— 綜 説 —

遺伝子診断

折茂 英生*

日本医科大学学生化学第2教室

DNA-based diagnosis

Hideo Orimo*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Nippon Medical School

はじめに

近年の分子生物学の進歩, すなわち 1970 年代以降の組換え DNA 技術の進展により, プローブとしての cDNA, ゲノム DNA の単離, クローニングが容易になったことと, 検出法としての Southern 法の開発が契機となり, DNA レベルでの疾患の診断や個人の識別が可能になってきた^{1,2)}. さらに PCR (polymerase chain reaction) 法の開発は微量の DNA サンプルでの診断を可能にした.

現在のところ, DNA 診断が可能な領域は限られているが, 遺伝子の異常による遺伝性疾患の診断, 悪性腫瘍における DNA 異常の解析とそれによる病型分類と予後の判定, 細菌やウイルスの DNA を検出することによる感染症の診断, さらに DNA の繰り返し配列などを利用した個人の識別や親子鑑定などに用いられている.

遺伝性疾患のなかでは, Mendel の法則に従う単一遺伝子疾患が最も解析が進んでいる³⁾. 糖尿病などの多因子疾患についての解析は容易ではないが, 現在精力的に研究が行われており, 将来は素因の DNA 診断が可能になることが期待される.

1. ヒトの遺伝子の構造とその異常

ヒトの細胞は 23 対の染色体をもち, ハプロイド

当たり 3×10^9 個の塩基対 (base pair, bp) を持つが, 蛋白をコードしている遺伝子は $5 \sim 10 \times 10^4$ 個と考えられる. 従って蛋白をコードしていない部分がヒト DNA の大部分を占める. 哺乳類では, 遺伝子は少数の例外を除き, 実際に蛋白をコードしているエクソンとその中間にあって mRNA の生成途中で除かれるイントロンからなり, 5' 側の転写開始点の上流には mRNA の合成を調節しているプロモーター部位が, 3' 側非翻訳部分には poly (A) signal をもつ. DNA の転写により生じた mRNA はイントロンが切りとられ (スプライシング), poly A tail が付加されて成熟 mRNA となり, 細胞質のポリゾーム上で蛋白に翻訳される (図 1).

このような遺伝子の配列に, 点突然変異, 欠失, 重複などの異常が起こることにより異常蛋白の合成や蛋白の欠損が生ずる⁴⁾. 点突然変異では塩基 1 個の異常により, コードする蛋白が変化する missense, 終止コドンに変わる nonsense, 1 塩基の欠失や挿入により open reading frame がずれる frame shift が知られている (図 2). また, スプライシングの際には, 正常でも何種類かの mRNA が生成することがある (alternative splicing) が, スプライシングの異常による異常な mRNA の生成も異常蛋白の合成の原因となる.

DNA の異常は染色体レベルの異常によっても起こる. 減数分裂時に相同染色体間でも組換えが起こる確率は 1 減数分裂当たり 30 回あるが, 不均

* 助教授

図1 ヒト β -グロビン遺伝子の構造。ヒトの遺伝子で最もよく研究されている β -グロビン遺伝子の構造を示す。ヒト β -グロビン遺伝子は3個のエクソンと2個のイントロンからなり5'側上流にプロモーター領域がある。Cap site から転写 (transcription) が開始され、3'側に poly (A) tail が付加される。さらにスプライシングによってイントロン部位が切断され、成熟 mRNA となる。ATG の翻訳開始部から終止コドンまでが蛋白へ翻訳 (translation) される。

衡組み換えや相同でない染色体間の組み換え、相互転座では DNA の異常 (欠失、重複、偽遺伝子との変換など) が起こり得る。

2. 病因遺伝子の同定

1) 遺伝子のクローニングと連鎖解析

従来の遺伝学では、酵素欠損などの遺伝性疾患の原因遺伝子の検索は、まず疾患の原因となる酵素などの蛋白の異常を発見し、その蛋白を精製し、ついでその蛋白をコードする遺伝子をクローニングして異常遺伝子を発見する方法がとられてきた。こうして遺伝子が明らかになった遺伝性疾患では後に述べる直接診断法で診断が可能であるが、異常となる蛋白が発見できなければこの方法はとることができない。これに対し、近年、逆行遺伝学 (reverse genetics) または positional cloning と呼ばれる方法が発展してきた。これは連鎖解析などにより病因遺伝子の座位を決定した後、その近傍の DNA マーカーを用いてさらに細かく連鎖解析を行って、原因と思われる遺伝子を同定、クローニングし、実際の患者でその異常を確認し

