

原 著

ハプトグロビン欠損者検出のための簡便な ELISA 法の開発

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

日本赤十字社血液事業本部中央血液研究所

(平成 17 年 12 月 19 日受付)

(平成 18 年 3 月 3 日受理)

背景：ハプトグロビン (Hp) 欠損は、国内における輸血アナフィラキシー発生の一因と考えられている。

目的：サンドイッチ ELISA を用いた簡便な Hp 欠損の検出法を検討する。

方法：被検患者血清、コントロール血清、スタンダード Hp を、ウサギ抗ヒト Hp ポリクローナル抗体を固相化したマイクロプレートに添加して、10 分間反応させ、プレートを洗浄後、結合した Hp を HRP 標識抗ヒト Hp ヤギ血清および TMB 基質で検出した。被検血清とスタンダード Hp の示す吸光度を比較して患者が Hp 欠損か否かを判定した。

結果：上記の方法で、血清中に存在する 3 μ g/dL 以上の濃度の Hp を検出できた。また、ピークレートネフェロメトリー法で血清 Hp 含量が 5mg/dL 以下と測定された患者の中から、先天性の Hp 欠損者を検出することができた。判定は肉眼でも可能であった。

結論：本法は、操作が簡便で、検出感度が高い。本法を用いれば先天性 Hp 欠損者と二次的に血中 Hp 含量が減少した患者の鑑別が可能である。頻回輸血を必要とする患者の輸血時のアナフィラキシー発生の予防や、将来の Hp 欠損者のためのドナープールの作製に有用な方法と思われる。

キーワード：ハプトグロビン欠損、輸血アナフィラキシー、簡便な ELISA

はじめに

輸血開始直後にアナフィラキシーを発生したハプトグロビン (Hp) 欠損者が、日本赤十字社による国内で発生した非溶血性輸血副作用を疑われる症例を対象とした調査の過程で見出された¹⁾²⁾。患者血中には同種抗ハプトグロビン (Hp)-IgG 抗体に加えて Hp 特異 IgE 抗体が検出され、これらの抗体がアナフィラキシー発生に関与することが示唆された²⁾。また、患者の Hp 遺伝子解析から欠失アリル (Hp^{del}) の構造が明らかとなり、 Hp^{del} のアリル頻度から国内での Hp 欠損の頻度は 1/4,000 と推定された³⁾。これらの結果から、Hp 欠損が、国内の血漿タンパク質欠損による非溶血性副作用発生に大きく関与する因子であることが示唆された。

Hp 欠損者に発生する重篤な輸血副作用を予防するには、患者が欠損か否かを迅速に判断することが重要である。本研究では、Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) による血中含量の測定を用いて、短時間で判定が可能で簡便な欠損の検査方法を検討した。

材料と方法

検査用プレートの作成

96 ウェルマイクロプレート (Maxsorp, Nalge Nunc#469078) に抗ヒト Hp ウサギ抗体 (DAKO, #A0030) を炭酸/炭酸水素ナトリウム緩衝液 (pH 9.6) で 10,000 倍に希釈し、1 ウェルあたり 100 μ L 添加し 4 $^{\circ}$ C で一夜放置した。抗体溶液を捨てて、0.1% (W/V) NaNO₃ を含む 1% (W/V) BSA/PBS を 1 ウェルあたり 150 μ L 分注し、37 $^{\circ}$ C で 1 時間保

