

日本人 Wilson 病のハプロタイプ解析

山口 昭弘

札幌市衛生研究所 (主任 菊地由生子 所長)

札幌医科大学医学部病理学第1講座 (主任 菊地浩吉 教授)

松浦 晃洋

札幌医科大学医学部病理学第1講座

(主任 菊地浩吉 教授)

荒島 真一郎

北海道大学医学部小児科学講座

北海道教育大学小児保健学講座

Haplotype Studies in Japanese Patients with Wilson Disease

Akihiro YAMAGUCHI

Sapporo City Institute of Public Health

(Chief: Dr. Y. KIKUCHI)

First Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

Akihiro MATSUURA

First Department of Pathology, Sapporo Medical University School of Medicine

(Chief: Prof. K. KIKUCHI)

Shinichiro ARASHIMA

Department of Pediatrics, Hokkaido University School of Medicine

Department of Child Health and Developmental Genetics,

Hokkaido University School of Education

ABSTRACT Chromosomal haplotypes of six Japanese families with Wilson Disease (WND) were investigated with short tandem repeat (STR) polymorphisms at loci; D13S314, D13S301 and D13S316. These markers had previously been established in northern European families and are all highly polymorphic and informative for the presymptomatic diagnosis for Japanese WND families as well. No statistically significant deviations in allele distributions between the normal and WND chromosomes were observed for either marker locus. However, two common haplotypes (combination of marker loci), D13S314-D13S301-D13S316: 11-2-7 and 11-3-7, were each more frequently observed in 4 out of 12 WND chromosomes. We then examined partial sequences of ATP7B (WND) gene where 41 disease-causing mutations were previously identified mainly in European populations. Two missense mutations, R779L and N1271S, were respectively identified in 1 out of 12 and 2 out of 12 Japanese WND chromosomes. (Received December 20, 1996 and accepted January 16, 1997)

Key words: Wilson disease, Haplotype, Short tandem repeat, Family analysis, Presymptomatic diagnosis

1 緒 言

Wilson 病 (WND) は常染色体劣性遺伝型式の先天性銅代謝異常症である。本症における肝・神経障害などの臨床症状は、一次的には肝における銅の過剰蓄積に起因し、肝の銅プールが閾値を超えた後、脳をはじめ他の組織へも銅蓄積が起こる結果と考えられている。最近、銅ホメオスタシスに関係する二つの遺伝子；WND 遺伝子 (ATP7B)¹⁻³⁾ と Menkes 病 遺 伝 子 (ATP7A)^{4,5)} が相次いで同定されたことを受け、生体内銅代謝に関する注目が高まっている。これらの遺伝子産物は、細胞膜を貫通して存在し銅の膜透過に重要な働きを持つ P-type ATPase であると予想されている^{6,7)}。銅ホメオスタシスは、銅の腸管吸収と胆汁への排泄のバランスの上に成り立つが、ATP7A タンパクは食事性銅の腸管吸収に、一方、ATP7B タンパクは肝細胞から毛細胆管への過剰銅の排泄にそれぞれ必須の酵素であることが、疾患との関係から推測されている。

WND 家系のハプロタイプ解析については、染色体上の CA ジヌクレオチドの繰り返し数の違いを検出する STR (short tandem repeat, 方法を参照) 多型を用いて、欧米人を中心に、患者の発症前診断あるいは保因者診断への有用性が報告されている^{8,9)}。また、ATP7B に極めて近傍の STR マーカーを用いた場合、ハプロタイプと遺伝子変異の関係についても、ある程度の情報が得られることが示唆されていた¹⁰⁻¹²⁾。ここ数年の間に、北欧、地中海沿岸、中東、南アジアおよ

び中国人の WND 家系について、ATP7B の塩基配列解析が進められた結果、現在のところ 40 種類の遺伝子変異が報告され、ハプロタイプと遺伝子変異の関係についても関連性が見い出されている¹³⁻¹⁶⁾。

一方、日本人 WND の遺伝子解析については、系統的な研究はなく、RNA のスプライシング異常 1 種類が報告されているに過ぎない¹⁷⁾。我々は、簡便・迅速に信頼性の高い結果が得られる蛍光オートシーケンサを用いる方法を開発し、日本人 WND の STR ハプロタイプ解析および ATP7B の直接塩基配列解析を行い有意義な結果を得たので報告する。

2 実験方法

2.1 WND 家系

日本人 WND6 家系 7 名の患者 (同胞例 1 例) とその家族 17 名の末梢血 DNA を試料とした。これらの家系はいずれも調べた範囲では血縁関係がなく、患者はすべて、Kaiser-Fleischer リングの存在などの臨床症状、および血中銅・セルロプラスミン、尿中銅、あるいは肝銅含量などの生化学データから WND と診断されている。

