

PCRを用いた血友病A出生前診断 (分担研究：遺伝性疾患をもつ小児の生活管理・ 指導に関する研究)

福井 弘, 西村拓也, 中 宏之, 松本雅彦*, 是沢光彦**,
吉岡 章

要約：PCR(Polymerase Chain Reaction)をもちいて第Ⅷ遺伝子内 RFLP(Bcl I/Intron 18)を分析することにより妊娠早期の血友病A出生前診断を4例行った。4例中3例が女性で、うち2例が保因者、1例は不明であったが、全例妊娠を継続した。1例が血友病A患者と判明し、人工妊娠中絶された。本法は従来のSouthern blot法に比して診断可能な症例は少ない、非特異的なバンドの出現する場合がある、等の問題点はあるが、短期間のうちに診断可能であり、またRI使用の必要がなく簡便であるなどの利点を有している。

見出し語：出生前診断, PCR, 血友病A, 遺伝子診断

1. はじめに

血友病Aは伴性劣性遺伝性疾患であり、本症の生活管理とその指導には遺伝相談と保因者診断、出生前診断が不可欠である。

従来よりわれわれは血友病A出生前診断を行ってきたが、当初は妊娠中期(妊娠19-21週)における胎児採血を行い、その第Ⅷ因子活性(F.VIII:C)及び第Ⅷ因子抗原(F.VIII:Ag)を測定する方法がとられてきた。1988年よりはこの出生前診断システムに、妊娠早期(妊娠9-11週)に得た胎盤絨毛細胞よりのDNAサンプルの第Ⅷ因子遺伝子内RFLP(Bcl I/Intron 18, Xba I/Intron 22)をSouthern blot法によって分析するDNA診断を導入した¹⁾。

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

*大阪市立母子センター産婦人科, **神奈川県立こども医療センター

この方法は胎児採血に比していくつかの制約があるものの、妊娠早期に診断可能であり、また診断は確実であるなどの利点を有していることを報告した。今回はPCR(Polymerase Chain Reaction)を用いたBcl Iポリモルフィズム解析により4例の出生前診断を行った²⁾。

2. 方法

1)胎盤絨毛細胞及び家系内メンバーの末梢白血球よりフェノールクロロホルム法によりゲノムDNAを抽出した。

2) PCRは常法に従いTaq polymeraseにて行った。Bcl Iポリモルフィズム部位を増幅するプライマー

の sequence は、8.1: 5'-TAAAAGCTTTAAATGGTC TAGGC-3'; 8.2: 5'-TTCGAATTCTGAAATATC TTGTTC-3' を用いた。これらを用いた PCR により 142bp のフラグメントが合成され、Bcl I で消化される場合は 99bp と 43bp のバンドが出現する³⁾。PCR 後のサンプルはセントリコン 30 を使用して濃縮及び脱塩の後、制限酵素 Bcl I にて消化し、10% ポリアクリルアミドゲルに電気泳動した。バンドはエチジウムブロマイドで染色し、紫外線ランプを使用してサイズを観察した。

3) 胎児 DNA の性別診断は国立小児病院小児医療研究センター、中堀 豊、中込弥男博士より供与をうけた Y 染色体特異プロブ DYZ 1⁴⁾ をもちいた Southern blot 法にて Y 特異 3.5 kb Eco RI フラグメントが観察されるか否か、あるいは Kogan ら³⁾ により報告された Y 特異 repeat 配列を認識するとされているプライマー、Y1-1F: 5'-TCCACTTTATCCAGGCCTG TCC-3'; Y1-2R: 5'-TTGAATGGAATGGGAACGAA TGG-3' を使用した PCR により 154bp の Y 特異フラグメントが合成されるか否かにより行った。

3. 成績

家系 1. (Fig. 1)

妊婦は第 1 子が血友病 A である疑保因者で、免疫凝血学的に保因者と診断されている。妊娠 10 週に採取された胎盤絨毛より得た DNA は Y repeat PCR ではバンドが出現せず、女性と診断した。妊婦は、Bcl I にて切断されていない 142bp と切断された 99bp+43bp のバンドを示しヘテロ接合体であったが、第 1 子の患児は切断された 99bp+43bp のバンドパターンを示したため妊婦のもつ切断された方が血友病と関連した gene 由来と考えられた。絨毛は両方の

gene のヘテロ接合体であり、父親より 142bp、母より 99bp+43bp を受け継いだ保因者女性と診断した。

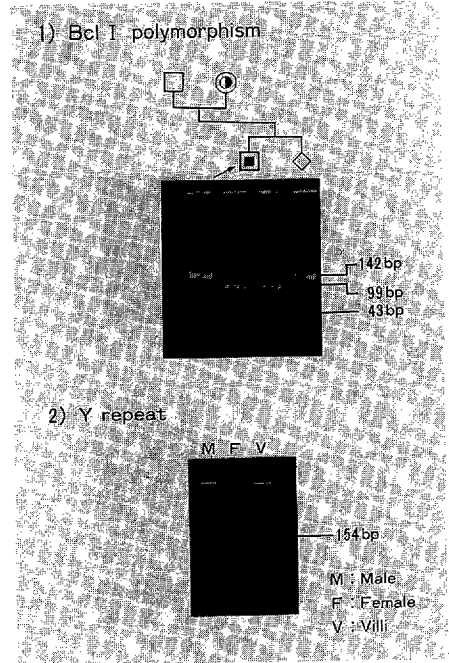


Fig. 1

家系 2. (Fig. 2)

