

<全 2 6 2> オンサイト用高感度インフルエンザ型別確定診断機器の開発

(委託先) 日本ケミコン株式会社

(再委託先) 株式会社ユニテック、G&G サイエンス株式会社

国立大学法人千葉大学医学部附属病院、国立国際医療研究センター

国立大学法人宮崎大学医学部附属病院、

国立大学法人千葉大学大学院医学研究院、国立大学法人豊橋技術科学大学

プロジェクトリーダー

株式会社ユニテック マーケティンググループ マネジャー 北山孝章

サブ・プロジェクトリーダー 千葉大学大学院医学研究院 特任教授 鈴木和男

(連絡先: 株式会社ユニテック マーケティンググループ 北山孝章

電話・045-530-6100 FAX・045-473-5200

E-mail・kitayama@unitec-ccs.co.jp)

1. 研究開発の背景と目的

1-1 医療現場のニーズ・課題

インフルエンザウイルス感染の型別確定診断には、数時間かかるPCR法による遺伝子解析に依存しており、ベッドサイドや外来での患者の確定診断は不可能である。市中診療所や発熱外来および高度医療病院における大部屋での感染症管理には、確定診断が必須である。このため、診察しながら確定診断が可能なオンサイト用のインフルエンザ型別簡便診断機器が切望されている。一方、当医療チームは、これまでインフルエンザウイルス(H5N1, AH1N1pdm, 季節型)を簡単に検出できるクロマトタイプ簡易検査キット(テープ法)を開発しているが、型別確定診断は不可能であった。また、DNAの結合反応を瞬時に計測できる機器として、我々のチームでは $32 \times 32 = 1024$ 画素からなるイオン光マルチモードセンサーの開発に成功している。しかし、医療現場での要望に対する知見の不足から、インフルエンザウイルスの型を判別できるオンサイトでの確定診断機器として利用するには至っていなかった。

また、本医療チームは、インフルエンザの臨床の専門医師であることに加え、診断キットの治験実績もある。

医療現場の課題

- 「感度、精度が低い」
- 「類似疾患との判別が困難」
- 「迅速確定診断が困難」
- 「薬剤耐性の判別が不可能」
- 「確定診断に数時間要する使用施設が限定」
- 「検体をまとめて測定」
- 「ベッドサイド、外来での迅速診断が不可」

1-2 本研究の目的・達成目標 (平成 24 年 2 月時点の目標)

1年後での臨床試験を目指す実用化研究開始を判断できる「試作装置の開発」を目標にしているが、1年後の予備臨床試験開始、そして4年後での実用化(上市)を計画している。本研究開発としては、臨床検査機器の申請を行うため、インフルエンザ迅速確定診断装置の実用化を目指し、ベースと

なる試作装置及び関連技術の開発を目標とする。

本研究の到達点としては、特許取得のイオンイメージセンサによる瞬時検出と、金膜表面へのDNA固定及びウイルスRNA即時分離技術を統合・自動化し、検出採取から20分程度で型別確定診断ができる試作機を開発し、本試作機を用いた臨床研究の成績を基に治験相談を実施する。

2. 研究開発の体制

①イオン光マルチモーダルセンサ及び計測装置改良

豊橋技術科学大学、日本ケミコン（株）

②診断装置開発（株）ユニテック

③DNA/RNAプローブ開発

DNA/RNA前処理技術開発

G&Gサイエンス（株）

千葉大学大学院医学研究院

④治験相談、臨床研究

千葉大学医学部附属病院

宮崎大学医学部附属病院

国立国際医療研究センター

の8機関からなる研究開発体制である。

事業管理機関である日本ケミコンでは事業の管理及びセンサの製造と金膜成膜加工を行い実験用に供給を行います。ユニテック社では診断機器装置の開発をおこないます。

G&Gサイエンス社は日本ケミコンが供給する金膜付センサ上へのDNA固定及び診断に最適な薬液の開発を行います。豊橋技術科学大学は特許を持つセンサ及び計測装置の本開発プロジェクト用への改良・開発を行います。千葉大学大学院医学研究院はインフルエンザ遺伝子を検出するためのプローブ開発を行い、センサチップ上への固定化検出条件の確定と試作機改良のための機能評価を行います。

千葉大学医学部附属病院、国立国際医療研究センター、宮崎大学医学部附属病院の3医療機関では試作機により臨床実験を実施します。

3. 研究開発の実施内容

3-1 研究開発の全体像

研究の概要

イオンイメージセンサをインフルエンザ診断に適した仕様に改造し、センサ上にDNA/RNAプローブを固定できるようにする。診断装置は自動測定ができる仕様にて試作し、臨床研究、研究結果を持って治験相談と総合改造と安全確認を実施した。