2.2 STR 多型解析

STR 多型 (STRP) の原理は、染色体上の CA、GT ジヌクレオチドなどの繰り返し数の違いを検出するもので、繰り返し領域を PCR により増幅後、変性ポリアクリルアミド電気泳動によりバンドサイズを測定し、対応するアレルを決定する。最も一般的に用いられて

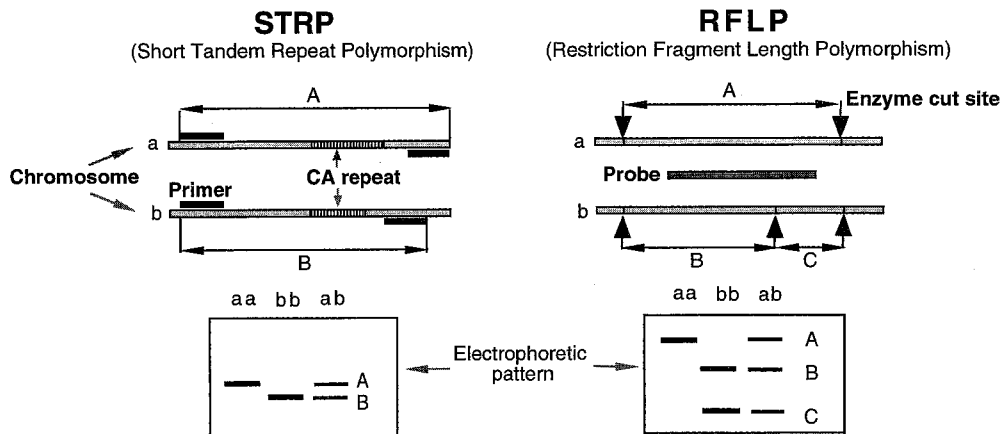


Fig. 1 Comparison of the principle between STRP (short tandem repeat polymorphism) and RFLP (restriction fragment length polymorphism). The difference of the number of CA dinucleotide repeat detecting by PCR amplification provides various alleles in STRP, while only two alleles, presence or absence of enzyme cut site, are usually identified in RFLP based on southern blot technique.

きた制限酵素切断片多型 (RFLP) が、通常、切断部位の有無による 2 種類の多型でしかないのに対して、STRP では、繰り返し数の差が、幾通りも存在することから、一般的に 10 種類近い多型が得られるのが特徴である (Fig. 1). 今回の多型検出に用いた STR マーカーを Table 1 に示したが、これらはいずれも ATP7B 近傍に位置する CA ジヌクレオチドの繰り返し数の違いによる多型を検出するものである^{11,12)}. STR 多型の検出には、従来、ラジオアイソトープが用いられて来たが、我々は、より簡便・迅速な方法として蛍光オートシーケンサを用い、以下の条件により行なった。各マーカー検出用の PCR プライマーの塩基配列は Petrukhin *et al.*¹³⁾ および Thomas *et al.*¹¹⁾ が報告したものと同一とし、片方のプライマーの 5' 端を蛍光色素; Texas Red で標識したものを用いた (グライナー・ジャパン, 東京). PCR は、TaqDNA polymerase; 1 unit および $\times 1$ 添付緩衝液 (ファルマシア・ジャパン, 東京), dATP, dCTP, dGTP および TTP 各 4 nmole, 標識および非標識プライマー; 各 2 pmole, テンプレート DNA; 50 ng を含む 20 μ l の反応液を調整し、GeneAmp9600system (パーキンエルマー・ジャパン, 東京) により、温度プログラム; [94°C-5 分] $\times 1$ サイクル \rightarrow [94°C-30 秒/55°C-30 秒/72°C-30 秒] $\times 30$ サイクル \rightarrow [72°C-5 分] $\times 1$ サイクルの条件で行なった。反応産物を蛍光オートシーケンサ SQ5500 (日立エンジニアリング, 東京) により分析し、同時に流した ssM13mp8 のシーケンシングラダー (Texas Red サイクルシーケンシングキット, アマシャム・ジャパン, 東京) との比較から増幅バンドサイズを決定した。

2.3 ATP7B 遺伝子変異の検出

ATP7B の 21 エクソンについて、エクソン/イントロン境界を含め、Petrukhin *et al.*¹²⁾ および Thomas *et al.*¹³⁾ の報告した条件に従い、PCR により増幅した。この PCR 産物を Suprec02 スピニングカラム (宝酒造, 東京) により精製後、各エクソンごとの Texas Red 標識シーケンシングプライマーおよび Thermo Sequenase シーケンシングキット (アマシャム・ジャパン, 東京) を用いてサイクルシーケンシング反応を行なった。反応産物は、蛍光オートシーケンサ SQ5500 により塩基配列を決定し、これまでに報告されている 41 の責任遺伝子変異の候補につき、その有無を調べた。

3 結 果

3.1 STR 多型の検出

STR 多型の典型的な検出例を Fig. 2 に示した。各目

Table 1 Allele-size definitions and distributions of STR markers in Japanese WND families.

