

原 著

Duchenne 型筋ジストロフィーの polymerase chain reaction 法を用いた出生前診断

東京女子医科大学 小児科 (主任: 福山幸夫教授)

サイトウカヨコ ハラダ タカヨ ヤマウチ イケヤキヨコ
 斎藤加代子・原田 隆代・山内あけみ・池谷紀代子

モリタ レイコ サクマ イズミ フクヤマ ユキオ
 森田 玲子・佐久間 泉・福山 幸夫

(受付 平成4年8月1日)

Prenatal Diagnosis of a Duchenne Muscular Dystrophy Family Using Polymerase Chain Reaction Amplification

Kayoko SAITO, Takayo HARADA, Akemi YAMAUCHI, Kiyoko IKEYA,
Reiko MORITA, Izumi SAKUMA and Yukio FUKUYAMA

Department of Pediatrics, Tokyo Women's Medical College

Molecular genetic analysis was conducted on a conceptus from a woman who had given birth to two sons with Duchenne muscular dystrophy (DMD) and was known to be a carrier of an aberrant DMD gene. A genomic deletion of exons 49—52 was demonstrated in the elder son and the same type of deletion was found in an asymptomatic younger son, 8 months of age, as well as in the mother. At 16 weeks gestational age in her fourth pregnancy, DNA was extracted from amniotic fluid cells. Female sex was established in the fetus by means of amplification of sequences specific for the Y chromosome. The fetus may be a carrier, because the intensity of PCR products from exon 51 (the deleted exon) was half that from exon 48 (the intact exon). We obtained the above results at 18 weeks gestational age and confirmed fetal sex at 19 weeks by karyotype analysis. Thus, PCR amplification permitted rapid prenatal diagnosis. We also utilized a prenatal diagnosis protocol for DMD families based on molecular genetic analysis.

緒 言

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) は、X 染色体性劣性遺伝形式をとり、3,000~4,000人の男児に1人の頻度で出生し、約1/3に突然変異の症例が認められることが知られている。近年の分子生物学、遺伝子工学の進歩により、Xp21領域より DMD 遺伝子がクローニングされ¹⁾、遺伝子産物であるタンパク質が発見され、ジストロフィンと命名された²⁾。ジストロフィンをコードしている遺伝子の変異によって、ジストロフィンが全く合成されなかったり、異常なジストロフィンとして合成されたりする。これらが、それぞれ Duchenne 型

筋ジストロフィー(DMD)、Becker 型筋ジストロフィー (BMD) である。

以上のような、遺伝子研究の進歩は、臨床面で遺伝子診断として役立ってきている。遺伝子診断により、臨床症状が発現する前の段階での診断が可能となり、臨床症状や従来の臨床検査では鑑別困難な疾患を、遺伝子レベルで異質な状態であるか否か判定することも可能になった。また、患者の家系の遺伝子解析が、保因者診断や出生前診断として遺伝相談に応用可能となってきた³⁾⁴⁾。一方、polymerase chain reaction (PCR) 増幅法は、出生前診断のように迅速に結果を得る必要のある

場合に非常に有効である。

今回、我々はDMDの兄弟発症の1家系において、遺伝子診断による出生前診断を行った。患者兄弟共に遺伝子欠失を有し、母親も同じ範囲の遺伝子欠失のため、DMDの保因者であることを遺伝子レベルで確認した。第4子の妊娠において、PCR増幅法を用いて、遺伝子診断による出生前診断と遺伝相談を行った。DMDの遺伝子診断の手順と時間的効率のよい出生前診断のすすめかたのプロトコールを含めて考察し報告する。

対象および方法

1. 対象

出生前診断を行った対象家系の患者は6歳11カ月の兄と3歳9カ月の弟である。兄が処女歩行の遅れ、両足飛びができない、転びやすいなどを主訴として、3歳10カ月時当科受診。当時8カ月の弟と共に筋生検、ジストロフィンテストを行い、DMDと確定診断した。その際、家族全員のDNAを分析した。母親は全く臨床症状を有さず、筋力テストは全て4+から5はあつた。CK値は134mU/mlと正常上限であった。

