

図 7. D8.4 T cell line の細胞内染色

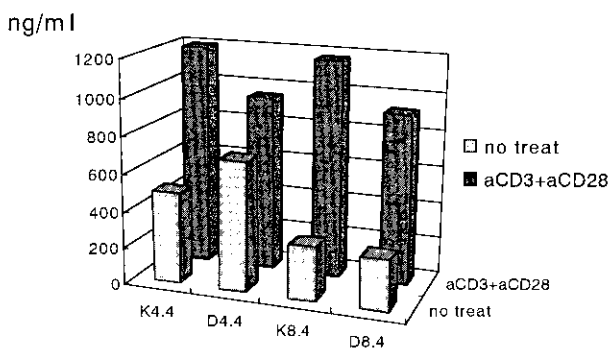


図 8. CD8<sup>+</sup> T cell の IFN- $\gamma$  production

一方、XLPにおける細胞傷害性T細胞機能については現在まだcontroversialな部分が多い<sup>9, 10)</sup>。この原因として、患者のどのような状態で採血した検体か、すなわちEBウイルス感染の前か、感染中か、あるいは後か、また患者のSAP遺伝子異常との関係、さらにはどのような系で細胞傷害性T細胞の機能測定を行ったか、などの違いが関与している可能性が考えられる。

今回の我々の系はHLA非特異的に、抗CD3抗体によって刺激されたT細胞が標的細胞であるFas<sup>+</sup> EB-1を傷害する実験系であるが、明かなCTL活性の低下を認めた。NK細胞と、CTLの両方の機能障

害を認めたことは、両細胞に共通する細胞傷害性の機構の異常が示唆される。これらの細胞が傷害性を発揮するためには、effector cellとtarget cellが多くのそれぞれの細胞に特異的なレセプターや接着分子を介して密接に接着すること、またその結果として、perforin, Granzyme系のeffector分子が放出されること等が必要である。従って、次には接着分子の発現や、放出顆粒のin vitroでの測定を行うことが機能障害の原因を明らかにしていくと考えられる。さらにCTLの系にはFas/FasL系も関与している事が報告されている。今回細胞傷害性T細胞の機能を標的細胞としてFas<sup>+</sup> EB-1を用いて検討したため、もしFas/FasL系が働く実験系であればCTL活性が少しはrestoreされる可能性もある。XLPではNK細胞, 細胞傷害性T細胞の機能異常が、単にEBウイルス感染の重症化に関係しているのみならず、感染以前のlymphomaの発症などにつながっていることも予想される。また、SAP knock out miceではCD8陽性T細胞のみならず、CD4陽性T細胞のTh1へのskewingも報告されている。

残念ながら今回作成した正常T細胞株は、培養を続けるうちにCTL活性を失ってしまったため、これらの以後の解析が不可能になった。稀少疾患であるだけに、全国的な研究体制を作り、その病態を明らかにする試みが必要と思われる。

#### 【参考文献】

- 1) Primary Immunodeficiency diseases : p.222-232. Edited by Ochs H.D., Smith C.I.E. and Puck J. M. OxfordUniversity Press New York.
- 2) Brandau O., Schuster V., Weiss M., *et al.* Epstein-Barr virus-negative boys with non-Hodgkin lymphoma are mutated in the SH2D1A gene, as are patients with X-linked lymphoproliferative disease (XLP). *Human Molecular Genetics* 8:2407-2413, 1999.
- 3) Sayos J., Wu C., Morra M., *et al.* The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395: 462-469, 1998.
- 4) Coffey A. J., Brooksbank R. A., Brandau O., *et al.* Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nature Genetics* 20:129-135, 1998.
- 5) Lichtenfels R., Biddison W.E., Schulz H., *et al.* CARE-LASS (calcein-release-assay), an improved fluorescence-based system to measure cytotoxic T lymphocyte activity. *J. Immunol. Method.* 172:227-239, 1994.
- 6) Sullivan J. L., Byron K. S., Brewster F. E., *et al.* Deficient natural killer cell activity in the X-linked lymphoproliferative syndrome. *Science* 210:543-545, 1980.
- 7) Parolini S., Bottino C., Falco M., *et al.* X-linked lymphoproliferative disease: 2B4 molecules displaying inhibitory rather than activating function are responsible for the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected cells. *J. Exp. Med.* 192:337-346, 2000.
- 8) Bottino C., Falco M., Parolini S., *et al.* NTB-A, a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease. *J. Exp. Med.* 194:235-246, 2001.
- 9) Rousset F., Souillet G., Roncarolo M.G., *et al.* Studies of EBV-lymphoid cell interactions in two patients with the X-linked lymphoproliferative syndrome: normal EBV-specific HLA-restricted cytotoxicity. *Clin. Exp. Immunol.* 63:280-289, 1986.
- 10) Harada S., Sakamoto K., Seeley J. K., *et al.* Immune deficiency in the X-linked lymphoproliferative syndrome. I. Epstein-Barr virus-specific defects. *J. Immunol.* 129:2532-2535, 1982.
- 11) Wu C., Nguyen K. B., Pien G. C., *et al.* SAP controls T cell responses to virus and terminal differentiation of TH2 cells. *Nature Immunol.* 2:410-414, 2001.

## Functional analysis of NK cells and Cytotoxic T cells in a patient with X-linked lymphoproliferative disease

Kenji Katamura<sup>1</sup>, Takahiro Yasumi<sup>1</sup>, Satoshi Matsuda<sup>2</sup>, Shigeo Koyasu<sup>2</sup>, Mitsufumi Mayumi<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine, Kyoto University

<sup>2</sup> Department of Immunology, Keio University School of Medicine

<sup>3</sup> Department of Pediatrics, Fukui Medical University

We analyzed the function of NK cells and cytotoxic T cells in a patient with X-linked lymphoproliferative disease (XLP). NK cell function was assessed in two different systems. One system used NK-sensitive K562 cells as target cells and the other was the re-direct assay system using NK-nonsensitive P815 cells as target cells with anti-CD16 mAb, which linked CD16 on NK cells and Fc $\gamma$  receptor on P815 cells. In both assay systems, NK function of the XLP patient was remarkably decreased. We also analyzed anti-CD3-dependent cytotoxic T lymphocyte (CTL) activity using EB-virus-transformed Fas<sup>-/-</sup> B cell line as target cells. Both patient-derived T lymphoblasts and HTLV-I-transformed CD8<sup>+</sup> T cell line had decreased CTL activity. The intracellular staining demonstrated FasL, Granzyme A and Granzyme B in HTLV-I-transformed CD8<sup>+</sup> T cell line from XLP. Furthermore, these transformed cells produced a large amount of IFN- $\gamma$  upon stimulation with anti-CD3 and anti-CD28 mAbs. These results suggested the defects to adhere to target cells or to release effector molecules to kill target cells in patient's NK cells and cytotoxic T cells.

---

## 日本人の原発性リンパ組織球性血球貪食症候群における Perforin 異常

菅 尚 浩 (九州大学 成長発達医学)  
高 田 英 俊 (九州大学 成長発達医学)  
野 村 明 彦 (九州大学 成長発達医学)  
大 賀 正 一 (九州大学 成長発達医学)  
井 原 健 二 (九州大学 成長発達医学)  
石 井 榮 一 (九州大学 成長発達医学)  
(佐賀医科大学 小児科)  
大 島 孝 一 (福岡大学 第一病理)  
原 寿 郎 (九州大学 成長発達医学)

### 【緒言】

HLHは発熱，血球減少，肝脾腫，播種性血管内凝固を呈する稀な小児疾患である<sup>(1)</sup>。原発性HLHは常染色体劣性の形式をとる遺伝性疾患で，同種造血幹細胞移植を行わない限りは致命的経過をたどる<sup>(2)</sup>。二次性HLHは悪性疾患，リウマチ性疾患や，EBVをはじめとする種々の感染症などが原因となって起こるため，家族歴がない乳幼児に同種造血幹細胞移植を行うのは難しい。FHLは9q21.3.22に関連したFHL1<sup>(3)</sup>，10q21.22に関連したFHL2<sup>(4)</sup>と，まだ遺伝子座が特定されていないもう一つの型<sup>(5)</sup>に分類されている。1999年，Steppらが10q21.22に異常のあるFHL患者の家系を調べたところ，患者全員にパーフォリン遺伝子の変異があり，それによるパーフォリンの異常がFHL2の原因であると報告した<sup>(6)</sup>が，その遺伝子型と表現型はまだはっきりとわかっていない。今回の研究では，日本における原発性HLHにおけるパーフォリン異常の有無を，遺伝子検査，フローサイトメトリーと免疫染色で調べた。

### 【対象と方法】

**患者** 1986年から1998年にJapan Children's Cancer Registryに登録された22人の日本人小児の原発性HLH患者の遺伝子解析を行った。うち6例は発症年齢が2歳以上であったり，二次性HLHと診断されたため，この研究から除外した。HLHの診断は

Henter, Imashukuらのガイドライン<sup>(1,7)</sup>に従った。原発性HLHのうち，HLHの家族歴を有する患者のみをFHL，家族歴のないものを散発性HLHと定義した。非血縁の15家系のうち，9例がFHLと診断され，7例が散発性HLHと診断された (Table I)。患者6と患者6'が同胞だった。近親婚はなかった。

