

核酸標準物質の現状と動向

柴山祥枝*

(平成21年8月12日受理)

The present condition and movement of nucleic acid standard

Sachie SHIBAYAMA

1. 緒言

20世紀後半から21世紀前半にかけて、人類は新たな局面を迎えている。ITやナノテクノロジー、ライフサイエンスといった科学技術が飛躍的に発展し、様々な技術革新が起きた一方で、地球温暖化や土壌・水質汚染といった環境問題、食糧危機など世界規模での問題が顕在化し始めた。

バイオテクノロジーは、人類、ひいては生物にとってその基本をなす「生命」についての科学的知見の革命的進歩から生まれてきた技術的成果である。バイオテクノロジーは人間生活の基本である、「生きる」、「食べる」、「暮らす」という3場面を抜本的に変化させ、環境問題や食糧危機の解決策を生み出す可能性を秘めている¹⁾。近年のゲノム研究から、DNAやRNAといった核酸が生体内で大きな役割を果たしていることが明らかになってきた。1940年代に初めて遺伝子の本体がDNAであることがわかり、1953年にワトソン、クリックらによってDNAの二重らせん構造が明らかにされた²⁾。それから半世紀たった2003年4月、ヒトゲノムプロジェクトが終了し、ヒトゲノムの配列情報が明らかになった³⁾。核酸は、バイオテクノロジーの中核を担う物質といっても過言ではない。生物のゲノムや核酸についての理解が深まるにつれて、バイオテクノロジーはますます発展していくと考えられる。

人間生活の基本の3場面で、特にバイオテクノロジーが応用されている分野は、「医療・健康分野」、「食料分野」、「環境分野」である。それらの分野では、バイオテクノロジーの応用により、新しい技術や、それを用いた製品や産業が生まれつつある。バイオ関連機器の進歩はもちろん、核酸自体を用いた新薬や機能性食品など、バ

イオテクノロジーが応用された例は多岐にわたる。このような産業を支えていく基盤の整備がこれから必要となる。今までは定性面が重視されてきた核酸であるが、近年、急速に核酸定量の重要性が高まりつつあり、核酸関連の計測の標準化が叫ばれるようになってきた。そこで、本調査研究では、方法・装置の標準化や核酸標準物質といった核酸関連の標準化や核酸の定量方法における現状と動向について調査を行った。

第2章において、核酸の役割や構造、関連技術について簡単に説明する。第3章では、核酸関連の標準化の現状について、方法・装置の標準化や核酸標準物質の点から述べる。第4章では、核酸の定量方法について現在一般的に用いられている定量方法と、標準物質の値付けに向けて開発中の定量方法について原理、問題点、方法間の比較について述べ、第5章では、核酸関係の標準化において、必要となるであろう技術的な課題や方法の標準化についての今後の展望を述べる。

2. 核酸

この章では、まず、核酸の構造について説明する。次に、核酸の役割について簡単にふれ、現在主に使われている核酸関連技術について述べる。最後に、現在どのように核酸が利用されているか例をあげて説明する。

2.1 核酸の構造²⁾

核酸には大きく分けて2つの種類があり、それぞれ、デオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) と呼ばれている。これら2種類の核酸は、構成成分中の糖の種類が異なっており、DNAではデオキシリボースが、RNAではリボースが結合している。DNA、RNAは、ともに糸状の分子であり、特にDNAは遺伝情報を担っている物質であるため、膨大な数のタンパク質をコードし

* 計測標準研究部門 有機分析科 バイオメディカル標準研究室

ている。そのため、巨大な分子となっている。

例えば、大腸菌の染色体は1個のDNA分子であり、400万塩基対からなる。細胞からDNAを取り出すと、その長さは 1.4×10^6 nm (= 1.4 mm) にもなる。このようにDNAは巨大な分子であるが、その構造は、膨大な数のデオキシリボヌクレオチド（単にヌクレオチドとも呼ばれる）がリン酸ジエステル結合により重合したポリマー構造である（図1）。1個のヌクレオチドは、それぞれ1つずつのリン酸基、糖、塩基からなる。ポリマー構造中では、リン酸基と糖がDNAの構造を作る骨格的な役割を果たして他のヌクレオチドと重合し、それにより連なった塩基配列が遺伝情報を担っている。

ヌクレオチドに結合する塩基は、DNAとRNAで異なっている。DNAでは4種類の塩基があり、アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)である。RNAでは、チミンの代わりにウラシル(U)が結合している（図2）。

また、ヌクレオチドからリン酸基がはずれた物質をデオキシヌクレオシド、または、単にヌクレオシドと呼ぶ。DNAにDNA分解酵素を作用させるとヌクレオチドが生じ、ヌクレオチドにホスホジエステラーゼ（リン酸エステルを加水分解する酵素）を作用させるとヌクレオシドが生じる（図3）。

2.2 核酸の役割²⁾

DNAは一部のウイルスを除いて、全ての生物において遺伝情報を担う物質である。1940年代にアベリーらの実験から遺伝子の本体がDNAであることが明らかにされてから、DNAは生物の基本となる物質の1つとして注目を集めてきた。1953年にワトソン、クリックらに

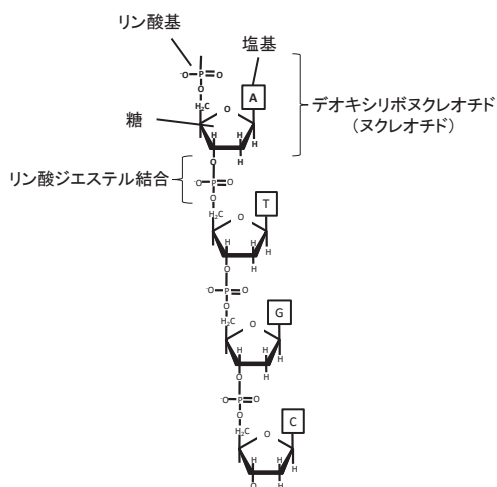


図1 DNAの構造

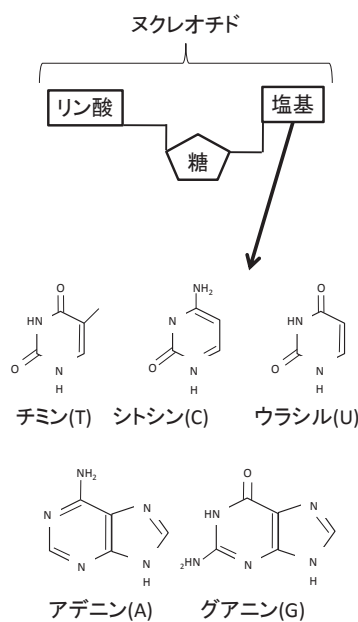


図2 塩基の構造

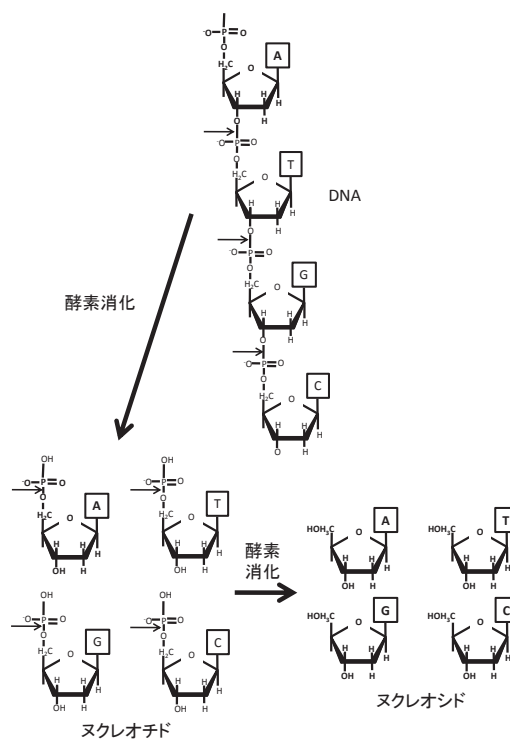


図3 DNAとモノマー2種類

よってDNAの二重らせん構造が明らかにされ、DNAの複製方法、細胞内での遺伝情報の流れ、遺伝子発現のメカニズムなど、様々なことが明らかにされた。さらに、2003年4月にヒトの全ゲノム情報を解明するヒトゲノムプロジェクトの終結が宣言され、今後はポストゲノミク

