

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

神田 芳郎¹⁾ 副島美貴子¹⁾ 川野 洋之²⁾ 江頭 弘一²⁾ 佐川 公矯²⁾

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リスク因子であるハプトグロビン欠損症の原因遺伝子はハプトグロビン遺伝子欠失 (HP^{del}) であり、その頻度は約 4,000 人に 1 人であると予想される。我々は最近安全な輸血医療の遂行を目的とし迅速・簡便なリアルタイム PCR 法に基づく 2 種の HP^{del} 診断法を開発し報告した。今回、臨床現場への導入を目的として久留米大学病院で輸血予定患者の血液を鋳型とし、TaqMan probe を用いる方法と SYBR green I を用い融解曲線をおこなう方法の 2 法を実施し結果を比較した。約 1 時間半で得られた結果は全サンプルで一致し、2009 年 1 月から 2010 年 3 月末に解析した 2,954 名のうち 91 名が HP/HP^{del} 、1 名が HP^{del}/HP^{del} であった。TaqMan 法は増幅シグナルそのものが結果を反映することから反応中に診断結果を予想でき、 HP^{del}/HP^{del} がソフトウェアで自動検出できるため多検体処理能力に優れた方法であり、SYBR 法は初期費用が低く抑えられ、より幅広い臨床現場での導入が容易であると考えられた。

キーワード：無ハプトグロビン血症、アナフィラキシーショック、輸血前診断

第 58 回日本輸血・細胞治療学会総会座長推薦論文

緒 言

免疫学的機序による非溶血性輸血副作用には、発熱、蕁麻疹等の軽微なものが多いが、輸血関連急性肺障害 (TRALI)、アナフィラキシーショックなど重篤な副作用も希に認められる¹⁾。アナフィラキシーショックの原因は大部分不明であるが、血漿蛋白欠損例でアナフィラキシーショックを惹起する事例が報告されている。西洋人の主な血漿蛋白欠損は IgA 欠損であるが、日本人ではハプトグロビン (HP) 欠損症の方が高頻度であり²⁾、2005 年から各種血液製剤添付資料「慎重投与の項」に記載されている。

HP は急性期反応物質として知られる糖蛋白であり、血中で遊離型ヘモグロビン (Hb) と結合し HP-Hb 複合体を形成し、溶血時に体内からの鉄の喪失を防ぐ、あるいは Hb の酸化作用による腎臓障害を防ぐ、という生理学的役割を担うと考えられている³⁾。HP 遺伝子 (HP) は優劣のない HP^1 と HP^2 の対立遺伝子の組み合わせにより、 $HP1-1$ 、 $HP2-1$ 、 $HP2-2$ の代表的な 3 つの表現型が決定される。 HP^1 は、5 つのエクソン、 HP^2 には HP^1 のエクソン 3、4 の重複 (1.7-kb) により生じたエクソン 5、6 が存在し 7 つのエクソンで構成されている³⁾。

我々は HP 欠損症患者の解析から HP 欠失対立遺伝子

(HP^{del}) を同定し HP^{del} のホモ接合体が HP 欠損症 (先天性無 HP 血症) となることを報告した⁴⁾。その後、欠失領域をクローニングし、欠失は HP の上流約 5.2kb から HP 下流に位置する HP 関連遺伝子のイントロン 4 まで及ぶことを示し、エクソン 1 とのデュプレックス PCR 法による遺伝子診断法を確立した⁵⁾。 HP^{del} は日本人集団には約 1.5% の頻度で存在し、したがって HP 欠損症患者 (HP^{del}/HP^{del}) は約 4,000 人に 1 人と推定される。HP 欠損症患者は普段は無症状であるが、輸血やアルブミン輸液等に伴うアナフィラキシーショック発症例が報告され輸血副作用発生のリスク因子と考えられる⁶⁾。