Marker	Band size (bp)	No. of Chromosomes		
		Allele	Normal	WND
D13S314 Thomas <i>et al.</i> ¹¹⁾	152	6.5 ^a	0	1
	151	7	0	0
	150	7.5 ^a	3	1
	149	8	0	0
	148	8.5 ^a	2	1
	147	9	1	0
	145	10	0	0
	143	10.5 ^a	1	1
	141	11	5	8
	D13S301 Petrukhin <i>et al.</i> ³⁾	156	-1 ^a	1
154		0 ^a	1	0
152		1	0	1
150		2	3	5
148		3	1	4
146		4	1	1
144		5	5	0
142		6	0	1
140	7	0	0	
D13S316 Thomas <i>et al.</i> ¹¹⁾	149	4	4	1
	147	5	0	0
	145	5.5	2	0
	144	6	0	0
	142	7	5	11
	140	8	0	0
	138	9	0	0
136	10 ^a	1	0	

^a Alleles newly identified in this study

的バンドは短い方に 2 bp ごとのゴーストバンドを伴うものの明確に同定でき、アレル番号に対応したバンドサイズは、ssM13mp8 のラダーパターンとの比較から厳密に決定できた。当初、予備実験として他の STR マーカー; D13S118, D13S227, D13S228, D13S137 および D13S119 を用いて、多型解析を試みた場合には、いくつかの組み換え現象を認めたが (データ未掲載)、ここで用いた 3 種の STR マーカー; D13S314, D13S301 および D13S316 は ATP7B の極めて近傍に位置することから、組み換えは全く認められなかった (Fig. 3)。また、日本人には、いずれのマーカーにおいても、欧米人においては報告されていない、いくつかの新たなアレルが認められた (Table 1)。STR 多型ハプロタイプ解析による家系解析は、得られる多型情報の豊富さから信頼性の高い発症前診断あるいは保因者診断

