

PID診断のための4段階検査	
0	病歴（感染歴、家族歴）、身長、体重、身体所見
1	血算、白血球分画（好中球、リンパ球数） IgGAM測定 補体価測定（CH50, C3, C4）
2	特異抗体産生（血液型ウラ試験、百日咳、麻疹、風疹、EBVなど） リンパ球表面抗原分子解析（CD3,4,8,19,16,56）
3	T：リンパ球増殖能解析（PHA刺激） B：IgGサブクラス測定、肺炎球菌ワクチンに対する抗体産生（3歳以上） NK：NK活性（腫瘍細胞障害活性） 好中球：殺菌能試験（数字だけでなく必ずパターンも確認、外注に注意）
4	詳細なリンパ球サブセット解析 原因遺伝子蛋白発現のFACS解析（ $\gamma c$ , CD40L, BTK, WASP, SAP, XIAP, foxP3, gp91phox等） 好中球解析（CD11, CD18などの表面糖タンパク、遊走能、貪食能、自己抗体） PIDJでの遺伝子解析、TREC, KREC
<small>stage 1は保険適応内検査@診療所、一般病院レベル stage 2は総合病院レベル（一部保険適応外） stage 3は大学病院、専門病院レベル（一部保険適応外） stage 4は研究検査@PIDJレベル</small>	

by JMF（一部改変）  
www.info4pi.org

図4 PID診断のための4段階検査

### 3. PIDJプロジェクト

2006年度より、厚生労働省原発性免疫不全症候群に関する調査研究班（以下、研究班）は、基礎免疫学研究施設である理化学研究所免疫アレルギー科学総合センター（以下、RCAI）、ゲノム解析施設であるかずさDNA研究所と共同研究を開始し、臨床情報の中央化、臨床検体解析/保存の中央化、遺伝子解析の中央化、を通し、臨床診断、治療のみならず、基礎免疫学へも貢献する枠組みを開始した。そのハブとなるシステムが、PIDJ（Primary Immunodeficiency Database in Japan）である。

この仕組みでは、全国の一般病院の医師が研究班のPID専門医に、症例の診断、治療について相談が可能であり、同時に症例の登録と蓄積がなされていく（図5）。

1. 易感染性を呈しPIDが疑わしい患者、あるいはPIDと診断されている患者を診療した場合、主治医はPID専門医に相談するために、PIDJホームページ（<http://pidj.rcai.riken.jp>）にアクセスし、「患者相談フォーム」に簡単な相談内容を記載する。
2. 研究班のPID専門医は内容を見てRCAIに医師ID申請を行う。IDを受け取った主治医は、患者臨床データを入力しオンラインで患者登録する。患者個人情報は、この時点で匿名化される。専門医は必要に応じ、考えられる診断、必要な検査、治療などのアドバイスをする。

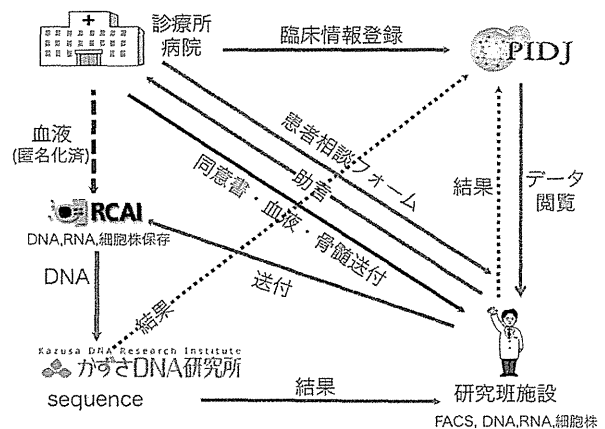


図5 PIDJネットワーク

3. 主治医は患者に対し説明し、同意が得られた場合、血液検体などを指定された期日に研究班施設に送付する。研究班施設では、FACSをはじめとする解析を行い、DNA、RNAを抽出し、必要に応じて細胞株樹立を行い、これらの検体をRCAIに送付する。
4. RCAIでは検体の保存を行い、かずさDNA研究所にDNAを送付する。
5. かずさDNA研究所では想定される疾患に対する候補となる既知遺伝子すべてについて、研究班施設の指示に従い、ゲノムDNAシーケンスによる遺伝子解析を行い、専門医に報告する。

6. 専門医は、結果と診断および治療についての助言を、主治医に情報提供する。

以上のような流れにより、主治医は、分子的診断を行い、専門医との連携を行うことが可能になり、患者には、診断、治療の迅速化、標準化をもたらすことができる。また、研究班施設は、貴重な患者情報を前方視的に収集することが可能になる。臨床検体が中央化することで、RCAIの基礎免疫学者と共同研究を容易に行うことができるようになる。さらに、臨床データを用いたPID診断支援ツールの開発<sup>2,3)</sup>やbioinformatics研究<sup>4)</sup>も行ってきた。かずさDNA研究所ではDNA診断のためのknow-howと新技術の開発を行い、現在は次世代シーケンサーを用いたアンプリコンシーケンス法による複数遺伝子のDNA解析を短時間、低コストで行っている。このように、PIDJは関係者それぞれに利点があるシステムである<sup>5)</sup>。

PIDJへの登録は、直線状に増加し、2011年末までの4年間で新規登録例が1,343例に上り、1日に約1例の新規患者が、全国各地の専門医に紹介されていると考えられる(図6)。このことから、PID全体では、出生数約3,000人に1人の発生率と考えられ、従来考えられているよりも多いと考えられる。

#### 4. PIDの遺伝子診断の実際

PIDは前述の通り、200以上の病型があり、150以上の遺伝子が原因として同定されており、日々増加している<sup>1)</sup>。PIDJ開始前は、各研究室に紹介のあった患者について、臨床像と細胞生物学的解析から候補遺伝子について各施設で解析していた。PIDJ開始後の5年間は、研究班から候補遺伝子を指定し、かずさDNA研究所でゲノムDNAによる遺伝子解析を行ってきた。当初、頻度

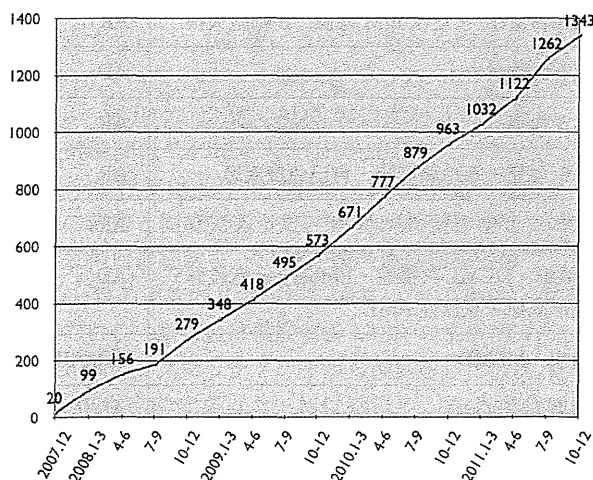


図6 PIDJデータベースへの登録患者の推移

の高い疾患から段階的に解析していくフローを考えていたが、マルチプレックスPCRを組み合わせたりすることで、並列的に行って行く方式に変更していった。この5年間で800例以上のDNA検体を受け、100遺伝子以上の解析を行ってきた。そのプライマー、解析条件については、インドとの共同研究で作ったRAPID (Resource of Asian Primary Immunodeficiency diseases)に公開している(<http://rapid.rcai.riken.jp/RAPID>)<sup>2)</sup>。

古典的PIDに含まれる疾患の多くは、表現型からの診断が比較的容易であり、変異もすでに多数例で同定されているため、1遺伝子の解析要求から1遺伝子変異が同定され、さらにFACSやウェスタンブロットで蛋白発現欠損も確認される例が多い。特に伴性劣性遺伝疾患は比較的容易である。例として、 $\gamma$ c欠損症、CD40L欠損症、WAS、BTK欠損症(X連鎖性無 $\gamma$ -グロブリン血症:XLA)、X連鎖性慢性肉芽腫症(XCGD)があげられる。一方、常染色体劣性疾患で、日本での発見例がこれまでもごく少数に限られていた遺伝子は、今回の検討でもごく少数に遺伝子変異を同定するにとどまった。例として、JAK3、Artemis、Cernunnos、AID、ICOS、TACI、などがあげられる。また、全く1例も変異を同定できなかった遺伝子も数多く存在した(BLNK、BAFFR、DOCK8、TNFRSF1Aなど)。今回の検討では、研究班医師の指示により、特定の遺伝子解析を行う、という仕組みであったため、研究班医師によってもバイアスが生じた可能性が考えられる。実際、複数の研究班施設で検討することで、原因遺伝子変異の同定に結びついた例も多い。ただ、これまでの検討方法では限界があるのも事実である。特に、CVID、MSMD、自己炎症性疾患については、変異解析例に比した変異同定例がごく少数(1~5%程度)にとどまるため、方法の改善が必要であると考えられる。一つの方向性は、アンプリコンシーケンス法を用いた既知遺伝子の除外診断法である。上記の疾患(CVID、MSMD、自己炎症性疾患)については、原因遺伝子と報告されている遺伝子が多いが、各遺伝子の変異例は世界的に見ても少数である点が難点である。少数であるとはいえ、可能性としては存在するため、除外しておかないと、全遺伝子エクソン解析(exome解析)の結果、既知遺伝子の変異であることもあり、解析の効率化という点でも重要である。そこで現在は、小型の次世代シーケンサーを用いて、10以上の候補遺伝子すべてのPCRによる増幅DNAを複数例同時にシーケンスすることで、決着を早く着けるという方法に着手している。

さらに、こうした方法で既知遺伝子変異が除外された場合、家族検体とともに、大型の次世代シーケンサーによるexome解析を行っている。これによる多数例の

解析により、データベースに載っていない日本人特有の遺伝子多型 (SNP) を除いた上で、家族内でもその患者にしかない特定の遺伝子変異が同定されれば、原因遺伝子変異としての可能性が上がる。とはいえ、exome 解析で同定されてくる変異は膨大であり、その一つ一つについて、機能解析と野生型遺伝子導入による機能回復実験を行っていくわけにはいかない。当初は、次世代シーケンサーの導入で、飛躍的に原因遺伝子同定が進むと思われたが、結局は、複数症例で多種類の遺伝子変異を同定できるかという事と、機能解析法をどれだけ持っているかということにかかっていることがわかってきた。

