

# 血友病 A 保因者の Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析

## II. 血友病 A 家系における保因者診断

奈良県立医科大学小児科学教室  
中 宏 之

### RESTRICTION FRAGMENT LENGTH POLYMORPHISM ANALYSIS IN HEMOPHILIA A CARRIERS II. CARRIER DETECTION IN HEMOPHILIA A FAMILIES

HIROYUKI NAKA

Department of Pediatrics, Nara Medical University

Received May 27, 1991

*Summary:* Carriers of hemophilia A were detected in 30 families by means of five intragenic and one extragenic restriction fragment length polymorphisms. The heterozygosity rates of Bcl I RFLP, Xba I RFLP, Bgl I RFLP, Hind III RFLP, and Msp I RFLP were 23.3%, 60.0%, 10.0%, 23.3%, and 23.3% respectively in 30 hemophilia A mothers. The combination of Bcl I and Xba I RFLPs was most effective and useful, and detected informatively 63.3% heterozygosity in 30 hemophilia A mothers. In 17 of 30 hemophilia A mothers (56.7%), the extragenic factor VIII, ST14-1 probe, was useful for carrier detection. The combination of Bcl I RFLP, Xba I RFLP and ST14-1 probe detected 26 carriers in 30 hemophilia A mothers (86.7%). The examples of carrier detection by RFLPs are presented in three families of hemophilia A.

#### Index Terms

carrier detection, RFLP, hemophilia A, factor VIII gene

#### 緒 言

血友病 A は X 染色体長腕末端部 Xp 28 上の第 VIII 因子遺伝子の種々の欠陥による第 VIII 因子蛋白合成障害症で、皮膚粘膜はもちろん関節・筋肉内その他深部臓器組織の出血を life long に反復する遺伝性出血性疾患である。

第 VIII 因子遺伝子は 1984 年 Genentec. Inc. と Genetics. Inc. のグループにより単離され、DNA 塩基対は全長 186 kb で 26 個のエクソンと 25 個のイントロンよりなり、蛋白をコードするエクソンより構成される mRNA は 9 kb で、アミノ酸残基は 2,351 個、血中の成熟蛋白は 2,332 個のアミノ酸よりなることが明らかにされるよう

になった<sup>1)-4)</sup>。血友病 A の遺伝子異常については患者白血球 DNA を特定の制限酵素で切断し、第 VIII 因子遺伝子よりの cDNA, あるいはその断片をプローブとして、サザンブロット法で断片の欠失の有無や異常断片を検索する方法<sup>5)-14)</sup>や、polymerase chain reaction (PCR) により第 VIII 因子内の特定領域を増幅し、直接塩基配列シーケンスして異常部位を決定する方法<sup>15)</sup>が開発され、欠失・点変異・挿入・重複などの変異の報告例が増加している。

血友病 A は異常第 VIII 因子遺伝子を保有する女性より男子に伝播されるので、保因者の検出は患者発生予防の観点より重要である。血友病家系の女性は家系調査で、i) 血友病患者の娘、ii) 二人以上の患者をもつ母親、iii)

患者一人の母親であっても母親の家系内に同様の血友病者がいる場合は、凝血免疫学的検索を行うことなく確定保因者と呼ぶが、患者一人の母親は凝保因者、また患者の姉妹祖母などは潜在保因者と呼ばれ、凝血免疫学的検索の対象とされる<sup>16)</sup>。凝血免疫学的検索による保因者診断の確定度は80%前後である<sup>17)</sup>。前述の如く第VIII因子遺伝子が単離されるようになり、血友病Aの遺伝子解析もサザンブロット法やPCR法を用い、遺伝子変異の同定が行われる様になったが、第VIII因子遺伝子は186 kb, cDNAも9 kbと大きく現在のところ、遺伝子異常症例は検索の約10%にすぎない。したがって、これらは保因者検出の直接的な方法として有用でない。一方、遺伝子内のイントロンの部は直接アミノ酸をコードしないので、個体の表現型には影響を及ぼさないが、塩基配列に変異を示すことがあり、その際には特定の制限酵素に反応させると切断サイズに差異が認められる。このrestriction fragment length polymorphism (制限酵素断片長多型性, RFLP)の検索において、両断片サイズのヘテロ接合体を示す女性を検索することにより、血友病B保因者診断の試みがPeakeら(1984)<sup>18)</sup>により行われ、血友病A保因者についてはGitschierら(1985)によりBcl I RFLPとして報告された<sup>19)</sup>。その後、第VIII因子遺伝子内のXba I, Hind III, Bgl I, Msp I制限酵素によるRFLPが血友病A保因者診断に用いられるようになった<sup>20)-23)</sup>。

著者は正常人35名(男性5名, 女性30名)のX染色体について、Bcl I, Hind III, Xba I, Bgl I, Msp Iの5種類の制限酵素による第VIII因子遺伝子内RFLPを検索し、女性30名中20例はいずれかの制限酵素切断により、断片サイズの異なるヘテロ接合体が観察されることを第1報で述べた<sup>24)</sup>。今回血友病A患者の母親30名について5種類の第VIII因子遺伝子内RFLPsと第VIII因子遺伝子近傍に存在し第VIII因子遺伝子と連鎖しているプローブST14-1によるRFLP<sup>25)</sup>による家系診断の可能性と家系内における女性の保因者診断についての検討を行った。

