

# タンデムマスを用いたアデノシン・デアミナーゼ欠損症に対するマススクリーニングの確立

小野寺 雅史

国立成育医療研究センター研究所成育遺伝研究部

## 研究要旨

アデノシン・デアミナーゼ (ADA) は核酸代謝産物のデオキシアデノシンをデオキシイノシンに転換する核酸代謝酵素で、この酵素が欠損することで重症複合免疫不全症 (SCID) を発症する。ただ、遺伝子変異によっては微量ながらも ADA 活性を認め、この場合、通常の SCID スクリーニングで測定される環状 DNA (TREC) が検出することもある。本研究は新生児マススクリーニングで採取されたる紙血中の ADA 活性を測定するため、ろ紙血 1 パンチより 5mM 酢酸アンモニウムにてタンパク成分を抽出し、基質であるアデノシンと混合させた後一定時間反応させ、反応産物のイノシン量を質量分析装置 (LCMA-8030) で定量した。結果、健常人では一定時間内に反応産物のイノシンを検出したが、対照とした ADA 欠損症患者ではその反応産物を検出することができなかった。また、現時点でこれらを下回る健常人検体は見つかっていない。今後は測定時間等を短縮することで新生児スクリーニングとしての同系の導入を成育医療研究センター内で検討している。

## A. 研究目的

原発性免疫不全症 (primary immunodeficiency、以下 PID と略す) は、免疫系に関与する分子の異常により発症し、細菌やカビ、ウイルスなどの病原体に対して易感染性を示す疾患群であり、その責任遺伝子は現在では 200 以上も同定される。特に T 細胞に異常のある重症複合免疫不全症 (severe combined immunodeficiency、以下 SCID と略す) はその診断に急を要し、1 歳までに根治的治療法である造血幹細胞移植を行わないとその生存率は極端に低下する。また、新生児早期に行われる生ワクチンの BCG や口タウイルスワクチンにより未診断患児が医原性感染症に罹患する危険性もあり、安全な予防接種の在り方を考えたときこの問題は重大である。このように PID 患者を発症前 (新生児早期) に診断することは極めて重要で、同時に、この診断法が確立できれば根治療法である造血幹細胞移植も重度の感染症の無い状態で行うことができ、患者の生命予後は大きく改善することが予想される。

現在、SCID の早期診断法としては PCR による TREC (T-cell receptor excision circles) 測定が行わ

れている。TREC は、T 細胞がその膜表面上に T 細胞受容体 (T cell receptor: TCR) を発現させるため TCR の可変領域である variable region (V)、diversity region (D)、joining (J) 遺伝子の再構成を行うが、その際に出現する環状 DNA のことで、TREC の存在は胸腺中の T 細胞新生を示している。すなわち、SCID 患者では T 細胞の新生が起らず TREC は検出できない。実際、この TREC 測定による新生児マススクリーニング (NBS) が米国ウィスコンシン州で行われ、20 万人の新生児のうち 5 名の SCID 患者を診断したと報告されている (J Allergy Clin Immunol. 124: 522-527, 2009)。ただ、SCID の一型である ADA 欠損症は、遺伝子変異により微量な ADA 活性を認めることがあり (delayed onset、late onset)、この場合、通常の検査で TREC を検出することもある。このため、ADA 欠損症に対する発症前診断に関しては TREC 測定とは別に直接患者検体を用いて ADA 活性を測定する必要がある。よって、本研究は ADA 欠損症に対する NBS の導入を視野に入れ、NBS で使用されるろ紙血を用いた ADA 活性の測定系を立ち上げる。

## B. 研究方法

### 1. 乾燥る紙血の作成

- 1) 同意が得られた健常人あるいは造血幹細胞遺伝子治療を受けた2名のADA欠損症患者より末梢血を採取し、NBS用のろ紙に添加する
- 2) 上記ろ紙血を4℃で測定時まで保存する。