兄が5歳6カ月時には母親は第3子妊娠に気づき、出生前診断を希望した。DNA分析を行うために、他院産婦人科に依頼して絨毛生検を施行、その5日後腹痛あり、7日目に流産した。ついで兄が6歳11カ月時に、母親は第4子の妊娠8週と診断され、再度出生前診断を希望した。今回は流産の危険性の少ない羊水診断を希望し、妊娠16週に当院産婦人科にて羊水穿刺を行った。

2. 方法

患者の遺伝子診断、家族の保因者診断、羊水細胞の遺伝子分析は以下のように行った。

1) 患者の遺伝子欠失の同定と家族の保因者診断

患者および家族の末梢血をヘパリン採取し、リンパ球から高分子DNAを調製した。遺伝子欠失のスクリーニングとして、患者とその家族のDNAをChamberlainらの報告したプライマーの組み合わせでPCR増幅し欠失を調べた。cDNAプローブを用いたサザンブロット法としては、患者とその家族のDNAを制限酵素処理し、

アガロースゲル電気泳動後、ニトロセルロース膜へ移しとり、³²PラベルしたDMDのcDNAプローブを用いてのハイブリダイゼーション、オートラジオグラフィを行った。オートラジオグラフィによって得られたシグナルの濃度をコントロールと比較して、母親もDMD遺伝子変異を有するか否か検討した。

2) 母体DNAのコンタミネーションの判定

出生前診断において、重大な診断ミスの原因として、絨毛採取における母体の子宮脱落膜組織の混入や羊水穿刺における母体血の混入による母体DNAのコンタミネーションがあげられる。今回の羊水穿刺においても、羊水細胞から調製したDNAに母体血由来のDNAが混入する可能性を考えなければならない。そこで、胎児の男女判定において、母体血の混入の比率が何%であれば、男児であるはずの胎児を女児と誤診する危険があるかを予備的に判定する実験を行った。正常男性のDNAに母体DNAを0.1, 1, 10, 50, 75, 90, 99, 99.9%の各比率で混合したサンプルを、Y染色体に特異的な塩基配列をプライマーとして増幅した。

3) 羊水細胞より調製したDNAを用いた出生前診断

採取羊水を二分し、半分よりDNAを調製し、残り半分は細胞培養を行った。細胞培養にはChang培地(製造: Irvine Scientific社, 輸入元: 富士レビオKK)を用いた。培養開始後11日目に増殖した羊水細胞の一部を染色体分析に、残りをDNA調製に供した。

羊水細胞採取後、迅速に結果を得るために、PCRによって出生前診断を行った。胎児の男女判定には、Y染色体上の遺伝子の配列の一部をプライマーとして用いた⁵⁾。DMD遺伝子に関しては患者家系で変異のないエクソン48と欠失していたエクソン51の一部の塩基配列をChamberlainら⁶⁾の報告に基づいてApplied Biosystems DNA Synthesiser, model 381Aにて作製した。PCR反応は熱変性94℃, 30秒, アニーリング56℃, 30秒, 伸長反応65℃, 2分の3ステップを、繰り返し23サイクル行った。

結 果

1. 患者の遺伝子欠失の同定と家族の保因者診断

患者の遺伝子欠失は Chamberlain らの報告したプライマーの組み合わせによる multiplex PCR 増幅法では、図 1a のように患者兄弟共にエクソン51が欠失していた。さらに、母親におけるエクソン51のバンドの濃度が、コントロール（女性）の半量であった。そこで、DMD 遺伝子における患者兄弟の欠失に相当する領域を、即ちエクソン47から52までの欠失を調べることができる cDNA プローブ 8 を用いてサザンプロット法により家族の DNA を解析した。患者兄弟において遺伝子欠失はエクソン49～52の範囲であった。欠失エクソンが母親の DNA では1コピーであり、変異のない領域は2コピーであることから、母親は DMD の保因者であることを遺伝子レベルで確認できた（図 1b）。

