

平成 27 年度  
次世代医療機器・再生医療等製品  
評価指標作成事業

微量診断装置審査 WG 報告書

平成 28 年 3 月

審査 WG 座長 前田 瑞夫  
国立研究開発法人 理化学研究所

## 報告書目次

1. はしがき .....	1
2. 委員名簿 .....	2
3. 微量診断装置の定義 .....	5
4. 微量診断装置による新規診断法開発、普及の臨床的意義 .....	7
5. 品質・安全性評価方法の基本的考え方 .....	9
6. 性能評価方法の基本的考え方 .....	15
7. 調査報告	
(1) 微量診断装置の開発・利用動向調査 .....	19
(2) バイオマーカーの現状 .....	29
8. 提言：クリニックへ導入する際の留意点 .....	65
9. 参考資料	
(1) 微量診断装置審査 WG 会議議事概要 .....	69
(2) 合同検討会報告資料 .....	87
10. 関連学会のご意見・ご要望と事務局の回答 .....	89

## はしがき

今世紀初頭、ヒトゲノム解読が宣言されると同時に、革新的な技術としてナノテクノロジーが提唱され、これらが医療を大きく変えるとして注目を集めた。なかでも半導体技術を応用して作製されるバイオチップ、とりわけ DNA チップは遺伝子型判定や RNA プロファイリングに威力を発揮し、個別化医療を支える診断装置になると期待されている。

バイオチップには、原理の異なるもう一つのカテゴリーがある。マイクロ流体チップがそれであり、ガラスやプラスチックからなるチップ上に数十 $\mu\text{m}$ 幅の溝（流路）をつくり、このなかでクロマトグラフィーや電気泳動で微量検体の高速分離分析を行なうものである。すなわちマイクロ流体チップには検体前処理・分離・検知などの要素が機能的に配置されており、クリニックや在宅医療にも適用可能な微量診断装置として開発が進められている。

本ワーキンググループでは、近年の技術革新が著しいこのマイクロ流体チップを中心に、実用化への期待が集まる微量診断装置についてその開発動向の調査を行った。また診断マーカーについては、近年、がん診断への適用に期待が集まっているマイクロ RNA(miRNA)、ならびに新規診断薬の登場が期待される肝疾患・循環器疾患のバイオマーカーについて調査を行った。さらに、これら調査結果をもとに、微量診断装置特有の留意すべき点についても議論を行ない、評価指標（案）作成のための基本的考え方をまとめた。

なお微量診断装置をクリニックに導入するにあたっては、検査の科学的根拠や使用者の理解度、被験者の情報保護、さらには保険収載の有無など、考慮すべき課題も多く、ワーキンググループで議論になったことから、これについては提言という形で本報告書に盛り込むこととした。また在宅医療への展開について、本報告書では技術的側面からその可能性を検討してきたが、医学的見地から留意すべき問題点についてはガイドライン作成の際に改めて検討を行うこととし、ここでは触れていない。

小型診断装置は、少子高齢化の問題が懸念される我が国において、かかりつけクリニックや在宅での予防医療・早期診断に有益であるほか、医療費の低減への効果が期待でき、さらに日本の先端技術が設備の整っていない発展途上国の医療に貢献するという意味でも意義が大きい。本報告書が研究開発者、製造者と行政審査の双方に有用な情報となれば幸いである。

平成 27 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標検討会(厚生労働省)／  
医療機器開発ガイドライン評価検討委員会(経済産業省)合同検討会

## 微量診断装置審査ワーキンググループ 委員名簿

座 長：前田瑞夫 理化学研究所前田バイオ工学研究室 主任研究員  
副座長：落谷孝広 国立がん研究センター研究所分子細胞治療研究分野 主任分野長

委 員 (五十音順)：

一木隆範 東京大学大学院工学系研究科バイオエンジニアリング専攻 准教授  
今井 靖 自治医科大学医学部臨床医学部門内科学循環器内科部門 准教授  
黒田雅彦 東京医科大学分子病理学分野 主任教授  
前川真人 浜松医科大学医学部臨床検査医学講座 教授  
馬渡和真 東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 准教授  
村上善基 大阪市立大学大学院医学研究科肝胆膵病態内科学 准教授  
湯川 博 名古屋大学先端ナノバイオデバイス研究センター 特任講師

学会推薦専門家 (五十音順)：

菊池春人 慶應義塾大学医学部臨床検査医学 専任講師 (日本臨床検査医学会)  
戸塚 実 東京医科歯科大学大学院保健衛生学研究科先端分析検査学 教授  
(日本臨床化学会)  
丹羽 修 埼玉工業大学先端科学研究所マイクロ・ナノ化学研究室 教授  
(日本分析化学会)

厚生労働省：

磯部総一郎 大臣官房 参事官 (医療機器・再生医療等製品担当)  
近藤英幸 医薬・生活衛生局 医療機器・再生医療等製品担当参事官室  
医療機器規制国際調整官  
片平尚貴 医薬・生活衛生局 医療機器・再生医療等製品担当参事官室  
医療機器審査調整官

独立行政法人 医薬品医療機器総合機構：

高江慎一 医療機器審査第一部 部長  
牧野 勤 医療機器審査第一部 審査役  
宮本大誠 体外診断薬審査室 室長  
宮崎生子 規格基準部 部長  
藤井道子 規格基準部医療機器基準課 テクニカルエキスパート

審査 WG 事務局：

新見伸吾 国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 部長

藪島由二	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 第一室長
植松美幸	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 埋植医療機器評価室主任研究官
野村祐介	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 第一室研究員
福井千恵	国立医薬品食品衛生研究所医療機器部 第一室非常勤職員

オブザーバ :

北森武彦	東京大学大学院工学系研究科応用化学専攻 教授
細川和生	理化学研究所前田バイオ工学研究室 専任研究員
木山亮一	産業技術総合研究所バイオメディカル研究部門 先進バイオ計測研究グループ 上級主任研究員

## 微量診断装置の定義

## 微量診断装置の定義

微量診断装置審査 WG 委員

高齢化の進展に伴い、国民の「健康寿命」の延伸を実現する手段の一つとして、発症予測/発症前診断により早期の治療介入を行う先制医療や奏効率の高い治療を行う個別化医療が期待されている。がんや認知症等の重篤な疾患の早期診断/早期治療や先制医療の実現には、病識がない早期において、大病院や受託検査機関のほか、クリニックや在宅医療にも導入可能な小型且つ低侵襲の高感度マルチマーカによる診断システム技術が不可欠である。

近年、体液中のマイクロ RNA、蛋白質、ヌクレオソーム等を対象とした微量診断装置のほか、質量分析器を利用した診断法や非侵襲下に血糖値を測定する装置等、様々な機器・技術の開発が活発に進められている。中でも、マイクロ流体チップは技術革新が著しく、様々な新規バイオマーカの測定に応用できることが期待されている。

微量診断装置の品質と性能を科学的根拠に基づいて適正且つ迅速に審査するための評価指標案を作成するにあたり、対象機器としては現在の研究開発動向を考慮して、近年中に上市が見込まれる次世代医療機器又は技術の改変速度が著しい機器を選定することが基本となる。対象機器は可能な限り広範に考えたいが、明らかに異なる技術（原理）を採用した複数の機器を対象にすることは難しいため、焦点を絞る必要がある。また、既承認品や発出済みの評価指標に示された機器は除外することも求められる。

このような背景から、当該審査 WG が作成を目指す評価指標案の対象機器に関する定義は以下のとおりとする。

### 【定義（案）】

採取量又は最終試料がマイクロリットルあるいはミリグラム程度以下の微量検体（血液、尿、唾液、涙液、呼気等）中に存在する特定のタンパク質やマイクロ RNA 等の診断マーカを測定するためにマイクロ流体チップを用いた微量分析装置を対象とする。従来法（DNA チップ、定量 PCR、ELISA 等）と比較して、分析所要時間を短縮できると共に、感度・検出限界の向上も期待される。分析に要する検体量が微量であるため、患者への負担が少なく（低侵襲）、大病院や受託検査機関のほか、クリニック等における Point-of-care testing (POCT) にも利用できる。チップ部分には、特定の診断マーカと結合する抗体や Capturing probe DNA 等が固定化されており、チップを交換することにより、目的に応じた多種多様の診断を行うことが可能である。また、微量分析特有の留意事項についても詳述する。

対象となる診断装置は、マイクロ流体チップ（体外診断用医薬品）と分析装置を組み合わせたものとなる。なお、診断装置から得られる情報の臨床的意義については、個別の事例ごとに臨床データをもとに検証することになる。

## 微量診断装置の臨床的意義



## 微量診断装置による新規診断法開発、普及の臨床的意義

(浜松医科大学) 前川真人

(国立がん研究センター研究所) 落谷孝広

### 1. 我が国の医療の現状と課題

2030年の我が国は、人口の減少（2030年には現在の人口から100万人以上の減少が見込まれる）や少子高齢化などを要因として、多くの困難な課題に直面していることが予想される。わが国に起こる、こうした世界が未だ経験したことのない急速な人口構成の変動は、国民全体に負のスパイラルを生み出し、地球環境やエネルギー問題と相まって日本全体の経済力の低下や世界におけるリーダーとしての立場の失墜を招きかねない。日本国民にとってより豊かで幸せな生活を維持成長させるためには、少子高齢化が招く労働人口の低下、生産性の低下、消費力の低下、貧困率の上昇、晩婚・非婚化といった負のスパイラルを断ち切るための思い切った政策の転換や科学政策の充実が必要な時期である。

日本社会で加速する人口減少による負のスパイラルを解消する第一の手段は、その起点となる少子高齢化に歯止めをかけることだが、社会情勢から割り出された答えはどれも否定的であることから、現時点で最も効果的な手段は、中～高齢者の社会における活躍の機会を増やすことで日本全体の生産性を保つことにある。しかし、我が国はすでに2人に1人が「がん」に罹患する時代となっており、2025年の我が国の国民医療費は54兆円に、また介護給付費は2012年度の8.1兆円から2025年度には2.4倍の19.8兆円にのぼると推測されている（厚生労働省）。この医療・介護費の増大を緩和するためには、研究の加速が必要であるが、シーズ探索などの基礎研究に始まり、創薬、新薬の開発が軸となる従来型の科学政策では追いつかないのが現状である。なぜなら、がんや認知症、アルツハイマー病を完全に克服するまでには膨大な費用と時間を要するためであり、治療重点の医療から、疾病予防を重視した保健医療体系への転換が緊急の課題である。すなわち、疾患を早く発見することで、がんなどの疾病による死亡率を低減させ、医療費の削減に寄与することが、科学的根拠のある事実として明らかになっている。

現在は、健康増進法によりがん検診が行われているが、肺がん検診が検診率20%をわずかに超えている以外は、いずれのがん種における検診も受診率は非常に低い。がん検診による最大のメリットは、早期発見によりがん死亡率の減少が達成されることであり、その他の恩恵としては、対象となるがんの罹患率の減少、QOLの改善、相対的な医療費の抑制などが挙げられる。その受診率を上げるためには、検診センターや人間ドックなどの集団検診（一次検診）で一回の採血や採尿、唾液などで複数のがんや多くの疾患を検出できる簡便な検査法が開発が求められている。こうした新規診断法の開発、普及を支えるのは、微量診断装置の開発であり、我が国の最新テクノロジーを結集した開発プロジェクトの始動が鍵となる。このような微量診断装置が開発されれば、人間ドック、検診センター、市区町村の健康診断をはじめ、将来的には在宅での検診（健康モニタリング）を可能にする診

断装置を普及させることで、疾患の早期発見と治療介入に繋がり、国民の生命を守り、かつ国民医療費の削減に大きく寄与するものと期待される。

## 2. 微量診断装置の役割と意義

微量検体を対象として、特に新しい分析技術（原理）を用いることで検体を微量化し、新しいバイオマーカー（病名診断、予後診断、治療法の選択など）を測定できる装置は、小型の装置、微量検体で、迅速かつ高感度（低い検出下限値）に測定できるという利点を有する。従って、まず検体の採取が容易で侵襲性が小さくなることが予測される。血液採取においても、通常の臨床検査で行われる静脈採血ではなく、自己血糖測定のための指頭採血のような毛細管血で分析可能となる。眼房水、関節液、髄液、頸管粘液、羊水、その他の体液など、微量しか採取できない体液、大量に採取したくない体液などの分析も容易になる。さらに、新生児、未熟児、小児からの検体採取も簡便になる。検体の微量化とともに試薬量も少なくなることで全体としての価格が下がる可能性がある。また測定系によっては、反応が早く終了するため測定時間の短縮が期待され結果が迅速に得られる。

新しい分析技術によって小型化すれば、分析装置はどこにでも設置でき、さらに操作が簡便で管理が容易、精度管理が簡単であれば、幅広い職種が分析可能となり、クリニックでも設置し検査ができるようになる。マイクロ流体チップなど全自動化された小型の機器はこの用途に向いていると考えられる。

かかりつけ医となるクリニックで分析できる体制が整えば、現在は低い検診率を上げる効果が期待でき、一次スクリーニングとして疾患のハイリスク群（がん、生活習慣病、認知症など）を拾い上げて、二次スクリーニング、精密検査へとつながる診断体系を構築することができ、これからの医療が求める予防医学や早期診断を実現することが期待される。

品質・安全性評価方法の基本的考え方

## 品質・安全性評価方法の基本的考え方

(日本臨床化学会推薦専門家/東京医科歯科大学) 戸塚 実  
(浜松医科大学) 前川真人

マイクロ流体デバイスと分析装置を組み合わせた微量診断装置の品質・安全性評価に当たっては、分析系が微小な流路によって構成されているという特徴を十分理解した上で、試料の多様性（血液、尿、唾液、涙液、または呼気）を考慮した最適な構造を備えていること、さらには必要に応じて試料の適切な前処理法を示すことが要求される。また、大小様々な医療現場で汎用可能なデバイスとするために、操作性に優れ、精度を保障する容易なシステムを備え、十分な感染防御対策が施されている必要がある。測定結果の精度については、その妥当性を容易に判断可能な機能を備え、不良検査結果を的確に識別できることが必要である。加えて、トレーサビリティ体系の構築によって標準化が実施できるか、あるいは特定の評価施設の指針によって標準化可能な体制の構築が望まれる。

### 1) 品質管理の方法

マイクロ流体デバイスの構造に即した反応原理を明確にした上で、測定対象物質を特異的に測定できることを、標準物質測定および実検体を用いた添加回収試験等にて説明すること。また、標準物質の表示値の分析化学的根拠と精度管理の方法について明確に説明すること。

### 2) 分析的妥当性

標準物質を段階的に希釈し、測定結果が直線性を示す範囲を明確にするとともに、低値域については検出限界を示すこと。また、その直線性の範囲における低値、中間値、高値の少なくとも3濃度の試料を用いた同時再現性を示し、誤差の程度を規定すること。さらに、測定値に影響を及ぼす干渉物質とその濃度について、測定反応に及ぼす影響と検出原理に及ぼす影響の別に定量的に説明すること。すでに対象物質を測定可能な装置が存在する場合は、その装置との相関性について説明するとともに、回帰式の傾きが大きく異なる場合、あるいは切片を生じる場合はその原因と考えられる可能性について示すこと。

### 3) データの標準化

マイクロ流体デバイスのロットによって測定値に差異を生じる場合は、較正が必要である旨の情報が遺漏なく使用者に通知されること。また、ロット毎の較正結果を記憶するなど、マイクロ流体デバイスのロット混在への対応法を説明すること。さらに、コントロール試料を供給するなど、精度管理に必要な仕組みについて示すこと。また、標準物質の使用により、真値に対するトレーサビリティ体系が構築されているか、特定の評価施設によるロット管理で標準化を可能とすること。

#### 4) 測定装置の較正

検量線作成が必要な場合は、検量線が直線である場合は0濃度（陰性）較正試料と値付けされた較正試料によって2点較正する方法を、検量線が曲線の場合は、0濃度（陰性）較正試料を含む様々な濃度の複数較正試料により、曲線に近似可能な検量線を作製する方法を説明すること。また、マイクロ流体デバイスのロットごとに較正内容が装置に組み込まれる場合は、その内容と根拠について説明すること。加えて、コントロール検体によって較正の妥当性を検証する方法を示すこと。

#### 5) 安定性

マイクロ流体デバイスのロット、有効期限および管理法を示すこと。また、測定が正常に行われなかった場合の、警報機能について説明すること。

#### 6) 試薬

マイクロ流体デバイス以外に、検体の前処理を含めて別途試薬を使用する場合は、その規格を明示すること。

なお、マイクロ流体デバイスを利用した微量診断装置の品質・安全性評価を行ううえで、必要と考えられる具体的な項目を別紙に示した。

## マイクロ流体デバイスを利用した微量診断装置の品質・安全性評価項目

### (ア) 基本的事項

- ・ 反応原理、検出原理（反応部、検出部等の機構についての原理を詳細に示す）
  - ① 反応原理を明確に示す
  - ② 検出原理と検出限界を示す
  - ③ 反応に影響する干渉物質とその濃度について言及する
  - ④ 検出原理の特性に起因する干渉物質とその濃度について言及する
  
- ・ 反応部と装置の構造（形状・サイズを含めた装置本体の仕様、装置を構成する各構成要素の仕様及び機能概略を示す）
  - ① 試料の定量的分取法
  - ② 試料のデッドボリューム
  - ③ 試薬の定量的分取法
  - ④ 試料と試薬の攪拌機構
  - ⑤ 反応液の検出部への導入法
  - ⑥ 反応ユニットの脱着法
  - ⑦ 検出部汚染防止への対処法
  
- ・ ソフトウェア（OS 及びアルゴリズムの妥当性を含む）
  - ① 外部出力機能（LAN、サーバ等への接続）
  - ② 測定日時、患者属性入力
  
- ・ 安定性（保管、配送、設置及び移動時）
  - ① 反応ユニットのロット、有効期限の管理
  
- ・ 設置（質量、寸法、転倒防止対策）
  - ① 電源の規格（電圧、電流）
  - ② 充電機能の有無
  - ③ 充電可能な場合は完全充電後の使用可能時間
  - ④ ディスポーザブルユニットの廃棄法（法定廃棄の必要性、等）
  
- ・ 騒音・振動・照明
  - ① 装置が発する騒音・振動の詳細
  - ② 室環境に求められる騒音・振動の規格
  - ③ 求められる照明の規格

- ・トレーニング計画の必要性とその内容
  - 技能習得基準（検体採取・測定・機器取扱）を設定し、標準手順書を作成し、以下の点を加える
  - ① 検体採取・測定・機器取扱方法
  - ② 測定者の明記
  - ③ 検査結果に対する注意点（検出限界、検体種、採取方法、誤操作）
  - ④ トラブル対応
  - ⑤ 消耗品等の廃棄・処理方法
  
- ・使用者向け操作マニュアル等の文書化の適切性
  - ① 文書改訂履歴の明確化と版数
  - ② 認証番号
  - ③ 医療機器の分類、一般名称、JMDN コード
  - ④ 操作方法
  - ⑤ 使用上の注意
  - ⑥ 貯蔵・保管方法
  - ⑦ 保守・点検事項
  - ⑧ 承認条件
  
- ・周辺環境対策（電磁波、温度等）
  - ① 室温管理条件
  - ② 湿度管理条件
  - ③ 電磁波対策（シールド）の必要性
  
- ・使用環境（病院、施設、在宅等）
  - ① 使用目的の明記（病院検査部における患者検体検査 and/or ベッドサイドにおける患者検体検査 and/or 個人による個人のための使用）
  - ② 使用者の条件（医師・看護師・臨床検査技師、等の医療技術資格を必要とするのか、誰でも使用できるのか）

#### (イ)安全性評価

- ・電気的安全性及び電磁両立性
  - ① 感電防止対策
  - ② 電気回路の遮蔽（防水対策）
  
- ・機械的安全性
  - ① 操作者の安全（駆動部への接触防止および接触時の緊急停止）

② 試料・試薬の飛散防止

・品質マネジメント

- ① 反応部の温度制御チェック機構
- ② 電気制御部のチェック機構
- ③ 反応のモニター機構
- ④ 検出部のチェック機構（光量、電量、など）
- ⑤ 作動のチェック機構
- ⑥ 試薬劣化のチェック機構
- ⑦ データ処理部のチェック機構

