

機関番号：14301

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791018

研究課題名 (和文) 重症複合免疫不全症の新生児マススクリーニング実現への簡易かつ
低コスト測定法の開発研究課題名 (英文) Development of easy and cost-effective mass-screening of severe
combined immunodeficiency using neonatal Guthrie cards.

研究代表者

大嶋 宏一 (OSHIMA KOICHI)

京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員

研究者番号：60525377

研究成果の概要 (和文)：重症複合免疫不全症の新生児マススクリーニングの実現を目指し、簡便、低費用、かつ精度の高い診断法の技術開発を行った。乾燥濾紙血から直接 PCR が可能である PCR 試薬を用いて、T 細胞新生能の指標である TRECs と内在性コントロールである RNaseP の競合的 PCR 反応を行った。PCR 反応後にはマイクロチップ電気泳動装置を用いて、迅速・簡易・低コストのマススクリーニング系の開発に大きく前進することができた。

研究成果の概要 (英文)：It aimed to make the newborn mass screening of the severe combined immunodeficiency come true, and the technology of diagnostics with simplified method, low cost and accuracy was developed. We attempted to establish the best condition in competitive PCR of the endogenous control (RNaseP) and TRECs that was the marker of T-cell generation by using the PCR reagent that makes it possible to perform PCR directly from Guthrie card dried blood. It has made significant strides toward the development of a prompt, simple, and low-cost mass screening system with a microchip electrophoresis device after PCR.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・小児科学

キーワード：重症複合免疫不全症、マススクリーニング

1. 研究開始当初の背景

(1) 致死性の先天性免疫不全症である重症複合免疫不全症 (SCID) の患児は、乳児期早期に造血幹細胞移植が実施されれば高い生存率が得られ、格段に予後を改善できる。しかし、現時点では出生後早期に診断する方法はなく、多くの患児が移植前に重症感染症を発

症し、治療が困難となっている。

(2) SCID の発症頻度は 5 万から 10 万人に 1 人とされるが、その診断には時間を要するため、乳児期に未診断のまま重症感染症で死亡している可能性を考慮すると、実際の頻度は増加すると考えられる。また、本邦における

現行の新生児マススクリーニングの対象疾患であるフェニルケトン尿症の発見頻度は約 11 万人に 1 人、メープルシロップ尿症では約 57 万人に 1 人、ホモシスチン尿症では約 105 万人に 1 人とされ、これらと比較しても SCID は決して希な疾患ではない。

(3) 本邦では BCG ワクチン接種時期が平成 17 年度からは生後 6 か月以内に早められたことから、未診断の SCID 患者に接種された場合、極めて治療に難渋する播種性重症 BCG 敗血症を発症する可能性が危惧される。

(4) T-cell receptor excision circles (TRECs) は、胸腺で T 細胞受容体の再構成が行われる際に生じる環状 DNA であり、SCID では著減ないし欠損することが分かっている。近年、欧米ではこの TRECs の定量が SCID のマススクリーニング法として有用である可能性を報告しており、本邦でも有用であることが報告されているが実現には至っていない。この主な原因は、コストの問題と現場における TRECs 定量の煩雑さの問題である。

2. 研究の目的

SCID の新生児マススクリーニングの実現を目指し、簡便、低費用、かつ精度の高い診断法の技術開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 対象

SCID 症例および正常コントロールの乾燥濾紙血の入手については防衛医科大学校小児科によって、個人情報取り扱いを考慮し、必要に応じて自治体への使用申請の提出を経て許可を取得し、さらに同意書を取得した上で、現行の新生児マススクリーニング検査の委託先施設から供与あるいは貸与を受けた。本研究では防衛医科大学校病院の協力を得て、乾燥濾紙血の貸与を受けた。

(2) 乾燥濾紙血からのゲノム DNA の抽出

本研究では手技的な煩雑さおよび費用を最小限にするために、乾燥濾紙血から直接 PCR が可能である Ampdirect® Plus / NovaTaq™ Hot Start DNA Polymerase (Shimadzu) を用いて、乾燥濾紙血からのゲノム DNA の抽出は行わず、直接 PCR 反応を行った。

(3) 内在性遺伝子との競合的 PCR 法

上記の PCR 反応液に TRECs のプライマーだけではなく、PCR の際の内在性コントロールとしての RNaseP (RNaseP RNA component H1, RPPH1) のプライマーも入れ、1 つのチューブで 2 遺伝子による競合的 PCR 反応を行った。本研究ではリアルタイム PCR での遺伝子定量

ではなく、手技的な煩雑さおよび費用を最小限にするために、PCR 後にマイクロチップ電気泳動装置である MCE-202 Multina (Shimadzu) を用いて、半定量して評価した。

