平成25年度戦略的基盤技術高度化支援事業

「血液中遊離核酸（miRNA）を用いた癌診断のための核酸抽出キットの開発」

研究開発成果等報告書

平成26年3月

委託者　近畿経済産業局

委託先　特定非営利活動法人
近畿バイオインダストリー振興会議

目 次

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

1-2. 研究体制 …… 2
（研究組織・管理体制、研究者氏名、協力者）

1-.3. 成果概要 …… 5

1-4. 当該研究開発の連絡窓口 …… 5

第 2 章 本論

2-1. 製品設計 …… 6
2-1-1. 構成メンブレンの決定 …… 6
2-1-2. プラスチックと S 膜、C 膜の接着方法の確立 …… 6
2-1-3. 製品試作と改良 …… 6

2-2. 血清中遊離核酸 DNA、miRNA 抽出の条件最適化 …… 7
2-2-1. 様々な抽出液を用いた miRNA 抽出の検証 …… 7
2-2-2. 試薬量の不足による白塊の析出と回避策 …… 7

2-3. 血漿の保存条件の最適化 …… 7
2-3-1. 短期保存検証 …… 7
2-3-2. 長期保存検証 …… 7
2-3-2. 保存温度検証 …… 8

2-4. 診断への応用 …… 8
2-4-1. 擬似血清を用いた検証と溶血により影響を受けない内部標準となる miRNA の検討 …… 8
2-4-2. 横紋筋肉種の診断検証 …… 10

2-5. より迅速かつ簡便に診断するための検証 …… 10
2-5-1. 多項目を同時に診断可能にするプライマーセットの条件最適化 …… 10
2-5-2. 抽出された DNA を用いた染色体転座切断点の検出 …… 11

最終章 全体総括 …… 12

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

【背景及び研究目的】

がんは、今や成人、小児を問わず、国民の病死原因の第一位を占める事象である。がんの最終診断は、腫瘍組織を採取し、病理診断をすることにより確定されるが、多くは侵襲的な外科手術を要することが多く、小児では短時間の生検でも全身麻酔を要するのが常である。近年、患者の Quality of life(QOL)を高める観点より、低侵襲的で迅速ながん診断の検査方法として血液中にがん組織より遊離したがん細胞由来の核酸診断が注目されている。一方、、血液によるがんの核酸診断を行うには、血球由来の核酸の混入を防ぐため、採血後速やかに高速遠心を行い、細胞成分の除去と分離血清の冷蔵あるいは冷凍保存、ならびに速やかな検査施設への輸送が必要とされる。したがって、診断薬や臨床検査のメーカーである川下製造業者からは、「輸送、保存の簡便化」、「核酸の抽出容易化」を実現した検体保存容器が求められている。

本事業の研究実施機関である公立大学法人京都府立医科大学は血清中遊離核酸を用いた遺伝子診断技術を有する。株式会社アワジェニックは徳島大学発ベンチャー企業であり、核酸を取り扱う能力が非常に高い。深江化成株式会社は核酸保存容器の製造には実績がある。「輸送、保存の簡便化」「核酸の抽出容易化」機能を実現するためにそれぞれの強みを持った 3 機関での事業体制によって「血液中遊離核酸（microRNA：以降 miRNA と略記）を用いた癌診断のための核酸抽出キット」の開発を行う。

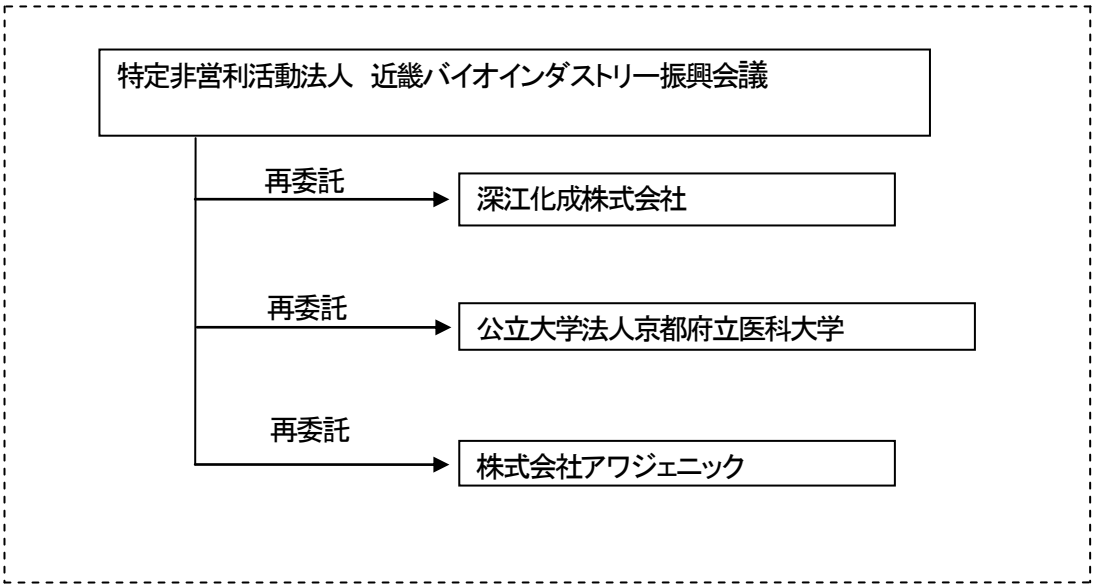
【研究目標】

本事業は、従来行われていた採血から核酸抽出・保存、輸送という一連の流れの中において、患者の採血を施行するユーザー、検査センターへ発送をするユーザー、およびセンター等で実際に核酸を抽出するユーザー、そして患者自身の負担を減らすことが目標である。