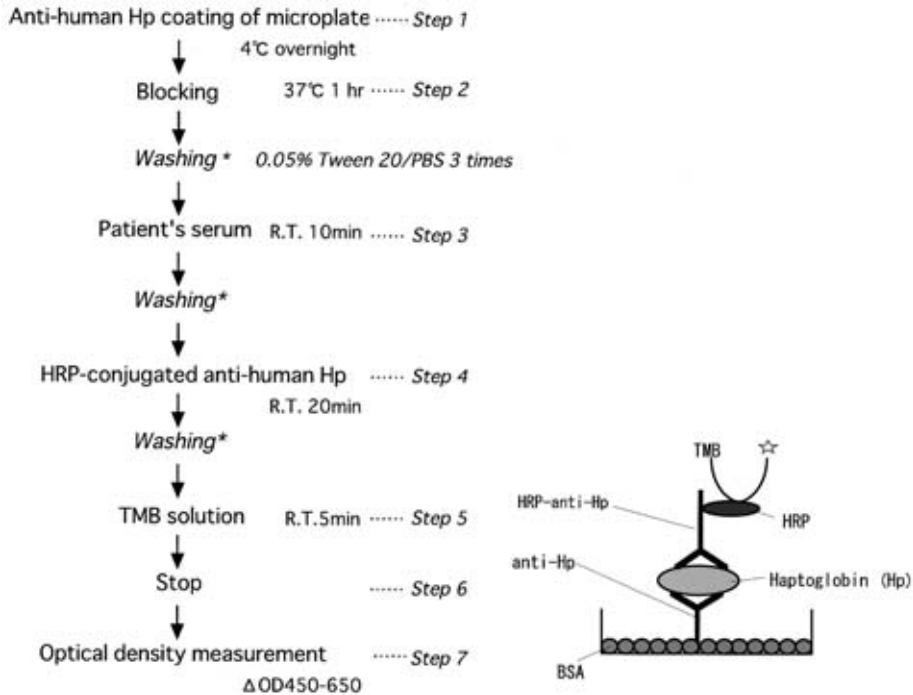


Fig. 1 Assay procedure for the detection of haptoglobin deficiency

温しブロッキングして検査用プレートを作成した。作製したプレートは1月以内では4°Cで保管し使用した。それ以上の長期間では-30°Cで保管し、使用時に37°Cで融解した。

ELISA

プレートを0.05% Tween20を含むPBS (PBS-T)で3回洗浄後、被検検体25μLを添加し、室温で10分間反応させた。PBS-Tで同様に洗浄後、1% BSA加PBS-Tで20,000倍に希釈したHorse-radish peroxidase (HRP) 標識抗ヒトHpヤギ抗体 (EY Laboratories, Inc. #PA-2121-1) を50μL/ウェル添加して、室温で20分間反応させた。PBS-Tで洗浄後、TMB基質溶液 (Bio FX Laboratories, #TMBW-01001-01) 50μL/ウェル添加して10分間反応させた後、1Mリン酸を50μL/ウェル添加し発色反応を停止させて、マイクロプレートリーダーで450nm~650nmの差吸光度を測定した。Fig.1に測定法の概略を示した。

標準曲線の作製、検査標準の設定と欠損の判定
精製Hp (プールヒト血漿由来、混合 Pheno-

type, Athens Research #16-16-080116) を2ng/dL~100mg/dLに段階希釈して前述の方法で差吸光度測定し、標準曲線を作成し、測定感度を確認した。得られた標準曲線から、測定可能な濃度範囲内に2種類のHp濃度を選択して、標準を設定した。

被検検体のHp含量はELISA測定で得られた差吸光度を同時に測定した標準と比較して、2種の標準を挟んだ3種類の濃度範囲に含まれるとして求め、低濃度標準を検出限界とし、これより低値の差吸光度を示す検体を欠損と判定した。

特異性の検討

プール健康人血清および血漿、Hp欠損者血清を原液から 10^{-8} 倍まで段階希釈して測定し、発色反応の特異性を確認した。

Hpサブタイプの影響の検討

3種のサブタイプの精製Hp, Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2 (Sigma #H0138, #9887および#9762) を測定し、相互の差吸光度の差の有無を検討した。

