

技 術

PCR法を用いた免疫グロブリン重鎖 (IgH) の
クロナリティ検出法の検討

高橋 一人 富樫 信 秋田 隆司
河野 尚秀 伊東 希美 工藤 和洋
下山 則彦

A Study of Detection Method of Clonality in Immunoglobulin
Heavy Chain (IgH) that Uses Polymerase Chain Reaction Method

Kazuto TAKAHASHI, Makoto TOGASHI, Ryuji AKITA,
Naohide KONO, Nozomi ITO, Kazuhiro KUDO,
Norihiro SHIMOYAMA

Key words : Polymerase Chain Reaction — Lymphoma —
Clonality — Gene Rearrangement

はじめに

悪性リンパ腫をはじめとするリンパ球増殖性疾患の診断は、病理組織標本や免疫組織化学所見によって行われるのが基本である。しかし、リンパ球の増殖が腫瘍性の変化なのか、あるいは反応性の変化なのか、判断が難しい症例も少なくない。このような症例では分子生物学的に増殖しているリンパ球のクロナリティを検出することが診断の補助として有用である。

悪性リンパ腫のクロナリティの検出は一般にサザンブロット法やPCR法が行われる。サザンブロット法は広く一般に用いられている方法であるが、手技が煩雑で高分子・高濃度のDNAを必要とし、検出感度はあまり高くない。一方、PCR法は非特異的反応やコンタミネーションに弱い特性があるものの、非常に感度が高く、手技が簡便で迅速性に優れている。断片化した微量のDNAでも検査が可能な技術のため、ホルマリン固定したパラフィン包埋ブロック組織も検査対象とすることができる方法である。これら利便性を背景にして、近年PCR法を用いたクロナリティの検出法が種々報告されてきているが¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾、今現在においても臨床検査としての標準法は確立されておらず、DNA抽出方法、プライマーの選択、PCR反応条件、判定方法等は各施設の判断に委ねられている。

今回我々はB細胞性悪性リンパ腫の診断に有用な免疫グロブリン重鎖 (IgH) のクロナリティの検出法について、有用性や問題点を検討したので、文献的考察を加え報告する。

原 理

リンパ球のB細胞は多数の免疫グロブリン (Ig) 遺伝子断片が再構成することにより、抗原に対する多様性を生み出している (図1)。Ig遺伝子は重鎖 (IgH) および軽鎖 (IgL) からなり、初めにIgH遺伝子が再構成し、続いてIgL遺伝子が再構成する。そのため、B細胞性悪性リンパ腫を疑う場合は分化の最も初期の段階で腫瘍化した場合でも検出できるように、通常はIgH遺伝子の再構成を検索する。IgH遺伝子の可変領域は多数のV (variable) 遺伝子群とD (diversity) 遺伝子群、さらに6個のJ (joining) 遺伝子群から構成され、始めにD、J遺伝子群からそれぞれ1個の断片が選択され再構成を起し、続いてV遺伝子群内の1断片とD-J結合遺伝子が再構成を起す。正常細胞の遺伝子再構成はランダムに起こり、ポリクローナルな集団となるが、単一細胞を起源とするB細胞性悪性リンパ腫ではモノクローナルな集団となる。そこでV遺伝子のFR3と呼ばれる部分とJ遺伝子の配列中にプライマーを設定し、PCRを行うことにより、単一な遺伝子再構成の有無を検出することができる (図2)。

