

ヘパリンによる RT-PCR 阻害の 定量的評価とその対策

入野 保¹⁾ 村木 一枝¹⁾ 室井千香子²⁾
多林 久治²⁾ 逢坂 光彦¹⁾

1) 滋賀県立成人病センター 研究所 (〒524-8524 滋賀県守山市守山 5-4-30) 2) 同 検査部
(平成 16 年 7 月 23 日受付/平成 16 年 10 月 22 日受理)

要旨

骨髓液採取時によく使用される抗凝固剤ヘパリンの reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法への反応阻害について詳細に検討した。まず、白血病の遺伝子検査で汎用される RT-nested PCR 法におけるヘパリンの反応阻害について、K 562 細胞株のヘパリン Na 添加、従来法 (TRIzol) 処理 RNA にて *M-bcr/abl* キメラ遺伝子の検出を試みた。対照の EDTA 添加試料に比べ、50 単位添加より明らかに PCR 産物が減少、200 単位では PCR 産物は検出できず、偽陰性となった。内部コントロール (*abl* 遺伝子) もほぼ同様の結果を示した。次に、ヘパリンの PCR 阻害について real-time PCR を用いて、詳細な定量的検討を行った。ヘパリンおよび EDTA を添加した細胞株および健常者の末梢血から、従来法およびシリカゲルメンブレン法 (シリカ法) にて RNA を抽出し、real-time PCR にて *GAPDH* 遺伝子の定量解析による比較検討を行った。従来法では細胞株・健常者末梢血ともに、ヘパリン 10 単位添加においても *GAPDH* 遺伝子の反応阻害が認められた。しかし、シリカ法ではヘパリンが高濃度でも反応阻害はみられなかった。結論として、シリカ法による核酸抽出を行うことは、ヘパリン由来の PCR 阻害による誤判定を防ぎ、正確な診断に寄与できると考えられた。

Key words

ヘパリン PCR 阻害 シリカゲルメンブレン法 real-time PCR RT-nested PCR

遺伝子解析によく用いられる polymerase chain reaction (PCR) 法には、さまざまな反応阻害物質が存在することが報告されている。例えば sodium dodecylsulfate (SDS) などのイオン性界面活性剤¹⁾、フェノール、プロテイナーゼ K など核酸抽出に用いられる試薬やヘモグロビン、ラクトフェリンなど血液中の物質²⁻⁷⁾が知られている。また採血時に抗凝固剤として用いられるヘパリンも強い PCR 阻害を起こす物質⁴⁻⁶⁾のひとつである。したがって、RT-PCR 法などによる造血器腫瘍の遺伝子解析の目的で、末梢血や骨髓液を採取する際には、ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) やクエン酸塩など他の抗凝固剤を用いることが望ましい。しかし、ヘパリンは強い抗凝固作用を有していることなどから、特に骨髓液採

取の際に使用される。したがって、その対応にしばしば苦慮させられる。

本稿では、まず遺伝子解析で汎用される RT-nested PCR 法におけるヘパリンの反応阻害を調べるため、慢性骨髄性白血病 (CML) に代表的な *Major (M)-bcr/abl* キメラ遺伝子の検出を例に、その影響を検討した。その結果をふまえ、より客観的に阻害の影響を評価すべく、real-time PCR⁷⁾を用いて、ハウスキーピング遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) 遺伝子を指標とした定量的な検討を行った。またヘパリンの反応阻害の影響を軽減する対策として、シリカゲルメンブレン法 (シリカ法) による RNA 抽出を行い、従来の抽出法と比較検討した。

I 対象・方法

1. RT-nested PCR による *M-bcr/abl* キメラ遺伝子の検出

1) 試料

CML の細胞株である K 562 の細胞懸濁液を 4 等分し、 3×10^6 個あたり 50, 100, 200, および 500 (シリカ法のみ) 単位のヘパリン Na (武田薬品工業) を、また対照として 1.8 mg の EDTA・2K (インセパック SP-0707 EM, 極東製薬) を同様に添加し、約 2 時間室温放置したものを試料とした。

