

表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた 高感度PSA検査POCTシステムの開発

High-sensitive Total PSA Test Using Surface Plasmon Field-enhanced Fluorescence Spectroscopy (SPFS) for
Point-of-Care Testing (POCT)

村山 貴紀*
Takanori MURAYAMA

岡田 純*
Jun OKADA

彼谷 高敏*
Takatoshi KAYA

佐藤 威文**
Takefumi SATOH

要旨

現在、前立腺癌の確定診断の際に実施されている前立腺針生検は、前立腺特異抗原 (PSA: Prostate specific antigen) 検査を中心に実施判断がなされている。PSAは臓器特異性が非常に高いことから、健診等における前立腺癌の早期発見、疾患進行予測にも有効性が確認されており、現在最も利用されている腫瘍マーカーの一つである。また、ホルモン療法、放射線療法、外科的摘出など多様な治療が確立されていることも前立腺癌診療の特徴の一つであり、PSA検査はこれら多様な治療効果モニタリングや再発判断の指標としても広く活用されている。

現在製品化されているPSA検査は、様々な形態の免疫反応場を採用することでシステムの小型化や試薬使用量の低減化、検査時間の短時間化を実現している。しかし、デファクトスタンダードとされている大型免疫測定システム (タンデム) と同等性能を実現した小型システムは皆無であり、今後国内外で需要が見込まれる診療所やクリニックでの“その場PSA検査”の高度化は、QOL向上や個別化医療実現において非常に重要である。

そこで我々は、表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS: Surface Plasmon Field-enhanced Fluorescence Spectroscopy) を検出原理とする小型SPFS血液検査システム (開発中) の泌尿器科領域への展開を具体化するため、既存製品との性能比較検証とともに、クリニック等で想定される“お困りごと”に対する提供価値やカスタマー・エクスペリエンスの視点で仮説検証を実施した。

本システムの迅速検査条件 TAT 10 min (TAT: Turn Around Time) での基本性能は、検出感度が 0.0023 ng/mL、実行感度が 0.0054 ng/mL (変動係数 20%)、定量範囲 7 桁の非常に幅広いダイナミックレンジ性能であり、TAT 29 min である既存大型免疫測定システムと同等以上の分析性能を実現した。前立腺癌血清検体 54 例の相関性試験においては極めて良好な相関性を確認した (R=0.99)。

本システムにより、短時間で信頼性の高いPSA検査が可能となり、クリニック等における適切かつ迅速な治療機会の創出は、QOL向上や新たな個別化医療社会に貢献できるものと期待している。

Abstract

Cases of prostate cancer in Japan have increased rapidly since around 2000. Currently in the diagnosis of prostate cancer, needle biopsies are indicated chiefly by the results of various examinations that determine prostate specific antigen (PSA) values. Since PSA is highly organ specific, it is also effective in predicting the early progression of the disease, making it one of the most widely used tumor markers. A PSA test is widely used as an indicator in prognostic monitoring and recurrence judgment after various treatments. Currently, PSA measurement must be performed with large apparatus, for no compact system has existed that realizes the performance of a large system. Such a compact system would render PSA tests more accessible at clinics and hospitals both in Japan and abroad.

We have created a compact system using surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy (SPFS), which measures PSA with high sensitivity by optimizing the reaction protocol for PSA measurement. The system's analytical sensitivity is equivalent to the high sensitivity of existing systems, and measurements made with our SPFS system are in strong agreement with conventional system measurements. In addition, our system provides a wider dynamic range than conventional systems.

Using this new system, clinics whose size and economics previously rendered them unable can now conduct PSA examinations and provide greater individualized medical attention to an increasingly aging society.

*開発統括本部 バイオ要素技術開発室

**佐藤威文前立腺クリニック

1 はじめに

前立腺は男性特有の栗の実大の臓器であり、膀胱下部出口付近の尿道を包み込む様に存在する。前立腺癌は、この前立腺に発生する悪性腫瘍である。PSA検査が臨床導入された1986年来、前立腺癌診断効率は飛躍的に向上し、欧米のみならず本邦においても、その罹患率が急激に増加している。1994年の本邦における罹患者数は10,940人であったが、2015年には8万人を超え、成人男性における悪性腫瘍罹患率で初めて第1位となった¹⁾。これはPSA検査の普及により、前立腺癌が限局性の早期段階で発見可能となったことが主要因の一つであると考えられている。

