

生頻度は不明であり、他にこの症例でみられた水痘ウイルス感染、家族的素因（姉と親戚に髄芽細胞腫）、それに γc 鎖発現によるgrowth advantageの賦与なども関与している可能性が否定できない。昨年末、さらにもう一例、遺伝子治療後の患者に α/β T細胞性白血病が発生したと報告されたが、その詳細についてはまだ明らかになっていない。

我々の症例の場合、家族内にHLA一致ドナーが存在せず、さらに重症感染症もあるため、遺伝子治療が良い適応となるはずだった。しかし、遺伝子治療の副作用のため遺伝子治療は保留中で、造血幹細胞移植を行うこととした。しかし、従来行

われてきたT細胞除去HLAハプロタイプ一致血縁骨髓移植は、移植片対宿主病（GVHD）、T細胞の生着遅延による感染症の危険、不完全な免疫再構築による低ガンマグロブリン値の持続、生着不全、自己免疫性溶血性貧血などの合併があることとT細胞除去に異種血球である羊赤血球が使用されることなど安全性の問題が残る^{2,3)}。非血縁臍帯血移植も選択肢にはいるが、前処置が必要で重症感染症を合併している患児には高度の危険を伴う。そこで、未熟な血液系の細胞に発現している表面抗原であるCD34を指標として造血幹細胞を分離・濃縮してから移植を行うCD34純化造血幹細胞移植を前処置なしで行うことにした⁴⁾。この方法で

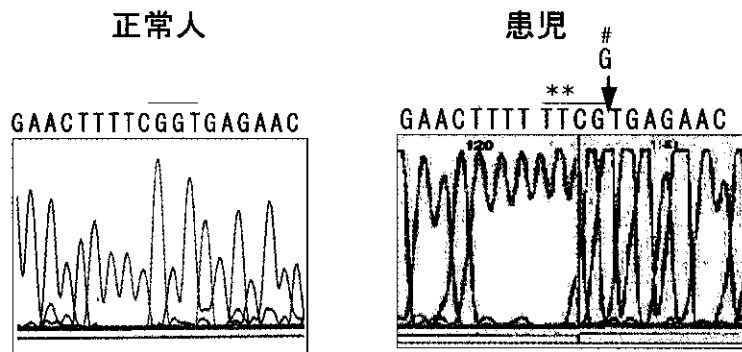


図3. 患児の γc 鎖変異

変異は γc 鎖の第7エクソンに存在し、cDNAの核酸レベルでは937番目にTが2個挿入され、さらに939番目のGが欠失していた。*は挿入変異を、#は欠失変異を現す。

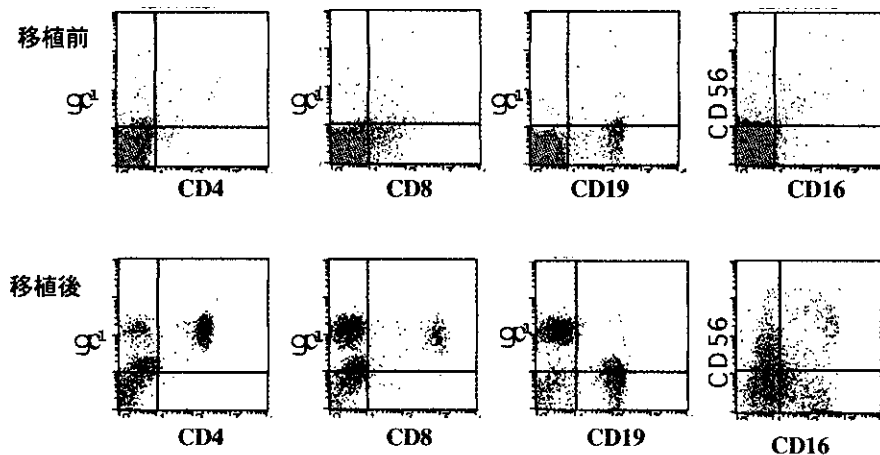


図4. 移植前後の末梢血リンパ球分画 γc 鎖発現とNK細胞

上段は移植直前の末梢血検査を、下段は移植後1カ月めの末梢血リンパ球分画における γc 鎖発現と移植後1カ月半の末梢血CD16/56陽性NK細胞を示す。

は造血幹細胞のみを分離・濃縮してくるため、結果として混入してくるT細胞の割合が減り、重症GVHD発症の頻度も低くなる。また、CD34純化造血幹細胞移植は自家、同種移植共に生着が可能で造血系および免疫系の再構築が可能であることが知られている。この方法では従来行われてきたT細胞除去造血幹細胞移植と同様、リンパ球系細胞の回復が遅れ感染症が多くなる傾向にあるが、造血3系統の回復日数はCD34陽性細胞が十分確保されれば通常の移植と同様であると報告されている⁸⁾。我々の症例でも前処置なしで早期生着がえられ、重症GVHDが回避できたことから、HLAハプロ一致純化CD34陽性末梢血幹細胞大量移植はHLA一致血縁ドナーの存在しないX-SCID患者に対する有望な治療法の一つとなりうると考えられた。

【参考文献】

1. Fischer A. Severe combined immunodeficiency (SCID). *Clin Exp Immunol* 122: 143-149, 2000.
2. Buckley RH, Schiff SE, Schiff BS, Markert L, Williams LW, Roberts JL, Myers LA, Ward FE. Hematopoietic stem-cell transplantation for the treatment of severe combined immunodeficiency. *N Eng J Med* 340:508-516, 1999.
3. Haddad E, Landais P, Friedrich W, Gerritsen B, Cavazzana-Calvo M, Morgan G, Bertrand Y, Fasth A, Porta F, Cant A, Espanol T, Muller S, Veys P, Vossen J, Fischer A. Long-term immune reconstitution and outcome after HLA-nonidentical T-cell-depleted bone marrow transplantation for severe combined immunodeficiency: a European retrospective study of 116 patients. *Blood* 91: 3646-3653, 1998.
4. Cavazzana-Calvo M, Hacein-Bey S, de Saint Basile G, Gross F, Yvon E, Nusbaum P, Selz F, Hue C, Certain S, Casanova JL, Bousso P, Deist FL, Fischer A. Gene therapy of human severe combined immunodeficiency (SCID)-X1 disease. *Science* 288: 669-672, 2000.
5. Hacein-Bey-Abina S, Deist FL, Carlier F, Bouneaud C, Hue C, De Villartay J-P, Thrasher AJ, Wulffraar N, Sorensen R, Dupuis-Girod S, Fischer A, Cavazzana-Calvo M. Sustained correction of X-linked severe combined immunodeficiency by ex vivo gene therapy. *N Eng J Med* 346:1185-1193, 2002.
6. Hacein-Bey-Abina S, von Kalle C, Schmidt M, Le Deist F, Wulffraat N, McIntyre E, Radford I, Villeval JL, Fraser CC, Cavazzana-Calvo M, Fischer A. A serious adverse event after successful gene therapy for X-linked severe combined immunodeficiency. *N Engl J Med* 348:255-256, 2003.
7. Urbano-Ispizua A, Brunet S, Solano C, Moraleda JM, Rovira M, Zuazu J, de La Rubia J, Bargay J, Caballero D, Diez-Martin JL, Ojeda E, Perez de Oteiza JP, Ferra C, Espigado I, Alegre A, de La Serna J, Torres P, Riu C, Odriozola J, Rozman C, Sierra J, Garcia-Conde J, Montserrat E. Allogeneic transplantation of CD34+-selected cells from peripheral blood in patients with myeloid malignancies in early phase: a case control comparison with unmodified peripheral blood transplantation. *Bone Marrow Transplant* 28:349-354, 2001.
8. Handgretinger R, Klingebiel T, Lang P, Schumm M, Neu S, Geiselhart A, Bader P, Schlegel PG, Greil J, Stachel D, Herzog RJ, Niethammer D. Megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from HLA-mismatched parental donors in children. *Bone Marrow Transplant* 27: 777-783, 2001.

Therapy choice for X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID).

Satoru Kumaki¹, Masayoshi Minegishi², Yoshiyuki Ohashi¹, Kazuaki Anan¹, Hiroshi Asada¹, Mikiya Endo³, Katsuya Yamamoto⁴, Kazuo Sugamura⁵ and Shigeru Tsuchiya¹

¹Department of Pediatric Oncology, Institute of Development, Aging and Cancer, Tohoku University, ²Division of Transfusion, Tohoku University Hospital, ³Department of Pediatrics, Iwate Medical University School of Medicine, ⁴Department of Pediatrics, Sendai City Hospital, ⁵Department of Immunology, Tohoku University School of Medicine.

A gene therapy clinical trial for X-SCID using the γ c chain had been initiated in France. We have been attempting to conduct a similar plan of the X-SCID gene therapy clinical trial and have already received government approval. Recently, however, a serious adverse effect of the gene therapy (leukemia) was reported from the French group and we have decided to put on hold our clinical trial. In the meantime, an X-SCID patient with severe *Pneumocystis carinii* pneumonia requiring mechanical ventilation support was identified. Since the patient did not have an HLA-identical family donor and suffered from severe infection, a megadose transplantation of purified peripheral blood CD34(+) progenitor cells from the HLA-haploidentical mother was performed without pretransplant-conditioning. After the transplantation, engraftment was achieved relatively earlier, and concomitantly, the patient recovered from the pneumonia. The result indicates that this approach offers a promising therapeutic option for X-SCID patients without an HLA-identical family donor.

