

出生前診断へのDNA診断の応用の実際に関する研究：
全国アンケート調査とOTC欠損症への具体的取り組みについて

(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)

松浦 稔展, 遠藤 文夫, 松田 一郎

要約：本研究においては昨年度に引き続きDNA診断を応用した出生前診断の現状に関するアンケート調査を行うとともに、我々が行っているOTC欠損症の出生前診断について検討してみた。全国アンケート調査からみるとDNA診断の対象とされる疾患が限られ、特定の疾患を一部の施設で集中して取り扱う傾向が認められてきている。我々が行ったOTC欠損症の出生前診断については、現在までに我々は15家系でDNA診断を試み11家系で変異を検出した。その結果をもとにサザンブロット法、ASO、変異による制限酵素切断部位の変化などを利用して7例の出生前診断を行った。

見出し語：OTC欠損症，出生前診断，DNA診断，全国アンケート調査

【DNA診断を応用した出生前診断の現状に関するアンケート調査について】

今回のアンケート調査では161施設中104施設から回答を頂いた。このなかで何らかの形で出生前診断に関与している施設は52施設（産婦人科35施設、小児科14施設、その他3施設）に及んでいる。これらのなかでDNA診断と関係している施設は21施設（産婦人科12施設、小児科9施設）であった。診断の対象とされている疾患は今回の調査では10疾患があげられた（表1）。これらの結果を見ると、対象疾患がしばられ限られた施設で多数例を取り扱う傾向が現れていると考えられる。また我が国において出生前にDNA診断を応用する対象疾

患として、筋ジストロフィー症、血友病A、OTC欠損症、21ヒドロキシラーゼ欠損症、が主要なものになってきている。

【OTC欠損症のDNA診断】

オルニチントランスカルバミラーゼ(OTC)は尿素サイクルの第2段階のカルバミルリン酸とオルニチンよりシトルリンを合成する反応に関与する。この酵素の異常症の本邦における発症頻度は8万人に1人と先天代謝異常症の中でも最も多い疾患の一つで、様々な病態の高アンモニア血症を引き起こすことが知られている。この疾患はほとんどの症例で発症後の予後が不良なため、今まで種々

の出生前診断が試みられてきた。しかし、この酵素は肝臓と腸管でしか発現しておらず、しかも妊娠後期に急激に上昇してくるため羊水細胞や胎盤絨毛組織による出生前診断は困難であった。そこで我々はOTC欠損症の遺伝子解析を行う目的でOTCのcDNAと遺伝子を単離し、遺伝子が全長73kbで10個のエクソンよりなることを明らかにした。それをもとに、サザンプロット解析やノーザンプロット解析を用い患者解析を行ってきた。しかし、これらの方法で変異が検出できる遺伝子の大きな欠失やは全体の2割にみえない。これは、病因となるOTC 遺伝子の変異のほとんどがが一塩基置換で、症例ごとに変異部位が異なっているためである。そこで、現在われわれはPCRによりOTC遺伝子の各エクソンを単離しPCR-SSCPにより変異を含むエクソンを推定し、変異の決定を行っている。この解析法が確立したことにより、ほぼ全ての症例での迅速な変異検出が可能となった。しかも、DNA はほとんどの場合どの組織でも均一で安定しているため、白血球、胎盤絨毛組織、羊水細胞で、変異による制限酵素切断部位の変化やASO法を用いることにより家系分析や出生前診断も可能となる。特に、時間的な制約のある出生前診断においてはその有用性は計りしれない。

しかし、患者解析を進めて行くうちにいくつかの問題が出てきた。PCR-SSCPは迅速に変異部位を推定できるが、変異の種類によっては正常の場合と区別がつかない場合がある。このような場合には全てのエクソンの塩基配列決定を行わなければならない。また、エクソンやエクソン/イントロン境界部位に変異が検出されない症例も見いだされてきている。このような症例はプロモーターや

エンハンサー領域および現在の方法では単離できないイントロンの一部に変異が存在する可能性がある。今後解決していかなければならない課題である。変異が検出できず家系分析や出生前診断を行わなければならない場合には、塩基配列の多型を基にしたRFLPs (restriction fragment length polymorphisms ; 制限酵素切断片長多型) を利用して診断を試みることになる。RozenらはOTC cDNAをプローブとしてMsp I 切断によるRFLPsを2種類見だし、おのおのについて女性がヘテロである確率は48%と39%と報告している。またFoxらはTaq I およびBam H I 処理でもRFLPsの存在することを見つけ、各々女性がヘテロである確率は11%と29%であることを示した。そしてこれら4つのRFLPsを使用することで、リスクをもつ母親の80%で、その妊娠男児のOTC欠損症罹患の有無が判断できるとしている。著者らは日本人でのRFLPsの検索を行ない、Msp I による2種類のRFLPsで日本人女性がヘテロである確率はRozenらの報告とほぼ同じであった。BamHI RFLPs は日本人での頻度は非常に低いが、Taq I RFLPsの頻度はFoxらの報告よりも高く、結局これらのRFLPsを使用する日本人女性の70%程度がヘテロとなり家系分析や出生前診断に利用可能と判明した。また、X染色体連鎖遺伝形式を示す致死的な疾患では、変異の1/3は新たな突然変異だと言われている。このような突然変異の多い疾患で出生前診断をRFLPsを利用して行なうことには問題が多く、そのためには母親が確実に保因者であることを確かめておかなければならない。保因者診断の方法としては蛋白負荷試験およびアロプリノール負荷試験がある。正常であれば負荷前後での尿中オロッ

