

図10. 細菌同定実験結果グラフ化

図1での実験で得られた画像を「誰でもDNAアレイ解析ソフト」を用いて数値化した。この際、それぞれの画像について、ポジティブコントロールプライマー部のシグナル量を1とした相対値を算出した。

グラフの上からも特異的に細菌の検出が行なえたことが確認できた。

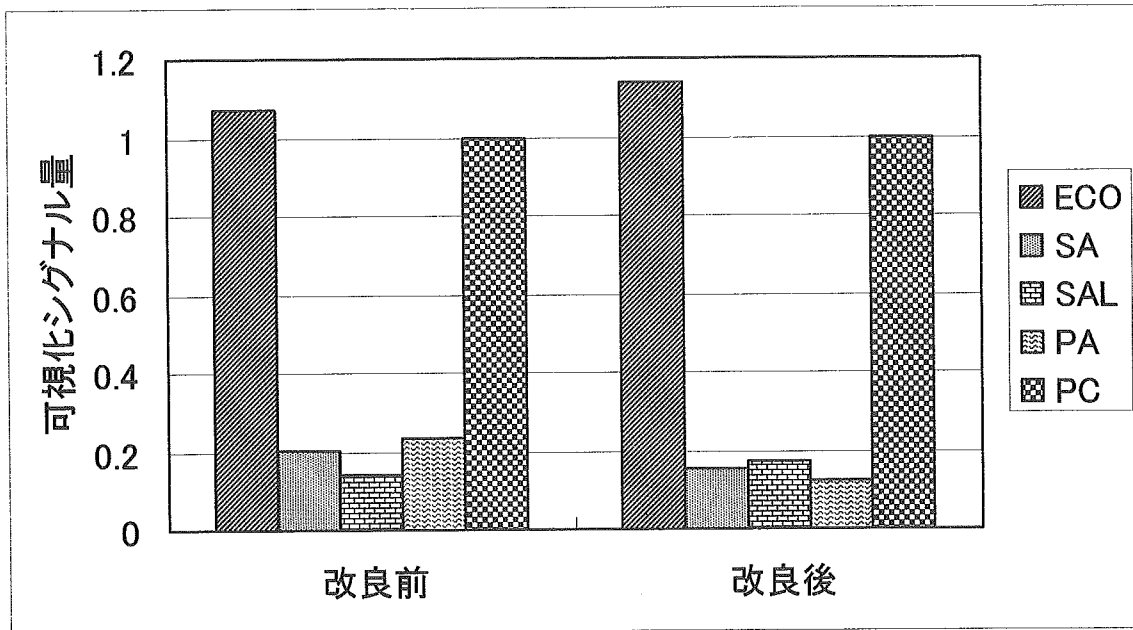


図 1 1. MPE X反応工程簡略化

表 1、2 のとおり、反応工程短縮、洗浄工程簡略化改良検討を行ない、改良前と改良後の比較を大腸菌 PCR 産物を用いて行なった。

工程を簡略化しても反応性、特異性に変化がないことが確認できた。

表 9. MPEX反応工程簡略化

	MPEX伸長反応	洗浄工程	ビオチンアビジン反応	洗浄工程	可視化反応	洗浄工程
改良前	反応時間:90分	3段階洗浄	反応時間:30分	3段階洗浄	反応時間:30分	1段階洗浄
改良後	反応時間:30分	2段階洗浄	反応時間:10分	2段階洗浄	反応時間:30分	1段階洗浄

改良前には約3時間必要であったMPEX反応時間が、検討の結果、1.5時間に短縮できた

表 10. 洗浄工程簡略化

	改良前	改良後
	洗浄液組成/洗浄時間	
伸長反応後 ビオチンアビジン反応後 洗浄工程	2X SSC with 0.1% SDS/1分間 ↓ 0.2X SSC/1分間 ↓ 0.02X SSC/1分間	2X SSC with 0.1% SDS/1分間 ↓ 超純水/1分間