造血幹細胞を標的としたX連鎖重症複合型免疫不全症の遺伝子治療改良型ベクターの作成と造血幹細胞への遺伝子導入

福 永 慶 隆 (日本医科大学付属病院小児科)
伊 藤 保 彦 (日本医科大学付属病院小児科)
早 川 潤 (日本医科大学付属病院小児科)
右 田 真 (日本医科大学付属病院小児科)
島 田 隆 (日本医科大学第二生化学)

X連鎖型重症複合型免疫不全症(X-SCID)はIL-2受容体common γ ($c\gamma$)鎖遺伝子の異常により細胞性免疫と液性免疫両方が障害される免疫不全症である。いままでは早期の造血幹細胞移植のみが唯一の根治的治療であった。しかし発見時にすでに重症感染症を合併していることが多く、また必ずしも移植ドナーがスムーズに得られるとは限らず、移植後も免疫能再建が不完全であったり、晩期障害など問題が山積している。もし自己の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が可能であれば、さらなる治療成績の向上が期待できる。すでにフランスではFischerらがヒトにMFGレトロウイルスベクターを用いて遺伝子治療を行った。いままで十数例の臨床応用が行われ、一応の臨床的改善を認めた。しかし従来のレトロウイルスベクターは造血幹細胞に対する遺伝子導入効率が低く、また長期的にはメチル化が起り恒久的な導入遺伝子の発現には疑問符があった。そこで、治療成績の改善を目標として、我々の研究室では汎用されているマウス白血病ウイルスのプロモーター、エンハンサーであるLTRをMyeloproliferative sarcoma ウイルス由来のLTRを用い、長期発現を可能とするために5'LTRのすぐ下流域に存在するnegative control regionを除いたMNDベクターに治療用遺伝子 $c\gamma$ を組み込んだ改良型レトロウイルスベクターを構築して、高力価のウイルスを産生するパッケージング細胞(GPAm12/ $c\gamma$)を樹立した。われわれは今後、新たに作製した改良型治療用ベクターなどを持ちいて、遺伝子導入のメカニズムの解明、導入効率の向上、さらなる安全性の検討を重ね、国産の改良型ベクターを用いた遺伝子治療の実現を目指したい。

研究目的

先天性疾患に対する遺伝子治療は実施から10年以上を経過し、臨床的な面で新しい知識が積み重ねられてきた。1990年に米国で行われたADA欠損症に対する世界初の遺伝子治療はレトロウイルスベクターが用いられた。その後アデノウイルス、HIVウイルスなど種々のベクターシステムが考案されてきたが、臨床応用の大半をレトロウイルスベクターが占めている。その理由としてはそのレトロウイルスの持つ特異的な感染様式が細胞障害性のない遺伝子導入を可能とし、目的遺伝子が宿

主ゲノムに組み込まれるため、永続的な遺伝子発現が期待できる。しかし、分裂細胞へしか感染しなく、造血幹細胞への遺伝子導入を困難にしている。造血幹細胞は自己複製能と多分化能を持つ細胞であり、恒久的治療を目的とする遺伝子治療の理想的な標的細胞の一つであるが、分裂期にある細胞はそのうちのごく一部にすぎない^{2,3)}。

X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID:X-linked sever combined immunodeficiency)は伴性劣性遺伝形式をとり、細胞性免疫と液性免疫の両方が障害される複合免疫不全症(SCID)の一つであり、

SCIDのなかで最も頻度の多い疾患である⁴。本邦では厚生省原発性免疫不全症候群調査班の統計で2003年までに111例が報告されている本疾患はT細胞、NK細胞が存在しない。B細胞数は正常から低下しているものまで様々であるが、T細胞欠除のため、抗体産生能は欠如する。そのため臨床症状としては生後まもなくから肺炎、中耳炎、驚口瘡など細菌、ウイルスに限らず真菌、原虫などすべての病原体に対し易感染性を呈する予後不良の疾患である。根治療法として骨髄移植や臍帯血移植など造血幹細胞移植が行われているが、移植に際してHLA適合ドナーが必要であり、移植時の危険も伴う。

本疾患において1993年にその責任遺伝子がインターロイキン2受容体(IL-2R)common γ ($c\gamma$)鎖であることが判明した⁵。 $c\gamma$ 鎖遺伝子はXp13にコードされ、4.2kbの塩基配列をもち、IL-2受容体は α 、 β 、 γ の3つのサブユニットから構成される。この $c\gamma$ 鎖はIL-2受容体以外にもIL-4,7,9,15,21の受容体に共通するサブユニットであり、それぞれのサイトカインからのシグナル伝達に重要な役割を果たしている^{6,7}。したがって、 $c\gamma$ 鎖に異常があると、細胞の分化、増殖、活性化に異常が出現しT細胞、B細胞、NK細胞のいずれの機能も障害されて細胞性免疫、液性免疫の両方の複合免疫不全となる事が判明した。

XSCIDはこれまでは造血幹細胞移植のみが唯一の治療法と考えられてきた。しかし発見時に重症感染症を呈していることが多く、必ずしもHLA一致の同胞ドナーを得られるとは限らない。米国や欧州の報告によるとHLA一致の骨髄移植では良好な成績を修めたものの、HLA不一致骨髄移植では治療成績は60%前後という^{8,9,10}。また造血幹細胞移植そのもののリスクは高く、生着後もB細胞再建不良は半数以上の症例で認められ、免疫補充療法の継続を必要とする症例も多い。晩期障害の問題も大きく、患児のQOLの向上も重要な問題である。そこでさらなる治療成績の向上のため、自己の造血幹細胞を標的とした遺伝子治療が考えられた。造血幹細胞は多分化能と自己複製能があり、一生にわたって造血能を発揮する。もし自己の細

胞に治療遺伝子を導入しそれを体内へ戻して生着、分化と増殖が可能なら、拒絶反応もなく、まさに理想的に根治できる。 $c\gamma$ ノックアウトマウスに対する遺伝子治療の成功がすでに報告されていたが^{11,12}、フランスのA.Fischerらのグループは、HLA同胞ドナーが得られない患児に対しヒトのX-SCID患者の骨髄から分離したCD34陽性細胞に治療遺伝子を組み込んだレトロウイルスベクターを感染させヒト $c\gamma$ 鎖遺伝子を遺伝子導入し、特に前処置をすることなく患者生体へ戻した¹³。結果Tリンパ球とNK細胞は順調に増加し、免疫能が回復し、臨床的には改善を見せた。しかし治療後に正常 $c\gamma$ 鎖遺伝子を含むBリンパ球の頻度は低かったと報告されている。X-SCIDの遺伝子治療においては、より幼弱な真の造血幹細胞への効率のよい遺伝子導入の実現とその恒久的な発現が、すべての免疫能の回復および根治的治療に結びつくと考える。われわれはすでにFisherらが行ったX-SCIDの遺伝子治療においての問題点を踏まえ、より導入効率の良いX-SCIDに対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の実現を目指したい。

研究方法

①改良型ベクターの開発

ヒト $c\gamma$ 鎖遺伝子を組み込んだベクタープラスミドを構築し、高力価のベクターを産生するパッケージング細胞のクローニングを目指した。Pearsらは、一過性に高力価のエコトロピックな組み換えレトロウイルスベクターを産生するBOSC23細胞を作成した¹⁴。われわれはこの細胞にレトロウイルスベクターをトランスフェクションし、産生されたウイルス上清をアンホトロピックなパッケージング細胞に繰り返し感染させて高力価のパッケージング細胞を作成した。

また選択的マーカーとしてネオマイシン耐性geneを含んだ $c\gamma$ 鎖を発現するウイルスベクターを作成しpositive selectionにてより産生効率の良いベクターを作成した。

ベクタープラスミドはフランスで使用されたMFGと類似なマウス白血病ウイルス(MOMLV)を基盤としたレトロウイルスベクターであるpG1と

Myeloproliferative sarcoma virus(MPSV)を基盤とし5'LTRにMPSVのLTRを用いその内部に含まれるnegative control regionを取り除き、さらに5'LTRのすぐ下流に存在するprimer binding siteを改変したMNDの2種類を用いた。MNDはプロモーター、エンハンサーを改良し、従来型のレトロウイルスベクターの問題点であった、発現効率、長期発現の問題を改善しようとしたものである。長期発現の低下が起こる理由の一つとしてLTRのメチル化が指摘され、MNDは5'LTRにMPSVのLTRを用い、その内部に含まれるnegative control regionを除き、さらに5'LTRのすぐ下流域に存在するprimer binding siteを改変したものである¹⁹⁾。

②パッケージング細胞の作製及び評価

ヒトc γ 鎖遺伝子を組み込んだベクタープラスミドをアンフォトロピック細胞(GPAM12)にトランスダクションし、さらにトランスフェクションしてエコトロピック細胞(E86)にも感染させて、パッケージング細胞を樹立した。樹立した細胞がc γ 鎖を発現しているかをフローサイトメーターをもちいて確認し、ノーザンプロット法でmRNAレベルでの発現を確認した。

③造血幹細胞に対する遺伝子導入

ヒト臍帯血CD34細胞をビーズ法でセレクションし、アンフォトロピック細胞(GPAM PG1-IL2、GPAM12 MND-IL2)を用いて遺伝子導入をした。その後FACS、造血コロニーアッセイを用いて導入率の検討をした。