	従来技術	新技術(本事業の目指す目標)
血漿分離にかかる時間	約 1 時間	約 30 分
血漿保存時間	24 時間以内	当初 3 日以上だったが達成したため、1 ヶ月～最大半年間に延長
血漿保存温度	4℃(場合によっては-20℃)	常温
核酸抽出にかかる時間	平均 2 時間(既存キット使用)	1 時間以内
コスト(50 検体輸送時)	約 2000 円(クール宅急便)	500 円以下(郵便封筒)
輸送時の容器の大きさ	40 立方センチ (採血管)	10 立方センチ(板状)
患者の身体的な負担	癌診断の場合、画像検査では診断できない場合、外科的な組織採取を行うため痛みを伴う。	血液中の遊離核酸を利用して癌の種類や悪性度が低侵襲的。危険や痛みがほとんどない。

1-2. 研究体制

1）研究組織



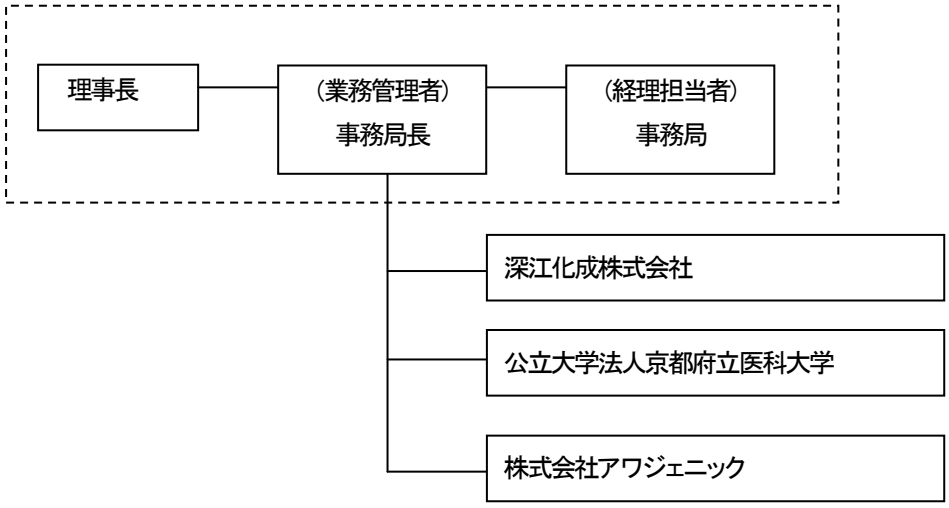
総括研究代表者（PL）
深江化成株式会社　営業部　部長
本　真

副総括研究代表者（SL）
公立大学法人京都府立医科大学・教授
細井　創

2）管理体制

①事業管理機関

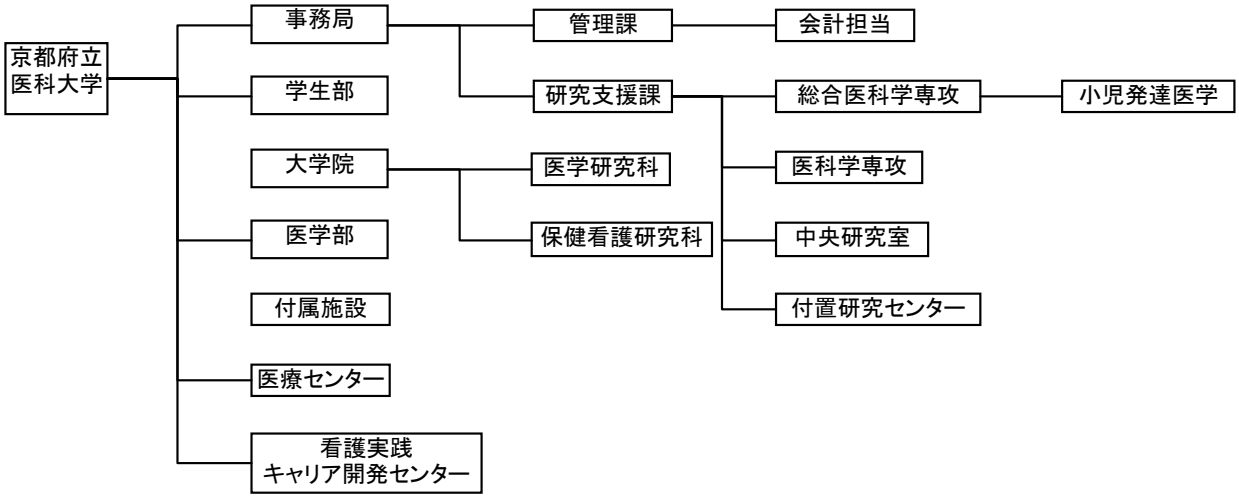
［特定非営利活動法人　近畿バイオインダストリー振興会議］



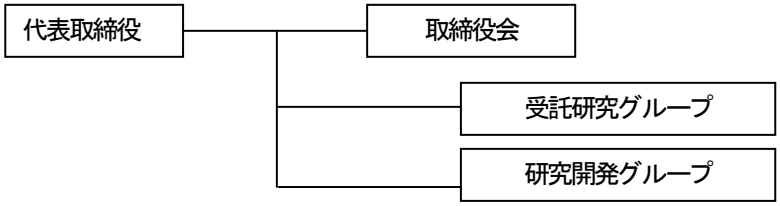
②（再委託先）

深江化成株式会社

公立大学法人京都府立医科大学



株式会社アワジェニック



3）管理員及び研究員

【事業管理機関】特定非営利活動法人 近畿バイオインダストリー振興会議

①管理員

氏 名	所属・役職
魚谷 信夫	理事・事務局長
山本 美穂子	事務局員

【再委託先】

深江化成株式会社

氏 名	所属・役職
本 真	営業部 部長
秋吉 由佳里	営業部 開発課
中島 保泉	技術部 参事

公立大学法人京都府立医科大学

氏 名	所属・役職
細井 創	大学院医学研究科・小児発達医学・教授
家原 知子	大学院医学研究科・小児発達医学・准教授
宮地 充	大学院医学研究科・小児発達医学・助教