たり、その翻訳産物の異常や減少を証明することにより病因遺伝子を決定する方法である。この方法により、従来病因が不明であった Duchenne 型筋ジストロフィー⁵⁾、嚢胞性線維症⁶⁾などの原因遺伝子が発見された。同様に家族性大腸ポリポージス家系の解析から、その原因である腫瘍抑制遺伝子と考えられる APC 遺伝子が単離された⁷⁾。

連鎖解析 linkage analysis は、減数分裂時に起こる相同染色体の組換えの頻度から遺伝子の座位を決定する方法である⁸⁾。図3に示すように相同染色体上に2種の座位があり、各々の対立遺伝子 (アレル) がヘテロ接合体であるとする。A と B のように離れている座位間では、組換えが起こり易いが、C と D のように互いに近い位置にあると組換えにあたり同じ挙動をとる場合が多い。従ってこの組換え頻度から2種の遺伝子間の距離を計算することができる。

連鎖解析には、蛋白をコードしないがその塩基配列が同一の座位に対して何種類も認められる (DNA 多型)、いわゆる DNA マーカーが使用される。DNA 多型には、RFLP (restriction frag-

1.Normal	GAG TGT ATG TTC TGG GAT Glu Cys Met Phe Trp Asp
2.Missense	GAG TGT ATC TTC TGG GAT Glu Cys Ile Phe Trp Asp
3.Nonsense	GAG TGT ATG TTC TGA Glu Cys Met Phe -
4.Frameshift (1bp deletion)	GAG GTA TGT TCT GGG AT- Glu Val Cys Ser Gly Thr
5.Frameshift (1bp insertion)	GAG ATG TAT GTT CTG GGA Glu Met Tyr Val Leu Gly

図2 点突然変異の分類。上段は塩基配列、下段は翻訳される蛋白を示す。1.のような配列があったとすると、2.のようにG→Cへの一塩基置換により、コードされる蛋白がメチオニンからイソロイシンに変わるような突然変異が missense mutation である。3.ではG→Aへの置換によりトリプトファンが終止コドンに変化し、nonsense mutation となる。Frameshift には4.のようにTが欠失してシステインがバリンに変わり続く蛋白がすべて変化するものと、5.のようにAの挿入でメチオニンに変化し続く蛋白がすべて変化するものがある。

ment length polymorphism), VNTR (variable number of tandem repeat) などがあげられる。RFLP とは制限酵素の認識配列部分の塩基配列の多型性により、ある制限酵素でゲノム DNA を切断した時に DNA 断片の長さの違いとして多型性を検出できるもので、多数の RFLP マーカーが分離され、それを検出するプローブの一部も市販されている。VNTR またはミニサテライトとは縦に連なる繰り返し配列の多型性をいう。繰り返し配列が何回出現するかは、その繰り返し部分の長さがわかっているならばその倍数として検出できる。VNTR は多型性が強く、マーカーとして有用であるばかりでなく、個人の識別でも威力を発揮し、法医学領域でもよく使用されている。

2) 直接診断と間接診断

原因遺伝子の塩基配列がわかっている場合は、直接その遺伝子に相補的なプローブまたは PCR 法を用いて、突然変異の性質まで診断することが

図3 相同染色体間の組換え。(A)ではAとBの2種の座位が離れていて、その間に組換えが起こり易い。(B)ではCとDは近接していて組換えが起こりにくい。(B)のような場合、CをDNAマーカー、Dをある遺伝性疾患の責任遺伝子とすると、CによってDの間接診断が可能となる。

できる。連鎖解析を用いれば、原因となる遺伝子が分離されていなくとも近傍の RFLP マーカーなどを用いて間接的に診断が可能であるが、この場合は組換え率の問題があり 100% の診断はできず、塩基配列の異常そのものを検出することもできない。また、RFLP マーカーと原因遺伝子との連鎖は家系によって異なるので、間接診断を行う場合はできるだけ多くの家系構成員のサンプルを必要とする。

