

考察

我々は平成 20 年度中にリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} の接合性の診断法を確立した。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、さらに従来法では約 500 bp であった増幅遺伝子断片が、リアルタイム PCR では 100 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 時間程度と従来法に比べ診断に要する時間を 1/4 程度に短縮することができた。一方経費は、用いた Real time 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 60 nmol 以上保証の合成スケールで 2 プライマーセットと 2 プローブを合成した場合で計約 170000 円であることから 1 反応あたり約 14 円以下(1 反応に Hp プローブ: 2.5 pmol, Hpd_{del} プローブ: 5 pmol として 12000 反応以上が可能であるため、さらに蛍光強度増強する白い PCR プレーートの使用で、プライマーとプローブを 1/3 に節約できるため経費は 1 反応あたり 5 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 検体当たり 123 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。

また従来法に比べてリアルタイム

PCR 法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ア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、ハイスループトット解析に適すること、などがあげられる。今回採用した Sorenson ultraAmp PCR semi-skirted 96 white plates の使用により、プライマー、プローブともに 1/3 の減量が可能になりさらなる検査費用のコストダウンも可能になった。また本診断法は簡便な方法であるため遺伝子解析の専門家がいない医療現場での利用も可能であると考えられる。

さらに平成 21 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 時間程度と平成 20 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。また、検討を重ね融解曲線解析によって増幅産物の区別が出来る条件を決定し、1 検体あたり 1 チューブで接合性を決定する検査を実施でき、コストの軽減と内部標準の獲得の 2 点を達成することができた。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、オリゴヌクレオチドの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（TaqManプローブ法同様、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プローブ法（1検体あたり約130円と試算）よりさらに安価である。

TaqManプローブ法と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。

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の鑄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℃、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℃、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。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がこの過程の中で、平成 22 年度には、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。

さらに平成 22 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 プローブ法用には、前述の 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。現時点はこの改善の理由は判然としないことから、この改善理由について解析してゆきたいと考えている。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。

平成 22 年度は、前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、非特異的な増幅がおこらない条件が取れば、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。

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鋳型とすることが出来るようになり、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える。

さらに平成 20 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

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。平成 21 年度は、この方法を用いてモンゴル人のゲノム DNA を試料とし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た。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。本法は当初 Hp^{del} 検出を目的として開発した方法であったが、改良によりハプトグロビン遺伝子型の判定もおこなうことが可能となり多分やへの応用が期待される。

E. 結論

本研究計画期間中に、我々はリアルタイム 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鋳型とするこ

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 を鋳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 11 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12)。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。また、今日までの輸血医療においては、輸血血液つまり供血者側の検査に重点がおかれてきた。これについてはかなり高い水準に達しているものと考えられるが、今後は HP^{del} のような受血者側の検査の充実がはかられ、より安全な輸血医療が実施され、当該研究計画の成果が少しでも寄与することが出来ればと願っている。

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 antihaptoglobin 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.
9. 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. 13:334-339, 2011.

10. Koch W, Latz W, Eichinger M, Roguin A, Levy AP, Schömig A, Kastrati A. Genotyping of the common haptoglobin Hp 1/2 polymorphism based on PCR. Clin Chem. 48:1377-1382, 2002.

F. 健康危険情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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 Jun;50(6):1322-1327.

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. 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.

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.

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.

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.

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レル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レルの輸血前診断. 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 Hp^{del} の欠失領域

図2 デュプレックス PCR 法による Hp^{del} 接合性の判定

図3 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

図4 SYBR Green I法で用いた各プライマーの位置

図5 LAMP 反応に用いたプライマーの位置

図6 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7 血液を直接鋳型としてリアルタイムPCR法を用いた Hp^{del} 遺伝子型判定

図8 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9 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10 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11 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

- 図 12 TaqMan probe 法における反応試薬間の結果の相違
- 図 13 SYBR Green I 法における反応試薬間の結果の相違
- 図 14 LAMP 反応における反応の特異性
- 図 15 LAMP 反応における反応の検出感度
- 図 16 LAMP 反応におけるさまざまな試薬調整法の影響
- 図 17 LAMP 法への蛍光試薬の導入
- 図 18 比較 Ct 法を用いたコピー数の定量法
- 図 19 さまざまなハプトグロビン遺伝子型で検出が予想される蛍光シグナル
- 図 20 さまざまな遺伝子型で検出された蛍光シグナル
- 図 21 Hp5', Hp2 プライマー、プローブセットの Ct 値から得られた calibration curve
- 表 1 リアルタイム PCR (TaqMan プローブ法並びに SYBR Green I 法) に用いた TaqMan プローブ、プライマーの配列とその位置
- 表 2 LAMP 反応に用いたプライマーの配列
- 表 3 SYBR Green I 法における反応試薬間の結果の相違
- 表 4 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 5 モンゴル人 946 サンプルのハプトグロビン遺伝子型
- 表 6 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 7 非糖尿病患者の臨床データとハプトグロビン遺伝子型
- (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 巻 第 3・4 号: 127-133. 別刷
 2. Soejima M, Koda Y. Rapid real-time PCR detection of *HP^{del}* directly from diluted blood samples. Clin Chem. 2008 Jun;54(6): 1095-1096. 別刷
 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

