

(乙)

## 学位論文抄録

イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と大腸癌診断実用化研究  
(Non-invasive methods for diagnosing colorectal cancer using colonocytes isolated  
from feces by immuno-magnetic beads)

古賀 宣勝

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

## 学位論文抄録

**【目的】**大腸癌の死亡者数は全悪性腫瘍のうち上位を占め日本でも年々増加しているが、早期に発見し内視鏡的切除や外科的切除による治療が行われれば生存率は極めて良好である。現在、大腸癌検診法として便潜血反応検査が広く普及しているが、便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸癌を特異的に診断してはいない。以前我々は epithelial cell adhesion molecule (EpCAM)抗体が結合した磁気ビーズ(イムノビーズ)を用いて自然排泄便から癌細胞を回収する方法を報告した。そこで本研究は便分離細胞を用いた新しい大腸癌検診法の開発を目的とした。

**【方法】**はじめに、自然排泄便の保存条件を検討した。便を当日処理群、4°Cで1、2、3日間保存群、37°Cで1、2、3日間保存群の7群に分け、それぞれから便中剥離細胞を分離回収しDNAおよびRNAを抽出後、核酸量の比較を行った。つぎに、便から効率よく剥離細胞を回収するイムノビーズの検討を行った。粒子径の異なるビーズに性能の異なる EpCAM 抗体を結合させ、それぞれのイムノビーズによる培養細胞の回収効率と大腸癌患者便を用いた便分離細胞数の比較を行った。最後に、大腸癌患者 166 名と健常者 134 名の自然排泄便を対象として、便分離細胞の mRNA を抽出し、定量性 real-time PCR による遺伝子発現解析を行った。

**【結果】**4°Cで3日間保存した便からは当日処理群と比べて同等の細胞が回収可能だった。一方で37°Cで保存した便は1日間でも有意に回収細胞量が減少していた。便中剥離細胞を効率よく回収するためには粒子径が小さく、性能の良い EpCAM 抗体を結合させたイムノビーズが最も有用であった。mRNA 量が極端に少ない症例を除外し、遺伝子発現解析が検討可能であった大腸癌患者 127 例、健常者 101 例について、4 種類の遺伝子を用いて検討すると感度 58.3%および特異度 88.1%という結果であった。また感度は原発腫瘍の占拠部位( $P=0.01$ )および腫瘍径( $P=0.02$ )と関連があったが、深達度( $P=0.06$ )や進行度( $P=0.37$ )とは関連がなかった。

**【考察】**便中剥離細胞は冷蔵保存可能であり大規模な検体を処理する癌検診が可能であることが示された。粒子径の小さいビーズは1個あたりの磁性体量は少ないが、細胞1個に対して多量のビーズが効率よく結合できるために結果として粒子径の大きなビーズよりも便中剥離細胞を効率よく回収できたと推測された。便 2g から回収した細胞の RNA 量は極微量であり、約 25%は検討不可能であるため、標的遺伝子は癌に高発現している遺伝子で、なおかつ発現量も高いものが望まれる。一方で癌細胞と正常細胞が混在した検体から一括して RNA を抽出することは癌に高発現している遺伝子であっても平均化されてしまい、結果として感度が低下することが考えられる。便分離細胞の RNA を用いた遺伝子発現解析は大腸癌検診にはまだまだ不十分であると考えている。この改善には細胞 1 個を診断する細胞診が有用であると考え、引き続き検討を行っている。

**【結論】**自然排泄便中の癌細胞を対象にした大腸癌検診について研究した。遺伝子発現解析のための便の保存と回収用イムノビーズに関しては至適条件を確認できたが、診断方法としては遺伝子発現解析以外の診断法の検討が必要である。