

平成23年度第3次補正予算戦略的基盤技術高度化支援事業

「光力学診断とマイクロ流路を用いた小型高速癌細胞診断装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成25年 2月

委託者 近畿経済産業局

委託先 公立大学法人奈良県立医科大学

## 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.....                    | 5  |
| 1-3 成果概要.....                       | 7  |
| 1-3-1 癌細胞の検出精度の向上.....              | 7  |
| 1-3-2 癌診断ワークステーションの小型化.....         | 7  |
| 1-3-3 癌細胞の分別採取の高速化.....             | 8  |
| 1-4 当該研究開発の連絡窓口.....                | 9  |
| 第2章 本論.....                         | 10 |
| はじめに.....                           | 10 |
| 2-1 癌細胞の検出精度の向上.....                | 14 |
| 2-1-1 筋層非浸潤膀胱癌における尿細胞診精度の向上.....    | 14 |
| 2-1-2 他臓器癌細胞の高速・高精度診断.....          | 16 |
| 2-1-3 間質細胞混入のない均一な癌細胞採取の評価.....     | 19 |
| 2-2 癌診断ワークステーションの小型化.....           | 21 |
| 2-2-1 ワークステーションによる試料作製の自動化の改良.....  | 21 |
| 2-2-2 割込み検査機能の追加.....               | 23 |
| 2-3 癌細胞の分別採取の高速化.....               | 26 |
| 2-3-1 高速化のための条件の決定.....             | 26 |
| 2-3-2 MEMS 流路デバイスのマルチ化.....         | 28 |
| 2-3-3 マイクロ流路の製作.....                | 30 |
| 2-3-4 マイクロ PCR プレートを用いた高速遺伝子診断..... | 32 |
| 2-3-5 新プロトタイプ機製作.....               | 35 |
| 最終章 全体総括.....                       | 37 |

## 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

本事業では、簡便かつ短時間で癌細胞の存在診断から質的診断まで応用できる癌細胞検出・採取装置を開発する。本研究の理念は、癌細胞に特異的に過剰蓄積されるプロトポルフィリンIXを蛍光励起で検出する「存在診断」と、MEMS 流路で蛍光細胞を選択的に採取し遺伝子診断で「質的診断」を行う細胞診断機器を開発し、悪性腫瘍の診断精度を向上し、癌医療の均霑化（きんてんか）に貢献する純国産の低廉な機器を製品化することにある。

本開発研究では、前処理から高精度蛍光プレートリーダーによる存在診断の過程、MEMS 流路による蛍光細胞の選択的採取の過程、小型高速リアルタイムPCRによる質的診断の過程について、それぞれの課題を解決し個別でも商品化できるシステム開発を目標とした。

#### 2) 研究の概要

本研究は、癌細胞に普遍的に過剰蓄積されるプロトポルフィリンIXの蛍光励起を検出する光力学診断を基本に、蛍光プレートリーダー（高精度分光光度計）で癌細胞を検出する「存在診断」と、MEMS 流路で蛍光癌細胞を選択的に採取し遺伝子診断する「質的診断」を双壁とする細胞診断機器の開発を目的とした。

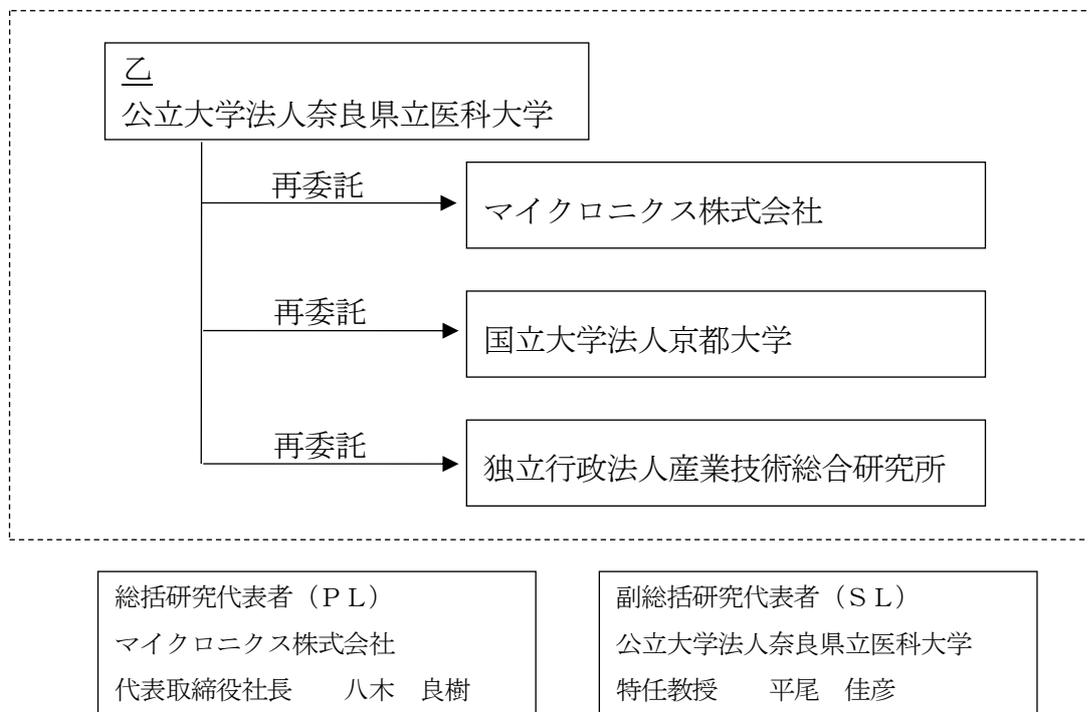
存在診断では、細胞前処理のワークステーションの小型化と高精度蛍光プレートリーダーによる診断精度の向上ならびに尿路上皮癌以外の前立腺癌、白血病などの他臓器への応用を検討する。質的診断では、細胞分別採取の精度を向上さず MEMS 流路のシステム開発と、遺伝子診断の高速化に寄与するリアルタイム PCR 機器の携帯性を可能とする小型化を到達目標にした。

本研究の最終目標は、癌細胞の存在・質的診断を簡便・高速・高精度を行う診断機器のシステム開発研究にあるが、それぞれの過程の成果として開発した機器が単独でも市場化され、医療のみならず広く自然科学の発展に寄与できることも、本開発研究の意義を高めると考えられる。

## 1-2 研究体制

### 1-2-1 研究組織・管理体制

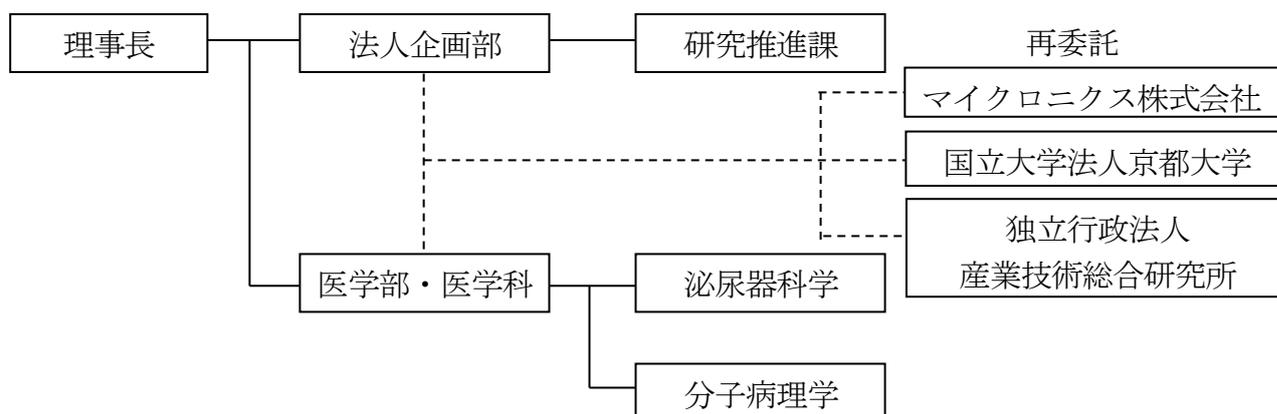
#### (1) 研究組織 (全体)



#### (2) 管理体制

##### ①事業管理者

[公立大学法人奈良県立医科大学]

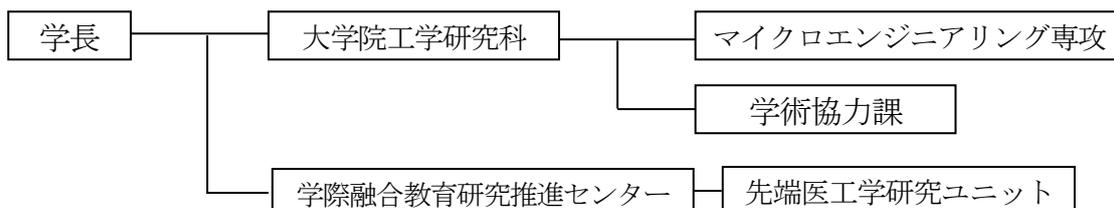


②再委託先

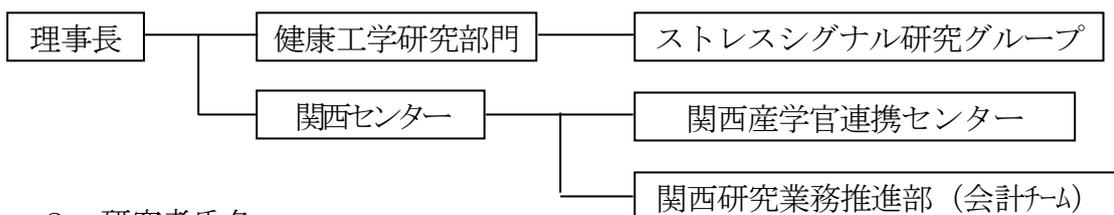
マイクロニクス株式会社



国立大学法人 京都大学



独立行政法人産業技術総合研究所



1-2-2 研究者氏名

(1) 事業管理者

公立大学法人奈良県立医科大学

| 氏名    | 所属・役職                |
|-------|----------------------|
| 池谷 仁宏 | 法人企画部研究推進課・課長        |
| 米坂 治  | 法人企画部研究推進課・産学連携推進係長  |
| 木下 信  | 法人企画部研究推進課研究推進係・主任主事 |

(2) 研究者

公立大学法人奈良県立医科大学

| 氏名     | 所属・役職            |
|--------|------------------|
| 平尾 佳彦  | 産学官連携推進センター・特任教授 |
| 藤本 清秀  | 泌尿器科学・教授         |
| 穴井 智   | 泌尿器科学・助教         |
| 千原 良友  | 分子病理学・講師         |
| 大西 小百合 | 医学部泌尿器科学・実験助手    |

マイクロニクス株式会社

| 氏名 | 所属・役職 |
|----|-------|
|----|-------|

|       |           |
|-------|-----------|
| 八木 良樹 | 代表取締役社長   |
| 八木 健介 | 営業・技術部・課長 |
| 岡 悦男  | 開発部・課長    |
| 矢部 久浩 | 技術部・部長    |
| 東 哲司  | 営業・技術部・係員 |

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 | 学際融合教育研究推進センター・特定助教 |

独立行政法人産業技術総合研究所

| 氏名    | 所属・役職                         |
|-------|-------------------------------|
| 永井 秀典 | 健康工学研究部門・研究員<br>(勤務部署：関西センター) |

(3) 経理担当者及び業務管理機関の所属、氏名

(事業管理者)

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) 産学官連携推進センター・特任教授 平尾 佳彦

(再委託先)

マイクロニクス株式会社

(経理担当者) 管理本部 経理係長 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) 大学院工学研究科 学術協力課 當麻 公子  
産学連携掛長  
(業務管理者) 大学院工学研究科 教授 田畑 修

独立行政法人産業技術総合研究所

(経理担当者) 関西センター 関西研究業務推進部 清水 潔  
会計チーム長  
(業務管理者) 健康工学研究部門長 吉田 康一

(4) その他

アドバイザー

|                                     |                              |
|-------------------------------------|------------------------------|
| 社団法人発明協会<br>広域大学知的財産アドバイザー<br>杉原 長利 | 事業化の為、成果を知的財産として権利化する際のアドバイス |
|-------------------------------------|------------------------------|

## 1-3 成果概要

### 1-3-1 癌細胞の検出精度の向上

#### 1-3-1-1 筋層非浸潤膀胱癌における尿細胞診精度の向上

今回開発した小型化した細胞前処理のワークステーションと蛍光プレートリーダーを用いて全自動下に細胞診断に応用可能か、その精度の検証を行った。

自動診断化においては、陽性診断基準の確立を当初の目的とした。尿沈渣検体の前処理ならびに蛍光プレートリーダーの測定条件等に関する設定を行なった。尿沈渣標本に含まれる細胞数により測定条件が大きく異なることが判明し、検体作成は単純に培養液の 5-ALA の有無とすること、ならびに蛍光プレートリーダーの測定においては蛍光強度の Gain 値の設定を自動的に制御によるソフトウェアを採用することで新規に作製した自動診断装置を用いた膀胱癌の検出感度を 81.8%に向上させることができ、初期の目標を達成した。

#### 1-3-1-2 他臓器癌細胞の高速・高精度診断

尿路腫瘍のみならず、前立腺癌患者検体の検証ならびに、前立腺癌以外は白血病、胃癌、大腸癌の培養細胞株を用いて検証をおこなった。

今回作製した新プロトタイプ機により、前立腺癌疑いの 23 症例での癌検出率は 60.9%で、感度 64.3%、特異度 55.6%、陽性的中率 69.2%であり、本検査を行うことで無益な前立腺針生検を回避できる有用性が検証できた。

他癌種の培養細胞を用いた検討では、すべての細胞株において細胞数に相関する蛍光強度が検出でき、白血病細胞では 100 個レベルの細胞数では陽性の判定が可能であった。悪性腫瘍細胞の普遍的な特徴であるプロトポルフィリンIXの過剰蓄積を光力学診断により高精度で検出できたことは、本診断機器の高い有用性を示すものである。

#### 1-3-1-3 間質細胞混入のない均一な癌細胞採取の評価

間質細胞などを完全に排除して癌細胞を選択的に採取することは、現時点では均一な癌細胞採取まで至っていない。しかし蛍光粒子を用いて分別採取率を検討した結果では、収集側、廃液側での蛍光ビーズ回収率は、現時点で 69.1%、2.1%と大きく改善している。

膀胱癌患者において自動診断装置を用いて PpIX 陽性細胞における膀胱癌遺伝子解析を行い、PpIX 陽性の意義を確認した。非癌症例 10 症例は、PpIX 細胞陰性と診断し、また全ての遺伝子変異も認めなかった。一方、癌症例 29 例中、PpIX 陽性と診断したのは 21 例で、そのうち 19 例に遺伝子変異を認めた。

### 1-3-2 癌診断ワークステーションの小型化

#### 1-3-2-1 ワークステーションによる試料作製の自動化の改良

奈良県立医科大学の指導でワークステーション機能の改良作業を行った。これまで課題の処理検体数はエンドレス・インキュベータの収納本数を 20 検体で順次入替方式・小型遠心機のサンプルチューブ 2 本処理・96well から 384well への

