

正常範囲は 10 unit 未満とした。SLE 123 血清の測定を行ったが、全て 10 unit 未満を示し、全例が陰性と判定した (図は省略)。

5. 免疫ブロットによる抗ヒストン抗体の検出

精製ヒストンを抗原とし、34 例の SLE 患者血清を用い、免疫ブロット法でヒストンのサブユニットに対する抗体を検討した。図 4 に代表例の SDS-PAGE を示す。レーン 1 では全てのサブユニットと、レーン 2 では H1d/e, H1c, H1⁰, H3, H2B と、レーン 3-5 では H1d/e, H1c, H1⁰, H2B と、レーン 6 では H1d/e, H1c, H1⁰ と、レーン 7 では H1d/e, H1c, と、レーン 8 では H1d/e, H2B と、レーン 9 では H1d/e と反応した。レーン 10-18 では反応はみられなかった。レーン 19 の陽性コントロールの DLE 患者血清は、H1d/e, H1c, H1⁰, H2B と反応した。34 例中 24 例 (71%) にいずれかのヒストン構成サブユニットに対する自己抗体が認められ、抗ヒストン抗体が SLE 患者血清中に高率に見出されることが確認された。各サブユニット特異抗体の陽性率は、抗 H1d/e, 抗 H1c, 抗 H1⁰, 抗 2B, 抗 H3, 抗 H4, 抗 2A 抗体の順に高かった (図 5)。特にいずれかの H1 構成蛋白を認識する患者全血清が H1d/e と反応しており、H1d/e にユニバーサルエピトープが存在することが示された。

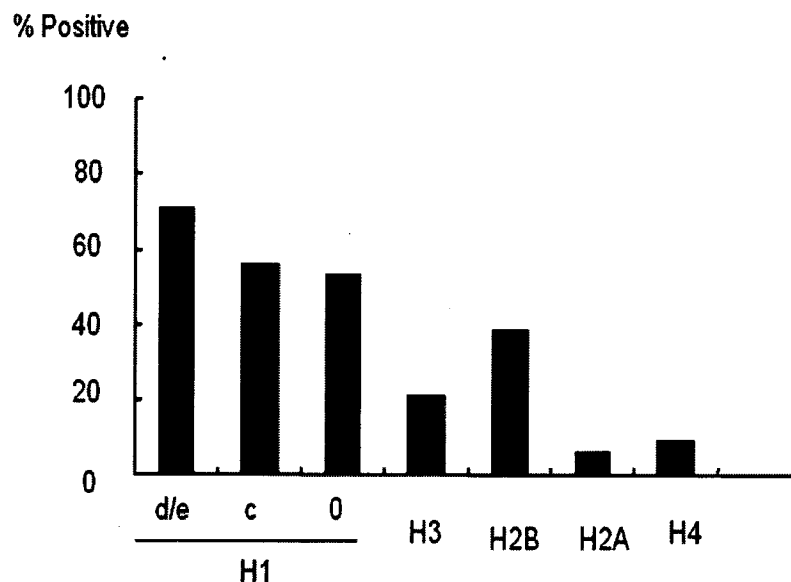


図5 ヒストン亜分画に対する特異抗体の陽性率

D. 考察

ヒストンはクロマチンの最小基本単位であるヌクレオソームを構成する蛋白成分であり、塩基性アミノ酸 (アルギニンおよびリジン) に富み、トリプトファンを含まない塩基性蛋白である。全ての有核細胞にはヒストンが存在し、そのアミノ酸配列は進化を通じて保存される。ヒストンは5種のサブユニット、H1 (21kDa), H2A (14.5kDa), H2B (13.7kDa), H3 (15.3kDa), H4 (11.3kDa) から構成される。H2A, H2B, H3, H4 は各々2分子が結合したオクタマー (8量体) を形成し、その周囲に DNA が2回転 (146bp) 巻きついてヌクレオソームとなる。H1 はヌクレオソーム構造には関与せず、ヌクレオソーム間の結合とクロマチン構造保持に関与する。

自然発症 SLE モデルマウスの解析からヌクレオソームが主要なループス抗原であり、ヌクレオ

ソームに対する免疫応答がその構成成分であるDNAとヒストンに対する自己抗体産生のトリガーとなる可能性が示されている。ChabreらはSLE患者においてELISAにより抗ヌクレオソーム抗体、抗DNA抗体および抗ヒストン抗体を検討し、84%の患者が抗ヌクレオソーム抗体陽性であること、抗ヌクレオソーム抗体は抗DNA抗体および抗ヒストン抗体と相関するものの、単独で陽性の患者もみられることなどを明らかとしている。本研究でも、SLE患者において抗ヌクレオソーム抗体が高率であることや抗ヌクレオソーム抗体と抗DNA抗体の相関が示された。抗ヌクレオソーム抗体の臨床的意義やDNAやヒストンに対する自己抗体とヌクレオソーム分子を認識する自己抗体エピトープの異同の検討は今後の課題であり、このためにマイクロアレイ上にヒストン抗原を固相化し、網羅的に自己抗体を検出するプロテインチップの開発は重要と考えられる。

