

# 十二指腸液中K-ras癌遺伝子変異の検出とその診断的意義に関する研究

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	<a href="http://hdl.handle.net/2297/9341">http://hdl.handle.net/2297/9341</a>

## 十二指腸液中 *K-ras* 癌遺伝子変異の検出と その診断的意義に関する研究

金沢大学がん研究所 腫瘍制御研究部門腫瘍内科 (主任: 澤武紀雄教授)  
阿依古麗 哈

内視鏡下経乳頭的に膵管より採取した純膵液において *K-ras* コドン 12 の変異が膵癌で高率に検出されることより、膵液中 *K-ras* 変異の検出は膵癌の診断法として大きな期待が寄せられている。しかし、慢性膵炎でも高感度な検出法を用いると粘液細胞過形成に由来する *K-ras* 変異の検出される場合があり、その癌特異性が問題となっている。また、純膵液採取には一定の技術を要するのみでなく、被検者に加重な負担を与える。そこで、誰にでも容易に採取できる十二指腸液において *K-ras* コドン 12 の変異を 3 種の検出法を用いて検討し、膵胆道癌の診断においていかなる意義を有するかを明らかにしようとした。内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP) 後スコープの吸引装置を利用して回収した十二指腸液より抽出した DNA において変異アレル特異的増幅 (mutant allele specific amplification, MASA) 法, PCR 制限酵素断片長多型分析 (PCR restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) 法, ハイブリダイゼーションプロテクション分析 (hybridization protection assay, HPA) 法を用いて *K-ras* コドン 12 の変異の検索を行った。十二指腸液中 *K-ras* コドン 12 の変異は膵癌において PCR-RFLP 法で 42% (16/38), HPA 法で 37% (14/38), MASA 法で 66% (25/38) に検出された。また、胆道癌では PCR-RFLP 法で 32% (7/22), HPA 法で 32% (7/22), MASA 法で 55% (12/22) に検出された。一方、慢性膵炎でも PCR-RFLP 法で 16% (6/38), HPA 法で 13% (5/38), MASA 法で 32% (12/38) に認められたが、胆嚢腺筋腫症 20 例, 胆石症 22 例, 対照群 20 例では PCR-RFLP 法, MASA 法いずれにても総て陰性であった。純膵液中での *K-ras* コドン 12 の変異を検討すると膵癌では PCR-RFLP 法で 78% (29/37), HPA 法で 66% (19/29), MASA 法で 81% (26/32) に検出され、膵液に比して十二指腸液における場合のほうが、いずれも低率であった。以上のように、ERCP 直後に膵癌患者より簡便に採取した十二指腸液での *K-ras* コドン 12 変異の検出頻度は、純膵液の場合に比して低いが、高感度の MASA 法を用いると *K-ras* コドン 12 変異がかなり高率に検出可能で、十二指腸液中 *K-ras* 変異の検出は、膵癌のみならず胆道癌のスクリーニングにも有用なことが示唆された。

**Key words** *K-ras*, pancreatic cancer, biliary tract cancer, duodenal juice, pancreatic juice

近年各種画像診断法の進歩や様々な腫瘍マーカーの開発などにより、ある程度進行した膵癌の診断能は非常に向上したが、依然として早期診断は難しく、治癒率の向上はあまりみられていない。また、膵生検は胃や大腸癌の場合のように容易に行えないため、慢性膵炎などの鑑別困難例も少なくない。一方、近年癌に関する分子生物学的研究の進歩により、膵癌で種々の癌遺伝子、癌抑制遺伝子異常の発現することが明らかにされ、特に、ヒトの膵癌の大部分を占める膵管癌で *K-ras* コドン 12 の点突然変異が膵癌組織で 75-100% と高率に発現することが明らかにされて<sup>1)~11)</sup>、発癌との関わりのみならず、臨床応用の点からも注目されている。当教室では膵の病的状態が増加する物質は血液よりも膵液へより反映され易いのではないかとこの観点より、十二指腸内視鏡下経乳頭的に採取した純膵液中の

種々の腫瘍マーカーや各種生理活性物質を測定し、膵疾患の診断へ応用しようとする研究を行って来た<sup>12)~14)</sup>。このような経験を踏えて、膵癌組織で *K-ras* コドン 12 の点突然変異が高率に発現することに注目し、セクレチン刺激による内視鏡下経乳頭的に採取した純膵液における *K-ras* コドン 12 の点突然変異の検出が膵癌診断に有用であることを報告してきた<sup>15)~18)</sup>。この方法では十二指腸内視鏡下経乳頭的に膵管に選択的にカニューレを挿入し、セクレチン刺激下に採取した純膵液を使用するので、このような場合の術者は十二指腸内視鏡検査に関して経験の深い専門家である必要がある。加えて、患者にとっても加重な負担になる検査法である。

そこで、本稿では膵液のみではなく、胆汁、十二指腸自身からの分泌液、胃液なども含有するが、誰にでも容易に採取でき

平成 10 年 9 月 18 日受付, 平成 10 年 10 月 23 日受理

Abbreviations: ASO, allele specific oligonucleotide; AE, acridinium ester; CT, computed tomography; ERCP, endoscopic retrograde cholangiopancreatography; HPA, hybridization protection assay; MASA, mutant allele specific amplification; PTCD, percutaneous transhepatic choledochal drainage; PCR-RFLP, restriction fragment length polymorphism; RLU, relative light unit; SSCP, single strand conformation polymorphism

る十二指腸液において*K-ras*コドン12変異の有無を検討し、膵癌のみならず胆道癌においてもいかなる診断的意義を有するかを解明しようとした。また、*K-ras*コドン12の検出法に関しては種々の方法が試みられてきたが<sup>19)~21)</sup>、Nakamuraら<sup>21)</sup>により開発された変異アレル特異的増幅 (mutant allele specific amplification, MASA) 法は検出感度が非常に高いと言われていたものの、測定条件が微妙で、必ずしも普及していない。そこで、MASA法の有用性について、PCR制限酵素断片長多型分析 (PCR restriction fragment length polymorphism analysis, PCR-RFLP) 法やハイブリダイゼーションプロテクション分析 (hybridization protection assay, HPA) 法など他の方法とも比較してその有用性についても明らかにしようとした。

#### 対象および方法

##### I. *K-ras* 変異の検出法に関する基礎的検討に用いた培養細胞株

各検出法の基礎的検討を行うために、陽性コントロールとして*K-ras*コドン12にGGT→TGTへの変異を有するヒト由来膵癌培養細胞株であるPaCa-2を、陰性コントロールとして*K-ras*コドン12に変異を有さないBxPC-3を用いた。PaCa-2についてはJCRB細胞バンク (癌研究振興財団, 東京) より供給され、BxPC-3については大日本製薬 (大阪) より購入した。PaCa-2はD. MEM培地 (大日本製薬), BxPC-3はRPMI 1640培地 (大日本製薬) に牛胎児血清 (大日本製薬) 10%を加えて培養液にて37℃, 5% CO<sub>2</sub>インキュベーター内で培養し、十分増殖した時点で細胞を回収した。

##### II. 十二指腸液

1994年9月から1998年6月までの間に金沢大学がん研究所内科及び関連施設を受診した膵癌患者38例, 慢性膵炎38例, 胆道癌22例, 胆嚢筋腫20例, 胆石症22例, 膵胆道系には疾患がなく, 悪性疾患を否定された比較対照群20例の合計160例を対象とした。膵癌症例中23例は, 手術ないし剖検時の摘出標本の病理組織学的診断により確認された, 他の15例は腹部超音波と腹部コンピューター断層撮影 (computed tomography, CT) の所見に加え, 内視鏡的逆行性胆道膵管造影 (endoscopic retrograde cholangiopancreatography, ERCP) の所見により診断され, これらの膵癌症例については腫瘍の大きさ, 占拠部位, 臨床病期について膵癌取扱規約 (膵癌研究会編)<sup>22)</sup>に従い分類した。胆道癌については全例手術ないし剖検時の摘出標本につき病理学的に確認された。慢性膵炎については, 日本膵臓学会の診断基準<sup>23)</sup>に基づき診断され, いずれも確診に一致していた。

十二指腸液の採取方法は空腹時に十二指腸内視鏡JF-10, JF1T-10, JF-230 (オリンパス, 東京) のいずれかを用いて, ERCP後スコープ抜去時にスコープの先端部を十二指腸乳頭部の近傍に置いてセクレチン注射を行わずに, スコープの吸引装置を利用して十二指腸液2~5ml吸引採取した。

##### III. 膵液

1990年4月から1997年4月までの間に金沢大学がん研究所内科および関連施設を受診した膵癌32例, 慢性膵炎20例より採取した純膵液を対象とした。膵癌症例中20例は, 手術ないし剖検時の摘出標本の病理組織学的診断により確認され, 他の12例は腹部超音波とCTおよびERCPの所見により診断された。慢性膵炎については, 日本膵臓病学会の診断基準に基づき診断

され, いずれも確診に一致していた。膵液の採取は空腹時に十二指腸内視鏡JF-10, JF1T-10, JF-230 (オリンパス) のいずれかを用いて, 経乳頭的に膵管内にカニューレを挿入し, セクレパン (エーザイ, 東京) 1U/kgを静注し, 膵液分泌開始後5分毎4分画に分割して計20分間にわたり膵液を採取した<sup>12~14)</sup>。