### 2. ろ紙血からのサンプル調整

- 1) 1パンチの乾燥血 (Dried Blood Spot: DBS)
- 2) 溶質溶媒 5mM AcONH<sub>4</sub>を添加
- 3) Voltex/ Sonic 30分 on ice
- 4) 37℃で30分間反応
- 5) アセトニトリル添加
- 6) 遠心にて上清を回収
- 7) 乾燥
- 8) 5mM AcONH<sub>4</sub>/ アセトニトリルで10倍希釈

### 3. LC/MS/MS 解析

- 1) HPLC; Prominence UFLC system  
Column; Merck ZIC-HILIC)
- 2) MS; LCMS-8030 Triple quadrupole mass spectrometer



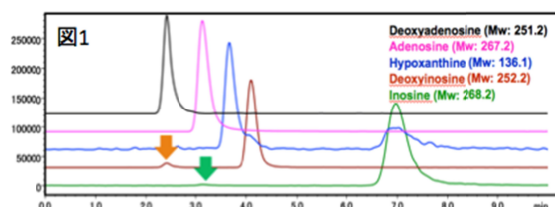
#### (倫理面への配慮)

これら一連の実験については施設内の倫理審査委員会の承認を受けている。また、得られたデータの管理に関しては連結可能匿名化し、個人情報保護法を遵守して行っている。

## C. 研究結果

### 1. LC/MS/MS の定量性に関して

分析対象となる代謝産物は親水性が高いことから ZIC-HILIC カラムを用いた HILIC モードにて検討した。その結果、5 mM 酢酸アンモニウム、93%アセトニトリルの条件で目的成分は10分以内に溶出を完了した(図1)。



検出はエレクトロスプレーイオン化正負イオン切り換え測定とし、アデノシンは正イオンモード、それ以外は負イオンモードで行い、表示した濃度範囲で良好な直線性が得られた(図2)。

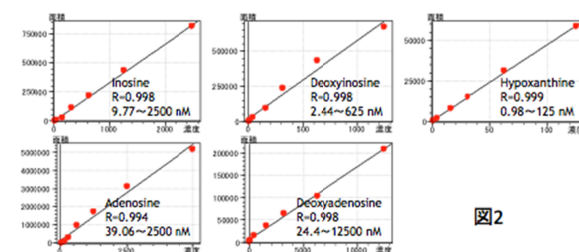
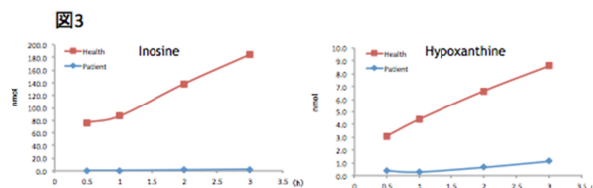


図2

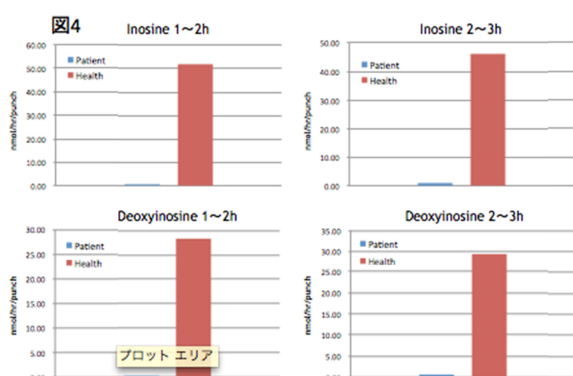
### 2. 代謝産物の測定に関して

LC/MS/MS 測定より実試料 (Health, Patient) について5成分の定量値を得た。サンプル1系列(試



料に 1 mM adenosine を添加) について、濃度を 1 punch の絶対量に換算し、経過時間に対しプロットした(図3)。Health では測定時間内にイノシン、ヒポキサンチン量の増加が確認されが、Patient では量も少なく測定時間内の増加が認められなかった。サンプル2系列(試料に 1 mM deoxyadenosine を添加) についても同様の傾向が確認された。

