◎茶木 善成¹⁾、林田 雅彦¹⁾、前川 ふみよ¹⁾、竹岡 加陽¹⁾
公益財団法人天理よろづ相談所医学研究所¹⁾

cell-free DNA (cfDNA) は、血液中のバイオマーカーの一つとしてリキッドバイオプシーに応用が進められており、我々は悪性リンパ腫における *RHOA* G17V 遺伝子変異と *MYD88* L265P 遺伝子変異の検出に応用している。今回、cfDNA 抽出の材料や方法が及ぼす影響について基礎的な検討を行った。

【材料および方法】材料は健常人ボランティア6名の血漿および血清であり、cfDNAの抽出はフェノール・クロロホルム法とし、2mLの処理量で80μLでの溶解とした。PCRの増幅は4μLのcfDNAをテンプレートとして、*RHOA*(127bp)、*MYD88*(296bp)、さらにBioMed-2に従い100-600bpの遺伝子の増幅を実施した。DNA量と質については、分光光度法による吸光度(A230, A260, A280)とアガロース電気泳動によるEB染色法にて評価した。また、PCRの増幅抑制の有無は、EB染色法にて希釈検体の増幅産物量を比較し評価した。

【結果および考察】採血後4時間以内に処理した血漿cfDNAのA260は2.46-3.25(平均2.86; dsDNA

136ng/μL)であったが、A280は3.86-5.25(平均4.58)、A230は23.09-31.25(平均27.37)と夾雑物を多く認めた。DNAサイズはヌクレオソーム単位の短鎖DNA(~1kbp)の他に数10kbp以上の長鎖DNAが存在した。血漿と血清のcfDNA回収量の比較では、血清で高いもののPCR増幅抑制を認めた。血清cfDNAでは、血液凝固に伴う白血球の破壊や蛋白の変化が影響すると考えられた。なお、血漿はEDTA採血が必要であり、ヘパリン加血は増幅反応を強く抑制した。採血後の冷蔵保存時間の影響は、3日目までの観察で長鎖DNA量が漸次増加し、各サイズのPCR産物も放置時間と共に増加した。

【まとめ】cfDNAの抽出をフェノール・クロロホルム法で行い、PCRによる増幅を確認した。血清の利用や長時間の検体保存は、白血球崩壊の影響を認めた。cfDNAには多くの夾雑物が存在したことから、PCRの増幅抑制を考慮した抽出法の改善が必要と考えられた。

0743-63-5611(内線8776)