

<全200> がん根治術中に於ける病理医不足問題を解決する がん迅速診断支援システムの開発

(委託先) 日本光電工業株式会社

(再委託先) 昭和オプトロニクス株式会社、電装産業株式会社、今井ゴム株式会社、
東京女子医科大学、がん研究会有明病院、東京工科大学

プロジェクトリーダー 日本光電工業株式会社 荻野記念研究所 所長 執行役員 山森伸二

サブ・プロジェクトリーダー 日本光電工業株式会社 荻野記念研究所 河田町研究室 室長 久保寛嗣

連絡先: 所属: 日本光電工業株式会社 荻野記念研究所 久保寛嗣

TEL: 03-5996-8018 FAX: 03-5996-8088

E-mail: Hirotsugu_Kubo@mb2.nkc.co.jp

1. 研究開発の背景と目的

現在、日本人における死亡率の3大要因の一つである悪性新生物(がん)は1981年以降、日本人の死亡率のNo.1となっている。がん治療法については、近年CT/PET等の画像診断の技術やナビゲーション技術の発達により、外科的手術が有効な治療となっているが、腫瘍を残すことなく摘出術を行うためには病理医が組織切片を術中迅速診断し、その結果をもって外科医が腫瘍摘出範囲を決定している。特に脳腫瘍(神経膠腫)においては腫瘍の悪性度が高くなるほど、正常組織に浸潤性に広がるため、術者は正常組織と腫瘍の境界を見極めながら、正常組織を傷つけることなく、腫瘍を摘出しなければならない。

本研究開発では、フローサイトメトリ技術を用いたがん組織の悪性度を定量的に計測する専用フローサイトメータ(以下がん迅速診断支援装置)と、その測定に用いる専用の凍結乾燥試薬を開発する。本装置は、今まで定量的な評価が難しかった組織診断に、組織悪性度の数値情報を付与することによって、より確実な術中迅速診断が行えるよう支援する専用フローサイトメトリシステムである。

当該研究期間にて本装置の開発ステージが達成する目標は以下の2点である。

- ① フローサイトメトリ法による基本測定技術の確立と量産試作機の開発、及びそれを用いた臨床評価。
- ② がん迅速診断支援装置に用いる専用凍結乾燥

試薬の開発

当該研究終了後に開発した装置、試薬、解析アルゴリズムの詳細な評価を行い、薬事申請のための治験データ取得を行う。最終的には薬事申請、承認後に装置に関してはクラスIの医用検体検査機器、試薬に関しては体外診断薬としての薬事申請、承認をとることを目標とする。

2. 研究開発の体制

本研究開発の事業管理機関を日本光電工業株式会社が担当し、再委託先である共同研究機関は以下の研究項目を担当し、以下の研究組織体制で行われる。

- ① 日本光電工業株式会社(再掲)
がん迅速診断支援装置とそれに用いる凍結乾燥試薬の開発。研究の全体統括。
- ② 昭和オプトロニクス株式会社
がん迅速診断支援装置に用いる光学ユニットの設計を担当。
- ③ 電装産業株式会社
細胞単離装置の開発を担当。
- ④ 今井ゴム株式会社
ディスプレイ細胞分離チップ開発を担当。
- ⑤ 東京女子医科大学
脳腫瘍組織解析アルゴリズムの評価。
- ⑥ がん研究会有明病院
消化器系組織解析アルゴリズムの評価。
- ⑦ 東京工科大学
病理所見との対応評価。

3. 研究開発の実施内容

3-1 研究開発の全体像

本研究開発では、フローサイトメトリ技術を用

平成 22 年度 課題解決型医療機器の開発改良に向けた病院・企業間の連携支援事業 成果報告概要
いた細胞核DNA量分析（以下 DNA Aneuploidy 解析）によるがんの悪性度、予後、悪性進行度の定量的な評価を実現することを可能とし、手術室での術中診断を強力に支援するがん迅速診断支援装置を開発することを目的とする。また、本測定装置に用いる専用凍結乾燥試薬を開発することにより、従来法では計測するために多くの時間と熟練の技術を要していた細胞前処理工程にかかる時間を大幅に短縮させることを目標とする。

