

マススクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢および
スクリーニング法に関する研究 (2)

進行性筋ジストロフィー症の遺伝子診断

—PCR法を用いて—

岡田伸太郎*, 乾 幸治*, 福島 久雄**, 塚本 浩子*

要約: 進行性の筋ジストロフィー症 (DMD) の診断は従来、臨床症状、家族歴、高CPK血症、筋生検により行われてきた。最近、DMDの遺伝子 (ジストロフィン遺伝子) が単離され、これを用いたサザンブロット法による診断、遺伝子解析が広く行われている。私達はヘパリン血より抽出したDNAを用い、ジストロフィン遺伝子プライマーを9種作成し、遺伝子増幅法 (PCR) を用いて診断を行ないその有用性を確認した。

見出し語: 進行性筋ジストロフィー症、遺伝子増幅法

研究方法 対象: 臨床症状、家族歴、血清CPK高値、筋生検より筋ジストロフィー症と診断された患者7名よりヘパリン血5mlを採取し、常法によりDNAを得た。又乾燥濾紙血3mmディスクから白血球を遊離させ、50μlのバッファーA (50mMKCl, 10mM Tris-HCl (pH8.3), 2.5mM MgCl₂ 0.1mg/ml gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween20, プロテイナーゼKIU) にて55℃1時間、95℃5分間処理後、DNA抽出液とした。さらに毛根1本も同様に処理し、DNA抽出液として用いた。

プライマーオリゴヌクレオチドの合成: プライ

マーオリゴヌクレオチドの合成には Applied Biosystems 社製のDNA合成装置を利用し、その後メンソルブ (NEN) にて精製した。作成したプライマーは、chamberlainらによって報告された9組18種 (24~28mer)¹⁾ で、増幅されるDNA断片は、DMD遺伝子のエクソン8中の360bp (a断片)、エクソン17中の416bp (b断片)、エクソン19中の459bp (c断片)、4.1kb Hind III断片中の268bp (d断片)、0.5kb Hind III断片中の547bp (e断片)、1.2/3.8kb Hind III断片中の506bp (f断片)、エクソン12中の331bp (g断片)、3.1kb Hind III断片中388bp (h断片)、エクソン4中の196bp (i断片) である。

DNAの増幅と検出: アトー社製のザイモリア

大阪大学 *小児科, **放射線基礎医学
(*Dep. of Pediatrics, **Dep. of
Radiation Biology, Osaka Univ.)

ターを用い、プライマーは3種ずつを組合せ (a~c, d~f, g~i) 同時に増幅した。PCRの条件は、100mMKCl, 20mMTris-HCl (pH, 8.3), 3mM, MgCl₂, 0.2 mg/ml gelatin, dNTPs 200μM, プライマー 2.0 μM, 鋳型 DNA 0.2 μg を使用し、全容量 50 μl とし、95℃で5分間処理後、Ampli Taq™ 2.5U を加え、流動パラフィン40 μl を重層し、94℃ 1min 後、94℃×1分間、55℃×1分間、72℃×4分間の加熱を30サイクル施した後、74℃×7分間処理した。乾燥濾紙、毛根を用いた場合は、DMA抽出液 50 μl 中 20 μl を用い PCR を同じ条件で行った。反応後 20 μl をとり、1.4%アガロースゲルにて電気泳動後、エチジウムブロマイドにて染色検出した。

結果：9種のプライマーを同時に増幅し、DMDを診断する方法が chamber lain らによって報告されているが²⁾、9種同時に行なうと f のバンドの増幅が悪く、3種を同時に行なうこととし、塩濃度、Mg 濃度の検討を行な

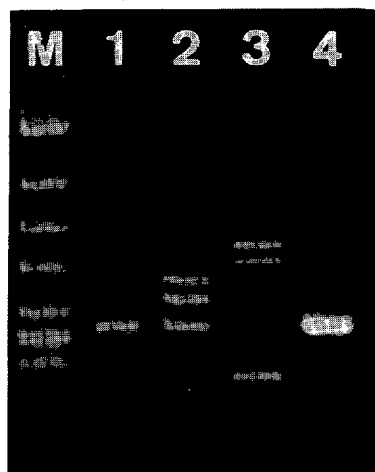


図1. 3mm血液濾紙よりのDNA抽出液を用い1.aのみ、2.a~c. 3.d~fのプライマーを用いて増幅した。4.ヘパリン血よりの抽出DNA 0.2μg使用。

い上記の方法にて正常者では3種ずつで、どのバンドも欠失することなく、9種のDNA断片が増幅検出され、それぞれの大きさは目的としたDNAの断片長と一致していることを確認した。DNAの鋳型としてヘパリン血以外の材料として直径3mmの乾燥濾紙ディスク一枚分、また毛根1本よりのDNA抽出液も上記の条件で3種類同時に増幅することが可能であった(図1)。

DMD患者でのPCRによるDNA増幅のパターンを図2に示す。DM患者7名を分析したところ、正常パターンを呈するもの3名、a~iまでの欠失を示すもの1名、aのみ1名、eのみ1名、fとhの欠失を示すもの1名であった。a~iまでの欠失を示す症例は、2歳時、精神運動発達遅延を主訴として来院し、当初先天性筋ジストロフィー症を疑われ、筋生検にてジストロフィン染色が陰性であることからDMDと診断、今回DNAレベルにて9種の断片がすべて検出されず、欠失範囲が極めて大きい症例であることが判明した。本症例では毛根にて欠損を証明しえた。eの欠

