

氏名(本籍)	稲留征典 (鹿児島県)
学位の種類	博士(医学)
学位記番号	博乙第1989号
学位授与年月日	平成16年1月31日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
審査研究科	人間総合科学研究科
学位論文題目	ホルマリン固定病理検体を利用したゲノムDNA解析法の改善に関する研究

主査	筑波大学教授	医学博士	三輪正直
副査	筑波大学教授	医学博士	赤座英之
副査	筑波大学教授	医学博士	加藤光保
副査	筑波大学助教授	医学博士	川上康
副査	筑波大学助教授	医学博士	松村明

論文の内容の要旨

(目的)

近年、ヒト材料を用いた分子生物学的解析の進歩にはめざましいものがあり、今後、DNA診断は病理組織診断と合わせて臨床上必要不可欠なものになると考えられる。病理検体を用いて十分なDNA解析を行うことができれば、患者の負担が軽減されるのみならず、組織診断に対応したDNA診断が行える。しかし、生検あるいは切除された病理検体のほとんどは組織診断用にホルマリン固定され、ホルマリン固定材料から抽出したDNAは断片化しているため、これを用いた遺伝子解析には限界がある。そこで本研究では、まず、ホルマリン固定材料から抽出したDNAを用いた遺伝子解析を実際に行ってその有用性と問題点を示す。次に、ホルマリン固定材料から抽出したDNAを凍結材料およびメタノール固定材料から抽出したDNAと比較し、その保存状態を明らかにする。さらに、ホルマリン固定材料から抽出したDNAから高分子量DNAのみを分離・精製することが可能かどうかについて検討を行い、その有用性を明らかにする。

(対象と方法)

- (1) ホルマリン固定された病理検体を用いて実際にDNA解析を行った。対象は、肺結核にB細胞性悪性リンパ腫の合併が疑われた症例、反応性リンパ節3例、胃生検および大腸生検症例50例である。いずれも病理検査用にホルマリン固定・パラフィン包埋された検体からDNAを抽出し、免疫グロブリン重鎖のリアレンジメント解析を用いてB細胞のクロナリティーを調べた。
- (2) 高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使ってDNAの分離・精製を行い、PCR法にてその有用性を調べた。まず、検体として2種類のDNAサイズマーカーを用い、HPLCを使ってDNAを分子量の違いによって分離可能であることを確認した。次に、凍結材料、メタノール固定材料、ホルマリン固定材料の各検体から抽出したDNAの保存状態をHPLCを使って可視化し、比較・解析した。さらに、外科的に切除されホルマリン固定された4種類の臓器についてHPLCを使って高分子量DNAのみを分離・精製し、分離する前のDNAとその質をPCR法を用いて比較した。増幅には β -globin領域を用い、262bpから989bpの

間で約 100bp 間隔でプライマーを設定した。

(結果)

- (1) 肺結核に悪性リンパ腫の合併が疑われた症例では、2箇所異なる病変部位から DNA を抽出し、さらに免疫グロブリン重鎖遺伝子についても2つの異なる領域 (FR3A, FR2) において解析を行い、いずれもクローナルな増殖であることが確認でき悪性リンパ腫と診断された。また、反応性リンパ節の胚中心は1個から5個 (平均 2.5 個) の B 細胞クローンから構成されていることが明らかになり、生検材料を対象としたクロナリティー解析では、悪性リンパ腫ではない反応性 (炎症性) の症例でも 44 例中 8 例 (約 18%) においてクローナルなバンドが検出された。
- (2) DNA サイズマーカーを HPLC で分離したところ、マーカーの各分子量に相当するピークを検出することが出来た。凍結材料、メタノール固定材料、ホルマリン固定材料の各検体から抽出した DNA の保存状態の比較では、凍結材料が最も良く、ホルマリン固定材料が最も悪かった。さらには、ホルマリン固定材料中にも少量ではあるものの、高分子量 DNA が残存していることが確認された。また、HPLC を用いて高分子量 DNA のみを分離・精製して PCR 増幅を行ったところ、そのままの状態でも PCR 増幅を行うよりも良好な結果が得られた。

(考察)

- (1) 悪性リンパ腫の診断に免疫グロブリン重鎖のリアレンジメント解析を応用することは、顕微鏡による組織学的観察のみではその病変が反応性病変であるのか腫瘍性病変であるのかの判定が困難な時には特に有用である。但し、生検材料のように検体量が少ない場合、偽陽性としてクローナルなバンドが検出されることが明らかになり、生検材料を用いたリアレンジメント解析 (クロナリティー解析) の判定には注意が必要であると考えられた。
- (2) HPLC を用いて DNA の保存状態を比較したところ、凍結材料、メタノール固定材料、ホルマリン固定材料の順に保存状態が悪くなった。但し、DNA の断片化が進んでおり保存状態が最も悪いとされているホルマリン固定材料においても、少量の高分子量 DNA が残存していることが明らかになり、さらに、この高分子量 DNA のみを分離・精製することが可能であることがわかった。このことはホルマリン固定された病理検体を利用した遺伝子解析は、今後さらに改善・発展する余地があることを示していると考えられた。今後は DNA 断片化の機序の解明とその修復、さらには残存する少量の高分子量 DNA の増幅について検討を重ねる必要があると考える。

審 査 の 結 果 の 要 旨

著者はホルマリン固定病理検体を用いて PCR 法を利用した免疫グロブリン重鎖遺伝子のリアレンジメント解析を行い、実際の診断における有用性と問題点を示した。さらに、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) を用いてホルマリン固定材料から抽出した DNA の保存状態を明らかにし、また高分子量 DNA の回収を試みた。ホルマリン固定材料中の DNA の断片化の機序は、重要な問題にもかかわらず今だ十分に解明されておらず、ホルマリン固定された検体から良質の DNA を抽出することは、病理検体を用いた DNA 解析の応用範囲を広げる上で必要不可欠である。本研究は DNA 断片化の解明には至ってはいないが、ホルマリン固定材料から抽出した DNA の保存状態を HPLC を用いて可視化し、ホルマリン固定材料中にも少量の高分子量 DNA が残存しており、これらを回収することが可能であることを示した。このようにして回収した高分子量 DNA も完全な状態ではないことも判明し問題点も残されてはいるが、ホルマリン固定材料中の DNA

断片化の機序の解明は重要なテーマであり、さらなる検討が期待される。なお本研究要旨は *Diagnostic Molecular Pathology* に印刷中である。

よって、著者は博士（医学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認める。