ス¹の時代であるといわれている。ヒト以外にも、病原性微生物や植物のゲノム情報も明らかになってきており、DNAからの情報を元に更に研究が進むことが予想される。DNAは生物の設計図といっても過言ではなく、DNAに関する情報に端を発する研究が発展すれば、人間社会に役立つ技術が創出されてくるだろう。例えば、個人の遺伝情報にあわせたテーラーメイド医療や、創薬は最もその恩恵にあずかることになるだろう。

一方、RNAは、DNAからタンパク質が合成されるとき、鋳型として働く。RNAには、タンパク質のアミノ酸配列情報を伝えるメッセンジャーRNA (mRNA) や、タンパク質合成の際に必要な転移RNA (tRNA) や、リボゾームRNA (rRNA) など役割の異なる種類がある。RNAは、DNAを鋳型として合成され(転写)、転写されたmRNAからタンパク質が合成される(翻訳)。したがって、タンパク質が合成されるまでの遺伝情報の流れは図4のようになる。しかし、タンパク質のアミノ酸配列情報を有しているRNAは、RNA全体の2%にすぎないということがヒトゲノムの解明によりわかってきた。タンパク質に翻訳されていないRNA (non-coding RNA) は、RNA自身が酵素活性を持ったり、他のタンパク質と相互作用して遺伝子の発現を抑制したりといった機能を持つことが最近の研究から明らかにされつつある。そのようなRNAは、機能性RNAと呼ばれており、医療や再生医学などへの応用が期待され、現在、盛んに研究が行われている⁴⁾。最後に、DNAとRNAの共通点、相違点

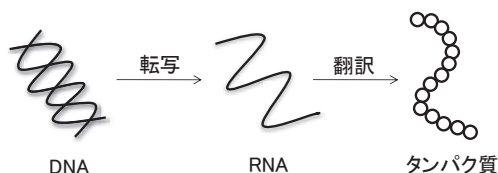


図4 細胞内のタンパク質合成の流れ

表1 DNAとRNAの共通点と相違点

名称	DNA	RNA
構造	<ul style="list-style-type: none"> ● 塩基 + 糖 + リン酸基 ●二本鎖、二重らせん構造 ● ポリマー 	<ul style="list-style-type: none"> ● 塩基 + 糖 + リン酸基 ● 一本鎖 ● ポリマー
結合している糖	デオキシリボース	リボース
結合している塩基	アデニン (A) グアニン (G) シトシン (C) チミン (T)	アデニン (A) グアニン (G) シトシン (C) ウラシル (U)
特徴	<ul style="list-style-type: none"> ● 全ての原核生物、真核生物において、遺伝情報を担う ● 一部のウイルスにおいて、遺伝情報を担う 	<ul style="list-style-type: none"> ● 一部のウイルスにおいて、遺伝情報を担う ● mRNA, tRNA, rRNA などの種類がある ● タンパク質へ翻訳されず RNA 自身が機能を持つものがある

について、表1にまとめた。

2.3 核酸関連技術

核酸は現在、生命科学の分野で活発に用いられており、核酸に特有の技術も存在する。この節では、その中でも頻繁に使われている、または、これから更なる応用が期待されている代表的な技術について、簡単に説明する。

2.3.1 遺伝子組換え技術⁵⁾

核酸を応用する分野で共通している技術例として、遺伝子組換え技術が挙げられる。遺伝子組換え技術は、1970年代に実用化されたが、完全に新しい技術というわけではなく、その考え方の基本は人類が数千年の間に行ってきた植物や動物の品種改良技術である。現在口にしているトマトやジャガイモは、野生種のものとは大きくかけ離れているが、それはヒトが長い時間をかけて少しずつ人為的に変化させてきたからである。一方で、その変化の原因は長い間知られることはなかったが、近年、DNAやRNAに関する基礎研究の結果、品種改良時に起こる変化は遺伝子によるものだということがわかってきた。現在では、偶然に頼ることなく目的を持って遺伝子を操作することが可能となっている。その結果、遺伝子組換え体 (genetically modified organism : GMO) が生み出されている。GMOの代表として、ダイズや小麦などの遺伝子組換え作物 (GM農作物) やインスリン等のホルモンを産生する遺伝子組換え微生物 (GM微生物) などは、いまやあちらこちらで耳にするものである。それ以外にも、医学の分野でも遺伝子組換え技術は重要な役割を果たしている。ゲノム情報からわかってきた病気の原因遺伝子を欠損させたモデルマウスは、現在の基礎医学では無くてはならない存在である。このように、遺伝子組換え技術は、色々な分野で利用されている。

2.3.2 ポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction; PCR)²⁾

PCRは1984年に考案され、現在、生命科学の分野においてなくてはならない手法となっている。PCRは複雑な混合物中の数コピー²⁾の特定のDNA配列でも100万倍以上に増幅できる方法である。その原理について、簡単な模式図を図5に示す。PCRは、増幅したいDNA配列(標的配列)を含む溶液に、次のような成分を加えて行う。

1. 標的配列(鋳型DNA)
2. 標的配列の末端と相補的な配列を持つ2種類のオリゴヌクレオチド(プライマー)

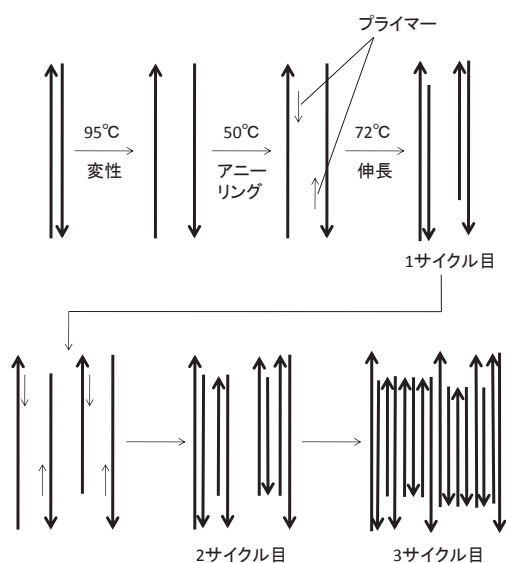


図5 PCR法によるDNA増幅の模式図

- 3. 4種類のデオキシリボヌクレオチド三リン酸 (dNTP)
- 4. 熱に安定なDNAポリメラーゼ (*Taq*DNAポリメラーゼ)

PCRの反応サイクルは、3段階からなっている。1段階目は、上記の成分を含む反応溶液を95℃前後に加熱し、2本鎖の鋳型DNA分子を変性させ、1本鎖DNAにする。次に、加熱した反応溶液を50℃付近まで急冷し、各プライマーとDNA鎖間で相補的に結合（アニーリング）させる。最後に、溶液を*Taq*DNAポリメラーゼが働くのに最適な温度である72℃まで加熱し、DNA合成を行う。この3段階を繰り返し行うことで、両側をプライマーではさまれた標的配列は指数関数的に増加する。