④in vivoの実験系の確立

エコトロピック細胞(E86 PG1-IL2, E86 MND-IL2)を用いて、遺伝子治療のin vivoでの実験を進めるためc γ 鎖遺伝子ノックアウトマウスを繁殖させた。

研究結果

①ベクタープラスミドの作成(PG1-IL2 neo)の作製

治療遺伝子であるIL2c γ cDNAはLTRにより発現がコントロールされていて、マーカー遺伝子であるネオマイシン耐性遺伝子(neo)はヘルペスウイルスチミジンキナーゼ(TK)遺伝子のプロモーター

によりコントロールされるように設計した。ベクタープラスミドはまずTK-neoのカセットを制限酵素により切断し、レトロウイルスベクタープラスミドのマルチクロニングサイトに挿入し、次にIL2c γ cDNAを同様な方法で挿入し構築した(Fig.1)。

パッケージング細胞(レトロウイルス産生細胞)の作製

一過性エコトロピックレトロウイルス産生細胞(BOSC細胞)にベクタープラスミドをリン酸カルシウム法を用いてトランスフェクションした。BOSC細胞より得たウイルス上清をアンフォトロピックレトロウイルス産生細胞(GPAM12)に遺伝子導入し高力価のウイルス産生細胞を作製した(以下GPAM12 PG1-IL2、GPAM12 MND-IL2と略す)。またネオマイシンを用いてポジティブセレクションした。さらにその作製したウイルス産生細胞をエコトロピックレトロウイルス産生細胞(E86)にトランスダクションしエコトロピックレトロウイルス産生細胞を作製した(以下E86 PG1-IL2, E86 MND-IL2と略す)(Fig.1)。

③パッケージング細胞の評価

ヒトc γ 鎖に特異的な単クローン抗体TUGh4を用い、我々の作製した4種(GPAM12 PG1-IL2、GPAM12 MND-IL2、E86 PG1-IL2, E86 MND-IL2)のパッケージング細胞のc γ 鎖発現の有無を調べた。いずれのレトロウイルス産生細胞にもc γ 鎖の発現を認めた。またノーザンプロット法を用いて各々のパッケージング細胞にc γ 鎖のmRNAの存在を確認した(Fig.2)。

④造血幹細胞への遺伝子導入

十分なインフォームドコンセントをして了承いただいた臍帯血を使用した。採取して数時間以内の臍帯血から単核球を分離し、ビーズ法にてCD34陽性細胞をポジティブセレクションした。その細胞を遺伝子導入効率を上げるためフィブロネクチン(CH-296;RetroNectin/Takara Biomedical社)でコートしたディッシュの上で培養した。IL3,IL6,SCF, TPO, Flt3のサイトカイン下で48時間刺激し造血幹細胞を分裂期にいたした上で、アンフォトロピックなGPAM12 PG1-IL2、GPAM12

MND-IL2細胞の上清を用いて、1日4回の合計4回の遺伝子導入を行った¹⁹⁾(Fig.3.)。その後培養した骨髄をc γ 鎖の特異的抗体であるTUGh4を用いてフローサイトメーターで評価した。すると健康人の臍帯血より遺伝子導入した群ではTUGh4の発現が有意に上昇した(Fig.4.)。また遺伝子導入したCD34細胞を用いて造血コロニーアッセイをしたところ、全血球系への分化が確認された。その中のいくつかをコロニーピッキングし、PCRサザン法で増幅して検討したところ、フローサイトメーターで確認した頻度と同様に導入遺伝子の発現を確認した(Fig.5.)。

⑤in vivoの実験系の確立

遺伝子導入した造血幹細胞が実際に自己複製と多分化能を維持し、in vivoにおいて長期造血再構築能を維持できるか、またメチル化を受けずに導入遺伝子が長期にわたって発現するかを検討するため、放射線照射したNOD/SCIDマウスにc γ 鎖遺伝子を遺伝子導入したCD34細胞を移植し、現在検討中である。またc γ ノックアウトマウスを用いて、エコトロピック細胞(E86 PG1-IL2, E86 MND-IL2)による造血幹細胞を標的とした遺伝子治療実験その評価法を検討中である。

遺伝子工学の急速な発展にともない種々の単一遺伝子異常による遺伝病の病因遺伝子が同定、単離され始めた。このことにより正常な遺伝子を患者の細胞に遺伝子導入し形質を正常化するという遺伝子治療が現実のものとなり、1990年米国においてAdenosine deaminase(ADA)欠損症の女児に世界初の遺伝子治療が行われた¹⁷⁾。その後、単一遺伝子病のみならずガンやエイズなど種々の疾患に対して遺伝子治療の臨床応用が行われているが、多くのプロトコールがもっとも研究の進んだマウスのレトロウイルス由来のベクターを使用したものであった。造血幹細胞は自己複製能と多分化能を有し各血液細胞へと分化する。よって少数の細胞であってもレシピエントの造血細胞を再構築する事ができる。このため造血幹細胞に効率よく遺伝子導入する事が可能になれば骨髄移植が有効である単一遺伝子病患者にとって、永続的な治療効果を期待できる。

造血幹細胞への遺伝子導入では、ベクターが標的細胞のゲノムに組み込まれることが必要である。そうでなければ分裂の度にベクターが希釈されて造血幹細胞の持つ自己複製能の利用はできず、発現遺伝子は希釈される。レトロウイルスベクターを用いた場合は、マウスでは末梢血に50%以上の遺伝子導入が可能であった¹⁸⁾。しかしヒトの場合ははるかに低く1%未満であり、その導入効率の低さが造血幹細胞に対する遺伝子治療の実現を困難にしている。その理由は、第一にはヒトのような大型動物では造血幹細胞の自己複製頻度はマウスに比し遙かに低いのでレトロウイルスの感染を受けにくいこと¹⁹⁾。第二には霊長類と齧歯類では造血幹細胞上のウイルス受容体の数に大きな差があることである。ヒトのレトロウイルス受容体であるアンフォトロピック受容体は齧歯類に特異的なエコトロピック受容体に比し、はるかに発現が少なくヒト造血幹細胞はそれだけ感染に対して抵抗性になる。

より有効な遺伝子治療の実現へ向けてさらには、レトロウイルス導入時の至適条件の検討、新しいウイルスベクターの開発、自家移植の前処置の必要性の検討なども必要と考える。造血幹細胞は大半は分裂していないため遺伝子導入にあたっては種々のサイトカインによる刺激が必要となる。造血幹細胞を分化させることなく、ex vivoで増幅させるサイトカインの検討により、SCF, FL, トロンボポエチン(TPO), IL-6/sIL-6Rのサイトカインの組み合わせではSRCは4.2倍に増幅されることがわかった²⁰⁾。Fisherらは遺伝子導入の際の増殖刺激にstem cell factor, トロンボポエチン, IL-3, Flt3リガンドを用いた。さらにフィブロネクチンフラグメント(CH296)をコーティングしたプラスチックバックを用いた。これに対し、われわれはより効率の導入効率を得るため、IL3, IL6, SCF, FL2/3, TPOの組み合わせとCH296を使用した。

FischerらはX-SCID患者の骨髄細胞からCD34(+)細胞を分離しレトロウイルスベクターを用いてc γ 鎖遺伝子の導入をおこない、細胞を患者に移植し遺伝子治療を行った。患者は骨髄抑制のための処理を受けていない状況で実施されたが、投与15

日目には末梢血に γ 鎖陽性細胞が出現し、T細胞、NK細胞には導入遺伝子の発現を10ヶ月以上にわたり確認した¹⁹⁾。患児は免疫学的には各種抗原に対する反応も年齢相応の対照群と相違なく臨床的には明らかな改善をみたが、治療後も血清IgG値は低下しており正常 γ 鎖を含むB細胞数の頻度も低く、B細胞に対する遺伝子導入は不十分であった。液性免疫の再構築、長期発現に関しては課題となっている。

我々の作製したMNDベクターを含む種々の改良型レトロウイルスベクターを用いてその遺伝子導入効率を検討した知見はすでに報告があるが²¹⁾、その評価に用いたのはマウスの骨髄細胞であった。B細胞にも効率よく遺伝子導入がなされ、液性免疫の再構築も確認されている。しかし、ヒト造血幹細胞はマウスに比し自己複製の頻度が少ないため、技術的な困難さをさらに伴う。われわれは臍帯血を用いて評価した。造血コロニーアッセイでは各血球系への分化を確認したが生体内で液性免疫の回復まで見ることが出来るかは今後の課題である。

結 論

X-SCIDに対する造血幹細胞を標的とした遺伝子治療はHLA一致同胞ドナーがいない患者に対し朗報をもたらし、フランスではすでに十数例に対し施行され、2例を除き骨髄細胞に γ 鎖遺伝子の導入が確認され、免疫能の改善をみとめた。しかし、最近その中の一例が、治療後31週の水痘罹患後からT細胞数が上昇し34週で300,000を越え、白血病を発症したとの報告があった²³⁾。その白血病細胞はCD3、4、7、28、45陽性で、monoclonalな γ δ T細胞の上昇を認めT-ALLであった。染色体検索では11q13に導入遺伝子の1コピーが逆方向に挿入されていた。その場所はT-ALLの発症に関与する転写遺伝子といわれるLMO2遺伝子の第一イントロンであり、LMO2遺伝子の過剰発現を認めた。このことは治療遺伝子のレトロウイルスの挿入変異によるLMO2遺伝子の異常発現が白血病発症の帰転になった可能性を示唆している。これまでもADA欠損症、Fanconi貧血、Gaucher病、

