

氏名・(本籍)	栗原 伸泰 (千葉県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1014 号
学位授与の日付	令和 2 年 3 月 24 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Practical application of non-contact alternating current electric field mixing for reagent-saving in situ hybridisation of HER2 (電界非接触攪拌技術を応用した HER2 In situ hybridization DNA プローブ希釈に関する検討)
論文審査委員	(主査) 後藤 明輝 教授 (副査) 大森 泰文 教授 寺田 幸弘 教授

学位論文内容要旨

Practical application of non-contact alternating current electric field mixing for reagent-saving in situ hybridization of HER2

電界非接触攪拌技術を応用した HER2 In situ hybridization
DNA プローブ希釈に関する検討

申請者氏名 栗原 伸泰

研究目的

Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)を標的とする薬剤は HER2 陽性乳癌に対して高い効果を示すことが知られている。一方で HER2 陰性乳癌への生存期間延長効果は認めず、毒性や薬剤コストを考慮すると、HER2 発現のより正確な評価が必要である。

乳癌の HER2 発現は免疫組織化学染色(IHC)及び In situ hybridization (ISH)で判定されるが、ISH では高価な DNA プローブが必要なだけでなく、判定まで長時間要するのが現状である。

当科では電界非接触攪拌技術を用いた迅速免疫化学染色装置を開発し、この装置を用いて、乳癌 HER2 での Dual ISH (DISH), 及び肺癌 ALK での fluorescence ISH (FISH)の反応時間短縮に成功し報告している。

そこで本研究は、電界非接触攪拌技術を用いて DNA プローブが希釈可能かどうかを検討し、DNA プローブ希釈の臨床的有用性を評価することを目的とした。

研究方法

秋田大学医学部付属病院で針生検もしくは根治手術を受けた、2015年1月から2017年7月までの113検体を使用した。全ての検体で IHC が施行されており、HER2 0/1(+) 陰性, (2+) 境界域, (3+) 陽性のいずれかの判定を得ている。この113例において、現在本邦で体外診断用医薬品として認められている INFORM Dual ISH HER2 Kit (Ventana Medical Systems)を使用した Automated slide stainer による DISH (ASS), ZytoDot2C SPEC HER2/CEN 17 Probe Kit (ZytoVision)を使用した従来の用手法による DISH (従来法 DISH), ZytoDot2C SPEC HER2/CEN 17 Probe Kit を使用し電界非接触攪拌技術を用いた DISH (AC mixing-ISH)の3法で ISH を施行した。AC mixing-ISH においては DNA プローブを2倍及び3倍に希釈し比較検討した。DNA probe の希釈には ISH 用希釈液の G-Hybo-L(Funakoshi)を用い、AC mixing-ISH での ISH 反応時間は従来法 DISH と同様とした。

尚、本研究で用いた電界非接触攪拌技術は、電極間に試薬を含んだ液滴を静置さ

せ、低周波電界を印加し水分子を共振させることで液を攪拌させ、反応を促進させる技術である。AC mixing-ISH では Hybridization 及び標識抗体と一次抗体を反応させる工程において、電界非接触攪拌技術を用いた。結果は JMP IN V.11.0.0 を用いて統計学的に解析し、Cohen の κ 係数を用いて一致率を評価した。 κ 係数は 0.4~0.8 で中等度から良好な一致で、0.8 以上優れた一致を示す。

研究成績

113 検体の HER2 IHC score の内訳は、(0/1+) 62 例, (2+) 30 例, (3+) 21 例だった。

HER2 IHC score(3+)の症例において、従来法 DISH 2 倍希釈ではシグナルの入りが悪くなり正確な判定が困難だったのに対し、AC mixing ISH 2 倍希釈で感度 100%, 3 倍希釈では 71.4%だった。この結果を元に、HER2 IHC ASS に対する従来法 DISH と AC-mixing ISH 2 倍希釈の一致率を検討した。