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
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
6. 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57回日本法医学会九州地方会. 2009; 佐賀
7. Yoshiro Koda, Mikiko Soejima. GENOTYPING METHOD FOR COMMON POLYMORPHISMS OF HAPTOGLOBIN AND DISTRIBUTION OF HP^{DEL} IN ASIA. 第20回国際輸血学会アジア部会. 2009; 名古屋
8. 神田芳郎. SYBR Green I-based real-time PCR法によるハプトグロビン欠失アリの診断法の確立とその臨床検体による評価. 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
9. 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
10. 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.
11. 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
12. HP^{del} の地理的な分布

別表

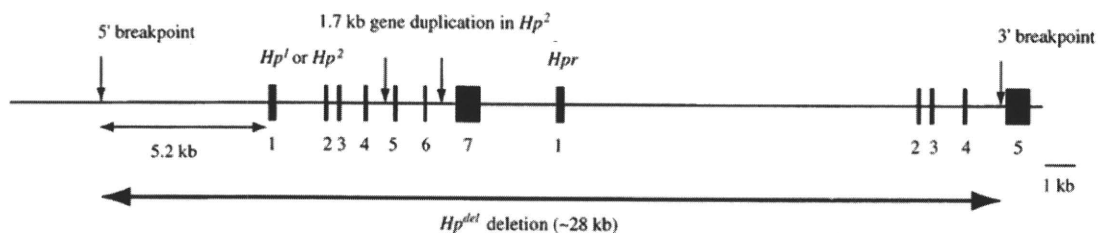


