検査案内書

第 1.2 版

国立成育医療研究センター研究所 衛生検査センター

管理者	**清河 信敬**
精度管理責任者	**在家 裕司**

検査項目：

E. MLPA 検査

E-001 SHOX MLPA 検査

E-002 CAH MLPA 検査

E-003 Y 染色体微細欠失　MLPA 検査

F. MS-MLPA 検査

F-001 マルチローカスインプリンティング異常症　MS-MLPA 検査

F-002 PWS/AS　MS-MLPA 検査

F-003 UPD7/UPD14　MS-MLPA 検査

F-004 SRS/BWS　MS-MLPA 検査

F-005 GNAS　MS-MLPA 検査

F-006 TNDM　MS-MLPA 検査

G. 研究検査

G-001 疾患特異的責任領域のコピー数解析およびメチル化解析

検査名：E 【E-001 SHOX MLPA 検査】

【E-002 CAH MLPA 検査】

【E-003 Y 染色体微細欠失　MLPA 検査】

概略

MLPA 法は、シーケンスや FISH などの従来法では検出が困難であった単一エクソンや染色体レベルにおけるコピー数変化（欠失・重複）の検出に対応した手法です。MLPA 法では、まず、それぞれターゲットとする遺伝子（領域）に対して特異的に結合する隣接した 2 つのプローブを用います。また、各プローブにはユニバーサルプライマーによる PCR 増幅を可能にする共通配列を結合させ、さらに、スタッファーシーケンス（サイズ調節塩基配列）を融合させることで、それぞれ異なる増幅断片長にな

るように設計されています。標的遺伝子配列にハイブリダイズした隣接する 2 つのプローブは、ライゲースにより連結され一本化されます。連結化プローブを標的遺伝子から遊離させ、さらに、ユニバーサル蛍光標識プライマーで PCR 増幅を行います。この PCR によって、異なる連結化プローブの長さに従った、さまざまな長さの増幅断片が得られます。PCR で得られたそれぞれの増幅断片は 1 領域ごとで長さが異なっているので、電気泳動解析によって検出されるシグナルは、各領域に対応しています。また、ピーク面積は連結化プローブ（標的遺伝子領域）の存在量を反映しております。その結果、遺伝子（exon、染色体）の欠失・重複やメチル化、既知の変異を部位特異的にかつ定量的に捉えることが可能になります。

「E-001 SHOX MLPA 検査」では、MRC-Hollands 社の Salsa MLPA® probemix P018 SHOX kit を用いて、SHOX エクソンと既知エンハンサー領域のゲノムコピー数を解析します。

「E-002 CAH MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix P050 CAH kit を用いて、先天性副腎過形成（CAH）発症の原因遺伝子である *CYP21A2, CYP21A1P, TNXB, ATF6B* 遺伝子エクソンのゲノムコピー数を解析します。

「E-003 Y 染色体微細欠失 MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix P360 Y-chromosome microdeletions kit を用いて、男性不妊の原因となる Y 染色体 AZF 領域のゲノムコピー数を解析します。

(1) 検査方法

末梢血から抽出した DNA を解析に使用します。このとき、３つの正常な二倍体サンプルリファレンス DNA をリファレンスサンプルとして、同時に解析します。上記のキットを用いて、MLPA プローブをハイブリダイゼーションさせます。この後、ライゲース反応で一本化したものを PCR によって増幅します。得られた増幅断片をキャピラリー電気泳動でフラグメント解析します。フラグメント解析後、各プローブのピークデータを標準化し、対象サンプルとリファレンスサンプルのデータを比較することで相対シグナル値を算出し、コピー数解析を行います。

(2) 基準値及び判定基準

基準値: DQ（Dosage Quotient、対象サンプルとリファレンスサンプルの相対シグナル値の比率）が 0.65 以上 1.35 以下。

判定: DQ が 0.65 未満で欠失、DQ が 1.35 より高値で重複。

【参考文献】

1. Benito-Sanz S, Barroso E, Heine-Suñer D, Hisado-Oliva A, Romanelli V, Rosell J et al.,

Clinical and molecular evaluation of SHOX/PAR1 duplications in Leri-Weill dyschondrosteosis (LWD) and idiopathic short stature (ISS).J Clin Endocrinol Metab. 2011, 96(2):E404—12.