PCRによって、今まで肉眼で見ることができなかった核酸の情報を可視化できるようになった。PCRは病原菌やウイルスの検出といった医学診断や親子鑑定、法医学などの分野でも応用されている。

2.3.3 DNAマイクロアレイ (DNAチップ)⁶⁾

DNAマイクロアレイ (DNAチップとも呼ばれる) は、シリコンやガラスの基板の上に塩基配列が既知のDNA断片 (プローブ) を固定化したものである。マイクロアレイ上に解析したいDNA断片 (標的DNA) を流し、相補的な配列のプローブと結合 (ハイブリダイゼーション) させることにより、遺伝子を特定する仕組みになっている。近年、ゲノムプロジェクトを通じて明らかとなってきた様々な遺伝情報をもとに、多くのDNA断片が固定化されたDNAマイクロアレイが開発され、多数の遺伝子発現を同時に解析することが可能となっている。

現在作成されているDNAマイクロアレイは、プロー

ブDNAとして、合成オリゴヌクレオチドとPCRによる遺伝子増幅断片の2種類がある。前者は遺伝子多型解析に用いられ、後者は遺伝子発現解析に用いられている。マイクロアレイは遺伝子発現やゲノム多型などの網羅的解析に有力な手段となっており、基礎研究から臨床研究まで現在では不可欠の手段となっている。

一方で、問題点も指摘されている。いくつか例を挙げると、まず、ハイブリダイゼーション時に、完全な相補配列でなくても標的DNAがプローブとハイブリダイズするため、検出時の再現性が乏しく、同じサンプルを数回測定しなくてはならないということが挙げられる。また、基板上に固定されるプローブDNAが常に一定量スポットされているかどうかを確認できないため、DNAマイクロアレイごとの均質性に問題があるとも指摘されている。これらの問題点を解決するために、アメリカにおいてDNAマイクロアレイのプラットフォームの標準化の動きがあるが、これについては、後の章で詳しく述べる。

2.3.4 RNA干渉 (RNA interference : RNAi)^{7), 8)}

RNAiは、siRNA (short interfering RNA) とよばれる21 mer ~ 23 merの2本鎖RNAにより配列特異的に遺伝子発現が抑制される現象であり、その現象が応用される技術の総称である。1998年に線虫で2本鎖RNAによる配列特異的な遺伝子の抑制が起きること (サイレンシング) が発見され、2001年には哺乳類でも同様の遺伝子抑制機構があることが明らかになった。線虫でのRNAiの機構について、簡単に図6に示す。

RNAiにおける最初の機構は、長い2本鎖RNAが、

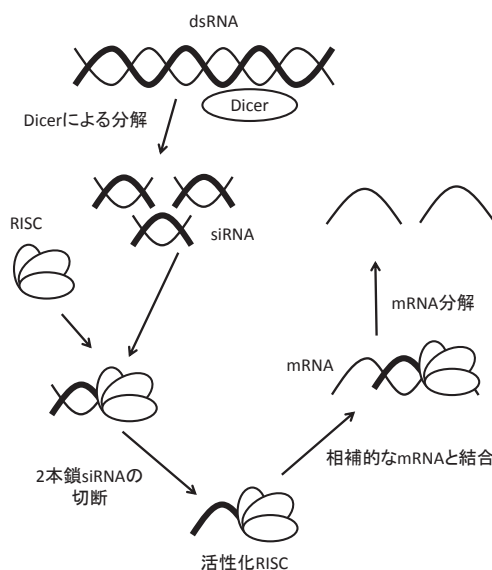


図6 線虫におけるRNAiの機構

Dicerと呼ばれる酵素によって21～23 merのsiRNAに分解されることから始まる。次に、2本鎖siRNAはRISC(RNA induced silencing complex)と呼ばれる複合体と相互作用する。2本鎖siRNAと相互作用したRISCは活性化され、2本鎖siRNAを1本鎖siRNAに分解する。そして、最終的に1本鎖siRNAと相補的なmRNAを分解する。mRNAが分解されるとタンパク質に翻訳されないため、遺伝子発現が抑制される。

現在、RNAiは遺伝子と疾患との関係が明らかな病気の治療に応用するための研究が行われている。

2.4 核酸の利用例と定量ニーズ

2.3で述べたように、現在、世界的に核酸に関する研究が精力的に行われており、その研究の成果が様々な分野へと応用されている。この節では、医療・健康分野、食料分野、環境分野に焦点を当て、それらの分野で利用されている、または、応用が期待されている核酸の例と、その定量ニーズについて述べる。

2.4.1 医療・健康分野

医療・健康分野における核酸の利用例は多く存在するが、その1つとして核酸医薬⁹⁾が上げられる。2008年7月にファイザー社が、滲出性加齢黄斑変性症(AMD)の治療薬である「Macugen」の認証を厚生労働省から取得し、Macugenは国内で初めて承認された核酸医薬となった。AMDは加齢とともに起こる病気で、眼球内の脈絡膜から異常な血管(新生血管)が生えてくることで起こる病気である。Macugenは、眼内における病的血管新生への関与がもっとも深いと考えられている血管内皮細胞増殖因子(VEGF165)に結合し、その働きを特異的に阻害する。このような特定の標的に強い親和性と高い特異性で結合する核酸は「アプタマー」と呼ばれている。また、アプタマー以外にも、2.3.4で述べたsiRNAも核酸医薬として応用されることが期待されている。核酸医薬は、癌、リウマチ、アトピー性皮膚炎、眼科疾患など様々な疾患への応用が期待されている⁴⁾。

一方、ヒトゲノム計画の終了により、ほぼ完全なヒトの全遺伝情報がわかっている現在、マイクロアレイでは、ヒトの全遺伝子の発現情報が1アッセイで解析可能となっている。そのような背景を踏まえて、現在マイクロアレイを用いた癌研究が盛んに行われている。近年の研究から、癌細胞は通常細胞とは異なる遺伝子発現パターンを示すことがわかってきた。そのため、全ての癌腫において癌細胞と対照細胞から抽出したDNAまたはRNAのマイクロアレイデータを比較した発現プロファ

イルが作成されつつある。そのような発現プロファイルを用いて、癌の早期発見や治療方針(癌細胞は薬剤耐性や放射線耐性を持つものも多い)を決定するのに役立つ研究が進んでいる⁹⁾。

このように、医療・健康分野では核酸は多くの場面で利用されており、さらなる応用も期待されている。その一方で、人間の体内に入る医薬品として核酸が使われる場合、核酸を精確に定量する必要性が生じてくる。また、マイクロアレイデータの蓄積によりテーラーメイド医療の実現が可能となった場合、遺伝子発現を定量的に扱う場面はさらに増えると考えられる。

2.4.2 食料分野

食料分野での核酸利用として真っ先に挙げられるものは、遺伝子組換え作物(GM農作物)だろう。GM農作物の商業栽培は1996年から始まり、すでに10年以上が経過している。国内では、2007年11月の段階でダイズ、トウモロコシ、ジャガイモ、テンサイ、ナタネ、ワタ、アルファルファの7品目、84種類のGM農作物の安全性審査が終了し、食品として商品化が可能となっている⁵⁾。また、世界に目を向けてみると、GM農作物の生産国は1996年当初の6カ国から、2007年の23カ国にまで増えている。耕作面積も、1億1430万ヘクタールに上り、年々増え続けている。GM農作物は着実に世界的に受容されてきつつある¹⁰⁾。

