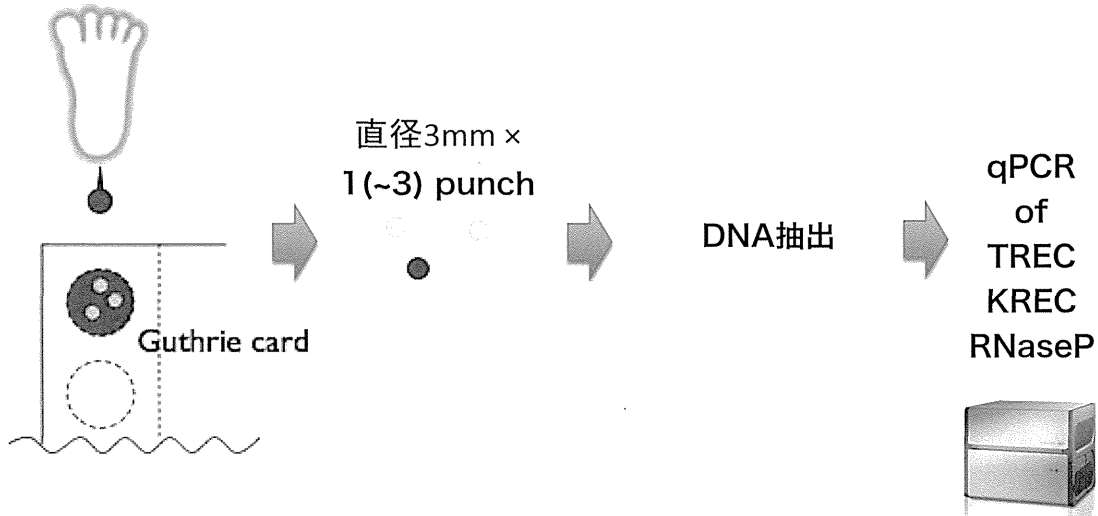


# TRECs and KRECs

Morinishi, Imai, Nonoyama et al.  
J.Pediatrics, 2009

Nakagawa Imai, Nonoyama et al.  
J Allergy Clin Immunol, 2011



病気を発症前につける  
新生児マス・スクリーニング事業とは

新生児マス・スクリーニング（先天性代謝異常症等検査）とは、生まれた赤ちゃんに検査を行い発症前に治療を開始することで、発達遅滞や突然死などを防ぐとする事業です。日本では1977年から実施されています。

これまでフェニルケトン尿症などの6疾患が対象となっていたが、2011年3月の厚生労働省通達により新検査方式であるタンデムマス法が全国で導入されるようになり、日本で生まれるすべての赤ちゃんがおよそ20疾患について症状を予防できるようになりました。

重症複合免疫不全症（SCID）は、検査機材 real time-PCR 法を導入することにより、確実に早期診断・治療により命を救うことができる病気です。アメリカでは既におよそ半分の州で、ヨーロッパや台湾などでも新生児マス・スクリーニングが始まりつつあります。

当会では、子どもの命を守るために、重症複合免疫不全症(SCID)が新生児マス・スクリーニング対象疾患となるよう、検査機材の導入を強く望んでいます。

作成

わたしたちは新生児マス・スクリーニングの普及を応援しています

PIDつばさの会  
先天性代謝異常症札幌市北海道家族交流会  
先天性代謝異常症の子どもを守る会

メディカルアドバイザー 今井耕輔先生（東京医科歯科大学小児科）

2014年9月

発症前に診断できれば、症状を防ぐことができます

## 重症複合免疫不全症(SCID)



Journal of Allergy and Clinical Immunology 2007年10月号表紙より

新生児マス・スクリーニングにより、  
感染症罹患前に発見することが重要です

## 重症複合免疫不全症(SCID)とは？

What's SCID (Severe combined immunodeficiency)?

Q. 重症複合免疫不全症(SCID)とはどのような病気なのですか？

A. 免疫機能が働かず、生後数週間から繰り返し感染症に罹るようになります。細菌・真菌・ウイルス等すべての病原体に対する抵抗力がありません。このため早期診断、早期治療が行われないと1歳まで生きるのは難しいとされています。

Q. 治療法はあるのですか？

A. 早期診断されれば、抗菌剤を投与したり、ガンマグロブリンを定期的に補充することにより感染症を予防することができます。また、乳児期早期に造血幹細胞移植（骨髄移植、臍帯血移植）を受けて免疫機能を再構築できれば、高い確率で根治も期待できます。

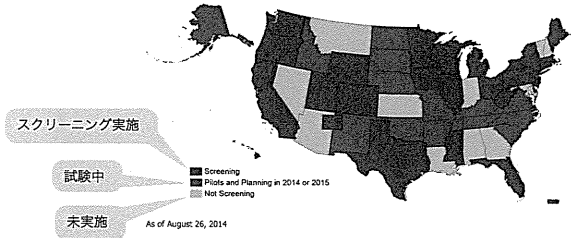
Q. どの病院にかかっても速やかに診断されますか？

A. いいえ、一部の専門家でないとなかなか診断ができません。そのため、新生児マス・スクリーニングで早期に病気を見つけてあげることがとても大切なのです。

Q. 日本でも重症複合免疫不全症(SCID)の新生児マス・スクリーニングは実施されていますか？

A. いいえ、診断・治療体制はありますが、新生児マス・スクリーニングを行うための検査機材はまだ全国に導入されておらず、公的な検査の対象にはなっていません。早急にスクリーニング対象疾患となることが望まれます。

SCID Newborn Screening: Current Status of Implementation Map



Immune Deficiency Foundationホームページより

### 海外の状況

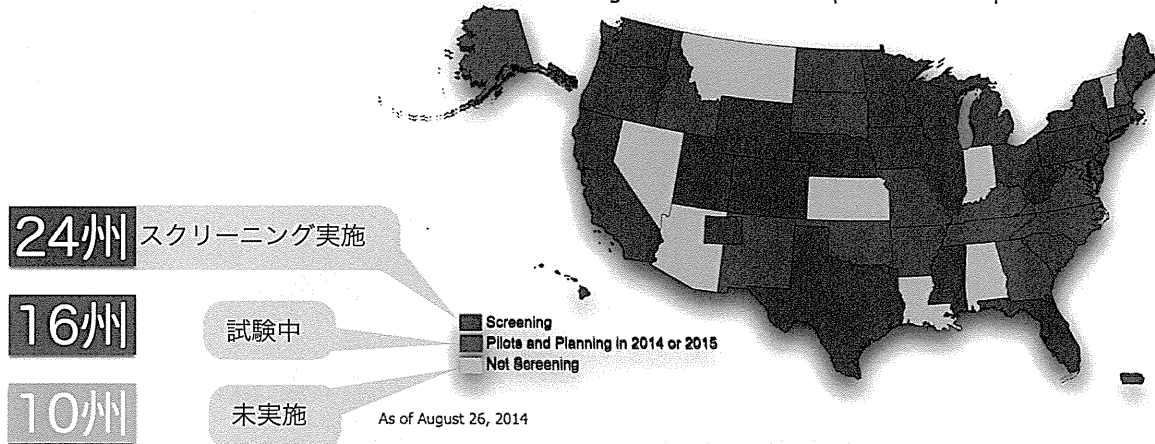
現在、アメリカで生まれた赤ちゃん（年間およそ400万人）のうち2/3が重症複合免疫不全症(SCID)の新生児マススクリーニングを受けています。この他、ヨーロッパや台湾などでもスクリーニングが広がっています。

作成 2014.9

PIDつばさの会勉強会、遺伝子診療学会、国際協力遺伝病遺伝子治療フォーラムで配布

# アメリカでのSCIDマススクリーニング

SCID Newborn Screening: Current Status of Implementation Map



Immune Deficiency Foundationホームページより

### 海外の状況

現在、アメリカで生まれた赤ちゃん（年間およそ400万人）のうち2/3が重症複合免疫不全症(SCID)の新生児マススクリーニングを受けています。この他、ヨーロッパや台湾などでもスクリーニングが広がっています。

台湾：希望者は750円~1000円払う

# TRECsを用いた新生児マススクリーニング 300万人の結果 (in USA)

Kwan, et al, JAMA, 2014

Table 2. Infants Screened and Incidence of SCID (Including Leaky SCID) in 11 Contributing Programs

