

日本医療研究開発機構 医療分野研究成果展開事業
(先端計測分析技術・機器開発プログラム)
事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) QOL向上と医療費削減に貢献する前立腺癌自動血液検査システムの開発
(英語) Development of the automated blood test system for prostate cancer diagnosis contributing to QOL improvement and medical expenses reduction

研究開発実施期間: 2015年11月24日～2019年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 彼谷 高敏
(英語) Takatoshi Kaya

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:
(日本語) コニカミノルタ株式会社 開発統括本部 課長
(英語) Manager, Corporate R&D Headquarters, Konica Minolta, Inc.

II 研究開発の概要

研究開発担当者である彼谷高敏(コニカミノルタ株式会社)、研究開発分担者である大山 力(弘前大学大学院医学研究科)らは、QOL向上と医療費削減に貢献する前立腺癌自動血液検査システムの開発課題に対して、平成27年度～30年度の活動により以下の成果を得た。

【バイオマーカー価値検証】

癌/非癌の臨床検体(PSA値4～20 ng/ml)を対象としたPSA糖鎖(以下PSA-Gi)の前立腺癌診断性能評価において、弘前大学および東北大学の各施設より分与された前立腺癌262例、非癌症例264例を対象とする試験を実施した。PSA-GiおよびPSA-Gi Density(PSA-Gi D:PSA-Gi値の前立腺体積換算値)の癌診断精度を、既存3検査(PSA検査、Free/Total PSA(F/T PSA)検査、PSA値の前立腺体積補正值(PSAD))と比較検証した結果、ROC解析(図1)から、PSA-GiおよびPSA-GiDのAUCはそれぞれ、全癌症例で0.77および0.82、臨床的重要癌症例(SigPC:非監視療法対象およびGS7以上)では0.79および0.84となり、高い癌診断性能を確認した。既存3検査に対しても癌診断精度が非常に高く($P < 0.0001$)、大きく凌駕する臨床性能を確認した(図1)。

グリソンスコア(GS)9以上、8、7、6の前立腺癌症例を対象に、悪性度マーカーの価値(高/低GSの分類の可否)検証を実施した。生検陽性262(GS9以上:74、GS8:36、GS7:116、GS6:36)例および生検陰性264例の生検前血清を対象に、PSA-GiおよびPSA-GiDと生検時GSの相関性を後ろ向きに評価した結果(図2)、PSA検査(total

PSA)においては正相関の傾向は認められたものの、生検陰性例とGS9以上の間でのみ有意差が認められた。一方、生検前血清のPSA-GiおよびPSA-GiD値は、生検時GSと正相関し、特にSigPC(非監視療法対象およびGS7以上)では陰性対象(生検陰性および監視療法対象GS6症例;ASGS6)に対して有意に高値を示した。このことから生検前のPSA-Gi測定が生検後の監視療法や積極的治療介入の選択の際に有用な診断補助情報となる可能性が強く示唆された。本成果の社会実装活動として、論文化およびシンポジウムを開催した。