株式会社アワジェニック

氏 名	所属・役職
田中 仁夫	代表取締役

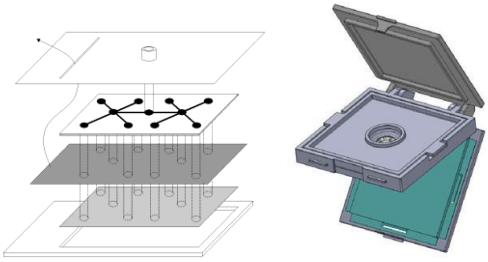
4）アドバイザー

機関名	所属・氏名
日本ポール株式会社	バイオファーマ事業部 ラボビジネスユニット ユニットマネージャー 小林 礼治
株式会社アプロサイエンス	代表取締役社長 金 敦祚
アークレイ株式会社	研究開発部 第5チーム兼第6チーム 責任者 平井 光春

1-3. 成果概要

真空採血管で回収した血液は、低温による輸送が必要で、血清分離に遠心機を必要とし、前処理が煩雑であった。本事業で開発した血漿プリザベーションプレートは、血漿分離膜通過した血漿をセルロースメンブレンに吸収乾燥させ、室温で保存でき、その中に含まれる miRNA を疾患の検診に利用するキットである。当初、使用後の血漿分離膜は引き抜いてしまう仕様を検討していたが、分離膜がもろく、仕様形状を抜本的に見直す必要が生じた。

しかしながら、研究開発の結果、想定していた血漿プリザベーションプレートの高度化目標値はほぼすべて達成することができ、癌の簡易診断へ利用できるキットの作成に成功した。

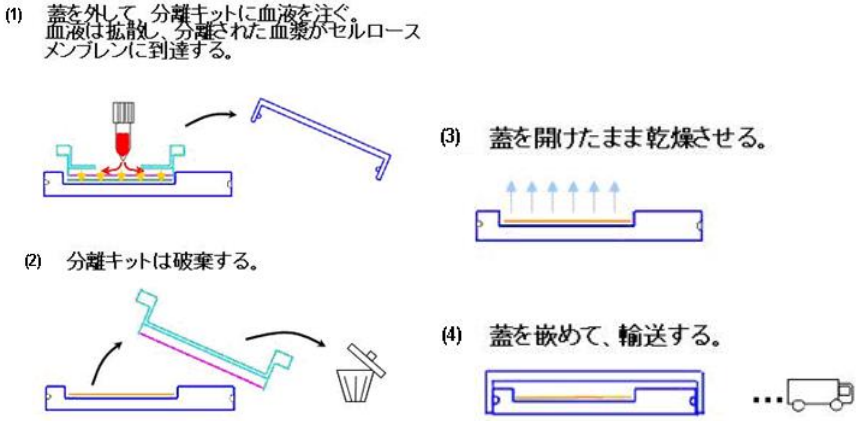


図○ 当初の血漿プリザベーションプレート(左)と本事業内で開発した血漿プリザベーションプレート(右)

	現状	高度化目標値	完成品の性能
血清分離、 核酸抽出	血清分離:1 時間 核酸抽出:2 時間	血清分離:30 分 核酸抽出:1時間	血清分離:1 分 30 秒 核酸抽出:1時間
保存	血清保存時間:24 時間 血清保存温度:4℃	血清保存時間:3 日以上 血清保存温度:常温	血清保存時間:28 日間 血清保存温度:常温
血液保存容器の 形状	保存容器の大きさ:40cm^2 (50 検体分)	保存容器の大きさ:10cm^2 (50 検体分)	保存容器の大きさ:約 25cm^2

【キットの利用方法】

本事業では、拡散分離キットと本体を作成した。使用方法の概要は以下の通りである。



1-4. 当該研究開発の連絡窓口

所属:深江化成株式会社
氏名:本　真
Mail:moto @watson.co.jp
Tel:078-991-4477
Fax:078-991-4491

第 2 章　本論

2-1.　製品設計

2-1-1.　構成メンブレンの決定

血漿分離膜によって、1mL の全血から 200 μL 相当の miRNA が回収できる血漿を分離させることが可能となるメンブレンの大きさと工程を決定した。まず大きさの目安として、深江化成株式会社で製造している「微生物プリザ　1　ウェル」に使用しているメンブレンの大きさ(18mm×42mm)を基準に、血漿分離膜(以下 S 膜)と、分離した血漿を吸収させるセルロースメンブレン(以下 C 膜)の大きさを決定した。面積が小さい場合、10　分以上の時間を要する上、目詰まりを引き起こし溶血の危険性が非常に高くなることがわかった。また逆に C 膜に対する S 膜の面積が大きすぎると、分離させる血漿を自身が吸収してしまい、ロスが大きくなることがわかった。

この結果から、S 膜、C 膜共に 25×60mm の大きさに決定した。

2-1-2.　プラスチックと S 膜、C 膜の接着方法の確立

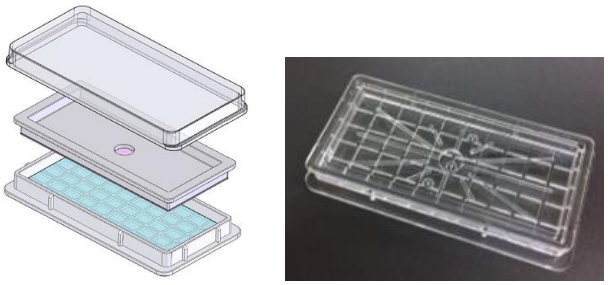
プラスチック基盤と S 膜、C 膜との接着方法の研究開発を行った。各膜について、①熱溶着、②超音波溶着、③樹脂接着の手法を試みた。