2. 母体 DNA のコンタミネーションの判定

母体血の混入の比率が何%であれば、男児であるはずの胎児を女児と誤診する危険があるかを予備的に判定した。図 2 のように母体 DNA レベルが総量の99.9%以上の場合にのみ、false negative 即ち、男児であるはずの胎児を女児であると誤診してしまうと判明した。従って、Y 染色体特異的領域のバンド（154bp）が認められない場合は、胎児が女児である可能性が高い。我々は、胎児の性別診断を、より正確に行うために、羊水細胞より直接調製した DNA の PCR 増幅と、培養羊水細胞より調製した DNA の PCR 増幅、そして染色体分析を施行して判定した。

3. 羊水細胞より調製した DNA を用いた出生前診断

18ml 採取した羊水の半量より DNA を調製した。性別判定のために Y 染色体特異的領域の増幅を行ったところ、胎児の DNA において154bp の Y 染色体特異的領域は増幅されず、胎児は女児と判定した。一方、第1子（胎児の兄）の DNA において欠失の認められないエクソン48の一部（506 bp）と欠失しているエクソン51の一部（388bp）を同時に増幅して、DMD 遺伝子の変異を調べた。胎

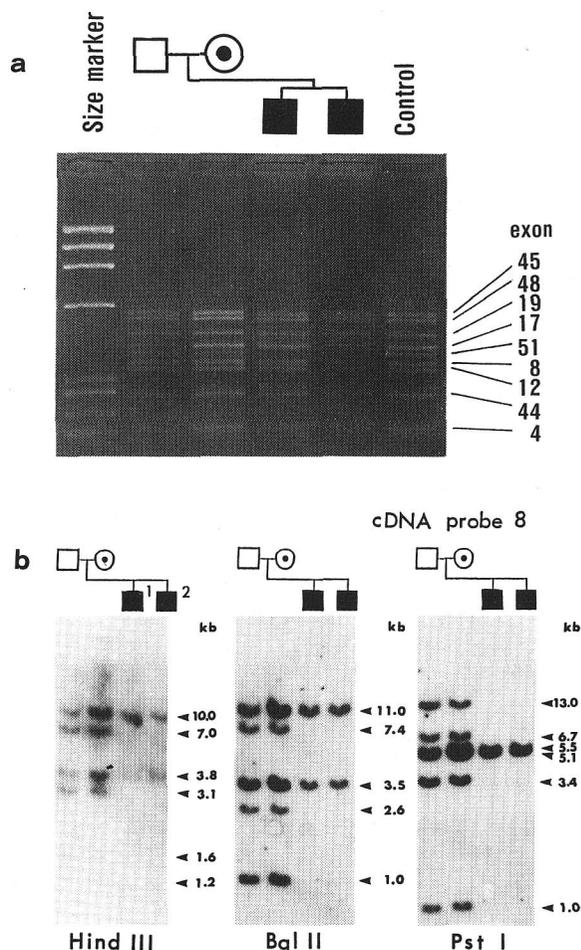


図1 患者 DNA の遺伝子欠失の同定と家族の保因者診断

a: multiplex PCR 増幅法

患者兄弟共にエクソン51が欠失している。母親のエクソン51は、他のエクソンのシグナルの濃度（2コピー）の半分（1コピー）である。

b: cDNA プローブを用いたサザンプロット法による家族の遺伝子解析

制限酵素は Hind III, Bgl II, Pst I を使用した。いずれの制限酵素を用いても、母親の DNA では、患者兄弟で欠失しているエクソン49～52が1コピーであった。その他の領域は2コピーであった。各エクソンは Hind III 断片として以下のようにになっている。エクソン47: 10kb, 48: 1.2kb, 49: 1.6kb, 50: 3.8kb, 51: 3.1kb, 52: 7.0kb

