

## 簡易遺伝子解析法を用いた 21-水酸化酵素欠損症の遺伝子診断

### ～ タイとペルーの患者における CYP21B 遺伝子の解析～

三上 篤 多川 真澄 水嶋 好清 佐藤 勇次 藤田 晃三  
福士 勝\*<sup>1</sup> 田島 敏広\*<sup>2</sup> 藤枝 憲二\*<sup>2</sup>

#### 要 旨

21-水酸化酵素欠損症と診断されたタイ人患者 27 家系とペルー人患者 30 家系について、PCR 法をベースとした簡易遺伝子解析法による遺伝子診断を行った。その結果、タイの 21 家系 (77.8%)、ペルーの 21 家系 (70%) で病因 allele が同定された。それぞれ 19 家系 (70.4%) と 15 家系 (50%) で遺伝子型が確定し、ほとんどの例で遺伝子型と病型はよく一致していた。変異の特徴として、タイは同定された 40allele 中で nt656G 変異が 24 (60%)、ペルーでは 36allele 中で deletion または conversion が 17 (47.2%) と高頻度を示した。両国の患者の変異パターンは異なり、報告されている他の人種とも異なることから、CYP21B 遺伝子の起源と進化過程は人種間で大きく異なることが確認された。

#### 1. 緒 言

21-水酸化酵素欠損症 (21-hydroxylase deficiency, 以下 21-OHD とする) は、先天性副腎過形成症 (congenital adrenal hyperplasia, 以下 CAH とする) の約 90% を占める常染色体劣性遺伝疾患である<sup>1)</sup>。その責任遺伝子 CYP21B の近隣には約 98% の高い相同性を持つ偽遺伝子 CYP21A が存在し、遺伝子複製の際に両遺伝子間の不等交叉等から欠失や変異が CYP21B 遺伝子に発生し、酵素活性が失活または減少することにより発病する<sup>2)</sup>。

本症の責任遺伝子の起源と進化過程の解明には、様々な人種の変異パターンを解析することが重要であるが、最近になって、国別ではあるが患者における変異 allele 頻度が明らかにされつつある<sup>3-8)</sup>。今回、タイとペルーの 21-OHD 患者家系の遺伝子診断を行う機会が得られ、変異パターン等を諸外国の患者家系と比較したので報告する。

#### 2. 対象と方法

##### 2-1 対 象

札幌市で受け入れている JICA 研修 (新生児マス・スクリーニングコース<sup>9)</sup>) の研修生のうち、CYP21B 遺伝子診断について協力の得られたタイとペルーの小児科医に乾燥る紙血検体の供与を依頼した。遺伝子解析を実施する旨のインフォームド・コンセントの得られたタイ人患者 27 家系、ペルー人患者 30 家系を対象とした。

##### 2-2 変異等の同定

PCR で用いるプライマーの塩基配列等を表 1, 図 1 に、各変異の有無を判定する方法等は表 2 に示す。

##### (1) PCR-RFLP 法

病因変異のうち、P30L (Pro-30 to Leu in exon1), nt656G (A or C at 656bp to G in intron2), I172N (Ile-172 to Asn in exon4), V281L (Val-281 to Leu in

\*1 札幌市保健福祉局生活衛生部

\*2 北海道大学医学部小児科

表 1-1 PCR に用いるプライマーの塩基配列 (PCR-RFLP 法)

