



## 生体と微量金属 (II)

## 遺伝性疾患が知られている銅 (Cu)

ヒトの体内Cu総量は70~100mgで、新生児では成人より濃度が高い。(表1) 臓器中濃度は肝が最も高く、脳、心、腎の順である。しかし体内総Cu量の約1/2が臓器量の大きい筋、骨に存在し、肝には約10%が存在する。

ヒトの1日摂取量は2~5mgで、食品、水によって経口的に摂取され、1日の必要量は満たされている。十二指腸、胃で吸収され、アルブミンと結合して大部分肝に移行し、セルロプラスミンとなる。血液中では血清、赤血球にほぼ同量存在し、血清Cuの95%はセルロプラスミンCuで、赤血球Cuの60%は最近よく話題となっている Superoxide dismutase のエリスロクブレインである。

Cu酵素は酸素の運搬、電子伝達、酸化還元の触媒として働くもので10数種類ある。そのうちのセルロプラスミンは、血中で芳香族ジアミンを酸化しうる唯一の酵素であり、鉄代謝にも関与し、二価のFeを三価のFeとする機能があり、Feの不足がなく、Cu不足のためにFe欠乏性貧血に似た貧血をおこすことが知られている。

Cu欠乏症は家畜では古くから知られていたが、ヒトではあまり知られていなかったが1969年にペルーの小児で上記のCu欠乏性の貧血が明らかになり、ついで各国で未熟児、大量のZn投与時(Zn、モリブデン等の投与はCu欠乏症を増悪する)、乳幼児下痢症等の非経口高栄養療法時に見られるようになった。

一方遺伝性疾患のCu欠乏症としては先天性の腸管吸収障害といわれる Menkes 病(ねじれ毛症)がある。腸管で吸収されたCuの血中への放出が阻害され、血中濃度が低い。伴性遺伝性で出生35,000人に1人の割合、生後3か月以内にねじれ毛、けいれん、低体温などがみられて早期に死亡するといわれている。しかし、きわめて早期に

非経口的にCuを投与すると効果がみられるといわれているが、適量のコントロールがむずかしく今後の研究がまたれている。

欠乏症とは異なるが先天性Cu代謝異常にWilson病がある。これは人口100万人に1人といわれているが、肝でのCu代謝異常でCuの胆汁への排泄が低下し体内にCuが沈着する疾患である。Wilson病発症者と未発症者との代謝のちがいを表2に示した。血漿、組織等へのCuの沈着がみられるが、尿中へ排泄されやすいので神経症状発現以前にペニシラミンにより適切に治療すれば予後は良いといわれている。

また高齢者では血清中のセルロプラスミンが加齢によって増加し、脂質の過酸化を促進し、動脈硬化、細動脈線維化を起し、老化速度を速めるといふ仮説がある。

## 少量なら必要か、有害なクロム (Cr)

Crはヒトの体内に2~10mg含まれる。血液中では60~70%がアルブミンと結合し、残りの一部が

表1 ヒトおよび動物の総銅含量(ppm)<sup>1)</sup>

	ヒト	ブタ	ネコ	ウサギ	ラット
新生児	4.7	3.2	4.0	4.0	4.3
成人	1.7	2.5	1.9	1.5	2.0

表2 Wilson症の銅代謝異常<sup>2)</sup>

銅代謝事項	未発症者	発症者
セルロプラスミン	低	低
血漿銅	正常	高
組織銅	高	高
銅の肝へのとり込み	正常	低
銅胆汁排泄	障害	障害
糞便中銅	低	低
尿中銅	正常	高
血漿からの銅クリアランス	正常	低
銅のセルロプラスミンへのとり込み	無	無

トランスフェリンと結合して臓器に運ばれる。

肺内含量が最も高く、90~720mg/gであるが、これは消化管からの吸収に加えて経気道吸収がかなりあることを示している。

また臓器中濃度は年齢(図1)、地域(表3)によってかなり差がある。肺、脂肪組織以外は新生児が高く加齢とともに減少するという他の元素では余りみられない特徴がある。

Crの生理作用としてはインシュリンが細胞膜でグルコースなどの摂取の際のCofactorとして働く糖代謝、ミトコンドリアへの水摂取、アミノ酸代謝に関係があるとされている。また食品の精製化などで米国など食品中のCrが少ない文明国ではCrの欠乏状態が出現することを近年懸念しているが、日本では欠乏症の報告はない。動物実験では低Cr食で耐糖能の低下がみられCrは必須であるといえるがヒトの場合は食物のCr添加実験

