

本サーマルサイクラー用基板の設計のため、形状検討基板を試作した。スライド状基板の切削加工によりウェル開口部となる窓を形成した基板を作製し、一方、ウェルの底部を形成するフィルムを張り合わせたウェル基板を試作した。

フィルムは、 $100\mu\text{m}$ 、 $200\mu\text{m}$ 、 $500\mu\text{m}$ の厚さのものを用いた。熱伝導性は、 $100\mu\text{m}$ のものが良好であり、ヒートブロックの温度への追随性は高かった。

スキャナーでのスポットの検出状況はウェル厚みが $100\mu\text{m}$ のものが良好であった。

以上の結果を踏まえて、射出成形による基板の作製の検討にあたり、ウェル底部の厚みは $100\mu\text{m}$ を目標とすることとした。

1-3-5. PCR&MPEx法用基板の射出成形検討

図22の基板設計に基づき、射出成形用の金型を作製した。基板には、耐熱性、低蛍光性、透明性が必要なことから、COC（飽和環状ポリオレフィン系樹脂）を使用することとした。基板の成形の結果、ウェル底面が 0.1mm の厚みでは、ウェル底面への樹脂の充填は全く不可能であった。

ウェル底面への樹脂の充填を改善するため、ウェル底面厚みを 0.2mm に変更し、成形を行ったが、ウェル底面へ樹脂の充填は可能となったが、ウェルドの発生による、ウェル底面の穴の発生が見られた。また、ウェル底面の歪みも発生しており、蛍光マイクロレイスキャナーによる検出も困難であった。

ウェル底面のウェルドの発生を抑えるべく、基板のウェル近くのデザインを変更し、ウェル底部への樹脂の流れを優先するよう

細工を行った結果、ウェル底面でのウェルドの発生はなくなった（図23）。また、ウェル底面の歪みもなくなり、蛍光マイクロレイスキャナーによる検出も可能となった（図24）。

1-3-6. 射出成形基板による基板上PCR&MPEx法検討

まず、ヒートブロックの設定温度と、加熱時間と実際の基板上液相温度の測定を行い、目標とするヒートサイクルが得られるかを確認した。ウェル内にPCR用溶液を満たし、ウェル内に熱電対を挿入しウェル上部から、PCR用のフィルムシールを貼付し、ウェル内の液中の温度変化を測定した。ヒートブロックの設定温度と実際の液相温度では、 20°C 程度の差があることがわかった。この差を保つことにより、PCRに必要なヒートサイクルを確保できることが判った。

温度サイクルでの再現性は、10ヒートサイクルずつ5回のヒートサイクルにより、温度変化の再現性をみたが、高い温度サイクルの再現性を確保できていることを確認した（図21）。

(2) 遺伝子増幅の確認

ヒトALDH2を組み込んだプラスミド（提供：東京家政大学藤森准教授）を用い、遺伝子増幅実験を実施した。PCR溶液をウェル中に充填した後、溶液の漏れ防止のためPCR用シールフィルムを基板ウェル部分に貼付し、基板用サーマルサイクラーにセットし、ヒートサイクルを付与し、基板上PCRの進行状況を確認した。

ヒートサイクル条件により、遺伝子増幅の度合いは異なるが、遺伝子の増幅を確認した（図25）。

(3) 遺伝子検出性の評価

基板上PCR&MPEx法によるSNPs検出性の検討を、上記ヒトALDH2プラスミドを用いて実施した。

基板上に、図26に示すような位置でALDH2の野生型(-/-)および変異型(+/-)検出のためのプライマーをポットし固定化した。

上記ヒートサイクルと同じ条件により、基板上PCR&MPEx法を実施し、SNPsの検出状況を確認した。図27に示すように、各々のSNPsについて特異性のある検出が出来ていることを確認した。

1-3-7. 操作性改善基板の検討

(1) 基板の作製

上記のように、PCR溶液をウェルに充填した後、PCR用フィルムシートを貼付する方法では、フィルムシール貼付の際ウェル中に気泡を巻き込みやすく、気泡の混入によると思われる、遺伝子増幅反応の阻害が確認されていた。また、フィルムを貼ることは、検査における操作性も悪いことから、図28に示すような、基板本体とウェル上カバーを作製することとした。基板本体とカバーが嵌合する構造とし、嵌合部には、シリコンゴムを導入し、基板本体とカバーを接着させる構造とした。基板の作製は、COC樹脂製の1mmのスライド基板に切削加工を施すことにより作製することが出来た。

基板本体とカバーをシリコンゴムにより接着後、溶液注入口から溶液を注入充填し、注入口をシールにより塞ぎ、サーマルサイクラーにてヒートサイクルを付与し、溶液の漏れの有無等を確認した。

ヒートサイクル時の溶液の漏れも観察さ

れずまた、気泡の混入及び発生も観察されなかった。また、反応後カバーの分離及び離脱も容易であり、カバーを外して蛍光スキャナーによるスポットの検出も容易であった。

(2) 遺伝子検出性の評価

上記と同様に、ウェル内にヒトALDH2検出用野生型および変異型各々のプライマーをスポットし固定化した後、基板本体にカバーを嵌合シリコンゴムにより接着した。同様にして基板用サーマルサイクラーにより、ヒートサイクルを付与し、基板上PCR&MPEx法によるSNPsの検出を行ったが、射出成形による基板に比較し、シグナルが弱い、特異的にSNPsの検出を行うことができた(図30)。

1-4. MPEx法の応用によるマイクロサテライト検出検討

表16に記載するようにリガーゼによる連結反応を60℃にて行った。4塩基繰り返しマイクロサテライトの検出では、正解となる6回の繰り返しに設定したプライマーのスポットが、際立って高いシグナル値を示し、特異的にマイクロサテライトの検出が出来た(図32)。

2塩基の繰り返しのマイクロサテライト検出においても、上記4塩基と同じ表16に記載するリガーゼ反応条件で、検出を検討したが、正解となるをプライマーから特異的まシグナルを得ることは出来なかった(図33)。リガーゼに耐熱性のものを用いて、高温度(95℃)から徐々に温度を下げ、80℃にてリガーゼ反応を行う条件を設定することにより、かなり改善されたシグナルを得ることが出来た(図34)。さらに、リガーゼ反応を行う前(リガーゼ溶液を添加する前)に

ハイブリダイゼーションの工程を設けることにより、一層改善されたシグナルを得ることが出来た (図 3 5)。

2. 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

2-1 PCR-SSP 増幅産物を鋳型にした SNPs 検出による DNA タイピング

2-1-1. PCR-SSP 法における特異性の検討

8 個の SNP をタイピングするために、8 種のプライマーを用意し、5 種の組み合わせ (1/2、3/4、3/5、6/7、6/8) によって PCR-SSP 反応を行った (図 4 2)。

増幅産物を電気泳動にて確認したところ、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(+)では、PCR 産物が検出されるが、適合しない SNP アリルを持つゲノム DNA サンプル(-)では、検出されなかった。また、各々の PCR 産物のサイズは、予想されるものと一致した。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。

