

研究終了報告書

「超早期感染検査用マイクロデバイスシステムの開発」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：木村 雄亮

1. 研究のねらい

SARS-CoV-2 の感染拡大は、多くの国や地域で厳しいロックダウンや制限が導入されるなど社会活動が停滞するとともに、交通や物流、教育、医療などの分野でも深刻な問題が発生し、個人レベルの日常生活へ甚大な影響を与えた。このような新規感染症は今後も出現する可能性が高く、ポストコロナ社会における感染症を予防、制御し柔軟に対応するための社会基盤の確立は非常に重要である。感染拡大が予見された地域やコミュニティ社会の基盤維持のためには、未発症段階を含む感染患者の早期発見と隔離、及び感染者の発生地域の迅速特定と情報共有が極めて重要である。しかしそのためには、以下の 3 つの課題が存在する。

①少ない患者の検査機会 ②高コスト検査 ③検査施設の制限

①、②について、未発症段階で高い検査コストを支払い、検査を行う患者は少なく、早期発見に繋がりにくい。③について、現在、検査可能な施設が限られており、施設への患者殺到による感染拡大やオーバーフローによる検査の遅れ、それに伴う重篤化等の問題が生じている。更に患者の検出が遅れる程、患者の行動経路が複雑化し、感染経路の特定が困難となる。以上より、病院施設に限定されず持ち運び可能な、未発症段階から正確に感染の検出が可能なデバイスシステムの開発は必須である。

そこで本研究は、強靱社会実現に向けた、超早期段階での感染検出、及びパンデミックに柔軟に対応可能な予測モデル作成を可能とする、各家庭レベルで使用可能な感染検査用マイクロデバイスシステムの開発、及びそれを起点としたリアルタイム感染者データネットワーク構築を目的とした(図 1)。目的達成のため、本研究は以下の 3 点を達成目標とした。

- I. 各家庭で実行可能な、低侵襲かつ簡単で感染検査を可能とするマイクロデバイスの開発
- II. I で開発したデバイス上検査データをスマートフォンで解析できる、アプリケーション開発
- III. II で開発したアプリケーションにより解析された感染者データを統括、収集し、病院施設などの要求施設に適宜共有可能なネットワークシステムの構築



図 1 本提案研究のコンセプト

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、唾液中ウィルス遺伝子検出による、発症前を含む超早期段階での非侵襲な感染検査を、非医療従事者でも簡単かつ低コストで行えるポータブルデバイスの開発、及びそれを起点としたリアルタイム感染者データネットワーク構築を目的とし、研究を行った。

達成目標のうち、唾液中に含まれるウィルス遺伝子検出を、極めて単純な動作のみで実行可能なマイクロデバイスの開発に成功した。本デバイスは手のひらに収まる程度の大きさであり、唾液からのウィルス検出反応を、従来装置の 1/50 以下の試薬量で実行できる。更に本デバイスは水と試薬の添加、及び押し込み動作のみの単純操作で、SalivaDirect 法による唾液中ウィルス遺伝子の抽出(C. Vogels et.al., *protocols.io*, 2020)、及び LAMP 法による標的ウィルス遺伝子の増幅及び検出を、電気的制御を一切用いずに実行できる(Y. Kimura et.al., *Scientific Reports*, 2023)。

LAMP リアクタの各 well には、異なるウィルス種に対応したプライマを乾燥状態で貼り付ける事が可能である。これにより検査サンプルの添加操作のみで、最大 9 種類のウィルス感染検査を同時に施行できる。LAMP による増幅反応後、標的となるウィルスに感染していたサンプルは、励起光の照射により強い蛍光を発するため、サンプルの蛍光強度を目視、あるいはスマートフォンで観察することで、結果を即時確認できる。更に結果観察についても電気的制御を用いずに目視観察できるシステム開発にも成功した。これによりウィルス遺伝子の抽出、増幅、及び増幅結果の確認までの全反応を、電気的制御を用いずに実行できるため、従来装置では不可能であった、無電化地域へのウィルス早期診断技術の提供も可能である。

開発デバイスを用い、3種類のウィルスの特異的検出に成功した。この時のウィルス濃度は 100 copies/ μ L であり、これは SARS-CoV-2 患者の発症時の唾液中ウィルス濃度にあたる(Jialou Zu et.al., *J Infect.* 2020)。以上より、発症前を含むウィルス感染者の検出が可能であることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ A「唾液からのウィルス遺伝子検出用マイクロデバイスの開発」