**遺伝子配列検査** genomic DNAはインフォームドコンセントを得た後，標準的なプロトコールで末梢血から抽出された。パーフォリン遺伝子のExon 2とExon 3はnested polymerase chain reaction (PCR)によって増幅された。既知のPCRプライマー<sup>(6)</sup>に加えて，別表のプライマー (Table II) を使用した。First PCRの条件は94℃，2分，1サイクル，94℃，1分，60℃，1分，72℃，1分を40サイクル，最後の進展を72℃，5分，1サイクルで行った。Second PCRはfirst PCRと温度条件は同じだが，40サイクルのところを30サイクルで行った。DNA sequence analyzer (ABI 310, Perkin-Elmer Biosystems, Foster City, CA) によってダイレクトシーケンスを行った。

**Flow cytometry** 末梢血の単核球はブロッキング処理の後，phycoerythrin cyanin 5.1 (PC5) 結合-抗CD8または抗CD16モノクローナル抗体 (Immunotech Coulter社) によって染色した。膜透過処理後，fluorescein isothiocyanate (FITC) 結合-抗パーフォリン抗体 (Ancell社, Bayport, MN) またはマウス

Table I. 家族性または散発性原発性リンパ組織球性血球貪食症候群の患者一覧

診断	パーフォリン遺伝子変異	発症月齢	性別	中枢神経系浸潤	NK 活性 (%lysis)	免疫化学療法	造血幹細胞移植	生存 (月)
1 家族性	del 1083G/1491T>A	1	女	なし	未検査	VP16, PSL	なし	16
2 家族性	del 1090-91CT	1	男	なし	未検査	HLH-94	非血縁骨髄	13
3 家族性	なし	0	男	なし	未検査	VP16, PSL, VBL, CY	なし	3
4 家族性	なし	0	女	なし	1	HLH-94	なし	1
5 家族性	なし	2	男	なし	2.2	HLH-94	なし	6
6 家族性	なし	2	男	なし	未検査	HLH-94	臍帯血	35+
6' 家族性	なし	6	女	あり	5	HLH-94	臍帯血	47+
7 家族性	なし	7	女	あり	未検査	VP16, PSL	同胞間骨髄	96+
8 家族性	なし	18	女	なし	未検査	HLH-94, VCR, Anthra	なし	22+
9 散発性	del 207C/1122G>A	2	男	あり	1	HLH-94, ICE, CHOP	自家末梢血	69+
10 散発性	なし	1	男	なし	1	Dex, VCR, Anthra	なし	9
11 散発性	なし	2	女	あり	未検査	Dex, VP16, CY	なし	54
12 散発性	なし	3	女	なし	1	Dex, VP16, CsA	なし	3
13 散発性	なし	7	男	あり	13	Dex, VP16, CsA	なし	11
14 散発性	なし	9	男	あり	5	HLH-94	臍帯血	35+
15 散発性	なし	22	女	あり	6	Dex, VP16, CY	なし	31+

家族性=家族性リンパ組織球性血球貪食症候群: 発症者以外に少なくとも1人以上の発症者が家族にいる

散発性=散発性リンパ組織球性血球貪食症候群: 発症者以外に家族に発症者がいない

NK: natural killer

Dex: dexamethasone, VP16: etoposide, VBL: vinblastine, VCR: vincristine, CY: cyclophosphamide, CsA: cyclosporine-A, PSL: prednisolone, Anthra: anthracyclines

ICE: the combination with ifosfamide, CY and VP16, CHOP: the combination with CY, hydrochloride doxorubicin, VCR and PSL

非血縁骨髄: 非血縁同種骨髄移植, 同胞間骨髄: 同胞間同種骨髄移植, 臍帯血: 臍帯血幹細胞移植, 自家末梢血: 自家末梢血幹細胞移植

新たなパーフォリン遺伝子変異とその効果;

del 1083G: フレームシフトし、364番目のアミノ酸で終了

del 1090-1091 CT: フレームシフトし、456番目のアミノ酸で終了

del 207C: フレームシフトし、106番目のアミノ酸で終了

1491T>A: 497番目のCysがMetに変異

Table II. パーフォリン遺伝子増幅用プライマー

Region	Primer sequence (5'→3')	Annealing site
Exon 2	Fn : CCCTTCCATGTGCCCTGATAATC	3164-3186
	Rn : AGCAGCCTCCAAGTTTGATTGG	3899-3918
	F1 : AAGGGAGCAGTCATCCTCCAT	3201-3221
	F2 : AGTGCAAGCGCAGCCACAATGT	3361-3384
	R1 : CCAGTCGTTGCGGATGCTAC	3641-3660
	R2 : AACTCTGCCTTTCAGGGCTCTTA	3871-3894
Exon 3	Fn : CCAGTCCTAGTTCTGCCCACTTAC	4882-4905
	Rn : AAGCTTGGTCTAATGGGAATAC	6197-6218
	F1 : TGACCTTGAGCAGTCCTGAAGGAG	4909-4932
	F2 : ACGGCAGCATCTCTGCCGAA	5261-5280
	F3 : TGGAGGTGACCTTCATCCAAGCAT	5705-5728
	R1 : CAGGTCGTTAATGGAGGTGT	5378-5397
	R2 : GCACTGACCAGATGGGGTTGTTA	5823-5845
R3 : GAACCCCTTCAGTCCAAGCATAAC	6148-6170	

exon 2、3 増幅用のfirst PCR用のプライマー(Fn and Rn)はStepp *et al* (1999)の報告に基づいて作成された。

second PCR用のプライマーのセットは各々 F1 and R1, F2 and R2, or F3 and R3の様に記載した。

抗ヒトIgG1によって細胞内染色を行い、EPICS XL (Immunotech Coulter社) によって解析した。

**免疫組織化学検査** 末梢血単核球のサイトスピン標本を用いて、パーフォリン、グランザイムB、CD4、CD8、CD56の免疫組織化学染色を行った。

**【結果】**

1. 遺伝子変異

FHLに罹患した同胞2人を持つ患者1はexon 3に新しい遺伝子変異を2つ、compound heterozygous (del 1083G, 1491 T>A) に有していた (Figure 1)。FHLの同胞1人を持つ患者2は、exon 3に新たな遺伝子変異 (del 1090-91 CT) を1つだけしか見つけられなかった。それ以外の7人のFHL患者 (Table I 上方) では遺伝子変異は見られなかった。家族歴のない、散発性HLH患者7人 (Table I 下方) の中では、患者9がexon 2に新たな遺伝子変異 (del 207 C) とexon 3に既知の遺伝子変異 (1122 G>A) をcompound heterozygousに有していた。この患者は健常な両親からの第1子で、母親がdel 207 C、父親が1122 G>Aを有していた (Figure 1)。患者9はChiari 1型奇形と左腎欠損があり、HLHの中樞

神経浸潤をきたした。

2. パーフォリンの表出

患者9とその両親、および患者14において、フローサイトメトリーを用いてCD8陽性細胞、CD56陽性細胞の細胞内パーフォリン蛋白を調べた。患者14ではCD8陽性細胞は60.7%、CD56陽性細胞は75.3%が陽性であったが、患者9では全く認められなかった (Figure 2)。患者9の両親は、パーフォリン陽性細胞はCD8陽性細胞もCD56陽性細胞も十分な数があり、その輝度や細胞数では保因者と非保因者である健常人とを区別することはできなかった (データは示していない)。

3. FHLの臨床的特徴

パーフォリン遺伝子変異のある群とない群、家族歴のある群とない群とで、臨床および検査検査所見のうち、発症年齢、性別、中枢神経疾患の有無、末梢血液像、フェリチン、トランスアミナーゼとトリグリセリドに関して比較した。遺伝子変異のある群の発症年齢が有意に早かった (1.3か月±0.6SD 対 6.5か月±6.8SD, p=0.017) というのが唯一の違いであった。その他のパラメーターには差はなかった。

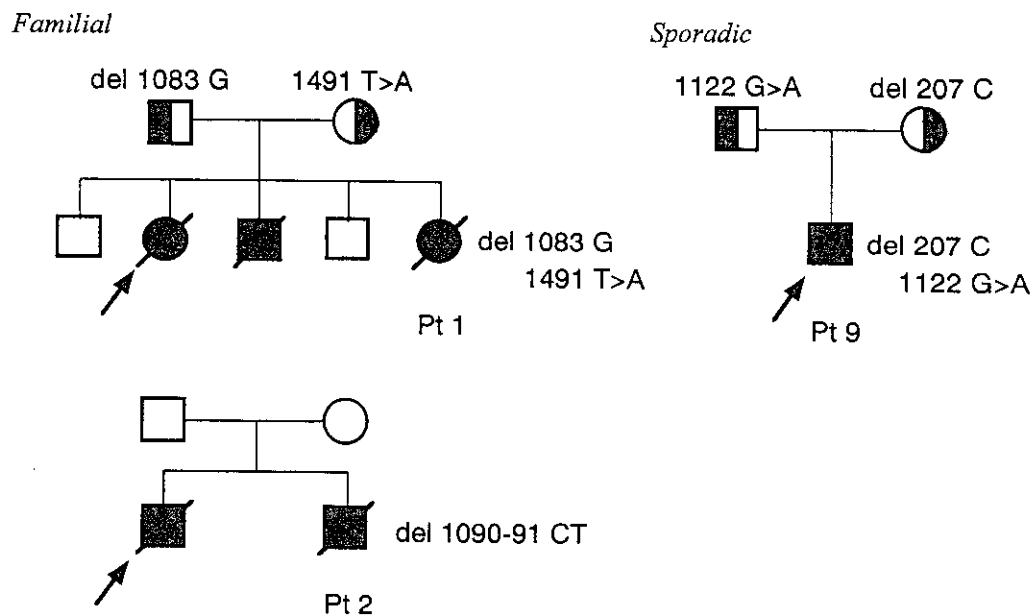


Figure 1. 原発性リンパ組織球性血球貪食症候群患者とその家族のパーフォリン遺伝子変異。四角、男；丸、女；斜め棒、死亡；矢印、発症者。遺伝子変異は各々に示す。

