

平成25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
(概要版)

平成26年2月

委託者 経済産業省
委託先 株式会社キュービクス

この報告書には、委託業務の成果として、産業財産権等の対象となる技術情報（未出願又は未公開の産業財産権等又は未公開論文）、ノウハウ等の秘匿情報が含まれているので、通例の取扱いにおいて非公開とする。ただし、行政機関の保有する情報の公開に関する法律（平成11年法律第42号）に基づき情報開示請求の対象の文書となります。

目 次

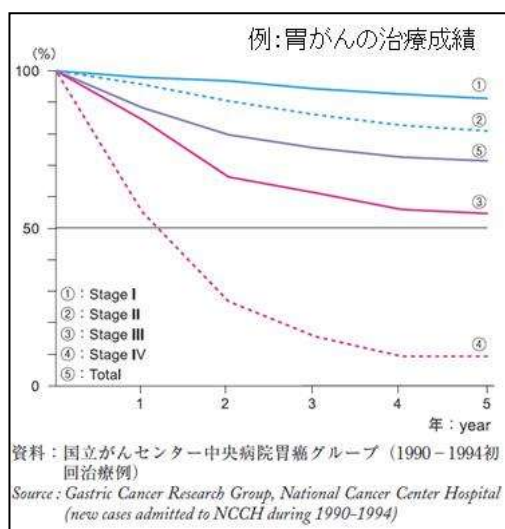
第1章	研究開発の概要	
1-1	研究開発の背景・目的・平成25年度の概要	1
1-2	研究体制	5
1-3	当該プロジェクト連絡窓口、所在地	8
1-4	協力者等	9
第2章	本論	
2-1	消化器がん診断マーカー遺伝子の最適組み合わせの検証	10
2-2	試薬分注工程の自動化	16
2-3	磁気ビーズ処理工程の自動化	21
2-4	自動検査装置の設計・試作	23
第3章	まとめ	
3-1	平成25年度	26

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 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>

がん予防で重要なのは早期発見であるが、内視鏡検査などでは身体的苦痛、時間的拘束などにより検診受診率が低い。一方、負荷の少ない血液によるがん検診は精度などに問題があった。

しかし、血液検査により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を金沢大学恒常性制御学講座が発見し、その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ている。さらに低価格化、迅速化、自動化を目指し、本委託事業では平成24年度には下記の内容を実施した。

- ① マイクロアレイ法とPCR法の同等性検証
- ② 低価格・短時間となる検査方法の確立
- ③ 従来法と自動化法の比較検討
- ④ 血液検体からの遺伝子の抽出法の検討（従来法 v s 磁気ビーズ法）

また、平成25年度には以下の3つの開発を行う。

- ・ 消化器がん有無判定遺伝子（PCR法）の確定
- ・ 自動化試薬分注方法（PCR法）の確立
- ・ 自動化検体処理方法（磁気ビーズ法）の確立

この 3 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25年度の概要>

がん検査の受診率を向上させるため簡便な血液だけで消化器がんの有無を判定できる新検査法（PCR 法）の開発を行う。検査の対象としては、消化器がん（胃がん・大腸がん・膵臓がん・胆道がん）である。この開発は検査に使用される A 検査キットと B 自動検査装置の開発が必要であり、A は体外診断用医薬品として薬事承認申請を目指す。また、B では自動化装置として医療機器の届出を完了する。

以下に開発項目 A・B ごとの内容を列記する。平成 25 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

