—技術報告—

TaqMan プローブ PCR 法による ABO 式血液型分類に関する一考察

尾形早映子, 片桐秀信, 小林舞子, 宇井勇人, 吉井富夫

警視庁科学捜査研究所

〒100-8929 東京都千代田区霞が関 2-1-1

**An Examination by TaqMan PCR Method with a Specific Probe
on ABO Blood Typing**

Saeko Ogata, Hidenobu Katagiri, Maiko Kobayashi, Hayato Ui and Tomio Yoshii

*Medico-Legal Section, Criminal Investigation Laboratory,
Metropolitan Police Department, Tokyo, Japan
2-1-1, Kasumigaseki, Chiyoda-ku, Tokyo, 100-8929, Japan.*

(Received 11 October 2006; accepted 26 December 2006)

We developed a highly sensitive and rapid ABO genotyping method based on the polymerase chain reaction (PCR) using TaqMan kit, in which three single nucleotide polymorphisms (SNPs: positions no. 261, 796 and 803) were targeted and searched with original probes. This method enabled us to confirm genotypes OO, AB (10 samples each), AO, BO, AA, and BB (1 sample each) and phenotypes A and B (10 samples each). All procedures from PCR took only 2 hours and 30 minutes. The TaqMan probe PCR method required only 1.2 ng of template DNA for ABO genotyping. It also allowed us to confirm the presence of PCR inhibitors and to estimate the quantity of template DNA by using real-time PCR, which would be utilized in subsequent examinations, as with the Multiplex STR method.

Key words: ABO genotyping, SNPs, TaqMan probe PCR method, Criminal investigation

緒 言

日本では個人識別法として, Multiplex STR (Short Tandem Repeat) 法等の DNA 多型分析が行われているが, 被疑者が特定されていない初動捜査においては, 捜査対象を絞り込むために, 法医学資料の迅速な ABO 式血液型の判定が依然として重要な鑑定項目となっている. ABO 式血液型の早期判定には特異性や抗体価の高いポリクローナル抗体が必要であるが, 複数社が供給を取りやめてしまった現

在, 迅速な判定が難しくなり, DNA レベルでの判定補助が試みられている. ABO 遺伝子については Yamamoto らによる histo-blood group A transferase (A 遺伝子) cDNA の解析以来, 数カ所の塩基変異等の SNPs (Single Nucleotide polymorphisms) により B 遺伝子および O 遺伝子が決定されていることが分かっている¹⁻⁵⁾. これらの報告を受けて, 法医学的 ABO 遺伝子型判定として, PCR-RFLP (PCR-Restriction fragment length poly-

morphism) 法が報告されたが⁶⁻¹⁰⁾, 作業が繁雑である上に, 制限酵素を複数使用するために酵素の活性阻害による誤判定が観察されている¹¹⁾. SNPsのうち, 高田らは261番塩基の欠失と796番塩基の置換に注目し, プライマー選択によるより簡便な TaqManPCR 法を報告している¹²⁾. TaqManPCR 法は, 標的とする鋳型 DNA をプライマーで増幅しながら, ハイブリダイズしたダブルラベル化プローブを, 酵素で切断し, それによって遊離する蛍光の強度から SNPs を判別する方法である¹³⁾. 一方, 佐藤らは O 遺伝子の判定には261番塩基の欠失, B 遺伝子の判定には796番および803番塩基の置換を検査することが特に有効であると報告している¹⁴⁾. 本研究において我々は, 佐藤らが報告する3箇所の変異に着目し, その当該変異を組み込んだ特異的なプローブを設計し, TaqMan プローブ PCR 法による簡易, 迅速な ABO 遺伝子型判定を検討した (一部, 2001年・第85次日本法医学会で発表¹⁵⁾). ここに TaqMan プローブ PCR 法の信頼性と検出限界について報告すると同時に, TaqManPCR 法の利点 (リアルタイムな増幅情報) を生かした, 実務資料への有用性を報告する.

