

日本医療研究開発機構 官民による若手研究者発掘支援事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

補助事業課題名: (日本語) RNA 直接検出法を基盤としたウイルスの高速検出デバイスに関する研究開発
(プログラム名) (英語) Study of High-speed Virus Detection device based on Direct RNA detection method

実施期間: 令和 3 年 5 月 28 日 ~ 令和 5 年 3 月 31 日

補助事業担当者 氏名: (日本語) 花房 宏明
(英語) HANAFUSA HIROAKI

補助事業担当者 所属機関・部署・役職:
(日本語) 国立大学法人広島大学・大学院先進理工系科学研究科・准教授
(英語) HIROSHIMA UNIVERSITY・Graduate School of Science and Engineering・Associate Professor

II 補助事業の概要

補助事業の成果およびその意義等

With ウイルス時代の到来により新興感染症や再流行感染症が猛威を振るい、空港や大規模イベントにおける多人数の入口検査や、医療機関、家庭などあらゆる場所で、“体温計で体温を測るかの如くウイルス検査を簡便・迅速に行うことができないか？”というニーズが顕現している。そのニーズに応じるためには安価で迅速性と信頼性があり、変異株への速やかな対応、個人ユースにも大量同時処理にも対応し、インターネットにも即時に通じることでシームレスに連携を可能とする検査デバイスが必須である。

蛍光検出器を備えた高速サーマルサイクラーによる逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-PCR)等を用いた検査はマイクロ流路などを用いて検査時間が飛躍的に短縮されているものの、取り扱いが難しく、技師が清浄な環境と高価で信頼性のある装置で検査することが求められる。また、罹患判定の確度も 70%程度であることが知られている。さらに、蛍光検出器を備えていることから一般家庭に常備するような低コストの検査機器とすることが難しい。そのため、2021 年 5 月現在でも日本国内においては一日の最大検査能力が 20 万件となっている。すなわち日本国民全員をスクリーニングするためには約 2 年を要する。

そのため、あらゆる箇所で迅速に検査を行うことができるウイルス検査機器の要求は言うまでもない。また、

イムノクロマト法などの簡易判定法は操作が簡便であるものの感度が低いことから罹患初期の判定は難しく、また、新興感染症の対応は極めて遅い。次のパンデミックとなりうる感染症の発生時に我々は普遍的な原理で動作し、高い処理能力と確度、対変異株性を有する検査方法を確立して立ち向かわなければならない。

本研究では標的 RNA 自体がプライマーとなることで偽陽性が生じない核酸増殖反応法である“RHa-RCA”法と、検体を MCM に配分して反応場を極小化し、高速・高感度にプロトンを検出する技術、高性能 Si-MOS トランジスタをプラスチック基板上に転写する技術 (MLT) の 3 つのシーズを融合し、提案機器である MCM 型センサの各セルに備えたイオン感応性トランジスタ (ISFET) により RHa-RCA 反応を用いてウイルス分子が増殖する過程で生じるプロトンを高速に検出・定量できる原理の検証を目標とした。また、2 年の研究期間においてはその原理検証と実証研究、教育プログラムにより会得した知見と併せ、機器コンセプトの完成を目標とした。

具体的には下記の項目を主軸として研究開発を進めた。

1. 微量プロトンを検出し、ウイルスを定量することができる ISFET の研究
2. マイクロチャンバの作製と最適化、微量プロトンの高感度・高速検出技術の実証
3. 小規模 MCM 構造の作製と検出
4. 市場調査と教育プログラムにより得た知見をもとに医療機器として要求される仕様・基準に適合した機器コンセプトの検討