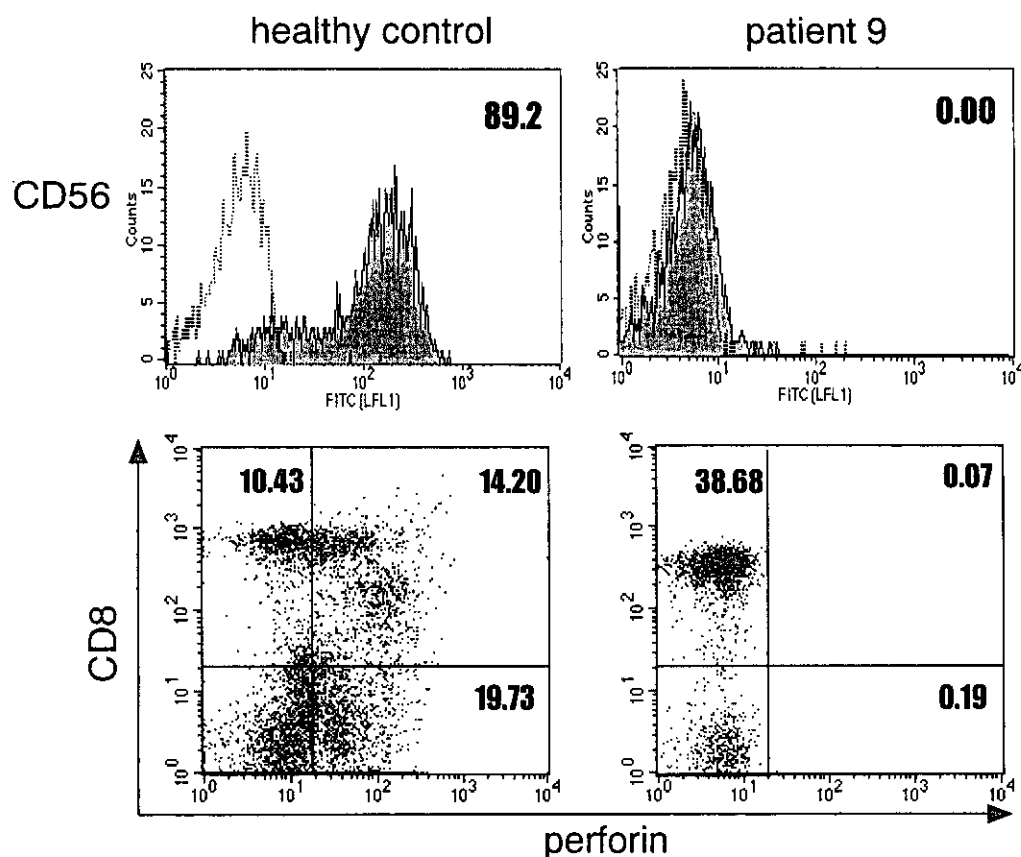


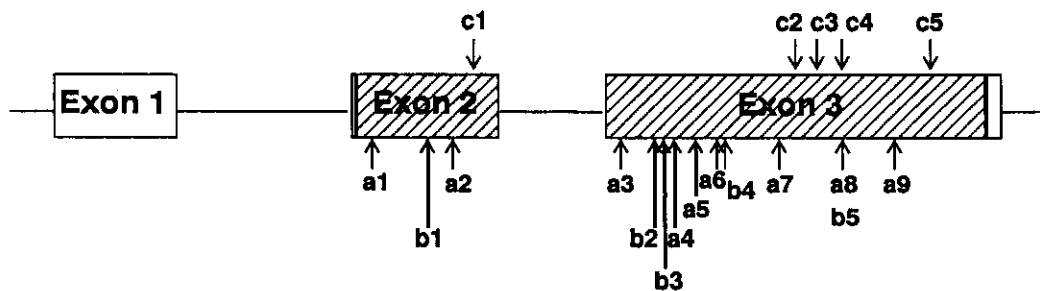
Figure 2. 細胞内パーフォリン蛋白のフローサイトメトリーによる解析。末梢血単核球をPC-5抗CD8, 抗CD56抗体で染色した後, 赤血球溶解と細胞膜透過処理後, FITC抗パーフォリン抗体 (Ancell社, Bayport, MN) で細胞内染色を行った。CD56陽性細胞にゲートをかけてシングルヒストグラムでパーフォリン表出を示した。白がコントロール抗体, グレーが患者検体。

### 【考察】

Steppらは10q21.22に関連した非血縁のFHL患者8人全員のパーフォリン遺伝子にナンセンスまたはミスセンス変異があると報告した<sup>(6)</sup>。EricsonらはFHL患者34人のうち7人(21%)にパーフォリン遺伝子異常を見出し, FHL1とFHL2の発症率は各々, 全FHLの~10%と20~40%と推定した<sup>(8)</sup>。我々の研究では, 遺伝子変異が罹患同胞例のある非血縁8家系中2家系(25%)と同胞発症のない非血縁7家系中1家系(14%)に認められた。散发例での遺伝子変異の発症率が低いのは, 二次性HLHが混じていることによるのかもしれない。パーフォリン遺伝子異常は, 日本のFHLに罹患した非血縁家系において, 少なくとも20%に起こり得る。H22 G>Aという遺伝子変異は, 異なった人種間での他2つの研究(6, 8)においても見つけられており, FHLにおける普遍的遺伝子変異の1つ

かもしれない。Ericsonらは20のトルコ家系を含む34人の患者において, 4つの新しい遺伝子変異を発見し, ホモ接合変異が多く認められた<sup>(8)</sup>。我々は日本人の非血縁15家系16人のHLH患者において同数の新しい遺伝子変異を認めた。特に, パーフォリン遺伝子異常が見つかった患者は全員, 九州出身であった。我々が研究した15家系のうち6家系(40%)が九州在住であった。九州では近親婚の割合が高いが, 今回調べられた家系内では近親婚もホモ接合変異もなかった。九州出身のmultiple founderがいて, 九州に隔離された可能性がある。

Griscelli症候群, Chediak-Higashi症候群, そしてリジン尿蛋白不耐症などの様々な遺伝的疾患がHLHの病態を呈する。Alicoraらは臨床的にHLHと診断された男性25例のうち4例(16%)がX染色体関連リンパ増殖性疾患であったと報告した<sup>(9)</sup>。パ



a1.	50	del T	b1.	148	G>A	Val 50 Stop
a2.	190	C>T Gln 64 Stop	b2.	657	C>A	Trp 219 Stop
a3.	548	T>G Val 183 Gly	b3.	671	T>A	Ile 224 Asp
a4.	673	C>T Arg 225 Trp	b4.	853-55	del AAG	
a5.	755	A>G Asn 252 Ser	b5.	1122	G>A	Trp 374 Stop
a6.	836	G>A Cys 279 Tyr				
a7.	1034	C>T Pro 345 Leu	c1.	207	del C	
a8.	1122	G>A Trp 374 Stop	c2.	1083	del G	
a9.	1286	G>A Gly 429 Glu	c3.	1090-91	del CT	
			c4.	1122	G>A	Trp 374 Stop
			c5.	1491	T>A	Cys 479 Stop

Figure 3. Steppら (1999) (a1~9), Ericsonら (2000) (b1~5), 我々 (c1~5) が報告したパーフォリン遺伝子変異のまとめ。16の遺伝子変異の中で、1122 G>Aだけが3つの報告全てに認められた共通の遺伝子変異であった。斜線部は翻訳領域を示す。

ーフォリン発現をみるフローサイトメトリーは、早期に造血幹細胞移植が必要なFHL2の乳児に対して有用なスクリーニング方法となる可能性がある。また、細胞障害関連分子についての更なる遺伝子解析が原発性HLHの病因と治療戦略に役立つかもしれない。