児の DNA においてエクソン48と比較してエクソン51のバンドの濃さは半量であった（図3）。これらの結果は、羊水穿刺の2日後に得られた。

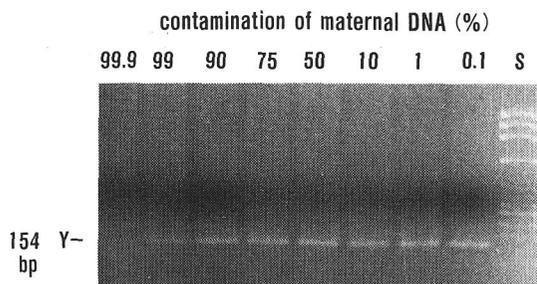


図2 母体 DNA のコンタミネーションの判定
正常男性の DNA に母親の DNA を各比率で混合し、PCR を行った。

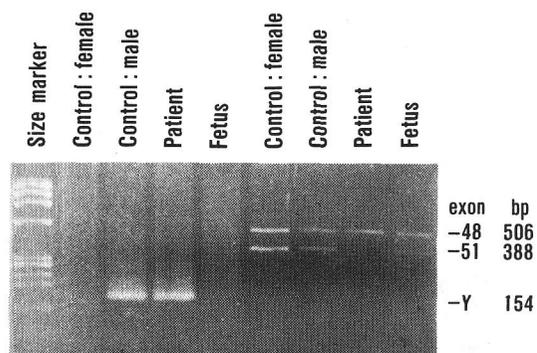


図3 羊水細胞から直接調製した DNA を用いた出生前診断
Patient は患者兄弟のうち、兄を示している。

胎児の遺伝子診断をより確実にするため、培養羊水細胞でも遺伝子解析を行った。10日後に細胞は10cm 径の培養皿に十分に増殖したため、一部を継代して染色体分析に、また一部より DNA の調製、分析を行った。羊水細胞から直接調製した DNA の PCR 増幅の結果と同様に、胎児は女兒であり、その DNA においてエクソン51の PCR 産物はエクソン48の PCR 産物の半分の量であったため、胎児は DMD の保因者の可能性があると考えた(図4)。妊娠18週に、これらの結果が明らかになった。

羊水細胞の染色体核型分析において、胎児は46, XX であった。これは妊娠19週に判明し、PCR の性別診断の結果と一致した。患者の両親に以上の結果を説明し、現在妊娠継続中である。また、妊娠8カ月において、超音波エコーにおいて、胎児

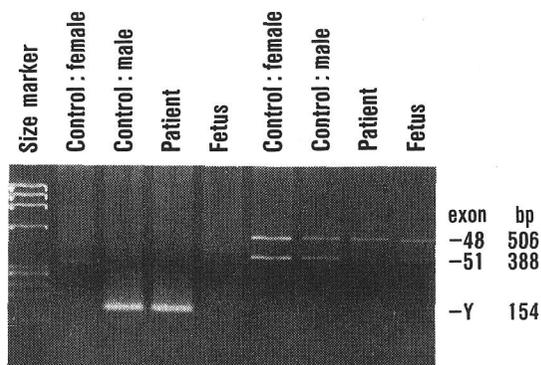


図4 培養羊水細胞より調製した DNA を用いた出生前診断
Patient は患者兄弟のうち、兄を示している。

の子宮を観察でき、女兒であることを確認できた。

考 察

近年の分子遺伝学の進歩により、DMD および BMD はその全容を次第に明らかにしてきている。そして、筋細胞移植などの治療の試みも開始されているが、根本的に有効な治療とは言い難く、遺伝病の発症予防という観点から遺伝相談、保因者診断、出生前診断の必要性が認められている。

保因者診断としては、DMD の遺伝子やその遺伝子産物ジストロフィンが発見される以前は、家族の遺伝歴を聴取して家系図を作成し、一方、筋力テスト、血清 CK, GOT, GPT, aldolase 測定、心電図、筋電図、などを単独または組み合わせて検査して判断してきた。しかし、いずれの方法も陽性の場合には保因者と判断することが容易であるが、陰性の場合に保因者でないとは断定はできなかった。これに対して、分子遺伝学的手法を用いた保因者診断法としては、(1)リンパ球より DNA を調製し、cDNA プローブを用いて遺伝子欠失を同定する方法⁷⁾⁸⁾、(2)リンパ球由来の mRNA の nested PCR 法⁸⁾⁹⁾、(3) restriction fragment length polymorphisms (RFLPs) を解析する方法^{3)10)~14)}がある。

我々は、出生前診断を速やかに正確に行うためには、妊娠してから慌てて遺伝子診断を行うのではなく、患児の遺伝子診断や保因者が疑われる女性の保因者診断を、その女性の妊娠前に行い、遺