抗ヒストン抗体の各サブユニットに対する反応性はELISAやRIAの成績と免疫プロット法では異なる。RubinらはRIAを用いSLEにおける抗ヒストン抗体の対応抗原はH2A-H2B複合体であるとした。Hardinらは免疫プロット法でSLE血清24例中11例(46%)に抗ヒストン抗体を見出し、H1とH2Bに抗ヒストン抗体の主要エピトープが存在するとした。さらに、抗原エピトープはH1のC末端側、およびH2BのN末端側に存在し、ヌクレオソームの表面に露出していることを明らかにした。Craftらは免疫プロットでDLEにおける各サブユニットに対する抗ヒストン抗体の反応性を検討した。プロカインアミド誘発性ループスとSLEはともにH1およびH2Bと、一部はH3とも反応したが、H2AおよびH4との反応はまれであった。一方、ヒドララジン誘発性ループスでは個々のヒストンと広く反応し、H3、H2A、H4と反応する血清も多く見出された。本研究においても、H1とH2Bに主要なエピトープが存在するというHardinらの報告と一致する成績が得られた。興味深いことに、ヒドララジン誘発性ループスの抗ヒストン抗体はヒストン分子中央の球状部位(トリプシン抵抗性の疎水性部位)を認識するのに対し、SLEおよびプロカインアミド誘発性ループスではヒストンのN末端かC末端近傍(トリプシン感受性の親水性部位)を認識し、両者の抗原エピトープが異なることが示されている。これまでの成績を合わせると、SLEおよびプロカインアミド誘発性ループスでは抗ヒストン抗体はヌクレオソームの露出部位と反応することから、正常なヌクレオソーム構造が抗原となり、またヒドララジン誘発DLEでは変性したクロマチンが自己抗体産生に関与する可能性が示され、両者の発症機序の違いが示唆される。MRL/MP-*lpr/lpr*マウスでは、コアヒストンに加え、H1およびバリエーションであるH1⁰に対して高抗体価の自己抗体を産生することが報告されてきた。Kallyaperumalらは、(SWR x NZB)F1(SNF1)マウスでH1⁰のアミノ酸22-42番目に自己免疫応答を刺激するT細胞エピトープ(H1⁰₂₂₋₄₂エピトープ)を同定することに成功した。このH1⁰₂₂₋₄₂エピトープは、同時にB細胞エピトープとなり、このエピトープを認識する自己抗体が、抗dsDNA抗体と交差反応を示すこと、H1⁰₂₂₋₄₂をSNF1マウスに免疫すると腎炎が悪化することなどより、病因・病態形成上きわめて重要であることが示唆されている。われわれは、MRL/MP-*lpr/lpr*マウスにおいてH1⁰₂₂₋₄₂が抗ヒストン抗体のB細胞エピトープであることをこれまでに見出している。そこでELISAでSLE患者とH1⁰₂₂₋₄₂との反応を検討したが、H1⁰₂₂₋₄₂を認識する抗体は認められなかった。今後、SLE患者におけるT細胞およびB細胞エピトープの解析が必要と考える。

E. 結論

SLE患者における抗ヒストン抗体とその対応抗原エピトープを解析し、免疫診断プロテインチップ開発のために抗ヒストン抗体標準血清を確立した。抗ヒストン抗体産生機序の追究がSLEの

病因・病態の解明上重要である可能性が示唆された。

F.健康危険情報

該当なし。

G.研究発表

1. 論文発表

1. Michito Hirakata, Akira Suwa, Tetsuya Takada, Shinji Sato, Sonoko Nagai, Ekkehard Genth, Yeong W. Song, Tsuneyo Mimori, Ira N. Targoff. “Clinical and immunological features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase.” *Arthritis and Rheumatism* 56(4):1295-1303, 2007.
2. Shinji Sato, Tetsuya Takada, Yumiko Katsuki, Noriko Kimura, Yuko Kaneko, Akira Suwa, Michito Hirakata, Masataka Kuwana. “Longterm effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid-induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 7-year followup.” *The Journal of Rheumatology* 35(1):142-146, 2008.
3. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭. 「メトトレキサート使用時における葉酸の使用法」*リウマチ科*37(2) : 176-183, 2007.
4. 諏訪 昭, 長谷川直樹, 平形道人, 斉藤栄子, 若林孝幸, 鈴木康夫. 「結核診断の新しい診断法: 全血インターフェロン γ 応答測定法のリウマチ性疾患への応用」*リウマチ科*37(2) : 191-196, 2007.
5. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子. 「抗リウマチ薬の使い方」*痛みと臨床*7(2) : 94-100, 2007.
6. 鈴木康夫, 若林孝幸, 斉藤栄子, 諏訪 昭. 「抗リウマチ薬の関節破壊抑制効果」 *CLINICAL CALCIUM* 17(4) : 110-116, 2007.
7. 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子, 鈴木康夫. 「CNSループスの診断に有用な検査法は? : SPECTの意義」*内科* 99(5):905-908, 2007.
8. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子. 「抗リウマチ薬による薬剤性肺障害」*リウマチ科*37(4) : 333-340, 2007.
9. 鈴木康夫, 諏訪 昭, 若林孝幸, 斉藤栄子. 「抗リウマチ薬 (DMARDs) はいつ, どのように使用すべきか」*内科*99(4) : 598-602, 2007.
10. 諏訪 昭, 斉藤栄子, 若林孝幸, 鈴木康夫. 「関節リウマチに伴う骨粗鬆症 (1) : 病態」*CLINICAL CALCIUM* 17(8) : 106-110, 2007.
11. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭, 「医薬品副作用学—薬剤の安全使用アップデート— 薬効群別副作用: 抗リウマチ薬」*日本臨床* 65(増刊号8) : 209-217, 2007.
12. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭, 「生物学的製剤とその注意点」*呼吸器科*12(3) : 268-277, 2007.
13. 鈴木康夫, 斉藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭, 「特集: NSAID胃粘膜障害 潰瘍: PG製剤」*日本臨床* 65(10) : 1843-1849, 2007.

14. 諏訪 昭. 「膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の診断と最新の治療」日本内科学会雑誌 **96(12):2804-2811, 2007.**
15. 若林孝幸, 齋藤栄子, 諏訪 昭, 鈴木康夫. 「早期診断とDMARDs治療」総合リハビリテーション **36(1) : 49-55, 2007.**
16. 諏訪 昭. 「ステロイドのよくある副作用」臨床研修プラクティス **5(2) : 68-74, 2008.**
17. 諏訪 昭. 「膠原病に伴う肺障害」山口 徹総監修 今日の治療指針2008年版—私はこう治療している . 医学書院, p642-643, 2008.