さて、2011~2012年に発見された免疫不全症の原因遺伝子を表1に示す。各々症例数は少ないが、これまで

にも別の遺伝子異常で報告のある表現型で様々な遺伝子異常が見つかっている。その中で、血液疾患として見つかる可能性もある GATA2 異常症について、解説する。

PIDJ を介した紹介症例の中で、低 $\gamma$ グロブリン血症を呈し、B細胞欠損、NK細胞欠損を伴う症例を経験した。この症例は女兒で、2歳時に重症水痘に罹患し、反復性の気道感染症に罹患していた。4歳時点で、軽度の好中球減少症と重度の単球減少症に気づかれていたが、骨髄では若干低形成だが、異型性はなかった。8歳時には、サルモネラ腸炎の重症化を経験した。13歳時には左下腿のリンパ管浮腫に罹患し、以後、反復性脂肪織炎に伴う発熱が見られている。また、左下腿に尋常性疣贅を認めた。NK細胞がIL-15を必要とする事から、IL-15

表1 2011~2012年に発見された免疫不全症

遺伝子名	分類	病名・症状	遺伝形式
MAGT1	複合免疫不全	EBV感染症, リンパ腫, ウイルス感染症, 呼吸器, 消化器感染症, CD4+T細胞減少	XL
UNC119	複合免疫不全	特発性CD4減少症・表在性真菌症・単純ヘルペス感染症・帯状疱疹・BOOP	AD
MST1/STK4	複合免疫不全	反復性細菌・ウイルス感染症・自己免疫疾患・ナイーブT細胞欠損症	AR
MCM4	複合免疫不全	NK欠損症・副腎不全・低身長・ゲノム不安定性	AR
LRBA	複合免疫不全	低 $\gamma$ グロブリン血症・自己免疫疾患	AR
ZBTB24	免疫不全を伴う症候群	ICF症候群(顔面奇形, 巨舌症, 細菌・日和見感染症, 吸収不良症候群, 血球減少症, 悪性腫瘍, 1番, 9番, 16番の分枝染色体のDNA損傷, 低ガンマグロブリン血症)	AR
WIPF1	免疫不全を伴う症候群	Wiskott-Aldrich症候群	AR
PI3K-p85 $\alpha$ (PIK3R1)	抗体産生不全	IgGおよびIgAおよび/またはIgM低値, B細胞欠損	AR
IKZF1	抗体産生不全	B細胞欠損・汎血球減少	AD
CD27	抗体産生不全	低 $\gamma$ グロブリン血症	AR
PLCG2	抗体産生不全	低 $\gamma$ グロブリン血症・寒冷蕁麻疹・自己免疫疾患	AR
MSH6	抗体産生不全	高IgM症候群	AR
GATA2	貪食細胞異常症	MonoMac症候群・DCML欠損症・Emberger症候群・家族性骨髄異形成症・家族性AML	AD
IRF8	貪食細胞異常症	樹状細胞欠損症・MSMD	AR/AD
STAT1	自然免疫不全症	慢性粘膜皮膚カンジダ症	AD
TRIF	自然免疫不全症	単純ヘルペス脳炎	AR/AD

XL: 伴性劣性遺伝, AD: 常染色体優性遺伝, AR: 常染色体劣性遺伝

産生細胞である樹状細胞について、検討したところ、末梢血中の Lin-HLA-DR+CD123+pDC 細胞および Lin-HLA-DR+CD11c+mDC 細胞はいずれも欠損している事が明らかになった。同様の経過をたどり、B, NK, DC 欠損を伴う症例がもう一例得られたため、exome 解析を開始したところ、アメリカ (MonoMAC 症候群)<sup>6,7)</sup> およびヨーロッパ (DCML 欠損症)<sup>8,9)</sup> から同様の症例が報告され、その原因遺伝子が GATA2 であることが明らかになった。そのため、この2症例について、検討したところ、いずれも GATA2 の *de novo* のヘテロ変異を認めた。その後の報告で、GATA2 変異は、家族性 MDS/AML にも見られることが明らかになった<sup>10,11)</sup>、国内でも GATA2 変異を伴う親子例を発見した。前述の症例は、その後骨髄異形成を呈してきており、Emberger 症候群 (リンパ管浮腫を伴う家族性 MDS) 類似の病態を呈していた事が明らかになった<sup>12)</sup>。さらに、MonoMAC 症候群類似で骨髄移植を行われた2例を加え、6例を国内で同定した (投稿準備中)。同様の症例は小児期発症あるいは成人の MDS/AML 症例にも存在すると考えられる。GATA2 は、造血幹細胞の維持に重要であり、その両アレルの欠損は胎生致死である。しかし、上記の症例等でみられた変異がハプロ不全によるものか、変異アレルのドミナントネガティブ効果によるものかは、わかっておらず、そのメカニズムの解明が待たれる。

##### 5. PID に対する造血幹細胞移植と遺伝子治療

PID のうち、細胞性免疫の異常、すなわち、SCID, WAS, CD40L 欠損, XLP, FHL, IPEX, SCN, LAD, CGD, EDA-ID, などに対しては、造血幹細胞移植が有効である。ここでは、日本における SCID, WAS, CD40L 欠損症の移植について、概説する。

厚労省研究班では、2006年に SCID の移植例についての調査を行い、100例について、解析を行った。うち、61例について、詳しく検討を行った。B+SCID が45例、B-SCID が13例、ADA 欠損症が3例であり、平均観察期間は  $7.4 \pm 6.4$  年 (1.1~23.3年) であった。全体での生存率は5年で72.4%、10年で69.3%であり、欧米の報告と同等であった。38例が骨髄移植を受け、5例が末梢血幹細胞を、18例が臍帯血移植を受けていた。HLA 一致の家族内ドナーから移植した13例は、全例生存しており、臍帯血移植症例も77.8%の生存率であったが、26例のミスマッチドナーから移植をした例は56.4%の15年生存率であった。特に感染症がある場合には、40.9%の生存率であったが、感染症がない場合には87.2%の生存率であることが明らかになった。

WAS に対する移植については、最近欧米での30年間

の移植例194例の集計結果が報告された<sup>13)</sup>。それによると、生存率は最近10年間では、89.1%と、生存率だけを取ると、かなり改善している。当然ではあるが、臨床状態が良好な時期での移植は合併症の頻度が低かった。キメリズム解析では、72.3%の患者が100%ドナータイプとなっていた。混合キメラ例では、リンパ球回復不良と移植後自己免疫疾患を合併しており、特に骨髄球系のドナー比率が50%以下の場合、血小板減少の持続が観察されていた。この調査では88%が骨髄破壊的前処置 (MAC) を用いていたが、12%で骨髄非破壊的前処置 (RIC) を用いていた。また、24例は臍帯血移植であったが、HLA 不適合家族内ドナーと同様、低い生存率を示していた (RR: 9.98, 10.5)。生着不全13例のうち、11例は MAC であったが、うち8例は HLA 不適合家族内ドナーであった。HLA の合致したドナー、十分な細胞数、そして、MAC が現在の標準的移植方法と考えられる。ただ、最近改訂された欧州免疫不全症学会および欧州骨髄移植学会 (ESID/EBMT) のガイドラインでは、VOD の危険性のため、cyclophosphamide がプロトコルから外され、busulfan (または treosulphan) あるいは melphalan に fludarabine を加えたものになっている。このプロトコルでは、alemtuzumab (Campath1H) を使うのが標準となっており、免疫抑制剤も tacrolimus ではなく、ciclosporin となっているため、そのままの形で日本に導入するのは危険である。日本では、以前の全国調査の結果に基づき、busulfan を入れた前処置を推奨している。

CD40L 欠損による高 IgM 症候群は、ヘルペス属ウイルス、ニューモシスティス肺炎、クリプトスポリジウム下痢症などの日和見感染のため、免疫グロブリンの補充だけでは長期予後の改善が得られない。欧州では、1990年代から積極的に HSCT が行われはじめ、8ヶ国38例のまとめが報告されている。それによると、14例が同胞、22例が非血縁ドナー、2例が親から移植を受け、12例では T 細胞除去を併用していた。34例が生着し、22例 (58%) が治癒した。18例はワクチンに対する抗体産生も確認できた。なお、亡くなった12例のうち、6例は重症のクリプトスポリジウム下痢症に罹患した症例であった<sup>14)</sup>。

一方、日本でも、10年ほど前から、東京医科歯科大学と防衛医科大学校で、計14例の XHIGM の移植を行った。5歳以下の7例は全例生存、5歳以上でも71.4%を達成しているため、国内40例の30年生存率が37.5%であるところから考えると、発見時点なるべく早く移植で治癒を目指すのが必要とおもわれる。14例中2例の死亡例はいずれも年長児であり、重症感染症を繰り返した結果である。また、19歳で移植した1例では、移

植後にクリプトスポリジウム肺炎、胆管炎を呈し、EBV脳炎後慢性硬膜下血腫から寝たきりになっている。一方、年少児でも骨髄破壊的前処置にも関わらず1例で移植後血球貪食症候群に伴う拒絶を経験しており、いつ移植をすべきか、前処置、感染予防方法など、検討すべき課題も残っている。現在、国内の移植例について解析中である。

PIDは単一遺伝子異常による疾患であるため、遺伝子治療による「治癒」が理想である。実際、PIDは遺伝子治療が最も成功している疾患群であり、これまでにXSCID、ADA、WAS、XCGDに対して、臨床研究が行われてきている。