図 2 に開発したデバイスを示す。本デバイスは試薬などの添加操作、及びデバイスの押込動作のみの単純操作で、ウィルス遺伝子発現解析による早期感染症検査を、少量かつ複数ウィルス種同時に実行できる。

本デバイスは主に、造形分解能 50 μ m 以下の 3 次元微細加工を可能とするマイクロ光造形法を用いて作製した。また、患者サンプルを添加し、実際に反応を行うリアクタについては、厚さ 100 μ m のポリプロピレン (PP) 製フィルムを、マイクロ光造形法で作製した鋳型に挟み込み、120 $^{\circ}$ C で加熱を行う事で鋳型に沿って熱変形させる「3D-FRP」手法 (Y. Kimura et.al., *Scientific Reports*, 2018) を用いて作製した。これらのパーツは低コストで作製でき、使い捨てが

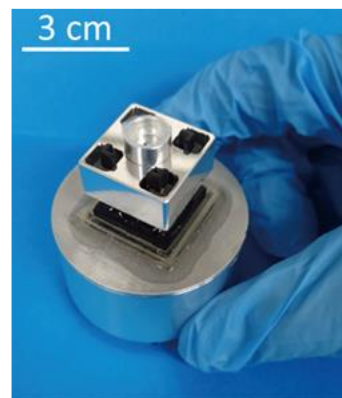


図 2 早期ウィルス感染検査用マイクロデバイス

可能である。そのため特に、患者サンプルと直接接触するパーツにおけるコンタミネーションを防止できる。LAMP 用リアクタには、サンプルを添加し、検出を行うwellが9つ搭載されている。このwellに、標的の異なるウイルス検出用プライマを乾燥状態で貼り付けることで、サンプルの添加のみで、最大9種類のウイルス感染検査が可能である。

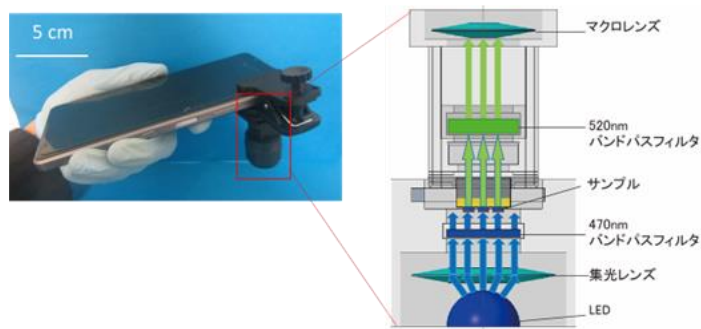


図3 観察システム

本デバイスは、研究代表者が開発した唾液中ウイルス検出手法である、「NEC-SD-LAMP」を実行する(特開 2022-174674)。本手法は、SalivaDirect 法による唾液中ウイルス遺伝子の抽出、及びLAMP 法によるウイルス遺伝子の増幅及び検出を、電気的制御を一切用いずに実行できる。

まず唾液サンプルとProteinase K、及びサンプル蒸発防止のミネラルオイルを添加することで、SalivaDirect 法による唾液中のウイルス遺伝子の抽出を行う。その後、発熱剤と水を添加することで、発熱剤による発熱反応が発生する。本発熱反応により、Proteinase K が失活し、SalivaDirect 反応を停止させると同時に、後続のLAMP 反応に使用するパルミチン酸を融解させる。本反応後、反応後サンプルにLAMP 試薬を添加し、LAMP 法を実行する。LAMP 法はサンプルを60-65℃の一定温度で、30分以上加熱することにより標的遺伝子を増幅、及び検出する手法であるが、本デバイスではその反応を、融解したパルミチン酸を用いて行う。デバイス内のパルミチン酸が全て液体から固体に遷移するまでの間、その温度はパルミチン酸の融点である62.9℃に維持される。この遷移熱を応用することで、LAMP 法を実行する。開発デバイスはこの一連の反応について、500 nL/wellでの少量試薬で、最大9種類のウイルス種の同時施行が可能である。

反応後の観察システムを、図3に示す。反応後デバイスに光学系パーツを設置し、デバイス底面から励起光を照射する事で、サンプルより発せられる蛍光を目視、あるいはスマートフォンで観察することで、結果の即時観察が可能である。以上より、唾液からの非侵襲なウイルス感染検査を、単純操作かつ少量試薬による低コストで、複数ウイルス種同時に即時検出可能なマイクロデバイスの開発に成功した。