##### IV. DNA抽出

採取した十二指腸液, 膵液を遠心分離して得られた沈渣に, プロテイナーゼK (和光純薬工業KK, 大阪) で処理後, フェノール-クロロホルム抽出, エタノール沈殿にてDNAを抽出し, 260nmの吸光度測定により, DNA濃度を測定した<sup>24)25)</sup>。

##### V. MASA法

MASA法は, センスプライマーの3'末端の変異DNAのみを高率にPCRにて増幅して点突然変異を検出しようとする方法である<sup>20)</sup>。正常型では, 3'末端が一致していないために, PCRにて増幅の効率が低下する。このような原理に基づいて, センスプライマーの3'末端を*K-ras*コドン12の第一塩基部位ならびに第二塩基部位に設定した。そして各変異塩基ごとに変異体に特異的なプライマーを合成し, アンチセンス: 5'-CTCATGAAAATGGTCAGAGAAACC-3'; センス: 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTA-3', 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTC-3', 5'-ACTTGTGGTAGTTGGAGCTT-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGA-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGC-3', 5'-CTTGTGGTAGTTGGAGCTGT-3', これらのプライマーを用いて, まず第1塩基, 第2塩基の3種類のプライマーをそれぞれ混合させ1セットにして, 抽出した鋳型DNA100ng, プライマー20pmol, AmpliTaq™ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) 2.5単位, dNTP (Perkin Elmer) 100μM, 10×PCR反応緩衝液 (KCl 500mM, Tris-HCl 100mM pH8.3, MgCl<sub>2</sub> 15mM, 0.1% グラチン) 5μl, 超純水を加え全量50μlとして反応液を調整した。TAKARA™ TP3000 (宝酒造, 京都) を用いた, 前加熱94℃1分間, 変性94℃30秒, アニリング63.5℃1分30秒, 伸長70℃1分30秒を1サイクルとして40サイクルPCR反応を行った。得られたPCR産物は2% NuSieve™ GTG アガロースゲル (FMC BioProducts, Rockland, USA) を用い, Tris-氷酢酸-EDTA (Tris-HCl 40mM pH8.0, 氷酢酸20mM, EDTA2mM) 泳動用緩衝液にて電気泳動を50V, 1時間行い, エチジウムブロマイド (0.5μg/ml) 染色を行って, バンドが得られることにより変異を確認した。そして変異が認められたものについては, さらに, プライマーをそれぞれ単独に用いて, 前述の方法で再度PCRで増幅し, アガロースゲル電気泳動後, エチジウムブロマイド染色にて変異した塩基配列を同定した<sup>21)</sup>。

実際の泳動図を用いて説明すると, 第1塩基部位に変異を設定した3種のプライマーを1セットにして, PCRを施行後に電気泳動を行うと, 図1に示すようにセット1の混合プライマーによりレーン2, 3に変異帯 (179bp) が検出され, 第1塩基の部位に変異のあることが判明する。同様に第2塩基の部位に変異を設定した3種のプライマーをセット2の混合プライマーとしてPCR後に電気泳動を行うとレーン1, 5で変異帯 (178bp) が検出され, 第2塩基の部位に変異が存在すると判定される。次に変異が陽性と判定されたものについて, プライマーをそれぞれ単独に用いて再度PCRを行った後に泳動を行うと, 図2に示すようにレーン2はCGT, レーン3はTGT, レーン1と5はGATのプライマーと反応して変異帯がみられ, 各々の症例の変異パターンも確認することが可能である。

VI. PCR-RFLP 法

Kahn ら<sup>19)</sup>に従い、K-ras コドン 11 の 1 番目に位置するセンスプライマーの 3' 末端に G→C のミスマッチを導入することにより、正常型 K-ras の PCR による増幅産物は、制限酵素 *Bst* NI の認識配列である CCTGG を含むので、*Bst* NI により 128bp と 29bp に切断されるが、変異型 DNA は認識されずに切断されないで、157bp のまま残るようにプライマーを設定した (センス: 5'-ACTGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGACCT-3', アンチセンス: 5'-TCAAAGAATGGTCCTGCACC-3'). これらのプライマーを用いて、抽出した DNA を鋳型として、鋳型 DNA 約 200ng, プライマー 10pmol, AmpliTaq™ ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus) 2.5 単位, dNTP (Perkin-Elmer) 200μM, 10× PCR 反応緩衝液 (KCl 500mM, Tris-HCl pH8.3 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, 0.1% グラチン) 10μl, 超純水を加え反応液量を 100μl となるように調整し、ミネラルオイル 75μl を重層した後、サーマルサイクラー PJ 1000 (Perkin-Elmer Cetus) を用いて、前加熱 94℃ 1 分, 変性 94℃ 48 秒, アニール 56℃ 1 分 30 秒, 伸長 72℃ 2 分 35 秒を 1 サイクルとして 40 サイクル行う PCR 反応を行った。得られた PCR 産物 21μl に対し 10× 牛血清アルブミン 3μg, *Bst* NI (New England Biolabs, Beverly, MA) 30U を加え、反応液量が 30μl となるように調整し、60℃ で 12 時間反応させた。これらのサンプルを 3% NuSieve™ GTG アガロースゲル (FMC BioProducts) にて 1× Tris-ホウ酸-EDTA (Tris 90mM, ホウ酸 90mM, EDTA 2.5mM) 電気泳動用緩衝液にて 50V, 4 時間電気泳動を行い、エチジウムブロマイド染色後、K-ras コドン 12 の点突然変異の有無を検討した。図 3 は PCR-RFLP でのアガロースゲルの電気泳動図であり、野生型は制限酵素 *Bst* NI により 128bp と 29bp 切断され、128bp の位置にバンドを認めるが (レーン 5, 7, 8, 11, 12), 変異型は *Bst* NI により切断されないで、157bp の位置に変異バンドを認める (レーン 4, 6, 9, 10)。K-ras コドン 12 に変異を有する膵癌培養細胞株 PaCa-2 を陽性コントロール (レーン 2), K-ras に変異を有さない BxPC-3 を陰性 (野生型) のコントロールとして用いた (レーン 3)。

VI. HPA 法

この方法の原理は、アクリジニウムエステル (acridinium ester, AE) が標識された DNA プローブはハイブリダイゼーションに際して、プローブに一致した塩基配列を有する場合には AE は塩基間に挿入 (intercalation) されるのに対し、不

致の場合は挿入されないことに基づいている。その後に加水分解反応を行うと、塩基が一致している場合は挿入された AE が加水分解から保護されるが、ミスマッチを有する場合は、AE が加水分解により失活する。そして加水分解から保護された AE を過酸化水素下で化学発光させ、ルミノメータで検出するというものである<sup>20)</sup>。プライマーにはセンス: 5'-GGCCTGCTGAAAATGACTGA-3', アンチセンス: 5'-GTCCTGCACCAGTAATATGC-3' を用いた。十二指腸液および唾液より抽出した DNA 200ng を鋳型として、プライマー 50pmol, AmpliTaq™ ポリメラーゼ (Perkin-Elmer Cetus) 2.5 単位, dNTP (Perkin-Elmer) 200μM, 10× PCR 反応緩衝液 (KCl 500mM, Tris-HCl pH8.3 100mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM, 0.1% グラチン) 10μl, 超純水を加え反応液量を 100μl となるように調整し、サーマルサイクラー PJ 1000 (Perkin-Elmer Cetus) を用いて、前加熱 94℃ 1 分, 変性 94℃ 1 分, アニール 55℃ 1 分, 伸長 72℃ 1 分を 1 サイクルとして 40 サイクル行う PCR 反応を行った。100℃ 10 分間熱変性した後、PCR 産物 10μl に AE 標識を行った野生型 (GGT, グリシン) 及び K-ras コドン 12 の変異型 6 種類 (AGT, セリン; CGT, アルギニン; TGT, システイン; GAT, アスパラギン; GCT, アラニン; GTT, バリン) に一致した 7 種類の DNA プローブ 50μl を各々一本ずつのチューブに添加し、65℃ 15 分間ハイブリダイゼーションを行った。そして各チューブに加水分解用緩衝液 (トリトン X-100 10-50ml/l, ホウ酸ナトリウム 0.15-0.20mol/l) 250μl を加え、65℃ 5 分間加水分解処理を行った後、急冷し、2 種類の検出反応液 (I :

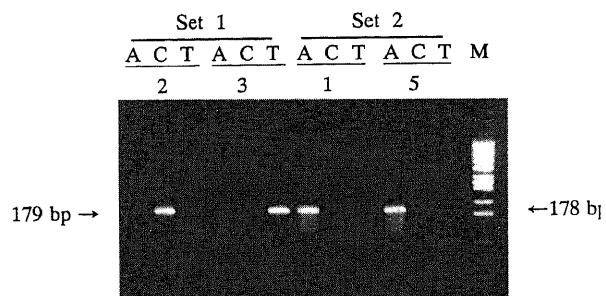


Fig. 2. MASA analysis on K-ras mutations at codon 12 with mutant specific primers. Set 1, mutant specific primers for the first-letter mutations (A, AGT; C, CGT; T, TGT); Set 2, mutant specific primers for the second-letter mutations (A, GAT; C, GCT; T, GTT); M, molecular size markers (ϕ X174 DNA digested by *Hinc* II).

