

図1. 成人PID症例の年齢分布

### C. 研究結果

#### 1: 成人例の解析

成人例 (n=263) の年齢分布は、20 歳代、30 歳代が多いが、50 歳代以上のPID症例も報告されている (図1)。診断分類では抗体産生不全症が56%と、PID全体より多い割合で報告された。疾患別ではPID全体ではXLAが最も多く報告されたが、成人例ではCVIDが最多であり、次いでXLA、慢性肉芽腫症が報告された。(図2、表1)。

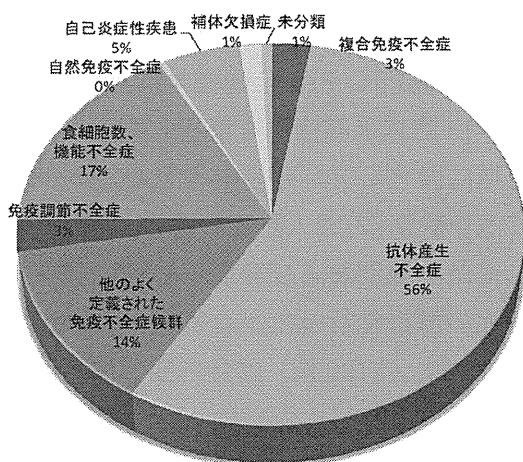


図2. 成人PID症例の分類 (n=263)

診断名	人数
CVID	65
XLA	45
慢性肉芽腫症	32
高IgE症候群	14
Wiskott-Aldrich症候群	11
高IgM症候群	9
選択的IgA欠損症	9
(重症)複合免疫不全症	7
重症先天性好中球減少症	7
家族性地中海熱	7
IgGサブクラス欠損症	5
Good症候群	5
毛細血管拡張性小脳失調症	5
補体欠損症	5

表1. 成人PID症例の診断分類

#### 2: 発症年齢による分類

15歳以上で発症したPID症例は51例報告された。発症年齢は10歳代~50歳代以上まで分布していた (図3)。診断分類ではCVIDが29例と半数以上を占めた (表2)。

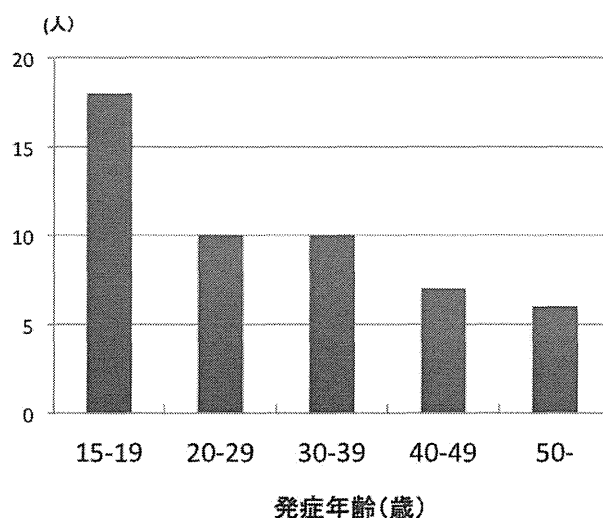


図3. 15歳以上発症のPID症例の発症年齢分布

診断名	人数
CVID	29
選択的 IgA 欠損症	5
Good 症候群	5
補体欠損症	3
XLA	2
周期性好中球減少症	2
家族性地中海熱	2
高 IgM 症候群	1
その他の抗体産生不全	1
Chediak-東症候群	1

表 2. 15 歳以上発症 PID の診断分類

### 3 : XLA と CVID の年齢別、発症年齢別の合併症解析

CVID の年齢別、発症年齢別の患者背景では、20 歳未満の群では初発年齢が低く、観察期間が短かった。一方、発症年齢別では発症が 15 歳未満の群で年齢は低いものの、観察期間は発症 15 歳以上の群と比べ長かった (表 3)。

XLA においては、年齢 20 歳以上の群で気管支拡張症や難聴の合併率が高値であり、罹病期間が長いほど合併率が上昇すると考えられた (表 4a)。一方 CVID では年齢別での気管支拡張症や難聴の合併率に差がみられなかった (表 4b)。発症年齢別で解析すると、発症 15 歳未満の群で気管支拡張症や難聴の合併率が高値であり、15 歳未満の発症であること、罹病期間の長さが合併率に関与する可能性が考えられた (表 4c)。

年齢	20 歳未満 (n=30)	20 歳以上 (n=62)	p 値
男女比	20:10	32:30	0.1689
年齢 (中央値:年)	12.1	30.7	-
初発年齢 (中央値:年)	3 (n=29)	14	<0.0001
観察期間 (中央値:年)	5.5 (n=29)	19.8	<0.0001

発症年齢	15 歳未満 (n=62)	15 歳以上 (n=29)	p 値
男女比	37:25	15:14	0.475
年齢 (中央値:年)	21.8	37.7	<0.0001
観察期間 (中央値:年)	15.0	6.6	<0.0001

表 3. CVID の年齢、発症年齢別背景

### 4 : 気管支拡張症

年齢別、発症年齢別解析により気管支拡張症 (BE) の合併に関して差がみられたため、気管支拡張症に注目して更に解析を行った。各疾患で気管支拡張症の合併の有無で比較すると、XLA では気管支拡張症の合併がある群で有意に現年齢が高く、観察期間が長かった。CVID では PID の診断年齢に差はみられなかったが、合併のある例で観察期間が長い傾向が見られた (表 5)。XLA (11 例/133 例中) と比べ、CVID (20 例/91 例中) は気管支拡張症の合併が多く報告されている ( $p=0.0038$ )。合併のある例で比較すると、現年齢や気管支拡張症の診断時年齢の差はみられなかったが、PID の診断から PE 診断までの期間が CVID では XLA と比べ有意に短かった (表 6)。XLA (観察期間中央値:9.4 年) と CVID (観察期間中央値:11.0 年,  $p=0.1944$ ) の気管支拡張症の罹患率を比較すると、XLA では 0.0070 人・年に対し、CVID では 0.016 人・年と CVID で罹

患率が高値であった。CVID の発症年齢別では発症年齢 15 歳未満が 0.016 人・年で、発症 15 歳以上が 0.015 人・年と差はみられなかった。

XLA	合併あり (n=11)	合併なし (n=122)	p 値
現年齢	31.6	12.4	<0.0001
PID 診断年齢	1.7 (n=10)	1.2 (n=114)	0.2902
観察期間	21.0 (n=10)	9.3 (n=114)	0.0015

CVID	合併あり (n=20)	合併なし (n=71)	p 値
現年齢	27.4	25.0	0.9911
PID 診断年齢	5.0	9.8	0.1034
観察期間	21.3	10.3	0.0556

表 5. 気管支拡張症合併の有無による患者背景  
(中央値：年)

	XLA (n=11)	CVID (n=20)	p 値
現年齢	31.6	28.0	0.816
PE 診断年齢	21.0 (n=9)	14.9 (n=15)	0.266 2
PID 発症 から PE 診断 までの期間	15.0 (n=9)	5.5 (n=15)	0.04

表 6. 気管支拡張症合併例での比較  
(中央値：年)

#### D. 考察とまとめ

小児科で診療することの多い PID だが、成人例の症例も多く、60 歳代の例もみられており、今後内科との連携が必須であることを示唆する結果であった。PID の成人発症に関する過去の海外からの報告でも、今回の解析と同様に成人

発症例では CVID が最も多く報告されており (Mansouri D. *et al.*, *J Clin Immunol.* 2005, Srinivasa BT. *et al.* *Am J Med.* 2012)、成人期に発症することの多い CVID の特徴を表している結果であった。