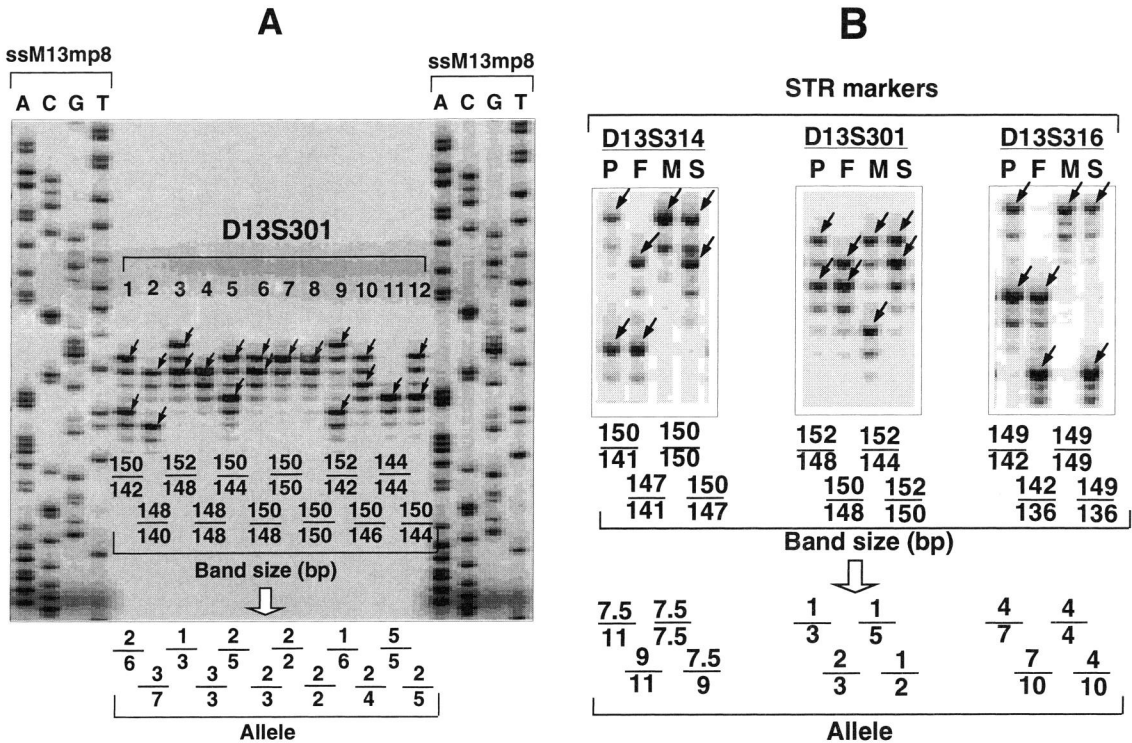


Fig. 2 Detection of short tandem repeat (STR) polymorphisms from 12 individuals (A). The target bands are indicated by arrows and their sizes and corresponding allele numbers are determined by the comparison of sequencing ladders of ssM13mp8. STR polymorphisms in the family 2 (Fig. 3) are shown (B); “P”, “F”, “M” and “S” represents “patient”, “father”, “mother” and “sister”, respectively. Experimental conditions are described in the text.

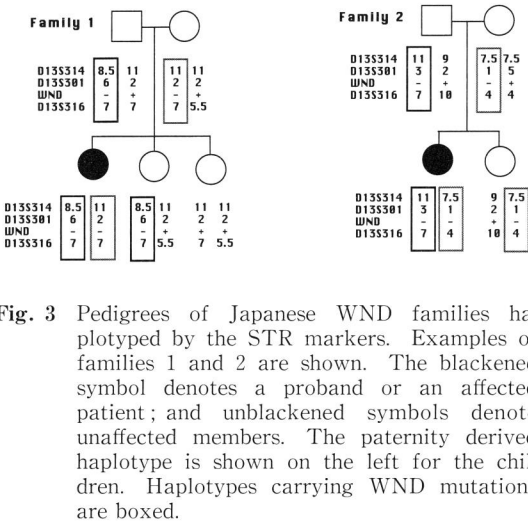


Fig. 3 Pedigrees of Japanese WND families haplotyped by the STR markers. Examples of families 1 and 2 are shown. The blackened symbol denotes a proband or an affected patient; and unblackened symbols denote unaffected members. The paternity derived haplotype is shown on the left for the children. Haplotypes carrying WND mutations are boxed.

親由来の WND 遺伝子を持つが、母親由来の遺伝子は正常なヘテロ保因者であることがわかる。これに対して、一番下の妹のハプロタイプは 11-2-7/11-2-5.5 であり両方とも正常の遺伝子を受け継いでいることがわかる (Fig. 3)。同様に、家系 2 の場合には、患児の妹は母親由来の WND 遺伝子と父親由来の正常遺伝子を持つヘテロ保因者であることがわかる (Fig. 2)。

3・2 アレルの分布

STR 多型から得られたアレルの分布を Table 1 および Fig. 4 に示した。いずれのマーカーとも、 χ^2 テストの結果、D13S314; 4.03 (5 df, $p=0.55$), D13S301; 11.30 (7 df, $p=0.13$) および D13S316; 7.05 (3 df, $p=0.07$) と正常および WND 染色体の間に有意差は認められなかった。

3・3 日本人 WND のハプロタイプ

日本人 WND のハプロタイプ解析の結果を Table 2 にまとめて示した。2 種類の共通ハプロタイプ; 11-2-7 および 11-3-7 (D13S314-D13S301-D13S316 の順) が、それぞれ WND 染色体の 4/12 (33%) と高頻度に

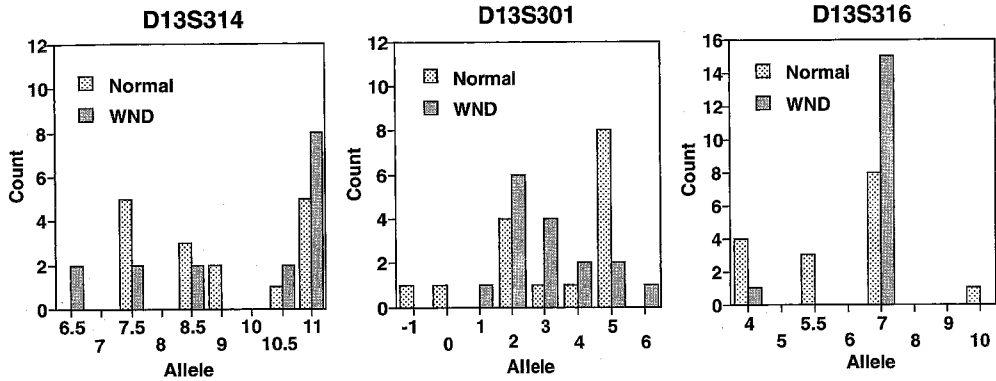


Fig. 4 Allele distributions in Japanese WND families. Statistically significant deviations were not observed in allele distributions for all the markers between “normal” and “WND” chromosomes by the χ^2 method.

