

PCR法による多型分析-Duchenne型筋ジストロフィーの保因者診断、  
出生前診断への応用

(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  
およびスクリーニング法に関する研究(2))

岡田伸太郎 乾 幸治 塚本浩子

要約：PCR法を用いて、昨年報告したpERT87座の3組のプライマーと制限酵素の組み合わせによる多型分析に加え、ジストロフィン遺伝子両端のCAリピート部位の4組のプライマーを用いた多型分析を行い、Duchenne型(DMD)及びBecker型筋ジストロフィー(BMD)の保因者診断・出生前診断を試みた。対象はDMDまたはBMD患者20例を含む17家系の男性27例と女性23例の計50例とした。少なくとも1組でヘテロを示した女性は、pERT87座の3組では74%、CAリピートの4組では91%、pERT87座とCAリピートの計7組を組み合わせると96%であり、pERT87座とCAリピートを組み合わせることが診断に有用であった。また保因者診断12例(保因者9例、非保因者3例)と出生前診断2例(非患者1例、非保因者1例)を行った。X染色体上の組換えを考慮した、ジストロフィン遺伝子内と両端での検索をである本法は、有効な保因者診断・出生前診断の方法と考えられた。

見出し語：進行性筋ジストロフィー、PCR法、保因者診断、CAリピート

研究方法 対象はDMDまたはBMD患者20例を含む17家系、男性27例と女性23例の計50例である。対象者の末梢へパリン血より常法にてDNAを抽出した。また出生前診断を行った2家系では、羊水培養細胞をパップアーA

---

大阪大学小児科 (Dep. of pediatrics,  
Osaka Univ.)

(50mM KCl, 10mM Tris-HCl(pH8.3),  
2.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mg/ml gelatin, 0.45% NP40, 0.45% Tween20, プリマゼンK 1U)  
で処理後、DNA抽出液として使用した。  
pERT87座のRFLPs分析: 昨年報告したと  
おり、Robertsら<sup>1)</sup>の報告した3組のプ  
ライマーと制限酵素 (A;pERT87-15/Bam  
HI B;pERT87-8/TaqI C;pERT87-15/XmnI)  
を組み合わせで行った。

CAリピートのRFLPs分析: Oudetら<sup>2)</sup>の報告した3'側プライマー(3'CA)とFeenerら<sup>3)</sup>の報告した5'側プライマー(5'DYS-I,II,III)のアンチセンスプライマーの5'端を<sup>32</sup>P-dATPでラベルし、これを用いてDNAを増幅し、8%アクリルアミドゲル(40%尿素)に泳動後、オートラジオグラフィーを行い、解析した。

結果と考察 pERT87座のRFLPs分析: 50例全体での多型頻度(allele(+), allele(-))は、A(0.66,0.34) B(0.32,0.68) C(0.57,0.43)であった。女性でのヘテロ率は、A 52% B 39% C 57%であった(表1)。

CAリピートのRFLPs分析: 5'端外側のマーカー(5'DYS-I,II)では、多型の種類は、女性でそれぞれ2種類、5種類であり、ともに欧米の報告の5種類、8種類に比べて少なかった。同じく女性のみでのヘテロ率(40.9% 45.5%)も欧米の報告(78.6% 82.0%)に比べて低く、PICも低値であった。しかし5'端内側のマーカー、5'DYS-IIIでは多型の種類も欧米と同じく4種類で、ヘテロ率も欧米の報告(51.0%)より高値(68.2%)を示した。また、3'CAでも多型の種類は3種類でヘテロ率(45.5%)も欧米(37.0%)より高く、PICも0.367であった。5' 3'両端でともにヘテロを示した女性率は25%であった(表2 表3)。

pERT87座の3組のプライマーを組み合わせると、少なくとも1組でヘテロを示す女性率は74%であり欧米の報告70%に一致した。CAリピートの4組のプライマーを組み合わせると91%、pERT87座とCAリピートの計7組のマーカーを組み合わせると96%の女性が少なくとも1組でヘテロを示し、診断に有効であると考えられた(表4)。

12例の保因者診断を行い、9例を保因者、3例を非保因者と診断した。いずれの症例もpERT87座かCAリピートのいずれか一方で少なくともヘテロを示していた。また2家系(BMD家系(男性胎児)、DMD家系(女性胎児))の出生前診断を行い、それぞれを非患者、非保因者と診断した。また17家系中3家系で組換え症例が見いだされた(5'端2家系、3'端1家系)。以上より、PCR法を用いたpERT87座とCAリピートを組み合わせたRFLPs分析はヘテロ率が高いことより、X染色体上の組換えを考慮し、ジストロフィン遺伝子内と両端での検索を行えば、有効な保因者診断・出生前診断の方法であると考えられた。

Informativeness of pERT87 Locus

| Allele        | Allele Frequency |          | Heterozygous (%) | PIC   |
|---------------|------------------|----------|------------------|-------|
|               | total            | (female) |                  |       |
| A : Allele(+) | 0.66             | 0.64     | 52               | 0.461 |
| (-)           | 0.34             | 0.36     |                  |       |
| B : Allele(+) | 0.32             | 0.33     | 39               | 0.442 |
| (-)           | 0.68             | 0.67     |                  |       |
| C : Allele(+) | 0.57             | 0.59     | 57               | 0.484 |
| (-)           | 0.43             | 0.41     |                  |       |