成人例の多い XLA と CVID を年齢別、発症年齢別に分けた解析では、XLA では年齢が上昇するにつれて合併症が増加しているのに対し、CVID では年齢での差はみられなかった。一方で発症年齢別では CVID では発症 15 歳未満の群で重篤な合併症が多く報告された。これは発症 15 歳未満の方がより観察期間が長いためと考えられた。

生命予後に関連すると考えられる気管支拡張症は、XLA と比べ CVID でより多く合併が報告され、Iran からの報告と同様であった (Aghamohammadi A. *et al.* *Respirology* 2010)。XLA/CVID とともに、気管支拡張症を合併した群で観察期間が長かったが、特に CVID では XLA と比べ PID 診断から気管支拡張症診断までの期間が短い結果であった。気管支拡張症の罹患率を比較しても CVID が XLA と比べて高く、CVID において、診断の遅れや抗体産生不全以外の免疫異常が背景にあると考えられた。

発症からの観察期間の長くなる成人期にはより合併症が増加してくると考えられ、感染予防をはじめ、適切な診断、治療が必要であると考えられる。

#### E. 研究危険情報

特になし

#### F. 知的財産の出願・登録状況

特になし

合併症	20歳未満 (n=93)	20歳以上 (n=45)
呼吸器疾患	気管支拡張症 2例	気管支拡張症 9例
耳鼻科疾患	難聴 0例 副鼻腔炎 6例 滲出性中耳炎 1例	難聴 6例 副鼻腔炎 4例 慢性/滲出性中耳炎 3例
消化器疾患	萎縮性胃炎 1例 慢性腸炎 1例	慢性腸炎 1例 非特異性腸炎 1例
肝胆膵疾患	-	肝硬変 1例 慢性肝炎 1例
その他	ビタミンB12欠乏症 1例	-

表 4a XLA の年齢別での主な合併症

合併症	20歳未満 (n=30)	20歳以上 (n=62)
悪性疾患	2例	6例
自己免疫疾患	5例	10例
呼吸器疾患	気管支拡張症 6例 間質性肺炎 2例	気管支拡張症 14例 間質性肺炎 2例
耳鼻科疾患	難聴 2例 副鼻腔炎 3例 中耳炎 3例	難聴 4例 副鼻腔炎 3例 中耳炎 3例
その他	ビタミンB12欠乏症 1例	-

表 4b CVID の年齢別での主な合併症

合併症	発症 15歳未満 (n=62)	発症 15歳以上 (n=29)
悪性疾患	6例	2例
自己免疫疾患	9例	4例
呼吸器疾患	気管支拡張症 16例 間質性肺炎 3例	気管支拡張症 4例 間質性肺炎 1例
耳鼻科疾患	難聴 6例 副鼻腔炎 6例 中耳炎 5例	難聴 0例 副鼻腔炎 1例 中耳炎 0例
その他	ビタミンB12欠乏症 1例	-

表 4c CVID の発症年齢別での主な合併症

## G. 研究発表

1. Nozaki T, Takada H, Ishimura M, Ihara K, Imai K, Morio T, Kobayashi M, Nonoyama S, Hara T: Endocrine complications in primary immunodeficiency diseases in Japan. Clin Endocrinol. (Oxf) 77: 628-634, 2012
2. Obinata K, Lee T, Niizuma T, Kinoshita K, Shimizu T, Hoshina T, Sasaki Y, Hara T: Two cases of partial dominant interferon- $\gamma$  receptor 1 deficiency that presented with different clinical courses of bacille Calmette-Guérin multiple osteomyelitis. J Infect Chemother. (in press)
3. Kusuhara K, Hoshina T, Saito M, Ishimura M, Inoue H, Horiuchi T, Sato T, Hara T: Successful treatment of a patient with tumor necrosis factor receptor-associated periodic syndrome using a half-dose of etanercept. Pediatr Int. 54: 552-555, 2012

4. Hoshina T, Kusuhara K, Saito M, Mizuno Y, Hara T: NKRP1A+  $\gamma\delta$  and  $\alpha\beta$  T cells are preferentially induced in patients with Salmonella infection. *Hum Immunol.* 73: 623-628, 2012
  5. Yamamura K, Ihara K, Ikeda K, Nagata H, Mizuno Y, Hara T: Histo-blood group gene polymorphisms as potential genetic modifiers of the development of coronary artery lesions in patients with Kawasaki disease. *Int J Immunogenet.* 39(2): 119-125, 2012
  6. Onoyama S, Ihara K, Yamaguchi Y, Ikeda K, Yamaguchi K, Yamamura K, Hoshina T, Mizuno Y, Hara T: Genetic susceptibility to Kawasaki disease: analysis of pattern recognition receptor genes. *Hum Immunol.* 73: 654-660, 2012
  7. Yamamura K, Joo K, Ohga S, Nagata H, Ikeda K, Muneuchi J, Watanabe M, Hara T: Thrombocytosis in asplenia syndrome with congenital heart disease: a previously unrecognized risk factor for thromboembolism. *Int J Cardiol.* 2012 (in press)
  8. Shiraishi A, Ohga S, Doi T, Ishimura M, Takimoto T, Takada H, Miyamoto T, Abe Y, Hara T: Treatment choice of immunotherapy or further chemotherapy for Epstein-Barr virus-associated hemophagocytic lymphohistiocytosis. *Pediatr Blood Cancer.* 59: 265-270, 2012
  9. Imagawa T, Takei S, Umebayashi H, Yamaguchi K, Itoh Y, Kawai T, Iwata N, Murata T, Okafuji I, Miyoshi M, Onoe Y, Kawano Y, Kinjo N, Mori M, Mozaffarian N, Kupper H, Santra S, Patel G, Kawai S, Yokota S: Efficacy, pharmacokinetics, and safety of adalimumab in pediatric patients with juvenile idiopathic arthritis in Japan. *Clin Rheumatol.* 31: 1713-1721, 2012
  10. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol.* (in press)
  11. Kitajima J, Inoue H, Ohga S, Kinjo T, Ochiai M, Yoshida T, Kusuhara K, Hara T: Differential transmission and postnatal outcome in triplets with congenital cytomegalovirus infection. *Pediatr Development Pathol.* 15: 151-155, 2012
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む)  
なし

# 重症先天性好中球減少症の臨床及び遺伝的特徴に関する全国調査

溝口洋子<sup>1)</sup>、岡田 賢<sup>2)</sup>、唐川修平<sup>1)</sup>、高田英俊<sup>3)</sup>、原 寿郎<sup>3)</sup>、小林正夫<sup>1)</sup>

1) 広島大学大学院医歯薬保健学研究院小児科学

2) 広島大学病院小児科

3) 九州大学大学院医学研究院成長発達医学

## 研究要旨

先天性好中球減少症 (severe congenital neutropenia, SCN) は、慢性好中球減少症のため生後より重症細菌感染症を反復する疾患である。我々は全国より情報を収集した 46 人の SCN 症例について臨床及び遺伝的特徴の解析を行った。90%の患者が 1 歳前に診断されていた。初発時の臨床症状としては皮膚感染症が最も多く、診断後の罹患感染症で最多だったのは細菌性肺炎及び皮膚感染症であった。46 人中 29 人に行われた遺伝子解析では 76%に *ELANE* 変異を、12%に *HAXI* 変異を認めた。治療として G-CSF 製剤の定期投与を行っている例は全体の 56%であり、感染時のみ使用している例が 22%であった。46 人中 4 人が経過中 MDS (myelodysplastic syndrome)/AML (acute myeloid leukemia) に移行し、全例造血幹細胞移植が行われ、3 名は無病生存中である。治療抵抗性感染症の合併例もしくは G-CSF 製剤の長期投与を受けた 12 例 (26%) において、悪性転化前に造血幹細胞移植が行われており、全例生存している。今後さらなる症例を蓄積し、移植適応症例の選別や移植前処置の確立が望まれる。

