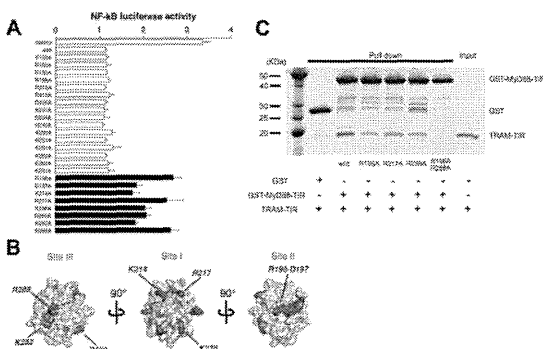


図 6



#### D. 考察

TIR ドメイン含有アダプター分子群のうち、従来“シグナル伝達アダプター分子”である MyD88、TRIF は、“膜誘導アダプター分子”である Mal、TRAM とそれぞれ相互作用することが知られており、MyD88 と TRAM は相互作用しない組み合わせと考えられていたが、本研究により MyD88-TRAM 間の相互作用が可能であることが明らかとなった。またその生物学的位置づけは、IL-18 シグナル伝達において“シグナル伝達アダプター分子”である MyD88 を、TRAM が効率的に細胞膜上の IL-18 受容体に誘導することである。MyD88 と TRAM の相互作用点は、MyD88-Mal と重複する。すなわち、My88 欠損症でみられる TIR ドメイン上の変異は、TLR4-Mal-MyD88 の複合体形成を阻害するだけでなく、IL-18R-TRAM-MyD88 の複合体形成も阻害することになり、IL-18 による Th1 反応の誘導も減弱すると考えられる。また、MyD88 欠損マウスや Mal 欠損マウスではその表現型として様々な種類の細菌感染症への易感染性の報告があり、TRIF 欠損マウスにおいてもウイルス感染やインフルエンザ菌に対する易感染性の報告があるが、TRAM 欠損マウスでは病原体に対する易感染性の報告は無い。今回の検討で、TRAM 欠損マウスでは Th1 細胞からの IL-18 刺激による IFN- $\gamma$  産生誘導が減弱していたことから、ヒト TRAM 欠損では、IFN- $\gamma$  シグナル系の機能低下に起因して

Mendelian susceptibility to mycobacterial diseases (MSMD) 様の臨床症状の発症が推測される。

#### E. 結論

TRAM は、MyD88 との相互作用を介して、IL-18 シグナル伝達経路に関与する。TRAM 欠損では、自然免疫機能の低下だけでなく IL-18 の機能減損に起因した Th1 細胞や NK 細胞活性の低下がみられるかもしれない。

#### F. 健康危険情報

特になし

#### G. 研究発表

##### 1) 論文業績

- Ohnishi H, Miyata R, Suzuki T, Nose T, Kubota K, Kato Z, Kaneko H, Kondo N: A rapid screening method to detect autosomal-dominant ectodermal dysplasia with immune deficiency syndrome. *J Allergy Clin Immunol* 129: 578-80, 2012
- Nada M, Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T, Kamatari Y, Tsutsumi N, Shirakawa M, Kondo N: Molecular analysis of the binding mode of Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain proteins during TLR2 signaling. *Mol Immunol* 52: 108-16, 2012
- Ohnishi H, Teramoto T, Iwata H, Kato Z, Kimura T, Kubota K, Nishikomori R, Kaneko H, Seishima M, Kondo N: Characterization of NLRP3 variants in Japanese cryopyrin-associated periodic syndrome patients. *J Clin Immunol* 32: 221-9, 2012
- Ohnishi H, Tochio H, Kato Z, Kawamoto N, Kimura T, Kubota K, Yamamoto T,

- Funasaka T, Nakano H, Wong RW, Shirakawa M, Kondo N: TRAM is involved in IL-18 signaling and functions as a sorting adaptor for MyD88. PLoS One 7: e38423, 2012
5. Kawamoto N, Ohnishi H, Kondo N, Strominger JL: The role of dendritic cells in the generation of CD4<sup>+</sup> CD25<sup>HI</sup> Foxp3<sup>+</sup> T cells induced by amino acid copolymers. Int Immunol (in press)
  6. Hori T, Ohnishi H, Teramoto T, Tsubouchi K, Naiki T, Hirose Y, Ohara O, Seishima M, Kaneko H, Fukao T, Kondo N: Autosomal-Dominant Chronic Mucocutaneous Candidiasis with STAT1-Mutation can be Complicated with Chronic Active Hepatitis and Hypothyroidism. J Clin Immunol 32: 1213-20, 2012
  7. 近藤直実, 他: 原発性免疫不全症の概念と分類, および自己炎症性疾患・自然免疫不全症・近縁疾患の位置付け. 自己炎症性疾患・自然免疫不全症とその近縁疾患. 近藤直実, 平家俊男 編. 診断と治療社. 2-31、2012
  8. 近藤直実: アレルギー疾患の免疫療法と分子標的治療 理論と実践. 近藤直実 編. 診断と治療社. 2-9、2012
  9. 近藤直実: 毛細血管拡張性小脳失調症. 小児疾患の診断治療基準 第4版. 小児内科 44:232-233、2012 東京医学社
  10. 大西秀典, 寺本貴英, 久保田一生, 山本崇裕, 渡邊倫子, 加藤善一郎, 金子英雄, 近藤直実: 原発性(先天性)免疫不全症の分類-2012update-. 小児科診療 75: 134-151、2012
- 2) 学会発表
1. 近藤直実: 演者: セミナー I : 小児喘息の長期管理. 国際喘息学会日本・北アジア部会(第22回) 2012年7月6日 福岡
  2. 近藤直実: 演者: シンポジウム 1 : 小児喘息から成人喘息治療への移行. 日本アレルギー学会春季臨床大会(第24回) 2012年5月12日 大阪
  3. Hidenori Ohnishi, Zenichiro Kato, Takeshi Kimura, Kazuo Kubota, Takahiro Yamamoto, Naomi Kondo: Molecular analysis of signal transduction pathway of IL-18, related with allergic condition. The 22nd Congress of Interasma Japan / North Asia, Jul 6-7, 2012, Fukuoka Japan
  4. Hidenori Ohnishi, Naotaka Tsutsumi, Takahiro Yamamoto, Hidehito Tochio, Zenichiro Kato, Kazuo Kubota, Masahiro Shirakawa, Naomi Kondo: The functional assessments of mutational effect of human IRAK4 and MyD88 gene. APAPARI 2012, Oct 19-21, 2012, Taipei, Taiwan
- H. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
特になし
  2. 実用新案登録  
特になし
  3. その他  
特になし

