

高感度イムノクロマトキット開発 に関する取組

国立大学法人埼玉大学

理工学研究科物質科学部門

先端産業国際ラボラトリー (MiU)

戦略研究センター健康科学研究領域

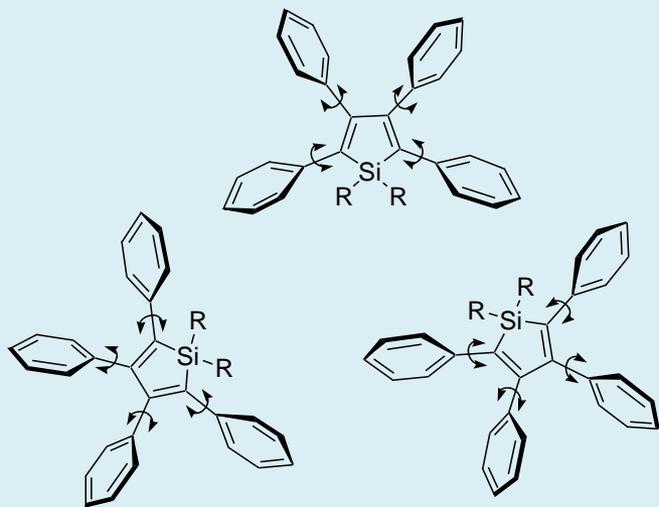
准教授

幡野 健

khatano@fms.saitama-u.ac.jp

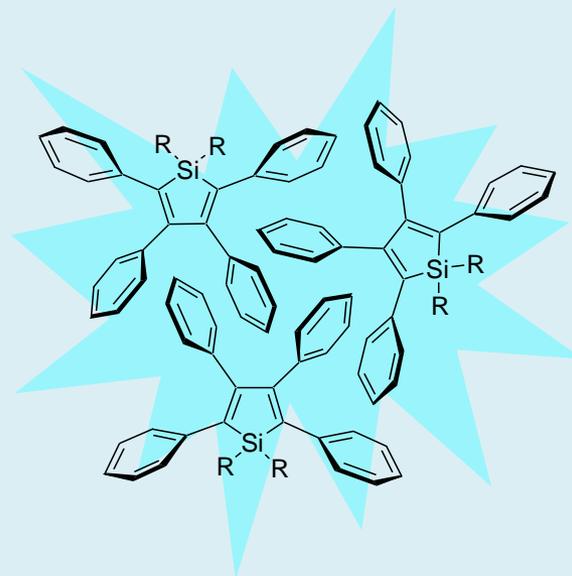
凝集誘起発光 (AIE)

分散状態 (非発光)



フェニル基の振動運動が**活発**

凝集状態 (強い発光)

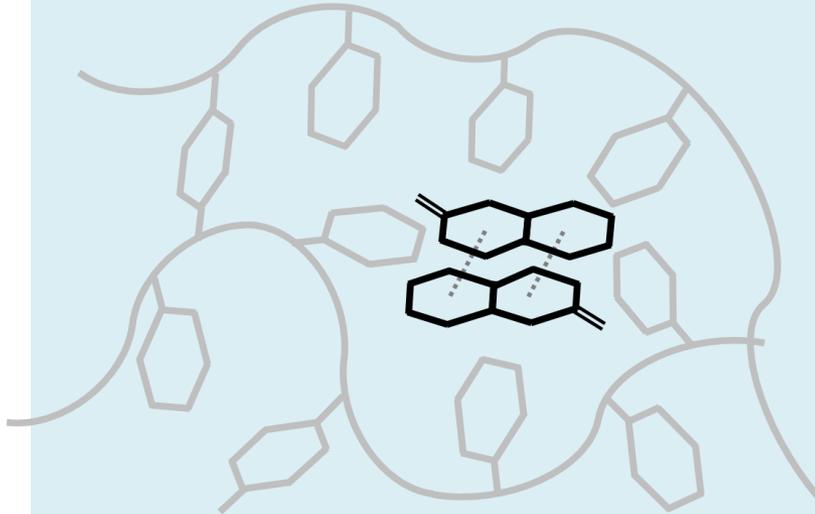


フェニル基の振動が**凝集**で抑制

Ref.) B. Z. Tang et al., *Chem. Commun.*, **2001**, 1740.

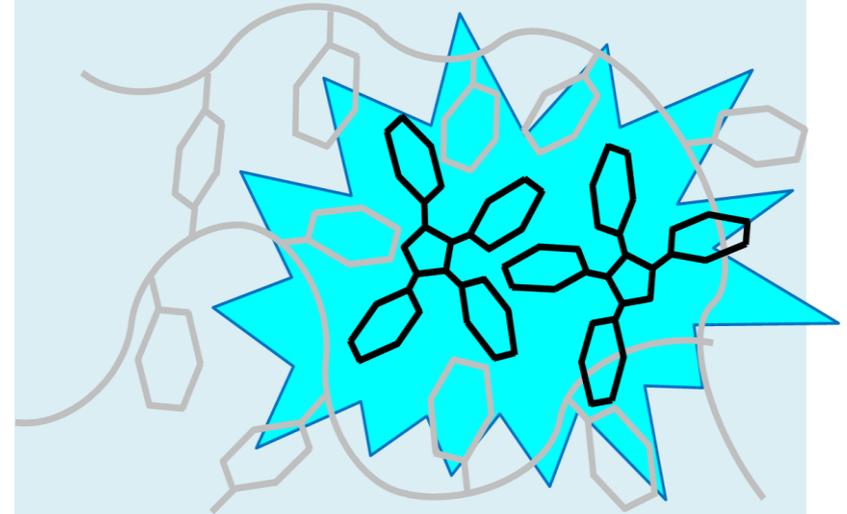
濃度消光と凝集誘起効果

π 共役系蛍光分子



濃度消光
蛍光強度の減少

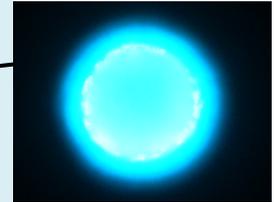
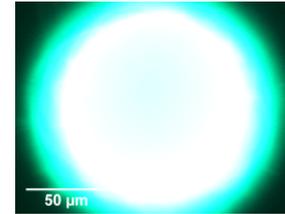
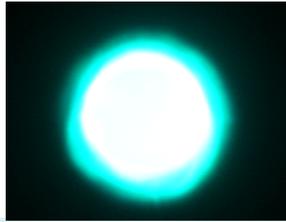
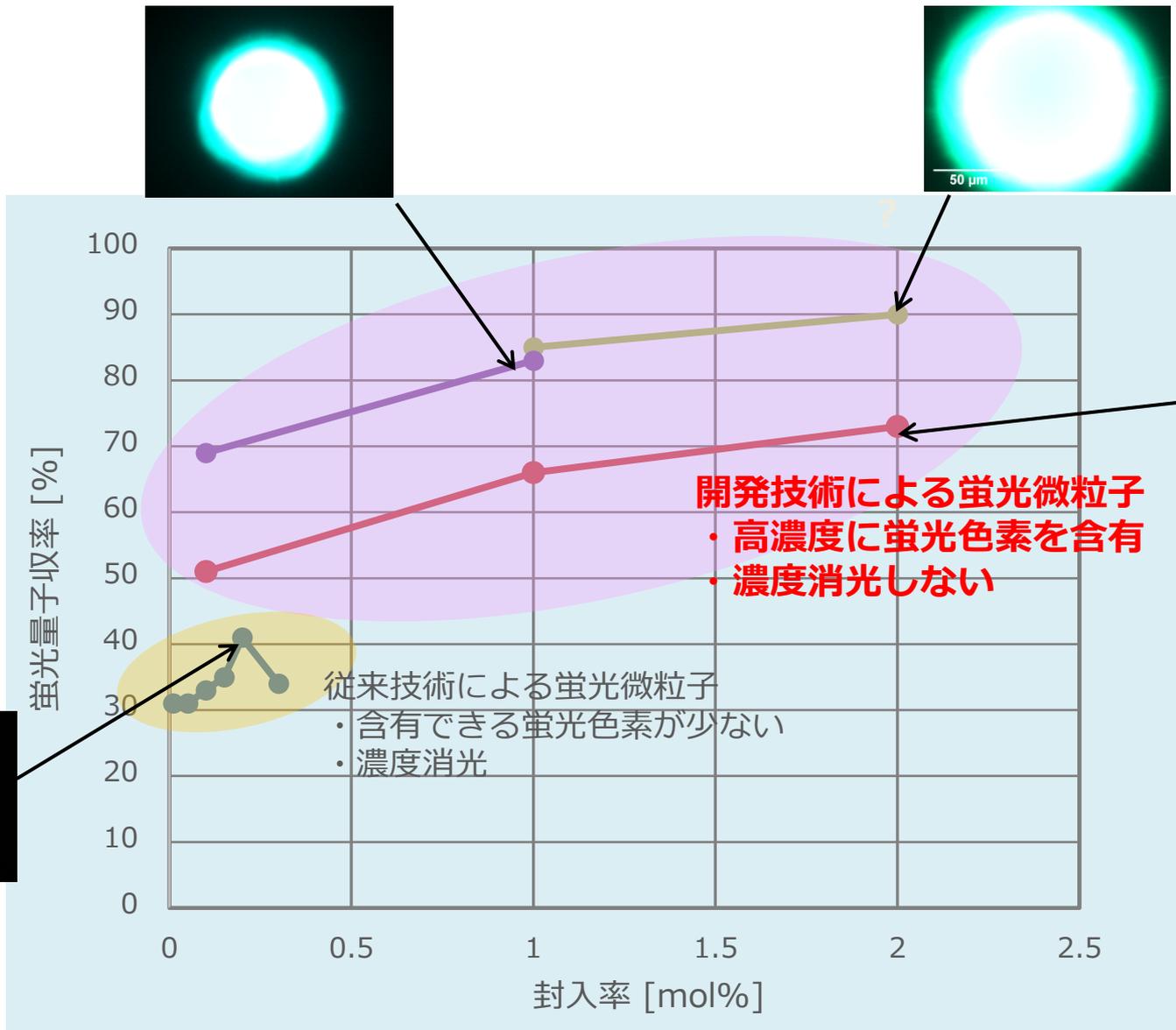
AIE蛍光分子