慢性肉芽腫症などに対して造血幹細胞を標的とした遺伝子治療の臨床応用が行われたが、X-SCIDほどにははっきりとした有効性が確認されなかった。遺伝子治療を成功させるためには、生体内での導入細胞の分化増殖が欠陥細胞に対して選択的に優位である (growth advantage) が必要である。X-SCIDにおける遺伝子治療が成功した最大の理由はその疾患におけるgrowth advantageであったかもしれない。まさに格好の遺伝子治療の適応疾患である。しかし、現在の手法では導入遺伝子はどこの部分に組み込まれ、どの様な悪影響を及ぼすかは確認できない。もしかしたら今回の白血病発症は起こるべくして発生した事件なのかもしれない。しかし、従来行われていた造血幹細胞移植の侵襲性と治療のリスク、晩期障害のことを考えると、X-SCIDの患者に対しては一日でも早い遺伝子治療の確立が必要である。今回の白血病発症を教訓とし、より安全で効果的な次世代の遺伝子治療法の開発が急務となった。われわれも次世代の改良型ベクターの開発を進めるとともに、我々のアッセイ法を発展させて、遺伝子治療による白血病発症のメカニズムの解析、およびより安全な遺伝子導入法の開発を目指していきたい。

参考文献

1. Blaese RM et al: Science 270: 475-80, 1995.
2. Ogawa M: Blood 81: 2844-53, 1993.
3. Karlsson S: Blood 78: 2481-92, 1991.
4. Fukunaga Y: J Nippon Med Sch 67: 83-91, 2000.
5. Noguchi M, et al: Cell 73: 147-57, 1993.
6. Sugamura K, et al: Ann Rev Immunol 14: 179-205, 1996.
7. Asao H, et al: J Immunol 167: 1-5, 2001.
8. Fischer A: N Eng J Med 340: 559-61, 1999.
9. Buckley RH, et al: N Eng J Med 340: 508-16, 1999.
10. Bertrand Y, et al: J Pediatr 134: 740-8, 1999.
11. Soudais C, et al: Blood 95: 3071-7, 2000.
12. Otsu M, et al: Blood 97: 1618-24, 2001.
13. Cavazzana-Galvo M, et al: Science 288: 669-72, 2000.

14. Peras WS, et al.: Proc Natl Acad Sci USA, 90: 8392-6, 1993.
 15. Halene S, et al: Blood 94, 3349-57, 1999.
 16. Ueda T, et al: Stem Cells 18: 204-13, 2000.
 17. Blaese RM, et al: Science 270: 475-80, 1995.
 18. Hanazono Y, et al: Hematopoietic cell transplantation 2nd ed. Blackwell Science, Inc. Malden, MA. pp. 89-96, 1999.

19. Abkowitz JL et al: Nat Med 2: 190, 1996.
 20. Ueda T, et al: J Clin Invest 105: 1013-21, 2000
 21. Guillermo AM, et al: Molecular Therapy 3: 565-73, 2001.
 22. Haccin-Bey-Abina S, et al. N Engl J Med. 348:255-6,2003.

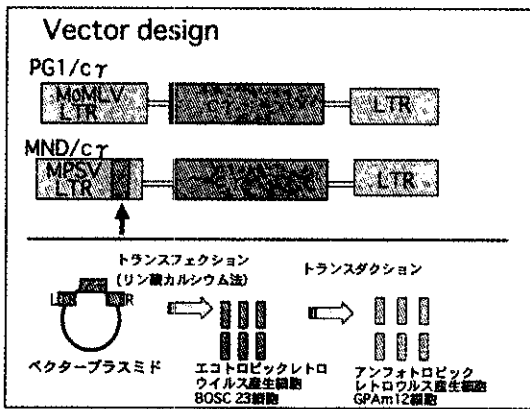


Fig.1

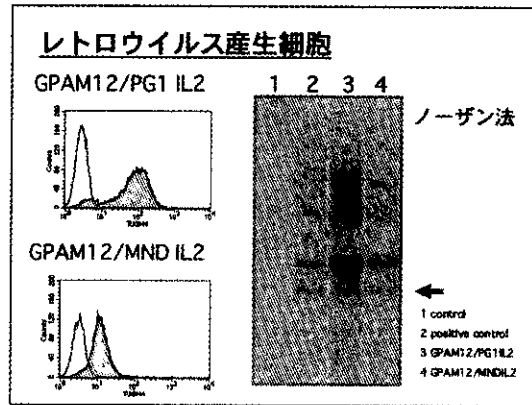


Fig.2

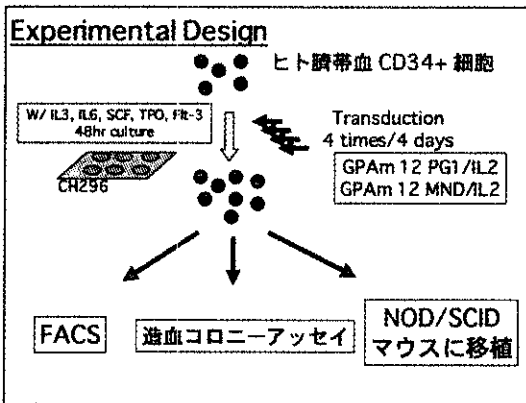


Fig.3

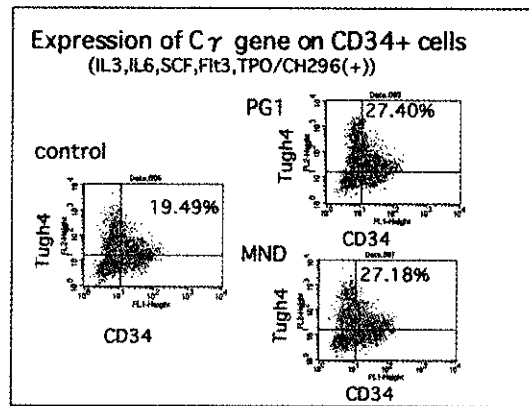


Fig.4

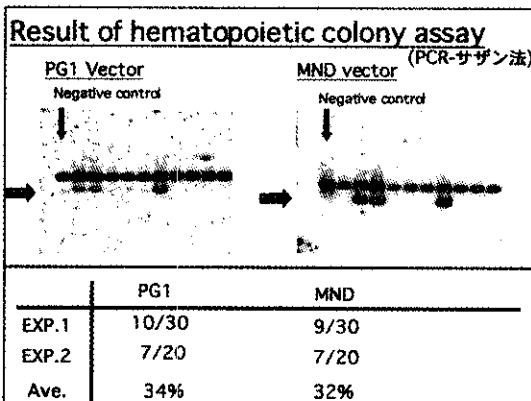


Fig.5

骨髓非破壊的同種骨髓移植により造血能の回復が得られた Myelokathexisの一例

蒲池吉朗 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)
小島勢二 (名古屋大学大学院医学系研究科小児科学)
栢植郁哉 (藤田保健衛生大学小児科)

Myelokathexisは成熟した好中球における著しい変性様形態変化および骨髓における顆粒球系の過形成を特徴とする先天性好中球減少症である。今回我々は18才女性患者に対し、HLA一致の姉をドナーとしてフルダラビン+TBIを用いた骨髓非破壊的同種骨髓移植(ミニトランスプラント)を行い、顆粒球に対する造血能の正常化を認めた。前処置に伴う副作用は軽度で、移植後、感染症や急性GVHDの徴候を認めず、day30にはcomplete chimeraを確認した。day70よりlimited typeの慢性GVHDを発症したが、免疫抑制剤内服の継続のみでday150過ぎには軽快した。本症の成因はいまだ不明であるが、今回、幹細胞移植により顆粒球に対する造血能が正常化したことより、造血細胞自身に原因があることが示唆された。これまで本疾患への造血幹細胞移植例の報告はみられないが、副作用の点からもミニトランスプラントは本症の治療選択肢の一つとして考慮されてもよいと考えられた。

【はじめに】

Myelokathexisは1964年にZeulzerら¹⁾およびKrillら²⁾により初めて報告された、骨髓における顆粒球系の過形成および成熟した好中球における著しい変性様形態変化を特徴とする非常にまれな先天性好中球減少症である。患者は末梢血中の好中球数の減少および機能低下により細菌感染を繰り返すが、抗生物質、G-CSF投与などにより予後は比較的良好であり、これまで造血幹細胞移植の適応疾患とは考えられていなかった³⁾。今回、我々は本症患者に対しHLA一致の姉よりフルダラビンを用いた骨髓非破壊的同種骨髓移植(ミニトランスプラント)⁴⁾を行い、顆粒球に対する造血能の正常化を認めたので報告する。

【症例】

患者は18才女性。家族歴に特記すべきことなし。乳児期より細菌感染による難治性中耳炎や重症呼吸器感染症を繰り返していた。7歳時、中耳炎の術前検査で白血球低下を指摘され近医を紹介

