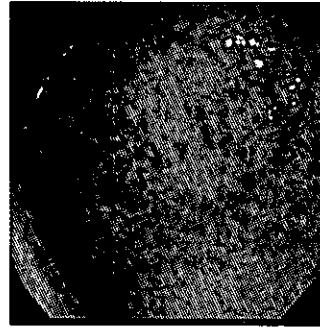
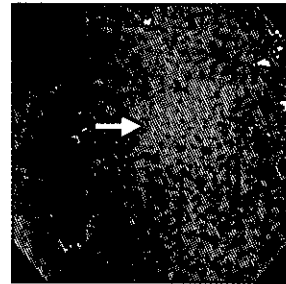
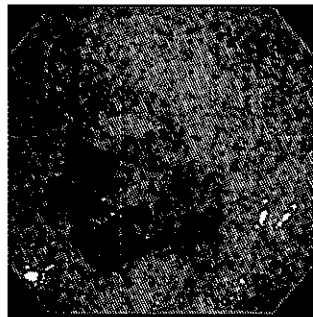


症例1 内視鏡所見

粘膜の浮腫、陰窩膿瘍、
血管透見像の消失



(CD 68陽性細胞)、非乾酪性の類上皮細胞肉芽腫から CGD 腸炎と診断し、メサラジンの投与を開始した。1 週後に解熱し、CRPも次第に陰性化した。

【考 察】

従来、CGD患者が血便、腹痛、下痢などの消化器症状を示した場合にCGD腸炎を疑い検査を進めていた。しかし、最近、消化器症状を全く認めず、身長・体重増加不良のみを呈した CGD 症例も報告された³⁾。今回の2症例のように消化器症状を認めなくても CGD 腸炎をきたす場合があり、特に熱源が不明の場合は CGD 腸炎を除外する必要がある。

確定診断には大腸ファイバーが必要である。粘膜の浮腫やびらん、血管透見像の消失、陰窩膿瘍の存在が手がかりとなるが肉眼的所見が全く正常のこともあるので確定診断には必ず組織診を行うことが重要である²⁾。PAS染色陽性のマクロファージの存在が最も診断価値が高い。HE染色でリンパ球や好酸球を中心とした細胞浸潤があり、好中球の浸潤が少ない点が特徴的である。必須ではないが、Crohn病に比べて大きな非乾酪性類上皮肉芽腫の存在が挙げられる。またCD68の免疫染色でマクロファージの浸潤像を観察することも診断に有用である⁴⁾ (Fig. 2)。

治療は炎症性腸疾患に準ずる。5-aminosalicylic acid (5-ASA) であるペンタサが第一選択薬となる。ペンタサは、サラゾピリンで起こる副作用の原因であるスルファピリジン除去し、5-ASAを徐放カプセル化した製剤である。ペンタサで効果なければ副腎皮質ステロイド薬、免疫抑制剤(シクロスポリン)の短期投与を考慮する⁵⁾。我々の2症例はともにペンタサ内服1週後に解熱した。CGD患者の熱源が不明の場合は消化器症状がなくてもCGD腸炎を疑い、大腸ファイバーを実施する必要がある。

【参考文献】

- 1) Isaacs D, Wright VM, Shaw DG, Raafat F, Walker-Smith JA. Chronic granulomatous disease mimicking Crohn's disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 1985 ;4(3):498-501
- 2) Schappi MG, Smith VV, Goldblatt D, Lindley KJ, Milla PJ. Colitis in chronic granulomatous disease. *Arch Dis Child*.2001 ;84(2):147-51.
- 3) Fitzgerald JF, Troncone R, Sabri M, Khan S. Clinical quiz. Chronic granulomatous disease. *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2002 ;34(2):198.
- 4) Mitomi H, Mikami T, Takahashi H, Igarashi M, Katsumata T, Ihara A, Ohtani Y, Ohta T, Okayasu I. Colitis in chronic granulomatous disease resembling

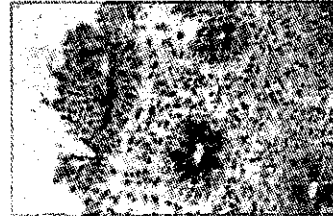
Crohn's disease: comparative analysis of CD68-positive cells between two disease entities. Dig Dis Sci 1999 ;44(2):452-6.

5) Rosh JR, Tang HB, Mayer L, Groisman G, Abraham SK, Prince A. Treatment of intractable

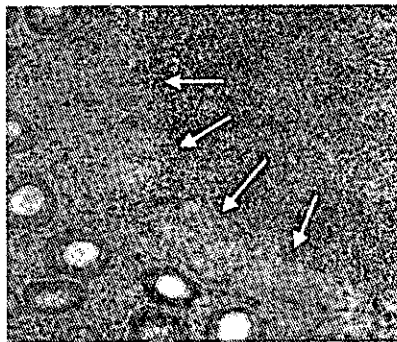
gastrointestinal manifestations of chronic granulomatous disease with cyclosporine. J Pediatr 1995 ;126(1):143-5.

CGD Colitisの病理学的特徴

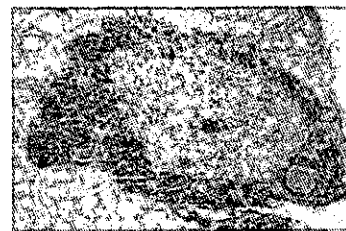
Crohn 病に比べて大きな
非乾酪性類上皮細胞肉芽腫



PAS 染色陽性のマクロファージ



HE 染色



マクロファージの著明な浸潤像 CD 68

Colitis in CGD without intestinal manifestation

Colitis is certainly enumerated on the list of diseases of CGD patients, and its intestinal manifestation has been reported to be similar to that of Crohn disease. Colitis in CGD typically has abdominal pain and diarrhea, sometimes with blood. However, our experience with 2 patients suggests that CGD colitis is mild in some patients. The first patient presented persistent fever and mild diarrhea without abdominal pain. The second patient also had long-standing fever and no intestinal manifestation. We performed colonoscopy in order to determine the fever origin. Endoscopic findings were edema of the mucosa, crypt abscess and loss of normal vascular pattern in patient 1, but were almost normal in patient 2.

Histological examination of the both patients disclosed much larger non-caseating epithelioid cell granulomas, in which aggregations of CD68-positive cells, ie macrophages, are seen more frequently than in Crohn's disease. The most specific features were apparent paucity of neutrophils and eosinophilic inflammatory infiltrates, together with large pigment-containing macrophages. Based on the diagnosis of colitis in CGD, they were placed on mesalamine (5-aminosalicylic acid) with a good outcome and the normalization of laboratory findings. It should therefore be recommended in CGD patients that colonoscopic examination also be included in the diagnostic procedure when they present nonspecific abdominal symptoms or the fever origin is obscure. As gross endoscopic examination may give insufficient information, biopsies should always be performed.

慢性肉芽腫症患児の好中球におけるスルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤による一酸化窒素産生量増加

辻 章 志 (関西医科大学小児科)
谷 内 昇一郎 (関西医科大学小児科)
蓮 井 正 史 (関西医科大学小児科)
山 本 明 美 (関西医科大学小児科)
畑 埜 泰 子 (関西医科大学小児科)
伊 藤 太 一 (関西医科大学小児科)
小 林 陽之助 (関西医科大学小児科)

今回我々はNOを直接検出する試薬である4,5-Diaminofluorescein-2 (DAF-2)を使用してST合剤の好中球におけるNO産生に対する影響をみた。

(1) 全血にS-methylisothiourea(EIT), lipopolysaccharide(LPS), 7-nitroindazole(7-NI)を加えて0, 1, 2時間培養した。その後DAF-2を添加, さらに2時間培養した。

(2) 全血1mlに7-NI, EDTA, Calcium ionophore(A23187), DAF-2を加えて10分, 30分培養した。

(3) 健常成人あるいはCGD患児の全血にLPS, ST合剤, DAF-2/DAを添加して培養した。それぞれその後溶血処理をしてflow cytometerで解析した。

結果は対照と比較してST合剤のDAF-2蛍光強度は増加した。ST合剤がCGD患児の感染に予防的に働く機序はNOが関与している可能性を示した。

【はじめに】

慢性肉芽腫症(以下CGDとする)は過酸化水素を産生することができない遺伝性疾患である。患児ではカタラーゼ産生細菌による感染がたびたび致命的となる¹⁾。CGD患児は長期間スルファメトキサゾール・トリメトプリム合剤(以下ST合剤とする)を内服することにより感染に対して予防することができる²⁾。しかしこの感染予防の機序については不明である。

一方、一酸化窒素(以下NOとする)は細胞間伝達と内皮由来血管弛緩因子の本体であることが知られている³⁾。最近NOはマクロファージだけでなく好中球も産生すると報告されている。またNO合成酵素の種類には3種類あるが、好中球ではmRNAの解析からiNOSだけでなくnNOSも発現していると報告されている⁴⁾。