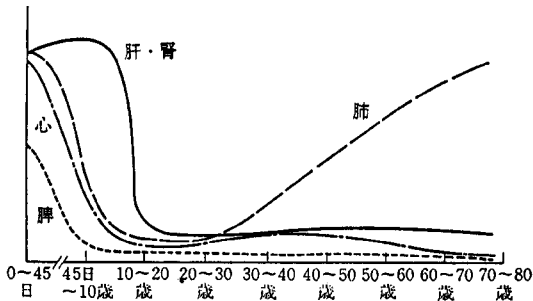


図1 各臓器中クロム濃度の年齢変化(各種報告をまとめたもの)<sup>1)</sup>

表3 地域別のクロム臓器内含量(ppm ash)および人体蓄積量(mg)(Schroeder)<sup>1)</sup>

臓器	米国人	アフリカ人	中近東人	極東人
肺	14.0	16.0	22.0	23.0
大動脈	1.9	5.5	11.0	15.0
睾丸	1.6	4.2	7.0	8.3
脾	1.6	2.5	4.2	6.7
心臓	1.6	0.9	4.0	6.3
肝	0.8	1.3	2.1	2.0
腎	0.8	2.0	5.3	3.3
脳	0.2	0.6	2.4	2.7
人体蓄積量	1.80	2.73	9.63	7.70

表4 GTF(ビール酵母抽出物)の耐糖能改善成績(Doisyらの成績、65歳以上の老人31人を対象)<sup>1)</sup>

	血糖値(mg/dl)			コレステロール(mg/dl)	トリグリセリド(mg/dl)
	前値	1時間値	2時間値		
GTF投与前	106±4	201±7	178±8	245±9	121±8
GTF投与後	99±4	162±11	132±5	205±10	112±12
		<0.01	<0.001	<0.01	

抽出物1日4g, 1~2ヵ月経口投与, 100gグルコース負荷試験

によって糖尿病患者の耐糖能の改善はみられているがすべてに有効ではない。最近特殊な例ではあるが経静脈高カロリー療法によるCr欠乏で糖尿病病状がみられCr投与で改善した報告がある。

Cr含有耐糖因子(GTF)はCr欠乏動物の耐糖能障害を改善する物質としてビール酵母から抽出され、命名された。Cr濃度の低下する老人では有効との例が表4に示されている。空腹時血糖低下、グルコース負荷時のインシュリン必要量の減少など改善がみられた。またGTFが血清コレステロール低下など脂質代謝に影響することもよく知られている。

Crの多い食品は醸造酵母、牛のもも肉、小麦全粒パン等でヒトは食品で1日30~100μg、水から10μg位摂取している。エビオス20gにGTF40~60μg含まれている。

### 今いちばん面白い元素セレン(Se)

10数年前には有害元素と考えられていたSeのヒトの体内量は約13mgである。Seは生体内に広く分布するグルタチオンペルオキシダーゼ1分子中に4原子含まれ、重要な働きをしており、腎、甲状腺の濃度が高い。

土壌中のSe含有量は地域により著明な差があり、したがって食品のSe含有量もかなり差がある。またSeは表5に示した様に栄養量と中毒量との差が少ない元素であるから地域により中毒症、欠乏症などがみられる。Se含有量の低い地域では食道癌、胃癌の死亡率が高く、また中国の低セレン地区では一種の拡張型心筋症である克山病がみられる。この疾病は心筋中のミトコンドリアのSe含有量が低下しているといわれ、小児や妊娠可能期の女性に多く、Seの経口補給で発症率が減少した。主食品中のSe含有量が0.03~0.04ppm以上であれば発症がみられないといわれている。

また腸管機能不全をはじめ種々の疾患に高カロリー輸液(TPN)が治療効果をあげているが、各

表5 セレン欠乏と中毒<sup>1)</sup>

	1日Se摂取量 (mg)	食品中Se (ppm)	食品100g中Se原子数	ヒト報告例	血液中Se (ng/ml)
欠乏レベル	0.01(0.003~0.022)	0.005~0.01	3.8×10 <sup>15</sup>	克山病(中国)	8~22
準欠乏レベル	0.03	0.01~0.02		虚血性心疾患, がん(フィンランド, NZ)	30~80 (45以下でリスク)
栄養レベル	0.1(0.04~0.23)	0.05~0.2	38×10 <sup>15</sup>		100~200
過剰レベル	0.2			ベネズエラ, 米国	355
中毒危険レベル	1.0(0.24~1.5)	0.5~1.0	380×10 <sup>15</sup>	中国	440
中毒レベル	5.0(3.2~6.7)	5~10	3,800×10 <sup>15</sup>	セレンーシス(中国)	3,200

