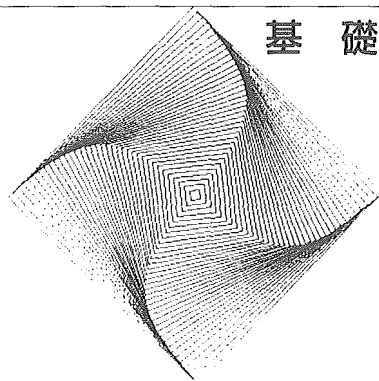


〈バイオとエレクトロニクスの融合・接点〉  
**DNA 診断と RNA 診断**

野 島 博

応用物理 第 74 卷 第 10 号 (2005 年) 抜刷



野 島 博

RNA 診断は、DNA 診断によって生じるであろうゲノム倫理問題を起こさないという意味で有用である。われわれは段階的サブトラクション法の開発に成功した。この技術によれば、ある細胞で特異的に発現している遺伝子がすべて包括的に単離できる。この技術の応用として、健康人血液細胞あるいは自己免疫疾患患者の血液細胞に特異的に発現している遺伝子をすべて単離した。これら発現特化型 cDNA マイクロアレイとして貼り付けた DNA チップを作製し、これを用いた RNA 血液診断法(例えば自己免疫疾患を対象とした)の構築を目指している。さらに、これら遺伝子は治療のためのゲノム創薬の標的としても有用である。

**Keywords :** RNA diagnosis, DNA diagnosis, stepwise subtraction, blood cell, cDNA microarrays, autoimmune disease

## 1. ま え が き

病気の原因は遺伝性素因と環境要因の二つに大別できる。感染症や怪我でさえ、かかりやすさや不注意さ、体質や治癒しやすさまでも考慮すれば、すべての病気には特定の遺伝性素因を当てはめて考えることができる。病気の診断と治療のために、遺伝子医療のための基礎研究が進んでいるが、そこで重要なのは正確に診断することである。遺伝子のレベルで異常がないかどうか調べることを遺伝子診断 (gene diagnosis) と呼ぶ。多くは DNA の塩基配列上の異常を検出することを目的とした DNA 診断であるが、最近、遺伝子の働き(転写レベル)を調べるという RNA 診断が発想されて研究が進んでいる。本稿では、DNA 診断と RNA 診断について比較を交えながら概説したい。

## 2. DNA 診断

### 2.1 DNA 診断技術小史

ヒトは両親由来の一对の対立遺伝子 (allele) を持つが、おのおのを構成する約 30 億塩基対の間には小さな差異が見つかる。個人差となると、1000 塩基に 1 個は塩基配列の違いが見つかるといわれている。この差異は遺伝子多型 (genetic polymorphism) と呼ばれ、多型マーカーを検出する方法が開発されてきた<sup>1,2)</sup>。まず 1980 年代前半には、第 1 世代の多型マーカーとして制限酵素断片長多型性 (RFLP: restriction fragment length polymorphism) が開発された。ゲノム DNA を適当な制限酵素で切断し、標的遺伝子をプローブとしたサザンブロットによって生じるバンドのパ

ターンの違い (これを多型性と呼ぶ) を検出するこの方法はリフリップとも呼ばれ、ゲノム上のマクロな欠失、挿入が主として検出できるため有用であった。制限酵素の認識サイトを変化させている場合には点変異も検出できる (図 1(a))。しかし解析には、1 制限酵素当たり数  $\mu\text{g}$  以上の DNA がサンプルとして必要である。

1980 年代後半には、反復単位が 7~40 塩基対で反復回数には個人差がある VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) と呼ばれる反復配列が発見され、第 2 世代の多型マーカー、別名ミニサテライト (minisatellite) として登場した。VNTR を挟むようにプライマーを設計して PCR で増幅すると、反復回数の多い人ほど長い DNA 断片を生じるので、それをアガロースゲル電気泳動を用いて VNTR (ミニサテライト) マーカーとして検出する (図 1(b))。これらは全ゲノム中に数千~数万カ所で検出できる。

1990 年代に入ると、第 3 世代の多型マーカーとしてマイクロサテライト (microsatellite) 多型が実用化された。マイクロサテライトとはヒトゲノムに存在する 2~7 塩基の短い繰り返し塩基配列を意味し、繰り返しの回数に個人差があるので、PCR・アガロースゲル電気泳動によって検出できる (図 1(c))。PCR で短い塩基配列の繰り返しを検出するのでサンプルは少量 (10 ng) ですみ、試料 DNA が古くて少しは分解していても検出できる。ただし繰り返し数の幅が数種類しかなく、あまりに小さいので一つのマイクロサテライトだけでは個人の特定はできない。いくつかのマイクロサテライトを同時に使用して確度を高める必要があるが、ヒトゲノム内には数万カ所でマイクロサテライト

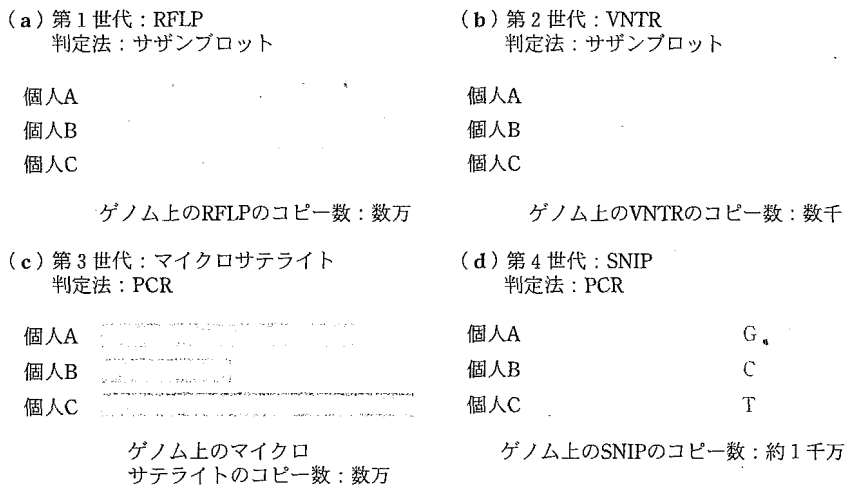


図1 第1～第4世代のDNA診断法の変遷。

があると予想されるので問題ない。

2000年に入って注目されてきた個人差としての一塩基多型であるSNP (SNP: single nucleotide polymorphism) は第4世代の多型マーカーである(図1(d)). SNPの有利な点は結果がプラスかマイナスかの2通りしかないためデジタル信号化でき、大量のSNP情報を高速コンピューターで解析できることにある。その結果、個々人の遺伝子の1塩基の違いを基盤とした医療の個別化 (personalized medicine) あるいはオーダーメイド医療という考え方がでてきた。約1000塩基につきくらいはあるSNPは、ヒトゲノム全体では300万カ所のSNPが存在すると予測されている。

## 2.2 DNA 変異検出法

これまでに数多くの遺伝子変異検出法が開発されてきた(図2)<sup>2)</sup>。対立遺伝子特異的増幅法 (ASA: Allele Specific Amplification) は、変異部を認識するようなプライマーを用いてPCRを行うと、変異DNAはプライマーと結合(アニール; DNAの相同な塩基配列同士が結合して二重らせんを構成すること)しないので、PCR反応が開始せずに増幅されないことを利用する。対立遺伝子特異的オリゴヌクレオチド法(ASO: Allele Specific Oligonucleotide)では、オリゴヌクレオチドそのものを標識して、変異点には弱くしか結合できない性質を利用して変異点を検出する。ミスマッチ化学切断法(CCM: Chemical Cleavage of Mismatch)は、変異点はハイブリッドを形成でき

ず立体構造が変わる性質を利用し、ここをDNaseに切断して断片を検出する。変性勾配ゲル電気泳動法(DDGE: Denaturing Gradient Gel Electrophoresis)は、変異により生じるヘテロ二重鎖を変性させ、尿素やホルムアミドなど無荷電の変性剤の濃度勾配をかけたゲルで電気泳動することで、患者あるいは正常人由来のバンドが異なった位置に電気泳動されるのを検出する。ヘテロ二重鎖法(HET: Heteroduplex Method)は、変異により生じるヘテロ二重鎖が中性ゲルで遅れて電気泳動されるのを検出する。プライマー伸長法(PEX: Primer Extension)は、変異点近傍に設定したプライマーを用いたPCRで直接塩基配列を決定して変異点を検出するためミニシーケンス法とも呼ばれる。

