

200838056A

厚生労働科学研究費補助金

医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業

輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な診断法の

確立と輸血前診断への臨床応用

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 芳郎

平成21(2009)年4月

目 次

I. 総括研究報告

- 輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な
診断の確立と輸血前診断への臨床応用に関する研究 ----- 1
神田 芳郎

II. 分担研究報告

1. 輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な
診断法の確立と輸血前診断への臨床応用に関する研究 ----- 33
佐川 公矯

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 36

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 37

厚生労働科学研究費補助金

(医薬品・医療機器等レギュラトリーサイエンス総合研究事業)

総括研究報告書

「輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの

迅速簡便な診断法の確立と輸血前診断への臨床応用」に関する研究

研究代表者 神田 芳郎 久留米大学 医学部 教授

研究要旨: 輸血後アナフィラキシーショックの原因の一つである血漿蛋白欠損のうち、日本人を含めた東アジア人集団ではハプトグロビン欠損症が最も高頻度であることが知られている。そのため2005年度から各種血液製剤の添付資料の「慎重投与の項」に記載されるようになった。本研究計画は、ハプトグロビン欠損症のうち先天性無ハプトグロビン血症の原因遺伝子ハプトグロビン遺伝子欠失対立遺伝子 (Hp^{del}) の、臨床現場でも利用可能な迅速診断法を確立し、より安全な輸血医療の遂行を目的とする。目的達成のためには迅速化、経費の軽減化、遺伝子解析専門のスタッフを必要としない等のメリットのある簡便な解析法の開発が必要であるが、当該年度に予定通り血液を直接試料としたリアルタイムPCR装置とTaqManプローブを用いた診断法を確立し、さらにハプトグロビンの主要な遺伝子型の判定と Hp^{del} の診断を同時におこなうシステムを構築することができた。現在、もう一つの診断法としてSYBR Green Iを用いた方法の条件検討をおこなっている。

研究分担者 佐川 公矯 久留米大学 医学部 教授

研究協力者 副島 美貴子 久留米大学 医学部 助教

A. 研究目的

重篤な非溶血性輸血後副作用であるアナフィラキシーショックの原因

の究明と対策は急務である。アナフィラキシーショックの原因の一つとして血漿タンパク欠損が知られている。そのうち西洋人ではIgA欠損が主要な原

因であるが、日本人ではその頻度は低く、ハプトグロビン欠損症の方が高頻度であることから(嶋田ら、日本輸血細胞治療学会誌 52 巻 pp. 493—500, 2006)、2005 年から各種血液製剤添付資料「慎重投与の項」に記載されている。

ハプトグロビンは急性期反応物質として知られる血清糖蛋白であり、遊離型ヘモグロビンと結合し、ハプトグロビン-ヘモグロビン複合体を形成するため、その生理作用は溶血時に体内から鉄の喪失やヘモグロビンの酸化作用による腎臓障害を防ぐことであると考えられている。ハプトグロビンは 1955 年に Smithies により多型の存在が報告された最初の血清蛋白質でもある。その遺伝子は 16 番染色体長腕 22 に位置し、主な対立遺伝子(アリル)として優劣のない Hp^1 と Hp^2 が存在し、その組み合わせにより $Hp1-1$ 、 $Hp2-1$ 、 $Hp2-2$ という代表的な 3 つの表現型が決定される。 Hp^1 対立遺伝子は、5 つのエクソンから構成される。一方 Hp^2 対立遺伝子は、 Hp^1 対立遺伝子のエクソン 3、エクソン 4 の重複 (1.7-kb) によりエクソン 5、エクソン 6 が生じており、7 つのエクソンで構成されている。

法医学の領域ではハプトグロビン多型は親子鑑定をはじめとする個人識別に用いられていたが、以前からハプトグロビンのみで親子関係が否定される孤立否定例が散見されていた。我々は、このような家系やハプトグロ

ビン欠損症患者の解析からハプトグロビン遺伝子欠失対立遺伝子(以下 Hp^{del} と省略)を同定し(Koda et al., Am J Hum Genet, 62, 245-252, 1998)、その欠失領域をクローニングすることにより、この欠失がハプトグロビン遺伝子の上流約 5.2 kb から、ハプトグロビン遺伝子の下流に存在しハプトグロビン遺伝子と 90%以上の相同性を示す、ハプトグロビン関連遺伝子のイントロン 4 までに及ぶことを示した。さらに欠失点の同定を行うことによりデュプレックス PCR 法による遺伝子診断を可能にした(Koda et al., Blood, 95, 1138-1143, 2000, 図 1, 2 参照)。また Hp^{del} のホモ接合体がハプトグロビン欠損症となることを報告した。

(Koda et al., Am J Hum Genet, 62, 245-252, 1998)。

Hp^{del} によるハプトグロビン欠損症患者(先天性無ハプトグロビン血症患者)は普段は特に自覚症状はなく健康に過ごしているが、輸血やアルブミン輸液等により血清中に抗ハプトグロビン抗体を産生しアナフィラキシーショックを起こす危険性があることが報告されている(Shimada et al., Transfusion, 42:766-773, 2002)。前述のデュプレックス PCR 法による解析により、 Hp^{del} は日本人集団には約 1.5%程度の頻度で認められることが示された。したがって日本人における Hp^{del} によるハプトグロビン欠損症の頻度は 4000 人に 1 人と推定される(Koda et al., Blood, 95, 1138-1143, 2000)。このよ

うに Hp^{del} によるハプトグロビン欠損症はその頻度は低いものの、重篤なアナフィラキシーショックを起こす危険性がある。 Hp^{del} は現時点では、国内外で同定されている唯一のハプトグロビン欠損症の原因変異である。実際に日本赤十字社による検査では、これまでに調べられた抗ハプトグロビン抗体を有する欠損症患者はすべて Hp^{del} のホモ接合体であり Hp^{del} の輸血前診断によりハプトグロビン欠損症による輸血後副作用の回避が可能となり、輸血医学領域において非常に意義深いと考える。

