

# Efficiency-Monitored Representational Difference Analysis による 若年者胃癌からの Epstein-Barr ウイルスの単離

見 田 裕 章

札幌医科大学医学部内科学第一講座 (主任 今井浩三 教授)

Isolation of Epstein-Barr Virus in Gastric Cancer of a Young Adult  
by Efficiency-Monitored Representational Difference Analysis

Hiroaki MITA

First Department of Internal Medicine, Sapporo Medical University, School of Medicine  
(Chief : Prof. K. IMAI)

**ABSTRACT** Gastric cancer in young adults is one of the most mortal neoplasms and is characterized by histopathological features of poorly differentiated type and infiltrative growth. However, very little is known about the genetic mechanisms of this malignant tumor, which is difficult to analyze due to the proliferation of scirrhous stroma. The aim of this study was to apply an improved representational difference analysis (RDA) in order to identify the genetic alterations in gastric cancer of young adults. To monitor the efficiency of RDA, mouse DNA fragment was added to a tester prepared from the genomic DNA of gastric cancer of a 24-yr-old woman, at the rate of a single copy per haploid genome (efficiency-monitored RDA (EM-RDA)). The difference products were analyzed by Southern blot with the mouse DNA as a probe. The real difference products, other than the mouse DNA, were subcloned and sequenced. As a result, added control DNA fragments were sufficiently amplified through 3 rounds of subtraction and the high efficiency of the subtraction was confirmed. Another two difference clones were identified as DNA fragments of Epstein-Barr virus (EBV). The existence of EBV in the gastric cancer cells was proved by EBV-encoded small RNA 1 *in situ* hybridization. In summary, efficiency-monitored RDA was demonstrated to raise the reliability of RDA. Furthermore, this method successfully contributed to the detection of EBV in the gastric cancer of a young woman. (Received December 1, 1997 and accepted January 8, 1998)

**Key words:** Genome, Subtraction, Monitoring, Young adults,  
Epstein-Barr virus related gastric cancer

## 1 緒 言

本邦において胃癌は主要な死因の一つであり、1993年の胃癌死亡は全悪性新生物死のうち男性で21.1%(2位)、女性で18.5%(1位)を占める<sup>1)</sup>。そのうち若年者胃癌は一般に29歳までに発症するものとされ<sup>2)</sup>、臨床的に悪性度は高く組織学的にはびまん性浸潤を示す低分化腺癌が多い<sup>3-5)</sup>。若年者胃癌の遺伝子異常についてはその詳細は不明であり、一部の症例にp53, DCCおよびnm23のallelic imbalanceが認められるという

報告があるのみである<sup>6)</sup>。また、びまん性浸潤を示す非充実型低分化腺癌は、間質に正常組織を豊富に含むため臨床材料の直接的な遺伝学的解析が困難な腫瘍の一つである。従ってこのような腫瘍の遺伝子異常を検出するためには新しい手法の開発が必要と考えられる。

近年報告された新しいゲノムのサブトラクション法であるrepresentational difference analysis (RDA)<sup>7)</sup>は、2種のゲノム間の差を検出することが可能である。特に癌研究への応用では、癌でのhomozygous deletion, loss of heterozygosity (LOH) および

amplificationなどが癌と正常組織のゲノムの差として RDA によって検出され、PTEN<sup>9)</sup>、DMBT1<sup>10)</sup>などの新しい癌抑制遺伝子の単離に成果をあげている。

RDA は、一方の DNA (以下、tester) からもう一方の DNA (以下、driver) と共通する DNA を除去することによって、tester に特異的な DNA 断片 (以下、difference product) を得る方法であり、2 つの異なるステージつまり representation と subtraction から構成される。前半の representation では、制限酵素処理と polymerase chain reaction (PCR) を用いて tester および driver それぞれのゲノムの複雑性を減らしたライブラリー (以下、amplicon) を作成する。後半の subtraction では、微量の tester amplicon に過剰量の driver amplicon を競合的にハイブリダイゼーションさせる。このようなシステムによって tester 特異的な DNA 配列のみが PCR で対数的に増幅される。

RDA を用いることにより、理論的には tester のハプロイドゲノムに特異的な 1 コピーの DNA 配列をも検出可能である<sup>10)</sup>。しかしその過程には多くの PCR、制限酵素処理およびライゲーションを使用するため、常にコンタミネーションの危険がつきまとう。また競合的ハイブリダイゼーションの段階では試料を厳密に高温に保ったままでの操作が要求され、これらの操作が正確になされなければサブトラクション効率は著しく低下し、結果として false positive を多く含んだ difference product の解析に無駄な時間を費やすことになる。しかし RDA のサブトラクション効率をモニターすること、すなわち高効率のサブトラクションが実現されていることを確認することによって、得られた difference product を非常に効率的に解析することが可能になると考えられる。

本研究においては、我々は RDA のサブトラクション効率をモニターし得る efficiency-monitored RDA (EM-RDA) を開発し、EM-RDA を若年胃癌の遺伝子異常の検索に実際に応用した。その結果、胃癌組織から Epstein-Barr (EB) ウイルスが単離され、若年女性胃癌からの EB ウイルス検出第 1 例目を見い出した。

## 2 方 法

### 2・1 解析症例

症例は 24 才女性。1993 年 11 月、心窩部不快感と体重減少を主訴に近医受診し、胃内視鏡検査にて胃噴門部から前庭部まで全周性に胃内腔を占拠する Borrmann IV 型病変を指摘された。病変は生検により低分化腺癌と診断された。同年 12 月胃全摘術を施行された。手術