変異等	プライマー (タイプ)	領域 (bp)	塩基配列
P30L	A (forward)	64 ~ 554	5'-TGG AAG CTC CGG AGC CTC CAC CTC g-3'
	B (reverse)		5'-GCT TCC AGG GAC CT---G GAT TGG GGA T-3'
nt656G	C (forward)	524 ~ 681	5'-TGG GGC ATC CCC AAT CCA GGT C C C T-3'
	D (reverse)		5'-AGA CAC CAG CTT GTC TGC AGG AGG c-3'
I172N	E (forward)	974 ~ 1134	5'-TTC TCT CTC CTC ACC TGC AGC ATC g-3'
	F (reverse)		5'-GCA TTA AGT TGT CGT CCT GCC AGA-3'
V281L Q318X R356W	G (forward)	1373 ~ 2133	5'-GAT CAC ATC GTG GAG ATG CAG CTG-3'
	H (reverse)		5'-GGC AAG GCT AAG GGC ACA ACG Ga-3'
del or conv	I (forward)	-813 ~ -791	5'-CTC AAA CCA GCT CAA GGT GGG CT-3'
	J (reverse)	-158 ~ -180	5'-AGT CTC ATT GGC CTT GGG ACG TC-3'

注 1 プライマー B, C, F と G 中の下線付き太字で示す塩基は, CYP21B 遺伝子特異塩基である。

注 2 プライマー A, D と H の 3' 末端にある小文字で示す塩基は, 遺伝子中に存在しないミスマッチ塩基である。

表 1-2 PCR に用いるプライマーの塩基配列 (PCR-ASO 法)

変異等	プライマー (タイプ)	領域 (bp)	塩基配列
Cluster	K (forward)	696 ~ 715	5'-CCT GTC CTT GGG AGA CTA CT-3'
	L (ASO-wild)	1393 ~ 1370	5'-CTG CAT CTC CAC GAT GTG ATC CCT-3'
	M (ASO-mutant)	1393 ~ 1370	5'-CTG CTT CTC CTC GTT GTG ATC CCT-3'
L307+T (1st PCR)	K (forward)	696 ~ 715	省略
	N (reverse)	2905 ~ 2886	5'-TCT CGC ACC CCA GTA TGA CT-3'
L307+T (Nested PCR)	K (forward)	696 ~ 715	省略
	O (ASO-wild)	1771 ~ 1755	5'-TGG TGA AGC AAA AAA AC-3'
	P (ASO-mutant)	1772 ~ 1756	5'-GTG GTG AAG CAA AAA AAA-3'
	Q (control)	2756 ~ 2737	5'-GAG CAA TAA AGG AGA AAC TG-3'

注 1 プライマー B, C, F と G 中の下線付き太字で示す塩基は, CYP21B 遺伝子特異塩基である。

注 2 プライマー K と L によって Cluster 変異部位の正常バンドが増幅され, K と M によって変異バンドが増幅される。

注 3 プライマー K と N によって CYP21B 遺伝子の exon3 から exon10 の領域が増幅される。これを 10 倍希釈して Nested PCR の鋳型とする。

注 4 プライマー K, O と Q によって L307+T 変異部位の正常バンドとコントロールバンドが増幅され, K, P と Q によって変異バンドとコントロールバンドが増幅される。

表 1-3 PCR に用いるプライマーの塩基配列 (Nested PCR 法)

変異等	プライマー (タイプ)	領域 (bp)	塩基配列
8bp-del (1st PCR)	R (forward)	-416 ~ -397	5'-TTC AGG CGA TTC AGG AAG GC-3'
	S (reverse)	1399 ~ 1375	5'-CCT CAG CTG CAT CTC CAC GAT GTG A-3'
8bp-del (Nested PCR)	T (forward)	684 ~ 701	5'-GAA CTA CCC GGA CCT GTC-3'
	U (reverse)	801 ~ 782	5'-CTG CTC CAC CAC TGG CTC CA-3'

注 1 プライマー B, C, F と G 中の下線付き太字で示す塩基は, CYP21B 遺伝子特異塩基である。

注 2 プライマー R と S で CYP21B 遺伝子の exon1 から exon6 の領域が増幅される。これを 10 倍希釈して Nested PCR の鋳型とする。