一括蛍光読み取り・XYZ 軸アームの高速化と効率的配置でプロト機の容積比率で 1/3、設置面積で 1/2 を達成した。

#### 1-3-2-2 割込み検査機能の追加

手術中診断をはじめ、多くの細胞診断は至急に検査結果を求められることがあり、本装置の割込み検査の機能が求められてきた。試料を試料台にセットし、パソコン画面上に必要な情報を入力すれば継続して測定ができる。

インキュベータでの試料の培養処理時間が 2 時間必要なため、最長で 2 時間は待ち時間になるが、従来の最長 8 時間待ちの場合から大幅に短縮でき実用の運用が可能になった。

#### 1-3-3 癌細胞の分別採取の高速化

##### 1-3-3-1 高速化のための条件の決定

12 時間・80 検体を達成するための細胞懸濁液の送液速度、細胞懸濁液の濃度などのパラメータを蛍光粒子によって検討した。さらに送液パラメータを最適化することで分別精度を 39% から 70% に改善することができた。実際の ALA 処理された 4 種類の癌細胞 (PC3、T24、DU145、BT284) をマイクロ流路内に送液した実験では、4 種類全ての癌細胞からフォトマルで蛍光強度を検知することができた。

##### 1-3-3-2 MEMS 流路デバイスのマルチ化

12 時間・80 検体を達成するために、まずワークステーション内部の分別採取に係る部分について検討した。特にマイクロ流路に送液中の癌細胞の蛍光をフォトマルで確実に検出できるように送液速度の最適化をマイクロニクスと行った。

##### 1-3-3-3 マイクロ流路の製作

MEMS の細胞検出部 (マイクロ流体デバイス) の作製には、京都大学・田畑研究室で開発した移動マスク露光技術を適用した。この加工技術は通常のリソグラフィプロセスと同様に紫外線露光プロセスと現像プロセスによる一括プロセスによって埋め込み型マイクロ流路が作製可能となった。

##### 1-3-3-4 マイクロ PCR プレートを用いた高速遺伝子診断

癌細胞に対する迅速な遺伝子診断を目的に、膀胱癌の質的診断に有効と認められた *FGFR3* 遺伝子変異や、肺癌における *EGFR* 遺伝子変異を、マイクロ PCR プレートを用いて高速検出することを検討した。まず、*FGFR3* 遺伝子変異については、マイクロ PCR プレート用に新たにリアルタイム PCR の系を作製し、Y375C 点変異の高速な検出を試みたところ、従来 1 時間程度を要していた PCR を 7 分まで短縮して検出することが可能であった。また、*EGFR* 遺伝子変異検出の系においては、専用キットの組成に改良を加えることで、高速な遺伝子検出が可能であることが確認された。

### 1-3-3-5 新プロトタイプ機製作

本事業で開発する装置を使用する川下産業は、主に病院や研究機関を想定している。使用する病院等では小型の高性能装置が求められている。また臨床現場では、患者の各検査の結果から、より精密な検査の可否判断を迅速に行いたい。本事業では目的に応じた三種類の個別機器を開発した。

- ①癌細胞スクリーニング装置 = **小型細胞診断装置**  
(尿中の試料から癌細胞の有無の判定)
- ②癌細胞分別採取装置 = **細胞検出器**  
(陽性、または擬陽性になった試料から癌細胞を検出し分別、採取する)
- ③高速 PCR 解析装置 = **高速遺伝子診断装置**  
(癌細胞の採取後その細胞の DNA を高速 PCR で増やして遺伝子診断をする装置)

目標の・80 検体以上/日 (約 9 分/1 検体)

- ・癌細胞分別採取精度 80%以上
- ・100cm×100cm×100cm 以内) を達成した

### 1-4 当該研究開発の連絡窓口

公立大学法人奈良県立医科大学

法人企画部 研究推進課 産学連携推進係長 米坂 治

〒634-8521

奈良県橿原市四条町840

基礎医学校舎4階

Tel:0744-22-3051

Fax:0744-29-4746

E-mail: [kenkyu@narmed-u.ac.jp](mailto:kenkyu@narmed-u.ac.jp)

## 第2章 本論

はじめに

### 癌に対する光力学診断の開発の背景

正常細胞以上に増殖する癌細胞は、グルコースを大量に消費することは良く知られており、近年、癌を検出するのに広く用いられている PET 検査 (positron emission tomography) の理論的背景になっている。しかしながら、癌細胞はグルコースを大量に消費するにもかかわらず、効率的なエネルギー産生系であるミトコンドリアの酸化的リン酸化を使わずに解糖系を使ういわゆるワールブルグ効果を有する特徴があり、この現象は癌細胞のミトコンドリアの機能低下にあることが近年報告されている。

血色素や葉緑素の前駆物質である 5-aminolevulinic acid (5-ALA) を投与すると、癌細胞などの増殖の盛んな細胞に能動的に取り込まれ、ミトコンドリアでプロトポルフィリンIX (PpIX) に代謝される。癌細胞では前述の如くミトコンドリアの機能低下により PpIXから血色素への代謝が低下し特異的に PpIXが蓄積される。PpIXは青色光 (405nm 前後) で励起すると赤色光 (600nm 以上) を発する特性があり、この特性を利用して癌細胞を検出する診断法が光力学診断 (PDD) である(図 2-1)。

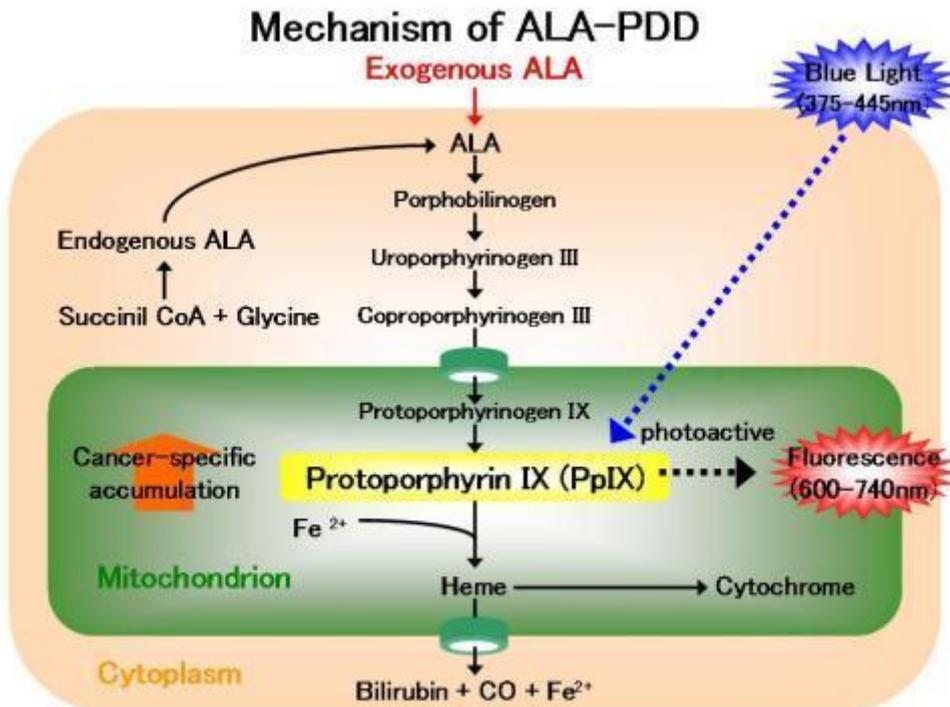


図 2-1 癌細胞における 5-ALA から PpIX への代謝経路と光力学反応

光力学診断は、脳の神経膠腫や皮膚癌の手術に応用されているが、欧米各国では既に膀胱癌の存在診断に承認され、日常診療に広く用いられている。膀胱癌の 70% を占める悪性度の比較的低い非筋層浸潤膀胱癌は、膀胱を温存する内視鏡手術 (TUR-BT) により予後は極めて良いが、再発を繰り返すことが知られている。この再発は、通常光源を用いた TUR-BT での微小病変や悪性度の高い上皮内癌などの平坦病変の見逃しや、腫瘍辺縁の不完全切除が原因とされ、PDD を利用した TUR-BT が欧米において急速に普及している。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 に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、白色光下で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)

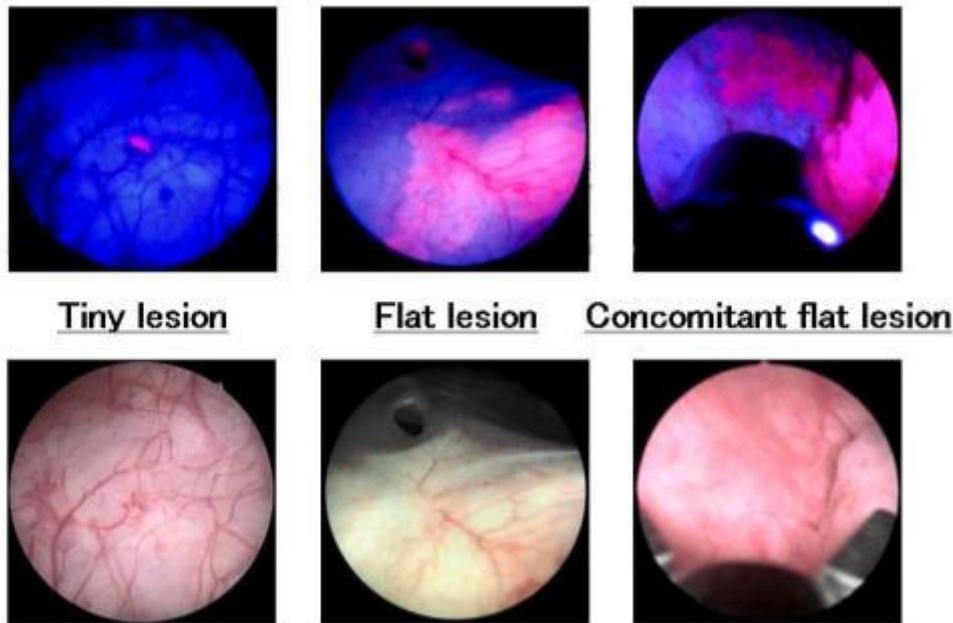


図 2-2 蛍光膀胱鏡像（上段）と白色光の膀胱鏡像（下段）

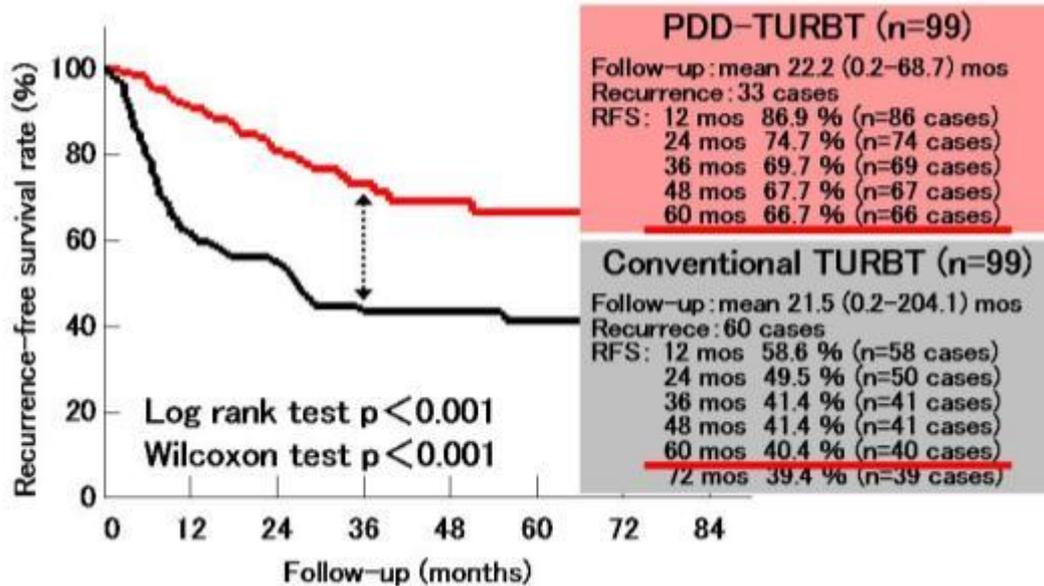


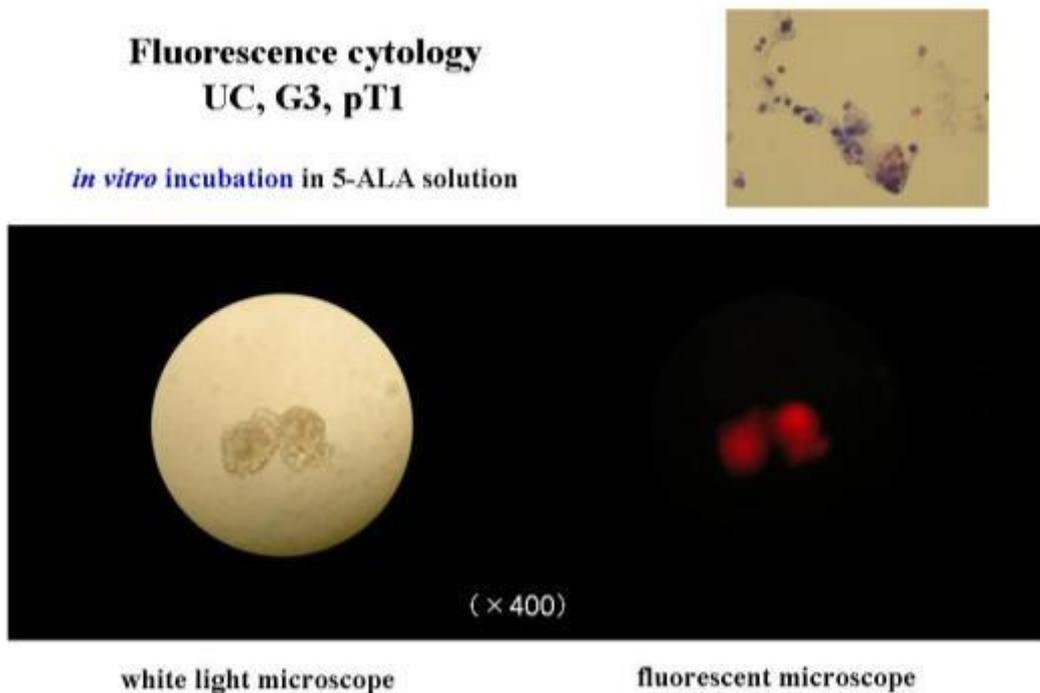
図 2-3 蛍光膀胱鏡と白色膀胱鏡でのTUR-BT後の再発率の比較

### 癌の細胞診断に光力学診断を応用した背景

膀胱癌の膀胱温存治療は、患者の生活の質の維持に最も望ましい治療法であるが、一方で、頻回に再発することから長期にわたる経過観察が必要で膀胱鏡検査と尿細胞診が必須とされ

ている。定期的に行われる膀胱鏡検査は精度は高いが苦痛を伴い、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、日常診療に苦痛の少なく診断精度の高い検査法の確立が望まれている。

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侵襲がなく、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、尿細胞診において細胞異形性の低い、いわゆる 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おり、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、尿中に剥離した癌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 HE 染色像 (右上)、白色光像 (下左)、PpIX 蛍光励起像 (右下)、