所見では腹腔リンパ節転移、膈および大網への直接浸潤を認め TNM 分類<sup>11)</sup>の stage IV と診断された。手術材料の病理組織診断は非充実型低分化腺癌<sup>12)</sup>であった。1994 年 6 月、膈頭部および腹腔リンパ節に再発を認め、1995 年 1 月死亡した。

### 2・2 解析 DNA およびモニタリング用標的 DNA の調整

2・1 で述べた症例の胃癌および正常胃組織の凍結手術材料より genomic DNA を既述の方法<sup>13)</sup>に従って抽出した。また、severe combined immunodeficiency (SCID) マウス (CLEA Japan, Osaka) の genomic DNA の BamHI (Toyobo, Osaka) 制限酵素断片から、サザンプロット法にてヒト genomic DNA とクロスハイブリダイゼーションしない DNA 断片 1 種 (450 bp) を選択し、モニタリング用標的 DNA として用いた。

### 2・3 Efficiency-Monitored Representational Difference Analysis

2・2 で得られた癌部および非癌部の genomic DNA は、BamHI で制限酵素処理し、フェノール抽出後エタノール沈殿し TE に溶解した。BamHI 処理後の癌部 DNA を tester として用い、ヒトのハプロイドゲノム (3 × 10<sup>9</sup> bp) に対し 1 コピー (450 bp) となる比率で tester にのみ 2・2 で述べたモニタリング用標的 DNA 1 種を混入した。BamHI 処理後の正常胃組織 DNA は driver として用いた。Amplicon の作製およびサブトラクションは原法の RDA プロトコル<sup>7)</sup>に一部変更<sup>14)</sup>を加えて行なった。

RDA のサブトラクション効率はサザンプロット法により評価した。3 ラウンドのサブトラクション後、tester amplicon, driver amplicon および第 1, 第 2, 第 3 ラウンドで生成された difference product (以下、1st, 2nd, 3rd product) それぞれ 1 μg を 1.5% Nusieve アガロースゲル上で電気泳動し、ナイロン膜 (Hybond-N<sup>+</sup>: Amersham, Cleaveland, OH) にプロットした。プローブとしてモニタリング用標的 DNA をランダム DNA ラベリング (Random DNA labeling kit: Takara, Tokyo) により [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P] でラベルしたものをを用いた。プレハイブリダイゼーションおよびハイブリダイゼーションは既述の方法<sup>13)</sup>に従って行なった。

### 2・4 3rd product の解析

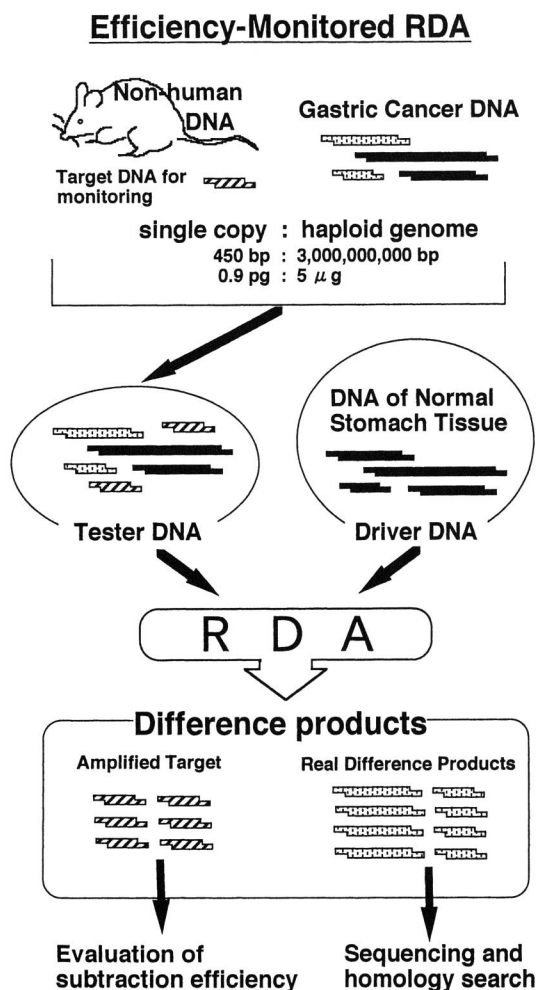
EM-RDA により生成された 3rd product の解析を行なうため、3rd product 全体を BamHI で制限酵素処理し pBluescript II (Stratagene, La Jolla, CA) にライゲーションした。T3/T7 プライマー (Stratagene)

を用いた PCR でインサートが確認されたりコンビナントクローンを単離し、ナイロン膜 (Hybond-N<sup>+</sup>) に 96 穴吸引マニフォールドを用いて既述の方法<sup>13)</sup> に従ってプロットした。モニタリング用標的 DNA, および他のクローンをプローブとしてドットプロットを行なうことにより、重複するクローンを除外した。重複せずに