された。そのときの血液検査では白血球 $1400/\mu l$ (好中球51%、リンパ球39%)、赤血球 $467万/\mu l$ 、Hb $13.3g/dl$ 、血小板 $20.8万/\mu l$ 、IgG $428mg/dl$ 、IgA $4mg/dl$ 、IgM $21mg/dl$ と白血球、好中球数の減少ならびに低ガンマグロブリン血症を認めた。そのため当科紹介され、骨髓検査所見よりMyelokathexisと診断された。G-CSFの連日投与により、白血球、好中球数の増加ならびに感染による発熱回数の減少を認めたが、低ガンマグロブリン血症および中耳炎症状は不変であり、またG-CSF開始後、脾臓の腫大および骨髓の繊維化がみられたため、G-CSF投与は約4ヶ月で中止となった。中止後、脾腫および骨髓繊維化は改善したが、白血球および好中球数は開始前に戻り、年に3、4回の細菌性重症呼吸器感染症を反復し、慢性中耳炎の増悪による難聴を認め、11歳時より補聴器の使用が必要となった。現在、全身状態の悪化はないものの血液所見の改善はみられず、重症呼吸器感染症の反復、鼓膜所見の悪化による難聴が徐々に進行していること、G-CSF

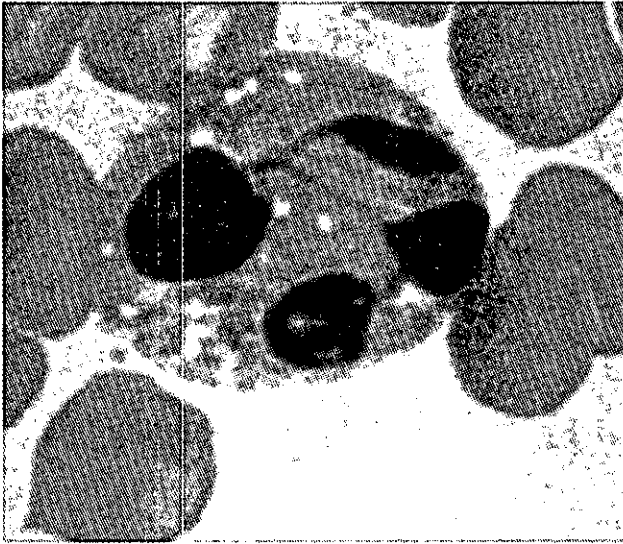


図1. 移植前の好中球分葉核球像

が副作用のため使用できないことおよび大学進学前に何とか治したいという本人の強い希望もあり、HLA一致の姉から同種骨髄移植を行うこととした。入院時、再度本人および家族に世界的にも本疾患に対する骨髄移植例はないことと骨髄移植に伴うリスク、合併症につき説明をおこない、本人および家族の移植希望意思が固いことを確認し、文書による同意を得た。

入院時、年齢18才、身長149cm、体重50kg。血液検査では白血球数900/ μ l、好中球数100/ μ l、Hb13.9g/dl、血小板16.3万/ μ l、

IgG332mg/dl、IgA8mg/dl、IgM18mg/dl。生化学検査では特に異常値は認められなかった。(表1) 骨髄は顆粒球系の成熟停止はなく、過形成を示し、分葉核球の核は辺縁に局在し、過分葉し互いに糸状に結ばれ、細胞質には空胞がみられた。赤芽球系および巨核球系は形態異常を認めなかった。(図1)。また、骨髄単核球およびCD34陽性細胞におけるコロニー形成能に異常は認められなかった。骨髄移植の詳細は表2に示した。HLA一致、血液型マイナーミスマッチの姉をドナーとして、 3×10^8 /kgの骨髄細胞を移植した。前処置はフルダラビン(30mg/m²×4days)と全身放射線照射(TBI,2Gy×1)を行い、GVHD予防には短期MTXとFK506を用いた。サイトメガロウイルス(CMV)感染予防は抗CMV高力価ガンマグロブリンを投与した。前処置中はTBI直後に吐き気と軽度の頭痛がみられた以外は、重篤な自、他覚症状は特に認めなかった。

移植後の経過を図2に示した。G-CSFについては以前の副作用より使用しなかったが、Day21で白血球数および好中球数が各々が1000/ μ l、500/ μ l以上となった。退院まで細菌感染の兆候はまったく認められなかった。粘膜障害については咽喉頭の違和感および口腔粘膜に水疱が1、2個みられた程度で水分経口摂取に支障はなく、

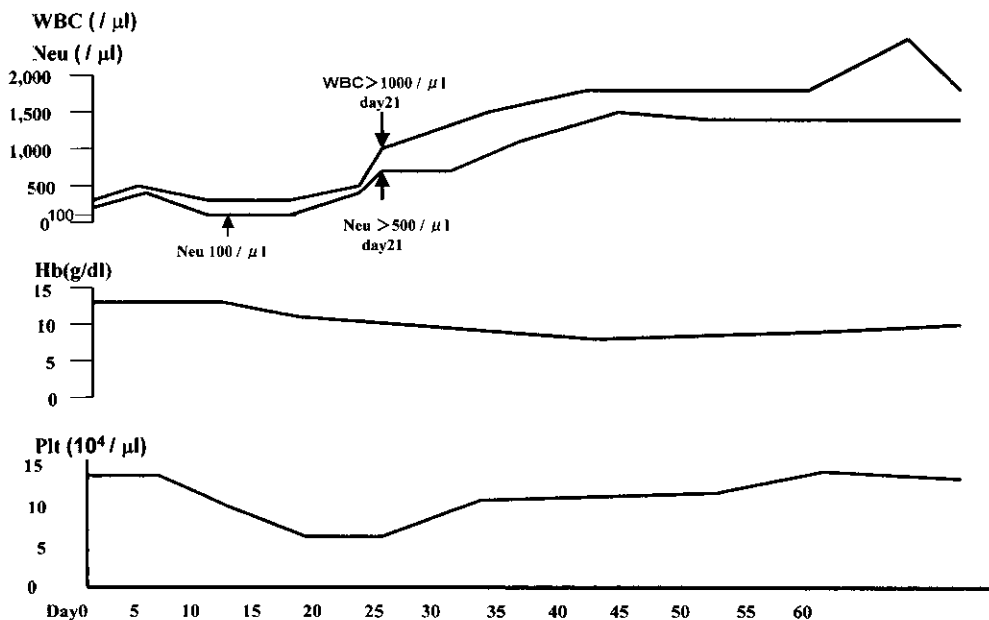


図2 移植後経過

Day10すぎには改善した。急性GVHDの所見はまったく認められなかったが、Day70過ぎより前胸部から腹部、上背部に掻痒を伴う細かい散在性の発疹が出現した。肝機能障害や、口腔症状、眼症状、消化器症状などは認めず、KARNOFSKY Scoreも90から100%だった。退院前のDay83に皮膚生検を施行し、病理所見から慢性GVHDと診断した。退院後Day100では、皮疹の増加や掻痒の増強が見られたが、免疫抑制剤内服の継続のみでDay150過ぎには軽快した。Day30におこなったキメリズム解析にて、complete chimeraを確認し、同時期の骨髓像では移植前にみられた特徴的な好中球の変性像を認めず、骨髓所見の改善がみられた。Day104において、末梢白血球数および好中球数は各々 $6100/\mu\text{l}$ 、 $3000/\mu\text{l}$ と正常化し、免疫機能検査にて、CD20陽性細胞数の増加、S.aureus CowanI刺激によるリンパ球芽球化能およびIn Vitro 免疫グロブリン産生の正常化を認めた。(表3) 現在移植後約1年が経過したが、易感染性や難聴の悪化もなく元気に大学生活を送っている。

【考案】

Myelokathexisの病因についてはいまだ不明であるが、骨髓からの成熟好中球の放出障害と顆粒球系の過形成および骨髓中の成熟した好中球におけるアポトーシスを思わせる著しい変性様形態変化が特徴的である。G-CSFは骨髓中の顆粒球プールから末梢への顆粒球の放出を促進し、またアポトーシスを抑制する作用があることがこれまで報告されている^{4), 5)}が、Aprikyanらは患者へのG-CSFの投与は、本症患者骨髓中のCD15陽性顆粒球系前駆細胞において著減しているBcl-xの発現を促進し、本疾患における末梢血好中球減少の部分的な改善と、またin vitroにおける好中球の生存を著明に改善することを報告した⁶⁾。しかしながら、本症におけるG-CSFおよびG-CSF受容体の遺伝子異常は認められず、また、Bcl-xの発現異常が本症における一次的な原因であるのか否かについては不明なままであり、G-CSF以外の骨髓から末梢への成熟好中球の放出に関与するような他のサイト

カインやケモカインおよびその受容体の変異も病因として示唆されている。いずれにせよ、今回、幹細胞移植により顆粒球に対する造血能が正常化したことより、本疾患においては、造血細胞自身に原因があることが示唆された。

Myelokathexisの病像は、末梢血中の好中球数の著減による乳児期からの細菌性呼吸器感染症の反復である。しかし、他の先天性好中球減少症と異なり、予後は比較的良好であり、文献上調べた限りでは骨髓移植を行なった症例はこれまでなかった。従来は骨髓移植においては、致命的合併症を引き起こす頻度も高かったが、最近の骨髓移植および支持療法の発達は、致命的な骨髓破壊を伴わない前処置を行なうことにより、重篤な副作用の発現を見ることなく、造血幹細胞の生着を可能とした³⁾。本症例は乳児期より中耳炎、肺炎などの呼吸器感染症を反復していたが、G-CSFの投与が有効であり、末梢血中の好中球数の増加や感染回数の減少を見た。しかしながら、G-CSFの副作用として、脾臓の腫大および骨髓の繊維化がみられたため、中止せざるを得なかった。そのため、その後も呼吸器感染症を繰り返し、慢性中耳炎の増悪による難聴が進行すること、本人および家族の治療へ希望が強いこと、HLA一致の同胞が存在することから、ミニトランスプラントを試みることにした。実際、非腫瘍性血液疾患や代謝性疾患で報告されているように重篤な合併症を引き起こすことなく³⁾、complete chimeraとなり、顆粒球に対する造血能の正常化を認めた。Myelokathexisは比較的予後良好な疾患ではあるが、G-CSFの投与が無効であったり、副作用などによりその使用が継続困難となり、感染の反復による重大な合併症の出現を見た時などは、副作用の点からもミニトランスプラントが本症の治療選択の一つとして考慮されてもよいと考えられた。

【文献】

- 1) Zuelzer W.W. Myelokathexis- A new form of chronic granulocytopenia. New England Journal of Medicine;1964 270: 699-704.
- 2) Krill C.E. Smith H.D. Mauer A.M. Chronic

idiopathic granulocytopenia. New England Journal of Medicine; 1964 270: 973-979.