<消化器がん有無判定遺伝子（PCR 法）の確定>

①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

<自動化試薬分注方法（PCR 法）の確立>

②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

<自動化検体処理方法（磁気ビーズ法）の確立>

③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>

・論文投稿

・薬事申請（対面面談 臨床性能試験対面相談）

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>

②③自動検査装置の設計・試作

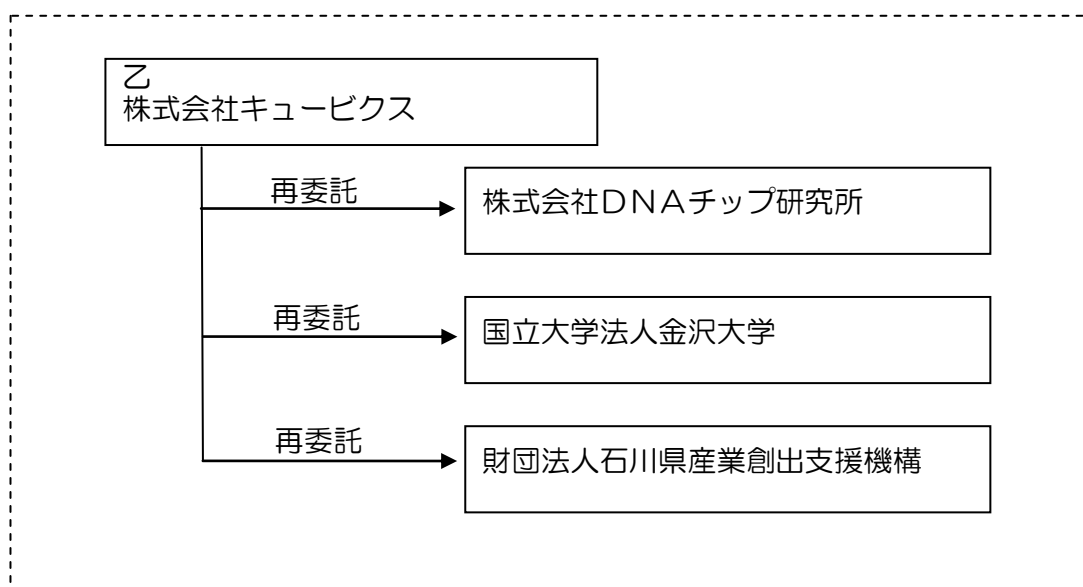
- ・性能検証試験
- ・医療機器届出

④プロジェクトの管理・運営

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）



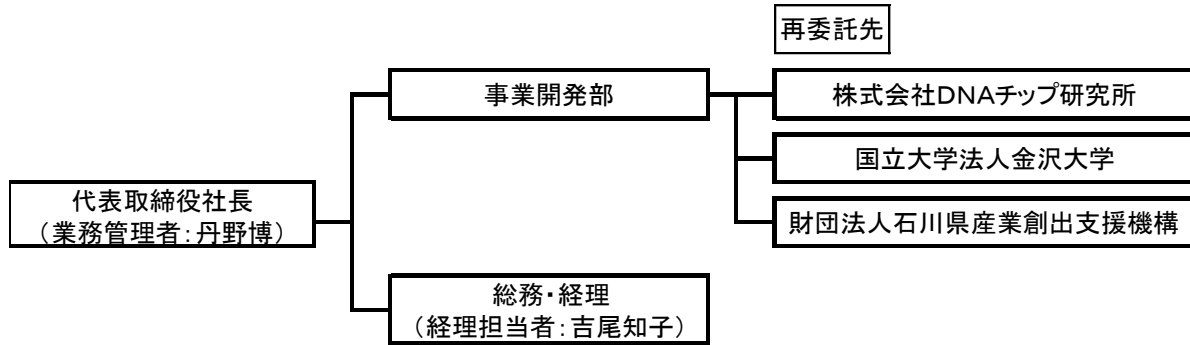
総括研究代表者（PL）
 所属 株式会社キュービクス
 役職 代表取締役社長
 氏名 丹野 博