	California	Colorado	Connecticut	Delaware	Massachusetts	Michigan	Mississippi	Navajo Nation	New York	Texas	Wisconsin	Total
Duration of screening included, mo	34	13	19	12	48	18	12	17	24	6	60	
Infants screened, No. <sup>a</sup>	1 384 606	70 989	57 136	11 202	293 371	162 528	37 613	3 498	485 912	183 191	340 037	3 030 083
Flow cytometry referrals, <sup>b</sup> No. (%) [95% CI] <sup>c</sup>	206 (14.9) [12-17]	10 (14.1) [5.4-23]	22 (38.5) [22-55]	9 (80.3) [28-133]	63 (21.5) [16-27]	114 (70.1) [57-83]	5 (13.3) [1.6-25]	1 (28.6)	478 (98.4) [90-107]	249 (135.9) [119-153]	108 (31.8) [26-38]	1265 (41.8) [39-44]
SCID cases	23	1	3	1	4	2	1	1	10	2	4	52
SCID incidence	1/60 000	1/71 000	1/19 000 <sup>d</sup>	1/11 000 <sup>d</sup>	1/73 000	1/81 000	1/38 000	1/3500 <sup>d</sup>	1/49 000	1/92 000	1/85 000	1/58 000 [1/46 000-1/80 000]
SCID cases per 100 000 screened, No. [95% CI] <sup>c</sup>	1.7 [1.0-2.3]	1.4 [0.3-5.2]	5.2 [1.9-15]	8.9 [2.2-49]	1.4 [0.4-3.5]	1.2 [0.4-4.4]	2.7 [0.6-5]	29 [6.9-159]	2.0 [0.8-3.3]	1.1 [0.3-3.9]	1.2 [0.3-3.0]	1.72 [1.3-2.2]
SCID infant survival, No./Total No. (%) [95% CI] <sup>c,e</sup>	21/23 (91) [83-100]	1/1 (100)	3/3 (100)	1/1 (100)	4/4 (100)	1/2 (50)	0/1	1/1 (100)	9/10 (90) [70-100]	0/2	4/4 (100)	45/52 <sup>f</sup> (86) [79-98]

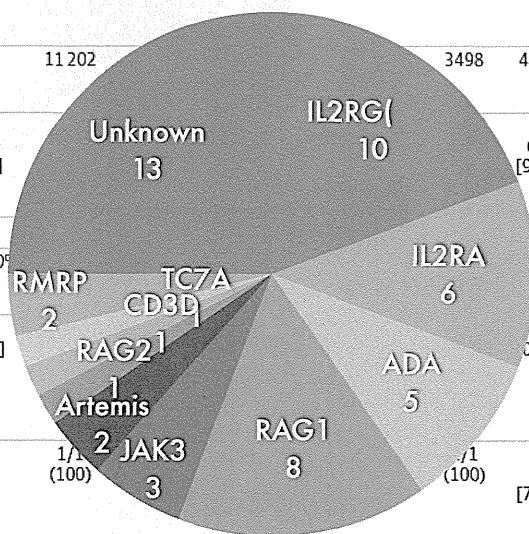
SCID 52例 (1人/58,000出生)

# TRECsを用いた新生児マススクリーニング 300万人の結果 (in USA)

Kwan, et al, JAMA, 2014

Table 2. Infants Screened and Incidence of SCID (Including Leaky SCID) in 11 Contributing Programs

	California	Colorado	Connecticut	Delaware	Massachusetts	Michigan	Mississippi	Navajo Nation	New York	Texas	Wisconsin	Total
Duration of screening included, mo	34	13	19	12	48	18	12	17	24	6	60	
Infants screened, No. <sup>a</sup>	1 384 606	70 989	57 136	11 202	293 371	162 528	37 613	3 498	485 912	183 191	340 037	3 030 083
Flow cytometry referrals, <sup>b</sup> No. (%) [95% CI] <sup>c</sup>	206 (14.9) [12-17]	10 (14.1) [5.4-23]	22 (38.5) [22-55]	9 (80.3) [28-133]	63 (21.5) [16-27]	114 (70.1) [57-83]	5 (13.3) [1.6-25]	1 (28.6)	478 (98.4) [90-107]	249 (135.9) [119-153]	108 (31.8) [26-38]	1265 (41.8) [39-44]
SCID cases	23	1	3	1	4	2	1	1	10	2	4	52
SCID incidence	1/60 000	1/71 000	1/19 000 <sup>d</sup>	1/11 000 <sup>d</sup>	1/73 000	1/81 000	1/38 000	1/3500 <sup>d</sup>	1/49 000	1/92 000	1/85 000	1/58 000 [1/46 000-1/80 000]
SCID cases per 100 000 screened, No. [95% CI] <sup>c</sup>	1.7 [1.0-2.3]	1.4 [0.3-5.2]	5.2 [1.9-15]	8.9 [2.2-49]	1.4 [0.4-3.5]	1.2 [0.4-4.4]	2.7 [0.6-5]	29 [6.9-159]	2.0 [0.8-3.3]	1.1 [0.3-3.9]	1.2 [0.3-3.0]	1.72 [1.3-2.2]
SCID infant survival, No./Total No. (%) [95% CI] <sup>c,e</sup>	21/23 (91) [83-100]	1/1 (100)	3/3 (100)	1/1 (100)	4/4 (100)	1/2 (50)	0/1	1/1 (100)	9/10 (90) [70-100]	0/2	4/4 (100)	45/52 <sup>f</sup> (86) [79-98]



10遺伝子

SCID 52例 (1人/58,000出生)

# ヨーロッパのscreening状況

## ➤ 欧州免疫不全症学会(ESID)での情報

- ドイツ・スウェーデン：TREC,KRECを組み合わせたスクリーニングを計画し、パイロットスクリーニング準備中。匿名化サンプルで1万人分テストし、1例B欠損を同定。同じサンプルでBTK遺伝子異常を証明。キットを作成し、配布中。FHL3(UNC13D)は欠失を同定するスクリーニング法を開発。
- フランス：コスト解析施行。パイロットスクリーニングを全土で（10%の人口で）2014/11月から開始。
- ノルウェーで、2014年開始
- “An informal **networking meeting on newborn screening for PID**”が会期中に開催

同時発表：千葉県政記者会、千葉民間放送テレビ記者クラブ、木更津記者クラブ、厚生労働記者会、経済産業記者会、経済産業省ベンクラブ、文部科学記者会、科学記者会

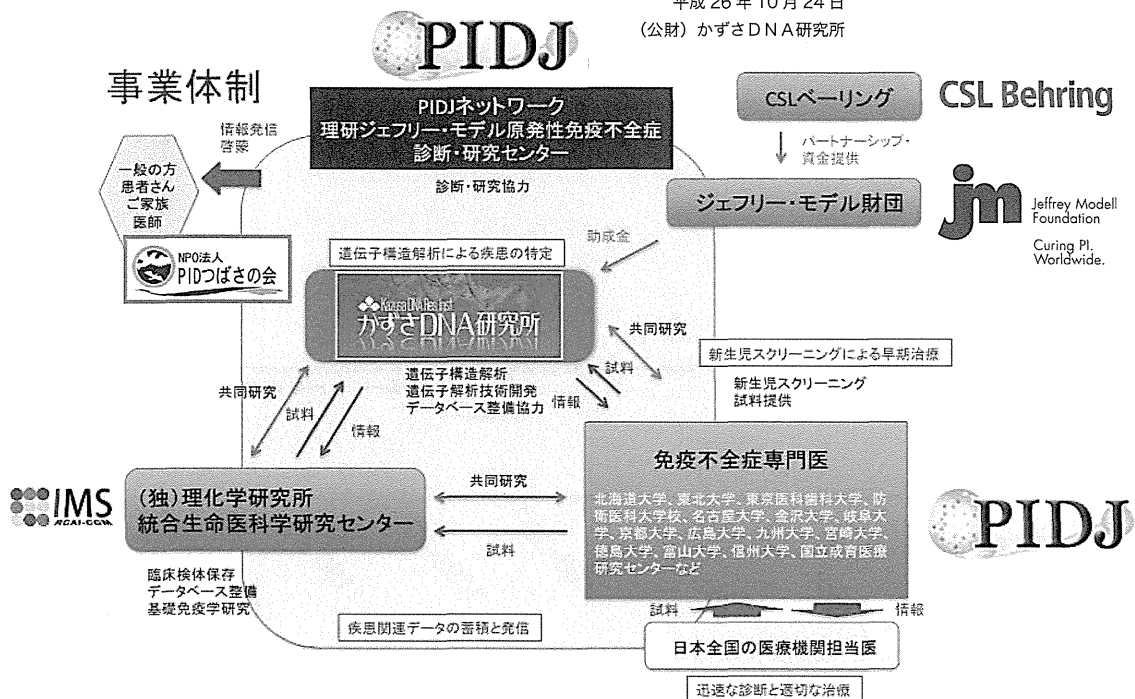


原発性免疫不全症の迅速な診断と的確な治療の実現に向けて

～公益財団法人かずさDNA研究所がジェフリー・モデル財団より研究助成を受ける～

平成26年10月24日

(公財) かずさDNA研究所



## 12. Multiplex PCR Compatibility

The TREC assay can be combined with MSTN in channel 580 or 660 or with KREC channel 610 and MSTN in either channel :

**Multiplex PCR and Instrument Compatibility**  
Color Compensation 40-0320 is mandatory for Multiplex PCR

500	FAM	580	610	640	660
		MSTN	KREC		
			KREC		MSTN
	TREC	MSTN	KREC		or MSTN
	TREC	MSTN	KREC		or MSTN

480 II	Z480	LC96	LC2.0	Nano
X	X	X	X	X
X	X	X		X
X	X	X		
X				

Table 4

For life science research use only. Not for use in diagnostic procedures. For *in vitro* use only.



