

## 論文の内容の要旨

論文提出者氏名	浅 香 志 穂
論文審査担当者	主 査 花 岡 正 幸 副 査 小 泉 知 展 ・ 栗 田 浩
論文題目 A novel, rapid point-of-care test for lung cancer patients to detect epidermal growth factor receptor gene mutations by using real-time droplet-PCR and fresh liquid cytology specimens (肺癌患者における上皮成長因子受容体遺伝子変異検出のための液滴型高速 PCR 装置と新鮮液状細胞診検体を用いた新規迅速ポイント・オブ・ケア・テスト)	
(論文の内容の要旨) <b>【背景・目的】</b> 非小細胞肺癌に対する上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異検査は、外科的切除不能な進行期非小細胞肺癌症例に対して EGFR チロシンキナーゼ阻害薬 (EGFR-TKI) 投与の適応を決定する際に不可欠である。現在、肺癌 EGFR 遺伝子変異検査においては、癌細胞を含む生検材料や手術材料などのホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体から抽出した DNA を用いて、PCR 法をベースにした検査を行うことが一般的である。しかしながら、多くの施設で検体採取から結果報告までおよそ7日から14日間の期間を要している。今回我々は、リアルタイム液滴型高速 PCR 装置 (セイコーエプソン社) と気管支洗浄液および胸水などの新鮮液状細胞診検体を用いて、新たな迅速 EGFR 遺伝子変異検査法 (EGFR d-PCR 法) を開発し、その有用性を検討した。 <b>【方法】</b> 対象患者は、信州大学医学部附属病院で2014年の1年間に原発性肺癌が疑われ、気管支洗浄液や胸水などの新鮮液状細胞診検体が病理検査に提出された患者245名のうち、細胞診で肺腺癌もしくは特定不能な非小細胞肺癌と診断された連続患者とした。 EGFR d-PCR 法で用いるリアルタイム液滴型高速 PCR 装置には、反応時間中一定の温度に保たれる高温と低温の2つのヒートブロックを有する。専用オイルが充填された反応チューブに PCR 反応液 (液滴) を注入し、このチューブの両端に2つのヒートブロックがくるように設置する。ヒートブロックがモーターによって回転することで、液滴は重力で高温と低温ブロック間を移動し、急速な温度変換が行われ、高速 PCR 反応が可能となる。蛍光検出器で PCR 反応産物の蛍光強度を測定する。 対象 EGFR 遺伝子変異は、最も高頻度な変異である exon21 の L858R と exon19 の E746_A750del とした。この2つの変異を併せて、肺癌関連 EGFR 遺伝子変異の90%以上を占める。加えて EGFR-TKI 耐性遺伝子変異として最も一般的な exon20 の T790M も対象とした。以上3種類の変異に対して、Amplification Refractory Mutation System (ARMS) 法の原理に基づいて変異特異的にアニーリングするプライマーと、蛍光標識プローブを設計した。 対象患者の新鮮液状細胞診検体の残余検体から DNA を抽出し、EGFR d-PCR 法を用いてリアルタイム PCR 検査を行った。比較対照として、現在 EGFR 遺伝子変異検査の体外診断薬として米国、欧州、日本、中国などで承認されている theascreen EGFR 変異検出キット RGQ 「キアゲン」 (QIAGEN 社製) とリアルタイム PCR 装置である Rotor-Gene Q (QIAGEN 社製) を用いた従来法で同様に検査を行った。両検査法の判定結果と検査時間を比較した。 さらに、EGFR 遺伝子変異型と野生型の肺癌培養細胞を用いて、種々の割合の EGFR 変異型陽性細胞混合液 (0%、0.01%、0.05%、0.1%、0.5%、1%、5%、10%、50%、100%) を作製し、EGFR d-PCR 法の検出限界を検討した。	

**【結果】**

対象患者は 80 名で、それぞれ検体の内訳は 77 名が気管支洗浄液検体、2 名が胸水、1 名が心嚢水であった。

*EGFR* d-PCR 法では、16 名が L858R 陽性、8 名が E746\_A750del 陽性、1 名が T790M 陽性と判定された。従来法では、16 名が L858R 陽性、11 名が exon 19 deletions 陽性（このうち 8 名が E746\_A750del 陽性）、1 名が T790M 陽性と判定された。全 80 名における L858R、E746\_A750del、T790M に関する *EGFR* d-PCR 法の結果は従来法と一致した。

リアルタイム PCR の反応時間は、*EGFR* d-PCR 法の 8 分 10 秒に対し、従来法は 1 時間 45 分であった。

肺癌培養細胞を用いた *EGFR* d-PCR 法では、L858R 検出系で 0.5%、E746\_A750del で 0.05%、T790M で 0.5% までの *EGFR* 遺伝子変異陽性細胞混合液で検出可能であった。いずれの変異検出系においても、*EGFR* d-PCR 法の検出限界は、従来法と同程度あるいはそれ以上の検出感度を有していた。

**【結語】**

*EGFR* d-PCR 法では、従来法と一致する判定結果および検査時間の大幅な短縮、同程度の検出限界が得られた。本法では DNA 抽出過程を含め 1 時間 30 分以内で判定結果を得られ、検査当日の結果報告により、早期に進行期肺癌患者の EGFR-TKI 治療を開始できる。