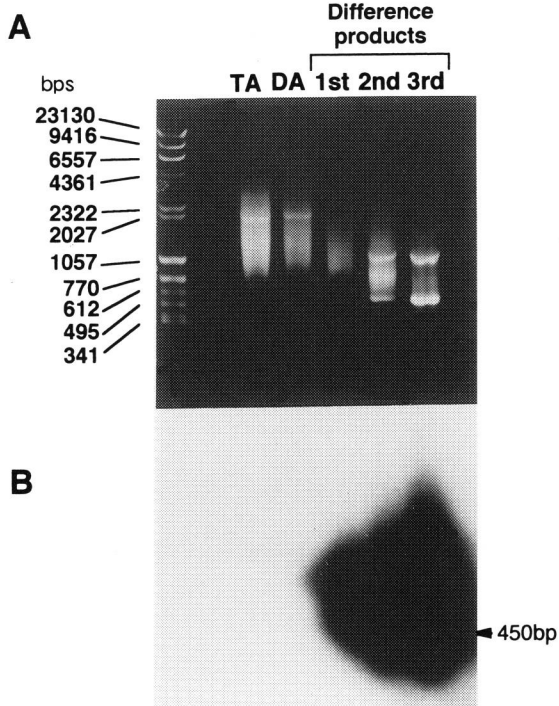
選択したクローンはそれぞれをプローブとして, tester および driver の amplicon および genomic DNA に対してサザンプロット法を行なった。サザンプロット法にて tester 特異的なバンドが確認されたクローンについては ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (Perkin-Elmer, Branchburg NJ) を用いてシーケンス解析を行なった。得られた塩基配列のホモロジー検索は GenBank Web site の BLAST program を用いて行なった。

## 2.5 *In situ* Hybridization

2.1 で述べた胃癌組織のホルマリン固定パラフィン包



**Fig. 1** The schema of efficiency-monitored RDA. BamHI restriction endonuclease fragments of genomic DNAs are shown in boxes with both cohesive ends. To evaluate the subtraction efficiency, the target fragment for monitoring (shown in boxes filled with oblique lines) was added to the tester at the rate of a single copy per haploid genome. After RDA, if the target fragment for monitoring was amplified in the difference products, a high sensitivity and efficiency of subtraction was guaranteed and other real difference products (shown in boxes filled with dots) were further analyzed with confidence.



**Fig. 2** Efficiency-monitored RDA with the scirrhous gastric cancer of the 24-yr-old woman. (A) One μg of each RDA product was electrophoresed in 1.5% agarose gel. The tester (lane TA) and driver amplicons (lane DA) showed similar smear bands in the range of around 0.7 kbp to 3 kbp. After three rounds of subtraction, the 3rd difference product (lane 3rd) showed two distinct bands. (B) Southern blot analysis of RDA products was performed with the target fragment for monitoring as a probe. On the lane of the difference products, strong signals of 450 bp were shown. The signal intensities were much stronger on the lanes of later round products.

埋切片に対して, Epstein-Barr virus encoded small RNA 1 (EBER1) *in situ* ハイブリダイゼーションを既述の方法<sup>15)</sup>に従って行なった. EBER1 プローブは全長 30 bp のオリゴヌクレオチドで, EB ウイルスが潜伏感染している細胞で高率に発現されている EBER1 遺伝子 (166 bp) の一部と相補的なものである. ジゴキシゲンニラベルを施した EBER 1 オリゴヌクレオチドをプローブとして用いた.

### 3 結 果

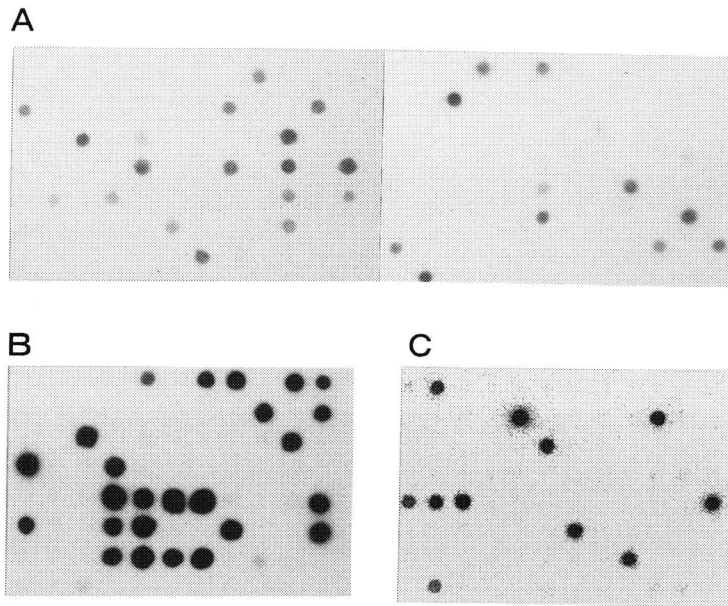
#### 3.1 EM-RDA

若年者胃癌の遺伝子異常を同定することを目的として, 胃癌 DNA を tester, 同一症例の正常胃組織を driver として RDA を施行し, 同時に RDA のサブトラクション効率の確認を行なった (EM-RDA, Fig. 1). Driver およびモニタリング用標的 DNA を混入した tester に, それぞれ RBam adapter<sup>7)</sup> をライゲーションした後 PCR を施行し amplicon を作製した. Tester および driver amplicon は電気泳動にてそれぞれ 0.7 kbp

から 3 kbp の範囲でスメアを呈した (Fig. 2A). 3 ラウンドのサブトラクションから得られた各ラウンドの difference product を電気泳動した結果, 1st product はスメアを, 2nd product は不鮮明なバンドを, 3rd product は 0.5 kbp と 1 kbp にバンドを呈した (Fig. 2A).

Difference product 中においてモニタリング用標的 DNA が増幅されていることを確認するため, tester および driver amplicon, および各ラウンドの difference product に対してモニタリング用標的 DNA をプローブとしてサザンブロットを行なった (Fig. 2B). その結果, 2 時間の expose で 1st, 2nd および 3rd product それぞれのレーンに 450 bp を中心とした強いシグナルが検出された. またこれら difference product のレーンにおいては, 1st, 2nd, 3rd とラウンドが進むにつれてバンドのシグナル強度が強くなるのが確認された.

