

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, ノーナゼク 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) を組み合わせて行った。

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 and Allele	Our Cases		Heterozygous (%)	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 Duchenn e 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。