

RFLP を利用した血友病の保因者診断

福井 弘, 西村拓也, 中 寛之, 吉岡 章

要約：血友病A保因者診断において3種の第Ⅷ因子遺伝子内プローブ/制限酵素による日本人正常集団のヘテロ接合体頻度は18~67%で、遺伝子外プローブ/制限酵素では55%であった。これら2~3種を組合せると、血友病A保因者診断率は約70%であった。血友病Bの場合、第Ⅸ因子遺伝子内RFLPは0で、2種の遺伝子外プローブ/制限酵素を用いた場合30~40%（組合せでは約50%）であった。以上より、血友病保因者診断にRFLP分析は有用であると考えられる。

見出し語：血友病，第Ⅷ因子，第Ⅸ因子，保因者診断，RFLP

1. はじめに

血友病は伴性劣性遺伝病であるが故に、本人はもとよりその血族の結婚、家族計画は種々の困難な問題を伴う。従って、遺伝相談と出生前診断は本症の生活管理と指導上極めて重要である。

遺伝相談/出生前診断の基本要件の一つは保因者診断である。保因者診断は、家系調査、凝血免疫学的因子定量およびDNA分析により行われるが、それぞれに一定の限界がある。

家系調査により診断可能なのは確実保因者のみで、他の血族女性については次の第Ⅷ、第Ⅸ因子定量が行われる。しかし、これも extreme Lyonization のため保因者の約半数の因子量は正常と表現される

ため診断不能である。血友病A保因者の診断率に限れば、第Ⅷ因子/フォン・ウィレブランド因子比の導入によりさらに向上した(80~90%)が、その精度には若干の問題が残されている。DNA診断はその家系特有の異常第Ⅷ(X)因子遺伝子が実際にその女性に遺伝しているか否かを直接分析する方法とRFLPを利用する方法の二とおりがある。前者はごく一部の家系のみで可能であるが、後者は、各個人の第Ⅷ(X)因子遺伝子においてその表現型に変化を及ぼさない多くのmutation（通常イントロン内）の存在を利用するものであり、すでに欧米の血友病保因者診断に応用されている。

奈良県立医科大学小児科 (Dept. of Pediatrics, Nara Medical University)

2. RFLPによる血友病A保因者診断

1)第Ⅷ因子遺伝子：Xq 28 に存在し、186 kb と非常に長い。26個のエキソンは9 kbより構成され、19個のリーダー配列を含む2,351個のアミノ酸をコードしている。

2)材料と方法：末梢白血球より genomic DNA を抽出し、各種制限酵素で切断、アガロース電気泳動後 Southern blot し、各種のプローブと hybridization した。使用したプローブは遺伝子内(①②③)と遺伝子外連鎖プローブ(④)に大別される。

①エキソン17, 18 をカバーし、イントロン18に Bcl I RFLP 部位のある F. Ⅷ/intron 18 (F8A) プローブ (Dr. R. Lawn)

②イントロン22の Xba I 部位を検索する F. Ⅷ/intron22 プローブ (Dr. R. Lawn)

③エキソン26近傍の Bgl I 部位を検索する F. Ⅷ/3' flanking (プローブC) プローブ (Dr. Lewis)

④Xq 28 とハイブリ化するサブクローン化 プローブ, St 14-1. Taq I を用いる (Prof. P. Chambon)。

3)成績1, 日本人のRFLPs 頻度：日本人でのヘテロ接合頻度は表1のごとくであった。2～3種のプローブによるRFLPs解析データと組合せることにより日本人血友病A保因者の診断率は約70%と考えられた。特に、遺伝子内プローブでは recombination の可能性はほとんどないのでその精度は極めて高い。

4)成績2, 保因者診断の実例：図1の血友病A患者の3人の姉の保因者診断を F. Ⅷ/F8A プローブ / Bcl I 多型を利用して行った。母 (I-2) はすでに凝血免疫学的に保因者と診断されていたが、1.2 と

0.9 kb のヘテロ接合。患者 (II-4) の DNA フラグメントは 1.2 kb。3人の姉のうち II-1 および II-2 は 0.9 kb のホモ接合体で非保因者、II-3 は 1.2 と 0.9 kb のヘテロ接合体で、保因者と診断した。

3. RFLPによる血友病B保因者診断

1)第Ⅸ因子遺伝子：Xq27 に存在し、全長約 33.5 kb である。8個のエキソンは 46個の第Ⅸ因子のプロレプロペプチド配列と成熟第Ⅸ因子の 415個のアミノ酸をコードしている。

2)材料と方法：血友病A保因者診断に準じた。用いたプローブは遺伝子内プローブとして cDNA (cⅨ) (Prof. G. G. Brownlee) と遺伝子外プローブとして pX58 dⅢc と pX45h (Prof. B. N. White) であった。