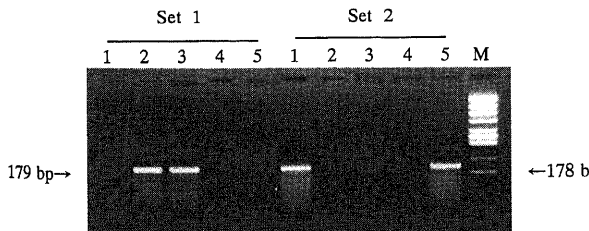


Fig. 1. MASA analysis on K-ras mutations at codon 12 shown by agarose electrophoresis. Set 1, primers for the first-letter mutations; Set 2, primers for the second-letter mutations; Lanes 1-3, duodenal aspirate DNA from patients with pancreatic cancer; Lane 4, duodenal aspirate DNA from a patient with chronic pancreatitis; Lane 5, duodenal aspirate DNA from a patient with biliary tract cancer; M, molecular size markers (ϕ X174 DNA digested by *Hinc* II).

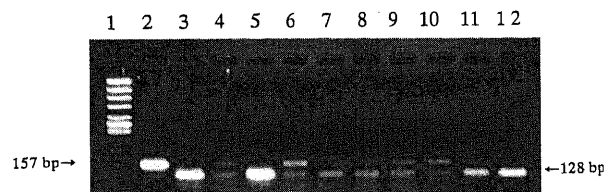


Fig. 3. PCR-RFLP analysis on K-ras mutations at codon 12. PCR products were digested with *Bst* NI. Lane 1; molecular size markers (ϕ X174 DNA digested by *Hinc* II). Lane 2; PaCa-2 as a positive control. Lane 3; BxPC-3 as a negative control. Lanes 4, 6, 9 and 10; cases with pancreatic cancer. Lanes 5, 7, 8, 11, and 12; cases with chronic pancreatitis.

0.1%過酸化水素, 1mmol/l硝酸,  $\Pi$ : 1mol/l水酸化ナトリウム)を順次加え, 化学発光をルミノメーターLeader I (Gen-Probe, Inc, San Diego, USA)にて測定し, カットオフ値は10,000相対光度単位 (relative light unit, RLU)とした<sup>17)</sup>.

#### Ⅷ. 統計的処理

$\chi^2$ 検定を用いて有意差検定を行い,  $P < 0.05$ を有意差ありと判定した.

### 成 績

#### I. MASA法に関する基礎的検討

MASA法の感度は非常に高いが, PCRの際のアニーリングの

温度により特異性が微妙に影響されるので, 陽性コントロールとして腫瘍培養細胞株PaCa-2を, また, 陰性コントロールとしてBxPC-3を用いて, アニーリングの温度を60.0°C, 61.0°C, 62.0°C, 63.0°C, 63.5°C, 64.0°Cと変えて, 至適温度の検討を行った. 図4 (A), (B), (C), (D)に示すようにアニーリング温度が60.0°C, 61.0°C, 62.0°C, 63.0°Cでは特異的のみならず, 非特異的なバンドも認められたが, 63.5°Cでは図4の (E)に示すように*K-ras*コドン12にTGTと変異を有する陽性コントロールと第1塩基部位に変異を設定した3種のプライマーを含むセット1との間のみ特異バンドが認められた. 64.0°Cまで上げると, 図4 (F)に示すようにいずれにもバンドが認められず,

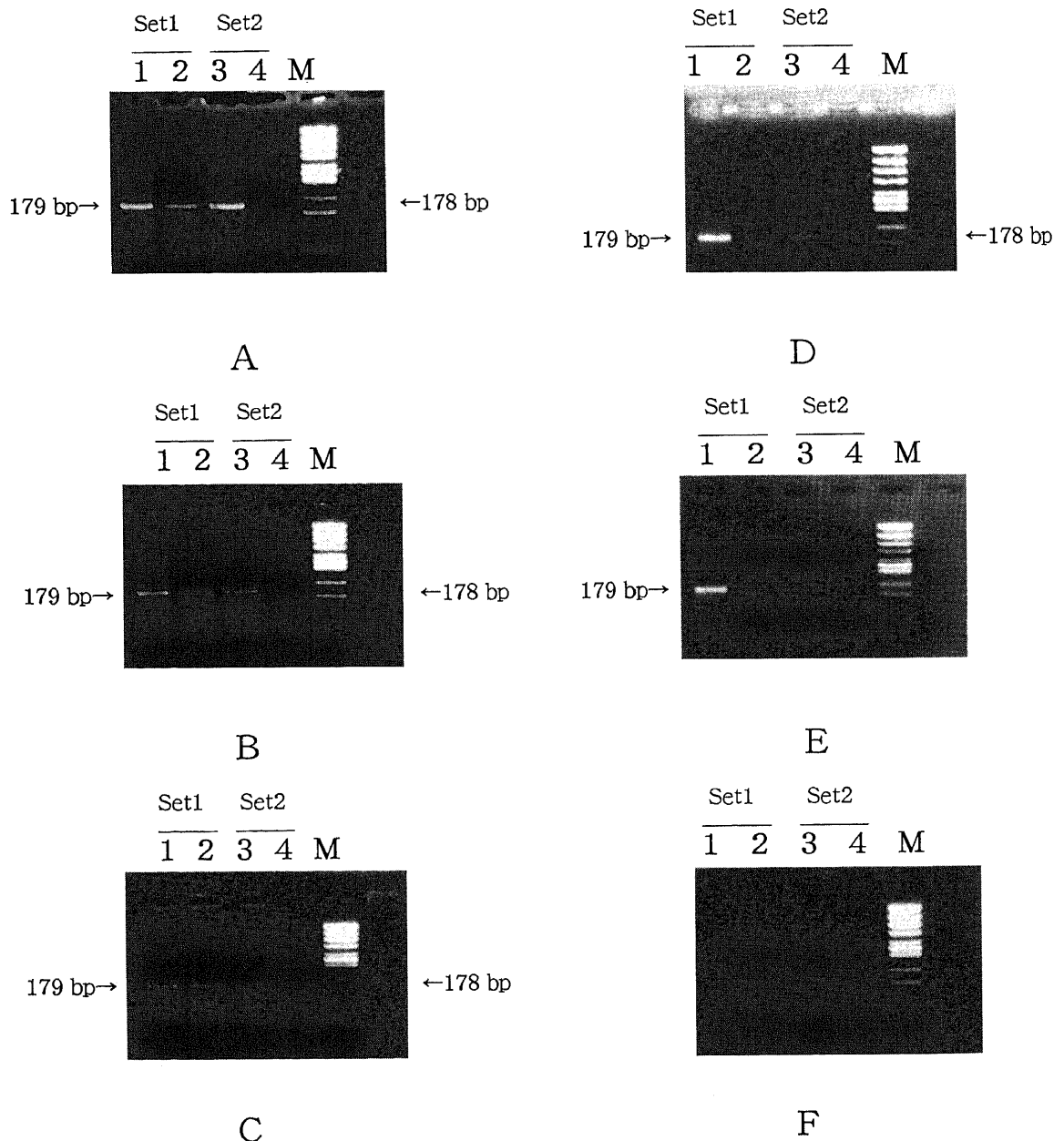


Fig. 4. Determination of the optimal temperature for annealing of MASA, using DNA isolated from PaCa-2 (mutant) and BxPC-3 (nonmutant) cells. Temperatures for annealing: (A) 60°C. (B) 61°C. (C) 62°C. (D) 63°C. (E) 63.5°C. (F) 64°C. Set 1, primers for the first-letter mutations; Set 2, primers for the second-letter mutations; Lanes 1 and 3, DNA from PaCa-2 cells; Lane 2 and 4, DNA from BxPC-3 cells. M: molecular size markers ( $\phi$  X174 DNA digested by *Hinc* II).

この温度ではプライマーに関係なく PCR が進展しにくくなるものと思われた。以上より、アニーリング温度は 63.5℃ が至適温度であるとみなし、以後の検討はこの条件下で行った。

次に、本法の検出感度を明らかにしようとして、同様に PaCa-2 と BxPC-3 をそれぞれ陽性と陰性コントロールに用いて以下のごとく検討した。BxPC-3 より抽出した DNA に対し、PaCa-2 より同様に抽出した DNA がそれぞれ 100%, 10%, 1%, 0.1%, 0.01%, 0.001% の割合となり、かつ両者の DNA を合わせた量が一定となるように 2 種の DNA を混合した、これを鋳型 DNA として PCR を行い、MASA 法にて分析すると図 5 に示すように変異バンドは DNA 濃度が 0.01% まで明瞭に検出され、さらに、0.001% でもわずかに検出されており、検出感度は 0.01~0.001% の間にあると考えられた。

II. 十二指腸液における K-ras コドン 12 の変異

1. MASA 法による検討

十二指腸液において MASA 法により K-ras コドン 12 変異について検索したところ、悪性疾患では膵癌 38 例中 25 例 (66%) で、胆道癌では 22 例中 12 例 (55%) で変異バンドを認めた。良性疾患では慢性膵炎 38 例中 12 例 (32%) で変異バンドを認めたが、胆嚢腺筋腫症 20 例、胆石症 22 例、対照群 20 例ではいずれにも検出されなかった。MASA 法で変異陽性と判定された膵癌、胆道癌および慢性膵炎において各々の変異型について検討すると

表 1 に示すごとく、変異型はさまざまであり、いずれの疾患群においても、GAT (アスパラギン) の変異型を示す頻度が最も高率であったが、疾患により特定のパターンは認められなかった。

2. PCR-RFLP 法による検討

MASA 法との場合と同様に、変異を有する PaCa-2 と変異を有さない BxPC-3 を用いて、希釈系列を作り、これを鋳型 DNA として PCR を行い、PCR-RFLP 法の感度について分析すると図 6 に示すように変異バンドの DNA 濃度は 0.1% まで確認された。

