

原 著

Non radioisotopic polymerase chain reaction-single strand  
conformation polymorphism analysis (non RI PCR-SSCP 法)による大腸癌患者の便中における K-*ras* 遺伝子点突然変異の

検出 —大腸癌マス・スクリーニングにおける

分子生物学的診断—

東京女子医科大学 第二外科学教室 (主任: 浜野恭一教授)

ヒ キ トシ ヤス  
比 氣 利 康

(受付 平成7年7月21日)

**Detection of K-*ras* (codon 12, 13) Mutation in the Stool of Patients with  
Colorectal Cancers by Non-Radioisotopic Polymerase Chain  
Reaction-Single Strand Conformation Polymorphism  
Analysis (Non RI PCR-SSCP): Molecular  
Biological Techniques for Performing  
Colorectal Cancer Mass Screening****Toshiyasu HIKI**Department of Surgery II (Director: Prof. Kyoichi HAMANO),  
Tokyo Women's Medical College

Tumor tissue specimens and preoperative fecal samples from 10 patients with colorectal cancer were examined by non-radioisotopic polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis (non-RI PCR-SSCP) for the presence of K-*ras* gene mutation. The K-*ras* point mutation was detected in the tumor specimens from 5 patients; and the fecal samples also showed the same K-*ras* gene point mutation in 3 of these 5 patients. Two of these 3 patients were in the early stages of colorectal cancer. The 2 patients whose tumors showed K-*ras* mutation but whose feces showed no K-*ras* mutation were reexamined using mutant-allele-specific amplification (MASA); however, no K-*ras* mutation was detected.

DNA of a PCR grade can be extracted from fecal samples by using catrimox-14® in about one hour, and thus the time needed for identification of the K-*ras* gene mutation can be reduced to about 15~20 hours. This technique is expected to increase the detection rate of colorectal oncogenes in fecal samples. When K-*ras* gene mutation in fecal samples is detected by this technique, the presence of colorectal tumor is highly suspected. This technique is therefore promising as a new and effective means for rapid molecular diagnosis of colorectal carcinoma.

## 緒 言

近年、大腸癌の死亡率は増加し、特に多くの先進諸国間においては大きな問題となっている。わ

が国においては1964年からの約30年間に大腸癌死亡者の数は約6,600人から約28,000人と約4倍の増加を示し、現在ではその全癌に占める死亡の割

合は10%を超える<sup>1)</sup>。

大腸癌は臨床的症状を呈した段階では、良好な予後が得られないことが多い。しかし、早期に発見することにより、外科的または内視鏡的に切除することが可能であり、予後の改善につながると考えられる。

したがって、早期発見のための大腸癌マス・スクリーニングが重要となってくる。そのスクリーニングの一つであり、非侵襲的な方法として便潜血反応<sup>2)~4)</sup>があるが、大腸憩室症や出血性胃潰瘍などの疾患においても陽性反応を示し、非特異的である。

一方、最近の大腸癌遺伝子関連の研究により、その発癌からの過程が明らかにされつつあり、少なくとも5つの遺伝子(4つの癌抑制遺伝子 APC<sup>5)</sup>, MCC, p53<sup>6)</sup>, DCC と1つの癌遺伝子 K-ras<sup>7)8)</sup>) の異常がその発生進展過程に関与していると考えられている<sup>9)</sup>。特に K-ras 遺伝子の変異は、腺腫が高度異型性を示す過程に、p53遺伝子の変異は、大腸腺腫が大腸癌に移行する過程に関与していることが示唆されている<sup>10)11)</sup>。

近年、代謝異常や血液疾患における遺伝子の異常を同定して疾患の診断に臨床応用される段階に至り、便中に K-ras 遺伝子点突然変異を同定し、大腸腫瘍の有無を診断できる可能性を示唆した報告が散見されるようになった<sup>12)13)</sup>。

便中より K-ras 遺伝子点突然変異を同定する従来の方法は Southern 法, plaque hybridization 法<sup>12)</sup>あるいは mutant-allele-specific amplification (MASA) 法<sup>13)</sup>にて施行された。しかし、これらの方法は、臨床応用する場合に以下の点において考慮すべき点が認められた。Southern 法, plaque hybridization 法は、放射性プローブを用いるばかりでなく、操作が複雑であるためルーチン化が困難である。これに対し MASA 法<sup>14)</sup>は操作が簡便で、K-ras 遺伝子点突然変異を同定する際、理論上感度も高いが、PCR 条件のわずかな違いにより対応する変異以外の点突然変異も増幅されてしまうことがあるなどの問題があり、また p53遺伝子など癌抑制遺伝子の検出には困難であることが考えられた。