妊婦の父は血友病 A 患者で妊婦 II-2 は確実保因者です。妊娠 9 週で胎盤絨毛を採取し、DNA を抽出した。DYZ 1 probe をもちいた Southern blot 解析では男性に特異的な 3.5 kb Eco RI フラグメントは出現せず、女性と診断した。

PCR を利用した Bcl I ポリモルフィズム解析では、患者 (I-1) は 99bp+43bp を示し、妊婦 (II-2) は 142bp と 99bp+43bp のヘテロ接合体で、妊婦のもつ 99bp+43bp が血友病に関連した遺伝子由来と考えられた。絨毛 DNA は 142bp と 99bp+43bp のヘテロ接合体であったが、保因者か否かの診断には父親 (妊婦の夫) のデータが必要であり、現在検体を得るべく手配中である。

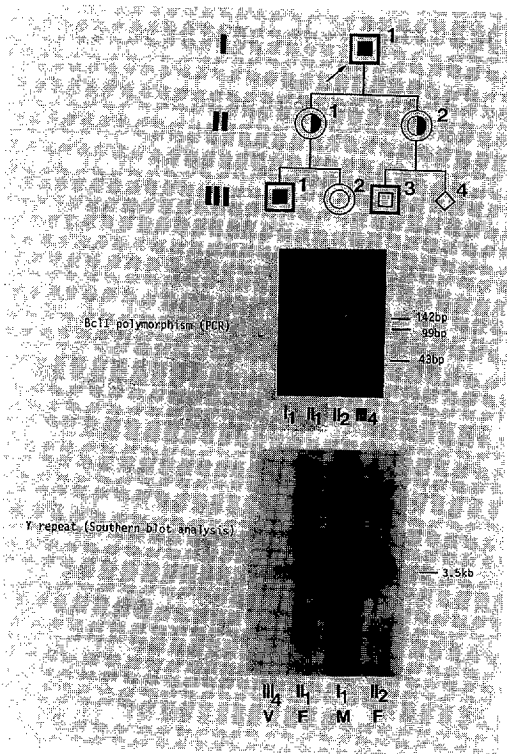


Fig. 2

その他、2家系につき同様の検索を行い、診断は、保因者1例、血友病A患者1例であった。患者と診断された症例以外はすべて出生したかあるいは妊娠継続中である (Table)。

Table PCRを用いた妊娠早期血友病A出生前診断例

	性別	診断	転帰
症例1	女性	保因者	出生
2	女性	正常女性or保因者	妊娠継続中
3	女性	保因者	出生
4	男性	患者	人工妊娠中絶

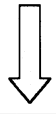
4. まとめ

胎盤絨毛細胞のDNAを鋳型としてPCRを行い、Bcl I ポリモルフィズムを解析することによる妊娠早期血友病A出生前診断を報告した。この方法は従来の Southern blot解析が Xba I ポリモルフィズムと Bcl I ポリモルフィズムの2つを解析できたのに比べて、Bcl I ポリモルフィズムしか使用できなかったが、(1) 操作が簡単(2) RI使用が不必要(3) 結果を1-2日の短期間の内に得ることができるなどの利点を有していた。しかし、(1)極少量のDNAのコンタミネーションであっても増幅されることによって診断に影響をあたえる可能性がある、(2)コンタミネーションがなくても非特異バンドの出現することがある、(3)不十分な制限酵素反応がおこることがある、などの問題点を有しており、充分な注意が必要である。

今後は、診断の確実性の向上と VNTR (Variable Number Tandem Repeat)の導入等による診断可能症例の拡大を図って行きたい。

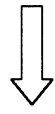
参考文献

- 1) 中 宏之他, Int. J. Hematol., 54, sup. No 1: 279, 1991.
- 2) 中 宏之, 奈医誌, 42:182-190, 1991.
- 3) Kogan, S. C. et al, New Engl. J. Med., 317:985-990, 1987.
- 4) Nakahori, Y. et al, Nucl. Acids Res., 14:7569-7680, 1986.



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:PCE(Polymerase Chain Reaction)をもちいて第 遺伝子内 RFLP(Bcl I/Intron18)を分析することにより妊娠早期の血友病 A 出生前診断を 4 例行った。4 例中 3 例が女性で、うち 2 例が保困者、1 例は不明であったが、全例妊娠を継続した。1 例が血友病 A 患者と判明し、人工妊娠中絶された。本法は従来 Southernblot 法に比して診断可能な症例は少ない、非特異的なバンドの出現する場合がある、等の問題点はあるが、短期間のうちに診断可能であり、また RI 使用の必要がなく簡便であるなどの利点を有している。