

201034005A

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22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 神田 芳郎

平成23（2011）年5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 -----	36
佐川 公矯	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	39
IV. 研究成果の刊行物・別刷 -----	40

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となり得る血漿蛋白欠損のうち日本人を含む東アジア人集団では、ハプトグロビン (Hp) 欠損症が最も高頻度である。Hp 遺伝子の全長欠失を伴う Hp 遺伝子欠失アリル (Hp^{del}) は先天性 Hp 欠損症の原因遺伝子で、ホモ接合体では Hp が合成されず、輸血等により抗 Hp 抗体が産生されアナフィラキシーショックを惹起すると考えられる。日本赤十字社による調査では無 Hp 血症患者は全例 Hp^{del} のホモ接合体であり、輸血前に Hp^{del} の遺伝子検査を実施すれば、無 Hp 血症に基く重篤な輸血副作用の回避が可能になると考えられる。当該研究計画の目的は、臨床現場で利用可能な Hp^{del} 迅速診断法を確立し、より安全な輸血医療の実現を目指すことにある。そのためには迅速化、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り、前年度までに血液を直接試料としたリアルタイム PCR 法を用いた 2 種の診断法を確立し、輸血前血液サンプルについて同時実施し両診断法の検証と改善をおこなってきた。今年度は、2 法を用いた輸血前診断を継続し、各種反応試薬、リアルタイム PCR 機器での比較検討を実施した。さらにより広い施設での利用を可能にするために、定温で DNA を増幅可能な LAMP 法を導入し専用機器を必要としない診断法を確立した。

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は不明な場合が多い中で、血漿タンパク欠損は分っているものの1つである。このうち西洋人では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¹⁾、2005年から各種血液製剤添付資料「慎重投与の項」に記載されるようになった。

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ことから、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、遺伝子内重複、すなわち Hp^1 対立遺伝子のエクソン3、エクソン4の重複(1.7-kb)

により新たにエクソン5、エクソン6が生じており、7つのエクソンから構成されている。

ハプトグロビンはこうした遺伝的多型性を有するため、法医学領域で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いわゆる孤立否定の家系が散見されていた。我々は、このような家系と血中にハプトグロビンが全く検出されない、ハプトグロビン欠損症(先天性無ハプトグロビン血症)患者の遺伝子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、その欠失領域をクローニングした。その結果、この欠失は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に及ぶことを示した。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²⁾。さらに、欠失点をはさんだ領域と欠失領域に含まれるエクソン1領域のデュプレックスPCR法によって接合性の判定が可能な遺伝子診断を確立した³⁾。

Hp^{del} によるハプトグロビン欠損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⁴⁾。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。このことから日本人における 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³⁾。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、血液からのゲノム DNA の抽出、PCR による Hp 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検査として導入するため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、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た。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法が導入できれば、対象となる患者を重篤な輸血副作用から救うことができる。

我々は当該研究費補助金の助成を受け、平成 20、21 年度の 2 年間に 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⁵⁾、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 法を確立し⁶⁾、多数検体の Hp^{del} を含むハプトグロビン遺伝子型の判定による詳細な遺伝子頻度の決定を可能にした⁷⁾。また、DNA インターカレーターである SYBR Green I を用い増幅反応後に融解曲線解析を実施し Tm 値を評価することにより 1 本のチューブで Hp^{del} の接合性を判定可能なリアルタイム PCR 法を確立した⁸⁾。さらに輸血前患者の検体を用いて TaqMan 法と SYBR Green I 法の比較検討をおこない、両方法で判定結果が完全に一致することを確認した⁸⁾。

当該年度では、より広い臨床現場における検査の実現を目的とし、専用機器や遺伝子解析専門技術者を必要としない恒温 DNA 増幅法である LAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法を用いた Hp^{del} 検出法を確立した。さらに、新規に導入した

リアルタイム PCR 機器 (LightCycler[®] 480) を用い、機器間での結果の同一性あるいはソフトウェアの使い勝手等の比較をおこなった。また、リアルタイム PCR 法の汎用化に伴い、特徴の異なる反応試薬製品が購入可能となっており、こうした製品を用い既に確立した診断法2法についての最適化と評価をおこなった。

B. 研究方法

LAMP 法を用いた *Hp^{del}* 検出法の開発

LAMP法は、鎖置換型酵素を使用するため恒温でDNA合成が進み高価な装置が必要無いこと、反応が進むにつれ生じるピロリン酸マグネシウムの白濁により目視で結果が評価可能であるという特長から、主として感染症診断の分野で利用されている診断法である。*Hp^{del}*の欠失点をはさんだ領域 (HP-del) を増幅するプライマーセットと欠失領域に含まれるHP上流域 (HP-5') をそれぞれ特異的に増幅するプライマーセットを専用のソフトウェアである PrimerExplorer Ver.4 (<https://primerexplorer.jp/lamp4.0.0/index.html>) にて選定し、Operon社に合成を依頼した。HP-del用のプライマーは F3, B3, FIP, BIP, LBの5本、HP-5'用のプライマーはF3, B3, FIP, BIP, LF, LBの6本を合成した。配列ならびに位置を表1、図1に示す。なお、loop primer (LF, LB) は、増幅に必須なF3, B3, FIP, BIPの4種の最適な組み合わせが決定した後合成した。反応にはLoopamp DNA

