

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月22日現在

機関番号：37104
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2011～2012
課題番号：23659373
研究課題名（和文） TaqMan 蛋白質定量法を用いた法医診断に有用な生化学的マーカーの定量法の確立
研究課題名（英文） Development of assay system of biochemical markers by TaqMan protein quantification method useful for forensic diagnosis.
研究代表者 神田 芳郎 (KODA YOSHIRO) 久留米大学・医学部・教授 研究者番号：90231307

研究成果の概要（和文）：法医診断に有用な生化学検査は、現在外注検査をおこなうのが一般的である。当該研究では、自施設で迅速かつ微量試料で実施できる検査法を確立することを目的とし TaqMan probe 法を用いた蛋白定量法の有用性を調べた。その結果、同法による再現性が良く測定範囲の広い方法を確立することは出来なかった。一方、市販の小規模施設用検査機器を用いることで当該研究目的の一部を達成できることが分かった。

研究成果の概要（英文）：Biochemical examinations useful for forensic diagnosis are usually performed by outsourcing. In this research, we examined usefulness of TaqMan protein assay to establish rapid and sample-saving on-site analysis method. As a result, we failed to design reproducible methods with wide dynamic range. On the other hand, we accomplish a part of the aim by using a commercially available testing equipment for private hospital.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・法医学

キーワード：法医診断、蛋白定量、生化学マーカー

1. 研究開始当初の背景

法医学領域では、剖検例の死因の特定あるいは死亡直前の病態の推定に際し、肉眼解剖所見、組織学的検査、薬毒物検査、感染症診断に加え、生化学的検査が有用な事例が数多く存在する。法医学で扱う死体から採取された血液や尿などの試料は、死後変化を受けており、一般に臨床医学で用いられている細胞逸脱酵素などの血液生化学検査項目の多くは診断意義を持たない。したがって、法医学領域では、死体試料中でも比較的安定で信頼しうる診断指標となりうる有用な生化学的マーカーの探索と検証がおこなわれている。こうした検査は検査機関への委託により実施されているのが現状であるが、必要な試料の量が多く、十分量検体が得られない症例の

場合、そのために検査の実施を諦める事例も経験する。また、結果が得られるまでには数日を要し、自施設での実施が期待される分野の1つである。一方、我々はこれまで遺伝子多型研究を専門におこなっており、リアルタイムPCR法の一つである TaqMan probe 法は、簡便かつ迅速な方法であり、加えて特異性の高い検査法であると評価していた。

2. 研究の目的

前項を受け、当該研究計画では、最近、遺伝子発現解析技術を応用し開発された、微量試料をターゲットとした TaqMan probe を用いた蛋白定量法（TaqMan® Protein Assay）により、法医学的な診断意義が示され、データの必要性が高い死体試料中の生化学的マ

一カーである血中トリプターゼ、血中C反応性蛋白 (CRP)、尿中ミオグロビンの定量法について、試料調整法、試料の状態が結果に与える影響等を検討する。これらの検討を通して、再現性が良く、かつ定量範囲の広い方法を提案することにより、死因究明や病態の推定に寄与する、自施設での実施が可能で、迅速かつ簡便な、法医鑑定の補助検査の開発を目的とする。

3. 研究の方法

本研究計画の内容は、実施に先立ち久留米大学倫理委員会へ実施計画を提出し、承認を得た。

(1) TaqMan Protein Assay System によるマーカー蛋白の定量

方法はキット (Lifetechnologies 社) の説明書に準じた。

① 抗体プローブの作成

トリプターゼに対するポリクローナル抗体をビオチンラベルし、透析によりフリーのビオチンを除去後、予めストレプトアビジンラベルされているアダプター (合成オリゴDNA) と反応させ、抗体プローブを作成した。作成したプローブのチェックを実施した後、使用できそうな抗体プローブを以下の定量検査に用いた。

② サンプル

サンプルには、キットに添付された希釈液あるいは尿を用いてさまざまな濃度に調整した標品、及び希釈液 $2 \mu\text{l}$ を用いた。

③ プローブとサンプルの反応

抗体プローブとサンプルをインキュベートし、アダプター間をDNAリガーゼを用いてライゲーションした反応産物を、すぐにPCRをおこなうものについてはこの反応液、時間をおくものについてはさらに蛋白分解処理を施した。

