

[別紙 2]

論文審査の結果の要旨

申請者氏名 山崎 淳平

本論文における一連の研究は、イヌのリンパ腫における MRD の分子生物学的検出システムを構築し、その臨床的有用性を検討することを目的として行った。

第1章: イヌのリンパ腫における MRD 定量システムの確立

イヌの T 細胞型リンパ腫由来細胞株 UL-1 を用いて、MRD 定量における症例特異的プライマーおよびプローブ設計法を検討するとともに、感度および特異性の検証を行った。まず、UL-1 細胞における T 細胞レセプター γ 鎖(TCR γ)の遺伝子断片を PCR によって増幅し、その配列を決定した。症例特異的なプライマーとプローブの設計には、得られた TCR γ 遺伝子配列の他にイヌゲノムデータベースにおける TCR γ 遺伝子近傍の配列を利用した。症例特異的プライマーを用いた PCR においては、正常犬の末梢血中単核球(PBMC)ゲノム DNA からの増幅は認められず、UL-1 細胞ゲノム DNA からの再構成済み TCR γ 遺伝子断片の増幅が確認された。次に、UL-1 細胞ゲノム DNA を正常犬 PBMC ゲノム DNA で段階希釈したものをサンプルとして用い、リアルタイム PCR により UL-1 細胞の TCR γ 遺伝子断片の定量を行ったところ、コピー数 10~100,000 のサンプルにおいて正確な定量結果が得られた。また、1 コピーのサンプルからは安定した増幅は得られなかったため、このシステムの感度は 10^{-4} であることが示された。

第2章: イヌのリンパ腫症例における末梢血中 MRD の検討

本章では、イヌのリンパ腫7症例における末梢血中 MRD の解析を行った。まず、個々の症例のリンパ腫細胞から免疫グロブリン重鎖(IgH) 遺伝子の再構成後の遺伝子断片を PCR によって増幅し、その配列を決定した。症例特異的プライマーとプローブの設計は、個々の症例の IgH 遺伝子配列およびイヌゲノムデータベースにおける IgH 遺伝子近傍の配列情報を組み合わせて行い、その特異性を確認したプライマー・プローブのセットをリアルタイム PCR に用いた。まず血液検査により末梢血液中に腫瘍細胞が確認される Stage V の症例において、通常の血液学的手法および本定量システムの結果を比較したところ、両方法によって得られた腫瘍細胞数はほぼ一致していることが確認された。そこで、リンパ腫症例においてその病状と末梢血中 MRD レベルとの関連

を検討したところ、MRD レベルはリンパ節の腫大および縮小の経過とほぼ一致して増加・減少することが判明した。また臨床的に完全寛解の状態にあった症例における MRD レベルを測定したところ、いずれの症例においても 0.1~10 コピー/ μ L (理論上、0.1~10 細胞/ μ L)の MRD レベルが検出された。

第3章: イヌのリンパ腫症例における末梢血中 MRD 測定の臨床的有用性に関する検討

本章では、末梢血中 MRD 定量の臨床的有用性を検討することを目的とし、定量を行ったイヌのリンパ腫症例 26 例に関して、次の3点について検証した。

A. 多剤併用化学療法プロトコル中における MRD 動態:リアルタイム PCRによって算出した末梢血腫瘍細胞数は、初診時において 10~>100 コピー/ μ L であったが、プロトコル 9 週目までに約 0.1~1 コピー/ μ L に減少し、その後 25 週目(最終週)まで維持されていた。最終週(寛解状態)における MRD レベルは初診時における末梢血中腫瘍細胞数と比較して有意に低い値であった。

B. 多剤併用化学療法終了時における MRD レベルと再発までの期間の相関:多剤併用化学療法により完全寛解に達した17症例の化学療法最終週における 20 サンプルの MRD レベルはその後の再発までの期間と負の相関を示した。そこで、これら症例を化学療法最終週における MRD レベルにより、>1 コピー/ μ L、0.1~1 コピー/ μ L、検出限界以下(分子生物学的寛解)の3群に分けたところ、再発までの期間に関してそれぞれの群の間に有意差が認められ、その中央値はそれぞれ 45, 190, 400 日であった。

C. MRD レベル解析の再発予測への応用:リンパ腫2症例において寛解時において末梢血液中 MRD レベル が分子生物学的寛解状態から逸脱した場合には、その後1~3ヶ月以内に再発していることが明らかとなった。

本研究の成果により、イヌのリンパ腫に関するこれまでの概念とは異なり、完全寛解の状態においても末梢血液中に腫瘍細胞が残存していることが示された。また、MRD レベルはイヌのリンパ腫のあらゆる状態においてその病状と相関を示すことが明らかとなり、とくに寛解状態においても腫瘍のわずかな進行度を評価できることが示された。今後、MRD レベルの測定をイヌのリンパ腫の診療に応用することにより、新規化学療法指針を提示できるものと考えられる。

本申請論文を審査した結果、博士(獣医学)の学位を授与するに値すると判断した。

(1988 文字)