AIE効果
蛍光強度の増大

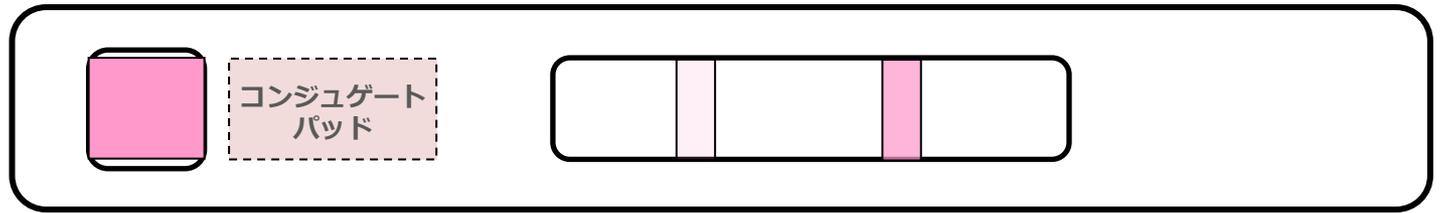
「AIE活性化化合物を包含する蛍光性微粒子」, 特願 2016-186496, 幡野 健・藤川 大輔・松下隆彦・松岡浩司, 出願人: 埼玉大学, 平成28年9月26日

高輝度蛍光微粒子の蛍光量子収率



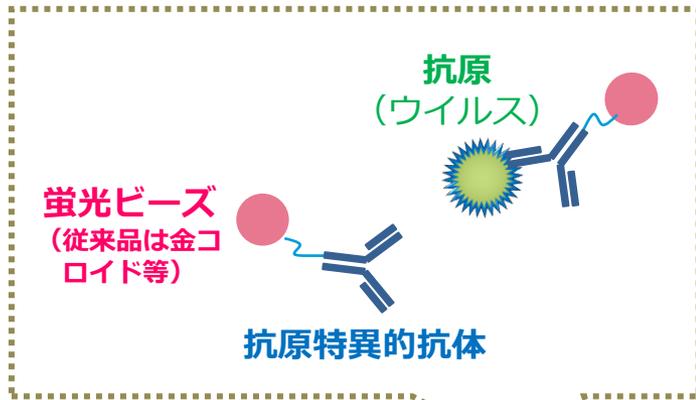
イムノクロマト法の原理

上からの模式図



サンプルパッド

抗原と標識抗体の結合

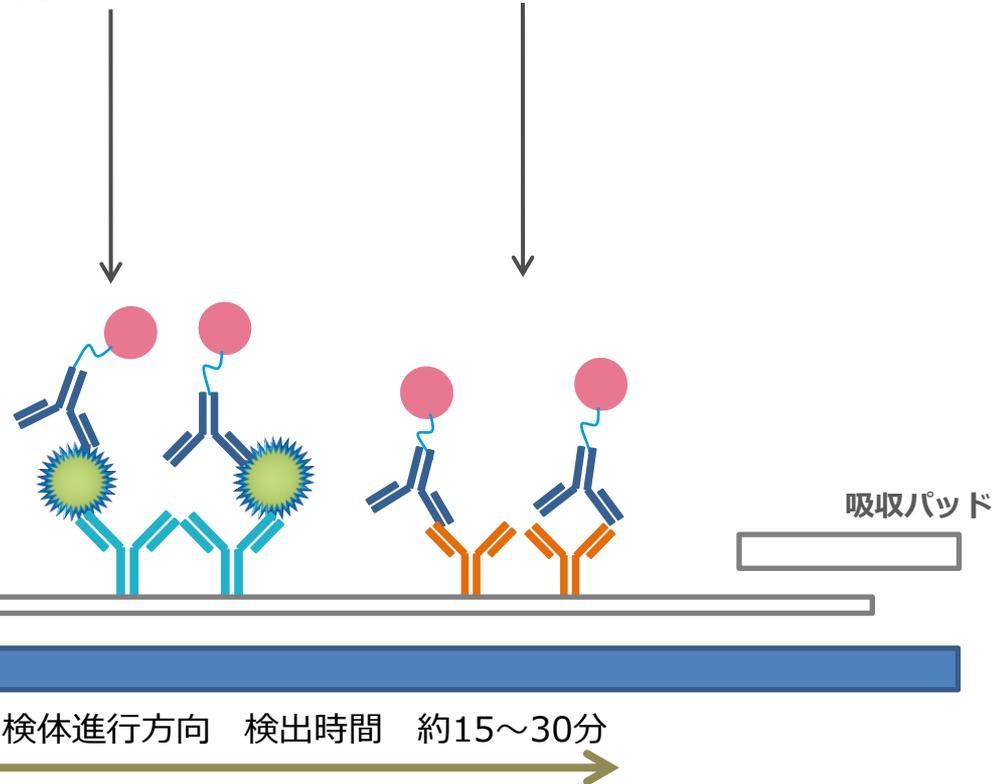


テストライン

抗原特異的固定化抗体で
抗原・標識抗体複合体を
捕捉

チェックライン

標識抗体特異的抗体で
標識抗体を捕捉



横からの内部模式図

バックキング
シート

メンブレン

コンジュゲートパッド

サンプルパッド

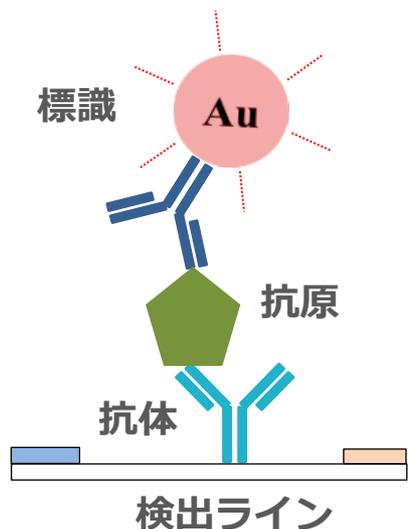
吸収パッド

検体進行方向 検出時間 約15~30分

本開発の目標

臨床現場における即時検査へのニーズと高感度化の達成にむけて

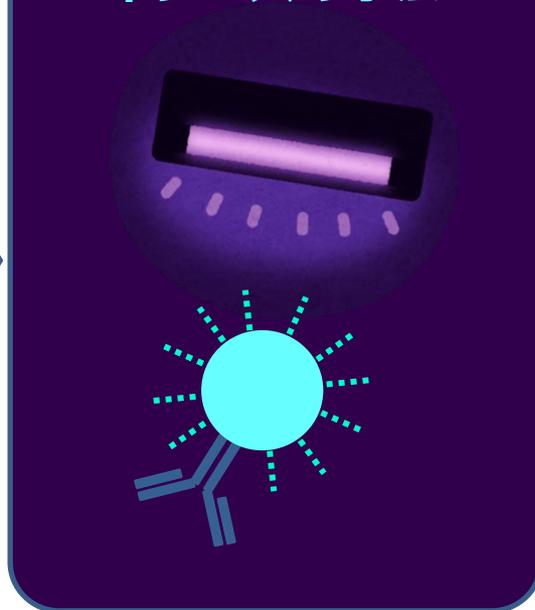
現在のイムノクロマト法



金コロイド

- × 発色/感度が悪い
- × 偽陰性の原因

本シーズの手法



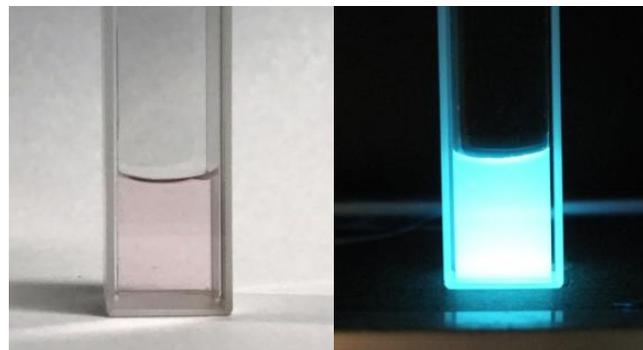
高輝度蛍光ビーズ

- 高感度化
- × UV照射が必要

同濃度における標識物質懸濁液の写真

金コロイド

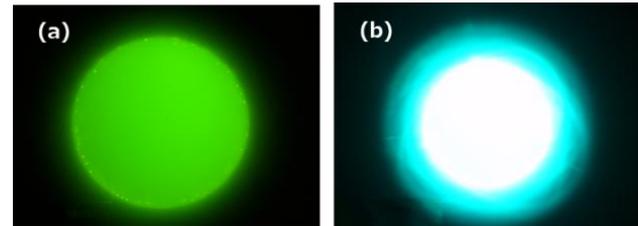
高輝度蛍光ビーズ



同条件下の既存ビーズと本シーズの蛍光

従来の蛍光ビーズ

高輝度蛍光ビーズ



- ・ イムノクロマトキットを最適化する研究開発 (ビーズ、抗体、メンブレン等)
- ・ UV照射・蛍光読み取りを行う、診断用医療機器の開発
- ・ 市場調査、薬事対応等の事業化推進