耐熱性DNAリガーゼを用いて増幅反応を同時に行いながら検出するLCR(Ligation Chain Reaction)は、感度が高い。SSCP法(Single Strand Conformation Polymorphism)では、一本鎖DNAは塩基配列に依存して特異的な立体構造をとる性質を利用し、5'末端を標識したプライマーを用いて試料DNAをPCRにより増幅したのち加熱変性して一本鎖にして、中性のポリアクリルアミドゲル電気泳動にかけてバンドの位置の移動を検出する。

## 2.3 スニップタイピング技術(SNP typing technology)

個人差SNP(スニップ)を系統的に決定して分類解析するSNPタイピング(SNP typing)の研究が大きなブーム

解析法の略称	野生型	変異型 (△は変異点)	変異検出の原理
ASA			変異DNAはPCRによる増幅を受けない
ASO			オリゴヌクレオチドは変異点近傍には結合できない
CCM			変異によるヘテロ二重鎖部分はDNaseにより分解される
DGGE			変異においてヘテロ二重鎖は変性勾配ゲルにおいて野生型とは異なった電気泳動度を示す
HET			変異によるヘテロ二重鎖は野生型より遅く電気泳動される
LCR			変異した塩基配列をもつものはDNAリガーゼによって接続されないためLCR法によって増幅されない
PEX			変異点の塩基配列をPCRにより直接決定。ミニシーケンスとも呼ぶ
SSCP			PCRで増幅した部分の点変異によって変化した一本鎖DNAの立体構造をゲル電気泳動度の差異によって検出する

図2 DNA診断に用いることのできる多彩なDNA変異部位の解析法。

となっている<sup>3)</sup>。従来「体質」という言葉で漠然と表現されていたものが1塩基の違いのレベルで語られるようになる日は近く、SNP情報を元にした医療の個別化 (personalized medicine) が進むと考えられる。酒に強い人と酒に弱い人、あるいはまったく酒を受け付けられない人がいるように薬の効き方も違うという発想のもとに、SNPで分類した体質に合わせて薬の量や質を最善の条件に設定したテーラーメイド医療は、患者により薬の効き方が異なるという問題を解決するかもしれない。その解析のために以下のような技術が開発されている<sup>1-3)</sup>。

タクマン法 (TakMan PCR) でタクマンプローブを試料DNAにハイブリダイズさせ、その上流に設定したプライマーから Taq DNA ポリメラーゼで相補鎖を生合成させる (図3(a))。タクマンプローブは、5'末端を蛍光物質で、3'末端を消光物質 (quencher) で標識した約20塩基からなる対立遺伝子 (アレル) 特異的なオリゴヌクレオチド (SOA) の愛称で、その3'末端はPCRのプライマーとしては働かないように前もってリン酸化してある。反応が進む

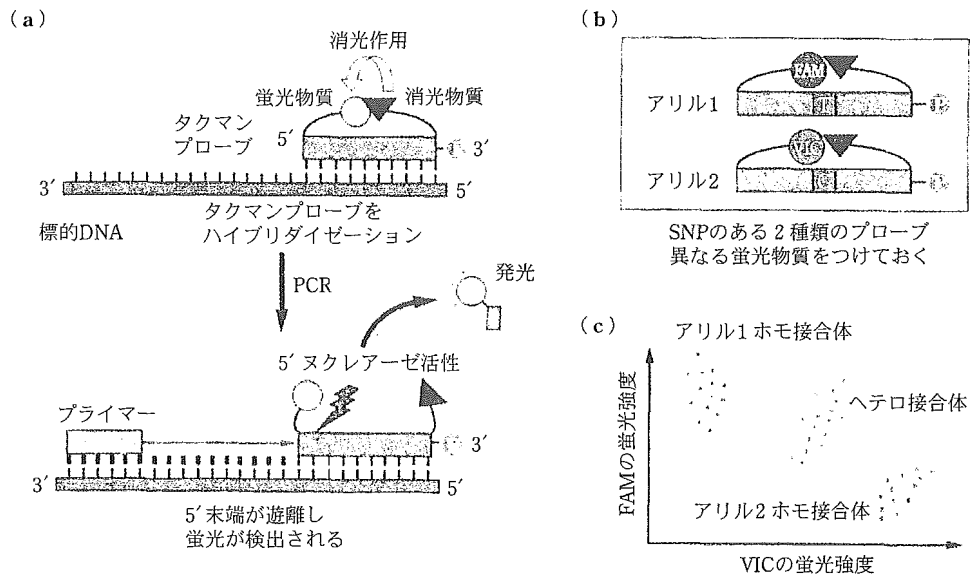


図3 タクマン法による SNP タイピングの原理。

とタクマンプローブに突き当たった時点で Taq DNA ポリメラーゼの5'ヌクレアーゼ活性により標識した蛍光物質が切り取られ、消光物質の影響を受けなくなった蛍光が光りだす。PCRにより鋳型が増幅されるにつれ、この蛍光強度は指数関数的に増強する。SNPを持つ2人のアレル特異的なタクマンプローブを個別な蛍光物質 (図3(b)ではFAMとVIC)で標識してPCRすれば、SNPタイピングができる。すなわち、試料がアレル1のホモ接合体ならFAMのみの蛍光が、アレル1とアレル2のヘテロ接合体なら

FAMとVIC両方の蛍光が、アレル2のホモ接合体ならVICのみの蛍光が観察されることで分類できる (図3(c))。

侵入法 (invader method) では、PCRのプライマーとしてアレルプローブ、侵入プローブ、FRETプローブ (Fluorescence Resonance Energy Transfer) プローブの三つのオリゴヌクレオチドを用いる (図4)。アレルプローブの3'側にはSNP部位近くの鋳型に相補的だが、5'側には無関係な配列 (フラップ: flap) がハイブリダイズしないで遊んでいる。侵入プローブは隣接して設計してあり、アレルプローブと一緒にすると、SNP部位を境にして侵入するような形で試料DNAにハイブリダイズする。SNP部位にA、G、C、T個別の塩基をもつ4種類の侵入プローブを準備する。FRETプロ

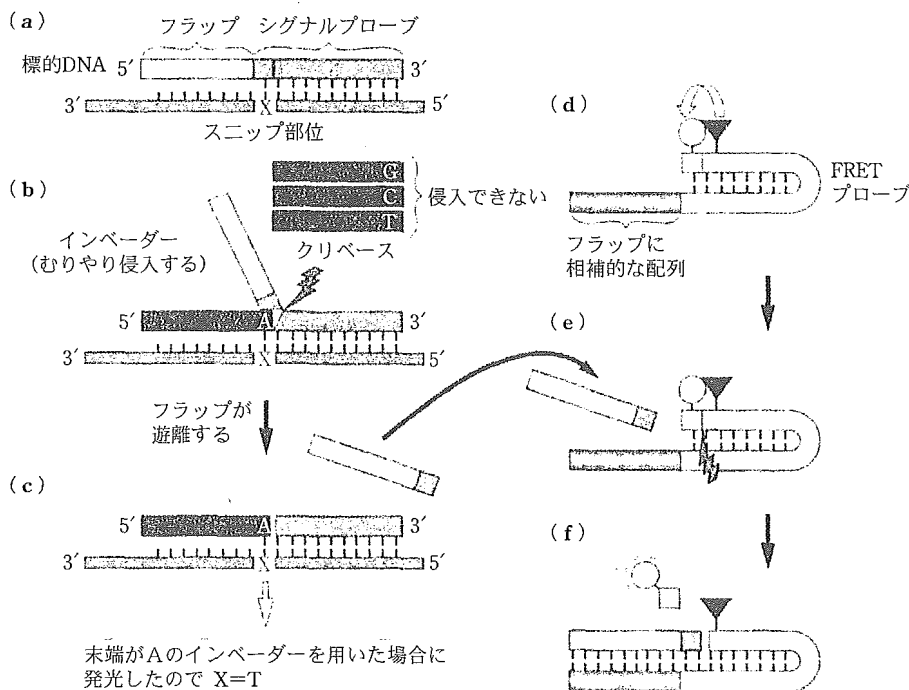


図4 侵入法による SNP タイピングの原理。

ブは普遍的に使えるプローブで、5'側はヘアピンを構成し、そこに蛍光物質で標識してあるが、かたわらに消光物質も標識してあるのでこのままでは蛍光は発しない。3'側はアシルプローブのフラップと相補的な配列をもつ。実際には、まずアシルプローブと侵入プローブのハイブリッドのうち、特殊な立体構造をもってしまう SNP 部位 (図4では A・T) を認識するヌクレアーゼによって、フラップ部位でアシルプローブが切断される。遊離したフラップは FRET プローブとハイ

