

200940030A

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に関する研究

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 芳郎

平成22（2010）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	
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 -----	43
佐川 公矯	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	46
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	47

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、当該年度には血液を直接試料としたリアルタイム PCR 装置と SYBR Green I 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確立しモンゴル人のハプトグロビン遺伝子型と糖尿病や血圧、脂質代謝等の生活習慣病に関する検査データとの関連解析を行った。さらに昨年度開発した TaqMan 法と SYBR Green I の輸血前遺伝子検査を同時実施することで両診断法の簡便性と妥当性を検証した。現在、新たな診断法として LAMP 法を用いた方法の確立を目指している。

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1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える。我々は昨年度厚生労働省研究費補助金の援助を受けて 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 法を確立し (図 2, 3 参照 ; Soejima and Koda, Clin Chem, 2008, 54(6):1095-1096.)、さらに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 法も確立した。当該年度は新たに SYBR Green I を用いた Hp^{del} の接合性を判定するリアルタイム PCR 法を確立し、またトリプレックス PCR 法を用いてモンゴル人のハプトグロビン遺伝子型と糖尿病や血圧、脂質代謝等の生活習慣病に関連する検査データとの関連解析を行った。さらに輸血前患者の検体を用いて TaqMan 法と SYBR Green I 法の簡便性と妥当性を評価した。

B. 研究方法

SYBR Green I 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

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 (SYBR Green I 法) はTaqMan法と比較して、初期費用が低く、幅広い機器で利用可能であるという利点を持つ。このSYBR Green Iを用いた診断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と濃度比を決定した。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。SYBR Green I法は、標的とするDNAを増幅しながら、増幅断片と結合したインターカレーターが発する蛍光を検出する方法である。SYBR Green I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)やTaqMan 法 (Soejima and Koda, Clin Chem, 2008, 54(6):1095-1096.) と同様、*Hp^{del}*の欠失点をはさんだ領域と、*Hp^{del}*で欠失している遺伝子領域の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であるが、前2法が欠失領域としてハプトグロビン遺伝子のエクソン 1上流域を用いたのに対して本診断法ではreverse primerを*Hp^{del}*の欠失点のreverse primerと共通のもの

(Hpdel-823R) を用い、forward primerのみを欠失アリル特異的なもの (Hpdel-690F) と健常 (非欠失) アリ

ル特異的なもの (Hpr-R) を用いた。1 μ lの鋳型 (5 ngゲノムDNA、原液から4096倍に希釈した血液、EDTAあるいはヘパリン採血)、最終濃度200 μ mol/lのdeoxynucleotide triphosphates, 10 μ l 2 X SYBR Premix Ex Taq II (perfect real time; Takara, Shiga, Japan)と500 nmol/l Hpdel-690F プライマー (配列及びその位置は表1に記載), 250 nmol/L Hpdel-823R プライマー (表1), 75 nmol/L Hpr-F プライマー (表1), 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Primer 3 software (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用いて設計し、オペロン バイオテクノロジー 株式会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65°C30秒のアニーリング兼伸長の過程を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兼伸長反応の最後にMx3000P (Agilent technology)のFAM filter (excitation/emission: 492/516 nm)を用いて測定した。さらに同機により95°C1分熱処理後に70°C30秒 その後、0.2°C/秒で90°Cまで温度を上げることで融解曲線解析を行った。その後MxPro™ Software (version 4.00. Agilent technology)を使ってdataの解析を行なった。なおMx3000Pは当該補助金によるリース機器である。

TaqMan法を用いたハプトグロビン遺伝子型と糖尿病や血圧、脂質代謝等の生活習慣病に關与する検査データと

の関連解析

946人のウランバートル市に住むモンゴル人を対象とした。被験者には、事前に遺伝子多型研究についての説明を行ない、同意を得た。946人のうち281人は既に2型糖尿病の診断を受け、ウランバートル市内の糖尿病リサーチセンターの外来患者として治療を受けている患者である。全ての血液サンプルは、正中静脈からの採血で得られたものである。血糖値は、Accu-chek[®]R (Roche Diagnostics, Basel, Switzerland) を用いて測定した。血液を遠心後、分離した血清を採取し、直ちに凍結した。その後、血清より総コレステロール、中性脂肪、HDLコレステロールなどについての臨床化学検査が行なわれた。これらの検査は、空腹時採血を行った632人にのみ実施した。ゲノムDNAは、Puregene DNA purification kit (Gentra Systems Inc, MN, USA)を用い、末梢血白血球より抽出した。ハプトグロビン遺伝子型の決定は、TaqMan法 (Soejima and Koda, Clin Chem, 2008, 54(11):1908-1913.) と conventional PCR法 (Koda et al., Blood, 95, 1138-1143, 2000; 15. Koch et al., Clin Chem 2002, 48(9):1377-1382.) を用いた。さらに、TaqMan法と conventional PCR法の判定で結果の不一致を示した2例とHp5'に対するHp2配列のコピー数が予想より多い1例に関しては、血清を使用したポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこないハプトグロビン表現型の決定を行った。

