原 著

閉塞性黄疸に対する PTCD 胆汁細胞診と
K-ras 点突然変異の解析神戸大学医学部第2病理¹⁾, 同 第1外科²⁾, 同 病院病理部³⁾味木 徹夫^{1,2)} 藤盛 孝博¹⁾ 塚本 龍子³⁾ 渥美亜紀子¹⁾小野山裕彦²⁾ 前田 盛¹⁾ 斎藤 洋一²⁾

K-ras 変異検出の診断への応用が胆汁で報告されているが、われわれは PTCD から採取した胆汁中から K-ras 変異を検討し、胆道狭窄をきたす疾患の確定診断への一助となりうるかを考案した。胆汁中細胞を使うにあたり、胆汁には強い細胞障害性があるため、まず基礎的検討として、培養細胞 NOZ を使って胆汁曝露時間による検体の使用の可否を検討した。高分子 DNA 抽出は胆汁曝露後 6 時間まで可能で曝露 12 時間では不可能となり、PCR 法による DNA 増幅は胆汁曝露後 12 時間まで可能で曝露 24 時間で不可能となった。したがって、新鮮材料を使用し、胆汁中の微量癌細胞検出の目的で高感度の K-ras 検出法を組み合わせれば、K-ras 変異が確定診断の一助となる可能性があると考えられた。次に、臨床材料として、13 例の PTCD から採取した新鮮胆汁の DNA を使用し、高感度検出が可能な enriched PCR 法で K-ras codon 12 の点突然変異を検討した。その結果、画像や臨床経過から肝癌と診断された症例には K-ras 変異が検出でき、K-ras 変異検討が肝癌確定診断の一助となる可能性が示唆された。

Key words: Obstructive jaundice—K-ras mutation—Cytology—PTCD—Bile

I. はじめに

閉塞性黄疸をきたす膵頭部腫瘍は、画像診断や腫瘍マーカーなどの生化学的検査が進歩した現在でも確定診断が困難である。これらの疾患は外科的に非切除となる場合も多いが、確定診断をつけることはその後の

化学療法や放射線療法を含めた治療法を考慮するうえでも重要である。これらの疾患に対して、減黄術のために percutaneous transhepatic choledocal drainage (PTCD) が行われ、PTCD 胆汁細胞診も診断の補助的材料として応用されている。しかし、PTCD 胆汁細胞診陽性率は、洗浄法などの工夫で武藤ら¹⁾の 91% の報告もあるが、通常では約 30~60%^{2~6)}とされている。このため、確定診断への新しい補助的手段の導入が望まれる。

近年、K-ras 遺伝子の変異が悪性腫瘍のマーカーとなりうることで報告されてきた。肝癌では K-ras 変異が 90% 近く検出されることが知られており⁷⁾、胆汁中の K-ras 変異検出を利用した診断への応用も報告されている^{8,9)}。一方、胆道癌は、従来 K-ras 変異は低率とされたが、最近の高感度検出法の出現に伴い、変異率は 50% 程度と考えられている¹⁰⁾。また、良性疾患では K-ras の変異は認められないとされて

Diagnostic value of bile cytology and K-ras point mutation detection in PTCD tube bile for biliary strictures

Tetsuo AJIKI^{1,2)}, M.D., Takahiro FUJIMORI¹⁾, M.D., Ryuu-ko TSUKAMOTO³⁾, C.T., Akiko ATSUMI¹⁾, M.T., Hirohiko ONOYAMA³⁾, M.D., Sakan, MAEDA¹⁾, M.D., Yoichi SAITO³⁾, M.D.