MOLBIOL

### LightMix® Modular TREC

Cat.-No. 53-0621-96

Kit with reagents for 96 PCR reactions 20 µl for detection of T-cell receptor excision circles [lyophilized]

**FAM**

Roche SAP n°7093861001

For life science research use only. Not for use in diagnostic procedures. For *in vitro* use only.



MOLBIOL

### LightMix® Modular KREC

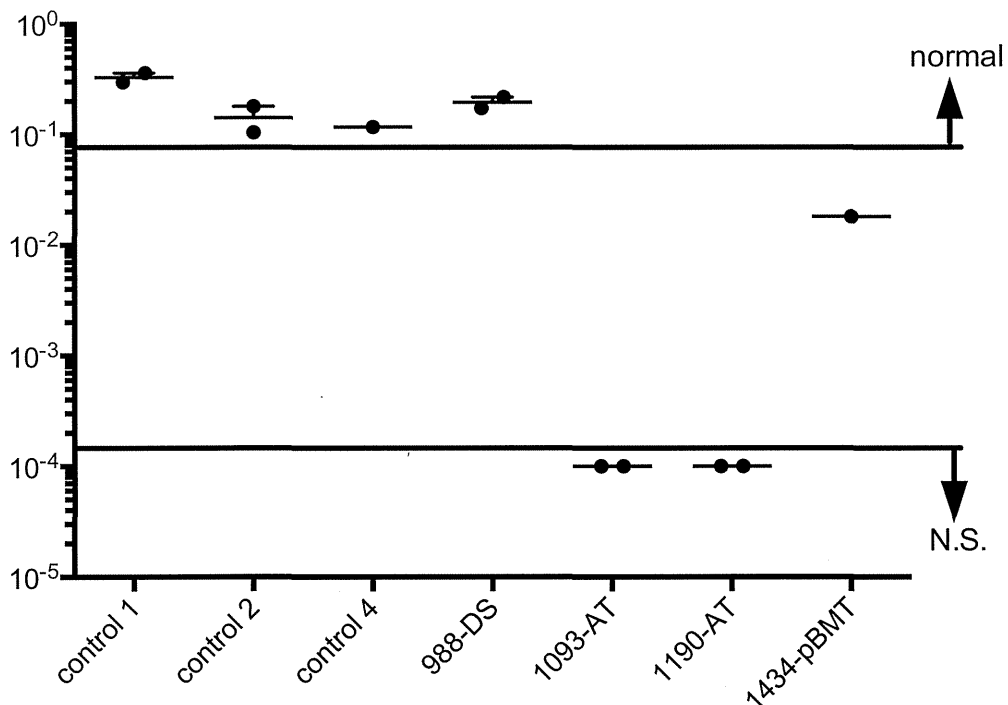
Cat.-No. 61-0622-96

Kit with reagents for 96 PCR rxns 20 µl for Kappa-deleting Recombination Excision Circles [lyophilized]

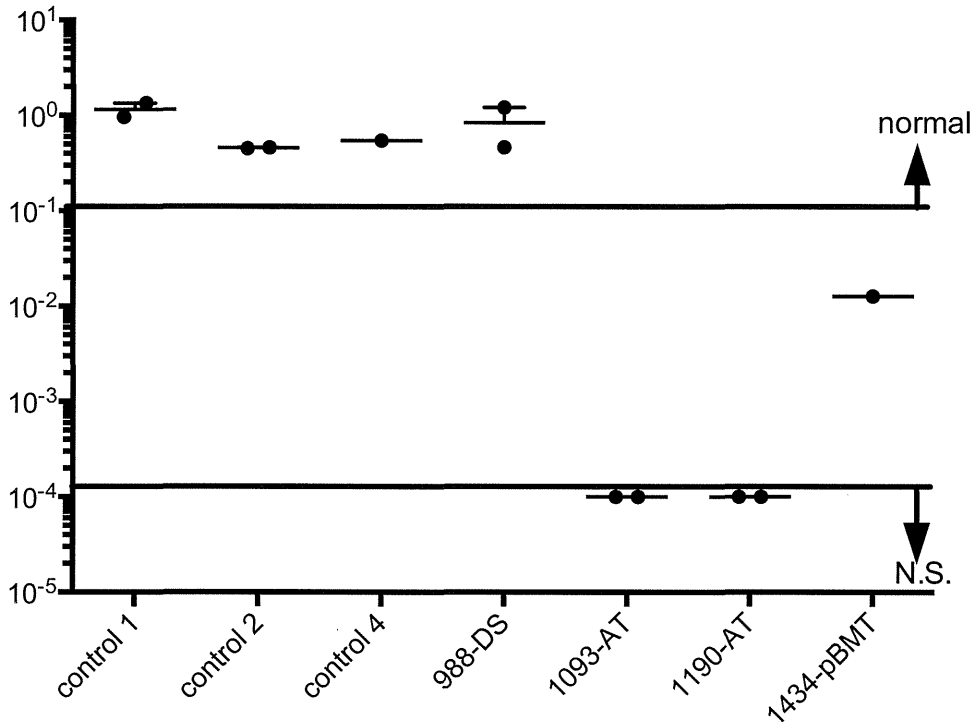
**610**

Roche SAP n°7093896001

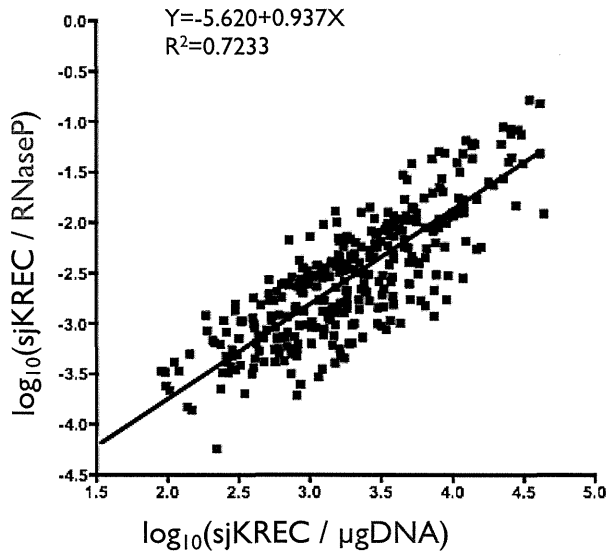
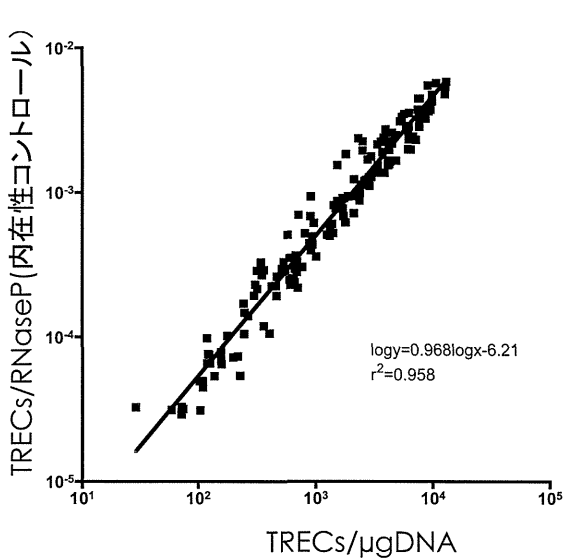
## TREC/MSTN-20ng



