

犬のがんが、みつかる

1

台頭する『がん』の新興検査法

岡山理科大学獣医学部獣医学科
田川道人

はじめに

人同様、ペットも高齢化がすすんでおり多くの動物はがんに罹患する。実際に国内の過去20年の病理解剖記録では犬猫ともに40%前後のがんで死亡している^[1]。医学では様々な“がんマーカー”が開発され、がんの診断や治療モニタリングに利用されているものの、獣医療においてはCRPやSAAといった炎症マーカーやLDHやALPといった逸脱酵素など古典的な血液検査項目が利用されるばかりであり、“がん”を特異的に検出可能なマーカーの臨床実装は自覚症状を口にしない動物を対象とする獣医療にとっては喫緊の課題である。

近年、医学では血液や尿などの体液を利用した腫瘍診断技術の開発が盛んに行われており、“リキッドバイオプシー”とよばれる新たな生検方法が注目されている。体液サンプルを用いることからきわめて非侵襲的であり、くり返し検査できる点や全身の病変を反映した解析を行うことが可能であるなど、侵襲性の強い従来の組織生検とは一線を画した検査手法である。現在のリキッドバイオプシーの主要な評価対象はエクソソームやセルフリーDNA (cell Free DNA : cfDNA)、循環腫瘍遺伝子 (circulating tumor DNA : ctDNA) などであり(図1)、とくにctDNAはリキッドバイオプシー技術のなかで唯一保険償還され、腫瘍の体細胞変異を網羅的に血中から検出可能であり現在のがんゲノム医療推進の一翼を担っている。

腫瘍マーカー開発において医学と獣医学では大きな隔たりが発生しているが、2023年以降、いくつかの高精度な腫瘍マーカーが利用可能となった。完全自由診療の獣医療においてはそれら検査の有用性は企業側が提供する情報だけを根拠に判断しなければならず、どのような症例でどの検査を選択し、得られた結果をど

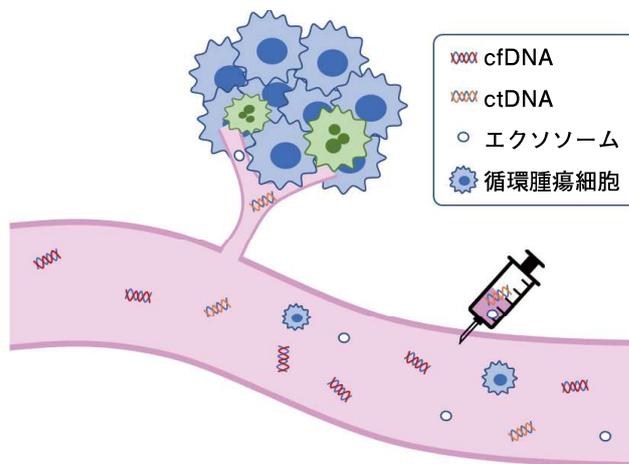


図1 リキッドバイオプシーの概念

血中には正常細胞を由来とするセルフリー DNAが多く循環しており、腫瘍細胞の崩壊に伴い循環腫瘍遺伝子(ctDNA)や腫瘍に由来するエクソソームが放出される。それらを血液検査等で検出し、腫瘍診断に応用する技術をリキッドバイオプシーとよぶ

のように解釈するかは我々獣医師にゆだねられている。今回、2024年獣医臨床病理学会のシンポジウム、「台頭する『がん』の新興検査法」において富士フィルム VETシステムズ、HIROTSU バイオサイエンス、メディカル・アークの三社にご協力いただき、各社が提供する新興がん検査についてご講演いただいた。本稿ではそれら三社の新興がん検査を取り上げたい。

Nu.Q[®] Vet Cancer Test

〔富士フィルムVETシステムズ(株)、東京〕

Nu.Q[®] Vet Cancer TestはアメリカのVolition社と富士フィルムVETシステムズ社が共同で提供するがんのスクリーニングを目的とした検査である。真核生物のDNAはヒストン蛋白質に巻き付いたヌクレオソ-

