

稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査を実施する際の ベストプラクティス・ガイドライン

日本人類遺伝学会 遺伝学的検査標準化準備委員会（平成 22 年 9 月 16 日）

はじめに

稀少疾患の分子遺伝学的検査の実施に際しては、一般的な臨床検査の質保証の基準とは異なる特殊な配慮が必要である。非常に多くの稀少疾患があり、検出される遺伝子変異の種類は無数に近く存在し、全く報告されていないものが見出されることも多いためである。しかしながら、稀少疾患の分子遺伝学的検査においてもその情報が診療情報の一部として利用される可能性があるという観点から、検査の質保証に関して一定の基準が必要なことは明らかであり、検査提供者を対象とした本ガイドライン作成の目的である。検査を依頼する臨床医としては、「遺伝学的検査に関するガイドライン」があるが、検査提供者の現状についての理解のため本ガイドラインを参照することが望ましい。

稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査の実施におけるわが国の現状

遺伝性疾患の原因遺伝子が発見されると、より多くの患者においてその遺伝子と疾患の関連を調べる研究を行う必要がある。その遺伝子の研究を行っている研究施設は当該施設以外からも多数の患者サンプルを集めて解析を行うことが多い。数年経過してそのような研究段階を終了すると、研究室としては、解析を研究として継続する価値が少なくなる。

しかしながら、研究によって臨床的意義が確立されたものであっても、その遺伝子の解析が、臨床検査会社などにおいて臨床検査として継続されないことが多い。その理由は、(1)疾患の種類は極めて多いが、頻度が低いものが圧倒的に多く、多種類の疾患・遺伝子に対応するためにはコストパフォーマンス上も問題が多いこと、(2)ミスセンス変異の解釈など、検査実施以外にも各疾患の専門家の濃厚な関与が必要な場合が多いこと、(3)保険収載されているものはごく一部に限られており一般的な臨床検査としての認識が低いこと（実施されているものも「研究検査」という位置付けになっている）、(4)数少ない保険収載のされた項目において、定められた保険点数では採算が取れないことが多いことなどがあげられる。

一方で、研究的な価値が薄れても、他の医療施設からの検体を受け入れ、研究室における解析を継続している施設もあるが、幾多の困難に直面している。解析実施のための人的経済的リソースの確保が困難なことが最大の理由である。研究的価値が少ないものを研究費を用い、研究スタッフにより細々と実施している施設も多い。

このような研究室レベルでの解析を継続するために、最低限の経費を解析実施者に還元できるシステムを構築する動きもある(オーファンネットなど)。また、先進医療として、他の医療施設での検体を受け入れ、費用の支払いを受けて医療機関で遺伝学的検査を実施することが、平成 20 年度より可能となった。このように非常に困難な状況で関係者の努力によって維持継続されている稀少疾患の遺伝学的検査についても、最終的に患者へフィードバックされる臨床検査として、検査の意義や質を担保するための何らかの基準や考え方が必要である。

稀少疾患において頻度の比較的高い疾患と異なるのは、分析的妥当性すなわち精度管理のあり方と、臨床的妥当性の評価の 2 点に集約される。

I. 本ガイドラインの対象

遺伝性疾患の遺伝学的検査の方法は、細胞遺伝学的検査、生化学的検査、分子遺伝学的検査に大別される。細胞遺伝学的検査については別途ガイドラインが公表されている(Ref.)。本ガイドラインは、分子遺伝学的検査を対象としている。PCR によって目的遺伝子の特定部分を増幅し、それを解析する手法を用いる検査としては、変異のスクリーニング、シーケンシング、制限酵素などによる切断、PCR 産物長の測定、アレル特異的プライミングなどがあるが、その他の分子遺伝学的検査も本ガイドラインに含まれる。なお、マイクロアレイ技術を応用した検査法も多く開発されている。特に、コピー数変化、欠失・重複などの検出を目的としたマイクロアレイ技術は、その感度の高さから、今後、有用な検査法として普及すると予測されるが、これらについては別途検討することとする。生化学的方法についても同様である。

また、本ガイドラインは頻度が低く浸透率が高い単一遺伝性疾患の診断のための分子遺伝学的検査を対象としている。頻度として 1/2,000 ないし 1/5,000 程度以下を原則とする(注)。Genetic heterogeneity の高い疾患においては、原因遺伝子ごとの疾患頻度(保因者頻度ではない)で同程度以下とする。当然、Common Disease に対する易罹患性遺伝子検査、肥満遺伝子などのいわゆる体質検査などは対象外である。特に、下記の臨床的妥当性の評価においては、根本的な相違があるので混同してはならない。

(注)厚生労働省難治性疾患克服事業における研究奨励分野の対象疾患における稀少性の定義「おおむね 5 万人未満」を参考としている。

II. 稀少疾患の分子遺伝学的検査における臨床的意義の評価

1. 稀少疾患の分子遺伝学的検査における臨床的妥当性・臨床的有用性の特徴

遺伝学的検査を実施する際には、まず検査の臨床的妥当性と臨床的有用性の評価が必要である。当然ながら、稀少疾患では、有病率や罹患率が極めて低いために臨床的妥当性・臨床的有用性を疫学的に評価するための多数のデータを得ることは

できず、それらを数値化して表示できない。また、頻度の高い疾患の遺伝学的検査の臨床的妥当性評価のための考え方をそのまま稀少疾患に転用することは出来ない。しかし、遺伝学的検査が患者や家族に診療上あるいは生活上の有用な情報をもたらさるのであれば、遺伝学的検査を利用する機会を閉ざすことがあってはならない。

2. 臨床的妥当性

(1) 稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査を実施するには、文献上、疾患発症と原因遺伝子の関係について明確な証拠(エビデンス)が示されていなければならない。そのためには、下記の1)または2)を満たすことが必要である。

