

分担研究課題：精度管理体制の構築

研究分担者：但馬 剛（国立成育医療研究センター研究所マススクリーニング研究室・室長）

重症複合免疫不全症と脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニングの精度保証に関する手引き ー検査施設の要件と検査実施に関する手引き（案）ー

研究協力者：福士 勝（札幌イムノ・ダイアグノスティック・ラボラトリー・顧問）

研究要旨

【背景】日本マススクリーニング学会は新生児マススクリーニング（NBS）の基準、指針、手引きとして、1997年の新生児スクリーニングの手引き、2013年のタンデムマス・スクリーニング開始時には「検査施設基準と検査実施基準」を報告してきた。2025年1月からはこども家庭庁による重症複合免疫不全症（SCID）と脊髄性筋萎縮症（SMA）のNBSが実証事業として開始されている。検査は従来のNBS対象疾患とは異なる遺伝子検査法により行われていることから、検査の総合的な精度保証に関する指針や手引きの発行が望まれる。

【目的】都道府県・政令指定都市からSCIDとSMAのNBS（SCID/SMA-NBS）を委託された指定検査機関における精度保証を確保し、検査の標準化を図るため検査施設が備えるべき要件と検査実施に関する要件を手引き（案）として作成する。

【方法】SCID/SMA-NBSの精度保証の手引きに記載されるべき要件としてその項目と内容を検討するため、検査施設の要件と検査実施に関する精度管理に必要と思われる参考資料を収集した。

【結果】SCID/SMA-NBSの検査施設として遺伝子検査に要求される管理組織体制、検査室の構造設備、検査能力、精度保証体制、個人情報管理を要件とし、検査実施では検査項目、検査法、検査法の妥当性評価、カットオフ値の設定、精度管理を要件として検討して案をまとめた。

【考察】SCID/SMA-NBSの精度保証の手引きは検査実施施設だけではなく、採血医療機関、検査主体の都道府県・指定都市の担当部門の理解も得てスクリーニングが行われることが望まれる。

研究協力者

石毛 信之
東京都予防医学協会母子保健検査部・部長
花井 潤郎
北海道薬剤師会公衆衛生検査センター・
技術顧問
吉田真一郎
KM バイオロジクス株式会社
新生児スクリーニングセンター・課長
酒本和也
大阪市環境保健協会・検査部長

（Newborn Screening; NBS）を委託された指定検査機関における精度保証を確保し、検査の標準化を図るため検査施設が備えるべき要件と検査実施に関する要件を手引き（案）として作成する。

B. 研究方法

SCID/SMA-NBSの精度保証の手引きに記載されるべき要件としてその項目と内容を検討するため、検査施設の要件と検査実施に関する精度管理に必要と思われる参考資料を収集した。

参考資料として厚生労働省の遺伝子検査関連法令と通知文書および関連検討分科会報告書、海外のISO規格15189:2022（臨床検査室の品質と能力に関する特定要求事項に関する国際規格）、米国Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI)のNBS関連ガイドラ

A. 研究目的

都道府県・政令指定都市から重症複合免疫不全症（Severe Combined Immuno Deficiency; SCID）と脊髄性筋萎縮症（Spinal Muscular atrophy; SMA）の新生児スクリーニング

イン、遺伝子検査に関する国内外のガイドラインおよび SCID/SMA の NBS に関する学術文献および米国 Association of Public Health Laboratory (APHL) の SCID・SMA 関連のシンポジウムと遺伝子検査関連研修会を参考資料とした。

(倫理面への配慮) 該当事項なし

C. 研究結果

検査施設の要件に関する手引き(案)と検査実施に関する手引き(案)を作成した。各手引きの目次を下記に記載し、全文を別紙として添付した。

I. 検査施設の要件に関する手引き

1. 管理組織体制
2. 検査室の構造と設備
3. 検査能力
4. 精度保証体制
5. 個人情報の管理

II. SCID/SMA-NBS 検査の手引き

1. 検査項目
2. SCID・SMA の NBS の検査法
3. qPCR 装置導入時の機器の選定, 機器の校正と検証および導入後の保守点検
4. qPCR 検査法の妥当性の評価とカットオフ値(基準値)の設定
5. 精度管理
6. 検査実施における注意点

D. 考察

日本マススクリーニング学会からは既に NBS検査施設基準及びタンデムマス・スクリーニングの検査施設基準及び検査実施基準がガイドラインとして提案されている。本手引きの作成では基本的には上記基準に準拠することとした。しかしながら、SCID/SMA-NBSがわが国のNBSとして初めての遺伝子検査により実施されることから、追加すべき要件がある。遺伝子検査において追加すべき要件の検討では遺伝子検査に関連する国内法令や国内外のガイドライン、

SCID/SMA-NBSに関連する学術文献等を参考にした。

検査施設の要件に関する手引きでは、遺伝子検査実施において要求される管理組織体制、検査室の構造設備、検査能力、精度保証体制、個人情報の管理を主要項目としてまとめた。

検査実施の関する手引きでは、SCID/SMA-NBS検査で要求される検査項目、検査法、検査法の妥当性評価、カットオフ値の設定、精度管理を要件として案をまとめた。このSCID/SMA-NBSの精度保証の手引きが検査実施施設だけではなく、スクリーニングに関与する採血医療機関、検査主体の都道府県・指定都市の担当部門でも利用され、関係機関の連携により各自治体のSCID/SMA-NBSシステムの改善が継続して行われることが望まれる。

E. 結論

本案は日本マススクリーニング学会技術部会系理事とqPCR-SCID/SMA-NBS検討ワーキンググループメンバーによる検討後、日本マススクリーニング学会精度保証システム委員会の承認を経て暫定版(Tentative version)とし、日本マススクリーニング学会会員および検査キットメーカー、機器メーカーからパブリックコメントを求めて承認版(Approval version)としてまとめることによりSCID・SMAのNBSの精度保証体制の確立に寄与できる。

F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表
 - 1) 福士 勝, 花井潤師, 石毛信之, 他：定量 PCR 法による SCID・SMA の新生児スクリーニングの精度保証の指針(案)について. 第 52 回日本マススクリーニング学会学術集会, 名古屋市, 2025. 10. 3-4.

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

該当案件なし

**重症複合免疫不全症および脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニングの
精度保証に関する手引き
―検査施設の要件に関する手引き（案）と検査実施に関する手引き（案）―**

**I. 重症複合免疫不全症および脊髄性筋萎縮症の新生児スクリーニングを行う検査施設の
要件に関する手引き（案）**

重症複合免疫不全症（SCID）および脊髄性筋萎縮症（SMA）の新生児スクリーニング（SCID/SMA-NBS）を行う検査施設が満たすべき事項として、管理組織体制、施設の構造と設備、検査能力、精度保証体制、個人情報の取扱いを具体的な内容を手引きとしてまとめた。方法は、既に報告されている日本マススクリーニング学会の新生児マススクリーニング検査施設基準^{1, 2)}、新生児スクリーニング所管行政部門からの通知文書「先天性代謝異常等検査の実施について」（厚生労働省子ども家庭局母子保健課長通知）³⁾と「新生児マススクリーニング検査に関する実証事業に係る外部精度管理について」（こども家庭庁成育局母子保健課事務連絡）⁴⁾に準拠した。

さらに、国内の NBS として初めて遺伝子検査法により行われる SCID/SMA-NBS において追加すべき事項については、特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会の「遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン」⁵⁾、遺伝子検査に関連する厚生労働省の臨床検査関連法令、遺伝学的検査に関連する国内学会のガイドライン、国際機関、欧米の臨床検査関連団体の基準（Standard）や指針（Guideline）、手引き（Guidance）、海外の関連学会の学術文献等を検索し、国内の SCID/SMA-NBS 検査実施施設が満たすべき要件を収集して手引きとしてまとめた。

1. 管理組織体制

1) 精度管理責任者

遺伝子検査による SCID/SMA-NBS 検査施設の管理者は、検体検査全般の精度管理に係る責任者の他に、遺伝子検査の精度の確保に係る責任者を選任しなければならない^{6, 7)}。

