

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 10 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：H22～H24

課題番号：22590641

研究課題名（和文） DNAチップを用いた体液・感染症の迅速診断法の開発

研究課題名（英文） Detection of body fluid type and infection disease through DNA chip analysis

研究代表者

池谷 博（IKEGAYA HIROSHI）

京都府立医科大学・医学研究科・教授

研究者番号：30292874

研究成果の概要（和文）：

本研究では、HBV と HCV の 2 種類の感染症と血液型を同時に判定する DNA チップの開発に成功した。また、感染病原体が死後相当時間経過しても感染性を有することの証明や、各種体液特異的な mRNA を検出することに成功した。

研究成果の概要（英文）：

In addition to the blood type, HBV and HCV were detected through DNA chip analysis during a single process. These viruses were detectable and infectious in postmortem cases. Additionally, we also succeeded in detecting body fluid specific mRNA.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	2,400,000	720,000	3,120,000
23 年度	700,000	210,000	910,000
24 年度	500,000	150,000	650,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：法医学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医鑑定学

## 1. 研究開始当初の背景

本研究者は、法医学で増加が問題となっている身元不明死体の出身地域の推定のために、ヒト寄生生物のゲノム型を用いる方法を開発し、今日実際の警察・法医実務で使われるようになった。ところが出身地域の検査には専門的な知識と手法が必要であったため、誰もが簡単に検査できる方法として、DNA チップを用いる方法を開発し、報告するとともに、特許の申請を行った。

（特願 2004-293111 ヒト感染性物・ウイルス等による人種・出身地域推定法、2006-329735 ゲノム型を判定するためのオリゴヌクレオチドプローブおよびマイクロアレイ、特願：2008-108209 BK ウイル

スのゲノム型を判定するためのオリゴヌクレオチドプローブ及びマイクロアレイ、11/987,919（米国）Oligonucleotide probes and microarray for determining genome types)

Ikegaya H, Iwase H, Saukko PJ, Akutsu T, Sakurada K, Yoshino M. JC virus DNA chip offers a geographical sorting of unidentified cadavers for rapid identification. *Forensic Sci Int Gene.* 2:54-60, 2008

Ikegaya H, Iwase H, Akutsu T, Sakurada K, Yoshino M. Development of BK virus DNA Chip enables for geographical identification of unidentified cadavers.

Jpn J Forensic Sci Technol. 13(1):51-58, 2008.

その後、この DNA チップ技術を生かして、法医学で個人識別に重要な役割を果たしているヒト ABO 式血液型の迅速判定法として新たに DNA チップを開発し、特許の申請を行った(特願:2008-058234 ABO 式血液型を判定するためのプローブセット)。現在までに本研究が開発した DNA チップ利点は、迅速・正確に多種多様な生物のゲノムを一度にかつ簡単迅速に検出できるところにある。

一方、救急患者として運ばれてくる患者は、法医学の遺体と同様にその血液型や感染症などが不明のため、輸血や手術などの緊急処置に対応して、迅速かつ簡便に血液型や感染症を判定する必要がある。しかしながら、現在においては、各種の血液型と感染症に関しては、自動化されているものも多いが、全く別個に検査されるため、費用がかかる上、中には相当程度時間がかかるものも存在している。

そこで、本研究では、今まで得られた微生物ゲノムと ABO 式血液型を検出する DNA チップ技術を生かして、未だかつて報告のない、救急患者や法医学の遺体等で必要な ABO 式血液型、Rh 式血液型の 2 つの血液型および B 型肝炎ウイルス(HBV)、C 型肝炎ウイルス(HCV)と HIV を一度に検出できる DNA チップを開発することを目的とした。

また、法医学の分野では、犯罪者のプロファイリングのために、血液型のみならず、その血液型が検出された検体の種類が犯行の状況を明らかにする上で証明が必須である。これらの検体には、血液、唾液、精液、汗等の体液が多いが、このような体液の判別と血液型の判別は、別の検査で行われるために、時間と労力がかかることが難点であった。そこで、今回、血液型と各種感染症を一度に判定できる DNA チップの開発にあたり、犯罪捜査における体液の検出についても同様な方法を試みた。

## 2. 研究の目的

本研究では、すでに開発を終わっているヒト遺伝子および ABO 式血液型遺伝子を判定する DNA チップに Rh 式血液型遺伝子のプローブを追加して作成し、ABO 式血液型および Rh 式血液型既知のヒト血液を用いて、一度に ABO 式血液型と Rh 式血液型遺伝子を増幅したのち、DNA チップと反応させ、正確に判定できるかを検討する。その後、HBV、HCV および HIV の 3 種の感染症が陽性の血液検体を用いて、作成したヒト血液型判定チップに感染症を判定す

