

<全 204>高病原性インフルエンザの簡便で高感度な早期診断のための イムクロマト方式体外診断システムの開発

(委託先) コニカミノルタエムジー株式会社
(再委託先) アドテック株式会社、シンセラ・テクノロジーズ株式会社、
財団法人東京都医学総合研究所、コニカミノルタオプト株式会社、
コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社

プロジェクトリーダー コニカミノルタエムジー株式会社 経営管理本部 商品企画部
医薬事業グループ グループリーダー (課長) 田中 真理

サブ・プロジェクトリーダー 財団法人東京都医学総合研究所 分子医療PT
プロジェクトリーダー 芝崎 太

(連絡先: コニカミノルタエムジー株式会社 経営管理本部 商品企画部
医薬事業グループ グループリーダー (課長) 田中 真理
電話 042-589-8145 FAX 042-589-3875 e-mail: shinri.tanaka@konicaminolta.jp)

1. 研究開発の背景と目的

インフルエンザの診断にはイムクロマト方式の簡易診断キットが使われており、罹患の有無を目視で判定できるため、薬剤投与などの治療方針の決定を診察現場で判断できるPOCTとして非常に有効である。ただし、簡易迅速な診断テストである一方、検出感度が低いために正診率が高くないことも事実であり、実際に患者がインフルエンザに罹患し、発熱して受診しているのにも関わらず、簡易診断キットで陽性と判定できないためにタミフル等の抗インフルエンザ薬の処方を受けられないといった問題点があった。

また、高病原性(H5型)インフルエンザの防疫、治療体制において、高病原性(H5型)と季節性(H1型)インフルエンザとを鑑別診断し、かつ罹患初期の患者でも確実に陽性と診断することは極めて重要であるにもかかわらず、既存の簡易診断キットではこの鑑別診断ができなかった。

本研究では蛍光発光方式のイムクロマトストリップとイムクロマトリーダーを組み合わせることで開発し、高感度で簡便、正確に高病原性(H5型)と季節性(H1型)インフルエンザを検出し、早期鑑別診断を可能にする。

本研究の成果により、高病原性(H5型)インフルエンザの防疫においては早期に診断することが可能になり、検疫における発症初期の患者のすり抜け防止や早期の隔離、治療開始に大きく寄与することができる。また、インフルエンザ患者を早期に陽性と診断することで、抗インフルエンザ薬を早期に確実に処方することができ、患者の重症化を防ぐことが可能になる。

尚、現在季節性インフルエンザとしては、Aソ連型(H1N1亜型)・A香港型(H3N2亜型)・豚由来H1N1型・B型の4種類が知られているが、本報告書ではこれらを総称して季節性インフルエンザと呼ぶこととする。

2. 研究開発の体制

- 1) アドテック株式会社
蛍光発光方式イムクロマトストリップおよび関連製品の開発、製造条件の確立、製造
- 2) 財団法人東京都医学総合研究所
蛍光発光方式イムクロマトストリップ用高病原性(H5型)インフルエンザ抗体の作製、および標識剤の開発
- 3) シンセラ・テクノロジーズ株式会社

蛍光発光方式イムノクロマトストリップ用抗体標識技術 (IMPACTag) の開発

4) コニカミノルタオプト株式会社

蛍光発光方式クロマトリーダーの開発、生産および蛍光発光方式イムノクロマトストリップハウジングの開発、試作

5) コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社

蛍光発光方式イムノクロマト検出システム及び蛍光標識材料の開発

6) コニカミノルタエムジー株式会社

蛍光発光方式イムノクロマトストリップおよびクロマトリーダーの臨床試験、薬事承認取得、販売

3. 研究開発の実施内容

3-1 研究開発の全体像

財団法人東京都医学総合研究所が持つ H5 型インフルエンザ抗体のシーズを活かし、共同研究体各社の技術、即ちイムノクロマトストリップ開発・試作・製造技術、抗体標識技術、光学技術、機械技術、臨床開発力を融合することで高感度で簡便、正確に高病原性 (H5 型)、季節性 (H1 型) インフルエンザを診断することができる診断システムを開発する。

3-2 < 蛍光発光方式イムノクロマトストリップおよび関連製品の開発、製造条件の確立、製造 >

担当者：アドテック株式会社 研究開発部 小林 行治

蛍光発光方式イムノクロマトストリップの構成要素である反応膜、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、吸水パッド、バックリングシート、ハウジング、綿棒、検体処理液等の開発・最適化を行い、それらを組み合わせ高病原性 (H5 型)、季節性 (H1 型) インフルエンザの検出に適したクロマトストリップを 200 種以上試作した。 蛍光発光方式イムノクロマトストリップの製造準備を行った。

