

平成 27 年度  
革新的ものづくり産業創出連携促進事業  
戦略的基盤技術高度化支援事業

「診断市場の POCT 化に資する新規蛍光剤を用いた高感度 POCT 装置の開発」

研究開発成果等報告書

平成 28 年 11 月

担当局 近畿経済産業局  
補助事業者 トラストメディカル株式会社

## 目 次

第1章 研究開発の概要	
1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標	4
(1) 研究開発の背景	4
(2) 研究目的及び目標	6
1-2 研究体制	7
(1) 研究組織・管理体制	7
(2) 研究者氏名	7
1-3 成果概要	7
(1) 高感度な POCT 装置を開発する(サブテーマ1)	7
(2) 血中ホルモン診断試薬を開発する(サブテーマ2)	8
1-4 当該研究開発の連絡窓口	8
第2章 本論 研究内容及び成果	9
2-1 高感度な POCT 装置の開発(サブテーマ1)	9
【平成 26 年度】	9
i) 反応容器の設計	9
ii) 反応容器金型の製作	10
iii) 高感度 POCT 装置試作品の製作	11
【平成 27 年度】	16
i) 反応容器の改良	16
ii) 高感度 POCT 装置量産指向品の試作	17
【平成 28 年度(事業期間後)】	20
i) 高感度 POCT 後継機の試作	20
2-2 血中ホルモン診断試薬を開発する(サブテーマ2)	22
i) コルチゾールの測定	22
i-1) 概要	22
i-2) 測定プロトコル	22
i-3) 測定結果	23
ii) アルドステロンの測定	23
ii-1) 概要	23
ii-2) ELISA 法によるアルドステロン測定	23
ii-2-1) サンプルと1次抗体との混合時間	24
ii-2-2) 1次抗体の濃度	25
ii-2-3) HRP 標識抗体の濃度	25
ii-2-4) マイクロウエルへの抗原固定量	26
ii-2-5) 作製した ELISA のパフォーマンス	26
ii-3) 目標アッセイ系でのアルドステロン測定	27
ii-4) 新規抗体作成	27
ii-4-1) 作成方式	28
ii-4-2) 作成結果	28
iii) レニンの測定	29

iii-1) 概要	29
iii-2) 目標アッセイ系でのレニン測定	29
iii-2-1) プロトコル	29
iii-2-2) 測定結果	30
iii-3) レニン抗体の作成	30
iii-3-1) 作成方式	30
iii-3-2) 作成結果	30
iii-4) 新抗体による目標アッセイ系でのレニン測定	32
iii-4-1) 抗体組み合わせの検討	32
iii-4-2) 新抗体によるレニン測定結果	32
IV) 高感度 POCT 装置分注閉塞機の試作	32
V) 高感度 POCT 診断薬カートナーの試作	35
最終章 全体総括	34
1. 複数年の研究開発成果	34
(1) 高感度な POCT 装置を開発する (サブテーマ1)	34
(2) 血中ホルモン診断試薬を開発する (サブテーマ2)	34
i) サブテーマ2 初年度達成目標と結果	34
2. 研究開発後の課題・事業化展開	35
(1) 研究開発後の課題	35
(2) 事業化展開	35
1) 想定している具体的なユーザー、マーケット及び市場規模等	35
2) 事業化見込み (目標となる時期・売上規模)	35
3) 事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール	36

## 第1章 研究開発の概要

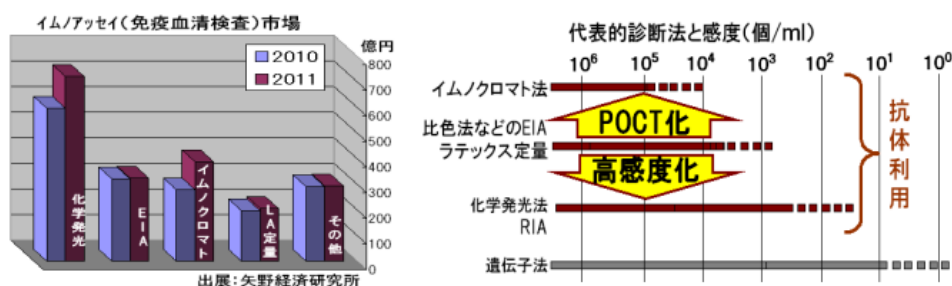
### 1-1 研究開発の背景・研究目的及び目標

#### (1) 研究開発の背景

〔日本の診断市場の2大ニーズ〕

日本の成長戦略の要はアベノミクス第三の矢であり中でも特に医療分野は重要である。日本の医療には今二つの大きな潮流がある。

下の左図はイムノアッセイ（免疫学的検査）の2011年度の伸びを示し、右図は感染症の検出感度のイメージを示している。日本の体外診断市場の特徴は検体検査の大半を四大検査センターが行っている事である。しかし海外では検査センター制度そのものが無く、日本よりはるかにPOCT化が進んでいる。ここからその2大潮流が読み取れる。



#### 診断市場の2大ニーズ 1. 検査センター検査から臨床現場検査化。即ちPOCT化。 2. 高感度化。

高感度POCT機器が開発されれば病院や医療現場での検査POCT化が進み、体外診断市場を改革し海外への販売も大いに見込める。もちろん本事業の開発は、テーマを絞って行う。

具体的には、高感度POCT機開発は、現場での診断が困難な原発性アルドステロン症（PA）に関する3ホルモン（アルドステロン・レニン・コルチゾール）を対象に実施する。

〔PAとは〕

PAとは、一般にはなじみが薄いですが世界中の学会が注目している高血圧である。副腎の良性腫瘍が原因で、高血圧患者の1割を占める。脳出血、脳梗塞、心筋梗塞、心肥大、不整脈、腎不全等のリスクが通常高血圧の4倍の高血圧である。これらの病気になった高血圧患者の4割はPAが原因だという事を意味する。

〔PAへの病院の取組みを妨害するボトルネック〕

PAは、非常に危険な高血圧で手術すれば完治するにもかかわらず世界的にも治療に取り組んでいない。このため世界の内分泌学会や高血圧学会ではPAへの取組みを行うようガイドラインが2008年から順次世界に発せられている。

取組病院が少ない原因は、診断から治療までの間に〔現場で測れない〕事が原因の大きなボトルネックがあって確実な治療が行えないからである。具体的には、PAの治療として片側副腎を摘出するので、病巣がどちらの副腎にあるかを判定することが重要で、この作業をAVSという。AVSはカテーテルで副腎静脈から血液サンプルを採るが、カテーテル先端が副腎静脈に適切に入っているかどうかを、その場で判定する診断法がなかった。そのためAVSそのものの成功率が60%程度にしかならなかった。このまま手術すれば病気でない副腎を取ってしまう危険があることから、PAの診断をしても意味が無いという問題があった。