改良前は3段階での洗浄工程であったが、バッファーでの洗浄を見直し、超純水での洗浄に改良を行なった。

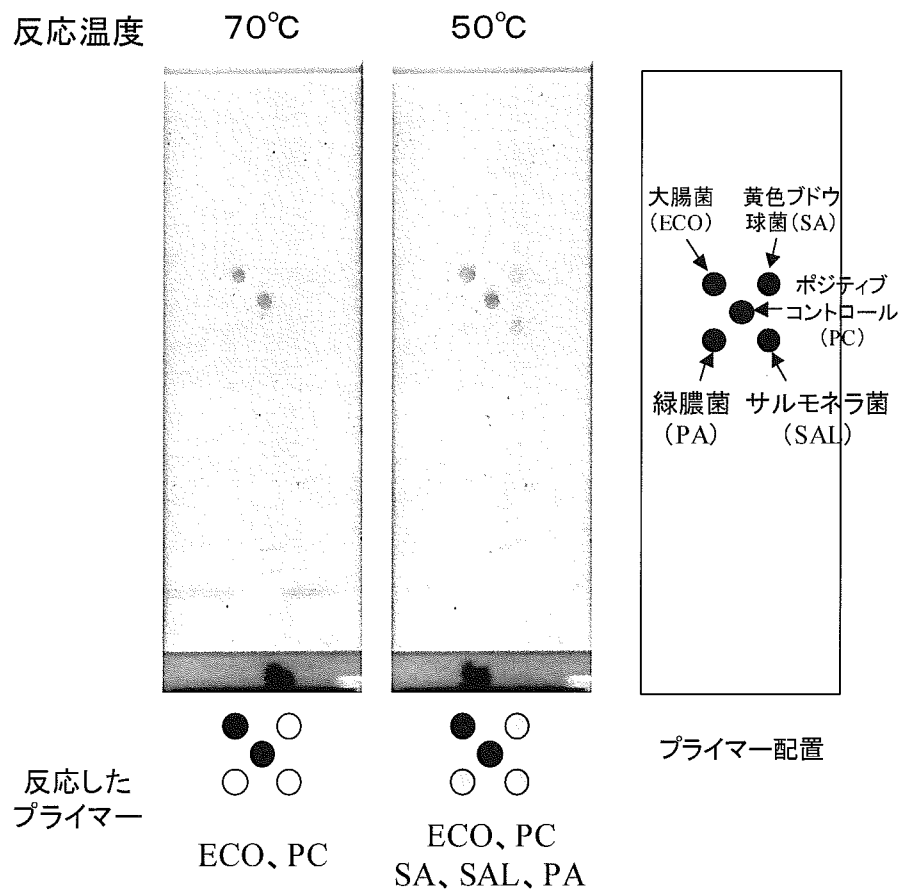


図 1 2. MPEX 伸長反応温度と特異性の関係

大腸菌 PCR 産物をターゲット DNA として、反応温度 70°C と 50°C それぞれで MPEX 反応を行った。

その結果、プライマー T_m 温度近傍である 70°C で反応させた場合には特異性が高かったが、T_m 値より 20°C 低い反応温度 50°C では非特異的な反応が見られた。

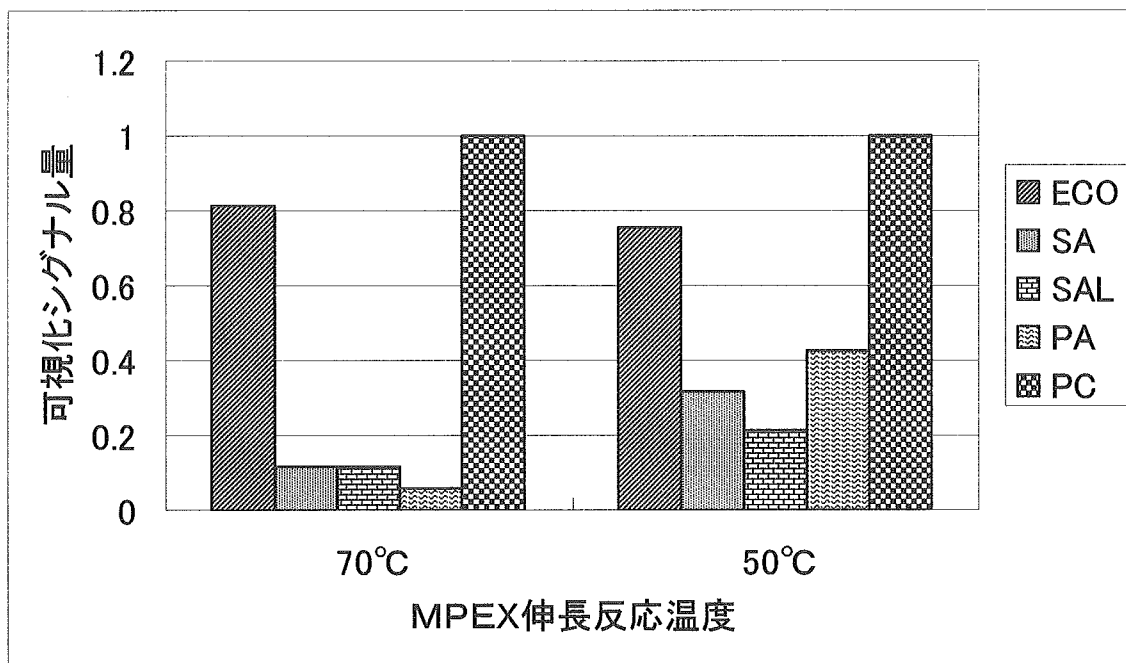


図 1 3. MPEX伸長反応温度と特異性の関係グラフ化

図 1 2 での実験で得られた画像を「誰でもDNAアレイ解析ソフト」を用いて数値化した。この際、それぞれの画像について、ポジティブコントロールプライマー一部のシグナル量を 1 とした相対値を算出した。