種の微量元素の欠乏症をひきおこす、特に小児の低蛋白血症を伴う重篤疾患であるクワシオーコルなどでSe欠乏のため、乳児急死症候群がみとめられている。TPN施行時は下肢の筋肉痛、心電図の変化に留意すべきである。

Seの特徴の一つとしてメチル水銀、無機水銀の毒性軽減作用があるが、臓器内の両金属濃度は逆に増加している。またCd、銀の毒性軽減にも有効なことも確認されている。白金錯体であるシスプラチンは強力な抗癌剤として世界中で繁用されているが、腎毒性が強く本剤の有効使用を妨げている。動物実験の結果亜セレン酸の併用がシスプラチンの致死毒性、腎毒性を著しく軽減し、抗腫瘍効果に影響をおよぼさないことがあきらかになった。しかしHg、Cdの場合とは異なる機構の様である。

Seの摂取量が低下すると生体内の過酸化物の生成が増加し、老化が促進するとの研究があり、血清、毛髪中Se含量と年齢との間に有意の逆相関が認められ、加齢と共に低下しているとの報告があるが、この二つを短絡的に結びつけて論ずることは出来ない。Seの欠乏は体液性免疫の遅れ、抗体価の減少などを生ずる。SeはIgM産生をビタミンEはIgG産生を高め、抗体産生を増強する。

その他の元素マンガン(Mn)、モリブデン(Mo)、バナジウム(V)、コバルト(Co)など

Mnは一般にミトコンドリアに濃縮され、骨、脳下垂体、授乳中の乳房、肝などに濃度が高い。ミトコンドリア酵素であるビルビン酸カルボキシラーゼはMg、Mnを必要としてグルコース代謝ではMnが必要である。この他にも数種のMn金属酵素、Mn活性化酵素があるが、ブタ、ニワトリ、ウシ、ヒツジでは欠乏症が認められる。成長

障害、骨格異常、生殖機能障害、新生児の運動失調などが主症状である。しかしヒトの欠乏症は今のところ認められていない。

Vはヒト体内での濃度が最も高いのは肺であり、加齢とともに増加がみられ、大気由来のものと考えられる。Vはコレステロール、糖の低下作用があるといわれるがヒトの必須性は不明である。

Moは骨格に5mg、肝に2mg含有されているがヒト、動物でのMo欠乏症は知られていない。しかしTPN時に頻脈、多呼吸、夜盲症などを来した症例にMo投与を行なったところこれらの症状が軽快したとの報告がある。

CoはCo自体の欠乏症は知られていないが、これを含むビタミンB12の欠乏症として悪性貧血や亜急性性連合性脊髄変性症が知られている。

ヨウ素は生体の90%近くが甲状腺に存在する。この様に局所に偏在する元素はめずらしい。欠乏症としては甲状腺腫、甲状腺機能低下症が知られている。

これらの元素の体内量、1日摂取量を表6に示した。

表6 微量元素のヒト体内量<sup>1)</sup>

	成人体内量 (mg)	一日摂取量 (mg)
V	18 ~ 20	0.1 ~ 2
Mn	12 ~ 20	3 ~ 7
I <sub>2</sub>	11	0.1 ~ 0.14
Ni	6 ~ 10	0.1 ~ 0.5
Mo	9	0.1 ~ 0.3
Co	1.5	0.02 ~ 0.16

参考文献

- 1) 和田攻：金属とヒト 朝倉書房  
(生物部 早川清子)

# PCR法の原理と応用

## —ウイルス感染のDNA診断—

はじめに

PCRとはPolymerase Chain Reaction (ポリメラーゼ連鎖反応)の略称で1個のDNA断片から $10^8$ 個以上のDNAをたった数時間で作り出す魔法の技術である。遺伝子工学はもちろんのことウイルス学、細菌学、ガン遺伝子の研究、遺伝病研究、法医学(血液、体液、毛髪からの個人の特定)、進化学、考古学(ミイラやマンモスの化石標本からの微量DNA分析)等の分野で応用されている。その原理がシンプルゆえに応用範囲が広く今後、様々な分野での利用、応用が期待される強力な遺伝子増幅技術である。