その一方で、日本国内において、2001年4月、農林水産省と厚生労働省によって、「農林物資の規格化及び品質表示の適正化に関する法律」(JAS法)及び食品衛生法規格基準改定により、GM農作物含有食品の表示が義務化された。これらの法律により、食品に含まれる原材料のうち、総重量の上位から3位以内、かつ総重量の5%を超えるものに対して、GM農作物の使用の有無を記載しなければならなくなった。現在、GM農作物の定量にはJAS分析試験ハンドブック遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改定第2版¹¹⁾において、定量的PCRを用いてGM農作物を定量する手法が定められている。定量的PCRで核酸を定量する場合、定量値が決まっている標準物質が必要となる。GM農作物の定量を行う際の標準物質はJAS分析試験ハンドブックで指定されており、これについては、後に詳しく述べる。

また、近年、食品の産地偽装や、品種の偽装が多く見つかっているが、上記で述べたJAS法により、生産から流通の段階で消費者への正しい情報の提供、および適切な商品表示が義務付けられている。そのような背景を受けて、食の安全を確保するための手段の1つとして、核

酸を用いた品種判定がある。判定したい対象（農産物、肉、魚など）からDNAを抽出し、特定のDNA配列の有無を調べることで品種を判定する。品種判定を行うためのキットが市販されているためPCRを用いて簡便に実験を行うことができる他、品種判定を請け負う業者も存在する。

2.4.3 環境分野

環境分野における核酸の利用例として、環境診断が挙げられる。現在、農薬や殺虫剤、その他多くの化学物質が日常生活において使われている。これら化学物質の一部は、環境に対してダメージを与える可能性が危惧されている。そのため、化学物質の環境へ与える影響を評価しなければならない。その評価の1つとして、環境中の微生物のモニタリングが挙げられる。

環境中の微生物のモニタリングには、伝統的に土壌や水を採取し、そこから微生物を培養するという手法が用いられてきた。しかし、環境中の微生物で培養できる微生物は全体の0.01%に過ぎないとも言われており、多く見積もったとしても全体の10%程度しか培養できず、残り90%の微生物は難培養性の微生物であることがわかってきた。そのため、従来の培養による方法では環境中の微生物のモニタリングが限界になりつつあった。一方、近年、培養による方法に取って代わる方法として、土壌中から微生物の核酸を抽出しPCRを用いて増幅した後解析するという技術が確立されてきた。このPCRを用いた技術によって難培養性の微生物も検出することが可能となり、環境中の微生物のモニタリング技術として現在精力的に研究が行われている¹²⁾。

3. 核酸関連の標準化の現状

この章では、核酸に関連する分野全般の標準化の現状について述べる。

3.1 方法・装置の標準化

物質の定量には、精確な値付けがなされている標準物質と、統一された操作手順や方法を用いることが必要となってくる。現在、バイオテクノロジーの分野において操作方法や、用いる装置の標準化が進んでいないためデータの信頼性が保てない事例も多々ある。その一例として、DNAマイクロアレイについて述べる。

3.1.1 米国におけるDNAマイクロアレイの標準化

2.3.3で述べたように、DNAマイクロアレイ技術は、

現在、臨床研究や遺伝子発現分析などの分野で、無くてはならないツールになっている。現在、各国の企業からDNAマイクロアレイ用のプラットフォームが発売されている。数多く存在するマイクロアレイ用のプラットフォームから良いものを選ぶポイントとして重要視されている点は、「検出感度の良さ」、「検出特異性の良さ」、「再現性の良さ」である。この3点を保証するために、プラットフォーム毎に特定の操作手順が決まっていたり、遺伝子発現解析の際のコントロールとして用いるために特異的にデザインされたRNA（外部RNAコントロール）がキットの一部として付随していたりする。特定の操作手順や外部RNAコントロールは、プラットフォーム間で統一されておらずプラットフォーム間のデータの互換性や信頼性に疑問が寄せられている。ある研究によると、同一のサンプルで異なる3社から販売されているプラットフォームを用いて実験を行ったところ、それぞれの解析結果に有意な差が認められたという報告もなされている¹³⁾。そのような背景から、米国食品医薬品局(FDA)が先導して、MicroArray Quality Control (MAQC) プロジェクトが推進された。

MAQCプロジェクトでは、アメリカ国内の6つの企業（Applied Biosystems, Affymetrix, Agilent, Eppendorf, GE Healthcare, Illumina）と国立癌センター研究所（National Cancer Institute: NCI）で作られているプラットフォームを用いて、2種類のRNAが異なった量含まれている4サンプルの解析を行い、その結果を比較している。マイクロアレイのデータの互換性の無さや信頼性が揺らぐ大きな原因の1つとして、各プラットフォームで異なるプロトコルが存在することがあげられる。そのため、MAQCプロジェクトでは、実験のためのプロトコルは全て同一のものを用いた。MAQCプロジェクトに携わった人数は、51機関137名に上り、研究室横断的に行われた。その結果、全てのプラットフォーム間で同様な遺伝子発現結果の傾向が見られ、プラットフォーム間のデータ比較ができるようになる可能性が示唆された¹⁴⁾。

DNAマイクロアレイのデータの互換性の無さや信頼性が揺らぐもう1つの原因として、外部RNAコントロールがあげられる。このRNAは、マイクロアレイの品質管理のためにサンプルRNAに添加して用いられる合成または天然由来のRNAである。市販されているマイクロアレイには、そのプラットフォームに特異的にデザインされた外部RNAコントロールが付随されており、そのRNAはマイクロアレイの遺伝子発現解析の際にコントロールとして用いられている。一方で、外部RNAコントロールはプラットフォーム毎に異なっているため、

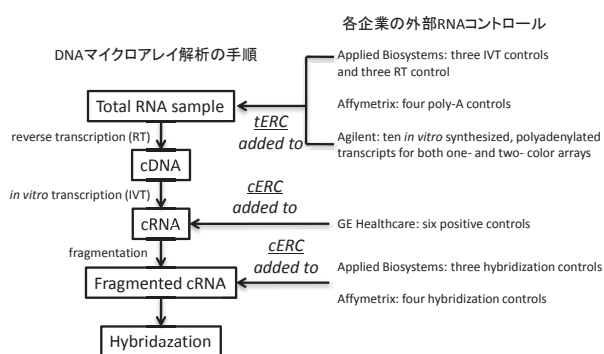


図7 外部 RNA コントロールの種類と添加のタイミング
tERC, cERC : 外部 RNA コントロールの種類

プラットフォーム間の遺伝子発現解析の際のコントロールが統一されていない。そのため、プラットフォーム間の実験結果を直接比較することは難しいと考えられている。そこで、MAQCプロジェクトにおいて外部 RNA コントロール自体の評価が行われた。外部 RNA コントロールは大きく分けて2種類存在し、それぞれサンプル RNA に添加するタイミングが異なる (図7. (19) から抜粋)。それぞれ、tERC (external total RNA control) と cERC (external copy RNA control) と呼ばれている。MAQCプロジェクトの結果、tERC と cERC はマイクロアレイ解析時の異なったステップで遺伝子発現解析のコントロールとして用いられていることが分かった。tERC は解析の初期にサンプル中に添加することから、サンプルの良し悪しを評価するのに役立つっており、一方の cERC はサンプル RNA 中の mRNA の量の違いによらない解析を保障でき、サンプル RNA ごとの実験結果を担保できる。2種類の外部 RNA コントロールは、マイクロアレイ解析時の異なるステップにおいて、マイクロアレイの品質をコントロールするのに用いられているので、2種類を組み合わせることで、包括的なプラットフォーム間の比較ができるようになる可能性が示唆されている¹⁵⁾。