## 対象及び方法

1. 対象: 血友病A 30家系(患者32名, 及びそれぞれの母親30名, 祖母1名, 祖父1名, 姉妹6名, 叔母1名, 父親11名)について検索した。
2. プローブ: 下記のプローブを用いた。i) F 8 A 第VIII因子遺伝子内エクソン17からイントロン18におよぶ647 bpの断片で、Genentec, Inc.のR. M. Lawn博士より供与を受けた。ii) Intron 22-fragment B 第VIII因子遺伝子内イントロン22内の1.6 kbの断片で、Genentec,

Inc.のR. M. Lawn博士より供与を受けた。

iii) F. VIII cDNA-fragment B, C 第VIII因子cDNAのうちエクソン14からエクソン26におよぶ4.7 kbの断片がfragment Bで、エクソン26の後半1.6 kbの断片がfragment Cである。これらは、Genetics, Inc.より供与を受けた。iv) ST 14-1 第VIII因子遺伝子の極近傍に存在し、DXS52と呼ばれる領域を認識するもので、第VIII因子と強く連鎖しており、第VIII因子との遺伝子間距離は2-3センチモルガンと推測されている。これは、Facite de MedicineのP. Chambon博士より供与を受けた。

3. 末梢血白血球よりゲノムDNAの抽出; 方法の詳細は第1報<sup>24)</sup>で述べた。

4. 制限酵素によるゲノムDNAの切断; 末梢血白血球より得たゲノムDNAを、Bcl I, Hind III, Kpn IとXba Iの両者、Bgl I, Msp I, Taq Iを用いて切断した。方法の詳細は第1報で述べた。

5. サブマリン電気泳動; 制限酵素で切断したゲノムDNAを第1報で述べた方法<sup>24)</sup>により泳動した。

6. サザンブロットニング; 教室の西野らの方法<sup>26)</sup>による。方法の詳細は第1報<sup>24)</sup>で述べた。

7. プローブのラベリング; Amersham社のマルチプライムDNAラベリングシステムキットを使用してプローブをラベルした。方法の詳細は第1報<sup>24)</sup>で述べた。

8. ハイブリダイゼーションおよびオートラジオグラフィ; 西野らの方法<sup>26)</sup>による。方法の詳細は第1報<sup>24)</sup>で述べた。

## 成 績

1. 血友病A患者母親の第VIII因子遺伝子内制限酵素断片長多型性(restriction fragment length polymorphism, RFLP)

教室で経過観察中の血友病A患者32例の母親30名の末梢血白血球よりゲノムDNAを抽出し、5種類の制限酵素で切断した。対応するプローブを用いてサザンブロットを行い、出現する断片の差異(RFLP)を観察した。これらの母親は家系の問診調査で、確定保因者と診断されたもの4例、疑保因者は26例で、それぞれ5種類の制限酵素切断の出現パターンはTable 1.のごとくであった。

制限酵素Bcl Iによる切断後、F 8 Aをプローブとしてサザンブロット法により検出された断片は0.8 kbを示したものは染色体60本中51本(85.0%)で、1.2 kbを示したものは9本(15.0%)であった。0.8 kbと1.2 kbのヘテロ接合体を示したものは30人中7人(23.3%)であった。血友病A患者自身はいずれかの断片サイ

ズを示すことより、ヘテロ接合体を示した家系においては異常第VIII因子遺伝子の由来する断片サイズの特定が可能であった。

制限酵素 Hind IIIによる切断後、F.VIII cDNA-fragmentBをプローブとしてサザンプロット法により検出された断片は2.7 kbを示したものは染色体60本中51本(85.0%)で、2.6 kbを示したものは9本(15.0%)であった。2.7 kbと2.6 kbのヘテロ接合体を示したものは30人中7人(23.3%)であった。Bcl I切断で0.8 kbと1.2 kbのヘテロ接合体を示したものは、Hind III切断でも2.6 kbと2.7 kbのヘテロ接合体を呈していた。

制限酵素 kpn I と Xba I による複合切断後、Intron22-fragmentBをプローブとしてサザンプロット

法により検出された断片は4本で、このうちRFLPを示した断片は1.4 kbと6.2 kbであった。1.4 kbを示したものは60本中40本(66.7%)で、6.2 kbを示したものは20本(33.3%)であった。1.4 kbと6.2 kbのヘテロ接合体を示したものは、30人中18人(60%)であった。

制限酵素 Bgl I による切断後、F.VIII cDNA-fragmentCをプローブとしてサザンプロット法により検出された断片は5.0 kbを示したものは染色体60本中55本(91.7%)で、20 kbを示したものは5本(8.3%)であった。5.0 kbと20 kbのヘテロ接合体を示したものは30人中3人(10.0%)であった。