#### 【文献】

- Henter, J.I., Elinder, G., & Ost, A. Diagnostic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis, The FHL Study Group of the Histiocyte Society. *Seminars in Oncology*, 18, 29-33, 1991
- Jabado, N., Degraeff-Meeder, E.R., Cavazzana-Calvo, M., et al. Treatment of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis with bone marrow transplantation from HLA genetically non-identical donors. *Blood*, 90, 4743-4748, 1997
- Ohadi, M., Lalloz, M.R.A., Sham, P., et al. Localization of a gene for familial hemophagocytic lymphohistiocytosis at chromosome 9q21.3-22 by homozygosity mapping. *American Journal of Human Genetics*, 64, 165-171, 1999
- Dufourcq-Lagelouse, R., Jabado, N., Deist, F.L., et al. Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis to 10q21-22 and evidence for heterogeneity. *American Journal of Human Genetics*, 64, 172-179, 1999
- Graham, G.E., Graham, L.M., Bridge, P.J., et al. Further evidence for genetic heterogeneity in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHLH). *Pediatric Research*, 48, 227-232, 2000
- Stepp, S.E., Dufourcq-Lagelouse, R., Le Deist, F., et al. Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Science*, 286, 1957-1959, 1999
- Imashuku, S., Hibi, S., Ohara, T., et al. Effective control of Epstein-Barr virus-related hemophagocytic lymphohistiocytosis with immunodeficiency. *Blood*, 93, 1869-1874, 1999
- Ericson, K.G., Fadeel, B., Nilsson-Ardnor, S., et al. Spectrum of Perforin gene mutations in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis. *American Journal of Human Genetics*, 68, 590-597, 2001
- Arico, M., Imashuku, S., Clementi, R., et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis due to



germline mutations in SH2D1A, the X-linked  
lymphoproliferative disease gene. *Blood*, 97, 1131-

1133, 2001

## Perforin defects of primary haemophagocytic lymphohistiocytosis in Japan

Naohiro Suga<sup>1</sup>, Hidetoshi Takada<sup>1</sup>, Akihiko Nomura<sup>1</sup>, Shouichi Ohga<sup>1</sup>, Eiichi Ishii<sup>1,2</sup>,  
Kenji Ihara<sup>1</sup>, Koichi Ohshima<sup>3</sup>, Toshiro Hara<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences, Kyushu University

<sup>2</sup>Department of Pediatrics, Saga School of Medicine

<sup>3</sup>Department of 1<sup>st</sup> Pathology, School of Medicine, Fukuoka University

Perforin gene was analyzed in 15 Japanese patients with primary haemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH). Perforin gene defects were found in 2 of 8 patients with familial HLH (FHL), and 1 of 7 without affected siblings. Four novel mutations were identified. Compound heterozygous mutations (1 FHL and 1 sporadic HLH) and only one allele mutation (1 FHL) were defined. Flow cytometry revealed no perforin expression in CD8<sup>+</sup> or CD56<sup>+</sup> cells of a survived patient with mutation. The frequency of mutation was at least 20% of FHL in Japan. Flow cytometry for intracellular perforin may be useful for the screening of FHL2.

---

## gp91<sup>phox</sup>, p22<sup>phox</sup> 欠損型慢性肉芽腫症患者の遺伝子変異と臨床像解析

布井博幸 (宮崎医科大学)  
 水上智之 (熊本大学医学部附属病院小児科)  
 石橋史成 (熊本大学医学部附属病院小児科)  
 岩田真由美 (熊本大学医学部附属病院小児科)

日本の204家系239人の慢性肉芽腫症患者の病型分類および遺伝子変異について調査し、臨床症状との対比を行った。今回病型分類できた158名のうち gp91-*phox* 欠損型が118名で、p22-*phox* 欠損型が17名であった。59家系の gp91-*phox* 欠損型患者および6家系の p22-*phox* 欠損型患者について遺伝子解析を行った。結果は gp91-*phox* 遺伝子変異の欠失、ミスセンス変異、ナンセンス変異がそれぞれ20-30%を占め、スプライス変異と欠失が18%、17%の割合であった。その中でも、INF- $\gamma$  が効果を示した症例では gp91-*phox* 遺伝子 (CYBB) のスプライスパターンの変化が誘導されていることが明らかになった。また p22-*phox* 欠損型 CGD患者でも INF- $\gamma$  の効果が認められる症例があったが、遺伝子レベルでの十分な説明ができなかった。今後とも臨床像と遺伝子変異の解析が必要と思われた。

### A. 研究目的

日本の慢性肉芽腫症 (CGD) 患者の病型分類および遺伝子変異について調査し、臨床症状との対比をする事を目的とし本研究を行ってきた。対象は1992年から2001年までに食細胞機能異常研究会 (現会長; 関西医科大学小児科学講座小林陽之助教授) に登録された204家系、239人のCGD患者である。男女比は208:31で6.7:1であった。患者とその家族の分布状況には地域的な偏りはなく、日本全国 (1都1道2府43県) にほぼ均等に広がっていた。CGDの出生数は年齢分布にもとづくと22万人出生当たり1人であった。患者の予後などの詳細については以前報告している (平成10年度厚生省特定疾患 血液系疾患調査研究班 原発性免疫不全症候群分科会) が、それから18名登録患者が増加している。

今回解析できた158名のうち135名 (85%以上) の症例がシトクロム構成因子のいずれかの欠損型であり、最も頻度が高いのは gp91-*phox* 欠損型で118名であった。p47-*phox* 欠損型は11名 (7.0%) で一番低い頻度であった (表 1)。81名の患者については病型分類が出来ていない。

表 1. 病型と頻度

欠損因子	病型	Cyt b <sub>558</sub> (%)	O <sub>2</sub> -産生 (%)	頻度 (%)
gp91- <i>phox</i>	X91 <sup>0</sup>	0	0	113 (71.5%)
	X91 <sup>+</sup>	100	0	5 (3.2%)
p22- <i>phox</i>	A22 <sup>0</sup>	0	0	16 (10.1%)
	A22 <sup>+</sup>	100	0	1 (0.6%)
p47- <i>phox</i>	A47 <sup>0</sup>	100	0-1	11 (7.0%)
p67- <i>phox</i>	A67 <sup>0</sup>	100	0-1	12 (7.6%)

gp91-*phox* 欠損型は蛋白発現パターンで2つに分類されるが、シトクロム陰性 (X91<sup>0</sup>) の頻度は113人、シトクロム陽性 (X91<sup>+</sup>) は5人であった。p22-*phox* 欠損型CGD患者は16家系17人であった。

### B. 研究方法

1) 患者対象はすでに塩基配列が報告されている20人の gp91-*phox* 欠損型CGD患者の結果と合わせて59家系68名の gp91-*phox* 欠損型CGD患者について遺伝子解析をまとめた。同時に16家系17人の p22-*phox* 欠損型CGD患者の内6家系6人の10アレルの遺伝子変異を解析した。いずれの患者にも、

個人情報を開示することがないことを告げ、受け持医により遺伝子解析についての家族の同意を得た上で行われた。

2) 患者の末梢血をヘパリン採血し、デキストラン法にて好中球を分離した。

3) 好中球活性酸素産生能はphorbol myristate acetate (PMA) で刺激し、DHR-123をプローブとしてフローサイトメトリー法によって測定した。

4) 好中球シトクロム *b558* のフローサイトメトリー法による解析は抗シトクロム *b558* モノクローナル抗体 (7D5抗体) を用いてフローサイトメトリー法によって測定した。

5) 染色体DNAはPUREGENE DNA Isolation Kit (Genra systems, USA) を用いて患者末梢血好中球から抽出した。

6) 塩基配列決定は *gp91-phox* 遺伝子の各エクソンの5', 3' 側のエクソン/イントロン部に相補的なプライマーとAmpli Taq Gold (Perkin Elmer Japan, Chiba) を用いて増幅し、70-80ngのPCR産物をテンプレートとしてTaq Dye Deoxy Terminator Sequencing Kit (Perkin Elmer Japan, Chiba) を用いてサイクルシーケンシングをおこない、オートシーケンサー (ABI model 373A, 310; Perkin Elmer Japan, Chiba) を使用して5' 側, 3' 側の両方向から行った。

7) *RP3* と *XK* 遺伝子の欠失の範囲はそれぞれの遺伝子のプライマーとXp21付近のマイクロサテライトマーカーを用いて染色体DNAを増幅して検索した。

### C. 結果

1) *gp91-phox* 欠損型遺伝子解析 (表 2, 3, 4, 5, 6)

我々の遺伝子解析結果, ミスセンス変異が17件, ナンセンス変異が14件, 欠失が10件, 挿入が7件, スプライス部位の変異が11件同定された。

変異の中で新たに見つかった症例はミスセンス変異が4家系, ナンセンス変異が7家系であった。ナンセンス変異はRoos, Raeらの報告と同様に, CpG配列がTGに変異し, 終止コドン (TGA) になっている症例が多かった。

数塩基の欠失 (表 4) が6家系で新たに見つ

表 2. *gp91<sup>phox</sup>* ミスセンス変異

Kindred number	Position	Nucleotide change	Amino acid change	Registered number
1	Promoter	-53C→T	Point Mutation	
2	Exon 3	180AGG→ATG	R54M	
3	Exon 3	163GCC→GAC	A55D	
4	Exon 3	169GCA→GAA	A57E	
5	Exon 4	301CAT→TAT	H101Y	
*6	Exon 6	625CAT→CGT*	H209R	P0183, (P0184)
7	Exon 6	665CAT→CGT	H222R	P0236
*8	Exon 6	670GCT→GGT*	A224G	P0210
*9	Exon 7	769TGC→CGC*	C257R	P0149, P0150
10	Exon 9	925GAG→AAG	E309K	
11	Exon 9	1012CAC→TAC	H338Y	
12	Exon 9	1015CCT→CAT	P339H	
13	Exon 9	1030TCC→TTC	S344F	
14	Exon 9	1030TCC→TTC	S344F	P0226, (P0227)
*15	Exon 10	1165GGG→GAG*	G389E	P0110
16	Exon 10	1258CTC→CCC	L420P	
17	Exon 12	1546TGG→CGG	W516R	