HP 欠損はアフリカ人に多いものの、溶血などの二次的な無 HP 血症も多いと考えられており、その遺伝的原因は未だ解明されておらず、現時点で HP^{del} は同定されている唯一の HP 欠損症の原因変異である。日本赤十字社でこれまでに調べられた抗 HP 抗体を有する欠損症患者は例外無く HP^{del} のホモ接合体であり HP^{del} の輸血前診断は HP 欠損症による輸血後副作用の回避を可能にする。そこで、我々は臨床現場でも利用可能な迅速診断法として、DNA 抽出をおこなわず希釈血液を直接 PCR の鋳型とする、2 種のリアルタイム PCR 法 (TaqMan

1) 久留米大学医学部法医学・人類遺伝学講座

2) 久留米大学病院臨床検査部

〔受付日：2010 年 8 月 26 日、受理日：2010 年 10 月 2 日〕

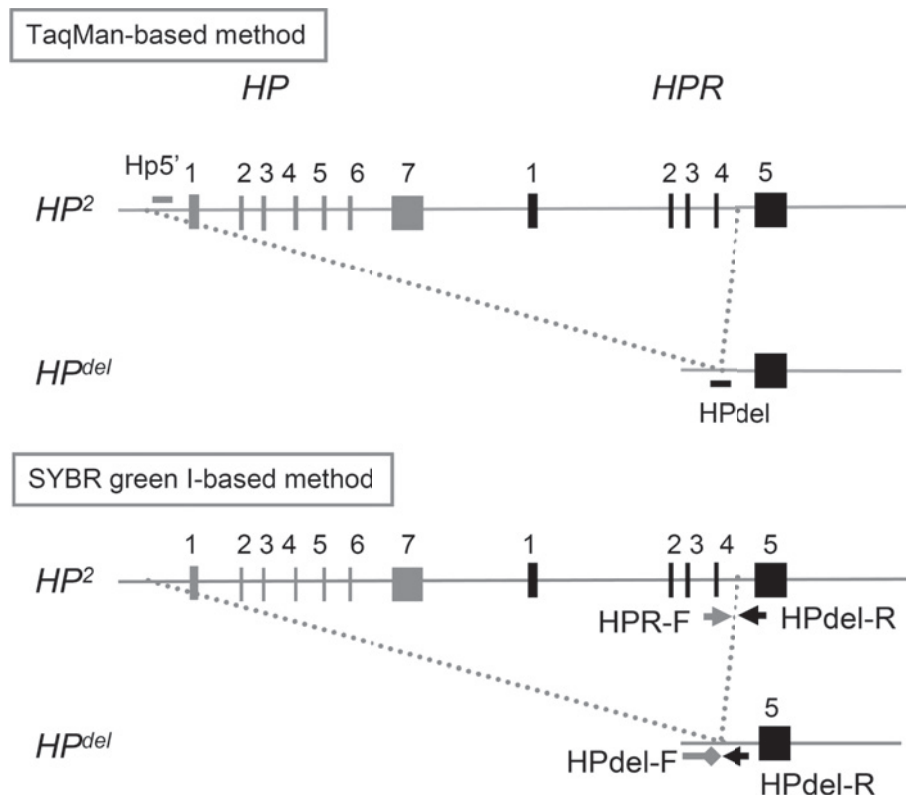


Fig. 1 Relative positions of primers and probes used in this study.

法と SYBR 法) を確立し報告した^{7,8)}。

今回、これら 2 法の輸血前検査への導入の有用性を確認するために患者検体について検査を実施し、結果の比較検討をおこなった。

方 法

1. 輸血前血液

サンプルは、2009 年 1 月 4 日から 2010 年 3 月 31 日まで、久留米大学病院臨床検査部輸血検査室で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た。患者血液が 45 サンプル集まった時点で、約 300 μ l を分注し HP^{del} 診断用に用いた。96 well plate に 45 サンプルずつ duplicate で調整した。既報のとおり条件検討をおこない、全血を 100 倍希釈したものを PCR 反応の鋳型として用いた^{7,8)}。全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同意を文章で得ている。なお本研究計画の実施は久留米大学倫理委員会の承認を得て実施した。

