

厚生労働科学研究費補助金
萌芽的先端医療技術推進研究事業
(ファーマコゲノミクス分野)

オーダーメイド薬物療法のための革新的な
ベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

平成17年度 総括・分担研究報告書

主任研究者 松原洋一

平成18年(2006)3月

目 次

I. 総括研究報告

- オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用
松原 洋一 1

II. 分担研究報告

1. CASSOH 法を用いた新規遺伝子診断法の確立
松原 洋一 7
2. CASSOH 法に用いるイムノクロマト試験紙の臨床応用に向けた改良
呉 繁夫 12
3. 薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用
水柿 道直 16
4. 臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価
平塚 真弘 20

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 23

IV. 研究成果の刊行物・別刷 25

I . 総括研究報告書

総括研究報告書

オーダーメイド薬物療法のための革新的なベッドサイド遺伝子診断法の開発と応用

総括研究者 松原 洋一（東北大学大学院・教授）

研究要旨

本研究の目的は、私たちが最近独自に考案したCASSOH法を用いて、簡便・迅速にsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出できるベッドサイド遺伝子診断法を確立し、オーダーメイド薬物療法を推進することにある。本年度は、1) CASSOH法に用いるイムノクロマト試験紙の技術的改良、2) 非侵襲的な「唾液」検体を用いた遺伝子診断法の確立、3) 複数の薬理遺伝学的遺伝子多型検出を目的としたCASSOH法のマルチプレックス化を行なった。さらに、4) 臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価を行なうとともに、5) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用を検討した。

分担研究者

呉 繁夫 東北大学大学院・助教授
水柿 道直 東北薬科大学・教授
平塚 真弘 東北薬科大学・講師

研究協力者

鎌田 文顕 東北大学大学院
・流動研究員
佐々木 崇光 東北薬科大学・助手
作山 佳奈子 東北薬科大学・大学院生

臨床的に有用と考えられるものが数多く知られてきている。しかしながら、このようなpharmacogeneticsに基づく個別化薬物療法は、オーダーメイド医療の掛け声とは裏腹に、一般の医療機関では実施されていない。遺伝子解析研究成果を実際に臨床へ応用するにあたって大きな障壁となっているのは、現時点では一般病院や診療所などの臨床の現場で施行が可能なSNP検出法が存在しないことである。

臨床の場で必要とされるSNP検出は、例えばこれから処方しようとする薬剤に対する代謝酵素の遺伝子多型など少項目のSNP情報である。しかも、短時間のうちにベッドサイドや外来診療の場で判定できることが求められるため、中央施設や検査会社などに検体送付することなく、病院内の一般臨

A. 研究目的

ゲノム研究の進展に伴い、薬物動態、薬効、副作用発現等の個人差が薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因することが次々と明らかになってきた。特に遺伝子上の一塩基多型（SNP）診断は、薬物投与前に患者の薬剤反応性を予測する上で大いに期待されている。すでに、これまでの研究によってエビデンスが積み重ねられ、

床検査技師によって実施できることが必要である。

最近私たちが独自に開発した遺伝子診断法 (CASSOH法) は、DNAを抽出することなく血液0.5 μ l を直接使用し、2ステップの操作を行うだけの簡便・迅速な手法で、採血から2時間以内にSNPの遺伝子型判定が可能なこれまでにない手法である (Matsubara & Kure, Hum Mutat 2003;22:166-172)。

本研究の目的は、この革新的なベッドサイド遺伝子診断法を用いることにより一般医療機関において薬理遺伝学的遺伝子多型をその場で検出できる遺伝子診断法を確立し、個別化薬物療法が実施できる体制を確立することにある。本年度は、1) CASSOH法に用いるイムノクロマト試験紙の技術的改良、2) 非侵襲的な「唾液」検体を用いた遺伝子診断法の確立、3) 複数の薬理遺伝学的遺伝子多型検出を目的としたCASSOH法のマルチプレックス化を行なうとともに、さらに、4) 臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価、5) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用を検討した。

B. 研究方法

1) CASSOH法に用いるイムノクロマト試験紙の技術的改良 (呉)

CASSOH法によるSNP型の迅速かつ正確な判定のためには、イムノクロマト試験紙の感度が高くしかも安定している事が必要である。そこで、イムノクロマト試験紙の検出感度の向

上を目指し、使用材料の見直し、標識法やパッドへの導入法、展開バッファの検討などを行った。

2) 非侵襲的な「唾液」検体を用いた遺伝子診断法の確立 (松原、呉)

血液に代わる検体採取法として、①患者への侵襲が少ない、②成人のみならず新生児・小児でも採取が容易でしかも随時可能、③安定したDNA量が確保できること、④検体の処理法が簡便迅速であること、などを条件に種々の検討をおこなった。

3) CASSOH法のマルチプレックス化の検討 (松原、平塚)

複数の遺伝子多型が関与していることが多い薬理遺伝学的遺伝子多型について、CASSOH法のマルチプレックス化を検討した。具体的には、イムノクロマトグラフィーによる金粒子の凝集の代わりに、イムノアフィニティーとELISAを組み合わせた呈色反応を行った。

4) 臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価 (平塚)

日本人集団において臨床的に有用な薬剤反応性遺伝子のSNP検出法を開発するために、薬剤反応性に影響を及ぼすと考えられる遺伝子を文献情報よりリストアップした。さらに、それらの遺伝子多型の人種差の有無、遺伝子診断法の種類を調査した。

5) CASSOH法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用 (水柿、平塚)

CASSOH法を利用した遺伝子診断法の感度と特異性を向上させるために、プローブ、展開バ

ッファーなど、今回試作した第一化学薬品製 SNP検出試験紙に最も適した組合せを決定した。

C. 研究結果

1) CASSOH 法に用いるイムノクロマト試験紙の技術的改良

今回、テストラインが現れる部位であるニトロセルロース・メンブレンとコンジュゲートパッドに吸着させている金標識抗体の標識法やパッドへの導入法、また、クロマトグラフィーを行う展開バッファーの検討も行った。以上の改良により、初期の試作品に比べ 3 倍程度の感度の向上を達成することができた。