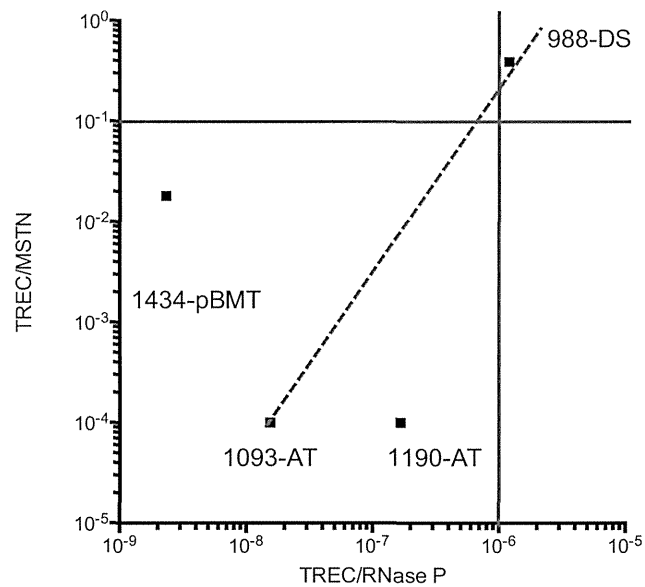
sjKREC/MSTN-20ng



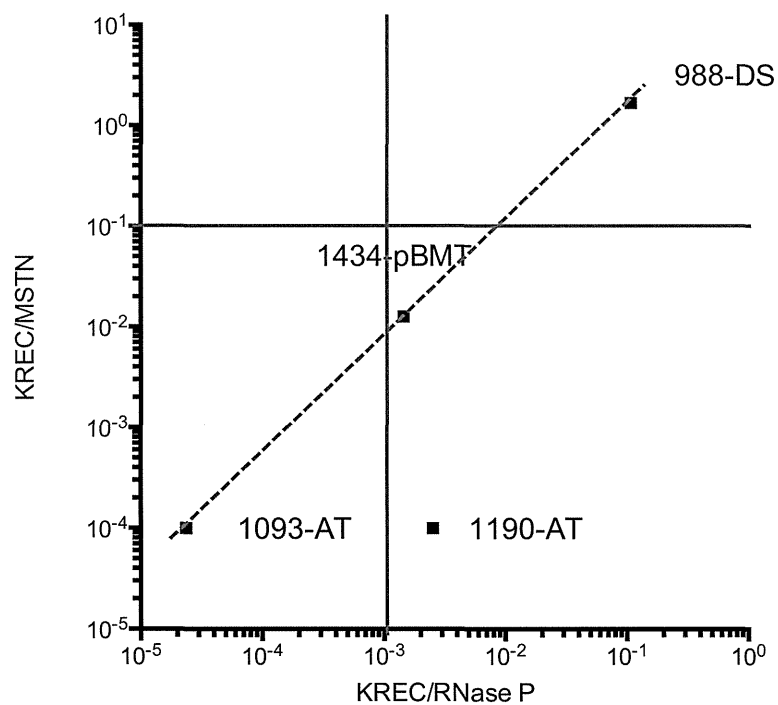
従来法での絶対定量 ( $/\mu\text{gDNA}$ ) と  
相対定量 ( $/\text{RNaseP}$ ) との相関



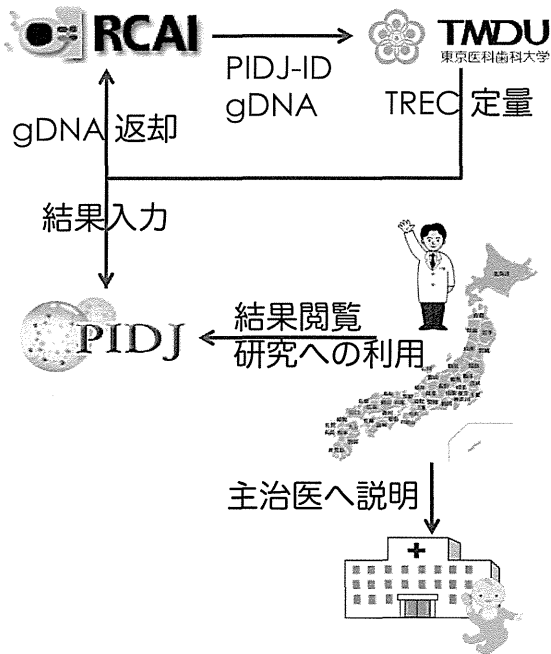
# TREC:従来法(/RNaseP)との相関



# KREC:従来法(/RNaseP)との相関

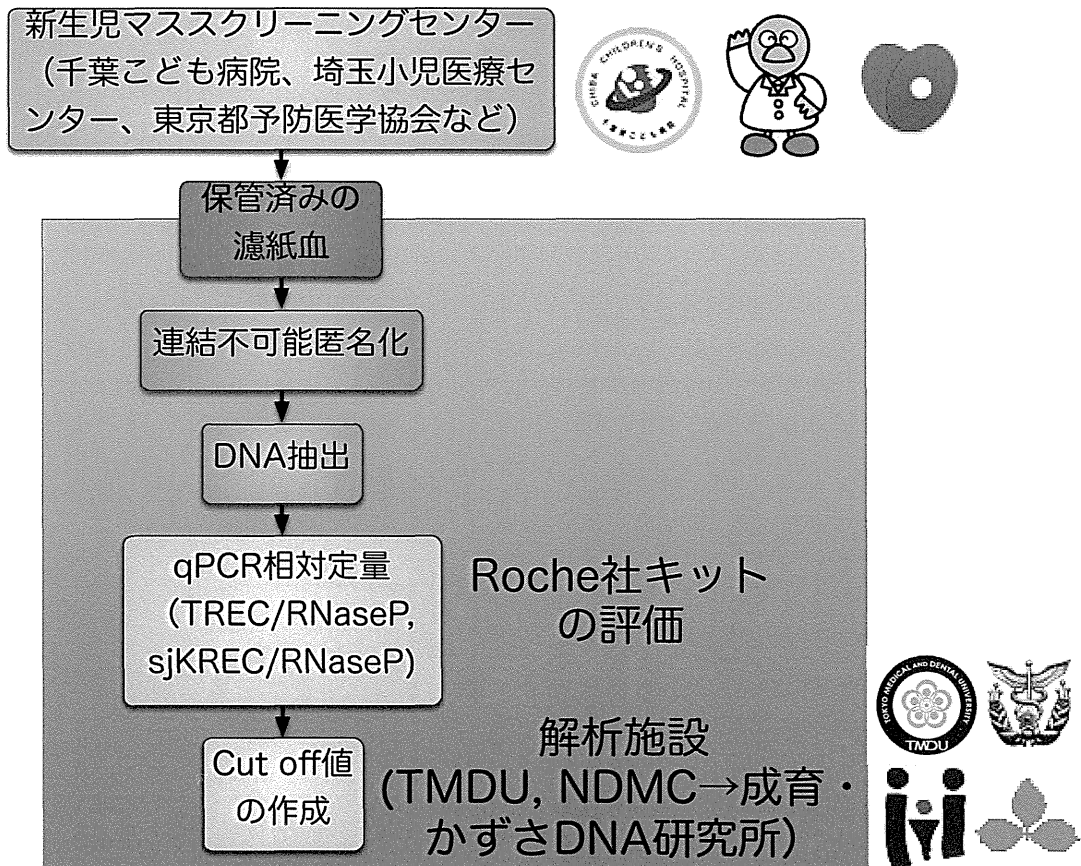


# PIDJにおける遺伝子解析検体を用いた TRECスクリーニングについて



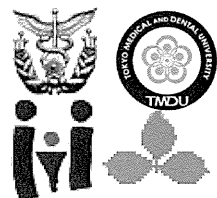
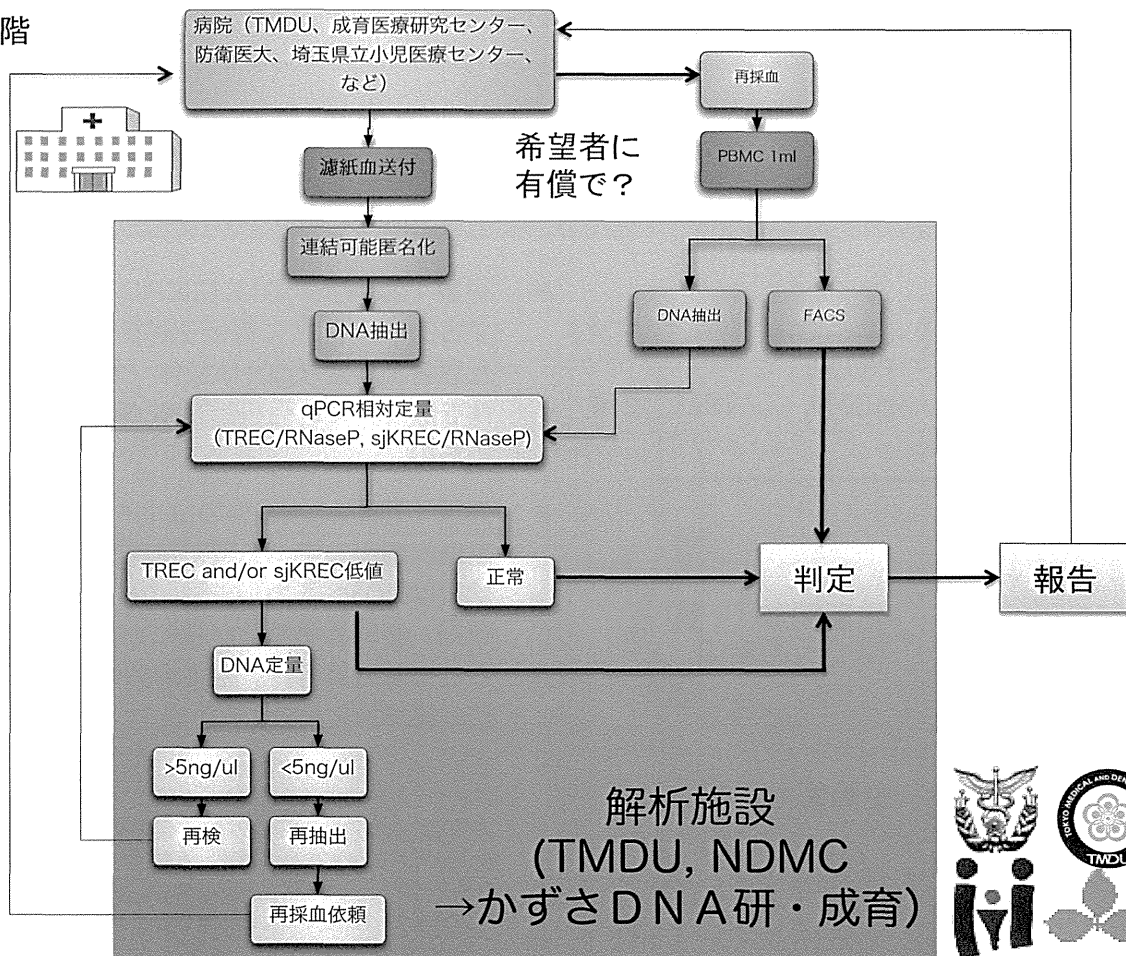
- 対象：2007.12-2012.12にPIDJを介してかずさDNA研究所に遺伝子解析依頼を行った患者全血由来gDNA検体（顆粒球等の検体を除く）で、理研RCAIに保存されているもの
- 方法：理研RCAI保存のgDNAを用い、東京医科歯科大学小児科でTREC定量を施行。結果はPIDJへ入力し、残gDNAはRCAIへ返却。各班会議施設からPIDJを閲覧することで結果は確認。各主治医への説明は班会議施設に一任。
- 参考：TREC測定は、理研RCAIの研究計画書に盛り込んであり、理研で行う予定であったものであり、各班会議施設での倫理委員会承認の際に、倫理委員会に提示・承認済みであるはずのものです。本来はRCAIで測定すべきものですが、共同研究契約を結び、東京医科歯科大で代行させていただくことにしております。