2. TaqMan 法

HP エクソン 1 の上流域 (HP5', 内在性コントロール領域) と HP^{del} の欠失点を含む領域 (HP-del) を増幅するプライマー、プローブセットを用いた⁷⁾。設計、合成はバイオサーチテクノロジー社 (Tokyo, Japan) に依頼した。プライマー、プローブの相対的な位置、配列を Fig. 1, Table 1 に示す。

PCR 反応液 (20 μ l) は鋳型の 100 倍希釈血液を 1 μ l, 10 μ l の *Premix Ex Taq*TM (Perfect Real Time; Takara, Shiga, Japan), HP5'-F and -R primers (150 nmol/l), HP5'-probe (42 nmol/l) (HP5' 検出用), HPdel-F and -R primers (300 nmol/l), HPdel-probe (83 nmol/l) (HP-del 検出用) を加え調整した。0.5 ng のゲノム DNA を用いたポジティブコントロール、鋳型を入れないネガティブコントロールを調整した。492/516 nm (FAM), 585/610 nm (CAL Fluor Red 610) の励起/蛍光フィルターを装着したリアルタイム PCR 機器 Mx3000P system (Agilent Technologies Japan, Tokyo, Japan) を用いて 95°C-30sec : 1 サイクル, 95°C-5sec, 60°C-30sec : 40 サイクルの PCR 反応と蛍光シグナルの測定をおこない、MxProTM Software (version 4.00, Agilent Technologies) を使って data の解析をおこなった⁷⁾。

3. SYBR 法

HP^{del} の欠失点と、 HP のエクソン 1 上流域の 2 領域を増幅する為に、 HP^{del} に特異的な forward primer (HPdel-690F) と健常 (非欠失) アリル特異的 forward primer (HPR-F) および共通の reverse primer (HPdel-823R) の 3 プライマーを用いた⁸⁾。プライマーは Primer 3 software (<http://primer3.sourceforge.net/>) を用い設計しオペロンバイオテクノロジー社 (Tokyo, Japan) に合成を依頼した。プライマーの相対的な位置と配列を

Table 1 Sequences and locations of TaqMan probes and primers used in real-time PCR for HP^{del} detection. The breakpoint of HP^{del} locates at 782-783 bp of GenBank no. AB025320.

	Sequence	Position
HP5-F	5'-CACATTTACTGATTTTCAGGCTGGA-3'	513-536 bp, GenBank no. M10935
HP5-R	5'-CCTTTTCACAGTAATTTTCTCCACCT-3'	571-596 bp (reverse), GenBank no. M10935
HP5-Taqman-probe	5'-CAL Fluor Red 610 -AGCTTTTAAGCAATAGGGAGATGGCCACA-BHQ2-3'	538-566bp, GenBank no. M10935
HPdel-F	5'-TCTTTATGGCACTGGGGAACA-3'	694-714 bp, GenBank no. AB025320
HPdel-R	5'-AGCAAGACACTCGTGAGTGGA-3'	822-801 bp (reverse), GenBank no. AB025320
HPdel-Taqman-probe	5'-FAM- TGTGCAAGAGCCTTTCCAATTTTGATCABHQ1-3'	772-799 bp (reverse), GenBank no. AB025320
HPdel-690F	5'-TATTTCTTTATGGCACTGGGGAACA-3'	690-714 bp, GeneBank no. AB025320
HPdel-823R	5'-GAGCAAGACACTCGTGAGTGGAAT-3	823-799bp (reverse), GeneBank no. AB025320 and 13,067-13,043 bp (reverse), GeneBank no. NC_000016.9
HPR-F	5'-CTGCAACTATTGGAATGAGATCAGC-3'	12,920-12,945 bp, GeneBank no. NC_000016.9, located in the 3' end of the deleted region in HPdel, Intron 4 of the HPR