- 1) 変異遺伝子産物の機能解析から、遺伝子変異と疾患発症についての因果関係を支持する生物学的エビデンスが得られている
- 2) 遺伝子変異と疾患発症についての最初の研究結果が他の研究者により再確認され、ピアレビューの学術雑誌に複数の科学論文が掲載され、関係を否定する論文がないこと。1件しか科学論文がない場合は、臨床的感度と特異度をある程度決められる多数の家系や複数の人口集団に由来する患者のデータが含まれていて、当該遺伝子の変異と疾患発症について関係が一般的に成り立つと推論できる

(注) GeneReviews (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=gene>、邦訳版GeneReviewsJapan (<http://grj.umin.jp/>)は、遺伝性疾患のうち、遺伝学的検査が可能となった疾患を中心に掲載されたレビューであり、稀少遺伝性疾患に対する遺伝学的検査の有用性についての情報が適切にまとめられている。検査実施者、検査依頼者ともに参考とすることができる。ただし、遺伝カウンセリングや発症前診断などの記載については北米の状況を反映したものになっており、日本における状況とはかなり異なること、日本人におけるデータが必ずしも十分でない場合もあることに注意すること。

(2) 臨床的妥当性を評価する際の留意点について

(1)に示した条件はあくまで浸透率の高い単一遺伝性の稀少疾患の診断のための分子遺伝学的検査のみに当てはまるものであり、多因子疾患など浸透率の低い疾患に適用することはできない。すなわち多因子疾患の易罹患性診断等においては、最初の研究結果を確認する論文が少数あったとしても、多数の論文のsystematic reviewを実施しなければ臨床的妥当性を評価することはできない。

また、一見単一遺伝性疾患と思われるものであっても、以下のような点に、留意が必要である。

- 1) 複数遺伝子の相互作用によって表現型が決まる可能性がある
- 2) 原因遺伝子が単一でなく、2つ以上の遺伝子の変異が同じ表現型の疾患を誘

起することがある。

3) 検査対象となる遺伝子に変異が無くても、別の原因によって同じ表現型の疾患が発症する場合がある(表現模写)。

4) 当該遺伝子の変異により生じる臨床症状が十分に明らかにされていない。

上記について評価するには、入手可能なすべての文献・情報を収集、文書化し、定期的に文献調査を繰り返す必要がある。特に、偽遺伝子や他の相同遺伝子の報告、既知の多型情報などについて十分情報収集を行うべきである。

3. 臨床的有用性

分子遺伝学的検査により、患者・家族に対して確定診断・予後判定・治療法の選択・合併症を回避するための予防的臨床検査の実施・家族計画の決定などについて、有用な情報が得られるエビデンスがあることが重要である。

(注)長期的に臨床検査としての実施を通じて得られるデータの蓄積と当該疾患の研究をつづけることによって、稀少疾患の分子遺伝学的検査の臨床的妥当性と有用性についてより正確な評価が可能になる。

Ⅲ. 分析的妥当性の検証と精度管理

1. 稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査に用いられる方法

稀少遺伝性疾患のみに用いられる方法論があるわけでないが、予想できない稀な変化をも見出す必要があることから、様々な方法を駆使する必要がある場合がある。具体的な方法論別の留意点については、別項に記載した。

2. 稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査における分析化学的特徴

稀少疾患のほとんどは単一ないし複数種類の遺伝子の変異によって発症するが、同定される変異は患者・家系ごとに異なっており、患者のもつ変異が共通である場合はまれである。したがって、稀少遺伝性疾患に対する分子遺伝学的検査では、通常、特定箇所の変異検出ではなく、その遺伝子内の全領域を対象とした網羅的な変異の検出が必要である。

翻訳領域全体およびイントロン/エクソン境界域の全ての領域の塩基配列を決定するか、様々な方法を用いて変異の存在する領域をスクリーニング検査によって特定した後、当該領域の塩基配列を決定することで変異を確認する複合的なアプローチのいずれかが、通常用いられる。

3. 分子遺伝学的検査の提供の開始および継続の際の分析的妥当性の評価

対象の遺伝子内に起こりうる全ての変異に対して、分析的妥当性を厳密に検証

することは、現実的には不可能である。

したがって、現実的な方法として、まず、変異検出の方法に関わらず、塩基配列が既にわかっている DNA サンプルを用い、再現性を確認することが必要である。次に、さまざまな変異・バリエーション・正常対照を含む一連のサンプルを盲検化して分析的妥当性を評価することが望ましい。検証に用いるサンプルを、他の施設から入手することも推奨される。検査の分析的妥当性評価の記録は、後日、検証や確認ができるように保存しておく必要がある。

極めて稀少な疾患で、複数の盲検化サンプルを得られない場合は、その検査方法の経験が十分あり、ネガティブコントロールで陰性であることが確認されれば、新しい検査の提供を開始してもよい。ただし、検査結果と臨床診断や家族歴が合致するかどうかを定期的にチェックする必要がある。

4. 稀少疾患の分子遺伝学的検査におけるポジティブコントロールとネガティブコントロール

(1)シーケンシング

ポジティブコントロールは必要ない。アーチファクトと真の違いとの区別のためにネガティブコントロールが必要な場合がある。

(2)変異スクリーニング

検体と比較するために、ネガティブコントロールを各 PCR 増幅産物毎に設定すべきである。全ての PCR 産物に対してポジティブコントロールを得ることは非現実的であり、ポジティブコントロールなしに検査を実施することは容認される。しかし、代表的なポジティブコントロールを必要に応じて定期的に検査することにより、検査の質が担保できる。変異スクリーニング法によっては、PCR 増幅産物内の多型もポジティブコントロールとすることができる。多数の検査を実施してポジティブコントロールが得られればそれを併せて検査するべきである。

(3)その他の方法

ホットスポット変異や創始者効果などにより患者の多くが同じ変異を持っている場合(注)、ポジティブコントロールとネガティブコントロールは、常に同時検査を行うべきである。

(注)制限酵素による切断(RFLP)・PCR 産物長の測定・アレル特異的プライミングなどの比較的単純な方法によって診断可能な場合がある。

(4)既知の変異検査(注 1)