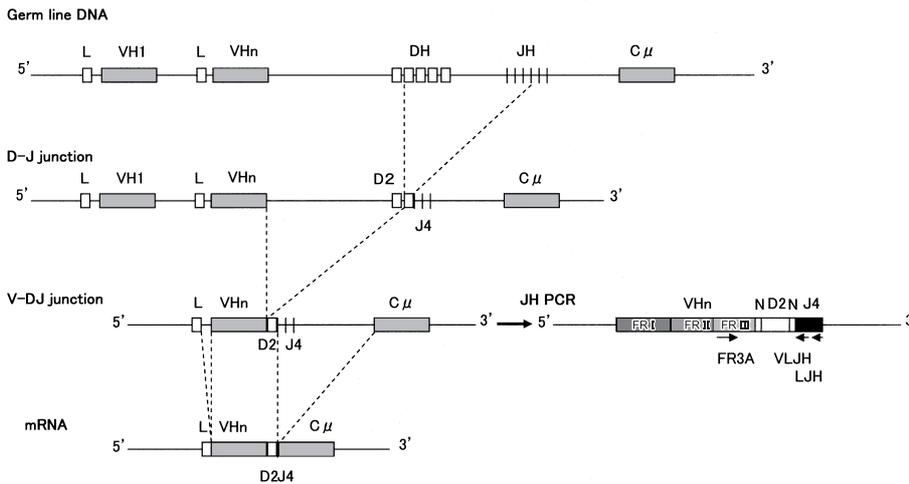


図1 免疫グロブリン重鎖 (IgH) の遺伝子再構成とクロナリティ検出の原理



図2 IgH 遺伝子再構成泳動所見
N: ポリクローナルスメア像
P: クロナリティ検出バンド

方 法

DNA 抽出方法, PCR 反応および電気泳動の各行程について, 技術的な検討を行った。

a. DNA 抽出 (図3・4)

通常の臨床検体から PCR 反応を行うために適当な DNA が抽出できているか確認した。対象は2005年2月から2006年3月までの間に DNA の抽出を行ったリンパ節や骨髄液等の生組織85例, パラフィン包埋ブロック組織60例とした。血液や骨髄液等, 液状検体は QIAamp DNA Blood Mini Kit (QIAGEN 社) を使用して DNA を抽出し, 固形生組織の場合は MagNa Lyser (Roche 社) で組織片をホモジナイズしたのち, 液状検体と同様に扱い DNA の抽出を行った。抽出した DNA は吸光度を測定し, 濃度および純度の確認を行った。パラフィン包埋ブロックからの DNA 抽出には DEXPAT (TaKaRa 社) を使用した。最初に組織周囲の余分なパラフィン部分をトリミングしたのち, 5 μ m 程度の厚さで薄切した。組織片の大きさが 2cm 四方程度の場合は 1 枚, 生検材料のような小さい組織片では 20 枚切り出した。また, 抽出した DNA は 1 度 エタ沈メイト (ニッポンジーン社) にて DNA を精製し, TE Buffer 30 μ l に溶解した。パラフィン包埋ブロック組織から抽出される DNA は少量なため吸光度は測定せず, そのままテンプレートとして PCR 反応に使用し, 何らかの泳動所見が得られた場合, PCR 反応により DNA が増幅していると考え, 検査可能な DNA が抽出されていると判断した。