Fig. 1, Table 1 に示す. PCR 反応は, 鋳型の 100 倍希釈血液を 1 μ l, 10 μ l の 2 \times SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II (Perfect Real Time; Takara), あるいは SYBR[®] Premix DimerEraser[®] (Perfect Real Time; Takara) と, 500 nmol/l HPdel-690F, 250nmol/l HPdel-823R, 75nmol/l HPR-F を含む 20 μ l の反応液を調整した. コントロール反応は TaqMan 法と同様に調整した. SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II は 95 $^{\circ}$ C-30sec : 1 サイクル, 95 $^{\circ}$ C-5sec, 65 $^{\circ}$ C-30sec : 40 サイクル, SYBR[®] Premix DimerEraser[®] は 95 $^{\circ}$ C-30sec : 1 サイクル, 95 $^{\circ}$ C-5sec, 55 $^{\circ}$ C-30sec, 72 $^{\circ}$ C-30sec : 40 サイクルの PCR 反応をおこなった. さらに同機で, 95 $^{\circ}$ C-1min, 70 $^{\circ}$ C-30sec, の処理後 0.2 $^{\circ}$ C/sec で 90 $^{\circ}$ C まで加温し, その蛍光シグナルを FAM filter を用いて測定し, MxPro[™] Software で融解曲線解析をおこなった⁸⁾.

結 果

2009 年 1 月 4 日から 2010 年 3 月 31 日までに輸血前患者 2,954 名の血液について TaqMan 法および SYBR 法の 2 法を用い HP^{del} 診断をおこなった.

条件検討時には蒸留水で 100 倍希釈した血液を直接鋳型とし良好な結果が得られていたが, 多数の患者検体の解析を始めてみると, 結果の再現性 (蛍光シグナル強度) にばらつきが認められた. そこで希釈液を 50 mM NaOH 溶液とし血液を 100 倍に希釈後 95 $^{\circ}$ C, 5 分処理し鋳型とした結果, 顕著な向上が認められた (data not shown).

TaqMan probe 法では, 健常者 (HP/HP) では CAL Fluor Red 610 のシグナルのみ, HP/HP^{del} では CAL Fluor Red 610 と FAM シグナルの両方, HP^{del}/HP^{del} では FAM シグナルのみが検出され, 結果は反応中にリアルタイム

で予想可能であった. 更に, 遺伝子型をグラフ表示することが可能であり, サンプル数が多い場合にも同時に HP^{del}/HP^{del} を同定出来ることが示された.

一方, SYBR 法では, 当初 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II を試薬に用い, 融解曲線解析の結果, HP/HP では T_m 値が約 84.5 $^{\circ}$ C の HPR intron 4 由来の産物 (148 bp) ピークのみが, HP/HP^{del} では T_m 値が約 80.3 $^{\circ}$ C の HP^{del} 由来の増幅産物 (134 bp) と約 84.5 $^{\circ}$ C 2 つのピークが, HP^{del}/HP^{del} では T_m 値が約 80.3 $^{\circ}$ C のピークのみが検出された (Fig. 2A). ところが解析を続ける中で negative control の 10% 程度に増幅シグナルが観測され, 融解曲線解析の結果このシグナルは目的の増幅産物の何れとも異なる T_m 値のピーク (77 $^{\circ}$ C 程度) を有しており, 電気泳動の結果, 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. そこで, 試薬を SYBR[®] Premix DimerEraser[®] (Perfect Real Time, Takara) に変更した結果, ダイマーと思われる増幅シグナルは出現しなかった. このシグナルは, 鋳型以外の反応液を分注して冷凍保存した PCR プレートを用いた場合でも出現しなかった. なお, 増幅産物の T_m 値はどちらも約 1.5 $^{\circ}$ C 低くなった (Fig. 2B). 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 を用いる場合より判定までに要する時間が 20 分程度長くなること, SYBR[®] Premix Ex Taq[™] II でも常に primer dimer の増幅が認められるわけではないこと, 融解曲線解析の T_m 値から非特異的産物であることが判定可能であること, さらに希釈血液試料では出現しないことなどを考慮すると試薬の選択は難しい問題であり今後の検討課題である.