しかしこれらの研究で測定しているNOは、NO

の代謝産物でありNOを直接測定しているものではない。今回我々はNOを直接検出する試薬である4,5-Diaminofluorescein(以下DAF-2とする)⁵⁾を使用して好中球中のNO産生量を測定し、NO産生に対するST合剤の影響をみた。

【対象と方法】

対象は正常健康成人5例とCGD男児5例である。CGD児は全例伴性劣性遺伝形式のgp 91 phox 欠損typeで、コントロール良好であった。採血時は感染もなく、ST合剤のみで経過を観察されていた。

(1) 健常成人の全血1mlに大腸菌リポポリサッカライド(以下LPSとする) iNOS特異的阻害剤であるS-methylisothiourea(以下EITとする)、nNOS特異的阻害剤である7-nitroindazole(以下7-NIとする)を添加してインキュベーションした。インキュベーション終了120分前にDAF-2/DAを添加し

た。

(2) 健常成人の全血1mlにCalcium ionophore、7-NI、EDTA、DAF-2/DAを添加してインキュベーションした。

(3) 健常成人あるいはCGD患児の全血100 μ lにPhorbol myristate acetate (以下PMAとする)、2'7'-Dichlorofluorescein diacetate (以下DCFH-DAとする)を加えて過酸化水素産生量を測定した。

(4) 健常成人あるいはCGD患児の全血1mlに、LPS、Ampicillin (以下ABPCとする)、Clarithromycin (以下CAMとする)、ST合剤を添加してインキュベーションした。インキュベーション終了120分前にDAF-2/DAを添加した。

(5) (1) ~ (4) のインキュベーション終了後は蒸留水を用いて溶血した後flow cytometerを使用してDAF-2あるいは2'7'-Dichlorofluorescein diacetate (DCFH)の蛍光強度を測定した。

【結果】

(1) LPSを添加してインキュベーションした結果、無刺激と比較して時間が経過するにつれてDAF-2の蛍光強度は増加した。またLPSとEITを添加した群の蛍光強度は抑制された。対照群も時間経過により蛍光強度は統計学的有意差は認めないが徐々に増加した。対照に7-NI、EITを加えた群はいずれのインキュベーション時間も対照よりも蛍光強度は抑制された (Figure 1)。

(2) Calcium ionophoreを添加した結果10分、30分ともに対照よりDAF-2蛍光強度は増加した。7-NIとEDTAを加えた群は対照と同じ程度まで蛍光

強度は抑制された (Figure 2)。

(3) CGD患児の好中球はPMA刺激でのDCFH蛍光強度は健常成人と比較して著明に低値であったがLPS刺激でのDAF-2蛍光強度は逆に有意に高値であった (Figure 3)。

(4) 健常成人にLPSとともにST合剤、ABPC、CAMを添加した結果、ABPC、CAMのDAF-2蛍光強度はコントロールと比較して変化はなかったが、ST合剤は臨床的血中濃度、10倍の血中濃度ともに、DAF-2蛍光強度は増加した。また臨床血中濃度の10倍をCGD患児の血液に添加したときもDAF-2蛍光強度はLPS単独で刺激したときより増加した (Figure 4, 5)。

【考察】

最近の研究で好中球もNOを産生することがわかってきた。発現しているNO合成酵素もiNOSだけでなくnNOSも発現していることが知られている。しかし好中球のNO産生量を測定するときはNOそのものを直接検出したものではなくnitrite anionやperoxynitriteを測定した報告だけであった⁶⁾。今回我々はDAF-2という細胞内で産生されたNOと反応して蛍光強度を増加する試薬を使用した。LPS刺激で好中球中のNOは増加したがiNOSを特異的に阻害するEITによりNO産生量は減少した。またインキュベーション中に無刺激でもNO産生量が増加しているのはnNOS由来のNOと考えられた。実際にnNOSを特異的に阻害する7-NIによりNO産生量は減少した。

CGD患児好中球には過酸化水素産生能はないが、

Fig.1

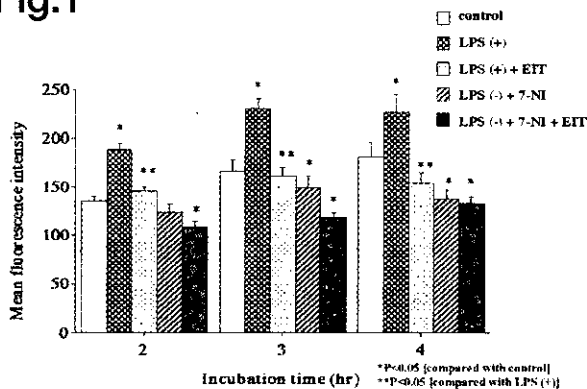


Fig.2

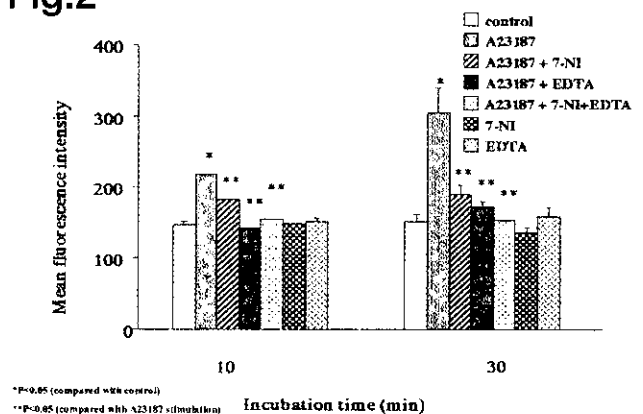


Fig.3

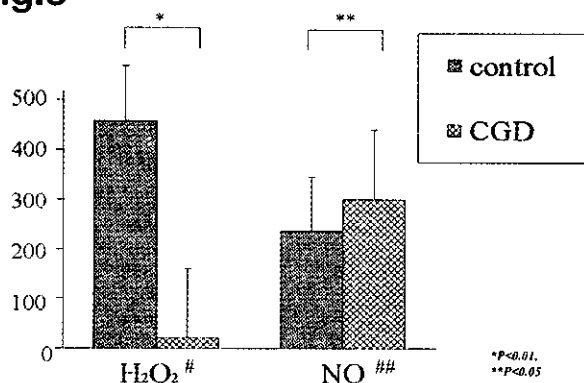


Fig.4

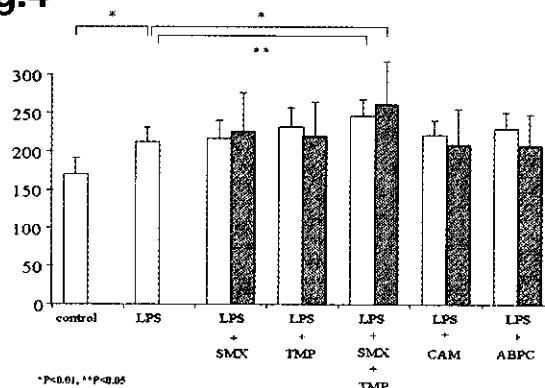
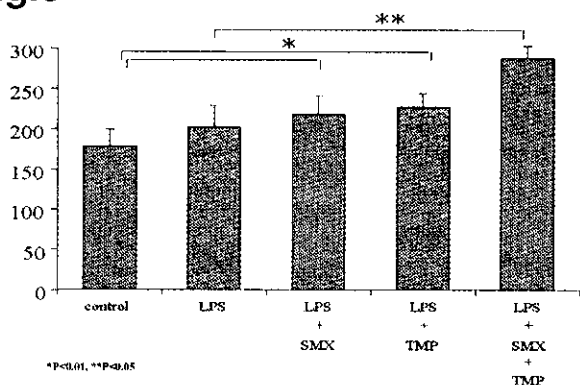


Fig.5



本患児のNO産生量は健常成人よりも増加していた。この理由として通常NOは活性酸素と反応してperoxynitriteあるいはnitrite anionと変化するが、本患児は活性酸素を産生することができないためNOが消費されず増加していることが推測された。

CGD患児はST合剤を予防内服をしているが、予防効果の機序については不明である。インターフェロンをCGD患児に注射することによりNO産生量が増加して、しかも増加したNOが細菌の殺菌に機能していると最近報告された⁷⁾。今回我々はCGD患児の血液にST合剤を添加することにより好中球のNO産生量が増加することを示した。上記の報告と併せて考えると、ST合剤がCGD患児の感染に予防的に働く機序はNOが関与している可能性を示唆している。

【文 献】

1. Thrasher, A.J., Keep, N.H., Wientjes, F., and Segal, A.W. (1994). Chronic granulomatous disease. *Biochim. Biophys. Acta.* 1227, 1-24.

2. Kobayashi, Y., Amano, D., Ueda, K., Kagasaki, Y., and Usui, T. (1978). Treatment of seven cases of chronic granulomatous disease with sulfamethoxazole-trimethoprim (SMX-TMP). *Eur. J. Pediatr.* 127, 247-254.