Table 2 Haplotypes of Japanese WND families

Chromosome Marker	Family											
	1		2		3		4		5		6	
	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M	F	M
Wilson disease	\$				¶		¶					
D13S314	8.5	11	11	7.5	11	11	11	11	11	11	6.5	10.5
D13S301	6	2	3	1	3	3	3	2	2	2	2	4
WND	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
D13S316	7	7	7	4	7	7	7	7	7	7	7	7
Normal												
D13S314	11	11	9	7.5	11	10.5	11	7.5	11	8.5	8.5	7.5
D13S301	2	2	2	5	-1	4	0	5	3	5	5	5
WND	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
D13S316	7	5.5	10	4	4	7	7	4	4	7	5.5	7

“F” and “M”: haplotypes of father and mother, respectively.

Common haplotypes more frequently observed in Wilson disease chromosomes are shown in boxes.

Mutations indentified \$: R779L, ¶ : N1271S.

存在した。11-2-7は正常染色体(1/12)にも認められるが、約70%の日本人WND染色体がこれら2種類のハプロタイプを有することになり、他の人口集団には認められない日本人WNDの特徴であった。

3・4 ATP7B 遺伝子変異の検出

これまでに報告されているATP7Bの遺伝子変異41種類の内、2種類の遺伝子変異; R779LおよびN1271Sが、それぞれ日本人WND染色体1/12および2/12に認められた(Fig. 5, 6)。日本人WNDの遺伝子変異として唯一報告されている1711-5 TtoG (1/30)¹⁷⁾、欧米人において比較的高頻度(20-30%)に認められている変異H1070Q^{2,13,16)}あるいはホットスポット変異と

考えられている2302delC^{13,16)}を含め、他の39種類の変異は認められなかった。R779Lは中国人¹³⁾に、N1271Sはイタリア人^{2,13,16)}およびトルコ人¹⁶⁾に認められていた変異であり、R779Lは家系1の父方のWND染色体(ハプロタイプ; 8.5-6-7)に、N1271Sは家系3および家系4の父方のWND染色体(ハプロタイプ; 11-3-7)に認められた(Table 2)。11-2-7をはじめ他のハプロタイプにはこれらの変異は認められず、また、ハプロタイプが同じでも、同じ遺伝子変異を持たないものも存在した(家系2の父方および家系3の母方のWND染色体はハプロタイプは11-3-7であるが、N1271S変異を持たない)。

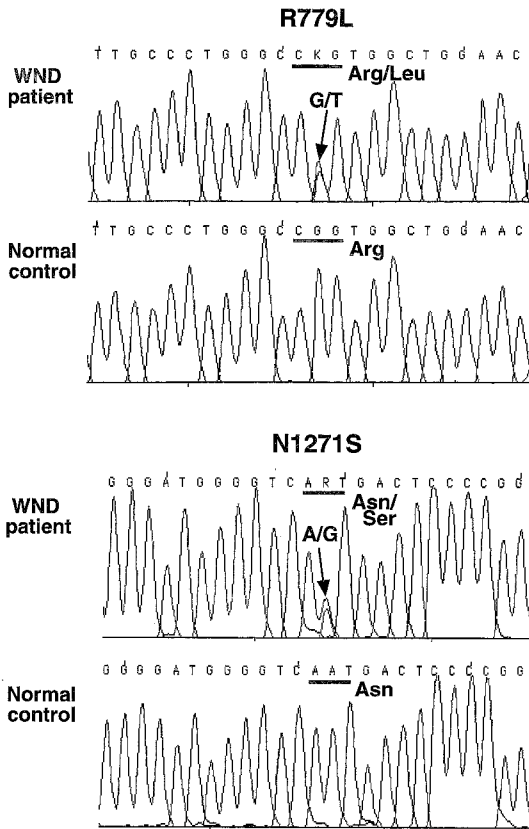


Fig. 5 Sequencing analyses of PCR products from genomic DNAs for the detection of the R779L and N1271S mutations. The site of the sequence alteration is indicated by the arrow. Experimental conditions are described in the text.