しかしながら PDD を用いた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** に示すよう癌細胞が集塊をなす膀胱癌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確認されている。単離癌細胞の蛍光顕微鏡での観察では、細胞の光脱色はさらに数秒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、細胞レベルでの光学的診断においても、より迅速に効率的に検査を行うシステムの開発が課題と考えてきた。また、蛍光顕微鏡下に長時間目視で細胞診断を行うことによる眼球への有害事象の発生にも対処する必要があり、目視に頼らないシステムの開発が喫緊の課題になった。

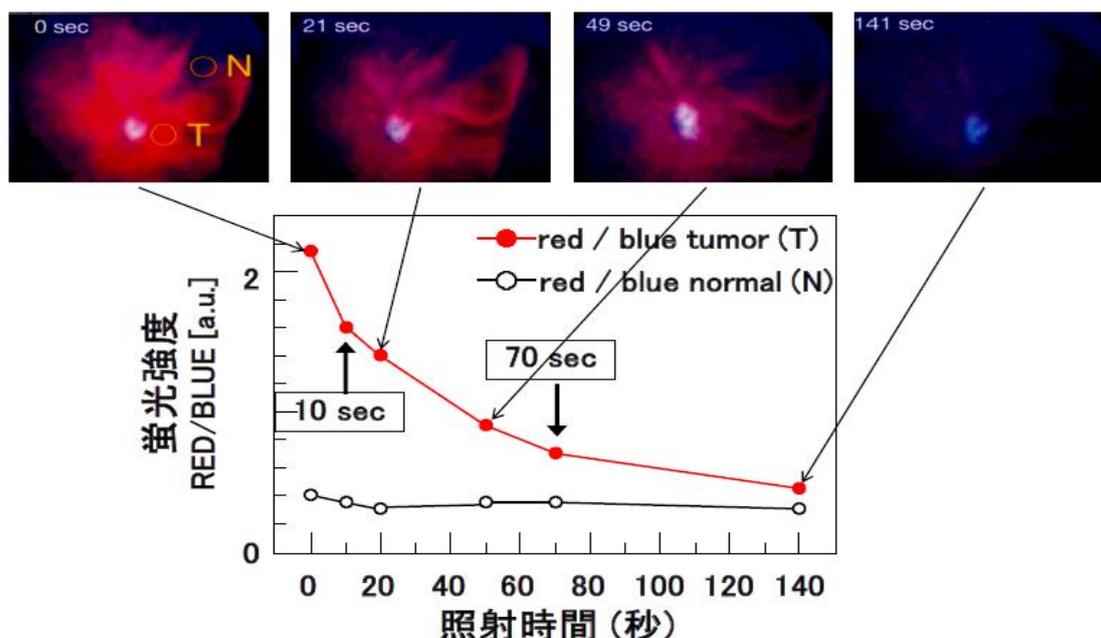


図 2-5 Photobleaching 現象 (励起後照射に伴う蛍光強度の減衰)

既存のフローサイトメトリーは機器が高額であることに加えて、操作が煩雑で時間を要し、多数の検体処理には効率的でなく、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、日常診療で用いるには多くの問題があり、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ている。

このことから、本事業では、多数の尿沈渣検体を 5-ALA 添加培養液中で前処理する煩雑な過程を制御するワークステーションで省力化し、さらに PpIX 蛍光励起細胞を蛍光プレートリーダーで迅速に「存在診断」するシステムを開発した。

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く、癌細胞の悪性度の判定には不可欠なものになってきているが、全ての尿検体の遺伝子診断は時間的・経済的に不可能である。蛍光プレートリーダーによる存在診断でスクリーニングし、陽性検体のみを遺伝子診断する体系が確立出来れば、診断効率は大幅に向上する。また尿路感染を伴う検体や細胞数の少ない検体での遺伝子診断には、癌細胞以外の細胞の混入のない検体を用いることが理想であり、MEMS 流路に光力学診断を組み込み、PpIX 陽性細胞のみを選択的に採取するシステム開発を行った。

## 2-1 癌細胞の検出精度の向上

### 2-1-1 筋層非浸潤膀胱癌における尿細胞診精度の向上

#### 2-1-1-1 プロトタイプ機による蛍光プレートリーダー判定の条件設定

筋層非浸潤膀胱癌に対する従来の目視による尿細胞診では陽性率は低く、侵襲性の高い膀胱鏡検査に大きく依存せざるを得ない状況にある。一方、蛍光顕微鏡を用いた光力学細胞診（PDD細胞診）の精度は、図2-1-1-1-1の上段に示すが、従来の光顕細胞診陽性率の53%に比較してPDD細胞診では91%と向上していた。しかしPDD細胞診では励起光が短時間に退色する欠点がある。それを克服すべく蛍光プレートリーダーによる尿細胞診診断機器を用いた結果を図2-1-1-1-1の下段に示すが、陽性率は86.9%でPDD細胞診と同等の精度で、光顕細胞診の47.8%より高い診断精度であった。

**光顕細胞診とPDD細胞診の陽性率(n=43)**

|         | 膀胱癌 |    |    | 細胞悪性度 |    |     | 癌深達度 |    |  | 尿路感染症 |
|---------|-----|----|----|-------|----|-----|------|----|--|-------|
|         | G1  | G2 | G3 | Ta    | T1 | CIS | T2<  |    |  |       |
| 症例数(n=) | 5   | 17 | 21 | 13    | 17 | 5   | 8    | 20 |  |       |
| -----   |     |    |    |       |    |     |      |    |  |       |
| 陽性率(%)  |     |    |    |       |    |     |      |    |  |       |
| 光顕細胞診   | 0   | 47 | 71 | 38    | 41 | 100 | 75   | 0  |  |       |
| PDD細胞診  | 60  | 71 | 90 | 62    | 76 | 100 | 100  | 0  |  |       |

**光顕細胞診、PDD細胞診およびPDD細胞診機器による陽性率(n=23)**

|                          | 膀胱癌    |       |        | 細胞悪性度 |       |        | 癌深達度   |    |  | 尿路感染症 |
|--------------------------|--------|-------|--------|-------|-------|--------|--------|----|--|-------|
|                          | G1     | G2    | G3     | Ta    | T1    | CIS    | T2<    |    |  |       |
| 症例数(n=)                  | 1      | 7     | 15     | 8     | 9     | 1      | 5      | 10 |  |       |
| No. positive patients(%) |        |       |        |       |       |        |        |    |  |       |
| 光顕細胞診                    | 0(0)   | 2(29) | 9(60)  | 4(50) | 4(44) | 1(100) | 3(60)  | 0  |  |       |
| PDD細胞診                   | 1(100) | 5(71) | 14(93) | 6(75) | 8(89) | 1(100) | 5(100) | 0  |  |       |
| PDD細胞診機器                 | 1(100) | 5(71) | 14(93) | 5(63) | 8(89) | 1(100) | 5(100) | 0  |  |       |

図2-1-1-1-1 膀胱癌患者の尿細胞診の手技別陽性率

これまで、5-ALA 光学的診断による、蛍光プレートリーダーを用いた陰陽性の判定は、図2-1-1-1-2に示すように、同一検体を5-ALA処理および未処理に2分割し、さらにマイクロウェルプレートのウェルそれぞれ3つずつさらに分割し、それぞれのウェルにおけるPpIXの蛍光強度のOD値を、unpaired t-testで統計学的に比較検討し、有意差のあるものを陽性と判断し、マイクロウェルプレートへの分配ならびに計測を手動で行った膀胱癌の検出感度は73.3%（25例中11例が検出可能）であった。

今回の研究当初から、プロトタイプ機による検体の自動分配ならびに蛍光プレートリーダーによる計測・判定を行った。図2-1-1-1-3に示すように、自動で判定を行ったあと、従来通り手動での計測も追加し、感度を比較した。プロトタイプ機では、膀胱癌検出感度は28.5%と著明な低下を認めた。

蛍光プレートリーダーによるPPIX陽性判定過程 (従来法)

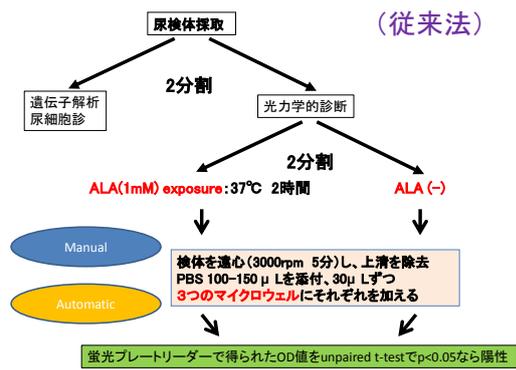


図 2-1-1-1-2 陰陽性の判定

蛍光プレートリーダーによるPPIX陽性判定過程 (改定)

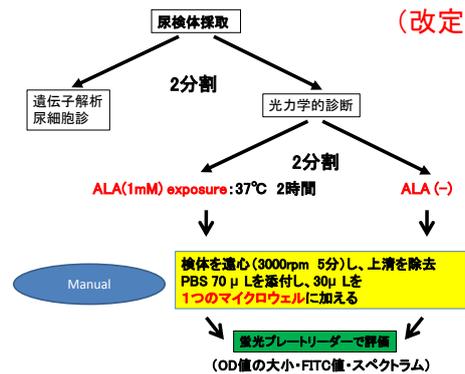


図 2-1-1-1-3 改訂版の陰陽性の判定

このため、同一検体を 5-ALA 処理および未処理に 2 分割したものを、それぞれ 1 つずつ自動分配する設定に変更し、1 検体あたりの含有細胞数が十分に確保できるようにし、5-ALA 処理した検体の OD 値が高い場合を陽性と判断し、この結果と 3 つずつ比較した結果とを比較した。(表 2-1-1-1-4)

### 膀胱癌蛍光細胞診の結果

(膀胱腫瘍手術症例の蛍光細胞診)

|  | 自然尿                             | 膀胱洗浄尿            |
|--|---------------------------------|------------------|
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content;">                     蛍光プレートリーダー<br/>尿細胞診<br/>(3Well)                 </div>                        | 客観的<br>(手動) 感度78%<br>(11/14)    | 感度91%<br>(11/12) |
| ↓  | 客観的<br>(診断装置) 感度28.5%<br>(4/14) | 感度22.2%<br>(2/9) |
| <div style="border: 1px solid black; padding: 2px; width: fit-content; background-color: red; color: white;">                     今回の検討<br/>(1Well)                 </div> | 客観的<br>(手動) 感度89.4%<br>(17/19)  | 感度100%<br>(4/4)  |
|  | 客観的<br>(診断装置) 感度50%<br>(2/4)    | 感度0%<br>(0/2)    |

(12例中8例はエラー)

表 2-1-1-1-4 1well と 3well の比較

蛍光プレートリーダーによる OD 値測定の際には、蛍光強度の Gain 値を設定する必要がある。このため、測定結果が「判定不能」となった場合、小型細胞診断装置側の制御ソフトにより蛍光プレートリーダーの Gain を自動的に下げていき、「判定不能」が出なくなるまで測定を行うよう設定を変更した。(表 2-1-1-1-5)

| GAIN | リファレンス<br>測定値 | 試料<br>測定値 | リファレンス/試料<br>Ratio |
|------|---------------|-----------|--------------------|
| 160  | 539           | OVER      |                    |
| 145  | 255           | 44844     | 0.0057             |
| 120  | 57            | 10766     | 0.0053             |
| 100  | 19            | 2773      | 0.0069             |

表 2-1-1-1-5 自動「GAIN」調整

これまでの蛍光細胞診の陽性判定基準の変遷をまとめると、図 2-1-1-1-6 のようになる。最終的に、今回設定した条件で、新規に作製した自動診断装置を用いた膀胱癌の検出感度は81.8%（11例中9例）であった。

## 蛍光細胞診の陽性判定基準の変遷

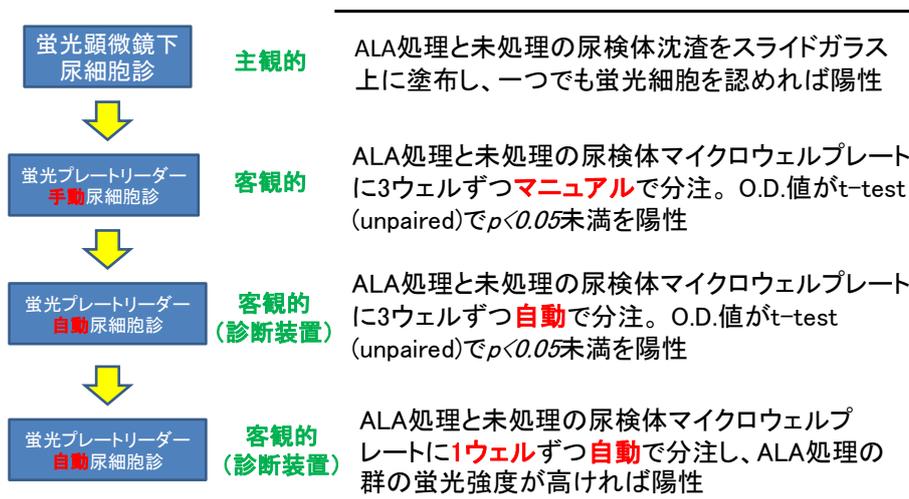


図 2-1-1-1-6 陽性判定基準の変遷

### 2-1-2 他臓器癌細胞の高速・高精度診断

本診断は他癌腫にも応用可能であり、尿路系腫瘍では前立腺癌について検討を行った。今回開発した自動診断装置での検証の変遷については図 2-1-1-1-6（2-1-1項）を参照されたい。蛍光顕微鏡による主観的な診断から、分光光度計による客観的な診断への以降の中で、陽性的中率については有意な低下は認めなかったが（表 2-1-2-1 参照）、感度については、旧プロトタイプ機の3ウェルを用いた場合、著明な悪化を認めた。そこで、1ウェルでの比較に移行し、感度の改善傾向を認めた。

## 前立腺癌蛍光細胞診の結果

(前立腺針生検結果と蛍光細胞診の比較)

|                               |               | PPV              | 感度               | 特異度             | 癌陽性率              |
|-------------------------------|---------------|------------------|------------------|-----------------|-------------------|
| 蛍光顕微鏡下<br>尿細胞診                | 主観的           | 77.9%            | 74.1%            | 70.2%           | 58.7%<br>(81/138) |
| ↓<br>分光光度計<br>尿細胞診<br>(3Well) | 客観的<br>(手動)   | 75.0%            | 62.5%            | 68.6%           | 60.0%<br>(24/40)  |
|                               | 客観的<br>(診断装置) | 64.3%            | 26.5%            | 84.4%           | 51.5%<br>(34/66)  |
| ↓<br>今回の検討<br>(1Well)         | 客観的<br>(手動)   | 62.5%<br>(10/16) | 45.4%<br>(10/12) | 50.0%<br>(6/12) | 47.1%<br>(16/34)  |
|                               | 客観的<br>(診断装置) | 88.0%<br>(8/9)   | 50.0%<br>(4/8)   | 0%<br>(0/1)     | 69.2%<br>(9/13)   |
|                               |               | (16例中3例はエラー)     |                  |                 |                   |