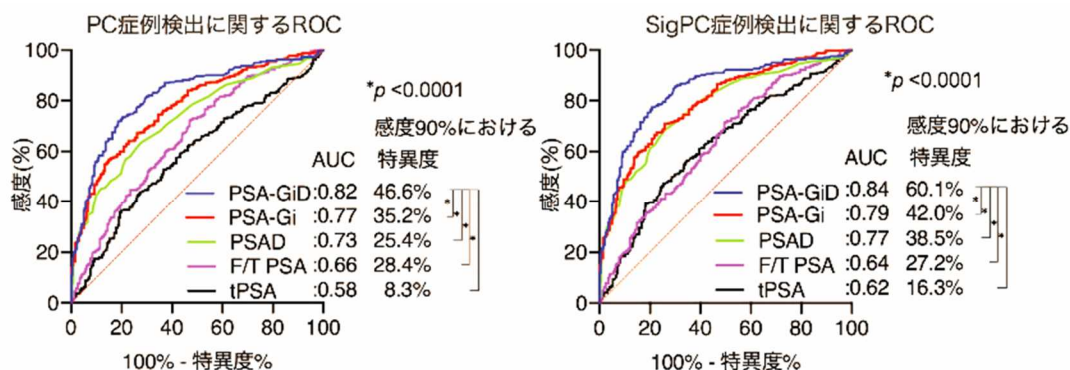


図1 各検査の前立腺癌および臨床的重要前立腺癌検出に関するROC解析

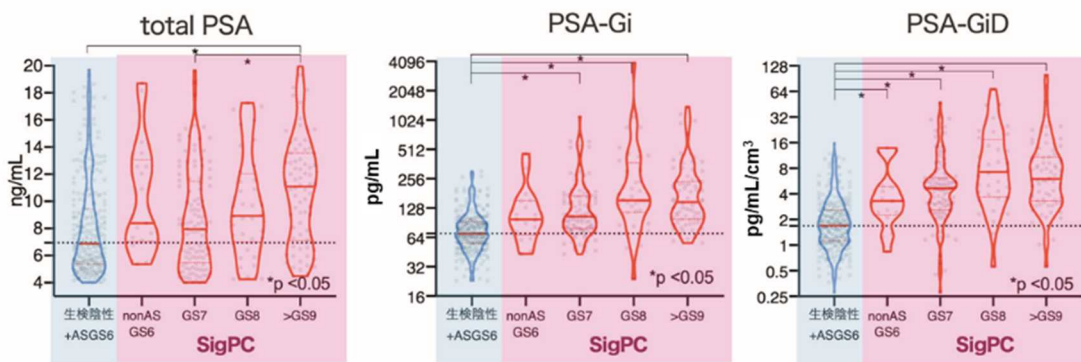


図2 生検時血清のtotal PSA、PSA-GiおよびPSA-GiD値の生検時のグリソンスコアによる分類

【システム開発/試薬・デバイス・機器】

試薬開発においては、糖鎖抗原であるPSA-Giの標準抗原化に関して、原材料仕様や標準抗原製造工程の管理方法を検討するため、原材料ロット評価および製造プロセス管理に必要な分析方法の検討を推進した。仮設定した規格に従い、社内標準抗原の製造検討を実施し、最終目標値の達成を確認した。

PSA-Gi試薬の基本性能として設定した検出下限値20 pg/ml以下の最終目標値に対して、上記作製した標準抗原試薬を用い基本性能確認試験を実施した。SPFS流路系システムを用い、測定再現性試験、検出感度試験を実施した結果(表1)および検量線(図3)を示す。測定再現性(日内再現性)は低/中/高濃度域すべてでCV8%以下であり、測定下限値は最終目標値(20 pg/ml以下)に対して11 pg/mlと見積もられ、最終目標値の達成を確認した。また、11 pg/ml ~ 500 ng/mlと幅広い定量範囲を確認し、非常に厳しい競合条件下でも高精度な定量が可能なSPFSシステムの特長も確認した。

No.	項目	仕様(目標)	結果
1	再現性	CV 10%	Low(0.05 ng/mL) : CV 6.2% Mid(1.0 ng/mL) : CV 4.3% High(100 ng/mL) : CV 3.0%
2	測定範囲	0.04 ng/mL~50 ng/mL	測定範囲 0.02 ~ 500 ng/mL 10 ⁵ 乗と幅広いダイナミックレンジを達成
3	検出限界(LoD)	LoD < 0.02 ng/mL	LoD:0.011 ng/mL
4	定量限界(LoQ)	LoQ(10%CV) < 0.04 ng/mL	LoQ(10%CV) : 0.017 ng/mL
5	測定時間	45 min	45 min

表1 流路系システムにおける測定性能(再現性・感度)