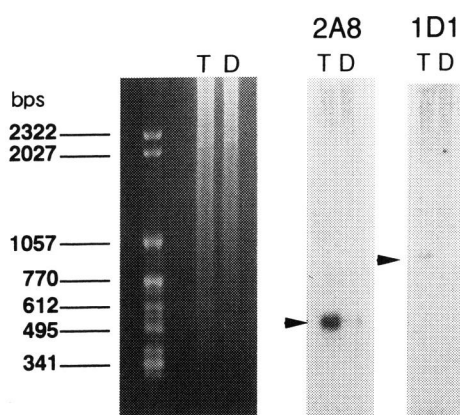
以上の結果から, tester のハプロイドゲノム中に混入した 1 コピーのモニタリング用標的 DNA が RDA により検出され, かつ 3 ラウンドのサブトラクションによ



**Fig. 3** Dot blot analysis of the 3rd product with target fragment for monitoring as a probe (A) and difference clone 2A8 (B) and 1D1 (C) as probes.

(A) One hundred ten recombinant clones of the 3rd product were isolated and the inserts were amplified by PCR with T3/T7 primer. The amplified inserts were blotted onto nylon filters with a 96-well suction manifold. In 110 randomly selected clones, the target fragment hybridized to 34 clones.

(B, C) Seventy six clones selected with the exception of target clones were blotted onto nylon filters. Clone 2A8 (shown in B) and 1D1 (shown in C) had respectively hybridized to 25 and 11 clones.

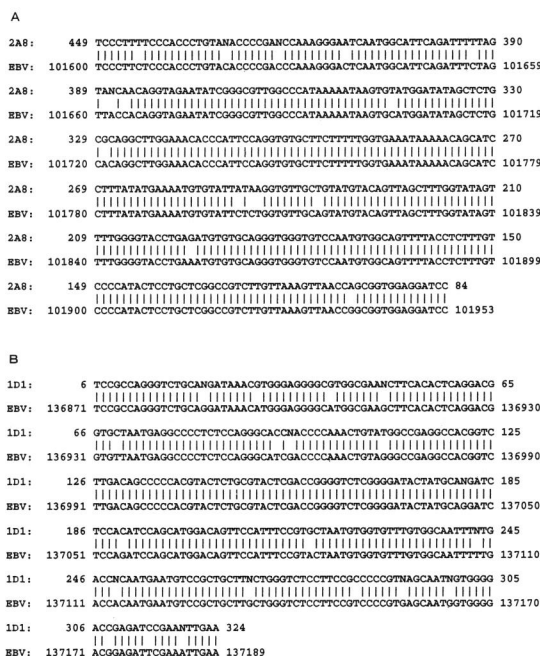


**Fig. 4** Southern blot analysis of tester (lane T) and driver (lane D) genomic DNAs with real difference products, 2A8 and 1D1 respectively, as probes. Genomic DNAs of the tester and the driver were digested with BamHI, and 4  $\mu$ g of each DNA sample was electrophoresed in 0.9% agarose gel. The clones 2A8 and 1D1 showed the band of about 0.5 kbp and 1 kbp respectively, on the lane of the tester only.

り効率的に増幅されていることが確認できた。

### 3.2 RDA 産物の解析

3rd product の解析を行なうため、3rd product 全体をサブクローニングし無作為にリコンビナントクローンを選択した。このうち T3/T7PCR にてインサートが確認された 110 クローンに対しモニタリング用標的 DNA をプローブとしてドットプロットを行なった (Fig. 3A)。その結果 110 クローン中 34 クローン (30.9%) がモニタリング用標的 DNA と同一であると判断され、RDA のサブトラクションが効率よく稼働していることが確認された。残りの 76 クローンに対して、それぞれをプローブとしてドットプロットを行なった結果、たとえばクローン 2A8 をプローブとした時 (Fig. 3B) は 76 クローン中 25 クローン (22.7%) に、クローン 1D1 をプローブとした時 (Fig. 3C) は 76 クローン中 11 クローン (10.0%) にハイブリダイゼーションすることが確認された。このようにクロスハイブリダイゼーションするクローンは重複して存在する同一クローンであると判断し、最終的に 13 クローンを重複しないクローンとして選択した。Tester, driver それぞれの amplicon



**Fig. 5** Representative sequence data of the clone 2A8 (A) and 1D1 (B). Obtained sequence of each difference clone is shown in the lines named "2A8" or "1D1", and compared sequence of EBV genome is shown in the lines named "EBV". The numbers of both ends in each line showed the positions in each fragment. The total length of EBV genome was 172,281 bp, as reported previously<sup>16)</sup>. Homology search of clone 2A8 and 1D1 revealed that both clones whose identities were respectively 94% in 2A8 and 93% in 1D1, were almost identical to the DNA fragments of EBV genome.

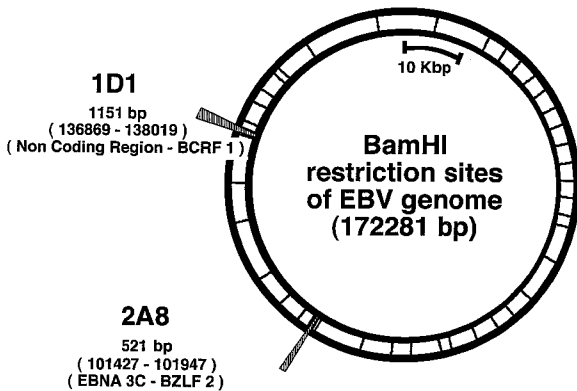


Fig. 6 The positions of clone 2A8 and 1D1 in EBV genome. The BamHI restriction sites of EBV genome<sup>16)</sup> are shown in the straight lines within the lane enclosed by double circles. The position of each clone is shown in the wedge-shaped mark. As a result of the homology search, 2A8 and 1D1 extended from the region of EBNA3C to BZLF2, and from the non-coding region to BCRF1, respectively.