PSAは、前立腺腺管から分泌されるタンパク質分解酵素の一つであり、射精後の精液の液状化に関係している。正常組織においては血液中への漏出はほぼ皆無であるが、組織極性が崩れるなどの異常（癌化や組織肥大・炎症など）が発生した場合に血液中に漏出すると考えられている。臓器特異性が極めて高いタンパク質であり、前立腺癌を対象とした腫瘍マーカーとして現在までに広く用いられるようになった。最新の前立腺診療ガイドライン²⁾において、PSA検査のカットオフ値は4ng/mLに設定されており、カットオフ値より高値の場合は前立腺癌の存在を疑われ、100ng/mL以上の場合は前立腺癌の骨転移も疑われる指標となっている。PSA再検査においてもカットオフ値を超えた場合には、より精密な検査の必要性から、前立腺針生検が施行され、病理学的検査の結果から治療方針が選択されている。前立腺癌の治療方法としては、監視療法、手術療法、放射線療法、薬物療法（ホルモン療法、化学療法）等、非常に多岐にわたって確立されている。PSA検査はこれらの治療効果モニタリングにも有用とされており、根治的前立腺全摘除術後再発の早期発見のための定期モニタリング、薬物療法効果モニタリングなど治療後のフォローアップにも広く利用されている²⁾。前立腺全摘除術後の再発の早期発見のためにPSA検査による定期モニタリングも推奨されており、生化学的再発に関するPSAカットオフ値は0.2ng/mLとされている。また、前立腺全摘除術後の内分泌治療患者には、術後PSA値が0.01ng/mL付近の極低値から徐々に上昇を示す症例も数多く報告されており³⁾、再発の早期予測において高感度PSA検査が実臨床で非常に重要な位置を占めている。

現在、PSA検査は酵素標識化学発光法（CLEIA法）を検出原理とする高感度大型免疫測定システムが標準的に実用されている⁴⁾⁵⁾。これらの既存大型システムは非常に優れた性能であるものの、いくつかの点で課題を有している。一つは、癌転移が疑われるPSA値100ng/mL以上の症例に対しては測定範囲外となることから検体希釈再検査が必要となり、結果報告の遅延や検査コストの増加に繋がっている。また、大病院と比して設置環境に制約のあるクリニックや診療所などには大型の免疫測定シス

テムの設置導入が困難であることから、通常外部臨床検査施設へPSA検査を外注しており、検査結果を得るまでに数日あるいはそれ以上を要すること等である（Fig. 1）。

我々はこれまでに、SPFSを検出原理としたサンドイッチ免疫測定系の研究開発を進め、肝臓細胞癌マーカーの α -フェトプロテインや急性心筋梗塞マーカーである心筋トロポニンI等の検査項目において高感度小型迅速測定システムを報告している⁶⁾⁷⁾。本検討においては、前述のいくつかの課題が浮き彫りとなっているtotal PSAに着目し、泌尿器分野における迅速小型検査システムを開発した。また、泌尿器クリニック等で想定される“お困りごと”に対する本システムの提供価値や本システム導入によるカスタマー・エクスペリエンスの視点で要求される機能（装置サイズ・分析性能・再測定リスク・ユーザビリティ）の検証結果を中心に報告する。

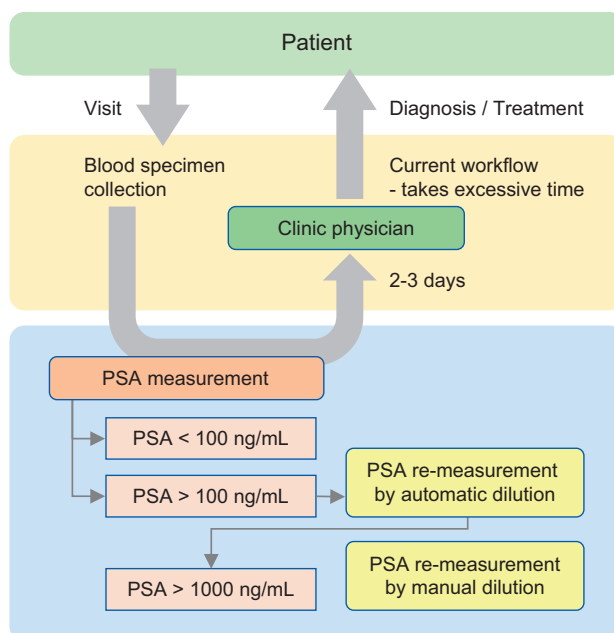


Fig. 1 PSA testing workflow in diagnosing prostate cancer.