十二指腸液において K-ras コドン 12 の変異について検討したところ、悪性疾患では膵癌 38 例中 16 例 (42%)、胆道癌 22 例中 7 例 (32%) に変異バンドを認めた。良性疾患では慢性膵炎 38 例中 6 例 (16%) に変異バンドを認め、胆嚢腺筋腫症 20 例、胆石症 22 例及び対照群の 20 例では、いずれにも K-ras 遺伝子の変異バンドは検出されなかった。

3. HPA 法による検討

HPA 法による測定値は RLU として表示され、既報<sup>17)</sup>に従い 10,000RLUs をカットオフ値に設定し、十二指腸液中 K-ras 変異の有無を検討した。図 7 に示すように膵癌 38 例中 14 例 (37%)、胆道癌 22 例中 7 例 (32%) が変異陽性と判定された。一方、慢性膵炎 38 例の患者から採取した十二指腸液での検討では、38 例中 5 例 (13%) が変異陽性と判定されたが、胆嚢腺筋腫症 20 例では変異陽性例は認められなかった。MASA 法の成績と対比

10<sup>2</sup> 10<sup>1</sup> 10<sup>0</sup> 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup> M (%)

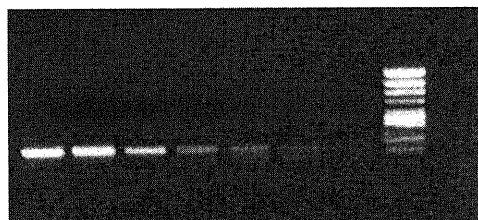


Fig. 5. Evaluation of the sensitivity of MASA analysis on K-ras mutations at codon 12. DNA from PaCa-2 (mutant) cells was mixed with that from BxPC-3 (non mutant) cells at the constant ratios and used as a template for PCR. M: molecular size markers (ϕ X174 DNA digested by Hinc II).

10<sup>2</sup> 10<sup>1</sup> 10<sup>0</sup> 10<sup>-1</sup> 10<sup>-2</sup> 10<sup>-3</sup> 10<sup>-4</sup> M (%)



Fig. 6. Evaluation of the sensitivity of PCR-RFLP analysis on K-ras mutations at codon 12. DNA from PaCa-2 (mutant) cells was mixed with that from BxPC-3 (non mutant) cells at the constant ratios and used as a template for PCR. M: molecular size markers (ϕ X174 DNA digested by Hinc II).

Table 1. Analysis of K-ras mutations at codon 12 in duodenal aspirate from patients with pancreatic cancer, chronic pancreatitis and biliary tract cancer by MASA

K-ras mutations	No. (%) of mutation-positive cases in		
	Pancreatic cancer 38 <sup>a)</sup>	Chronic pancreatitis 38 <sup>a)</sup>	Biliary tract cancer 22 <sup>a)</sup>
Total number of positive cases	25 (100)	12 (100)	12 (100)
Type of K-ras mutations			
AGT (Ser)	4 (16)	4 (33)	0
CGT (Arg)	5 (20)	2 (17)	0
TGT (Cys)	3 (12)	1 (8)	0
GAT (Asp)	13 (52)	5 (42)	8 (67)
GCT (Ala)	0	0	0
GTT (Val)	0	0	4 (33)

Ser, serine ; Arg, arginine ; Cys, cysteine ; Asp, aspartic acid ; Ala, alanine ; Val, valine ;  
a) Total number of cases tested.

して検討すると、HPA法で陽性とされたもので、MASA法で陰性とされたものは、いずれの疾患群においても1例も認められなかった。一方、MASA法で陽性と判定されたが、HPA法で陰性とされたものは、膵癌25例中11例(44%)、胆道癌12例中5例(42%)、慢性膵炎12例中7例(58%)と、かなり高率に認められた。一方、胆嚢腺筋腫症20例ではMASA法、HPA法いずれにおいても全例陰性であった。

### Ⅲ. 十二指腸液中K-rasコドン12変異の各測定法による検出頻度の比較

十二指腸液中K-ras遺伝子変異の測定法による検出頻度を比較すると表2に示すごとく、膵癌、胆道癌での陽性率はPCR-RFLP法、HPA法に比して、MASA法で高率であった。また、

慢性膵炎でも同様にMASA法で高率であった。

### Ⅳ. 十二指腸液と純粋膵液におけるK-rasコドン12変異の検出頻度の比較

十二指腸液と純粋膵液中におけるK-ras変異の頻度を比較したところ(表3)、膵癌群における検討では、いずれの方法にても十二指腸液に比して膵液で高率にK-ras変異が検出された。慢性膵炎群についてみると、膵液と十二指腸液に明らかな差異は認められなかった。

### Ⅴ. 十二指腸液中K-ras変異の有無と膵癌の臨床病理学的事項との関係

MASA法による十二指腸液中K-ras変異の有無と臨床病理学的事項との関連について検討した(表4)。腫瘍径との関係につ

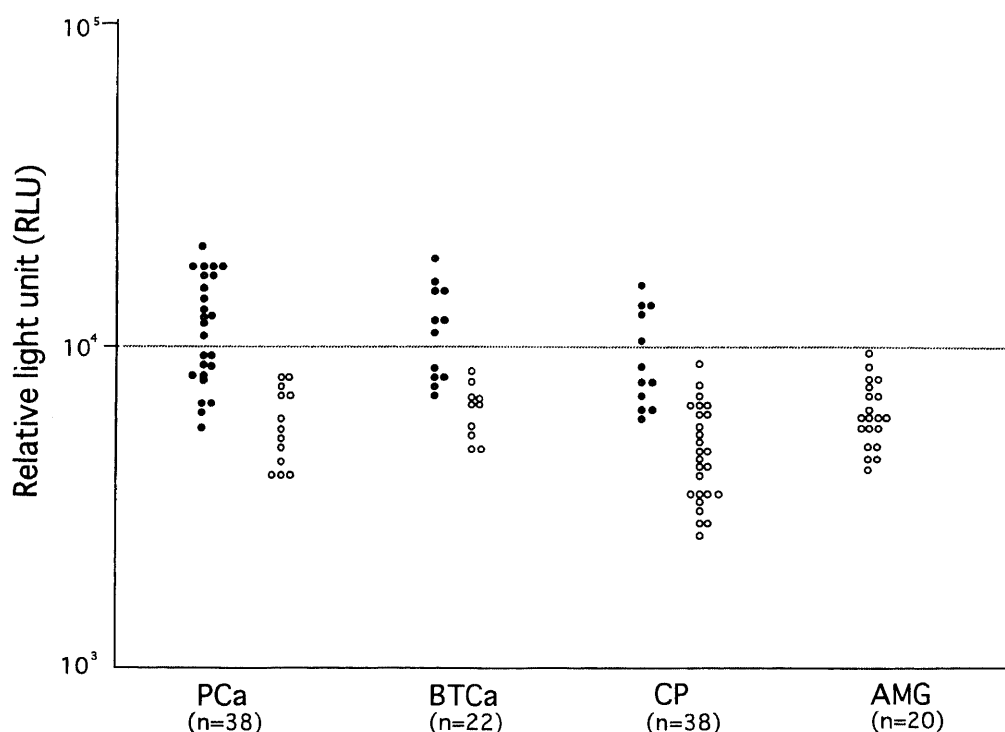


Fig. 7. Relation between levels of chemiluminescence by HPA and positivity by MASA for K-ras mutations at codon 12 in duodenal aspirates from patients with pancreatic cancer (PCa), biliary tract cancer (BTCa), chronic pancreatitis (CP) and adenomyomatosis of the gallbladder (AMG). ●, cases with K-ras mutations detected by MASA. ○, cases without K-ras mutations.

Table 2. Comparison of the incidence of K-ras mutations at codon 12 in duodenal aspirate from patients with pancreatic cancer, biliary tract cancer, chronic pancreatitis, adenomyomatosis of gallbladder, cholecystolithiasis and control subjects by MASA, PCR-RFLP and HPA

Disease	No. of cases examined	No. (%) of K-ras mutation-positive cases by		
		PCR-RFLP	HPA	MASA
Pancreatic cancer	38	16 (42)	14 (37)	25 (66)
Chronic pancreatitis	38	6 (16)	5 (13)	12 (32)
Biliary tract cancer	22	7 (32)	7 (32)	12 (55)
Adenomyomatosis of gallbladder	20	0 (0)	0 (0)	0 (0)
Cholecystolithiasis	22	0 (0)	n.d.	0 (0)
Control subjects	20	0 (0)	n.d.	0 (0)

RFLP, restriction fragment length polymorphism; HPA, hybridization protection assay; MASA, mutant allele specific amplification; n.d., not done.

Table 3. Comparison of the incidence of K-ras mutations at codon 12 in duodenal aspirate and pure pancreatic juice from patients pancreatic cancer and chronic pancreatitis by MASA, PCR-RFLP and HPA

Disease	Incidence (%) of K-ras mutation at codon 12					
	Duodenal juice			Pancreatic juice		
	RFLP	HPA	MASA	RFLP	HPA	MASA
Pancreatic cancer	42 (16/38) <sup>a)</sup>	37 (14/38)	66 (25/38)	78 (29/37)	66 (19/29)	81 (26/32)
Chronic pancreatitis	16 ( 6/38)	13 ( 5/38)	32 (12/38)	13 ( 5/40)	4 ( 1/26)	25 ( 5/20)

a) No. of K-ras mutation-positive cases/no. of cases tested. RFLP, restriction fragment length polymorphism ; HPA, hybridization protection assay ; MASA, mutant allele specific amplification.