および genomic DNA に対して、これら 13 クローン をプローブとしてサザンブロット行なった。その結果 13 クローン中 2 クローンが tester に特異的なバンドを呈した。クローン 2A8 をプローブとした時は約 0.5 kbp に、クローン 1D1 をプローブとした時は約 1 Kbp に tester 側のレーンでのみバンドを認めた (Fig. 4)。

そこで、この 2 クローンの塩基配列を決定しホモロジー検索を行なったところ、ともに 90%以上の相対率で EB ウイルスゲノム<sup>16)</sup>の一部と相対性を示した (Fig. 5)。またこれらのクローンの EB ウイルスゲノム上の位置は、クローン 2A8 が EBNA3C から BZLF2 にかかる領域、クローン 1D1 は non-coding region から BCRF1 にかかる領域に位置するものであることが明らかとなった (Fig. 6)。

### 3.3 EBER1 *in situ* Hybridization

EM-RDA で得られた 2 クローン、2A8 および 1D1 が胃癌細胞中に存在する EB ウイルスゲノム由来のものか否かを確認するため、2・1 の症例の胃癌組織切片に対しヘマトキシリン-エオジン (HE) 染色 (Fig. 7A, 7B)、および EBER1 *in situ* ハイブリダイゼーション (Fig. 7C, 7D) を行なった。Fig. 7A, 7C に示すように弱拡大像 (40 倍) では正常粘膜下に浸潤した癌組織に陽性シグナルを認め、正常粘膜では陰性であった。また Fig. 7B, 7D に示すように強拡大像 (200 倍) では癌細胞が

間質に豊富な線維形成およびリンパ球浸潤を伴ってびまん性に浸潤するのを認め、癌細胞の核内にのみ陽性シグナルを認めた。したがって、本症例は EB ウイルス関連胃癌と診断され、EM-RDA によって胃癌 DNA から正常胃組織 DNA をサブトラクションして得られた 2 クローン 2A8 および 1D1 は、本症例の胃癌細胞特異的に存在する EB ウイルスゲノム由来の DNA 断片であると考えられた。

## 4 考 察

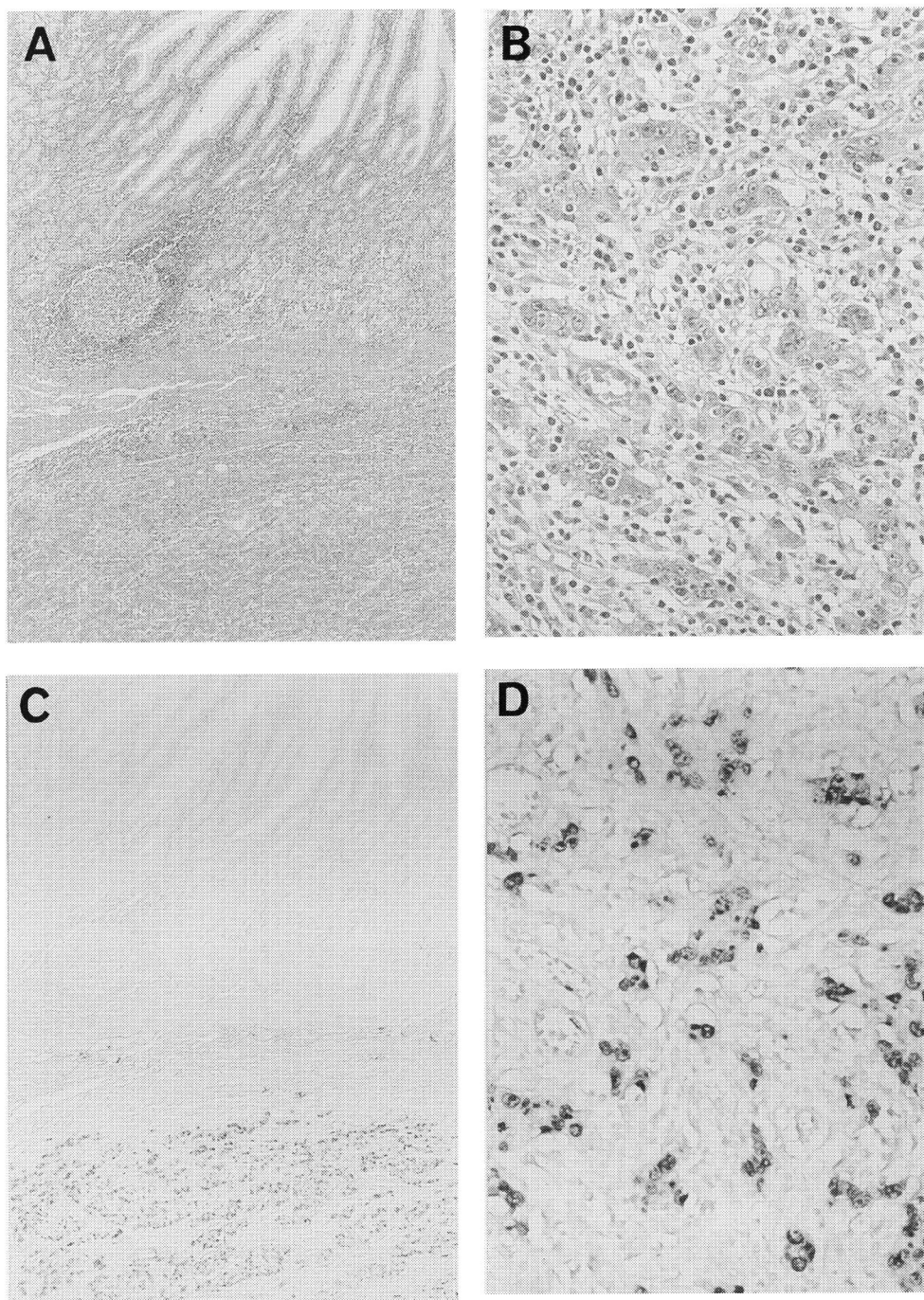
若年者胃癌は日本では全胃癌の 2% に認められると報告されている<sup>2)</sup>。しかしその遺伝学的背景の詳細は不明であり、microsatellite instability が認められないといった報告があるにすぎない<sup>6,17)</sup>。