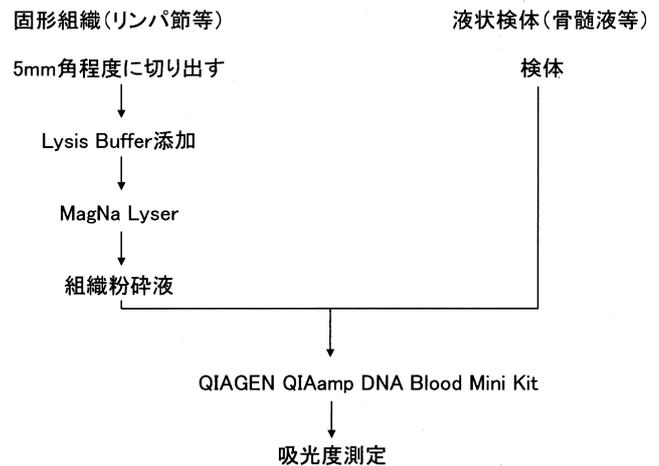


図3 生組織からの DNA 抽出

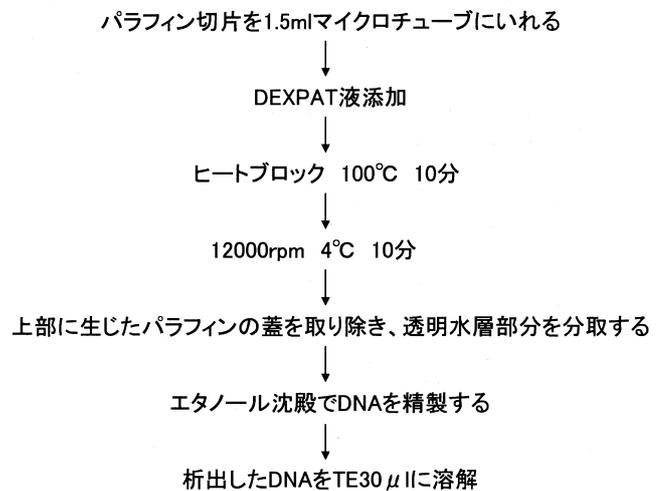


図4 パラフィン包埋ブロック組織からの DNA 抽出

b. PCR 反応

1 回目 FR3A と LJH, 2 回目 FR3A と VLJH による seminested PCR を実施し, アニール温度および伸長反応時間について検討を行った。サーマルサイクラーには TaKaRa 社の PCR Thermal Cycler Dice TP600 を使用した。対象は組織学的に B 細胞性悪性リンパ腫が疑われ, 他施設の PCR やサザンブロット解析で遺伝子再構成が認められた 5 例を陽性コントロール, 組織学的に非腫瘍性のリンパ球増殖が疑われ, 遺伝子再構成が認められなかった 3 例を陰性コントロールとした。

アニール温度の検討では 1 回目の温度を 55°C に固定し, 2 回目を 46~66°C の間で 2°C 刻みに設定して PCR 反応を行い, その逆の条件でも同様の検討をした。なお, いずれもアニールの反応時間は 30 秒とした。伸長反応はアニール温度を 1 回目, 2 回目ともに 55°C に設定した上で, 30 秒と 1 分間で比較した。その他の反応条件はホットスタート加熱処理 95°C 10 分, 熱変性 94°C 30 秒, 付加伸長反応を 72°C 5 分とし, 1 回目・2 回目ともに 30 サイクル行った。PCR 反応液は 50 μ l 中にサンプル DNA 100ng, 各プライマーが最終濃度 0.2 μ M, 耐熱性 Taq ポリメラーゼが最終濃度 25mU/ μ l になるように調整した。なお, 現在の当検査室で行っている検査のプロトコルを表 1・2 に示す。

c. 電気泳動

同一 PCR 産物を 2% アガロースゲル, 6% アガロースゲルおよび 12.5% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行い比較した。アガロースゲルの場合はゲル内にエチジウムブロマイドを 4 ng/10ml の割合で混和し, PCR 産物 6 μ l + ローディングバッファー 2 μ l の混合液を 2% アガロースゲルでは 100V 20 分, 6% アガロース

ゲルでは 100V 40 分泳動した。ポリアクリルアミドゲルでは PCR 産物 8 μ l + ローディングバッファー 2 μ l の混合液を 12.5% ポリアクリルアミドゲルで 100V 90 分泳動後, エチジウムブロマイドで 30 分染色した。

結 果

a. DNA 抽出

生組織では全 85 例に, パラフィン包埋ブロック組織では 60 例中 59 例 (98%) に何らかの DNA 増幅を認めた。生組織の DNA 抽出において, DNA の純度を示す吸光度 280/260 の比が推奨値の 1.800 を下回るものが数例出現したが, いずれもエタノール沈殿を行うことにより, 1.800 以上の値となった。抽出に要する時間は生組織, パラフィン包埋ブロック組織ともに約 1 時間であった。

b. PCR 反応

1 回目のアニール温度を 55°C とした場合, 2 回目のアニール温度が 54~62°C で良好な泳動所見が得られた。2 回目のアニール温度を 55°C とした場合は, 1 回目のアニール温度が 54~60°C で良好な再現性を得ることができた。この範囲より温度が低い場合や高い場合は, 目的としたバンドが不明瞭になったり消失したりするものや非特異的なバンドが出現することがあった (図 5)。伸長反応時間は 30 秒と 1 分で比較したところ, 泳動所見に大きな差はみられなかった。

c. 電気泳動

類似した DNA 分離能を有する 6% アガロースゲルと 12.5% ポリアクリルアミドゲルの比較では, ポリアクリルアミドゲルの方が再構成バンドや陰性スメア像の認識が容易であった。特に近接する複数のバンドを分離する能力は明らかにポリアクリルアミドゲルの方が高かった。また, 2% のアガロースゲルを用いた場合では, 再構成バンドと陰性スメア像の鑑別が困難な場合があった (図 6)。