3. Furchgott, R.F., and Zawadzki, J.V. (1980). The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 288, 373-376.

4. Greenberg, S.S., Ouyang, J., Zhao, X., and Giles, T.D. (1998). Human and rat neutrophils constitutively express neural nitric oxide synthase mRNA. *Nitric Oxide* 2, 203-212.

5. Kojima, H., Nakatsubo, N., Kikuchi, K., Kawahara, S., Kirino, Y., Nagoshi, H., Hirata, Y., and Nagano, T. (1998). Detection and imaging of nitric oxide with novel fluorescent indicators: diaminofluoresceins. *Anal. Chem.* 70, 2446-2453.

6. Filep, J.G., Beauchamp, M., Baron, C., and Paquette, Y. (1998). Peroxynitrite mediates IL-8 gene expression and production in lipopolysaccharide-stimulated human whole blood. *J. Immunol.* 161, 5656-5662.

7. Ahlin, A., Larfars, G., Elinder, G., Palmblad, J., and Gyllenhammar, H. (1999). Gamma interferon treatment of patients with chronic granulomatous disease is associated with augmented production of nitric oxide by polymorphonuclear neutrophils. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* 6, 420-424.

Increased nitric oxide production by neutrophils from patients with chronic granulomatous disease on trimethoprim-sulfamethoxazole

Tsuji S, Taniuchi S, Ito T, Hatano Y, Hasui M, Yamamoto A, Kobayashi Y.

Chronic granulomatous disease (CGD) is an inherited disease characterized by severe and recurrent bacterial and fungal infections. Phagocytic cells of CGD patients are unable to produce superoxide anion, and their efficiency in bacterial killing is significantly impaired. In these patients, the prophylactic and therapeutic validity of a long-term use of trimethoprim-sulfamethoxazole (TMP-SMX) has been well established. However a role of nitric oxide produced by phagocytic cells from CGD patients is unknown, and the mechanism of TMP-SMX in CGD is unclear. We have directly measured nitric oxide (NO) production in whole human blood by using 4,5-diaminofluorescein as a novel fluorescent indicator for intracellular NO. Intracellular NO production of gated-neutrophils increased time-dependently when stimulated by lipopolysaccharide (LPS) and calcium ionophore. Although all PMN specimens from patients with CGD failed to generate hydrogen peroxide, NO production by CGD PMNs was significantly increased when compared with that of control PMNs ($p < 0.05$). TMP-SMX with LPS significantly increased when compared with LPS-stimulated samples at clinical ($n=5$, $P < 0.05$) and 10-fold clinical concentrations ($n=5$, $P < 0.01$). TMP-SMX with LPS in CGD PMNs significantly increased the production of NO in comparison with the LPS stimulation at 10-fold clinical concentrations ($n=5$, $P < 0.05$). In conclusion, our data indicates the possibility that NO production by neutrophils from patients with CGD treated with TMP-SMX has a role of bactericidal activity instead of O_2^- in host defense mechanism.

メモリーB細胞subpopulationsの解析

史 宇 暉 (信州大学大学院移植免疫感染症)
上 松 一 永 (信州大学大学院移植免疫感染症)
菅 根 一 男 (信州大学大学院移植免疫感染症)
山 崎 崇 志 (信州大学小児科)
南 雲 治 夫 (信州大学小児科)
小 宮 山 淳 (信州大学小児科)

ヒト末梢血B細胞は IgDとCD27発現によって3分画、IgD⁺CD27⁻ ナイーブ細胞 (circulating B cell 1: cB1), IgD⁺CD27⁺メモリーB細胞 (cB2) ならびにIgD⁻CD27⁺メモリーB細胞 (cB3) に分類される^{1,2,3)}。免疫不全症を中心に種々の疾患においてこのB細胞分画の解析が普及しているが^{4,5,6,7)}、メモリーB細胞の2つの分画の詳細については不明である。ヒト正常成人末梢血からsortingによって、2つの分画を分離し機能解析を行った。cB2, cB3ともに、cB1と比べて、細胞は大きく細胞質に富んでいた。cB2には、CD5, CD38, CD72の発現がcB3に比較し高く、CD80, CD86, CD95の発現は低下していた。2群においてほぼ同等頻度の重鎖免疫グロブリン遺伝子の可変領域(VH5) somatic hypermutationを見られた。免疫グロブリン受容体IgGとIgAの発現は、cB2に発現ではなく、cB3のみに発現している。cB2は免疫グロブリンmature γ 1と γ 2の発現が、cB3と比べて、弱く、AIDの発現はcB3のみに発現していた。In vitro において、cB2からcB3への移行は認められなかった。各種刺激下の形質細胞への誘導は2群において差異を認めなかった。cB2細胞はcB3と比べて、早期に大量のIgMを産生した。cB2は、class switchを起こしていない独立のメモリーB細胞の一集団であり、高親和性IgMを早期に産生し初期の生体防御機構に重要な役割を担っていると考えられる。

【はじめに】

ヒト末梢血B細胞は IgDとCD27発現によって3分画、すなわちIgD⁺CD27⁻ナイーブ細胞 (circulating B cell 1: cB1), IgD⁺CD27⁺メモリーB細胞 (cB2) ならびにIgD⁻CD27⁺メモリーB細胞 (cB3) に分類される。免疫不全症などのさまざまな疾患においてこのB細胞分画の解析が進んでいるが、メモリーB細胞の2つの分画の機能の詳細については不明である。ヒト正常成人末梢血からsortingによって、3つの分画を精製し、これらの細胞群の細胞形態、表面分子の発現、クラススイッチとsomatic hypermutationの有無、形質細胞への分化誘導能、免疫グロブリン産生能について検討した。

【方 法】

1. ヒト正常人末梢血か、CD19 microbeads を用いたpositive selectionによりB細胞を精製し、さらにsortingによって、cB1、cB2ならびにcB3を精製した。
2. May-Giemsa 染色を行い、3つ細胞群の形態を調べた。
3. Flow cytometryで3つ細胞群のbcl-2の発現と表面分子の発現を調べた。
4. RT-PCRによって、3つの細胞群のgermline γ 1,2 mature γ 1,2, AIDの発現を調べた。
5. RT-PCRで増幅したmRNAをクローン化したものをsequenceし、免疫グロブリン重鎖可変領域遺伝子 (VH5) のsomatic hypermutationを調べた。

6. Sortingした細胞を各種刺激後、形質細胞への誘導をflow cytometryで解析した。
7. 精製したB細胞を各種刺激下で培養し、上清中のIgA, IgG, IgMをELISA法によって測定した。

【結果】

1. 形態

精製したB細胞をMay-Giemsa染色して形態を観察すると、cB2およびcB3は、cB1タイプB細胞より、細胞が大きく細胞質に富んでいた(図1)。

2. 分子群の発現

cB1, cB2とcB3において、表面分子の発現の違いが見られた。cB2は、CD5, CD38, CD72の発現が、cB3に比較し高く、CD80, CD86, CD95の発現は低い傾向が見られた(表1)。免疫グロブリン受容体の発現を見ると、cB2はIgDとIgMを発現していたが、IgGやIgAは発現しておらず、これらはcB3のみに発現していた(図2)。cB2とcB3の細胞内bcl-2の発現は、ともにcB1より高かった(図1)。

3. mature $\gamma 1/\gamma 2$ とAIDの発現

cB2のmature $\gamma 1/\gamma 2$ のmRNAの発現は、cB3に比べて弱く、cB2がクラススイッチを起こしていないと考えられた。AID mRNAの発現は、cB2では見られなかった(図3)。

4. 体細胞突然変異 (somatic hypermutation)

cB2とcB3のVH5 geneにおけるsomatic hypermutationの頻度を比較したところ、統計学的に差はなかった(表2)。VH5 geneの各framework region (FRs), complementarity-determining regions (CDRs)において、2つ細胞群間には差はないと思われた(図4)。