④ リアルタイムPCR

ライゲーション反応がおこった領域を特異的に増幅するプローブ、プライマーセットを用いたリアルタイムPCRをおこない、 C_T 値 (閾値に到達するまでのサイクル数) を指標とし、定量可能範囲の決定と再現性の確認をおこなった。

(2) Proseek によるマーカー蛋白の定量

方法はキット (OLINK BIOSCIENCE) の説明書に準じた。

① 抗体プローブの作成

Probemaker を使い、オリゴAとB (合成オリゴDNA) を抗体に連結し、プローブA及びプローブBを作成した。プローブの出来の善し悪しは、一部をアクリルアミドゲル電気泳動に供し、銀染色を行い確認した。

② サンプル

サンプルとして、希釈液を用いてさまざまな濃度に調整した標品、剖検血液及び尿サンプル及び希釈液 $1 \mu\text{l}$ を用いた。

③ プローブとサンプルの反応

抗体プローブとサンプルをインキュベートし、プローブをターゲット蛋白に結合させた。その後、DNAポリマーゼを加えPCRの鋳型である相補鎖を合成した。

④ リアルタイムPCR

ポリマーゼ反応がおこった領域を特異的に増幅するプローブ、プライマーセットを用いたリアルタイムPCRをおこなった。

C_T 値を指標とし、定量可能範囲の決定と再現性の確認をおこなった。

(3) サンドイッチELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 法を用いたマーカー蛋白の定量

① システムの構築

文献を参考に、ヒト血清蛋白ハプトグロビンのサンドイッチELISAによる定量システムを構築した。

② トリプターゼのELISAによる定量

トリプターゼをターゲットとして、これらに対する、さまざまな市販の抗体を購入し、標品の希釈系列を対象としてELISA法をおこなった。標準曲線から定量性があると考えられるTaqMan蛋白定量法のプローブに利用可能な抗体の選択をおこなった。

(4) Nycocard 及び Nycocard Reader II を用いた蛋白の定量

方法はキット (AXIS-SHIELD PoC AS) の説明書に準じた。

本法は固相免疫測定法を用いており、CRPとHb_{A1C}の2つのマーカーについてキットが入手可能である。

① CRPの定量

剖検血液サンプルあるいはキット中のコントロール血清 $5 \mu\text{l}$ を専用希釈液で希釈し、抗CRP抗体を固相化したテストデバイスに滴下後、金コロイド標識抗体試薬を滴下し検体中のCRPと結合させサンドイッチを形成させる。次に洗浄液を滴下することにより過剰の標識抗体を洗浄したものを、Nycocard Reader II で読み取った。

② Hb_{A1C}の定量

剖検血液サンプル $5 \mu\text{l}$ を反応試薬に加え、赤血球を溶血、グリコヘモグロビンに青色色素で標識したホウ酸を結合させ、 Zn^{2+} の作用によりヘモグロビンを沈殿させる。反応検体をテストデバイスに滴下し、洗浄液を滴下したのものについて、メンブレン上に残った沈殿の赤色 (ヘモグロビン由来) と青色 (グリコヘモグロビン由来) の色調をNycocard Reader II で読み取った。

(5) 外注による各検査項目の実施

血清を用いたトリプターゼの定量検査は、三菱化学メディエンス株式会社へ依頼した。血清を用いたCRP、全血を用いたHb_{A1c}、尿を用いたミオグロビンの各定量検査はエスアールエルに依頼した。

4. 研究成果

(1) TaqMan Protein Assay Systemによるマーカー蛋白の定量

重篤なアレルギー反応であるアナフィラキシーショックの指標となるトリプターゼについて、ポリクローナル抗体をビオチン化したものを用いてプローブを作成した。抗体プローブは、フリーのビオチンの影響がないことをチェックし、希釈液を用い標準品の希釈系列を作成し解析をおこなった。トリプターゼは、基準値が低く、検査系には非常に高い感度を必要とするが、目標とする感度の約100分の1の感度(数百ng/ml)であった。

