

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）

原発性免疫不全症スクリーニングの現状と課題

研究協力者 今井耕輔（東京医科歯科大学小児科 准教授）

研究要旨

原発性免疫不全症は致死的な先天性疾患であるが、発症前に発見して治療を開始することによってその予後を大きく改善することが可能である。本研究では、本疾患に対する海外での NBS の実施状況を把握するとともに、東京医科歯科大学においてパイロット研究を実施した。

研究協力者

寺田尚美（東京医科歯科大学小児科）
稲見有希（東京医科歯科大学小児科）
葉姿汶（東京医科歯科大学小児科）
山下基（東京医科歯科大学小児科）
森丘千夏子（東京医科歯科大学小児科）
満生紀子（東京医科歯科大学小児科）
滝敦子（東京医科歯科大学小児科）
森尾友宏（東京医科歯科大学小児科）

2016 年 5 月から 12 月にかけて東京医科歯科大学で出生した 213 名の新生児を対象に、TREC 法及び KREC 法を用いてスクリーニングを実施した。

C．研究結果

（スライドを参照のこと）

KREC 法および TREC 法で得られる結果は出生体重、出生週数に影響を受けないものと考えられた。市販のキットと自家製キットのいずれにおいても適切な結果が得られることを確認した。

A．研究目的

原発性免疫不全症は致死的な先天性疾患であるが、発症前に発見して治療を開始することによってその予後を大きく改善することが可能である。欧米各国ではすでに NBS 対象疾患となっている。

本研究では、海外での状況を把握するとともに、東京医科歯科大学においてパイロット研究を実施した。

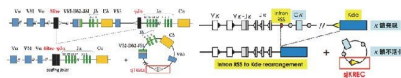
B．研究方法

D．考察

原発性免疫不全症を対象として NBS を実施するにあたっての技術的な課題や結果報告までの日数には問題がないと考えられた。

E．結論

原発性免疫不全症の NBS に関して、わが国における、より大規模なパイロット研究を実施する準備が整備された。



1. PID新生児スクリーニング

原発性免疫不全症 (PID)

- 生まれつき (原発性) 病原体に弱い (= 易感染性を示す) という症状を示す疾患群
- 人口1万人に1例程度 (日本に1万例近く)
 - 「指定難病」 (特定疾患の対象)
 - 小児期発症が多いが、成人期発症 (診断) 例も多い
 - 診断できていない見逃し例が多数存在
 - 診断前の死亡例が多数存在
- 病型 = 原因遺伝子は250以上!
 - 基本的に単一遺伝子疾患。X連鎖、常劣、常優、de novo.
 - 原因遺伝子の発見が正常免疫系の理解につながり、免疫の絡むcommon diseaseの病態の理解にもつながり、治療 (= 遺伝子治療) にも直結する

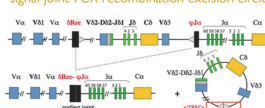
マススクリーニングの条件@SCIDとB欠損

Puck, 2006 at EU PID consensus meeting, modified

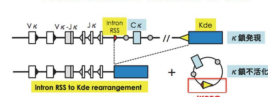
マススクリーニングの条件	SCID (重症複合免疫不全症)	B細胞欠損症 (XLAなど)
重症疾患である	未治療では乳児期に死亡	ときに乳児期に死亡。診断の遅れで慢性肺疾患
通常の検査では診断不能	新生児期は一見健康	新生児期は一見健康
妥当な発生率	頻度不明。約1/50,000人	頻度不明。約1/100,000人?
確定診断法が確立されている	T細胞数 (FACS) 芽球化反応 (PHA, ConA)	B細胞数 (FACS), IgGAM
有効な治療法が存在する	骨髄移植(BMT)、臍帯血移植(CBT) 遺伝子治療(γC, ADA), 酵素補充(ADA)	免疫グロブリン補充療法 (静注または皮下注)
早期治療が有効	感染症罹患前の治療は最良の予後	早期の免疫グロブリン補充開始で、肺炎、重症細菌感染症、慢性肺疾患は減少する
診断と治療が可能	小児免疫科、骨髄移植センター	小児科