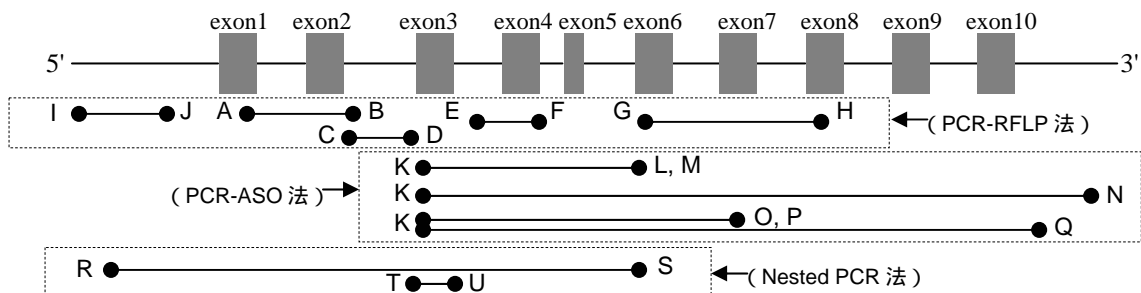


図 1 PCR に用いるプライマーと増幅領域

注 はプライマーを示す。点線四角で囲んだプライマーセットで増幅されるフラグメントに関しては, 本文と表 1 を参照のこと。

exon7), Q318X ( Gln-318 to term in exon8 ), R356W ( Arg-356 to Trp in exon8 ) の 6 変異については従来法<sup>10)</sup>, すなわち CYP21B 遺伝子中の変異部位を含む領域を PCR 増幅した後に制限酵素反応を行い, バンドの切断の可否により変異の有無を検出する方法 ( RFLP: restriction fragment-length polymorphism ) で同定した。

また, CYP21B 遺伝子内の deletion または conversion ( 以下 del or conv とする ) については, CYP21A と CYP21B 遺伝子のプロモーター領域を競合 PCR で増幅した後, 制限酵素 Taq I で CYP21B 由来を 582bp に, CYP21A 由来を 530bp に切断し, 各バンドの強度比を算出する方法<sup>11)</sup>で検出した。

### (2) PCR-ASO 法

cluster 変異<sup>4)</sup> ( Ile-236 to Asn, Val-237 to Glu, Met-239 to Lys in exon6 ) については, CYP21B 遺伝子中の同変異部位の変異型と野生型それぞれに特異的なプライマー<sup>12)</sup> ( ASO: allele specific oligonucleotide ) を用いて PCR 増幅し, 変異の有無を増幅の可否で確認する方法で同定した<sup>13)</sup>。

また, L307+T 変異<sup>14)</sup> ( T insertion to Leu-307 in exon7 ) については, 予め CYP21B 遺伝子の同変異を含む領域を 1stPCR で増幅し, さらに増幅した DNA フラグメントを ASO で PCR 増幅 ( Nested PCR ) して同定した<sup>13)</sup>。

### (3) Nested PCR 法

8bp-del<sup>14)</sup> ( 8bps deletion in exon3 ) は, CYP21A 遺伝子の exon3 で見られる 8 塩基欠失が CYP21B 遺伝子に導入された変異である。したがって, まず CYP21B を 1stPCR で選択的に増幅し, Nested PCR 増幅するとバンド長に 8 塩基の差ができることで同定した<sup>15)</sup>。

### 2-3 遺伝子型の分類

同定された変異等を酵素障害の大きい順に, 完全欠損のグループ Null ( del or conv, 8bp-del, cluster, L307+T, Q318X, R356W ), ほぼ欠損のグループ A ( nt656G ), 以下, 残存活性が 2-10% のグループ B ( I172N ), 残存活性が 25-75% のグループ C ( P30L, V281L ) と分類した。次に, 病因 allele の組み合わせから成る遺伝子型を酵素障害の度合いの大きい