蛍光イムノクロマト法の実験結果

インフルエンザウイルス検出試験

(埼玉大学 高輝度蛍光ビーズ+A社 黒PETメンブレン)

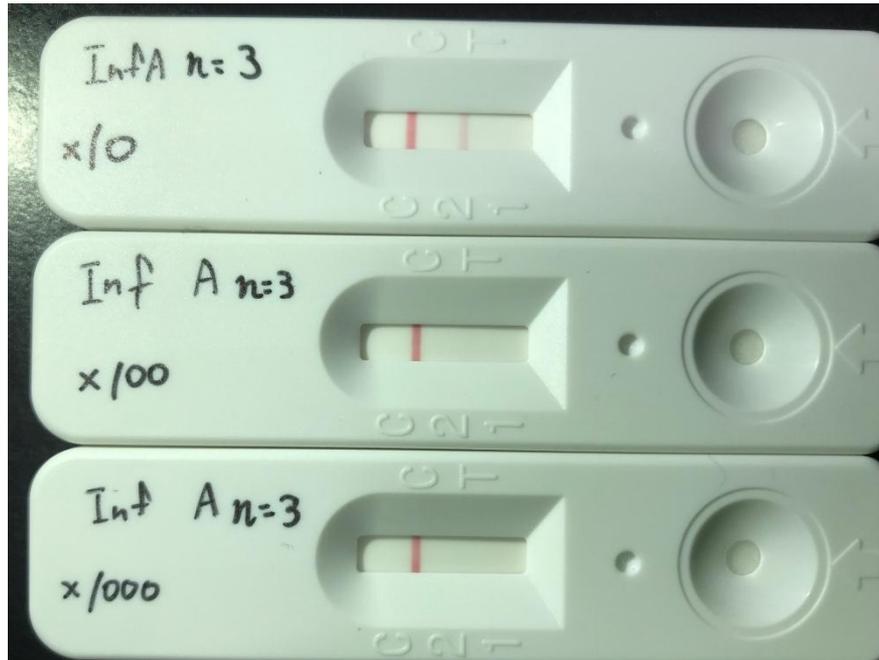
抗原希釈倍率

10倍希釈

10²倍希釈

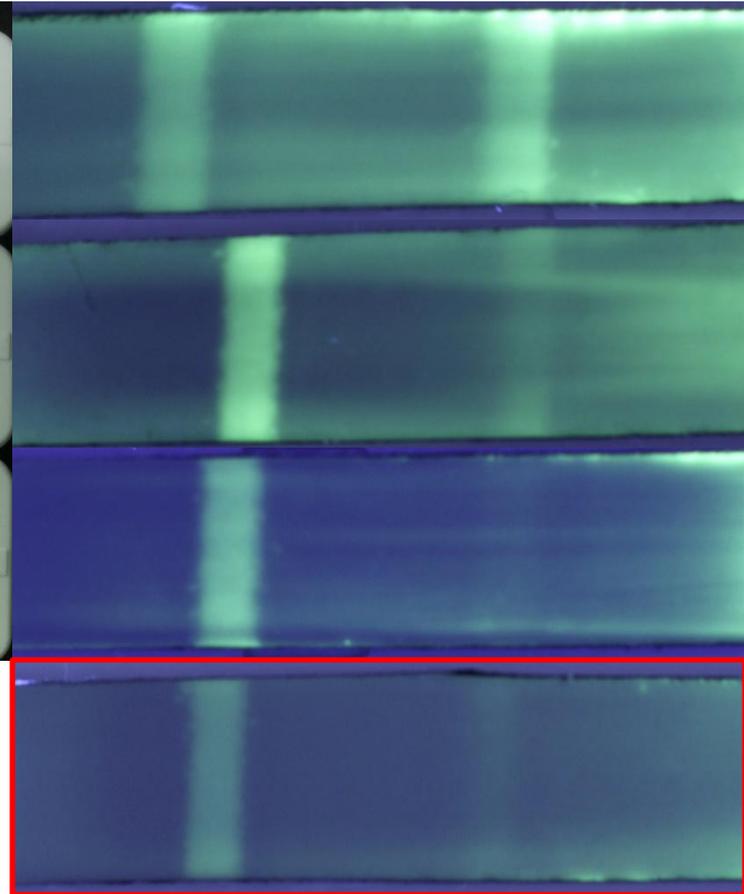
10³倍希釈

10⁴倍希釈



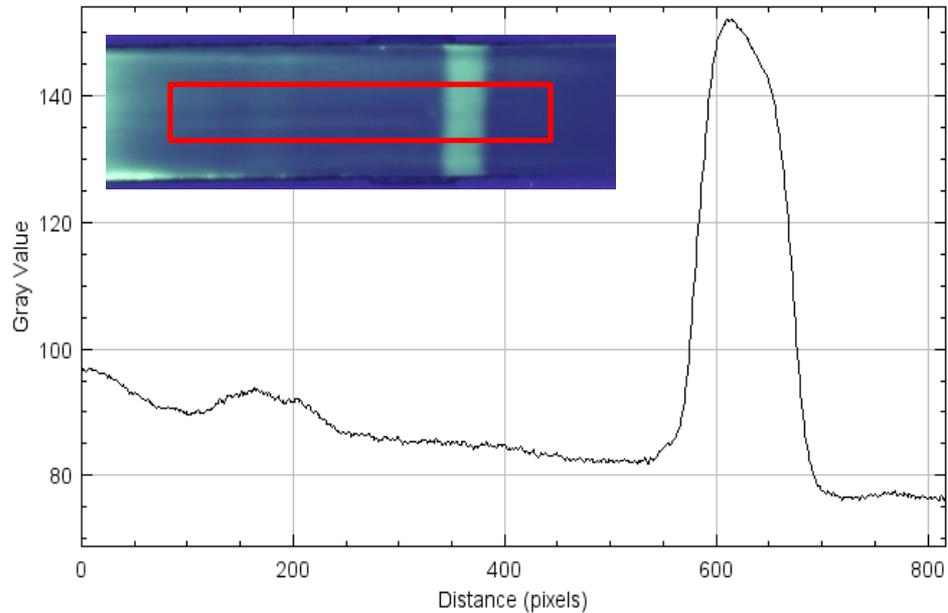
C

T

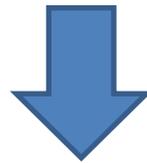


蛍光イムノクロマト法の実験結果

・ 10^4 倍希釈



インフルエンザウイルス検出試験において、同じ抗体・抗原を用いて金コロイドで作成したイムノクロマトキットより、**1,000倍の高感度化を達成**



JST START事業に申請・採択
事業プロモーター：日本医療機器開発機構

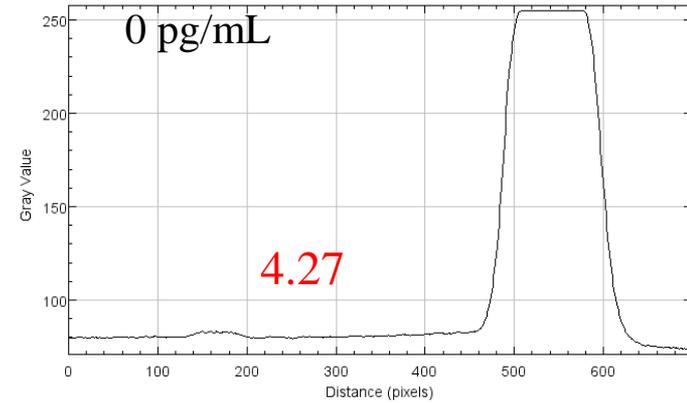
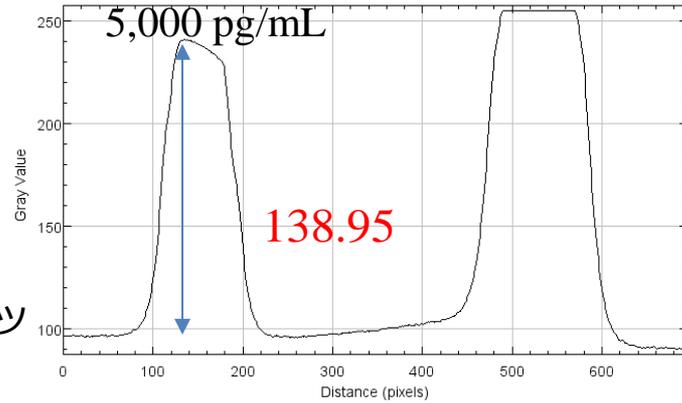
新型コロナウイルス抗原検出用イムノクロマトキットの製造にチャレンジ