3-2 <サブテーマ1：がん迅速診断支援装置本体の開発（日本光電工業株式会社）>

[実施内容]

- 【1-1】基本測定機構設計
- 【1-2】電気回路設計
- 【1-3】解析アルゴリズムの開発
- 【1-4】専用凍結乾燥試薬の開発
- 【1-5】非臨床評価

[実施結果]

DNA 量解析専用フローサイトメータの開発において下記を達成した。【1-1】にて基本測定系の流路開発、【1-2】にて信号処理系の電気設計、ソフトウェア設計を行った。本得研究では臨床用医療機器として開発を進めるための第一ステップとして、研究用機器として開発を進めた。作製された機器の環境温度サイクル試験、機械安全性試験、電氣的安全性試験としてのEMC試験を行い、いずれも想定の規定をクリアすることができた。平成 23 年末の段階で、研究用機器として開発工程を終了し、商品化審査のための手続き中。（平成 24 年 3 月審査終了予定）

【1-3】脳腫瘍解析用のアルゴリズム解析については、東京女子医科大学と共同で脳腫瘍組織の解析を行い、脳腫瘍での 81 症例 328 組織の解析では、感度 87.9%、特異度 87.9%の成績を得た。

【1-4】DNA 量解析専用凍結乾燥試薬（研究用試薬）の開発を行った。将来の体外診断薬としての開発に移行するための第一ステップとして、研究用試薬としての開発を行った。本試薬で特徴となる凍結乾燥工程の検証、工場での量産製造ラインの整備、試薬の基本性能確認試験を経て、有効期限決定のための保存安定性試験を行い、想定の基本性能、保存安定性をクリアすることができた。研究用試薬としては社内商品化審査をクリアし、開発工程を平成 23 年 12 月に終了。現在

は工場での生産移管を実施中。途中の量産試作で作製した試薬を基に継続して保存安定性試験、データ取りを継続している。

【1-5】機器、試薬を組み合わせた総合性能確認では、測定時間 8 分、測定精度についてはヒト末梢血単核球測定時の精密度 CV：3.0%以下を達成した。消化器組織での展開を図るため、ブタ動物組織を用いて、細胞単離性能、凍結乾燥試薬での組織染色具合、DNA ヒストグラムの解析を行い、試薬が想定通りワークし、DNA ヒストグラムを作成できることを確認した。

3-3 <サブテーマ2：光学測定性能の向上およびコストダウン（昭和オプトロニクス株式会社）>

本研究開発にて開発する、がん迅速診断支援専用のフローサイトメータに搭載するレーザー光源および光学ユニットの性能向上とコストダウンを実現するために、改良設計およびコストダウン設計を行い、研究成果として汎用フローサイトメータと同等以上の蛍光分解能が得られることと、コストが低減できることを明らかにする。

[実施内容]

- 【2-1】レーザー光源の高出力化
- 【2-2】照射光形状の最適化
- 【2-3】小型レーザー光源の開発
- 【2-4】光学ユニットのコストダウン
 - 【2-4-1】蛍光分析用受光光学系の最適化
 - 【2-4-2】レーザー光源の検査自動化
 - 【2-4-3】レーザーユニットのコストダウン
 - 【2-4-4】光学ユニットの検査自動化

[実施結果]

【2-1】レーザー光源の出力を 20mW から 80mW にアップすることにより、蛍光分解能が著しく向上したことを確認した。レーザー光源の高出力化においては、レーザー共振器の設計見直しと薄膜検査治具の導入により、その有効性が確認でき、高出力レーザーの安定生産が可能となった。

【2-2】ガウスビーム形状をDOE（回折光学素子：Digital Optics Elements）を用いたトップハットビーム形状とすることにより、照射光強度の均一化と照射光位置調整の容易化が図られた。

【2-3、2-4】コストダウンでは、汎用ICを用いて開発したハイブリッドコントローラを組込んだ電源一体型の小型レーザー光源、蛍光波長による色消しを不要と

平成 22 年度 課題解決型医療機器の開発改良に向けた病院・企業間の連携支援事業 成果報告概要
した蛍光分析用受光光学系、トップハット型DOEを用い照射光光学部品を簡素化したレーザユニット、レーザ光源および光学ユニットの検査自動化により、目標とするコスト削減の見通しが立った。