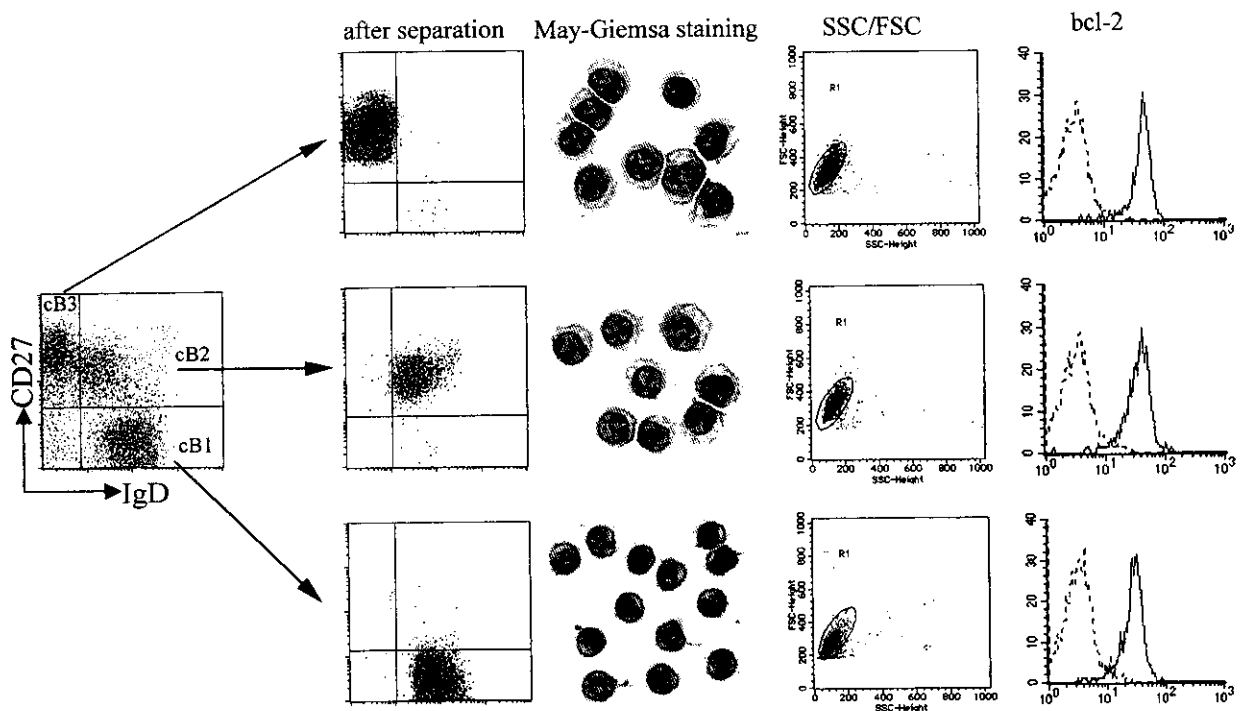
5. 形質細胞への分化誘導

各種刺激下でcB2とcB3ともに、形質細胞への分化が見られ、誘導された形質細胞の割合には差が認められなかった(図5)。

6. 免疫グロブリン産生能

cB2はcB3と比べて、早期に大量のIgMを産生した。cB3がIgA, IgM, IgGのすべてを産生したのに対し、cB2ではIgAの産生をほとんど認めなかった(図6)。

図1. IgDとCD27発現によって分類されるヒト末梢血B細胞(cB1, cB2, cB3)の形態とbcl-2発現



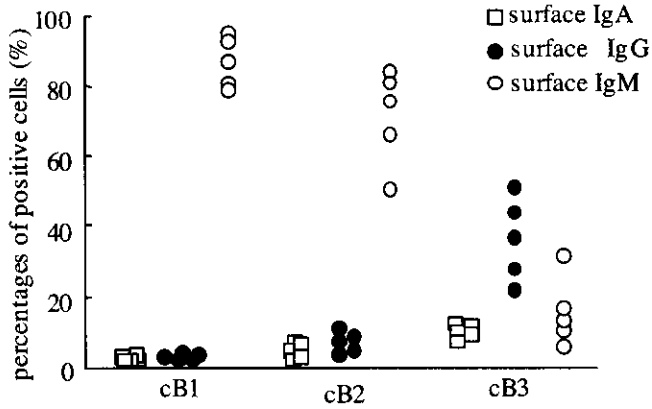


図2. 免疫グロブリン受容体の発現の比較

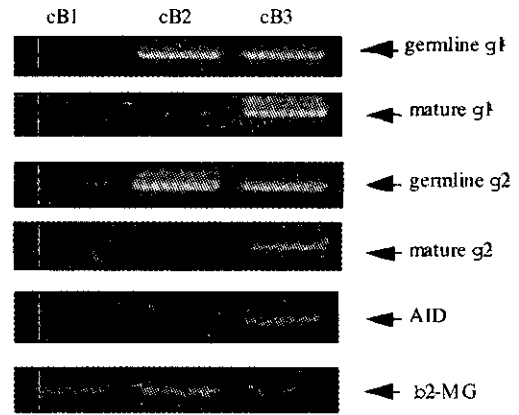


図3. mature $\gamma 1/\gamma 2$ とAIDのmRNA発現

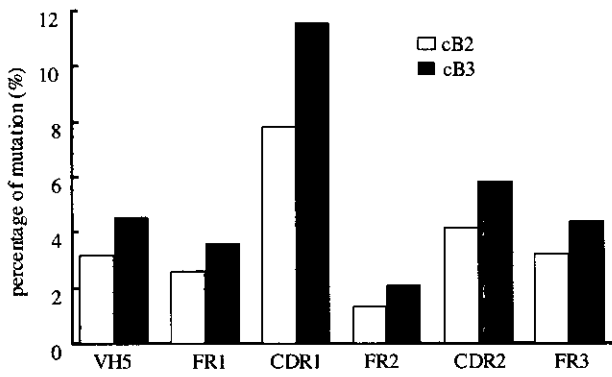


図4. メモリーB細胞 (cB2とcB3) の各FRs とCDRsにおける somatic hypermutation 頻度

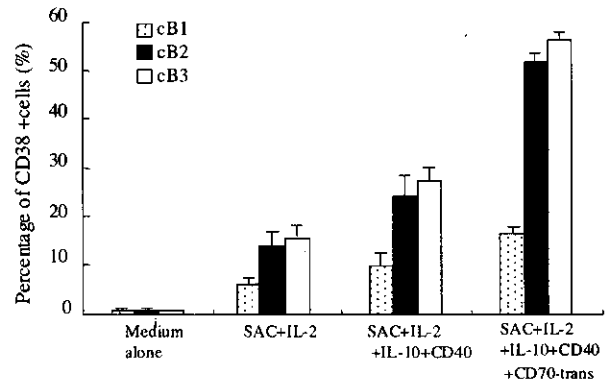


図5. cB1, cB2, cB3の形質細胞への分化の比較

図6. 免疫グロブリン産生能の比較

精製したB細胞を、SAC+IL-2+IL-10+CD40+CD70-transfectantの存在下で8日間培養した。1日毎に培養上清中のIgA, IgM, IgGの産生をELISA法で測定した。

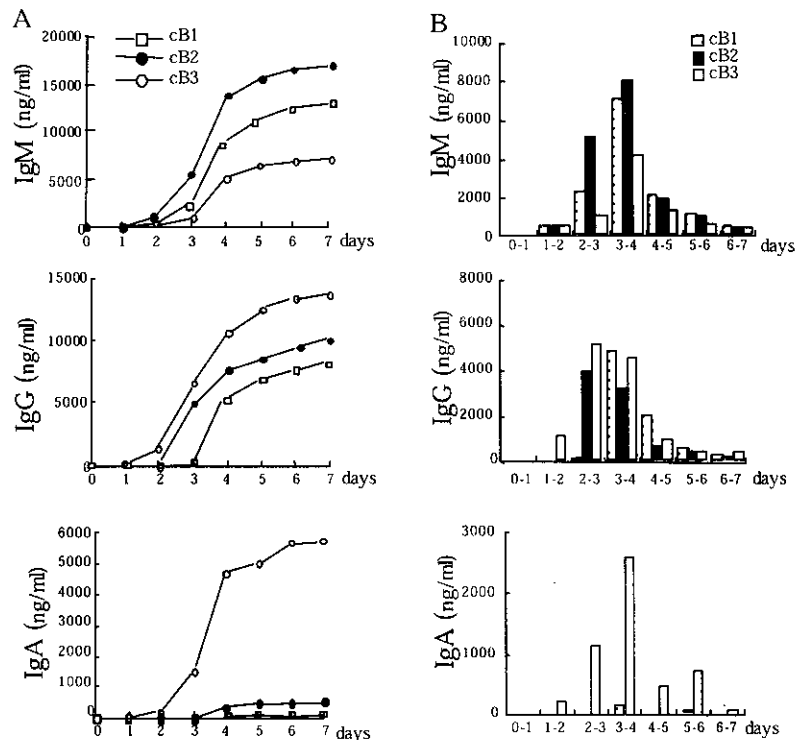


表 1. 表面分子発現の比較

surface Ag	cB1	cB2	cB3
CD5 ^b	20.4 ± 4.6 ^c	11.4 ± 2.3	< 5
CD23	30.6 ± 14	< 5	< 5
CD25	< 5	< 5	< 5
CD38	61 ± 17.5	22 ± 6.2	< 5
CD72	96.8 ± 2.5	79 ± 10.8	35.3 ± 15.2
CD80	< 5	18.2 ± 10	73.7 ± 10
CD86	< 5	< 5	26.7 ± 3.8
CD95	< 5	6.5 ± 2.3	29.1 ± 8.9
HLA-DR	93.8 ± 6.2	96.7 ± 4.7	98.2 ± 3.5

表 2. メモリーB細胞cB2とcB3におけるsomatic hypermutationの頻度の比較

cell population	Number of sequences		Range	Mutations					
	Total	Mutated		Total number	R ^b	S ^b	frequency/total sequences, %	amino acid replacement	
donor 1	cB2	13	13 (100%)	1-22	109	83	26	2.9	76
	cB3	14	14 (100%)	1-17	99	78	21	2.4	75
donor 2	cB2	12	14 (100%)	2-20	125	91	36	3.5	78
	cB3	14	14 (100%)	4-23	234	172	62	5.7	150
donor 3	cB2	12	11 (91.7%)	0-31	118	89	29	3.3	73
	cB3	12	12 (100%)	9-35	200	165	35	5.7	142

