

乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断： PCR法を用いる組織非特異型アルカリホスファ ターゼ遺伝子RFLPの検出

佐藤清二* 松尾宣武* 奥山虎之*
工藤 純** 清水信義**

要約：乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断を、PCR法による組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子内RFLP、第9イントロンの*Bcl*I RFLPおよび第12エキソンの*Scrf*I RFLPを指標として検討した。対照におけるRFLP対立遺伝子頻度は、*Bcl*I 2.0kb(0.45)/1.6kb(0.55)、*Scrf*I 400bp(0.22)/300bp(0.78)で、これらのRFLPは、本症4家系中2家系の出生前診断に適応可能であった。日本人本症家系において、61%の確率で簡便かつ迅速な出生前診断が可能と結論した。

見出し語：乳児型低ホスファターゼ症、組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子、出生前診断、PCR法、RFLP(s)

I. はじめに

乳児型低ホスファターゼ症は、組織非特異型アルカリホスファターゼ(TNSALP)欠損により重症化骨障害をきたす常染色体性劣性遺伝疾患で、TNSALP構造遺伝子内の多様かつ微細な変異によると考えられる¹⁾⁻³⁾。今回、我々は、PCR法により2種類のTNSALP遺伝子のRFLPを検出し、これらのRFLPを指標とした本症の出生前診断の可能性を検討した。

II. 対象

対象は、家系内に乳児型低ホスファターゼ症患者を認めず、かつ血縁関係のない出生地の異なる

日本人18例および本症4家系13例(患児4、両親8、胎児1)である。

III. 方法

末梢白血球および胎児絨毛組織からDNAを精製し、TNSALP遺伝子の第9イントロンを含む2.0kbおよび第12エキソンの蛋白質非翻訳部分720bpのDNA断片を、PCR法で増幅した。プライマーは、既知のTNSALP cDNA塩基配列より適当な20merを選定した。PCR法で増幅した第9イントロンの2.0kbは、*Bcl*I、*Taq*I、*Msp*Iで処理、0.8%アガロース電気泳動後、第12エキソンの720bpは、*Scrf*I、*Hha*I、*Hinf*I、*Msp*Iで処

*慶應義塾大学医学部小児科、 **同 分子生物 (Departments of Pediatrics and Molecular Biology, School of Medicine, Keio University)

理, 5%ポリアクリルアミドゲル電気泳動後, それぞれエチジウムブロマイドで染色した(図1)。

IV. 成績

正常対照: 第9イントロンにおいて *Bcl*I による RFLP (2.0kb/1.6kb) が, 第12エクソンにおいて *Ser*fI による RFLP (400 bp/300 bp) が検出された。 *Taq*I, *Msp*I (第9イントロン), *Hha*I, *Hinf*I, *Msp*I (第12エクソン) では RFLP は検出されなかった。 RFLP 対立遺伝子頻度は, *Bcl*I 2.0 kb (0.45) / 1.6 kb (0.55), *Ser*fI 400 bp (0.22) / 300 bp (0.78) であった(表1, 表2)。

乳児型低ホスファターゼ症家系: *Ser*fI RFLP による出生前診断は, 4家系の両親がいずれも 300 bp/300bp のホモ接合体のため, 不可能であった。 *Bcl*I RFLP による出生前診断は, 家系1および2では, 両親がホモ接合体のため不可能, 家系3では, 両親がいずれもヘテロ接合体で, 患児がホモ接合体のため, 次子の出生前診断は100%可能(患者, 保因者, 正常者の区別が可能), 家系4では, 母と患児が2.0kbのホモ接合体, 父が2.0kb/1.6kbのヘテロ接合体のため, 50%の確率で可能と判断した。以上の成績に基づき, 家系3では, 現在, 出生前診断を待機中である。また, 家系4では, 次子の妊娠第9週に絨毛生検を行ない, 出生前診断を試みた。胎児は, 2.0kb/2.0kb のホモ接合体で, 保因者または患児と考えられ出生前診断は不可能であった。

V. 考按

今回, 我々は PCR 法を用い2種類の RFLP (*Bcl*I RFLP と *Ser*fI RFLP) を指標とする出

生前診断法を開発した。出生前診断の目的は, 患者と保因者, 患者と正常者を区別することで, 保因者と正常者を区別する必要はない。この点を考慮すると, 出生前診断可能率は, *Bcl*I RFLP 0.495, *Ser*fI RFLP 0.314 と計算される。2種類の RFLP を組合せた場合の出生前診断可能率は, 0.611 となる。

今後の課題は, 新たな RFLP を検出し, 出生前診断可能率を高めることである。遺伝子内組換えによる誤診を防ぐために, TNSALP 遺伝子のより上流(5'側)の部位に存在する RFLP を指標とすることが合理的である。最近, 肝型 TNSALP 第1エクソンが, 骨型の第1エクソンと異なり, 第2エクソンの3.4kb上流に, Alu 配列に挟まれて存在することが報告されている⁴⁾(図1)。Alu 配列を含めた肝型第1エクソン周辺部の RFLP を検討することは, 合理的かつ有意義と考えられる。

VI. 文献

- 1) Greenberg, C. R. et al.; Am J Hum Genet, 46, 286, 1990.
- 2) Weiss, M. J. et al.; Am J Hum Genet, 44, 686, 1989.
- 3) Goseki, M. et al.; Cli Chim Act, in press.
- 4) Matsuura, S. et al.; Biochem Biophys Res Commun, 168, 993, 1990.

図1 PCR法による増幅DNA断片

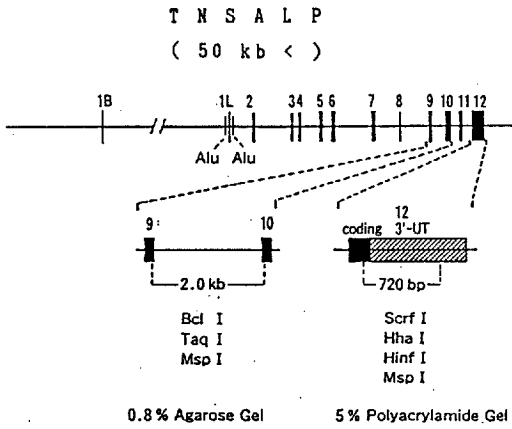


表1 BclI RFLP対立遺伝子頻度

対立遺伝子断片	頻度
2.0 kb	0.45
1.6 kb	0.55

表2 Scrfl RFLP対立遺伝子頻度

対立遺伝子断片	頻度
400 bp	0.22
300 bp	0.78

表3 乳児型低ホスファターゼ症家系の Bcl I RFLP

家系	患児	父	母	胎児
1.	2.0/1.6	2.0/2.0	1.6/1.6	
2.	2.0/1.6	1.6/1.6	2.0/2.0	
3.	2.0/2.0	2.0/1.6	2.0/1.6	
4.	2.0/2.0	2.0/1.6	2.0/2.0	2.0/2.0



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:乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断を,PCR 法による組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子内RFLP,第9イントロンのBcl I RFLPおよび第12エキソンのScrf I RFLPを指標として検討した。対照におけるRFLP対立遺伝子頻度は,Bcl I 2.0kb(0.45)/1.6kb(0.55),Scr I 400bp(0.22)/300bp(0.78)で,これらのRFLPは,本症4家系中2家系の出生前診断に適応可能であった。日本人本症家系において,61%の確率で簡便かつ迅速な出生前診断が可能と結論した。