

総 説

輸血医療における DNA 診断の応用

国島 伸治 神谷 忠

愛知県赤十字血液センター

(平成13年12月3日受付)

(平成14年2月28日受理)

APPLICATION OF NUCLEIC ACID-BASED METHODS IN TRANSFUSION MEDICINE

Shinji Kunishima and Tadashi Kamiya

Japanese Red Cross Aichi Blood Center, 539-3 Minamiyamaguchi, Seto 489-8555, Japan

Key words : 16S ribosomal RNA, Human genome project, Microsatellite analysis, Positional cloning, Transfusion-associated graft versus host disease

はじめに

2001年初頭のセンセーショナルなニュースとして、ヒトの30億塩基対にもおよぶゲノムDNA配列の決定が発表された^{1,2)}。概要配列という注釈付きではあるがヒトの全ての遺伝暗号、すなわちヒトの仕様書が明らかとなり、ポストシーケンスあるいはポストゲノム時代の到来とも言われている。今後も日々進歩しつつある遺伝学的解析技術やヒトゲノム情報データベースの蓄積が医学・医療へ与える影響には枚挙にいとまがないことは明らかである。これら最新の技術・情報は研究室だけの出来事ではなく、現在の輸血医療へも広く利用されている。本総説では、ヒトに限らず、ウイルスおよび細菌のゲノムの情報を利用した輸血医療における検査・解析法の実際について紹介する。なお、HLA検査は古くから移植関連検査として輸血医療において重要な役割を果たしてきているが、多くの優れた総説があるために割愛する。

1. ゲノム - ヒトゲノム - ヒトゲノム解析計画

ゲノムとは生物が個体として生存するために必要な遺伝情報の総和であり、全ての遺伝子と遺伝子間領域を含む細胞が持つ全ての染色体DNAを指す。具体的に言えばヒトにおけるゲノムとは、

22本の常染色体とXとYの2本の性染色体をあわせて24本の染色体DNAの塩基配列を指す。ヒトゲノム解析計画とは、30億塩基対からなるヒトゲノムの全塩基配列を決定し、完全な遺伝情報解明を最終目的とする全世界的プロジェクトであり、1980年代後半にアメリカを中心として発足した。当時は、ヒトゲノム配列はわずかにその数%が決定されているのみで、この計画は、アポロ計画と同等あるいはそれ以上に困難なものであると考えられていた。計画発足時には、1) ヒト染色体の詳細な物理地図作成、2) 塩基配列解析技術の開発、3) 情報ネットワークおよびコンピュータ能力の拡大の3つの目標が掲げられた。後者2つに関しては革新的な技術開発が相次いだ結果、当初の計画よりはるかに早くヒトゲノムが解読されようとしている。ヒトゲノムが解読されることによって、当初の目的であった遺伝性疾患の発症機構の解明のみならず、数多くの疾患において的確な診断・治療法および予防法が開発されることが予想される。さらに、発生・恒常性・老化など生命現象の解明や、言語・記憶・知能といったヒト特有の機能が解明されることが期待されている。ゲノム配列決定はヒトのみならず、ウイルス、細

菌、植物など数多くの生物種についても進行中である。

2. ウイルスゲノム

ウイルスのゲノム情報は、核酸増幅検査(NAT)に代表されるウイルス感染症のスクリーニング検査に用いられている³⁾。すなわち、NATではHBV、HCV、HIVの3種のウイルスについて、そのゲノム配列を基にウイルスゲノムを血液から抽出、増幅後、検出する。このNAT技術によって感染初期のウインドウ期の短縮や、ごく微量のウイルスを含む血液を輸血用血液製剤から除外することができ、輸血用血液製剤の安全性向上に寄与している。また、NATは年間およそ600万検体にも達する全ての献血由来の血液に対して施行するために、高精度・高速化が必要不可欠であり、その行程のほとんどが自動化されている。検体判別、プーリング、DNA抽出、増幅、検出の何れの段階においてもゲノム解析から派生した技術が応用されている。

