

平成22年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「MEMS 技術を用いた癌診断用カートリッジ型ハイスルーブット光力学
尿中細胞診断装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成23年 9月

委託者 近畿経済産業局

委託先 関西ティール・エル・オー株式会社

目次

第1章 研究開発の概要.....	3
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標.....	3
1-2 研究体制.....	4
1-2-1 研究組織・管理体制.....	4
1-2-2 研究者氏名.....	6
1-3 成果概要.....	8
1-3-1 MEMS加工技術を応用した癌細胞検出・採取カートリッジの開発.....	8
1-3-2 カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置の全体設計.....	8
1-3-3 臨床現場における「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」の 評価.....	9
1-4 当該研究開発の連絡窓口.....	10
第2章 本章.....	11
2-1 MEMS加工技術を応用した癌細胞検出・採取カートリッジの開発.....	15
2-1-1 フローセルおよび微細切替弁の設計・開発.....	15
2-1-2 カートリッジの開発.....	19
2-2 カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置の全体設計.....	20
2-2-1 着手時の構想イメージ図から新規検査項目の手順と設計.....	20
2-2-3 完成した装置.....	21
2-2-5 装置の内部配置と各ユニットの名称(図2-15).....	22
2-3 臨床現場における「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」の評価	22
2-3-1 膀胱癌細胞の分別処理能力の評価検証.....	22
2-3-2 膀胱癌細胞検出感度の評価検証.....	23
2-3-3 膀胱癌培養細胞の分別採取率の評価検証.....	27
2-3-4 採取する癌細胞の生物学的悪性度の遺伝子診断への応用可能性の検証.....	29
最終章 全体総括.....	35

第1章 研究開発の概要

1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

1) 研究の目的

日本人の疾病における死亡原因第一位となっている癌は、加齢により発症リスクが高まるが、高齢化が進行する日本においては、その死亡者数は今後も増えていくと推測されている。（厚生労働省 がん対策推進基本計画より）とくに精検受診率が低い膀胱癌・前立腺癌は、早期発見が難しく、60歳台で急激に患者数が増えている。従来の膀胱癌および前立腺癌の診断は、苦痛を伴う膀胱鏡検査や針検診を主体とするものであり、患者および医師のストレスとなっており、これが精検受診率の低さの一因になっている。川下産業の医療機関・検査機関においては、膀胱癌等を簡易かつ迅速に自動検出する方法が求められている。

本事業の共同研究体の一員であるマイクロニクス株式会社は、患者の尿から膀胱癌・前立腺癌細胞を光学的診断法を用いて分離・分析する装置を開発しているが、癌細胞を分別する工程に課題があり、結果が出るまでに時間を要している。本事業では、MEMS 技術を用いて高速かつ高精度に尿から癌細胞を分離するシステムを開発し、問題解決を図る。

目標数値は下記の通りである。

	現状	ニーズ	高度化目標
検出および採取	個別 (細胞診+セルソータ)	同時	同時
精度 (癌細胞の検出率)	平均50% (細胞診)	80%	85%以上
癌細胞分別採取率	80% (セルソータ)	80%	85%以上
処理速度	8時間/検体	1時間/検体	8時間/50人 =約10分/検体

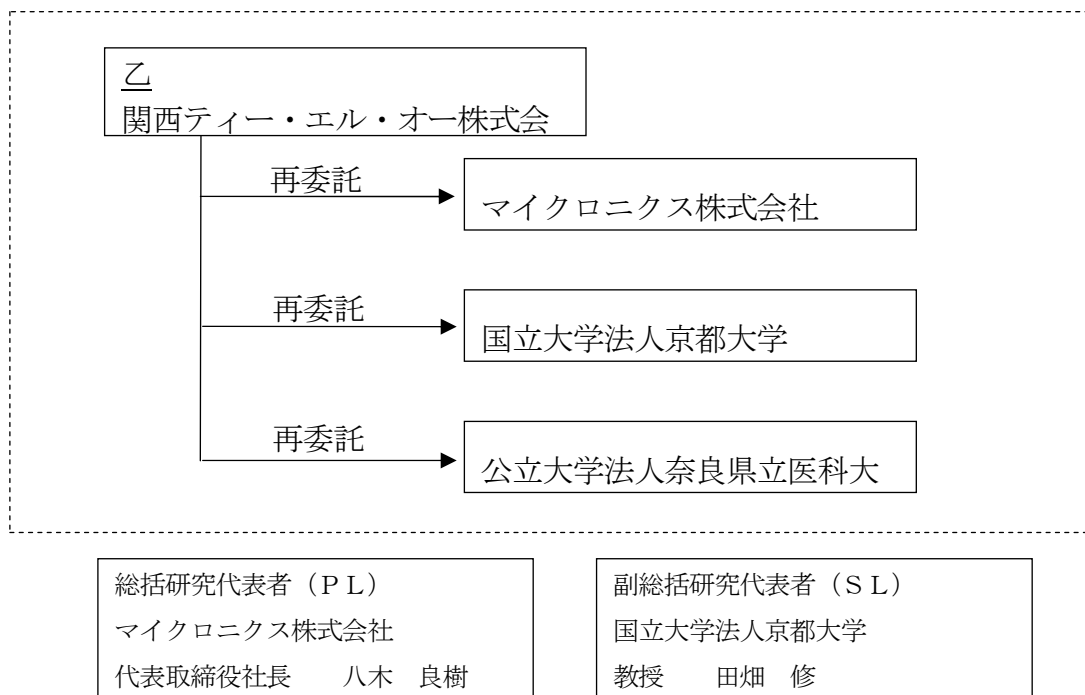
2) 研究の概要

我が国最大の疾病における死亡原因は、癌である。膀胱癌は、とくに早期発見が難しく、尿中の癌細胞の検出精度が低いため、川下産業の医療機関・検査機関においては、簡便・高速・高精度に自動検出する診断装置の開発が求められている。本事業では、MEMS 技術と光学診断法を用いて、フローセル・微細切替弁を作製し、癌細胞の検出・分別・採取を行う癌診断用カートリッジ型ハイスループット光力学尿細胞診断装置の開発を行う。

1-2 研究体制

1-2-1 研究組織・管理体制

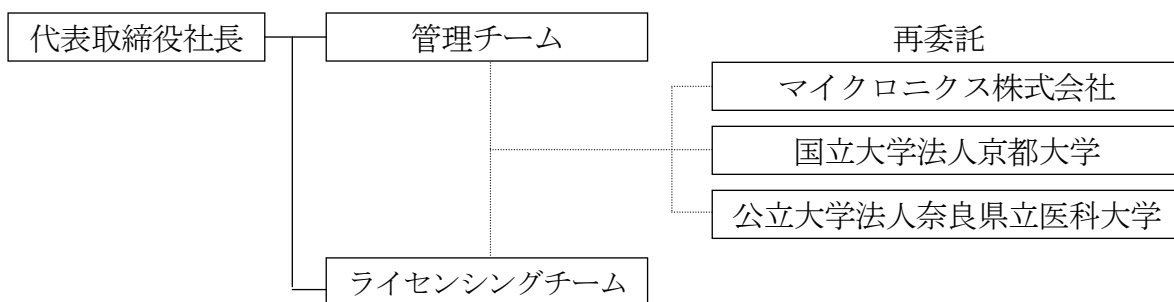
(1) 研究組織（全体）



(2) 管理体制

①事業管理者

関西ティール・エル・オー株式会社

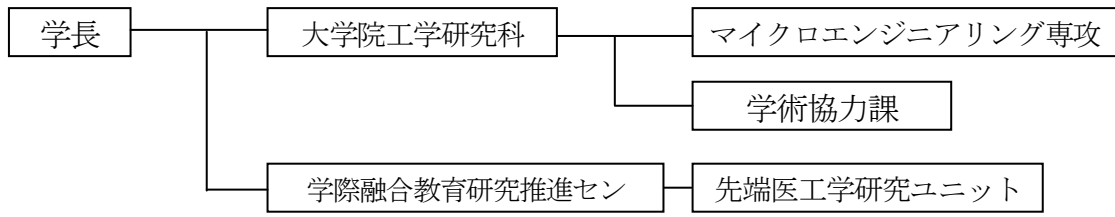


②再委託先

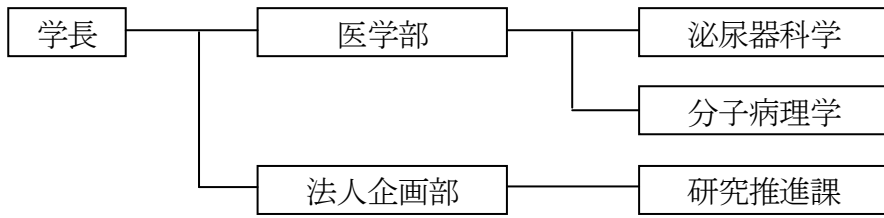
マイクロニクス株式会社



国立大学法人 京都大学



公立大学法人 奈良県立医科大学



1-2-2 研究者氏名

(1) 事業管理者

関西ティーン・エル・オー株式会社

氏名	所属・役職
坂井 貴行	取締役
広野 秀之	管理部長
五十川 二美	ライセンシングチーム・アソシエイト
岡田 裕子	管理チーム

(2) 研究者

マイクロニクス株式会社

氏名	所属・役職
岡 悦男	開発部・課長
松木 拓也	開発部・課長
矢部 久浩	技術部・部長
東 哲司	技術部・課長

国立大学法人 京都大学

氏名	所属・役職
田畑 修	大学院工学研究科・教授
平井 義和	先端医工学研究ユニット・特定助教

公立大学法人 奈良県立医科大学

氏名	所属・役職
平尾 佳彦	泌尿器科学・教授
藤本 清秀	泌尿器科学・准教授
千原 良友	分子病理学・講師
穴井 智	泌尿器科学・助教

(3) 経理担当者及び業務管理機関の所属, 氏名
(事業管理者)

関西ティール・エル・オー株式会社

(経理担当者)	管理部長	広野 秀之
(業務管理者)	取締役	坂井 貴行

(再委託先)

マイクロニクス株式会社

(経理担当者)	管理本部	越原 美穂
(業務管理者)	管理本部長	宮地 玉美

国立大学法人京都大学

(経理担当者)	工学研究科学術協力課 産学連携掛長	當麻 公子
(業務管理者)	工学研究科長	小森 悟

公立大学法人奈良県立医科大学

(経理担当者)	法人企画部研究推進課長	池谷 仁宏
(業務管理者)	泌尿器科学	平尾 佳彦

(4) その他

アドバイザー

株式会社ピー・ドゥ 代表取締役 馬淵 邦彦	カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置 のソフトウェア開発
--------------------------	--------------------------------------

1-3 成果概要

1-3-1 MEMS 加工技術を応用した癌細胞検出・採取カートリッジの開発

1-3-1-1 フローセルおよび微細切替弁の設計・開発

紫外線リソグラフィ技術で作製した癌細胞検出・採取カートリッジ（マイクロ流体デバイス）の開発を行った。まず 3 ポートの液体入力，2 ポートの液体出力を有するマイクロ流体デバイスを設計・製作した，マイクロ流体デバイスの作製には近年、MEMS デバイスの加工で注目されている厚膜レジストの紫外線フォトリソグラフィ技術と、京都大学・田畑研究室で開発された独創的なマイクロ流体デバイス加工手法を適用した。次に癌細胞懸濁液とシース液をシリンジポンプで圧送するための送液システムを構築した。さらに癌細胞検出部では波長 405nm のレーザを懸濁液に照射することで癌細胞から発光した波長 635nm の光を光電子増倍管（フォトマル）で検出する検出システムを構築した。最後にこの検出システムを通過した癌細胞の発光強度が閾値以上の場合、発光した細胞のみ採取するために採集用試験管に向けてシース液を流れるように制御するピンチバルブ制御システムを構築した。

1-3-1-2 カートリッジの開発

作製したマイクロ流体デバイスと LabVIEW によるピンチバルブ制御システムを用いて、マイクロ流路への送液実験および制御システムの動作確認を行った。まず超純水をシリンジポンプから各ポートに流量を制御しながら送液し、マイクロ流路内での流れの様子を観察した。その結果、流量によって作製したマイクロ流路内の層流幅を制御することができることを確認した。次に癌細胞と同じ直径 20 μm の蛍光粒子を分散させた溶液をマイクロ流路に送液した。その結果、蛍光粒子分散液とシース液の流量を制御することで蛍光粒子をマイクロ流路中央部に送液できることが確認でき、さらに LabVIEW システムで電磁バルブの ON/OFF を制御することで、蛍光粒子の送液方向が切り替わることを確認した。この他、蛍光粒子がシリンジやマイクロ流路へ付着・凝集することを防ぐための分散溶液の検討や表面コーティングの検討を行った結果、これらの処理が本研究において有効な方法であることを確認した。

1-3-2 カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置の全体設計

開発・研究する装置は大きく大別して患者の診察で膀胱癌の疑いのある尿中細胞診断で新たに膀胱癌の細胞の有無を検査する「スクリーニング」を効率よく、可能な限り自動で行うこと。2 つめはその中で陽性または偽陽性の尿から癌細胞出を検出し、細胞の DNA などの詳細の検討を容易に行う細胞検出器の開発である。この 2 つを効率よく配置した装置の開発、研究を行った。着手時の構想イメージ図から新規検査項目からの手順を参考にしている。

泌尿器科で膀胱癌に関する最先端研究をしている奈良県立医科大学泌尿器科平尾研究室と MEMS 技術を利用した数々の機器開発を進めてきた京都大学工学部の田畑研究室とマイクロニクス(株)の創薬関連機器の開発・設計・製造力を生かし、3 者それぞれの専門分野から臨床現場で運用する有効な装置となった。