なお、医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行では、責任者は医師又は臨床検査技師のほか、遺伝子関連・染色体検査の専門知識及び経験を有する他の職種を認めるものとされ、外の検体検査の精度の確保に係る責任者との兼任は妨げないとされている。遺伝子関連・染色体検査の専門知識及び経験を有する他の職種の例として下記の者が検体検査の業務について3年以上の実務経験及び精度管理についての3年以上の実務経験を有する者が考えられるとされている。厚労省の例示では大学院、大学、短期大学、専門学校又は高等専門学校において分子生物学関連科目（分子生物学、遺伝子検査学、細胞遺伝学、人類遺伝学、微生物学、生化学、免疫学、血液学、生理学、病理学、解剖学、動物細胞工学、生物科学等）を履修した者が望ましく、医師又は臨床検査技師を遺伝子関連・染色体検査を行う場合の精度の確保に係る責任者とする場合は検体検査の業務について3年以上の実務経験及び精度管理についての3年以上の実務経験を有する者とするのが望ましいとされている。

2) 検査技術者

SCID/SMA-NBS を行う検査施設の管理者は、NBS に関する知識と技術に加えて遺伝子検査に精通した検査技術者を配置しなければならない^{2, 5, 6, 7, 8)}。

SCID と SMA の NBS の検査施設管理者は、検査開始前に検査に従事する担当者に対して NBS に加えて遺伝子検査に関連する研修等を受講させること、検査の開始後も関連学会等が行う研修会や学術集会などへの参加による最新知識の取得と検査技術の向上を図るための体制を整備しておかなければならない。また、SCID/SMA-NBS の検査担当者は従来のスクリーニングと同様に日本マススクリーニング学会認定技術者制度の認定技術者であることが望ましい。

3) 関係機関との連携

- (1) SCID/SMA-NBS 検査施設は、検査委託する都道府県および政令指定都市が組織する新生児スクリーニング関係機関および関係者により構成された連絡協議会に参加し、採血を担当する医師会産婦人

科及び小児科医会、精密検査・診断・治療部門の専門医療機関、保護者への教育及び精密検査対象者や確定患者の追跡調査等を行う自治体の母子保健担当部門との密接な連携体制を確保しておくべきである^{1, 2, 3, 4)}。

- (2) SCID/SMA-NBS 検査施設は、連絡協議会等の地域の連携組織が行うスクリーニングシステムの評価と改善に協力することが求められる^{1, 2)}。
- (3) SCID/SMA-NBS 検査施設は、従来の先天代謝異常症および先天性内分泌疾患の NBS と同様に SCID および SMA の NBS のコンサルタント医師を選任し、NBS の検査結果の判定についていつでも相談できるようにしておかなければならない^{1, 2)}。
- (4) SCID および SMA は稀少疾患であり、これらを専門とする医師は多くない。SCID/SMA-NBS 検査施設は実施主体の都道府県および指定都市の母子保所管部門と連携し、NBS 陽性者発生時の確定診断と治療開始が迅速に行われるようにするため、コンサルテーションの窓口となる地域スクリーニング中核医師及び地域中核医療機関を定め、SCID および SMA の全国ネットワークを介して専門医師の指導を受けることができる体制を確立しておかなければならない^{1, 2, 3, 4)}。

2. 検査室の構造と設備

- 1) qPCR による SCID/SMA-NBS を行う検査室の環境は国内関連法令^{6, 7, 8)}と国際基準等^{9, 10, 11, 12)}に準拠した室内環境を整備しなければならない。
- 2) SCID/SMA-NBS の検査は PCR 法であり、増幅サイクル数が 40 回では PCR 産物（アンプリコン）が 2⁴⁰ コピーまで増幅される。このため、全検査工程におけるコンタミネーションによる偽陰性発生の防止対策が重要であり、従来の生化学的検査法（免疫化学的検査法、酵素活性測定法、質量分析法等）と比較してより厳格な対策が必要である。このため、遺伝子検査施設はすべての PCR 前アッセイ段階とすべての PCR 増幅および PCR 後の段階を分離する一方向のワークフローが要求される。
- 3) 増幅前環境として①PCR 試薬の調製エリア（キャリブレータ DNA/プラスミド等の調製は除く）、②検体前処理エリア（検体処理と DNA 抽出）、③最終エリア（PCR プロセス実施）の 3 区画とすることが推奨されている。
- 3) 適切なレイアウトによる区画ができない場合は安全キャビネット、クリーンベンチ等を利用すべきとされている。増幅前および検体処理作業区域の潜在的汚染を監視するため、定期的な拭き取り検査も推奨されている。
- 4) 乾燥ろ紙血（DBS）の取扱いでは、マイクロプレートへの DBS 打ち抜き時のクロスコンタミネーションを避けるため安全キャビネット内で行うことは DBS による感染性の制御も含めて有効である。
- 5) 遺伝子検査室で使用する下記の設備、機器、器具、消耗品等は上記の区画ごとに専用とすることが推奨されている。

*DBS 打ち抜き機器/器具、検査試薬の保管と調製エリア、冷蔵庫、冷凍庫、安全キャビネット、クリーンベンチ、卓上型マイクロチューブ遠心機、マイクロプレート遠心機、ボルテックスミキサー、マイクロピペット/チップ、マイクロチューブ、白衣、ディスポーザブル手袋等

3. 検査能力

- 1) SCID/SMA-NBS においても、新生児マススクリーニング検査施設基準²⁾と同様に検査施設は年間 2 万から 3 万検体以上を受託できる能力を有していることが望ましい。
SCID と SMA は患者頻度が 2 万から 5 万人に 1 人と少ないため、年間検査数が 2 万人以下では真陽性例検出の確率が低く、NBS で SMA 陽性発見時の緊急対応の経験が乏しくなるため適切な対応が遅くなる恐れがあり、さらに年間検査数が少ないと毎日実施しなければならない検査で使用するキット・試薬の 1 人当たりコストが高くなり費用対効果が低下する。
- 2) SCID/SMA-NBS 検査施設は、従来の新生児スクリーニング対象疾患の検査と並行して検査を実施できる能力を有し、スクリーニング陽性例のフォローアップが実施主体の自治体が定める実施要綱・要領および新生児スクリーニング連絡協議会のコンセンサスに従って行われるシステムを構築し

て、精密検査の受診および再採血が適切に行われることが求められる。^{1)、2)、3)、4)}。

アメリカの Cure SMA のレポート¹³⁾では SMA 陽性例で SMN2 が 2 コピーでは日齢 14 以内、3 コピーでは 29 日以内に治療が開始された児の予後が良好と報告されており、日齢 14 日以内に治療開始が行われるスクリーニングシステムの確立が重要とされている。日齢 14 以内に治療を開始するためには確定診断と治療を行う医療機関への受診は遅くとも日齢 8 から 10 日までに行われなければならない。

また、SCID/SMA-NBS の検査を外部検査機関に委託して実施するシステムでは新生児の DBS 検体の分割と再郵送などにより検査開始までのステップが増えるため、検査と検査結果報告の遅延によりターンアラウンドタイム (Turn Around Time; TAT) の増加を招き、適切な診断と治療開始が遅延する可能性がある。

- 3) ISO 15189⁹⁾等の基準に準拠した第三者認定の取得に必要な体制整備に努めることが望ましい。

遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン⁵⁾と医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令の施行について (厚生労働省医政局長通知)^{6)、7)}では、遺伝子関連・染色体検査の質については欧米と同じ水準を目指すことが必要であり、管理組織の構築及び必要な手順の文書化などにより、ISO 15189 や CAP 等の国際的な基準による第三者認定の取得に必要な体制整備に努めることが望ましいとされている。遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン⁵⁾においても国際的な基準による第三者認定の取得が推奨されている。

4. 精度保証体制

- 1) SCID/SMA-NBS を行う検査施設の管理者は、精度の確保に係る責任者 (精度管理責任者) に加えて、検査責任者および検査担当者などを選任し、検査の責任体制を文書で明確に規定しておかなければならない^{5)、6)、7)}。
- 2) SCID/SMA-NBS を行う検査施設は、遺伝子検査に必要な検査前、検査時、検査後の内部精度管理を実施するとともに、第三者機関が実施する外部精度評価プログラムに参加して総合的な精度保証体制を確立することにより検査の信頼性を保証しなければならない^{5)、6)、7)}。

- (1) 検査前の精度管理では、検査結果や迅速な検査結果の報告に影響を与える新生児および母親の正確な属性情報の確保、偽陽性及び偽陰性の原因となる不適切な DBS 検体や採血後に迅速に送付されていない医療機関に対して適切な DBS 検体を確保するための助言や指導を行う。