3. 遺伝子解析のための組換え DNA 技術

1) Southern 法, Northern 法

遺伝子診断において、最も古くから広く使われている方法が Southern blot 法⁹⁾である。サンプルの DNA は、患者血液、手術・生検・剖検により得た組織、患者由来の細胞（線維芽細胞、羊水細胞など）などから抽出したものをを用いる。プローブとしては、直接診断では調べたい遺伝子の一部に相補的なゲノム DNA または cDNA、間接診断では RFLP マーカーの DNA に相補的な DNA を使用する。ゲノム DNA を制限酵素で断片化し、電気泳動で分離し一本鎖に変性後、メンブレンに転写 (blotting)、固定し、³²P で標識したプローブとハイブリダイズさせ、洗浄後、オートラジオグラフィにより視覚化し、バンドの位置と数により判定する。この方法による直接診断では制限酵素の認識配列の変化を伴う点突然変異や大規模な欠失、挿入、再編成の診断が可能である。最近ではラジオアイソトープを使わないでプローブを標識する方法も普及してきている。図 4 に Southern 法の原理を示した。

一般に遺伝子診断にあたっては DNA を対象とすることが多いが、発現の異常など mRNA を対象とするとき用いられるものが Northern blot 法¹⁰⁾である。この方法は基本的には Southern 法と同じであり、その名も Southern に対する語呂合わせからきている。患者白血球、線維芽細胞、生検材料などの新鮮な RNA を抽出し、ホルムアルデヒド・ホルムアミドで変性後、変性アガロースゲルで電気泳動し、blotting と hybridization を行う。Northern 法では mRNA のサイズと量について検討できる。

2) 塩基配列の決定 (Sequencing)

DNA の塩基配列決定法には化学反応による修飾と分解による Maxam-Gilbert 法と酵素反応を利用した dideoxy 法があり、今日ではほとんど後者が使用される。直接診断の場合、患者ゲノム DNA または cDNA をクローニングして塩基配列を決定する。現在では後述する PCR 直接塩基配列法を使用すればクローニングを省略することも可能だが、いずれにせよ最終的には塩基配列の

図 4 Southern 法。ゲノム DNA を適当な制限酵素で切断し、アガロース・ゲル電気泳動で切断された DNA のサイズによって分離し、ゲルをアルカリ変性させてゲノム DNA を一本鎖にしたら、ニトロセルロースまたはナイロンメンブレンに毛細管現象を利用して転写 (capillary blotting) し、固定後、³²P で標識したプローブとハイブリダイズさせる。これを適当な条件で洗浄後、オートラジオグラフィを行う。

決定により変異部分を確定することが必要である。

3) PCR (polymerase chain reaction) 法

Southern 法の欠点としては制限酵素の認識配列の変化を伴わない点突然変異の検出が困難なこと、時間がかかること、ゲノム DNA が微量では検出困難で、従って感度に限りがあることなどが挙げられる。これらの点で有利なものが PCR 法である。必要な部分の DNA のみを増幅することができるこの方法は 1985 年に Mullis らによって発

図5 PCR (polymerase chain reaction) 法。増幅したい部分の両側にそれぞれ相補的な17~22mer程度のオリゴヌクレオチドをDNAシンセサイザーで合成し、プライマーとして使用する。5'側プライマーを斜線、3'側プライマーを白抜きで示した。プライマーは鋳型DNAに対して過剰量を使用する。反応はまず鋳型となる2本鎖のゲノムDNAを熱変性で1本鎖とし、温度を下げてプライマーを鋳型DNAに結合 (annealing) させ、ついで Taq DNA polymerase の作用により4種 (dGTP, dATP, dTTP, dCTP) のデオキシヌクレオチド三リン酸 (dNTP) を鋳型に相補的となるようにプライマーを伸長 (extension) させて鋳型に相補的な新しい鎖を合成する。ここで再び熱変性によりDNAを一本鎖にして以上の反応を繰り返す。図中に示していないがdNTPも過剰量を使用する。この熱変性、アニーリング、伸長のサイクルを25~30回行って鋳型DNAを数十万倍に増幅する。