データは平均値±SD、中央値(範囲)、または割合(%)で示した。2型糖尿病(T2DM)、BMI (body mass index)、血圧、脂質関連項目それぞれについて、ハプトグロビン遺伝子型との関連性について検討した。データは、 χ^2 test (Chi-squares-test)、Kruskal-Wallis test または one way ANOVA を用いて解析をおこなった。関連性検討のP値は0.05以下を有意差ありとした。

輸血前血液の *Hp^{del}* 接合性診断

TaqMan プローブ及び SYBR Green I を用いたリアルタイムPCR法と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 プローブ及び SYBR Green I を用いたリアルタイムPCR法で解析を行っている。平成22年3月31日現在で2,954名の輸血前患者血液の解析を行った。

(倫理面への配慮)

上述のとおり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

SYBR Green I 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

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、希釈した血液サンプルを鋳型として使用でき、1 サンプルにつき 1 チューブで接合性を決定できるように条件検討をおこなった。SYBR Green I 法で接合性を 1 サンプルにつき 1 つのチューブで判定するためには、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れぞれの DNA 断片の T_m (melting temperature) 値から識別可能なプライマーの組み合わせを見つけた必要がある。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、ヘテロ接合体サンプルにおいて異なる T_m 値の 2 つの増幅産物を同じ増幅条件でほぼ等量増幅しなければならない。そのため 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

条件を検討した。その結果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することに成功した (Soejima et al., Transfusion, 2010, in press)。

今回開発した SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 法は reverse primer を 1 種類のみ、すなわち Hp^{del} の欠失点検出用の reverse primer

(Hpdel-R) に設定し、forward primer のみを欠失点特異的なもの (Hpdel-F) と健常 (非欠失) アリル特異的なもの (Hpr-R) の 2 種類を用いた (図 4)。

ゲノム DNA (5 ng) を鋳型として用いた場合、図 5 に示すように健常者 (Hp/Hp) では T_m 値が $84.3-84.7^{\circ}\text{C}$ (148 bp の Hpr intron 4 由来の増幅産物) のみのピークが、 Hp^{del} のヘテロ接合体

(Hp/Hp^{del}) では T_m 値が約 80.3°C (134 bp の Hp^{del} 由来の増幅産物) 及び約 84.5°C (148 bp の Hpr intron 4 由来の増幅産物) 両方のピークが、また Hp^{del} のホモ接合体 (Hp^{del}/Hp^{del}) では T_m 値が約 80.3°C (134 bp の Hp^{del} 由来の増幅産物) のみのピークが検出された。

さらにハプトグロビンの遺伝子型が既に判明している日本人の凍結保存血液を蒸留水でそれぞれ原液から 4096 倍に段階的に希釈した試料を鋳型とした場合、原液から 16 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、64 倍から 1024 倍の希釈では、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} の判定が可能であった (図 6, 7)。そこで我々は血液の希釈倍率として前年度開発した TaqMan 法で用いた 100 倍を選択して以降の研究を進めた。

またこの TaqMan 法による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、SYBR Green I 法でも透明な PCR plate と比較してみたところ、本方法でも蛍光シグナルの増強が確認できた。したがって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) を用いることとした。さらに、条件検討をおこなった後、輸血前血液の診断を開始したところ、鋳型を入れていない negative control の 10% 程度 (10 検体に 1 検体程度) 増幅シグナルが観測された。このシグナルは融解曲線解析の結果目的の増幅産物の何れとも異なる Tm 値のピーク (77°C 程度) を有しており、電気泳動の結果、そのサイズからプライマーダイマーであることが示唆された (図 8)。そこで、試薬を SYBR Premix DimerEraser (Perfect Real Time, Takara) に変更して実施した結果、プライマーダイマーと思われる増幅シグナルは出現しなかった。一方、ダイマー形成の軽減を目的とした本試薬を用いると、SYBR Premix Ex Taq II を用いる場合より反応時間が 30 分程度長くなるというデメリットも生じ、SYBR Premix Ex Taq