2010 年 3 月 31 日現在, 2 法で結果が矛盾する症例は無く, 両法の正確性が確認された. 検査対象者 2,954

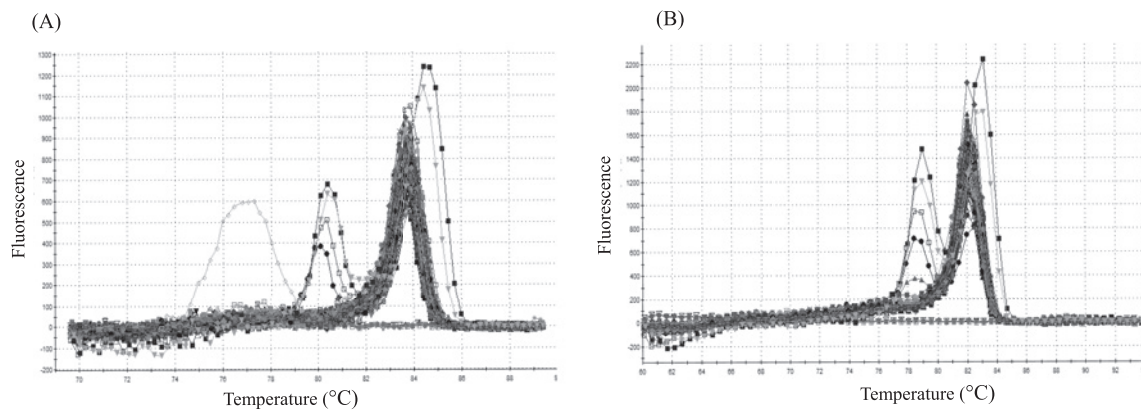


Fig. 2 Results of SYBR Green I-based real-time PCR for distinguishing HP^{del} and HP alleles. Results obtained by using SYBR® Premix Ex Taq™ II (A) and SYBR® Premix DimerEraser® (B).

名中, 91名の HP^{del} ヘテロ接合体と1名のホモ接合体が検出された. この結果から福岡地区における HP^{del} の遺伝子頻度は約1.6%程度であると推定される. なお, 今回検査をおこなった全患者に重篤な輸血副作用の報告は無く, 1名の HP^{del}/HP^{del} の輸血予定患者への輸血は必要性が無くなったため実施されなかった.

考 察

希釈血液を直接鋳型とし TaqMan probe と SYBR Green I を指標としたリアルタイム PCR 2法を用い輸血前患者血の遺伝子診断を実施し臨床現場での利用の可能性について検討をおこなった. 輸血前診断を開始してみると, 条件検討時にはみられなかった再現性の低いサンプルやプライマーダイマーの出現などの問題が発生したが, 50mM NaOHの使用, 試薬の変更により大幅に改善された.

いずれの方法も, DNA抽出を必要とせず希釈血液を用いることが可能であり HP^{del} の接合性を1サンプルにつき1本のチューブで判定可能で, 採血から凡そ1時間半で診断結果が得られる. 操作が簡便で診断結果が明確であるため, 遺伝子解析専門の技術者がいない医療現場での利用も可能であると考えられる. さらに従来法と比較して増幅後チューブの開閉を必要としない閉鎖系で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性が軽減されること, ハイスルーブット解析に適すること, などメリットが大きい.

2法を比較すると, TaqMan法では, 前述の通りリアルタイムに結果が観察・予想できること, 遺伝子型のグラフ化により HP^{del}/HP^{del} の同定が容易であり, よりハイスルーブット解析に適しており規模の大きな施設での輸血前診断や, 献血者のスクリーニング検査によりHP欠損者のドナープールの作製にも有用なものと評価される. 一方SYBR法は, 蛍光が1波長で比較的安価な装置で解析が可能であること, 一般的なPCR法に

用いる試薬のみで十分であり準備や調整が容易で幅広い臨床現場に導入しやすい方法であると位置づけられる.

経費については, TaqMan法では1検体あたり約130円, SYBR法では約110円と試算される.