2) 非侵襲的な「唾液」検体を用いた遺伝子診断法の確立

検討の結果、唾液検体が最も優れていると判断された。唾液については、直接PCR反応系に添加した場合、阻害物質の混入と考えられる遺伝子増幅の成否にばらつきが認められた。いくつかの精製・抽出方法を検討した結果、私たちが調整した処理液で 10 分間加温処理することによって、そのままPCR反応液に添加して良好な増幅が得られる系を確立した。

3) CASSOH 法のマルチプレックス化

複数の遺伝子多型が関与していることが多い薬理遺伝学的遺伝子多型について、CASSOH 法のマルチプレックス化を検討した。この目的のために、CASSOH 法の最終検出ステップに、試験紙ではなくイムノアフィニティーと ELISA 法を組み合わせた新しい手

法を開発した。多数のチップをケースに収納することによってマルチウェルプレートフォーマットで用いることを可能とした。

4) 臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価 (平塚)

検討の結果、ミトコンドリア DNA (1555A>G 多型)、CYP2C19(*2, *3 アレル)、NAT2(*5, *6, *7 アレル) 及び TPMT(*3C アレル) の SNP が、日本人で比較的頻度が高く、しかも遺伝子型-表現型の関連性が明確であり、臨床的に遺伝子多型情報として有用であると判断した。

5) CASSOH 法の薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用 (水柿、平塚)

ミトコンドリア DNA (1555A>G 多型) 及び NAT2(*5, *6, *7 アレル) の検出系を中心に検討し、最適なプローブ条件及び展開バッファー組成の決定を行った。

D. 考察

本年度は、CASSOH 法の臨床応用に向けていくつかの検討を行なった。

まず、CASSOH 法に用いるイムノクロマト試験紙の技術的改良をおこない、感度を向上させることができた。研究室レベルでの遺伝子解析とは異なり、臨床検査としての遺伝子検査は、十分な感度と安定した検査結果・再現性を確保することが重要である。

次に、非侵襲的な迅速遺伝子診断法のために、唾液を用いた検査法を確立することができた。薬理的遺伝子多型に基づく個別化薬物療法の普及にとって、重要な進展と思われる。

CASSOH法のマルチプレックス化は、複数の遺伝子多型が関与していることが多い薬理遺伝学的遺伝子多型において需要が高いと考えられる。今回考案した新しい方法（CASSOH-ELISA法）は、比較的高いスループットを持ちながら、特別の機器を用いることなく肉眼で遺伝子型を判定できる手法であり、臨床応用に有用と思われる。

臨床的に有用な薬理遺伝的遺伝子多型情報の収集と評価については、これらを整理し、国際誌（*Clin. Chim. Acta*, 363, 177-186 (2006)）に発表した。日本人では、白人におけるSNPの頻度分布やハプロタイプに差があることから、有用性の高い情報と考えられる。

ミトコンドリアDNA (1555A>G多型) 及び NAT2 (*5, *6, *7アレル) を対象としたCASSOH法の検討によって、臨床応用段階にあることが実証されたものと考えられる。

E. 結論

CASSOH法の更なる検討と改良によって、本手法による薬理遺伝的遺伝子多型の検出が、すでに臨床応用段階に達しているものと考えられる。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M.

Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) *J Biochem Biophys Methods* (in press)

2. Hiratsuka M, Sasaki T, Mizugaki M. Genetic testing for pharmacogenetics and its clinical application in drug therapy (Review). *Clin Chim Acta* 363:177-186, 2006
3. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38:294-296, 2006.
4. Sato K, Kanno J, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S: De novo and salvage pathways of DNA synthesis in primary cultured neural stem cells. *Brain Res* 1071:24-33, 2006
5. Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, deGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchey R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Breningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy). *Hum Mutat* 27:343-352, 2006
6. Gripp KW, Lin AE, Stabley DL, Nicholson L, Scott Jr. CI, Doyle D, Aoki Y, Matsubara Y, Zackai EH, Lapunzina P, Gonzalez-Meneses A, Holbrook J, Agresta CA, Gonzalez IL, Sol-Church K: HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation. *Am J Med Genet* 140 A:1-7, 2006
7. Ebisawa A, Hiratsuka M, Sakuyama K, Konno Y, Sasaki T, Mizugaki M. Two novel single nucleotide polymorphisms (SNPs) of the CYP2D6 gene in Japanese individuals. *Drug Metabol Pharmacokin* 20: 294-299, 2005
8. Hiratsuka M, Kudo M, Koseki N, Ujiie S, Sugawara M, Suzuki R, Sasaki T, Konno Y, Mizugaki M. A novel single nucleotide polymorphism of the human

- methylenetetrahydrofolate reductase gene in Japanese individuals. *Drug Metabol Pharmacokin* 20:387-390, 2005
9. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y: Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37:1038-1040, 2005.
 10. Flusser H, Korman SH, Sato K, Matsubara Y, Galil A, Kure S: Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation. *Neurology* 64:1426-1430, 2005
 11. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, Kawame H, Kamasaki H, Yamanaka T, Takada F, Nishio K, Sakurai M, Tamai H, Nagashima T, Suzuki Y, Kure S, Fujii K, Imaizumi M, Matsubara Y: Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 50:192-202, 2005
 12. Otomo J, Kure S, Shiba T, Karibe A, Shinozaki T, Yagi T, Naganuma H, Tezuka F, Miura M, Ito M, Watanabe J, Matsubara Y, Shirato K: Electrophysiological and histopathological characteristics of progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16:137-145, 2005
 13. Boneh A, Korman SH, Sato K, Kanno J, Matsubara Y, Lerer I, Ben-Neriah Z, Kure S: A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem. *J Hum Genet* 50:230-234, 2005
 14. Dinopoulos A, Matsubara Y, Kure S: Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia. *Mol Gene Metab* 86:61-69, 2005
 15. Salvi F, Aoki Y, Della Nave R, Vella A, Pastorelli F, Scaglione C, Matsubara Y, Mascalchi M: Adult Alexander's disease without leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 58:813-814, 2005
 16. Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y: Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS. *Hum Mutat* 26:285-290, 2005
- (2) 学会発表
1. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝相談、呉繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、日本小児科学会宮城地方会、仙台、2005年6月
 2. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝カウンセリング、呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、第12回日本遺伝子診療学会大会、松本、2005年8月
 3. アミノグリコシド系抗生剤による副作用の回避を目的としたミトコンドリアDNA1555A>G多型遺伝子診断と遺伝カウンセリング、作山佳奈子、平塚真弘、呉繁夫、松原洋一、金野由美子、佐々木崇光、水柿道直、第44回日本薬学会東北支部大会、仙台、2005年10月
 4. Denaturing HPLC を用いた Methylenetetrahydrofolate Reductase の遺伝子多型解析、工藤睦、平塚真弘、金野由美子、佐々木崇光、小関奈那美、水柿道直、第44回日本薬学会東北支部大会、仙台、2005年10月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- ・発明の名称「遺伝子変異検出法」
 - ・出願番号 特願2002-323419
 - ・国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
 - ・出願国 PTC