ブリダイズするが、この時 SNP 塩基 (T) が侵入して立体構造が変化し、ヌクレアーゼによって蛍光色素が切り出されて発光する。もし、アシルとマッチしなければ (図4では A・C)、フラップは切断されないため蛍光は発せられない。遊離のアシルプローブはフラップ領域で FRET プローブとハイブリダイズしても蛍光が遊離してしまうが、この反応効率は無視できるほど低くなるように設計してある。

RNA を増幅できる RCA を用いた SNP タイピング技術もある。例えば T と G の SNP を区別したい場合、SNP 部位だけ塩基が異なる二つの南京錠型プローブ (padlock probe) を準備する (図5(a))。もし試料 DNA が T アリルのホモ接合体の場合には、ハイブリダイズさせて DNA リガーゼを作用させると、マッチする場合だけ環状になって RCA 反応が進み増幅されるため、T アリルのホモ接合体であると判断できる。アシル別にプローブを準備し、異なる蛍光色素で標識した別個のプライマー (P1, P2) を用いれば、1本のチューブ内で反応させてもアリルの識別はつく (図5(b))。この方法は一定温度で実行できるので自動化しやすい。

### 3. RNA 診断

DNA 塩基配列の違いではなく、遺伝子の働き具合を mRNA の転写レベルで包括的に調べる診断法を RNA 診断と呼ぶ。DNA 診断が「不変」の遺伝情報を調べる「静的な検査」であるのに比べて、時々刻々と「変化」する遺伝子発現の動態を調べる RNA 診断は「動的な検査」である。その解析法には選抜アレイとリアルタイム PCR の2種類がある。

#### 3.1 遺伝子選抜の方法

可変スプライシングまでも含めると、数万以上転写され

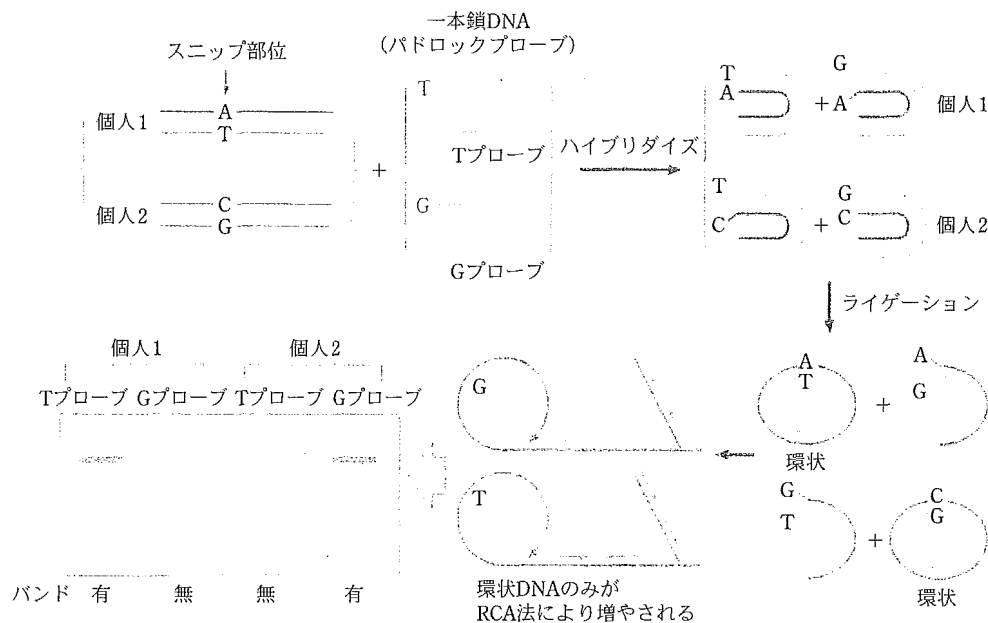


図5 RCA法によるSNPタイピングの原理。

ているヒトゲノムのすべての遺伝子の転写量を計測して解析する試みはトランスクリプトームと呼ばれている。実際、アフィメトリクス社やアジラント社から、44k (44,000) もの cDNA が搭載された DNA チップが 10 万円程度の価格で売り出されるようになってから、ずいぶん身近になってきた。しかし、ヒトゲノムのすべての遺伝子の転写動態を追跡変化して RNA 診断となすことは、解析すべき遺伝子の数が多すぎて意味をなさない。RNA 診断を実用化するには、遺伝子の数を 100~500 個程度に絞り込まなければならない。問題は「何を基準に絞り込むか」である。既知の機能を示す遺伝子群を基準として、ゲノムの中から塩基配列の相同性を元を選び出すという試みはあるが、それではあまりに恣意的で得られるデータに深みがない。よりよい (ベターな) 試みの一つに、検査をしたい細胞で特異的に発現している遺伝子を絞り込んで選抜する方法がある。では、どうやって確実に漏れなく合理的に絞り込むことができるか？

筆者らは段階的サブトラクション法 (stepwise subtraction) という独自の技術を開発して、この問題を克服した<sup>4)</sup>。このサブトラクションを段階的に繰り返すという技術によると、例えば X と Y なる二つの細胞 (あるいは細胞群) において転写誘導 (あるいは転写抑制) されている cDNA 群がすべて漏れなく単離できる。その概略は以下のようである。まず X から mRNA を精製し、高品質 (cDNA 挿入が一方向、平均鎖長は 1.2 kb 以上、独立クローニング数百万 cfu 以上、空ベクターは最小限) な cDNA ライブラリーを作製、マイナス鎖のみとなるように単鎖化しておく。一方、Y から mRNA (プラス鎖) を精製しフォトビオチンの光照射 (あるいは熱処理) によりビオチン標識する。この二つをハイブリダイズさせると、同一な cDNA/mRNA は二

重鎖を形成するため、その後のストレプトアビジンによる結合捕獲と遠心によって除ける。ここに X にのみ存在する mRNA 由来の cDNA は単鎖のまま残る (図 6)。この過程を 2 回繰り返して第 1 次差分 cDNA ライブラリーとする。ここから例えば、200 個の cDNA クローンランダムに選び出して番号をつけ、20 個ずつ (まず No.1~20) ノーザンプロット解析して発現量を検査し、X にしかバンドが検出されなければ「当たり」のクローンとして収穫曲線にプロットする。次いで No.21~40 までノーザンプロット解析して収穫曲線にプロットする。この作業を繰り返してゆくと、No.200 に近づくにつれて徐々に重複クローンが増えてくるため、新規な「当たり」のクローンは取れなくなって曲線は寝てくる (図 7(a))。そこで No.200 でいったん作業を止め、これまでに検査した 200 個の cDNA クローンを 1 本のチューブにまとめ、T7RNA ポリメラーゼを使って mRNA に変換する。この mRNA を同様にビオチン化し、元の単鎖 cDNA ライブラリーとハイブリダイズさせて、解析済みの 200 個の cDNA クローンを除去し、これを第 2 次差分 cDNA ライブラリーとする。ここからまた新たな収穫作業を始める。すなわち、160 個の cDNA クローンランダムに選び出して番号をつけ、20 個ずつ (まず No.1~20) ノーザンプロット解析して発現量を検査し、X にしかバンドが検出されなければ「当たり」のクローンとして収穫曲線にプロットする (図 7(b))。同様な作業を延々と繰り返してゆけば、最後には元の cDNA ライブラリーに存在していた cDNA をすべて漏れなく最後までノーザンプロット解析することができるはずである (図 7(c))。そして、最後の段階の高次 cDNA ライブラリーにはもう同じ cDNA しか残っていない、つまり段階的サブトラクションは終了して、当初目指した発現誘導されている cDNA がすべて入手されたことになる。

