

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 17 日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25460875

研究課題名(和文)ゲノムプロファイリング法による感染微生物の検出

研究課題名(英文)Detection of infectious microbes by the Genome Profiling method

研究代表者

池谷 博 (Ikegaya, Hiroshi)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：30292874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：ランダムPCRを用いたGP法で、2種類のウイルス種の識別に成功した。クラスター解析によってウイルス種を同定する以前に、ウイルス種特有のSpecies Identification dots(Spiddos)によってウイルス種が判別できることがわかった。実際のヒト尿検体からウイルス種を同定することに成功した。死体血中の細菌17SrDNAをPCR増幅し、温度勾配電気泳動したところ、GPにて各種細菌類に相当するSpiddosを同定することに成功した。細菌17SrDNAを指標としたGP法による微生物種の同定が溺死の判定法として有効と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Detection of two viral species were successful by the Genome profiling(GP) method using random PCR. Prior to the cluster analysis, viral species were detectable by the Species Identification dots (Spiddos). Those viruses were detectable from human urine samples. Various bacteria species were detectable from the postmortem human blood samples by the GP method using 17SrDNA amplification. The diagnosis of drawing were successful by the GP method using 17SrDNA amplification.

研究分野：法医鑑定学

キーワード：ゲノムプロファイリング JCウイルス BKウイルス 17SrDNA 溺死

1. 研究開始当初の背景

病院や研究所など血液を扱う臨床分野では、ウイルスや細菌感染の危険性を考慮し、事前の検査と十分な予防策がとられている。しかし、交通事故、傷害、殺人事件現場に残された血痕や加害者および被害者の衣服に付着している血痕および死体からの感染の危険性については未知な部分であり、それらに対する検査と予防策は十分にとられていない。研究者は、本研究の開始の前年までの基盤研究(C)において、C型肝炎ウイルスといった解剖時の執刀医の防御のために重要な感染症が、死後2ヶ月を経ても血液や血痕から検出され、かつ感染性を有している可能性が高いことを報告した。

Takasaka T, Ikegaya H et al. Detection of hepatitis C virus and antibodies in postmortem blood and bloodstains. J Clin Microbiol. 2011 Mar; 49(3): 1122 - 3.

そして、血液型と同時にB型肝炎およびC型肝炎ウイルスのゲノム型を判定できるDNAチップを開発した。

しかしながら、DNAチップでは様々な感染症が検査できるが、予想されていない感染症に対しては役に立たないこと。DNAチップは検出機会だけでなく、作成するのに非常に高価であり、多数の感染症のプローブを作成し、マルチプレックスな反応系を構築するのに技術や手間がかかることから、汎用されるかどうか疑問であった。また、ウイルスや細菌は、突然変異を良く起こすので、作成したDNAチップをその都度改変していくのに非常に労力と経費がかかる。そこで、既知の感染症だけでなく、未知の感染症をも、安価で簡単に検出できる方法が期待された。

そこで、研究代表者らは、ゲノムプロファイ

リング法に着目した。この方法は、1997年に西垣らにより生物工学で開発された方法であり、ランダムPCRによって試料に含まれる巨大なゲノムDNAの一部を増幅する。これは統計学でのランダムサンプリングに相当し、名前の由来となっているが、増幅されたDNA断片をゲルの上部に横一線に載せて上下にマイナス極からプラス極へと電気泳動することで複雑なバンドパターンが現れる(温度勾配ゲル電気泳動: TGGE)。様々な増幅されたDNA断片の温度特異的開裂点(Species identification dots: Spiddos)を、塩基配列が予めわかっている内部参照試料を用いて補正し、規格化する。このようにして得られたSpiddos座標はゲノム固有の普遍的な値となり、生物間の比較に用いられている。このSpiddos座標を用いて生物ゲノム間の類似性即ちPaSS値をコンピューターで算出し、クラスター解析する。この方法を利用することによって、研究代表者らはヒトとその他の動物種を分けることができるばかりか、予め様々な動物種の泳動データを持っていれば、動物種特有のSpiddosの出現と、Spiddos座標のクラスター解析によって試料に含まれる動物種を推定することができることを明らかにした。

Suwa N, Ikegaya H, et al. Human blood identification using the genome profiling method. Leg Med (Tokyo). 2012 May; 14(3): 121 - 5

このことを利用して、解剖時に採取された血液を用いて、ゲノムプロファイリング法で解析することにより、様々な感染微生物が検体に含まれていた場合には、ヒトゲノムとともに感染微生物のゲノムの一部が増幅される