制限酵素 Msp I による切断後、F.VIII cDNA-fragmentCをプローブとしてサザンプロット法により検出

Table 1. Analysis of intragenic factor VIII RFLPs in 30 mothers of hemophilis A patients using 5 kinds of restriction enzymes

No.	Family	Polymorphic restriction enzymes				
		Bcl I	Xba I	Bgl I	Hind III	Msp I
Allele(kb)		Alleles				
		0.8/1.2	1.4/6.2	5.0/20.0	2.6/2.7	4.3/7.5
		B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg2	H1/H2	M1/M2
1	D. K.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
2	T. M.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
3	K. M.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg2	H1/H2	M1/M2
4	S. Y.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg2	H1/H2	M1/M2
5	N. K.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg1	H1/H2	M2/M2
6	H. K.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
7	K. K.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
8	A. K.	B1/B2	X1/X1	Bg1/Bg1	H1/H2	M1/M2
9	K. Y.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
10	M. I.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg1	H1/H2	M1/M2
11	Y. I.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
12	T. G.	B2/B2	X2/X2	Bg2/Bg2	H1/H1	M1/M1
13	H. H.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
14	S. S.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
15	M. N.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
16	T. W.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
17	M. N.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
18	T. Y.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
19	K. N.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M1/M2
20	D. D.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg2	H1/H2	M1/M2
21	K. H.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
22	H. H.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
23	O. T.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
24	T. H.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
25	K. O.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
26	Y. M.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
27	M. N.	B1/B2	X1/X2	Bg1/Bg1	H1/H2	M1/M2
28	T. F.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
29	O. Y.	B1/B1	X1/X1	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2
30	K. N.	B1/B1	X1/X2	Bg1/Bg1	H2/H2	M2/M2

された断片は4.3 kbを示したものは染色体60本中9本(15.0%)で、7.5 kbを示したものは51本(85.0%)であった。4.3 kbと7.5 kbのヘテロ接合体を示したものは30人中7人(23.3%)であった (Table 2.)。

2. 血友病A患者母親の第VIII因子遺伝子連鎖プローブを用いたRFLP.

血友病A患者母親30名の末梢血白血球より抽出したゲノムDNAを制限酵素Taq Iで切断し、第VIII因子遺伝子の極近傍に存在しDXS 52と呼ばれる領域を認識するST 14-1をプローブとして用い、出現断片の多型性について検討した。このRFLPでは、5.4, 4.8, 4.4, 4.2, 3.8, 3.3, 3.1 kbの7種類のvariable bandがあり、各1本のX染色体あたり3種類variable bandがいろいろな組合せで出現した。女性の場合4種類以上のvariable bandが観察された場合にはヘテロ接合体と考えられた。4種類以上のvariable bandが観察された母親は30人中17人(56.7%)であり、家系診断が可能であった。

3. 血友病A患者家系の母親以外の保因者診断

血友病A患者32名の30家系で母親以外の女性7家系10人について、第VIII因子遺伝子内にあるいは第VIII因子遺伝子外連鎖プローブを用いて、RFLPによる保因者診断を行った。

i) Bcl I ポリモルフィズムによる診断; 制限酵素Bcl IとプローブF8Aを用いて、母親が1.2 kbと0.8 kbのヘテロ接合体を示し、保因者診断が可能であったのは10人中7人であった。これらのうち、No. 5 N. K. 家系の3姉妹について例示する (Table 1およびFig. 1)。N. K. 家系では血友病A患児 (II-4) の母親 (I-2) は1.2 kbと0.8 kbのヘテロ接合体を示し、患児 (II-

4)は1.2 kbの断片を示し、この家系においては異常第VIII因子遺伝子はこの1.2 kbの断片に由来すると考えられた。長女 (II-1)と次女 (II-2)は0.8 kbのホモ接合体を示し、母親由来の1.2 kbの断片を受け継いでおらず非保因者と診断した。三女 (II-3)は1.2 kbと0.8 kbのヘテロ接合体を示し、父親 (I-1) 由来の0.8 kb断片と母親由来の1.2 kbの断片を受け継いでおり、保因者と診断した。

ii) Xba I ポリモルフィズムによる診断; 制限酵素Kpn IとXba Iの複合切断後、プローブIntron 22-fragment Bを用いて、母親が6.2 kbと1.4 kbのヘテロ

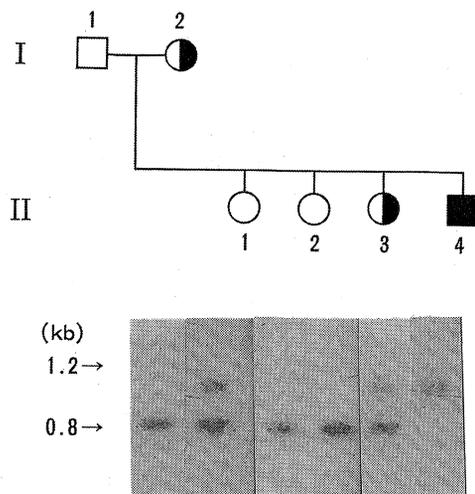


Fig. 1. RFLP pattern of factor VIII gene digested by Bcl I in a family with hemophilia A using F8A probe.