S 膜はプラスチック側への熱溶着を試みたが、耐熱性が低く解けてしまった。超音波溶着は、位置決めのための専用の冶具の必要性が生じたことと、S 膜が超音波による振動でもろくなることがわかり不採用となった。結果、樹脂による接着として決定した。

一方の C 膜とプラスチックとの接着方法は、いずれの方法でもプラスチックに接着可能であったが、C 膜内に保存した miRNA の抽出の際に C 膜をプラスチック基盤から剥がす必要が生じた。そこで接着による固定化を諦め、製品そのものの構造を見直すことにした。

2-1-3.　製品試作と改良

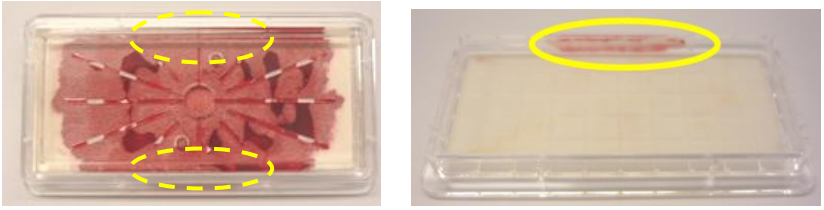
平成 23　年度に必要最小限の仕様を満たす、血漿プリザベーションプレートの第一次試作品を作成した。長方形状、一点滴下型とし、C 膜が乾き易いように C 膜側の接着面を網目状にした。



図○　(左)　試作品イメージ図　S 膜(ピンク)が血漿分離板に、C 膜が本体にそれぞれ接着されている

(右)　イメージ図を基に作成した成形品。メンブレンは溶着させていない状態

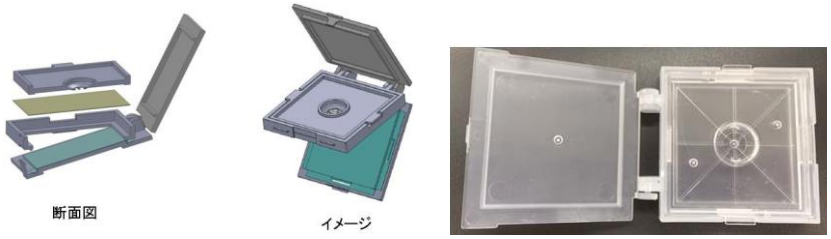
平成 23 年度試作品を用いた評価を行ったところ、血液の拡散および C 膜の接着に課題が残った。血液の拡散では短辺方向に血液の拡散が早く、高圧になった　2　点に血液が集中し、溶血やリークの原因になった。一方 C 膜は溶出処理の際にきれいに剥がすことができなかった。



図○

長辺側両端まで血液が拡散していない一方で、丸で囲んだ部分に血液が集中する。ここで溶血やリークが生じる。

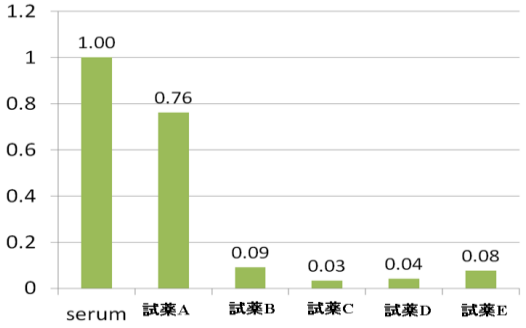
そこで平成 25 年度にこれらの課題を克服する形状の試作量産品を作成した。血漿の分離能を変えないために、同じ面積のまま形状を正方形へと変更し、C 膜はプラスチック板で挟みこむ仕様にした。



2-2. 血清中遊離核酸 DNA、miRNA 抽出の条件最適化

2-2-1. 様々な抽出液を用いた miRNA 抽出の検証

C 膜上に保存した血漿から miRNA を抽出するための最適な抽出試薬の条件を決定するために、市販品の抽出液を含む 6 点の代表的な抽出溶液を選択し抽出検証を行った。その中から溶出の効率が 77%、溶出核酸量 79.6%の市販試薬をベースにより核酸を抽出できる試薬条件を決定した。



試薬 A の条件を採用した

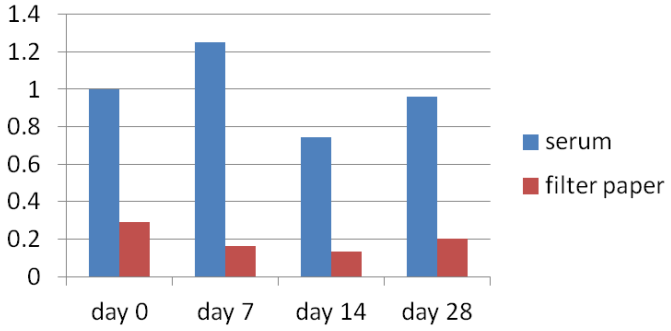
2-2-2. 試薬量の不足による白塊の析出と回避策

抽出時に時々白い塊が生じることがあることがわかった。白い塊が出来ると核酸回収率が落ちる傾向が見られたため回避方法を検討した。白い塊を遠心すると溶液が得られ、miRNA を含む成分もまた得られることがわかった。40 度程度の熱では溶けなかった。これは抽出試薬量の不足により生じる現象であり、試薬量を追加することにより発生を回避できることがわかった。