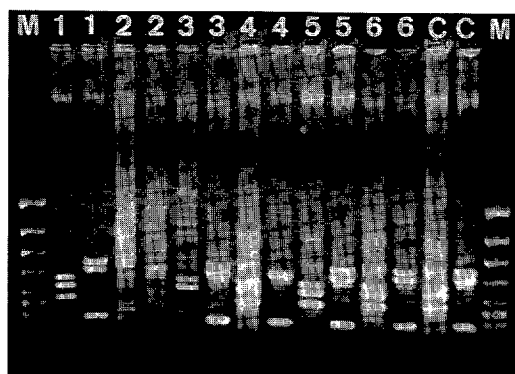


図2. DMD患者(1~6), 正常者(c)よりのPCRパターン。プライマーは左側がa~c, 右側がd~fの増幅。2:すべてのバンド欠失, 3:aの欠失, 4:fの欠失, 1, 5, 6:正常。

失を示す症例は、12歳時、走るのが遅くなったことを主訴として来院し、24歳の現在 内反尖足歩行がある。この症例は家族歴なく、筋生検が施行されておらず、Becker型があるいは他の筋ジストロフィー症かの診断が困難な症例であったが、今回ジストロフィン遺伝子の欠失を証明できたことからBecker型と診断しえた。今回対象となった7例中、筋生検未施行は4例であり、このうち3例においてDNAを用いて、ジストロフィン 遺伝子の異常を証明することができた。

考察：Duchenne型筋ジストロフィー症(DMD)は、3500人の男子に1人発症するといわれ、頻度の高い遺伝性疾患である。従来の診断は、臨床症状、家族歴、高CPK血症、筋生検によって行なわれてきたが、1987年cDNAがクローニングされ、少なくとも70以上のエクソンからなる2000kb以上の遺伝子と判明し、遺伝子解析も広く行なわれるようになった。本疾患の約60%に遺伝子の欠失が見い出され、5'端より500kb、1200kbの部位にホットスポットが見い出されている²⁾³⁾。このためPCR法による診断法が開発され¹⁾⁴⁾、ジストロフィン遺伝子欠失のある症例の80~90%の迅速な診断が可能となり、診断のため筋生検を必要とする症例が半減すると考えられる。彼らの報告では、1つの反応で9種のプライマーを同時に増幅することに重点をおいているが、彼らの方法で9種同時に行なうとバンドの欠失する場合があります。私達はより確実に診断するため3種ずつにわけて行い、PCR法による診断の有用性を確認した。現在、欠失の部位、大きさと臨床症状の重症度との相関は認められていない³⁾。最近、筋痛、

筋痙攣を主症状とするジストロフィン遺伝子の欠失例も報告されており⁵⁾、遺伝子解析が広がるにつれ、臨床状も広がっていくと思われる、アイトープを用いず、ほとんどの実験室レベルで行いうるPCR法による簡易診断が有用になると思われる。又近接遺伝子症候群であるグリセロールカイネース欠損症の症例の中には、ジストロフィン遺伝子の欠失を示す例もあり⁶⁾、これらの症例への応用も考えられる。

今回私達は、乾燥濾紙血3mmディスク1枚、毛根1本の微小材料からもPCR法を用いて遺伝子異常の診断が可能であることを確認した。PCR法は他の先天性代謝異常症の迅速診断にもきわめて有用であると考えられるので、今後特殊なケースのマススクリーニングにも使用したいと考えている。

文 献

- 1) Chamberlain, J. S. et al.: Multiplex PCR for diagnosis of Duchenne muscular Dystrophy: in PCR Protocols, Innis, M. et al (eds.) Academic Press, pp.272, 1989.
- 2) Koenig, M. et al.: Complete Cloning of the Duchenne Muscular Dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals: Cell, 50, 509, 1987.
- 3) Baumbach, L. L. et al.: Molecular and clinical correlations of deletions leading to Duchenne and Becker muscular dystrophies: Neurology, 39, 465, 1989.

- 4) Chamberlain, J. S. et al. : Deletion screening of the Duchenne muscular dystrophy locus via multiplex DNA amplification : Nucl. Acid Res., 16, 11141, 1988.
- 5) Gospe, S. M. et al. : Familial X-linked myalgia and cramps : A nonprogressive myopathy associated with a deletion in the dystrophin gene : Neurology, 39, 1277, 1989.
- 6) Towbin, J. A. et al. : Characterization of patients with glycerol kinase deficiency utilizing cDNA probes for the Duchenne muscular dystrophy locus. : Hum. Genet., 83, 122, 1989.



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：進行性の筋ジストロフィー症(DMD)の診断は従来、臨床症状、家族歴、高CPK血症、筋生検により行われてきた。最近、DMDの遺伝子(ジストロフィン遺伝子)が単離され、これを用いたサザンブロット法による診断、遺伝子解析が広く行われている。私達はヘパリン血より抽出したDNAを用い、ジストロフィン遺伝子プライマーを9種作成し、遺伝子増幅法(PCR)を用いて診断を行ないその有用性を確認した。