既知変異の再解析の場合や血縁者に対し既知変異の有無を調べる場合は、発端者の検体(ポジティブコントロール(注 2))を用いて、当該変異の検出が可能であるか

どうか確認したうえで、血縁者の検査を行うべきである(注 3)。発端者の変異確認は先に行うことが望ましいが、血縁者や出生前診断のサンプルの検査と並行して実施することは許容される。

発端者が死亡しているなど、変異の再確認を行うことができない場合は、ポジティブコントロールとして次のようなものを使用することができる。

- ①家系内の変異の絶対保因者(Obligate carrier)
- ②検査した血縁者のいずれかに発見された同一の変異
- ③過去に変異を報告した施設から入手したサンプル

ポジティブコントロールを入手できなかった場合や発端者に変異が再確認できなかった場合(注 4)には、報告書にその旨を明記する。発端者の結果の矛盾がある場合、それが解明されるまでは血縁者や出生前検査の結果についても報告書は作成できない。

胎児が既知の変異をもっているか出生前診断をする場合、使用するプライマーが両親の変異アレルばかりでなく正常アレルを増幅可能であることを確認することが必要である。したがって、すでに両親がヘテロ接合体であることが報告されていても、両親の検体をコントロールサンプルとして利用しなければならない。

(注1)既知変異の解析は、次のような状況で行われる。

- 1) 変異の再確認をする
- 2) 発端者における変異が同定されている場合に、他の血縁者も同一の変異を有するかどうか、決定する
- 3) 発端者における変異が同定されている場合に、2)と同様に、次子が同一の変異を有するかどうか、出生前診断を行う

(注 2)このような場合のポジティブコントロールは、過去の報告を再確認する役割、検出方法が十分な感度を有することを確認する役割、PCR プライマーが当該家系の変異アレルを増幅できることを確認する役割を果たす。

(注 3)既知変異に対する特異的アッセイを設定する前に、検査対象の変異について十分な情報を得ておくことが大切である。可能であれば、最初に用いられたアッセイの条件を知るべきである。変異の名称が曖昧でないことも重要である。

(注 4)プライマー塩基配列内の多型部位が原因である可能性があり、その旨を報告書に但し書きするべきである。このような場合、最初のプライマーから離れた部位のプライマーセットを用いて解析をやり直す必要がある。プライマーをデザインするとき SNP データベースを確認すれば、この問題を回避しやすくなる。このような理由から、解析に用いたプライマー配列を報告書に記載すべきである。

5. 種々の分子遺伝学的検査を共通の方法で実施している場合の質保証の方策

種々の疾患に対する分子遺伝学的検査を、1つの施設が、全く同じ方法を用いて実施している場合(例えば、シーケンシング)には、スタッフの技能やソフトウェアの性能などについての評価は、遺伝子ごとに行う必要はなく、共通の方法論ごとに行えばよい。

6. 検出感度・検出特異度

塩基配列の正常からの変化を検出する感度と特異度を明らかにしておく必要がある。変異スクリーニングの場合には、特に感度の情報が重要である。しかしながら、シーケンスでも感度、特異度が100%ではない(注)ことに留意が必要である。結果報告書においてこれらの情報は必須である。

(注)ヘテロ接合性変異のシグナルが小さく見逃される可能性がある、ある程度以上の長さの欠失・挿入は検出できないなどの理由による。

7. 精度管理

分子遺伝学的検査の施設技能試験の体制は、頻度の高いものについても、わが国ではまだ整備されていない。したがって、本項における記載は、精度管理のために施設として自らあるいは他の施設と協力しながら取り組むべき事項と位置付けられる。

稀少疾患の分子遺伝学的検査については、使用している変異解析の方法の全般に関して内部精度管理を行うのが適切である(下記注)。例えば、シーケンシング、制限酵素による切断、ヘテロ二重鎖解析、定量PCRを用いる場合、解析方法毎に盲検化サンプル(たとえば代表的変異を有するものなど)の解析を定期的実施することが望ましい。

特定の遺伝子について継続して相当数の検査をおこなっている施設では、遺伝子特異的な精度管理プログラムを策定することが望まれる。遺伝子特異的精度管理プログラムを実施すれば、検査法毎の精度管理プログラムを実施した実績と考えることができる。

他の施設と盲検化サンプルの交換をする協定を結ぶことができ、精度管理プログラムで用いることができるのが最も望ましい。施設内に蓄積されたサンプルしか精度管理用として使えない場合は、盲検化すればよい。検査のプロセスの各構成要素をできる限り多く評価するため、精度管理用サンプルを、異なるスタッフ、異なるシーケンサー、異なるソフトウェアなどで解析することが重要である。

これらの精度管理の実施状況についてはできるだけ詳細に記録し、後日、検証や確認ができるように保存しておく必要がある。

(注)稀少疾患においては、下記の理由により、遺伝子毎に精度管理試験を実施することは実際的でない。

- 1) 一つの施設で実施される、遺伝子の解析数は、遺伝子毎に数えると非常に少ない場合が多い
- 2) ひとつの施設が多数の遺伝子の分子遺伝学的検査を提供する場合がある
- 3) 稀少遺伝性疾患のほとんどは、患者毎に変異の場所や性質が異なるため、特定の遺伝子について精度管理試験を行うとき、恣意的に選んだ一つの変異の同定について行ったとしても、当該遺伝子の遺伝子検査全般を評価するような試験となりえない

IV. 分子遺伝学的検査の実施担当者

施設の責任者は、分子遺伝学的検査についての専門的な学識、十分なトレーニングおよび実施経験を有すべきであり、技術スタッフも十分な分子遺伝学的検査の経験を積むべきである。ほとんどの稀少疾患の分子遺伝学的検査はシーケンシング技術を用いて実施されるので、まずは既知変異・未知変異を検出するための DNA シーケンシングの手技とその結果と解釈に習熟する必要があり、他の種々の方法にも研鑽を積む必要がある。

