

第 51 回日本小児感染症学会会長講演

一小児科医が経験した臨床症例と免疫学との関わり

東 寛¹⁾

はじめに

昨年 10 月に北海道旭川市で開催された第 51 回日本小児感染症学会で講演させていただいた内容についての寄稿依頼が学会誌の編集部からありました。現役最後の仕事として、講演では話さなかった事にも触れながら筆をとることに致しました。

私は、1979 年に旭川医科大学を卒業し、初代小児科教授である吉岡 一先生のおられた母校の小児科に入局し 1997 年まで在籍しました。1997～2011 年の 14 年間は、北海道赤十字血液センターに在籍しましたが、2011 年から再び、母校に戻りました。入局から 1997 年までの 18 年の間に経験したことの中から、四つの話をピックアップして、振り返ってみたいと思います。全ては 20 年以上も昔の話です。

I. 慢性肉芽腫症 (CGD) の話

患者さん (男児) は、生後 1 か月に肺炎で入院。1～3 歳まで、繰り返す肛門周囲膿瘍と表在リンパ節腫脹がありました。3 歳 6 か月に多発性肝膿瘍を発症し、加療のため入院となりました。今まで、多くの抗菌薬を使用してきた事もあり、治療は難渋する事が予想されました。たまたま、読みあさった文献の中に、サルファ剤 (シノミン) の大量投与が効果を示したという症例報告を見つけ、オーベンの先生の許可を得て、その大量投与も併用しました。サルファ剤は細胞内に取り込まれた細菌にも作用する事も重要な根拠でした。処方箋を発行するに及んで、処方量に「誤り」があ

るのではないかととの問い合わせが薬剤部からありましたが、理由を説明し、そのまま投与する事ができました。幸いにも肝臓の膿瘍は縮小し、退院の日を迎える事が出来たのでした。今でも、あの時のサルファ剤の大量投与は、治療経過に多大な影響を与えたと思っています。その後、しばらくして、CGD 患者の感染症の発症阻止にバクタの予防投与が推奨されるようになりました。この症例は、男児に発症した CGD であり、当時は NADPH oxidase を構成している cytochrome_{b558} (Cytb₅₅₈) が欠損している事が原因とされておりました。診断の確定のために、好中球の機能検査を行いました。古典的な NBT slide test の結果を示してあります (図 1)。検査を進めてゆくうちに、Cytb₅₅₈ 分子が検出される事がわかりました。すなわち、gp91-phox は p22-phox とヘテロダイマーを形成して細胞表面に発現しますが、その p22-phox が好中球表面に発現しており、実際に Cytb₅₅₈ を定量すると健康人と比較して遜色なく存在している事がわかりました (図 2)。さらに、患者さんの好中球を刺激すると細胞膜に NADPH oxidase 複合体が形成されることも示唆できました。従って、Cytb₅₅₈ 陽性の X-linked CGD であるとの結論に到達しました。崎山先生 (北大)、布井先生 (熊本大)、金ヶ崎先生 (医科学研究所) からサポートを受けながら得た結論でした¹⁾。この結論から、Cytb₅₅₈ 蛋白、より厳密には gp91-phox 蛋白には一つのアミノ酸置換 (point mutation) があるのだろうと想定し、それを証明するために、gp91-phox の遺伝子解析をする事に挑戦しました。当時は、Sanger 法を用いた遺伝子シーケンスの解

1) 旭川医科大学小児科学講座教授 [〒 078-8510 旭川市緑が丘東 2 条 1-1-1]

