

コンピューターによるイメージ分析を利用した  
デュシャンヌ／ベッカー型筋ジストロフィー保因者診断法の開発  
(分担研究：マススクリーニングの新しい対象疾患とその実施年齢に関する研究)

鈴木義之、桜庭 均、石井恵子、立野玲子\*

**【要約】** X染色体劣性遺伝病であるデュシャンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー (DMD/BMD) では、その約6割にジストロフィン遺伝子の欠失が見られる。この欠失部分に相当する遺伝子断片を増幅し、イメージプロセッシングで定量化する gene dosage分析法を作成し、DMD/BMDの保因者同定が可能かを検討した。予備実験では、確定ヘテロ接合体群は、正常対照群の約1/2の値をとり、両群間に重なりはみられなかった。その結果を元に、実際にat riskのBMD家系の家族診断への応用を試みた。

**【見出し語】** デュシャンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー、保因者診断、  
酵素的遺伝子増幅、イメージプロセッシング

**【研究方法】**

- |   |   |
|---|---|
| 1) ゲノムDNAの分離  | ノクロロホルム抽出、RNase処理により、DNAを分離して試料とした。           |
| 正常者及びDMD/BMDの患者とその家族由来の白血球またはリンパ芽球から、プロテアーゼ処理、フェノール | 2) ジストロフィン遺伝子エクソン部分の増幅<br>酵素的遺伝子増幅 (PCR) には、昨 |

---

東京都臨床医学総合研究所  
臨床遺伝学研究部門、コンピューターセンター\*  
(Department of Clinical Genetics, and Computer Center \*,  
The Tokyo Metropolitan Institute of Medical Science)

年度報告した「DMD/BMDの遺伝子欠失のスクリーニング」に用いたプライマーをそのまま使用した。但し、反応条件を変え、センス及びアンチセンスプライマーを各々0.25 $\mu$ gと5uのTaq DNAポリメラーゼ及び適当量の試料DNAを用い、全50 $\mu$ lの反応液(50mM KCl, 10mM Tris-塩酸, pH 8.3, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.001%ゲラチン, 0.2mM dNTPs)中で、増幅反応を変性:94°C、1分間、アニーリング:55°C、2分間、伸長:72°C、3分間で適当数のサイクルで行った。

### 3) 増幅産物の定量的解析

増幅産物の定量には、増幅反応の条件が重要となる。今回は、エキソン52と60とを同時に、各々サイクル数や鋳型DNA量を変化させて増幅し、鋳型DNA量と増幅産物量とが直線的な関係にある範囲を設定した上で、実験を行った。増幅産物は、1.5%アガロースゲル電気泳動で分離し、エチジウムブロマイド染色した後に、高感度カメラで撮影し、各々の輝度をイメージプロセッシングで測定した。すなわち、画像入力ボードとカラーグラフィックボードを含むホストコンピュータでデジタル化し、512×480画素に分画して、一画素につき0~255のレベルの輝度を持つ画像データに変換した。このデータはハードディスクに保存し、必要時

に、ディスプレイ上の任意の部分の面積、その部分の輝度、平均値などが計算される様に設計されたイメージ分析システム(図1)で処理した。最終的な判定は、サンプリングの誤差などを防ぐために、単一のバンド輝度の比較としてではなく、エキソン52(標的)/エキソン60(対照)の輝度比で行った。

### 【結果と考察】

DMD/BMDは頻度の高い難病の一つである。現在、まだ根本的治療法が確立されておらず、遺伝相談が重要であるが、それには保因者の同定が不可欠である。しかし、血中クレアチンキナーゼ活性測定や制限酵素断片長多型による保因者診断は、必ずしも正確ではなく、一方、筋生検は女性にとり負担が大きい。前年度からの研究を継続した所、これまでに、PCR法を用いて日本人DMD/BMD約100家系を分析し、その34家系に遺伝子の部分欠失を発見した。PCR法は、他の方法に比べて多くの点で、便利なことから、もしPCR法で欠失遺伝子部分の定量化が出来れば、保因者診断に極めて有益である。この場合欠失エキソンと対照エキソン部分とを一つの試験管内で同時に増幅し、当該欠失部分の増幅産物量/対照部分の増幅産物量の比をとると、男性

患者：保因者女性：正常者女性では、0：1：2の値をとる筈である。しかし、実際にこの条件を成立させるためには、感度の良い特異的DNAの感知系と厳密なPCRの反応条件とが必要になる。

