

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 卷 第 3・4 号: 127-133. 別刷

## 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

久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

神 田 芳 郎

### はじめに

輸血あるいは血液製剤の投与は比較的安全な医療行為であるが、副作用や合併症のリスクを伴う。したがって輸血副作用の原因解明とその予防は、輸血医療にとって重要な課題である。輸血副作用で最も重要なものはウイルス等の感染性副作用であり、それ以外には免疫学的なものがある。免疫学的な副作用はさらに溶血性・非溶血性に区分され現在非溶血性輸血副作用が最も高頻度である。非溶血性輸血副作用は、蕁麻疹や発熱などの軽症例が大部分をしめるが、重篤なアナフィラキシー反応、輸血関連急性肺障害 (TRALI) や血液製剤の細菌汚染による死亡例も報告されている。

アナフィラキシーショックの原因の1つとして血漿タンパク欠損が知られている。そのうち、ヨーロッパ人ではIgA欠損の頻度が高く、日本人ではハプトグロビン欠損症によるものが多い。本稿では、われわれが法医学の1分野である親子鑑定から見出したハプトグロビン欠損症の原因遺伝子とその分布、現在開発中であるアナフィラキシーショックの回避を目的とした輸血前診断法について紹介する。

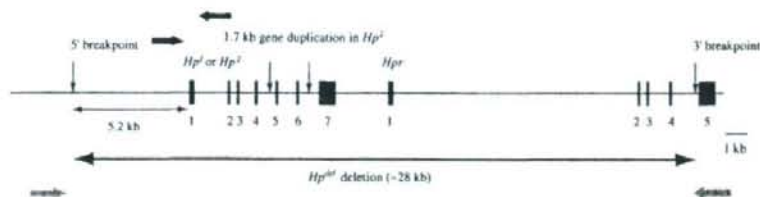
### ハプトグロビンとその多型について

ハプトグロビンは、多くの脊椎動物に認められる。主として肝臓で合成される血清糖蛋白質であり、溶血により血中に放出された遊離ヘモグロビンと高親和性に結合し複合体を形成する。その複

合体は細網内皮系細胞にCD163を介して速やかに取り込まれて分解処理される。この機構によりヘモグロビンの酸化性血管障害毒性を中和すると同時に、腎糸球体からのヘモグロビンの喪失を防止する作用を発揮すると考えられている。ハプトグロビンの半減期は3.5～5日であるが、ハプトグロビン・ヘモグロビン複合体の半減期は10～30分とさきわめて短時間であり、その代償的産生は迅速には行われないうえ、ヘモグロビンの血中への移行が持続すると血清ハプトグロビンは一般的な検出法による検出感度以下になると考えられている。また急性期反応蛋白であり、感染、炎症、組織崩壊、悪性腫瘍などでは肝臓以外の異所性産生(特に好酸球)による血清ハプトグロビンの著しい増加を認める。ハプトグロビンは1955年にOliver Smithiesらにより多型の存在が報告された最初の血清蛋白質であり、法医学の領域では親子鑑定などの個人識別に用いられてきた。ハプトグロビンには1型( $Hp^1$ )、2型( $Hp^2$ )の2つの主要な共優性対立遺伝子が存在し、その結果1型、2型、2-1型の3つの表現型に分類される。1型はさらにデンブングル電気泳動での移動度の違いから1F (Fast, 移動度の速いアリル)型と1S (Slow, 移動度の遅いアリル)型に細分される。これらは $Hp^1$ の1塩基多型による1アミノ酸置換に由来していることが知られている。ハプトグロビンは $\alpha$ 鎖と $\beta$ 鎖で構成され、1型は4量体、2型はそれ以上の多量体蛋白である。ハプトグロ

Y. Koda. Usefulness of diagnosis of haptoglobin-gene deletion for transfusion recipients.

A



B



図1 ハプトグロビン遺伝子の構造と  $Hp^{del}$

A: ハプトグロビン遺伝子 ( $Hp^1$ ) の構造とハプトグロビン遺伝子欠失の物理的地図と変異同定用プライマーの位置

B: ハプトグロビン遺伝子欠失遺伝子の DNA 配列 ( $Hp^{del}$ ) と 5' および 3' 欠失接合部周囲の DNA 配列のアラインメント

\*は 2 つの領域で同一の塩基配列を示している。  
(文献 8) より引用、改変)

β 遺伝子は 16 番目の染色体長腕上 (16q22.3) に局在し α 鎖と β 鎖は同一の遺伝子から 1 つのプレカーサーとして合成される (図 1)。 $Hp^1$  は 5 つのエクソンで構成されているが、 $Hp^2$  は  $Hp^1$  の第 3 および第 4 エクソンが遺伝子内で重複し第 5 および第 6 エクソンとなり 7 つのエクソンから構成される。 $Hp^1$  ではエクソン 1 から 4 が、 $Hp^2$  ではエクソン 1 から 6 が α 鎖をコードしており、最も長いエクソンである第 5 エクソン ( $Hp^2$  では第 7 エクソン) が β 鎖をコードする。この β 鎖にヘモグロビン結合部位が存在している<sup>2)</sup>。またハプトグロビン遺伝子の約 2.2 kb 下流には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 ( $Hpr$ ) が局在している<sup>3)</sup>。このハプトグロビン関連遺伝子はハプトグロビン遺伝子の祖先型である  $Hp^1$  が遺伝子重複によって生じたものと考えられている。また、1 型に比べて 2 型ハプトグロビンはヘモグロビン結合能が弱いことが知られている。

#### ハプトグロビン遺伝子欠失について

前述の主要な多型以外にもハプトグロビンにはさまざまな多型が存在し、その 1 つに  $Hp0$  が挙げられる。血清中にハプトグロビンが検出されない患者が特にアフリカを中心に広く認められ、長年先天性無ハプトグロビン血症 ( $Hp0$ ) の存在が示唆されていた。ところがアフリカはマラリア多発地域であるため、マラリアによる 2 次的なハプトグロビン低下例を無ハプトグロビン血症であると判断している可能性も否定できないことからその存在を疑問視する研究者も多かった。しかしながら、我々は実際の親子鑑定でハプトグロビン表現型のみで親子関係が否定 (孤立否定) される事例や、低ハプトグロビン血症患者が同一家系内に多発する事例を経験したことから、少なくとも一部の無ハプトグロビン血症は遺伝的要因で生じているものと考えた。そこで、秋田大学吉岡らのグループが日本人 9,711 人の血清ハプトグロビンのスクリーニングの結果見出した、血清ハプトグロビンが高感度 ELISA 法でも検出されない無ハプ