伝子変異の状況をあらかじめ正確に把握しておくことが必要であると考えている。本症例において、母親のCK値は正常であったが、遺伝子レベルでは、患者において欠失しているエクソン49~52が母親のDNAにおいて1コピーであり、そのほかの領域は2コピーであることから、DMDの保因者であることを遺伝子レベルで確認していた。

このように本症例では、母親が保因者であると遺伝子的にも予め確認できたが、患者が家系的にも孤発例であり遺伝子的にも突然変異と考えられるような症例では germline mosaicism^{15)~17)}を考えなければならぬ。germline mosaicismとは、生殖細胞にDMDの遺伝子異常がモザイクで存在するため、リンパ球由来のDNAを用いた遺伝子診断では異常がない母親からDMDの遺伝子異常を有する患児または保因者が2人以上生まれるような変異をいう。Bakkerらは、新突然変異と考えられた41例中6例(14%)に germline mosaicismの存在を考えた。従って、gene doseやjunctional fragmentによって、母親が保因者でないと証明された場合でも、germline mosaicismにより、患児が生まれる可能性がある。この点は、DMDの保因者診断、出生前診断において十分な留意が必要である。

出生前診断では妊娠中の限られた時期に、迅速に、正確な結論を出す必要がある。polymerase chain reaction (PCR) 増幅法¹⁸⁾の応用により、妊娠の早い時期に、男女性別判定と、遺伝子診断を行うことが可能となってきた。PCR増幅法とは、DNAの熱変性、プライマーのアニーリング、DNAポリメラーゼによる伸長反応のサイクルの繰り返しにより、目的のDNAを10万~100万倍に増幅する方法である。増幅したい遺伝子領域、増幅したいサイズは、プライマーを任意に選択し合成する事により、設定することができる。PCR増幅により得られた反応液をアガロースゲル電気泳動にかけることにより、増幅したDNAを目的のサイズのバンドとして検出することができる。従って、遺伝子の欠失を有するDMDのような遺伝性疾患において、PCR増幅法を用いることにより遺伝子診断や出生前診断を速やかに行うことが

可能になった。

本症例において、妊娠16週に羊水穿刺を行い、2日後には羊水より直接に調製したDNAのPCR増幅法の結果が得られ、胎児は女兒であること、保因者の可能性があることがわかった。今回我々は上記の結果の確認のため、羊水の培養を行って、妊娠18週に同様の結果を得た。さらに、妊娠19週には培養羊水細胞の染色体核型分析の結果も得られ、胎児が女兒であると判明した。

PCR増幅法には結果を迅速に得られるという長所がある一方、人工産物が入る可能性がある—false positive、即ち微量のDNAのコンタミネーションがあった場合にもそれを増幅してしまう可能性がある。本症例では羊水採取において、母親の血液が採取細胞中に混じて、母親のDNAを増幅するために、羊水細胞のDNAによる性別診断において、本来は男児であるべき結果を女児として誤診してしまう可能性を実験的に検討した。その結果、母体DNAレベルが総量の99.9%以上の場合(胎児—男児のDNAレベルが0.1%以下であった場合)にのみ、false negative即ち、男児であるはずの胎児を女児であると誤診してしまうと判明した。さらに、羊水細胞は培養すると、血液中のリンパ球と異なり、容器の壁に接着して増殖する。従って、培養羊水細胞は確実に胎児由来の細胞であるといえる。本症例において、培養羊水細胞のDNA分析、染色体核型分析をも行い結果を再確認できた。

以上の遺伝子診断と出生前診断の経験をもとにして、DMD/BMDの遺伝子診断の手順と出生前診断のタイムテーブルを図5、6に示した。遺伝子診断としては、multiplex PCR増幅法を欠失のスクリーニングとして応用し、保因者診断にはサザンプロット法、PCR-RFLPによるCA繰り返し配列の多型解析¹²⁾¹³⁾、nested PCR法などの方法によって結果の再現性を確認することが必要であると考えた。またPCR法で遺伝子の欠失を示さない症例は、サザンプロット法でさらに検討し、RFLPの解析が必要である。出生前診断では先にも述べたように、妊娠中の限られた時期に正確な結論を出す必要があり、図6のような時間の経過