表されたもので¹¹⁾、DNA診断の進歩によって画期的な方法となった。鋳型となるゲノムDNAは白血球 (血液1滴からの crude なDNAで増幅可能)、精液、毛髪、絨毛、病理標本などから得られ、200 ng程度で反応を行うことができる。この方法を行うためには調べたい遺伝子の塩基配列がわかっている必要がある。増幅したい部分の両側にそれぞれ相補的な合成プライマーを使用し、反応は鋳型 (template) となる2本鎖のゲノムDNAの熱変性、プライマーの鋳型DNAへの結合 (アニーリング)、DNA polymerase の作用によるプライマーの伸長の3段階からなる。プライマーの伸長により、鋳型に相補的な新しい鎖が合成される。ここで再び熱変性によりDNAを1本鎖にして以上の反応を繰り返す。使用されるDNA polymerase は熱変性のステップでも変性が起こらないことが必要であり、耐熱性の Taq polymerase が使用される。この熱変性、アニーリング、伸長のサイクルを25~30回繰り返すことにより鋳型DNAを数十万倍に増幅することができる。全行程は3時間程度である。図5にPCR法の概略を示した。

PCR法で増幅したDNAは制限酵素による認識配列の変化がある場合には、そのまま制限酵素により消化することで変異を検出できるが、PCR法の利点は増幅したDNAをさらに次のステップで解析できることで、よく利用されるいくつかの方法を述べる。

変異部位が同定されていない未知の点突然変異の検出法であるPCR-SSCP (single strand conformation polymorphism) 法¹²⁾では、放射性標識したプライマーまたはdNTPを用いてPCR増幅後、熱変性によりDNAを1本鎖にして尿素を含まない非変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動を行うと、点突然変異がある場合DNAの高次構造が変化して移動度の差となって検出される。未知の点突然変異の検出には、標識RNAプローブを用いて、対象とするDNAまたはRNAとハイブリダイズさせると、変異部位ではミスマッチのため部分的に1本鎖となってRNase Aに感受性となり切断されることで変異を検出する方法

図6 ASO 法による鎌状赤血球症の診断。鎌状赤血球症は β -グロビン遺伝子の6番目のコドン GAG(グルタミン酸をコード)が A $\rightarrow$ T の点突然変異により GTG(バリンをコード)に変化した常染色体劣性遺伝病である。ASO(allele specific oligonucleotide) 法では、2種のオリゴヌクレオチド・プローブを用いる。すなわち、この場合には正常アレル型プローブ CTCCTGAGGAGAAGTCTGC と変異アレル型プローブ CTCCTGTGGAGAAGTCTGC を合成し³²P でラベルし、PCR にて増幅した変異部分を含む DNA を変性後ドットプロットしたナイロンメンブレンとハイブリダイズさせ、適当な条件で洗浄後オートラジオグラフィで検出する。図のように正常型プローブとのみハイブリダイズするもの(A)は2本のアレルとも正常のホモ、正常型と変異型の両方とハイブリダイズするもの(B)はヘテロ(保因者)、変異型とのみハイブリダイズするもの(C)は2本のアレルとも変異をもつホモ(患者)と診断される。

(RNase 切断法)¹³⁾も用いられる。

既知の変異に対しては PCR で増幅した DNA を、allele specific oligonucleotide (ASO) とハイブリダイズさせることで異常 DNA を検出できる。これは1塩基のミスマッチがあるとオリゴヌクレオチドプローブとゲノム DNA のハイブリッドが不安定になることを利用した検出法である(図6)¹⁴⁾。この方法の変法としてミスマッチを持つプライマーを使用した allele specific PCR 法も開発されている。

PCR 法を利用した直接塩基配列決定法には、PCR の2種のプライマーのモル比を非対称にして1本鎖 DNA を増幅させてそれを塩基配列決定の鋳型としたり、PCR で生成した2本鎖 DNA を λ -exonuclease 処理して1本鎖をつくり鋳型とする方法が行われる。

PCR 法では RNA を鋳型として使うこともできる。目的とする遺伝子が大きくすべてのエクソンを増幅するのが難しい場合などは、患者白血球や組織の RNA を増幅するのが便利である。RNA を抽出し、ランダムプライマーと逆転写酵素(RT)を用いて mRNA を cDNA に変え、次いで PCR を行って cDNA を増幅する(RT-PCR