増幅試薬キット、蛍光・目視検出試薬 (栄研化学株式会社) を用い、リアルタイム濁度測定装置Loopamp EXIA (栄研化学株式会社) により*Hp^{del}*検出システムの条件検討をおこなった。専用の8連チューブ (栄研化学株式会社) を用い、濁度の有無は機器と目視の両方法で確認した。25 μ lの反応液中の各プライマーの量は、F3, B3は5 pmol、FIP, BIPは40 pmol、LF, LBは20 pmolを用いた。温度条件は60~65 $^{\circ}$ Cで60 min合成反応した後、80 $^{\circ}$ C 5 minにより酵素の失活をおこなった。反応条件検討用のゲノムDNAは既にハプトグロビン型が分っているサンプルを、さらにリアルタイムPCR法との比較検討対象として久留米大学病院で輸血予定患者の末梢血を用いた。熱変性後の希釈血液は12,000rpm、3 minの遠心後テンプレートとして用いた。増幅産物は、反応液をアガロースゲル電気泳動後にゲルをエチジウムブロマイドで染色後に確認し、さらに増幅産物のバンドをゲルから抽出し、Mighty Cloning Kit (TaKaRa社) を用いてpUC118にサブクローニングし、得られたプラスミドのシーケンス解析によりおこなった。シーケンス反応は反応試薬BigDye Terminators v1.1 Cycle Sequencing Kitでおこない反応産物はエタノール沈殿により精製をおこない ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Life Technologies社) によって泳動をおこなった。プラスミドの配列をシーケンスプライマーとした。

リアルタイム PCR 法 2 法を併用した輸血前血液の *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 法を用いた久留米大学病院患者の輸血前遺伝子診断については前年度通りに実施した。平成 23 年 3 月 31 日までに総計 5286 名について輸血前患者血液の解析をおこなった。

リアルタイム PCR 機器ならびに各種試薬の比較検討

当該補助金によるリース機器である Mx3000P (Agilent technology 社) と、他予算により当講座に導入された LightCycler[®] 480 (Roche Diagnostics 社) を用い機器による検査結果の比較検討をおこなった。

1) TaqMan probe 法

これまで選定後に最適化をしてきた反応試薬である *Premix Ex TaqTM* (Perfect Real Time, TaKaRa 社) に加えて、SsoFastTM Probes Supermix (Bio-Rad 社) を用いて *Hp^{del}* の検出をおこなった。反応試薬検討に伴い、これまで使用してきた 50 mM NaOH により 100 倍希釈した後、熱変性をおこない遠心分離したものに加え、50 mM NaOH により 100 倍希釈しただけのものを鋳型として用いた。温度条件は、*Premix Ex TaqTM* については、Mx3000P を用いた場合、95°C 30 sec の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 30 sec を 45 サイクルで、

LightCycler[®] 480 を用いた場合、95°C 30 sec の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 20 sec を 45 サイクルで実施した。SsoFastTM Probes Supermix では、95°C 2 min の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 30 sec を 45 サイクル (Mx3000P)、95°C 2 min の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 20 sec を 45 サイクル (LightCycler[®] 480) で実施した。反応容量はいずれも 20 µl で、プライマーとプローブの量は従来の方法に従った⁵⁾。

2) SYBR Green I 法

これまで選定後に最適化してきた SYBR[®] *Premix Ex TaqTM* II (Perfect Real Time, TaKaRa 社) に加えて、SsoFastTM EvaGreen[®] Supermix (Bio-Rad 社)、Fast SYBR[®] Green Master Mix (Life Technologies 社)、GoTaq qPCR Master Mix (Promega 社)、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 社)、THUNDERBIRDTM SYBR[®] qPCR Mix (TOYOBO 社) について比較検討をおこなった。鋳型については、TaqMan probe 法と同様、50 mM NaOH により 100 倍希釈した後、熱変性をおこない遠心分離したものに加え、50 mM NaOH により 100 倍に希釈しただけのものを鋳型として用いた。

SYBR[®] *Premix Ex TaqTM* II の反応は、Mx3000P の場合は、95°C 30 sec の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析 (70°C 30 sec, 90°C 30 sec, 0.2°C/sec 以下 Mx3000P では同じ条件) を、

LightCycler® 480 の場合は、95°C 30 sec の熱変性後 95°C 5 sec, 65°C 30 sec を 40 サイクルあるいは 95°C 5 sec, 62°C 30 sec を 35 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析 (70°C 1min, 90°C 30 sec, 4.4°C/sec 以下 LightCycler® 480 では同じ条件) をおこなった。SsoFast™ EvaGreen® Supermix の反応は、Mx3000P、LightCycler® 480 共に、98°C 2 min の熱変性後、98°C 5 sec, 65°C 20 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析をおこなった。Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies 社) は、Mx3000P の場合は、95°C 20 sec の熱変性後、95°C 5 sec, 65°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析を、LightCycler® 480 の場合は、95°C 20 sec の熱変性後、95°C 3 sec, 60°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析をおこなった。GoTaq qPCR Master Mix (Promega 社) は、Mx3000P の場合は、95°C 2 min の熱変性後、95°C 15 sec, 65°C 60 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析を、LightCycler® 480 の場合は、95°C 2 min の熱変性後、95°C 3 sec, 65°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析をおこなった。FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 社) は、Mx3000P の場合は、95°C 10 min の熱変性後、95°C 15 sec, 65°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析を、LightCycler® 480 の場合は、95°C 10 min の熱変性後、95°C 10 sec, 60°C 30 sec を 45 サイクルの増幅反応の後、融解

曲線解析をおこなった。THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社) は、95°C 1 min の熱変性後、95°C 5 sec, 60°C 30 sec を 40 サイクルの増幅反応の後、融解曲線解析を LightCycler® 480 でおこなった。用いたプライマーとその濃度は、既報に従った⁸⁾。