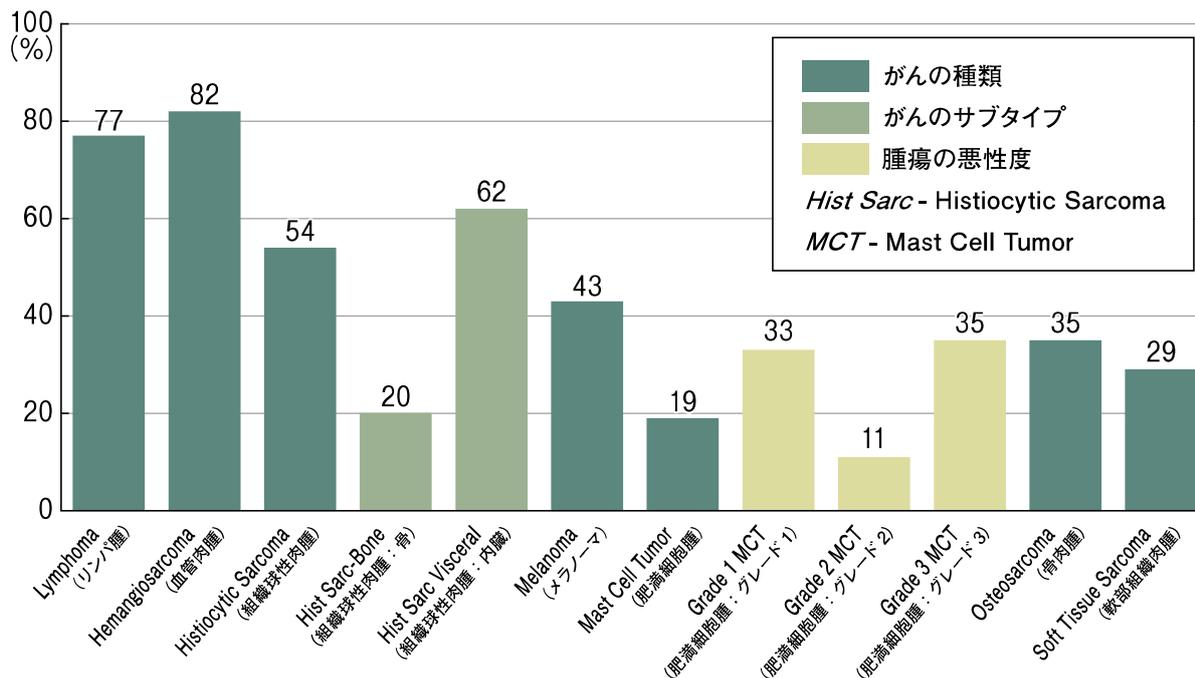


図2 Nu.Q® Vet Cancer Testの腫瘍種別検出感度 (資料提供：富士フイルムVETシステムズ(株))

ム構造を形成し、複数のヌクレオソームが数珠状に連なりクロマチンとよばれる高次構造をとり核内に収納されている。細胞が崩壊した際にそれら構造体が血中に放出され、ヌクレオソームはセルフリーDNAとともに循環している。ヌクレオソームを含むセルフリーDNAはアポトーシスや壊死による細胞死に伴って循環血液中に放出されることから、炎症性疾患や感染症、腫瘍など様々な疾患で上昇することが知られている。医学では急性肺損傷患者や心臓外科手術後に上昇することが報告されているほか^[2, 3]、乳癌、非小細胞性肺癌など様々な腫瘍で進行度や組織グレード、予後、治療反応との相関が示されている^[4, 5]。

獣医学においても血中ヌクレオソーム濃度と疾患の関連が複数報告されており、外傷や敗血症、免疫介在性疾患や炎症性疾患で上昇することがわかっている^[6-8]。犬のがんと血中ヌクレオソーム濃度の関係はこれまで不明であったが、本講演の演者であるDr. Wilson-Roblesらが複数の検討を行っている。2022年にBMC Veterinary Researchに掲載された報告では、528頭の悪性腫瘍罹患犬および134頭の健常犬を対象とし、血中のヌクレオソーム濃度をELISA法で測定している。その結果、Nu.Q® Vet Cancer Testは感度49.8%、特異

