

氏名(本籍)	あ み よし ひろ 阿 弥 良 浩 (神奈川県)		
学位の種類	博 士 (医 学)		
学位記番号	博 甲 第 1,290 号		
学位授与年月日	平 成 6 年 3 月 25 日		
学位授与の要件	学位規則第5条第1項該当		
審査研究科	医 学 研 究 科		
学位論文題目	遺伝子増幅法の臨床応用に関する研究		
主査	筑波大学教授	医学博士	稲 田 哲 雄
副査	筑波大学教授	医学博士	阿 部 帥
副査	理化学研究所 ライフサイエンス	農学博士	石 井 俊 輔
	筑波研究センター分子遺伝学研究室主任研究員 (筑波大学客員教授)		
副査	筑波大学教授	医学博士	大 塚 藤 男
副査	筑波大学助教授	理学博士	岩 村 幸 雄

論 文 の 要 旨

〈目的〉

本研究は近年盛んに使われるようになった遺伝子増幅法を用いて極めて少数の異常細胞の遺伝子を高感度に検出することを目的とした。第一部では、Polymerase Chain Reaction(PCR)を使い、末梢血単核球中に存在するHTLV-1プロウイルスの検出を行った。第二部では、新しい遺伝子増幅法Ligase Chain Reaction(LCR)を用いてある種の癌で高頻度にみられるK-ras遺伝子の第12コドンにおける点突然変異を高感度に検出する系の樹立を試みたものである。

第1部 HTLV-1プロウイルスの検出へのPCRの応用

〈方法〉

HTLV-1プロウイルスの検出；末梢血中の単核球をファイコールで分離後、proteinase Kでタンパク分解してライゼートとした。それから直接PCRをおこなった。PCR産物はアガロース電気泳動した後フィルターに転写し、³²Pでラベルしたプローブを用いてサザンブロットを行い、HTLV-1プロウイルスのgag, pX, LTR領域の配列の検出を行った。細胞ゲノム中にHTLV-1プロウイルスを一分子持つATL-1K細胞を用いて検出感度の検討をおこなった。

HTLV-1持続感染ラットにおける母仔間伝播の証明；5匹のF344正常雌ラットの3、4週令時にHTLV-1産生細胞MT-2を尾静脈から静注した。静注後12週から持続感染状態で正常雄ラットと交配

し、仔ラットを得た。仔ラットから経時的に採血を行い、末梢血単核球中の HTLV-1 プロウイルスの検出を行った。

〈結果〉

検出感度は正常リンパ球約 10^5 個に対し、HTLV-1 プロウイルス 1 分子まで検出可能であった。つまり約 10^5 個の末梢血単核球中に感染細胞が一個あれば検出可能と考えられた。この高感度検出系を用いてラット母仔間で HTLV-1 の伝播を調べた。その結果 MT-2 投与母ラット 4 匹の仔 25 匹から HTLV-1 プロウイルスを検出した。全期間中の検出率が低いので、二匹の仔ラットの生後 4 週の末梢血単核球において更に追加の検出を行い、コンタミネーションの可能性を否定した。その結果、HTLV-1 が確かに母仔間で伝播したと考えられた。

〈考察〉

本研究によって HTLV-1 の母子間伝播がラットのモデル系においてもおこることが示された。これは小動物モデルで HTLV-1 の母子間伝播を示した初めての例である。また一方、ラット内でのウイルス量が少ないことも明らかになった。ウイルス量が少ない理由は不明であるが、ヒトキャリアーにおいてもウイルス量がこのラットと同じ程度に少ない例もあることが報告されている。このモデルは将来的に母子間伝播の経路の詳細な分析や、母子感染の予防法の検討にも応用可能と考えた。

第 2 部 K-ras 点突然変異に対する Ligase Chain Reaction(LCR)法の臨床応用に関する研究

〈方法〉

K-ras 遺伝子の変異は第12コドンの第1, 第2塩基に集中していることが知られている。LCR ではその変異を検出するため隣接した二つのオリゴマーを使う。それらが対象とする DNA 鎖と正しく対合した時のみライゲースにより結合され、できたオリゴマーが次の反応サイクルの鋳型となることができる。このようなサイクルを繰り返すことにより対象配列が選択的に増幅されていく。一塩基対は4種類の配列をとり得るので変異検出用のオリゴマーは4種類、計8本合成した。またそれらの下流に隣接するオリゴマーを2本合成しそれぞれ放射能で標識して、高感度の検出に用いた。つまり一塩基対の変異検出のために、計10本のオリゴマーを用意した。

DNA サンプルとして K-ras 第12コドンの第一塩基がグアニンからチミンに変異していることが知られているヒト肺巨細胞癌細胞株 LU65 を用いた。これを使い LCR の反応温度や反応サイクル数など至適条件の設定および検出感度の検討などを行った。またヒト卵巣癌から取られた DNA から K-ras の変異の検出を試みた。

〈結果〉

至適反応温度は 63°C から 65°C であり、対象とする DNA が全て均一な組織からなる通常の検出には、反応サイクルは30回で十分であることがわかった。また同じ条件下で反応サイクル数を40回に増やすことにより検出感度を100倍にまで上昇させることに成功した。また臨床材料としてヒト卵巣癌 DNA を用いて K-ras の第2塩基がグアニンからチミンに変化しているものを検出し得た。

〈考察〉

臨床検体には、細胞診などのように正常組織の混入が回避できないものも多い。そのような検体においても LCR は対象となる異常遺伝子だけを特異的に増幅する簡単な検出法と考えられた。今後、臨床方面への応用が期待される。

審 査 の 要 旨

本研究は、2種の遺伝子増幅法についてその臨床への適応を検討した。まず PCR 法についてはサザンブロット法とを組み合わせラットにおいて HTLV-1 の母仔間の伝播を確認した。この高感度検出系によれば、この伝播の経路などを明らかにすることや母子感染の予防法の検討への応用が期待される。第二の LCR 法については反応条件の改良によってその検出感度を100倍にまで高めることができ、これによって卵巣腫瘍の細胞に K-ras 変異を検出した。すなわち本研究は、これらの遺伝子増幅法が微小癌や前癌病変の診断に有用な情報を与えることを示したものとして、意義深いものである。

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。