〔教育講演〕

遺伝子診断の現状と展望

河 合 忠

進化論から DNA へ

遺伝というのは、親の形質が子に伝えられることであって、地球上に生息する数千万種ともいわれるすべての生物に共通の性質であり、それを司るのが遺伝子である。1800 年代後半 Darwin が提唱した進化論に発した遺伝に関する知識は、1865 年に Mendel の法則の発表となった。1860 年すでに Schleiden & Schwann により唱えられた細胞説によれば、生物はすべて細胞からなり、遺伝は精子と卵子により起こるとされた。さらに、1968 年には Haeckel により、遺伝は細胞核が担当することが報告され、1879 年には Flemming は核内に染色体を発見し、それが遺伝を司ると考えた。Mendel の法則が植物学者により再発見されたのは、実に 1900 年であって、遺伝を決定する因子として遺伝子なる概念が定着した。1903 年に Sutton は対立遺伝子の存在を提唱し、さらに性染色体に X と Y が存在することを明らかにした。

化学者が遺伝現象、とりわけ細胞核の役割に注目したのは 1920 年以降であって、核酸と蛋白質の複合体の存在を証明した。多くの化学者の研究により、生命現象に特有な化学反応はなく、多くの酵素が関与するエネルギー代謝の結果であり、ADP から ATP への反応が主役を演じていることが解明された。さらに、核酸にはデオキシリボ核酸 (DNA) とリボ核酸 (RNA) があり、きわめて巨大な分子を形成しており、すべてのウイルスにも核酸の存在することが解明された。1947 年になると、Chargaff らの研究により、DNA はヌクレオチドからなり、その数は動物種により異なり、アデニンとサイミン、グアニンとサイトシンはそれぞれ

同数含まれることが判明した。1950 年代になると、Wilkins & Franklin による X 線解析による DNA 分子の立体構造が報告され、ついに 1953 年に Watson & Crick による DNA の二重螺旋構造が提唱され、それにより鋳型による遺伝子の複製がほぼ完全に説明できた。しかも、塩基同士の弱い非共有結合でありながら多数個が集合することにより安定な結合物を作ることが判明し、さまざまな生物現象における重要な機序であることが示唆されていた。

1950 年以降になると、化学者は生命現象を解明するためのモデルとして細菌、とりわけ大腸菌を使うようになった。すなわち、分裂、増殖が速く、最も小さな単細胞であり、その中には約 5,000 程度の分子が存在し、約半分は大分子化合物で占められており、その中で糸状構造をもつ巨大核蛋白が重要な役割を担っていることが判明した。こうして、かつては神秘的な生命現象の単位として遺伝子の存在を考えていたのが、現実に DNA という“もの”として理解できるようになった。

遺伝子の構造と機能のあらまし

遺伝子の大部分を占める構造遺伝子は DNA の鎖が 2 本螺旋状に結合した形で存在する。DNA は 4 種類の塩基、すなわちアデニン (A)、サイミン (T)、グアニン (G)、サイトシン (C) の配列した鎖にデオキシリボースとリン酸が結合したヌクレオチドから成る。2 本鎖のうち 5'→3' 方向に塩基配列を示すのがセンス鎖、3'→5' 方向に塩基配列を示すのが鋳型鎖と呼ばれ、A と T、G と C の二つの組合せで両鎖が結合しているので、塩基配列については互いに相補的な関係が成立し

Present and future of gene diagnosis.

Tadashi Kawai ; 自治医科大学臨床病理学教室

Correspondence address : Tadashi Kawai, Department of Clinical Pathology, Jichi Medical School, 3311-1, Yakushiji, Minami-kawachi-machi, Tochigi 329-04, Japan.

Key words : gene diagnosis, gene testing.