・リスクマネジメント

- ① 考えられるトラブルとその対処法
- ② 警報音や画面によるトラブルの表示
- ③ 使用頻度に応じた操作部の設計（簡便な操作、緊急停止ボタンの配置など）
- ④ 緊急時の試料・試薬のロスおよびコンタミネーションの防止

(ウ)標準溶液（作製方法、使用方法、保存条件）

注意事項

- ① 有効期限と使用期限
- ② ロット管理
- ③ 設定値と許容範囲
- ④ 温度管理
- ⑤ 汚染防止
- ⑥ 濃縮防止管理（密閉）
- ⑦ 使用前の室温化手順
- ⑧ 使用法（頻度、必要なタイミングなど）

(エ)試薬調製

注意事項

- ① 有効期限と使用期限
- ② ロット管理
- ③ 温度管理
- ④ 汚染防止
- ⑤ 微量試薬の濃縮防止管理（密閉）
- ⑥ 使用前の室温化手順
- ⑦ 調製手技の統一化



(オ)検体調製（種類、採取量・方法・部位、前処理、保存方法等）

- ① 試料は主に血液、尿、唾液、涙液、または呼気である
- ② 試料は生体から採取した検体材料をそのまま用いるか前処理を必要とするか明示する
- ③ 試料の採取は通常の検体検査に準ずる
- ④ 指定された量を確実に採取する
- ⑤ 試料が血液の場合、全血、血漿、血清のいずれかを明示する
- ⑥ 試料が尿の場合、防腐剤使用の可否を明示する
- ⑦ 試料を保存する場合、その方法を明示する
- ⑧ サンプルングによる測定結果への影響を明示する

(カ)測定制御用プログラム

- ① 制御フローの明記
- ② ダウン時のマニュアル対応の可否

(キ)測定、データ解析、使用上のリスク分析

- ① 測定レンジをオーバーした場合の対処
- ② 異常データを識別できる出力形式
- ③ （専門家でない者が使用できる場合）データ使用の可否の明確化

(ク)装置・試薬等の管理（装置較正、日常管理・保守点検、分析法バリデーション等）

- ① 較正の方法
- ② 較正の必要時と頻度
- ③ 日内・日間精度管理の方法
- ④ 日内精度管理の頻度
- ⑤ 保守点検の頻度と方法

(ケ)トラブルシューティング

- ① トラブルの原因を特定できるシステムを内蔵
- ② トラブルと対策の一覧表
- ③ トラブルシューティングの具体的図説
- ④ ユーザーが対処可能な範囲の明確化
- ⑤ トラブルシューティングに要する大まかな時間

## 性能評価方法の基本的考え方

# 性能評価方法の基本的考え方

(東京大学) 馬渡和真

分析では、サンプリングした微量検体を 10-100 $\mu\text{m}$  スケールの流路で構成されるマイクロ流体チップに導入して、チップの中で前処理などさまざまな分析操作を行う。したがって、性能評価においては、従来の分析法における一般的な分析性能評価項目に加えて、チップが取り扱う微量検体特有の性能評価項目が生じる。特に、マイクロ流体チップは加工、流体制御、検出、温度制御などさまざまな技術が用いられるため、これら技術要素に応じて評価項目を整理する必要がある。

## (1) 微量検体特有の性能評価項目

### (1-1) チップ加工部

#### (1-1-1) 加工精度

マイクロスケールなどの微細加工ではサイズ誤差が生じやすい。そこで、マイクロ加工したチップのマイクロ流路やチャンバーなどサイズの許容誤差範囲を示し、作製したチップが許容誤差範囲内であることを示すこと。基板を接合する場合は、基板接合後の寸法について検討すること。

#### (1-1-2) 表面処理

微小空間では比表面積が桁違いに大きいことから非特異吸着防止や表面を利用した分子捕捉などのために表面処理が必要な場合が多い。そこで、修飾した表面処理の均一性や安定性を示す指標（評価方法を含む）および該指標の許容誤差範囲を示すとともに、許容誤差範囲を満たしていることを示すこと。

#### (1-1-2) 機能性分子の活性

マーカーの分析には分子認識能を持った DNA やタンパク質などの機能性分子(試薬)をチップ内に事前に固定して用いることが多い。しかし、微小空間では微量であるために活性変化を受けやすい。そこで、チップに固定化した機能性分子の活性の安定性を示す指標（評価方法を含む）および該指標の許容誤差範囲を示すとともに、許容誤差範囲を満たしていることを示すこと。

### (1-2) 流体制御部

#### (1-2-1) 流量・圧力制御

微小な空間では超微小流量となるため流量や圧力の誤差が生じやすい。そこでチップ内における流量・圧力の許容誤差範囲を示すとともに、許容誤差範囲を満たしていることを示すこと。

#### (1-2-2) 検体注入量

外部空間からチップに一定量の微量検体を導入する場合、体積が微量であるために誤差が生じやすい。そこで、検体注入方法および注入可能な容量範囲及び至適容量を示すこと。また、容量の許容誤差範囲を示すとともに、許容誤差範囲を満たしていることを示すこと。特に呼気（気体）を扱う場合は、圧力による体積変動も考慮すること。

#### (1-2-3) キャリーオーバー

微小空間では外部空間とチップの接続部などにデッドボリュームが生じやすく、また非特異吸着も大きいことから、従来の測定法よりもキャリーオーバーの影響は大きくなる。そこで、キャリーオーバーについて、許容範囲を示すとともに、許容範囲を満たしていることを示すこと。

#### (1-3) 検出部

##### (1-3-1) 位置合わせ

検出に際しては微小空間の中でそのまま検出できることが望ましいが、微小空間ゆえに検出位置がずれ測定誤差が生じやすい。そこで、検出位置の位置合わせ方法とともに位置合わせの許容誤差範囲を示すこと。また、許容誤差範囲を満たしていることを示すこと。

##### (1-3-2) 基板材料の影響

チップを構成する基板にはさまざまな材料（ガラス、樹脂など）が用いられる。マイクロ流体チップでは流路サイズよりも基板の厚みの方が桁違いに大きく、基板の構成材料や不均一性、荒さなどが検出精度に影響を与える場合がある。そこで、基板材料の検出精度に対する影響を評価するとともに、これらの許容範囲を示すこと。また、許容範囲を満たしていることを示すこと。

#### (1-4) 温度制御部

測定時に必要な温度が設定可能な制御域をもち、その温度をマイクロ流路内において許容可能な誤差内で安定して保持できることを示すこと。あるいは、外部温度による影響を内部補正可能な機構を備えていることを示すこと。

#### (2) 一般的な分析性能評価項目

##### (2-1) 検出性能（LOD/LOQ）

測定対象とするマーカーの臨床的意義のある濃度域を設定できること。また、その濃度域において、十分な検出性能を有することを確認するため、その検出限界濃度およ

び定量限界濃度を判定すること。

(2-2) ダイナミックレンジ

対象とするマーカーの測定において、様々な濃度について試験を行い、精度よく定量可能な濃度範囲を示すこと。

(2-3) 再現性・頑健性

適切な濃度の複数のサンプルを使用した繰り返し測定を行うとともに、各種測定条件を適切な範囲内で変動させて測定を行い、微量検体測定での再現性及び頑健性について検証すること。その際、繰り返し回数、使用検体、条件範囲等に関する妥当性を示すこと。また、必要に応じて、外部精度管理の方法に関する情報を提供すること。

(2-4) 正確性

臨床的に必要な測定範囲内で得られた測定値の妥当性（正確性）を評価するために、国際標準品または外部精度管理物質などを使用した試験を行い、偏りなく正しい値がであることを示すこと。

(2-5) 相関性

同一検体を用いて、従来法による測定値と微量検体による測定値の比較を行い、その相関性を確認すること。

(2-6) 共存物質の影響

対象とする物質の測定時に抗原抗体反応や基質の酵素反応を妨害する可能性のある物質（血液中のヘモグロビン、ビリルビン、脂質などや投薬された薬物など）について、あらかじめ評価しておくこと。また、測定機構に影響を与えうる混入物全般の影響についてもあらかじめ評価を行い、その影響を排除可能な機構を備えていることを示すこと。

(2-7) 希釈直線性

試料を段階的に希釈し、試料の希釈倍率と測定値が比例関係にある事を確認すること。

(2-8) 添加回収試験

標準検体に濃度既知のマーカーを添加して、添加量が測定値に正しく反映されていることを確認すること。また、標準検体の標準としての妥当性も示すこと。

(2-9) miRNA を分析する際に特に要求される項目

(2-9-1) 相同 miRNA の選択的検出

miRNA は一塩基だけ異なる配列を持つような、高い相同性を持つ RNA が存在する。類似の miRNA の中から選択的に標的 miRNA を検出できるか確認すること。

#### (2-9-2) 定量性

miRNA は非常に微量かつ不安定であるため、生体試料からの抽出・精製工程における精度の影響を受けやすい。miRNA の抽出・精製・検出の一体型マイクロ流体チップの場合は特に、その抽出・精製工程の精度を確認すること。

#### (2-9-3) 前駆体 miRNA と成熟型 miRNA の区別

miRNA は細胞内で前駆体と成熟型が存在するが、成熟型のみが生物学的活性を有するため、前駆体 miRNA と成熟型 miRNA を区別して扱う場合が多い。前駆体 miRNA と成熟型 miRNA を選択的に測定できるのか確認すること。

\* 配列解析をマイクロアレイで行う場合には、マイクロアレイチップの性能評価方法に準ずる。

# 調査報告

開発・利用動向調査

## 微量診断装置の開発・利用動向調査

(東京大学) 一木隆範  
(東京大学) 馬渡和真  
(名古屋大学) 湯川 博  
(理化学研究所) 細川和生

### 1. はじめに

診療・介護などの医療現場での臨床検査を意味する point-of-care testing (POCT) の概念は、1980 年代後半に米国で導入されて以降、糖尿病患者の血糖モニター検査や妊娠検査などの普及に見られるように、世界中で診断機器、診断薬としての地位を築いている。近年、センサ技術、マイクロ流体デバイス技術などの目覚ましい進化、ならびに新規バイオマーカーの開発の進展により、微量の検体(血液、尿、唾液、涙液、呼気等)中に存在する特定のタンパク質や miRNA 等の診断マーカーを測定し、広範な疾患領域における POCT を可能にする微量分析装置の実用化が近づきつつある。

特に「マイクロ流体デバイス」技術を用いる診断装置では、装置の小型化や機能集積化が可能になり、従来の診断機器に比較して、操作の簡便化、分析所要時間の短縮、感度向上などが期待される。診断に要する検体量が微量であるため、患者への負担が少なく(低侵襲)、大病院や受託検査機関のほか、クリニック等、さらに将来は在宅での臨床検査に利用できると考えられる。

現在、米国のベンチャー企業が中心的担い手となって、多くの装置が開発、製品化されているが、国内でもいくつかのベンチャーに加えて、電子デバイスメーカーや精密機器メーカーなど、微量診断装置の上市を目指して研究開発を行っている企業は少なくない。本稿では国内外で開発中、あるいは海外で上市済であっても国内で販売されていない製品の中からいくつかの代表的なデバイスを紹介し、開発や承認取得の状況、機器の原理や特徴、将来性などを記す。

### 2. Rheonix: EncompassMDx, Rheonix CARD

米国 Rheonix, Inc. が 2008 年から開発している分子診断システムであり、体外診断装置であるため、FDA 承認が必要ないとしている。現時点では、研究目的使用のみ(RUO)のオープン・システムとして提供可能である。

生化学検査および免疫検査、DNA 検出を完全自動化したシステム [文献 1] で、自動サンプル調製、多重処理による高効率化、低コストを特徴とする。プラットフォーム EncompassMDx に、使い捨ての流体デバイス Rheonix CARD [文献 2-4] を装填して使用する。

EncompassMDx は自動溶液ディスペンサー、イメージ分析、自動サンプリング、定量 PCR を含み、シフトあたり 48 サンプルのスループットで 1 年間に 12,000 テスト(シングルシフト、5 日/週、50 週/年)が可能である。一塩基変異多型(SNP)検査における全



図 1 EncompassMDx  
(文献 4 より)



血サンプル分析(16 サンプル)の場合、蛍光ベースの定量 PCR に 60~75 分、無人分析に 3.5 時間を要する。ポリスチレン製の機能集積デバイス Rheonix CARD は、様々なサンプル(組織、尿、全血、血清、体液等)に対応し、5  $\mu$ l~5 ml の溶液または 20 mg までの組織サンプルを溶剤・酵素で溶解した後、カラム吸着や磁気ビーズで分析対象の DNA 等を精製する。PCR で増幅した後、Hy-Fi Microarray™(256 プローブ/cm<sup>2</sup>の低密度マイクロアレイ)を用いて DNA、RNA またはタンパク質を捕獲し、定量 PCR、ラテラルフローイムノアッセイ(ストリップテスト)で分析する。

アプリケーションは HPV 検出、ワルファリン遺伝子型判定等が想定されている。

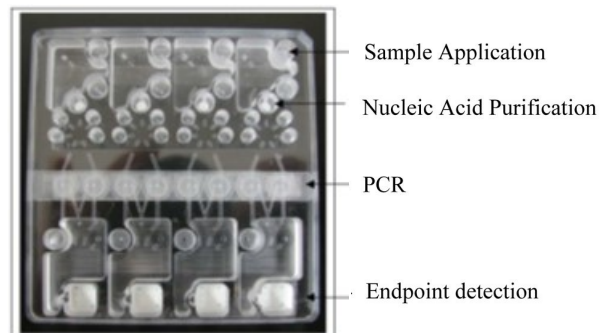


図2 Rheonix CARD (文献3より)

### 3. Abaxis: Piccolo Xpress Point-of-Care chemical analyzer

1980 年代にオークリッジ研究所で開発された血液診断技術に、米国 Abaxis が改良を加えたコンパクトディスク方式の全血分析装置で、2003 年に上市、FDA 承認をうけており、26 の CLIA 認定を保持している。

Piccolo Xpress™ に、使い捨てのプラスチック製試薬ディスク(直径 8 cm)を装着して使用する。リング状試薬ディスクの中央に血漿用希釈剤(300  $\mu$ l 程度)が封入されており、全血 90-120  $\mu$ l を注入すると、遠心分離と毛管現象を組み合わせ、必要量の血液を量って赤血球を分離し、さらに希釈剤を量り、幅 0.50 mm、高さ 0.13 mm の流路を介してディスク周辺部のキュベットに輸送する。キュベットには凍結乾燥された試薬ビーズが入っており、血漿サンプルと混合される。ディスクは、時計回りに 1000 rpm、反時計回りに 1000 rpm で各 70 秒間回転させる振動サイクルにより、キュベット内に渦を発生させる。分光光度計は、スピニング・ディスクで同期してキセノン・アーク灯を発光させることにより、3.5 分の間、全キュベットで反応をモニターし、吸光度からグルコースなどの濃度変化を検出して反応量を算出する。また、複数のテスト(14 検体まで)を並行処理できる。小分子や、代謝、脂質、肝臓、腎臓病などのタンパク質病理マーカー等の診断にも使用できるとしている[文献 5,6]。

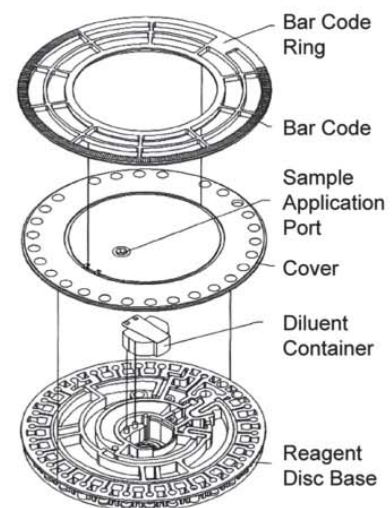


図3 Single-use disc (文献5より)



図4 Piccolo Xpress™ Point-of-Care chemical analyzer (文献5より)

#### 4. OPKO Diagnostics: Claros 1 (mChip)

米国の OPKO Diagnostics 社(2011 年以前は Claros Diagnostics 社)が 2005 年から開発してきた、免疫学的測定を原理とするポイントオブケア診断デバイスである。開発中は mChip という名前で文献等に情報が公開されていたが、現在では改良を経て Claros 1 と命名され、FDA clearance pending となっている。以下の情報は mChip のものである。

装置は図 5 に示すような外観であり、内部は図 6(左)に示すように流体制御系、吸光度測定系、データ処理・通信系を含み、全体が 9V バッテリーで駆動される持ち運び容易な装置である。装置には、図 6(右)に示すマイクロ流体デバイスを挿入して用いる。マイクロ流体デバイスは上流から試薬貯蔵部、試料を入れたキャピラリー、捕捉用分子を固定化した測定領域、廃液溜めを直列に接続した構成となっている。使い方は、

まず全血等の試料を毛細管現象でキャピラリー管に充填し、それをマイクロ流体デバイスに差し込んだ後、デバイスを装置に挿入する。以降の反応・検出は自動的に進行する。

文献 7 にはルワンダにおける HIV 診断の実証実験の結果が報告されている。HIV の抗原タンパク質を測定領域に固定化し、1  $\mu$ l の全血試料から抗 HIV 抗体を検出した。金微粒子で修飾した 2 次抗体を用いて、銀増感法により上昇する吸光度をリアルタイムで計測した。採血から結果が出るまでの時間は 20 分であった。167 人のルワンダ人被験者に対して、感度 100%、特異度 99% のほぼ完全な HIV 診断ができたと報告している。ほぼ同様の方法で梅毒を診断する実証実験もルワンダで行っており、67 人の被験者に対して、感度 95%、特異度 76%であった<sup>2)</sup>。

#### 5. Gyros AB: Gyrolab System

スウェーデンの Gyros AB 社(1999 年に Amersham 社からスピノフ)が 2001 年に販売を開始した製品群である。コンパクトディスク型のマイクロ流体デバイス(現在の主力商品は Bioaffy 200 CD、図 7)を回転させて、遠心力により溶液を駆動する。回転の制御と蛍光の検出は Gyrolab workstation により行う。デバイスには 112 組の流路があり、それぞれの流路にストレプトアビジンを表面修飾した微粒子が封入されていて、その表面上で免疫学的測定を行う。流路内壁は大部分が親水性であり、最初の溶液導入は毛細管現象により行うが、要所に設けられた「疎水性のブレーキ」(図 8)により溶液は停止させられ、所定の体積(Bioaffy 200 CD では 200 nl)が測り取られる。回転数を上げると溶液が疎水性ブレーキを突破して、下流



図 5 mChip 装置外観 (文献 7 より)

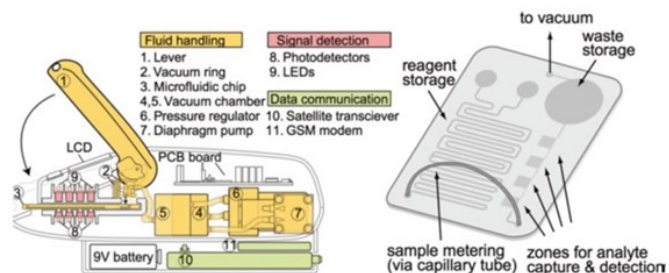


図 6 装置の内部構造(左)とマイクロ流体チップ(右)  
(文献 7 より)



図 7 Bioaffy 200 CD(文献 9 より)

にある微粒子が封入されたカラム部分を通過し、微粒子表面で反応が進行する。

文献 9 には  $\alpha$ -フェトプロテイン(AFP)、インターロイキン-6(IL-6)、癌胎児性抗原(CEA)の免疫学的測定を行った結果が報告されている。測定時間は、抗体の固定化や洗浄も含めて 50 分であり、それぞれの検出限界は 0.15 pM(AFP)、1.25 pM(IL-6)、1.31 pM(CEA)となった。デバイス内での変動係数(CV 値)は 10%未満、デバイス間および日間の変動係数は 20%未満であった。総合的な評価として、従来の ELISA と同等の性能が 1/10 程度の時間、1/1000 程度の試料体積で得られたとしている。

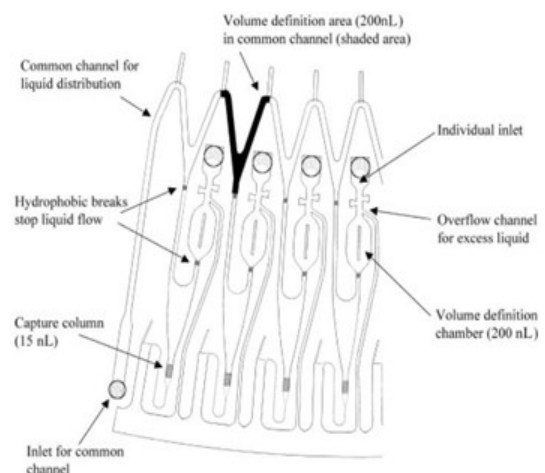


図 8 流路の構造(文献 9 より)

