

$$\Delta Ct = [\text{内在性control(Hp5')} \text{のCt}] - [\text{target(Hp2)のCt}]$$

$$\Delta\Delta Ct = [\text{referenceサンプル}\Delta Ct] - [\text{各サンプル}\Delta Ct]$$

ΔCt_R

ΔCt_S

$$\text{targetの相対コピー数: } 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

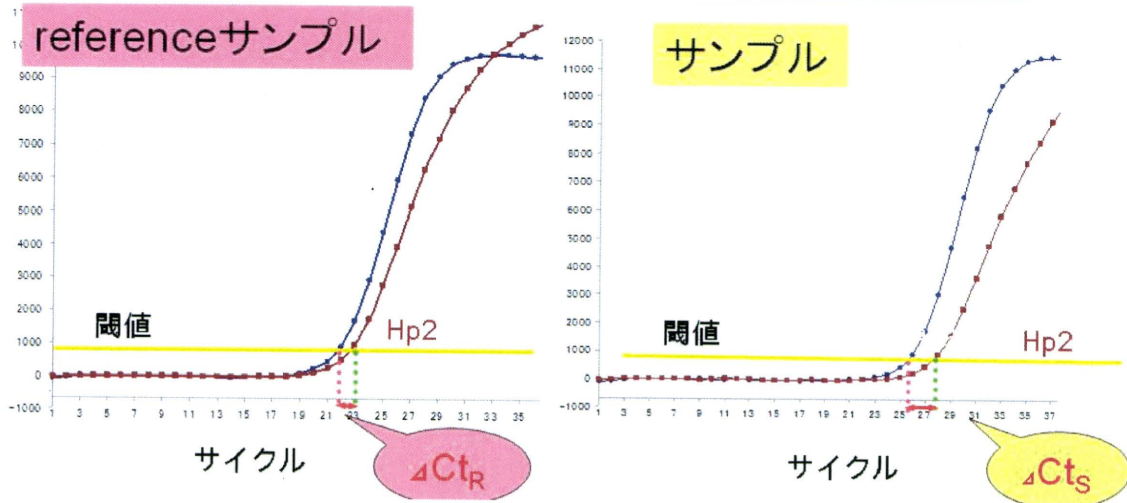


図 18 比較 Ct 法を用いたコピー数の定量法

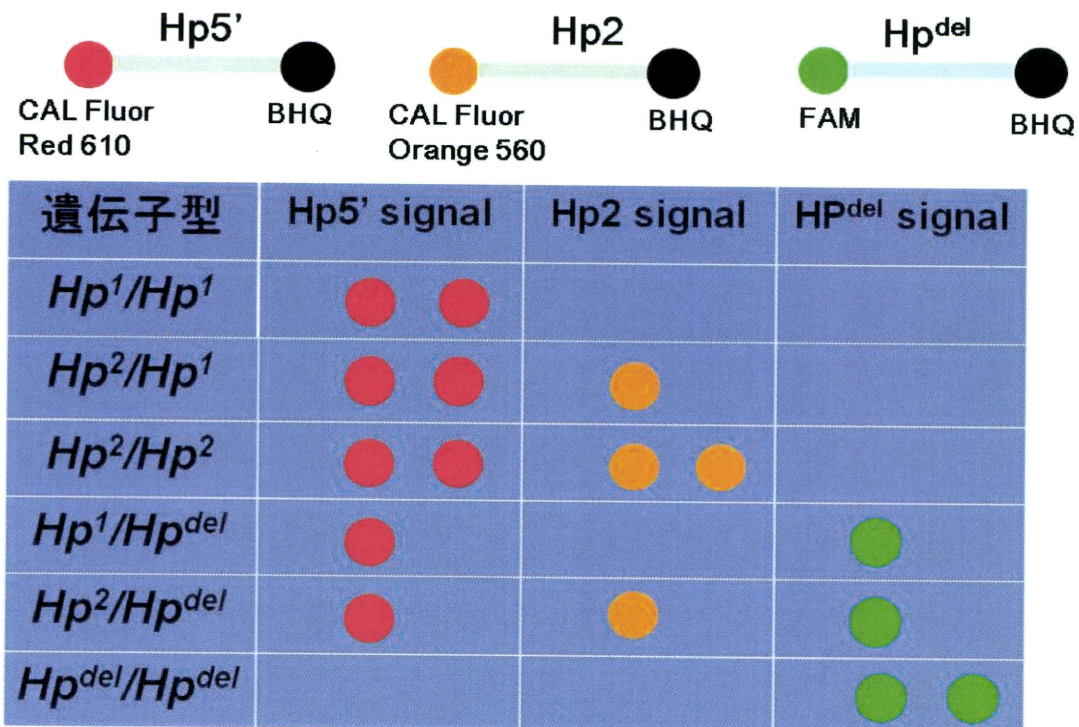


図 19 さまざまなハプトグロビン遺伝子型で検出が予想される蛍光シグナル

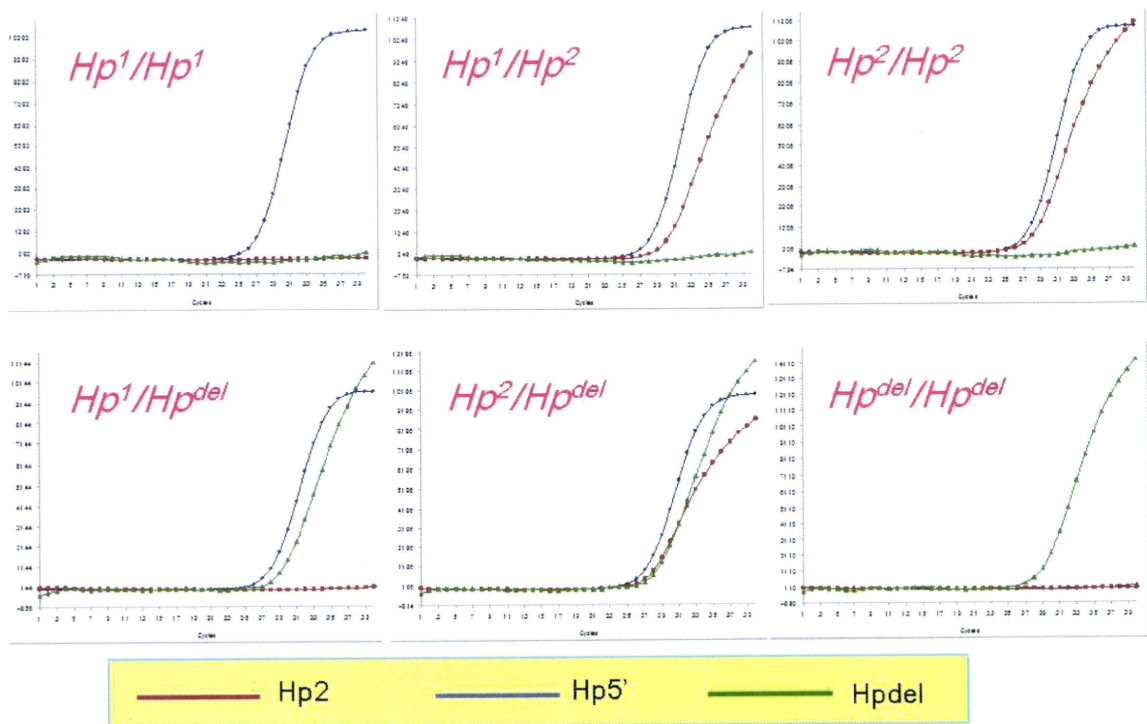


図 20 さまざまな遺伝子型で検出された蛍光シグナル

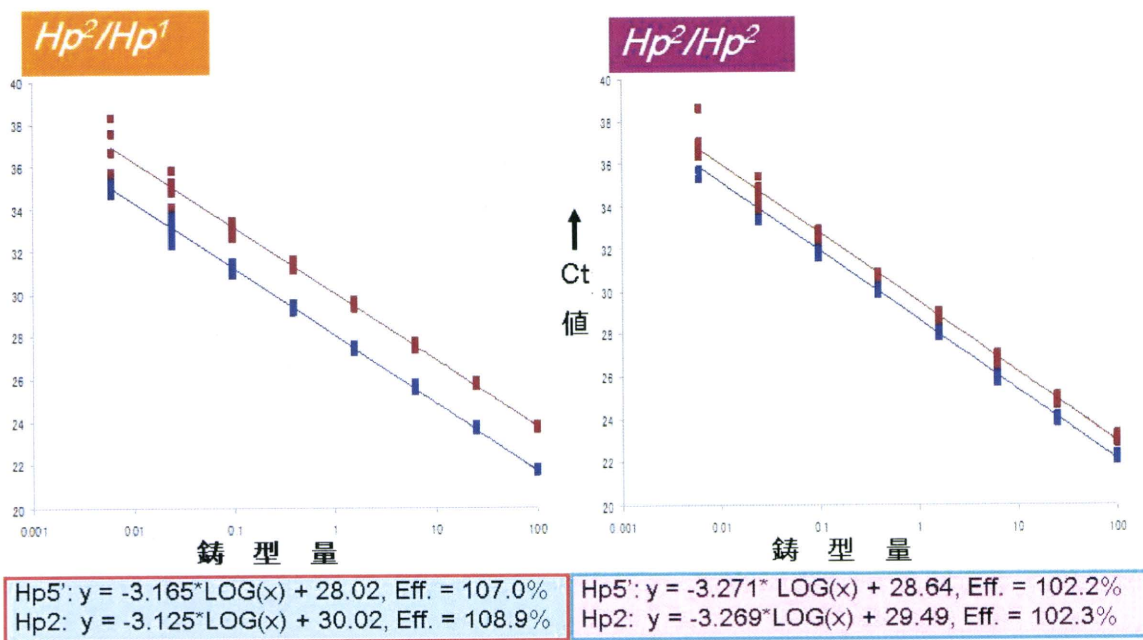


図 21 Hp5'、Hp2 プライマー、プローブセットの Ct 値から得られた calibration curve

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

	Sequence	Position
Hp5'-F	5'-CACATTTACTGATTTTCAGGCTGGA-3'	sequence from 513-536 bp, GenBank no. M10935
Hp5'-R	5'-CCTTTTCACAGTAATTTTCTCCACCT-3'	reverse sequence from 571-596 bp, GenBank no. M10935
Hp5'-Taqman-probe	5'-CAL Fluor Red 610-AGCTTTTAAGCAATAGGGAGATGGCCACA-BHQ2-3'	sequence from 538-566bp, GenBank no. M10935
Hp2-F	5'- GGAGCTGCTCTGCACATCAA-3'	reverse sequence from 4547 to 4566 bp in GeneBank no. M10935)
Hp2-R	5'- CCCTTTCAATGAATTTTCAGGGA-3'	sequence from 4448 to 4469 bp in GeneBank no. M10935
Hp2-Taqman-probe	5'-CAL Fluor Orange 560-ACCCCGAATAGAAGCTCGCGAACTGTA- BHQ1-3'	reverse sequence from 4511 to 4537 bp in GeneBank no. M10935
Hpdel-F	5'-TCTTTATGGCACTGGGGAACA-3'	sequence from 694-714 bp, GenBank no. AB025320
Hpdel-R	5'-AGCAAGACACTCGTGAGTGGAA-3'	reverse sequence from 822-801 bp, GenBank no. AB025320
Hpdel-Taqman-probe	5'-FAM-TGTGCAAGAGCCTTCCAATTTGATCABHQ1-3'	reverse sequence from 772-799 bp, GenBank no. AB025320
Hpdel-690F	5'-TATTTCTTTATGGCACTGGGGAACA-3'	sequence from 690 to 714 bp in GeneBank No. AB025320
Hpdel-823R	5'-GAGCAAGACACTCGTGAGTGGAAAT-3	reverse sequence from 823-799 bp of GeneBank No. AB025320 and reverse sequence from 13,067 to 13,043 bp of GeneBank No. NC_000016.9
Hpr-F	5'-CTGCAACTATTGGAAATGAGATCAGC-3'	sequence from 12,920 to 12,945 bp in GeneBank No. NC_000016.9, located in the 3' end of the deleted region in Hpdel, Intron 4 of the HPR