2-1-2. MPEX 反応による SNPs 検出

8 種類のオリゴ DNA を固定化させたプラスチック基板上において、5 種類の PCR-SSP 増幅産物を鋳型にした MPEX 反応をおこない、SNP 検出の特異性を検討した (図 4 3)。最上部パネルは、PCR Product 1/2 を鋳型にした検出結果を示しており、プライマー1 およびプライマー2 のスポット上にはのみシグナルが検出され、他のプライマー上にはシグナ

ルが認められなかった。また、PCR Product 1/2 以外の PCR 産物を鋳型にした場合、プライマー1 およびプライマー2 のスポット上にシグナルは検出されなかった。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となった。

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た。

2-2. PCR 増幅産物を鋳型にした SNPs 検出による DNA タイピング

2-2-1. 関節リウマチ感受性 SNPs の SNP アリルの検出法の検討

(1) 関節リウマチ感受性 SNPs の選定

これまでに報告されている 12 遺伝子、46 候補領域の中から、Pc 値と Odds 比を考慮して 5 SNPs (rs2269428、rs3219185、rs204999、rs2071283、rs2071284) と HLA-DRB1*0405 遺伝子を選択した (表 1 8) (Tamiya, G *et al. Hum. Mol. Genet.* 14, 2305-2321, 2005.)。

(2) PCR 反応

使用する DNA 試料は、始めに TaqMan ア

ッセイ法または塩基配列決定法により SNP アリルを決定し、各 SNP における 3 種類の SNP アリル (アリル 1 のホモ型、アリル 1 とアリル 2 のヘテロ型、アリル 2 のホモ型) を偏りなく総計 24 検体採取したものである (表 2)。表 1 に示した 5 SNPs について、MPEX 反応の鋳型となる PCR 産物を得るためにそれぞれ PCR 反応をおこなった。近傍に位置する rs2071283 と rs2071284 においては、2 SNPs を含んだ領域を増幅させるプライマーを用いて PCR 反応をおこなった。プライマーの Tm 値が、Nearest Neighbor 法で 64°C 近傍になるように PCR プライマーを設計した。得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであること (図 4 4)、さらにリアルタイム PCR 法における Dissociation curve 解析により非特異的な増幅はないことを確認した (data not shown)。

(3) MPEX 反応による SNP アリルの検出

MPEX プローブは、Nearest Neighbor 法で Tm 値が 64~67°C になるように設計し、5 SNPs 検出用のそれぞれの対応プローブを全て同一基板上に固定した。そして、鋳型として各 SNP を含んだ 4 種類の PCR 産物 (rs2269428、rs3219185、rs204999 および rs2071283-rs2071284) を等量ずつ加え、同一基板上で 5 SNPs の MPEX 反応をおこなった。各 SNP において得られたシグナル強度から SNP アリルを決定した (図 4 5)。5 SNPs において、それぞれホモ型とヘテロ型の計 3 種類の SNP アリルに相当するシグナル強度比が得られた。24 検体すべてにおいて、MPEX 法を用いて得られた 5 SNPs のそれぞれの SNP アリル判定結果は、TaqMan アッセイ法または塩基配列決定法により決定された SNP アリルと一致していた。さらに、

それぞれの SNP アリル由来のシグナル強度を 2 次元グラフ上で一点として表した散布図を作成すると、各スポットが 3 種類の SNP アリルに対応する 3 つのクラスターに分けられた (図 4 6)。3 つのクラスターの境界がはっきり識別できる SNP については、SNP アリル検出の精度がより高く、一方境界が隣接するまたは重なるような SNP においては、誤判定を引き起こす可能性があると考えられる。本実験では、rs2071284 を除く 4 SNPs において、クラスターの識別が比較的明瞭であることから、設計した MPEX プローブは特異的であり検出系は有用であると考えられる。一方、rs2071284 については、検出精度のさらなる向上を目指し、G アリルまたは A アリル陰性におけるバックグラウンドのシグナル値を抑えるような MPEX プローブの改良の必要性が示唆された。

2-2-2. 関節リウマチと関連する HLA-DRB1*0405 遺伝子の検出法の検討

(1) PCR 反応

使用する DNA 試料は、始めに HLA タイピング法により HLA-DRB1 アリルを決定したものである (data not shown)。PCR プライマーは、Tm 値が、Nearest Neighbor 法で 63~65°C になるように設計した。29 検体全ての HLA-DRB1 アリルにおいて、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであり、その他の非特異的増幅がないことを確認した (図 4 7)。

(2) MPEX 反応での HLA-DRB1*0405 遺伝子の検出

MPEX プローブは、Nearest Neighbor 法で Tm 値が 66~70°C になるように設計した。多型性に富む HLA-DRB1 遺伝子のエクソン 2 領域内において、3 カ所の SNPs

[(G/A)(T/A)(T/A)] をそれぞれ検出し、[(G)(T)(T)]の SNP アリルが陽性である場合に HLA-DRB1*0405 遺伝子陽性であると判定した (図 4 8)。MPEX 反応において得られた各 SNP アリルのシグナル強度比より、3 SNPs のそれぞれの SNP アリルを決定した。この MPEX 反応で得られた SNP アリルの組み合わせ結果とタイピング法で既知の HLA-DRB1 アリルより予測される SNP アリルの組み合わせを比較することで、各 MPEX プローブの特異性について検討した。その結果、本実験で用いた DNA サンプルにおいて、3 カ所の SNPs の SNP アリルが、[(G)(T)(T)]の組み合わせが陽性のサンプルは、全てタイピング結果において HLA-DRB1*0405 陽性であった。しかしながら、一部の DNA サンプルにおいて、図 4 8 に示した DRB1*0405, DRB1*1501 のように、HLA-DRB1 アリルがヘテロであり、SNP アリルのシグナル強度比が共に同程度得られると予想されながら、実際は、一方の SNP アリルのシグナル強度が対立する SNP アリルのシグナル強度を低下させるようなシグナル強度の偏りが認められた。また、図 4 8 の各グラフに表した左から 3 つめの SNP である、3-A SNP アリルのシグナル強度比は、DRB1*1502 ホモ型のサンプルでは、ほとんど検出されないが、DRB1*0405, DRB1*1302 ヘテロ型や DRB1*0401 ホモ型の DNA サンプルでは、非特異的な高いシグナルが検出されていることから、より特異性を示すようなプローブの再設計が必要であると考えられた。以上のことから、一部の MPEX プローブについては特異性の向上が求められるものの、基本的な MPEX 法による HLA-DRB1*0405 遺伝子検出系は、有用であることが示唆された。

2-2-3. チクロピジン (抗血小板薬) やチオプロニン (肝機能改善薬) 服用による副作用の遺伝子マーカーHLA-A*3303 の検出法の検討

特定の HLA アリルが医薬品服用による副作用と関連していることが多数報告されているが、チクロピジン(Hirata, K *et al. Pharmacogenomics J.* 8, 29-33, 2008.)やチオプロニン (Kurosaki, M *et al. Dig. Dis. Sci.* 45 1103-1108, 2000.)の服用により引き起こされる重度な肝障害では、HLA-A*3303 遺伝子との関連が示唆されている。