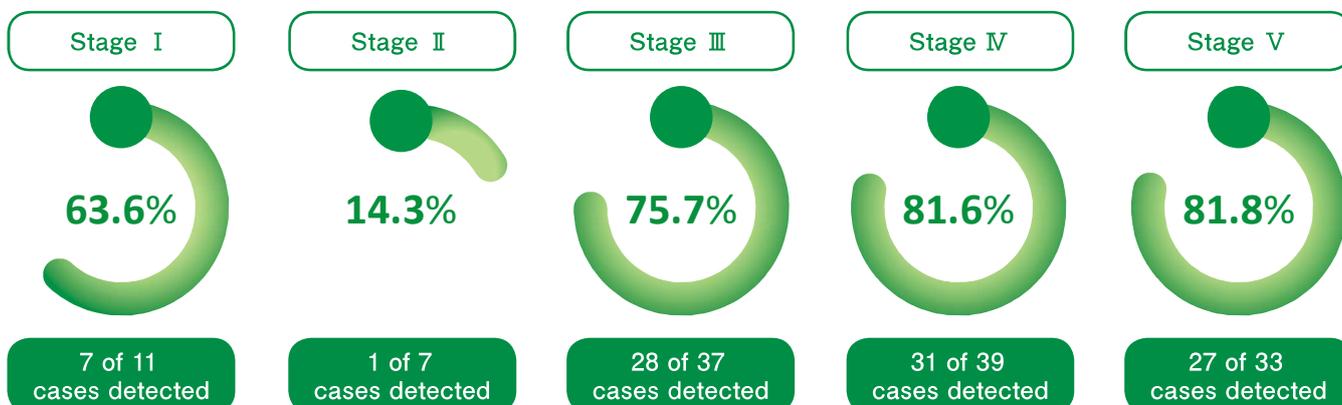
度97%で悪性腫瘍を検出可能であり、リンパ腫、血管肉腫、組織球性肉腫などの腫瘍ではより高感度に検出が可能であったことが示された(図2)^[9]。同報告によると、肥満細胞腫ではGradeの上昇とヌクレオソーム濃度に関連がみられるなど、臨床挙動との一定の関連がみられるようである。また早期診断という点に関して、リンパ腫の検出感度はstage Iで63.6%、stage IIIでは75.7%、血管肉腫においてもstage Iで66.7%と早期ステージにおいても良好な検出感度を維持している(図3)。検査結果はヌクレオソーム濃度に応じ、ローリスク、ハイリスク、その中間のグレーゾーンに大別され、リスク分類に応じた対応を検討していく必要があるとともに、数値の上昇は細胞の活発な増殖と破壊に関連するため、その増減を評価することで腫瘍のモニタリングにも応用可能かもしれない。いっぽう、ヌクレオソームの上昇は細胞崩壊と強く関連するという事は裏を返せば細胞増殖が緩やかな腫瘍では軽微な上昇に留まる可能性がある。実際に軟部組織肉腫の検出感度は29.4%に留まることが示されており^[9]、限局し増大の緩やかな固形腫瘍では結果の解釈に注意が必要である。

Lymphoma: Disease Type/Stage リンパ腫 : タイプ/ステージ



At 97% specificity, the Nu.Q® Vet Cancer Test was able to detect 77% of LSA

特異度97%で、本検査はLSAの77%を検出することができた



Hemangiosarcoma: Disease Type/Stage 血管肉腫 : タイプ/ステージ

At 97% specificity, the Nu.Q® Vet Cancer Test was able to detect 82% of HSA

特異度97%で、本検査は82%のHSAを検出することができた

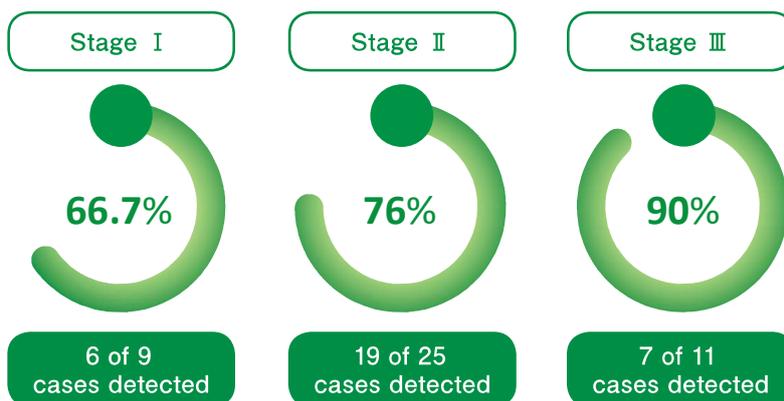


図3 リンパ腫と血管肉腫のstage別検出感度 (資料提供：富士フイルムVETシステムズ(株))