## A. 研究目的

先天性好中球減少症 (severe congenital neutropenia, SCN) は、乳児期からの慢性好中球減少症 (特に末梢血好中球数が 200 /mL 未満) と、骨髄における顆粒球系の成熟障害、生後より反復する重症細菌感染症を臨床的特徴とする疾患である。本研究では本邦における SCN 症例の臨床及び遺伝学的特徴、及び治療成績について明らかにすることを目的とする。

## B. 研究方法

全国各施設に SCN 症例の有無を問う質問紙を送付し、SCN 患者の集積、総数把握を行った。さらに回答のあった施設には、より詳細な質問紙を送付し、臨床経過及び遺伝子検査、治療について調査を行った。その結果 30 施設より集積された 46 人の SCN 症例について解析を行った。

## C. 研究結果

### 1) 診断時年齢、性差

診断時年齢は平均 4.6 ヶ月であり、生直後から 24 ヶ月にわたっていた。90%の患者が 1 歳前に診断されており、約 75%の患者は生後 6 ヶ月以前に診断されていた。24 ヶ月をこえて診断された症例はなかった。男女比は 1:1 であり、性差は認めなかった

### 2) 臨床症状

初発時の臨床症状としては皮膚感染症が最も多く、診断後の罹患感染症で最多だったのは細菌性肺炎及び皮膚感染症であった。また 8 人 (17%) に精神発達遅滞を認めた。その内 4 例が *HAXI* 変異、1 例が *ELANE* 変異症例であった。

### 3) 遺伝子解析

46 例中 33 例 (72%) に遺伝子解析が行われていた。33 例の内 29 例 (88%) に遺伝子異常が同

定された。29例の内訳は、25例(76%)が *ELANE* 変異、4例(12%)が *HAX1* 変異であった。

#### 4) G-CSF 製剤投与

46例中36例(78%)の患者がG-CSF製剤の投与を受けていた。その内定期投与を受けている例が26例(56%)であり、10例(22%)は感染時のみ投与を受けていた。10例(22%)は投与歴がなく、G-CSF不応例が2例認められた。G-CSF製剤の定期投与を行っている群の平均投与期間は6.6年であった。

#### 5) 悪性転化前の造血幹細胞移植

46例中12例(26%)が悪性転化前に造血幹細胞移植を受けていた。移植時の平均年齢は5歳であった。移植ソースは3例が血縁骨髄、6例が非血縁骨髄、4例が非血縁臍帯血であった。移植前処置は骨髄非破壊的前処置が11例で選択されていた。生着不全が2例に認められた。移植後合併症として1例に混合キメラ、1例に慢性GVHDを認めたが、全例生存中であった。

#### 6) 悪性転化

4例が経過中MDS(myelodysplastic syndrome)/AML(acute myeloid leukemia)に移行し、全例造血幹細胞移植が行われた。1名のみ移植後のGraft versus host diseaseにより死亡したが、3名は無病生存中である。

### D. 考察

まず本邦におけるSCNの原因遺伝子は、欧米と比し、*ELANE*異常が多く、*HAX1*異常が少なかった。また臨床的特徴として精神運動発達遅滞の合併が17%に認められた。これは精神運動発達遅滞をしばしば合併する*HAX1*異常症以外の症例においても認められており、本邦における精神運動発達遅滞の有病率(推定1%)に比し高頻度で認められた。精神運動発達遅滞はSCNの合併症である可能性がある。治療に関しては、G-CSF製剤の定期投与を受けている患者の割合が欧米(約90%)に比し低かった。これは主治

医のG-CSF製剤使用に対する抵抗感や、重症例においては移植を選択されていることが多いことに因ると推測された。悪性転化前に造血幹細胞移植を受けている例は26%にのぼり、欧米(3%台)に比し高い傾向にあった。これは本邦におけるHLA一致度の高さや、骨髄非破壊的移植の導入による結果と考えられる。また悪性転化症例は本研究では15年経過で46例中4例(8.6%)であり、欧米(10年での累積発症率が21%)の報告に比し低い傾向にあった。本研究はコホート調査であり、prospectiveな調査とは単純に比較することはできないが、G-CSF製剤の定期投与の割合の低さや、悪性転化前の早期の移植が、欧米と比較し低いMDS/AML発症率につながっている可能性がある。

### E. 結論

今後さらなる症例を蓄積し、移植適応症例の選別や移植前処置の確立が望まれる。

### F. 研究危険情報

特になし

### G. 研究発表

#### 1) 学会発表

1. Osamu Hirata, Miyuki Tsumura, Yoko Mizoguchi, Satoshi Okada, Shizuko Minegishi, Tomohiro Morio, Masao Kobayashi: Gain-of-function mutations of *STAT1* in Japanese patients with CMCD. The 15<sup>th</sup> European Society for Immunodeficiencies Meeting. Florence, Italy, 2012.10
2. Yoshiyuki Kobayashi, Hirotaka Matsui, Akinori Kanai, Miyuki Tsumura, Satoshi Okada, Mizuka Miki, Kazuhiro Nakamura, Shinji Kunishima, Toshiya Inaba and Masao Kobayashi: Identification of

integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant macrothrombocytopenia. The 54<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12

3. Rie Onodera, Kazuhiro Nakamura, Kikuyo Taniguchi, Emi Kurita, Asako Hiraoka, Kaduta Yasui, Nobuki Matsuyama, Fumiya Hirayama, and Masao Kobayashi: A novel method using extracted human neutrophil antigens from HNA gene-transfected cell lines for detection of antibodies against human neutrophil antigens. The 54<sup>th</sup> Annual meeting of American Society of Hematology, Atlanta 2012.12
4. 溝口 洋子, 津村 弥来, 平田 修, 峯岸 志津子, 森尾 友宏, 岡田 賢, 小林 正夫: 機能獲得性 *STAT1* 変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症の解析. 第 54 回日本小児血液学会 2012 年 11 月 30 日-12 月 2 日

## 2) 論文発表

1. Hiramoto T, Ebihara Y, Mizoguchi Y, Nakamura K, Yamaguchi K, Ueno K, Mochizuki S, Yamamoto S, Nagasaki M, Furukawa Y, Tani K, Nakauchi H, Kobayashi M, Tsuji K: Wnt3a stimulates maturation of impaired neutrophils developed from severe congenital neutropenia-derived pluripotent stem cells with heterozygous *ELANE* mutation. Proc Natl Acad Sci USA 2013 (in press)
2. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nunoi H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. Blood 119(23): 5458-66, 2012
3. Kobayashi Y, Matsui H, Kanai A, Tsumura M, Okada S, Miki M, Nakamura K, Kunishima S, Inaba T, Kobayashi M: Identification of the integrin  $\beta 3$  L718P mutation in a pedigree with autosomal dominant thrombocytopenia with anisocytosis. Br J Haematol 2012 (Epub ahead of print)
4. Tsumura M, Okada S, Sakai H, Yasunaga S, Ohtsubo M, Murata T, Obata H, Yasumi T, Kong XF, Abhyankar A, Heike T, Nakahata T, Nishikomori R, Al-Muhsen S, Boisson-Dupuis S, Casanova JL, Alzahrani M, Shehri MA, Elghazali G, Takihara Y, Kobayashi M: Dominant-negative STAT1 SH2 domain mutations in unrelated patients with Mendelian susceptibility to mycobacterial disease. Human Mutation 33(9): 1377-87, 2012
5. Zhang X, Inukai T, Hirose K, Akahane K, Kuroda I, Honna-Oshiro H, Kagami K, Goi K, Nakamura K, Kobayashi M, Endo M, Yagita H, Kurosawa H, Thomas Look A, Honda H, Inaba T, Nakazawa S, Sugita K: Oncogenic fusion E2A-HLF sensitizes t(17;19)-positive acute lymphoblastic leukemia to TRAIL-mediated apoptosis by upregulating the expression of death receptors. Leukemia 26(12): 2483-93, 2012
6. Ohno N, Kobayashi M, Hayakawa S, Utsunomiya A, Karakawa S: Transient