Table 4. Relationship between K-ras mutations in duodenal aspirate by MASA and the size, clinical stage and location of pancreatic cancers

Characteristics		No. of patients with K-ras mutation	
		+	-
Size	TS <sub>1</sub>	1	2
	TS <sub>2</sub>	11	6
	TS <sub>3</sub>	11	4
	TS <sub>4</sub>	2	1
Stage	I	0	0
	II	1	1
	III	7	6
	IV	17	6
Location	Head	20	10
	Body	3	2
	Tail	2	1

MASA, mutant allele specific amplification ; TS<sub>1</sub> ≤ 2.0cm, 2.0cm < TS<sub>2</sub> ≤ 4.0cm, 4.0cm < TS<sub>3</sub> ≤ 6.0cm, 6.0cm < TS<sub>4</sub> ; +, mutation-positive ; -, mutation-negative.

いてみると、TS<sub>1</sub> (≤2cm) はやや低かったが、TS<sub>2</sub>以上では差異は認められなかった。臨床病期についてみると、ステージ(stage) I の症例は含まれてないが、ステージIVでK-rasの変異の陽性率が高い傾向がみられた。さらに、腫瘍の占拠部位との関係についてみると、K-ras変異の陽性率に差異は認められなかった。

考 察

一般に単一の遺伝子変異がある癌で高頻度に検出されることは稀であるが、1988年Almogueraら<sup>1)</sup>によりK-rasコドン12の点突然変異はヒト膵癌組織で22例中21例(95%)という驚くべき高頻度に生じていることが初めて報告されて以来、多くの研究者により追試され、75-100%と高率な変異率が報告されている<sup>1)-11)</sup>。1989年Bos<sup>26)</sup>のras癌遺伝子のヒト各種癌組織における突然変異の頻度について纏めた文献的集計によると、膵管癌は82% (128/156)、大腸癌は43% (119/277)、肺癌は30% (19/63)、甲状腺癌は29% (16/55)、膀胱癌は10.4% (7/67)、腎臓癌は10% (3/30)、肝癌は9.7% (3/31)、子宮癌は6.6% (7/106)、乳癌は2.3% (2/86)、食道癌は0% (0/25)、胃癌は0% (0/33)であり、膵癌では例外的に高頻度に発現していることが判る。また、Klöppl<sup>27)</sup>の1994年の総説においても膵癌は75-90%、大腸癌は30-50%、卵巣癌は45%、胆道癌上部は9%、下部は41%、肺癌は15-30%、乳頭癌は10-30%、胃癌は<5%であり、膵癌のK-ras点突然変異の頻度はもっとも高

い。また、ヒト膵癌で検出されるのはK-rasのみで、H-rasやN-rasの検出された報告例はない。さらに、ヒトK-rasの変異はコドン12, 13, 61に起こるが、膵癌ではほとんどコドン12に限られている点でも、臨床応用という観点から都合がよい<sup>26)</sup>。当教室ではこれに注目し、膵癌の大部分は膵管上皮由来の膵管癌であることより、発生した膵癌細胞の一部は、容易に膵液中に脱落するという想定の下で、セクレチンの分泌刺激にて、内視鏡下経乳頭的に採取した純粋膵液中においてK-rasコドン12の点突然変異の有無を検索し、その診断的意義を検討してきた<sup>15)-18)</sup>。教室の渡辺ら<sup>15)</sup>はアレル特異的オリゴヌクレオチド (allele specific oligonucleotide, ASO) プロンプを用いたドットプロットハイブリダイゼーション (dot blot hybridization) 法で膵液中のK-rasコドン12変異を分析し、膵癌で55% (11/20) に変異が陽性で、慢性膵炎18例ではいずれも陰性であったことを初めて報告した。その後内外で多くの追試があり<sup>28)-33)</sup>、Kondoら<sup>33)</sup>は60% (26/43)、Berthélemyら<sup>29)</sup>は77% (17/22) に膵癌においてK-rasコドン12の変異率を報告している。また、当教室でもPCR-RFLP法で81% (21/26) にK-rasコドン12の変異を認めている<sup>16)</sup>。さらに、検出感度の高い方法で分析すると、100%に検出し得たというTadaら<sup>31)</sup> (6/6) やTrumperら<sup>28)</sup> (16/16) の成績もみられる。しかし、検出感度を上げると、慢性膵炎でも約20-30%にK-rasコドン12の変異が陽性になることが判明し<sup>30)</sup>、K-ras遺伝子変異の癌特異性が大きな問題となっている。膵管内乳頭腺腫やその腺腫内癌でも



K-*ras* 変異が高率にみられるのに加え, Yanagisawaら<sup>34)35)</sup>は, 慢性膵炎組織の一部にみられる粘液過形成上皮よりマイクロダイセクション法で抽出したDNAにK-*ras* コドン12の変異が63% (10/16) という高頻度でみられることを明らかにし, 粘液細胞過形成-腺腫-癌腫のシーケンスの概念を分子生物学的側面より支持するものであると述べている. これらのことより, 良性疾患の膵液に見られるK-*ras* の変異はこの様な過形成上皮の混入したことを反映すると考えられるようになり, 苦勞して採取した純膵液中のK-*ras* コドン12の変異を検出してもスクリーニング的な意味しかないという意見もみられるようになっていく.

一般に, 純膵液の採取には十二指腸内視鏡下経乳頭的に膵管に選択的にカニューレを挿入し, セクレチン刺激下に採取する方法で行われている. この様な方法には十二指腸内視鏡を用いて, 膵胆道へのアプローチが円滑に行え得る経験の深い内視鏡の専門家が必要である. 加えて, 本法は患者にとって苦痛を伴うことが多く, 時に偶発症として乳頭炎や急性膵炎を惹起させる場合がある. この様なことより, 本研究では, 誰にでも容易に採取できる十二指腸液でK-*ras* 変異の有無を検討することがどの様な診断的有用性を有するかを明らかにしようとした. 日常臨床の実際的な面も考慮して, ERCP後のスコープ抜去後にスコープの先端部を十二指腸乳頭部の近傍に置いて, セクレチンやセルレインなどのように膵液や胆汁分泌を刺激するような薬物を用いずに, スコープの吸引装置を利用して十二指腸液を2~5ml吸引採取するという簡便な採取法を用いた. 当然ながら, 十二指腸液は膵液のみでなく, 胆汁, 十二指腸自身からの分泌物, 胃液なども含有するので, 膵臓のみでなく, 胆道系のDNA診断も行える可能性が期待できるが, 膵液はかなり希釈されるため, 臨床検査法として用いるには, K-*ras* 変異の検出法の感度が重要な要素になると想定される. 著者の方法で採取した十二指腸液におけるK-*ras* 変異の成績についてみると, 膵癌ではPCR-RFLP法で38例中16例 (42%), HPA法で38例中14例 (37%) であるのに対し, MASA法では38例中25例 (66%) とかなり高いK-*ras* 変異の検出率が得られた. さらに, 胆道癌では, PCR-RFLP法で22例中7例 (32%), HPA法で22例中7例 (32%) であるのに対し, MASA法で22例中12例 (55%) と同様に最も高い検出率が得られた. 一方, 慢性膵炎でもPCR-RFLP法で38例中6例 (16%), HPA法で38例中5例 (13%) であるのに対し, MASA法で38例中12例 (32%) と同様にかなり高い陽性率がみられた. 前述したように, 十二指腸液の採取はセクレチンなどの分泌刺激剤を使わずに, ERCP造影後に吸引採取したものであるため, 十二指腸液中に含まれる膵液の量はかなり少ないものと想定されるが, MASA法により得られた十二指腸液中のK-*ras* 変異の検出率は膵, 胆道癌いずれにおいても50%を超えており, その検出率は期待以上に高いのではないかとと思われる.

十二指腸液中K-*ras* コドン12の変異について, Iguchiら<sup>36)</sup>は, セクレチン刺激にて施行するセクレチンテスト下に採取した十二指腸液を用いて, 一本鎖高次構造多型分析 (single strand conformation polymorphism, SSCP) 法で膵癌において63% (12/19) にK-*ras* 変異が検出されたと報告している. また, Wilentzら<sup>37)</sup>は膵十二指腸の手術時に直接採取した十二指腸液において, 膵癌で25% (13/51) にK-*ras* 変異を検出したと報告している. 前者では独自にセクレチンテスト用のチューブを挿

入し, セクレチン刺激下に長時間にわたり, 十二指腸液を採取している. したがって, セクレチンにより膵液を積極的に分泌させているので, 膵液を高濃度に含有する利点はあるが, 採取法としては簡便ではなく, 時間も要する. さらに, セクレチンにより膵液分泌を刺激して採取しているにもかかわらず, 検出法の感度の違いのせいも, K-*ras* 変異の陽性率も若干低い. 後者では検出率が非常に低いのみならず, 手術時に採取された十二指腸液を使用しているため, 臨床検査法としての優劣を比較して論ずる対象ではない. 著者の用いた十二指腸液は, ERCP造影後ではあるが, 膵液や胆汁の刺激剤を用いずに, 2~5mlの少量を一瞬に採取したものであり, 本法は通常の上部消化管内視鏡検査時に十二指腸までに挿入し, 十二指腸液を簡便に採取する方法に匹敵するものであると思われる. にもかかわらず, 膵癌で66%, 胆道癌で55%にK-*ras* コドン12の変異を検出し得た著者の成績は注目に値するものであるといえよう.