しかしながら、以前我々が報告した PCR 法による遺伝子診断は、ゲノム DNA の抽出、PCR による遺伝子増幅、アガロースゲル電気泳動による増幅断片の分離を必要とするため、採血から診断まで 5 時間程度の時間を要し、また、手技が煩雑であるため、ある程度遺伝子解析の専門性を有する技術者が行う必要があることなどから、医療現場での診断法として一般的な臨床検査とするには更に改良の余地が必要であった。そこで、我々はより安全な輸血医療の遂行を目的とし、臨床現場でも利用可能な迅速診断法を確立することにより、日本人における血液製剤投与後のアナフィラキシーショックの主要な原因遺伝子である Hp^{del} の自動解析法の開発を目指している。この診断法が確立されれば、輸血前に臨床現場での Hp^{del} によるハプトグロビン欠損症の迅速診断が実現可能と

なり、さらに多くの医療現場に導入できれば対象となる患者を重篤な副作用から救うことができるものと考えられる。

B. 研究方法

TaqMan プローブを用いた Hp^{del} の接合性を判定するリアルタイム PCR 法の開発

TaqMan プローブ法は、標的とする DNA を増幅しながら、増幅した領域内に蛍光標識プローブを設定し、増幅断片とハイブリダイズしたプローブが分解されることで遊離する蛍光物質が発する蛍光を検出する方法である。TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法は以前我々が開発した conventional PCR 法 (Koda et al, Blood, 95(4): 1138-1143) と同様、 Hp^{del} の欠失点をはさんだ領域と、 Hp^{del} で欠失しているハプトグロビン遺伝子のエクソン 1 上流域の 2 つの領域の増幅の有無を 1 本のチューブで同時に調べる方法を用いた。1 μ L の鋳型 (0.1 ng - 10 ng ゲノム DNA、原液から 300 倍に希釈した血液)、200 μ mol/L の deoxynucleotide triphosphates, 10 μ L Premix ExTaqTM (Perfect Real time) (Takara, shiga, Japan)、 $Hp5'$ -F、 $Hp5'$ -R プライマー各 150 - 450 nmol/L、CAL Fluor 610 (CFR-610) 標識 $Hp5'$ -TaqMan プローブ 42 - 125 nmol/L、 $Hp del$ -F、 $Hp del$ -R プライマー各 300 - 900 nmol/L、FAM 標識 $Hp del$ -TaqMan プローブ 83 - 300 nmol/L を含む 20 μ L

の PCR 反応液を調整した。これらオリゴヌクレオチドはバイオサーチテクノロジー社に合成を依頼した。この反応液を 95°C30 秒の前処理後、95°C5 秒の熱処理 60°C30 秒のアニーリングと伸長の過程を 45 から 50 サイクル行い、蛍光シグナルは各サイクルのアニーリングと伸長反応の最後に Mx3000P (Agilent technology, Tokyo, Japan) の FAM filter (excitation/emission: 492/516 nm) と ROX filter

(excitation/emission: 585/610 nm) を用いて測定した。その後、MxPro™ Software (version 4.00. Agilent technology) を使って data の解析を行った。なお Mx3000P は当該補助金によるリース機器である。

ハプトグロビンの主要な遺伝子型 Hp^1 , Hp^2 の判定と Hp^{del} の検出を同時にこなうトリプレックス PCR 法の確立

血清学的方法および conventional PCR 法によりハプトグロビン表現型、遺伝子型が決定された 127 名の 0.1 ng - 10 ng ゲノム DNA を鋳型として、Premix ExTaq™ (Perfect Real time) (Takara, shiga, Japan) と Hp2-F, Hp2-R プライマー各 300 nmol/L, CAL Fluor Orange 560 (CFO-560) 標識 Hp2-TaqMan プロープ 83 nmol/L, Hp5'-F, Hp5'-R プライマー各 150 nmol/L, Hp5'-TaqMan プロープ 42 nmol/L, Hpdel-F, Hpdel-R プライマー各 300 nmol/L, Hpdel-TaqMan プロープ 83 nmol/L を含んだ 20 μ l の PCR 反応を調整した。これらのオリゴヌクレオ

チドはバイオサーチテクノロジー社に合成を依頼した。リアルタイム PCR は 95°C30 秒の前処理後、95°C5 秒の熱処理 60°C30 秒のアニーリングと伸長の過程を 40 サイクル行い、蛍光シグナルは各サイクルのアニーリングと伸長反応の最後に Mx3000P (Agilent technology) の FAM filter (excitation/emission: 492/516 nm), HEX filter (excitation/emission: 535/555 nm) と ROX filter (excitation/emission: 585/610 nm) を用いて測定した。その後、MxPro™ Software (version 4.00. Agilent technology) を使って data の解析を行ない、それぞれのサンプルの Ct 値 (蛍光シグナルが閾値に到達するまでに要する PCR のサイクル数) から ΔCt [(Hp5' の Ct 値) - (Hp2 の Ct 値)] を求めた。次に ΔCt 値から $\Delta \Delta Ct$ [(対照の ΔCt 値) - (サンプルの ΔCt 値)] を求め、Hp2 の Hp5' に対する相対コピー数を $2^{-\Delta \Delta Ct \text{ sample}}$ から算出しハプトグロビン遺伝子型の決定を行った。対照には遺伝子型が Hp^1/Hp^2 であることがすでに分かっているゲノム DNA (5 ng) を用いた。

本研究で用いたプライマー、プローブの位置を図 3 に、さらにそれらの配列とプローブにラベルされた蛍光、その配列を含む GeneBank accession number およびその中での位置を表 1 に示す。

SYBR Green I を指標としリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} 判定法の確立

初期費用が低く、幅広い機器で利用可能である DNA のインターカレーターである SYBR Green I を指標としリアルタイム PCR 法を用いた判定法を確立するために様々なプライマーの組み合わせで条件を検討した。10 種類程度のプライマーの組み合わせとそれぞれのプライマーの濃度を検討することにより最適なプライマーの組み合わせを検討した。また PCR の温度条件の検討には当該補助金により購入した Veriti 96 well サーマルサイクラー (Applied Biosystems, Tokyo, Japan) を用いた。

輸血前血液の Hp^{del} 接合性診断

TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法による遺伝子診断が可能になったことから、研究分担者の佐川公矯久留米大学教授をはじめとする臨床検査部輸血検査室のスタッフとともに、患者の輸血前遺伝子診断を平成 21 年 1 月より開始した。久留米大学病院臨床検査部輸血検査室で取り扱う患者血液が 45 サンプル集まった時点で、その血液約 300 μ L を用いて TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法で解析を行っている。平成 21 年 3 月 31 日現在で 675 名の輸血前患者血液の解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は輸血前患者血液を用いて行っている。輸血前のルーチン検査のために採血された血液の一部を用い