(3) 医療機関に緊急報告を行うこととする検査値の範囲

特にありません。本検査自体は緊急的なものではありませんが、診療上の必要性から可能な限り早急に検査依頼医師などにメールにて報告を行います。また、患者さんの状態等の理由で至急に結果が必要な場合は、事前に連絡をいただければ可能な限り対応いたします。

(4) 検査に要する日数

検体が本所に届いた時点から 60 営業日以内。

(5) 測定を委託する場合にあっては、実際に測定を行う衛生検査所の名称

測定の委託はありません。

(6) 検体の採取条件、採取容器および採取量

採取条件：検査の目的や限界について十分に説明し、本検査の申し込みの意思を確認してください。原則として血液や唾液を解析対象とします。調整された DNA も解析可能ですが、由来組織や DNA 精製方法により解析できないことがありますので、事前にご相談ください。

[末梢血の場合]

採取容器：匿名化 ID 記載ラベルが貼付された採血管　1 本以上。

・EDTA-2K（または Na）顆粒入り採血管

採血容器は各医療機関でご用意ください。

採取量：末梢血 3-5ml 程度

[唾液の場合]

採取容器：Oragene・DISCOVER(型番　OGR-500、OGR-575 等)　1 本以上。

採取キットがご入用の場合お送りしますので、事前にご相談ください。

唾液採取キットの説明書に従って採取してください。

(7) 検体の保存条件

採取後は、冷蔵（4℃、3－4 日程度）または冷凍（－30℃、5 日～1 か月程度）で保存し、なるべく速やかに発送してください。検体採取から測定までの時間が長くなると DNA 抽出に悪影響を及ぼす可能性があります

(8)　検体の提出条件

上記（6）、（7）を満たす検体について、各医療機関でご用意いただいた送付用発泡スチロールボックスを用い 、常温にて本所に発送してください。発送日の翌日に到着することを原則としますが、休祝日の前日発送の場合は、直近の営業日到着としてください。検体採取から測定までの時間が長くなると DNA 抽出に悪影響を及ぼす可能性があります。

(9)　検査依頼書及び検体のラベルの記載項目

検査依頼書は、当検査所指定の様式を使用してください。主な記載項目を以下に示します。

① 匿名化 ID
② 希望する検査項目
③ 性別
④ 検体採取年月日
⑤ 医療機関情報
⑥ 依頼医師名及び連絡先
⑦ 遺伝カウンセリングを担当する臨床遺伝専門医
⑧ 請求書送付先情報

(10)　検体を医療機関から衛生検査所まで搬送するのに要する時間

発送日の翌日到着を原則としますが、地域によっては翌々日到着となる場合があります。

土日祝日は受付け不可なので、直近の翌営業日到着となります。

(11)　検体受領場所

各医療機関において指定された場所で検体を輸送業者に提出してください。

(12)　免責事項

不可避の事故（搬送中の採血管の破損など）による検体の喪失の場合は当検査所で責任を追うことはできません。検査可能な DNA が得られない場合には、検査を行うことができません。

検査名：F【F-001　マルチローカスインプリンティング異常症 MS-MLPA 検査】

【F-002　PWS/AS　MS-MLPA 検査】

【F-003　UPD7/UPD14　MS-MLPA 検査】

【F-004　SRS/BWS　MS-MLPA 検査】

【F-005　GNAS　MS-MLPA 検査】

【F-006　TNDM　MS-MLPA 検査】

概略

MS-MLPA 法は、シーケンスや FISH などの従来法では検出が困難であった単一エクソンや染色体レベルにおけるコピー数変化（欠失・重複）の検出に対応した手法です。さらに、メチル化感受性酵素である HhaI 処理を加えることで、特定の CG 配列におけるメチル化状態を解析することができます。