## 第1段階

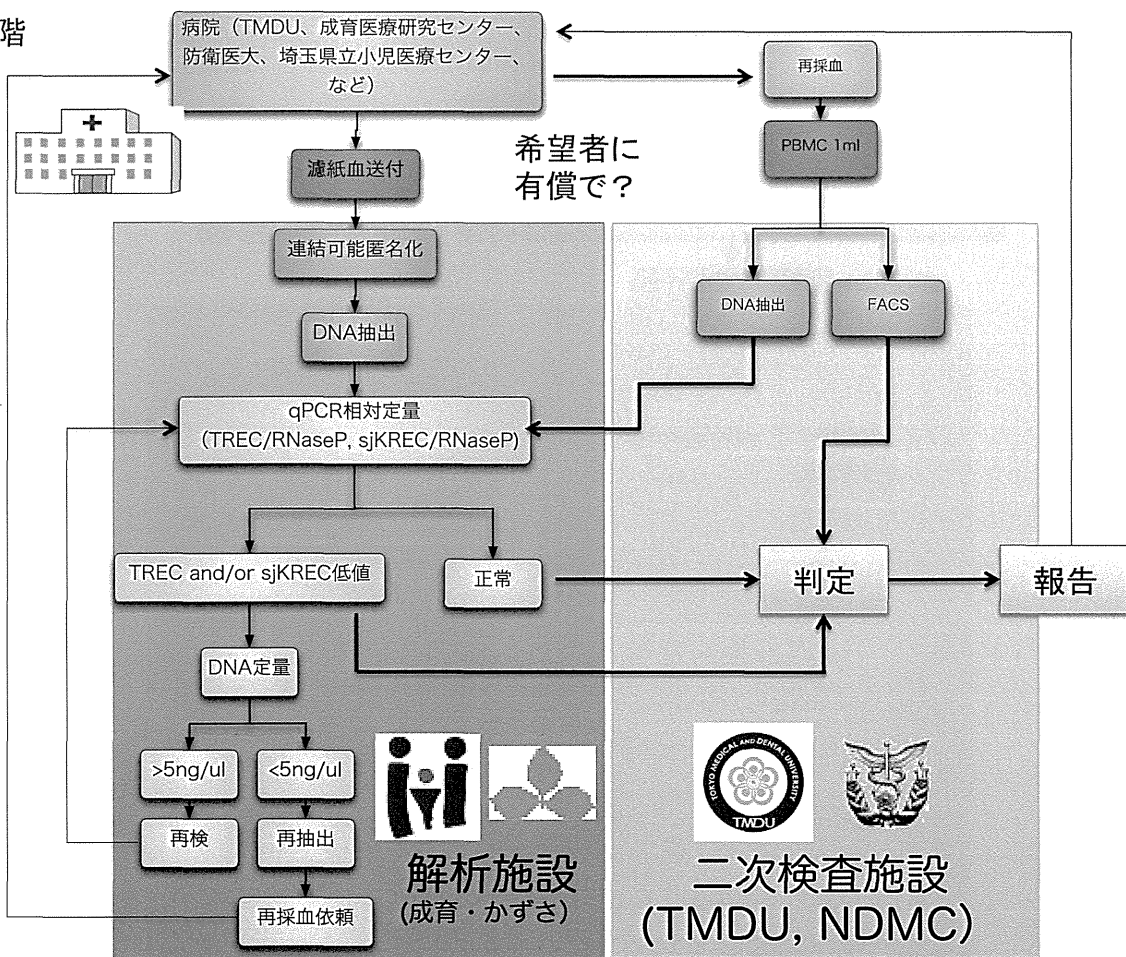




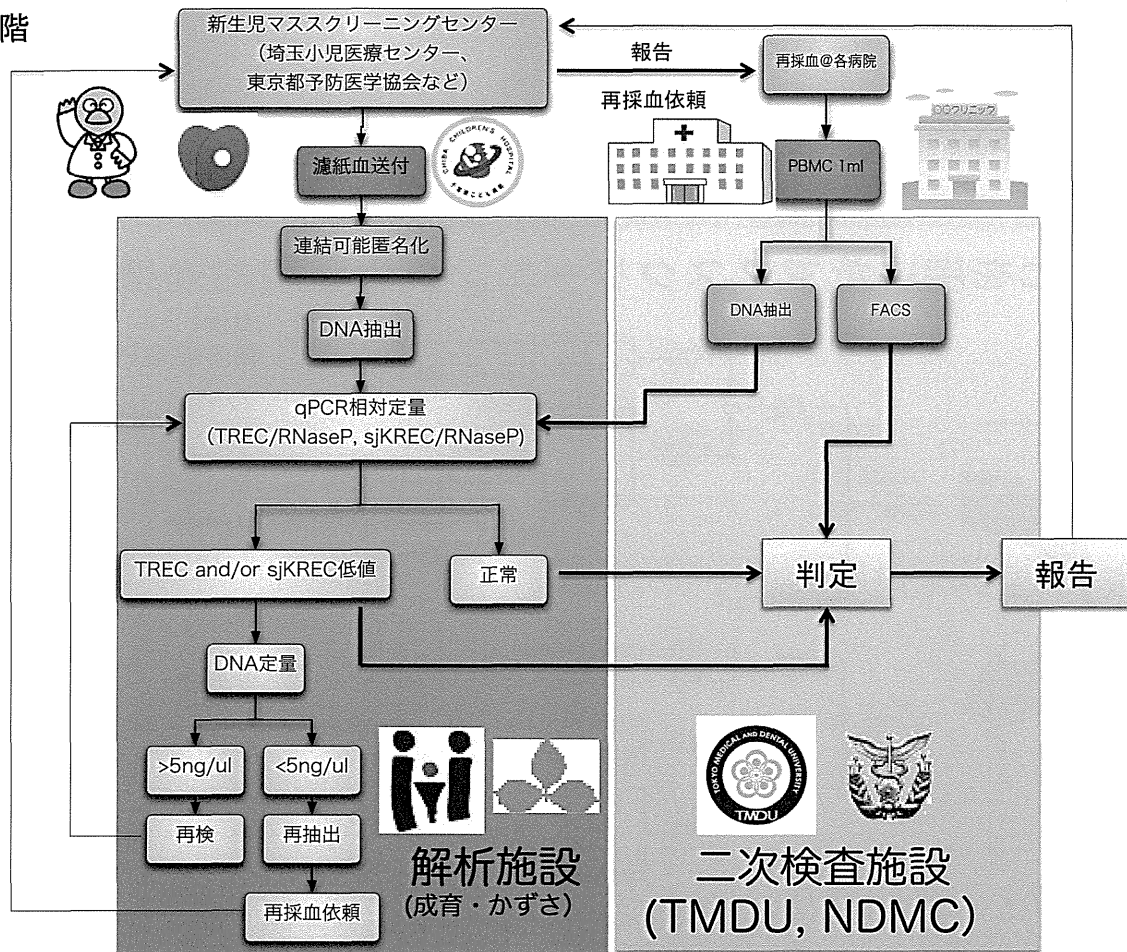
第2段階



第3段階

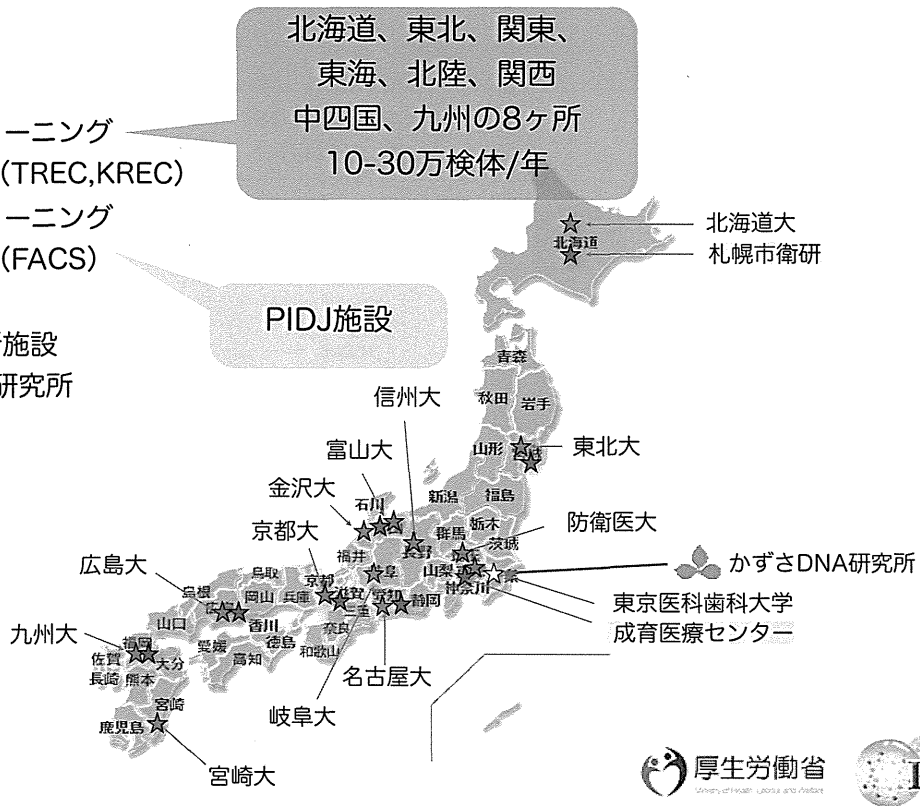


# 第4段階



## PIDマススクリーニング体制(案)

- ★ PIDマススクリーニング  
一次検査施設 (TREC,KREC)
- ★ PIDマススクリーニング  
二次検査施設 (FACS)  
→移植施設
- ☆ PID遺伝子解析施設  
＝かずさDNA研究所



# Cost-Effectiveness Analysis of Neonatal Mass Screening for Severe Combined Immunodeficiency by T-Cell Receptor Excision Circles Quantification in Japan

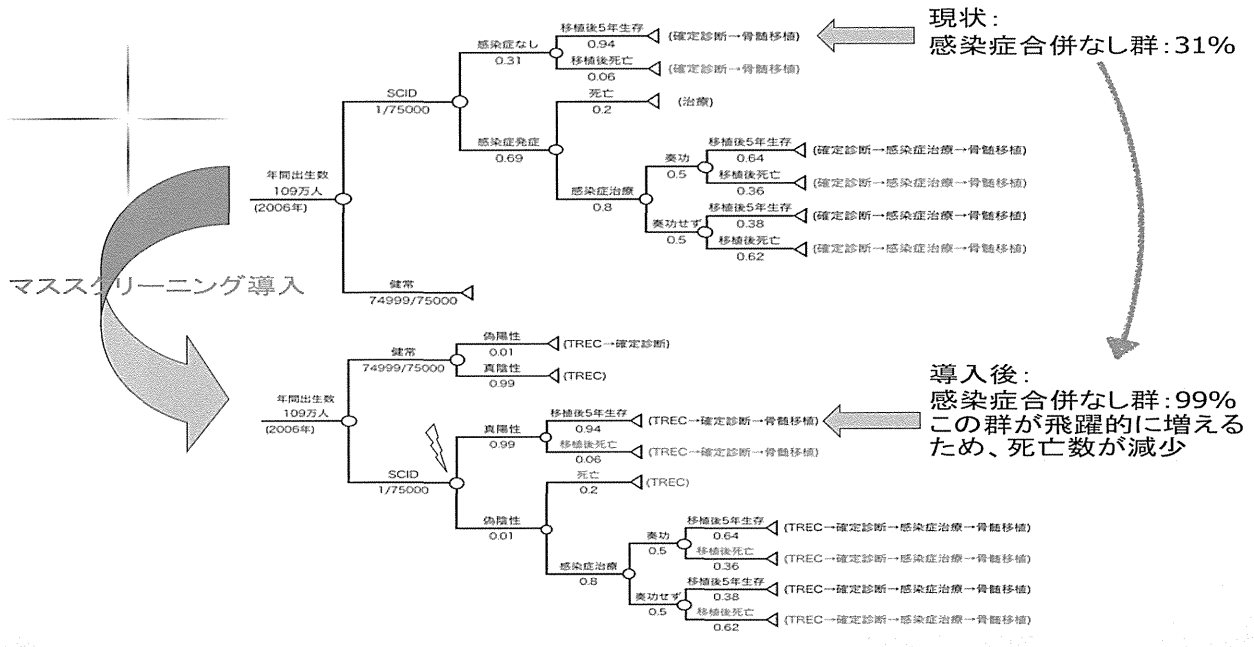
Hiroki Sato<sup>1)</sup>, Kohsuke Imai<sup>1,2)</sup>, Yoichi Morinishi<sup>2)</sup>, Noriko Nakagawa<sup>2)</sup>, Takashi Fukuda<sup>3)</sup>, Shigeaki Nonoyama<sup>1)</sup>

1) Department of Medical Informatics, National Defense Medical College Hospital, Saitama, Japan.

2) Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Saitama, Japan.