正常人では両遺伝子の PCR 産物が十分に認められるが、SCID 患者では TRECs のみがほとんど認められなくなるという条件検討を行った。

4. 研究成果

(1) SCID 患者および正常コントロールの乾燥濾紙血の収集

本研究期間内に、防衛医科大学校小児科の協力を得て、同意書取得後に、現行の新生児マススクリーニング検査の委託先施設から正常コントロールの乾燥濾紙血 174 枚と SCID 患者の乾燥濾紙血 9 枚を供与あるいは貸与を受けることができた。マススクリーニングの実現には、最終的に実際の患者検体で感度および感受性を確認する必要があるが、非常に稀な疾患である SCID 患者の乾燥濾紙血を複数入手できたことの意義は大きい。

(2) 正常コントロールにおける競合的 PCR

TRECs と RNaseP の 2 遺伝子の PCR バンドを適切に得られる条件 (濾紙血パンチのサイズ、テンプレート量、プライマー量、PCR 反応条件) を確立することができた。

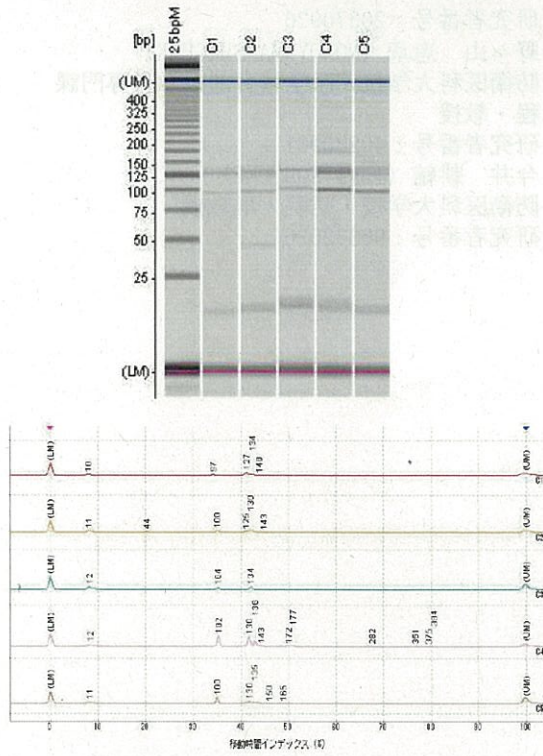
PCR 反応条件

95°C 10min	} ×40cycle
94°C 30s	
58°C 30s	
72°C 30s	
72°C 3min	

PCR 反応液

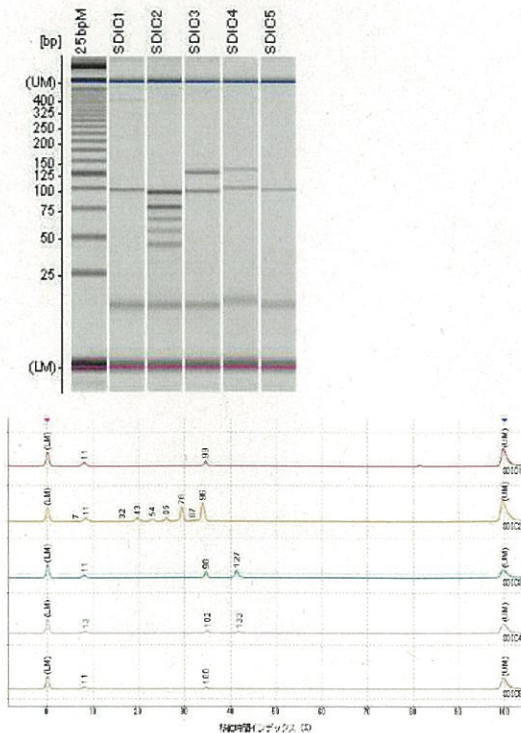
• 2×AmpDPlus	10uL
• 2.5uM RNaseP-F	1uL
• 2.5uM RNaseP-R	1uL
• 10.0uM Rec	1uL
• 10.0uM Ja	1uL
• BIOTAQ_HS	0.1uL
• DW	up to 20uL

上記 20uL の PCR 反応液に打ち抜いた乾燥濾紙血 (1.25 mm パンチ) を 1 枚加え直接 PCR を行い、PCR 後の反応液 10uL を別のチューブに移し、MultiNA (MEC-202) の DNA-500 キットを用いて、測定したところ、以下のように健康人 5 名とともに、約 130 bp の TRECs と約 100 bp の RNaseP のバンドを認めた。