この技術をいくつかの実験系に適用した結果、いずれにおいても転写量で 100 倍以上の差がある cDNA が 100~500 個程度単離できた<sup>5)</sup>。絞り込みの目的にかなうほどよい数である。そこで、この技術を用いて RNA 血液診断システムの構築を行うことにした。その目的を達成するため、数名の健常人から血液を採取し、赤血球を除く全血液細胞を集め、そこから採取した mRNA を用いて cDNA ライブラリーを作製した。ついで、ヒト繊維芽細胞由来の mRNA を用いてどこにでも発現されている (house keeping) 遺伝子を差し引くべくサブトラクションを段階的に 4 回ほど繰り返して、血液細胞には発現されているが繊維芽細胞にはまったく発現されていない遺伝子 (PREB: predominantly expressed in blood cells) を 305 種類単離できた。これら PREB cDNA マイクロアレイ上に貼り付けて選抜

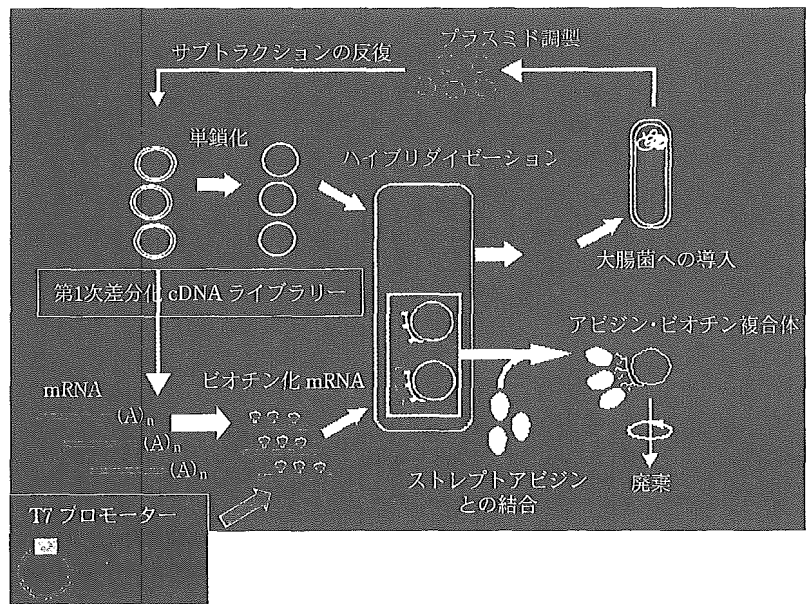


図 6 ビオチン・アビジンの結合により差分化を行う過程の概略。2 次差分以降は、すでに解析済みの cDNA を 1 本のチューブにまとめ、T7RNA ポリメラーゼによって mRNA を合成する。

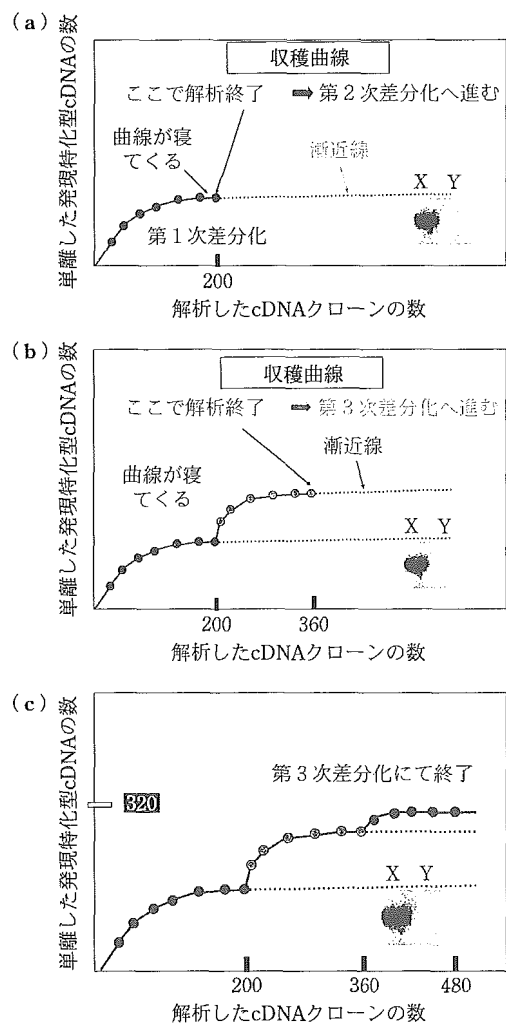


図 7 段階的サブトラクション法の原理。(a)1 次差分から 2 次差分へ、(b)2 次差分から 3 次差分へ、(c)3 次差分にて終了。

アレイ (PREB-DNA チップ) を作製し、誰でも自在に用いることができるようにタカラバイオ(株)からの販売を開始した。

### 3.2 血液診断法の比較

PREB-DNA チップは新しいタイプの血液検査のツールとして有用である。現行の血液検査は、DNA⇒RNA⇒たんぱく質という遺伝情報の流れの中で最後にくるたんぱく質(酵素)、あるいはそれが触媒して生ずる産物の量を計測する。例えば肝臓の解毒、抱合、排泄機能などの作用をしている  $\gamma$ -グルタミールトランスペプチダーゼ ( $\gamma$ -GTP [ $\gamma$ -glutamyl transpeptidase]) は、肝・胆道系の異常の推測に有用である。CRP (C-reactive protein) の量は体内のどこかで起きた炎症に敏感に反応する。これら検査値は病気の可能性を疑うために有用ではあるが、どの遺伝子やたんぱく質が病気の原因であるかという本質にまで迫ることはできない。あくまで皮相的な結果を検査しているだけである。

一方、DNA 診断は遺伝情報の流れの中で最初にくる DNA の塩基配列を調べることで、体質などを検査する。検査の対象となる遺伝子は、その機能が既知のものも多いが、機能未知な遺伝子でも検査はできる。その遺伝子を足がかりとして研究を進めれば、その病気の遺伝子レベルでの原因に迫れるかもしれない点で現行の血液診断とは一線を画す。その成果をもって治療薬を開発することは、ゲノム情報を駆使した「ゲノム創薬」の一つとして発展させることもできよう。しかも検査結果は A, G, C, T という 4 種類しかないため、結果をデジタル化しやすく、多数の SNP を同時に測定して解析することで高度な情報を与える血液検査ができる。ただし、その検査結果は一度測定すれば一生その値は変化することはない。それどころか、自分のみならず、子どもや親、親族に至るまで皆同じ値をもつことになる。ここに究極の個人情報であるゲノム情報を得ることの危険性が問題となってくる。この点については後に改めて触れてゆこう。

他方、RNA 診断においては、検査する遺伝子の発現レベルの変動をもって診断データとする。ただし、ヒトにおける数万の遺伝子の発現動態をすべて対象とすると情報が多すぎて実用的ではないので、選択アレイを用いて発現レベルを個々の遺伝子に相当するスポットの強弱パターンで解析する。遺伝子の活動状況を検査する RNA 診断は体調や病状など現況によって変動しうる点で、DNA 診断から得られるゲノム情報とは本質的に異なる。個人でさえ変化するのであれば、おのずと家族や親族では変動の状況が異なるため、万が一情報が遺漏しても大きな問題は生じない。しかも、病気に特徴的な発現変動を示す遺伝子を対象とし