リンパ腫stage IIの検出感度が低いことについては症例数の少なさが影響しているのではとのことであった

N-NOSEあにまる

[(株)HIROTSUバイオサイエンス、東京]

線虫 (*Caenorhabditis elegans*) を利用したがんのスクリーニング検査であり、がん患者の尿中に含まれる特有の“匂い”に対して線虫が誘引行動を示す現象を利用したものである。がんに関連した代謝変化により体外に排泄される揮発性有機化合物に変化が生じることが知られており、がんのバイオマーカーとしての利用が期待されている^[10]。線虫には1,200遺伝子程度の嗅覚受容体様遺伝子があり、人の約3倍、犬の約1.5倍存在

することから嗅覚が非常に発達していると考えられており、本検査法の開発者であるHirotzuらは2015年に世界ではじめて*C. elegans*ががん患者の尿に誘引行動を示し、健常者の尿に対しては忌避行動をとることを報告した^[11]。測定原理としては、直径9cmのゲルプレート上の一方に麻酔作用のあるアジ化Naと尿、もう一方にアジ化Naのみを置き、中心に置いた線虫がどちらに移動したかを一定時間経過後に判定する。この検査は人のがんスクリーニング検査キット(N-NOSE)としてすでに上市されており、現在では、体内の23種のがん[口腔(舌・歯肉を含む)、咽頭、喉頭(声門を含む)、

➤ 6歳以上は定期的な「がん(腫瘍)スクリーニング検査」の受検を推奨

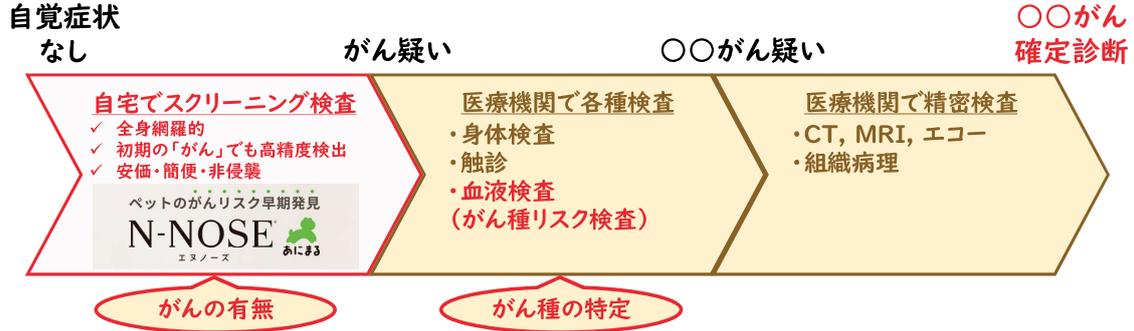


図4 N-NOSEあにまるの使用例(犬と猫)

スクリーニング検査として使用し、がんの疑いが高い場合はより詳細な精密検査の受診をすすめる (資料提供：(株)HIROTSUバイオサイエンス)