2

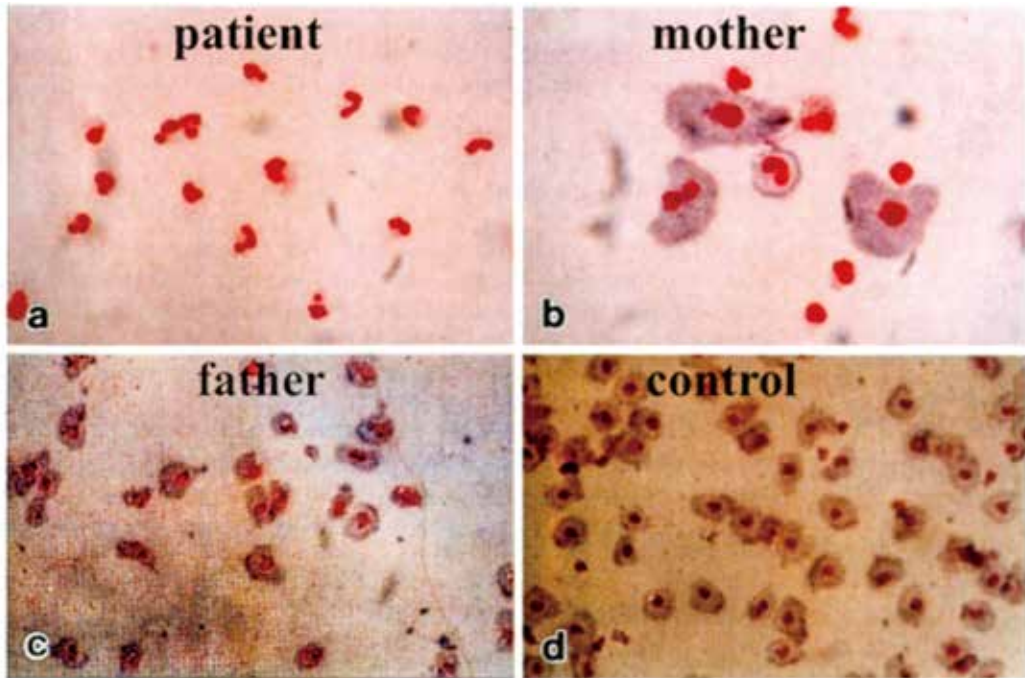


図 1 NBT slide test¹⁾

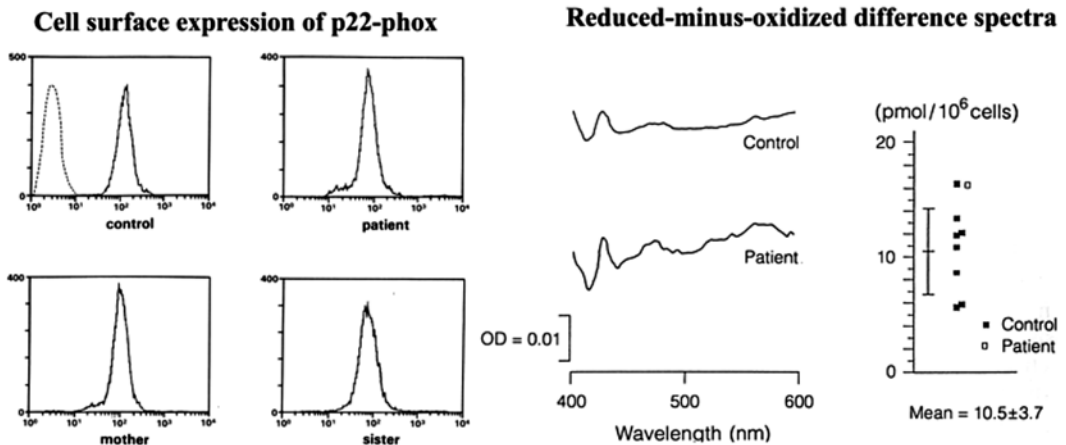


図 2 Cell surface expression of p22-phox (左) と Reduced-minus-oxidized difference spectra (右)¹⁾

析が臨床の教室でも可能になってきた時代でした。しかし、DNA のシーケンスを行うためには、自分で gel を作って電気泳動をし、最後に自分の目でシーケンスを読まなければなりません。RT-PCR 法を用いて増幅した cDNA を 1 回の泳動で 200base ほどを解析するという極めてゆっくりとしたスピードでシーケンスを行い、

gp91-phox 遺伝子に del 507~509 Gln-Lys-Thr, insert His-Ile-Trp-Ala と表記できる遺伝子変異を見いだしました²⁾。いわゆる point mutation ではなかった訳ですが、この変異部位が電子の transport に重要な部分である事を示唆できた訳です (図 3)。今の時代ですと、まず、*gp91-phox* 遺伝子のシーケンスを行って遺伝子診断し、その後に

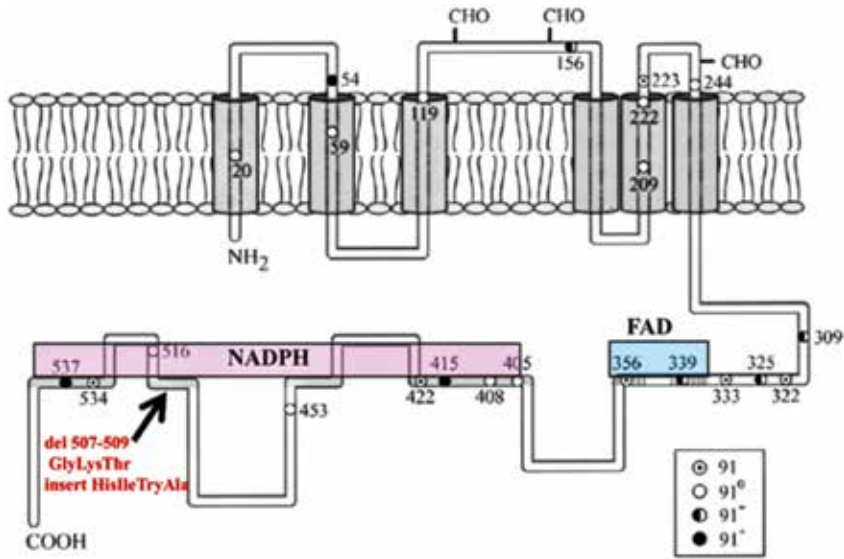


図 3 Structure of gp91-phox (Rae J, et al:Am J Hum Genet 62 : 1320-1331,1998)

機能解析という順番になるのかも知れません（いわゆる reverse genetics です）。この遺伝子解析の結果から、変異遺伝子特異的 PCR primer セットを作製し、保因者診断を行う事も出来ました。がむしゃらに原因を追求した結果を、こうした形で患者さんの家族に還元でき、大変よかったですと思っています。また、この症例から、食細胞の生体防御に果たす役割が生体にとっていかに重要かも学ばせてもらいました。

[余談 1]