3-3 < 蛍光発光方式イムノクロマトストリップ用 H5 インフルエンザ抗体の作製、および標識剤の開発 >

担当者：財団法人東京都医学総合研究所 分子医療 PT・プロジェクトリーダー 芝崎 太

医学研が保有する高病原性 (H5 型) インフルエンザウイルスの培養が可能な P3 施設を利用し、医学研が

既に確立している抗体の検定、評価を行う以下の方法を用いて、要求条件を満たす高病原性 (H5 型) インフルエンザ特異抗体の作製、検定を行った。

- ・生ウイルスの培養によるコントロールウイルス作製
- ・生ウイルスから H5 蛋白の作製と抗体の検定、評価システム

- ・感染細胞を用いた染色法による抗体の検定、評価システム

また、IMPACTag について以下の検討を行った。

- ・バックグラウンドを低減させる方法の開発
- ・均一に流れるバッファー系の開発
- ・抗体の固着方法の開発によるシグナルの増強
- ・使用する膜の最適化
- ・サンプル処理の最適化

3-4 < 蛍光発光方式イムノクロマトストリップ用抗体標識技術 (IMPACTag) の開発 >

担当者：シンセラ・テクノロジーズ株式会社 代表取締役社長 村上 佳知美

IMPACTag で最適なシグナルを得るための DNA の配列・長さ及び標識色素を検討した。更にイムノクロマト上での計測に適した蛍光色素やバッファー等の評価・開発を進めた。

また、IMPACTag 法によって標識した抗体と蛍光色素を抗体に直接標識したものを使用して、イムノクロマト系において、蛍光強度や展開状況を蛍光測定器によって測定・評価した。

3-5 < 蛍光発光方式クロマトリーダーの開発、生産および蛍光発光方式イムノクロマトストリップハウジングの開発、試作 >

担当者：コニカミノルタオプト株式会社 LC 事業推進室 開発グループ 山崎 茂

高速な位置制御機構を持った蛍光発光方式イムノクロマトリーダーおよび高精度に位置制御でき、蛍光発光方式に適合した低コストハウジングを開発した。汎用測定器との性能比較において、相関性を確認し、装置としての基本的な信頼性、安全性を確認して試作を行い、予備臨床試験、臨床試験用に供した。

3-6 < 蛍光発光方式イムノクロマト検出システム及び

蛍光標識材料の開発>

担当者：コニカミノルタテクノロジーセンター株式会社
 光学バイオ技術開発室 室長 須田 美彦

蛍光標識抗体の蛍光シグナルを増加させるために、従来の低分子蛍光色素よりも輝度の高い蛍光体を標識材料として選択し、蛍光標識抗体を作製した。更に、それを搭載した蛍光発光方式イムノクロマトストリップの評価を行った。

また、メンブレンの自家蛍光を低減するために、蛍光検出のための光学システムを設計し、バックグラウンド (BG) ノイズを低減させた蛍光発光方式イムノクロマトシステムを検討した。このBGノイズの低減も、クロマトストリップの構成や組立、展開溶液やメンブレンの選択などが重要であるため、クロマトストリップ開発を担当するアドテック(株)と連携して実施した。

3-7 < 蛍光発光方式イムノクロマトストリップおよびクロマトリーダーの臨床試験、薬事承認取得、販売 >

担当者：コニカミノルタエムジー株式会社 経営管理本部 商品企画部 医薬事業グループ 田中 真理

ナショナルセンター級の大病院、中小病院、開業医までを含めた診療現場、および行政のニーズを詳細に把握し、我々が目指す高感度、簡便、迅速にインフルエンザを診断する検出システムの診断価値を確認した。

また、インフルエンザ診断キットの臨床試験を円滑かつ効率的に進めるため、CROと契約し、予備臨床試験、および臨床試験を実施した。

4. 得られた成果

高病原性(H5 型)インフルエンザを診断するためのH5 型インフルエンザ抗体を作成した。この抗体を用いて金コロイド方式のイムノクロマトストリップを試作し、リコンビナント抗原を用いて交叉反応性を評価した。H5 型抗原の内、H5N1 型で人に感染した実績のある全てのクレード(亜型)に対して反応すること、また、季節性(H1 型等)インフルエンザには反応しないことを確認した。この H5 型インフルエンザ抗体を用いて蛍光発光方式イムノクロマトストリップを試作した。

