

DNA 診断技術の確立

荻 田 善 一

(富山医科薬科大学和漢薬研究所)

遺伝子工学における組換え DNA 実験技術の確立によって、ヒトの特定遺伝子の大量生産が可能となった。また、DNA 分子の塩基配列決定法が確立されることによって遺伝子構造の欠陥を解明することができるようになった。その結果、種々の異常血色素症や成長ホルモンの欠損症などの病因が DNA レベルで論じられるようになったのである。

最近になって、遺伝子発現の産物である酵素蛋白質の量的質的变化に基づいてなされてきた遺伝性疾患の診断法が、遺伝性疾患をもたらす遺伝子の構造異常すなわち DNA 分子の塩基配列の異常にもとづいて診断しようとする方向に発展しつつある。

本研究の目的は、先天異常をもたらす染色体異常ならびに代謝異常症より得た培養リンパ球細胞を試料とし、セルソーターによって簡便に異常染色体を識別するための flow karyotype

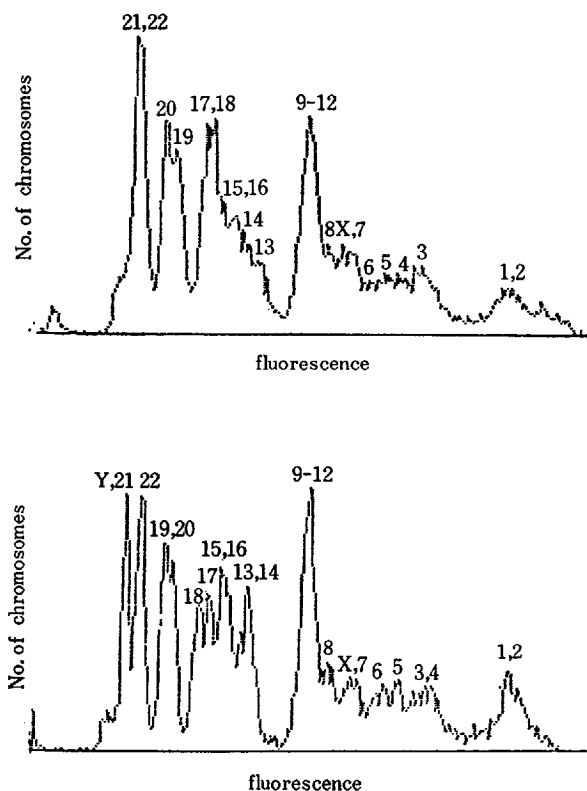


図1 健常者末梢リンパ球から得た flow karyotype

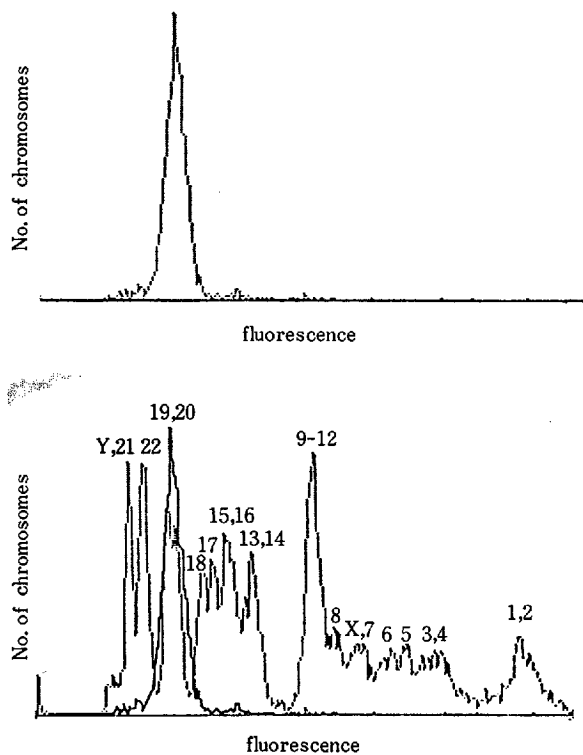


図2 分取染色体の純度と再現性

決定法を完成するとともに、代謝異常遺伝子が帰属する染色体を分取し、それからゲノム DNA 分画を同定し、DNA レベルの情報を得るとともに DNA 診断技術の確立を目的としている。