Ⅱ. 分担研究報告

分担研究報告書

CASSOH法を用いた新規遺伝子診断法の確立

分担研究者 松原 洋一 (東北大学大学院・教授)

研究要旨

本研究の目的は、私たちが最近独自に考案したCASSOH法を用いて、簡便・迅速にsingle nucleotide polymorphism (SNP)が検出できるベッドサイド遺伝子診断法を確立することである。本年度は、まず、血液よりも患者に対する侵襲が少ない検体を用いた遺伝子診断法の検討を行った。その結果、「唾液」を簡便な操作で短時間処理することによって目的遺伝子の増幅と遺伝子型の判定があることを示すとともに、その手技を確立した。つぎに、複数の遺伝子多型が関与していることが多い薬理遺伝学的遺伝子多型について、CASSOH法のマルチプレックス化を検討した。この目的のために、CASSOH法の最終検出ステップに、試験紙ではなくイムノアフィニティーとELISA法を組み合わせた新しい手法を開発した。ここでは、PCR反応液をチップ上のメンブレンに吸着させ、試薬を順次加えることによって青の発色で多型の有無を検出する。多数のチップをケースに収納することによってマルチウェルプレートのフォーマットで用いることを可能とした。この新しい方法 (CASSOH-ELISA法) は、比較的高いスループットを持ちながら、特別の機器を用いることなく肉眼で遺伝子型を判定できる手法であり、薬理遺伝学的遺伝子多型の臨床応用に有用と思われる。

A. 研究目的

薬物代謝酵素や薬物標的分子等の遺伝子多型に起因する、薬物動態・薬効・副作用発現等の個人差をあらかじめ遺伝子検査によって同定し、その結果を基に個別化薬剤処方をおこなう未来型の医療 (オーダーメイド医療) が提案されている。これを具現化するためには、一般病院でも施行が可能な簡便かつ迅速な遺伝子検査法 (SNP検出法) の確立が急務である。

最近私たちが独自に開発した遺伝子診断法 (CASSOH法) は、DNAを抽出することなく

血液 $0.5\mu\text{l}$ を直接使用し、2ステップの操作を行うだけの簡便・迅速な手法で、採血から2時間以内にSNPの遺伝子型判定が可能なこれまでにない手法である (Matsubara & Kure, Hum Mutat 2003;22:166-172)。

本年度の研究目的は、まず第一に、患者にとって血液よりもさらに侵襲の少ない検体採取法・処理法を確立することであった。次に、複数の遺伝子多型が関与していることが多い薬理遺伝学的遺伝子多型について、CASSOH法をベースにしたマルチプレックス化を検討した。

B. 研究方法

① 血液の代替となる検体の検討

血液に代わる検体採取法として、1) 患者への侵襲が少ない、2) 成人のみならず新生児・小児でも採取が容易でしかも随時可能、3) 安定したDNA量が確保できること、4) 検体の処理法が簡便迅速であること、などを条件に種々の検討をおこなった。

② マルチプレックス化の検討

つぎに、CASSOH法をベースにしたマルチプレックス化のために、最終段階の検出系の変更を検討した。具体的には、イムノクロマトグラフィーによる金粒子の凝集の代わりに、イムノアフィニティーとELISAを組み合わせた呈色反応を行うこととした。

C. 研究結果

① 血液の代替となる検体の検討

検討の結果、唾液検体が最も優れていると判断された。このほかに、毛髪、体毛、頬粘膜、爪、皮膚剥離片、尿なども候補となったが、小児や個体によっては採取困難、DNA収量が少ない／一定しない、DNA抽出処理に時間がかかる、などの理由で不適切と判断された。とくに、非侵襲的な検体として一部で用いられている頬粘膜や爪などは、DNA抽出処理に時間がかかりCASSOH法の迅速性を著しく損なうため本研究の趣旨にそぐわないと判断した。

唾液については、直接PCR反応系に添加した場合、障害物質の混入と考えられる遺伝子

増幅の成否にばらつきがあり、何らかの処理が必要と考えられた。いくつかの精製・抽出方法を検討した結果、私たちが調整した処理液で10分間加温処理することによって、そのままPCR反応液に添加して良好な増幅が得られる系を見出した。その結果、図1に示すようなステップでCASSOH法による遺伝子診断が可能となった。

② CASSOH法のマルチプレックス化の検討

この目的のために、CASSOH法の最終検出ステップに、試験紙ではなくイムノアフィニティーとELISA法を組み合わせた新しい手法を開発した。ここでは、PCR反応液をチップ上のメンブレンに吸着させ、試薬を順次加えることによって青の発色で多型の有無を検出する。チップには特別の工夫が加えられており、添加された液はすべてメンブレン下部のパッドに吸収されるため、通常のELISAのように廃液を処理する必要がない。また、多数のチップをケースに収納することによってマルチウェルプレートのフォーマットで用いることも可能である。