# 死細胞に対する急性好中球性炎症反応における Minc1、補体、ATP の関与

河野 肇<sup>1)</sup>、柳田たみ子<sup>1)</sup>、高山真希<sup>1)</sup>、菊地弘敏<sup>1)</sup>、Kenneth L Rock<sup>2)</sup>、Zubin Patel<sup>2)</sup>

1) 帝京大学医学部内科学講座、2) UMass Med School

## 要旨

in vivo において細胞死、特に necrosis は炎症を引き起こす。この反応は、死細胞から炎症性の分子が漏れ出して自然免疫細胞が反応することによって考えられており、そのような炎症惹起性分子は DAMPs (Damage Associated Molecular Patterns) と呼ばれている。DAMPs としての候補として挙げられている分子があるものの、in vivo における働きについては明らかとなっていないことが多い。本研究では DAMPs 候補として挙げられている 3 分子 (補体 C3、ATP と P2X7、Minc1 (Clec4e)) についてその in vivo での死細胞 に対する炎症への関与を検討した。C3 欠失マウスでは炎症初期反応は減弱しているか、その後は野生型と同等であった。それに対して、P2X7 欠失マウス、Minc1 欠失マウスでは炎症の反応は炎症初期でも極期でも野生型と同等であった。

## A. 研究の目的

過去十年の研究を通じて、免疫機構は病原体の感染徴候のみを監視している訳ではなく、自分自身の細胞の状況を見ていることが明らかとなった。このことは、死細胞に対する炎症反応から良く説明される。ネクローシスによる細胞死が発生すると、自然免疫機構はこれを察知し、好中球を主体とする急性炎症反応が認められる。この急性炎症は、ネクローシスの種類、例えば、物理的か、虚血か、などにはよらず、また、薬剤性などの無菌的処置においても同様に認められる。

このような、細胞死に対する急性炎症反応は両刃の剣であり、生体にとって良いこととも悪いことも引き起こす。炎症反応により自然免疫細胞と補体などの液性成分が細胞死の箇所に送り込まれ、細胞傷害を収めることができ、デブリを取り除き、組織治癒過程を促進する。その反面、組織に滲出した好中球はプロテアーゼ

や活性酸素などをばらまき、組織障害を悪化させる。好中球を除去した動物モデルでは、心筋虚血や薬物性肝障害などが改善することが知られており、感染を伴わないネクローシスにおいては、急性好中球性炎症反応がかえって、問題を悪化させることが明らかである。

どのように死細胞が急性炎症反応を惹起させるかについては、十分に理解されていない。細胞死がおきると、そのことが、無害な生体の構成成分から炎症惹起性の存在へと姿を変える。これには形質細胞膜の破綻が重要な役割を果たしていると考えられている。形質細胞膜の破綻はネクローシスの最も重要なサインであるのみならず、細胞質内に通常であれば隠されている分子を細胞外に出すこととなる。このような分子群を DAMPs (Danger / Damage Associated Molecular Patterns) とよぶ。DAMPs がどのように細胞死における急性炎症反応に役割を果たしているかについては、明らかでは

ないことが多いが、細胞質由来の分子として HMGB1、IL-1、SAP-130 そして各由来の分子としては DNA、ATP、尿酸が報告されている。そして、細胞死が炎症反応を惹起する過程においては、自然 IgM 抗体や補体が関与することが知られている。しかしこれらの分子の *in vivo* における重要性については完全には判明していない。尿酸と ATP の重要性は *in vivo* でも報告されているが、同じ生体モデルではない。今回の報告ではこれまで我々が用いてきた *in vivo* モデルにおけるこれら DAMPs とメディエーターについて検討を行った。

## B. 研究方法

### Reagent and antibodies

Antibodies against Ly-6G (clone 1A8) were obtained from BD Bioscience. Anti- 7/4 antibody was purchased from Serotec. 7-AAD was obtained from Molecular probe. Acetaminophen, ATP and Apyrase (grade VII) were purchased from Sigma.

### Animal and cell lines

Wild type C57BL/6, P2X<sub>7</sub> receptor deficient mice, C3 deficient mice were purchased from Jackson Laboratories or Japan SLC, Inc. Mincle deficient mice were obtained from Consortium for Functional Glycomics at The Scripps Research Institute. All animal protocols were approved by the UMass and Teikyo University animal care and use committee. EL4 cells were maintained in RPMI-1640 with 10% fetal calf serum (FCS) and antibiotics.

### Preparation of necrotic cells and apyrase treatment.

Necrotic EL4 cells were prepared as described. EL4 cells were washed 5 times with phosphate buffered saline (PBS) and then resuspended in PBS at 10 million cells / 50 microL and then heat-shock at 45°C for 10 min followed by 37°C incubation for 5 hours; this resulted in necrosis (7-AAD/PI positive cells).

To induce mechanical necrosis, liver from C57BL/6 was weighed, mixed with 5 times of weight of PBS and subjected to mechanical injury by a dounce homogenizer followed by nitrogen cavitation for 10 min at 500 psi. Similarly, mechanical necrosis was induced in EL4 by nitrogen cavitation for 10 min at 500 psi.

Mice were injected with 25 units of intact or boiled (95°C for 5min) apyrase s.c. and challenged with acetaminophen 30 minutes later as described below.

### Neutrophil recruitment to peritoneal cavity

Quantification of recruited neutrophils and monocytes to the peritoneal cavity was described before. Mice were injected i.p. 30 million of necrotic EL4 cells in 150 microL of PBS or 150 microL of liver homogenate. After 4 or 16 hours of injection, the peritoneum was lavaged with 6 mL of PBS with 2%FCS, 3mM of EDTA and 10U/mL of heparin. The absolute number of neutrophil (Ly-6G+ 7/4+) in 100 microL of lavage was

counted using a flow cytometer equipped with a high throughput sampler (BD bioscience).

### Acetaminophen induced liver injury

Mice were fasted for 18 hours and injected i.p. with 300 mg/kg of acetaminophen. 18 hours after acetaminophen injection the liver was perfused with PBS and harvested. One hundred mg of liver was homogenized in 1 mL of myeloperoxidase buffer (0.5% hexadecyl trimethyl ammonium bromide, 10 mM EDTA, 50 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 5.4), sonicated and assayed for myeloperoxidase activity as described.

