3） 双生児の卵性診断へのアプローチ

—双生児が一卵性であるか二卵性であるかを鑑別する新しい方法—

新潟大学医学部産科婦人科学教室（主任：竹内正七教授）
高　橋　完　明

A New Method to Differentiate Monozygotic and Dizygotic Twins

Hiroaki TAKAHASHI

Department of Obstetrics and Gynecology, Niigata University School of Medicine
(Director: Prof. Shoshichi TAKEUCHI)

It has become possible to accurately differentiate monozygotic from dizygotic twins in one week after birth. From each newborn twin, a 10 ml sample of umbilical cord blood was obtained at birth. DNA was extracted from the leukocytes. Using mini-satellite DNA as a probe, Southern hybridization was performed to prepare a DNA fingerprint. Identical DNA fingerprints from each twin indicate a monozygotic relationship and different fingerprints indicate a dizygotic relationship.

Key words: Twin, mini-satellite DNA, DNA fingerprint.

双生児が一卵性か二卵性かを生後１週間で正確に判定することが出来るようになった．出生時に臍帯血 10ml をそれぞれ採取し，白血球から DNA を抽出し，minisatellite DNA を probe とし Southern hybridization を行い DNA fingerprint を作成する．双生児の DNA finger print が同一なら一卵性と考えられ，異なる場合には二卵性と考えられる．

は　じ　め　に

双生児を一卵性あるいは二卵性であるかを見分けるのは，双生児が男と女である場合を除いては難しい．胎盤の形状，卵膜の種類と数，血液型で一卵性あるいは二卵性を区別できる場合もあるが，難しいことが多い．一般的には児が大きくなって顔が似ているから一卵性とか，体格が似ていないので二卵性とか推定されている．しかしながら遺伝性疾患か否かを診断する際には正確に一卵性あるいは二卵性を決定しておくことはきわめて重要である．すなわち双生児の第１児が病気に罹患し，第２児が罹患していない場合，一卵性双生児と確定していれば，遺伝性の疾患は除外できることになる．又，一卵性双生児の片方が遺伝性疾患で発病した場合には，やがてもう片方も発病するだろうと予測する事が出来，あらかじめ発病前になんらかの治療を進めておくことができる．

このたび minisatellite DNA [1]を probe として用い，

Reprint request to: Hiroaki TAKAHASHI, Department of Obstetrics and Gynecology Niigata University School of Medicine, Asashimachi-Dori, Niigata 951, JAPAN.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通１番町
新潟大学医学部産科婦人科学教室
高橋完明

DNA fingerprint を行うことで卵性診断を試みた.

実験材料と方法

DNA の抽出：静脈血または臍帯血 10ml に0.2%食塩水 20ml を加え，赤血球を溶血させ，×3,000rpm で遠心し上清を捨てる．再び0.2%食塩水 20ml 加え，この操作を3－4回繰り返す.

このペレットに1% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate), 10μg/ml proteinase K, 10mM Tris Cl, pH7.6, 50 mM NaCl, 25mM EDTA の溶液を加え37℃，16時間インキュベートする．この溶液をフェノール・クロロフォルムで抽出したのち，エタノール沈澱させる[2]．DNA を spool out したのち乾燥させ，TE バッファーで溶解させる．Southern Blotting：DNA 20μg を制限酵素，HinfI, HaeIII, MboI, HpaII で切断したのち，1%アガロースゲルで電気泳動し，nitrocellulose filter に transfer する[3].

Probe：ヒト myoglobin gene のイントロンに存在する33塩基配列（5'-CTAAAGCTGGAGGTGGGCAGGAAGGACCGAGGT）を化学合成し，7回反復する配列を Jeffreys の方法[4]により作成した（図 1）.

Probe は multi-primer method 法で ^{32}P を標識された[5].