ていることから、本研究のための特別な採血は必要としない。またすべての患者に対して輸血副作用に関する検査を行う旨の包括的インフォームドコンセントを文章で得ている。さらに本研究計画の実施は久留米大学倫理委員会の承認を得たうえで行っている。

C. 研究結果

TaqMan プローブを用いた Hp^{del} の接合性を判定するリアルタイム PCR 法の開発

TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法により希釈した血液サンプルを鋳型とし、1 サンプルにつき 1 つのチューブで Hp^{del} の接合性を判定するシステムを構築した (Soejima and Koda, Clin Chem, 2008, 54(6):1095-1096.)。ゲノム DNA (5 ng) を鋳型として用いた場合、図 4 に示すように健常者 (Hp/Hp) では CFR-610 (Cal Flour Red 610) のみ、 Hp^{del} のヘテロ接合体 Hp/Hp^{del} では FAM シグナルと CFR-610 シグナル両方が、また Hp^{del} のホモ接合体 (Hp^{del}/Hp^{del}) では FAM シグナルのみが検出された。

さらにハプトグロビンの遺伝子型が既に判明しているインドネシア人の凍結血液及び日本人の採血直後の血液をそれぞれ蒸留水で原液から 300 倍に段階的に希釈した試料を鋳型とした場合、原液から 10 倍希釈の血液は蛍光シグナルの顕著な阻害が認め

られたが、40倍以上の希釈ではサンプルによっては検出されるシグナルが、ゲノムを鋳型としたときに比べやや弱い傾向にはあるものの、問題なく Hp^{del} 遺伝子型判定が可能であった。そこで我々は血液の希釈倍率として100倍を選択して以降の研究を進めていった。その結果インドネシア人47人の中に2名の Hp^{del} ヘテロ接合体を見出した(図5)。

またこの実験の遂行中に白色のPCR plateの使用により、蛍光強度が増強することが確認できたため、以後の実験では透明の96 well PCR plateの代わりに Sorenson ultraAmp PCR semi-skirted 96 white plates (Nippon Genetics, Tokyo, Japan)を用いた。白色のplateの使用により $Hp5'$ プライマーの使用量を450 nmol/Lから150 nmol/Lに、 $Hp5'$ プローブの使用量を125 nmol/Lから42 nmol/Lに、 $Hpdel$ プライマーの使用量を900 nmol/Lから300 nmol/Lに、 $Hp5'$ プローブの使用量を250 nmol/Lから83 nmol/Lに減量しても透明plateと同程度の蛍光シグナルを得ることができた。

ハプトグロビンの主要な遺伝子型 Hp^1 、 Hp^2 の判定と Hp^{del} の検出を同時におこなうトリプレックスPCR法の確立

ハプトグロビンの主要な遺伝子型である Hp^1/Hp^1 、 Hp^2/Hp^1 、 Hp^2/Hp^2 の判定と Hp^{del} の検出を同時におこなうトリプレックスPCR法をデザインした (Soejima and Koda, Clin Chem, 2008,

54(11):1908-1913.)。反応液には Hp^{del} 接合性の判定に用いた、 $Hp5'$ -F、 $Hp5'$ -Rプライマー、 $Hp5'$ -TaqManプローブ、 $Hpdel$ -F、 $Hpdel$ -Rプライマー、 $Hpdel$ -TaqManプローブに、 $Hp2$ 対立遺伝子に特異的な、 $Hp2$ -F、 $Hp2$ -Rプライマーと $Hp2$ -TaqManプローブを加えることでハプトグロビンの主要な遺伝子型判定を試みた。 $Hp2$ プライマーは Hp^2 対立遺伝子の1.7-kbの重複部位をはさむ領域で、また $Hp2$ プローブは重複部位をまたがる領域に設定した。

遺伝子型の判定に用いた方法は比較Ct法であり、以下に原理を簡単に説明する。図6に示すように比較Ct法は内在性コントロール(本実験では $Hp5'$ プローブを用いた)と標的配列(本実験では $Hp2$ プローブを用いた)のCtの差(ΔCt)を求め、その値とあらかじめ遺伝子型が判明している対照試料から得られたCt値の差($\Delta \Delta Ct$)を比較することにより標的配列の内在性コントロールに対する相対コピー数(本実験では $Hp2:Hp5'$)を算出する方法である。

今回用いたプローブの組み合わせでは、各遺伝子型に対して図7に示すような結果が得られることが予想される。実際に遺伝子型が判明しているゲノムDNAを用いたリアルタイムPCR増幅では Hp^1/Hp^1 では $Hp5'$ (CFR610シグナルのみ)、 Hp^2/Hp^1 、 Hp^2/Hp^2 では $Hp5'$ と $Hp2$ (CFR610とCFO560シグナル)、 Hp^1/Hp^{del} では $Hp5'$ と $Hpdel$ (CFR610とFAMシグナ

ル)、 Hp^2/Hp^{del} ではすべてのシグナル、 Hp^{del}/Hp^{del} では Hp^{del} (FAM シグナルのみ) と、予想通りの結果が得られた (図 8)。

次に今回用いたプライマー、プローブのセットで比較 Ct 法を用いてハプトグロビンの主要な遺伝子型判定が可能であるか否かを検証するために $Hp5'$ プライマー、プローブと $Hp2$ プライマー、プローブの増幅効率を求めた。この方法はあらかじめ遺伝子型が Hp^2/Hp^1 及び Hp^2/Hp^2 であることが判明しているゲノム DNA 100 ng から 4 倍希釈したものを 8 段階作製し (一番薄い濃度は約 6.1 pg になる) リアルタイム PCR の鋳型とした。これらのサンプルの Ct 値を求めたところ Ct 値は鋳型の量に応じてほぼ理論値通り増加した。(すなわちゲノム DNA を 4 倍希釈するごとに Ct 値が 2 ずつ増加した。) また $Hp2$, $Hp5'$ それぞれの増幅効率もほぼ 100% であり、比較 Ct 法に用いることが可能なプライマー、プローブのセットであることが示された (図 9)。さらに ΔCt 値 ($[Ct \text{ of } Hp5'] - [Ct \text{ of } Hp2]$) はこの濃度の範囲内で Hp^2/Hp^2 で -0.79 から -0.91 であり、 Hp^2/Hp^1 で -1.85 から -2.07 でありその差は理論値である 1 に近い値となった。