3.1.2 日本における DNA マイクロアレイの標準化

我が国においても、DNA マイクロアレイの標準化についての議論が進んでいる。上記で述べた MAQC プロジェクトのような米国の標準化の動きは、我が国への影響も大きく、2007年7月、国内で DNA マイクロアレイのプラットフォームを生産している企業 (キャノン、シスターコーポレーション、DNA チップ研究所、東芝、東レ、日本碍子、ハプロファーマ、三菱レイヨン、メディビック、横河電機、かずさディー・エヌ・エー研究所)

を中心としたバイオチップコンソーシアム (Japan MicroArray Consortium : JMAC)¹⁶⁾ が設立された。今後、海外のコンソーシアムとも連携しつつ、国内の DNA マイクロチップの標準化を推し進めていく中心となる機関になると期待されている。

3.1.3 その他の装置、キットの標準化

DNA マイクロチップ以外にも、核酸には様々な関連技術がある。それらの技術にも専用の装置やキットが必要になることが多い。現在、日本のメーカーでも核酸関連の装置やキットを販売しているところはあるが、国内メーカーのものよりも海外メーカーのものが多く使われている。例えば、GM 農作物を JAS 分析試験ハンドブック¹¹⁾ に記載された計算方法によって定量的 PCR を用いて定量する場合、内標比と呼ばれる、各 GM 農作物固有の値を計算に含める必要がある。この内標比は定量的 PCR に用いる機種によって異なる値となっているため、実質的に、JAS 分析試験ハンドブックに記載されている機種を使わなければ GM 農作物の定量はできない。現在、JAS 分析試験ハンドブックに記載されている装置は、ABI と Roche の装置のみであり、国内メーカーで作られている定量的 PCR 装置の記載はない。日本のライフサイエンス分野は、現在装置もキットも欧米に一步遅れをとっている状態である。世界的に見ても、定量的 PCR 装置として用いられている装置としては ABI と Roche の装置が席卷しているため、このような事態となっている。そのため、国内メーカーの装置のような後発装置の市場確保は厳しい状況である。一方で、海外におけるキットの発売状況にも深刻な影響がある。表2に示すのは、米国における PCR キットのユーザーシェアの状況であり、日本の企業はわずか2%しかシェアを確保できてい

表2 米国内 PCR キットのユーザーシェア状況

社名	国籍	米国市場シェア
Applied Biosystems Group	米	28%
GE Healthcare	英	25%
Roche	スイス	12%
Invitrogen	米	10%
OncorMed	米	7%
Chimerx	米	5%
Neurosearch	デンマーク	3%
New England Biolabs	米	3%
Promega	米	3%
Stratagene	米	2%
Takara	日本	2%

ない¹⁷⁾。これは米国内での調査であるため、米国企業が多く占めるのは仕方のないことかもしれないが、GE HealthcareやRocheなど、米国以外に拠点を持つ企業が上位を占めていることを考えると危機的状況である。

このような状況を改善するための可能性の1つとして、装置やキットの標準化が考えられる。GM農作物における機種の内標比の問題に関して、装置のバリデーションを適正に行うことができれば、装置間の比較もできるようになり、機種によらずにGM農作物の定量ができるようになるだろう。また、世界的に見ても装置の標準化がなされた例は少なく、日本の装置に標準化がなされれば他国の装置と差別化が図れるだろう。また、どの装置を用いても正確な定量性を担保できるようになると考えられるため、それは大きなメリットになり、市場に流通するようになると思われる。

3.1.4 標準化の課題

マイクロアレイの標準化は、米国においてMAQCプロジェクトが行われたことを皮切りに、現在も進められている。3.1.1で述べたように、マイクロアレイを標準化するには、①統一されたプロトコルを作成すること、②外部RNAコントロールを活用する、といったことが必要である。一方で、各プラットフォームに最適なプロトコルと統一されたプロトコルの違いが結果にどう反映されるか、どのような配列の外部RNAコントロールが必要かといった課題も存在する。上記プロジェクトでは、外部RNAコントロールはアプローチの方法とマッチしたものを使用するべきであるという結論にとどまり、外部RNAコントロールの統一化までは言及していない。一方で、プロトコルの統一化が必要であるという結論もあることから、いずれは外部RNAコントロールも統一化が図られるだろう。どのような形で統一化が図られるか現段階ではわからないが、アプローチ方法によってプロトコルが異なるということも考えられるので、プロトコルと一対一対応できる外部RNAコントロールの整備が必要になるだろう。このような実用的に用いることのできる標準物質の整備も将来的には必要になると考えられる。プロトコルの統一や、外部RNAコントロールについての課題を解決するためには、更なる包括的な実験が必要であり、標準化にはまだ時間がかかるであろうことが予想される。また、MAQCプロジェクトはマイクロアレイ自体の標準化を進めようとしているため、米国の標準を世界標準として認めさせようとする動きもある。そのため、DNAマイクロアレイ市場が米国企業に独占されかねない。その動きに対抗するためにも、日

本でもJMACを始めとしてDNAマイクロアレイの標準化について考えていく必要がある。

DNAマイクロアレイ以外の装置、キットの標準化に関しても、どのようにして標準化を推し進めていくかについてこれから議論を始めなければならないと考えられる。装置やキットの標準化には、関係する企業間の連携が不可欠である。しかし、装置やキットは販売競争が激しく、利害の調整が難しい。そのため、中立機関を設け利害調整を図るなど方法を考えなければならないだろう。

3.2 核酸標準物質

核酸標準物質は日本国内だけではなく、海外の計量機関からも頒布されている。まず、海外の核酸標準物質の現状について述べ、次に国内の核酸標準物質の現状について述べる。

3.2.1 海外の核酸標準物質

(1) 米国

アメリカの国家計量機関であるNIST (National Institute of Standards and Technology)¹⁸⁾が2008年時点で頒布している核酸標準物質は次の7種類ある。ヒトDNA定量用標準物質、DNAの制限酵素多型検出用標準物質、ミトコンドリアDNA変異検出用標準物質、ヒト脆弱性X染色体検出用標準物質、PCR用DNA標準物質、ヒトY染色体検出用標準物質、ミトコンドリアDNAの配列標準物質の7種類である。これらは全てDNA標準物質であり、法医学用、医学用、研究用の標準物質である。このうち、認証値としてDNA溶液の濃度に対する値がつけられているものは、わずか1種類(ヒトDNA定量用標準液)のみであり、残りの6種類は、配列やDNAの性質(酵素による切断パターンやある繰り返し配列の数など)を認証している。表3に概略をまとめる。

表3 NISTから頒布されている核酸標準物質

標準物質名	使用目的	認証
Human DNA Quantitation Standard (SRM2372)	法医学	核酸濃度
DNA Profiling Standard (SRM2390)	法医学	酵素処理後のDNA断片の大きさ(bp)
Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutation Detection Standard (SRM2394)	法医学 医学 研究	・ミトコンドリアDNAの変異率 ・ミトコンドリアDNAの配列
Fragile X Human DNA Triplet Repeat Standard (SRM2399)	医学	CGGの繰り返し数
PCR-based DNA Profiling (SRM2391b)	法医学	STR*数
Human Y-Chromosome DNA Profiling Standard (SRM2395)	法医学	Y染色体中のSTR数
Mitochondrial DNA Sequencing (SRM2392-1)	法医学 医学	ミトコンドリアDNAの配列