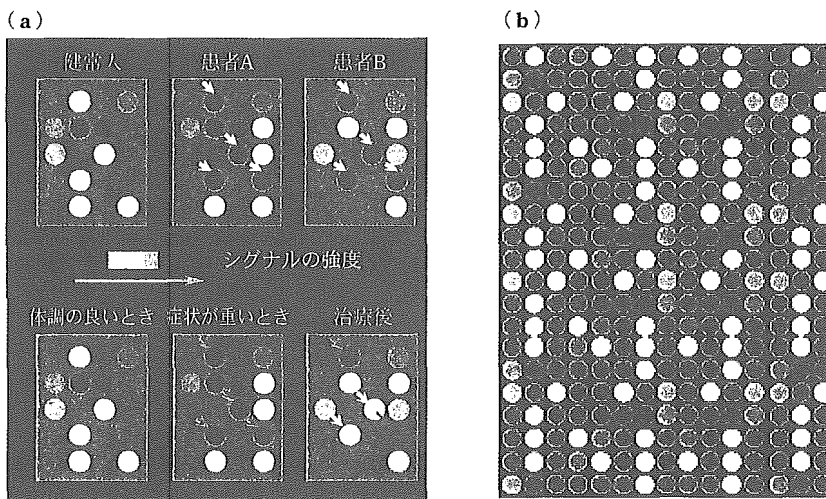


図8 発現強度パターンの解析例。(a)20個のスポットで例示すると、患者AとBで共通に発現亢進、あるいは発現低下しているcDNAが目瞭然にわかる。あるいは同じ患者でも症状が重いつきや治療後では発現パターンが変化すると期待される。(b)PREB-DNAチップでは305遺伝子を貼り付けている(図では300個)ので、パターン解析にはちょうどよいサイズであると考えられる。

て研究を進めれば、当該病気の原因となる遺伝子レベルでの変異を追求でき、そこからゲノム創薬へ展開できる。いわゆる「エビデンスに基づいたゲノム医療」が実行できる。その点でRNA診断はDNA診断と同等の優位性をもつ。言い換えればRNA診断はゲノム倫理問題なくゲノム創薬へ展開できる手法なのである。

### 3.3 選別アレイによるRNA診断の実際

ではPREB-DNAチップを用いて、実際にどのような血液RNA診断が可能なのか概説しよう。まず、患者から血液5ccを採取し、赤血球を除いたあとで全血液細胞から全RNAを精製する。最近ではスピнкаラムなどのキットが販売されているので、初心者でも簡単に高品質のRNAが精製できる。これを蛍光色素(Cy3, Cy5)で標識し(これもキット化されている)、PREB-DNAチップとハイブリダイズさせ、洗浄後専用のスキャナースIGNAL強度を観察する。例えば図8(a)のような結果が期待できる。すなわち、健康人に比べて患者Aと患者Bで特異的に強くハイブリダイズするスポットがいくつか出現すると、これに相当するcDNA(遺伝子)が病気にかかっていると期待できる。個々の305個のPREB cDNAについて、ある病気や症状に対する正常値と異常値の範囲をあらかじめ測定してデータを蓄積しておけば、どの遺伝子が異常値を示すかパターンとして一目瞭然にわかる。PREB-DNAチップはデータが十分蓄積するまで主として臨床レベルの研究用としてのみ有用であろうが、診断に使えるほど十分な量のスポット強度パターンのデータが蓄積してくれば、RNA診断として実用化できよう。さらに、特定のスポットの変化に注目すれば、それをゲノム創薬の標的にしたり、治療効果のモニター用マーカーとしても使える。図8(a)では理解しやすいように20個のスポットで例示してあるが、300個のスポットでさえ、図8(b)程度の複雑さであるから強

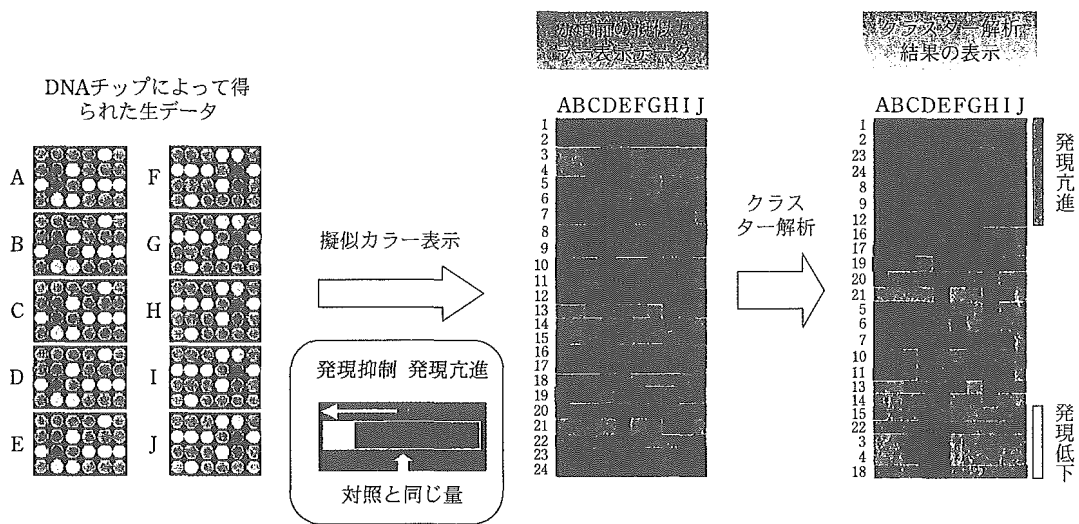


図9 クラスタ解析の原理. 例えば, A~Jまでの10個のサンプルについて, 24個の遺伝子の発現量をDNAチップによってトランスクリプトーム解析する場合, 生のデータから得られた発現量を緑~赤の擬似カラー表示する. これを基にしてコンピューターにより分布の類似したものを一群として表示することをクラスタ解析と呼ぶ.

度パターンとしての診断が可能である. これがヒトの前遺伝子を対象として数万個のスポットを検索すると, 解析不可能となり意味を成さないだろう.

患者の数が増えてきてパターンの変動が複雑になると, スポットを眺めているだけでは詳細な解析はできなくなる. そこで, 基本的にはクラスタ解析という手法を用いてスポットの強度をグループ化して解析する. 図9ではA~Jという10人の患者について20個の遺伝子について得られたスポット強度データをもとにして, クラスタ解析した結果を示してある. 7個の遺伝子がすべての患者で発

現亢進しており, 5個の遺伝子がすべての患者で発現低下していることが一目でわかる. これを臨床のレベルをもってゆくと, 例えば図10に示すように, 健常人の結果と比べながら, 患者特異的に過剰発現している遺伝子群が示すパターンや治癒した状態のモニター, あるいは効果がないだけでなく副作用が生じているパターンなどが検出できるであろう. 305個の遺伝子について数千人オーダーのデータが蓄積したときに, どのような解析ソフトが考えられるかについては, まだ何も動いていない. 読者の中で共同研究をしていただける方がおられると幸いである.

### 3.4 個別遺伝子のRNA診断解析

RNA診断は個々の遺伝子についても詳細に進めることができる. この目的には「検出可能な量に達するまでに要する増幅回数の違いを測定することで, もとの試料に存在するmRNAの量を測定する技術」であるリアルタイム (real time) 定量PCR (polymerase chain reaction) が有用である<sup>9)</sup>. 耐熱性DNAポリメラーゼと2本のオリゴヌクレオチドプライマーを用いて目的領域のDNAを特異的に増幅することで, きわめて微量なDNAを高感度に検出できるPCRは応用の幅が広い. 例えば, 逆転写酵素とPCRを組み合わせたRT-PCR (reverse transcription-PCR) によって微量なRNAの検出も可能である. 試料中のmRNAはRT-PCRによって毎回2倍ずつ増幅されるが, 検出器によって検出可能な濃度に達する増幅回数は試料の中にもともと存在するmRNA量に比例する. 試料の量が少なければ, より多くの増幅回数が必要となる. アプライドバイオシステムズ社により開発された(1995年), このシステムはTaqMan<sup>®</sup>プローブ(図3)を利用してPCRの増幅産物量をPCR反応中にリアルタイム