- pseudothrombocytopenia in a neonate: Transmission of a maternal EDTA-dependent anticoagulant. *Platelets* 23(5): 399-400, 2012
7. Regulation of hematopoietic stem cells using protein transduction domain-fused Polycomb. Kajiume T, Sera Y, Kawahara Y, Matsumoto M, Fukazawa T, Imura T, Yuge L, Kobayashi M. *Exp Hematol* 40(9): 751-60, 2012
  8. 溝口 洋子, 鎌田 綾, 三木 瑞香, 谷 博雄, 世羅 康彦, 中村 和洋, 小林 正夫: Glanzmann thrombastheniaへの遺伝子組み換え活性型第VII因子製剤による止血効果. *日本小児血液・がん学会雑誌* 49(1-2)9:61-6, 2012
  9. 梶梅 輝之, 浅野 孝基, 世羅 康彦, 小林 正夫: 輸血後蕁麻疹発症前の末梢血一般検査所見. *アレルギー* 61(8):1086-91, 2012
  10. 溝口洋子, 津村弥来, 岡田賢, 小林正夫. 慢性性皮膚粘膜カンジダ症と機能獲得性STAT1変異. *臨床免疫・アレルギー科* 57(4): 437-43, 2012
- neutropenia receiving long-term G-CSF therapy. Rosenberg PS, Alter BP, Bolyard AA, Bonilla MA, Boxer LA, Cham B, Fier C, Freedman M, Kannourakis G, Kinsey S, Schwinger B, Zeidler C, Welte K and Dale DC. *Blood*. 2006; 107(12):4628-35.
- Stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia without evidence of leukemic transformation. Zeidler C, Welte K, Barak Y, Barriga F, Bolyard AA, Boxer L, Cornu G, Cowan MJ, Dale DC, Flood T, Freedman M, Gardner H, Mandel H, O'Reilly RJ, Ramenghi U, Reiter A, Skinner R, Vermynen C, Levine JE. *Blood*. 2000; 95:1195-98

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし

#### 参考文献

Hematopoietic stem cell transplantation in severe congenital neutropenia: experience of the French SCN register. Ferry C, Ouache'e M, Leblanc T, Michel G, Notz-Carre're A, Tabrizi R, Flood T, Lutz P, Fischer A, Gluckman E and Donadieu J. *Bone Marrow Transplant*. 2005; 35(1):45-50

The incidence of leukemia and mortality from sepsis in patients with severe congenital

# フローサイトメトリーによる p47phox/p67phox 解析と慢性肉芽腫症の病型診断

和田泰三、村岡正裕、東馬智子、谷内江昭宏

金沢大学医薬保健研究域医学系小児科

## 研究要旨

慢性肉芽腫症 (CGD) の診断は、活性酸素産生能の低下、欠損蛋白の同定により行われ、遺伝子解析にて確定される。gp91phox と p22phox 欠損型では、7D5 抗体を用いたフローサイトメトリー解析が欠損蛋白の同定に有用である。しかし、p47phox と p67phox 欠損型では、比較的煩雑な Western blot 法を用いる必要がある。そこで今回、これらに対するフローサイトメトリー解析を開発した。健常人における p47phox/p67phox の発現は、gp91phox と同様、顆粒球、単球、B 細胞に認められた。顆粒球は、死細胞の混入や凝集がみられやすく、単球や B 細胞の方が解析に適していた。p47phox 欠損型 CGD 患者の単球と B 細胞では、p67phox の発現は保たれていたが、p47phox 発現はほとんど認められなかった。一方、p67phox 欠損型では、p47phox の発現は認められたが、p67phox の発現は著しく減弱していた。以上より、本法は CGD の病型診断に有用であると考えられた。

## A. 研究の目的

慢性肉芽腫症 (CGD) は、食細胞 NADPH オキシダーゼを構成する分子の欠損により活性酸素産生障害をきたす原発性免疫不全症である。NADPH オキシダーゼは、2つの膜蛋白 (gp91phox、p22phox) と 4つの細胞質蛋白 (p47phox、p67phox、p40phox、Rac1/2) から構成される。CGD の診断は、活性酸素産生能の低下、欠損蛋白の同定により行われ、遺伝子解析にて確定される。gp91phox 欠損型および p22phox 欠損型 CGD では、7D5 抗体を用いたフローサイトメトリー解析が欠損蛋白の同定に有用である。しかし、p47phox 欠損型ならびに p67phox 欠損型 CGD では、比較的煩雑な Western blot 法を用いる必要がある。そこで今回、これらに対するフローサイトメトリー解析は、末梢血より抽出したゲノム DNA を用いて、

フロー解析が可能か否かを検討した。

## B. 研究方法

対象は、p47phox 欠損 2 症例、p67phox 欠損 5 家系 7 症例である (表 1)。p67-4 のみ血族結婚の家族歴を認めた。コントロールとして健常人 10 人、gp91phox 欠損 3 例も解析した。

p47phox および p67phox 発現解析は、末梢血より分離した単核球と顆粒球を用いて行った。必要な表面抗原を染色後に細胞を固定し、抗 p47phox 単クローン抗体 (BD)、抗 p67phox 単クローン抗体 (Santa Cruz) を用いて細胞内のそれぞれの発現を解析した。

活性酸素産生能は、全血を用いた DHR123 法にて行った。また、NCF1 および NCF2 遺伝子解析はダイレクトシーケンス法により行った。

表 1. 解析対象

患者	年齢	性	遺伝子	変異
p47-1	31歳	女	<i>NCF1</i>	Tyr26fs*
p47-2	13歳	女	"	Tyr26fs, 7q11.23 del
p67-1.1	8歳	男	<i>NCF2</i>	Asp408fs*
p67-1.2	2歳	女	"	Asp408fs*
p67-2.1	1ヶ月	女	"	Gln260X, Arg395Trp
p67-2.2	3歳	男	"	Gln260X, Arg395Trp
p67-3	6ヶ月	女	"	Tyr394Asp, Asp408fs
p67-4	10ヶ月	男	"	Arg102X*
p67-5	5歳	女	"	Trp22X, Arg102X

\*homozygous

### C. 研究結果

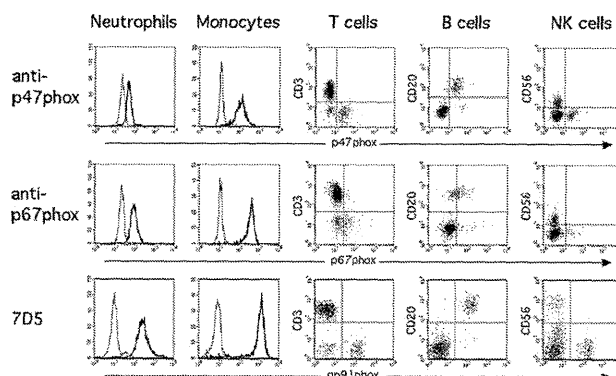
#### 1) 遺伝子変異

*NCF1* もしくは *NCF2* 遺伝子に有意な遺伝子変異が認められた(表 1)。*NCF2* 遺伝子変異のうち、p67-2.1 と p67-2.2 にみられた Gln260X、p67-3 の Tyr394Asp、p67-5 の Trp22X は、新規の変異であった。

#### 2) 活性酸素産生能

gp91phox 欠損型 CGD では、活性酸素産生能がほとんど認められなかった。一方、p47phox 欠損型あるいは p67phox 欠損型 CGD では、欠損から中等度の産生能残存まで様々なレベルを示した(図 2)。