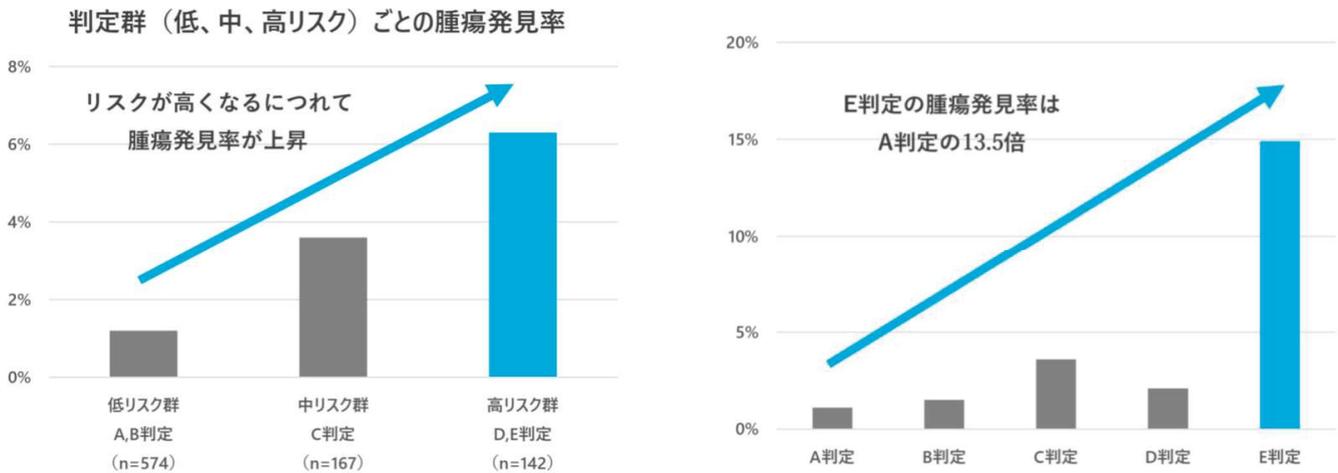


図5 N-NOSEあにまる(犬用)の腫瘍発見率

E判定では他の判定と比べ腫瘍発見率が高い (資料提供：(株)HIROTSUバイオサイエンス)

甲状腺、食道、肺、乳、胃、消化管間質腫瘍(GIST)、肝臓、胆嚢、胆管、膵臓、腎臓、大腸、子宮頸部、子宮体部、卵巣、精巣、前立腺、膀胱、皮膚、血液(悪性リンパ腫、多発性骨髄腫、白血病を含む)を検出可能としている。N-NOSEの特徴の一つが早期ステージであっても高い感度を有している点であり^[12]、スクリーニング検査としての必要条件を満たすとともに他のがん検査とは一線を画した検査である(図4)。

Sugimotoらは動物のがん患者を対象にした同様の試験を実施し、その結果を2022年に報告している。腫瘍罹患犬18頭、健常犬19頭、腫瘍罹患猫13頭、健常猫10頭と小規模なstudyではあるが、最大AUCが犬で

0.8114、猫で0.9000ときわめて高い精度でがんと非がんを見分けることが可能であった^[13]。なおN-NOSEあにまるを提供しているHIROTSUバイオサイエンス社によると、検査結果は腫瘍リスクの低いA判定からリスクの高いE判定まで評価可能であり、犬用の検査キット(N-NOSEわんちゃん)におけるE判定での腫瘍発見率はA判定の13.5倍であったことが公開されている(図5)。線虫を用いたがんの検出は他のグループでも追加検証が行われており、リンパ腫、肥満細胞腫、悪性黒色腫、血管肉腫など犬の高悪性度腫瘍に対し感度85%、特異度90%、精度87%で診断可能であったことが報告されている^[14]。

