

平成27年2月

# 阪本智宏 学位論文審査要旨

主 査 植 木 賢  
副主査 北 野 博 也  
同 清 水 英 治

## 主論文

A novel point-of-care system for high-speed real-time polymerase chain reaction testing for epidermal growth factor receptor mutations in bronchial lavage fluids after transbronchial biopsy in patients with non-small cell lung cancer

(非小細胞肺癌患者におけるポイント・オブ・ケア検査としての経気管支肺生検後洗浄液検体中の上皮成長因子受容体遺伝子変異検索のための新規高速PCR法)

(著者：阪本智宏、小谷昌広、高田美也子、千酌浩樹、中本成紀、西井（伊藤）静香、上田康仁、泉大樹、牧野晴彦、唐下泰一、武田賢一、山崎章、矢内正品、田中那津美、井岸正、清水英治)

平成27年 International Journal of Oncology 掲載予定

## 参考論文

1. Food-borne botulism in Japan in March 2012

(2012年3月に日本で発生した食餌性ボツリヌス症について)

(著者：百瀬愛佳、朝倉宏、北村勝、岡田由美子、上田豊、花原悠太郎、阪本智宏、松村毅、岩城正昭、加藤はる、柴山恵吾、五十君静信)

平成26年 International Journal of Infectious Diseases 24巻 20頁～22頁

# 学 位 論 文 要 旨

A novel point-of-care system for high-speed real-time polymerase chain reaction testing for epidermal growth factor receptor mutations in bronchial lavage fluids after transbronchial biopsy in patients with non-small cell lung cancer

(非小細胞肺癌患者におけるポイント・オブ・ケア検査としての経気管支肺生検後洗浄液検体中の上皮成長因子受容体遺伝子変異検索のための新規高速PCR法)

近年、進行非小細胞肺癌患者の適切な治療を選択する上で、EGFR遺伝子変異の検索は必須となっている。特に2011年以降は、一次治療におけるEGFRチロシンキナーゼ阻害剤の適応はEGFR遺伝子変異陽性例に限定されており、実臨床においてEGFR遺伝子変異検査は特に重要な位置を占めている。しかしながら、臨床現場で病理診断結果が判明後に更に遺伝子変異検査を追加して行うとその結果が判明するまでには相当な時間的な遅延が生じる。この遅延を解消するため、本研究は反応時間10分程度と極めて高速なPCR反応を可能とする機器 (UR104MK IV) を用いた新規高速PCR法 (ultrarapid PCR) を開発した。標的とする遺伝子変異は、変異全体の9割を占めるhot spot mutationとして知られているexon19欠失変異 (19del) およびexon21点変異 (L858R) の2つとし、それぞれに特異的なプライマーを作成した。そして、ガイドシース併用気管支腔内超音波断層法による経気管支生検 (EBUS-GS-TBB) で採取した液性臨床検体を用いたultrarapid PCRと、実臨床で一般的に使用されている代表的なEGFR遺伝子変異検索法の1つであるホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織検体を用いたPCR invaderとの一致率を前向きに検討し、その妥当性を検証したため報告する。

## 方 法

19delおよびL858Rに特異的なプライマーを作成し、細胞株を用いて検出限界を検証した。2012年11月から2013年12月の期間に、画像検査で肺癌が疑われ当科でEBUS-GS-TBBを行った連続168例を前向きに登録した。検体はブラシ生検後のブラシを洗浄したものと、生検操作終了後の気管支洗浄液の混和物を用い、DNAを精製した。全例でultrarapid PCRによるEGFR遺伝子変異検索を即日行った。また非小細胞肺癌が病理学的に確定した120症例についてはFFPE組織検体を用いたPCR invaderを後日追加し、その結果を比較することによりultrarapid PCRの妥当性を検証した。

## 結 果

細胞株を用いた実験では、19del、L858Rともにわずか1%まで検出可能であり、高感度なPCR法であることが確認された。EBUS-GS-TBBの診断率は、全体で91.0%であった。168例のうち121例が肺癌と診断され、さらにそのうち腺癌は89例（73.6%）であった。病期はIV期のものが32例（26.4%）であった。ultrarapid PCRを用いて、26例で遺伝子変異を検出し、そのうち19delが11例（42.3%）、L858Rが15例（57.7%）認められた。PCR-invaderを基準としたultrarapid PCRの陽性一致率および陰性一致率は、19delでは100%、97.2%であり、L858Rでは100%、98.1%であり、Cohen's kappa coefficientsを求めるとそれぞれ0.87、0.93と非常に高い一致が得られその妥当性が証明された。

## 考 察

EBUS-GS-TBB全体の診断率は90%を超えており、非常に高精度な検査法と言える。仮想内視鏡ナビゲーション（VBN）の併用を症例に応じてうまく使い分けることが重要であり、特に標的病変が小さなもので有効であることが示唆された。一般に気管支鏡検体は組織量が少なく、また正常細胞の混入も多いが、このような臨床検体を用いても、ultrarapid PCRは遺伝子変異解析を行うのに十分な高感度検査であることが示された。

ultrarapid PCRの最大の特徴はその反応速度である。治療遅延により予後が致命的となり得る可能性がある症例に対しては、本法のようなポイント・オブ・ケア検査によるEGFR遺伝子変異診断が有益であると考えられる。

本法は19delとL858Rのみを検出するように設計している。これは、既報の大規模臨床試験においてEGFR-TKIの治療効果が立証されているのがこれらhot spot mutationのみであることに基づいているが、この他の稀少変異や未知の遺伝子変異を持つ症例の治療機会を失う可能性は否定できない。また、EGFR-TKIに対する獲得耐性変異として知られるexon 20点変異T790Mも現状では検出できない。これらの制約を解消するためには、それぞれの変異に対する特異的なプライマーセットを設計する必要があり、今後の課題と言える。

## 結 論

EBUS-GS-TBBによる臨床検体を用いた、ultrarapid PCRによるEGFR遺伝子変異診断の有効性が示された。高精度なEBUS-GS-TBBと高感度な迅速診断が可能となるultrarapid PCRを組み合わせることで、EGFR肺癌のポイント・オブ・ケア検査が可能となり得る。