血液センターにて全ての献血由来の血液に対して施行されている高感度・高精度な血清学的ウイルススクリーニング検査にもかかわらず、輸血後にウイルス感染症を発症する場合がある。このような輸血後ウイルス感染症が疑われる症例においては、患者血液中に存在するウイルスと実際に輸血された血液製剤あるいは供血者の保管検体中に検出されるウイルスの濃度および遺伝子型を比較する事により感染症発症の因果関係を知る事ができ、多くの場合、供血者がウイルスに感染後ウイルス抗原あるいは抗体が陽性になる前のごく短いウインドウピリオドの間に献血することが原因であることが明らかとなっている⁴⁾。

3. 細菌ゲノム

血液製剤の無菌試験

血液センターにおける輸血用血液製剤の無菌試験は、製剤より一部を抜き取り培養することにより施行されている。通常の無菌試験では結果の判定には2週間を要するため、血漿製剤以外で出庫前の製剤に対して無菌試験を施行することは困難である。さらに、細菌の混入があった場合には室温にて保存される血小板製剤で特に問題となる可

能性がある。我々は、NAT同様、分子生物学的技術を用いた迅速な無菌試験法の開発を最終目的とし、その第一段階として無菌試験において血液製剤への細菌の混入が疑われた場合の迅速な検出および同定法の確立とその基礎的な検討を行っている⁵⁾⁻⁷⁾。分子生物学的技術を用いる理由は、核酸を用いた細菌の検出では培養に因るものに比べて一般的に迅速で正確であり、検出および同定に際してその根拠となるものは細菌の生物学的性状ではなく、核酸の塩基配列であるために細菌同定に必要とされる知識および技術習得の必要性は低いからである。

血液製剤への細菌の混入は文献上およそ0.01%から0.2%の頻度において認められるとされている⁸⁾⁹⁾。混入したとの報告がある細菌の多くが皮膚常在菌であるが、混入する可能性のある細菌は多岐にわたるために、特定の細菌(あるいは遺伝子)を標的としたDNAの増幅ではすべての細菌の混入を検出することは困難である。一方で、リボソームRNA遺伝子は全ての細菌に存在し、細菌に共通した塩基配列の普遍領域と、菌種ごとに特異な配列の可変領域が存在する¹⁰⁾。従って、普遍領域に対してPCRプライマーを設定することによって1組のプライマーですべての細菌のDNAを増幅(すなわち検出)することができる。さらに、普遍領域に挟まれる可変領域の配列を決定し、公共データベースに登録されている配列との相同性について比較することによって菌種の同定が可能になる。このデータベースには、2,000種類以上の菌種の配列が登録されており、その登録数も日々増加している。この一連の解析に要する日数はおよそ1日であり、培養による同定と比較すると早期に同定結果が得られる。実際の解析方法のフローチャートをFig.1に示す。

4. ヒトゲノム

ヒトゲノム情報を用いた検査・解析は、主にDNA型鑑定に基づいた方法が行われている。DNA型鑑定とは、多型性DNAマーカーを解析することにより人それぞれのDNAの“型”を決定するものである。DNAマーカーは発見された順に、1) 制限酵素断片長多型(RFLP)、2) ミニサ

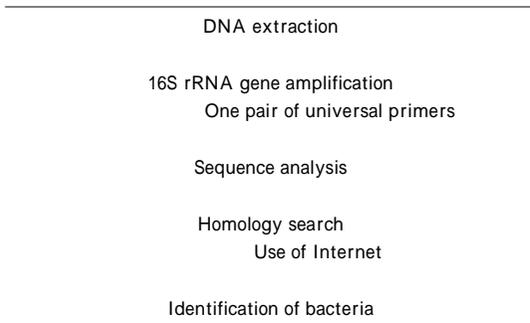


Fig. 1 Flow chart of 16S rRNA gene analysis

テライト多型あるいは VNTR と呼ばれる DNA の数十塩基対の繰返し配列, 3) CACACA... といった 2 ないし数塩基対の単純な配列の繰返し回数に多型が存在するマイクロサテライト多型がある. RFLP は現在でも HLA や血小板抗原等のタイピングに広く用いられているが, マイクロサテライト多型部位はゲノム上に豊富に存在し, アリル数が多数で, PCR の適応が可能であるために利用価値は極めて高い.