*採血医療機関における採血日齢が適正か、DBS の採血状態が適正か、採血後の DBS の乾燥・保管・郵送が適切か、低出生体重の有無、その他特記事項などの情報が正確に記載されているかを確認する。

- (2) 検査の精度管理では、検査機器保守管理標準作業書、測定標準作業書、並びに各種台帳を整備し、検査実施ごとに作業日誌に記載しておかなければならない。

*検体受領・受付標準作業書：郵送検体の受領、種分け、内容確認・問い合わせ等を徹底するための標準作業書を作成する。

*検査機器保守管理標準作業書：検査に用いる検査機器等の保守管理を徹底するために標準作業書を作成する。

*測定標準作業書：検査と測定担当者の検査手技の画一化を図り、測定者間の較差をなくすために作成される作業書であり、検査項目ごとに、「定義」、「臨床的意義」、「測定方法及び測定原理」、「検査手順 (フロー等)」及び「基準範囲及び判定基準」並びに以下の事項について記載することが想定されている。

・性能特性 (測定感度、測定内変動等)、検査室の環境条件、検査材料 (検体量、採取条件等)、試薬、機器、器具及び消耗品、精度管理試料及び標準物質の取扱方法、検査の変動要因、測定上の注意事項、異常値を示した検体の取扱方法、精度管理の方法及び評価基準、参考文献等。

*各種作業日誌および台帳として下記の事項が想定される。

- ・検体受付・仕分作業日誌：検体受付日時、受領者、附番した検体番号、特記事項、他課・科間の搬送日時等、検体受領・受付標準作業書に基づいて作成する。
- ・検査機器保守管理作業日誌：点検日時及び点検実施者名、業者による定期保守点検を受けた場合は、その作業内容、点検を行った業者名等、検査・測定作業の開始時に必要な機器の較正
- ・試薬管理台帳：試薬の有効期限、保管されている試薬の在庫、検査・測定作業の開始時に必要な試薬の較正

＊内部（統計学的）精度管理の実施とその記録として下記の事項が想定されている。

- ・実施日及び実施検査項目、実施者名、実施結果（検査エラー値が出た場合の考察等含む）が記載されていること。
- ・内部精度管理検体等により繰り返し検査した時の結果のばらつきの度合いを統計学的に評価した結果を記録し、検査結果が施設の内部精度管理基準内あるかどうかを確認した記録、基準を超えて検査が棄却された場合はその是正措置も記録することにより、検査結果の精度を確保する体制が整備されていること。

＊外部精度管理の実施とその記録（台帳）として下記の事項が想定される。

- ・都道府県・政令指定都市から委託された外部精度管理実施機関の外部精度管理プログラムに参加し、その評価結果を記録する。評価報告書で指摘事項があった場合は、その是正措置についても記録する。なお、外部精度管理の記録は外部精度管理調査実施主体が作成する報告書で代替可能である。

- (3) 検査後の精度管理では、検査データに基づく適切な判定、迅速な検査結果の報告が行われていること（臨床的に求められる TAT の確保）。再採血、並びに精密検査対象者の短期フォローアップ、精密検査対象者の長期フォローアップの情報を把握し、データベース化してスクリーニングシステムの改善を行うこと。

採血から DBS 受付までの日数、検査開始までの日数、検査結果とその判定までに要する日数などのデータを解析し、適正なスクリーニングが行われているかどうかを定期的に検証しスクリーニングシステムの改善を行うこと。

5. 個人情報の管理

- 5-1) 従来から行われている生化学的マーカーの測定による先天性代謝異常症と内分泌疾患の NBS は遺伝学的検査として実施されてきた。SCID/SMA-NBS も遺伝学的検査であるが、遺伝子断片もしくは遺伝子を取り扱う検査であり、これまで以上に厳重な個人情報の管理が確保されていなければならない。

- 5-2) 2011 年に日本医学会から「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」¹⁴⁾ が提出され、新生児スクリーニングの項目では、新生児マススクリーニングにおける遺伝学的検査の実施に当たっては、検査の実施前に保護者に十分な説明を行うこと、検査陽性であった場合には専門医療施設において遺伝カウンセリングを行った上で、確定検査としての遺伝学的検査を実施すること、診断が確定した場合には、遺伝カウンセリングを含む、疾患・治療に関する情報提供を行い、疾患への対応支援することが必要なこと、個人情報および個人遺伝情報の取扱いでは、個人情報の保護として個人情報保護法等を遵守した上で、遺伝情報にアクセスする医療従事者は、遺伝情報の特性を十分理解し、このガイドラインに基づき個人の遺伝情報を適切に扱うことが求められている。

- 5-3) 2014 年の特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会の遺伝子関連検査標準化専門委員会から遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン⁵⁾においても、法規制と倫理的配慮として医師法、医療法、個人情報保護法などの法規に準拠し、インフォームドコンセントや遺伝カウンセリングを徹底し、個人情報の保護の管理を重視している。さらに、遺伝子検査の倫理と社会的責任として、遺伝情報を含む個人情報保護と遺伝カウンセリングの重要性が強調されており、遺伝子検査の結果が個人や家族に与える影響を考慮し、適切な支援と情報提供を行う必要があるとされている。

5-4) 都道府県・政令指定都市から NBS を委託されている指定検査施設と指定検査施設から外部委託されている検査施設は、検体受付時に記録された個人情報データ、検査結果データ、フォローアップデータの保管方法と利用方法、検査終了後の残余 DBS 検体の保管、調査研究でのデータや残余 DBS 検体などの目的外利用時の倫理委員会の承認の取得等に関する標準作業書を整備しておくべきである。

II. SCID と SMA の NBS 検査に関する手引き

SCID/SMA-NBS を行う検査施設の検査能力の妥当性と検査結果の信頼性を確保するためには、各検査施設が行う精度保証・精度管理の結果を定性的および定量的に検証することが極めて重要である。このため、SCID/SMA-NBS の全ての工程における適切な手順と質の確保に要求される基準を作成し、その基準への適合度を評価し、その評価結果をもとに改善を行う方法を標準作業書としてまとめておくことが重要である。

SCID/SMA-NBS の検査法、検査施設の検査の妥当性と検査結果の信頼性の確保に必要な精度保証・精度管理の評価項目とルーチン業務で実施すべき評価項目を以下に示す。

なお、検査法とそのバリデーション並びに精度管理については国内関連法令・通知文書¹⁵⁾、アメリカの Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI) から出版されている SCID/SMA-NBS 関連のガイドライン^{16, 17)}、Association of Public Health Laboratories (APHL; 全米公衆衛生研究所協会) 主催の 2020 年 Molecular Training Workshop における報告^{11, 12, 18)} を参考とした。

1. 検査項目

1) SCID/SMA-NBS では、T 細胞受容体遺伝子再構成断片 (T cell receptor Recombination Excision Circle : TREC) の低下^{注1}、B 細胞 Ig κ 鎖遺伝子再構成断片 (Ig κ -deleting Recombination Excision Circle (Kappa-chain recombination excision circles) : KREC) の低下^{注2}、SMN1 遺伝子エクソン 7 ホモ接合欠失の有無^{注3}を指標として行われており、国内のすべての検査施設では TREC/KREC/SMN1 エクソン 7 ホモ接合欠失の有無、および内在性リファレンス DNA の 4 指標を同時に測定するマルチプレックス・リアルタイム定量ポリメラーゼチェーンリアクション (Multiplex Real time Quantitative polymerase Chain Reaction; マルチプレックス qPCR) が採用されている。

注 1. TREC は T 細胞受容体 (TCR) α 鎖の VDJ 遺伝子再構成 (TCR δ deletion) の過程で生じる環状 DNA で新生 T 細胞産生のバイオマーカーであり、SCID では低下または欠損するため SCID スクリーニングの指標としている。

注 2. KREC は B 細胞の Immuno globuline κ 鎖の遺伝子再構成の過程で生じる環状の遺伝子再構成断片 (Ig κ -deleting Recombination Excision Circle) は新生 B 細胞産生のバイオマーカーであり、X 連鎖性無ガンマグロブリン血症 (X-linked agammaglobulinemia; XLA) などの B 細胞欠損症のスクリーニングの指標としている。

