

図7 SYBR Green I 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。1: Fast SYBR[®] Green Master, 2: GoTaq qPCR Master Mix, 3: SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (anneal temp. 65°C, 40 cycles), 4: SYBR[®] Premix Ex TaqII (anneal temp. 62°C, 35 cycles), 5: SsoFast[™] EvaGreen[®] Supermix, 6: FastStart Universal SYBR Green Master (ROX), 7: THUNDERBIRD[™] SYBR[®] qPCR Mix.
4の結果が最も安定している。

表 1 LAMP 反応に用いたプライマーの配列

Set for <i>HP^{del}</i>	Primer sequence (5' to 3')
(HP-del)	
F3	TGCTCTTGTCTTTGTCCA
B3	CCACATACTGTCAAGGAGAG
FIP (F1c + F2)	GCCATAAAGAAATAGCACTTGAACATGCAGAAAAGTAAAAATTGCCT
BIP (B1c + B2)	GGCCAAAAAATTCTATATAAAGAATGATCAGACACTCGTGAGTGGAA
LB	GGAAAGGCTCTTGCA
Set for 5' region of <i>HP</i>	
(HP-5')	
F3	GGAGAAAATTACTGTGAAAAGGA
B3	TCTATGACCCACAAACCTG
FIP (F1c + F2)	GCTCATTTTGAGTTTTTTCAAACCCTACTTTCTTTAGAGCCCCAC
BIP (B1c + B2)	TGCAGTGTGAAAATCCTCCAAGATTCCTGAAATCAGCAACTGG
LF	ACATTTCTGCAGCCTAGCTTAG
LB	AAAGAGACAGATTGATGGTTCCTG

それぞれの場所は図 1 に示す。

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

Sample preparation	Mean (SD) Tt value (min)	
	HP-del	HP-5'
Detection limit of purified DNA		
100 ng	24.9 (4.0)	23.7 (2.4)
10 ng	26.8 (4.2)	26.3 (2.8)
1 ng	30.9 (5.5)	30.0 (4.0)
0.1 ng	39.5 (5.3)	33.0 (5.4)
0.01 ng	-	32.7 (5.4)
0.001 ng	-	-
Serial dilution by NaOH		
1:10	*	*
1:30	28.6 (1.5)	29.9 (2.4)
1:100	34.0 (3.7)	32.6 (3.9)
1:300	41.5 (10.1)	37.4 (2.5)
1:1000	45.8 (9.2)	37.9 (7.9)
1:3000	*	*
Water- or NaOH-diluted with/without heat		
× 2 with water and heat	31.8 (3.3)	33.3 (4.5)
× 10 with water and heat	-	*
× 100 with NaOH and heat	35.7 (4.0)	36.7 (5.4)
× 100 with NaOH	31.4 (2.9)	32.2 (5.1)
Serial proportion of NaOH		
1	33.5 (1.0)	35.4 (6.4)
2	35.4 (2.3)	36.0 (3.9)
4	42.4 (2.8)	42.8 (8.4)
8	-	-

-は濁度が観察されなかったサンプルを、*は濁度が常には観察されなかったサンプルを示す。Tt: Threshold time (閾値の濁度に達するまでの時間)

表3 SYBR Green I法における反応試薬間の結果の相違

試薬	MX3000P				LightCycler® 480 (LC480)			
	項目	全体 シグナル強度	HPdel シグナル強度	HP シグナル強度	項目	シグナル強度	HPdel シグナル強度	HP シグナル強度
SYBR Premix Ex Taq II (TaKaRa)	血液	4000~8000	500	700~900	血液	12~24	79.5	83.7
	DNA	12000	650	1200	DNA	30	80.2	84.5
	ダイマー				ダイマー			
	特徴	Melt curve analysis でベースラインが最も美しい。LC480 では Tm 解析で解析可。血液のシグナル比、65°Cでは HPdel:HP = 1:2.5 であり、機種間で HPdel と HP のピーク比が異なるも、62°Cにすると 1.5:2 程度になる。						
300~1100	77.4							
	血液	3000~8000	400~1100	シグナル強度	血液	15~22	74	78
	DNA	10000	1300	900	DNA	40	74	78
	ダイマー				ダイマー			
特徴	Tm は低い、血液とゲノム間の差が小さい。Melt curve analysis の温度設定は変更(60°Cから)すべき。Melt curve analysis では低いところのベースラインが乱れている印象。血液のシグナル比、HPdel:HP = 2700:2300							
Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)	項目	全体	HPdel	HP	項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	3000~10000	600	400~1600	血液	7~37	78.5	82
	DNA	12000	1300	1600	DNA	40	79	83
	ダイマー				ダイマー			
特徴	シグナルは強い、Tm は Ex とほぼ同等でサンプルの pH に影響は受ける。LC480 で血液のシグナル比 HPdel:HP = 1750:1500 と同等。増幅はサンプル間で異なる。							
GoTaq qPCR Master Mix (Promega)	項目	全体	HPdel	HP	項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	18000~30000	シグナル強度	シグナル強度	血液	25~40	78.5	82.5
	DNA	24000	2000	3000	DNA	50	79.8	84
	ダイマー				ダイマー			
特徴	増幅が良いというより、蛍光シグナル強く鈍型の影響を受けない。Tm は Ex と同等でサンプルの pH に影響は受ける。LC480 で血液のシグナル比 HPdel:HP = 4000:6500、Tm 解析で解析可能。							
Fast Start Universal STBR Green Master (ROX) (Roche)	項目	全体	HPdel	HP	項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	300~3000	シグナル強度	シグナル強度	血液	10~15	73.5	78.5
	DNA	10000	800	1600	DNA	45	74	79.5
	ダイマー				ダイマー			
特徴	増幅が悪いいため、LC480 では 45 サイクルに設定するも既にプラトーに達している。LC480 で、Melt curve analysis の分離悪い。血液のシグナル比 HPdel:HP = 0.5:1.5							