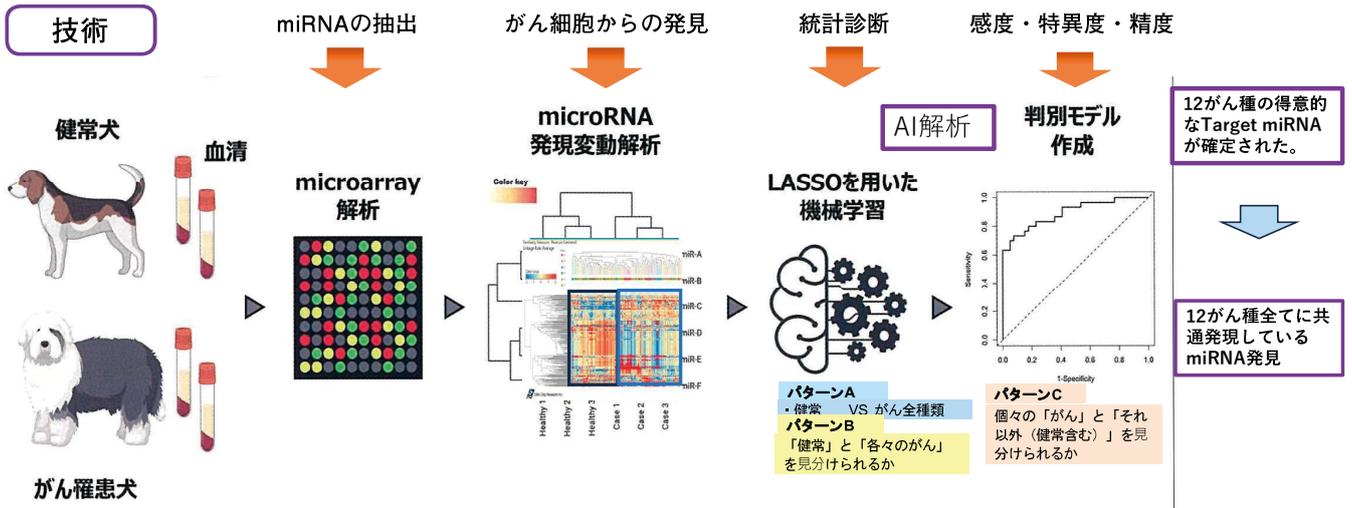


図6 Ark-Testの解析スキーム

血清中のmicroRNAをマイクロアレイを用いて解析し、がん罹患犬に特異的な発現を検出することで判別モデルを作成している (資料提供：(株)メディカル・アーク)

検査の意義

検査の意義

感度

- ①がんの判定ができる
- ②12がん種の判定ができる
- ③残存病変のモニタリング
 - 寛解や進行の評価
 - 治療効果の評価
 - 手術後の評価
 - 抗がん剤治療の評価
 - 放射線治療の評価
 - 再発の評価
- ③ステージの補助判定ができる
- ④治療の選択が可能となる

miRNA-における臨床への応用, DNA変異検査との比較

EXOSOME(miRNA)

Ark-Test

判定日数4日

90%以上

Human とAnimalにおける各種がんに対する共通miRNAは同じである。

- Brain (ref. 29)
miR-4763-3p, miR-1915-3p, and miR-3679-5p
- Esophagus (ref. 19)
miR-8073, miR-6820-5p, miR-6794-5p, miR-3196, miR-744-5p, miR-6799-5p
- Breast (ref. 23)
miR-1246, miR-1307-3p, miR-4634, miR-6861-5p, miR-6875-5p
- Lung (ref. 24)
miR-1265b, miR-6075
- Liver (ref. 25)
miR-320b, miR-663a, miR-4448, miR-4651, miR-4749-5p, miR-6724-5p, miR-6877-5p, and miR-6885-5p
- Pancreas and bile duct (ref. 17)
miR-6075, miR-4294, miR-6880-5p, miR-4790-5p, miR-125a-3p, miR-4530, miR-6836-3p, miR-4476
- Colonorectum (ref. 16)
miR-78, miR-1228, miR-1246, miR-150, miR-21, miR-223, miR-23a
- Ovary (ref. 26)
miR-320a, miR-665, miR-3184-5p, miR-6717-5p, miR-4459, miR-6076, miR-3195, miR-1275, miR-3185, miR-4640-5p
- Uterine sarcoma (ref. 21)
miR-1246 and miR-191-5p
- Bladder (ref. 28)
miR-6087, miR-6724-5p, miR-3960, miR-1343-5p, miR-1185-1-3p, miR-6831-5p and miR-4695-5p
- Prostate (ref. 27)
miR-17-3p, miR-1185-2-3p
- Bone & soft tissue (Sarcoma) (ref. 30)
miR-4736, miR-6836-3p, miR-4281, miR-762, miR-658, miR-4649-5p, miR-4665-3p

図7 Ark-Testの検査適応

がんの判定のみならず、がん種の特定と残存病変のモニタリングも可能としている (資料提供：(株)メディカル・アーク)

Ark-Test

[(株)メディカル・アーク]

長さが20塩基程度の短い1本鎖RNAであるmicroRNAは蛋白質には翻訳されず、それ自身が重要な機能を有することが知られている。microRNAは標的となる塩基配列をもつmRNAに結合、その分解や翻訳を阻害する作用を示すことから、遺伝子機能を抑制して制御する働きがあるとされている。現在、人で