XSCIDに対する遺伝子治療は1999年に行われ、すでに最初に行われた患児は元気に小学校を卒業する年になっている。この研究はフランス、ネッケル小児病院、および、イギリス、Great Ormond Street Hospitalで、重篤な感染症に罹患しているにもかかわらず、移植のためのドナーが得られない、20例に対して行われた<sup>15)</sup>。方法は、患者骨髄からCD34+細胞を分離し、試験管内で培養しながらγレトロウイルスベクターに組み込んだ*IL2RG* 遺伝子のcDNAを導入し、体内に戻す、というものである。その結果、ほとんどの症例で、T細胞の再構築が得られ、しかも10年以上の長期にわたり、ポリクローナルなナイーブT細胞が末梢血中に見られている。通常のウイルス感染に対する免疫も得られ、半数の患者では、B細胞の再構築により、グロブリン補充も不要になっている。NK細胞はT細胞よりも数は少ないが、ほとんどの患者で検出可能なレベルになっている。こうした成功の陰で、日本でも報道されたように、重大な副反応である、モノクローナルなT細胞の異常増殖が約2~5年後に5例で見られた<sup>16)</sup>。しかし、5例中4例では、通常の白血病に対する治療を行い、治癒している。ほとんどが、いわゆるがん遺伝子（とくに*LMO2*）内にベクターが挿入されたことから、そのエンハンサー活性によって遺伝子発現が増強したことがその原因であることが明らかになった。こうした原因解明の研究により、γレトロウイルスがランダムではなく、転写が活発な「遺伝子」の領域に挿入されやすい事が明らかになった。とはいえ、同時期に同タイプのベクターを用いて行われたADA欠損症に対する遺伝子治療では、1例もそうした症例は見られておらず、その後に行われたWASに対する遺伝子治療では同様のT細胞増殖が、XCGDに対する遺伝子治療ではMDS様の副反応が見られた事から、こうした副反応は原疾患にも依存する事が明らかになった。いずれにしろ、この副反応により、XSCIDの遺伝子治療は一度中止されたが、昨年、3'LTRを欠損させ、内因性プロモーターを用いた改変ベクターによる

臨床研究が、仏英米伊の共同研究として開始され、すでに3例以上の患者で行われている。筆者がネッケル小児病院で昨年実際に目にした患者も、診断前にBCG接種を受けたため、全身に発疹があり、さらにRSウイルス細気管支炎に罹患し、EBVが末梢血で検出されるという患者であったが、遺伝子治療後2ヶ月で元気になっていた。遺伝子治療は移植医療と比較して、GVHDの危険性がなく、免疫抑制剤の使用も不要であり、それに伴う合併症の危険もない。一方で、最初の臨床研究時に見られたような未知の合併症に会う可能性もある発展途上の治療ではあるが、致命的疾患に対する治療の選択肢として存在する事は重要である。

日本では、フランスにおけるXSCIDの重大副反応の後、血液幹細胞に対する遺伝子治療が認可されにくい状況が続いていたが、先日、ようやくXCGDに対する遺伝子治療が認可され、患者の募集が始まった。詳細は別項にゆずるが、他のPIDに対しても遺伝子治療の臨床研究が活発になる事を期待したい。

著者のCOI (conflicts of interest) 開示：本論文発表内容に関連して特に申告なし

## 文 献

- 1) Al-Herz W, Bousfiha A, Casanova JL, et al. Primary immunodeficiency diseases: an update on the classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee for Primary Immunodeficiency. *Front Immunol.* 2011; **2**: 1-26.
- 2) Keerthikumar S, Raju R, Kandasamy K, et al. RAPID: Resource of Asian Primary Immunodeficiency Diseases. *Nucleic Acids Res.* 2009; **37**. Database issue: D863-D867.
- 3) Hijikata A, Raju R, Keerthikumar S, et al. Mutation@A Glance: an integrative web application for analysing mutations from human genetic diseases. *DNA Res.* 2010; **17**: 197-208.
- 4) Keerthikumar S, Bhadra S, Kandasamy K, et al. Prediction of candidate primary immunodeficiency disease genes using a support vector machine learning approach. *DNA Res.* 2009; **16**: 345-351.
- 5) Burrows PD, Fischer A. Building networks for immunodeficiency diseases and immunology training. *Nat Immunol.* 2008; **9**: 1005-1007.
- 6) Vinh DC, Patel SY, Uzel G, et al. Autosomal dominant and sporadic monocytopenia with susceptibility to mycobacteria, fungi, papillomaviruses, and myelodysplasia. *Blood.* 2010; **115**: 1519-1529.
- 7) Hsu AP, Sampaio EP, Khan J, et al. Mutations in *GATA2* are associated with the autosomal dominant and sporadic monocytopenia and mycobacterial infection (MonoMAC) syndrome. *Blood.* 2011; **118**: 2653-2655.

- 8) Bigley V, Haniffa M, Doulatov S, et al. The human syndrome of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *J Exp Med*. 2011; **208**: 227-234.
- 9) Dickinson RE, Griffin H, Bigley V, et al. Exome sequencing identifies GATA-2 mutation as the cause of dendritic cell, monocyte, B and NK lymphoid deficiency. *Blood*. 2011; **118**: 2656-2658.
- 10) Hahn CN, Chong CE, Carmichael CL, et al. Heritable GATA2 mutations associated with familial myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia. *Nat Genet*. 2011; **43**: 1012-1017.
- 11) Ostergaard P, Simpson MA, Connell FC, et al. Mutations in GATA2 cause primary lymphedema associated with a predisposition to acute myeloid leukemia (Emberger syndrome). *Nat Genet*. 2011; **43**: 929-931.
- 12) Ishida H, Imai K, Honma K, et al. GATA-2 anomaly and clinical phenotype of a sporadic case of lymphedema, dendritic cell, monocyte, B- and NK-cell (DCML) deficiency, and myelodysplasia. *Eur J Pediatr*. doi: 10.1007/s00431-012-1715-7.
- 13) Moratto D, Giliani S, Bonfim C, et al. Long-term outcome and lineage-specific chimerism in 194 patients with Wiskott-Aldrich syndrome treated by hematopoietic cell transplantation in the period 1980-2009: an international collaborative study. *Blood*. 2011; **118**: 1675-1684.
- 14) Gennery AR, Khawaja K, Veys P, et al. Treatment of CD40 ligand deficiency by hematopoietic stem cell transplantation: a survey of the European experience, 1993-2002. *Blood*. 2004; **103**: 1152-1157.
- 15) Fischer A, Hacein-Bey-Abina S, Cavazzana-Calvo M. 20 years of gene therapy for SCID. *Nat Immunol*. 2010; **11**: 457-460.
- 16) Hacein-Bey-Abina S, Garrigue A, Wang GP, et al. Insertional oncogenesis in 4 patients after retrovirus-mediated gene therapy of SCID-X1. *J Clin Invest*. 2008; **118**: 3132-3142.

## T 細胞・B 細胞サブセット

今井耕輔\* Kohsuke Imai

### 1. T 細胞・B 細胞サブセットとは

末梢白血球中のリンパ球は、獲得免疫（特異的免疫）を担う T 細胞、B 細胞と、自然免疫（非特異的免疫）を担う NK 細胞に大別される。T 細胞は、細胞性免疫を担い、CD4 陽性のヘルパー T 細胞と CD8 陽性のキラー（細胞傷害性）T 細胞に大別されるが、さらに種々の機能を有したサブセットで構成されている。B 細胞は、T 細胞の働きにより、さらに抗体産生細胞に分化し、抗体（免疫グロブリン）を産生し、分泌する。T 細胞・B 細胞サブセット（または T 細胞・B 細胞百分率）は、これらの末梢血中の割合をみるのに、細胞表面の特異抗原に対するモノクローナル抗体とフローサイトメトリー法（FCM）を利用する方法である。実施料 210 点、免疫学的検査判断料 144 点が算定可能である。

### 2. T 細胞・B 細胞サブセット測定目的

末梢血中の T 細胞、B 細胞の割合を知ることによって、免疫不全症の原因診断に用いる。とくに、低 $\gamma$ グロブリン血症患者において、その原因が T 細胞なのか B 細胞なのかを知るうえで重要である。T 細胞欠損症は、重症複合免疫不全症でみられるが、DiGeorge 症候群の一部でもみられる。CD4 陽性 T 細胞と CD8 陽性 T 細胞の割合を知ることにも可能である。後天性免疫不全症候群（AIDS）では、CD4 陽性 T 細胞のみが低下し、CD8 陽性 T 細胞は残存している。先天性免疫不全症のなかには、CD4 陽性 T 細胞のみが低下している例、あるいは CD8 陽性 T 細胞のみが低下している例がある。B 細胞欠損症は *BTK* 遺伝子異常による伴性劣性無 $\gamma$ グロブリン血症や、その他の遺伝子異常による無 $\gamma$ グロブリン血症、分類不能型免疫不全症（CVID）の一部でみられる。抗 CD20 モノクローナル抗体 rituximab（リツキシマブ）投与後や、化学療法後にも B 細胞の低下、欠損は認められる。化学療法、骨髄移植後には、T 細胞、B 細胞の回復の程度はさまざまであ

\* 東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座寄附講座  
〔〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 M & D タワー N909〕  
TEL 03-5803-4082 FAX 03-5803-0378 E-mail: kimai.ped@tmd.ac.jp

---

るが、その状態を把握するのに有用である。ウイルス感染時には、CD8 陽性細胞が通常増加する。自己免疫性疾患（全身性エリテマトーデス、慢性関節リウマチ、Sjögren 症候群、多発性硬化症、サルコイドーシス）では、通常 CD4/8 比が上昇している。

### 3. T 細胞・B 細胞サブセットの原理と正常値

T 細胞の同定には CD3 (BML) あるいは CD2 (SRL, 三菱) を、B 細胞の同定には CD19 (BML), CD20 (三菱), あるいは表面免疫グロブリン (SRL) を認識する蛍光標識をつけたモノクローナル抗体を用いてフローサイトメーターによって、全血中、あるいは末梢血単核球中の各サブセットの割合を測定している。

正常値は、小児の場合、年齢により異なるため、注意が必要である。年齢別リンパ球サブセット正常値を表に示す。また、全血中か、単核球中かによって、正常値は異なる。リンパ球数も年齢によって変動するため、絶対値についても考慮が必要である。