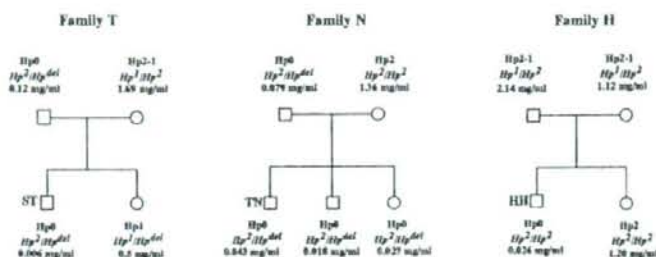


図2 低ハプトグロビン血症家系図  
 それぞれ家系内のハプトグロビン表現型、遺伝子型、血中ハプトグロビン濃度を示す。ST, TN, HHが最初に発見された低ハプトグロビン血症患者（発端者）である。Hp2/Hp<sup>del</sup>が低ハプトグロビン血症になる。（文献5）より引用

トグロビン血症の患者1名<sup>4)</sup>の末梢血の供与を受け、そのゲノムDNAを詳細に解析した。その結果、ハプトグロビン遺伝子完全欠失アリル (Hp<sup>del</sup>)を同定した<sup>5)</sup>。さまざまな制限酵素とハプトグロビン $\alpha$ 鎖 cDNA および  $\beta$ 鎖 cDNA のプローブを用いたサザンブロット解析およびプロモーター領域のPCR解析により、この患者に認められる遺伝子欠失 (Hp<sup>del</sup>) はハプトグロビン遺伝子のプロモーター領域の上流からハプトグロビン関連遺伝子のイントロン4に及ぶことが示された。さらに低ハプトグロビン血症3家系の遺伝子解析をしたところ、2家系にこの患者と同じ欠失 (Hp<sup>del</sup>) が認められ、発端者以外にも家系内に低ハプトグロビン血症患者が認められた。

一方 Hp<sup>del</sup> が認められなかった1家系では発端者以外には低ハプトグロビン血症患者は認められなかった (図2)。この症例では発端者のハプトグロビン遺伝子の全てのエクソンの配列を解析したものの変異を検出できなかった。これらの解析により Hp<sup>del</sup> のヘテロ接合体、特に Hp<sup>2</sup> と Hp<sup>del</sup> のヘテロ接合体が低ハプトグロビン血症に、また Hp<sup>del</sup> のホモ接合体が先天性無ハプトグロビン血症になることが示され、長年疑問視されていた Hp0 の存在に関する論争に終止符が打たれることとなった。また日本人における家族性低ハプトグロビン血症に Hp<sup>del</sup> が深く関わっていることも示された<sup>5)</sup>。

前述のごとくハプトグロビンはヘモグロビンの腎からの漏出やヘモグロビンによる酸化から生体を防御していると考えられているにも関わらずこの症例の無ハプトグロビン血症患者は特に自覚症状はなく健康に過ごしていることが報告されている<sup>6)</sup>。なお無ハプトグロビン血症は現在小児慢性特定疾患 (先天性代謝異常, ICD10分類 E88.0D) に加えられている。

#### 無ハプトグロビン血症とアナフィラキシーショックについて

頻回の輸血やアルブミン輸液により血清中に IgG 型のみならず IgE 型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患者が報告されてきた<sup>6)</sup>。我々はそのような症例に Hp<sup>del</sup> が関与しているか否かを調べるために、日本赤十字中央血液センターから以下の2例の患者の EB virus transformed Bリンパ球の供与を受け、ハプトグロビン遺伝子の解析をおこなった。

症例1. 33歳の女性。初産。羊水過多、胎児奇形。初回妊娠第31週で25%アルブミン製剤の投与直後にアナフィラキシーショックを発症した。翌日子宮切開、死胎児除去術後、濃厚赤血球輸血後再びアナフィラキシーショックを発症した<sup>7)</sup>。

症例2. 94歳の女性。骨髄異形成症候群。7か月間に3回の濃厚赤血球及び1回の濃厚血小板輸血を受けていたが無症状であった。最後の輸血から

1カ月後に2回目の濃厚血小板輸血を受けた時にアナフィラキシーショックを発症した。2症例とも副腎皮質ステロイド療法が奏効している。

遺伝子解析の結果、これら2症例とも  $Hp^{del}$  ホモ接合体であることが示された。しかしながら、 $Hp^{del}$  の欠失点の同定がなされていない当時は診断には煩雑なサザンブロット解析をおこなう必要があった。そこで我々は  $Hp^{del}$  の PCR 法を用いた簡便な遺伝子診断法確立を目的として、上記2症例のゲノム DNA を用いて、 $Hp^{del}$  の遺伝子欠失領域のクローニングを試みた。その方法として、ゲノム DNA を切断部が平滑末端になる制限酵素、*AluI*, *DraI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *SspI* で切断し、その末端に特定の配列を持つカセットオリゴヌクレオチドを結合させそれぞれの制限酵素のライブラリーを作製した後、既存の配列 ( $Hp^{del}$  に存在しているハプトグロビン関連遺伝子エクソン5の配列) とカセットオリゴヌクレオチドの配列による PCR 増幅を行う。Cassette-mediated PCR 法を用いた、*DraI* ライブラリーから最長の約2.5 kb の PCR 産物が得られたため、この産物の塩基配列を決定したところ  $Hp^{del}$  欠失領域は、ハプトグロビン ( $Hp$ ) の転写開始点の上流約5.2 kb からハプトグロビン関連遺伝子のエクソン5から52ないしは53 bp 上流に相当するイントロン4までの、約28 kb の領域に及ぶことが示された (図1)<sup>8)</sup>。2か所の切断点周囲の塩基配列の

alignment を行ったところ、この部分の配列に相同性はなく、切断点で TG の2塩基が一致しているのみであった。このことから、この欠失は非同源性遺伝子組み換えにより生じたものと推定された。欠失点のクローニングにより、欠失点をさまざまな領域でのプライマーを用いることで、315塩基の  $Hp^{del}$  由来の PCR 産物の増幅が可能になった。さらに  $Hp^{del}$  で完全に欠失している  $Hp$  エクソン1の隣接領域 (476bp) を同時に1本のチューブで増幅するデュプレックス PCR 法の開発により、 $Hp^{del}$  の存在の有無のみならずその接合性を1回の PCR 増幅により診断することが可能となった (図3)<sup>9)</sup>。