3-4 <サブテーマ3：ディスプレイ細胞単離チップの開発>

[実施内容]

【3-1】細胞単離装置の開発(電装産業株式会社)

各種生体組織への対応を目的として、ピペッティングによる細胞単離を実現すべく、ピペッティング条件が可変な細胞単離装置の開発を行った。

【3-2】ディスプレイ細胞分離チップの開発(今井ゴム株式会社)

がん迅速診断支援装置にて用いる、ピペッティングとろ過の機能を持ったディスプレイ細胞単離チップを開発した。

【3-3】単離性能評価(東京工科大学)

動物生体組織を対象として、ピペッティングによる細胞単離条件を探索する。

[実施結果]

【3-1】組織単離の最適化のための様々なピペッティング条件を設定し、各種の臓器に対応する最適値を探索するために本装置の開発を行い、各種条件にてピペッティングを繰り返し行うことが出来ていることを確認した。これにより、十分な細胞が取得可能な条件の探索を行うことが可能となった。

【3-2】本チップは、ピペッティングにより細胞を単離するためのチップ部と本体装置と接合するためのキャップ部、細胞ろ過のためのナイロンメッシュ部を有し、チップ部には組織詰り防止のための横穴を設けた。キャップ部はエラストマー樹脂で作成し、本体との接合時に気密性を確保した。ピペッティングによる組織の攪拌、気密性、メッシュによるろ過性能において、十分な性能であることは確認できた。

【3-3】【3-1】で開発した細胞単離装置のプロトタイプを使用して、ブタ大腸組織の細胞単離実験を行った。吐出速度とピペッティング回数を変化させたときの取得細胞数を評価した。吐出速度を早くしていくと取得細胞数は増える傾向にあったが、早くしすぎると細胞へダメージを与えた。また回数に関しては、いずれも取得細胞は 100cell/uL 以上の濃度となり十分量の細胞が確保できた。以上の条件であれば、組織から細胞

を単離するのに要する時間は、7 分程度であり、迅速診断として十分利用可能な時間であった。

3-5 <サブテーマ4：臨床評価>

[実施内容]

【4-1】脳腫瘍組織解析アルゴリズムの評価(東京女子医科大学)

脳腫瘍(神経膠腫瘍)における DNA ploidy 解析による迅速診断の可能性を評価する。

【4-2】消化器系組織解析アルゴリズムの評価(がん研究会有明病院)

消化器組織の ploidy 解析を行い、がん迅速診断の可能性を探索する。

【4-3】病理所見との対応評価(東京東京工科大学)

[実施結果]

【4-1】DNA ploidy 解析結果より、G0/G1 期細胞よりも DNA 量の増加した細胞の比率を Malignancy Index (MI) として定義し、WHO 脳腫瘍分類上のグレードと比較したところ、グレードが大きくなるにつれて MI も増加することが分かった。正常組織 (4.6 ± 2.6%) と腫瘍組織 (25.3 ± 22.0%) の MI には有意差があり、感度 88%、特異度 88%で判別可能であった。さらに各グレードの MI (grade II: 13.3 ± 11.0%、grade III: 35.0 ± 21.8%、grade IV: 46.6 ± 23.1%) にも有意差があることが確認され、10 分で解析可能である本手法は、迅速診断としても有用であることが示唆された。

【4-2】腫瘍組織中には DNA Aneuploidy が検出される症例・検出されない症例が存在した。さらに、正常組織中にも、DNA Aneuploidy 様の細胞が検出されたもの (pseudo-Aneuploidy) もあったため、DNA Aneuploidy 検出のみでの腫瘍の判定は困難であることが分かった。しかし、同一症例の正常・腫瘍組織の比較を行うことにより、正常組織と比較して腫瘍組織では G0/G1 期細胞の集団がブロードに存在する・デブリの領域の比率が増加する・DNA 増殖細胞比率が増加する等の変化が見られたため、それらの検出により腫瘍/正常の判別が可能である可能性が示唆された。