¹⁾Second Department of Pathology, ²⁾First Department of Surgery, ³⁾Department of Clinical Pathology, Kobe University School of Medicine

論文別刷請求先 ☎ 650 神戸市中央区楠町 7 の 5 の 1 神戸大学医学部第2病理 味木徹夫

平成 6 年 12 月 12 日受付

平成 7 年 3 月 1 日受理

いる。このため、従来の画像診断や細胞診と、K-ras 遺伝子の検索を組み合わせることで、胆道狭窄の確定診断がより容易になる可能性があると考えられる。しかし、胆汁には細胞膜障害を主体とした強い細胞障害性があり¹¹⁾、胆汁中に剝離した細胞を遺伝子診断に応用することは困難であると思われる。このため、胆汁中細胞を使うにあたり、まず基礎的検討として、胆汁曝露時間による胆汁中細胞の使用の可否の検討を行った。その結果、新鮮材料を使用し、胆汁中の微量癌細胞検出のために高感度の K-ras 検出法を組み合わせれば、K-ras 変異が確定診断の一助となる可能性があると考えられた。そこで、最近の PTCD 施行症例に対し、細胞診と胆汁中 K-ras 変異検出を検討し、これらの確定診断への補助的手段としての有用性を検討した。

II. 対象および方法

1. 胆汁曝露に対する DNA 抽出および増幅の基礎的検討

基礎検討に用いた胆汁は、PTCD 術後 14 日目で胆管炎のない胆管癌患者（総ビリルビン値 1.5）の PTCD チューブから採取し、ガーゼで濾過した後に 3000 回転 10 分間遠沈し、上清の液状成分を使用した。

胆汁中浮遊細胞のモデルとしては、胆嚢癌腹水より樹立された細胞株 NOZ¹²⁾（慈恵医大、永森静志博士より提供された）を用いた。

NOZ の細胞浮遊液を 5×10^5 個/ml に調整後、1 ml を沈渣とし、胆汁 1 ml に加え攪拌、その後 2 時間、4 時間、6 時間、12 時間、24 時間胆汁に暴露させ、その後通常の方法¹³⁾での DNA 抽出の可否を検討した。対照としては、同様に同じ時間 RPMI 1640 (GIBCO) 1 ml 中に NOZ を浮遊細胞として入れ、通常の方法での DNA 抽出の可否を検討した。抽出の可否は教室の Tokuda らが報告したように¹⁴⁾、増幅効率がいよとえられる高分子 DNA が得られたか否かで評価した。

次に、通常の方法で抽出した NOZ の DNA 10 μ g を上記胆汁に暴露させ、その後フェノール抽出およびエタノール沈殿により回収した DNA が polymerase chain reaction (PCR) 法を使って K-ras 遺伝子の増幅が可能かどうかを検討した。

2. 臨床検体の検討

神戸大学第 1 外科および関連病院において 1994 年 4 月より 11 月までに閉塞性黄疸に対して施行された 13 例の新鮮な PTCD 胆汁を用いた。12 例の閉塞性黄疸は悪性腫瘍が原因で、このうち 3 例が手術例、9 例が非手術非切除例であり、非手術例に対しては臨床経過、画像などから最終診断がなされた。これらの細胞診、K-ras 変異の検出を検討した。細胞診は検体を遠沈後、沈渣を塗抹し、Papanicolaou 染色を行い判定した。K-ras 変異の検出方法としては、2 段階の PCR と制限酵素切断を利用し、変異細胞の割合を増して高感度の検出を行うことを原理とした enriched PCR 法¹⁵⁾を行い、3% アガロースゲル電気泳動にて変異バンドの検出を行った。以前に報告したように¹⁶⁾、細胞株を使った検出感度の実験では、正常細胞に対し変異細胞が 1/200 あれば、この方法で K-ras 変異の検出が可能であった。切除組織からの K-ras 変異は dot-blot hybridization 法¹⁷⁾により codon 12 の点突然変異を検討した。

III. 結 果

1. DNA 増幅の基礎的検討の結果

NOZ を浮遊細胞として胆汁に曝露後、通常の方法で DNA を抽出すると、6 時間曝露までは高分子 DNA 抽出が可能であったが、12 時間曝露で抽出が不可能となった。一方、RPMI 中に浮遊細胞として NOZ を入れた場合は 24 時間を経ても、高分子 DNA の抽出が可能であった（写真 1）。