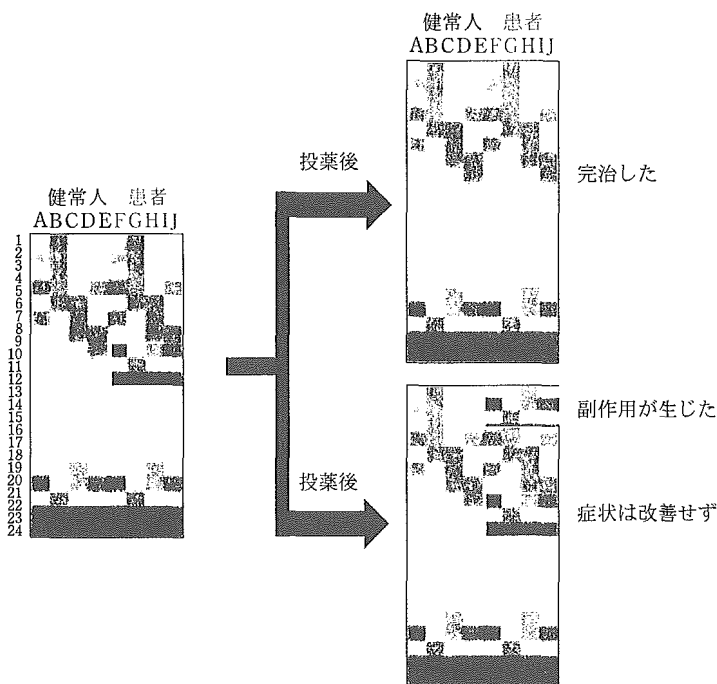


図10 PREB-DNAチップを用いたクラスタ解析によるRNA診断の例.



で検出して定量を行うもので、精密な定量精度と広い測定範囲 ( $10^5$  オーダー以上) が実現されている。この技術を用いて得られる結果は定量性に優れている。例えば、ある自己免疫疾患患者において数十人分の患者血液細胞由来の mRNA から cDNA ライブラリーを作製し、それを健常人の血液細胞由来の mRNA を用いて段階的サブトラクション法を行って、多数クローニングした遺伝子のうちのひとつをリアルタイム定量 PCR にかけたところ、期待どおりこの遺伝子はすべての患者で、発現亢進していたが健常人では発現は低かった(図 12)。このような定量データは再現性がよいため、病気の原因遺伝子の追及をする研究のために有用である。

#### 4. お す び

欧米で提唱されて始まった SNP タイピングの研究は、わが国でも流れに乗り遅れてはならじと政府が巨額の研究資金を投じて研究が進められている。ただし 1000 塩基に一つは存在するといわれる塩基配列上の個人差から、病気の発症や薬の利き方まで診断できる点変異 (SNP) を探し当てるのは「わらの山から針を見つけ出す」より困難な作業であろう。しかし、実際にはこれとは別の「臨床に根ざした基礎研究」という方向から、多くの病気において病因と密接に関連する遺伝子上の点変異が見つかった。これらを対象とする DNA 診断すでに現実に行われており、「ゲノム情報秘匿」や「知らないでいる権利」などのゲノム倫理問題が生じてきた。点変異というゲノム情報が漏れいすることで結婚・就職・保険加入などの差別という問題を超えるべく法律の整備が急がれる。ただし、昨今のマスコミを騒がしているクレジットカード数百万人分の情報漏れなどのニュースを目の当たりにすると、法律があっても無力な気がする。カードの場合には停止して番号を変えれば済むが、ヒトの遺伝情報は変更することはできないし、本人だけでなく子々孫々に至る家族や親族の情報まで漏れ出したことになるので、その影響は計り知れない。さらに治療のない点変異の情報は「知らないでいる」ほうがましである。「あなたは 60 歳を過ぎるとアルツハイマー病にかかる確率が 80% です」という情報を 20 歳の誕生日に知らされることを喜ぶ若者がいるだろうか？ 遺伝情報が漏れれば嫌がらせに、このようなゲノム情報をわざと知らせるいたづらが起こる可能性は大きい。これも法律では対処できない問題であろう。それに比べると RNA 診断により得られる情報は日々刻々と変化するので、このようなゲノム倫理上の問題はほとんど生じない。RNA 診断という、わが国で初めて発想された独創的な診断法を、「独創的な人材を育てるべきだ」と声高に唱え続けているのに、なぜ育てようとししないのか？ 「独創的な発想を育てる環境」を整えなければ、せっかく育った独創的な人材は苦しむばかりである。

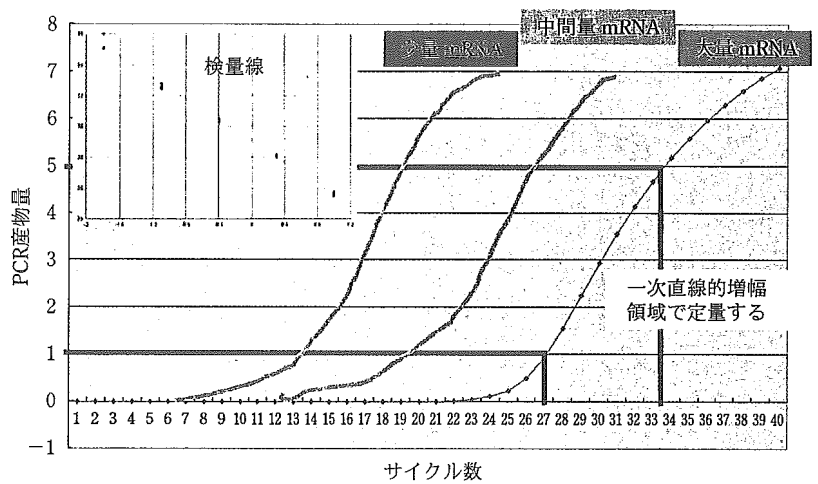


図 11 リアルタイム定量 PCR の原理。

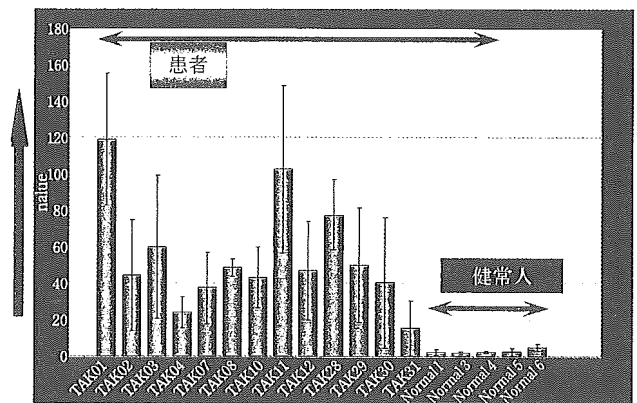


図 12 ある病気の患者血液特異的に発現亢進している遺伝子についてリアルタイム定量 PCR を行い、すべての患者で発現亢進しているが、健常人では誰も発現亢進していないことを示すデータを得た。

#### 文 献

- 1) 野島 博：ゲノム工学の基礎(東京化学同人，2002)。
- 2) 野島 博：医薬分子生物学(南江堂，2004)。
- 3) 中村祐輔(編)：改訂 先端のゲノム医学を知る(羊土社，2002)。
- 4) Fujii *et al.*：EMBO Rep. 3 (4), 367-372 (2002)。
- 5) 野島 博：ポストゲノムの切り札となる段階的サブトラクション法(実験医学 20, 1442-1444, 2002)。
- 6) 永野麻奈美：リアルタイム PCR の原理(講談社サイエンティフィック，2005)。

(2005年7月5日 受理)

#### のじま 野島 博

1951年山口県生まれ。79年東京大学理系大学院卒、理学博士。79～81年米国スタンフォード大学ポストドク(R. Kornberg 教授)。82～87年自治医大薬理学教室助手・講師。88年大阪大学微生物病研究所助教授。95年より同教授。

## V リウマチ医療体制実態調査研究

# リウマチ診療施設事例集

---

平成17年10月

厚生労働科学研究  
RA・骨粗鬆症の重症化防止治療開発研究班

主任研究者 越智 隆弘

分担研究者 龍 順之助

## はじめに

平成17年3月から、厚生科学審議会疾病対策部会の専門委員会としてリウマチ・アレルギー対策委員会が設置され、リウマチおよびアレルギー対策の指針策定に向けての審議が行われました。そして、今後のリウマチ対策の目標としては、特に重症化防止策の推進に重点が置かれることとなりました。そのために、国と地方公共団体、医師会、学会などの関連団体との連携によってリウマチ対策を推進することが必要になります。その検討の中で、地域におけるリウマチ診療レベルに不均衡があるという指摘があり、その是正のために、現状認識が必要となりました。そこで、大学病院からクリニックまで、諸地域において指導的立場でリウマチ診療に従事している代表的な施設の御協力を頂いて、リウマチ診療施設において努力して頂いている現状および問題点に関する事例集を作成しました。この事例集が、関連組織の相互協力による適切な地域医療確保のための一助となり、今後のリウマチ重症化防止策が推進されることを祈念致しております。

