G, Moser.H.W, Paton.B.C, Besley.G.T, Kondo.N. Genomic structure and identification of 11 novel mutations of the PEX6 (peroxisome assembly factor-2) gene in patients with peroxisome biogenesis disorders. *Hum Mutat* 13: 487-496, 1999.
9. Agata H, Kawakami N, Kondo N, Hayashi T, Fukutomi O, Shimizu H, Orii T. Differences of genetic effects for the development of allergic diseases in two cities of Japan. *Annals Allergy Asthma & Immunol*: 82(6), 586-590, 1999.
10. Fukao T, Kaneko H, Birrell G, Gatei M, Tashita H, Yoshida T, Cross S, Kedar P, Watters D, Khana K.K, Misko I, Kondo N, Lavin M.F. ATM is upregulated during the mitogenic response in peripheral blood mononuclear cells. *Blood*: 94, 1998-2006, 1999.
11. Shimozawa N, Zhang Z, Suzuki Y, Imamura A, Tsukamoto T, Osumi T, Fujiki Y, Orii T, Barth P.G, Wanders R.J.A, Kondo N. Functional heterogeneity of C-terminal peroxisome targeting signal 1 in PEX5-defective patients. *Biochem Biophys Res Commun*: 262, 504-508, 1999.
12. Toyama R, Mukai S, Itagaki A, Tamura S, Shimozawa N, Suzuki Y, Kondo N, Wanders R.J.A, Fujiki Y. Isolation, characterization and mutation analysis of PEX13-defective chinese hamster ovary cell mutants. *Hum Mol Genet*: 8, 1673-1681, 1999.
13. Shimozawa N, Imamura A, Zhang Z, Suzuki Y, Orii T, Tsukamoto T, Osumi T, Fujiki Y, Wanders R.J.A, Besley G, Kondo N. Defective PEX gene products correlate with the protein import, biochemical abnormalities, and phenotypic heterogeneity in peroxisome biogenesis disorders. *J Med Genet*: 36, 779-781, 1999.
14. Nakazawa T, Agematsu K, Yasui K, Onodera T, Inoue R, Kaneko H, Kondo N, Yamamoto M, Kayagaki N, Yagita H, Okumura K, Komiyama A. Cytolytic mechanisms involved in non-MHC-restricted cytotoxicity in Chediak-Higashi syndrome. *Clin Exp Immunol*: 118, 108-114, 1999.
15. Kaneko H, Matsui E, Fukao T, Kasahara K, Morimoto W, Kondo N. Expression of the BLM gene in human haematopoietic cells. *Clin Exp Immunol*: 118, 285-289, 1999.
16. Matsui E, Kaneko H, Fukao T, Teramoto T, Inoue R, Watanabe M, Kasahara K, Kondo N. Mutations of the IL-12 receptor β 2 chain gene in some atopic subjects. *Biochem Biophys Res Commun*: 266, 551-555, 1999.
17. Zhang Z, Suzuki Y, Shimozawa N, Kawabata I, Tamaya T, Sato K, Kondo N. Prenatal diagnosis of peroxisome biogenesis disorders by means of immunofluorescence staining of cultured chorionic villous cells. *Clin Genet*: 56, 467-468, 1999.
18. Shimozawa N, Zhang Z, Imamura A, Suzuki Y, Fujiki Y, Tsukamoto T, Osumi T, Aubourg P, Wanders R.J.A, Kondo N. Molecular mechanism of detectable catalase-containing particles, peroxisomes in fibroblasts from PEX2 defective patient. *BBRC*: 6801, 619-699 (in press)
19. 近藤直実, 寺本貴英, 松井永子, 金子英雄, 深尾敏幸, 笠原貴美子, 鹿野博明, 寺田知新: IgE産生の分子生物学. *小児内科* 31: 279-284, 1999
20. 近藤直実, 藤井秀比古, 福富悌, 楨明子, 加藤義弘, 篠田紳司, 松岡敏男, 清島 満: 運動誘発気道収縮と自律神経系. *アレルギー科* 7: 240-249, 1999
21. 近藤直実: アレルギーと遺伝. *毎日ライフ* 4: 20-23, 1999