MS-MLPA 法では、まず、それぞれターゲットとする遺伝子（領域）に対して特異的に結合する隣接した 2 つのプローブを用います。また、各プローブにはユニバーサルプライマーによる PCR 増幅を可能にする共通配列を結合させ、さらに、スタッファーシーケンス（サイズ調節塩基配列）を融合させることで、それぞれ異なる増幅断片長になるように設計されています。標的遺伝子配列にハイブリダイズした隣接する 2 つのプローブは、ライゲースにより連結され一本化されます。連結化プローブを標的遺伝子から遊離させ、さらに、ユニバーサル蛍光標識プライマーで PCR 増幅を行います。この PCR によって、異なる連結化プローブの長さに従った、さまざまな長さの増幅断片が得られます。PCR で得られたそれぞれの増幅断片は 1 領域ごとで長さが異なっているので、電気泳動解析によって検出されるシグナルは、各領域に対応しています。また、ピーク面積は連結化プローブ（標的遺伝子領域）の存在量を反映しております。その結果、遺伝子（exon、染色体）の欠失・重複やメチル化、既知の変異を部位特異的にかつ定量的に捉えることが可能になります。

「F-001 マルチローカスインプリンティング異常症 MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME034 Multi-locus Imprinting kit を用いて、既知の

ヒトインプリンティング疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

「F-002　PWS/AS　MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME028 PWS/AS kit を用いて、Prader-Willi 症候群および Angelman 症候群の疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

「F-003　UPD7/UPD14　MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME032 UPD7/UPD14 kit を用いて、７番染色体上のコピー数またはメチル化異常を原因とする Silver-Russell 症候群、Kagami-Ogata 症候群、Temple 症候群の疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

「F-004　SRS/BWS　MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME030 SRS/BWS kit を用いて、11p15 領域のコピー数またはメチル化異常を原因とする Silver-Russell 症候群および Beckwith-Wiedemann 症候群の疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

「F-005　GNAS　MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME031 GNAS Imprinting kit を用いて、偽性副甲状腺機能低下症の疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

「F-006　TNDM　MS-MLPA 検査」では、MRC-Holland 社の Salsa MLPA® probemix ME033 TNDM kit を用いて、新生児一過性糖尿病の疾患責任領域のゲノムコピー数とメチル化状態を解析します。

(1)　検査方法

末梢血から抽出した DNA を解析に使用します。このとき、３つの正常な二倍体サンプルリファレンス DNA をリファレンスとして、同時に解析します。

上記のキットを用いて、MS-MLPA プローブをハイブリダイゼーションさせます。ハイブリダイゼーション反応生成物を等分し、一方にのみ HhaI による制限酵素処理を加え、ともに PCR により増幅し、得られた増幅断片をキャピラリー電気泳動でフラグメント解析します。フラグメント解析後、各プローブのピークデータを標準化し、対象サンプルとリファレンスサンプルのデータを比較することで相対シグナル値を算出し、コピー数解析を行います。さらに、HhaI 未処理および HhaI 処理産物のピークデータ比を算出し、メチル化解析を行います。

(2)　基準値及び判定基準

コピー数解析：基準値および判定は以下の通りです。

基準値: DQ（Dosage Quotient、対象サンプルとリファレンスサンプルの相対シグナル値の比率）が 0.65 以上 1.35 以下。

判定: DQ0.65 未満で欠失、DQ1.35 より高値で重複。

メチル化解析：基準値および判定は以下の通りです。

基準値： HhaI 未処理および HhaI 処理産物のシグナル比 0.4 以上、0.6 以下。

判定：HhaI 未処理および HhaI 処理産物のシグナル比 0.4 未満で低メチル化、0.6 より高値で高メチル化。

注意：正常細胞系列とメチル化異常を有する細胞系列（片親性ダイソミー、エピ変異など）とのモザイクなどにより部分的なメチル化異常を示す場合、確定診断には別の方法で再検査が必要になることがあります。

特に、下記の検査の一部の解析部位において、このようなことが起こりえます。

「F-001 マルチローカスインプリンティング異常症 MS-MLPA 検査」

「F-004　SRS/BWS　MS-MLPA 検査」

「F-005　GNAS　MS-MLPA 検査」

【参考文献】

1. Procter M, Chou LS, Tang W, Jama M, Mao R. Molecular Diagnosis of Prader–Willi and Angelman Syndromes by Methylation-Specific Melting Analysis and Methylation-Specific Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification. Clin Chem, 2006, 52(7):1276—1283.