2 高感度迅速PSA検査システムの概要

高感度迅速PSA検査システムは、デスクトップサイズの測定装置と使い捨てタイプの試薬カートリッジ、検体コンタミネーションを抑制するための樹脂製専用ディスプレイホルダーチップから構成されている（Fig. 2）。1測定サンプルに対して1カートリッジを使用し、最大で3つのカートリッジを同時ランダムに測定することが可能で、診療ワークフロー阻害を最小化した構成となっている。

高感度PSA_SPFS測定システムの基本仕様をTable 1に示す。測定用試薬カートリッジには、抗PSA抗体が予め固相化されたSPFS光学プリズムチップが装填され、その他に測定に必要な試薬（検体希釈液、蛍光色素標識抗体液、洗浄液等）も予め必要量充填されている。使用者は、画面操作に従って測定用試薬カートリッジを装

置に架設し、測定対象検体等を規定量以上分注することで測定を開始することができる。装置内では、検体希釈や免疫反応操作、SPFS光学測定までの一連の操作がすべて自動化されており、使用者負担の軽減に配慮した。検査結果は、測定開始から10分後に得られることから、従来の外注検査に要する時間を大幅に圧縮できる。

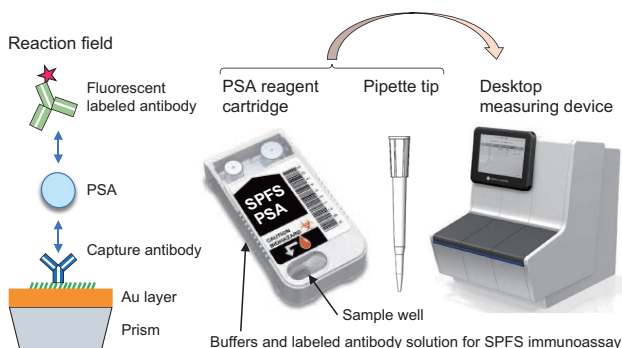


Fig. 2 Compact high-sensitivity PSA measurement system consisting of disposable reagent cartridges, disposable contamination-free resin pipette tips, and a desktop measuring device.

The PSA reagent cartridge is mounted with an SPFS optical prism chip on which an anti-PSA antibody is solidified, and is filled with other reagents necessary for measurement (i.e. sample dilution liquid, fluorescent labeled antibody liquid, and cleaning liquid). The operator attaches the measurement reagent cartridge to the desktop measuring device and dispenses the sample into the cartridge to start measurement.

Table 1 PSA SPFS system specifications.

sample type	serum
sample volume	200 μ L
Turnaround time (TAT)	10 minutes
Number of measurement slots	3
Temperature	15 – 30 $^{\circ}$ C

本システムにおいて使用する試薬液量150 μ Lでの試薬ハンドリング性能について、重量法による評価結果をTable 2に示す。本システムの特長の1つである高い測定再現性は、検体希釈操作時やチップ内試薬回収操作時における試薬ハンドリングを高精度に自動制御する技術により達成されており、測定間における変動因子の最小化を実現している。この様に、本システムはクリニックなどの設置環境の制約や運用上のリスク、ユーザー負担軽減に配慮した仕様となっており、革新的なカスタマー・エクスペリエンスの提供が期待できる。

Table 2 Reagent handling performance of PSA SPFS system.

The PSA SPFS system achieves highly precise measurement reproducibility with highly precise, automated reagent handling for the dilution of samples.