さて、次の話に移る前に、T 細胞増殖因子 (TCGF) とそのレセプターを発見・同定した Kendall A. Smith の事に触れたいと思います。P. Nowell が PHA 刺激によりリンパ球が増殖することを偶然に発見したのは 1960 年で、それからリンパ球の研究が始まったと言って良いのではないかと思います。その 15 年後の、1976 年に D. Morgan が PHA で刺激したリンパ球の培養上清中に TCGF 活性があることを発見します。3 年後の 1979 年には、その中に LAF (lymphocyte activating factor) と TCGF の二つが混在していることがわかり、それぞれ、IL-1, IL-2 と命名されました。ちなみに私が小児科医となったのが、この

1979 年です。この 1 年後 (1980 年) に、K. Smith が活性化した T 細胞のみが TCGF 活性を吸収できること (つまり活性化 T 細胞のみが TCGF と結合すると言う事)、IL-2 と命名された物質が化学的に単一分子であることを報告しました。それに引き続き、1982 年に彼らの研究グループが IL-2 receptor の α 鎖を報告しました。その後 β 鎖そして γ 鎖の存在が明らかになったのでした。 α 鎖の発見は、活性化 T 細胞のみに反応する単クローン抗体である抗 Tac 抗体が重要な役割を果たしました。彼らは、IL-2 と活性化した T 細胞 (activated T; Tac) への結合を完全に抑制する単クローン抗体を作製しました。それが抗 Tac 抗体です。この単クローン抗体が IL-2 receptor α 鎖を認識するものだったのです。単クローン抗体作製技術を開発した Kohler and Milstein が Nobel Prize を受賞したのが 1984 年です。また、S. Tonegawa が免疫グロブリンの遺伝子の再構成に関する発見で Nobel Prize を受賞したのが 1987 年です。こうした経緯から見えてくるのは、1980 年を中心としてその前後に、免疫学における、今となつては誰もが知っている、しかし極めて重要な発見や技術革新のあった事がわかります。現在では、たくさんのサイトカイン、ケモカイン及びそれらのレセプ

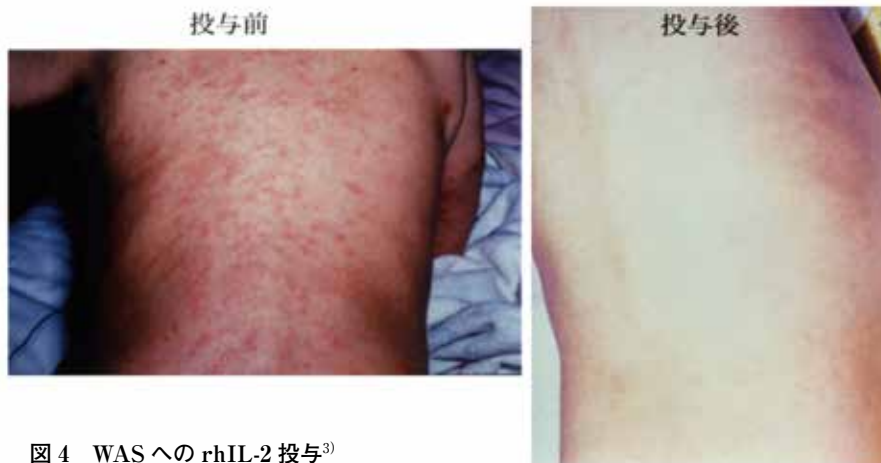


図4 WASへのrhIL-2投与³⁾

ターが解明され、複雑なサイトカインネットワークの存在が明らかになっています。K. Smithの仕事はこれらの仕事の先駆けとなったことは明らかです。余談の余談になりますが、私は1984～1987年まで、第二病理学教室の片桐一教授の紹介のもと、吉岡一教授の許しを得て、米国のDartmouth Medical School (Hanover, NH)の細菌学教室に2年半ほど留学させていただきました。細菌学教室とは言っても、研究テーマは、retrovirusにより発症するマウス白血病細胞に対するCTLクローンが認識する抗原の探索でした。当然、CTLクローンの培養維持のためにIL-2を添加した培養液をふんだんに使用しました。実は、このIL-2について最先端の研究をしていたK. Smithのラボが私のラボの上階にありました。当時、彼のラボにいたポストドクが、IL-2のT細胞に対する親和性を調べる実験をしていて、高親和性receptorと低親和性receptorがある事などを早朝の研究発表会で報告していたのを鮮明に覚えています。私は、一度だけK. Smithから話かけられた事があり、「Hanoverは田舎だけれど、自分には田舎の静かな環境が必要なんだ」と話していたのを記憶しています。余談の余談が長くなりましたが、そんなこともありIL-2は、私の中で、特別なサイトカインとなりました。

II. Wiskott-Aldrich 症候群の話

本症の trias は難治性湿疹、血小板減少症、重症

で繰り返す感染症です。

患者さんは生後2か月で両側の中耳炎、肛門周囲膿瘍、点状出血斑の症状があり入院となりました。生後6か月には左の中耳炎と血性耳漏、敗血症、尿路感染症で入院していました。3歳にHSV-1感染症を発症しました。Acyclovirで軽快するが再発を繰り返し、Acyclovir resistant HSV-1が誘導され、コントロール不能となりました。免疫不全状態のウイルス感染のコントロールの難しさを痛感した症例であったと同時に、耐性ウイルスの出現の恐ろしさも実感した症例でした。北大小児科の崎山先生より免疫増強効果を期待して、recombinant human IL-2 (rhIL-2)を投与してはどうかと言う提案をいただき、その投与を試みる事にしたのでした。投与方法の詳細は割愛しますが、rhIL-2の投与後に、皮膚に形成された多数の小さなヘルペス疹と難治性の湿疹の明らかな改善を認めました(図4)。rhIL-2の投与の前後で、リンパ球サブセットを検討したところ、rhIL-2の投与に伴って、CD4陽性細胞の割合が明らかに変化している事もわかりました(図5)。何故IL-2がそのような効果をもたらしたのかについては、明確な答えがなかったのですが、“わずか1例で観察されたもの”として1993年にEur. J. Pediatricsに投稿し受理されました³⁾。奇しくも同じ年に、WASでは抗CD3抗体刺激下でのIL-2の産生が障害され、かつT細胞の増殖能が低下しているという事が報告されました⁴⁾。翌年の