表 2-1-2-1 前立腺癌蛍光細胞診の結果

最終的には、今回作製した新プロトタイプ機により、表 2-1-2-2 の前立腺癌蛍光細胞診に示す結果となった。

以上より、膀胱癌のみならず、前立腺癌に対しても、患者検体を用いた検討で、高速かつ高精度な蛍光細胞診を行うことが可能となった。

## 前立腺癌蛍光細胞診の結果

(新自動診断装置で測定した結果)

|                       |               | PPV             | 感度              | 特異度            | 癌陽性率             |
|-----------------------|---------------|-----------------|-----------------|----------------|------------------|
| 新自動診断装置の<br>検討(1Well) | 客観的<br>(診断装置) | 69.2%<br>(9/13) | 64.3%<br>(9/14) | 55.6%<br>(5/9) | 60.9%<br>(14/23) |

表 2-1-2-2 前立腺癌蛍光細胞診の結果

さらに、尿路腫瘍のみならず、白血病、胃癌、大腸癌の培養細胞株を用いて検証をおこなった。Cell counter で細胞数を測定し、既定の細胞数に調整した検体を作成し、自動蛍光細胞診断を行った。すべての細胞株において細胞数に相関する蛍光強度が検出可能で、細胞数では 100 個レベルまで陽性の判定が可能であった。悪性腫瘍細胞の普遍的な特徴であるプロトポルフィリンIXの過剰蓄積を光力学診断により高精度で検出できたことは、本診断機器の高い有用性を示すものである。

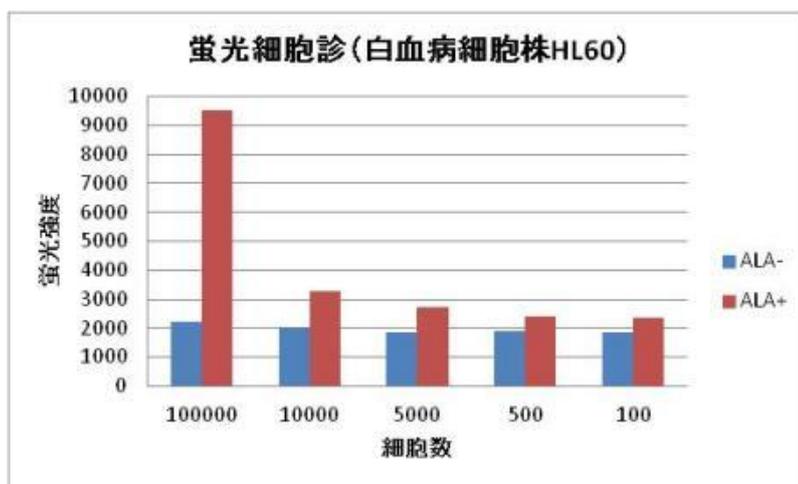


図 2-1-2-3 急性前骨髄球性白血病由来培養細胞 (HL60 株) の自動蛍光細胞診断

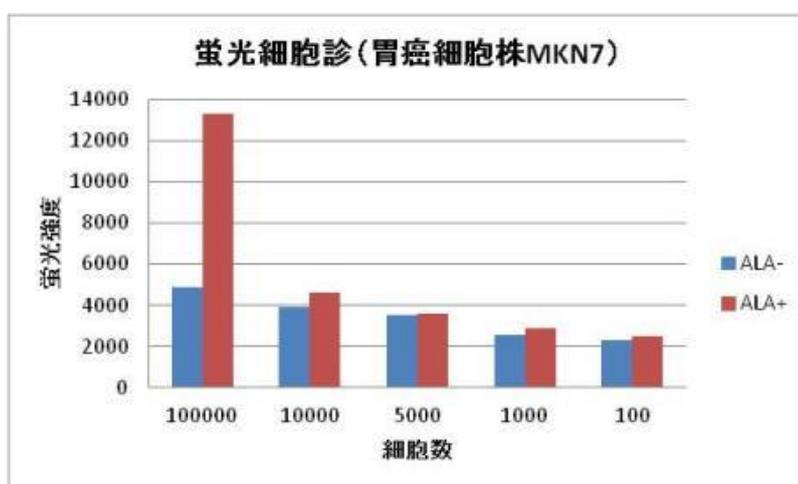


図 2-1-2-4 高分化型胃腺癌由来培養細胞 (MKN7 株) の自動蛍光細胞診断

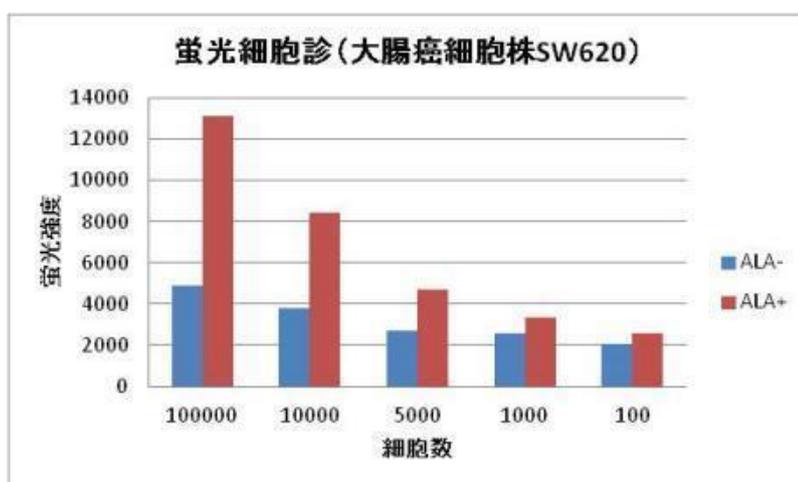


図 2-1-2-5 大腸腺癌由来培養細胞 (SW620) の自動蛍光細胞診断

### 2-1-3 間質細胞混入のない均一な癌細胞採取の評価

#### ① 均一な癌細胞採取について

間質細胞などを完全に排除して癌細胞を選択的に採取することは、遺伝子診断の精度の向上ならびに診断効率の改善に大きく寄与する。蛍光粒子を用いて分別採取率を検討した結果（2-3-1-③）、収集側、廃液側での蛍光ビーズ回収率は、改善後では69.1%、2.1%と大きく改善しており、今後、培養癌細胞に血管上皮細胞や線維芽細胞を混入させ、本機器の選択的分別能の検証を実施する予定である。

#### ② PpIX 陽性細胞における膀胱癌遺伝子解析

膀胱癌検体 29 例と、非癌検体 10 症例に対し、自動診断装置を用いた PpIX 陽性細胞における膀胱癌遺伝子解析を行った。膀胱癌に関する遺伝子解析は、染色体 9 番短腕、長腕、17 番短腕、および FGFR3 の遺伝子変異を pyro-sequence 法を用いて評価した。

非癌症例 10 症例は全ての症例で PpIX 細胞陰性と診断した。一方、癌症例 29 例中、PpIX 陽性と診断したのは 21 例で、そのうち 19 例に遺伝子変異を認めるも、2 例では遺伝子変異は認めなかった。また、PpIX 陰性と診断した 8 例中、5 例に遺伝子変異を認めた（図 2-1-3-1）。

#### Comparison of Fluorescence-cytology with genetic diagnosis

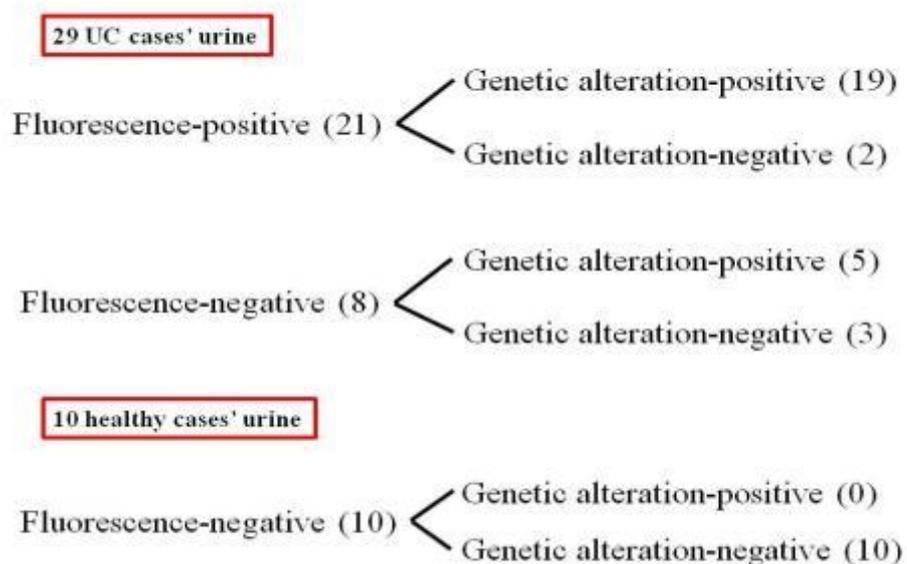


図 2-1-3-1 PpIX 陽性細胞における膀胱癌遺伝子診断の結果

遺伝子変異のあった 21 症例の詳細を図 2-1-3-2 に示す。

**Genetic alterations in 21 Fluorescence-positive cases**

| Stage | Grade | Cytoker | 9p   | 9q   | 17p  | FGFR3 |
|-------|-------|---------|------|------|------|-------|
| 2     | 3     | Neg     |      | Loss |      |       |
| 1     | 2     | Neg     |      | Loss |      |       |
| a     | 2     | Neg     |      | Loss |      |       |
| 1     | 3     | Neg     | Loss |      |      |       |
| 1     | 3     | Pos     | Loss |      |      |       |
| 1     | 3     | Neg     | Loss |      |      |       |
| 2     | 3     | Pos     | Loss |      |      |       |
| a     | 2     | Neg     |      | Loss |      |       |
| a     | 2     | Neg     | Loss |      |      |       |
| 1     | 3     | Neg     |      |      | Loss |       |

|   |   |     |      |      |      |     |
|---|---|-----|------|------|------|-----|
| 2 | 3 | Neg | Loss |      |      |     |
| a | 2 | Sus |      |      |      |     |
| 2 | 3 | Neg |      |      |      |     |
| 1 | 3 | Neg |      |      |      | Pos |
| 1 | 2 | Sus |      |      |      | Pos |
| a | 2 | Pos |      | Loss |      |     |
| a | 1 | Neg |      | Loss |      |     |
| 1 | 3 | Pos |      | Loss |      |     |
| a | 3 | Sus |      |      | Loss |     |
| a | 2 | Pos |      | Loss | Loss |     |
| a | 2 | Sus |      | Loss |      |     |

図 2-1-3-2 遺伝子変異の詳細

## 2-2 癌診断ワークステーションの小型化

### 2-2-1 ワークステーションによる試料作製の自動化の改良

多数の検体を同時に処理するための課題を抽出した。平成 22 年度のプロトタイプ機で、最大処理検体数を測定し、検体数を増やすための課題＝試料検体の効率的な動き等を抽出し、臨床現場での使用を考慮した改良作業を行った。改良にはハードおよびソフトの両面から高速化・小型化を図った。

目標とする検体処理速度は 12 時間/80 検体であった。小型細胞診断装置での処理速度は図 2-2-1-1 のタイムチャート（処理速度）に示す通り、12 時間で 80 検体を達成した。

#### ・主な改良点

##### ① 処理検体数

- ・ 試料台 : 40 検体処理後の空きスペースに追加してエンドレス
- ・ インキュベータ : 収納本数 20 検体→順次入替
- ・ 小型遠心分離機 : サンプルチューブ 2 本単位
- ・ 上澄み廃棄→希釈水の分注→攪拌→マイクロプレート 384well 分注 : 1 本毎
- ・ 蛍光プレートリーダーでの計測 : 384well 一括で数秒間の処理時間  
マイクロプレートの交換でエンドレスの運用
- ・ 陽性検体の保管 : 遮光された検体保管最大 15 本
- ・ 緊急検体の割込み操作

##### ② 機構部の高速化

XYZ 軸アームの高速化については、小型化による移動距離の短縮と処理ユニットの適正配置と蛍光プレートリーダーの分析時間の短縮及び待ち時間の縮小で達成できた。 図 2-2-1-1 小型細胞診断装置の外観写真と処理ユニットの配置を示す。