【考案】

これまで、ヒト末梢血B細胞を分類する有用な表面マーカーは見出されていなかった。われわれは、CD27分子がメモリーB細胞のマーカーであることを提唱してきたが、メモリーB細胞は、さらにIgD発現によって二つの分画に区分される。しかしながら、この二つの分画の機能については、十分な解析がなされていなかった。末梢血B細胞をcB1タイプB細胞とcB2,cB3メモリーB細胞に分けて解析することは、免疫不全症、自己免疫疾患、アレルギー疾患などのさまざまな疾患の病態解析にきわめて有効である。

cB2,cB3ともに細胞質に富む大きな細胞であること、somatic hypermutationを起こしていること、また、bcl-2発現が高いことからcB2,cB3は、一度抗原刺激を受けたメモリーB細胞であると考えられる。しかし、表面マーカーの解析では、明らかに二つの細胞群では、分子発現が異なり、cB2では、IgGやIgAなどの免疫グロブリン受容体発現が

見られないことから、cB2はクラススイッチを起こしていないメモリーB細胞であると考えられる。このことは、mature $\gamma 1/\gamma 2$ mRNA transcriptの解析でも明らかであり、cB3においては、AIDをspontaneouslyに発現し常にクラススイッチを起こしていると考えられる。

cB2,cB3は、cB1と異なり、一般的な刺激においても同程度に形質細胞に分化するから、形質細胞への分化誘導能には差異はないと思われる。しかし、産生する免疫グロブリンは異なり、cB2はIgMを早期にしかも大量に産生する細胞群であることは判明した。

cB2は、class switchを起こしていない独立のメモリーB細胞の一集団であり、高親和性IgMを早期に産生し初期の生体防御機構に重要な役割を担っていると考えられる。このB細胞分類法によって、さまざまな疾患の病態解明が進むことが期待される。

【文 献】

1. Agematsu, K., Hokibara, S., Nagumo, H. and Komiyama, A., CD27: a memory B-cell marker. *Immunol. Today* 21, 204-206, 2000.
2. Maurer, D., Fischer, G., Fae, I., Majdic, O., Stuhlmeier, K., Von Jeney, N., Holter, W. and Knapp, W., IgM and IgG but not cytokine secretion is restricted to the CD27⁺ B lymphocyte subset. *J. Immunol.* 148, 3700-3705, 1992.
3. Klein, U., Rajewsky, K. and Kuppers, R., Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells. *J. Exp. Med.* 188, 1679-1689, 1998.
4. Agematsu, K., Futatani, T., Hokibara, S., Kobayashi, N., Takamoto, M., Tsukada, S., Suzuki, H., Koyasu, S., Miyawaki, T., Sugane, K., Komiyama, A. and Ochs, H., Absence of memory B cells in patients with common variable immunodeficiency. *Clin. Immunol.* 103, 34-42, 2002.
5. Warnatz, K., Denz, A., Draeger, R., Braun, M., Groth, C., Wolff-Vorbeck, G., Eibel, H., Schlesier, M. and Peter, H., Severe deficiency of switched memory B cells (CD27(+)IgM(-)IgD(-)) in subgroups of patients with common variable immunodeficiency: a new approach to classify a heterogeneous disease. *Blood* 99, 1544-1551, 2002.
6. Nagase, H., Agematsu, K., Kitano, K., Takamoto, M., Okubo, Y., Komiyama, A. and Sugane, K., Mechanism of hypergammaglobulinemia by HIV infection: circulating memory B-cell reduction with plasmacytosis. *Clin. Immunol.* 100, 250-259, 2001.
7. Hansen, A., Odendahl, M., Reiter, K., Jacobi, A., Feist, E., Scholze, J., Burmester, G., Lipsky, P. and Dorner, T., Diminished peripheral blood memory B cells and accumulation of memory B cells in the salivary glands of patients with Sjogren's syndrome. *Arthritis Rheum.* 46, 2160-2171, 2002.

Functional analysis of human memory B-cell subpopulations

Yuhui Shi¹, Kazunaga Agematsu¹, Kazuo Sugane¹, Takashi Yamazaki², Haruo Nagumo², Atsushi Komiyama²
Department of Infectious Immunology¹ and Pediatrics², Graduate School of Medicine, Shinshu University.

The number of memory B cells in peripheral blood has been assayed in various diseases by using CD27 as memory B-cell marker. However, the defining differences of characteristic and function between the two memory B-cell subpopulations separated by IgD expression remain to be clearly elucidated. We analyzed here IgD⁺CD27⁺ B cells (circulating B cells 2: cB2) and IgD⁻CD27⁺ memory B cells (cB3) in comparison with IgD⁺CD27⁻ naive B cells (cB1). cB2 were found to be morphologically similar to cB3 with abundant cytoplasm, whereas cB3 expressed CD80, CD86 and CD95 on their surface more predominantly than cB2. A majority of cB2 expressed both IgD and IgM, and cB3 expressed IgA or IgG. Mature γ 1 and γ 2 transcripts were found in cB3, but very low levels in cB2, and activation-induced cytidine deaminase (AID) mRNA expression was recognized only in cB3. The frequencies of somatic hypermutation in cB2 and cB3 were comparable levels studied by VH5. cB2 produced large amounts of IgM predominantly and promptly, which is in accordance with the known characteristics of memory B cells. Taken together, although cB2 are unclass-switched, cB2 have the functions of memory B cells and are not in the process of transition from naive to switched memory B cells, playing a crucial role in secondary immune response by producing high affinity IgM in the early phase of infections.

FOXP3遺伝子変異を認めたIPEX患者における免疫学的解析

川 村 信 明 (北海道大学医学部小児科)
戸 板 成 昭 (北海道大学医学部小児科)
波多野 典 一 (北海道大学医学部小児科)
小 林 一 郎 (北海道大学医学部小児科)
岡 野 素 彦 (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)

免疫抑制剤療法により長期生存しているThe immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) 患者における免疫学的機能解析を行った。この患者では免疫抑制剤の長期投与中にもかかわらず、血清免疫グロブリン高値、末梢血リンパ球の活性化マーカーの発現増強、末梢血メモリーリンパ球の著増、末梢血単核球のサイトカイン遺伝子発現増強などT細胞・B細胞の異常活性化所見が認められた。さらに、Herpesvirus saimiri を用いて患者末梢血より樹立したCD4陽性T細胞株の解析でも、CD13発現増強、サイトカイン産生増加、免疫抑制剤による増殖抑制効果の減弱などT細胞活性化調節の異常を示唆する所見が認められた。以上の結果から、FOXP3がT細胞活性化においてnegative regulator として重要な機能を担っていることが示唆された。

【はじめに】

The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX)は多彩な自己抗体の出現を特徴とする予後不良な全身性自己免疫疾患であるが、最近になりその責任遺伝子としてFOXP3がクローニングされた。FOXP3はforkhead/winged-helix family に属する転写因子と考えられており、T細胞活性化調節に重要な役割をになっていると推測されているが、その機能に関してはまだ不明な点が多い。今回私達は、免疫抑制剤による治療を長期に継続しているIPEX患者における免疫学的な特徴についてまとめて報告した。

【対象と方法】

症例は12歳男児で、臨床症状、治療経過、自己抗原解析、遺伝子解析などについては既に報告している。まず、この症例におけるこれまでの臨床検査結果、フローサイトメトリー検査結果をま

とめた。RT-PCR用に、末梢血単核細胞からtotal RNAを抽出し、First-strand cDNA synthesis kit (Pharmacia P-L Biochemicals Inc.)にてcDNAを作成した。それをテンプレートとして各サイトカインに特異的なプライマーを用いてPCR (94°C for 1 min, 55°C for 1 min, 72°C for 1 min; 25 cycles) を施行した。一方、患者及び正常者末梢血より、Herpesvirus saimiri を用いてT細胞株を樹立し、引き続きMACS column にてCD4陽性細胞株を分離した。T細胞株は、rhIL-2 (5 U/ml) を添加した20%FBS加RPMI1640にて培養した。細胞表面抗原は、FITC-, PE-, PerCP-標識抗体を用いて、FACSCaliburにて解析した。細胞株の刺激には、OKT3 (5 µg/ml) を用いた。細胞質内サイトカイン産生は、PE標識抗サイトカイン抗体及びCytofix/Cytoperm Plus™ Cytostain™ kit (PharMingen)を用いて染色し、FACSCaliburにて解析した。細胞増殖反応は、CFSE (Molecular Probes)で細胞をラベル (5 µM, 10 min) した後に