著者は、新たに迅速かつ容易に便中より PCR グレードの DNA を抽出し、K-ras 遺伝子点突然変異を検出するばかりでなく、p53遺伝子などの癌抑制遺伝子も比較的容易に検出できる可能性のある non radioisotopic polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism analysis (non RI PCR-SSCP 法<sup>15)~17)</sup>) を用い、大腸癌患者の便中の K-ras 遺伝子点突然変異の検出を行った。

## 対 象

1995年4~6月までに、東京女子医科大学第二外科学教室にて手術を施行した大腸癌10例を対象とし、切除された大腸癌組織、および手術、検査時に前処置のため緩下剤を内服し回収された便を材料とした。

性別は男性9、女性1、年齢分布は28~71歳(平均年齢55.6歳)であった。占居部位は直腸3例、S状結腸4例、下行結腸3例であった。分化度別では、高分化腺癌5例、中分化腺癌5例であった。深達度別では、m 2例、sm 1例、mp 1例、ss(a1) 4例、se(a2) 2例であった。組織学的進行程度別分類では、Stage 0: 2例、Stage I: 2例、Stage II: 1例、Stage IIIa: 1例、Stage IIIb: 2例、Stage IV: 2例であり、また Dukes 分類では、Dukes A: 4例、Dukes B: 1例、Dukes C: 3例、Dukes D: 2例であった。リンパ節転移または肝転移陽性は10例中5例で、陰性は5例であった(表)。

## 方 法

### 1. 材料の採取

#### 1) 腫瘍

切除標本より腫瘍組織の一部を肉眼的に約100mg程切除し、検査に供するまで-80℃下で凍結保存した。

#### 2) 糞便

手術、検査時に前処置として緩下剤(ニフレックス®2lまたはマグコロール®250ml)を服用し排泄された泥状~水様便10mlを滅菌スピッツ管に取り、4℃3,000rpm 20分にて遠心分離し沈殿物を検査に供するまで-80℃下で凍結保存した。

表 対象とした大腸癌患者の内容と K-*ras* 遺伝子に対する non RI PCR-SSCP 法による解析結果

Patient	Age/sex	Tumor location	Pathology	Stage/ Dukes	Tumor size(cm)	Tumor mutation	Mutant <i>ras</i> gene in stool
1	71/M	sigmoid	well differentiated adenocarcinoma in tubulovillous adenoma m, n(-)	0/A	4.5×2.8	+	+
2	67/M	sigmoid	well differentiated adenocarcinoma sm, n(-)	I/A	5.2×3.3	(codon 12, Val)	(codon 12, Val)
3	63/M	rectum(Ra <sup>1)</sup> )	moderately > poorly differentiated adenocarcinoma ss, n2(+), H3	IV/D	4.5×3.5	(mutation except codon 12 → codon 13 Asp)	(mutation except codon 12)
4	49/M	descending	moderately differentiated adenocarcinoma mp, n(-)	I/A	3.2×2.9	+	-
5	43/M	rectum(Rb <sup>2)</sup> )	moderately differentiated adenocarcinoma al, n1(+)	IIIb/C	4.0×3.5	(codon 12, Val)	-
6	52/M	descending	well differentiated adenocarcinoma ss, n(-), H3	IV/D	4.5×3.5	(codon 12, Asp)	-
7	56/M	rectum(Ra <sup>1)</sup> )	moderately differentiated adenocarcinoma se, n1(+)	IIIa/C	3.6×3.3	-	-
8	28/M	descending	moderately differentiated adenocarcinoma se, n3(+)	IIIb/C	7.0×6.0	-	-
9	63/M	sigmoid	well~moderately differentiated adenocarcinoma ss, n(-)	II/B	4.5×3.0	-	-
10	64/F	sigmoid	well differentiated adenocarcinoma m, n(-)	0/A	4.0×1.5	-	-

1) Ra : 上部直腸, 2) Rb : 下部直腸.

## 2. DNA の抽出

### 1) 腫瘍

腫瘍組織10~15mg を catrimox-14<sup>®</sup>(<sup>18</sup>) (Iowa Biotechnology) 1ml に入れ組織をホモジナイズした。4℃ 15,000rpm 5分にて遠心分離し、不溶物を取り除いた。上清を取り出し、再び 4℃ 15,000rpm 5分にて遠心分離した。沈殿物に2M 塩化リチウム500μlを加え溶解させ、4℃ 15,000rpm 5分にて遠心分離した。上清にイソプロピルアルコール500μlを加え、-80℃にて5分間静置後、4℃ 15,000rpm 10分にて遠心分離した。沈殿物に70%エタノール500μlを加え洗浄し、4℃ 15,000rpm 5分にて遠心分離した。沈殿物 (DNA) を乾燥させ、TE 溶液 (Tris-HCl [pH 7.5], 1mM EDTA) 50μl に溶解した。