研究テーマB「開発デバイスの機能検証」

開発デバイスを用い、唾液中に混入したウイルスDNAの検出を行った結果を図4に示す。図4は、健常者の唾液に、終濃度100 copies/ μ Lで、それぞれ異なる種類のウイルスDNAを添加したサンプルを用意し、開発デバイス内で検出反応を実行し、その結果をスマートフォン上カメラで撮影したものである。図4より、標的とな

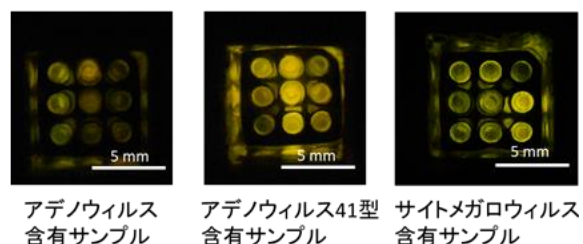
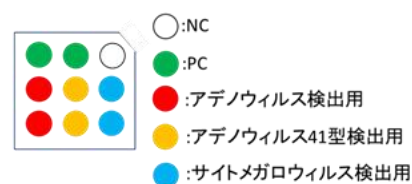


図4 唾液中ウイルスDNA 検出反応結果

るウイルス DNA を含むサンプルを添加した時のみ、そのウイルスの検出用リアクタ内に含まれるサンプルの蛍光強度が増加したことから、3 種類のウイルス種に対し、特異的な検出が可能であることが示唆された。また使用したウイルス濃度は、SARS-CoV-2 患者の発症時の唾液中ウイルス濃度にあたる (Jialou Zu et.al., *J Infect.* 2020)。以上より、発症前を含むウイルス感染者の早期検出が可能な検査デバイスの開発に成功した。

研究テーマ C「無電化環境における反応後解析システムの開発」

本デバイスの最大の特長として、電氣的制御を一切使用せず、核酸解析手法による唾液からのウイルス早期感染診断が可能となる点がある。そこで観察系についても、電氣的制御を用いずに結果の確認が可能となるシステム開発を行った。開発システムを用い、実際に反応後サンプルの観察を行ったところ、LAMP による増幅反応が生じた well の蛍光強度の増加を明確に観察することができた。以上より、SalivaDirect 法による唾液からのウイルス遺伝子の抽出、LAMP 法による抽出遺伝子の増幅、及び結果の観察に至る全てを、無電化環境で実施可能な画期的なシステムの開発に成功した。開発デバイスの実用化により、従来では困難であった、無電化地域を含む発展途上国や災害による大規模停電が発生している地域にも、非常に特異性の高い早期感染症検査技術を届ける事が可能となる。

研究テーマ D「反応解析用アプリケーション、及び解析データ統括用システムの開発」

反応解析用アプリケーション、解析データ統括用システムについては、まだ開発途中である。引き続き開発に従事し、加速フェーズ中の達成を目指す。

3. 今後の展開

本研究期間内において、唾液を用いた非侵襲なウイルス早期感染症診断を、非常に単純な操作のみで少量試薬かつ複数ウイルス種同時に実行できるマイクロデバイスの基本原理の開発に成功した。また開発デバイスは電氣的制御を一切使用せず、反応から結果観察までの全てを実行できることから、従来では不可能であった、無電化地域への早期段階からの特異的な感染症検査技術の提供が可能となる。更に、本反応は全て真空断熱容器内で反応を行うため、周辺環境に依存する事なく、熱帯などの高温地域においても安定した反応実行が可能な点も利点として挙げられる (Y. Kimura et.al., *Scientific Reports*, 2023)。

しかし実用化のためには、①アプリケーション及び統括システムの開発、②精製部の完全ディスプレイポータブル化や光学系システムの一体化など、実用化に向けたデバイス機能の修正、③実際の患者の唾液サンプルを用いた、*in vivo* 検証実験など、未だ改善を行わなければならない箇所が存在する。これらについて、ACT-X 研究終了後 1 年以内の達成を目標とする。

これらの達成により、実用的かつ低コスト作製が可能な早期感染症検査用マイクロデバイスの開発が可能となる。開発デバイス、及び出願済のウイルス感染検出手法に関する特許 (特開 2022-174674) を基に、A-STEP などの社会実装支援制度への申請を通じ、ACT-X 研究期間終了後 5 年を目処にデバイス単体での実用化を目指す。