1-3-3 臨床現場における「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」の評価

1-3-3-1 膀胱癌細胞の分別処理能力の評価検証

機器の開発研究における標準物質として、癌細胞と同等の大きさ（約 20-30 μ m）で、蛍光により励起する PpIX を含有する巨大リポソームを株式会社リポソーム工学研究室と共同で作製した。これを蛍光プレートリーダーで測定すると、濃度依存性に正の相関を持つ近似式の作成が可能であった。しかし、PpIX を含有する巨大リポソームの作製が煩雑であり、かつ物質としての安定性に低く、再現性に乏しかった。このため、一時的にポリサイエンス社製の FITC filter set で検出できる直径 20 μ m のポリスチレン単分散ラテックスビーズを使用した。対照として使用するビーズは蛍光物質を含有しない同一粒子径のビーズを使用した。これらのビーズを用いて試作した MEMS 流路で、流路中央を流れ、分別可能であることを確認した。しかし使用したビーズは蛍光、励起波長は異なるため、分別処理の検証の際に、PpIX の溶液内への溶出を憂慮しないですむポリスチレン製で、サイズは 30-50 μ m で、当比重の PpIX 封入ビーズが至適と考え、Bangs Laboratories 社へ作製を委託した。PpIX 封入によって帯電性の度合いがどの程度変化するか、あるいはポリスチレンビーズから PpIX がどの程度溶出するか、今後の検討が必要である。calibration に最適な含有 PpIX の至適濃度については、実試作機上で濃度を変えて検証中である。

1-3-3-2 膀胱癌細胞検出感度の評価検証

5-ALA 光力学的診断による癌細胞検出感度の評価検証を、分光光度計を用いて行った。5-ALA による生体染色条件、細胞処理方法、PpIX 陰陽性判定基準を設定し、培養癌細胞ならび患者尿検体において評価した。また、PpIX の濃度を直接測定することで、標準物質として PpIX を使用することが可能であった。結果、培養癌細胞の場合、細胞数 1000 個以上であれば PpIX の陰陽性を判定することが可能であり、細胞数を反映するバックグラウンド蛍光としては FITC が最適であった。また、臨床尿検体では、膀胱癌の場合、感度 73.3%、特異度 80.2%の癌検出率であった。さらに前立腺癌では、感度 59%、特異度 50%の癌検出率であった。本機器においては、患者尿検体を 5-ALA 添加・未添加の処理を行った上で、その後の行程から分光光度計による解析までを自動的に行うことができ、臨床現場における負担を軽減し、かつ客観的な評価が可能な癌スクリーニング機器として汎用されることが期待される。

1-3-3-3 膀胱癌培養細胞の分別採取率の評価検証

フローサイトメトリー用ビーズ（励起波長 405nm で蛍光波長が 488nm：実際の蛍光波長とは異なる）のように京大で外部の切換弁を on/off することで MEMS 式カートリッジの出口側の回収で分別できることは確認した。実際の癌細胞の蛍光現象は極めて微細、かつ数秒間で消滅するため、評価検証するためには標準物質で行う必要性がある。この分別採取率は目標の 85%以上は達成できるのは確実であるが、最終の検証には実際の細胞に近い標準物質（405nm の励起波長に対して出てくる蛍光波長も 635nm）が製作可能とあることが平尾教授の調査で判明し、すでに米国から入荷したので、検証の準備し、継続して検証を進める。

1-3-3-4 採取する癌細胞の生物学的悪性度の遺伝子診断への応用可能性の検証

「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」で採取したがん細胞の存在診断に有用となる遺伝子解析手法の開発を行った。尿路上皮がん特異的に生じる第9染色体短腕、長腕および第17染色体短腕の欠失と *FGFR3* 遺伝子の点突然変異の検出を解析対象とし、高速DNA解析装置(PyroMark)を用いた微量細胞からのハイスループットな遺伝子定量解析の有用性を検討した。対象は奈良県立医科大学で尿路上皮がん手術を施行された76とし、各症例のがん組織と尿中剥離細胞から抽出したDNAを用いて解析を行った。がん組織を用いた検討では本法により症例の85%から遺伝子変化の検出が可能であった。尿中剥離細胞を用いた検討では感度74.7%、特異度100%で尿路上皮がん患者尿が診断可能であった。さらにDNAAメチル化異常を指標とした解析を加えることにより、尿中剥離細胞から感度82.7%、特異度100%で尿路上皮がん患者尿が診断可能であった。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

関西ティール・エル・オー株式会社
管理部長 広野 秀之

〒600-8216
京都市下京区西洞院通塩小路下がる東塩小路町939番地
キャンパスプラザ京都 6F

Tel:075-353-5890

Fax:075-353-5891

E-mail: hhiro@kansai-tlo.co.jp

第2章 本章

はじめに 癌に対する光力学診断の開発の背景

膀胱癌の70%をしめる非筋層浸潤膀胱癌の診療には膀胱鏡検査と尿細胞診は重要である。非筋層浸潤膀胱癌は経尿道的膀胱腫瘍切除術（TUR-BT）による膀胱温存治療が行われるが、異所性に再発を繰り返すことから、長期にわたる経過観察が必要である。尿細胞診は侵襲が少ないが、異型度の少ない膀胱癌では偽陰性率は高く、定期的に行われる膀胱鏡検査は苦痛を伴い患者のQOLを大きく阻害している。膀胱内の異所性再発は腫瘍細胞の播種や多中心性発生が原因とされるが、通常光源を用いたTUR-BTでは非可視微小病変や上皮内癌などの平坦病変および腫瘍辺縁部位などの不完全切除が高い再発率の原因とされている。これらの膀胱癌診療の問題を解決するための手段として、光力学診断（PDD）の技術を利用した蛍光膀胱鏡下のTUR-BTが欧米において急速に普及している。

光力学診断は、癌細胞のミトコンドリア内に過剰に蓄積される蛍光物質プロトポルフィリンIX（PpIX）を青色光で励起し、蛍光膀胱鏡システム下で癌腫を赤色に発色させるもので、既に欧米諸国で承認され、新しいTUR-BT手技として臨床現場に普及している。その原理は、PpIXの前駆物質である5-aminolevulinic acid（5-ALA）を経口的もしくは経尿道的に投与すると、癌細胞などの増殖の盛んな細胞に能動的に取り込まれ、ミトコンドリアでPpIXに代謝され、腫瘍細胞では特異的にPpIXが蓄積するという特性を利用している（図2-1）

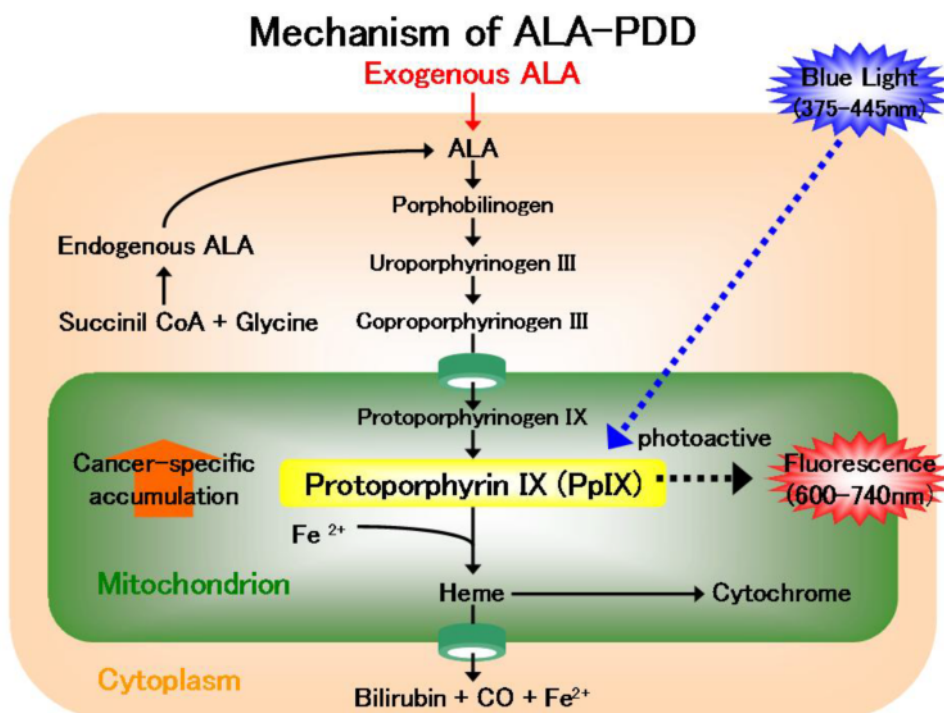


図2-1 癌細胞における5-ALAからPpIXへの代謝経路と光力学反応

5-ALAの投与を受けた膀胱を青色光源で観察すると、PpIXが蓄積した細胞は図2-2のようになるため、通常光のTUR-BTと比較すると病変部の切除がより確実なものになる。この光力学診断下にTUR-BTを実施することで、通常光下でTUR-BTを行った群に比較して術後再発率の改

善が見られ、臨床上極めて有用であることが報告されている(図 2-3)

光力学診断は、膀胱癌の診療のみならず、神経膠腫、皮膚癌や前立腺癌などの臨床に広く応用展開がなされ、新規医療として期待されている。

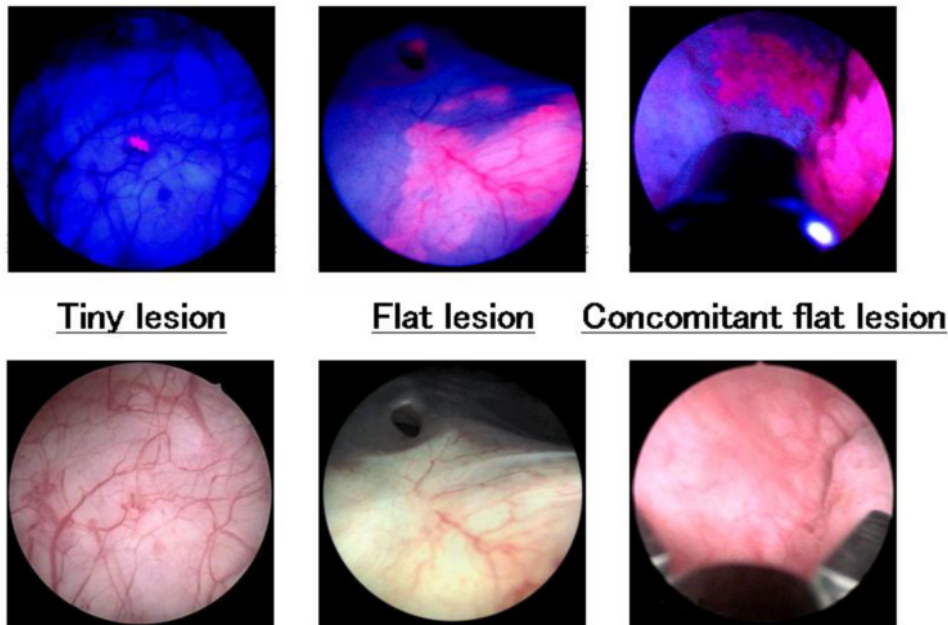


図 2-2 蛍光膀胱鏡像 (上段) と通常光の膀胱鏡像 (下段)

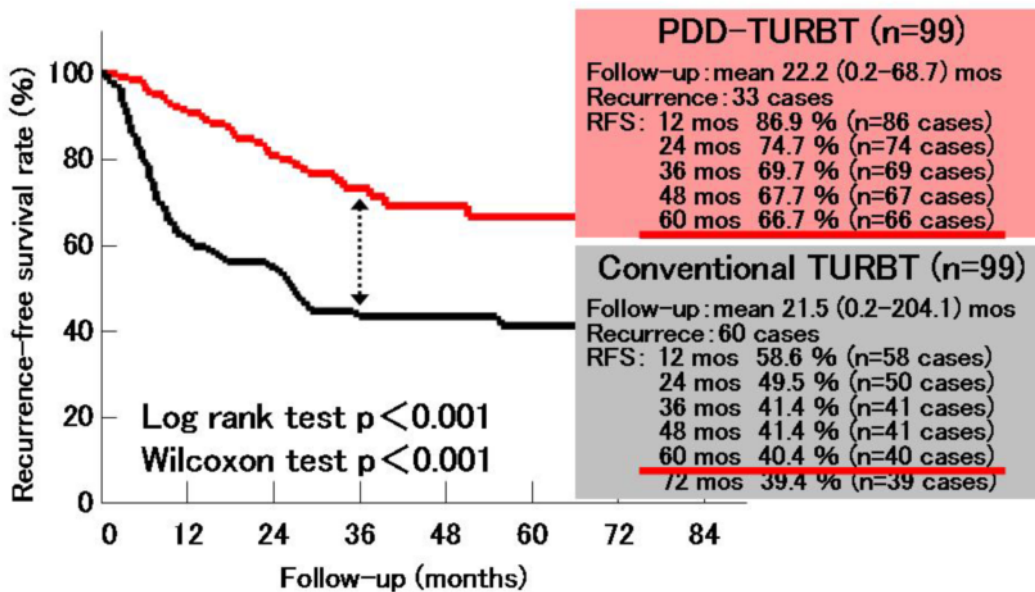


図 2-3 蛍光膀胱鏡と通常膀胱鏡での TUR-BT 後の再発率の比較

一方、尿細胞診や尿中バイオマーカーなど尿検体を用いた検査は低侵襲であり、内視鏡で確認が難しい微小もしくは平坦な癌の存在診断では有用であるが、最も一般的な尿細胞診において細胞異形性の低い low-grade 腫瘍では感度が低く、検体採取の条件や検者によって判定が異なるなどの問題点もある。特に目視に頼る主観的な検査であることから経験のある検者が必要であるが、全国的に検者は偏在していることが指摘されている。既存の尿細胞診やバイオマーカー以上に簡便で精度の高い検査の開発が望まれている。特に非筋層浸潤性膀胱癌においては