グラフの上からも、反応温度は T_m 近傍に設定することが好ましいことがわかった。

MPEX 法による薬剤応答遺伝子の
多型判定法の開発に関する研究

分担研究者

猪子 英俊 東海大学 大学院医学研究科 委員長
同 医学部基礎医学系 学系長
森川 實 ジェノダイブファーマ株式会社
代表取締役社長

研究要旨

本研究の目的は、テーラーメイド医療の現場での使用を念頭においた遺伝子診断法の開発・確立である。初年度では、ある薬剤の効果に支配的に関与するHLAの特定のハプロタイプ同定のための「PCR-SSP法とMPEX法の組み合わせによる簡易診断法」の原型を確立するとともに、MPEX法をヒトDNAに直接適用するための基礎的情報を収集した。

A. 研究目的

1 研究の背景

近年の Pharmacogenetics、Pharmacogenomics による医薬品の副作用や奏功性に関する知見の蓄積により、医薬品投与の個々人での最適化 (personalization) が求められるようになってきている。米国 FDA はこの流れに基づき、治療に対する患者の応答性を予測できる分子診断テストの

適用を加速するために、

Pharmacogenomics に関する二つのガイダンス

① Guidance for Industry
Pharmacogenomic Data Submissions

② Class II Special Controls
Guidance

Document: Drug Metabolizing
Enzyme Genotyping System

および1つのコンセプト・ペーパー

(ドラフト)
Drug-Diagnostic Co-Development
Concept Paper (Draft)
を 2005 年に出している。さらに
Pharmacogenomics の知見に基づき塩
酸イリノテカンやワルファリンカリ
ウム等の添付文書の改訂を 2004 年か
ら 2006 年にかけて行うとともに、そ
れにあわせた遺伝子検査を行うため
にロシュ社の CYP450 AmpliChip、サー
ドウェーブ社の UGT1A1 測定用検査薬
を承認した。

日本でも厚生労働省により 2004 年
6 月に、「ゲノム検査等を利用した臨床
実施及び評価に関する指針の作成」の
ためにパブリックコメントの募集が
なされ、2005 年 3 月には『「医薬品の
臨床試験におけるファーマコゲノミ
クスの利用指針の作成に係る行政機
関への情報の提出について (案)」に
対して寄せられたご意見と当省の考
え方について』としてその結果が公表
されている (2005 年 3 月 18 日 薬
食審査発第 0318001 号)。 日本製薬
工業協会でも「医薬品の臨床試験にお

けるファーマコゲノミクス実施に際
し考慮すべき事項 (案)」を発表しそ
れに関するパブリックコメントの募
集を行った (平成 17 年 7 月 1 日付け
製薬協発第 357 号)。

このように患者個々人の遺伝的背
景に基づく医薬品の投与が求められ
つつあり、医薬品投与の個々人での最
適化が行われれば副作用の低減等
による患者の QOL の向上にもつながるも
のである。しかし現時点での患者個々
人の遺伝的背景の検査 (遺伝子検査)
は、迅速性、簡便性、コスト、正確性、
感度等の面から医療現場での要望に
必ずしも応え切れていない。

2 研究の目的

本研究は、薬剤応答遺伝子の多型マ
ーカー (SNPs) や、疾患感受性遺伝子
の感受性 SNPs 等の遺伝子マーカーを
指標とした遺伝子診断に利用し得る、
「迅速・簡便・安価・正確・高感度」
な遺伝型診断法の開発を目的とする。
住友ベークライトバイオ製品開発プ

プロジェクトチームが開発した、親水性に優れたDNAマイクロアレイ用プラスチック基板を使用した高感度のDNA伸長・増幅方法（MPEX法）を利用することによって、既存の方法の種々の問題を克服し、最終的には、ベットサイド、診療所レベルでのハイスループットの遺伝子検査の実現を目指す。

初年度の計画としては、これまで予備的実験で使用されていた単純な合成オリゴに加え、より複雑な生体サンプルを使用して、住友ベークライト基板上での反応・検出系の条件検討を行い、最低限、反応を「ゲノムの特定領域の増幅」と、「増幅産物の住友ベークライト基板上での検出」の二過程に分けたアッセイシステムの確立を目指すと共に、住友ベークライト基板のメリットを最大限生かした、より簡便な方法の開発のための予備的・基礎的データを収集することに重点を置く。また、ある薬剤の効果の指標となるという情報を我々が既に得ている「HLAの特定のハプロタイプ」を主な対象として、一般的な方法論の確立のみなら