注 3. SMN1 (survival of motor neuron 1; SMN1) 遺伝子は、運動ニューロンの正常な機能を維持する survival of motor neuron (SMN) タンパク質を産生している。NBS では SMA の 95% を占める SMN1 遺伝子エクソン 7 変異のホモ接合欠失の有無をスクリーニング指標としている。なお、残りの患者の 5% は現在の検査法では検出できない。

2. SCID と SMA の NBS の検査法

2000 年代後半にアメリカと日本から SCID-NBS の検査法として DBS から抽出された TREC および KREC を定量する qPCR 法の報告があり^{19, 20, 21, 22)}、ウィスコンシン州の NBS²³⁾ とアメリカ 11 州の NBS²⁴⁾ によりその有用性が報告された。アメリカでは SCID が 2014 年に RUSP の推奨疾患となり、TREC と内在性リファレンス DNA を測定するデュプレックス qPCR 法による NBS が主流となっていた。

2010 年代後半から始まった SMA の NBS は SMN1 の測定を TREC、KREC、内在性リファレンス DNA を同一ウェル内で定量するクワドルプレックス qPCR 法が開発され、2020 年代になると TREC、KREC、SMN1、内在性リファレンス DNA のマルチプレックス測定が主流となっている^{25, 26, 27, 28, 29, 30)}。最近ではデジタルド

ロップレット PCR 法 (droplet digital PCR : ddPCR) による SCID のルーチン検査法³¹⁾、SMA の二次検査法として SMN1、SMN2 コピー数の定量^{32, 33, 34)}、SMN1、SMN2、TREC、内在性リファレンス DNA のクワドルプレックス ddPCR の報告³⁵⁾があり、海外ではルーチン検査として ddPCR 法による SCID/SMA-NBS を行っている検査施設や SMA-NBS の二次検査法として ddPCR を行っている検査施設もある。

SCID と SMA の NBS の検査法として dPCR、ddPCR が利用可能であるが、国内外を含め多数検体処理能力 (スループット) が高く、検査コストが dPCR・ddPCR よりも安価なことから qPCR 法による検査が主流となっている。現在、国内の SCID/SMA-NBS 検査施設では自家製 qPCR 試薬 (検査室開発検査法、Laboratory Development Test; LDT) を使用する 1 施設を除いて、市販の研究用 qPCR キットが利用されている。このため本手引きでは qPCR 法による検査について記載する。

3. qPCR 装置導入時の機器の選定、機器の校正と検証および導入後の保守点検

- 1) qPCR 装置は 4 項目以上のマルチプレックス測定ができることが必須である。
- 2) SCID と SMA のスクリーニングに要求される正確度と精度を確保するため、導入時に装置メーカーによる校正が行われ正確な定量測定が保証されている。
- 3) qPCR 装置導入後は装置メーカーの使用ガイドラインにより定期点検と日常保守点検計画を作成し、保守点検ごとに保守点検台帳に実施年月日、実施者名、保守点検項目、点検結果を記載して保管する。

4. qPCR 検査法の妥当性の評価とカットオフ値 (基準値) の設定

4-1) スクリーニング開始前の検査法の妥当性の評価

検査法の妥当性評価の目的は、検査に使用する qPCR 装置と SCID/SMA スクリーニングキット/試薬が目的に適合していることを多角的な性能評価を行ってデータで示すことである。このため、検査施設では SCID/SMA-NBS の開始前に使用する検査法の性能を評価しておかなければならない。複数の qPCR 装置を使用する検査施設は装置ごとに検査法の妥当性の評価しなければならない。体外診断医薬品として承認された試薬を使用する施設では、製造・販売業者が保証する性能仕様どおりに機能していることを検証する (Verification; ベリフィケーション) が求められる。このため、体外診断用医薬品として承認済みまたは認可済みの検査キットを使用する検査施設では、製造・販売業者が保証する性能仕様のうち 1) 正確度、2) 精度、3) 検査結果報告が可能な範囲、4) 製造元の基準範囲 (正常値) が検査室の新生児集団に適していることを製造・販売業者が定めた性能仕様と同等であることを検証しなければならない。一方、研究用試薬または自家製試薬を使用する検査施設では検査法の妥当性確認 (Validation; バリデーション) を行わなければならない。現在国内で販売されている試薬・キットはすべて研究用試薬であり、使用開始前に検査法のバリデーションの実施が必須である。

定量的な検査では正確で再現性のある測定系を実現するために、ランダム エラー (精度) と系統的エラー (バイアス) の評価が行われる。SCID と SMA の NBS では陽性例の TREC/KREC/SMN1 は低値および検出されないレベルであり、測定系の検出限界 (LoD) と定量下限 (LoQ) の評価も重要である。

DBS を用いる SCID と SMA の NBS の検査法の評価でもサンプリングから qPCR までのプロセス全体を考慮する必要がある。DBS から DNA を抽出するステップでの DNA の抽出効率は使用するキット・試薬と抽出手順により異なることから、TREC/KREC/SMN1 濃度 (コピー数) 既知の標準プラスミド/合成オリゴヌクレオチド溶液を添加した DBS を作成して同様の評価を行うことが求められる。

4-2) 妥当性確認項目

一般的に検査法のバリデーションの評価項目として下記の 1) から 9) までの項目があるが、スクリーニング対象疾患の指標ごとに必要な項目を実施する。

- 1) 正確性、2) 精度、3) 分析感度、4) 分析特異性、5) 定量性-報告可能な検査結果範囲、6) 基準範囲 (正常値)、7) 検体と試薬の安定性、8) キャリーオーバー試験、9) ロバスト性 (堅牢性)

なお、上記の評価項目が使用するキット・試薬メーカーの添付文書の性能項目に記載されている場合はメーカーの協力を得て同様の方法で実施すべきである。

4-2-1) 正確度/真度 (Accuracy)

正確度は既知濃度の標準試料を測定し、その回収率（測定値/真値）から評価できる。

- ・ 正確度は使用キット添付の真陽性と正常の DBS 内部精度管理検体および日本マスキング学会の技能試験（PT）検体を測定して評価する。
- ・ 測定された検体が期待される結果と一致し、偽陰性および偽陽性がなければ正確度は許容範囲内とみなすことができる。
- ・ 同一検査法（試薬・検体調製手順が同じ）、同型の qPCR 装置を使用する検査施設間で新生児 DBS 検体の測定値の散布図、相関係数と回帰直線などからバイアスの有無を確認できる。

4-2-2) 測定精度/再現性 (Analytical Precision)

測定精度は繰返し行われた測定結果間の一致の近さとして定義され、(repeatability; 同一測定内の反復測定)と室内再現性（測定日間、測定者間、測定機器間）を変動係数（CV 値）が許容範囲内かを評価する。

- ・ 測定精度は使用キット添付の真陽性と正常のろ紙併行精度血内部精度管理検体および日本マスキング学会の技能試験（PT）検体および QC 検体を測定して評価する。
- ・ 併行精度は同一測定内で 10 から 20 回の測定を行って日内変動を評価する。
- ・ 室内再現性は、異なる測定の日間、測定者間、測定機器間の評価ではそれぞれ 3 濃度以上のろ紙血検体を 5 日間、3 測定者、全ての測定機器で測定する。
- ・ 評価の結果は C_q 値の標準偏差、相対標準偏差（変動係数 CV）及び標準偏差の適切な信頼区間 100 (1 - α)%として記載し、95%以上の一致率、または CV が 5%未満では精度は許容範囲内であり、時間や測定装置、検査担当者に依存しないとみなすことができる。
- ・ 高い測定精度を維持するには、試薬調製のばらつきを減らす、PCR 反応系を最適化して増幅効率の安定性を高めるための工夫が重要である。
- ・ 測定の真度及び精度は現状を考慮すると 50%程度であり、C_q 値の変動は ± 0.5 との報告³⁶⁾もあることから、検査施設での十分な検討が必要である。

4-2-3) 測定感度 (Analytical Sensitivity)