2.学会発表

1. 諏訪 昭. 「再燃にミゾリピンが有効であった 多発性筋炎の一例」 第6回リウマチ性疾患研究会, 東京都, 平成19年1月
2. 諏訪 昭, 平形道人, 金子祐子, 佐藤慎二, 桑名正隆, 齋藤栄子, 若林孝幸, 鈴木康夫. 「膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症 (CPH) におけるNa利尿ペプチドの意義に関する研究」第51回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成19年4月.
3. 若林孝幸, 齋藤栄子, 諏訪 昭, 鈴木康夫. 「高齢関節リウマチに対する低用量タクロリムスの有効性と安全性の検討」第51回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成19年4月.
4. 佐藤慎二, 平形道人, 金子祐子, 諏訪昭, 桑名正隆. 「筋炎特異および関連自己抗体を用いた皮筋炎の病型分類の検討」第51回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成19年4月.
5. 金子祐子, 平形道人, 花岡洋成, 古屋善章, 高田哲也, 香月有美子, 木村納子, 佐藤慎二, 諏訪 昭, 桑名正隆. 「多発性筋炎に対するタクロリムスの効果」第51回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成19年4月.
6. 齋藤栄子, 若林孝幸, 諏訪 昭, 鈴木康夫. 「SLE治療経過中に発症し, ステロイドが著効した蛋白漏出性胃腸症 (PLGE) の一例」第51回日本リウマチ学会総会, 横浜市, 平成19年4月
7. 齋藤栄子, 諏訪 昭, 若林孝幸, 鈴木康夫. 「サラゾスルファピリジン (SASP) 、メトトレキサートが効果不十分でインフリキシマブが奏功した強直性脊椎炎の一例」第1回生物学的製剤治療研究会, 横浜市, 平成19年5月
8. Akira Suwa, Michito Hirakata, Naoki Hasegawa, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Eiko Saito, Takayuki Wakabayashi, Yasuo Suzuki. "Whole blood interferon-gamma assay is useful to assess the risk of latent tuberculosis infection in patients with rheumatoid arthritis." American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November, 2007.
9. Akira Suwa, Michito Hirakata, Tohru Sato, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Eiko Saito, Takayuki Wakabayashi, Yasuo Suzuki. "N-terminal pro-brain natriuretic peptide as a diagnostic marker of pulmonary arterial hypertension in connective tissue disease." American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November, 2007.
10. Shinji Sato, Kana Hoshino, Takashi Sato, Yukie Yamaguchi, Akira Suwa, Michito Hirakata, Masataka Kuwana. "Clinical classification of dermatomyositis using myositis-specific autoantibodies and newly found autoantibodies in patients with

- dermatomyositis.” American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November 7-11, 2007.
11. Tetauya Takada, Michito Hirakata, Yumiko Katsuki, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Akira Suwa, Tadayuki Ishihara. “Myositis-specific autoantibodies are associated associated with specific histopathological features on muscle biopsies.” American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November, 2007.
 12. Michito Hirakata, Akira Suwa, Tetauya Takada, Yuko Kaneko, Shinji Sato, Masataka Kuwana, Tadayuki Ishihara. “Clinical features of Japanese patients with anti-asparaginyl tRNA synthetase autoantibodies.” American College of Rheumatology 71st Annual Meeting, Boston, November, 2007.
 13. 齋藤栄子, 諏訪昭, 若林孝幸, 鈴木康夫. 「サラゾスルファピリジン(SASP, メトトレキサート(MTX)が無効でインフリキシマブが奏功した強直性脊椎炎の一例)」第22回日本臨床リウマチ学会, 鹿児島市, 平成19年11月.

H.知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む)

1. 特許取得

該当なし.

2. 実用新案登録

該当なし.

3. その他

該当なし.

Ⅲ.研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

主任研究者：伊藤嘉浩

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
伊藤嘉浩	マイクロレイ・パ イチップの基礎	伊藤嘉浩監修	マイクロレイ・パ イチップの最新技術	シーエムシー出版	東京	2007	3-10
伊藤嘉浩	固定化技術-生体分子のマイクロレイ固定化法	伊藤嘉浩監修	マイクロレイ・パ イチップの最新技術	シーエムシー出版	東京	2007	91-109
伊藤嘉浩	マイクロレイ・パ イチップの応用	伊藤嘉浩監修	マイクロレイ・パ イチップの最新技術	シーエムシー出版	東京	2007	165-180
和田章・阿部洋・伊藤嘉浩	ア ^o タマ-医薬	植田充美監修	抗体医薬の最前線	シーエムシー出版	東京	2007	213-225

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
H. Mojgan, H. Hasuda, M. Sakuragi, Y. Yoshida, K. Suzuki, and Y. Ito,	Modification of the titan surface with photoreactive gelatin to regulate cell attachment	Journal of Biomedical Materials Research PartA	83	906-914	2007
T. Ishii, A. Wada, S. Tsuzuki, M. Casolaro and Y. Ito	Copolymers including L-histidine and hydrophobic moiety for preparation of nonbiofouling surface	Biomacromolecules	8(11)	3340-3344	2007
Y. Ito, H. Hasuda, M. Sakuragi, and S. Tsuzuki	Surface modification of plastic, glass and titanium by photoimmobilization of polyethylene glycol for antibiofouling	Acta Biomaterialia	3	1024-1032	2007
G. Chen, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, and T. Tateishi,	Grid pattern of nanothick mic rogel network	Langmuir	23	5864-5867	2007
L. Guo, N. Kawazoe, Y. Fan, Y. Ito, J. Tanaka, T. Tateishi, X. Zhang, and G. Chen	Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells on photoreactive polymer-modified surfaces	Biomaterials	29	23-32	2008
Y. Ito	Covalently immobilized biosignal molecule materials for tissue engineering	Soft Matter	4(1)	46-56	2008
M. Casolaro, Y. Ito, T. Ishii, S. Bottari, F. Saperi, and R. Mendichi	Stimuli-responsive poly (ampholyte)s containing L-histidine residues : synthesis and protonation thermodynamics of methacrylic polymers in the free and in the cross-linked gel forms	Express Polymer Letters	2(3)	165-183	2008
Y. Ito	Control of water droplet movement	高分子	56(12)	973	2007
伊藤嘉浩	再生医療のために幹細胞増幅基材	膜	32(5)	276-280	2007
伊藤嘉浩	幹細胞培養のためのナノ界面創成バイオリクター	化学	62(7)	38-41	2007
伊藤嘉浩	ナノ界面テクノロジーによる機能表面創出	高分子論文集	65(1)	6-19	2008