(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上で行っている。

C. 研究結果

LAMP法を用いた Hp^{del} 検出法の開発

LAMP法による検査では、 Hp^{del} の接合領域 (欠失点を挟んだ領域) とコントロール領域 (欠失に含まれる領域) である Hp の上流域の増幅反応を別のチューブでおこなった。ハプトグロビンの遺伝子型が既に分っているゲノムDNAを用い2つの反応の特異性について調べた結果、HP-delの反応では、 HP^{del} のヘテロ接合体 (Hp/Hp^{del}) と Hp^{del} のホモ接合体 (Hp^{del}/Hp^{del}) で濁度の

増加が観察され野生型のホモ接合体 (*Hp/Hp*) では観察されなかった。一方*Hp-5'*の反応では、*Hp/Hp*と*Hp/Hp^{del}*で濁度の増加が観察され、*Hp^{del}/Hp^{del}*で観察されなかった (図2)。さらに、それぞれの産物はアガロースゲル上でラダーを形成し、バンドをゲルから切り出しプラスミドに組み込んで得られたクローンのシーケンス解析で増幅されるべき配列が確認されたことから、それぞれのプライマーセットは標的領域を特異的に増幅していることが確認できた。なお、条件検討の結果最適な増幅はいずれのプライマーセットでも61.5°C前後で得られたことから、以降の反応温度は61.5°Cとした。次に*Hp/Hp^{del}*のゲノムDNAの希釈系列について検出感度について検討したところ、検出限界がHP-delでは0.1 ng、HP-5'では0.01 ngであったことから、この検査の感度は0.1 ngであると判断した (図3)。当該研究では、診断結果が得られるまでの時間と作業を出来るだけ省くため、ゲノムDNAの抽出は実施せず、希釈血液サンプルあるいは同等な簡便な調整法の使用を前提としていることから、ゲノムDNAでの特異的増幅と検出感度を確認した後、鋳型となる血液サンプルの調整法を幾つか試し比較をおこなった。同様の目的で、最近用いられている血液の調整法である水で2倍に希釈し熱変性を行ったもの、水で10倍に希釈し熱変性を行ったもの、*Hp^{del}*のリアルタイムPCR法による診断の鋳型として使っている50 mM NaOH溶液で100倍に

希釈して熱変性を行ったもの、50 mM NaOH溶液で100倍に希釈しただけのもの4つを比較したところ、HP-del、HP-5'のどちらの反応も50 mM NaOH溶液で100倍に希釈しただけのものが比較したものの中では最も良い鋳型となることが分った (図3、表2)。なお、表2に示すように、希釈倍率については、希釈率が低いと濁度の上昇が観察されるが、これは変性タンパクによるものと考えられる。また希釈が高すぎると当然増幅が検出されなくなるが、希釈に用いた数検体では30から1000倍希釈と比較的広範な希釈倍率の血液が利用可能であった。このような希釈血液を直接鋳型とする場合は、白血球由来のゲノムDNAを増幅しているものと考えられ、患者間でその量は当然ばらつくものと考えられることから、確実な増幅のために、本検査法では希釈倍率を100倍とし、以降の実験をおこなった。さらにサンプルの持ち込みによるアルカリの反応への影響を調べる為、反応液中の50 mM NaOH希釈血液量を振って反応をおこなった結果、使用サンプル量に依存した反応阻害が観察され、NaOH濃度は8 mM以内が望ましいという結果が得られた (表2)。輸血前血液100サンプルについて検査を実施した結果、閾値に達するまでの時間の平均値 (SD) は、HP-delで31.9 (3.0) 分、HP-5'では29.8 (2.9) 分であった。さらにLAMP法で得られた遺伝子型の診断結果はリアルタイムPCRを用いた2法と完全に一致し、*Hp/Hp*が93サンプル、*Hp/Hp^{del}*

が7サンプルであった。さらに濁度の増加による測定法の他に、蛍光・目視試薬を反応液に添加し、 Hp/Hp 、 Hp/Hp^{del} 、 Hp^{del}/Hp^{del} の血液サンプルについてLAMP反応をおこなった。その結果、陽性の反応では緑色、陰性の反応ではオレンジ色を呈し、特に紫外線を照射しなくても、色調によって目視での結果の判定が可能であった(図5)。また蛍光・目視試薬はSYBR Green Iなどの蛍光物質とは異なり反応前に添加することが可能であり、反応後キャップを開けることによって生じるコンタミネーションの危険性を回避することが可能である。

リアルタイム PCR 法 2 法を併用した輸血前血液の 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 法を用いて、平成 23 年 3 月 31 日までに久留米大学病院患者総計 5286 名の輸血前遺伝子診断を実施した結果、 Hp^{del} のヘテロ接合体が 180 名、ホモ接合体が 2 名検出された。このデータから算定した Hp^{del} の久留米地区の頻度は約 1.74% であり、以前我々が報告した日本人全体の遺伝頻度 1.5% とほぼ同程度であった。また、原理の異なる 2 法により判定した遺伝子型で結果が一致しない検体は認められなかったことから、これらの診断法の特異性はいずれも 100% であると判断された。