- ・ ブランク限界 (Limit of Blank (LoB))
 - ・ ブランク試料で観測される可能性のある測定結果の最大値
 - ・ 陽性検体を最低 60 回繰返し分析することにより決定
 - ・ ブランクの平均値に、ブランクの標準偏差の 1.65 倍を加えた値（外挿されたコピー数の 95 パーセントタイル値）として算出
- ・ 検出限界 (Limit of Detection (LoD))
 - ・ LoB に近い濃度で、標準試料とその希釈液を最低 20 回の繰返し測定を行い、各希釈液で 95%以上の確率で LoB を超える濃度を検出限界とする。
- ・ 定量限界 (Limit of Quantification (LoQ))
 - ・ LoD 付近の濃度で、標準試料とその希釈液を最低 20 回の繰返し測定を行い、95%以上の確率で増幅を認め、各希釈液における CV%が 50%以下の最小濃度を選択する。(95%の確率で検出可能なコピー数の最小値)

4-2-4) 分析特異性 (Analytical Specificity)

分析特異性は検査または手順が、存在する可能性のある妨害物質または交差反応性物質が存在する場合でも、対象物を正しく識別または定量できる能力であり、目的のターゲットだけを検出し、非特異的な反応を起こさないかを評価する。

- ・ 陰性対照（テンプレートを含まない反応）では増幅シグナルが出ないことを確認する。
- ・ 無関係な配列を持つ試料でクロスリアクションが起きないことを確認する。
- ・ 特異性の確認は PCR アッセイの信頼性の基本であり、プライマーおよびプライマーの適切な設計がなされていないと特異的な増幅およびその検知が難しくなるため注意が必要である。
- ・ DBS 検体および DNA 抽出溶液中の成分が PCR に干渉する報告されている。
- ・ 患者検体や PT 検体で偽陽性/偽陰性の結果がないことを確認する。

- ・繰り返し測定を行っても、TREC/KREC/SMN1 とともに内在性リファレンス遺伝子の増幅が低いか増幅が見られない場合は、評価対象とした DBS 検体に PCR 妨害物質の存在、または検体の DNA 抽出調製の不備があったと推定され、ルーチン検査では「不適切検体」として報告され、再採血の要請が行われる。

4-2-5) 定量性 (Quantitation linearity) と報告可能な検査結果範囲

アッセイが広い濃度範囲で線形に応答し定量が可能な範囲を確認することで、検体中のターゲット量と検出蛍光強度が比例関係にあることから信頼できる定量ができる範囲（定量レンジ）を決定できる。定量レンジ外の高濃度では希釈が必要になること、低濃度では統計的ばらつきが大きくなることから許容可能な CV% の範囲を設定しておくことが重要である。

- ・テンプレートの連続希釈による増幅曲線（X 軸をサイクル数、Y 軸（常用対数）を検出される蛍光シグナル量）から得られる各連続希釈テンプレートの Cq 値 (quantification cycle) または Ct 値 (threshold cycle) を Y 軸、テンプレートのコピー数を X 軸（常用対数）としてプロットした検量線を作成する。
- ・理論的には元のテンプレート量に 2 倍の差がある場合、1 サイクル違いの増幅曲線を得ることができ、検量線の傾き (Slope) から PCR 増幅効率 (E) は $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1]$ の一次回帰式から得ることができる。理論どおりの増幅反応では E は 100 % で検量線の傾きは約 -3.32 となるが、Slope が -3.58 ~ -3.10 で E が 90% ~ 110% が適正範囲とされている。E が 110% 以上は不良であり、プライマーダイマーの形成や阻害物質の影響が考えられ、ピペッティングエラーの可能性もある。E が 90% 以下は低効率とされ、プライマーの設計不良、反応条件の最適化が不適切であるなどが考えられる。
- ・測定指標（TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA）の報告可能範囲は、定量下限（LoQ）から標準曲線の最高点までと定義される。SCID と SMA スクリーニングの結果は定性的に報告され、TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA が基準範囲内であれば正常と報告され、TREC/KREC/SMN1 が基準範囲外（コピー数ではカットオフ値以下、Ct/Cq 値では以上）かつの内在性リファレンス DNA が基準範囲内で「陽性（精密検査）」または「境界域（再採血）」として奉公され、内在性リファレンス DNA が基準範囲外で「不適切検体」と報告される。

4-2-6) 暫定カットオフ値（基準範囲）の設定と妥当性の評価

- ・日常的な採血で得られた DBS 検体 1,000 件以上測定して決定する。
- ・暫定カットオフ値は平均値と標準偏差または中央値とパーセンタイル値などから陽性率も考慮して設定されるが、同一方法（同一キット・試薬）で同一機器を使用する他施設のカットオフ値、査読のある専門誌の論文に記載されたカットオフ値、日本マススクリーニング学会技術部会が行っている調査データ等との比較検討を行って適切な設定する。
- ・パイロットスタディ開始後の陽性率が暫定カットオフ値の設定時と一致し、かつ真陽性例が 100% 陽性である場合、暫定カットオフ値は許容範囲内とみなされる。

4-2-7) DBS 検体の安定性試験 (Stability Study)

産婦人科等の医療機関が採血してから検査開始までに TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA が室温保存でどの程度の期間安定しているか評価するとともに、検査施設での検査終了後の保存条件（室温放置や凍結融解の繰り返しなど）によって測定値が変化しないかを事前に検証しておき、検体の取り扱いや保存方法を標準作業書として作成しておくことで、偽陰性例、偽陽性例の後方視的な検討が可能となる。

- ・TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA の平均 Cq 値を算出し、時間に対してプロット TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA の安定性を評価ができる。

4-2-8) DBS 検体のスポットの中心部と周辺部の濃度差の評価

DBS 検体のスポットの中心部と周辺部からパンチャーで各 3 個以上打ち抜いて使用するキット・試薬で TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA を測定してコピー数または Cq/Ct 値を評価し、差がある場合はルーチン検査で内部精度管理 DBS と新生児 DBS の打ち抜きは常に血液スポットの同一位置から行う。

4-2-9) キャリーオーバーとクロスコンタミネーションの検証試験³⁰⁾

新生児 DBS 検体のマイクロプレートへの連続パンチ時のパンチャーによるキャリーオーバー、DNA 抽出、試薬分注などの測定操作中のクロスコンタミネーションの有無を検証する。

・パンチング時のキャリーオーバーの検討方法と評価

- ・試薬 80 個の新生児 DBS 検体をパンチした後、8 個のブランクろ紙スポットをパンチし、パンチング中に同じパンチヘッドを使用してサンプルをパンチングする際に発生する可能性のあるキャリーオーバーを評価する。
- ・すべてのブランクろ紙スポット（血液がスポットされていない白ろ紙）で TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA 量が定量下限 (LoQ) 未満かつ Ct/Cq 値がカットオフ値以上では血液ろ紙の打ち抜きでキャリーオーバーまたはクロスコンタミネーションは発生していない。
- ・キャリーオーバーの可能性がある場合、アッセイ時に新生児検体をパンチ後に白ろ紙をパンチしてクロスコンタミの可能性を低減できるか、その可能性も検討しておくべきである。キットメーカーの推奨手順を参照し、毎検体パンチ後に白ろ紙をパンチが推奨されている場合、その適用についてメーカーと協議すべきである。
- ・DNA 抽出およびアッセイ中の潜在的なクロスコンタミネーションの評価
- ・新生児検体とテンプレートなしのコントロールを交互に配置したプレートをチェッカーボードパターンで測定する。
- ・ブランクろ紙スポットを含むウェルの 95%以上で TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA 量が検出限界 (LoD) 未満または Ct/Cq 値がカットオフ値以上ではクロスコンタミネーションは発生していない。
- ・クロスコンタミネーションによる非特異増幅は一定の頻度で発生する可能性があるため、非特異増幅を認める検体と、一般検体との増幅曲線の違い・形状などを確認する必要がある。

4-2-10) ロバスト性 (Robustness; 堅牢性) 試験・その他：

ロバスト性は試薬ロット間差、測定機器差による影響や DBS のマトリックスによる影響を検討する。

- ・EDTA またはヘパリンの qPCR 反応への影響を検討するため血液サンプルへ異なる濃度の EDTA またはヘパリンを添加し、採血用ろ紙にスポットし、qPCR で測定する。
- ・PCR 阻害物質の影響を受けないか、DNA フリー血液へ TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA をスパイクし、さらに異なる濃度の EDTA またはヘパリンを添加して回収率を確認する

4-3) スクリーニング開始以降の検査法の妥当性の検証

検査施設は下記によりスクリーニング開始後もその妥当性を定期的に検証すること。

4-3-1) ルーチン検査導入後は検査機器の大規模メンテナンス後を含めて定期的の実施し、検査機器の変更時及び検査キット・試薬の変更時はルーチン検査開始前に実施すること。