Gyrolab System は抗体と抗原の結合親和性測定にも応用できる<sup>2)</sup>。測定対象の抗体と抗原それぞれの希釈系列を作り、全ての組み合わせをあらかじめ反応させておく。一方で、Bioaffy 200 CD のカラムには抗原を固定化しておき、先の反応で結合しなかった抗体をカラム上で捕捉・定量する。その結果から抗体抗原反応の結合親和性が評価でき、抗体のスクリーニング等に役立つとしている。

## 6. $\mu$ mic AB: Lateral-flow immunoassay device

1998年にスウェーデンのウプサラ大学サイエンスパークに設立されたベンチャー企業で、樹脂(シクロオレフィンポリマーなど)の微細加工技術をベースとして、POC 診断などの医療分野へと展開している。

ここでは、マイクロ加工技術を利用した定量免疫クロマトグラフィーデバイスを紹介する。図 9 のように、従来ニトロセルロースの膜で構成されていた反応部を、マイクロ加工技術によりサイズ制御されたマイクロピラーで形成した。酸素プラズマにより樹脂表面を参加して、シラン加剤である APTES(3-aminopropyl triethoxysilane)を表面に化学的に結合させ、その後 APTES のアミノ基にデキストランを結合させる。その結果、壁面は疎水性から親水性(接触角 30 度)になり、毛管力での溶液輸送が可能になる。Sample zone に血清 15  $\mu$ l を入れ、Sample zone の先端に蛍光標識

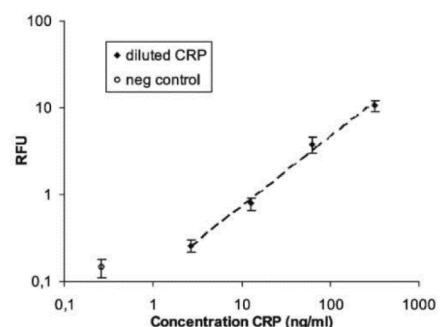
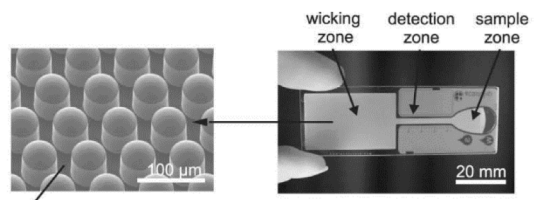


図 9 マイクロ加工技術を利用した定量免疫クロマトグラフィーデバイス開発(文献 11 より)

抗体を加えることで、免疫反応が起こりながら溶液が進む。**Detection zone** には捕捉抗体がスポットしてあり、アナライトを捕捉してサンドイッチ構造を形成する。**Detection zone** からの蛍光を検出することで定量する。非常に制御された構造上での光学検出であるために、定量性も高いという利点がある。CRP を標準添加した血清を試料として、CRP を定量した。検出限界は **2.6 ng/ml** であり、光散乱により定量的な光学検出が困難なニトロセルロースベースのデバイスと比べて **2 桁低い値** であり、**CV15%** と定量性も確保されている。



図 10 実用化されたシステム(Meritas® Troponin I test, 文献 12 より)

簡便な操作で、血液一滴あれば定量できる方法であり、従来のニトロセルロースベースのイムのクロマトグラフィデバイスの欠点を補っており、今後の展開が期待される。Amic 社が 2008 年に Johnson & Johnson 社に吸収された時、開発はストップした。その後、同じくウプサラ大学サイエンスパークの Fiomis 社(アイルランドにある診断キットの世界的メーカー Trinity Biotech 社の小会社)がライセンスを受けシステムを実用化した(CE: cleared, FDA: not cleared)[文献 12]。200  $\mu$ l の全血もしくは血清を用い 15 分で測定可能な小型システムである。

## 7. マイクロ化学技研株式会社: マイクロ ELISA

2001 年に神奈川県川崎市に設立されたベンチャー企業で、ガラスの微細加工技術や、非蛍光性分子の超高感度技術(熱レンズ顕微鏡)など、マイクロ流体技術に関する幅広い技術を有しており、分析や医療診断、化学合成などへと展開している。

ここでは、ELISA(Enzyme-linked immunosorbent assay)法をマイクロ空間に集積化したマイクロ ELISA システムについて紹介する。図 11 のように、マイクロ流路にダム構造を形成して、捕捉抗体を固定化したマイクロビーズを導入する。マイクロビーズはダムのギャップよりも大きいので、ダムの手前で捕捉される。マイクロビーズを反応場として、血清や酵素標識抗体を導入して、抗体/アナライト/酵素標識抗体のサンドイッチ構造を形成す

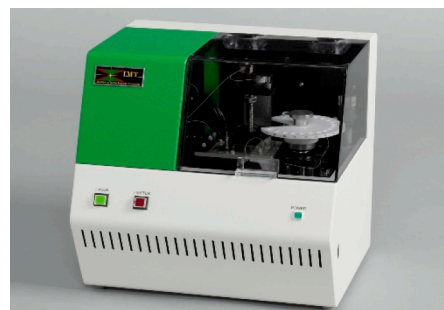
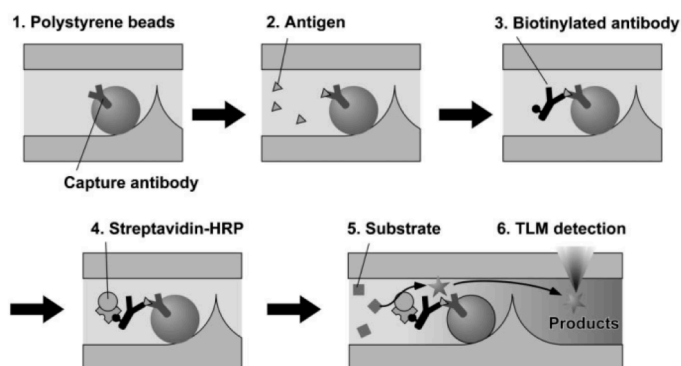


図 11 マイクロ ELISA 法の原理(上図、文献 13 より)とマイクロ ELISA システム(下図、文献 14 より)



る。最後に基質を導入して、酵素反応による発色基質の濃度を超高感度検出器である熱レンズ顕微鏡(TLM)により定量する。現在では、マイクロ ELISA デバイス、ポンプ、バルブ、TLM デバイスなどを搭載した持ち運び可能なシステムが研究用途に実用化されている[文献 15]。

導入する試料量は数  $\mu\text{l}$  あれば十分であり、マイクロ空間の反応であるので反応そのものは数分で終了する。また、ビーズ表面に固定化された抗体を変えれば、さまざまな種類のアナライトに対応可能である。試料や試薬をセットした後はすべての操作が自動化されており、誰でも使えることができ、クリニックやホームユースに適した装置であると考えられる。

## 8. MYTECH: プロテオ® チップ

昭和大学横浜市北部病院消化器センターとマイテックが開発した、表面増強ラマン散乱(SERS)を応用したバイオチップを用いる超早期がん診断技術で、がん患者の血液にごく微量存在するがん関連物質を吸着し、簡便・迅速にがんの検査が行え、ステージ 0 から、がんの有無・がん種の識別・進行度の判定が 7 分以内で可能である。

治療前の状態の患者から末梢血を採血し、血清を遠心分離し、10 倍に希釈した血清 20  $\mu\text{l}$  をバイオチップ上に添加する。血中に遊離したがん関連物質ヌクレオソームを、プロテオチップに形成された過酸化銀メソ結晶に吸着させ、蛍光顕微鏡で観察し、超早期のがんを直接検出する。ヌクレオソームを構成するヒストンは正電荷をもつアミノ酸の含有量が高く、負電荷をもった DNA 分子に強く結合する。正電荷のヒストンがアセチル化され、負電荷同士となって DNA と反発すると、DNA がヒストンからほどけて遺伝子が発現する。基板表面の酸化銀メソ結晶は負電荷のため、正電荷のメチル化ヒストンが特異的に吸着する。吸着したヌクレオソームの蛍光有無と吸着したヌクレオソームの量によりがん有無判定と定量測定が可能である。

DNA・抗体・蛍光物質等のプローブを用いずに、簡便、迅速であり、かつ低コストで実施することが可能である。がんの種別(部位)も特定可能で、健康診断などで使う血液の一部を使って、1 枚のチップ、1 回の検査で、複数のがんの識別・検査が可能である。

金属チップ表面に種々の特性を持たせることにより、目的の物質のみを選択的に検出することも、網羅的検出も可能である。また、抗体を用いた検出法とは異なり、未知の物質の探索的な検出も可能である。その為、がん以外の疾病でも、原因・関連物質を短時間で同定、定量できる可能性がある。



図 12 測定に用いたバイオチップ (文献 2 より)

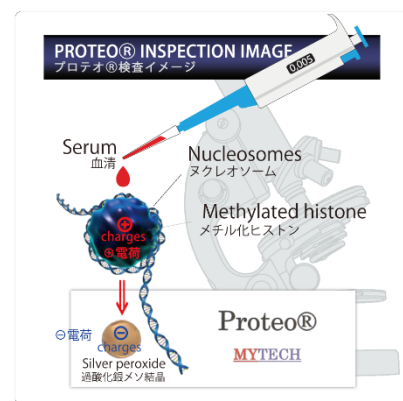


図 13 検査イメージ(文献 3 より)

## 9. 理化学研究所：可搬型マイクロチップ（自律駆動マイクロチップ）

理化学研究所が開発しているマイクロ流体チップである。独自の流体駆動原理によって外部ポンプなしで使用できるため、装置全体の可搬性を向上させることができる。マイクロチップの主要部分はポリジメチルシロキサン(PDMS)というシリコンゴムでできている(図 14a)。PDMS は流路の加工が容易なだけでなく、内部に多量の空気を溶解するという特性があり、この特性を活用することで自律駆動を実現している。具体的にはマイクロチップを減圧下に置くことにより PDMS に溶解している空気を取り除き、使用時には、流路内部と出口廃液溜めにある空気が PDMS に再溶解する現象によって流路に陰圧を発生させ、入り口にある液体を流路に引き込む。

文献 16 ではこのマイクロチップを用いたマイクロ RNA の検出が報告されている。ガラス基板上にプローブ DNA をライン状に固定化し、そのラインと直交するようにマイクロ流路を配置した。サンプルとビオチン化プローブ DNA を流して基板上でサンドイッチ構造を作らせた後、独自の増幅反応を行った(図 14c)。20 分の反応時間で miR-21 を 0.5 pM の低濃度まで検出可能であった。

文献 17 では同様の検出実験をマルチプレックス化した結果が報告されている。3 種類のマイクロ RNA(miR-500, miR-21, miR-16)に対応するプローブ(CP-500, -21, -16, 図 15)をそれぞれ 30 μm 幅のライン状に固定化してマイクロチップを作製し、検出実験においては対応する 3 種類のビオチン化プローブを混合して使用した。結果として異なる RNA 間の交差反応は全く観察されず、それぞれ特異的に検出され、得られた検量線もシングルプレックスのチップから得られたものと有意な違いはなかった。

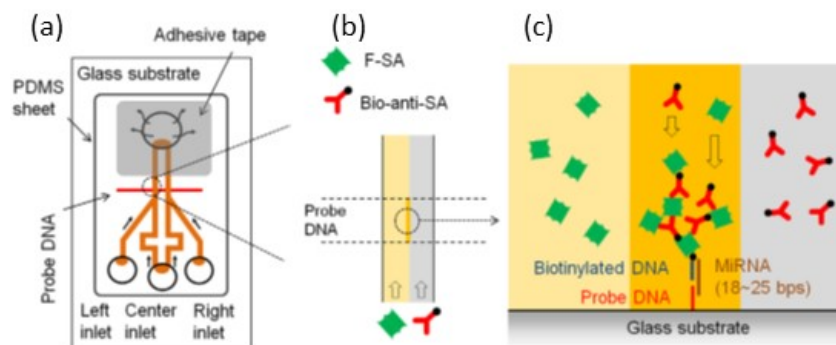


図 14 自律駆動マイクロチップとチップ上でのマイクロ RNA 検出反応、それぞれの模式図(文献 16 より)

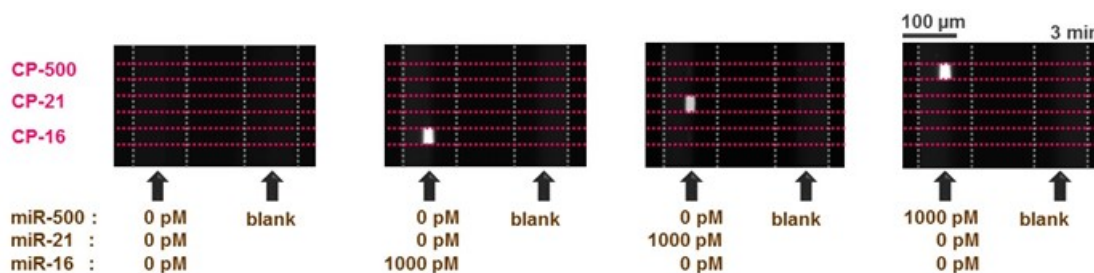


図 15 3 種類のマイクロ RNA を特異的に検出した実験(文献 17 より)

## 10. 東京大学: エクソソーム診断装置

血液や尿などの体液には、エクソソームなどの微小な細胞外小胞体が多く含まれている。エクソソームは、分泌した細胞に由来するタンパク質や核酸(mRNA, マイクロRNAなど)をその内部や膜中に有しており、これらの分子を利用して、様々な疾患の診断が可能になると期待されている。例えば、国立がん研究センターの落谷らは、大腸がん細胞が分泌するエクソソーム表面に発現しているタンパク質CD147を同定し、エクソソームをマーカーとするがん診断の可能性を示している。大腸がん患者194人と健康人191人の血清を解析したところ、従来の血液検査(腫瘍マーカーCEAやCA19-9)と比較して同等以上の診断能を有することが報告されている【文献18】。

東京大学では、マイクロ流路を用いる免疫粒子電気泳動法の原理【文献19】に基づく、エクソソーム表面に発現するタンパク質、糖タンパク質等の分析を可能にする装置を開発している【文献20】。図16に測定の原理およびエクソソーム診断装置の試作機を示す。マイクロ流路チップ内で抗体と作用させたエクソソームの電気泳動を行い、レーザー暗視野光学系を用いて、エクソソームの電気泳動速度を測定し、個々のエクソソームのゼータ電位を検出する。通常、エクソソームの表面は細胞と同様に負に帯電しているが、表面に抗体が結合すると抗体の正電荷に由来してエクソソーム表面の電荷密度が減少し、ゼータ電位が正にシフトする。このシフトを利用してエクソソームと抗体の結合を検出できる。文献3では、がんモデルマウスから採取した血液検体を分析し、がん由来エクソソームの検出に成功している。本システムを用いると、使い捨てのマイクロ流路チップを用いて、10  $\mu$ l程度の血液に相当する試料から1回の測定が可能である。抗体結合の情報を電位として測定するため、蛍光標識抗体を用いたアッセイでしばしば問題となる褪色の影響がなく、サイズ効果による信号検出の不利も生じないなどの技術的な優位性を持つ。特にナノ粒子の測定において重要である。現時点では、研究開発用の装置が試作されているが、装置の小型化によりクリニック等での利用も期待される。

## 11. おわりに

現在本邦でまだ認可を受けていない微量診断装置の開発・利用動向調査を行った。本稿で紹介した以外にも、様々な原理や手法を用いたデバイスがあり、海外のみならず我が国でも開発が行われている。今後の開発動向や臨床試験の結果を注視し、有効性と安全性を検討する必要がある。

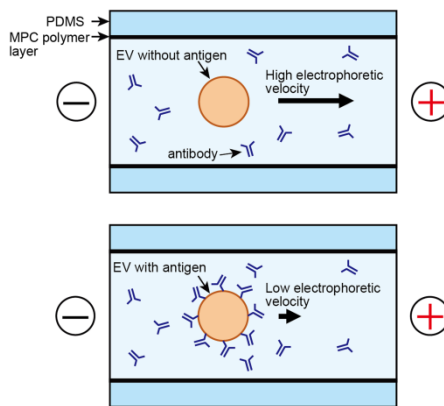


図16 チップ免疫粒子電気泳動法の原理(上、文献19より)、エクソソーム分析装置の試作機(下、文献20より)

## 参照文献

- 1) G. Spizz et al., Determination of Genotypes Using a Fully Automated Molecular Detection System, *Arch Pathol Lab Med*—Vol 139, June 2015; 805-811.
- 2) Z. Chen et al., Development of a Generic Microfluidic Device for Simultaneous Detection of Antibodies and Nucleic Acids in Oral Fluids, *BioMed Research International*, Volume 2013 (2013), Article ID 543294, 12 pages.
- 3) G. Spizz et al., Rheonix CARD® Technology: An Innovative and Fully Automated Molecular Diagnostic Device, *Point Care*. 2012 March 1; 11(1): 42–51.
- 4) R. A. Montagna, MLO Clinical Issues – Meeting the Technical Challenges of Personalized Medicine and Companion Diagnostics, 2012 January; 16-25.
- 5) Whitepaper on Piccolo Xpress(TM) chemistry analyzer: Centrifugation and capillarity integrated into a multiple analyte whole blood analyzer.
- 6) Whitepaper on Piccolo Xpress(TM) Point-of-Care chemistry analyzer: Intelligent Quality Control (iqc™) on the Piccolo Xpress® Point-of-Care chemistry analyzer
- 7) C. D. Chin et al., Mobile Device for Disease Diagnosis and Data Tracking in Resource-Limited Settings, *Clin. Chem.* 2013, 59, 629–640.
- 8) C. D. Chin et al., Microfluidics-Based Diagnostics of Infectious Diseases in the Developing World, *Nat. Medicine* 2011, 17, 1015–1019.
- 9) N. Honda et al., Simultaneous Multiple Immunoassays in a Compact Disc-Shaped Microfluidic Device Based on Centrifugal Force, *Clin. Chem.* 2005, 51, 1955–1961.
- 10) H. Salimi-Moosavi et al., Rapid Affinity Measurement of Protein-Protein Interactions in a Microfluidic Platform, *Anal. Biochem.* 2012, 426, 134–141.
- 11) C. Jöhnsson et al., Silane-dextran chemistry on lateral flow polymer chips for immunoassays, *Lab on a Chip*, 8, 2008; 1191-1197.
- 12) Trinity Biotech 社の Website: <http://www.trinitybiotech.com/>
- 13) K. Sato et al., Microchip-based enzyme-linked immunosorbent assay (microELISA) system with thermal lens detection, *Lab on a Chip*, 4, 2004; 570-575.
- 14) マイクロ化学技研株式会社の Website: <https://www.i-mt.co.jp/>
- 15) T. Ohashi et al., A micro-ELISA system for the rapid and sensitive measurement of total and specific immunoglobulin E and clinical application to allergy diagnosis, *Lab on a Chip*, 9, 2009; 991-995.
- 16) H. Arata et al., Rapid and Sensitive MicroRNA Detection with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification on Power-Free Microfluidic Chip, *PLOS ONE*, 2012, 7, e48329.
- 17) R. Ishihara et al., Multiplex microRNA Detection on a Power-Free Microfluidic Chip with Laminar Flow-Assisted Dendritic Amplification, *Anal. Sci.* 2015, 31, 573–576.
- 18) Y. Yoshioka, et al., “Ultra-sensitive liquid biopsy of circulating extracellular vesicles using ExoScreen”, *Nature Communications*, 2014, 5, 3591.



19) T. Akagi et al., On-Chip Immunoelectrophoresis of Extracellular Vesicles Released from Human Breast Cancer Cells, PLoS ONE, 10, 2015; e0123603

20) 一木隆範, 赤木貴則, ”ナノ医療を加速するナノ粒子解析プラットフォームの開発”, Drug Delivery System, Vol. 30 (2015) No. 3, 204-211.

