

日本医療研究開発機構 開発途上国・新興国等における医療技術等の実用化研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名：（日本語）現場使用可能な新型コロナウイルス変異株 RNA 検出システムの開発と開発途上国・新興国での性能評価

（英 語）Development and Performance evaluation of the on-site RNA detection system for SARS-CoV-2 variants in developing and emerging countries

研究開発実施期間：令和 3 年 11 月 24 日～令和 6 年 3 月 31 日

研究開発代表者 氏名：（日本語）ビヤニ マニシュ

（英 語）Manish Biyani

研究開発代表者 所属機関・部署・役職：

（日本語）BioSeeds 株式会社・代表取締役

（英 語）BioSeeds Corporation・CEO

II 研究開発の概要

（1）最終目標

インドで唾液中の SARS-CoV-2 ウイルスを現場にて、30 分以内、超高感度に検出可能な新 PCR 類似システム「RICCA キット・RICCA デバイス・RICCA ロボ」を用いた新型コロナウイルス感染症検査の開始

（2）研究開発の成果およびその意義等

開発途上国・新興国等において、先進国でなされている設備環境が整った基幹病院、検査センターでの臨床検査体制を 1～数年以内に確立することは、費用面や流通面において不可能である。これらの国では、どの地域にも住民が容易に訪れ、その場で迅速に検査結果が出る体制がない。

研究開発課題は、現場使用可能な新型コロナウイルス変異株 RNA 検出システムの開発と開発途上国・新興国での性能評価を行うことである。新型コロナウイルス感染症の感染を食い止める最も効果的な方法は、症状の有無にかかわらず、感染の疑いのある人を特定し隔離することである。現在、世界的に流行している新型コロナウイルス感染症では、主に RT-PCR による検査が行われている。しかし、この方法は、サンプルの前処理が必要であることや、高価な装置（蛍光光度計付きサーマルサイクラー）が必要なことから、現場での検査は難しく、また短時間での大量検査にも課題がある。

私たちはこれまで、AMED「ウイルス等感染症対策技術開発事業」の助成を受け、研究開発課題「現場で利用できるコンタミリスクがない閉鎖系新型コロナウイルス検出システム構築に向けた要素技術の確立」

（代表者：保川、分担者：ビヤニ他、期間：令和 2 年 10 月～令和 3 年 3 月）に取り組んだ結果、上記検査システムに適用できる新規核酸増幅法を開発した。

本法は「等温 RNA 増幅法」と「等温 DNA 増幅法であるリコンビナーゼポリメラーゼ増幅法（RPA 法）」を組み合わせたもの（RICCA（RNA Isothermal Co-assisted Coupled Amplification）と命名）であり、高い特異性をもつ（国際特許 WO 2022/244104 A1 BioSeeds 出願）。一般に増幅エラー率が高いとされる等温増幅法でありながら、両増幅反応をワンポットで相補的に進行させることで、高い増幅特異性を維持する。

増幅には4種のタンパク質と5種の酵素を含む計25種の試薬の混合物を用いる。これら増幅用試薬と核酸抽出用の試薬、ならびに核酸検出用のラテラルフローストリップと組み合わせてキット化すれば、新型コロナウイルス感染症の陽性/陰性を現場にて数十分で判別可能である(RICCA キット)。さらに検出に本プロジェクトにて開発する携帯型電気泳動装置(PalmPAGE)を使用すれば、新型コロナウイルスの変異株の種類も特定できる。RICCA キットおよび PalmPAGE はいずれも安価かつ小型であり、市販される簡便なブロックヒーター、ピペッターさえあれば他に高価な設備は一切不要であることから、開発途上国・新興国におけるその場迅速検査システムとしてのポテンシャルは大きい。

唾液中の SARS-CoV-2 ウイルスを現場にて、30 分以内、超高感度に検出可能な新 PCR 類似システム「RICCA キット・RICCA デバイス・RICCA ロボ」(図 1)を開発し、RICCA キット・デバイスのインドでの実用化が必要となる、薬事承認取得のための臨床試験を現在推進中。(インド COVID-19 陽性患者数減少のため実施時期を変更 → 令和 6 年までに RICCA キットのインド薬事承認取得、令和 7 年に販売予定)



図 1. 30 分以内に現場で結果が出る本企画の製品イメージ。

(図 1 上) RICCA キット：患者に唾液を適量採取するためのシリンジおよびスポンジ、唾液中のウイルス RNA を抽出・増幅するための各種凍結乾燥した試薬、増幅した RNA を検出するためのラテラルフローストリップが含まれている。さらに医師がキットを正しく使用できるよう、キットの操作手順を分かりやすく説明する専用アプリが付属されている。(図 1 中央) RICCA デバイス：W124×D145×H79 mm の手のひらサイズの小型筐体に電気泳動を実施しその結果を記録するための電極、電源、カメラ、制御用回路基板が内蔵されている。RICCA デバイスは USB ケーブルで接続された外部 PC にて制御する構成となっており、制御用の専用ソフトウェアも開発済である。(図 1 下) RICCA ロボ：多検体を迅速に測定可能なシステム。

(1) Target goal

To establish a new PCR-like on-site test system in developing countries that can detect SARS-CoV-2 virus in saliva within 30 minutes with ultra-high sensitivity.