新型コロナウイルス核タンパク質の検出

Image J

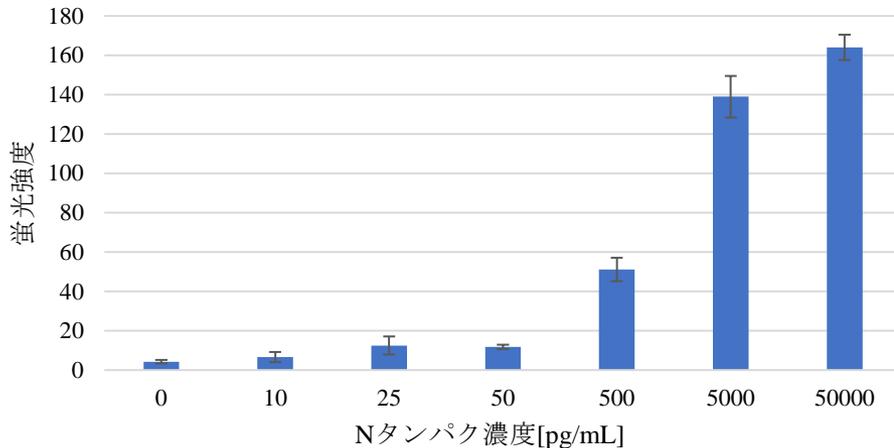


枠線内の蛍光強度をプロット



試行回数：n=3

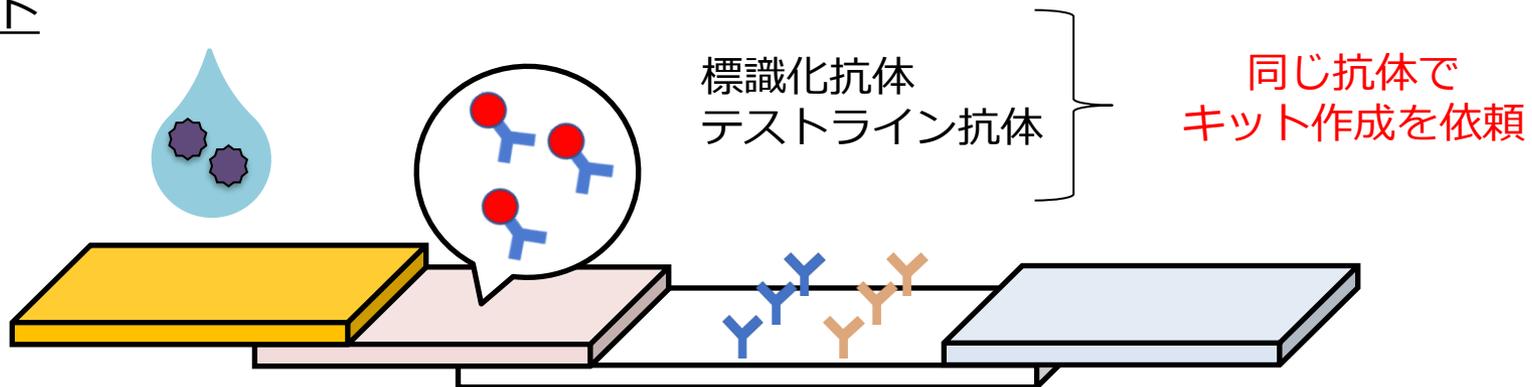
露出増大下でのNタンパク検出



抗原濃度 [pg/mL]	蛍光強度 (平均値)	$\pm 3\sigma$ (標準誤差)	判定結果
50,000	163.97	6.41	++
5,000	138.95	10.60	+
500	51.17	1.99	+
50	11.78	1.15	+
25	12.53	4.61	+
10	6.72	2.60	-
0	4.27	0.89	

金ナノ粒子を用いたNタンパクの検出

作製キット



抗原濃度
[pg/mL]