### Statistical analyses

Data are reported as means  $\pm$  standard errors. Statistical analyses in each independent experiment was performed with an unpaired, two-tailed Student's *t*-test. One-way ANOVA and Dunnett's multiple comparison post-test were used to compare the means of multiple groups to the control group.  $P < 0.05$  was considered statistically significant.

## C. 研究結果

### 細胞死における補体の役割

補体は死細胞をオプソナイズして、急性炎症反応を惹起することが知られている。(26). この急性炎症反応カスケードには、C3a と C5a の生成が重要な役割を果たしている。これらはそれぞれ、C3 と C5 の分解産物である。補体

の細胞死に対する炎症反応を検討するにあたり、我々は C3 を欠失したマウスを用いることとした。このマウスにおいては C3a は生成されない。さらには、下流の補体活性化経路は活性化されない。また、C3 欠失マウスでは C5a も生成されない。

まず我々はマウスを絶食においた後に過剰用量のアセトアミノフェンを投与し、薬剤性肝障害を惹起した。そして、その肝臓に浸潤した好中球数をミエロペルオキシダーゼ (MPO) 活性にて測定した。MPO 活性は通常肝臓では低値を示すが、アセトアミノフェン投与下では高値を示す。(Fig 1A). この実験において、C3 欠失マウス野生型に比べては明らかに好中球浸潤に減弱を認めた。(Fig. 1A). 血清中のトランスアミナーゼ alanine aminotransferase (ALT) には差を認めなかった (Fig 1B).

この結果をさらに他の系にて検証した。我々はマウス腹腔にネクロシスをおこした EL4 細胞を打ち込み、そこに滲出してくる好中球数を定量した。(Fig 2A) に示す様に、死細胞を注射後 4 時間にて好中球の浸潤が確認される。この好中球の浸潤は C3 欠失マウスにおいて明らかに減弱していた。(Fig. 2A) しかし、16-18 時間後の炎症の極期においては、野生型と C3 欠失マウスには差が認められなくなっていた。(Fig. 2C, D).

### 死細胞における急性炎症反応における ATP の役割

アポトーシス死細胞から漏出する ATP は”私を食べて” 信号であることが判明している。また、ネクロシスによる細胞死においても、

炎症反応惹起性物質である (DAMPs) であることが示唆されている。in vitro においては、ATP は P2X7 受容体を刺激して IL-1 を生成することが確認されている。

ATP の細胞死における関与を検討するために、我々は死細胞を P2X7 受容体欠失マウスに腹腔投与し、好中球の滲出を確認した。滲出してくる好中球数は、4 時間後においても、16 時間後においても、P2X7 受容体欠失マウスにおいても、野生型と差は認められなかった。(Fig. 3)。

#### Mincle (Clec4e) の細胞死における役割

C-type レクチン型受容体である Mincle が死細胞による炎症反応に関与しているとの報告がある。この報告においては、放射線照射による胸腺の細胞死による急性炎症反応を観察しており、抗 Mincle 抗体による減弱が認められた。Mincle の細胞死における関与を検討するために、Mincle 欠失マウスを用いた。

ネクロシス EL4 細胞を腹腔に注入しての急性好中球性反応は、Mincle 欠失マウスにおいては野生型と変化を認めなかった。超急性期 (4hr) においても、炎症の極期 (16hr) においても (Figure 7A, B, C, D)。Mincle 欠失マウスにおけるアセトアミノフェン肝障害モデルにおいても、変化は m に止められなかった。(Figure 7E, F)