Dilution rate	6 dilution \pm 0.22 dilution
Dispensing accuracy	150 μ L \pm 6 μ L
Dispensing repeatability (CV)	1.2 %
Residual liquid volume	< 7 μ L

3 高感度PSA測定システムの基本性能評価

3.1 測定感度と同時再現性

高感度PSA_SPFS測定システムの基本性能として、ブランク上限値 (Limit of Blank; LoB), 検出下限値 (Limit of Detection; LoD), 定量下限値 (Limit of Quantification; LoQ) を評価した。LoBとLoDは、ゼロ濃度の社内キャリブレーション溶液と低濃度血清サンプルを対象に10重測定し、CLSIガイドラインEP17-A2に準じて95パーセントに相当する濃度をLoB, 95%の信頼度で測定できる最小濃度をLoDとして算出したところ、それぞれ0.0023 ng/mL, 0.0054 ng/mLと見積もられた。LoQは、血清サンプル9例を各3重測定し、プレジジョンプロファイル法により変動係数が20%となるtotal PSA濃度を算出したところ、0.0055 ng/mLと見積もられ、化学発光酵素免疫測定法 (CLEIA法) を原理とした大型免疫測定システム (TAT40 min) と比べて、本システムの分析性能はTAT10 minの迅速検査条件下で同等レベルであることが確認された。また、3濃度 (Low: 0.1 ng/mL, Mid: 1.0 ng/mL, High: 70 ng/mL) の社内標準物質を同日に各々15重測定した同時再現性評価においては、各濃度の定量再現性 (CV) は5.1%, 4.6%, 5.2%であり (Table 3), 小型システムでありながら高い再現性能を有していることも確認した。

Table 3 Analytical sensitivities and within-run imprecisions.

The PSA SPFS system exhibits LoB (limit of blank), LoD (limit of detection), and LoQ (limit of quantification) equivalent to those of the PSA CLEIA method, as well as low within-run imprecision CV (coefficient of value) and wide measurement dynamic range.

	Our PSA SPFS system	PSA CLEIA method
LoB	0.0023 ng/mL	0.0016 ng/mL
LoD	0.0054 ng/mL	0.0030 ng/mL
LoQ (20%CV)	0.0055 ng/mL	0.0043 ng/mL
Within-run imprecision	0.1 ng/mL 5.1% CV	N.D.
	1.0 ng/mL 4.6% CV	N.D.
	70 ng/mL 5.2% CV	N.D.
Measurement range	0.008–5,000 ng/mL	0.008–100 ng/mL

3.2 定量ダイナミックレンジ

ゼロ濃度の社内キャリブレーションをベース液に精製PSA抗原を設定濃度となるように添加調整した10サンプル (0 ng/mL–5000 ng/mL) を各々3重測定し、定量ダイナミックレンジを確認した (Fig. 3)。5000 ng/mLまで同一希釈条件下で良好な直線性を示し、同一サンプルを対象としたCLIA法を原理とする大型免疫測定システム (X社システム) に対して、1.5桁程度広い定量ダイナミックレンジ性能を有することが確認された。尚、既存システムにおいては測定レンジから外れた際に自動希釈による再測定機能が搭載されており、1000 ng/mLを定量上限としているが、本評価においてはあくまでも同一希釈条件のもとで比較を行った。小型高感度迅速SPFS測定シ

システムは、反応阻害を回避した形でCapture抗体を高密度に3次的に固相化していることで既存システムより優れた定量ダイナミックレンジ性能を達成しており、迅速性担保や検査コスト削減の課題となっている再測定リスクが最小化されていると考えられる。

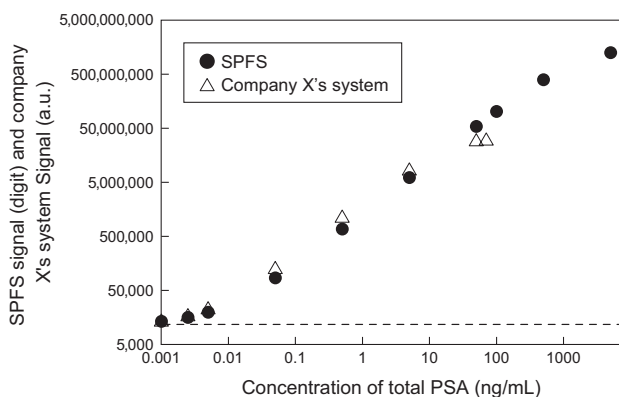


Fig. 3 Calibration curves of total PSA in a standard antigens sample from the SPFS system (●) and company X's CLEIA system (△). The SPFS system has a wider measurement range.