3-2 <試作機の改良>

電荷転送型二次元イオンイメージセンサを診断装置にワンタッチで搭載できる仕様にして、更にセンサ側には流路と廃液溜めを設けたパッケージを開発し、診断装置側には薬液の供給ができ、診断は全て自動で診断結果まで出せるように改良を加えた試作機の製作（計測装置技術）を行った。



写真1 流路、廃液溜め付き診断用センサ



写真2 薬液供給機能付インフルエンザ型別確定診断装置

また、センサ上にはDNAプローブを固定するために金膜の加工を施す。本開発プロジェクトではDNAの固定に適し、かつ電荷の変化を高感度で読み取れる金膜の形状と厚みを特定した。

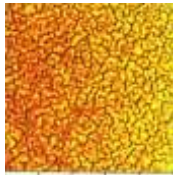


写真 3 DNAプローブを固定に最適の金膜状態

診断は一目でどのDNAと反応しているか、また型別の確認ができるようソフトウェアの改良を行い、診断結果判定の迅速化に対応した。

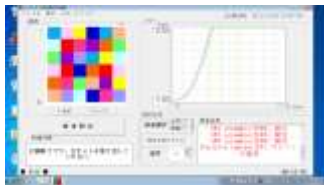


写真 4 診断判定画面

3-3 <インフルエンザウイルス遺伝子のプローブ設計、固定化技術>

インフルエンザウイルスを検出するためのDNAプローブを設計し、その配置を決め、また金膜加工を施したセンサ上へ固定する技術を確立した。

また、固定したDNAプローブと検体（ぬぐい液）で確実にハイブリできることを確認した。



写真 5 DNAプローブ固定化の状態



写真 6 DNAプローブの配置



写真 7 ホンコン型 (A/H3N2) ハイブリ後蛍光画像

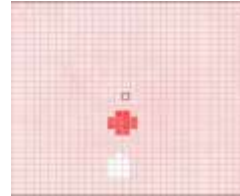


写真 8 ホンコン型 (A/H3N2)のハイブリ
検出シグナル

(ハイブリ状態を電荷の変化で確認)

3-4 <RNA/DNA 前処理キット技術>

新しく殆ど前処理が不要のより簡便な抽出方法を開発し、このキットから直接診断用センサの滴下用ホールにぬぐい液を滴下するよう、診断用センサに合致した仕様とした。



写真 9 RNA/DNA 前処理キット



写真 10 ぬぐい液滴下方法

3-5 <試作機改良のための機能評価>

試作機 1 台で評価サブテーマ< 1 >と< 2 >で開発した DNA プローブ固定済みセンサにて機能評価し、伝家が確実に読み取れていることを確認した。

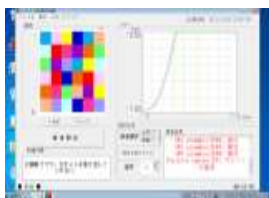


写真 1 1 診断判定画面

また、医療現場の医師達からのアドバイスがあり、医療現場に則した廃液の処理とした医療廃棄物仕様として最終試作機にフィードバックできるように評価と見直しを実施した。

3-6<臨床研究、治験相談準備、治験相談>

当初予定していた C R O では十分満足な対応ができないことが判明したため、千葉大学の A R O への相談を行うことで了解を得た。

医療 3 機関では倫理委員会への申請を行い、承認を得ることができた。

3-7 <最終試作機に向けた総合改良>

医療現場の医師達からのアドバイスに対応するためセンサには液溜めのついたパッケージの開発を行った。



写真 1 2 流路、廃液タンク付き診断用センサ

また同じく診断時間を 1 0 分まで短縮して欲しいとの依頼に対して、今回は 2

0 分までの短縮までであった。

薬液を流すと泡が溜まり測定結果に影響与えることも確認でき、最適のパラメーターを決めた。

3-8 <試作機実用化の安全試験>

診断用センサ内に廃液を溜めることで医療廃棄物として処理できるようにできた。

診断時間は 2 0 分で、そのための診断装置作業手順を明確化した。

【診断装置作業手順】

- ・ 梱包パッケージから診断用センサの取り出し。
- ・ 診断装置の蓋を開け、診断用センサの装着。テーブルに載せるだけ。
- ・ 診断装置の蓋をしめ、操作コントロール用の P C にて測定開始のアイコンのクリック。
- ・ センサの電荷初期値を測定。
- ・ 診断装置の蓋を開けて、診断装置内のセンサ上に患者からの拭い液を滴下。
- ・ 再び診断装置の蓋を閉めて、操作用 P C の指示に従い診断継続をクリック。
- ・ 後はハイブリダリゼーションプロセス、ハイブリ後のセンサ電荷の変化を自動計算。
- ・ 電荷の変化が大きく、ハイブリした部分を診断画面に表示。
- ・ 計測スタートからこの診断判定まで 2 0 分で終了。