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

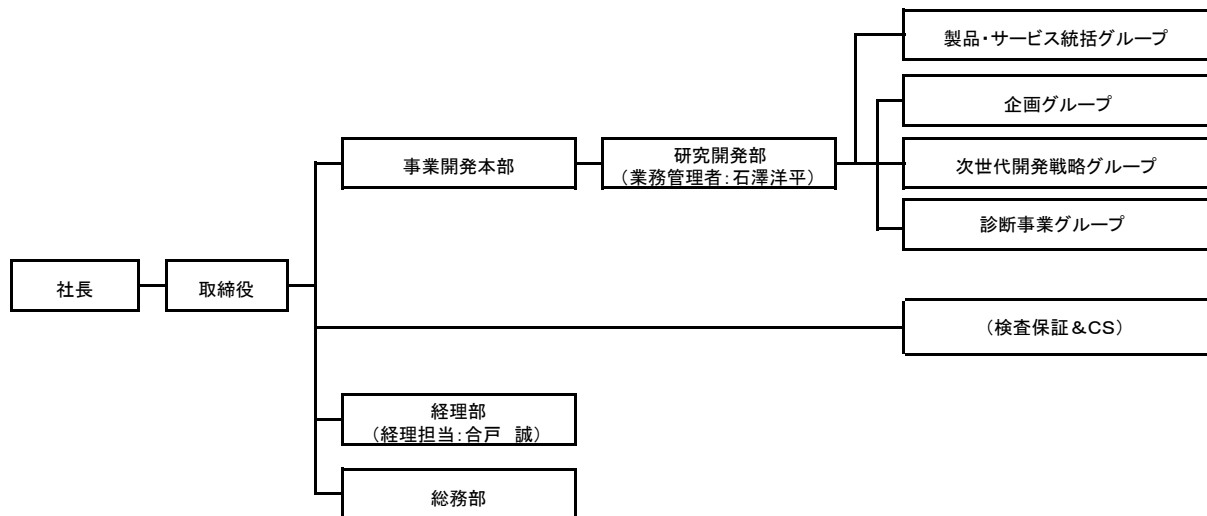
① 事業管理者及び研究実施者

株式会社キュービクス

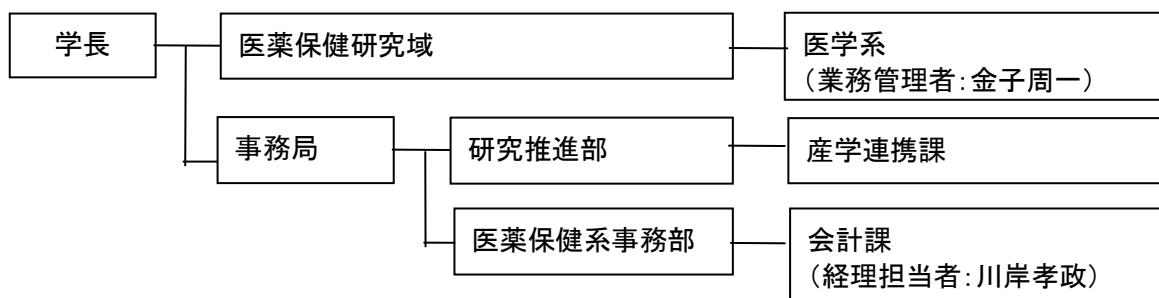


② 再委託先

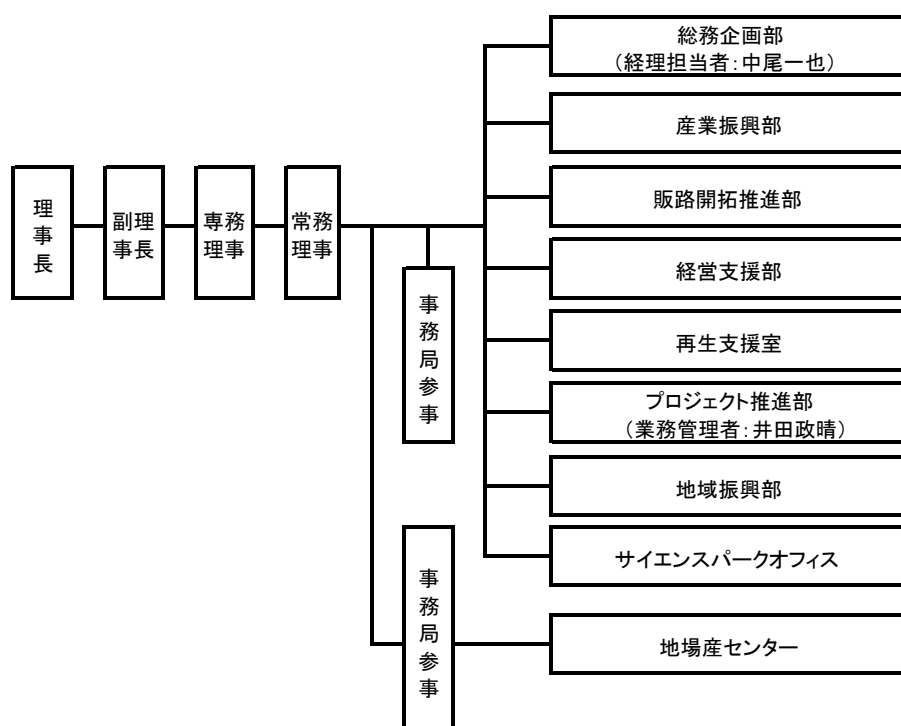
株式会社DNAチップ研究所 (抜粋)



国立大学法人金沢大学（抜粋）



財団法人石川県産業創出支援機構（抜粋）



(2) 管理員及び研究員

【事業管理機関】 株式会社キュービクス

① 管理員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
太田 靖二	事業開発部員(兼務)	④

② 研究員

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
丹野 博	代表取締役社長	①②③
宮崎 義孝	事業開発部長	①②③
辰巳 勇	事業開発部員	①②③
竹松 優子	事業開発部員	①②③
太田 靖二	事業開発部員(兼務)	①②③

【再委託先】

研究員
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	①
石澤 洋平	研究開発部 部長	①
中村 誠二	診断事業グループ リーダー	①
谷野 元彦	次世代開発戦略グループ 研究員	①
高田 心み	製品統括グループ 研究員	①
石井 美穂	診断事業グループ 研究員	①