感度を上げるために、プローブに用いる抗体を、一般的にはポリクローナル抗体よりも高感度になることが期待されるモノクローナル抗体に変更することも考えたが、他メーカーの製品(Proseek)が発売になった。これらの1つの大きな違いは、2種の抗体プローブ間の結合を、TaqMan Protein Assay Systemではリガーゼでおこなうのに対し、ProseekではT4 DNAポリメラーゼを用いる点である。前者の方がnucleaseへの耐性が弱いため、当該研究計画で用いるような血液等の生体サンプルでは、TaqMan Protein Assay Systemを用いた場合、正確な定量が困難になる可能性が考えられることから、後者の方が、本研究にはより適しているものと予想された。実際に、尿を希釈液として標品を希釈し、解析をおこなったが、TaqMan Protein Assay Systemでは増幅の抑制が認められた。したがって、その後は、Proseekによる検討を行うことにした。

(2) Proseekによるマーカー蛋白の定量

① CRPの定量アッセイ

CRPは、急性炎症あるいは組織崩壊性病変で増加し、感染や組織障害を鋭敏に反映する炎症マーカーである。当該計画でターゲットとして考えている生化学マーカーの中で、他より数約倍高い基準値、つまり検出感度の要求性が低いため、最初に定量システムの構築を試みた。抗体は1種のポリクローナル抗体を両プローブの作成に用いた。ダイナミックレンジ(測定可能域)を調べたところ、実際の検体は $\times 10^4$ あるいは $\times 10^5$ 希釈する必要があることが分かった。そこで、剖検サンプルの血清を希釈液で希釈し標準曲線用サンプルと共に解析した結果、外注検査の結果と比

較すると、十から数十倍高値であり、また再現性に乏しかった。この理由の1つとして、サンプルの希釈倍率が高いことが考えられた。一方、尿を希釈液として用いた場合でも、反応の阻害は認められないことから、システム自体は生体試料に適しているものと考えた。また、検出感度そのものも十分であると判断されたことから、以下の実験をおこなった。

② ミオグロビンの定量アッセイ

心筋や呼吸筋に存在するヘム蛋白であるミオグロビンは、法医学的には、尿中値が熱中症や悪性過高熱、悪性症候群等の横紋筋融解症の診断に有用である。

抗体は1種のポリクローナル抗体を両プローブの作成に用いた。なお、本法では抗体の濃度及び添加物の濃度に制限があるが、含まれるアジ化ナトリウムの濃度が不明であったため、透析を行ったものをプローブ用に用いた。標品の希釈系列から標準曲線を作成したものの、ダイナミックレンジの再現性が乏しく、また剖検例の尿サンプルを定量したところ、外注検査値との乖離も大きく、ばらつきも大きかった。そこで、プローブがラベルされているかどうかチェックする目的で、ラベル後の抗体をアクリルアミドゲルで泳動後、銀染色により検したところ、良好な像は認められなかった。

そこで、透析ステップを回避するために、新たに、添加物が基準レベルよりも低い、若しくは含まれないモノクローナル抗体を2種選定し、プローブを合成した。

前回作成したプローブとの組合せも含め、標準曲線と剖検例サンプルを用いて解析を行った。しかしながら、サンプルを加えない反応系での増幅であるバックグラウンドが高く、結果として検出感度が低くなり、また、剖検例サンプルの推定される濃度は、外注検査のそれとの相関が悪い結果となった。

③ トリプターゼの定量アッセイ

トリプターゼについては、2種のモノクローナル抗体を選定してアッセイを実施した。その結果、標準曲線が描けないくらい反応性が悪いことが分かった。

そこで用いた抗体の評価をおこなうために、サンドウィッチELISA法をおこなうことにした。システムを整えるため、まず確立された方法に準じおこなうべきであると考え、文献のとおり血清蛋白であるハプトグロビンのサンドウィッチELISA法を立ち上げた。同様に、トリプターゼの定量用プローブに用いた抗体で標準曲線を作成した。その結果、抗体間で感度の違いは認められたものの、どちらの抗体を使っても、目的