4-3-2) 検証項目は検量線の直線性、増幅効率、測定精度と正確度とする。

4-3-3) 使用する検体は検査済み新生児検体又は内部および外部精度管理用検体とする。

4-4) ルーチンスクリーニング開始後の暫定カットオフ値の検証

カットオフ値の設定においては、検査方法、使用する機器のパラメータ、スクリーニングプログラムの対象疾患に対する考え方、受容可能な偽陽性率等が考慮されるべきである。

また、測定値に影響を与える検査機器及び検査方法の変更、二次検査の実施の有無や最新の知見（患者の臨床データ）なども考慮されるべきである。

4-4-1) 陽性率の評価方法とカットオフ値の再設定

カットオフ値の妥当性評価の主要なファクターは感度と陽性数（陽性率）であり、陽生率が高すぎる場合はカットオフ値を下げ、0 の場合はカットオフ値を上げる。

*注：妥当な陽性率は患者頻度と陽性的中率から適切な値を設定すべきである。

海外では初回採血検体でターゲット遺伝子によっては、再採血を行わずに即精査カットオフ値を設定している検査施設が多い。

4-4-2) ルーチン検査開始後のカットオフ値の再評価

- a) qPCR 装置、検査方法および DBS の前処理方法の変更時にはカットオフ値を再評価する。
- b) ルーチン検査開始後は、定期的（月，四半期，年）に新生児検体の分布と陽性率を確認してカットオフ値を慎重にモニターする。
- c) 偽陽性率が期待値よりも高い場合はカットオフ値を再設定する
- d) 偽陽性率の低減のためにカットオフ値を下げた場合，偽陰性例の発生の可能性が増加することを考慮すべきである。
- e) 偽陰性例の報告があった場合は，カットオフ値の再評価を含めてスクリーニング全体のプロセスを検証すべきである。
- f) TREC/KREC、特に TREC では、早産や低出生体重児では偽陽性を生じる可能性が高いことが報告されている。そのため、カットオフ値設定と判定アルゴリズム策定時に検査室の対応をコンサルタント医師・実施団体と事前に協議して決定しておくべきである。

5. 精度管理

NBS 検査施設における精度保証では、一般の臨床検査と同様に検査結果に十分な信頼性を与えるために行う検査前、検査時、検査後の精度管理が体系的に運用されていなければならない。精度保証で要求される検査施設の検査能力の妥当性と信頼性を客観的に評価するためには、検査前、検査時、検査後の精度管理を実施するために設定される基準が定性的及び定量的に評価できなければならない。

検査施設における精度管理としては、適切な新生児 DBS 検体の確保、qPCR に適した内部精度管理の実施とその許容ルールの設定、迅速な検査結果の報告、陽性検体のフォローアップにより構成される。検査施設は検査システム全体の精度と信頼性確保に必須な精度管理実施項目を定め、データを必要に応じて毎日、毎週、毎月ごとに管理し、基準を満たさない場合は正しい是正措置をとり、その結果を記録しておかなければならない。

5-1) 検査前精度管理

NBS では検体として DBS を使用しており、産婦人科等の採血担当医療機関における採血が適正に行われていないと、検査施設における不正確な検査、検査結果報告の遅延につながる可能性が大きくなる。適正に採血された DBS により検査結果への変動要因を低減するため、検体受付時に下記の a) から e) までの項目をチェックし、一般社団法人日本マススクリーニング学会の「ろ紙血の採取法・採血時期・保存法」の改訂版の発行について³⁷⁾に記載されている採血基準に適合していない場合は採血医療機関における適切な採血の協力をお願いするとともに、必要に応じて指導も行う。

- a) 採血用濾紙のチェック：採血用濾紙に変色・変形等がないことを確認し，採血医療機関で使用时まで適切な環境で保管されていること。
- b) 検体情報の記載のチェック：検査結果の正しい判定と結果報告に必要な生年月日，性別，母・児氏名，出生時体重・採血時体重，在胎週数，採血年月日，哺乳状況，抗生剤の使用の有無，退院後の連絡先等の情報が正しく記載され，検査のインフォームドコンセントが得られていること。
- c) 採血方法と乾燥状態のチェック：標準化された手技による採血及び乾燥が行われていること（標準的な採血日齢（4～6）が遵守されていること，十分に採血量が確保されている）。
- d) 検査機関への検体の送付：指定の専用封筒で採血・乾燥後，直ちに（24 時間以内）に送付されていること
- e) 不備検体のチェック：採血日齢，採血量，濾紙上の血液状態，採血からの経過日数などが採血基準に適合していること

なお，採血日齢，採血から検査機関での受付までの所要日数及び不備検体の医療機関別の統計値を定期的（月ごと，年間）に集計して，医療機関への適切な採血の協力及び指導時の客観的なデータとして利用する

5-2) 検査時の精度管理

I の「SCID および SMA の NBS 検査施設が備えるべき条件に関する手引き」に記載したように、遺伝子検査施設では、すべての PCR 前アッセイ段階とすべての qPCR 増幅および PCR 増幅後の段階を分離す

る一方向のワークフローが要求される。増幅前環境として①qPCR 試薬の調製エリア（キャリブレータ DNA/プラスミド等の調製は除く）、②検体前処理エリア（検体処理と DNA 抽出）、③最終エリア（qPCR プロセスの実施）の 3 区画とすることが推奨されている。適切なレイアウトによる区画ができない場合は安全キャビネット、クリーンベンチ等を利用すべきとされている。

4-2-1) DBS からのサンプリングと DNA 抽出処理

- a) 検体受付から 24 時間以内（ワーキングデー）に検査が開始されていること
- b) マイクロプレートへの DBS 打ち抜き時のクロスコンタミネーションを避けるため安全キャビネット内で行うことは DBS による感染性の制御も含めて有効である。
- c) 一定量の検体が正確に採取されていること
 - *注：濾紙打ち抜き器（パンチャー）の定期的な点検
- d) 試薬の分注および DNA 抽出液等の分取で使用するマイクロピペットまたは自動分注・分取装置の精度が維持されていること
 - *注：分注機器の精度の定期的な確認
- e) DNA 抽出条件がいつも一定であること
 - *温度、時間、プレートシェーカー等の機器の設定条件が一定であることを確認
- f) 使用するマイクロプレート、プレートカバー、マイクロピペット、ピペットチップはキット・試薬メーカーが推奨する製品を使用すること

5-2-2) qPCR 装置の管理

- a) qPCR 装置の最適性能を維持するために必要な保守・点検マニュアルを作成し定期的な保守点検を行うこと
- b) 分析開始前に qPCR 装置の性能をチェックしておくこと
 - *メーカーが推奨する性能点検項目を実施

5-2-3) 内部精度管理

- a) 内部精度管理検体による統計学的内部精度管理の実施

新生児濾紙血液検体と同一組成の濾紙で作成された 2 濃度以上できれば 3 濃度（正常新生児・再採血カットオフ・精密検査カットオフレベル）の DBS 内部精度管理検体を使用し、測定データとして Ct/Cq 値またコピー数を利用する。

 - ・Xbar 管理図による管理（平均値 $\pm 2SD$ を超える警告限界、平均値 $\pm 3SD$ を超える管理限界）とトレンド、シフトの管理を行う。管理限界を超えたアッセイは棄却される。
 - ・海外では Levey-Jennings チャートを用いる Westgard のマルチルールによる管理方法が汎用されている。
- b) 新生児検体の分布の評価

新生児 DBS 検体の検査ごと（プレートごと）に TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA の Ct/Cq 値またコピー数の分布の統計値（平均値・標準偏差、中央値、四分位数など）の再現性を管理する。さらに、採血日齢別、出生時体重/在胎週数別、医療機関別、採血から検査開始までの日数別などの分布と統計値から採血日齢、採血医療機関、検体保存期間による違いなどによる測定値への影響がないかどうか評価して問題があればその対応策を検討する。
- c) 複数の qPCR 装置の使用施設では機器ごとにデータを集計し機器間差の検証を行い、機器間差を認める場合は機器間でカットオフ値への影響がない程度であればその差を許容して判定時に留意し、カットオフ値へ影響がある場合は機器メーカーへ調整を依頼する。