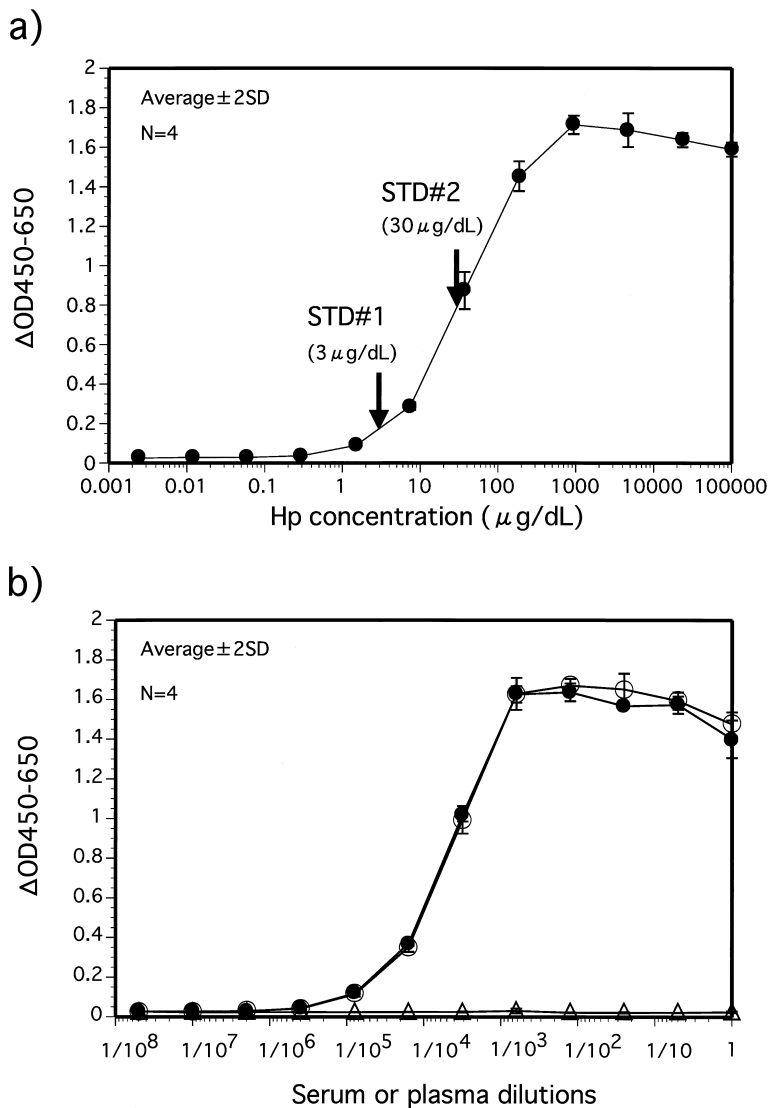


Fig. 2 Absorbance values obtained from various concentrations of purified haptoglobin, pooled normal human plasma or serum, and haptoglobin-deficient plasma. a) Standard curve of purified human haptoglobin of mixed phenotype. Arrows show the haptoglobin concentrations of the standards. b) Differential optical density obtained from pooled plasma collected from twenty Japanese healthy voluntary donors with a haptoglobin concentration of 66.4 mg/dL, determined by the peak-rate nephelometry method (●-●), pooled serum collected from twenty healthy Japanese volunteer donors with a haptoglobin concentration of 82.5 mg/dL (○-○) and plasma collected from a haptoglobin-deficient individual (△-△).

夾雑物の影響の検討

測定値に与える共存物質の影響は、Hp 欠損者血清、溶血ヘモグロビン、ビリルビン、乳ビ(干

渉チェック A プラス, シスメックス) を精製 Hp に添加し、差吸光度に与える影響を用いて調べた。

Table 1 Effects of Hp sub-type and coexisting materials on Hp detection using ELISA

a) Hp sub-type		b) Coexisting materials		
Hp sub-type	$\Delta OD_{450-650}$ Recovery (%) ^{*1}	Coexisting materials	Concentrations	$\Delta OD_{450-650}$ Recovery (%)
Hp1-1	100	None ^{*2}	—	100
2-1	104 ± 5.9	Hemoglobin	500 mg/dL	86.4 ± 3.6
2-2	101 ± 3.1		5 mg/dL	82.2 ± 1.8
			500 µg/dL	83.0 ± 3.5
			50 µg/dL	84.3 ± 13.5
			5 µg/dL	99.1 ± 5.5
			0.05 µg/dL	101 ± 3.2
		Hp-deficient plasma	90% (V/V)	86.7 ± 3.5
		Bilirubin (Saturated)	19 mg/dL	97.3 ± 4.7
		Bilirubin (Free)	17 mg/dL	102 ± 2.4
		Lipid	2,520 ^{*3}	101 ± 5.6

^{*1}100 µg/dL of three Hp-sub types were assayed.