### 4. T 細胞・B 細胞サブセット測定結果の解釈の際に注意すべき点



検査会社によって、使っている抗体、認識する抗原が異なるため注意が必要である。

CD3 は T 細胞受容体 (TCR) 複合体の一部であるため、CD3 陽性細胞は TCR 陽性細胞と同義である。歴史的には、T 細胞はヒツジ赤血球とロゼット (花びらのような配列) を形成する細胞 (E-ロゼット形成細胞) とされており、ヒツジ赤血球の T 細胞側の受容体が CD2 であることがわかったため、CD2 陽性細胞を T 細胞としている検査会社がある。しかし、CD2 は NK 細胞にも発現しているため、厳密には、CD2 陽性細胞の割合は T 細胞と NK 細胞を合わせたものになる。なお、NK 細胞は CD3 陰性かつ CD16 陽性かつ CD56 陽性の細胞である。CD3 陽性細胞にも CD56 陽性細胞があるため、CD56 陽性細胞のみを NK 細胞とすると T 細胞の一部を含んでしまうため、注意が必要である。

B 細胞は、B 細胞受容体である免疫グロブリン (Ig) を表面にもつリンパ球であるが、Ig は他の細胞にも Fc 受容体を介して結合していることがあり、そうした細胞を含んでしまうことがある。また、末梢血中の Ig が高値の場合には、モノクローナル抗体が吸着されるため、見かけ上「B 細胞」が低値をとる。そのため、末梢血 B 細胞で必ず発現している CD19 あるいは



表 年齢別リンパ球サブセット正常値

年齢別リンパ球サブセット正常値 (%)

	新生児 (n=20)	生後1週~2か月 (n=13)	2~5か月 (n=46)	5~9か月 (n=105)	9~15か月 (n=70)	15~24か月 (n=33)	2~5歳 (n=33)	5~10歳 (n=35)	10~16歳 (n=23)	成人 (n=51)
CD19 <sup>+</sup> B細胞	12% (5~22)	15% (4~26)	24% (14~39)	21% (13~35)	25% (15~39)	28% (17~41)	24% (14~44)	18% (10~31)	16% (8~24)	12% (6~19)
CD3 <sup>+</sup> T細胞	62% (28~76)	72% (60~85)	63% (48~75)	66% (50~77)	65% (54~76)	64% (39~73)	64% (43~76)	69% (55~78)	67% (52~78)	72% (55~83)
CD4 <sup>+</sup> T細胞	41% (17~52)	55% (41~68)	45% (33~58)	45% (33~58)	44% (31~54)	41% (25~50)	37% (23~48)	35% (27~53)	39% (25~48)	44% (28~57)
CD8 <sup>+</sup> T細胞	24% (10~41)	16% (9~23)	17% (11~25)	18% (13~26)	18% (12~28)	20% (11~32)	24% (14~33)	28% (19~34)	23% (9~35)	24% (10~39)
CD4/CD8比	1.8 (1.0~2.6)	3.8 (1.3~6.3)	2.7 (1.7~3.9)	2.5 (1.6~3.8)	2.4 (1.3~3.9)	1.9 (0.9~3.7)	1.6 (0.9~2.9)	1.2 (0.9~2.6)	1.7 (0.9~3.4)	1.9 (1.0~3.6)
CD3 <sup>-</sup> /CD16-56 <sup>+</sup> NK細胞	20% (6~58)	8% (3~23)	6% (2~14)	5% (2~13)	7% (3~17)	8% (3~16)	10% (4~23)	12% (4~26)	15% (6~27)	13% (7~31)

中央値 (5~95パーセンタイル)

年齢別リンパ球サブセット正常値 (×10<sup>3</sup>/μL)

	新生児 (n=20)	生後1週~2か月 (n=13)	2~5か月 (n=46)	5~9か月 (n=105)	9~15か月 (n=70)	15~24か月 (n=33)	2~5歳 (n=33)	5~10歳 (n=35)	10~16歳 (n=23)	成人 (n=51)
リンパ球数	4.8 (0.7~7.3)	6.7 (3.5~13.1)	5.9 (3.7~9.6)	6.0 (3.8~9.9)	5.5 (2.6~10.4)	5.6 (2.7~11.9)	3.3 (1.7~6.9)	2.8 (1.1~5.9)	2.2 (1.0~5.3)	1.8 (1.0~2.8)
CD19 <sup>+</sup> B細胞数	0.6 (0.04~1.1)	1.0 (0.6~1.9)	1.3 (0.6~3.0)	1.3 (0.7~2.5)	1.4 (0.6~2.7)	1.3 (0.6~3.1)	0.8 (0.2~2.1)	0.5 (0.2~1.6)	0.3 (0.2~0.6)	0.2 (0.1~0.5)
CD3 <sup>+</sup> T細胞数	2.8 (0.6~5.0)	4.6 (2.3~7.0)	3.6 (2.3~6.5)	3.8 (2.4~6.9)	3.4 (1.6~6.7)	3.5 (1.4~8.0)	2.3 (0.9~4.5)	1.9 (0.7~4.2)	1.5 (0.8~3.5)	1.2 (0.7~2.1)
CD4 <sup>+</sup> T細胞数	1.9 (0.4~3.5)	3.5 (1.7~5.3)	2.5 (1.5~5.0)	2.8 (1.4~5.1)	2.3 (1.0~4.6)	2.2 (0.9~5.5)	1.3 (0.5~2.4)	1.0 (0.3~2.0)	0.8 (0.4~2.1)	0.7 (0.3~1.4)
CD8 <sup>+</sup> T細胞数	1.1 (0.2~1.9)	1.0 (0.4~1.7)	1.0 (0.5~1.6)	1.1 (0.6~2.2)	1.1 (0.4~2.1)	1.2 (0.4~2.3)	0.8 (0.3~1.6)	0.8 (0.3~1.8)	0.4 (0.2~1.2)	0.4 (0.2~0.9)
CD3 <sup>-</sup> /CD16-56 <sup>+</sup> NK細胞数	1.0 (0.1~1.9)	0.5 (0.2~1.4)	0.3 (0.1~1.3)	0.3 (0.1~1.0)	0.4 (0.2~1.2)	0.4 (0.1~1.4)	0.4 (0.1~1.0)	0.3 (0.09~0.9)	0.3 (0.07~1.2)	0.3 (0.09~0.6)

中央値 (5~95パーセンタイル)

---

は CD20 陽性細胞を B 細胞とすることが多い。B 前駆細胞型白血病では、CD19 陽性、CD20 陰性であるため、CD20 を B 細胞としている検査会社では陰性に、CD19 を B 細胞としている会社では陽性の報告となるため、注意が必要である。なお、CD20 は正常 T 細胞の一部でも発現しているため、CD19 のほうがより B 細胞特異的である。

また、フローサイトメトリー法を用いる際の注意点として、ゲートのかけ方、陽性陰性の分け方により、誤差が生じる点は注意が必要である。そのため、可能であればドットプロットあるいはヒストグラムを取り寄せて確認することが望ましい。とくに、白血病細胞、リンパ腫細胞をみる際には、若干大きい細胞群にゲートをかける必要がある。また、腫瘍細胞は汎白血球抗原である CD45 の発現量が少ない (dull である) ため、そこにゲートをかける白血病・リンパ腫解析検査 (LLA, 造血器悪性腫瘍細胞検査, 実施料 1000 点, 判断料 125 点) を用いたほうが望ましい。

## 5. Key Points



- ① 低 $\gamma$ グロブリン血症患者において、末梢血 T 細胞・B 細胞サブセットを測定することで、その原因が T 細胞なのか (複合免疫不全症)、B 細胞なのか (B 細胞欠損症) を知ることができる。
- ② CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞の割合をみることで、さらに鑑別が可能である。
- ③ 検査会社によって、測定に使っているモノクローナル抗体の種類が異なるため、異なったサブセットをみていることになるため、注意が必要である。

## 6. 文献

- 1) Comans-Bitter WM, de Groot R, van den Beemd R, et al : Immunophenotyping of blood lymphocytes in childhood. Reference values for lymphocyte subpopulations. J Pediatr 130 : 388-393, 1997

## 22. ウィスコット・アルドリッチ症候群

Wiskott-Aldrich syndrome (WAS)

東京医科歯科大学小児・周産期地域医療学講座 今井耕輔

診断の要点	<ul style="list-style-type: none"><li>● 小型血小板減少症，アトピー性皮膚炎様慢性湿疹，免疫不全症を 3 主徴とする，WAS 遺伝子異常による X 連鎖性疾患である。</li><li>● 合併症として，自己免疫疾患と悪性腫瘍（とくに悪性リンパ腫）がある。</li><li>● 症状は，遺伝子異常によって異なり，WAS 蛋白陰性例は，乳児期から 3 主徴を呈する重症例となり，WAS 蛋白陽性例は血小板減少のみを主体とする X 連鎖性血小板減少症 (XLT) となる。</li></ul>
治療の要点	<ul style="list-style-type: none"><li>● 血小板減少に対してγグロブリンは無効である。</li><li>● 湿疹の重症度はさまざまであるが，アトピー性皮膚炎に対する治療に準じる。</li><li>● WAS 蛋白陰性例では，細菌，真菌，ヘルペス属ウイルス感染の予防を行い，5 歳までをめどに造血幹細胞移植（骨髄，臍帯血）を行う。</li><li>● XLT でもドナーが得られ，出血のコントロールがむずかしければ，移植を考慮する。</li><li>● 海外では，遺伝子治療の臨床試験が開始されている。</li></ul>

### 歴史と定義

Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS) は，1936 年に Wiskott が血小板減少 (血便)・難治性の湿疹・反復する中耳炎 (免疫不全症) の 3 主徴を呈する 3 人の男児例を記載し，1954 年に Aldrich が大家系の解析から X 連鎖性遺伝であることを示した症候群である。

1994 年に，連鎖解析により，機能不明だが，造血細胞のみで発現している原因遺伝子 WAS がクローニングされた (Xp11.23)。

3 主徴の揃った WAS のみならず，免疫不全を伴わない X 連鎖性血小板減少症 (X-linked thrombocytopenia : XLT) と，血小板減少を伴わない X 連鎖性好中球減少症 (X-linked neutropenia : XLN) も WAS 遺伝子異常による。XLT は間欠的な例も報告されており，慢性 ITP (特発性血小板減少性紫斑病) の頻回再発群との鑑別が問題になる。