Table 2. Allele frequencies of intragenic factor VIII RFLPs in 30 mothers of hemophilia A patients

Probe	Enzyme	No. of X chromosome	Alleles (kb)	No.	Frequency	Heterozygosity (%)
F8A	Bcl I	60	0.8(B1)	51	0.850	23.3
			1.2(B2)	9	0.150	
Intron 22	Xba I	60	1.4(X1)	40	0.667	60.0
			6.2(X2)	20	0.333	
Factor VIII cDNA	Bgl II	60	5.0(Bg1)	55	0.917	10.0
			20.0(Bg2)	5	0.083	
	Fr.B	Hind III	60	2.6(H1)	9	0.150
Fr.C	Msp I	60	2.7(H2)	51	0.850	23.3
			4.3(M1)	9	0.150	
			7.5(M2)	51	0.850	

接合体を示し、保因者診断が可能であったのは10人中9人であった。これらのうち、No. 9 K. Y.家系の姉について例示する。この家系の母親は Bcl I, Bgl I, Hind III, Msp I ポリモルフィズムではいずれもホモ接合体を示し家系診断はできなかったが、Xba I ポリモルフィズムではヘテロ接合体を示し家系診断が可能であった (Table 1 および Fig.2)。K. Y.家系では血友病 A 患者 (II-2) の母親 (I-2) は、6.2 kb と 2.4 kb のヘテロ接合体を示し、患児 (II-2) は 6.2 kb の断片を示し、この家系においては異常第VIII因子遺伝子はこの 6.2 kb の断片に由来すると考えられた。姉 (II-1) は 6.2 kb と 1.4 kb のヘテロ接合体を示し、父親由来の 1.4 kb の断片と母親由来の 6.2 kb の断片を受け継いでおり、保因者と診断した。

iii) 第VIII因子遺伝子外連鎖プローブ ST 14-1 による診断  
制限酵素 Taq I で切断後、第VIII因子遺伝子外連鎖プローブ ST 14-1 を用いて、母親が4種類以上の variable band を示し、保因者診断が可能であったのは10人中8人であった。これらのうち、No. 25 K.O.家系の姉について例示する。この家系の母親は第VIII因子遺伝子内ポリモルフィズムではいずれもホモ接合体を示し家系診断はできなかったが、第VIII因子遺伝子外連鎖プローブ ST 14-1 ではヘテロ接合体を示し、家系診断が可能であった (Table 1 および Fig.3)。K. O.家系では血友病 A 患者 (II-2) の母親 (I-2) は 5.4, 4.2, 3.8, 3.3, 3.1 kb の5本の variable band を示しヘテロ接合体と考えられ、患児 (II-2) は 5.4, 4.2, 3.3 kb の断片を示し、この家系においては異常第VIII因子遺伝子はこの 5.4, 4.2, 3.3 kb の断片に由来すると考えられた。姉 (II-1) は 5.4, 4.2, 3.3 kb の断片を受け継いでおり、保因者と診断した。

## 考 案

第VIII因子遺伝子イントロンはアミノ酸をコードしないが、塩基配列中に特定の制限酵素による断片サイズに差異 (多型性) を認める部位が存在する。現在、イントロン 18 における Bcl I ポリモルフィズム<sup>19)</sup>、イントロン 19 における Hind III ポリモルフィズム<sup>21)</sup>、イントロン 22 における Xba I ポリモルフィズム<sup>20)</sup>、イントロン 25 における Bgl I ポリモルフィズム<sup>23)</sup>、第VIII因子遺伝子末端部 3'非翻訳領域における Msp I ポリモルフィズム<sup>22)</sup> が知られている。また、Taq I 切断は第VIII因子遺伝子近傍に存在する DXS 52 と呼ばれる領域を認識する ST 14-1 プローブ<sup>25)</sup>により、Bgl II 切断は第VIII因子遺伝子近傍に存在する DXS 15 と呼ばれる領域を認識する DX 13 プ

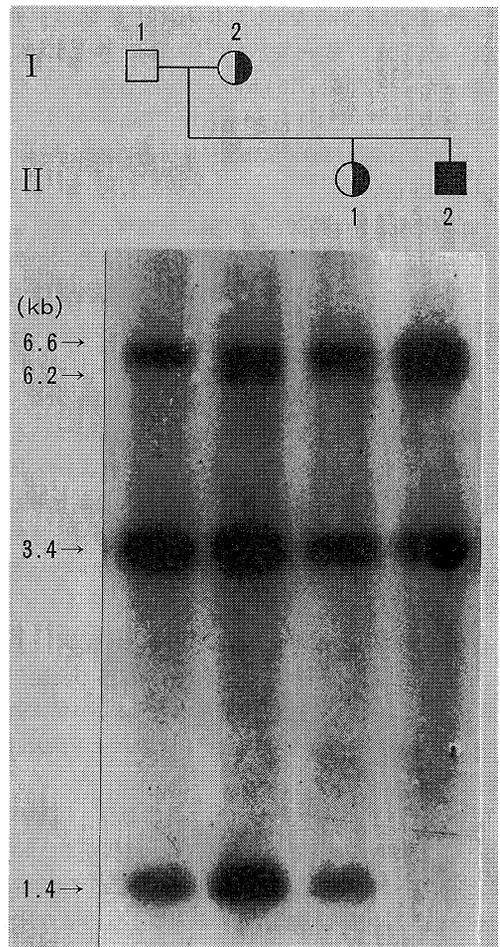


Fig. 2. RFLP pattern of factor VIII gene digested by Xba I in a family with hemophilia A using Intron 22 fragment. B probe.