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者：上阪 等

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
なし							

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
T. Sugihara, C. Sekine, T. Nakae, K. Kohyama, M. Harigai, Y. Iwakura, Y. Matsumoto, N. Miyasaka, and H. Kohsaka	A new murine model to define the critical pathologic and therapeutic mediators of polymyositis	Arthritis Rheumatism	56 (4)	1304-1314	2007

研究成果の刊行に関する一覧表

分担研究者：諏訪 昭

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
諏訪 昭	膠原病に伴う肺障害	山口 徹	今日の治療指針2008年版 —私はこう治療している	医学書院	東京	2008	642-643

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
M. Hirakata, A. Suwa, T. Takada, S. Sato, S. Nagai, E. Genth, Y. W. Song, T. Mimori, and I. N. Targoff.	Clinical and immunogenetic features of patients with autoantibodies to asparaginyl-transfer RNA synthetase	Arthritis and Rheumatism	56(4)	1295-1303	2007
S. Sato, T. Takada, Y. Katsuki, N. Kimura Y. Kaneko, A. Suwa, M. Hirakata, and M. Kuwana	Longterm effect of intermittent cyclical etidronate therapy on corticosteroid-induced osteoporosis in Japanese patients with connective tissue disease: 7-year followup	The Journal of Rheumatology	35(1)	142-146	2008
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	メトトレキサート使用時における葉酸の使用法	リウマチ科	37(2)	176-183	2007
諏訪 昭, 長谷川直樹 平形道人, 斉藤栄子 若林孝幸, 鈴木康夫	結核診断の新しい診断法：全血インターフェロンγ応答測定法のリウマチ性疾患への応用	リウマチ科	37(2)	191-196	2007
鈴木康夫, 諏訪 昭 若林孝幸, 斉藤栄子	抗リウマチ薬の使い方	痛みと臨床	7(2)	94-100	2007
鈴木康夫, 若林孝幸 斉藤栄子, 諏訪 昭	抗リウマチ薬の関節破壊抑制効果	CLINICAL CALCIUM	17(4)	110-116	2007
諏訪 昭, 若林孝幸 斉藤栄子, 鈴木康夫	CNSループスの診断に有用な検査法は？：SPECTの意義	内科	99(5)	905-908	2007
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭,	抗リウマチ薬による薬剤性肺障害	リウマチ科	37(4)	333-340	2007
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	抗リウマチ薬 (DMARDs) はいつ、どのように使用すべきか？	内科	99(4)	598-602	2007
諏訪 昭, 斉藤栄子 若林孝幸, 鈴木康夫	関節リウマチに伴う骨粗鬆症(1)：病態	CLINICAL CALCIUM	17(8)	106-110	2007
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	医薬品副作用学—薬剤の安全使用アップデート—薬効群別副作用：抗リウマチ薬	日本臨床 (創刊号)8	65	209-217	2007
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	生物学的製剤とその注意点	呼吸器科	12(3)	268-277	2007
鈴木康夫, 斉藤栄子 若林孝幸, 諏訪 昭	特集：NSAID胃粘膜障害 潰瘍：PG製剤	日本臨床	65(10)	1843-1849	2007
諏訪 昭	膠原病に伴う肺動脈性肺高血圧症の診断と最新の治療	日本内科学会雑誌	96(12)	154-161	2007
若林孝幸, 斉藤栄子, 諏訪 昭, 鈴木康夫	早期診断とDMARDs治療	総合リハビリテーション	36(1)	49-55	2007
諏訪 昭	ステロイドのよくある副作用	臨床研修プラクティス	5(2)	68-74	2008

IV.研究成果の刊行物・別刷

第1章 マイクロアレイ・バイオチップの基礎

伊藤嘉浩*

マイクロアレイ・バイオチップは、歴史は十数年と浅いものの、コンピュータ・チップの発展で知られる「ムーアの法則」のように、微細化が進み集積度が増してきた¹⁾。マイクロアレイ・バイオチップを含むバイオテクノロジー技術は、複合化され、生体情報を指数関数的に増やし、その応用の可能性をますます広げている²⁾。このような中、最近、DNAチップ、プロテインチップ、ナノバイオに関する書籍や解説・総説が多く出版され^{3~13)}、その中でマイクロアレイ・バイオチップも解説されているが、基礎から応用までを広く網羅した書籍はなかった。そこで、基礎編第1~5章では、マイクロアレイ・バイオチップの簡単な歴史について述べた後、製造のための、チップ材料と形状、マイクロアレイ技術、生体分子固定化技術、検出技術について、詳しい内容や各技術に関するトピックスについて各章で述べる。

1 マイクロアレイ・チップのはじまり

マイクロアレイ・バイオチップの基本的な要素技術の一つとなる、バイオ分子の相互作用による分析技術は古くから知られており、抗原・抗体反応によるイムノアッセイはその代表例である。EkinsとChuらが1980年代後半、マイクロアレイ・マルチ-アナライズ・イムノアッセイの可能性を述べている^{14,15)}。プロテイン・マイクロアレイ、特に抗体マイクロアレイのアイデアはここになると思われる。

一方、核酸のハイブリダイゼーションを利用したRNAの検出法は、30年以上前にオックスフォード大学のSouthernらによって開発されサザン・ブロット法と呼ばれ、これも代表的な分子生物学分析法の一つとなっている。このサザン・ブロット法を多数のオリゴヌクレオチドを結合したアレイへ拡張するDNAマイクロアレイの基本特許はOxford Gene Technologies社から1998年に出願された(第2章第3節)。そして本格的な高密度化/小型化は、Fodor(現在はAffymetrix社会長)らが、1991年の*Science*誌に光保護基を用いて光リソグラフィによる生体分子マイクロアレイを報告したことに始まる(特許出願は1989年)。これが現在のAffymetrix