1) 血友病での保因者診断

血友病は代表的な先天性出血性素因で血友病 A と血友病 B があり, それぞれ血液凝固因子第 VIII 因子および第 IX 因子活性の欠乏が原因で出血症状を呈する. 本疾患の止血管理は献血由来あるいは遺伝子組み換え型凝固因子の補充療法が中心となるが, そのためには的確な診断が必要となる. 通常での臨床診断は凝血的検査により行われるが, 遺伝相談としての保因者診断あるいは出生前診断に際しては従来の家族歴および血液凝固検査では精度の不確かさが問題となることがあった. 一方で, 血友病 A の遺伝子解析に関しては第 VIII 因子遺伝子が非常に巨大であるために個々の症例で遺伝子異常を特定し, 保因者診断などへ応用することは困難なことが多かった. そこで, 第 VIII 因子遺伝子が座位する X 染色体上の DNA マーカーを指標にした間接診断法が行われている. Fig. 2 には, 第 VIII 因子遺伝子内に存在する HindIII 認識部位の多型性を利用した PCR-RFLP を示す. 保因者診断を希望して受診した女

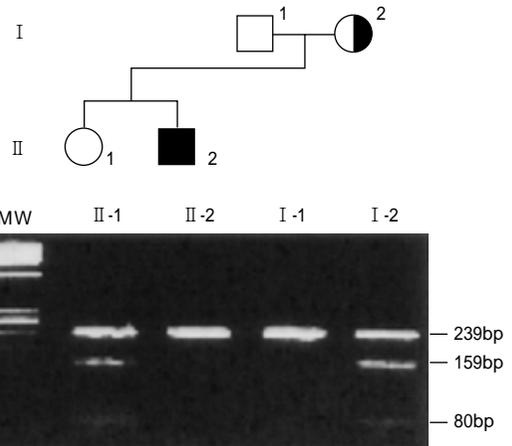


Fig. 2 Carrier detection in a hemophilia A family by use of the HindIII PCR-RFLP.

Open square, healthy father ; semi-solid circle, definite carrier ; open circle, examined female ; solid square, hemophiliac patient. The female (II-1) had a paternal HindIII-undigested 239bp band and maternal HindIII-digested 159 + 80bp bands. The patient had a maternal HindIII-undigested 239 bp band, indicating that the maternal HindIII-digested 159 + 80bp bands were not related to the defective F-VIII gene. Thus the female (II-1) was diagnosed as not a carrier.

性 (II-1) は, HindIII 認識部位を持たない 239bp アリルと HindIII 認識部位を持つ 159bp + 80bp アリルのヘテロ接合体であるが, 239bp アリルは父親 (I-1) から, 159bp + 80bp アリルは母親 (I-2) から受け継いでいることが分かる. 一方, 患者である弟 (II-2) は 239bp アリルを持つことから母親の 159bp + 80bp アリルは正常な X 染色体上にある第 VIII 因子遺伝子であることが分かり, この女性は保因者でないことが診断される¹¹⁾.

2) 輸血後 GVHD

輸血後 GVHD は照射血の使用によって, 現在ではほとんど見られなくなっているが, 発症すると予後不良な輸血副作用のひとつで, 受血者と供血者の一方向適合により引き起こされることが知られている (Fig. 3, A). すなわち, AA という遺伝子型の供血者のリンパ球が AB という遺伝子型の受血者へ輸血された場合, AB の受血者は AA のリンパ球を異物と認識できない. 一方で

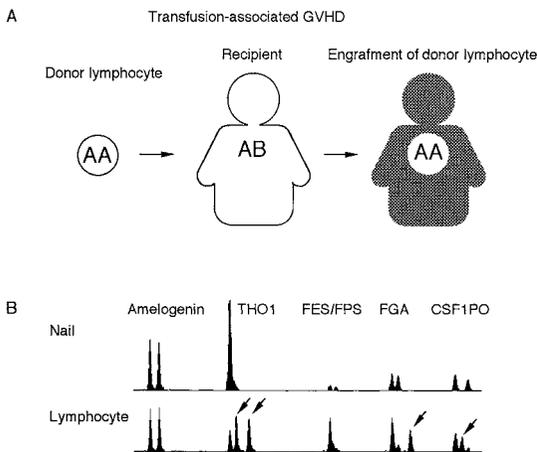


Fig. 3 Transfusion-associated graft versus host disease.