若年者胃癌の組織型としては非充実型低分化腺癌、いわゆるスキルス胃癌の頻度が比較的高いと報告されている<sup>3-5)</sup>。スキルス胃癌は臨床的には若年女性に多く<sup>18)</sup>、腹膜播種を高頻度に認め予後不良とされる<sup>19)</sup>。また病理組織学的には癌細胞のびまん性浸潤を特徴とし粘膜下浸潤を認める<sup>20)</sup>。スキルス胃癌の遺伝子異常については k-sam<sup>21)</sup>、c-met<sup>22)</sup> の遺伝子増幅が認められるとの報告があるが頻度は 30~40% であるため、これら以外にも臨床的および病理組織学的特徴の形成に関連する未知の遺伝子異常が存在すると推測される。

しかしスキルス胃癌では間質に線維芽細胞などの正常細胞を多量に含むため、臨床材料を用いた癌の遺伝子異常の検索には困難が伴う。したがってこれら若年者胃癌やスキルス胃癌の分子生物学的病態を解析するためには、既知の遺伝情報によらず疾患関連異常遺伝子を検出できる新しい手法が求められる。

RDA は 2 種のゲノム間の“差”を検出できる優れた手法であり、癌と正常のゲノムを比較することによって未知の癌関連遺伝子の単離に応用することが可能である。しかしその高度な感受性と PCR を多用する複雑な手技のため、試料のコンタミネーションの危険性が常にある。またサブトラクションが効率よく行なわれなければ、difference product 中に非特異的繰り返し配列が false positive として多く含まれることになり、RDA の利便性を減ずる原因となる。また癌組織中での多量の正常細胞の存在は difference product の収量を減らす原因となる。癌組織から正常細胞を除去する試みとして、腫瘍をマウスに移植し増殖させた移植片を用いる方法<sup>23)</sup>、もしくは ploidy pattern を基に flow-cytometry で腫瘍細胞のみを回収する方法<sup>24)</sup>なども報告されているが、必ずしも純粋な腫瘍細胞のみを回収





**Fig. 7** Hematoxylin and eosin staining (A, B) and EBER1 *in situ* hybridization (C, D) of the formalin fixed paraffin embedded specimen of the gastric cancer analyzed by EM-RDA.

(A, C) In the low-power magnification (×40), positive signals of EBER1 were shown in every carcinoma cell which invaded the submucosal region, but not significantly in the normal mucosa.

(B, D) In the high-power magnification (×200), cancer cells showed diffuse distribution with rich fibers and infiltrating lymphoid cells in the stroma, and positive signals of EBER1 were shown only in the nuclei of carcinoma cells.

できるわけではない。

以上のように RDA のサブトラクション効率を低下させる要素は多数存在するが、サブトラクション効率のモニターを行なうことによって高効率のサブトラクションの実現が可能になると考えられる。さらに高効率のサブトラクションが実現された RDA は、スキルス胃癌のように多量の正常細胞を含んだ癌組織の直接的な解析に大いに効力を発揮すると考えられる。

今回我々は RDA のサブトラクション効率をモニターできる系、すなわち EM-RDA を開発し、定量的な方法でモニタリング用標的 DNA が difference product 中に増幅されているのを確認した。このようにサブトラクション効率が保証された RDA の系を用いて 24 歳女性のスキルス胃癌を解析した結果、驚くべきことに EB ウイルスゲノムの一部が検出された。

EB ウイルス関連胃癌は EBER1 陽性にて診断され、本邦では全胃癌の 6.7% に認められる<sup>25)</sup>。EBER1 陽性率と組織型の相関については、中分化型管状腺癌および充実型低分化腺癌に EBER1 陽性率が比較的高いものに対し (8.8~9.1%)、非充実型低分化腺癌は全組織型の中で最も陽性率が低い (2.4%)<sup>25)</sup>。さらに年齢と性別を加えて考えると、34 歳以下の女性での EB ウイルス関連胃癌の報告はこれまでなく<sup>26)</sup>、本症例が第 1 例目となる。

EB ウイルス関連胃癌は間質に著明なリンパ球浸潤を呈する gastric cancer with lymphoid stroma (GCLS) と呼ばれる組織型を呈することが多い<sup>27)</sup>。本症例にも間質に豊富なリンパ球浸潤が認められているため、その病理組織学的診断には当初の非充実型低分化腺癌の他に、GCLS の記述が加えられるべきと考えられる。しかしそれにも増して重要と考えられるのは、本症例は 24 歳女性に発症し進行癌であり予後不良であったという点において、通常の EB ウイルス関連胃癌ときわめて異なっているということである。EB ウイルス関連胃癌は一般に予後良好といわれているため<sup>27)</sup>、本症例の臨床的特徴はむしろ典型的なスキルス胃癌に一致すると思われた。