(1) PCR 反応

使用した DNA 試料は、予め蛍光プローブ SSO 法または直接塩基配列決定法により HLA-A アリルを決定したものである (data not shown)。全ての検体において、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであることを確認した (図 4 9)。

(2) MPEX 反応を用いた HLA-A*3303 遺伝子の検出

MPEX プローブは、Nearest Neighbor 法で Tm 値が 64~66°Cになるように設計した。多型性に富む HLA-A 遺伝子のエクソン 2 領域内において、2 カ所の SNPs [(C/G)(T/C)]をそれぞれ検出し、[(C)(T)]の SNP アリルが陽性である場合に HLA-A*3303 遺伝子陽性であると判定した (図 5 0)。図 5 0 に示すように、MPEX 反応により得られた各 HLA-A アリルの SNP アリル判定結果は、既知の HLA-A アリルより予測される SNP アリルの組み合わせと一致していた。さらに、全ての検体においても同様の結果が得られ、MPEX 法により HLA-A*3303 遺伝子の特異的に検出できることが示された (data not shown)。さらに、MPEX プローブの 3'末端

修飾における比較検討を特異性、増幅効率、シグナル強度を指標に QPCR 法および MPEX 法を用いておこなった (図 5 1)。MPEX プローブの 3'末端の修飾様式は、検出する SNP アリルの近傍の多型性により、①何も修飾を施さない、②3'末端を LNA 修飾、③3'末端および 3'末端から 5 塩基内側までの SNP を全て LNA 修飾の 3 種類とした。本実験にて検討した HLA-A*3303 検出用 MPEX プローブにおいて、F2 は 3 種類、F4 は①と②の 2 種類となった (図 5 1)。QPCR 法において、陽性サンプルと陰性サンプルにおける増幅産物由来の蛍光シグナル検出開始サイクル数 Ct の差である ΔCt が 10 サイクル以上のプローブは、特異性が保持され、SNP アリルの検出に有用であると Michikawa, Y らの論文において報告されている。本実験において、Normal と LNA 修飾のプライマーを用いて得られたシグナル検出開始サイクル数の差 ΔCt を比較すると、LNA 修飾の方が大きく、さらに複数 SNP に修飾をおこなうに伴い、 ΔCt がさらに大きくなる傾向が認められた。しかしながら、一方で複数 SNP を LNA 修飾すると最初に蛍光シグナルを検出するサイクル数が大きくなり、PCR 増幅効率の低下が引き起こされることが示された。増幅効率の低下は、MPEX 反応におけるシグナル強度の低下と密接に関係するため、特異性の保持、伸長・増幅効率、シグナル強度の 3 つのバランスが大変重要となる。さらに、MPEX 反応における各プローブ由来のシグナル強度および検出特異性を比較したところ、シグナル強度は、Normal の方が高いまたは、LNA 修飾との有意な差異は認められず、共に高いという結果が得られた。一方で、特異性においては、Normal および LNA 修

飾共に大変高く保持されていた。したがって、3'末端に何も修飾を施さない MPEX プローブを用いた HLA-A*3303 遺伝子検出系は、有用であることが示された。

2-2-4. カルバマゼピン (抗てんかん薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*1502 の検出法の検討

カルバマゼピン服用により引き起こされる Stevens-Johnson syndrome と HLA-B*1502 との関連が報告されている (Chung, WH *et al. Nature* 428, 486, 2004.)。

(1) PCR 反応

使用した DNA 試料は、始めに蛍光プローブ SSO 法または直接塩基配列決定法により HLA-B アリルを決定したものである (data not shown)。全ての検体において、得られた PCR 産物は、電気泳動法により目的のサイズであることを確認した (図 5 2)。

(2) MPEX 反応を用いた HLA-B*1502 遺伝子の検出

MPEX プローブは、Nearest Neighbor 法で T_m 値が 67~68.5°C になるように設計した。多型性に富む HLA-B 遺伝子のエクソン 2 およびエクソン 3 領域内において、2 カ所の SNPs [(T/G)(C/A)] をそれぞれ検出し、[(T)(C)] の SNP アリルが陽性である場合に HLA-B*1502 遺伝子陽性であると判定した (図 18)。図 18 には、Normal プローブを用いて得られた各 SNP アリルのシグナル強度比を示した。B*1502 陽性の DNA 検体において、MPEX 反応による各 SNP アリルの判定結果は、予測される SNP アリルの組み合わせ [(T)(C)] と一致していた。しかしながら、F1 (T/G) における SNP アリル T のシグナル強度比は、対立する SNP アリル G に比べて

低かった。また、F2 (C/A) において SNP アリル A のシグナル強度は B*0702 ホモ型では高いが、B*1502, B*5201 ヘテロ型では、B*5201 由来の SNP アリル A のシグナルが全く認められなかった。したがって、MPEX 法による HLA-B*1502 検出系は、一部の SNP アリルのシグナル強度をさらに上げるような MPEX プローブの改良が必要だが、基本的には有用であること、そして、今後、様々な HLA-B アリルの組み合わせからなる DNA 検体を用いて MPEX プローブの有用性を検討することが重要であると考えられた。

2-2-5. アロプリノール (尿酸合成阻害剤) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*5801 の検出法の検討

アロプリノール服用により引き起こされる重度皮膚障害 (SCAR: severe cutaneous adverse reactions) と HLA-B*5801 遺伝子との関連が報告されている (Hung, Sl *et al.* *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 102, 4134-4139, 2005)。

(1) PCR 反応

2-2-4項の(1)PCR 反応にしたがった。

(2) MPEX 反応を用いた HLA-B*5801 遺伝子の検出

MPEX プローブは、Nearest Neighbor 法で Tm 値が 65~70°C になるように設計した。多型性に富む HLA-B 遺伝子のエクソン 2 およびエクソン 3 領域内において、2 カ所の SNPs [(C/G)(A/T)] をそれぞれ検出し、[(C)(A)] の SNP アリルが陽性である場合に HLA-B*5801 遺伝子陽性であると判定した (図 5 4)。なお、図 5 4 に示している各 SNP アリルのシグナル強度比は、末端を LNA 化していない Normal プローブを用いて得られ

た値である。B*5801 陽性 DNA 検体において、MPEX 反応で得られた各 SNP アリル判定結果は、予測される SNP アリルの組み合わせ [(C)(A)] と一致していた。しかしながら、B*5801 陽性検体間において、B*5801, B*5601 ヘテロ型では、B*5801 由来の SNP シグナル C と B*5601 由来の SNP シグナル G のシグナル強度比が同程度であるのに対し、B*5801, B*0702 ヘテロ型サンプルにおいては B*5801 由来の SNP シグナル C の強度比が B*0702 由来の SNP シグナル G に対して半分に低下しているというように、一部の DNA 検体でシグナル強度比の偏りが見られた。他方の F2 (A/T) SNP アリルにおいては、十分なシグナル強度比と特異性が認められた。したがって、F1 SNP の SNP アリル C のシグナル強度比が安定するような MPEX プローブの改良が必要だが、MPEX 法による HLA-B*5801 検出系は、基本的には有用であることが明らかとなった。