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.

1.

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

久留米大学
神田芳郎、川野洋之、
江頭弘一、佐川公矯

2.

研究の目的

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Hp遺伝子(Hp)欠失 Hp^{del} のホモ接合体によるハプトグロビン(Hp)欠損症が最も高頻度(約4000人に1人)に認められる。今回我々はリアルタイムPCRを用いた Hp^{del} の迅速診断法2法を確立しその有用性と妥当性について比較検討をおこなった。

3.

方法

鋳型：100倍希釈末梢血を利用(DNA抽出を省略)

解析：

2種類の TaqMan probeを用いた方法(TaqMan法)

SYBR green Iをインターカラーターとして用い融解

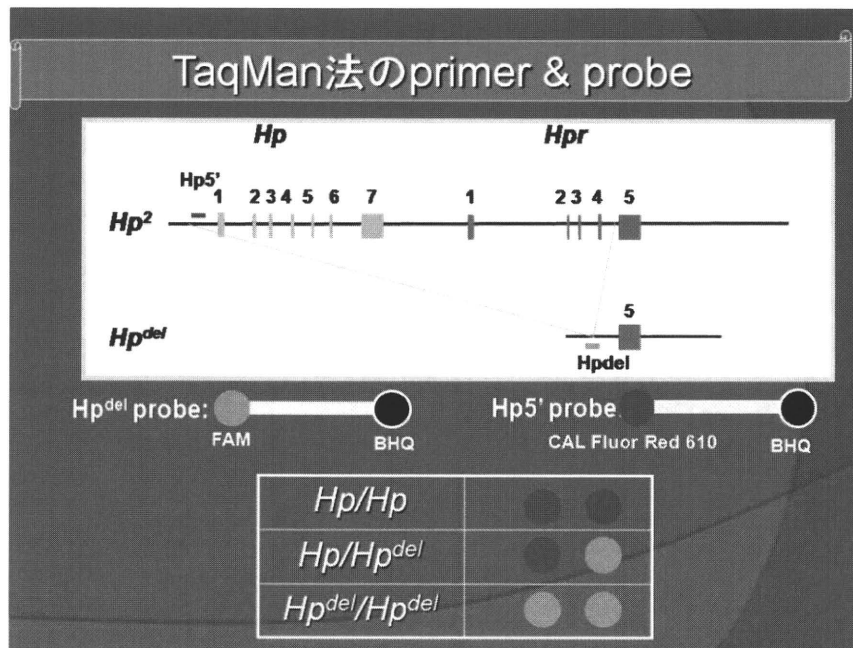
曲線により産物の評価をおこなう方法(SYBR法)