考 察

PCR はプライマー間の DNA を大量に増幅する技術であり, 微量な検体 DNA から有用な情報を得ることが可能である。しかし, 我々の経験では PCR 法を用いた B 細胞のクロナリティの検出で, 再現性のある良好な結果を得るためには, 技術的な問題と結果の解釈の 2 つの問題があると思われた。

最初の行程となる DNA の抽出は良好な PCR を行うために基本的かつ重要な行程である。我々は生組織およびパラフィン包埋ブロック組織ともに DNA 抽出に市販のキットを利用し, 短時間で PCR 反応に十分な量および

表 1 反応液組成

	試薬濃度	添加量 (μ l)	最終濃度
10 \times Buffer		5.0	1 \times
dNTP	2mM	5.0	200 μ M
Primer each	25 μ M	0.4	0.2 μ M
Taq	5U/ μ l	0.25	25mU/ μ l (1.25U/50 μ l)
Template		1.0	2ng/ μ l (100ng/50 μ l)
DW		37.95	

表 2 反応条件

JH PCR (seminested PCR)	95°C	10min.	} 30cycle
	94°C	15sec.	
	55°C	30sec.	
	72°C	30sec.	
	72°C	5min.	
	15°C	end	

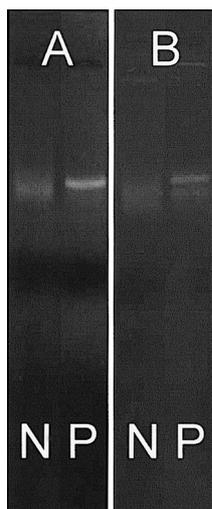


図5 1回目のアニーリング温度の違いによる泳動所見の変化

アニーリング温度が高くなると陽性バンドが不明瞭になり、非特異的なバンドがみられるようになった（6%アガロースゲルにて泳動）。
A：55°C，B：65°C，N：陰性コントロール，
P：陽性コントロール

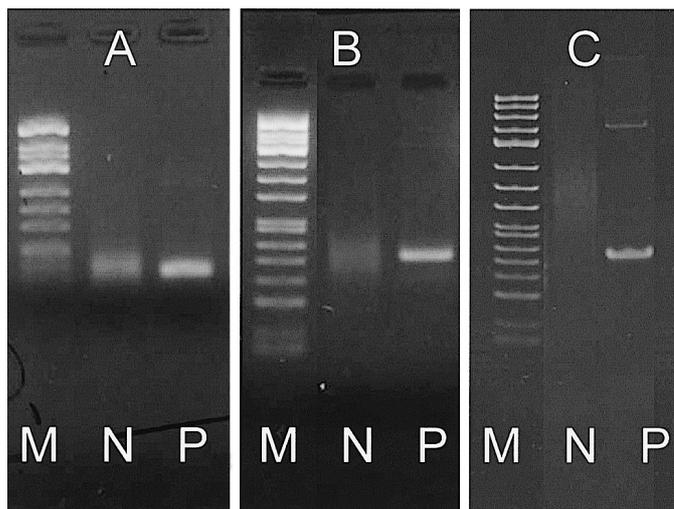


図6 ゲルの濃度・種類の違いによる泳動所見の変化

A：2%アガロースゲル，B：6%アガロースゲル，
C：12.5%ポリアクリルアミドゲル
M：サイズマーカー，N：陰性コントロール，
P：陽性コントロール

品質のDNAを抽出することができた。パラフィン包埋ブロック組織ではDNAの変性・断片化が生じ、PCR反応でDNAの増幅が行われないことがある³⁾が、今回抽出を行った検体では約98%で何らかのDNA増幅を確認することができた。これは生検等の小組織片が病理検査に提出された場合、当日中に処理を開始し、ホルマリン固定時間を半日～1時間程度にしているため、DNAの損傷が少なかったためと考えられた。また、明らかな有意性は認めていないものの、エタノール沈殿により、DNAを精製・濃縮することも安定した結果を得るための一因になると考えられた。