ことから、温度勾配ゲル電気泳動によって各微生物特有の *Spiddos* が現れ、*Spiddos* 座標の Pass 値をクラスター解析することにより感染微生物が判定できるのではないかと考えられた。

2. 研究の目的

研究代表者の施設には、解剖時にウイルス・細菌検査がなされた血液検体が約 200 例凍結保存されている。これらの検体すべてに対し、ゲノムプロファイリング法を試み、共通する *Spiddos* 座標から、ヒトおよび各種感染微生物特有の *Spiddos* を明らかにし、微生物種を同定する。

そして、各種微生物特有の *Spiddos* 座標から Pass 値を算出し、クラスター解析することにより微生物種だけでなく、ゲノム型をも分類可能であるかどうかを検討する。さらに、検査した検体の中で、ヒトおよびあらかじめ検査した感染微生物と合致しない *Spiddos* が現れたものに対しては、電気泳動後の温度勾配ゲルの *Spiddos* の部分を切り出し、シーケンス解析することにより、検査対象外の感染微生物の同定を試みることを目的とした。

3. 研究の方法

解剖時にウイルス・細菌検査がなされたのち、凍結保存された血液検体約 200 例を用いて、ゲノムプロファイリング法を試み、共通する *Spiddos* 座標から、ヒトおよび各種感染微生物特有の *Spiddos* を明らかにし、微生物種を同定する。

そして、各種微生物特有の *Spiddos* 座標から Pass 値を算出し、クラスター解析することにより微生物種だけでなく、ゲノム型をも分類可能であるかどうかを検討する。さらに、検査した検体の中で、ヒトおよびあらかじめ検査した感染微生物と合致しない *Spiddos* が現れたものに対しては、電

気泳動後の温度勾配ゲルの *Spiddos* の部分を切り出し、シーケンス解析することにより、検査対象外の感染微生物の同定を試みる。

解剖時に採取された血液を使用するために、学内の医学倫理委員会に研究利用の許可を申請し、既に凍結保存されている 200 例分の血液検体から DNA・RNA を抽出する。検体採取時に検査されている血液培養検査の結果が陰性だった検体を用いて DNA または cDNA をランダム PCR することにより、DNA ウイルスと RNA ウイルスの両者のゲノムプロファイリング法による検出を試みることにより、既知のウイルス特有の *Spiddos* を明らかにする。

そして、それらの *Spiddos* 座標から Pass 値を算出し、クラスター解析することで、ウイルスのゲノム型まで判定できるかどうかを検討する。検出されたウイルスゲノム型は、通常のシーケンス解析データをもとにした分子系統解析の結果と比較し、判定されたゲノムプロファイリング法により判定されたゲノム型が通常のゲノム型の判定と同一であることを確認する。

次に、細菌感染症をターゲットとし、検体採取時に検査されているウイルス検査が陰性であったものを検体とし、ランダム PCR を行い、血液培養検査の結果を参考としながら、ゲノムプロファイリング法により各種感染細菌の特有の *Spiddos* を明らかにする。そして、ウイルスと同様に、それらの *Spiddos* 座標から Pass 値を算出し、クラスター解析することで、細菌のゲノム型まで判定できるかどうかを検討する。検出された細菌ゲノム型は、通常のシーケンス解析データをもとにした分子系統解析の結果と比較し、判定されたゲノムプロファイリング法により判定されたゲノム型が通常のゲノム型の判定と同一であることを確認する。これらの知見をもとに、溺死の診断において

溺水時の生活反応として、各臓器から溺水現場のプランクトンが検出されるのと同様に、溺死体において、ゲノムプロファイリング法で検出された血液および各臓器中の細菌種と溺死現場の水に含まれる細菌種が一致するかどうか検討し、溺死診断にゲノムプロファイリング法が利用できるかどうかを検討した。