Hp^{del} の欠失点は **GenBank no. AB025320** の **782 -783 bp** に位置している。

表 2 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	TGCTCTTGTCTTTGTTCCA
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)	GCTCATTGAGTTTTTTCAAACCCTACTTTCTTTAGAGCCCCAC
BIP (B1c + B2)	TGCAGTGTGAAAATCCTCCAAGATTCTGAAATCAGCAACTGG
LF	ACATTTCTGCAGCCTAGCTTAG
LB	AAAGAGACAGATTGATGGTTCCTG

それぞれの場所は図 5 に示す。

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	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	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	80	700~900	血液	12~24	79.5	83.6	血液	12~24	79.5	83.7	
	DNA	12000	650	80.4	1200	DNA	30	80.2	84.5	DNA	30	80.2	84.5	
	ダイマー					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。						無						
300~1100	77.4	全体	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	
	DNA	3000~8000	400~1100	73.2~73.7	900	DNA	15~22	74	78	DNA	15~22	74	78	
	ダイマー	10000	1300	73.8	900	ダイマー	40	74	78	ダイマー	40	74	78	
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						有 (73°C)							
Sso Fast EvaGreen Supermix (Bio-Rad)	項目	全体	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	
	DNA	3000~10000	600	78.9	400~1600	DNA	7~37	78.5	82	DNA	7~37	78.5	82	
	ダイマー	12000	1300	79.5	1600	ダイマー	40	79	83	ダイマー	40	79	83	
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。						無							
GoTaq qPCR Master Mix (Promega)	項目	全体	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	
	DNA	18000~30000	1500~2000	78.9	2000~4000	DNA	25~40	78.5	82.5	DNA	25~40	78.5	82.5	
	ダイマー	24000	2000	79.5	3000	ダイマー	50	79.8	84	ダイマー	50	79.8	84	
特徴	増幅が良いというより、蛍光シグナル強く鑄型の影響を受けけない。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。						有 (76°C)							
Fast Start Universal STBR Green Master (ROX) (Roche)	項目	全体	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP		項目	シグナル強度	HPdel	HP
	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	血液	シグナル強度	シグナル強度	シグナル強度	
	DNA	300~3000	100~400	73.5	100~600	DNA	10~15	73.5	78.5	DNA	10~15	73.5	78.5	
	ダイマー	10000	800	74.4	1600	ダイマー	45	74	79.5	ダイマー	45	74	79.5	
特徴	増幅が悪い、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						有 (76°C)							