図1 Hp^{del} の欠失領域：遺伝子欠失はハプトグロビンの上流約 5.2-kb からハプトグロビン関連遺伝子のイントロン 4 にまでおよぶ

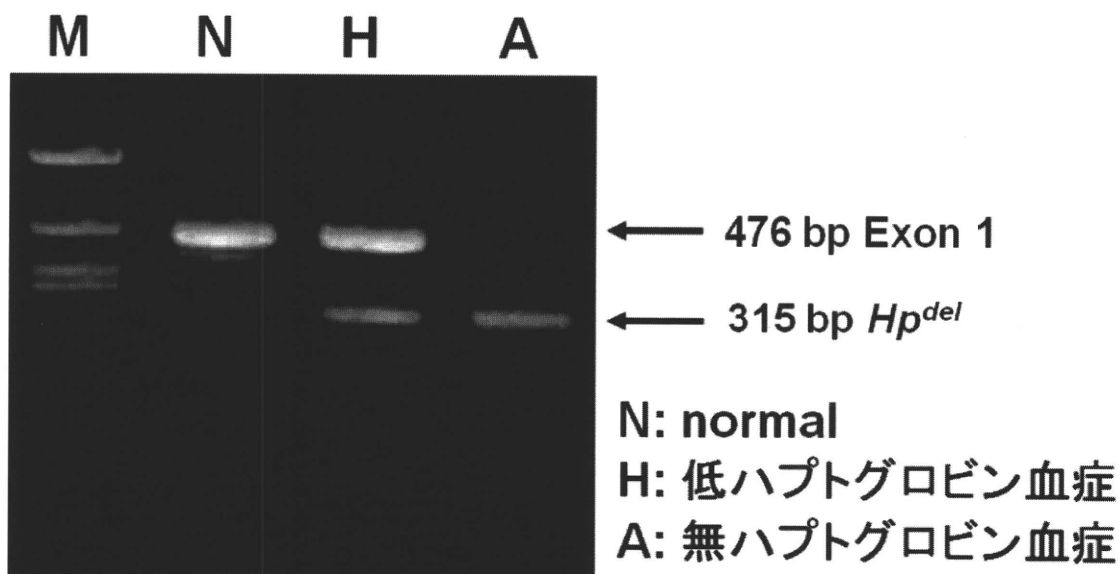


図2 デュプレックス PCR 法による Hp^{del} 接合性の判定

N は Hp のホモ接合体、H は欠失のヘテロ接合体、A は欠失のホモ接合体

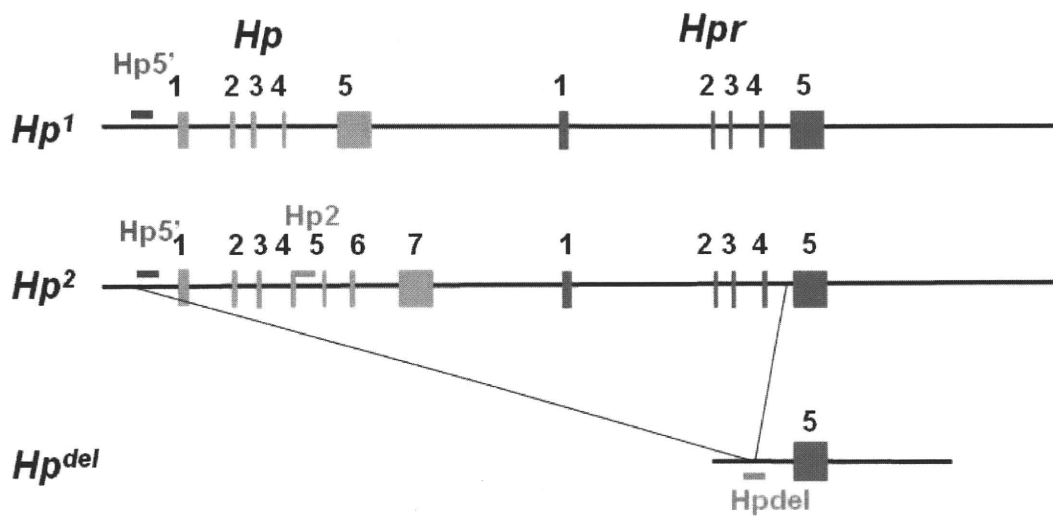


図3 TaqMan プローブ法で用いた各プローブ、プライマーの位置

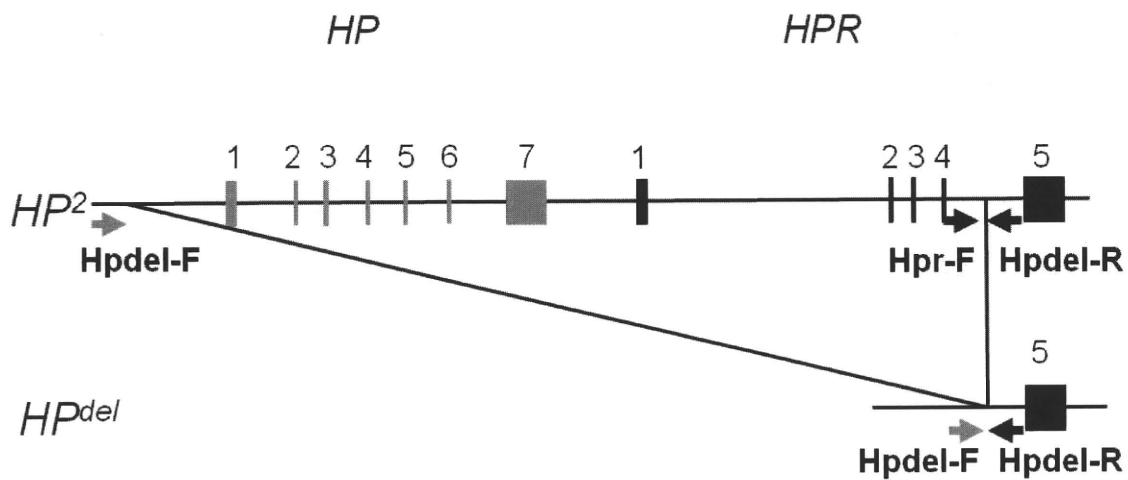
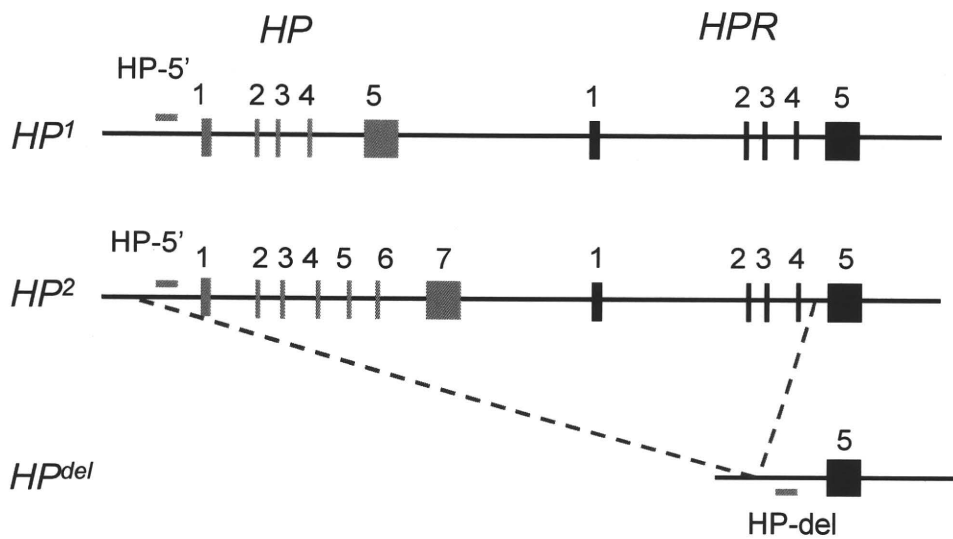


図4 SYBR Green I 法で用いた各プライマーの位置



HP-del

GTCAGATATAAATGTTTTGTACCTCCTTTGTTCAAGTGTGCTCTTGTCTTTGTTCCATCTGTGATG
 GGCACCCTTTCTGCAGAAAGTAAAAATTGCCTTGCTGAGAGAATTAAATTTATGTTCAAGTGCTAT
 TTCTTTATGGCACTGGGAACAAGCATTTCGATTTCTAACAGATGAAAAGGTTAGGCCAAAAAAT
 TCTATATAAAGAATGATCAAAT↓TGAAAGGCTCTTGACATTCCACTCACGAGTGTCTTGCTCT
 CCTTGACAGTATGTGGGAAGCCCAAGAATCCGGCAAACCCAGTGCAGCGGATCCTGGGTGGACACC