II でも常に primer dimer の増幅が認められるわけでもなく、さらに融解曲線解析の Tm 値から非特異的産物であることが判定可能であり、さらに希釈血液試料からはこのシグナルは認められなかったことなどから輸血前診断という目的を考えるとどちらの試薬が適当であるかは難しい問題であり今後の検討課題である。

TaqMan法を用いたハプトグロビン遺伝子型と糖尿病や血圧、脂質代謝等の生活習慣病に關与する検査データとの關連解析

モンゴル人集団 946 人におけるハプトグロビン遺伝子型の決定は、TaqMan 法と conventional PCR 法の 2 法で行った。リアルタイム PCR 法では比較 Ct 法で $Hp5'$ (コントロール領域) に対する $Hp2$ 領域の相対的コピー数 ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) を算出し、その数値が 0.5 に近いものを Hp^1/Hp^2 、1 に近いものを Hp^2/Hp^2 とし、 $Hp2$ のシグナルが認められないものを Hp^1/Hp^1 と判定した。また Hp^{del} のシグナルが認められるサンプルに関しては、 $Hp2$, $Hp5'$ の両シグナルが認められるものを Hp^2/Hp^{del} 、 $Hp5'$ シグナルのみ認められるものを Hp^1/Hp^{del} 、 $Hp2$ シグナルも $Hp5'$ シグナルも認められないもの (すなわち Hp^{del} のシグナルのみ) を Hp^{del}/Hp^{del} と判定した。両方法の判定で 946 例中 943 例は結果が完全に一致したが、結果の不一致が 3 例存在した。これら結果不一致のうち 2 例のハプトグロビン遺伝子型は、リアルタイム PCR 法の

結果が Hp^2/Hp^2 、conventional PCR 法からは Hp^1/Hp^2 であった。また 1 例は conventional PCR 法では遺伝子型は Hp^2/Hp^2 であったが、リアルタイム PCR 法で Hp^2/Hp^2 と判断した他のサンプルの $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ sample}}$ 値は、高い場合であっても 1.20 前後にあったのに対して、この 1 例の $2^{-\Delta\Delta Ct \text{ sample}}$ 値は 1.35 前後の高い結果であった。これら 3 例の精査のため、血清を試料としポリアクリルアミドゲル電気泳動をおこないハプトグロビン表現型の決定を行った。その結果この 3 名のハプトグロビン表現型は、前者 2 例が Hp^1/Hp Johnson で、 $Hp2$ の相対的コピー数が 1.35 と判定された 1 例が Hp^2/Hp Johnson といずれも HP Johnson 対立遺伝子のヘテロ接合体であることがわかった。これらの結果から、モンゴル人 946 人のハプトグロビン遺伝子型は Hp^1/Hp^1 が 70 人、 Hp^1/Hp^2 が 363 人、 Hp^2/Hp^2 が 493 人、 Hp^1/Hp^{del} が 5 人、 Hp^2/Hp^{del} が 12 人、 Hp^1/Hp Johnson が 2 人、 Hp^2/Hp Johnson が 1 人であることがわかった (表 2)。また、 Hp^1 対立遺伝子頻度は、0.34 であり、 Hp Johnson の頻度は 0.009 であった。

表 3 に 2 型糖尿病患者のハプトグロビン遺伝子型別の年齢、体重、身長、BMI、体脂肪率、ウエスト、ヒップ、Waist/Hip 比、血圧 (収縮期血圧 SBP, 拡張期血圧 DBP) を示した。これらの項目とハプトグロビン遺伝子型の違いによる差は認められなかった。また、ハプトグロビン遺伝子型別の臨床化学項目

についても表 3 に示した。これらすべての項目に関して有意差は見られなかった。同様に、非糖尿病患者についてもハプトグロビン遺伝子型および表現型との関連性について調べた結果を表 4 に示す。これらについての有意差も認められなかった。

ハプトグロビン遺伝子型、対立遺伝子と 2 型糖尿病の関連性を χ^2 test を用いてそれぞれ検定を行ったところ 2 型糖尿病の罹患の有無とハプトグロビン遺伝子型 ($P=0.3665$) および対立遺伝子頻度 ($P=0.8181$) との間に有意な相関は認められなかった。