材料と方法

1 実験材料

実験内容について説明し, 同意を得た関東在住の血縁関係のない日本人成人で, ABO 式血液型が A 型, B 型, O 型 (遺伝子型が OO 型), AB 型 (遺伝子型が AB 型) の各10名, 遺伝子型が AO 型 (両親の血液型が A 型と O 型で表現型が A 型のもの) の1名, BO 型 (両親の血液型が B 型と O 型で表現型が B 型のもの) の1名, AA 型 (両親の血液型がともに AB 型で表現型が A 型のもの) の1名, BB 型 (両親の血液型がともに AB 型で表現型が B 型のもの) の1名から全血約1 ml を得た. いずれもポリクローナル血清 (SERI 社, 米国) で表現型を確認し, DNA の抽出は, 血液約50 μ l から QIAamp DNA Micro Kit (QIAGEN) により行った. 抽出 DNA は TE 50 μ l に溶かし検体 DNA とした.

なお, 本研究は, 日本法科学技術学会倫理審査委員会の審査と承認を得て実施された.

2 反応条件および型判定法

ABO 遺伝子型の判定では, Fig. 1 に示したように, 2種類の PCR 反応系を用いている. PCR-1 反

Fig. 1 Schematic diagram of ABO genotyping using the TaqMan probe PCR method.

PCR-(1): PCR amplification of the exon 6 fragment including SNPs at position 261.

PCR-(2): PCR amplification of the exon 7 fragment including SNPs at positions 796 and 803. $\triangle$: nucleotide deletion.

応系は、261番塩基の欠失（O 遺伝子）を識別するもので、PCR-2 は、796番と803番の2塩基置換（B 遺伝子）を識別するものである。PCR-1 反応系の調製では、検体 DNA に MasterMix（アプライドバイオシステムズ・ジャパン）12.5 μ l を加え、次いで O-F および O-R プライマーを各300 nM, AB-Fam および O-Vic プローブを各150 nM になるように加え、滅菌水にて全体積を25 μ l にした。PCR-2 反応系の調製では、検体 DNA に MasterMix（アプライドバイオシステムズ・ジャパン）12.5 μ l を加え、B-F プライマーを200 nM, B-R プライマーを

300 nM, AO-Fam プローブを50 nM, B-Vic プローブを100 nM になるように加え、滅菌水にて全体積を25 μ l にした。これらの反応混液を Applied Biosystems 7900HT Fast リアルタイム PCR システム7900HT-4 にセットし、PCR 条件として、50°C 2分（STAGE 1）、95°C 10分（STAGE 2）の前処理後に、95°C 15秒、60°C 1分（STAGE 3）の反応を40サイクル行い、ABI PRISM 7900HT Sequence Detection System (SDS ver. 2.1)を用いて解析した。各プライマーとプローブの塩基配列は Table 1 に示した。増幅の有無は35サイクル以下の増幅曲線に立

Table 1 Primers and probes.

PCR-(1):		Sequence
Primer	O-F	CCTGTGTGGATGTGCAGTAGGA
	O-R	CGTTGAGGATGTTCGATGTTGAA
Probe	AB-Fam	Fam-TCCTCGTGGTGACCCCTTGGC-TAMRA
	O-Vic	Vic-ATGTCCTCGTGGTACCCCTTGGCT-TAMRA
PCR-(2):		Sequence
Primer	B-F	CTGCACCTCTTGCACCGAC
	B-R	AGGCCTTCACCTACGAGCG
Probe	AO-Fam	Fam-CCCGAAGAACCCCCCAGGTAGTAGAGAAA-TAMRA
	B-Vic	Vic-CCCGAAGAACGCCCCCATGTAGTAGAGAAA-TAMRA

Fig. 2 Amplification plots for (1) a homozygous case and (2) a heterozygous case. The graph shows normalized reporter fluorescence (ΔRn) versus cycle number.

Fig. 3 Results of TaqMan probe PCR-based ABO genotyping using genomic DNA samples from 10 individuals for each of the A, B, O, and AB blood types and the AO, BO, AA, and BB genotypes. Heterozygous SNPs and each Homozygous SNPs marked with circles for classification.

(1): A Vic-labeled probe was used to detect O-allele SNPs (Allele 1); a Fam-labeled probe was used to detect A and B alleles (Allele 2).

(2): A Vic-labeled probe was used to detect B-allele SNPs (Allele 1); a Fam-labeled probe was used to detect O and A alleles (Allele 2).