3) Hord J. Whitlock J. Gay J. et al. Clinical feature of myelokathexis and treatment with hematopoietic cytokines: A case report of two patients and review of the literature. Journal of Pediatric Hematology Oncology 1997; 19: 443-448

4) Slavin S. Nagler A. Naparstek E. et al. Nonmyeloablative stem cell transplantation and cell therapy as an alternative to conventional bone marrow transplantation with lethal cytoreduction for the treatment of malignant and nonmalignant hematologic diseases. Blood 1998; 91: 756-763.

5) Weston B. Axtell RA. Todd RF. III et al. Clinical and biologic effects of granulocyte colony stimulating factor in the treatment of myelokathexis. Journal of Pediatrics 1991; 118: 229-234.

6) Cernelc P. Andoljsek D. Makar U. et al. Effects of molgramostim, filgrastim and lenograstim in the treatment of myelokathexis. Eur J Physiol 2000; 440: 81-82.

7) Aprikyan A. Liles W. Park J. et al. Myelokathexis, a congenital disorder of severe neutropenia characterized by accelerated apoptosis and defective expression of bcl-x in neutrophil precursors. Blood 2000; 95: 320-327.

表1 移植前検査所見

WBC	900 / μ l	IgG	332 mg/dl	
Neu	100 / μ l	IgA	8 mg/dl	
Lymph	700 / μ l	IgM	18 mg/dl	
RBC	4.51×10^4 / μ l	AST	12 IU/l	画像所見
Hb	13.9 g/dl	ALT	12 IU/l	X-P及びCT上、肺野に異常所見認めず
Ret.	11 %	LDH	96 IU/l	
Plt	16×10^4 / μ l	CRP	0.1 mg/dl	
Na	138 mEq/l	Cl	102 mEq/l	
K	4.0 mEq/l	Ca	4.7 mEq/l	

表2 骨髄移植

患者	(血液型)	(HLA)			
	A(+)	A31,33	B35,62	CW3	DR2(1101,1501)
ドナー	AB(+)	A31,33	B35,62	CW3	DR2(1101,1501)
前処置	(フルダラピン、TBI)	GVHD予防			
day-5	Flu30mg/m ²	short MTX+FK506			
day-4	Flu30mg/m ²				
day-3	Flu30mg/m ²	輸注有核細胞数			
day-2	Flu30mg/m ²	3 × 10 ⁸ /kg			
day-1	TBI 2Gy × 1				

表3 免疫機能検査

	BMT前(7歳)		BMT後(day331,18歳)	
リンパ球サブセット(%)				
CD3*		65.2		73.3
CD4*		54.3		28.7
CD8*		12.6		44.2
CD56*		nt		15.6
CD20*		3.6		10.4
リンパ球芽球化能(cpm)				
Medium		2807.3 ± 390.2		218.7 ± 40.7
PHA		54600.0 ± 8674.1(19.4)*		24296.7 ± 189.9(111)*
ConA		32300.0 ± 2835.4(11.5)*		nt
PWM		12277.0 ± 1505.7(4.4)*		3133.3 ± 166.6(14.3)*
SAC		6500.0 ± 1315.4(2.3)*		3566.7 ± 105.5(16.3)*
Ig産生能(ng/ml)				
Medium	IgM	IgG	IgM	IgG
PWM	30	19	123.0	285.0
SAC	29	17	855.0	1053.0
SAC+IL2	41	11	1865.0	1072.0
	41	11	4189.0	1286.0

nt: not tested

*: S.I.

Successful reconstitution of myelopoiesis in a patient with myelokathexis who received non-myeloablative bone marrow transplantation using fludarabine

Yoshiro Kamachi¹⁾, Seiji Kojima¹⁾, Ikuya Tsuge²⁾

Department of Pediatrics, Nagoya university Graduate School of Medicine¹⁾

Department of Pediatrics, Fujita Health University²⁾

Myelokathexis is a congenital neutropenia to be characterized by a remarkable degradation of mature neutrophils and myeloid hyperplasia in bone marrow. We report here a successful non-myeloablative bone marrow transplantation (NMBMT) using fludarabine and TBI for a patient with myelokathexis from her HLA-matched sibling donor and recognized reconstitution of her myelopoiesis after NMBMT. The side effect that occurred to her by conditioning was mild. We did not recognize signs of infection or acute GVHD in the patient and confirmed complete chimerism on day 30. Although she developed chronic GVHD of limited type on day 70, her symptom was improved on day 150 by continuing only oral administration of immunosuppressive agent. A cause of this disorder was still unknown. The patient obtained the ability of normal myelopoiesis by stem cell transplantation. It was suggested that the cause of this disorder was due to the abnormal myelopoiesis in patient's hematopoietic cells. Although there has been no report of bone marrow transplantation to this disorder until now, it was thought that we might consider NMBMT as one of treatment alternatives of myelokathexis because of no severe side effect in NMBMT.

IFN- γ 産生能低下と白血球増多症を呈した症例の免疫学的検討

布井博幸 (宮崎医科大学小児科)

水上智之 (熊本大学小児科)

生直後より白血球増多症、下痢不明熱と皮下結節を伴う血管周囲炎を認めていた患者について、免疫学的検査を行った。IFN- γ 産生T細胞が少なく、IL-12存在下でのIFN- γ 産生能も低下していた。そこで、IL-12 / IL-12R系、及びJAK2 / STAT 4などのシグナル伝達系の異常を考え、それらコードする遺伝子配列決定を行ったが、異常を確認できなかった。患者は肺の移動性結節性病変、抗セントロメア抗体陽性となったことからBOOPと診断され、またTCRレパトリーの異常を伴っていた。これらのことから、患者は何らかのT細胞分化誘導機構における先天的免疫異常が考えられ、今後T細胞リセプター(TCR) 下流のシグナル伝達系を含めた検討が必要である。

【はじめに】

我々はこれまで、白血球増多症を呈する白血球粘着不全症候群や白血球減少症を呈する β -アクチン異常症、高IgM症候群などを明らかにしてきた。今回、生直後より白血球増多症(3万-4万)と易感染性を示した症例を経験したので、これまでの免疫学的検討を報告する。

症例：4歳11ヶ月の男児

主訴： 易感染性の精査

家族歴：特に異常なし

既往歴：在胎41週6日、出生時体重 3006g、頭囲経膈分娩出生後より白血球数が高く、NICUに入院となる。退院後も不明熱を繰り返し、白血球増多の状態であった。生後1ヶ月から発熱を繰り返し、生後2ヶ月に水痘罹患。生後3ヶ月から発熱嘔吐あり、PRSPによる化膿性髄膜炎と診断され、抗生物質投与にて軽快している。その後も不明熱が継続するため、免疫不全疑いにて入院精査され、Th1成熟異常が考えられていた。

現病歴： その後も下痢発熱や皮下結節を繰り返し、帯状疱疹の再発、検査値の異常として白血球増多症、血小板増多、鉄欠乏性貧血が持続してい

た。H13. 12月 肺炎にて7回目の入院(原因不明) シプロキササン、カルベニン、メロペン、ミノマイシンなどにて加療されるが、高熱 38-40℃、CRP 持続陽性(maxで27 mg/dl)と改善傾向ないため、精査加療目的にて当科へ搬送入院となる。

臨床所見：身長 cm(-SD)、体重15Kg(-SD)、外胚葉奇形；歯牙形成不全(3歳まで乳歯が認められず、前歯が剣歯のようになっている)と発汗不全が認められる。

生化学検査：TP 6.1g/dl, T-Bil 0.0mg/dl, Alb 3.2g/dl, Na 138mEq/l, K 4.7mEq/l, Cl 105mEq/l, GOT 18U/l, GPT 10U/l, LDH429U/l, ALP 284U/l, Ca 9.8mg/dl, P 5.3mg/dl, LAP 44U/l, γ -GTP 12U/l, BUN 3.1mg/dl, ChE173U/l, Cr 0.20mg/dl, Cu 188 μ g/dl

染色体解析：46 XY 正常

免疫学的検査：WBC 31900/ μ l(St 13.0%, Seg 17.0%, Lymp 55.0%, Mono 10.0%, Eos 5.0%), RBC 347万/ μ l, Hgb 8.0g/dl, Hct 25.5%, Plts 87.2万/ μ l, IgG -G1 1000 mg/dl, -G2 106 mg/dl, -G3 101 mg/dl, -G4 5 mg/dl