2) RNA 抽出および cDNA 合成

RNA 抽出は代表的な RNA 抽出法である acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform (AGPC) 法⁹⁾を基にした TRIzol (Invitrogen) (従来法)、およびシリカ法を原理とした QIAamp RNA Blood Mini kit (QIAGEN)⁹⁾の 2 種類を用いた。抽出方法は各製品の説明書に従った。なお、シリカ法では若干のゲノム DNA が混入するため、DNase I (QIAGEN) にて DNA 分解処理を行った。

抽出した RNA は 1.2% アガロースゲル (ナカライテスク) による電気泳動にて変性や DNA 混入を認めず、また吸光度を測定し OD 260/280 がすべて 2.05 以上であることを確認した。吸光度より計測した RNA 1.0 μ g から First Strand cDNA Kit (Amersham) を用い cDNA を合成した。

3) RT-nested PCR による *M-bcr/abl* キメラ遺伝子の検出

上記の cDNA をテンプレートとして nested PCR を行った。PCR 試薬は AmpliTaq Gold DNA polymerase (Applied Biosystems) を使用した。1 st, 2 nd PCR のプライマー配列および PCR 条件は Cross NCP らの報告¹⁰⁾に従った。内部コントロールには *abl* 遺伝子を用いた。

2. real-time PCR による *GAPDH* 遺伝子発現量の定量解析

1) 対象

4 種類の造血器腫瘍由来の細胞株 (K 562, HL 60, U 937, MOLT 4) および 4 名の健常ボランティア (男 1 名, 女 3 名, 平均年齢 44 歳) の末梢血を用いた。

2) 試料

各細胞株の懸濁液および採血直後の末梢血を等分し、細胞株は 3×10^6 個あたり 10, 50 単位の 2 濃度、末梢血は 1 ml あたり 10, 50, 200 単位の 3 濃度のヘパリン Na を、また対照として 1.8 mg の EDTA・2K を添加し、作製した。

3) RNA 抽出および cDNA 合成

従来法、シリカ法ともに 1.2) と同手順にて RNA 抽出、純度・収量測定および cDNA 合成を行った。

また RNA ペレットの洗浄回数と阻害の軽減効果の関係を調べるため、通常 2 回の 75% エタノール洗浄のみのところ、K 562 については 5 回洗浄した RNA も作製し、比較検討した。

4) real-time PCR による *GAPDH* 遺伝子発現量の定量解析

上記の cDNA をテンプレートとして、ハウスキーピング遺伝子である *GAPDH* 遺伝子の real-time PCR による定量解析を行った。real-time PCR の装置は SDS Prism 7700 (Applied Biosystems) を用いた。また *GAPDH* 遺伝子の TaqMan Assay Reagents (Applied Biosystems) を、PCR の反応試薬は TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) を使用した。real-time PCR の反応液組成および PCR 条件は表 1 の通りである。また検量線作成用のスタンダードは *GAPDH* 遺伝子の PCR 増幅産物を TA クロニ

表 1 real-time PCR の反応液組成および反応条件 (*GAPDH* 発現定量)

PCR 反応液組成	濃度	容量	最終濃度
Master Mixture	2 X	12.50	1 X
Pre-Developed TaqMan Reagents (<i>GAPDH</i>)	20 X	1.25	1 X
dH ₂ O	—	10.75	
cDNA	—	0.50	
合計	—	25.00 (μ l)	
PCR 反応条件	温度	時間	
UNG 処理	50°C	2 分	} 50 サイクル
UNG 失活	95°C	10 分	
変性	95°C	15 秒	
アニーリング/伸張	60°C	1 分	