表 2 判定方法

変異等	検出方法	制限酵素	増幅長 ( bp )	検出バンド		
				変異 ( - )	変異 ( + )	変異 ( - / + )
del or conv	PCR-RFLP	Taq I	656	( 582:530=1:1 )	( 582:530=0:1 )	( 582:530=1:2~3 )
P30L	PCR-RFLP	Hha I	491	464, 27	491	491, 464, 27
nt656G	PCR-RFLP	Hha I	158	158	134, 24	158, 134, 24
8bp-del	Nested PCR	-	118 110	118	110	118, 110
I172N	PCR-RFLP	Taq I	161	161	138, 23	161, 138, 23
cluster	PCR-ASO	-	698	ASO-wild ( + )	ASO-mutant ( + )	左両方 ( + )
V281L	PCR-RFLP	ApaI	761	375, 311, 75	686, 75	686, 375, 311, 75
L307+T	PCR-ASO	-	1078 2064	ASO-wild ( + )	ASO-mutant ( + )	左両方 ( + )
Q318X	PCR-RFLP	Pst I	761	298, 204, 138, 121	436, 204, 121	436, 298, 204, 138, 121
R356W	PCR-RFLP	Pvu II Cpo I	761	543, 173, 24	543, 197	543, 197, 173, 24

注 1 30bp 以下のバンドは, 4% アガロースゲルで 100V-40min 電気泳動すると判別不能となる。

注 2 del or conv の同定は, 582:530=CYP21B:CYP21A によって判定する。

注 3 cluster 変異と L307+T 変異の同定は, 正常 allele 検出用 ASO セットと変異 allele 検出用 ASO セットでそれぞれ増幅するバンドの有無で判定する。

注 4 R356W 変異の同定は, 正常バンドと変異バンドともに Pvu II で 761bp のバンドを切断して 543bp にした後, Cpo I で判定する。

順に, I 群 ( Null / Null ), II 群 ( A / Null , A / A ), III 群 ( B / Null , B / A , B / B ), IV 群 ( C / Null , C / A , C / B , C / C ) と分類した。

#### 2-4 病型

21-OHD の病型診断は, 臨床症状や ACTH 負荷試験等の成績によって総合的に判断して確定するが, 重症度順に塩喪失症状を呈する重症例の患者を塩喪失型 ( Salt-wasting : SW ), 外性器に男性化症状の見られる例を単純男性化型 ( Simple-virilizing : SV ), そして症状の発現が遅れるものを含めて比較的軽微な非古典型 ( Non-classical : NC ) とした。

表 3-1 患者家系解析結果 ( タイ )

No.	病型	遺伝子型( paternal / maternal )	群
1	SW	del or conv / del or conv	I
2	SW	del or conv / del or conv	I
3	SW	del or conv / del or conv	I
4	SW	8bp-del / nt656G	II
5	SW	nt656G / del or conv	II
6	SW	del or conv / nt656G	II
7	SW	nt656G / del or conv	II
8	SW	nt656G / nt656G	II
9	SW	nt656G / nt656G	II
10	SW	nt656G / nt656G	II
11	SW	nt656G / nt656G	II
12	SW	nt656G / nt656G	II
13	SW	nt656G / L307+T	II
14	SV	nt656G / nt656G	II
15	NC	nt656G / nt656G	II
16	NC	nt656G / nt656G	II
17	SV	I172N / nt656G	III
18	SV	I172N / del or conv	III
19	SV	del or conv / I172N	III
*20	SW	ND / nt656G	-
*21	SV	ND (del or conv) / nt656G	-
**22	SW	ND (del or conv / del or conv)	-
**23	SV	ND (del or conv / del or conv)	-
**24	SV	ND (del or conv / del or conv)	-
**25	SV	ND (del or conv / del or conv)	-
**26	SW	ND	-
**27	SV	ND	-