Hybridization：^{32}P 標識された probe は 6×SSC (20×SSC：3M NaCl, 0.3M Sodium Citrate), 5× Denhardt's 溶液，100ug/ml yeast tRNA の溶液中で60℃，16時間ハイブリダイズされた．filter は50℃の6×SSC，0.1% SDS 溶液中で15分，2回洗浄され，−80℃で16時間 autoradiography された.

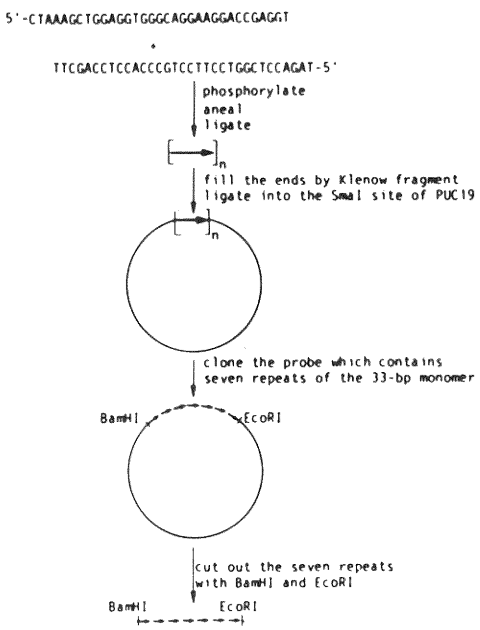

図 1　使用された probe の作成方法

結　　果

Case 1は父親 (lane1)，母親 (lane2)，双生児の第1児 (lane3)，第2児 (lane4) の DNA を HinfI で digest

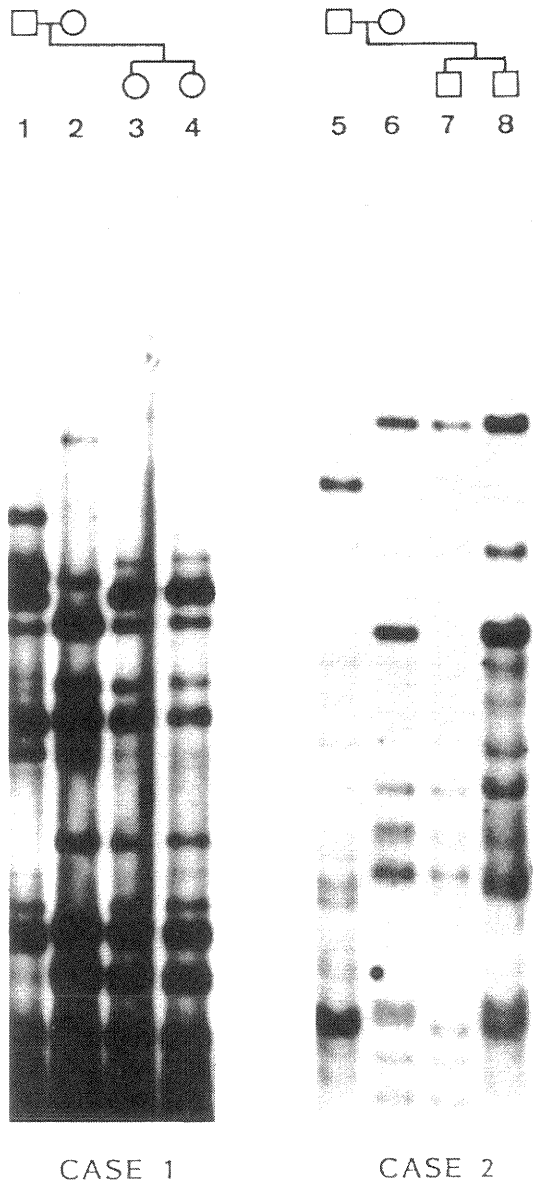

図 2　親子鑑定と双生児

した DNA fingerprint である（図 2）. lane3, lane4 のすべてのバンドは lane1, lane2 に認められるバンドと同じものからなり，真の親子であると判定できた. lane3 と lane4 の DNA fingerprint は全く同一なため case1 の lane3, 4 は一卵性双生児と判定できた. Case2 は HaeIII で digest した DNA fingerprint である. やはり lane 7, 8 のバンドは lane5, 6 のバンドのいずれかと同じバンドからなりやはり真の親子と鑑定できたが，lane7 と lane8 の DNA fingerprint のパターンは異なるので，二卵性双生児と診断できた. Case3, Case5 は HaeIII で処理し，Case4, Case6 は HinfI で処理した DNA fingerprint である（図 3）. lane1 と lane2 の fingerprint は同一で，lane3 と lane4 も同一で，Case3, 4 とも一卵性双生児と診断できる. lane5 と lane6 及び lane7 と lane8 はそれぞれ異なる DNA fingerprint を示しており，Case5, 6 とも二卵性双生児と診断できる.