22. 近藤直実, 金子英雄, 深尾敏幸, 伊上良輔, 寺本貴英, 田下秀明, 加藤善一郎, 松井永子, 寺田知新, 鹿野博明, 笠原貴美子, 森本航, 小見山圭代, 森本直子: 免疫不全とアレルギー—分子遺伝学と構造生物学—. アレルギー科7: 316-324, 1999
23. 近藤直実, 深尾敏幸, 金子英雄, 笠原貴美子, 吉田任子: Ataxia telangiectasia (毛細血管拡張性失調症). 臨床検査43: 434-439, 1999
24. 近藤直実: ATM遺伝子. 医学のあゆみ—シグナル伝達からみた癌の分子機構—別冊, 63-68, 1999
25. 近藤直実, 深尾敏幸, 平山耕一郎, 坂本龍雄, 鳥居新平: 小児気管支喘息患児と親又は保護者のQOL調査票の評価—徐放性テオフィリンシロップ投与前後における評価—. アレルギー48(5): 533-545, 1999
26. 近藤直実: 小児アトピー疾患における遺伝とサイトカインとの関係. アレルギー科8(1), 38-45, 1999
27. 近藤直実, 松井栄子, 鹿野博明, 寺田知新, 渡辺みづほ, 坂口平馬, 森本直子, 吉田任子: 食物アレルギーの病態と臨床. アレルギー臨床255(19): 18-23 (1093-1098) 1999
28. 近藤直実: アレルギー疾患の遺伝子解析. 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか(4) 第5版 増刊号57—, 750-755, 1999
29. 近藤直実, 鈴木康之, 下澤伸行, 高橋幸利, 深尾敏幸: 小児神経疾患の遺伝子診断. 広範囲 血液・尿化学検査 免疫学的検査—その数値をどう読むか(4) 第5版 増刊号57—: 700-706, 1999
30. 近藤直実: 好酸球増多. 今日の小児診断指針3, 294-296, 1999

(齊藤 隆)

1. Regnault, A., Lankar, D., Lacabanne, V., Rodriguez, A., Rescigno, M., Saito, T., Verbeek, S., Bonnerot, C., Ricciardi-Castagnoli, P. and Amigorena, S.: FcR γ -mediated induction of dendritic cell maturation and MHC class I-restricted antigen presentation after immune complex internalization. *J. Exp. Med.* 189:371-380, 1999.
2. Ohno, H., Tomemori, T., Nakatsu, F., Okazaki, Y., Aguilar, C., Foelsch, H., Saito, T., Shirasawa, T., Mellman, I. and Bonifacio, J. S.: μ 1B, a novel adaptor medium chain expressed in polarized epithelial cells. *FEBS Letters* 499:215-220, 1999.
3. Otsuji, M., Aoe, T., Kimura, Y., Okamoto, Y. and Saito, T. (1999): Oxidative stress by tumor-derived macrophages and abnormal structure of T-cell receptor complex. In: Packer, L. and Yodoi, J. (eds) *Redox Regulation of Cell Signaling and its Clinical Application*. Marcel Dekker, Inc., New York, pp49-64.
4. van Egmond, M., van Vuuren, H., Morton, H. C., van Spruiel, A. B., Shen, L., Hofhuis, F. M. A., Saito, T., Mayadas, T. N., Verbeek, J. S. and van de Winkel, J. G.: Human IgA receptor (FcaRI, CD89) function in transgenic mice requires both FcR γ chain and CR3(CD11b/CD18). *Blood* 93:4387-4394, 1999.
5. Yamazaki, T., Hamano, Y., Tashiro, H., Ito, K., Nakano, H., Miyatake, S. and Saito, T.: CAST, a novel CD3e-binding protein transducing activation signal for IL-2 production in T cells. *J. Biol. Chem.* 274:18173-18180, 1999.
6. Wild, M.K., Cambiaggi, A., Brown, M.H., Davies, E.A., Ohno, H., Saito, T. and van der Merwe: Dependence of T cell antigen recognition on the dimensions of an accessory receptor-ligand complex. *J. Exp. Med.* 190:31-41, 1999.
7. Arase, K., Saijo, K., Watanabe, H., Konno, A., Arase, H., and Saito, T.: Ablation of a specific cell population by the replacement of a uniquely expressed gene with a toxin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:9264-9268, 1999.