

主論文の要旨

**Detection of circulating tumor cells in drainage venous blood
from colorectal cancer patients using a new filtration
and cytology-based automated platform**

新規CTC自動分離プラットフォームを用いた
大腸がん患者における排出路静脈からの循環腫瘍細胞の検出

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小池 聖彦 特命教授)

筒山 将之

【緒言】

血液中循環がん細胞(CTC; circulating tumor cell)は血清中循環 DNA(ctDNA)並んで Liquid biopsy の1つとして注目されている。消化器癌患者では、末梢静脈血の CTC 陽性患者が陰性患者と比較して生存期間が有意に短いなど、CTC の予後マーカーとしての有用性を示す報告が多くなされている。しかしながら、CTC は希少細胞であるため遺伝子解析が困難な例が多いことや、従来の蛍光 CTC 検出法では形態学的な情報が乏しいため治療効果の評価が難しいなどコスト以外の課題も多く、実地臨床には未だ応用されていない。

我々は CTC を 3D 金属フィルターによって分離したのちスライドグラスに転写した後、細胞診の手法を用いて CTC を光学顕微鏡で検出できる新しい CTC 分離・検出システムを開発してきた。細胞のサイズによって選別するフィルター型 CTC 分離デバイスを独自に開発してきた。本デバイスは従来の CTC 検出装置に比べ簡便、低コストに加えて検出精度が高いため、実地臨床においても予後マーカー以外に再発の早期診断や治療効果判定など臨床的にも有用なツールとなりうる可能性がある。

今回、この CTC 分離デバイスをさらに改良・半自動化して、大腸癌患者における末梢静脈血と、より多くの CTC 回収が期待される占居部位近傍からの排出路静脈血を用いて、CTC の細胞学的な診断基準を確立し、本デバイスによる CTC 検出能を評価するとともに、CTC 数と臨床病理学的背景との関連性について検討を行った。

【対象及び方法】

2017年4月から2018年3月までの期間に、愛知県がんセンター中央病院にて術前治療を受けていない原発性大腸癌患者26名を対象とした。末梢静脈血(PVB; Peripheral vein blood)は手術日3日以内に末梢静脈血より10ml採血を行い、排出路静脈血(DVB; Drainage vein blood)は、摘出検体の排出路静脈から18G針を用いて採血を行った。いずれの血液もEDTA含有スピッツへ保存し、4時間以内に上記デバイスによるCTCの分離を行った。

全血を5mM EDTA含有リン酸緩衝生理食塩水にて10倍希釈し、8 μ mの細孔をもつ3D金属フィルターデバイスを用いて、5-10ml/minの流量で濾過(濃縮)を行った。次にCTCをトラップしたフィルターを遠心分離してスライドグラスへCTCの転写、パパニコロウ染色と免疫染色(ケラチン)を施した後、明視野で観察を行った。

【結果】

本デバイスを用いて大腸癌患者血液検体を観察・検討し、以下の診断基準を確立した。サイトケラチン陽性、ヘマトキシリン核染色およびパパニコロウ染色にて核異型性を有する細胞をCTCとする(Figure. 1)。CTCとの鑑別が問題となる細胞としては、巨核球、マクロファージ、内皮細胞および白血球集塊等が候補に挙がるが、殆どはCD45やCD68、CD61、CD34等の免疫蛍光染色を組み合わせることなく、パパニコロウ染色単独で十分鑑別が可能であった。

本デバイスを用いたパイロット研究を行った。登録患者26名の患者背景は、年齢中央値(範囲)は66(39-80)歳、男性18名(69%)、右側結腸癌6例、左側結腸癌・直腸癌が20例、進行度はStage I/II/III/IV: 7/6/7/6例であった。

健診で異常を認めない健康なボランティア(年齢中央値55歳、男性10名)とCTC検出率を比較したところ、優位に大腸癌患者においてCTC陽性率が高かった(54%vs14%、 $p<0.05$)。