感度の低い従来の尿細胞診に替わって、尿中に剥離した腫瘍細胞を光学的診断によって検出する蛍光尿細胞診法の確立が望まれている。光力学尿細胞診は尿中に剥離した腫瘍細胞を選択的に赤く蛍光発色させることから、図 2-4 に示す如く、存在診断として客観性と特異性が担保されており、さらに蛍光細胞を選択的に採取し遺伝子情報を解析することにより質的診断に発展することが期待される。

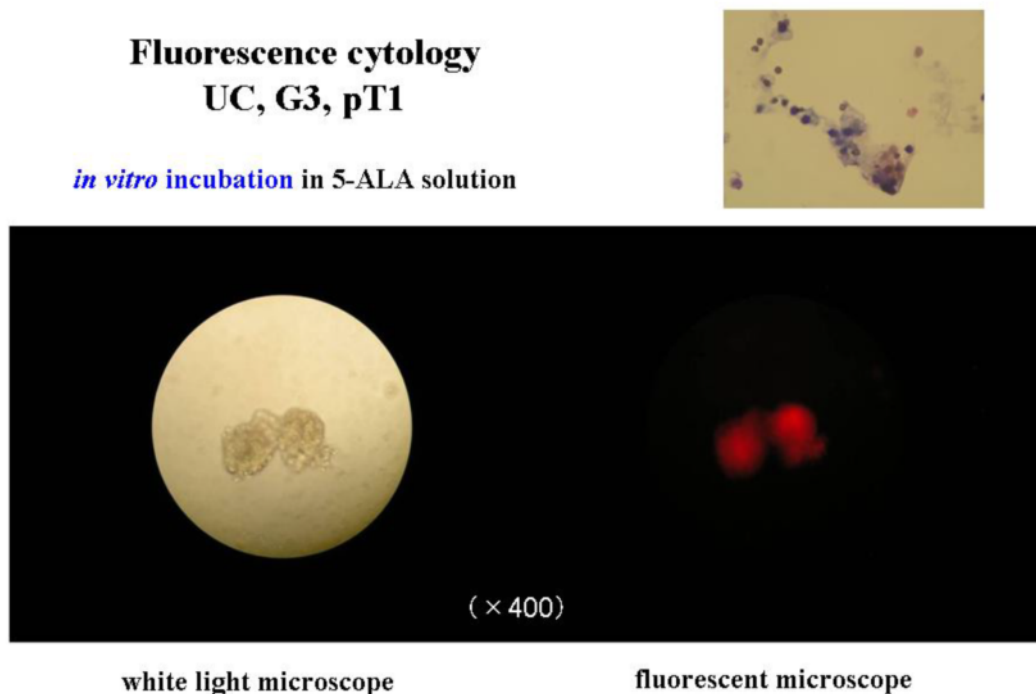


図 2-4 尿中剥離細胞の白色光像（左下）、PpIX蛍光励起像（右下）、HE 染色像（右上）

しかし、蛍光尿細胞診にも問題点があり、蛍光の退色現象 (photobleaching) がその課題の一つに挙げられる。蛍光膀胱鏡検査において膀胱癌組織を観察すると、図 2-5 に示すよう細胞集塊の組織においても短時間でその赤色発光は退色することが示されている。蛍光顕微鏡での観察では、細胞の光脱色はさらに 5~15 秒ほどの短時間で進行する。このことから、従来の細胞診と同様に細胞数が少ないと偽陰性が発生する可能性が高く、細胞レベルでの光力学診断においては、より効率的に迅速に検査を行うシステムの開発が課題と考えてきた。

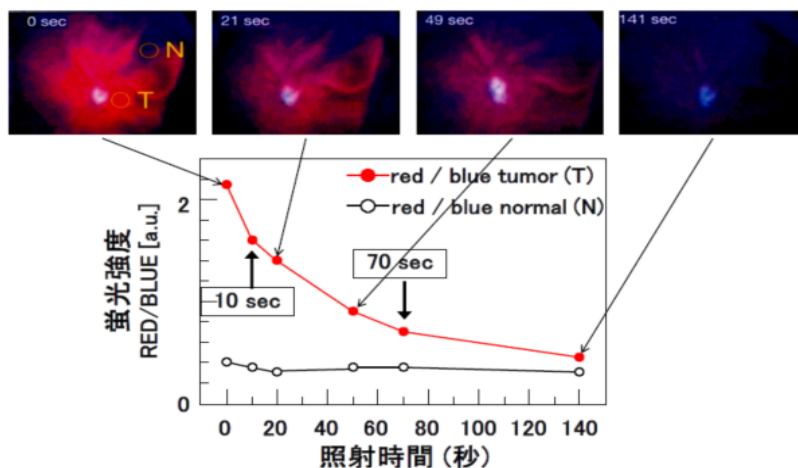


図 2-5 Photobleaching 現象 (励起後照射に伴う蛍光強度の減衰)

既存のフローサイトメトリーは検査が煩雑で時間を要し、多数の検体処理では効率的でなく、赤血球や炎症細胞の自家蛍光の発現、PpIX検出に至適な励起・観察フィルターの選択が困難な点など多くの問題があり、pIX誘導蛍光陽性細胞を特異的かつ迅速に検出・分離できる新たな装置の開発が望まれた。近年、膀胱癌のみならず、癌の遺伝子解析に関する研究の発展はめざましいものがあり、癌細胞のみが選択的に採取することができれば、その生物学的悪性度の解明は大きく前進し、至適な治療法の実行や予後予測、さらに創薬や予防医学に大きく貢献する。このことから、本事業では、PpIX誘導蛍光陽性細胞の存在診断を分光光度計で迅速に行い、かつ検出した細胞を選択的に検出・分離し、癌の遺伝子解析で質的診断を行うために、PpIX検出に特化したMEMS (Micro electro mechanical systems) 加工技術を用いた新規の自動システムの開発を行った。

2-1 MEMS 加工技術を応用した癌細胞検出・採取カートリッジの開発

2-1-1 フローセルおよび微細切替弁の設計・開発

● 概要

半導体集積回路の微細加工技術やシステム化技術に基礎を置く **Micro Electromechanical Systems (MEMS)** で形成したマイクロ流体デバイスを利用し、バイオや化学実験を行なう異分野融合型の研究が盛んに行われている。マイクロ流体デバイスの加工にはプロセスの容易さ、コスト面などから、厚膜レジストを用いた紫外線 (UV) フトリソグラフィ技術が注目を集めている。本研究では厚膜レジストの紫外線フトリソグラフィ技術を応用した癌細胞検出・採取カートリッジのフローセル (マイクロ流体デバイス) の開発を行った。

本研究で開発した 3 ポートの液体入力、2 ポートの液体出力を有するマイクロ流体デバイスの概要を図 2-6 に示す。液体入力ポートのうち、中央のポートはシリンジポンプから送液された癌細胞の懸濁液用であり、残りの 2 ポートはシース液用である。次にマイクロ流路中央部は癌細胞検出部分となり、ここでは波長 405 nm のレーザー光を懸濁液に照射して癌細胞から発光した波長 635 nm の光を光電子増倍管 (Photomultiplier Tube、通称：フォトマル) で検出する (光力学診断法)。このときフォトマルで得られた癌細胞の発光強度が閾値以上の場合、発光した細胞のみ採取するために、マイクロ流路後方に位置する 2 ポートの液体出力のうち採集側の試験管に向けてシース液を流れるように電磁バルブ (ピンチバルブ) の開閉を制御する。

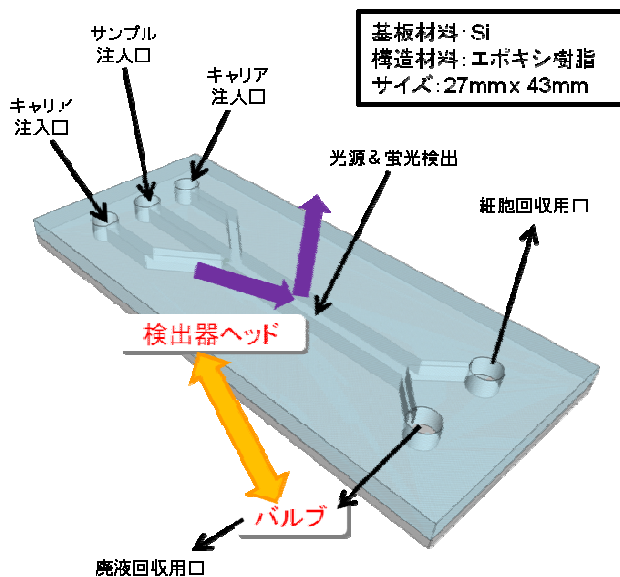


図 2-6 マイクロ流体デバイスの概要

● 三次元微細加工技術を応用したマイクロ流体デバイス加工

紫外線フトリソグラフィを応用し、厚膜レジストを構造材料とするマイクロ流体デバイスに関する研究が活発に行われている。ここで紫外線フトリソグラフィとは、フォトレジストを塗布した物質の表面をパターン状に紫外線露光することで、紫外線露光された部分と露光されていない部分からなるパターンを生成する技術である。本研究では京都大学・田畑研究室が開発した三次元微細加工技術「移動マスク紫外線露光法」を応用した独創的な埋め込み型マイクロ流路の加工法を適用した (図 2-7)。ここで移動マスク紫外線露光法とはフォトマスクをレジスト表面に対して周期移動させることでレジスト表面の紫外線露光量分布を制御し、レジ

ストの三次元構造体を作製する技術である。この加工法は濃淡を持たせたグレースケールマスクを用いてレジスト表面の露光量分布を制御する方法と違い、フォトマスクの移動パターンにより、三次元レジスト形状の修正ができるため、経済的かつ自由度の高い加工ができるようになる。

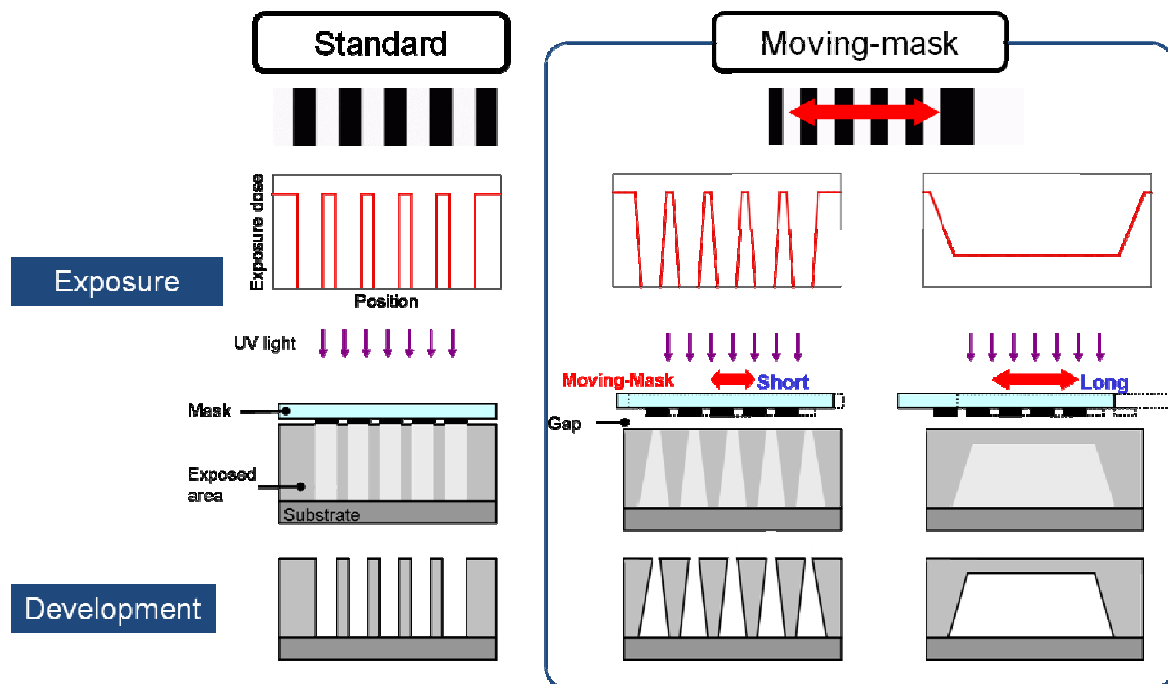


図 2-7 移動マスク紫外線露光によるマイクロ流体デバイスの作製方法

● マイクロ流体デバイス作製結果

作製したマイクロ流体デバイスに青インクを送液した結果を図 2-8 に示す。マイクロ流体デバイスの各構成要素部分で青インクが漏れることなく送液できていることがわかる。この結果から我々が開発した三次元微細加工技術によって、癌細胞検出・採取カートリッジのフローセルがシンプルに作製できることを実証した。