* STR; short tandem repeat → DNA配列中に存在する短い繰り返し配列

表4 IRMMから頒布されている核酸標準物質

標準物質名	使用目的	認証
PLASMID DNA for prothrombin mutation (heterozygous) (IRMM/IFCC-492)	医学	DNA 断片の配列
PLASMID DNA for prothrombin mutation (homozygous) (IRMM/IFCC-491)	医学	DNA 断片の配列
PLASMID DNA for prothrombin wildtype (homozygous) (IRMM/IFCC-490)	医学	DNA 断片の配列
GENOMIC DNA of ESCHERICHIA COLI O157 (EDL 933) (IRMM-449)	医学	flc 遺伝子の確認
GENOMIC DNA of CAMPYLOBACTER JEJUNI (NCTC 11351) (IRMM-448)	医学	ceuE 遺伝子の確認
GENOMIC DNA of LISTERIA MONOCYTOGENES (IRMM-447)	医学	prfA 遺伝子の確認
GENOMIC DNA INSERT of BACILLUS SUBTILIS DSM 5750 (IRMM-312)	食品研究	挿入された遺伝子断片の大きさ(kb)
GENOMIC DNA INSERT of BACILLUS LICHENIFORMIS DSM 5749 (IRMM-311)	食品研究	挿入された遺伝子断片の大きさ(kb)
MON 810 MAIZE (ERM-BF413D)	食品	・GM サイズ DNA のコピー数(%) ・GM サイズの量(g/kg)
PLASMID DNA FRAGMENTS OF MON 810 MAIZE (ERM-AD413)	食品	プラスミド中の組換え DNA 数

(2) EU

食品の安全性や環境汚染、医療などに関連する標準物質や計測方法について研究しているEUの計量機関であるIRMM (Institute for Reference Materials and Measurements)¹⁹⁾からも、核酸標準物質が頒布されている。IRMMから頒布されている核酸標準物質もDNA標準物質であり、次の10種類である。ヒトプロトロンピンDNAのプラスミド標準物質3種類、病原菌や微生物のゲノムDNA標準物質5種類、GMサイズ関連標準物質2種類である(表4)。これらの標準物質は、配列や遺伝子の有無が認証されており、認証値としてではなく参照値としてDNAの濃度が付けられているものもある。

(3) 韓国

韓国の国家計量機関であるKRISS (Korea Research Institute of Standard and Science)²⁰⁾も、現在、DNA標準物質の準備を進めている。KRISSが開発中のDNA標準物質は、NISTやIRMMの標準物質とは少々異なり、20塩基の合成オリゴヌクレオチド溶液に対して、オリゴヌクレオチドの構成成分であるリンを誘導結合プラズマ発光分析法(ICP-OES)により定量・換算することで、計量学的にトレーサビリティの取れた精確な濃度を付けた標準物質となる予定である。DNA溶液のトレーサビリ

ティの取れた精確な濃度を付ける方法については、この後詳しく述べるが、現在、そのようにして精確な濃度が付けられた標準物質は存在しない。

3.2.2 国内の核酸標準物質

国内の核酸標準物質としては、2.4.2でも述べたGM農作物検出用標準物質がある。その標準物質は、食品総合研究所の古井博士らによって開発され²¹⁾、GM農作物特異的な遺伝子を人工的に結合させたプラスミドDNAと、GM農作物特異的なプライマーのセットで用いる。また、定量的PCRに用いるための蛍光プローブも指定されている。PCRを行うためには、配列に特異的なプライマーが必要だということは既に述べたが、プライマーと鋳型配列の結合(アニーリング)の強さは塩基配列によって異なり、アニーリングが弱いとPCRの反応効率にも影響が出る。そのため、PCR用標準物質は、鋳型となるDNA(この場合は人工プラスミド)とプライマーのセットである必要がある。標準物質には多くの種類があるが、そのほとんどはGM農作物検出用の定性標準物質であり、定量用の標準物質は2種類のみである。定量用標準物質は、含まれているプラスミドDNAのコピー数がわかっているものであり、それを用いて検量線を引くことでGM農作物の定量を行う。しかし、JAS分析試験ハンドブック¹¹⁾によると、GM農作物の定量的PCRを用いた定量は、現在のところ、該当する農作物が必ず持っている内在性遺伝子に対する組換え遺伝子の存在比率から組換え体は何%存在するかを相対的に測定する方法であるため、GM農作物の絶対量を知る方法ではないと明記されている。

3.2.3 核酸標準物質における課題

現在頒布されている核酸標準物質は定性用の標準物質が多く、定量用の標準物質が少ない。その理由は、核酸は、最近まで、定量情報よりも定性情報がより重要視されてきたからであると考えられる。しかし、現在、精確な定量情報の重要性が認識されつつある。その一方で、定量用標準物質は、NIST、IRMMがそれぞれ1種類ずつ頒布しているのみである。NISTから頒布されている定量用核酸標準物質は、その定量方法として、独自の方法を用いている。一般的に良く用いられる吸光度法(これは後の章で詳しく述べる)と似た方法で測定しており、DNA溶液に230, 260, 270, 280, 330 nmの波長の光を当て、吸光光度計により測定された値を認証値としている。²²⁾ IRMMの定性用核酸標準物質には参照値として定量値が付いているものもあるが、そのほとんどは蛍光色素を

用いた方法で定量値が付けられており、その精確性、トレーサビリティには疑問が残る。また、NISTやIRMMから頒布されている標準物質において、DNA配列が認証されているものもいくつか存在するが、配列の精確性をどのように評価するのかという点については、ほとんど議論が行われていないのが現状である。

4. 核酸の定量方法

核酸の定量方法には、現在、広く一般的に用いられている方法があるが、その方法は精確性に疑問が残る。そこで、精確に核酸を定量する方法についての研究が現在各国で進められている。この章では、一般的に用いられている核酸の定量法とその問題点と、開発中の定量方法について述べる。

4.1 一般的に用いられる定量法

現在、一般的に用いられている核酸の定量方法には、大きく分けて2種類の方法がある。この節では、その2種類の方法の原理、問題点について述べる。

4.1.1 吸光度法

吸光度法は、簡便に核酸溶液の濃度を決定できる方法として、現在、頻繁に用いられている。核酸の構成成分である塩基は260 nm付近の紫外線（UV）に対して極大吸収を持っていることが知られており、その性質を利用して核酸溶液の濃度の決定に用いられている。一般的に、Optical Density 260 (OD₂₆₀)の値が0.020のDNA溶液の濃度が1 μg/mlとして計算される²³⁾。

一方で、4種類の塩基はそれぞれ260 nm付近のUVに極大吸収を持っており、モル吸光係数もそれぞれ異なっている。核酸には様々な配列・長さのものがあ、そのモル吸光係数は4種類の塩基の総数によって厳密には異なってくる。そのため、吸光度法によって核酸を定量するには、本来は配列・長さによってモル吸光係数を決定すべきである。しかし、現在は便宜上、上記の値を用いて定量が行われている。

4.1.2 蛍光法

蛍光法は、DNAの2本鎖の間に入り蛍光を発する物質（市販されているものとして、SYBR[®]Greenや、SYBR Gold, Pico Greenなどがある）を用いて、その蛍光強度から2本鎖DNAの濃度を決定する方法である。溶液中に含まれる2本鎖DNAの量が多いほど蛍光が強くなる。蛍光を用いた定量はPCRと組み合わせられ、定量的PCR

の検出にも用いられている。定量的PCRは、PCRによって試料を増幅しながら蛍光値を測定するので、試料が微量しか手に入らないときなどに真価を発揮する。

4.1.3 問題点

吸光度法と蛍光法は、現在、核酸の定量方法ではどちらも主流な方法である。その一方で、いくつかの問題点も存在する。吸光度法に関しては、上記でも述べたように、定量値として用いている値の精確性に問題があり、精確な定量は難しいと考えられる。蛍光法に関しては、相対値として濃度を決定する方法であるが、現在、その基準となる標準物質が統一されておらず、データ間や機器間の比較ができないといった弊害がある。また、基準となる標準物質も上記の方法によって値がつけられており、値の決め方に問題がある。