注1 No.22~25 は, CYP21A 遺伝子の del or conv のホモ接合体, No.21 はヘテロ接合体と予想された。

注2 No.26 では, 検体の劣化により, すべての PCR で産物が得られなかった。

注3 No.27 は外性器異常が主訴の鑑別診断依頼であった。

注4 \*のついた No. は一方の変異 allele のみ同定され, \*\*のついた No. はいずれの変異 allele も同定されなかった。

### 3. 結果

#### 3-1 病因 allele の同定

タイでは ( 表 3-1 ), 患者 27 例中 21 例 ( 77.8% ) でいずれかの病因 allele が同定された。患者の遺伝子型が同定できたのは 19 例 ( 70.4% ) で, 2 例 ( No. 20, 21 ) では片方の病因 allele のみが同定された。いずれの変異等も検出されなかった 6 例の内訳は, 試料の劣化による DNA 抽出不良が 1 例 ( No. 26 ), 21-OHD の診断が未確定であるものが 1 例 ( No. 27 ), そして, 発症のメカニズムは不明であるが偽遺伝子 CYP21A に del or conv が存在すると考えられたものが 4 例 ( No. 22~25 ) であった。

表 3-2 患者家系解析結果 ( ペルー )

No.	病型	遺伝子型( paternal / maternal )	群
1	SW	del or conv / 8bp-del	I
2	SW	L307+T / del or conv	I
3	SW	del or conv / Q318X	I
4	SW	del or conv / del or conv	I
5	SW	del or conv / L307+T	I
6	SW	del or conv / R356W	I
7	SV	del or conv / del or conv	I
8	SV	del or conv / del or conv	I
9	SW	nt656G / nt656G	II
10	SW	del or conv / nt656G	II
11	SW	nt656G / del or conv	II
12	SW	del or conv / nt656G	II
13	SV	nt656G / nt656G	II
14	SV	nt656G / del or conv	II
15	SV	P30L / R356W	IV
*16	SW	ND / V281L+Q318X+R356W	-
*17	SW	ND / nt656G	-
*18	SV	ND / nt656G+V281L	-
*19	SV	ND / del or conv	-
*20	SW	del or conv / ND	-
*21	SW	ND / I172N	-
**22	SW	ND	-
**23	SV	ND	-
**24	SV	ND	-
**25	SV	ND	-
**26	SW	ND	-
**27	SW	ND	-
**28	SV	ND	-
**29	SV	ND	-
**30	SV	ND	-

注1 No.22~30 は塩類喪失が外性器異常が主訴の鑑別診断依頼であった。

注2 \*のついた No. は一方の変異 allele のみ同定され, \*\*のついた No. はいずれの変異 allele も同定されなかった。

ペルーでは(表 3-2), 患者 21 例中 30 例(70%)  
でいずれかの病因 allele が同定された。半数の 15/30  
家系で患者の遺伝子型が同定され, 6 例(No. 16~21)  
では片方の病因 allele のみ同定された。いずれの変  
異等も検出されなかった 9 例(No. 22~30)は,  
21-OHD の診断が未確定の患者であった。

### 3-2 遺伝子型の同定

同定された遺伝子型の内訳は, タイでは患者 19  
例中 del or conv のホモ接合体が 3 例(15.8%), nt656G  
のホモ接合体が 8 例(42.1%), その他 8 例はヘテロ  
複合体で, nt656G / del or conv が 3 例(15.8%),  
nt656G / 8bp-del が 1 例(5.3%), nt656G / L307+T が  
1 例(5.3%), I172N / del or conv が 2 例(10.5%),  
I172N / nt656G が 1 例(5.3%)であった(表 3-1)。

ペルーでは患者 15 例中 del or conv のホモ接合体  
が 3 例(20%), nt656G のホモ接合体が 2 例(13.3%),  
del or conv / 8bp-del が 1 例(6.7%), del or conv /  
L307+T が 2 例(13.3%), del or conv / Q318X が 1 例  
(6.7%), del or conv / R356W が 1 例(6.7%), nt656G

/ del or conv が 4 例(26.7%), P30L / R356W が 1 例  
(6.7%)であった(表 3-2)。

### 3-3 変異 allele パターン(表 4)

タイの患者で変異等が同定された 40 allele の内訳  
は, del or conv が 11(27.5%), nt656G が 24(60%),  
I172N が 3(7.5%), 8bp-del と L307+T が 1(2.5%)  
であった。