次に、DNA 自身を胆汁に曝露させた場合は 12 時間曝露までは PCR 法による遺伝子増幅が可能であったが、24 時間曝露で増幅が不可能となった（写真 2）。

2. 臨床検体検討の結果（表 1）

臍癌 4 例中 3 例に細胞診が施行され、3 例とも細胞診陰性であった。しかし、4 例全例に PTCD 胆汁中より K-ras 変異が検出された。一方、胆管癌は細胞診陽性（写真 3）が 2 例みられたが、胆汁中から K-ras 変異は検出されなかった（写真 4）。胆汁中および切除材料とも検討できた悪性疾患 3 例の K-ras 変異は、全例両者とも相同する結果をえた（写真 5）。

IV. 考 察

神戸大学第 1 外科において 1988 年から 1993 年の間

写真 1 胆汁曝露した NOZ, および RPMI 中にいれた NOZ からの DNA 抽出. 約 23 kilobase pair に高分子 DNA バンドがみられる. 胆汁曝露 12 時間で高分子 DNA バンドがみえなくなった. M: λ -Hind III, DNA マーカー

表 1 PTCD 施行症例の細胞診および K-ras 変異

症例	診断	年齢	性別	細胞診	K-ras mutation	
					胆汁	切除標本*
1	膵癌	69	M	II	+	
2	膵癌	47	M	I	+	
3	膵癌	82	M	ND	+	
4	膵癌	63	M	II	+	++
5	胆管癌	83	F	V	-	
6	胆管癌	80	M	V	-	
7	胆管癌	78	M	I	-	
8	胆管癌	78	F	II	-	
9	乳頭部癌	46	F	I	-	-
10	大腸癌転移	36	M	I	-	
11	胃癌転移	89	F	I	+	
12	胃癌転移	62	M	I	-	-
13	総胆管結石	63	M	I	-	-

*空欄は非切除例, **GGT→GAT, ND; not done

に PTCD を施行し胆汁細胞診を行った症例は 29 例あり, 24 例が悪性疾患 (膵癌 3 例, 胆管癌 14 例, 胆嚢癌 2 例, 乳頭部癌 3 例, 悪性腫瘍転移 2 例), 5 例が良性疾患 (総胆管結石 4 例, 総胆管嚢腫術後の良性狭窄 1 例) であった. このうち 21 例が開腹手術または剖検により組織学的診断がなされ, 残りの 8 例は臨床経過, 画像から確定診断を得た. 悪性疾患 24 例中, 陽性 (class V) は 5 例 (21.7%) で, 疑陽性 (class III) は 1 例 (4.4%) と, 疑陽性をいれても 1/4 強にしか細胞診陽性例がなく, 細胞診が確定診断に有用であった症例は当科では今までのところ少ない.

悪性疾患に対する PTCD 胆汁細胞診の陽性率は種々の割合で報告されている (表 2). われわれの施設の陽性率は低率であるが, この理由としては, 検査回数がいずれも 1~2 回と少なく, 洗浄法¹¹⁾やブラッシング法¹⁸⁾などの陽性率を向上させると思われる方法

写真 2 胆汁曝露後に回収した DNA の K-ras 遺伝子増幅 (1=曝露 2 時間, 2=曝露 4 時間, 3=曝露 6 時間, 4=曝露 12 時間, 5=曝露 24 時間), 6=胆汁曝露しなかった DNA の増幅, 曝露 12 時間まで 157 base pair の DNA 増幅が可能であった. M: ϕ X-174 Hae III, DNA マーカー

写真 3 胆汁細胞診陽性例 (症例 5, Pap. 染色, 対物 20 倍)

が行われていないためと思われる. PTCD チューブからの検体採取は無侵襲に頻回に行うことができるという利点があり, 今後採取法を再考して, 当科でも陽性率の向上をめざしている. しかし同時に, 分子生物学的研究の進歩に伴い, PTCD 胆汁を使った新しい補助的手段が導入できないかと考え, われわれは今回の研究を行った.