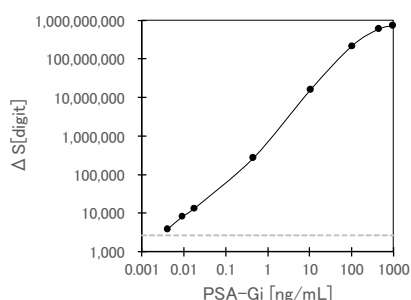


図3 スタンダードカーブ

体外診断医療機器レベルの仕様として設定した 50 test/h の測定処理能力を有した SPFS 測定原理に基づく血液検査システムを実現するためには、SPFS 連続測定と SPFS 測定チップの連続自動搬送の実現が必須であり、新たな SPFS 測定デバイスとしてウェル型の SPFS チップを考案した(図 4)。本チップはウェル型反応容器と SPFS 光学プリズムを接合した構成である。反応容器側面にはあらかじめ開口部が設けてあり、プリズム表面の一部が反応容器内側に露出する構造となっている。反応容器内に露出されたプリズム表面には金薄膜およびその表面上に (PSA) 抗体があらかじめ固定化されているため、反応容器に検体や試薬を分注することでセンサ表面での種々の反応と SPFS 測定が実施可能である。また、反応容器下部に偏心した攪拌子を接触・回転させることで反応容器内の試薬は渦状に攪拌され、反応効率の面で不利な固液反応を大幅に効率化することが可能である。

試作した検査装置のプロトタイプ機の外観を示す(図 5)。検査室や検査センターでの利用を想定し、装置は 2 段構成のフロアトップ型となっており、反応に関連する機構を上段に、制御電装基板やポンプ、試薬ボトル/タンク、廃棄箱などを下段に配置している。測定対象検体は使い捨て検体カップと検体ラックで供給する方式であり、検体分注は検体コンタミネーションリスクを最小化するためにディスポーザブルチップ方式を採用した。試薬オンボードスタビリティを考慮した試薬ボトルの冷蔵保管機能、ユーザビリティを考慮した消耗品の一括廃棄構造を搭載している。反応温度制御に関しては、反応ターンテーブル温調に加えて装置庫内の部分空調を採用し、設置環境温度(15~30℃)下においても高精度な室温温調を実現した。SPFS 光学測定は、高感度・高精度な連続測光を実現するために検体反応後のブランク測定と標識試薬反応後のシグナル測定を 1 つの SPFS 光学ユニットで実現している。

プロトタイプ機を用いた試薬性能検証を行った結果、測定再現性 CV8%以下、測定下限値は 19 pg/ml と見積もられ、プロトタイプ機(ウェル型 SPFS チップ)においても目標値の達成を確認した。また、30 症例の患者血清を用いた流路系システムとプロトタイプ機(ウェル系)の相関性も非常に良好(相関係数 $r=0.99$, slope:1.06)であり、流路型システムで取得してきた臨床検体評価におけるバイオマーカー価値エビデンスをプロトタイプ機においても高いレベルで再現できることを確認した。

今後、機器に関しては、本開発で作成したプロトタイプ機をベースに製品化検討を推進し、SPFS 血液検査システムの医療機器化を目指す。試薬に関しては、PSA-Gi 試薬の安定製造検討と並行して、体外診断用医薬品として展開すべく国内外多施設での臨床研究を継続する予定である。特に、癌悪性度に関しては治療法選択においても非常に重要な指標となる可能性があり、前立腺癌診療の様々なシーンで簡便な血液検査による本法が確立されれば患者 QOL の向上や医療費の適正化に大きく貢献できるものと期待されている。

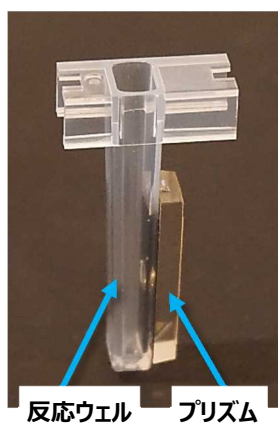


図 4 ウェル型 SPFS チップ

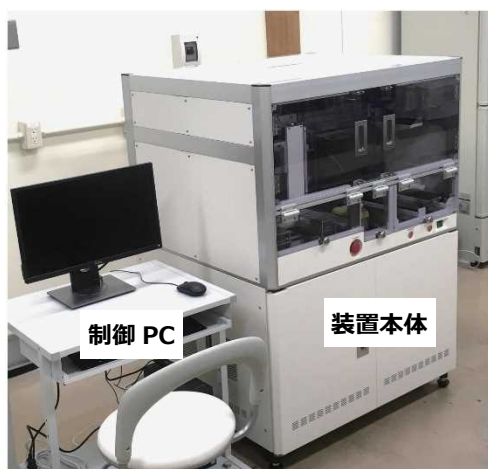


図 5 プロトタイプ機

[Validation of biomarker values]