の2法を実施し比較

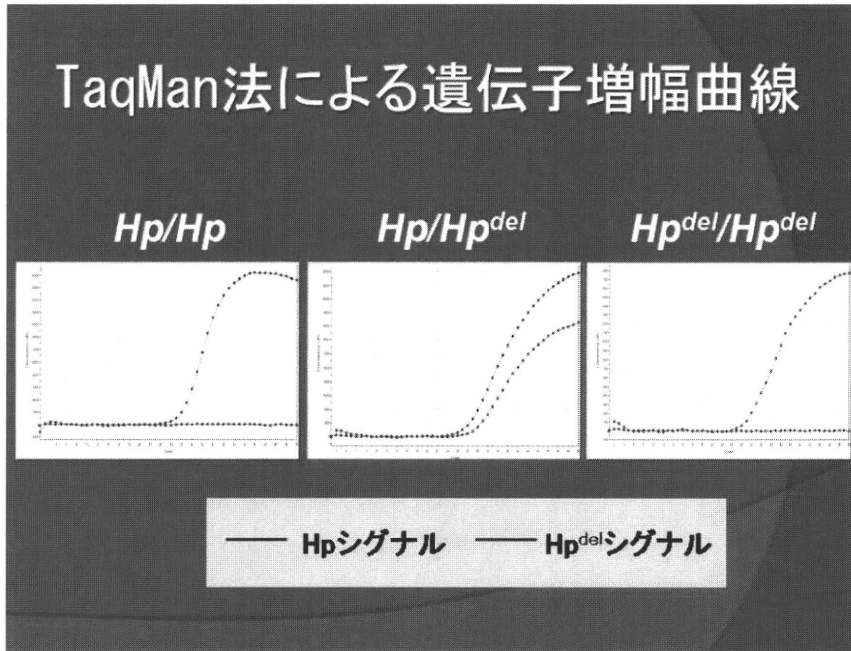
使用機器：Mx3000P (Stratagene)

1時間程度で診断が可能

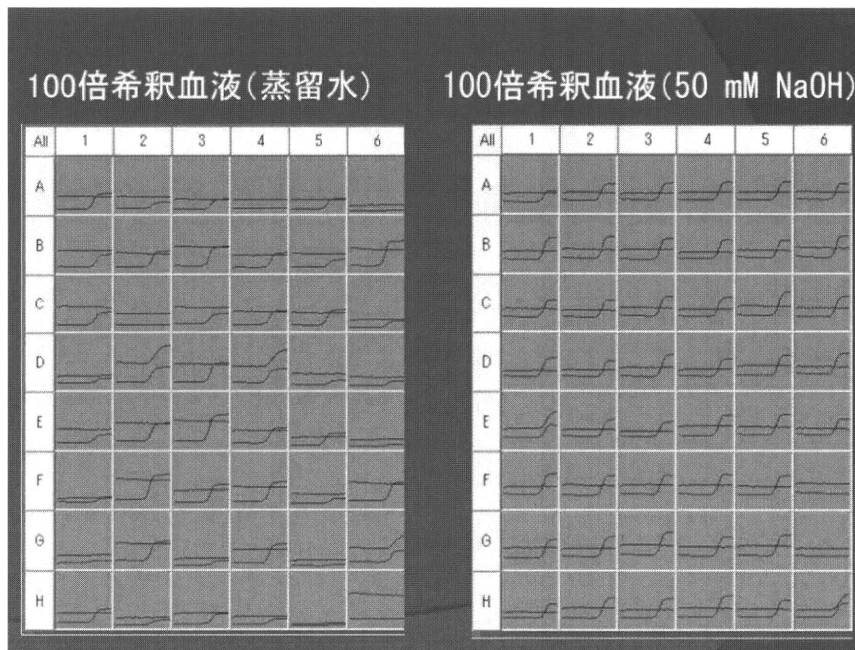
4.



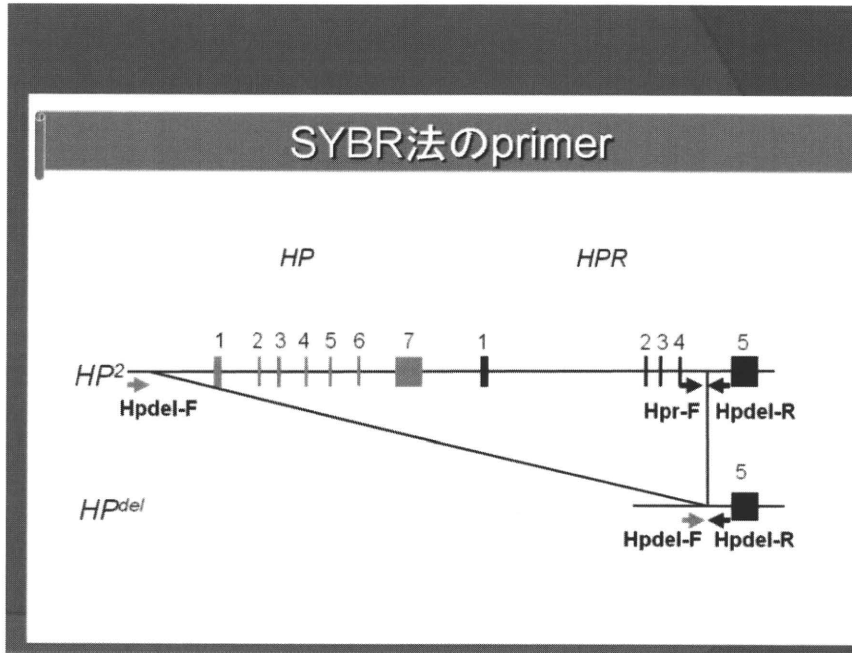
5.