# 調査報告

バイオマーカーの現状

# バイオマーカーの現状

(東京医科大学) 黒田雅彦  
 (自治医科大学) 今井 靖  
 (大阪市立大学) 村上善基

## I. はじめに

今回、微量診断装置審査WGは、臨床応用に可能な微量診断装置の実用化にむけて、まずはじめに診断マーカーの現状に関して文責を行った、具体的には、特にリキッドバイオプシーの応用が期待されているがんにおける miRNA 診断、臨床的に新規の診断薬が期待されている、肝疾患、循環器疾患において、詳しい調査を行った。

## II. がんにおける microRNA(miRNA)のマーカーの現状

今回微量診断装置審査ワーキンググループでは、現状の診断マーカーの世界的な動向を調査した。

具体的には、PubMed において、報告された論文を網羅的に調べることにより疾患の診断に有用なマーカーの検索を行った。合計 3560 の miRNA の論文を検索し、疾患において発現が変動する miRNA を表 1 及び図 1 にまとめた。

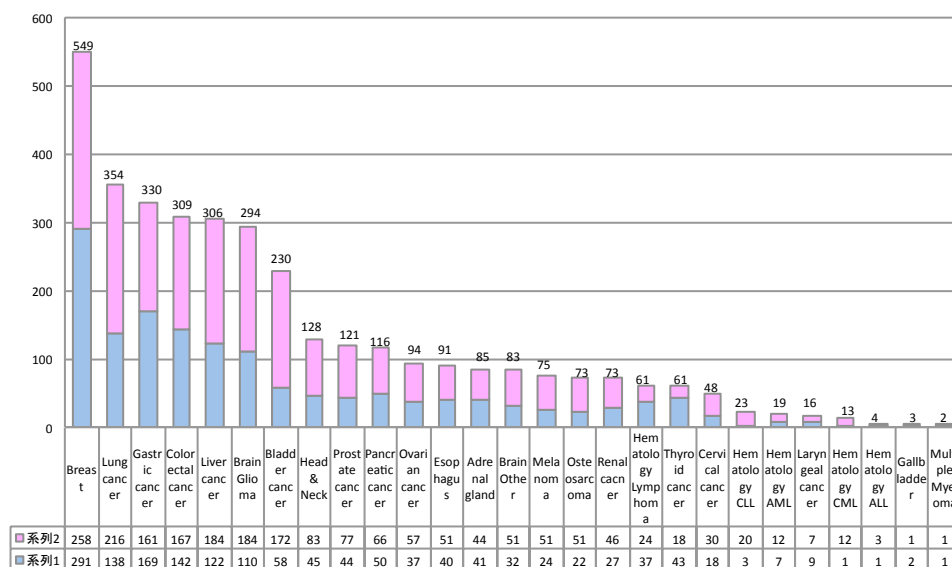
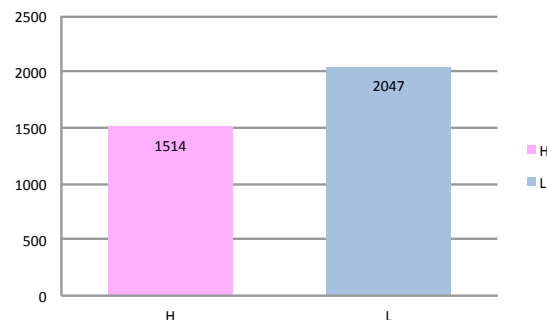


図 1. 疾患により発現が変動する miRNA

疾患別では、多いがん種では、乳がん 549 例、肺癌 354 例、胃がん 330 例、大腸がん 309 例、肝臓がん 306 例と続いていた (図 1)。血液疾患は全体的に少数であるのが興味深い。また、がんにおける miRNA の発現の特性か、発現が増加する miRNA に関する報告は 1514

で、一方発現が減少する miRNA は 2047 であった。今後の診断応用に関しては、これらのデータが参考になると考えられる。

図2 がんにおいてmiRNAの発現変動に関する論文数



H:がんにおいて発現が上昇するmiRNA  
L:がんにおいて発現が低下するmiRNA

### III. 肝疾患におけるバイオマーカーの現状

肝組織は非常に特徴のある microRNA(miRNA)発現プロファイルを持っており、全 miRNA のうち約 70%が miR-122 である。これを背景に肝疾患の診断、治療は miR-122 を中心に精力的に行われている、本稿では 2013 年から 2015 年に発表された代表的な論文をもとに現状を報告する。

#### 1) 循環血中の miRNA を用いた肝疾患診断

慢性 B 型肝炎(CHB)の診断には血清中の miR-181b, 122-5p, 99a-5p, 92a-5p, 29, 124 などの発現を用いて行われている。また慢性 C 型肝炎(CHC)の診断には miR-196a, 30c-5p, 223-3p, 302c-3p, 17-5p, 122, 22, 34a, 20a を用いた報告がある。また慢性 C 型肝炎の治療効果と関連するものとして miR-122 が有用であるとの報告がある (表 2)。

#### 2) 肝細胞癌(HCC)の血清診断

血清中の miRNA を用いたものが多く miR-24-3p, 143, 215, 101, 223-3p, 1228 の発現を利用している。またエクソソームなどの血清中の小粒子を画分しそれに含まれる miR-18, 221, 222, 224, 21 などが利用されている (表 3)。

### 3) 肝代謝疾患の血清診断

複数の miRNA がアスピリンに起因した薬剤性肝障害との関連があるとされている。また原発性胆汁性肝硬変(PBC)やアルコール性肝障害の診断マーカー、肝移植に関連したマーカー、新しい試みとしてHBVのワクチン接種による抗HBs抗体獲得の有無と関連したmiRNAの同定も試みられている(表4)。

### 4) miRNA を利用した核酸創薬

最後に miRNA を治療に応用する試みも複数報告されており、LNA-122 を使った CHC 治療が phase II まで米国で進んでおり(Miravirsen(R))、HCV のタンパク分解酵素阻害剤や RNA polymerase 阻害剤により直接的に複製をコントロールする薬剤の治療効果がめざましいため、実臨床での開発は中断した。HCC に対する治療として miR-221, 191, 375, 101 や let-7, 7a を動物実験でおこなっている報告がある。また現在特異的な治療方法のない肝線維化についても miR-21, 214 の機能を阻害することによって治療を行う試みが報告されている(表5)。

表 2. 肝炎診断に使用した miRNA とその文献

	miRNA	方法	疾患	著者	雑誌	年
1	181b	real time PCR	healthy vs CHB	Yu F,	Diq Dis Sci.	2015
2	196a	real time PCR	healthy vs CHC	Liu B,	Mol Biol Rep.	2015
3	30c-5p, 223-3p, 302c-3, 17-5p	real time PCR	CHC, HCV-positive cirrhosis, HCV-positive HCC, control	Oksuz Z,	Mol Biol Rep.	2015
4	122-5p, 99a-5p, a92-5p	real time PCR	HBsAg-carrier, CHB, SVR	Brunetto MR,	PLoS One	2014
5	29	real time PCR	CHB(S0/1, S2/3, S4), healthy	Huang C,	J Diq Dis.	2014
6	124	real time PCR	CHB necroinflammation 段階別	Wang JY,	J Viral Hepat.	2015
7	122, 22, 34a	real time PCR	HIV, HIV/HCV	Anadol E,	Heaptology	2015
8	122	real time PCR	HCV genotype3	Kumar S,	Dis Markers.	2014
9	122	real time PCR	CHB, CHC, healthy	Zhang X,	PLoS One.	2014
10	122	real time	HCV	Köberle V,	J Viral	2013

		PCR	genotype1(interferon,ribavirin), SVR		Hepat.	
11	122	real time PCR	SVR, NR(nonresponse)	Su TH,	Proc Natl Acad Sci U S A.	2013
12	134, 198, 320c, 483-5p	microarray	HCV 1, 3, healthy	Shwetha S,	Sci Rep.	2013
13	22, 122	real time PCR	CHB	Arataki K,	J Med Virol.	2013
14	複数	real time PCR	children CHB	Winther TN,	PLoS One	2013
15	20a	real time PCR	HCV fibrosis	Shrivastava S,	Hepatology	2013

表 3. 肝細胞癌診断に使用した miRNA

	miRNA	方法	疾患	著者	雑誌	年	備考
1	18, 221, 222, 224	real time PCR	HCC vs CHB or LC	Sohn W et al.	Exp Mol Med	2015	exosome
2	24-3p	real time PCR	HBV related HCC, healthy control (chronic liver disease)	Meng FL et al. .	Med. Oncol.	2014	
3	複数		HCC, control (HBV, C, cirrhosis)	Yang Y et al.	Mol Biol Rep.	2014	
4	143, 215	real time PCR	HCC, control	Zhang ZQ et al.	Diaqn Pathol.	2014	
5	101	real time PCR	CHB, HBV-liver virrhosis, HBV-HCC, healthy	Xie Y et al.	Cancer Biol Ther.	2014	
6	21	real time PCR	HCC, CHB	Wang H et al.	Biomed Res Int.	2014	exosome
7	125b-5p,	real time PCR	CHB,	Giray BG	Mol Biol	2014	

	223-3p		HBV-positive HCC, control	et al.	Rep.		
8	複数	microarray	HCC, CHB, normal	H. Li et al.	Clin Transl Oncol.	2014	microvesicle
9	1228	microarray, PCR		Hu J et al.	Int J Cancer.	2014	スタンダードとしての 利用

表 4. 各種代謝疾患と関連する miRNA の報告

解析媒体	方法	疾患	著者	雑誌	年	備考	miRNA
血清	real time PCR	APAP	Ward J et al.	Proc Natl Acad Sci USA.	2014		
血清		transplantation	Farid WR et al.	Transpl Int.	2014		review
血清	real time PCR	acute liver failure, CHC, HIV/HCV	Dubin PH et al.	J Med Virol.	2014		122
血清	deep sequence	PBC, CHC, CHB, healthy	Ninomiya M et al.	PLoS One.	2013		505-3p, 197-3p etc
血清	real time PCR	HBV vaccine responder, nonresponder	Xiong Y et al.	Clin Vaccine Immunol.	2013		155
血清		APAP	Vliegenthart AD et al.	Aci Rep.	2015		色々
血清	microarray	human alcoholic hepatitis, mouse model	Momen-Heravi F et al.	J Transl Med.	2015	exosome	色々
peripheral blood mononuclear cells	real time PCR	PBC, AIH, PBC-AIH, SLE, healthy	Katsushima F et al.	Hepatol Res.	2014		色々
血清	real time PCR	PBC, healthy	Tan Y et al.	PLoS One.	2014		色々

peripheral blood mononuclear cells	real time PCR	PBC, healthy	Qin B et al.	J Gastroenterol Hepatol.	2013		色々
---	------------------	--------------	--------------	-----------------------------	------	--	----

表 5. miRNA を使った核酸創薬の試み

疾患	miRNA	修飾	動物 モデル	投与方法	著者	雑誌	年
癌	miR-221	Cholesterol-modified anti-miR-122	細胞移植 マウス	tail vein	Jong-Kook Park et al.	Cancer Research	2011
癌	miR-191	2'-MOE-modified oligonucleotides anti-miR-191	細胞移植 マウス	i. p.	Eran Elyakim et al.	American Association for Cancer Research	2010
癌	let-7	adenovirus	virus 入り 細胞移植 マウス		Huajun Jin et al.	Plos One	2011
癌	miR-375	cholesterol-conjugated 2'-O-methyl-modified miR-375 mimics	細胞移植 マウス	intratumor	X-X he et al.	Oncogene	2012
癌	miR-101	lentivirus-mediated	細胞移植 マウス	tail vein	Fang Zheng et al.	PLOS Genetics	2015
癌	let-7a	chilesterol-conjugated	細胞移植 マウス	tail vein	Yang Ming Liu et al.	BMC cancwe	2014
癌	miR-221	Cholesterol-modified anti-miR-122	細胞移植 マウス	tail vein	Jong-Kook Park et al.	Cancer Research	2011
線 維 化 ・ 癌	214	LNA-anti-miR-214	PDGFC 過剰発現 マウス	tail vein (Invivolect amine 2.0)	Okada H et al.	Cancer sci.	2015
線 維	21	anti-miR-21 (phosphorothioate backbone containing modification)	Pten null マウス	Intraperi- toneal	Zhang J et al.	Cancer Res.	2015



#### IV. 循環器分野におけるバイオマーカーの現状

循環器内科領域は、心電図、心臓超音波検査などの生理学的検査、および胸部X線、心臓カテーテル検査、カテーテル治療、CT/MRI,核医学などのイメージング技術の進歩が目覚ましいが、それらと並行し、様々なバイオマーカーが診療現場で多用される。さらに病態生理の解明と分子生物学・分子解析技術の進歩により、将来臨床応用される可能性の高い種々の候補物質が取り上げられつつある。

一例として心不全に関連したバイオマーカーについて以下の図 3 に示す如く、最近では論文報告が著増していることがわかる<sup>1)</sup>。その中でも臨床現場での使用頻度が高いものに焦点を当て概説する。

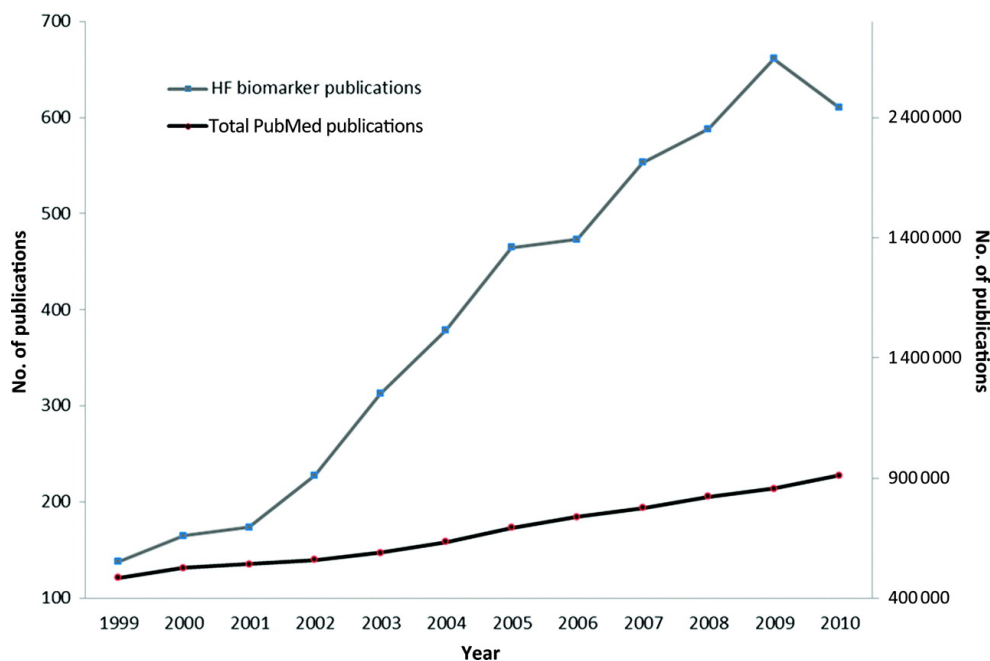


図 3. 心不全に関連したバイオマーカーの論文報告数の年次推移

##### 1) 冠動脈疾患のバイオマーカー

冠動脈インターベンションによる緊急血行再建が普及した現在において急性心筋梗塞はいかに早期発見し可及的早期に血行再建するかが予後改善に大きく関与する。

急性心筋梗塞においては心電図における ST 変化と並行し、急性冠動脈閉塞による心筋壊死を反映する心筋組織傷害マーカーを評価することが必須である。

また前段階である不安定プラークをスクリーニングすることができればプラーク破綻の前に介入することができ心筋梗塞予防へつながる。ここでは心筋組織傷害マーカーと不安定プラークバイオマーカーを説明する。

## 1-1) 心筋傷害マーカー

### ①CK (クレアチンキナーゼ) CK-MB

CK は最も一般的な心筋壊死マーカーであり現在でも広く心筋梗塞の診断、予後の予測に用いられている。急性心筋梗塞発症後 3-8 時間で上昇し 10-24 時間で最大となり 3-6 日後に正常化する。血中 CK の最高値は心筋壊死量を反映するが早期再灌流療法施行例ではピーク到達時間が早くなり最高値も低くなる。

CKは骨格筋および心筋の細胞質可溶性分画に主に存在する酵素で、MM (骨格筋型)、MB (心筋型)、BB (脳型) の 3 つのアイソザイムからなり、細胞の損傷によって血液中に遊出される。心筋傷害の評価には CK 自体は心筋への特異性が低いため CK-MB の評価が必要である。また、CK-MB は骨格筋にも 1~3%存在するため筋疾患でも増加することに留意する必要がある。CK-MB/CK 比が 5%を超えれば心筋傷害の存在を考慮する。

### ②トロポニン

トロポニンは筋収縮を調整する蛋白で心筋特異的なバイオマーカーとして利用される。心筋細胞内で筋原線維に 94%、細胞質可溶性分画に 6%と特異的な分布をしていることから、その遊出動態を分析することにより種々の心筋障害の状態を分析することが可能である。トロポニン (複合体) はトロポニン T、I、C の 3 つのサブユニットからなり、トロポミオシンと共に心筋と骨格筋の収縮機構の調節に重要な役割を果たしている (図 4)。

トロポニン T (TnT) : アクチン及びトロポミオシンとの結合部

トロポニン I (TnI) : アクチンミオシンの ATPase 活性部位を抑制

トロポニン C (TnC) : カルシウムとの結合部位

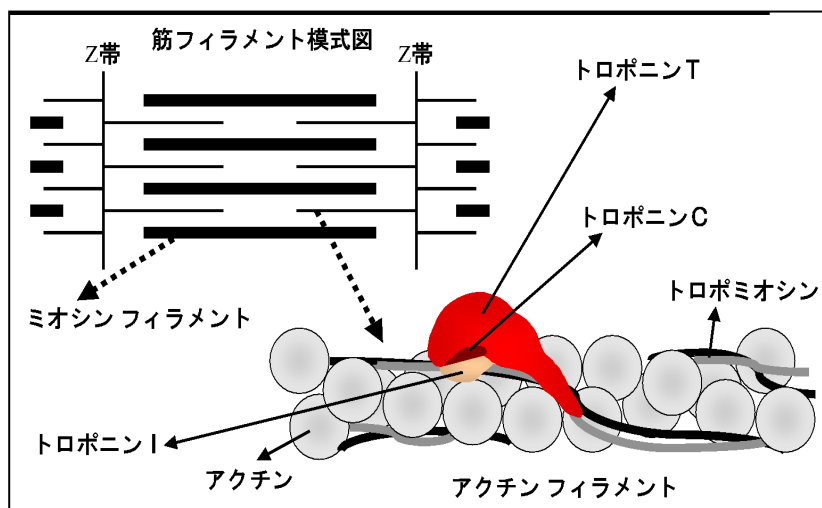


図 4. 心筋におけるトロポニンの役割

CKは健常人でも検出され心筋特異度が低いのに対して心筋トロポニンは心筋特異度が高く、健常人で上昇することはない。心筋トロポニンの上昇は健常人の上限値の99%を超える場合と定義されCKが上昇しない程度の微小心筋傷害でも確実に検出される。

ECC/ACCF/AHA/WHFの心筋梗塞のuniversal definitionでは臨床上の心筋虚血に一致して心筋壊死が確認された場合に心筋梗塞と診断し、心筋壊死の診断には心筋トロポニンの上昇を用いるとされている<sup>2,3)</sup>。

心筋トロポニンは心筋特異性に優れてはいるが従来の測定では発症 2 時間以内の超急性期の感度は低かった。最近臨床応用されている高感度心筋トロポニンはトロポニンの微増を精度高く検出測定できることから心筋の壊死量が小さく血中のトロポニン値が微増しかしながら超急性期でも診断に有用であることが示されている<sup>4,5)</sup>。

しかし、心筋トロポニンは心不全、腎不全、心筋炎、急性肺血栓塞栓症、敗血症などによる心筋傷害でも上昇するため注意が必要である。

また、トロポニンは心筋梗塞のみならず、心筋症、心不全のマーカーとしても知られ、軽度であってもトロポニンTやIの上昇を示す症例では予後が不良であることが知られている。

### ③ミオグロビン

骨格筋を含めて広く存在することから特異性に乏しい一方、クレアチンキナーゼやトロポニンTと比較してより早期に上昇するため、心筋梗塞の可能性のある患者においては測定項目の一つに加えておくべき指標と考えられる。