### 1) 糞便

便サンプル 1 g に対し、1ml の TE buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.5, 10mM EDTA) を加え約 30秒間 vortex をかけた。室温で10分以上静置後、4℃ 15,000rpm 5分間遠心分離した。上清50μl に Catrimox-14<sup>®</sup> 500μl を加え、攪拌し、室温で10分以上静置した後、4℃ 15,000rpm 5分間遠心分

離した。沈殿物に2M 塩化リチウム500μlを加え溶解させた後、4℃ 14,000rpm 5分間遠心分離した。上清にイソプロピルアルコール500μlを加え、-80℃にて5分間静置後、4℃ 15,000rpm 10分間遠心分離した。沈殿物に70%エタノール500μlを加え洗浄し、4℃ 15,000rpm 5分間遠心分離した。沈殿物 (DNA) を乾燥させ、TE buffer 50μl に溶解した。

## 3. Polymerase chain reaction (PCR) 法

### 1) 腫瘍より抽出された DNA

#### (1) 1st PCR 反応

K-*ras* 遺伝子 codon 12, 13を含む210bp を PCR 法にて増幅した。すなわち、抽出した DNA 5μl を template とし、primer forward [5'-GTGTGACATGTTCTA ATATAGTCA-3'] (20pmol/μl) を1μl, primer reverse [5'-GGTCCTGCACCAGTAATATGC-3'] (20pmol/μl) を1μl, 2.5mM dNTP を8μl, 10×buffer (100 mM Tris-HCl pH 8.9, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) を10μl, H<sub>2</sub>O 75μl を加え、全量を99μl とした。75μl のミネラルオイルを重層し、サーマルサイクラーPJ 2000 (Perkin Elmer Cetus) を使

用, 80°C 10分間加温し, 2.5unit/ $\mu$ l Taq polymerase (Takara) を最終的に1 $\mu$ l 加え, denature 94°C 30秒, anneal 55°C 30秒, extension 72°C 1分の条件で30サイクルの polymerase chain reaction (PCR) を行った。

#### (2) 2nd PCR 反応

増幅されているのを確認の後1st PCR products 100 $\mu$ l の内1 $\mu$ l を template とし, *K-ras* 遺伝子 codon 12, 13を含む71bp を PCR 法にて増幅した。つまり primer forward [5'-GACTGAA TATAAACTTGTGG-3'] (20pmol/ $\mu$ l) を1 $\mu$ l, 5'末端を蛍光色素ローダミン X®でラベルした primer reverse [5'-GAATTAGCTGTAT CGTCAAG-3'] (10pmol/ $\mu$ l) (Takara) を2 $\mu$ l 加え, 上記1st PCR と同様の条件にて2nd PCR を施行した。

#### 2) 糞便より抽出された DNA

1st PCR 反応, 2nd PCR 反応とも PCR を40サイクル繰り返す以外は, 条件は全て同じである。

#### 4. Non radioisotopic single strand conformation polymorphism analysis (non RI SSCP 法) による解析

腫瘍および糞便よりの *K-ras* 遺伝子 PCR products を95% deionized formamide, 20mM EDTA, 0.05% xylene cyanol を含むホルムアミド色素溶液で20倍希釈する。希釈された試料を80°C 5分間加熱し, 1レーン当たり1 $\mu$ l を, 0.5×TBE buffer (90mM Tris, 92mM boric acid, 2.5mM EDTA) を含む5% polyacrylamide gel (acrylamide: bisacrylamide=99:1) 200mm (幅)×475mm (長さ)×0.3mm (厚さ) に入れる。電気泳動条件は, 4°C 30W にて1.5~2時間泳動し, FMBIO-100 system® (Takara) を用いて検出した。

#### 5. Mutant-allele-specific amplification (MASA) 法による検出

腫瘍組織に *K-ras* 遺伝子点突然変異が認められた症例の糞便における同変異の検出に際して PCR-SSCP 法にて解析した後, MASA 法でも再検討を行った。MASA 法は, PCR 条件の少しの違いにより非特異的な変異が増幅されてしまうこと

があるなどの問題があるものの, 理論上感度が高いため, MASA 法でも再検討を行った。

上記方法にて抽出増幅された1st PCR products のうち1 $\mu$ l を template とし, *K-ras* 遺伝子 codon 12の変異を検出するようデザインされた primer forward [5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTC-3', 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT-3', 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGC-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3'] (10pmol/ $\mu$ l) を1 $\mu$ l, primer reverse [5'-CTCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'] (10pmol/ $\mu$ l) を1 $\mu$ l, 2.5 mM dNTP を4 $\mu$ l, 10×buffer (100mM Tris-HCl pH 8.9, 500mM KCl, 15mM MgCl<sub>2</sub>) を5 $\mu$ l, 2.5unit/ $\mu$ l Taq polymerase (Takara) を1 $\mu$ l 加え, 全量を50 $\mu$ l とした。75 $\mu$ l のミネラルオイルを重層し, Gene Amp PCR system 9600を使用した。PCR 条件は denature 94°C 30秒, anneal 65°C 30秒, extension 72°C 30秒で30サイクル行い, *K-ras* 遺伝子 codon 12点突然変異を特異的に増幅した。PCR products のうち10 $\mu$ l を4% NuSieve agarose gel (1×TAE) で100V, 25分電気泳動し, ethidium-bromide で検出した。