リアルタイム PCR 機器ならびに各種試薬の比較検討

1) TaqMan probe 法

当該研究では、上述の通り血液サンプルを希釈、あるいは同程度の未精製試料を鋳型として用いるため、増幅ならびに蛍光検出に耐える酵素とその他の構成物による試薬は限定され、今回比較できた試薬は 2 種、また機器も 2 種であったが、いずれの試薬、いずれの機器も当該研究目的に利用可能であった。強いて言えば、SsoFast™ Probes Supermix での反応の方がサンプル間のシグナル強度の差が小さく、遺伝子型の座標 (Allelic Discrimination plot) 上で各遺伝子型が散在せず纏まったグループを形成した(図 6)。また、これまでは血液を 50 mM NaOH で 100 倍に希釈し、その後熱変性、遠心分離をおこない、その上清をサンプルとして用いていたが、今回は LAMP 反応で最も成績の良かった 50 mM NaOH で 100 倍に希釈しただけのサンプルを用いてみた。その結果従来通り熱変性、遠心分離をおこなったサンプルでは試薬による差異は小さかったものの、希釈のみおこなったサンプルを用いた場合には、Premix Ex Taq™ では、 Hp の増幅シグナルが極めて微弱で十分に観察されない例が散見されたものの、SsoFast™ Probes Supermix ではそうした例は殆ど認められず、この点がこの試薬の利点であるといえる。一方最終的な結果が得られるまでの時間には両試薬で殆ど差が無かった。機器の比較では、Mx3000P ではまさに“リアルタイム”に各ウェルの結果を反映

する増幅シグナルが観察できることからソフトウェアの使用上のメリットを認めた。

2) SYBR Green I 法

増幅に関しては後述のごとく、THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社) 以外は問題なく認められたものの、その後の融解曲線解析について試薬間の差異が認められた。SYBR® *Premix Ex Taq*™ II については最も融解曲線解析のベースラインが安定していた。また LightCycler® 480 での融解曲線解析では、Mx3000P で *Hp* と *Hp^{del}* 由来のピークの高さが同程度になるように設定したプライマーの濃度比でおこなうと、*Hp* に比べ *Hp^{del}* 由来ピークが低くなったため、アニール及び伸長反応の温度を 65°C から 62°C に下げて実施した結果ピーク比が 1 に近づいたことからアニールの温度を変更した。また増幅が向上したのでサイクルを 40 から 35 サイクルに減らすことが可能になった。SsoFast™ EvaGreen® Supermix では、増幅時の蛍光シグナルは強いもののサンプル間での差が大きく、また Tm 値は他試薬と比較して pH によると思われる変化を大きく受けていた。この結果は、Sso polymerase を用いた TaqMan プロブ法でシグナル強度が均一であったのとは対照的であるが、この理由としては、インターカレーターとして SybrGreenI の代わりに用いている EvaGreen の傾向が血液の成分によっ

て検出時に阻害されている可能性が考えられた。Fast SYBR® Green Master Mix (Life Technologies 社) は、SYBR® *Premix Ex Taq*™ II と比較し、Tm 値は約 6°C 低いが、pH によると思われる影響は最も小さかった。しかしながらベースラインの乱れが大きいこと、ネガティブコントロール反応でのプライマーダイマーと思われる非特異的増幅産物の形成がデメリットとして挙げられた。GoTaq qPCR Master Mix (Promega 社) は、SYBR Green I とは異なるインターカレーター (BRYT™ Green) を利用しており、非常に蛍光シグナルが高く、サンプル間差が小さいものの、pH によると思われる Tm 値の変化は大きかった。FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 社) に関しては、Tm 値は他試薬に比べ低めであり、ゲノム DNA と比較して血液サンプルでの増幅の抑制が大きく、また酵素の活性化に時間を要する為結果が得られるまでの時間が長いという点がデメリットとしてあげられる。一方 THUNDERBIRD™ SYBR® qPCR Mix (TOYOBO 社) はゲノム DNA では問題なく増幅と遺伝子型解析のための融解曲線解析が可能なものの、希釈血液を鋳型とした場合には十分な増幅が認められず、今回の解析には適さないことが示唆された。

機器間での機能的な相違は TaqMan probe 法と同様に認め難いものであったが、LightCycler® 480 では Melt

curve解析でのwellの色分けにより結果が一目瞭然でありソフトウェアでLightCycler® 480に利点が認められた。各製品を用いて得られた結果については図7及び表3に示す。

考察

今年度は、昨年度までに確立したリアルタイムPCR法に基く2つの診断法に加え、LAMP法による Hp^{del} 検出法を確立した。この方法は結果の評価が反応によって生じるピロリン酸マグネシウムの白濁によることから、目視での評価が可能である。また常温で反応が可能でリアルタイムPCR機器などの専用機器が必要無く、初期費用が低く押さえられるため、新興国や離島などでの感染症の遺伝子診断法として注目されている方法である。また検査法も簡便であるため、必ずしも遺伝解析専門のスタッフを必要としない。当該研究計画においても、より広い医療現場での Hp^{del} 診断の実施を目的とし導入したものである。今回条件検討を通し、鋳型となるゲノムDNAの抽出を省略するために現在一般的におこなわれている水で希釈した血液を熱変性し、その後遠心分離をおこなう方法と比べ、血液を50 mM NaOHで希釈しただけの検体は少なくとも同程度の良い鋳型となることが示された。この調整法を導入することにより、熱変性をおこなう為のブロックインキュベーターのような機器、遠心分離装置が不要となり同時に解析に要する時間も短縮することができるこ

とから、さらに簡便で迅速な診断が可能となる。同鋳型調整法は Hp^{del} 以外の遺伝子検査への応用が期待される。他方LAMP法では、TaqMan法のような配列特異的なプローブを用いず、またSYBR Green I法のような融解曲線解析による T_m 値での検定といった産物の評価を伴わず、反応液の混濁度のみから判定する方法であり診断精度は劣るものと考えられる。さらにこれまでに我々が確立したリアルタイムPCRの2法が1サンプルにつき1つのチューブしか必要ないのに対し、2つのチューブが必要であること、プライマーが1つの反応あたり5或いは6つ必要であるという点がデメリットとして挙げられる。したがってLAMP法は、リアルタイムPCR法による診断法に比べ、処理サンプルが少ない場合に適した方法であると考えられる。どの診断法を採用するかについては対象検体数や診断環境等を考慮し選定されるべきであろう。