2-3. 血漿の保存条件の最適化

2-3-1. 短期保存検証

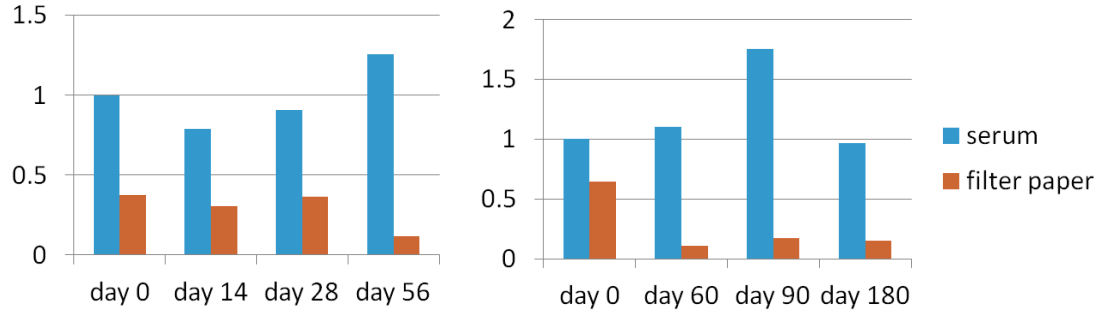
Day 0 に採血を行い、同日に一部の血液をキットに添加しろ紙の回収を行った。また、血清の保存も行った。Day 0, 7, 14, 28 に、常温で保存させたろ紙から miRNA を抽出した。同時に-20 度で凍結保存していた血清からも miRNA を抽出した。この miRNA は健常人で発現の高いものを選定し、何種か検証した。miRNA の定量は、RT-qPCR により行った。Day 0 から Day 28 までのろ紙の常温保存において miRNA の収量は、Day 0 の血清と比較して 13.5%-30%の収量であった。



2-3-2. 長期保存検証

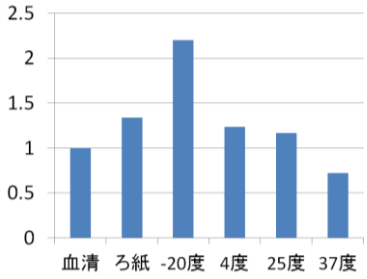
Day 0 に採血を行い、同日に一部の血液をキットに添加しろ紙の回収を行った。また、血清の保存も行った。Day 0, 14, 28, 56、または、Day 0, 60, 90, 180 に、常温で保存させたろ紙から miRNA を抽出した。同時に-20 度で凍結保存していた血清からも miRNA を抽出した。miRNA の定量は、定量的リアルタイム PCR により行った。ろ紙と血清を用いた miRNA の収量の比較を行うと、ろ紙の方が全体的に低い結果となった。この結果は Day 0 の段階でも同様で、ろ紙にて保存した場合 miRNA 収量の低下を認めた。

Day 0 から Day 180 までのろ紙の常温保存では、Day 0 の血清と比較して、Day 28 までは 30%程度の収量であり、Ct 値(増幅に必要な PCR のサイクル数)にして 2 以内の収量の低下であったが、当初 Ct 値≦2 以内に留めるという目標は達成された。しかし、day 56 以降は、10%-20%の収量に落ち込み、Ct 値にして 3 ほどの収量の低下があり、長期の保存では収量の低下が顕著となった。微量の miRNA を対象とする場合、注意が必要と考えられた。



2-3-3. 保存温度検証

2 種の条件(血清、ろ紙)については、採血後ただちに miRNA を抽出した。保存温度検討検体については、同日それぞれ目的の温度でろ紙状態で血漿を 14 日間保存した後、miRNA を抽出した。Day 0 においてはろ紙と血清では、miRNA の収量に差を認めなかったが、Day14 ではろ紙の保存温度が高いほど収量が低下する傾向が分かった。

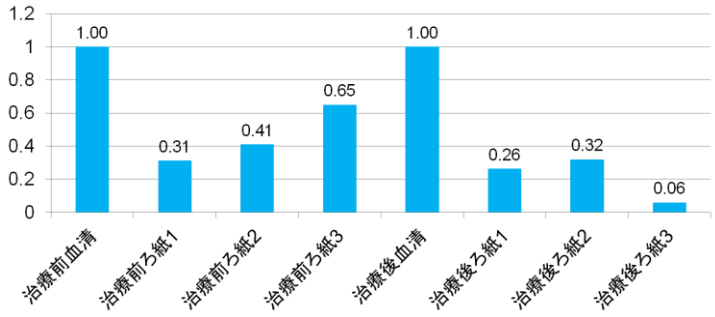


2-4. 診断への応用

2-4-1. 擬似血清を用いた検証と溶血の影響を受けない内部標準の決定

正常人血清に横紋筋肉腫細胞株培養液を添加し、がん患者の擬似血清を作成し、これを治療前血清、正常人血清を治療後血清として、検証を行った。血清は 2 週間、-20 度凍結保存、ろ紙は二週間常温保存したものを用いた。以下に miR-221 を用いて治療前血清、治療後血清をそれぞれ 1 として、治療後絶対量を比較した結果を示す。すべてにおいて収量値の減少が見られたものの、miR 全体として抽出量の絶対量は 2-6 割となっておりばらつきがみられる。