IgA 179 mg/dl, IgM 31 mg/dl, IgE 62 lu/l
 リンパ球芽球化反応(コントロール基準値)
 PHA刺激 51276 cpm (26000~53000) , ConA刺激
 27494 cpm(20000~48000)
 バックグランド563 cpm (70~700)
 NK活性(E:T=10:1) 0.8 (control 12.2) , (E:T=20:1)
 1.7 (control 23.1)
 LAK活性 IL-2 (-) 1.8, IL-2 (+) 2.2
 特異的抗体反応 (各々の感染罹患後抗体価)
 VZV-IgG 400×、インフルエンザAシドニー型
 1024×

Th1/Th2細胞の3カラー解析(%)(*は図2参照)

	11/9/'98*	1/11/'991	25/'98	12/5/'02*	Control*
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD4	1.14	3.14	2.65	6.07	13.0
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD8	8.83	70.4	66.29	28.79	60-80
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD56	2.0	66.29	30.22	38.33	80-90

本患者と麻疹肺炎患者でのTh1細胞での比較 (%)

	患者	麻疹肺炎患者
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD4	1.14	15.9±3.4
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD8	8.83	42.0±18.8
IFN- γ (+)IL-4(-)/CD56	2.00	62.7±11.0

麻疹肺炎患者は酸素テントが必要な1歳前後患者8名を対象とした。

IL-12R β 1, β 2, JAK2, STAT 4の遺伝子配列決定
 IL-12R β 1, β 2, JAK2, STAT 4の塩基配列決定を行った[1,2,3,4]。結果何ら塩基配列異常を認めなかった。

今回入院後検査経過 (図3)

<血算>

WBC $26.9 \times 10^3/\mu\text{l}$, RBC $4.32 \times 10^6/\mu\text{l}$, Hb 7.7g/dl,
 Hct 26.9%, Plt $80.0 \times 10^4/\mu\text{l}$

<生化>

TP 8.48 g/dl, AST 29 IU/L, ALT 5 IU/L, LDH 344
 IU/L, CRP 6.5 mg/dl, IgG 2744mg/dl, IgM 109mg/dl,
 IgA 1361mg/dl, C3 138mg/dl, C4 36mg/dl, C50
 58IU/L

【結果と考察】

患者は生直後より白血球増多症、下痢、不明熱

と皮下結節を伴う血管周囲炎を認め、白血球数が経過中常に3万台であったため、詳しい免疫学的な検索を行った。免疫学的にはB細胞(70%以上)特にCD5⁺/CD20⁺B細胞増加と免疫グロブリンの増加が認められ、T細胞はそれに比して低下し、CD4の低下と末梢血にて γ δ T細胞, NK (CD16⁺/CD3⁻) 細胞, NKT(CD57⁺/CD3⁺) 細胞増加が認められた(図1)。本患者と免疫低下をきたす麻疹肺炎患者とのIFN- γ (+)産生細胞分画比較しても、IFN- γ (+) /CD4 (Th1細胞) , /CD8 (Tc1細胞) , /CD56細胞が低値であった。経過中各細胞群比の回復は認められたものの、FACS解析(図2)からIFN- γ (+)細胞のmean channel (産生量)は正常コントロールに比し低下しており、IFN- γ 産生低下が持続している。

次に各種サイトカイン産生能を比較した結果(表1)、Th1/Tc1細胞が産生するIFN- γ , IL-2およびTh2/Tc2細胞が産生するIL-4, -5, -10, -12ともコントロール患者に比し低下していた。それに比べ、MIP-1 α , TNF- α , IL-6などの炎症性サイトカインは刺激前から増加しており、PHA, ConA刺激でも増加していた。すなわち、早期の炎症反応は認められるが、後期の免疫反応が低下していた。以上より、Th1/Tc1細胞の成熟異常を考え、患者T細胞をIL-12存在下で培養し、IFN- γ 産生細胞の増殖を比較したところ、コントロールに比べ明らかなIFN- γ 産生Th1誘導能の低下が認められた(表2)。そこで、Th1細胞の成熟異常をきたすことが知られているIL-12 / IL-12R系、及びJAK2 / STAT 4などのシグナル伝達系についても遺伝子配列決定を行ったが、何らこれらの遺伝子変異を認めなかった。

患者は肺の移動性結節性病変と抗セントロメア抗体陽性であることからBOOPと考えられる病態であることが最近明らかになった。さらにTCRレパートリーの異常を伴っていることから、何らかの先天性免疫異常が考えられ、T細胞リセプター(TCR)下流のシグナル伝達蛋白異常を含めなお検討中である。また、白血球増多症については、

図1：末梢リンパ球表面マーカー解析 (%)

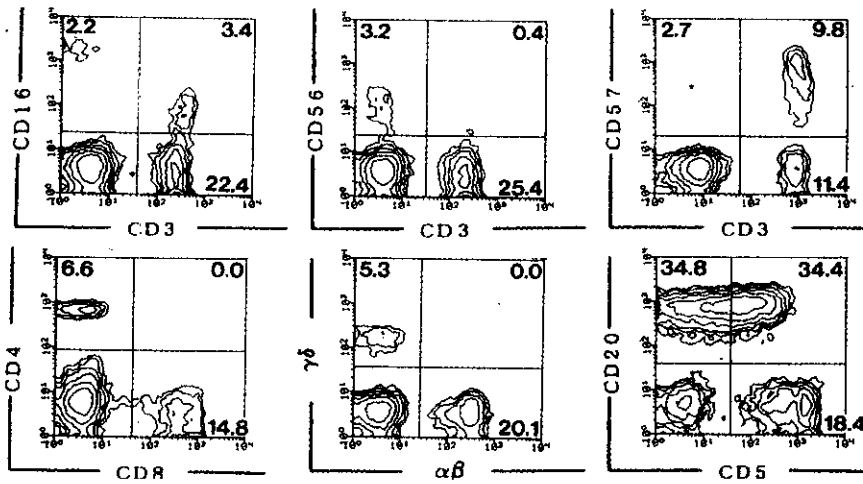


図2：IFN-γ (+) (Th1/Th2, Tc1/Tc2) 細胞の3カラー解析 (%)

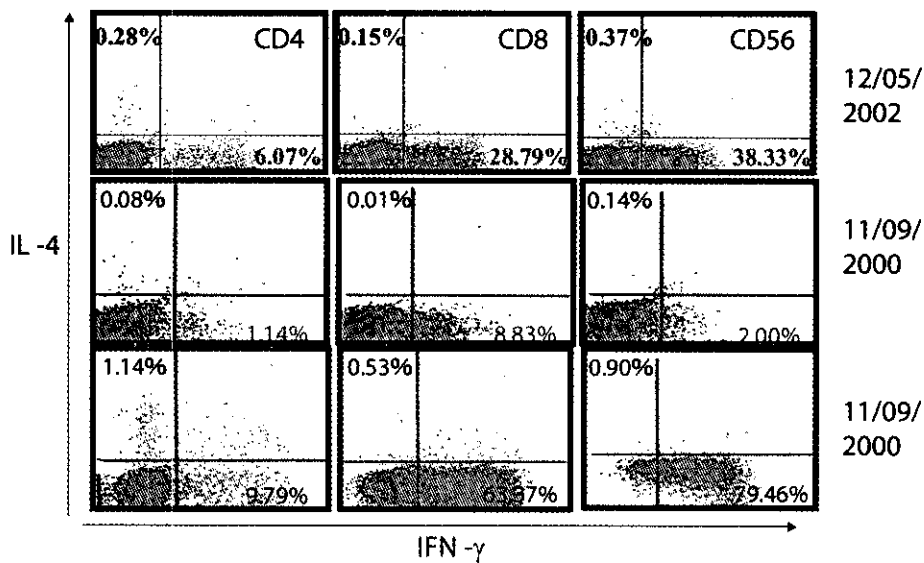
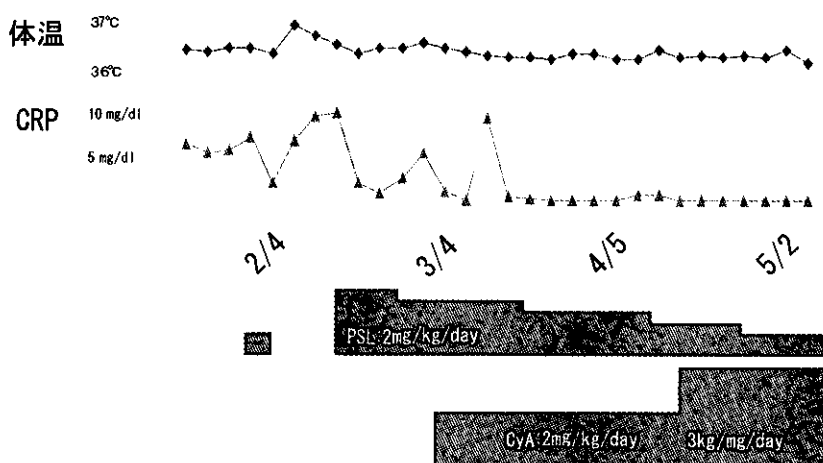


図3：その後の一般臨床経過



入院後も上記の症状を示し、胸部CT所見でも激しい痛みを伴う移動性の結節性肺臓炎を繰り返した。CT所見からBOOPが最も考えられたためプレドニゾン2mg/kgの治療を行い軽快傾向を得られた。プレドニゾンの減量に伴い再燃を見たため、サイクロスポリンを併用し軽快出来ている。

