

## 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 ターゼ遺伝子内Alu配列SSCPの検出

佐藤清二\* 松尾宣武\* 奥山虎之\*  
工藤 純\*\* 清水信義\*\*

要約：我々は、既に、二種類の組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子内PCR-RFLPを指標とした乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断法（診断可能率61%）を開発した。今回、診断可能率を高めるために、肝型第1エクソン近傍Alu配列の多型性の検出を、PCR-SSCP法で検討した。本症4家系（13例）では対象としたAlu配列（Alu-1）内にSSCPは検出されなかった。PCR-SSCP法の設定条件の検討が今後の課題である。

見出し語：乳児型低ホスファターゼ症，出生前診断，Alu配列，PCR-SSCP

### 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）欠損による重症骨形成不全により、乳児期に死亡する常染色体劣性遺伝疾患で、TNSALP構造遺伝子内の多様かつ微細な変異による<sup>1)2)</sup>。したがって、本症の出生前診断には、TNSALP構造遺伝子内多型性を利用した家系の連鎖解析が最も合理的と考えられる。

我々は、既に、二種類のRFLP（第9イントロンの*Bcl*I RFLP、第12エクソンの*Ser*fI RFLP）を指標とした出生前診断法（診断可能率61%）を開発した<sup>3)</sup>。今回、診断可能率を高めるために、

肝型第1エクソン近傍のAlu配列の多型性の検出をPCR-SSCP法で検討した。

### II. 対象

対象は、乳児型低ホスファターゼ症の4家系13例（患者4，両親8，胎児1）である。

### III. 方法

末梢白血球および胎盤絨毛組織からDNAを精製した。肝型第1エクソン上流のAlu配列を含む367bp（図1. Alu-1）のDNA断片をPCR法で増幅した。プライマーは、既知の肝型第1エクソン近傍の塩基配列<sup>4)</sup>より適当な20merを選定した。

\* 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）

プライマーの塩基配列は、以下の通りである。5'-GATTGTCTCCACCTCATGCC-3' (sense, -1811~-1792), 5'-CATATACTACCGAGCC AAGT-3' (anti-sense, -1463~-1444)。

Oliglow kit (ABI)を用い、senseプライマーは蛍光色素 JOE で、anti-senseプライマーは蛍光色素 FAM で標識した。sense strand の SSCP 検出のためには蛍光 (JOE) 標識した sense プライマーと蛍光標識していない anti-sense プライマーを、anti-sense strand の SSCP 検出のためには蛍光 (FAM) 標識した anti-sense プライマーと蛍光標識していない sense プライマーを用いて PCR 増幅を行なった。PCR 増幅産物をホルムアミド溶液 (95%ホルムアミド, 20mM EDTA) で3倍に希釈・80℃ 3分加熱, 5%アクリルアミドゲル (アクリルアミド:ビス比49:1, バッファー 0.5 × TBE) で電気泳動 (30W, 1270V, 44℃), オートシーケンサー (ABI) で解析した。double strand の位置を確認する目的で、PCR 増幅産物を非変性条件 (10%グリセロールで希釈, 加熱せず) で、同時に電気泳動した。

#### IV. 成績

sense strand : 全症例において、単一のピーク (泳動 163.7分時) が検出され、SSCPは認められなかった。double strand DNAは泳動88.0分時に検出された (図2)。

anti-sense strand : sense strand 同様、全症例において、単一のピーク (泳動161.5分時) が検出され、SSCPは認められなかった。double strand DNAは泳動88.0分時に検出された (図3)。

#### V. 考 按

PCR-SSCP法はAlu配列の多型の検出に有用であることが報告されている<sup>5)</sup>。乳児型低ホスファターゼ症の遺伝子診断において、Alu-1 SSCPは、出生前診断可能率を高めるのみならず、Alu-1がTNSALP遺伝子の5'側に存在するため、遺伝子内組換えによる誤診を防ぐ上でも有用と推測される。

しかし、今回、PCR-SSCP法による我々の検討では多型が検出されなかった。その理由として、1) Alu-1に多型が存在しない、2) Alu-1に多型は存在するが、今回のPCR-SSCP法の設定条件に問題がある、のいずれかの可能性が推測される。現段階ではいずれによるかは明らかでないが、PCR-SSCP法の成績がその設定条件に大きく影響されることから<sup>6)</sup>、設定条件をより詳細に検討し、Alu-1の多型の有無に結論を出したい。

#### VI. 文 献

- 1) Weiss, M. J. et al. ; Am J Hum Genet, 44, 686, 1989.
- 2) Goseki, M. et al. ; Cli Chim Act, 190, 263, 1990.
- 3) Okuyama, T. et al. ; 日児会誌, 95, 1632, 1991.
- 4) Matsuura, S. et al. ; Biochem Biophys Res Commun, 168, 993, 1990.
- 5) Orita, M. et al. ; Genomics, 5, 874, 1989.
- 6) Spinardi, L. et al. ; Nucleic Acids Res, 19, 4009, 1991.