Recovery was calculated using Hp1-1 as 100%.

Mean ± 2SD. N = 4

^{*2}Purified human Hp (mixed type, 100 µg/dL) was assayed.

^{*3}Formazin Nephelometric Unit

Mean ± 2SD. N = 4

ネフェロメトリーで Hp が検出限界以下であった患者血清の検査

非溶血性輸血副作用の発生が報告された患者で、血清の血中 Hp 含量が、ピークレートネフェロメトリー (Immage Immunochemistry System, ベックマン・コールター) を用いた測定で、検出限界 (5mg/dL) 以下であった 16 名の患者の血清を、2 種類の標準、陰性コントロール (緩衝液および Hp 欠損者血清) および陽性コントロール (健康人血清) と同時に測定した。結果から、Hp 含量が 3µg/dL 以下であって欠損と判定された血清については、患者の了解を得て Hp 遺伝子を神田らの方法³⁾に従って Hp^{del} 特異 PCR で検査した。

結 果

標準曲線の作製と標準検体の設定

2ng/dL~100mg/dL の間の種々の濃度の精製 Hp を用いて測定し作成した標準曲線は、2~200 µg/dL の濃度範囲で S 字型の発色パターンを示し、この範囲で Hp 含量の測定が可能なが確認された (Fig. 2a)。この結果から、安定した判定が期待される低濃度および中間点の濃度である 3 µg Hp/dL と 30µg Hp/dL の 2 点を測定時の標準と設定した。被検検体の差吸光度が低値標準 (3 µg Hp/dL) よりも小さいものを欠損と判定するこ

ととした。従って、検査の検出感度は 3µg Hp/dL となった。

特異性の検討

原液から 1/10⁸ まで段階希釈した健康人血清と Hp 欠損者血清を測定した (Fig. 2b)。健康人検体 (献血者由来血清および血漿検体) では原液から発色反応が認められ、1/10³~1/10⁵ 倍希釈の範囲で測定可能な S 字型の発色パターンが観察された。一方、欠損検体では原液から 1/10⁸ 倍希釈の全ての範囲での発色が全く認められなかった。

サブタイプの差の検討

Hp の主なサブタイプ (1-1, 2-1, 2-2) の間に ELISA の発色の差は認められなかった (Table 1 a)。

夾存物質の影響

精製 Hp を用いた測定値に対する、共存物質の影響を確認する目的で、Hp 欠損血漿、ヘモグロビン、ビリルビン、乳皮成分を添加して差吸光度に与える影響を検討した (Table 1 b)。ビリルビン、乳皮成分は、影響しないが、ヘモグロビン、Hp 欠損血漿では、約 18% の低下が認められた。