今年度は、リアルタイムPCRによる Hp^{del} 検査法2法について輸血前患者血を対象とした遺伝子診断を継続して実施した。さらに、これらのサンプルを用い、新規に別予算により導入したリアルタイムPCR機器であるLightCycler® 480とMx3000Pを比較使用をおこなった。LightCycler® 480はMx3000Pに比べ高額な機種であり温度制御に優れていること、ウェル間での温度のばらつきが小さいことが特徴であり反応時間を短くすることが

可能である。我々が実施している *Hp^{del}* 診断に関しては、使用している酵素の性質もあり、解析時間の大きな違いは無く、その他の機器の性能による差異もこれまでの比較検討では認められなかった。一方、以下に記すそれぞれのソフトウェアの特性による違いが感じられた。TaqMan probe 法では、リアルタイムに結果をモニターすることが出来る Mx3000P の方が使いやすく、SYBR Green I 法では、遺伝子型 (Tm 値により判定) によってウェルを色分けして表示できる LightCycler[®] 480 の方が使いやすいという印象であった。

さらに今年度は、近年のリアルタイム PCR 法の急速な普及に伴い販売される試薬の種類が増えたことから、より適したものを探すため、幾つかの試薬を選定し比較検討をおこなった結果、TaqMan probe 法用には、NaOH 希釈後熱変性した血液サンプル以外の使用で観察されていた蛍光シグナルの減弱あるいは無検出が殆ど認められず、サンプル間のシグナル強度差が非常に小さい SsoFast[™] Probes Supermix が優れていることが示された。一方、SYBR Green I 法については、比較対象試薬は多く、また大部分の試薬が使用可能であったものの、これまで使用してきた SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II が最適な試薬であることが示された。

それぞれに特徴がある3つの方法であるが、併用によって決定された遺伝

子型には矛盾するものは観察されておらず、また機器間での結果の矛盾も無く、これら3つの方法は特異性と感度の高い信頼できる診断法であるといえよう。また、いずれの方法でも NaOH で希釈した血液をそのまま鑄型とすることが出来るため、時間、コスト両方の削減を可能にすると考えられる。また LAMP 法に色調による判定法を導入したとしても、いずれも反応後にキャップを開ける必要が無い閉鎖システムで実施可能であり、遺伝子診断で重要な課題である増幅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性を軽減できることから、チップ電気泳動装置等を利用したハイスループットなコンベンショナル PCR 法と比較してもメリットが大きいものと考えられる。

E. 結論

当該年度では、リアルタイム PCR 法による2つの診断法に加え、LAMP 反応による診断法を確立し、3つの方法を比較検討した。市販試薬の比較検討解析などによって全ての方法で 50 mM NaOH で 100 倍に希釈をただけの全血を鑄型とすることが可能になり、更なる時間と手技の軽減が実現できた。抽出した DNA を鑄型として用いコンベンショナル PCR による増幅、電気泳動による判定という方法では約 5 時間を要した遺伝子検査が、これらの方法を用いることにより、採血から 1 時間~1 時間半で診断できるようになった。また、リアルタイム PCR

機器による結果にも矛盾は無く、温度等の条件が幅広い機器で使用可能であることが示唆された。輸血前診断のデータの蓄積から、久留米地区における Hp^{del} を原因とするハプトグロビン欠損症（先天性無ハプトグロビン血症）患者の頻度は 3300 人に 1 人程度と推定され、決して頻度の高いリスク変異ではないといえる。また、遺伝子検査であるため、倫理面での問題もあり担当医、輸血スタッフの負担など考慮すべき問題は多いものの、オーダーメイド医療が目指される今後においては、悪性新生物の体細胞変異検出や輸血医療分野ではウイルス検出のための核酸増幅検査（Nucleic Acid Amplification Testing）とは異なり遺伝的欠損症は生涯に一度の検査を行えばよいことから、非常に有効な検査項目であると考えられる。また、参考資料 3 に記載のように、献血時のスクリーニングでハプトグロビン欠損（無ハプトグロビン血症）であることが判明している妊婦については、計画的に洗浄赤血球の使用がおこなわれている例も報告されている。 Hp^{del} は我が国を初め東アジア、東南アジアに分布しこれらの地域では Hp^{del} を原因とした輸血後アナフィラキシーショックの危険性がある（参考資料 4）。当該研究計画により確立した診断法が導入され、一人でも多くのハプトグロビン欠損症患者が重篤な輸血後副作用を未然に回避されることを期待している。

参考文献

1. 嶋田英子, 伊佐和美, 前田伊規子, 他: ハプトグロビン欠損者検出のための簡便な ELISA 法の開発. 日本輸血細胞治療学会誌, 52: 493—500, 2006.
2. Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, et al: The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. Am J Hum Genet, 62:245-252, 1998.
3. Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al: Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaptoalbuminemic patients with anti-haptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. Blood, 95:1138-1143, 2000.
4. 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.
5. Soejima M, Koda Y: Rapid real-time PCR detection of HP^{del} directly from diluted blood samples. Clin Chem, 54:1095-1096, 2008.
6. Soejima M, Koda Y. TaqMan-based real-time PCR for genotyping common polymorphisms of haptoglobin (HP^1 and HP^2). Clin Chem, 54: 1908-1913, 2008.
7. Nakamura H, Soejima M, Munkhtulga L, Iwamoto S, Koda Y. Haptoglobin polymorphism in Mongolian population: comparison of the two

genotyping methods. Clin Chim Acta, 408:110-113, 2009.