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

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 5 モンゴル人 946 サンプルのハプトグロビン遺伝子型

<i>Hp</i> 型	サンプル数	$2^{-\Delta\Delta C_t \text{ sample}}$ (<i>Hp</i> 2: <i>Hp</i> 5')の 平均値 ± 標準偏差	データ範囲
<i>Hp</i> ¹ / <i>Hp</i> ¹	70	0 ± 0	0 - 0
<i>Hp</i> ¹ / <i>Hp</i> ²	363	0.49 ± 0.04	0.38 - 0.64
<i>Hp</i> ² / <i>Hp</i> ²	493	1.00 ± 0.08	0.76 - 1.27
<i>Hp</i> ¹ / <i>Hp</i> ^{del}	5	0 ± 0	0 - 0
<i>Hp</i> ² / <i>Hp</i> ^{del}	12	1.01 ± 0.10	0.92 - 1.29
<i>Hp</i> ¹ / <i>Hp</i> ³	2	1.02	0.98 - 1.06
<i>Hp</i> ² / <i>Hp</i> ³	1	1.36	1.36

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

	<i>Hp¹/Hp¹</i>	<i>Hp¹/Hp²</i>	<i>Hp²/Hp²</i>	その他	<i>P</i> value
男/女(<i>N</i>)	13/14 (27)	53/45 (98)	75/74 (149)	3/4 (7)	0.793
年齢 (y)	50.9±11.0	51.3±9.8	53.2±9.1	54.4±14.5	0.217
BMI (kg/m ²)	29.6±5.2	29.7±5.7	29.6±5.5	27.3±2.9	0.995
体脂肪率 (%)	37.4±10.2	36.7±9.2	37.1±10.9	35.3±9.8	0.936
ウエスト/ヒップ比	0.92±0.08	0.94±0.08	0.93±0.08	0.91±0.10	0.527
最高血圧 (mmHg)	144.8±26.3	145.7±27.6	147.6±29.1	128.6±14.4	0.827
最低血圧 (mmHg)	87.8±15.5	87.0±15.5	88.1±14.3	80.4±11.5	0.841
総コレステロール (mg/mL)	200.9±46.7	192.8±39.9	190.6±40.8	184.8±30.7	0.634
HDLコレステロール (mg/mL)	50.1±12.6	49.3±11.6	49.5±10.4	49.4±13.3	0.968
トリグリセリド (mg/mL)	132 (39-1740)	164 (37-1480)	135 (49-1161)	112 (70-168)	0.517
空腹時血糖 (mmol/L)	12.1 (5.3-18.9)	11.1 (4.4-27.5)	10.4 (2.7-24.8)	8.6 (7.3-13.6)	0.443
空腹時インシュリン (mU/mL)	16.8 (5.2-88.8)	18.9 (1.6-85.5)	18.1 (1.6-121.0)	16.1 (1.5-29.0)	0.594
アディポネクチン (ng/mL)	21.3 (4.4-86.6)	18.9 (3.1-267.6)	17.6 (1.0-220.6)	13.3 (5.2-38.5)	0.829
フルクトサミン (mmol/mL)	323 (153-516)	368 (225-589)	343 (216-709)	366 (248-529)	0.396

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

	Hp ¹ /Hp ¹	Hp ¹ /Hp ²	Hp ² /Hp ²	その他	Pvalue
男/女(N)	15/28 (43)	119/146 (265)	134/210 (344)	8/5 (13)	0.244
年齢 (y)	47.6±11.4	50.1±10.6	49.4±10.4	52.2±8.4	0.319
BMI (kg/m ²)	26.3±4.6	26.9±4.9	26.6±4.5	29.0±6.1	0.700
体脂肪率 (%)	36.2±12.6	33.7±9.8	34.7±9.6	36.9±8.6	0.235
ウエスト/ヒップ比	0.80±0.10	0.82±0.11	0.82±0.11	0.80±0.17	0.272
最高血圧 (mmHg)	132.6±22.6	131.5±22.6	130.0±23.1	136.4±34.3	0.649
最低血圧 (mmHg)	83.8±13.3	84.0±14.4	83.6±15.5	85.0±17.7	0.957
総コレステロール (mg/mL)	176.8±37.4	176.8±34.1	180.4±38.3	203.8±42.1	0.592
HDLコレステロール (mg/mL)	53.3±9.6	54.9±11.5	53.8±11.7	56.5±9.4	0.556
トリグリセリド (mg/mL)	101 (32-568)	87 (30-1210)	96 (34-635)	134 (67-292)	0.237
空腹時血糖 (mmol/L)	5.6 (4.6-6.8)	5.5 (4.2-6.9)	5.5 (4.2-6.8)	5.6 (4.4-6.6)	0.921
空腹時インシュリン (mU/mL)	11.6 (2.5-213.0)	11.7 (1.5-87.7)	11.3 (1.0-161.0)	12 (2.86-44.0)	0.792
アディポネクチン (ng/mL)	33.8 (4.3-85.4)	32.3 (2.0-249.5)	34.0 (3.0-103.2)	27.9 (4.81-66.9)	0.891
フルクトサミン (mmol/mL)	238 (206-288)	236 (191-340)	236 (194-307)	227 (205-255)	0.855

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

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

久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

神 田 芳 郎

はじめに

輸血あるいは血液製剤の投与は比較的安全な医療行為であるが、副作用や合併症のリスクを伴う。したがって輸血副作用の原因解明とその予防は、輸血医療にとって重要な課題である。輸血副作用で最も重要なものはウイルス等の感染性副作用であり、それ以外には免疫学的なものがある。免疫学的な副作用はさらに溶血性と非溶血性に区分され現在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。

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、ヨーロッパ人ではIgA欠損の頻度が高く、日本人ではハプトグロビン欠損症によるものが多い。本稿では、われわれが法医学の1分野である親子鑑定から見出したハプトグロビン欠損症の原因遺伝子とその分布、現在開発中であるアナフィラキシーショックの回避を目的とした輸血前診断法について紹介する。