5-2-4) 外部精度管理

外部精度管理は定期的に既知濃度の検体を用いて検査室の測定精度とその妥当性を評価するシステムである。外部精度管理プログラムに参加しその実施結果の記録を保管しておくことは、検査施設の検査の質を証明する最も良い方法である。外部精度管理の実施は年間 3 回から 4 回が適切とされている。

下記の a) は国内の NBS 検査施設が現在参加可能な外部精度管理プログラムであり、自施設内で実施

可能な b) と同一キット・試薬を使用している検査施設間差の評価が可能な c) は、a) の補完的な方法として有効であるが、キット・試薬メーカーを含む SCID/SMA-NBS に関与している機関の協力が必要となる。

a) SCID/SMA-NBS 実証事業では実施主体の都道府県・政令指定都市から日本マススクリーニング学会が外部精度管理実施機関として委託されており、年間 3 回の検査能力試験 (Proficiency Test; PT) が行われている。外部精度管理実施機関から指定検査施設へ送付される PT-DBS 検体は内在性リファレンス DNA が正常で、TREC のみ異常、KREC のみ異常、SNN1 のみ異常、の 3 種類 (要精密検査または要再採血) と、TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA のすべてが正常、TREC/KREC/SMN1/内在性リファレンス DNA がすべて増幅しないか極めて低レベルの不適切検体の 5 種類で構成されている。

b) 施設内ブラインド DBS による外部精度管理

検査施設の精度管理責任者がルーチン検査の過程に精度管理検体 (正常/異常検体) を検査担当者が分からないように通常の新生児検体に入れる。結果は当該施設の精度管理責任者、部門責任者がチェックし、そのデータと評価結果を記録して保存する。頻度は年 2 回以上が一般的である。

c) 新生児検体を利用する外部精度管理

新生児の正常及び異常検体 (4~6 検体) を同じシステム (試薬・機器) で検査を行っている施設間で交換して検査を行うことにより施設間の測定バイアスの検討が可能である。

※注: 新生児検体を検査施設間で交換して外部精度管理 (測定結果の判定の検査施設間差の検討等) を行う場合、採血時に保護者から「新生児スクリーニングの一環として精度管理の目的で使用されること」について承諾が得られていて、連結不可能な匿名化した DBS 検体を利用する場合は個人情報保護法、遺伝学的検査関連のガイドライン等にも抵触しないと考えられる。

3) 検査後精度管理 (検査結果の報告と陽性例のフォローアップ)

- (1) 再採血および精密検査対象者では検体受付後 1~3 日 (ワーキングデー) で結果が報告できている。
- (2) 正常例も含めて全員の検査結果が主治医、保護者に確実に報告されている。
- (3) 再採血対象者の採血が適切な日齢で行われている。

・初回採血検体の TREC 測定値は在胎週数 (出生時体重) とコピー数は比例し (Ct/Cq 値とは反比例) する傾向はアメリカにおける初期の SCID-NBS で報告され、正期産児と比較して早産児では異常値 (コピー数低値・Ct/Cq 高値) 確率が高いが、修正在胎週数の増加に伴って正常化することも知られており、真陽性例と偽陽性例の判定のため再採血の繰り返しを行うことを避けるための検討も行われており、TREC が測定感度以下では早産児でも精密検査対象としている報告が多い^{38, 39, 40, 41)}。

早産児における TREC 測定値の再採血に関する統一された基準は、現状では国内だけでなく諸外国でも提案されていない。

・再採血判定となった新生児の適切な再採血の日齢はコンサルタント医師との協議により判定アルゴリズムを設定しておくことが重要であり、新生児の主治医への検査結果の報告では適切な再採血の日齢とその理由なども含めて情報提供することが求められる⁴²⁾。

なお、わが国では早産児における TREC 測定結果に対する統一された判定基準のコンセンサスがないたため、当分は都道府県・政令指定都市が主宰する新生児スクリーニング連絡協議会等で自治体ごとに判定アルゴリズムを決めておくべきである。

- (4) 精密検査例では迅速かつ確実に精密検査医療機関を受診されていることが確認できる。
- (5) 精密検査例の診断、治療経過、予後などの情報が把握できる。

・上記 (1) から (5) の事項が管理できているかどうかを検証するため、検体受付から検査結果報告までの日数、再採血日齢、精密検査受診日齢のデータ収集と解析を行うこと必要であり、これによりシステムの改善を図ることが可能となる。なお、精密検査例のフォローアップでは実施主体の自治体、採血医療機関、精密検査医療機関との密接な連携が必須である。

6. 検査実施時の注意点

実務において PCR を設計・運用する上で押さえておくべきポイントを以下に記載した。

適切なコントロールの設定：PCR 検査では必ず陽性コントロール（既知のターゲットを含む試料）と陰性コントロール（テンプレート無添加の反応液）を設定すること。陰性コントロールで増幅が起らないことを確認することで、環境や試薬由来のコンタミネーションを監視できる。PCR は高感度のため微量の外来 DNA でも鋭敏に検知する。試薬や環境からの DNA 汚染が結果に影響しないよう厳密な手順とクリーンな環境が必要である。陰性コントロールに増幅シグナルが出た場合は検査プロトコルを見直し、原因となる汚染源の除去（試薬の交換、器具の洗浄滅菌など）や手技の改善を行うべきである。

・サンプルの取り扱い

DNA 試料（DBS）については、高分子のゲノム DNA はせん断しやすいため取扱いは丁寧に行う。また、コンタミネーション防止の観点から、PCR 反応溶液の調製はクリーンベンチ内で行う、エアロゾル対策付きのフィルターピペットチップを使用する、増幅産物を扱うエリア（ポスト PCR 領域）と試料調製エリア（プレ PCR 領域）を物理的に分けるといった対策を徹底する。手袋の頻繁な交換や器具のエタノール清拭なども汚染予防に効果的である。

・データの品質管理

PCR の結果の信頼性を高めるため、一般的にターゲット遺伝子の発現量の検査では複数の繰り返し測定を行い、外れ値やばらつきを評価することが推奨されている。しかし、SCID の NBS のターゲット遺伝子である TREC/KREC はカットオフ値が測定感度限界と定量下限付近に設定されていることから、同一検体でも増幅の有りと無しの結果が得られることがあるため、内在性リファレンス DNA の増幅状況との関係を考慮して判定されるべきである。

標準曲線法による測定では、4-2-5)で記載したように増幅曲線の形状の適正性、検量線の R^2 値や増幅効率 E からその測定が適切に行われたかを判断する。対数換算の検量線で直線性が得られなかった場合はそのデータは受け入れず、原因を特定しなければならない。また、装置間差や日差再現性を把握するため、機器の定期的なキャリブレーションや熟練者によるクロスチェックも有用である。検査プロトコルや条件の変更を記録し、再現実験の際に参照できるようにしておくトラブルシューティングに役立つ。データのトレーサビリティ（追跡可能性）を意識した運用が最終的に信頼性の高い結果につながる。

参考資料

- 1) 日本マススクリーニング学理事長、日本マススクリーニング学会技術システム担当理事、新生児マススクリーニング検査施設基準、日本マススクリーニング学会誌 21 巻 3 号 207-209, 2011
- 2) 日本マススクリーニング学会精度保証システム委員会、日本マススクリーニング学会技術部会、タンデムマス・スクリーニングの検査施設基準及び検査実施基準、日本マススクリーニング学会誌 23 巻 3 号 328-338, 2013
- 3) 先天性代謝異常等検査の実施について、子母発 0330 第 2 号、平成 30 年 3 月 30 日、各都道府県、指定都市母子保健主管部（局）長あて、厚生労働省子ども家庭局母子保健課長通知、MHLW_MCH_20180330.pdf、2025 年 7 月 5 日アクセス
- 4) 新生児スクリーニング検査に関する実証事業に係る外部精度管理検体について、令和 5 年 12 月 28 日、こども家庭庁成育局母子保健課事務連絡、各都道府県、指定都市母子保健主管部（局）あて、https://www.cfa.go.jp/assets/contents/node/basic_page/field_ref_resources/4dfcd1bb-0eda-4838-9ea6-778ba380f04c/83b4cc2e/20240105_policies_boshihoken_tsuuchi_2023_73.pdf、2025 年 7 月 5 日アクセス
- 5) 特定非営利活動法人日本臨床検査標準協議会、遺伝子関連検査に関する日本版ベストプラクティス・ガイドライン（承認文書）、2012 年
- 6) 医療法改正などの経緯と検体検査の精度の確保に係る基準について、<https://www.mhlw.go.jp/content/10800000/10800000/000911173.pdf>、2025/7/5 アクセス
- 7) 医療法等の一部を改正する法律の一部の施行に伴う厚生労働省関係省令の整備に関する省令
平成 30 年 8 月 10 日医政発 0810 第 1 号（各都道府県知事・各保健所設置市長・各特別区長あて厚生労働省医政局長通知）、