V. 検査の前後の留意点

検体の取扱や輸送、患者や家系の識別方法、受託拒否の基準などの検査実施前後の留意点は、一般的な分子遺伝学的検査においても稀少疾患の分子遺伝学的検査においても同じである。日本臨床検査標準化協議会による遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル(文献 7)に詳細な記述があるが、特に注意すべき点を以下に列挙する。

1. 検査前の留意点

(1) 検査の説明・同意文書

説明文書は、患者と検査を依頼する医師とが、検査についてその限界も含めて正しく理解するためのものでなければならない。文書には、検査対象遺伝子の名称、検査対象領域(エクソン)、当該遺伝子と関連する疾患、検査の目的(鑑別診断、保因者検査、出生前診断など)、臨床的感度と分析的感度などを明示しなければならない。そのための情報を検査提供者は検査依頼者(臨床医)に提供する必要がある。

(注)例えば、「この疾患の患者の 70%がイロハ遺伝子に変異を認める。これまでにイロハ遺伝子で報告されている変異の 95%超は、エクソン 10,11,16 の塩基配列解析で検出される。」

(2)検査のオーダー

他の遺伝学的検査と同様に、稀少疾患の分子遺伝学的検査は医療機関を介して実施する。検査実施施設は、検査依頼が適正であることを確認するべきである。患者自身が直接に検査依頼を出すことはできない。

(3)病歴および家族歴ほか

遺伝学的検査を実施する施設は、検査結果の正確な解釈や適切なフィードバックに役立てうる可能性のある背景情報はどのようなものでも提供を求めらるべきである。患者の疾患罹患や臨床症状・経過、家族歴、家系図、家系の既知変異などの情報は最低限必要である。疾患によっては、表現型、民族、遺伝形式などによってどの遺伝子やエクソンを優先して解析するかを決められることがある。検体採取や搬送の状況などの情報が必要な場合もある。

2. 検査後の考慮事項

(1)臨床的意義の解釈

分子遺伝学的検査の実施後は、データベースの検索など見出された変化を解釈するために多大な労力をかける必要があり、しばしば、検査実施そのものよりも困難を伴うことがある。これは、極めて重要な作業であることが強調されるべきである。具体的な解釈についての情報は、別項(分子遺伝学的検査における結果の解釈)にまとめた。

(2)報告書の記載内容

報告書は正確、簡潔かつ包括的であるべきで、被検者や専門家による適切な意思決定ができるように、すべての必要情報が記載されていなければならない。

一般的な分子遺伝学的検査の報告書に必要な基本項目は、稀少疾患の分子遺伝学的検査の報告書にも必要な項目である。

最低限、以下の情報を報告書に含めることが必要である。

- ① 被検者識別情報
- ② 医師等検査依頼者とその連絡先
- ③ 検査の適用理由と、検査実施に必要なあるいは参考となる被検者の臨床医学的情報
- ④ 実施した検査(疾患名、遺伝子名を含む)と方法(解析の範囲、検査の限界及び解析感度と特異性を含む)。特定の変異に対してのみ実施された場合は、報告書に、遺伝子の全体の網羅的な解析は実施されておらず、他の部分の変異は否定できないことを明示すべきである。
- ⑤ 検体の種類

- ⑥ 検体採取日とその受領日、受付番号、家系番号(使用する場合)
- ⑦ 検体の状態に関する情報(必要な場合は添加物、輸送や保存の状態など)
- ⑧ その検体を実際に検査した施設(再外注された場合は検査施設を含む)の名称と所在地
- ⑨ 検査結果(検査結果の中間報告を行った場合は、その内容を最終報告に反映させること)
- ⑩ 検査結果の解釈に必要な情報(被検者の臨床データ、家系情報・人種等、検査の臨床的感度・特異度など、検体の量や質が結果に影響する可能性のある場合はそのことも含む)
- ⑪ 報告書の作成者および最終責任者の所属、役職、氏名
- ⑫ 検査施設の連絡先情報
- ⑬ 報告書の発行日

原則的に検査報告書には以下の情報も含めることが必要である。

- ① 遺伝カウンセリングの有資格専門家による遺伝カウンセリングの必要性
- ② 家族への影響の可能性
- ③ 必要な追加検査等の情報などの推奨事項

(3)変異の命名法など

同定された変異または多型は、DNA・タンパク質レベルの両方において、国際標準命名法を用いて記載されるべきである。シグナルペプチドをもつタンパクの場合には、シグナルペプチドにも付番しているかどうか記載する必要がある。年月を経る間にエクソンの付番の方法が変わってしまうこと、塩基の付番とコドンの付番が不一致となる場合もあることに留意する。標準塩基配列の番号を特定すると共に、その塩基配列の第1塩基・第1コドン1と開始コドン ATG との位置関係が明確になるような記載を含める必要がある。準拠した付番方法が明示されている文献を引用することが望ましい。標準塩基配列と変異部位の前後の塩基配列を具体的に記載すること、シーケンスのクロマトグラムの生データを添付することが極めて有用である。

(4)報告書の記載様式

報告書は、その受領者が検査の臨床的有用性と検査結果の限界を理解できるように、分かりやすく記載されなければならない。検査結果の結論を簡潔明瞭に頭書するか要約をまず記載し、そのあとに詳細な情報を付記するべきである。報告書を読む者が必ずしも詳細な情報を正確に理解できるとは限らないためである。変異データベースにおいては、検査結果は要約して記述されるのが一般的であることもその理由である。

(5)報告に関する記録

検査実施施設は、報告に関するすべての情報を記録・保存しておかなければならない。

分子遺伝学的検査において用いられる技術に関するガイドライン

1. シーケンシング

シーケンシングについて技術的ガイドラインとしては、ACMG Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories 2006 edition

(http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm)

G13 章を参照すべきである。付属文書として、Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI - 旧 NCCLS) が「MM9-P: Nucleic Acid Sequencing Methods in Diagnostic Laboratory Medicine」(December 2004) が参考になる。

