

C. 研究結果

2013年には、160症例の検体を受けた。そのうち、15例が複合免疫不全症であり、 γc (IL2RG遺伝子) 異常を4例、RAG2を1例、LIG4を1例、STAT5Aを1例で同定した。また、WAS遺伝子異常を6例で同定した。WAS患者については、2例がバンガラデシュ人、パキスタン人であり、日本人1例と合わせ、HLA一致骨髄、臍帯血バンクに適合ドナーを得られなかったため、こうした患者に関しては、遺伝子治療の対象となると考えられる。

新生児マススクリーニングについては、成育医療研究センター内での出生新生児に希望者に対して、同意取得後スクリーニングを行うべく、技術移転を開始した。更に、埼玉県内の出生新生児から得られた濾紙血を成育医療研究センターでTREC、KREC測定をするべく、意見交換を開始した。また、東京都については、東京都予防医学協会と方法、体制等について、意見交換を行った(別図)。

10カラーを用いた少量血液による二次検査方法を確立した(図2A、2B)。約250 μ lの血液から、T細胞分画、B細胞分画、NK細胞分画、単球分画の評価が可能である。TREC、KREC解析についても、当科に紹介された症例全例で検討した。CVIDとされる患者でも、B細胞新生能低下例(B群1例)、T細胞新生能低下例(C群10例)、両方の低下例(D群8例)を認めた。

D. 考察と結論

2013年に当科では160例の原発性免疫不全症疑い患者の紹介を受けた。その中で、遺伝子治療の対象疾患となり得る2疾患(XSCIDとWAS)については、10例を遺伝子診断した。新生児マススクリーニングによる患者リクルートを行い、確定診断のためのFACS解析方法も確立され、遺伝子解析も速やかに行うことが可能である体制を構築した。

来年度は、実際に病院レベル、自治体レベルでのパイロットスクリーニングを行うべく、準備を行ってきたい。

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Kawasaki Y, Toyoda H, Otsuki S, Iwasa T, Iwamoto S, Azuma E, Itoh-Habe N, Wada H, Fujimura Y, Morio T, Imai K, Mitsuiki N, Ohara O, Komada Y. A novel

Wiskott-Aldrich syndrome protein mutation in an infant with thrombotic thrombocytopenic purpura. *Eur J Haematol* 90: 164-168, 2012

- 2) 今井耕輔. 【乳幼児健診Q&A】 歯科 口の中にミルクのかすのようなものがいつもありますが、大丈夫ですか. 小児科診療. 11:2045-2048, 2012
 - 3) 今井耕輔. 【知っておきたい内科症候群】 膠原病・免疫・アレルギー 《免疫不全症》 ウィスコット・アルドリッチ症候群. 内科 109:1501-1503, 2012
 - 4) Kamae C, Nakagawa N, Sato H, Honma K, Mitsuiki N, Ohara O, Kanegane H, Pasic S, Pan-Hammarström Q, van Zelm MC, Morio T, Imai K, Nonoyama S. Common variable immunodeficiency classification by quantifying T-cell receptor and immunoglobulin κ -deleting recombination excision circles. *J Allergy Clin Immunol* 131:1437-1440, 2013
 - 5) Yoshimi A, Kamachi Y, Imai K, Watanabe N, Nakadate H, Kanazawa T, Ozono S, Kobayashi R, Yoshida M, Kobayashi C, Hama A, Muramatsu H, Sasahara Y, Jakob M, Morio T, Ehl S, Manabe A, Niemeyer C, Kojima S. Wiskott-Aldrich syndrome presenting with a clinical picture mimicking juvenile myelomonocytic leukaemia. *Pediatr Blood Cancer* 60:836-841, 2013
 - 6) 今井耕輔. TREC, KRECによる原発性免疫不全症のスクリーニング. 小児内科 45:1148-1151, 2013
 - 7) 今井耕輔. 新生児スクリーニングによる原発性免疫不全症の診断. 小児科臨床 66:1025-1032, 2013
2. 学会発表
 - 1) Imai K. Screening for Primary

Immunodeficiency Diseases using
TREC and KREC. Symposium (1)
Primary immunodeficiency. East
Meets West.

The Asia Pacific Association of
Pediatric Allergy, Respiriology &
Immunology 2012 (APAPARI 2012).
Taipei, Taiwan. Oct. 19-21, 2012.

- 2) Tezuka M, Imai K, Okawa T,
Tomizawa D, Takagi M, Kajiwara M,
Nagasawa M, Morio T, Mizutani
S. Fatal Outcome Due to
Parainfluenza-3 Pneumonitis in a
Patient with Atypical Complete
DiGeorge Syndrome.
The 4th JSH International Symposium
2013. in Ehime. May 24-25. 2013.
- 3) 今井耕輔, 先天性免疫不全症にお
ける遺伝子診断法. 第116回日本
小児科学会学術集会. 総合シンポ
ジウム5. 2013年4月19日, 広島
- 4) 今井耕輔, 原発性免疫不全症に対
す
遺伝子治療の現状と展望 シン
ポジウム 3 小児免疫不全症の現
状と展望 (教育セッション 5 免
疫不全) 第55回日本小児血液・が
ん学会学術集会. 2013年11月30
日, 福岡
- 5) 土持太一郎, 安藤久美子, 落合秀匡,
池原甫, 井上祐三朗, 菱木はるか,
小林弘信, 岩倉英雄, 遠藤真美子,
下条直樹, 満生紀子, 今井耕輔, 森
尾友宏, 小原 収. CHARGE症候群
に重症複合型免疫不全を合併し
た1例. 第4回関東甲越免疫不全症
研究会, 2013年9月22日, 東京

F. 知的所有権の出願・取得状況

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。

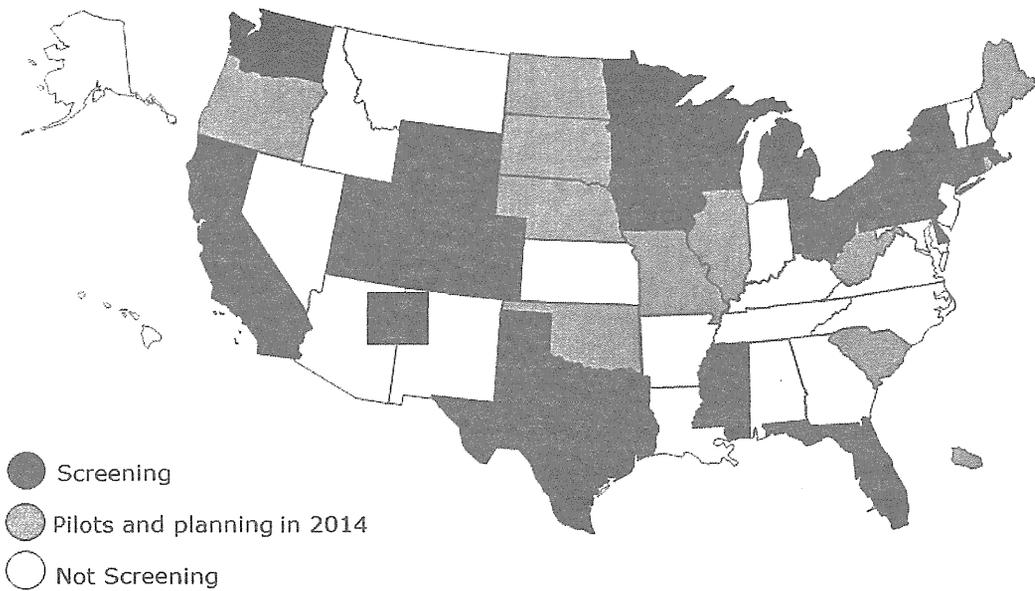


図1：米国におけるTRECを用いたT細胞欠損症の新生児マススクリーニングプログラムの導入状況。Screening：マススクリーニング実施中の州（19州と地域）、Pilots and planning in 2014：2014年中にマススクリーニング開始予定の州（12州と地域）、Not Screening：州議会で開始が認められたが、具体的には開始していない州（6州と地域）あるいはそれ以外（13州）（IDF SCID Newborn Screeningサイトより、<http://idfscidnewbornscreening.org>）

Sample ID; 2010SR002 (川口市立医療センター)
Assay date; 2014.01.30

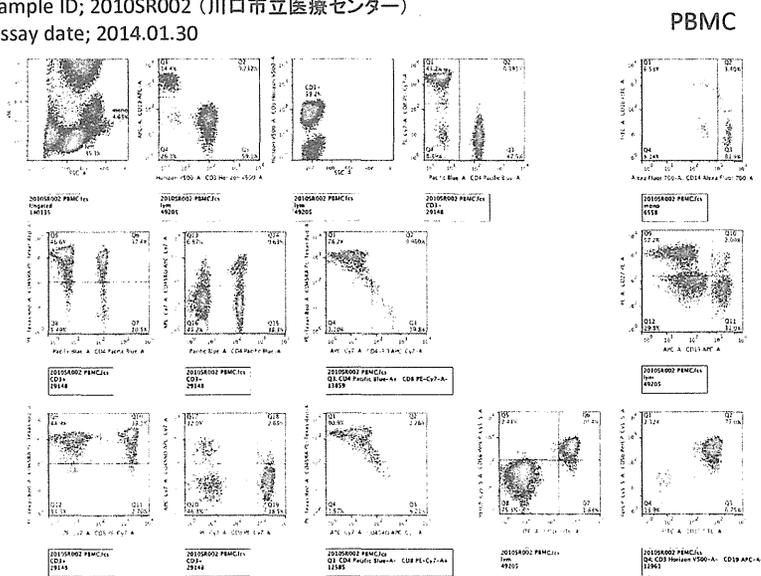


図2 A：正常新生児のリンパ球分画

Sample ID; TT Baby (神奈川県立こども医療センター)
 Assay date; 2013.05.16

PBMC

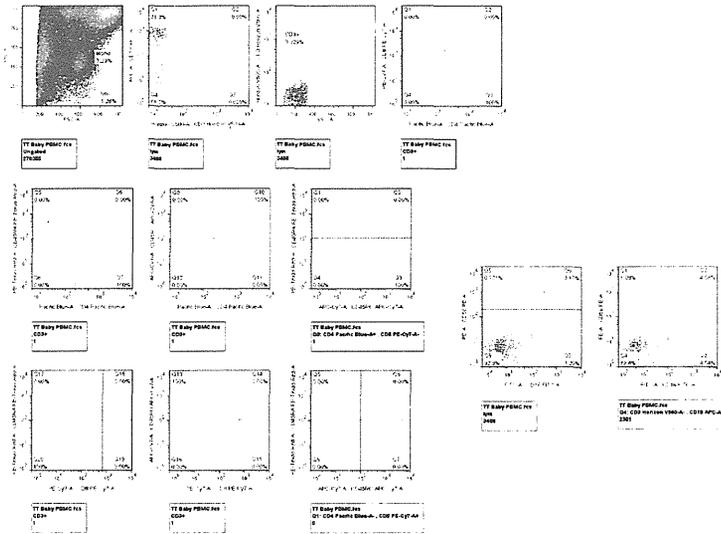


図 2 B : XSCID 新生児のリンパ球分画

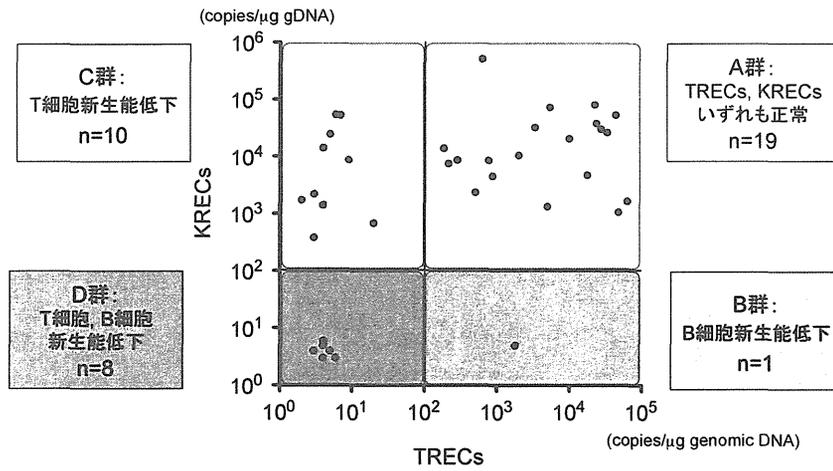


図 3 : TREC, KREC で亜群分類した CVID 患者

遺伝子治療対象疾患のハイリスクスクリーニング法の確立とその臨床応用

研究分担者 奥山 虎之 国立成育医療研究センター臨床検査部 部長
研究協力者 小須賀基通 国立成育医療研究センター臨床検査部 医長

研究要旨

遺伝子治療の対象疾患として、原発性免疫不全症候群とライソゾーム病が注目されている。これらの疾患は、発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できないため、ハイリスクスクリーニング法の確立が必要である。本研究ではライソゾーム病の早期あるいは発症前診断を可能にするハイリスクスクリーニング法を確立し、臨床応用することを目的とする。ポンペ病を対象疾患としてろ紙血検体を用いた酸性グルコシダーゼ活性測定によるスクリーニング法を確立した。2013年1月から2013年12月までにポンペ病ハイリスクスクリーニング患者288検体にスクリーニング検査を行った。その結果、3例（1.04%）のポンペ病患者を診断した。また pseudodeficiency（偽欠損）（6.6%）を19例で認めた。乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量によるハイリスクスクリーニングは、遺伝子治療などの治療が可能なライソゾーム病の早期発見に応用可能と考えられる。

A. 研究目的

遺伝子治療の対象疾患として、原発性免疫不全症候群とライソゾーム病が注目されている。特に、ライソゾーム病では、酵素補充療法の効果が乏しい中枢神経症状に有効性が期待できる遺伝子治療の開発が望まれている。すでに欧州を中心に遺伝子治療の臨床試験が実施され、その有効性が報告されている。しかし、どんなに優れた治療法が開発されても、発症前あるいは発症早期に治療を導入しない限り、望ましい効果は期待できない。上記の事情を考慮し、本研究ではライソゾーム病の早期あるいは発症前診断を可能にするハイリスクスクリーニング法を確立し、臨床応用することを目的とする。

B. 研究方法

ポンペ病は、ライソゾーム酵素のひとつである酸性グルコシダーゼの先天的欠損を原因とする常染色体劣性遺伝病であり、乳児型の心筋肥大や小児・成人期の近位筋の筋力低下、呼吸筋の障害で発症する。本病は、発症前もしくは早期に酵素補充療法を開始することにより、生命予後や QOL の改善が最も得られる。本年度は、ライソゾーム

病の中でも、特に早期発見が重要なポンペ病について、乾燥ろ紙血を用いたハイリスクスクリーニング法を確立し、パイロット研究でその有用性を確認する。

1. スクリーニング法の確立

採取や輸送が簡便で侵襲の少ない乾燥ろ紙微量血検体から酸性グルコシダーゼの測定をする。蛍光人工基質である4メチルウンベリフェリルグルコシドを用いた酸性グルコシダーゼ酵素活性定量法を確立する。その際、非特異的なグルコシダーゼの活性を除去するために、アカルボースを反応液に添加する。

2. ポンペ病ハイリスクスクリーニングの実践

上記の診断技術を用いて、原因不明の心筋肥大や筋力低下を呈する症例のハイリスクスクリーニングを行う。活性低値を呈した症例については、pseudodeficiency（偽欠損）の可能性を考慮して、G576S 多型の検出により診断する。

（倫理面への配慮）

本研究は、国立成育医療研究センター倫理委員会の承認を受けて行った。

C. 研究結果

1. 乾燥ろ紙血を用いた酵素活性測定は、ポンペ病患者と非ポンペ病患者を識別するのに有用な方法であった (図 1)。

図 1. ポンペ病ハイリスクスクリーニング結果 (2013.1.1~2013.12.31)

	件数	頻度 (%)
総検査数	288	100
ポンペ病患者	3	1.04
pseudodeficiency	19	6.60
非ポンペ病患者	266	92.36

2. ポンペ病ハイリスクスクリーニングを 2013 年 1 月から 2013 年 12 月末までに 288 症例に行い、3 例 (1.04%) のポンペ病患者を診断した。また pseudodeficiency (偽欠損) を 19 例 (6.6%) で認めた。

D. 考察

ポンペ病の診断は、従来、筋生検による病理学的診断や皮膚線維芽細胞を用いた酵素活性測定により診断されてきた。しかし、いずれの方法も侵襲を伴う検査であり、検査の適応が限られてきたため、非侵襲的な検査による診断が望まれてきた。今回、我々は、乾燥ろ紙血検体を用いた非侵襲的な検査でポンペ病をスクリーニングし、血中の白血球を用いた遺伝子検査で確定診断する方法を確立した。これにより、筋生検や皮膚生検という侵襲的な検査をすることなく、ポンペ病が診断できるようになった。また、検査に要する時間が短縮され、費用も削減できることにより、医師が検査を積極的にするようになり、ポンペ病と診断される患者が増加した。同様の方法は、他の多くのライソゾーム病の診断に応用可能であり、我々は遺伝子治療などの治療が可能なライソゾーム病の診断法確立を目指している。

E. 結論

乾燥ろ紙血を用いた酵素活性定量によるハイリスクスクリーニングは、ライソゾーム病の早期発見に有用である。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. Okuyama T, Yotsumoto J, Funato Y. Survey of second-trimester maternal serum screening in Japan. J Obstet Gynaecol Res. 39:942-947, 2013.
2. Tajima G, Sakura N, Kosuga M, Okuyama T, Kobayashi M. Effects of idursulfase enzyme replacement therapy for Mucopolysaccharidosis type II when started in early infancy: comparison in two siblings. Mol Genet Metab. 108: 172-177, 2013.
3. Niizeki H, Shiohama A, Sasaki T, Seki A, Kabashima K, Otsuka A, Takeshita M, Hirakiyama A, Okuyama T, Tanese K, Ishiko A, Amagai M, Kudoh J. The novel SLC02A1 heterozygous missense mutation p.E427K and nonsense mutation p.R603* in a female patient with pachydermoperiostosis with an atypical phenotype. Br J Dermatol. doi:10.1111/bjd.12790. 2013 Dec 16.
4. 後藤由紀、柿島裕樹、藤直子、渡辺靖、小関満、松林守、木田和宏、小須賀基通、奥山虎之。ポンペ病を対象とした新生児マススクリーニングの運用、日本マススクリーニング学会誌、23:51-55, 2013.

2. 学会発表

1. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M, Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S : EFFICACY OF

- ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS
HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON
BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II, 12th
International Congress of Inborn Errors of
Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4.
2013.
2. M. Kosuga, K. Kida, H. Nakajima, J. Fujimoto, T. Okuyama: Development of a new method for diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. 12th International Congress of Inborn Errors of Metabolism, Barcelona, Spain, September. 4. 2013.
 3. 奥山虎之:患者登録と新規治療の開発法(シンポジウム:先天性希少疾患の治療の進歩と患者会の役割). 第116回日本小児科学会学術集会学会、広島、2013. 4. 19.
 4. 小須賀基通、木田和宏、藤直子、奥山虎之:5つのライソゾーム酵素同時測定によるライソゾーム病の新たなスクリーニング法. 第116回日本小児科学会学術集会学会、広島、2013. 4. 19.
 5. 田中あけみ、鈴木健、奥山虎之、濱崎孝史、藤川研人、坂口知子、小田絵里、藤直子、斎藤三佳、澤田智 北川照男:三施設共同によるライソゾーム病スクリーニング・パイロットスタディ2年6か月のまとめ. 第40回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013. 8. 24.
 6. 奥山虎之:ライソゾーム病に対する新生児マス・スクリーニングの現状と今後の課題(シンポジウム). 第40回日本マス・スクリーニング学会学術集会、大阪、2013. 8. 24.
 7. M. Kosuga, H. Nakajima, K. Kida, J. Fujimoto, T. Okuyama. Diagnosis of adrenoleukodystrophy using liquid chromatography-mass spectrometry. American Society of Human Genetics 63rd Annual meeting. Boston, USA. 2013, October 24.
 8. Tanaka A, Okuyama T, Suzuki Y, Sakai N, Hamazaki T, Kosuga M. Sawada T, Yabe H, Ishige M, Mugishima H, Kato S. EFFICACY OF ENZYME REPLACEMENT THERAPY VERSUS HEMATOPOIETIC STEM CELL TRANSPLANTATION ON BRAIN INVOLVEMENT IN MPS II. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013. Nov. 27.
 9. A. Wakiyama, Y. Oda, Y. Yamada, H. Fujisawa, M. Yotsuya, H. Tsuda, M. Furujo, T. Kubo, T. Okuyama. Application of clinical path in enzyme therapy for uniformization of nurse operations. The 3rd Asian Congress for Inherited Metabolic Diseases (ACIMD)/The 55th Annual Meeting of The Japanese Society for Inherited Metabolic Diseases (JSIMD). Maihama, Chiba, 2013. Nov. 28.
 10. 田中あけみ、濱崎孝史、桜庭均、斎藤静司、鈴木健、奥山虎之、門野千穂、坂口知子、工藤聡志、藤川研人、小田絵里、藤直子、澤田智、斎藤三佳、北川照男
Iduronate-2-sulfatase の pseudodeficiency allele は意外に多く存在する? 日本人類遺伝学会第58回大会、仙台市、2013. 11. 23.
- H. 知的所有権の取得状況 (予定を含む)**
特になし。

北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) の構築とその集計結果について

研究分担者 有賀 正 北海道大学大学院医学研究科小児科学分野 教授

研究要旨

北海道で発生した全ての原発性免疫不全症 (PID) 患者の把握のため、道内 3 医育大学小児科の協力で、北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) を構築した。北海道で発生した PID 患者の疫学情報、早期診断、早期治療、情報交換などが得られる体制が構築され、より良い診療体制が整備された。

A. 研究目的

原発性免疫不全症 (PID) は稀な疾患である。PID には疾患数が極めて多く、中には適切に診断されない症例も存在する可能性がある。全国の PID 発生数を見ると、PID 専門医がいる地区からの患者数は少ない地区に比して多い傾向にあり、正確な疫学情報は不明とも考えられる。PID には早期診断、治療が必須な疾患もあり、一般小児科医が PID を認知する事が重要であると考えられる。北海道地区は地理的に他の地区から独立した特徴があり、道内各地の基幹病院が全て 3 医育大学の関連病院となっているという背景から、3 医育大学の小児科が協力すれば道内に発生した全ての PID 患者を把握できる事が期待される。そこで、道内 3 医育大学小児科の協力を得、北海道原発性免疫不全症患者データベース (PIDH) を構築する事を目的とした。

B. 研究方法

既に全国的には日本免疫不全症研究会（野々山恵章会長）が中心となっている日本免疫不全症患者データベース (PIDJ) が運営されており、その協力体制としてかずさ DNA 研究所による責任遺伝子解析や理研免疫・アレルギー化学総合研究センター (RCAD) によるデータベースの構築と維持管理があげられる。今回、北海道地区で全ての PID 患者を

PIDH とりまとめ、PIDJ への橋渡しを行いながら、道内全ての患者の把握を継続して実施する体制を構築した。北海道大学小児科、札幌医科大学小児科、旭川医科大学小児科から担当者を指名し、それぞれの関連病院全てにおいて診断された（または診断を疑う）PID 患者全てを報告してもらう様（事務局：北大小児科）に協力体制を築いた。登録方法はできるだけシンプルになる様試みた（図 1.）。

患者基本情報		登録歴
患者氏名		
患者氏名(アルファベット読み)		
性別		
生年月日(西暦)		
病歴		
診断名*		
最終病名(西暦)		
最終病状	生存、死亡、不明	
近親者の有無**	有、無、不明	
自己免疫疾患の有無**	有、無、不明	
リンパ腫腫瘍の有無**	有、無、不明	
その他の合併症**	有、無、不明	
患者診断施設		

*確定診断がないときは暫定診断名

**いずれかに○

PIDJ の取得のために必要な情報です。一つでも情報が欠落していると登録できませんのでよろしくお願ひ致します。

図 1. PIDH 登録様式

事務局から PIDJ に登録し、えられた ID はそのまま PIDH の ID として用いた。これにより、主治医の異動や患者の転居によっても情報管理が容易であり、他の地区の PID 研究施設への相談もこの ID を用いる事で可能となった。患者名の入った情報は封書郵送を原則とし、事務局で ID を得た後は、ID のみで運用した。

以下に示す図2に北海道で発生したPID患者の登録、集計の流れを示す。年1回の北海道免疫不全研究会において、最新の情報を提供するとともに、定期的にPIDHの登録状況などを報告する機会とした。

北海道の原発性免疫不全症 (PID) 患者の登録、集計の流れ

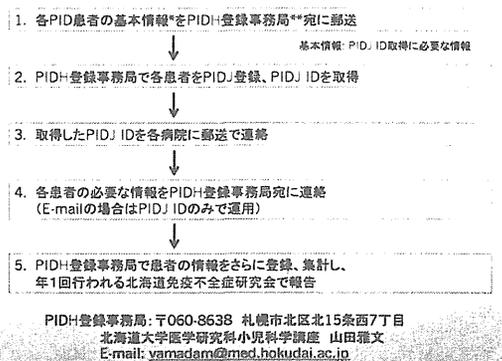


図2. 北海道のPID患者の登録、集計

C. 研究結果

2006年以降、PIDHに登録された症例は72例(生存65例、死亡7例)で、造血幹細胞移植例24例(生存22例、死亡2例)であった。

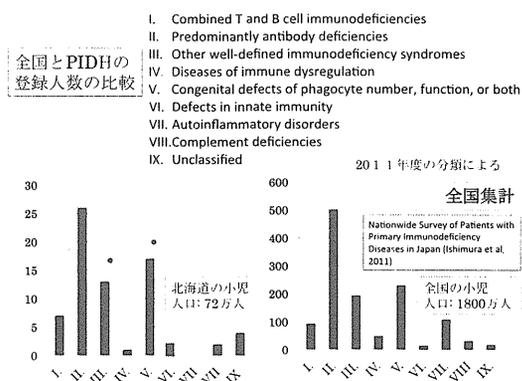


図3. PIDHとPIDJの登録状況の比較

登録の状況を2007年の全国集計と比較すると、概ね同様の傾向を認めた。細かく分析すると、PIDHでは、III群とV群が多く、VII群が少ない事が指摘できる。事務局である北大が主な研究対象となっているWiskott-Aldrich症候群(III)、慢性肉芽腫症(V)との関連が示唆された。また、VIIの自己炎症症候群では病因遺伝子が確定していない症例がこのグラフでは含まれていない事が反映されている

と思われた。

PIDHのシステムが構築され、道内に周知されていった結果、診断に関する相談も事務局へ多くなってきており、このシステムがより機能する事によって、道内全てのPID患者さんに早期診断、早期治療が可能になる事が期待される。

D. 考察

道内3医育大学小児科の協力により、PIDHのシステムが構築された。既に全国システムのPIDJに登録されていた症例に加えて、新たに20例近くのPID患者が登録された。PIDHに登録されたPID疾患分類の分布は全国のPIDJの分布と類似していたが、北大がこれまでで主な研究のテーマとしてきた疾患を含む

III、V群が多く、興味深い結果であった。また、PIDHではVII群の自己炎症症候群の症例が未登録であり、今後の登録動向が注目される。一方、診断の再評価が必要な症例見られ(CVID→XLA)、一般病院での正しい診断に必要な情報も浮き彫りになってきている。また、PIDHシステムの周知が進み、大学間の垣根を越えての相談事例も増えてきている。このシステムがより活用され、北海道地区では、より多くのPID患者の早期診断、早期治療が実現できる体制となることを期待したい。また、これまでに確立された疾患には該当しない様な病態を示す症例に関しては、他施設との共同研究などを通じて新たな責任遺伝子を検出し、その病態を解析する事によって新しいPID疾患概念の確立を目指したい。

E. 結論

道内3医育大学小児科が協力し、PIDHを構築した。PIDHは、単なる登録のシステムではなく、全例登録による全体像の疫学的把握、疑い例の拾い上げ、集計結果のフィードバック、最新の情報交換が可能になるなど、様々な面でスキルアップが期待されるシステムである。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Ariga T: A possible turning point in the hematopoietic stem cell gene therapy for primary immunodeficiency diseases?: lentiviral vectors could take the place of retroviral vectors. Expert Rev. Clin. Immunol. 11, 1015-1018, 2013.
- 2) Kanegane H, Taneichi T, Nomura K, Wada T, Yachie A, Imai K, Ariga T, Santisteban I, Hershfield MS, Miyawaki T. Successful bone marrow transplantation with reduced intensity conditioning in a patient with delayed-onset adenosine deaminase deficiency. Pediatr Transplant. 17, E29-E32, 2013
- 3) Horino S, Sasahara Y, Satoh M, Niizuma H, Kumaki S, Abukawa D, Satoh A, Imaizumi M, Kanegane H, Kamachi Y, Kobayashi I, Ariga T, Tsuchiya S, Kure S. Selective expansion of regulatory T cells in mixed chimera after allogeneic bone marrow transplantation in a patient with IPEX syndrome. Pediatr Transplant. 18: E25-E30, 2014.

2. 学会発表

- 1) 山田雅文、大倉有加、竹崎俊一郎、山崎康博、小林一郎、有賀 正、要藤裕孝、古谷野 伸、小原 収：北海道における原発性免疫不全症患者登録システム（PIDH）の構築とその集計結果について。日本免疫不全研究会 2012年1月 福岡
- 2) 有賀 正 特別講演：日常診療での原発性免疫不全症と最新のトピックス。第4回信州東海免疫不全症研究会 2013年7月6日 名古屋

慢性肉芽腫症登録事業に関する研究

研究分担者 布井 博幸 (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野 教授)
研究協力者 西村豊樹、小原 めぐみ (宮崎大学医学部生殖発達医学講座小児科学分野)
水上智之(国立病院機構熊本医療センター)
今井 耕輔(東京医科歯科大学小児科大学院・周産期地域医療学)

研究要旨 日本における慢性肉芽腫症の調査について、全国での免疫不全患者登録システム(PIDJ; Primary Immunodeficiency in Japan)が考案され、PIDJ に登録されている。これまで宮崎大学で集計した患者データと PIDJ のデータを統合し検討した。慢性肉芽腫症患者の発生頻度が人口ベースでやや高くなったこと、全国的な患者分布など、情報収集法の良い面が多いと思われた。ただ、病型分類での偏り、死亡原因や移植関連死など個人情報もあり、詳細な情報のフィードバックの難しさも問題点の一つである。

A・研究目的

日本における慢性肉芽腫症(CGD; Chronic Granulomatous Disease)の調査研究をこれまでに行い、2006年には全国統計結果と gp91^{phox} 蛋白の新しい機能ドメイン異常、また2008年には慢性肉芽腫症への造血幹細胞移植方法に関する提言を行って来た。4年前より全国での免疫不全患者登録システム(PIDJ; Primary Immunodeficiency in Japan)が考案され、CGD もこのPIDJ に登録される様になり、患者登録が変わってきたので、これまで宮崎大学で集計した患者データと PIDJ のデータを統合し、検討したので報告する。これらのデータはゲノム・遺伝子解析および疫学に関する倫理指針に基づき、各研究機関にて、患者および患者家族からのインフォームド・コンセントをもらった後に行われている。

B・研究方法

1) PIDJ 登録患者とこれまでの患者データベース:
2009年までに宮崎大学に相談があった症例で、主にDHR-123法でCGDと診断されたのは286名であった。免疫不全としてPIDJに登録されていた免疫不全患者は2779名で、その内CGDとして登録されていた患者は166名、疑い患者12名、および登録重複患者13名を除外すると141名であった。各県別発生頻度、各年齢別発生頻度については、

2011と2012年総務省統計局統計調査部国勢統計課「国勢調査報告」「人口推計年報」基に計算した。

C・結果

1) これまでのCGDデータベースと症例の照合を行ったところ、図1の様に、両データベースで重複していた症例が91例、宮崎CGDデータベースのみで登録されていた症例は195例、PIDJデータベースのみで登録されていた症例は50例であった。この50例中2000年前後で21例と29例の登録がなされていた。2000年以降に診断された患者76名の約43%がPIDJデータベースに登録されており、重要なデータとなっている。

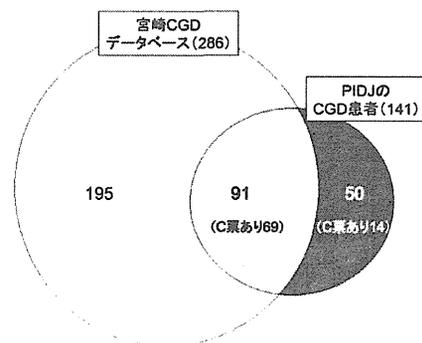


図1:日本のCGD患者データベース

2006年以降は19例であったことから、宮崎CGDデータベースでもかなりの(2006年以前でも31名)登録落ちがあっ

た。反対に PIDJ データベースだけでは全体像が見れず、両データベースを統合し解析する必要があると思われた。

2) 病型分類では表1に2013年までと括弧内に2007年度の統計を示した。2013年までには、総数336例が登録されており、その患者内は138名の病型未定の患者を除くと、gp91, p22, p47, p67 欠損患者は各々167例(80%), 16例(8%), 11例(5.3%), 14例(6.7%)であった。以前に報告した比率よりも gp91 欠損患者比率がむしろ増加している。

CGD 亜型	患者数	対象全数: 208(158)	対象全数: 336
		比率	比率
gp91-	167(118)	80.2 (74.7)%	49.7%
p22-	16 (16)	8 (10.7)%	4.7%
p47-	11 (11)	5.3 (7)%	3.2%
p67-	14 (12)	6.7 (7.6)%	4.1%
unknown	138		41.0%

表1:CGD の病型分類

2) 各都道府県での患者発生状況(図3)

届け出病院の所属県別 CGD 患者を各県の10,000,000人口当たりの患者数として表した。所属県が判らない15名は除外し、321名を対象に解析した。九州でやや多く、関東から東北ではやや発生が低いのではないかとと思われる。まだPIDJにも登録していただいていない施設もあり、協力が必要だと思われる。

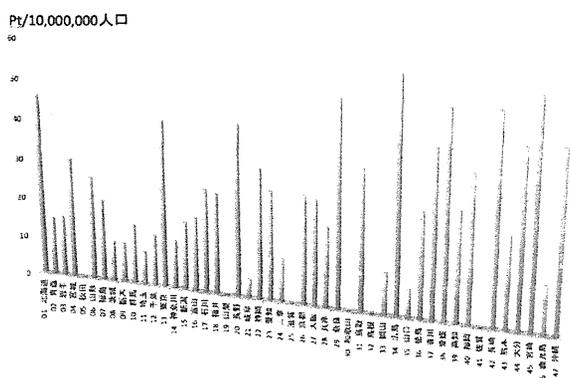


図2:県別 CGD 発生頻度

4) CGD 患者発生頻度について:

各年代の CGD 患者数を各世代の人口で除して発生頻度を計算した。診断技術や発生頻度が安定していると考えられる1970年から2010年の間で、統計解析を行った。結果、同世代人口100万人に 5.13 +/- 1.63 例で、19.4万人に一人の比率であった。

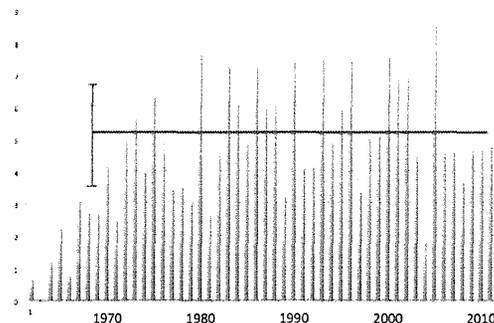


図3:各年代毎の CGD 患者発生率(100万人人口当たり)

5) CGD 患者の死亡者解析:

調査期間中死亡された方は73名/336名で、平均死亡率は22%であった。死亡された患者の生年を図4の赤のカラムに示した。生死の記録が十分検証されていないので、参考資料としていただきたい。

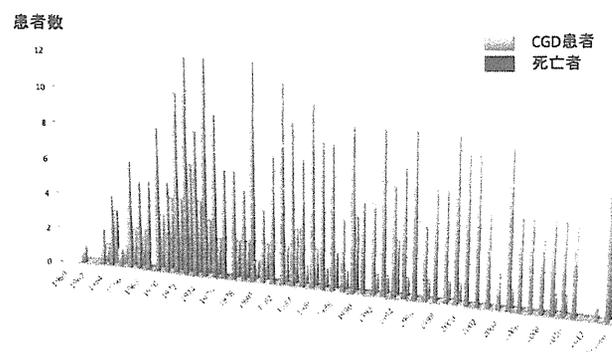


図4:各生年での CGD 患者数と死亡者数

6) 死亡原因の解析

横軸に患者の生年、縦軸に死亡年齢を示した。死因については判っている患者65名についてシンボルで示した。

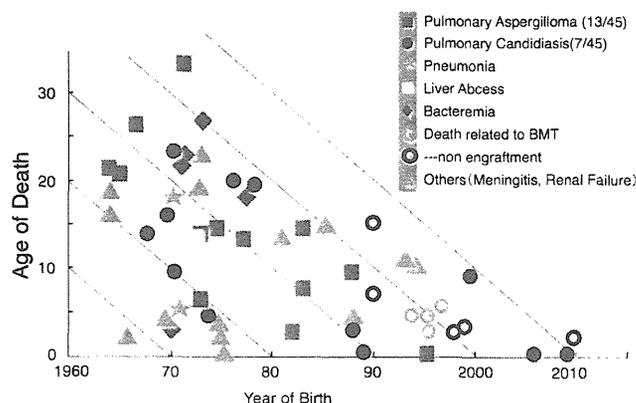


図5:死亡原因分類

斜線内に10年毎の死亡原因が判る。1970年代には低年齢でのその他(髄膜炎、腎不全)での死亡が多いが、1980-

1990年代は真菌(Aspergilloma, Candidasis)が、2000年に入ってから、真菌(特に Candidasis)と移植関連死亡例が認められている。移植関連の資料については、2008年の厚労省研究の一環としての解析結果などを参照。

D. 考察

データ収集に関して、宮崎および PIDJ の CGD データベースでの登録症例は各々195例と50例で、重複症例が91例であった。PIDJ のみに登録されていた50例中、2006年以降は19例であった。2006年以前までの宮崎 CGD データベースでも31名の登録が落ちている。また、CGD 患者発生率は、2006年に22.5万人に1人と推定していたが、PIDJ 登録事業が開始されてからは19.4万人に一人となっていた。これらのことから、広域での調査登録事業の情報収集(診断技術と情報の収集方法)がPIDJ 導入により、改善されたと思われる。

各都道府県での患者発生率については、各県の人口比で表すと、九州にやや多く、東北ではやや発生頻度が低い様に思われた。しかし、多くの患者さんを見ておられる施設からの報告がまだ十分出ないと思われた。

病型分類については、gp91 欠損型の患者比率が80%台になっており、以前の75%より増加している。他の病型については、p67 欠損患者が新たに2例登録されたのみで、やはり、日本ではgp91 欠損以外の症例が少ないと考えられる(1)。

CGD 患者の10年毎の低年齢での死亡原因を見ると、1970年代には髄膜炎、腎不全での死亡が多いが、1980-1990年代は真菌(Aspergilloma, Candidasis)が、2000年代には、真菌(特に Candidasis)と移植関連死亡例が認められている。2005年までの詳細な統計では、28例の移植が実施されており、6例の死亡が確認されている(図5)(2)。2006年以降の移植数の把握が出来ていないが、以降7年間で3例の死亡があり、移植関連死は2例で、他の1症例は肉芽腫増大に伴う呼吸不全で亡くなっている。移植に伴う死亡も減少してきていると考えられる。しかし、詳細な事項に関しては、骨髄移植の内容や詳しい経過などは情報のフィードバックが頻回に行われなければ、やはり難しいと思われた。

E. 結論

2006年まで宮崎大学でデータ収集していたが、以降PIDJによるCGD データ収集が行われている。発生頻度、

地域分布などの解析から、情報収集法の良い面が多いと思われた。ただ、病型分類、死亡原因や移植関連死など詳細な情報のフィードバックが難しいのかもしれない。

参考文献

1. Ishibashi F, Nunoi H, Endo F, Matsuda I, Kanegasaki S., Statistical and mutational analysis of chronic granulomatous disease in Japan with special reference to gp91-phox and p22-phox deficiency. Hum Genet. 2000;106(5):473-81.
2. 布井 博幸ら、慢性肉芽腫症に対する骨髄移植のまとめ、平成16年度厚生科学研究費

G・研究発表

- 1) Konomoto T, Tanaka E, Imamura H, Orita M, Sawada H, Nunoi H. Nephrotic syndrome complicated by idiopathic central diabetes insipidus. *Pediatr Nephro*, In press, 2014.
- 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 O6-methylguanine methyltransferase (MGMT) promoter methylation. *J Pediatr Hematol Oncol*. 35(1), e38-41, 2013.

H. 知的財産圏の出現・登録状況、参考文献 なし

I. 知的財産権の出願・登録状況 なし

厚生労働科学研究費補助金（成育疾患克服等次世代育成基盤研究事業）
分担研究報告書

遺伝子・細胞治療実施に係る基盤整備

研究分担者 藤本純一郎 国立成育医療研究センター 理事長特任補佐室長

研究要旨 本研究に係る治験実施に関する枠組みについて臨床研究センター（現在の社会・臨床研究センター）の担当者との間で協議を行い、概要ならびに役割分担を決定した。今後、相手企業との協議あるいはPMDAとの協議に際も同行し情報共有を行うこととした。また、外国企業から送付された共同研究契約書の内容について、内容の吟味ならびに完全和訳を専任の弁理士へ仲介した。当センターは、本年度、臨床研究中核病院の指定を受けたため、本研究を推進できる強力な基盤ができた。

A. 研究目的

遺伝子・細胞治療の臨床研究開発に係る基盤整備を行い、医師主導治験等の開発を促進することを目的とする。

B. 研究方法

本年度、当センターは厚生労働省の臨床研究中核病院整備事業の指定を受けたことを受け、本事業の中での当該研究の位置づけを検討した。また、研究代表者、関連企業の担当者、臨床研究センター（現在の社会・臨床研究センター）担当者等との協議を行い方向性や計画等を定めた。また、外国企業からの契約書等の内容確認については当センターの顧問弁理士に相談しつつ検討を行った。

（倫理面への配慮）

本年度の分担研究を実施するにあたっては、ヒトを対象とした研究は行わない。

C. 研究結果

1. 臨床研究中核病院整備事業での位置づけ

臨床研究中核病院整備事業は世界的に使用するICH-GCP準拠の質の高い臨床研究を実施するための基盤整備である。本研究が目指している遺伝子治療はまさにこの方向性と合致しているため、臨床研究中核病院整備事業が支援を行う重点的なシーズのひとつと位置づけた。

2. 関係者との協議

臨床研究中核病院整備事業を担う本体は臨床研究センターであり、治験・医師主導治験の薬事・開発等に精通しているもの、データマネジメントに精通しているもの、ならびに知財・産学連携の担当者（研究分担者が併任）らが所属している。そこでこれらの担当者によるチームを作り、研究代表者、企業関係者らとの協議を開始した。

3. 海外の製薬企業からの契約書等の内容検討

本研究が目指す遺伝子治療は海外製薬メーカーとの連携で行う可能性を模索してい

ることから契約に係る文書作成等が必要となる。そこで知財・産学連携担当者（研究分担者が併任）当センターの顧問弁理士と相談しながら内容の吟味、日本語訳などを実施した。

D. 考察

当センターが臨床研究中核病院に指定されたことを受け、臨床研究センターをより充実した内容にするために成 25 年 11 月より社会・臨床研究センターを新たな組織として発させた。本研究が目指す小児稀少難病に対する遺伝子・細胞治療は企業などが参入しにくい分野であるため、いわゆる ARO の機能を持つ臨床研究中核病院が推進すべき課題である。今後は、ICH-GCP に準拠したデータマネジメント機能を導入するなど、信頼性の高いデータ収集と質の保証ならびに担保等、開発に直結する役割を演ずることが可能となった。

E. 結論

臨床研究中核病院整備事業の中で本研究を推進できる強力な基盤ができた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Nemoto A, Inukai T, Uno K, Kiyokawa N, Miyagawa Y, Takahashi K, Sato H, Akahane K, Hirose K, Honna-Oshiro H, Goi K, Kagami K, Nakazawa S, Fujimoto J, Inaba T, and Sugita K. Diverse underlying proliferation response to

growth factors in imatinib-treated Philadelphia chromosome-positive leukemias. *Leukemia Res.* 37(1):93-101, 2013.

Ueno H, Okita H, Akimoto S, Kobayashi K, Nakabayashi K, Hata K, Fujimoto J, Hata J, Fukuzawa M, Kiyokawa N. DNA methylation profile distinguishes clear cell sarcoma of the kidney from other pediatric renal tumors. *PLoS One.* 2013 Apr 26;8(4):e62233.

Kiyokawa N, Iijima A, Tomita O, Miharu M, Hasegawa D, Kobayashi K, Okita H, Kajiwara M, Shimada H, Inukai T, Makimoto A, Fukushima T, Nanmoku T, Koh K, Manabe A, Kikuchi A, Sugita K, Fujimoto J, Hayashi Y and Ohara A. Significance of CD66c expression in childhood acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia Res.*, in press.

Enosawa S; Horikawa R; Yamamoto A, Sakamoto S, Shigeta T, Nosaka S, Fujimoto J, Tanoue A, Nakamura K, Umezawa A, Matsubara Y, Matsui A and Kasahara M. Hepatocyte transplantation using the living donor reduced-graft in a baby with ornithine transcarbamylase deficiency: a novel source for hepatocytes. *Liver Transplant.*, in press.

2. 学会発表等

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願

特願 2013-023347：疾病診断装置及び疾病
診断方法

2. 実用新案

該当なし

3. その他

該当なし

遺伝子治療における ICH-GCP に準拠したデータ管理

研究分担者 瀧本 哲也 国立成育医療研究センター研究所社会・臨床研究センター
開発薬事・プロジェクト管理部データ管理室長

研究要旨

国立成育医療研究センターで実施する遺伝子治療のデータマネジメント体制を ICH-GCP 水準に引き上げることによって、医師主導治験のデータ管理の実施も可能な体制を整備するための作業の一環として、「個人情報保護」のポリシーを定めるとともに、「標準業務手順書（SOP）の作成/管理」、「データマネジメントに関する SOP」、および「データ管理に関する用語集」の作成を開始した。これと併せて、来年度以降の「施設訪問モニタリング体制」の実現を目指して、SOP 作成にむけて内容の検討を開始した。このような遺伝子治療の領域における ICH-GCP 準拠、すなわち治験に堪え得る品質の臨床試験を実施する体制の構築は小児・成育疾患を対象とした臨床研究中核病院としても重要な柱のひとつと位置付けられる。

A. 研究目的

国立成育医療研究センターではこれまで保険診療の範囲内で実施される後期治療開発のための臨床試験の中央モニタリングを実施しつつ、先進的な医療である遺伝子治療研究のデータ管理のあり方についても研究してきた。本分担研究では、現在の臨床試験のデータマネジメント体制を ICH-GCP 水準に引き上げることによって、医師主導治験のデータ管理も可能な体制を遺伝子治療の領域で整備することを目的とする。

B. 研究方法

遺伝子治療における ICH-GCP に準拠したデータ管理に要求される事項について考察する。具体的にはデータ管理に関する各種の標準業務手順書(SOP)を作成するとともに、Source Document Verification (SDV) モニタリングが可能な体制を模索する。

(倫理面への配慮)

国立成育医療研究センターでは現在すでに、「遺伝子治療臨床研究に関する指針」に従った臨床データ管理が可能な体制をとっている。すなわち組織的安全管理措置（国立成育医療研究センターの保有個人情報管理規定など）のもとで、人的安全管理措置（データ管理業務担当者との個人情報非開示契約の締結、個人情報

報の取扱いにかかわる教育など）、物理的安全管理措置（二重ロックのサーバおよびデータセンター内イントラネット、入退室管理、無停電装置設置など）、技術的安全管理措置（システムのファイアウォールによる保護、ユーザー認証、不正ソフトウェア対策、データの定期的バックアップなど）を講じている。今後、ICH-GCP に準拠した体制を目指して、個人情報の保護など安全性の向上のためにさらに必要な措置をとる予定である。

C. 研究結果

1. 遺伝子治療の特殊性

遺伝子医療は実験的要素や特殊な医療技術を含む先進的医療であり、症例登録に先立って遺伝子治療臨床研究適応評価判定委員会（判定委員会）による適応判定が必要である。また、重篤な有害事象発生時の対処についても、特殊な手順が必要となる。以前の研究ではこれらの手順のあり方について検討してきたが、遺伝子治療の特殊性を踏まえて、通常の臨床試験とは別に固有の SOP が必要と考えられる。

その一方で、目標とする症例数が少ないため統計学的処理にはなじまず、1 例ごとの有効性と安全性の正確な評価が重要となるが、計画中の臨床試験の実施施設は当面、当センターのみであるため、施設訪問で行う SDV モニタリングと中央データマネジメントとの区別に

については判然としない面がある。しかしながらこの点については、将来の多施設での実施も視野に入れた手順書を作成することとした。

2. SOPが必要と考えられるデータ管理関連項目

ICH-GCP に準拠したデータ管理を実施するために、SOPが必要と考えられる項目を、GCP本文を参考にしつつ GCDMP (Good Clinical Data Management Practices; 日本製薬工業協会訳) から抽出した。

1) 総論的な事項

まず、すべての SOP の体裁を統一するとともに、品質保証の基本となる「SOPの作成/管理」のための SOP、および「個人情報保護」に関するポリシーの明文化は必須と考えられる。このほか、「データ管理に関する用語集」を作成し、データセンター内での用語の定義を明確にすることとした。

2) データマネージメント

業務の中心となるデータ管理については、Case Report Form (CRF) の作成 (CRF の設計・作成、および記入の手引き)、症例登録、中央モニタリング (データマネージメント計画書作成、データクリーニング、データレビューなど)、およびデータおよび記録文書の保存とアーカイビングに関する SOP の作成が必要と考えられた。

3) データベース作成

収集したデータを入力するデータベースについては、SOP のなかに構築 (設計、エディットチェックとバリデーション手順、ユーザー研修)、運用 (データ入力、内部/外部データの取扱い、メディカルコーディング、データ転送)、安全管理 (システムセキュリティ、システム使用不能時の代替手段など) について記載することとした。

4) Electric Data Capture (EDC)

EDC については、設置 (設計仕様書/操作説明書、セットアップ/維持管理、データレビューとエディットチェック、ソフトウェア変更管理、データベースロック)、運用 (データ収集とハンドリング、データの整合性確認、EDC 研修)、安全管理 (ユーザー管理およびセキュリティ、バックアップ/危機管理) などについて規定した SOP が必要と考えられた。

5) 有害事象の収集と報告

これについては主に重篤な有害事象について、収集

の手順、および収集したデータと原資料との整合性確認の方法が記載の中心となる。ただし、遺伝子治療については先述のように報告の手順が特殊であるため、一般のデータ管理の有害事象報告の SOP の記載内容に追加が必要と考えられた。

6) 監査

これについての SOP の内容は、データの品質/品質保証の実態について、監査を実施する手順ではなく、外部の監査を受けるための準備に関する事項が主体となると考えられた。

上記のうち、3)、4) については費用面だけでなくどのような電子データ処理システムを採用するかで違いが大きく、また遺伝子治療は少数例の実施であるため、複雑なデータベースシステムや EDC の必要性は乏しいと考えられるため、本年度の作成開始は見合わせることにした。同様に、6) についても当面の優先順位は高くないと考えられた。その一方で、遺伝子治療症例の登録については、臨床研究適応評価判定委員会による判定を要することから、特別の SOP が必要と考えられる。

したがって、まずは 1)、2) について、SOP の原案を作成した。5) については、まず一般的な臨床試験について作成することとした。今後、遺伝子治療に特有の事項を追加して完成させるとともに、当センター内外の SOP や研究班での議論等に基づいて改善していく予定である。

3. 施設訪問モニタリング体制

施設訪問モニタリングによる Source Document Verification (SDV) が可能な体制の構築は、ICH-GCP 規準を満たすためには必須と考えられる。

GCP 本文等から、SDV で確認すべき事項は、「施設が種々の要件を満たしていること」、「最新の治験実施計画書にしたがって治験を実施していること」、「適格な被験者のみを治験に組み入れていること」、「適切な被験者登録と同意取得を行っていること」、「各種報告書の内容が正確かつ完全で、適切な時期に提出されていること」、「症例報告書と原資料との照合結果が一致していること (これには用法/用量や治療法の変更、有害事象、併用療法、併発症、実施されなかった試験や検査、中止症例、脱落例とその理由などの点が含まれる)」、「有害事象の

報告の時期が適切であること」、「文書の適切な保存がなされていること」であると考えられた。

遺伝子治療は当センター単施設での実施となるため、施設訪問モニタリングについては当面不要と考えられるが、将来の治療施設が増加する可能性を考慮し、また来年度以降のモニター要員の雇用も視野に入れつつ、上記の具体的な内容について検討を開始することとした。

D. 考察

希少難病の多くは小児期に発症する。国立成育医療研究センターは、平成25年度より、臨床研究中核機関のひとつに指定され、このような小児難治性疾患の治療法の開発のための全国的な体制の中心となることが期待されている。

原発性免疫不全症患者をはじめとする小児稀少難病に対する遺伝子治療は臨床試験の一種であり、その実施には遺伝子治療臨床研究に関する指針を順守し、かつ厚労相の認可を要するが、それだけでは得られた臨床データを新規細胞医薬候補品の承認申請に用いることはできない。承認申請には、別途治験を実施する必要があるが、これは一種リソースの無駄であり、開発の遅れをもたらす可能性がある。遺伝子治療研究は、欧米では治験ベースで数多く行われ、画期的な治療成績が報告されているのに対し、我が国には遺伝子治療を治験レベルで実施する体制が整っていないため、容易に国際共同治験に参加することもできない状況にある。

本研究班で目指している、遺伝子治療の領域における新規細胞医薬候補品の承認申請にも耐えられるようなICH-GCP準拠のデータ管理体制の構築は、このような遺伝子治療開発の促進に役立つだけでなく、臨床研究中核機関として必要な機能の確立にもつながるものである。データ管理において、GCPで求められているのは、被験者の人権・安全・福祉が保護されつつ、臨床試験が適正に実施され、必要なデータが正確かつ完全に記録され、原資料に照らして検証できることであり、それを確認するのがモニタリングであると考えられる。しかしながら、特に遺伝子治療についてこれらをどのように具体化していくかについては、本研究班でひきつづき検討していく必要があると考えられる。

E. 結論

国立成育医療研究センターで実施する遺伝子治療のデータ管理体制をICH-GCP水準に引き上げることによって、医師主導治験のデータ管理の実施も可能な体制を整備するための作業の一環として、「個人情報保護」のポリシーを定めるとともに、「標準業務手順書(SOP)の作成/管理」、「データマネージメントに関するSOP」、および「データ管理に関する用語集」の作成を開始した。これと併せて、来年度以降の「施設訪問モニタリング体制」の実現を目指して、SOP作成にむけて内容の検討を開始した。

F. 研究危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表等
なし
2. 学会発表等
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

Ⅲ. レンチウイルスベクター製造および
遺伝子導入法検討報告書