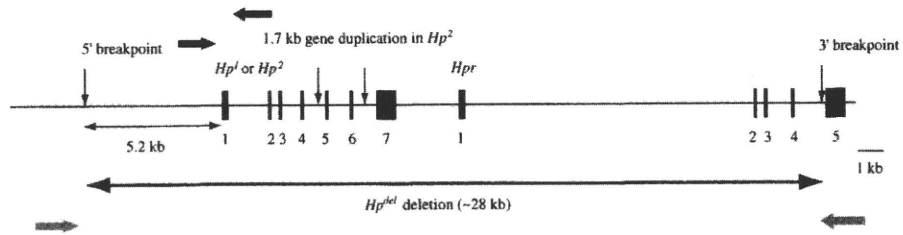
ハプトグロビンとその多型について

ハプトグロビンは、多くの脊椎動物に認められる、主として肝臓で合成される血清糖蛋白質であり、溶血により血中に放出された遊離ヘモグロビンと高親和性に結合し複合体を形成する。その複

合体は細網内皮系細胞にCD163を介して速やかに取り込まれて分解処理される。この機構によりヘモグロビンの酸化血管障害毒性を中和すると同時に、腎系球体からのヘモグロビンの喪失を防止する作用を発揮すると考えられている。ハプトグロビンの半減期は3.5～5日であるが、ハプトグロビン・ヘモグロビン複合体の半減期は10～30分ときわめて短時間であり、その代償的産生は迅速には行われないので、ヘモグロビンの血中への移行が持続すると血清ハプトグロビンは一般的な検出法による検出感度以下になると考えられている。また急性期反応蛋白であり、感染、炎症、組織崩壊、悪性腫瘍などでは肝臓以外の異所性産生 (特に好酸球) による血清ハプトグロビンの著しい増加を認める。ハプトグロビンは1955年にOliver Smithiesらにより多型の存在が報告された最初の血清蛋白質であり¹⁾、法医学の領域では親子鑑定などの個人識別に用いられてきた。ハプトグロビンには1型 (Hp^1)、2型 (Hp^2) の2つの主要な共優性対立遺伝子が存在し、その結果1型、2型、2-1型の3つの表現型に分類される。1型はさらにデンプンゲル電気泳動での移動度の違いから1F (Fast, 移動度の速いアリル) 型と1S (Slow, 移動度の遅いアリル) 型に細分される。これらは Hp^1 の1塩基多型による1アミノ酸置換に由来していることが知られている。ハプトグロビンは α 鎖と β 鎖で構成され、1型は4量体、2型はそれ以上の多量体蛋白である。ハプトグロ

Y. Koda. Usefulness of diagnosis of haptoglobin-gene deletion for transfusion recipients.

A



B

```

5' N: AACAGATGAAAAGGTTAGGCCAAAAAATTCATATAAAGAATGATCAAAAATGTGTAAAAGTATGCACAGAGAAAATCTGAAAGGAAGTAAACACTAAAATGTT
*****
Hpdel: AACAGATGAAAAGGTTAGGCCAAAAAATTCATATAAAGAATGATCAAAAATGGAAAGGCTCTTGACACTTCCACTCAGAGTGTCTTGCCTCTCCTTGACAG
*****
3' N: TCCAGTATTATGCAGCAGTGACAGCCGCCAATGCTTTCACCCCCTTCTCAGATGAAAAGGCTCTTGACACTTCCACTCAGAGTGTCTTGCCTCTCCTTGACAG
    
```

図1 ハプトグロビン遺伝子の構造と Hp^{del}

A: ハプトグロビン遺伝子 (Hp^2) の構造とハプトグロビン遺伝子欠失の物理的地図と変異同定用プライマーの位置

B: ハプトグロビン遺伝子欠失遺伝子の DNA 配列 (Hp^{del}) と 5' および 3' 欠失接合部周囲の DNA 配列のアラインメント。

*は2つの領域で同一の塩基配列を示している。
(文献8)より引用、改変)

ピン遺伝子は16番目の染色体長腕上(16q22.3)に局在し α 鎖と β 鎖は同一の遺伝子から1つのプレカーサーとして合成される(図1)。 Hp^1 は5つのエクソンで構成されているが、 Hp^2 は Hp^1 の第3および第4エクソンが遺伝子内で重複し第5および第6エクソンとなり7つのエクソンから構成される。 Hp^1 ではエクソン1から4が、 Hp^2 ではエクソン1から6が α 鎖をコードしており、最も長いエクソンである第5エクソン(Hp^2 では第7エクソン)が β 鎖をコードする。この β 鎖にヘモグロビン結合部位が存在している²⁾。またハプトグロビン遺伝子の約2.2 kb下流には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(Hpr)が局在している³⁾。このハプトグロビン関連遺伝子はハプトグロビン遺伝子の祖先型である Hp^1 が遺伝子重複によって生じたものと考えられている。また、1型に比べて2型ハプトグロビンはヘモグロビン結合能が弱いことが知られている。

ハプトグロビン遺伝子欠失について

前述の主要な多型以外にもハプトグロビンにはさまざまな多型が存在し、その1つに $Hp0$ が挙げられる。血清中にハプトグロビンが検出されない患者が特にアフリカを中心に広く認められ、長年先天性無ハプトグロビン血症($Hp0$)の存在が示唆されていた。ところがアフリカはマラリア多発地域であるため、マラリアによる2次的なハプトグロビン低下例を無ハプトグロビン血症であると判断している可能性も否定できないことからその存在を疑問視する研究者も多かった。しかしながら、我々を実際の親子鑑定でハプトグロビン表現型のみで親子関係が否定(孤立否定)される事例や、低ハプトグロビン血症患者が同一家系内に多発する事例を経験したことから、少なくとも一部の無ハプトグロビン血症は遺伝的要因で生じているものと考えた。そこで、秋田大学吉岡らのグループが日本人9,711人の血清ハプトグロビンのスクリーニングの結果見出した、血清ハプトグロビンが高感度ELISA法でも検出されない無ハプ

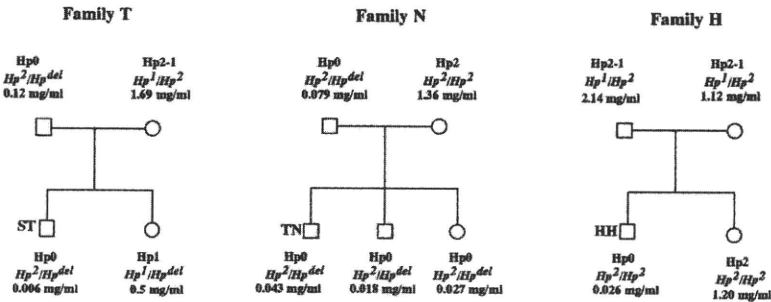


図2 低ハプトグロビン血症家系図
 それぞれ家系内のハプトグロビン表現型、遺伝子型、血中ハプトグロビン濃度を示す。ST, TN, HHが最初に発見された低ハプトグロビン血症患者（発端者）である。Hp2/Hp^{del}が低ハプトグロビン血症になる。（文献5）より引用）