TRECとKREC

signal joint TCR recombination excision circles



signal joint kappa-deleting recombination excision circles



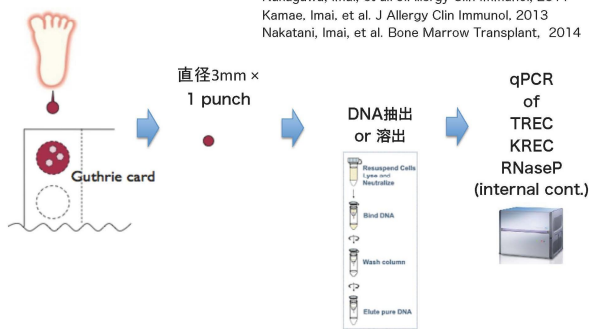
- T cell receptor (TCR) α鎖のVDJ遺伝子再構成 (TCRD deletion) の過程で生じる環状DNA
- T細胞の分化・増殖により複製されず、安定して存在するため、**新生T細胞**のマーカーとして利用可能
- 我々は、新生児濾紙血におけるsjTREC定量法を開発し、SCIDのマススクリーニングへの応用が可能であることを報告した
- κ鎖再構成時あるいはκ鎖のallelic exclusionのために、κ鎖定常領域 (Cκ) が染色体DNAから切り出された際に生じる環状DNA
- B細胞の分化・増殖により複製されず、安定して存在するため、**新生B細胞**のマーカーとして利用可能
- 我々は、新生児濾紙血におけるsjKREC定量法を開発し、XLAなどのB細胞欠損症のマススクリーニングが可能であることを報告した

Morinishi Y, Imai K, et al. J. Pediatrics, 2009

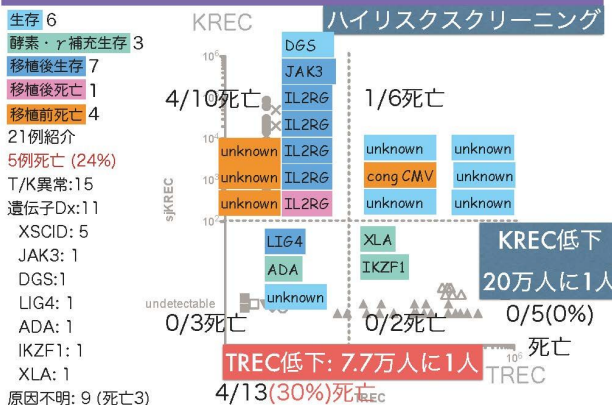
Nakagawa, Imai, et al. J Allergy Clin Immunol, 2011

Taqman法定量PCRによるTREC, KREC測定を用いた新生児PIDマススクリーニング

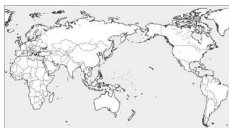
Morinishi, Imai, et al. J.Pediatrics, 2009
Nakagawa, Imai, et al. J.Allergy Clin Immunol, 2011
Kamae, Imai, et al. J Allergy Clin Immunol, 2013
Nakatani, Imai, et al. Bone Marrow Transplant, 2014



2014-2015年生まれ紹介患者21例のTREC/KRECと予後



2. PIDスクリーニング世界の現状



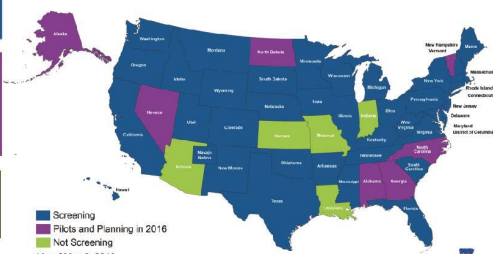
アメリカでのSCIDマススクリーニング

実施
38州

試験
実施
7州

未定
5州

SCID Newborn Screening: Current Status of Implementation Map
38 States Currently Screening for SCID - 84% of all newborns in the U.S. are receiving SCID ecreening