PCRはプライマーの塩基配列やサーマルサイクラーの機種の違いにより、DNAとの結合部位や温度勾配の特性、使用できるマイクロチューブの規格が異なる。そのため、自施設に適した反応条件は実験的に見つけ出す必要がある。

アニーリングの温度はPCR反応を左右する大きな要因の1つにあげられ、その温度はプライマーのT_m値を基準に設定する⁹⁾。今回検討したIgHの seminested PCRでは2回目に用いるプライマーVLJHのT_m値が1回目に用いるプライマーLJHのT_m値より高いため、2回目の反応温度の方を高く設定している報告もある⁴⁾が、我々の施設では1回目、2回目のPCR反応ともに55°C 30秒で安定した結果を得ることができた。アニーリングの温度は同じプライマーを使用している施設により報告が様々¹⁾²⁾³⁾⁴⁾⁵⁾⁶⁾⁷⁾⁸⁾なことから、設備的な要因も結果に影響を与えていると思われた。

伸長反応時間はPCR産物1kb当たり1分間を基準に設定するといわれている⁹⁾。B細胞の遺伝子再構成で出現するバンドサイズが200bp以下であることを考慮すると、30秒で十分と考えられた。今回の検討で伸長反応を1分に延長した場合、判定に影響を及ぼすほどではなかったが、若干再構成バンドの輪郭が不明瞭になることがあったため、過度の伸長反応は泳動所見に影響を及ぼす可能性もあると思われた。

電気泳動に使用するゲルは検出するPCR産物のサイズにより、種類や濃度を調整する必要があり、500bp以下のバンドの分離にはポリアクリルアミドゲルが向いているとされている⁹⁾¹⁰⁾。類似するDNA分離能を有する6%アガロースゲルと12.5%ポリアクリルアミドゲルの比較したところ、ポリアクリルアミドゲル方がバンドの認識が容易であり、特に近接する複数のバンドを分離する能力は明らかに優れていた。ポリアクリルアミドゲルはゲル作製および泳動時間に時間がかかり、サブマリン型電気泳動装置を用いるアガロースゲルとは異なるスラブ型泳動装置を必要とするが、その効果は大きく、判定には不可欠と感じた。市販のポリアクリルアミドゲルは自家製のポリアクリルアミドゲルと比べると高価であるが、明瞭な泳動所見を得られるような工夫が施してあるものがあり、ゲル作製手技の煩雑さも考慮すると日常の検査には市販品の利用が向いていると思われた。また、理論的にはアガロースゲルでも濃度を上げることにより、さらに分離能を向上させることができると思われるが、実際に高濃度のアガロースゲルを作製してみると、6%

を超える濃度では均質なゲルの作製が難しく、泳動像に歪みを生じてしまうため、現実的な方法ではなかった。

PCR, サザンブロット, FISH等, 遺伝子を対象とした検査は診断を確定させるための決め手となる結果を期待されることが多い。しかし, B細胞のクロナリティを検出するためにPCRを行うと, クロナリティを示唆する明瞭な1本の遺伝子再構成バンドやポリクローナルな集団を示唆するなめらかなスメア状のパターンを示すものはそれほど多くはない。また, 一見判定が容易に見えても, 病理学的所見やその他の検査所見と結果が合致しない場合も見うけられる。このように曖昧な結果を生じる原因は, PCR法によるB細胞のクロナリティ検出原理が, 疾患に特有な遺伝子配列を検出する一般のPCR検査とは異なるために生じると考えられる。