#### D. E. 考察と結論

本研究を通じ、さまざまな DAMPs があるなかで、これまで、尿酸や HMGB1 に関して評価を行ってきた in vivo システムで補体、ATP、Mincle

評価を行った。C3 は明らかに細胞死に関する炎症反応に関与していた。また ATP と Mincle にはそのような反応は認められなかった。

Figure 1

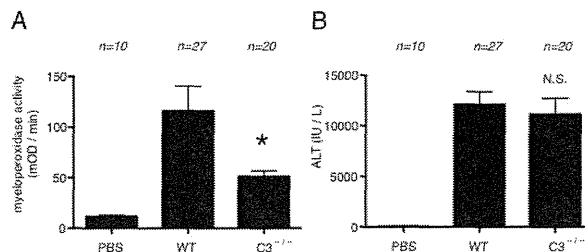


Figure 2

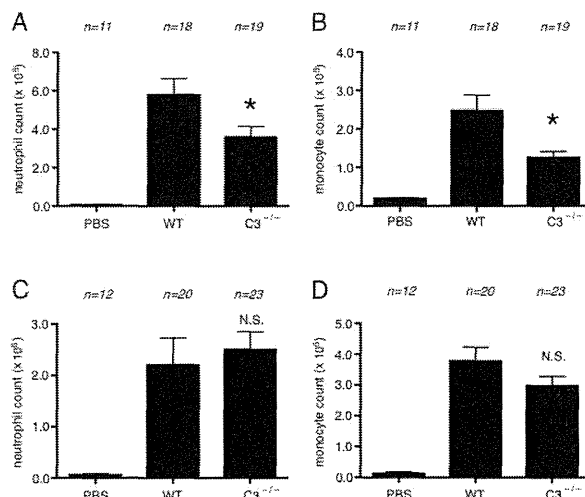


Figure 3

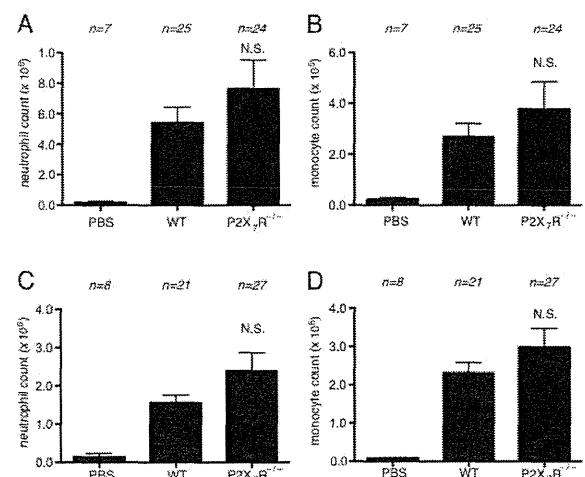
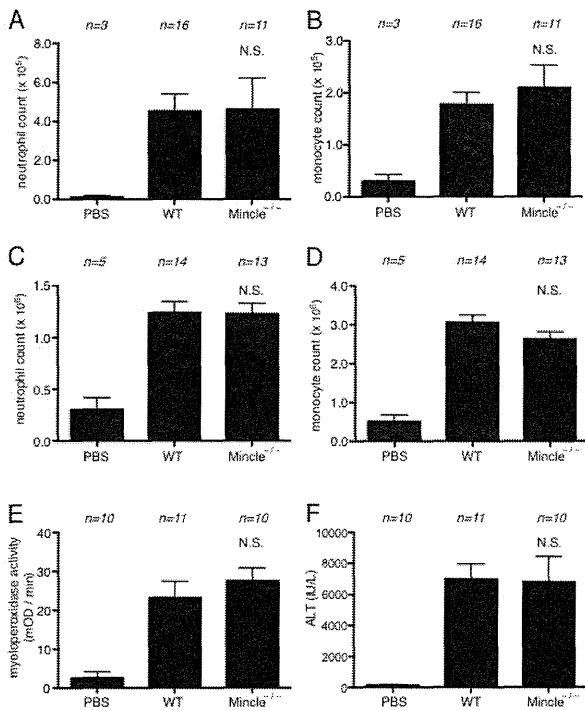


Figure 7



F. 研究危険情報

なし

G. 研究発表

1) 論文発表

- Hajime Kono, Gregory M. Orlowski, Zubin Patel, Kenneth L. Rock. The IL-1-Dependent Sterile Inflammatory Response Has a Substantial Caspase-1-Independent Component That Requires Cathepsin C. *J Immunol*, 189:3734-40, 2012
- 河野 肇:動脈硬化と自然免疫 Annual Review 循環器 2012, 42-8, 2012
- 河野 肇:コレステロール、動脈硬化、そして自然免疫炎症 自己抗体と自己免疫 2012, 33-41, 2012

- 河野 肇: NETs (好中球細胞外 traps) は SLE の病態に関与するか? *リウマチ科* 48: 569-73, 2012
- 河野 肇: NLRP3 インフラマソームと動脈硬化. *臨床免疫・アレルギー科* 57, 444-9, 2012
- 河野 肇: インフラマソームと動脈硬化 *Medical Practice* 29:2106- 8, 2012

2) 学会発表

Hajime Kono, Tamiko Yanagida, Maki Takayama, Kurumi Asako, Hirotohi Kikuchi. The role of complement C3, ATP and Mincle in the cell death - induced sterile inflammatory response. 日本リウマチ学会 2012年4月

H. 知的財産権の出願・登録状況、参考文献

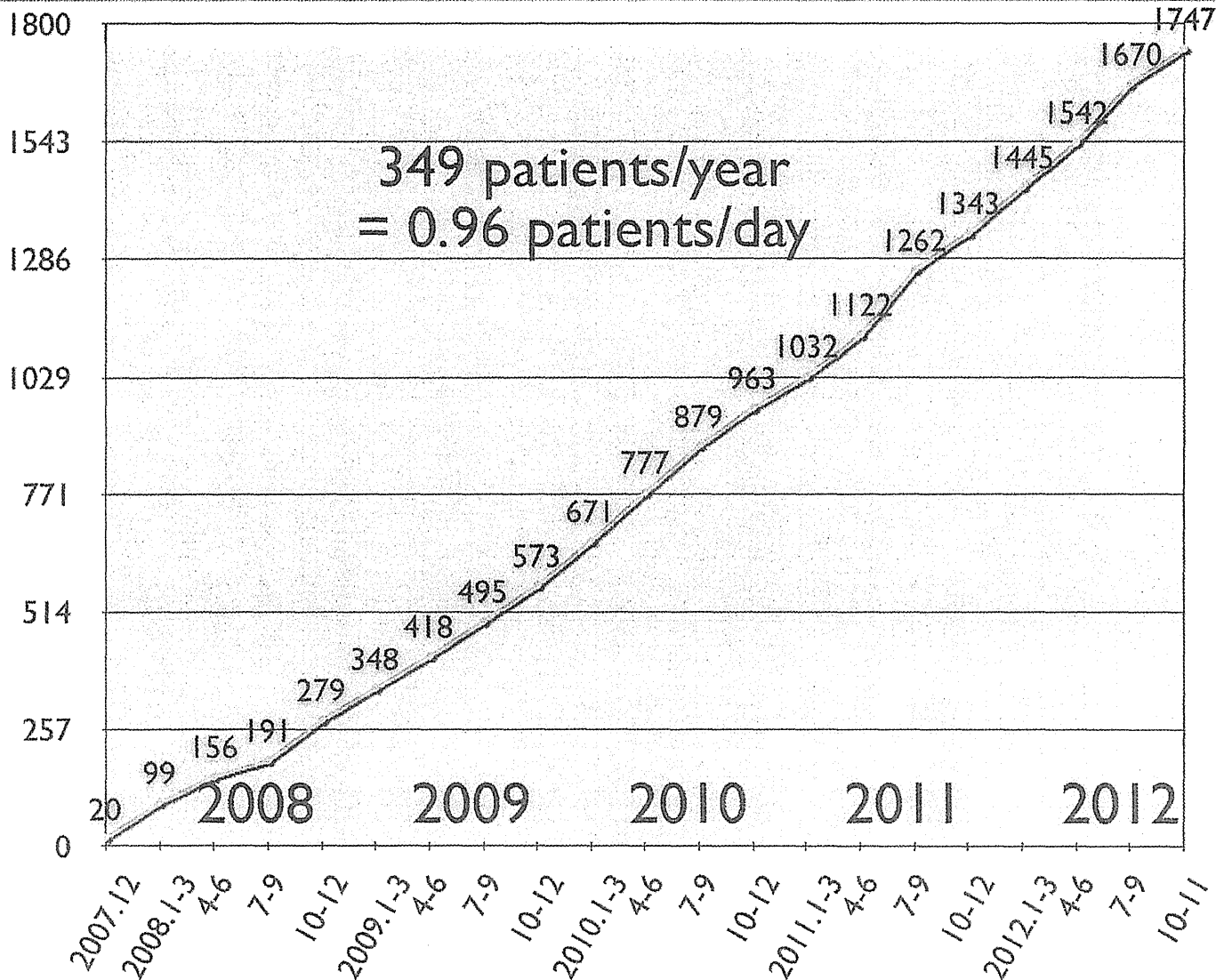
なし

## 參考資料



# PIDJ 2008-2012

Newly registered patients increasing linearly  
still after 5 years!