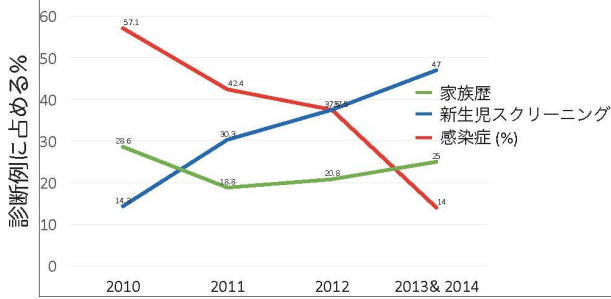


2016.5現在



90%の新生児がTRECスクリーニングを受けられている

米国ではすでに感染で発見されるよりも新生児マススクリーニングで発見されるSCIDの方が多くなっている→感染症なしで移植できる！



*Data from Primary Immune Deficiency Treatment Consortium (PIDTC)



Courtesy of Prof. Notarangelo LD Boston Children's Hospital

PIDスクリーニング各国の状況：18ヶ国



原発性免疫不全症(PID)の早期発見にご協力ください

原発性免疫不全症(PID)は生まれつき感染に弱い稀な病気です(1万人~5万人に1人)。BCGやロタワクチンなどの細菌生ワクチンで感染したつら。通常は早くに治るようなかぜが長引いたり、結核に感染することもある重い病気です。そのため、生後早期に診断し、感染症の予防や治療を行うことが重要です。当院では、全国の大学と共同でその早期診断法を確立しましたが、まだ日本人での正常値がわかりません。そこで、

あなたのお子様が生まれて、約5日後に行われる、新生児マススクリーニング検査の際に、0.1ml~3.0ml(2~3滴)程度の血液をいただけませんか。

●ご協力いただける方は、医師による詳しい説明がございます。説明書をご覧いただき、御同意いただける場合には同意書に御署名をお願いします。

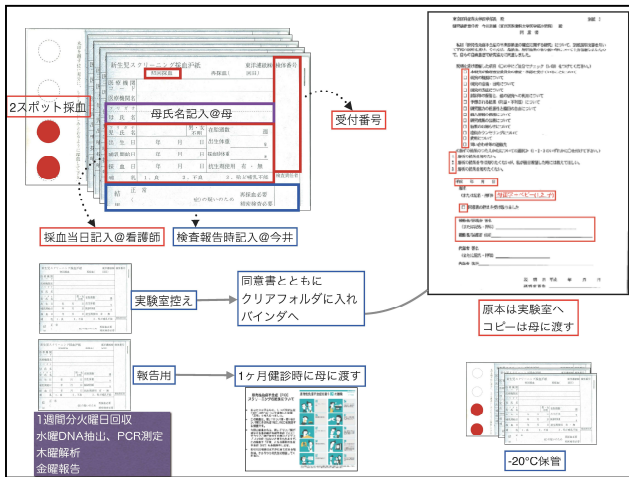
- ・お話しいただけるかどうかは任意です。同意書にサインしなくても大丈夫です(とあなたのお子様に不利な事は一切ありません。)
- ・個人情報は厳重に守らせていただきます。
- ・本研究(研究課題名：原発性免疫不全症の早期診断法の確立に関する研究)は、本学倫理委員会(承認番号1560番)の承認を受けております。
- ・お申込みは、下記にお電話/お書きください。

東京医科歯科大学小児科
 連絡先：〒113-8531 東京都文京区湯島3-1-45
 電話：03-3833-2474 FAX: 03-3833-0379
 訪問：おむすび組医師：寺岡雅晴