ず、実際にこの薬剤の効果の予測に有用なアッセイ系の開発を併せて行う。

B. 研究方法

1 DNA試料

タイピング法の検討に用いた血液試料よりのDNA抽出・精製は、QIAGEN社のQIAamp DNA Blood Mini kitを用いて行った。DNA濃度の測定はMolecular Probe社、PicoGreenを用いた。

2 SNP解析

モデル試料セット作成の為のSNPタイピングは、GSL社のジェノサーチHLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-DRB1 kitをそれぞれ使用し、蛍光プローブSSO (sequence specific oligonucleotide) 法にて行った。今回用いたLuminex法は、2種類の蛍光物質により100種類の色調となるポリスチレンビーズ表面に配列特異的オリゴプローブを固相した蛍光ビーズを、ビオチン標識したPCR産物とハイブリダイゼーション(ABI社Geneamp9700遺伝子増幅装置を用いて、95℃、2分変性

処理後、52°C、60分)させ、ストレプトアビジン標識フィコエリスリン反応(ABI社Geneamp9700遺伝子増幅装置を用いて、52°C、5分)させた後、2種類の検出用レーザーを有するLuminex測定装置にて、ビーズ表面の蛍光色素を判別し、遺伝子多型を判別する方法である。また、SNPのアリルは、PCR産物をQIAGEN社のQIAquick PCR Purification kitを用いて精製し、Applied Biosystems社のBig Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction kit v3.1およびApplied Biosystems社の310 Genetic Analyzerを用いた塩基配列決定によって確認した。

3 PCR反応・MPEX反応

チューブを用いてのPCRには、ABI社Geneamp9700遺伝子増幅装置を用いた。ゲノムDNAサンプルを用いたPCR反応は、50 μ lで行い、反応液は、鋳型DNA、各DNA polymerase専用の1x Thermophilic DNA Polymerase緩衝液、0.4 mM dNTPs、各0.2 μ M プライマー、耐熱性DNA Polymeraseから構成される。

血液試料を用いたPCR反応は、50 μ lで行い、反応液は、新鮮血液 1 μ l、各DNA polymerase専用の1x Thermophilic DNA Polymerase緩衝液、0.4 mM dNTPs、各0.2 μ M プライマー、耐熱性DNA Polymeraseから構成される。PCRの反応条件の詳細については、結果参照。また、スライドチャンバー形状のMPEX基板上での反応は、ハイブリダイゼーションオープン、または、in situ PCRチャンバーを用いて行った。反応には、以下にあげる耐熱性DNA Polymeraseの何れかを用いた：ABI AmpliTaq (Applied Biosystems社製)、LA Taq (タカラバイオ株式会社製)、Z-Taq (タカラバイオ株式会社製)、EX Taq (タカラバイオ株式会社製)、Bst DNA Polymerase (New England Biolabs社製)。MPEX反応は、80 μ lで行い、次のものから構成した：鋳型DNA、1x MPEXバッファー、1x Thermophilic DNA Polymerase緩衝液(使用した酵素によって異なる)、0.01 mM biotin-dUTP、0.01 mM dATP、0.01 mM dCTP、0.01 mM dGTP、耐熱性DNA Polymerase。また、基板に固定するプライマーは、5'末

端をアミノ化したものを用いた。プライマーの基板への固定は10 μ M プライマーを基板表面にスポットし、80°C、1時間保温した後、アルカリ処理および洗浄、乾燥にておこなった。

4 プライマー設計

PCR-SSP (PCR with Sequence-Specific Primers) 法に用いたプライマーは、HLAの塩基配列データベースをもとに、すべて、SNPの位置がプライマー3'末端になるように設計した。プライマーの T_m 値は、Nearest Neighbor法によって算出した。

5 PCR産物、MPEX反応生成物の検出

PCR産物の検出は、1.5% アガロースゲル泳動、エチジウムブロミド染色によった。またbiotin-dUTP標識されたMPEX反応生成物の検出は、発色反応によった。具体的には、MPEX反応後、Streptavidin-アルカリフォスファターゼの結合(37°C、30分)、NBT/BCIPとの反応(37°C、30分)を行った後、発色像をデジタルカメラにて撮影した。

6 倫理面への配慮

本プロジェクト推進にあたり、分担研究機関である東海大学の医の倫理委員会/臨床研究審査委員会に対して、研究課題「HLA領域におけるゲノム多様性を簡便に検出する技術の開発研究」を申請し、血液採取ならびにヒトゲノム・遺伝子解析研究計画が承認され、また分担研究機関であるジェノダイブファーマ株式会社においては、ヒトゲノム・遺伝子解析研究に対して、前述の研究計画が同社倫理審査委員会にて審議され、承認されている。