なお，WAS の 3 主徴を呈し，WAS 遺伝子の変異がない女児例で，WIP の遺伝子変異を伴う例が報告された。WIP は WASP (Wiskott-Aldrich syndrome protein) の安定化を担っている分子であり，

WASP 蛋白発現も低下する<sup>1)</sup>。

### 臨床の実際

#### 1. 疫学・病因

WAS/XLT は，男児 10~100 万出生に 1 人とされているが，国内で 84 例が PIDJ データベース (厚生労働省研究班による中央診断データベース) に登録されている。

原因は WAS 遺伝子の変異であり，重症例 (免疫不全合併例) は WASP 蛋白が発現しておらず，軽症例 (免疫不全非合併例) は WASP 蛋白を発現しており，遺伝子型，臨床像 (とくに免疫不全の合併，湿疹の重症度)，予後との相関が認められる<sup>2)</sup>。

WASP は，細胞質内でさまざまなシグナル伝達分子と結合し，シグナル伝達の場の形成を行いつつ，アクチンの重合に関わり細胞骨格の変化を制御している。

さらに，近年 WASP が *TBX21* 遺伝子 (Th1 分化誘導転写因子) のプロモーターに結合し，転写因子として働いていることが示された<sup>3)</sup>。

## 2. 症状・徴候

血小板減少症が全例でみられ、初発症状の79%を占めている。血便、皮下出血(紫斑、点状出血)が多いが、鼻出血、血尿もみられ、頭蓋内出血も20%と高頻度にみられる。

湿疹は、アトピー性皮膚炎と見分けがつかず、ごく軽症例から難治例までさまざまである。IgEも高値であり、食物アレルギーを伴う例もみられるが、喘息は多くはない。

易感染症状、難治性湿疹は、明らかにWASP陰性例に多い。上下気道(中耳炎・副鼻腔炎・肺炎)・皮膚(膿痂疹・蜂巣炎・膿瘍)の細菌感染症や、腸炎、髄膜炎、敗血症もみられる。多糖体抗体の産生が不良であり、肺炎球菌やブドウ球菌感染症が多くみられる。カンジダ・アスペルギルスなどの真菌感染、ヘルペス属ウイルス(HSV, VZV, CMV, EBVなど)をはじめとするウイルス感染の反復・重症化もみられる。

自己免疫・炎症性疾患はWASP陰性例の約20~40%にみられる。自己免疫性溶血性貧血・腎炎・血管炎・関節炎・炎症性腸疾患の発症が報告されている。腎炎の合併例では、早期に透析にいたる例も散見されており、注意が必要である。

悪性腫瘍の合併は13%にみられ、とくに悪性リンパ腫が多くみられる。

## 3. 検査所見・鑑別診断

WASの血小板減少は、血小板のサイズの低下等に伴う破壊の亢進が主たる原因である。血小板サイズは数値上正常範囲内(7.1~10.5 fl)になる場合があるが、血小板減少があるため、ヒストグラムで確認してみると小型血小板であることも多く、注意が必要である。また、PAIgG陽性例も多く、自己抗体による破壊も関与している。WASP蛋白陰性例の場合、骨髄中の巨核球数の低下を約半数に認め、*in vitro*でTPO刺激時の巨核球産生不全も伴っており、TPOシグナルの異常もきたしていると考えられる。したがって、一度出血すると血小板サイズが小さいことも相俟って、止血が困難である。血小板凝集能は低下している。なお、WASP蛋白陽性例でも血小板数はWASP蛋白陰性例とほとんど変わらず、頭蓋内出血の頻度も差

がない。

一方、免疫関連の検査異常は、さまざまな程度を示し、通常の検査で特異的といえるものはない。重症例では同種血球凝集素価(血液型裏試験)が低下しており、診断の助けとなる。

厚生労働省原発性免疫不全症に関する調査研究班と理化学研究所免疫アレルギー科学総合研究センター、かずさDNA研究所による共同研究であるPIDJプロジェクトで、WASPの遺伝子診断も可能である。〈<http://pidj.rcai.riken.jp>〉にアクセスし、相談していただきたい。

## 4. 治療・予後

血小板減少症に対しては、 $\gamma$ グロブリン大量療法は多くの場合効果がない。ステロイド剤の効果は、さまざまであるが、少量であれば、日和見感染に対する予防を行ったうえで、検討する。血小板輸血は、血小板不応症にいたる例の経験も多く、できるだけ避けるべきであるが、重大出血の頻度はITPに比べると桁違いに多いので、注意が必要である。脾摘は、一定の効果はあるが、易感染の危険を増大させるため、勧められない。

湿疹に対しては、その程度に応じ、アトピー性皮膚炎に対する治療に準じてよいと考えられる。食物アレルギーの関与が疑われる場合もあるので、注意が必要である。重症例では、無菌室管理により湿疹が改善した例も多く、試してみる価値はある。

感染症に対する予防として、ST合剤、itraconazole, valaciclovir(あるいはvalganciclovir)の内服を考慮する。BCGをはじめ、生ワクチンは禁忌である。IgGは正常な例が多いが、特異抗体不全の場合もあり、感染を繰り返す例、重症化したときは、 $\gamma$ グロブリンの補充を考慮してよい。ヘルペス属ウイルスの定量的PCRによるモニタリングと早期治療が必要である。

根治治療は、同種造血幹細胞移植であり、厚生労働省研究班によるガイドラインが出ているため、お問い合わせいただきたい。免疫不全症ではあるが、移植時の生着不全が多い疾患である。骨髄非破壊的前処置が有効であるエビデンスはなく、混合キメラ例では比較的重症な自己免疫疾患

の合併が知られている<sup>4)</sup>。

また、内因性プロモーターによるより安全なレンチウイルスベクターを用いた遺伝子治療が、4ヵ国共同(英, 仏, 伊, 米)で2011年にスタートしている<sup>5)</sup>。

WASP陰性例では、移植をセンサーとすると15歳で生存率は0になる。近年は造血幹細胞移植により早期に救命されており、ドナーが得られればできるだけ早く移植を行うべきである。WASP陽性例は、長期生存率は90%以上であるが、頭蓋内出血をイベントとするとWASP陰性例と予後に有意差がほとんどなく、IgA腎症からの腎不

全例、家系内の若年での悪性腫瘍合併等もみられることが国際調査でも明らかになった<sup>6)</sup>。また、適したドナーがいる場合、XLTも移植適応ではないかと考えられる。

#### 文 献

- 1) Lanzi G et al : J Exp Med **209**(1) : 29, 2012
- 2) Imai K et al : Blood **103**(2) : 456, 2004
- 3) Taylor MD et al : Sci Transl Med **2**(37) : 37ra44, 2010
- 4) Ozsahin H et al : Blood **111**(1) : 439, 2007
- 5) Galy A et al : Curr Opin Allergy Clin Immunol **11**(6) : 545, 2011
- 6) Albert MH et al : Blood **115**(16) : 3231, 2010

南江堂



■ 日常診療で知っておきたい所見・鑑別・治療などのポイントをコンパクトにまとめた

## 血液内科ゴールデンハンドブック

編集 小澤敬也/坂田洋一

■ 新書判・462頁 2011.11. ISBN978-4-524-26308-0  
定価 **4,725円** (本体 4,500円+税5%)

**2012**  
internal medicine

## 高IgM症候群

Hyper-IgM syndrome with defect of immunoglobulin class switch recombination

今井耕輔\* Imai Kohsuke

**定義・概念：**免疫グロブリンのクラススイッチ(抗原特異性を保ったままIgMからIgG, IgA, IgEへクラスが変換されること)の障害による易感染性を特徴とする原発性免疫不全症候群。「高」IgM症候群となっているが、IgMは必ずしも高値とは限らず、正常値をとる例も少なくない(全体の1/4程度)。IgAは感度以下となる例が多く、IgGは年齢の-2SD以下となる。B細胞は正常な例が多いが、まれにB細胞を欠損する例もみられる(<1%)。

**病態生理：**免疫グロブリンのクラススイッチは、二次リンパ組織(リンパ節、扁桃、脾臓、小腸パイエル板)内の胚中心(germinal center)で、抗原とヘルパーT細胞からのサイトカイン分泌とCD40リガンド(CD40L)によるB細胞上のCD40への刺激により生じる(図1)。T細胞上のCD40Lの異常によるものを1型、B細胞上のCD40の異常によるものを3型とよぶ。CD40L/CD40が異常であると樹状細胞を活性化できないため、IL-12が産生されず、その結果T細胞の機能的分化障害が起きる。さらに、CD40刺激により抗原提示細胞はCD80などのco-stimulatory signalを伝達する分子の発現を増強させるが、CD40L/CD40が異常であるところこの分子の発現誘導が不良になり、その結果T細胞とB細胞の相互作用に障害が起これ、結果的にT細胞の機能不全が起きる。この結果、1型と3型では日和見感染などを伴い、臨床的にも重症である(複合型HIGM)。胚中心の成熟B細胞に特異的に発現するactivation induced cytidine deaminase(AID)は、シチジンを脱アミノ化し、ウリジン(U)に変える酵素であると考えられている。とくに、免疫グロブリン重鎖の各定常領域の5'側に存在するグアニン/シチジン(G/C)に富んだ繰り返し配列を特徴とするスイッチ(S)領域と免疫グロブリン重鎖および軽鎖遺伝子可変領域を標的としていると考えられている。AID遺伝子の異常によるHIGMを2型とよぶ。DNA鎖内のUは異物であり、塩基除去修復反応(base excision repair: BER)、あるいはミスマッチ修復(mismatch repair: MMR)により修復される。BERで、Uの塩基であるウラシルを取り除く酵素がウラシルDNAグリコシラーゼ(UNG)であり、その異常によるHIGMが5型である。また、MMRでMsh6がミスマッチを認識しPMS2がDNA鎖を切断するが、その異常によるHIGMも報告されている。CD40+IL-4による刺激に反応し、B細胞の増殖が正常にみられる患者を4型とよび、メモリー(CD27陽性)B細胞が正常なタイプ(4M型)と減少しているタイプ(4N型)が報告されている。4M型はS領域へのDNA切断導入の異常、4N型はクラススイッチ特異的な

