

分担研究課題

次世代のマススクリーニングの在り方に関する研究

研究分担者 松原洋一（国立成育医療研究センター 研究所長）

重症複合免疫不全症に対する新生児スクリーニング法の開発

研究協力者 小野寺雅史（国立成育医療研究センター成育遺伝研究部）

研究要旨

原発性免疫不全症は、免疫系の異常により生下時より病原体に対して易感染性を示す疾患群であり、特に重症複合免疫不全症(SCID)は根治的治療である造血幹細胞移植を行なわないと、生後1歳までに死亡する重篤な疾患である。このため重症感染症罹患前の診断は、患者の生命予後を大きく改善することから、発症前あるいは早期診断法の確立は急務であり、これに対し胸腺での未熟T細胞新生時に生ずるTRECをろ紙血を用いて測定する新生児マススクリーニング(NBS)が欧米を中心に精力的に進められている。本研究では、原発性免疫不全症患者の早期診断を可能にするNBSの本邦での導入を検討するために、国立成育医療センターで出生した新生児303例を対象にTRECによるNBSの試験研究を行った。その結果、擬陽性率は0.3%程度であった。さらに減らす必要がある。TREC低値の新生児は、実際に一過性のリンパ球減少症を呈しており、TRECによるT細胞数の評価は正しいものと思われる。今後はセンター外からの検体の受け入れ、本スクリーニングの有用性を明らかにしてゆきたい。

A．研究目的

小児難治性疾患である重症複合免疫不全症(severe combined immunodeficiency: SCID)は、T細胞の分化障害を根幹とし、これに伴ってB細胞やNK細胞の異常が出現する。このため、患者は生下時より重度のウイルスや細菌、真菌感染症に罹患し、迅速な確定診断と造血幹細胞移植が施行されない場合は患者は死に至る。さらに、感染予防としてのBCGやロタワクチン接種は、逆に患児に重篤なワクチン感染症を引き起こすことがあり、早期の診断法の確立が求められる。

現在、SCIDの早期診断法としてPCRによるTREC(T-cell receptor excision circles)測定が行われているが、この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際に出現する環状DNAのこ

とで、その存在は胸腺中の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(以下、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)。このように、欧米ではSCIDに対するNBSの導入が積極的に進められているが、本邦では診断法としては利用されているが、NBSとしては行われていない。そこで、本研究では、原発性免疫不全症患者の早期診断を可能にするNBSの本邦での導入を検討するために、その系の確からしさを含め、当センター病院においてTRECによるNBSの導入を試みた。

B．研究方法

ろ紙血からのサンプル調整とPCRに関しては、

dry blood spot (DBS) より 3.2mm のろ紙 (約 3 μ l 程度の血液) を採取し、そこから Purification kit (QIAGEN) を用いて DNA を回収した。得られた溶液の 20 μ l を用い PCR に TREC を増幅した。なお、内部コントロールとして アクチンを用い、検量線を作成して TREC の値を決定した。

対象は、2015 年 3 月～11 月 (9 ヶ月) の期間に国立成育医療センターで出生した児である。

331 名に対して試験研究の説明をし、同意の得られた 303 名 (説明したうち 91.5% が同意) を検査した。

(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。なお当該新生児スクリーニングに関する実施計画書と説明パンフレットを作成し、当センター内に倫理委員会に実施に関する承認を求め、センター内の実施に関しては 2014 年 2 月 12 日、センター外からの検体の解析及び解析に関する外部委託に関しては改訂版を提出し、2015 年 10 月 8 日に承認された。

C. 研究結果

1. スクリーニングの結果

実施検体数は 303 検体で、うち陽性数 : 2 検体 (0.6%) であった。この 2 例は、リンパ球減少が 1 例、技術的エラーが 1 例あった。結果として SCID 患者は発見されなかった (0 名)。

結果の送付日時は、生後 23.7 \pm 5.3 日であった。検査できなかったケースは 28 名あったが、その理由は、時間がない (授乳中、体調不良等) というもので、検査を拒否したケースはなかった。

2. 陽性検体のフォロー

1 例 (A023) が、2 回の検査で TREC 5、25 と低値を示し (50 が cut off 値)、生後 1 ヶ月後の当センター免疫科を受診した。それまで、特に感染症を認めない。再検の結果 (生後 1 か月) TREC

は 339 と正常値を示し、リンパ球数は 2,700 と正常範囲であった。

一方、生下時のリンパ球数は 900 と低値を示したことからスクリーニングの TREC 低値はリンパ球減少症が原因と判断し、最終的には一過性リンパ球減少症と診断した。

表 1. 陽性を示した症例 (A0023) の TREC (新生児期 2 回)

	Actin コピー/ μ l	TREC コピー/ μ l
正常コントロール	29800	377
陽性コントロール	48966	ND
A0023 1 回目	87000	5
A0023 2 回目	75677	25

表 2. 陽性を示した症例 (A0023) の TREC (生後 1 カ月時再検)

	Actin コピー/ μ l	TREC コピー/ μ l
正常コントロール	16100	326
陽性コントロール	27133	ND
A0023	22367	339

D. 考察

T 細胞受容体 (TCR) の鎖の可変領域は variable region (V) と joining region (J) の二領域から構成され、また、同一遺伝子上に TCR α 鎖があり、TCR α 鎖の再構成の際にこの配列が環状 DNA (signal joint TREC : sjTREC) として切り出される。このため、TREC は以前より SCID を疑う症例の診断において利用され、現在では欧米を中心に幅広く導入され、多くの SCID 患者が発症前に診断されている。

今回、我々はこれら TREC による NBS を当センターへの導入を試みた。これまでのところ当センターで出産した 331 名の新生児に対し NBS の説明を行い、同意された 303 検体に対して TREC 測定を行った。その結果、2 検体の陽性があり、実際、1 名は false positive であった (約 0.3%)。この値を全国レベルに当てはめると日本では年間 100 万人の新生児が出産することから 3,000

検体に擬陽性が出現することになり、決して低いとは言えない数値である。このため、現在、精度管理として複数のキットの精度を、side by sideで検証しており、可能な限りこの false positive を減らすことでスクリーニングを維持して行くことが重要であると考えている。

一方、陽性であった1検体は実際にリンパ球の減少を反映していた。確かに、この新生児は一過性のリンパ球減少症ではあったが、新生児期にウイルス感染症の罹患率が高いことを考えると、これら TREC 値が低い新生児を早期に観察することは新生児期の重篤な感染症予防に繋がる可能性はある。

今後は、センター内の検体のみではなく、外部の施設からも検体を受け入れ、また、マススクリーニングを想定した解析の外部委託を目指し、実際の検体の流れや情報の保持を調査し、TREC の全国マススクリーニング導入に向けたパイロットスタディとしての本研究を継続して行っていく。

E. 結論

成育医療研究センター内で出産した新生児の

TREC によるスクリーニングを開始した。擬陽性率は0.3%程度であり、この値はより小さなものにする必要があると思われた。

一方、TREC 低値の新生児は、実際に一過性のリンパ球減少症を呈しており、TREC のよる T 細胞数の評価は正しいものと思われた。今後はセンター外からの検体の受け入れ、外部に対して TREC 測定の依頼を行う。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Nakazawa Y et al: Effects of enzyme replacement therapy on immune function in ADA deficiency patient. *Clin Immunol* 161: 391-393, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

特になし