使用された廃液は診断用センサの廃液溜めにたまり、診断装置の外には一切でない。

- ・ 使用した診断用センサを診断装置から取り出し、センサモジュールをそのまま廃棄。

4. 得られた成果

<達成できたこと>

- ・ インフルエンザ迅速確定診断ができるよ

う金膜上に DNA を固定したセンサ及び試作機の開発は終わることができた。

検体採取から型別確定診断ができるまで 20 分程度で終わることができた。

医療廃棄物の安全な処理の確保のため、モジュール内に廃液を封じ込めることに成功した。

・「治験相談」にむけた ARO との打ち合わせができた。

< 達成出来なかったこと >

・金膜状に DNA プローブの固定はできたが、大量生産の過程でバラツキが大きく、固定スポットニングの際の大量生産の条件が完全には決まらなかった。

・インフルエンザ流行のピークが 1 月末にずれ込み、臨床研究が進展せず、治験相談までには至らなかった。

・医療機器製造販売の認可を持つ企業の参加してもらったところまでは至らず。

5. 薬事対応の状況

クラス分類Ⅲで日本ケミコン株式会社を申請者として申請をする予定。2012 年度に治験相談と臨床治験を開始し、2013 年度には治験評価を実施する。

6. 開発過程で創出した知的財産、新規技術等の成果

FET 型センサを用いたインフルエンザウイルス RNA の検出方法として、出願番号「特願 2011-189768 号」として特許出願済み。

7. 開発した製品の市場性

本開発プロジェクトで開発行っているインフルエンザ迅速型別確定診断方法は他に類を見ない技術である。

通常の風邪との切り分け、インフルエンザの型別の判定のみならず、タミフル耐性の新型種での診断も可能な技術である。

従い、型別同時診断、簡易師団を行う診断方法などを開発している企業は多数あるが、インフルエンザ型 1 種類の判定が主流であり、本開発プロジェクトで開発した診断技術がこれまでのインフルエンザ診断方法に置き換わるポテンシャルを持つ。マーケットは日本のみならず、海外市場もあり、2014 年に上市できるとしてその 5 年後には 500 億円のマーケットがあると考えている。

8. 今後の事業展開計画

2012 年度

現状の問題点の解決、製品化完了

薬事申請

臨床治験

2013 年度

臨床治験

臨床治験評価

薬事承認・登録

2014 年度

販売開始

保険収載申請

上記のスケジュールを進めるためには、販売を担う医療機器製造販売の認可を持つ企業の参加は必須であり、2012 年度中の大きな課題である。

9. まとめ

本開発プロジェクトでは既存技術の応用を行ったイオンイメージセンサの活用とその計測及び DNA/RNA 前処理技術の開発、一方本プロジェクトメンバーが初めてトライしたセンサ上への金膜の加工、その金膜状に DNA/RNA を固定する技術、計測装置に流路を設けて、自動で診断するファンクション、診断用センサ上で DNA のハイブリを実現する技術と、開発の難度の違いがあったが、当初の目標である本プロジェクト終了後 1 年で臨床試験が目指せる試作装置の開発は達成でき、4 年以内での実用化を目標とできるコア技術の開発に成功した。

医療現場からの希望に沿った診断機仕様、診断機の更なる小型化、診断用センサで使

用する薬液を格納する構造の構築と技術的課題が残った。さらに、実用化を目指した際の販売側からの意見、マーケットリサーチができる、医療機器製造販売認可を持つ企業の参加は本プロジェクト中には適わなかったため、実用化を目指す際の課題が残った。

[引用文献]

Sugamata R, Dobashi H, Nagao T, Yamamoto K, Nakajima N, Sato Y, Aratani Y, Oshima M, Sata T, Kobayashi K, Kawachi S, Nakayama T, **Suzuki K**. The contribution of neutrophil-derived myeloperoxidase in the early phase of fulminant acute respiratory distress syndrome induced by influenza virus infection. *Microbiol Immunol*. in press.

Fujimori Y, Sato T, Hayata T, Nagao T, Nakayama M, Nakayama T, Sugamata R, **Suzuki K**. Novel anti-viral characters of nanosized copper(I) iodide particles showing inactivation activity against 2009 pandemic H1N1 influenza virus. *Applied Environ Microbiol*; in press.

Phung TTB, Sugamata R, Uno K, Aratani Y, Ozato K, Kawachi S, Nguyen LT, Nakayama T, **Suzuki K**. Key role of RANTES (regulated upon activation normal T-cell expressed and secreted), nonstructural protein1 and myeloperoxidase in cytokine storm induced by influenza virus PR-8(A/H1N1) infection in A549 bronchial epithelial cells. *Microbiol Immunol*. 2011; Dec; **55**(12):874-884.