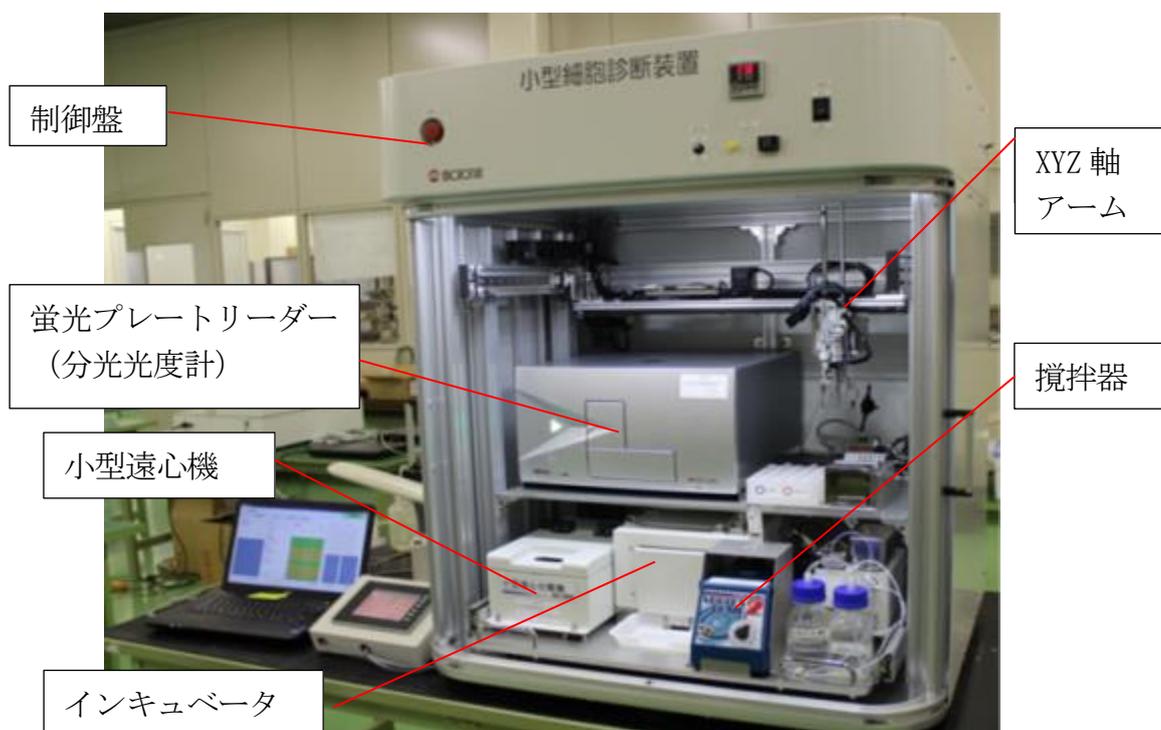


図 2-2-1-1 小型細胞診断装置の外観写真と処理ユニットの配置

### ③ 本体寸法の比較

図 2-2-1-2 に新旧の寸法図比較を示す、これにより容積で 1/3・設置面積で 1/2 になった。図 2-2-1-3 に容積と設置面積の計算値と写真を示す。

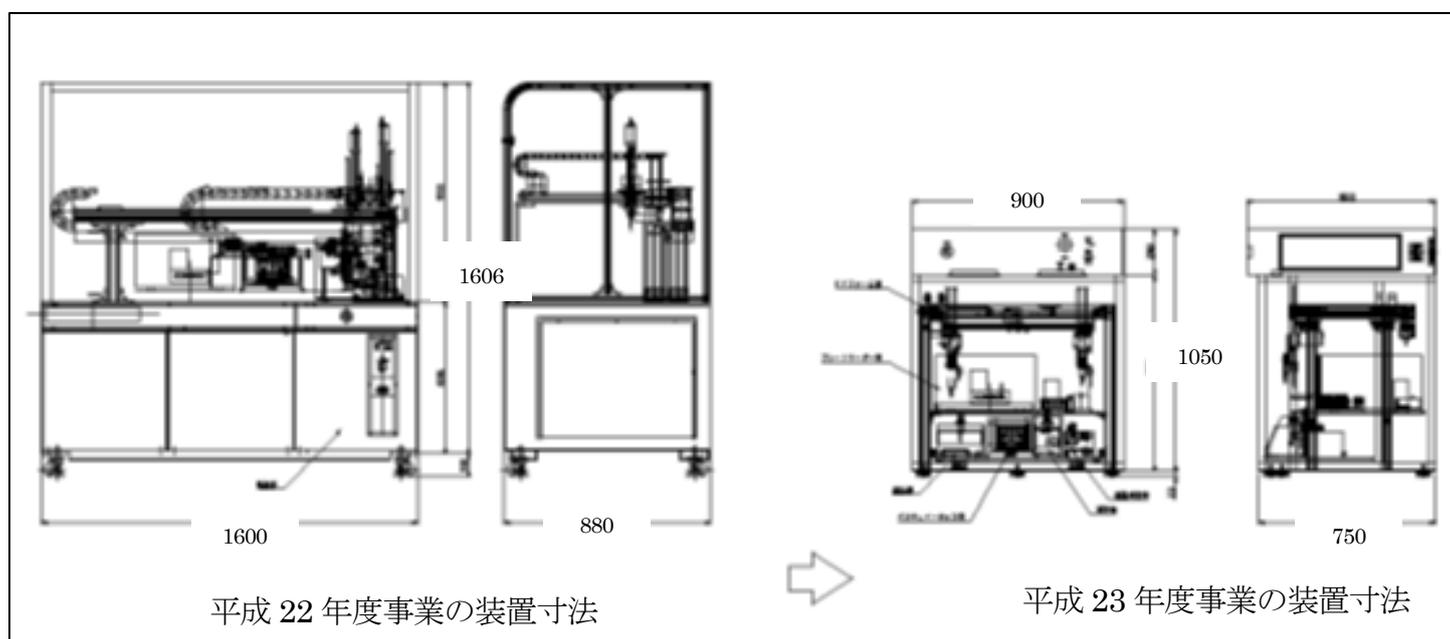


図 2-2-1-2 新旧の寸法図比較

容積比較 (幅\*高さ\*奥行)

前 :  $1600 \times 1606 \times 880 \div 2.26\text{m}^3$

現 :  $900 \times 1050 \times 750 \div 0.7\text{m}^3$

容積は約 1/3

設置面積比較 (幅\*奥行)

前 :  $1600 \times 880 \div 14.08\text{m}^2$

現 :  $900 \times 750 \div 0.7\text{m}^2$

設置面積は約 1/2



平成 22 年度の外観



平成 23 年度の外観

図 2-2-1-3 に容積と設置面積の計算値と写真

また、制御盤を本体の上に置くことにより設置面積をより有効に配置できた。

④ 小型遠心機の改良

試料に癌細胞に特有の蛍光を示す試薬 5ALA を細胞に取り込ませるための培養後、遠心分離させて上澄みを廃液する工程に必要な遠心機は装置内に設置する必要があった。自動化の障害はφ14mmL:40mm のサンプルチューブを 2 個吊り下げ、3000rpm で回転、停止、位置検出できる機能を新規に開発した。

2-2-2 割込み検査機能の追加

術中診断をはじめ、多くの細胞診断は至急に検査結果を求められることがあり、割込み検査の機能が不可欠である。検査の効率化を図り、装置の付加価値を高めた。

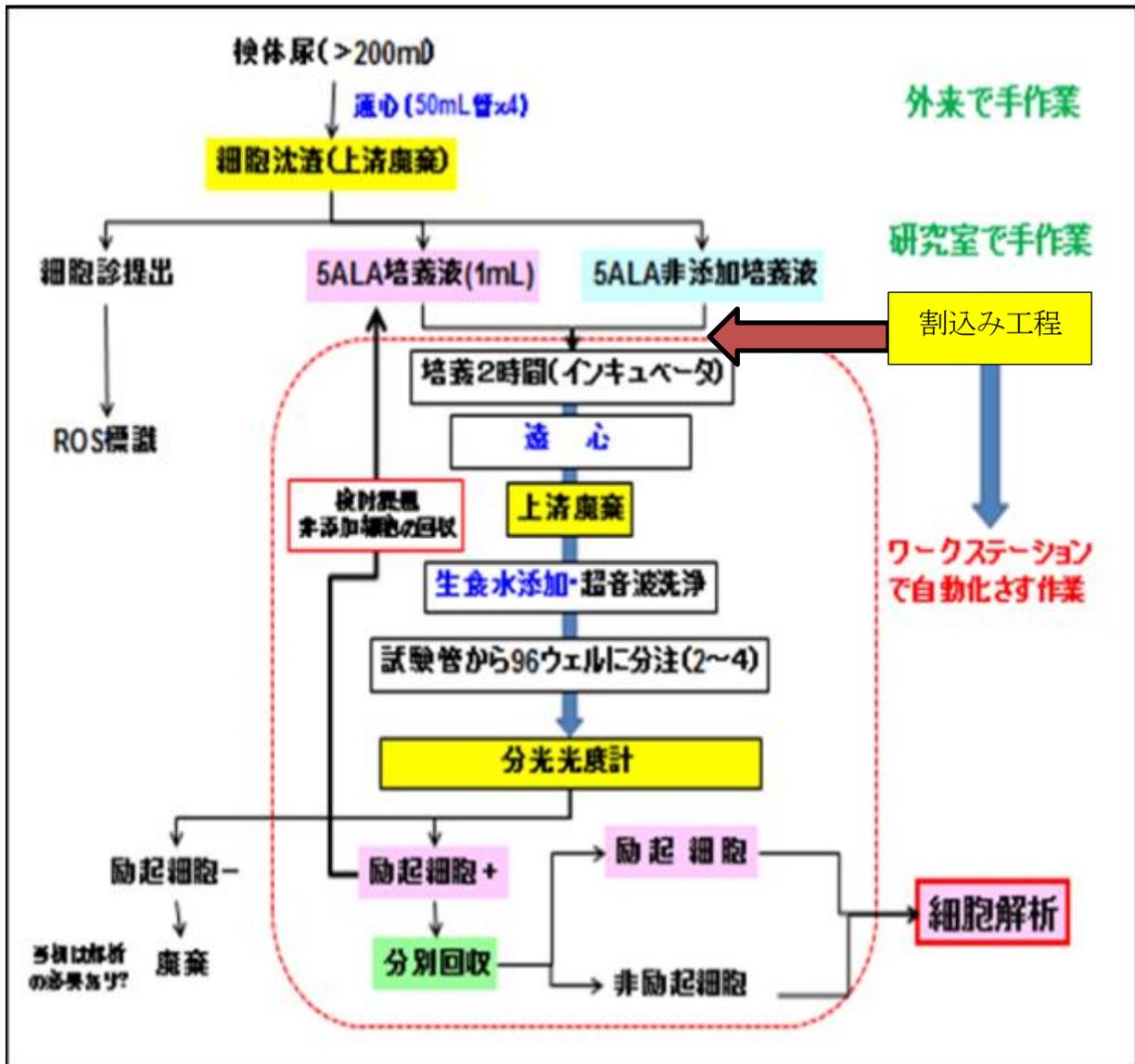


図 2-2-2-1 工程表

入院患者や外来患者からの検体尿 (約 200mL) を尿試験紙読み取り検査 (尿中の糖・蛋白・潜血・ウロビリノーゲン・pH・比重など) の後、病理診断部門で細胞沈渣検査するために遠心分離機で上澄みを廃棄し、沈殿した固形物を含む溶液 (50mL) から一般の細胞診を行うことと並行して今回、開発した「小型細胞診断装置」 (外観写真 図 2-