原理

PCR法はDNAポリメラーゼ反応を利用した標的DNA増幅法である。DNAポリメラーゼは1本鎖DNAを鋳型とし相補的なDNAを合成する。反応開始にはプライマーとよばれる鋳型DNAと相補的な $10\sim 20$ のオリゴヌクレオチドと4種類のデオキシリボ3リン酸(dATP, dGTP, dCTP, dTTP)にDNAポリメラーゼを反応させることによりDNA鎖は伸長される。従って適当なプライマーを用いることにより目的とするDNA領域だけを合成することができる。PCR法の原理と増幅工程を図1、図2に示した。生体においてDNA

は通常2本鎖で存在している。またDNAは加熱により2本に分離する性質を持っている。先ず目的とする領域の2本鎖DNAを加熱により1本鎖に分離させる。目的とする領域をはさむ2本のプライマーを使用し鋳型となるDNAに付着させる。DNAポリメラーゼの働きによりプライマーを始点として鋳型DNAと相補的な新しいDNA鎖が伸長される。伸長が完了したら再び加熱し2本鎖DNAを解離させる。するとこの時点で最初2本であったDNA鎖は4本に倍増される。ポリメラーゼの働きによる新しいDNA鎖の伸長と加熱によるDNA鎖の解離を繰り返していけばDNA鎖は、指数関数的に増幅される。試料中のDNAの検出には従来からDNAハイブリダイゼーション法(核酸のハイブリッド形成を利用した核酸検出法)が用いられてきた。その感度は放射性同位元素を用いた場合でもおよそ $10^{-18}$  mole (1 mole =  $6.23 \times 10^{23}$ 個分子)とされ、DNA分子がハイブリダイゼーション法で検出されるためには、 $10^{-18} \times 10^{23}$ つまり $10^5 \sim 10^6$ のDNAが存在することが必要であった。しかしPCR法では検出したDNAが1本でもあれば短時間に $10^8$ 個以上に増幅することができる。従って検体中のDNAをPCR法で増幅してからDNAハイブリダイゼーションを行えば検体中に存在するたった1個のDNAの存在を証明することができる。さらにもう一度PCRを行えば1個のDNA鎖からアガロース電気泳動(アガロースを担体に核酸の大きさにより泳動分離する電気泳動法)で目に見える1本

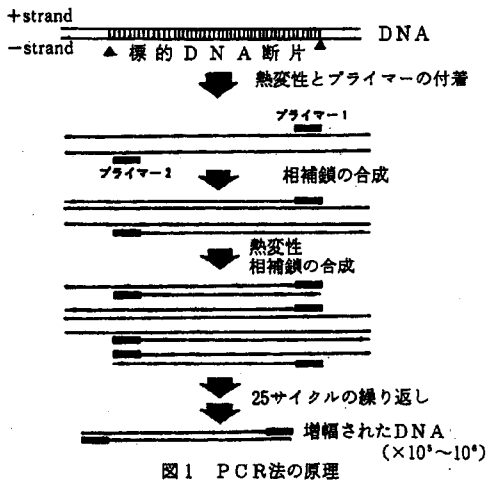


図1 PCR法の原理

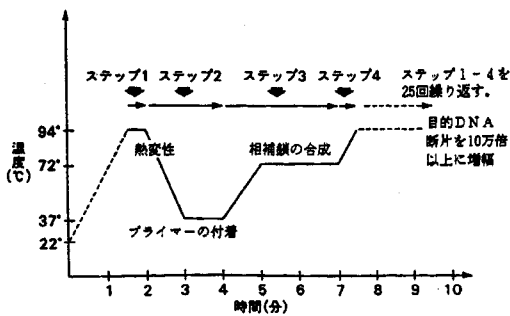


図2 増幅工程

のバンドにまで増幅させることが可能となる。

従来までは加熱によるDNAポリメラーゼの失活で反応の1サイクル毎にDNAポリメラーゼを反応系に加えることが必要であった。しかし、近年温泉に存在するイオウ細菌から耐熱性のDNAポリメラーゼの発見と反応を自動制御する機器の発売によってPCR法は簡便化された。その結果、前述したように幅広い分野で利用されるようになった。

