

プロテインチップ、DNAマイクロアレイ等の新しい技術を用いた診断法の有用性とその評価手法に関する研究

所属 国立医薬品食品衛生研究所
遺伝子細胞医薬部
研究者 鈴木 孝昌

研究要旨 DNA マイクロアレイおよびプロテインチップの臨床診断への応用を目的とした、データの評価技術および判定基準の作成に関する基礎的検討を行うとともに、実用化へ向けた条件検討および手法の改良を行った。

分担研究者

- (1) 第一化学薬品株式会社 牛沢 幸司
(2) 富士レボ株式会社 伊勢 伸之

A. 研究目的

近年、DNA マイクロアレイやプロテインチップなど、ゲノム情報を利用した新しい解析手法をバイオマーカー等の検索に用いることにより、癌をはじめとする各種疾病の診断および薬剤の有効性の判定等に用いようとする研究が進められている。昨年から今年にかけて欧米で初めての診断用 DNA チップとして P450 の多型を検出するための GeneChip が承認を受け、いよいよその臨床応用が始まりつつある段階にある。しかし、DNA マイクロアレイやプロテインチップなど全く新しい技術を診断手法として利用するには、用いるアレイやチップの品質の恒常性をどのように担保するか、また診断指標としての有効性をどのように評価するか等、今までにない視点に立った評価が求められる。すなわち、アレイやチップを用いた分子診断技術を迅速に臨床応用に結びつけるためには、品質や有効性の的確な評価手

法の確立が急務である。現在、その応用例として癌組織を使った遺伝子発現のパターンから、薬剤の有効性や予後の予測を行う試みがなされているが、この場合データそのものの評価とともに、蓄積されたデータの中からどのデータを診断指標とするのか、あるいはその診断指標の信頼性に関しても評価する手法を検討することが必要となる。そこで、本研究では、臨床応用により近いと考えられる SNP や感染菌種の特異性といった遺伝子型に基づいた判定法の応用に注目して、DNA マイクロアレイを使った診断法のデータ評価を行う。この目的において、本研究では、これら新しい解析技術の現状における問題点を抽出解析し、その改良を行うことにより、より信頼性の高い診断技術の開発を行うとともに、その有効性の評価手法に関して基礎的な検討を行うことにより、今後予測される関連技術を用いた診断手法の評価における基礎を築くことができると期待できる。

一方、プロテインチップに関しては、質量分析計と組み合わせたシステムや、抗体などをスポットティングしたガラスアレイなどが開発されており、腫瘍マーカーの検索に有効であることなどが報告されているが、技術的には DNA マイクロアレイと比較し

てまだまだ開発途上にある技術であり、信頼されうる診断データを得るためには、さらに手法の改良や、データの評価法の検討が必要であると考えられる。本研究では、ハイスループットな酵素免疫測定法としても期待される抗体プロテインチップの有効利用に関して、信頼性のあるデータを得るために必要なチップ作成上の問題点を検証し、その克服に向けた条件検討や実際のデータ解析を通じて、DNA マイクロアレイと同等の信頼性を持つプロテインチップの開発を試みるとともに、それらを用いた解析におけるデータ評価法および判定基準の確立をめざす。

これらの目的の達成のため、まず本年度は既存の DNA マイクロアレイとして、染色体解析のための CGH (Comparative Genome Hybridization) 法に用いる CGH アレイを用いて、実際のデータを取得することにより、そのデータの評価と有効性の検証を行った (国立医薬品食品衛生研究所)。

また、DNA マイクロアレイを使った解析では、通常蛍光ラベルしたプローブを用いたオーバーナイトのハイブリダイゼーションによるシグナルの検出が行われるが、蛍光色素の安定性や所要時間が長いと言った問題点があり、臨床応用へ向けた課題となっている。そこで、より迅速かつ安定した検出法として、DNA 2本鎖特異的挿入剤を用いた電流検出型の DNA チップの開発を、(株) 東芝の協力のもとに行い、モデルケースとしてヒトパピローマウイルス (HPV) の遺伝子型判定への応用に関する基礎検討を行った (第一化学薬品)。

さらに、プロテインチップに関しては、抗原を固相基板に集積し、多数の抗原抗体反応を同一基板上で行うことにより、一度に大量の診断マーカーに関して同時に定量が可能なプロテインチップの開発をめざし、基礎的な検討を開始した。プロテインチップの実用化に当たっては、従来の試験方法で求められていた個々の試験精度にどれだけ迫れるかが課題となり、また、一方でマルチエンドポイントによる解析という面からも、新たな評価基準の導入も必要になる。DNA チップと比べて新しい技術であるため、データの安定性、再現性といったハードウェア