### ④H-FABP (heart type fatty acid-binding protein )

H-FABP は心筋細胞質内に存在する低分子可溶性蛋白である。軽度の心筋傷害レベルで循環血中に逸脱しやすく心筋梗塞発症 90 分から上昇を認め 6 時間以内に最大値を示すためH-FABP 全血迅速診断法は発症 2 時間以内の超急性期の急性心筋梗塞の診断も可能である(表 6)。しかし、心筋特異性が低く、急性大動脈解離、骨格筋障害、腎機能障害例でも陽性となることが報告されている。

表 6. ST 上昇型急性心筋梗塞の診療に関するガイドライン (2013 年改訂版) より

発症からの経過時間別に見た各心筋バイオマーカーの診断精度

	<2時間	2~4時間	4~6時間	6~12時間	12~24時間	24~72時間	>72時間
ミオグロビン*	○	○	○	○	○	△	×
心臓型脂肪酸結合蛋白 (H-FABP)*	○	○	○	○	○	△	×
心筋トロポニンI,T*	×	△	◎	◎	◎	◎	◎
高感度心筋トロポニンI,T	◎	◎	◎	◎	◎	◎	◎
CK-MB	×	△	◎	◎	◎	△	×
CK	×	△	○	○	○	△	×

◎：感度、特異度ともに高く診断に有用である。○：感度は高いが、特異度に限界がある。△：感度、特異度ともに限界がある。×：診断に有用でない。\*：全血迅速診断が可能である。

1-2) 不安定プラークバイオマーカー

急性冠症候群では心筋傷害や壊死に先行してプラーク不安定化・破綻・血栓形成が生じると考えられている。つまり、その局所における炎症メディエーターの上昇とともに、組織改変にかかわるマトリクスメタロプロテアーゼの上昇(代表的なものとして MMP9, 1,2,3 など)があると考えられる。

①C 反応性蛋白 (C-reactive protein : CRP) およびペントラキシン 3 (pentraxin : PTX3)

CRP (高感度 CRP) は冠動脈疾患、特に不安定狭心症症例において高値を示す傾向があるが、特異性はないために、個別の症例において CRP 値を評価しても、それをガイドとした診療は実質的に困難と考えられる。CRP はペントラキシンファミリーの物質で種々の炎症性サイトカインの刺激を受けて肝臓から産生される急性期反応蛋白であるが、同じペントラキシンファミリーの物質の PTX3 は C 末側が CRP と高い相同性を示し、肝臓のみならず、血管壁からも産生がなされるため、血管における炎症をより如実に反映させる可能性があり、注目される物質である (図 5)。実際、本邦における不安定狭心症を対象とした研究によれば不安定狭心症症例で有意に上昇することが知られ、また PTX3 の値が高いほど心臓血管イベントが高いとされている (図 6)。すでに ELISA での測定系が確立しており、今後注目されるマーカーの一つである<sup>6)</sup>。



図 5. CRP および PTX3 の構造について

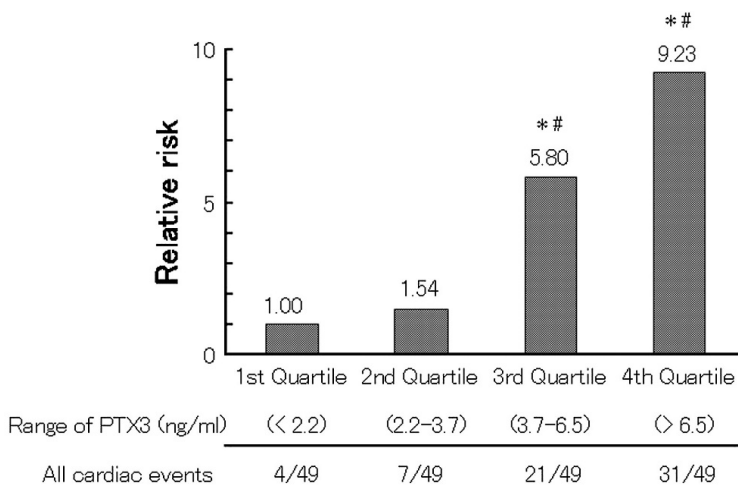


図 6. 血中 PTX 値と心血管イベント発症との関連

## ②MPO : myeloperoxidase

MPO は主に好中球アズール顆粒中に存在するリソソーム蛋白質の一種であり、生体防御にとって重要な働きをする。酸化ストレス関連因子であり、LDL の酸化を起こしうることから動脈硬化病変においてはプラーク破綻に関与し、実際に急性冠症候群の破綻したプラークには多数の好中球浸潤が認められたと報告されている 7)。また、MPO は CRP の急性冠症候群予測能より優れていると報告されており臨床応用が期待される。

## ③MMP-9 : Matrix Metalloproteinase-9

MMP は細胞外基質を分解する酵素の総称でありマクロファージが MMP を産生する。特に MMP-9 は gelatinase B または 92-kDa type IV collagen として知られており繊維性被膜の菲薄化に関与していると考えられており、急性冠症候群において安定狭心症と比べて有意な上昇が報告されている 8)。以上のことから MMP-9 は不安定プラークのバイオマーカーとして注目されている。

### 1-3) 心不全のバイオマーカー

ナトリウム利尿ペプチドファミリーには分子内に類似の環状構造を有する 3 種類のペプチド、ANP (atrial natriuretic peptide)、BNP (B-type natriuretic peptide) および CNP (C-type natriuretic peptide) があり心不全マーカーとして ANP および BNP が重要である。いずれも本邦によって発見された血管作動性物質であり、バイオマーカーであるとともに、ANP、BNP は心不全に対する医薬品として本邦ではカルペリチド (ANP)、欧米では BNP 製剤としても臨床応用されている。

#### ①ANP

ANP は心房組織において合成および貯留され静脈灌流に伴う心房筋の伸展に応じて分泌されるが、急性心不全患者に循環血液量の増加や心収縮力の低下に伴い心房圧が上昇し ANP 分泌が促進される。また、低酸素や虚血性心疾患でも同じく ANP の合成や分泌が促進されるため睡眠時無呼吸症候群や急性心筋梗塞においても ANP は上昇する。

また心房だけでなく肥大した心室組織他重症心不全の心室筋においても合成・分泌され、心不全患者において活性化されているアンジオテンシン、バソプレシン、エンドセリンなどの神経体液性因子によっても ANP 産生が刺激される。ANP 受容体は主として血管壁や腎臓に存在しており細胞内の cGMP の活性化を促すことで血管拡張反応による血圧低下やナトリウム排泄による利尿作用をもたらす。これらの作用を利用し、ヒト心房性ナトリウム利尿ペプチド (h-ANP) が心不全治療薬 (カルペリチド) として用いられている。カルペリチドは血管拡張作用とナトリウムの排泄作用を有しているため血圧低下をもたらすことがあるが現在の心不全治療薬として有用性が示されている。

## ②BNP

BNP はブタの脳から分離されその後に主に心室から分泌されることが確認され B 型ナトリウム利尿ペプチドと言われるようになった。BNP は通常は 70%が心室由来で残りは心房由来とされている。BNP 前駆体 (pro-BNP) が蛋白分解酵素により生理活性をもたない末端側の NT-proBNP に分解される。BNP は主に左室心筋壁の伸展により産生され圧負荷や容量負荷による機械的ストレスが BNP 産生を増加させる。BNP は ANP 同様に心筋虚血やその他の神経体液性因子、サイトカインにより血中濃度が上昇し血管拡張作用やナトリウム利尿作用、交感神経系やレニン・アンジオテンシン系に拮抗する作用、線維化抑制作用も有する。生物学的半減期は BNP が約 20 分、NT-proBNP は 120 分であり急性心不全の心負荷を反映することから NYHA クラス分類や重症度に相関する。

BNP、NT-proBNP はともに急性心不全の診断に有用であり強力な予後予測指標であることが数多く報告されている。

また、カットオフ値については日本心不全学会より「BNP に関する学会ステートメント」(日本心不全学会ホームページ : <http://www.asas.or.jp/jhfs/topics/bnp201300403.html>) が示されている (図 7、表 7)。

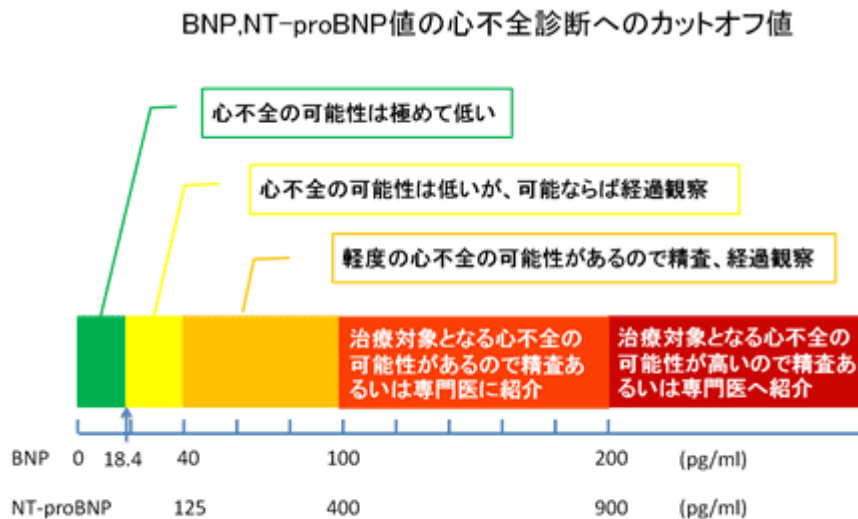


図 7. 日本心不全学会「BNP に関する学会ステートメント」(日本心不全学会ホームページ : <http://www.asas.or.jp/jhfs/topics/bnp201300403.html> より引用)

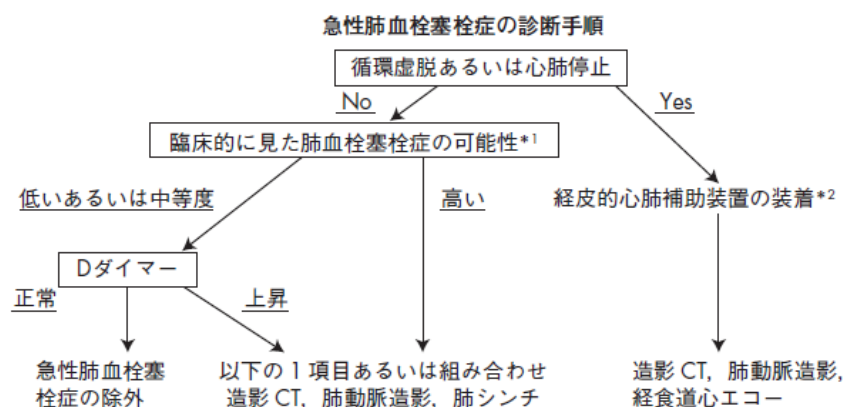
表 7. BNP と NT-proBNP の比較

	BNP	NT-proBNP
分子量	3.5 KD	8.5 KD
ホルモン活性	あり	なし
血清での測定	不可	可
安定性	やや低い	高い
測定時間	20分	20分
血中濃度	低い	高い
半減期	22分	60～120分
排泄機序	クリアランスレセプター 酵素分解	腎排泄
腎機能の影響	+	++

1-4) 肺血栓塞栓症のバイオマーカー

①D-dimer

D-dimer はフィブリン分解産物の集合体である。肺血栓塞栓症は循環器救急症の中でも致死的疾患のひとつであり、肺血栓塞栓症のスクリーニングに特異的なバイオマーカーは無いが D-dimer はその特異度から除外診断には有用とされており Wells スコアや Geneva スコア



肺塞栓症を疑った時点でヘパリンを投与する。深部静脈血栓症も同時に検索する。

\*1 スクリーニング検査として胸部X線、心電図、動脈血ガス分析、経胸壁心エコー、血液生化学検査を行う。

\*2 経皮的な心肺補助装置が利用できない場合には心臓マッサージ、昇圧薬により循環管理を行う。

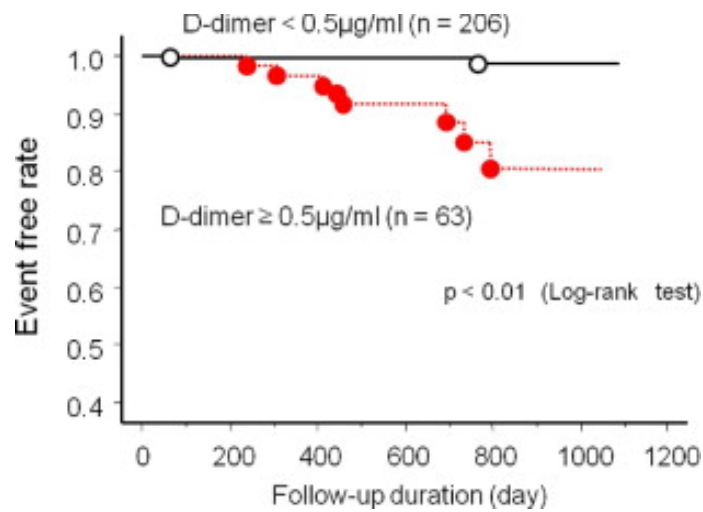
図 8. 日本循環器病学会 肺血栓塞栓症および深部静脈血栓症の診断、治療、予防に関するガイドライン (2009年 改訂版) より引用



と D-dimer を組み合わせることで重症例を安全に除外し得る。日本循環器病学会ガイドラインの急性肺塞栓症診断手順のフローチャートでは D-dimer 測定が推奨されており、肺血拴塞栓症の除外診断に有用であり検査前確率が高くない場合に利用価値が高い検査である (図 8)。

また、肺塞栓症の重症度判定や重症度判定としては前述の BNP や心筋トロポニン値および H-FABP がその指標として有効であることが示されており、D-dimer は下肢深部静脈血拴症の診断にも有用である (図 9)。さらに D-dimer は心房細動における心房内血拴のリスク評価としても着目されており、d-dimer が 0.5ug/ml を超えると心臓血管イベント、心事故が増加する傾向があるとされている<sup>9)</sup>。

i. 血拴塞栓症発生率



ii. 心血管イベント (出血性合併症を含む) 発生率

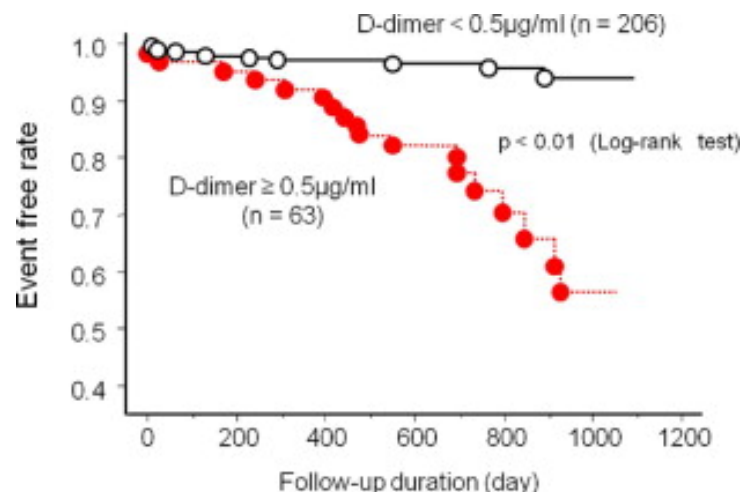


図 9. 心房細動患者における D-dimer と心血管イベントとの関連性 : 文献<sup>9)</sup> より引用



#### 1-5) 大動脈解離に関するバイオマーカー

循環器診療における救急疾患で忘れてはならないのが大動脈解離である。通常、造影 CT で診断をすることがあるが、全身状態が安定していたり、あるいは鎮静がかけられている状況であれば経食道エコーにて大動脈の状態を詳細に観察出来ることもある。

解離に伴い、白血球数や CRP、血沈などの非特異的な炎症指標が上昇するが、大動脈壁の損傷・傷害を反映するとされる各種マーカーが現在着目されつつある。

急性大動脈解離の診断マーカーとしてミオシン重鎖、クレアチンキナーゼ BB、可溶性エラスチン断片などが提唱されてきたが、実際に臨床の場で利用可能となっていない。D-dimer がスクリーニングに有用と言われており、現場では測定されるようになってきた。

また若年者の大動脈解離をきたしやすい基礎疾患としてマルファン症候群が代表的であるが、その症候群において大動脈病変がある例ほど TGF beta 値が高い傾向を示し、また原因遺伝子としても知られるフィブリリンの分解産物の血中濃度が上昇しているとの報告もある<sup>10)</sup>。

#### V. まとめ

各種バイオマーカーにつき概説したこれらを定量的に測定することで循環器疾患の診断を容易にすることが期待できる、しかし、一方でマーカーだけの診断には限界がある。特に定性的測定の場合には偽陽性や偽陰性の可能性もあるし、急性冠症候群の発症超急性期においてはミオグロビンや H-FABP などでも検出できないことが多い。このような心臓超音波検査など他の診断手法をから総合的に判断する必要がある。バイオマーカーはあくまで診断手段の一つでしか無くそれらの結果にとらわれすぎず症状や他の検査結果と総合的に判断することが望ましい。

#### 参考文献

- 1) van Kimmenade RR et al. : Emerging biomarkers in heart failure. Clin Chem. 2012; Jan; 58(1): 127-38.
- 2) Thygesen K, Alpert JS, White HD, et al. Universal definition of myocardial infarction. Circulation 2007; 116: 2634-2653.
- 3) Thygesen K, Alpert JS, Jaffe AS, et al. Third universal definition of myocardial infarction. Circulation 2012; 126: 2020-2035.
- 4) Reichlin T, Hochholzer W, Bassetti S, et al. Early diagnosis of myocardial infarction with sensitive cardiac troponin assays. N Engl J Med 2009; 361: 858-867.
- 5) Keller T, Zeller T, Peetz D, et al. Sensitive troponin I assay in early diagnosis of acute myocardial infarction. N Engl J Med 2009; 361: 868-877
- 6) Suzuki S, et al : Pentraxin 3, a new marker for vascular inflammation, predicts adverse clinical outcomes in patients with heart failure. Am Heart J. 2008 Jan;155(1):75-81

- 7) Naruko T, Ueda M, Haze K, et al: Neutrophil infiltration of culprit lesions in acute coronary syndromes. *Circulation* 106: 2894-2900, 2002.
- 8) Kai H, Ikeda H, Yasukawa H, et al: Peripheral blood levels of matrix metalloproteases-2 and -9 are elevated in patients with acute coronary syndromes. *J Am Coll Cardiol* 32: 368-372, 1998.
- 9) Sadanaga T, Sadanaga M, Ogawa S: Evidence that D-dimer levels predict subsequent thromboembolic and cardiovascular events in patients with atrial fibrillation during oral anticoagulant therapy. *J Am Coll Cardiol* 55:2225-2231, 2010.
- 10) Ramirez F et al: Marfan syndrome: from molecular pathogenesis to clinical treatment. *Curr Opin Genet Dev.* 2007 Jun;17(3):252-8

参考資料：今後注目される循環器系バイオマーカー

### **Inflammation**

CRP

TNF- $\alpha$

TWEAK (TNF-like weak inducer of apoptosis)

IL-1, -6, -10, and -18

LP-PLA2 (lipoprotein-associated phospholipase A2)

Soluble TNF receptors 1 and 2

YKL-40

IL-1 receptor antagonist

Midkine

Leucine-rich 2-glycoprotein

PTX3

CA-125

S100A8/A9 complex

Osteoprotegerin

Serine protease PR3

Soluble endoglin

Adiponectin

### **Oxidative stress**

Oxidized LDLs

MPO

Urinary biopyrrins                      Urinary and plasma isoprostanes

Urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

Plasma malondialdehyde

### **Extracellular-matrix remodeling**

MMPs (MMP2, MMP3, MMP9)  
TIMP1  
IL-6  
Collagen propeptides  
N-terminal collagen type III peptide  
Myostatin  
Syndecan-4  
Glectin-3

### **Neurohormones**

Norepinephrine  
Renin  
Angiotensin II  
Aldosterone  
Arginine vasopressin, copeptin  
Endothelin-1  
Urocortin  
Chromogranin A and B  
MR-proADM  
Leucine-rich 2-glycoprotein

### **Myocyte injury and apoptosis**

Troponins I and T  
Myosin light-chain kinase I  
Heart-type fatty-acid-binding protein  
Creatine kinase MB fraction  
sFAS (soluble apoptosis-stimulating fragment)  
Heat shock protein 60  
sTRAIL (soluble TNF-related apoptosis-inducing ligand)