すでに血清学的方法、従来法の PCR 増幅によりその表現型、遺伝子型が判明している 7 名の日本人では、このプローブ、プライマーセットを用いたリアルタイム PCR 法による判定結果は従来法と完全に一致した。さらにガー

ナ人集団 123 サンプルのハプトグロビンの遺伝子型判定をしたところ、リアルタイム PCR 法では 35 名の Hp^1/Hp^1 では、 $Hp5'$ の Ct 値は 26.6 から 29.3 であったが、 $Hp2$ では Ct 値が得られなかった (すなわち $Hp2$ のシグナル増加が認められなかった)。また 57 名の Hp^2/Hp^1 では ΔCt は -1.99 ± 0.11 であり、31 名の Hp^2/Hp^2 は -1.00 ± 0.11 でそれぞれの値の範囲は、-1.64 から -2.52 と -0.62 から -1.29 であり重なりは認められなかった。またこの結果と対照試料との比較により $Hp2:Hp5'$ の相対比は 57 名の Hp^2/Hp^1 では、 0.44 ± 0.036 であり、31 名の Hp^2/Hp^2 では、 0.88 ± 0.071 と算出された。したがって今回開発したリアルタイム PCR 法を用いた ΔCt 法によって判定したハプトグロビン型と従来法 PCR 及びポリアクリルアミドゲル電気泳動法による表現型の判定結果は完全に一致することが示された。

SYBR Green I を指標としリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} 判定法の確立

初期費用が低く、幅広いリアルタイム PCR 用の機種で利用可能である SYBR Green I を指標としたリアルタイム PCR 法を用いた判定法について、1 サンプルにつき 1 チューブで希釈した血液サンプルを鋳型として使用可能になるように条件検討をおこなっている。SYBR Green I 法で接合性を判定するためには、欠失点を挟んだ領域と欠失領域 2 つの産物を同時に増幅し、その 2 つの産物の増幅の有無をそ

それぞれの DNA 断片の T_m (melting temperature) 値から判断することで、 Hp^{del} の接合性を 1 サンプルにつき 1 つのチューブで判定できる組み合わせのプライマーの組み合わせを見つけ出す必要がある。さらに T_m 値の違いを利用して Hp^{del} の接合性を判定するためには、異なる T_m 値の 2 つの遺伝子産物をヘテロ接合体において同じ増幅条件でほぼ同程度の量の遺伝子断片を増幅しなければならない。そのため現在までに 10 種類以上のプライマーの組み合わせを用いて、それぞれのアニール温度、プライマー濃度および濃度比、PCR サイクル数などの条件をそれぞれ変更して最適な条件を検討中である。

輸血前患者検体検査と検体血液の希釈法について

平成 21 年 3 月 31 日現在で 675 名の輸血前患者血液について 1 サンプルあたり 2 回以上の解析を行っている。現在までのところ duplicate assay で結果が食い違っていた症例は見つかっておらず、675 名の中に 23 名の Hp^{del} ヘテロ接合体が検出された。したがって現在までの結果から、福岡地区における Hp^{del} の遺伝子頻度は約 1.7% 程度であると推定される。

当該研究計画では遺伝子診断の迅速化、簡便化を目的として、当初蒸留水により 100 倍希釈した血液を直接リアルタイム PCR の鋳型 ($1 \mu\text{L}$ を $20 \mu\text{L}$ 反応液に加える) として用いて解析

していた。実際この方法で凍結した血液や、少数試みた採血直後の新鮮な血液でも良好な結果が得られていた。しかしながら実際多数の患者検体の解析を始めてみると、結果の再現性 (蛍光シグナル強度) にばらつきが認められた (図 10)。その後、血液の凍結再融解、熱処理、弱アルカリ処理等の方法を試したが結果の再現性は十分とは言い難かった。しかしながら現在 50 mM NaOH 溶液で血液を 100 倍に希釈後 95°C 、5 分処理したものを直接リアルタイム PCR の鋳型 ($1 \mu\text{L}$ を $20 \mu\text{L}$ 反応液に加える) として用いることにより再現性の顕著な向上が認められた。最近では血液等を直接検体とするための溶解試薬が多数販売されているので今後はこれら市販の溶解剤等についても検討してゆきたいと考えている。

D. 考察

我々は今年度中にリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} の接合性の診断法を確立する予定であったが、予定通りこの方法を確立することができた。この方法により従来法に比べて、ゲノム DNA 抽出と電気泳動にかかる時間が節約でき、さらにリアルタイム PCR で増幅する遺伝子断片は 100 bp 程度でありアニールおよび伸長反応の時間も短縮できたため、採血から診断まで約 1 時間程度と従来法に比べ診断に要する時間を $1/4$ 程度に短縮することができた。一方経費は、用いた Real time PCR Premix は 1 反応あたり原価

79円であり、プライマーとプローブ合成にかかる費用は60 nmol以上保証の合成スケールで2プライマーセットと2プローブを合成した場合で計約170000円であることから1反応あたり約14円以下(1反応にHp プローブ: 2.5 pmol, Hpdel プローブ: 5 pmolとして12000反応以上が可能であるため、さらに蛍光強度増強する白いPCRプレートの使用で、プライマーとプローブを1/3に節約できるため経費は1反応あたり5円以下になる)。その他の消耗品として、96 well plate (1000円で1検体あたり約10円)、チップ、水など1検体約20円として、総経費は1検体当たり123円程度と試算される。コスト的にも多検体の解析(むしろ多検体の解析でコストメリットが生じてくる)が十分可能な数字であると考えている。

また従来法に比べてリアルタイムPCR法のメリットはコスト面のみならず、増幅後のチューブの開閉を必要としない閉鎖系であり産物のキャリアオーバーによるコンタミネーションの危険が低下すること、ハイスループット解析に適すること、などがあげられる。また今回採用したSorenson ultraAmp PCR semi-skirted 96 white platesの使用により、プライマー、プローブともに1/3の減量が可能になりさらなる検査費用のコストダウンも可能になった。また本診断法は簡便な方法であるため遺伝子解析の専門家がない医療現場での利用も可能で