トグロビン血症の患者1名⁴⁾の末梢血の供与を受け、そのゲノムDNAを詳細に解析した。その結果、ハプトグロビン遺伝子完全欠失アリル (Hp^{del}) を同定した⁵⁾。さまざまな制限酵素とハプトグロビンα鎖cDNAおよびβ鎖cDNAのプロンプを用いたサザンブロット解析およびプロモーター領域のPCR解析により、この患者に認められる遺伝子欠失 (Hp^{del}) はハプトグロビン遺伝子のプロモーター領域の上流からハプトグロビン関連遺伝子のイントロン4に及ぶことが示された。さらに低ハプトグロビン血症3家系の遺伝子解析をしたところ、2家系にこの患者と同じ欠失 (Hp^{del}) が認められ、発端者以外にも家系内に低ハプトグロビン血症患者が認められた。

一方Hp^{del}が認められなかった1家系では発端者以外には低ハプトグロビン血症患者は認められなかった (図2)。この症例では発端者のハプトグロビン遺伝子の全てのエクソンの配列を解析したものの変異を検出できなかった。これらの解析によりHp^{del}のヘテロ接合体、特にHp²とHp^{del}のヘテロ接合体が低ハプトグロビン血症に、またHp^{del}のホモ接合体が先天性無ハプトグロビン血症になることが示され、長年疑問視されていたHp0の存在に関する論争に終止符が打たれることとなった。また日本人における家族性低ハプトグロビン血症にHp^{del}が深く関わっていることも示された⁵⁾。

前述のごとくハプトグロビンはヘモグロビンの腎からの漏出やヘモグロビンによる酸化から生体を防御していると考えられているにも関わらずこの症例の無ハプトグロビン血症患者は特に自覚症状はなく健康に過ごしていることが報告されている⁴⁾。なお無ハプトグロビン血症は現在小児慢性特定疾患 (先天性代謝異常, ICD10分類E88.0D) に加えられている。

無ハプトグロビン血症とアナフィラキシーショックについて

頻回の輸血やアルブミン輸液により血清中にIgG型のみならずIgE型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患者が報告されてきた⁶⁾。我々はそのような症例にHp^{del}が関与しているか否かを調べるために、日本赤十字中央血液センターから以下の2例の患者のEB virus transformed Bリンパ球の供与を受け、ハプトグロビン遺伝子の解析をおこなった。

症例1. 33歳の女性。初産、羊水過多、胎児奇形。初回妊娠第31週で25%アルブミン製剤の投与直後にアナフィラキシーショックを発症した。翌日子宮切開、死胎児除去術後、濃厚赤血球輸血後再びアナフィラキシーショックを発症した⁷⁾。

症例2. 94歳の女性。骨髄異形成症候群。7カ月間に3回の濃厚赤血球及び1回の濃厚血小板輸血を受けていたが無症状であった。最後の輸血から

1カ月後に2回目の濃厚血小板輸血を受けた時にアナフィラキシーショックを発症した。2症例とも副腎皮質ステロイド療法が奏効している。

遺伝子解析の結果、これら2症例とも Hp^{del} ホモ接合体であることが示された。しかしながら、 Hp^{del} の欠失点の同定がなされていない当時は診断には煩雑なサザンブロット解析をおこなう必要があった。そこで我々は Hp^{del} の PCR 法を用いた簡便な遺伝子診断法確立を目的として、上記2症例のゲノム DNA を用いて、 Hp^{del} の遺伝子欠失領域のクローニングを試みた。その方法として、ゲノム DNA を切断部が平滑末端になる制限酵素、*AluI*, *DraI*, *EcoRV*, *HaeIII*, *SspI* で切断し、その末端に特定の配列を持つカセットオリゴヌクレオチドを結合させそれぞれの制限酵素のライブラリーを作製した後、既存の配列 (Hp^{del} に存在しているハプトグロビン関連遺伝子エクソン5の配列) とカセットオリゴヌクレオチドの配列による PCR 増幅を行う。Cassette-mediated PCR 法を用いた、*DraI* ライブラリーから最長の約 2.5 kb の PCR 産物が得られたため、この産物の塩基配列を決定したところ Hp^{del} 欠失領域は、ハプトグロビン (Hp) の転写開始点の上流約 5.2 kb からハプトグロビン関連遺伝子のエクソン5から 52 ないしは 53 bp 上流に相当するイントロン4までの、約 28 kb の領域に及ぶことが示された (図1)⁸⁾。2か所の切断点周囲の塩基配列の

alignment を行ったところ、この部分の配列に相同性はなく、切断点で TG の2塩基が一致しているのみであった。このことから、この欠失は非相同性遺伝子組み換えにより生じたものと推定された。欠失点のクローニングにより、欠失点をはさんだ領域でのプライマーを用いることで、315塩基の Hp^{del} 由来の PCR 産物の増幅が可能になった。さらに Hp^{del} で完全に欠失している Hp エクソン1の隣接領域 (476bp) を同時に1本のチューブで増幅するデュプレックス PCR 法の開発により、 Hp^{del} の存在の有無のみならずその接合性を1回の PCR 増幅により診断することが可能となった (図3)⁹⁾。

ハプトグロビン遺伝子欠失の遺伝子頻度

上記遺伝子診断法を用いて様々な集団における遺伝子頻度を調べたところ、現在までのところ、 Hp^{del} は東アジア人 (日本人、韓国人、中国人、モンゴル人) 及び東南アジア人 (タイ人、インドネシア人) 集団に 1~3% の頻度で認められるが、アフリカ人、西洋人、西アジア人、南アジア人の各集団には存在しないものと思われる (表1)⁸⁾⁻¹³⁾。特に約40年前に初めて無ハプトグロビン血症が報告され、その頻度が世界で最も高いと考えられているアフリカ人集団では、現在までに南アフリカのコーサ族 (101名)、ガーナ人 (123名) およびガンビア人 (598名) の解析が行なわれているが Hp^{del} は1例も検出されていない。また我々が行ったガーナ人の血清ハプトグロビンの定量で9名の無ハプトグロビン血症患者と8名の低ハプトグロビン血症患者が認められたものの、共通の遺伝子異常が見出せなかった事から、これらの地域における無ハプトグロビン血症の原因は遺伝的要因のみではないと考えられる¹³⁾。

日本人集団の Hp^{del} の頻度は約 1.5% 程度と推定されることから、そのホモ接合体である無ハプトグロビン血症の頻度は約 4,000 人に1人と予想される⁸⁾。この数字は西洋で最も頻度が高い血漿蛋白質欠損である IgA 欠損症に匹敵する。実際、過去10年間に報告された、原因が特定できた血漿蛋白質欠損の中で、無ハプトグロビン血症は20例と、IgA 欠損症や C9 欠損症よりも発生頻度は