To evaluate the prostate cancer diagnostic performance of the prostate-specific antigen glycosylation isomer (PSA-Gi), we examined serum samples from 262 patients with biopsy-proven prostate cancer (PC) and 264 men without PC, which were provided from Hirosaki University and Tohoku University. The PC diagnostic accuracy of PSA-Gi and of PSA-Gi Density (PSA-GiD: prostate volume-adjusted PSA-Gi level) was compared with that of three conventional serum tests (PSA test, free/total PSA (F/T PSA), and prostate volume-adjusted PSA level (PSAD)) by area under the curve (AUC) of receiver operating characteristic curve analysis. AUC of PSA-Gi and PSA-GiD for detection of overall PC patients was 0.77 and 0.82, respectively, and also AUC of PSA-Gi and PSA-GiD for detection of clinically significant PC (SigPC, which include patients on non-active surveillance and with Gleason score (GS) ≥ 7) was 0.79 and 0.84, respectively. These results indicate a significantly higher diagnostic performance than that of conventional serum test ($P < 0.0001$).

To validate the grading performance (validity of classification of high/low GS) of the PSA-Gi and PSA-GiD, the correlations of PSA-Gi and PSA-GiD with the GS at biopsy were retrospectively examined in prebiopsy serum samples from 262 biopsy-positive patients (\geq GS9: 74; GS8: 36; GS7: 116; and GS6: 36) and those of 264 biopsy-negative patients (Figure 2). Although positive correlation trends were noted with the PSA test (total PSA), a significant difference was found only between the biopsy-negative cases and patients with GS ≥ 9 . Meanwhile, both the PSA-Gi and PSA-GiD levels in the prebiopsy serum samples were positively correlated with the GS at biopsy, with the levels being particularly higher in the patients with SigPC than in the biopsy-negative patients (biopsy negative and GS6 cases on active surveillance; ASGS6). This strongly suggested that prebiopsy PSA-Gi measurement can provide useful and diagnosis-assisting information for selecting the appropriate active surveillance or aggressive treatment interventions after biopsy.

[System development/reagent, device, appliances]

To evaluate the sensitivity performance of the developed measurement PSA-Gi assay kit, we confirmed the reproducibility and sensitivity using the SPFS system. The test results for measurement reproducibility and detection sensitivity are shown in Table 1, and the calibration curves in Figure 3. Regarding the measurement reproducibility (intra-day reproducibility), with $CV \leq 8\%$ in all the concentration ranges (low, medium, and high), the LoD was estimated to be 11 pg/ml, confirming that it met the final target value (≤ 20 pg/ml). Moreover, we observed a wide quantitative range of 17 pg/ml–500 ng/ml and confirmed that one of the features of the SPFS system was its high precision, even under intensely competitive conditions.

To realize an automated blood test system for in vitro diagnosis based on the surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS) technology and that has the throughput of 50 test/h, it is necessary to realize continuous SPFS measurements and continuous automated transportation of the measurement device. In this study, we developed a novel measurement device (Figure 4) and the prototype testing system (Figure 5). This measurement device is a well-type reaction cuvette combined with an SPFS optical prism. Since the PSA antibody are immobilized on the prism surface that faces the inside of the reaction cuvette, all reactions and SPFS measurement are carried out by dispensing the specimen or reagent into the reaction cuvette.

As for the equipment, we will promote a development of commercial product based on the prototype system. As for the reagents, clinical research is planned to continue at multiple institutions, in Japan or abroad, in order to develop in vitro diagnostics. In particular, there is a possibility that cancer grading will become an important index for the proper selection of treatment options. By realizing PSA-Gi testing based on a simple blood test in various situations in prostate cancer diagnosis, we believe it will greatly contribute toward improving the QOL of patients and reducing medical expenses.