判定結果

T C

500,000

50,000

5,000

2,500

1,250



++

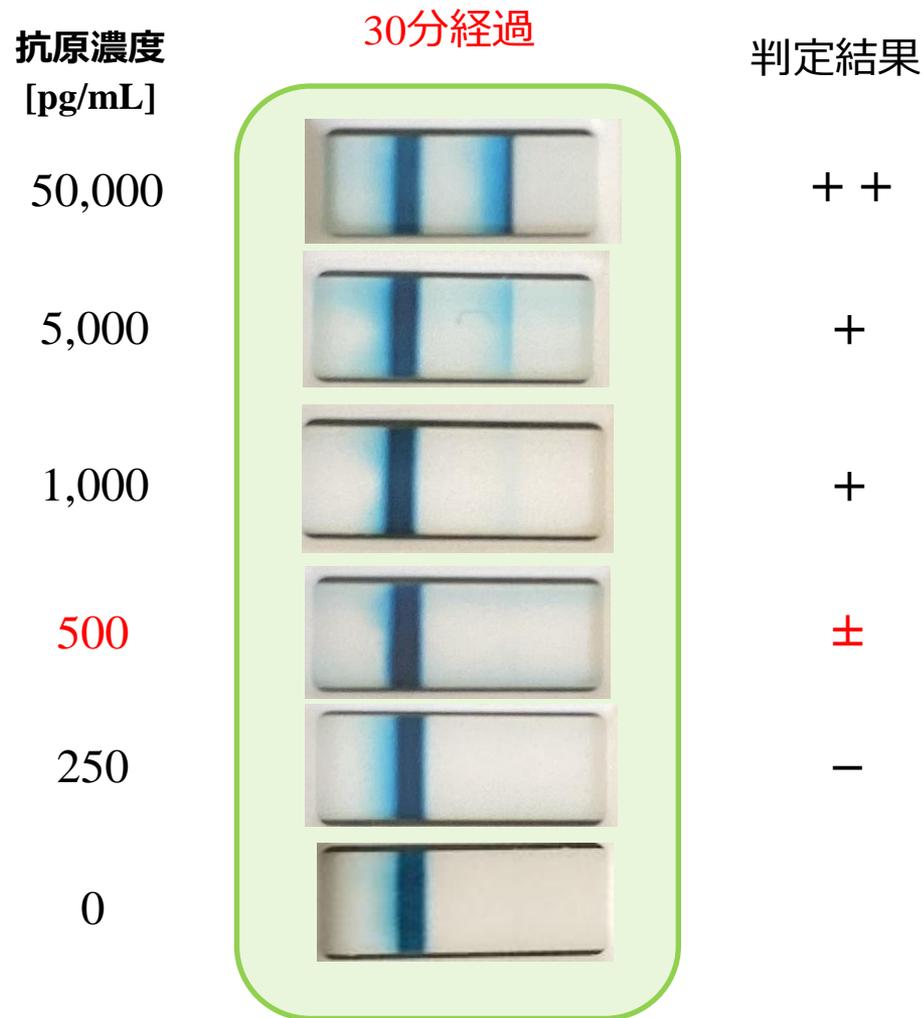
+

+

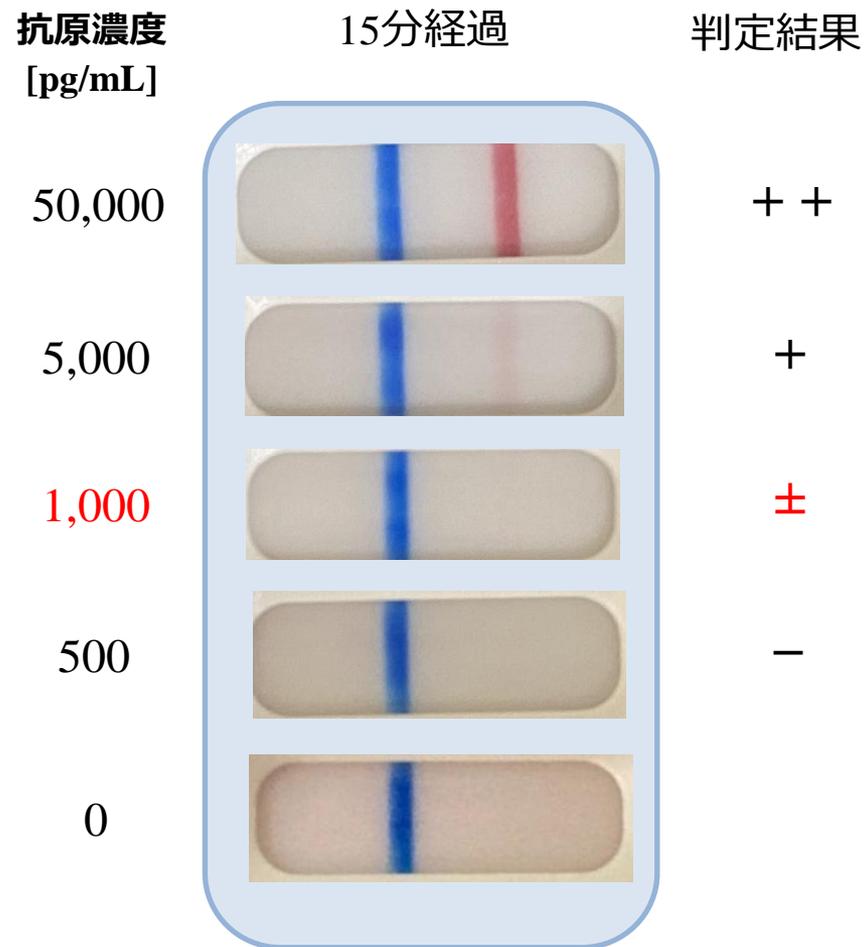
±

-

Nタンパクの検出B社製品との比較



Nタンパクの検出C社製品との比較



Nタンパクの検出結果の比較

	検出限界 [pg/mL]	検出時間 [min]
開発品	25	15
金ナノ粒子	2,500	15
B社製品	500	30
C社製品	1,000	15

金ナノ粒子と比べて**100倍**
B社製品と比べて**20倍**
C社製品と比べて**40倍**
高感度化を達成した

患者検体を用いたPCR結果との比較

		RT-PCR		計
		陽性	陰性	
蛍光免疫クロマト	陽性	28	1	29
	陰性	1	9	10
計		29	10	39

開発キット：陽性一致率 96.6%、陰性一致率 90%、全体一致率 **94.9%**

市販キットa: 全体一致率 **67.6%**

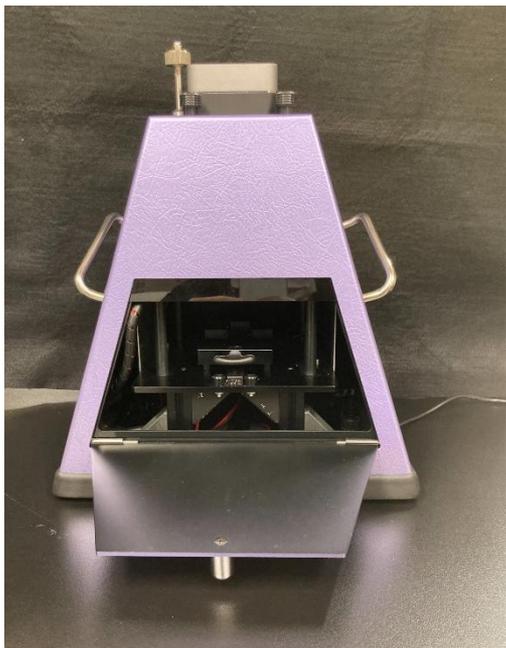
市販キットb: 全体一致率 **87.9%**

市販キットc: 全体一致率 **93.0%**

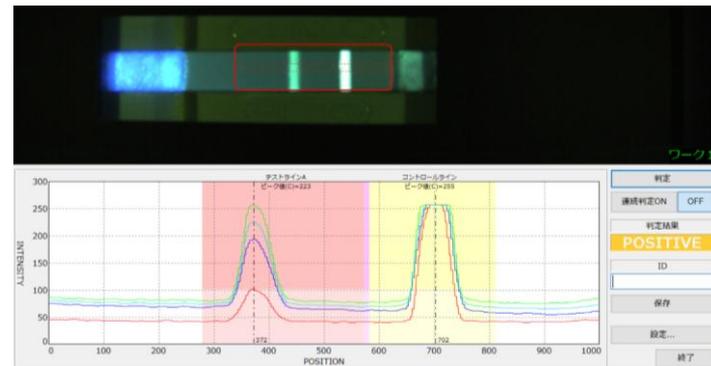
開発キットの全体一致率高い

定量用イムノクロマトリーダー

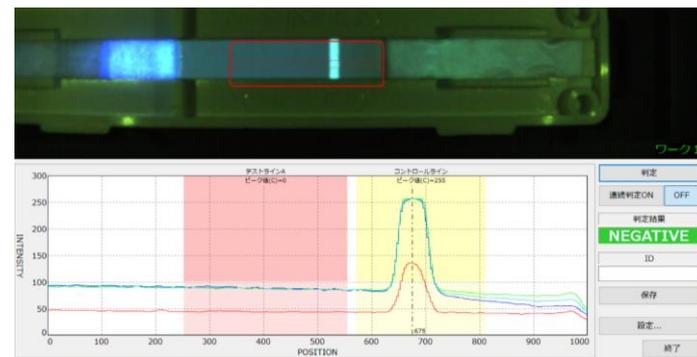
試作1号機



試作2号機（自動判定機能付）



陽性検体



陰性検体

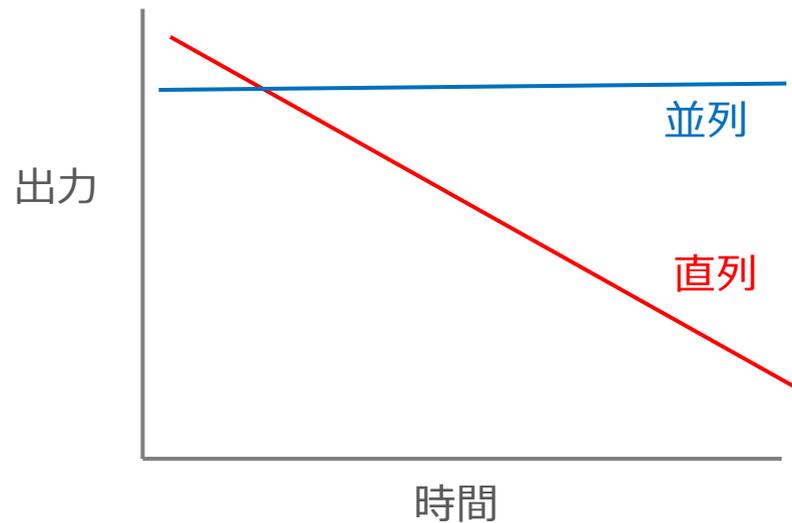
D社製 定性用UV照射装置の開発

試作1号機 (乾電池 : 直列)



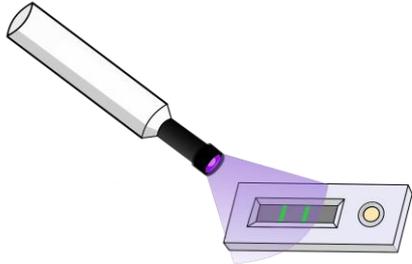
イムノクロマトキットを挿入

試作2号機 (乾電池 : 並列)



今後の展開

Phase 1 : 新型コロナウイルス感染症検査での上市



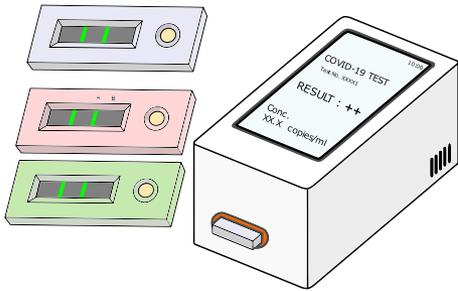
<新型コロナウイルス感染症キット>

- ・薬局で販売されるイムノクロマトキットと差別化したPCR並の超高感度かつ、迅速なPOCTを主にクリニック向けに上市。

<紫外線照射装置・目視判定>

- ・ポータブル、安価で導入ハードルが低い。
- ・トラブル時に交換対応可能な機器とし、起業初期においても安定的な検査運用を提供
- ・途上国向けの診断機器としても使用

Phase 2 : 主要な検査項目への展開と診断機器のアップデート



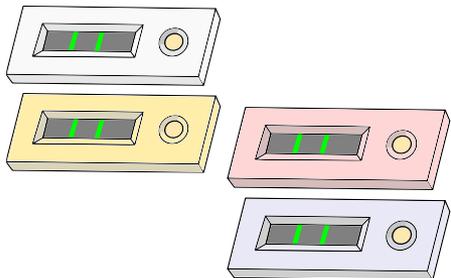
<市場の大きい検査ラインナップ拡大>

- ・新型コロナとの鑑別診断にインフルエンザ、夏に感染が多いアデノウイルス等の上市
- ・通年での収益性の確保と機器と合わせた囲い込み戦略により事業基盤を固める。

<移動式蛍光分析装置・自動判定>

- ・導入コストは高いが、機器の客観的判定により、検査の感度・特異度をより向上。
- ・バーコード読取等のユーザビリティを改善
- ・検査ラインナップの拡充に合わせ、診断機器による検査キットの囲い込みを狙う。