第 45 回日本電気泳動学会春季大会・教育講演

ている。構造遺伝子の機能特性（遺伝情報）はこのDNAの塩基配列によって規定されている。

構造遺伝子DNAのうち鋳型鎖の塩基配列がメッセンジャーRNAに転写される。したがって、mRNAはセンス鎖の塩基配列と同じであるが、RNAではDNAのサイミンがウラシル(U)に置き変わる。この後、スプライシングを経てイントロン（アミノ酸合成に関与しない部分）が切り取られてエクソン（アミノ酸合成に関与する部分）の集まった成熟mRNAと成る。それがリボソーム上で構造遺伝子の暗号どおりにアミノ酸が連結してペプチド鎖が合成される。

個々のアミノ酸には特定のコドンが対応している。すなわち、コドンは3個の塩基配列である。アミノ酸の合成はmRNAのもつ遺伝子暗号（コドンの順序）により、対応している。このようにして、遺伝子暗号どおりのアミノ酸が連結したポリペプチド、すなわちタンパク質が合成される。細胞内で合成されたさまざまなタンパク質が身体の代謝に関与して生物の生命を維持している。タンパク質以外の物質、たとえば、脂質や糖質などは遺伝子に関係していないように思えるが、それらが体内で造られる過程ではさまざまな酵素（タンパク質である）が関与するので、結局ほとんど全ての代謝は遺伝子により制御されていることになる。

遺伝子検査の意義

病気の発症には環境因子（外因）と遺伝因子（内因）がさまざまな割合で関与している。外因は、微生物とそれ以外の要因に大きく分けられる。したがって、遺伝子検査は被検者自身が対象になる場合と外因として侵入する微生物が対象となる場合とがある。臨床的に遺伝子検査が実施されるのは、以下の場合であるが、現在わが国で保険診療に適用になり診療報酬が設定されているのは、病原微生物の核酸同定検査のみである。さらに、先端診療技術として特定の診療機関に限って承認されているものには、血液造血器腫瘍、たとえば白血病、悪性リンパ腫など、ごく少数の診断検査に限られている。

1) 感染症の診断

感染症は外から病原微生物が宿主体内に侵入し、そこで増殖し、宿主の組織を破壊して炎症を起こす結果発症する。それぞれの微生物は特有の遺伝子をもっているのので、それを確認することによって病原微生物を同定することができる。とくに、人工培養ができないもの（ウイルス、など）、培養に長時間がかかったり高度な技術が必要なもの（結核菌、抗酸菌、リステリア、

マイコプラズマ、など）の同定に有用である。

抗菌薬に対する耐性（メチシリン耐性黄色ブドウ球菌（MRSA）など）や毒素産生が遺伝子変異によって生ずる場合には、それらの性状も遺伝子検査により確認できる。

遺伝子検査は短時間に特定の病原微生物を最終的に同定できるという大きな利点がある。

2) 遺伝病の診断

ある特定の遺伝子の変異によって発病する一因子遺伝病では、その遺伝子変異を確認することにより診断ができる。そのほかにも、多因子遺伝病と考えられるごくありふれた病気（common diseases）でも遺伝子検査が診断と治療方針の決定、予後の推定、発症の危険度の予測などに役立つようになるであろう。

遺伝病での遺伝子診断の利点は、発病以前（発症前診断）や治療後で無症状の時点でも確認することができること、病巣以外の組織細胞を使って検査できることである。とくに、妊娠中の胎児期の出生前診断、さらに人工受精卵で着床前診断も可能になりつつある。

3) 癌の診断

自己細胞の中に存在する癌遺伝子と腫瘍抑制遺伝子の変異に、さまざまな外因が関与して発癌すると考えられている。したがって、発症の危険度の予測、癌細胞の有無、癌の悪性度の確認などに遺伝子検査が役立つようになろう。血液腫瘍では、腫瘍細胞の由来（B細胞、T細胞、など）の決定、治療後の残存腫瘍細胞の定量、一部悪性度の推定に臨床的に利用されている。しかし、固形腫瘍では、大腸癌など一部のものについて、癌転移の有無の判定に利用されているにすぎない。今後、臨床研究の成果が積み重ねられることにより、実用性が確認されていくであろう。