最後に、本研究で用いた約400例の検討により、遺体においてどのような感染症が主に認められ、医療現場、事故・災害現場で注意しなくてはならないのかを明らかにする。

4. 研究成果

解剖時に採取された検体を使用するために、本研究計画について学内の医学倫理審査委員会承認を得、検体収集を行ったが、あいにく解剖体数が半減し、検体入手に支障をきたした。そのため、感染微生物のモデルの一つとなるウイルスプラスミドを入手し、ゲノムプロファイリング法によるウイルス検出の有効性を検討した。感染微生物のモデルとして、JCウイルスとそれに近似のウイルスであるBKウイルスの2種類のウイルスの、ゲノム型の異なるプラスミドサンプルを多数用意した。これらのプラスミドをランダムPCR増幅し、温度勾配ゲル電気泳動によってゲノムプロファイリングすることにより判定されたウイルスゲノム型と、通常のプライマーを用いたPCR法ののちにシーケンサーで塩基配列を決定し、分子系統解析する従来法で判定されたウイルスゲノム型が同一となるかどうかを比較検討した。これにより、ゲノムプロファイリング法で、2種類のウイルス種が識別できることが明らかになった。さらにウイルス種特有の*Spiddos*が明らかになったことから、クラスター解析によってウイルスを同定する以前に、*Spiddos*によってウイルス種が判定できることがわかった。ところが、ウイルスゲノ

ムの1%以内の変異からなる同一ウイルス種の異なるゲノム型に関しては、*Spiddos*同定の際の誤差などから判別するのは困難であることがわかった。

次年度では、実際の臨床検体として解剖時に採取された尿を用いて、従来法により、JCウイルスまたはBKウイルス陽性検体、陰性検体と判別した尿検体を持ち、これらの検体からDNAを抽出し、ランダムPCR法によりゲノムを増幅し、温度勾配ゲル電気泳動法によりゲノムプロファイリングを試みた。この結果、ウイルスゲノム以外の人ゲノムが混在する中で、前年度に発見したウイルス特有の複数の*Spiddos*を同定することにより、ウイルス種の検出と同定ができることが明らかになった。以上の成果を*The Open Journal of Virology*に学術論文として発表した。また、この研究の過程でJCウイルスに関する新たな知見が得られたことから、*Investigative Genetics*に内容を学術論文として発表した。

最終年度は、これまでに多くの死体の血液検体を収集したことから、これらの検体を血液培養検査に出すとともに、17SrDNAをPCR増幅し、温度勾配電気泳動したところ、ゲノムプロファイリングにて各種細菌類に相当する*Spiddos*を同定することに成功した。しかし、腐敗による細菌の発生は多種多様であり、なかなかたくさんの菌種を同定することは容易ではないと考えられた。そこで、溺死の診断に絞って、水中の細菌と死体血の中の細菌の*Spiddos*が合致するか否かを検討することとした。

現在、溺死の診断には、壊機法を用いるのが通常であるが、方法自体が危険であることや、植物プランクトンの硅藻類のみの判定しかできず、感度が悪いという欠点が存在した。本研究では死亡状況や、壊機法によって溺死と診断された症例の血液と、溺死ではない単

なる水中死体や、陸上で死体から採取された血液、発見現場と推定入水現場の水を用いて、17SrDNAをPCR増幅し、温度勾配ゲル電気泳動を試みた。すると、溺死死体血と溺死現場水中に含まれる細菌の *Spiddos* が一致することがわかった。その他の溺死体ではない死体血に含まれる細菌の *Spiddos* が合致しないことはもちろん、淡水や海水による菌種の違い、および水系や入水場所の違いも結果に反映しており、溺死の判定法として、ゲノムプロファイリングによる微生物種の同定が有効な方法となりうるものと考えられた。最終年度に法歯科医学会で報告したが、現在これらの結果を報告するために論文を作成中であり、今年度内に学術雑誌に投稿する予定である。

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2件)

1. Miyamori D, Ishikawa N, Idota N, Kakiuchi Y, McLean S, Kitamura T, Ikegaya H. Tracing Jomon and Yayoi ancestries in Japan using ALDH2 and JC virus genotype distributions. *Investig Genet*. 30;6:14, 2015. 査読あり
2. Tanaka Y, Hirata R, Mashita K, Mclean S, Ikegaya H. Detection of Human Polyomavirus using the Genome profiling

Method. *The Open Virology Journal*. 9:29-37, 2015. 査読あり

[学会発表](計2件)

池谷 博. ゲノムプロファイリング法によるポリオーマウイルスの同定. 第62回日本ウイルス学会学術集会 2014年11月10日 パシフィコ横浜 神奈川県横浜市.

井戸田望, 石川昂, 池谷 博. 温度勾配ゲル電気泳動を用いた微生物ゲノム検出による溺死診断の検討. 日本法歯科医学会第9回学術大会 2015年6月28日 東京大学山上会館 東京都文京区.

[図書](計0件)

[産業財産権]

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]

ホームページ等

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