### **Myocyte stress**

BNP, NT-proBNP, MR-proANP  
sST2  
GDF-15

**Extracardiac involvement**

RDW

Cystatin-C,  $\beta$ -trace protein

NGAL, NAG [N-acetyl- $\beta$ -(D)-glucosaminidase],

KIM-1 (kidney injury molecule-1)

$\beta$ 2-microglobulin

Urinary albumin-to-creatinine ratio

Triiodothyronine









































## 提言

クリニックへ導入する際の留意点

## 提言

### － クリニックへ導入する際の留意点 －

(浜松医科大学) 前川真人

(大阪市立大学) 村上善基

従来の疾患をより精度高く診断することや、今までの臨床検査では行なうことのできなかつた予後予測、治療効果予測、疾患の診断を、大規模な研究所、病院だけではなく、クリニックやベットサイドレベルでも測定するためには、分析装置、分析項目について以下の要件に留意する必要がある。

#### 1. 分析装置側の要件

クリニックへ導入するメリットは、かかりつけ医で気軽に検査を受けることができることであり、待つ時間も少なく、迅速に結果を得ることによって、速やかに診療に反映させることができることである。いわゆる、現行の POCT (point of care testing) がそれにあたるものと考えられるため、POCT に準じた利点と欠点を考慮する必要がある。

POCT の概念は、1980 年代に欧米で導入され始め、20 世紀も終わりに近づく頃から急速に発展してきた。本邦でも 2004 年に日本臨床検査自動化学会の POC 推進委員会 (現 POC 技術委員会) から「POCT ガイドライン 第 1 版」が、2008 に第 2 版、2013 年に第 3 版<sup>1)</sup> が発刊された。POCT は、『被験者の傍らで医療従事者が行う検査であり、検査時間の短縮および被験者が検査を身近に感ずるといった利点を活かし、迅速かつ適切な診療・看護・疾病の予防、健康増進などに寄与し、ひいては医療の質、被験者の QOL (quality of life) および満足度の向上に資する検査である』と定義されている。クリニックに導入する微量診断装置は、この POCT の利点を有するべきであり、以下の要件が揃うことが望ましい。

- 1) 微量の検体 (血液、尿、唾液、呼気、他) で検査が可能なこと
- 2) 小型で機器・試薬の管理が容易であること
- 3) 操作が簡単であること
- 4) 短時間で結果が得られること
- 5) 精確 (精密で正確) な結果が得られること
- 6) どこで測定しても、同様の結果が得られること
- 7) 結果の解釈がエビデンスに基づきはっきりしており、次の段階の診療につなげられること
- 8) 患者や受診者の健康や医療に役立つこと、特にその場で結果が得られる利点が大いこと
- 9) コストパフォーマンスがよいこと (機器、試薬、ランニングコストが妥当で、外部委託よりも安価に検査できること)

- 10) 検査結果は電子化され保存できること、できれば電子カルテとして管理され、さらにネットワークを通じて病診連携によって患者の把握ができることが望ましい。
- 11) 医療費の抑制に貢献すること

このような微量分析装置がクリニックに導入されれば、比較的検査を受けやすくなるため、万人に対してスクリーニングにも使用できることになり、早期発見・早期診断、発症予防に繋がる可能性がある。装置の開発者側からみると、最新の技術を結集して安価な機器・試薬を提供することが期待されるため、必要に応じて相応のインセンティブを開発者に供与することも考慮されるべきである。

## 2. 分析項目側の要件

現在の診療は、問診、診察（身体所見など）、検査と進む。検査でも、問診と診察で絞り込めれば最初からピンポイントな検査を行うこともあるが、一般的にはスクリーニング的な検査によって病態を絞り込んでいき、疾患特異的な検査に進めていく<sup>2)</sup>。診療報酬もそのように組まれている。一方、特定健診のように早期発見することによって、予防・早期治療が期待できる生活習慣病に対してはスクリーニングとして特定の組合せの検査を行っている。同様に、発症したら QOL を著しく低下させることになるだけでなく、治療や介護に莫大な経費がかかる癌や認知症はこれからの高齢化社会においての大きな問題であり、予防・早期治療が重要である。従って、癌や認知症はこの微量診断装置による測定対象として最適であり、クリニックで簡便に測定できることは大きな利点となりうる。ここで重要なのは、この微量診断装置で測定する検査の科学的根拠を示すことである。さらに、この微量診断装置で陽性となった人を、次のステップとしての精密検査・確定診断法を確立することである。これらの開発研究と、クリニックと大病院の協力体制を、国・行政・学会（学術団体）が支援・指導して進めていくべきである。

クリニックやベッドサイドレベルでも測定でき、正しく活用されるためには以下の 9 項目が必要である。

### (1) 検査の科学的根拠（学会などのガイドラインに準拠）

新たな診断についての臨床研究を学会が承認するために診断方法と診断結果について科学的根拠を得る必要があり、診断内容は査読のある学術論文として発表、該当する学会で発表するなどの外部評価を受ける。その結果を実証するための臨床研究を行うために、大学等の倫理委員会で承認を得た後にランダム化比較試験のメタアナリシスを行うか、少なくとも一つのランダム化比較試験等を行う。さらに該当する学会のシンポジウムや市民公開講座、学会ホームページ、メディアなどで情報公開する。

### (2) 使用者（医療従事者）の理解度



例えば血糖、ALT、WBCなど既に臨床検査で汎用されている検査項目はあまり問題がないが、特に専門性が高く従来診断に苦慮していたような項目、全く新規の項目であれば、学会や厚生労働省のガイドラインに沿って検査結果を評価する必要があり、場合によっては学会等の研修会などの使用トレーニングが必要である。

### (3)利用者（検査を受ける側）の理解度

分析項目や検査方法、その意義などを患者側に十分理解してもらう必要がある。また場合によってはクリニックや病院の専門医からセカンドオピニオン、カウンセリングを受ける体制、診療上次にくる精密検査などができるような流れを作成・構築する。

### (4)簡便な検体採取

微量の検体（血液、尿、唾液、呼気、他）で検査が可能であり、精確（精密で正確）な結果が得られることが必要である。

### (5)測定体系の確立

標準となる測定法、標準物質、標準的操作法（SOP）があり、トレーサビリティ連鎖が担保され、どこで測定しても同様の結果が出るが必要である。

### (6)被検者の情報保護

この項目は医師法に定められた事項として必要である。簡便な検査でより高度な情報が得られることに十分留意する必要がある。

### (7)国外対応

国際的にサービスが提供される可能性があり、規制が国内に限定されるとは限らないため、その対策が必要である。すなわち、この様な情報機器が世界標準になった際に、情報提供する地域に配慮することも今後の検討課題として必要になると考えられる。

### (8)コストパフォーマンス

コストパフォーマンスに優れ（機器、試薬、ランニングコストが妥当で、外部委託よりも安価に検査可能）、医療費の抑制に貢献すると共に、患者や受診者の健康や医療に役立ち、特にその場で結果が得られることの利点大きいことが必要である。

### (9)高度先進医療としての利用

保険収載されない場合は混合診療となる可能性があるため、先進医療\*の承認が必要である。

\* (参考) 先進医療

先進医療とは、平成 16 年 12 月の厚生労働大臣と内閣府特命担当大臣(規制改革、産業再生機構)、行政改革担当、構造改革特区・地域再生担当との「基本的合意」に基づき、国民の安全性を確保し、患者負担の増大を防止するといった観点も踏まえつつ、国民の選択肢を拡げ、利便性を向上するという観点から、保険診療との併用を認めることとしたものである。また、先進医療は、健康保険法等の一部を改正する法律(平成 18 年法律第 83 号)において、「厚生労働大臣が定める高度の医療技術を用いた療養その他の療養であって、保険給付の対象とすべきものであるか否かについて、適正な医療の効率的な提供を図る観点から評価を行うことが必要な療養」として、厚生労働大臣が定める「評価療養」の 1 つとされた。具体的には、有効性及び安全性を確保する観点から、医療技術ごとに一定の施設基準を設定し、施設基準に該当する保険医療機関は届出により保険診療との併用ができることとした。

([http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou\\_iryuu/iryuuhoken/sensiniryoo/](http://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/kenkou_iryuu/iryuuhoken/sensiniryoo/))

参考文献

- 1) 日本臨床検査自動化学会, POC 推進委員会: POCT ガイドライン 第 3 版. 日本臨床検査自動化学会会誌 38(Suppl. 1), 2013.
- 2) 熊坂一成: 初期診療の検査オーダーの考え方. 臨床検査のガイドライン, JSLM 2015, 日本臨床検査医学会ガイドライン作成委員会(編), 2015.

## 参考資料

微量診断装置審査 WG 会議議事概要

平成 27 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業

微量診断装置 審査 WG 第 1 回会議

議事概要

審査 WG 事務局（国立医薬品食品衛生研究所）

作成年月日：平成 27 年 11 月 17 日

1. 開催日時 2015 年 10 月 1 日（木） 15:00～18:00

2. 開催場所 オフィス東京 3 階 T3 会議室  
東京都中央区京橋 1-6-8 コルマ京橋

3. 出席者（敬称略）

審査 WG 座 長：前田瑞夫（理化学研究所）

副座長：落谷孝広（国立がん研究センター）

委 員：一木隆範（東京大学）、今井 靖（自治医科大学）、黒田雅彦（東京医科大学）、  
前川真人（浜松医科大学）、馬渡和真（東京大学）、村上善基（大阪市立大学）、  
湯川 博（名古屋大学）

学会推薦委員：戸塚 実（東京医科歯科大学、日本臨床化学会推薦）

厚生労働省：片平尚貴、間々田圭祐

総合機構：牧野 勤、宮本大誠、宮崎生子、藤井道子

オブザーバ：細川和生（理化学研究所）、木山亮一（産業技術総合研究所）

審査 WG 事務局：新見伸吾、齋島由二、植松美幸、野村祐介

4. 配付資料

資料 1：座席表

資料 2：微量診断装置審査 WG 委員名簿

資料 3：微量診断装置審査 WG 活動計画案の概要説明

資料 4：講演資料「医療機器の承認審査概要」

参考資料 1：RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標

参考資料 2：DNA チップを用いた遺伝子型判定診断薬に関する評価指標

参考資料 3：臨床検査のガイドライン JSLM 2012（第 1 章 1-3 項抜粋版）

参考資料 4：分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン CAC/GL59-2006

参考資料 5：分析用語に関するガイドライン CAC/GL72-2009

参考資料 6：分析法バリデーションガイドライン

参考資料 7：プロテオチップ資料（Nature com. / Sci. Rep., 2015:5:10455）

参考資料 8：プロテオチップ資料（報道発表用）

参考資料 9：テロメスキャン資料（報道発表用）

参考資料 10：PESI-MS 資料（報道発表用等）

## 5. 議事内容

### 5-1. 開会にあたり

事務局、厚生労働省及び座長、副座長から挨拶を頂いた後、委員及びオブザーバが自己紹介を行った。配布資料の確認後、事務局より次世代医療機器評価指標作成事業の目的と現在までの成果について概説された。また、事務局より以下のように本 WG の活動計画及び第 1 回会議のポイントが紹介された。

#### (1) 活動計画

活動期間は 2 年を基本とする。今年度は微量診断装置に関する国内外の研究・開発動向と関連規格について調査すると共に、同デバイスの定義、安全性及び有効性評価法の基本的考え方等を取りまとめる。次年度は微量診断装置の安全性と有効性を科学的根拠に基づき適正且つ迅速に審査するための評価指標案を作成すると共に、小型の微量診断装置を在宅医療に導入するための基本的な考え方や留意事項等に関する調査研究を実施する。なお、今年度の報告書は 1 月末脱稿を目標として作成する。

#### (2) 第 1 回会議のポイント

- ・ 微量診断装置導入の臨床的意義
- ・ 微量診断装置・技術基盤の研究・開発動向
- ・ ニーズの高い対象疾患・診断マーカ
- ・ 微量診断装置の定義（対象機器を含む）
- ・ 品質・安全性評価方法
- ・ 性能評価方法（微量診断特有の評価項目を含む）
- ・ TF の立ち上げ

### 5-2. 講演：医療機器の承認審査概要

牧野氏より、医療機器審査の視点、審査において一般的に要求されるデータパッケージ及び審査事例が紹介された。主な内容は以下のとおりである。

- ・ 医療機器の承認申請にあたり、医療機器の開発と審査部の関連、医療機器の製造販売、申請から承認までの流れ、医療機器の申請区分について紹介された。
- ・ 医療機器の審査では、承認拒否事由（薬機法第 14 条第 2 項）の該当性を審査する。
- ・ 医療機器を設計・開発、製造、販売するには基本要件基準（薬機法第 41 条第 3 項）に適合していなければならない。
- ・ 医療機器はリスクに応じて I から IV までにクラス分類されている。現行の制度では、体外診断機器の多くはクラス I の一般医療機器に該当すると考えられる。
- ・ 承認申請にあたり、PMDA では薬事戦略相談や対面助言等を行っている。
- ・ 医療機器の審査では、装置の臨床的意義、仕様を示し、装置の有効性評価として性能評価、安全性として品質・安全性評価が求められる。微量診断装置の評価に関する項目出しについて、本 WG でご検討いただきたい。

事務局より、本 WG で検討される評価指標案をイメージする上での具体的事例として、過去に発出された「RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を紹介し、評価指標案において提示すべき項目が説明された。

### 5-3. 総合討論

#### (1) 微量診断装置について

##### <対象装置に関する現状の位置づけ>

PMDA より、現在の法規制や従来の評価指標との関係について説明された。主な内容は以下のとおりである。

- ・ 体外診断用医薬品は薬機法の改正により、医薬品と分離された。体外診断用医薬品の審査上の基本的考え方は医療機器と同じであるが、クラス分類や細かい部分の考え方が少し異なる。
- ・ 体外診断用医薬品側から見て、当該医薬品単体又は分析装置と組み合わせたシステムとして扱う場合のほか、当該システムを体外診断用医療機器として扱う 3 つのカテゴリーがある。全体を包括する網羅的な評価指標案を作成することは良いと思うが、それぞれ規制の枠組みに違いがある。
- ・ 「RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標」を作成した当時と現在とではソフトウェアが規制の枠に入ったという点で違いがある。
- ・ 体外診断用医薬品としての安全性は性能限界を考えれば良い。体外診断用医薬品の場合、人から採取した検体を扱うため、人への直接的なリスクはないと考えられるが、交差反応物質や阻害物質等による検査値の変化により診断できないリスクがある。

##### <評価項目の考え方>

事務局より、評価指標案の項目となり得るポイントが説明された。主な内容は以下のとおりである。

- ・ 基本的事項に関する評価項目は、反応原理、検出原理、装置の構造、ソフトウェア、安定性（保管、輸送、配置、移動、騒音、振動等に伴うもの）、トレーニングの要否、電磁的影響、温度、使用環境等が考えられる。
- ・ 性能評価の項目には、ハードウェアの性能評価と分析の性能評価がある。ハードウェアの性能評価項目としては、マイクロ流体デバイスとしての性能、流速、圧力、検体注入、デッドボリューム、カラムオープン、温度制御、抗体の固定化法（ $\mu$ ELISA の場合）等が考えられる。分析の性能評価項目としては、検出感度、LOQ/LOD、測定範囲のダイナミックレンジ、再現性、頑健性、正確性、既存装置とのデータの相関性、希釈した時の直線性、添加回収試験等が考えられる。
- ・ 安全性評価の項目は、電気的安全性・電磁両立性、機械的安全性、品質マネジメント及びリスクマネジメント等が考えられる。微量検体を扱う場合のリスクマネジメントについては、送液部、導入部、反応部、微小流動や検出部、制御部等、それぞれの部位でのリスク管理について規定するのが良いと思われる。また、ユーザビリティについては、微量を扱うという点で、検体調整、標準液の調整法、保存方法等の項目が挙げられる。その他、制御プログラム、データ解析、リスク分析と較正、トラブルシューティング等も考えられる。

これを受けて、委員及び PMDA より、以下の事項について特に検討した方が良いとのコメント

があった。

- ・ 検体の採取方法や保管は診断結果の品質に関わると考えられるため、検討を要する。
- ・ 前処理法により、診断結果の品質も変わる。病院やクリニック等、施設毎に採血の条件は異なる。最適な条件下でなく、ロバストに情報が収集できること、ばらつきが生じる場合、どのようにコントロールするかについても、本 WG で討議した方が良い。

#### <微量の定義について>

「微量診断装置」の定義や、本 WG で作成する評価指標案が「対象とする機器」については WG での討議によって決定するが、「微量診断」という用語について、以下のようなコメントが寄せられた。

- ・ 検体、装置それぞれに微量である場合がある。
- ・ 微量診断という一般的なイメージは検体のボリュームであり、既に検体量が  $1\mu\text{L}$  あれば測定可能な装置が存在している。新たな診断応用の領域では、ナノモル、ピコモルレベルを計測可能な装置による「微量成分診断」も考えられる。
- ・ 微量であることのメリットは低侵襲である。通常の方法により採取した血液から微量の検体をサンプリングする場合は採血自体に係る侵襲度は同じであるが、低侵襲に微量の血液を採取し、診断することも考えられる。
- ・ 事務局からの説明による対象機器の例では、日常に使われている機器から最新の機器まで、非常に幅広くカバーされている。検体のボリュームが微量であったとしても、装置のサイズも自動化の度合いによって異なることを考えると、一律に全てをカバーする評価指標案を作成することは難しいと考えられる。
- ・ 装置のサイズによって、品質管理の仕方も異なる。ある程度、具体的な機器のイメージが共有できた方が良い。

#### <在宅利用について>

事務局より、在宅利用の扱いについて、厚労省及び PMDA との事前相談における方針が以下のように説明された。

- ・ 病院やクリニックに加え、在宅利用まで含めると、機器自体の安全性や品質評価以外に考慮すべき項目が多岐にわたる。また、現在開発が進められている微量診断装置の在宅医療への導入には相応の時間を要すると思われることから、本 WG において作成する評価指標案は、装置としての性能、品質及び安全性を評価する項目に絞る。在宅利用する上での基本的考え方や留意点については評価指標案本体に含めず、調査報告又は提言等として報告書に掲載する予定である。

#### <次世代医療機器について>

事務局より、次世代医療機器について、以下の事項が説明された。

- ・ 次世代医療機器とは近い将来、上市化される機器を想定している。厚労省は開発と審査を迅速化するための評価指標を、経産省は開発のためのガイドラインを作るという事業として進められている。そのため、評価指標案は既存の医療機器に適用するものでなく、現在開発中であり、製品化の近い装置が対象となる。

- ・ miRNA 診断装置、微量免疫診断装置については、本 WG 委員も開発されている。その他の対象としては、プロテオチップ、テロメスキャン等の診断薬、装置自体は大型であるが MS 装置、非侵襲の血糖計測装置等も考え得る。
- ・ 装置の研究開発動向やニーズの高い診断マーカー等の調査を行い、最終的に WG 内の討議によって、対象範囲を絞る。

#### <微量診断装置導入の臨床的意義>

- ・ 微量な検体で一般的な臨床精度が得られ、かつ、迅速に判断できるならば、すぐに結果を知りたい場面でも利用できる。検査会社に送付し結果を得るのではなく、その場で結果がわかれば、地域医療においても貢献できる。
- ・ 短時間であることや場所を問わず精度の高い結果を示すことは、少しハードルが高いと考えられる。迅速診断といった場合、対象疾患によって必要な情報が異なる。診断マーカーにも依存する。
- ・ マーカーの経過を追跡し、前がん状態を予測する用途も考えられる。
- ・ miRNA や DNA による診断を行うことにより、テーラーメイド医療に関する情報を得ることができる。

#### <ニーズの高い対象疾患・診断マーカー>

- ・ 第一に掲げられる疾病はがんである。マーカーとしては、疾患に伴って血液中に特異的に放出される物質のほか、細胞も性状や病態を反映するマーカーとして挙げられる。カテゴリーとしては、細胞由来又は血液や体液中の核酸物質 (DNA、RNA) のほか、ペプチド、蛋白質、脂質、糖質、オンコメタボライド、エクソソーム等がある。RNA は、mRNA、tRNA、miRNA、non-coding RNA に分類される。
- ・ 現時点で利用できるマーカーのほか、バリデーション中のマーカーも含めて広範に検索する。循環器疾患は今井委員、消化器疾患は村上委員、がんは落谷委員に調査して頂くこととなった。