図 1. 正常白血球亜群における NADPH オキシダーゼ各サブユニットの発現



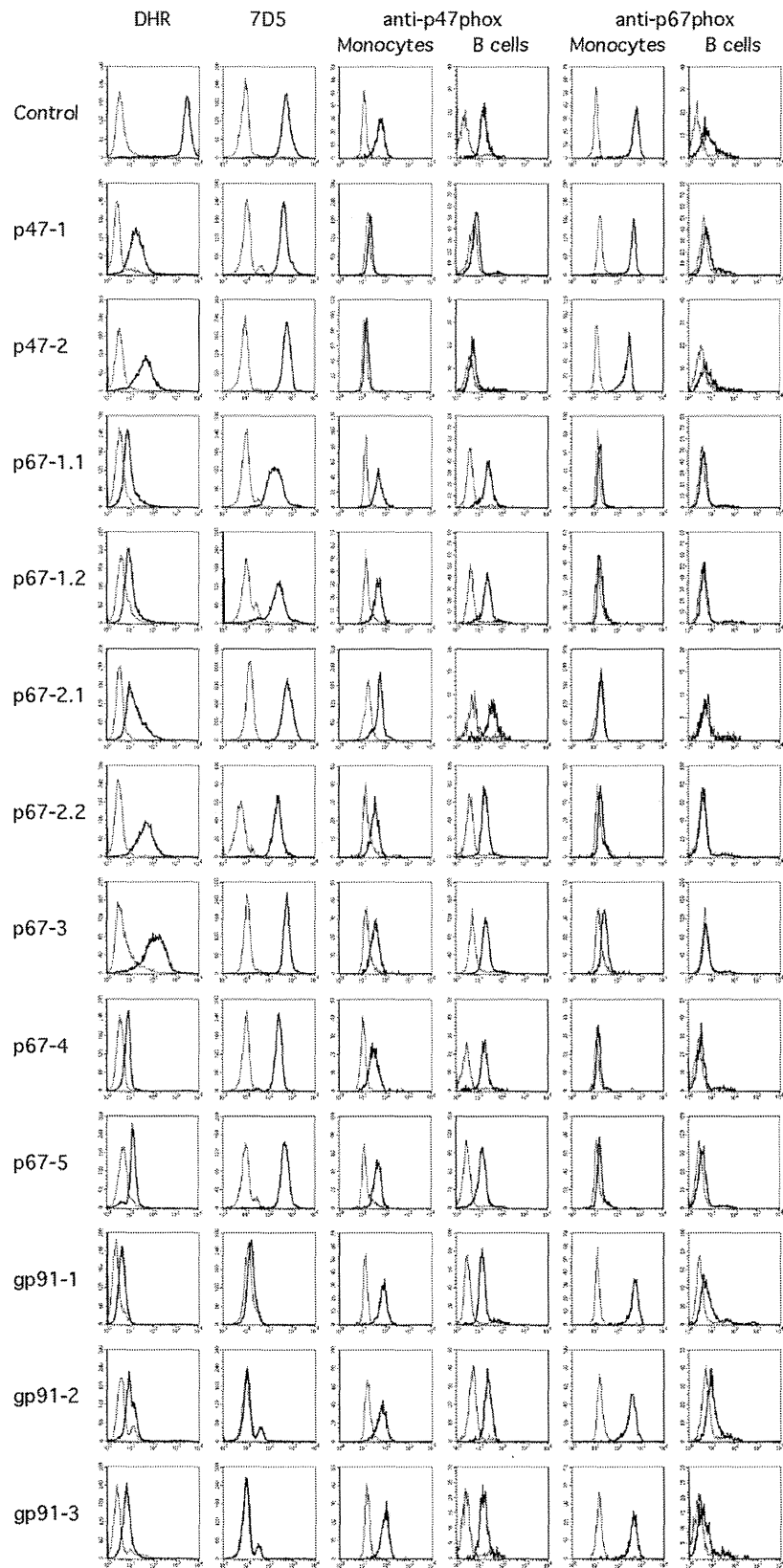
#### 3) 細胞内 p47phox ならびに p67phox 発現

正常白血球亜群における p47phox と p67phox の発現は、従来の報告と同様、また gp91phox の発現と同じく、食細胞と B 細胞に認められた(図 1)。顆粒球は分離操作の過程で死細胞の混入や凝集がみられやすく、単球や B 細胞の方が解析に適していた。

p47phox 欠損型 CGD 患者の単球と B 細胞では、p67phox の発現は保たれていたが、p47phox 発現はほとんど認められなかった。一方、p67phox 欠損型では、p47phox の発現は認められたが、p67phox の発現は著しく減弱していた(図 2)。gp91phox の発現は、p47phox 欠損型、p67phox 欠損型とも正常であった。

p47phox 欠損型 CGD 保因者における p47phox 発現、p67phox 欠損型 CGD 保因者における p67phox 発現についてそれぞれ単球を用いて検討したところ、正常に比べごく僅かに低下しているのみであった。

図 2. CGD 患者における活性酸素産生能、gp91phox/p47phox/p67phox の発現



## D. 考察

今回の研究により、フローサイトメトリーを用いた p47phox と p67phox の発現解析が可能となった。p47phox と p67phox は、好中球、単球、B 細胞の細胞質内に発現しているが、実際の臨床検体においては、凝集しやすく解析の難しい好中球ではなく、単球と B 細胞を用いることで、より信頼性のあるデータが得られ、診断に有用であった。

gp91phox と p22phox は、一方が欠損するともう一方の発現も欠損することが知られており、flavocytochrome b558 に対する単クローン抗体 7D5 は、gp91phox と p22phox の両方の発現をスクリーニングすることが可能である。したがって、今回の p47phox/ p67phox 発現解析と 7D5 抗体による解析を組み合わせることで、CGD のほぼすべての病型において、簡便で迅速なフローサイトメトリーによる蛋白発現解析が可能となった。また、本法は、従来のウエスタンブロット解析に比べ感度もよいと考えられ、変異蛋白の残存と活性酸素産生能の程度、さらに臨床症状との関係の解明に有用であると考えられた。

p47phox と p67phox は安静状態において細胞質内で複合体を形成している。しかし、gp91phox と p22phox の関係と異なり、一方が欠損した場合でも他方の発現には影響をほとんど及ぼさないことが本研究により明らかにされた。

gp91phox 欠損型 CGD 保因者においては、X 染色体のランダムな不活性化のため、DHR123 法による活性酸素産生能が 2 峰性のパターンを示す。また gp91phox 発現も同様に 2 峰性のパターンとなり、どちらの解析も保因者診断に有用であることが知られている。一方、p47phox あるいは p67phox 欠損型 CGD 保因者では、活性酸素産生能は正常で、それぞれの蛋白発現もほぼ正常で

あると報告されている。実際、我々の解析した家系においても保因者の活性酸素産生能は正常であった。また保因者における p47phox あるいは p67phox 発現に関しても、正常コントロールと比べごく僅かに低下しているのみであり、蛋白解析から保因者診断を行うことはできないと考えられた。したがって p47phox あるいは p67phox 欠損型 CGD の保因者診断は従来通り遺伝子解析で行うことが望ましいと考えられた。

## E. 結論

フローサイトメトリーによる p47phox と p67phox 発現解析は、CGD の病型診断に有用であることが示された。

## F. 研究危険情報

特になし

## G. 研究発表

### 1) 論文発表

Wada T, Muraoka M, Toma T, et al: Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry; useful screening tests for chronic granulomatous disease. *J Clin Immunol* (in press)