4 考 察

従来、多型解析に最も一般的に用いられてきた RFLP に比べ、STR 多型解析は、実験手技の簡便さに加え、得られる多型情報の豊富さから、その有用性が極めて高いと言われている。しかし、多型マーカーによっては、多型の程度に人種差があることも知られておりすべてのマーカーがすべての人種に有用であるとは限らない。今回の結果から、ここで用いた 3 種類のマーカーについては、日本人集団においても欧米人同様に、高度な多型を示すことが確認できた。我々は以前、ネイティブポリアクリルアミドゲル電気泳動による STR 多型解析の簡易法を開発し、実際の WND 家系解析に活用できることを報告した^{19,20)}が、さらに本報においては、蛍光オートシーケンサの適用により、簡便・迅速

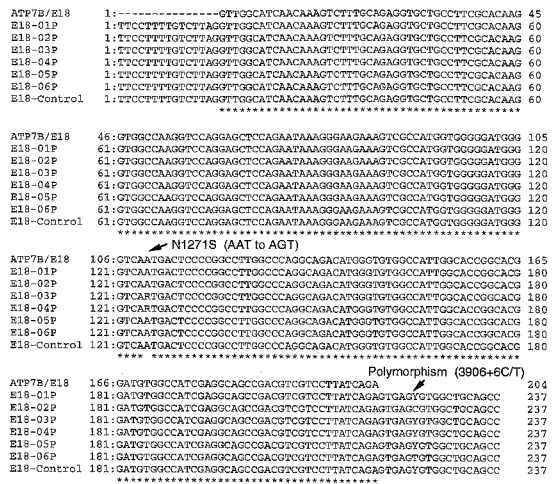


Fig. 6 Comparison of nucleotide sequences of exon 18 and adjacent introns of ATP7B in patients with WND. At the top row, ATP7B/E18 was derived from normal ATP7B sequences published by Bull *et al.*¹⁾, Tanzi *et al.*²⁾ and Petrukhin *et al.*³⁾ Since their sequences were not identical in several regions, we included E18-Control sequence derived from a normal Japanese individual as an internal control shown at the bottom row. E18-01P to E18-06P were derived from the WND patients corresponding the family number in Table 2 or Fig. 2. Nucleotide change, A to G (thus R) at the position 125 in E18-03P and E18-04P resulted in N1271S mutation. Nucleotide change (C or T, thus Y) at the intronic position 225 is observed in the normal individual also. This mutation; 3906+6 (C/T)¹³⁾ is considered as a polymorphism in intron 18 of ATP7B without affection of the splicing.

かつ確実に、目的バンドサイズ；アレル番号を決定することが可能となった (Fig. 1)。日本人において新たに同定されたアレルの内、D13S314 および D13S316 におけるバンドサイズ 1 bp の相違は、2 bp 単位で変動する CA リピートの繰り返し数の違いでは説明できず、PCR 増幅領域内の奇数 bp の欠失あるいは挿入が起っている可能性がある (Table 1)。このことを含め、日本人 WND において、新たなアレルが数多く同定されたことは、日本人が、欧米人あるいは他の集団から遺伝学的にかなり離れていることによると思われる。

日本人における STR マーカー個々のアレル分布について、正常遺伝子と WND 遺伝子の間で統計学的な有意差が認められなかった (Fig. 4)。これまでの報告でも、連鎖不平衡が認められたのは、D13S314、D13S316 は北欧人¹¹⁾ においてのみ、また、D13S314 はサルジニ

ア人¹²⁾においてのみと、限られた集団についてだけであり、STR 領域での変異の起こり易さが一因と考えられている。このように個々のアレルについては、特定の発端者からの寄与 (founder effect) が認められなかったのに対して、2つの共通ハプロタイプ 11-2-7 および 11-3-7 が WND 染色体に偏在して認められ、日本人 WND 染色体の 67% に相当することは、日本人 WND の特徴としてその起源を考察する上でも興味深い (Table 2)。また、このことは日本人の WND 遺伝子頻度が高いとする Reilly *et al.*¹⁸⁾ による疫学調査の結果とも矛盾しない。ハプロタイプ 11-3-7 は北歐人 WND 染色体 (2/66) およびバングラディッシュ人 WND 染色体 (1/2) で報告されているが¹⁵⁾、その他 5 種類の日本人 WND 染色体において認められたハプロタイプは他の集団においての報告はない。このように日本人 WND 染色体のハプロタイプが特徴的である一方、他の集団において認められた遺伝子変異 2 種類; R779L (1/12) および N1271S (2/12) が同定されている (Table 2, Fig. 5)。