るプローブを追加し、3 種の感染症ゲノムを増幅させ、チップと反応させることによって、3 種類の感染症が正確に判定できるかどうかを検討する。

さらに、血液が血痕の状態になった場合、および血液や血痕が死後相当時間経過した場合であっても正確に検出できるかどうかを検討し、あわせて血痕や死後相当時間経過した遺体の血液において感染病原体の感染性があるか否かを培養細胞に感染させることで判定した。

次に、血液、唾液、精液、汗等の各種体液に含まれる mRNA を抽出し、解析することにより、各種体液特異的な mRNA を発見する。そして、その mRNA を検出するためのプローブを血液型と感染症を判定する DNA チップ上にあわせて追加し、体液種をも判定できるかどうかを検討する。

そして最後に実際の捜査資料に近い、斑痕化した体液や、遺体から採取した資料を用いて、体液種、血液型そして感染症の有無が判定できるかどうかを検討することを目的とした。

## 3. 研究の方法

平成 22 年度では、すでに開発しているヒト特異的遺伝子(D17Z1 領域)および ABO 式血液型判定 DNA チップ(特願:2008-058234 ABO 式血液型を判定するためのプローブセット)に、Rh 式血液型の判定プローブを設計・追加し、RhD- および + の血液型、ABO 式血液型およびヒト遺伝子が正確に判定される反応条件を、様々なヒト血液型の血液検体を収集し、これらを用いて検討する。検体の収集にあたっては、インフォームドコンセントを適確にとるだけでなく、検体提供機関の段階で検体を完全非連結匿名化して譲り受ける。あらかじめ研究内容および実施に関する大学内の倫理審査委員会に審査をお願いする。

輸血等で問題となる Rh 式血液型は RhD 型だけであり、この D 抗原コードする配列を持つか持たないかによって Rh 式血液型が基本的には決定される。この D 抗原をコードする領域からプローブを設計することとなる。

さらに次年度に行う 3 種類の感染症の陽性検体を収集する。感染症検体の収集に当たっては、研究のために確保できる研究室の BSL レベルにあわせ、研究者の所属する機関で研究が困難であればあらかじめ核酸抽出した状態で検体を譲り受ける。

平成 23 年度では、体液の識別 DNA チップの開発を主に行うこととする。同意の得られた約 20 名のボランティアから血液と精液、

尿、汗、唾液の各種体液を採取し、この4種類の体液に特異的であると報告のある mRNA の cDNA に対するプローブを部位選択的に4-5種類設計し（合計約20種類のプローブを設計、合成する）、1枚のDNAチップ上に固定する。その後、4種類の体液の mRNA の cDNA を同時に増幅し、DNAチップ上に固定したプローブとハイブリダイズさせ、数種類設計した中で最もよくシグナルを検出できたプローブを選別し、最終的なDNAチップを作製する。

使用する3ミリ各の極小DNAチップ上にプローブを固定する作業に関しては、特殊な機械が必要であるため、研究協力者である、科学研究費への応募資格を有しないDNAチップの作製企業にお願いします。さらに現有しておらず、研究の全ての期間において必要となるマイクロアレイスキャナーについては本研究費にて購入する。

作製したチップを用いて、今までの人獣識別、ABO式血液型の識別に加えて各種体液の識別が行えるかどうか、反応条件を詳細に検討する。また、各種体液を希釈し、検出感度との関係を検討したり、内部標準 mRNA のシグナル強度と比較検討することで、体液に含まれる mRNA の濃度まで判定できるかどうか検討する。この段階で、従来の方法と感度の比較検討も行う。また、各種体液の混合資料を作成し、検出が特異的に行えるかどうかを検討する。さらに、各種体液を斑痕化させたものを用いて、検討を行い、検出感度や時間経過により検出制度が変化するか否か、並びに判定の正確性を生の体液と比較検討する。最後に実際の犯罪現場や犯罪被害者の着衣等に残された体液斑を用いて、作製したDNAチップで体液を正確に判定できるかを検討する。平成24年度では、実際の司法解剖や犯罪捜査で得られた資料の残余を用いて作成したチップが正確に判定できるかどうかをさらに検討する。また、感染症が陽性と判断された血液や血痕の検体を用いて、血液や血痕が死後もしくは、作成後どのくらいまで各種感染病原体が検出できるのかどうかを検討する。各種病原体の感染が確認できた血液や血痕を用いて、これらの各種感染病原体が感染している血液や血痕が、実際に感染性を有するかどうか、HBVを例に取り、これらの試料を培養細胞の培養液に混入させ、その後一定日数培養を続けた後に、これらの培養細胞および培養液からウイルスのゲノムを検出したり、ウイルスの抗原を検出することにより検討する。