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

財団法人石川県産業創出支援機構

氏名	所属・役職	実施内容(番号)
井田 政晴	プロジェクト推進部長	④
中村 陽一	プロジェクト推進部技術開発支援課主査	④
中尾 一也	総務企画部総務企画課長	④
国岡 由紀	プロジェクト推進部長コーディネーター	④

1-3 当該プロジェクト連絡窓口、所在地

(事業管理者及び研究実施者)

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

(再委託先)

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

〒920-8640 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

1-4 協力者等

定期的に開催する研究開発委員会において、外部より下記のアドバイザーを招き、本事業に対する医療機器開発技術面、薬事申請、事業化面への助言を得る。

村上 清史 金沢学院大学 スポーツ健康学部 教授

大橋 弘幸 東レ株式会社 医薬・医療事業本部 バイオツール事業推進室長

第2章 本論

2-1 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

(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25年度実施内容>

- 株式会社キュービクス

マイクロアレイより得られたデータから大腸癌検査用候補遺伝子、膵臓癌検査用候補遺伝子を選択し、PCR 法により遺伝子発現量を検証する PCR アレイ（製品名：RT² Profiler™ PCR Array：キアゲン社）の設計をそれぞれ行った。

- 株式会社 DNA チップ研究所

大腸癌の検討では、選択された 381 個の遺伝子発現量を一度に測定することができる PCR アレイを使用して、大腸癌 22 例と健常人 27 例を測定した。同様に膵臓癌の検討では、膵臓癌用の PCR アレイを用いて、膵臓癌 28 例と健常人 27 例の遺伝子発現量の測定作業を行った。

- 国立大学法人金沢大学

株式会社 DNA チップ研究所で得られた遺伝子発現量データを使用して以下の統計的解析を行った。

- 大腸癌用 PCR アレイによる大腸癌症例検体 22 例と健常人検体 27 例の比較解析

- 膵臓癌用 PCR アレイによる膵臓癌症例検体 28 例と健常人検体 27 例の比較解析

また、薬事申請の際に必要な論文作成のために、同じ種類の細胞だけを分けて回収できるフローサイトメーターを用いて、健常人 23 例、膵臓癌症例 31 例、大腸癌症例 2 例、胆道癌症例 2 例の血液検体から細胞表面抗原別に細胞を分けて回収した。回収した細胞から RNA を抽出し、マイクロアレイによる遺伝子発現解析を始めとした遺伝子解析を行った。現在、データ解析・検証中である。

<成果>

1. 癌検査用候補遺伝子を絞り込むための PCR アレイの設計

PCR アレイは縦 16 個 (A~P) × 横 24 個 (1~24) の合計 384 個の well があり、そのうちの P22 (HGDC: ゲノム混入確認用)、P23 (RTC: 逆転写反応確認用)、P24 (PPC: ポジティブコントロール) は品質管理用の well となっており、残りの 381 個にマイクロアレイデータから選択した遺伝子を搭載した。P5~P21 までの 17 個の well にはハウスキーピング遺伝子が搭載されている (B2M、18SrRNA、ACTB、GAPDH、GUSB、HPRT1、HSP90AB1、LDHA、NONO、PGK1、PPIA、PPIH、RPLP0、RPLP1、SDHA、TBP、TFRC)

2. PCR アレイからのデータ取得

PCR アレイによる遺伝子発現量の測定はキアゲン社のマニュアルに従い、トータル RNA 1ug を用いた cDNA 合成反応と PCR 反応を行った。大腸癌用 PCR アレイの測定結果では大腸癌 22 例と健常人 27 例を検討した。また同様に膵臓癌用 PCR アレイの測定結果では膵臓癌 28 例と健常人 27 例を検討した。これらの測定データは PCR 法による増幅産物量が一定量になるサイクル数を数値化したもので、遺伝子発現量の比較解析に当たっては、ノーマライゼーション (正規化) の作業が必要となる。

3. PCR アレイから取得されたデータの解析 (コントロール遺伝子の選択)

どの遺伝子をコントロール遺伝子として基準とするのかを検証するため、17 個のハウスキーピング遺伝子から 1 個を選択し、その発現量を基準として、残りの全遺伝子の発現量のノーマライゼーションを行う手法を取り入れた。

- 大腸癌 22 例、健常人 27 例の遺伝子発現量データを解析し、大腸癌と健常人とで有意差があるかどうかを検証した。

- また同様に膵臓癌 28 例、健常人 27 例の遺伝子発現量データを解析し、膵臓癌と健常人とで有意差があるかどうかを検証した。

一般的な解析では p 値が 0.05 以下で有意差があると判断されるため、GUSB、HPRT1、PGK1、RPLP0、RPLP1、GAPDH、TFRC、LDHA の 8 遺伝子に関しては大腸癌 vs 健常人、さらに膵臓癌 vs 健常人においても有意差はなかった。この 8 遺伝子の中にあつた、PCR 実験でコントロール遺伝子として一般的に使用されている遺伝子 GAPDH をコント