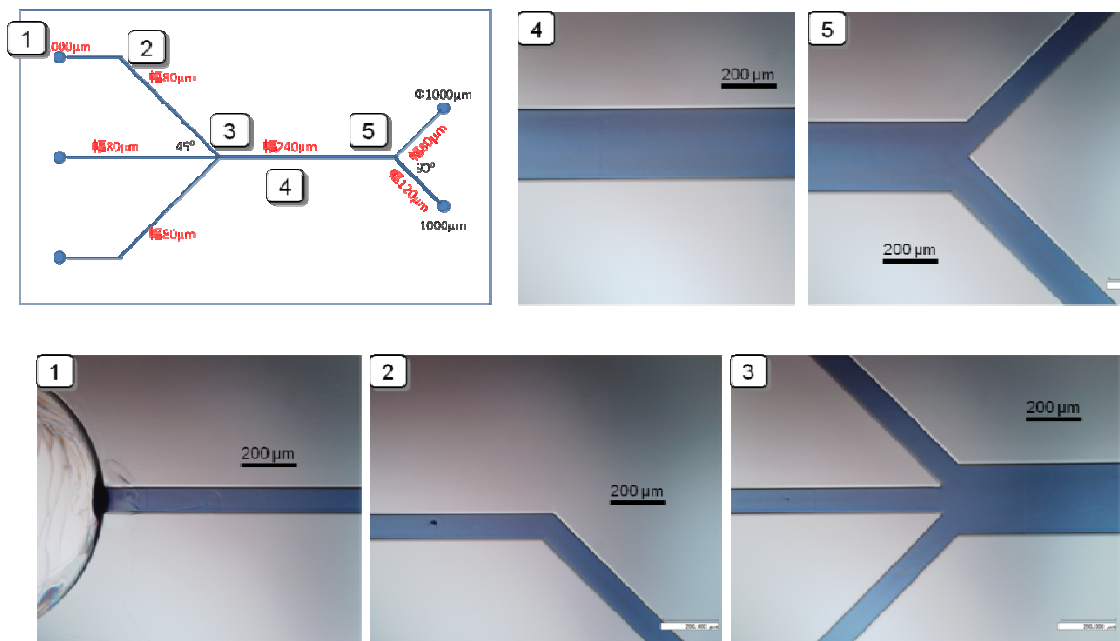


図 2-8 青インクの送液実験結果

- LabVIEW を用いた制御システムの構築

LabVIEW とはナショナル・インスツルメンツ (NI: National Instruments) 社によって開発されたバーチャル計測器用のソフトウェアであり、多種多様な分野で利用されている。本研究では NI CompactRIO プラットフォーム、NI LabVIEW Real-Time、LabVIEW FPGA モジュールを使用して、**図 2-9** に示した制御システムを構築した。

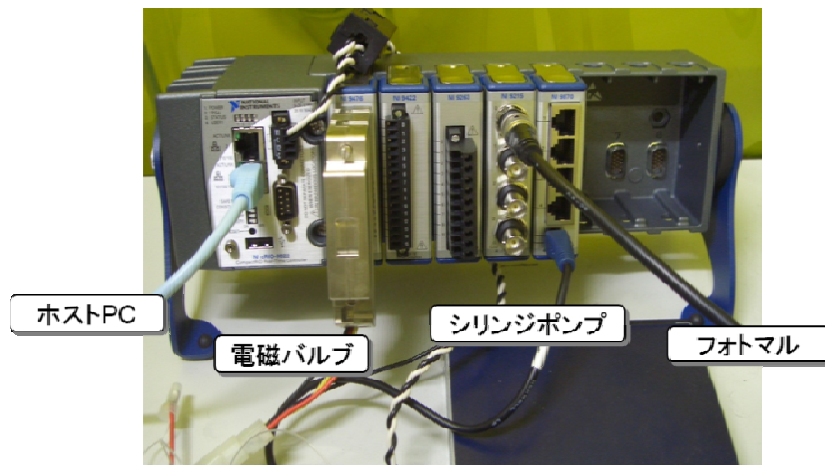


図 2-9 構築した制御システムの写真

- シリンジポンプ (マイクロシリンジポンプ) ・電磁バルブ (ピンチバルブ)

癌細胞懸濁液とシース液の送液するためのシリンジポンプにはパルス影響がなく、優れた再現性を有することが要求される。そこで本研究では KdScientific 社製 Legato210 を採用した。このマイクロシリンジポンプはマイクロプロセッサで送液を制御可能であり、広範囲な注入・吸引・流量設定が可能である。

次にマイクロ流路後方に位置する 2 ポートの液体出力のうち、採集側の試験管に向けてシース液を流れるようにする電磁バルブにはピンチバルブを採用した。ここでピンチバルブとはシリコンチューブなど軟質チューブを直接押しつぶして開閉するタイプのバルブである。接液部品がチューブだけになるので、使用後にチューブを交換することにより癌細胞懸濁液の送液系全体をクリーンに保つことができ、クロスコンタミネーションの防止ができる。

- 検出器 (フォトマル)

本研究では検出感度が CCD 分光器の約 100~200 倍の感度可以实现できる高感度式フォトマルを採用した。レーザーとフォトマルで構成される検出器の概要と写真を**図 2-10** に示す。装置の構成を以下に記述する。

- ① 光センサーモジュール方式 : フォトマル (光電子増倍管)
- ② 集光レンズ
- ③ 蛍光フィルター (2 種類) : 485 nm (蛍光粒子用)、635 nm (膀胱癌細胞用)
- ④ ダイクロイックミラー (ハーフミラー)
- ⑤ 励起光レーザー : 405 nm
- ⑥ マイクロ流体デバイス用ステージ
- ⑦ 位置決め用 XYZ ステージ

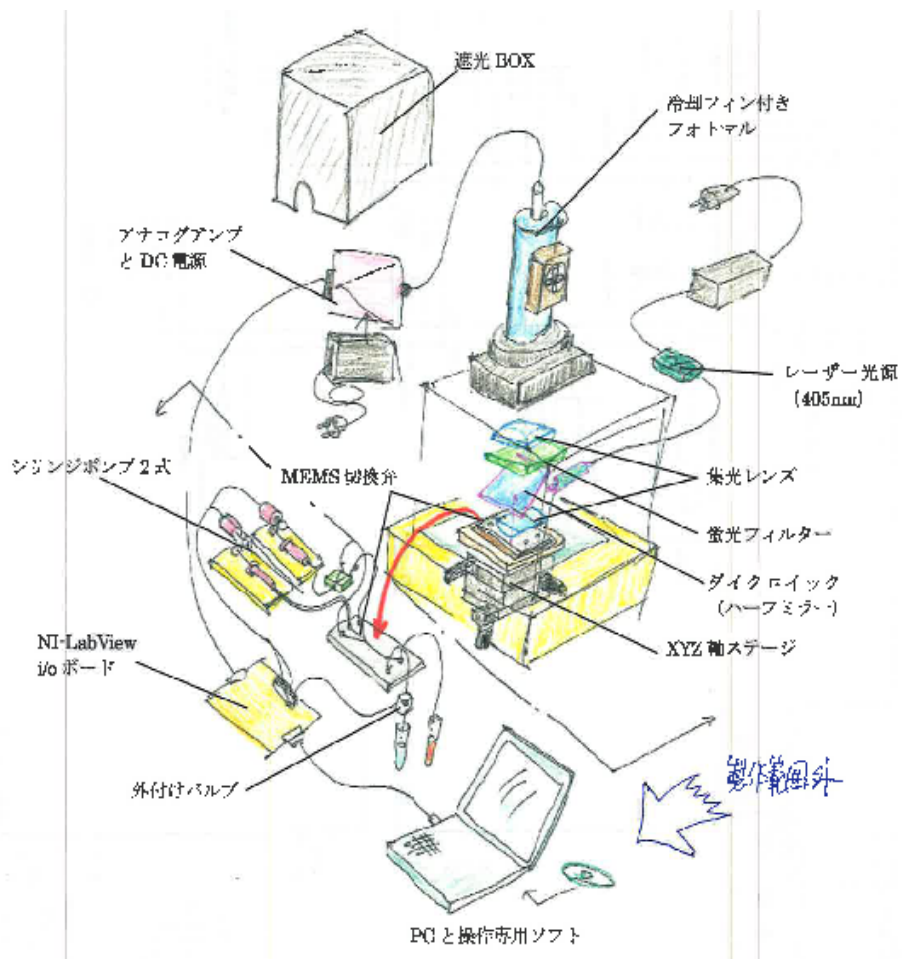


図 2-10 検出器の図面と構成図

2-1-2 カートリッジの開発

● 蛍光粒子の送液実験

ポリサイエンス社 Fluoresbrite™ Yellow Green (YG) Fluoresbrite YG Microspheres (粒子径：20 μm) の分散溶液をシリンジポンプでマイクロ流路に送液した。この蛍光粒子における最大励起波長は 441.53 nm で最大発光波長は 485.56 nm である。送液実験にはこの蛍光粒子をシース液で 100 倍に希釈したものをを用いた。またマイクロ流体デバイスの構造材料であるフォトリソトや分散液を入れて送液するためのプラスチックシリンジなどは疎水性でビーズが付着しやすいので、内部をコーティング処理した。

送液中のマイクロ流体デバイスの写真を図 2-11 に示す。蛍光粒子がマイクロ流路の中央部分を流れていることがわかる。さらに電磁バルブを開閉した時に蛍光粒子の流れる方向が変化した様子も合わせて図 2-11 に示す。以上の結果から LabVIEW を用いた制御システムでの送液と電磁バルブによってシース液の送液方向を制御できることを確認できた。

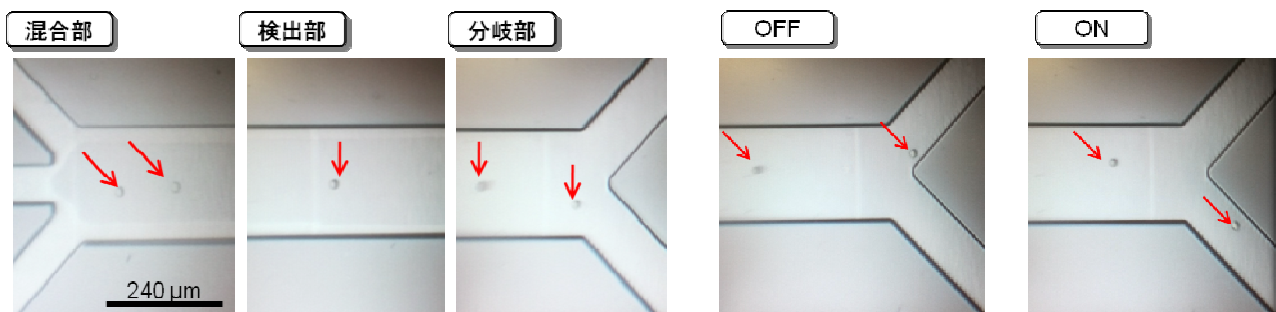


図 2-11 送液実験の結果 (左：送液の様子、右：バルブ開閉の様子)

● 癌細胞を用いた蛍光強度の実験結果

【測定対象物】

UMUC3+ : 発光波長 630 nm

【測定条件】

レーザー出力 : 405nm LOW

フィルター : 630nm 透過用

フォトマルコントロール電圧 : 0.8 V

【測定結果】

ガラス基板上に癌細胞を置き、その時に計測された最大電圧値を以下に示す。

ガラス基板 : 0.578 V

癌細胞 (約 20~30 個) : 0.705 V~0.650 V (時間依存して減衰)

【考察】

ガラス基板の電圧値に対して癌細胞の電圧値が小さいため、癌細胞 1 個をフォトマルで検出することはやや困難であることがわかった。また蛍光染色した癌細胞は励起レーザーにより蛍光強度が減衰するとともに、自然光の照射でも数秒間で蛍光が減衰する。したがってフォトマルで癌細胞の蛍光検出を行うためには、瞬時の測定が必要であることがわかった。

2-2 カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置の全体設計

本装置では新たに開発、研究する項目は大別して「スクリーニング」と「癌細胞の採取」である。

病院の泌尿器科で診察した患者から膀胱癌の疑いのある尿中細胞診断で膀胱癌の細胞の有無を検査する「スクリーニング」と有無検査で陽性または偽陽性の尿から「癌細胞を採取」する装置の自動化、効率化の開発である。

2-2-1 着手時の構想イメージ図から新規検査項目の手順と設計

泌尿器科で膀胱癌に関する最先端研究をしている奈良県立医科大学泌尿器科平尾研究室と MEMS 技術を利用した数々の機器開発を進めてきた京都大学工学部の田畑研究室とマイクロニクス㈱の創薬関連機器の開発・設計・製造力を生かし、3者それぞれの専門分野から臨床現場で運用するための装置開発のイメージを検討した。(図 2-12)

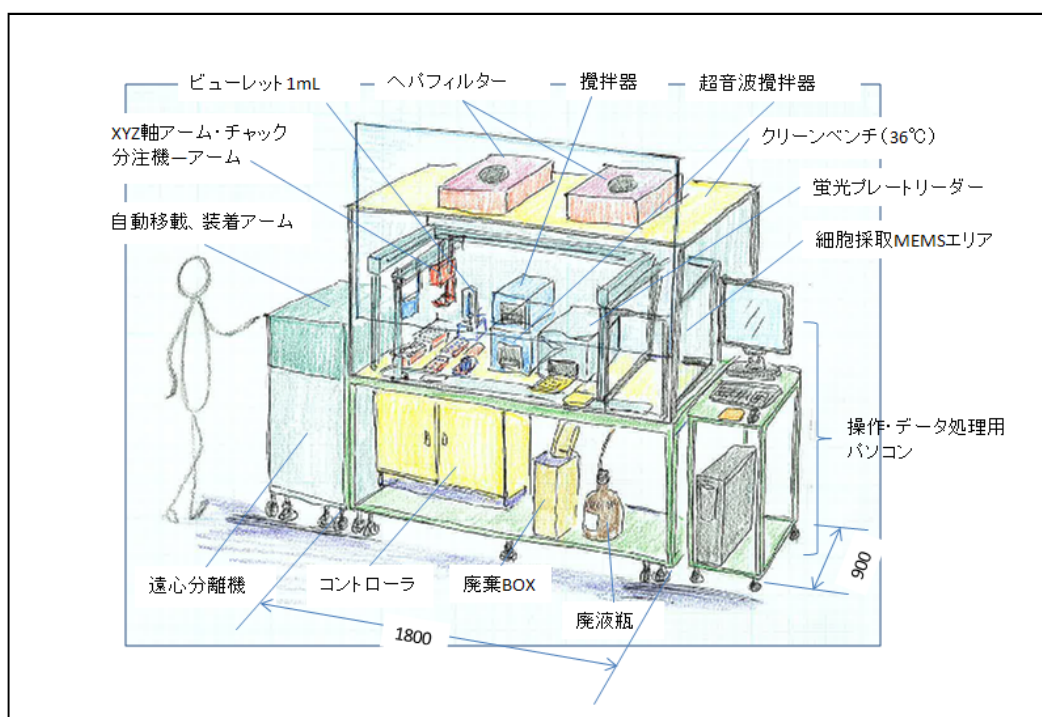


図 2-12 着手時の装置イメージ図

初めに、臨床現場で現行の検査手順をまとめ、新たに本研究の新規テーマを含めた内容を奈良県立医科大学からスクリーニング手順の提案があった。(図 2-13)