3) Department of Health Economics and Epidemiology Research, School of Public Health, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

## TRECを用いたマススクリーニングの費用対効果



# Cost-Effectiveness Analysis of Neonatal Mass Screening for Severe Combined Immunodeficiency by T-Cell Receptor Excision Circles Quantification in Japan

Hiroki Sato<sup>1)</sup>, Kohsuke Imai<sup>1,2)</sup>, Yoichi Morinishi<sup>2)</sup>, Noriko Nakagawa<sup>2)</sup>, Takashi Fukuda<sup>3)</sup>, Shigeaki Nonoyama<sup>1)</sup>

1) Department of Medical Informatics, National Defense Medical College Hospital, Saitama, Japan.

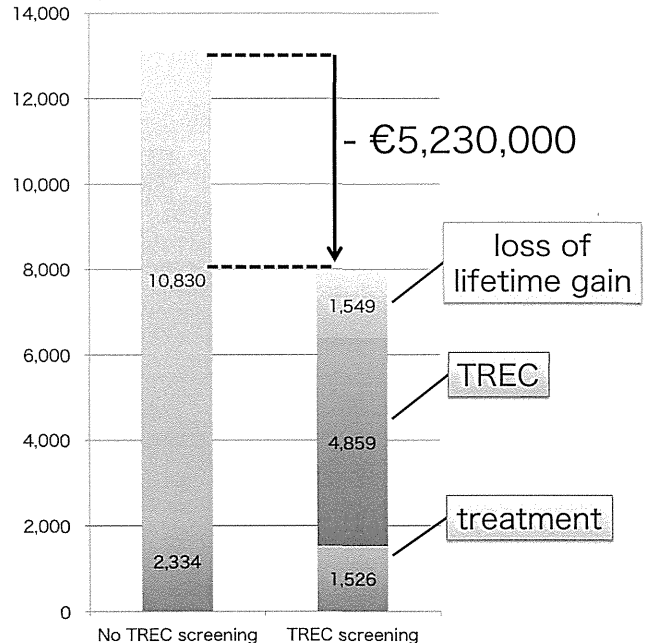
2) Department of Pediatrics, National Defense Medical College, Saitama, Japan.

3) Department of Health Economics and Epidemiology Research, School of Public Health, The University of Tokyo, Tokyo, Japan.