(1) Flow karyotype 分析法の確立

Coulter Epics V型セルソーターを用いてヒト培養リンパ球より染色体を分画することを試みた。

ヒト染色体の分画は、すでに Young ら (1981)¹⁾ によって報告された方法に準じて行った。ヒト末梢血から Ficoll conray 法により得たリンパ球を10% FCS, 25 mM HEPES, 5 μ l/ml PHA-P を含む RPMI1640 中で48時間培養した。コルセミド (0.32 μ g/ml) を加え、さらに14~16時間培養し、分裂中期細胞 (M期) を増加させた。この時点でのM期の存在頻度は、約10~15%であった。

培養リンパ球細胞を集め、0.075 M KCl で低張処理を行い、次いでポリアミンを含んだ緩衝液で処理し、最後に0.1%ジギトニン-ポリアミン緩衝液に浮遊させた。この浮遊細胞を26-gage の注射針を通すことにより細胞から染色体を分離した。DNA に親和性をもつ蛍光色素、エチジウムブロマイドで染色体を蛍光染色し、セルソーターによる分取のための試料溶液とした。

蛍光染色された染色体をセルソーターにより515 nm のレーザー波長、出力1.2W で励起し、DNA 含量の差異に従って分画することに成功した²⁾ (図1)。

第21, 第22ならびにY染色体の分画パターンに個人による差異が認められた。この flow karyotype にみられる異質性の存在に遺伝性のあることから, これは染色体の DNA 量の多型現象の存在を示しているものと考えられる。さらに家系調査ならびに DNA 分析を行ない, より詳細に検討したい。

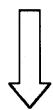
(2) 代謝異常症の DNA 診断法の検討

図2に示したように第19番, 第20番染色体分画を分取し, 再度セルソーターで分画すると, 分取前の第19番, 第20番染色体分画に相当する位置にそのピークが一致した。すなわち, 目的とする特定の染色体をセルソーターでほぼ純粋に分取できることを確かめることができた。このことから, 病的遺伝子の存在する染色体のみを分取し, DNA を抽出し, 病的遺伝子をクローニングし, 塩基配列を解析するというような一連の実験系を確立することが可能となった。

本研究において, 患者の末梢血 1 ml に含まれる白血球細胞から 25~60 μ g の DNA 試料を得ることができるので, 10~20 ml の全血液を用いる代謝異常症の DNA 診断技術を確立したいと考えている。

参 考 文 献

- 1) Sillar, R. and Young, B.D. : J. Histochem. Cytochem., **29** : 74~78, 1981.
- 2) 桃井啓子, 磯部正治, 久村富徳, 丸山由紀子, 荻田善一 : 医学のあゆみ, **128** : T-55~T-58, 1984.



検索用テキスト OCR(光学的文字認識)ソフト使用

論文の一部ですが、認識率の関係で誤字が含まれる場合があります



遺伝子工学における組換え DNA 実験技術の確立によって、ヒトの特定遺伝子の大量生産が可能となった。また、DNA 分子の塩基配列決定法が確立されることによって遺伝子構造の欠陥を解明することができるようになった。その結果、種々の異常血色素症や成長ホルモンの欠損症などの病因が DNA レベルで論じられるようになったのである。

最近になって、遺伝子発現の産物である酵素蛋白質の量的質的变化に基づいてなされてきた遺伝性疾患の診断法が、遺伝性疾患をもたらす遺伝子の構造異常すなわち DNA 分子の塩基配列の異常にもとづいて診断しようとする方向に発展しつつある。

本研究の目的は、先天異常をもたらす染色体異常ならびに代謝異常症より得た培養リンパ球細胞を試料とし、セルソーターによって簡便に異常染色体を識別するための flow karyotype 決定法を完成するとともに、代謝異常遺伝子が帰属する染色体を分取し、それからゲノム DNA 分画を同定し、DNA レベルの情報を得るとともに DNA 診断技術の確立を目的としている。