(A) Schematic presentation of the mechanism of transfusion-associated graft versus host disease. When the donor is homozygous for one of the recipient's HLA haplotypes (AA) and the recipient has an HLA type that is haploidentical with that of the donor (AB) the recipient is unable to reject the donor's T lymphocytes, which can react against the recipient's tissues. (B) Representative electropherograms of five short tandem repeat loci in a case of transfusion-associated graft versus host disease. Nail, electropherogram obtained with DNA from the patient's nail; lymphocyte, electropherogram obtained with DNA from the patient's CD8+ lymphocytes. Arrows indicate peaks not present in the patient's somatic cells.

AA のリンパ球は AB の受血者を異物と認識し受血者組織・臓器を傷害する。確定診断は、患者体内に供血者由来リンパ球の存在を検出することで、ここにミニサテライト多型あるいはマイクロサテライト多型解析を用いる¹²⁾。すなわち、患者の爪あるいは毛髪から抽出した DNA 上のマイクロサテライト解析の結果から患者本来の体細胞型を決定し、患者血液から分離したリンパ球から抽出した DNA での結果に本来の体細胞型以外の異なるパターンを検出することで GVHD 発症を確定することが出来る (Fig. 3 B)。患者リンパ球での THO1, FGA および CSF1PO ローカスにおいては本来の体細胞型とは異なるピーク (矢印) が認められる。さらに、輸血された血液製剤から得

た DNA 型と患者で見いだされた体細胞型と異なるパターンが一致すれば原因となった血液製剤 (供血者) を特定することが可能となる。

3) HLA 一致移植症例での生着確認

ドナー/レシピエント間で HLA 座の完全一致した幹細胞移植症例での生着確認には HLA タイピングは適応できないために、マイクロサテライト解析を施行する。ドナーおよびレシピエントの移植前および移植後の検体について、HLA 遺伝子群が存在する 6 番染色体以外のマイクロサテライト多型部位を解析することにより、ドナーの遺伝子型とレシピエントの移植後の遺伝子型が同一であれば生着が確認される。同様な考え方で、移植後に発症あるいは再発した腫瘍の起源解明についてもマイクロサテライト解析を施行することにより、本人由来あるいはドナー由来のものであるかを知ることができる¹³⁾。

4) ポジショナルクローニング

ポジショナルクローニングは、原因遺伝子についての手がかりが無く、機能解析からのアプローチが不可能である遺伝性疾患の原因遺伝子を染色体上の位置から直接同定する方法である。特異な染色体異常を有する患者、あるいは遺伝性疾患の家系を用いた連鎖解析などによって責任遺伝子座を決定する。連鎖解析とは、遺伝性疾患を有する家系において疾患表現型と染色体上の多型性 DNA マーカーとの連鎖を解析し、その疾患の責任遺伝子座を決定する方法である。従来は、その領域の物理地図を作製し、機能遺伝子を単離後、変異の起きている遺伝子を同定していたが、この過程には多大な労力、費用、時間が費やされていた。この、整列化したクローンを作成し配列決定をして行く工程は、ゲノム配列決定法そのものである (Fig. 4)。ヒトゲノム配列が明らかとなった今日では遺伝子座が同定できればその領域に発現する候補遺伝子を探索し、変異解析を施行することが可能となり、数年前には考えられない程迅速に疾患の原因遺伝子同定が可能になっている。