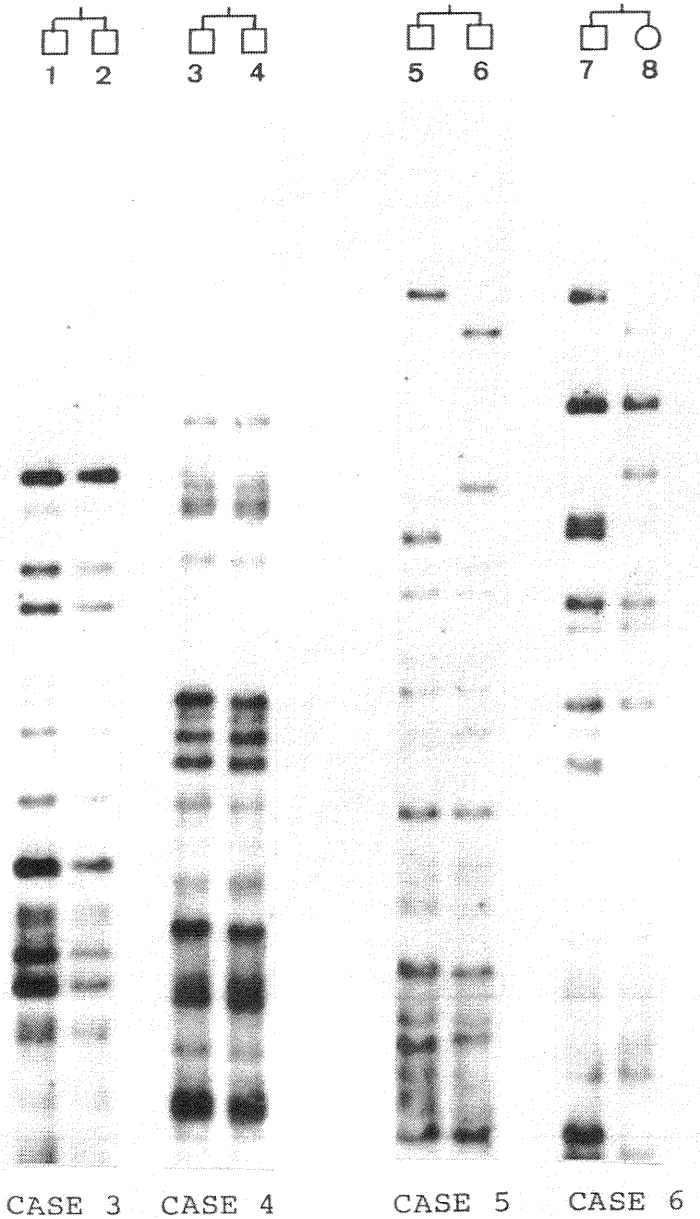

図 3　一卵性双生児と二卵性双生児

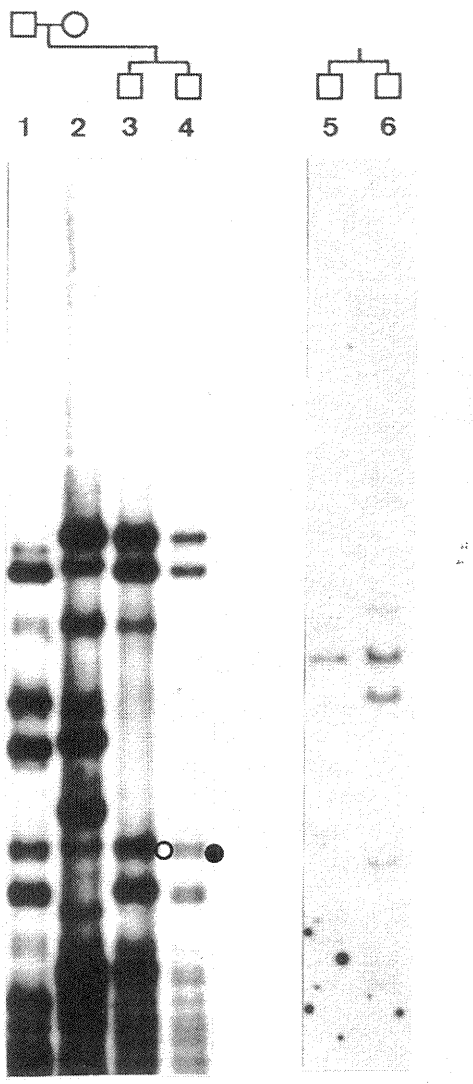

図 4　一卵性双生児と間違いやすい二卵性双生児の例

Case7 の lane1-4 は HinfI で digestion した DNA fingerprint である（図 4）．lane3 と lane4 は一見，同一のように見えるが，慣れた目には lane4 の印のバンドは lane3 の印のバンドと異なっていると思われる．印のバンドは父親由来のバンドで2本のバンドが重なっており，lane3 のバンドは母親の fingerprint に見られるバンドと同一と考えられる．lane5，6 は MboI で digestion したものであり，lane3 の個体と lane5 の個体は同一で，lane4 と lane6 の個体は同一である．その結果 Case7 は明らかに二卵性双生児と診断できる．

考　　察

minisatellite DNA を用いた DNA fingerprint による双生児の卵性診断は現在まで10数例を経験したが，簡便かつ正確な方法と思われる．しかし1種類の restriction enzyme で処理した DNA fingerprint が双生児間で異なる場合はともかくとして，同じであるからといって一卵性とは限らない．事実 Case7 の場合は HinfI 処理の DNA fingerprint だけでは二卵性を一卵性と誤診するかも知れず，少なくとも2種類の restriction enzyme を用いた DNA fingerprint を行わなければならないと考える．われわれは HaeIII，HinfI，MboI，HpaII という4種の restricion enzyme をこの研究の初期の頃使用していた．しかし今回使用した probe では MboI 処理の場合にはバンドの数が少ないという欠点があり，HpaII の場合はバンドの数が多くて比較しやすいが，DNA の methylation[6]によるためなのか，しばしばバンドが安定しない欠点がある．HinfI はときどき二卵性双生児であってもほとんど似たようなパターンを示すことがある．これは日本という島国で，かつ新潟という小地方の住民の DNA を比較しているためと考えられる．minisatellite DNA を probe として用いた DNA fingerprint 法は出生時に 10ml の臍帯血を採血することにより約1週間で判定可能な正確な方法と考えられた．

参　考　文　献

1) **Nakamura, Y., Leppert, M., O' Connel, P., et al.:** Variable number of tandem repeat (VNTR) markers for human gene mapping. Science, **235**: 1616～1622, 1987.
2) **Blin, N. and Stafford, D.W.:** Isolation of high molecular-weight DNA. Nucleic Acid Res., **3**: 2303～2310, 1976.
3) **Southern, E.:** Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **69**: 152～159, 1975.
4) **Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L.:** Hypervariable "mini-satellite" regions in human DNA. Nature, **314**: 67～73, 1985.
5) **Feinberg, A.P. and Vogelstein, B.:** A technique for radiolabelling DNA restriction

endonuclease fragments to high specific activity. Anal Biochem., **132**: 6～13, 1983.
6) **Bird, A.P. and Southern, E.M.:** Use of restriction enzyme to study eukaryotic DNA methylation. J. Mol. Biol., **118**: 27～37, 1978.