検出デバイスの開発と動作の検証研究においては、センサ部の ISFET を作製し、想定している pH 検出性能を満たしていることを確認した。さらに、プラスチック基板上にも ISFET を作製し、Si ウエハ上と同等の検出性能であることを示した。これはセンサ部のディスプレイ化にも対応することが期待できる。続いて、このセンサ部にサイズの異なるチャンバを形成し、提案する新規の RNA 増幅方法を用いてテスト RNA の増幅を行い、核酸増幅を電気的な変化として捉えるデバイスの動作原理検証を試みた。その結果、検体液を導入するチャンバサイズを縮小化することで RNA 濃度に依存して有意な検出信号の違いを 5 分間で捉えることに成功した。また、アクティブマトリクス型検出の基本として小規模の構造を作製し、同様に評価を行った。その結果、個別のセルごとに濃度の異なる検体を評価することができ、想定しているウイルス検出が期待できる動作特性を取得した。これらのことから、基礎原理の検討を行い、目標とするポータブル型ウイルス検出機器の実現に資する成果を得た。また、大規模 MCM 構造を見据え、検査液量を作製目標である 5pL まで制御できる寸法で、100 万個のチャンバ構造と流路構造を作製し、PDMS フィルムにて蓋を作製して流れの評価を行った。その結果、シリンジから圧送するような意図的な外力を加えず、検体を導入部に滴下するのみで毛細管現象によりチャンバ群内に検査液が浸漬していくことを示した。これにより圧送をせずに検体液をデバイスに展開することが十分に可能であることが分かった。これを検査システムの使用方法に組み入れ、簡易な手順で検査液をデバイスに導入できることが分かった。以上の研究開発項目を展開し、基本構造の実証を完了した。

機器コンセプトの検討項目においては、初期コンセプトを作製し、市場調査やステークホルダーへのインタビュー、PMDA 相談、企業面談、展示会等での展開を行った。特に、類似競合機器の市場調査では、検出感度と装置価格がトレードオフであり、低コストで信頼性の高い診断機器の領域に大きなギャップがあることが分かった。装置の大きさ、操作の簡便性、1 回あたりの検査コストが低い領域の機器をねらう本提案機器は大きな優位性を示している。また、遠隔診療市場が 2032 年までに約 5900 億ドルの市場となることが予見されている。(Telemedicine Market Size to Surpass USD 590.9 billion in value by 2032, at CAGR of 25.7% - Market.us, Global News Wire, February 27, 2023)。すなわち、これまでの医療の形態が大きく変わることが予想され、本研究開発で目指すいつでもどこでも検査を可能とする機器の方向性を大きく支持する結果となった。これらから得た知見を基に、提案デバイスに要求される検出性能・使用方法・使用者・ビジネスモデル、薬事戦略仕様・基準の把握を進め、具体的なコンセプトの検討を行った。ビジネスモデルの作製に先立ち、検査システムの部品や使用方法の構成を検討し、検査一連の流れを想定した使用方法のプロトタイプを作成した。これをもとに、検査チップや試薬、測定機器の製造販売のビジネスモデルを作成した。また、薬機法承認に向けて、まず、医療機器のクラス分類や審査区分の検討、PMDA

全般相談を経て試薬と機器を合わせた形でクラス2相当の医療機器審査を行うことが適切である決定された。

以上の研究開発成果を基盤として、「高感度のウイルス罹患判定結果を得たい人にとって、その場で簡便にウイルス罹患検査を行い、迅速に結果が得られる方法 “5分であらゆる検査をどこでも” という機器コンセプトを完成させた。

また、事業期間を通じて、医療機器開発における事業・薬事・特許戦略メンタリングやケーススタディ、開発サポート機関からの個別サポートを受け、医療機器開発を進めるにあたって必要な知識を取得することができ、開発機器の構成と事業化戦略を完成することができた。

以上の研究開発を通じて、最終目標であるコンセプトの完成と 5×5MCM デバイスを作製し、マトリックス方式による核酸増幅検出原理の検証を達成した。

本研究開発機器の完成によりウイルス検出センサー部をスマートフォンなどのパーソナルデバイスに接続することで検査と同時に医療機関などとネットワークで連携し、あらゆる箇所でウイルス検査を迅速に実施できる検査体制を構築することができる。この計画は次のパンデミックとなりうる新興・再興感染症の発生時には自宅・医療施設・大規模イベント会場や入国管理など、あらゆる場所で With ウイルス社会を強力にささえる基盤技術となりうる。ウイルス罹患の有無を即時に理解する提案機器は無意識の拡散を抑制し、社会活動を持続的に安定化させることが期待できる。また、通常期の用途においても、本研究機器の実現によりウイルス検査を始めとした検査を自宅で行うことができ、医療者も患者もどちらの立場からも移動と時間の制約を低減することが可能となり、将来のオンライン診療を下支えする医療機器となりうる。

With the advent of the with-virus era, emerging and re-emerging infectious diseases are becoming more and more prevalent. We strongly need to perform virus testing as easily and quickly as taking body temperature with a thermometer. To meet this need, it is essential to have a testing device that is inexpensive, rapid, and reliable, that can respond quickly to mutant strains, that can be used for individual use or for mass simultaneous processing, and that can be linked seamlessly with the Internet by instantaneous access.