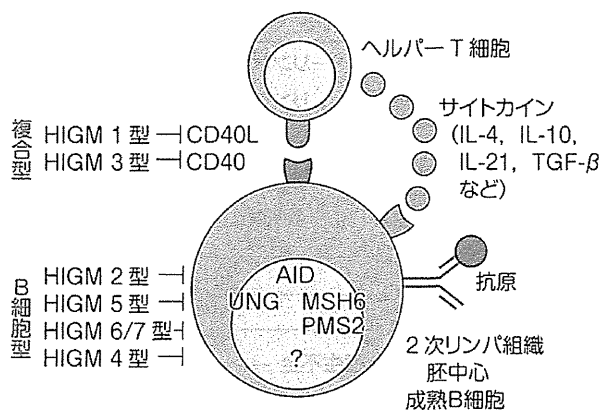


図1 クラススイッチに必要な刺激とその障害による高IgM症候群(HIGM)の分類

T-B細胞表面分子の異常による1型と3型は、T細胞機能不全症と同様な日和見感染症を伴うため、複合型クラススイッチ障害に分類される。一方、B細胞内の異常による2型(AID異常)と5型(UNG異常)は、B細胞型クラススイッチ障害とよばれ、日和見感染を伴わない。4型は、メモリーB細胞が正常なM型と、減少しているN型( naive型)が存在する。HIGM4Nはクラススイッチ特異的なDNA修復異常によると考えられるが原因は不明である。

DNA二重鎖修復異常によると考えられるが、原因遺伝子は不明である。また、PHA芽球化反応の低下を認める例や、CD40+IL-4による刺激に対する増殖が不良な例、さらに進行性にB細胞が減少する例なども経験しているが、いずれも原因遺伝子は明らかではない。Cernunnos/XLF遺伝子(non-homologous end joiningにかかわる遺伝子)の異常やATM遺伝子(毛細血管拡張性失調症の原因遺伝子)、NBS1遺伝子(Nijmegen breakage syndromeの原因遺伝子)の異常も、初期症状がHIGMであることもあり、鑑別が必要である。

**臨床症状・経過・予後：**全病型に共通するのは、主に化膿菌(ブドウ球菌、肺炎球菌など)による感染の反復化、重症化による易感染性である。上気道感染(中耳炎、副鼻腔炎)、下気道感染(気管支炎、肺炎)の反復感染が多く、膿皮症、化膿性リンパ節炎、大腸菌性腸炎、敗血症などにも罹患する。1型、3型は、幼少期にニューモシスチス肺炎に罹患し、診断の契機になることも多い。スリガラス状の間質性陰影と酸素飽和度の低下、AaDo2の著明な増大(20以上)が特徴的であり、血液、喀痰、胃液などからのPCRが診断に有用である。確定診断のため肺生検やBALにより虫体を確認したとの報告もあるが、乳児期には侵襲的な検査であり、気管支狭窄を引き起こす可能性があるため通常は行わない。人工換気時には、換気不均等による気胸に気をつける。また、単純ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルス、パルボウイルス、JCウイルスなどのウイルス感染や、カンジダ、アスペルギルス、クリプトコッカスなどの真菌感染による日和見感染にも罹患しうる。学童期以降には、クリプトスポリジウム(*Cryptosporidium parvum*)に

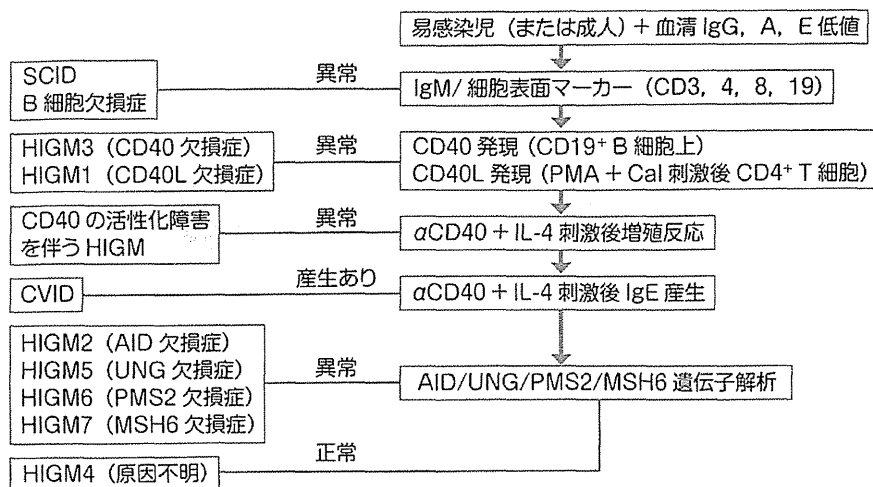


図2 高 IgM 症候群(HIGM)の病型診断と他疾患の除外に必要な検査

よる、難治性の下痢と引き続き胆管炎、さらには肝不全、胆管癌により命を失うこともまれではなく注意が必要である。生水の飲用を避ける。診断には、便中の虫卵を比重遠心法にて検出するか、便PCRを行う。胆管炎合併例では肝生検やERCPも考慮する。肝性脳症にいたる例もあるので、アンモニアの測定、知能検査、脳MRIも重要である。また、1型患者では、約半数で原因不明の好中球減少がみられる。

2型の臨床症状は、前述の化膿菌に対する易感染性のほかに、二次リンパ組織(リンパ節、扁桃、肝臓、脾臓)腫脹があげられる。年少例で、腸間膜リンパ節腫脹による反復性腸重積を契機にみつかった例も存在した。一方、成人(30~40歳代)まで、それほど反復感染が顕著ではなく、肺炎を年に1回起こすのを契機に診断にいたった例も複数ある。また、自己免疫疾患(自己免疫性溶血性貧血: AIHA, 特発性血小板減少性紫斑病: ITP, インスリン依存型糖尿病: IDDM, 肝炎, 関節炎, クロウン病など)がみられる例も存在する。

診断基準: IgG, IgA, IgE が低値で, IgM が正常~高値の易感染症例で, 本疾患を疑う。年少児では IgM が低値であることすらある。原則的に T 細胞数が正常, B 細胞数が正常(>1%)のものを対象とする。HIGM を疑う場合, 男性であれば, PMA+CaI で刺激した活性化リンパ球上の CD40L の発現をフローサイトメーターで見る。とくに, 好中球減少を伴う場合, 1 型の可能性が高い。CD40L 発現低下例では, CD40LG 遺伝子の sequence を行う。B 細胞上の CD40 分子の発現低下があれば 3 型であるが, 国内症例はまだ発見されていない。CD40L 発現正常の場合, AID, UNG, PMS2, Msh6 遺伝子の sequence を行う。いずれも正常の場合, CD40+IL-4 刺激を行い, 増殖, IgE 産生について検討する(図2)。

なお, T 細胞数減少, T 細胞機能低下がある場合, (重症)複合免疫不全症を疑う。B 細胞数が 1% 以下の場合, 無ガンマグロブリン血症(B細胞欠損症)を疑う。CD40L 発現

が正常で, *in vitro* クラススイッチが正常な場合, CVID と診断する。

治療方針・治療基準: ガンマグロブリンの定期補充がもっとも重要である。IgG が著明低値の場合, 初回は, 200~500 mg/kg 投与しても上昇が不十分なことも多い。十分に上昇させた後, 2~4 週に一度点滴静注し, 血清の IgG を 500~700 mg/dL 以上に保つようにする。症例によって, 至適な投与量, 投与間隔は異なるので, 血清 IgG を測定し, 個別に調節する。副作用のアナフィラキシーショックに気をつけ, 緩徐に投与する。細菌感染症は重症化するるので, 抗生

物質の点滴静注による治療を躊躇せず行う。

1 型, 3 型でみられる T 細胞機能不全に対しては, 日和見感染に対して ST 合剤(バクタ 0.05~0.1 g/kg/日), 抗真菌薬(イトラコナゾール)の予防内服を行う。

1 型でみられる好中球減少症に対しては, G-CSF 投与などが試みられるが, 高濃度の G-CSF 投与が必要になる症例や, 全く反応しない症例もある。移植時の影響についても, 現在解析中である。2 型, 4 型でみられる自己免疫疾患に対してはステロイドの投与や, 難治性の AIHA, ITP に対しては抗 CD20 抗体(リツキシマブ)の投与も考慮する。

1 型は後述のとおり予後不良であるため, HLA 一致の血縁者がいる場合はできるだけ早期に骨髄移植をすることが推奨される。また, 非血縁者間骨髄移植, 年少児では臍帯血移植も行っている。前処置にはブスルファン 4 mg/kg/日×4+シクロホスファミド 50 mg/kg/日×4+ウサギ ATG 2 mg/kg/日×4 が推奨される。

予後: 1 型の予後は不良で, 国内調査およびヨーロッパでの調査では長期(20 年以上)生存率は 20% 前後である。死因は, カリニ肺炎, 肝不全, 脳炎などがあげられる。また, クリプトスポリジウム感染合併例では, 造血幹細胞移植の成功率がきわめて悪い。クリプトスポリジウム非合併例の移植成績は悪くない。IVIG を行っていれば, 2 型, 5 型の予後は悪くない。4 型は現在検討中であるが, 複合免疫不全症になるような場合は造血幹細胞移植も考慮する。その際, 前処置の選定のために放射線高感受性がないかどうか, 線維芽細胞を用いて検討することが必要である。