3.3 既存大型免疫システムとの相関

PSA血清検体54例(0.004ng/mL–3630ng/mL)を対象に、小型高感度迅速SPFS測定システムとCLEIA大型免疫測定システム(X社)の相関性を評価した。尚、今回評価した54例の内6例は100ng/mL以上の検体であり、X社システムでは希釈再測定を行っており、1000ng/mLを超える検体1例については手希釈による再測定を実施している。

X社システムの定量測定範囲であるtotal PSA<100ng/mLの48例における最小二乗法による1次近似の傾きは1.02、相関係数Rは0.99と非常に良好であり(Fig. 4)、total PSA>100ng/mLを加えた54例においても、1次近似の傾きは0.92、相関係数Rは1.00と非常に良好な結果となった(Fig. 5)。これらの結果から、検体中のtotal PSAを大型免疫測定システムと同等以上の感度で検出できるだけでなく、大型免疫測定システム同様の信頼性の高い定量性を持つことが確認された。

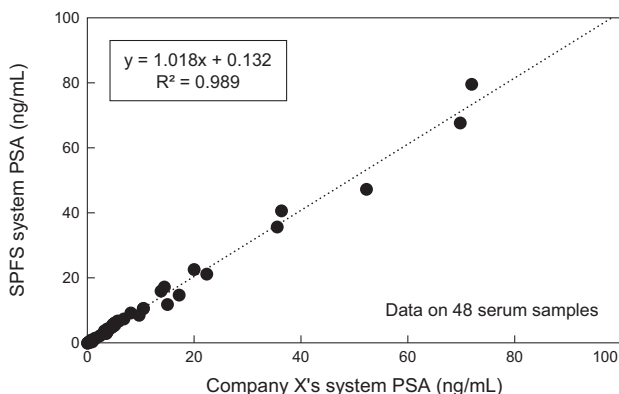


Fig. 4 Correlative evaluation of SPFS system and company X's system. Measurements were conducted on 48 serum samples whose concentrations were lower than 100 ng/mL total PSA.

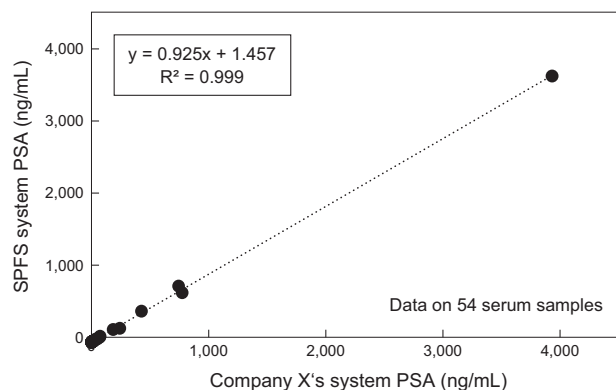


Fig. 5 Correlative evaluation of SPFS system and company X's system. Measurements were conducted on 54 serum samples, including 6 cases whose total PSA concentration was over 100 ng/mL.

4 高感度迅速SPFS測定システムの提供価値検証

高感度迅速SPFS測定システム導入による泌尿器クリニック等で想定される“お困りごと”に対する提供価値について他社製品や想定顧客ヒアリング調査を実施した。

Table 4に他社PSA検査システムのサイズや測定レンジ等をまとめた。設置面積等で大型免疫測定システムの導入が困難なクリニックにおいて、大型病院と同様のPSA検査を迅速に実施可能な本システムは、従来製品とは一線を画したシステム仕様であることが理解できる。

また、ヒアリング調査などからPSA検査における高値検体による再検査率は、施設間差はあるものの年間およそ2%程度であることが集計された。再測定費用が測定実施者負担であることを考慮すると、幅広いダイナミックレンジ性能により“再検査発生を限りなくゼロ”にすることが可能な高感度迅速SPFS測定システムの提供価値は、導入医療施設に対しては再測定費用リスクの最小化と迅速PSA検査(測定時間10min)の提供による施設サービス向上の両立であると考えている。その本質は、QOL向上と個別化医療の提供であり、迅速な結果報告によるタイムリーな診断・治療方針決定が革新的カスタマー・エクスペリエンスに繋がるものと期待している。

Table 4 Contents of six automated immunoassay systems that perform total PSA tests.