#### 結 果

Non RI PCR-SSCP 法にて検討した大腸癌組織10例中5例に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた。大腸癌組織に変異を認めた5症例中3症例の糞便においても大腸癌組織と一致する *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた。図1~3は大腸癌組織および糞便に対する non RI PCR-SSCP 法による解析結果である。

図1は, No. 1から No. 3は大腸癌組織と糞便において一致する *K-ras* 遺伝子点突然変異が認められた症例である。

No. 1 : TM71T → mutation (+)

TM71SD → mutation (+)

No. 2 : AM67T → mutation (+)

AM67SD → mutation (+)

No. 3 : MY63T → mutation (+)

MY63SD → mutation (+)

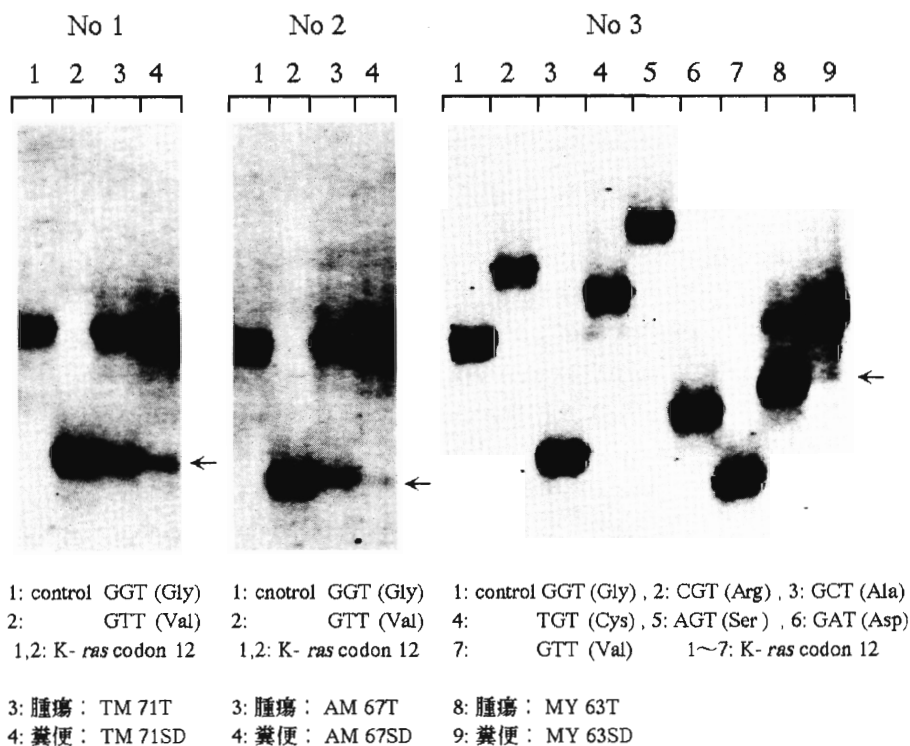


図1 non RI PCR-SSCP 法による解析  
 腫瘍と糞便に同一の K-*ras* 遺伝子点突然変異が認められた症例

図2は, No. 4およびNo. 5はK-*ras* 遺伝子点突然変異が大腸癌組織には認められたが糞便においては認められなかった症例である。

- No. 4 : NS49T → mutation (+)  
 NS49SD → mutation (-)  
 No. 5 : HN43T → mutation (+)  
 HN43SD → mutation (-)

図3は, No. 6およびNo. 7はK-*ras* 遺伝子点突然変異が大腸癌組織において認められず, よって糞便においても認められなかった症例である。

- No. 6 : KO52T & KO52SD → mutation (-)  
 No. 7 : YS56T & YS56SD → mutation (-)

No. 1よりNo. 5のK-*ras* 遺伝子点突然変異の種類は同時に泳動したコントロールバンドと比較すると以下の変異が考えられた。

- No. 1 : TM71T & TM71SD ;  
 Gly (GGT) → Val (GTT)  
 No. 2 : AM67T & AM67SD ;

Gly (GGT) → Val (GTT)

No. 3 : MY63T & MY63SD ; codon 12以外のmutationが考えられsequenceの結果, codon 13のGly (GGC) がAsp (GAC) に変異したものであることが同定できた。