EB ウイルス関連胃癌におけるヒト遺伝子の異常については未知の点が多い。一方同じ EB ウイルス関連腫瘍であるパーキットリンパ腫は染色体 8 q 24 に転座 t(8; 14)(q 24; q 32) を認め、転座によって c-myc の上流に位置した免疫グロブリン遺伝子のプロモーターが c-myc の転写レベルを活性化することによって悪性化に関連していると考えられている<sup>28)</sup>。EB ウイルス関連胃癌でのヒト遺伝子の異常については、replication error

が認められないこと<sup>29)</sup>、5 番および 17 番染色体の LOH が稀に認められること<sup>29)</sup>、また異常 p 53 タンパクの蓄積や bc 12 の発現と無関係である<sup>30,31)</sup> という報告が認められるのみである。したがって、本症例だけでなく EB ウイルス関連胃癌全般についても、未知の重要な遺伝子異常の存在が推測される。

EB ウイルスはほとんどの正常成人の B リンパ球に潜伏感染していることが知られているが、感染は B リンパ球 10<sup>6</sup> 個に 1 個の比率でしか認められない<sup>32)</sup>。一方 EB ウイルス関連胃癌では癌細胞 1 個あたり数コピーから 100 コピーの EB ウイルスが存在しているとの報告がある<sup>33)</sup>。EM-RDA で得られた 2 種の EB ウイルス関連クローンはそれぞれ解析クローンの中の 22.7% および 10.0% と大部分を占めた。つまりこれらのクローンは胃癌組織と正常組織に存在する EB ウイルス量に大きな差があることを反映して、EM-RDA によって検出されたものであると考えられる。実際に *in situ* hybridization によっても胃癌細胞中の EB ウイルスの存在が確認された。

このように EB ウイルス関連胃癌では p 53 など多くの腫瘍で高頻度に異常を示す癌抑制遺伝子の異常があまり認められないことから、EB ウイルス関連胃癌や若年性胃癌の発癌機構の解明には、今後さらなる知見の集積が必要と考えられる。

## 5 要 約

若年性胃癌の新たな遺伝子異常を検索する目的で、RDA に改良を加えた方法である EM-RDA を開発し応用することによって、以下の結果を得た。

1. Tester 側にあらかじめ混入した 1 コピーのモニタリング用標的 DNA は、3 回のサブトラクションで difference product 中で十分に増幅され検出された。
2. 高効率のサブトラクションが実現されている RDA (EM-RDA) によって、若年女性スキルス胃癌から EB ウイルスゲノムを検出した。

以上の結果から、我々はサブトラクション効率をモニターできる EM-RDA の開発に成功し、この方法は difference product のクローン解析を効率良く行なう上で非常に有用と考えられた。また EM-RDA の応用によりこれまで報告のない若年女性の EB ウイルス関連胃癌を診断することができた。