4) 組織適合性の診断

臓器移植において、提供者と受入者との間で組織適合性が高いほど移植の成功率が高い。現在では、組織適合性試験は主として血清学的検査に依存しているが、近い将来、より信頼性の高い遺伝子検査による適合性の決定が主流を占めると考えられる。

5) 遺伝子治療のモニタリング

いろいろな病気で遺伝子治療が試みられているが、その前提として遺伝子検査により特定の遺伝子の変異を確認しなければならず、さらに治療後の経過観察に遺伝子検査が不可欠である。

6) 法医学的有用性

それぞれの個人は特有の遺伝子の組合せ（ゲノム）をもっているのので、犯罪容疑者の同定、親子鑑定、性

決定などに広く応用される。

こうして、21 世紀には、検体検査の中の約 5~7% の業務量は遺伝子検査により占められるであろうと推定されている。

遺伝子検査の進め方

遺伝子の本体は DNA であって、それぞれ固有の塩基配列をもっている。したがって、部分的に塩基配列の異なる DNA があるかどうかを検査する方法が遺伝子検査である。

1) 核酸の抽出

遺伝子は染色質（分裂時には染色体となる）に配列し、タンパク質を結合した巨大分子を形成しているので、細胞や組織から遺伝子である DNA またはリボソームにある RNA を有機溶媒などで抽出する操作から始まり、抽出した核酸について検査する。

2) 電気泳動法による分離

電気泳動法は核酸分析の上で不可欠の分離分析法であり、二つの目的に利用される。すなわち、核酸断片の分離と核酸断片の回収である。

遺伝子は巨大分子として存在するので、さまざまな制限酵素（restriction enzymes）で切断してから分析する。多種類の遺伝子断片混合物をそれぞれの断片に分離するのに、最もしばしば利用されるのが電気泳動法である。すなわち、DNA は中性緩衝液中で強い陰性荷電をもち、しかもさまざまな大きさの断片が混在するので、分子篩効果をもつ支持体電気泳動法を使えば、各断片を分離することが可能となる。1 kb 以下の小さな断片群を分離するにはポリアクリルアミドゲル電気泳動法を用い（表 1）、1 kb 以上の断片群にはアガロースゲル電気泳動法を用い（表 2）、10 kb 以上の大きな断片群にはパルスフィールドゲル電気泳動法が好んで用いられる。

核酸断片の回収の場合には、ゲル電気泳動法にて分離した DNA 断片を、よりきめ細かなニトロセルロース膜などに転写してハイブリダイゼーションを行うのに利用する。

3) ハイブリダイゼーション

ハイブリダイゼーションは、塩基配列の分かった DNA を合成し、それを DNA プローブとして使用し、それが被検 DNA またはその断片に結合するかどうかを検査する方法である。ハイブリダイゼーション反応を液相または固相で実施することが可能である。液相ハイブリダイゼーションは定量的観察に適している。固相ハイブリダイゼーションには、表 3 のように四つ

表 1-1. 遺伝子検査におけるポリアクリルアミドゲル電気泳動法の特徴

- 1) 低分子核酸断片の分離に適している
- 2) 比較的多量の DNA を分離可能である
- 3) 不純物が混入しにくい
- 4) 作製後のゲルの保存が困難である
- 5) ゲル作製に手間がかかる

表 1-2. 遺伝子検査におけるポリアクリルアミドゲル濃度と DNA 分画範囲

ゲル濃度 (%)	DNA サイズ (bp)
3.5	100-1000
5.0	80-500
8.0	60-400
12.0	40-200
15.0	25-150
20.0	10-100

表 2-1. 遺伝子検査におけるアガロースゲル電気泳動法の特徴

- 1) 分離できる分子量分画範囲が広い
- 2) 溶液の調製が簡単である
- 3) 溶液は無毒である
- 4) 泳動後の抽出が容易である
- 5) 不純物の混入が起こりやすい