ペルーの患者で変異等が同定された 36 allele の内  
訳は, del or conv が 17(47.2%), nt656G が 9(25%),  
L307+T が 2(5.6%), R356W が 2(5.6%)その他 P30L,  
8bp-del, I172N, Q318X, nt656G + V281L, V281L  
+ Q318X + R356W がそれぞれ 1(2.8%)であった。

### 3-4 遺伝子型と病型の相関

遺伝子型の群と病型の相関を見ると, タイは I 群  
が 3 例(SW: 3 例), II 群が 13 例(SW: 10 例, SV:  
1 例, NC: 2 例), III 群が 3 例(SV: 3 例)であっ  
た(表 5-1)。ペルーは I 群が 8 例(SW: 6 例, SV:  
2 例), II 群が 6 例(SW: 4 例, SV: 2 例), IV 群  
が 1 例(SV: 1 例)であった(表 5-2)。

表 4 変異 allele 検出頻度

グループ	21-水酸化酵素の 残存活性	変異 allele	同定数(頻度%)	
			タイ	ペルー
Null	0%	del or conv	11 (27.5%)	17 (47.2%)
		8bp-del	1 (2.5%)	1 (2.8%)
		L307+T	1 (2.5%)	2 (5.6%)
		Q318X	-	1 (2.8%)
		R356W	-	2 (5.6%)
		Cluster	-	-
		V281L+Q318X+R356W	-	1 (2.8%)
A	~5%	nt656G	24 (60.0%)	9 (25.0%)
		nt656G+V281L	-	1 (2.8%)
B	2~10%	I172N	3 (7.5%)	1 (2.8%)
C	25~75%	P30L	-	1 (2.8%)
		V281L	-	-
合計			40 (100%)	36 (100%)

注 1 表中の 21-水酸化酵素の残存活性は, 複数のグループの報告を参考にした。

表 5-1 病型と遺伝子型群別の相関(タイ)

群	I	II	III	IV	合計
SW	3	10	-	-	13
SV	-	1	3	-	4
NC	-	2	-	-	2
合計	3	13	3	-	19

表 5-2 病型と遺伝子型群別の相関(ペルー)

群	I	II	III	IV	合計
SW	6	4	-	-	10
SV	2	2	-	1	5
NC	-	-	-	-	-
合計	8	6	-	1	15

#### 4. 考 察

病因 allele の検出率は、タイで 77.8%、ペルーで 63.3%であった。これは 21-OHD の診断が未確定で、遺伝子解析による診断確定が必要であった例を多数含むためである。病因 allele が同定されなかった患者のうち、タイで 6 例すべて、ペルーで 9 例中 6 例が SV 型であり、外性器男性化を示す他の疾患の可能性が高い。また、検索を行わなかった変異や新規の変異が存在する可能性は、これらが非常に稀な変異であるため考えにくい。したがって、改めて診断を確認することと、Direct-sequence 法<sup>16)</sup>等による新規の変異等の搜索が必要であると考えられた。

検出された変異等の特徴について、著者らの日本における患者 130 家系の解析結果(未報告)およびスウェーデンのグループ<sup>3)</sup>を例に比較すると、タイ人患者で nt656G 変異が 60.0%と、日本の 37.3%およびスウェーデンの 30.4%に比べてかなり高頻度に検出された。本変異が世界でも類を見ない発生頻度を示す Yupic Eskimo (1/282 人)でよく見られる<sup>17)</sup>ため、タイの民族でも元来 nt656G が 21-OHD の Hot spot であることが示唆された。同変異は in vitro で予測した残存活性とは異なり、すべての病型で同定される変異<sup>18)</sup>であることから、淘汰されずに現在まで受け継がれたとも考えられる。一方、ペルー人患者では del or conv が日本の 21.9%およびスウェーデンの 32.1%に比べて 47.2%という高頻度で検出された。同じ南米のブラジル(11.0%)とチリ(7.9%)のグループ<sup>19)20)</sup>では頻度が低いことから、ペルーに住む民族の起源が彼らと異なるか、del or conv が Hot spot (45%)である英国人<sup>21)</sup>らの移民によって導入されたことも考えられた。

