

# 重症複合免疫不全症の新生児スクリーニング用診断薬の開発

福士 勝 [株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー／所長]  
 藤井 正 [株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー／マネージャー]  
 水江 由佳 [株式会社札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー／主任研究員]  
 伊藤 禎司 [株式会社岸本医学研究所／試薬部長]  
 花井 潤師 [札幌市衛生研究所／保健科学係長]  
 野町 祥介 [札幌市衛生研究所／技術職員]  
 有賀 正 [北海道大学医学研究科生殖・発達医学講座小児発達分野／教授]  
 今井 耕輔 [東京医科歯科大学大学院医歯学総合研究科小児周産期地域医療学／准教授]

## 背景・目的

重症複合免疫不全症(Severe combined Immunodeficiency ; SCID)は、T細胞の欠如または著減を特徴とする免疫能低下による乳児期に様々な重症感染症を繰り返す致死の先天性免疫不全症である。しかし、最近の治療技術の進歩により、感染症に罹患する前に治療できれば、生存率95%以上の根治が期待できる。そのため乳児期早期の診断はさわめて重要である。そこで本研究開発では、SCID 患児で低下する血中T細胞CD3抗原を定量する酵素免疫測定法(ELISA)を新規開発し、新生児マススクリーニングの新規検査項目として導入することを目指す。

## 内容・方法

1) 新生児マススクリーニングの検査材料は、乾燥濾紙血液であり、一般的な血清サンプル等と比較して30倍以上高い検出感度が求められる(図1)。そのため、

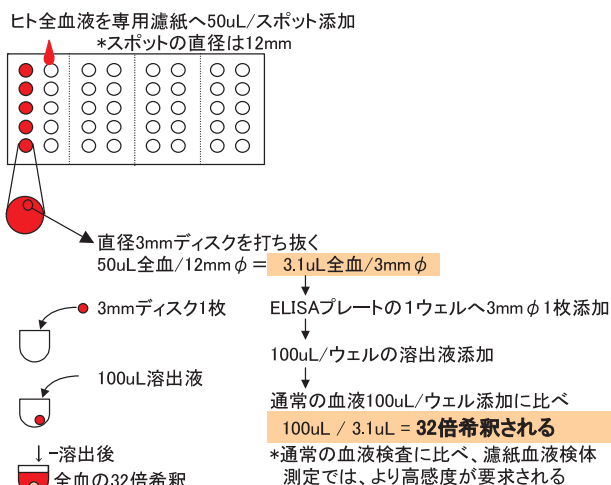


図1 新生児マススクリーニングの検査材料(乾燥濾紙血液)測定に要求される感度

構成試薬の抗体の各種修飾方法の改良により、スタートアップ研究での検討成果であるCD3 ELISA 測定系(図2)の高感度化を検討した。さらに、高いバックグラウンドの改善のためプレート洗浄液改良の検討を行った。

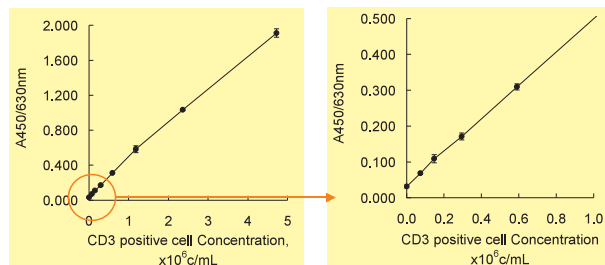


図2 CD3陽性細胞(Jurkat E6-1細胞株)の溶解液測定時のCD3 ELISA 測定系の感度と直線性

- 2) 抗凝固剤処理したヒト全血から分画した赤血球、白血球、血漿を用い、CD3陽性細胞濃度既知の全血液を再構成した。専用濾紙へ再構成全血液を50μLずつ滴下し、乾燥する方法で標準濾紙血液の検討を行った。
- 3) 乾燥濾紙血液からT細胞CD3抗原を効果的に溶出するため、界面活性剤、タンパク質保護剤、pHなどの最適条件を調べ、溶出液作製の検討を行った。
- 4) 札幌市衛生研究所が確立したSCID検査法の1つであるT-cell receptor excision circles(TRECs; T細胞新生能のマーカーであるT細胞受容体の遺伝子再構成時に生成される環状DNA)定量的PCR法によりTRECs解析の検討を行った。