一方, 胆道系悪性腫瘍の組織レベルでのK-*ras* コドン12の変異について検討した従来の成績をみると, 当初, 胆管癌, 胆嚢癌にはK-*ras* 変異はほとんど認められないという報告もあった<sup>38)39)</sup>. その後Motojimaら<sup>40)</sup>は, K-*ras* コドン12の変異が胆道癌で22.9% (11/48) に認め, 部位別にみると, 上部9% (2/23), 中部0% (0/6), 下部47.4% (9/19) と下部に多いことを報告している. Imaiら<sup>41)</sup>は変性勾配ゲル電気泳動法 (denaturing gradient gel electrophoresis) を用いて, 胆道癌で57% (13/23), 胆嚢癌で39% (9/23) にK-*ras* コドン12の変異を検出している. また, Storkら<sup>42)</sup>は胆道癌で66% (4/6) にK-*ras* コドン12の変異を検出している. さらに, 高感度の検出法を用いたLeviら<sup>43)</sup>は胆管癌で100% (15/15), 渡邊ら<sup>44)</sup>は胆嚢癌で55% (6/11), 胆管癌で100% (2/2), 胆管細胞癌で100% (2/2) にK-*ras* コドン12の変異を検出している. このように, 検出法の感度の向上と共に胆道癌にもK-*ras* 変異はかなり高率に発現していることが明らかになっている. さらに, Matsubaraら<sup>45)</sup>はPCR-SSCP法を用いて, 膵胆管合流異常を伴った胆道癌組織の癌細胞よりマイクロダイセクション法で抽出したDNAで80% (4/5), 過形成あるいは異形成上皮より同様に抽出したDNAで58% (7/12) にK-*ras* 変異が認められたことから, K-*ras* の変異は過形成や異形成のような前癌性病変の段階でも既に起こっているのではないかと述べている. 一方, 胆汁中K-*ras* 変異について検討した成績をみると, Ajikiら<sup>46)</sup>の経皮経肝総胆管ドレナージ (percutaneous transhepatic choledochal drainage, PTC) によって採取した胆汁中のK-*ras* 変異は20% (1/5) とかなり低いが, Leeら<sup>47)</sup>のERCP時に採取した胆汁中K-*ras* の変異は67% (2/3) にみられたと報告している. さらに, Itoら<sup>48)</sup>はPTCDにより採取した胆汁中で著者らと同様にMASA法を用いた検討で, 胆道癌で79% (11/14) にK-*ras* 変異が検出し得たと報告している. このように, 胆汁中においても高感度な検出法を用いれば, 胆道癌でもK-*ras* コドン12の変異が高率に検出できることが明らかになっている. 今回の著者の十二指腸液における胆道系疾患の検討では, 胆道癌でPCR-RFLP法にて32% (7/22), HPA法にて32% (7/22), MASA法にて55% (12/22) にK-*ras* コドン12の変異が検出されたのに対し, 胆嚢腺筋腫症20例, 胆石症22例, 対照群の20例では, MASA法を含むいずれの方法にてもすべて陰性であった. このように, 高感度のMASA法を用いれば, 胆道癌においても胆汁や膵液の分泌刺激剤などを用いずに簡単に採取した十二指腸液において

も、K-ras変異の検出がかなり高率に可能であるという成績が得られた。

MASA法は、3'末端が変異特異的塩基になるよう設定した合成オリゴヌクレオチドプライマーを用い、厳密な条件設定のもとにPCR反応を行うと、多量の正常遺伝子中に混在するごく少量の変異遺伝子の特異的に検出することができるといわれている<sup>20)</sup>。当初著者は、Nakamuraら<sup>21)</sup>の原著に従った条件設定でMASA法を行ったが、良好な結果は得られなかった。一般に、PCRの際のアニーリングによって一本鎖のDNAが再結合する。この際アニーリング温度を上げるとPCRの効率が下がるが、特異性が上がる、逆にアニーリング温度を下げるとPCRの効率が上がるが、特異性が下がる。そこで、種々の条件下でPCRを試み、図4で示したように63.5℃が筆者の用いた実験装置におけるアニーリングの至適温度であるという結果が得られた。さらに、検出感度を調べるために、変異細胞株PaCa-2と非変異株BxPC-3を用いて検討すると、図5に示すように変異型の割合が0.01～0.001%にまで検出可能な結果が得られた。これは正常細胞10,000～100,000個に癌細胞1個が含まれるまで検出可能であることを意味しており、検出感度が極めて高い方法であることが確認された。また、実際に十二指腸液においても今回検討した三つの検出法の中でMASA法で最も高いK-ras変異の検出率が得られた。さらに、K-rasコドン12変異の測定法として報告されているASO法<sup>49)</sup>やSSCP<sup>50)</sup>法など他の検出法の感度と比較しても、この様な高い感度は得られていない。従って、MASA法はK-ras変異の検出法として高度な感度が要求される、十二指腸液におけるK-ras変異の検出には最も適した方法であり、さらに変異型をも同時に検出できる利点がある。MASA法を用いて十二指腸液中K-rasコドン12変異の検討では、表1に示したように、K-rasの変異型はさまざまであるが、膵癌、胆道癌、慢性膵炎いずれの疾患群においてもGAT(アスパラギン酸)が半分弱の割合を示し、良悪性疾患でパターンの差異がみられなかった。

PCR-RFLP法については、変異した塩基配列の種類を同定できないが、従来変異型の割合が0.1%でも検出できるといわれている<sup>49)</sup>、今回の著者の用いた条件下における本法の検出感度も、培養細胞株を用いた検討で、図6に示すように正常DNAに対し、変異型DNAの割合が0.1%に含まれるまで検出可能であった。これは、理論的に正常細胞1000個に癌細胞が1個が含まれるまで検出可能であることを反映しており、かなり高い検出能といえる。しかし、十二指腸液におけるK-ras変異の検出率は、前述したごとくMASA法に比してかなり低率であり、十二指腸液のK-ras変異の検出には適さないとと思われる。HPA法は当教室で開発された方法であり、短時間内で定量的に測定が可能で、かつ、変異型も同時に測定できる利点を有するが、検出感度は5%と低い<sup>17)</sup>。したがって、十二指腸液のK-rasの測定にHPA法は適さないことはいうまでもない。一般に慢性膵炎に伴う過形成は膵管上皮の一部にしか存在しないため、膵液中にそのような上皮に由来したK-ras遺伝子の変異があっても、正常上皮に由来した多くの野生型K-ras遺伝子に希釈され、検出されにくくなり、検出感度の高い分析法を用いた時のみ陽性になるとと思われる。一方、膵癌では癌細胞の絶対量が多いため、K-ras遺伝子変異を有する膵癌細胞の膵液への混入する割合が高くなり、検出され易いと推定される。HPA法はプローブにアクリジニウムエステルを標識し、DNAのPCR産物と反応

させ生じる化学発光値よりK-ras変異の有無を定量的に短時間に測定できる。この方法で測定したHPA値は、膵癌で著明な高値を示す場合が多いのに対し、慢性膵炎では図7に示すように多くは低値を示すという成績が得られる。つまり、検出感度の高いMASA法のように定性的な方法では慢性膵炎でもK-ras変異はかなり検出されるが、HPA法のように定量的に測定し、従来の腫瘍マーカーのように適切なカットオフ値を用いると、癌特異性の高い検査法として用いる利点が考えられる。

今回の著者のK-rasコドン12変異の検出率は、十二指腸液を用いると、膵癌ではPCR-RFLP法、HPA法、MASA法でそれぞれ42%、37%、66%である。これに対して純膵液ではそれぞれ78%、66%、81%であり、いずれでも純膵液での検出率が優れている。後者ではセクレチン刺激下に純膵液のみ採取するのに対し、前者ではそのような刺激剤を用いずに採取し、膵液以外の他の液体成分も含んだものについて検討していることから、この様な結果は当然である。しかし、この様な条件で採取した十二指腸液でもMASA法を用いるとかなり高い陽性率が得られることは注目されよう。一方、慢性膵炎においても、十二指腸液でのK-rasコドン12の変異検出率はそれぞれ16%、13%、32%であるのに対し、純膵液ではそれぞれ13%、4%、25%であり、偽陽性率はむしろ十二指腸液で高いという成績が得られた。その原因は判然としないが、今回用いた十二指腸液はERCP後に回収したもので、造影剤注入に伴い、膵管上皮の障害や脱落が生じやすく、K-ras変異の生じている過形成上皮が膵液中に脱落しやすくなるなどの要素が複合しているのかもしれない。

以上のごとく、十二指腸液をERCP後にスコープの先端部を十二指腸乳頭部近傍に置いて、スコープの吸引装置を利用して採取する方法は、経乳頭的に膵管に挿管してセクレチン刺激下に行う純膵液採取法に比して、患者に与える苦痛も少なく、誰にでも容易に短時間内で採取できる簡便な方法である。十二指腸液は膵液のみではなく、胆汁、十二指腸自身からの分泌物、胃液なども含有するが、高感度な検出法であるMASA法を用いれば、K-rasコドン12変異を高率に検出可能で、膵癌のみでなく、胆道癌のスクリーニングにも応用できると考えられる。

## 結 論

膵癌患者38例、胆道癌22例、慢性膵炎38例、胆嚢腺筋腫症20例、胆石症22例、対照群20例、合計160例よりERCP施行後セクレチン刺激を行わずに、スコープの吸引装置を利用して採取した十二指腸液よりDNAを抽出し、K-ras癌遺伝子の変異をMASA法、PCR-RFLP法、HPA法の3種の検出法を用いて検討し、以下の結論を得た。