HP^{del} に起因するHP欠損の輸血前診断は, 出現頻度を考慮すると費用対効果は必ずしも高いものとは言いがたく, 遺伝子診断を実施する為の倫理面的問題などクリアすべき問題は少なくない. 一方, 因果関係が明確であるアナフィラキシーショックの割合は低いが, 抗IgAを始めとする同定されているものについては可能であれば輸血前の検査が実施されることが望ましい. またオーダーメイド医療の観点からも遺伝的欠損症については生涯に一度の検査で十分であり有用な検査項目であると考えられる. 今後も検討を継続し, 個々の現場環境に即した診断法を確立することにより, 将来的には低頻度ながらHP欠損による輸血副作用を予防し安全な輸血が実施されることを期待したい.

謝辞: 本研究は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」により行なわれた.

文 献

- 1) 前田平生, 遠山 博: 輸血の副作用・合併症. 編者 遠山 博, 柴田洋一, 前田平生, 他. 輸血学, 第3版, 中外医学社, 東京, 2004. 530—622.
- 2) 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.
- 3) Carter K, Worwood M: Haptoglobin: a review of the major allele frequencies worldwide and their association with diseases. Int J Lab Hematol, 29: 92—110, 2007.
- 4) Koda Y, Soejima M, Yoshioka N, et al: The haptoglobin gene deletion responsible for anhaptoalbuminemia. Am J Hum Genet, 62: 245—252, 1998.

- 5) Koda Y, Watanabe Y, Soejima M, et al: Simple PCR detection of haptoglobin gene deletion in anhaploglobinemic patients with antihaptoglobin antibody that causes anaphylactic transfusion reactions. *Blood*, 95: 1138—1143, 2000.
- 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) Soejima M, Koda Y: Rapid real-time PCR detection of HP^{del} directly from diluted blood samples. *Clin Chem*, 54: 1095—1096, 2008.
- 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.

EVALUATION OF TWO REAL-TIME PCR METHODS FOR DETECTION OF HP^{del} , A RISK MUTATION FOR ANAPHYLACTIC SHOCK, BEFORE TRANSFUSION

Yoshiro Koda¹⁾, Mikiko Soejima¹⁾, Hiroyuki Kawano²⁾, Kouichi Egashira²⁾ and Kimitaka Sagawa²⁾

¹⁾Department of Forensic Medicine and Human Genetics, Kurume University School of Medicine

²⁾Department of Laboratory Medicine and Transfusion Medicine, Kurume University Hospital

Abstract:

Anhaploglobinemia is one of the risk factors for severe anaphylactic transfusion reaction because the patient produces serum haptoglobin antibodies. The causal mutation of anhaploglobinemia in Japan is the haptoglobin deletion allele (HP^{del}), and the frequency of HP^{del} homozygotes is estimated to be one out of 4,000 individuals. The clinical detection of HP^{del} before transfusion is important to prevent anaphylactic shock. In order to facilitate safe blood transfusion, we recently developed two rapid and simple methods for detection of HP^{del} , TaqMan probe- and SYBR green I-based real-time PCR, using diluted blood samples directly as templates. Both methods need only one tube per sample and about one and a half hours to obtain results. In this study, we evaluated these two methods for detection of HP^{del} in patients who were scheduled for blood transfusion at Kurume University Hospital. The genotypes of 2,954 patients as determined by the two real-time PCR methods from January 2009 to March 2010 were fully concordant, and 91 HP/HP^{del} and one HP^{del}/HP^{del} were detected. We can predict the results in real time by monitoring the raw data during the reaction and easily detect the HP^{del}/HP^{del} in many samples analyzed by a dual-scatter plot in the TaqMan-based method. This method seems to be suitable for high-throughput analyses such as detection before transfusion at large institutions or screening for HP^{del} in a large population study. On the other hand, the SYBR Green I-based method is appropriate for relatively small institutions due to its low initial cost and analyzability using economical real-time PCR machines.

Keywords:

anhaploglobinemia, anaphylactic transfusion reactions, diagnosis before transfusion