HP-5'

ACAAGGTGGAGAAAATTACTGTGAAAAGGAAGTACTTTCTTTAGAGCCCCACCTAAGCTAGGCTGC
 AGAAATGTCTACAATGGGTTTGAAAAAATCAAATGAGCCTTTCTGCAGTGTGAAAATCCTCCAA
 GATAAAGAGACAGATTGATGGTTCCTGCCGCCCTGTCTGCTGCCAGTTGCTGATTTTCAGGAAAT
 ACTTTGGCAGGTTTGTGGGTCATAGAGTTGCCAGGTTTCTTGGGATTTGTAATAGAACATCACAAG

図5 LAMP 反応に用いたプライマーの位置

“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。

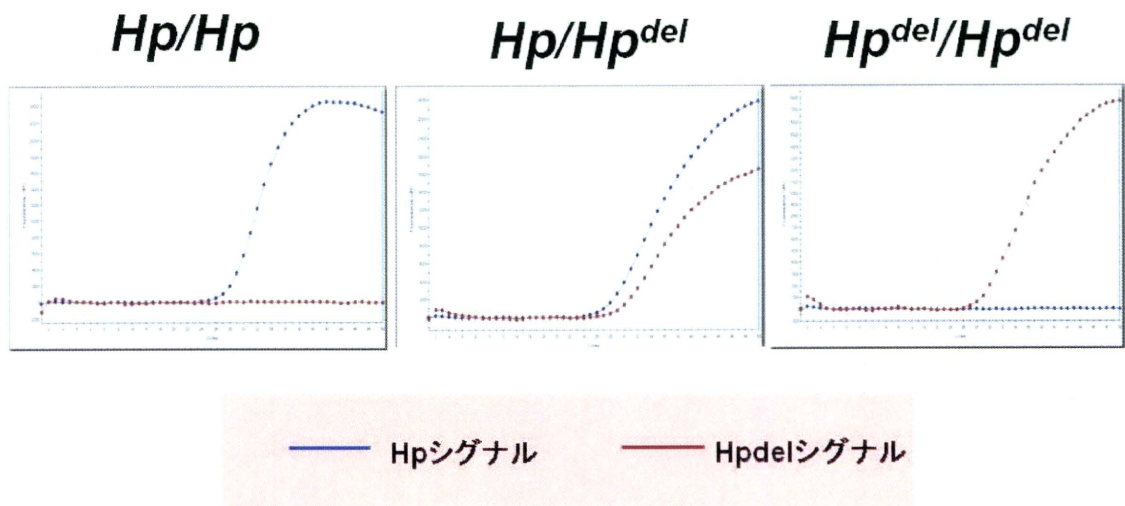


図6 TaqMan プローブ法を用いたリアルタイム PCR による標的遺伝子産物の増幅曲線

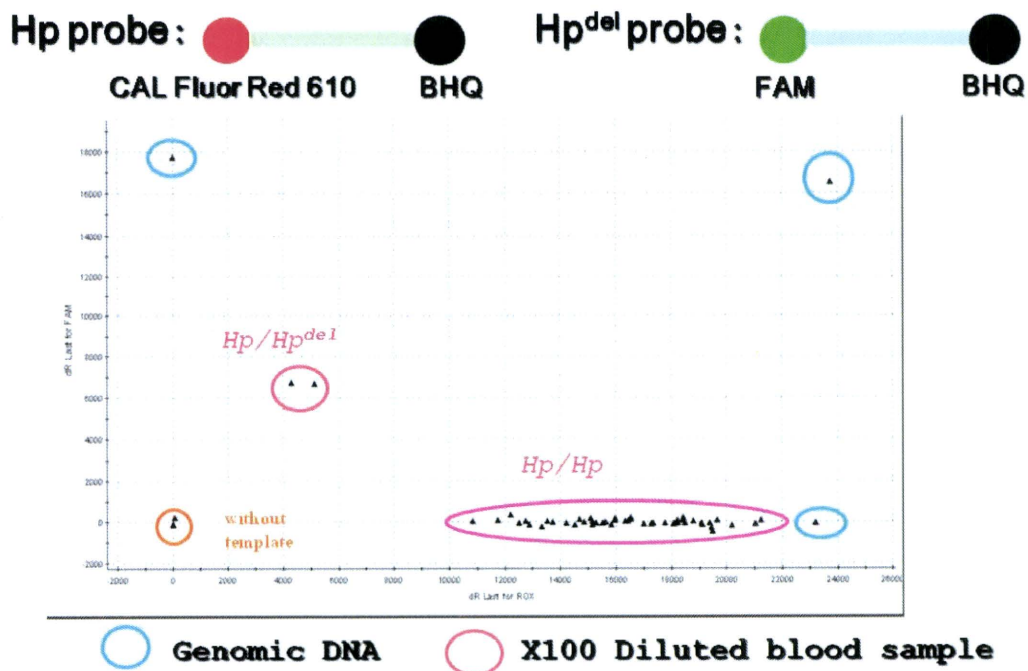


図7 血液を直接鋳型としてリアルタイム PCR 法を用いた Hp^{del} 遺伝子型判定

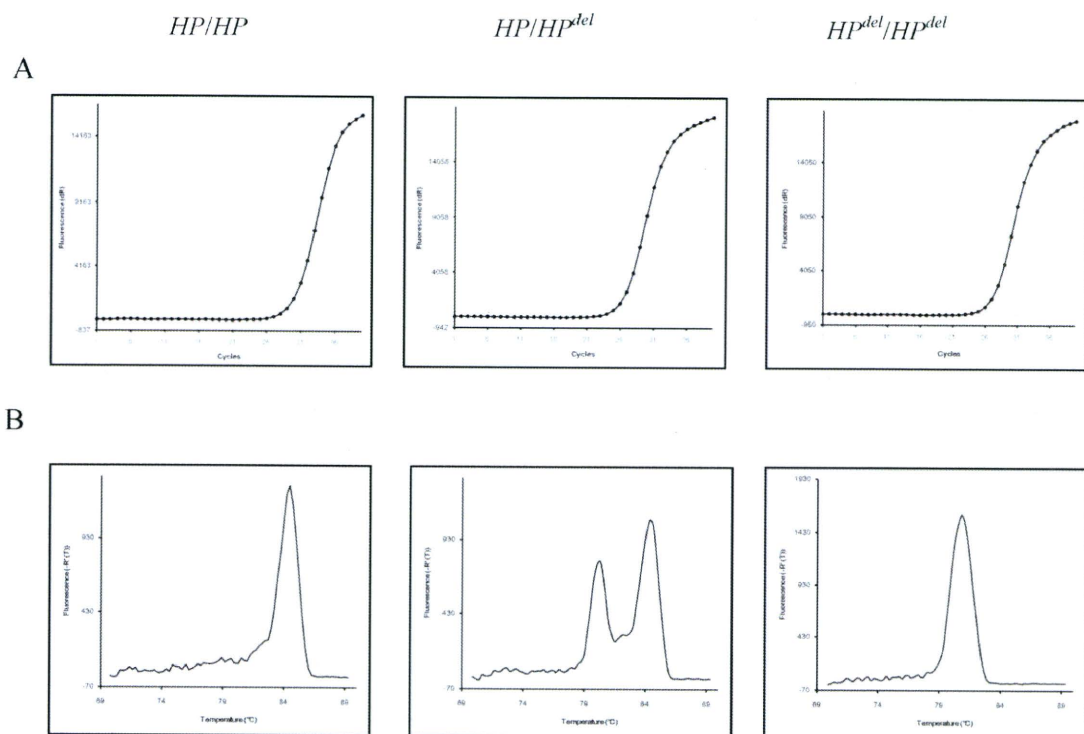


図8 SYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRによるさまざま遺伝子型の標的遺伝子産物の増幅曲線 (A)、と融解曲線解析 (B)