Hp がネフェロメトリーで検出限界以下であった患者血清を対象とした検査

ピークレートネフェロメトリー法で Hp 含量が

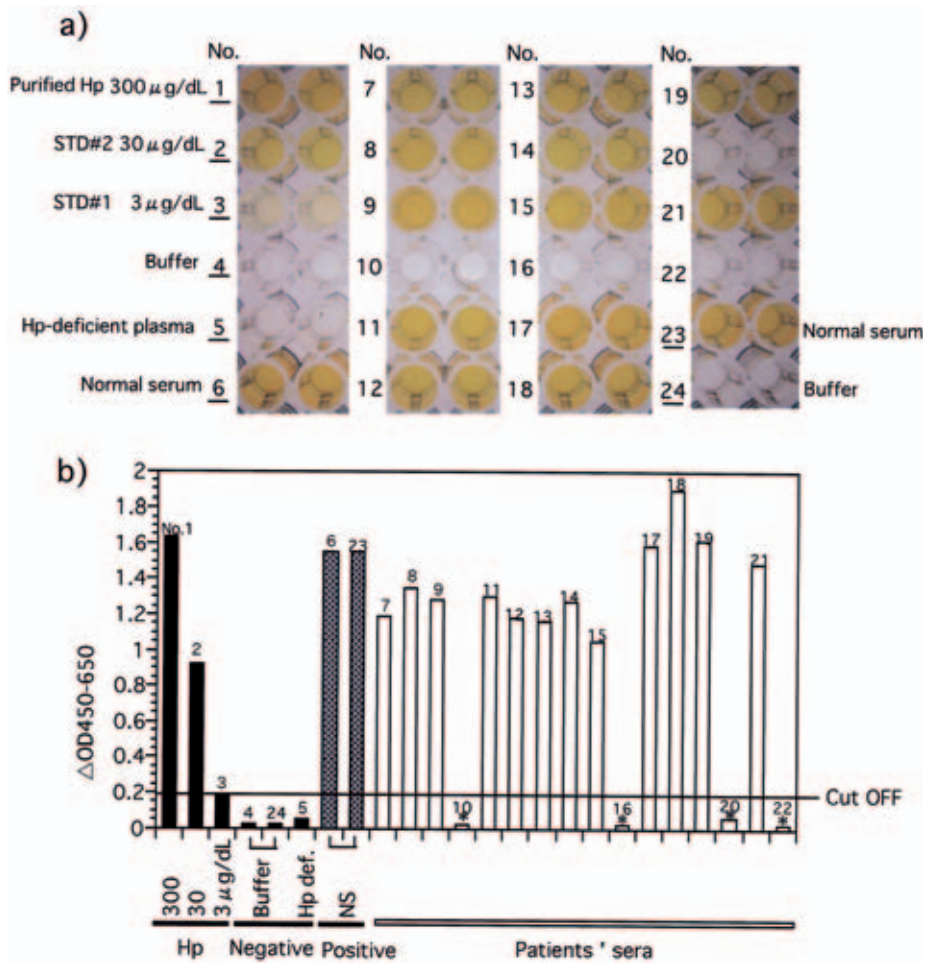


Fig. 3 Results from assay for 16 patients with low serum haptoglobin concentrations. Sixteen patients who had experienced nonhemolytic transfusion reactions with serum haptoglobin concentrations under the detection limit of peak-rate nephelometry, 5 mg/dL, were assayed to detect haptoglobin deficiency.

a) Color development pattern of patients' sera.

Wells of No. 1 ~ 3; purified haptoglobin, No. 4 ~ 5 and 24; negative controls (No.4 and 24; buffer control, No.5; haptoglobin-deficient plasma), No.6 and 23; positive control (normal human serum), No.7 ~ 22; patients' sera with low serum haptoglobin concentrations. _; standards and controls.

b) Distribution of the measured differential optical density

* : serum judged to be haptoglobin-deficient.

検出限界 (5mg/dL) 以下であった副作用発生症例 16名の患者血清を検査した。結果を Fig.3 に示した。a)に2回ずつ測定したマイクロプレートの写真を、b)に差吸光度の平均値をグラフで示した。12検体が30 μ g Hp/dLの標準の示す差吸光度以

上を示したのに対し、3 μ g Hp/dLの標準以下の吸光度を呈した、緩衝液コントロールと同程度の発色の4検体が検出され、欠損と判定された (Fig. 3b)。両群の検体の発色反応の差は明らかで、目視による判別も可能だった (Fig. 3a)。

欠損と判定された4名の患者について実施したPCR検査から、全員が Hp^{del} ホモ接合体であることが示唆された。

考 察

抗Hp-IgG抗体および、Hp特異IgE抗体を産生したハプトグロビン(Hp)欠損患者での重篤な非溶血性副作用の発生が、日本赤十字社のヘモビジュランスシステムによる輸血副作用発生調査の過程で見出された¹⁾²⁾。輸血副作用の発生を予防するためには、患者がHp欠損か否かを迅速に判定する必要がある。欠損の判定には血中Hp含量の測定が有用と思われた。