2-3. リアルタイム LAMP 反応における HLA クラス II 遺伝子 (HLA-DRB1, -DQB1) および HLA クラス I 遺伝子 (HLA-A) におけるアリルのグループ分けの検討

HLA-DRB1, -DQB1, -A 遺伝子において日本人に見られる HLA アリルをほぼ 2 桁の (血清学的タイピングと同程度の分解能) レベルでのタイピングを目指していくつかの群に分けた。

(1) HLA-DRB1 遺伝子

HLA-DRB1 遺伝子を 11 群に分けて、各群特異的な多型領域について、5'末端または 3'末端に多型が位置するようにプライマーを設計した (図 5 5)。

直接塩基配列決定法または PCR-SSO 法

(Luminex)により、HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いて LAMP 反応をおこなった。その結果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた(11 群中 2 群について示す；図 5 5)。ABI PRISM 7000 において、検査 DNA サンプル中に標的のアリルが存在しているという増幅反応の陽性シグナルを検出する開始時間は、上述の DNA 濃度の場合、すべての群において 60 分間の反応時間において 40 分以内であった。

リアルタイム LAMP 反応による増幅曲線による陽陰性の判定法の他に、LAMP 反応溶液への SYBR GreenI 滴下による目視判定を検討した。これは、SYBR GreenI が有する 2 本鎖特異的インターカレーターの性質を利用したものであり、溶液の色が緑色になると陽性、オレンジ色になると陰性を示す。本実験において、陽性サンプルを鋳型にした反応溶液は緑色を、陰性サンプルを鋳型にした反応溶液はオレンジ色を呈した(図 5 6)。これらの陽陰性の判定結果は、リアルタイム LAMP 反応の増幅曲線による判定結果と同一であった。

2-3-2. HLA-DQB1 遺伝子

HLA-DQB1 遺伝子を 9 群に分けて、HLA-DRB1 遺伝子と同様にプライマー設計および LAMP 反応をおこなった(図 5 7)。その結果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた(9 群中 2 群について示す；図 5 7)。

2-3-3. HLA-A 遺伝子

HLA-A 遺伝子を 8 群に分けて、HLA-DRB1 遺伝子と同様にプライマー設計および LAMP 反応をおこなった(図 5 8)。その結

果、すべての群において各群特異的な増幅反応が認められた(8 群中 2 群について示す；図 5 8)。

2-4. リアルタイム LAMP 反応における薬剤の副作用に関連する HLA アリルの検出の検討

血栓、塞栓の治療ならびに血流障害の改善において服用される抗血小板薬、塩酸チクロピジンの服用により引き起こされる重度な肝障害と、特定の HLA 遺伝子型との関連が示唆されている(Hirata, K *et al.*, *Pharmacogenomics J.* 8, 29-33, 2008.)。この遺伝子型は、日本人において 2 番目に高い頻度のハプロタイプ (HLA-A*3303、-B*4403、-Cw*1403、-DRB1*1302、-DQB1*0604) である。

それぞれの HLA アリルを特異的に増幅させるプライマーを設計し、HLA アリルが既知の DNA サンプルを用いたリアルタイム LAMP 反応をおこなった。リアルタイムにより得られる増幅曲線と陽性シグナルの検出開始時間により、陽陰性の判定をおこなった。各 HLA アリルにおけるプライマーの有用性の検討結果として、DNA サンプルごとの 60 分間の反応における検出開始時間を示した(表 2 0 から表 2 4)。HLA-A*3303 アリルは、35 検体中、A*3303 検体 10 検体すべてで検出された(表 2 0)。HLA-B*4404 アリルは、28 検体中、B*4404 検体 7 検体すべてで検出された(表 2 1)。HLA-Cw*1403 アリルは、29 検体中、Cw*1403 検体 12 検体すべてで検出された(表 2 2)。HLA-DRB1*1302 アリルは、28 検体中 DRB1*1302 検体 9 検体のすべてで検出された(表 2 3)。HLA-DQB1*0604 アリルは、29 検体中、DQB1*0604 検体 9 検体すべてで

検出された(表24)。また、何れの場合も、当該アレル以外の検体では増幅が見られなかった。従って、ここで用いた LAMP 法によって、各 HLA アレルを特異的に検出することができ、塩酸チクロピジンによる肝障害と相関する特定のハプロタイプの有無の判定が可能であることが明らかとなった。

2-5. プラスチック基板上での HLA アレルのタイピング

リアルタイム LAMP 反応において確立した反応条件とこれまでに確立した MPEX 反応条件を組み合わせ、プラスチック基板上で一定温度下における標的領域の増幅および標的多型の検出を並行しておこなう反応系(図59)の確立を目指して、HLA アレルのタイピングをモデルとして検証をおこなった。

最初に、リアルタイム LAMP 反応においてプライマーの有用性を明らかにした HLA-DRB1 遺伝子の各群特異的なプライマーセットを用いた等温増幅反応をおこない、基板上に各群特異的な LAMP プライマー(FIP、BIP、LF)を固定した標的アレルの陽陰性の判定をおこなった。次に、HLA 遺伝子座特異的な領域を等温により増幅し、HLA アレルまたは多型特異的なプローブを複数個固定させた基板を用いた HLA アレルのタイピングをおこなった。

2-5-1. LAMP プライマーを固定化させたプラスチック基板上での標的 HLA アレル検出の検討

(1) FIP プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG2 群の FIP プライマーを基板上に固定化させ、RG2 群特異的なアレル

(HLA-DRB1*1501、*1502、*1602 アレル)の増幅反応をおこなった。その結果、RG2 陽性サンプルにおいてのみ、FIP プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた(図60)。

(2) BIP プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG8 群の BIP プライマーを基板上に固定化させ、RG8 群特異的なアレル(HLA-DRB1*0802、*0803、*0809 アレル)の増幅反応をおこなった。その結果、RG8 陽性サンプルにおいてのみ、BIP プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた(図61)。

(3) Loop プライマーを固定化させた検出系

HLA-DRB1 遺伝子において 11 群に分けたグループの内、RG9 群の LF プライマーを基板上に固定化させ、RG9 群特異的なアレル(HLA-DRB1*0901 アレル)の増幅反応をおこなった。その結果、RG9 陽性サンプルにおいてのみ、LF プローブに陽性シグナルを示し、特異性が認められた(図62)。