このばらつきを補正するために、内部標準となる miR による補正が必要である。



次に、内部標準の決定検証を実施した。これは外注のアレイ検証により網羅的な解析を実施した。

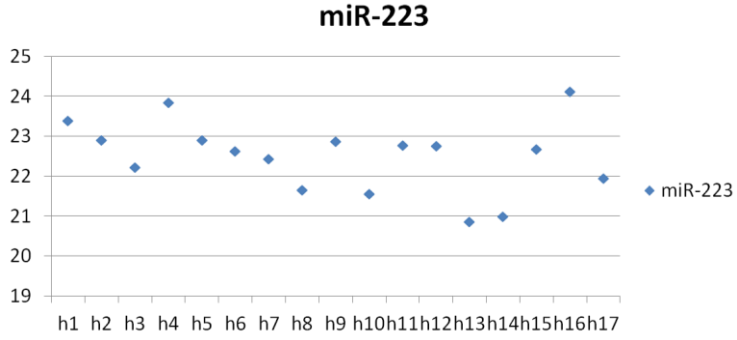
#Sample ID	CB-RNAQ-025-3	CB-RNAQ-025-20	Count					Fold Change
#Name	S5815	S5815+RBC	Count all	count S5815	count S5815+RBC	%detected S5815	%detected S5815+RBC	RBC+/-
hsa-let-7g	2.10	7.24	2	1	1	100	100	35.181
hsa-miR-486-5p	2.45	9.43	2	1	1	100	100	125.952
hsa-miR-30c	0.93	4.68	2	1	1	100	100	13.424
hsa-miR-378	0.93	2.90	2	1	1	100	100	3.909
hsa-miR-221	-0.62	0.99	2	1	1	100	100	3.046
hsa-miR-424	1.86	4.39	2	1	1	100	100	5.763
hsa-miR-532-5p	-2.27	1.50	2	1	1	100	100	13.611
hsa-miR-99a	0.74	-0.99	2	1	1	100	100	0.301
hsa-miR-125b	1.63	1.56	2	1	1	100	100	0.950
hsa-miR-185	1.58	8.37	2	1	1	100	100	110.410
hsa-miR-25	1.27	7.25	2	1	1	100	100	62.976
hsa-miR-20a	4.24	9.87	2	1	1	100	100	49.410
hsa-miR-24	4.54	5.61	2	1	1	100	100	2.095
hsa-miR-23a	4.75	4.49	2	1	1	100	100	0.833
hsa-miR-99b	-0.61	-2.09	2	1	1	100	100	0.358
hsa-miR-23b	1.71	1.58	2	1	1	100	100	0.912
hsa-miR-223	8.10	8.81	2	1	1	100	100	1.632
hsa-miR-16	5.56	11.90	2	1	1	100	100	80.825

これは回収した血清にあえて赤血球を添加し、該当する miR がその影響を受けるかどうかを検証した結果である。最右部 RBC+/-の部分が赤く反転している miR 種は値が高く、赤血球由来の miR に強く影響を受けている。これらの miRNA は内部標準に適していない。

逆に値の増加が少ない miRNA 候補をオレンジで示している。これらが赤血球の影響を受けないため内部標準候補となることがわかった。

注目すべきは miR-221 である。この miRNA は現在、一般的な内部標準候補といわれているものであるが、この miRNA でも赤血球の影響を受けていることが確認できる。この結果は、今後の miR 検証を実施していく中で miR-221 が内部標準として適切かどうか再考すべきであることを示している。

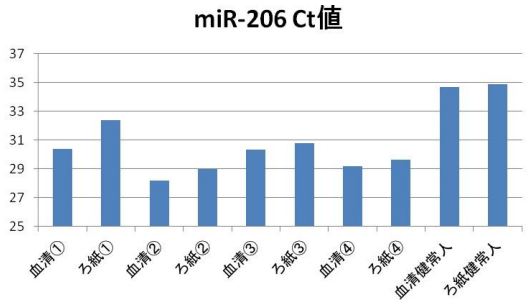
最後に、この結果から得られた内部標準候補が適切かどうかをさらに精査するために、検体間でばらつきがないか、miRNA の発現量が十分であるかを検討した。以下に miR-223 の結果を記す。



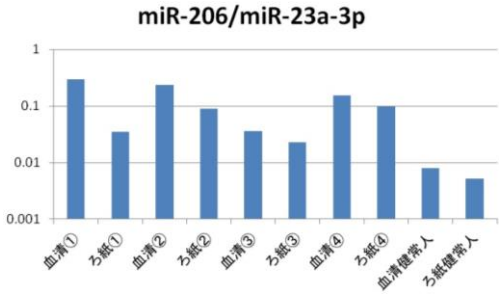
RT-qPCR による Ct 値は 22.5±0.9 であり、健常人の間でのばらつきも少ない。また発現量も十分であり、新たな miRNA 検証の際の内部標準候補と考えられた。

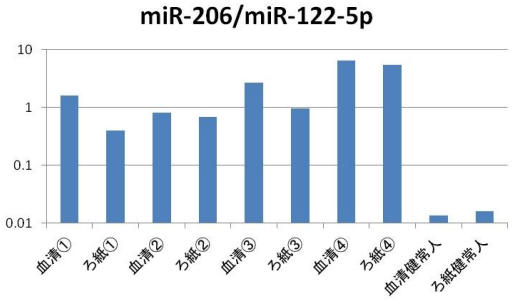
2-4-2. 横紋筋肉種の診断検証

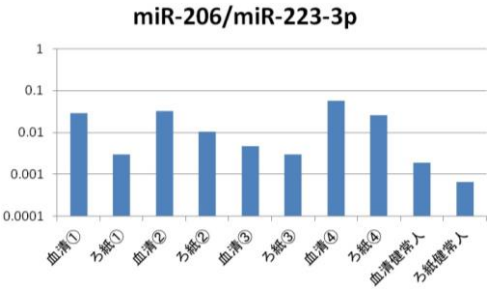
実際の横紋筋肉種患者の血清を含む下記の検体について、PCR アレイにより miRNA の発現の差異を検討した。具体的には、血清中に miR-206 が高発現している横紋筋肉腫患者血清を用いて、血清保存とろ紙保存の発現の比較を行った。miR-206 は赤血球にほとんど発現しておらず、血清保存とろ紙保存において、Ct 値は大きな変動を認めなかった。また、ろ紙保存においても血清保存と同様、横紋筋肉腫患者では、健常人に比べて miR-206 発現が高い（Ct 値が低い）ことを明らかにした。



そこで先の検証で決定した miR-223-3p、miR-122-5p、miR-23a-3p の 3 つの miRNA を内部標準として、miR-206 の相対定量を行った。血清保存、ろ紙保存の両者において、健常人と比べて高値を呈することが分かった。