#### ハプトグロビン遺伝子欠失の遺伝子頻度

上記遺伝子診断法を用いて様々な集団における遺伝子頻度を調べたところ、現在までのところ、 $Hp^{del}$  は東アジア人 (日本人、韓国人、中国人、モンゴル人) 及び東南アジア人 (タイ人、インドネシア人) 集団に1~3%の頻度で認められるが、アフリカ人、西洋人、西アジア人、南アジア人の各集団には存在しないものと思われる (表1)<sup>10) 11)</sup>。特に約40年前に初めて無ハプトグロビン血症が報告され、その頻度が世界で最も高いと考えられているアフリカ人集団では、現在までに南アフリカのコーサ族 (101名)、ガーナ人 (123名) およびガンビア人 (598名) の解析が行なわれているが  $Hp^{del}$  は1例も検出されていない。また我々が行ったガーナ人の血清ハプトグロビンの定量で9名の無ハプトグロビン血症患者と8名の低ハプトグロビン血症患者が認められたものの、共通の遺伝子異常が見出せなかった事から、これらの地域における無ハプトグロビン血症の原因は遺伝的要因のみではないと考えられる<sup>12)</sup>。

日本人集団の  $Hp^{del}$  の頻度は約1.5%程度と推定されることから、そのホモ接合体である無ハプトグロビン血症の頻度は約4,000人に1人と予想される<sup>9)</sup>。この数字は西洋で最も頻度が高い血漿蛋白質欠損である IgA 欠損症に匹敵する。実際、過去10年間に報告された、原因が特定できた血漿蛋白質欠損の中で、無ハプトグロビン血症は20例と、IgA 欠損症や C9 欠損症よりも発生頻度は

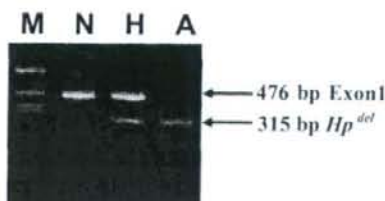


図3 デュプレックス PCR による  $Hp^{del}$  の検出 ( $Hp^{del}$  と  $Hp$  の exon 1)  
Hp-exon1-U, Hp-exon1-L, Hp-del-U, Hp-del-L primer を用いたデュプレックス PCR。  
N: 健常人ゲノム DNA H: 低ハプトグロビン血症患者ゲノム DNA A: 無ハプトグロビン血症患者ゲノム DNA を増幅 (文献8) より引用)

表1 ささまざまな集団における  $Hp^{del}$  の頻度

集 団	染色体数	$Hp^{del}$	$Hp^{del}$ 頻度 (%)	95% 信頼区間 (%)	文 献
東アジア					
Mongolians	238	2	0.8	0.0-2.0	(10)
Japanese	1046	16	1.5	0.8-2.3	(8)
Han Chinese	568	17	3.0	1.6-4.4	(8)
Koreans	314	8	2.5	0.8-4.3	(8)
Koreans	1018	31	3.0	2.0-4.1	(9)
中央アジア					
Tibetans	364	0	0	0.0-0.8	(10)
Tamangs	106	0	0	0.0-2.8	(10)
Uygurs	112	0	0	0.0-2.6	(10)
東南アジア					
Indonesians	210	2	1.0	0.0-2.3	(10)
Thais	400	6	1.5	0.3-2.7	(11)
南アジア					
Bangladeshi	102	0	0	0.0-2.9	(10)
Tamils	104	0	0	0.0-2.8	(10)
Sinhalese	102	0	0	0.0-2.9	(10)
西アジア					
Turks	214	0	0	0.0-1.4	(10)
ヨーロッパ					
Europeans	200	0	0	0.0-1.5	(8)
アフリカ					
Xhosas	202	0	0	0.0-1.5	(8)
Ghanaians	246	0	0	0.0-1.2	(13)
Gambians	1196	0	0	0.0-0.3	(12)

高く、日本人では最も高頻度である。また日本赤十字社による検査では、これまでに調べられた無ハプトグロビン血症患者はすべて  $Hp^{del}$  のホモ接合体であり<sup>10)</sup>、さらにアルブミン投与後に心停止をきたした症例も報告されていることから生命の危険を伴う重篤な副作用である<sup>15)</sup>。無ハプトグロビン血症受血者に、生理食塩水による洗浄赤血球あるいは洗浄血小板の輸血をおこなえば抗ハプトグロビン抗体の産生が回避されアナフィラキシーショックを免れることが報告されているので、受血者の無ハプトグロビン血症の診断は重要な検査であると思われる<sup>16)</sup>。一方2005年度から新たにアルブミンやハプトグロビンなど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。献血者の遺伝子検査の導入により無ハプ

トグロビン血症患者用のアルブミン等の血液製剤プールの作製も可能となり安全な血液製剤供給に重要な役割を果たすことが期待できる。

#### Real Time PCR法を用いた $Hp^{del}$ 診断法の開発

無ハプトグロビン血症患者の検出法としては遺伝子診断のほか血漿ハプトグロビン測定が考えられる。具体的には、ヘモグロビンとの複合体の形成によるペルオキシダーゼ活性の変化を検出する方法、電気泳動法、単純放射免疫拡散法、ピークネフェロメトリー法などが挙げられる。中でもピークネフェロメトリー法は、操作が簡便で安定した結果が得られることから、急性期タンパク質や疾患のマーカーの測定法として現在臨床の現場で広く用いられている。しかしながらこれらの方法

は検出限界が数 mg/dL 程度であるため低ハプトグロビン血症と無ハプトグロビン血症の鑑別が困難である。したがって、溶血性貧血などでハプトグロビン代謝が促進された患者や肝疾患のようにその産生が減少した患者では血中ハプトグロビン濃度が容易に検出限界以下となるため、これらの方法を用いて血中にハプトグロビンが検出されなかった低ハプトグロビン血症患者が、しばしば無ハプトグロビン血症 (Hp0) として報告されていたものと考えられる。これらの欠点を補う高感度検出法として ELISA 法が挙げられる。この方法の検出限界は数  $\mu\text{g}/\text{dL}$  程度であるため、低ハプトグロビン血症と無ハプトグロビン血症の鑑別が可能となる。日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所の嶋田らが開発した ELISA 法は検査時間も 40 分と迅速で、大量の検体を扱うことも可能なため有用な検査法であるが ELISA プレートの準備に 1 晩必要である<sup>14)</sup>。したがって迅速かつ大量スクリーニング可能な診断法は ELISA 法に代る有用な検査法となることが期待される。しかしながら従来の PCR による診断法はゲノム DNA の抽出から PCR 終了まで 3~4 時間程度の時間が必要である。