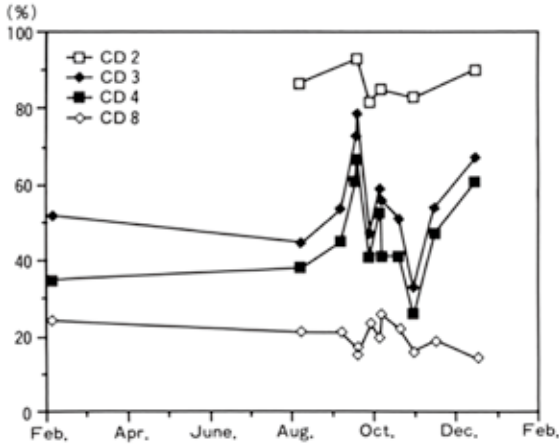


図5 Changes of the percentage of each lymphocyte subset during the IL-2 administration

1994年には、WASの責任遺伝子が同定され、それを機にWASpの機能解析が、世界中で盛んに行われました。ExogenousなIL-2に反応したと推定される我々の症例でも、IL-2の産生が障害されているのかどうか、十分なIL-2の存在下でも、T細胞は増殖しないのかという疑問が残りましたが、その疑問を残したまま、私は、1997年に一旦臨床の場を去る事になりました。その後、しばらくして、関根暉彬先生（当時国立がんセンター在職）から、この患者さんのT細胞は、抗CD3抗体による刺激で活性化する（CD25を発現する）がIL-2

を産生しない事（図6）、exogenousなIL-2存在下で培養すると増殖できるというデータをいただいたのでした（図7）。1997年前後に私の身の回りで起こった事の詳細な経緯を思い出そうとしても、何故か思い出せなくなっています。いずれにしても、このデータにより、rhIL-2投与の臨床効果が何故認められたかについての論理的根拠を得る事ができたのでした。

最初のcase reportからすでに7年を経過していましたが、貴重な症例の貴重なデータであると考えEur. J. Pediatricsに投稿したところ受理の返事が返ってきました⁵⁾。これで、この症例に関しては、私の中で決着をみたことになり、その後はすっかり忘れておりました。しかし、実は、これで終わりではありませんでした。2017年のClinical ImmunologyにWASの患者にlow-dose IL-2 therapyを行ったphase I trialの結果が報告されました⁶⁾。こうしたtrialを行った背景を読んでも、rhIL-2を投与した症例報告が引用されている事がわかりました。わずか1例の症例報告であっても、どこかで、それが引用される場合のあることを今更ながら実感した次第です。