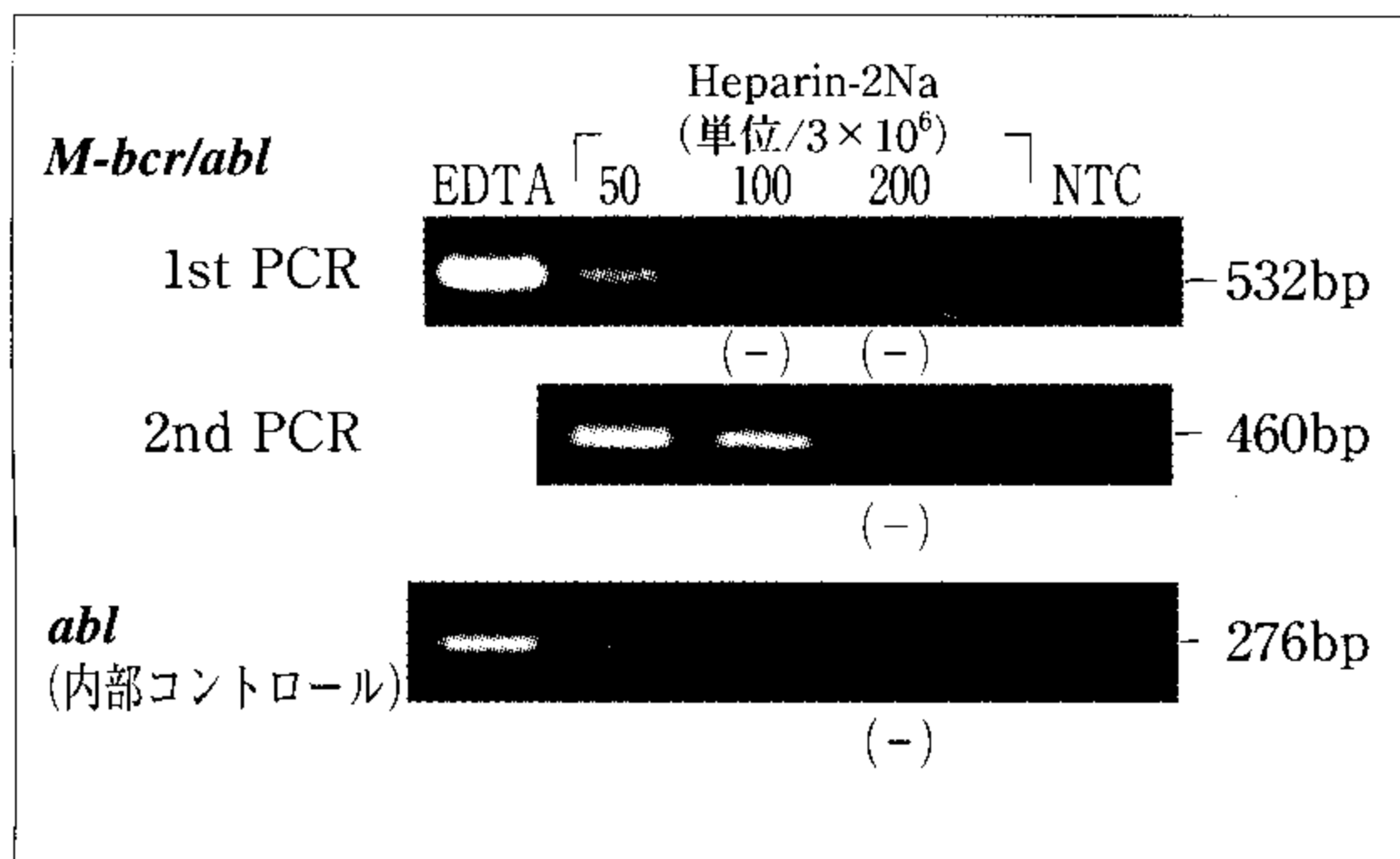


図1 ヘパリン添加による RT-nested PCR への影響
【従来法】—K 562 からの *M-bcr/abl* 検出—

NTC : no template control.