遺伝子型は、予め同定されれば患者の病型が予測できるため、治療指針を決定する上で重要な要素となる。ペルーの患者で、重症が予想される I 群のうち 2 例が SV 型を示した他は、遺伝子型から予想される病型と実際の病型とで大きく解離する症例はなかった。実際の応用例としては、例えば発見後た

だちに SW 型が予想された場合にフロリネフ投与を開始したり、NC 型が予想された場合に治療開始を遅らせたりすることも視野に入れて患者を観察できるのではないかと考えられる。患者の遺伝子型を早い段階で同定することは、患者の治療方針を決定する上で有用と考えられる。

#### 5. 結 語

今回、タイとペルーの 21-OHD 患者家系について CYP21B 遺伝子解析を行ったところ、症例数は少ないが、日本人や白人家系とは大きく異なる変異パターンを示した。また、遺伝子型から予想される病型と実際の病型はよく一致しており、治療方針を決定する上で、早期の遺伝子型同定は有用と考えられた。今後、両国とも依頼数の増加が予想され、さらに解析法の改良と対象国の追加により、本症遺伝子の起源と進化過程の解明の糸口となることが期待される。

#### 6. 文 献

- 1) White PC, New MI, Dupont B : Congenital adrenal hyperplasia. N Engl J Med, 316, 1519-1524 and 1580-1586, 1987.
- 2) Higashi Y, Yoshida H, Yamane M, et al : Complete nucleotide sequence of two steroid 21-hydroxylase genes tandemly arranged in human chromosome: a pseudogene and a genuine gene. Proc Natl Acad Sci USA, 83, 2841-2845, 1986.
- 3) Wedell A, Thilén A, Ritzén EM, et al : Mutational spectrum of the steroid 21-hydroxylase gene in Sweden: Implications for genetic diagnosis and association with disease manifestation. J Clin Endocrinol Metab, 78, 1145-1152, 1994.
- 4) Speiser PW, Dupont J, Zhu D, et al : Disease expression and molecular genotype in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. J Clin Invest, 90, 584-595, 1992.
- 5) Krone N, Roscher AA, Schwarz HP, et al :