図1 TMSAlp gene (>50kb) の構造

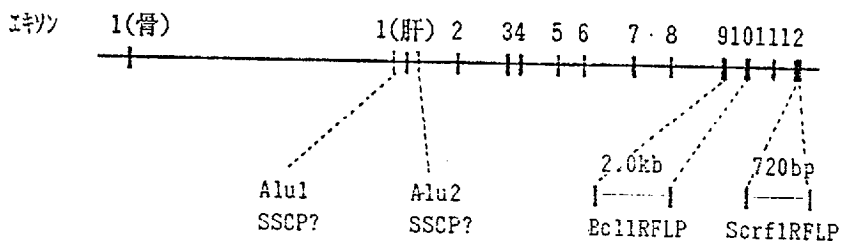


図2 Alu-1 sense strand SSCP検出成績：家系4

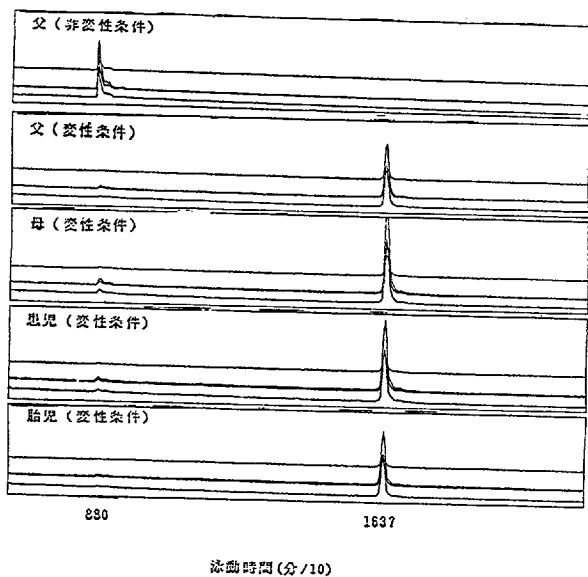
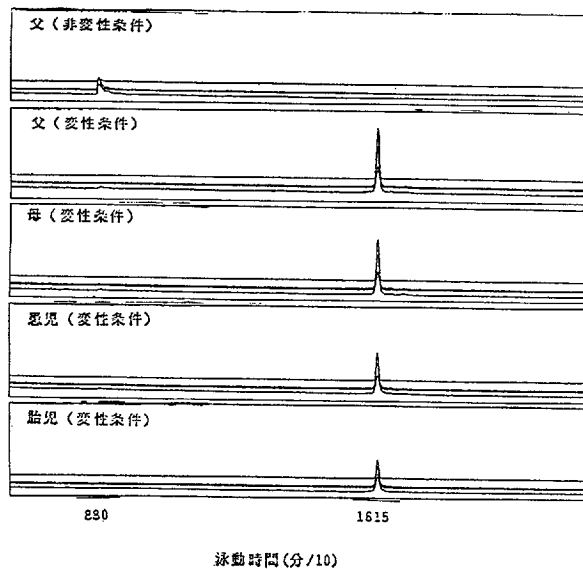


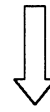
図3 Alu-1 anti-sense strand SSCP検出成績：家系4





## 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:我々は、既に、二種類の組織非特異型アルカリホスファターゼ遺伝子内 PCR-RFLP を指標とした乳児型低ホスファターゼ症の出生前診断法(診断可能率 61%)を開発した。今回、診断可能率を高めるために、肝型第 1 エキソン近傍 Alu 配列の多型性の検出を、PCR-SSCP 法で検討した。本症 4 家系(13 例)では対象とした Alu 配列(Alu-1)内に SSCP は検出されなかった。PCR-SSCP 法の設定条件の検討が今後の課題である。