この内容から自動化できる項目、新規開発すべき項目に分け、短時間の研究機関あることから、効率よく装置化を進めた。患者の診察時、外来現場で検体尿(約 200mL)を採取し、細胞沈渣で上澄みを破棄するまで手作業で行うこととした。この後は従来からの検査項目の「細胞診」への提出と今回の研究項目への展開になる。これ以降は研究室に試料を移動して①蛍光試薬の添加(5ALA)②36°C・暗室でのインキュベーション③試薬等の投与、希釈、遠心工程を経て、④蛍光プレートリーダーでの陽性、擬陽性、陰性の判定を行う。ここまでが1日の外来患者を含めた約50名の尿検体を8時間以内に素早くスクリーニングすることを目標にし、達成が可能になった。

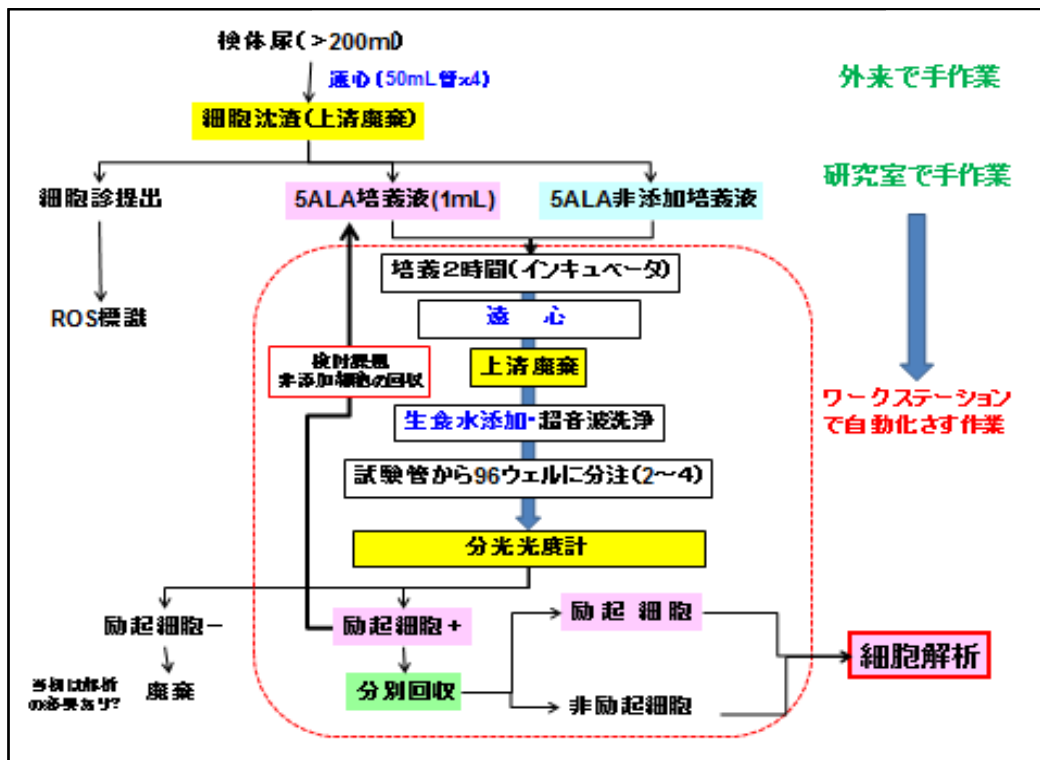


図 2-13 奈良県立医科大学泌尿器科からのスクリーニングの手順

2-2-3 完成した装置

奈良県立医科大学泌尿器科研究室に設置した装置の全体写真を図 2-14 に示す



図 2-14 装置の全体外観写真

2-2-5 装置の内部配置と各ユニットの名称(図 2-15)

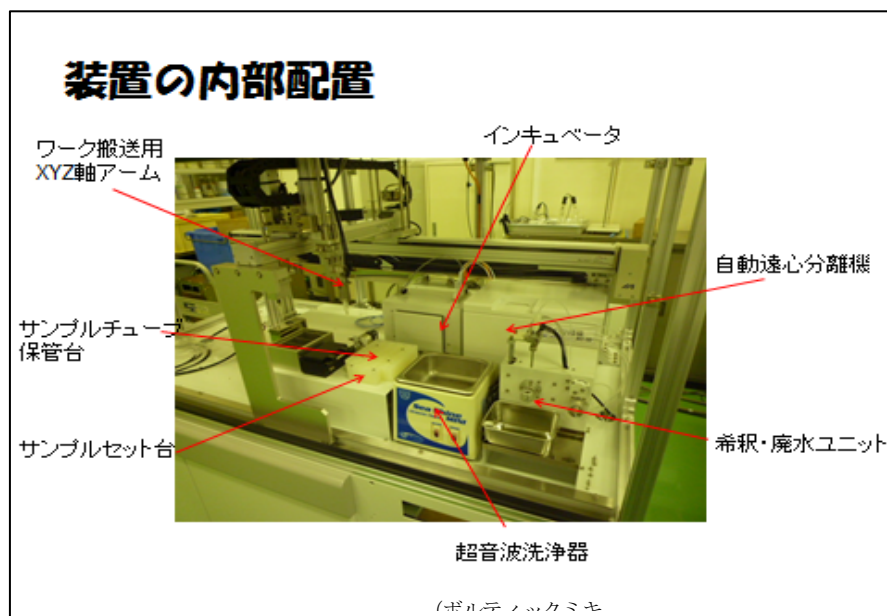


図 2-15 装置内の各ユニットの配置

2-3 臨床現場における「カートリッジ型ハイスループト尿中細胞診断装置」の評価

2-3-1 膀胱癌細胞の分別処理能力の評価検証

機器の開発研究には標準物質を用いてその精度を検証する必要がある。準備研究として癌細胞と同等の大きさ(約 20-30 μm)で、蛍光により励起する巨大リポソームを検討したが、PPIX-GUV 溶液の作成が煩雑であり、かつ物質としての安定性に乏しいことが挙げられる。安定性が乏しい理由としては、第一に、GUV 溶液保存の際、容易に沈澱が生じ、かつこれらの攪拌が困難である。また、攪拌のためボルトボックスを掛け続けると GUV 量が激減してしまう。さらに、光酸化により膜が劣化する可能性もあり、PpIX を希釈するための DMSO により GUV 自体が不安定となり得る。結果、溶液中への PpIX の溶出へとつながり、測定結果に安定性が乏しかった。

そこで、リポソームでの検証の際に、PpIX の溶液内への溶出を憂慮しないですむ PpIX 封入ビーズが至適と考え、Bangs Laboratories 社へ作製を委託した。calibration に最適な含有 PPIX の至適濃度については、実試作機上で濃度を変えて検証した。

これはフローサイトメリーの標準物質として用いられておりビーズ状、ポリスチレン製で比重、粒径、保存状態蛍光強度の強弱の選定などが容易であることからメーカー(米国: Polysciences, Inc 社)と種々検討を重ねた結果、膀胱癌に 5ALA 培養で染色した状態とポリスチレンビーズに染色したものが蛍光波長、レーザー励起波長もほぼ同等の標準物質が製作可能となった。同時に蛍光染色しないブランクビーズも製作し、膀胱癌細胞の分別処理能力の評価検証に用いた。このビーズを用いて継続して検証中である。

仕様 Description : PolyStyrene・PPIXCustom ; ProtoporphyrinIX

Main Diameter : 44.20 μm

Quantity : 20mL

Solids : 5.09%

Store at : 2-8°C

2-3-2 膀胱癌細胞検出感度の評価検証

本機器による膀胱癌細胞検出感度の評価には、公立大学法人奈良県立医科大学附属病院泌尿器科で診療する膀胱癌・前立腺癌の患者および疑われる患者の試料の尿細胞診を対照として検証するとともに、教室で保有する膀胱癌培養細胞を用いて検出感度の評価を検討した。同時に本機器で測定する前処理として、種々の細胞を用いて 5-ALA 暴露による蛍光励起の至適条件を検証した。癌細胞の検出率 85%以上を目標値とした。なお、本研究に関して、倫理委員会の承認を得ている。

(1) . 蛍光プレートリーダーを用いた PpIX 検出感度に関する検討

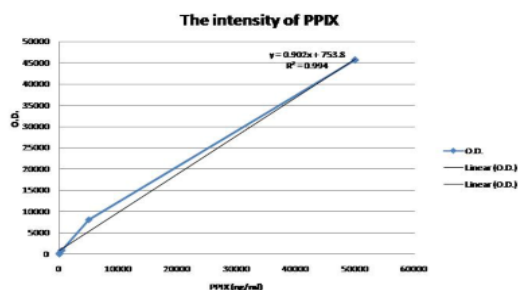
5-ALA 光学的診断による癌細胞検出感度の評価検証として、5-ALA の細胞内での代謝産物であるプロトポルフィリン IX の検出に、TECAN 社製 PRO200M 分光光度計で癌の存在診断を行った。

まず、癌培養細胞へ 5-ALA を添加後、細胞内での代謝産物であるプロトポルフィリン IX (PPIX) の検出について、標準物質として PpIX 試薬を用いて定量線を作成した。PPIX 試薬は、DMSO で希釈可能で、5mg/mg のストック溶液を作成した上で、50000～ 50 ng/ml に希釈し、100 μ L ずつ 96 ウェルプレートに分注した。PPIX の励起波長は 405nm で、635nm における蛍光波長を O.D.とした。

ソフトウェアの Optimize 機能により自動的に設定された Gain 値と、Manual で Gain150 に設定した測定結果を比較検討することで、至適化を目指した。

その結果、**図 3-1**のごとく、PPIX 濃度と蛍光プレートリーダーにより得られた O.D.値は正の相関関係を認めた。この結果は先述のリポソームへの PPIX 表面吸着による標準物質の検討結果と比較し、より高い相関を示し、かつ、試薬調整が容易であり、安定性も高かった。しかし、PPIX の直接希釈では、フローセルでの検討が行うことができないので、癌検出スクリーニングを目的とした分光光度計による解析のみ PPIX 試薬を用いた。

Quantify the intensity of PPIX



The differences of PPIX intensity between chemical & culture cells needs to be compared

図 3-1 PPIX と OD 値の相関関係

(2) . 膀胱癌細胞株を PpIX 検出感度に関する検討

本研究では、以下の検討を行った。

- ① 5-ALA による生体染色条件設定 (培養液、暴露時間、温度)
 - ② 適切なプレートは？
 - ③ 細胞塊への対処 (細胞の単一化) として、トリプシン処理の工程は必要か？
 - ④ 繰り返し分光光度計での解析が可能か？
 - ⑤ FITC などによる標準化、DAPI、GFP は？
- ① 5-ALA による生体染色条件設定

これまでの検討で、添加する 5-ALA の濃度は 1 mM とし、培養液は、一般の癌培養細胞を行う際の、ウシ血清 (FBS) 未添加 RPMI 溶液を使用した。5-ALA への暴露時間については 0.5、1、2、3、4、8 時間と経時的に検討したところ、蛍光強度は、5-ALA 暴露後 2 時間でピークを呈し、以後ほぼ変化しなかった。このため至適暴露時間は 2 時間とした。5-ALA 暴露中の細胞培養温度は、一般的な細胞培養温度である 37°C とした。

さらに、蛍光強度測定に際し、細胞希釈液をウェルに分注する前には、遠心の上、上澄み液を除いた上で、緩衝液として PBS を用いて、各細胞数に希釈した上で、解析を行った。PPIX の励起波長、蛍光波長は、PPIX 試薬を検討したときの結果を基に、それぞれ 405nm、635nm として測定した。また蛍光陰性のコントロールとして、解析の際には常に 5-ALA 添加を行っていない培養細胞株も準備し、同様の RPMI 除去、PBS 希釈を行った上で、先述の波長条件下で観察した。5-ALA 添加した細胞株の PPIX の O.D. 値と、5-ALA 未添加細胞株の O.D. 値を t-test (unpaired) で解析し、 $p < 0.05$ 未満を陽性と判断した。

②. 蛍光プレートリーダーによる蛍光強度解析の際の適切なプレートの選択

蛍光プレートリーダーに用いるプレートの選択については、蛍光プレートリーダーでの解析における蛍光検出の設定において、ウェルの底面における蛍光を検出するために、Flat bottom の Transparent の 96 ウェルプレートと、ウェル内溶液の液面の高さで蛍光強度を評価する、底面が黒色の Blackbottom のプレートを比較検討した。Transparent プレートと比較すると、Blackbottom プレートは蛍光強度が低い傾向にあった。このため、検体が含有する細胞が少数の場合、検出感度が低くなってしまうので、Flat bottom の Transparent プレートが適切であると判断した。

③. 細胞塊への対処 (細胞の単一化) とトリプシン処理の工程は必要かどうかの検証

分光光度計での解析に際し、細胞が集塊を形成する性質が細胞検出感度に影響を与える可能性を考慮し、膀胱癌培養細胞株を 10cm Dish 上で培養し、細胞を収集する際に、蛋白分解酵素であるトリプシンによる処理が必要かどうかを検討した。(図 3-2) 結果としては、トリプシン処理の如何に関わらず、細胞数 1000 個のレベルまで、5-ALA 添加細胞株と未添加細胞株の PPIX 蛍光強度を鑑別することが可能であった。トリプシン自体には細胞障害作用を伴うため、分光光度計による膀胱癌細胞の検出においては、トリプシン処理は不要と判断した。