従来法 DISH の ASS に対する一致率は 71.7% (κ 係数 0.417, 95% CI 0.266 to 0.569) で、一致率は中等度だった。これに対して AC mixing-ISH 2 倍希釈での HER2 スコアの精度は、ASS と同等で 96.4%の一致率 (κ 係数=0.912, 95% CI 0.828 to 0.997) だった。AC mixing-ISH 2 倍希釈で非特異反応を抑え安定した結果を得ることが出来た。

結論

AC mixing を用いることで、DNA プローブ濃度を希釈しても正確で安定した HER2 スコアを得ることが可能で、臨床応用できる可能性が示唆される。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 後藤 明輝
申請者： 栗原 伸泰

論文題名： Practical application of non-contact alternating current electric field mixing for reagent-saving in situ hybridization of HER2

電界非接触攪拌技術を応用した HER2 In situ hybridization DNA プローブ希釈に関する検討

要旨

著者の研究は、論文内容要旨に示すように、乳癌における Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 発現を判定する手法の一つである Dual color In situ hybridization (DISH) において、電界非接触攪拌技術を用いた HER2 DISH DNA プローブ希釈プロトコルを開発し、その臨床的有用性を検討したものである。DISH は反応時間が長く、また使用される DNA プローブが非常に高価であることから、進行癌患者の治療開始の遅れや経済的な負担に繋がっている。電界非接触攪拌技術を応用した先行研究である HER2 DISH 迅速化プロトコルの作成に続き、本研究では DNA プローブ希釈に取り組み、実臨床で使用されている体外診断薬で行われた DISH 結果との比較を行うことで、臨床的有用性を検討している。本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

乳癌 HER2 発現の判定には、本邦では免疫組織化学染色で定性的な評価を行い、そのうち(2+) 境界域と判定されたものが、ISH による定量的な判定に回っている。DNA プローブは一般に非常に高価であり、プローブ希釈のための希釈液が市販されてはいるが、その使用は研究用に限定される。筆者らの教室では、秋田県産業技術センターとの共同研究で開発した電界非接触攪拌技術を用いることで、免疫組織化学染色における抗原抗体反応の促進に成功し、これまでに乳癌の HER2 DISH の時間短縮や肺癌 ALK FISH の時間短縮への応用も成功している。本研究の斬新性は、この電界非接触攪拌技術を乳癌 HER2 DISH の DNA プローブ希釈に初めて応用した点にある。

2) 重要性

本研究で用いた研究用試薬では、スライドグラス 1 枚につき約 1 万円の費用がかかる。また乳癌 ISH 単独検査の保険点数は 2700 点となっており、検査料として

は高額である。様々な癌腫で遺伝子検索が治療選択に必須になっている現代において、その検査料は患者の経済的な負担のみならず、本邦で膨らみ続ける医療費の問題にも関わる。また癌の不均一性を考慮し、転移巣における遺伝子異常の再検索も求められることが増加している。本研究において、DNA プローブ希釈プロトコルで得られた結果は、体外診断薬で行われた HER2 DISH 結果と比較検討し、非常に高い一致率を得ている。これらのことから新規の方法論を開拓したことにくわえ、DISH のコスト効率の上昇の可能性を見出せた実用的価値をあわせ持つ点に本研究の重要性があるといえる。

3) 研究方法の正確性

Hybridization 工程における電界非接触攪拌の条件については、既に筆者らの教室において開発し、報告したプロトコルに則り行われている。乳癌 DISH の評価に関しては、希釈プロトコルにおいても病理専門医による評価を行い、体外診断薬の結果判定と同レベルでの評価を行っている。結果に関しては、いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

さらに現在の HER2 発現判定の問題点を背景に研究目的を掲げ、HER2 DISH DNA プローブ希釈プロトコル作成に関する方法論が明確に記載され、体外診断薬で行われた HER2 DISH 結果との比較検討結果、考察が簡潔に述べられていると考える。

以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。