B細胞の遺伝子再構成の原理を細かくみると, 最初の過程にあたるD-J結合の際にD遺伝子とJ遺伝子との間にランダムな塩基配列の付加, D遺伝子3'側の欠失およびJ遺伝子5'側のランダムな欠失が生じ, V遺伝子とD-J結合遺伝子が結合する際にも同様な塩基配列の付加・欠失が生じる。B細胞が1つのクローンを起源として腫瘍性増殖をすると, 再構成時には同じパターン塩基の付加・欠失が起こり, VおよびJ遺伝子間に設定したプライマー間の距離が一定となるため, PCRで単一のバンドを生じるようになる。一方, 正常なポリクローンのB細胞では様々な長さの塩基の付加・欠失が生じ, PCRを行うと正規分布に従いスメア状のパターンを示すと考えられている。そのためクロナリティを検出しても生じるバンドのサイズは症例によって異なるが, 理論上プライマー間の距離には一定の範囲があるので, FR3AとVLJHの組み合わせでは70~150bp内にバンドが出現すると想定することができる。

正常な生体では多種の抗原に対応するため, 単一のB細胞の増殖が起きるとは考えにくく, クロナリティが検出されるということは腫瘍性増殖をしている可能性が高いといえる。しかし, 中峯¹¹⁾, 村尾¹²⁾やIijima¹³⁾らは良性疾患や生検等の微量なサンプルを対象としてPCRを行った場合でもバンドが出現することがあると報告している。また, 遺伝子異常が必ずしも設定したプライマー間に生じているわけではなく, 使用しているプライマーが再構成の際に選択される遺伝子全てと反応できるとは限らないので, 腫瘍性増殖があったとしても検出できない可能性がある。

検体内に占める腫瘍細胞の比率が低く, 検出限界程度しか含まれていない場合は, スメア像の中に薄いバンドをみることもあり, バイクローンやオリゴクローンの症例では複数のバンドや分離能が悪い太いバンドをみることもある。発生当初はモノクローンの腫瘍細胞であって

も, 腫瘍化した後に生じた遺伝子変異で, 複数のクローンを持つこともあり得る¹¹⁾。また, 我々の経験ではパラフィン包埋ブロック組織のようにDNAの断片化が起きやすい検体では, 解釈が困難な複数のバンド状所見がみられることもあり, 単に泳動所見をみるだけでは判断が難しいことがある。PCRの結果は有力な情報と成り得るが, 様々な要因が複雑に絡み合う可能性があり, 単独での判定には危険性が伴う。結果の解釈は臨床症状, 病理学的所見, その他の検査所見を合わせて総合的に行うことが重要と考えられた。

ま と め

PCR法は一般病院でも実施しやすい利便性がある反面, 偽陰性・偽陽性や施設間差が問題となっており, ヨーロッパでは2003年にBIOMED-2¹⁴⁾と呼ばれる標準化の検討が報告されている。BIOMED-2では我々が検討した方法とは異なり, V遺伝子群を7種類のファミリーに分類し, それぞれに対してプライマーを設定してPCRを行い, heteroduplex法による電気泳動もしくはキャピラリー電気泳動にて解析している。この手法はまだ一般的とはいえないが, 既にキット化された商品も販売されていることから, 標準化の一手段として今後の検討課題になり得ると考えられた。

これまでリンパ球のクロナリティ検出にはサザンブロット法を用いた方法が一般的であったが, PCR法を用いた検出法もかなり普及してきている。結果の解釈が難しい場合もあり, 診断確定方法としては決定力に弱い面もみられるが, 検出感度や迅速性に優れ, 微小残存病変を経時的にモニタリングすることも可能であることから, 臨床現場では利用価値の高い検査法と考えられた。

文 献

- 1) Tim C. Diss et al. : Detection of monoclonality in low-grade B-cell lymphomas using the polymerase chain reaction is dependent on primer selection and lymphoma type. *Journal of Pathology*, 1993 ; 169 : 219-295.
- 2) Salvatore De Vita et al. : The polymerase chain reaction detects B cell clonalities in patients with Sjögren's syndrome and suspected malignant lymphoma. *The Journal of Rheumatology*, 1994 ; 21 : 1497-1501.
- 3) 塩沢英輔 他 : パラフィン包埋切片を用いた非ホジキンリンパ腫のクロナリティ解析の有用性に関する検討 ; 迅速DNAキット (Wako DNA Isolater PS-Rapid Reagent) を用いたPCR方による免疫グロブリン重鎖遺伝子再構成の検出. *血液・腫瘍科*, 2003 ; 46 :