# プログラム

<p>10:10~10:15</p>	<p>開会挨拶 第6回当番幹事 防衛医科大学校 野々山 恵章</p>
<p>一般口演 1 [MLA]</p> <p>10:15 ≡ 10:45</p>	<p>北海道大学 有賀 正</p> <p>IVIG補充療法にて高度な副反応を生じている成人期に診断のついたX連鎖性無γグロブリン血症 東京医科大学 小児科 志村 優</p> <p>リンパ系腫瘍を合併したX連鎖無ガンマグロブリン血症の2例 富山大学医学部 小児科 星野 顕宏</p> <p>1演題 15分 (発表10分・質疑5分)</p>
<p>一般口演 2 [CCD]</p> <p>10:45 ≡ 11:15</p>	<p>広島大学 小林 正夫</p> <p>侵襲性肺アスペルギルス症を合併した慢性肉芽腫症の乳児例 信州大学 小児医学講座 重村 倫成</p> <p>蛍光プローブを用いた好中球活性酸素産生測定法 (宿題報告) -DCFH法とDHR-123法の比較- 室崎大学医学部 生殖発達医学講座小児科学分野 布井 博幸</p> <p>1演題 15分 (発表10分・質疑5分)</p>
<p>一般口演 3 [COVID/補体]</p> <p>11:15 ≡ 11:45</p>	<p>東京医科歯科大学 森尾 友宏</p> <p>新規B因子機能獲得型変異を有する非典型的溶血性尿毒症症候群の1家系 岐阜大学大学院医学系研究科 小児病態学 大西 秀典</p> <p>Infliximabが奏効した、分類不能型免疫不全症に合併した潰瘍性大腸炎類似腸炎の1例 京都大学医学部附属病院 発達小児科学 小田 紘嗣</p> <p>1演題 15分 (発表10分・質疑5分)</p>
<p>11:45~13:15</p>	<p>昼食 (幹事会/PIDJ委員会)</p> <p>※昼食は各自お済ませください。 ※幹事の先生方は B1F 会議室 1+2] にご参集ください。(昼食を準備しています)</p>

一般口演 4 [自己炎症・WHIM]
13:15
≡
13:45

九州大学

高田 英俊

4-1 単一細胞イムノアッセイによるNLRP3体細胞モザイクの機能的解析の試み

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ

白崎 善隆

4-2 難治性疣贅と類上皮細胞肉芽腫からなる多発性皮膚結節を伴った原発性免疫不全症の1例

和歌山県立医科大学医学部 皮膚科

金澤 伸雄

1演題 15分(発表10分・質疑5分)

一般口演 5 [CMC/HIE]
13:45
≡
14:30

宮崎大学

布井 博幸

5-1 STAT1機能獲得型変異を有する慢性皮膚粘膜カンジダ症 (CMC) の臨床症状の検討

北海道大学医学部 小児科学分野

竹崎 俊一郎

5-2 STAT1機能獲得性変異による慢性皮膚粘膜カンジダ症

広島大学 小児科

岡田 賢

5-3 高IgE症候群に肺非結核性抗酸菌症を合併した2症例の検討

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

瀧本 智仁

1演題 15分(発表10分・質疑5分)

一般口演 6 [CID]
14:30
≡
15:00

富山大学

金兼 弘和

6-1 生後2カ月からCD5,19,20陽性Bリンパ球のポリクローナル増多と肝脾腫を呈し、20歳時に難治性T細胞性リンパ腫を発症した1男子例

千葉県こども病院 血液腫瘍科

沖本 由理

6-2 白血球・血小板減少と多発奇形を合併した複合免疫不全症の1例

九州大学大学院医学研究院 成長発達医学分野

瀧本 智仁

1演題 15分(発表10分・質疑5分)

15:00~15:15

Break

一般口演 7 [CID/ATM]
15:15
≡
15:45

名古屋大学

小島 勢二

7-1 ATM変異のない毛細血管拡張性運動失調症Ataxia Telangiectasia疑い症例のエクソーム解析

東京医科歯科大学大学院 発生発達病態学分野

高木 正稔

7-2 ACTH不応症、Fanconi貧血様の症状と悪性リンパ腫を合併した原発性免疫不全症の1例

東北大学病院 小児科

大久保 幸宗

1演題 15分(発表10分・質疑5分)

一般口演 8 [OMENN/RAG]
15:45
≡
16:15

- 8-1** 金沢大学  
谷内江 昭宏
- 8-1** Omenn症候群様症状を呈した完全型DiGeorge症候群2例の解析  
金沢大学 小児科  
和田 泰三
- 8-2** IgA単独欠損症として紹介されRAG1遺伝子変異を認めた1男児例  
防衛医科大学校 小児科学講座  
加藤 環

1演題 15分 (発表10分・質疑5分)

一般口演 9 [SCID]
16:15
≡
16:45

- 9-1** 成育医療センター  
小野寺 雅史
- 9-1** SCID-X1 Multiple Reversion mosaicism症例における長期的治療戦略の検討  
京都大学医学部附属病院 小児科  
河合 朋樹
- 9-2** 国内SCID140症例の造血幹細胞移植成績について  
東京医科歯科大学 小児・周産期地域医療学講座  
今井 耕輔

1演題 15分 (発表10分・質疑5分)

16:45~17:00
-------------

Break

特別講演
17:00~18:00

- 特別講演** 防衛医科大学校  
野々山 恵章
- ESID Guidelines for Haematopoietic Stem Cell Transplantation and Gene Therapy
- Prof. Bobby Gaspar  
GOSHCC Professor of Pediatrics and Immunology  
Consultant in Pediatric Immunology, Molecular Immunology Unit  
UCL Institute of Child Health

18:00~18:10
-------------

閉会挨拶  
第6回当番幹事 防衛医科大学校  
野々山 恵章

## ESID Guidelines for Haematopoietic Stem Cell Transplantation and Gene Therapy

The treatment options for severe immunodeficiencies are limited. The mainstay of treatment is allogeneic stem cell transplantation and more recently gene therapy is available for specific conditions. As our knowledge of the genetic and molecular basis of these conditions increases, our treatment is guided by the underlying molecular defect. Thus we cannot think of all SCID cases as the same and we can no longer apply common treatment strategies. Instead for each type of SCID we must tailor our treatment options. In this lecture, I will attempt to demonstrate how the knowledge of the disease basis, the use of retrospective transplant data, the use of novel conditioning regimes and recent gene therapy developments have led to specific guidelines for these diseases.