平成17年10月

リウマチ対策検討会委員長 越 智 隆 弘

# 目 次

北見赤十字病院におけるリウマチ病診療	種市 幸二	1
北海道整形外科記念病院におけるリウマチ病診療	三浪三千男	4
筑波大学附属病院におけるリウマチ病診療	伊藤 聡／住田 孝之	6
高崎市 井上病院におけるリウマチ病診療	櫻井 武男	8
東京都葛飾区 安倍内科医院におけるリウマチ病診療	安倍 千之	9
東京都墨田区 医療法人内田クリニックにおけるリウマチ病診療	内田 詔爾	10
東邦大学医療センター大学病院リウマチ膠原病センターに おけるリウマチ病診療	川合 眞一	11
東京大学医学部附属病院アレルギーリウマチ内科に おけるリウマチ病診療	沢田 哲治／山本 一彦	12
帝京大学医学部附属病院整形外科におけるリウマチ病診療	西村 慶太	14
帝京大学医学部附属病院内科におけるリウマチ病診療	広畑 俊成	17
順天堂大学医学部附属順天堂医院におけるリウマチ病診療 .....	山路 健／金井 美紀／森本 真司	18
日本大学医学部附属板橋病院におけるリウマチ病診療	龍 順之助	20
東京都江東区 蕨内科・リウマチ科医院におけるリウマチ病診療 .....	蕨 治言	22
北里大学病院膠原病リウマチ感染内科に おけるリウマチ病診療	近藤 啓文	24
国立病院機構相模原病院におけるリウマチ病診療	森 俊仁	25
長岡赤十字病院におけるリウマチ病診療	羽生 忠正	26
新潟県立瀬波病院におけるリウマチ病診療	村澤 章	28
国立病院機構大阪南医療センターにおけるリウマチ病診療	佐伯 行彦	31

大阪府堺市 日野病院におけるリウマチ病診療	志水 正敏	32
大阪市 行岡病院におけるリウマチ (RA) 病診療	行岡 正雄	34
(財)甲南病院・加古川病院におけるリウマチ病診療	居村 茂明	45
兵庫医科大学 (リウマチ・膠原病科) におけるリウマチ病診療	佐野 統	47
東広島記念病院リウマチ膠原病センターにおけるリウマチ病診療	山名 征三	48
(医)美摩病院 吉野川リウマチセンターにおけるリウマチ病診療	四宮 文男	50
道後温泉病院におけるリウマチ病診療	高杉 潔	52
松山赤十字病院リウマチセンターにおけるリウマチ病診療	仲田 三平	56
福岡市 近藤リウマチ・整形外科クリニックにおけるリウマチ病診療	近藤 正一	58
産業医科大学病院におけるリウマチ病診療	田中 良哉	60
熊本市 石川整形外科リウマチ科におけるリウマチ病診療	石川浩一郎	64
独立行政法人国立病院機構 別府医療センターにおけるリウマチ診療	安田 正之	67
鹿児島赤十字病院におけるリウマチ病診療	松田 剛正	68

## 北見赤十字病院におけるリウマチ病診療

種 市 幸 二

### I. 当院でのリウマチ病診療状況

当院は695病床の急性期病院であります（在院日数15日）。その中で内科は97病床でリウマチ膠原病、呼吸器、代謝、腎、血液を担当し、混合病棟となっており、リウマチ科として独立していません。リウマチ専門医は3名です。入院はリウマチ膠原病患者20-25名、リウマチ膠原病は診断や治療が困難な場合も多く、在院日数が長期化し、急性期病院では診療がやりづらいのも事実です。在院日数短縮のためシェーグレン症候群のパス入院や大量ステロイド治療の患者はプレドニン30mg/日で早期退院としています。また、人工関節などの手術症例は当病院整形外科が行いますが、リハビリは急性期のみ実施し、2-3週間後のリハビリは他の回復リハビリ施設へ転院の上行っています。今後、DPC導入時にはリウマチ膠原病は外来診療が中心にならざるを得ないと考えています。リウマチ膠原病外来は約2000名（60%は関節リウマチ）の患者を2名のリウマチ専門医により診療しています。1医師30分に4名の患者を予約枠で診察していますが、その中に新患や重症者が混在しますので予約診療時間が1時間くらい遅れることもしばしばあるのが現状であります。他疾患に比べ1名にかかる診察時間が長くなるため診察終了が午後3時過ぎまでかかります。診察時間の短縮のためACRのコアセットに関することは看護師が行い、医師は疼痛関節のみ診察すれば良い流れになっています。

### II. 当院リウマチ診療における診療連携の状況

当院は平成17年4月28日に4医師会の協力のもと北海道より地域医療支援病院の承認を受けました。これまでの当院の地域医療連携の取り組みは平成10年9月地域医療支援室開設、平成13年1月地域医療連携室の強化（併任室長、次長、専任の事務員2名）、同年4月地域医療連携委員会の設立、診療情報書の返書・返却規則の整備、平成14年10月登録医システムの構築、診療所・病院へ連携への理解を求めての訪問、同年12月医療機関向けの「ほっと連携」発刊、平成15年7月地元の医師会と当院の地域医療連携委員会のメンバーが中心となり、オホーツク医療連携を考える会が発足し、年2回開催され、疾病別連携として慢性肝炎、糖尿病、癌の連携、病院間の連携パスとして整形外科的疾患、高齢者、身障者などの24時間体制などが地域全体として進められています。一方、リウマチ性疾患の連携に関しては現在のところは一方通行で当リウマチ外来へ紹介される場合がほとんどの状況です。当院リウマチ膠原病外来は昭和61年開設であまりにも地域住民や地元の医師に信頼されていることも一因であると思っています。オホーツクリウマチ研究会（10回）、オホーツク臨床免疫フォーラム（8回）が開催され、顔の見える医療を心がけていますが、現実にはリウマチ医療連

携の進捗ははかばかしくありません。病院間の連携パスとしての整形外科的疾患の中でTKA,THA後に他施設の回復リハビリへ転院が唯一の医療連携実行例であります。今後はリウマチ専門医、リウマチ登録医を中心として当院の医療連携に基づいて実行するつもりでいます。

### Ⅲ. 当院リウマチ診療の問題点と改善対策

リウマチ患者の数の多さとリウマチ専門医が少ないことが最大の問題点です。また、患者の信頼を受けていることは喜ばしいことですが、リウマチ患者が当院から他医療機関へ転院を希望しなかったり、当院での継続治療を希望する場合がほとんどであります。当院に限りませんが、合併症が多い場合があり、1人あたりの診察時間が長い、入院期間も長くなる場合が多く、急性期病院はもちろんのこと診療所にとっても経営的に不利であります。こうした逆境の中で即効性の改善策は見当たりませんが、最初は地域のリウマチ専門医とリウマチ登録医の中で医療連携を推進し、さまざまな勉強会や研究会などでリウマチ診療プレーヤーを増やし、統一したガイドラインでリウマチ患者を診察するシステムの構築が地味ですが重要と思います。当院が治験や先端の医療、合併症例を受け持ち、安定したリウマチ患者をリウマチ医療連携のプレーヤーの地元の医師会の先生に診てもらい、治療変更時や半年に1度くらいのリウマチの評価に当院を受診していただくのが患者・医師ともに妥協できるのではないかと考えています。すでに、当院は地元の医師会、地域住民に信頼される病院でありますので、それに基づいて一步一步難問を取り除いてリウマチ医療連携を推進できると考えています。