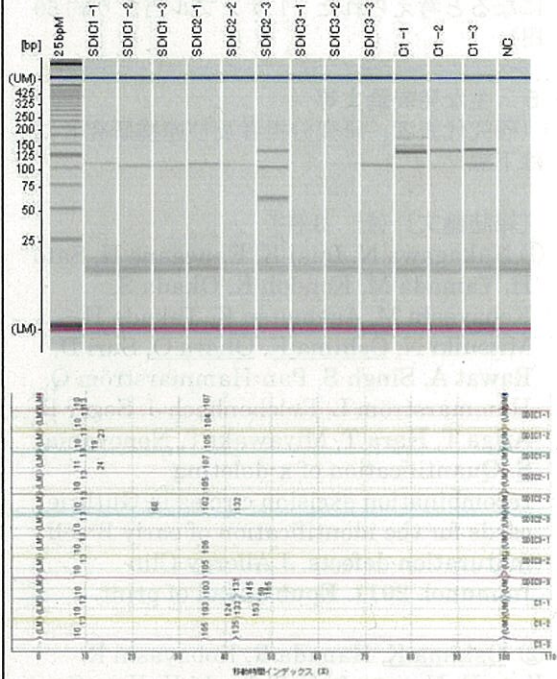


(3) SCID 患者における競合的 PCR

上記(2)の条件で SCID 患者のサンプルで評価を行うと、以下のように SCID3 と 4 のサンプルで TREC_s を認めた。



微量の DNA のキャリーオーバーおよび DNA のコンタミネーションの可能性は別実験で排除しており、SCID 患者検体に微量ながら残存する TREC_s を検出した可能性も考えられた。ただし、PCR 条件が未だ不安定である可能性も否定できないため、SCID 患者検体の n 数を増やして再検討を行った。



すると、正常コントロールでは再現性良く TREC_s と RNaseP の 2 遺伝子ともに PCR バンドを認めたが、SCID 患者検体では再現性が得られず、同じ検体間で結果にバラつきを認めた。

以上より、正常コントロール検体では TREC_s の DNA が十分にあると考えられ、検出条件が安定であることは判明したが、患者検体ではごく微量の DNA に対する PCR 反応であることが不安定さの原因と考えられ、プレート量を増やす必要がある可能性があるということが分かった。逆に、これまでに確立している Taq Man probe を用いたリアルタイム PCR の系よりも、感度が良く、患者検体からも TREC_s を検出してしまうという可能性も否定できない。

以上のように、実際の患者検体でしか問題点が明らかにならない点が判明した。これまでの検討で、実験系の感度および感受性を確認する体制が整い、マスキングの実現に向けて大きく前進したと考えられる。

(4) 手技的な煩雑さおよび費用の削減

今回行った乾燥濾紙血からのゲノム DNA の抽出法では、抽出キットを使用しないことからコスト削減に寄与した。また、リアルタイム PCR ではなく、MCE-202 Multina を使用することにより、全自動で 1 回 108 サンプル、1 分析あたり最速 75 秒での分析が可能となり、分析費用がリアルタイム PCR の約 10 分の 1 になると考えられた (1 サンプル当たり約 50 円)。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

① Nakagawa N, Imai K, Kanegane H, Sato H, Yamada M, Kondoh K, Okada S, Kobayashi M, Agematsu K, Takada H, Mitsuiki N, Oshima K, Ohara O, Suri D, Rawat A, Singh S, Pan-Hammarström Q, Hammarström L, Reichenbach J, Seger R, Ariga T, Hara T, Miyawaki T, Nonoyama S. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects. *J Allergy Clin Immunol*. 2011. Epub ahead of print.

② Oshima K, Hanada R, Kobayashi R, Kato K, Nagatoshi Y, Tabuchi K, Kato S. Hematopoietic stem cell transplantation in patients with severe congenital neutropenia: An analysis of 18 Japanese cases. *Pediatr Transplant*. 14: 657-663, 2010

③ Oshima K, Yamazaki K, Nakajima Y, Kobayashi A, Kato T, Ohara O, Agematsu K. A case of familial Mediterranean fever associated with compound heterozygosity for the pyrin variant L110P-E148Q/M680I in Japan. *Mod Rheumatol*. 20: 193-195, 2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大嶋 宏一 (OSHIMA KOICHI)
京都大学・iPS 細胞研究所・特定研究員
研究者番号: 60525377

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

小原 収 (OHARA OSAMU)
(財)かずさ DNA 研究所・ヒトゲノム研究

部・副所長

研究者番号: 20370926

野々山 恵章 (NONOYAMA SHIGEAKI)

防衛医科大学校・医学教育部医学科専門課程・教授

研究者番号: 40280961

今井 耕輔 (IMAI KOHSUKE)

防衛医科大学校・病院・准教授

研究者番号: 90332626