III. IL-6の測定について

interleukin 6 (IL-6) は、1986年に活性化B細胞を抗体産生細胞に分化する活性を持つものとし

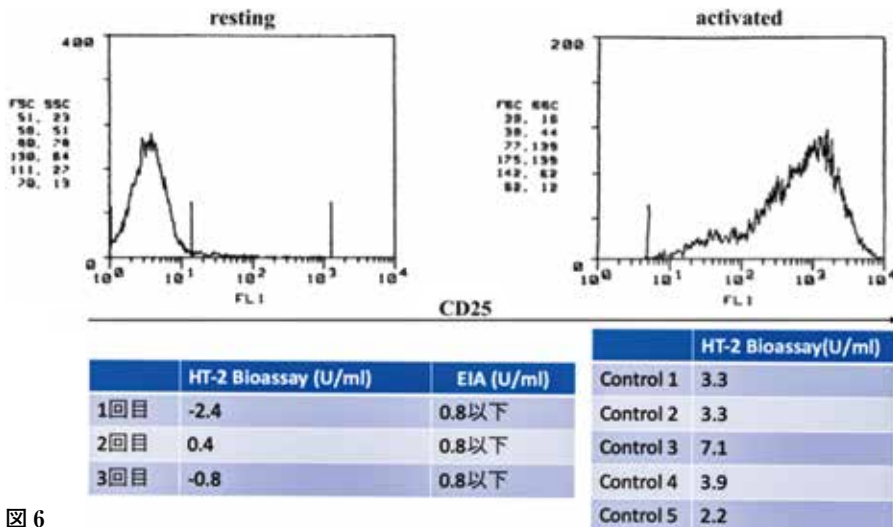


図6

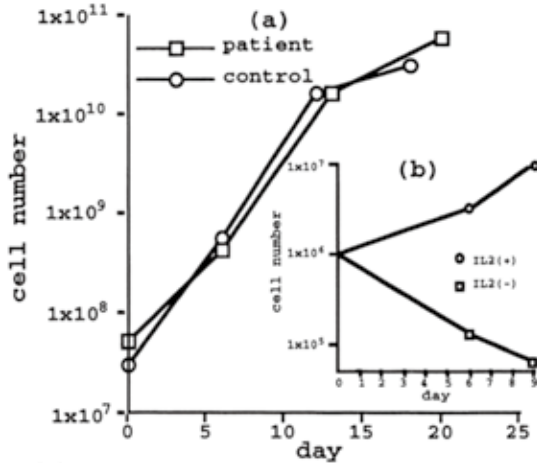


図7 Lymphocyte proliferation assay⁵⁾

て阪大の岸本先生・平野先生により同定されたサイトカインです。IL-6は、急性期蛋白質の誘導・Th17サブセットの抑制・Tregの誘導・中枢における発熱誘導等の活性を持つことが知られています。約2年半の米国留学を終えて帰国した1987年頃の免疫学の世界は、サイトカインネットワークの話題で賑わっていました。特にIL-6は、抗体産生や急性期蛋白の誘導を促し、血清中のIL-6のbioassayが可能であることから、多くの臨床家が興味を持ったと思います。私は、IL-6依存性細胞株であるMH60、BSF-2とrhIL-6を岸本先生から譲渡していただきました。つまり「門を叩いたと

ころ開いた」訳です。それを使って、臨床検体中のIL-6のbioassayを試みました。

明らかな細菌感染症や川崎病では、確かにIL-6活性が高いと言う結果が得られました(図8)。IL-6がCRP産生を誘導することから、この結果は当たり前と言う見方もできますが、CRPではなくIL-6活性で炎症反応の強度を見る事が出来たことは新鮮でした。生後数か月の乳児では、より年長の子と比較するとIL-6活性が高いと言う結果も出ました(図8)。結果は1992年の日本小児科学会雑誌に掲載されました⁷⁾。時期をほぼ同じくして、ELISAを用いたIL-6のassay kitが市販されたので、煩雑なbioassay系からこちらに乗り換えました。しかし、血清中のIL-6の測定結果の再現性はあまり良いものではありませんでした。そんな時に、後輩の佐々木先生から、髄液中のIL-6を測定してみませんかとの提案があり、髄液中のIL-6濃度の測定を開始しました。こちらは、再現性も十分にありました。これも予想された事ではありますが、髄膜炎では確かに髄液中のIL-6濃度が10pg/mL以上となる事がわかりました。一方で、熱性痙攣ではIL-6濃度の上昇が認められない事も見いだしました(図9)⁸⁾。また、髄液細胞の増加に先行してIL-6濃度が上昇する場合のある事も報告しました(図10)。この仕事をさらに進めて、無菌性髄膜炎ではIL-6濃度の上昇のみであるが、細菌性髄膜炎ではIL-6とTNF-αの両者の

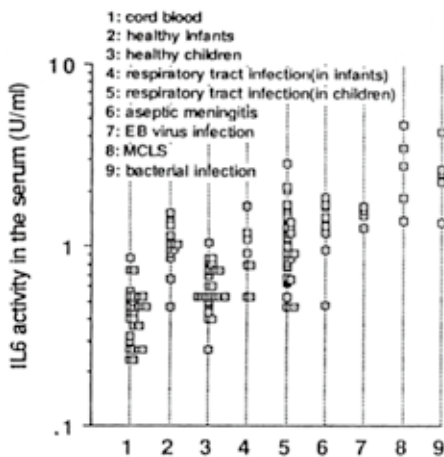


図8 血清中のIL-6濃度⁷⁾

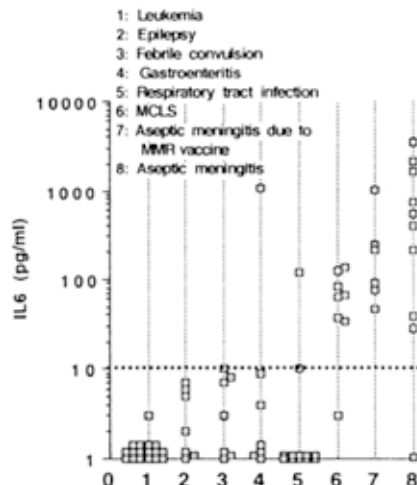


図9 髄液中のIL-6濃度⁸⁾

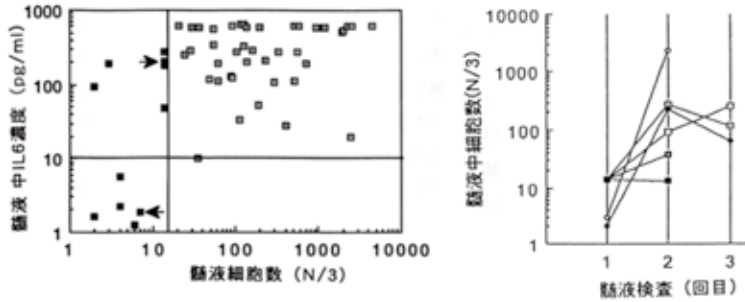


図10 無菌性髄膜炎の髄液細胞数とIL-6濃度⁹⁾

上昇がある事を示す事ができました(図11)。今では、IL-6、TNF- α 、IL-1 α などが炎症性疾患の形成と密接に関連している事が明らかになり、その活性を抑制するための抗体試薬が治療に使われるようになりました。これは免疫学の大きな成果の一つです。しかしながら、これらの抗体試薬が治療として使われているJIA、Crohn's disease、ulcerative colitis等の病因については相変わらず不明のままである事も忘れてはならないと思います。炎症の場にもどのような物質(分子)が関与・介在しているのかに思いを馳せながら患者さんの治療に臨む事が必要なのだと思います。