May-Hegglin anomaly (MHA) 原因遺伝子の同定

MHA は、巨大血小板、血小板減少症および顆粒球封入体を 3 主徴とし、常染色体優性遺伝形式を

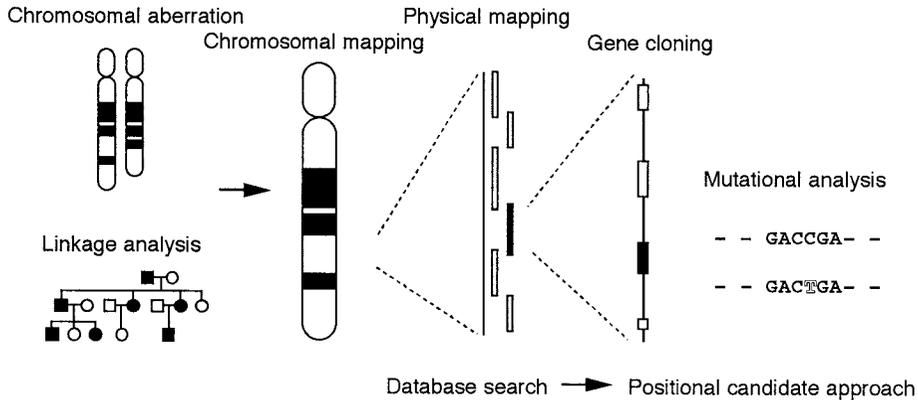


Fig. 4 Strategy of positional cloning.

Positional cloning is an approach to cloning a gene on the basis of its chromosomal location. Initial localization of the disease gene to a particular chromosome (Chromosomal mapping) may be achieved through a unique chromosomal aberration or by linkage analysis. High-resolution physical mapping for cloning and analysis of a disease gene is then necessary. Now that the DNA sequences of the human genome have been elucidated, disease genes are likely to be identified by combining genetic mapping with mutational analysis in a positional candidate approach.

とるまねな血小板機能異常症である。臨床症状は軽度な出血傾向であるが、輸血療法の適応が問題となることもある。本疾患の的確な診断および治療法の確立には、原因遺伝子を明らかにすることが必要であった。我々は連鎖解析により本疾患の責任遺伝子座を22番染色体長腕に同定した¹⁴⁾。1999年12月、ヒトゲノム解析計画として最初のヒト染色体の全塩基配列解読が日英米の国際協力の元に22番染色体についてなされ、MHA責任遺伝子座を含む領域の詳細な物理的地図が明らかとなった¹⁵⁾。この領域にはおよそ10種類の遺伝子が存在し、それらの機能および発現部位からA型細胞性ミオシン重鎖(nonmuscle myosin heavy chain-A, NMMHCA)をコードし、巨核球および顆粒球に強く発現し、顆粒球の分化に伴い発現レベルが上昇することが報告されていたMYH9に注目した¹⁶⁾。複数のMHA家系においてMYH9の変異解析を施行したところ、いずれの家系においても異常が見い出され、MHAはMYH9異常により引き起こされることが明らかとなった¹⁷⁾。

ポジショナルクローニング法は、疾患の原因遺伝子のみならず表現形質が評価可能な遺伝性素因

であれば応用することができる。Dombrock血液型はその最初の報告以来、対応抗原は不明であったが、家系を用いた連鎖解析によって12番染色体短腕に責任遺伝子座が同定され¹⁸⁾その領域に発現する遺伝子を候補として、その原因遺伝子がADP ribosyltransferaseであることが最近明らかとされている¹⁹⁾。

おわりに

ゲノム解析技術以外にも、生命科学の進歩はまさに日進月歩であり、クローン技術や再生医学の技術が輸血医療の分野においても新しい展開をもたらすことが期待されている。一枚のスライドガラス上で数千の遺伝子が解析できるDNAチップ技術を用いることにより、HLAや血小板抗原をタイピングすることが可能になる。さらに、血液細胞をフラスコ内で作ったり、特定のHLAをもつ血小板製剤を作るなどオーダーメイドの血液製剤ができる日も遠くはないと考えられる。基礎研究で得られた成果が臨床応用されるまでにはそれほど多くの時間はかからないであろうし、輸血医療にも進んで取り入れていかなければならない。