Number of patients



Required cost (€1,000)

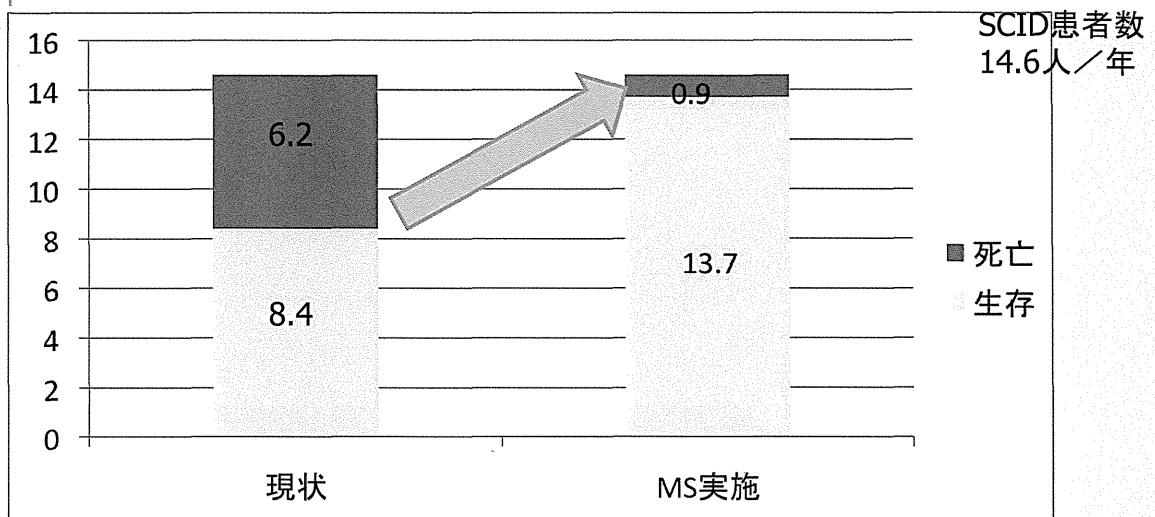


# まとめ

- アメリカで、300万人のマスクリーニング結果が報告
- 欧州でもTREC,KREC新生児スクリーニングが進行中
- かずさDNA研にJMFからgrantがきたので、千葉県でのマスクリーニングを千葉県こども病院と連携して検討中（自費で開始することを検討）
- TREC,KRECキットがRocheから発売
  - 従来法との相関は悪くない
  - 多検体で確認
  - 体外診断薬適応申請を検討→先進医療、保険適応を検討
- パイロットスクリーニング体制を検討
- コスト解析を論文化中

## TREC MS導入による死亡数減少

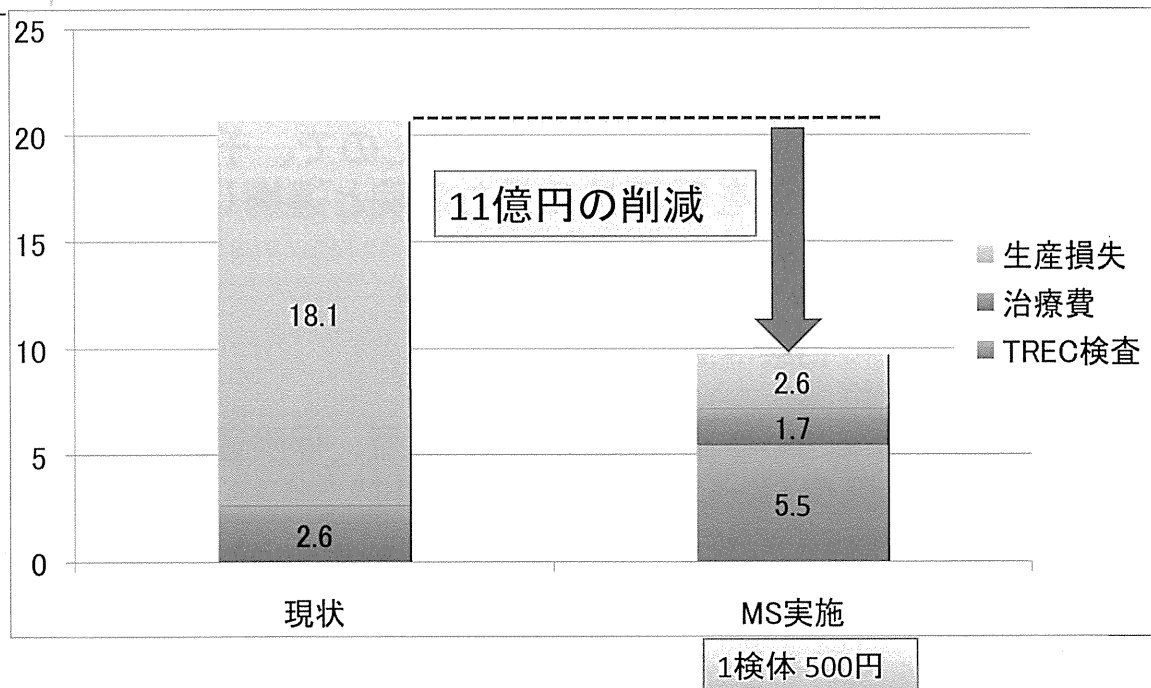
年間患者数(人)



TREC MS導入によって  
SCID患者の年間死亡数が1人以下に減少

# TREC MSによる総費用削減 1検体 500円の場合

億円/年



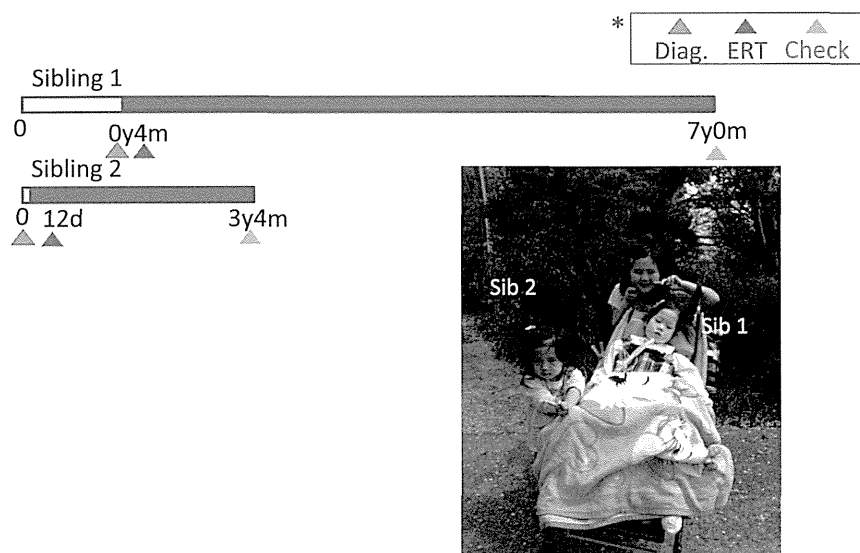
# ライソゾーム病早期診断システムについて

国立成育医療研究センター  
奥山 虎之

## 目的と必要性

- 酵素補充療法、造血細胞移植、遺伝子治療などの開発と臨床応用により、ライソゾーム病は治療可能な疾患が増えてきた。
- しかし、治療効果を最大限に引き出すためには、発症早期あるいは発症前から治療を開始する必要がある。
- 適切な診断・スクリーニングシステムを確立する必要がある。

## Sibling study of Pompe disease



## スクリーニング体制の条件

- 対象疾患・病態の選択基準が明確であること
- 簡便で再現性が高い検査法であること
- 検体の輸送が容易であること
- スクリーニング陽性者について確定診断までのプロセスが明確であること
- 診断確定者の予後・重症度が予測可能であり、適切な治療法が選択できること
- 遺伝相談を含めた適切なカウンセリングやコンサルタント制度が確立していること

## ライソゾーム病のスクリーニング

- 酵素活性によるスクリーニング
- 過剰蓄積物質によるスクリーニング

## DBSによるLSDのスクリーニング法

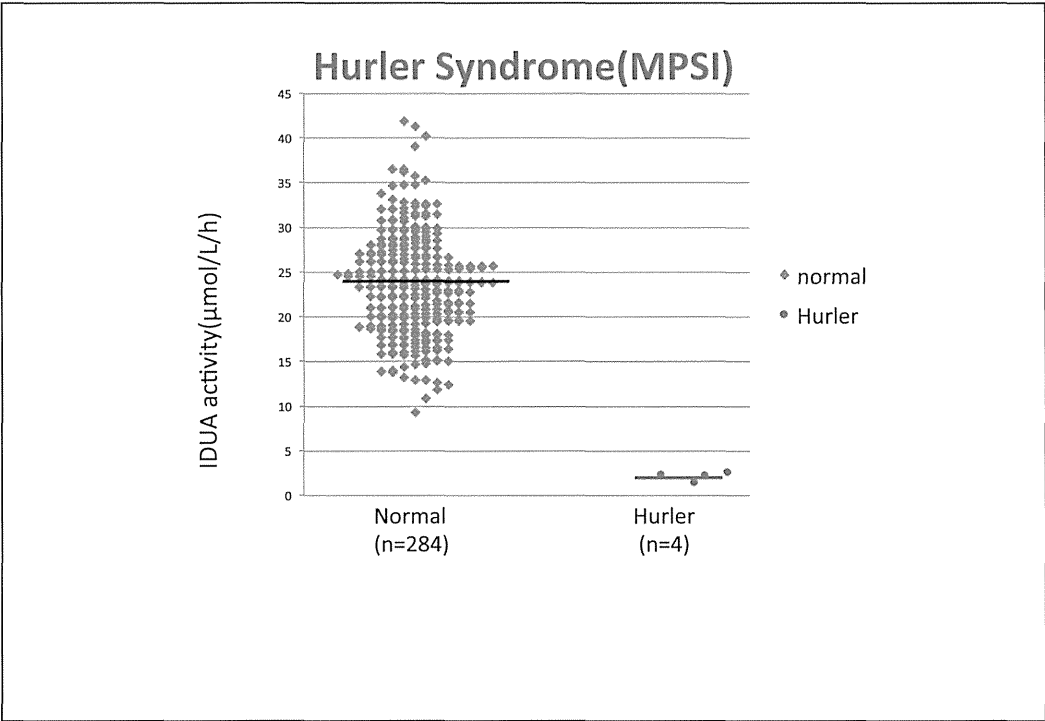
### 酵素活性によるスクリーニング

- 多くの疾患で可能
- 発症前から酵素活性が低下していることはほぼ確実である
- サンプルが不良の場合には偽陽性となるので、患者を見過ごす可能性が低い
- 個々の疾患で独立した検査方法を確立する必要がある
- スクリーニング陽性が確定診断に直結する