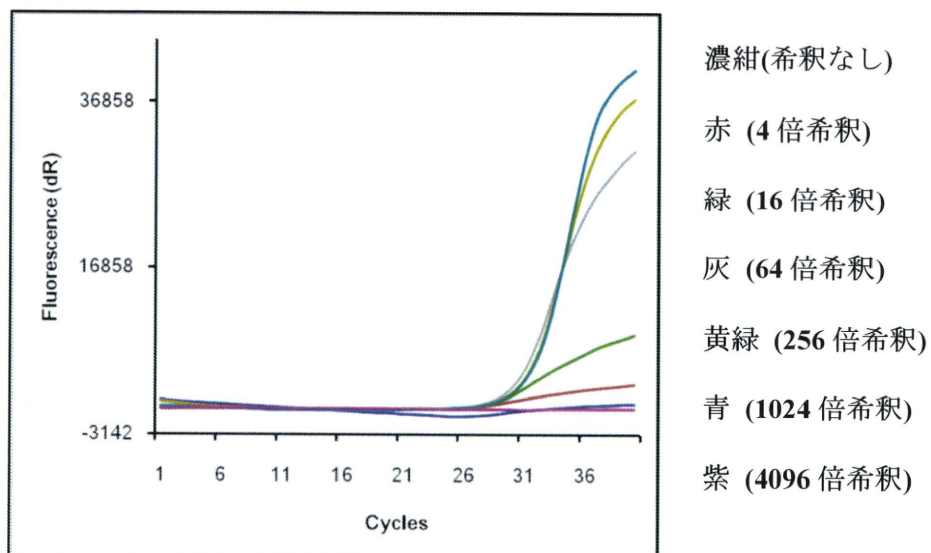


図9 血液を直接鋳型にした場合のSYBR Green Iを用いたリアルタイムPCRの増幅曲線

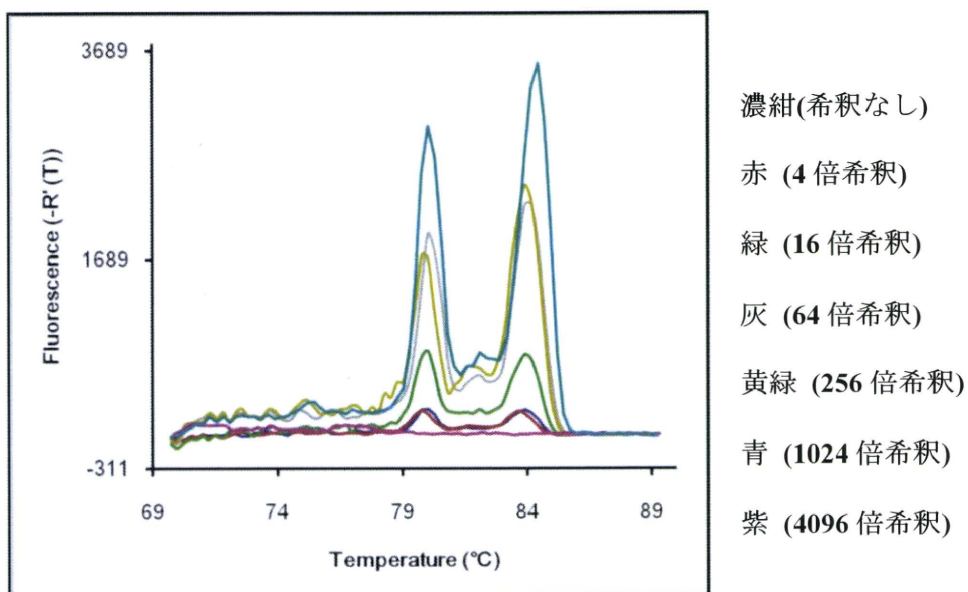


図 10 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線

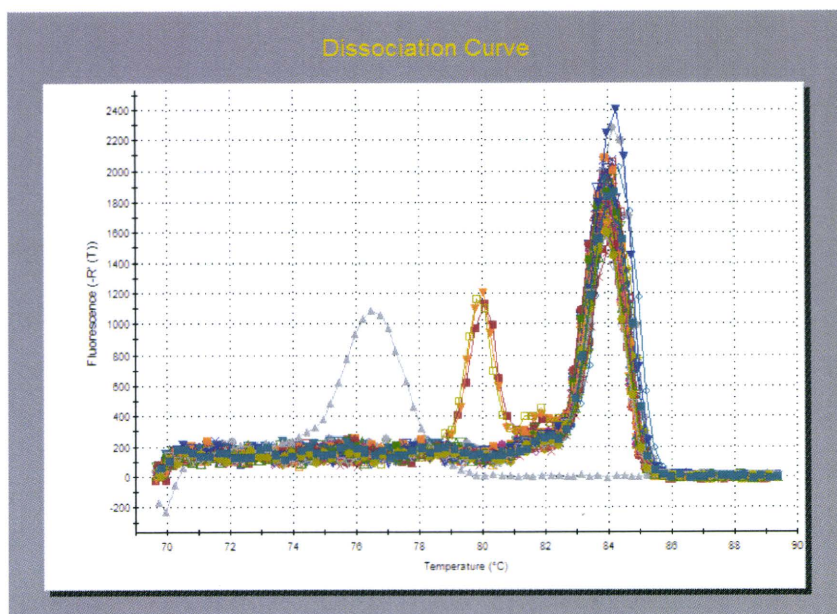
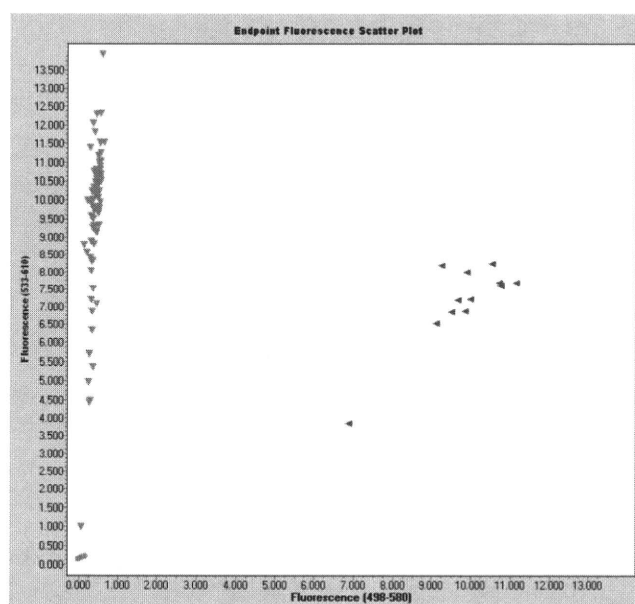


