



使用済み新生児マススクリーニング濾紙血を用いた ゲノム・エピゲノム解析の有効性の検討（その1）

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 日本DOHaD研究会 公開日: 2016-03-24 キーワード: 作成者: Tay, Zar Kyaw, 山口, 清次, 佐藤, 憲子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10271/2995



P-31

使用済み新生児マススクリーニング濾紙血を用いたゲノム・エピゲノム解析の有効性の検討(その1)

Tay Zar Kyaw¹、山口清次²、佐藤憲子¹

¹東京医科歯科大学難治研 環境エピゲノム/分子疫学 ²島根大学医学部小児科

ABSTRACT

現行の新生児マススクリーニングは小児の障害発生予防を第一義的な目的とした重要な事業であり、先天性代謝異常症の発症予防に大きな成功をおさめている。一方、より発症頻度が高い生活習慣病、血液免疫疾患や精神疾患についても、疾患発症リスクを早期に予測し先制的に対処できる方法を開発する重要性が近年認識され始めている。特に、胎児期～乳幼児期の種々の環境要因と遺伝的要因の組み合わせは将来の疾患発症リスクにも、特定のゲノム領域のDNAメチル化レベルにも影響を与えることが示唆されてきたため、新生児のゲノム・エピゲノム情報は、将来の疾患リスクを推定する上で重要な参考情報となる可能性がある。しかし、DNAメチル化状態と疾患易罹性についての因果関係はまだ明らかではなく、今後コホート研究によって疫学データを蓄積した上で解析する必要がある。この時に、新生児期の検体を用いたゲノム・エピゲノム解析方法を標準化しておくことが望ましい。新生児マススクリーニング濾紙は、使用済みであっても貴重な新生児の生体試料となる可能性が高い。本研究は、使用済み新生児マススクリーニング濾紙を用いてゲノム・エピゲノム解析を行う際の参照データを提供することを目的とする。今回(その1)として、使用済み濾紙100検体から得られたDNAの質・量の現状を報告する。

BACKGROUND

これまでに、いくつかの先行研究で、新生児マススクリーニング濾紙血からDNAを抽出した報告がある。その代表例を比較し、まとめたリストをTable 1に示す。これらのDNAは、ゲノム・エピゲノム解析に用いられているものだが、DNA抽出方法、DNA回収量、DNAの質は一定していない。

Table 1. List of studies using neonatal blood cards

Reference no.	Sample size	DNA extraction method	DNA quantification method	DNA yield(ng)/3mm Ø disc	DNA integrity (Appearance of DNA band in Electrophoresis)
1	4	QIAamp DNA mini kit	PicoGreen staining method	16.8-76.5	Slightly smeared
	4	EZNA forensic DNA reagent set		15.5-44.5	Almost intact
	4	Chelex 100		7.75-33.5	Not applicable
	4	Alkaline lysis		1-2	Unable to detect
2	24	GenSolve	PicoGreen staining method	65.7-196	Highly intact
3	95	QIAamp DNA micro kit	OD ₂₆₀ based method	158.2	Smeared
4	3	QIAamp DNA micro kit	OD ₂₆₀ based method	13.3-28.6	Unable to detect
	6	QIAamp DNA micro kit+ in house		124.9-227.6	All degraded
	42	GenSolve+ QIAamp DNA micro kit		26.9-262.2	
	3	GenSolve+ NucleoSpin		47.3-130.1	
	3	GenSolve+ NucleoSpin in house		40.9-141.6	
	6	GenSolve+ NucleoSpin XS		60.8-201.4	
	6	GenSolve+ NucleoSpin XS in house		83.5-266.3	
	6	NucleoSpin		141.2-236.3	
	3	NucleoSpin+ in house		122.8-194.9	
6	NucleoSpin XS	68.2-92.6			

References:
1. Sjöholm ML et al. *Clinical Chemistry* 2007, 53:1401.
2. Hardin J et al. *BMC Genetics* 2009, 10:38.
3. Rajatlika S et al. *BMC Genetics* 2013, 14:105.
4. Ghantous A et al. *BMC Biotechnology* 2014, 14:60.

OBJECTIVE

本研究は、実際の使用済み新生児マススクリーニング用濾紙血から、どの程度の質と量のDNAが抽出されるか、現状を調査することを目的とした。

METHOD

新生児濾紙

本研究は島根大学医学部と東京医科歯科大学の倫理審査を受け、承認された。(承認番号: 第1747号と第2014-4-2番)。各検体の濾紙血液スポットの一部は既にマススクリーニングに使われており、3年以上経過している。これらは全て連結不可能匿名化されている。

DNA抽出

一人の検体につき、可能な限りの数のパンチ(3mm直径)を採取した。各検体のDNAをQIAamp DNA Mini Kit (Qiagen)で、抽出した。

DNA量の測定

各検体のDNA濃度をQuant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit (Molecular Probes)で測定した。

電気泳動

各検体のDNAを1レーンあたり50ng電気泳動(0.7% Agarose gel)し、GelRedで染色した。マーカーはLambda/HindIIIを用いた。

RESULT

- 1検体あたり平均9個のパンチ(3mm直径)が採取された(Fig. 1)。
- 1検体あたり平均360ng(最高値1134.2ng、最低値25.2ng)のDNAが回収された(Fig. 2)。

Figure 1. Histogram of punch numbers

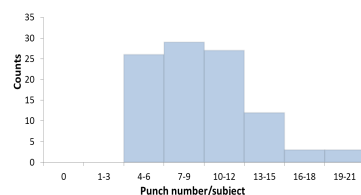
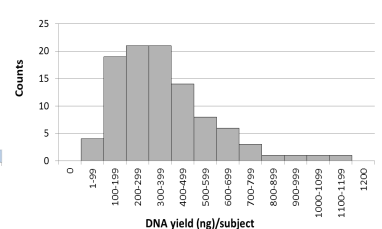


Figure 2. Histogram of DNA yield



3. パンチの数とDNA回収量に弱い相関性がみられた(Fig. 3)。
4. DNAは分解の少ない状態で抽出された(Fig. 4)。

Figure 3. Correlation between DNA yield and punch number

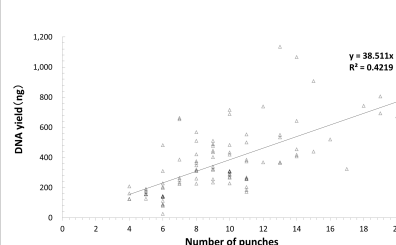
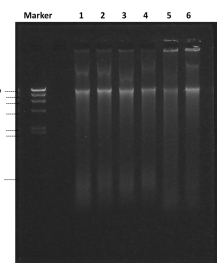


Figure 4. Agarose gel analysis of isolated gDNA



DISCUSSION

使用済み濾紙血からパンチ(3mm直径)1個当たり、平均約40ngのゲノムDNAが分解の少ない状態で抽出され、この結果は先行研究の同程度であると考えられた。今回100検体の濾紙血から、DNAを抽出した結果、多くの検体は質・量共に、ゲノム・エピゲノム解析に使用可能なDNAを供与出来る試料として扱えることが確認出来た。しかし、検体によって収量に違いがみられ、そのばらつきは大きいと思われた。従って、一般的なメチル化解析等、DNA量を比較的多く必要とされる分析には、十分なDNA量が回収出来ない場合もあると考えられる。

筆頭発表者: 演題発表に関連し、開示すべきCOI関係にある企業などはありません。