



衛研

# 技術情報

VOL.13 NO. 4

1989

## 医学領域におけるバイオテクノロジー

### はじめに

“生命とは何か？”という人類の絶えざる探究の中で、ヒトは“細胞”を発見し、さらにその内部構造や機能を知り、ついに核の中の“DNA（デオキシリボ核酸）”に到達した。DNAは、その生物の遺伝子情報のマスターコピーであり、この中から必要な部分がコピーされてRNA（リボ核酸）となって外へ出ていき、細胞質でそれを鋳型にして蛋白質が合成され、その蛋白質から細胞ができ、最終的にその生物が発現されるというように、DNAは自分自身を発現するもとなる機能を有する重要な物質である。

生命科学の研究分野において、このDNAの構造と機能を解析するために開発された技術がバイオテクノロジー（生命操作技術）であり、この中には、「組換えDNA技術」「細胞融合」「受精卵操作」などが含まれる。中でも組換えDNA技術は、DNAを特定の部位で分断する酵素、制限エンドヌクレアーゼ（制限酵素ともいう）が多数分離されたことと、DNA断片を接合するリガーゼの発見により、この20年間に飛躍的に進展し、発酵、微生物工業においては、蛋白質（ホルモンを含む）や酵素、抗生物質などの生産に大きな成果を得てきている。また、本来この技術が必要とし、開発推進を行ってきた医学分野においてもその歩みは着実に進んでおり、発癌機構と免疫現象が遺伝子レベルで解析され、遺伝疾患についても、その本態の解明及びそれに基づくDNA診断法の確立、さらに遺伝子治療への基礎的研究へと発展している。

ここでは、我々の健康を守る立場にある医療の場で、バイオテクノロジーがどのように利用されているのか、遺伝子による診断、治療の現状を中心にまとめると共に、疾病の予防と生命の延長を目的とする公衆衛生領域での応用についても考察

を試みた。

### 1 遺伝子疾患

現在約3,000種の遺伝子疾患が報告されており、新生児のほぼ1%は、何らかの遺伝的異常をもつといわれている。遺伝子疾患は、主として次の4つに大別される。

#### (1) 染色体異常

染色体の数の変化により、例えば21番目の常染色体が1個多すぎるとダウン症となる。

#### (2) 分子病

遺伝子型の異常によって生じた病的な構成成分が、分子構造の変化という形で確認されたもので、各種のヘモグロビン異常がよく知られている。

#### (3) 遺伝性代謝異常

酵素系に遺伝性の欠陥があるため正常な代謝過程が行われないもので、フェニルケトン尿症、アルカプトン尿症、血友病、無アルブミン血症など、非常に多くの種類が知られている。

#### (4) 遺伝性形態異常（奇形）

口蓋裂、多指、合指、心臓奇形など、いずれも家族性があり遺伝的要因は否定できない。

この他にも、アレルギー、高血圧症や癌も遺伝性であることは確かであり、多くの疾病が多数の遺伝子と環境条件との関与により発症するものと考えられる。

### 2 遺伝子診断

1970年のSmithらの制限エンドヌクレアーゼの発見以後、DNA塩基配列の化学的決定法が相次いで確立され、遺伝子疾患におけるDNAレベルの解析が可能となった。血友病、筋ジストロフィー、サラセミア、フェニルケトン尿症など数多くの疾患で、関与する体内因子の異常あるいは欠除

が発見され、その結果、遺伝子レベルでの正確な診断が早期に行えるようになった。

遺伝子診断の方法の概略を、図1に示す。末梢血から、リンパ球あるいは白血球（出生前診断では羊水細胞）を集め、それらの細胞からDNAを精製する。精製したDNAを、適当な制限エンドヌクレアーゼで切断し、生じたDNA断片をアガロース・ゲルの中で電気泳動すると、その大きさに従って小さいものほどより遠くまで移動する。このようにゲル内で帯状に分布したDNA断片の中から、目的の遺伝子を含む断片を同定するため、断片全部をそのままの配置でニトロセルロース膜に吸いとらせて固定する。一方、目的の遺伝子と相補的な塩基配列を持つ放射能でラベルした（蛍光ラベルもできるようになった）DNA断片（DNAプローブ）をあらかじめ用意し、これを含む液に上記のニトロセルロース膜を浸し、適当な温度処理を行う。ここでDNAプローブは、目的のDNA断片とだけ水素結合してフィルターに固定されるため、不要なDNA断片と区別できる。このようにして得た目的のDNA断片を、健常者のそれと比較して診断を行う。また、この方法により逆に、原因不明な遺伝子疾患の病因遺伝子を求めることもなされており、今後ますます多くの遺伝子疾患の本態が解明され、さらにそれが治療へとつなげられることになるであろう。