- https://www.mhlw.go.jp/web/t_doc?dataId=00tc3586&dataType=1&pageNo=1. 025/7/5 アクセス
- 8) 血液製剤のウイルスに対する安全性確保を目的とした核酸増幅検査(NAT)の実施に関するガイドラインについて、別添ガイドライン(平成16年8月3日)(薬食発第0803002号)(日本赤十字社社長あて厚生労働省医薬食品局長通知), <https://www.mhlw.go.jp/new-info/kobetu/iyaku/kenketsugo/5anzen1.html>. 2025/7/5 アクセス
- 9) ISO Medical laboratories—Requirements for quality and competence. ISO15289. International Organization for Standardization; 2022. <https://www.iso.org/standard/76677.html>. 2025/10/17 アクセス
- 10) Molecular Laboratory Set up: Introduction, Design, Requirements, Laboratory Practices and Its Uses. Univers84a. 2021. <https://universe84a.com/molecular-laboratory-set/>. 2025/10/17 アクセス
- 11) APHL 2020 NBS Molecular Training Workshop. Molecular Laboratory Design and QA/QC Considerations. https://www.aphl.org/programs/newborn_screening/_layouts/15/WopiFrame.aspx?sourcedoc=/programs/newborn_screening/Documents.aspx?sourcedoc=/programs/newborn_screening/Documents/2020_Molecular_Workshop/APHL-Molecular-Workshop-2020-Lee-Tab-Design-and-QAQC-Considerations.pptx&action=default. 2025/10/17 アクセス.
- 12) APHL 2020 NBS Molecular Training Workshop. How to Validate a Molecular Assay. https://www.aphl.org/programs/newborn_screening/_layouts/15/WopiFrame.aspx?sourcedoc=/programs/newborn_screening/Documents/2020_Molecular_Workshop/APHL-Molecular-Workshop-2020-Lee-How-to-Validate-a-Molecular-Assay.ppt&action=default. 2025/10/17 アクセス
- 13) Cure SMA Data Sources: CDR(2022-2023) and CUS data (2021-2023), https://www.curesma.org/wp-content/uploads/2024/06/9042024_State-of-SMA_vWeb.pdf. 2026/2/7 アクセス
- 14) 日本医学学会,「医療における遺伝学的検査・診断に関するガイドライン」,2011年2月制定、2022年3月改定. 2026/3/9 アクセス.
- 15) 分析法バリデーションに関するガイドラインについて. 令和7年10月9日, 医薬薬審発1009第1号, 各都道府県衛生主管部(局)長あて 厚生労働省医薬局医薬品審査管理課長通知.
- 16) CLSI. Newborn blood spot screening for severe combined immuno deficiency by measurement of T-cell receptor excision circles; Approved guideline. NBS6-A. Clinical Laboratory Standards Institute; 2013.
- 17) CLSI. Newborn blood spot screening for spinal muscular atrophy, 1st edition, NBS13. Clinical Laboratory Standards Institute; 2025.
- 18) APHL 2020 NBS Molecular Training Workshop. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) and Spinal Muscular Atrophy (SMA) by Real-Time PCR. https://www.aphl.org/programs/newborn_screening/_layouts/15/WopiFrame.aspx?sourcedoc=/programs/newborn_screening/Documents/2020_Molecular_Workshop/APHL-MolecularWorkshop-2020-Lee-SCID-SMA.pptx&action=default, 2025/10/17 アクセス
- 19) J Allergy Clin Immunol. 115, 2, 391-398, 2005. Development of population-based newborn screening for severe combined immunodeficiency.
- 20) J Allergy Clin Immunol. 124, 3, 522-527, 2009. Development of a routine newborn screening protocol for severe combined immunodeficiency.
- 21) J Pediatr. 155, 6, 829-33. 2009. Identification of severe combined immunodeficiency by T-cell receptor excision circles quantification using neonatal Guthrie cards.
- 22) J Allergy Clin Immunol. 128, 1, 223-225.e2, 2011. Quantification of κ -deleting recombination excision circles in Guthrie cards for the identification of early B-cell maturation defects.
- 23) J Allergy Clin Immunol. 129, 3, 622-627. 2012. The Wisconsin approach to newborn screening for severe combined immunodeficiency
- 24) JAMA 312, 7. 729-738. 2014. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency in 11 Screening Programs in the United States.
- 25) Int. J. Neonatal Screen. 5(4), 39; 2019, Development of a Multiplex Real-Time PCR Assay for the Newborn Screening of SCID, SMA, and XLA

- 26) PLOS ONE, 15,11, 2024, A high-throughput newborn screening approach for SCID, SMA, and SCD combining multiplex qPCR and tandem mass spectrometry.
- 27) Genes 15,11, 1467, 2024, A Modular Genetic Approach to Newborn Screening from Spinal Muscular Atrophy to Sickle Cell Disease-Results from Six Years of Genetic Newborn Screening.
- 28) Genes, 5, 314, 2024, Multiplex Real-Time PCR-Based Newborn Screening for Severe Primary Immunodeficiency and Spinal Muscular Atrophy in Osaka, Japan: Our Results after 3 Years.
- 29) World Journal of Pediatrics, 20, 1270-1282, 2024. Comprehensive newborn screening for severe combined immunodeficiency, X-linked agammaglobulinemia, and spinal muscular atrophy: the Chinese experience.
- 30) PLOS ONE. 0306329 June 28, 2024. Quality considerations and major pitfalls for high throughput DNA-based newborn screening for severe combined immunodeficiency and spinal muscular atrophy.
- 31) J Molecular Diagnostics 19, 5,755-76, 2017. A Droplet Digital PCR Method for Severe Combined Immunodeficiency Newborn Screening.
- 32) Clinical Chemistry. 64.12, 1 1753-1756, 2018. Multiplex Droplet Digital PCR Method Applicable to Newborn Screening, Carrier Status, and Assessment of Spinal Muscular Atrophy.
- 33) Molecular Genetics and Metabolism. 145, 2, 109-114, 2025, Newborn screening for spinal muscular atrophy: The potential of digital polymerase chain reaction technique.
- 34) Mol Genet Metab Rep. 2025 23;43 101234 Cost analysis of NBS for SMA using digital PCR vs. MLPA.
- 35) Int. J. Neonatal Screen. 11, 4, 97, 2025, Validation on First-Tier Fully Automated High-Throughput SMN1, SMN2, TREC, and RPP30 Quantification by Quadruplex Droplet Digital PCR for Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy and Severe Combined Immunodeficiency.
- 36) qPCR を用いた定量におけるバリデーションの考え方、第 9 回 JBF シンポジウム、2018,
https://bioanalysisforum.jp/images/2018_9th_JBFS/P6_DG2017-33.pdf. 2025/9/26 アクセス.
- 37) ろ紙血の採取法・採血時期・保存法」の改訂版の発行について、日本マススクリーニング学会
https://www.jsms.gr.jp/download/Revised%20edition_roshiketsu_20240805.pdf. 2025/9/26 アクセス
- 38) J Clin Immunol. 34, 3, 289-303.2014, Newborn Screening for SCID in New York State: Experience from the First Two Years
- 39) J Allergy Clin Immunol Pract. 9, 5, 2060-2067, 2021. Ten Years of Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency (SCID) in Massachusetts
- 40) Int. J. Neonatal Screen. 7(3), 40. 2021. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency: Do Preterm Infants Require Special Consideration?
- 41) Int. J. Neonatal Screen. 9(4), 40. 2023. Newborn Screening for Severe Combined Immunodeficiency: Lessons Learned from Screening and Follow-Up of the Preterm Newborn Population.
- 42) 日本産婦人科・新生児血液学会誌 35 巻 2 号, 89-96, 2026, .TREC を用いた新生児マススクリーニングについて