2-5-2. HLA アレルまたは多型特異的なプローブを固定化させたプラスチック基板上での標的 HLA アレル検出の検討

(1) HLA-DRB1*13 アレルおよび HLA-DRB1*14 アレルの特異的検出の検討

プラスチック基板上に、HLA-DRB1*13 または HLA-DRB1*14 アレル特異的な検出用オリゴ DNA を固定化し、液相下において、すべてのアレルを含む HLA-DRB1 遺伝子座共通の領域を LAMP 反応にて増幅した。その結果、DRB1*13 陽性サンプルにおいてのみ HLA-DRB1*13 オリゴ DNA に陽性シグナルが、DRB1*14 陽性サンプルにおいてのみ

HLA-DRB1*14 オリゴ DNA に陽性シグナルが認められた (図 6 3)。

(2) HLA-DRB1*13 オリゴ DNA におけるプローブの特異性およびシグナル強度の検討

HLA-DRB1*13 特異的オリゴ DNA において、多型を含む配列の長さを 18 mer から 14 mer、Tm 値を 61.28 から 48.25 の範囲に位置する 5 種類のオリゴ DNA を設計した。同一基板上に 5 種類のオリゴ DNA を固定化し、HLA-DRB1*13 アリルの特異的検出能およびシグナル強度について比較検討した。その結果、すべてのオリゴ DNA において、HLA-DRB1*13 は特異的に検出された。しかしながら、シグナル強度の差異は、オリゴ DNA 間で認められた。オリゴ DNA の長さが短くなり、Tm 値が低くなるのに伴って、シグナル強度が低下した (図 6 4)。

(3) HLA-DQB1*02、*03、*04 アリルの特異的検出の検討

プラスチック基板上に、HLA-DQB1*02、*03、*04 アリル特異的な検出用オリゴ DNA をそれぞれ固定化し、液相下において、すべてのアリルを含む HLA-DQB1 遺伝子座共通の領域を LAMP 反応にて増幅した。その結果、各アリル陽性サンプルにおいてのみアリル特異的オリゴ DNA に陽性シグナルが認められた (図 6 5)。

2-6. プラスチック基板上での医薬品副作用マーカー、特定 HLA アリル検出の検討

(1) 塩酸チクロピジン (抗血小板薬) やチオプロニン (肝機能改善薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-A*3303 の検出の検討

すべてのアリルを含む HLA-A 遺伝子座共

通の領域を増幅させるようなプライマーを設計し、リアルタイム LAMP 反応における増幅曲線によりプライマーの有用性を明らかにした (図 6 6)。エクソン 2 における増幅領域内の HLA-A*3303 特異的な多型が位置する 2 カ所をそれぞれ検出するオリゴ DNA (Probe 1 および Probe 2) を設計した (図 6 6)。

1) Probe 1 における特異性の検討

オリゴ DNA の配列内における HLA-A*3303 アリル特異的な多型の位置を 3 種類設計し、さらに個々の種類に対して 3 段階の Tm 値を設計し、総計 9 種類のオリゴ DNA を比較検討した (図 6 6-1)。その結果、HLA-A*3303 アリル特異的なシグナルを有するオリゴ DNA (P2、P3、P4) が見いだされた。一方、HLA-A*3303 陰性サンプルまたは DNA 鋳型がないサンプルの反応系においても非特異的シグナルを示すオリゴ DNA が認められた。しかしながら、これら反応系において、HLA-A 遺伝子の内部陽性オリゴ DNA のシグナルは検出されていないことから、増幅産物によるクロスコンタミネーションの可能性は極めて低い (図 6 7-1)。Probe 1 においては、多型位置を 3'末端でなく、3'末端から 4 塩基内側においたオリゴ DNA に特異シグナルが認められた。

2) Probe 2 における特異性の検討

Probe 1 と同様に総計 9 種類のオリゴ DNA を設計し、比較検討をおこなった。その結果、HLA-A*3303 アリル特異的なシグナルを有するオリゴ DNA (P21、P22、P27) が見いだされた。その他のオリゴ DNA は、非特異的なシグナルを示した (図 6 7-2)。Probe 2 においては、多型位置を 3'末端でなく、3'末端から 4 塩基内側においたオリゴ DNA に特異

シグナルが認められた。

(2) カルバマゼピン (抗てんかん薬) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*1502 およびアロプリノール (尿酸合成阻害剤) 服用による副作用の遺伝子マーカー HLA-B*5801 の検出の検討

すべてのアリルを含む HLA-B 遺伝子座共通の領域を増幅させるようなプライマーを設計し、リアルタイム LAMP 反応における増幅曲線によりプライマーの有用性を明らかにした (図 6 8)。

HLA-B*1502 または HLA-B*5801 検出用オリゴ DNA において、アリル特異的な多型領域を含むオリゴ DNA の長さ、配列内の多型の位置 (3'末端または 3'末端から何番目に位置しているか) および Tm 値を考慮してそれぞれのアリルごとに複数種類設計した。これらプローブを用いて、各アリル特異的な検出の検討をおこなったが、適切なオリゴ DNA を見いだすことができなかった (data not shown)。

D. 考察

1. MPEX 法の実用化検討

住友ベークライトの基板を用いることで、基板にプライマー DNA を固定化し、検体中の DNA 鎖又は RNA 鎖を鋳型とし、DNA ポリメラーゼや DNA トランスフェラーゼ、ヌクレオチドモノマーの存在下、PCR と同様なヒートサイクルを加えることにより、固定化したプライマー DNA 鎖が伸長する。ヌクレオチドモノマーの 1 つに蛍光色素等の標識を行うことにより、DNA プライマーの伸長反応の際、標識が導入されることにより、シグナルとして蛍光等により検出が可能と

なる。本方法は、住友ベークライトの、表面にホスホリルコリン基を導入した基板において可能であることを確認し実現した、遺伝子検出法である。

基板表面に、プライマーを固定化し、検体中の DNA 鎖等を鋳型にして、伸長反応を起こして、遺伝子を検出する方法は、過去に提唱はされているが、実現までに至っていないのが実状であった。その理由は、十分にシグナルが得られないことにあると考えられる。

我々は、本方法の開発にあたり、従来のガラス製の DNA チップ用基板や住友ベークライトのプラスチック製アルデヒド導入基板等との比較を行っている。住友ベークライトの表面にホスホリルコリン基を有する基板は、ハイブリ効率が高くまた、基板上に固定化されているがらまるで、水の中でハイブリをしているような挙動を示す。またヒートサイクル後の、プライマー DNA の保持も良好であり、固相化したプライマーの伸長に適用できる可能性を見出した。ホスホリルコリン基は生体の膜表面に近い環境を提供していると考えられる。このことが、ハイブリを促進しかつ、DNA ポリメラーゼの酵素反応を促進し、従来の DNA チップ用基板では、成し得なかった、基板上に固定化された DNA 鎖の伸長反応を可能にしたと考えられる。

本方法は、原理的に SNPs の検出に有力な手段となり得る。本研究では、本方法を用いて、SNPs の遺伝子検出法を開発し、臨床検査用途への展開を目指して、薬剤応答性遺伝子の検出システムを構築することを課題としている。臨床検査用途への展開を図るには、迅速化、簡便化、高感度化、高精度化が必要である。