(2) Research and development results and significance

In developing and emerging countries, it is impossible to establish molecular testing facilities in clinics and small hospitals as in developed countries due to high-cost and maintenance. The goal of this project is to develop a novel COVID-19 RNA detection system that can be used in the field and evaluate its performance in developing and emerging countries. Currently, RT-PCR is the main method used to test for novel coronavirus infections. However, this method requires sample pretreatment and expensive equipment (thermal cycler with fluorometer), which makes on-site testing difficult.

We have been working on a research and development project entitled "Establishment of elemental technologies for the construction of a closed system for the detection of novel coronaviruses that can be used on-site without risk of contamination" (PI: Yasukawa, Co-PI: Biyani, et al; Period: October 2020 - March 2021), funded by the AMED Virus Control Technology Development Project. As a result of these efforts, we have developed a new nucleic acid amplification method applicable to the above inspection system. This method is a combination of "isothermal RNA amplification" and "recombinase polymerase amplification (RPA), an isothermal DNA amplification method" (named RICCA, RNA Isothermal Co-assisted Coupled Amplification), and has high specificity (International Patent WO 2022/244104 A1, BioSeeds Corporation). Although this is an isothermal amplification method, which is generally considered to have a high amplification error rate, the high amplification specificity is maintained by performing both amplification reactions in one pot in a complementary manner. A freeze dried mixture of 25 reagents, including 4 proteins and 5 enzymes, is used for amplification. When these amplification reagents for amplification are combined with nucleic acid extraction reagents and lateral flow strips for nucleic acid detection, the kit enables positive/negative identification of COVID-19 infections in the field within 30 minutes. Next, we developed a device (RICCA device) that utilizes the concept of 1-inch gel electrophoresis PalmPAGE and can analyze the amplicon products from the RICCA kit to detect the COVID-19 variants such as alpha or delta-type. Both the RICCA kit and the RICCA device have great potential as in-situ rapid testing systems in developing and emerging countries because they are inexpensive, portable, and require no other expensive equipment other than a simple, commercially available block heater and pipettes. Finally, we used a compact dispensing system (Opentrons) and integrated it with the RICCA technology to introduce a robotic platform for parallel mass testing (Fig.1).

The RICCA kit/device is currently undergoing clinical trials for regulatory approval in India. (Due to the decrease in the number of COVID-19 positive patients in India, the timing of the clinical trials has been changed → RICCA kit is expected to receive regulatory approval in India by the end of 2024 and be launched in 2025).

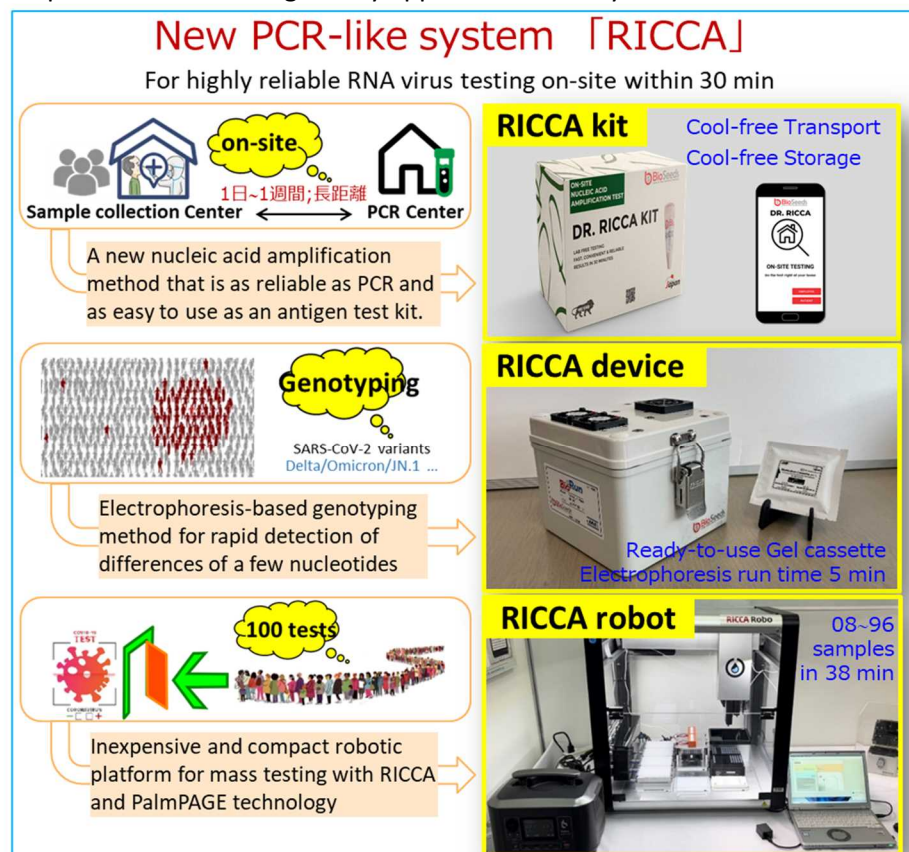


Figure 1. Product image of this project. The RICCA kit (top) includes a syringe and sponge to collect the appropriate amount of saliva from the patient, various lyophilized reagents to extract and amplify viral RNA in saliva, and lateral flow strips to detect the amplified RNA. In addition, to help physicians use the kit correctly, a dedicated application is included that provides easy-to-understand instructions on how to use the kit. The RICCA device (center) is a small, palm-sized case (W124 x D145 x H79 mm) that containing a gel electrophoresis unit, a power supply unit and LED-based gel documentation unit for performing 5-min gel electrophoresis with real-time gel visualization. The RICCA robot (bottom) is a system that can quickly measure multiple samples in parallel.