3)成績1, 日本人のRFLPs 頻度：cDNA をプローブとし、制限酵素 Taq I, Xmn I, Dde I, Msp I 処理による RFLPs は正常日本人 50 人では全く多型が出現せず、正常中国人、朝鮮人でも同様であった。これらの結果はすでに欧米白人でのヘテロ接合体率 40% とは大きく異なる成績であった。2種の遺伝子外プローブ (pX58dⅢc / Sst I, pX45h / Taq I) を用いて RFLPs を検索したところ表2のごとく、それぞれ、40%、30% のヘテロ接合体率が得られ、これら2種を組合せると約 50% の頻度で、保因者診断が可能であった。なお、recombination の可能性が残されている点注意を要する。

4)成績2, 保因者診断の実例：図2の患者の母 (I-2) はすでに凝血免疫学的に保因者と診断されていたが、9.0 および 6.0 kb のヘテロ接合。患者 (II-1) の DNA フラグメントは 6.0 kb。従って、ヘテロ接合体の妹 (II-2) は保因者と診断した。

4. まとめ

RFLPsを用いた血友病A, Bの保因者診断の有用性を報告した。従来の家系調査および凝血症免疫学的診断法に対して不利な点と有利な点をまとめると

不利な点：①診断可能条件として、母親がすでに保因者と診断されていることに加えてRFLPs上ヘテロ接合体であること、かつ、家系内患者の多型断片サイズが判明していること、の三点がある。

②プローブ、制限酵素を数多く導入、組合せても診断率には限界がある。③研究室レベルの検査であり、技術的には困難性を残している。④コストが高い。などである。

有利な点：①診断可能な場合はほぼ確実な結果が得られる。②妊娠初期CVSによる出生前診断に利用できる。

参考文献

- 1) Nishino M, et al : Jpn. J. Human Genet., 32 : 237-245, 1987.
- 2) 西村拓也 : 奈医誌. 39 : 531-541, 1988.
- 3) 西村拓也 : 奈医誌. 39 : 585-590, 1988.

表1

プローブ	酵素	Alle 数	ヘテロ接合の頻度(%)
1. F. Ψ /intron 18	Bcl I	2	27-30
2. F. Ψ /intron 22	Xba I	2	67
3. F. Ψ /3' flanking	Bgl I	2	18
4. St 14-1 (DXS 52)	Taq I	10	55
5. DX13 (DX15)	Bgl I	2
6. 1+2			71
7. 1+2+3			71
8. 1+4			70

表2

プローブ	酵素	Alle 数	ヘテロ接合の頻度(%)
1. pX58dIIIc	Sst I	2	40
2. pX45h	Taq I	2	30
3. 1+2			47

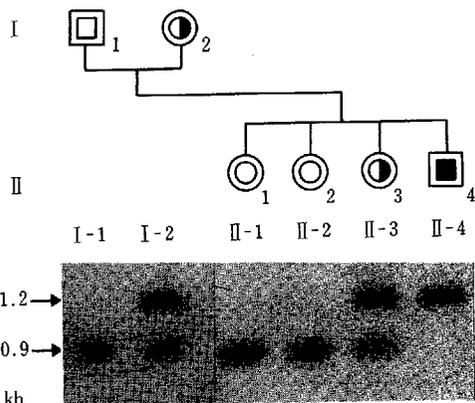


図1

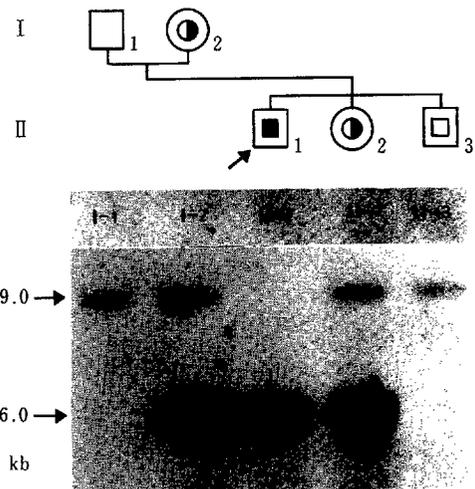


図2



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



要約:血友病 A 保因者診断において 3 種の第 因子遺伝子内プローブ/制限酵素による日本人正常集団のヘテロ接合体頻度は 18~67%で,遺伝子外プローブ/制限酵素では 55%であった.これら 2~3 種を組合せると,血友病 A 保因者診断率は約 70%であった.血友病 B の場合,第 因子遺伝子内 RFLP は 0 で,2 種の遺伝子外プローブ/制限酵素を用いた場合 30~40%(組合せでは約 50%)であった.以上より,血友病保因者診断に RFLP 分析は有用であると考えられる。