

生物の驚異的な能力を利用したモニタリング技術—線虫嗅覚によるがん検査—

広津 崇亮

九州大学大学院理学研究院生物科学部門

1. 生体情報のモニタリングにおける新コンセプト「生物診断」

多くの人を病気から救うには、病気になった後の治療技術だけでなく、病気を早期に発見する検査技術の開発が必要不可欠である。例えばがんのように、病気を早期に発見することができれば、高い治療効果が見込まれる病気も多い。しかし、早期であればあるほど生体に起こっている変化、つまり生体情報の変化が小さく、それをモニタリングする技術の開発は難易度が高いことが予想される。さらに、技術的に可能となったとしても、微少な変化を検知するためにはセンサーや機械を高スペックにする必要があり、結果として高額な機械による高額な検査になってしまう傾向にある。1回の検査の値段が高いというのは、多くの人にとって抵抗感があるため、実用化にとって極めて大きな問題となる。また国の医療費の増加という面でも議論の余地がある。そこで反対に、低コストを追求するために簡易キットを作ると、多くの場合、今度は精度が低く早期発見できないという問題に直面する。

そのジレンマを打破する可能性があるのが、新しいコンセプト「生物診断」である。生物の持つ優れた能力を用いることで高精度を維持し、飼育コストの低い生物を選択することで低コストを実現するという発想である。線虫がん検査 N-NOSE (Nematode NOSE = 線虫の鼻) は、線虫の優れた嗅覚を利用したがん検査法である。人工機器より感度が高い生物(線虫)の嗅覚を利用し、飼育コストが低い線虫を使うことで、高精度と低コストを両立しているところが大きな特色である。生物の嗅覚は微量物質の検知に優れており、がん組織が小さくがん特異的物質の分泌が微量である早期がんの発見にも向いている。

線虫 *C. elegans* は、好きな匂いには誘引、嫌いな匂いには忌避といった走性行動を示す。我々は線虫ががん患者の尿には誘引行動を、健常者の尿には忌避行動を示すことを発見した。N-NOSE は線虫の走性行動を指標として、尿を用いてがんを識別する技術であり、下記の特長を併せ持つ。

- ①非侵襲で簡便：尿で解析できる。必要な尿はわずか1滴である。
- ②安価：材料費だけなら1検体あたり数百円程度である。
- ③対象がん種が広い：現在10数種類のがんについて検出可能であることがわかっている。その中には早期発見が極めて難しいすい臓がんも含まれている。
- ④早期発見：ステージ0、1の早期がんについても高精度に検出可能である。
- ⑤高精度：感度、特異度ともに90%以上。腫瘍マーカーと比べて感度が圧倒的に高い。

2. N-NOSE の実用化を目指した体制作り

我々は N-NOSE を一刻も早く実用化すること、安価で広く普及させることを最大の目標としている。早く広く普及させるためには、我々にない技術や販売ノウハウを持った企業と連携することが必須である。また、安価な検査にするためには、その理念を持った発明者・研究者自身がイニシアチブを握って実用化を推進することが望ましい。さらに実用化研究には、基礎研究を遥かに上回る研究費が必要であり、資金を速やかに調達することも必要である。これらの点を解決する方策として、ベンチャー企業（株式会社 HIROTSU バイオサイエンス）を昨年夏に創立し、発明者自身が代表に就任した。

3. N-NOSE の実用化に向けた研究開発

N-NOSE の実用化には、以下の 3 点の研究開発が必須である。

- ①臨床研究により症例数を増やして精度を検証する
- ②大規模検体の解析を可能とする自動解析装置の開発
- ③線虫ががんの匂いを受容するメカニズムの解析

本年度は①②に集中して研究開発を進めた。得られた成果について以下に報告する。

①臨床研究による精度検証

2 年前の報告では、がん患者 24 例、健常者 218 例について N-NOSE 解析を行い、感度（がん患者をがんと見分ける確率）95.8%、特異度（健常者を健常と見分ける確率）95.0%であった¹⁾。感度は腫瘍マーカー（約 20%）と比較して圧倒的に高い結果であった。しかし特になんがん患者の症例数が少なく、基礎研究の域を出ない。よって、大学医学部や病院と共同研究を行うことにより、がん患者、健常者の尿検体を採取し、症例数を増やして N-NOSE の精度を検証することが必須である。

生物統計専門家の試算により、各がん種 76 例以上が検証に必要であることがわかった。そこで共同研究病院を増やし、短期間で目標症例数を得る体制作りが求められた。現在、数十の医学部、病院が参加する全国規模共同研究の体制を構築することに成功し、倫理審査で承認を得られた施設から順に研究を開始している。