面に関してまだ十分な検討が行われているとはいえず、臨床応用へ向けて解決すべき問題も多いと考えられる。本研究では、これらの検討課題を明確にし、信頼性のあるデータを取得しうるプロテインチップを開発することを目的とした。また併せて、実際に得られるデータを元に、新たな評価基準の作成に関する基礎的検討を行うことを目的とした (富士レビオ)。

B. 研究方法

1. CGH アレイを用いた染色体解析

1-1. CGH マイクロアレイ (MAC Array™)

Macrogen 社にて開発された MAC Array™ スライドを使用した。これは、Macrogen 社の所有する約 720 個 (検討 1) および 4000 個 (検討 2) のヒト BAC DNA クローンをスライドガラス上にそれぞれ triplicate および duplicate にてスポットティングしたもので、すべての染色体領域をそれぞれ、平均 4Mb および 1Mb 以下の間隔でカバーする。

1-2. 使用した細胞株

(HL60)

ヒト前骨髄球系白血病細胞株 HL60 細胞およびその垂株として増殖速度が亢進した株である HL60-RG 細胞を使用した。これらの細胞は既に染色体解析およびメタフェーズ CGH 法にて解析が行われ、myc 遺伝子の増幅を含む、特定領域の増幅および欠失が起きていることが調べられている。

(TK6)

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞株の tk (チミジンキナーゼ) 遺伝子変異体として、tk 遺伝子を含む 17 番染色体領域に欠失を持つことが、多型性マーカーを用いた解析から確かめられている S-11 および S-15 の 2 クローンを CGH 解析に使用した。

1-3. 細胞からの DNA の抽出

上記各培養細胞を遠心分離によって集め、培地を除いた後 proteinaseK 溶液にて処理した後、通常の Phenol/chloroform 法にてゲノム DNA の抽出を行った。得られた DNA の沈殿を 70% Ethanol にて洗浄し、TE-4 バッファーに溶解させた。

1-4. プローブのラベル化

テスト DNA および対照ゲノム DNA を各 0.5 μ g 使用し、BioPrime DNA Labeling Kit : (Invitrogen 社) により蛍光ラベル化を行った。この際、解析対象細胞由来 DNA を Cy3 にて、コントロール正常 DNA を Cy5 にて標識した。その後、Qiaquick PCR Purification Kit (Qiagen 社) にてプローブ溶液を精製し、余分な未反応色素等を除いた。最終的にエタノール沈殿にてハイブリ用標識プローブを調整した。

1-5. CGH アレイへのハイブリダイゼーション

標識化調製したテストおよびコントロール DNA をハイブリ溶液に溶解し、70°C で 15 min. 加熱変性させた後、37°C で 60 min. インキュベートした。プレハイブリダイゼーションを行ったアレイスライドに、調製したプローブ溶液 44 μ l をアプライし、22 X 30 mm のカバーガラスを静かに掛け、遮光した湿箱中にて 37°C, 48~72 hours 振とう (5~10 rpm) しながらインキュベートした。

1-6. アレイスライドの洗浄

ハイブリダイゼーション後コプリンジャー中にてアレイスライドからカバーガラスを静かに外し、50% formamide, 2X SSC (46°C, 15 分)、2X SSC, 0.1% SDS (46°C, 30 分)、PN buffer (室温、15 分)、2X SSC (室温、5 分) で順次洗浄した。各濃度のエタノール (70%, 85%, 100%) にて、室温で 1 分間順番に洗浄した後、遠心 (550 rpm, 5 min.) で乾燥させた。

1-7. スキャンニングと解析

GenePix4000B マイクロアレイスキャナーにてマイクロアレイをスキャンニングし、アレイイメージを取得し、Cy3, Cy5 各波長の蛍光強度を測定した。蛍光強度の補正を行った後、各スポットにおける Cy3/Cy5 の蛍光強度比を算出し、専用ソフトウェアによる解析を行った。

検討 2 における解析に関しては、上記 1-4 以降の操作を CGH アレイの開発元である Macrogen 社にて依頼解析した。

2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定

2-1. 電流検出型 DNA チップの原理

電流検出型の DNA チップは、①DNA プローブが結合した金電極上で検体 DNA とハイブリダイゼーション反応を行い、②形成したハイブリッド (二本鎖) 部位に特異的に結合する挿入剤という分子を添加し、③電圧印加による挿入剤の酸化還元電流を検出する、という原理である。