(3) 医療機関に緊急報告を行うこととする検査値の範囲

特にありません。本検査自体は緊急的なものではありませんが、診療上の必要性から可能な限り早急に検査依頼医師などにメールにて報告を行います。また、患者さんの状態等の理由で至急に結果が必要な場合は、事前に連絡をいただければ可能な限り対応いたします。

(4) 検査に要する日数

検体が本所に届いた時点から 60 営業日以内。

(5) 測定を委託する場合にあっては、実際に測定を行う衛生検査所の名称

測定の委託はありません。

(6) 検体の採取条件、採取容器および採取量

採取条件：検査の目的や限界について十分に説明し、本検査の申し込みの意思を確認してください。原則として血液や唾液を解析対象とします。調整された DNA も解析可能ですが、由来組織や DNA 精製方法により解析できないことがありますので、事前にご相談ください。

[末梢血の場合]

採取容器：匿名化 ID 記載ラベルが貼付された採血管　1 本以上。

・EDTA-2K（または Na）顆粒入り採血管

採血容器は各医療機関でご用意ください。

採取量：末梢血 3-5ml 程度

[唾液の場合]

採取容器：Oragene・DISCOVER(型番　OGR-500、OGR-575 等)　1 本以上。

採取キットがご入用の場合お送りしますので、事前にご相談ください。

唾液採取キットの説明書に従って採取してください。

(7) 検体の保存条件

採取後は、冷蔵（4℃、3－4 日程度）または冷凍（－30℃、5 日～1 か月程度）で保存し、なるべく速やかに発送してください。検体採取から測定までの時間が長くなると DNA 抽出に悪影響を及ぼす可能性があります

(8) 検体の提出条件

上記（6）、（7）を満たす検体について、各医療機関でご用意いただいた送付用発泡スチロールボックスを用い、常温にて本所に発送してください。発送日の翌日に到着することを原則としますが、休祝日の前日発送の場合は、直近の営業日到着としてください。検体採取から測定までの時間が長くなると DNA 抽出に悪影響を及ぼす可能性があります。

(9) 検査依頼書及び検体のラベルの記載項目

検査依頼書は、当検査所指定の様式を使用してください。主な記載項目を以下に示します。

⑨ 匿名化 ID

⑩ 希望する検査項目

⑪ 性別

⑫ 検体採取年月日

⑬ 医療機関情報

⑭ 依頼医師名及び連絡先

⑮ 遺伝カウンセリングを担当する臨床遺伝専門医

⑯ 請求書送付先情報

(10) 検体を医療機関から衛生検査所まで搬送するのに要する時間

発送日の翌日到着を原則としますが、地域によっては翌々日到着となる場合があります。

土日祝日は受付け不可なので、直近の翌営業日到着となります。

(11) 検体受領場所

各医療機関において指定された場所で検体を輸送業者に提出してください。

(12) 免責事項

不可避の事故（搬送中の採血管の破損など）による検体の喪失の場合は当検査所で責任を追うことはできません。検査可能な DNA が得られない場合には、検査を行うことができません。

検査名：G【G-001 疾患特異的責任領域のコピー数解析およびメチル化解析】

概略

MLPA 法や MS-MLPA 法は、シーケンスや FISH などの従来法では検出が困難であった単一エクソンや染色体レベルにおけるコピー数変化（欠失・重複）の検出に対応した手法です。さらに、MS-MLPA 法ではメチル化感受性酵素である HhaI 処理を加えることで、特定の CG 配列におけるメチル化状態を解析することができます。

MLPA 法や MS-MLPA 法で用いられるキットは多岐にわたりますが、そのコアとなる原理は共通しているため、疾患特異的なプローブが含まれる検査試薬を用いることで、種々の疾患の遺伝学的検査が可能となります。

本検査では、患者さんの血液や唾液から精製される DNA を用い、患者さんの臨床症状に応じた解析キットを用いてコピー数およびメチル化状態の解析を行います。使用するキットの種類については、検体提出前のご相談が必要になります。また、すでに精製された DNA を用いた検査も実施可能ですが、DNA の由来する組織や精製に使用されたキットなどの情報提供をお願いします。

なお、血液や唾液以外の組織に由来する DNA や特殊な方法で精製された DNA を用いた検査を依頼された場合、検査に必要なリファレンスサンプルのご供与をお願いすることがあります。

(1) 検査方法

「E. MLPA 検査」および「F. MS-MLPA 検査」と同様に、末梢血や唾液から抽出した DNA を使用し、疾患特異的キットを用いてコピー数およびメチル化状態を解析します。このとき、3 つの正常な二倍体サンプルリファレンス DNA をリファレンスとして、同時に解析します。