## IVIG補充療法にて高度な副反応を生じている成人期に診断のついたX連鎖性無 $\gamma$ -グロブリン血症

Adverse reactions to gamma globulin infusion in an atypical case of XLA diagnosed at adult age

東京医科大学 小児科 1))

志村 優、河島 尚志、呉 宗憲、武隈 孝治、星加 明徳

静岡県立こども病院 2))

藤岡 泰生

【症例】患者は診断時45歳、幼少時より月に1回程度の発熱を繰り返し、免疫不全症候群が疑われ、8歳頃精査するも明らかな診断はつかなかった。発熱の頻度は徐々に減少し、15歳以降は年に1回程度の発熱を認めるのみであった。42歳ごろより、易感染性が著明となり化膿性髄膜炎にて3回入院、化膿性左股関節炎にて1回入院、化膿性脊椎炎1回入院となった。家族歴は、母はパーチエット病であった以外に詳細は不明だが、明らかな免疫不全症はいなかった。免疫不全症を疑い再度検査を行い、 $\gamma$ -グロブリン低値 (IgG 667mg/dl、IgA 592mg/dl、IgM<5mg/dl)、T細胞85%、B細胞 1%、CD3 60.3%、CD4 45.1%、CD19 0.2%、CD20 0.3%であり、FACSにてmonocyteのBtk蛋白欠損、遺伝子検査にてexon6のskipをおこす637G>T (169E>X) を認めた。この結果からX連鎖性無 $\gamma$ -グロブリン血症 (XLA) と診断し、IVIGの月1回5g投与開始となった。開始後からは一度も化膿性疾患は認めず経過している。しかしながら、IVIGによる副反応を著明に認めるようになった。IVIGの使用開始後より異常感覚、筋力低下、視力低下、震えを訴えるようになり、回数の増加とともに訴えは増加してきた。頭部MRIでは明らかな異常所見はなく、これらの感覚異常・知覚異常は、IVIG注射中より出現し、3日から10日間継続するようになった。時に皮膚が赤くなることや、微熱を伴うことなど自律神経症状も加わっていた。症状はステロイドの前投与や症状出現後投与でもコントロールできず、抗アレルギー薬も無効であった。また、グロブリン製剤の変更を行うも同様であった。現在、免疫応答が維持されていると判断、現在IVIGの減量と免疫抑制剤の検討を行っている。

【考察】IVIGにおける副作用の検討は多く報告されているが、一般に副作用発現時の注意や自己抗体に関する検討のみである。IVIGの副反応は免疫不全患者では高いことが知られているが、患者はXLAのなかでもIgGやIgAが検出される特殊なタイプであり、このことから、IVIG製剤に対し神経症状が強くてているものと推察された。定期的補充に関する症例ごとの検討が必要と考えられた。(遺伝子検査ならびにFACS検査をしていただいた富山大学の金兼弘和先生に感謝いたします。)

# リンパ系腫瘍を合併したX連鎖無ガンマグロブリン血症の2例

Lymphoid malignancies in two patients with X-linked agammaglobulinemia

富山大学医学部 小児科 )))

星野 顕宏、金兼 弘和、楊 曦、宮脇 利男

熊本赤十字病院 小児科 )))

伴 英樹、右田 昌宏

大阪大学医学部 小児科 )))

橋井 佳子

大阪大学医学部病態病理学 )))

森井 英一

国立成育医療研究センター小児血液・腫瘍研究部 )))

清河 信敬

【はじめに】X連鎖無ガンマグロブリン血症(XLA)はBruton's tyrosine kinase(BTK)蛋白をコードするBTK遺伝子の異常によって生じ、プロB細胞からプレB細胞への分化障害のために生じる抗体産生不全が特徴である。長期的には消化器悪性腫瘍の発生頻度が健常人に比べて高いことが報告されているが、その他の悪性腫瘍の報告は少ない。成熟B細胞は欠損しているものの、プロB細胞やT細胞は存在するためリンパ系腫瘍の合併はありえるが、過去にT細胞悪性リンパ腫が2例報告されているのみである。今回、リンパ系腫瘍を合併したXLAの2例を経験した。腫瘍発生の病態を考える上でも興味深いため、報告する。

【症例1】6歳時に細菌感染症を契機にXLAと診断され、以後免疫グロブリン補充療法(IVIG)を施行されていた。10歳時に末梢血に芽球を認め、骨髄穿刺の結果、B前駆細胞性急性リンパ性白血病(BCP-ALL)と診断された。現在化学療法を施行され、寛解中である。

【症例2】3歳時に非ホジキンリンパ腫に罹患した(細胞表面マーカーなどは再検討中)。化学療法を施行し、長期寛解が得られているが無ガンマグロブリン血症を指摘されていた。以後、定期的にIVIGを施行されていたが33歳時に末梢血にB細胞が欠損していることに気付かれ、XLAと診断された。

【考察】XLAがリンパ系腫瘍を合併することは非常にまれで、特にB細胞系腫瘍は自験例が初めての報告と思われる。BTK欠損が腫瘍の発生に関与しているのか、あるいは偶然の発生であるのか明確に判断することは困難である。しかし、BTKはリンパ系腫瘍に対して亢進・抑制いずれの方向にも働く可能性がある。BTKはB細胞の活性化細胞内シグナル伝達に重要な役割を果たしているため、BTKを阻害することでより分化したB細胞系悪性腫瘍は抑制される。実際、BTK阻害剤は一部のB細胞系悪性腫瘍の新規薬剤として、すでに臨床試験が行われている。一方で、分化の乏しいB細胞由来であるBCP-ALLに対しては亢進に働く可能性がある。ALLの発症には、プレB細胞の分化に関わる遺伝子(PAX5, JKZF1, E2Aなど)の欠損や変異が強く関与していることが報告されている。BTKも同様に、ALL細胞の一部にBTKの体細胞変異が存在することや、マウスにおいてBtkやBlinkを欠損させると高率にBCP-ALLが発生することが報告されている。過去にXLAとリンパ系腫瘍の報告が少ないことは、BTK欠損のみではリンパ球の腫瘍化を説明できないことを示唆している。しかし、今後の腫瘍細胞の検討は病態の解明につながると考えている。