Hpは $\alpha 2$ グロブリンに属する血漿タンパクであり、ヒト血中には約100mg/dLと比較的豊富に含まれ、遊離ヘモグロビンと安定な複合体を形成し、溶血ヘモグロビンの代謝に関与するとされる。多型性があり、ヒトでは主に3種のサブタイプ(Hp1-1, Hp2-1, Hp2-2)より構成される。血中Hp含量は、今日まで、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⁴⁾、電気泳動⁵⁾、SRID⁶⁾、ネフェロメトリー⁷⁾、ELISA⁸⁾など種々の方法で測定されている。なかでもネフェロメトリーは、操作が簡便で、Hpのサブタイプによる差や、試験管内の溶血の影響を受けないことから、急性期タンパク質や疾患のマーカーとして広く検査に用いられている。しかしながら、ELISA以外の方法では、検出感度が数mg~数十mg/dL程度であるので、肝疾患、溶血性貧血など種々の疾患でヘモグロビン代謝の促進とともに代謝されるか、産生が減少し、両者の平衡が保たれずに血中Hp含量が低下した患者では、時として検出限界以下と測定される。これらの方法を用いて血中にHpが検出されなかった患者が、しばしばHp0-0と表現され報告されている。また、これらの方法を用いた場合は、一回の測定結果から遺伝性の欠損か一過性の消耗による低下かの判別は困難であり、両者の判別のためには長期間のモニタリングや追加の検査が必要とされる⁹⁾¹⁰⁾。ところで、輸血でアナフィラキシーを発生したHp欠損者は、Hp遺伝子の全てのエクソンと直列に配置される偽遺伝子の第1から第4エクソンまでが欠失

した構造をもつ Hp^{del} アレルのホモ接合体であるので³⁾、Hpタンパク質の発現が全くないものと想定される。従って、より高感度の検出法を用いて、疾患によって一過性に減少した患者の血中に残存する微量のHpを検出できれば、欠損者との識別が可能と考えられる。

ELISAは一般に数 $\mu\text{g}/\text{dL}$ と高感度でこの目的に合致する。しかし、検体の希釈、プレートの洗浄、抗体との反応、発色、標準曲線の作製と濃度の算出などの操作が必要で、煩雑である。本研究では、ELISAを欠損の判定のみに特化して、簡便に実施できるよう改良した。すなわち、検体は希釈せずに測定し、被検血清のHp含量は標準品と比較して判定することとし、さらに、血清、HPR標識抗体との反応は室温とし、反応時間も可能な限り短縮して、操作時間を短縮した。これらの改良の結果、高感度(検出限界=3 $\mu\text{g}/\text{dL}$)で、なおかつ40分程度と短時間で欠損の判定が可能となった。

本法では、欠損者の血清では発色反応を全く示さないことから、特異性が高いことが示唆された。加えて、Hpサブクラス間の発色反応の差が無いことから、サブクラスの差は結果に影響しないことが確認された。また、溶血ヘモグロビンや、欠損者の血漿および血清の添加によって、若干の発色の低下が認められたものの、ピークレートネフェロメトリーで5mg/dL以下と測定された患者の検査結果から、欠損判定にはほとんど影響しないことが示唆された。すなわち、欠損者とそれ以外の低Hp含量の患者血清間には、差吸光度の差が1以上あるので、溶血血清検体における20%程度の吸光度の減少は、欠損の判定にほとんど影響を与えないものと推察された。欠損者とその他の患者の示す発色の差は肉眼的にも明らかであった。目視による判定も可能と思われた。また、本法で検査し、欠損と判定した患者は全て遺伝子検査で Hp^{del} のホモ接合体と判定されたことから検査の有効性が示唆された。結果には示さなかったが、本法を用いた欠損者の判定は、同時および日差測定とも再現性が良好であった。