ここでは、コンピューターによるイメージ分析系を作り、この系を用いて条件を検討した。

欠失が見られたDMD/BMD家系のうち約1/3にエクソン52の欠失が見られたため、標的エクソンとして52を、対照エクソンには60を選択した。【方法】に示したPCRの条件では、エクソン52と60の増幅産物は、可視域でサイクル数21～24まで指数関数的に増加した。

また鋳型となるDNA量が0.5～2.0 $\mu$ gの間で、PCR産物量との間に直線的関係が成立した。この至適条件下で測定したエクソン52/エクソン60の値は、正常者女性で $0.81 \pm 0.15$ （平均値 $\pm$ 標準偏差、試料数10）、3人の確定ヘテロ接合体女性では各々、0.30、0.32、0.41であった。これらの値は正常者女性平均のほぼ半分で、両者間で重なりは見られず、この方法が保因者診断に使える可能性が示唆された。

そこで、BMDの家族診断に応用した（図2）。この家族では、III-1の男とその祖父（I-1）においてジストロフィン遺伝子のエクソン52の欠失が見られ、家族はIII-2の2歳の女兒が保因者か否

かの同定を強く希望した。本法によるエクソン52/エクソン60比の値は、at riskにあるIII-2の女兒で1.08と十分に高く、この欠失を持たないと判定した。

PCRとイメージ分析の組み合わせにより、一部DMD/BMDの保因者診断が可能であることを示唆する結果を得た。この方法は、現段階ではgene dosage分析の適応条件を満たす限られた例にしか適用できないが、増幅産物量の測定感度を上げることなどで、さらに有効な例を増やし得られると思われる。

#### 【文献】

- 1) Sakuraba H., Ishii K., Shimamoto M., et al: Brain Dev. 13:339-342, 1991
- 2) Ishii K., Sakuraba H., Minamikawa-Tachino R., et al: Brain Dev. 1992, in press

図 1

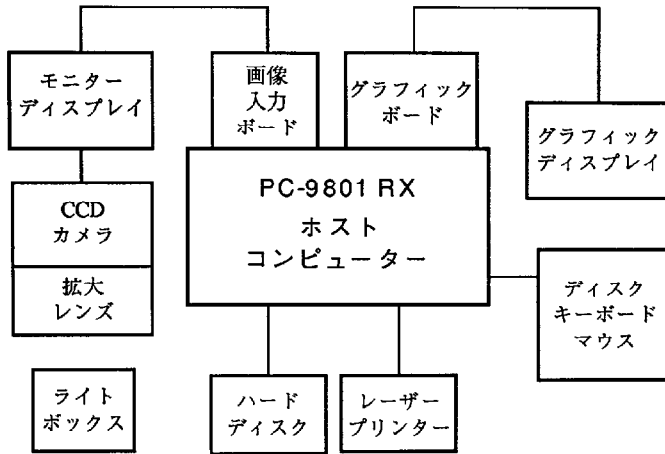
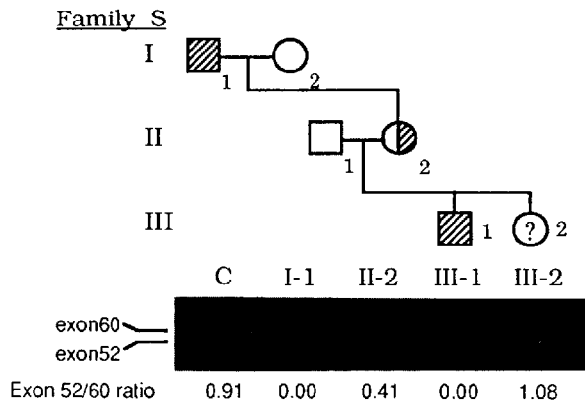
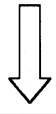


図 2

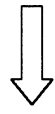
**CARRIER DETECTION OF DMD/BMD**





## 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】X 染色体劣性遺伝病であるデュシャンヌ型及びベッカー型筋ジストロフィー(DMD/BMD)では、その約6割にジストロフィン遺伝子の欠失が見られる。この欠失部分に相当する遺伝子断片を増幅し、イメージプロセッシングで定量化する gene dosage 分析法を作成し、DMD/BMD の保因者同定が可能かを検討した。予備実験では、確定ヘテロ接合体群は、正常対照群の約1/2の値をとり、両群間に重なりはみられなかった。その結果を元に、実際に at risk の BMD 家系の家族診断への応用を試みた。