**Key Words:** 免疫グロブリン, クラススイッチ, 日和見感染症, 造血幹細胞(骨髄)移植

\*東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児・周産期地域医療学講座

〔〒113-8519 東京都文京区湯島 1-5-45 M & D タワー 9 階 N909〕

TEL 03-5803-4705 FAX 03-5803-0378

E-mail: kimai.ped@tmd.ac.jp

## Clinical and Genetic Characteristics of XIAP Deficiency in Japan

Xi Yang · Hirokazu Kanegane · Naonori Nishida ·  
Toshihiko Imamura · Kazuko Hamamoto ·  
Ritsuko Miyashita · Kohsuke Imai ·  
Shigeaki Nonoyama · Kazunori Sanayama ·  
Akiko Yamaide · Fumiyo Kato · Kozo Nagai ·  
Eiichi Ishii · Menno C. van Zelm · Sylvain Latour ·  
Xiao-Dong Zhao · Toshio Miyawaki

Received: 26 July 2011 / Accepted: 14 December 2011 / Published online: 8 January 2012  
© Springer Science+Business Media, LLC 2012

**Abstract** Deficiency of X-linked inhibitor of apoptosis (XIAP) caused by *XIAP/BIRC4* gene mutations is an inherited immune defect recognized as X-linked lymphoproliferative syndrome type 2. This disease is mainly observed in patients with hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) often associated with Epstein–Barr virus infection. We described nine Japanese patients from six unrelated families with XIAP deficiency and studied XIAP protein

expression, *XIAP* gene analysis, invariant natural killer T (iNKT) cell counts, and the cytotoxic activity of CD8<sup>+</sup> alloantigen-specific cytotoxic T lymphocytes. Of the nine patients, eight patients presented with symptoms in infancy or early childhood. Five patients presented with recurrent HLH, one of whom had severe HLH and died after cord blood transplantation. One patient presented with colitis, as did another patient's maternal uncle, who died of colitis at

X. Yang · H. Kanegane (✉) · N. Nishida · T. Miyawaki  
Department of Pediatrics, Graduate School of Medicine,  
University of Toyama,  
2630 Sugitani,  
Toyama 930-0194, Japan  
e-mail: kanegane@med.u-toyama.ac.jp

X. Yang · X.-D. Zhao  
Division of Immunology,  
Children's Hospital of Chongqing Medical University,  
Chongqing, China

T. Imamura  
Department of Pediatrics, Graduate School of Medical Sciences,  
Kyoto Prefectural University of Medicine,  
Kyoto, Japan

K. Hamamoto  
Department of Pediatrics, Hiroshima Red Cross Hospital,  
Hiroshima, Japan

R. Miyashita  
Department of Pediatrics, Izumiotsu Municipal Hospital,  
Izumiotsu, Japan

K. Imai · S. Nonoyama  
Department of Pediatrics, National Defense Medical College,  
Tokorozawa, Japan

K. Sanayama  
Department of Pediatrics, Japanese Red Cross Narita Hospital,  
Narita, Japan

A. Yamaide  
Department of Allergy and Rheumatology,  
Chiba Children's Hospital,  
Chiba, Japan

F. Kato  
Department of Pediatrics,  
Tokyo Women's Medical University Medical Center East,  
Tokyo, Japan

K. Nagai · E. Ishii  
Department of Pediatrics,  
Ehime University Graduate School of Medicine,  
Toon, Japan

M. C. van Zelm  
Department of Immunology, Erasmus MC,  
Rotterdam, The Netherlands

S. Latour  
INSERM U768, Hôpital Necker-Enfants Malades,  
Paris, France



4 years of age prior to diagnosis with XIAP deficiency. Interestingly, a 17-year-old patient was asymptomatic, while his younger brother suffered from recurrent HLH and EBV infection. Seven out of eight patients showed decreased XIAP protein expression. iNKT cells from patients with XIAP deficiency were significantly decreased as compared with age-matched healthy controls. These results in our Japanese cohort are compatible with previous studies, confirming the clinical characteristics of XIAP deficiency.

**Keywords** X-linked lymphoproliferative syndrome · X-linked inhibitor of apoptosis · Epstein–Barr virus · hemophagocytic lymphohistiocytosis · invariant natural killer T cell

### Abbreviations

BIR	Baculovirus IAP repeat
CTL	Cytotoxic T lymphocyte
HSCT	Hematopoietic stem cell transplantation
HLH	Hemophagocytic lymphohistiocytosis
IAP	Inhibitor of apoptosis
LCL	Lymphoblastoid cell line
MMC	Mitomycin C
mAb	Monoclonal antibody
MFI	Mean fluorescence intensity
iNKT	Invariant natural killer T
PCR	Polymerase chain reaction
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
TCR	T cell receptor
XIAP	X-linked inhibitor of apoptosis
XLP	X-linked lymphoproliferative syndrome

### Introduction

X-linked lymphoproliferative syndrome (XLP) is a rare inherited immunodeficiency estimated to affect approximately one in one million males, although it may be underdiagnosed [1]. XLP is characterized by extreme vulnerability to Epstein–Barr virus (EBV) infection, and the major clinical phenotypes of XLP include fulminant infectious mononucleosis (60%), lymphoproliferative disorder (30%), and dysgammaglobulinemia (30%) [2]. In addition, XLP is associated with a variety of additional clinical phenotypes such as vasculitis, aplastic anemia, and pulmonary lymphoid granulomatosis. Patients with XLP often develop more than one of these phenotypes. The gene responsible for XLP was identified as *SH2D1A*, located on Xq25 and encoding the SLAM-associated protein (SAP) [3–5]. However, gene analysis revealed *SH2D1A* mutations in only 50–60% of presumed XLP patients [6]. Importantly, a mutation in the gene that encodes the X-linked inhibitor of

apoptosis (XIAP) called *XIAP* or *BIRC4* was identified as a second causative gene for XLP [7]. *XIAP* is located close to the *SH2D1A* gene on the X chromosome and consists of six coding exons [8–10]. XIAP produces an anti-apoptotic molecule that belongs to the inhibitor of apoptosis (IAP) family proteins. It contains three baculovirus IAP repeat (BIR) domains that, together with flanking residues, bind to caspases 3, 7, and 9, thereby inhibiting their proteolytic activity [11].

The clinical presentations of XIAP-deficient patients have been frequently reported [7,12,13]. More than 90% of patients with XIAP deficiency develop hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) which is often recurrent. Therefore, it was recently suggested that the phenotype of XIAP deficiency fits better with the definition of familial HLH than with XLP disease [12]. However, familial HLH is characterized by defects in CD8<sup>+</sup> T and NK cell cytotoxicity responses, while these responses are normal in XIAP deficiency [7,12]. Other symptoms of XLP, such as splenomegaly, hypogammaglobulinemia, and hemorrhagic colitis, have been reported in patients with XIAP deficiency, but lymphoma has never been noted [7,12–15].

We searched for patients with XIAP deficiency in Japan by detection of *XIAP* gene mutations and flow cytometric assessment of lymphoid XIAP expression. We previously reported the first case of XIAP deficiency in Japan [14]. Thereafter, we identified eight additional cases from five families with XIAP deficiency in our country. In this study, we describe the clinical and laboratory findings from nine patients from six unrelated families with XIAP deficiency, including previous cases, to help further the understanding of the pathogenetic features of this disease.

### Materials and Methods

#### Patient and Family Member Samples

Patients without identified *SH2D1A* mutations but with presumed XLP phenotypes were screened for *XIAP* mutations. Their family members were also screened for the same mutation. Upon identification of *XIAP* mutations, the patients were enrolled in this study. Patient 2.2 passed away before a genetic diagnosis of XIAP deficiency was made, but he was the maternal uncle of patient 2.1 and had presented with a XLP phenotype (Table I). In the end, nine patients from six different families were found to have XIAP deficiencies, three of whom had been reported previously [13,14]. Upon the approval of the Ethics Committee of the University of Toyama and after obtaining informed consent, 5–10 mL heparinized venous blood was collected from the patients, their mothers, and 25 age-matched healthy children (1–13 years of age). All of the samples were

transferred to our laboratory at room temperature within 24 h for analysis.

#### Mutation Analysis of the *XIAP* Gene

DNA was extracted from peripheral blood using the QuickGene-Mini 80 nucleic acid extraction system (FUJI-FILM Co., Tokyo, Japan). The coding regions and the exon–intron boundaries of the *XIAP* gene were amplified by polymerase chain reaction (PCR) using primers flanking each of the six exons by standard methods. PCR products were sequenced using the BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) with the same primers used for PCR amplification. Sequencing analysis was performed on an Applied Biosystems Prism 310 Capillary Sequencer (Applied Biosystems).

#### Flow Cytometric Analysis of XIAP Protein Expression in Lymphocytes

XIAP protein expression was studied by flow cytometric techniques as previously described [16,17]. Peripheral blood mononuclear cells (PBMC) from patients 1, 2.1, 3.1, 3.2, 4, 5, 6.1, 6.2, and 25 age-matched healthy children were prepared by density gradient centrifugation over Histopaque-1077 (Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis, MO, USA). The cells were first fixed in 1% paraformaldehyde in PBS for 30 min at room temperature and then permeabilized in 0.5% saponin in washing buffer. The fixed and permeabilized cells were then incubated with an anti-XIAP monoclonal antibody (mAb) (clone 48 (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) or clone 2 F1 (Abcam, Cambridge, UK)) for 20 min on ice, washed, and then incubated with a FITC-labeled anti-mouse IgG1 antibody (SouthernBiotech, Birmingham, AL, USA) for 20 min on ice. The stained cells were analyzed on the FC500 flow cytometer (Beckman Coulter, Tokyo, Japan).

#### Western Blot Analysis of XIAP Protein Expression in Lymphocytes

PBMC from normal controls and patients 3.1, 5, and 6.2 were washed and pelleted. The cells were then lysed in 10  $\mu$ L of lysing solution (1% Triton-X 100; 150 mmol/L NaCl; 10 mmol/L Tris–HCl, pH 7.6; 5 mmol/L EDTA–Na; 2 mmol/L phenylmethylsulfonyl fluoride) per  $10^6$  cells for 30 min on ice. The lysed cells were centrifuged for 10 min at 15,000g to remove nuclei, and the supernatants were diluted in the same volume of Laemmli's sample buffer. Samples were then electrophoresed in sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide 10% to 20% gradient gel and blotted on nitrocellulose filters. Blots were blocked in 5% skim milk in PBS for 1 h, treated with anti-XIAP mAb (clone 28 or clone 2F1) for 2 h, and then incubated with peroxidase-conjugated

anti-mouse IgG antibody (Invitrogen, Grand Island, NY, USA) for 1 h. Immunoblots were developed by the ECL Western blotting detection system (GE Healthcare UK Ltd., Buckinghamshire, England).