【4-3】病理所見との対比は【4-1】【4-2】と同時に実施された為、【4-1】【4-2】に内包。

4. 得られた成果

本研究により、フローサイトメトリ法による基本測定技術の確立を行い、本技術を用いた量産試

平成 22 年度 課題解決型医療機器の開発改良に向けた病院・企業間の連携支援事業 成果報告概要
作機を開発した。また、試作機に乗せるための解析アルゴリズムの評価を行い、脳腫瘍の解析アルゴリズムを構築できた。消化器系のがんに対しても解析アルゴリズムの基礎検討を行うことが出来た。さらに、量産試作機で用いるための凍結乾燥試薬を開発することが出来た。

5. 薬事対応の状況

薬事申請に関して、日本光電工業㈱内の品質管理統括部薬事管理課の担当者とディスカッションを行い、申請区分、治験の進め方についての助言をもらった。平成 24 年度以降での治験計画、薬事申請の計画について、計画策定を行うことで合意した。

6. 開発過程で創出した知的財産、新規技術等の成果

本事業開発品に関連する特許として、平成 20 年より 4 件の特許を出願している。今後も特許性のある案件に関しては積極的に特許化を狙う。

7. 開発した製品の市場性

組織の悪性度を数値化することにより、今迄視覚的な定性情報に頼ってきた病理診断に加え、客観的な定量データを術者に提供することが出来、画像診断情報・迅速病理診断情報と併せてより確実な腫瘍摘出が可能となると予測される。

8. 今後の事業展開計画

研究用機器、研究用試薬としての発売は 24 年度中に行う。本研究用機器、研究用試薬を用いて臨床データを蓄積する。同時に市場性を投資回収の評価を行い、社内審査を経て有効性が認められた場合、まず脳腫瘍領域において探索的治験を行い、薬事申請につなげていく。薬事承認が下り次第発売を開始する。

9. まとめ

本研究開発では、フローサイトメトリ技術を用いたがん組織の悪性度を定量的に計測する専用フローサイトメータと、専用の凍結乾燥試薬の開発を行った。本装置の開発により、今まで定量的な評価が難しかった組織診断に対し、組織悪性度の数値情報を付与することによって、より正確な術中迅速診断が行えるシステムが構築でき、がんの再発の防止、摘出部位の最適化により術後の患者 QOL の向上に寄与出来る可能性が示唆された。本研究期間に於いては、体外診断用医療機器、体外診断薬に展開するための研究用機器、研究用試薬を開発したが、非臨床での実

験、解析アルゴリズムの開発を通じ、医療機器としてのステップアップを踏むための下地が出来たと考えている。今後、臨床用の医療機器、体外診断薬としての開発を継続し、探索的治験、薬事申請と確実にステップアップを行うことで、癌治療の最適化に寄与していきたいと考える。

[引用文献]

- 1) 高本滋、鶴澤正仁、中内啓光、他;FCM による DNA Aneuploidy 検索のガイドライン; CytometryResearch19 (1);1-9,2009
- 2) Kawamoto K, Herz F, Wolley RC, Hirano A, Kajikawa H, Koss LG. Flow cytometric analysis of the DNA distribution in human brain tumors. Acta Neuropathol.46(1-2):39-44, 1979.
- 3) Mesiwala AH, Scampavia LD, Rabinovitch PS, Ruzicka J, Rostomily RC. On-line flow cytometry for real-time surgical guidance. Neurosurgery.;55(3):551-560, 2004.

[研究発表]

- [1] 永井 豊 et al., 核酸染色による新しい FCM 技術への取り組み, 第 21 回 日本サイトメトリー学会学術集会, 2011 年 6 月 25 日(土)-26 日(日)
- [2] 塩山 高広 et al., 神経膠腫の術中迅速解析のためのフローサイトメトリーによる腫瘍悪性度判定の検討, 社団法人日本脳神経外科学会 第 70 回学術総会, 2011 年 10 月 12 日(水)-14 日(金)

[特許申請]

- [1] 特願 2008-119269 『診断装置及び診断システム』 診断の自動化システム
- [2] 特願 2009-244702 『細胞処理の製造方法、細胞核 DNA 量測定方法及びその測定に用いるキット』 自動解析に用いるキット
- [3] 特願 2010-189919 『細胞単離機器』 細胞を単離するためのユニット
- [4] 特願 2010-189920 『細胞解析装置及び細胞解析方法』 細胞解析の手法