ロール遺伝子として使用する。他の体外診断用医薬品（WT 1 mRNA測定キット「オーツカ」：承認番号 21800AMZ1038800）でもコントロール遺伝子として使用されている。

4. PCR アレイから取得されたデータの解析（大腸癌 vs 健常人の比較）

大腸癌 22 例、健常人 27 例の PCR 法で得られた遺伝子発現量を統計解析的手法を用いて、PCR 法とマイクロアレイ法の比較解析を行った。

・PCR 法での結果においては

大腸癌>健常人、2 倍以上の発現上昇：50 遺伝子

大腸癌<健常人、2 倍以上の発現減少：3 遺伝子

このうち、マイクロアレイ法でも 2 倍以上の変動を認めたものは

大腸癌>健常人、2 倍以上の発現上昇：44 遺伝子

大腸癌<健常人、2 倍以上の発現減少：0 遺伝子

上記 44 遺伝子のうち、Y 染色体上に位置している遺伝子 7 遺伝子は性別により変動するため除外した。これらの解析により 37 個の遺伝子を大腸癌検査に使用する遺伝子の候補としてリストアップした。

ANXA1、B2M、CAPZA2、CCDC82、CD69、CENPQ、COMMD8、COX7B
DBI、DYNLT3、EVI2A、HAT1、IFNG、JAK2、LPAR6、LY96、MRPL13
MRPS28、NDUFA4、PDCD10、PFDN4、POLR2K、PSMA4、PSMA6
PSMC6、RGS18、RNF11、RPL31、RPS27L、RSL24D1、S100A12
S100A8、SAMD9、SUB1、SYCP2、TIMM8B、TMX1

この 37 遺伝子に関して、PCR 法とのマイクロアレイ法の発現量変動の倍率を一覧にした。

*発現量変動の倍率とは、遺伝子の量がどのくらい増減したかの数値であり、例えば、大腸癌>健常人で、倍率が 2 倍の場合、大腸癌の検体にはその遺伝子が、健常人の 2 倍存在している事を示す。

全般的に PCR 法での倍率よりマイクロアレイ法の倍率の方が、数値が高めである傾向があるものの、数十倍もの開きがあるようなものではなく、また発現上昇・減少の方向が逆になっているものもない。このためこの 37 遺伝子に関しては、大腸癌と健常人とを判別する遺伝子の候補とした。

5. PCR アレイから取得されたデータの解析（膵臓癌 vs 健常人の比較）

膵臓癌 28 例、健常人 27 例の PCR 法で得られた遺伝子発現量を統計解析的手法を用いて、PCR 法とマイクロアレイ法の比較解析を行った。

• PCR 法での結果においては

膵臓癌>健常人、2 倍以上の発現上昇：4 遺伝子

膵臓癌<健常人、2 倍以上の発現減少：14 遺伝子

このうち、マイクロアレイ法でも 2 倍以上の変動を認めたものは

膵臓癌>健常人、2 倍以上の発現上昇：2 遺伝子

膵臓癌<健常人、2 倍以上の発現減少：1 遺伝子

上記 3 遺伝子のうち、Y 染色体上に位置している遺伝子はなかった。この 3 個の遺伝子を膵臓癌検査に使用する遺伝子の候補としてリストアップした。

ECHDC3、CLEC4D、NOG

この 3 遺伝子に関して、PCR 法とのマイクロアレイ法の発現量変動の倍率を一覧にした。

*発現量変動の倍率とは、遺伝子の量がどのくらい増減したかの数値であり、例えば、膵臓癌>健常人で、倍率が 2 倍の場合、膵臓癌の検体にはその遺伝子が、健常人の 2 倍存在している事を示す。

上記 3 遺伝子に関しては、発現上昇・減少の方向も揃っており、PCR 法とマイクロアレイ法ともに膵臓癌と健常人とで発現量の差が 2 倍以上となっており、膵臓癌と健常人とを判別する遺伝子の候補とした。

2-2 試薬分注工程の自動化

（担当：株式会社キュービクス）

<平成 25 年度実施内容>

1. 新試薬を用いた PCR 法の遺伝子発現量測定結果の確認

従来は、PCR 法による遺伝子量測定には、RNA の逆転写反応後に遺伝子増幅反応を行う 2 つの手順（2-Step）が必要だったが、新試薬（Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit）を使用することで、この 2 つの反応が連続したで 1 回の手順（1-Step）で可能となる。従来法では 5 時間以上かかるものが新試薬の利用で 2 時間以内となるため、検査の迅速化には新試薬の採用は必須である。従来法との比較検証を行った。