Phase 3 : 競合優位性の確保、海外展開



<独自項目による競合優位性の強化>

- ・高感度化、低価格化ニーズの高い項目の上市 (RSV、水痘帯状ヘルペス等)
- ・検査機関で実施される高感度が必要な検査のPOCT化 (コプロボルフィリン等)。

<海外展開向け項目>

- ・国内死亡例があるマダニ媒介SFTSウイルス検査の開発
- ・途上国に多いHIV、マラリア、デング熱、結核、シャーガス病等の検査を開発。
- ・媒介生物を対象としたアグリ領域の検査

市場調査（埼玉県内）

顧客ヒアリング対象：埼玉県医師会が購入したラテラルフローアッセイ数を調査（[2024.4.1~2024.8.31](#)）

新型コロナ	430,000キット
新型コロナ/インフルエンザ	60,000キット
マイコプラズマ肺炎	4,000キット
日和見感染症	1,500キット
プール熱	1,000キット

販売終了し、インフルとの同時検査に移行。

ネット販売もあり、実際の流通量は不明。

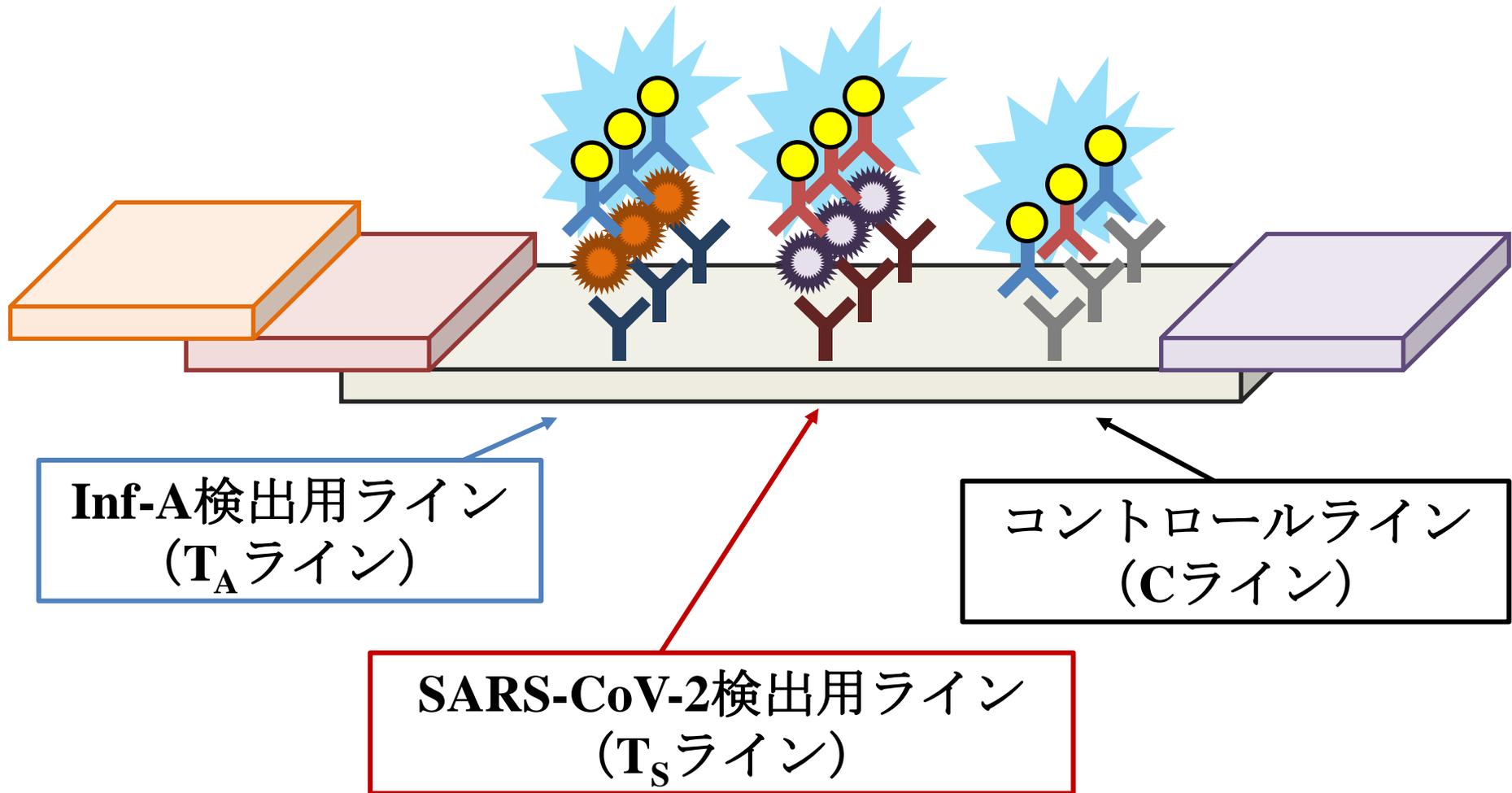
埼玉県の人口：7,400,000人に対して、全国の人口：125,000,000人（埼玉の17倍）

全国規模での予想流通量（埼玉県のデータを基に計算）

新型コロナ	7,310,000キット
新型コロナ/インフルエンザ	1,020,000キット
マイコプラズマ肺炎	68,000キット
日和見感染症	25,500キット
プール熱	17,000キット

インフルエンザAと新型コロナ同時検出

ストリップ上に複数のTラインを塗布したキットを作成



インフルエンザAと新型コロナ同時検出

Inf-A [ng/mL] /
SARS-CoV-2 [pg/mL]

500 / 0

0 / 5,000

500 / 5,000

50 / 500

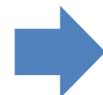
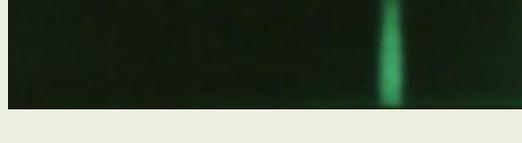
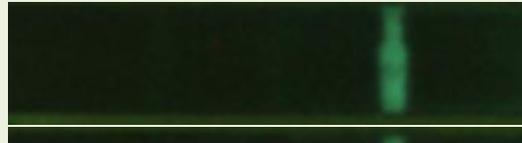
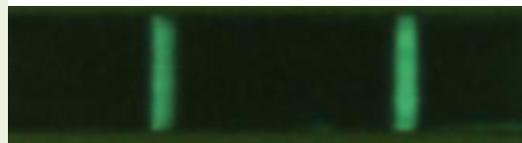
10 / 100

5 / 50

2.5 / 25

0
(blank)