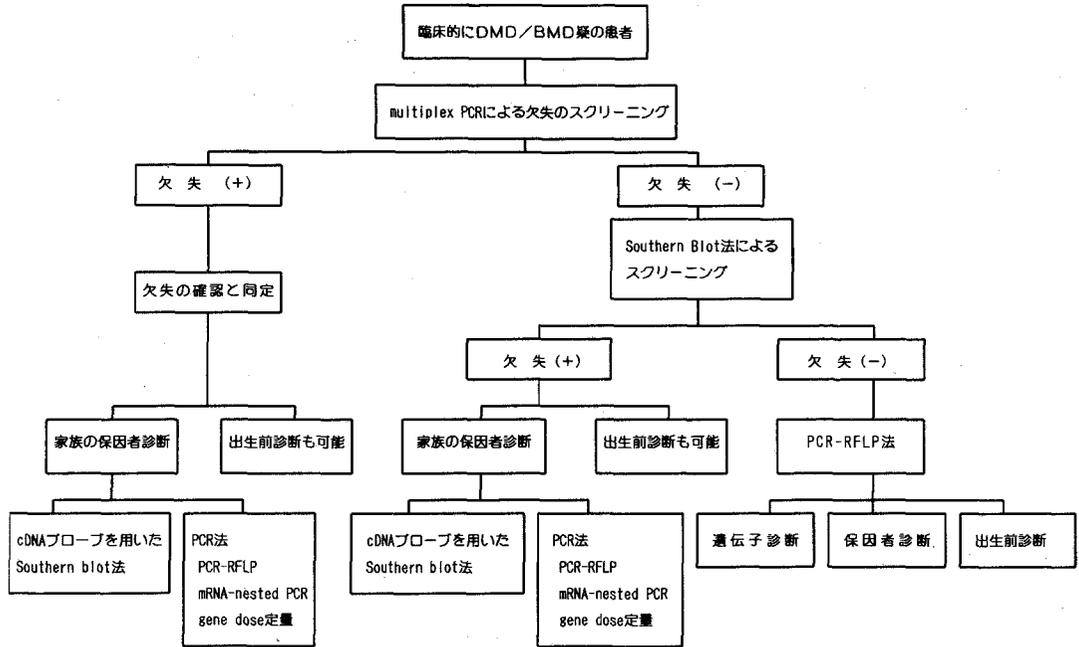


図5 DMDの遺伝子診断の手順

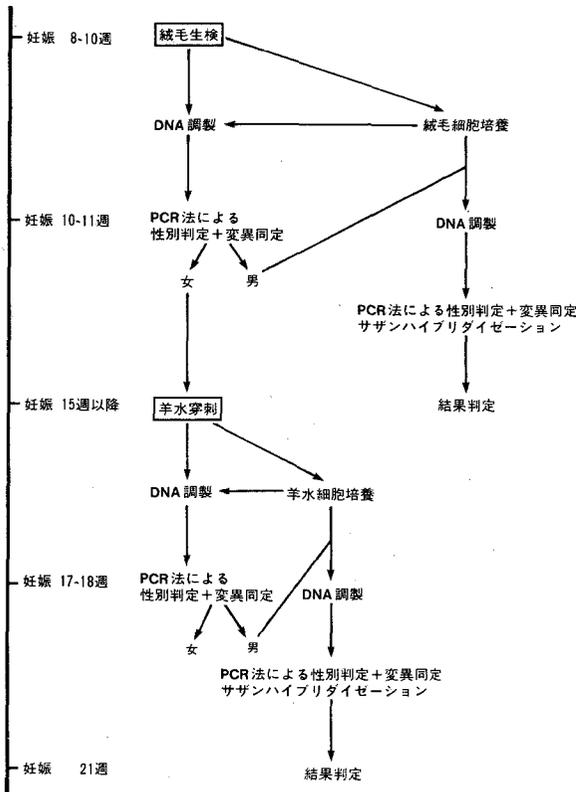


図6 DMDにおける出生前診断のすすめ方

で結果を導いていく必要がある。絨毛採取法は採取時期は8～10週であり、PCR増幅法を実施することによって、妊娠の早期に結果を得ることができ、有用な方法となりえる。しかし、本症例の第3子のような流産誘発の危険性が高いこと、採取細胞に母親の組織の混在の可能性があることなどの欠点がある。後者の対策としては絨毛細胞の分析結果が女兒と判定された場合には、羊水穿刺を行って性別診断の再確認が必要である。羊水穿刺は15～19週に施行する。絨毛採取法よりは安全な方法である。我が国では、1991年より日本母性保護医協会の見解として、人工妊娠中絶は原則として妊娠22週未満までとなったため、羊水診断に関しては、さらに時間的な制約がある。この症例ではPCR増幅法を実施することによって、妊娠19週に結果を判定し得た。

胎児がDMDの保因者であるか否かに関して、電気泳動のシグナルをみるとエクソン51のPCR産物がエクソン48のPCR産物の半分の濃度であることから、胎児は患者と同じ遺伝子欠失を一つのX染色体上に有する、即ち保因者である可能性を考えた。しかし、PCR増幅法は定量的な判断を

下すためには適切とはいえない。今回の出生前診断の対象例は、まだ妊娠中であり最終結論はまだ出ておらず、PCRの結果で胎児が保因者であるか否かを断言はしなかった。

出生前診断は、胎児期ないし生後早期に治療を開始することが可能な疾患についてなされる場合と、治療法が確立していない重篤な遺伝性疾患に関してなされる場合がある。前者は発見された異常を出生前または後に治療をする努力が必要である。後者は治療不可能であり、かつ重大な障害を有するため、その診断結果の行使に当たっては、医療従事者の格別な倫理的な配慮が必要であると共に、診断結果に対しての両親への十分な説明と同意、理解 (informed consent) が尊重されなければならない。遺伝子診断が可能になる以前は、DMDの保因者が疑われる女性が妊娠した場合、羊水検査により、男女の性別判定を行い、選択的産婦人科手術、即ち選択的男児中絶を行って、健康な男児の可能性があっても、放棄せざるを得ない状況であった。遺伝子診断が可能になったことによって、少なくとも人工妊娠中絶による正常男児の犠牲は救うことができるようになってきた。