実際の担がん患者血清を用いて、ろ紙保存検討を行い、担がん患者血清で高発現を示す miRNA の発現が、ろ紙保存でも検出可能であることを明らかにした。ろ紙保存した血清を用いた癌診断が可能であることが示唆された。

2-5. より迅速かつ簡便に診断するための検証

2-5-1. 多項目を同時に診断可能にするプライマーセットの条件最適化

京都府立医科大学小児科で行っている現行の方法では、古典的なユニプレックス PCR を用いており、手技が極めて煩雑、かつ所要時間は約半日を要するため、PCR プライマー構造を変え、それぞれに異なる蛍光色素を標識したプローブを用いてマルチプレックスリアルタイム PCR 法で解析するシステムの開発を行う。今回は遺伝子 A と遺伝子 B を同時に検出するプライマーセットの開発を目標とし実施した。

遺伝子 A と遺伝子 B を同時に検出するプライマーセットを Sybr 法で用いて、単一の PCR 産物を検出できることを確認でき、配列に相補的なプローブを設計することができた。これにより、両者を別々に検出する場合に問題になる以下の問題を解決することができた。

①手技が煩雑である

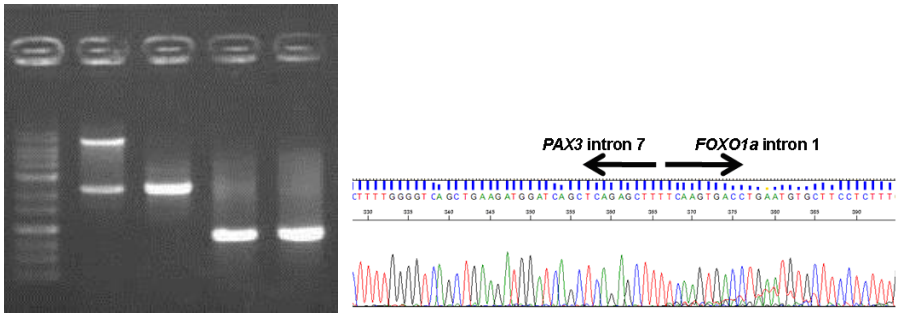
2 種を別々に検出する際、準備も含め実験に手間が 2 倍かかっていた。この作業を同時に行う事ができるようになった。

②等量の検体を入れることができない

厳密に考えると等量に試薬を入れることが現行の方法では難しい。1μL のピペットマンで試薬を分注すれば 1μL 分注できるはずだが、人の手の誤差は絶対生じる。結果として 2 種のプライマーの内、一方はうまく分注できても、他方はできない、と言うこともあり得る。また、ピペットマンの誤差で、一つには 1.1ul 入って、もう一つには 0.9ul しかはいらない、と言うことも可能性としてありえる。今回のようなマルチプレックスでは等量の DNA に対して PCR することになる為、そうした誤差の可能性が低いことがメリットとなる。

2-5-2. 遊離 DNA を用いた染色体転座切断点の検出

PAX3-FKHR 融合遺伝子を発現しているヒト横紋筋肉腫細胞株 Rh30 細胞株からゲノム DNA を抽出した。すでに先行文献で制限酵素マップを用いて、PAX3 での切断点のおおよその位置は同定されている。BamHI, Bgl II 処理後の ligation による LDI-PCR を用いて、breakpoint を含む PCR product を得ることができた。これをシーケンサーにより切断点の同定を行った。切断点周囲にプライマーを設定し、切断点を含む領域の増幅をリアルタイム PCR 法で検出した。さらに、細胞株の培養液上清から抽出した genomic DNA を用いて、PCR 増幅を得ることができた。



Rh30 における genomic breakpoint の同定

しかし、切断点の同定に時間を要するため、血清診断に応用することは実用的でないと考えられた。また、次世代シーケンサーを用いて切断点の同定を行う場合、切断点の同定に要する時間は短縮されるが、費用の負担が非常に大きく、現時点では実用的ではないと考え、次世代シーケンサーを用いた検討は行わなかった。

最終章　全体総括

3 年に渡る事業にて、主となる 3 機関が実施した概要は以下の通りである。

深江化成株式会社:ユーザーの使用しやすい形状の決定、信頼性をあげる検証
京都府立医科大学:保存した血漿内核酸の性能検証、内部標準の決定
株式会社アワジェニック:セルロースから効率よく miRNA を抽出する試薬・手法の決定

さらにアドバイザー3 機関のご協力により、製品の性能評価を頂き、「血漿中の核酸 miRNA を用いた癌の診断キット」という血漿プリザベーションプレートが完成した。本事業締結時の目標値等と比較しながら、今回完成した血漿プリザベーションプレートの機能について考察し、本キットの今後の展開について纏める。

(1)事業締結時の目標と完成品性能の比較

	現状	高度化目標値	完成品の性能
血清分離、核酸抽出	血清分離:1 時間 核酸抽出:2 時間	血清分離:30 分 核酸抽出:1時間	血清分離:1 分 30 秒 核酸抽出:1時間
保存	血清保存時間:24 時間 血清保存温度:4℃	血清保存時間:3 日以上 血清保存温度:常温	血清保存時間:28 日間 血清保存温度:常温
血液保存容器の形状	保存容器の大きさ:40cm^2 (50 検体分)	保存容器の大きさ:10cm^2 (50 検体分)	保存容器の大きさ:約 25cm^2

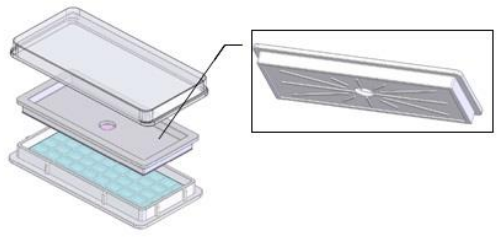
上記表より、当初の目標値と比較して当初想定していた性能の高度化目標はほぼすべて達成した。特筆すべき点は、血清の分離については本デバイスを利用することで現行作業の約 60 分の 1 という大幅な時間短縮に成功したこと、血漿保存時間が現行の 28 倍にも延びたことである。ユーザーが求めるニーズ以上のものを作成することができたといっても過言ではない。