## 結果・成果

昨年度、十数種の抗ヒトCD3抗体を用い、200通り以上の組み合わせから抗原抗体反応に最適な抗体の組み合わせを選択し、CD3 ELISA 測定系の開発に成功し、さらにCD3陽性細胞(ヒトT細胞及びJurkat E6-1細胞株)の溶解液中CD3の定量が可能であることを確認できた。CD3陽性細胞の溶解液をサンプルとした場合、細胞濃度依存的に良好な直線性を示し、検出感度はCD3陽性細胞濃度 $0.074 \times 10^6 \text{ cells/mL}$ であった(図2)。しかし、本研究開発で目指す新生児スクリーニング用の濾紙血液をサンプルとした場合、一般的な血清サンプル等と比較して30倍以上高い検出感度が求められる。そこで、本研究開発では、CD3 ELISA 測定系の高感度化を検討し、以下の結果が得られた。

1) CD3 ELISA 測定系構成抗体の修飾方法の改良

ELISA 構成試薬の抗体を消化、還元、特殊修飾方法により高感度化を検討した。その結果、従来測定系より約2倍に感度が上がる修飾方法を見出した。また、全血中の赤血球が原因となる高値バックグラウンドの問題があり、プレート洗浄液の組成を中性からアルカリ性にすることでバックグラウンドの改善に成功した。

2) CD3定量のための標準濾紙血液の作製検討

健康成人の全血から精製した CD3 陽性 T 細胞あるいは Jurkat E6-1 細胞株の CD3 陽性細胞濃度を FACS とヘマサイトメーターを用いて算出した。これら CD3 陽性細胞と抗凝固剤処理したヒト全血から分画した赤血球と血清を用い、CD3 陽性細胞濃度既知のヒト全血液を再構成し、専用濾紙へ滴下し、乾燥させることで濾紙血液標準品を作製できた。

### 3) 乾燥濾紙血液からの CD3 の溶出方法の検討

抗原抗体反応阻害率が低いとされる界面活性剤 Zwittergent 数種類を新たに加え、溶出液組成を検討した結果、TritonX-114 が最も高い溶出効果を示した(図3)。さらに、TritonX-114 による抗原抗体反応の阻害低減方法を検討し、TritonX-114 の最適濃度や ELISA 反応時の溶出液添加方法を改良することで反応性の向上を認めた。

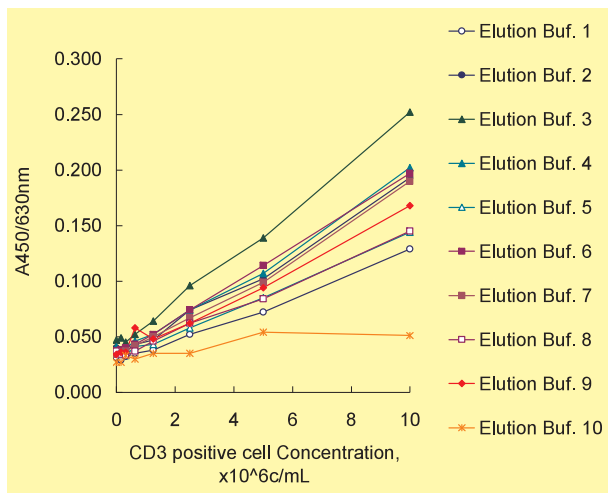


図3 各種溶出液による乾燥濾紙血液からの CD3 溶出効果比較(Elution Buf. 3～5 ; TritonX-114 含有)

### 4) CD3 ELISA 測定系の性能評価のための TRECs 解析の検討

SCID 診断方法の1つである TRECs の定量 PCR を行い、本研究開発で構築している CD3 ELISA 測定系の感度・精度を評価するための乾燥濾紙血液サンプルのデータを蓄積した。

## 今後の展望

濾紙血液 CD3 ELISA 測定系の目標感度達成には、さらに約5倍の感度アップが必要であり、改良検討を継続し、臨床応用可能な CD3 ELISA 測定系の完成を目指す。課題解決後は CD3 ELISA 測定系の製品化と治験を実施して診断薬の承認を得る。約2年間で新生児30万人以上を対象としたパイロットスタディを実施する。全国レベルでのスクリーニングの開始に向けて、全国各地の検査施設やスクリーニング指導医療機関の専門医等からなる共同研究組織を確立し、全国レベルでの SCID の新生児スクリーニング実施のためのエビデンスを得る。