

J群28.8%(60/210), K群23.5%(35/149)と同様の頻度であった。rhMLH1-93 (A/G) の遺伝子型頻度はJ群 A/A: 26%(n=54), A/G: 51%(n=108), G/G: 23%(n=48), K群 A/A: 18%(n=27), A/G: 24%(n=36), G/G: 58%(n=86)と人種により大きく異なっていたが、それぞれ正常人での頻度とは類似していた。一方メチル化と rhMLH1-93 (A/G) の関係は、メチル化はJ群 A/A: 44%(24/54), A/G: 24%(26/108), G/G: 21%(10/48), K群では A/A で: 33%(9/27), A/G: 33%(12/36), G/G で: 16%(14/86)に認められ、人種に関わらず rhMLH1-93 (A/G) との密接な関係を認めた (J群  $p=0.007$ , K群  $p=0.053$ )。特に A-アレルを有する大腸癌は G-アレルを有する大腸癌に比較してメチル化の頻度が有意に高率であった (J群: 34% vs 23%,  $p=0.007$ , K群: 33% vs 19%,  $p=0.008$ )。

② rhMLH1-93 (A/G) のアレルの違いによるメチル化発生について、gel shift assay を行い転写因子や蛋白の結合の違いを解析した。その結果メチル化の頻度が低い G アレルを有するオリゴでのみ転写因子の結合を認め、この転写因子はメチル化の結合を阻害する可能性が考えられた。転写因子の候補としては AP4, MyoD などが考えられるが現在さらに解析中である。

③ rhMLH1-93近傍の2箇所の SNP によるハプロタイプとメチル化の頻度との解析を行った。その結果、rhMLH1-93近傍2箇所それぞれの SNP 単独では hMLH1プロモーター領域のメチル化の頻度に影響を及ぼさないが、rhMLH1-93を含む3箇所のハプロタイプとメチル化の解析では、rhMLH1-93の A を含むハプロタイプではメチル化の頻度が有意に高い結果であった。

(結語) hMLH1プロモーター領域内の rhMLH1-93 (A/G) はメチル化発生に影響を与える重要な因子のひとつであると考えられた。現在メチル化発生への関与をさらに明らかにするために、MSI 陽性大腸癌の前癌病変と考えられている鋸歯状ポリープ (serrated adenoma) や hyperplastic polyp などにおいても解析を継続し、hMLH1メチル化陽性大腸癌高危険群の拾い上げマーカーへの可能性について検討中であ

る。

## リン酸化を介した哺乳動物精子の受精能獲得調節メカニズムの解明

産科婦人科助手 鈴木 達也

【背景】不妊症に占める原因のうち男性側の責任は約50%近くに存在する。中でも造精機能障害が90%以上を占め、このうち原因不明の特発性造精機能障害が60%である。これらの特発性造成機能障害(無精子症を除く)は精子の運動性・受精能力が障害され低下している病態であり、主として薬物療法が行われるが一般的にその有効性は低く、人工授精や体外受精に移行することが多い。低下した精子の運動性・受精能力を改善する治療法を開発するためには、運動性・受精能力を獲得するメカニズムを明らかにする必要がある。精子の運動性・受精能力の獲得は、 $Ca^{2+}$ や cAMP, A キナーゼによるタンパク質リン酸化によって調節されていることが示されている。従って、これらリン酸化タンパク質を解析するとともにそれらを調節する酵素を検索することにより、精子の運動性・受精能力を改善する治療法を開発できる可能性があると考えた。

【目的】精子受精能獲得(超活性化)に関与するタンパク質のリン酸化・脱リン酸化を引き起こすキナーゼ・フォスファターゼを検索することにより、精子の受精能獲得を調節するリン酸化経路を明らかにすることを目的とした。

【材料と方法】ヒトでは通常、運動開始前精子(精巣精子又は精巣上体精子)を採取することは困難であり、今回は超活性化による運動パターン変化が著明であるハムスターを実験動物として用いた。ハムスター精巣上体尾部より精子を採取し、modified Tyrode's albumin lactate pyruvate (m-TALP) 培養液を用いて超活性化を誘起した。その上で位相差顕微鏡下に精子の運動率ならびに超活性化率の変化を解析した。さらにプロテインフォスファターゼ (PP) 阻害剤(オキサ酸(10nM, 0.1nM)・カリキュリン A (2nM, 0.5nM)) を添加し、精子の運