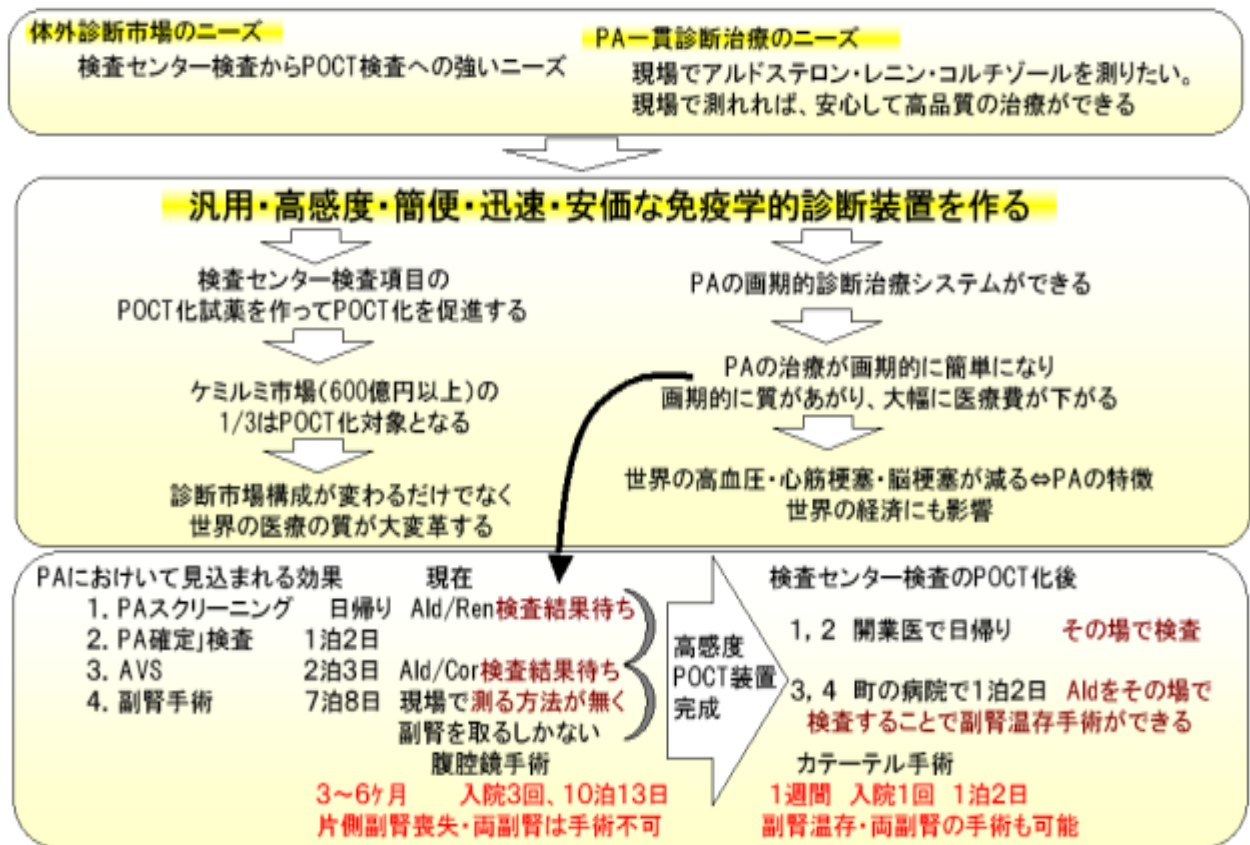
〔ボトルネック解消技術の完成〕

北陸先端大学院大学・金沢大学・トラストメディカルの3者は、カテーテルが副腎静脈に正しくセットされているかどうかをベッドサイドで判定できるコルチゾールイムノクロマトを開発した。金沢大学医学部で300例以上の臨床テストを実施しAVS失敗ゼロを達成した。またNEDOの（平成24年度ベンチャー企業への実用化助成事業：副腎静脈サンプリングの成功率を高めるデバイスとリーダーの開発）によりリーダーも開発し、PAの診断から治療までの一貫手順のボトルネックを事実上解消させることに成功した。現在日本で特許が成立し、英国・米国・豪州・台湾などにサンプルを提供している。

〔世界でPAへの取り組みが急増する〕

PA治療のボトルネックの解消技術の世界に広めることで、世界のPA患者並びに医師が安心してPA治療に取り組める環境ができる。今後PA治療への取り組みは世界的に一気に進む事が期待される。また日本では今年AVSに健康保険が適用されたので採算上の病院の負担が無くなった。

以上より、本事業の目指すものをまとめとして図示する。



上図に示したように、本開発はPAだけを目的に行うものではないが、PAだけに限っても上図下部に記したように極めて大きな改善ができる。

- 入院が3回で10泊13日⇒1回1泊2日。
- 片側病変しか治療できない⇒両側副腎も治療可能。
- 手術で副腎を失う⇒副腎温存可能。

しかし診断治療として定着するまでには、本開発後もかなりの年月を要する。

PA以外への展開は、本事業完了後PAと平行して開発を進める。

## (2) 研究目的及び目標

本開発事業では、川下産業である体外診断市場にむけて、次のものを開発する。

### 〔開発アイテム〕

#### 開発アイテム1 (サブテーマ1)

目的：検査センター検査を医療現場で簡単・安価・迅速に検査出来るようにするため、高感度な POCT 装置を開発し、体外診断市場の POCT 化を助ける汎用機器を提供する。

方式：ストークスシフトが市販蛍光色素と格段に大きい新規蛍光色素を用いた蛍光標識方式の免疫学的診断装置である。

#### 開発アイテム2 (サブテーマ2)

目的：PA 一貫治療にて必要となる血中ホルモン診断試薬を開発し、高感度 POCT 装置の感度検証を行う。

項目：PA 一貫治療にて必要となる血中ホルモンの診断試薬を開発する。

### 〔達成目標〕

#### 開発アイテム1 (サブテーマ1) 汎用高感度蛍光免疫 POCT 診断装置

##### H26 年度目標

1. 高感度 POCT 装置の測定可能な試作品ができること。
2. 開発アイテム3種のうち1つについて1 ng/ml を測定できること。

##### H27 年度目標

- ・高感度 POCT 装置の一体型試作機的设计・試作を行う。

#### 開発アイテム2 (サブテーマ2) PA 関連3ホルモンの診断薬を開発する

##### H26 年度目標

1. 3種のアッセイ系の反応が確認されること。
2. 1種について1 ng/ml を達成していること。

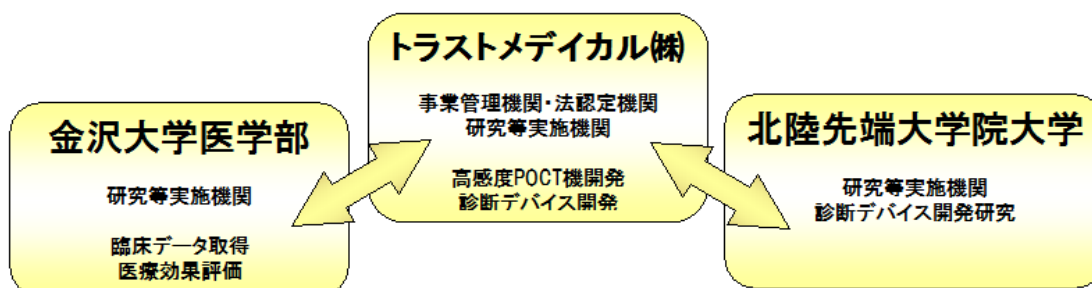
##### H27 年度目標

- ・アルドステロン・レニン・コルチゾールの3種のアッセイ系診断試薬を開発することにより、アルドステロン300pg/ml、レニン40pg/ml、コルチゾール600ng/mlの測定感度を達成する。