そこで、我々は医療現場に導入することを目的とし、DNA 抽出の手間を省き、さらに簡便、迅速で増幅産物のキャリーオーバーを回避することが可能な自動解析法の開発を目指し、水で 100 倍に希釈した血液 1  $\mu\text{L}$  を用いて 20  $\mu\text{L}$  の反応系で行う TaqMan real time PCR 法を開発した<sup>15)</sup>。この方法を用いると採血から約 1 時間 30 分以内で無ハプトグロビン血症の遺伝子診断が可能であり、また 1 検体当たりの検査費用も 150 円程度と試算される。この金額はゲノム DNA の抽出にかかる費用と同程度であることからゲノム DNA を用いる従来の検査法や ELISA 法と比較してもさらに迅速、安価でかつ high throughput な検査法である。今後は実際の医療現場で本検査法の有用性を検証してゆきたいと考えている。

#### おわりに

*Hp<sup>del</sup>* アリルは法医学における親子鑑定のみならず例の解析から見出され、現在同定されている唯一

の先天性無ハプトグロビン血症 (Hp0) の原因変異である。また一部の研究者から疑問視されていた本疾患の存在を決定付ける役割を果たしたといえる。Real time PCR による診断法が確立し、今後輸血医学の現場で利用されれば、輸血あるいは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<sup>del</sup>* が輸血前に病院で診断できること、さらに遺伝子頻度の調査が行われていないアジア諸国での *Hp<sup>del</sup>* 遺伝子頻度検査の検査としても利用できることから、予防医学的に重要な役割を果たすことが期待される。

#### 文 献

- 1) Smithies O, Walker NF: Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature*, 176: 1265-1266, 1955
- 2) Maeda N, Yang F, Barnett DR, Bowman BH, Smithies O: Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature*, 309: 131-135, 1984
- 3) Maeda N: Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. The haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. *J Biol Chem*, 260: 6698-6709, 1985
- 4) 吉岡尚文, 横井 毅, 那谷雅之, 日黒ひとみ, 森田 香, 匂坂 馨: 血清ハプトグロビン欠損の遺伝学的検討. *生物物理化学*, 35: 297-301, 1991
- 5) Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H: The haptoglobin-gene deletion responsible for anaphylobinemia. *Am J Hum Genet*, 62: 245-252, 1998
- 6) Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y et al: Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 42: 766-773, 2002
- 7) Morishita K, Shimada E, Watanabe Y, Kimura H: Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-haptoglobin in a patient with ahaptoglobinemia.

- Transfusion 40 : 120 - 121, 2000
- 8) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M et al : Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoalbuminemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. Blood, 95 : 1138 - 1143, 2000
  - 9) Park KU, Song J, Kim JQ : Haptoglobin genotypic distribution (including Hp0 allele) and associated serum haptoglobin concentrations in Koreans. J Clin Pathol, 57 : 1094 - 1095, 2004
  - 10) Soejima M, Koda Y, Fujihara J, Takeshita H : The distribution of haptoglobin-gene deletion (*Hp<sup>del</sup>*) is restricted to East Asians. Transfusion, 47 : 1948 - 1950, 2007
  - 11) Shimada E, Odagiri M, Chaiwong K et al : Detection of *Hp<sup>del</sup>* among Thais, a deleted allele of the haptoglobin gene that causes congenital haptoglobin deficiency. Transfusion, 47 : 2315 - 2321, 2007
  - 12) Cox SE, Doherty C, Atkinson SH, Nweneke CV, Fulford AJ, Ghattas H, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Prentice AM : Haplotype association between haptoglobin (Hp2) and Hp promoter SNP (A-61C) may explain previous controversy of haptoglobin and malaria protection. PLoS ONE, 2 : e362, 2007
  - 13) Teye K, Quaye IK, Koda Y, Soejima M, Tsuneoka M, Pang H, Ekem I, Amoah AG, Adjei A, Kimura H : A-61C and C-101G Hp gene promoter polymorphisms are, respectively, associated with ahaptoalbuminaemia and hypohaptoalbuminaemia in Ghana. Clin Genet, 64 : 439 - 443, 2003
  - 14) 嶋田英子, 伊佐和美, 前田伊規子, 鎌田裕美, 橋本志歩, 渡辺嘉久, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫 : ハプトグロビン欠損者検出のための簡便なELISA法の開発. Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, 52 : 493 - 500, 2006
  - 15) Shimode N, Yasuoka H, Kinoshita M et al : Severe anaphylaxis after albumin infusion in a patient with ahaptoalbuminemia. Anesthesiology, 105 : 425 - 426, 2006
  - 16) Nishiki S, Hino M, Kumura T et al : Effectiveness of washed platelet concentrate and red cell transfusions for a patient with anhaptoalbuminemia with antihaptoglobin antibody. Transfus Med, 12 : 71 - 73, 2002
  - 17) Soejima M, Koda Y : Rapid real-time PCR detection of *Hp<sup>del</sup>* directly from diluted blood samples. Clin Chem (in Press)



参考資料2

Mikiko Soejima, Yoshiro Koda. Rapid real-time PCR detection of *HP<sup>del</sup>* directly from diluted blood samples. *Clinical Chemistry*. 2008 Jun;54(6): 1095-1096. 別刷

tion of plasma volume changes during marathon running. *Br J Sports Med* 1995;19:188-91.

5. Mourzopoulos G, Stamatakis M, Toubakis M, Sembel A, Mani C, Sabelkoas M, Skandalakis P. Changes of bone turnover markers after marathon running over 245 km. *Int J Sports Med* 2007;28:576-9.