- ・月1回マザーズクラス(母親学級)で、新生児について、ワクチンについて、など話す中で、研究の説明と説明書の配布
- ・生後1~2日目(月水金)に新生児科医・小児科医による母への説明と同意書の取得(産科からは、有料になれば口頭説明要らない、と)
- ・生後4日目に採血



3. TMDU院内パイロットスクリーニング



1ヶ月健診で配布、間に合わなければ郵送

原発性免疫不全症 (PID) スクリーニングの結果について

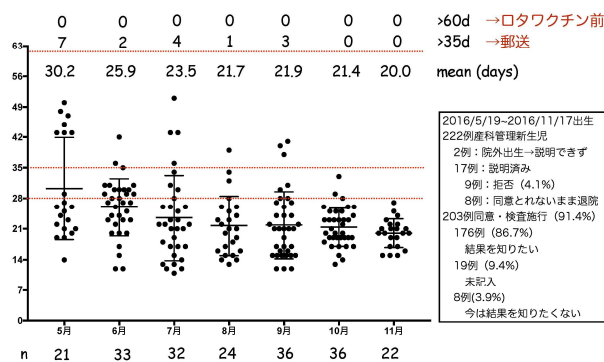
- ・あなたのお子さんの、リンパ球新生能(TREC,KREC)について検査した結果「正常」と考えられました。
- ・この検査は、若いリンパ球・若いリンパ球に含まれるTREC,KRECを測定する検査です。
- ・今回の結果からは、若いリンパ球が減少する重症複合免疫不全症(SCID)やリンパ球が減少する無ガンマグロブリン血症ではないと考えられますがこの検査で「正常」となる原発性免疫不全症(PID)も多数存在します。
- ・右の10の徴候のどれかにあてはまる場合は、かかりつけの先生にご相談ください。

原発性免疫不全症を疑う10の徴候

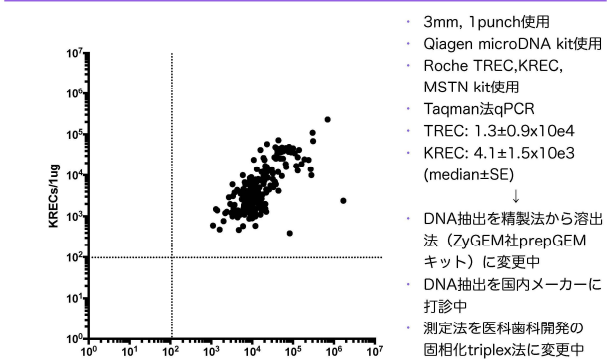


結果報告までの日数 (n=203)

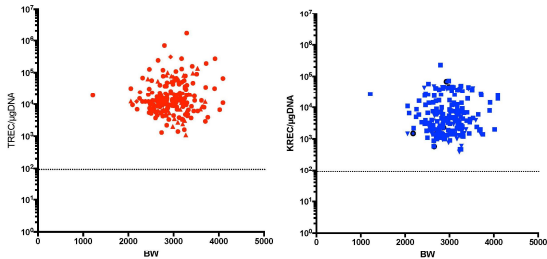
2016/5/19~2016/11/17出生分



2016/5/19~2016/12/1出生分：n=213

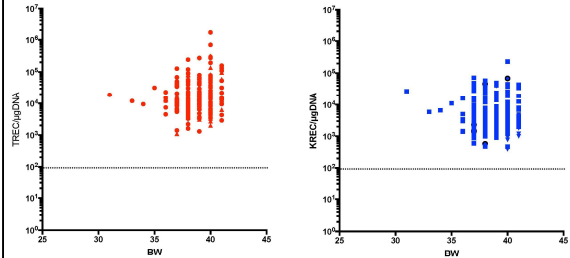


出生体重とTREC,KREC (n=208)