は2,500種類以上のmicroRNAが報告されており、様々な生命現象や疾患との関連が指摘されている^[15]。とくにがんではmicroRNAによる脱制御が発がんやがんの進展に寄与することが知られ、microRNAの発現の変化はがん早期診断におけるバイオマーカーとして注目されている。たとえば人の乳癌患者において特定のmicroRNAの発現変化は腫瘍サイズやstage、転移の有無、予後との関連が指摘されるなど^[16]、実際に様々な腫瘍種でその有用性が明らかとなっている。

獣医学においてもがんとmicroRNAの関係性は研究がすすんでおり、複数の腫瘍で人と類似したmicroRNAパターンが存在することが報告されている^[17]。土屋らは国内獣医大学および複数の動物病院の協力を得て、健常犬および5つのがん種(口腔内悪性メラノーマ、尿路上皮癌、悪性リンパ腫、肝細胞癌、肥満細胞腫)各40検体の患者血清を用い、microRNAを抽出後、マイクロアレイによりそれぞれのがん種に関するmicroRNAの特定と精度の高い判別が可能であったことを報告している^[18]。現在利用可能なArk-Testは健常犬37頭、腫瘍罹患犬398頭を用いた解析結果をもとにしており(図6)、がん罹患しているかどうかを感度91%、特異度92%ときわめて高い精度で判定可能である。12種のがん(肝臓癌、膀胱腫瘍、口腔内悪性メラノーマ、リンパ腫、肥満細胞腫、血管肉腫、骨肉腫、扁平上皮癌、肺腺癌、鼻腔腺癌、肛門嚢腺癌、乳癌)については80%の精度で特定が可能としており、microRNAの発現変化を利用することで治療の効果判定や再発マーカーとしての臨床応用も可能な腫瘍マーカーである(図7)。本稿執筆時点(2024年11月)で上記検査の詳細は特許申請後に論文化されるとのことである。

各検査の使いどころ

今回ご紹介した3つの検査はすべてのがんの早期診断を目的としているものの、検出している標的や方法がまったく異なり、我々臨床家はどの検査をどのタイミングでどういった症例に対し選択すればよいのかは非常に悩ましい。表1にそれぞれの検査の概要と筆者が考える適応について記載した。適応についてはあくまで筆者個人の見解であり、その枠に留まらず様々な状況で各検査を選択していただければと思う。

その際、各社が提供するデータ(感度、特異度など)を我々獣医師がしっかりと向きあい評価していくことが大切である。得られた結果をどのように解釈し、今後の検査や治療方針を伝えるかは我々獣医師に委ねられている。

おわりに

2023~2024年に相次いで上市された『がん』の新興検査法であるが、まだまだ課題も多いものの、これまでにない画期的な検査であることは間違いない。非侵

表1 各検査の概要および筆者が考える適応

検査方法	Target	検出方法	動物種	がん種の特定	診断精度	適応度
Nu.Q [®] Vet Cancer Test	ヌクレオソーム	ELISA	犬	—	感度 49.8%※1 特異度 97% AUC 0.687	スクリーニング 治療効果判定
N-NOSEあにまる	匂い物質	線虫による評価	犬、猫	—	AUC 0.811 (犬) AUC 0.900 (猫) ※2	スクリーニング
Ark-Test	microRNA	デジタルPCR	犬	12種※3	感度 91% 特異度 92% AUC 0.970	スクリーニング 疾患同定 治療効果判定

※1 がん種ごとの感度は図2参照

※2 感度、特異度は記載なし

※3 肝臓癌、膀胱腫瘍、口腔内悪性メラノーマ、リンパ腫、肥満細胞腫、血管肉腫、骨肉腫、扁平上皮癌、肺腺癌、鼻腔腺癌、肛門嚢腺癌、乳癌

襲的に全身のがんをスクリーニング可能ながんの検査法は飼い主、動物、そして我々獣医師にとってメリットも大きい。がんの早期診断と疾患モニタリングが獣医療にパラダイムシフトを生むかどうかは今後の課題であることを認識し、“動物独自の『がん検診』”として、決して一過性のブームで終わらせることのないよう、企業と我々獣医師、双方が協力しあい今後もさらに発展していくことを願っている。