大腸癌患者において、DVBはPVBよりもCTC陽性率は優位に高く(54% vs 96%、 $p<0.05$)、CTC数は優位に多かった(中央値(範囲)、1(0-78)個 vs 39(0-589)個、 $p<0.05$)。Stage II-IV患者におけるDVB中のCTC数は、Stage I患者のCTC数と比較して有意に増加していた(13(2-54)個 vs 70(0-589)個、 $p<0.05$)。

【考察】

これまでに開発された様々なCTC検出プラットフォームはその大部分が暗視野による蛍光顕微鏡観察によってCTC同定が行われてきた。しかし、蛍光法は形態学的情報に乏しいことや永久標本作成が困難であることなど、課題も多かった。また、フィルターを用いてCTCを細胞のサイズで捕捉し、細胞学的方法でCTCを染色・検出する方法の報告もあるが、これらの方法の多くは使用するフィルターがポリカーボネート製であり、アルコールなどの有機溶媒が使えず、形態識別能に優れたパパニコロウ染色等が不可能であった。本研究におけるCTC検出法は、金属フィルターで捕捉したCTCを孔のないスライドガラスに転写し標本を作成するため、パパニコロウ染色を用いた細胞診による細胞の精緻な観察が行えるだけでなく、免疫細胞染色や免疫蛍光染色など目的に応じたさまざまな染色の組み合わせオプションが可能となった。また、本研究における流体回路に定圧制御システムを導入した自動分離装置の技術開発も、濾過中の細胞へのずり応力の軽減による良好なCTCの形態保持、すなわちCTC細胞診に大いに貢献した。このCTCのスライドガラス永久標本の作成により、複数の病理学者やスクリーナーによる光学顕微鏡での客観的なCTC同定が可能となった。我々の調べる限りにおいて、今回開発したCTC自動検出システムは、スライドガラス標本を用い、細胞診に基づきCTCを診断できる初めてのCTC検出システムといえる。

このCTC自動検出プラットフォーム及び大腸癌患者血液検体を用いて細胞診に基づくCTCの診断基準を確立した。サイトケラチン染色陽性、ヘマトキシリン核染色あるいはパパニコロウ染色にてクロマチン増量、明瞭な核小体を有する異型細胞をCTC同定の診断基準とした。鑑別すべき正常細胞として白血球集塊、マクロファージ、巨核球や内皮細胞等が挙げられるが、これらはパパニコロウ染色によって、免疫染色なしでも容易に鑑別することが可能であった。

このCTC自動検出プラットフォームの性能を評価するため、またCTC数と臨床病理組織学的背景との関連を検討するために、実臨床における原発性大腸癌患者の末梢静脈血(PB)および排出路静脈血(DVB)サンプルのCTC検出・評価を行った。本研究は小さなサンプルサイズ($n=26$)のパイロット研究ではあるものの、大腸癌患者の末梢

血 (PVB) CTC が健常人に比べて有意に多いこと($p < 0.05$)、また PB と比較して DVB で有意に多いことを明らかにした($p < 0.01$)。また、進行度が上がるにつれ、DVB における CTC 数は増加傾向にあり、既存の報告と同様であった。DVB は PB に比べて 1 回しか採取できない欠点があるものの、手術後にリスクなく患者から多数の CTC を回収できる可能性が高いため、DVB は遺伝子診断など Liquid biopsy として新たなソースとなり得る可能性が示唆された。

一方、現行の CTC 自動検出プラットフォームの弱点としては、フィルター上にトラップされた CTC をフィルターからスライドガラスに移動する効率が現状 50-70%程度と比較的低いことと、スライドガラス上での CTC の分布が不均一となり、細胞の変形を引き起こす可能性がある。これらは主に CTC 転写時の遠心分離による影響が大きいと考えられ、加圧法、空気圧法などを用いた新たなより細胞に優しい CTC 転写方法の開発・研究が今後必要である。

【結語】

3D 金属フィルターおよび低圧制御システムを用いた CTC 自動検出プラットフォームを新たに開発し、細胞診に基づいた CTC の診断基準を確立した。大腸癌患者検体を用いた臨床研究から、DVB から回収した CTC は Liquid biopsy として新しい有用な診断ツールとなり得る可能性が示唆された。