本総説の要旨は第49回日本輸血学会総会(2001

年5月,東京)教育プログラム「輸血医学とゲノム情報」にて報告した。

文 献

- 1) International Human Genome Sequencing Consortium. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature*, 409 : 860-921, 2001.
- 2) Venter, J.C., Adams, M.D., Myers, E.W., et al. : The sequence of the human genome. *Science*, 291 : 1304-1351, 2001.
- 3) Japanese Red Cross NAT Screening Research Group : Nationwide nucleic acid amplification testing of hepatitis B virus, hepatitis C virus and human immunodeficiency virus type 1 for blood transfusion and follow-up study of nucleic acid amplification positive donors. *Jpn. J. Infect. Dis.*, 53 : 116-123, 2000.
- 4) Matsumoto, C., Tadokoro, K., Fujimura, K., et al. : Analysis of HBV infection after blood transfusion in Japan through investigation of a comprehensive donor specimen repository. *Transfusion*, 41 : 878-884, 2001.
- 5) 国島伸治, 井上千加子, 西本全一郎, 他 : 16S rRNA 遺伝子増幅法を用いた血液製剤の無菌試験への応用. *血液事業*, 23 : 57-60, 2000.
- 6) Kunishima, S., Inoue, C., Nishimoto, Z., et al. : Application of 16S ribosomal RNA gene amplification to the rapid identification of bacteria from blood culture bottles. *Transfusion*, 40 : 1420-1421, 2001.
- 7) Kunishima, S., Inoue, C., Kamiya, T., et al. : Presence of *Propionibacterium acnes* in blood components. *Transfusion*, 41 : 1126-1129, 2001.
- 8) Soeterboek, A.M., Welle, F.H.W., Marcelis, J.H., et al. : Prevalence of bacterial contamination in whole blood after donation. *Vox Sang.*, 69 : 149, 1995.
- 9) Blajchman, M.A. : Bacterial contamination and proliferation during the storage of cellular blood products. *Vox Sang.*, 74(Suppl 2) : 155-159, 1998.
- 10) Schmidt, T.M., Relman, D.A. : Phylogenetic identification of uncultured pathogens using ribosomal RNA sequences. *Methods Enzymol.*, 235 : 205-222, 1994.
- 11) 小嶋哲人 : 血友病の遺伝子異常と遺伝子診断. *日本生理学雑誌*, 60 : 31-42, 1998.
- 12) Wang, L., Juji, T., Tokunaga, K., et al. : Polymorphic microsatellite markers for the diagnosis of graft-versus-host disease. *N. Engl. J. Med.*, 330 : 398-401, 1994.
- 13) 岡本昌隆, 都築基弘, 長谷川明生, 他 : 同種骨髄移植後に donor 由来の B 細胞リンパ腫を発症した ATL の 1 例. *臨床血液*, 41 : 1052, 2000.
- 14) Kunishima, S., Kojima, T., Tanaka, T., et al. : Mapping of a gene for May-Hegglin anomaly to chromosome 22q. *Hum. Genet.*, 105 : 379-383, 1999.
- 15) Dunham, I., Shimizu, N., Roe, B.A., et al. : The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature*, 402 : 489-495, 1999.
- 16) Toothaker, L.E., Gonzalez, D.A., Tung, N., et al. : Cellular myosin heavy chain in human leukocytes : isolation of 5' cDNA clones, characterization of the protein, chromosomal localization, and upregulation during myeloid differentiation. *Blood*, 78 : 1826-1833, 1991.
- 17) Kunishima, S., Kojima, T., Matsushita, T., et al. : Mutations in the NMMHC-A gene cause autosomal dominant macrothrombocytopenia with leukocyte inclusions (May-Hegglin anomaly / Sebastian syndrome). *Blood*, 97 : 1147-1149, 2001.
- 18) Mauthe, J., Coghlan, G., Zelinski, T. : Confirmation of the assignment of the Dombrock blood group locus (DO) to chromosome 12p : narrowing the boundaries to 12p12.3-p13.2. *Vox Sang.*, 79 : 53-56, 2000.
- 19) Gubin, A.N., Njoroge, J.M., Wojda, U., et al. : Identification of the Dombrock blood group glycoprotein as a polymorphic member of the ADP-ribosyltransferase gene family. *Blood*, 96 : 2621-2627, 2000.