最初に開始した南風病院（鹿児島市）との共同研究では、2016 年 12 月中間速報結果を報告した²⁾。消化器がん（すい臓がん、大腸がん、胃がん、食道がん、胆のうがん、胆管がん）と診断された患者の尿検体 63 サンプルについて N-NOSE 検査を行った結果、57 サンプルが陽性を示し感度は 90.5%であった。特に発見が難しいとされている胆膵がんについても、N-NOSE は 90.0%の高感度を示した。同じ患者で調べた腫瘍マーカー CEA、CA19-9 は感度がそれぞれ 20.6%、28.6%だった（表 1）。

	陽性/試験数	感度
N-NOSE	57/63	90.5%
CEA	13/63	20.6%
CA19-9	18/63	28.6%

表 1 N-NOSE および腫瘍マーカーの感度の比較

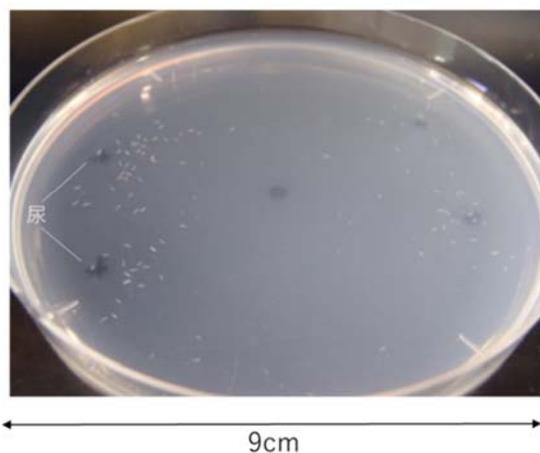
N-NOSE のこれまでの臨床研究データを合計すると、がん患者尿検体 112 サンプルについて、陽性だったのが 105 サンプルで感度は 93.8%。また本試験では、PET-CT、腫瘍マーカー、その他の検査項目、医師による総合判定、その全てで陰性と診断された被験者を「健常者」とみなしており、これまでに健常者と診断された被験者 14 検体については N-NOSE 検査でいずれも陰性であった（特異度=100%）。

②自動解析装置の開発

現在 N-NOSE 解析は検査員により手動で行っているため、1 日当たりの解析検体数が 3～5 検体である。我が国のがん年齢に達した人口は 6000 万人であり、手動では検査希望者全員の解析をすることが不可能である。よって自動解析装置により単位時間当たりの解析数を大幅にアップさせる必要がある。図 1 に示すように、自動解析装置の開発には多くの課題がある。本年度は、最初に解決すべき以下の課題について研究開発を行った。

②-1 線虫の誘引・忌避は、線虫の個体数を目視で計測することで行っている。このステップが手間と時間を最も要するため、線虫の数を画像から自動的に計測するシステムの開発を行う。

②-2 線虫の行動観察に使用しているシャーレは生物研究室で普通に使用されている汎用的なものである。N-NOSE に専用のシャーレにカスタマイズすることで、検査の効率化を図る。



<問題点>

- ・線虫個体数を目視で計測
- ・走性インデックスを手計算
- ・シャーレに毎回マーク
- ・トレーサビリティに問題
- ・汎用プレートでサイズが大きい
- ・環境の影響を受けやすい
- ・アジ化ナトリウムを使用
- ・1回の解析 = 30分
- ・同時解析数 = 1

図 1 自動解析装置の開発における現状の課題

②-1 線虫の個体数の画像計測

現在の N-NOSE 解析では、シャーレの片側に尿を、中心に線虫を置き、尿に寄った線虫個体数 (N_a)、反対側に逃げた個体数 (N_b) を目視で計測し、走性インデックス ($= N_a - N_b / \text{all}$) を手で計算することで行っている。目視での計測、インデックスの手計算が解析効率を高めるうえでボトルネックとなっている。そこで、シャーレ画像を取得し、画像解析