表 2-2. 遺伝子検査におけるアガロースゲル濃度と DNA 分画範囲

ゲル濃度 (%)	DNA サイズ (kb)
0.3	4-50
0.6	0.9-20
1.0	0.6-7
1.2	0.4-6
1.5	0.2-4
1.8	0.1-2
2.0	0.1-3

の基本的な検査法がある。

4) 遺伝子検査の高感度化

遺伝子検査を日常診療に導入するには、ごく微量の試料で検査できることが必要であり、そのために高感度化が工夫されている。それには、大きく分けて①signal amplification と②target amplification がある。

Signal amplification では、ハイブリダイゼーションが実際に起こったか否かを鋭敏に可視化するのに、初期段階では放射性アイソトープを用いていたが、放射性廃棄物の処理、解像度が悪いなどの問題点があり、近年では蛍光色素、ビオチン・アビジン、酵素、化学

表3 固相ハイブリダイゼーション法の基本的な方法

1. Spot (dot blot) hybridization
核酸試料を滴下した支持体上で行う
2. *In situ* hybridization
細胞, 組織, 染色体, などの形態構造を保存したままで行う
3. Southern blot hybridization
DNA 断片を電気泳動法で分離した後, ニトロセルロース膜に転写して行う
4. Northern blot hybridization
RNA 断片を電気泳動法で分離した後, ニトロセルロース膜に転写して行う

発光物質, などを標識物質として用いるようになった。とくに, 化学発光物質と蛍光物質は近年広く利用されつつある。とくに, 蛍光物質を使用した fluorescent *in situ* hybridization (FISH) 法の応用範囲が急速に拡大し, 注目されている。また, 商品化されている方法としては, 種々の病原微生物の検出に利用されている hybridization protection assay (HPA) [Gen-Probe, 中外製薬] と HCV の定量に利用されている branched DNA assay [Chiron, 第一化学] などがある。

Target amplification の代表的なものが, polymerase chain reaction (PCR) 法である。すなわち, あらかじめ合成しておいたプライマー, 塩基材料, 耐熱性ポリメラーゼ, などとともに増殖しようとする DNA とを混合して, サーマルサイクラー装置にかけて標的 DNA を増幅する。理論的には, 1 個の遺伝子があれば無限に増殖が可能であり, 現在最も効率的な増幅技術である。しかし, この方法にもいくつかの難点があり,

とくに他からの核酸断片の汚染に対する対策が必要である。

5) 遺伝子検査技術の簡易化と機械化

遺伝子検査が広く日常診療に取り入れられるについては, 検査技術の簡易化と機械化 (できれば自動化) が必要である。現に, さまざまな機械化が進められているし, 核酸バイオセンサーの開発も進められている。これらの技術が開発されるならば, 簡易迅速測定装置による測定の標準化が進展するであろう。

遺伝子診断の倫理的課題

現時点では, 治療がきわめて困難なエイズや癌について, 告知すべきかどうかが社会問題となっている。この問題は遺伝子診断に限ったことではなく, 基本的には「説明と同意 (informed consent)」が原則であるが, わが国の社会的現状では個々の症例ごとに医師の判断に委ねられている。

遺伝子病の場合には, 治療不可能か少なくとも進行を止められない病気について, 発症前診断が適切か否かが問われている。可能な限り医療機関内に「遺伝相談室」または「倫理委員会」を設置し, 主治医の独断により進められることのないよう慎重な対応が必要である。

ヒト・ゲノム・マッピング・プロジェクトが世界的規模で進められており, 21 世紀前半にはほとんどの遺伝子のマッピングが終わっていると予測されている。その結果から, 臨床的に役立つ多くの情報が得られるようになり, 遺伝子検査の対象も著しく拡大すると考えられる。そのような状況下での遺伝子検査の進め方, 遺伝子検査結果の守秘体制, など早急な指針の作成と国民の合意づくりが必要である。