また, No. 1のTM71Tについてsequenceを施行した結果, codon 12GGT → GTT (Gly → Val)の変異が得られnon RI PCR-SSCP法の結果と一致した。

K-*ras* 遺伝子codon 12に対してMASA法で再検討した結果は以下の通りである。

No. 1 : TM71はnon RI PCR-SSCP法にて大腸癌組織と糞便において一致するK-*ras* 遺伝子点突然変異Gly (GGT) → Val (GTT) が認められた症例で, MASA法でも同一の変異が認められた。

No. 2 : AM67はnon RI PCR-SSCP法にて大腸癌組織と糞便において一致するK-*ras* 遺伝子

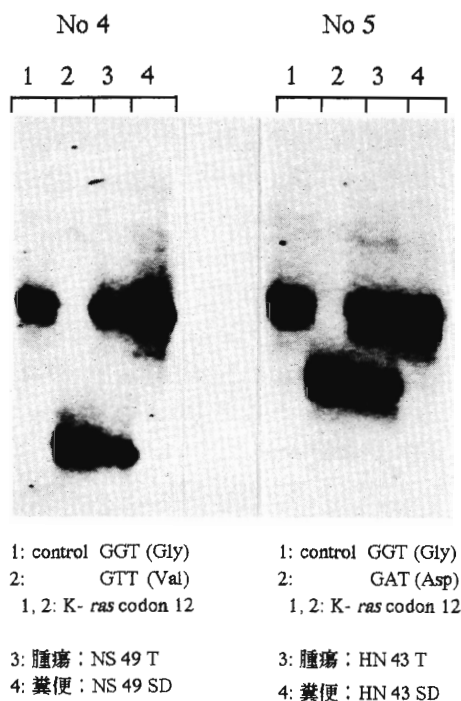


図2 non RI PCR-SSCP 法による解析  
腫瘍のみに K-*ras* 遺伝子点突然変異を認めた症例

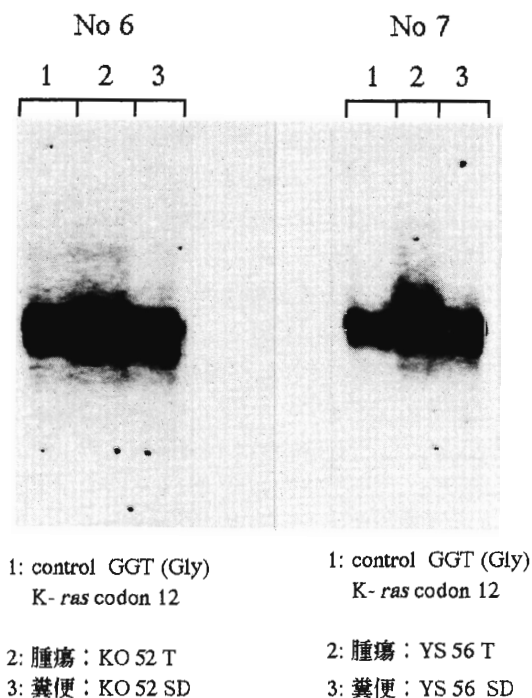


図3 non RI PCR-SSCP 法による解析  
腫瘍、糞便ともに K-*ras* 遺伝子点突然変異を認めなかった症例

点突然変異 Gly (GGT) → Val (GTT) が認められた症例で, MASA 法でも同一の変異が認められた。

No. 4および No. 5は, non RI PCR-SSCP 法にて K-*ras* 遺伝子点突然変異が大腸癌組織には認められたが糞便においては認められなかった症例である。

No. 4: 大腸癌組織 NS49T の変異は Gly (GGT) → Val (GTT) と考えられるが, 糞便 NS49SD において, MASA 法でも変異は認められなかった。

No. 5: 大腸癌組織 HN43T の変異は Gly (GGT) → Asp (GAT) と考えられるが, 糞便 HN43SD において, MASA 法でも変異は認められなかった。

以上, non RI PCR-SSCP 法にて K-*ras* 遺伝子点突然変異が認められなかった検体は, MASA 法でも変異は認められなかった。

No. 6: KO52は non RI PCR-SSCP 法で K-*ras*

遺伝子点突然変異が大腸癌組織にも糞便においても認められなかった症例である。KO52の糞便 KO52SD において MASA 法でも変異は認められなかった。

よって糞便中における癌細胞および癌遺伝子は, 大腸癌組織より脱落, 剥離し移行したものであり, 大腸癌組織において K-*ras* 遺伝子点突然変異が存在しなければ, 糞便においても認められない。