* Yoshihiro Ito (独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

社のジーンチップあるいは「アフィメトリクス型」となっている。固相法による逐次合成法で、塩基数にして数十の長さのオリゴヌクレオチドが、網羅的にスライドガラス上に配列されている。現在販売されているジーンチップには、数万種以上もの遺伝子と遺伝子断片がアレイされ、オリゴヌクレオチドを用いているため遺伝子発現解析のほか、ジェノタイプング（遺伝子配列解析）などに応用することができる。現在では、このジーンチップの他に様々な DNA マイクロアレイが作られ、学術研究を中心に広く用いられている。

ジーンチップをはじめとする DNA マイクロアレイが飛躍的に展開されるきっかけは、1995年にスタンフォード大学の Brown らが、長い DNA をそのまま正電荷高分子を吸着したガラス板上にスポット状に貼り付ける方法を考案し、遺伝子発現を大量かつ同時並行的に検討する研究に用いてからになる。そして、ゲノム科学の急激な進展ともあいまって非常に急速に発展した。この「スタンフォード型」そのものは、点突然変異の検出には不向きであるが、調製が容易なため、比較的長い DNA 鎖を固定化して、遺伝子発現を調べる目的で使用されている。

このように遺伝子解析から始まったマイクロアレイ・バイオチップであるが、一つには基礎編で紹介するような様々な要素技術やシステムが開発され高性能化するとともに、応用編で述べるようにタンパク質をはじめとする様々な生体分子や細胞にまで応用が展開され、その範囲が広がってきている。

2 マイクロアレイの要素技術

2.1 基板素材^{16,17)}

当初、シリコン板に始まり、続いてスライドガラス上への生体分子のマイクロアレイ固定化が行われるようになった。特に DNA マイクロアレイでは、電気化学的にハイブリダイゼーションを検知する場合もあり、半導体酸化シリコンや非酸化シリコン、シリコン・ナイトライドが多く用いられている。しかし、現在最も一般的なものは、ガラス基板を様々な有機化処理してその上に生体分子や細胞を固定化している例が多い。これは、ガラス基板が様々な溶媒に耐性があり、機械的にも安定で、低蛍光性で、しかも安価に修飾できることによっている。無機材料としてはダイヤモンド基板なども使用されるようになってきている（第2章第2節）。また無機材料だけでなく、第2章第1節で述べられるようなプラスチック基板もあり、それぞれ特徴ある使用方法が考えられている。

基材表面処理としては表面の官能基量を高めるために3次元化が行われ、そのためにアガロース、ポリアクリルアミド、ニトロセルロース、ナイロン、ポリフッ化ビニリデン、ポリジメチルシロキサンなどが用いられることが多い。また、 dendrogram や dendron を表面に形成す

る報告もある。固定化物とアナライトとの相互作用を促進するためにポリエチレングリコールのようなスペーサー分子を導入することが有効であることも多く報告されている。

2.2 形状

当初は平らな基板が用いられたが、アナライトとの相互作用をできるだけ多くするために表面積や固定化するプローブ分子の密度を高める方策がとられた。多孔性やフィルター状の担体を用いたり、基板表面に凹凸を形成させたり、生体分子固定化ビーズを光ファイバーの束に配置したり、固相合成した多孔性ガラス担体をそのまま基板上に固着したり、中空糸内で架橋ゲルを形成したり、糸の上に物理的に固定化したりと、特にDNAマイクロアレイ・バイオチップに関してメーカー各社が様々な独自技術を開発している。このことは、第2章第3節に詳しく述べられている。

2.3 マイクロアレイ技術^{18,19)}

接触型と非接触型に分類することができ、様々な会社から販売されている。接触型は、さらにピン型とスタンプ型に分類できる。前者のピンには様々な形状がある。キャピラリーチューブ、ソリッドピン、スプリットピン（先割れピン）、シリコンピン（メタルピンより低コストで微細加工可能）などが知られている。スタンプ型は、ピン型を複数個束ねたような形となり、弾性スタンプを用いたソフトリソグラフィがよく知られている。この他、実用化レベルには達していないものの、原子間力顕微鏡（AFM）を用いたディップ・ペン・リソグラフィはナノ・レベルのマイクロアレイに有効な方法である。

非接触型には光化学法、電界プリント法、液滴ディスペンス法と、レーザー・アブレーション法がある。光化学法としては、光リソグラフィがあげられ、その代表例は、On chip 合成で用いられ、ジーンチップ（Affymetrix 社製）が有名である。ナノチップ（Nanogen 社製）は、電界プリント型を利用している。マイクロ電極で基板を正に帯電し、負電荷をもつDNAやRNAを吸着させている。液滴ディスペンス法の主な方法はインクジェット型、マイクロポンプ型と、エレクトロスプレイ・デポジション型で、これらは各々第3章第1節、第2節、第3節に解説がある。レーザー・アブレーション法では、直接法と間接法がある。直接法では、生体分子とグリセロール、緩衝剤を石英板に被覆し、そこにパルス・レーザーを照射し、被覆したなかの一部領域を蒸発させ基板上へ沈着させる方法である。間接法では、基板に予めレーザー処理をしてから生体分子を固定化する。

マイクロアレイした液滴が乾燥する際に、不均一な分布が生じ、特に円周辺部に生体分子（ペプチドや抗体のようなタンパク質で顕著）が局在する現象がよく観察されるが、これは界面活性

剤の添加で解消できることが最近報告されている²⁰⁾。プロテオーム解析の分野では、二次元電気泳動したゲル板をナチュラルプロテインアレイとして用いられることが多く、この自動作成も可能になってきている（第3章第4節）。このような従来の方法とは全く別に第3章第5節で紹介があるように、網羅的なプロテオーム解析のために二次元電気泳動をチップ型に発展させたケミカルプリンタが開発されている。

2.4 固定化法²¹⁾

固相法で合成可能な核酸やペプチドの On chip 合成から始まったマイクロアレイ技術であるが、その技術の発展とともに、様々な生体分子の固定化が行われるようになり、従来の酵素固定化法で養われた技術を含め、様々な固定化法が考案されてきている。第4章第1節では、固定化法として、物理固定化法、イオン結合法、包埋法、共有結合法（生体分子をそのまま固定化する場合と、修飾してから固定化する場合）、生体親和性を用いて固定化する方法などについて詳述した。第4章第2節では、特にハイドロゲルを用いた最近の包埋法での固定化についての解説がある。