しかし一方で、遺伝子診断の誤ったエスカレートは、男と女の生み分けによる自然のバランスのくずれや、より質の高いパーフェクト・ベビーへの願望など、大きな危険性を含んでいることを忘れてはならない。

### 3 遺伝子治療

遺伝子疾患の治療は、理想的には欠陥遺伝子が除かれて、その場所に正常遺伝子をはめ込むことができればよい。しかし、実際にそれを行うには非常に多くの問題があり、現段階では難しい。

現在行われている遺伝子疾患に対する治療法は、大別すると、

#### ○対症療法

アスピリン、抗高血圧剤、抗生物質などの投与

#### ○臓器、骨髄移植

遺伝的欠陥により損傷を受けた心臓、腎臓、骨

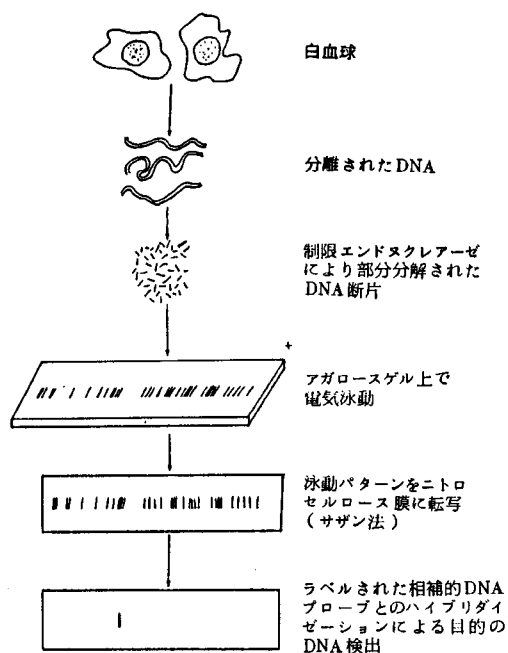


図1 特定の遺伝子の検出法

#### 髄などの移植

##### ○遺伝子の代謝産物の置換

インシュリン（糖尿病）、成長ホルモンの投与や、銅（ウィルソン病）、フェニルアラニン（フェニルケトン尿症）の除去

などであるが、これらの方法で治療できるのは、全遺伝子疾患のうちごくわずかであり、直接遺伝子それ自体に向けた治療法の確立が待たれている。

そして、最近のバイオテクノロジーの進歩、中でも図2に示した遺伝子操作（組換え）の技術 — 例えば、ある生物細胞の特定な遺伝子を持つDNA断片(A)と、他の細胞のDNA分子(B)とを、EcoRI（制限エンドヌクレアーゼの1つ）で切断し、試験管内でDNAリガーゼにより接合させ、得られた複合体を再び(B)の元の細胞にもどしてクローン化する — の開発により、遺伝子そのものの治療への大きな一歩がふみ出された。

けれども、遺伝子治療法として実用化するためには、正常な遺伝子を組み込まれた細胞が、患者体内の必要な場所へ入り、必要な時に適当な強さで発現し、さらに増殖しその効果を継続させる、というようなことが必要であり、現時点では、こ