■: four controls without template; ◇: AA sample result; △: BB sample result; ☆: AO sample result; ◎: BO sample result; ▲: AB sample result; ◆: OO sample result.

×: Heterozygous SNPs, ●: Homozygous SNPs

ち上がりがあるか否かで判断した。

Fig. 2-(1)のように、SNPsとしてホモ接合体のもの（例えばPCR-2反応系ではBB, AO, AA, OO型）では、FamあるいはVic蛍光のどちらかの増幅曲線に立ち上がりが見れたが、ヘテロ接合体のもの（例えばPCR-2反応系ではAB, BO型）では、Fig. 2-(2)に示したように、FamおよびVic蛍光の両増幅曲線に立ち上がりが見れた。型判定は、縦軸にFam蛍光の増加量、横軸にVic蛍光の増加量をとった分析結果（Fig. 3）において、蛍光増加量に有意性が認められた場合に行った。

3 実務参考資料

実務参考資料としては、1名から約1年間、靴下を履いて各月約10時間使用した運動靴（Code.031012, MAX AIR 2003年, ナイキ社, 米国）

の提供を受けた。中敷きを採取し、滅菌水に浸して付着する垢を遊離させ、次いで遠心にて集めた。垢からのDNA抽出は、蛋白分解処理（TNE 2% SDS 4.5 ml, 0.5 M DTT 400 μ l, 10 mg/ml proteinase K 250 μ l 混液中で室温一晩振とう）、続くフェノール・クロロホルム洗浄、そしてエタノール沈殿法にて行った。抽出DNAはTE 50 μ lに溶かし検体DNAとした。

結果

1 ABO 遺伝子型判定の信頼性

表現型がAB, Oの各10例（遺伝子型はAB, OO), A, Bの各10例と遺伝子型がAA, BB, AO, BOの各1例について、採取DNAから10 μ lを用い（DNA量、約3~30 ng）、TaqManプローブPCR法で分析した。Fig. 3-(1)には、O遺伝子検出用の

PCR-1 反応系で測定された Vic 蛍光増加量 (O 遺伝子対応) と, Fam 蛍光増加量 (A あるいは B 遺伝子対応) を示した. また, Fig. 3-(2) には, B 遺伝子検出用の PCR-2 反応系における Vic 蛍光増加量 (B 遺伝子対応) と Fam 蛍光増加量 (A あるいは

は O 遺伝子対応) を示した. Fig. 3-(1) では, 横軸に沿って OO 型が, 縦軸に沿って AB, AA, BB 型が検出され, O 遺伝子をヘテロに含む AO, BO 型はその中間領域に検出された. Fig. 3-(2) では, 横軸に沿って BB 型が, 縦軸に沿って OO, AA, AO 型が検出

Fig. 4 Results of TaqMan probe PCR-based ABO genotyping using DNA samples at different dilutions. Heterozygous SNPs and each Homozygous SNPs marked with circles for classification.

(1): A Vic-labeled probe was used to detect O-allele SNPs (Allele 1); a Fam-labeled probe was used to detect AA, BB, and AB alleles (Allele 2).

(2): A Vic-labeled probe was used to detect B-allele SNPs (Allele 1); a Fam-labeled probe was used to detect OO, AO, and AA alleles (Allele 2).

■: four controls without template, ×: Heterozygous SNPs, ●: Homozygous SNPs

☆: limit sensitivity

され、B 遺伝子をヘテロに含む AB, BO 型はその中間領域に検出された。また、ABO 式血液型が A 型、B 型にある各10例では、AO 型が7例、AA 型が3例、BO 型が7例、BB 型が3例と判定された。これらの遺伝子型はいずれも表現型とまったく矛盾しないものであった。