## 1-2 研究体制

### (1) 研究組織・管理体制

下に示す分担で開発に取り組む。



### (2) 研究者氏名

(フリガナ) 研究員氏名	所属	研究分担
(総括研究代表者) (ヨネダ タカシ) 米田 隆	国立大学法人金沢大学	研究総括 (PM) アッセイ系評価
(副総括研究代表者) (ツボイ クニオ) 坪井 邦雄	トラストメディカル(株)	装置設計全般
(イワキ ツネヒト) 岩城 常仁	トラストメディカル(株)	装置機構設計
(スギヤマ マスキヨ) 杉山 益清	トラストメディカル(株)	装置制御設計
(カワハラ ノブマサ) 河原 伸雅	トラストメディカル(株)	アッセイ系開発
(ハシモト カズヒロ) 橋本 和宏	トラストメディカル(株)	アッセイ系開発
(タナカ カオリ) 田中 かおり	トラストメディカル(株)	アッセイ系開発
(タカムラ ユズル) 高村 禪	北陸先端科学技術大学院大学	アッセイ系開発

## 1-3 成果概要

### (1) 高感度な POCT 装置を開発する (サブテーマ1)

- 一体型高感度 POCT 装置試作機を製作した。  
特徴は、投影床面積が A3 サイズの小型コンパクト機。
- 目標感度、コルチゾール 600ng/ml、アルドステロン 300pg/ml、レニン 40pg/ml を達成した。

(2) 血中ホルモン診断試薬を開発する(サブテーマ2)

- コルチゾール、アルドステロン、レニンの血中ホルモン診断試薬を開発した。
- 目標感度、コルチゾール 600ng/ml、アルドステロン 300pg/ml、レニン 40pg/ml を達成した。

1-4 当該研究開発の連絡窓口

トラストメディカル株式会社  
バイオ開発部 部長 坪井 邦雄  
Tel: 0790-47-9009 Fax: 0790-47-9007  
E-mail: tsuboi@neatnet.jp



## 第2章 本論 研究内容及び成果

### 2-1 高感度なPOCT装置の開発（サブテーマ1）

【平成26年度】

#### i) 反応容器の設計

〔反応容器の構成〕

反応容器概略の全体構成の検討を実施し、まず各槽の個数について、対象とする反応系のプロトコルから最大必要となるステップ数に基づき、洗浄液槽1個、試薬槽9個、加熱セル1個、集磁・測定兼用セル1個の構成とした。

〔液槽の容量〕

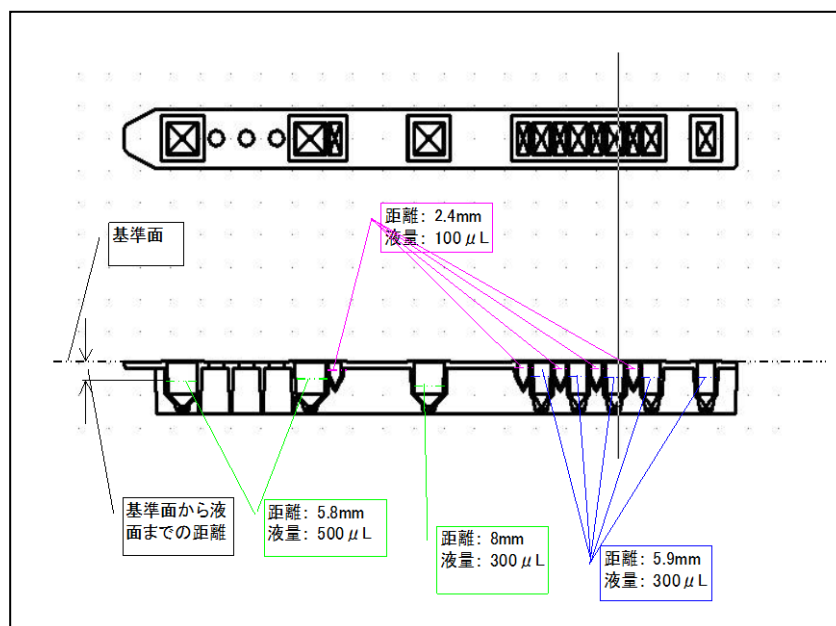
試薬槽は、使用する試薬の量に幅があり300 $\mu$ L~50 $\mu$ Lの範囲となる。そこで槽のサイズを2種類に分けて、分注量300 $\mu$ Lを余裕を持って収納する600 $\mu$ Lと少量分注側を受け持つ200 $\mu$ Lとした。観測セルは、最終反応物を収納し、測定に供するセルである為、試薬の最大分注量300 $\mu$ Lが対象となる事から試薬槽の大サイズと同容量の600 $\mu$ Lとした。

〔反応容器の材質〕

高感度POCT装置反応容器の材料選定を実施し、成形性の点からの検討からポリプロピレン(PP)系、アクリル系、ポリスチレン(PS)系がまず対象として絞り込まれた。さらに、光学観測に用いられる観測セルに関して光学特性の点から検討を進め、透明グレードの材料を用いるとして、順位付けを行った。最も高い透明性(可視光)が得られるアクリル系が最上位に位置し、次にPS系、少し離れてPP系となった。

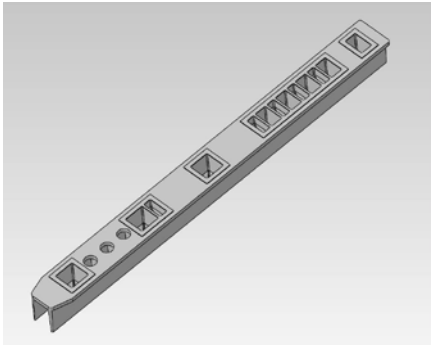
〔反応容器の基本設計〕

セル、槽群の構成として、個別型や個別カップをセットして一体型化するタイプではなく、取扱いの容易な一体成形のカートリッジ式とした。カートリッジ内の構成として、検体カップ、ピペットチップホルダー、測定部、複数の試薬カップ、反応セルからなる構成とし、この構成に基づき反応容器(カートリッジ)の設計を行った。以上の検討にて決定した、反応容器の形状設計図を次に示す。