### 2) 学会発表

1. 和田泰三、村岡正裕、東馬智子、他：慢性肉芽腫症の病型診断における p47phox/p67phox FACS 解析の有用性. 第 44 回日本小児感染症学会総会・学術集会, 2012 年 11 月 24-25 日 北九州
2. Wada T, Muraoka M, Toma T, et al: Rapid detection of intracellular p47phox and p67phox by flow cytometry in patients

with chronic granulomatous disease. 15th  
Biennial Meeting of the European Society  
for Immunodeficiencies. Oct 3-6, 2012  
Florence, Italy

H. 知的財産権の出願・登録状況  
特になし

## 蛍光プローブを用いた好中球活性酸素産生能測定法の比較

布井博幸<sup>1)</sup>、井上義雄<sup>2)</sup>、末松 茂<sup>2)</sup>、岡田俊明<sup>2)</sup>、津田雅弘<sup>2)</sup>、奥山虎之<sup>3)</sup>、西村豊樹<sup>1)</sup>、水上智之<sup>4)</sup>

- 1) 宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学
- 2) 株式会社エスアールエル
- 3) 成育医療センター検査部
- 4) 国立病院機構熊本再春荘病院小児科

### 研究要旨

慢性肉芽腫症の診断には、好中球の放出する活性酸素を検出する事が重要である。好中球活性酸素産生検出法は主に、ジクロロフルオレセインジアセテート (DCF-DA) やジヒドロローダミン 123 (DHR-123) の蛍光プローブが用いられている。臨床検査会社では、早くから DCF-DA を用いた方法で好中球殺菌能検査として、全国の臨床の場からの検査をされてきた。今回、臨床検査会社と協力して、広く実験室で用いられている DHR-123 法との違いを検討したので、報告する。結果は溶血前に DCF-DA と全血をインキュベートし、刺激をすると、溶血後インキュベートして刺激する場合に比べ、かなり蛍光強度が低下した。一方 DHR-123 では溶血時期により蛍光強度に大きな変化は無かったが、溶血前に刺激した場合に比較して、ピークの幅が広がっていた。以上の結果から、DHR-123 を用いた方が、安定した結果が得られる事、またコントロールを同時に測定する事で、より慢性肉芽腫症診断の感度が可能である事を確認した。

### A. 研究目的

慢性肉芽腫症の遺伝子解析が進み、種々の変異が報告されている。現在我々の教室で慢性肉芽腫症登録されている患者は 271 名であった。その内 gp91<sup>phox</sup> 異常患者が 154 名、遺伝子解析が終了した患者が 72 名、その内 gp91<sup>phox</sup> が 7D5 モノクローナル抗体でコントロールの 4%以上陽性であった患者は 21 名と 29%であった。この内ジヒドロローダミン (DHR) -123 検査でコントロールの 1%以上の活性酸素産生能を持つ患者は 14 名で 19%であった (平成 17 年度原発性免疫不全調査研究班分担研究報告)。

慢性肉芽腫症の診断にあたっては、この活性酸素を検出して蛍光を発する蛍光プローブがよく用いられている。特に、日本での臨床検査会社では早期からジクロロフルオレセインジアセテート (DCF-DA) が用いられており、診断に貢献してきた<sup>1)</sup>。DHR-123 は実験室でよく用いられている

が、DCF-DA を用いている臨床検査会社との違いから、上記のように僅かだが活性酸素産生能を有する変異の患者の診断で、医療現場から混乱が生じている。

DCF-DA は細胞膜を比較的容易に透過し細胞質に集積され、アセチル基が細胞内の加水分解酵素により分解され、DCFH となり細胞内に滞留性が高くなる。一方、DHR-123 はミトコンドリアの内膜と外膜の間にプロトンを蓄積されている高い電位差に応答してミトコンドリアに局在化する特性を持っている<sup>2)</sup>。

今回の研究では好中球殺菌能として用いられる DCF-DA と DHR-123 の特性を、検査会社で検討してもらったので報告する。

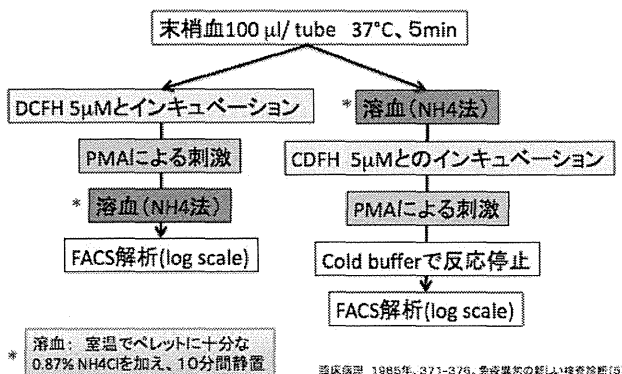
### B. 研究方法

- 1) 溶血時期による好中球活性酸素産生能検査比較

a) 溶血前に PMA 刺激をする方法 (図 1 左) : ヘパリン加末梢血 100ml を 5mM DCF-DA 2ml または 1mM DHR-123 2ml に 37°C で 15 分間震盪加温し、25mM EDTA/PBS を 0.5ml 加え、50mg/ml PMA を 10ml 加え、37°C 25 分間反応させる。その後氷上で冷却し、反応停止させ、1800rpm 5 分間遠心し、ペレットを 0.84%NH<sub>4</sub>Cl lysing solution で溶血し、PBS に再浮遊させ、FACS 解析する<sup>1)</sup>。

b) 溶血後に PMA 刺激する方法 (図 1 右) : ヘパリン加末梢血 100ml を 0.84%NH<sub>4</sub>Cl lysing solution 室温 10 分間の静置で溶血させ、1800rpm 5 分間遠心し、ペレットを 5mM DCF-DA 2ml または 1mM DHR-123 2ml に浮遊させ、37°C 5 分間加温した後、50mg/ml PMA を 10ml 加え、37°C 20 分間反応させ、再度、1800rpm 5 分間遠心し、PBS に再浮遊させ、FACS 解析する。試薬調整は以下の様である。PBS : リン酸水素 2 ナトリウム 12H<sub>2</sub>O ; 2.7g, リン酸 2 水素カリウム ; 0.2g, 塩化カリウム ; 0.2g, 塩化ナトリウム 8.0g を蒸留水 1L に溶解する。25mM EDTA/PB : EDTA-2Na ; 9.3g/PBS1L, Lysing solution : 塩化アンモニウム ; 82.6g, 炭酸水素カリウム ; 10g, EDTA・4Na ; 370mg を蒸留水 10L に溶解する。

図 1 : DCF-DA 法による好中球活性酸素産生能検査



2) 慢性肉芽腫症患者とコントロール好中球活性酸素産生能の DCF-DA 法と DHR-123 法での比較

CGD 患者から IC を確認し、CGD 患者とコントロール好中球を用いて、DCF-DA 法と DHR-123 法での好中球活性酸素産生能比較を行った (図 3)。

### C. 結果

1) DCF-DA 法では溶血を PMA 刺激前と後に行うと、刺激後に溶血を実施した場合、蛍光強度が Peak channel で比べても、かなり減少した (10<sup>3</sup> から 10<sup>1</sup> : 図 2 上段)。一方、DHR-123 法では溶血の時期によって蛍光強度の Peak channel にそれ程大きな違いは見られなかった (図 2 下段)。ただ、Peak 幅が刺激前に行った方が、シャープで有るのに対し、刺激後に溶血を行った方はやや広い分布を示した。

2) 慢性肉芽腫症患者の検査を、従来の DCF-DA 法通りに、溶血を PMA 刺激後に行うやり方と、DHR-123 法で溶血を PMA 刺激前に行うやり方を比較した。結果は、図 3 のように、DCF-DA 法 (図 3 左) でも、十分判定可能である。しかし、DCF-DA 法では DHR-123 法に比べ、蛍光強度の Peak 値の変化は前者が 50 から 800-1000 (リニアスケール) で Peak の高さも低いのに比べ、後者が 10<sup>1</sup> から 10<sup>3</sup> を越え (ログスケール) Peak の高さも大きかった。