シーケンシングを行う場合、解析ソフトウェアを使用して患者の塩基配列を正常と比較することが不可欠である。クロマトグラム(シーケンス波形)でヘテロ接合部位を調べるだけでは不十分である。使用するソフトウェアは両方向および重複する DNA フラグメントと、cDNA およびゲノム標準塩基配列を容易に比較できるものでなければならない。

2. 遺伝子変異スクリーニング技術

Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE), Protein Truncation Testing (PTT), Single Strand Conformational Polymorphism (SSCP), ヘテロデュプレックス法 (HA), 熱変性高速液体クロマトグラフィー法 (DHPLC)などが含まれる。技術的ガイドラインとしては、ACMG Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories 2006 edition

(http://www.acmg.net/Pages/ACMG_Activities/stds-2002/stdsmenu-n.htm)の G9 章、G10 章、G11 章、G18 章をそれぞれ参照すべきである。

遺伝子変異スクリーニング技術に関しては、検出感度と検出特異度を決定することが重要である。

3. シーケンシングと遺伝子変異スクリーニング法の限界

シーケンシングと遺伝子変異スクリーニング法のいずれも、微小な欠失や挿入・ナンセンス変異・ミスセンス変異・スプライシング変異・一塩基置換などの点変異は検出するが、遺伝子の欠失や重複・その他の大規模なゲノム再構成は検出しないことを理解しておかなければならない。

したがって、大きな遺伝子構造変化の存在を検出する技術的プラットフォームの開発が推奨される。Southern blot, fluorescent in situ hybridization (FISH), multiplex gene dosage analysis, reverse transcription polymerase chain reaction (PCR), long-range PCR, SYBR® green や蛍光プローブ技術を用いた real time quantitative PCR, multiplex ligation probe amplification (MLPA)、アレイ CGH などがあるが、常に

進化し続けている。これらの技術の大半は、アッセイを自研究室内で開発することが必要となる。そのため、十分な経験を持つ施設のみがこの取り組みを行うことが望ましい。

分子遺伝学的検査における結果の解釈

1. 点変異, 微小挿入・欠失などの塩基配列変化の解釈

塩基配列変化が病因かは次の3点で評価する。

- 1) 文献やデータベースで報告されているか
- 2) 疾患との相関があるか
- 3) その種類の変異が疾患を引き起こすと予想されるか

このため、見出された変化を次のように分類する必要がある。

- 1) 疾患を起こすことがわかっており、過去にそのように報告もされている
- 2) 疾患の発症と関係がないことがわかっており、過去にそのように報告もされている
- 3) 報告はされていないが、疾患を起こすと予想される
- 4) 報告されておらず、疾患を起こすか推論することもできない
- 5) 報告はされていないが、おそらく疾患を起こすことはない

シーケンス変化を規則に従って命名しなければならない。適切な標準塩基配列を報告書に記載することが、非常に重要である。代替のナンバリングシステムや別のストップコドンが発表されれば、文献とデータベースをレビューする際は留意し、報告書に説明を記載しなければならない。

変化を評価し、既報かどうか判断するため、データベースと文献を探索しなければならない。ヒトゲノム変異データベース (<http://www.hgmd.cf.ac.uk/ac/index.php>)、ヒトゲノムvariation (HGV) データベース

(<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/dblist/dblist.html>)、遺伝子特異的データベースなどである。これらのデータベースは変化の適切な解釈のために非常に有用である。データベースの情報には、塩基の変化、塩基の位置、アミノ酸の変化とコドンの位置、罹患者の頻度などの全てが含まれる。変化が非罹患者で報告されているか否かは有用な情報となる場合がある。

遺伝子特異的データベースには、最近報告された変異は含まれていない可能性がある。特定の変化と疾患との関連について論争がある複数の論文を参照している場合もある。定期的に更新されていないデータベースには、間違っている情報が含まれている可能性がある。参照したデータベースの情報も報告書に記載するべきである。稀少遺伝性疾患の分子遺伝学的検査で新規の変化が発見されることが多い。これらの変化の性質を可能な限り明らかにし、データベースに情報を伝えることが大切である。適切なデータベースに定期的にデータを送付するポリシーと手順を策定することが望ましい。既存のデータベースでは日本人のデータの集積が特に貧弱である場合が多いので、日本人データベースを充実させていく必要がある。

見出される変化は以下ように分類される

- 1) **短小化型変異:** フレームシフトを起こす微小な挿入・欠失やナンセンス変異などにより、タンパク質の短小化を起こすもので、通常、病因となる変異と解釈される。他の報告などのフォローアップは必要ない。
- 2) **ナンセンス変異:** 潜在的なスプライス部位形成も可能であり、注意が必要である。スプライス部位予測プログラムにより評価可能である。
- 3) **スプライシング変異:** 通常は、GT:AG スプライス受容/供与サイトの変化で発生するが、イントロンの中央部やエクソン内でも起こり得る。スプライス部位予測プログラムの使用が有用である。<http://rulai.cshl.edu/tools/ESE>, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html (2009年10月6日現在)などがある。これらのプログラムでは、スプライシングへの影響の与えやすさがスコアで示され、予測は使用するアルゴリズムで変わる。cDNA を調べなければ、スプライシング異常を確認することはできない。この場合、発現組織の RNA が必要なので、再度試料を得なければならぬかもしれない。しかし、採取可能でない場合もあり得る。
- 4) **サイレント変異:** アミノ酸は変化しないので、病因でない場合が多いが、異常なスプライシングが起こる場合があるため、注意が必要である。
- 5) **ミスセンス変異:** 病因となる変異なのか、判断が難しい。タンパク質の機能喪失または機能獲得を起したり、潜在的スプライス部位を形成して異常なスプライシングを起こすことがある。病因か確定できないミスセンス変異は、「意義が不明な変化」として報告すべきである。ミスセンス変異の評価方法について以下に記す。