Giuseppe Lippi<sup>1\*</sup>  
 Federico Schena<sup>2</sup>  
 Martina Montagnana<sup>1</sup>  
 Gian Luca Salvagno<sup>1</sup>  
 Giuseppe Banfi<sup>1</sup>  
 Gian Cesare Guidi<sup>1</sup>

<sup>1</sup> *Sezione di Chimica Clinica  
 Dipartimento di Scienze  
 Morfologico Biomediche  
 Università di Verona, Italy*

<sup>2</sup> *Sezione di Scienze Motorie  
 Dipartimento di Scienze  
 Neurologiche e della Visione  
 Università di Verona, Italy*

<sup>3</sup> *Istituto Galeazzi e Università di Milano  
 Italy*

\* Address correspondence to this author at:  
 Sezione di Chimica Clinica  
 Dipartimento di Scienze  
 Morfologico Biomediche  
 Università degli Studi di Verona  
 Ospedale Policlinico G.B. Rossi  
 Piazzale Scuro, 10  
 37134, Verona, Italy  
 Fax 0039 045 8201866  
 e-mail: glippi@univr.it

DOI: 10.1373/clinchem.2007.102657

#### Rapid Real-Time PCR Detection of *HP<sup>del</sup>* Directly from Diluted Blood Samples

To the Editor:

Anthapoglobulinemic patients have been reported to experience severe anaphylactic reactions to transfusions due to the production of antihapoglobin (anti HP) antibodies (1, 2). Anthapoglobulinemia in patients homozygous for *HP<sup>del</sup>*, which is a deletion of an approximately 28 kb segment of chro-

mosome 16 extending from the promoter region of the *HP* (hapto-globin) gene to exon 5 of *HPR* (hapto-globin related protein), has been adequately characterized only recently (1). Use of a simple duplex PCR method has detected the *HP<sup>del</sup>* allele in East and South-east Asian populations at frequencies of 196–396 but this allele has not been detected in African, West and South Asian, and European populations (1, 3, 4). Thus, diagnosing *HP<sup>del</sup>* homozygosity prior to blood transfusion or the infusion of blood components into individuals from East and Southeast Asian populations is effective for preventing anaphylactoid shock due to anti-HP antibodies. We have developed a simple method that uses a 5' nuclease real-time PCR assay (TaqMan; Applied Biosystems) to detect the *HP<sup>del</sup>* allele without having to isolate genomic DNA. The ethics committee of Kurume University School of Medicine approved this study protocol.

To distinguish alleles, we performed real-time PCR assays that detect the 2 regions that encompass the *HP<sup>del</sup>* breakpoint and the 5' region of *HP* exon 1, which is deleted in *HP<sup>del</sup>*. The 20- $\mu$ L PCR reaction contained 200  $\mu$ mol/L deoxynucleoside triphosphates, 1  $\mu$ L of template (diluted blood or genomic DNA), 0.5 U of *Ex TaqHS* with its buffer (Takara), and the following primers and TaqMan probes (see Fig. 1 legend for sequences): Hp5'-F and -R primers (450 nmol/L); Hp5'-TaqMan probe (125 nmol/L) for detecting the 5' region of *HP*; Hpdel-F and -R primers (900 nmol/L); and Hpdel-TaqMan probe (250 nmol/L) for detecting *HP<sup>del</sup>*. The PCR temperature profile was 95 °C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturing at 95 °C for 5 s and annealing and extension at 60 °C for 30 s. All oligonucleotides were synthesized by Bioscience Technologies. We mon-

itored amplification progress by monitoring the fluorescence at the end of each cycle with an Mx3000P instrument (Stratagene) with excitation and emission wavelengths of 492 and 516 nm (FAM), and 585 and 610 nm (CAL Fluor Red 610).

With genomic DNA (5 ng/ $\mu$ L) as a template, we used dual color scatter plots to distinguish individuals previously determined to have the *HP/HP*, *HP/HP<sup>del</sup>*, and *HP<sup>del</sup>/HP<sup>del</sup>* genotypes. Samples with the *HP/HP* genotype had little FAM fluorescence and plotted along the x-axis, *HP<sup>del</sup>/HP<sup>del</sup>* samples had little CAL Fluor Red 610 fluorescence and plotted along the y-axis, and *HP/HP<sup>del</sup>* samples were located between the homozygote samples in the plot (Fig. 1). To the TaqMan real-time PCR mixture, we directly added 1  $\mu$ L of samples diluted 100-fold with PCR-grade water (previously frozen samples of buffy coat from 47 Indonesians from Surabaya or a freshly drawn blood sample from 1 Japanese individual from Fukuoka). Blood was collected in EDTA-containing tubes (Indonesian and Japanese samples) and in a heparin-containing tube (the Japanese sample). The results from 2 independent experiments showed no discrepancies. In addition, the results obtained with the present TaqMan real-time PCR method were fully concordant with those obtained with a previously described PCR method for the same individuals (i.e., 46 *HP/HP* individuals and 2 Indonesians with *HP/HP<sup>del</sup>*; Fig. 1) (1). We previously had collected blood samples from 105 Indonesian individuals from Surabaya and had not found the *HP<sup>del</sup>* allele in 58 of these individuals (3); however, in the present study we did find 2 *HP<sup>del</sup>* alleles among the remaining 47 individuals in this population sample. Thus, the *HP<sup>del</sup>* allele is also present in Southeast Asian popula-

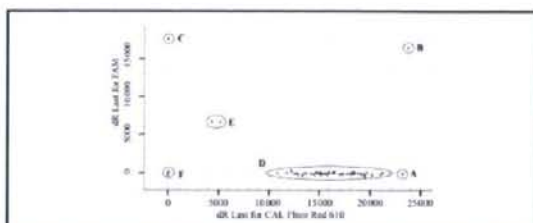


Fig. 1. Real-time PCR results for distinguishing  $HP^{del}$  and  $HP$  alleles.

The results of a dual-color scatter plot of fluorescence signals (dr Last) from genomic DNA from 3 Japanese individuals (A,  $HP/HP$ ; B,  $HP/HP^{del}$ ; C,  $HP^{del}/HP^{del}$ ) and blood samples from 47 Indonesians (D, 45  $HP/HP$  samples; E, 2  $HP/HP^{del}$  samples) and 1 Japanese individual (F,  $HP/HP$ ). Results for no added template (F) are also indicated. We used the following primers and TaqMan probes [labeled at the 5' end with fluorescent substances and at the 3' end with Black Hole Quenchers (BHQ) (Biosearch Technologies)]:  $HP^S$ -F, 5'-CACATTACTGATTCAGGCTGGA-3' (sequence from 513–536 bp, GenBank no. M10935);  $HP^S$ -R, 5'-CTTTTACAGTAATTTTCTCCACCT-3' (reverse sequence from 571–596 bp, GenBank no. M10935);  $HP^S$ -TaqMan probe, 5'-CAL Fluor Red 610-AGCTTTAAGCAATAGGAGATGGCCACA-BHQ2-3' (sequence from 538–566 bp, GenBank no. M10935);  $HP^{del}$ -F, 5'-TCITTATGGCACTGGGGAACA-3' (sequence from 694–714 bp, GenBank no. AB025320);  $HP^{del}$ -R, 5'-AGCAAGACACTCGT GAGTGGAA-3' (reverse sequence from 822–801 bp, GenBank no. AB025320); and  $HP^{del}$ -TaqMan probe, 5'-FAM-TGTGCAAGAGCCTTCCAAATTTGATCA-BHQ1-3' (reverse sequence from 772–799 bp, GenBank no. AB025320). The  $HP^{del}$  breakpoint is between base pairs 782 and 783 (GenBank accession no. AB025320).

tions, Thais (4), and Indonesians (this study) at frequencies similar to those of East Asians.