[余談2]

血清中のIL-6濃度を測定した結果は、本学会の学術集会でも発表しました。当時としては、比較的新しいデータであり、早速1991年には小児科学会雑誌へ投稿しました。査読者から、「生物活性がIL-6の量を反映しているのか示せ」との返信が返ってきました。そこで、血清のbioassay値(活性)それらをassay kitで測定したIL-6値とを比較検討し、明瞭な相関のあることを示すとともに、bioassayの活性は、抗IL-6抗体で完全にブロックされるというデータを査読者に提示しました。しかし、その後も、その査読者から「論文の書き方が不適切だ」として批評を受け、結局、投稿後1年を経過しても査読者とのやりとりが続いておりました。教室の教授は吉岡教授から2代目の奥野晃正教授に代わっていましたが、見かねた奥野教授が、学会に直接手紙を書いてくださいました。その後、この論文は、すんなり受理となつ

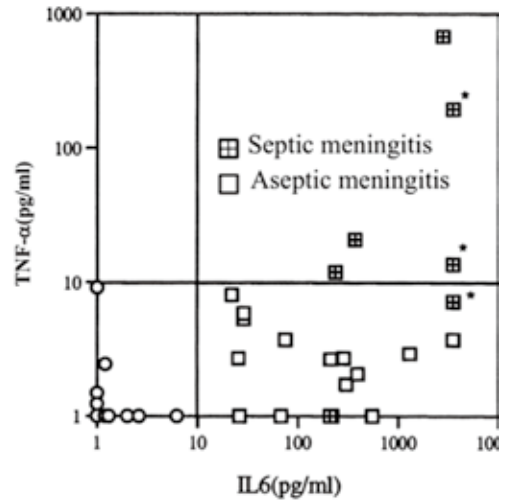


図11 細菌性髄膜炎のTNF- α 濃度とIL-6濃度¹⁰⁾

たのでした。ついでにもう一つ。実は、同じ頃に日本小児科学会雑誌に投稿した症例報告(後述)に関しても、長い間返答を待たなければ「掲載不可」とされました。さすがに、すっかり落ち込んだのを覚えています。当時の日本小児科学会の査読制度がどのようなものだったのか、知る由もありませんが、こういう事はいつの時代でもあるのだと思います。

IV. CRMO (chronic recurrent multifocal osteomyelitis) の話

(Interferon- γ が著効した骨化性線維腫様の組織像を有する慢性骨髓炎の1例)

CRMOと言われる疾患があります。最近は、自己炎症疾患の一つである可能性が指摘されています。患者さんは慢性骨髓炎に矛盾しない組織像と

臨床像を呈し、種々の抗菌薬治療に抵抗を示し、患部（左下腿）の切断を希望して整形外科に入院しておりました。切断の前に内科的にできる手段はないかとの事で小児科に紹介されました。以下、写真は全て文献11より引用します。左下腿の過伸長があり、全体は熱感を伴って痛みを伴うものでした。脛骨・腓骨の肥厚および吸収像があり、右上腕の橈骨・尺骨遠位端にも骨膜の肥厚と骨の透亮像が認められています（図12）。^{99m}Tec 骨シンチ画像でも、左下腿と右前腕遠位端への明らかな取り込みが認められました（図13左）。骨病変は確かに多発していた訳です。小児科入院後、種々の抗菌薬やステロイドの投与を行いました。病勢のコントロールは困難であり、最終的に本人の希望通りに左下腿の切断を行いました。その時、同時に右尺骨の病変の biopsy を行いました。左下腿切断後、CRP は速やかに陰性化し（図14）、生検の病理組織でも骨膜下の炎症細胞の浸潤像および骨新生と線維性置換像が入り乱れた所見があり、臨床症状と合わせて、慢性骨髓炎に矛盾しない所見が得られました（図15）。ところが、やがて、検査所見で、CRP の再上昇を認めるようになりました（図14）。同時に無症状であった前

腕遠位部位の発赤と腫脹が顕在化し、可動制限も出てきました。X-p 上も当該骨病変には骨膜反応性と思われる変化が顕著になってきました（図16：右前腕の X-p 治療前）。再び、種々の抗菌薬の投与を試みましたが、病勢の改善は得られませんでした。当時 IFN- α は、CML の治療に使用されておりましたが、その生物学的作用は多岐に及ぶ事もわかっていました。この症例の本体が、感染症ではないとすると、細胞の増殖抑制作用もある IFN- α の投与が、この特異な炎症反応に対して何らかの作用を及ぼすかも知れないと考え、この症例に IFN- α の投与を試みることにしたのでした。IFN- α の投与後から CRP 値は速やかに陰性化し、悪化していた骨病変も10週後には、ほぼ正常化しました（図16：前腕の X-p, 10週後）。骨シンチでも右前腕遠位端の異常な取り込みが消失している事がわかりました（図13右）。そこで、IFN- α の投与を中止したところ、10日後に再び、右手関節の可動制限と炎症反応の上昇を認めました。しかし、IFN- α の再投与により再び速やかに沈静化したことから、結果として IFN- α による病勢の鎮静効果が再確認できました。