D. 考察

個別化薬物療法のための遺伝子診断は、重篤な疾患の患者だけが対象ではないため、できうる限り非侵襲的であることが望ましい。採血そのものは、医療機関内ではごく当たり前の検査手技であるが、一般には痛みや不安をともなう嫌な検査ととらえられており、とくに小児では耐え難い恐怖を伴う。また、毎日のようにこの病院でも起きている針刺し事故は、肝炎・

HIVなどの血液を介した感染症のリスクを伴っている。したがって、個別化薬物療法を普及するに当たっては、血液に代わる検体採取が望まれる。

これまでも、頬粘膜、毛髪、爪などがDNA抽出に用いられてきたが、収量が悪い／精製操作が煩雑で時間がかかるなどの欠点があった。今回私たちは、唾液を簡単に処理することによって安定した遺伝子増幅が可能なことを示した。この手法をCASSOHと組み合わせることによって、非侵襲的な迅速遺伝子診断法を確立することができた。

次に、今回開発したCASSOH-ELISA法は、比較的高いスループットを持ちながら、特別の機器を用いることなく肉眼で遺伝子型をできる遺伝子検査法としてこれまでに類を見ない手法である。この新しい手法については、論文として掲載される予定である (J Biochem Biophys Methods, in press)

E. 結論

非侵襲的に唾液を用い、CASSOH法によっておこなう迅速遺伝子診断法を確立した。また、CASSOH法のマルチプレックス化を検討し、CASSOH-ELISA法を確立した。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

(1) 論文発表

1. Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K,

Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) *J. Biochem. Biophys. Methods* (in press)

2. Aoki Y, Niihori T, Kawame H, Kurosawa K, Ohashi H, Tanaka Y, Filocamo M, Kato K, Suzuki Y, Kure S, Matsubara Y.: Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome. *Nat Genet* 37:1038-40, 2005.

3. Flusser H, Korman SH, Sato K, Matsubara Y, Galil A, Kure S: Mild glycine encephalopathy (NKH) in a large kindred due to a silent exonic GLDC splice mutation. *Neurology* 64:1426-30, 2005

4. Niihori T, Aoki Y, Ohashi H, Kurosawa K, Kondoh T, Ishikiriyama S, Kawame H, Kamasaki H, Yamanaka T, Takada F, Nishio K, Sakurai M, Tamai H, Nagashima T, Suzuki Y, Kure S, Fujii K, Imaizumi M, Matsubara Y: Functional analysis of PTPN11/SHP-2 mutants identified in Noonan syndrome and childhood leukemia. *J Hum Genet* 50:192-202, 2005

5. Otomo J, Kure S, Shiba T, Karibe A, Shinozaki T, Yagi T, Naganuma H, Tezuka F, Miura M, Ito M, Watanabe J, Matsubara Y, Shirato K: Electrophysiological and histopathological characteristics of progressive atrioventricular block accompanied by familial dilated cardiomyopathy caused by a novel mutation of lamin A/C gene. *J Cardiovasc Electrophysiol* 16:137-45, 2005

6. Boneh A, Korman SH, Sato K, Kanno J, Matsubara Y, Lerer I, Ben-Neriah Z, Kure S: A single nucleotide substitution that abolishes the initiator methionine codon of the GLDC gene is prevalent among patients with glycine encephalopathy in Jerusalem. *J Hum Genet* 50:230-4, 2005

7. Dinopoulos A, Matsubara Y, Kure S: Atypical variants of nonketotic hyperglycinemia. *Mol Gene Metab* 86:61-69, 2005

8. Salvi F, Aoki Y, Della Nave R, Vella A,

- Pastorelli F, Scaglione C, Matsubara Y, Mascalchi M: Adult Alexander's disease without leukoencephalopathy. *Ann Neurol* 58:813-814, 2005
9. Suzuki Y, Yang X, Aoki Y, Kure S, Matsubara Y: Mutations in the holocarboxylase synthetase gene HLCS. *Hum Mutat* 26:285-290, 2005
10. Gripp KW, Lin AE, Stabley DL, Nicholson L, Scott Jr. CI, Doyle D, Aoki Y, Matsubara Y, Zackai EH, Lapunzina P, Gonzalez-Meneses A, Holbrook J, Agresta CA, Gonzalez IL, Sol-Church K: HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation. *Am J Med Genet* 140 A:1-7, 2006
11. Niihori T, Aoki Y, Narumi Y, Neri G, Cave H, Verloes A, Okamoto N, Hennekam RC, Gillessen-Kaesbach G, Wiczorek D, Kavamura MI, Kurosawa K, Ohashi H, Wilson L, Heron D, Bonneau D, Corona G, Kaname T, Naritomi K, Baumann C, Matsumoto N, Kato K, Kure S, Matsubara Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome. *Nat Genet* 38:294-6, 2006.
12. Sato K, Kanno J, Tominaga T, Matsubara Y, Kure S: De novo and salvage pathways of DNA synthesis in primary cultured neural stem cells. *Brain Res* 1071:24-33, 2006
13. Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, deGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchey R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Brenningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy). *Hum Mutat* 27:343-352, 2006
- (2) 学会発表
1. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝相談、呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、日本小児科学会宮城地方会、仙台、2005年6月
 2. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝カウンセリング、呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、第12回日本遺伝子診療学会大会、松本、2005年8月
- H. 知的財産権の出願・登録状況
- ・ 発明の名称「遺伝子変異検出法」
 - ・ 出願番号 特願2002-323419
 - ・ 国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
 - ・ 出願国 PTC