本研究課題では、ガラス基板上に金電極をパターンニングしたチップを用いて DNA の解析を行った。今回使用したものは、基板上に作用電極が 40 個 (直径 200 μ m) と、参照極、対極が形成されており、作用電極上に DNA プローブの固定化を行った。プローブには、末端をチオール化した合成 DNA を用いた。チオール基と金は非常に親和性が高いため、電極表面にプローブ溶液を滴下するだけで簡単に固定化できる。また、固定化プロセスでは Cartesian 社製の DNA 溶液微量分注装置を使用し、100nL の DNA プローブ溶液を個々の電極上にスポッティングした。今回はデータの信頼性を確保するために 1 種類のプローブに付き 8 電極を割り当てた。合成 DNA は Sigma Genosys 社あるいは Fasmac 社製を用いた。測定は、DNA チップ自動検査装置 GLH-2C301 (試作機) を用いて行った。この装置では、ハイブリダイゼーション反応からデータ解析までのプロセスを自動化しており、遺伝子増幅産物を DNA チップカセットに注入後、装置にセットするだけで、DNA の解析が可能である。

2-2. ヒトパピローマウイルス (HPV)

今回、電流検出型の DNA チップで HPV の遺伝子型判定を検討するに当たり、検出対象のモデル系として、HPV の 2 型、4 型、6 型、11 型、16 型、18 型のゲノム全長を含むプラスミド pHPV2、pHPV4、pHPV6、pHPV11、pHPV16 と pHPV18 をヒューマンサイエンス研究資源バンクより、ま 35 型、56 型のゲノム全長を含むプラスミド pHPV35、pHPV56 を ATCC より入手した。HPV の遺伝子型の判別には、変異に富んでおり従来から遺伝子型の

判定に使用されてきた HPV の L1 領域を用いることにした。

3. 抗体を用いたプロテインチップ作製に関する基礎的検討

プラスチックやガラス基板をベースとして、これらの基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を確立すべく検討を行った。以下に示す通り、抗体が効率的かつ安定的に結合できる条件を見付けるため、基板の処理方法、抗体の結合方法について実験的検証を行った。

① プラスチック基板に対するプラズマクリーニング効果の検討

1cm x 2cm のポリスチレン基板およびポリプロピレン基板にプラズマクリーニング処理を施す前及び後において、10 μ g/ml のストレプトアビジン溶液；250 μ l を表面に載せ、4 時間放置した。洗浄後、蛍光標識ビオチンを反応させ、結合した蛍光標識ビオチンに由来する蛍光を蛍光スキャナーで測定し、基板全体に渡る均一性を観察した。

② プラスチック基板、ガラス基板の比較検討
上記ポリスチレン基板及び、蛋白質吸着用として市販されているガラス基板をプラズマクリーニング処理した後、①と同様ストレプトアビジン溶液をスポットした。洗浄後、蛍光標識ビオチンを反応させ、結合した蛍光標識ビオチンに由来する蛍光強度を測定し、両基板間で比較を行った。

③ ポリスチレン、ポリプロピレン基板への抗体固相化能の比較検討

①と同様にプラズマクリーニング処理を施したポリスチレン基板及びポリプロピレン基板に、2 μ M のストレプトアビジン；250 μ l を反応させた。洗浄後ウシ血清アルブミンでブロッキングし、次いで蛍光標識したビオチン抗体を反応させ固相化し、洗浄後の蛍光を蛍光スキャナーで測定した。

④ ポリプロピレン板への化学結合によるストレプトアビジンの導入

ポリプロピレン板を活性エステル化 (OSu 化) し、リンカーを介して蛍光標識したストレプトアビジン

を化学結合させた。洗浄後、結合した蛍光標識ビオチンに由来する蛍光強度を蛍光スキャナーにより測定した。

(倫理面への配慮)

本研究課題は病原性のウイルスを取り扱うことから、安全対策に充分配慮する必要があると考えており、国際的なガイドラインである WHO の「実験室バイオセーフティ指針」、あるいは総理府作成の「組換え DNA 実験指針」、国立感染症研究所作成の「病原体等安全管理規定」に従って研究を行う。

また本研究上、正常ヒト由来の DNA サンプルがコントロールとして必要となったため、研究者本人のサンプルもしくは委託解析用に企業が保持していた DNA サンプルを対象として使用した。

C. 研究結果

1. CGH アレイを用いた染色体解析

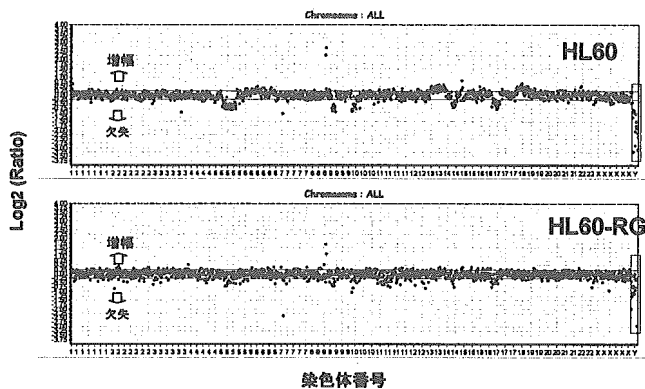
(検討 1)