図 2 : DCF-DA 法と DHR-123 法による好中球活性酸素産生能の比較

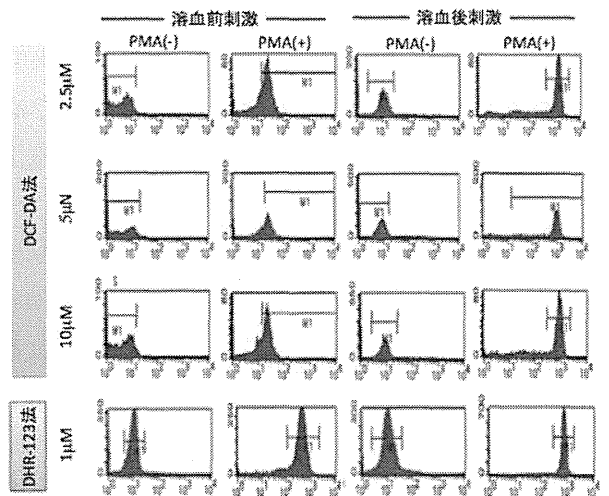
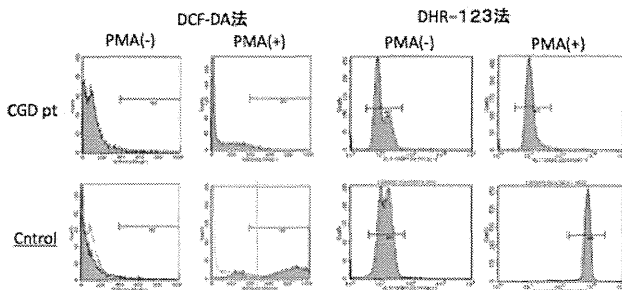




図3：CGD患者の活性酸素産生能のDCF-DA法とDHR-123法の違い



#### D. 考察

慢性肉芽腫症の遺伝子解析が進み、種々の変異が報告されている。我々の教室で遺伝子解析が終了した患者が72名、その内 gp91<sup>phox</sup>が7D5モノクローナル抗体でコントロールの4%以上陽性であった患者は21名と29%であった。その内訳は Splice 変異8名(3変異), Nonsense 変異8名(3変異), Missense 変異1名(1変異), Deletion 変異2名(2変異), Insertion 2名(2変異)であった。この内 DHR-123 検査でコントロールの1%以上の活性酸素産生能を持つ患者は14名で19%であった。その内訳は Splice 変異3名、nonsensense 変異3名、missense 変異1名、insertion 変異2名、deletion 変異2名であった(平成17年度原発性免疫不全調査研究班報告)。

今回 DCF-DA 法による活性酸素測定法では、DCF-DA を加えてから溶血を行うと、PMA 刺激後の活性酸素による蛍光強度が低い値を示した。一方、溶血し、白血球を分離後、DCF-DA を細胞に取り込ませた場合は十分な蛍光強度が得られた事から、おそらく赤血球に取り込まれた DCFH が溶血とともに除去され、好中球内への DCFH の分布が低濃度になっていた可能性がたかい。好中球内の DCFH 濃度の確認が必要である。従って、DCFH でも十分な蛍光強度を得る為には、溶血を先に行って、刺激する行程を取ると良いのではないかと思われた。

DHR-123 は溶血の時期による変化は少ないものの、プローブ添加前に溶血しておいた方が、より

均一な Peak を示していた。この事は、DHR-123 がミトコンドリア膜の電位差の大きさに呼応して、ミトコンドリアに集積する性質があるため、好中球によりよく集積した為だと思われた。

わずかに活性酸素産生能を有する患者の診断は、いずれにしても、判断に苦しむ、常に、正常コントロールを同時に検査する必要がある。gp91phox 欠損の場合、母親か正常者との比較があると、わずかに活性酸素産生能が残存されておられる患者の診断もできると思われた。

臨床検査会社による DCF-DA 法による好中球殺菌能検査については、検体を出される時には一言、「DHR-123 法で」依頼することをお伝えください。

#### E. 結論

わずかに好中球活性酸素産生能を有する慢性肉芽腫症患者がおられる患者の診断の為には、DCF-DA や、DHR-123 の特性を知り、常にコントロールをおいて診断する事が重要である。

#### 参考文献

1. 関 秀俊, 多賀 千之, 宮脇 利男, フローサイトメトリーを用いた好中球機能検査. 臨床病理 33 (4) 371-376 (1985)
2. 塩路 幸生, 細胞内活性酸素種および関連する高活性化学種捕捉蛍光プローブ 福岡大学理学集報 40 (2) 261-266 (2010)

#### F. 研究発表

1. Oshima K, Nagase T, Imai K, Nonoyama S, Obara M, Mizukami T, Nunoi H, Kanegane H, Kuribayashi F, Amemiya S, Ohara O: A Dual Reporter Splicing Assay Using HaloTag-containing Proteins. Curr Chem Genomics. 6: 27-37, 2012
2. Yamada A, Moritake H, Shimonodan H, Yokogami K, Takeshima H, Marutsuka K, Nunoi H: Efficacy of Temozolomide in a Central Nervous System Relapse of

- Neuroblastoma With O<sup>6</sup>-Methylguanine Methyltransferase (MGMT) Promoter Methylation. *J Pediatr Hematol Oncol.* 35(1): e38-41, 2013
3. Moritake H, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Harada M, Sugimoto T, Nao-I N, Nuno H: Cytomegalovirus retinitis as an adverse immunological effect of pulses of vincristine and dexamethasone in maintenance therapy for childhood acute lymphoblastic leukemia. *Pediatr Blood Cancer.* 60(2): 329-31, 2013
  4. Matsunaga T, Yamashita K, Kubuki Y, Toyama T, Imataki O, Maeda K, Kawano N, Satou S, Kawano H, Ishizaki J, Yoshida S, Kameda T, Sasaki T, Sekine M, Kamiunten A, Taniguchi Y, Hidaka T, Katayose K, K-Shimoda H, Shide K, Yamamoto S, Moritake H, Nuno H, Makino S, Kitanaka A, Matsuoka H, Shimoda K: Acute myeloid leukemia in clinical practice: a retrospective population-based cohort study in Miyazaki Prefecture, Japan. *Int J Hematol.* 96(3): 342-9, 2012
  5. Hosoki K, Fujisawa T, Hashiguchi A, Nagao M, Hiraguchi Y, Tokuda R, Nakano T, Nuno H, Ihara T: Aberrant cytokine responses to influenza A virus in a child with severe influenza A infections. *Allergol Int.* 61(3): 507-9, 2012
  6. Nakamura H, Fang J, Mizukami T, Nuno H, Maeda H: PEGylated D-amino acid oxidase restores bactericidal activity of neutrophils in chronic granulomatous disease via hypochlorite. *Exp Biol Med (Maywood).* 237(6): 703-8, 2012
  7. Kawai T, Nishikomori R, Izawa K, Murata Y, Tanaka N, Sakai H, Saito M, Yasumi T, Takaoka Y, Nakahata T, Mizukami T, Nuno H, Kiyohara Y, Yoden A, Murata T, Sasaki S, Ito E, Akutagawa H, Kawai T, Imai C, Okada S, Kobayashi M, Heike T: Frequent somatic mosaicism of NEMO in T cells of patients with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *Blood.* 119(23): 5458-66, 2012
  8. Moritake H, Yamada A, Kimoto Y, Sawa D, Shimonodan H, Nuno H: Acute megakaryoblastic leukemia and severe pulmonary fibrosis in a child with Down syndrome: successful treatment with ultra low-dose cytarabine using GATA1 mutation to monitor minimal residual disease. *Am J Hematol.* 87(4): 447-50, 2012
  9. Arai T, Oh-ishi T, Yamamoto H, Nuno H, Kamizono J, Uehara M, Kubota T, Sakurai T, Kizaki T, Ohno H: Copy number variations due to large genomic deletion in X-linked chronic granulomatous disease. *PLoS One.* 7(2): e27782, 2012
  10. Moritake H, Hidaka F, Kamimura S, Kojima H, Shimonodan H, Nuno H: Concomitant transient erythroblastopenia of childhood with neonatal hepatitis. *Pediatr Int.* 54(1): 147-50, 2012
  11. Mizukami T, Obara M, Nishikomori R, Kawai T, Tahara Y, Sameshima N, Marutsuka K, Nakase H, Kimura N, Heike T, Nuno H: Successful treatment with infliximab for inflammatory colitis in a patient with X-linked anhidrotic ectodermal dysplasia with immunodeficiency. *J Clin Immunol.* 32(1): 39-49, 2012
- G. 知的財産圏の出現・登録状況  
なし