とする検出限界を得ることはできなかった。

そこで、さらに新たにいくつかの抗体を選定し、まず、複数の捕獲抗体を用いた ELISA 法による検定により、感度と定量性の高い抗体を選び、ラベリング反応を実施した。これらを用いて標準曲線用サンプルと反応させ定量 PCR をおこなった。その結果、定量性、感度共に良いプローブセットが得られた。しかしながら検査の再現性が乏しかったため、標品を変えて再検査を実施したが、同様に再現性に乏しい結果しか得られなかった。

(3) Nycocard 及び Nycocard Reader II を用いた蛋白の定量

上記のように、TaqMan Protein Assay System 及び Proseek を用いた蛋白定量法では法医学試料に適用可能な検査系を確立することが出来なかった。しかしながら研究遂行中に、CRP と、過去 1~2 か月間の血糖を反映するマーカーである Hb_{A1c} の簡易定量がおこなえる Nycocard という臨床検査キットを見出した。このシステムは、外注検査に依頼する量の 100 分 1 以下の $5 \mu l$ の試料での検査が実施出来、かつ、検査に要する時間も数分と迅速、簡便な方法であるため、解剖中に結果を得ることが出来る。本キットにより得られた結果は、溶血血液での Hb_{A1c} の値以外は、外注検査値と非常に高い相関が認められた。なお、また、Nycocard 本体のみならず、専用の読み取り機器である Nycocard Reader II の値段も 20 万円程度と割安であるため、法医学の各教室で導入可能なものと考えられる。

④ 考察と今後の展望

TaqMan probe 法による蛋白定量法では、抗体を核酸でラベルするという特殊性から現状では専用試薬を用いなければならない。そのため、反応系は全てブラックボックスであり、各ステップで試薬や温度といった条件を変える等の工夫が極めて困難である。1~2 μl しか検体を必要としない点は大きなメリットである反面、検査のステップが多く結果に誤差が増幅され反映されるのではないかと考えられる。さらに、Proseek は生体サンプルに耐性のある方法ではあるが、抗体濃度、添加物の条件が非常に厳しく、これに見合う抗体を探す必要がある。さらにこの条件をクリアしたからといって、プローブに適した抗体であるかどうか、組合せが適切かどうかは試してみなければ分からない。しかしながら 1 回のラベリングにも高額な費用がかかる。更に、異なる抗体を探してトライすることにより、再現性、感度共に高い条件が得られる可能性は否定できないが、条件検討が困難であれば、広く使われる方法にはなり難いもの

と判断される。

当初ツールとして考えていた TaqMan 蛋白定量法では目的を達成出来なかったものの、Nycocard の導入により、検査が可能な項目が現状では 2 種のみではあるが、当該研究計画の目的である、微量試料を用いた自施設で実施可能な方法の提案は可能になったものと考えている。

今後は、Nycocard のような、臨床分野では用いられているが法医学試料での検証が行われていない方法を検索すること、あるいは、他のシステムの試用も考慮し目的を達成したいと考えている。

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 11 件)

- ① Soejima M, Koda Y. TaqMan real-time polymerase chain reaction for detection of SEC1-FUT2 hybrid alleles: identification of novel hybrid allele: Clin Chim Acta. 査読有. 415, 2013, 59-62. doi: 10.1016/j.cca.2012.08.020. Epub 2012 Aug 29.

[学会発表] (計 13 件)

- ① 神田芳郎, 副島美貴子. FUT2 融合遺伝子 (se^{fus}) スクリーニング法による新規ハイブリッドアレルの同定. 日本 DNA 多型学会 第 21 回学術集会, 2012 年 11 月 8 日, 京都教育文化センター (京都市).
- ② 副島美貴子, 神田芳郎. FUT2 融合遺伝子 (se^{fus}) スクリーニング法の開発. 第 62 回日本法医学会学術九州地方集会, 2012 年 10 月 13 日, 熊本大学医学部山崎記念館 (熊本市).

[図書] (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.med.kurume-u.ac.jp/med/foren/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

神田 芳郎 (KODA YOSHIRO)
久留米大学・医学部・教授
研究者番号：90231307

(2) 研究分担者

副島 美貴子 (SOEJIMA MIKIKO)
久留米大学・医学部・講師
研究者番号：80279140