### 〔モデルの試作〕

耐試薬性、成形性、光学計測への適応の観点から反応容器（カートリッジ）材質の検討を行いモデルを試作した。カートリッジ化した反応容器の材質として成形性と光学的特性のバランスの取れた材料が求められる事から透明 PS を反応容器の材料として選定した。設計を行った反応容器のモデル図及び設計モデルに基づき、透明アクリル材を用いて切削加工にて作成した試作品の写真を以下に示す。



### ii) 反応容器金型の製作

射出成型金型の作成を行うにあたり、反応容器モデルをベースに抜き勾配付与や肉厚調整、ゲート部分の形状変更を行った成形用反応容器形状を再設計した。この成型品データに基づき、下記仕様にて金型の製作を行った。

- ・ 製品取数 : 2
- ・ 成形材料 : 透明 PS
- ・ 多点ピンゲート : 各セルの底面頂点毎に配置の事。
- ・ キャビ取られ対策要、両側スライドコア構造の検討も含む
- ・ 観測セル壁面は、透明性確保の為、磨き仕上
- ・ 抜き勾配は、キャビコア共 片側  $3^{\circ}$  を基本とする事
- ・ 突き出しは、丸ピンを基本とする
- ・ 取り出しは手取りとする
- ・ 形状は、添付する 3D データに基づくこと

上記仕様に基づき射出成型金型の設計を行った。金型サイズは、 $400\text{mm} \times 600\text{mm} \times 390\text{mm}$ 、重量は、 $612\text{Kg}$  になった。

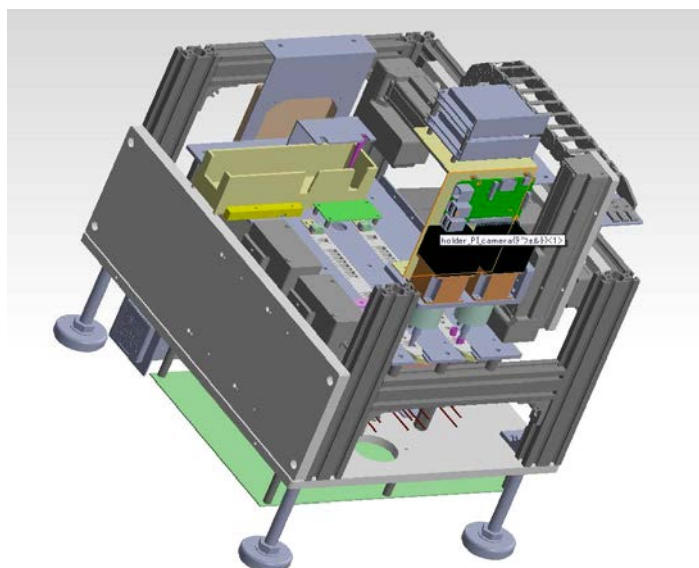
### 〔成形試作〕

製作した金型を右に示す。  
成形品の写真を下に示す。



### iii) 高感度 POCT 装置試作品の製作

反応容器を搭載する高感度 POCT 測定装置の詳細検討，設計を行い、試作装置を製作した。装置に求められる機能は、搭載された反応容器に対して検体，試薬，反応生成物，検体を移動させる機能、移動させる液体の計量回収・計量吐出機能、特定のセルの加熱機能、特定のセルでの集磁，解磁機能、観測セルでの光学的測定（吸光度・蛍光強度）機能となる。設計した高感度 POCT 装置試作の 3D モデルを以下に示す。



#### 〔装置機構面の検討〕

反応容器の搭載個数に関しては A3 の床面投影サイズから逸脱しない範囲で個数の検討を行い、搬送系のアクチュエータの可搬重量も許容された事から、反応容器 2 個を搭載対象とした。配置は、反応容器を奥に向かって長く挿入する方向とし、搭載姿勢は天面を上向きに置くオーソドックスな方法とした。

本装置においては、省人化のウエイトも低い事及び 移載動作の自由度を確保する目的から、装置への移載は手投入とした。

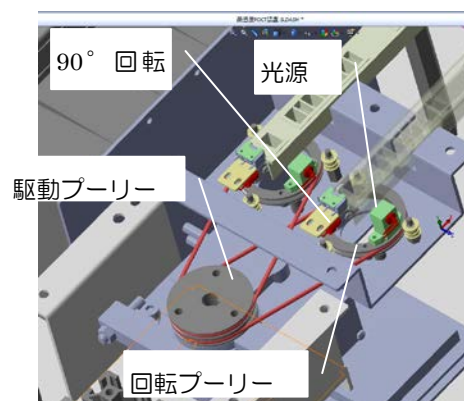
反応プロセスを実行するユニットは、基本的には加熱，集磁，測光観測の 3 ユニット構成となる。各反応プロセスにおいて、夫々の反応，観測を行う部分は、反応容器上で分散配置されている為、横方向の移動は行わず、上下動を基本とした。

#### 〔検体や試薬のハンドリング〕

試薬等のハンドリングに関しては、反応容器は移動させず固定保持とした。その結果、チップ側を移動させる方式とした。

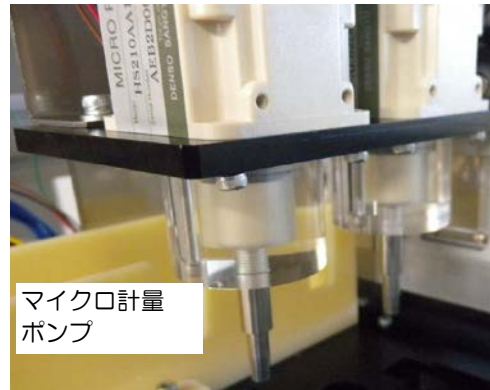
#### 〔光学測定部の回転機構〕

測光ユニットと集磁部は互いに干渉する位置にある。その為、集磁部を必要に応じて上下動させ、測光部は基本固定とした。測光部に関して、励起光測定と吸光度測定で入光方向が異なる為、光源側は、回転変位する方式とした。さらに、測光部の光源は、励起，吸光で使用波長が異なる為、光源部の交換を容易に行える着脱式とした。右に測光部の光源旋回系部分のモデルを示す。回転プーリーからベルト伝達される駆動力にて光源が同期して角度 90° の範囲を旋回する。



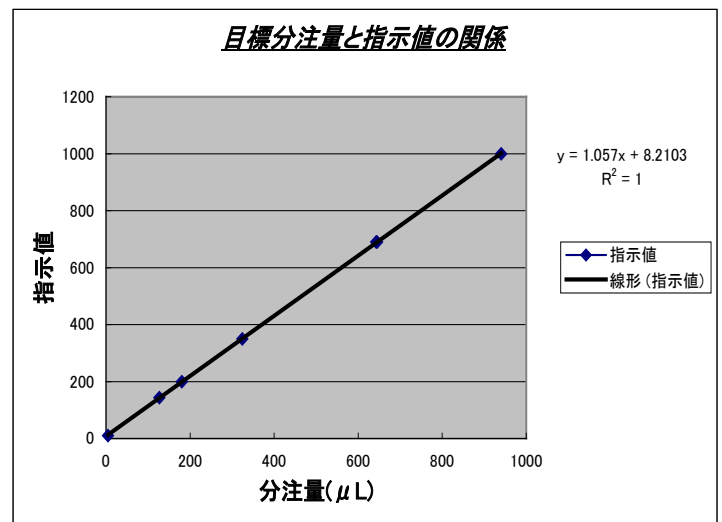
### 〔ポンプ機構〕

液の移載に関して、計量吸引・計量吐出を行う為、液の吸引・吐出のアクチュエータとしてはマイクロ計量ポンプを用いる事とした。マイクロ計量ポンプはコンパクトで軽量である為、直交 2 軸系に過大な重量負荷をかけずに 2 個搭載可能となり、反応容器を 2 個搭載するとマッチする。マイクロ計量ポンプの写真を右に示す。