## 家族性血球貪食性リンパ組織球症の診断と病態に関する研究

八角高裕<sup>1)</sup>、堀 雅之<sup>1)</sup>、井澤和司<sup>1)</sup>、西小森隆太<sup>1)</sup>、小原 収<sup>2) 3)</sup>、平家俊男<sup>1)</sup>

- 1) 京都大学大学院医学研究科発生発達医学講座発達小児科学
- 2) 公益財団法人かずさDNA研究所
- 3) 理化学研究所横浜研究所免疫アレルギー科学総合研究センター

### 研究要旨

FHLと二次性HLHの病態解明を目的として、当科出診断したFHL:18症例と二次性HLH:63症例について、発病早期の一般臨床検査値や、NK活性・NK細胞脱顆粒機能などを比較検討した。急性期には、NK活性やNK脱顆粒機能は二次性HLH症例でも一時的に低下している場合が多く、FHLを積極的に疑う所見とはならない事が判明した。発病初期に於ける白血球分画・ferritin・sIL-2Rを検討した所、FHL症例では全例が(好中球)/(リンパ球)比が1以下であり、sIL-2Rの上昇に比してferritin値は比較的low値に留まる事が明らかとなり、これはリンパ球の過剰活性化を基本病態とするFHLの特徴を反映しているものと思われた。一方、二次性HLH症例の(好中球)/(リンパ球)比は1以上である症例が多く、sIL-2Rに比してferritinの上昇が著しい傾向にある事が判明し、特にMAS症例や新生児HSV-HLH症例にこの傾向が強い事が判明した。FHLと二次性HLHの発症機構には大きな違いがある事が示唆され、今後の病態解明に向けた新たな視点が示された。

### A. 研究目的

血球貪食性リンパ組織球症(HLH)は、感染や膠原病などに続発する二次性のものと、遺伝的素因による原発性のものとに大別される。家族性血球貪食症候群(FHL)は単一遺伝子異常を原因とする原発性HLHの代表疾患であり、何れもNK細胞や細胞傷害性T細胞(CTL)の細胞傷害活性に関与する分子の異常が原因である。FHLの基本病態は、細胞傷害活性の低下したCTLが過剰に活性化し、過剰なサイトカインを賛成する事であると考えられているが、動物モデルでの検討が中心であり実際の症例での検討は不十分である。加えて、FHLと二次性HLHの病態に関する比較検討は殆ど為されていない。更に、FHLと二次性症例の鑑別は治療方針の決定の為にも重要であるが、一般検査による両者の鑑別は不可能と考えられており、診断に手間取る事も多い。当科では4年

半前よりFHLの迅速診断を行ってきたが、FHLと二次性HLHの病態解明と鑑別を目的として、両者の発病早期の臨床検査やNK活性・NK細胞脱顆粒機能などを比較検討した。

### B. 研究方法

当科で診断したFHL:18症例(FHL2:8症例、FHL3:10症例)と二次性HLH症例:63例について、アンケートにより、発病初期で治療等による二次的影響が少ない時期の一般臨床検査値を収集した。二次性症例の内訳は、EBウイルス関連HLH(EBV-HLH):23症例、マクロファージ活性化症候群(MAS):6症例、新生児HSV-HLH:4症例、ツツガムシ病:1症例、急性壊死性脳症:2症例、原因不明:26症例であった。NK脱顆粒機能は、患者血及び正常人コントロール血より末梢血単核球(PBMC)を分離してK562細胞と2時間共培養し、CD3陰性CD56陽性細胞中に占めるCD107a陽性細胞の割合をフロ

ーサイトメトリー法にて解析した。

(倫理面への配慮)

研究を行うに当たり、当大学倫理委員会の指針に基づき、承認を得て informed consent を取得の上行った。

### C. 研究結果

NK活性検査やNK脱顆粒機能は、急性期には二次性HLH症例でも一時的に低下している事が多く、FHLを積極的に疑う所見とはならない事が判明した。発病初期に於ける白血球分画・ferritin・sIL-2Rを各群間で比較検討した所、FHL症例では全例が(好中球)/(リンパ球)比が1以下であり、sIL-2Rの上昇に比してferritin値は比較的低位に留まる事が明らかとなった。一方、二次性HLH症例の(好中球)/(リンパ球)比は1以上である症例が多く、この様な症例ではsIL-2Rの値に比してferritinの上昇が著しい傾向にある事が判明し、特にMAS症例や新生児HSV-HLH症例にこの傾向が強いことが判明した。EBV-HLH症例や原因不明症例では一定の傾向は認められなかった。

### D. 考察

FHL症例では、少なくとも病初期に於いては全例が(好中球)/(リンパ球)比が1以下であり、sIL-2Rの上昇に比してferritin値は比較的低位に留まる事が明らかとなった。これはリンパ球の過剰活性化がFHLの基本病態であるとする動物実験の結果を裏付けるものと思われた。一方、二次性HLH症例の(好中球)/(リンパ球)比は1以上である症例が多く、sIL-2Rの値に比してferritinの上昇が著しい傾向にある事が判明し、特にMAS症例と新生児HSV-HLH症例にこの傾向が強いことが判明した。これら二次性HLHの病態は基本的にFHLのそれとは異なる事が示唆された。興味深い事にEBV-HLH症例には一定の傾向が認められず、原因として感染しているEBウイルス量や感染細胞の違いが考えられたが、残念ながら今回

の研究では十分な情報が得られず解析は困難であった。FHL二次性HLHの発症機構には大きな違いがある事が示唆され、今後の病態解明に向けた新たな視点が示されると同時に、FHLを含めたHLH症例の治療方針の決定に参考となる可能性が示唆された。

### E. 結論

FHLと二次性HLHの発症機構には大きな違いがある事が示唆され、今後の病態解明に向けた新たな視点が示されると同時に、FHLを含めたHLH症例の治療方針の決定に参考となる可能性が示唆された。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1) 論文発表

1. Yokota S, Nishikomori R, Takada H, Kikuchi M, Nozawa T, Kanetaka T, Kizawa T, Miyamae T, Mori M, Heike T, Hara T, Imagawa T: Guidance on the use of canakinumab in patients with cryopyrin-associated periodic syndrome in Japan. *Mod Rheumatol* (in press)
2. Abe J, Izawa K, Nishikomori R, Awaya T, Kawai T, Yasumi T, Hiragi N, Hiragi T, Ohshima Y, Heike T: Heterozygous TREX1 p.Asp18Asn mutation can cause variable neurological symptoms in a family with Aicardi-Goutieres syndrome/familial chilblain lupus. *Rheumatology (Oxford)* (in press)
3. Tanaka T, Takahashi K, Yamane M, Tomida S, Nakamura S, Oshima K, Niwa A, Nishikomori R, Kambe N, Hara H, Mitsuyama M, Morone N, Heuser JE,