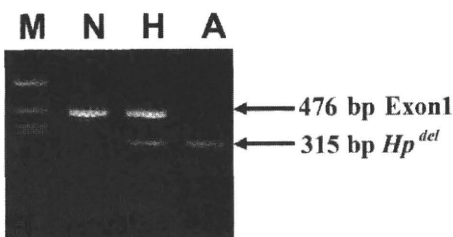


図3 デュプレックス PCR による Hp^{del} の検出 (Hp^{del} と Hp の exon 1)
 Hp-exon1-U, Hp-exon1-L, Hp-del-U, Hp-del-L primer を用いたデュプレックス PCR。
 N: 健常人ゲノム DNA H: 低ハプトグロビン血症患者ゲノム DNA A: 無ハプトグロビン血症患者ゲノム DNA を増幅 (文献8) より引用)

表1 さまざまな集団における Hp^{del} の頻度

集団	染色体数	Hp^{del}	Hp^{del} 頻度 (%)	95% 信頼区間 (%)	文献
東アジア					
Mongolians	238	2	0.8	0.0-2.0	(10)
Japanese	1046	16	1.5	0.8-2.3	(8)
Han Chinese	568	17	3.0	1.6-4.4	(8)
Koreans	314	8	2.5	0.8-4.3	(8)
Koreans	1018	31	3.0	2.0-4.1	(9)
中央アジア					
Tibetans	364	0	0	0.0-0.8	(10)
Tamangs	106	0	0	0.0-2.8	(10)
Uygurs	112	0	0	0.0-2.6	(10)
東南アジア					
Indonesians	210	2	1.0	0.0-2.3	(10)
Thais	400	6	1.5	0.3-2.7	(11)
南アジア					
Bangladeshi	102	0	0	0.0-2.9	(10)
Tamils	104	0	0	0.0-2.8	(10)
Sinhalese	102	0	0	0.0-2.9	(10)
西アジア					
Turks	214	0	0	0.0-1.4	(10)
ヨーロッパ					
Europeans	200	0	0	0.0-1.5	(8)
アフリカ					
Xhosas	202	0	0	0.0-1.5	(8)
Ghanaians	246	0	0	0.0-1.2	(13)
Gambians	1196	0	0	0.0-0.3	(12)

高く、日本人では最も高頻度である。また日本赤十字社による検査では、これまでに調べられた無ハプトグロビン血症患者はすべて Hp^{del} のホモ接合体であり¹⁴⁾、さらにアルブミン投与後に心停止をきたした症例も報告されていることから生命の危険を伴う重篤な副作用である¹⁵⁾。無ハプトグロビン血症患者に、生理食塩水による洗浄赤血球あるいは洗浄血小板の輸血をおこなえば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ので、受血者の無ハプトグロビン血症の診断は重要な検査であると思われる¹⁶⁾。一方2005年度から新たにアルブミンやハプトグロビンなど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。献血者の遺伝子検査の導入により無ハプ

トグロビン血症患者用のアルブミン等の血漿製剤プールの作製も可能となり安全な血液製剤供給に重要な役割を果たすことが期待できる。

Real Time PCR法を用いた Hp^{del} 診断法の開発

無ハプトグロビン血症患者の検出法としては遺伝子診断のほかには血清ハプトグロビン測定が考えられる。具体的には、ヘモグロビンとの複合体の形成によるペルオキシダーゼ活性の変化を検出する方法、電気泳動法、単純放射免疫拡散法、ピークネフェロメトリー法などが挙げられる。中でもピークネフェロメトリー法は、操作が簡便で安定した結果が得られることから、急性期タンパク質や疾患のマーカーの測定法として現在臨床の現場で広く用いられている。しかしながらこれらの方法

は検出限界が数 mg/dL 程度であるため低ハプトグロビン血症と無ハプトグロビン血症の鑑別が困難である。したがって、溶血性貧血などでハプトグロビン代謝が促進された患者や肝疾患のようにその産生が減少した患者では血中ハプトグロビン濃度が容易に検出限界以下となるため、これらの方法を用いて血中にハプトグロビンが検出されなかった低ハプトグロビン血症患者が、しばしば無ハプトグロビン血症 (Hp0) として報告されていたものと考えられる。これらの欠点を補う高感度検出法として ELISA 法が挙げられる。この方法の検出限界は数 μ g/dL 程度であるため、低ハプトグロビン血症と無ハプトグロビン血症の鑑別が可能となる。日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所の嶋田らが開発した ELISA 法は検査時間も 40 分と迅速で、大量の検体を扱うことも可能なため有用な検査法であるが ELISA プレートの準備に 1 晩必要である¹⁴⁾。したがって迅速かつ大量スクリーニング可能な診断法は ELISA 法に代る有用な検査法となることが期待される。しかしながら従来の PCR による診断法はゲノム DNA の抽出から PCR 終了まで 3~4 時間程度の時間が必要である。

そこで、我々は医療現場に導入することを目的とし、DNA 抽出の手間を省き、さらに簡便、迅速で増幅産物のキャリーオーバーを回避することが可能な自動解析法の開発を目指し、水で 100 倍に希釈した血液 1 μ L を用いて 20 μ L の反応系で行う TaqMan real time PCR 法を開発した¹⁷⁾。この方法を用いると採血から約 1 時間 30 分以内で無ハプトグロビン血症の遺伝子診断が可能であり、また 1 検体当たりの検査費用も 150 円程度と試算される。この金額はゲノム DNA の抽出にかかる費用と同程度であることからゲノム DNA を用いる従来の検査法や ELISA 法と比較してもさらに迅速、安価でかつ high throughput な検査法である。今後は実際の医療現場で本検査法の有用性を検証してゆきたいと考えている。

おわりに

Hp^{del} アリルは法医学における親子鑑定の矛盾例の解析から見出され、現在同定されている唯一

の先天性無ハプトグロビン血症 (Hp0) の原因変異である。また一部の研究者から疑問視されていた本疾患の存在を決定付ける役割を果たしたといえる。Real time PCR による診断法が確立し、今後輸血医学の現場で利用されれば、輸血あるいは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} が輸血前に病院で診断できること、さらに遺伝子頻度の調査が行われていないアジア諸国での Hp^{del} 遺伝子頻度検索の検査としても利用できることから、予防医学的に重要な役割を果たすことが期待される。

文 献

- 1) Smithies O, Walker NF : Genetic control of some serum proteins in normal humans. *Nature*, **176** : 1265 - 1266, 1955
- 2) Maeda N, Yang F, Barnett DR, Bowman BH, Smithies O : Duplication within the haptoglobin Hp2 gene. *Nature*, **309** : 131 - 135, 1984
- 3) Maeda N : Nucleotide sequence of the haptoglobin and haptoglobin-related gene pair. The haptoglobin-related gene contains a retrovirus-like element. *J Biol Chem*, **260** : 6698 - 6709, 1985
- 4) 吉岡尚文, 横井 毅, 那谷雅之, 目黒ひとみ, 森田 香, 匂坂 馨 : 血清ハプトグロビン欠損の遺伝学的検討. *生物物理化学*, **35** : 297 - 301, 1991
- 5) Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, Kimura H : The haptoglobin-gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. *Am J Hum Genet*, **62** : 245 - 252, 1998
- 6) 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
- 7) Morishita K, Shimada E, Watanabe Y, Kimura H : Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-haptoglobin in a patient with anhaptoalbuminemia.