A:pERT87-15/BamHI B:pERT87-8/TaqI C:pERT87-15/XmnI

表1

Informativeness of 5' Dystrophin Markers

| Marker and Allele | Our Cases        |          | Heterozygous (%) | PIC   | Reported Cases*  |                  | PIC   |
|-------------------|------------------|----------|------------------|-------|------------------|------------------|-------|
|                   | Allele Frequency |          |                  |       | Allele Frequency | Heterozygous (%) |       |
|                   | total            | (female) |                  |       | Frequency        | (%)              |       |
| 5' DYS-I          | 49               | 22       |                  |       |                  |                  |       |
| A1 (185bp)        | 0                | (0)      |                  |       | 0.048            |                  |       |
| A2 (183bp)        | 0                | (0)      |                  |       | 0.071            |                  |       |
| A3 (181bp)        | 0.296            | (0.250)  | 40.9             | 0.375 | 0.310            | 78.6             | 0.608 |
| A4 (179bp)        | 0.704            | (0.750)  |                  |       | 0.536            |                  |       |
| A5 (177bp)        | 0                | (0)      |                  |       | 0.036            |                  |       |
| 5' DYS-II         |                  |          |                  |       |                  |                  |       |
| A1 (228bp)        | 0.141            | (0.114)  |                  |       | 0.090            |                  |       |
| A2 (226bp)        | 0.155            | (0.159)  |                  |       | 0.077            |                  |       |
| A3 (224bp)        | 0                | (0)      |                  |       | 0.103            |                  |       |
| A4 (222bp)        | 0.070            | (0.091)  |                  |       | 0.026            |                  |       |
| A5 (220bp)        | 0                | (0)      | 45.5             | 0.626 | 0.103            | 82.0             | 0.768 |
| A6 (218bp)        | 0.028            | (0)      |                  |       | 0.192            |                  |       |
| A7 (216bp)        | 0.070            | (0.068)  |                  |       | 0.013            |                  |       |
| A8 (214bp)        | 0.535            | (0.568)  |                  |       | 0.397            |                  |       |
| 5' DYS-III        |                  |          |                  |       |                  |                  |       |
| A1 (225bp)        | 0.141            | (0.136)  |                  |       | 0.057            |                  |       |
| A2 (223bp)        | 0.352            | (0.211)  |                  |       | 0.529            |                  |       |
| A3 (221bp)        | 0.169            | (0.205)  | 68.2             | 0.794 | 0.057            | 51.0             | 0.586 |
| A4 (219bp)        | 0.338            | (0.318)  |                  |       | 0.357            |                  |       |

\* ; Fenner CA, Boyce FM, Kunkel LM (1991) Am J Hum Genet 48:621-627

表2

Informativeness of 3' Dystrophin Markers

| Marker<br>and Allele | Our Cases      |           | Heterozygous<br>(%) | PIC   | Reported Cases* |              | PIC  |
|----------------------|----------------|-----------|---------------------|-------|-----------------|--------------|------|
|                      | Allele         | Frequency |                     |       | Allele          | Heterozygous |      |
|                      | total (female) |           |                     |       | Frequency       | (%)          |      |
| 3' CA                | 49             | 22        |                     |       |                 |              |      |
| A1 (137bp)           | 0.155          | 0.182     |                     |       | 0.22            |              |      |
| A2 (133bp)           | 0.803          | 0.773     | 45.5                | 0.367 | 0.76            | 37.0         | 0.34 |
| A3 (121bp)           | 0.042          | 0.045     |                     |       | 0.02            |              |      |
| A4 (119bp)           | 0              | (0)       |                     |       |                 |              |      |

\* : Oudet C, Heilig R, Mandel JL (1990) Hum Genet 84:283-285

表3

Heterozygosity of pERT87locus and CA repeat

| Marker                       | % Heterozygous |
|------------------------------|----------------|
| <u>1) pERT87locus</u>        | (female 23)    |
| A: 87-15/BamHI               | 52             |
| B: 87-8/TaqI                 | 39             |
| C: 87-15/XmnI                | 57             |
| A, B, C                      | 74             |
| <u>2) CA repeat</u>          | (female 22)    |
| 5' DYS-I                     | 41             |
| 5' DYS-II                    | 46             |
| 5' DYS-III                   | 68             |
| 3' CA                        | 46             |
| 5' DYS-I, II, III            | 82             |
| 5' DYS-I, II, III, 3' CA     | 91             |
| <u>3) pERT87 (A, B, C) +</u> |                |
| 5' DYS-I, II, III, 3' CA     | 96             |

表4

文献

1) Roberts, R.G., et al.: Rapid carrier and prenatal diagnosis of Duchenne and Becker muscular dystrophy: Nucleic Acids Res., 17, 811, 1989

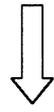
2) Oudet, C., et al.: An informative polymorphism detectable by polymerase chain reaction at the 3' end of the dystrophin gene: Hum Genet., 84, 283, 1990

3) Feener C.A., et al.: Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA : Application to the 5' region of the dystrophin gene: Am J Hum Genet., 48, 621, 1991



## 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:PCR 法を用いて、昨年報告した pERT87 座の 3 組のプライマーと制限酵素の組み合わせによる多型分析に加え、ジストロフィン遺伝子両端の CA リピート部位の 4 組のプライマーを用いた多型分析を行い、Duchenne 型(DMD)及び Becker 型筋ジストロフィー(BMD)の保因者診断・出生前診断を試みた。対象は DMD または BMD 患者 20 例を含む 17 家系の男性 27 例と女性 23 例の計 50 例とした。少なくとも 1 組でヘテロを示した女性は、pERT87 座の 3 組では 74%、CA リピートの 4 組では 91%、pERT87 座と CA リピートの計 7 組を組み合わせると 96%であり、pERT87 座と CA リピートを組み合わせることが診断に有用であった。また保因者診断 12 例(保因者 9 例、非保因者 3 例)と出生前診断 2 例(非患者 1 例、非保因者 1 例)を行った。X 染色体上の組換えを考慮した、ジストロフィン遺伝子内と両端での検索をである本法は、有効な保因者診断・出生前診断の方法と考えられた。