HP Johnson 対立遺伝子は Hp^1 のエクソン 3、エクソン 4 の 1.7kb の領域が 3 回重複することにより、9 つのエクソンから構成される 16。このため、今回用いたリアルタイム PCR 法では 1 つの Hp Johnson 対立遺伝子中に $Hp2$ プライマーで増幅され、 $Hp2$ プロブが結合する部位が 2 ヶ所存在することになる。したがって $Hp5'$ と $Hp2$ の相対的な比を用いる TaqMan プロブを用いたリアルタイム PCR 法では、以前我々が予測していたように、 Hp Johnson の誤判定が認められた。一方 conventional PCR 法では、primer A と B により 5.1-kb の Hp Johnson に特異的な PCR 産物の増幅が予想されるが、今回の PCR 条件では、いずれもこれらの産物の増幅は確認できなかった。したがってこれらの症例は conventional PCR 法を用いても誤判定となる可能性が高いものと思われる。

しかしながら、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法と conventional PCR 法の結果は、HP Johnson 型を除く、943 例の結果が完全に一致したことから、以前我々が確立した TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法がハプトグロビン遺伝子型の決定において信頼のおける測定法であることが、今回の実験においても追認された。また、conventional PCR 法では、ハプトグロビン遺伝子型の決定は大変な手間と時間がかかるうえ、 Hp^1 、 Hp^2 、 Hp^{del} の検出を同時に行うことは困難であるが、TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法は、大量の data (high-throughput) 解析に非常に適した方法であり、同時に Hp^1 、 Hp^2 、 Hp^{del} が検出できる。後述のとおり、ハプトグロビン多型はさまざまな疾患との相関解析がおこなわれており、多型判定法として本法が導入されればアジア人集団では輸血副作用の原因となる Hp^{del} の検出および頻度分布を調べることも可能となる点においても有用であると考えられた。

今回の我々の研究ではモンゴル人集団における Hp Johnson 型の頻度は、0.0032 (3/946)であった。以前の報告では Hp Johnson 対立遺伝子の頻度は、日本人集団で 0.0003 (15/50000)¹⁷、メラネシア人集団で 0.0036(3/831)¹⁸ と報告されており、本研究対象のモンゴル人集団は、日本人と比較し Hp Johnson の頻度は高く、メラネシア人集団と同じ頻度であった。

これまでの報告ではハプトグロビン多型は様々な人種で虚血性心疾患や高血圧、糖尿病、高脂血症などと相関が指摘されているが、今回の研究に用いたモンゴル人集団ではハプトグロビン遺伝子型とこれらの項目についての関連性は認められなかった。

輸血前患者検体検査と検体血液の希釈法について

我々は平成 21 年 1 月より輸血前患者血液について TaqMan 法で 1 サンプルあたり 2 回以上の解析を行っている。さらに当該年度に開発した SYBR Green I 法に関しても保存していた 50 mM NaOH で 100 倍希釈した血液を用いて遺伝子診断を実施した。平成 22 年 3 月 31 日現在までのところ 2 法の duplicate assay で結果が食い違っていた症例は見つかっておらず、2,954 名の中に 91 名の Hp^{del} ヘテロ接合体と 1 名のホモ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 1.6%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 $19\mu\text{l}$ 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。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 μ l を 19 μ 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。このうち、simplePrep reagent for DNA (Takara, Shiga, Japan) で検討をおこなった。全血 2 μ l をプロトコールに従って処理し、DNA 抽出液 1 μ l を 19 μ l 反応液に加えて反応をおこなったが、50 mM NaOH で 100 倍希釈した場合と比較しシグナルが低くさらに同様の希釈でもシグナルが検出される Ct 値が大きいという結果であり代替に値するものではないという評価に至った。今後他の試薬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 SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 法による *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 150 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 時間程度と昨年度に開発した TaqMan 法とほぼ検査に要する時間を同程度にすることができた。一方経費は、用いたリアルタイム 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 3 種類の合成オリゴプライマーのみであり最小単位 (合成スケール 25 pmol 程度) であれば 1 プライマーあたり約 2000 円であり 3 つの計でも約 6000 円であることから 1 反応あたり約 3 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 検体あたり 110 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。この数字は昨年度開発した TaqMan 法 (1 検体あたり約 130 円と試算) よりさらに安価である。

TaqMan 法と SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 法の共通の従来法と比較しての共通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ー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。一方 TaqMan 法に比べて SYBR Green I を用いたメリッ

トは蛍光の検出が1波長であるため、比較的安価なリアルタイムPCR装置で解析が可能であること、また準備する試薬が一般的なPCR法に用いる試薬のみで試薬の準備や調整が容易であることがあげられる。また本診断法は簡便な方法であるがその正確性もTaqMan法に引けを取らず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。