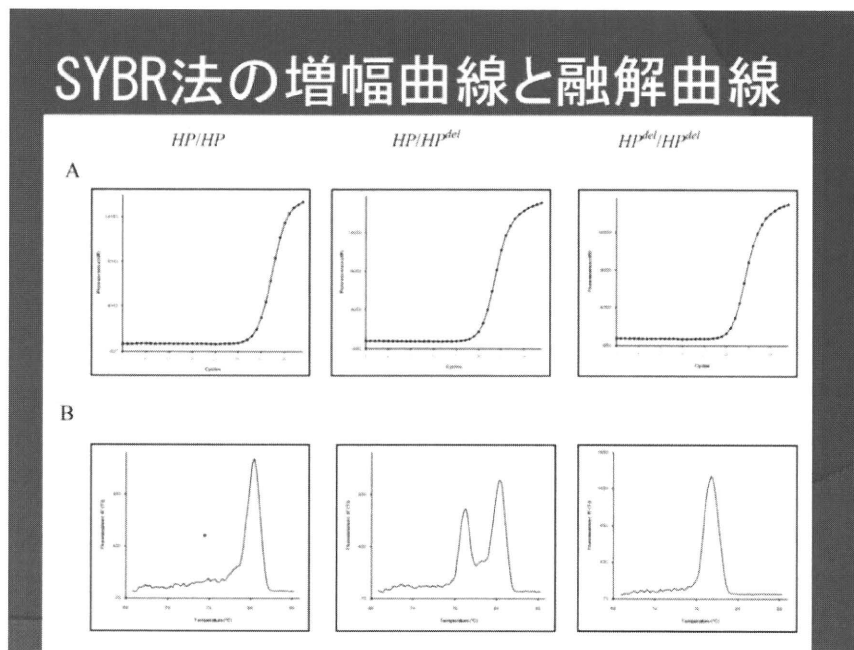
6.



7.

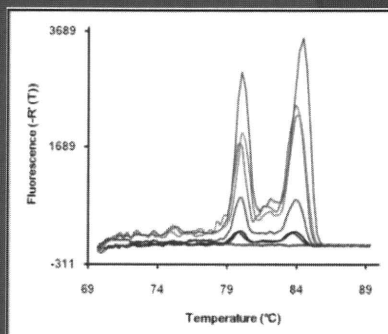
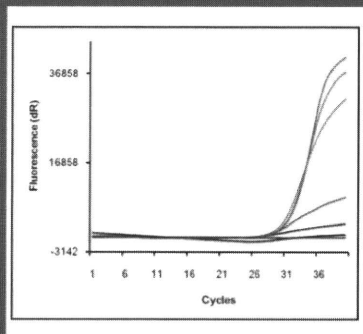


8.



9.

血液を直接鑄型にした場合の増幅曲線と融解曲線



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)

64倍から1024倍で蛍光シグナル強度の阻害が少なく十分な増幅が認められた。

10.

リアルタイムPCRによる Hp^{del} 診断法の比較

- ◎ 2437検体が終了し、全例で両法の結果が一致した。
- ◎ 75の Hp^{del} allelesを検出した(73人のヘテロ接合体と1人のホモ接合体、ホモ接合体は遺伝子頻度から約4200人に1人と推定される)。
- ◎ 両法とも臨床診断に利用可能である。
- ◎ ① TaqMan法は増幅シグナルそのものが結果に一致するため反応中に診断結果を予想でき、結果を自動的に解析できること、
② SYBR法は高価な蛍光プローブが必要無く初期費用が低いこと、
がそれぞれメリットとして挙げられる。

参考資料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.

1.