表 3. *gp91<sup>phox</sup>* ナンセンス変異

Kindred number	Position	Nucleotide change	Amino acid change	Registered number
1	Exon 4	271CGA→TGA	R91X	P0215
2	Exon 5	388CGA→TGA	R130X	P0122
*3	Exon 5	413TCA→TAA*	S138X	P0171
*4	Exon 5	422CAA→TAA*	Q148X	P0228
5	Exon 5	469CGA→TGA	R157X	
6	Exon 7	676CGA→TGA	R226X	P0054
7	Exon 7	676CGA→TGA	R226X	P0177
8	Exon 7	676CGA→TGA	R226X	P0233
*9	Exon 9	967CAA→TAA*	Q323X	P0172
*10	Exon 10	1309AAA→TAA*	K437X	P0214
*11	Exon 11	1354GAG→TAG*	E452X	P0052
*12	Exon 11	1396CAG→TAG*	Q466X	P0206
*13	Exon 11	1399GAA→TAA*	E467X	P0216, P0025
14	Exon 11	1429TAC→TAA	Y476X	

表 4. *gp91<sup>phox</sup>* の欠失

Kindred number	Position	Nucleotide change	Registered number
*1	Exon 6	del. 606T or 609A*	P0208
*2	Exon 8	del. 870ATCTCAACG*	P0049
*3	Exon 11	del. 1447TGGGATGAGTCTC*	P0223
*4	Exon 12	del. 1497A*	P0221
5	Multigene	500 kb	
6	Multigene	500 kb	P0163
7	Promoter-Exon 7	25 kb	
*8	Exon 3-Exon 4	7 kb*	P0224
9	Exon 12-Exon 13	>6 kb	
*10	Exon 12-Exon 13	2 kb*	P0138

った。これらの患者の欠失部位はいずれも欠失の好発しやすい特徴として知られる数塩基の繰り返し配列部や対照的な塩基配列部があるに存在していた。隣接する遺伝子欠損にともなう合併症とし

表 5. gp91<sup>phox</sup> ゲノムでの挿入

Kindred number	Position	Nucleotide change	Registered number
* 1	Insertion Exon 1	G after G6*	P0235
* 2	Insertion Exon 2	T after T121*	P0173
3	Insertion Exon 7	TT after T707	
4	Insertion Exon 7	A after A742	P0120 (P0119)
5	Insertion Exon 7	A after A742	P0229
6	Insertion/ Deletion Exon 10	Ins. ATGTGATGAACACAT del. 1180GCC	
7	Insertion/ Deletion Exon 12	Ins. CATCTGGG del. 1521AAAGA	

表 6. gp91<sup>phox</sup> のプライス異常

Kindred number	Position	Nucleotide change	Splicing product	Registered number
* 1	Intron 2, 5' splice site	gt→gc*		P0234
* 2	Intron 2, 5' splice site	gtaag→gtaaa*	del. Exon 2	P0239
3	End Exon 3	252GCG→GCA	del. Exon 3	P0205 (P0204)
4	End Exon 3	252GCG→GCA	del. Exon 3	P0148 (P0147)
5	End Exon 3	252GCG→GCA	del. Exon 3	P0056 P0057
* 6	Intron 4, 5' splice site	gtaag→gtaagg*		P0232
7	Intron 4, 3' splice site	ag→aa	del. Exon 5	
* 8	Intron 6, 5' splice site	gtga→gtgt*		P0139 P0240
9	Intron 7, 3' splice site	ag→gg	del. Exon 8	
* 10	Not Determined	Not Determined	del. Exon 12*	P0189
* 11	Intron 12, 3' splice site	ag→gg*	ND	P0111

表 7. p22<sup>phox</sup> 欠損患者の遺伝子変異

Kindred number	Position	Nucleotide change	Amino acid change	Registered number
1	Nonsense (homozygous) Exon 1	7CAG→TAG	Q3X*	P0230
2	Nonsense (homozygous) Exon 1	7CAG→TAG	Q3X	P0231
3	Nonsense (homozygous) Exon 1	25TGG→TGA	W9X*	P0207
4	1) Splice Intron 1	del. +4agtg*	ND	P0201
	2) Missense Exon 2	71G→A	G24R*	
5	1) Missense Exon 2	71G→A	G24R*	P0225
	2) Missense Exon 6	371C→T	A124V*	
6	Deletion (homozygous) Exon 6	del. 34bp*	Frameshift	P0162

では 8 家系中 9 人の患者に網膜色素変性症がみられたが、そのうち RP3 と XK 遺伝子を含んだ大きく欠失している症例は 2 人であった。この 2 人の患者の赤血球膜には棘突起が観察され Kell 抗原の減弱が認められた。視力は現時点では正常であるが、7 才時に網膜色素変性所見がすでに認められ、また乳児期には筋緊張低下がみられた。

スプライス変異 (表 6) は 6 家系で新たな変異が見つかった。その内エクソン 3 の 3' 末端のグアニンがアデニンに置換している症例では、アミノ酸はアラニンのままのサイレント変異であった。この家系には 5 人の CGD 患者と 5 人のキャリアーが存在していた。この患者と兄の mRNA を好中球から抽出してエクソン 3 を含む領域を増幅するためのプライマーを用いて逆転写 PCR 法をおこなったところ、2 人ともに 2 つの PCR 産物が同定されたが、それらの割合に兄弟間で大きな違いが認められた。この兄弟の好中球には 7D5 抗体を用いたフローサイトメトリー法によりシトクロム *b558* の発現が正常の約 20% 認められており、後で IFN- $\gamma$  により CYBB 遺伝子のスプライスパターンの変化を誘導していることが明らかになった (文献 2)。

2) p22-phox 遺伝子解析結果から、挿入以外の全てのタイプの変異が認められ、2 人の患者に同じ変異がみられた (表 7)。また今回判明した変異はこれまでに報告されていなかった。

p22-phox 遺伝子のヘテロの変異が認められた患者は BCG 接種による疑似結核に罹患した。この患者に interferon (IFN)- $\gamma$  を投与したところ疑似結核は治癒している。IFN- $\gamma$  投与後の患者好中球の活性酸素産生能を DHR-123 をプローブとしてフローサイトメトリー法で測定した結果、投与前と比較して明らかな増加が認められ、さらに 7D5 抗体をもちいたフローサイトメトリー法において IFN- $\gamma$  投与後の患者好中球ではわずかではあるがシトクロム *b558* の発現が認められた。In vitro と in vivo で IFN- $\gamma$  投与による gp91-phox mRNA の発現増強が確認されている。

## D. 考察

1) gp91-phox 欠損型の遺伝子変異の好発する特異的な部位はなく、ほぼ全エクソンに認められた。遺伝子変異がおこった頻度が最も高かったのはエクソン 3, 7, 9 であった (図 1)。エクソン 1 と 13 には遺伝子変異は認められなかった。Roos, Rae らはエクソン 3, 5, 7 に比較的高い頻度で遺伝子変異が認められたと報告している。

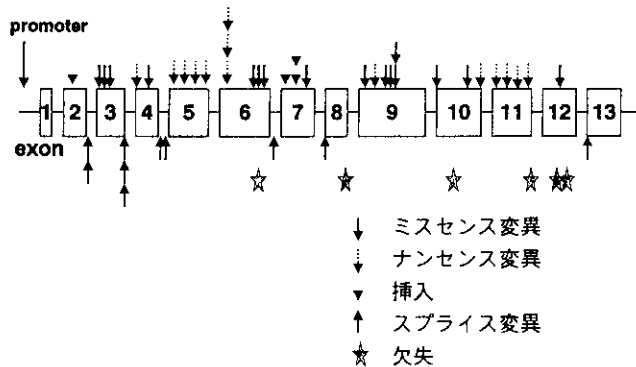


図 1.  $gp91^{phox}$  遺伝子変異のゲノムマップ

日本の  $gp91-phox$  遺伝子変異の種類は欠失、ミスセンス変異、ナンセンス変異がそれぞれ20-30%を占め、スプライス部位の変異と欠失がそれぞれ18%, 17%の割合であった。このそれぞれの変異の割合はRoos, Raeらの報告とほぼ同様であった。

$gp91-phox$  欠損型の17例のミスセンス変異と14例のナンセンス変異に関しては、シトシンからチミンへの置換が最も多く、この一塩基置換は特に CpG配列にみられた。3患者(表5の2, 3, 4, 5)の挿入に関しては、同一塩基の繰り返し配列によって複製フォークにおいてミスペアリングが生じて挿入がおきてしまったのではないかと考えられる。この現象は欠失がおこる際にも同様にみられる。