ソフトにより線虫個体数を判別し、そのデータをもとに走性インデックスを自動計算するシステムの構築を試みた。

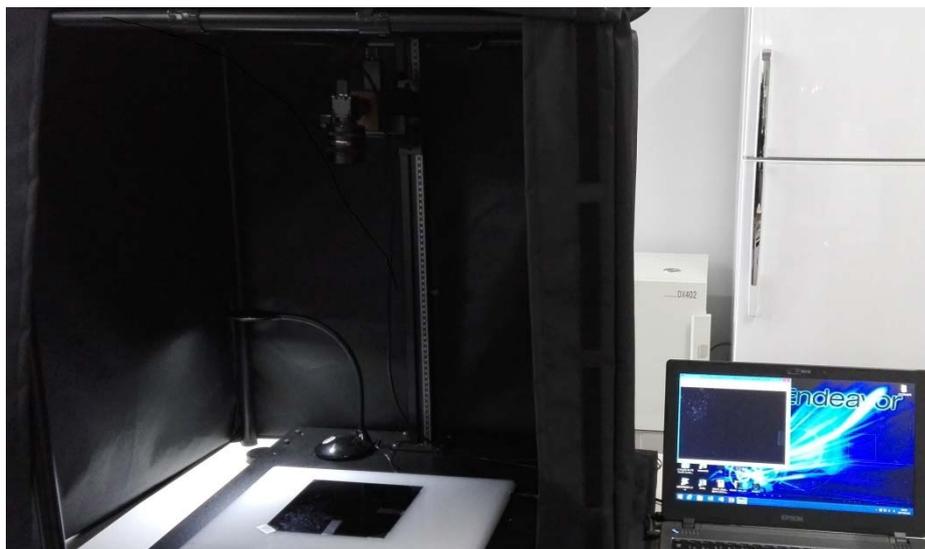


図2 線虫個体数の画像解析システム

光の条件を一定にするために暗室を設計し、線虫を最適なコントラストで取得する条件を決定した（図2）。取得したシャープ画像について、画像解析ソフトで二値化などの処理を行い、線虫以外の汚れなどのデータを除去することで、線虫の個体数を領域ごとに自動的に計測することが可能となった。このシステムを導入することで、検査員の手間を大幅に省くことができ、作業の効率化を達成できた。

②-2 N-NOSE 専用シャーレの開発

現在使用している汎用シャーレ（直径9cm）では、図1の3点目以降のような複数の問題があった。そこで、それらを解決するために、N-NOSE 専用シャーレの開発を行った。改良点は以下である。

- ・シャーレに毎回線虫を置く点などのマークをする必要があったため、シャーレにあらかじめプリントする。
- ・検体情報を手動で書き込むためトレーサビリティに難点があったため、バーコードを付加する。
- ・直径9cmでサイズが大きく円形で取り扱いが容易でないため、長方形の小型シャーレとする。
- ・シャーレが大きいと、線虫の泳ぐ距離が長いため解析時間が長くなり、その分環境の影響を受けやすい。それを防ぐために、小型シャーレを開発する。
- ・シャーレを小型にすることで、解析時間の短縮を図り、解析効率のアップにつなげる。

この小型シャーレで解析条件の検討を行った結果、匂いに対する線虫の走性行動が解析可能であること、解析時間が5分～10分に短縮できることがわかった。解析時間の短縮により、環境条件の影響を受けにくく安定的な検査ができること、単位時間当たりの解

析数が増加する効果がある。

4. 今後の展望

2020年初めの実用化を目指し、上記の研究開発を進めるとともに、実用化後を見越した体制作りを急ピッチで進めている。N-NOSEは1次がんスクリーニング検査として高いニーズが見込まれる。これまで、簡便に安価に高精度にがんをスクリーニングする検査は存在せず、そのために我が国のがん検診受診率が上がらない問題が続いていた。N-NOSEは最初に受けるがん検査として優れた特長を有しており、がん検診率を上昇させる期待がある。よって、国民が広く受けられる体制を構築する必要がある。当初は必ず医師、医療関係者を介することを予定している。なぜなら、がん検査は非常にデリケートなものであり、結果の伝え方に細心の注意を払う必要があるからである。そのためには全国に協力病院を置く必要があり、その体制構築を進めている。

自動解析装置については、2017年4月企業と共同で開発を進めることを発表した^{3,4}。今後も多くの企業との協業により、一刻も早い実用化の実現を目指して進めていく。

1. Hirotsu T. et al., A Highly Accurate Inclusive Cancer Screening Test Using *Caenorhabditis elegans* Scent Detection, PLOS ONE, 10(3): e0118699 (2015)
2. 株式会社 HIROTSU バイオサイエンス プレスリリース (2016年12月13日)
3. 株式会社 HIROTSU バイオサイエンス プレスリリース (2017年4月18日)
4. 日立製作所 プレスリリース (2017年4月18日)

謝辞

本研究開発の実施にあたり、貴財団より厚いご支援を賜りました。奨励賞を頂いたことは、自分の研究への自信につながりました。授与式で審査員の先生方や財団の関係者の皆様から頂いた温かい言葉は、今でも大きな支えとなっております。この場を借りて、心より感謝申し上げます。