4. 自己評価

研究目的の達成状況

達成目標のうち、研究内容の大半を占める「Ⅰ. 各家庭で実行可能な、低侵襲かつ簡単で感染検査を可能とするマイクロデバイスの開発」については、本内容を達成するマイクロデバイスのプロトタイプは完了している。上記のように実用化のための課題は残っているが、駆動原理の開発、及び目標とする検出感度、検出特異性を得られたことから、目標を達成できたと考える。

その一方で、研究代表者の研究期間中に発生した異動に伴う研究の遅れや、未熟なソフトウェア開発能力が原因となり、「Ⅱ. Ⅰで開発したデバイス上検査データをスマートフォンで解析できる、アプリケーション開発」及び「Ⅲ. Ⅱで開発したアプリケーションにより解析された感染者データを統括、収集し、病院施設などの要求施設に適宜共有可能なネットワークシステムの構築」については未達成である。代表者はこれまでソフトウェア開発の経験がなかったため、具体的なタイムスケジュールを意識できず、想定以上に時間がかかってしまっており、反省すべき点である。本内容については、領域内で確立できた研究者間のネットワークを通じ、引き続き開発を進めたい。

以上より、本研究の達成状況は、70-80%と評価する。

研究の進め方

研究代表者の異動に伴い、新たな3Dプリンタ購入の必要性など、当初の計画には無い出費が発生したが、物品購入費内容の見直しなどにより柔軟に対応し、増額措置を講じることなく、当初の研究費内で研究を実施することができた。それにより新たな所属機関でも問題無く研究を遂行できる環境を整えることができたこと、及びその他の研究費に関しては、計画通りに進めることができたことから、適切に研究費を執行できたと考える。

研究実施体制については、計画当初から代表者1人で遂行することを想定しており、予定通りに実施することができた。しかし異動に伴い、ACT-X以外の業務や共同研究数が大幅に増加し、研究進捗に遅れが出てしまった。所属研究機関では学生の受入がランダムであり、本研究のRAとして雇用するのは困難であったが、ACT-X以外の補助業務などについて、研究室内の研究補助員に依頼するなどし、代表者は開発に注力するなどの対応を取るべきであったと反省する。

研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

現在、開発デバイスの実用化のための共同研究計画などが進められており、本研究成果の更なる発展、展開が見込まれている。開発デバイスが実用化された場合、従来の抗原抗体反応型の感染検査キットよりも、更に精度の高い検査技術を安価で提供できるだけでなく、従来では困難であった、無電化地域などへの検査技術提供、及びそれに伴う現地の感染者データの取得が可能となる。これより感染症を克服した強靱化社会の実現だけでなく、研究分野へ応用可能な、新たなデータ取得なども期待され、大きな波及効果が期待できると考えられる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Yusuke Kimura, Masashi Ikeuchi, Development of non-electrically controlled SalivaDirect LAMP (NEC-SD-LAMP), a new nonelectrical infectious disease testing method, *Scientific Reports*, 2023, 13, 11791,

本論文は、開発デバイスで使用する、電気的な制御系を用いずに唾液中のウイルス遺伝子を増幅することで感染症を検出できる新手法「NEC-SD-LAMP」の原理開発に関するものである。本手法は、装置に水を加えるだけで、唾液からの SalivaDirect 法によるウイルス DNA の抽出、抽出した DNA の LAMP 法による増幅が可能であり、増幅結果を目視観察することで、感染の即時確認が可能である。本手法により複数のウイルス DNA の特異的検出が可能であった。本手法は現在、特許出願中である(特開 2022-174674)。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 1 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

招待講演

1. 木村雄亮、生田幸士、井上佳則、池内真志, ウイルス感染症早期発見を可能とする ポータブルデバイスの開発, 2022 年, 日本機械学会 第 34 回バイオエンジニアリング講演会

学会発表

1. 木村雄亮、益谷美都子、池内真志, 新型コロナウイルス感染早期診断用ポータブルデバイスの実用化検証, 2022 年, 令和 4 年度生体医歯工学共同研究拠点成果報告会
 2. Yusuke Kimura, Mitsuko Masutani, Masashi Ikeuchi, Development of the portable device for early detection of viral infection, 2022, The 7th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2022)
 3. 木村 雄亮、池内 真志, 無電化地域でのウイルス遺伝子発現解析を可能とする「NEC-SD-LAMP ポータブルデバイス」の開発, 2021 年, 2021 年度 IBB 成果発表会
 4. 木村 雄亮、池内 真志, 新手法「NEC-SD-LAMP」による、無電化環境でのウイルス遺伝子発現解析の実施, 2021 年, 第 44 回日本分子生物学会年会
- (他 1 件)