さらに昨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 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。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、サザンブロットあるいは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。本年度はこの方法を用いてモンゴル人のゲノムDNAを用いてハプトグロビン遺伝子型を決定し、すでに得られていた糖尿病、身長、体重、血圧、その他の検査データを用いて関連解析を行った。本研究ではハプトグロビン遺伝子型と糖尿病罹患率や検査データ等にハプトグロビン遺伝子型による差異は認められなかったものの本法が大量の遺伝子型判定に有用なことが示され、同時にハプトグロビンの稀な変異型であるHp Johnsonの同定にも有効であることが示唆された。

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阻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阻害は認められた。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阻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阻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阻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 Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP)法を用いて、*Hp^{del}* の接合性を判定できるプライマーセットを検討中である。この方法は常温 (60°C から 65°C) で反応が可能であることや増幅産物を反応液の白濁で目視可能であることなどから、初期費用が安価な遺伝子診断法になるものと期待される。しかしながらプローブを用いず反応液の混濁度から反応産物の有無を判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。さらに 1 サンプルにつき 2 つのチューブが必要なものの、その原理から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。最終年度は、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。現在この 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いる。

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し 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診断法を確立した。この方法と TaqMan プローブ法の 2 法を用い輸血前患者の血液から直接遺伝子診断を実施し比較検討をおこない臨床現場で利用可能であるかどうかを検討した。また TaqMan プローブ法を応用し開発した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 法を用いモンゴル人集団のハプトグロビン遺伝子型と糖尿病や血圧、脂質代謝等の生活習慣病に關与する検査データとの関連解析をおこなった。

今後は新たに開発中の方法と併せ、

比較検討をおこない、個々の現場環境に即した診断法を確立したいと考えている。

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Nakamura H, Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, Koda Y. Haptoglobin polymorphism in Mongolian population: comparison of the two genotyping methods. Clin Chim Acta. 2009 Oct;408(1-2):110-113.

Soejima M, Tsuchiya Y, Egashira K, Kawano H, Sagawa K, Koda Y. Development and validation of a SYBR Green I-based real-time polymerase chain reaction method for detection of haptoglobin gene deletion in clinical materials. Transfusion. 2010 Jan 22. [Epub ahead of print]

2. 学会発表

神田芳郎、副島 美貴子、上村 繁雄、岩本 禎彦. ハプトグロビン多型とモンゴル人集団における生活習慣病の相関解析. 第59日本法医学会九州地方会. 2009; 佐賀.

Yoshiro Koda, Mikiko Soejima. GENOTYPING METHOD FOR COMMON POLYMORPHISMS OF HAPTOGLOBIN AND DISTRIBUTION OF HP^{DEL} IN ASIA. XXth Regional Congress of the ISBT, Asia. 2009; 名古屋.

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 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

図3 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4 SYBR Green I 法で用いた各プライマーの位置

図5 SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR によるさまざま遺伝子型の標的遺伝子産物の増幅曲線

図6 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の増幅曲線

図7 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線

図8 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線に認められた primer dimer

(参考資料)

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

表2 モンゴル人 946 サンプルのハプトグロビン遺伝子型

表3 2型糖尿病患者の臨床データとハプトグロビン遺伝子型

表4 非糖尿病患者の臨床データとハプトグロビン遺伝子型

1. 神田芳郎、副島 美貴子、上村 繁雄、岩本 禎彦. ハプトグロビン多型とモンゴル人集団における生活習慣病の相関解析. 第 日本法医学会九州地方会. 2009; 佐賀
2. Yoshiro Koda, Mikiko Soejima. GENOTYPING METHOD FOR COMMON POLYMORPHISMS OF HAPTOGLOBIN AND DISTRIBUTION OF HP^{DEL} IN ASIA. 日本法医学雑誌. 2009; 名古屋