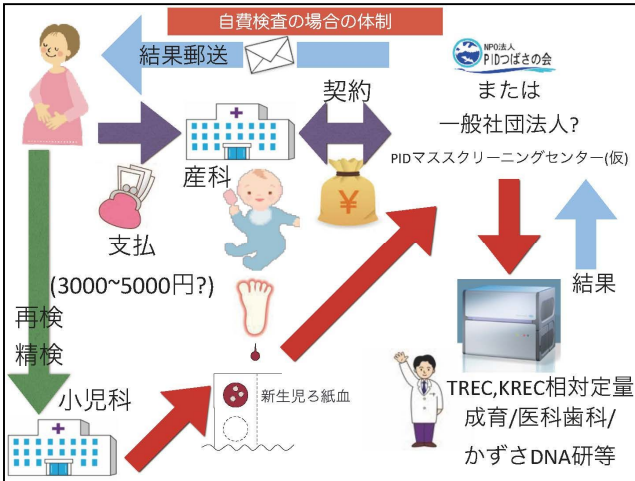


median 2968g (1214-4090g)
体重とTREC,KRECには相関はなさそう

出生週数とTREC,KREC (n=208)



median 39w (31-41w)
週数とTREC,KRECには相関はなさそう



4. 正常値設定とPID-NBS用キット作成

EnLite™ Neonatal TREC system

PUNCHING → **ELUTION** → **AMPLIFICATION** → **MEASUREMENT**

1.5mm/パンチで打ち抜き、直接黒色の96穴プレートに入れる

Elution bufferを入れて、boil 45分

試薬を入れて FRET法で測定
通常のPCR プローブがハイマシんで増幅 プリすると光る

FDA承認
測定時間：200分 (ハンズオンは60分)
定価：41万円/312検体=1315円/TREC
1プレート768検体

EnLite-TRECでの予備検討の結果

- n=476
- 東京医科歯科大学出生新生児濾紙血：n=88
- 岐阜大学から提供の新生児ろ紙血（岐阜大学から提供）：n=389
- β actin
 - median: >608
 - range: 17-608
- TREC
 - median: 64
 - range: 11-473
 - TREC<10: 0
 - TREC<20: 7 (1.47%)
 - 1例は β actinも17

TREC,KRECキット化

用途	A	B	C	D	E	F	G	H
検査対象	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC	TREC KREC
固相化pPrMix								

FAM, HEX, Cy5

既発売の再生医療用ウイルスキット(特許取得済み)・開発中の呼吸器感染症ウイルスキットと同様の方法で、TREC, KREC, RNasePの固相化プライマープローブキットを作成

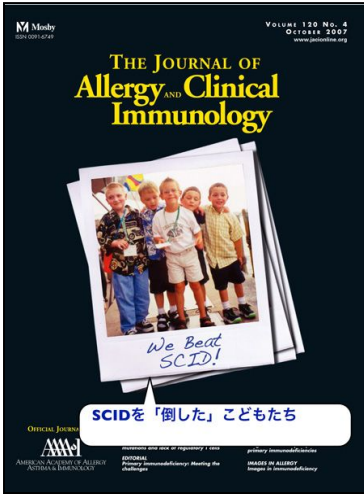
各社のリアルタイムPCR装置に対応

in houseのプライマープローブ (防衛、医科歯科改良版)、既発売のRoche社のキット (TREC, KREC)、Perkin Elmer社のキット (TREC, FRET法) との比較

EnLite, Roche, TMDU kitのTRECの比較 n=65

Method	Median	Range
TREC-FRET法	58.0 ± 9.9	
TREC/KREC qPCR法	235.7 ± 21.7	
TREC/KREC qPCR法	299.9 ± 32.8	

TMDU出生新生児ろ紙血を使用
p<0.0001, ANOVA
NS: Roche vs TMDU
TMDUkitも既発売法と同等
Perkinが低いのはPCR機械の増幅効率の問題?



皮下注γ-グロブリン補充療法を行う乳児 (IDF, 2008)