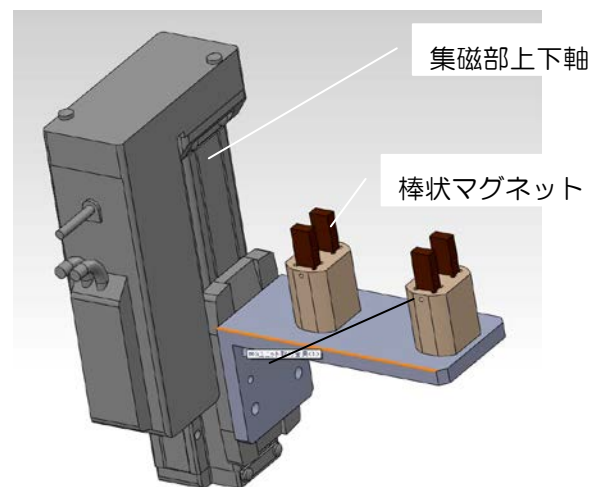
マイクロ軽量ポンプの実際の吸吐出液量と計量指示量との関係を求めた。検量線として、一次式の関係で  $y = 1.057x + 8.2103$  ( $R^2 = 1$ ) を得た。ポンプドライバーへの吸引・吐出量指示値と実際の分注量との関係を左下に示す。又、目標分注量と指示値との関係をプロットしたグラフと得られた一次の検量線式を右下に示す。

分注量(mg)	指示値
940.0	1000
642.7	690
645.0	690
324.1	350
180.4	200
126.7	144
4.3	10



### 〔集磁機構〕

集磁部のマグネットは、コンパクトで強い磁力が求められる為、ネオジウム系の磁性材を用い、最大 450mmT の強度が期待できる棒状形状 2 本を対向位置に保持し、セルを挟みこむ様にした。右に集磁ユニットのモデルを示す。棒状マグネットとその固定部が、上記の光源巡回系の回転プーリーの内径部の円形空間を通過して巡回系に干渉する事無くセルにアプローチする構造とした。

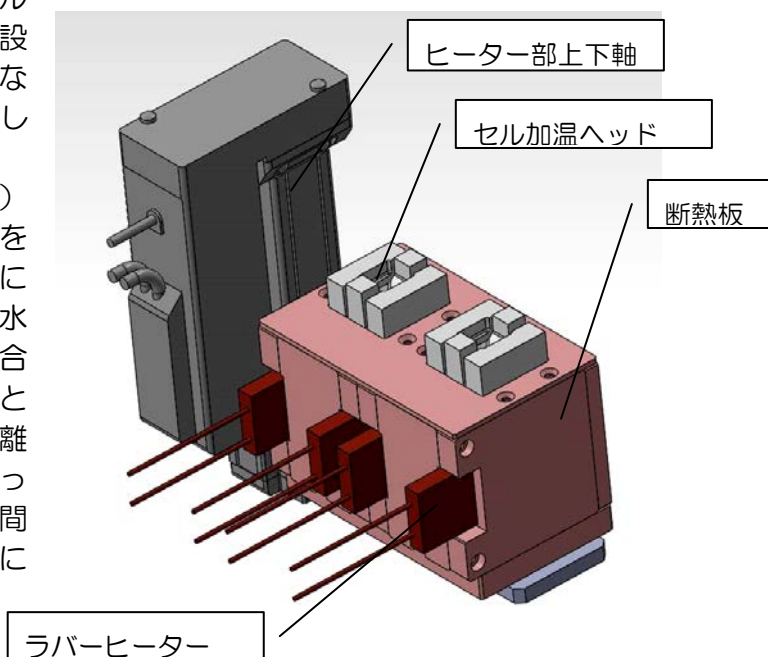


なお、集磁前に試薬の攪拌が必要となる事から、攪拌の方法について検討し、ポンプによる吸排動作で発生する乱液流で攪拌を行うピペティングを実行する事とした。

## 〔加熱部〕

加熱部は、ヒーターブロック(アルミ材)にセルがすっぽり収まる穴を設け、周囲への熱放散をできるだけ少なくする為に、断熱材で囲む方式とした。

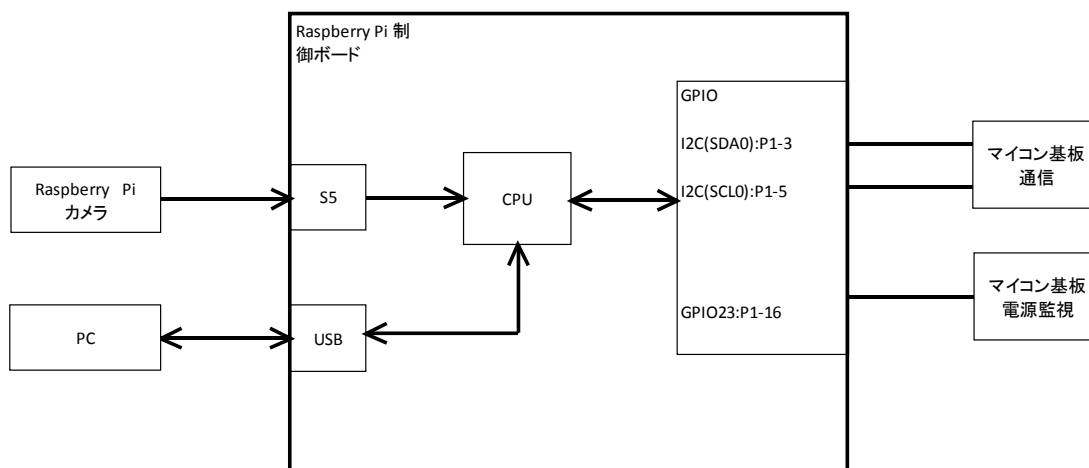
ヒーターユニット(温調器も接続)単体で稼働させ、反応容器サンプルをヒーターユニットのセル加熱ヘッドに挿入した状態でセル内の液体温度(水温)の測定を行った。室温に近い場合は、到達時間も短く、到達飽和温度と指示値との乖離も少ない。室温より離れて高くなる程、その差は大きくなった。90℃指示の場合、到達時間3min、乖離温度 $\pm 3^{\circ}\text{C}$ となった。右に加熱ユニットのモデルを示す。

