

(90)

氏名(生年月日)	比 氣 利 康
本 籍	
学位の種類	博士(医学)
学位授与の番号	乙第1617号
学位授与の日付	平成8年2月16日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当(博士の学位論文提出者)
学位論文題目	Non radioisotopic polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis (nonRI 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
論文審査委員	(主査) 教授 浜野 恭一 (副査) 教授 相川 英三, 太田 和夫

主 論 文 の 要 旨

〔目的〕

大腸癌の発生進展過程には多段階の遺伝子異常が関与していると考えられている。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関与していることが示唆されている。

大腸癌マス・スクリーニングにおいて分子生物学的診断の可能性を検討するため、non RI PCR-SSCP 法にて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を施行した。また、本法の臨床応用への可能性を探るため、検出感度、簡便さおよび臨床的有用性について検討した。

〔対象および方法〕

大腸癌症例10例の腫瘍および糞便を対象に K-ras 遺伝子点突然変異を同定した。

K-ras 遺伝子点突然変異を検出する方法は、①凍結保存された腫瘍組織10~15mg より、②前処置により排泄された水様便を遠心分離し沈殿物を凍結保存、その内1g より陽イオン界面活性物質 Catrimox-14®にて DNA を抽出し、蛍光色素ローダミン X を用いて2 step PCR を施行、PCR products に対し SSCP を施行した。

本法にて腫瘍に K-ras 遺伝子点突然変異を認めた糞便の検体に対して、mutant-allele-specific amplification (MASA) 法にて再検討し、また本法の所要時間についても検討した。

〔結果および方法〕

1. 臨床成績

1) 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組織と一致する変異を認めた。

2) 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 の早期癌であった。したがって、本法が、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。

2. 検出法の評価

1) 腫瘍に K-ras 遺伝子点突然変異を認め糞便には認められなかった2例の検体に対して MASA 法を施行したが、変異を検出することはできなかった。以上より本法は、MASA 法と同様に感度の点で優れた方法といえる。

2) 便より DNA を抽出し PCR 施行する場合、便サンプル中には PCR を阻害する因子が存在するため、従来、多段階のステップを必要とした。しかし Catrimox-14®を用いたことによって、約1時間以内で抽出することができるようになり、本法に要する総所要時間は、約15~20時間であった。

3) 放射性同位元素を用いず蛍光色素を用いて検出

できたことによりこの方法は、汎用性が高められた。

本法は、癌抑制遺伝子 p53 遺伝子などの変異の有無の同定も、他の方法より容易であり、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点が便潜血反応とは明らかに異なる点である。

〔結論〕

1. 本法にて糞便中に *K-ras* 遺伝子点突然変異を検出した場合、大腸腫瘍の存在診断につながり、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組織と一致する変異を認めた。またリンパ節転移を伴わない壁深達度 m および sm の早期癌をも検出する

ことができた。

2. 本法にて、大腸癌組織に変異を認めた 5 症例中 2 症例は糞便に変異は認めず、MASA 法にて再検討したが変異は認めなかった。以上より、本法は感度の点で優れた方法といえる。

3. 本法は感度的にも優れ、糞便中における *K-ras* 遺伝子点突然変異の有無を約 20 時間以内で確認でき、また検出に蛍光色素を用いたため汎用性が高められた。

以上より本法は臨床的に有用である。

論文審査の要旨

大腸癌早期発見のために大腸癌マス・スクリーニングは重要である。そのうち、非侵襲的な方法として便潜血反応があるが、非特異的である。

これに対し、糞便中より、大腸癌発生進展に関与している *K-ras* 遺伝子点突然変異を検出する分子生物学的診断は有力な大腸腫瘍の存在診断につながる特異的な非侵襲的検査である。

本研究は大腸癌患者の便中における *K-ras* 遺伝子点突然変異を PCR-SSCP 法にて検出する方法を確立し、その検出感度、簡便さについて検討した。大腸癌患者の組織、糞便より陽イオン界面活性物質 Catrimox-14® を用いて DNA を抽出、蛍光色素を用いて 2 step PCR を施行した。PCR products に対して SSCP を施行し、*K-ras* 遺伝子点突然変異を検出した。

その結果、壁深達度 m および sm の早期癌も検出することができ、検出感度にも優れ、汎用性に豊み短時間で施行できるようになった。

以上より本研究は、学術上、臨床上価値ある論文である。

主論文公表誌

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

東京女子医科大学雑誌 第65巻 第11号
928-937頁 (1995年11月25日発行) 比気利康

副論文公表誌

- 1) 術前に診断し得たメッケル憩室出血の 3 例。日救急医学会関東地方会誌 13(1) : 24-27 (1992) 比気利康, 釘宮睦博, 村瀬 茂, 他 2 名
- 2) 腹部鈍的外傷後にみられた胆汁性仮性嚢胞の 1 治験例。日救急医学会関東地方会誌 13(1) : 84-86 (1992) 比気利康, 泉 公成, 村瀬 茂, 他

3 名

- 3) 術前に診断しえた空腸腫瘍大量出血の 1 例。日救急医学会関東地方会誌 14(1) : 34-35 (1993) 比気利康, 川瀬敦之, 泉 公成, 他 3 名
- 4) 瘻孔内に限局した痔瘻瘻の 1 治験例。日本大腸肛門病会誌 44(3) : 360-364 (1991) 神崎 博, 亀岡信悟, 朝比奈完, 呉 兆礼, 比気利康, 他 5 名
- 5) 切除不能な癌に対する, radiofrequency 誘電加温を用いた局所温熱療法の実験。東女医大誌 60(8) : 627-633 (1990) 瀬下明良, 浜野恭一, 大地哲郎, 桐田孝史, 井原 寛, 西山隆明, 堀江良彰, 浅沼端子, 金沢裕之, 木山 智, 比気利康, 宮川隆平
- 6) 魚骨による胃穿孔の 1 例。日救急医学会関東地方会誌 14(2) : 18-19 (1993) 泉 公成, 村瀬 茂, 川瀬敦之, 比気利康, 他 3 名