Although tests using reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and other methods with high-speed thermal cyclers equipped with fluorescent detectors have dramatically reduced testing time by using microfluidic channels, etc., they are difficult to handle and require technicians to use clean environments and expensive, reliable equipment. In addition, it is known that the accuracy of the determination of morbidity is about 70%. In addition, it is difficult to make the device low-cost enough to be used in ordinary households because it is equipped with a fluorescent detector. Therefore, as of May 2021, the maximum daily testing capacity in Japan is still 200,000 cases. In other words, it will take about two years to screen all Japanese citizens. Therefore, there is a demand for virus testing equipment that allows rapid testing at any location.

In this research, we combined three seeds: (1) the "RHa-RCA" method, a nucleic acid proliferation reaction method in which the target RNA itself serves as a primer and false positives do not occur; (2) a technology to minimize the reaction field by distributing the sample to the MCM and detect protons with high speed and high sensitivity; and (3) a technology to transfer high-performance Si-MOS transistors (MLT) onto a plastic substrate. (MLT) technology for transferring high-performance Si-MOS transistors onto plastic substrates, and to verify the principle that the ion-sensitive transistors (ISFETs) in each cell of the MCM-type sensor, the proposed device, can detect and quantify protons generated in the process of virus molecule multiplication using the RHa-RCA reaction at high speed. The goal was to verify the principle. During the two-year research period, we also aimed to complete the concept of the device by combining the verification of the principle with empirical research and the knowledge obtained through the educational program.

In the development of the detection device and the verification study of its operation, an ISFET for the sensor part was fabricated and confirmed to meet the expected pH detection performance. In addition, ISFETs were fabricated on plastic substrates, and the detection performance was shown to be equivalent to that on Si wafers. This is expected to support the disposable sensor part. We then formed chambers of different sizes in the sensor part and amplified test RNA using the proposed novel RNA amplification method, and attempted to verify the operating principle of the device that captures nucleic acid amplification as an electrical change. As a result, we succeeded in capturing significant differences in detection signals in 5 minutes depending on RNA concentration by reducing the size of the chamber into which the sample solution was introduced. We also fabricated a small-scale structure as the basis for active matrix-type detection and evaluated it in the same way. As a result, it was possible to evaluate specimens with different concentrations in each individual cell and obtained operating characteristics that could be expected to detect the expected viruses. Based on these results, we investigated the basic principle and obtained results that contribute to the realization of the targeted portable virus detection device. In addition, with an eye toward a large-scale MCM structure, we fabricated a million chamber and channel structures with dimensions that would allow us to control the amount of test solution up to 5 pL, which is the fabrication target, and fabricated a lid with PDMS film and evaluated the flow. As a result, it was clarified that the test solution was immersed in the chamber group by capillary action only by dropping the specimen into the introduction area without applying an intentional external force such as pumping from a syringe. This was found to be sufficient to allow the specimen solution to expand into the device. This was incorporated into the usage of the testing system, and it was found that the test solution could be introduced into the device through a simple procedure. Through the above research and development, we achieved our final goal of completing the concept, fabricating a 5×5 MCM device, and verifying the principle of nucleic acid amplification detection using proposed method.

In the examination of the instrument concept, the concept of the instrument was completed as "a method for those who want to obtain highly sensitive results of viral infection diagnosis, to perform on-the-spot viral infection tests easily and quickly, and to obtain results "anywhere in 5 minutes for all kinds of tests.

Through the above research and development, we have achieved the final goal of completing the concept, fabricating a 5×5 MCM device, and verifying the principle of nucleic acid amplification detection using the matrix method. With the completion of this R&D device, the virus detection sensor part can be connected to a personal device such as a smartphone, and at the same time as testing, it can be linked to medical institutions via a network to establish a testing system that can rapidly conduct virus testing at any location.