$gp91-phox$  欠損型の2つのミスセンス変異(表2の2, 4)と数塩基の挿入と欠失が同時にみられた1例(表5の6)がシトクロム陽性で、1つのスプライス部位の変異(表6の3, 4, 5)と3つのミスセンス変異(表1の5, 10, 11)がシトクロム弱陽性であった。これらのうち3症例については詳しく解析されていて、それぞれNADPH結合部位(表5の6), FAD結合部位(表1の11), ヘム結合部位(表1の5)の機能不全を持つことが示されており、これらの症例の解析が  $gp91-phox$  蛋白質のそれぞれのドメインの機能解明の手がかりとなる。

患者(表6の3)とその兄のmRNAを解析したところ正常なスプライスをうけたものと選択的スプライスがおきたものの2種類が同定された。 $gp91-phox$  mRNAの安定性やスプライスの効率に何らかのサイトカインが影響を及ぼしていることが明らか

かになった。

6人の  $gp91-phox$  欠損型患者に  $gp91-phox$  遺伝子の大きな欠失が認められた。4人(表4の7, 8, 9, 10)は数エクソンを欠失し、その内の1人はプロモーター領域からエクソン7までを含んだテロメア側の25kbの欠失であった。患者(表4の5, 6)はRP3遺伝子(網膜色素変性症3責任遺伝子),  $gp91-phox$  遺伝子(X-CGD責任遺伝子), XK遺伝子(McLeod症候群責任遺伝子)を含んだ500kb以上の範囲を欠失していた。

8家系中9人のCGD患者が網膜色素変性症を合併していた。この内の3家系に  $gp91-phox$  遺伝子を含むXp21.1領域の大きな欠失が認められ、2家系に  $gp91-phox$  遺伝子の点変異が認められた。残り2家系のうちの1家系はp22- $phox$  遺伝子のエクソン6の34塩基対を欠失していた(表7の6)。X連鎖性網膜色素変性症(X-linked retinitis pigmentosa; xLRP)は遺伝学的にはヘテロジニアスな疾患で、RP3はXLRPの中で最も頻度が高い。今回の解析で日本のCGD患者のRP3の合併頻度は健常人よりもかなり高いことが判明した(0.039 vs 0.00004)。

McLeod症候群の発症は遅く臨床症状である神経筋の異常は通常は40才代であられる。これまでに報告されたX-CGDでMcLeod症候群を合併している3人はいずれも神経発達の遅れやミオパチーなどの症状はみられていないが、今回新たに見つけたMcLeod症候群を合併しているX-CGD患者(表4の6)は乳児期に筋力低下をとまなう発達の遅れがみられ、9才時にはアキレス腱反射が消失していた。

2) p22- $phox$  欠損型CGDも  $gp91-phox$  欠損型と同様に遺伝学的にかなりヘテロジニアスな疾患であると考えられる。これまでの報告と今回の我々の解析結果から、p22- $phox$  構造のわずかな変化がその安定性や  $gp91-phox$  との複合体形成に影響を及ぼし、シトクロム  $b_{558}$  の発現がみられなくなるのではないかと推測される。

患者(表7の4)の一方のアレルあるいは両方のアレルからわずかに変異p22- $phox$ が発現しているかもしれないので、IFN- $\gamma$ 投与により  $gp91-phox$  の発現が増強し、変異p22- $phox$ と複合体を形成し

た可能性が考えられる。p22-*phox* 遺伝子のヘテロの変異を持つ患者（表 7 の 5）の好中球は正常好中球の数パーセントの活性酸素を産生していることが確認された。この患者は生後10ヶ月時に皮下膿瘍に罹患したが、それ以降は重症感染症には罹患していない。

#### E. 結論

gp91-*phox* 遺伝子およびp22-*phox* 遺伝子変異でも特定の変異はなく、また変異が集中することもなかった。

変異の所在によって、INF- $\gamma$  が有効な症例も明らかにすることが出来た。臨床像とGenotypeの関係についてももっと検討されるべきだと考えている。

#### 参考文献

- 1) Ishibashi F, et al. Statistical and mutational analysis of chronic granulomatous disease in Japan with special reference to gp91-*phox* and p22-*phox* deficiency. *Human Genetics*. 106, 473-481, 2000
- 2) Ishibashi F, et al. Improved superoxide generating ability by interferon-gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in *CYBB* gene. *Blood* 98:436-441 (2001)

**F. 謝辞：**この仕事を行うにあたり、全国の施設の皆様から、快く患者検体をお送りいただき、また詳しい臨床的観察をお教えいただきました。ここに深謝致します。

#### G. 研究発表

##### A) 学会発表

特になし

##### B) 発表誌名巻号・頁・発行年

- 1) Ishibashi F, et al. Improved superoxide generating ability by interferon-gamma due to splicing pattern change of transcripts in neutrophils from patients with a splice site mutation in *CYBB* gene. *Blood* 98:436-441 (2001)
- 2) Nunoi H, Yamazaki T, Kanegasaki S. Neutrophil cytoskeletal disease. *Int J Hematol*. 74:119-24 (2001)
- 3) Cui SH, et al. A thiol proteinase inhibitor, E-64-d, corrects the abnormalities in concanavalin A cap formation and the lysosomal enzyme activity in leucocytes from patients with Chediak-Higashi syndrome by reversing the down-regulated protein kinase C activity. *Clin Exp Immunol*. 125:283-90 (2001)
- 4) Yamauchi A, et al. Location of the epitope for 7D5, a monoclonal antibody raised against human flavocytochrome b558, to the extracellular peptide portion of primate gp91phox. *Microbiol Immunol*. 45:249-57 (2001)
- 5) 布井博幸, 水上智之, イジナ・マルカド, 三 潤 浩, 西原重剛, 後藤善隆, 緒方敬之, 森 島恒雄, 中山慎一, 森 信二, 坂田 宏, 森 裕美, 真鍋孝治, 足立尚登, 遠藤文夫, 渡辺 啓祐: インフルエンザ感染症における重症度 判定のためのマーカーの検討: 小児感染免疫 13: 225-232, 2001

## Molecular and clinical analysis of chronic granulo granulomatous disease with gp91<sup>phox</sup> and p22<sup>phox</sup> deficiency

Hiroyuki Nunoi<sup>1)</sup>, Tomoyuki Mizukami<sup>2)</sup>, Fuminari Ishibashi<sup>2)</sup>, Mayumi Iwata<sup>2)</sup>,

<sup>1)</sup> Miyazaki Medical College

<sup>2)</sup> Kumamoto University Medical School

Abstract Chronic granulomatous disease (CGD) is a group of inherited disorders of host defense due to a mutation in any of the 4 components of phagocyte NADPH oxidase, namely gp91-, p22-, p47- and p67-*phox*. We determined 157 CGD subtypes in 239 registered patients from 204 families in Japan. Independent 59 and 6 patients with gp91- and p22-*phox* deficiency, respectively, had been analyzed in molecular level. As X-linked gp91-*phox* deficiency, we found 17 missense and 14 nonsense mutations, 10 deletions, 5 insertions, 2 insertion with deletion and 11 splice site mutations. As for p22-*phox* deficiency, 3 homozygous nonsense mutations and 1 homozygous deletion, a missense mutation together with a splice site mutation and 2 different missense mutations were found. These mutations have not been reported before. Based on the present and reported data from Japan, we discussed genotypes and clinical phenotype in our CGD patients.

---

## X連鎖自己免疫アレルギー調節異常症候群の遺伝子診断

柘 植 郁 哉（藤田保健衛生大学小児科）  
宇理須 厚 雄（藤田保健衛生大学小児科）  
蒲 池 吉 朗（名古屋大学小児科）  
早 川 昌 弘（名古屋大学小児科）  
坂 本 龍 雄（名古屋大学小児科）

X連鎖自己免疫アレルギー調節異常症候群（X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD) あるいは immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) と呼ばれる）は forkhead family に属する転写因子Forkhead Box P3 (FOXP3) の障害により、免疫不全、アレルギー、自己免疫疾患といった多彩な病像を示す伴性遺伝疾患である。今回我々は、在胎26週 3 日体重853gにて出生後、難治性の皮膚感染症により死亡した極小低出生体重児のFOXP3 の遺伝子解析を行った。症例の兄も、難治性の皮膚炎から、MRSA 全身感染症を併発し、10ヵ月時に死亡しており、母方の従兄弟 2 名は、乳児期に著明な好酸球増多を伴う体重増加不良と難治性の気管支喘息を呈した。

患者ゲノム DNA を用い、FOXP3 遺伝子全11エクソンの塩基配列を決定したところ、Ala384Thr のミスセンス変異を認めた。本変異は、すでに Wildin, RS等、Bennet, CL 等により報告されているものと一致し、FOXP3 遺伝子変異のhot spotと考えられた。

XLAAD は多彩な病像を呈し、かつ同一変異でも表現型が多様であること、通常の免疫機能検査では異常の検出が難しいこと、早期診断すれば造血細胞移植等により根治の可能性が有ることより、遺伝子診断が有用であると考えられた。