#### Flow Cytometric Identification of Invariant Natural Killer T Cells

PBMC from eight patients (1, 2.1, 3.1, 3.2, 4, 5, 6.1, and 6.2) and 25 controls were incubated with fluorochrome-conjugated anti-CD3 (Dako Japan KK, Kyoto, Japan), anti-TCRV $\alpha$ 24, and anti-TCRV $\beta$ 11 mAbs (Beckman Coulter) to identify invariant natural killer T (iNKT) cells by flow cytometry. After the electronic gating of 100,000 CD3<sup>+</sup> T cells, iNKT cell populations were defined by the co-expression of TCRV $\alpha$ 24 and TCRV $\beta$ 11. The iNKT cell counts were evaluated at the diagnosis of XIAP deficiency.

#### Establishment of Alloantigen-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Lines and Analysis of Cytotoxic T Lymphocyte-Mediated Cytotoxicity

Alloantigen-specific CD8<sup>+</sup> cytotoxic T lymphocyte (CTL) lines were generated as described previously [18,19]. Briefly, PBMC were obtained from patients 1, 2.1, 3.1, and unrelated healthy individuals. These cells were co-cultured with a mitomycin C (MMC)-treated B lymphoblastoid cell line (LCL) established from an HLA-mismatched individual (KI-LCL). Using cell isolation immunomagnetic beads (MACS beads; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA), CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were isolated from PBMC that had been stimulated with KI-LCL for 6 days. CD8<sup>+</sup> T lymphocytes were cultured in RPMI 1640 medium supplemented with 10% human serum and 10 IU/mL interleukin-2 (Roche, Mannheim, Germany) and stimulated with MMC-treated KI-LCL three times at 1-week intervals. These lymphocytes were then used as CD8<sup>+</sup> alloantigen-specific CTL lines. The cytotoxic activity of CTLs was measured by a standard <sup>51</sup>Cr-release assay as described previously [20]. Briefly, alloantigen-specific CTLs were incubated with <sup>51</sup>Cr-labeled allogeneic KI-LCL or TA-LCL, which did not share HLA antigens with KI-LCL, for 5 h at effector/target cell ratios (E/T) of 2.5:1, 5:1, and 10:1. Target cells were also added to a well containing only medium and to a well containing 0.2% Triton X-100 to determine the spontaneous and maximum levels of <sup>51</sup>Cr release, respectively. After 5 h, 0.1 mL of supernatant was collected from each well. The percentage of specific <sup>51</sup>Cr release was calculated as follows: (cpm experimental release – cpm spontaneous release) / (cpm maximal release – cpm spontaneous release)  $\times$  100, where cpm indicates counts per minute.

**Table I** Summary of our data

	Patient 1 [13]	Patient 2.1 [12]	Patient 2.2 [12]	Patient 3.1	Patient 3.2	Patient 4	Patient 5	Patient 6.1	Patient 6.2
Age at initial presentation	20 months	7 months	3 months	2 months	Asymptomatic	2 months	6 months	17 months	15 months
Current age	4 years	Deceased	Died of colitis	12 years	17 years	15 years	2 years	1 year	12 years
Family history	No	Yes	Yes	Yes	Yes	No	No	Yes	Yes
HLH	+	+	-	+	-	-	+	+	+
Recurrent HLH	+	+	-	+	-	-	+	-	+
Fever	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Splenomegaly	+	+	ND	-	-	-	-	+	+
Cytopenia	+	+	ND	+	-	-	+	+	+
EBV	+	-	ND	+	-	-	-	+	+
Hypogammaglobulinemia	-	+	ND	-	-	+	-	-	-
Colitis	-	-	+	-	-	-	+	-	-
Treatment	PSL CsA Dex	PSL CsA Dex	ND	PSL CsA	-	IVIG	PSL, Dex CsA, IVIG Infliximab	IVIG, Dex	PSL
Allogeneic HSCT	-	+	-	-	-	-	-	-	-
Mutation	R238X	R381X	ND	W217CfsX27	W217CfsX27	E349del	Del of exons 1-2	N341YfsX7	N341YfsX7
XIAP protein expression	±	-	ND	-	-	+	±	±	±

*HLH* hemophagocytic lymphohistiocytosis, *ND* no data, *EBV* Epstein-Barr virus, *PSL* prednisolone, *CsA* cyclosporin A, *Dex* dexamethasone, *IVIG* intravenous immunoglobulin, *HSCT* hematopoietic stem cell transplantation, + yes or positive, - no or negative, ± residual expression

Statistical Analysis

Student’s *t*-test was used for statistics, with *P*-values <0.05 considered to be statistically significant.

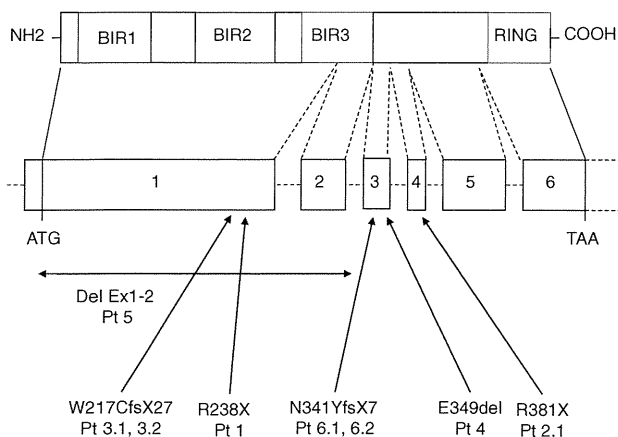
Results

Clinical Manifestations of the Patients

Most of our patients presented with disease symptoms at very early ages; five patients presented in infancy and three patients presented in childhood (Table I). Three of the six families had family history records. Five of the nine patients had recurrent HLH, fever, splenomegaly, and cytopenia. EBV infection and hypogammaglobulinemia were also observed in multiple patients. Most patients with HLH were treated with corticosteroids with or without cyclosporin A to prevent an otherwise rapidly fatal disease course. Patients 2.2 and 5 presented with colitis, whereas patient 2.2 died; patient 5 improved with anti-TNF alpha mAb (infliximab®) treatment. Patient 2.1 underwent cord blood transplantation but died of complications. Patient 4 had a history of recurrent otitis media and pneumonia since 2 months of age, and he was found to have hypogammaglobulinemia. The patient was treated with intravenous immunoglobulin replacement therapy alone, and he is currently doing well. No patient developed lymphoma.

Detection of XIAP Mutations

We identified XIAP mutations in patients from all six unrelated families (Fig. 1) and analyzed all of the data using the US National Center for Biotechnology Information database

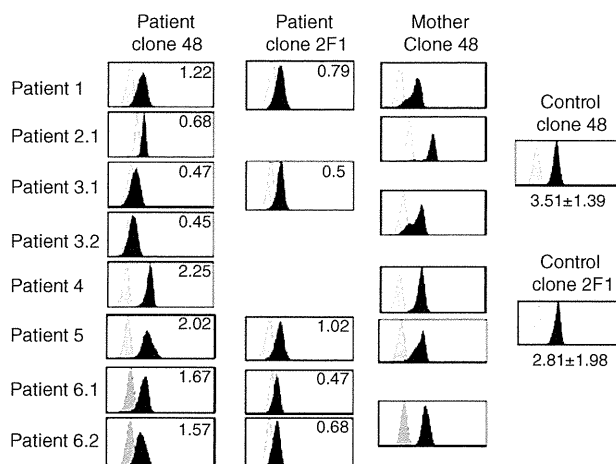


**Fig. 1** XIAP gene mutations and their consequences for XIAP protein. XIAP comprises six exons and encodes the XIAP protein, which consists of 497 amino acids. XIAP contains three BIR domains and one RING domain. Mutations identified in our patients are indicated

(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) to check for single-nucleotide polymorphism in the XIAP gene. As previously reported, patient 1 possessed a nonsense mutation, 712 C > T, resulting in an early stop codon R238X [14]. Patient 2.1 had a nonsense mutation in exon 5, 1141 C > T, resulting in R381X [13]. Patient 2.2 might have the same mutation as patient 2.1 because patient 2.2 was the maternal uncle of patient 2.1 [13]. Patients 3.1 and 3.2 were siblings and were found to have a one base pair deletion (650delG) in exon 1, resulting in a frameshift and premature stop codon (W217CfsX27). Patient 4 was found to have one amino acid deletion (1045\_1047delGAG; E349del) in exon 3. Patient 5 has a large deletion, spanning exons 1 and 2. Patients 6.1 and 6.2 were brothers and had a two-nucleotide deletion (1021\_1022delAA), which resulted in a frameshift and premature stop codon (N341YfsX7). All of the mothers of the patients from families 1–5 were heterozygote carriers of the mutations. Interestingly, we could not find any XIAP mutation in the mother of patients 6.1 and 6.2. We identified deleterious XIAP mutations in nine patients from six unrelated Japanese families that are likely to underlie their XLP phenotypes.

XIAP Expression in Lymphocytes from the Patients and Carriers by Flow Cytometry

XIAP expression levels were analyzed in the lymphocytes of patients from all six families (Fig. 2). The lymphocytes of



**Fig. 2** XIAP protein expression in lymphocytes from the patients and their carriers. Flow cytometric detection of intracellular XIAP in lymphocytes from patients and their maternal carriers. The gray and black areas indicate the negative control and anti-XIAP staining, respectively. Anti-XIAP staining was performed using the clones 48 and 2 F1 antibodies where indicated. The number in the box indicates the log scale difference between the mean fluorescence intensity (ΔMFI) stained by the isotype antibody and that by the anti-XIAP antibodies. XIAP expression in 25 normal controls was also analyzed by the clone 48 and 2 F1 antibodies. The data of mean ± standard deviation of ΔMFI and each representative profile were shown