T_A **T_S** C



Inf-A のみに感染



SARS-CoV-2 のみに感染



同時感染

特異的

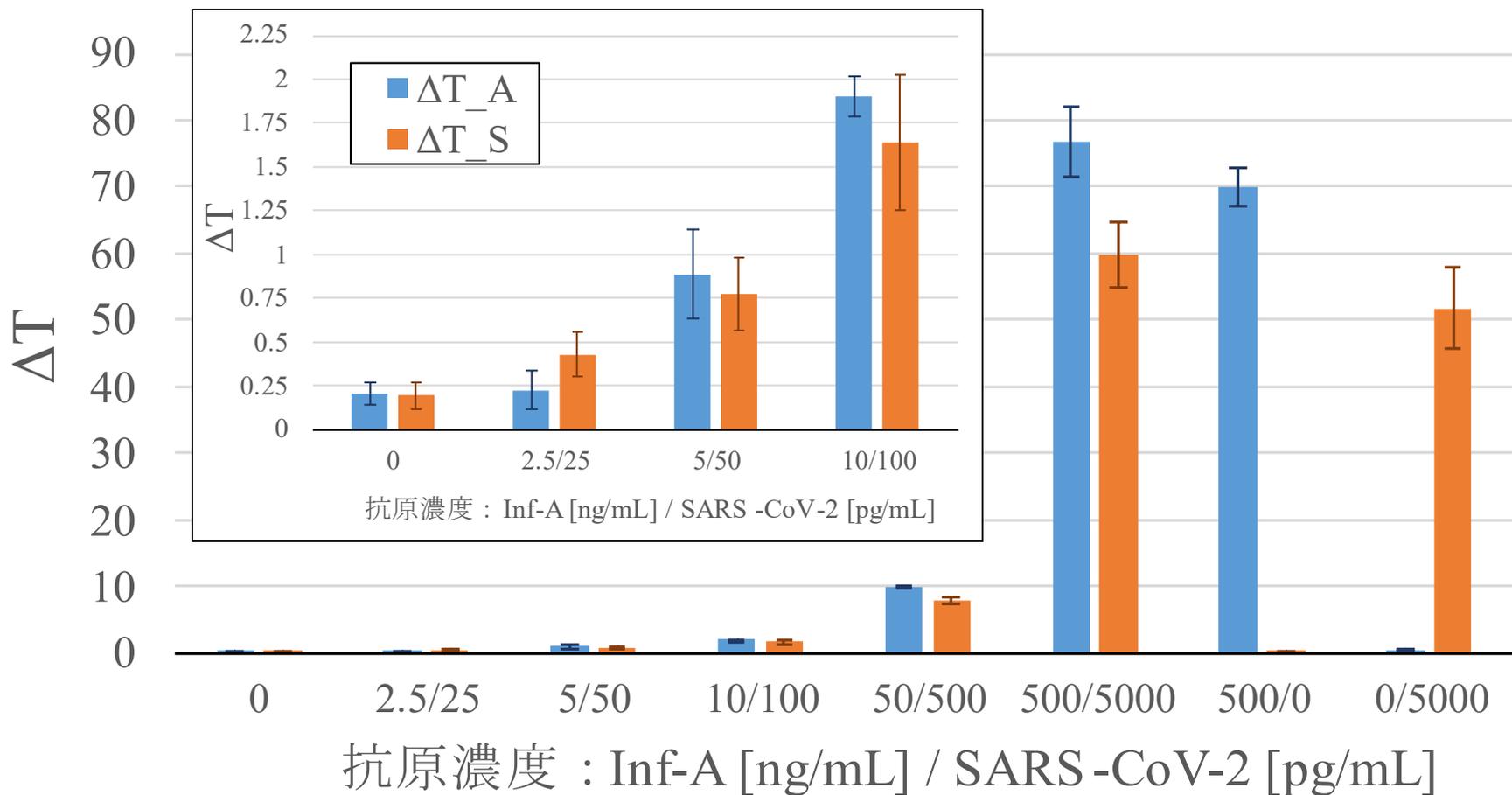
単一検出と同程度の感度

イムノクロマト法によるSARS-CoV-2
Nタンパクの検出感度比較 [4]

	検出限界 [pg/mL]	検出時間 [min]
開発品	25	15
金ナノ粒子	2,500	15
A社製キット	500	30
B社製キット	1,000	15

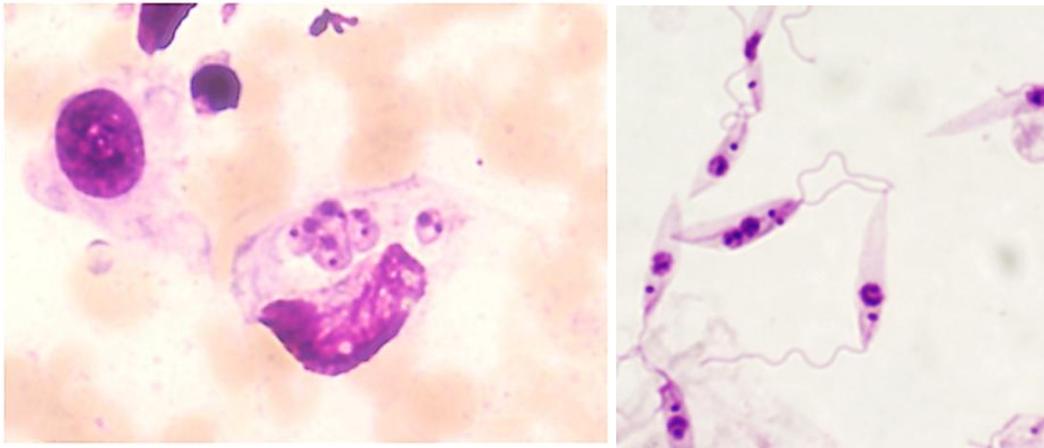


インフルエンザAと新型コロナ同時検出 - 画像解析 -



研究背景（リーシュマニア症）

- **リーシュマニア原虫**によって引き起こされる寄生虫症
- 吸血昆虫である**サシチョウバエ**が媒介



リーシュマニア原虫

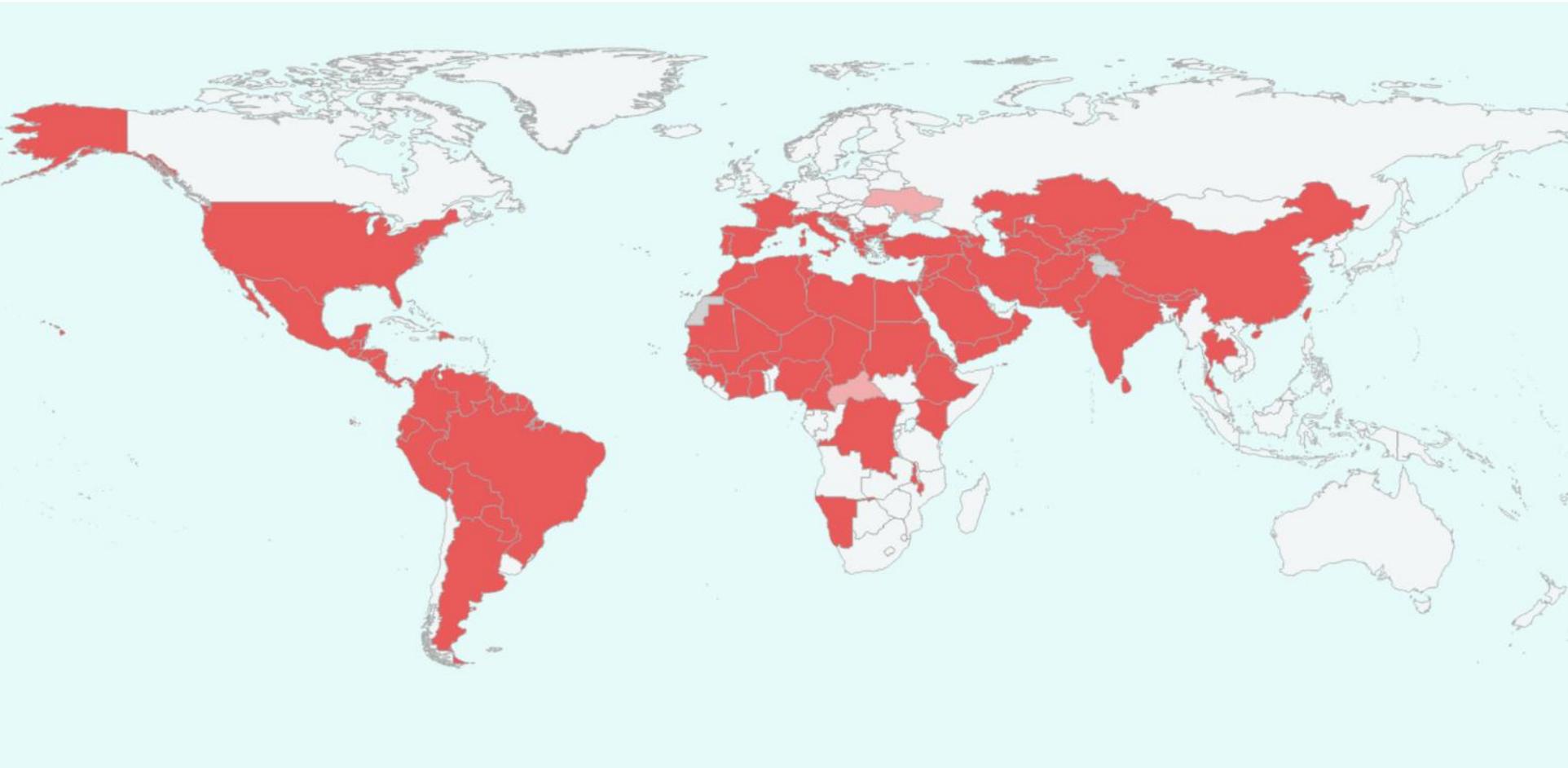


サシチョウバエ

リーシュマニア症の感染国

世界約100カ国で1,200万人以上の患者

WHO, 2020



研究背景（リーシュマニア症）

- ・ 症状は感染した原虫種によって異なる
- ・ 検査法や治療法は未発達
- ・ 顧みられない熱帯病（NTD：Neglected Tropical Diseases）の1つ