A previous study demonstrated that TaqMan real-time PCR methods can distinguish alleles from samples of dried whole blood (5). In the present study, we instead diluted samples of whole blood 100-fold to decrease the concentrations of substances that could inhibit the PCR reaction or quench the fluorescence signal. This procedure is simple, but a proper assessment of its reliability requires further evaluation with many more samples. Compared with the conventional PCR approach, the present TaqMan real-time PCR assay is simple and rapid (<1.5 h). More-

over, this automated method is cost-effective and amenable to high throughput, eliminates preparation of genomic DNA and post-PCR handling, and prevents contamination via PCR product carryover. Thus, application of this method for routine clinical diagnosis prior to blood transfusions or the infusion of human blood products may prevent anaphylactoid shock caused by anti-HP antibodies. This method may also be useful for detecting  $HP^{del}/HP^{del}$  homozygotes among donors of blood samples used for preparing blood products, such as albumin for anaphylactoid recipients, and for large-scale screening of  $HP^{del}$  in various populations.

**Grant/Funding Support:** This work was supported in part by grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan.

**Financial Disclosures:** None declared.

**Acknowledgments:** We thank Katherine Ono for editing the English in this manuscript.

#### References

- Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, et al. Simple PCR detection of haplotypic gene deletion in anaphylactoid patients with anaphylactoid reactions. *Blood* 2000;95:1138–43.
- Shimada E, Tachikawa K, Watanabe Y, Ikeda K, Nishihara H, Maeda I, et al. Anaphylactoid transfusion reactions in haplotypic-deficient patients with IgE and IgG haplotypic antibodies. *Transfusion* 2002;42:766–73.
- Soejima M, Koda Y, Fujihara I, Takeshita H. The distribution of haplotypic gene deletion ( $HP^{del}$ ) is restricted to East Asians. *Transfusion* 2007;47:1543–50.
- Shimada E, Osagiri M, Chawong K, Watanabe Y, Anzawa M, Maeda I, et al. Detection of  $HP^{del}$  among Thais, a deleted allele of the haplotypic gene that causes congenital haplotypic deficiency. *Transfusion* 2007;47:2315–21.
- Ullvik A, Ueland PM. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR: application to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem* 2001;47:2050–3.

Mikiko Soejima  
Yoshiro Koda\*

Department of Forensic Medicine and  
Human Genetics  
Kurume University School of Medicine  
Kurume, Japan

\* Address correspondence to this  
author at

Department of Forensic Medicine and  
Human Genetics  
Kurume University School of Medicine  
Kurume 830-0011, Japan  
e-mail: ykoda@med.kurume-u.ac.jp

DOI: 10.1373/clinchem.2008.103747

## 参考資料 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

### 教育講演 2

#### EL-2 ハプトグロビン欠損症原因遺伝子の同定

久留米大学医学部法医学人類遺伝学講座

神田芳郎

TEL: 0942-31-7554 FAX: 0942-31-7700 E-mail: ykoda@med.kurume-u.ac.jp

ハプトグロビン(Hp)はヒトで初めて多型が報告された血清蛋白である。法医学領域では個人識別や親子鑑定に用いられてきたが以前から親子関係が否定される例が散見されていた。我々はそのような家系の遺伝子解析をおこない Hp 遺伝子の完全欠失(Hp<sup>del</sup>)の存在をサザンブロット法により同定した。その後日本赤十字中央血液センターとの共同研究で、輸血後抗 Hp 抗体によりアナフィラキシーショックを呈したと考えられる無 Hp 血症患者の遺伝子解析をおこなった結果、これらの患者が Hp<sup>del</sup> のホモ接合体であることを示した。そこで Hp<sup>del</sup> の簡便な PCR 法による診断を目的として Hp<sup>del</sup> 欠失領域のクローニングをおこない、この欠失が Hp 遺伝子の約 5 kb 上流から Hp 遺伝子の下流に存在する、ハプトグロビン遺伝子と高い相同性を示すハプトグロビン関連遺伝子(Hpr)のイントロン 4 に及ぶことを示した。その結果欠失点をはさんだ領域と Hp 遺伝子のエクソン 1 のデュプレックス PCR 法を用いて 1 回の PCR により Hp<sup>del</sup> の接合性の診断が可能になった。この方法を利用して日本人集団での Hp<sup>del</sup> のアレル頻度を調べたところ約 1.5% であったことから、ホモ接合体の頻度は約 4,000 人に 1 人と推定された。日本人以外のさまざまなヒト集団でのスクリーニングの結果、Hp<sup>del</sup> はアフリカやヨーロッパ人集団には認められず、東アジア、東南アジア人集団に存在することが示唆された。日本人では血清蛋白欠損の輸血後アナフィラキシーショックのうち Hp 欠損症が最も高頻度出現し、2005 年度から新たに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。現在、臨床現場での利用と世界各地のヒト集団における Hp<sup>del</sup> の頻度を解析するために、リアルタイム PCR 法を用いた、さらに迅速で簡便な診断法の確立と血液製剤投与前検査の有用性の検討を計画している。

#### 参考資料 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

#### B210 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

副島美貴子, 上村繁雄, 神田芳郎 (久留米大)