図 11 血液を直接鋳型にした場合の SYBR Green I を用いたリアルタイム PCR の融解曲線に認められた primer dimer

1. Premix Ex Taq (TaKaRa)



2. SsoFast Probes Supermix (Bio-Rad)

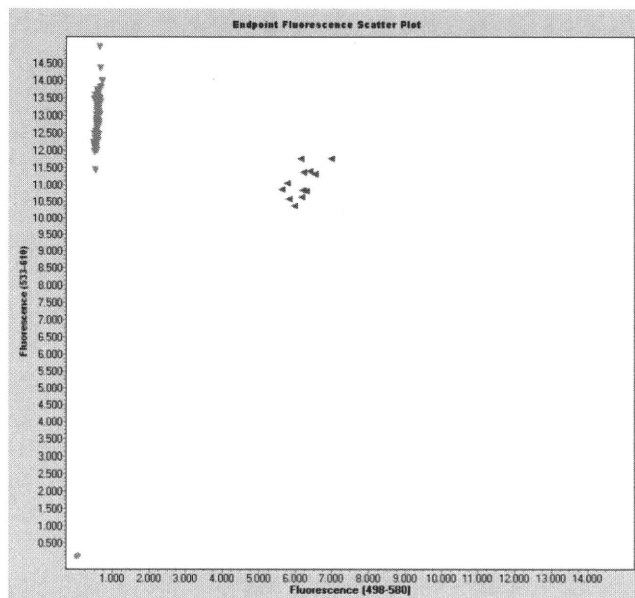


図 12 TaqMan probe 法における反応試薬間の結果の相違

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。

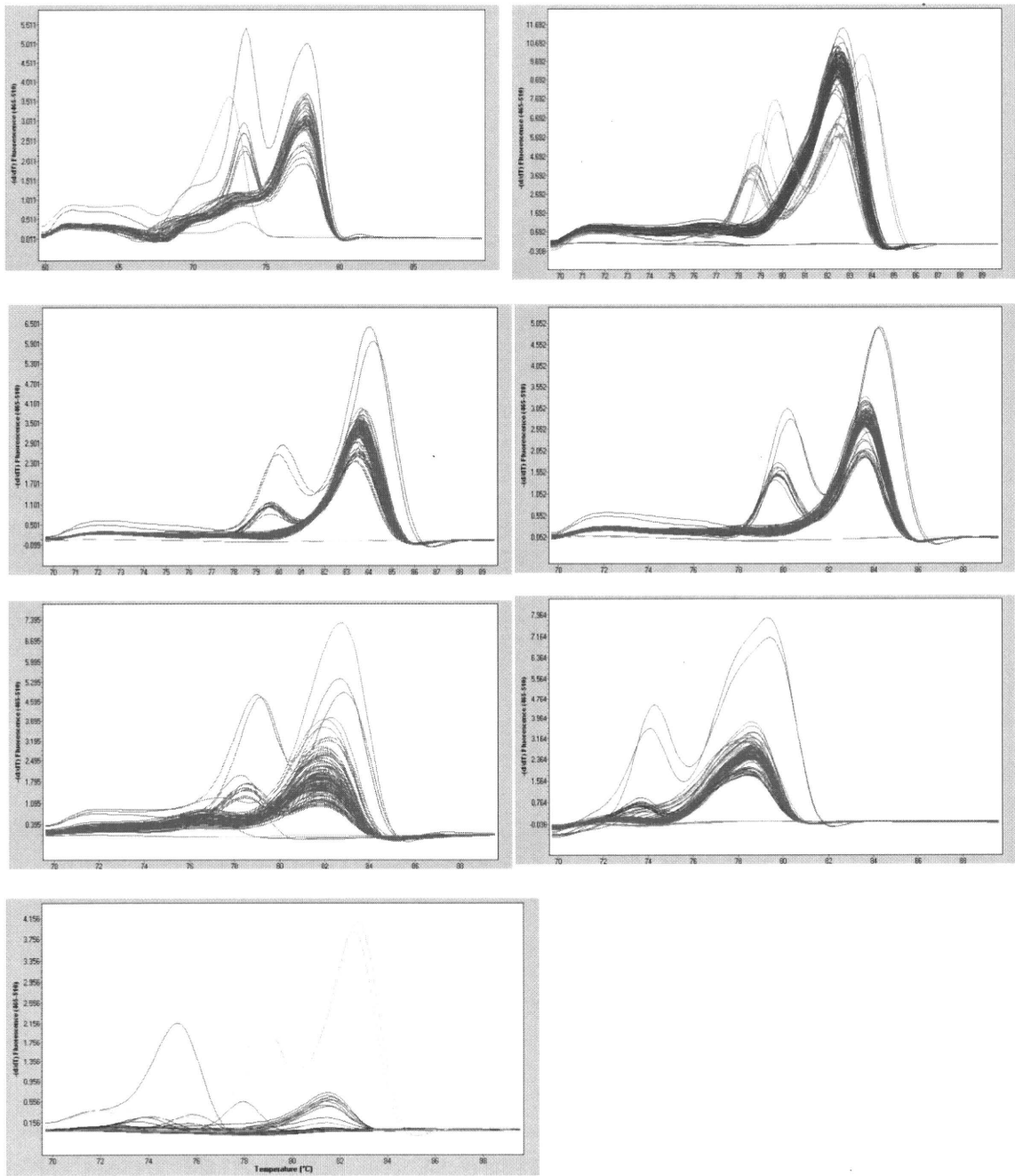


図 13 SYBR Green I 法における反応試薬間の結果の相違

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。

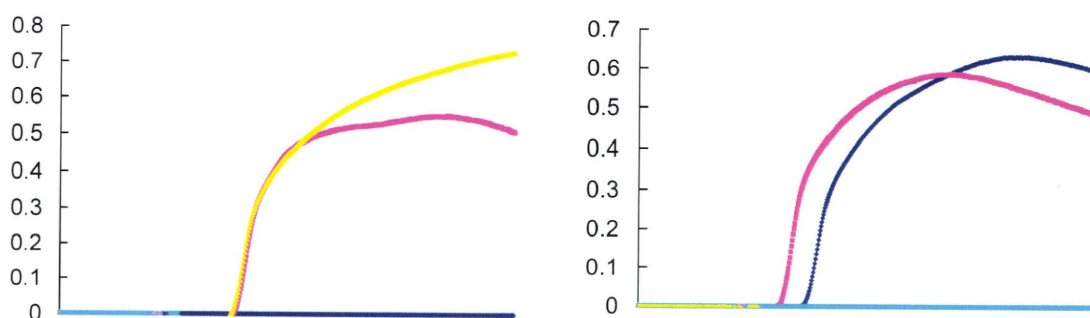


図 14 LAMP 反応における反応の特異性