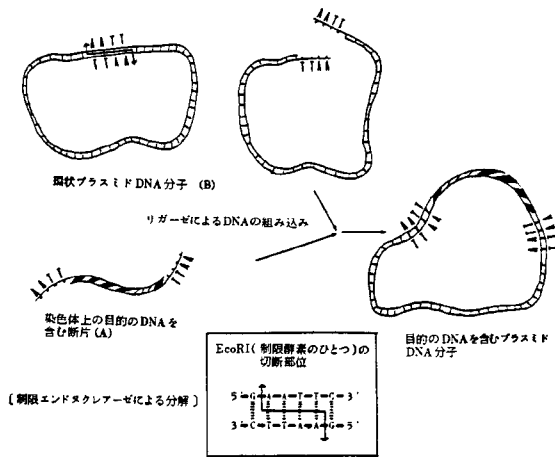


図2 遺伝子組み換え

れらはかなり難しい問題である。

しかし、アメリカでは現在、3つの重篤な遺伝子疾患（アデニンシデアミナーゼ欠乏症、プリンヌクレオシドホスホリラーゼ欠乏症、レッシュ・ナイハン症候群）に対してこの方法での研究が、今の所、動物を対象としてではあるが、意欲的に進められており、今後ヒトの遺伝子疾患の治療法は大きく変わっていくことが予想される。

#### 4 疾病の予防と生命の延長

今日の公衆衛生における最も大きな課題は疾病の予防であろう。

疾病は、その二大要因である遺伝的素質と環境との関与により発症する。遺伝的素質とは、ヒトが生まれつき持っている性質であり、両親から遺伝子として受けつがれる。遺伝子の中には、自分自身を発現するためのあらゆる情報が組み込まれており、その中には、例えば“将来どんな疾病にかかりやすい体質か”というような情報も入っている。もう一方の環境とは、生物の生存、生活に交渉をもつ外界をさし、自然的環境（日光、空気、水、土地、ねずみ・蚊・はえなどの生物など）と社会的環境（衣服、食物、住居、政治、経済、宗教、教育など）がある。

環境と疾病との関わりについて、遺伝子レベルでの検討は不十分であるが、例えばある疾病にかかりやすい環境因子は何なのかというような研究は、特に、食生活、住居、空気などの面から数多

くなされており、がん防止のための12ヶ条（国立がんセンター）などが発表されている。

一方、疾病と遺伝子との関わりについての研究は、まだ緒についたばかりである。しかし将来において、狭義の遺伝子疾患に限らず、ごくありふれた疾病 — 糖尿病、冠動脈疾患、分裂病など — においても、疾病に対する高リスク群を遺伝子のレベルで診断し、得られた情報を利用して環境を変え、発症を予防できるようになれば、その公衆衛生における意義はきわめて大きくなるであろう。

もう1つの大きな課題は、老化の予防である。

高等動物の脳細胞は、生涯再生しない細胞であるだけでなく、生命維持に不可欠な細胞であるため、個体の老化を知る鍵として多くの研究がなされている。これらの研究の中に、脳細胞の核のDNA活性が加齢とともに変化するという報告があり、それによると、DNAの鎖が加齢とともにあちこちで切断されているということである。このことから、古くなってすり切れたDNAを持つ細胞からつくられる蛋白質に変化が生じ、加齢とともに老化となって発現するというメカニズムが考えられている。このように、老化のメカニズムの研究においては、遺伝子レベルでの着実な進捗が期待され、それとともに、老化に伴って発症する種々の疾病の予防が可能になるであろう。

以上述べたように、公衆衛生においてもバイオテクノロジーは大きな期待をもたらし、人類の未来に新たな道を開きつつある。

#### おわりに

遺伝子診断・治療は、その技術が生まれてわずか20年の間にめざましい進展をとげ、その未来には、さらに大きな可能性を秘めている。遺伝子疾患における遺伝子治療、成人病などの予防、さらに、老化や老人性痴呆についてもバイオテクノロジーの担う役割は無視できないであろう。

しかし人道的意味合いから、その治療は、子、孫、ひいては人類の遺伝子プールにまで影響を及ぼさない範囲内、少なくとも生殖細胞に影響を与えない範囲で行われなければならないことを絶対に忘れてはならない。

