

赤血球破壊のバイオマーカー： miR-451による溶血性貧血診断法

梅村創^a、高田勇吉^b、江寄彩乃^a、波多野真優^a、飯田夏紀^a、山崎直也^a、古賀眞理^b、石橋郁佳^b、澁田樹^a、佐藤謙一^a、宇治義則^a、浅野仁^c
a: 国際医療福祉大学福岡保健医療学部医学検査学科、b: 国際医療福祉大学大学院、c: 国際医療福祉大学福岡看護学部

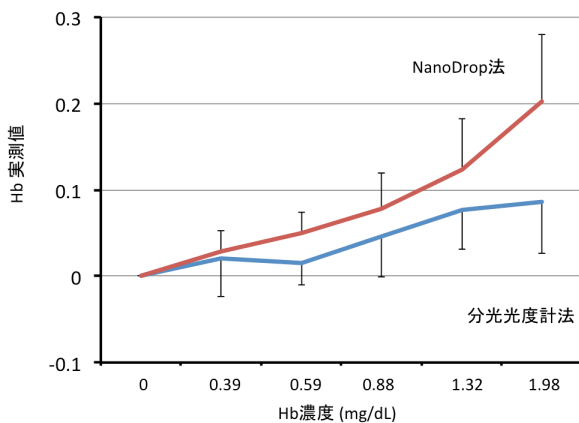
【目的】 溶血の診断は骨髄穿刺検査に加えて、網赤血球数、赤血球形態、血漿に放出された赤血球内成分（血清鉄、乳酸脱水素酵素：LD,AST,遊離ヘモグロビンなど）、血中ビリルビン、尿中ウロビリノーゲン、ハプトグロビンなどにより総合的に決定される。マイクロRNAは、血漿など様々な体液中に安定な分子として存在し病態を反映して変動する。本研究では、赤血球に特異的に発現しているマイクロRNA：miR-451、を溶血のバイオマーカーとして着目し、溶血性貧血診断における有用性を明らかにすることを目的とした。

【対象・方法】 正常対照者5名。EDTA加静脈血より赤血球沈層を作製し、溶血溶解により溶血液を作製した。溶血液の血色素(Hb)濃度は血球計数機(Sysmex, XE-5000)により測定した。純水により溶血液の段階希釈液を作製し、分光光度計U-5100 (HITACHI社)、414nmの吸光度による溶血のナンドロップ検出法(NanoDrop2000, ThermoFischer社)の2種類のHb測定法、およびRT-qPCR法 (reverse transcriptase-quantitative polymerase chain reaction method) によるmiR-451検出法の感度を比較した。マイクロRNAの抽出はカラム法 (NucleoSpin miRNA, Takara) により、測定はMicroRNA Assay Kit(ThermoFischer社)、ABI7500fast(ThermoFischer社)を使用した。

【結果1】

分光光度計とNanoDropのHb測定感度比較：検出可能な最低濃度は、分光光度計法1.32mg/dL、ND法0.59mg/dL、とND法が有意に感度が良かった (n=5、p<0.05)。

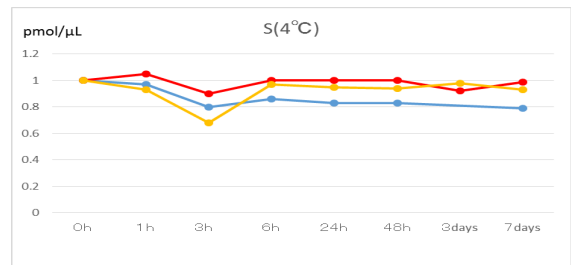
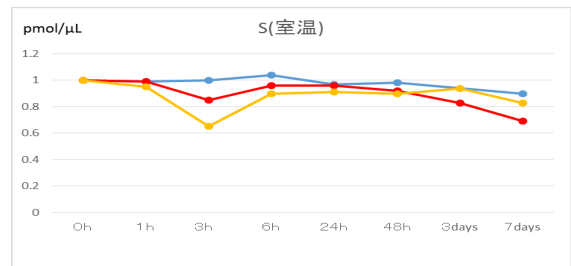
測定法	Hb濃度(mg/dL)						
	0	0.39	0.59	0.88	1.32	1.98	
分光光度計	平均	0	0.0208	0.01546	0.0454	0.076	0.0854
	標準偏差	0.000	0.045	0.026	0.047	0.045	0.059
	p-value (t検定)	0	0.358267	0.102723	0.096406	0.020102	0.031738
NanoDrop	平均	0	0.028	0.05	0.078	0.124	0.202
	標準偏差	0	0.02	0.02	0.04	0.06	0.08
	p-value (t検定)		0.065743	0.010305	0.013636	0.009075	0.004468



【考察・結語】 溶血の低侵襲性バイオマーカーである生化学的検査は、赤血球に特異的ではなく、骨髄穿刺検査など侵襲性のある形態学的検査などとともに総合的に診断されている。赤血球内マイクロRNAであるmiR-451の血漿濃度を解析する方法は、感度、特異性、低侵襲性に優れており、今後広く臨床検体を用いて有用性を検討することが望まれる。

【結果2】

血漿Hb測定における検体放置時間の影響：室温放置では1週間後に平均して24%の低下がみられ、4℃保存では12%の低下が見られた(n=3)。



【結果3】

赤血球由来マイクロRNAの有用性：段階希釈した溶血液を用いてND法と赤血球由来マイクロRNA：miR-451解析法の相関を解析した。Hb濃度0.02~8 mg/dLの希釈系列で、二者間の相関係数は $r = 0.99978$ であった。