2.5 検出技術

マイクロアレイ固定化した生体分子と溶液中の生体分子（分析対象物、アナライト）を相互作用させて検出する方法は、標識法と非標識法に分類される。前者には、蛍光法、発色法、化学発光法、放射性同位元素法がある。後者には、電気化学法、表面プラズモン共鳴（SPR）法、水晶発振子マイクロバランス（QCM）法、マス・スペクトル（MS）法などがある。蛍光法は第5章第1節に解説があるように DNA マイクロアレイでは最も一般的に用いられている方法で、より高感度な測定を目指して様々な蛍光分子や分光検出装置の開発が行われている。化学発光法は励起光源が不要のため廉価で検出装置ができることから、タンパク質マイクロアレイでよく利用される。電気化学法が第5章第2節に、非標識型の SPR 法、MS 法が第5章第3節、第4節に各々解説されている。

その他にも、様々な方法が開発されている。標識法としては、金ナノ粒子で DNA を標識して銀(I)の還元反応によって感度を2桁向上した例が報告されている。また、プロテインチップなどにおいては、DNA のように容易に増幅することができないため、シグナルの増幅の方法として、ローリングサークル増幅（RCA）法が考案されている。これは、DNA プライマーを結合した抗体を用いて、環状一本鎖 DNA を鋳型にした DNA 鎖の増幅・伸長を行うもので、伸張された DNA 鎖に蛍光標識した多数のオリゴ DNA 相補鎖をハイブリッド形成させ、蛍光色素をチップ上の微小スポットに集積化するものである。非標識法としては原子間力顕微鏡による測定が知られてい

自動化	方法	工程					販売会社	解析対象	
		採取	抽出	増幅	反応	検出		解析	DNA
全自動	PCR	lab-in-a-tube方式、一体型					IQuum社	○	△
一部 自動	チップ	系型DNAアレイ、一体型					Precision System Science社	○	-
		Lab-on-Chip、一体型					STMicroelectronics社	○	-
		数種の発現解析ツール					Affymetrix社*	○	○
		ビーズアレイ					Illumina社*	○	○
		電流検出、一体型					東芝	○	-
		デュアルモードアレイ					Agilent社**	○	○
	ケミルミネッセンス検出					AppliedBiosystems社**	-	○	
	PCR	キャピラリー電気泳動検出、一体型					BeckmanCoulter社	-	○

*: 多検体対応の増幅工程付加オプションあり
 **: 複数の機器で試料調製から解析まで対応

○: 実施例プロトコルあり
 △: 用途記載のみ
 -: 用途記載なし

(財) 化学技術戦略推進機構提供 (株式会社ダイヤリサーチマーテック調べ)

図1 DNA マイクロアレイ・バイオチップを用いた全自動システムの現状 (2007年)

る。

3 マイクロアレイ・バイオチップを使用した分析システム

マイクロアレイ・バイオチップを使った自動化システムも研究開発されるようになってきている。DNA マイクロアレイの現状を図1に示す。遺伝子分析には、細胞からの遺伝子の抽出過程が必要となり、まだ全工程を自動で行う装置はチップ型では製品はない。後述するように、現在重要課題になっているマイクロアレイの標準化のためには、サンプル調製段階からの標準化が必須であることから、全工程自動化システムの開発は今後のマイクロアレイ・チップのさらなる発展のためには重要な要素になると考えられる。

一方タンパク質解析ではすでにELISAなどで自動化装置が汎用されており、それを利用した自動化装置の開発が進められてきている²²⁾。我々のグループでも、アレルギー診断や自己免疫疾患診断用のマイクロチップのための分析システムを開発している²³⁾。これは、マイクロ流路型チップとマイクロアレイを融合させたもので、エッペンドルフ・チューブに入れた血清を装填すれば自動的に吸い取り、チップ上を流し、自動的にインキュベーション、洗浄、二次抗体反応、洗浄をし、最終的に化学発光試薬を加えて化学発光量を定量し、パソコン画面上に血清中に含まれる抗体量を表示できるようになっている (図2)。

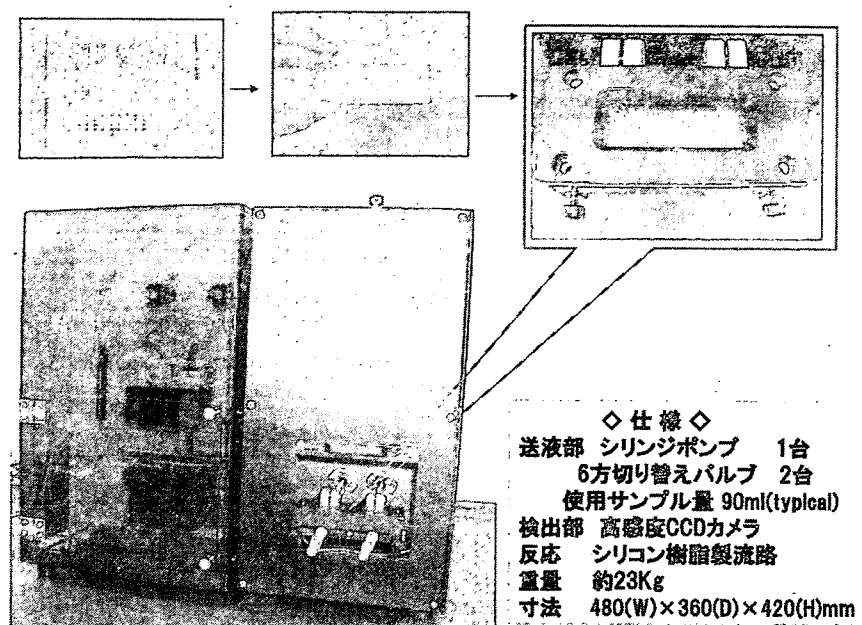


図2 プロテイン・マイクロアレイのための全自動測定システムの例
マイクロ流路とマイクロアレイ・チップを複合化してバイオチップを構成。バイオチップとサンプルを装填すると自動で測定し、データをパソコン画面に表示する。