血漿タンパク欠損によるアナフィラキシーショックは重篤な非溶血性輸血後副作用であり, 日本人ではハプトグロビン (Hp) 欠損症が最も高頻度に認められる. Hp遺伝子 (*Hp*) 欠失 $Hp^{del}$ のホモ接合体は先天性Hp欠損症となるが, その頻度は日本人では約4,000人に1人と推定される. 今回臨床現場で利用可能な $Hp^{del}$ の迅速診断法を確立することを目的とし条件検討をおこなった. 【方法】Hpの遺伝子型が分かっている血液およびゲノムDNAを用い,  $Hp^{del}$ とHpの上流域をAmpdirect Plus (島津製作所), TaKaRa Ex Taq Hot Start Version (TAKARA BIO INC.) を用いたduplex PCRにより増幅し, 融解曲線により増幅産物の評価をおこなった. 機器はStepOneリアルタイムPCRシステム (Applied Biosystems) を用いた. 【結果】健常者とヘテロ接合体については血液試料を,  $Hp^{del}$ のホモ接合体は血液試料を検討できなかったためゲノムDNA試料を用いたが何れも1本のチューブで $Hp^{del}$ あるいはHp上流域の増幅が認められ, リアルタイムPCR機器による融解曲線解析により接合性の判定が可能であった. 【考察】本法の導入により検査の迅速化と低コスト化, コンタミネーションやサンプルの取り違えの危険性の軽減が期待される. 日本赤十字社による検査では, これまでに調べられたHp欠損症患者はすべて,  $Hp^{del}$ のホモ接合体であり, 遺伝子診断によりHp欠損を原因とする血液製剤投与後のアナフィラキシーショックの回避が可能となるものと考える. 今後, 輸血医療現場における本法の臨床応用について検討をおこなう予定である.

## 参考資料 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

# 21

## Real-time PCRによるハプトグロビン遺伝子型の判定

副島美貴子, 神田芳郎

久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

【はじめに】ハプトグロビン (Hp) は、*Hp1* と *Hp2* の2対立遺伝子の組み合わせによる3種の表現型からなる多型タンパクである。*Hp2* は *Hp1* の遺伝子内重複によって生じたものであり Hp 遺伝子型の判定には *Hp2* の重複部位を含む比較的長い領域の増幅が必要である。そこで今回我々は Real-time PCR 法を用い迅速で簡便な Hp 遺伝子型の判定法の確立を試みた。

【材料・方法】プロモーター領域 (*Hp5'*) と *Hp2* に特徴的な重複領域 (*Hp2*) にそれぞれプライマーとプローブを設定し、*Premix Ex Taq* (Perfect Real Time) (takara 社) および *Mx3000P* (Stratagene 社) により Real-time PCR 解析をおこなった。*Hp5'* プローブは CAL Fluor Red 610、*Hp2* は CAL Fluor Orange 560 でそれぞれラベルした。リファレンスとして用いた *Hp2/Hp2* サンプルの *Hp2* とコントロール領域である *Hp5'* の閾値に達するまでに要するサイクル数の差 ( $\Delta Ct$ ) から、各サンプルの  $\Delta Ct$  を減じ  $\Delta \Delta Ct$  とした。*Hp2* の *Hp5'* に対する相対的コピー数は  $2^{-\Delta \Delta Ct}$  により算出し遺伝子型を決定した。鑄型には遺伝子型が既知の DNA サンプルを使用した。なお、本研究計画は久留米大学倫理委員会の承認を得ておこなった。

【結果・考察】123 サンプルについて解析をおこない、プロモーター領域に対する *Hp2* の相対的コピー数が 0.34~0.50 であるサンプルを *Hp1/Hp2*、0.79~0.98 であるサンプルを *Hp2/Hp2* とした。なお *Hp2* シグナルの得られなかったサンプルは *Hp1/Hp1* と判定した。得られた結果は、従来法によって決定した遺伝子型ならびに表現型と完全に一致した。本法は簡便であり解析に要する時間も短いことから大量解析に適した方法であることが示唆された。

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)

分担研究報告書

「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

研究分担者 佐川 公嬌 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、久留米大学病院臨床検査部輸血検査室は平成21年1月より  $Hp^{del}$  診断のための輸血前患者の血液試料の供与を開始した。

A. 研究目的

輸血や血液製剤の投与は重篤な副作用の発生頻度の低い比較的安全な医療行為である。しかしながらウイルス等の感染性副作用はその対策が重要である。感染性副作用以外では免疫学的副作用が知られており、さらに免疫学的副作用は溶血性・非溶血性に区分され、現在非溶血性輸血副作用が最も高頻度である。非溶血性輸血副作用は、蕁麻疹や発熱などの軽症例が大部分をしめるが、重篤なアナフィラキ

シー反応、輸血関連急性肺障害

(TRALI) や血液製剤の細菌汚染による死亡例も報告されている。したがって重篤な非溶血性輸血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、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。

本研究の目的は、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である。我々の役割は、研究代表者である神田芳郎久留米大学教授の研究グループに新たに開発された  $Hp^{del}$  の自動解析法の評価を目的とした患者の輸血前遺伝子診断のための血液試料の供与と、その検査法が臨床現場で利用可能か否かを評価することである。

## B. 研究方法

本年度は、我々臨床検査部輸血検査室のスタッフと研究代表者である神田芳郎久留米大学教授の研究グループと研究の進め方、解析の進捗状況、改善点等について会合や電話等により複数回の議論を行った。

まず輸血前診断の開始にあたってどのような形でインフォームドコンセントを得るべきかという問題で議論を重ね、輸血予定患者に行う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るという方法を採用した。

さらにどのような形で血液試料を供給すべきかを議論し、その結果血液を遠心分離した後バッフィーコート

分画を供与することで、平成21年度1月より血液試料の供与を始めた。供与方法は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、バッフィーコート分画約300 $\mu$ Lを供与するという方法で、試料の匿名化(連結可能匿名化)は久留米大学臨床検査部輸血検査室で行っている。

しかしながらその後バッフィーコート分画約300 $\mu$ Lでは解析に用いる試料の採取(約1 $\mu$ L)が困難であることと、実験結果の再現性(リアルタイムPCRの蛍光シグナル強度)にばらつきがあるという理由により、486番目の試料からは全血約300 $\mu$ Lの供与に変更している。平成21年3月31日現在で675名の輸血前患者血液を供与している。

### (倫理面への配慮)

本研究では輸血前患者血液を供与しているが、輸血前のルーチン検査のために採血は必要でありその血液の一部を用いていること及び供与する血液量が約300 $\mu$ Lと少量であることから、本研究を実施する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やっている。

## C. 研究結果



供与血液は連結可能匿名化（現在連番を用いている）後に、研究代表者の研究グループに供与している。現時点では輸血副作用が問題となる  $Hp^{del}$  のホモ接合体は1名も見出されておらず平成21年3月31日現在675名の中に23名の  $Hp^{del}$  ヘテロ接合体が検出されたのみである。今後  $Hp^{del}$  のホモ接合体が検出された場合は本人に結果を通知し、洗浄赤血球の輸血等の必要な処置を講じてゆく予定である。