#### 5-4. TF の立ち上げ

TF を立ち上げ、以下のように担当者を決めた。

TF1 : (主査) 一木委員

(研究・開発動向調査) 落谷副座長、一木委員、湯川委員

(性能評価方法の基本的考え方) 馬渡委員、湯川委員

(品質評価方法の基本的考え方) 前川委員、戸塚委員

TF2 : (主査) 前川委員、(副査) 落谷委員

(臨床的意義・定義・マーカー調査) 前川委員、今井委員、黒田委員、村上委員

#### 5-5. その他 (次回の会議日程)

第 2 回会議は事前の日程調整に従って以下の要領で開催することが決定された。第 2 回会議では TF の調査結果又は途中経過をパワーポイント等により報告し、その内容について討議する。第 3 回会議では第 2 回会議の討議内容を反映させた調査報告書を提示し、その内容を精査することにより最終版の作成に向けた方向性を決定する。



第2回会議

日時：2015年11月30日（月） 15:00～18:00

場所：オフィス東京 3階 T3会議室

東京都中央区京橋 1-6-8

以上

平成 27 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業  
微量診断装置 審査 WG 第 2 回会議  
議事概要

審査 WG 事務局（国立医薬品食品衛生研究所）  
作成年月日：平成 27 年 12 月 23 日

1. 開催日時 2015 年 11 月 30 日（月） 15:00～18:00
2. 開催場所 オフィス東京 3 階 T3 会議室  
東京都中央区京橋 1-6-8 コルマ京橋
3. 出席者（敬称略）  
審査 WG 座 長：前田瑞夫（理化学研究所）  
副座長：落谷孝広（国立がん研究センター）  
委 員：一木隆範（東京大学）、黒田雅彦（東京医科大学）、前川真人（浜松医科大学）、  
馬渡和真（東京大学）、村上善基（大阪市立大学）、湯川 博（名古屋大学）、  
学会推薦委員：戸塚 実（東京医科歯科大学、日本臨床化学会推薦）、丹羽 修（埼玉工業大学、  
日本分析化学会推薦）  
厚生労働省：近藤英幸  
総合機構：牧野 勤、宮本大誠、藤井道子  
オブザーバ：細川和生（理化学研究所）、森下裕貴（国立衛研）  
審査 WG 事務局：新見伸吾、齋島由二、植松美幸、野村祐介
4. 配付資料  
資料 1：座席表  
資料 2：微量診断装置審査 WG 委員名簿  
資料 3：金属バイオチップによるがん診断技術開発（招聘講演用資料）  
資料 4-1：研究・開発動向調査（落谷先生）  
資料 4-2：研究・開発動向調査（一木先生、馬渡先生、湯川先生、細川先生）  
資料 4-3：品質・安全性評価方法（戸塚先生、前川先生）  
資料 5-1：がん検診によるがん死亡率低下（落谷先生）  
資料 5-2：対象疾患・診断マーカ調査「消化器領域に関する miRNA」（村上先生）  
資料 5-3：Cancer, 118:3036-3043（2012）（村上先生）  
資料 5-4：Scientific Report, Nature com（2015）（村上先生）  
資料 5-5：臨床的意義・定義（前川先生）  
資料 5-6：診断マーカ調査（前川先生）  
資料 5-7：診断マーカ調査（黒田先生）  
資料 6：審査 WG 第 1 回会議議事概要案

- 参考資料 1：RNA プロファイリングに基づく診断装置の評価指標（再配布）
- 参考資料 2：分析結果の不確かさの推定に関するガイドライン（再配布）
- 参考資料 3：分析法バリデーションガイドライン（再配布）
- 参考資料 4-1：微量検体免疫分析装置に関するガイドライン案  
（革新的医療機器実用化促進事業：東京大学/北森教授）
- 参考資料 4-2：革新的医療機器実用化促進事業（東京大学）概要資料
- 参考資料 5：研究・開発動向調査の報告事例（平成 25 年度心カテ審査 WG 報告書）
- 参考資料 6-1：品質・安全性評価方法の基本的考え方の報告事例①（平成 25 年度心カテ審査 WG 報告書）
- 参考資料 6-2：品質・安全性評価方法の基本的考え方の報告事例②（平成 23 年度活動機能回復装置審査 WG 報告書）
- 参考資料 7-1：有効性評価方法の基本的考え方の報告事例①（平成 25 年度心カテ審査 WG 報告書）
- 参考資料 7-2：有効性評価方法の基本的考え方の報告事例②（平成 23 年度活動機能回復装置審査 WG 報告書）

## 5. 議事内容

### 5-1. 開会及び招聘講演

事務局の開会挨拶後、プロテオチップによるがん診断技術の開発に関する招聘講演を行った（講師：昭和大・伊藤氏）。講演の主な内容は以下のとおりである。

- ・ がんの早期診断を目指し、プロテオチップを用いたがん診断技術を開発している。これはプロテオチップに血清を滴下し、ラマン定量分析法を用いて、がん細胞由来の遊離 DNA を測定する原理に基づく。
- ・ プロテオチップは過酸化銀を含む銀酸化物のメソ結晶領域を有するチップであり、初期状態では陰性に帯電していると考えられる。
- ・ 胃がん、大腸がんの患者血清及び良性疾患を有する患者血清をプロテオチップに滴下し、レーザーラマン散乱を比較すると、がん患者由来血清では疾患に応じて特有の波形が観察された。胃がん患者ではステージの進行に伴いラマン光強度が増大する。大腸がん患者の場合、ステージ I の患者試料は試験を行っていないが、胃がん患者と同様、病状の進行に伴いラマン光強度が増大する。
- ・ 細胞溶解液で処理した培養がん細胞、当該溶解細胞から抽出した DNA、RNA 及び蛋白質、並びに物理的に破砕した培養がん細胞のラマン散乱を解析した結果、物理的に破砕した培養がん細胞のみががん患者血清と同様の波形を示した。
- ・ 血清を滴下したプロテオチップ表面に付着した物質を回収して確認した結果、一本鎖 DNA のみが検出された。付着物は DNA を含んだ何らかの物質であると考えられるが、細胞溶解液を使用して培養がん細胞から抽出した DNA はチップに結合しなかったことから、DNA を含んだ複合体であると推測される。
- ・ プロテオチップにはエピゲノムの変化である DNA のメチル化を伴った遊離ヌクレオソームが主に結合していることが推察される。DNA 及びヒストンのメチル化は、細胞のがん化と深く関連することが報告されており、実験結果と相関性があると言える。

- ・ プロテオチップに結合する物質がヌクレオソームであれば、自家蛍光を利用して検出できると考えられる。がん患者の血清は良性疾患患者由来の血清と比較して高い蛍光強度を示す。ただし、がん特異的な物質でなく、加齢等によっても変化するため、希釈法により病態に由来する差分を抽出している。今後、症例数を増やし、解析を進めていく必要があるが、自家蛍光の測定は7分程度で完了するため、がん診断における有望な技術として期待している。
- ・ プロテオチップを使用したがん診断としては、まず初めに自家蛍光を測定する。蛍光強度が低い場合は経過観察とする。蛍光強度が高ければレーザーラマン散乱を測定して原発臓器を推定し、集中的に病院で検査することが有効であると考えている。
- ・ 今後の課題は、プロテオチップに結合する物質を直接的に証明すること、当該解析技術の標準物質を作成すること、症例数を増やして解析を進めて行くことである。

招聘講演終了後、質疑応答が行われた。主な内容は以下のとおりである。

- ・ がん患者のデータは進行がんなのか、内視鏡的ながん病変を粘膜層から一括切除することで治療可能な早期がんに対しても当該機器によるがん診断ができるか。→初期の論文データ（ラマン散乱の形状、強度についての病態による比較）については12例症例ずつの比較であり、全症例、良性疾患の方を含み手術患者であった。最近では115例の解析を進めているが、これについては内視鏡的治療の患者の検体を含んでいる。
- ・ CTCの量と予後の関係を示したグラフでは、CTCの量と経口投与に比例するのか。→CTCがゼロの方でも本解析手法では検出できることから、早期診断に絞った場合ではCTCよりも有意性があると考えられる。
- ・ 検体は新鮮なものを使うのか、凍結保存されたものを使うのか。→現在はマイナス80℃で凍結保存したものを用いている。いろいろな条件下で、採血から何ヶ月毎といったように設定を変えて調べているが、保存期間による影響はなく、再現性のある結果が得られている。
- ・ 早期診断可能であるとのことだが、非常に限られた数のがん細胞の死と正常に起こる細胞の死とを区別できるか。→がん患者とがん患者でない方とでは、がんでない方の生体変化はがん患者でも起きているが、さらに、がん患者ではがんとしての変化が上乗せされると考えている。血液中に出てくるヌクレオソームの量ががんによってどの程度上乗せされるのかについてはまだデータがない。
- ・ 血清を使っているが、血漿の結果はあるか。ある場合、血清と血漿とでパターンは変わるか。→血漿は数例しかないで、わからないがあまり変わりはない。凝固因子に左右されない血清を選択したことから、血漿については厳密に比べていない。
- ・ 治療経過によって判定した症例はあるか。→あるが非常に数が少ない。治療効果判定に使えるかは今後の課題である。
- ・ 胃がんと大腸がんの結果が紹介されたが、がんによってスペクトルは変わるか。→紹介したデータでは2つの大まかなピークがみられるが、精密な機械を用いることで、より詳細に特徴的なピークがみられると考えており、それががんの原発部位の推定につながると思われる。
- ・ 破碎していない培養がん細胞をそのまま測定したことはあるか。ラマン散乱でがんをみるという話は10年以上前に浜口宏夫東大名誉教授（ラマン分光がご専門）によって診断に使えるのではないかというトピックが紹介された。そのときも $1,500\text{cm}^{-1}$ あたりに2つのピークが出ていた。ラマンシフトの起源の同定などで情報があれば教えてほしい。→起源については

調査中である。プロテオチップは細胞だと大きすぎるため、遊離核酸で進めている。→細胞と核酸が濃縮されたものとはスペクトルが違ってよいかと思う。→検討していきたい。

- 血液中のキャリアタンパク、血漿量といった基本的なデータの影響はあるか。結合能に何らかの薬剤の影響があるか。例えば、肝硬変になってアルブミンが少なくなるとか、コレステロール血症でキャリアタンパクが増える状態の影響はあるか。→初期のデータでは余病のない方を選んで行った。総タンパクとアルブミンに関して調査したところ、相関しないという結果を得た。今後はアルブミンが極端に高い、低いという方も条件に加えて検討したいと思う。
- チップ開発において、化学修飾を使った理由と表面形状を突起型にした経緯を知りたい。→金属に金属錯体が結合したときに電極電位差で錯体の結晶化が生じることがわかった。その時点では、抗体を混ぜ、1-3分で固相化のような状態で抗体をつけて抗原をみることができた。この方法はエンドトキシンの検出に利用した結果を NEDO SBIR で発表した。リムルス試薬を使ってエンドトキシンを5分で検出できた。その後、次亜塩素酸ナトリウムを使って表面の構造を変え、分散させた形状にしたものを作った。物質的にマイナスに帯電していることがわかったので、がん等の疾病に使えるのではないかと応用した。
- 金属としての銀の役割は何か。銀は例えば硫黄や窒素といった原子に相性がよいことは化学的によく知られている。マイナスの荷電を持った材料は他にもあると思うが、銀を選択した根拠を知りたい。→金でも試したが、銀の方が表面増感ラマン分光 (SERS) において活性が高かった。金を用いて陰性に帯電した物質を作ろうとしたが、今のところできていない。
- マイナスの荷電を持ったプラスチックもある。SERS でなく、自家蛍光でよいのであれば、プラスチックも使えるのではないか。マイナス荷電が大事で、銀そのものの化学的性質ではないと考えてよいのか。→SEMのEDS分析から酸素量が95at%であった。通常の酸化銀ではないような物性であるため、そのあたりが効いているのかと思う。
- 酸化銀が金属銀でなく、酸化銀としてほとんど存在しているということか。表面増強だと金属の性質を利用し、そこで電場が増強してラマンが増強される、であれば、金でもできるのではと思う。→金属でないラマン散乱が起きないので、酸化銀や過酸化銀がレーザーを当てることによって還元され、金属になっている部分もあると思う。これについては詳しく調べる必要があると考えている。
- ラマン散乱をみるのであれば、金属性のナノ粒子がよいと思うが、それではダメで銀がよい理由は何か。→表面は過酸化銀、酸化銀、塩化銀の共有結合、配位結合、イオン結合の混ざった不安定な状態であると推測される。そこに血清を滴下すると一旦少し溶けて再結晶するのではないかと考えている。
- 動的にメチル化したものを表面に結合させるといった実験をしてはどうか。→ヌクレオソームの状態のテストサンプルを用意するのは難しいが、詳細な実験はできると思うのでやってみたい。

## 5-2. 初参加のメンバー紹介と事務局からの資料確認、事業の切り分けについて

初参加の近藤氏と丹羽委員の紹介がなされた。引き続いて、配布資料の確認がなされた。第1回の議事概要についてメール回覧によって指摘があり、修正したものが配布されたが、その後指摘はなく、会議内で内容が了承された。

事務局より、革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業について紹介がなされ

た。要点は以下のとおりである。

- ・ 厚生労働省の事業として、次世代医療機器評価指標作成事業、革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業がある。いずれも最終成果物は評価指標となる。
- ・ 東京大学では平成 24 年度から革新的医薬品・医療機器・再生医療等製品実用化促進事業の中で、 $\mu$  ELISA の研究開発を進めてきた。この成果をもとに東京大学発として「微量検体免疫分析装置」の評価指標案を作成済みであり、事業の成果として評価指標案を厚労省に提出する予定であった。
- ・ 今年度、別途、微量診断装置審査 WG が立ち上がり、次世代事業のほうがより対象を限定せず、広い範囲の機器に対する評価指標を作ることになった。東京大学で進めている  $\mu$  ELISA を対象にした評価指標案は、本審査 WG が対象とする機器の一部となる。
- ・ 東京大学での評価指標案作成は今年度で終了し、厚生労働省には  $\mu$  ELISA に関する技術レポートを提出することとし、現在までに得られている評価指標案作成に関する成果は、本審査 WG に取り込む形を取る事となった。本内容について、当該研究の代表である北森教授より本審査 WG に作成済の案を提出していただく旨、了承を得た。本審査 WG で作成を目指す評価指標のベースにもなり得る資料であるので、参考にさせていただきたい。

### 5-3. TF からの調査報告

TF による調査結果をもとに議論がなされた。

TF1 のタスクは、大型から小型の機器、診断薬と機器の切り分け、測定原理、国内外の市販、認可等の情報等を網羅的に調べ、定義にもとづいて、性能や品質の考え方を報告書としてまとめることである。

TF2 のタスクは、大型から小型の機器、診断薬と機器の切り分け、測定原理、国内外の市販、認可等の情報等を網羅的に調べ、定義にもとづいて、性能や品質の考え方を報告書としてまとめることである。

#### (1) TF1: 研究・開発動向調査(落谷副座長)

研究開発の全体像を把握するため、低侵襲、非侵襲、体液診断、個別化医療、先進医療というキーワードでレビューを行った。ヒト臨床検体としては、血液、尿、唾液、呼気、生体ガス等があり、計測対象には、血中循環腫瘍細胞 (CTC)、タンパク質、核酸、細胞外小胞(extracellular vesicles)、癌代謝物(oncometabolites)、短鎖ペプチド(mini-peptides)、exosome 等がある。今後は膨大な臨床情報との統合をし、深層学習 (deep learning: 多層構造のニューラルネットワークを用いた機械学習) によって、診断性能を向上させていくことが考えられる。

#### (2) TF1: 微量診断デバイスの研究・開発動向調査 (一木委員)

バイオチップはガラスやプラスチック等の基板上に生体分子プローブや流路等集積化した小型の分析機器である。検体を入れて、診断結果を出力するという流れの中には前処理されたサンプルがマイクロ流路を通り、検出器で検出されるという構成要素がある。分析性能一般的な評価項目に対して、マイクロ流体システムに求められる評価項目があげられ、

分析に与える影響等も紹介された。構成要素が紹介された。微量診断を行う装置には、低侵襲、小型、迅速、低コスト、操作が容易といった条件が求められる。また、医学的エビデンスが十分にあることが前提となるため、バイオマーカの探索も必須である。その他国内外の装置が紹介された。性能面では従来品と同等である中で、コストが低い、解析に必要な時間が短いといった医療の質としてのメリットにあげられることが多い。

- (3) TF2: 品質・安全性評価方法の基本的考え方（戸塚委員）  
微量診断には対象の物質が微量しかない場合、早期発見につながるような検出をするならば、高感度化ということも考えた方がよいと思われる。
- (4) TF2: 微量診断の意義について（落谷副座長）  
少なくともがんに関しては、微量で低侵襲かつ早期に診断することにより、がんによる死亡を低下させるといったエビデンスが十分、あるいは、期待されるものを対象として行うのがよい。
- (5) TF2: マーカ調査について（村上委員）  
miRNA に関する診断について、文献調査に基づき、肝臓疾患（肝臓がん、肝炎、肝障害等）に対するマーカ、方法論（real-time PCR、microarray、exosome 等）の紹介がなされた。また、消化器系のがん（胆管がん、膵臓がん、胃がん）については、診断において複数の miRNA を使っていくことになるだろうというのが現状である。
- (6) TF2: マーカ調査について（黒田委員）  
miRNA に関する論文は PubMed で 2,000 本程度報告されている。そのうち、どういう疾患でマーカとして使われているのか、どんなマーカがよいのかについて内容をまとめた。特定のがんで論文が多いものについてはバリデーションが進んでいると考えられる。一方で、研究が多くなされているのは、まだ診断が難しい疾患で、膵臓がん、乳がん、肺がん等があげられた。
- (7) TF2: 臨床的意義について（前川委員）  
個人的な見解として、微量診断装置の定義としては「微量の体液を試料として診断する装置」と考え、現在の臨床検査マーカではまだ病名診断には至らないが、今後出てくるバイオマーカは病名診断にも至るケースがあるものとして捉えんとする。また、装置のサイズは関係ないとする。臨床的意義を左右する因子としては、分析側の因子、試料側の因子、検査の性能がある。がんを標的とする場合は有病率を考慮する必要があるだろう。バイオマーカとして、トロポニン（心筋梗塞の除外）やタウタンパク（アルツハイマー）等の例が紹介された。

#### 5-4. 総合討論（定義について）

微量診断装置に関して本 WG で共有するイメージは、下記の通りである。

- ・使用施設：大病院だけでなく、クリニックでも使える。最終的には在宅での診断まで考えられるとよいが、第一段階ではクリニックでの使用を前提とする（\*）。
- ・サンプルの取得方法：簡単に微量の検体を採取する。
- ・診断時間：比較的短時間である。
- ・技術：マイクロ流体を使うもの。
- ・分析対象：血液に限らず、ガス分析等も含む。
- ・キーワード：早期診断、早期治療。
- ・バイオマーカ：調査によって対象として想定されるマーカを示す。装置としての要素技術は

同じであるが、マーカ診断としての品質をどのように担保するかについて、本 WG で作成する指標にもとづき、診断装置として使えるものであるか評価することになる。

(\*受託を含めて検査機関からクリニックへ移行、クリニックから在宅へ移行する場合の留意点等も評価項目として加える。

#### 5-5. その他（次回の会議日程）

第 3 回会議は事前の日程調整に従って以下の要領で開催することが決定された。第 3 回会議では TF の調査結果を文書化して報告することを目標にする。時間的に難しい場合は途中経過の報告でもよい。第 3 回会議での討議状況に応じて、第 4 回会議（2016 年 1 月 16 日（土）14-17 時を予定）の開催が必要か、もしくは、メール討議で済ませることができるか判断する。