法)¹⁵⁾。これを上記の方法と組み合わせて診断に用いることができる。

PCR 法の最大の利点は微量の試料で診断でき、感度が高いことであるが、それは同時に欠点でもある。すなわち、微量の contamination があった場合、それが増幅されて誤った結果がでる恐れがある。contamination を防ぐためには細心の注意を払われねばならない。

4. 現在行われている遺伝子診断

1) 遺伝病の遺伝子診断

表1に主な疾患を直接診断可能なものと間接診断によるものとに分けて掲げた¹⁶⁾。単一遺伝子疾患の原因遺伝子は次々に明らかにされているので、直接診断の可能な疾患は今後さらに増加すると思われる。直接診断により変異が明らかになると、前述した ASO 法などを用いて家族のスクリーニングや出生前診断が可能となる。

2) 悪性腫瘍の遺伝子診断

悪性腫瘍の DNA 診断は癌遺伝子の発見以来盛んに行われ、癌遺伝子の点突然変異、増幅、再構成が癌遺伝子の活性化に重要であることが明らかにされている¹⁷⁾。一方、網膜芽細胞腫などの家族性

表 1 遺伝子診断が可能な主な遺伝病

A. 直接診断可能なもの

疾 患 名	責 任 遺 伝 子
低 β リポ蛋白血症	アポリポ蛋白 B
家族性高コレステロール血症	LDL レセプター
Lesch-Nyhan 症候群	ヒポキサンチン・グアニン・ホスホリボシルトランスフェラーゼ
低ホスファターゼ症	肝/骨/腎型アルカリホスファターゼ
ガラクトース血症	ガラクトース-1-リン酸ウリジルトランスフェラーゼ
シトルリン血症	アルギニノコハク酸合成酵素
オルニチントランスカルバミラーゼ欠損症	オルニチントランスカルバミラーゼ
フェニルケトン尿症	フェニルアラニン・ヒドロキシラーゼ
Pompe 病(糖尿病II型)	α -1, 4 グルコシダーゼ
垂井病(糖尿病VII型)	筋ホスフォフルクトキナーゼ
無カタラーゼ血症	カタラーゼ
Fabry 病	α ガラクトシダーゼ
Gaucher 病	β グルコシダーゼ(グルコセレブロンダーゼ)
Nieman-Pick 病	スフィンゴミエリナーゼ
異染性白質ジストロフィー	アリルスルファターゼ A
Tay-Sachs 病	ヘキソースアミニダーゼ A (α ポリペプチド)
Sandhoff 病	ヘキソースアミニダーゼ B (β ポリペプチド)
急性間欠性ポルフィリア	ポルフォビリノーゲン・デアミナーゼ
晩発性皮膚ポルフィリア	ウロポルフィリノーゲン・デカルボキシラーゼ
アデノシンデアミナーゼ欠損症	アデノシンデアミナーゼ
先天性副腎過形成(21 水酸化酵素欠損症)	ステロイド 21 水酸化酵素
Albright 遺伝性骨異栄養症(偽性副甲状腺機能低下症)	促進性 G 蛋白 α サブユニット
Alport 症候群	IV型コラーゲン α 5 ポリペプチド
Ehlers-Danlos 症候群IV型	III型コラーゲン α 1 ポリペプチド
Marfan 症候群	フィブリリン
Hunter 症候群(ムコポリサッカリドーシスII型)	イズロン酸-2-スルファターゼ
神経線維腫症 I 型(Von Recklinghausen 病)	NF 1(ニューロフィブロミン)
家族性アミロイドポリニューロパチー	トランスサイレチン(プレアルブミン)
家族性 Alzheimer 病(一部)	アミロイド前駆体(APP)
Becker 型筋ジストロフィー	ジストロフィン
Duchenne 型筋ジストロフィー	ジストロフィン
筋緊張性ジストロフィー	DM(Myotonin protein kinase)
ミトコンドリア脳筋症(MELAS 症候群)	ミトコンドリア tRNA
α 1 アンチトリプシン欠損症	α 1 アンチトリプシン
嚢胞性線維症	CFTR(Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator)
肥大型特発性心筋症(一部)	心筋 β ミオシン重鎖
アンチトロンビンIII欠乏症	アンチトロンビンIII
プロテインC欠乏症	プロテインC
G 6 PD 欠損性溶血性貧血	G 6 PD(グルコース-6-リン酸デヒドロゲナーゼ)
血友病A	第VIII因子
血友病B	第IX因子
von Willebrand 病II型	von Willebrand 因子
α サラセミア	α_2 -グロビン
β サラセミア	β -グロビン
鎌状赤血球症	β -グロビン
眼皮膚型白皮症 I 型	チロシナーゼ
単純表皮水疱症	ケラチン 14
家族性大腸ポリポーシス	APC
網膜芽細胞腫	RB
色素性乾皮症 A 群	Xeroderma pigmentosum group A complementing (XPAC)
色素性乾皮症 B 群	Excision-repair cross-complementing(ERCC 3)
脆弱 X 症候群	FMR-1