2. 改造後の自動分注装置による試薬分注と手作業分注との比較検証

採血管処理部で採血管から抽出された RNA はサンプルラックに立てたサンプルチューブに分注される。装置改造前は自動分注装置からサンプルラックごとに取りだし、手作業で PCR 試薬分注を行っていたが、装置改造によりサンプルラックを PCR 試薬分注部に自動的に移送させて、連続で PCR 試薬分注までを作業させることが可能となった。また平成 24 年度に行った自動分注装置と手作業での比較検証はアプライドバイオシステムズ社製試薬による検証であったため、新試薬（Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit）の場合での自動分注装置と手作業との比較検証も兼ねている。

<成果>

1. 新試薬を用いた PCR 法の遺伝子発現量測定結果の確認

・使用した試薬

①アプライドバイオシステムズ社製逆転写酵素（2-Step 専用）

「High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit」

②アプライドバイオシステムズ社製 PCR 試薬（2-Step 専用）

「TaqMan® Gene Expression Master Mix」

③キアゲン社製逆転写酵素（1-Step 専用）

「Rotor-Gene RT Mix」

④キアゲン社製 PCR 試薬（1-Step、2-Step どちらも可能）

「Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix」

蛍光プローブは以下を使用した。

・ TMCO1（金沢大学消化器がん診断マーカー遺伝子からランダムに選択）

・ GAPDH（コントロール遺伝子）

*アプライドバイオシステムズ社製試薬は、PCR 試薬の中で一番シェアが大きく、ごく一般的に使用されているため、比較対象とした。

2-Step-A : ①+②で反応時間合計 5 時間

2-Step-B : ①+④で反応時間合計 5 時間

1-Step : ③+④で反応時間 2 時間

6 検体で上記 3 パターンを検討した。

各々の有意差検定結果

2Step-A vs 2Step-B : 有意差ナシ (p=0.82)

2Step-A vs 1Step : 有意差ナシ (p=0.87)

2Step-B vs 1Step : 有意差ナシ (p=0.94)

*有意差検定においては、一般的に $p < 0.05$ で有意差があるとされており、今回の基準もそれに従った。

これらの結果より、キアゲン社製新試薬 (Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Kit) を使用した PCR 法でも、遺伝子発現量が正常に測定できることが判明し、遺伝子発現量の測定結果が従来法と有意差がなかったことを確認できたことで、安心して新試薬を使用することができるようになった点は大変意義があった。

2. 改造後の自動分注装置による試薬分注と手作業分注との比較検証

同一のサンプルを入れた 50 本のチューブを用意し、そのうち 25 本は自動分注装置、残りの 25 本は手作業で PCR 試薬の分注を行った。PCR 反応は 1Step で行い、測定に使用する蛍光プローブは金沢大学消化器がん診断マーカー遺伝子からランダムに 2 個 (LY96、CSTA) 選択しそれぞれ検証を行った。

・使用した試薬

キアゲン社製逆転写酵素 : 「Rotor-Gene RT Mix」

キアゲン社製 PCR 試薬 : 「Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix」

コントロールプローブ : 「GAPDH」

・有意差検定結果 (LY96)

自動分注装置 vs 手作業 : 有意差ナシ (p=0.75)

・有意差検定結果 (CSTA)

自動分注装置 vs 手作業 : 有意差ナシ (p=0.73)

*有意差検定においては、一般的に $p < 0.05$ で有意差があるとされており、今回の基準もそれに従った。

改造した自動分注装置における、採血管処理部から PCR 試薬分注部への自動搬送を経ての PCR 試薬分注でも遺伝子発現量は正常に測定されていることが検証さ

れた。また新試薬を用いた場合でも手作業と装置による分注でも PCR 法による遺伝子発現量の測定結果には有意差はなかった。

この結果より、来年度に予定している実際の臨床検体を用いた PCR 法による遺伝子発現量測定には、自動分注装置による PCR 試薬分注で支障ないと判断できた。

2-3 磁気ビーズ処理工程の自動化

(担当：株式会社キュービクス)

<平成25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、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ため、その比較検証が必要である。平成 24 年度に行った検証では当初予定していたメーカーの磁気ビーズでは抽出された遺伝子の品質が低く、別メーカーの磁気ビーズへと変更する必要があった。自動分注装置はキアゲン社製であるため、磁気ビーズもキアゲン社製のもので検証することとした。