あると考えられる。

さらに当該年度の研究によってHp^{del}の接合性の診断のみならずハプトグロビンの主要な遺伝子型Hp¹, Hp²の判定とHp^{del}の検出を同時におこなうトリプレックスPCR法を確立した。ハプトグロビンの主要な遺伝子型の多型は多くの血清蛋白や血液型遺伝子に一般的に認められる1塩基多型や遺伝子欠失による多型ではなく、遺伝子内での約1.7-kbの遺伝子重複による多型であることや、さらにハプトグロビン遺伝子にはその約2-kb下流にハプトグロビン遺伝子と90%以上の相同性を持つハプトグロビン関連遺伝子が存在することから、この多型の遺伝子診断は、サザンプロットあるいは3.5-kb以上の断片を増幅するPCRが必要であった。しかしながら今回開発した比較Ct法を用いたリアルタイムPCR法を用いれば100塩基程度の増幅であるため短時間にハプトグロビンの主要な遺伝子型診断が可能になる。ハプトグロビンの主要な遺伝子型の多型は心疾患、高血圧、糖尿病などいわゆる生活習慣病の発症との関連が示唆されているため、今回の方法の開発で大量の試料を用いた関連解析が容易になるものと期待される。現在はこの方法はゲノムDNAを鋳型にする場合のみ遺伝子型判定が可能であるが、さらに今後はこの方法を発展させて希釈血液から直接の型判定法を検討してゆきたいと考えている。

本実験計画ではゲノムDNAの抽出

をスキップして遺伝子診断を行うことが一つの到達目標である。我々が行った少数の新鮮血や凍結保存した血液では蒸留水 100 希釈したものが PCR の鋳型として利用可能であった。しかしながら実際輸血前診断を開始し多数検体を処理すると、いくつかの試料で十分な蛍光シグナルを得ることができなかった。試料によってはシグナル強度が duplicate の解析でも一致しないことからこの蛍光シグナル検出の障害は単純に希釈した血液から溶出したヘモグロビンによるものであるとは考え難い。さらに蒸留水希釈した血液を凍結、再融解した試料や 95°C、5 分処理した試料、また 50 mM NaOH で 10 分以上処理した試料においても蛍光シグナルの障害は認められた。しかしながら 50 mM NaOH に 100 倍希釈した血液を 95°C、5 分処理した試料では蛍光シグナルの障害に大きな改善が認められた。現時点ではこの蛍光シグナルの障害の原因は判然としないが、今後この理由を解明してゆきたいと考えている。またプローブにラベルする蛍光物質を変更することでこの障害に影響が認められるのか否かについても今後検討してゆきたいと考えている。

さらに現在 SYBR Green I を指標としたリアルタイム PCR 法を用いて、 Hp^{del} の接合性を 1 サンプルにつき 1 つのチューブで判定できるプライマー set を検討中である。この方法は高価な蛍光色素でラベルしたプローブを

必要としないことから、TaqMan プローブ法以上に初期費用がかからない安価な遺伝子診断法になるものと期待される。プローブを用いず T_m 値の違いからその PCR 産物を推定する方法をとるため、TaqMan プローブ法と比較して診断精度は劣ると思われるものの、上記の理由から実際の臨床現場でのスクリーニング検査には、より有用な診断法になるものと思われる。次年度以降は、この解析方法も確立したいと考えている。さらに、従来のゲル電気泳動法よりも簡便でオートマチック制御が可能な DNA マイクロチップ電気泳動装置を用いた診断法についても検討をするために、20 年度末に島津製作所の MCE®-202 Multina を導入した。来年度からこの DNA マイクロチップ電気泳動装置を用いた解析法の確立も目指してゆく予定である。

このようにして構築した複数のシステムの比較(長所・短所)を通じて臨床現場に最も適した解析方法を決定してゆきたいと考えている。また本法は輸血前診断のみならず献血者のスクリーニング検査によりハプトグロビン欠損者のドナープールの作製にも有用な役割を果たせるものと考えている。

E. 結論

希釈血液を直接鋳型とする TaqMan プローブ法を用いた Hp^{del} の接合性を判定するシステムを構築し、現在この

方法を用いて輸血前患者の検体血液から直接遺伝子診断を実施中である。今後はこれらの結果を基に臨床現場で利用可能な迅速診断法を確立してゆく予定である。またこの方法を応用した研究として、ハプトグロビンの主要な遺伝子型 Hp^1 , Hp^2 の判定と Hp^{del} の検出を同時におこなうトリプレックス PCR 法を確立した。さらに現在 SYBR Green I を指標としたリアルタイム PCR 法を用いて、 Hp^{del} の接合性を 1 サンプルにつき 1 つのチューブで判定できるプライマーの組み合わせを検討中である。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Soejima M, Koda Y. Rapid real-time PCR detection of HP^{del} directly from diluted blood samples. Clin Chem. 2008 Jun;54(6): 1095-1096.

Soejima M, Koda Y. TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin (HP^1 and HP^2). Clin Chem. 2008 Nov;54(11): 1908-1913.

神田芳郎: 無ハプトグロビン血症の輸血前診断とその意義について. 久留米大学医学会雑誌. 2008 第 71 巻 第 3・4 号: 127-133.

2. 学会発表

神田芳郎. Hp 欠損症原因遺伝子の同定(教育講演). 第56回日本輸血・細胞治療学会総会, 日本輸血・細胞治療学会誌, 2008; 54: p137, 福岡.

副島美貴子, 上村繁雄, 神田芳郎. 輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な診断法の確立. 第92次日本法医学会総会. 日本法医学雑誌. 2008; 62: p64, 長崎.

副島美貴子, 神田芳郎. Real-time PCR によるハプトグロビン遺伝子型の判定. 日本DNA多型学会第17回学術集会抄録集, 2008, 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

別表参照

図 1 Hp^{del} の欠失領域

図 2 デュプレックス PCR 法による Hp^{del} 接合性の判定

図 3 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

図 4 TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による標的遺伝子産物の増幅曲線

図5 血液を直接鋳型としてリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} 遺伝子型判定

図6 比較 Ct 法を用いたコピー数の定量法

図7 さまざまなハプトグロビン遺伝子型で検出が予想される蛍光シグナル

図8 さまざまな遺伝子型で検出された蛍光シグナル

図9 $Hp5'$ 、 $Hp2$ プライマー、プローブセットの Ct 値から得られた calibration curve

図10 蒸留水と 50 mM NaOH で希釈した血液を鋳型とした各試料のリアルタイム PCR 増幅曲線

表1 リアルタイム PCR に用いた TaqMan プローブ、プライマーの配列とその位置

(参考資料)