1. MASA法によるK-rasコドン12変異の検出におけるPCRの条件設定を培養細胞株を用いて検討したところ、アニーリングの至適温度は63.5℃であった。また、その検出感度は培養細胞株を用いて検討で、正常DNAに対して変異型DNAの割合が0.01～0.001%まで変異バンドの検出が可能であった。

2. 十二指腸液中K-rasコドン12変異は膵癌患者でPCR-RFLP法で42% (16/38)、HPA法で37% (14/38)、MASA法で66% (25/38)に検出された。また、胆道癌では、PCR-RFLP法で32% (7/22)、HPA法では32% (7/22)、MASA法では55% (12/22)に検出された。一方、慢性膵炎でも、PCR-RFLP法で16% (6/38)、HPA法で13% (5/38)、MASA法では32%

(12/38)に検出されたが、胆嚢腺筋腫症20例、胆石症22例、対照群20例では、PCR-RFLP法、MASA法いずれにても総て陰性であった。

3. 十二指腸液中膵癌患者の*K-ras*コドン12変異の有無と臨床病理学的事項との関係を検討したところ、腫瘍の大きさ、占拠部位、病期などで特定の関連性は認められなかった。

4. 純膵液中での*K-ras*コドン12変異を検討したところ、膵癌患者では、PCR-RFLP法で78% (29/37)、HPA法で66% (19/29)、MASA法で81% (26/32)に検出され、いずれの検出法を用いても、十二指腸液の場合に比して、純膵液での検出のほうが高率であった。

以上より、ERCP施行直後にセクレチンなどの分泌刺激を行わずに、スコープの吸引装置を利用して簡便に採取した十二指腸液においても、高感度のMASA法を用いれば、*K-ras*コドン12の変異がかなり高率に検出することが可能で、膵胆道癌のスクリーニングに有用なことが示唆された。

#### 謝 辞

稿を終えるに当たり、御指導と御校閲を賜りました恩師澤武紀雄教授に心より深く感謝の意を表わします。また本研究に終始御助言と御支援を賜りました金沢大学がん研究所内科渡辺弘之先生をはじめ全ての教室員の方々に深く御礼を申し上げます。さらに貴重なサンプルを提供して下さった福井県済生会病院内科の諸先生に深く感謝いたします。最後に、御協力を頂きました増田麻里研究支援推進員に深くお礼を申し上げます。本稿の内容の一部は第56会日本癌学会(1997年、京都)および第28会日本膵臓学会総会(1998年、横浜)にて発表した。

#### 文 献

- 1) Almoguera C, Shibata D, Forrester K, Martin J, Arnheim N, Perucho M. Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-*K-ras* genes. *Cell* 53: 549-554, 1988
- 2) Smit VT, Boot AJ, Smits AM, Fleuren GJ, Cornelisse CJ, Bos JL. KRAS codon 12 mutations occur very frequently in pancreatic adenocarcinomas. *Nucleic Acids Res* 16: 7773-7782, 1988
- 3) Grünwald K, Lyons J, Fröhlich A, Feichtinger H, Weger RA, Schwab G, Janssen JW, Bartram CR. High frequency of *Ki-ras* codon 12 mutations in pancreatic adenocarcinomas. *Int J Cancer* 43: 1037-1041, 1989
- 4) Mariyama M, Kishi K, Nakamura K, Obata H, Nishimura S. Frequency and types of point mutation at the 12th codon of the c-*Ki-ras* gene found in pancreatic cancers from Japanese patients. *Jpn J Cancer Res* 80: 622-626, 1989
- 5) Nagata Y, Abe M, Motoshima K, Nakayama E, Shiku H. Frequent glycine-to-aspartic acid mutations at codon 12 of c-*Ki-ras* gene in human pancreatic cancer in Japanese. *Jpn J Cancer Res* 81: 135-140, 1990
- 6) Tada M, Omata M, Ohto M. Clinical application of *ras* gene mutation for diagnosis of pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 100: 233-238, 1991
- 7) Motojima K, Urano T, Nagata Y, Shiku H, Tsunoda T, Kanematsu T. Mutations in the Kirsten-*ras* oncogene are common but lack correlation with prognosis and tumor stage in human pancreatic carcinoma. *Am J Gastroenterol* 86: 1784-1788, 1991
- 8) Masson P, Andren-Sandberg A. Crude isolation of DNA from unselected human pancreatic tissue and amplification by the polymerase chain reaction of *Ki-ras* oncogene to detect point mutations in pancreatic cancer. *Acta Oncol* 31: 421-424, 1992
- 9) Hruban RH, van Mansfeld AD, Offerhaus GJ, van Weering DH, Allison DC, Goodman SN, Kensler TW, Bose KK, Cameron JL, Bos JL. *K-ras* oncogene activation in adenocarcinoma of the human pancreas. A study of 82 carcinoma using a combination of mutant-enriched polymerase chain reaction analysis and allele-specific oligonucleotide hybridization. *Am J Pathol* 143: 545-554, 1993
- 10) Diguseppe JA, Hruban RH, Offerhaus GJ, Clement MJ, van den Berg FM, Cameron JL, van Mansfeld AD. Detection of *K-ras* mutations in mucinous pancreatic duct hyperplasia from a patient with a family history of pancreatic carcinoma. *Am J Pathol* 144: 889-895, 1994
- 11) Rozenblum E, Schutte M, Goggins M, Hahn SA, Panzer S, Zahurak M, Goodman SN, Sohn TA, Hruban RH, Yeo CJ, Kern SE. Tumor-suppressive pathways in pancreatic carcinoma. *Cancer Res* 57: 1731-1734, 1997
- 12) Takemori Y, Sawabu N, Ohta H, Satomura Y, Watanabe H, Yamakawa O, Kidani H, Takahashi H, Wakabayashi T. Evaluation of cancer-associated carbohydrate antigen (NCC-ST-439) measurement in pure pancreatic juice collected by endoscopic aspiration. *Dig Endosc* 2: 141-147, 1990
- 13) Wakabayashi T, Sawabu N, Takemori Y, Satomura Y, Kidani H, Ohta H, Watanabe H, Yamakawa O, Takahashi H, Watanabe K, Konishi F. Diagnostic significance of cancer-associated carbohydrate antigen (CA19-9) concentrations in pancreatic juice: analysis in pure pancreatic juice collected by endoscopic aspiration and immunohistochemical study in chronic pancreatitis. *Pancreas* 8: 151-159, 1993
- 14) Ohta H, Sawabu N, Takemori Y, Kidani H, Wakabayashi T, Satomura Y, Watanabe H, Motoo Y, Okai T, Takahashi H. Measurement of sialylated stage-specific embryonic antigen-1 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer. *Int J Pancreatol* 15: 35-41, 1994
- 15) Watanabe H, Sawabu N, Ohta H, Satomura Y, Yamakawa O, Motoo Y, Okai T, Takahashi H, Wakabayashi T. Identification of *K-ras* oncogene mutations in the pure pancreatic juice of patients with ductal pancreatic cancers. *Jpn J Cancer Res* 84: 961-965, 1993
- 16) Watanabe H, Sawabu N, Songür Y, Yamaguchi Y, Yamakawa O, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Wakabayashi T. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pure pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by PCR-RFLP analysis. *Pancreas* 12: 18-24, 1996
- 17) Watanabe H, Miyagi C, Yamaguchi Y, Satomura Y, Ohta H, Motoo Y, Okai T, Yoshimura T, Tsuji Y, Sawabu N. Detection of *K-ras* point mutations at codon 12 in pancreatic juice for the diagnosis of pancreatic cancer by hybridization protection assay: A simple method for the determination of the types of point mutation. *Jpn J Cancer Res* 87: 466-474, 1996
- 18) Wakabayashi T, Sawabu N, Watanabe H, Morimoto H, Sugioka G, Takita Y. Detection of *K-ras* point mutation at codon