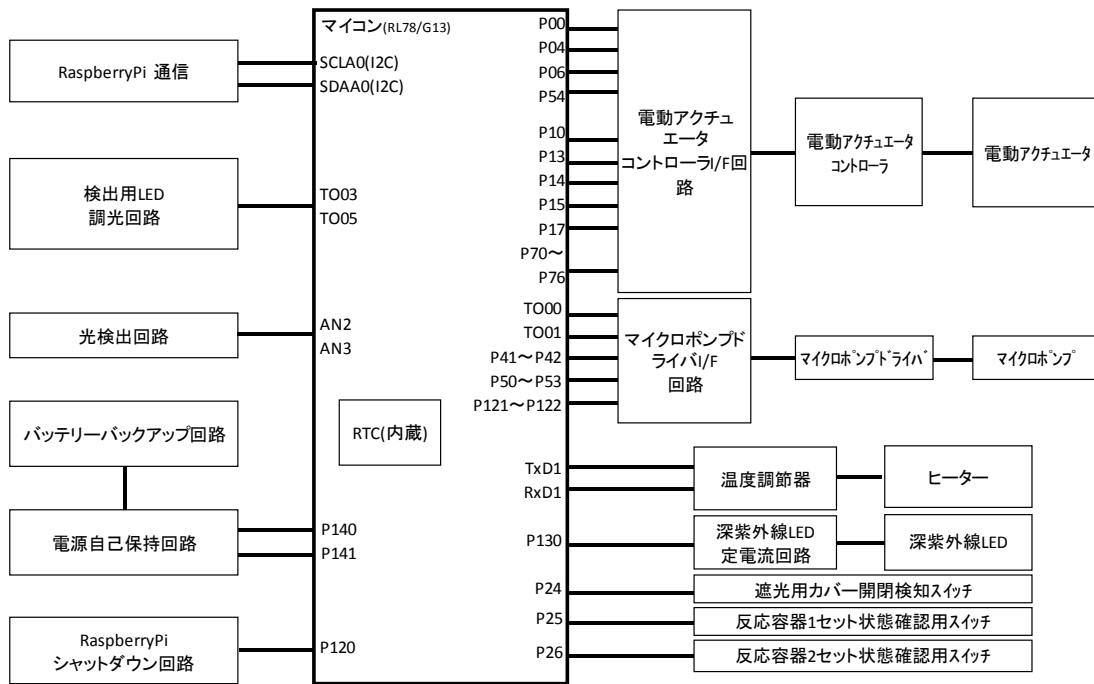


## 〔ハードウェア構成〕

高感度 POCT 装置全体の制御および CMOS カメラモジュールを制御する Raspberry Pi 基板とアクチュエータ制御や電源保持回路、LED 調光制御を行う RL78 マイコン基板からの構成になる。CMOS カメラモジュールは安価な Raspberry Pi 専用カメラを搭載する。

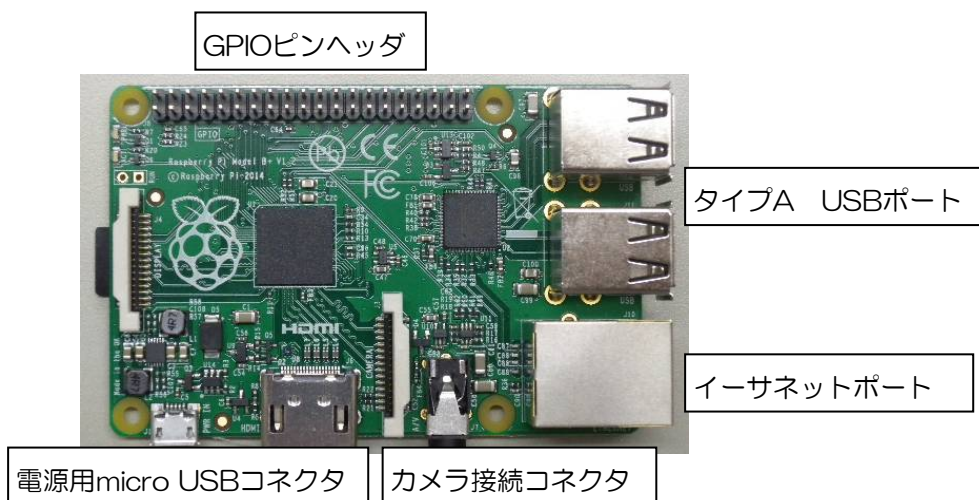
以下に全体構成を示す。





〔Raspberry Pi 基板〕

Raspberry Pi 基板は、Broadcom の BCM2835 プロセッサを搭載した安価で小型の PC ボードコンピュータである。搭載 CPU コアは ARM1176JZF-S で、メインメモリは 512MB の SDRAM が搭載されている。本体には 2.0USB ポートが 4 つ、マイクロ SD カードスロット、イーサネット、オーディオ出力、フルサイズの HDMI ポートが用意されている。Raspberry Pi 基板には電源スイッチはなくマイクロ USB ポートに 5V 供給すれば起動する。そのため電源起動、終了シーケンス制御は、RL78 マイコン基板で行っている。また他の周辺機器と接続する GPIO ポートが基板上にあり、汎用 I/O ポートやシリアル・インターフェース、I2C のピンヘッダがあり接続した機器を Linux から制御できる。RL78 マイコン基板とシリアル通信 (I2C) で同期を取りながら装置制御を行う。