コントロール正常 DNA として、研究者本人の口腔粘膜より調製したゲノム DNA を用いて、HL60 および HL60-RG 細胞より抽出した DNA と CGH アレイ上で競合的にハイブリさせた。ハイブリには、BioMicro 社製 MAUI hybridization System を用いた。マイクロアレイスライドおよびハイブリ装置ともに使用経験がなく、初めての試みであったこともあり、ハイブリ液に泡が混入するなどしたため、得られたハイブリ像はシグナルが弱いとともにムラが見られた。1 回目の実験では、解析可能なデータが得られなかったため、再実験を行ったところ、シグナル強度の改善が見られた。

2 回目の実験で得られたシグナル強度をもとに、コントロールに対する HL60 細胞株での染色体各領域での DNA 量の比の log 値をプロットしたのが図 1 である。いずれの細胞においてもすでに知られている 8 番染色体上の myc 領域の増幅が確認されたが、RG 株においては全体に変化が小さく、存在しないはずの Y 染色体上のプローブに関して、17 プローブ中 3 プローブが正常範囲の値を示した。一方、正常 HL60 株では、Y 染色体上すべてのプローブに対

して明らかな減少値が得られた。また、メタフェーズ CGH の結果から予想される変化に関しては、HL60 株では同様に検出できたが、RG 株に関しては検出できない領域が見られた。これらの結果から、HG60-RG 株に関するデータについては信頼性が低いことが明らかとなった。

図1 HL60 および HL60-RG 細胞株での染色体領域の増減 (検討1)

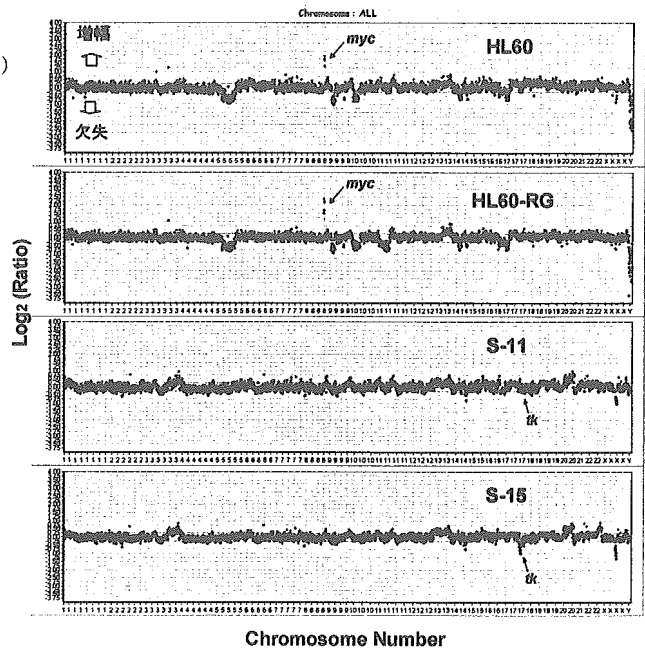


(検討2)

さらに他種の細胞を加え、スポット数を増やした CGH アレイを用いて同様の検討を行った。本検討においては、最良の解析結果を得る目的で、CGH アレイに関する実験の経験を積んでいる開発元の Macrogen 社に DNA 抽出後の操作を委託して解析を行った。なお、本検討では、コントロール DNA として、Macrogen 社が保有する男性由来 DNA を使用した。本アレイにて得られたアレイのハイブリメージは検討1と比較して、ムラがなく強いシグナルが得られた。この結果を数値化し、細胞ごとの染色体領域の増減をグラフに表したのが図2である。HL60-RG 株では検討1と違って HL60 とほぼ同程度に染色体領域の増減が認められ、Y 染色体上のプローブもすべて有意差が見られた。HL60-RG 株にて親株と大きな差が見られたのは、11 番染色体の欠失、および 18 番染色体が正常である点であり、メタフェーズ CGH の結果と一致する。これに対して、異なる細胞株である TK6 のクローンは HL60 細胞とは異なるパターンを示したことより、CGH アレイのデータが細胞の識別に有用であることが示唆された。S-11 と S-15 の二つのクローン間においては、

突然変異の選択マーカーとして用いられた 17 番染色体上の tk 遺伝子近傍の欠失領域に差が見られた。他、S-15 クローンにおいて、X 染色体短腕の欠失が検出された。