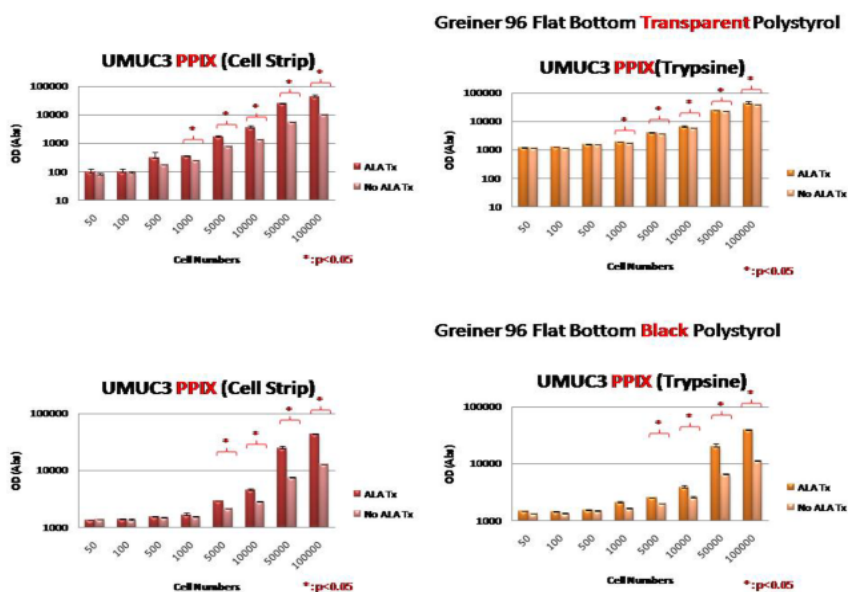
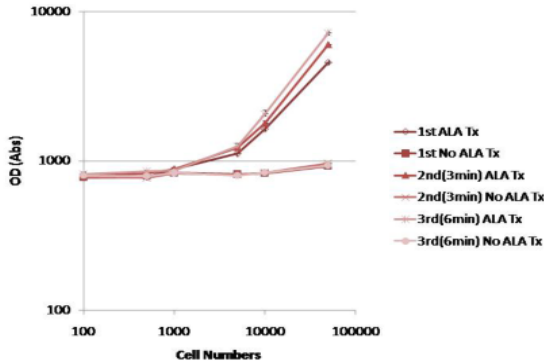


図 3-2 UMUC3 については Cell Strip あるいはトリプシンで細胞を処理したものを解析した場合、1000 個以上であれば有意に ALA 処理の有無を区別できた。

④. 蛍光プレートリーダーによる繰り返し蛍光強度解析の再現性の確認

細胞株における PPIX による蛍光強度を、1 回の測定後に、経時的に 3 分後、6 分後の 2 回、同様に分光光度計で測定した。結果 (図 3-3)、1 回目と比較し、3 分後、6 分後の

Reproductions of PPIX Quantification

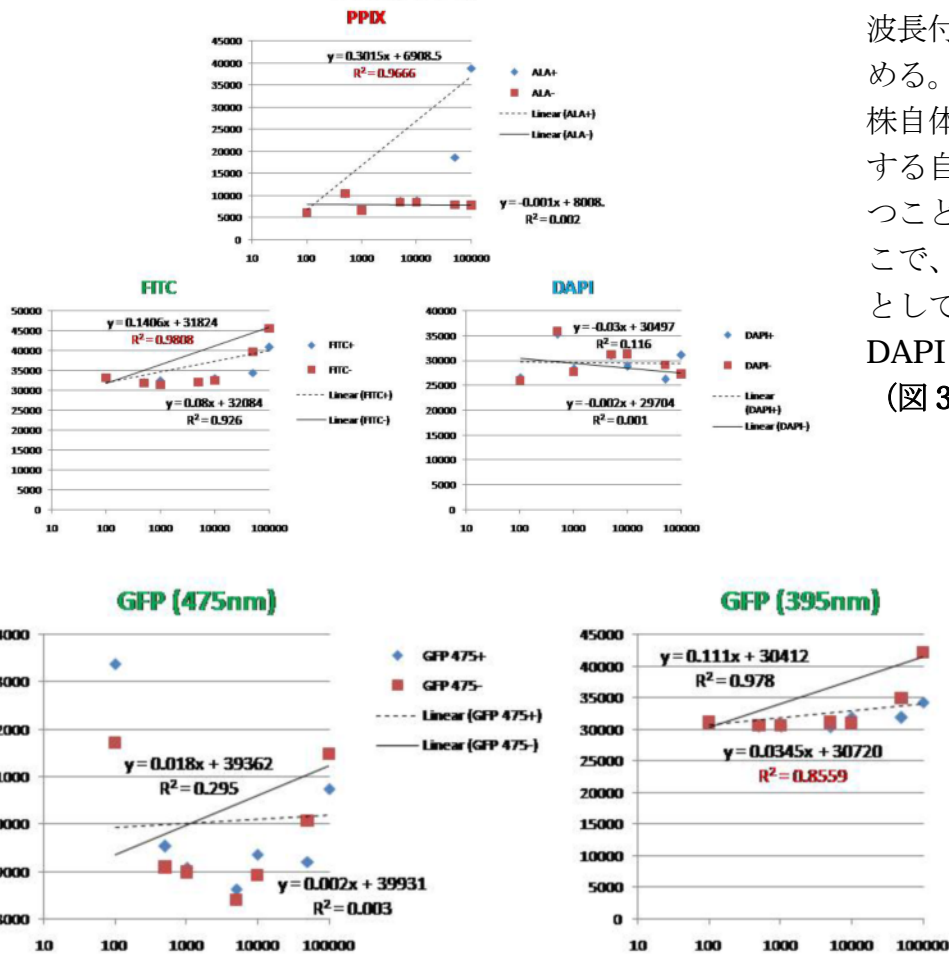


PPIX 蛍光強度は、有意な減衰を認めなかった。これにより、PPIX は通常、Auto bleaching により、徐々に蛍光強度の減衰が認められるのが、蛍光顕微鏡下の PPIX 観察では確認できていたが、分光光度計の解析では、経時的な影響を受けないことが分かった。

図 3-3 蛍光強度解析の再現性

⑤ 細胞数を反映する蛍光バックグラウンド (BG) の検討 (FITC、GFP、DAPI)

Optimal background fluorescent?
FITC? DAPI?



ALA 未添加細胞株であっても、PPIX の蛍光波長付近で自家発光を認める。これは、培養細胞株自体が、細胞数に対応する自家蛍光の波長を持つことが示唆される。そこで、蛍光 BG の検討として、FITC、GFP、DAPI を比較検討した。

(図 3-4)

図 3-4 蛍光バックグラウンドの検討

以上の、培養細胞株を用いた ALA 励起細胞の有無の識別により、選別不要な試料の選択が可能となった。そこで、担癌患者（尿路上皮がん）、非担癌患者（尿路感染症、術後フォローアップ患者）の臨床尿検体を用いて、5-ALA 染色によるスクリーニング行程による陽性、擬陽性、陰性の振り分け作業を行った。この作業で、陽性と判断された尿検体のみ、以後のフローセルによる細胞 Sorting 作業行程に進むことで、大量の尿検体の癌細胞の有無を判定するスクリーニング作業が可能となる。

1. 患者検体を用いた尿細胞診の検出感度に関する研究

【患者背景】

尿路上皮癌：膀胱鏡にて膀胱内に腫瘍性病変があり、且つ手術（経尿道的膀胱腫瘍切除術）により組織学的に尿路上皮癌の診断が得られた患者を陽性対象とした。また、自排尿と手術時の膀胱内洗浄尿を採取し、それぞれの尿検体の分光光度計による ALA 癌分別能を検証し、従来のスクリーニング検査である尿細胞診による正診度と比較した。（表 3-1）（表 3-2）

前立腺癌：前立腺癌腫瘍マーカーである前立腺特異抗原（PSA）の異常高値、あるいは前立腺直腸指診により前立腺に腫瘤を触知された、前立腺癌疑いの症例に対し、前立腺癌確定診断のために、前立腺針生検を行った患者を対象とした。このうち生検で組織学的に前立腺癌が証明された患者を陽性と判断し、証明されなかった患者を陰性と判断した。

【結果】

表 3-1 膀胱癌

膀胱癌 臨床検体			
細胞診		吸光度	
voiding			
	陽性	陰性	
Cancer	7	8	
感度	46.7%		
washing			
	陽性	陰性	
Cancer	7	5	
感度	58.3%		

吸光度		
voiding		
	陽性	陰性
Cancer	11	4
Non cancer	17	69
感度	73.3%	特異度 80.2%

表 3-2 前立腺癌

前立腺癌 臨床検体		
吸光度		
	陽性	陰性
Cancer	21	13
Non cancer	19	11
感度	61.8%	特異度 37%
ALA/FITC		
	陽性	陰性
Cancer	20	14
Non cancer	15	15
感度	59%	特異度 50%

		陽性	陰性
Cancer		19	17
Non cancer		12	21
感度	52.8%	特異度 63.7%	

2-3-3 膀胱癌培養細胞の分別採取率の評価検証

分別採集率の評価検証には、公立大学法人奈良県立医科大学泌尿器科学教室が保有する種々の膀胱癌・前立腺癌培養細胞および非癌培養細胞を種々の比率で混和して採集率 85%の検証作業を計画を予定した。実際には培養した癌細胞の蛍光強度は極めて微弱で且つ数秒で減衰するため、この分別採取率の検討には安定した標準物質が不可欠である。

当初、機器の開発研究には標準物質として、蛍光により励起する巨大リポソームを予定したが、リポソーム自身が壊れやすく、保存状態が厳しく、ブランク(蛍光しないリポソーム)との混合濃度値の作成が難しいため、細胞検出器の標準物質としては採用を断念した。

一方、フローサイトメトリー用ビーズはポリスチレン製で比重、粒径、保存状態蛍光強度の強弱の選定などが容易であることからメーカー(米国: Polysciences, Inc 社)と種々検討を重ねた結果、膀胱癌に 5ALA 培養で染色した状態とポリスチレンビーズに染色したものが蛍光波長、レーザー励起波長もほぼ同等の標準物質が製作可能となった。同時に蛍光染色しないブランクビーズも製作した。標準物質の写真と仕様を示す(図 3-5)

仕様

Description : PolyStyrene・PPIXCustom ;
ProtoporphyrinIX

Main Diameter : 44.20 μm

Quantity : 20mL

Solids : 5.09%

Store at : 2-8°C

Bangs

図 3-5 標準物質と仕様



すでに、京都大学ではフローサイトメトリー用の標準物質を使った分別評価を行っている。カートリッジ式 MEMS 切換え弁の流路設計、周辺の流路構成部品の試験装置も完成して、基本性能の評価試験は進めている。その細胞検出器の原理図(図 3-6)と MEMS 微細流路例を示す(図 3-7)

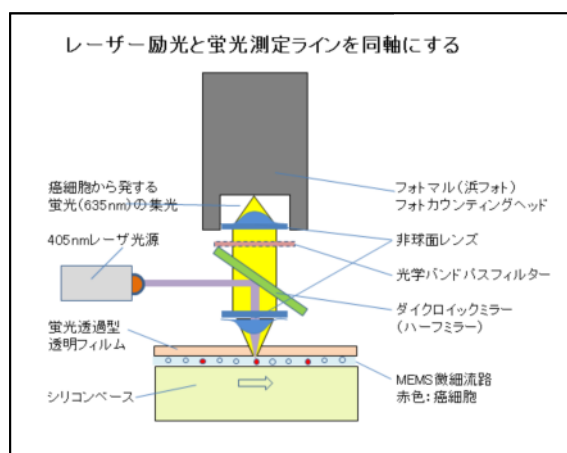


図 3-6 細胞検出器の原理図

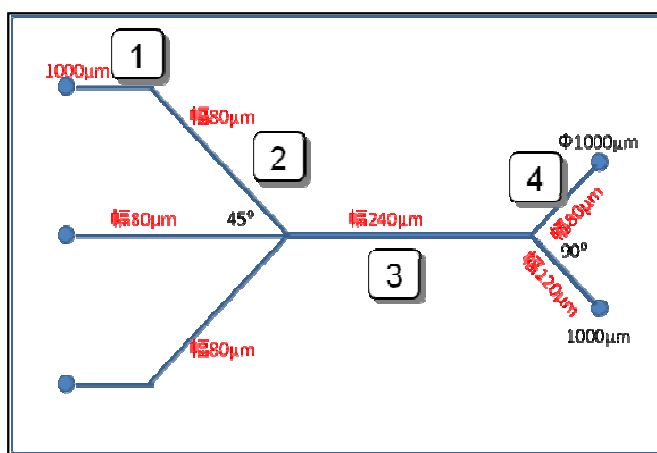


図 3-7 カートリッジ式 MEMS 微細流路

すでにフローサイトメトリー用ビーズ(励起波長 405nm で蛍光波長が 488nm : 実際の蛍光波長とは異なる)を使い外部の切換え弁を on/off することで MEMS 式カートリッジの 2 方向の出口のどちらの方向に目的のビーズ(細胞)を分別するかを確認している。