C. 研究結果

1 タイピング用モデルサンプルセットの作成

ある薬剤の効果の指標となるHLAの特定のハプロタイプの検出を目的としたタイピング用モデルサンプルセットを作成するため、計17人の血液試料を採取し、蛍光プローブSSOによって計8個のSNP (図1A) のアリルを決定した。さらに、各サンプルのアリル

をSequencingによって確認し、各SNPに対して、陽性型サンプルと、陰性型サンプルを準備した。

2 PCR-SSP法によるアリル判定

図1Aに示した8個のSNPの組み合わせによるPCR-SSP (PCR with Sequencing-Specific Primers) 法を行うために、8種のプライマーを用意し、計5種の組み合わせによってPCR反応を行った。図1Aの1-8の各プライマーの3'末端は、SNPの位置に一致しており、さらに、「薬剤効果の指標となるHLAの特定のハプロタイプに見られるSNPアリル」に適合するように設計した。PCR反応には、本研究室で日常的に使用しているAmpliTaqを用い、また、反応は、段階的タッチダウン法によった(図1C参照)。図1Bは、PCR産物をアガロースゲル電気泳動にて分離した後の、エチジウムブロミド染色像を示す。図上部に示した各プライマー対に対して、プライマー3'配列に適合するSNPアリルを持つゲノムDNAサンプル(図1Bの+印のサンプル)、或いは、適合しないSNPアリルを持つ

ゲノムDNAサンプル(図1Bの-印のサンプル)を用いたが、予想通り、適合DNAサンプルの場合にはPCR産物が検出されるが、不適合DNAサンプルの場合には、PCR産物が検出されなかった。また、各々のPCR産物のサイズは、想定したものとよく一致した。さらに、ここで得られたPCR産物を用いて塩基配列を決定し、データベースを用いて解析を行った結果、それぞれのPCR産物は、各SNPアリルを持つことを確認できた。従って、これらの5種類のプライマー対によって、薬剤の効果に支配的な影響を及ぼす特定のHLAハプロタイプを、PCR-SSP法によって容易に判定することが可能になった。この方法の特徴は、PCRに使用する順、逆プライマー対の双方ともが、特定のアリルに特異的になるようにデザインしている点であり、通常PCR-SSP法(一方のプライマーだけを特定のアリルに特異的に設定する)の場合に問題となる「ミスプライミングや、PrimerのExonucleolytic Cleavageによる非適合アリルの増幅」に起因するミスタイ

ピングを、事実上回避することができる。

3 PCR反応時間の短縮

上述のAmpliTaqによるPCR全反応の終了には、約2時間を要する。そこで、PCR反応時間の短縮のために、PCR反応サイクルや、使用酵素の検討を行った。図2にその例を示したが、左側は、重合速度が通常の耐熱酵素の5倍以上高いことが知られているZ-Taq（タカラバイオ株式会社製）を用い、また、右の例では、LA Taq（タカラバイオ株式会社製）を用いた。これまでのところ、1時間程度の反応時間で、双方ともに良好な増幅が見られており、より温度変化が迅速な最新型のPCR機器（ABI9800他）を用いることで、反応時間をさらに短縮することが可能であろうと考えられる。

4 血液試料を用いたハプロタイプ判定法の確立

上で確立したPCR-SSP法によるハプロタイプ判定法を、血液試料を用いて（即ち、DNAを精製すること無しに）

行うことを想定し、血液サンプルの処理、及び、PCR条件について検討した。反応条件は、基本的には図2に順じ、PCR反応液には、血液中のPCR阻害物質を中和することが知られているAmpdirect Plus（島津製作所）を添加した。また、耐熱性酵素としては、Z-Taq、LA Taq、NovaTaqを用いた。その結果、Ampdirect Plusは、血液試料を直接PCR反応に用いる上で、極めて有効であることが明らかとなり、また、耐熱性DNA Polymeraseとしては、NovaTaqを用いた場合に、最も安定した、信頼性の高い結果が得られることが判明した。図3には、血液試料の、Ampdirect Plus/Novataqの組み合わせを用いたPCRの例を示したが、特定のHLAハプロタイプの同定に必要・十分である5種の各プライマー対セットの各々のプライマー対で、良好な増幅を得ることができた。考察の項でも議論するように、現在のところ、PCR-SSP法は温度サイクルを用いた反応を行っており、医療現場等への直接の適用は、正確・迅速な温度変化が可能である機器（サーマルサイクラー）