図2 各細胞株での染色体領域の増減 (検討2)



染色体ごとの増減を、詳細に細胞間で比較した結果、HL60 と HL60-RG 細胞間での比較では、正常範囲内 ($\log_2(\text{Ratio}) = -0.25 \sim 0.25$) における微かな増減もぴったりと一致しており、例えばメタフェーズ CGH の結果より予測された 10 番染色体短腕の欠失領域についても、二つの細胞間での差が明らかになった。また、異なる細胞との比較により、ベースラインでの変動は細胞の種類が異なっても完全に一致することがわかり、本アレイを用いた解析に固有の変動であることが示唆された。こうした一致性からも、単独ではコントロールとの比のみでは増減の判断が難しい場合においても、他のデータとの比較から結論が出せることが明らかとなった。HG60 と TK6 細胞の比較からは、HG60 における 9 番、10 番、および 17 番染色体短腕領域の欠失と 8 番染色体 *myc* 領域の増幅が明らかとなった。また、TK6 における 17 番染色体 *tk* 領域の欠失は長腕末端テロメア領域まで及んでいることがわかった。

2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定

(1) HPV の増幅条件の検討

まず、発癌に関与していると言われ high risk グループに分類される 4 種類の HPV (16 型、18 型、35 型、56 型) がクローニングされているプラスミドを鋳型にして、増幅条件の検討を行った。L1 領域を含むように、各遺伝子型を特異的に増幅するプライマーをデザインして実験を行った結果、遺伝子型それぞれに特異的な増幅を電気泳動で確認できた。そこで次に、これらのプライマーセットを混合し (マルチプライマー)、遺伝子型特異的な増幅が可能か検討した。その結果、単独に比べ若干増幅効率が落ちる傾向にあるものの、遺伝子型に対応した増幅が確認できた。更に、これら high risk グループ増幅用のプライマーセットを用いて、それ以外のグループである 2 型、4 型、6 型、11 型との交差反応を確認したところ、それら全てにおいて増幅は認められなかった。

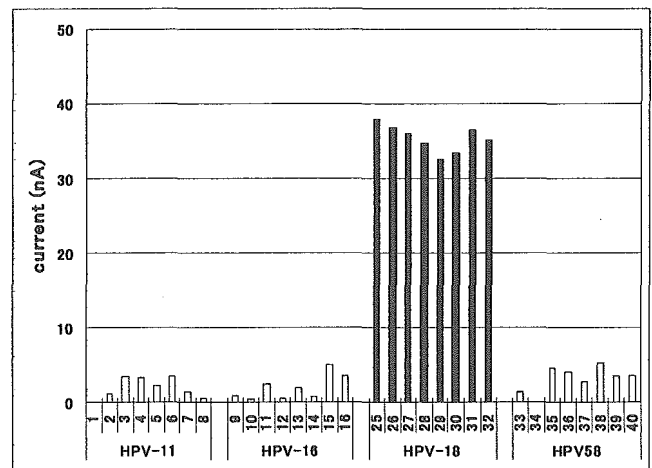
以上のように、high risk グループを特異的に増幅するプライマーセットを作製することができた。今後プライマー配列の最適化を行いながら、他の high risk グループの増幅についても検討する予定である。

(2) HPV-DNA の検出

予め 11 型、16 型、18 型、58 型の L1 領域に特異的な配列のプローブを固定化してある DNA チップカセットに、2×SSC (0.3mol/L 塩化ナトリウム、0.03mol/L クエン酸ナトリウム) 溶液に溶解した HPV の増幅産物 (2 型、4 型、16 型、18 型) 40 μL を注入し、DNA チップ自動検査装置で遺伝子型の判定を行った。装置が自動的に行う反応は以下の 5 プロセスから構成されている。①ハイブリダイゼーション反応 (35℃、1 時間)、②洗浄 (0.2xSSC 溶液、35℃、40 分)、③挿入剤との反応 (50 μmol/L ヘキスト 33258、25℃、5 分)、④電気化学測定 (1 分)。⑤測定値を基に遺伝子型を判定。今回は、遺伝子型に電流のカットオフ値をバックグラウンド電流 + 3SD に設定して評価した。その結果、2 型、4 型の増幅産物に対しては全く電流値増加が見られな

かったのに対し、16 型と 18 型の増幅産物には、対応するプローブからのみ特異的な電流信号が検出された。このことから、電流検出型 DNA チップを用いて HPV の遺伝子型判定が可能であることが示された。18 型の典型的な検出例を図 3 に示した。今回は、1 プローブ当たり 8 電極からの信号を測定しているため、チップ内での同時再現性を評価した結果、CV 値で 5% 以下であった。

