

201034005B

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20年度～22年度 総合研究報告書

研究代表者 神田 芳郎

平成23（2011）年5月

## 目 次

### I. 総合研究報告

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 ----- 1

総括研究報告 神田 芳郎

(資料 1) 久留米大学医学会雑誌. 2008 第 71 卷 (3, 4 号) : 127-133. 別刷

(資料 2) Clin Chem. 2008 Jun;54(6): 1095-1096. 別刷

(資料 3) 日本輸血・細胞治療学会誌, 2008; 54: p137, 福岡. 要旨

(資料 4) 日本法医学雑誌. 2008; 62: p64, 長崎. 要旨

(資料 5) 日本DNA多型学会第17回学術集会, 2008, 東京. 要旨

(資料 6) 第 57 回日本法医学会九州地方会, 2009; 佐賀. presentation file

(資料 7) 第 20 回国際輸血学会アジア部会, 2009; 名古屋. ポスター

(資料 8) 平成 21 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, 2010; 東京. presentation file

(資料 9) 第 58 回日本輸血・細胞治療学会, 2010; 名古屋. presentation file

(資料 10) 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. presentation file

(資料 11) 日産婦関東連会誌. 第 47 卷 3 号 342 頁. 要旨

(資料 12) 未公開データ ( $HP^{del}$  の地理的な分布)

分担研究報告 佐川 公矯

II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----100

III. 研究成果の刊行物・別刷 -----102

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)

総合研究報告書

「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。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、初年度に血液を直接試料とした TaqMan プローブを用いたリアルタイム PCR 法を、次年度に SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR 法を確立し、平成 21 年 1 月から平成 23 年 3 月まで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。さらに最終年度には、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。これら 3 種の診断法はいずれも特異性、感受性共に 100% であり、さまざまな臨床現場において利用可能で非常に有効な診断法であると考えられ、対象検体数や診断環境等を考慮し選定することが可能である。

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<sup>1)</sup>、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、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(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<sup>2)</sup>。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(図2参照)<sup>3)</sup>。

$Hp^{del}$ 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<sup>4)</sup>。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<sup>3)</sup>。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 $Hp^{del}$ の輸血前診断を実施すれば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<sup>3)</sup>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年度に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<sup>5)</sup>、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<sup>6)</sup>、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<sup>7)</sup>。平成21年度には、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<sup>8)</sup>。さらに平成21年1月から平成23年3月まで輸血前患者の検体を用いた遺伝子検査

を久留米大学病院で開始し、TaqMan プローブ法と 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<sup>8)</sup>。最終年度である平成 22 年度には、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<sup>del</sup>* 検出法を確立した<sup>9)</sup>。さらに、新規に導入したリアルタイム PCR 機器 (LightCycler<sup>®</sup> 480) を用い、機器間での結果の相同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

### TaqMan プローブを用いた *Hp<sup>del</sup>* 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、増幅領域内に蛍光標識プローブを設定し、標的とする DNA を増幅しながら、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<sup>3)</sup>と同様、*Hp<sup>del</sup>* の欠失点をはさんだ領域と、*Hp<sup>del</sup>* 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  $\mu$  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  $\mu$  mol/L の deoxynucleotide triphosphates, 10  $\mu$  L Premix ExTaq<sup>™</sup> (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 Hpdel-TaqMan プローブ 83 - 300 nmol/L を含む 20  $\mu$  L の PCR 反応液を調整した。(プローブ及びプライマーの位置と配列は図 3 及び表 1 に記載) 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°C 30 秒の前処理後、95°C 5 秒の熱処理 60°C 30 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<sup>™</sup> 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。

## 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<sup>3)</sup>やTaqMan法<sup>5)</sup>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  $\mu$ 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  $\mu$ mol/Lのdeoxynucleotide triphosphates, 10  $\mu$ l 2 X SYBR Premix Ex Taq II (perfect real time; Takara, Shiga, Japan)と500 nmol/LHpdel-690F プライマー(配列及びその位置は図4及び表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  $\mu$ 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。

リアルタイム PCR 法 2 法を併用した

## 輸血前血液の *Hp<sup>del</sup>* 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<sup>®</sup> 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 Taq<sup>™</sup>* (Perfect Real Time, TaKaRa 社) に加えて、SsoFast<sup>™</sup> Probes Supermix (Bio-Rad 社) を用いて *Hp<sup>del</sup>* 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 Taq<sup>™</sup>* 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<sup>®</sup> 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。SsoFast<sup>™</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>5)</sup>。