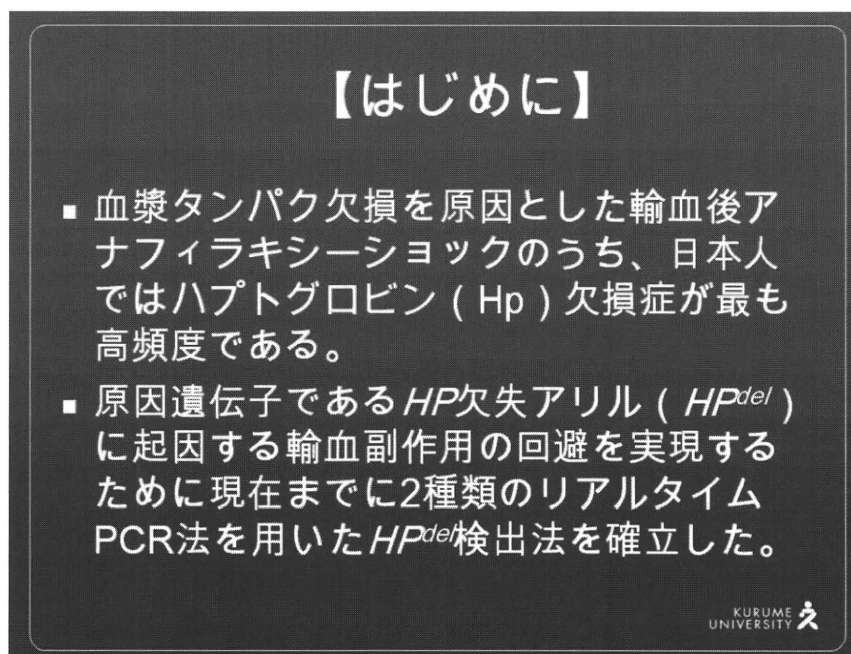


LAMP法を用いた輸血副作用
原因遺伝子 HP^{del} の検出法

神田 芳郎
久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座


 久留米大学
KURUME UNIVERSITY

2.



【はじめに】

- 血漿タンパク欠損を原因とした輸血後アナフィラキシーショックのうち、日本人ではハプトグロビン (Hp) 欠損症が最も高頻度である。
- 原因遺伝子である HP 欠失アリル (HP^{del}) に起因する輸血副作用の回避を実現するために現在までに2種類のリアルタイムPCR法を用いた HP^{del} 検出法を確立した。

KURUME UNIVERSITY 

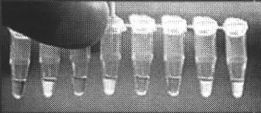
3.

【研究の目的】


リアルタイムPCR機器を必要としない臨床現場での輸血前血液の検査を目的としLAMP (Loop-mediated isothermal amplification) 法による HP^{del} 検出法を確立する。

LAMP法のメリット

ウイルス、細菌検査に使用されている。



1. 装置は恒温槽のみで十分である。
← 恒温 (60~65°C) でDNA増幅が進む。
2. 結果は目視で判定可能である。
← 反応で生じるピロリン酸マグネシウムが白濁する。

KURUME UNIVERSITY 

4.


【方 法】

サンプル: 久留米大学病院で輸血予定患者の末梢血

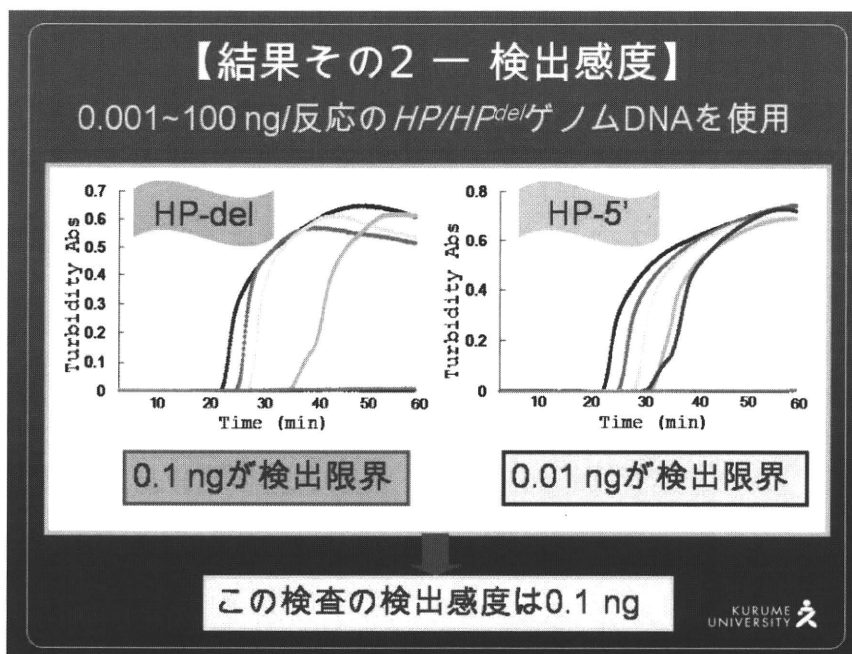
LAMP反応

HP^{del} と $HP5'$ 領域増幅用のそれぞれのプライマーセット、Loopamp DNA増幅試薬キット、リアルタイム濁度測定装置Loopamp EXIA (栄研化学) を用い、60~65°Cで60分反応後80°C5分の処理により酵素を失活した。結果は装置と目視の両方でおこなった。