このように現在主流な核酸の定量方法には問題点が多いため、標準物質を用いない核酸溶液の精確な定量方法の確立（一次標準測定法）と、それによって値がつけられた標準物質の作成が急務である。

4.2 核酸溶液の一次標準測定法

核酸溶液の一次標準測定法の確立が必要なのは前節で述べたが、この節では、その候補として研究されている、核酸のモノマー（ヌクレオチドやヌクレオシド）を分析対象とした安定同位体希釈質量分析法（IDMS法）と、一次標準測定法ではないが、トレーサブルな測定方法である誘導結合プラズマ発光分析法（ICP-OES）を用いたリンの定量という2つの方法について述べる。これらの方法は、国際度量衡委員会（CIPM）の下部組織である、物質質量諮問委員会（CCQM）のパイロットスタディとしても実施されている方法で、目下、一番実用性が高いと考えられている。

4.2.1 安定同位体希釈質量分析法²⁴⁾⁻²⁶⁾

安定同位体希釈質量分析法（IDMS法）は、試料に測定対象物と同じ構造の安定同位体標識化合物を添加し、その同位体比を質量分析によって測定することで試料を定量する方法である。IDMS法は、一次標準測定法としてCCQMにおいて認められている。IDMS法は、低分子化合物の定量に多く用いられている。一方、核酸のような高分子化合物の場合、安定同位体標識化合物を用意することは、理論上は可能であるが、そのような物質は高価なため現実的ではない。しかし、核酸の構造を考えると、すでに述べたように、核酸はモノマーであるヌクレオチドと、ヌクレオチドからリン酸が切れたヌクレ

オシドに分解することができる。そして、これら2種類の物質はIDMS法によって定量できる可能性がある。IDMS法で核酸のモノマーを定量するためには、核酸を完全に単量体へ分解するための酵素条件を確定することと、精確な濃度がわかっている単量体標準液の2つが必要となり、現在、研究が行われている。

4.2.2 誘導結合プラズマ発光分析を用いたDNA中のリンの定量²⁷⁾⁻²⁹⁾

誘導結合プラズマ発光分析法 (ICP-OES) は、誘導結合プラズマ (ICP) で生成した励起原子および励起イオンからの共鳴発光線を観測する方法である。ICP-OESは、1980年代から装置が普及し始め、現在では、金属元素の微量成分分析法の中心を占めている。核酸の章で述べたとおり、核酸はその構造中にリン酸基をもつ物質である。リンはICP-OESで定量することができる代表物質である。そこで、核酸を酸分解によって各元素にまで分解してリンを遊離させ、その試料溶液をICP-OESで分析することで、溶液中のリンの濃度を測定することができる。そこから逆算して、元の核酸溶液の濃度を決定する。リンの定量については、計量法トレーサビリティ制度 (JCSS) の標準液が市販されていることから、トレーサビリティの確保された結果を得ることができる。一方で、リンは自然界に豊富に存在する物質であることから、測定時のリンが核酸中に含まれていたリンなのか、それ以外のものなのかを判断しなければならない。

4.2.3 核酸溶液の一次標準測定法における課題

核酸溶液の一次標準測定法として挙げた、IDMS法やICP-OESを用いたリンの定量についても、解決すべき課題がいくつか考えられる。

IDMS法は4.2.1でも述べたとおり、モノマーであるヌクレオチドやヌクレオチドをさらに分解したヌクレオシドの状態では定量しなければならない。そのため、IDMS法で定量した核酸溶液の値は、ヌクレオチドやヌクレオチドを定量した値から核酸の値へと逆算している。すなわち、IDMS法で決定できる値は、ヌクレオチドやヌクレオチド溶液の濃度であり核酸溶液そのものの濃度ではない。これは、ICP-OESを用いたリンの定量にも言えることである。ICP-OESで測定しているのはリンの濃度であり、核酸溶液自体の濃度を決定しているわけではない。さらに、ICP-OESを用いる分析では、最低でも1 mg/g程度の核酸がサンプルとして必要である。一方で、PCRを用いて増幅した核酸溶液でも、1 mg/gには到底及ばないため、試料の確保が困難である。

核酸の塩基配列が遺伝情報を担っていることは核酸の構造の章で述べたが、核酸は塩基配列が異なると二次構造や荷電の仕方が異なるという性質がある。塩基配列の組み合わせは無限に考えられ、核酸は非常にバラエティーに富んでいる。すなわち、塩基配列を決定することは核酸を特定することであり、特定の核酸溶液の濃度を定量することに意味がある。IDMS法、ICP-OESを用いたリンの定量のどちらも、核酸を分解して定量する方法であるため、分解前の核酸が持っている塩基配列情報は失われている。そのため、IDMS法やICP-OESを用いて定量した核酸溶液は、定量的な情報とは別に、塩基配列情報を何らかの方法で確認・評価する必要がある。現段階では、定量情報と塩基配列情報を別々に測定・確認しなければならないが、今後、定量情報と塩基配列情報を同時に測定・確認できる方法を開発することができれば、効率よく核酸溶液の定量が行えるようになるだろう。

4.3 定量方法間の比較

核酸の定量方法について、一般的に用いられている吸光度法や蛍光法と、一次標準測定法として研究が進んでいるIDMS法やICP-OESを用いる方法について、上記で述べた。これらの方法の違いでどれくらい定量値に差が出るのかについて、いくつかの論文が発表されている。

イギリスの国家計量機関であるLGCの研究者であるEnglish氏らが2006年に発表した論文³⁰⁾によると、ICP-OESを用いて濃度を決定した核酸溶液を、UVによる方法2種類、蛍光による方法2種類の計4種類の方法で定量した値を比較する実験を行った。その結果が図8で、1種類の方法につき36回ずつ測定した結果がプロットされている。1,2がUVを用いた方法で測定した結果で、3,4が蛍光を用いた方法で測定した結果である。この結果から、まず、UVによる定量も、蛍光による定量も、

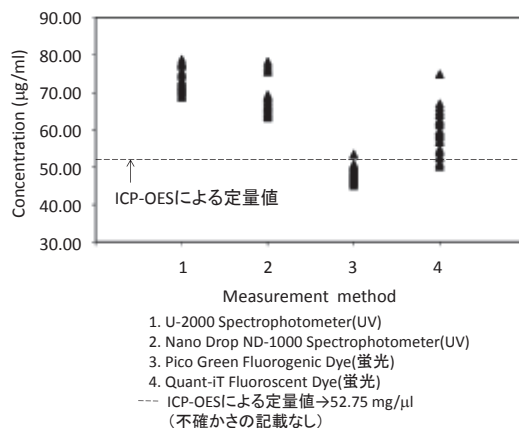


図8 方法ごとの核酸の定量値の比較

定量値が非常にばらつくことがわかった。測定値がばらつく原因として、English氏らは、測定に用いる溶液量の差や、測定手順の違いを挙げている。一方、4種類の測定方法において、36回の測定値の平均値をそれぞれ計算してみると、ICP-OESで定量した値とは大きく異なっていた。English氏らは、何故このような差が生じるのかについても言及している。UVを用いて定量する方法では、260 nmの光を吸収する特性を持つ物質のコンタミネーションが原因で、過大評価されたのではないかとしており、HPLCを用いて分取するといったより純度を高くする工夫をすれば、改善されるのではないかとしている。蛍光を用いて定量する方法については、2種類の方法のうち的一方（図8における3の方法）は、ICP-OESで定量した値よりも低い値を与えている。これは、その方法が2本鎖DNAを測定する方法だからではないかとEnglish氏らは考えている。1本鎖DNAでも2本鎖DNAでもリンは含まれているので、ICP-OESを用いる方法では測定される。そのため、2本鎖DNAのみを定量する方法は、ICP-OESで定量した値よりも小さくなったのではないかと述べている。残りの蛍光で定量する方法の値がICP-OESで定量した値と異なっている理由については述べられていないが、実際、4種類の定量方法の中でその方法が一番ICP-OESの値と近いという結果になっている。