皮膚型



粘膜皮膚型



内臓型

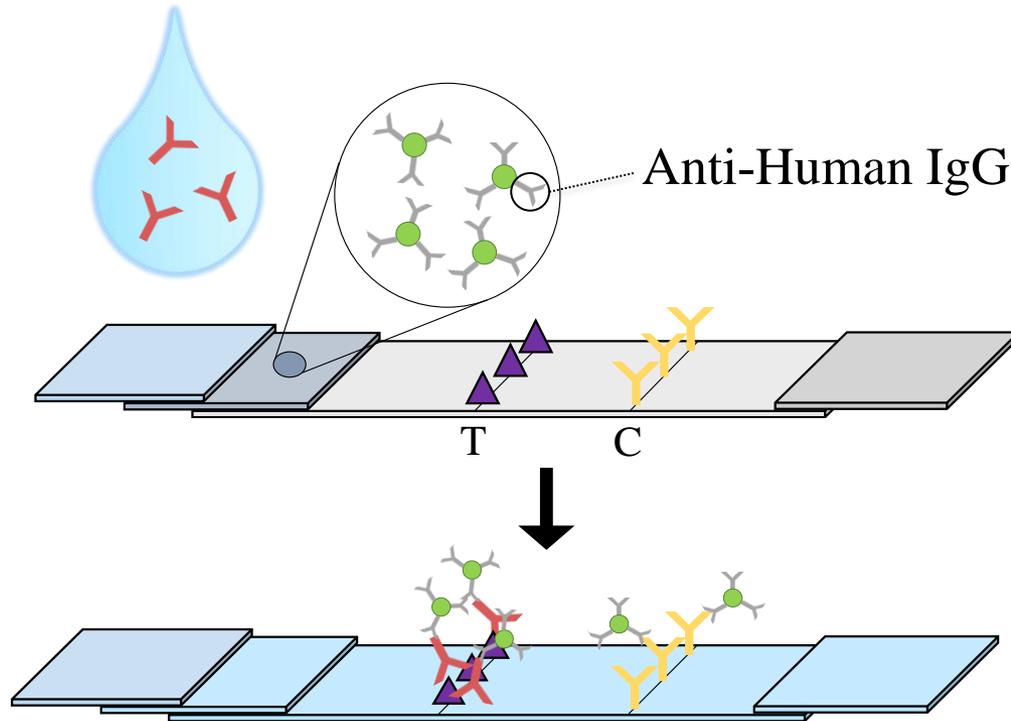
皮膚型は特に致死率が低いため臨床現場即時検査の精度が低いまま

↳ 蛍光イムノクロマト法による検査

リーシュマニア症の抗原検査キット構成

感染した原虫種や状況によっては体内の原虫は非常に少ない

↳ 感染した患者の体内に産出される**抗体**によって検査



Y : 患者血清抗体 (分析対象物) **Y** (green) : 標識抗体 **▲** : 抗原組み換えタンパク **Y** (yellow) : 抗体特異的抗体

サンプル提供：加藤智大先生（自治医科大学）、伊藤 誠先生（愛知医科大）

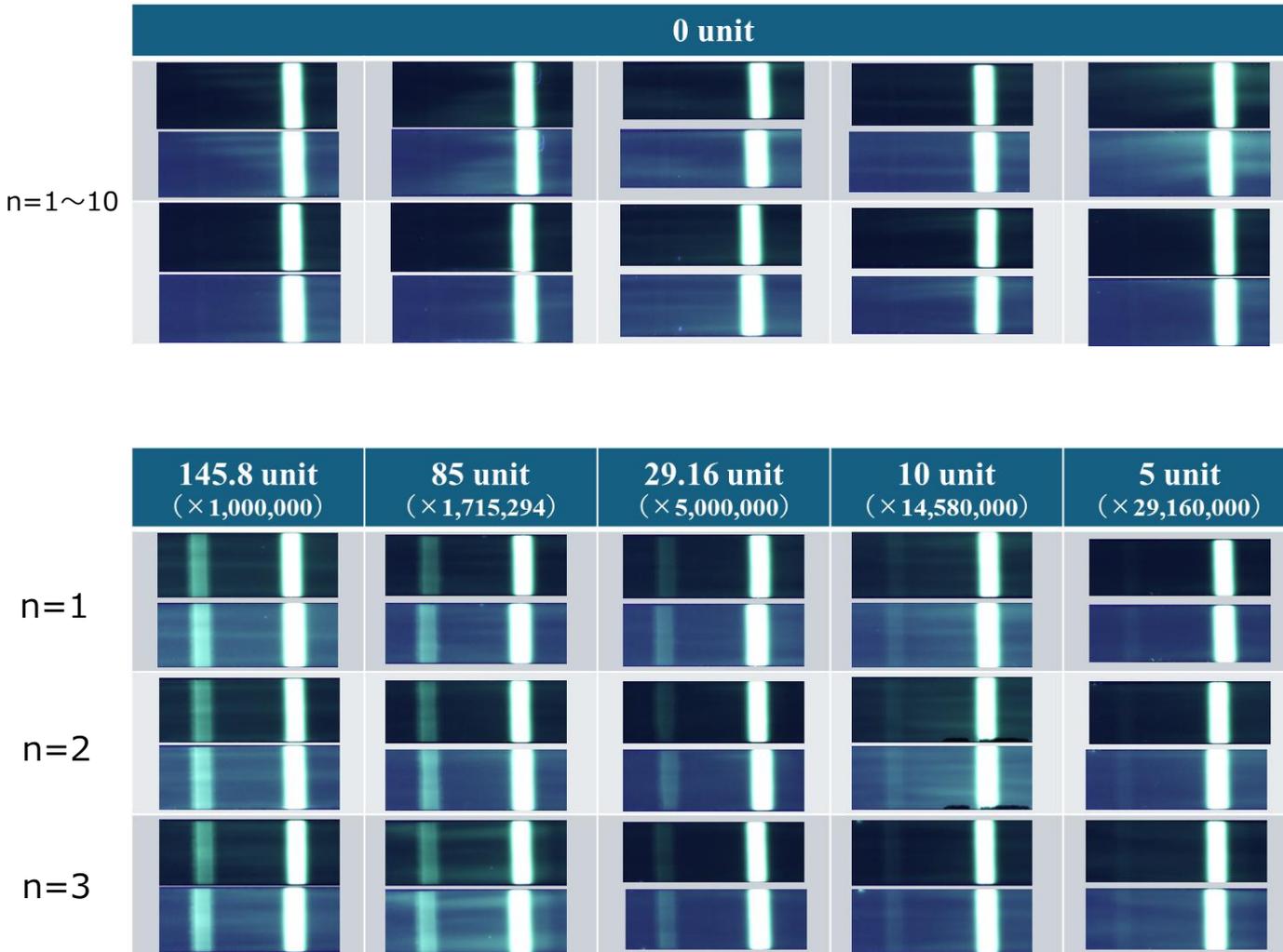
市販品（米国製）での抗体検出検査結果

検出濃度		陰性		×8,500 (17,153unit)		×85,000 (1,715unit)		×850,000 (171.5unit)		×1,700,000 (85.8unit)		×4,250,000 (34.3unit)		
キット														
Kalazar Detect		×		○		○		○		○		○		△
		×		○		○		○		○		△		×
		×		○		○		○		○		○		×
検出濃度		×8,500,000 (17.2unit)												
キット		×		×		×								

既存品では1,700,000倍希釈 (85.8unit)までは検出できた。

※検体20 μ Lに追加バッファー150 μ Lで展開させて検出

リーシュマニア症抗体検出



励起光の露出時間

上段 : 30 ms

下段 : 70 ms

※ハンディリーダーで見たときは70 msで撮影したものと近い

現状で最良条件下での実験結果

0 unit				
1.05604	1.13643	1.50517	1.34901	1.38382
1.41092	1.05704	1.42567	1.54488	1.39186

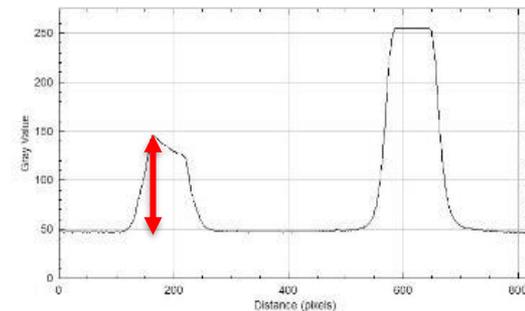
検出ライン : 1.833892 (検出ライン) = (0 unitでの平均値) + 3 × (0 unitでの標準偏差)

145.8 unit (×1,000,000)		85 unit (×1,715,294)		29.16 unit (×5,000,000)		10 unit (×14,580,000)		5 unit (×29,160,000)	
98.19262	○	54.06793	○	25.24249	○	8.66160	○	4.46810	○
94.94787	○	63.67219	○	22.11888	○	8.61733	○	5.26464	○
97.74748	○	67.26336	○	21.51485	○	9.49265	○	4.95350	○

5 unit (×29,160,000) まで検出

・n=3すべてで検出ラインの値を超えたときに検出できたとした

・市販キットは同条件で85 unitまでしか検出できず



謝辞

- ❖ 本開発の基礎部分は、JSPS科研費 基盤研究（C）の助成を受けたものです。
- ❖ 本研究の応用部分は、JST研究成果展開事業 大学発新産業創出プログラム（START）の助成を受けて行っています。「with/postコロナにおける社会変革への寄与が期待される研究開発課題への短期集中型」
- ❖ 蛍光微粒子の製造販売に向け、TOKYO戦略的イノベーション事業にてE社との共同研究を開始しています。
- ❖ 事業プロモーターである株式会社日本医療機器開発機構（現 サナメディ）の皆さまに厚く御礼申し上げます。
- ❖ サンプルをご提供くださいました、自治医科大学の加藤智大先生、愛知医科大学の伊藤 誠先生に感謝申し上げます。
- ❖ 研究室の学生諸君、パートの皆さんに感謝申し上げます。
- ❖ イノベーションセンターのスタッフの皆さんに感謝申し上げます。