2 検出感度

検出感度については、DNA 量が0.2～10.0 ng の範囲で検討した。増幅曲線の立ち上がりは35サイクルまでを限界ととり、Fig. 4-(1)に示す O 遺伝子検出用の PCR-1 反応系では、ホモ接合体 (AB, OO) のいずれの遺伝子型においても、DNA 量0.4 ng では35サイクルまでに PCR 増幅曲線に立ち上がりは認められたが、0.2 ng では35サイクルまでに認められなかったため、検出感度は0.4 ng 以上と判定した。最も感度が悪かったヘテロ接合体の場合は、0.4～0.8 ng で増幅限界領域付近に Fam および Vic の両蛍光の増幅曲線の立ち上がりは認められたが、両蛍光の立ち上がりが同じサイクル数に現れなかったため、同じサイクル数に両蛍光の立ち上がりは認められる1.0 ng をヘテロ接合体の検出限界とした (Fig. 5)。Fig. 4-(2)には、B 遺伝子検出用の PCR-2 反応系での結果を示した。Fig. 4-(1), (2)中の星印は各遺伝子型の検出限界量を示す。各サンプルの濃度系列は判別しやすいようにだ円で囲んだ。い

れもヘテロ接合体に比べホモ接合体での感度が高く、また、B 遺伝子検出系は O 遺伝子検出系に比

Fig. 6 Results of a PCR-inhibition test with real-time PCR amplification.

(1): Positive amplification result with control DNA.

(2): Positive amplification result with control DNA mixed with sample DNA.

Fig. 5 Amplification plots of (1) 0.8 ng and (2) 1.0 ng samples. The graph shows normalized reporter fluorescence (ΔRn) versus cycle number.

べ感度が高かった．本法の検出感度（最低必要 DNA 量）をまとめると，BB 型の判定では 0.2 ng, OO 型の判定では 0.4 ng, AA および AB 型の判定では 0.6 ng（O 遺伝子検出系での 0.4 ng, B 遺伝子検出系での 0.2 ng の合計），AO および BO 型の判定では 1.2 ng（O 遺伝子検出系での 1 ng, B 遺伝子検出系での 0.2 ng の合計）ということになる．したがって遺伝子型未知の DNA については，1.2 ng あれ

ば，その型判定が可能であることが分かった．

3 実務参考資料への対応

血清学的検査法では ABO 式血液型の判定が困難であるとされる靴中敷を参考資料とし，TaqMan プローブ PCR 法で ABO 遺伝子型の判定を試みた．中敷垢からフェノール・クロロホルム法で DNA を抽出し，その検体 DNA に TaqMan プローブ PCR 法を適用したところ，明らかに PCR 阻害があるこ

Fig. 7

(1)-1, (2)-1: Results for the TaqMan probe PCR analysis of the ABO genotyping from AO genotype DNA samples extracted from shoe insole.

(1)-2, (2)-2: PCR amplification plot of AO genotype DNA samples extracted from shoe insole. The graph shows normalized reporter fluorescence (ΔRn) versus cycle number.

(1): A Vic-labeled probe was used to detect O allele SNPs (Allele 1), a Fam-labeled probe was used to detect AA, BB, AB alleles (Allele 2).

(2): A Vic-labeled probe was used to detect B allele SNPs (Allele 1), a Fam-labeled probe was used to detect OO, AO, AA alleles (Allele 2).

×: positive control, ■: four controls without template, ☆: sample result.

Fig. 8 Results of DNA quantification of AO and BO genotype DNA samples extracted from shoe insoles.

(1): Calibration curves for AO standard sample (■) and sample from shoe insole (×). The graph shows the correlation of Threshold cycle number and Quantity (ng).

(2): PCR amplification plots of samples from shoe insole. The graph shows normalized reporter fluorescence (ΔRn) versus cycle number.

とが認められた (Fig. 6). そこでその検体 DNA を QIAamp DNA Stool Mini Kit (QIAGEN) で精製し (この段階でも阻害あり), 更に吉井らのスピンカラム (Bio-Gel) 法で精製¹⁶⁾したところ, 阻害が解除され, 遺伝子型は AO 型と判定された (Fig. 7). 更に, 抽出 DNA 量は濃度既知の AO 遺伝子型標品を同一プレートにセットすることで, それより得られる Standard Curve (Fig. 8-(1), $y = -4.05x + 32.58$, r value: 0.985) と対比することで概算した¹⁷⁾. その結果, AO 型の靴からは, 全量は約 8.65 ng の DNA が抽出されたことになる.