リウマチ医療は少なくともリウマチ教育施設においては同じレベルの診療がその地域の患者に行われなければなりません。診療のレベルを維持・向上するには経営的基盤が必要です。しかしながら、先に述べましたが現在の診療においてはリウマチ診療は経営的にはきわめて不利の状況です。また、リウマチ性疾患はQOLやADLの低下をもたらす代表的疾患です。リウマチ性疾患の克服には先進的な医療を行い、早期に疾患活動性を抑え、合併症対策のできる病院と安定したリウマチ患者を診療する診療所と機能分類することがリウマチ医・患者の幸福を導き出します。これを実現するには、リウマチ医療連携を進めるにあたっては診療報酬におけるインセンティブが必要です。

### Ⅳ. 当院におけるリウマチ患者長期経過観察対策

現時点ではリウマチ資料として診療録とは別に個々の患者ごとに作成しています。初診時の詳細なデータ。経過表にはACRのコアセット、ステージ、クラス、薬物療法の有効性、副作用、エスケープ、合併症、RF定量、CBC、肝機能・腎機能、骨密



度、尿中NTX、BAP、胸部X-Pの所見、KL-6、MMP3、手術が記載されています。また、骨関節X-Pは別経年変化をスケッチしています。この作業を外来診察中にするにはかなりの労力が必要ですが、治療方針の変更、患者とのコミュニケーションに必須であることより継続しています。平成18年に電子カルテが導入になるのでこれらのデータをコンピュータ上で運用する予定です。特に、関節図をクリックするだけで、ACR20,50,70、DAS28を自動的に計算するようにします。また、関節X-Pに関してもシャープスコアを自動化できないか交渉中であります。また、過去の資料はすべてスキャナでスーパーシートに取り込みいつでも取り出せるシステムになっています。

## I. 当院でのリウマチ病の診療状況

当院では、7～8年前よりリウマチ外来を併設し、2名の専門医による外来診療にあたっている。現在、500～600名のリウマチ患者が通院しており、リウマチ活動性のコントロール不十分な患者の入院治療及びリウマチ疾患に対する手術のため入院治療している患者は常に30名はおり（ベッド数225であるのでその約13%を占める）外来は予約は採用しておらず、随時診療を受け付けることになっている。リウマチ患者の新患数は、月に10～15名であり、そのうち他医からの紹介は約半数を占める。

新患には、リウマチ治療体系を、2004年、日本リウマチ財団から発表された内容を必ず説明して、最終的には生物学的製剤の使用に至ることを説明している。又、血液検査は月1回行うこと、緩解期を迎えたら2～3ヶ月に1回になること、さらに胸部レ線は6ヶ月に1回撮影し、呼吸器内科の専門医にチェックしてもらうこともあわせて説明している。

一方、リウマチ疾患の手術は年間500～800例前後を越え（当院の年間手術例数は2900～3000例である）全体の6～15%前後を占める。

当院は、上肢、下肢、脊椎と各専門医がそれぞれ4～5名で構成され、リウマチ外来で頸椎手術を要する患者が見つければ、脊椎の専門医に手術を依頼し、TKAの適応例は下肢の専門医に依頼する形としている。

さらに、生物学的製剤を含む新しい抗リウマチ剤の投与を開始する際には、我々リウマチ医、薬局、外来、病室の看護師らが製薬会社の学術課の人達から研修を受け、投与方法、合併症、副作用など、その対応を十分に理解することを第一として投与開始している。

先にも述べたが、2人の呼吸器内科専門医とも密に連絡を取り、胸部疾患の発生にも十分な処置をとっており、その実績は明らかに証明されている。

## II. 当院リウマチ診療における診療連携の状況

現在、病診連携を行っている医療機関は約40に達し、これらの診療科は、ほぼ全科を網らしている。さらに、約10の整骨院とも連携している。これらの連携先の中で特に強い関係にあるのは山の上病院リウマチ膠原病センターである。当院のリウマチ専門医を一人、週1回外来に派遣し、リウマチ患者の診療に当たらせてもらい、とくに手術適応患者を見つけることを主な仕事とし、主治医との相談の上で、当院での手術を行い、術後は、リハビリを含めたリウマチ治療を再び山の上病院に依頼する形をとっており、逆に当院でのリウマチ治療が不十分な患者の治療を山の上病院に依頼している。

このように、両者の関係は、きわめて円滑であり、リウマチ患者にとっても大きなメリットとなっている、と確信している。

### Ⅲ. 当院リウマチ治療の問題点と改善対策

先にも述べたように、当院は2名のリウマチ専門医が治療に当たっているが、現在の患者数の増加傾向に対応するためには、もう1名専門医を増やしたいと考えており、若い医師の教育が急務である。

当院では、約95パーセントの手術症例をパスを用いて行っているが、リウマチの手術症例がこのレールに乗らないことが、しばしばあり、これも検討事項である。

一方、新しく開発された抗リウマチ薬はいずれもコストが高く、患者に経済的な負担を多くしており、そのために投与を必要とする患者がその治療を受けられず、断念しなければならないことを目の前で何例か経験することがある。今できる、あらゆる手段をとるよう努力はしているが、これも医師の力を越えており、ケースワーカーなどの専門職を採用して患者との相談に対応できることが必要かと考えているところである。

### Ⅳ. 当院におけるリウマチ患者長期経過観察対策

当院は整形外科の部位別の専門医17名で構成されていることは先にも記したが、手術症例は術者が、入院、手術、術後の処置に関してそれぞれ独立したフォローアップ体制を持っている。従って、2名のリウマチ専門医は全て（手術症例に限るが）の症例の経過を見ることはない。即ち、ある一定期間、手術症例はリウマチ専門医の手を離れることになる。しかし、学会、研究会などの発表や、雑誌への投稿時は即座に患者のデータを見ることができる。しかしながら、これらのデータ逸失を防ぐこと、統一した管理システムをしっかりと作りあげることの重要性は痛感しており、これから取り組むべき最重要課題との認識を持っている。

### I. 当院でのリウマチ病診療状況

薬物療法は主に膠原病リウマチアレルギー内科が行い、整形外科は主に手術療法を行っている。近年導入された生物学的製剤もすべて内科が使用している。内科はいわゆる伝統校のナンバー内科の一部としてではなく、臓器別システムでの膠原病・リウマチ専門グループとして診療を行っている。したがって呼吸器グループや腎臓グループ、血液グループなどとは並列の関係にあり、独立したポジションを持っている。生物学的製剤は、点滴中のバイタルサインのチェックや頻回の皮下注射など、マンパワーを要し、しかも包括化医療の導入により外来での対応が求められている。膠原病リウマチアレルギー内科は独立しているため、生物学的製剤専門外来を立ち上げるなど、柔軟な対応が可能であった。整形外科にはリウマチ専門のグループはなく、手術をする関節の部位により、膝グループや股関節グループなどの医師が主治医となる。以上のようなシステムは、内科系リウマチ医と整形外科系リウマチ医が存在するヨーロッパ式のシステムとは異なり、よりアメリカ式に近いと考えられるかもしれない。昨年からはリウマチケア研究会を立ち上げ、内科と整形外科の連携に加え、リハビリテーション部門もこれまで以上に積極的にリウマチ診療に関与することになった。また、コメディカルにもリウマチ診療におけるチーム診療の重要性を認識してもらうことになった。膠原病リウマチアレルギー内科と整形外科は同じフロアにあり、連携しやすいシステムになっている。

### II. 当院リウマチ診療における診療連携の状況

スタッフが地域の医師会講演会で講演を行い、積極的に診療連携を呼びかけている。せっかくの紹介患者が初診時に長時間待たされてしまうという問題があったため、FAXとEメールによる紹介システムを立ち上げ、新患枠に余裕のある日に受診してもらうようにしている。また、紹介患者は、問題点、紹介先などを記録するようにし、その後の診療内容を紹介元に返信したか、当院で診療を続けることになったのか紹介元にお返ししたのかなどの転帰を明らかにし、“大学病院に紹介したが、その後の経緯がわからない”という紹介医の不満を解消するように努力している。また、昨年には大学附属病院から車で約10分ほどの場所にサテライトクリニックを設立し、安定している患者はなるべくサテライトクリニックを活用するようにし、附属病院では問題点の多い患者や初診患者に時間をさけるように努力している。サテライトクリニックの患者に問題が生じたときは、大学附属病院に迅速に入院してもらい治療をしている。