図1 唾液検体とCASSOH法による迅速遺伝子診断

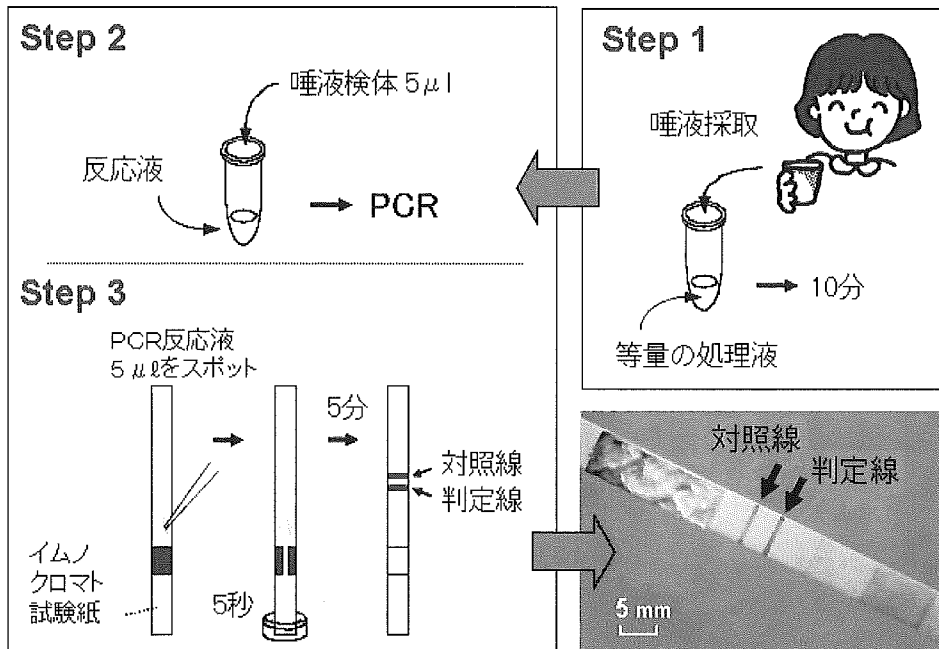


図2 CASSOH-ELISA法による遺伝子診断手技

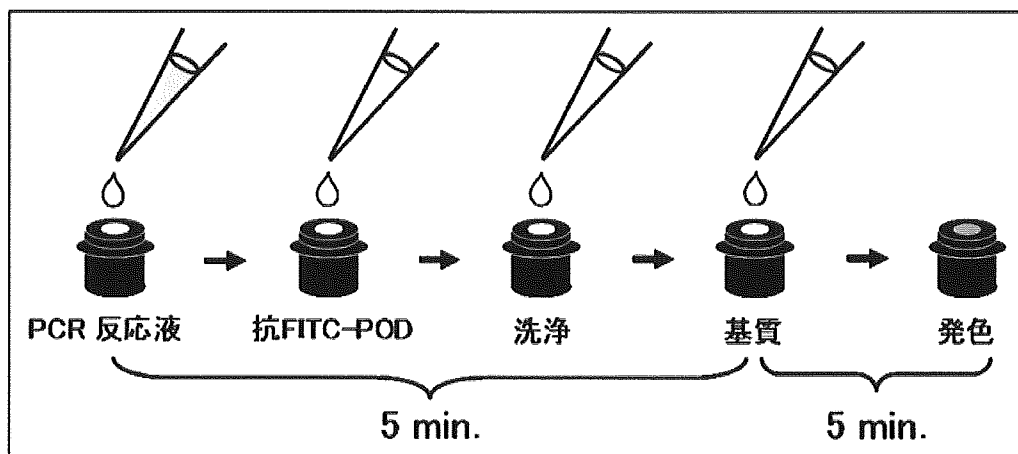
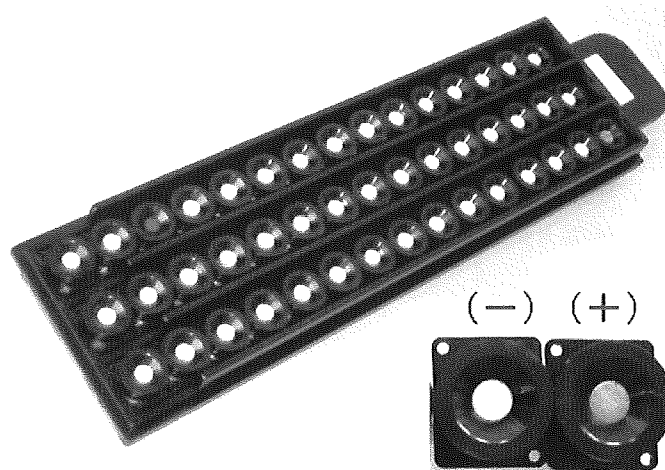


図3 CASSOH-ELISA法によるマルチプレックス遺伝子診断



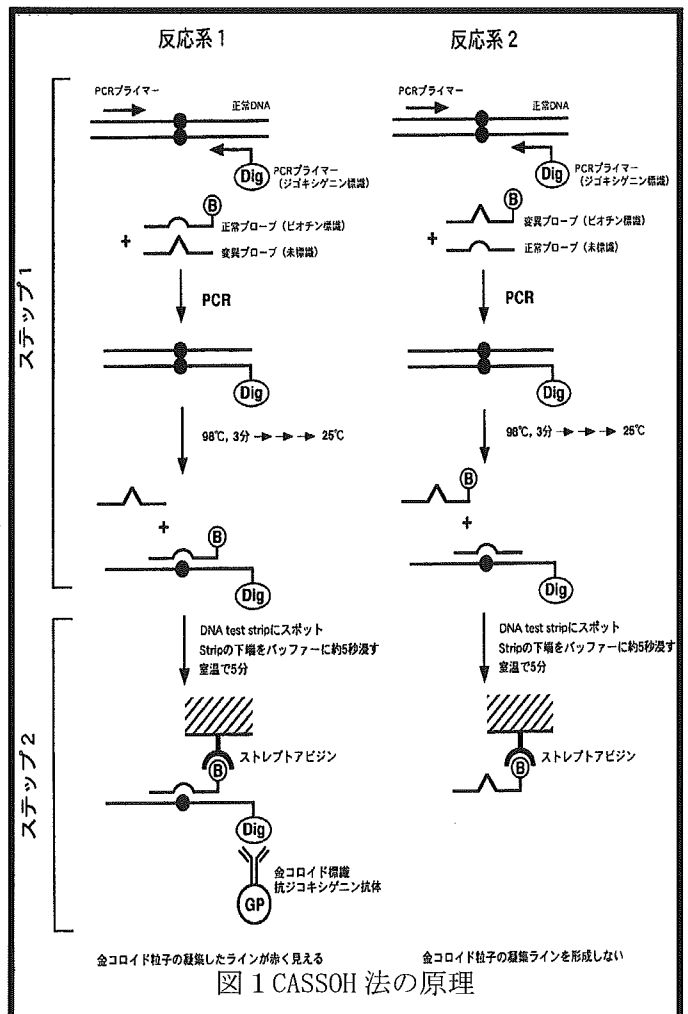
CASSOH法に用いるイムクロマト試験紙の臨床応用に向けた改良
 分担研究者 呉 繁夫 (東北大学大学院・助教授)