種々の濃度のcyclosporin A添加あるいは無添加にて培養し、7-10日後にFACSCaliburにて解析した。

【結果】

本症例では免疫抑制剤による治療を長期に継続しているにも関わらず、血清免疫グロブリン値はいずれも高値を持続しており、特にIgA (600-900 mg/dl), IgE (4,000-15,000 IU/ml) が異常高値を示している。患者末梢血中リンパ球サブセットの推移では、CD4陽性細胞分画が優位 (40-55%) に経過していたが、特にCD45RA陽性のナイーブ細胞が極端に減少 (10-20%) していた。リンパ球における活性化マーカーの検討では、特にB細胞、CD8陽性細胞で強い発現を認めた (Table.1)。各リンパ球サブセットにおけるメモリー分画では、CD4, CD8, CD19いずれの陽性細胞でもメモリー細胞の

著明な増加を認めた (Fig.1)。末梢血単核球でのサイトカイン発現パターンでは、Th1, Th2いずれのサイトカインも同じように発現しており、どちらか一方への偏りは少ないと考えられた (Fig.2)。患者及び正常者末梢血より樹立したCD4陽性T細胞株の細胞表面抗原の解析では、ほとんどの活性化マーカーは患者・正常者細胞株で同様に発現していたが、CD13のみが患者細胞株で強く発現していた (Table.2)。これらの細胞株でのFOXP3遺伝子発現解析では、患者細胞株でのみFOXP3発現がほとんど認められなかった (Fig.3)。また、患者細胞株では、サイトカイン産生が正常者細胞株よりも多い傾向であったが、特にIFN- γ の産生が強く認められた (Fig.4)。また、正常者細胞株の増殖はCyclosporin Aにより抑制されるが、患者細胞株ではその抑制効果が低下していた (Fig.5)。

Table.1 末梢血リンパ球活性化マーカーの発現

	Patient	Control	(%)
CD69 / CD4	1.7	0.8	
CD25 / CD4	9.2	6.5	
HLA-DR / CD4	12.4	4.8	
CD95 / CD4	87.9	31.0	
CD69 / CD8	7.9	1.5	
CD25 / CD8	6.6	0.2	
HLA-DR / CD8	38.1	1.1	
CD95 / CD8	81.3	28.0	
CD69 / CD19	21.5	1.0	
CD25 / CD19	24.6	2.7	
CD23 / CD19	44.1	48.3	
CD95 / CD19	79.7	16.5	

Table.2 CD4 陽性 T細胞株

	KS-T-4	S-T-4	N-T-4
CD4	99.4	99.3	97.2 (%)
CD25	92.3	99.0	97.4
CD69	99.0	98.9	95.7
CD95	99.6	99.9	99.9
CD154	90.6	91.2	86.4
HLA-DR	99.8	99.9	99.9
CD13	61.5	13.0	8.0

KS-T-4: patient
S-T-4: patient's sister (normal FOXP3)
N-T-4: unrelated healthy individual

Fig.1 メモリー細胞

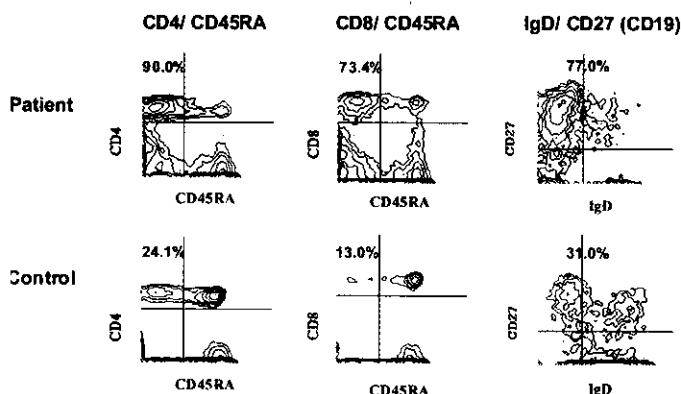


Fig. 2 サイトカイン発現パターン (RT-PCR)

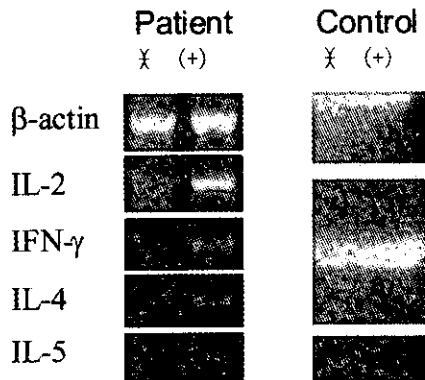


Fig. 3 FOXP3 遺伝子発現 (RT-PCR)

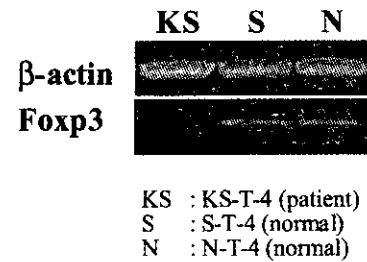


Fig. 4 T細胞株におけるサイトカイン産生

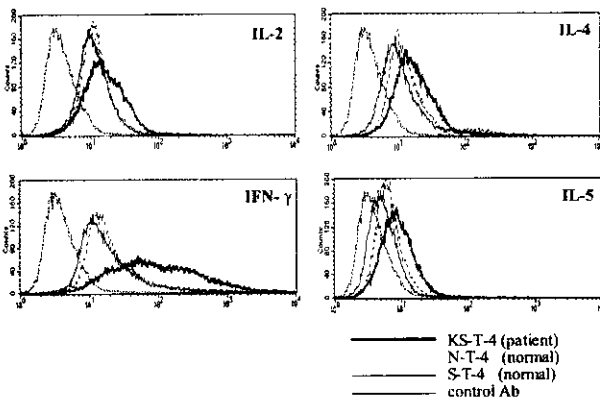
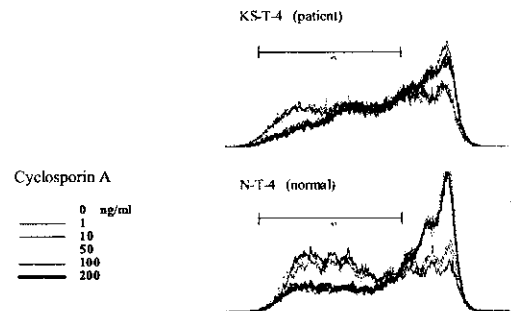


Fig. 5 T細胞株の増殖能とCsAIによる抑制効果 (CFSE/FCM)



【考案】

IPEX患者末梢血リンパ球の解析では、T細胞、B細胞ともに*In vivo*で強く活性化されており、メモリー細胞が優位となっていた。特にB細胞では活性化マーカーが強く発現し、クラススイッチの亢進所見も認められ、T細胞のヘルパー活性が異常に増強している結果と考えられた。一方、患者末梢血由来CD4陽性T細胞株での解析では、CD13発現増強、サイトカイン産生増加、免疫抑制剤による増殖抑制効果の減弱などが認められ、CD4陽性T細胞自体の活性化調節が障害されている可能性も示唆された。FOXP3は主に末梢血中CD4陽性T細胞に発現して機能していると考えられているが、FOXP3の欠損によりCD4陽性T細胞のヘルパー活性が異常に増強し、その結果としてB細胞による抗体産生や細胞傷害性T細胞による組織障害などが異常に亢進し、IPEXの病態が形成

されている可能性が考えられた。以上の結果から、FOXP3がT細胞活性化においてnegative regulatorとして重要な機能を担っていると同時に末梢性のトレランスの維持にも深く関与していることが強く示唆された。

【参考文献】

- 1) Satake N, Nakanishi M, Okano M, Tomizawa K, Ishizaka A, Kojima K, Onodera M, Ariga T, Satake A, Sakiyama Y, Ishikawa N, Matsumoto S: A Japanese family of X-linked auto-immune enteropathy with haemolytic anaemia and polyendocrinopathy. *Eur J Pediatr* 152: 313-315, 1993
- 2) Kobayashi I, Nakanishi M, Okano M, Sakiyama Y, Matsumoto S: Combination therapy with tacrolimus and betamethasone for a patient with X-linked auto-

- immune enteropathy. *Eur J Pediatr* 154: 594-595, 1995
- 3) Kawamura N, Furuta H, Tame A, Kobayashi I, Ariga T, Okano M, Sakiyama Y: Extremely high serum level of IgE during immunosuppressive therapy: paradoxical effect of cyclosporine A and tacrolimus. *Int Arch Allergy Immunol* 112: 422-424, 1997
- 4) Kobayashi I, Imamura K, Kubota M, Ishikawa S, Yamada M, Tonoki H, Okano M, Storch WB, Moriuchi T, Sakiyama Y, Kobayashi K: Identification of an autoimmune enteropathy-related 75-kilodalton antigen. *Gastroenterology* 117: 823-830, 1999
- 5) Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, Buist N, Levy-Lahad E, Mazzella M, Goulet O, Perroni L, Dagna Bricarelli F, Byrne G, McEuen M, Proll S, Appleby M, Brunkow ME: X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nature Genet* 27: 18-20, 2001
- 6) Bennett CL, Christie J, Ramsdell F, Brunkow ME, Ferguson PJ, Whitesell L, Kelly TE, Kelly TE, Saulsbury FT, Chance PF, Ochs HD: The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3. *Nature Genet* 27: 20-21, 2001
- 7) Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F: Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature Genet* 27: 68-73, 2001
- 8) Kobayashi I, Shiari R, Yamada M, Kawamura N, Okano M, Yara A, Iguchi A, Ishikawa N, Ariga T, Sakiyama Y, Ochs HD, Kobayashi K: Novel mutations of FOXP3 in two Japanese patients with immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked syndrome (IPEX). *J Med Genet* 38: 874-876, 2001
- 9) Kobayashi I, Kawamura N, Okano M: A Long-Term Survivor with the Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome. *N Engl J Med* 345: 999-1000, 2002