- Transfusion 40 : 120 - 121, 2000
- 8) 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
 - 9) Park KU, Song J, Kim JQ : Haptoglobin genotypic distribution (including Hp0 allele) and associated serum haptoglobin concentrations in Koreans. J Clin Pathol, 57 : 1094 - 1095, 2004
 - 10) Soejima M, Koda Y, Fujihara J, Takeshita H : The distribution of haptoglobin-gene deletion (Hp^{del}) is restricted to East Asians. Transfusion, 47 : 1948 - 1950, 2007
 - 11) Shimada E, Odagiri M, Chaiwong K et al : Detection of Hp^{del} among Thais, a deleted allele of the haptoglobin gene that causes congenital haptoglobin deficiency. Transfusion, 47 : 2315 - 2321, 2007
 - 12) Cox SE, Doherty C, Atkinson SH, Nweneka CV, Fulford AJ, Ghattas H, Rockett KA, Kwiatkowski DP, Prentice AM : Haplotype association between haptoglobin (Hp2) and Hp promoter SNP (A-61C) may explain previous controversy of haptoglobin and malaria protection. PLoS ONE, 2 : e362, 2007
 - 13) Teye K, Quaye IK, Koda Y, Soejima M, Tsuneoka M, Pang H, Ekem I, Amoah AG, Adjei A, Kimura H : A-61C and C-101G Hp gene promoter polymorphisms are, respectively, associated with ahaptoglobinaemia and hypohaptoglobinaemia in Ghana. Clin Genet, 64 : 439 - 43, 2003
 - 14) 嶋田英子, 伊佐和美, 前田伊規子, 鎌田裕美, 橋本志歩, 渡辺嘉久, 松田利夫, 岡崎 仁, 十字猛夫 : ハプトグロビン欠損者検出のための簡便なELISA法の開発. Japanese Journal of Transfusion and Cell Therapy, 52 : 493 - 500, 2006
 - 15) Shimode N, Yasuoka H, Kinoshita M et al : Severe anaphylaxis after albumin infusion in a patient with ahaptoglobulinemia. Anesthesiology, 105 : 425 - 426, 2006
 - 16) Nishiki S, Hino M, Kumura T et al : Effectiveness of washed platelet concentrate and red cell transfusions for a patient with anhaptoalbuminemia with antihaptoglobin antibody. Transfus Med, 12 : 71 - 73, 2002
 - 17) Soejima M, Koda Y : Rapid real-time PCR detection of Hp^{del} directly from diluted blood samples. Clin Chem (in Press)

参考資料2

Mikiko Soejima, Yoshiro Koda. Rapid real-time PCR detection of *HP^{del}* directly from diluted blood samples. *Clinical Chemistry*. 2008 Jun;54(6): 1095-1096. 別刷

- tion of plasma volume changes during marathon running. *Br J Sports Med* 1985;19:138-41.
5. Mouzopoulos G, Stamatakis M, Tzurakos M, Tsemeli A, Mani C, Saholeas M, Skandalakis P. Changes of bone turnover markers after marathon running over 245 km. *Int J Sports Med* 2007;28:576-9.

Giuseppe Lippi^{1*}
 Federico Schena²
 Martina Montagnana¹
 Gian Luca Salvagno¹
 Giuseppe Banfi³
 Gian Cesare Guidi¹

¹ Sezione di Chimica Clinica
 Dipartimento di Scienze
 Morfologico-Biomediche
 Università di Verona, Italy

² Sezione di Scienze Motorie
 Dipartimento di Scienze
 Neurologiche e della Visione
 Università di Verona, Italy

³ Istituto Galeazzi e Università di Milano
 Italy

* Address correspondence to this author at:
 Sezione di Chimica Clinica
 Dipartimento di Scienze
 Morfologico-Biomediche
 Università degli Studi di Verona
 Ospedale Policlinico G.B. Rossi
 Piazzale Scuro, 10
 37134, Verona, Italy
 Fax 0039 045-8201889
 e-mail ulippi@tin.it

DOI: 10.1373/clinchem.2007.102657

Rapid Real-Time PCR Detection of *HP^{del}* Directly from Diluted Blood Samples

To the Editor:

Anhaptoglobinemic patients have been reported to experience severe anaphylactic reactions to transfusions due to the production of antihaptoglobin (anti-HP) antibodies (1, 2). Anhaptoglobinemia in patients homozygous for *HP^{del}*, which is a deletion of an approximately 28-kb segment of chro-

sosome 16 extending from the promoter region of the *HP* (haptoglobin) gene to exon 5 of *HPR* (haptoglobin-related protein), has been adequately characterized only recently (1). Use of a simple duplex PCR method has detected the *HP^{del}* allele in East and Southeast Asian populations at frequencies of 1%–3% but this allele has not been detected in African, West and South Asian, and European populations (1, 3, 4). Thus, diagnosing *HP^{del}* homozygosity prior to blood transfusion or the infusion of blood components into individuals from East and Southeast Asian populations is effective for preventing anaphylactoid shock due to anti-HP antibodies. We have developed a simple method that uses a 5' nuclease real-time PCR assay (TaqMan; Applied Biosystems) to detect the *HP^{del}* allele without having to isolate genomic DNA. The ethics committee of Kurume University School of Medicine approved this study protocol.

To distinguish alleles, we performed real-time PCR assays that detect the 2 regions that encompass the *HP^{del}* breakpoint and the 5' region of *HP* exon 1, which is deleted in *HP^{del}*. The 20- μ L PCR reaction contained 200 μ mol/L deoxynucleoside triphosphates, 1 μ L of template (diluted blood or genomic DNA), 0.5 U of *Ex Taq*HS with its buffer (Takara), and the following primers and TaqMan probes (see Fig. 1 legend for sequences): Hp5'-F and -R primers (450 nmol/L); Hp5'-TaqMan probe (125 nmol/L) for detecting the 5' region of *HP*; Hpdel-F and -R primers (900 nmol/L); and Hpdel-TaqMan probe (250 nmol/L) for detecting *HP^{del}*. The PCR temperature profile was 95 °C for 30 s, followed by 50 cycles of denaturing at 95 °C for 5 s and annealing and extension at 60 °C for 30 s. All oligonucleotides were synthesized by Biosearch Technologies. We mon-

itored amplification progress by monitoring the fluorescence at the end of each cycle with an Mx3000P instrument (Stratagene) with excitation and emission wavelengths of 492 and 516 nm (FAM), and 585 and 610 nm (CAL Fluor Red 610).