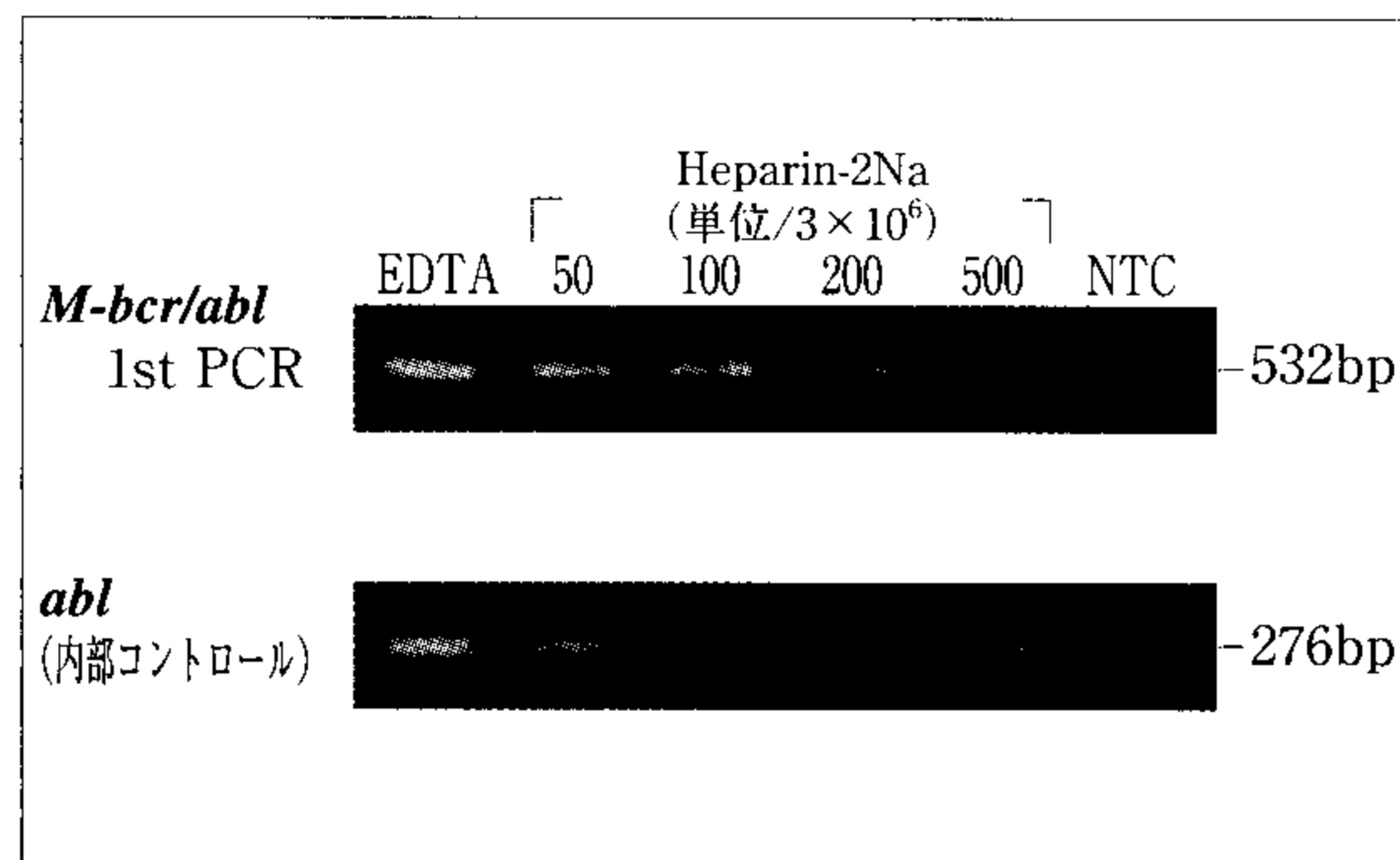


図2 ヘパリン添加による RT-nested PCR への影響
【シリカ法】—K 562 からの *M-bcr/abl* 検出—

NTC : no template control.

ングベクター (pGEM-T Vector System, Promega) を用いて作製した plasmid DNA を 10 倍ずつ段階希釈した系列を使用した。

すべての定量解析は同時に 3 重測定し、統計処理を行った。

II 結 果

1. RT-nested PCR による *M-bcr/abl* キメラ遺伝子の検出

RT-nested PCR 法におけるヘパリンの反応阻害を調べるため、まず *M-bcr/abl* キメラ遺伝子を有する K 562 のヘパリン添加、従来法処理 RNA サンプルにて nested PCR を行った。図 1 の上か

ら順に *M-bcr/abl* キメラ遺伝子の 1st と 2nd PCR および *abl* 遺伝子 (内部コントロール) の電気泳動の結果を示す。1st PCR では EDTA 添加試料に比べ、50 単位のヘパリン添加試料より PCR 産物の減少がみられ、高濃度の 100 および 200 単位では検出されなかった。2nd PCR でも 200 単位のヘパリン添加試料からは検出できず、陰性となった。また内部コントロールの *abl* 遺伝子も *M-bcr/abl* キメラ遺伝子と同様に 50 単位添加より PCR 産物の減少が始まり、200 単位では検出できなかった (図 1)。

