

分担研究課題名：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キリーニング研究室・室長）

**定量 PCR 法による新生児スクリーニングの精度管理体制の構築**

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・所長）

研究要旨

定量 PCR 法による重症複合免疫不全症 (SCID) と脊髄筋萎縮症 (SMA) の新生児スクリーニングの外部精度管理体制を確立するため、国内のスクリーニング検査施設で使用されている検査キットへ対応した技能試験 (PT) 用の適切な濾紙血検体 (DBS) の作成方法を検討した。白血球除去血液への TREC/KREC/SMN1/内在性 DNA (RNaseP) プラスミドの適切な添加により、SCID 陽性、SMA 陽性および正常の判定ができる PT 用 DBS の作成が可能となった。

研究協力者

石毛 信之(公益財団法人東京都予防医学協会  
母子保健検査部・次長)  
花井 潤師(一般財団法人北海道薬剤師会公衆  
衛生検査センター・技術顧問)

本マスキリーニング学会拡大スクリー  
ニング精度管理検討ワーキンググルー  
プ・定量PCR精度管理検討グループメン  
バーの9施設が行った。

(倫理面への配慮)

該当なし

A. 研究目的

定量PCR法によるSCIDとSMAの新生児スク  
リーニングの外部精度管理用PT-DBSの作成  
法を確立する。

B. 研究方法

- 1) PT-DBS作成のベースとなる白血球除去血  
液の市販血液パックからの調製法を検討  
する。
- 2) 国内で利用可能なDBSのTREC/KREC/SM  
N1/内在性DNA検査キット(4社+自製試薬  
の5種類)に対応が可能なプラスミドを検  
討し作成する。
- 3) PT-DBS作成に必要なTREC/KREC/SMN1/内  
在性DNAプラスミドの白血球除去血液への  
適切な添加量を検討するため、白血球除去  
血液へ高コピー数のTREC/KREC/SMN1/内在  
性DNAプラスミドを添加し白血球除去血液  
で8種類の希釈系列血液を調製し、濾紙へ  
スポットしてDBSを作成した(希釈系列  
DBS)。この希釈系列DBSのTREC/KREC/SMN1/  
内在性DNAのコピー数及びCt値の測定を日

C. 研究結果

- 1) 白血球除去血液の調製は、市販血液パッ  
クの遠心と洗浄を繰り返して白血球層と  
上清を除去することにより、  
TREC/KREC/SMN1/内在性DNAを増幅不能レ  
ベルかコピー数又はCt値をカットオフ値  
以下とすることが可能であった。
- 2) 初期検討のDBSで使用した  
TREC/KREC/SMN1プラスミドは国内で使用  
されている4社のキットと自製試薬で増  
幅されることが確認できた。一方、内在性  
DNAは1社のキット以外は増幅が認められ  
なかったため、各メーカーから使用してい  
るプラスミドの塩基配列情報の提供を受  
けてそれぞれのプラスミドを作成した。
- 3) 9施設の希釈系列DBSのqPCRによる  
TREC/KRECのコピー数及びSMN1のCt値と各  
施設のカットオフ値から、PT検体で正常お  
よびSCID/SMA陽性となるDBS検体作成時の  
各プラスミドの適切な添加量の決定が可

能になった。内在性DNAはDBSからのDNA抽出の良否の確認、または内在性DNA量からTREC/KRECのコピー数を算出している。このため、PT検体では新生児DBSのqPCRで得られるCt値の分布範囲内となるように添加されていることが必須である。この添加量は希釈系列DBSの測定結果から各施設が設定している内在性DNAのコピー数又はCt値を参考にして決定することが可能である。

なお、内在性DNAは1社キットで提供された塩基配列で作成したプラスミドで増幅が認められていないため、プラスミドの再作成を含めてさらに検討を要する結果であった。

#### D. 考察

SCIDとSMAの新生児スクリーニングは、TREC/KREC/SMN1/内在性DNAの4種類を同時に測定できるマルチプレックスqPCRにより行われている。このため、PT検体を含めて精度管理用DBSとして、SCID陽性検体ではTREC極低値か増幅なしでKREC/SMN1/内在性DNAが正常、またはKREC極低値か増幅なしでTREC/SMN1/内在性DNAが正常、SMA陽性検体ではSMN1低値または増幅なしでTREC/KREC/内在性DNAが正常、正常検体ではTREC/KRE

C/SMN1/内在性DNAすべてが正常となるDBSを用いることにより1検体で4指標の精度管理が可能になる。また、今回PT-DBSの作成方法として検討した白血球除去血液をベースとしてTREC/KREC/SMN1/内在性DNAプラスミドを添加する方法は内部精度管理用DBSとしても有用と思われる。

また、希釈系列DBSはスクリーニング検査施設で使用しているSCID/SMAのqPCRキットの感度の検定にも利用可能であり、外部精度管理に参加する検査施設間及び使用キット間の再現性の評価にも利用できると思われる。

#### E. 結論

定量PCR法によるSCIDとSMAの新生児スクリーニングの外部精度管理用PT-DBSの作成法を確立した。

#### F. 研究発表

1. 論文発表：なし
2. 学会発表：なし

#### G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得：該当なし
2. 実用新案登録：該当なし
3. その他：該当なし