## 謝 辞

御指導御校閲いただいた本学内科学第一講座 今井浩三教授に深謝いたします。また御協力いただいた諸



先生, 特に実験全般にわたり御指導いただいた本学内科学第一講座 伊東文生講師に深謝致します。

### 参考文献

1. 部位別がん死亡率の推移. がんの統計編集委員会編. がんの統計 1995. 東京, がん研究振興財団, 1995, 11.
2. 臨床病理: 若年者胃癌. 胃癌研究会編. 日本の胃癌. 東京, 金原出版, 1996, 730-736.
3. Adachi Y, Ogawa Y, Sasaki Y, Yukaya H, Mori M, Sugimachi K. A clinicopathologic study of gastric carcinoma with reference to age of patients. *J Clin Gastroenterol* 1994, 18: 287-290.
4. Theuer CP, de Virgilio C, Keese G, French S, Arnell T, Tolmos J, Klein S, Powers W, Oh T, Stabile BE. Gastric adenocarcinoma in patients 40 years of age or younger. *Am J Surg* 1996, 172: 473-477.
5. Kitamura K, Yamaguchi T, Yamamoto K, Ichikawa D, Taniguchi H, Hagiwara A, Sawai K, Takahashi T. Clinicopathological analysis of gastric cancer in young adults. *Hepatogastroenterology* 1996, 43: 1273-1280.
6. Hayden JD, Cawkwell L, Sue Ling H, Johnston D, Dixon MF, Quirke P, Martin IG. Assessment of microsatellite alterations in young patients with gastric adenocarcinoma. *Cancer* 1996, 79: 684-687.
7. Lisitsyn NA, Lisitsyn NM, Wigler M. Cloning the differences between two complex genomes. *Science* 1993, 259: 946-951.
8. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, Puc J, Miliarensis C, Rodgers L, McCombie R, Bigner SH, Giovanella BC, Ittmann M, Tycko B, Hibshoosh H, Wigler MH, Parsons R. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast, and prostate cancer. *Science* 1997, 275: 1943-1947.
9. Mollenhauer J, Wiemann S, Scheurlen W, Korn B, Hayashi Y, Wilgenbus KK, Deimling A, Poustka A. DMBT1, a new member of the SRCR superfamily, on chromosome 10q25.3-26.1 is detected in malignant brain tumours. *Nat Genet* 1997, 17: 32-39.
10. Lisitsyn N, Wigler M. Representational difference analysis in detection of genetic lesions in cancer. *Methods Enzymol* 1995, 254: 291-304.
11. UICC International Union Against Cancer. TNM classification of malignant tumours, Fourth, fully revised edition. Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, Springer-Verlag, 1897.
12. 胃癌研究会胃癌組織分類検討委員会. 胃癌の組織学的分類. 胃癌研究会編. 胃癌取扱い規約. 改訂第 12 版. 東京, 金原出版, 1993, 59-89.
13. Ausubel FA, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. *Current Protocols in Molecular Biology*. New York, John Wiley & Sons, 1996.
14. Schutte M, da Costa LT, Moskaluk CA, Rozenblum E, Guan X, de Jong PJ, Bittner M, Meltzer PS, Trent JM, Kern SE. Isolation of YAC insert sequences by representational difference analysis. *Nucleic Acids Res* 1995, 23: 4127-4133.
15. Shibata D, Weiss LM. Epstein-Barr virus-associated gastric adenocarcinoma. *Am J Pathol* 1992, 140: 769-774.
16. Baer RJ, Bankier AT, Biggin MD, Deininger PL, Farrell PJ, Gibson TJ, Hatfull GF, Hudson GS, Satchwell SC, Seguin C, Tuffnell PS, Barrell BG. DNA sequence and expression of the B95-8 Epstein-Barr virus genome. *Nature* 1984, 310: 207-211.
17. Maehara Y, Emi Y, Tomisaki S, Oshiro T, Kakeji Y, Ichiyoshi Y, Sugimachi K. Age-related characteristics of gastric carcinoma in young and elderly patients. *Cancer* 1996, 77: 1774-1780.
18. Hirose S, Honjou H, Nakagawa H, Nishimura K, Kuroda Y, Tsuji M, Miwa A, Kitagawa M. Scirrhous carcinoma of the stomach: a clinical and pathological study of 106 surgical cases. *Gastroenterol Jpn* 1989, 24: 481-487.
19. Kiyasu Y, Kaneshima S, Noga S. Morphogenesis of peritoneal metastasis in human gastric cancer. *Cancer Res* 1981, 41: 1236-1239.
20. Tahara E. Growth factors and oncogenes in human gastrointestinal carcinomas. *J Cancer Res Clin Oncol* 1990, 116: 121-131.
21. Hattori Y, Odagiri H, Nakatani H, Miyagawa K, Naito K, Sakamoto H, Katoh O, Yoshida T, Sugimura T, Terada M. K-sam, an amplified gene in stomach cancer, is a member of the heparin-binding growth factor receptor genes. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 5983-5987.
22. Kuniyasu H, Yasui W, Kitadai Y, Yokozaki H, Ito H, Tahara E. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 189: 227-232.

23. Hahn SA, Seymour AB, Shamsul Hoque ATM, Schutte M, da Costa LT, Redston MS, Caldas C, Weinstein CL, Fischer A, Yeo CJ, Hruban RH, Kern SE. Allelotype of pancreatic adenocarcinoma using xenograft enrichment. *Cancer Res* 1995, 55: 4670-4675.
24. Maesawa C, Tamura G, Suzuki Y, Ishida K, Saito K, Sotodate R. Sensitive detection of p53 gene mutations in esophageal endoscopic biopsy specimens by cell sorting combined with polymerase chain reaction single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 1992, 83: 1253-1256.
25. Tokunaga M, Land CE, Uemura Y, Tokudome T, Tanaka S, Sato E. Epstein Barr virus in gastric carcinoma. *Am J Pathol* 1993, 143: 1250-1254.
26. Tokunaga M. Epstein-Barr virus related gastric cancer in Japan: A molecular patho-epidemiological study. *Acta Pathol Jpn* 1993, 43: 574-581.
27. Nakamura S, Ueki T, Yao T, Ueyama T, Tsuneyoshi M. Epstein-Barr virus in gastric carcinoma with lymphoid stroma. *Cancer* 1994, 73: 2239-2249.
28. Shiramizu B, Barriga F, Neequaye J, Jafri A, Dalla Favera R, Neri A, Gutierrez M, Levine P, Magrath I. Patterns of chromosomal breakpoint locations in Burkitt's lymphoma: relevance to geography and Epstein-Barr virus association. *Blood* 1991, 77: 1516-1526.
29. Chong JM, Fukayama M, Hayashi Y, Takizawa T, Koike M, Konishi M, Kikuchi Yanoshita R, Miyaki M. Microsatellite instability in the progression of gastric carcinoma. *Cancer Res* 1994, 54: 4595-4597.
30. Margaret L, Gulley ML, Pulitzer DR, Eagan PA, Schneider BG. Epstein-Barr virus infection is an early event in gastric carcinogenesis and is independent of bcl2 expression and p53 accumulation. *Human Pathol* 1996, 27: 20-27.
31. Ojima H, Fukuda T, Nakajima T, Nagamachi Y. Infrequent overexpression of p53 protein in Epstein-Barr virus-associated gastric carcinomas. *Jpn J Cancer Res* 1997, 88: 262-266.
32. Rocchi G, de Filici A, Ragona G, Heinz A. Quantitative evaluation of Epstein-Barr-virus-infected mononuclear peripheral blood leukocytes in infectious mononucleosis. *N Engl J Med* 1977, 296: 132-134.
33. Fukayama M, Hayashi Y, Iwasaki Y, Chong J, Ooba T, Takizawa T, Koike M, Mizutani S, Miyaki M, Hirai K. Epstein-Barr virus-associated gastric carcinoma and Epstein-Barr virus infection of the stomach. *Lab Invest* 1994, 71: 73-81.

---

別刷請求先:

(〒060-8543) 札幌市中央区南1条西16丁目

札幌医科大学医学部内科学第一講座 見田裕章