With genomic DNA (5 ng/ μ L) as a template, we used dual-color scatter plots to distinguish individuals previously determined to have the *HP/HP*, *HP/HP^{del}*, and *HP^{del}/HP^{del}* genotypes. Samples with the *HP/HP* genotype had little FAM fluorescence and plotted along the x-axis, *HP^{del}/HP^{del}* samples had little CAL Fluor Red 610 fluorescence and plotted along the y-axis, and *HP/HP^{del}* samples were located between the homozygote samples in the plot (Fig. 1). To the TaqMan real-time PCR mixture, we directly added 1 μ L of samples diluted 100-fold with PCR-grade water (previously frozen samples of buffy coat from 47 Indonesians from Surabaya or a freshly drawn blood sample from 1 Japanese individual from Fukuoka). Blood was collected in EDTA-containing tubes (Indonesian and Japanese samples) and in a heparin-containing tube (the Japanese sample). The results from 2 independent experiments showed no discrepancies. In addition, the results obtained with the present TaqMan real-time PCR method were fully concordant with those obtained with a previously described PCR method for the same individuals (i.e., 46 *HP/HP* individuals and 2 Indonesians with *HP/HP^{del}*; Fig. 1) (1). We previously had collected blood samples from 105 Indonesian individuals from Surabaya and had not found the *HP^{del}* allele in 58 of these individuals (3); however, in the present study we did find 2 *HP^{del}* alleles among the remaining 47 individuals in this population sample. Thus, the *HP^{del}* allele is also present in Southeast Asian popula-

Letters to the Editor

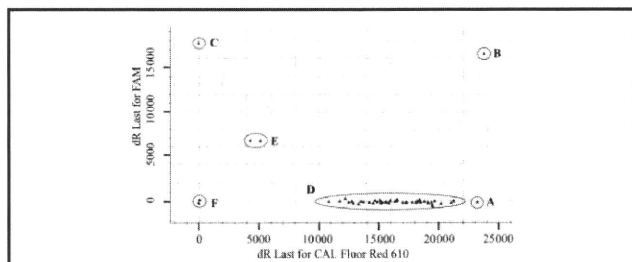


Fig. 1. Real-time PCR results for distinguishing HP^{del} and HP alleles.

The results of a dual-color scatter plot of fluorescence signals (dR Last) from genomic DNA from 3 Japanese individuals (A, HP/HP ; B, HP/HP^{del} ; C, HP^{del}/HP^{del}) and blood samples from 47 Indonesians (D, 45 HP/HP samples; E, 2 HP/HP^{del} samples) and 1 Japanese individual (D, HP/HP). Results for no added template (F) are also indicated. We used the following primers and TaqMan probes [labeled at the 5' end with fluorescent substances and at the 3' end with Black Hole Quenchers (BHQ) (Biosearch Technologies)]: $HP5'-F$, 5'-CACATTACTGATTTCAGGCTGGA-3' (sequence from 513–536 bp, GenBank no. M10935); $HP5'-R$, 5'-CCTTTTCACAGTAATTTCTCCACCT-3' (reverse sequence from 571–596 bp, GenBank no. M10935); $HP5'-TaqMan$ probe, 5'-CAL Fluor Red 610-AGCTTTTAAGCAATAGGGAGATGGCCACA-BHQ2-3' (sequence from 538–566 bp, GenBank no. M10935); $HPdel-F$, 5'-TCTTTATGGCACTGGGGAACA-3' (sequence from 694–714 bp, GenBank no. AB025320); $HPdel-R$, 5'-AGCAAGACACTCGTGAGTGGAA-3' (reverse sequence from 822–801 bp, GenBank no. AB025320); and $HPdel-TaqMan$ probe, 5'-FAM-TGTGCAAGAGCCITTC AATTTGATCA-BHQ1-3' (reverse sequence from 772–799 bp, GenBank no. AB025320). The HP^{del} breakpoint is between base pairs 782 and 783 (GenBank accession no. AB025320).

tions, Thais (4), and Indonesians (this study) at frequencies similar to those of East Asians.

A previous study demonstrated that TaqMan real-time PCR methods can distinguish alleles from samples of dried whole blood (5). In the present study, we instead diluted samples of whole blood 100-fold to decrease the concentrations of substances that could inhibit the PCR reaction or quench the fluorescence signal. This procedure is simple, but a proper assessment of its reliability requires further evaluation with many more samples. Compared with the conventional PCR approach, the present TaqMan real-time PCR assay is simple and rapid (<1.5 h). More-

over, this automated method is cost-effective and amenable to high throughput, eliminates preparation of genomic DNA and post-PCR handling, and prevents contamination via PCR product carryover. Thus, application of this method for routine clinical diagnosis prior to blood transfusions or the infusion of human blood products may prevent anaphylactoid shock caused by anti-HP antibodies. This method may also be useful for detecting HP^{del}/HP^{del} homozygotes among donors of blood samples used for preparing blood products, such as albumin for anaphylactoidemic recipients, and for large-scale screening of HP^{del} in various populations.

Grant/Funding Support: This work was supported in part by grants-in-aid for Scientific Research from the Ministry of Education, Science, Culture and Sports of Japan.

Financial Disclosures: None declared.

Acknowledgments: We thank Katherine Ono for editing the English in this manuscript.

References

- Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, Shimada E, Nishimura M, Morishita K, et al. Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anaphylactoidemic patients with anti-haptoglobin antibody that causes anaphylactoid transfusion reactions. *Blood* 2000;95:1138–43.
- Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, Ikeda K, Nihara H, Maeda I, et al. Anaphylactoid transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG haptoglobin antibodies. *Transfusion* 2002;42:766–73.
- Soejima M, Koda Y, Fujihara J, Takeshita H. The distribution of haptoglobin-gene deletion (Hp^{del}) is restricted to East Asians. *Transfusion* 2007;47:1948–50.
- Shimada E, Odagiri M, Chaiwong K, Watanabe Y, Anazawa M, Mazda T, et al. Detection of Hp^{del} among Thais, a deleted allele of the haptoglobin gene that causes congenital haptoglobin deficiency. *Transfusion* 2007;47:2315–21.
- Ulvik A, Ueland PM. Single nucleotide polymorphism (SNP) genotyping in unprocessed whole blood and serum by real-time PCR: application to SNPs affecting homocysteine and folate metabolism. *Clin Chem* 2001;47:2050–3.

Mikiko Soejima
Yoshiro Koda*

Department of Forensic Medicine and
Human Genetics
Kurume University School of Medicine
Kurume, Japan

* Address correspondence to this
author at:

Department of Forensic Medicine and
Human Genetics
Kurume University School of Medicine
Kurume 830-0011, Japan
e-mail ykoda@med.kurume-u.ac.jp

DOI: 10.1373/clinchem.2008.103747