## 侵襲性肺アスペルギルス症を合併した慢性肉芽腫症の乳児例

A case of an infant CGD patient with invasive aspergillus pneumonia

信州大学 小児医学講座)))

重村 倫成、柴崎 拓実、高附 充帆、塚原 孝典、平林 耕一、  
齋藤 章治、吉川 健太郎、中沢 洋三、小林 法元、坂下 一夫、  
上松 一永、小池 健一

【緒言】慢性肉芽腫症 (CGD) は先天性好中球機能不全で、食細胞からの活性酸素産生不全のため真菌に易感染性を示す。特にアスペルギルス感染症は致命的になる事が多く、抗真菌剤治療のみでは完治は困難である。我々は、生後2週時に侵襲性肺アスペルギルス症を罹患し、抗真菌剤のみでは治療抵抗であったため、顆粒球輸血を施行した症例を経験した。

【症例】p67phox欠損のCGD女児。生後2週時、多発性の侵襲性肺アスペルギルス症に罹患し、呼吸不全のため人工呼吸管理を施行された。2ヵ月間のアムホテリシンBリボソーム製剤 (L-AMB: 10mg/kg/日) とミカファンギン (MCFG: 6mg/kg/日) 治療にも関わらず、呼吸状態が改善しないことから当院へ紹介された。L-AMBは減量 (5mg/kg/日)、MCFGは同量を継続し、顆粒球輸血を計16回実施した。リツキシマブを顆粒球輸血に対する自己免疫反応予防に使用し、移植前に抗HLA抗体陰性を確認後、臍帯血移植を施行した。移植後9日目に拒絶され、さらに計5回の顆粒球輸血を施行し、前移植から49日後再度臍帯血移植を施行した。GVHD予防はtacrolimus、MMFを使用し、再移植後すみやかに完全キメラとなり、生着症候群やGVHDなく約6ヵ月間の人工呼吸管理から離脱できた。移植後8ヵ月経過したがアスペルギルス感染症の再燃なく経過している。

【結語】侵襲性肺アスペルギルス症を合併したCGDに対して、顆粒球輸血で感染巣を鎮静化させ、臍帯血移植を無事に成功することができた。



# 蛍光プローブを用いた好中球活性酸素産生測定法 (宿題報告) -DCFH法とDHR-123法の比較-

Comparison of ROS detection released from PMN by fluorescent DCFH and DHR-123 probes

富崎大学医学部 全施設連医学講座小児科学分野)))

布井 博幸

富崎大学医学部)))

谷口 英里奈、小原 恵

成賢医療センター臨床検査部)))

奥山 虎之

株式会社エスアールエル)))

高井 健次、井上 義雄、桑原 宗記

【はじめに】好中球活性酸素産生測定については、臨床検査会社ではDCFH法が用いられている。「好中球活性酸素産生能の測定感度の面でDCFH法とDHR-123法との比較検討をしてほしい」との宿題を同研究会でいただいていた。今回エスアールエルで通常の検査法にて、DCFHとDHR-123を用いた好中球活性酸素産生能の比較検討を行っていただいたので、報告する。

方法:1) 健常者およびCGD患者末梢全血にDCFHおよびDHR-123を加え、PMA刺激後、溶血して、FACS解析を行った。2) 同様の検査を溶血操作後にDCFHおよびDHR-123を加え、PMA刺激後、FACS解析を行った。

【結果】DCFH法ではPMA刺激後に溶血を行って活性酸素産生能を解析すると蛍光ピークが非刺激時の4-5倍であったが、溶血後にPMA刺激をすると蛍光ピークが約100倍になった。DHR-123法では溶血の前後でのPMA刺激でも蛍光ピーク値は90-100倍であった。しかし、溶血をPMA刺激後に行うと、DHR-123蛍光ピークは変わらないものの、その分布は幅広いものとなった。

【議論】DCFHは細胞内に入り、活性酸素の量に比例して蛍光を発するが、全血にDCFHを加えると、赤血球へもトラップされ、好中球でのDCFH濃度が低下し、十分な基質濃度にならない為、十分な蛍光強度が得られないのではないかと考えた。一方、DHR-123は細胞内のミトコンドリアによく集積しやすいことから、赤血球より好中球に集積しやすく、溶血の時期に関係なく、細胞内濃度が高く、十分な活性が計測できたのではないかと考えた。

【結論】好中球活性酸素産生能を同じ反応液を用い、同じ方法で臨床検査会社に行ってもらった結果、DHR-123の方がDCFH溶血の時期に係らず、より安定した、高い感度が得られることが判った。臨床検査会社に好中球活性酸素産生能を依頼する場合、臨床現場からDHR-123法での検査と指定いただければ、DHR-123法による臨床検査を委託できることになった。



## 新規B因子機能獲得型変異を有する 非典型的溶血性尿毒症症候群の1家系

A kindred of atypical hemolytic uremic syndrome having a novel mutation in complement factor B

阪南大学大学院医学系研究科 (小児病態学))

大西 秀典、船戸 道徳、近藤 直実

かずさDNA研究所))

小原 収

あいち小児保健医療総合センター(腎臓科))

上村 治

【はじめに】非典型的溶血性尿毒症症候群 (aHUS) では50%以上の患者において補体C3消費の制御因子であるcomplement factor (CF) H、CFI、membrane cofactor protein (MCP) の遺伝子異常が同定されている。さらに最近ではC3やCFB等の遺伝子異常も稀に報告されている。今回、当院にaHUSにて入院した患者に対して家系内の遺伝子解析を行い新規のCFB遺伝子変異を見いだしたので報告する。

【患者背景】患者 (女児) : 1歳でaHUS発症。父方姉の第2子 (女児) : 10ヶ月でaHUS発症 (死亡)。父方兄の第2子 (男児) : 1歳でaHUS発症。

【方法】患者家族 (父、母、患者、弟)、父方姉家族 (父方姉、父方姉の子2名)、父方兄家族 (父方兄、父方兄の子2名)、父方祖父と祖母、以上12名の血清C3値を測定した。また、対象者の全血よりゲノムDNAを精製し、直接シーケンシング法にてCFH、CFI、MCP、C3、CFBの各遺伝子解析を行った。