腫瘍からの DNA に K-*ras* 遺伝子点突然変異が認められた 5 症例の内訳は以下の通りである。占居部位は直腸 2 例, S 状結腸 2 例, 下行結腸 1 例であった。Stage 0: 1 例, Stage I: 2 例, Stage IIIa: 1 例, Stage IV: 1 例であり, また Dukes 分類では, Dukes A: 3 例, Dukes C: 1 例, Dukes D: 1 例であった。分化度別では, 高分化腺癌 2 例, 中分化腺癌 3 例であった。深達度別では, m 1 例, sm 1 例, mp 1 例, ss (al) 2 例であった。リンパ節転移または肝転移陽性は 2 例であった (表)。

5 症例のうち腫瘍からの DNA に *K-ras* 遺伝子点突然変異が認められ糞便においても一致した変異が認められる 3 症例の内訳は以下の通りであった。占居部位は直腸 1 例, S 状結腸 2 例であった。Stage 0: 1 例, Stage I: 1 例, Stage IV: 1 例であり, また Dukes 分類では, Dukes A: 2 例, Dukes D: 1 例であった。分化度別では, 高分化腺癌 2 例, 低分化腺癌 1 例であった。深達度別では, m 1 例, sm 1 例, ss(al) 1 例であった。リンパ節転移または肝転移陽性は 1 例であった(表)。

今回, 新たに catrimox-14® を用いて便サンプルより簡易に, 約 1 時間以内で PCR グレードの DNA を調整することができ, 全過程における時間の短縮を計ることができた。

### 考 察

大腸癌マス・スクリーニングの非侵襲的検査方法として便潜血反応があり, 広く一般に使われている。しかしながら, 胃潰瘍や大腸憩室症などの疾患においても陽性反応を示し, また, 偽陰性率 37.5%<sup>19)</sup>との報告もあり, 便潜血反応は, 非特異的である。

これに対し最近の大腸癌遺伝子関連の研究により, その発癌からの過程が明らかにされつつあり, *K-ras*, p53 遺伝子など少なくとも 5 つの遺伝子の異常がその発生進展過程に関与していると考えられ<sup>10)11)</sup>, これらの遺伝子異常を指標として病理学などにおいて癌に対する診断がより合目的なものになりつつある。

今回検出を目的とした *K-ras* 遺伝子の点突然変異は, 腺腫が高度異型性を示す過程に関与していると考えられている。*ras* 遺伝子 family には *K-ras* 遺伝子, *H-ras* 遺伝子, *N-ras* 遺伝子という構造の類似した 3 つの遺伝子があり<sup>20)21)</sup>, 大腸癌に関与する *ras* 遺伝子の 88% は *K-ras* であり, その hot spot は codon 12, 13 あるいは 61 に存在し, その大部分は codon 12 に存在する。その *ras* 遺伝子変異は, 径 1cm 以上の腺腫では 58%, 大腸癌では 47% に認められるとの報告がある<sup>22)</sup>。

*K-ras* 遺伝子点突然変異を検出する方法としてプローブを用いる Southern 法<sup>17)</sup>および plaque

hybridization 法, 点突然変異に対して特異的に結合するように primer を設計し目的とする変異のみを増幅する MASA 法<sup>14)</sup>, DNA を変性させ単鎖化し 1 塩基配列の差を単鎖のバンドの移動の違いとして検出する SSCP 法<sup>15)</sup>などがある。Southern 法および plaque hybridization 法は変異を検出する際, 相補的に変異に対応するオリゴヌクレオチド・プローブをハイブリダイゼーションさせる複雑な操作を必要とするためルーチン化は困難である。MASA 法は, 操作は簡便で理論上感度は高いものの, template となる DNA の精製条件や PCR 条件(特に anneal 温度)によって対応する変異以外の点突然変異も増幅されてしまう恐れがあるなどの問題がある。また Southern 法および plaque hybridization 法, MASA 法は, いずれも多部位における数塩基対の欠失, 挿入を伴う p53 遺伝子などの癌抑制遺伝子の検出に際して, それらに対応するプローブ, プライマーの数を準備しなければならず癌抑制遺伝子の検出は困難であることが考えられた。SSCP 法は変性単鎖化された 1 本鎖 *K-ras* 遺伝子点突然変異のバンドを明確に分離するには, ゲル内温度をある一定温度に保たなければならないが, *K-ras* 遺伝子ばかりでなく p53 遺伝子などの癌抑制遺伝子の検出も比較的容易に行え, かつ一度に大量の検体を扱うことができるなどの利点も併せ持っている。したがって今回, SSCP 法にて *K-ras* 遺伝子点突然変異の検出を行った。

今回 non RI PCR-SSCP 法にて, 10 検体のうち 5 検体の腫瘍に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認め, 頻度は他の報告と比し大きな相違はなかった。腫瘍と糞便に同一の *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた 3 症例のうち 2 症例の腫瘍は, リンパ節転移を伴わない壁深達度 m および sm の早期癌で検出することができた(表)。したがって, non RI PCR-SSCP 法にて糞便中より *K-ras* 遺伝子の変異を検出する方法が, 大腸癌マス・スクリーニングに応用されることにより早期発見につながる可能性が示唆された。