簡便化、迅速化という課題からみると、当

初のPCRに準じたヒートサイクルによるプライマーの伸長反応は、大きな妨げとなると考えられる。そこで、我々はまず、ヒートサイクルを必要としない、一定温度でのDNA鎖伸長を試みた。検討の結果、37℃等一定温度の反応で、シグナルが検出され、ヒートサイクルをせずとも、遺伝子検出ができることを確認した。ヒートサイクルの不要化により、本MPEX法遺伝子診断システムの簡便化において、大きな意味をもつ。一定温度の反応は、小さなインキュベータがあれば、MPEX反応を行えることであり、特別な反応装置を必要としないため、システムの導入においても低コスト化を図ることが出来る。

さらに、我々はシグナルの検出において、簡便化、迅速化が図れないかについて検討を行った。従来、DNAチップにおいては、蛍光標識を行い、専用のマイクロアレイスキャナーにより、スポットシグナルの検出が行われている。蛍光試薬は、非常に高価なものであり、また、蛍光スキャナーも非常に高価なものであり、ベッドサイドでの診断には向かない。測定に高価な装置を必要としていては、本方法をベッドサイドでの遺伝子診断に用いることができない。そこで、我々は、検出において高価な蛍光スキャナーが不要な可視化による、スポット検出の方法を検討した。

アルカリフォスファターゼ、BICP/NBTを用いた方法で、可視化でスポットの検出を可能にすることができた。本可視化法は、例えばOAスキャナーやデジカメにより取り込んだ画像から、スポットの濃さを数値化することも可能である。可視化が出来たことによって、将来の遺伝子診断システムの構築において、検出機器の簡素化とコスト削減が図れる。

操作性の簡便化を図るべく、ヒートサイクルをかけずに定温法によるMPEX法を検討した。しかしながら、定温法では検出感が悪く、検出感度はハイブリダイズによるいわゆる従来からのDNAマイクロアレイによる検出と感度はほぼ同じであることから、PCRによる遺伝子の増幅が必要であること、さらにMPEX反応には、ゲノムDNAからある程度の長さへの遺伝子の切り出しが必要であることが判明した。このことから、MPEX法によるゲノムからの遺伝子検出には、PCRは必須の工程となる。PCRとMPEXとを合わせた時間が全体の検出時間となる。検体中の目的とする遺伝子量が少ない場合、PCRに要する時間が長くなり、長時間の検出時間を要することになる。また、PCRとMPEXの2つの操作となることから、作業上の煩わしさから、ベッドサイドをはじめとする医療の現場へは受け入れ難いものである。

そこで、PCRのヒートサイクルとMPEXのヒートサイクルを共通とし、両反応を同時に同じ反応系で行えないか検討を行った。液中でのPCRでは、指数関数的に遺伝子の増幅がなされ、基板表面では、相加的に遺伝子の増幅が行われることとなり、両者の相乗効果による、増幅効率の向上により、より高感度化が期待できる。

このような反応を行うには、ヒートサイクルに耐えられる、基板上プライマーオリゴDNAが安定して固定化されていることが必要である。住友ベークライトの基板は、先のMPEX法検討時の検証から、安定的にオリゴDNAの固定化は出来ている。

又、本方法では、PCRでは標識が入らないことが増幅効率確保するのに必要であり、一方、MPEXでは、標識ヌクレオチドが入り易い

ことが理想である。本研究では、Cy3-dUTPの添加濃度を抑えることにより、遺伝子の特異的な検出に成功している。酵素反応が起こり易い表面環境を有する、基板だからこそ可能であったと考えられる。

本 MPEX と PCR の同時反応法を遺伝子検出手法として確立するには、基板上で温度管理を正確に行える、基板のデザインと基板にも適用しうるサーマルサイクラーが必要となる。

従来のサーマルサイクラーは、ヒートブロックの温度をペルチェ素子等により、変化させ、ヒートサイクルを加える方法であるが、ヒートブロックの温度を加温や冷却により変化させることは、温度変化に時間を要することとなり、多数回のヒートサイクルを行うには、トータルで長時間の増幅時間を要することとなり、従来のヒートサイクル法では、飛躍的な反応時間の短縮は期待できないと考えられる。

本検討においては、形状が基板状であることから、予め温度設定がされたヒートブロック上を基板が移動する方法を採用することが出来た。今回の試作機においては、各々の設定温度のヒートブロックを上下から挟んで加温する方法により効率良く熱を伝えることが出来た。

基板は、プラスチック製であり熱伝導性が悪く、従来のようなヒートブロックの温度を変化させる方法では、従来の PCR に用いるプロピレン製の容器のように基板をかなりの肉薄にする必要があったと思われるが、本検討による複数温度に設定したヒートブロックを用いる方法では、基板の厚みによる熱伝導性の悪さ加味して、実際に必要な温度よりも、加熱工程では、設定を高め、冷却工

程では低めに設定することにより、ヒートサイクルにおける各過程の時間を長くすることなく、ヒートサイクル時間を短くした PCR (遺伝子の増幅) が可能となる。

以上から、本検討における複数の温度設定したヒートブロックを用いるヒートサイクル法は、プラスチック基板を用いた PCR による増幅法では、最も適したヒートサイクル法であると考えられる。

基板上で PCR と MPEX 法を同時に行う基板用サーマルサイクラーと基板を開発し、遺伝子の増幅から検出までを約 30 分で行うことが出来た。30 分という時間は、ベッドサイドにおける検査待ち時間として許容できる範囲であると考えられる。しかしながら、本増幅反応の前に、DNA サンプルの調製が必要なことを考慮すれば、遺伝子の増幅と検出の部分を 20 分程度以内に納める必要があると考える。血液サンプルから簡便に迅速に DNA を抽出し、PCR による増幅のための前処理用キットも市販されており、このようなキットとの組み合わせで一層の簡便化、迅速化が図れるものと考えられる。また、近年、基板に微細流路を設け、流路内で種々の操作や反応を行う研究も進められており、本検討にて構築した技術と、微細流路技術を組み合わせることにより、さらに簡便で迅速、そして極微量なサンプルで SNPs の診断を含めた遺伝子診断システムの構築ができると考える。

ベッドサイドにおける臨床検査においては、血液サンプルの採取から検出まで、一貫した閉鎖系で実施できることが、安全性の確保からも必要である。今後、微細流路技術も取り入れ、より迅速、簡便であり、極微量なサンプル量でより安全に SNPs 診断を可

能とする遺伝子検査システムの構築を検討も必要であると考え。

基板上での多数同時のマイクロサテライトの検出をリガーゼによるプライマーとリポーターオリゴDNAとの結合による、MPEX法を応用しての検出を検討することにより、まだ完全ではないが、本方法によりマイクロサテライトの検出が出来ることを確認することが出来た。本方法によるマイクロサテライトの検出には、正確なハイブリダイゼーションと、正確かつ効率的な酵素反応が行える基板環境必要であると考えられる。今回マイクロサテライトの検出の可能性を確認出来たのも、住友ベークライトのDNAマイクロアレイ用の基板であってこそと思われる。