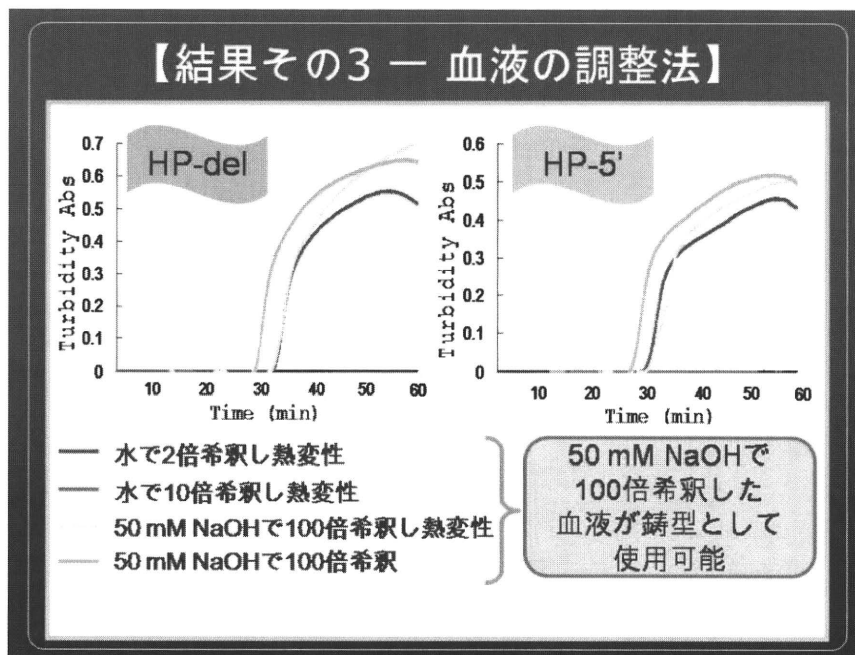
本研究計画は久留米大学倫理委員会の承認を得て実施した。

KURUME UNIVERSITY 

7.



8.




9.

【結果その4 — 輸血前血液】

輸血予定患者血液100サンプルを50 mM NaOHで希釈したものを鑄型としてLAMP反応を実施

- 93名が *HP/HP*、7名が *HP/HP^{del}*
- 閾値の濁度に達する時間の平均値(SD)は
HP-del: 31.9 (3.0)分, HP-5': 29.8 (2.9)分
- 結果はリアルタイムPCRを用いた2法と完全に一致

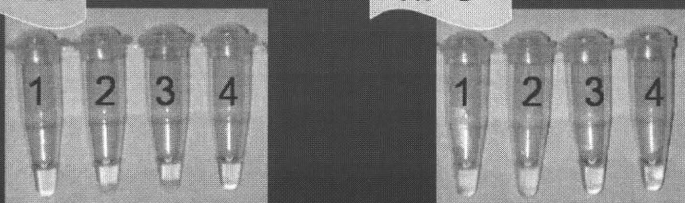
KURUME UNIVERSITY 

10.

【結果その5 — 色調の変化による判定】


反応前に蛍光目視試薬を添加し反応後観察

HP-del HP-5'



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

↓

緑は陽性、オレンジは陰性
色調の変化によっても結果の評価が可能 

11.

【考察 - 1】

リアルタイムPCR法との比較


長 所

1. 必要な装置は恒温槽のみである。
2. 目視で確認可能である。

短 所

1. 2本のチューブが必要である。
2. ハイスループット解析には適さない。

医療現場で利用可能

KURUME
UNIVERSITY 


12.