ミスセンス変異の評価の最も基本は、アミノ酸変化が保存的か非保存的かという点である。一般に、非保存的な変化は病因である場合が多い。対象のアミノ酸が進化的に保存されたものかどうかを検索すべきである。進化的に保存されたアミノ酸は、重要な機能的な役割をもち、変化が病因となる可能性が高い。また、既知の機能ドメインに発生するアミノ酸変化は病因になりやすい。

もうひとつの方法は、罹患者・非罹患者の両方を含む他の家族メンバーを解析することである。

アミノ酸置換のタンパク質機能への影響をみるタンパク質モデリング予測ソフトウェアや進化トレース法 (Lichtarge Laboratory, Baylor College of Medicine) などの予測ソフトウェアツールの使用も可能である。これらの妥当性は評価段階にあるものもあり、注意が必要である。

変化がタンパク質機能に影響するか調べる機能解析を実施できれば、最終的な評価ができる。現時点で、一般検査室で可能な機能解析法はほとんどないが、研究室と連携して機能解析が可能な場合もある。

- 6) **一塩基置換:** 一塩基置換を見いだしたら、病因とならないものかどうか、既知の高頻度 SNP (一塩基多型) かどうかを確認しなければならない。公開 SNP データベ-

ス (<http://snp.cshl.org/>, www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=snp) の検索、その遺伝子の研究者への相談、十分な数の健常者の解析により評価する。変化が病因とならないもの、すなわち、「normal variant」であると結論づけられた場合、その根拠を報告書に記載する必要がある。一般集団に低頻度で認められた variant が罹患集団で非常に多いと報告されている場合は、報告書に記載すべきである。変化が評価できない場合は、「意義が不明な variant」として報告すべきである。

一塩基置換が検出されたときは、疾患に関連しない場合も報告書に記載することが望ましい。将来、疾患に関連していることが発見される可能性もある。さらに、あらゆるヘテロ接合性変化も、以下のようにしばしば有用な情報となる。

- 1) 両アレルが増幅され解析されていることが確認できる。
- 2) 家系における連鎖解析の場合、マーカーとして利用可能である。
- 3) 出生前診断の場合、母体細胞の混入がないかの確認に利用可能である。
- 4) サンプルの取違いや父親/母親不明の問題に利用できる可能性がある。

このため、ヘテロ接合性の SNP の存在は報告書に記す必要がある。SNP の位置 (例: ivs3-112)、または位置と実際の遺伝子型 (ivs3-112, g/a) のいずれを記載しても良い。最終的な結論を誤解しないよう、報告書の別の章または脚注に記載することが望ましい。

疾患との関連が不明な低頻度一塩基置換が、見かけ上ホモ接合となっている場合、コメントに値する。そのような variant は関連リスクがあると後にわかる可能性があるためである。しかし極端な懸念を引き起こすような記載方法は不適切である。さらに重要なことに、血族婚でない家系における解析でヘテロ接合の SNP 部位が存在せず、大欠失の可能性がある場合、稀少な一塩基置換が見かけ上ホモ接合性であれば、欠失がさらに強く示唆される。そのような状況下では、低頻度一塩基置換は、両親の検査をする場合のマーカーとして使える可能性もある。

また、まれな変化をホモ接合性で観察した場合、プライマー塩基配列内の多型部位が原因である可能性があり、その旨を報告書に但し書きすることが望ましい。このような場合、最初のプライマーから離れた部位のプライマーセットを用いて解析をやり直すことが考慮される。プライマーをデザインするときに SNP データベースを確認すれば、この問題を回避しやすくなる。このような理由から、解析に用いたプライマー配列を報告書に記載することが望ましい。

2. 大きな構造変化の解釈

大きなゲノム構造の変化 (欠失、重複、再配列) が疑われる場合がある。例えば、男性で X 連鎖遺伝子の PCR 増幅が起きない場合、発端者で変化がホモ接合で検出されている際に、両親では発端者の持つ変化が検出されない場合などである。「分子

遺伝学的検査において用いられる技術に関するガイドライン」3. に記載された検査法により大きな変化(欠失、重複、再配列)の存在を確認できる場合がある。これらの追加検査により正常コントロールと異なる結果が得られた場合には、大きなゲノム構造の変化が存在していることが示唆され、通常そのような異常は病因と解釈できる。これらの追加検査によっても正常コントロールと差異がない場合は、ほぼ正常と解釈される。この場合、報告書に実施した追加検査法の感度について記載することが重要である。

大きなゲノム構造の変化は変異データベースに掲載されることが少ない。大きなゲノム構造の変化はルーチン検査の対象とならず、検出・報告されることが少ないためである。

大きなゲノム構造の変化の場合、その正確な境界の情報を含む名称ではなく、通常、「遺伝子(名称)のエクソン(番号)の欠失」などと簡略記載される。

3. 「正常」という検査結果の解釈

「正常」という結果(正常からの違いが認められないという結果)が得られた場合、報告書において検査の検出感度に言及すること、未検出の変異が存在する可能性を述べることが大切である。これは以下の理由による。

- 1) 大欠失や逆位などは検出されない可能性がある(特に片側アリルに存在する場合)。
- 2) 検査対象でない領域に変異が存在する可能性がある。(プロモータ領域など、翻訳領域外は検査対象とならないことが多い)
- 3) 検査対象の遺伝子と別の遺伝子に変異が存在する可能性がある。
- 4) プライマー結合部位に予期しない変異が存在し、アレルの欠落や競合するアレルの優先的な増幅につながった可能性がある。
- 5) モザイクの可能性はある。

稀少疾患の分子遺伝学的検査結果報告書の例

例1 翻訳領域の全エクソンのシーケンシングにより病的変異が検出されず、数カ所のヘテロ接合が検出された場合

検査名: XXX 遺伝子のシーケンス解析

検査の理由: ____症候群の疑い

方法: 翻訳領域の 18 のエクソンと隣接するイントロンを PCR 法により増幅し、両方向からシーケンスした。標準配列として NM_XXXXXXX を用いた。第 1 コドンは開始コドン ATG とし ATG の A を第 1 塩基として付番した。