2-2-2) 用の試料として 1mL を 2 本、サンプルチューブ（写真 図 2-2-2-3）に採取し、装置内の試料台（写真 図 2-2-2-4）にセットする。

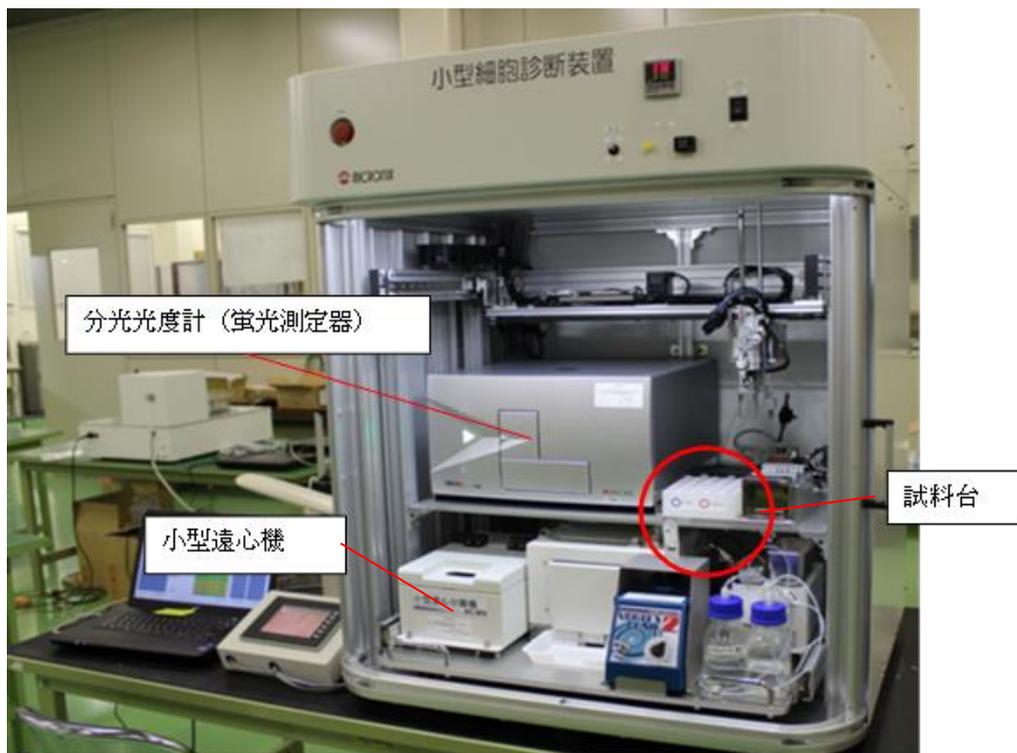


図 2-2-2-2 小型細胞診断装置の外観写真と試料台

この試料台の詳細配置と処理順は図 2-2-2-3 に示す。

検体の処理順は通常 1→40 の順に処理されるが図に示す黄色のセット位置（2 本）は割り込み用位置として空けておく、

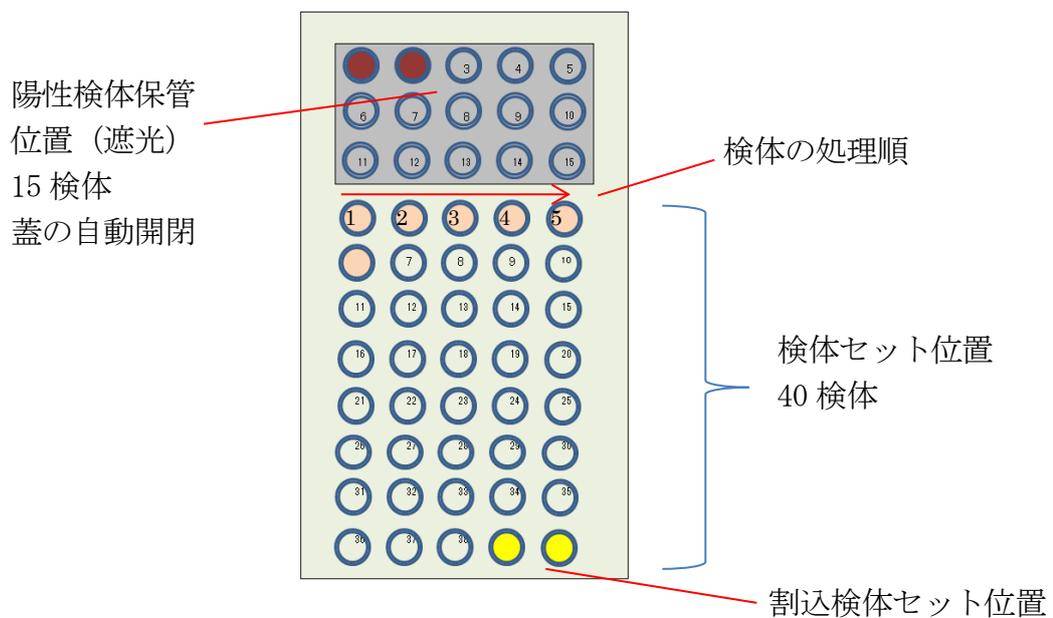


図 2-2-2-3 試料台の処理順

工程表のプロトコール（手順）（図 2-2-2-4 参照）の例を示す。

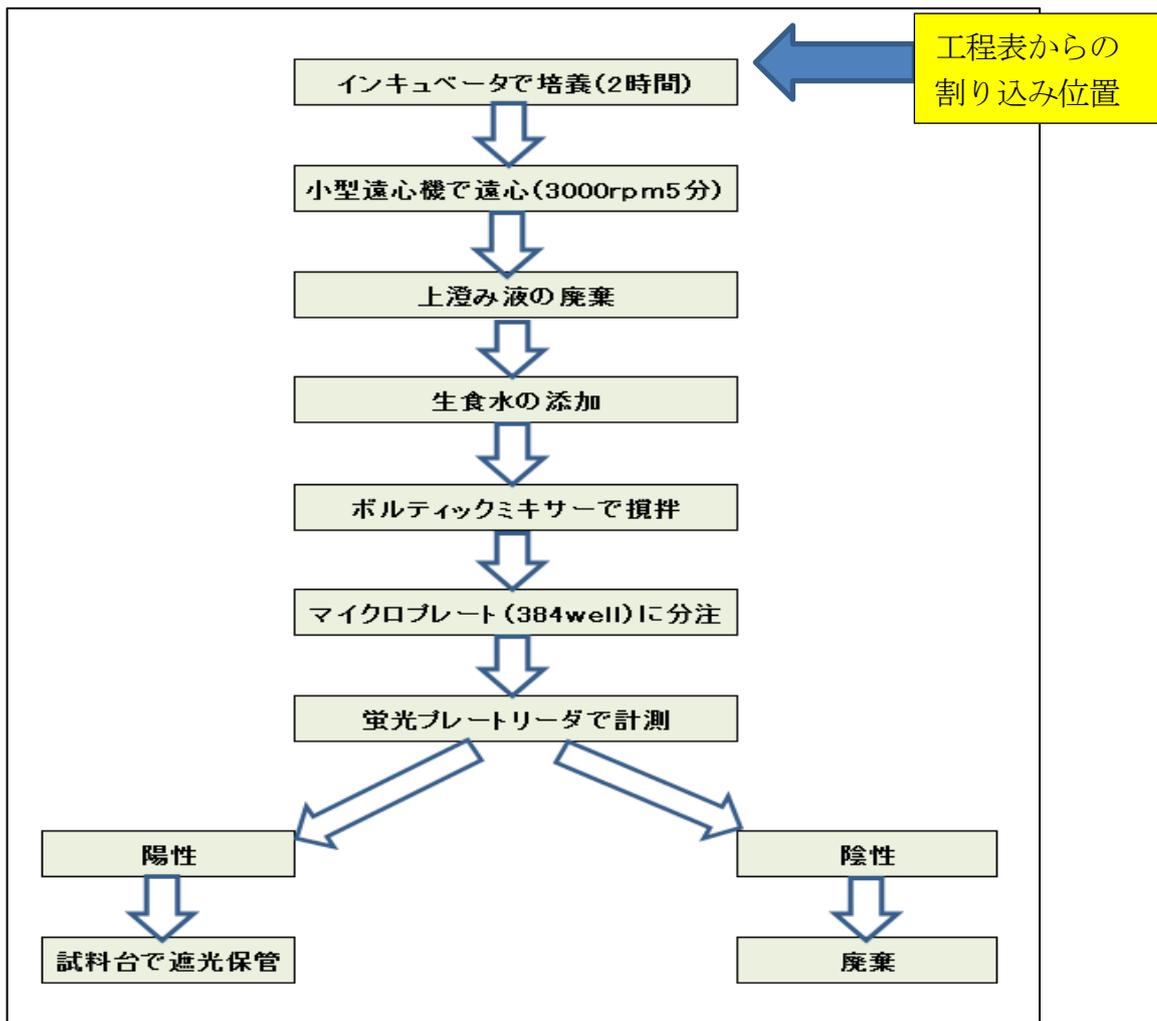


図 2-2-2-4 プロトコール例

計測にはマイクロプレートの各 well に対し、癌細胞を含む場合、402nm の励起レーザー光を照射すると微弱な 630nm の蛍光が検出され、一定の閾値を超えれば陽性と判定される。陽性になったサンプルチューブの検体は試料台の遮光された保管位置に移動させる。

この工程で、希釈水の分注などすでに次の工程に進行している検体はそのまま進行するが未検査の検体に対しては飛越して割込ませたい検体を先に工程表の手順に進めることができる。当然ながら未検査の検体はこの後に引き続き工程を進める。

**処理検体数**は原則エンドレスで測定が終了すれば試料台にセットし、PC 画面上に必要な情報を入力すれば継続して測定ができる。

## 2-3 癌細胞の分別採取の高速化

### 2-3-1 高速化のための条件の決定

#### ① 癌細胞の分散液の検討

希釈液には超純水、生理食塩水、シース液 (BD FACSFLOW Sheath Fluid) の3種類を検討した。本研究で用いたシース液は NaCl、KCl、 $K_2HPO_4$ 、 $Na_2$ -EDTA を含む緩衝溶液である。ボルテックスミキサーで2分間攪拌後、沈殿と凝集の様子を観察した結果、凝集・沈殿の度合いは、シース液、生理食塩水、超純水の順番で低いことがわかった。そのため蛍光粒子の分散液にはシース液を用いた。

#### ② 蛍光粒子での分別採取率の評価

高速化に向けて検討した結果が妥当であるかについて、事前に検討した表 2-3-1-1 に示す送液パラメータを用いて蛍光粒子を送液し、蛍光粒子 (ポリサイエンス社 Fluoresbrite™ Yellow Green (YG) Fluoresbrite YG Microspheres (粒子径: 20  $\mu$ m)) と無蛍光粒子 (ポリサイエンス社 Polybead Polystyrene Microspheres (粒子径: 20  $\mu$ m)) を用いて分別率を確認した。今回の実験では蛍光粒子を癌細胞、無蛍光粒子を廃棄する細胞と想定して、蛍光粒子の数をカウントした。また蛍光ビーズの濃度は2時間の送液によって、2000個の蛍光粒子が送液されるように調整した。

表 2-3-1-1 送液条件のまとめ

|               |               |
|---------------|---------------|
| 送液幅 (マイクロ流路幅) | 300 $\mu$ m   |
| マイクロ流路高さ      | 55 $\mu$ m    |
| サンプル送液量       | 1 $\mu$ l/min |
| シース送液量        | 5 $\mu$ l/min |
| バルブ待ち時間       | 0.2 sec       |
| バルブホールド時間     | 0.1 sec       |
| 初期・蛍光ビーズの割合   | 9.8 %         |

分別採取率の結果をまとめて表 2-3-1-2 に示す。実験結果から送液パラメータを最適化することで、分別採取率が 39%から 69%に向上し、大きく改善されたことがわかる。また改善後の実験においてフォトマルで検知した蛍光粒子の数は900個であり、収集側で回収された蛍光粒子の数は729個であるため、細胞検出モジュールによる回収率は69%である。

表 2-3-1-2 分別採取の実験結果の比較

|                  | 改善前           | 改善後           |
|------------------|---------------|---------------|
| 送液時間             | 2 時間          | 1.5 時間        |
| フォトマルで検知した蛍光ビーズ数 | 500 個         | 900 個         |
| 収集側での蛍光ビーズ       | 39.3% (375 個) | 69.1% (729 個) |
| 廃液側での蛍光ビーズ       | 2.8% (125 個)  | 2.1% (171 個)  |

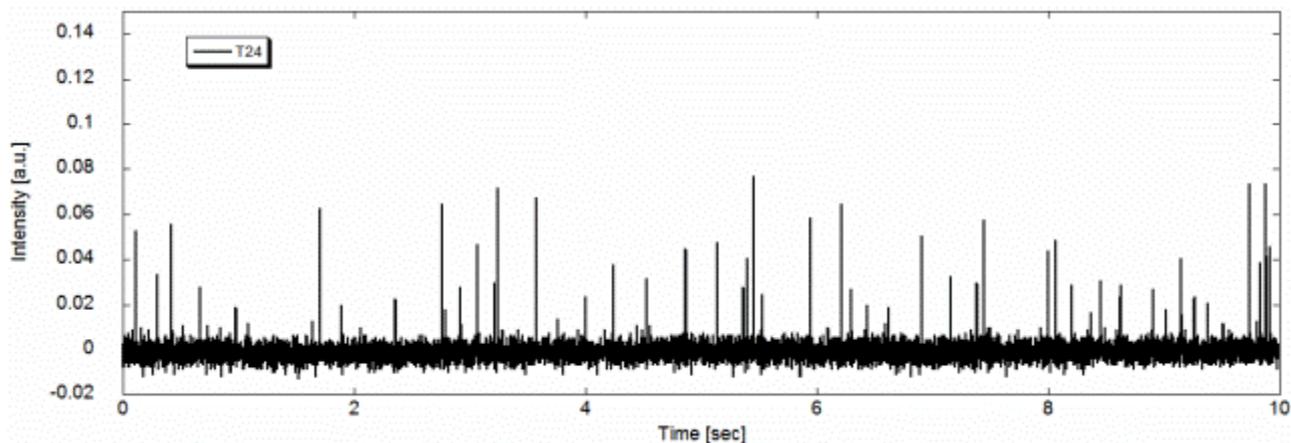
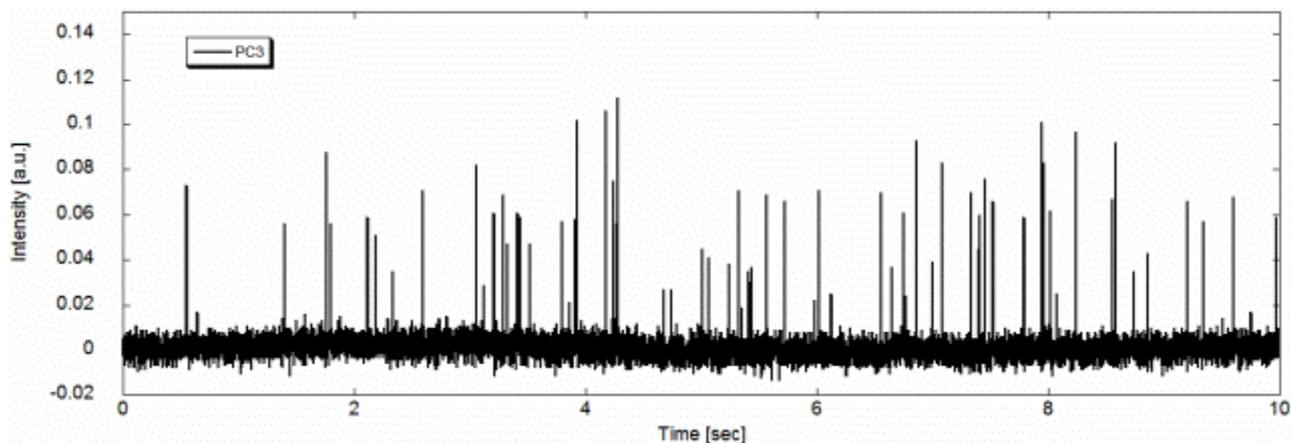
#### ③ 癌細胞を用いた基礎検討

- マイクロ流路内での蛍光強度

ALA 処理された PC3、T24、DU145、BT284 の 4 種類の細胞を表 2-3-1-3 に示した送液パラメータでマイクロ流路内に送液し、細胞検出モジュールで蛍光強度が検出できるか測定した。図 2-3-1-4 に示した実験結果では 4 種類全ての癌細胞で蛍光強度をフォトマルが検出できていることがわかる。

表 2-3-1-3 送液条件のまとめ

|               |                            |
|---------------|----------------------------|
| 送液幅 (マイクロ流路幅) | 300 $\mu\text{m}$          |
| マイクロ流路高さ      | 55 $\mu\text{m}$           |
| サンプル送液量       | 7 $\mu\text{l}/\text{min}$ |
| シース送液量        | 1 $\mu\text{l}/\text{min}$ |



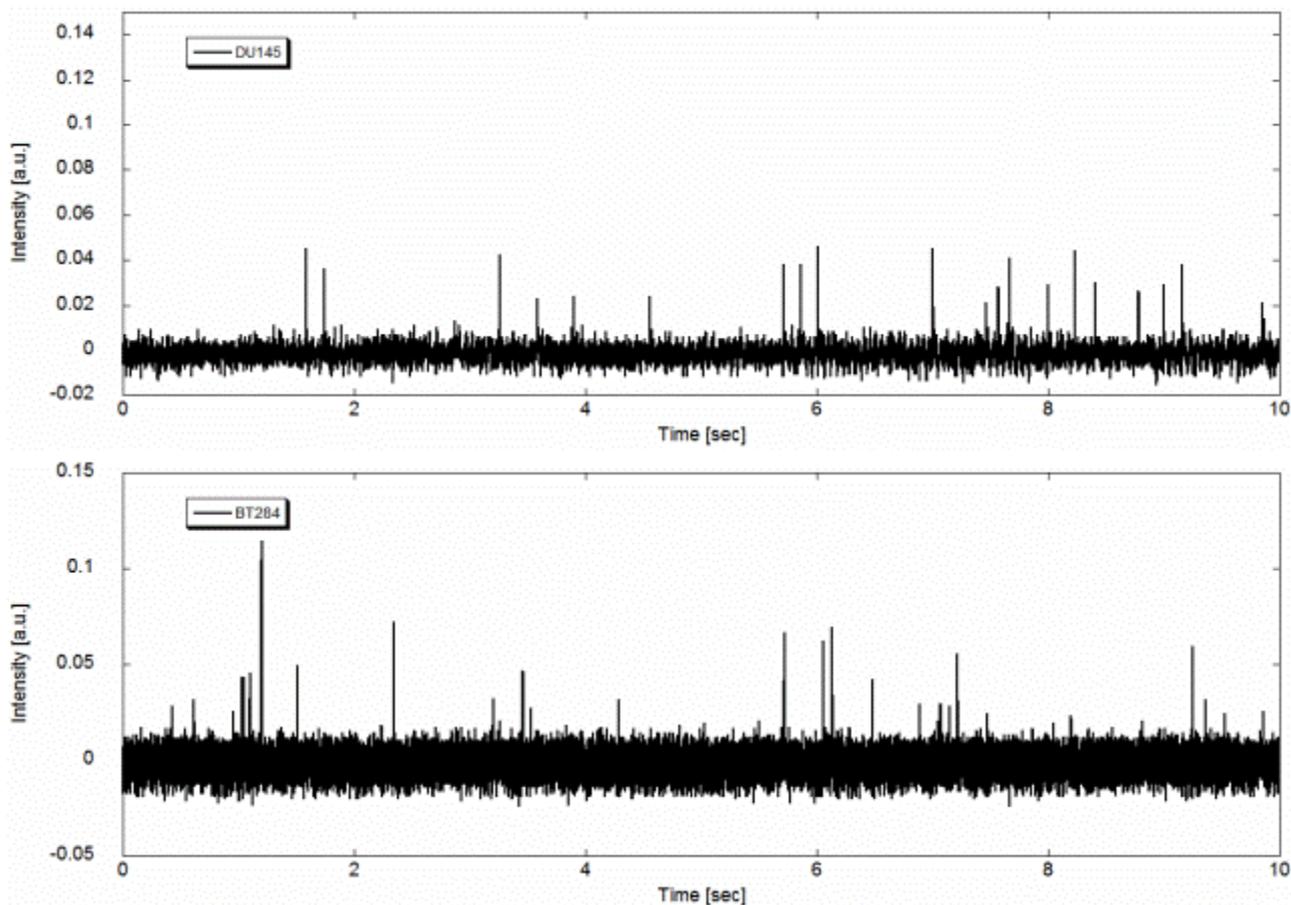


図 2-3-1-4 マイクロ流路に送液中の癌細胞の蛍光強度

## 2-3-2 MEMS 流路デバイスのマルチ化

### ① MEMS 流路デバイスのマルチ化に向けた検討項目

目標到達に向けての MEMS 流路デバイスのマルチ化を検討するために、まず蛍光染色された癌細胞の検出、分別を行う癌細胞検出モジュールを新規に構築した。以下、癌細胞分別用マイクロ流体デバイスとその周辺システムの写真を図 2-3-2-1 に示す。これらのモジュールを採用し、マイクロ流体デバイスの個数と細胞検出モジュールの個数を増加させれば、マイクロ流体デバイスのマルチ化には容易に対応できるものである。