この論文以外にも、KRISの研究者²⁵⁾らが2004年に発表した論文においてもICP-OESでの定量とUVでの定量について比較されているが、両者の定量値に差があった。このように、現在定量に用いられている吸光度法や蛍光法と、IDMS法やICP-OESを用いた定量方法には、明確な定量値の差がある。前者の方法において、実際の値からの差が生じる原因として様々な要因が考えられており、より精確な定量方法としてIDMS法やICP-OESを用いた定量方法には期待がかかっている。

5. 今後の展望

これまでの章で、核酸関連の標準整備についての現状と課題について述べてきた。この章では、核酸関連の標準整備の現状を鑑みて、今後必要となると考えられる点について述べる。

定量用核酸標準物質を開発するためには、いくつかの必要な技術を開発しなければならない。具体的には、4.2.3で述べた、核酸自体を定量できる定量方法の開発、核酸定量情報と塩基配列情報を同時に測定・確認できる方法、微量で測定できる方法などの開発である。一方

で、核酸の塩基配列情報の精確性をどのように評価するかという点については、議論は始まったばかりである。今後、議論だけではなく、現在用いられている塩基配列決定方法を評価する具体的な方法も開発しなければならないと考えられる。

一方で、核酸標準物質を作るにあたっては、プロトコルの統一や装置・キットの標準化は必須であり、また、プロトコルの統一や装置・キットを標準化するには核酸標準物質が必要となる。すなわち、核酸標準物質の整備と、プロトコルの統一や装置・キットの標準化は表裏一体の関係であり、同時に並行して行わなければならないと、できるところから推し進めていくことが肝心だと考えられる。

6. まとめ

21世紀がバイオテクノロジー、生命科学の時代であるといわれていることを考えても、核酸標準物質を含めた、核酸関連の標準整備は今後必要性が高まってくるだろう。本調査で挙げたように、近年、核酸の定量ニーズはバイオテクノロジーの応用分野である医療分野、食料分野、環境分野において増加している。このニーズを満たし精確な核酸定量を実現するには、定量用核酸標準物質とプロトコルや装置などの標準化が不可欠である。核酸関連の標準整備が進むと、バイオテクノロジーが発展することは明らかであり、人間生活に多大な恩恵をもたらすだろう。例えば、テーラーメイド医療の実現や、食の安全の保障、環境の保全・修復が可能になる、といったことが考えられる。現在でも、バイオテクノロジーは日々進歩・発展しており、新たな技術も生まれている。そのため、技術の変化に対応して素早く多様な標準整備を推し進めていくべきである。それには、産業界との連携を密にし、相互に協力していくことが不可欠であると考えられる。

用語集

- *1 ポストゲノミクス：ポスト (post) + ゲノミクスで、「ゲノミクスで明らかにされた事柄のさらなる発展的研究」の意。すなわち、ゲノミクスで明らかになった遺伝子配列情報に基づいて、遺伝子発現パターンや網羅的解析などを示す言葉として使用されている。
- *2 コピー：コピーはDNA数の単位。同じ配列のDNAが何個あるかを示す。
- *3 核酸医薬：DNAやRNA自身を用いた医薬品の総称。

目的のタンパク質や核酸に結合してその働きを抑制する作用をもつ。

参考文献

- 1) BT戦略会議, バイオテクノロジー戦略大綱, (2002)
- 2) Lubert Stryer, ストライヤー生化学第4版, 東京化学同人, 75-141, 975-1006
- 3) International Human Genome Sequencing Consortium, *Nature*, 431 (2004), 931-945
- 4) 富木毅, *CICSJ Bulletin*, 26 (2008)
- 5) 橘田和美, 遺伝子組換え体概論, 遺伝子組換え体の検知技術 農産物・食品からの定性・定量的検知方法 (農林交流センター, 食品総合研究所, 農林水産消費安全技術センター, 第126回農林交流センターワークショップ 第59回食品総合研究所食品技術講習会, 2007.12月)
- 6) 松永是, 川口竜二, 大門尚志, DNAチップ応用技術 (松永是監修), 株式会社シーエムシー, 3-5, 21-27, 150-156
- 7) Gregory J. Hannon, *Nature*, 418 (2002), 244-251
- 8) Heriberto Cerutti, *TRENDS in Genetics*, 19 (2003)
- 9) 油谷浩幸編集, DNAチップ/マイクロアレイ臨床応用の実際, 株式会社メディカルドウ, 228-328
- 10) Clive James, BRIEF 37 Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2007, ISAAA
- 11) 独立行政法人農林水産消費技術センター, JAS 分析試験ハンドブック 遺伝子組換え食品検査・分析マニュアル改定第2版定量的PCR編, (2002)
- 12) Haifeng Qian, Baolan Hu, Dan Cao, Wei Chen, Xiaoyan Xu, Yingchong Lu, *Bull Environ Contam Toxicol*, 78 (2007), 239-244
- 13) Paul K. Tan, Thomas J. Downey, Edward L. Spitznagel Jr, Pin Xu, Dadin Fu, Dimiter S. Dimitrov, Richard A. Lempicki, Bruce M. Raaka, Margaret C. Cam, *Nucleic Acid Res.*, 31(2003), 5676-5684
- 14) MAQC consortium, *Nature Biotech.*, 24 (2006), 1151-1161
- 15) Weida Tong *et al.*, *Nature Biotech.*, 24 (2006), 1132-1139
- 16) バイオチップコンソーシアム (JMAC) ホームページ, <http://www.jmaqc.org/>
- 17) Molecular diagnostics markets, TriMark Publications (2006), 30-31
- 18) NIST ホームページ, <http://www.nist.gov/>
- 19) IRMM ホームページ, <http://irmm.jrc.ec.europa.eu/html/homepage.htm>
- 20) KRISSE ホームページ, <http://www.kriss.re.kr/>
- 21) Kuribara H, Shindo Y, Matsuoka T, Takubo K, Futo S, Aoki N, Hirao T, Akiyama H, Goda Y, Toyoda M, Hino A, *J. AOAC Int.*, 85 (2002), 1077-1089
- 22) National Institute of Standards and Technology, Certificate of Analysis, Standard Reference Material[®]2372 Human DNA Quantitation Standard
- 23) 日本分析化学会編, 分析化学便覧 改訂四版, 丸善, 1164
- 24) Gavin O'connor, Carol Dawson, Alison Woolford, Kenneth S. Webb, and Tim Catterick, *Anal. Chem.*, 74 (2002), 3670-3676
- 25) Carol E, Peter Stokes, Gavin O'connor, Alison J. Woolford, *J. Chromatography*, 817 (2005), 173-182
- 26) 独立行政法人産業技術総合研究所, 産総研 TODAY, 8 (2008), 29
- 27) Incul Yang, Myng-Sub Han, Yong-Hyeon Yim, Euijin Hwang, Sang-Ryoul Park, *Anal. Biochem.*, 335 (2004), 150-161
- 28) Marcia J. Holden, Savelas A. Rabb, Yadu B. Tewari, Michael R. Winchester, *Anal. Chem.*, 76 (2007), 1536-1541
- 29) 上本道久, 川田哲, ICP発光分析・ICP質量分析の基礎と実際 (上本道久監修), 株式会社オーム社, 1-60
- 30) Claire A. English, Sheila Merson, Jacquie T. Keer, *Anal. Chem.*, 78 (2006), 4630-4633