1. 神田芳郎：無ハプトグロビン血症の輸血前診断とその意義について。久留米大学医学会雑誌。2008 第71巻 第3・4号：127-133。別刷
2. Soejima M, Koda Y. Rapid real-time PCR detection of HP^{del} directly from diluted blood samples. Clin Chem. 2008 Jun;54(6): 1095-1096。別刷
3. 神田芳郎。Hp 欠損症原因遺伝子の同定 (教育講演)。第56回日本輸血・細胞治療学会総会、日本輸血・細胞治療学会誌、2008; 54: p137, 福岡。要旨
4. 副島美貴子, 上村繁雄, 神田芳郎。輸血副作用の原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの迅速簡便な診断法の確立。第92次日本法医学会総会。日本法医学雑誌。2008; 62: p64, 長崎。要旨
5. 副島美貴子, 神田芳郎。Real-time PCRによるハプトグロビン遺伝子型の判定。日本DNA多型学会第17回学術集会抄録集, 2008, 東京。要旨

別表

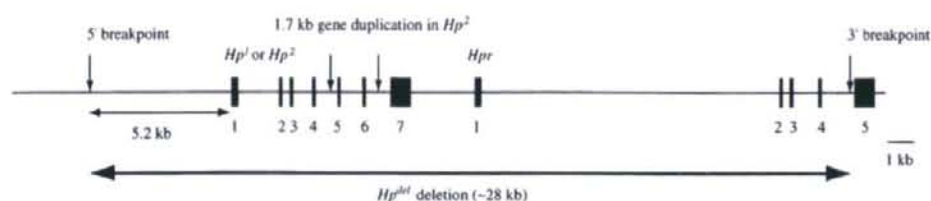


図1 Hp^{del} の欠失領域：遺伝子欠失はハプトグロビンの上流約 5.2-kb からハプトグロビン関連遺伝子のイントロン 4 にまでおよぶ

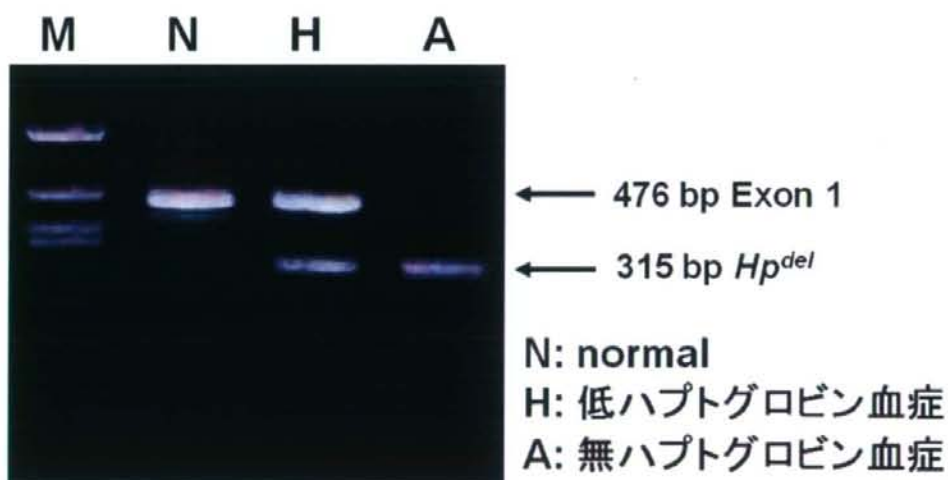


図2 デュプレックス PCR 法による Hp^{del} 接合性の判定：N は Hp のホモ接合体、H は欠失のヘテロ接合体、A は欠失のホモ接合体

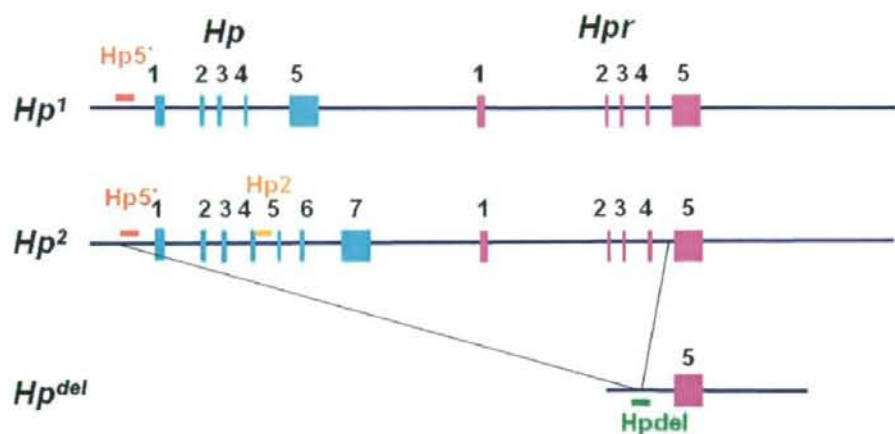


図3 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

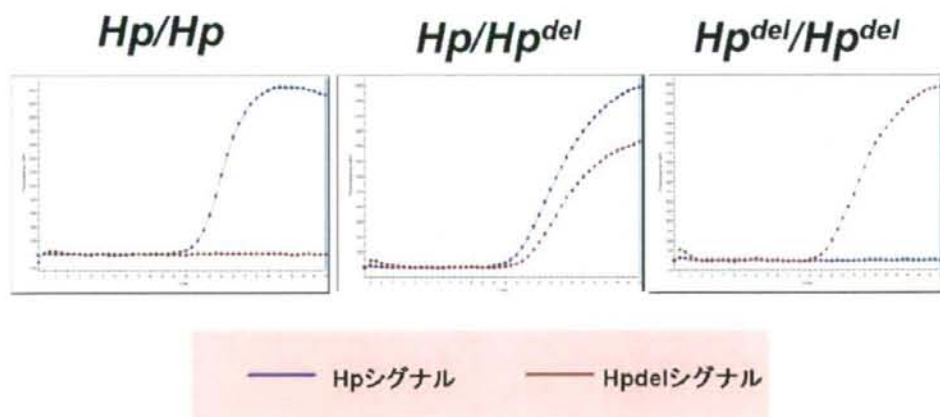