【結果】C3値は患者母、父方兄の第1子、父方祖父を除く9名で基準値以下であった。遺伝子解析ではC3値の低下を認めた9名のうち父方祖母を除く8名で、CFB遺伝子のエクソン8にミスセンス変異 (c.1050G>C, K350N) をヘテロ接合性に認め、父方祖母に同変異をホモ接合性に認めた。

【考察】今回、新規に同定されたCFB-K350N変異は、既報のCFBのタンパク立体構造を参照すると von Willebrand factor type Aドメイン内のC3との結合に直接関与するMg ion-dependent adhesionサイトに位置しており、CFB-K350N変異ではCFBの機能が増強され、補体の異常な活性化に関与すると考えられた。一方、興味深いことに本変異保有者の血清C3値の低下が必発であるが、aHUSは必ずしも発症していない。

【結語】aHUSの患者家系内解析により、機能獲得型と推測される新規CFB遺伝子変異を同定した。

# Infliximabが奏効した、分類不能型免疫不全症に合併した潰瘍性大腸炎類似腸炎の1例

Infliximab was effective in a patient with CVID, associated with ulcerative colitis-like enteropathy

京都大学医学部附属病院 発達小児科学科))

小田 紘嗣

京都大学医学部附属病院 小児科))

八角 高裕、日衛鳥 栄太郎、井澤 和司、河合 朋樹、

西小森 隆太、平家 俊男

京都大学医学部附属病院 消化器内科))

松浦 稔、仲瀬 裕志

【症例】19歳男性現病歴：幼児期より頻回下痢、発熱を繰り返し、10歳時に低ガンマグロブリン血症を認め、分類不能型免疫不全症（CVID）と診断された。16歳時発熱、頻回下痢、肛門痛に対して行った下部消化管内視鏡（CS）・小腸内視鏡検査では有意な所見を認めなかったが、19歳時施行のCSでは下部直腸の潰瘍など潰瘍性大腸炎（UC）様の所見を認めた。

【治療経過】5-ASAは薬剤熱のため使用できず、顆粒球除去療法とazathioprine製剤の治療効果も限定的であった。Infliximab（IFX）開始後便性、肛門痛の改善を認め、1か月後のCSでも潰瘍部の改善を認めた。

【FACS解析】炎症性腸疾患を認めなかった時期にはT細胞分画に大きな異常を認めなかったが、UC様所見出現後の解析ではCD8+CD25+細胞集団が出現していた。IFX開始3週後の時点での再検査では、この集団に大きな変化は認められなかった。

【考察と結論】UC様の難治性腸炎を認めたCVID患者に対しIFXが奏効した。CVIDに合併したUC様腸炎の病態にCD8+CD25+リンパ球が関与している可能性が考えられた。



## 単一細胞免疫アッセイによるNLRP3 体細胞モザイクの機能的解析の試み

Development of a single cell immunoassay for functional analysis of somatic mosaicism on the NLRP3

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター 免疫ゲノミクス研究グループ )))

白崎 善隆

理化学研究所免疫・アレルギー科学総合研究センター )))

志村 七子、山岸 舞

京都大学医学部 )))

井澤 和司、中川 権史、西小森 隆太、平家 俊男

かずさDNA研究所ヒトゲノム部 )))

小原 収

原発性免疫不全症は、発症率は低く臨床症状も一様ではなく、診断には専門的な知識と技術が必要である。そのため、原因遺伝子が判明している遺伝子疾患が疑われる症例に対しては、臨床検体からのシーケンス解析が最も迅速な確定診断基準となる。しかしながら、シーケンス解析で得られた変異が未知のものであった場合、実際の疾患と必ずしもリンクしている保証がない。さらに最近、遺伝子疾患のひとつ、CINCA症候群の症例において原因遺伝子上の低頻度体細胞モザイク変異が明らかとなり、従来のシーケンス解析では変異未同定とされた患者のおよそ7割が、実際には体内の一部の細胞に変異が存在していることが明らかとなった（アレル頻度で4.36%）。このような症例では、サブクローニングによる従来法で迅速に変異を同定することは現実的には不可能である。また、体細胞モザイク変異細胞を含む症例に対しての有効性が実証された次世代シーケンシング解析は高額機器を使用するため利用できる施設が限られており、従来の遺伝子検査のような汎用性は期待できない。以上の背景を踏まえ我々は、①疾患原因となる因子の分泌を指標として臨床検体から得た細胞を一細胞毎に解析し、疾患の原因細胞を特定すること、さらに、②特定した細胞からのシーケンス解析を行うことで、機能とリンクした変異の検索をすること、を可能とする新しいシステムを構築している。本システムを用い、CINCA症候群モザイク変異患者、対照群として健常者の、各々の末梢血由来単球から、疾患原因となる細胞機能としてインターロイキン（IL）-1 $\beta$ （IL-1 $\beta$ ）の細胞外分泌を一細胞毎に定量した。これはCINCA症候群の原因遺伝子であるNLRP3がIL-1 $\beta$ 分泌を制御しており、変異によってIL-1 $\beta$ の異常分泌をもたらすといった実験的事実や、CINCA患者に対しては抗IL-1 $\beta$ 治療が劇的に効を奏するといった臨床的事実に基づいている。解析の結果、健常者由来の単球でも数%の細胞からIL-1 $\beta$ の分泌が認められたものの、CINCA症候群モザイク患者由来の単球では、全体の20%近くからIL-1 $\beta$ 分泌が認められ、健常者とは有意に異なっていた。単球一細胞から分泌されたIL-1 $\beta$ 量は細胞毎に非常にばらつきがあり、患者、健常者に関わらず、高分泌のポピュレーションは少なく、非常に低くしか分泌していないもしくは分泌していない細胞が大多数を占める、ガンマ分布様の裾野の長い分布を示した。分布形状解析より、モザイク患者由来の単球サンプルには、24%のIL-1 $\beta$ 高分泌細胞が含まれている結果となったが、これは、このモザイク患者がアレル頻度で12%の変異を持っている事実と一致した。現在、単離したIL-1 $\beta$ 高分泌細胞から、一細胞毎のゲノムシーケンス解析系を確立しつつある。これにより、機能とリンクした変異を一細胞から検出することが可能になると期待される。