別表

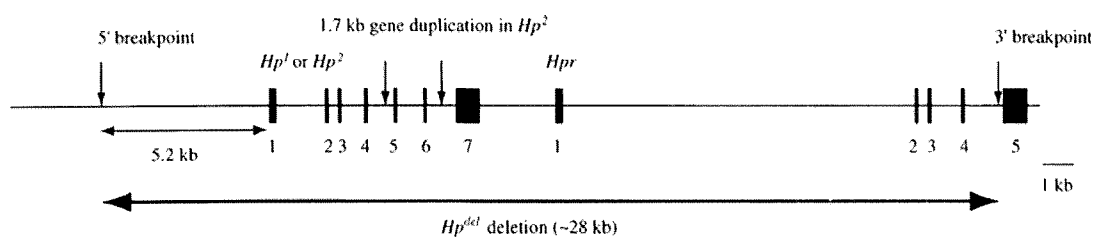


図1 Hp^{del} の欠失領域：遺伝子欠失はハプトグロビンの上流約 5.2-kb からハプトグロビン関連遺伝子のイントロン4にまでおよぶ

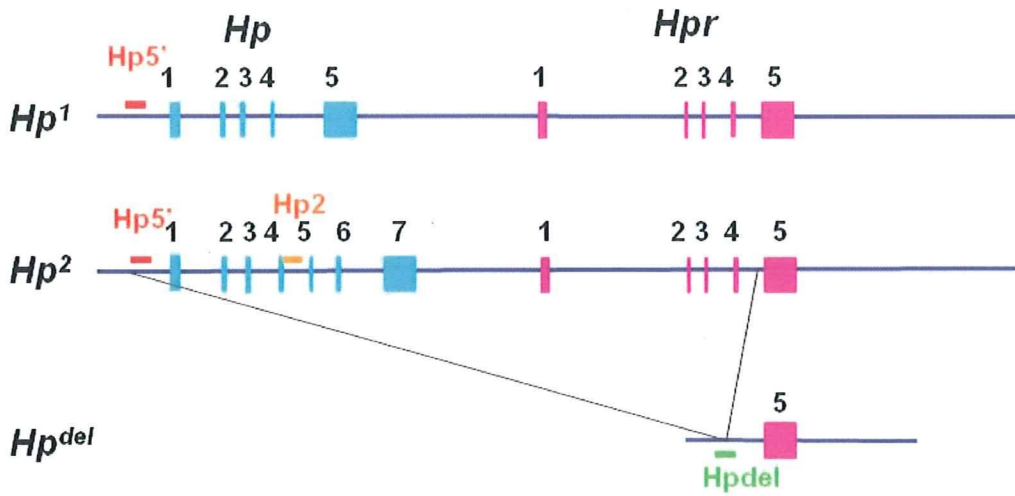


図2 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

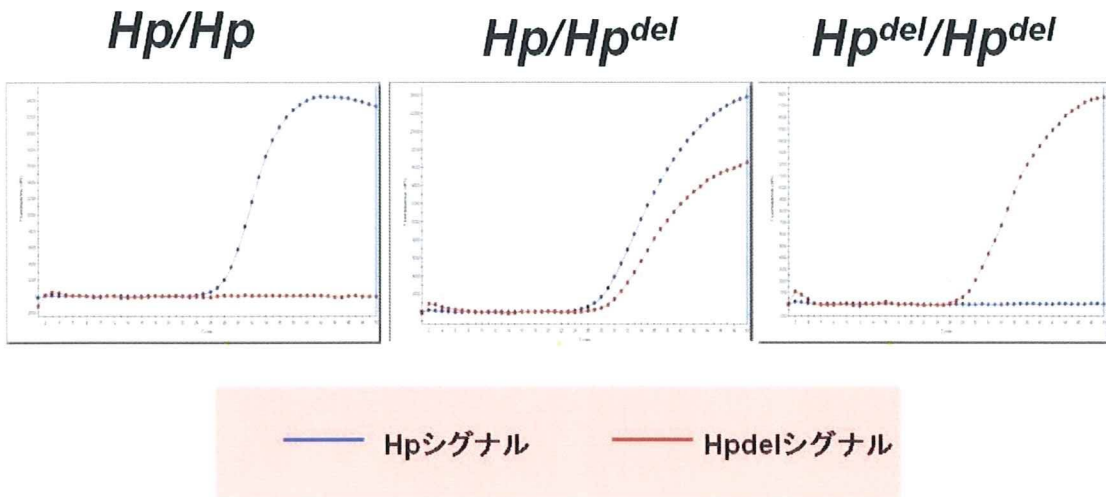