Immunological analysis of IPEX patient carrying *FOXP3* gene mutation

Nobuaki Kawamura, Naruaki Toita, Norikazu Hatano, Ichiro Kobayashi, Motohiko Okano, Kunihiko Kobayashi

Department of Pediatrics, Hokkaido University Graduate School of Medicine

We report the immunological characteristics of long-lived patient with IPEX. While he has been received immunosuppressants for a long time, the present analysis disclosed evidences suggesting the operation of abnormally activated T and B cell functions in his peripheral blood; those were high concentrations of serum immunoglobulins, high expressions of activation markers on peripheral blood lymphocytes, increased frequency of peripheral blood memory cells, and increased cytokine gene expressions in PBMC. Furthermore, data suggesting the abnormality in regulation of T cell activation were also obtained. They were a high expression of CD13, increased cytokine production, resistance to proliferation-inhibition effect of cyclosporin A in a CD4-positive T cell lines established from patient's PBL. Collectively, it is suggested that FOXP3 plays an important role in T-cell activation as a negative regulator.

常染色体優性遺伝形式をとる高IgM症候群II型の検討

野々山 恵 章 (防衛医科大学校小児科)

高IgM症候群2型は、クラススイッチに必須の役割を果たす分子AID (Activation-induced cytidine deaminase)の遺伝子変異により起きる免疫不全症である。AIDは12番染色体に存在し、通常は常染色体劣性遺伝する。我々は常染色体優性遺伝形式をとると考えられる高IgM症候群3家系を見だし、それが変異AIDのdominant negative効果によるものと考えたので報告する。

【はじめに】

高IgM症候群II型は、AID (Activation-induced cytidine deaminase)の異常による原発性免疫不全症である。B細胞が免疫グロブリンのクラススイッチが起こせず、血清中のIgG, IgAは低値を示し、IgMは正常ないし高値をしめす。AIDは12番染色体上にあり、常染色体劣性遺伝する。そのため血縁結婚の家系で発症することが多い。

我々は、これまでにAIDの遺伝子異常を検討した結果、12例の高IgM症候群II型患者を見出し、そのB細胞機能と臨床症状について検討を加えてきた。

その過程で、今までとは異なる常染色体優性遺伝形式をとると考えられる3家系を見だし、その病態について解析したので、報告する。

【対象と方法】

患者対象は、AID R190X変異を持つ患者およびその家族合計16人である。3家系を対象としたが、この3家系は、血縁関係にない独立した家系であった。また、血族結婚はない。なお、血清IgG, IgA, IgE, IgMなどの臨床データの収集および遺伝子解析は文書による同意を得た。

ヒトB細胞は、ヒト末梢血単核球から、CD19ダイナビーズとDetachaビーズを用いて分離した。

IgE産生はB細胞を抗CD40 mAbとIL-4で刺激し12日間培養し、その培養上清をIgE特異的ELISAにて測定した。

Somatic hypermutationは、末梢血単核球からRNAを抽出後、VH5とC μ 領域に特異的なprimerによりRT-PCRを行い、得られたPCR産物をTAクローニングし、10クローン以上をsequenceして、germ lineのsequenceと比較して、その変異の頻度を比較検討した。

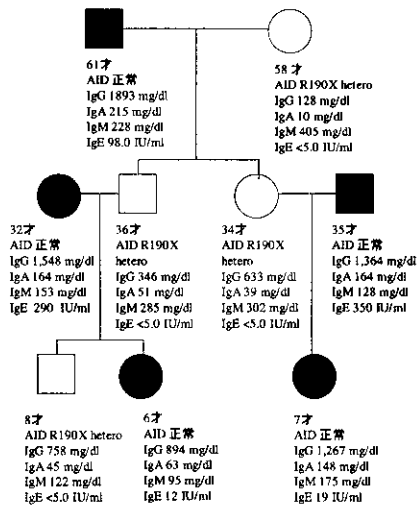
CD40 ligand (CD154)発現は、末梢血単核球をPMA+Ca ionophoreで6時間刺激後、抗CD40 ligand mAb (5c8)で染色し、FACSで測定した。活性化の指標としてCD69抗原の発現を検討した。また、CD40 ligandのDNA sequenceも行った。

AID遺伝子異常の検討は、末梢血単核球からEBウイルスにてB cell linesを作製し、RNAを抽出後cDNAを合成し、TA cloning vectorにサブクローニングし、sequenceした。見出された変異は顆粒球より抽出したgenomic DNAをsequenceすることで確認した。最低10クローンを解析した。また、direct sequenceもあわせて行った。

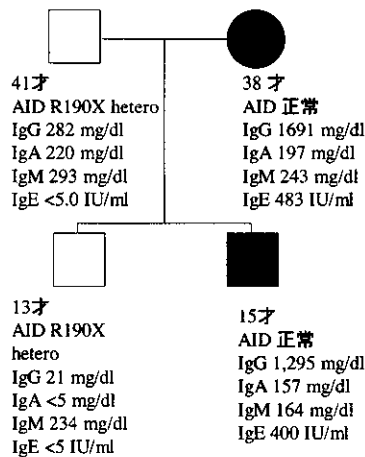
【結果】

家系1は、58歳女性が発端者であった(図1)。血清IgGが128 mg/dl、IgA 10 mg/dlと低下していたが、IgMは405 mg/dlであった。この患者でAIDを検索したところ、R190Xの点突然変異が認められたが、正常のAIDも認められ、通常は保因者となるパターンであった。配偶者はAIDに異常を認めなかった。IgG, IgA, IgMは正常範囲内であった。36歳の息子と34歳の娘ではともにAID

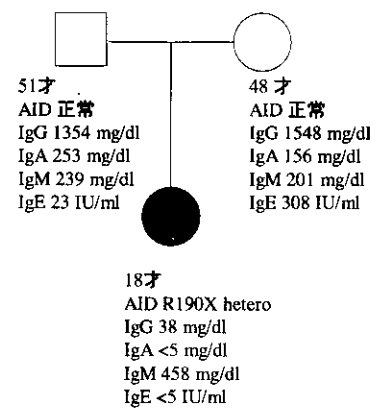
家系 1 (図 1)



家系 2 (図 2)



家系 3 (図 3)



R190X 変異がヘテロに認められた。IgG, IgA は息子で346 mg/dl, 51 mg/dl, 娘で633 mg/dl, 39 mg/dlと低下していた。息子側の8歳の発端者の孫、はR190X 変異がヘテロに認められ、IgG 758 mg/dlと正常下限であり、IgA は45 mg/dlと低下していた。一方正常のAID を持つ孫2人はIgG, IgA, IgM は正常であった。また、AID にヘテロの異常を持つ4人全員がIgE が検出感度以下であるのに対し、AID 正常の孫2人はともにIgE が検出された。

家系2では、父親と2人の息子のうち1人がAID にR190X のヘテロの異常を持っていたが、ともにIgG の低下が認められた。IgE も検出感度以下であった(図2)。AID 正常の配偶者と息子では、IgG は正常であり、IgE も検出された。

家系3では、患者ではAID にR190X のヘテロの異常を持っており、IgG 38 mg/ml、IgA <5mg/dlと低下していた(図3)。IgE は検出感度以下であった。両親はともにAID 正常であり、IgG, IgA, IgMは正常で、IgE は検出された。

次に、家系構成員全員を対象にして、そのB細胞のIgE 産生能を検討した(表1)。その結果、患者B細胞は抗CD40抗体とIL-4の刺激により、IgE 産生を起こさず、クラススイッチに障害があると考えられた。AID 正常の家系構成員は検討できた5人全てでIgE を正常に産生した。

またB細胞の体細胞変異を検討したところ、患

者では低下していた。検討できた家系内のAID 正常の構成員は5人全てで正常の体細胞突然変異の頻度が認められた(表2)。

また、患者では扁桃肥大が高率に見られた。一人で扁桃摘出がなされており、その病理学的検討では、杯中心の拡大が認められた。AID正常の家族7人では扁桃肥大や表剤リンパ節腫大は認められなかった。