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 : 黄色 Hp/Hp^{del} : 赤色 Hp^{del}/Hp^{del} : 黒色 Negative control: 青色

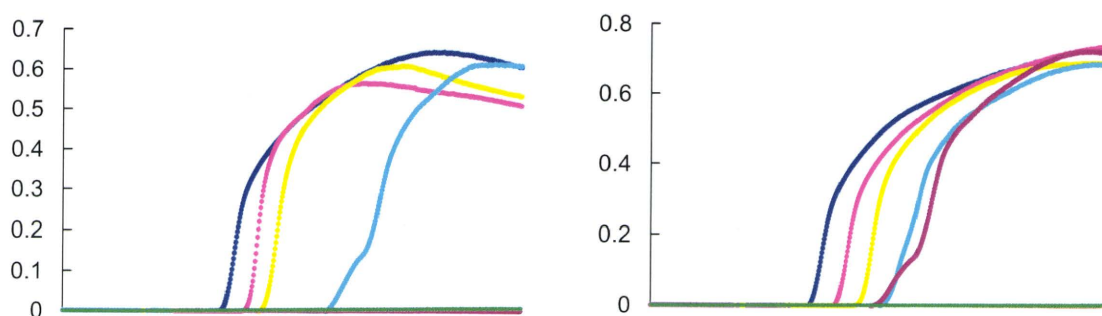


図 15 LAMP 反応における反応の検出感度

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。

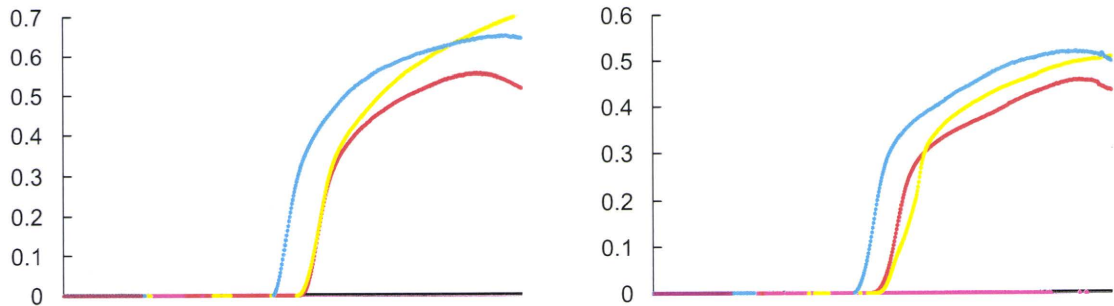


図 16 LAMP 反応におけるさまざまな試薬調整法の影響

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: —

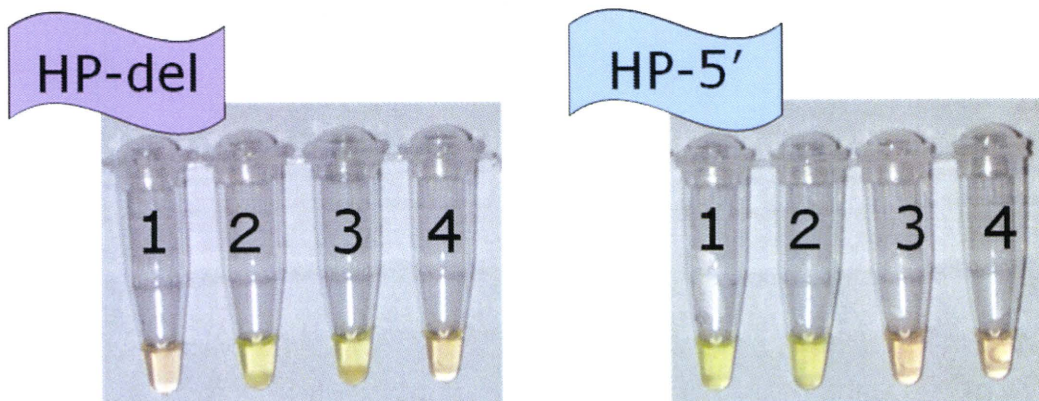


図 17 LAMP 法への蛍光試薬の導入

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