研究要旨

CASSOH法によるSNP型の迅速かつ正確な判定のためには、イムクロマト試験紙の感度が高くしかも安定している事が必要である。この目的で、イムクロマト試験紙の検出感度の向上を目指した改良を行った。イムクロマト試験紙は、支持体であるプラスチック版上に、5種類の吸水性膜が両端を重ねた5層構造を持つ。今回は、テストラインが現れる部位であるニトロセルロース・メンブレンとコンジュゲートパッドに吸着させている金標識抗体の標識法やパッドへの導入法の改良を行った。また、クロマトグラフィーを行う展開バッファの検討も行った。以上の改良により、初期の試作品に比べ3倍程度の感度の向上を達成した。

A. 研究目的

オーダーメイド薬物療法を目的とする遺伝子診断法の実践のためには、ベッドサイドや外来で迅速かつ簡便に一塩基多型(SNP)を決定する検出系の開発が必須である。私たちは、この検出系としてイムクロマトを応用したCASSOH法を開発した。CASSOH法はPCRにて増幅されたSNP部位を含む遺伝子断片に対し、それぞれの対立遺伝子に相補的な2種類のオリゴヌクレオチド・プローブを準備し、いずれのプローブが選択的に結合するかを金標識された抗体の沈降線で検出するものである(図1)。SNP検出の感度は、主にこのイムクロマトの感度に依存するためSNP判定の正確さと安定性を確保するには、イムクロマトの検出感度が高く、しかも、ロット差が低いことが肝要であ



る。そこで、今回の研究ではこのイムノクロマト試験紙を構成する吸水性膜の品質と検出に用いる抗体の検討を行った。

B. 研究方法

イムノクロマト試験紙は、支持体であるプラスチック板上に、5種類の吸水性膜が両端を重ねた構造を取っている。具体的には、下部から順に、ボトムチップ、コンジュゲートパッド、サンプルパッド、膜、及び吸収パッド、からなっている（図2）。今回は、これらの構造物のうち、コントロールラインとテストラインが引かれているニトロセルロース・膜、金標識抗体が吸着してあるコンジュゲートパッド、及びクロマトグラフィーを行う展開バッファの組成を検討した。特にコンジュゲートパッドに吸着されている抗ジゴキシゲニン抗体はイムノクロマト法による検出感度に密接に関係するため、抗体の選択、金コロイド粒子の標識法、そしてそのコンジュゲートパッドへの導入法の3点を詳細に検討した。評価は、いずれも従来の材料で作成したイムノクロマト試験紙と新しい素材を導入した試験紙とを実際の検出系に

供し、その結果現れるテストラインの濃さや出現速度を目視・比較することにより、行った。

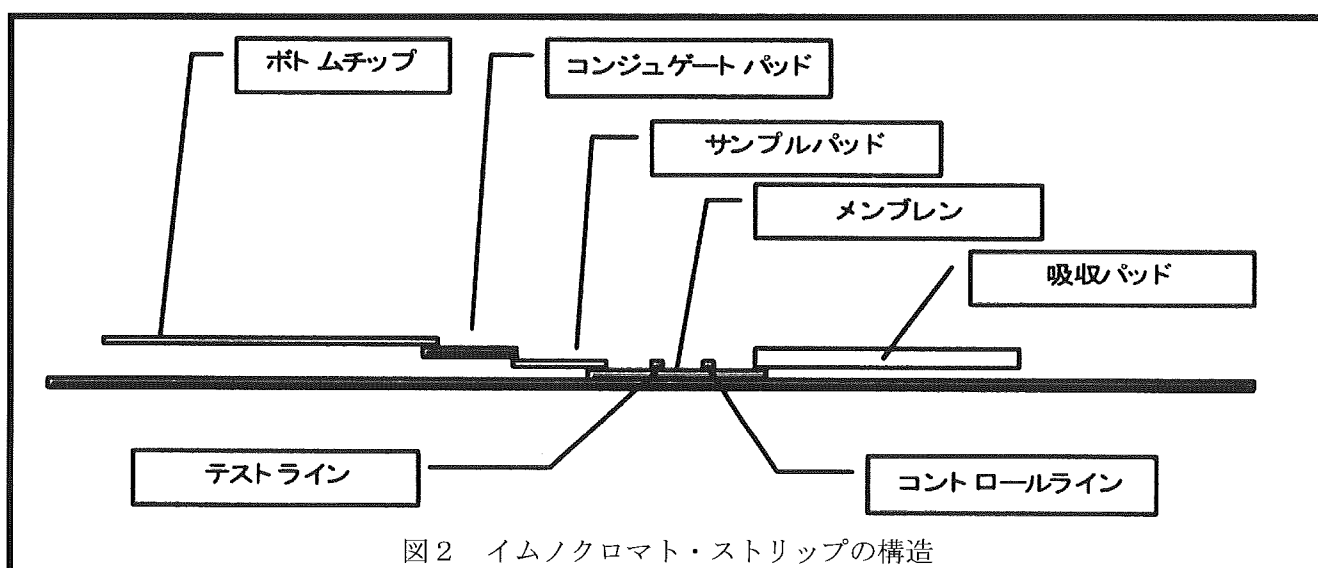
C. 研究結果

① ニトロセルロース・膜の材質の検討

従来は使用していた、ニトロセルロース製膜は、ロット間の差が大きく、コントロール及びテストラインの滲みの原因となっていた。そこで、他の安定した膜を求め、3社12種類のニトロセルロース・膜を比較検討した。その結果、一製品を選定した。このニトロセルロース・膜の使用により、ラインの滲みが無くなり、ロット間のバラつきをなくす事に成功した。