一方、シリカ法処理 RNA サンプルでは、*M-bcr/abl*, *abl* 遺伝子ともに、1st PCR にて高濃度 (500 単位) のヘパリン添加試料からも検出された (図 2)。

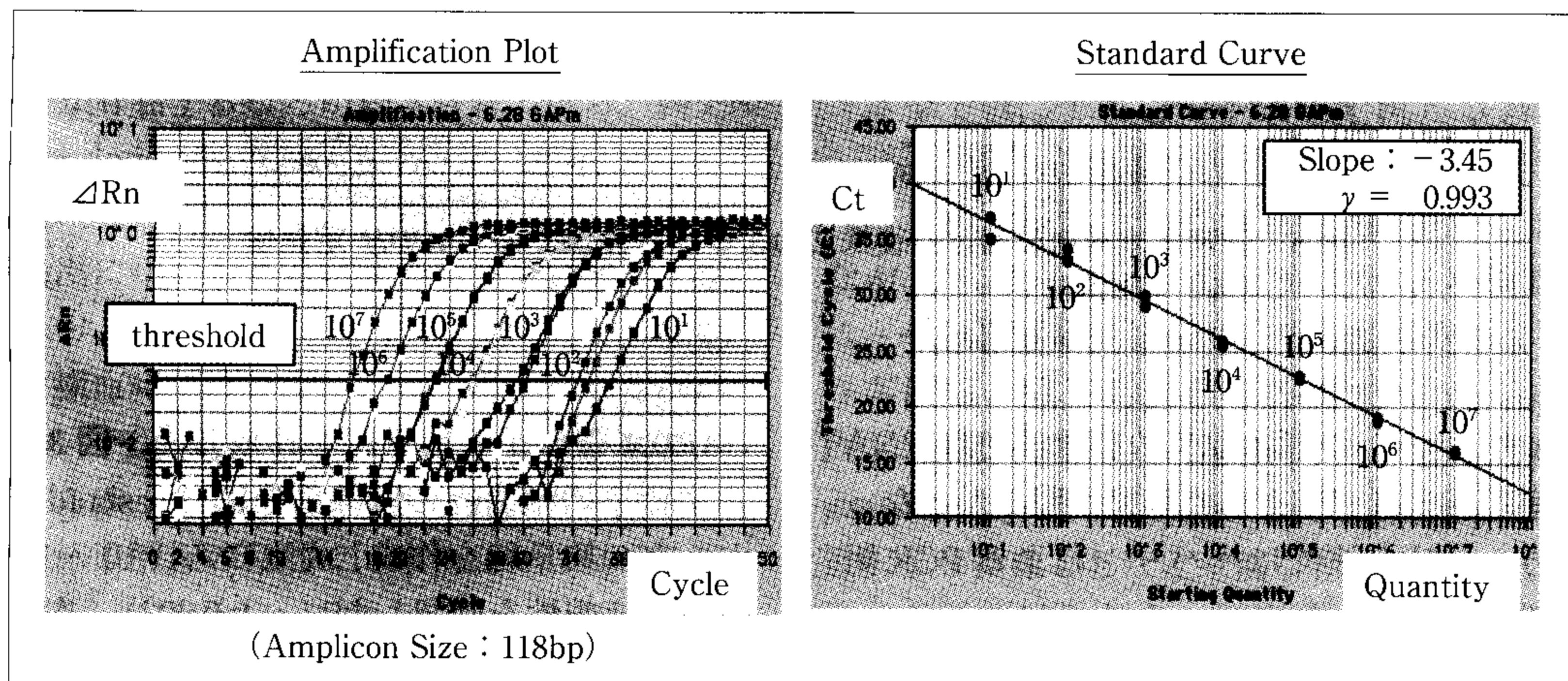


図3 real-time PCR による *GAPDH* 定量における増幅曲線 (左) および検量線 (右)

スタンダードのコピー数: $10^7 \sim 10^1$, ΔRn : 蛍光シグナル強度, Ct: threshold cycle.

