

241 単離した胎児有核赤血球のPEP-TaqMan PCR分析

石川県予防医学協会, 石川・うきた病院*, 石川・松江産婦人科**, 富山・博医館ホスピタル***, 金沢医大総合医学研究所**** 伊川和美, 山藤薫*, 浮田俊彦*, 桑原悠隆*, 松江運緒**, 五十嵐辰博***, 高林晴夫****

[目的] 近年リアルタイムにPCR産物の検出を行えるシステム(TaqMan PCR)が開発され, 遺伝子DNAの定量測定に大きく貢献している. 我々はこのシステムが標的DNAの検出感度と特異性に優れており, しかも短時間に簡便に行えることから, 単離胎児有核赤血球を用いPEP(Primer Extension Pre-amplification)により全ゲノム増幅されたDNA産物からの検出にも有用であると考え β -actin, SRYのDNA領域の検出について検討を行った. [方法] 患者より同意を得, 男性胎児血液標本よりマイクロマニピュレータにより単離した胎児有核赤血球20個についてZhangらの方法によりPEPを行い, その増幅産物から β -actin, SRY領域の検出をTaqMan PCRを用いて行った. 同時にPEPにより標的領域についてどの程度のDNA増幅がみられるか検討した. β -actinの増幅はTaqMan PCR Kitを用い, SRY領域の増幅はLoらの方法により行った. [成績] β -actin領域は20細胞中11細胞(55%)に, SRY領域は17細胞中6細胞(35%)に検出された. SRY領域が検出された6細胞はすべて β -actin領域も検出された. また各領域が検出された細胞において, 各々の単離細胞当たりのPEP増幅コピー数は β -actin領域では0.5-59.5(平均4.8), SRY領域では2.4-278.4(平均17.8)であった. [結論] マイクロマニピュレータにより単離した胎児有核赤血球を用い単一遺伝子領域(β -actin, SRY領域)のPEP-TaqMan PCR分析を行い定量的な検出が可能となった. その結果PEPの増幅効率がはじめて明かとなった. 本法は微量DNA検体の検出に有用であり, 母体血中胎児有核赤血球によるDNA診断のための強力な分析手法と考えられた.

242 母体血清中の胎児DNAを用いた胎児性別診断 一伴性劣性遺伝性疾患の非侵襲的スクリーニング検査としての有用性一

広島大

本田 裕, 三春範夫, 大橋容子, 吉本真奈美, 大濱紘三

[目的] 最近, Loらにより母体血清中に胎児DNAが混入していることが報告された. 伴性劣性遺伝性疾患を出生前診断の対象にする場合, 母体血清中胎児DNA検索による性別診断を羊水検査や絨毛検査実施前のスクリーニング検査として用いることができる. そこで本法の精度と有用性を検討するとともに, 妊娠初期の母体血清中胎児DNAの定量的評価を行った. [方法] 当科で妊婦健診を行った妊婦のうち同意の得られた正常妊娠81例(妊娠5週-10週; 平均8週3日)を対象とし, 6.0-9.0mlの末梢血を採取した. 血清分離後, その2mlからDNAを抽出し, PCR法を用いてY染色体に特異的な遺伝子領域DYS14の検出を行って性別を判定した. また, 男児と判定された症例について, ABI PRISM 7700 Sequence Detection Systemを用いて性決定遺伝子SRYを定量し, beta-Globin遺伝子を外部標準として母体血清中の胎児DNA量を算出した. [成績] 出生児81例中40例が男児で, このうち38例(95%)で血清中にDYS14が検出され, DYS14が検出されなかった男児2例は妊娠5週, 6週に採血した症例であった. 一方, 41例の女児ではDYS14検出例は皆無であった. また, 男児と判定された38例のうち23例における胎児DNAの定量的評価では, 母体血清中DNAに占める胎児DNAの割合は0.046-3.65%(平均:0.87%)であった. [結論] 妊娠初期には母体血清中に1%弱の割合で胎児DNAが存在していることが判明し, PCR法を用いたDYS14検出による胎児性別診断は伴性劣性遺伝性疾患のスクリーニング検査として有用であることが示された. しかし, 妊娠6週以前では胎児DNA量が少ないため偽陰性になる可能性があり妊娠7週以降にこれを実施することが望ましい.

243 PCR法によるX染色体性魚鱗癬症(XLI)の遺伝子診断:新しい変異ステロイドスルファターゼ(STS; Glu 560 Pro)の機能解析

北海道大

藤本裕子, 菅原照夫, 奥山和彦, 藤本征一郎

[目的] STS遺伝子座位はXp22.3であり, XLIの大部分はSTS遺伝子の欠失により発症する. 今回, 未報告のSTS遺伝子変異で発症したXLIを経験したので, その変異遺伝子の機能解析をする. [方法] 症例は生下時体重3,300gの男児で, 生後3週目頃に全身に魚鱗癬が出現した. 母親(22歳)の妊娠経過は順調であったが, 妊娠末期に尿中E3が異常低値を示したため, DHAS負荷試験(12時間尿604ml中のE3排泄量は2.18mg)を施行した. 40週と4日にて分娩誘発を行った. 胎盤(735g, 病理組織学的に正常)のSTS酵素活性は0.01units/mgと低値(コントロール群 13.5 ± 2.5 (m \pm SE))で, XLIと酵素学的に診断された. 遺伝子解析の方法は, 両親の同意を得たのち, 臍帯血ならびに患児および両親の末梢血のリンパ球よりDNAを抽出し, STS遺伝子の全エクソンをPCR法で増幅した. アガロースゲル電気泳動法で増幅産物を分離・精製した後, ダイレクトシーケンス法により遺伝子変異を同定した. 変異STS cDNAを作成し, COS-1細胞に遺伝子導入し, STS酵素活性を測定した. [成績] 患児のSTS遺伝子の1882番目(エクソン10)の塩基がA \rightarrow Cに変異し, 560番目のアミノ酸がグルタミンからプロリンに置換していた. 父親にはSTS遺伝子変異はなかったが, 母親のSTSは正常と変異遺伝子のヘテロ接合性を示した. 遺伝子導入したCOS-1細胞のSTS酵素活性はSTS cDNA遺伝子導入群 130 ± 25 pmol/ μ g/hour(n=3)に対し, 変異STS cDNA遺伝子導入群では 5.0 ± 5.2 pmol/ μ g/hour(n=3)と著明に低下していた. [結論] 未報告のSTS遺伝子変異(Glu 560 Pro)により発症したXLIを遺伝子解析し, 変異STSの酵素活性欠損を証明しえた.