② 抗体の検討

検出に用いる金コロイド標識抗ジゴキシゲニン抗体として、従来はモノクローナル抗体を用いていたが、安定供給の面で不安がある。供給の安定と感度の改善を目的とし、抗ジゴキシゲニン・ポリクローナル抗体の導入を検討した。初めに、このポリクローナル抗体を2種類の方法で金標識した。金コロイド粒子は、予備検討



の結果から、直径40 nmの大きさのものを用いた。ポリエチレングリコールを用いた新しい標識法(図3B)と従来の標識法を(図3D)その結果、新しい金コロイド標識法がより感度に優れることが判明した。

③ コンジュゲートパッドへの方法の検討

更に、抗ジゴキシゲニン抗体をコンジュゲートパッドへ吸収後、乾燥させコンジュゲートパッドを作成する。この際、抗体を溶解する溶解液を2種類用意し、どちらの感度がよいかを検討した。ポリエチレングリコールを含む抗体溶解液を用いた新しい方法で作成した試験紙(図3A)と従来の抗体溶解液に溶かしてコンジュゲートパッドへ導入した試験紙(図3C)を比較した。(金コロイド粒子の標識は、AとCいずれも②で検討しよい結果を示した、ポリエチレングリコールを用いる新しい方法を用いている。)その結果、コンジュゲートパッドへの導入には、ポリエチレングリコールを用いる新しい方法(A)が感度の点で優れていることが明らかになった。

いた。今回、オリゴヌクレオチド・プローブのハイブリダイゼーションによく用いられる2xSSC溶液を展開液として使用したところ、テストラインの現れる速度には違いが無かったものの、従来のラインよりバンドの鮮明さが改善した。従って、新しく作成したイムノクロマト試験紙には展開液として2xSSCがより適切と考えられた。

D. 考察

今回のイムノクロマト試験紙の検討により、ニトロセルロース・メンブレンの選択、抗ジゴキシゲニン抗体の種類、金コロイドによる抗体の標識法、標識抗体のコンジュゲートパッドへの導入法の検討を行うことにより、検討以前のイムノクロマト・試験紙に比し、約3倍の感度を得ることが出来た。また、クロマトグラフィーを行う展開液を2xSSCに変えることで、テストバンドの鮮明さを増すことが出来た。CASSOH法による実際の臨床検体の検査にあたっては、PCR増幅の弱い検体も含まれていることが予想され、イムノクロマト試験紙の検出感度は十分な余裕がある事が必要である。その点から、試験

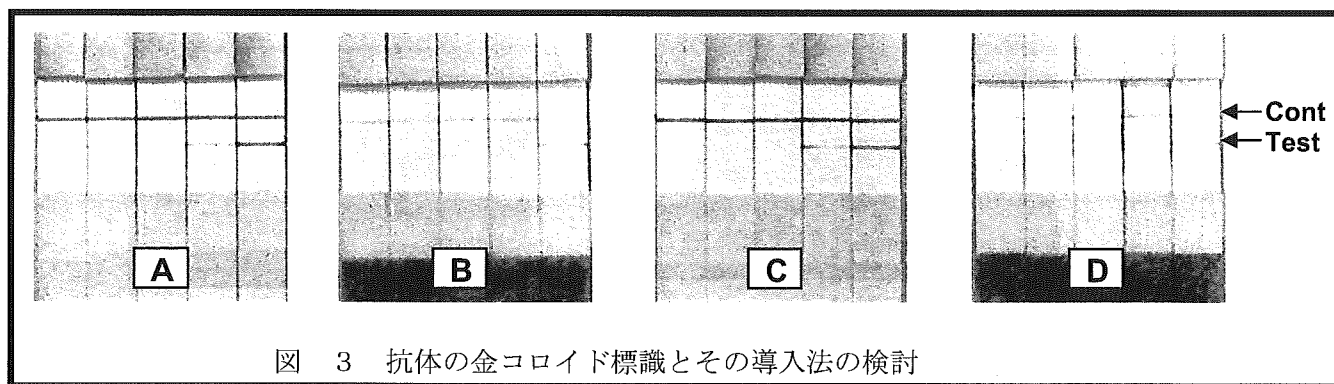


図 3 抗体の金コロイド標識とその導入法の検討

④ クロマトグラフィー展開液の検討

従来、クロマトグラフィーにはリン酸バッファに界面活性物質を含む展開液を使用して

紙の更なる検討・改良が必要であると考え。

E. 結論

イムノクロマト試験紙を構成する抗体や素材の検討、及びクロマトグラフィーの展開液の改善により、検出感度を約3倍に改善することが出来た。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

A. 論文発表

1. Hiratsuka M, Ebisawa A, Sakuyama K, Matsubara Y, Kure S, Soya Y, Konno Y, Sasaki T, Kishiba A, Mizugaki M. Competitive allele-specific short oligonucleotide hybridization (CASSOH) with enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of pharmacogenetic single nucleotide polymorphisms (SNPs) J. Biochem. Biophys. Methods (in press)
2. Kure S, Kato K, Dinopoulos A, Gail C, deGrauw TJ, Christodoulou J, Bzduch V, Kalmanchev R, Fekete G, Trojovský A, Plecko B, Breningstall G, Tohyama J, Aoki Y, Matsubara Y. Comprehensive mutation analysis of GLDC, AMT, and GCSH in nonketotic hyperglycinemia (glycine encephalopathy). Hum Mutat 2006;27:343-352