同一人のボランティアから採血したパクスジーン RNA 採血管 2 本（1 本は従来の遠心分離法用、もう 1 本は磁気ビーズ法用）を 1 セットとして、10 セット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い、遠心分離法と磁気ビーズ法との比較試験を行った。

<成果>

- 抽出された遺伝子量の比較（遺伝子量は採血管 1 本から抽出された量：単位は ng）

有意差検定では $p=0.99$ となり、遠心分離法で採血管処理を行った場合と、磁気ビーズ法で採血管処理を行った場合とで抽出された遺伝子量に有意差はなかった。

*有意差検定においては、一般的に $p<0.05$ で有意差があるとされており、今回の基準もそれに従った。

- 抽出された遺伝子品質の比較

有意差検定では $p=0.0003$ となり、有意差を持って磁気ビーズ法では遠心分離法よりも遺伝子の分解度が大きくなっていた。

*有意差検定においては、一般的に $p<0.05$ で有意差があるとされており、今回の基準もそれに従った。

アジレントテクノロジー社（分解度を測定する電気泳動装置メーカー）が公開している資料（Optimizing real-time quantitative PCR experiments with the Agilent 2100 bioanalyzer Application Note、著者：Steffen Mueller）によると PCR 法による遺伝子発現量測定において、分解度 6.5 は 8.9 と比較可能な程度の分解度とされている。また遺伝子発現解析を受託しているタカラバイオ株式会社では品質検定のクリア基準を分解度 7.0 以上としている。

これらより今回磁気ビーズで抽出された遺伝子 10 例に関しては、遠心分離法で抽出された遺伝子と分解度において差があるものの、PCR 法による遺伝子発現量測定に使用するには支障がないと判断できる。

2-4 自動検査装置の設計・試作

（担当：株式会社キュービクス）

<平成25年度実施内容>

1. 自動分注装置の改造

平成 24 年度に導入した自動分注装置は、採血管処理部と PCR 試薬分注部から構成されている。これを採血管処理と PCR 試薬分注とを連続で作業できるように改造することにより、省力化、高速化、検体管理ミスなどを防止することが可能となる。そのため、採血管処理部と PCR 試薬分注部を連結する部品の設置、連続作業プログラムの導入を行い、性能検証を行った。

2. 自動分注機改造の性能検証

通常の手作業（遠心分離法）による採血管処理においては、遺伝子抽出作業終了後に 65℃、5 分間の熱処理を行い、立体構造を崩す工程がある。

しかし、自動分注ロボットにはこの工程を行う機能はないため、採血管処理部と PCR 試薬分注部とを連結させ、連続で作業させる場合、この 65℃、5 分間の熱処理はできない。そのためこの熱処理の有無が PCR 法による遺伝子量測定結果に必須なのかどうかを検証した。

<成果>

1. 自動分注装置の改造

採血管処理部での作業が終了した検体はサンプルチューブに入って、トレイに

置かれた状態となっている。装置改造前は手作業でトレイごと取り出し、PCR 試薬分注部へと移す作業が必須であったが、装置改造によってリフトによる移動で、トレイごと自動的に PCR 試薬分注部に移送され、そのまま PCR 試薬分注工程へとつなげることが可能となった。

2. 自動分注機改造の性能検証

同じ採血管から抽出された遺伝子が入ったサンプル液を半分に分け、片方は65°Cの熱処理を行い、もう片方は熱処理を行わなかった。それらの遺伝子発現量測定を PCR 法で行い、正常に PCR 反応が行われるかを検証した。

測定に使用する蛍光プローブは金沢大学消化器がん診断マーカー遺伝子からランダムに選択（JAK2）し検証を行った。

・使用した試薬

キアゲン社製逆転写酵素：「Rotor-Gene RT Mix」

キアゲン社製 PCR 試薬：「Rotor-Gene Multiplex RT-PCR Master Mix」

コントロールプローブ：「GUSB」

・熱処理あり・なしの場合での遺伝子発現測定結果

有意差検定結果

熱処理あり vs 熱処理なし : 有意差なし (p=0.22)

*有意差検定においては、一般的に $p < 0.05$ で有意差があるとされており、今回の基準もそれに従った。

65°Cの熱処理を行い場合は、遺伝子の立体構造が保たれたまま PCR 反応に進むため、遺伝子を増幅する酵素が遺伝子に結合しにくくなり、遺伝子増幅の効率が落ちる可能性が考えられる。今回の検証では、熱処理がなくとも熱処理をした場合と有意差がなかった結果となり、本事業で想定している自動分注による採血管処理工程から PCR 試薬分注工程までの間に熱処理は必ずしも必要ではないと判断できる。