#### D. 考察

本研究計画における、当該年度の我々の役割は血液試料の供与であるが、来年度以降は血液試料の供与に加えて、新たに開発された  $Hp^{del}$  の診断法の評価を行ってゆく予定である。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 法は既に開発されているが、現在 SYBR Green I を指標としリアルタイム PCR 法を用いた  $Hp^{del}$  判定法や DNA マイクロチップ電気泳動装置を用いた解析法が開発途中であることから、これら複数のシステムのうちどの方法が最も臨床現場での検査方法として適しているのか評価してゆく予定である。

#### E. 結論

平成21年1月より  $Hp^{del}$  診断のための輸血前患者の血液試料の供与を開始した。来年度以降は血液試料の供与に加えて、開発された  $Hp^{del}$  の診断法の評価を行ってゆく予定である。

#### F. 健康危険情報

なし。

### III. 研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

なし

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
副島美貴子 神田芳郎	TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin ( $HP^1$ and $HP^2$ ).	Clinical Chemistry	54(11)	1908-1913	2008

#### IV. 研究成果の刊行物・別刷

Mikiko Soejima, Yoshiro Koda. TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin ( $HP^1$  and  $HP^2$ ). *Clinical Chemistry*. 2008 Nov;54(11): 1908-1913.

## TaqMan-Based Real-Time PCR for Genotyping Common Polymorphisms of Haptoglobin ( $HP^1$ and $HP^2$ )

Mikiko Soejima<sup>1</sup> and Yoshiro Koda<sup>1\*</sup>

**BACKGROUND:** The haptoglobin gene ( $HP$ ) has 2 common codominant alleles ( $HP^1$  and  $HP^2$ ) that account for 3 phenotypes.  $HP^2$  is generated by a 1.7-kb intragenic duplication of  $HP^1$ .

**METHODS:** We used the real-time TaqMan PCR system to develop an effective method for  $HP$  genotyping that allows us to evaluate the relative number of copies of the  $HP^1$  allele-specific junctional region of the 1.7-kb gene duplication ( $HP2$ ) by comparing the intensity of the amplification signals to those of the  $HP$  promoter region ( $HP5'$ ), which was used as the internal control. The difference in threshold cycles ( $\Delta Ct$ ) between  $HP2$  and  $HP5'$  was used to assess  $HP^2$  copy number. In addition, the assay detects the  $HP$  deletion ( $HP^{del}$ ) at the same time.

**RESULTS:** The mean  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  values (the  $HP2/HP5'$  ratio) obtained from 123 samples of known  $HP$  genotypes clearly differentiated 2 nonoverlapping intervals that correspond to the  $HP$  genotypes. Ratios for  $HP^1/HP^2$  samples ranged from 0.34–0.50,  $HP^2/HP^2$  samples ranged from 0.79–0.98, and the absence of an  $HP^2$  allele signal was defined as  $HP^1/HP^1$ . We simultaneously detected  $HP^{del}$ . The assay produces results in <1 h.

**CONCLUSIONS:** The TaqMan-based real-time PCR method was successfully applied to  $HP$  genotyping. The method is easy to use in a molecular diagnosis laboratory, and its robustness and rapidity make it suitable for high-throughput analysis of large populations. © 2008 American Association for Clinical Chemistry

Haptoglobin ( $HP$ )<sup>2</sup> is a glycoprotein found in the plasma of all vertebrates. It binds hemoglobin to prevent both iron loss and kidney damage during hemo-

lysis. Humans have a polymorphism in the gene encoding the protein because of 2 codominant  $HP$  (haptoglobin) alleles,  $HP^1$  and  $HP^2$ , that give rise to the 3 common  $HP$  phenotypes,  $HP1$ ,  $HP2-1$ , and  $HP2$  (1, 2). The  $HP^2$  allele appears to have been generated by a 1.7-kb intragenic duplication of exons 3 and 4 of the  $HP^1$  allele. The frequencies of the  $HP^1$  and  $HP^2$  genotypes vary worldwide depending on the ethnic group, with the  $HP^1$  frequency varying from about 0.07 in parts of India to >0.7 in parts of West Africa and South America (3).

Because of its polymorphic nature,  $HP$  has been used as a genetic marker for identifying parentage and individuals, and several variant phenotypes have been reported, one of which,  $HP$  Johnson, occurs at low frequency in various populations (3). The molecular weight of the  $\alpha$  chain is larger (23 kDa) than that encoded by  $HP^2$ , and Southern blotting has shown 3 tandem repeats of the same 1.7-kb DNA segment found in the  $HP^2$  gene duplication (4). Another variant,  $HP2-1$  modified ( $HP2-1M$ ), which exhibits greater  $HP1$  protein production than  $HP2$  because of a mutation in one of the interleukin-6 response elements in the promoter of the  $HP^2$  allele, occurs at relatively high frequencies in African populations (5–7). In addition,  $HP^{del}$ , which lacks an approximately 28-kb segment of chromosome 16 that extends from the  $HP$  promoter region to exon 5 of the haptoglobin-related gene, has been identified (8, 9). This allele has been found only in East and Southeast Asian populations (9–13).

Both  $HP^1$  and  $HP^2$  alleles have been associated with susceptibility to diabetic, cardiovascular, inflammatory, and autoimmune diseases (2). Such associations may be explained by functional differences between the subtypes in the binding of hemoglobin and its rate of clearance from the plasma. Recent studies have identified profound differences between the antioxidant and immunomodulatory properties of

<sup>1</sup>Department of Forensic Medicine and Human Genetics, Kurume University School of Medicine, Kurume, Japan

\*Address correspondence to this author at Department of Forensic Medicine and Human Genetics, Kurume University School of Medicine, Kurume 830-0011, Japan. E-mail: koda@med.kurume-u.ac.jp

Received June 20, 2008; accepted August 19, 2008.

Previously published online at DOI: 10.1373/jclinchem.2008.113126

<sup>2</sup>Nonstandard abbreviations:  $HP$ , haptoglobin;  $HP2-1M$ ,  $HP2-1$  modified;  $Ct$ , threshold cycle;  $HP2$ , region encompassing the breakpoint of the partial gene duplication in intron 4 of the  $HP^2$  allele;  $HP5'$ , 5' region of  $HP$  exon 1;  $HP^{del}$ , region encompassing the  $HP^{del}$  breakpoint.