2. 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

本研究は、「迅速・簡便・安価・正確・高感度」な遺伝子診断法の開発を目的としている。

一年目は、医薬品の副作用マーカー、HLA遺伝子の多型性を対象に、PCR-SSP法を用いて多型を示す領域を特異的に増幅後、増幅産物を鋳型として分注し、プラスチック基板上で固定させたPCR-SSPプライマーからのDNA伸長・増幅反応をおこない、多型を検出する系を確立した。本実験において確立した反応条件において、プラスチック基板上に固定したプライマーは、適合するPCR産物が存在する時のみ、特異的かつ効率的にDNA鎖を伸長させることを明らかにした。したがって、プラスチック基板上で検出した多型を組み合わせで判定することで、HLAアレルのタイピングやハプロタイプの検出が可能であるこ

とが示唆された。しかしながら、HLAアレルのタイピングにおいて、アレルごとに特異的なPCR-SSP用プライマーセットおよびプローブの構築を必要とすること、検出された多型の組み合わせによってアレルを判定するために、その多型が同一染色体上に存在するのか、または別の染色体上に存在するのかという情報が得られず、多型の組み合わせが不確かとなりDNAタイピングが誤判定となる危険性があることが問題となった。

そこで、二年目は、HLAアレルタイピングにおいて、共通のプライマーセットを構築するために、HLAクラスI遺伝子 (HLA-A) およびHLAクラスII遺伝子 (HLA-DRB1, HLA-DQB1) において、すべてのアレルを含む遺伝子座共通の領域を増幅させるプライマーを設計し、それらの有用性を明らかにした。そして、共通のプライマーセットを用いてPCR反応をおこない、得られた遺伝子座共通領域の増幅産物を鋳型として分注し、HLAアレル特異的なオリゴDNAを固定したプラスチック基板上で、標的多型を検出する系を確立し、HLAアレルのDNAタイピングにおける有用性を明らかにした。また、疾患感受性遺伝子の感受性SNPsのモデルとして、関節リウマチ発症との相関を示す5種類の感受性SNPsについても、同様に検討をおこない、本法によるSNPs診断法が有用であることを示した。しかしながら、これらの検出系は、PCR反応をおこなうために温度サイクルをおこなう機器やPCR増幅産物を検出するための特殊な機器を必要し、臨床現場に不向きであること、鋳型となるPCR増幅産物をMPEX反応溶液中に分注する操作が必須のため、検査前に増幅産物によるクロスコンタミネーションが生じる危険性があることが問題となった。また、一年目に明らか

となったSNPs間における染色体上の位置情報の欠失によるDNAタイピング誤判定の危険性を解決することはできない。

そこで、最終年度は、医薬品の副作用マーカー、HLA遺伝子を対象に、等温増幅法の一つであるLAMP反応をプラスチック基板上でおこなわせることにより、HLAのDNAタイピングおよび特定HLAアレルの検出系を確立した。本タイピング法は、一定温度下(60–65°C)、プラスチック基板上で標的領域の増幅および標的多型の検出を同時並行して行う検出系である。標的SNPs検出の際に鋳型となる増幅産物を生成するためのPCR反応による前工程を必要とせず、クロスコンタミネーションの確率が低減する利点がある。また、基板上の反応であるので、容易にマルチプレックス化が可能であると考えられる。さらに、LAMP法は、同一DNA鎖上(シス)に存在する複数の多型領域を同時に検索するDNAタイピングを可能とする。本実験において、プラスチック基板上での等温増幅および等温での伸長反応によるHLAアレルのタイピングは有用であることを明らかにした。

一方で、検出用オリゴDNAの設計において、様々な点を考慮する必要性が明らかとなった。DNAの鋳型なしにおいて、または陰性サンプルにおいて生じる非特異シグナルが、オリゴDNAの長さや T_m 値、配列のGC含量、または塩基配列そのものの特性等に起因しているのか、現在のところ明らかな規則性は認められていない。今後、個々のHLAアレルについて検討を重ねて、有用なオリゴDNAを確立する予定である。本タイピング法の最大の特徴は、特殊な機器を必要としない点、および、短時間で目視判定によるDNAタイピングが可能である点である。他の遺伝子の多型タイピング

への活用が可能であり、医薬品投与による副作用予測や、疾患の罹患予測等の検査という臨床現場においても実用性の高い検査法としての、さらなる開発の展開が可能であると考えている。

E. 結論

MPEX (Multiple Primer Extension) 法を実現し、さらに本方法を臨床診断に適用し得る迅速化、簡便化、高感度化を図るための基礎技術検討を行った。最終的に、ハード面として、基板上でMPEX反応とPCRを同時に行うことにより、ゲノムDNAから短時間に高感度でSNPsを検出する方法を、基板上PCR&MPEX用サーマルサイクラーの開発及び基板の作製により確立し、遺伝子の増幅から検出まで約30分で可能な検出システムを開発した。又、医薬品副作用マーカー、HLA遺伝子のDNAタイピングおよび特定HLAアレルの検出において、目的のSNPアレルを含む検査領域の特異的な増幅とSNP検出を、等温条件下で同一プラスチック基板上で同時におこなうシステムの開発と検証をおこなった。本タイピング法は、高価なPCR装置や蛍光検出機器を必要としない「基板上での等温増幅と発色アッセイを基盤とした簡便な新手法」である短時間で特異的に目視により判定できる」という有用性を裏付けるデータを蓄積し、「基板上での等温増幅と発色アッセイを基盤とした簡便な新手法」の基本型を完成した。

以上の検討により、MPEX法を用いた、迅速、簡便で高感度な、臨床診断に適応し得る、SNPs診断の2つの有力な基礎技術を構築することが出来た。

F. 研究発表

1. 論文発表

・ Kinoshita K, Fujimoto K, Yakabe T, Saito S, Hamaguchi Y, Kikuchi T, Nonaka K, Murata S, Masuda D, Takada W, Funaoka S, Arai S, Nakanishi H, Yokoyama K, Fujiwara K, Matsubara K, Multiple primer extension by DNA polymerase on a novel plastic DNA array coated with a biocompatible polymer, *Nucleic Acids Research* 2007, Vol.35, No1 e3 doi: 10.1093/nar/gkl939