（生物部 林 留美子）

# 下痢症原因ウイルスとしての 小型球形ウイルスについて

## はじめに

冬季に多発する非細菌性胃腸炎の主要な病原ウイルスとしてロタウイルスや小型球形ウイルス (Small Round Virus: SRV) が知られている。乳児嘔吐下痢症の原因ウイルスであるA群ロタウイルスについてはウイルス分離同定が可能となるとともに、その血清型やウイルス核酸などの分子レベルの研究が急速に進んでおり、現在ワクチンの開発が試みられている。しかし、近年A群ロタウイルスと共通抗原性を欠くB群及びC群ロタウイルスに起因する急性胃腸炎の集団発生が報告されており、今後の動向を注目する必要がある。他方SRVは電子顕微鏡(電顕)による検出しかできないことから、粒子のウイルス学的性状に不明な点が多いが、SRVを病因とする集団食中毒様事例が各地で報告されている。愛知県においても平成元年3月に複数の小学校でSRVに起因すると考えられた急性胃腸炎が集団発生し、その有症者は3,353人と他に例をみない程の大規模な集団発生であった。これまで原因不明とされていたものの多くが、このウイルスによることが明確となり、衛生行政上も重要なウイルスとして世界的に注目されているので、SRVに関する最近の見聞並びにSRV検査の現状を紹介したい。

## SRVの分類

1972年 Kapikianらが急性胃腸炎患者の糞便中にノーウォークウイルスを初めて発見して以来、アストロウイルス、カリシウイルス及びSnow Mountain, Montgomery County, Wallon, Hawaii, Ditchling, Otofuke (発見された地名がウイルス名となっている)の各因子など直径30nm前後のSRVが非細菌性胃腸炎の病原ウイルスとして報告されてきた。しかし、SRVはほとんどが組織培養で増殖できないため、また各SRVに対する標準血清が準備されていないために電顕観察による形態学的特徴から分類されているのが現状である(図1)。

## SRVの疫学

ロタウイルスの感染が主に乳幼児に冬季、散発発生するのに対して、SRVの感染は幼児から成

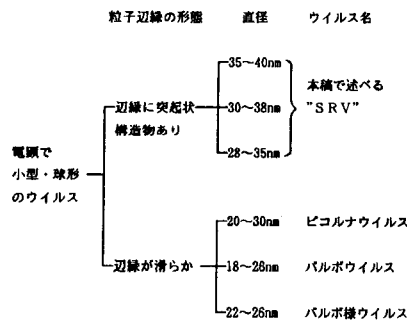


図1 小型球形の形態をもつウイルス一覧

人の幅広い年齢層に多発し、学校、療養院、航行中の船、キャンプ地、家庭内、地域内で集団発生することが多い。また患者と接する家族内に二次感染が認められることがある。男女間で感受性に差はない。

SRVのひとつであるカリシウイルスを抗原とした免疫電顕法による札幌市民の抗体調査によると、抗体陽性率は0~5か月で23%、6~23か月で30%、2~5歳で65%、6~12歳で90%、成人では90%であったことが示されている。また別のSRVであるHawaii因子様ウイルスに対する愛媛県民の抗体保有状況については、0~1歳で18%、2~3歳で50%、4~6歳で56%、7~9歳で56%、10~16歳で44%と報告されている。

東京都衛研が「集団かせ」として処理された30集団について、SRVに対する血清疫学的調査を実施した結果、9集団(内2集団はインフルエンザウイルス感染を確認)にSRV感染症が確認されたことを報告している。さらに、SRVとインフルエンザウイルスそれぞれに感染した患者の症状を比較すると、インフルエンザ感染例では発熱、頭痛、せき及び咽頭痛が高率であり、SRV感染例では嘔吐及び下痢が高率であること、またインフルエンザウイルスとSRVの流行は互いに重なり合っているが、SRVの流行の方が先行していたことが明らかにされている。当所においても初期のインフルエンザ様集団発生からインフルエンザウイルスが分離されない事例が多いことを経験しており、SRV感染症が混在していた可能性が示唆され今後の検討が必要である。