が高額であるために、場合によっては困難であると考えられる。しかしながら、一定温度での遺伝子増幅法が既に種々報告されており、一定温度での反応には高額機器は必要とされない。従って、これらの一定温度増幅法を、既に確立した「Ampdirect Plusを用いた簡便・迅速なPCR-SSP法」に取り入れることを計画しており、SNPアリル特異的プライマーを用いた「遺伝子増幅過程」を、より安価・簡便な機器で行うことは充分可能であると考えている。

5 MPEX法によるPCR産物の特異的検出

ベットサイド、診療所レベルでも使用可能な、即ち、ゲル泳動等を使用しないアッセイ開発の第一段階として、上で確立した「血液試料を用いたPCR-SSP法によるハプロタイプ特異的DNA増幅反応」からの増幅産物を、住友ベークライト基板上でのMPEX法によって検出する条件の検討を行った。PCR-SSP法によるPCR産物検出のための他の簡便法としては、サイバークリ

ーン等を用いたインターカレーターによるDNA 2重鎖の特異的染色を用いることも考えられる。しかしながら、特に高信頼性を要求される医療現場においては、PCR産物のIdentityも併せて確認できる方法が望まれ、MPEX法を用いるメリットは大きい。また、MPEX法によって、PCR産物のIdentityのみならず、プライマー3'末端配列の一致・不一致によるSNPのアリル判定も同時に行うことを計画しているが、これについては、後段（考察）に述べるように、より簡便なアッセイの開発とともに、次年度以降本格的に検討する計画である。

MPEX法の概念的模式図を図4に示したが、基本的には、基板に固定したプライマーよりの、プライマー伸長反応である。伸長反応における基質にbiotin-dUTPを添加することによって、伸長鎖をBCIP/NBTの発色反応によって検出した。MPEX法によるPCR産物の同定・検出法を検討するに当たり、当初は、基板上で、通常のPCRに用いる2段階温度サイクルを用いての条件検討を行ったが、利便性を考慮すると、

一定温度での反応がはるかに有利である。住友ベークライト社から、MPEX法による効率的な一定温度でのシグナル検出が可能との情報も得ていたため、一定温度でのMPEX反応によるPCR産物の検出を試みた。プライマーの T_m は、当初、通常のゲノムDNA PCRにも適した 60°C に設定したが、明らかな非特異的シグナルが見られたために、 T_m 65°C に設定したものをを用いた。図5は、プライマー3と5によるPCR産物のMPEX法による検出実験の例を示しており、MPEX反応は、 65°C で90分間行い、その産物をBCIP/NBT染色によって可視化した。DNA Polymeraseとしては、種々の酵素を検討した結果、最も安定して高効率の活性を示したEX Taq (タカラバイオ社製)、さらに、強いStrand Displacement活性を持つBst DNA Polymerase (New England Biolabs社製)を用いた。基板上には、プライマー1、2、3、5、6、7の何れかを固定したが、どちらのDNA Polymeraseを用いた場合でも、MPEXシグナルはプライマー3とプライマー5のスポット上にのみ検出されており、他のプライマー

上にMPEXシグナルが検出されることは無かった。従って、MPEX法を用いることによって、一定温度の単純な反応により、簡便にPCR産物を同定・検出することが可能となった。

6 PCR-SSP/MPEX反応によるHLAハプロタイプの判定

初年度のモデル SNP セットとしては、先に述べたように、ある薬剤の効果に支配的に関与する HLA の特定のハプロタイプ同定に必要な・十分な 8 個の SNP を選んで、条件検討を行って来たが、ここでは、この 8 個の SNP に選択的なプライマーセットによる PCR 産物を、MPEX 法を用いて特異的に同定できるかを検討した。図6にその結果の一例を示したが、PCR産物としては、上から順に、プライマー1/2による産物、プライマー3/5による産物、プライマー4/5による産物、プライマー6/8による産物、プライマー6/7による産物を基板に加えてMPEX反応を行った。何れの場合も、用いた基板には、1-8の全てのプライマーを個別にあらかじめ固定した。プライマーの T_m は何れも

65°Cに設定し、また、反応温度については、住友ベークライト社より、プライマーTmより5°C高い反応温度において最も良好な特異性が得られるとの情報を得たため、70°Cに設定し、90分間、一定温度でMPEX反応を行った。用いるDNA Polymeraseについては、70°Cでも良好な反応性を示すEX Taqを用いた（Bst DNA Polymeraseの場合は、至適温度が65°Cであるため、ここでは使用しなかった）。

図6最上部パネルは、PCR Product 1/2を反応に加えた場合を示すが、プライマー1のスポット上、及び、プライマー2のスポット上にのみシグナルが検出されるが、他のプライマーを基板に固定した場合には、産物は検出されない。さらに、プライマー1か2を固定した基板上（図6の各パネルの左端の2スポットに対応）に、PCR Product 1/2以外のPCR産物を反応に加えた場合でも、シグナルは検出されない。従って、ここで設定した条件でのMPEX反応では、適合するプライマーとPCR産物の組み合わせでのみ効率的なDNA鎖伸長が起こることが明らかである。