この稀有で極めて印象的な経過をたどった症例



1999年入院時

図12 CRMO患者の入院時の写真と骨のX-p

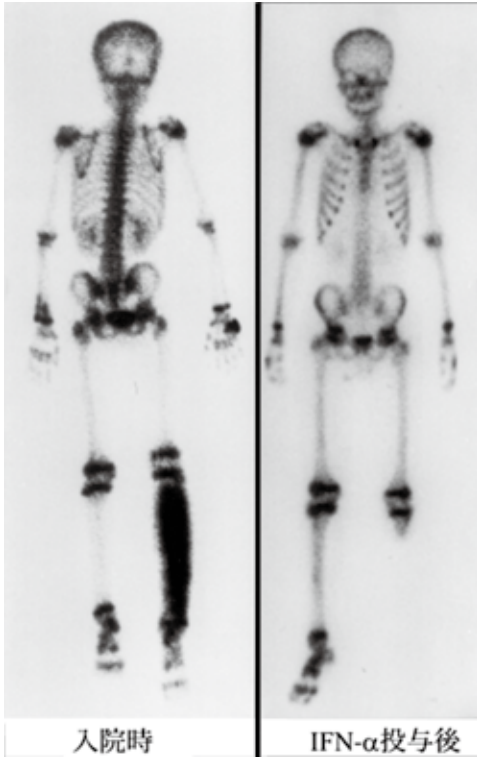


図13 CRMO患者の99mTc骨シンチ

は、病理像もはっきりしており、IFN- α の効果も再確認できている事から、日本小児科学会雑誌に症例報告として投稿しました。しかしながら、長い間返答を待ったのちに、『編集委員会で、十分検討の結果、当誌には不相当と判断されたので、ここに同封し返送します』とのコメントとともに『掲載不可』との返答が返ってきたのでした。この事は非常に残念でしたが、その後、臨床小児医学に投稿し、無事に掲載されました¹¹⁾。IFN- α がなぜ著効したのか、今も不明です。しかし、どこかで同じような事で悩んでいる患者さんがいる可能性がある限り、いかなる雑誌あるいは形式にしろ、こうした症例を報告する事は重要な事だと思っています。もし、皆さんが類似の症例に遭遇する事があったならば、是非、治療の選択肢の一つに考えていただきたいと思います。