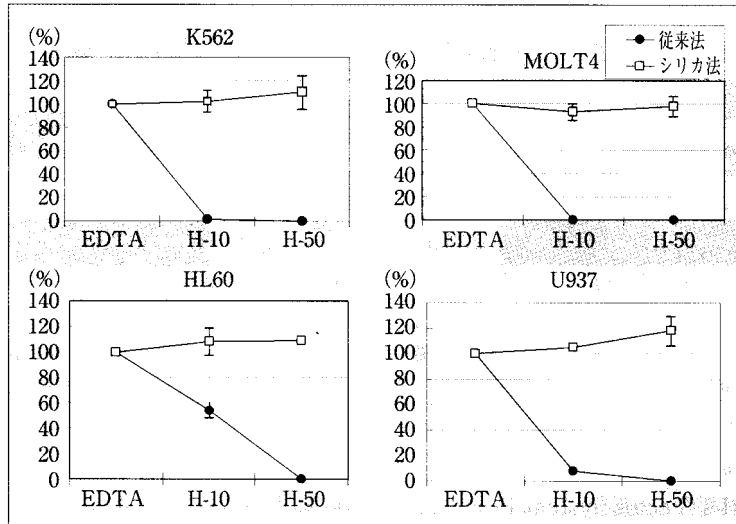


図4 細胞株における従来法およびシリカ法での *GAPDH* 定量値 (%) の比較

H-10: ヘパリン 10 単位/ 3×10^6 .

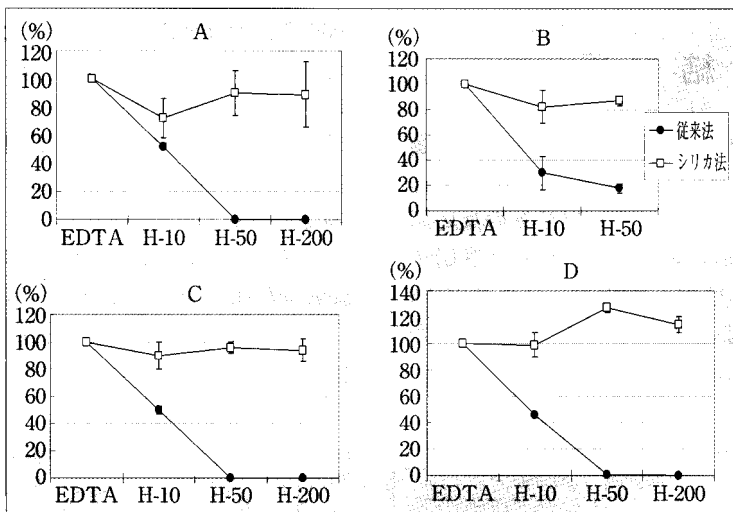


図5 健常者末梢血における従来法およびシリカ法での *GAPDH* 定量値 (%) の比較

H-10: ヘパリン 10 単位/ 3×10^6 .

以上より、ヘパリン添加試料の従来法処理 RNA による RT-nested PCR への阻害が明らかとなった。一方、シリカ法ではヘパリンによる PCR 阻害の抑制が確認できた。

2. real-time PCR による *GAPDH* キメラ遺伝子の定量解析

I の 2. 4) にて作製したスタンダードを用いて

GAPDH 遺伝子の検量線を作成した。図 3 の左に示す標準増幅曲線の直線部分に threshold をを設定し、右の検量線を作成したところ、 $10^1 \sim 10^7$ まで良好な直線性を確認した ($\gamma = 0.993$)。また PCR 効率 (Slope) は -3.45 と良好な値が得られた。

次に *GAPDH* 遺伝子の定量分析を行い、従来・シリカ両抽出法でのヘパリンの反応阻害の程度

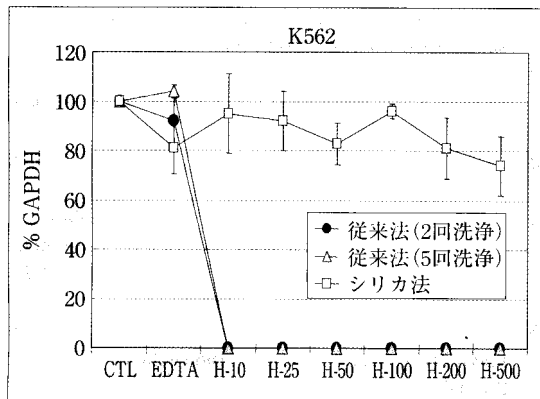


図6 RNAペレットのエタノール洗浄2回および5回の比較(従来法)

CTL: 抗凝固剤無添加, H-10: ヘパリン 10 単位/ 3×10^6 .