- Comprehensive analytical strategy for mutation screening in 21-hydroxylase deficiency. *Clin Chem*, 44, 2075-2082, 1998.
- 6) Krone N, Braun A, Roscher AA, et al : Predicting phenotype in steroid 21-hydroxylase deficiency? Comprehensive genotyping in 155 unrelated, well defined patients from southern Germany. *J Clin Endocrinol Metab*, 85, 1059-1065, 2000.
  - 7) Kapelari K, Ghanaati Z, Wollmann H, et al : A rapid screening for steroid 21-hydroxylase mutations in patients with congenital adrenal hyperplasia. Mutations in brief no. 247. Online. *Hum Mutat*, 13, 505, 1999.
  - 8) Lobato MN, Ordonez-Sanchez ML, Tusie-Luna MT, et al : Mutation analysis in patients with congenital adrenal hyperplasia in the Spanish population: identification of putative novel steroid 21-hydroxylase deficiency alleles associated with the classic form of the disease. *Hum Hered*, 49, 169-175, 1999.
  - 9) Fukushi M, Hanai J, Mikami A, et al : Vatcharangkul P, Muttamara S, ed, Neonatal screening in the 21<sup>st</sup> century, p87, First offset (1993) Co.,LTD. Bangkok, Thailand, 1998.
  - 10) 三上 篤, 福士 勝, 藤田晃三, 他 : 迅速 DNA 診断法を用いた点変異検索による 21-水酸化酵素欠損症の発生頻度. *日本マススクリーニング学会誌*, 10, 2000, in press.
  - 11) Siegel SF, Lee PA, Rudert WA, et al : Phenotype / Genotype correlations in 21-hydroxylase deficiency. *Adolesc Pediatr Gynecol*, 8, 9-16, 1995.
  - 12) Owerbach D, Sherman L, Ballard AL, et al : Pro-453 to Ser mutation in CYP21 is associated with nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency. *Mol Endocrinol*, 6, 1211-1215, 1992.
  - 13) Wedell A, Luthman H : Steroid 21-hydroxylase deficiency: two additional mutations in salt-wasting disease and rapid screening of disease-causing mutations. *Hum Mol Genet*, 2, 499-504, 1993.
  - 14) Higashi Y, Tanae A, Inoue H, et al : Evidence for frequent gene conversion in the steroid 21-hydroxylase P-450 (C21) gene: Implications for steroid 21-hydroxylase deficiency. *Am J Hum Genet*, 42, 17-25, 1988.
  - 15) Oriola J, Plensa I, Machuca I, et al : Rapid screening method for detecting mutations in the 21-hydroxylase gene. *Clin Chem*, 43, 557-561, 1997.
  - 16) Tajima T, Fujieda K, Nakae J, et al : Molecular basis of nonclassical steroid 21-hydroxylase deficiency detected by neonatal mass screening in Japan. *J Clin Endocrinol Metab*, 82, 2350-2356, 1997.
  - 17) Speiser PW, New MI, Tannin GM, et al : Genotype of Yupic Eskimos with congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *Hum Genet*, 88, 647-648, 1992.
  - 18) Witchel SF, Bhamidipati DK, Hoffman EP, et al : Phenotypic heterogeneity associated with the splicing mutation in congenital adrenal hyperplasia due to 21-hydroxylase deficiency. *J Clin Endocrinol Metab*, 81, 4081-4088, 1996.
  - 19) Bachege TA, Billerbeck AE, Madureira G, et al : 21-Hydroxylase deficiency in Brazil. *Braz J Med Biol Res*, 33, 1211-1216, 2000.
  - 20) Fardella CE, Poggi H, Soto J, et al : Mutations in the CYP21B gene in a Chilean population with simple virilizing congenital adrenal hyperplasia. *J Endocrinol Invest*, 23, 412-416, 2000.
  - 21) Lako M, Ramsden S, Campbell RD, et al : Mutation screening in British 21-hydroxylase deficiency families and development of novel microsatellite based approaches to prenatal diagnosis. *J Med Genet*, 36, 119-124, 1999.

**Genetic Diagnosis for 21-Hydroxylase Deficiency  
by Convenient Gene Analysis  
~ Diagnosis of the CYP21B Gene in Thai and Peruvian Patients ~**

Atsushi Mikami, Masumi Tagawa, Yoshikiyo Mizushima, Yuji Sato, Kozo Fujita,  
Masaru Fukushi <sup>\*1</sup>, Toshihiro Tajima <sup>\*2</sup> and Kenji Fujieda <sup>\*2</sup>

Molecular diagnosis was carried out in 27 Thai and 30 Peruvian families affected by 21-hydroxylase deficiency using convenient gene analysis based on polymerase chain reaction. The responsible mutations were characterized in chromosomes of 21 (77.8%) Thai and 21 (70%) Peruvian patients. The genotypes were also determined in 19 (70.4%) and 15 (50%) of Thai and Peruvian patients, respectively. The clinical manifestations of those cases were well correlated between their disease severity predicted by genotypes and phenotypes of 21-hydroxylase deficiency. The most prevalent impairment was nt656G mutation in Thai patients (60%; 24 of 40 chromosomes characterized), and deletion or large gene conversion in Peruvian patients (47.2%; 17 of 36). The mutation spectrum of each group showed distinctive patterns, and differed from those of other nations reported. This suggests that the origin or the evolution of the CYP21B gene obviously varies among races.

---

\* 1 Department of Public Sanitation, Health and Welfare Bureau of Sapporo City

\* 2 Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine