

平成24年度
課題解決型医療機器等開発事業

「血液によるがんの早期発見に必要な安全・
簡便・高感度・低価格な機器の開発」

成果報告書
(要約版)

平成25年2月

委託者 経済産業省

委託先 財団法人石川県産業創出支援機構

目 次

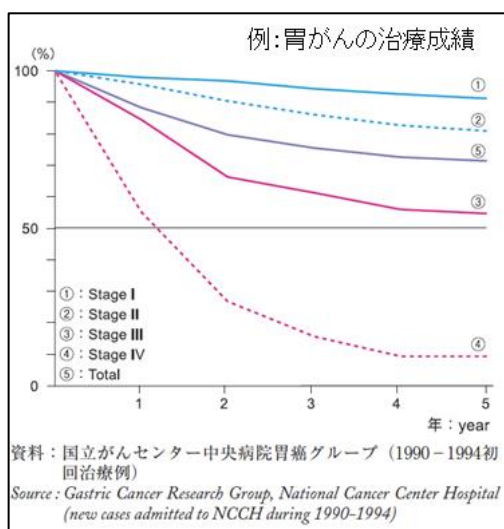
第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・目的・平成24年度の概要	1
1-2	研究体制	5
1-3	当該プロジェクト連絡窓口、所在地	8
第2章	本論	
2-1	マイクロアレイ法とPCR法との同等性検証	10
2-2	低価格・短時間となる検査条件の確立	11
2-3	試薬分注工程の自動化	12
2-4	磁気ビーズによる血液検体処理工程の確立	13
第3章	まとめ	
3-1	平成24年度	14

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

<研究開発の背景>

がん患者数は年々増加しており、昭和56年より日本人の死因の第一位となっている



・5年生存率（例：胃がん）

ステージⅠ（早期がん）：90%以上

ステージⅣ（進行がん）：10%以下

・がんの治療費総額試算（5年生存時）

ステージⅠ（早期がん）：88万円

ステージⅣ（進行がん）：280万円

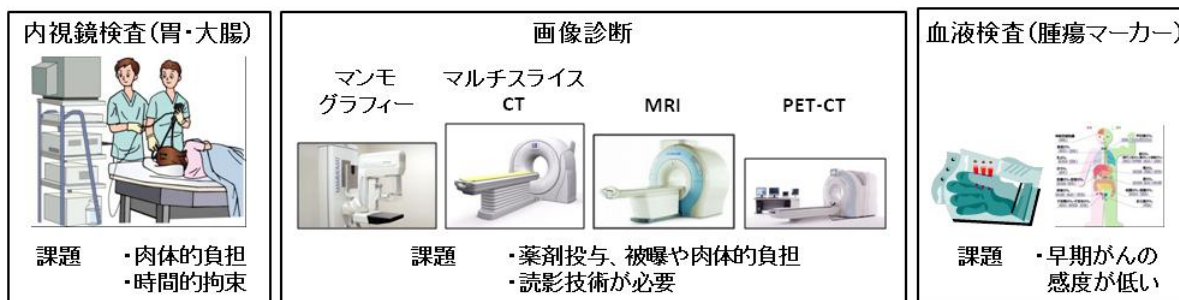
がんの治療には早期発見が極めて有効である

がんに罹る日本国民は近年増大しており、医療費もそれに伴い増大しているが、がんの早期発見によって患者の予後を大きく改善し死亡率の低下と治療費の軽減による医療費の削減が可能となる。がん対策基本法が平成19年4月に施行され、がんの早期発見を目的として、がん検診の受診率を50%以上にすることが目標とされている。

がんの早期発見

☆ がん検診の受診率について、50%以上とする【5年以内】

現在、がん検診における低受診率の原因は内視鏡検査法や画像診断法（CT、MRI、PET-CT等）におけるX線被曝への抵抗感・身体的負担・時間的拘束・経済的負担等である。また腫瘍マーカーによる血液検査は簡便であるが、感度・特異度が低く早期がんの発見には不適である。これらの課題をふまえ、がん検診受診率を飛躍的に向上させるには既存の検査法の弱点を大幅に改善した、安全・簡便・高感度・低価格で、かつ高精度・大量検体処理可能な新しいがん検査技術とそれを実現する診断機器が必要である。血液を検体としての検査では、非常に簡便で受診者に



としては安全性が高い。金沢大学恒常性制御学講座と株式会社キュービクスでは、マイクロアレイを用いて血液中の遺伝子発現パターンの解析により、消化器がんを高い精度で診断する消化器がん診断用マーカー遺伝子（以下、金沢大学がん診断マーカー）を発見、消化器がん検査方法の開発に成功している。先行研究（BBRC 2010;400:7-15）における validation サンプルでの結果、同方法の感度は 100%（37/37）、特異度は 86.7%（13/15）であり、既存の腫瘍マーカーによる血液検査と比較して非常に高感度であった。

平成成 23 年 8 月より、株式会社キュービクスにおいて上記金沢大学がん診断マーカーを用いた消化器がん検査が既に事業化されており、これまでに東京都、大阪府、石川県などの 20 以上の医療機関の医師の裁量の元で 200 例ほどの依頼を受けて、検査を行っている。そのうち、早期大腸がん 1 名、すい臓がん 1 名を発見できた。早期大腸がん症例は、すぐに内視鏡による切除でがんの完全除去ができた。これこそまさに早期診断早期治療の実践の良い例であった。マイクロアレイや試薬が高価なため検査費用（自由診療）は 6~10 万円であるが、医療現場や受診者からのニーズはさらに高くなっている。しかし、この検査デバイスとしてのマイクロアレイ検査では、原価が高額で、スキャナやオープン、データ解析ソフトなどいくつもの装置、コンピュータやソフトウェアの操作が必要であり、検査の手技や原理の理解といった知識・技術習得の必要があるため、すぐに医療現場に導入し、多くの検体処理に対応することは困難である。

これらの課題を克服する方法は

- ① 人手による手作業工程のない自動化検体処理方法の開発
- ② 一般的で安価な専門的知識を必要としない PCR 法を利用した検査方

法の開発

この2つの開発により自動検査システムを完成させ、消化器がんの血液検査をより安く、自動で検査できるシステムを導入する。

マイクロアレイ法とPCR法はともに遺伝子の発現パターンを測定する方法で相関性が高いが、マイクロアレイ法は全遺伝子の網羅的な検査を行うのに対し、PCR法では必要な遺伝子だけを絞り込んで検査を行うことが可能である。マイクロアレイ法は費用が高く作業工程も多く、時間（現状：72時間）がかかりコストダウンには向かないが、PCR法を用いることで工程数が少なくコストダウンも容易となり、安全・簡便・高感度・低価格な改良医療機器の開発が可能である。

<研究開発の目的>

血液検査で消化器がんを高感度で発見できる消化器がん診断マーカー遺伝子が金沢大学恒常性制御学講座により発見され、研究成果が学術誌に発表された。また、株式会社キュービクスによりこれらの研究成果が事業化され、医師の裁量のもと血液による消化器がんの検査が開始されている。この技術をさらに発展させ、以下の2つの開発を行う。

- ・PCR法を利用した検査方法の開発
- ・手作業工程のない自動化検体処理方法の開発

この2つの開発を合わせ、消化器がんの血液検査をより安く、自動で検査できるシステムを開発することが本事業の目的である。

<平成24年度の概要>

がん検査の低受診率の原因であるX線被曝への抵抗感・身体的負担・時間的拘束・経済的負担などを克服するため、PCR法を用いて血液だけでがん検査ができる検査技術の開発を行う。検査の対象としては、消化器がんである胃がん・大腸がん・膵臓がん・胆道がんである。

この開発により、検査に使用される試薬一式としての消化器がん A.検査キットを完成させ、安全・簡便・高感度・低価格な検査が可能な体外診断薬としての薬事承認申請を目指すものである。またこの検査キットによる自動で検査が

可能となる B.自動検査装置を医療機器として開発する。

以下に A.、B.ごとの内容を列記する。24 年度は①②③④の4項目について実施する。

A.消化器がん検査キット

＜診断マーカー遺伝子の選択＞

①マイクロアレイ法と PCR 法との同等性検証

- ・消化器がん診断マーカー遺伝子の最適組み合わせの検証

＜PCR 検査工程の確立＞

②低価格・短時間となる検査条件の確立

③試薬分注工程の自動化

- ・自動化 PCR 検査における感度の検証

＜検体処理技術の安定化＞

④磁気ビーズによる血液検体処理工程の確立

- ・磁気ビーズ処理工程の自動化
- ・一貫した自動検査工程の確立及び動作・感度検証

＜薬事関連＞

- ・消化器がん診断メカニズムの解明
- ・論文投稿・特許申請
- ・治験
- ・薬事申請

B.自動検査装置

＜ソフトウェアの開発＞

- ・検査結果自動出力ソフトウェアの開発

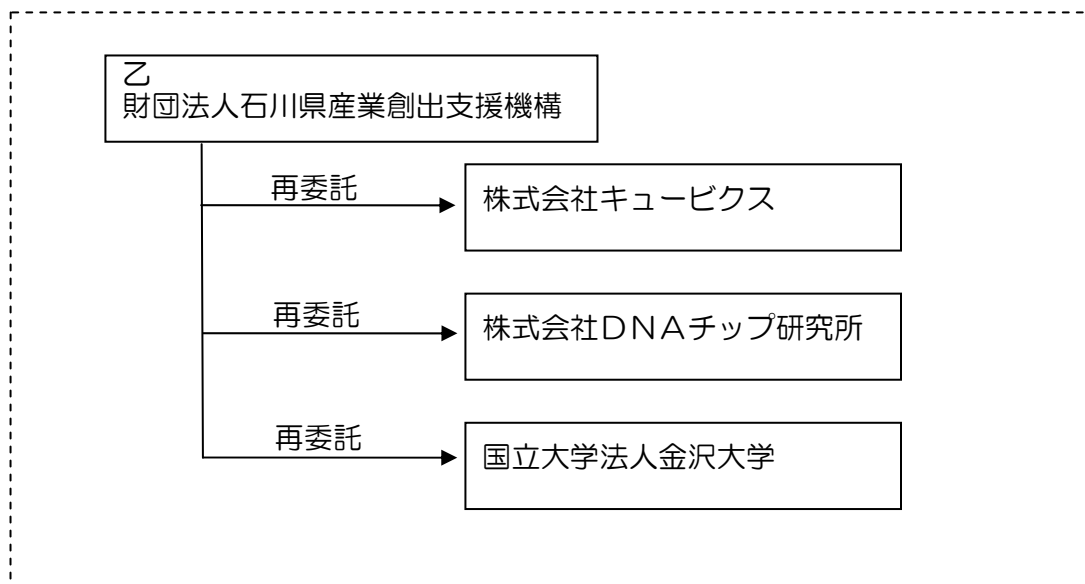
＜装置の開発＞

- ・自動検査装置の設計・試作
- ・性能検証試験
- ・医療機器届出

1-2 研究体制（研究組織・管理体制・研究者氏名・協力者等）

(1) 研究組織及び管理体制

1) 研究組織（全体）



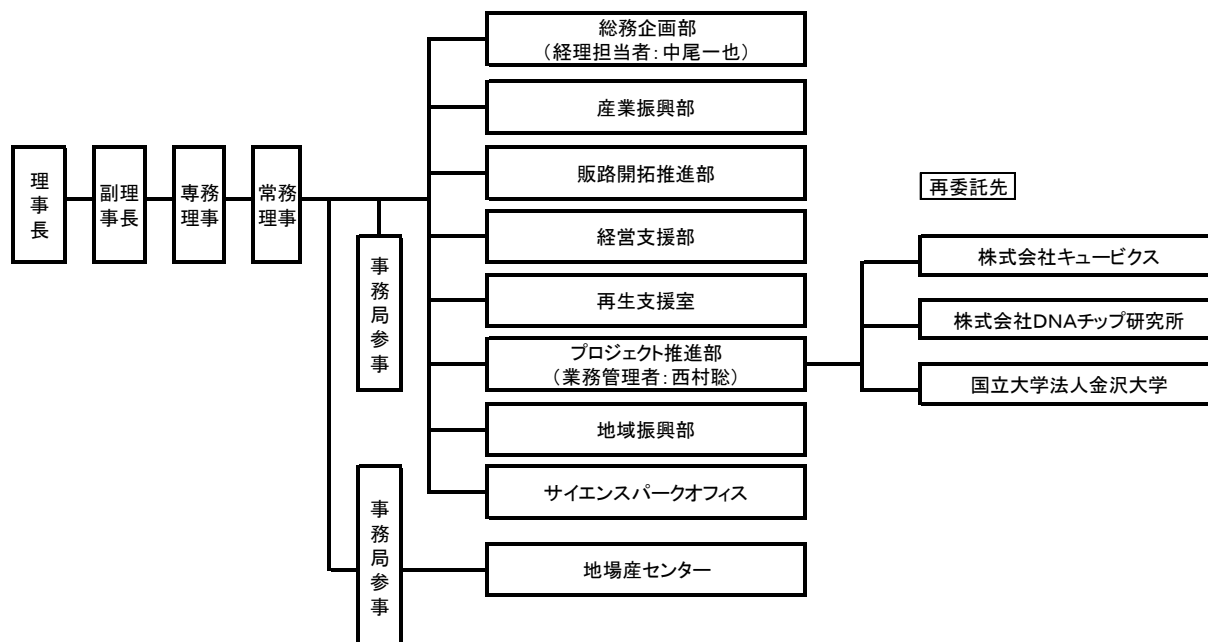
総括研究代表者（PL）
所属 株式会社キュービクス
役職 代表取締役社長
氏名 丹野 博

副総括研究代表者（SL）
所属 株式会社DNAチップ研究所
役職 代表取締役社長
氏名 的場 亮

2) 管理体制

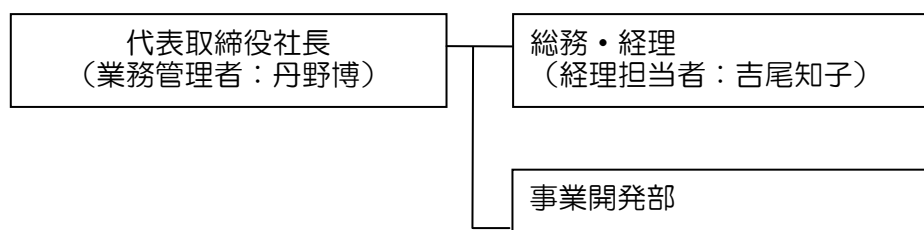
① 事業管理者

財団法人石川県産業創出支援機構

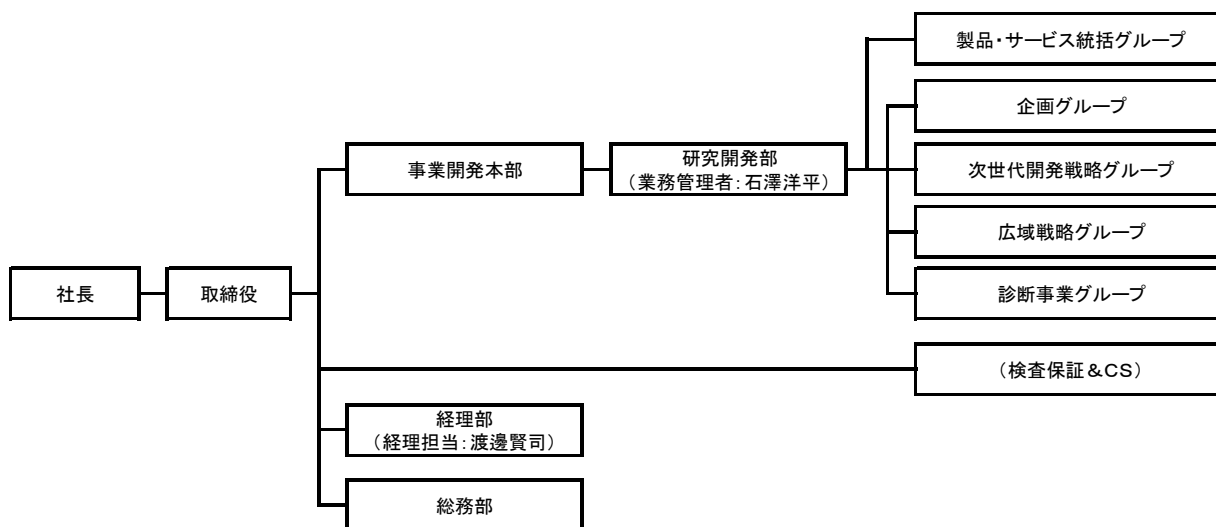


② 再委託先

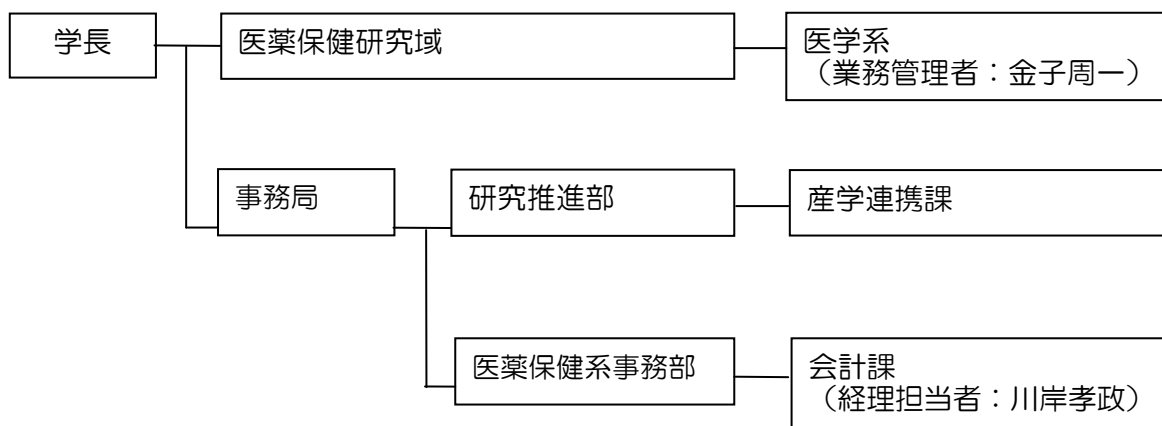
株式会社キュービクス



株式会社DNAチップ研究所



国立大学法人金沢大学



(2) 管理員及び研究員

【事業管理者】 財団法人石川県産業創出支援機構

管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
西村 聡	プロジェクト推進部長	⑤
高畑 典男	プロジェクト推進部研究交流推進課長	⑤
中村 陽一	プロジェクト推進部技術開発支援課主査	⑤
橋本 崇史	産業振興部人材支援課アドバイザー	⑤
中尾 一也	総務企画部総務企画課長	⑤

【再委託先】

研究員

株式会社キュービクス

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
丹野 博	代表取締役社長	①③④
宮崎 義孝	事業開発部長	①③④
辰巳 勇	事業開発部員	①③
竹松 優子	事業開発部員	①③

株式会社DNAチップ研究所

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
的場 亮	代表取締役社長（兼）事業開発本部長	①②
石澤 洋平	研究開発部 副部長	①②
中村 誠二	診断事業グループ リーダー	①②
谷野 元彦	広域戦略グループ 研究員	①②

国立大学法人金沢大学

氏名	所属・役職	実施内容（番号）
金子 周一	医薬保健研究域医学系・教授	①
酒井 佳夫	医薬保健研究域医学系・准教授	①

1-3 当該プロジェクト連絡窓口、所在地

（事業管理者）

財団法人石川県産業創出支援機構

〒920-8203 石川県金沢市鞍月2丁目20番地

（最寄駅：西日本旅客鉄道株式会社北陸本線金沢駅）

（経理担当者） 総務企画部総務企画課長 中尾 一也

（業務管理者） プロジェクト推進部長 西村 聡

(再委託先)

株式会社キュービクス

〒921-8832 石川県野々市市末松3-570 いしかわ大学連携イン
キューバータ203

(最寄駅：西日本旅客鉄道株式会社北陸本線野々市駅)

(経理担当者) 総務・経理 吉尾 知子

(業務管理者) 代表取締役社長 丹野 博

株式会社DNAチップ研究所

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町1丁目1-43

(最寄駅：東日本旅客鉄道株式会社 鶴見線 鶴見小野駅)

(経理担当者) 経理部 部長 渡邊 賢司

(業務管理者) 研究開発部 副部長 石澤 洋平

国立大学法人金沢大学

医薬保健研究域医学系 恒常性制御学講座

〒921-8640 石川県金沢市宝町13-1

(最寄駅：西日本旅客鉄道株式会社北陸本線金沢駅)

(経理担当者) 医薬保健系事務部会計課 経理係長 河岸 孝政

(業務管理者) 医薬保健研究域医学系 教授 金子 周一

第2章 本論

2-1 マイクロアレイ法とPCR法との同等性検証

(株式会社キュービクス、株式会社 DNA チップ研究所、国立大学法人金沢大学)

<平成24年度実施内容>

金沢大学の研究成果である消化器がん診断マーカー遺伝子はマイクロアレイ法による解析で発見されたものである。これらの遺伝子群はマイクロアレイ法では消化器がんを判別する遺伝子群として働く事が認められているが、PCR 法でも同様に機能するかについて同一症例（消化器がん症例、健常人症例）について検証を行う。

① マイクロアレイ法

消化器がん症例 59 例（胃がん 22 例、大腸がん 12 例、膵臓がん 17 例、胆道がん 8 例）及び健常人 13 例をそれぞれマイクロアレイ法による解析と、PCR 装置を用いた PCR 法による検査を行い、遺伝子の発現量に関して、

- ・消化器がん症例群と健常人群における有意差の検定
- ・消化器がん症例群と健常人群における平均値の比較

② PCR 法

金沢大学消化器がん診断マーカー遺伝子のうち特に差異のある5遺伝子についてマイクロアレイ法と同等の変動を確認できるかの検証をまずは実施する

<結果>

消化器がん症例 59 例（胃がん 22 例、大腸がん 12 例、膵臓がん 17 例、胆道がん 8 例）及び健常人 13 例の血液検体から遺伝子を抽出した。その後、マイクロアレイ法及び PCR 法により遺伝子の発現量を測定した。その結果、マイクロアレイ法においては有意差の検定・平均値の比較のどちらにおいても金沢大学の研究成果と同様に消化器がん症例と健常人の発現量に差異が確認できた。また PCR 法による発現量の測定結果でも、金沢大学消化器がん診断マーカー遺伝子のうち特に差異のある5遺伝子については有意差の検定・平均値の比較のどちらにおいても消化器がん症例と健常人の遺伝子発現量に差異があることが確認できた。

消化器がん症例と健常人との間に差異があると確認できたということは、その

遺伝子を測定することで消化器がんの有無を判別できることを示唆する。また、マイクロアレイ法による消化器がん症例と健常人との差異と検体の臨床症状と比較・解析した結果は下記の学会にて発表された。

- ・JDDW2012（消化器学会週間 神戸）シンポジウム 9「消化器がん検診における新しい診断方法の展開」金沢大学附属病院 消化器内科 小村 卓也 他
- ・第20回浜名湖シンポジウム 一般演題「末梢血液細胞の遺伝子発現変化に見られるがん反応解析とがん診断法開発の可能性」金沢大学附属病院 消化器内科 酒井佳夫 他

2-2 低価格・短時間となる検査条件の確立

（株式会社 DNA チップ研究所）

＜平成24年度実施内容＞

PCR法におけるコスト削減のために試薬使用量の調整試験を行った。

（試験方法）8例の検体を使用し、PCR反応条件に変化を与えない試薬使用量の調整試験をおこない最小限の使用量を確立する。

＜結果＞

消化器がん診断マーカー遺伝子のうち、A_24_P201702、A_24_P169378を用いて、試薬量をマニュアル通り、1/2量、1/5量でPCR法による遺伝子発現量の測定を行った結果、A_24_P201702、A_24_P169378ともに1/2量の測定においては、マニュアル通りの測定結果との統計的有意差は無かった。しかし、A_24_P201702の1/5量での測定結果において、有意差アリの結果が出たため1/5量ではマニュアル通りの測定結果との間に差異があった。（有意差検定：p値が0.05未満を有意差があると設定した。）これらの測定結果から、試薬量のコストダウンに関しては、1/2量までは問題ないと確認できた。

2-3 試薬分注工程の自動化

（担当：株式会社キュービクス）

＜平成24年度実施内容＞

ヒューマンエラーによる試薬分注上のミスを排除するため分注の自動化装置開

発が期待されている。この開発は自動化の確立のみならず多数検体の同時処理も可能となる。開発には自動分注装置の分注プログラムを新たに作成する必要があり、その動作確認及び手作業との品質確認を行う。16例の検体を用いてPCR法の試薬分注を手作業と自動分注装置とで計3回行い（合計48検体）PCR法による遺伝子発現量の測定結果を比較検証し、自動分注装置を用いた場合と手作業分注の場合とに有意差が無いことを検証した。（有意差検定：p値が0.05未満を有意差があると設定した。）検証には試薬メーカーからPCR法において検体差で変動にない遺伝子として販売されている「GUSB遺伝子」の試薬を使用した。（PCR法における検証の重複回数は試薬メーカー実験手順に従い3回とした）

<結果>

1回目、2回目、3回目の検証すべてにおいて、自動分注装置を用いた場合と手作業分注の場合とにPCR法による測定結果に有意差は無かった。この結果から手作業で分注していたPCR法の試薬分注を自動分注装置に置き換えて作業させることが可能と確認できた。

2-4磁気ビーズによる血液検体処理工程の確立

（担当：株式会社キュービクス）

<平成24年度実施内容>

血液検体から検査に必要な遺伝子を抽出する方法として、これまでは遠心分離法で行ってきたが、自動化装置によるPCR法では磁気ビーズ法にて行われている。血液検体処理工程の確立にはその比較検証が必要であるため、従来法とPCR法での比較検討を行った。

<方法>

遠心分離法と磁気ビーズ法によりそれぞれ10例の血液検体処理を行い、抽出された遺伝子の量や分解度の品質チェックを行った。

<結果>

1.抽出される遺伝子の量

PCR法（磁気ビーズ法）>従来抽出方法

2.遺伝子の品質

遺伝子を電気泳動による品質チェックを行った

分解度：PCR 法（磁気ビーズ法）＞従来の抽出方法であり、磁気ビーズ法では遺伝子の分解度が大きい結果であった。遺伝子の分解度が大きいことはマイクロアレイ法、PCR 法の両方の検査において正確な遺伝子発現量の測定が出来ないことを示すため、磁気ビーズの種類の変更を検討しなければならなくなった（有意差検定：p 値が 0.05 未満を有意差があると設定した。）その後、遠心分離法で使用している試薬メーカー製の磁気ビーズに切り換えを行い、新たな血液検体 4 例を用いて検証を行った結果、遺伝子品質の低下を示すデータは無かった。そのため遠心分離法を PCR 法における磁気ビーズ法（従来法と同一メーカーのもの）による血液検体処理に切り換える可能性が示唆されたが。但し、遠心分離法の数値は 10 例でのデータであるため、新しい磁気ビーズを用いた検体処理をあと 6 例行い、合計 10 例での検証を継続している。

第3章 まとめ

3-1 平成24年度

59 例の消化器がん症例、13 例の健常人症例を用い、マイクロアレイ法および PCR 法の同等性試験を実施した。消化器がん診断マーカー遺伝子を用いたマイクロアレイ法での検証では既に発表のとおり判別能を再確認でき、金沢大学の研究者によって学会での発表が行われたことは大変大きな成果であった。マイクロアレイ法で得られた消化器がん診断マーカー遺伝子のうち特に差異のある遺伝子群を用いた PCR 法でもマイクロアレイ法と同様に機能することを確認できたことはマイクロアレイ法から PCR 法への移行への大きなステップとなった。また、検査キットに使用される PCR 法の試薬量を少なくとも 1/2 に削減できることが確認でき、これは検査費用の低減に寄与する。

試薬分注工程の自動化においては、自動検査装置と手作業とでは PCR 法による検査結果に差異がないことが確認できた。

血液検体処理工程の確立に関しては、当初予定していた磁気ビーズの性能が予想されたものではなかったことから、急遽新しい磁気ビーズへと切り換えて検証を行っている。いまのところ遺伝子の品質低下を示すデータはない。

平成 24 年度に購入した機器は自動分注装置と PCR 装置を各 1 台ずつである。

・自動分注装置は試薬分注ミスを回避するために、人間の手作業がどれだけ装置に置き換えられるのかを確認する工程にて使用された。（2-3 試薬分注工程の自動化）

- ・PCR 装置は上記自動分注装置を用いた試薬分注による PCR 結果と人間の手作業での試薬分注による PCR 結果を比較検証する工程において使用された。(2-3 試薬分注工程の自動化)

平成 25 年度はマイクロアレイ法で検証する検体数をさらに増加させることで解析の精度を高め、消化器がん症例と健常人とで発現量に差のある遺伝子の中から、100 個の遺伝子のピックアップを行う。その後、PCR 法による検証を行い、30 個程度に絞り込むことを目標とする。平行して文献や研究データから遺伝子の機能解析や PCR 法による検査感度などの学術・統計的な裏付けも行う。

試薬分注工程の自動化においては、平成 24 年度の成果である試薬量を 1/2 へと削減した PCR 法の分注を自動分注装置に作業させ、PCR 法による検査結果の検証を行う。

磁気ビーズ処理工程の自動化においては、今年度に切り換えを行った新しい磁気ビーズの性能検証を行い、品質確認が出来た後に自動分注装置による作業へと移行する。

平成 25 年度の計画において、

- ・自動分注装置は試薬使用量を 1/2 へと削減した PCR 法の「試薬分注工程の自動化」及び血液検体処理における「磁気ビーズ処理工程の自動化」に使用される予定である。ミス無く均一品質な検査体制への足がかりとなる。

- ・PCR 装置は上記自動分注装置がミス無く均一品質を保持するように稼働しているかどうかを検証するために使用される予定である。自動分注装置によって分注された試薬や検体は最終的に PCR 法による遺伝子発現量の測定が行われる。その結果を解析することで分注ミスの有無や品質の均一性の検証が可能である。