Non RI PCR-SSCP 法にて腫瘍に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた 5 症例のうち 2 症例は, 糞

便中には点突然変異を検出することができず、MASA 法でも再検討したが検出することはできなかった。したがって、糞便中より *K-ras* 遺伝子の変異を検出するにあたって、本法は MASA 法と同様に感度の点で優れた方法といえる。

上記の糞便中に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めなかった 2 症例の原因について検討してみる。HN43は占居部位：下部直腸(Rb), anal verge より 4.5cm で直腸指診にて触診できた症例であり、糞便は緩下剤にて急激に排泄され、かつ肛門付近であったために、剥離、脱落した大腸癌組織が均等に混じらなかったことが原因の一つとして考えられる。また、NS49は占居部位：下行結腸、腫瘍径 3.2×2.9cm であり、腫瘍に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた 5 検体のうち最小の腫瘍径であった。腫瘍が小さく、低い隆起性病変のため十分な量の腸癌組織が剥離、脱落しなかったことが原因の一つとして考えられる。よって、糞便中に *K-ras* 遺伝子点突然変異を検出する際に影響を与える要因として、non RI PCR-SSCP 法にて糞便中にも腫瘍と同じ *K-ras* 遺伝子点突然変異を検出し得た 3 症例の場合とを合わせ検討してみると、①糞便の採取方法、②腫瘍の大きさ、③腫瘍の形状(内腔への隆起程度)、④腫瘍存在部位などが考えられた。

したがって、今後改善を加え、non RI PCR-SSCP 法にて、さらに検出率を上げるためには、p53遺伝子などの癌抑制遺伝子を検出するばかりでなく、糞便の採取方法も検討する必要があると考えられた。

従来、糞便サンプルより PCR グレードの DNA の調整は、多段階のステップがあり、多くの時間が必要とされた。便より DNA を抽出し PCR 施行する場合、便サンプル中には核酸分解酵素の他、特に多糖類等の逆転写酵素と Taq polymerase の両方を阻害する因子が存在<sup>23)</sup>するため、通常の方法で PCR グレードの DNA を調整することは困難であり、これまでは、hexadecyl trimethyl ammonium bromide(CTAB)<sup>24)</sup>が用いられた。しかしながらこの方法は、多くのステップを必要とするため、PCR グレードの大腸癌 DNA の調整に

約12時間以上の時間が必要であった。しかし陽イオン界面活性剤である catrimox-14®を用いることによって、contamination の可能性を低くしたばかりでなく、便サンプルから PCR グレードの DNA の調整に約 1 時間以内で抽出することができるようになり、全過程における時間の短縮を計ることができた。

また、放射性同位元素を用いず蛍光色素ローダミン X®を用いて検出できたことによりこの方法は、汎用性が高められた。

さらに、SSCP 法は点変異ばかりでなく、小欠失や挿入のような DNA 多形性を容易に同定できる。よって大腸癌発生進展過程に関与していると示唆されている癌抑制遺伝子、例えば APC, p53 遺伝子などの変異の有無の同定は、他の方法より容易である。したがって、non RI PCR-SSCP 法にて糞便中より大腸癌遺伝子を検出する方法は、大腸癌の検出率を高めることができると考えられる。

最後に、大腸癌において p53遺伝子など高率に変異を認める遺伝子はあるが、100%の発現率を示す遺伝子は認められていないのが現状である。しかし、non RI PCR-SSCP 法にて糞便中より *K-ras* 遺伝子変異を検出する方法は、変異が検出された場合、有力な大腸腫瘍の存在診断につながる情報が得られ、この点が従来の方法とは明らかに異なる点である。

## 結 語

大腸癌手術症例10例において、大腸癌組織および術前の糞便より DNA を抽出し、non RI PCR-SSCP 法による *K-ras* 遺伝子点突然変異の検出について検討した。

1. Non RI PCR-SSCP 法にて検討した大腸癌組織10例中 5 例の大腸癌組織に *K-ras* 遺伝子点突然変異を認め、うち 3 例の便中においても大腸癌組織と一致する *K-ras* 遺伝子点突然変異を認めた。3 例中 2 例は、壁深達度 m および sm の早期癌であった。

2. Non RI PCR-SSCP 法にて *K-ras* 遺伝子点突然変異が大腸癌組織には認められたが糞便には認められなかった 2 検体の糞便について、MASA



法でも再検討したが、変異を検出することはできなかった。これは本法が、MASA 法と同様に感度の点で優れた方法といえる。

3. 便から PCR グレードの DNA を抽出する過程は、従来、CTAB を用いても約12時間以上必要とされたのに対し、catrimox-14®を用いることにより約1時間で行うことができ、non RI PCR-SSCP 法で点突然変異の有無を確認するのに要する総所要時間は、約15~20時間であった。