図 3 電流検出型 DNA チップを使った HPV 遺伝子型判定結果の一例 (18 型)



3. 抗体を用いたプロテインチップ作製に関する基礎的検討

(1) マイクロアレイチップを構成する要素技術に関する調査

学術論文、学会発表、各種展示会発表、各種報告書、インターネット等の調査により、マイクロアレイを構成する要素技術として、

- ① 基板の材質
- ② 蛋白質の固定化方法
- ③ 反応した目的物を検出する方法
- ④ 基板上に蛋白質をスポットィングする方法及びマイクロ流路を作製する技術

の 4 つに大きく分類されることがわかった。

臨床的に有用な抗体アレイを確立するには、まずは基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を検討することが最優先課題として挙げられた。特に抗体アレイでは、従来 of ELISA 等の測定系に

比較して、微小な反応場で同時に多数の反応を行い得る性能が要求される。測定対象を補足するための抗体を微小な反応場に高密度に且つ高精度に集積することが最も必要な条件であり、最も重要な検討事項として考えられた。

(2)基板への抗体固相化方法の検討

以上の調査結果から本年度は、抗体アレイを確立するための最重要検討項目として、基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を確立すべく検討を行った。実験設備、環境、経済性、汎用性等も考慮した上で、基板材料としては、プラスチック或いはガラスを選択することとした。これらの基板に測定対象物を補足するための抗体を固相化する方法としては、ストレプトアビジン-ビオチンアフィニティー結合を利用することとし、アビジンを基板に固相化した基板を作製することとした。そして、基板に効率的に且つ安定的に抗体等のタンパク質を固相化する方法を検討し、以下に示す通り抗体固相化の基礎を成す結果を得た。

① プラスチック基板に対するプラズマクリーニング効果の検討

プラズマクリーニング未処理のプラスチック基板にストレプトアビジン溶液を載せたところ、目視による観察においてポリスチレン基板、ポリプロピレン基板共に液滴を形成してしまい、基板全体に均一に液が広がることはなかった。一方、同基板にプラズマクリーニング処理を施したところ、ポリスチレン基板、ポリプロピレン基板共に均一に液が展開することが観察された。洗浄後それらの基板へ蛍光標識ビオチンを反応させ、結合した蛍光標識ビオチンの基板上での分布を蛍光スキャナーにより観察したところ、プラズマクリーニングしていないものでは不均一なスポットを呈したのに対し、プラズマクリーニング処理基板では、基板全体に渡ってほぼ均一な蛍光シグナルが観察された。これらのことから、プラズマクリーニングによるプラスチック基板への表面改質効果により基板表面の濡れ特性、均質性が改善され、併せて物理吸着性能が付与されたことが確認された。

② プラスチック基板、ガラス基板の比較検討

ポリスチレン基板、及び蛋白質吸着用として市販されているガラス基板に対して、①と同様の処理を行い、基板全体に渡って蛍光強度を測定し、両基板の物理吸着特性及び均一性を比較した。蛍光強度はポリスチレンの方が3-4倍高い値を示し、物理吸着特性が高いことが示された。一方、基板全体の蛍光強度を比較したところ、ガラス基板では不均一が目立ち、ポリスチレンの方が均一性の上で優位であることがわかった。プロテインチップの微小反応場における測定再現性等を考慮すると均質性は重要な因子であり、プロテインチップ作製の選択肢としては、ガラス基板よりもプラスチック基板が優れるものと判断された。

③ ポリスチレン、ポリプロピレン基板への抗体固相化能の比較検討

①と同様にプラズマクリーニング処理した後ストレプトアビジンを物理吸着させたポリスチレン基板およびポリプロピレン基板に、蛍光標識したビオチン化抗体を反応させたところ、両プラスチック基板共に基板全体に均一な蛍光シグナルが観察された。ただし、ポリプロピレン基板に比較して、ポリスチレン基板が約10倍高い蛍光強度を示した。この結果から、本抗体固相化法では、ポリスチレン基板へより多くの抗体を集積できることが示された。

④ ポリプロピレン基板への化学結合によるストレプトアビジンの導入

③の結果より、ポリスチレン基板はポリプロピレン基板に比較して物理吸着量の多いことが示されたが、アッセイ系全体として考えた場合、目的物質が補足分子のないところに非特異的に吸着したり、標識体が目的物質以外のところに非特異吸着したりして、目的物質を検出する際のバックグラウンドを上げる要因となることが懸念される。バックグラウンドを低く保つことは高感度を求める際に有利に働くため、物理吸着の少ないポリプロピレンを用い、他の方法によりストレプトアビジンを結合させることも抗体固相化法の選択肢として考えた。