B. 学会発表

1. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝相談、呉繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、日本小児科学会宮城地方会、仙台、2005年6月
2. アミノグリコシド系抗生剤による難聴：ミトコンドリア1555A>G変異の遺伝子検査と遺伝カウンセリング、呉 繁夫、菅野潤子、青木洋子、平塚真弘、松原洋一、第12回日本遺伝子診療学会大

会、松本、2005年8月

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ・ 発明の名称 「遺伝子変異検出法」
- ・ 出願番号 特願2002-323419
- ・ 国際特許出願番号 PTC/JP03/14204
- ・ 出願国 PTC

分担研究報告書

薬物代謝酵素遺伝子多型検査への応用
分担研究者 水柿 道直 東北薬科大学教授

研究要旨

CASSOH法を利用した遺伝子診断法の感度と特異性を向上させるために、ビオチン標識プローブと競合プローブの鎖長を変化させ、第一化学薬品製SNP検出試験紙に最も適した組合せを決定した。ミトコンドリアDNA 1555A>G多型検出系では、従来、野生型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは13mer、変異型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは12merの合成オリゴヌクレオチドを用いていた。今回、11~13merのプローブをそれぞれ合成し、最も感度良く、特異的に検出できる組合せがすべてのプローブで12merであることが判明した。これは、従来用いていたロシュ製の試験紙と今回新たに作成された第一化学薬品製の試験紙の品質の違いに由来することが予想された。また、N-アセチルトランスフェラーゼ2 (NAT2) 遺伝子のSNP検出系でも、同様にプローブ鎖長の最適化ができた。また、CASSOH法のイムノクロマトグラフィーにおいて、第一化学薬品製の試験紙に適した展開バッファの組成を検討し、最適条件を決定した。

A. 研究目的

近年、薬剤反応性遺伝子における一塩基多型 (SNP) 解析に基づき、レスポンド・ノンレスポンドの識別や副作用予測を行うことで、患者個々に適した投与薬剤の用法・用量の選択が可能になると考えられている。現在国内外において、種々の薬剤反応性遺伝子のSNPと投与薬物の血中濃度・治療効果、副作用発現等の相関性に関する情報が積み上げられている。しかし、薬物療法に影響を与えるSNPを有する患者に対して、臨床レベルでその診断を行い、薬物の適正使用を行っている施設は非常に少ないと言える。今回、これまでに

我々が構築してきた薬剤反応性に関与する遺伝子多型診断法 (CASSOH法) のブラッシュアップを行った。対象とする遺伝子は、ミトコンドリアDNA (1555A>G多型) 及びNAT2 (*5, *6, *7アレル) とした。検出法のブラッシュアップでは、検出プローブの鎖長を変化させ、最も感度良く、正確にSNPを検出できる組合せを特定した。また、CASSOH法のイムノクロマトグラフィーにおいて、第一化学薬品製の試験紙に適した展開バッファの組成を検討した。

B. 研究方法

ミトコンドリアDNA (1555A>G多型) 及び

NAT2(*5, *6, *7アレル)をCASSOH法により検出し、最適なプローブ条件及び展開バッファー組成の決定を行った。方法は、まずSNPを挟む領域で通常のPCRを行った。ただし、その際に一方のプライマーの5'端をDIG(ジゴキシンゲン)でラベルした。また、反応液中にはDIGプライマーとは逆鎖に作成した5'及び3'端ビオチンラベル対立遺伝子特異的(野生型及び変異型検出)オリゴヌクレオチドプローブ(SNP部位は中央付近に来るように)を加えた。さらに非特異的なプローブのハイブリダイゼーションを阻害するため、野生型検出ビオチンプローブに対しては3'端リン酸ラベル変異型競合プローブを、変異型検出ビオチンプローブには3'端リン酸ラベル野生型競合プローブを添加した。なお、これらのプローブは11~13merのものをすべて設計した。次にPCR後、高温でPCR産物を一本鎖にし、続いて温度を段階的に25℃まで低下させた。仮に鋳型DNAとビオチンプローブの配列が一致すれば、その産物はビオチンとDIGのダブルラベル化体となる。それに対して鋳型DNAとビオチンプローブの配列が一致しない場合は、ダブルラベル化PCR産物は得られない。次にイムノクロマトグラフィーで結果を視覚化する。つまり得られた反応物を第一化学薬品社製DNA検出試験紙にスポットし、展開した。DNA検出テスト試験紙には、金コロイドラベルされた抗DIG抗体が塗布されたパッドとストレプトアビジンが塗布されたラインが存在し、PCR産物はサンプルパッド上に滴下され緩衝液により展開される。PCR産物がダブルラベル化されていればストレプト

アビジンにビオチンがトラップされ、さらに金コロイドラベル抗DIG抗体が凝集し、バンドを形成する。つまり試験紙を2本用意し、一方には野生型プローブを用いた時の反応液を、もう一方には変異型プローブを用いた時の反応液をアプライすることによって遺伝子型を視覚的に判別することができる。

イムノクロマトグラフィーの際に用いられる展開バッファーとして、50~100mMのリン酸バッファーあるいはトリスバッファーを用いた。また、それらのバッファー中に100~500mMのNaClを添加し、反応性の変化を確認した。

(倫理面への配慮)

今回の研究プロトコールは本邦における「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」を遵守し、東北薬科大学・大学院倫理委員会および東北大学医学部倫理委員会に申請・承認された同名課題「薬剤反応性遺伝子の多型性が薬効及び薬物動態に与える影響に関する研究」に従って実施された。

C. 研究結果

ミトコンドリアDNA(1555A>G多型)の検出において、従来のロシュ製のDNA検出試験紙を用いた場合、野生型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは13mer、変異型検出ビオチンプローブ及び競合プローブは12merの合成オリゴヌクレオチドを用いていた。しかし、第一化学薬品製の試験紙を用いた場合、11~13merのプローブで最も感度良く、特異的に検出できる組合せは、すべてのプローブが12merの組合せであった。同様に、NAT2(*5, *6, *7