胆汁中の胆汁酸には細胞膜障害性があることが知られており¹¹⁾, 胆汁中に浮遊した腫瘍細胞は強く変性障害される. 今回の検討によって, 胆汁中の細胞塊を用いた遺伝子変異の検索は細胞剥離後 6 時間から 12 時間が限界であることが明らかになった. DNA レベルによる増幅の検討でも胆汁への曝露は 12 時間が増幅できる限界であった. この差異は PCR 法がばらばらになった DNA の断片をも増幅可能な方法であることによると思われる¹⁹⁾. 細胞診では陰性であっても癌細胞の DNA の断片が含まれていれば, これが PCR 法で増幅され, K-ras 変異の検出が可能となるのである

写真4 Enriched PCR法によるK-ras変異の検出。1, 2 (症例番号5, 6, 胆管癌) には変異バンドが検出されず, 3, 4 (症例番号1, 2, 肝癌) には変異バンドが検出された。placental DNA=wild type, NOZ=mutant type のコントロール。M: ϕ X-174 Hae III, DNA マーカー

写真5 症例4の胆汁細胞診(A)および組織像(B)。胆汁中, 切除材料のいずれからもK-ras変異が検出された

う。

K-rasの検出方法として, 今回われわれはenriched PCR法を使用した。この方法はKahnら¹⁵⁾により初めて報告され, いくつかの問題点は指摘されてい

表2 PTCD胆汁細胞診の陽性率

報告者	報告年	陽性率
武藤 ¹⁾	1977	91%*
Harell ²⁾	1981	47%
Iitsuka ³⁾	1984	46%
Cohan ⁴⁾	1985	44%
及川 ⁵⁾	1987	33%
加藤 ⁶⁾	1991	63.6%
味木	1994	21.7%

*洗浄法を使用

るものの, 現状では高感度の検出が行える優れた方法と考えられている。いずれにせよ, PTCD胆汁中には微量な癌細胞やその断片しか含まれていないと考えられ, 高感度の検出法を使用する必要がある。

臨床症例の解析では, 肝癌はPTCD胆汁中の全例K-ras変異が陽性で, PTCD胆汁中のK-ras変異の検討が, 肝癌による胆道狭窄の確定診断にかなり有用な補助手段になると考えられた。一方, 胆道系の癌では肝癌よりK-ras変異率は低く, 通常の腫瘍からも高感度法を用いなければK-ras変異の検出は困難であり¹⁰⁾, 今回の検討でも, 胆汁からK-ras変異を検出できた例はなかった。このような点から胆管癌による胆道狭窄については, PTCD胆汁中と切除組織でのデータが対応できる症例を今後検討する必要がある。また, 胆道系癌のスクリーニングに有用な別の癌遺伝子, 癌抑制遺伝子の検討も必要であろう。

なお, 胆汁には個体差があり, 個々の症例ごとにDNAレベルの検討と細胞診との対比を今後も続けていく必要があると思われる。また, PTCD胆汁中の検体を用いた場合, 変性による偽陰性の問題もあるが, より新鮮な材料を採取することでDNAの使用が可能であり, PTCD胆汁にも分子生物学的手法の導入が期待できるとと思われる。

以上より, 現状ではPTCD中の浮遊細胞を使う検索にはまだ問題点もあるが, 新鮮材料と高感度のK-ras検出法を組み合わせることで, 胆道狭窄の原因診断の補助手段となる可能性があり, 特に肝癌症例に有用と考えられた。

PTCD胆汁資料を提供して下さった白岩 浩先生, 戸嶋和彦先生 (市立西脇病院), 成田晃一先生, 坂根正芳先生, 田畑文平先生 (田畑胃腸病院), 宮崎直之先生 (県立柏原病院), およびご助言をいただいた大林千穂先生 (神戸大学病院病理部), 山田勇先生, 富田政雄先生 (神戸大学第1外科) の諸先生方に対し