B. 間接診断によるもの (1992 年末現在)

疾 患 名	責 任 遺 伝 子
Wilson 病	Charcot-Marie-Tooth 病 I 型
低リン酸血症	Lowe 症候群
Menkes 病	Friedreich 運動失調症
悪性高熱症	結節性硬化症
無ガンマグロブリン血症	von Hippel-Lindau 病
Wiskott-Aldrich 症候群	Norrie 病
副腎白質ジストロフィー	成人型囊胞腎
Prader-Willi 症候群	脈絡膜欠損症
Emery-Dreifuss 型筋ジストロフィー	網膜色素変性症
Huntington 舞蹈病	

A. に掲げたものでも、遺伝子が巨大であるため、近傍または内部の RFLP を使用した間接診断の方が実用的な疾患も多い。

腫瘍を始めとして RB, p53 などの癌抑制遺伝子が単離され、その突然変異による不活化が検討されている¹⁸⁾。方法論的には、遺伝性疾患と同様に Southen 法, PCR 法が用いられるが、腫瘍組織は正常 DNA を持つ正常細胞と腫瘍細胞が混じっているため、その点の注意が必要とされる。

3) 感染症の遺伝子診断

従来の感染症の診断は培養による菌の確認か抗体価の上昇によっており、迅速性に欠けていた。現在では特定の細菌 DNA に対する DNA プローブを用いる抗酸菌やマイコプラズマなどの診断や、細菌やウイルスに特異的な DNA または RNA (RNA ウイルスの場合) を PCR 増幅して、その存在を診断することが容易になってきた。PCR により診断が可能となってきた感染症には B 型肝炎, C 型肝炎, エンテロウイルス, パピローマウイルスなどが挙げられる^{1,2,19)}。

5. 遺伝子診断の倫理的問題点

遺伝子診断の進歩は一方で以前には考えられなかった問題を提起した^{20,21)}。ここでは三点のみを論ずることにする。第一には、従来よりあった表現型としての遺伝病患者に対する就職・結婚などの社会的差別が、遺伝子型が容易に解析されるようになったため、保因者にも拡大される可能性である²⁰⁾。これは遺伝病だけでなく、例えば p53 の一方のアレルの変異が認められた場合に易腫瘍発現性と考えられて不利益を受ける可能性も指摘されている²¹⁾。

第二に、治療不能な疾患が診断されることの問題である。多くの遺伝病は現在でも治療不能であり、出生前診断によって胎児が重篤な遺伝病であることが判明した場合の妊娠継続の決定時に、できる限り多くの情報が、社会福祉、経済的サポートなどに関する情報とともに両親に提供される必要がある。日本では遺伝相談の専門家はほとんど存在しないのが実状であり、この方面の専門家の養成とともに、遺伝子診断の適応に関する一致したガイドラインの策定が早期に望まれる。また、成人に対する診断でも、late onset の治療不能な疾患に将来必ず罹患することが判明した場合の適切な care は困難であり、倫理上大きな問題である。一方、診断が行われる以上は、遺伝病の治療の進展も望まれる。若干の遺伝病の治療には従来から補充療法や除去療法が行われてきたが、遺伝子治療の急速な進展は今後に希望を与えるものといえる。

第三の問題は、個人識別に用いられる VNTR の多型性などが個人のプライバシーに属する問題とされる点である。先に述べたように PCR 法を用いれば微量のサンプルで多型性を調べられるので、本人が知らないうちにこれらのデータが調べられている可能性があり、人権問題としても今後社会的に検討されなければならない。