ポリプロピレン基板を活性エステル化(OSu化)

し、リンカーを介して蛍光標識ストレプトアビジンを化学結合させたところ、①のポリスチレン板での蛍光強度よりもさらに 10 倍以上高いシグナルを得ることが出来た。基板全体に渡って観察される蛍光の均質性も物理吸着法を利用したものと同程度のものであった。これらの結果より、化学結合を利用することにより物理吸着の少ない材質を選択でき、さらにストレプトアビジン等の補足分子をより高密度に固相化できることが示された。

以上、本年度はプロテインチップ（抗体チップ）を作成する上で最も重要な検討項目として、基板に効率的にかつ安定的に抗体を結合させる方法を検討し、その基礎を築くことが出来た。

D. 考察

既存後術の評価として、マイクロアレイを用いた CGH 法に関する検討を行ったところ、予想された変化を確実に検出することができ、有用性が確認された。また、細胞間でのベースラインノイズの一致性から、この手法の再現性の高さが伺われ、従来の CGH 法にかわる簡便な手法としての応用が期待できる。ガラスアレイを用いる方法では特に、得られたデータの質を何らかの方法でチェックすることが必要となるが、CGH アレイでは、染色体として差が出るのが予測される性染色体でのデータが、信頼性の評価に有用であることがわかった。すなわち、コントロールとして男性由来の DNA を用い、女性由来のサンプルを解析した場合に、Y 染色体上のマーカーはすべて欠失しているという結果がでるかが評価基準となる。今回の検討 1 における実験 2 の HL60-RG 細胞の例でも、一見それなりのデータが出た訳であるが、Y 染色体のデータに問題があることがわかり、真のデータ（検討 2）とも差があることが確認された。マイクロアレイを用いた CGH 法は、染色体標本作製などの特殊技術を必要とせず、比較的簡便な操作でハイスループットな結果が出ることから、癌細胞の染色体解析などへの応用が期待される技術である。今回の検討から、データの質をきちんと評価すれば非常に再現性の高いデータが得

られる事がわかり、その有用性が示された。

次に、既存の技術の改良という点に関して、電流検出型という新しい原理に基づいたチップの開発に関しても検討を行った。今回は HPV ウイルスの遺伝子型の判定を目的としたチップを作製し、データの信頼性を評価するためのモデル実験系を構築して、幾つかの基礎データを収集することができた。その結果、目的とする遺伝子型を正しく判定できることがわかった。今後、感度、精度、保存性などの実験データの蓄積を図ると共に、より信頼性・実用性の高いシステムの開発に向けた検討を行う予定である。

以上、DNA マイクロアレイに関する検討では、比較的技術的にも習熟されてきていることから、実用化に向けての期待がかかる場所であり、今後さらなる基礎データの蓄積から、DNA マイクロアレイを原理とする診断手法の判定基準作りおよびその妥当性を検証していく予定である。

一方、技術基盤の整備が必要と考えられるプロテインチップに関しては、抗体を固定化したハイスループットな ELISA 系の開発をめざして検討を行った。蛋白質は高次構造、修飾、活性維持等の面で非常に多様性に富むものであり、共通の測定系を構築することが難しく、さらに蛋白質そのものを増幅することが出来ないため非常に高感度な測定系が求められる。従って、DNA アレイとは比較にならない程、解決すべき課題は多い。特に抗体を用いたプロテインチップ（抗体アレイ）では、従来の ELISA 等の測定系に比較して、微小な反応場で同時に多数の反応を行い得る性能が要求され、高感度化の視点からは活性を維持しつつ高密度で一定の配向性を持たせて抗体を基板に結合させることが重要となる。

本年度、まず我々はプロテインチップの作製に必要とされる要素技術の調査を行い、最重要項目として取り組むべき課題として、抗体をいかにして固相基板に安定的且つ高密度に集積できるかの基礎データを収集した。ポリプロピレンの基板を活性エステル化しストレプトアビジンを化学結合により固定化することにより、単にストレプトアビジンを物理吸着させるよりも 10 倍以上効率にストレプトアビジ

ンを導入することが可能であった。この結果から、抗体を効率的に且つ厳密に制御しながら基板上に集積化可能であることが示された。一方、この時、ポリプロピレン基板上の特定の微小表面における蛍光強度を基板全体に渡って比較すると、約 CV20%程度の均一性になっているものと見積もられ、これが最終的なアッセイ系に直接反映されると考えると、既存 ELISA の再現性には至らない可能性がある。微小反応場から成るアッセイ系を構築する上では、さらに厳密に反応場を制御する必要がある。最終アッセイ系としての再現性を規定する要因は固相の均一性だけではないが、抗体アレイを構築する場合には、スポット間あるいはチャンネル間、チップ間の再現性が重要な課題の一つであることから、この点において改善の余地を残している。