【考察 - 2】

血液を50 mM NaOHで希釈する
だけで鑄型として使用できる。

↓

他の核ゲノム遺伝子型検査への応用の可能性

KURUME
UNIVERSITY 

参考資料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

342

日産婦関東連会誌第47 巻3号

78 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

東京大学産婦人科

○松本玲央奈, 保谷茉莉, 梁井葉子, 永松健, 兵藤博信, 大須賀穰, 亀井良政, 藤井知行, 上妻志郎, 武谷雄二

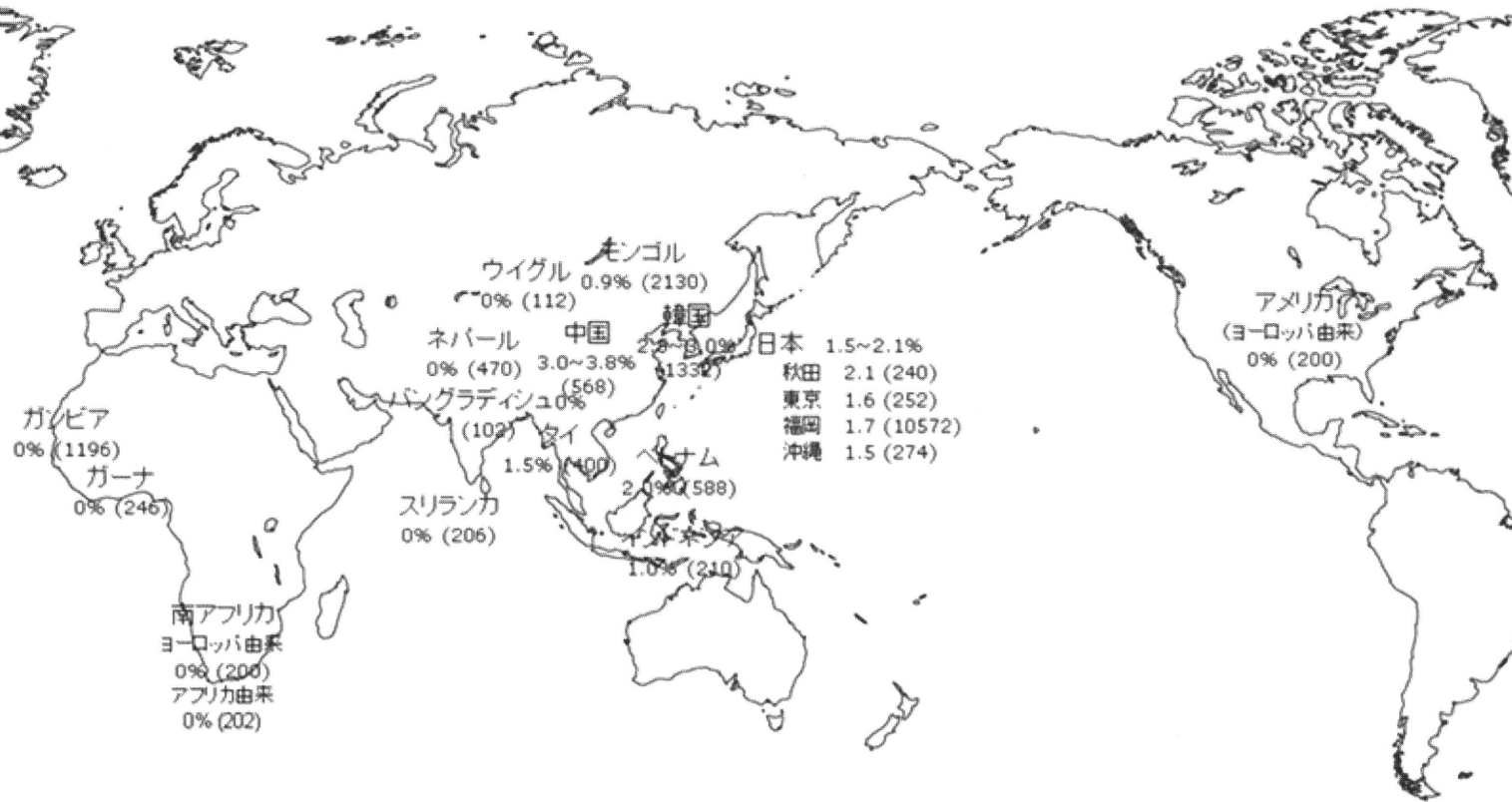
【緒言】ハプトグロビン欠損症の頻度は日本人では約4000 人に1 人である. 多くは無
症状であり, 健診などで偶然発見されるケースが多い. しかし, 輸血時においては, ア
ナフィラキシー・ショックが報告されている. 輸血後アナフィラキシー・ショックの原
因として, 日本人ではハプトグロビン欠損症によるものが最も多い. 今回ハプトグロビ
ン欠損症合併妊娠を経験した. 分娩準備について考察を加え, 報告する.

【症例】30 歳, 2 経妊0 経産. 23 歳時,
献血のスクリーニングでハプトグロビン欠損症と指摘された. これまで症状は特になか
った. 28 歳時, 子宮外妊娠手術の際, 輸血を行ったが, 洗浄赤血球を使用して問題な
く経過した. 今回, 自然妊娠. 他院で妊婦健診を受けていたが, 33 週時, 切迫早産の
ため入院. 33 週4 日切迫早産の症状が増悪したため, NICU のある当院へ母体搬送とな
った. 36 週3 日, 輸血部技師不在の夜間に陣発したが, 順調に進行し, 36 週4 日経膈
分娩となった. 出血量は55 ml であった.

