

**医療分野研究成果展開事業/研究成果最適展開支援プログラム (AMED・A-STEP)
平成 27 年度終了課題 事後評価報告書**

プロジェクトリーダー (企業責任者)	株式会社古河電工アドバンスエンジニアリング 技術開発部 部長 渡辺 秀樹
研究責任者	国立大学法人大阪大学 産業科学研究所 教授 中谷 和彦
支援タイプ	ハイリスク挑戦タイプ
研究開発課題	ヘアピン PCR 法によるデジタル肝炎検査技術の開発

1. 研究開発の目的

B 型肝炎の推定感染者数は日本国内に 130 万人(世界では 2.4 億人、推定潜伏感染者は 20 億人)にも
のぼり肝がんへの移行が問題となっている。B 型肝炎ウイルスは体内からの完全除去が難しいうえ、体内
のウイルス数と肝がん発症に関係があると言われており患者の予防的治療を実施する上で、また過剰な抗
ウイルス薬投与による医療費増大を防ぐ意味でも、日常診療におけるウイルス数定量が望ましい。

ウイルスの核酸抽出からPCR及び計測を行うNAT検査は、先行製品によって行われているが、ウイルス
の定量検査範囲は125コピー/ml以上である。しかし初期感染者及び潜伏感染者あるいは治療中の患者は
低濃度であってもウイルス数増減観察が治療に重要とも言われており、簡易でかつ低ウイルス濃度の検査
が望まれている。そこで、医療現場で肝炎患者の検査を自動で高精度・短時間で行う小型検査装置を提供
することで、適切で迅速な治療体制の構築に貢献する事を目的とした。

2. 研究開発の概要

①成果

研究開発目標	成果及び達成度
①マイクロウェルプレート上もしくはマイクロ 流路内の微少検体群で 10 コピー/ml以 下の濃度検査	①-1 ウェルプレート作製 シリコンウェハを用いて多数の微細孔を配したウェルプレ ートを開発した。 ①-2 ウェルプレートの表面処理 ウェル内を親水化して、検体導入、PCR 反応が確認でき た。 ①-3 核酸抽出限界向上 共沈用 carrier RNA とグリコゲンを用いて核酸抽出を改 善し効率向上を確認した。市販試薬の核酸検出限界であ る 200 コピー/ml から 100 コピー/ml まで向上することに成 功したが、10 コピー/ml 以下の安定した核酸抽出は確認で きなかった。 総合的に 160 コピー/ml までの検出が確認できた。

<p>②デジタル化による計数手段確立</p> <p>③前処理からPCR判定までの一体化 DNA抽出からPCR判定までの機能を小型(各辺60cm以内)の構造体に構成する。</p> <p>④処理時間短縮化 DNA抽出、増幅、判定までを3.5時間以内に処理する。</p>	<p>②-1.計数手段の確立 蛍光減衰型用のポジ数のカウントソフトを開発した。</p> <p>②-2.蛍光強度差向上 既開発プライマーに対して蛍光分子の結合部位数が異なるプライマー数種類を作成し、ネガ/ポジの明暗差(約30%)が増大したプライマーを採用した。</p> <p>②-3. HBV 実検体のデジタル検出 測定値は全体的に比較対象とした検査会社の測定値より高く、偽陽性を排除しきれなかった。</p> <p>③DNA抽出からPCR判定までの機能を各辺60cmの構造体に収めることができた。</p> <p>④-1.核酸抽出工程時間短縮 DNA抽出では70分を達成し、凝集分散性に優れた磁性ビーズを用いて、さらなる時間短縮を目指したが、DNA吸着性能が改善前より低く、再分散性も悪かった。また、溶液中の塩濃度等に影響され時間短縮の効果を確認できなかった。</p> <p>④-2.増幅工程短縮 熱源にペルチェ素子を用いたが、必要な熱量を発生できなかったことと、小型化の影響で熱設計が不十分になってしまったことで、目標を大幅に超える160分となった。</p> <p>④-3 判定工程短縮 ウェルプレートの位置認識向上、②項の計数ソフト高速化により10分を達成した。 トータルの処理時間は4時間となった。</p>
--	--

②今後の展開

本研究開発では十分に社会的な意義のあるテーマに取り組み一定の成果を示すことができたが、未達成の課題が残っており製品化を考えるとそれらを解決する研究開発が必要となる。特に注目すべき課題としては、DNA抽出工程の高速化、デジタルPCR安定化のための検体の導入性向上、蛍光強度差向上、PCRサイクル高速化があげられる。

本技術はB型肝炎のみならずC型肝炎ウイルス、HIVの定量にも発展しうる技術であり、定性診断にも用いることができることから、地域の保健所、全国300を超える地域医療支援病院等に

設置することで迅速な検査サービスを提供することが可能になると予測される。

3. 総合所見

本研究開発はB型肝炎ウイルス検査に用いるPCR法に蛍光色素との結合に化学処理不要な独自のヘアピンプライマー技術を導入することで、高感度、短時間処理可能な小型簡便自動装置およびシステムを開発し、医療現場での低濃度の初期または潜伏感染者および治療中の濃度検査などを容易にすることが目的であり、特徴的なヘアピンプライマーの完成度、競合技術と比較した優位性、有用性および実用化に向けた戦略と具体化内容について評価を行った。

当初の目標である検査感度、時間短縮などは未達であるものの、ハイリスク挑戦課題として技術リスク低減に向けた要素技術検討と未達課題の解析などを進め、蛍光シグナル増大型プライマーの基本性能を確認できた点は、一定の成果である。

今後は、上記課題の解決を踏まえた具体的計画策定と体制の見直しにより、イノベーション創出や産業化に結びつく出口戦略、及び薬事戦略を踏まえた有用性、有効性の検証を進められることが期待される。

※記載の情報は平成28年7月時点の情報です。