図3 TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による標的遺伝子産物の増幅曲線

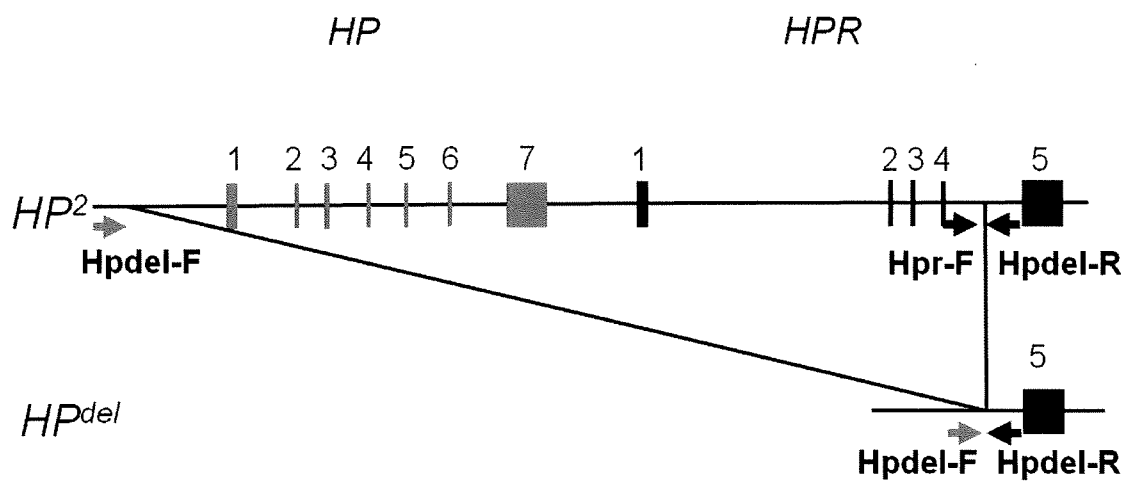


図 4 SYBR Green I 法で用いた各プライマーの位置

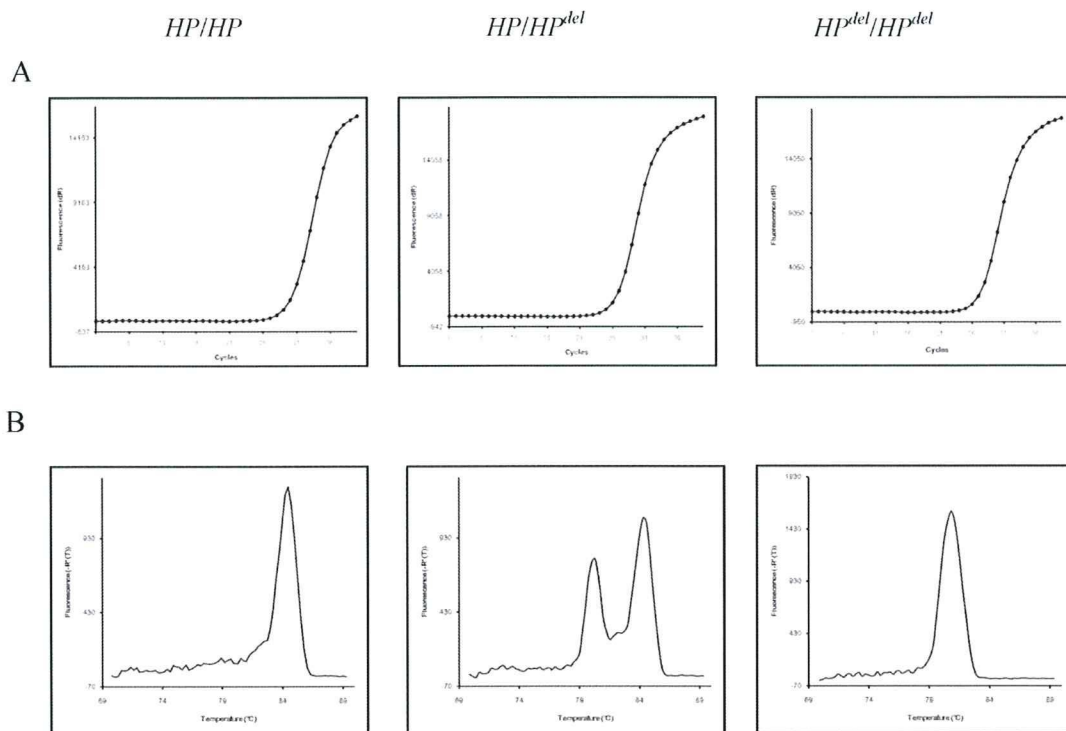


図5 SYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRによるさまざま遺伝子型の標的遺伝子産物の増幅曲線 (A)、と融解曲線解析 (B)