8. Soejima M, Tsuchiya Y, Egashira K, et al: 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, 50:1322-1327, 2010.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

Soejima M, Egashira K, Kawano H, Kawaguchi A, Sagawa K, Koda Y. Rapid Detection of Haptoglobin-Gene Deletion in Alkaline-Denatured Blood by Loop-Mediated Isothermal Amplification Reaction. J Mol Diagn. May;13(3):334-339, 2011.

神田芳郎、副島美貴子、川野洋之、江頭弘一、佐川公矯 輸血副作用原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの輸血前診断法の検討（第58回日本輸血・細胞治療学会座長推薦論文）日本輸血細胞治療学会誌, 57(1):34-38, 2011.

2. 学会発表

神田芳郎、川野洋之、江頭弘一、佐川公矯. 輸血副作用原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの輸血前診断法の検討. 第58回日本輸血・細胞治療学会. 2010; 名古屋.

副島 美貴子、神田芳郎. 輸血副作用原因遺伝子ハプトグロビン欠失アリの輸血前診断. 第94次日本法医学会学術全国集会. 2010; 東京.

H. 知的財産権の出願・登録状況

なし。

別表参照

- 図1 LAMP 反応に用いたプライマーの位置
- 図2 LAMP 反応における反応の特異性
- 図3 LAMP 反応における反応の検出感度
- 図4 LAMP 反応におけるさまざまな試薬調整法の影響
- 図5 LAMP 反応への蛍光試薬の導入
- 図6 TaqMan probe 法における反応試薬間の結果の相違
- 図7 SYBR Green I 法における反応試薬間の結果の相違

表1 LAMP 反応に用いたプライマー
の配列

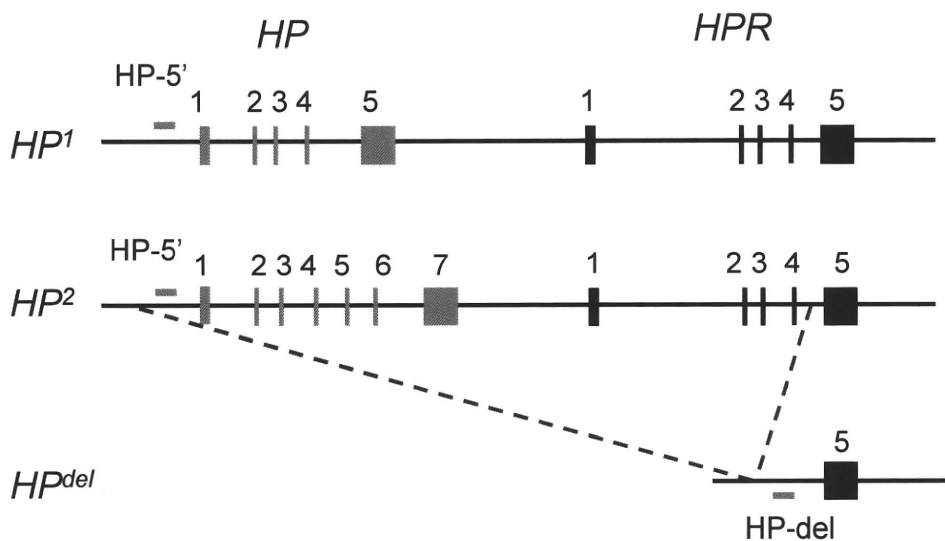
表2 LAMP 反応における各種鋳型を
用いて得られた閾値濁度に達
するまでに要する時間

表3 SYBR Green I法における反応試
薬間の結果の相違

(参考資料)

1. 神田芳郎、川野洋之、江頭弘一、
佐川公矯. 輸血副作用原因遺伝子
ハプトグロビン欠失アリの輸血
前診断法の検討. 第58回日本輸
血・細胞治療学会. 2010; 名古屋.
2. 神田芳郎. LAMP法を用いた輸血
副作用原因遺伝子 HP^{del} の検出. 平
成22年度厚生労働科学研究費補助
金輸血関連研究班第2回合同班会
議. 2011; 東京.
3. 松本玲央奈ら, ハプトグロビン欠
損症合併妊娠の分娩管理に対する
考察. 日産婦関東連会誌. 第47巻3
号342頁
4. HP^{del} の地理的な分布

別表



HP-del

F3

GTCAGATATAAATGTTTTGTACCTCCTTTGTTCAAGTGTGCTCTTGTCTTTGTTCCATCTGTGATG

F2

Flc

GGCACCTTTCTGCAGAAAGTAAAAATTGCCTTGCTGAGAGAATTAAATTTATGTTCAAGTGCTAT

TTCTTTATGGCACTGGGGAACAAGCATTTTGCATTTCTAACAGATGAAAAGGTTAGGCCAAAAAAT

B1c

Junction

LB

B2

TCTATATAAAGAATGATCAAAATTTGGAAAGGCTCTTGACATTTCCACTCACGAGTGTCTTGCTCT

B3

CCTTGACAGTATGTGGGAAGCCCAAGAATCCGGCAAACCCAGTGCAGCGGATCCTGGGTGGACACC

HP-5'