この分別回収率の検証は予め蛍光ビーズとブランクビーズをの混合比率を決めて、出口側のチューブにそれぞれ分別され、回収された種類と数量で確認する予定である。(図 3-8) (図 3-9) 一方、実際の癌細胞では蛍光現象は極めて微細、かつ数秒間で消滅するため、評価検証するためには標準物質で行う必要がある。この分別採取率は目標の 85%以上は達成である。この達成率を確認するためには、細胞に近い入荷した標準物質(405nm の励起波長に対して出てくる蛍光波長も 635nm) で継続して研究を進め、確認できることを期待している。

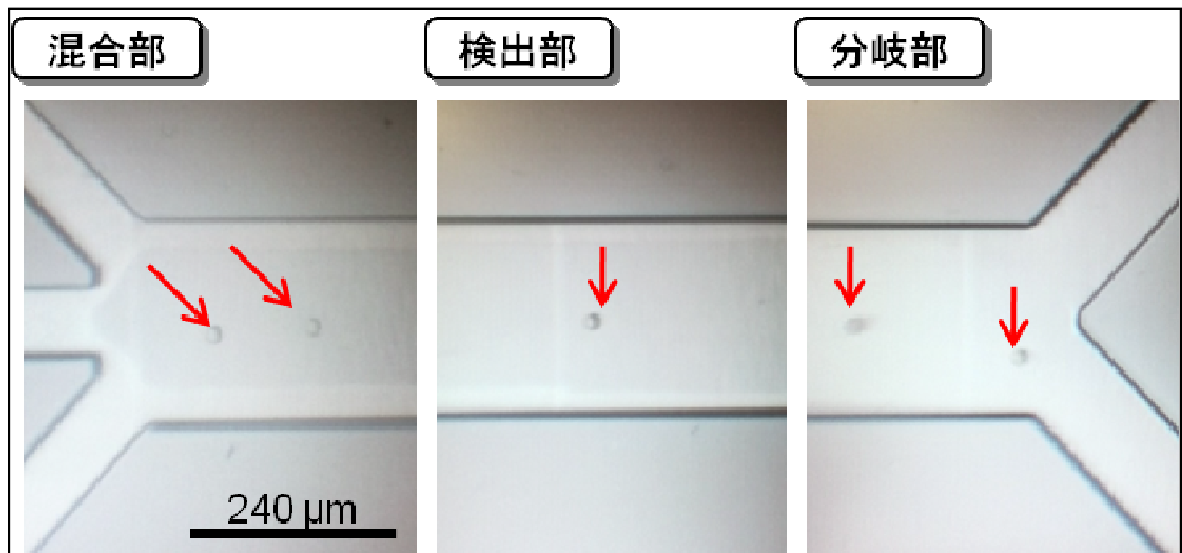


図 3-8 MEMS 流路内にビーズを流す評価試験

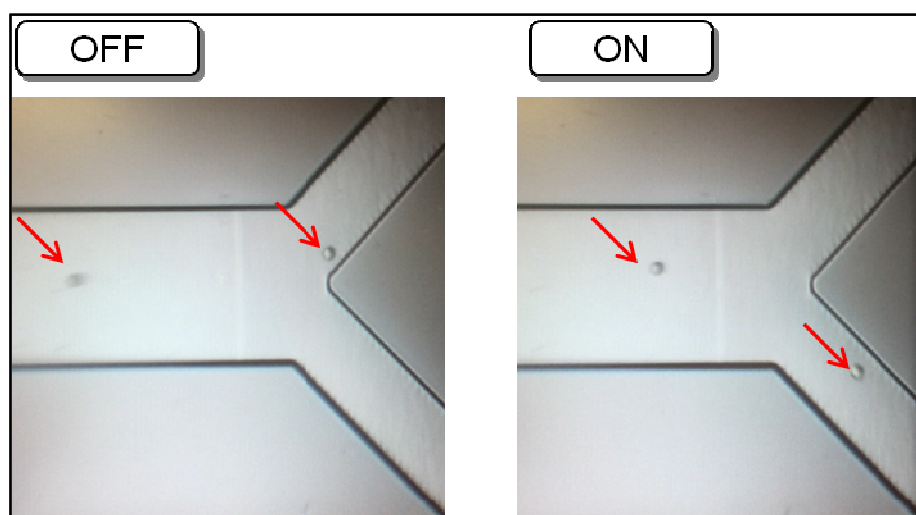
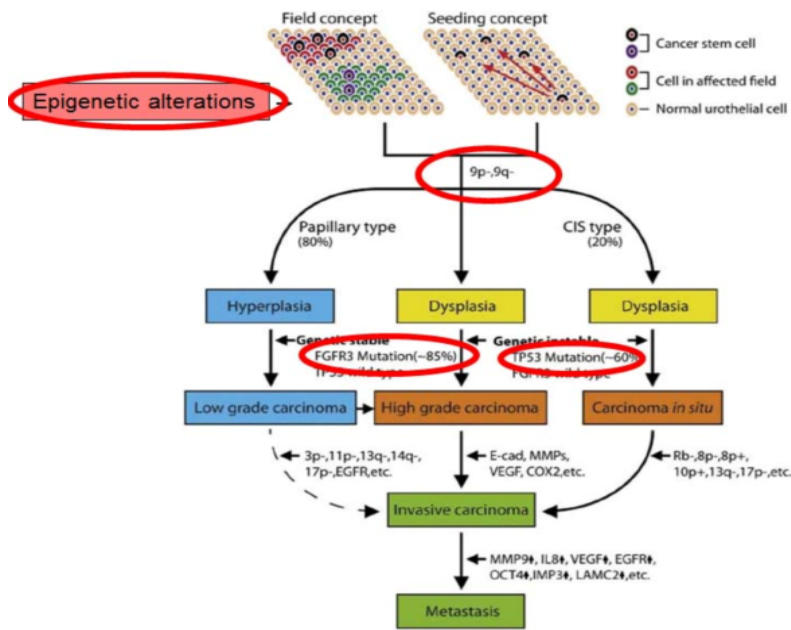


図 3-9 外部に取付た小型ピンチバルブの on/off でビーズの分別状態が確認

2-3-4 採取する癌細胞の生物学的悪性度の遺伝子診断への応用可能性の検証



分子生物学的手法を用いた尿中剥離細胞からの尿路上皮がん診断、および生物学的悪性度診断に際し、尿路上皮がんの多段階発がん過程に生じる遺伝子変化を図 3-10 に示す。

図 3-10 尿路上皮がんの多段階発がん過程に生じる遺伝子変化

これらの遺伝子変化はがん化によって生じる体細胞変化であり正常細胞には生じない。また

悪性度の違いにより、がん進展の経路が異なることが明らかにされている。本研究における解析対象は、多段階発がん過程の早期に高頻度に生じ、非筋層浸潤がんと浸潤がんを区別し得るという観点から、第 9 染色体、第 17 染色体の欠失と *FGFR3* の点突然変異とした。一方、DNA メチル化異常に代表されるエピジェネティック変化は発がん過程のもっとも早期に生じると考えられるが、炎症や環境因子にも影響を受けるため、がん特異的な変化とは言い難い一面がある。我々は上記遺伝子解析に網羅的 DNA メチル化解析から同定されたがん特異的 DNA メチル化異常を指標とした診断マーカーを加え、診断の特異度を低下させずに検出感度を上昇させるアプローチを予定した。これらの解析はすべて高速 DNA 解析装置(PyroMark)でハイスループットに施行できる。

1) 体細胞変化に生じる遺伝子変化を指標とした遺伝子診断マーカーの検討

① PyroMark の対立遺伝子の定量性と染色体欠失の評価法の検討

ゲノム上に存在する一塩基多型(SNP)がヘテロ接合を示す場合、対立遺伝子のコピー数を定量することが可能である。一つの SNP がヘテロ接合を示す割合は約 3 割であり、複数の SNP を解析することで解析可能な症例が増加する。

第 9 染色体短腕 2 カ所、同長腕 3 カ所、第 17 染色体短腕 2 カ所の SNP を用いて解析した。

PCR による増幅前の鋳型 DNA を T/T および C/C のホモ接合の試料を 2 種類用意し、図 3-11 に示すように比率を変えて混合試料を作成した。この試料を用いて DNA 中に占める対立遺伝子の定量性を検討した。

この結果から、PyroMark は各対立遺伝子を 1%オーダーの定量性を示した。

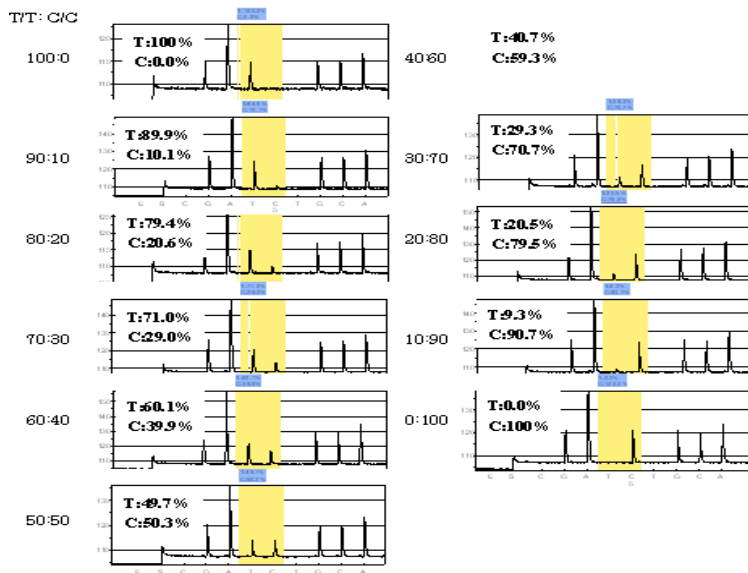


図 3-11 DNA 中に占める対立遺伝子の定量性の検討

次に各 SNP マーカーにおける染色体欠失のカットオフ値を決定した。尿路上皮がん患者 72 例の末梢血リンパ球を用いてヘテロ接合を示す症例の各対立遺伝子比を測定し、腫瘍組織において対立遺伝子比が $\pm 3SD$ を超えて正常と異なる場合を染色体欠失と判定した。

② *FGFR3* 点突然変異の解析

PyroMark を用いた *FGFR3* 点突然変異の解析は未だ報告がない。

図 3-12 に我々が報告した日本人非筋層浸潤尿路上皮がんにおける各点突然変異の頻度を示す。

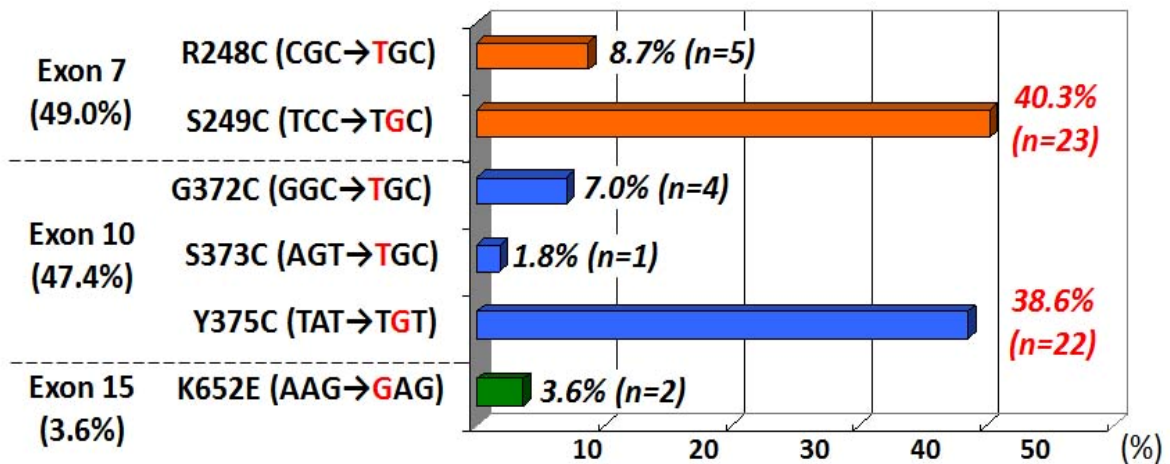


図 3-12 日本人非筋層浸潤尿路上皮がんにおける各点突然変異の頻度

本研究での解析対象は Exon 7 の 2 カ所と Exon 10 の 2 カ所(G372C、Y375C)とし、各 Exon で同時に 2 カ所の点突然変異が検出できるよう PCR プライマーを作成した。

これらのプライマーを用いた検討では、モノクローナルと考えられる膀胱がん細胞株においては、変異型の遺伝子のみが検出し得た。

③ 臨床試料を用いた遺伝子診断の検討

奈良県立医科大学で尿路上皮がんと診断され手術を施行された 76 例と良性疾患で当科を受診した 20 例を対象とした。これらの症例は摘出試料の研究利用が本大学の倫理委員会で承認され、同意が得られた症例である。症例の末梢血リンパ球、腫瘍、尿中剥離細胞から抽出した DNA を用いて上記遺伝子診断の診断的有用性を検討した。尿路上皮がん症例ではすべての症例で腫瘍摘除前に尿細胞診が施行され、尿中剥離細胞の遺伝子解析の結果と比較検討した。結果を表 2-6 に示す。

尿路上皮がん症例は各染色体上の少なくとも一カ所でヘテロ接合を示し、染色体欠失の判定が可能であった。各染色体上のマーカーが少なくとも一カ所欠失を示した症例を染色体欠失ありと判定した。尿路上皮がん組織においては深達度 Ta および T1 の非筋層浸潤がんで第 9 染色体長腕の欠失が高頻度に非止められた。同様に *FGFR3* の点突然変異は非筋層浸潤がんにおいてのみ認められた。一方第 17 染色体短腕(*TP53*)の欠失は T2 以上の筋層浸潤がんで効率的に認められた。各染色体の欠失または *FGFR3* の点突然変異を認めた症例を遺伝子変化ありと判定した。この結果、遺伝子変化を認めた症例は 65 例であり、本コホートにおける遺伝子変化を有する率は 85.5%であった。

表 2-6 DNA を用いて上記遺伝子診断の診断的有用性の検討

Diagnostic accuracy in Tissue samples

	9p	9q	17p	FGFR3		Total
				ex.7	ex.10	
Ta (n=34)	43.8	85.7	29.2	26.5	29.4	88.2
T1 (n=24)	36.4	85.7	46.7	12.5	12.5	83.3
T2 (n=16)	60.0	73.3	88.9	0	0	81.3
T4 (n=2)	100	50.0	100	0	0	100
G1 (n=2)	0	100	0	0	50.0	100
G2 (n=29)	42.9	80.0	18.8	27.6	31.0	82.8
G3 (n=45)	52.2	82.8	65.6	8.9	7.1	84.4

The samples which at least one locus on each chromosomal arms showed heterozygosity were analyzed.