【結語】ハプトグロビン欠損症患者に対しての輸血においては, 生理食塩水による洗浄
赤血球や, 洗
浄血小板の輸血を行うことにより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. しかしながら, 洗浄赤血球の入手にあ
たっては, 血液センターにあらかじめ注文するか, もしくは技師による操作が必要であ
る. そのうえ, 洗浄赤血球の使用期限は24 時間と短い. そのため分娩準備として, 自
己血貯血が有効と考えられる. 今回は順調な分娩で, 輸血は不要であったが, ハプトグ
ロビン欠損症合併妊娠の患者に対しては, 早い段階から, 計画的な管理が必要である.

参考資料4

Hp^{del} の地理的な分布



現在までに当研究室、他グループによって調べられた集団についての結果。 Hp^{del} の遺伝子頻度（染色体数）で示す。 Hp^{del} は東アジア、東南アジアに分布している。

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 公矯 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、わが国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。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に寄与することを目的とする。そのためには、迅速、低コストで、遺伝子解析非専門技師でも実施・評価が可能な解析法の開発と、臨床応用に向けた倫理的な問題解決が不可避である。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、適宜ミーティングにより検査の最適化をおこなった。またこれに先立ち臨床現場で起こりうる諸問題について考察をおこなった。

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とされている。しかしながらウイルス等の感染性副作用についてはその対策が重要であり、重点的な研究・管理がなされている。一方、感染によるもの以外では免疫学的副作用が知られており、このうち現在では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。したがって安全な輸血医療をおこなうためには、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も重要なものと考えられる。

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、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。

当該研究の目的は、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し、わが国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。臨床検査部輸血検査室グループの役割は、研究代表者である神田芳郎久留米大学教授らによって開発された Hp^{del} の診断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管理等の供与に関わる手順の最適化と、検査法が臨床現場で利用可能か否かを評価、さらに無ハプトグロビン血症患者であると診断された場合の本人、主治医への情報の還元、遺伝子診断を実施するための倫理的な問題を克服するための提案、助言をおこなうことである。

B. 研究方法

当該年度も昨年度に引き続き、輸血前血液についての Hp^{del} の遺伝子検査を実施した。具体的な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のうち全血（昨年度に、検査結果のばらつきを回避する目

的でバッフィーコートから変更されたもの。）約 300 μ l を 1.5 ml のエッペンドルフチューブに移し、匿名化符号（サンプル番号）を黒マジックでキャップに記載するという方法を採用した。45 サンプル集まった時点で、神田研究室に電話連絡し輸血検査室にスタッフが来室した際検査室スタッフが直接手渡しした。

なお、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。

検査にあたって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、改善点等についてミーティングあるいは電話により議論を行った。

平成 23 年 3 月 31 日までに 5286 名の輸血前患者について血液の供与をおこなった。

（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 μ 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行っている。

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た。研究終了時（平成 23 年 3 月 31 日）までに、5286 名について検査を実施し、輸血副作用が問題となる無ハプトグロビン血症患者つまり Hp^{del} のホモ接合体は 2 名見出され、180 名の Hp^{del} ヘテロ接合体が検出された。2 名の Hp^{del} のホモ接合体の患者はいずれも術前患者で輸血予定であったが結局輸血は必要性がなくなり施行されなかった。

D. 考察

当該年度の我々輸血検査室では血液試料の供与に加えて、開発されたリアルタイム PCR 法に基づく 2 法ならびに新たに開発された LAMP 法による検査法について評価を行った。グループ内の複数の技師による評価では、多数検体を処理する必要がある場合には、リアルタイム PCR 法が適しており、LAMP 法では 1 ないし 2 サンプル程度の処理が適していること、また、いずれの方法も DNA の抽出を必要とせず、簡便で負担の少ない方法であるという見解で一致した。今後 Hp^{del} の輸血前診断を標準化するためには、 Hp^{del} のホモ接合体と判定された患者への告知については、遺伝情報であり

非常にデリケートな問題であるということ認識しておくべきである。したがって、告知のタイミング、方法等、主治医との関係、検査部の役割等について標準化を図ってゆくことが今後の重要な問題であると考えている。

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研究計画終了までに 5286 名について検査を実施した。当該研究計画により開発された Hp^{del} 検査法はいずれも簡便で負担の少ない方法であると評価した。

F. 健康危険情報

なし