さらに、PCR Product 3/5の場合（上から2番目のパネル）、PCR産物の内側に対応するプライマー（プライマー4）でもシグナルが検出でき、同様に、PCR Product 6/8の場合（上から4番目のパネル）にも、内側に対応するプライマー（プライマー7）でシグナルが検出される。このPCR産物の内側に対応するプライマーによるPCR産物の同定は、アッセイの第一段階であるPCR-SSP法によって非特異的な産物（プライマーダイマーや、標的領域以外の増幅産物）が生じた場合にも、特異的なPCR-SSPの産物と区別できる点で有用であると考えられる。

D. 考察

本研究は、遺伝子診断に基づくテーラーメイド医療を念頭に置き、診療所やベッドサイドレベルでの「簡便・迅速・安価・正確」なハイスループットの遺伝子検査法の開発を目指すものである。初年度では、これまでは手付かずであった「複雑な生体サンプルへのMPEX法適用の為の基礎的情報の収集」とともに、「特定の薬剤に対する

効果の遺伝的指標として有用である」という情報を我々が既に得ている

「HLAの特定のハプロタイプ」の同定法を実際に開発・確立することを目標として実験を進めた。その結果、PCR-SSP法とMPEX法の組み合わせによるHLAハプロタイプ判定法の原型を完成することができた。この、PCR-SSPの増幅段階と、MPEXによる検出段階からなる2段階法については、各過程のさらなる改良は必要であるが、基本的には、製品化までを視野に入れた展開が既に可能であると考えられる。一方、MPEX法が持つ潜在的な可能性の具現化という点では、「複雑な生体サンプル」を用いた場合の様々な反応パラメターの検討等、系統的、網羅的な解析によって「可能性と限界」を見極めるには至っておらず、これについては、次年度の中心課題として認識している。以下、ヒトゲノムDNA（或いは、血液試料）を出発点とした遺伝子診断法の開発に向けて、2段階法（DNA増幅段階と検出段階を別過程で行う）、及び、1段階法（DNA増幅と検出を併

せて行う）に分けて具体的な考察を加えたい。

1 2段階（DNA増幅段階と検出段階）法

まず、2段階（DNA増幅段階と検出段階）法の第一段階である増幅段階に関して、診療所レベルでの機器設置を念頭に置いた場合、従来の、温度サイクルを用いるPCRではなく、より簡便な一定温度増幅法の採用が望ましい。幸い、既に一定温度遺伝子増幅に関しては、LAMP法（Loop-Mediated Amplification）や、HDA（Helicase-Dependent Amplification）、Rolling Circle法を初めとして、種々考案されており、これら方法の原理をPCR-SSP法に応用することによって、増幅段階の一定温度化は可能であると考えている。

さらに、後段に述べるように、2段階目の「MPEX法によるPCR産物の同定」に関しては、SNPのアリル特異的な検出を視野に入れており、それが可能な場合には、1段階目の増幅段階として

PCR-SSP法を用いる必要性は無くなり、単純なDNA増幅だけが必要とされる。その場合には、プライマー設定の自由度が飛躍的に増大するので、より汎用的なアッセイの開発が可能になろう。

次に、2段階目の検出段階であるが、既に、特定のPCR産物の特異的検出に成功しており、今後は、1段階目で増幅したサンプルを用いた、「SNPのアリル特異的検出」を実現したいと考えている。本来MPEX法は、プライマー伸長による鋳型の直線的増幅に依存する。従って、伸長産物が、その後の反応の鋳型となって増幅するPCR反応に比較して、Sequence-Specific Primerによるアリル判定に関しては有利であると考えられる。しかしながら、PCR同様、Misincorporationや、プライマー3'末端のNucleolytic Cleavageに起因するミスタイピングの可能性も考えられる。そのようなミスタイピングの可能性を最小限に留めるためには、PCR-SSP法で既にその効果が明らかにされている種々の方法（修飾ヌクレオチドの導入、プライマー内の

SNPの位置の変更、用いるDNA Polymeraseの検討等）を導入する計画である。

2 1段階法

本研究は、実際の医療現場における遺伝子診断での実用を目指したものであり、DNA増幅と検出を併せて行える、より簡便な1段階法の開発が期待され、1段階法によるアリル特異的なSNP判定の実現が理想である。実際、MPEX法は、合成オリゴを用いた単純な実験系においては、濃度がfMレベル（ヒトゲノムDNA 約2 ng/ μ l溶液中のシングルコピー遺伝子の濃度に相当）の標的分子の検出が可能であり、PCRに比肩し得る感度を持つとされている。従って、基本的には、通常のPCR反応に用いるものと同様のサンプルを用いたシングルコピー遺伝子の検出が可能であることが期待されるが、これまでのところ、ゲノムDNAを直接MPEX反応に用いた場合、特異的シグナルの検出には成功していない。合成オリゴを用いた単純な反応系に比較して、実際のゲノムDNAを用いた場合に