ト酸の変化はみられないが保因者の場合は負荷後に有意な上昇がみられる。変異が判明していない場合でも、この負荷試験とRFLPsを利用することにより家系分析や出生前診断が可能となる。現在までに我々はこれらの方法を用い7例の出生前診断を行った(表2)。実際に解析を行った例として、サザンプロット解析による出生前診断を図1に示す。

現在までに残されていた問題点の1つとして、みいだされた変異が本当に病因となる変異なのか、あるいは単に一塩基の多型なのかという疑問が残っていた。我々は、すでに正常のヒトOTC cDNAをCos 1細胞で発現させることに成功している。更に、我々が独自に考案したPCRを利用したcDNAへの変異導入法により容易に変異を持ったヒトOTC cDNAを作製することができるようになり、見出した塩基置換がOTC活性に影響を及ぼすか否かを確認できるようになった。現在、この発現系を用いて更に多くの変異についてそれがOTC活性に及ぼす影響について検討を行っている。このような解析を進めることにより塩基置換と変異酵素の生化学的性状さらには臨床的な特徴とを結び付けることができよう。さらに、患者で検出された変異が病因であると証明することにより、DNAを用いた出生前診断の信頼性をより高めることができると考える。

図1. RFLP(Restriction fragment length polymerphism)による出生前診断

染色体DNAを制限酵素Msp Iで消化し OTC cDNAをプローブにしてサザンプロット解析を行った。父親は6.6kbのhemizygote、母親は6.6kbと6.2kb

の heterozygote である患児は女兒で6.6kb の homozygoteであることより母親の6.6kbのバンドをもつ alleleが異常であることが予測された。この結果をもとに、第4子の羊水細胞より染色体DNAを抽出しサザンプロット解析を行ったところ6.2kbのhemizygoteであることが判明し、胎児は正常男児であることが予測された。これと同時に患児の同胞(男児1名、女兒1名)についても同様の解析を行ったところ共に母親より6.6kbのバンドを持つ allele を引き継いでいることが判明した。しかし、異常な allele を引き継いでいるはずの男児同胞は全く正常であり、この結果よりこの家系における変異は患児の両親のどちらかの配偶子に起こった突然変異であることが判明した。

表 1

出生前診断の対象疾患と検査施設

筋ジストロフィー症	9施設	58例
血友病A	7施設	27例
OTC欠損症	4施設	9例
21ヒドロキシラーゼ欠損症 (先天性副腎過形成)	2施設	8例
低ホスファターゼ血症	2施設	4例
Lesch-Nyhan 症候群	1施設	2例
筋緊張型筋ジストロフィー症	2施設	2例
ゴーシェ病	1施設	1例
ゼルバーガー症候群	1施設	1例
ウエルトニツヒホフマン病	1施設	1例

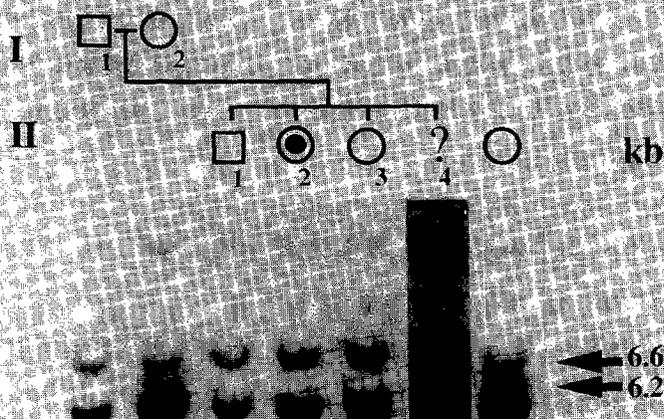
表 2

出生前診断を実施した症例

症例	変異部位	方法	結果
1	-	サザンブロット (RFLP)	保因者
2	-	サザンブロット (RFLP)	保因者
3	第5エクソン	制限酵素切断部位の変化	保因者
4	第5エクソン	制限酵素切断部位の変化	保因者
5	第5エクソン	制限酵素切断部位の変化	保因者
6	第6エクソン	制限酵素切断部位の変化	不明
7	第1イントロン	制限酵素切断部位の変化	患者

図 1

Pedigree and Southern blot analysis of DNAs from a patient with mild OTC deficiency (Msp I digestion)





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:本研究においては昨年度に引き続いてDM診断を応用した出生前診断の現状に関するアンケート調査を行うとともに、我々が行っているOTC欠損症の出生前診断について検討してみた。全国アンケート調査からみるとDNA診断の対象とされる疾患が限られ、特定の疾患を一部の施設で集中して取り扱う傾向が認められてきている。我々が行ったOTC欠損症の出生前診断については、現在までに我々は15家系でDNA診断を試み11家系で変異を検出した。その結果をもとにサザンプロット法、ASO、変異による制限酵素切断部位の変化などを利用して7例の出生前診断を行った。