(2) 基準値及び判定基準

コピー数解析：基準値および判定は以下の通りです。

基準値: DQ（Dosage Quotient、対象サンプルとリファレンスサンプルの相対シグナル値の比率）が 0.65 以上 1.35 以下。

判定: DQ0.65 未満で欠失、DQ1.35 より高値で重複。

メチル化解析：基準値および判定は以下の通りです。

基準値：HhaI 未処理および HhaI 処理産物のシグナル比 0.4 以上、0.6 以下。

判定：HhaI 未処理および HhaI 処理産物のシグナル比 0.4 未満で低メチル化、0.6 より高値で高メチル化。

注意：正常細胞系列とメチル化異常を有する細胞系列（片親性ダイソミー、エピ変異など）とのモザイクなどにより部分的なメチル化異常を示す場合、確定診断には別の方法で再検査が必要になることがあります。

(3) 医療機関に緊急報告を行うこととする検査値の範囲

特にありません。本検査自体は緊急的なものではありませんが、診療上の必要性から可能な限り早急に検査依頼医師などにメールにて報告を行います。また、患者さんの状態等の理由で至急に結果が必要な場合は、事前に連絡をいただければ可能な限り対応いたします。

(4) 検査に要する日数

検体が本所に届いた時点から 60 営業日以内。

(5) 測定を委託する場合にあっては、実際に測定を行う衛生検査所の名称

測定の委託はありません。

(6)~(11) 検体の採取条件、採取容器および採取量、その他

検体の採取条件など(6)以降の事項は、「E. MLPA 検査」および「F. MS-MLPA 検査」に準じます。

(12) 免責事項

「E. MLPA 検査」および「F. MS-MLPA 検査」と同様に、不可避の事故（搬送中の採血管の破損など）による検体の喪失の場合は当検査所で責任を追うことはできません。検査可能な DNA が得られない場合には、検査を行うことができません。

検査のお申し込み、お問い合わせ

問い合わせ先：
国立研究開発法人国立成育医療研究センター研究所
衛生検査センター総合窓口
〒154-8567　東京都世田谷区大蔵 2-10-1
Tel　：　03-3416-0181
E-mail　：　eisei@ncchd.go.jp.

改訂履歴一覧表

No.	改訂内容	Ver.	改訂日	作成者	承認者
1	新規作成	1	2022/03/01	松原圭子	清河信敬
2	1） P4, 7 行目 2） P8, 23 目 3）P11, 21 行目 「(3) 医療機関に緊急報告を行うこととする検査値の範囲」の記載において、 「診療上の必要性から可能な限り早急に報告します。」→「診療上の必要性から可能な限り早急に検査依頼医師などにメールにて報告します。」に修正。 4） P4, 34 行目 5） p9, 14 行目 「(7) 検体の保存条件」の記載において、 「採取後は、4℃から 30℃で保存し」→「採取後は、冷蔵（4℃、3－4 日程度）または冷凍（－30℃、5 日～1 か月程度）で保存し」に修正。 6） P5, 4 行目 7） P9, 18 行目 「(8) 検体の提出条件」の記載において、 「~~冷蔵（4℃、保冷剤は入れない）もしくは~~」を削除し、「上記（6）、（7）を満たす検体について、各医療機関でご用意いただいた送付用発泡スチロールボックスを用い、常温にて本所に発送してください。」に修正。	1.1	2023/11/30	松原圭子	清河信敬
3	1) P1, 17 行目　精度管理者の「松本健治」を「在家裕司」へ変更。 2) P5, 1 行目　「(7) 検体の保存条件」の記載において、「採取後は、冷蔵（4℃、3－4 日程度）または冷凍（－30℃、5 日～1 か月程度）の間で保存し」を「採取後は、冷蔵（4℃、3－4 日程度）または冷凍（－30℃、5 日～1 か月程度）で保存し」に修正。	1.2	2025/6/5	**荒巻道彦**	清河信敬

	3) P5, 3-4 行目　「凍結保存は避けてください。」を削除。 4) P5, 8-9 行目「凍結は不可です。」を削除。 5) P10, 19 行目「凍結保存は避けてください。」を削除。 6) P10, 23 行目「凍結は不可です。」を削除。				
4					
5					
6					
7					