考 察

ABO 遺伝子型判定に有効とされる 261 番, 796 番, 803 番の塩基変異に注目した TaqMan プローブ PCR 法で ABO 遺伝子型の判定について検討したところ, 判定された遺伝子型は既知遺伝子型, 表現型ともに矛盾すること無く一致した. なお, 本法の検出限界は 1.2 ng DNA と判明した.

SNPs を用いた ABO 遺伝子型の判定方法としては, 1 塩基変異プライマー伸長反応を用いた Multiplex single-base primer extension reaction 法等^{14,18,19)}がなされているが, テンプレート DNA 量を適正に調整しなければ正確な型判定は困難である. 本報告で示した TaqMan プローブ PCR 法で

は, 今回明らかにした検出限界量 (1.2 ng) 以上であれば, 型判定が可能であり, しかも前もって DNA 量を微調整する必要も無い. また, 本法は PCR から型判定までが自動的に行われるため, 他の判定法^{14,18,19)}で問題となる試料調製時の作業ミス等の危険性は全く回避されている. 但し, 本法では 1 塩基の欠損をみる O 遺伝子検出系が, B 遺伝子検出系に比べて感度が悪く, 微量な資料の判定には分析結果を多少見慣れる必要があり, また, 両遺伝子検出系ともに常に陽性対照が必要である.

ABO 式血液型のアリルには, 多彩なサブタイプが報告され²⁰⁾, O² と CisAB 以外のサブタイプでは, 表現型と, 261, 796, 803 番のアリル塩基の変異による判定とは矛盾が無いと報告されている¹⁴⁾. 261 番に欠損が無く, 802 番に塩基置換がある O² と, 796, 803 番の両方ではなく, どちらか一方に置換のある CisAB では, TaqMan プローブ PCR 法では判定が出来ない. O² をサンプルとした場合は, 802 番は B 遺伝子判定用のプローブに含まれるため, B 遺伝子判定用のプローブがハイブリダイズしないため, DNA 量が十分あっても B 遺伝子判定系では B-Vic, AO-Fam プローブのいずれの蛍光も検出されない. また, CisAB をサンプルとした場合についても, 796 番, 803 番どちらか一方の変異では B 遺伝子判定用のプローブがハイブリダイズしない

ため、DNA 量が十分あっても B 遺伝子判定系では B-Vic, AO-Fam プローブのいずれの蛍光も検出されない。したがって、O² と CisAB については判定ができないが、O 遺伝子判定系の増幅と、より感度の良いはずの B 遺伝子判定系の増幅を比較することで、誤判定を避けることはできる。判定には注意が必要ではあるが、これらの出現頻度は極めてまれであるため、本法は抗原抗体反応による ABO 式血液型早期判定の補助として有効な方法であると思われる。

また、本 TaqMan プローブ PCR 法は PCR から型判定までが約 2 時間半であるため、抗原抗体反応法による ABO 式血液型早期判定の補助として、捜査のニーズに迅速に答えることができる。

一方、法医学資料の中には、抽出した DNA が PCR 阻害をおこす場合がある。参考例として、血清学的検査法では ABO 式血液型の判定が困難であるとされる靴垢から抽出した DNA について TaqMan プローブ PCR 法を適用したところ、PCR 阻害という現象を明瞭に観察することができ、更に、抽出された DNA 量の推定も可能であった。したがって、本法は Multiplex PCR 法に先立つスクリーニング法として、ABO 式血液型情報だけでなく、PCR 阻害や DNA 量についての情報も与えてくれる。