を比較した。EDTA 添加試料での *GAPDH* 遺伝子の定量値を 100% として、3 濃度のヘパリン添加時の定量値を%として示した (H-10: ヘパリン 10 単位/ml 添加)。図4の細胞株において、従来法ではヘパリン 10 単位添加にて K 562: $1.9 \pm 0.3\%$, HL 60: $54 \pm 5.9\%$, U 937: $8.0 \pm 0.7\%$, MOLT 4: $<0.1\%$ と減少し、50 単位以上ではすべて 0.1% 以下と著明な減少がみられた。対してシリカ法では 200 単位のヘパリン添加試料でも *GAPDH* 遺伝子発現量の減少はみられず、ヘパリンによる PCR 阻害を抑制できた。また、健常者末梢血においても、A~D の 4 例ともほぼ同様の結果を示した (図5)。

RNA ペレットの洗浄回数と阻害の軽減効果の関係をみるため、K 562 を用いて 10~500 単位まで 6 濃度のヘパリン添加試料について検討したところ、図6のとおり 2 回に対し 5 回洗浄でも軽減はみられなかった。一方、シリカ法では 500 単位の高濃度まで阻害は認められなかった。

III 考 察

従来からヘパリン添加試料由来の DNA での PCR への影響は多く報告されている⁴⁻⁶⁾が、今回、RNA からの RT-nested PCR でもその阻害が明らかとなった。また、阻害の程度を定量的に解析する目的で real-time PCR を用いて定量的検討を行った。その結果、10 単位の低濃度でも阻害が起

こっており、50 単位以上では PCR 産物比で 99% 以上の高度の阻害が明らかとなった。末梢血用のヘパリン添加採血管 (市販) では、15 単位/ml 程度の濃度となる。また骨髓液は通常少量しか採取されないため、ヘパリンが高濃度化しやすい。よって、ともに有意な PCR 阻害が起こり得るため、その対策が不可欠と考える。

RNA ペレットあるいは処理前に細胞 (白血球) の洗浄を十分行うことでヘパリンの影響を軽減できるとの報告³⁾もあるが、RNA ペレットのエタノール洗浄でも、また RNA 抽出前の白血球を 5 回以上 PBS にて洗浄しても軽減されなかった (データ未提示)。他の対策としては、ヘパリナーゼにて中和する方法⁶⁾が残るが、作業が複雑化するだけでなく、試薬が高価なため実用的とはいえず、過剰のヘパリナーゼによる RNA への影響が危惧される。

一方、本検討の結果、シリカ法では高濃度のヘパリンを含有していても反応阻害はほとんど認められなかった。本法ではヘパリンはスピンカラムに吸着せず通過してしまい、カラム中に残ったヘパリンも洗浄ステップで除去できたものと推察される。また PCR 阻害物質であるフェノールや SDS なども使用されていない。本法は従来法に比較し、ややコスト高となるが、キット化されており、手技が簡便で短時間処理が可能であるため、特に臨床検査室での RNA 抽出に有用と考えられる。また、ヘパリン添加試料由来の DNA では、制限酵素処理に対する反応阻害が報告されている¹¹⁾ことより、PCR 以外の目的においても、ヘパリン添加試料に対してはシリカ法にて核酸を抽出することが望まれた。

RT-nested PCR 法は感度が高く特殊な装置が不要なことから、特に造血器腫瘍のキメラ遺伝子の検出に汎用されている。K 562 は臨床検体に比べ *M-bcr/abl* 遺伝子の発現がかなり高いため、100 単位のヘパリン添加試料までは RT-nested PCR 法で検出できた。しかし、臨床検体ではもともと低発現のうえ、治療効果の判定の場合は検出感度ぎりぎりの検体も多い。よって骨髓液採取時にヘパリンを使用した場合、その阻害により誤判定が誘引されやすい。