ローブ<sup>27)</sup>により RFLP を示す。これら7種の RFLP 部位においてヘテロ接合体を検索することは、異常第VIII因子遺伝子を担った X 染色体がどのように受け継がれているのかを検出する方法として用いられるようになった。

著者は第1報<sup>24)</sup>において、正常女性 30 例について5種の第VIII因子遺伝子内ポリモルフィズムを検索した。それぞれのヘテロ接合体頻度は Bcl I ポリモルフィズムで 8 例 (26.7%)、Hind III ポリモルフィズムで 8 例 (26.7%)、Xba I ポリモルフィズムで 19 例 (63.0%)、Bgl I ポリモルフィズムで 7 例 (23.3%)、Msp I ポリモルフィズムで 8 例 (26.7%) であり、Bcl I と Xba I ポリモルフィズムを用いる場合が最も効率的で、30 例中 20 例 (66.7%) においてヘテロ接合体を検出したことを報告した。今回、血友病 A 患者の母親 30 例について、5 種

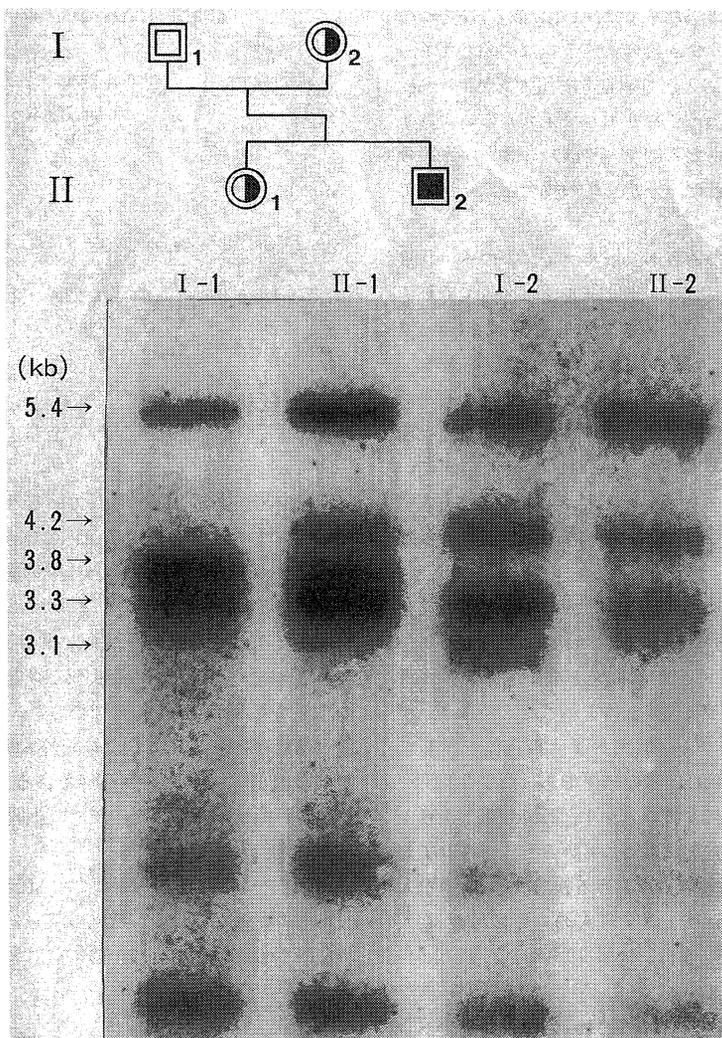


Fig. 3. RFLP pattern of factor VIII gene digested by Taq I in family with hemophilia A using ST14-1 probe.