#### 4. 研究成果

本研究では、ヒト特異的遺伝子およびABO式血液型遺伝子を判定するDNAチップに、

HBV、HCVの2種類の感染症を判定するプローブを追加し、各感染症の陽性の体液検体を用いて、感染症ゲノムを増幅させ、作成したDNAチップと反応させることによって、血液型の鑑別とともに2種類の感染症が正確に判定できるかどうかを検討し、ウイルスの有無の判定が可能であった事を確認した。HIVに関しては、プローブ設計とチップの作成は行ったが、感染検体の入手が困難であったため、実際の検討は行うことができなかった。また、感染症と血液型同時に判定するDNAチップの作成過程でABO式血液型遺伝子判定のDNAの長さをウイルスゲノムの増幅断片の長さに合わせ、相互がバランスよくプローブに反応できるように反応条件を調整し、この結果ABO式血液型遺伝子判定の感度が向上したため、これをJ. Forensic Sci. に報告した。また、体液が斑痕の状態になった場合、および体液が液体のまま死後相当時間経過した場合であっても、体液の識別や感染症の判定が正確に検出できるかどうかを、C型肝炎ウイルス陽性の乾燥血液および血痕ならびに実際のC型肝炎ウイルスに感染した遺体からウイルスを検出することにより検討した。その結果、死後60日経過したものであっても感染性が高度に疑われる事を確認した。これらの成果をJ. Clin. Microbiol. に報告した。さらに、各種体液に特異的な新たな指標となるmRNAを見つけるため、精液と膿液を用いて、total RNAを抽出し、cDNAのゲノムプロファイリングを試みた。これにより、精液と膿液特異的なspiddosが認められたため、特異的mRNAの存在が疑われた。これをLeg. Med. およびJap J Forensic Sci & Tech. に報告した。また、感染微生物が、死後あるいは作成後相当時間経過した血液や血痕においても培養細胞に感染し、増殖することが証明できたため、今後これらを報告する予定である。

#### 5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計5件）

① Watanabe K, Hosoya M, Hirayama K, Saitoh H, Iwase H, Ikegaya H, Akutsu T, Sekiguchi K, Sakurada K. Forensic validation of the modified ABO genotyping method using a DNA chip. Leg Med. pii: S1344-6223(13)00007-2. 10.1016/j.legalmed.2013.01.004.

② Hirata R, Takasaka T, Miyamori D, Ahmed S, Sakudara K, Nishigaki K, Ikegaya H. Use of the Genome Profiling Method for

the Identification of Saliva and Sweat Samples. Jp J Forensic Sci Tech. 18:79-83, 2013.

③Takasaka T, Itoh Y, Kaneko H, Ikegaya H. Detection of hepatitis C virus and antibodies in postmortem blood and bloodstains. J Clin Microbiol. 49: 1122-1123, 2011

④ Takasaka T, Sakurada K, Akutsu T, Nishigaki K, Ikegaya H. Trials of the detection of semen and vaginal fluid RNA using the genome profiling method. Leg Med 13: 265-267, 2011

⑤ Watanabe K, Ikegaya H. Hirayama K, Motani H, Iwase H, Kaneko H, Fukushima H, Akutsu T, Sakurada K. A novel method for ABO genotyping using a DNA chip. J Forensic Sci. 56S1:183-187, 2011.

[学会発表] (計 2 件)

①渡邊 賢, 細谷 真悠子, 平山 幸一, 斉藤 久子, 岩瀬 博太郎, 池谷 博, 阿久津 智子, 関口 和正, 櫻田 宏一. DNA チップを用いた ABO 遺伝子型判定法の検討. 日本法科学技術学会. 平成 22 年 11 月 16 日東京

②原隼平, 高坂友和, 石川 昂, 小松亜由美, 吉本寛司, 池谷 博. 血痕からの肝炎ウイルス感染の危険性. 第 94 次日本法医学会学術全国集会. 平成 22 年 6 月 24 日. 東京

[図書] (計 0 件)

なし。

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

なし。

○取得状況 (計 0 件)

なし。

[その他]

なし。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

池谷 博 (IKEGAYA HIROSHI)

京都府立医科大学大学院・医学研究科・教授

研究者番号 : 30292874

### (2) 研究分担者

なし。

(3) 連携研究者  
なし。