近年の医学における技術的進歩は著しく、受精卵において出生前診断を行うことが可能となった。Handysideら¹⁹⁾によると、adrenoleucodystrophyとX連鎖性精神遅滞のリスクがある2家族で体外受精を行い、受精卵が卵割し6~8細胞期の時点で、細胞を一個採取してY染色体特異的領域をPCRにて調べ、女兒の場合のみ母体に戻し着床させて健康な女兒が出生した。この方法は着床前に診断し、正常な受精卵のみ母体に戻し妊娠を継続する方法であり、人工妊娠中絶を避けることができる。しかし、この場合も受精卵の生存権という倫理的問題は残っている。

DMD遺伝子の発見から約5年間で、遺伝子診断によって臨床的な診断の確定が可能となり、さらに出生前に胎児がDMDであるか否かを明らかにできるようになってきた。このめざましい進歩が、患者とその両親や家族にとって有益なものとなり、また治療や療育に役立つように、医療従事者としての努力が必要である。

結 論

Duchenne型筋ジストロフィーの兄弟発症の1家系において、遺伝子診断による出生前診断を行った。患者はエクソン49から52の範囲の遺伝子欠失を有していた。母親はDMDの保因者であることを遺伝子レベルで確認した。第4子の妊娠16週に得られた羊水細胞においてpolymerase chain reaction (PCR)法を用いDNA診断により、胎児は女兒であり、保因者の可能性があると考えた。しかし、本法によって定量的な判断を下すことは難しく、胎児が保因者であるか否かを断言はしなかった。PCR法を用いることによって、時間的制約のある出生前診断を迅速に施行できた。本症例の経験に基づいて、遺伝子診断を利用したDMDの出生前診断のプロトコールについて述べ、倫理的考察を行った。

症例の羊水穿刺を施行していただきました当院母子センター中林正雄教授、羊水細胞の染色体検査をしていただきました至誠会第二病院染色体研究室岡田美智子先生に深謝いたします。本研究は平成4年度厚生省精神神経研究委託費(2指-2-13, 2指-3-02)によって行われた。