Non RI PCR-SSCP 法にて糞便中より K-*ras* 遺伝子変異を検出する本法は、変異が検出された場合、大腸腫瘍の存在が非常に強く疑われ、大腸癌マス・スクリーニングにおける有力な検査方法の一つとして発展することが期待される。

本稿を終えるにあたり、御指導と御校閲を賜った東京女子医科大学第二外科学教室浜野恭一教授、ならびに亀岡信悟教授に深甚なる感謝の意を表わします。また研究に御協力頂いた教室員各位に厚く御礼申し上げます。

研究にあたり御助言を頂いた国立がんセンター腫瘍遺伝子部部長関谷剛男先生、八島一夫先生ならびに臨床検査部医長菅野康吉先生、武田薬品つくば第一開拓研究所音田治夫部長、大儀和宏研究員ならびに細谷昌樹研究員、宝酒造バイオ研究所大島 淳主任研究員、三菱化学ビーシーエル山森俊治部長に深謝いたします。

コントロール検体の一部を分けて頂いた東京大学医科学研究所中村祐輔教授、癌研究会付属病院生化学部林 尚子先生に深謝いたします。

研究を始めるにあたって御助言頂いた横浜市立大学医学部第二生化学教室長田真一助手、筑波大学医学部病理学教室中村靖司先生に厚く御礼申し上げます。

#### 文 献

- 1) 厚生省大臣官房統計調査部：平成5年人口動態統計。厚生統計協会，東京(1995)
- 2) Ransohoff DF, Lang CA: Screening for colorectal cancer. N Engl J Med 325: 37-41, 1991
- 3) Eddy DM, Nugent FW, Eddy JE et al: Screening for colorectal cancer in a high-risk population. Gastroenterology 92: 682-692, 1987
- 4) Eddy DM: Screening for colorectal cancer. Ann Intern Med 113: 373-384, 1991
- 5) Nishisho I, Nakamura Y, Miyoshi Y et al: Mutation of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. Science 253: 665-669, 1991
- 6) Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM et al: Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinoma. Science 244: 207-211, 1989
- 7) Bos JL, Fearon ER, Hamilton SR et al: Prevalence of *ras* gene mutations in human colorectal cancers. Nature 327: 293-297, 1987
- 8) 藤森孝博, 長廻 紘, 里中和廣ほか: *ras* 遺伝子異常からみた表面型大腸癌の特異性。胃と腸 27: 111-117, 1992
- 9) 馬場正三: 大腸癌発癌に関連する因子について。日臨外医学会誌 55(9): 2181-2192, 1994
- 10) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell 61: 759-767, 1990
- 11) 中村祐輔: 大腸腫瘍の発生・進展過程と遺伝子異常。「細胞工学」(中村祐輔 編) pp77-85, 秀潤社出版, 東京(1993)
- 12) Sidransky D, Toino T, Hamilton ST et al: Identification of *ras* oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. Science 256: 102-105, 1992
- 13) 長谷川嘉一, 武田 聖, 一井重利ほか: 大腸腫瘍患者の便を試料とした K-*ras* 遺伝子点突然変異の PCR 法による検出。日癌会52回総会記: 572, 1993
- 14) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y: Detection of K-*ras* mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). Hum Mut 2: 112-117, 1993
- 15) Orita M, Suzuki Y, Sekiya T et al: Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. Genomics 5: 874-879, 1989
- 16) Hayashi K, Yandell DW: How sensitive is PCR-SSCP? Hum Mut 2: 338-346, 1993
- 17) Grompe M: The rapid detection of unknown mutations in nucleic acids. Nat Genet 5: 111-117, 1993
- 18) Macfarlane DE, Dahle CE: Isolating RNA from whole blood the dawn of RNA-based diagnosis? Nature 362: 186-188, 1993
- 19) 菅原伸之, 山下和良, 熊谷裕司ほか: 人間ドックでの発見大腸癌に関する検討 受診歴を中心に。健康医 9(1): 50-55, 1994
- 20) Barbacid M: *ras* genes. Annu Rev Biochem 56: 779-785, 1987
- 21) Bos JL: The *ras* gene family and human

- carcinogenesis. *Mutat Res* 195 : 255-271, 1988
- 22) **Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR et al** : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319 : 525-532, 1988
- 23) **Wilde J, Eiden J, Yolken R et al** : Removal of inhibitory substances from human fecal specimens for detection of group A rotaviruses by reverse transcriptase and polymerase chain reactions. *J Clin Microbiol* 28 : 1300-1307, 1990
- 24) **Wang J, Jiang XI, Madore HP et al** : Sequence diversity of small, round-structured viruses in the norwalk virus group. *J Virol* 68 : 5982-5990, 1994
-