4 マイクロアレイの標準化

DNA マイクロアレイは研究で広く用いられるようになったが、いろいろな種類のプラットフォームが市販されるようになると、それぞれでデータが異なるという結果が明らかになってきた。そこで、数年前からデータを公的に管理・保存するシステムが学術分野において整備されるようになってきた。そしてさらに、マイクロアレイを医療診断に利用するために、どのような検討を行い、データを取り揃える必要があるかという検討が、世界的に進められている。代表的なものとして、米国食品医薬品局 (FDA) がイニシアチブをとり、米国立衛生研究所 (NIH), 米環境保護局 (EPA), 米農務省 (USDA), 米国の遺伝子発現解析プラットフォーム製造会社などが参加した DNA チップの遺伝子発現解析の品質管理検定プロジェクト (micro array quality control, MAQC) で、その成果が2006年9月にまとまった²³⁾。MAQCプロジェクトでは、6社のDNAマイクロアレイのプラットフォームとオペロン社のオリゴヌクレオチドで作成したマイクロアレイ、そしてマイクロアレイ以外の定量的な遺伝子発現解析プラットフォーム (Applied Biosystems社のTaqmanアッセイ, Panomics社のQuantiGeneアッセイ, Gene Express社のStaRT-PCRアッセイ) とを比較した。その結果、すべてのプラットフォームにおいて、得られた結果に大差がなく、DNAマイクロアレイで得られたデータの精度が他の定量的なアッセイにより確認されたと結論付けた²⁴⁾。しかし、結果については議論の余地が指摘されるところもあり²⁵⁾、今後

のさらなる展開が望まれるところである。

MAQC プロジェクトについては第二期がはじまっており、「臨床」「生物統計学」「トキシコゲノミクス」「MAQC Titration (混合試料の解析)」の四つのワーキンググループで、DNA マイクロアレイの研究の品質向上、医療応用への可能性について検証を進めている。日本でも産業界が中心となって、米国をはじめとする国外団体と国際協調を図りながら、バイオチップの産業化に向けた標準化を推進して市場を確立することを目標に、2007年10月にバイオチップ・コンソーシアムが発足した。

5 マイクロアレイ・バイオチップのこれから

欧米では、DNA マイクロアレイは既に認可を得て臨床応用のために販売されるようになってきている(第6章)。日本でも販売が始まっているものの、保険は適用されておらず、今後どのように展開していくか未知の部分もある。ただ、個の医療の基盤となるバイオマーカーが続々実用化のプロセスに入ってくることを考えると、将来は、臨床診断分野で欠かせない技術になると予測される。本書で紹介するように、様々な生体分子の分析を目指して、新しいバイオチップの開発はもちろんのこと、その製造装置、検出装置なども研究開発されている。このようなハードの発展とともに、解析データが膨大になるため、その解析法もバイオインフォマティクスの発展とともに進歩している。このような技術の進歩により、より詳細な生体情報が得られるようになると、創薬分野での研究開発に応用できるとともに、病気の予防や診断、投薬管理、予後管理などが精密に行えるようになり、バイオチップ化することでデータの送受信も容易になり、遠隔医療への貢献も大きくなる可能性があり、QOL (Quality of Life, 生活の質) の向上が進むものと考えられる。また、医療への応用ばかりでなく、環境モニターへの応用へも期待がかかる。マイクロアレイ・バイオチップ技術が大いに発展することを期待したい。

文 献

- 1) 伊藤嘉浩, 大村馨, バイオニクス, 2, 70-71 (2005)
- 2) R. Carlson, *Biosec. Biotero. Biodiff. Str. Prac. Sci.*, 1, 1-12 (2003)
- 3) 伊藤嘉浩, 「バイオテクノロジー総覧」, 日本能率協会総合研究所編, 通産省資料出版会 (2005)
- 4) 山本重夫監修, 「バイオ解析・診断技術のテーラメイド医療への応用」, シーエムシー出版

(2006)

- 5) 山根恒夫, 松永是, 民谷栄一監修, 「ナノバイオ大事典」, テクノシステム (2007)
- 6) 三原久和・小島英理・馬場嘉信編, 「ナノバイオ計測の実際」, 講談社 (2007)
- 7) 軽部征夫監修, 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」, テクノシステム (2007)
- 8) 久原哲監修, 「DNA チップ活用テクノロジーと応用」, シーエムシー出版 (2007)
- 9) 関根光雄編, 「新しい DNA チップの科学と応用」, 講談社 (2007)
- 10) A. Kozarova, S. Petrinac, A. Ali, J. W. Hudson, *J. Proteome Res.*, **5**, 1051-1059 (2006)
- 11) L. Bonetta, *Nat. Methods*, **3**, 571-577 (2006)
- 12) H.-J. Mueller, T. Roeder, "Microarrays", Elsevier Academic Press (2006)
- 13) S. F. Kingsmore, *Nat. Rev. Drug Discov.*, **5**, 310-320 (2006)
- 14) R. Ekins, F. W. Chu, *TIBTECH*, **17**, 217-218 (1999)
- 15) M. G. Weller, *Anal. Bioanal. Chem.*, **375**, 15-17 (2003)
- 16) S.-y. Seong, C.-y. Choi, *Proteomics*, **3**, 2176-2189 (2003)
- 17) S. J. Oh, B. J. Hong, K. Y. Choi, J. W. Park, *OMICS J. Integr. Biol.*, **10**, 327-348 (2006)
- 18) I. Barulovic-Nad, M. Lucente, Y. Sun, M. Zhang, A. R. Wheeler, M. Bussmann, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **26**, 237-259 (2006)
- 19) R. Mukhopadhyay, *Anal. Chem.*, September **1**, 5969-5972 (2006)
- 20) Y. Deng, X.-Y. Zhu, T. Kienlen, A. Guo, *J. Am. Chem. Soc.*, **128**, 2768-2769 (2006)
- 21) F. Rusmini, Z. Zhong, J. Feijen, *Biomacromolecules*, **8**, 1775-1789 (2006)
- 22) B. G. Knecht, A. Strasser, R. Dietrich, E. Martlbauer, R. Niessner, M. G. Weller, *Anal. Chem.*, **76**, 646-654 (2004)
- 23) 伊藤嘉浩, 大村馨, バイオインダストリー, **23**, 27-34 (2006)
- 24) MAQC Consortium, *Nat. Biotechnol.*, **24**, 1151-1161 (2006) など同月号に 6 報
- 25) *Nat. Biotechnol.* **25**, 25-29 (2007)