今後は、ABO 遺伝子型に、他の SNPs の検討を加え、捜査に即応する DNA レベルでの迅速、簡易な個人識別法を確立したい。

参考文献

- 1) Yamamoto F., Marken J., Tsuji T., White T., Clausen H. and Hakomori S.: Cloning and characterization of DNA complementary to human UDP-GalNAc: Fuc alpha 1-2Gal alpha 1-3GalNAc transferase (histo-blood group A transferase) mRNA. *J. Biol. Chem.*, **265**, 1146-1151 (1990).
- 2) Yamamoto F., Clausen H., White T., Marken J. and Hakomori S.: Molecular genetic basis of the histo-blood group ABO system. *Nature*, **345**, 229-233 (1990).
- 3) Yamamoto F. and Hakomori S.: Sugar-nucleotide donor specificity of histo-blood group A and B transferases is based on amino acid substitutions. *J. Biol. Chem.*, **265**, 19257-19262 (1990).
- 4) Yamamoto F., McNeill P. D., Yamamoto M., Hakomori S., Bromilow I. M. and Duguid J. K.: Molecular genetic analysis of the ABO blood group system: 4. Another type of O allele. *Vox Sang*, **64**, 175-178 (1993).
- 5) Grunnet N., Steffensen R., Bennett E. P. and Clausen H.: Evaluation of histo-blood group ABO genotyping in a Danish population: Frequency of a novel O allele defined as O2. *Vox Sang*, **67**, 210-215 (1994).
- 6) Lee J. C. and Chang J. G.: ABO genotyping by polymerase chain reaction. *J. Forensic Sci.*, **37**, 1269-1275 (1992).
- 7) O'Keefe D. S. and Dobrovic A.: A rapid and reliable PCR method for genotyping the ABO blood group. *Hum. Mutat.*, **2**, 67-70 (1993).
- 8) Akane A., Yoshimura S., Yoshida M., Okii Y., Watabiki T., Matsubara K. and Kimura K.: ABO genotyping following a single PCR amplification. *J. Forensic Sci.*, **41**, 272-274 (1996).
- 9) Ladd C., Bourke M. T., Scherzinger C. A., Pagliaro E. M., Gaensslen R. E. and Lee H. C.: A PCR-based strategy for ABO genotype determination. *J. Forensic Sci.*, **41**, 134-137 (1996).
- 10) Herrin G. Jr.: A simplified amplification procedure for two regions of the glycosyl transferase (ABO blood group) gene. *J. Forensic Sci.*, **41**, 138-141 (1996).
- 11) Ringel P. F., Weiler G. and Bein G.: Errors in ABO typing of blood stains using PCR. *Int. J. Legal Med.*, **113**, 352-355 (2000).
- 12) 高田雄三, 向田政博: シークエンスディテクターによる血液型判定. DNA 多型, **7**, 94-97 (1999).
- 13) Happich D., Schwaab R., Hanfland P. and Hoernschmeyer D.: Allelic Discrimination of

- Factor V Leiden Using a 5' Nuclease Assay. *Thromb. Haemost.*, **82**, 1207–1379 (1999).
- 14) Satoh K. and Itoh Y.: Progress in Forensic Genetics vol 11, Forensic ABO blood grouping by 4 SNPs analyses using ABI PRISM® 3100 genetic analyzer. (Eds. Amorim A., Corte-Real F., Morling N.) pp49–51, Elsevier BV, Amsterdam (2006).
- 15) 尾形(上田)早映子, 西田ちよみ, 佐藤耕一: TaqManPCR 法を用いた ABO 式血液型遺伝子型の判定. 第85次日本法医学会総会講演要旨集, p111 (2001).
- 16) 吉井富夫, 田村一雄, 谷口高広, 秋山勝則, 石山昱夫: 水溶性メラニンの PCR 阻害活性とその簡便除去法. 日本法医学雑誌, **47**, 323–329 (1993).
- 17) Heid C. A., Stevens J., Livak K. J. and Williams P. M.: Real time quantitative PCR. *Genome Res.*, **6**, 986–994 (1996).
- 18) Mizuno N., Ohmori T., Sekiguchi K., Kato T., Fujii T., Fujii K., Shiraishi T., Kasai K. and Sato H.: Alleles Responsible for ABO Phenotype-Genotype Discrepancy and Alleles in Individuals with a Weak Expression of A or B Antigens. *J. Forensic Sci.*, **49**, 21–28 (2004).
- 19) Doi Y., Yamamoto Y., Inagaki S., Shigeta Y., Miyaishi S. and Ishizu H.: A new method for ABO genotyping using a multiplex single-base primer extension reaction and its application to forensic casework samples. *Leg. Med.*, **6**, 213–223 (2004).
- 20) The National Center for Biotechnology Information (NCBI): The Blood Group Antigen Gene Mutation Database. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/mhc/xslcgi.fcgi?cmd=bgmut/home>.