なお、著者らは遺伝子異常を呈するDMDの患者家系における遺伝子診断を用いた出生前診断の実施に関して、東京女子医科大学倫理委員会の認可を受けている。

文 献

- 1) Koenig M, Hoffman EP, Bertelson CJ et al: 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
- 2) Hoffman EP, Brown RH Jr, Kunkel LM: Dystrophin: The protein product of the Duchenne muscular dystrophy locus. *Cell* 51: 919-928, 1987
- 3) Darras BT, Harper JF, Francke U: Prenatal diagnosis and detection of carriers with DNA probes in Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med* 316: 985-992, 1987
- 4) 齋藤加代子, 田中あけみ, 原田隆代ほか: DystrophinのcDNAプローブを用いたDuchenne型筋ジストロフィー症家系の遺伝子診断—遺伝相談へ

- の応用の可能性の検討. 脳と発達 21 : 361-368, 1989
- 5) **Kogan SC, Doherty BS, Gitschier J**: An improved method for prenatal diagnosis of genetic diseases by analysis of amplified DNA sequences. *N Engl J Med* 317 : 985-991, 1987
 - 6) **Chamberlain LS, Gibbs RA, Ranier JE et al**: Multiplex PCR for the diagnosis of Duchenne muscular dystrophy. *In PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications* (Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ et al eds) pp272-281, Academic Press, New York · London (1990)
 - 7) **den Dunnen JT, Grootsholten PM, Bakker E et al**: Topography of the Duchenne muscular dystrophy (DMD) gene : FIGE and cDNA analysis of 194 cases reveals 115 deletions and 13 duplications. *Am J Hum Genet* 45 : 835-847, 1989
 - 8) 齋藤加代子, 山内あけみ, 池谷紀代子ほか : Duchenne 型及び Becker 型筋ジストロフィー家系の PCR 法を用いた遺伝子診断と保因者診断. 厚生省精神神経疾患研究委託費 筋ジストロフィー及び関連疾患の成因と治療法開発に関する研究平成 3 年度研究報告書, 132-136, 1992
 - 9) **Roberts RG, Bentley DR, Barby TFM et al**: Direct diagnosis of carriers of Duchenne and Becker muscular dystrophy by amplification of lymphocyte RNA. *Lancet* 336 : 1523-1526, 1990
 - 10) **Saito K, Ikeya K, Yamauchi A et al**: Molecular genetic analysis of Duchenne/Becker muscular dystrophy families. *In Fetal and Prenatal Neurology* (Fukuyama Y et al eds) pp46-59, Karger, Basel (1992)
 - 11) **Kunkel LM, co-authors**: Analysis of deletions in DNA from patients with Becker and Duchenne muscular dystrophy. *Nature* 322 : 73-77, 1986
 - 12) **Beggs AH, Kunkel LM**: A polymorphic CACA repeat in the 3' untranslated region of dystrophin. *Nucleic Acid Res* 18 : 1931, 1990
 - 13) **Feener CA, Boyce FM, Kunkel LM**: Rapid detection of CA polymorphisms in cloned DNA : Application to the 5' region of the dystrophin gene. *Am J Hum Genet* 48 : 621-627, 1991
 - 14) **Clemens PR, Fenwick RG, Chamberlain JS et al**: Carrier detection and prenatal diagnosis in Duchenne and Becker muscular dystrophy families, using dinucleotide repeat polymorphisms. *Am J Hum Genet* 49 : 951-960, 1991
 - 15) **Bakker E, van Broeckhoven CH, Bonten EJ et al**: Germline mosaicism and Duchenne muscular dystrophy mutations. *Nature* 329 : 554-556, 1987
 - 16) **Wood S, McGillivray BC**: Germline mosaicism in Duchenne muscular dystrophy. *Hum Genet* 78 : 282-284, 1988
 - 17) **Bakker E, Veenema H, den Dunnen JT et al**: Germline mosaicism increases the recurrence risk for 'new' Duchenne muscular dystrophy mutations. *J Med Genet* 26 : 553-559, 1989
 - 18) **Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al**: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239, 487-491, 1988
 - 19) **Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K et al**: Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 344 : 768-770, 1990