### 【はじめに】

X連鎖自己免疫アレルギー調節異常症候群（X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome (XLAAD) あるいはimmune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) と呼ばれる）はforkhead familyに属する転写因子Forkhead Box P3 (FOXP3) の異常により、免疫不全、アレルギー、自己免疫疾患といった多彩な病像を示す伴性遺伝疾患である。今回我々は、在胎26週 3 日体重853gにて出生後、難治性の皮膚感染症により死亡した極小低出生体重児のFOXP3 の遺伝子解析を行った。症例の兄も、難治性の皮膚炎から、MRSA全身感染症を併発し、10ヵ月時に死亡しており、母方の従兄弟 2 名は、乳児期に著明な好酸球増多を伴う体重増加不良と難治性の気管支喘息を呈した。

### 【方法】

FOXP3 遺伝子全11exon の塩基配列の決定。

患者由来白血球より、ゲノムDNAを抽出し、Chatila TAら<sup>1)</sup>に準じて各エクソンをPCRにて増幅した後、ABI PRISM 310-10 ジェネティックアナライザを用いて塩基配列を決定した。

### 【症例】

対象とした症例の家系図を、(図1)に示した。

症例1 (III-1) 平成2年12月16日生。平成3年1月4日頃より嘔吐、体重増加不良があり、肥厚性幽門狭窄の診断にて手術をうけた。術前検査(表1)にて、末梢血好酸球増多(21012/mm<sup>3</sup>)を呈し、また、手術時幽門部の生検にて、幽門筋層間の線維性結合織中に好酸球浸潤を認めたことから好酸



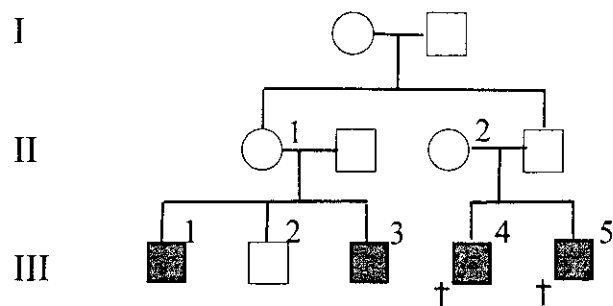


図 1. 対象の家系図

球性胃腸炎と診断された。アトピー性皮膚炎を認め、手術後も吐乳が見られた。平成3年7月24日発熱。3日で解熱するも、微熱、喘鳴、食思不振続くため、PSL 1mg/kg開始となった。症状改善後漸減中に、9月6日より間質性肺炎併発、呼吸不全となり、6日間呼吸器管理を要した。間質性肺炎治癒後免疫機能検査を施行したが、大きな異常は認められなかった(表2)。その後は、アトピー性皮膚炎、軽症喘息を認める程度で安定している。最近の検査結果を表3に示した。

症例2 (III-3) 平成11年8月5日生。平成11年10月頃よりアトピー性皮膚炎、体重増加不良で外来通院加療(4250g)。抗アレルギー剤、母親の卵除去、低アレルギーミルクなど投与される。平成11年12月22日、細気管支炎にて入院加療(4382g)。平成11年12月28日退院するも、平成12年1月2日より鼻閉、喘鳴出現、翌日より発熱し、嘔吐・哺乳量低下も認められたため、1月4日入院となった(4260g)。

入院時の所見を表4に示した。著明な好酸球増多を認め、IgEも高値であった。入院後も1年ほどは好酸球増多が持続し、喘息様発作も反復したため、入院は1年9カ月に及んだが(図2)、次第に改善し、退院しえた。易感染性は明らかではなかった。

症例3 (III-4) 平成10年7月8日、在胎39週出生体重2615gにて吸引分娩。母乳主体の混合栄養であった。7月27日頃から顔面に湿疹ができ始め、徐々に全身へ広がった。8月3日某院受診し、膿

表 1. 症例1 (III-1) 肥厚性幽門狭窄入院時検査所見

RBC	453	$\times 10^4 / ml$	TP	5.7	g/dl	RAST Index	
Hb	15.3	g/dl	GOT	31	IU/L	卵白	1.0>
WBC	30900	$/mm^3$	GPT	17	IU/L	ミルク	1.0>
Eo	68	%	T.Bil	5.9	mg/dl	小麦	1.0>
Neu	7	%	Amy	19	IU/L	米	1.0>
Lym	21	%	Na	139	mEq/L	卵黄	1.0>
Plt	27.3	$\times 10^4 / ml$	K	4.9	mEq/L		
CRP	0.1	mg/dl	Cl	108	mEq/L		
IgG	329	mg/dl	Ca	4.9	mEq/L		
IgA	21	mg/dl	CK	31	IU/L		
IgM	80	mg/dl	Glu	83	mg/dl		
IgE (1/14)	1	IU/ml					
IgE (2/24)	94	IU/ml					

表 2. 症例1 (III-1) 平成3年10月8日(9カ月) 間質性肺炎治癒後の免疫検査

リンパ球サブセット	リンパ球芽球化能		
CD3+	74.6 % (2560/ml)	Medium	277 cpm
CD4+	51.6 % (1770/ml)	PHA	26524 cpm
CD8+	28.1 % (964/ml)	PWM	6399 cpm
CD56+	9.2 % (315/ml)	Sac	855 cpm
CD20+	7.1 % (243/ml)		
ClassII+	10.7 %		

表 3. 症例 1 (III-1) 最近の検査所見 (11歳)

Hb	14.0 g/dl	TP	6.4 g/dl	RAST index	
WBC	9600 /ml	ALB	4.1 g/dl	卵白	0
Eo	0 %	BUN	10 mg/dl	ミルク	0
Neu	69.4 %	CRE	0.5 mg/dl	小麦	0
Lym	34.0 %	GOT	19 IU/L	ダニ	2
Plt	19.1 ×10 <sup>4</sup> /ml	GPT	12 IU/L		
IgG	643 mg/dl	CRP	2.3 mg/dl		
IgA	6> mg/dl	RA	(-)		
IgM	29 mg/dl	ANA	<40x		
IgE	3 IU/ml	ss抗DNA	9.0 AU/ml		
CH50	42.5 U/ml	ds抗DNA	12.2 IU/ml		

表 4 症例 2 (III-3) 入院時所見

入院時現症

体重 4260g, 体温37.3℃, 脈拍132/分, 呼吸数50/分

皮膚; 耳介周辺, 頬部, 四肢屈曲部にアトピー性湿疹, 殿部に糜爛

頸部; リンパ節腫脹大豆大まで数個ずつ塊状に腫脹。

口腔; 発赤なし

胸部; ラ音(-) 心音清明

腹部; 平坦, 肝脾腫(-)

入院時検査所見

RBC	467 ×10 <sup>4</sup> /ml	TP	6.3 g/dl	RAST Index	
Hb	12.0 g/dl	GOT	37 IU/L	卵白	6
WBC	19900 /ml	GPT	33 IU/L	ミルク	3
Eo	20 %	T.Bil	0.2 mg/dl	小麦	2
Neu	14 %	Amy	18 IU/L	米	0
Lym	63 %	Na	151 mEq/L	大豆	0
Plt	80.8 ×10 <sup>4</sup> /ml	K	3.4 mEq/L	ダニ	0
CRP	1.1 mg/dl	Cl	109 mEq/L	リンパ球芽球化能	
リンパ球サブセット		Ca	5.2 mEq/L	Medium	1249 cpm
CD3+	39.7 % (2509/ml)	CK	83 IU/L	PHA	37955 cpm
CD4+	21.7 % (1371/ml)	Glu	85 mg/dl	ConA	21182 cpm
CD8+	15.3 % (967/ml)	IgG	704 mg/dl	Sac	19056 cpm
CD56+	9.4 % (594/ml)	IgA	65 mg/dl		
CD20+	30.3 % (1915/ml)	IgM	106 mg/dl		
CD25+	3.4 %	IgE	7224 IU/ml		
CD69+	13.7 %				

痲疹として抗生剤が投与されたが改善せず, 8月5日同院入院となった。入院時, 好酸球は8800/mm<sup>3</sup>と著明に増加していた。入院後は, 膿痲疹より全身膿皮症となり, 一時は消毒等により改善するも, MRSAの全身感染を来し, 各種の治療に抵抗した。平成11年1月頃からは, 難治性の下痢, 膵炎も併発した。平成11年3月MRSAによる敗血症となり, 各種治療に反応せず, 4月8日死亡。この間, 平成10年中は10000/mm<sup>3</sup>程度の好酸球増多が持続した。IgEは9月14日の1800IU/mlが最高値で,

RASTは牛乳の5.26UA/ml以外は, 測定感度以下であった。

症例4 (III-5) 平成12年12月8日在胎26週3日, 853gにて出生。RDSにて呼吸管理し, 一時改善したが, 1月16日酸素飽和度の悪化が見られ, さらにPDAも悪化したため, 名古屋大学転送となった。入院時, 好酸球増多は見られなかったが(表5), その後増加し(図3), 皮膚炎にMRSA感染を合併し, 次第に治療に不応となって平成13年8月28日死亡した。