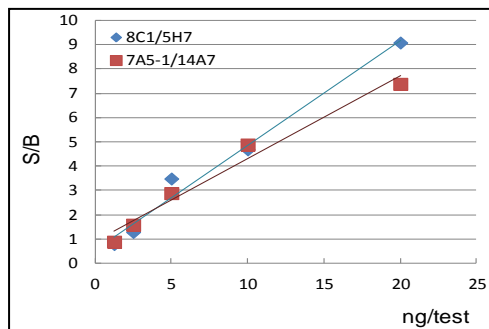


図1. 赤色蛍光ラテックスビーズを使用したH5型トリインフルエンザウイルス検出用フルストリップ試作品の検出感度

季節性(H1 型)インフルエンザを高感度で診断するための蛍光標識技術を開発し、反応膜、サンプルパッド、コンジュゲートパッド、吸水パッド、バックギンシート、ハウジング、綿棒、検体処理液等の開発・最適化を行い、これらの技術、材料を組み合わせることで蛍光発光方式イムノクロマトストリップを開発・試作し、高感度化を達成した。

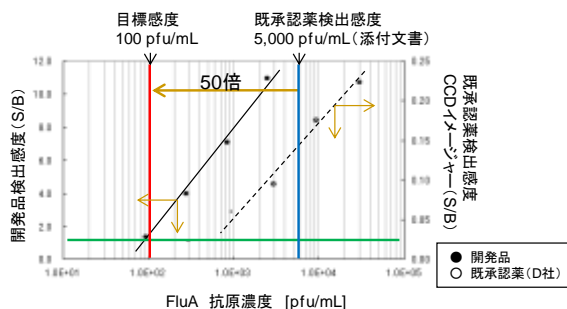


図2. 蛍光発光方式のイムノクロマト検出と既存品イムノクロマトとの検出感度比較

季節性(H1 型)、高病原性(H5 型)インフルエンザを高感度で診断するためのイムノクロマトリーダーを開発し、試作した。汎用測定器との性能比較において、相関性を確認し装置としての妥当性を検証した。電気安全規格、電波規格、レーザーの安全規格についても全て規格に適合していることを確認した。



図 3. 設計試作機外観



図 4. ハウジング外観

5. 薬事対応の状況

既に予備臨床試験を終え、現在季節性(H1 型)インフルエンザの診断システムとして臨床試験を実施中である。

今後臨床開発を進め、製造承認の取得およびインフルエンザ診断キットの早期上市を目指す。

6. 開発過程で創出した知的財産、新規技術等の成果

本研究開発の成果として、特許出願 2 件(クロマトストリップ 1 件、クロマトリーダー 1 件)の他、数件の特許出願を準備している。

7. 開発した製品の市場性

本製品の上市により、輸入品を含む既存のインフルエンザ診断キットを置き換える。インフルエンザの早期診断、早期治療が可能になり、インフルエンザ脳症等の重症例を減少させることができる。

季節性(H1 型)インフルエンザと高病原性(H5 型)インフルエンザを簡便迅速に鑑別診断することが可能になる。

8. 今後の事業展開計画

クロマトキットの製造は既存のインフルエンザ診断キットを製造しており、製造ノウハウと製造設備を有し、製造業許可を有するアドテック社を予定している。クロマトリーダーの製造は精密光学機器を製造しており、製造ノウハウと製造設備を有し、製造業許可を有するユニカミノルタテクノプロダクト社を予定している。本研究の再委託先及び事業管理会社の関係会社で事業化が可能である。

9. まとめ

高病原性(H5 型)インフルエンザを診断するための H5 抗体を作製し、リコンビナント抗原を用いて人に感染した実績のある全てのクレード(亜型)に対して反応することをイムノクロマト系にて確認した。

季節性(H1 型)、高病原性(H5 型)インフルエンザを高感度で診断するための蛍光発光方式イムノクロマトストリップを開発し、実際の製造拠点となるアドテック社にて試作した。

季節性(H1 型)、高病原性(H5 型)インフルエンザを高感度で診断するための蛍光発光方式イムノクロマトリーダーを開発し、実際の製造拠点となるユニカミノルタテクノプロダクト社にて試作した。

[引用文献]

引用文献無し

[研究発表]

該当無し

[特許申請]

[1] 特願 2011-268080 代表発明者：田村鶴紀 出願人：ユニカミノルタエムジー株式会社
ラテラルフロー型クロマト法用テストストリップおよびそれを用いたアナライトの検出または定量方法

[2] 特願 2011-274140 代表発明者：濱中大輔 出願人：ユニカミノルタオプト株式会社
クロマトグラフィ分析装置及びクロマトグラフィ分析装置