R779L 変異 (CGG→CTG) は中国人 WND 染色体の 3 種類のハプロタイプ; 5-8-5.5, 6-4-7 および 6-8-7¹⁵⁾ において認められているが、これらは R779L 変異を持つ日本人 WND 染色体のハプロタイプ; 8.5-6-7 とは全く異なるものであった (Table 2)。このように様々なハプロタイプに同一の変異が認められる原因としては、その変異の起源が十分に古く、その後、組み換えなどを含め多様な STR 多型を生じる場合とホットスポットとして高頻度にその変異が発生する場合とが考えられる。R779L 変異については、200 を超える北歐人をはじめ他の集団の WND 染色体には認められないにも係わらず^{13,15,16)}、中国人 (3/4) と日本人 (1/12) にも認められることから、前者の可能性が高く、東アジア人の祖先が北歐人など他の集団と分岐した後に生じた変異と考えられる。

一方、N1271S 変異 (AAT→AGT) については、イタリア人およびトルコ人 WND 染色体の種々のハプロタイプにおいて報告されており¹⁶⁾、ハプロタイプ 11-3-7 の日本人 WND 染色体 2 本に認められている (Table 2)。また、ハプロタイプ 11-3-7 を持つバングラディッシュ人 WND 染色体には、G944S 変異が同定されているが、これと同じハプロタイプ 11-3-7 の日本人 WND 染色体 4 本を含め本変異は認められていない (Table 2)。これらのことから、N1271S 変異については、非常に起源の古い変異あるいはホットスポット変異いずれの可能性も考えられる。

日本人 WND 染色体の遺伝子変異とハプロタイプの関係では、対象の数が十分ではなく、また一対一の対応でもないが、N1271S がハプロタイプ; 11-3-7 の 2/4 本に認められたことは、特定の遺伝子変異とハプロタイプの関連性を示唆するものと考えられる (Table 2)。このことは非常に重要であり、もう一つの共通ハプロタイプ; 11-2-7 にも同様な連鎖を示す遺伝子変異が存在することが予測され、この変異も日本人 WND 遺伝子変異の比較的頻度の高い変異の一つである可能性がある。

本報では、日本人 WND 染色体について、ハプロタイプ解析を中心に、北歐人など他の人口集団について既に報告されていた WND 遺伝子変異の有無を検証した。現在、対象 WND 家系数を増やすと共に、ATP7B の完全な塩基配列解析により、日本人 WND 染色体に特徴的な責任遺伝子変異の同定を進めているところである。

5 要 約

1. 日本人 WND6 家系について、蛍光式オートシーケンサを用いる簡便・迅速かつ信頼性の高い STR 多型ハプロタイプ解析および ATP7B 直接塩基配列解析を行なった。
2. STR 多型によるハプロタイプ解析は、得られる多型情報の豊富さから、WND 家系の保因者診断に有用であった。
3. 日本人 WND 染色体には 2 種類の共通ハプロタイプ; 11-2-7, 11-3-7 の存在が明らかとなり、これらのハプロタイプでは WND 遺伝子の頻度が高い可能性が示唆された。
4. 既知の ATP7B 遺伝子変異 41 種類の内、R779L (1/12) と N1271S (2/12) の 2 種類が日本人 WND 染色体においても同定された。
5. 共通ハプロタイプ; 11-3-7 と N1271S 変異との関連性が認められたことから、もう一つの共通ハプロタイプと関連した日本人に特徴的な共通遺伝子変異の存在が予測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご懇切なご指導・ご校閲を頂きました札幌医科大学医学部病理学第 1 講座; 菊地浩吉教授ならびに札幌市衛生研究所; 菊地由生子所長に深謝致します。併せて、貴重なご助言を賜りました北海道大学医学部病理学第 1 講座; 脇坂明美助教授、また、本研究へのご協力を頂きました札幌市衛生研究