Hp欠損は、日本国内で4,000人に1名、その他

の東アジアでも、韓国、中国ではさらに高頻度で存在すると推定される³⁾。これらの欠損者は、複数回の輸血によるアナフィラキシーの発生が危惧されることから、頻回輸血を必要とされる患者については、欠損検査の実施が望まれる。本法を用いた簡易 ELISA での血中 Hp 含量の測定は、短時間で判定可能であることから、直接、患者の検査を行う場合にも、あるいは定法による測定で検出限界以下であって、欠損の疑われる患者の確定検査においても有用と思われる。

文 献

- 1) Morishita K, Shimada E, Watanabe Y, et al : Anaphylactic transfusion reactions associated with anti-haptoglobin in a patient with ahaptoglobinemias. *Transfusion*, 40 : 120—121, 2000.
- 2) Shimada E, Tadokoro K, Watanabe Y, et al : Anaphylactic transfusion reactions in haptoglobin-deficient patients with IgE and IgG class anti-haptoglobin antibodies. *Transfusion*, 42 : 766—773, 2002.
- 3) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al : Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in ahaptoglobinemias patients with antihaptoglobin

antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95 : 1138—1143, 2000.

- 4) Jayle MF : Method for the determination of serum haptoglobin. *Bull Soc Chim Biol*, 33 : 876—880, 1951.
- 5) Laurell CB, Nyman M : Studies on the serum haptoglobin level in hemoglobinemia and its influence on renal excretion of hemoglobin. *Blood*, 12 : 493—506, 1957.
- 6) Heilmann E, Wiesmann A : Immunologische Haptoglobinbestimmung : Vergleich zwischen radialer Immunodiffusion und Latex-Agglutinationstest. *Diagnostik*, 10 : 668, 1977.
- 7) Van Lente F, Marchand A, Galen RS : Evaluation of a nephelometric assay for haptoglobin and its clinical usefulness. *Clin Chem*, 25 : 2007—2010, 1979.
- 8) Yerly S, Bouvier M, Rougemont A, et al : Development of a haptoglobin ELISA. Its use as an indicator for malaria. *Acta Tropica*, 47 : 237—244, 1990.
- 9) Monoharan A : Congenital haptoglobin deficiency. *Blood*, 90 : 1709, 1997.
- 10) Delanghe J, Langlois M, De Buyzere M : Congenital ahaptoglobinemias versus acquired hypohaptoglobinemias.

A SIMPLE ELISA FOR THE DETECTION OF HAPTOGLOBIN DEFICIENCY

Eiko Shimada, Kazumi Isa, Ikiko Maeda, Hiromi Kamada, Shiho Hashimoto,
Yoshihisa Watanabe, Toshio Mazda, Hitoshi Okazaki and Takeo Juji
The Japanese Red Cross, Blood Service Headquarters, Central Blood Institute

Haptoglobin (Hp) deficiency is thought to be a risk factor for anaphylactic transfusion reactions in Japan. A simplified sandwich ELISA was developed as a practical method for detection of Hp deficiency. Patients' sera, control sera and standard Hps were added to the anti-human Hp rabbit polyclonal antibody-coated micro-plates without dilution and incubated for 10 min. After washing, captured Hp was detected using horseradish peroxidase conjugated anti-human Hp goat anti-serum and TMB substrate. Hp deficiency was identified by comparing the intensity of color development of the test serum with that of the standard Hp. With this system, it was possible to detect Hp in serum at a lower limit of 3 $\mu\text{g}/\text{dL}$ and to detect patients with congenital Hp deficiency among patients in whom serum Hp concentrations were under the detection limit of 5 mg/dL when measured by peak-rate nephelometry. It was also possible to detect deficiencies with the unaided eye.

In conclusion, this method was easy to perform and sufficiently sensitive to allow the detection of congenital Hp deficiency among patients with disease-induced hypohaptoglobinemia. It may therefore be useful in avoiding anaphylactic transfusion reactions in patients requiring multiple transfusions. It can also be readily applied to expand the future haptoglobin-deficient donor pool.

Key words : haptoglobin deficiency, anaphylactic transfusion reaction, simple ELISA