図4 TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による標的遺伝子産物の増幅曲線

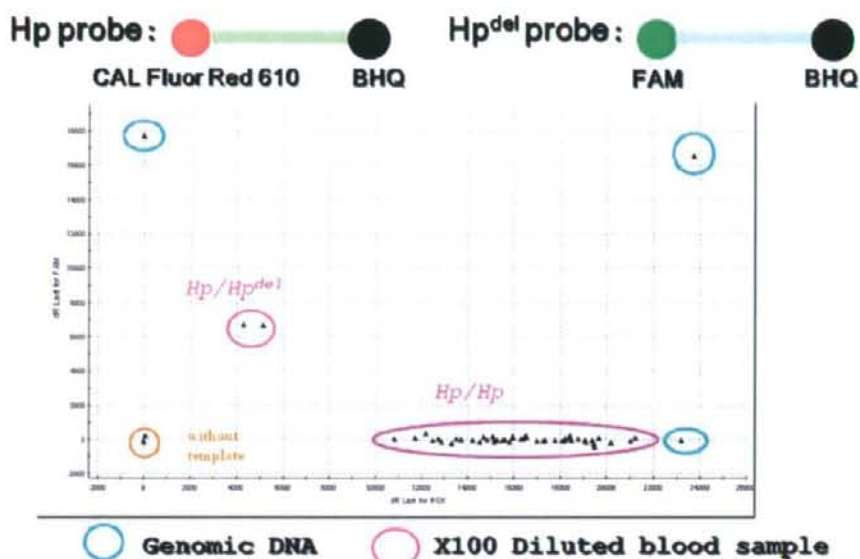


図5 血液を直接鋳型としてリアルタイムPCR法を用いたHp^{del}遺伝子型判定

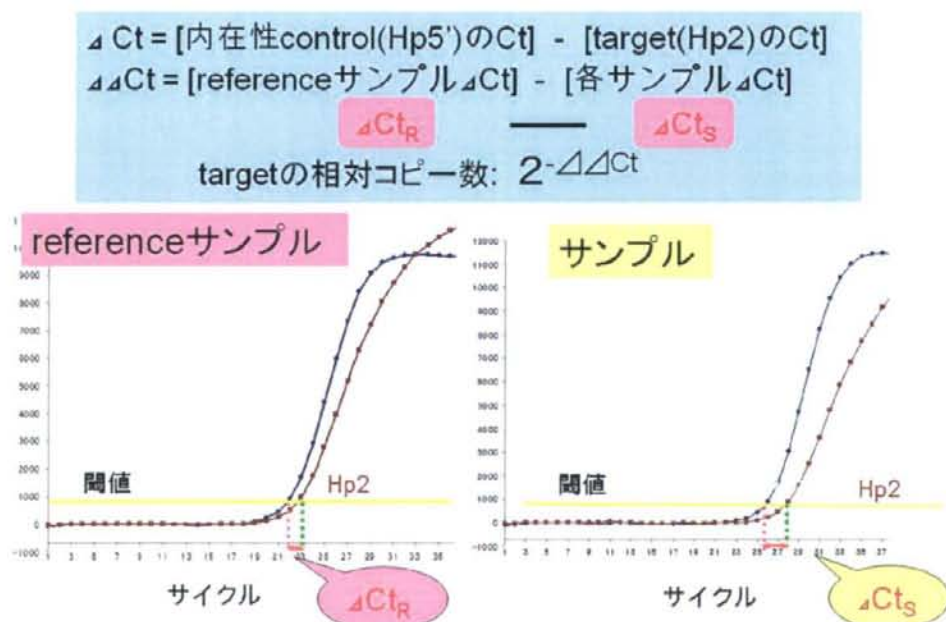


図6 比較Ct法を用いたコピー数の定量法

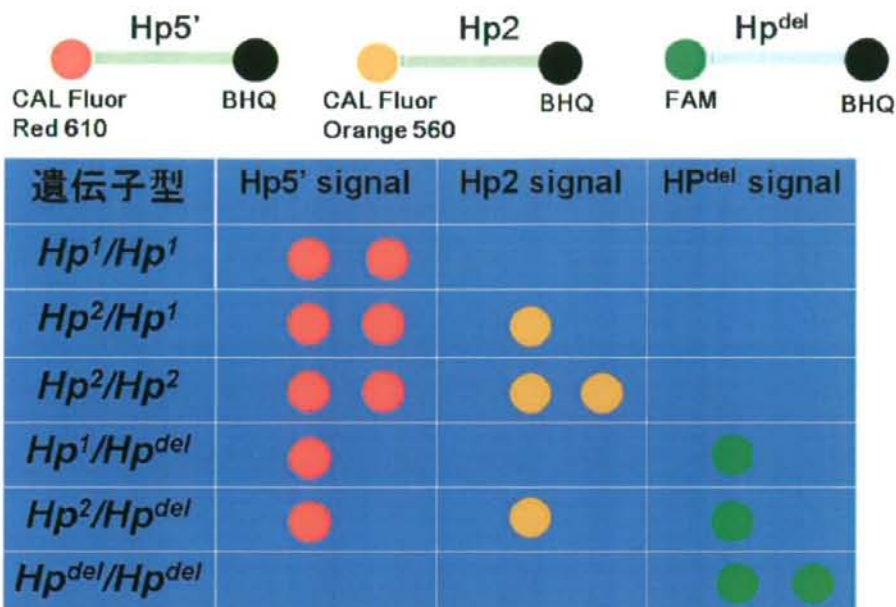


図7 さまざまなハプトグロビン遺伝子型で検出が予想される蛍光シグナル

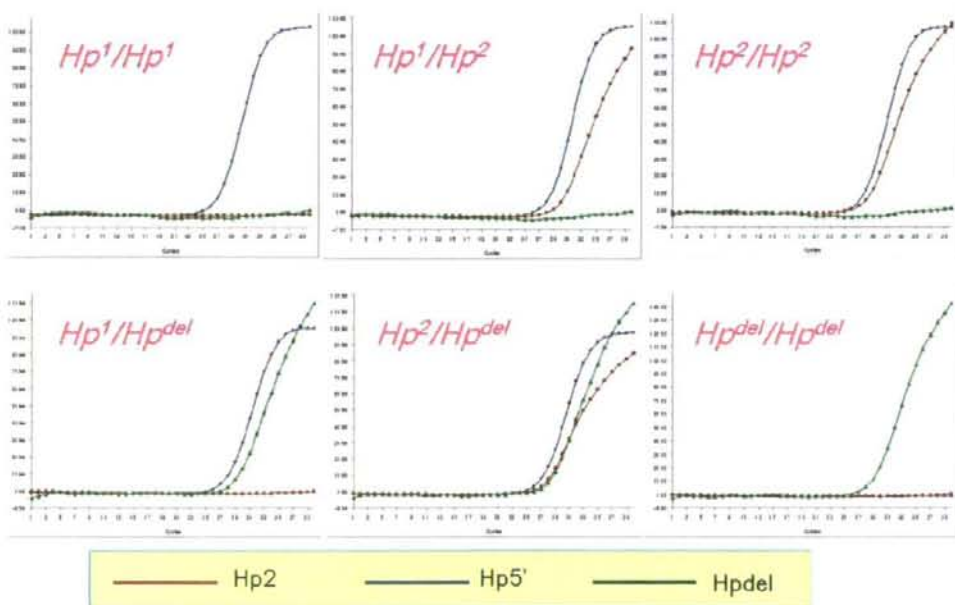


図8 さまざまな遺伝子型で検出された蛍光シグナル

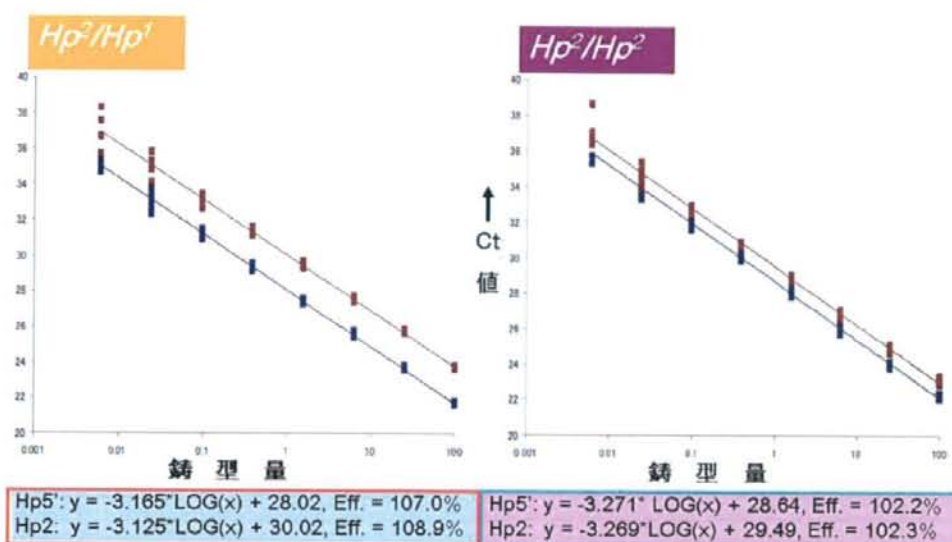


図9 Hp5'、Hp2プライマー、プローブセットのCt値から得られた calibration curve

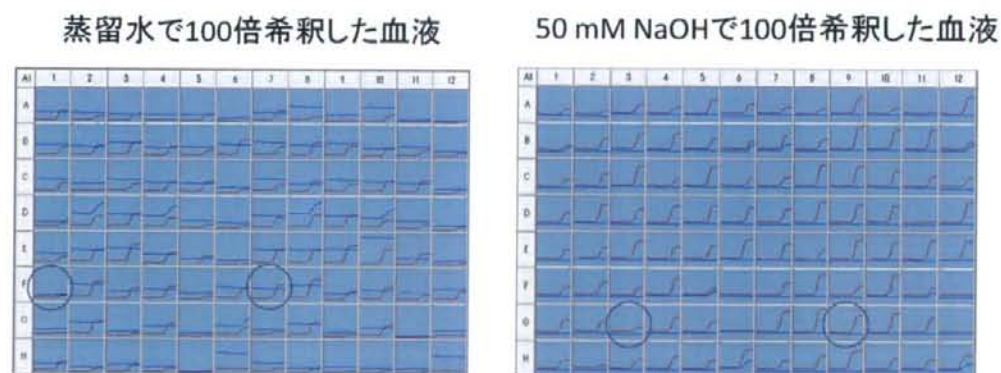


図10 蒸留水と50 mM NaOHで希釈した血液を鋳型とした各試料のリアルタイムPCR増幅曲線: 1と7、2と8、3と9、4と10、5と11、6と12の列のそれぞれの行が duplicate 測定になっている。対応するサンプルで蛍光シグナルの増強に差が認められる。特に蒸留水希釈では蛍光シグナルの増加がほとんど認められない試料も存在する。一方で50 mM NaOHで結果の改善が認められ、さらに95°C、5分処理で大きな改善が認められた。

表 1 リアルタイム PCR に用いた TaqMan プローブ、プライマーの配列とその位置

	Sequence	Position
Hp5'-F	5'-CACATTTACTGATTTTCAGGCTGGA-3'	sequence from 513-536 bp, GenBank no. M10935