結果: (今回の検査では)XXX 遺伝子の変異は同定されなかった。

詳細: 数カ所においてヘテロ接合となっている部位を認めた。これらの部位では両方のアレルが存在していることが示唆された。コドン 223 では TAT と TAC が認められた。これは既知の多型で、両方のコドンはチロシンをコードしており臨床的な意義は無いと考えられる。コドン 816 では CCA(プロリン、P)、CGA(アルギニン、R)が存在していた。P816R は疾患に無関係であると報告されている (Author et al, 2005)。ほかに c.427-13(IVS3-13)の位置にもヘテロ接合となっている部位を認めたが、病的意義はないと考えられた。これらのヘテロの部位を認めたことから2つのアレルが存在しており、遺伝子全体の欠失が存在する可能性は否定された。

解釈: 本患者において____症候群と関連する遺伝子変異は同定されなかった。この結果は____症候群の診断を否定するものではない。____遺伝子の変異は____症候群の家族歴のある患者の 65%に認められ、家族歴のない患者の 30%にのみ認められる (Author et al., 2000)。上記の解釈は報告書作成時点での____症候群に関する遺伝学的知見に基づくものである。

限界: 本検査では XXX 遺伝子の翻訳領域とそのごく近傍の領域のみが解析された。プロモーター領域の異常・イントロンやその他の非翻訳領域に異常があったとしても今回の検査では検出されることはない。DNA シーケンシングは検査を行った領域内の塩基置換、小さな欠失、小さな挿入を高い感度で検出することが出来るが、100%の感度ではない。XXX 遺伝子以外の遺伝子に変異があったとしても検出されることはない。大きな欠失や挿入は今回の検査方法では検出されない場合が多い。

参考文献:

例2 翻訳領域の全エクソンのシーケンシングにより病的変異が検出されず、ヘテロ接合が全く検出されなかった場合

検査名：XXX遺伝子のシーケンス解析

検査の理由：____症候群の疑い

方法：翻訳領域の14のエクソンと隣接するイントロンをPCR法により増幅し、両方向からシーケンスした。標準配列としてNM_xxxxxxxxを用いた。第1コドンは開始コドンATGとしATGのAを第1塩基として付番した。

結果：（今回の検査では）XXX遺伝子の変異は同定されなかった。

詳細：ヘテロ接合となっている部位を1箇所も認めなかった。このような部位があれば、遺伝子全体の欠失を除外することが可能であるが、今回の結果からは、除外できない。__症候群では10%以上の症例で欠失がおきることが知られている。さらにこの患者ではc.428-28(IVS3-28)の部位では見かけ上、Gのホモ接合体となっている。この部位は標準配列ではTとなっている位置で、Gの塩基は100名以上の正常者と患者の配列で認められたことのない変化である。IVS3-28の位置のGは疾患の原因となる変異ではない。しかし患者の両親が近親婚でなければこのような稀なアレルがホモ接合の状態で存在する可能性は低いので、欠失について検査する意味があると判断される。

解釈：本患者において__症候群と関連する遺伝子変異は同定されなかった。この結果は__症候群の診断を否定するものではない。____遺伝子の変異は____症候群の家族歴のある患者の65%に認められ、家族歴のない患者の30%にのみ認められる (Author et al., 2000)。両親の検査をすることにより患者に欠失があるかどうか明らかにできると期待される。あるいは、可能であれば欠失解析が考慮される。上記の解釈は報告書作成時点での__症候群に関する遺伝学的知見に基づくものである。

限界：本検査ではXXX遺伝子の翻訳領域とそのごく近傍の領域のみが解析された。プロモーター領域の異常・イントロンやその他の非翻訳領域に異常があったとしても今回の検査では検出されることはない。DNAシーケンシングは検査を行った領域内の塩基置換、小さな欠失、小さな挿入を高い感度で検出することが出来るが、100%の感度ではない。XXX遺伝子以外の遺伝子に変異があったとしても検出されることはない。大きな欠失や挿入は今回の検査方法では検出されない場合が多い。

参考文献：

例3 遺伝子変異スクリーニングにより異常が検出され、シーケンシングにより病的変異が同定された場合

検査名: XXX遺伝子の変異解析

検査の理由: _____症候群の疑い

方法: 翻訳領域の18のエクソンと隣接するイントロンをPCR法により増幅し、熱変性高速液体クロマトグラフィー法(DHPLC法)により変異のスクリーニングを行った。異常な波形を認めた部位を両方向からシーケンスした。標準配列としてNM_XXXXXXXXを用いた。第1コドンは開始コドンATGとしATGのAを第1塩基として付番した。

結果: ヘテロ接合性の病的変異が2か所同定された。S318Pおよび p.L1061fsX4.

詳細: c.952部位のTからCへの置換によりS318P(第318アミノ酸残基がセリンからプロリンへ置換)。調べ得た限り、_____症候群の患者で同じ変異を持っているものはいない。しかしこの塩基置換には機能的に重要な部位における非保存的な置換であり、また当該セリン残基は全ての脊椎動物種で保存されている。過去にS318Pが正常多型として報告されたことはないが、50正常アレルを対象としたわれわれの検討ではPアレルは検出されなかった。上記の理由により、S318P変異は_____症候群の原因である可能性が高い。ただし、機能的な観点からの検討は行われていない。

p.L1061fsX4変異(注)(文献2)は1061番目のロイシンコドンに変異がおこりc.3183部位にあるT塩基が欠失しており、フレームシフト変異を起こしている。このフレームシフト変異により4コドン下流のところまで終止コドンが生じる。

解釈: S318Pとp.L1061fsX4は_____症候群の原因となっていると考えられる。XXX遺伝子に2箇所の変異を同定したことから、臨床診断が確認された。この結果は、保因者診断や出生前診断を計画するときの情報になりうる。この常染色体劣性遺伝性疾患の場合、患者の両親は保因者であると考えられるが、新生突然変異である可能性も否定は出来ない。上記の解釈は報告書作成時点での_____症候群に関する遺伝学的知見に基づくものである。