司会　ただ今，DNA の Polymorphism を利用した双生児の診断というお話でしたが，どなたか御質問ございませんでしょうか．

山内　非常におもしろい結果を見せて頂いたのですが，先程木南先生の方からもお話が出たし，今の高橋先生からもお話が出たように，このミニサテライトを用いたDNA フィンガープリント法が法医学の分野で大きく注目されております．親子鑑定への応用といたしましては，東大で木南先生と御一緒にお仕事されていた方が始められているのですが，現時点では血液型による方法が一般的であるとされております．それで，先生の双生児の場合，血液型についての両者の比較をやっておられますでしょうか．

高橋　昔は臍帯血で比較したんですけれど，最近臍帯血は母体血とのコンタミが多くて，多くの病院ではなされていないと思います．

木南　Hinf I という制限酵素はなるべく使われない方がいいと思うのですが．

高橋　実は，Hae Ⅲ でやっておりまして，Hae Ⅲ ではちゃんと異なったバンドが出るのですけれども，写真が汚いもので呈示しなかったのです．

木南　一般に Hinf I の方が polymorphic になりやすいのですが，バンドの安定性という点で我々はこの頃 Hinf I を使わなくなっています．

本山　従来，双胎が1卵性か2卵性かの判定は，卵膜隔壁の絨毛膜の有無によって組織学的にはなされてきました．そのような方法は必ずしも正しくはないというようなことが，先生のお仕事からは示されるのでしょうか．適切な組織標本さえ作り得れば，従来の方法で日常的には判定していってよろしいのでしょうか．

高橋　私は，そこら辺のことはよくわかりません．実際に産科医が産褥婦に対して『1卵性ですよ.』『2卵性ですよ.』と言って，将来顔が似ている，似ていない，で，1卵性，2卵性と推測されると思うのですが，この事柄に関してはフィードバックがないのです．10年後とか20年後のことですので，全くフィードバックがありませんので，ちょっとわからないと思うのです．

司会　先生方の所では，CVS（絨毛膜生検）というか，そういったテクニックは使っておられますか．

高橋　出生前診断は，今では超音波診断が簡便かつ正確で，上手な人では大体妊娠13週位で性別がわかりますので，あまり使われておりません．ただ染色体異常の診断の際にはやっております．

司会　ありがとうございました．次に第4席は，Gaucher 病の DNA 診断ということで，辻先生，お願い致します．

4) Gaucher 病の遺伝子診断

神経内科　**辻　　省　次**

1 はじめに

Gaucher 病は，ライソソーム水解酵素の一つであるグルコセレブロシダーゼの遺伝的欠損により，その基質であるグルコセレブロシドが主として網内系に蓄積するスフィンゴリピドーシスの一つである．近年の分子生物学的研究を飛躍的な発展の結果，本疾患の病態生理を分子レベルでとらえることが可能になりつつある．

本稿では，最初に Gaucher 病について簡単に述べた後，筆者が明らかにしてきた Gaucher 病における遺伝子異常を中心に述べる．

2 Gaucher 病の臨床病型について

Gaucher 病は，臨床症状に著しい多様性のあることが特徴で，発症年齢，神経症状の有無から，次のような3つの臨床型に分類されることが多いが，いずれの臨床型の中でも症例により重症度や発症年齢などに差がみられる事が多い[1]．

1型　（慢性非神経型，chronic non-neuronopathic）

通常肝脾腫が最初に気づかれる徴候で，貧血，白血球減少，血小板減少などの hypersplenism を伴う．神経症状は伴わない．発症年齢は幼児から成人までと幅広く，