#### 第 3 回会議

日時：2015 年 12 月 25 日（金） 14:00～17:00

場所：オフィス東京 3 階 T3 会議室

東京都中央区京橋 1-6-8

以上



平成 27 年度次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業

微量診断装置 審査 WG 第 3 回会議

議事概要

審査 WG 事務局（国立医薬品食品衛生研究所）

作成年月日：平成 27 年 12 月 28 日

1. 開催日時 2015 年 12 月 25 日（金） 14:10～16:10
2. 開催場所 オフィス東京 3 階 T3 会議室  
東京都中央区京橋 1-6-8 コルマ京橋
3. 出席者（敬称略）  
審査 WG 座 長：前田瑞夫（理化学研究所）  
副座長：落谷孝広（国立がん研究センター）  
委 員：一木隆範（東京大学）、今井 靖（自治医科大学）、黒田雅彦（東京医科大学）、  
前川真人（浜松医科大学）、馬渡和真（東京大学）、村上善基（大阪市立大学）、  
湯川 博（名古屋大学）  
学会推薦委員：菊池春人（慶應義塾大学、日本臨床検査医学会推薦）、戸塚 実（東京医科歯  
科大学、日本臨床化学会推薦）、丹羽 修（埼玉工業大学、日本分析化学会推  
薦）  
厚生労働省：片平尚貴  
総合機構：牧野 勤、藤井道子  
オブザーバ：細川和生（理化学研究所）、森下裕貴（国立衛研）  
審査 WG 事務局：新見伸吾、齋島由二、植松美幸、野村祐介
4. 配付資料  
資料 1：座席表  
資料 2：微量診断装置審査 WG 委員名簿  
資料 3：審査 WG 第 2 回会議議事概要案  
資料 4-1：TF1/研究・開発動向調査  
資料 4-2：TF1/性能評価方法の基本的考え方  
資料 4-3：TF1/品質・安全性評価方法の基本的考え方  
資料 5-1：TF2/臨床的意義①  
資料 5-2：TF2/提言「クリニックへ導入する際の留意点」  
資料 5-3：TF2/臨床的意義②  
資料 5-4：TF2/対象疾患・診断マーカ調査（電子ファイルのみ）  
  
参考資料 1：第 2 回会議に向けた TF 作業概要説明  
参考資料 2：第 3 回会議に向けた TF 作業概要説明

参考資料 3 : 今後の予定

## 5. 議事内容

### 5-1. 開会及び委員紹介

事務局の開会挨拶後、初参加となる菊池委員が紹介された。

### 5-2. 配布資料及び第 2 回会議議事概要案の確認

事務局より、配布資料の確認を行った後、第 2 回会議議事概要案の内容が説明された。議事概要案については、修正・追加等の必要があれば、1 週間以内に事務局へ連絡することとした。

### 5-3. 総合討論

#### (A) 定義について

第 2 回会議終了後に事務局から配信した TF 作業概要説明資料（参考資料 3）に掲げた定義案を精査した。主な討議内容は以下のとおりである。

- ・ 「微量」に関する量の定義をマイクロリットルあるいはミリグラムとした場合、血液や尿の場合は問題ないが、呼気については 200 mL 程度をサンプリングするため、量的に制限することは難しい（委員）→「採取量又は最終試料がマイクロリットルあるいはミリグラム」とする。
- ・ 「感度向上」については、分析化学的には「検出限界の向上」が正しい表現である（委員）→「感度・検出限界の向上」とする。
- ・ マイクロ流体「デバイス」と「チップ」が混在しているので、用語の扱いを決めておきたい（委員）→「マイクロ流体デバイス」という表現が一般的であるが、薬事においてチップは体外診断薬、分析装置は医療機器（デバイス）となる。混同を避けるため、定義案においては「チップ」という用語を利用したい。
- ・ 定義案に該当する機器と既存機器の違いは何か？（委員）→ 診断対象ががん等の場合は既存機器と異なると考えられる。一般的名称が定義されていない体外診断薬（チップ）又は医療機器（分析装置）は新規に追加されることになる。クラス分類については、薬事的な案件となるため、本 WG では議論しない。定義案では、特定の診断マーカと結合する抗体や Capturing probe DNA 等を固定化したマイクロ流体チップを搭載し、チップを交換することにより、目的に応じた多種多様の診断を行うことのできる装置を対象として既存機器との住み分けを行っている。
- ・ 定義案の中に POCT が含まれており、設置の問題等についてはどうするか？（委員）→ 使用場所を問わず、診断装置自体の品質・安全性及び性能の評価項目に変わりはないが、大病院・受託検査機関、クリニック及び在宅における利用については、測定を安全且つ正確に行うために要求される事項がそれぞれ異なる。微量診断装置をクリニックへ導入する際の留意点は今年度の報告書に提言として掲載するが、在宅利用については来年度検討する。

定義については、報告書掲載案を事務局が作成し、前田座長の査読を受けた後、委員全員に配信して意見等を収集することとなった。

#### (B) 臨床的意義について

落谷副座長と前川委員から、資料 5-1 及び 5-3 の内容が説明された。総論部分は微量診断装置の導入、各論部分は微量診断装置により得られる情報の臨床的意義に相当する。前者は次年度作

成する評価指標案の「1.はじめに」、後者は「4.評価に当たって留意すべき事項」の素案となる。臨床的意義については、落谷副座長が資料 5-1 と 5-3 を取りまとめた後、前川委員が査読し、一つの報告書として事務局へ提出することになった。なお、資料 5-1 に示された留意点メモ部分は臨床的意義から切り離し、提言へ移行させることとなった。

#### (C) 対象疾患・診断マーカについて

黒田委員より、文献調査結果を Excel にまとめた資料が紹介された。情報量が膨大なため、電子媒体のみの配布とした（資料 5-4）。第 2 回会議において村上委員から提示された情報も当該資料に包含されていることが確認された。後日、今井委員から提出される循環器分野（脳梗塞、心疾患）におけるバイオマーカに関する調査結果も取り込み、黒田委員が調査目的・方法及び結果の概要等を作成して報告書形式にまとめることとなった。

#### (D) 開発・利用動向調査

一木委員から、資料 4-1 に基づいて、国内で許認可を受けていない装置や実用化が比較的近い機器が紹介された。クリニックへの導入が難しい試作段階の装置は除外したことが説明された。今年度の調査は終了させ、必要に応じて次年度も調査を継続させることとした。今年度の報告書には資料 4-1 の内容に可搬型マイクロチップに関する情報を追加することになった。

#### (E) 性能評価方法の基本的考え方

馬渡委員から、資料 4-2 に基づいて、微量検体特有の性能評価と一般的な分析性能評価に必要な項目とその理由が紹介された。資料 4-2 には、一木委員より提供された miRNA を分析する際に要求される項目も追記したことが説明された。性能評価方法の基本的考え方については、資料 4-2 の内容に呼気を対象とした際の要求事項を追加し、報告書としてまとめることとなった。

#### (F) 品質・安全性評価方法の基本的考え方

戸塚委員から、資料 4-3 に基づいて、仕様及び安全性評価に関する要求項目が紹介された後、内容を精査した。主な討議事項は以下のとおりである。

- ・ 診断薬となるチップに関する項目は必要か？（委員）→ 次年度作成する評価指標案の対象は医療機器であるため、厳密に考えた場合、チップは対象外となる。しかし、定義案に掲げた微量診断装置の品質・安全性及び性能を評価するためには、チップ部分と組み合わせて評価する必要があるため、その点を考慮した分析装置の評価指標案を作成する。
- ・ 性能評価項目と重複する部分があるが問題ないか？（委員）→ 次年度作成する評価指標案の叩き台となるため、重複を考慮することなく網羅的な内容とする。なお、重複については評価指標案の叩き台を作成する際に事務局がチェックする。
- ・ 各論（オ）には血液及び尿のほか、唾液と呼気を追加する。
- ・ データの標準化と関連する事項として、標準的な測定法に関する項目を追加する必要があるか？（委員）→ 提言に追記する。新しい技術は標準化が難しいが、将来的には化学測定におけるトレーサビリティを実証する必要があることを指摘しておいた方が良い。
- ・ 資料 4-3 に調査目的等を追記して報告書形式に整える。

#### (G) 提言

前川委員から、資料 5-2 の前半部分が紹介された後、質疑応答を行った。主な内容は以下のとおりである。

- ・ POCT が入っているので、コネクタビリティ（相互接続性）も考えた方がよい。紙媒体の情報は転記ミス等も生じるため、その転送については、今後、電子カルテがオンライン化されることが重要となる。クリニック/大病院間における情報提供手段としても利用されると思われる（委員）。→ 提言は微量診断装置をクリニックへ導入する際に必要な留意点を取りまとめることが目的である。医療 ICT を含むビッグデータの活用は医療分野における国家戦略の一つとして掲げられているが、医療 ICT の整備は当該装置をクリニックへ導入するための必須要求項目ではないと思われるため、クリニックへの普及を促進すると共に、より良い医療を提供するために必要なツールという位置付けで提言に記載してはどうか？
- ・ 前川委員担当部分の最後の文章に「学会」を追加する。

村上委員から、資料 5-2 の後半部分が紹介された。主な討議内容は以下のとおりである。

- ・ 微量診断装置をクリニックまで広く普及させるためには、学会としてランダム化比較試験等を実施するほか、国民への情報提供を目的とした市民公開講座等を開催する仕組みが必要である。
- ・ 微量診断装置は高度な技術を搭載した機器になると考えられる。スクリーニングとして使う場合は経済的な側面やビジネス展開としての考え方も必要である。海外では既に議論が進んでいるため、微量診断装置を導入するメリットに関する考え方を国内においても広めていくことが必要と思われる。
- ・ 高額な装置を普及させるための先進医療等についても追加する。

## 6. その他

報告書作成の方向性は決定されたため、第 4 回会議は開催しないこととした。各 TF 調査担当者は報告書原稿を 1 月末までに事務局へ提出する。事務局は提出資料を報告書として編集し、審査 WG 全体で内容を確認した後、3 学会（日本分析化学会、日本臨床化学会、日本臨床検査医学会）に査読を依頼し、意見等を募集する。最終的な報告書は 3 月に印刷製本し、厚生労働省へ提出する。なお、各 TF 調査担当者は以下のとおりである。

- (A) 定義：事務局（原案作成）⇒ 前田座長（校閲）⇒ 審査 WG（査読）
- (B) 臨床的意義：落谷副座長（編集）⇒ 前川委員（査読・提出）
- (C) 対象疾患・診断マーカ調査：黒田委員（編集・提出）
- (D) 開発・利用動向調査：一木委員（追加・提出）
- (E) 性能評価方法の基本的考え方：馬渡委員（追加・提出）
- (F) 品質・安全性評価方法の基本的考え方：戸塚委員（編集・提出）
- (G) 提言：前川委員（編集・提出）

次年度は最終目標である評価指標案及び在宅医療に関する提言を作成すると共に、必要に応じてその他の調査研究を実施する予定である。

以上

## 参考資料

合同検討会報告資料

## 委員構成

座長 前田瑞夫 理化学研究所(主任研究員)  
副座長 落谷孝広 国立がん研究センター研究所(主任分野長)

### 委員 (五十音順)

一木隆範 東京大学(准教授)  
今井 靖 自治医科(准教授)  
黒田雅彦 東京医科大学(主任教授)  
前川真人 浜松医科大学(教授)  
馬渡和真 東京大学(准教授)  
村上善基 大阪市立大学(准教授)  
湯川 博 名古屋大学(特任講師)

### (独)医薬品医療機器総合機構

高江慎一 医療機器審査第一部(部長)  
牧野 勤 医療機器審査第一部(審査役)  
宮本大誠 体外診断薬審査室(室長)  
宮崎生子 規格基準部(部長)  
藤井道子 規格基準部医療機器基準課  
(テクニカルエキスパート)

### 学会推薦専門家 (五十音順)

菊池春人 日本臨床検査医学会(慶應義塾大学・専任講師)  
戸塚 実 日本臨床化学会(東京医科歯科大学・教授)  
丹羽 修 日本分析化学会(埼玉工業大学・教授)

### 事務局: 国立医薬品食品衛生研究所

新見伸吾 医療機器部(部長)  
薮島由二 医療機器部第一室(室長)  
植松美幸 医療機器部埋植医療機器評価室(主任研究官)  
野村祐介 医療機器部第一室(研究員)

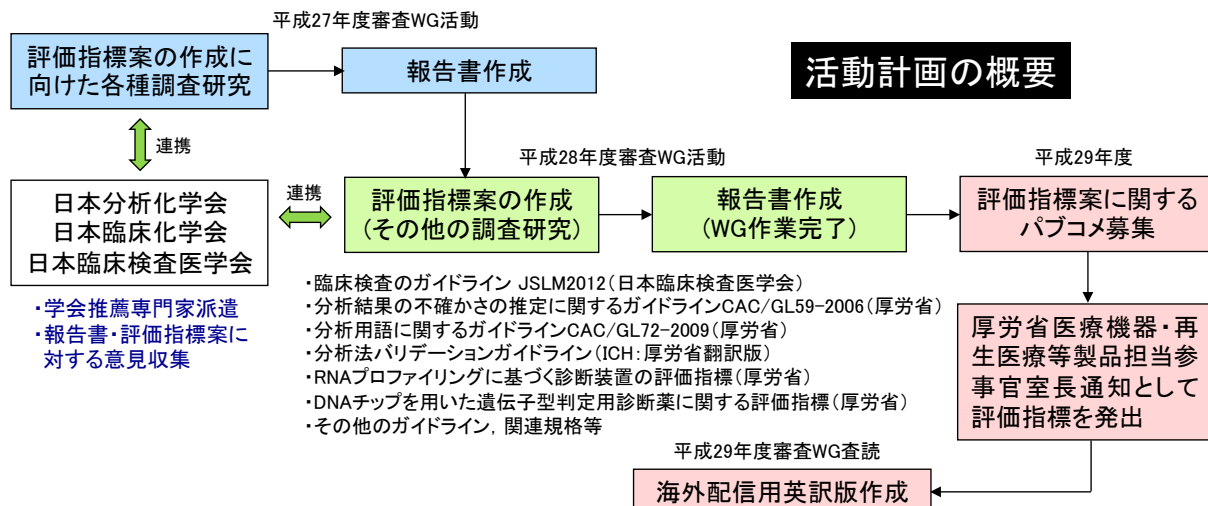


微量診断装置  
審査WG事務局

## 目標及び活動計画

### 微量診断装置審査WGの目標

高齢化の進展に伴い、国民の「健康寿命」の延伸を実現する手段の一つとして、発症予測/発症前診断により早期の治療介入を行う先制医療や奏効率の高い治療を行う個別化医療が期待されている。がん等の重篤な疾患の早期診断/早期治療や先制医療の実現には、病識がない早期において、クリニックや在宅医療にも導入可能な小型且つ低侵襲の高感度マルチマーカによる診断システム技術が不可欠である。近年、体液中のマイクロRNA、蛋白質、ヌクレオソーム等を対象とした微量診断装置の開発が活発に進められている。本WGでは、最先端の微量診断装置を巡る国内外の研究・開発動向及び関連規格等を調査すると共に、その品質・安全性と性能を科学的根拠に基づいて適正且つ迅速に審査するための評価指標案の作成を目指す。



# 平成27年度活動内容の要約

## 【第1回会議のポイント】

平成27年度第1回会議 (10/1)

現状把握、課題抽出、方向性の決定

平成27年度第2回会議  
(11/30)

招聘講演及びTF活動報告・討議

平成27年度第3回会議  
(12/25)

TF活動報告及び報告書構成決定

平成28年1月末

平成27年度報告書各種原稿/脱稿

平成28年2月末

平成27年度報告書最終案作成

平成28年3月中旬

平成27年度報告書提出

### (1) 総合討論

- ・微量診断装置導入の臨床的意義
- ・微量診断装置・技術基盤の研究・開発動向
- ・微量診断装置の定義(対象機器を含む)
- ・品質・安全性評価方法
- ・性能評価方法(微量診断特有の評価項目を含む)
- ・ニーズの高い対象疾患・診断マーカ

### (2) TFの立ち上げ

- ・TF1: 研究・開発動向調査, 品質評価方法, 性能評価方法
- ・TF2: 対象疾患・マーカ調査(検体を含む), 意義・定義

### 対象機器の一例

- ・マイクロRNA診断装置(可搬型マイクロチップ等)
- ・微量検体免疫分析装置( $\mu$ ELISA等)
- ・プロテオチップ(昭科大学/マイテック)
- ・テロメスキャン(岡山大学/オンコリスバイオファーマ)
- ・その他(MS, 非侵襲血糖測定機等)

### 対象疾患の一例

- ・がん, アルツハイマー
- ・循環器系疾患
- ・脳腫瘍(神経膠腫)の分子診断等



$\mu$ ELISA



血液一滴分析装置



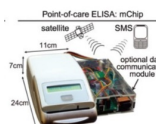
プロテオチップ



C<sub>1</sub> Single-Cell Auto Prep



EncompassMDx



mChip



Meritas Troponin I test

# 平成27年度報告書の構成と今後の計画

## 平成27年度報告書(調査研究)

1. はしがき
2. 委員名簿
3. 微量診断装置の定義
4. 微量診断装置の臨床的意義
5. 品質・安全性評価方法の基本的考え方
6. 性能評価方法の基本的考え方
7. 提言: クリニックへ導入する際の留意点
8. 調査報告
  - (1) 開発・利用動向調査
  - (2) バイオマーカの現状
9. 参考資料
  - (1) 会議議事概要
  - (2) 合同検討会報告資料

### 内容の一例(定義案のポイント)

- # 微量検体: 血液、尿、唾液、涙液、呼気等(低侵襲)
- # 診断マーカ: タンパク質やマイクロRNA等
- # 従来法を除外: マイクロ流体チップを用いた微量分析装置
- # 利点①: 分析所要時間の短縮と感度・検出限界の向上
- # 利点②: クリニック等におけるPOCTにも利用
- # 利点③: 目的に応じた多種多様の診断
- # 対象範囲: チップを含めた分析装置
- # 留意点①: 微量分析特有の留意事項
- # 留意点②: 個別の事例ごとに臨床データをもとに検証

## 平成28年度活動計画

### 微量診断装置に関する評価指標案

1. はじめに
2. 本評価指標の対象
3. 評価指標の位置づけ
4. 評価に対して留意すべき事項
  - (1) 基本的事項(原理、臨床的意義を含む)
  - (2) 非臨床試験
    - ① 性能に関する評価
      - # 微量検体特有の性能評価項目
      - # 一般的な分析性能評価項目
    - ② 品質・安全性に関する評価
      - # 検体・試薬等の調製・管理
      - # 測定、データ解析、リスク分析
      - # トラブルシューティング
  - (3) 臨床性能
    - ① 被験者集団の妥当性
    - ② 海外データの取扱い
    - ③ 医療情報の提示
    - ④ 倫理面の配慮 等

・関連学会と連携して評価指標案を作成するため、次年度も引き続き活動する。

・少なくとも会議を3回開催すると共に、必要に応じて調査研究も実施する。

## 関連学会のご意見・ご要望と事務局の回答



## 関連学会のご意見・ご要望と事務局の回答

微量診断装置審査 WG 事務局

微量診断審査 WG は、次世代医療機器・再生医療等製品評価指標作成事業の成果に対するご意見・ご質問、本審査 WG へのご要望等を広く収集することを目的とし、連携学会（日本臨床化学会、日本臨床検査医学会、日本分析化学会）に所属する会員を対象として、平成 27 年度報告書案を事前公開いたしました（意見募集期間：2016 年 2 月 2 日～2016 年 2 月 29 日）。これを受け、日本臨床化学会評議員より以下のご要望をいただきましたので、事務局の回答と併せてご紹介いたします。

### <日本臨床化学会/評議員からのご要望>

汎用の自動分析装置の測定との相関、トレーサビリティーについても今後の検討課題としてほしい。報告書の POCT の相関とトレーサビリティーの項は、トレーサビリティーの参照機として基準測定法になると思います。一方、医療機関の検査室では、基準測定法に対して汎用の自動分析装置、試薬がトレーサビリティーとしてつながっています。両方の装置及び試薬は、基準測定法に対して、トレーサビリティーはありますが、両方の関係は、運用する側から見るとあいまいです。

例えば、GLU 測定は POCT と汎用の生化学自動分析装置のデータ比較、検討は多数報告されていますが、両方が検査結果としてどのように運用すべきかの実用的なガイドライン等も出ていないと思います。まして、血糖以外の測定項目は、POCT 等の微量分析と既存の分析法との関連について系統的な調査も少ないと思います。微量計測と汎用の方法で並立して測定される項目については、両方の精度、直線性、妨害物質の違い、取り扱い等を系統的に集めて、データベースとして情報提供することが必要と思います。

特に、具体的な運用等についてはガイドラインが必要かと思います。微量診断と POCT、既存の自動分析相当との技術に関する定義に対する理解が曖昧いで、申し訳ありませんが、よろしく願いいたします。

### <事務局の回答>

標準化については、微量診断装置に限らず、検査機器全般の測定確度を保証する上で重要な評価項目となるため、基本的な考え方等を具体的に提示できるよう、平成 28 年度審査 WG 会議において討議いたします。