Instrument	Company	Size (mm) (W)×(D)×(H)	Measurement range (ng/mL)	TAT
-	Konicaminolta	450×490×490	0.003-5000	10 min
ARCHITECT	Abbott	1549×1245×1219	0.008-100	29 min
UniCel	Beckman	1710×970×1700	0.008-150	20 min
cobas	Roche	1200×730×800	0.002-100	>18 min
AIA	Tosoh	1960×840×1360	0.003-100	18 min
POCube®	Toyobo	280×310×275	0.1-80	6 min

5 まとめ

小型高感度迅速SPFS測定システムの展開として泌尿器分野に着目し、前立腺癌の診断方法の1つとして汎用されているPSA検査への応用について検討を行った。その結果、本システムは小型かつTAT10minの迅速測定でありながらTAT29minである大型免疫測定システムと同等以上の性能を有し、相関性も良好であった。これは前立腺診療ガイドラインに則った前立腺検診でのPSA検査(カットオフ値4ng/mL)や再発早期発見のためのPSA定期モニタリング(カットオフ値0.2ng/mL)シーンにおいても本システムが信頼性の高い測定により適応可能であることを示唆している。

さらに、既存大型免疫測定システムでは再測定が必要となるPSA高値検体に対しても、本システムでは再測定無しに正確に測定可能であることを示した。

現在のPSA検査で課題と考えられる再検査リスクやクリニック等における検査の高度化に対して、我々の開発した高感度迅速SPFS測定システムは再検査リスクを限りなくゼロにすることが可能であり、検査コスト削減や大型免疫測定システムの導入が難しいクリニックや診療所においても高精度・高感度なPSA検査が実施可能となることが期待できる (Fig. 6)。

また現在、PSA分子上の癌特異的な糖鎖構造変化を定量するPSA糖鎖バイオマーカー (PSA-Gi)⁸⁾ についても、本システムへの搭載を検討しており、クリニックや診療所における前立腺癌個別化診療やQOL向上にさらに貢献したいと考えている。

●参考文献

- 1) 国立がん研究センター がん統計
- 2) 前立腺癌診療ガイドライン 2016年版
- 3) Thomas, A. S., et al, J Urol, 152, 1515-1519 (1994)
- 4) 前立腺特異抗原キット アーキテクト®・PSA (体外診断用医薬品 添付文書)
- 5) 前立腺特異抗原キット アクセスハイブリテックPSA (体外診断用医薬品 添付文書)
- 6) 彼谷高敏, 松尾正貴, 石田賢治, 須田美彦, “表面プラズモン共鳴励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた高感度免疫測定システムの開発”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol.9, 95-98 (2012)
- 7) 寺田孝太郎, 大谷真紀子, 村山貴紀, 井出陽一, “表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いたバイオマーカー測定技術の救急医療への応用”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol.15, 8-11 (2018)
- 8) 金子智典, 彼谷高敏, 小島駿, 中村幸登, 須田美彦, “表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) を用いた糖鎖マーカー定量による前立腺癌診断法の開発”, Konica Minolta Tech. Rep., Vol.13, 73-78 (2016)

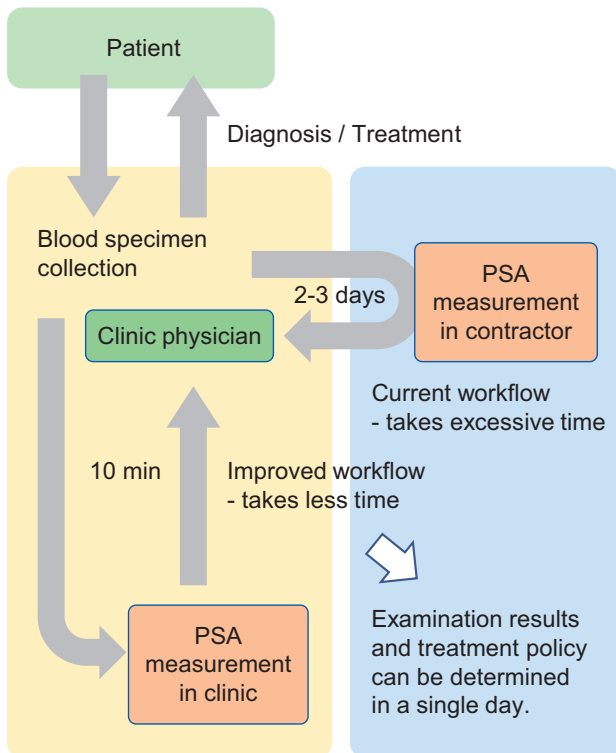


Fig. 6 Rapid workflow of a high-sensitivity PSA immunoassay system in diagnosing prostate cancer.