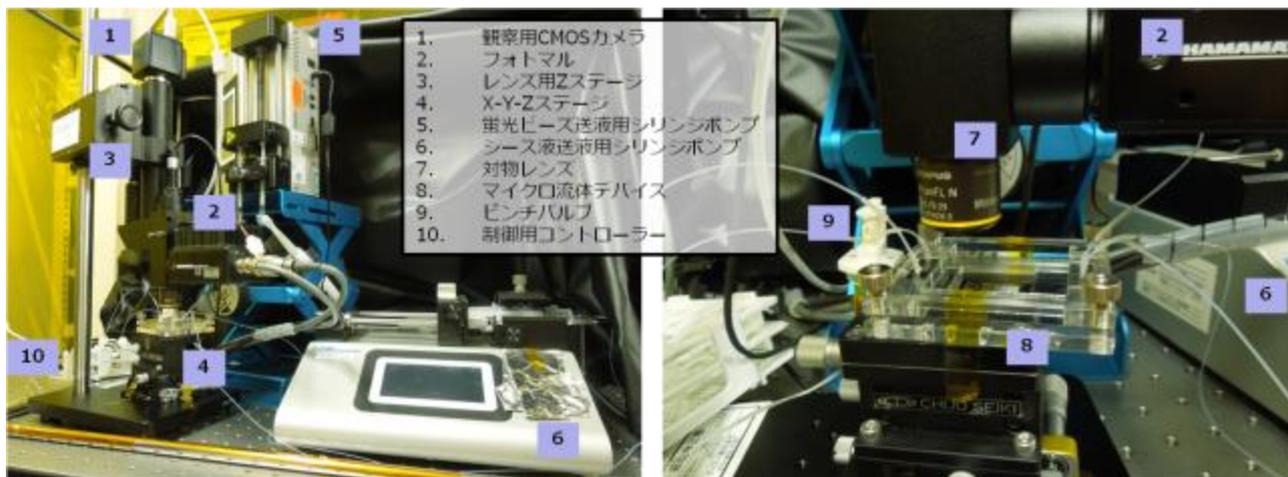


図 2-3-2-1 癌細胞分別用マイクロ流体デバイスとその周辺システム

## ②細胞懸濁液の送液速度の検討

細胞懸濁液の送液速度が速くなるにつれ、蛍光をフォトマルで感知するための十分な時間が得られない可能性がある。つまりスループットの向上を目標に細胞懸濁液の送液速度を速くすると、分別精度が悪くなるということである。そこで③の実験と同様に蛍光粒子の送液速度を変えて、分別精度を確認した（図 2-3-2-2 参照）。

図 2-3-2-2 に示した実験結果では、高スループットの送液パラメータに設定すると分離精度が 40%程度にまで低下することがわかる。これは細胞懸濁液の送液速度が速くなると、癌細胞の蛍光をフォトマルで検出できなくなることと、切替バルブに使用しているピンチバルブの性能に依存することが原因であると考えられる。以上の検討結果から、1つのマイクロ流路で対応可能な検体数を 70%程度の分別率で分別する場合、12 時間・80 検体の目標を達成するためには 20 本のマイクロ流体デバイスで対応すればよい。

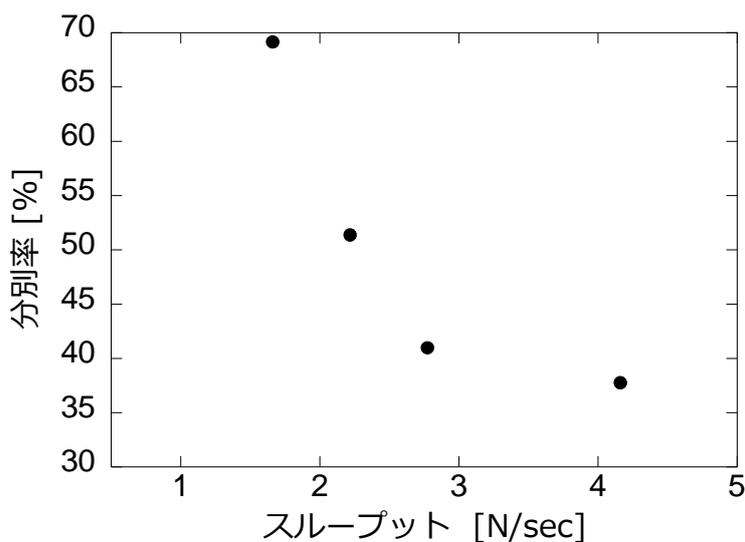


図 2-3-2-2 送液速度と分別率の関係

### 2-3-3 マイクロ流路の製作

#### ① 概要

膀胱細胞や赤血球が含まれる検体から癌細胞を検出、それらを分別するためのマイクロ流体デバイスとして、数十  $\mu\text{m}$  以上の膜厚を有するエポキシ系化学増幅型厚膜ネガレジスト（以下レジスト）を構造材料とし、紫外線フォトリソグラフィ技術に応用した MEMS 加工技術に着目した。本研究では京都大学・田畑研究室で開発された独創的な三次元加工技術である「移動マスク露光法」を適用してマイクロ流体デバイスを作製した（図 2-3-3-1 参照）。この加工技術に応用すれば、使い捨て可能なマイクロ流体デバイスが製品化できるため、被験者間での細胞のコンタミネーションが起りにくい高精度な診断を実現できる。

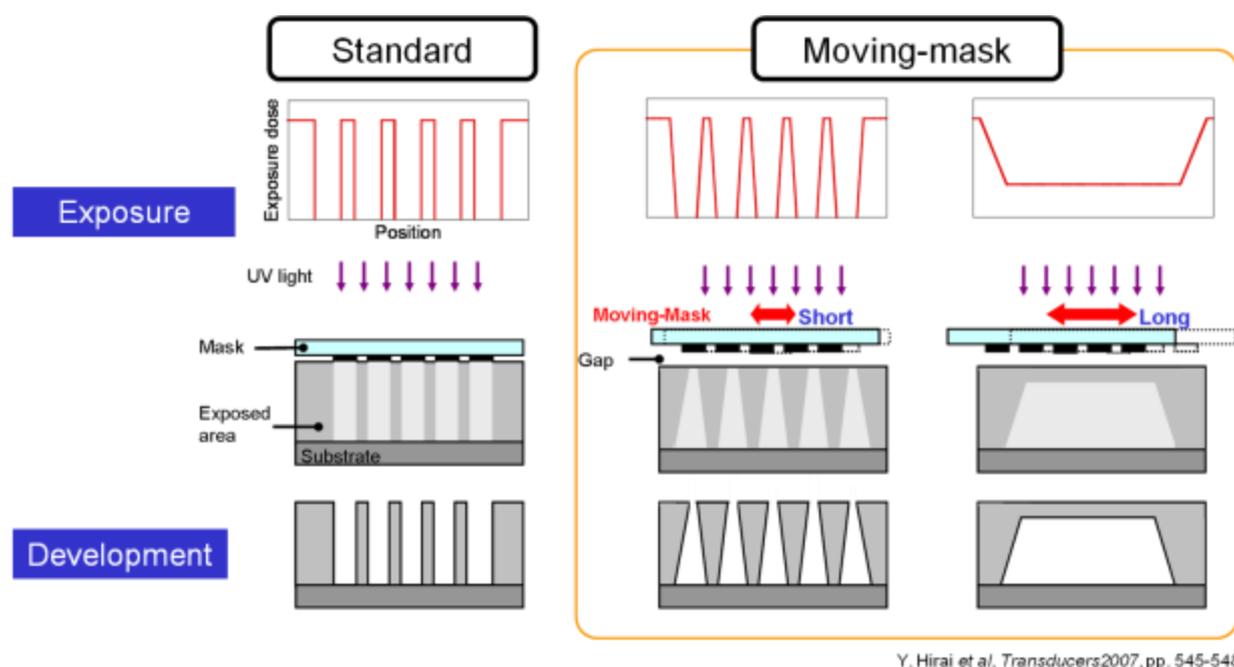


図 2-3-3-1 移動マスク露光法によるマイクロ流体デバイス加工

#### ② プロセス

マイクロ流体デバイスの構成材料には化学増幅型厚膜ネガレジストである TMMR-S2000（東京応化工業）を用いた。移動マスク露光法でマイクロ流体デバイスを作製するための手順を以下に記述する。まず、スピンドクターによりシリコンウェハ上に TMMR-S2000 を一定厚さに塗布する。その後、ホットプレートで加熱し、TMMR-S2000 内の溶剤を蒸発させレジストを安定化させる（プリベイク）。次に移動マスク紫外線露光機で露光を行う。この移動マスク露光法では紫外線露光の際にフォトマスクをレジストに対して水平方向に微小周期移動することで、レジスト表面の紫外線露光エネルギー分布の制御を行う。紫外線露光後のサンプルは再びホットプレートで加熱する（PEB: Post Exposure Bake）。その後、PM シンナーにて現像してマイクロ流路構造を形成した。

### ③ マイクロ流路の切削加工

マイクロ流体デバイスの作製に、近年、CADに基づく機械加工（NC 切削加工）を用いた研究も可能となってきており、そこで、NC 切削加工によるマイクロ流路構造の作製精度について検討を行った。

標的となる遺伝子の濃度は微量であるため、流路表面への試料などの非特異吸着が生じると擬陰性の要因となり大きな問題である。試料の物理吸着には、表面粗さが重要であるとの知見が得られていたため、今回は流路内壁の鏡面加工による平滑化を検討した。

鏡面加工の条件として、日進工具製 CBN スーパーサーフェースエンドミル  $\phi 0.5$  mm（コーナーR：0.05 mm）の1枚刃のエンドミルを利用し、60,000 rpm、切込み速度 30 mm/min、切削速度 200 mm/min、ピッチ 5  $\mu\text{m}$ 、切削深さ 4  $\mu\text{m}$  にて加工を行った。鏡面加工を行わない従来の流路内壁の表面粗さは、 $R_a=1.79$   $\mu\text{m}$  であったのに対し、鏡面加工を施すことにより、 $R_a=0.44$   $\mu\text{m}$  程度まで改善された（図 2-3-3-2 参照）。一方、産総研の所有する大規模レーザー加工装置により作製された COP 流路の表面粗さは  $R_a=0.59$   $\mu\text{m}$  であり、レーザー加工以上の平滑度を達成した。

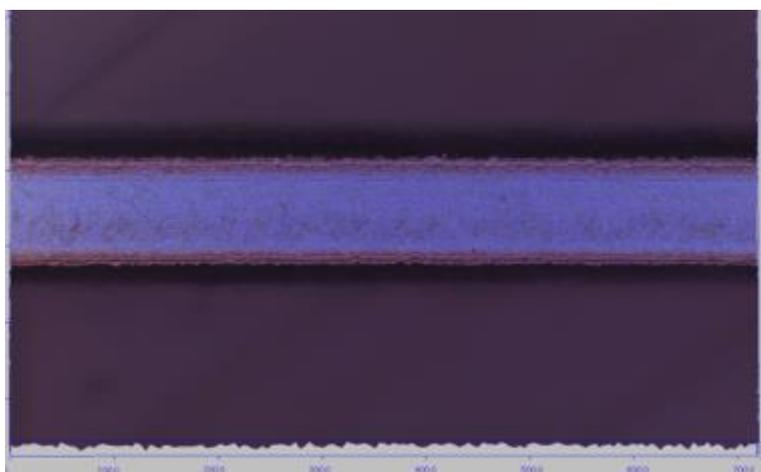


図 2-3-3-2 NC 切削加工により鏡面加工した流路内壁の共焦点顕微鏡像

### ④ マイクロ PCR プレートの作製

上記の NC 切削加工の条件に基づき、マイクロ PCR 用マイクロ流体デバイスの作製を行った。材質には PCR に必要な温度にも耐えられ、かつリアルタイム PCR における蛍光検出に適した透明性を有する COP を使用することとした。標準的なリアルタイム PCR の試薬キット（Takara CycleavePCR Core kit）を用いて流路幅及び深さと流路のピッチについて効率的な PCR が可能な条件を検討したところ、図 2-3-3-3 のような結果が得られた。マイクロ PCR において、標的 DNA の増幅に伴う蛍光増加が安定して最も高くなる条件として、流路幅及び深さが 400  $\mu\text{m}$  で、ピッチが 800  $\mu\text{m}$  の蛇行流路構造をマイクロ PCR プレートにて採用することとした。これにより、樹脂成形における型設計の構造が決定された。

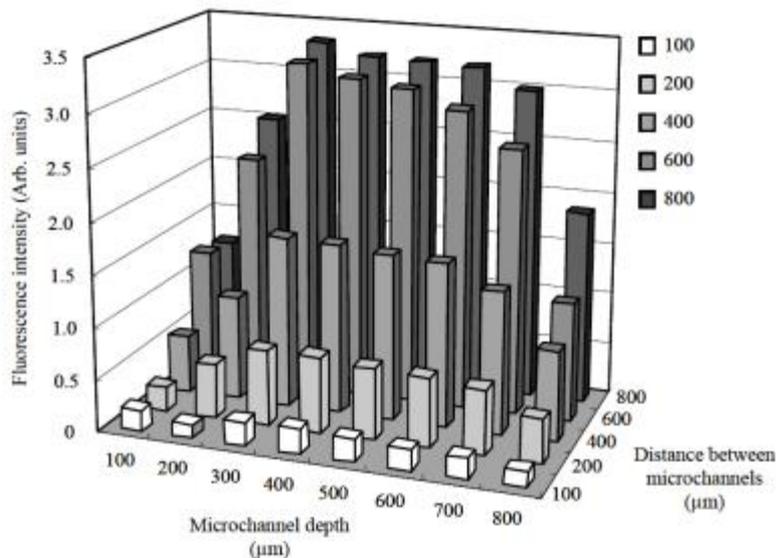


図 2-3-3-3 マイクロ PCR プレートを用いた高速 PCR における流路形状とピッチの比較 (Takara Cycleave PCR Core kit 使用。流速 70  $\mu\text{l}/\text{min}$  で 40 サイクルを 4 min で完了)

#### 2-3-4 マイクロ PCR プレートを用いた高速遺伝子診断

本検討は、少数の癌細胞から高速・簡便に癌特異的に生じる遺伝子変化を検出する系の作成を目的とした。PCR 法により、変異を生じた DNA のみを増幅させることで遺伝子変化の有無が判定可能であれば簡便な検出法となり得る。本検討では膀胱癌患者の尿検体から *FGFR3* 遺伝子の点突然変異の検出を試みた。*FGFR3* 遺伝子の点突然変異は非筋層浸潤膀胱癌の約 40% に生じる遺伝子変化であり、尿試料から比較的高頻度に検出可能である。

我々はこれまで PNA (peptide nucleic acid)-PCR clamp 法による *FGFR3* 遺伝子変異の検出法と膀胱癌診断精度について報告した。PNA は Taq DNA polymerase の 5'  $\rightarrow$  3' エキソヌクレアーゼに耐性で、PNA の相補鎖と強く結合でき、さらに 1 塩基のミスマッチで  $T_m$  が大きく減少するため、clamp primer としての使用に適している。すなわち、PNA を正常 DNA と相補的に作成することで、PCR 時において正常 DNA の増幅を阻害できる。今回 *FGFR3* 点突然変異の中でも特に頻度が高い Exon7、10 に clamp primer を作成し以下の検討を行った。

##### ① PNA-PCR clamp 法による遺伝子変異検出限界の検討

*FGFR3* 遺伝子 Exon7 の変異が既知である膀胱癌細胞株 (UMUC14) を用い、細胞数 10000 個から段階希釈で細胞数を減じた試料よりそれぞれ DNA を抽出した。PNA は 2  $\mu\text{M}$  とし、30 サイクルの PCR を行った。PNA 処理により 100 個以上の細胞から抽出した DNA ではアガロース電気泳動で変異遺伝子の増幅が確認できた。すなわち、被験者尿試料中に少なくとも 100 個の癌細胞が存在すれば本検出系で診断が可能である。