限界: 本検査では2つの変異は異なる2本の染色体のそれぞれに存在していると仮定している。しかしシーケンシングの結果からは上記の仮定が正しいかどうかを証明することはできない。両親の検査により、両親のそれぞれがヘテロの変異を持つかどうかを確認することによって、2つの変異は異なる2本の染色体のそれぞれに存在していることを示すことが出来る。

参考文献:

例4 翻訳領域の全エクソンのシーケンシングにより病的意義が不明な変異が同定された場合

検査名：XXX遺伝子のシーケンス解析

検査の理由：___症候群の疑い

方法：翻訳領域の6エクソンと隣接するイントロンをPCR法により増幅し、両方向からシーケンスした。標準配列としてNM_XXXXXXXを用いた。第1コドンは開始コドンATGとしATGのAを第1塩基として付番した。

結果：病的意義が不明な1塩基置換c.975C to T (S325S)が見いだされた。標準配列と比較したところ、上記以外の差違は認められなかった。

詳細：この患者ではc.975塩基にCからTへのヘテロの1塩基置換が同定された。この1塩基置換の結果、コドン325はAGTからAGCに置換される。しかし、両方のコドンともセリン(S)をコードしておりアミノ酸の置換は生じない。この1塩基置換は___症候群の患者で過去に同定されたことはないが、XXX遺伝子の病的意義を持たない多型として報告されたこともない。アミノ酸置換は生じず、また異常なスプライシング部位が導入される可能性も考えにくいのでこの1塩基置換に病的意義がない可能性もあるが、機能解析は行われておらずそのように結論づけることもできない。

解釈：本患者において遺伝子変異は同定されなかったが、病的意義について判断できない結果が得られた。古典的な___症候群の患者の85%以上にXXX遺伝子の病的変異が同定される。両親がc.975C to Tを有するかどうか、またその親が___症候群の軽微な症状を有するかどうかを検討することにより、c.975C to Tに病的な意義があるかどうか判断の手がかりが得られるかもしれない。

限界：本検査ではXXX遺伝子の翻訳領域とそのごく近傍の領域のみが解析された。プロモーター領域の異常・イントロンのやその他の非翻訳領域に異常があったとしても今回の検査では検出されることはない。DNAシーケンシングは検査を行った領域内の塩基置換、小さな欠失、小さな挿入を高い感度で検出することが出来るが、100%の感度ではない。XXX遺伝子以外の遺伝子に変異があったとしても検出されることはない。大きな欠失や挿入は今回の検査方法では検出されない場合が多い。少なくとも1箇所についてヘテロ接合であったことから遺伝子全体の欠失は否定される。

参考文献：

用語

変異 (Mutation): 遺伝子の正常な塩基配列からの変化であり、有害な臨床症状の原因となる。疾患の発症と関連する変化。

Variation: 遺伝子の標準的な塩基配列からのあらゆる変化。Variation は疾患の原因となる(変異)こともあれば、ならないこともある。

ポジティブコントロール (Positive control): 既知の塩基配列変化を持つ DNA サンプル

ネガティブコントロール (Negative control): 関心の対象である特定の塩基配列が正常であることがわかっている DNA サンプル

分析的感度 (Analytical sensitivity): 変異をもつことが分かっている生体サンプルをある分子遺伝学的検査の方法で分析したとき、正しく陽性と判定されるサンプルの割合。

分析的特異度 (Analytical specificity): 変異をもたないことが分かっている生体サンプルをある分子遺伝学的検査の方法で分析したとき、正しく陰性と判定されるサンプルの割合。

臨床的感度 (Clinical sensitivity): ある疾患の表現型をもつ集団のうち、ある分子遺伝学的検査の結果が陽性である人の割合。稀少遺伝性疾患の場合は、数値化して表現できないことが多い。

臨床的特異度 (Clinical specificity): ある疾患の表現型をもたない集団のうち、ある分子遺伝学的検査の結果が陰性である人の割合。稀少遺伝性疾患の場合は、数値化して表現できないことが多い。

臨床的有用性 (Clinical utility): 症状のある患者の確定診断・発症前診断・治療・家族計画・出生前診断などにおける分子遺伝学的検査の臨床的な価値。リスクとベネフィットの両方を含んだ概念である。

確認 (Confirmation): 個人から得たサンプルを再度解析すること。1) 同じ患者から新たにサンプルを採取し、DNA を抽出して解析をおこなう、2) 最初に提供されたサンプルから抽出された DNA に戻って再度解析する、3) 塩基配列の variation を同定した当初の方法とは異なる方法により解析する、などの方法がある。

References

1. 遺伝学的検査に関するガイドライン(遺伝医学関連 10 学会)
<http://www.congre.co.jp/gene/11guideline.pdf>
2. ACMG Laboratory Practice Committee Working Group. Recommendations for standards for interpretation of sequence variations. Genet Med 2000;2:302–303.
3. Antonarakis, SE. Recommendations for a nomenclature system for human gene mutation: Nomenclature Working Group. Hum Mutat 1998;11:1–3.
www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/rec.html.
4. Human Genome Mutation Database at the Institute of Medical Genetics in Cardiff, 2004 <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/hgmd0.html>.
5. Human Genome Variation Society. Variation databases, 2004
<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/dblist/dblist.html>.
6. Cartegni L, Chew SL, Krainer AR. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutation that affect splicing. Nat Rev Genet 2002;3:285–298.
7. den Dunnen JT, Antonarakis SE. mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutation: a discussion. Hum Mutat 2000; 15:7–12.
8. 非営利活動法人日本臨床検査標準協議会遺伝関連検査標準化専門委員会: 遺伝子関連検査検体品質管理マニュアル Tentative Guideline(2009 年 2 月)
http://www.jccls.org/techreport/tentative_guideline.pdf