今後、本年度得られた知見を基にして、微小な反応場で多数の測定対象を定量するために必要な要件、例えば固相化する抗体の配向性、自由度等を厳密に制御し、さらに安定な且つ精密な固相化手法を開発したいと考えている。

E. 結論

1. マイクロアレイを用いた CGH 法は、従来の手法に比べてより簡便で、詳細な解析が可能であり、染色体の増幅、欠失に関する解析において有効性が高いことが示された。また、得られたデータの質の評価に関して、Y 染色体上のプローブのデータの利用が有効であることがわかった。

2. 電流検出型 DNA チップを用いた HPV の遺伝子型判定について検討を行った。電流のカットオフ値を、バックグラウンド電流+3SD に設定して評価した結果、配列特異的な検出が確認できた。チップ内での同時再現性は CV 値で 5% 以下であった。

3. プロテインチップ (抗体アレイ) 作成要素技術に関する調査結果に基づき、抗体の固相化方法の基礎を確立すべく検討を行った。そして、プラスチック基板上に化学的結合方法で抗体を高密度に固相化可能であることが確かめられ、このことにより、今後、高感度で高精度なアッセイ系を構築できる可

能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yamada K, Suzuki T, Kohara A, Hayashi M, Mizutani T, Saeki K, In vivo mutagenicity of benzo[f]quinoline, benzo[h]quinoline, and 1,7-phenanthroline using the lac Z transgenic mice. *Mut. Res.*, 559, 83-95, (2004)

Arlt VM, Zhan L, Schmeiser HH, Honma M, Hayashi M, Phillips DH, Suzuki T, DNA adducts and mutagenic specificity of the ubiquitous environmental pollutant 3-nitrobenzanthrone in Muta Mouse. *Environ. Mol. Mutagen.*, 43, 186-195, (2004)

2. 学会発表

鈴木孝昌, Palanisamy Rajaguru¹, 小原有弘, 本間正充, 林 真, 高木篤也, 菅野 純, 山口照英
GeneChip による遺伝子発現解析を用いてアリストロキア酸による遺伝子傷害の臓器特異性を予測可能か

第 63 回日本癌学会総会 (2004.9.)

Y. Luan, R. Palanisamy, A. Kohara, D. Mulhern, S. Ninomiya, N. Miyada, M. Honma, T. Yamaguchi, T. Suzuki

Gene expression profiles in liver of thiazolidinedione-treated mice and consideration on mechanisms for troglitazone hepatotoxicity

Toxicogenomics International Forum (2004.10)

鈴木孝昌, 夔 洋, Palanisamy Rajaguru, 中嶋圓, 浜田修一, 兵庫淳志, 降旗千恵

DNA マイクロアレイの変異原性試験への応用に関する共同研究: GeneChip による指標遺伝子の

選択

日本環境変異原学会第 33 回大会(2004.11)

鈴木孝昌

“-omics”解析がもたらす環境変異原研究の新展開

日本環境変異原学会第 33 回大会 4 研究会合同定例会(2004.11)

薬 洋、 ラジャグル パラニサミー、本間正充、
林 真、鈴木孝昌

ヒト細胞における遺伝毒性物質による遺伝子発
現変化の解析

日本環境変異原学会第 33 回大会 (2004.11)

戸部 香織、仲地 豊、近藤 恭光、中嶋 圓、
浜田 修一、鈴木 孝昌、兵庫 淳志、田代 英
夫、榊 佳之、降旗 千恵

マウス肝発癌初期過程における遺伝子発現解析
に用いる Oligonucleotide Microarray の開発
第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

鴻野貴司、薬洋、鈴木孝昌、野村靖幸、降旗千恵
学習記憶障害を示す老化促進モデルマウス

(Senescence-Accelerated Mouse : SAM)

SAMP8 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイ
クロアレイを用いた解析

第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

宮島正樹、薬洋、鈴木孝昌、野村靖幸、降旗千
恵

大脳萎縮を示す老化促進モデルマウス

(Senescence-Accelerated Mouse : SAM)

SAMP10 の原因遺伝子に関する大集積 DNA マイ
クロアレイを用いた解析

第 27 回日本分子生物学会年会 (2004.12)

Takayoshi Suzuki

Current status in in vitro diagnostics in Japan

International Symposium on International
Harmonization on Biopharmaceuticals-
KFDA, Seoul, Korea (2004.10)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

・出願特許 P2004-181101 「核酸増幅法を用
いたヒト乳頭腫ウイルスの検出」

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し