##### ② PNA-PCR clamp 法による遺伝子変異検出精度の検討

上記検討より得た PCR 産物を用い、パイロシーケンス法によるシーケンス解析を行った。既知の変異を有する膀胱癌細胞株は、Exon7 においては UMUC14 がコドン 249 変異を示

し、Exon10 においてコドン 375 変異を示した。本検討ではモノクローナルな癌細胞株を用いているため、上記コドンの変異を示す細胞の割合はほぼ 100%と定量された。

### ③ 膀胱癌および尿試料を用いた診断精度の検討

奈良県立医科大学附属病院泌尿器科で手術を施行された 165 症例(健常者尿 49 例)の癌組織と担癌状態での尿試料を対象とし、PNA-PCR clamp 法とパイロシークエンス法を用いて *FGFR3* 遺伝子変異の解析を行った。臨床試料には癌細胞と正常細胞が混在しているため、PNA-PCR clamp 法ではアガロース電気泳動で変異遺伝子の増幅を認めた場合を変異有りと判定し、パイロシークエンス法では変異遺伝子の割合が 5%を超えた場合を変異有りと判定した。両者の結果は全症例で一致し、本検出系が高精度であることを確認した。乳頭状非浸潤癌(Ta)では 44.2%の症例に *FGFR3* 遺伝子変異を認め、深達度の上昇に伴い検出率は低下した(表 2-3-4-1)。これらの検出率はこれまでの報告に比し遜色ない結果であった。尿試料においては、Ta 症例での検出率は 7.7%と低下し、深達度の上昇に伴い検出率は低下した。この結果は担癌状態の尿試料には癌細胞以上に正常尿路上皮細胞が含まれているため、癌細胞数の相対的低下に起因する。すなわち、DNA 抽出を行った試料中に癌細胞は 100 個以下であったと考えられる。一方、健常者尿からは変異は検出されず、特異度は 100%であった。

表 2-3-4-1 *FGFR3* 遺伝子変異を指標とした膀胱癌診断精度 (%)

| 深達度         | 膀胱癌  | 同一患者尿 |
|-------------|------|-------|
| 健常者尿 (n=49) | -    | 0     |
| Tis (n=1)   | 0    | 100   |
| Ta (n=52)   | 44.2 | 7.7   |
| T1 (n=39)   | 23.1 | 5.1   |
| T2 ≤ (n=24) | 8.7  | 0     |

### ④ マイクロ PCR プレートを用いた *FGFR3* 遺伝子変異検出の検討

*FGFR3* 遺伝子変異が膀胱癌の質的診断に有用であることが示されており、マイクロ PCR プレートを用いた *FGFR3* 遺伝子変異の検出を検討した。なお、野生型の Exon7 及び 10 の部分配列をそれぞれ pUC57 に挿入したプラスミド 2 種と、同配列の Exon7 のコドン 248 (CGC→TGC) 及び 249 (TCC→TGC) に点変異、また別に Exon10 のコドン 375 (tat→tgt) に点変異を加えた同等配列のプラスミド 2 種を合成し標準試料として使用した。

マイクロ PCR プレートを用いて遺伝子検出を行うためには、検出にリアルタイム PCR 法における蛍光増加を定量する必要がある。そこで、蛍光プローブ用いるリアルタイム PCR 法の系として、前述の 3 つの点変異をそれぞれ検出するための CycleavePCR プローブとプライマーセットを新たに設計した。

設計した CycleavePCR 法を使用した一例として、*FGFR3* 遺伝子の標準試料 (エクソン 10 のコドン 375 に点変異) に対して変異の検出を検討したところ、図 2-3-4-2 に示す通り、変異を含む標準試料に対してのみ蛍光増加が確認され、野生型に対しては、蛍光強度はネガティブコントロールと同等のままであった。このとき、マイクロ PCR プレートにおける PCR

溶液の流速は 40  $\mu\text{L}/\text{min}$  であり、40 サイクルの PCR 時間は約 7 分と、従来法の約 1 時間に比べ極めて高速な遺伝子増幅を実現した。これにより、*FGFR3* 遺伝子変異に対する高速な遺伝子診断への道筋が開けたものと期待される。

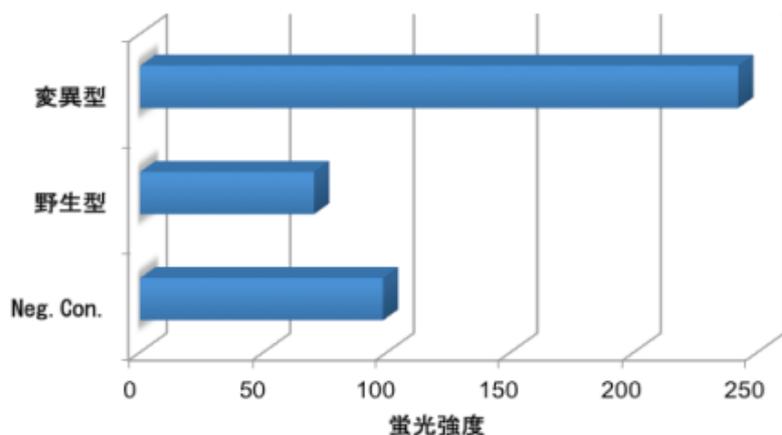


図 2-3-4-2 マイクロ PCR プレートを用いた *FGFR3* 遺伝子変異 (Y375C) の検出

⑤ マイクロ PCR プレートを用いたその他の癌関連遺伝子検出の検討

膀胱癌における *FGFR3* 遺伝子以外にも、各種癌に関連する遺伝子が幾つか知られており、肺癌における *EGFR* 遺伝子変異はその代表的なものである。そこで *EGFR* 遺伝子についてもマイクロ PCR プレートにて検出可能か検討を行った。

*EGFR* 遺伝子のリアルタイム PCR には既に TaqMan EGFR Exon 19 Detection Kit が市販されている。なお、同キットではあらかじめ TaqMan Mutation Detection Reference Assay Kit による遺伝子検出のための Ct 値の設定が求められており、本キットを用いてマイクロ PCR プレートにより遺伝子検出が可能か検討を行った。

マイクロ PCR プレートによる高速な遺伝子検出には、複製速度に優れた DNA ポリメラーゼが不可欠であるため、今回は、TaqMan Mutation Detection Reference Assay Kit のプライマー及び TaqMan プロブのみを利用し、DNA ポリメラーゼやその他試薬については、SpeedSTAR HS DNA ポリメラーゼを使用することとした。その結果を図 2-3-4-3 に示す。マイクロ PCR プレートによる高速な PCR 後、ポジティブコントロールにおいて明らかな蛍光増加が確認され、標的遺伝子の増幅による蛍光検出が可能であった。

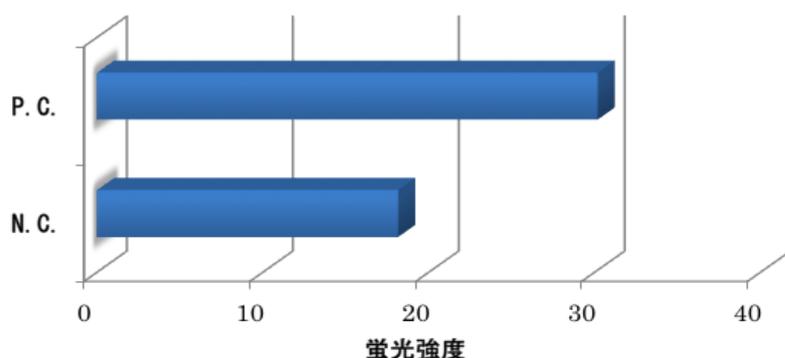


図 2-3-4-3 マイクロ PCR プレートによる *EGFR* 遺伝子変異検出のための TaqMan Mutation Detection Reference Assay Kit の結果

## 2-3-5 新プロトタイプ機製作

本事業で開発する装置を使用する川下産業は、主に病院や研究機関を想定している。使用する病院等では、小型の高性能装置が求められている。また臨床現場では、患者の各検査の結果から、より精密な検査の可否判断を迅速に行う要求があり、目的に応じた三種類の個別機器を開発した。マイクロニクス株式会社が新プロトタイプ機を製作または仕様書を作成・機器の製作し、京都大学田畑研究室と産総研関西センターで機能確認、改良を行い、奈良県立医科大学が臨床現場で性能の検証した。

### ① 癌細胞スクリーニング装置 = 小型細胞診断装置

尿中の沈渣処理後の試料から癌細胞の有無の判定

### ② 癌細胞分別採取装置 = 細胞検出器

陽性、または擬陽性になった試料の沈渣物の中から癌細胞を検出して採取する細胞検出器

### ③ 高速 PCR 解析装置 = 高速遺伝子診断装置

癌細胞の採取後その細胞の DNA を高速 PCR で増やして検出検証する装置

各装置の開発・製作・検証の役割分担の流れを図 2-3-5-1 に示す。

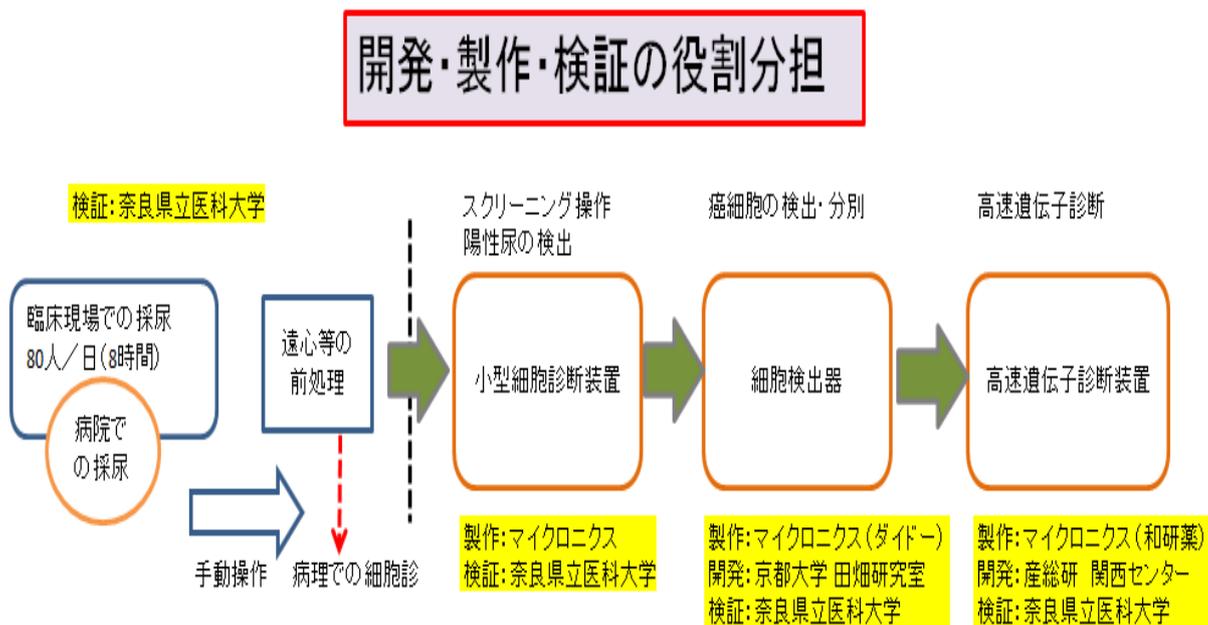


図 2-3-5-1 開発・製作・検証の役割分担の流れ

### ① 小型細胞診断装置

最終版の小型細胞診断装置の外観写真を図 2-3-5-2 に示す。



図 2-3-5-2 外観写真

## ② 細胞検出器

最終版の細胞検出器の外観写真を図 2-3-5-3 に示す。



蛍光検出用フォトマル

図 2-3-5-3 外観写真

## ③ 高速遺伝子診断装置

最終版の高速遺伝子診断装置の外観写真を図 2-3-5-4 に示す。



図 2-3-5-4 外観写真

## 最終章 全体総括

平成 23 年度第 3 次補正予算戦略的基盤技術高度化支援事業の「光力学診断とマイクロ流路を用いた小型高速癌細胞診断装置の開発」は、医療現場のニーズを工学・産業界のシーズ・技術を活用して開発した機器を医療の場で検証する医工・産官連携の実証例として、臨床現場で運用できる開発研究ができたので、その成果と課題を総括する。

癌細胞のエネルギー産生の特徴であるワールブルグ効果を利用した光力学診断を用いて、癌細胞のプロトポルフィリンIXの蛍光励起を検出して「存在診断」と MEMS 流路で癌細胞を選択的に採取し遺伝子診断で「質的診断」する特色のある細胞診断機器を開発することを目的とした。

小型化により汎用性と省力化が図られ、蛍光プレートリーダーによる精度向上により従来の尿細胞診を大きく凌駕し、膀胱鏡検査の頻度を減少させる可能性を明らかにした。また、尿路上皮癌以外の前立腺癌、白血病などの他臓器癌の診断への可能性を明らかにした。存在診断の精度向上は遺伝子診断の要否のスクリーニングに繋がっており、本システムの大幅な検体処理能力の向上に寄与する。

「質的診断」では、細胞分別採取の鍵となる MEMS 流路のシステム開発により現時点で選別率が 70%に向上し、今後、選択的癌細胞採取の精度向上が期待できる。小型化に関しては、選択的細胞採取装置は精度向上を追求するために現状では小型化には至っていないが、性能面の達成率は臨床現場で十分運用できるレベルに到達している。さらに、遺伝子診断において小型アルミトランクに収納できるリアルタイム PCR 機器が開発され、医療以外の多領域において活用されることも期待される。

臨床現場での成果として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。

| 項目        | 現状       | 22 年度実績と<br>川下業者のニーズ     | 高度化成果                       |
|-----------|----------|--------------------------|-----------------------------|
| 癌細胞検出精度   | 30-50%   | 80%                      | 85%以上                       |
| 癌細胞分別採取精度 | 30-50%   | 80%                      | 85%以上                       |
| 検体処理速度    | 数時間/1 検体 | 8 時間/50 人<br>(約 10 分/検体) | 12 時間/80 検体<br>(約 9 分/1 検体) |

今後は、採取装置の改良と価格面で一層の低廉化を図ることと、公立大学法人奈良県立医科大学と国立大学法人京都大学及び独立行政法人産業技術総合研究所からは、関連学会での論文発表と関連学会の機器展示またはポスター展示を積極的に進める。平成 24 年度において、すでに関連展示会の「BI0tech2012 - 第 12 回 国際バイオテクノロジー展」ならびに「第 15 回関西機械要素技術展 近畿経産局関西サポイン企業ブース」に展示、「ベンチャープラザ近畿でビジネスプラン発表会」に参加発表、「平成 24 年度産総研関西センター本格的な研究ワークショップ」の技術交流会に展示等積極的に PR 活動を進めている。来年度の関連学会や展示会に出展予定に伴い、カタログの整備や、医療用具の申請についてもクラス 1 での認可に向けて調査準備し、事業化を推進する。