### 蓄積物質によるスクリーニング

- 限られた疾患で可能
- 発症前から蓄積物質が蓄積しているかは多くの場合明らかではない
- サンプルが不良の場合には、偽陰性となるので、患者を見逃す確率が高い
- 一つの検査で数種の疾患が同時にスクリーニングできる場合がある
- スクリーニング陽性者に対して、2次スクリーニングや確定診断のためのステップが必ず必要になる





## ファブリー病患者αガラクトシダーゼA遺伝子の遺伝子変異解析 (分担研究者 大橋十也 慈大)

### 研究概略

ファブリー病(FD)はX染色体上に存在するGLA遺伝子の遺伝的機能低下・不全に起因する病気である。男性FDは、GLA活性測定や基質(Gb3など)蓄積測定によりFDの診断が可能であり、遺伝子解析をしなくても確定診断が可能である。一方女性FDはGLA活性が低値～健常者レベルの場合があり、確定診断には遺伝子変異解析が必須となる。

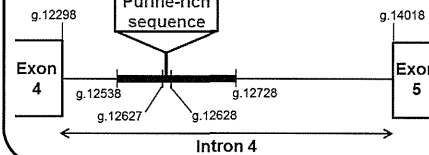
分担研究者・大橋は、これまでに年間約20家系、総計108家系のGLA遺伝子解析を行ってきた。そのうち95%の家系はexon上またはexon/intron結合領域に遺伝子変異を持っていることを明らかにした。その他の家系は遺伝子変異の同定が出来ず、女性のFD患者疑いの確定診断ができていなかった。

本研究事業では、GLA遺伝子変異が未同定のFD家系の遺伝子変異解析を詳細に行い、興味深い3種類のGLA遺伝子変異を明らかにした。

本研究は、東京慈恵会医科大学倫理委員会の承認及び患者同意を得て行った。

### 解析1

#### GLA DNA配列



### 結果・考察

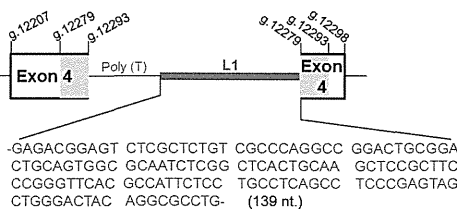
#### 【解析1】

GLA exon上に遺伝子変異が認められない患者のGLA cDNA解析を行った所intron4(黒太線)とpurine-rich配列(赤字)がexon4-5間に保持されたcloneを同定した。gDNA解析でintron4にpurine-rich配列の挿入変異の存在が明らかになった。本挿入配列はintronic splicing enhancer (ISE)の機能を持っていた。

1/2

### 解析2

#### GLA DNA配列



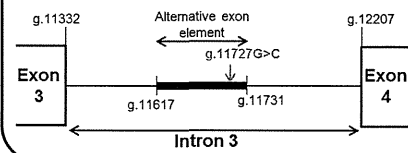
### 結果・考察

#### 【解析2】

GLA exon4領域のPCRが不良の患者のGLA cDNA解析を行った所exon4のskippingが起きていることがわかった。gDNA解析でexon4にexon-skippingを誘発するretrotransposon L1(赤字)の挿入変異の存在が明らかになった。

### 解析3

#### GLA DNA配列



### 結果・考察

#### 【解析3】

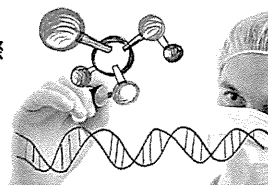
GLA exon上に遺伝子変異がない患者のGLA cDNA解析を行った所、既知のalternative exon領域であるintron3(黒太線)がexon3-4間に保持されたcloneを同定した。gDNA解析でintron3にnon-SNPの点変異(赤字)の存在が明らかになった。deep intronic point mutationがalternative exonの誘導に関与していた。

### まとめ

本研究事業では3種類の新規GLA遺伝子変異を明らかにした。女性FDの確定診断に至った例もあった。

2/2

平成26年度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「国際少難病に対する遺伝子・細胞治療の実施とその支援体制の整備」(小野寺班)平成27年1月



- 研究課題:**
1. 遺伝子治療に向けてのライソゾーム病患者  
ハイリスクスクリーニング—特にライソゾーム  
酸性リパーゼ欠損症(LAL)並びに  
ニーマンピツクC病
  2. ライソゾーム病iPS細胞を用いての遺伝子治療に向けての  
研究

研究者名: ○衛藤義勝、辻嘉代子、藤崎美和、梅田稔子、平山怜美



財団法人脳神経疾患研究所先端医療研究—センター &  
遺伝病治療研究所

## ヒトライソゾーム病患者での遺伝子治療疾患

1. 既に遺伝子治療が開始されたヒト ライソゾーム病
  - 1) Metachromatic Leukodystrophy (MLD) using Lentivirus vector, ex vivo gene therapy, Biffi A et al, Science, 2013
  - 2) Neuronal ceroid lipofuscinosis using AAV vector, direct injection into brain (USA, 2010)
  - 3) Sanfilippo A syndrome using AAV vector, direct injection into brain (Lysogene, 2013)
  - 4) Pompe disease using AAV vector, Byrne et al, 2011
2. 現在遺伝子治療が計画中のライソゾーム病
  - 1) MPS-I gene therapy using Lenti virus vector (Italy, 2014)
  - 2) MPS II using AAV gene therapy (France, 2014)
  - 3) Krabbe disease using lenti virus gene therapy (Italy, 2014)
  - 4) Fabry disease using lentivirus vector, ex vivo gene therapy (Canada, 2014)
  - 5) Gaucher disease using AAV2 vector (ReGenX, 2015)
  - 6) Sanfillipo B using AAV gene therapy (USA, 2015)
3. 過去に遺伝子治療が行われたライソゾーム病
  - 1) Gaucher disease using retrovirus vector (NIH, 1996)

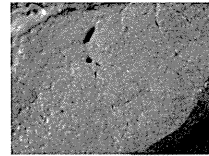
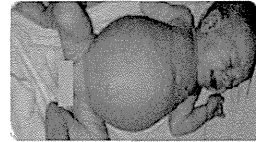


Fabry gene therapy candidate, Mr. Armstrong, Cargally,)

## ライソゾーム酸性リパーゼ欠損症

(Lysosomal acid lipase deficiency ; LALD)

遺伝形式 : 常染色体劣性  
 原因遺伝子 : LIPA (10q23.2-q23.3 / エクソン数 10)  
 蓄積物質 : コレステロールエステル、トリグリセリド  
 発生頻度 : ウォルマン病 約1/50万人  
                   コレステロールエステル蓄積症 約1/4~30万人



### ● ウォルマン病

生後早期に発症、3~6ヶ月で死亡

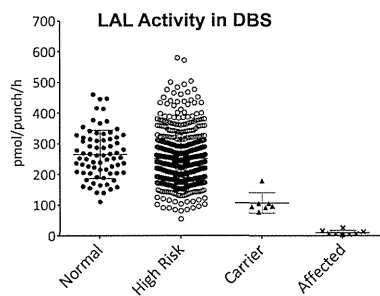
- ・重度の呼吸障害
- ・成長障害
- ・肝脾腫
- ・副腎の石灰化
- ・脂肪便性の下痢

### ● コレステロールエステル蓄積症(CESD)

遅発性

- ・肝腫大
- ・小滴性脂肪肝
- ・肝線維症 (肝硬変)
- ・肝機能障害 および/あるいは 肝不全
- ・若年性動脈硬化

## 脂肪肝患者でのDBSを用いたライソゾーム酸性リパーゼ活性測定スクリーニング



期間 : 2014年1月~9月

実施件数 : 487件

ハイリスクスクリーニング患者487名中、  
 Cut-off値(111.9 pmol/punch/h)以下の患者が14名、  
 うち1名にLAL活性の著明な低下が認められた。  
 また、健常人群とハイリスク患者群の酵素活性に有意  
 な差は認められなかった。

	(pmol/punch/h)			
	Normal (n=72)	High Risk (n=487)	LAL Deficiency*	
		Carrier (n=7)	Affected (n=8)	
Mean	265.4±78.3	107.1±30.7	10.2±7.3	
Minimum	110.7	77.5	2.2	
Maximum	460.8	179.8	26.2	

\* CESD患者および保因者の検体は、Synageva Biopharma社から提供を受けた