## SRVの感染経路

ウイルスに汚染された飲料水、遊泳用水または食品を介して経口的に感染すると考えられている。ヒトからヒトへは糞口感染により伝播される。食中毒様集団発生の原因食品としてカキやトリガイなどの貝類がよく知られており、2枚貝は海水中のウイルスを濃縮、蓄積するためと考えられている。最近下痢及び嘔吐の症状を有する1人の従業員が調製した菓子を介して3,000人が発症した事例やサラダあるいは生ハムの喫食による大規模な急性胃腸炎の集団発生が報告されており、食品取扱者に対する衛生知識の啓蒙が望まれる。

SRVを原因とする集団発生事例において、疫学調査から感染源が推定されているが、感染源からウイルスが検出された報告は未だなく、今後の検討課題である。

## SRVの臨床症状

SRVの感染で認められる臨床症状は嘔気、嘔吐、腹痛、倦怠、下痢、発熱、頭痛などであるが、嘔吐は子供の主要症状で、下痢は成人に多い傾向がある。症状は入院が必要となるほど重症化することはなく、予後も良好である。平均の潜伏期間は24-48時間、平均の有症期間は12-60時間と見積もられている。

## SRVの検査法

SRVはほとんどが組織培養で分離増殖できないので、SRVの検索には電顕により糞便から直接ウイルス粒子を検出する方法が用いられている。図2に下痢症原因ウイルスの検査法を示した。

電顕観察には、 $10^6$ 個/ml以上のウイルス量を

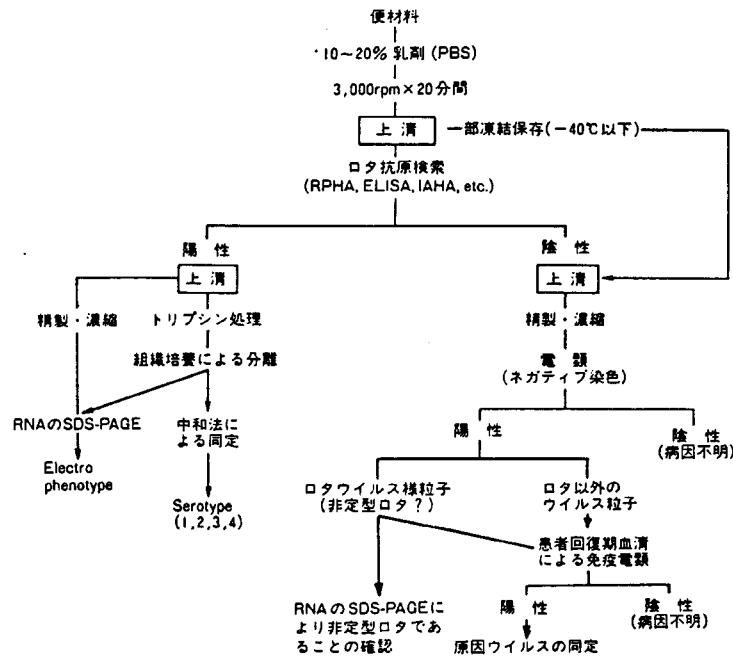


図2 下痢症のウイルス学的検査法

必要とするので、ロタウイルス抗原陰性の材料については超遠心機で精製濃縮後、電顕用試料としている。写真1に小学校の集団発生において、当所で検出されたSRVの電顕写真を示した。検出された粒子の直径は約35nmで、辺縁には突起状の構造物が認められた。

SRVに感染すると発症と同時にウイルスを糞便中に排泄するが、図3に示したように、経日ごとに排泄されるウイルス量は急激に減少する。それにもない採取時期別のSRVの検出率も1病日で67%、2病日で40%、3病日で42%、4病日で26%、5病日で27%、10病日で0%と病日の経過につれて低下していくことが報告されている。従って、検体は発症後できるだけ初期のもので、また精製濃縮段階でウイルスがかなり損失するので排便量を全量採取することが望まれる。

糞便中にはウイルス様粒子が多数存在するので、免疫電顕法により検出されたウイルス粒子と病気との関連を患者のペア血清を用いて確認する。すなわち急性期と回復期血清を被検ウイルス粒子とそれぞれ反応後、粒子に対する抗体の付着の程度と凝集の程度を電顕観察する。患者ペア血清の間