#### 2) SYBR Green I 法

これまで選定後に最適化してきた SYBR<sup>®</sup> *Premix Ex Taq<sup>™</sup>* II (Perfect Real Time, TaKaRa 社) に加えて、SsoFast<sup>™</sup> EvaGreen<sup>®</sup> Supermix (Bio-Rad 社)、Fast SYBR<sup>®</sup> Green Master Mix (Life Technologies 社)、GoTaq qPCR Master Mix (Promega 社)、FastStart Universal SYBR Green Master (ROX) (Roche 社)、THUNDERBIRD<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> *Premix Ex Taq<sup>™</sup>* 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<sup>®</sup> 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<sup>8)</sup>。

### LAMP 法を用いた *Hp<sup>del</sup>* 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<sup>del</sup>*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。これらの配列ならびに位置を表2、図5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に合成した。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  $\mu$ 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。

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

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<sup>TM</sup> (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 プローブ 83 nmol/L, Hp5'-F, Hp5'-R プライマー各 150 nmol/L, Hp5'-TaqMan プローブ 42 nmol/L, Hpdel-F, Hpdel-R プライマー各 300 nmol/L, Hpdel-TaqMan プローブ 83 nmol/L を含んだ20  $\mu$ 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 $^{\circ}$ C30秒の前処理後、95 $^{\circ}$ C5秒の熱処理60 $^{\circ}$ 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<sup>TM</sup> 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  $\Delta$ Ct [(Hp5'の Ct 値) - (Hp2 の Ct 値)] を求めた。次に  $\Delta$ Ct 値から  $\Delta$ Ct [(対照の  $\Delta$ Ct 値) - (サンプルの  $\Delta$ Ct 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  $Hp^2/Hp^2$  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。

#### **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**

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<sup>®</sup>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<sup>6)</sup>とconventional PCR法<sup>3,10)</sup>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關連性について検討した。データは、 $\chi^2$  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。關連性検討のP値は0.05以下を有意差ありとした。

(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上で行っている。またモンゴル人、インドネシア人及び遺伝子型が判明している日本人検体のゲノムDNA等の遺

伝子解析に関しては、久留米大学倫理委員会の承認を得た上でやっている。

### 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<sup>5)</sup>。ゲノム DNA (5 ng) を鋳型として用いた場合、図 6 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 7)。

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。

#### 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、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<sup>8)</sup>。

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 8 に示すように健常者 ( $Hp/Hp$ ) では  $T_m$  値が 84.3-84.7°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障害が認められたが、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 9, 10)。そこで我々は血液の希釈倍率として平成 20 年度に開発した 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  $T_m$  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 11)。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さらなる検討を加えた。

## 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う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 12)。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<sup>®</sup> 480 での融解曲線解析では、Mx3000P で *Hp* と *Hp<sup>del</sup>* 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<sup>del</sup>* 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<sup>™</sup> EvaGreen<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> Green Master Mix (Life Technologies 社) は、SYBR<sup>®</sup> Premix Ex Taq<sup>™</sup> 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<sup>™</sup>

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<sup>™</sup> SYBR<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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<sup>®</sup> 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 13 及び表 3 に示す。

## リアルタイム PCR 法 2 法を併用した輸血前血液の *Hp<sup>del</sup>* 接合性診断

TaqMan プロブ及び 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<sup>del</sup>* 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。

#### 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14)。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15)。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、鑄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法による診断の鑄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鑄型となることが分った(図16、表4)。なお、表4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



積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4)。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17)。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。

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<sup>6)</sup>。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、 $Hp^2$  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 18 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 ( $\Delta Ct$ ) 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 19 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 Hpdel (FAM シグナルのみ) と、予想通りの結果が得られた (図 20)。

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 21)。さらに  $\Delta Ct$  値([Ct of Hp5']-

[Ct 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  $\Delta Ct$  は  $-1.99 \pm 0.11$  であり、31 名の  $Hp^2/Hp^2$  は  $-1.00 \pm 0.11$  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、 $0.44 \pm 0.036$  であり、31 名の  $Hp^2/Hp^2$  では、 $0.88 \pm 0.071$  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  $\Delta \Delta Ct$  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。

## 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  $Hp^{del}$  のシグナルのみのもの) 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 5)。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 6 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。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關連性について調べた結果を表 7 に示す。これらについての有意差も認められなかった。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 6, 7 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。

ハプトグロビン遺伝子型、対立遺伝子と 2 型糖尿病の關連性を  $\chi^2$  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。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プロー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プロー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我が国の様々な地域あるいはアジア人集団で輸血副作用の原因となる $Hp^{del}$ の検出および頻度分布を詳細に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)<sup>17</sup>、メラネシア人集団で0.0036(3/831)<sup>18</sup>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。