Total 85.5%

次に同一症例の尿中剥離細胞の解析結果を示す。1 例で解析可能な DNA が抽出できず、75 例の解析となった。抽出困難各染色体欠失および *FGFR3* 点突然変異検出頻度は腫瘍組織に比して低下した。とくに *FGFR3* 点突然変異の検出感度は腫瘍組織に比べて顕著に低下した。非筋層浸潤がんと浸潤がんにおける遺伝子変化の特徴は腫瘍組織と一致していた。尿細胞診との比較では、Class III 以上を陽性とする、深達度 T4 症例では遺伝子解析、尿細胞診ともに 100%の感度で検出可能であったが、T3 以下の症例では遺伝子解析の感度が上回った結果となった。全症例では遺伝子変化を検出し得たのは 56 例であり、検出感度は 74.7%であった。一方、尿細胞診の検出感度は 45.3%であった。また良性疾患患者の尿中剥離細胞からはこれらの遺伝子変化は検出されなかった。これらの結果より本コホートにおいては尿中剥離細胞か

らの遺伝子診断の精度は感度 74.7%、特異度 100%となった。腫瘍組織の結果と比較すると 10.8%の症例が尿中剥離細胞では診断し得なかった結果となった。(表 2-7)

表 2-7 遺伝子診断の精度は感度と腫瘍組織の結果との比較

Diagnostic accuracy in Urine samples

	9p	9q	17p	FGFR3		Total	Cytology >Suspicious
				ex.7	ex.10		
Ta (n=33)	20.0	71.4	20.8	9.1	6.1	69.7	24.2
T1 (n=24)	45.5	78.6	53.3	4.2	12.5	79.2	62.5
T2 (n=16)	20.0	73.3	77.8	0	0	75.0	56.3
T4 (n=2)	100	100	100	0	0	100	100
G1 (n=2)	0	100	0	0	0	100	0
G2 (n=28)	14.3	65.0	18.8	3.6	10.7	71.4	25.0
G3 (n=45)	38.1	79.3	59.3	6.7	3.6	75.6	60.0

The samples which at least one locus on each chromosomal arms showed heterozygosity were analyzed.

Total 74.7% vs. 45.3%

2) DNA メチル化異常を指標とした尿路上皮がん診断法の検討

① 尿路上皮がん診断に有用となる DNA メチル化異常の同定

本研究の目的は上記の体細胞変異に生じる遺伝子変化を用いた特異度を低下させることなく検出感度を上昇させ得る DNA メチル化異常を同定することである。同一コホートのうち、良性疾患症例 20 例、尿路上皮がん術後経時的尿 20 例、がん随伴尿 32 例を対象とし、Illumina HumanMethylation 450 assay を用いて全 genome 領域上の約 45 万カ所の CpG 配列における DNA メチル化レベルを網羅的に解析し、各グループ間での比較検討を行った。良性疾患尿と尿路上皮がん術後経時的尿を正常群とし、癌随伴尿と比較すると、 $p < 0.000001$ で有意差を示した CpG 配列は 1402 カ所あった。この CpG 配列について unsupervised clustering 解析を行った。この結果 DNA メチル化プロファイルによってクラスターは 2 分され、右側のクラスターは全例がん随伴尿症例であった。左側クラスターのうち、右側のクラスターはがん随伴尿と術後経時的尿症例で構成され、左側クラスターは全例良性疾患尿で構成された。

② DNA メチル化マーカーの有用性の検討

上記解析の結果からがん随伴尿において特異的に生じる異常メチル化 CpG 配列の候補として、異常高メチル化を示す 3 遺伝子と異常低メチル化を示すマーカー 1 遺伝子を選出し、尿中がん診断の有用性の検討を行った。上記遺伝子解析の結果、尿中剥離細胞で遺伝子変化が検出されなかった 19 例と良性疾患尿 20 例を対象として PyroMark を用いて解析した。

これら 4 種類のマーカーの検討では、がん随伴尿と良性疾患尿で DNA メチル化レベルに有意差を認めなかった。この理由として、検索した症例数が少なかったこと、がん随伴尿は遺伝子異常を認めない症例に限定していることが考えられる。低メチル化マーカーの一つはがん随伴尿 5 例がすべての良性疾患尿より低メチル化を示し、この解析の結果を先の遺伝子解析の結果と組み合わせると、尿中剥離細胞を対象としたがん診断における検出感度は 82.7%、特異度は 100%であった。

3) 細胞数と抽出 DNA 収量および PyroMark を用いた遺伝子検索可能限界の検討

通常、健常尿に含まれる尿中剥離細胞数は少なく、遺伝子解析に十分な DNA が抽出できない場合が多い。本検討では膀胱がん細胞株の個数を段階的に減らした試料から各々 DNA を抽出し、PyroMark での解析に必要な細胞数の検討を行った。

試料調整は 5000、2500、1000、500、250、100、50 個の段階希釈とした。5000 個の細胞から抽出した DNA の収量は 645 ng であり、分光光度計での核酸濃度測定感度下限を下回っていた。次に rs10810945 を用いて PCR を行うと全試料で DNA の増幅が認められた。PyroMark を用いた解析結果を図 3-13 に示す。

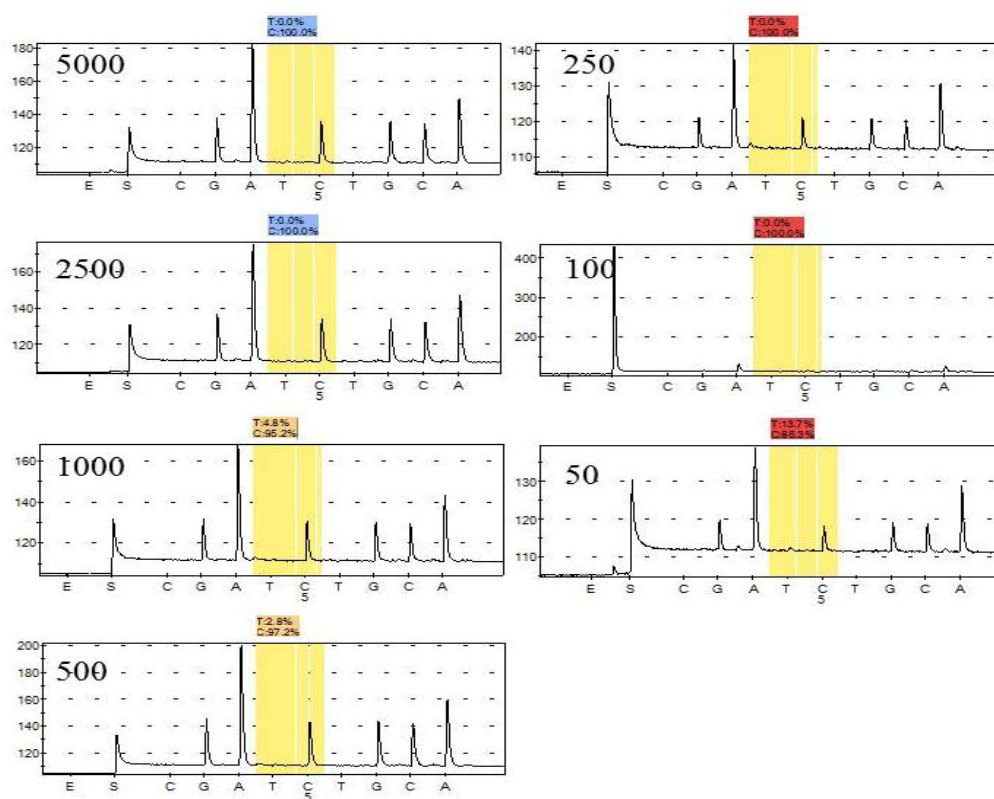


図 3-13 PyroMark を用いた解析結果

この結果から、細胞数 50 個から抽出した DNA で PCR と PyroMark の解析は可能であるが、250 個の細胞数から抽出した DNA では対立遺伝子の定量解析が遜色なく施行できることを確認した。これらは細胞株を用いたモデルであり、実際の臨床試料では細胞の状態が異なる点に留意する必要がある。

4) 総括

尿路上皮がんが生じる遺伝子変化をがん診断に応用する試みがこれまで多数報告されてきたが、未だ臨床応用が可能となる十分な感度、特異度を満足する分子マーカーは確立されていない。

尿中がん診断の感度を低下させる要因は尿中腫瘍細胞の絶対数不足、または正常細胞のコンタミネーションによる腫瘍細胞の割合の低下が挙げられる。とくに PCR による遺伝子増幅が必要な分子生物学的解析法では、腫瘍細胞を特異的に増幅させることは困難であった。我々はこの問題を改良するために、微量ながん由来の DNA を 1%単位で検出し得る染色体欠失解析法および遺伝子突然変異解析法を開発した。本法により、これまで染色体欠失解析のスタンダードであった PCR-SSCP 法あるいはフラグメント解析法で標準とされた対立遺伝子比 50%の閾値を 20%台に下げることが可能であった。FGFR3 点突然変異解析は従来の PNA 法を用いた同一症例尿の解析と比較すると、PNA 法で検出し得た症例は 4/75 例、解析不能例 14/75 例であったが、本法では 6/75 で点突然変異が検出可能であり、解析不能例は認めなかった。がん組織において、遺伝子異常は 85.5%の症例で認め、これが今回ターゲットとした遺伝子変化の検出感度の上限だと考えられる。しかし尿中剥離細胞では遺伝子変化の検出率は 74.7%と低下した。さらに感度を上昇させ、特異度を低下させないために網羅的メチル化解析から慎重に選出した DNA メチル化マーカーを追加することで、尿中剥離細胞から感度、82.7%、特異度 100%でがん診断が可能となった。これらは「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」における診断率の検証に用いるための preliminary な研究であり、今回は患者尿試料を用いた検討には至らなかった。しかし、「カートリッジ型ハイスループット尿中細胞診断装置」を用いて尿路上皮がん細胞が特異的に採取可能となれば本法は上記の検証に有用となるばかりでなく、試料をがん細胞に限定することにより、さらに高感度な検出法として臨床応用可能になると期待できる。

最終章 全体総括

従来からの研究開発成果と今回の成果・課題を踏まえて、今後の事業化展開について述べる。本テーマは医工・産学連携の例として有効なテーマであった。目標は現在、人類が抱える癌との闘いの中で、特に精検受診率が低い膀胱癌・前立腺癌に着目した。従来の膀胱癌および前立腺癌の診断は、苦痛を伴う膀胱鏡検査や針検診、患者および医師のストレスとなっていた。これが精検受診率の低さの一因になっている。医療機関・検査機関においては、膀胱癌等を簡易かつ迅速に自動検出するワークステーションの開発が要望されている。

今回の研究・開発でまずは患者の採尿からワークステーションで前処理し、短時間に精度の高い膀胱癌、前立腺癌に対して、陽性・擬陽性の判定ができるスクリーニング検査ができるようになった。更に、一部継続課題があるものの、陽性、擬陽性尿から癌細胞の分別、採取してそのあとのDNA検査へ確度の高い診断へすすめることができた。

計画時の高度化目標の数値と達成率については次のような成果が得られた。

	現状	ニーズ	高度化目標
①検出および採取	個別 (細胞診+セルソータ)	同時	同時
②精度 (癌細胞の検出率)	平均50% (細胞診)	80%	85%以上
③癌細胞分別採取率	80% (セルソータ)	80%	85%以上
④処理速度	8時間/検体	1時間/検体	8時間/50人 =約10分/検体

達成率

① 検出および採取・・・ほぼ同時

- ・蛍光プレートリーダーでスクリーニング検査して判定後の尿を継続して分別・採取する方式でより精度がアップした。

＜陽性・擬陽性者の尿のみ細胞検出して分別する方式に発展＞

② 精度・・・90%以上

- ・検体尿を自動前処理して蛍光プレートリーダーで高速スクリーニング処理できること
- ・マイクロプレート 384well をリーダーで読取る、**検体のn数を任意に増やせること**
- ・陽性・擬陽性・陰性の閾値を測定の後でも変更できるので精査し易い
- ・標準物質が実際の癌細胞の光学特性に近いものが入手できた。さらに精度向上が期待

② 癌細胞分別採取率・・・作業進行中:85%以上の成果が期待できる:継続

- ・蛍光する標準物質と非蛍光の標準物質が入手できた
- ・混合比をいろいろ変更してMEMSの切換弁の性能確認が出来る

④ 処理速度・・・8時間50人を達成

- ・尿検体→陽性率が10%で6人の細胞採取することになった。
- ・検体尿をインキュベータで培養する時間・遠心分離・分注・攪拌・計測など重複して処理できる並列処理で目標は達成できた。

事業化戦略について、当面は継続して研究の課題解決に努める。京都大学では研究員を専属に配置して進める。また 奈良県立医科大学では引き続き、臨床研究を進め次の学会にその成果を発表する等の活動を進め、マイクロニクスでは装置のカタログ化や技術系のネット上での紹介公表できるところまでのPR技術資料を作成して事業化を推進する。