総括

以上、私が若い頃に経験した印象に残る四つの事柄について紹介させていただきました。

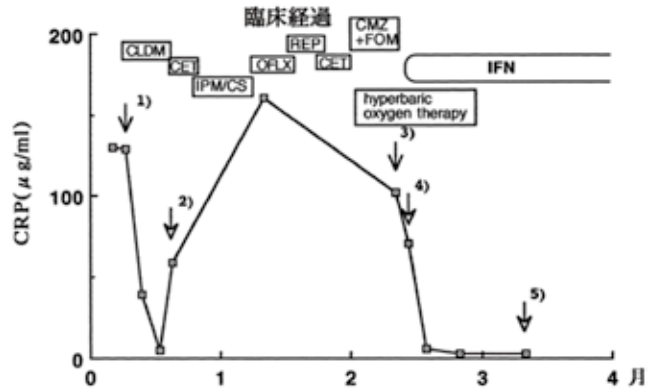


図14 臨床経過

- 1) 左下腿切断, 2) 右手関節疼痛出現, 3) IFN投与開始, 4) 右手関節疼痛軽減, 発熱の消失, 5) 右手関節の疼痛, 腫脹の消失

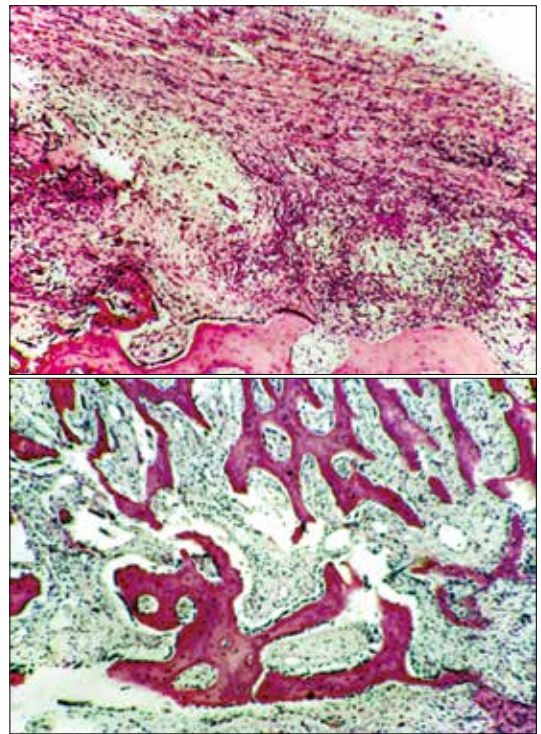


図15 病理組織

- 上：肥厚した骨膜骨膜下の好中球・単球からなる炎症細胞浸潤
- 下：骨芽細胞の縁取りの著しい新生骨梁及び骨の線維性置換

1980年前後から始まった免疫学の数々の成果が現代の医療に大きな影響を与えています。

reverse geneticsの時代になり、初めに遺伝子

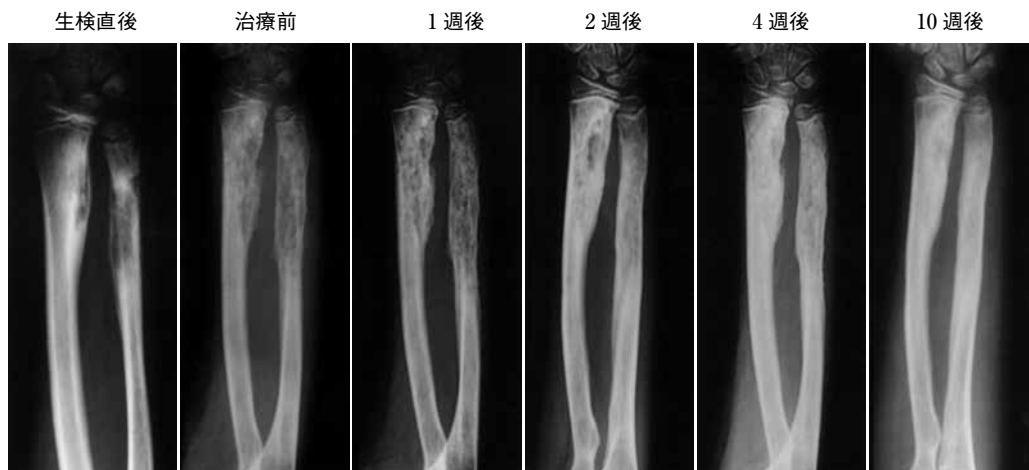


図 16 右前腕の X-p 所見の変化

検査ありきと言う風潮が定着しました。

それを元に、遺伝子治療、細胞治療の時代の入り口に差し掛かっています。

しかしながら、説明のつかない不思議な事例・病態がまだまだたくさんあります。この学会のテーマである小児の感染症がなくなることもありません。従って、私たちの前になすべきことはたくさんあります。技術革新が進んで、その気になれば、誰でも、どこでも、相応の検査・実験ができるようになりました。遺伝子のシーケンスなどは、いとも簡単にできる時代です。これは素晴らしい事だと思います。この素晴らしい環境を利用すれば、臨床をやりながらでも様々な研究にチャレンジできます。

一方で、臨床研究におけるレギュレーションが確立され、何かを行う前に、まず、たくさんの書類を提出しなければならないというハードルが、良くも悪くも存在するようになりました。それが、臨床研究に着手する事を躊躇させ、我々の自由な発想から生まれるリサーチを実践しようとする時に、大きな障害になっている事も事実のようです。

診療においてもそうです。今の医療では、適応のない薬を使用する事のハードルは当時とは比べものにならないほど高くなってきました。rIL-2 や IFN- α の投与、さらには、はじめに紹介した CGD の患者さんへのサルファ剤の大量投与など

の医療行為は、適応外使用として大いに問題視されるかも知れません。また、保存された髄液のサイトカインの測定なども、倫理委員会の審査を経なければ許されない状況になっています。

しかし、そんな事に影響されてはダメです。必要な手続きは面倒がらずにさっさと済ませて、今あるすばらしい環境を無駄にする事なく、どんなに小さなテーマであってもリサーチを続ける努力をするべきです。症例報告もリサーチなのです。その努力がきっと better patient care につながると思う訳です。

長々と書いてきましたが、読者の皆さんに伝えたい事事を一言で言えば、“一例報告を大切にすることが重要である！”という言葉に集約されると思います。

文 献

- 1) Azuma H, et al : Cytochrome b positive X-linked chronic granulomatous disease: a normal cell surface expression of cytochrome b. *Eur J Pediatr* 151 : 279-282, 1993
- 2) Azuma H, et al : A new mutation in exon 12 of the gp91-phox gene leading to cytochrome b-positive X-linked chronic granulomatous disease. *Blood* 85 : 3274-3277, 1995
- 3) Azuma H, et al: Effect of interleukin 2 on intractable herpes virus infection and chronic eczematoid dermatitis in a patient with Wiskott-Aldrich

- syndrome. *Eur J Pediatr* 152: 998-1000, 1993
- 4) Molina IJ, et al : T cells of patients with the Wiskott-Aldrich syndrome have a restricted defect in proliferative response. *J Immunol* 151 : 4383-4390, 1993
 - 5) Azuma H, et al : Impaired interleukin-2 production in T cells from a patients with WAS : basis of clinical effect of interleukin-2 replacement therapy. *Eur J Pediatr* 159 : 633-634, 2000
 - 6) Jyonouchi S, et al : Phase I trial of low-dose interleukin 2 therapy in patients with Wiskott-Aldrich syndrome. *Clin Immunol* 179 : 47-53, 2017
 - 7) 東 寛, 他 : 血清中 Interleukin 6 (IL6) 活性の基礎値の加齢に伴う変動について. *日本小児科学会雑誌* 96 : 1177-1181, 1992
 - 8) 東 寛, 他 : 無菌性髄膜炎および川崎病における髄液中 Interleukin6 (IL6) 濃度の検討. *日本小児科学会雑誌* 97 : 929-935, 1993
 - 9) 東 寛, 他 : 無菌性髄膜炎における髄液中 Interleukin 6 (IL6) の動態について—髄液中 IL6 濃度は細胞増多に先行して上昇する—. *日本小児科学会雑誌* 97 : 2332-2333, 1993
 - 10) Azuma H, et al : Clinical significance of cytokines measurement for the detection of meningitis. *J Pediatr* 131 : 463-465, 1997
 - 11) 東 寛, 他 : Interferon- α が著効した骨化性線維腫様の組織像を有する慢性骨髓炎の 1 例. *臨牀小児医学* 41 : 99-104, 1993

* * *