以上より、シリカ法によるRNA抽出は、ヘパリンの影響を回避し、正確な診断に寄与することができるものと考えられる。

IV 結 語

従来のRNA抽出法にて、ヘパリンによるPCR反応阻害を定量的に解析したところ、高度の阻害が認められ、誤判定の危険性が示唆された。その対処としてシリカ法を検討したところ、阻害がほとんどなく非常に有用であることが証明できた。

臨床検体の採取にあたっては、どのような阻害物質が存在しているか理解したうえで、最小誤差に抑えられるよう、適切な処理方法を選択すべきである。また、検査を進める際は、正確な診断に貢献できるよう、誤判定の要因を極力除外する努力を惜しんではならない。

なお本論文の要旨は第43回近畿医学検査学会(京都)および第53回日本医学検査学会(富山)において報告した。

■文献

- 1) Narayanan S: Considerations in the application of selected molecular biology techniques in the clinical

- laboratory: Preanalytical and analytical issues, 臨床病理 1996; Suppl 103: 262-270.
- 2) Higuchi R: Rapid, efficient extraction for PCR from cells or blood, Amplifications a forum for PCR users 1989; 2: 1-3.
- 3) Rolfs A *et al.*: ラボマニュアルPCR, 加藤郁之進監訳, 宝酒造株式会社出版, 大津, 1996
- 4) Ito M *et al.*: Inhibitory effect of dextran sulfate and heparin on the replication of human immunodeficiency virus (HIV) *in vitro*, Antiviral Res 1987; 7: 361-367.
- 5) Beutler E *et al.*: Interference of heparin with the polymerase chain reaction, BioTechniques 1990; 9: 166.
- 6) Holodniy M *et al.*: Inhibition of human immunodeficiency virus gene amplification by heparin, J Clin Microbiol 1991; 29: 676-679.
- 7) Heid CA *et al.*: Real time quantitative PCR, Genome Res 1996; 6: 986-994.
- 8) Chomczynski P *et al.*: Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction, Anal Biochem 1987; 162: 156-159.
- 9) QIAGEN: High-Performance RNA, 14-15, 1999
- 10) Cross NCP *et al.*: Minimal residual disease after allogeneic bone marrow transplantation for chronic myeloid leukaemia in first chronic phase: correlations with acute graft-versus-host disease and relapse, Br J Haematol 1993; 84: 67-74.
- 11) Coad JE *et al.*: Inhibition of restriction endonucleases by common clinical anticoagulants, Anal Biochem 1992; 205: 368-369.

Quantitative evaluation and improvement on inhibitory effect by heparin in RT-PCR

Tamotsu Irino¹⁾, Kazue Muraki¹⁾, Chikako Muroi²⁾, Hisaharu Tabayashi²⁾, Mitsuhiko Osaka¹⁾

¹⁾Research Institute, Shiga Medical Center

5-4-30, Moriyama, Moriyama-shi, Shiga, 〒524-8524, Japan

²⁾Department of Clinical Laboratory, Shiga Medical Center

The inhibitory effects of the anticoagulant heparin, as used in bone marrow aspiration, on reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR) were examined in detail. First, the inhibitory effects of heparin were evaluated by detecting *M-bcr/abl* fusion gene using RT-nested PCR on RNA extracted under conventional methods (TRIzol) from the K 562 cell line with or without heparin-Na. Compared with EDTA-treated samples, PCR product clearly was decreased at 50 units of heparin, and could not be detected at 200 units, indicating a false negative. Products of internal control (*abl* gene) decreased in parallel, and again could not be detected at 200 units. Quantitative GAPDH expression analysis was also evaluated using real-time PCR. RNA was extracted under conventional and silica gel membrane methods (silica method) from 4 cell lines and peripheral blood of 4 healthy individuals, to which heparin and EDTA were added, respectively. In the conventional method, inhibitory effects were observed in both cell lines and peripheral blood with 10 units of heparin. In the silica method, inhibitory effects were not observed even with high concentrations of heparin. As a conclusion, nucleic acid extraction using the silica method prevents misjudgment due to the inhibitory effects of PCR, and can contribute to accurate diagnosis.