また目標値に届かなかった保存容器の大きさだが、これは「600μL 全血から 200μL の血漿を分離する」という目標値を優先させたこと、またリークしないために貼り代幅をとったことによる。現状よりもコンパクトにはなったものの、目標値には届かなかった。

一方で本デバイスは、「血液 1mL(1000μL)を滴下しても漏れはなく、溶血も少なく、血漿の分離が可能である」ことがわかった。これは、血液の過剰滴下によるトラブルを防ぐだけでなく回収したい血漿量が多く必要な場合、調整することが可能といえる。一口に血漿を用いた研究といっても多様であり、ユーザーのニーズに答えていくために、今後は「200μL よりも少量の血漿が必要な実験」への展開も考えていきたい。

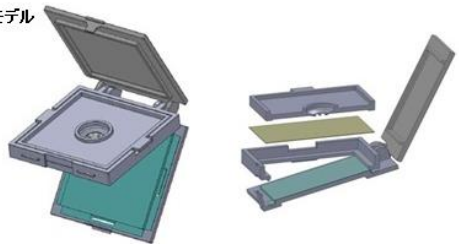
(2)仕様形状について

平成23年度モデル



全体：長方形
　　蓋、拡散分離板、本体が全て独立
拡散分離板：1 点血液滴下型
メンブレン接着法：S 膜 超音波溶着
　　C 膜 熱溶着

平成25年度モデル



全体：正方形
　　蝶番により一体型(組み品)
拡散分離板：1 点血液滴下型

いずれも 600μL の血液を分離し、200μL の血漿を得るという最低スペックは満たしている。H23 年度モデルである試作品は、長辺側の S 膜が分離に使用されないまま短辺側の血液がリークするというトラブルが生じた。これは血液を滴下孔へ滴下すると同心円状に拡散していくことが原因である。すなわち短辺側は滴下孔からの距離が短い分、血液が集中、飽和し、結果メンブレン上で保持できず、壁面プラスチックを回りこんで C 膜へリークしたのである。

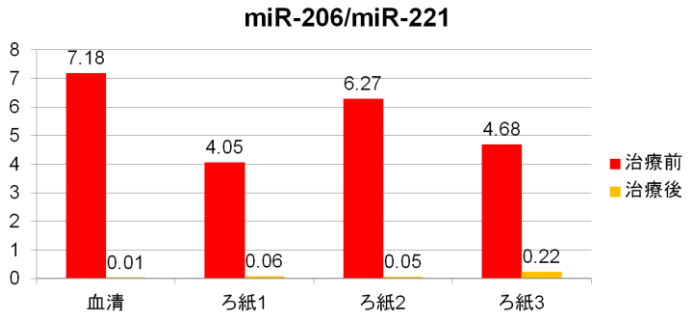
そこで C 膜の平面に一様に拡散するように、形状を正方形へ変更したものが、H25 年度モデルの試作量産品である。H23 年モデルで 3～5 分にかかっていた分離時間が、このモデルに変更することで 1.5 分にまで短縮された。また蝶番によって蓋の入れ違えによる、検体の取り違えも防ぐ構造にした。

(3)癌診断のための miRNA 保存評価

本デバイスの基本的性能として、癌の簡易診断に利用する miRNA の保存検証を実施した。結果として、保存開始から 28 日間までは常温かでも検証に用いるために十分量の miRNA を得られた。常温下では、28 日以降最大 180 日(半年)まで保存検証を実施したが、56 日以降保存している miRNA の回収収量が激減し、保存には注意が必要であることがわかった。

また保存温度による収量の差異も確認を行った。14 日間様々な温度で保存を実施したところ、想定通り低温下での保存(-20℃)が最も収量が多かった。しかしながら、14 日間では現行の保存温度と同じく 4℃で保存した場合と、常温で保存した場合ではほぼ同等の収量が得られた。

また、ろ紙上で保存した miRNA を用いて簡易の癌診断ができることもわかった。癌に罹患している場合、していない場合で、ろ紙上に保存した血漿内 miRNA の発現を確認したところ、顕著な発現量の差が認められた。



一方でろ紙血内の miRNA を用いた診断の際には、溶血の影響を考慮しなければならないことがわかった。溶血が起こると、赤血球内の miRNA が癌にて発現している miRNA と混ざり合ってしまい、ターゲットとする癌のみの miRNA を用いた診断ができなくなるためである。そこで同時に、溶血の影響を受けにくい miRNA を探索し、これをコントロールとして採用することを目指した。結果、発現が高く安定な miRNA の候補として、miR-223 が挙げられた。

以上の結果から、癌検診のようなスクリーニングには利用できるかもしれないことがわかった。一方でろ紙血内 miRNA の定量性は低く、スクリーニング後の精密検査での使用に耐えうるような精度を出すことが難しいこともわかった。本キットは、癌検診のようなスクリーニング目的の検査には有用であると考えられた。

(4)ろ紙からを抽出する際の試薬・手法の決定

ろ紙内乾燥血漿から miRNA を効率よく抽出する試薬及び手法は、現在核酸抽出に多用されている miRNeasy Mini Kit（キアゲン社）を参考にした。試薬そのものについてはほぼ問題なく作成できたが、抽出検証の際白い塊（中間層）が出来ることが有ることがわかった。この白い塊が出来ると核酸回収率が落ちる傾向が見られたため解決策を模索した。

この白い塊は QIAzol(+クロロホルム)を追加することにより発生をほぼ回避できることがわかった。そこでプロトコールを見直し、抽出の際に用いる試薬を増やすことで、安定に miRNA を回収できるようになった。