第2章 まとめ

3-1 平成25年度

マイクロアレイ法での解析から 381 個の遺伝子を選択し、PCR 法による遺伝子発現量測定結果で癌症例と健常人と差があるかどうかを検証した。PCR 法での遺伝子発現量測定においては、コントロール遺伝子が必要となるのが一般的であり、大腸癌 22 例 vs 健常人 27 例、膵臓癌 28 例と健常人 27 例の両方の解析結果から遺伝子「GAPDH」がコントロール遺伝子として適当であると判断した。これにより統一した方法で、遺伝子発現量測定数値を補正することが可能となり、大腸癌 vs 健常人および膵臓癌 vs 健常人の PCR 法による遺伝子発現量の比較解析を行った。

比較解析の結果、大腸癌検査に使用する候補として 37 遺伝子をリストアップした。膵臓癌症例に関しても同様の手法で解析し、膵臓癌検査に使用する候補として 3 遺伝子をリストアップした。

これらリストアップされた遺伝子は、平成 26 年度に予定している新たな検体での検証を経て、癌の判定に必要な遺伝子かどうかを確定させる。なお、膵臓癌候補遺伝子としては 3 個のリストアップであるが、数が少ないために膵臓癌の判定性能が低い可能性も考えられる。この点については、コンソーシアム内で実際のデータとつきあわせて数を増やす必要があるかどうかの議論を行う予定としている。

癌症例と健常人とでマイクロアレイ法と PCR 法の両方で、発現量に差が 2 倍以上ある遺伝子に関しては非常に高い相関性が取れており、増加・減少の方向は 100%一致していた。

従来の手作業による採血管処理工程及び PCR 試薬分注工程を自動化する目的で、自動分注装置の改造を行った。それに伴い、これまで手作業による遠心分離法で遺伝子を抽出していたが、それが磁気ビーズを用いた方法へと切り替えることで必要があった。今年度の検証で、改造された自動分注装置による磁気ビーズ法で従来法とほぼ同量の遺伝子を抽出することが確認できた。遺伝子の品質に関しては、従来よりも分解度の程度が大きくなってしまったが、これまでの文献や他社の品質基準を参考にしたところ、PCR 法による遺伝子発現量測定には支障ないレベルであることが確認できた。従来の手作業の工程においては、採血管処理工程と PCR 試薬分注工程の間に遺伝子の立体構造を崩すための熱処理工程があった。熱処理をしない場合、その後の PCR 法による遺伝子発現量測定が正常に行えるのかどうかを検証した結果、熱処理がなくとも遺伝子発現量測定は正常に行うことが確認でき、測定結果も熱処理をした場合と有意差がなかった。改造された自動分注装置にはこの熱処理を行う機能はもともとなかったが、この結果をもって熱処理用のユニットを増設する必要はないと

判断できた。改造された自動分注装置による PCR 試薬分注精度を手作業による試薬分注精度と比較検証した結果、自動分注装置の分注精度は手作業と有意差はない結果となった。

これにより採血管処理工程から PCR 試薬分注工程までをこれまでの手作業から改造された自動分注装置に置き換えることが可能と判断できた。

現在一般的に行われている PCR 法では遺伝子発現量測定に 5 時間程度かかる。本事業で予定している検査時間は採血管処理の開始から PCR 法での遺伝子発現量測定結果出力まで 4 時間としており、時間短縮のため PCR 法に新しい試薬を採用する必要があった。今年度の検証で、ごく一般的に使用されている PCR 試薬と新試薬との比較検証を行い、新試薬による遺伝子発現量の測定は正常に行われていることが確認され、測定結果もごく一般的に使用されている PCR 試薬と有意差がないことが確認できた。

<平成 25 年度事業で確認できたこと>

- ・大腸癌検査用遺伝子 37 個のリストアップ
- ・膵臓癌検査用遺伝子 3 個のリストアップ
- ・新しい PCR 試薬の使用が可能であることを確認
- ・改造された自動分注装置の分注性能には問題ないことを確認
- ・改造後の自動分注装置による磁気ビーズ法を用いた採血管処理方法の確立
- ・検体の熱処理の必要性の検証で、必要ないことを確認

平成 26 年度は、改造された自動分注装置と今年度採用した新しい PCR 試薬の組み合わせで、実際の臨床検体の遺伝子発現量の測定を行い、その解析結果をもって今年度候補に挙げられた癌判定用の遺伝子を用いた癌の感度の検証を行う。それにより検査キットに必要な遺伝子を確定させることが可能となり、今後の薬事申請へとつなげる。