予測される問題点は、(1) 複雑な配列を持つDNAの集合体中で、如何に特定の標的に対する特異性を保証し得るか、さらに、(2) 標的以外のDNA分子が大過剰に存在するための反応効率の低下を如何に克服するか、の2点である。これらの問題点を踏まえつつ、以下に、次年度で検討する予定である項目を列挙する。

a. 検出法

現在までは、主に、BCIP/NBT法による発色反応によってMPEX反応生成物を検出している。しかし、発色反応は一般的に高感度とは言えず、また、ダイナミックレンジも比較的狭い。従って、今後は、より高感度、かつ、広いダイナミックレンジを有する「蛍光基質を用いた検出法」や、「化学発光法」に転換する必要がある。

b. プライマー設定

通常のPCR反応では、反応の特異性は順方向、逆方向の2種のプライマーの配列によって保証されるが、MPEX反応では、特異性を規定するのは1種類の

プライマーのみであり、特にゲノム等の複雑なサンプル中での特異性の維持は、困難が予想される。従って、(i) 通常のゲノムPCR用に比較してより高い T_m を設定する、(ii) プライマーと標的DNAのハイブリダイゼーションの特異性を上昇させる添加物の付加 (Stratagene社製 PCR Enhancer等)、(iii) ハイブリダイゼーションの特異性を増加させるようなプライマーDNAの修飾等の検討を行う予定である。また、下にも述べるように、基板上で、順、逆の2種のプライマーによる増幅を行う可能性も検討しており、この場合には、PCRと同等の特異性が期待されるので、特異性の問題は解消すると予想される。さらに、SNPのアリル判定を可能にする為には、上述の2段階法での「SNPのアリル特異的検出」の項で既に述べたと同様の検討を行う計画である。

c. プライマー伸長鎖と鋳型鎖の解離

MPEX反応では、基本的には、標的となるゲノムDNAは、一度プライマーにアニールし、DNA伸長の鋳型として機能

した後は、プライマー伸長鎖との2本鎖として留まると考えられ、再度、同一の鋳型鎖が、別のプライマー分子の鋳型としてどの程度効率的に機能し得るかは疑問である。しかしながら、既に、一定温度増幅法である Helicase-Dependent Amplification 法では、DNA Helicaseを添加することによって、通常必要な熱変性のステップを用いることなく、この問題をある程度克服している。従って、Helicase-Dependent Amplificationの条件を適用することによって、鋳型DNAと伸長鎖の解離が促進される結果、同一の鋳型分子が複数回の伸長反応に効率的に寄与することが可能となり、一定温度でのMPEX反応シグナルの増加が期待される。ただし、Helicase-Dependent Amplificationの方法自体が、未だ、酵素の由来（種類）や、反応条件等について、至適化されているとは言い難く、我々独自に仔細な条件検討を行う必要があると考えている。

d. 基板上での他の方法によるDNA増幅

反応の特異性と効率の問題を克服する一つの手段として、MPEX反応以外のDNA増幅反応を基板上で行う可能性が考えられる。一定温度での反応で、十分な特異性と増幅効率が達成される可能性がある方法としては、先にあげたLoop-mediated Amplification (LAMP法)、Helicase-Dependent Amplification (HAD法)、Rolling Circle Amplification (RCA法)等が既に報告されている。住友ベークライト社の基板の特性の一つは、基板の性質が様々な生化学的反応や、ハイブリダイゼーションに適している点であり、MPEX法の進展状況によっては、基板上でのこれら他の一定温度DNA増幅反応を行うことも、併せて検討することが必要であろう。

E. 結論

初年度では、ある薬剤の効果に支配的に関与するHLAの特定のハプロタイプの同定を具体的な課題として、血液試料を用いての、PCR-SSP法による特定の標的領域の選択的増幅と、その産物の、MPEX法による検出の2過程から

なるハプロタイプ判別法の原型を確立した。この方法については、比較的早期に、実際の医療現場での使用を視野に入れた展開が期待できるので、次年度では、さらに、住友ベークライトの基板やMPEX法の潜在的な可能性を最大限に利用した、より簡便・迅速・安価・正確・高感度・ハイスループットな方法の開発に注力する計画である。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

平成17年度の出願および登録なし

2. 実用新案登録

平成17年度登録なし

3. その他

17年度の意匠等の出願および登録なし