第4章 固定化技術

1 生体分子のマイクロアレイ固定化法

伊藤嘉浩*

1.1 はじめに

生体分子のマイクロアレイ固定化法は、これまで「固定化酵素」として展開されてきた方法論がそのまま採用される一方で、最近新たな固定化法も開発されてきている。マイクロアレイのための生体分子固定化法については、核酸、タンパク質、糖ごとに、いくつかの解説や総説が発表されている¹⁻¹¹⁾。本節では、これらをまとめて解説する。

一般に、生体分子の固定化法には、非特異的な物理吸着による方法 (図1 a)、イオン結合による方法 (図1 b)、ヒドロゲルなどによる包埋による方法 (図1 c)、生体分子に何も修飾を加えずに共有結合による固定化法 (図1 d) などがある。さらに生体分子を、On chip 合成したり (図1 e)、共有結合用に新しい官能基で修飾して基板の官能基に反応させたり (図1 e)、ビオチン・アビジン結合に代表されるような生体親和性結合のために修飾してから固定化する方法がある (図1 f)。

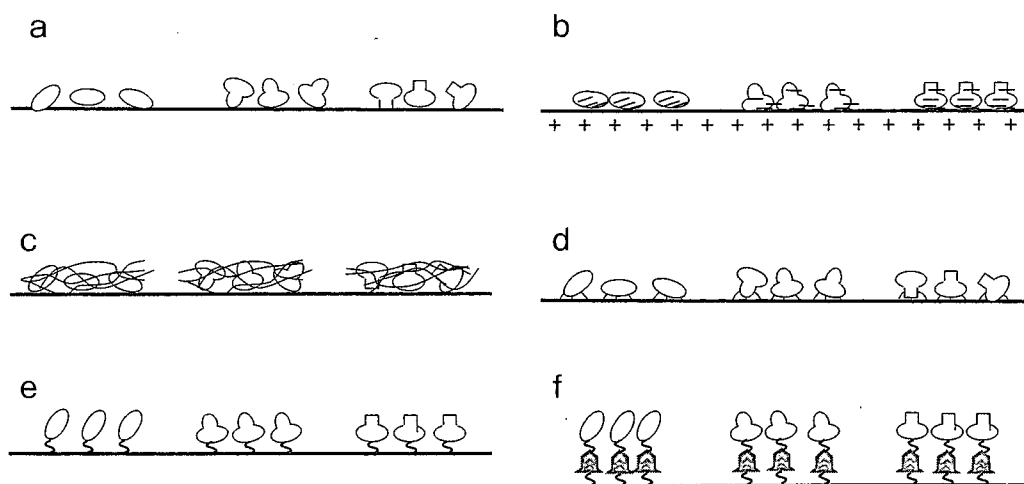


図1 生体分子の固定化法

a) 物理吸着固定化法, b) イオン結合固定化法, c) 包埋固定化法, d) 生体分子を未修飾のまま共有結合固定化する方法, e) 生体分子を部位特異的に修飾して共有結合固定化する方法, f) 生体分子を修飾して生体親和性により固定化する方法。

* Yoshihiro Ito (独)理化学研究所 伊藤ナノ医工学研究室 主任研究員

表1 様々なマイクロアレイ固定化法とその特徴

生体成分の修飾	固定化法	安定性	作成の簡便性	アッセイ時のバックグラウンド	固定化物の活性	固定化分子の配向性
無	物理吸着法	低	高	高	低	低
	イオン結合法	中程度			低	
	包埋法			高		中程度
	共有結合法	高			低	中程度
有	共有結合法	中程度	低	中程度	高	高
	生体親和性結合法	中程度				

固定化法は、固定化された生体分子の活性と密接に関連し、バイオチップの性能と深くかかわる(表1)。固定化が不完全では、固定化の意味がなくなるが、固定化の方法によっては配向性の問題が起きたり、構造変形により活性が失われる場合も多い。生体分子が生物活性を維持するためには、できるだけコンフォメーションや機能(分子認識)部位に影響なく固定化が行われる必要がある。一方では、マイクロアレイには、様々な生体分子を同じ方法で固定化する要求があり、単なる固定化とは異なり、一朝一夕にいかない。最適の固定化方法を求めて検討が行われている¹²⁾。

1.2 物理吸着固定化法^{10,11)}

最も簡単な固定化法は物理吸着固定化法である。生体分子は一般的に疎水性相互作用により固体表面に吸着することが知られている。ただし、その吸着様式は生体分子や基材表面によって様々に異なり、生物活性も様々である。表面への吸着量を多くするために基材の3次元化が行われることが多い。基材には、ニトロセルロース膜、ポリフッ化ビニリデン膜、ナイロン膜、ポリスチレン基板などが広く利用されている^{13~15)}。特にニトロセルロース膜をガラス基板に貼り付けたスライドガラスは吸着能が高く、長期間安定だとしてマイクロアレイには多用されている。一方、糖鎖のように親水性が高く固体表面に吸着しにくいものは、生体分子側に疎水性基を導入してから固定化することも行われている^{16~19)}。

欠点としては、強く固定化されないことがあげられる。固定化したつものの生体分子が、緩衝液や界面活性剤ですぐに除去されてしまえば、アッセイには使えない。また、もともと非特異的な吸着によっているため、アッセイの際に、生体分子が固定化されていない領域にアナライト以外の様々な分子が吸着してバックグラウンドが上がってしまうことも大きな欠点である。さらに、主として疎水性相互作用で結合するため固定化分子の変性(コンフォメーション変化)が大きい場合も報告されている。