動率・超活性化率の変化をコントロールと比較した。なお、オカダ酸・カリキュリン A はともに PP1 および PP2A の阻害剤であり、IC50 値はオカダ酸 (PP1: 10-15nM, PP2A: 0.1nM), カリキュリン A (PP1: 2nM, PP2A: 0.5-1.0 nM) である。また、m-TALP 添加による超活性化過程精子からタンパク質を抽出し、SDS-PAGE で分離後、抗リン酸化チロシン抗体を用いたウェスタンブロッティングでリン酸化タンパク質の変化を検出し、さらに 0.1nM オカダ酸添加精子での変化と比較した。

【結果】精子運動率はコントロール精子と PP 阻害剤添加精子とともに運動開始から 90% を超え、差を認めなかった。超活性化完了時間はコントロール精子では運動開始から約 3 時間であったが、PP 阻害剤添加精子はいずれの濃度においても約 2.5 時間で超活性化が完了した。また、コントロール精子よりも 10nM オカダ酸添加精子はより早期にタンパク質チロシンリン酸化が起こっていた。

【結論】PP2A 阻害により精子超活性化がより早期に完了しており、超活性化の過程には PP2A が関与していることが示唆された。今後、その他のキナーゼ・フォスファターゼについての検討を進めていく予定である。

## フローサイトメトリを用いた微小残存リンパ腫細胞の検出

輸血・細胞移植部 山本 千鶴

背景：悪性リンパ腫は、B 細胞性と T 細胞性に大別されるが、B 細胞性リンパ腫が悪性リンパ腫の過半数を占めている。B 細胞性リンパ腫は、細胞表面に B 細胞抗原である CD19 や CD20 を発現していることが特徴である。悪性リンパ腫は、進展度によって臨床病期の I 期から IV 期に分けられ、臨床病期が進むにつれて予後不良である。悪性リンパ腫は、しばしば骨髄に浸潤するが、骨髄に浸潤すると臨床病期は IV 期となり予後不良が示唆される。悪性リンパ腫の骨髄浸潤は、骨髄塗抹標本や骨髄病理組織検査 (両者を合わせて PTH) によってなされるが、これら

の検査では微小な悪性リンパ腫細胞の検出は困難である。私たちは、B 細胞性リンパ腫に発現している CD19 抗原に着目し、フローサイトメトリを用いて骨髄細胞中の CD19 陽性細胞における軽鎖の発現を検討した (CD19-FCM)。B 細胞性リンパ腫では、腫瘍化に伴い軽鎖の発現は  $\kappa$  または  $\lambda$  の何れかになるので、CD19 陽性細胞中の  $\kappa$  と  $\lambda$  比を算出することによって B 細胞性リンパ腫細胞の有無を判定することができる。健常ヒト骨髄単核細胞と B 細胞性リンパ腫患者の骨髄単核細胞の検討から、 $\kappa$  と  $\lambda$  比の正常範囲は 0.5-3.0 である。また、健常ヒト骨髄単核細胞と B 細胞性リンパ腫細胞の混合実験から、CD19-FCM の感度は 10% と判明している。そこで、B 細胞性リンパ腫患者の骨髄細胞を CD19-FCM を用いて検査し、CD19-FCM の結果が予後を反映するか検討した。

対象と方法：対象は、初発または再発の 85 例の B 細胞性リンパ腫。男性 50 例、女性 35 例。組織型はびまん性大細胞型リンパ腫 29 例、ろほう性リンパ腫 20 例、その他の組織型 36 例。全例、フローサイトメトリでリンパ腫細胞に CD19 の発現を認めた。当部のフローサイトメトリ検査に出された骨髄細胞の一部を単核細胞に分離し、FITC 標識抗体 (陰性コントロール, CD5, CD10, CD20, CD14, CD34, immunoglobulin,  $\kappa$ ,  $\lambda$ ) と PE 標識 CD19 で 2 重染色した。染色した細胞は、Cytron または FACS Calibur フローサイトメータを用いて測定した。 $\kappa$  と  $\lambda$  比が 0.5 未満または 3.0 を超えた場合、B 細胞性リンパ腫細胞の混入と判断した。

生存率は、Kaplan-Meier 法で算出し、群間の有意差検定は Log-rank test を用いて検討した。生存率に及ぼす因子は、単変量の比例ハザードモデルを用いて検討した。

結果：検査時の結果から、CD19-FCM(-) PTH(-) (49 例), CD19-FCM(+) PTH(-) (23 例), CD19-FCM(+) PTH(+) (13 例) の 3 群に分けられた。化学療法は、CHOP 療法または CHOP 療法の変法を受けた例が 47 例で最も多かった。観察期間の中央値は 10.5 ヶ月。2 年の生存率は、CD19-FCM(-) PTH(-) が  $69 \pm 7\%$ , CD19-FCM(+) PTH(-) が  $45 \pm 11\%$ , CD19-FCM(+) PTH(+) が  $31 \pm 15\%$  であった