- 596-602.
- 4) 北條 洋 他:PCRを用いた遺伝子変異・クロナリティー解析. 病理と臨床 臨時増刊号, 2004; 22: 376-385.
 - 5) 鈴木孝夫 他:悪性リンパ腫診断のための最近の検査—免疫組織化学・細胞診・遺伝子検査を中心に—. 医学検査, 2004; 53: 1185-1198.
 - 6) Yan-Chin Tai et al.:Immunoglobulin gene rearrangement of lymphoid malignancies: Application of the PCR technique to formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. J.Clin.Exp Hematopathol, 2003; 43: 1-9.
 - 7) 湯本典夫 他:悪性リンパ腫の遺伝子診断. 病理と臨床 臨時増刊号 1996; 14: 101-107.
 - 8) Toshio Ikarashi et al.:Detection of monoclonality in B-and T-cell lymphoma by the use of polymerase chain reaction of formarin-fixed paraffin-embedded tissue. 新潟県厚生連医誌, 2000; 10: 10-15.
 - 9) 中山広樹:バイオ実験イラストレイテッド3. 本当にふえるPCR. 秀潤社, 東京都, 1996.
 - 10) 上野一郎 他:臨床検査 遺伝子・染色体検査教本. 近大出版, 東京都, 1998.
 - 11) 中峯寛和 他:悪性リンパ腫細胞のクロナリティー証明の方法論とその臨床的意義. 日本臨床, 2000;58: 618-623.
 - 12) 村田眞一 他:遺伝子診断とは. 病理と臨床, 2000; 18: 620-623.
 - 13) Tatsuo Iijima et al.:Clonal proliferation of B lymphocytes in the germinal centers of human reactive lymph nodes: Possibility of overdiagnosis of B cell clonal proliferation. Diagnostic Molecular Pathology, 2000; 9: 132-136.
 - 14) JJM van Dongen et al.:Design and standardization of PCR primers and protocols for detection of clonal immunoglobulin and T-cell receptor gene recombinations in suspect lymphoproliferations: Report of the BIOMED-2 Concerted Action BMH 4-CT98-3936. Leukemia, 2003; 17: 2257-2317.
 - 15) 清水 章 他:リンパ系腫瘍のDNA再構成とDNA診断. 日本臨床 増刊号, 1989; 47: 479-491.
 - 16) 大島孝一:リンパ節材料からの遺伝子診断. 病理と臨床, 2000; 18: 646-652.
 - 17) 辻野志穂:悪性リンパ腫の分子生物学的病態解析—免疫グロブリン遺伝子およびT細胞受容体遺伝子解析を中心に—. 日本臨床, 2000; 58: 613-617.
 - 18) 伊藤 薫:リンパ腫の遺伝子検査法. MB Derma, 2003; 71: 93-98.
 - 19) 光谷俊幸 他:悪性リンパ腫の病態および診断—病理組織像を中心として—. 医学検査, 2004; 53: 1103-1115.
 - 20) 東田修二:遺伝子検査. Medical Technology, 2004; 32: 49-52.
 - 21) 木村暢宏:リンパ球の遺伝子再構成とsomatic hypermutation. 血液・腫瘍科, 2004; 49: 31-37.
 - 22) 赤羽美智子 他:PCR法を用いた胃 MALT lymphomaの monoclonalityの検索とその臨床病理学的応用. 臨床病理, 2003; 51: 852-858.
 - 23) 植田 豊 他:遺伝子検査 —検査内容と結果の解釈. 内科, 2000; 86: 481-484.
 - 24) 冊木信男 他:悪性リンパ腫における染色体異常と遺伝子再構成. 日本網内系学会会誌, 1989; 29: 121-125.
 - 25) 田丸淳一:悪性リンパ腫—B細胞性腫瘍における再構成免疫グロブリン遺伝子の somatic mutation について—. 病理と臨床 臨時増刊号, 1996; 14: 134-137.