表1：各種サイトカイン産生能比較

	IL-2	IL-4	IL-5	IL-6	IL-10	IL-12	IFN- γ	TNF- α	MIP-1 α
—	6.8	7.8	4.3	370.4	5.3	2.8	3.0	81.4	2225.0
control	5.1	4.0	84.9	99.3	4.9	14.9	3.0	10.6	47.0
PHA	48.1	12.5	3.8	1409.0	43.6	3.6	573.5	1520.5	28404.0
control	254.0	366.1	443.2	1981.0	1302.5	12.6	2526.5	1750.7	1198.6
ConA	8.3	7.8	4.8	905.9	57.5	3.0	200.0	525.5	9944.1
control	8.1	48.4	23.4	1145.4	140.1	4.4	162.9	220.0	5956.4
LPS	16.8	11.4	6.4	2028.5	59.7	4.2	411.1	791.2	11211.8
control	13.7	7.5	39.2	4591.1	1008.3	4.9	1088.4	10773.7	16675.4

サイトカイン産生能(24hr培養後)

表2：IL-12存在下でのIFN- γ 産生能

T	antiCD3/28 activated T cell (44hr)					
	添加IL-12	0	10	100	1000	10000
Pt	CD2T	<20	<20	41	128	120
cont1	CD2T	1320	1280	840	2540	2900
cont2	CD2T	<20	290	2360	7340	1750

CD56-CD2+Lymを+IL-12刺激のもと44hr培養し、anti-CD3 Ab(1 μ g/ml)+anti-CD28(0.5 μ g/ml)刺激のもとIFN- γ (pg/10⁶ cell/ml)の産生を測定した。

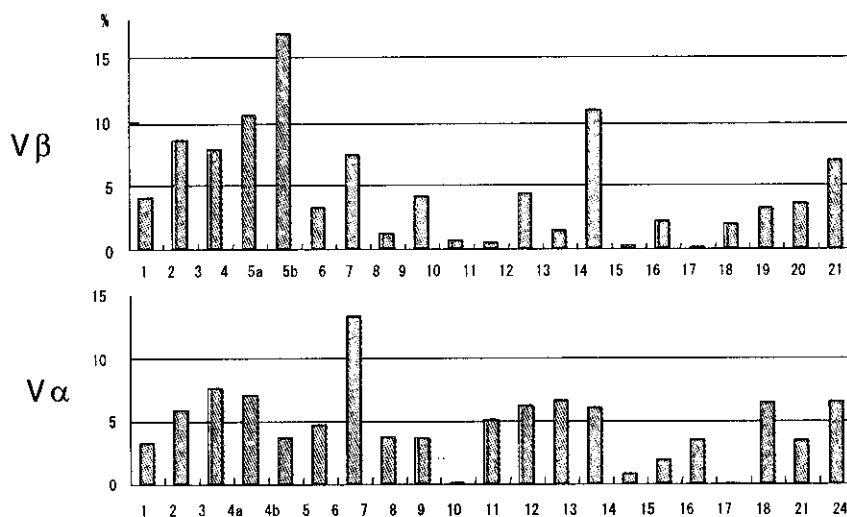
CD56+	-				5X10 ⁴ Mo			
添加IL-12	0	100	1000	10000	0	100	1000	10000
pt	<20	<20	<20		173	459	430	
cont1	57	196			2818	1584		
cont2	929	1909	2817	<10	1683	2903	4704	

CD56+LymをIL-12刺激のもと44hr培養し、ConA+A23157刺激のもとIFN- γ (pg/10⁶ cell/ml)の産生を測定した。

a) CD56-CD2+LymをIL-12刺激のもと44hr培養し、anti-CD3Ab (1mg/ml)とanti-CD28(0.5mg/ml)刺激のもとIFN- γ (pg/10⁶ cell/ml)の産生を測定した。

b) CD56+LymをIL-12刺激のもと44hr培養し、ConA+A23157刺激のもとIFN- γ (pg/10⁶ cell/ml)の産生を測定した。

図4：TCRレパートリー解析(5)



何らかの原因によるIFN- γ 産生低下が白血球増加に関わっているのではないかと推察している。

謝辞：

各種サイトカイン産生能については大隅一興先生（大塚東京アッセイ研究所）、IL-12によるTh1細胞の誘導については宇野賀津子先生（ルイ・パストゥール医学研究センター）またTCRレパートリ検索については木村暢宏先生（福岡大学医学部内科）にご協力いただきました。ここに深謝致します。

【文献】

1. Chua AO, Chizzonite R, Desai BB, et al.: Expression cloning of a human IL-12 receptor component. A new member of the cytokine receptor superfamily with strong homology to gp130. *J Immunol* 153:128-36,1994
2. Presky DH, Yang, H. Minetti, LJ et al.: A

functional interleukin 12 receptor complex is composed of two-type cytokine receptor subunits *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14002-14007,1996

3. Yamamoto K, Quelle FW, Thierfelder WE, et al.: Stat4, a novel gamma interferon activation site-binding protein expressed in early myeloid differentiation. *Mol Cell Biol* 14:4342-9,1994
4. Dalal I, Arpaia E, Dadi H, et al.; Cloning and characterization of the human homolog of mouse Jak2. *Blood* 91:844-51,1998
5. Kimura N, Isii E, Sato M, et al. Effect of chemotherapy and stem cell transplantation in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis analyzed by T-cell repertoire. *Br J Haematol* 113:822-31,2001

Immunological examinations in a patient with congenital leukocytosis and low capacity of IFN- γ production.

Hiroyuki Nunoi, Dept. Pediatrics, Miyazaki Medical College

Tomoyuki Mizukami, Dept. Pediatrics, Kumamoto University Medical School.

Immunological examinations had been done in a 4-year-old boy with recurrent fever, perivasculitis and congenital leukocytosis. His IFN- γ producing T cell population was significantly low. A recombinant IL-12 fail to induce IFN- γ producing T cells in the patient. IL-12/ IL-12 receptor ($\beta 1$, $\beta 2$), JAK2 and STAT4 genes had been analysed but any mutation in these genes was not detected. The patient contracted a BOOP (Bronchiolitis obliterans organizing pneumonia) with a positive anti-centromer antibody and abnormal pattern of TCR repertoire. Based on these findings, we suspected him a patient with a congenital immunodeficiency in T cell differentiation, including TCR and its signal transduction system which would involve in Th1/Th2 and also Tc1/Tc2 balance.

明らかな消化器症状を認めなかったCGD腸炎の2例

蓮井正史 (関西医科大学小児科)
植村芳子 (関西医科大学臨床検査医学科)
伊藤太一 (関西医科大学小児科)
畑埜泰子 (関西医科大学小児科)
辻章志 (関西医科大学小児科)
山本明美 (関西医科大学小児科)
谷内昇一郎 (関西医科大学小児科)
小林陽之助 (関西医科大学小児科)

CGD患者にCrohn病類似の炎症性腸疾患を合併することが知られている。腹痛、水様性下痢などの消化器症状を認めることが多いが、これらの症状がなくとも腸炎をきたす場合があり、熱源が不明の場合は腸炎も念頭に置き、診断を進める必要がある。その際、大腸ファイバーで組織診断を実施することが重要である。治療はメサラジンが奏効する場合が多い。

【はじめに】

慢性肉芽腫症 (chronic granulomatous disease : 以下 CGD と略す) は先天性好中球機能異常症の1つであり、本邦の先天性免疫不全症の中で最も頻度の高い疾患である。細菌および真菌による感染症の反復・遷延・重症化を特徴とする。一方、Crohn 病類似の炎症性腸疾患 (以降、CGD 腸炎と呼ぶ) が CGD に合併することが知られている¹⁾。近年、症例の集積とともに CGD 腸炎は CGD 特有の病態であり、他の炎症性腸疾患との鑑別も可能となり、その治療法も次第に確立してきた²⁾。多くの症例では腹痛、水様性下痢、血便等の消化器症状を呈し、診断に到る場合が多い。今回、我々は発熱のみで明らかな消化器症状を認めなかった2症例の CGD 腸炎を経験したので報告する。

【対象と方法】

症例1：8歳の男児。生後7か月にCGD (gp91欠損症) と診断された。抗菌薬に反応しない発熱が2か月持続するため入院した。白血球 11,100/ μ l、Hb 9.6 g/dl。CRP 6.0 mg/dl。赤沈 81mm/1時

間。病初期に1日数回の軟便をきたしたが抗菌薬による副作用と考えられていた。全身状態は良好で腹痛と血便とは認めなかった。各種培養検査はいずれも陰性であり、熱源が不明であった。腹部CTと腹部エコーとで大腸粘膜の肥厚を認めたので、大腸ファイバーを施行した。

症例2：6歳の男児。生後7か月にCGD (gp91欠損症) と診断された。50日前から発熱が持続するため入院した。白血球12,600/ μ l、Hb 9.3 g/dl。CRP 5.2 mg/dl。赤沈 98mm/1時間。各種培養検査は陰性であった。消化器症状を全く認めなかった。熱源が不明であり、症例1を経験していたのでCGD腸炎を疑い大腸ファイバーを施行した。

【経過】

症例1は大腸ファイバーで粘膜のびらんと浮腫、陰窩膿瘍および血管透見像の消失を認め、肉眼的には潰瘍性大腸炎と類似の所見を呈した (Fig. 1)。症例2は肉眼的に異常を認めなかった。2症例ともPAS染色陽性のマクロファージの存在、粘膜固有層にマクロファージの著明な浸潤