Hp5'-R	5'-CCTTTTCACAGTAATTTTCTCCACCT-3'	reverse sequence from 571-596 bp, GenBank no. M10935
Hp5'-Taqman-probe	5'-CAL Fluor Red 610-AGCTTTTAAGCAATAGGGAGATGGCCACA-BHQ2-3'	sequence from 538-566bp, GenBank no. M10935
Hp2-F	5'-GGAGCTGCTCTGCACATCAA-3'	reverse sequence from 4547 to 4566 bp in GeneBank no. M10935)
Hp2-R	5'-CCCTTCAATGAATTTTCAGGGA-3'	sequence from 4448 to 4469 bp in GeneBank no. M10935
Hp2-Taqman-probe	5'-CAL Fluor Orange 560-ACCCCGAATAGAAGCTCGCGAACTGTA- BHQ1-3'	reverse sequence from 4511 to 4537 bp in GeneBank no. M10935
Hpdel-F	5'-TCTTTATGGCACTGGGGAACA-3'	sequence from 694-714 bp, GenBank no. AB025320
Hpdel-R	5'-AGCAAGACACTCGTGAGTGGAA-3'	reverse sequence from 822-801 bp, GenBank no. AB025320
Hpdel-Taqman-probe	5'-FAM-TGTGCAAGAGCCTTCCAATTTTGATCABHQ1-3'	reverse sequence from 772-799 bp, GenBank no. AB025320

Hp^{del} の欠失点は GenBank no. AB025320 の 782 -783 bp に位置している。