F3

F2

LF

ACAAGGTGGAGAAAATTACTGTGAAAAGGAAGTACTTTCTTTAGAGCCCCACCTAAGCTAGGCTGC

Flc

B1c

AGAAATGTCTACAATGGGTTTGAAAAAATCAAAATGAGCCTTTCTGCAGTGTGAAAATCCTCCAA

LB

B2

GATAAAGAGACAGATTGATGGTTCTTCCGCGCCCTGTCCTGCCAGTTGCTGATTTTCAGGAAAT

B3

ACTTTGGCAGTTTGTGGGTCATAGAGTTGCCAGGTTTCTTGGGATTTGTAATAGAACATCACAAG

図1 LAMP反応に用いたプライマーの位置

ターゲット領域の場所（上）とプライマーの位置（下）

“Junction”は欠失の接合点を示している。HP5'は Hp^{del} では欠失している Hp exon 1 の上流域を増幅するプライマーセットで、HP-del は Hp^{del} の欠失点周辺を増幅するプライマーセットで Hp^{del} でなければ増幅困難である。

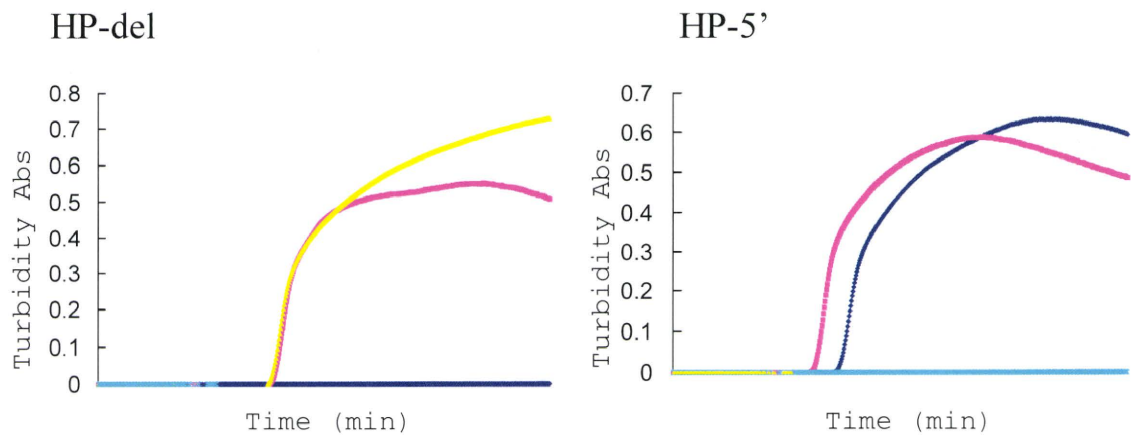


図 2 LAMP 反応における反応の特異性

遺伝子型がわかっているゲノム DNA を用いた。反応が配列特異的に進んでいることが示された。

Hp/Hp: — (yellow) *Hp/Hp^{del}*: — (pink) *Hp^{del}/Hp^{del}*: — (black) Negative control: — (blue)

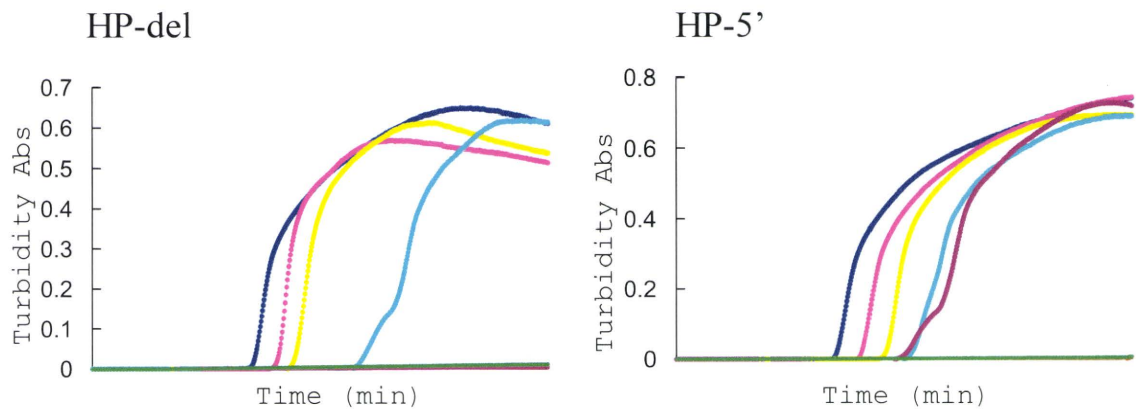


図 3 LAMP 反応における反応の検出感度

0.001~100 ng/反応の *Hp/Hp^{del}* ゲノム DNA を使用した。HP-del では 0.1 ng、HP-5' では 0.01 ng が検出限界であり、この診断法の検出感度は 0.1 ng と判断した。