- 12 in pure pancreatic juice collected 3 years and 6 months before the clinical diagnosis of pancreatic cancer. *Am J Gastroenterol* 91: 1848-1851, 1996
- 19) Kahn SM, Jiang W, Culbertson TA, Weinstein IB, Williams GM, Tomita N, Ronai Z. Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via 'enriched' PCR amplification. *Oncogene* 6: 1079-1083, 1991
- 20) Arnold LJ, Hammond PW, Wiese WA, Nelson NC. Assay formats involving acridinium-ester-labeled DNA probes. *Clin Chem* 35: 1588-1594, 1989
- 21) Takeda S, Ichii S, Nakamura Y. Detection of *K-ras* mutation in sputum by mutant-allele-specific amplification (MASA). *Hum Mutat* 2: 112-117, 1993
- 22) Japan Pancreas Society. Classification of pancreatic carcinoma, 1st English ed, p3-14, Kanehara & Co Ltd, Tokyo, 1996
- 23) Homma T, Harada H, Koizumi M. Diagnostic criteria for chronic pancreatitis by the Japan pancreas society. *Pancreas* 15: 14-15, 1997
- 24) Bowtell DD. Rapid isolation of eukaryotic DNA. *Anal Biochem* 162: 463-465, 1987
- 25) Jeanpièrre M. A rapid method for the purification of DNA from blood. *Nucleic Acids Res* 15: 9611, 1987
- 26) Bos JL. *ras* oncogenes in human cancer: a review. *Cancer Res* 49: 4682-4689, 1989
- 27) Klöppel G. Gene changes and pancreatic carcinoma: The significance of *K-ras*. *Dig Surg* 11: 164-169, 1994
- 28) Trumper LH, Burger B, von Bonin F, Hintze A, von Blohn G, Pfreundschuh M, Daus H. Diagnosis of pancreatic adenocarcinoma by polymerase chain reaction from pancreatic secretions. *Br J Cancer* 70: 278-284, 1994
- 29) Berthélemy P, Bouisson M, Escourrou J, Vaysse N, Rumeau JL, Pradayrol L. Identification of *K-ras* mutations in pancreatic juice in the early diagnosis of pancreatic cancer. *Ann Intern Med* 123: 188-191, 1995
- 30) Uehara H, Nakaizumi A, Baba M, Iishi H, Tatsuta M, Kitamura T, Ohgashi H, Ishikawa O, Takenaka A, Ishiguro S. Diagnosis of pancreatic cancer by *K-ras* point mutation and cytology of pancreatic juice. *Am J Gastroenterol* 91: 1616-1621, 1996
- 31) Tada M, Omata M, Kawai S, Saisho H, Ohto M, Saiki RK, Sninsky JJ. Detection of *ras* gene mutations in pancreatic juice and peripheral blood of patients with pancreatic adenocarcinoma. *Cancer Res* 53: 2472-2474, 1993
- 32) Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Kyogoku A, Nose H, Shimada K, Ohkura H, Ohtsu A, Yoshida S, Shimosato Y. Detection of point mutations in the *K-ras* oncogene at codon 12 in pure pancreatic juice for diagnosis of pancreatic carcinoma. *Cancer* 73: 1589-1594, 1994
- 33) Kondo H, Sugano K, Fukayama N, Hosokawa K, Ohkura H, Ohtsu A, Mukai K, Yoshida S. Detection of *K-ras* gene mutations at codon 12 in the pancreatic juice of patients with intraductal papillary mucinous tumor of the pancreas. *Cancer* 79: 900-905, 1997
- 34) Yanagisawa A, Ohtake K, Ohashi K, Hori M, Kitagawa T, Sugano H, Kato Y. Frequent c-Ki-*ras* oncogene activation in mucous cell hyperplasias of pancreas suffering from chronic inflammation. *Cancer Res* 53: 953-956, 1993
- 35) Yanagisawa A, Kato Y, Ohtake K, Kitagawa T, Ohashi K, Hori M, Takagi K, Sugano H. c-Ki-*ras* point mutations in ductectatic type mucinous cystic neoplasm of the pancreas. *Jpn J Cancer Res* 82: 1057-1060, 1992
- 36) Iguchi H, Sugano K, Fukayama N, Ohkura H, Sadamoto K, Ohkoshi K, Seo Y, Tomoda H, Funakoshi A, Wakasugi H. Analysis of Ki-*ras* codon 12 mutations in the duodenal juice of patients with pancreatic cancer. *Gastroenterology* 110: 221-226, 1996
- 37) Wilentz RE, Chung CH, Sturm PD, Musler A, Sohn TA, Offerhaus GJ, Yeo CJ, Hruban RH, Slebos RJ. *K-ras* mutations in the duodenal fluid of patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* 82: 96-103, 1998
- 38) Tada M, Yokosuka O, Omata M, Ohto M, Isono K. Analysis of *ras* gene mutations in biliary and pancreatic tumors by polymerase chain reaction and direct sequencing. *Cancer* 66: 930-935, 1990
- 39) 多田 稔, 小俣政男. 膵胆道腫瘍の*ras*遺伝子異常とその診断的意義. *胆と膵* 13: 253-257, 1992
- 40) Motojima K, Tsunoda T, Kanematsu T, Nagata Y, Urano T, Shiku H. Distinguishing pancreatic carcinoma from other periampullary carcinomas by analysis of mutations in the Kirsten-*ras* oncogene. *Ann Surg* 214: 657-662, 1991
- 41) Imai M, Hoshi T, Ogawa K. *K-ras* codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis. *Cancer* 73: 2727-2733, 1994
- 42) Stork P, Loda M, Bosari S, Wiley B, Poppenhusen K, Wolfe H. Detection of *K-ras* mutations in pancreatic and hepatic neoplasms by non-isotopic mismatched polymerase chain reaction. *Oncogene* 6: 857-862, 1991
- 43) Levi S, Urbano-Ispizua A, Gill R, Thomas DM, Gilbertson J, Foster C, Marshall CJ. Multiple *K-ras* codon 12 mutations in cholangiocarcinomas demonstrated with a sensitive polymerase chain reaction technique. *Cancer Res* 51: 3497-3502, 1991
- 44) 渡邊雅男, 田中淳司, 政氏伸夫, 松浦 淳, 木山善雄, 森井 健, 直原 徹, 齋藤雅雄, 比嘉敏夫, 笠井正晴, 浅香正博, 宮崎 保. 胆道系悪性腫瘍における*K-ras* gene codon 12 における点突然変異の検出. *日本消化器病学会雑誌* 90: 789-794, 1993
- 45) Matsubara T, Sakurai Y, Sasayama Y, Hori H, Ochiai M, Funabiki T, Matsumoto K, Hirono I. *K-ras* point mutations in cancerous and noncancerous biliary epithelium in patients with pancreaticobiliary maljunction. *Cancer* 77: 1752-1757, 1996
- 46) Ajiki T, Onoyama H, Yamamoto M, Fujimori T, Maeda S, Saitoh Y. Detection of point mutations in *K-ras* gene at codon 12 in bile from percutaneous transhepatic choledochal drainage tubes for diagnosis of biliary strictures. *Int J Pancreatol* 18: 215-220, 1995
- 47) Lee JG, Leung JW, Cotton PB, Layfield LJ, Mannon PJ.

Diagnostic utility of *K-ras* mutational analysis on bile obtained by endoscopic retrograde cholangiopancreatography. *Gastrointest Endosc* 42: 317-320, 1995

48) Ito R, Tamura K, Ashida H, Nishiwaki M, Nishioka A, Yamamoto Y, Furuyama JI, Utsunomiya J. Usefulness of *K-ras* gene mutation at codon 12 in bile for diagnosing biliary strictures. *Int J Oncol* 12: 1019-1023, 1998

49) Haliassos A, Chomel JC, Grandjouan S, Kruh J, Kaplan JC,

Kitzis A. Detection of minority point mutations by modified PCR technique: a new approach for a sensitive diagnosis of tumor-progression markers. *Nucleic Acids Res* 17: 8093-8099, 1989

50) Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K. Allele-specific polymerase chain reaction: a method for amplification and sequence determination of a single component among a mixture of sequence variants. *Anal Biochem* 192: 82-84, 1991

**Detection of *K-ras* Point Mutations at Codon 12 in Duodenal Aspirate and its Diagnostic Significances** Aiguli Ha, Department of Internal Medicine and Medial Oncology, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920-0934 - J. Juzen Med Soc., 107, 345 - 356 (1998)

**Key words** *K-ras*, pancreatic cancer, biliary tract cancer, duodenal juice, pancreatic juice

#### Abstract

The prevalence of *K-ras* mutations (KRM) at codon 12 in pure pancreatic juice (PPJ) aspirated from the orifice of papilla of Vater through endoscopic cannula has been reported to be more than 80%, suggesting KRM is a promising potential marker for pancreatic cancer (PCa). However, a considerable number of reports have indicated that KRM, which is derived from mucous cell hyperplasia, is also detected in PPJ from chronic pancreatitis (CP) patients when using highly sensitive methods, raising a question as to its specificity to pancreatic cancer. Furthermore, aspirating PPJ not only requires technical skill, but it is also exhausting for patients. This study was performed to evaluate whether detection of KRM at codon 12 in duodenal aspirate (DA), which is an easily collectable sample, is useful for the diagnosis of pancreatico-biliary cancer. DA was aspirated immediately after endoscopic retrograde cholangiopancreatography (ERCP) via duodenal endoscope without secretory stimulation, such as by secretin. DNA was extracted from the DA, and the samples were analyzed for KRM at codon 12 by mutant allele specific amplification (MASA), restriction fragment length polymorphism analysis followed by polymerase chain reaction (PCR-RFLP), and hybridization protection assay (HPA). The incidence of KRM detected in the DA from patients with PCa was 42% (16/38) by PCR-RFLP, 37% (14/38) by HPA and 66% (25/38) by MASA. For DA samples from patients with biliary tract cancer the incidence was 32% (7/22) by PCR-RFLP, 32% (7/22) by HPA and 55% (12/22) by MASA. On the other hand, for DA samples from patients with CP, KRM was detected in 16% (6/38) by PCR-RFLP, 13% (5/38) by HPA and 32% (12/38) by MASA. No mutations were found by PCR-RFLP or MASA in any DA samples from patients with adenomyomatosis of the gallbladder (n=20), cholecystolithiasis (n=22), or in the control subjects (n=20). Moreover, KRM at codon 12 were also studied in PPJ collected through cannula into the pancreatic duct with secretin stimulation from patients with PCa and a comparison of the detection rates was made between PPJ and DA. KRM was found in PPJ from PCa patients at rates of 78% (29/37) by PCR-RFLP, 66% (19/29) by HPA and 81% (26/32) by MASA, indicating that for PCa the methods with DA have a lower sensitivity than those with PPJ. Although the prevalence of KRM in patients with PCa is lower in the DA than in the PPJ, KRM is detectable in considerably high frequencies in DA from patients with PCa or biliary tract cancer when using a highly sensitive method such as MASA. The present study suggests that analysis of KRM in DA is useful for screening not only for PCa but also for biliary tract cancer.