2. 学会発表

・ 清水佐良子、吉川枝里、平田浩司、光永滋樹、森川實、猪子英俊

「等温増幅によるHLAのDNAタイピング法の検討」

第16回日本組織適合性学会大会

2007年9月9日～9月11日

・ 清水佐良子、光永滋樹、齋藤晋、藤本健太郎、横山兼久、木下健司、藤原一彦、田中正史、森川實、猪子英俊

「プラスチック基板上での等温増幅法を用いた遺伝子多型の検出法の検討」

第30回日本分子生物学会年会

2007年12月11日～15日

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

1-1. 特許出願

特願 2005-144108

「遺伝子の検出方法」

特願 2005-184136

「DNA鎖伸長方法、DNA鎖増幅方法およびDNA鎖伸長用マイクロアレイ」

特願 2005-263988

「DNA鎖増幅方法」

特願 2006-43350

「遺伝子の検出方法及び遺伝子検出担体」

・ 特願 2006-161865

「DNA鎖伸長方法およびDNA鎖伸長用アレイ」

・ 特願 2006-239912

「DNA配列の検出方法」

・ 特願 2007 - 18442

「DNA鎖伸長方法、DNA鎖増幅方法およびDNA鎖伸長用マイクロアレイ」

・ 特願 2007-149817

「複数の多型部位を有するDNA配列の特異的増幅方法」

・ 特願 2007-177200

「遺伝子の検出方法」

・ 特願 2007-232138

「遺伝子の検出方法」

・ 特願 2007-283345

「基板上での等温増幅反応による標的塩基配列の補足及び検出方法」

1-2. 特許登録

・ 特許 3927580

「DNA鎖伸長方法、DNA鎖増幅方法およびDNA鎖伸長用」
登録処理中

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

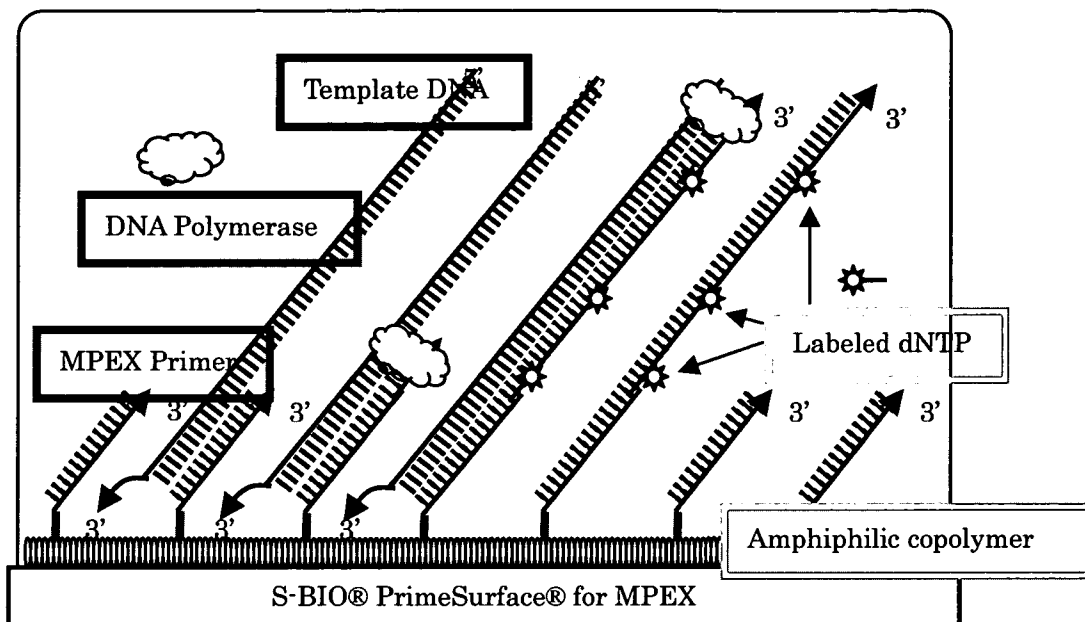


図1 MPEX法原理

基板上にDNAプライマーを固定化し、検体側のDNA或いはRNAを鋳型として、ポリメラーゼによりDNA鎖を伸長させることにより検体中の遺伝子を検出する。このMPEX法による遺伝子検出は、遺伝子検出特異性が高く、特にSNPsの検出に適する。住友ベークライトのDNAマイクロアレイ用基板表面は、酵素反応に適した環境を有しており、MPEX法に適する。

表1. 合成オリゴDNA配列

	5'→3'
プライマーDNA	NH2-ACTCCCGGATTGCGC
ターゲットDNA	Cy3-AAGGCGGGAGGGACG GCAATCCGGGAGTTTA CAAAATGGACAAACTTC TAT

表2. 菌検出に用いたMPEX用プライマー配列

	5'→3'
ECO	CTGATATGTAGGTGAAGCGACTTGCTCG
SA	AGTAGGATAGGCGAAGCGTGCGATT
SAL	TGTGTGTTCCAGGTAAATCCGGTTC
PA	GTTAATCGACGCAGGGTTAGTCGGTT
PC	GACAGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGC

表3. 23SリボゾームDNA増幅に用いたPCR用プライマー配列

	5'→3'
43a2	GACAGCCAGGATGTTGGCTTAGAAGCAGC
69ar2	GGAATTTTCGCTACCTTAGGACCGTTATAGT TACG
69arrh	GGAATTTTCGCTACCTTAGGATGGTTATAGT TACC

表4. PCR反応溶液調製処方

10×EX Taq Buffer	5 μL
Each 2.5mM dNTP	8 μL
100mM 43a2	0.5 μL
100mM 69ar2	0.5 μL
100mM 69arrh	0.5 μL
Total DNA	1 μL
EX Taq Polymerase	0.5 μL
D. W.	34 μL

表5. MPEX反応液処方

10×EX Taq Buffer	10 μL
10% Triton X100	10 μL
0.1mM Cy3-dUTP	5 μL
0.1mM dATP	5 μL
0.1mM dGTP	5 μL
0.1mM dCTP	5 μL
5nM オリゴDNA	10 μL
EX Taq Polymerase	1 μL
D. W.	49 μL

表6. ビオチンアビジン反応溶液処方

10× MPEXバッファーA	8 μL
2× MPEXバッファーB	40 μL
1/100 Streptavidin-AP	8 μL
D. W.	24 μL

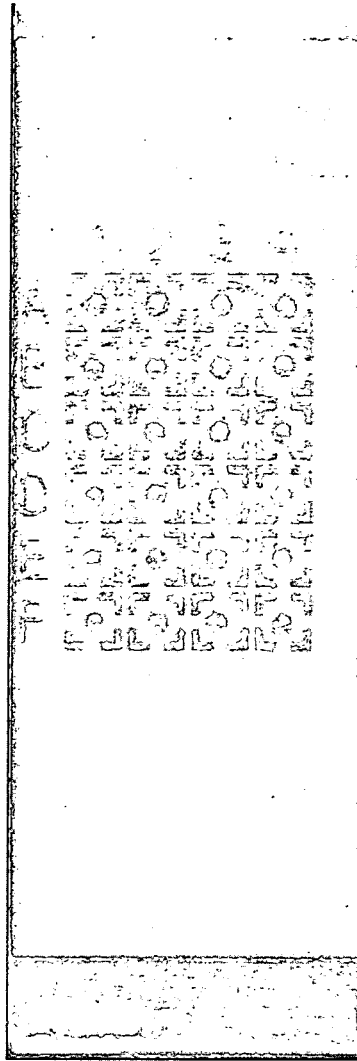


図2. 可視化検出基板

可視化検出した結果、基板上24スポットのシグナルばらつきは、 $CV=9\%$ となり、十分に信頼性の高い検出方法であることがわかった。