深謝いたします。

Summary

Detection of the *K-ras* mutation at codon 12 in pancreatic juice is a valuable diagnostic modality for differentiating chronic pancreatitis from pancreatic carcinoma. We attempted to detect *K-ras* mutations in bile DNA, collected from PTCD tubes, as a diagnostic approach to biliary obstruction. Since bile salt acts as a detergent in removing components from the plasma membrane, we first examined the degeneration of cells according to bile exposure time using cell line NOZ. High molecular weight DNA could not be extracted from cells exposed to bile for 12 or more hours. Moreover, NOZ-DNA exposed to bile for 24 or more hours could not be amplified by the PCR method. Therefore, in order to detect mutations in bile, it is necessary to use fresh materials and to use a highly sensitive method, because of the considerable cell contamination present. We next examined cytology and the *K-ras* mutation in 13 samples using the enriched PCR method. The *K-ras* mutation was detectable in the bile of all pancreatic carcinoma cases which had been clinically and radiologically diagnosed, but of which cytology was not confirmative. These results suggest that the detection of *K-ras* mutations in PTCD tube bile may be a useful diagnostic approach to the detection of biliary tract obstruction.

文 献

- 1) 武藤良弘・他：閉塞性黄疸に対する細胞診の応用—経皮経肝的胆管ドレナージによる胆汁細胞診—, 日臨細胞誌, 16 : 211~217, 1977.
- 2) Harell, G.S., et al. : Cytologic bile examination in the diagnosis of biliary duct neoplastic strictures, A.J.R., 137 : 1123~1126, 1981.
- 3) Iitsuka, Y., et al. : Diagnostic significance of bile cytology in obstructive jaundice, Jpn. J. Surg., 14 : 207~211, 1984.
- 4) Cohan, R.H., et al. : Biliary cytodiagnosis, Bile sampling for cytology, Invest Radiol, 20 : 177~179, 1985.
- 5) 及川正道・他：胆汁, 胆汁の細胞診, 日臨細胞誌, 26 : 87~94, 1987.
- 6) 加藤 拓・他：肝外胆管癌における PTCD 胆汁細胞診の解析, 日臨細胞誌, 30 : 979~983, 1991.
- 7) Almoguera, C., et al. : Most human carcinomas of the exocrine pancreas contain mutant c-*K-ras* genes, Cell, 53 : 549~554, 1988.
- 8) Kondo, H., et al. : 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.
- 9) Watanabe, H., et al. : 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.
- 10) Imai, M., et al. : *K-ras* codon 12 mutations in biliary tract tumors detected by polymerase chain reaction denaturing gradient gel electrophoresis, Cancer, 73 : 2727~2733, 1994.
- 11) 佐川 広・他：胆汁酸の膜障害性に関する研究 (第1報) —ヒト赤血球膜を用いて—, 胆道, 5 : 125~132, 1991.
- 12) 永森静志・他：ヒト肝癌, 胆管癌および胆のう癌培養細胞の機能と形態, 細胞, 15 : 195~200, 1983.
- 13) Gross-Bellard, M., et al. : Isolation of high-molecular-weight DNA from mammalian cells, Eur. J. Biochem., 36 : 32~38, 1973.
- 14) Tokuda, Y., et al. : Fundamental study on the mechanism of DNA degradation in tissues fixed in formaldehyde, J. Clin. Pathol., 43 : 748~751, 1990.
- 15) Kahn, S.M., et al. : Rapid and sensitive nonradioactive detection of mutant *K-ras* genes via 'enriched' PCR amplification, Oncogene, 6 : 1079~1083, 1991.
- 16) 味木徹夫・他：Enriched PCR 法を用いた *K-ras* 遺伝子変異の高感度検出法, 消化器癌, 4 : 241~243, 1994.
- 17) Fujimori, T., et al. : Non-involvement of *ras* mutations in flat colorectal adenomas and carcinomas, Int. J. Cancer, 57 : 51~55, 1994.
- 18) Kurzawinski, T., et al. : A prospective controlled study comparing brush and bile exfoliative cytology for diagnosing bile duct strictures, Gut, 33 : 1675~1677, 1992.
- 19) Burmer, G.C., et al. : Analysis of c-*Ki-ras* mutations in human colon carcinoma by cell sorting, polymerase chain reaction, and DNA sequencing, Cancer Res., 49 : 2141~2146, 1989.