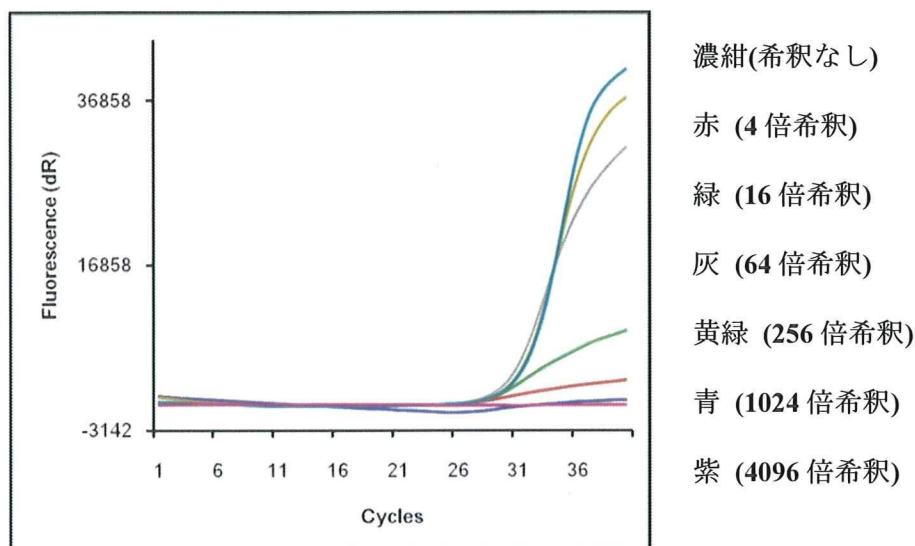
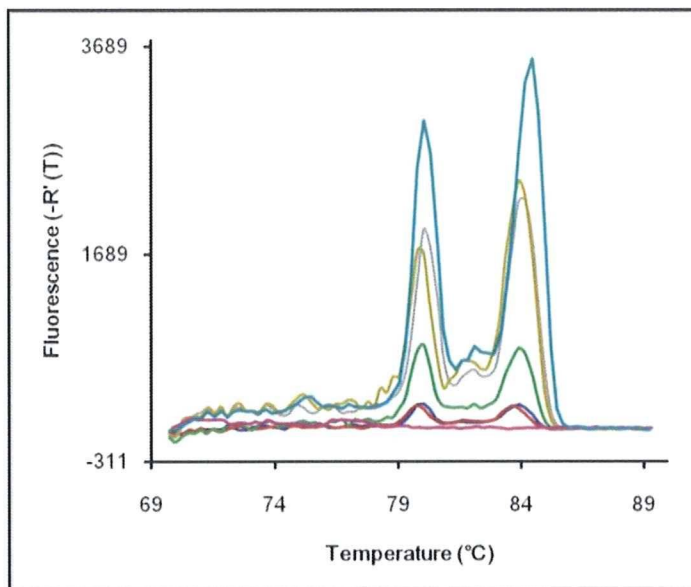


図6 血液を直接鋳型にした場合のSYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRの増幅曲線



濃紺(希釈なし)
 赤 (4倍希釈)
 緑 (16倍希釈)
 灰 (64倍希釈)
 黄緑 (256倍希釈)
 青 (1024倍希釈)
 紫 (4096倍希釈)

図7 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線

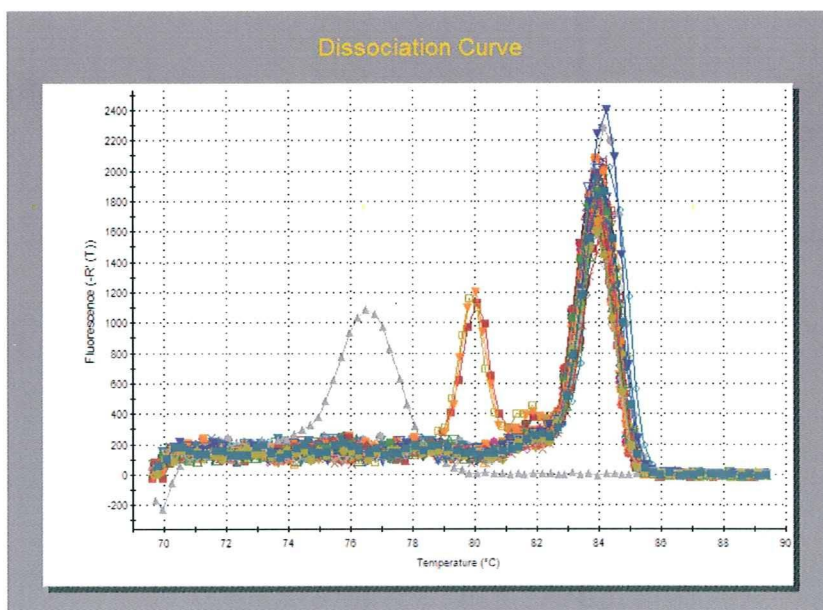


図8 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線に認められた primer dimer