参考文献

- [1] Nakayama H, Shiga T, Uchida K, Chambers JK, Morino T, Sasaki N. Chronological transition of necropsy cases of animals in Tokyo, Japan. *J Vet Med Sci* 2023;85(1):19-29.
- [2] Abrams ST, Zhang N, Manson J, Liu T, Dart C, Baluwa F, Wang SS, Brohi K, Kipar A, Yu W, Wang G, Toh CH. Circulating histones are mediators of trauma-associated lung injury. *Am J Respir Crit Care Med*. 2013;187(2):160-169.
- [3] Gao H, Zhang N, Lu F, Yu X, Zhu L, Mo X, Wang W. Circulating histones for predicting prognosis after cardiac surgery: a prospective study. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2016;23(5):681-687.
- [4] Mego M, Kalavska K, Karaba M, Minarik G, Benca J, Sedlackova T, Gronosova P, Cholujova D, Pindak D, Mardiak J, Celec P. Plasma Nucleosomes in Primary Breast Cancer. *Cancers (Basel)*. 2020;12(9):2587.
- [5] Kumar S, Guleria R, Singh V, Bharti AC, Mohan A, Das BC. Plasma nucleosome levels might predict response to therapy in patients with advanced non-small-cell lung cancer. *Clin Lung Cancer*. 2010;11(1):36-44.
- [6] Letendre JA, Goggs R. Determining prognosis in canine sepsis by bedside measurement of cell-free DNA and nucleosomes. *J Vet Emerg Crit Care (San Antonio)*. 2018;28(6):503-511.
- [7] Letendre JA, Goggs R. Concentrations of plasma nucleosomes but Not Cell-Free DNA Are prognostic in dogs following trauma. *Front Vet Sci*. 2018;5:180.
- [8] Monestier M, Novick KE, Karam ET, Chabanne L, Monier JC, Rigal D. Autoantibodies to histone, DNA and nucleosome antigens in canine systemic lupus erythematosus. *Clin Exp Immunol*. 1995;99(1):37-41.
- [9] Wilson-Robles HM, Bygott T, Kelly TK, Miller TM, Miller P, Matsushita M, Terrell J, Bougoussa M, Butera T. Evaluation of plasma nucleosome concentrations in dogs with a variety of common cancers and in healthy dogs. *BMC Vet Res*. 2022;18(1):329.
- [10] Saalberg Y, Wolff M. VOC breath biomarkers in lung cancer. *Clin Chim Acta*. 2016;459 :5-9
- [11] Hirotsu T, Sonoda H, Uozumi T, Shinden Y, Mimori K, Maehara Y, Ueda N, Hamakawa M. A highly accurate inclusive cancer screening test using *Caenorhabditis elegans* scent detection. *PLoS One*. 2015;10:e0118699
- [12] Hatakeyama H, Morishita M, Alshammari AH, Ungkulpasvich U, Yamaguchi J, Hirotsu T, di Luccio E. A non-invasive screening method using *Caenorhabditis elegans* for early detection of multiple cancer types: A prospective clinical study. *Biochem Biophys Rep*. 2024;39:101778.
- [13] Sugimoto T, Okuda Y, Shima A, Sugiura N, Kondo N, Ishihara G, Hirotsu T, di Luccio E. A new detection method for canine and feline cancer using the olfactory system of nematodes. *Biochem Biophys Rep*. 2022;32:101332.
- [14] Namgong C, Kim JH, Lee MH, Midkiff D. Non-invasive cancer detection in canine urine through *Caenorhabditis elegans* chemotaxis. *Front Vet Sci*. 2022;9:932474.
- [15] Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet*. 2011;12:861-874.
- [16] Zhang Z, Zhou Y, Liang S. Correlation Between miR-497-5p Expression With Clinicopathological Characteristics and Prognosis in Patients With Breast Cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2024;32(4):200-205.
- [17] Sahabi K, Selvarajah GT, Abdullah R, Cheah YK, Tan GC. Comparative aspects of microRNA expression in canine and human cancers. *J Vet Sci*. 2018;19(2):162-171.
- [18] 土屋玲子, 伊藤博, 落谷孝広. マイクロRNAを用いたイヌ悪性腫瘍における早期診断法の確立. *日本分子腫瘍マーカー研究会誌*. 2022;37:41-42.