【考案・結論】

今回の検討で、我々はAID R190X の変異を有すると、常染色体優性遺伝形式で高IgM 症候群2型を発症することを示した。すなわち、AID R190X 変異を持つと、反対側のアレルに正常のAID を持っていたとしても、血清IgG, IgA は正常下限ないし低値を示し、IgM は正常ないし高値をとった。さらに、リンパ節腫大を持つこと、体細胞突然変異が障害されていること、in vitro の解析でB細胞がIgE クラススイッチを起こさないこと、などAID 異常による高IgM 症候群2型と同様な所見をとった。また、他の遺伝子異常がこれらの家系での免疫不全を起こしている可能性は低いと思われる。同一の家系構成員でも、AID 正常の場合、免疫不全症状がなく、AID 異常が存在することが免疫不全の発現に対応したからである。したがって、これらの患者ではAID R190X のヘテロな異常により発症

表 1末梢血 B細胞のIgE 産生能

Family	Pts.	No stimulation	Anti-CD40 + IL-4
1	1 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
1	2 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
1	3 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
1	4 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
1	5 (AID normal)	<0.2 ng/ml	12.5 ng/ml
1	6 (AID normal)	<0.2 ng/ml	18.3 ng/ml
2	1 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
2	2 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
2	3 (AID normal)	<0.2 ng/ml	40.5 ng/ml
3	1 (AID R190X)	<0.2 ng/ml	<0.2 ng/ml
3	2 (AID normal)	<0.2 ng/ml	11.9 ng/ml
3	3 (AID normal)	<0.2 ng/ml	25.3 ng/ml

表 2 Somatic hypermutation in AD-HIM2 patients

Family	Pts.	SHM (% per bp)
1	1 (AID R190X)	0.06
1	2 (AID R190X)	0.39
1	3 (AID R190X)	1.61
1	4 (AID R190X)	0.81
1	5 (AID normal)	2.38
1	6 (AID normal)	2.10
2	1 (AID R190X)	1.98
2	2 (AID R190X)	0.21
2	3 (AID normal)	2.63
3	1 (AID R190X)	1.30
3	2 (AID normal)	2.61
3	3 (AID normal)	2.17

していると考えられる。

今回検討し得た症例では、IgG, IgA は正常下限または低下していたが検出感度以内であった。IgM は正常ないし正常上限程度であった。これは、AID の異常を両アレルに持っている典型的な高IgM 症候群 2 型では、血清IgM がほとんどの患者で1,000 mg/dl 以上とごく高価であり、IgG, IgA はほぼ検出感度以下であることと比較すると、表現型は軽度であった。また、同じ変異であるにも関わらず、IgG の値が21 mg/dl と低値である症例と

758 mg/dl と正常下限である症例が存在した。こうした現象の原因は不明であるが、異常AID タンパクの発現量の違いによるもの、年齢や環境要因によるものかなどが考えられる。現在、各患者における異常AID タンパクの発現を検討しているので、その結果から原因を明らかにしていきたい。

一方、血清IgE は全ての症例で検出されなかった。このことは、in vitro の検討で、全ての症例でIgE 産生能が障害されていた結果と一致する。IgE へのクラススイッチには正常AID タンパクが

IgG, IgA に比較して多く必要とされる事が示唆されるが、さらなる検討が必要である。

また、AID R190X 変異以外の、他の 1 2 症例の高IgM 症候群 2 型の患者の家族では、保因者は血清IgG, IgA, IgM は正常であり、in vitro でのIgE 産生誘導も起きていた。また、これまでにAID の遺伝子異常をヘテロに持っていて発症するという報告はない。したがって、この常染色体優性遺伝をとる変異はAID190X に特徴的であると考えられる。それではAID R190X 変異が、なぜ常染色体優性遺伝形式をとるのであろうか。R 190X変異ではAIDのC末端の9アミノ酸が欠失する。この異常タンパクが発現することにより、正常のAIDタンパクの機能を障害していること、すなわち dominant negative 効果が起きている事が考えられる。このことを確定するためには、AID R190X を正常B細胞に発現させることで、クラススイッチが障害されることを示す必要があり、現在検討中である。

以上の検討から、AID R190X変異により常染色

体優性遺伝形式で高IgM症候群 2 型が発症するが、これはおそらく dominant negative効果によるものであると考えられた。

【参考文献】

1. Revy, P. Muto, T. Levy, Y. et al. : Activation-induced cytidine deaminase (AID) deficiency causes the autosomal recessive form of the hyper-IgM syndrome (HIGM2). *Cell*. 102:565-575, 2000.
2. Muramatsu, M. Kinoshita, K. Fagarasan, S. et al. : Class switch recombination and hypermutation require activation-induced cytidine deaminase (AID), a potential RNA editing enzyme. *Cell*. 102:553-563, 2000.
3. Muramatsu M. Sankaranand VS. Anant S. et al. : Specific expression of activation-induced cytidine deaminase (AID), a novel member of the RNA-editing deaminase family in germinal center B cells. *J. Biol. Chem.* 274:18470-18476, 1999.

Autosomal dominant hyper IgM syndrome type 2 patients.

Shigeaki Nonoyama

Department of Pediatrics, National Defense Medical College

Hyper IgM syndrome type 2 (HIM2) is an autosomal recessive primary immunodeficiency disorder caused by the mutation of AID (Activation-induced cytidine deaminase) located on chromosome 12. We report seven HIM2 patients in three independent family with autosomal dominant inheritance. All patients had normal AID in one allele and R190X mutant AID in other allele. Serum IgG levels were low or low normal and IgA and IgE levels were low or undetectable. B cells failed to undergo IgE class switch if stimulated with anti-CD40 and IL-4. Frequencies of somatic hyper mutation in VH5 region were decreased in B cells, and lymphadenopathy was observed in all patients. These results suggest that R190X mutant AID protein impairs normal AID function as dominant negative effect and causes autosomal dominant HIM2.

選択的IgA欠損症の病態の解析

金子 英雄 (岐阜大学医学部小児病態学講座)
浅野 勉 (岐阜大学医学部小児病態学講座)
深尾 敏幸 (岐阜大学医学部小児病態学講座)
寺田 知新 (岐阜大学医学部小児病態学講座)
近藤 直実 (岐阜大学医学部小児病態学講座)

選択的IgA欠損症はIgAの低値のみを特徴とする先天性免疫不全症である。演者らはIgA欠損の病態を明らかにするため、患者B細胞のB細胞分化の障害部位について検討した。Southern blottingではC α 領域の大きなdeletionは認めず、C α 領域のシーケンスもコントロールと同様であった。患者B細胞ではクラススイッチに先立って発現するC α germline transcriptsは無刺激で低下しており、TGF- β 1とPMA刺激によりコントロールとほぼ同程度に誘導された。circle transcriptsは患児で無刺激で全く発現が認められなかったがTGF- β 1とPMA刺激により誘導された。mature transcriptsは無刺激で発現が低下していたが、TGF- β 1とPMA刺激により発現が誘導される症例もみられた。以上より選択的IgA欠損症の病態としてC α germline transcriptsの発現低下が重要と考えられる。

【はじめに】

選択的IgA欠損症は血清IgAのみ低値を示す先天性免疫不全症である。頻度は比較的多いが病因についてはいまだ明らかでない。また抗てんかん薬の服用によりしばしば、二次性のIgA欠乏症がおこる。岐阜大学小児科では抗体産生不全症のうち、IgG subclass欠損症や、IgG2-IgG4-IgA欠損症の病態を明らかにしてきた¹⁾。今回は抗体産生不全症のうち、選択的IgA欠損症について解析した。表面IgM陽性B細胞がIgA陽性細胞に分化するにはクラススイッチが必要である。この過程は、まずC α germline transcriptsの発現、クラススイッチ組み換え、C α mature transcriptsの発現がおこり表面IgA陽性B細胞と分化することが知られている。IgA欠損症の病態を解析するために、選択的IgA欠損症のB細胞についてクラススイッチに伴いみられる種々のステップ即ち、germline transcripts、mature transcriptsの発現、circle transcriptsの有無について検討した。

【対象と方法】

対象とした患者はIgAのみ選択的持続的に低値(測定感度以下)を示す患者3名(P1,P2,P3)、抗てんかん薬服用後より持続的にIgA低値を示す患者1名(P4)。

- 1.好中球よりゲノムを抽出し、8 μ gDNAをPstIあるいはBamHIで酵素切断し、2Kb C α 2をプローブに用い、C α 鎖およびS α 鎖欠失の有無をsouthern blotにて解析した。
- 2.ゲノムを用いてI α プロモーター領域、C α 各エクソンをそれぞれPCRにて増幅、サブクローニングしシーケンスを施行した。
- 3.患者及びコントロールより得たヘパリン化血からPBMCsを分離し、無刺激またはTGF β 1 (1ng/ml)+PMA(2.5 μ l/ml)にて24時間培養を行った。回収したPBMCsよりRNAを合成し、RNA2 μ gよりcDNAを合成した。
- 4.IgAへのclass switch段階の解析のために、germline transcripts、mature transcriptsの半定量を行った。