の第VIII因子遺伝子内ポリモルフィズムと第VIII因子遺伝子連鎖プローブ ST 14-1 を用いたポリモルフィズムを検索した。

制限酵素 Bcl I による切断後、F 8 A をプローブとしてサザンプロット法により検出した場合、0.8 kb と 1.2 kb のヘテロ接合体を示したものは 30 人中 7 人 (23.3%) であった。制限酵素 Hind III による切断後、F. VIII cDNA-fragment B をプローブとしてサザンプロット法により検出した場合、2.7 kb と 2.6 kb のヘテロ接合体を示したものは 30 人中 7 人 (23.3%) であった。制限酵素 Kpn I と Xba I による複合切断後、Intron 22-fragment B をプローブとしてサザンプロット法により検出

した場合、1.4 kb と 6.2 kb のヘテロ接合体を示したものは、30 人中 18 人 (60%) であった。制限酵素 Bgl I による切断後、F. VIII cDNA-fragment C をプローブとしてサザンプロット法により検出した場合、5.0 kb と 20 kb のヘテロ接合体を示したものは 30 人中 3 人 (10.0%) であった。制限酵素 Msp I による切断後、F. VIII cDNA-fragment C をプローブとしてサザンプロット法により検出したものは 30 人中 7 人 (23.8%) であった。これらのポリモルフィズムにおけるヘテロ接合体の頻度は、Bgl I ポリモルフィズムが正常女性の 23% に比して 10% と低かったのを除いて、他の 4 種類のポリモルフィズムにおいては正常女性と明かな差異を認めなかった。ま

た、家系分析を行うに当たっては、いずれかのひとつのポリモルフィズムでヘテロ接合体を示せば可能となる。Xba I ポリモルフィズムがもっとも有用であり、これに Bcl I, Hind III, Msp I ポリモルフィズムのいずれかを加えるのがもっとも効率的で、全体の 63.3% が家系分析可能であった。これは、正常女性の場合とほぼ同じであった (Table 3)。

欧米白人女性における各ポリモルフィズムのヘテロ接合体頻度は、Bcl I, Xba I ポリモルフィズムでそれぞれ 42%, 18%, 48% であり、これら 3 種類の組合せで約 70% の女性にヘテロ接合体を認めると報告されている。また、Bcl I ポリモルフィズムに Bgl I ポリモルフィズムを加えてもあらたにヘテロ接合体を示す女性は増加せず、あまり有用とは考えられないと報告されている<sup>28)</sup>。一方、Bgl I ポリモルフィズムはアメリカ黒人種ではより有用であり 38% がヘテロ接合体を示すとの報告<sup>29)</sup>もある。

今回の検討では、欧米白人に比して Bcl I ポリモルフィズムでは 23.3% とヘテロ接合体頻度は低かったが、Xba I ポリモルフィズムでは 60% と高く、また Bgl I ポリモルフィズムでヘテロ接合体を示したものは、いずれも Bcl I ポリモルフィズムでヘテロ接合体を示しており、欧米白人種とほぼ同様の結果であった。

また、欧米白人種において Bcl I, Hind III, Msp I ポリモルフィズムは完全に連鎖していると報告されており<sup>21)22)</sup>、第 1 報の正常日本人における検討では、欧米白人種と同様連鎖していた<sup>24)</sup>。血友病 A の患児の母親 30 人では、2 家系 (No. 5, N. K, No. 19 K. N, Table 1) において連鎖を認めなかった。しかし、この 2 家系はいずれも Xba I ポリモルフィズムでヘテロ接合体を示していた。

現在のところ、等 VIII 因子遺伝子内 RFLP を利用した家系診断が可能なのは、検索例の 3 分の 2 程度が限界とされている。しかし、第 VIII 因子遺伝子の極近傍に存在し、第 VIII 因子遺伝子と非常に強く連鎖していると報告されている 2 つの領域がある。DXS 52<sup>25)</sup> と DXS 15<sup>27)</sup> で、この遺伝子座の RFLP を利用することにより家系診断を行う試みがなされた。DXS 52 を認識するプローブとして ST 14 を用い、制限酵素 Taq I 切断にて出現する RFLP を、DXS 15 については、プローブとして DX 13 を用い、制限酵素 Bgl II 切断によって出現する RFLP を検討するものである。特に、ST 14 を用いた場合、出現する断片数が少なくとも 8 本以上と多いためヘテロ接合体を示す確率は高いものとなり、ST 14 では 80% から 90% 以上、DX 13 については 50% ヘテロ接合体を示し家系

Table 3. Heterozygosity rates

RFLP (Enzyme)	Heterozygosity	
	(Normal females)	(Hemophilic mothers)
Bcl I	26.7(%)	23.3(%)
Xba I	63.0	60.0
Bgl I	23.3	10.0
Hind III	26.7	23.3
Msp I	26.7	23.3
Xba I+Bcl I	66.7	63.3
+Bgl I	63.0	60.0
+Hind III	66.7	63.3
+Msp I	66.7	63.3
Xba I+Bcl I+Bgl I	66.7	63.3
Taq I (ST14-1)	...	56.7
Taq I+Bcl I+Xba I	...	86.7

診断に有用であると報告されている<sup>25)27)</sup>。ただし、極近傍とはいっても第 VIII 因子遺伝子内ではないため、組替え (recombination) の可能性は当然考慮されるが、その危険性は 4% 前後とされている<sup>29)30)</sup>。著者の検討では、ST 14 のみの結果であるが血友病 A 30 家系中 17 家系、56.7% が診断可能であり、欧米の報告にはやや劣るものの、その有用性は高いものであった。また、第 VIII 因子遺伝子内に存在する RFLP で保因者診断が可能であり、かつ第 VIII 因子遺伝子外プローブである ST 14 でも保因者診断が可能であった家系中では、組替えを示唆するものはなかった<sup>31)</sup>。