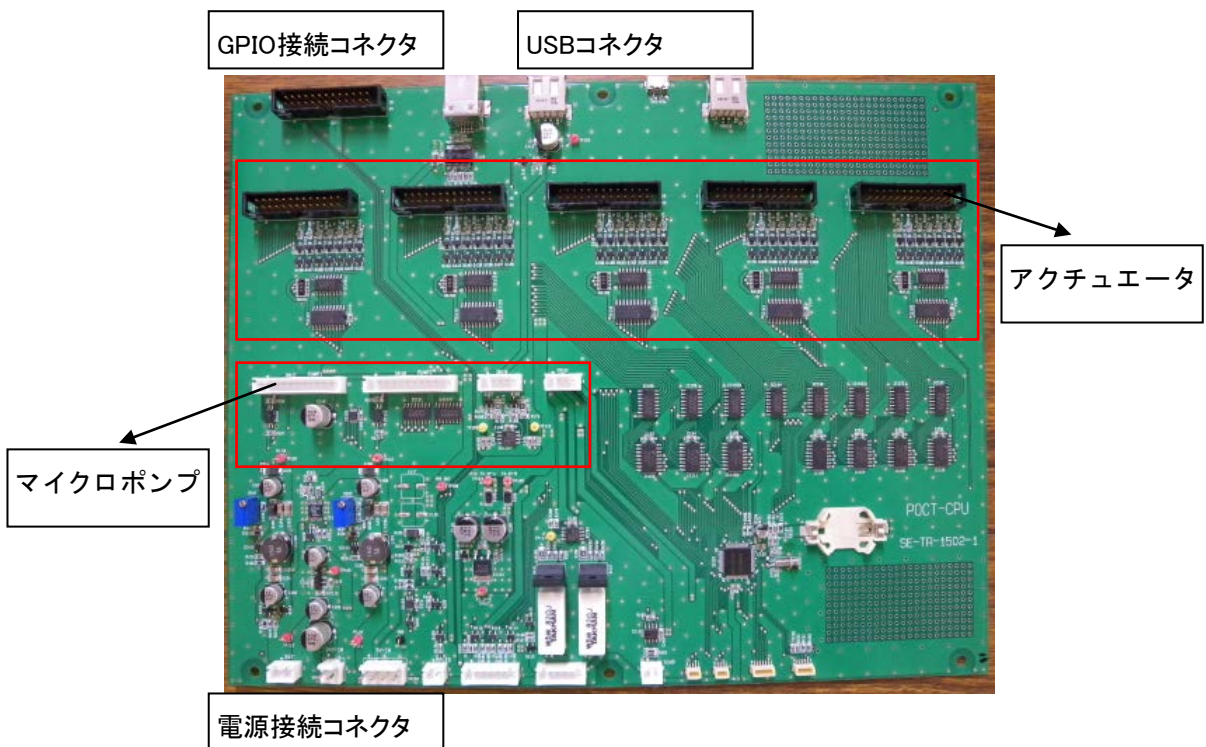


CMOS カメラモジュールのイメージセンサには OV5647 が使用されており、必要な信号処理はメインのデバイス OV5647 に入っており、自動露光、自動ホワイトバランス、レンズのシェーディング補正などの機能がある。Raspberry Pi 基板とカメラモジュールは、15 ピンのフレキシブルケーブルで携帯機器用シリアル・インターフェー

規格にて接続する。フレーム・レートは最大 1080p で 30fps(フレーム/秒)であるが、画像の測定範囲を 640×480 ピクセル程度に 狭めことにより高速フレーム・レートで動作させることが可能になる。A-D コンバータを内蔵しており、画像データをデータ・バスからデジタル値で出力する。露光時間や光量ゲインなどの機能を利用し、レンズの影響による歪みあるいは輝度(濃淡)レベルの低下を防ぐ。また輝度レベルが全面的に均一にならないため、画像データ中央範囲を演算処理する。

#### 〔マイコン基板〕

マイコン基板は、ルネサスエレクトロニクス製 RL78/G13 を搭載した。この RL78 マイコンの主な性能としては、32MHz 動作、フラッシュ ROM：64KB、データ・フラッシュ：4KB、RAM：4KB、超低消費電力、各種シリアル・インターフェースなどが上げられる。本装置では OS として Linux を使用しており起動までの制御と終了時のデータ処理などの電源保持回路を設けており、このマイコン基板で制御している。他に電動アクチュエータコントローラ、計量用マイクロポンプコントローラの制御を行っている。



【平成 27 年度】

i) 反応容器の改良

〔反応容器射出成型品の評価〕

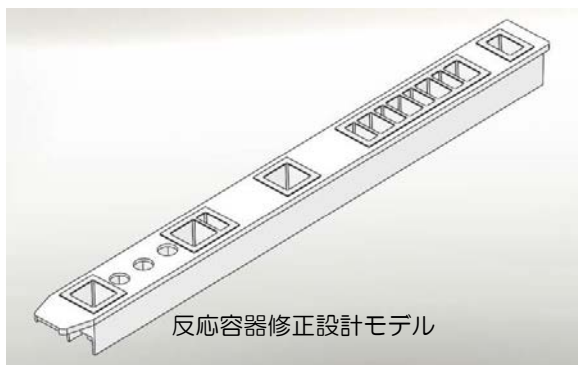
平成 26 年度に製作を行った反応容器の射出成型金型にて成形を行った成型品の評価を行った。形状的には、金型構成上及び 成型上有利な方向になる長手方向の縦リブの検体槽側への延長が、容器のハンドリングやアルミシールの剥離の際に障害になる事がわかった。充填密度の多寡による変形に関しては、本容器の形状特性上、そりが出やすい傾向にあった。即ち、天面が肉厚大平面形状になっている事から、密度を上げるとヒケは少なくなるがそりが大きくなり、反対に密度を下げるとそりは小さくなるがヒケが多くなるという傾向を示した。反応容器成型品へのアルミシート熱溶着テストから、セル隣接集積部の隔壁部は、溶着が不完全で試薬等の密封に問題があることが分かった。

そこでこの部分の寸法測定を実施し、試薬セル等が隣接集合している部分のセル間の隔壁が周囲のシール溶着面より 0.04mm～ 0.1mm 低くなっている事が分かった。

〔反応容器の修正〕

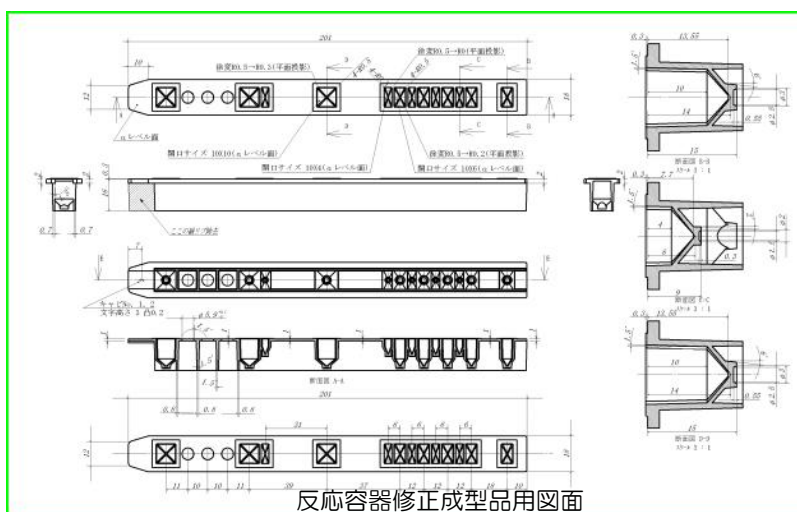
評価結果を踏まえ、反応容器製品形状の修正設計を行った。そり改善の為に、厚み 2mm の一様肉厚の天板部でセルの存在しない部分は厚みを 1mm に薄くして、早く冷却固化して冷却収縮によるそりの進行を抑える様にした。縦リブの先端部の長さを短縮した。又、金型の寸法修正として、セル間の隔壁部の持ち上げを行った。

次に、高感度 POCT 装置での運用上での問題点が残った。即ち、本修正にて短くした



た縦リブの先端が検体槽から 3mm 程度飛び出す構造になっていたが、装置にセットした場合に固定が不安定になることと成形性においても不安定要因となる事が分かった。そこで修正形状から、さらに短くし、先端が検体槽の外周と一致する所まで短くすることにした。設計を行った反応容器のモデル図を図に示す。