#### ウイルス感染のDNA診断

ウイルス感染の病原診断は患者材料中のウイルスを検出し同定することである。ウイルスを直接検体から検出することは最高度の抗原抗体反応の技術、電子顕微鏡の技術を駆使しても検体中に最低 $10^5 \sim 10^6$ 個/mlのウイルス粒子数が必要で、ロタ、アデノウイルス等数種類のウイルスを除いて不可能である。そこでいったん細胞を用いてウイルスを増殖させた後、同定する方法が従来から行われてきた。しかし、この方法は分離同定までに多数の手間と時間を要する。また、ウイルスによっては増殖に適した細胞が見つからないものも少なくない。そこで検体に含まれるほんの少しのウイルス粒子からウイルスDNAを直接抽出しPCR法を用いてウイルスの特異遺伝子を増幅させる。その後アガロース電気泳動を行いハイブリダイゼーション、あるいはエチジウムブロマイド染色（二重らせんDNAを特異的に染色する染色法）によりウイルスの特異遺伝子を検出する。PCR法を用いればウイルスの検出同定が1～2日で可能となりウイルス感染の診断、治療に対して適切な処置を行なうことができる。

次にウイルス感染のDNA診断法が確立されてるものを数種類紹介する。

##### 1) ヒト免疫不全ウイルス (HIV)

AIDS（後天性免疫不全症候群：acquired immunodeficiency syndrome）ヒト免疫不全ウイルス（HIV）の慢性持続感染によって引き起こされる免疫不全を中心に、全身に広がるカリニ肺炎等の日和見感染症や悪性腫瘍、神経性障害を伴って高率に死に至らしめるウイルス感染症である。AIDSは発症予防、治療の難しさと高い発症率、死亡率等から、世界共通の問題としてその対応に迫られている。HIVはRNAを遺伝子に持つウイルスで、免疫関係を制御するT4リンパ球に感受

性をもつ。感染後その宿主リンパ球の遺伝子上に自分自身の逆転写酵素（RNAを鋳型としてDNAを合成する酵素）を用いDNAとした後宿主リンパ球の遺伝子上に組み込まれ、プロウイルス（レトロウイルスが逆転写酵素により自分自身のRNAを二重鎖DNAとして、宿主細胞DNAに組み込まれている状態）として生体内で持続感染を成立させる。

HIV感染の診断にPCR法を必要とする理由は種々存在する。HIVの感染診断には通常血中抗体の測定が行なわれている。しかし、抗体陽性となるまでに最低3か月を要し、場合によってはsilento infectionという現象がかなりの高率で発生することが報告されている。すなわち、ウイルス分離に成功するような場合でも抗体陰性という期間が長く続くということである。この抗体陽転までの期間内においても十分に感染能力を備え二次感染を生じさせる。HIVハイリスクグループにおいては抗体測定だけでは不十分で、完全に二次感染を防止することができない。HIV感染者の血中のウイルスRNA、プロウイルスDNAのコピーは多くないのが通例である。従って、従来からのハイブリダイゼーション法では直接ウイルス核酸を検出できないのが当然とされている。ウイルス分離は一般の施設では不可能であり、一般によく用いられている抗原検出もあまり感度が高くない。そこで、信頼のおける診断法はPCR法ということになる。HIVはRNAを遺伝子にもつウイルスであり、T4リンパ球中ではプロウイルスDNAとして存在する。従ってRNA、DNAのいずれか、または両者を出発材料とするPCR法が用いられる。

##### 2) 単純ヘルペスウイルス (HSV)

単純ヘルペスウイルスはDNAを遺伝子にもつウイルスで生物学的および免疫学的性状から1型、2型に分類されるHSVは他のヘルペスウイルスと同様に感染宿主に持続感染する。神経節細胞に潜伏したウイルスは時に再活性化し宿主に回帰発症の形で現われる。母親が初感染で新生児の感染はしばしば致命的となる全身性の感染、脳炎を引き起こす。乳幼児期ではおもに歯肉口内炎を、成年期では皮膚ヘルペス、性器ヘルペス、ヘルペス角膜炎などを引き起こす。