所：福士勝係長，佐藤泰昌課長，長谷川きをり氏，中澤恵実理氏に深謝致します。

参考文献

1. Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat Genet* 1993, 5: 327-336.
2. Tanzi RE, Petrukhin K, Chernov I, Pellequer JL, Wasco W, Ross B, Romano DM, Parano E, Pavone L, Brzustowicz LM, Devoto M, Peppercorn J, Bush AI, Sternlieb I, Pirastu M, Gusella JF, Evgrafov O, Penchaszadeh GK, Honig B, Edelman IS, Soares MB, Scheinberg IH, Gilliam TC. The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene. *Nat Genet* 1993, 5: 344-350.
3. Petrukhin K, Fischer SG, Pirastu M, Tanzi RE, Chernov I, Devoto M, Brzustowicz LM, Cyanis E, Vitale E, Russo JJ, Matseoane D, Boukhgalter B, Wasco W, Figus AL, Loudianos J, Cao A, Sternlieb, Evgrafov O, Parano E, Pavone L, Warburton D, Ott J, Penchaszadeh GK, Scheinberg IH, Gilliam TC. Mapping, cloning and genetic characterization of the region containing the Wilson disease gene. *Nat Genet* 1993, 5: 338-343.
4. Chelly J, Tümer Z, Tønnesen T, Petterson A, Ishikawa-Brush Y, Tommerup N, Horn N, Monaco AP. Isolation of a candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 1993, 3: 14-19.
5. Mercer JF, Livingston J, Hall B, Paynter JA, Begy C, Chandrasekharappa S, Lockhart P, Grimes A, Bhavé M, Siemieniak D, Glover TW. Isolation of partial candidate gene for Menkes disease by positional cloning. *Nat Genet* 1993, 5: 344-350.
6. Bull PC, Cox DW. Wilson disease and Menkes disease: new handles on heavy-metal transport. *Trends Genet* 1994, 10: 246-252.
7. Cox DW. Genes of the copper pathway. *Am J Hum Genet* 1995, 56: 828-834.
8. Stewart EA, White A, Tomfohrde J, Osborne-Lawrence S, Prestridge L, Bonne-Tamir B, Scheinberg IH, St George-Hyslop P, Giagheddu M, Kim JW, Seo JK, Lo WH, Ivanova-Smolenskaya IA, Limborska SA, Cavalli-Sforza LL, Farrer LA, Bowcock AM. Polymorphic microsatellites and Wilson disease (WD). *Am J Hum Genet* 1993, 53: 864-873.
9. Schwab SG, Scheerer J, Wildenauer DB. Presymptomatic testing in families with Wilson's disease. *Lancet* 1994, 343: 1937-1638.
10. Bowcock AM, Tomfohrde J, Weissenbach J, Bonne-Tamir B, St George-Hyslop P, Giagheddu M, Cavalli-Sforza LL, Farrer LA. Refining the position of Wilson disease by linkage disequilibrium with polymorphic microsatellites. *Am J Hum Genet* 1994, 54: 79-87.
11. Thomas GR, Bull PC, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotype studies in Wilson Disease. *Am J Hum Genet* 1994, 54: 71-78.
12. Petrukhin K, Lutsenko, Chernov I, Ross BM, Kaplan JH, Gilliam TC. Characterization of the Wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions. *Hum Mol Genet* 1994, 3: 1647-1656.
13. Thomas GR, Forbes JR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. The Wilson disease gene: spectrum of mutations and their consequences. *Nat Genet* 1995, 9: 210-217.
14. Thomas GR, Jenson Ó, Gudmundsson G, Thorsteinsson L, Cox DW. Wilson disease in iceland: a clinical and genetic study. *Am J Hum Genet* 1995, 56: 1140-1146.
15. Thomas GR, Roberts EA, Walshe JM, Cox DW. Haplotypes and mutations in Wilson disease. *Am J Hum Genet* 1995, 56: 1315-1319.
16. Figus A, Angius A, Loudianos G, Bertini C, Dessi V, Loi A, Deiana M, Lovicu M, Olla N, Sole G, Virgiliis SD, Lilliu F, Farci AMG, Nurchi A, Giacchino R, Barabino A, Marrazi M, Zancan L, Greggio NA, Marcellini M, Solinas A, Deplano A, Barbera C, Devoto M, Ozsoylu S, Kocak N, Akar N, Karayalcin S, Mokini V, Cullufi P, Balestrieri A, Cao A, Pirastu M. Molecular pathology and haplotype analysis of Wilson disease in Mediterranean populations. *Am J Hum Genet* 1995, 57: 1318-1324.
17. Shimizu N, Kawase C, Nakazono H, Hemmi H, Shimatake H, Aoki, T. RNA splicing mutation in Japanese patients with Wilson Disease. *Biochem Biophys Res Commun* 1995, 217: 16-20.
18. Reilly M, Daly L, Hutchinson M. An epidemiological study of Wilson's disease in the Republic of Ireland. *J Neurol Neurosurg Psychia-*

try 1993, 56: 298-300.

19. 山口昭弘, 松浦晃洋, 荒島真一郎, 福士 勝, 菊地由生子, 菊地浩吉. マイクロサテライト多型マーカーを用いたウィルソン病の簡易ハプロタイプ解析法. 日本小児科学会誌 1995, 99: 1489-1490.
20. 松浦晃洋, 山口昭弘, 荒島真一郎. Wilson 病家系の

STRP ハプロタイプピングによる保因者診断. 医学のあゆみ 1995, 173: 128-129.

別刷請求先:

(〒 003) 札幌市白石区菊水 9 条 1 丁目

札幌市衛生研究所 山口昭弘