Inosine、doxyinosine について測定時間内の生成物の変化量を図 4 に示す。両代謝産物において 1~2 時間における変化量と 2~3 時間における変化量は、ほぼ同等の傾向を示した。患者検体は 3 時間の観察時間内でも両代謝産物の増加を認めなかった。



#### D. 考察

近年の次世代シーケンサーの台頭によりこれまで診断が叶わなかった多くの PID 患者の診断が可能となってきた。また、原因遺伝子に対する治療遺伝子をウイルスベクターにて患者造血幹細胞に導入し、再び、患者体内に投与する造血幹細胞遺伝子治療も多くの PID に対してその有効性を示すようになってきた。ただ、これら有効な治療はあくまでも診断が確定してからであり、その段階に至るまでには多くの患者は重篤な感染症を罹患し、それが原因で本来ある治療有効性を享受できない症例も多々ある。このことから、現在では如何にして発症前に疾患を診断するか（発症前診断）に重きが置かれ、米国ウィスコンシン州で示されたる紙血を用いた TREC 測定による NBS の情報は極めて有用であり、我が国においても早々の導入が望まれる。ただ、SCID の中で酵素欠損から発症する ADA 欠損症はその臨床症状が遺伝子変異により多岐にわたり、変異のタイプによっては一定の T 細胞数を有し、これが原因で自己免疫反応 (Omenn 症候群) を発症することもあり、ADA

欠損症に対しては TREC 測定とは別の診断法が必要となる。

今回、NBS の導入を視野に入れ、NBS で使用される紙血を用い ADA の代謝産物である inosine や deoxyinosine を測定することで ADA 活性を評価する系を検討した。その結果、健常人検体は観測時間内に一定の代謝産物を産生したが、ADA 患者検体でその産生を認めなかった。ことからこの系の確かさは証明されたと言ってもよいが、ADA 活性に関するカットオフ値の情報が存在しないため、健常新生児（未熟児を含む）検体の測定範囲が不明で、時に false positive を生む危険性を否定はできない。よって、今後も数多くの健常人検体を測定することで健常人検体の活性値分布図を作成する必要がある。なお、これに関しては、現在成育医療研究センターにおいて NBS で使用された健常人紙血を用いて ADA 活性を測定している。

今後は測定時間の短縮などより簡便な測定法を開発し、PID に対する NBS として TREC/KREC とともに本 ADA アッセイを行い、PID 患者の発症前診断に繋がりたいと考えている。

#### E. 結論

LC/MS/MS によるプリン代謝産物一斉分析系を確立した。

健常者試料と患者試料を測定し、これら代謝産物の定量分析を行った。

健常者試料と患者試料に有意な差を認めたため、これら代謝成分を測定することで ADA 活性の評価は可能と思われた。

今後は測定時間を短縮することで NBS への導入を検討する。

なお、今回の研究は成育医療研究センター研究所 中島英規博士と共同研究である。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G . 研究発表

1. Takeda K, Nakazawa Y, Komuro H, Yamamoto M, Shoji K, Morita K, Miyairi I, Katsuta T, Ohya Y, Ishiguro A, Onodera M: Augmentation of anti-tubercular therapy with interferon in a patient with dominant partial interferon. *Clinical Immunology* (in press).
2. Akagi K, Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Harayama S, Oana S, Onodera M: A case of macrophage activation syndrome developing in a patient with chronic granulomatous disease-associated colitis. *J Pediatr Hematol Oncol* (in press).
3. Kawai T, Watanabe N, Yokoyama M, Arai K, Oana S, Harayama S, Yasui K, Oh-ishi T, Onodera M: Thalidomide Attenuates Excessive Inflammation without Interrupting Lipopolysaccharide-driven inflammatory cytokine production in chronic granulomatous disease. *Clinical Immunology* 147: 122-128, 2013.

#### H . 知的財産権の出願・登録状況

該当なし