• Igari H, Watanabe A, Chiba H, Shoji K, Segawa S, Nakamura Y, Watanabe M, **Suzuki K**, Sato T. Effectiveness and safety of pandemic influenza A (H1N1)

2009 vaccine in healthcare workers at a university hospital in Japan. *Jpn J Infect Dis*. 2011; **64**:177-82.

Kawachi S, Matsushita T, Sato T, Nunoi H, Noguchi H, Ota S, Kanemoto N, Nakatani K, Nishiguchi T, Yuge A, Imamura H, Kitajima H, Narahara K, **Suzuki K**, Miyoshi-Akiyama T, Kirikae T. Multicenter prospective evaluation of a novel rapid immunochromatographic diagnostic kit specifically detecting influenza A H1N1 2009 virus. *J Clin Virol*. 2011; **51**:68- 72.

Phung TTB, Luong ST, Kawachi S, Nunoi H, Nguyen LT, Nakayama T, **Suzuki K**. IL-12 and myeloperoxidase (MPO) in Vietnamese children with acute respiratory distress syndrome and induced avian influenza (H5N1) infection. *J Infect*. 2011; **62**: 104-108.

• Furuya H, Kawachi S, Shigematsu M, **Suzuki K**, Watanabe T. Clinical factors associated with severity in hospitalized children infected with avian influenza (H5N1). *Environ Health Prev Med*. 2011; **16**:64-68.

• Yasuda H, Yoshizawa N, Matsumoto M, Kawachi S, Suzuki K. Transmission of Pandemic H1N1 Influenza in Japan in 2009: Simulated Measures and Post-Analysis. *EASIAM Conference 2010*; **6**:110-116.

• Igari H, Segawa S, Watanabe A, Suzuki A, Watanabe M, Sakurai T, Kuroda F, Watanabe M, Tatsumi K, Nakayama M, Nakayama T, **Suzuki K**, Sato T. Immunogenicity of a monovalent pandemic influenza AH1N1 vaccine in healthcare workers. *Microbiol Immunol*. 2010; **54**: 618- 624.

・ Yasuda H, **Suzuki K**. Measures against transmission of pandemic H1N1 influenza in Japan in 2009: simulation model. Euro Surveill. 2009;**14**: 12-18.

・ Osaki Y, Maehara Y, Sato M, Hoshino A, Yamamoto K, Nagao T, **Suzuki K**, Kawach S. Analysis of cytokines in broncho-alveolar lavage fluids of patients with ARDS: Increase of IL-6, G-CSF, MCP-1, MIP-1 β . JJSICareMed 2010; **17**:179-184.

・ Kawach S, Luong ST, Shigematsu M, Furuya H, Phung TTB, Phan PH, Nunoi H, Nguyen LT, **Suzuki K**. Risk parameters of fulminant acute respiratory distress syndrome followed by avian influenza (H5N1) infection in Vietnamese children. J Infectious Dis 2009; **200**: 510-515.

・ Yasuda H, Yoshizawa N, Kimura M, Shigematsu M, Matsumoto M, Kawachi S, Oshima M, Yamamoto K, **Suzuki K**. Preparedness for the spread of influenza: prohibition of traffic, school closure, and vaccination of children in the commuter towns of Tokyo. J Urban Health 2008; **85**:619-635.

・ Nguyen TL, Nakajima N, Phuc P, Sato Y, Hoang NT, Pham VH, Luong TS, Katano H, Kumasaka T, Oka T, Kawachi S, Matsushita T, Sata T, Kudo K, **Suzuki K**. H5N1-infected cells in lung with diffuse alveolar damage in exudative phase from a fatal case in Vietnam. Jpn J Infectious Dis 2008; **61**: 157-160.

電荷転送型イメージセンサを用いたインフルエンザウイルス遺伝子の型別診断法の開発

第20回日本バイオイメージング学会
2011年9月1日、2日

【2】 Shoko Takenaga, Ryuichi Sugamata, Noriko Nakajima, Kazuaki Sawada, Koichi Okumura and Kazuo Suzuki

Pattern recognition of multi-and-easy detection of influenza viral RNA using CCD array sensor operating principle as an ISFET

Nature Technology (投稿予定)

【特許申請】

【1】特願 2011-189768号

出願者：千葉大学 (65%)
豊橋技術科学大学 (35%)

FET型センサを用いたインフルエンザウイルスRNAの検出方法

【研究発表】

【1】武永祥子、菅又龍一、中島典子、澤田和明、奥村弘一、鈴木和男