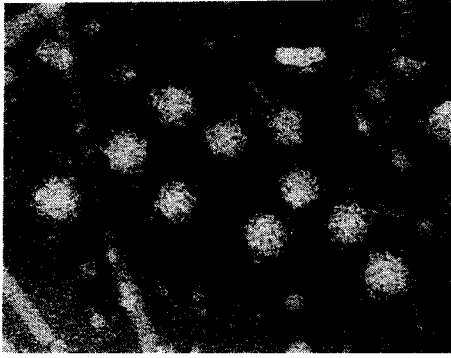


写真1 SRVの電子顕微鏡写真(20万倍)

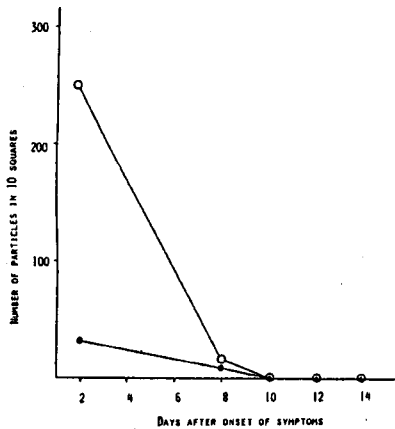


図3 SRVの排泄期間と排泄量  
○：患者1、●：患者2

で明らかな差異が認められたものを目的ウイルス粒子との特異的抗原抗体反応陽性とする。患者血清は試料に含まれるウイルス粒子の濃度が低い場合に、特異抗体の作用で凝集物を作らせることにより、粒子検出の感度を高めることができるので非常に有用である。

病日を経過した検体由来のウイルス粒子では、はじめから抗体が付着しているために免疫電顕に不適となる場合があること、また抗原と抗体の最適条件設定に多量のウイルス粒子を必要とするところからも検体の質と量が問題となる。

現在電顕法と比べて簡便かつ汎用的な方法として、Western Blot (WB)法によるSRVの血清診断法が検討されている。すなわちウイルス抗原をSDS電気泳動後、ニトロセルロース膜に電気的にウイルス蛋白を転写し、転写膜を作成する。こ

の転写膜と患者ペア血清を反応後染色を行い、分子量約6万前後のウイルス蛋白特有なバンドの有無を検出するものである。WB法は簡便で高感度な方法であるが、転写膜を作成したウイルスと共通抗原を有するSRVが関与した下痢症患者としか反応しないという点、またSRVの培養が困難であるため臨床材料から精製抗原を多量に得ることがむずかしい点など解決すべき問題が多い。

### SRVの予防対策

ボランティアへの感染実験からSRVに対する型特異的免疫の持続は比較的短いと考えられている。ロタウイルス感染の場合は血清抗体よりも局所抗体が感染防御の主体をなすとされているが、SRV感染では血清及び局所抗体とも宿主抵抗性とは関係がない。むしろウイルス投与前のボランティアの抗体価は発症群の方が非発症群よりも高く、かつ非発症者は再度のウイルス接種にも抵抗性を示したことから、SRVの感染発症には免疫学的要因よりもむしろ遺伝的要因が関与していることが示唆されている。そのため直ちにワクチン開発のような積極的な防衛策をとれないのが現状である。

SRVは糞口感染によりまたは水を介して伝播すると考えられるので、食品取扱者は自己の健康に注意を払うとともに手の消毒を励行すること、また飲料水及び遊泳用水の消毒により感染の機会を減らすことが肝要であると思われる。

### おわりに

SRVの組織培養による分離増殖法が確立されればウイルス分子の性状が解明され系統的な分類が行われるとともに、遺伝子技術を用いた簡便な検出法が確立できると思われる。さらにウイルス性下痢症の感染源と考えられている食品及び水から原因ウイルスが検出できるようになれば、下痢症との因果関係が明確となり、感染源からの有効な除去法などの予防対策も講じることができると期待される。

電顕法にまさる方法がない現状で今後とも多発すると予想される食中毒様集団発生の原因究明のためには、できるだけ早期の検体をできるだけ多量に採取し、細菌学的検査、ウイルス学的検査、患者のペア血清を用いた血清学的検査を並行して行うことが望まれる。

(ウイルス部 小林慎一)