RFLP を利用した家系診断は、遺伝子異常を直接解析したものではないため、種々の制約を含むが、これらが克服できる家系にとって非常に有用な手段であると思われる。

## 結 語

1. 血友病 A 患者母親 30 例における 5 種類の第 VIII 因子遺伝子内 RFLP と第 VIII 因子連鎖プローブ ST 14-1 を用いた RFLP について検討した。ヘテロ接合体頻度は Bcl I, Hind III, Xba I, Bgl I, Msp I, Tap I ポリモルフィズムでそれぞれ 23.3%, 23.3%, 60%, 10%, 23.3%, 56.7% であった。Bcl I, Xba I と Taq I の組合せが最も効率的で、86.7% においてヘテロ接合体を認めた。
2. 血友病 A 患者 32 名の 30 家系のうち、母親以外の女性 7 家系 10 人について、第 VIII 因子遺伝子内あるいは等 VIII 因子遺伝子外連鎖プローブを用いて、RFLP による保因者診断を試みた。9 人について保因者診断をし得た。

会, 日本血液学会にて発表した。

文 献

- 1) Gitschier, J., Wood, W. I., Goralka, T. M., Wion, K. L., Chen, E. L., Eaton, D. H., Vehar, G. A., Capon, D. J. and Lawn, R. M. : Characterization of the human factor VIII gene. *Nature* 312 : 326-330, 1984.
- 2) Wood, W. I., Capon, D. J., Simonsen, C. C., Eaton, D. L., Gitschier, J., Keyt, B., Seeburg, P. H., Smith, D. H., Hollingshead, P., Wion, K. L., Delwalt, E., Tuddenham, E. G. D., Vehar, G. A. and Lawn, R. M. : Expression of active human factor VIII from recombinant DNA clones. *Nature* 312 : 330-337, 1984.
- 3) Vehar, G. A., Kyte, B., Eaton, D., Rodriguetz, H., O'Brien, D. P., Rotblat, F., Oppermann, H., Keck, R., Wood, W. I., Harkins, R. N., Tuddenham, E. G. D., Lawn, R. M. and Capon, D. J. : Structure of human factor VIII. *Nature* 312 : 337-342, 1984.
- 4) Toole, J. J., Knopf, J. L., Wozney, J. M., Sultzman, L. A., Buecker, J. L., Debra, D., Pittman, D. D., Kaufman, R. J., Brown, E., Shoemaker, C., Orr, E. C., Amphlett, G. W., Foster, W. B., Coe, M. L., Knutson, G. J., Fass, D. N. and Hewick, R. M. : Molecular cloning of a cDNA encoding human antihemophilic factor. *Nature* 312 : 342-347, 1984.
- 5) Antonarakis, S. E., Waber, P. G., Kittum, S. D., Patel, A. S., Kazazian, H. H., Mellis, M. A., Counts, R. B., Stamatoyannopoulos, G., Bowie, E. J. W., Fass, D. N., Wozney, J. M., Pittman, D. D. and Toole, J. J. : Hemophilia A detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N. Engl. J. Med.* 313 : 842-848, 1985.
- 6) Gitschier, J., Wood, W. I., Shuman, M. A. and Lawn, R. M. : Identification of a missense mutation in the factor VIII gene of a mild hemophiliac. *Science* 232 : 1415-1416, 1986.
- 7) Youssoufian, H., Kazazian, H. H., Phillips, D. G., Aronis, S., Tsiftis, G., Brown, V. A. and Antonarakis, S. E. : Recurrent mutations in haemophilia A give evidence for CpG mutation hotspots. *Nature* 324 : 380-382, 1986.
- 8) Youssoufian, H., Antonarakis, S. E., Aronis, S., Philipps, D. G. and Kazazian, H. H. : Characterization of five partial deletions of the factor VIII gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 : 3772-3776, 1987.
- 9) Youssoufian, H., Antonarakis, S. E., Bell, W., Griffin, A. M. and Kazazian, H. H. : Nonsense and missense mutations in hemophilia A. Estimate of the relative mutation rate at CG dinucleotides. *Am. J. Hum. Genet.* 42 : 718-725, 1988.
- 10) Levinson, B., Janco, R., Phillips, III J. and Gitschier, J. : A novel missense mutation in the factor VIII gene identified by analysis of amplified hemophilia DNA sequences. *Nucl. Acids Res.* 15 : 9797-9805, 1987.
- 11) Youssoufian, H., Wong, C., Aronis, S., Platokoukis, H., Kazazian, H. H. and Antonarakis, S. E. : Moderately severe hemophilia A resulting from Glu → Gly substitution in Exon 7 of the factor VIII gene. *Am. J. Hum. Genet.* 42 : 867-871, 1988.
- 12) Bardoni, B., Sampietro, M., Romeno, M., Crapanzano, M., Mannuci, P. M. and Camerino, G. : Characterization of a partial deletion of the factor VIII gene in a haemophiliac with inhibitor. *Hum. Genet.* 79 : 86-88, 1988.
- 13) Mikami, S., Nisimura, T., Naka, H., Kuze, K. and Fukui, H. : A deletion involving introns 13 and exon 14 of factor VIII gene in a hemophiliac with anti-factor VIII antibody. *Jpn. J. human Genet.* 33 : 401-407, 1988.
- 14) Mikami, S., Nishimura, T., Naka, H., Kuze, K. and Fukui, H. : Nonsense mutation in factor VIII gene of a severe hemophiliac patient with anti-factor VIII antibody. *Jpn. J. human Genet.* 33 : 409-415, 1988.
- 15) Shima, M., Ware, J., Yoshioka, A., Fukui, H. and Fulchier, C. A. : An arginine to cysteine amino acid substitution at a critical thrombin cleavage site in a dysfunctional factor VIII molecule. *Blood* 74 : 1612-1617, 1989.
- 16) 吉岡 章 : 血友病 A 出生前診断—その理論と実際. 臨床病理臨時増刊 特集 73号 : 63-78, 1987.
- 17) 嶋 緑倫 : 血友病 A の第 VIII 因子凝固抗原 (VIII CAg) に関する研究. 2. VIII CAg 測定法を導入した血友病