HSV感染症診断では血清学的診断、ウイルス分離、ウイルス抗原の検出が行なわれている。こ

の際に型別判定を行なうことは再発、予後の判定を占うばかりではなく感染経路の推定にも有用である。現在行なわれている型別判定法はウイルス分離とモノクローナル抗体（単一の抗原決定基のみを認識する抗体）によるもの、蛍光標識モノクローナル抗体による抗原検出法がある。前者は感度には優れるが分離に日数がかかる。後者は迅速ではあるが感度が低いという欠点をもっている。これらの欠点を克服したものがPCR法である。HSVのDNAポリメラーゼをコードする遺伝子は1型、2型の間で85%のホモロジーをもっている。そこで一方のプライマーに1型、2型に共通な遺伝子領域を、他のプライマーは1型特異的、2型特異的な領域を使用しPCR法を行なう。反応終了後、アガロース電気泳動を行い増幅された遺伝子の大きさにより1型、2型に型別される。この方法を用いることにより現在行なわれている型別判定法と比較し、迅速に高感度に1型、2型の型別判定を行なうことが可能となった。

### 3) ムンプスウイルス

ムンプスウイルスはRNA遺伝子にもつヒトの代表的なパラミクソウイルスで、耳下腺腫張炎のみならず無菌性髄膜炎、睾丸炎、肺炎などを引き起こすことが知られている。時には予後不良な難聴、脳脊髄炎の原因ともなる。米国においては1968年からムンプスワクチンの実用化が行なわれ顕著な効果をあげた。わが国においてもワクチンの開発が行なわれ、1981年から任意接種の形でワクチン接種が行なわれるようになった。1989年からは麻疹、風疹と共に三種混合ワクチン(MMR)として定期接種に組み入れられた。しかし、ワクチン接種後2～4週間後には無菌性髄膜炎を発症した例が報告され、しばしばムンプスウイルスが髄液中から分離されるようになった。この分離株がワクチン由来株か、野生株かの判定がこのワクチンの有効性と安全性を考えるうえで重要な問題となってきた。

ワクチン株か野生株かの判定はムンプスウイルスの遺伝子配列が明らかにされている現在、遺伝子構造の比較により識別できるようになった。しかし、遺伝子配列を決定するには、ウイルスを大量に必要とする。従来は患者の髄液を組織培用法でムンプスウイルスを分離し、分離ウイルスのブ

ラックサイズによってワクチン株か野生株かの判定を行なってきた。しかし、ワクチン株は人に接種された後に細胞での分離、継代を行なうとブラックサイズが野生株と変わらなくなり判定が困難となる場合が多かった。また、この一連の操作は多大な労力と日数を要した。

この問題を解決したのがPCR法である。まず、分離されたウイルスからRNAを抽出し、逆転写酵素によりDNAに変換する。ワクチン株と野生株の遺伝子はほぼ同じ遺伝子配列をもっている。しかし、ムンプスウイルスをコードする6つの遺伝子のうちP遺伝子、SH遺伝子が両株間において遺伝子配列に多くの相違が認められる。これらの変異の多い領域を標的にその変異領域を挟んだ両株間でよく保存されている1組のプライマーを使用し、PCR法を行なう。わが国のワクチン株はその変異領域に特有の塩基置換をもっている。そのために、増幅されたワクチン株のDNA鎖は制限酵素のBamHI、Eco01091の切断パターンが野生株と異なることが明らかにされている。PCRを用いこれらの制限酵素の切断パターンを比較することにより、短時間にしかも多数の分離ウイルスの処理が可能となり、容易に無菌性髄膜炎の起因ウイルスの由来を明らかにすることが可能となった。

まとめ

以上、PCR法の原理とウイルス感染診断にPCR法が利用されている3種類のウイルスを紹介した。他にもB、C型肝炎ウイルス、ATLV-1、エンテロウイルスなどもPCR法が確立されている。ウイルスに対する有効な薬剤は現在のところ限られたウイルスにしか存在しない。しかし、ウイルス感染の早期診断は二次感染の予防、予後の判定に非常に有用であり、今後多数のウイルスに応用されると期待される。

### 参考文献

- 実験医学, Vol.8 No.9 1990 PCRとその応用  
武部 豊, 他: HIVの新しい診断法—PUR. エイズジャーナル, 2(2):162-173, 1989  
木村 宏, 他: ウイルス感染のDNA診断法(1). モダンメディア, 36:528-535, 1990  
TaKaRa PCR Technical News

(ウイルス部 森下高行)