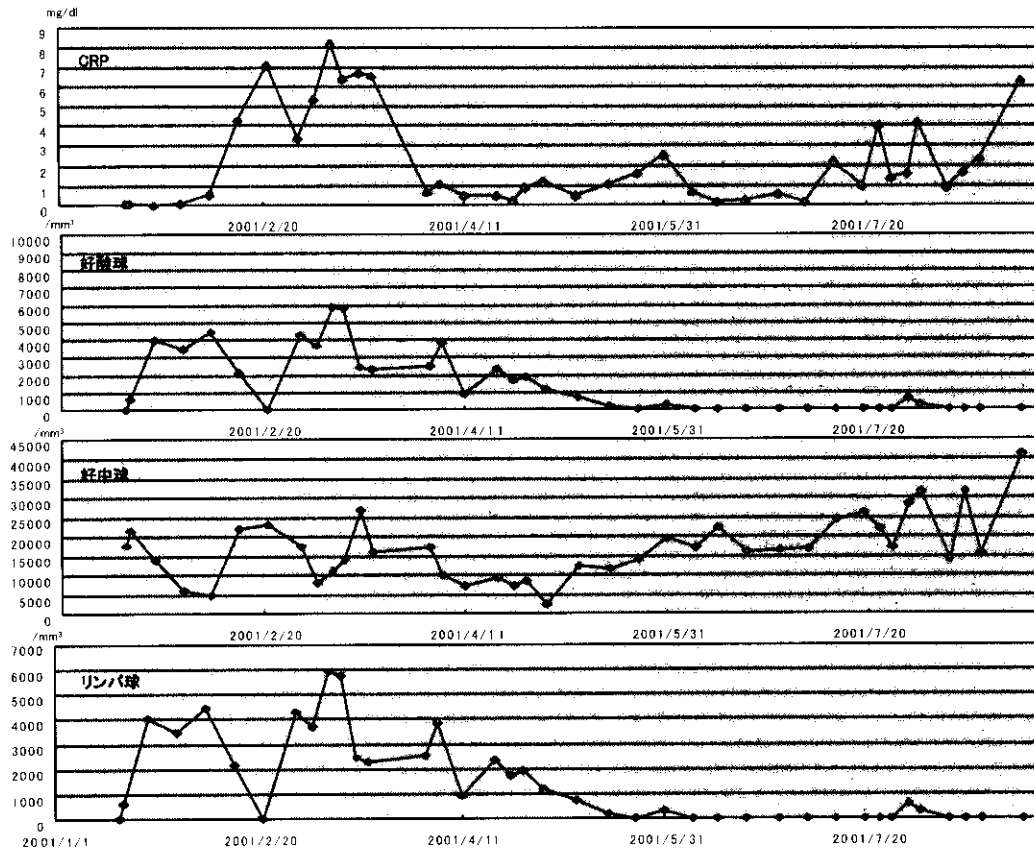


図 2. 症例 2 (III-3) の入院経過

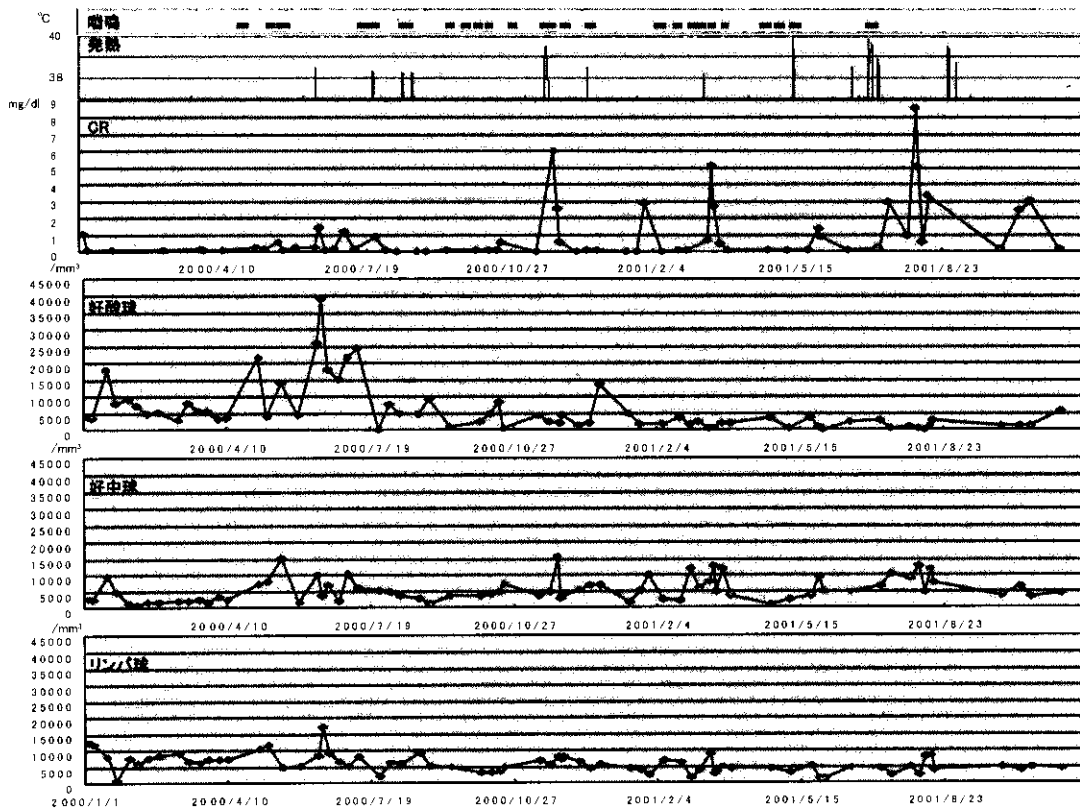


図 3. 症例 4 (III-5) の入院経過

表 5. 症例 4 (III-5) 入院時所見

入院時現症 (日齢39日)						
体重 694g,						
顔貌異常なし, 大泉門0.5横指陥没, 耳介の異常なし,						
心音; 連続性雑音を聴取, 呼吸音; 正常						
腹部平坦, 肝脾腫なし,						
肛門外陰部異常なし,						
四肢の奇形なし,						
皮膚; ツルゴール低下						
入院時検査所見						
RBC	467	×10 <sup>4</sup> /ml	TP	3.6	g/dl	リンパ球サブセット
Hb	12.0	g/dl	GOT	22	IU/L	CD3+ 4100 /ml
WBC	23500	/ml	GPT	15	IU/L	CD4+ 3900 /ml
Eo	0	%	T.Bil	7.1	mg/dl	CD8+ 2020 /ml
Neu	76	%	D.Bil	2.4	IU/L	CD56+ 1810 /ml
Lym	12	%	Na	136	mEq/L	CD20+ 351 /ml
Plt	80.8	×10 <sup>4</sup> /ml	K	3.0	mEq/L	
CRP	0.1	mg/dl	Cl	99	mEq/L	リンパ球芽球化能
IgG	228	mg/dl	Ca	4.4	mEq/L	Med 861 cpm
IgA	14	mg/dl	P	1.8	mg/dl	PHA 14203 cpm
IgM	33	mg/dl	ALP	548	IU/L	ConA 10464 cpm
IgE	16	IU/ml				Sac 5512 cpm

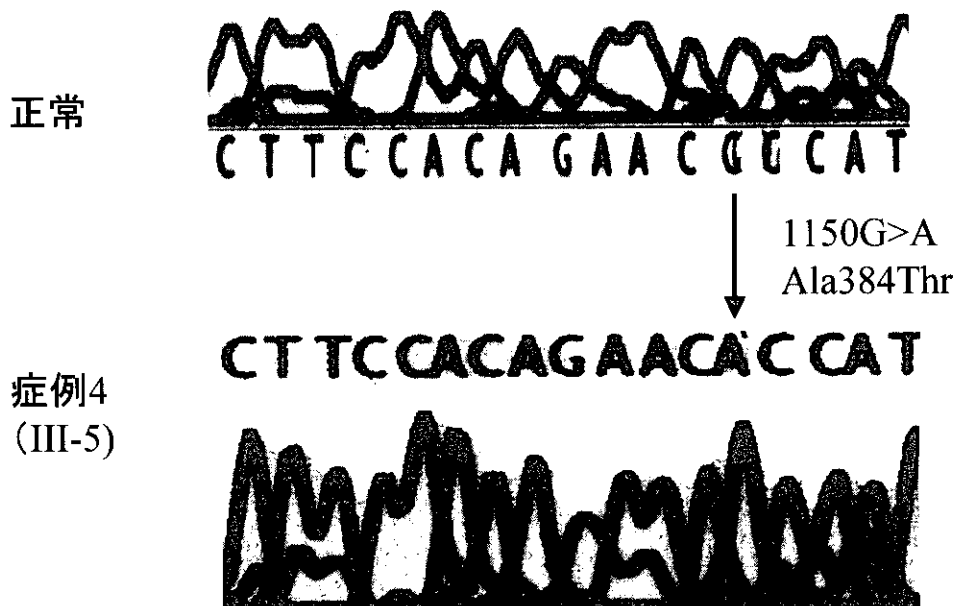


図 4. 症例4 (III-5) で見られた遺伝子変異

#### 【結果】

症例 4 (III-5) のゲノムDNAを用い, PCRにて *FOXP3* 各エクソンを増幅し塩基配列を決定したところ, 1150G>A (Ala384Thr) のミスセンス変異を見出した (図 4)。

#### 【考案】

*FOXP3* は, ヒトのXLAADの病因として同定されたforkhead familyに属する転写因子であり, Scurfyと名付けられた遺伝性リンパ増殖性疾患モデルマウスの病因であることも明らかにされている。