- A 保因者の診断. 奈医誌. 36 : 67-77, 1985.
- 18) **Peak, I. R., Furlong, B. L. and Bloom, A. L.** : Carrier detection by direct gene analysis in a family with hemophilia B. *Lancet i* : 242-243, 1984.
  - 19) **Gitschier, J., Drayna, D., Tuddenham, E. G. D., White, R. L. and Lawn, R. M.** : Genetic mapping and diagnosis of haemophilia A achieved through a Bcl I polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 314 : 738-740, 1985.
  - 20) **Wion, K. L., Tuddenham, E. G. D. and Lawn, R. M.** : A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. *Nucl. Acids Res.* 14 : 4535-4542, 1986.
  - 21) **Ahrens, P., Kruse, T. A., Schwartz, M., Rasmussen, P. B. and Din, N.** : A new Hind III restriction fragment length polymorphism in the hemophilia A locus. *Hum. Genet.* 76 : 127-128, 1987.
  - 22) **Youssofian, H., Philips, D. G., Kazazian, H. H. and Antonarakis, S. E.** : Msp I polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. *Nucl. Acids. Res.* 15 : 6312, 1987.
  - 23) **Oberle, I., Camerino, G., Heilig, R., Grunbaum, L., Cazenave, J-P., Crapanzano, C., Mannucci, P. M. and Mandel, J. L.** : Genetic screening for hemophilia A (classic hemophilia) with a polymorphic DNA probe. *N. Engl. J. Med.* 312 : 682, 1985.
  - 24) **中 宏之** : 血友病 A 保因者の Restriction fragment length polymorphism (RFLP) 解析 I. 正常女性における第 VIII 因子遺伝子内 RFLP. 奈医誌. 42 : 173-181, 1991.
  - 25) **Harper, K., Winter, R. M., Prembrey, M. E., Hartly, D., Davies, K. E. and Tuddenham, E. G. D.** : A clinically useful DNA probe closely linked to haemophilia A. *Lancet ii* : 6, 1984.
  - 26) **西野正人, 西村拓也, 中 宏之, 中井寛明, 宮田茂樹, 奥 香世, 三上貞昭** : サザンプロット法を用いた第 IX 因子 cDNA による血友病 B 患者の第 IX 因子遺伝子の解析. 奈医誌. 37 : 762-768, 1986.
  - 27) **Tantrabahi, U., Murty, V. V. V. S., Jhanwar, S. C., Toole, J. J., Woozney, J. M., Chaganti, R. S. K. and Latt, S. A.** : Physical mapping of the factor VIII gene proximal to two polymorphic DNA probes in human chromosome band Xq28 : Implications for factor VIII gene segregation analysis. *Cytogenet. cell Genet.* 42 : 75-79, 1984.
  - 28) **Janco, R. L., Philips, III J. A., Orlando, P. J., Woodard, M. J., Wion, K. L. and Lawn, R. M.** : Detection of hemophilia A carriers. Using intragenic factor VIII : C DNA polymorphisms. *Blood* 69 : 1539-1541, 1987.
  - 29) **Lehesjoki, A. E., Chapellid, A. and Rasi, V.** : Haemophilia A : Two recombinations detected with probe ST14. *Lancet ii* : 280, 1986.
  - 30) **Driscoll, M. C., Miller, C. H., Goldberg, J. D., Aledort, L. M., Hoyer, L. W. and Golbus, M. S.** : Recombination between Factor VIII : C gene and ST14 locus. *Lancet ii* : 279, 1986.
  - 31) **Nishino, M., Nishimura, T., Naka, H., Mikami, S., Tokino, T. and Murutsu, T.** : Carrier detectoin in Japanese hemophilia A families using factor VIII gene probe (F8A) and the gene-linked ST 14-1 probe. *Jpn. J. Hum. Genet.* 32 : 237-245, 1987.