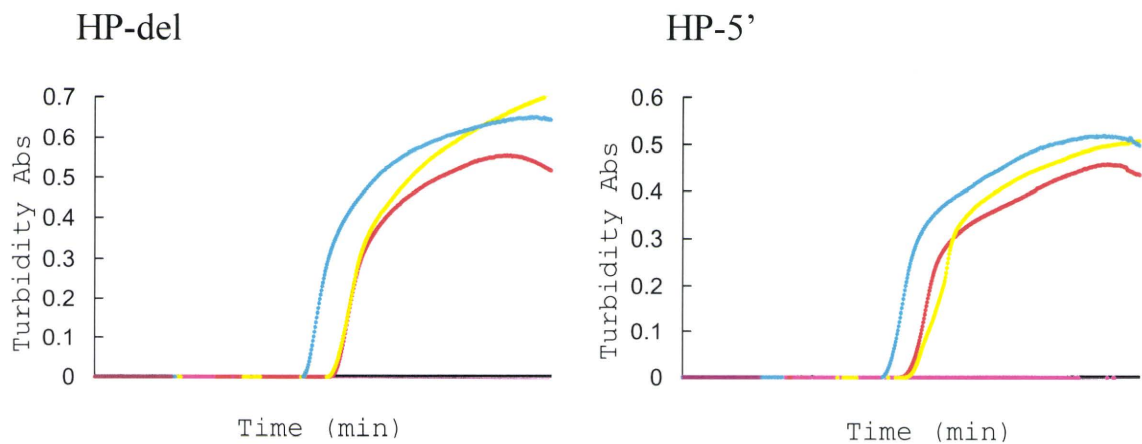


図 4 LAMP 反応におけるさまざまな試薬調整法の影響

水で 2 倍希釈後熱変性: — 水で 10 倍希釈後熱変性: —
 50 mM NaOH で 100 倍希釈後熱変性: — 50 mM NaOH で 100 倍希釈: —

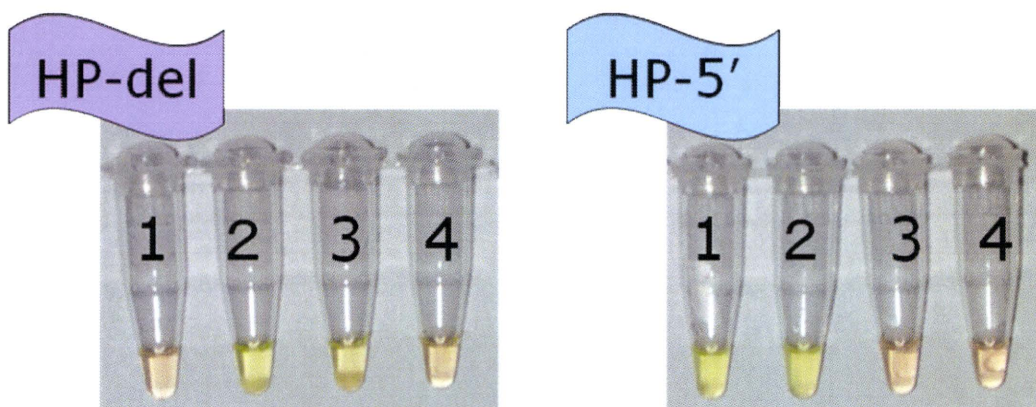
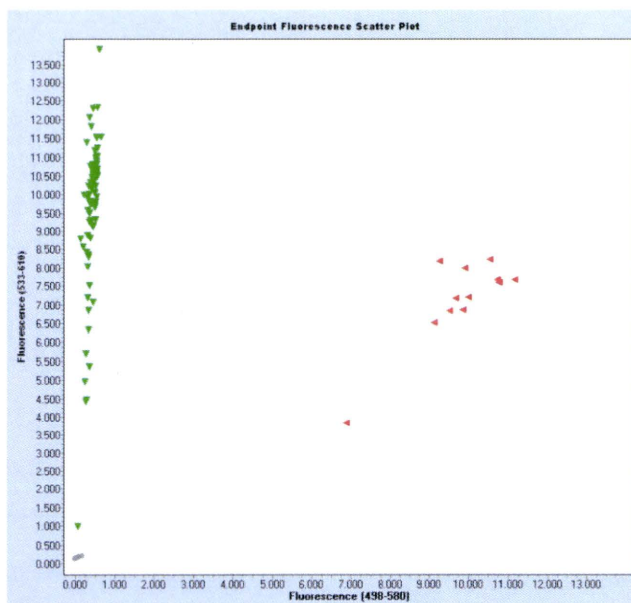


図 5 LAMP 法への蛍光試薬の導入

蛍光試薬を反応液に添加しておくことにより、緑は陽性、オレンジは陰性で濁度のみならず色調の変化によっても結果の判定が可能になった。

1: Hp/Hp , 2: Hp/Hp^{del} , 3: Hp^{del}/Hp^{del} , 4: Negative Control

1. Premix Ex Taq (TaKaRa)



2. SsoFast Probes Supermix (Bio-Rad)

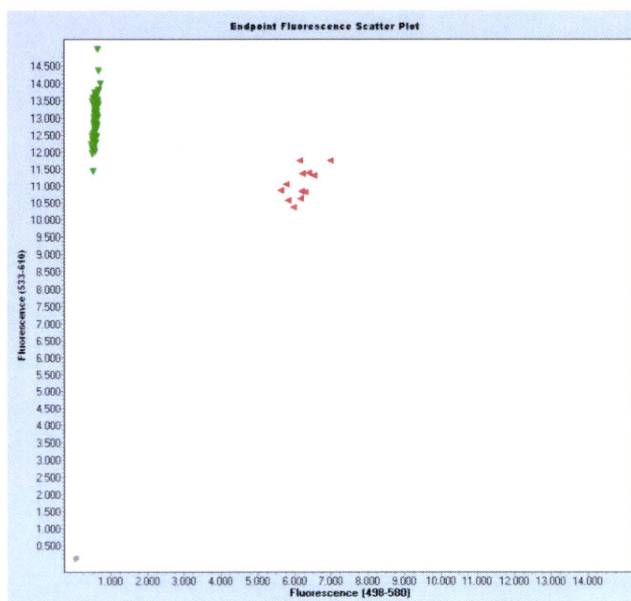


図 6 TaqMan probe 法における反応試薬間の結果の相違

LightCycler[®] 480 での結果を示す。SsoFast Probes Supermix を用いた方がサンプル間のシグナル強度が揃いそれぞれの遺伝子型がグループを形成しているのが分かる。