以上のような社会的問題の解決には、正しい情報が提供されることが重要で、遺伝子診断の利点が十分に認識された上で議論が深まることが期待される。

御校閲いただきました島田 隆教授に深謝致します。

文 献

- 1) 中村祐輔, 平井久丸, 木南 凌 (編): DNA 診断と疾患の分子生物学, 実験医学, 9 (10), 1991.
- 2) DNA 検査と診断—PCR の活用, 医学のあゆみ, 162 (9), 1992.
- 3) Antonarakis, S.E.: Diagnosis of genetic disorders at the DNA level. *N. Engl. J. Med.*, 320, 153~163, 1989.
- 4) Beaudet, A.L., Scriver, C.R., Sly, W.S., Valle, D., Cooper, D.N., McKusick, V.A., and Schmidke, J.: Genetics and biochemistry of variant human phenotypes, in; *The metabolic basis of inherited disease* (Eds. Scriver, C.R., Beaudet, A.L., Sly, W.S., Valle, D.), p. 5~53, McGraw-Hill Inc., New York, 1989.
- 5) Koenig, M., Hoffman, E.P., Bertelson, C.J., Monaco, A.P., Feener, C., and Kunkel, L.M.: Complete cloning of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) cDNA and preliminary genomic organization of the DMD gene in normal and affected individuals. *Cell*, 50, 509~517, 1987.
- 6) Riordan, J.R., Rommens, J.M., Kerem, B.-S., Alon, N., Rozmahel, R., Grzelczak, Z., Zielenski, J., Lok, S., Plavsic, N., Chou, J.-L., Drumm, M.L., Iannuzzi, M.C., Collins, F.S., and Tsui, L.-C.: Identification of the cystic fibrosis gene; Cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245, 1066~1073, 1989.
- 7) Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., Hedge, P., Markham, A., Krush, A.J., Petersen, G., Hamilton, S.R., Nilbert, M.C., Levy, D. B., Bryan, T.M., Preisinger, A.C., Smith, K.J., Su, L.-K., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B.: Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science*, 253, 665~669, 1991.
- 8) Ott, J. (安田徳一 訳): ヒト遺伝子リンケージの統計分析. ソフトサイエンス社, 1987.
- 9) Southern, E.M.: Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.*, 98, 503~517, 1975.
- 10) Thomas, P.S.: Hybridization of denatured RNA and small DNA fragments transferred to nitrocellulose. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77, 5201~5205, 1980.
- 11) Saiki, R.K., Scharf, S., Faloona, F., Mullis, K.B., Horn, G.T., Erlich, H.A. and Arnheim, N.: Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230, 1350~1354, 1985.
- 12) Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T., and Hayashi, K.: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics*, 5, 874~879, 1989.
- 13) Myers, R.M., Larin, Z., and Maniatis, T.: Detection of single base substitutions by ribonuclease cleavage at mismatches in RNA:DNA duplexes. *Science*, 230, 1242~1246, 1985.
- 14) Saiki, R.K., Bugawan, T.L., Horn, G.T., Mullis, K. B., and Erlich, H.A.: Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324, 163~166, 1986.
- 15) Kawasaki, E.S.: Amplification of RNA. in; *PCR protocols* (Eds. Innis, M.A., Gelfand, D.H., Sninsky, J.J., White, T.J.), p. 21~27, Academic Press Inc., San Diego, 1990.
- 16) McKusick, V.A.: Mendelian inheritance in man, 10th ed., The Johns Hopkins University Press, Baltimore, 1992.
- 17) McKenzie, S.J.: Diagnostic utility of oncogenes and their products in human cancer. *Biochim. Biophys. Acta*, 1072, 193~214, 1991.
- 18) Marshall, C.T.: Tumor suppressor genes. *Cell*, 64, 313~326, 1991.
- 19) Kwok, S., and Sninsky, J.J.: Application of PCR to the detection of human infectious diseases. in; *PCR technology* (Ed. Erlich, H.A.), p. 235~244, Stockton Press, New York, 1989.
- 20) Holzman, N.A., and Rothstein, M.A.: Eugenics and genetic discrimination. *Am. J. Hum. Genet.*, 50, 457~459, 1992.
- 21) 藤木典生, 平山幹生, 武藤多津郎, 中崎繁明: 遺伝医学の倫理. 小児科, 33, 471~481, 1992.

(受付: 1993年 6月17日)