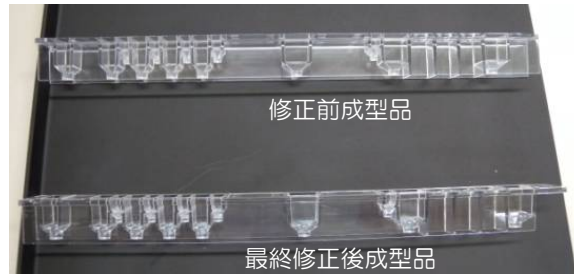
このモデルに基づき、最終成型品の図面を作成し、射出成型金型の修正・改造を行った。修正した反応容器修正金型と修正前後の成型品の写真を示す。







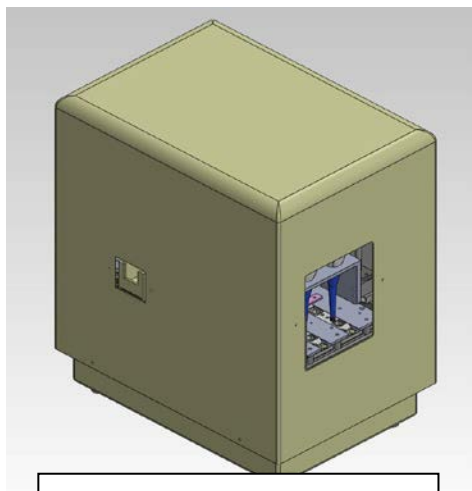
反応容器修正金型写真



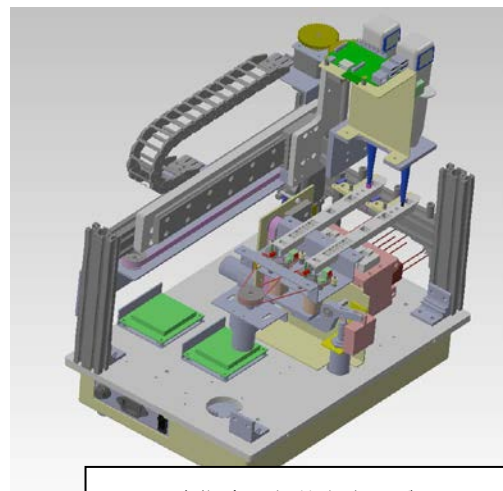
反応容器修正前後成型品写真

## ii) 高感度 POCT 装置量産指向品の試作

前項にて述べた反応容器を搭載し、量産を指向した試作装置の詳細検討，設計を行い、試作装置を製作した。下図に設計の結果を示す 3D モデルを示す。内部の構造を見せる為に、外装及び一部部品の表示を抑制した 3D モデルを示す。



量産指向品外形モデル



量産指向品部分省略モデル

ユーザーインターフェイスとなるタブレット端末との連携の検討を行った。現実性を重視すれば有線 (USB, LAN 等) になるが、収納性、利便性の点からすると無線 (LAN, Bluetooth 等) となる。これらのプラス面、マイナス面を考慮して検討を進めた。無線電波の環境での制限 (医療現場での使用) の点、タブレット端末に標準装備されている事から、無線 LAN (WiFi) での結合を選択した。

図に試作した量産指向品の全体写真を示す。



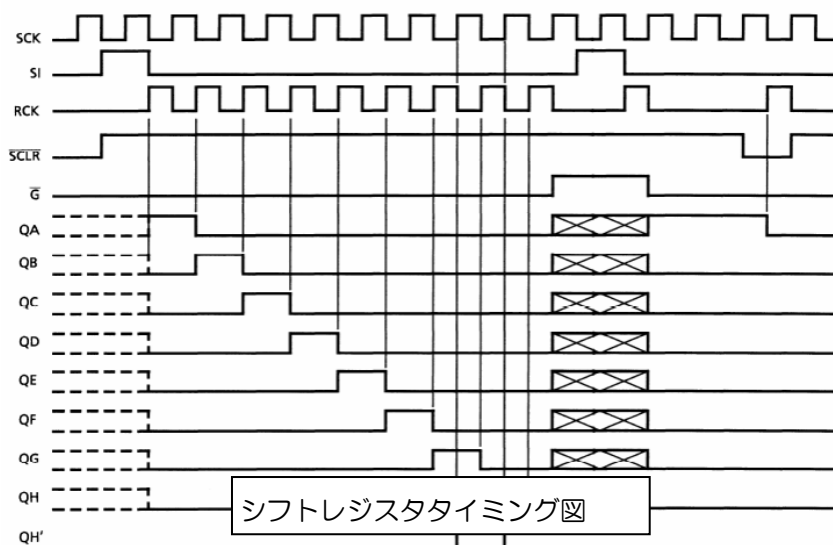
高感度 POCT 装置量産指向品 全体写真

〔マイコン I/O ポート増設〕

電動アクチュエータを複数駆動するには、マイコン I/O ピンでは不足するため、8 ビットシフトレジスタ/ラッチ (74HC595) を用いて出力ピンを増設した。マイコン I/O ポートからは出力データをシリアルで送信し、シフトレジスタ IC でそれをパラレルに変換して出力することになる。この IC は 3 本の制御信号で 8 ビット出力ができる。また IC を直列に接続することにより制御信号はそのままに 1 個追加することに 8 ビット出力を増設できる。さらに 74HC595 は単にシフトレジスタとは異なり、データ送信中は出力端子の状態を変化させずに全てのデータを送信し終わってから任意のタイミングで出力ポートを変化させることができるようにラッチ回路が内蔵されている。これにより遅い動作で駆動させても出力端子の余計な変化は起こらない。

同様に 8 ビットの入力ポートを、8 回路入りバスバッファ (74HC541) を使用して増設している。こちらも 74HC541 を何個追加してもマイコンからの制御信号は 3 本のみとなる。マイコンからのクロック信号に応じて入力端子の情報 (パラレル) を QH 端子からシリアルに変換されてマイコンへ送信される。

電動アクチュエータからの入力信号を 2 本のイネーブル信号で選択するよう検討した。シフトレジスタ IC のタイミング図は下図の通りである。



〔電動アクチュエータ制御〕

マイコン基板上の 8bit シリアル-パラレル変換 IC からの出力を電動アクチュエータコントローラに接続する。アクチュエータを指定位置に移動させるには、予めコントローラ設定ソフトを用いて目標位置や移動速度などをコントローラに記憶させておく必要がある。コントローラ設定ソフトには 2 種類のモードがあり、各パラメータと 12 種類・64 パターンのステップデータを管理できる。入力した各データはコントローラ内のメモリに保存されアドレス指定により動作させる。

## 【平成 28 年度（事業期間後）】

### i) 高感度POCT後継機の試作

本事業にて試作を行った高感度 POCT 装置をベースに汎用前処理 PCR 装置の検討、試作を進めている。

目的とする機能は、診断用検体前処理装置＋リアルタイムPCR装置の形態で、検体・試薬などを計量・混合・ろ過・加熱・集磁洗浄・リアルタイムPCRを行う。

用途は、単なる試薬混合・遺伝子診断前処理・抗体診断前処理・酵素反応診断前処理 8検体同時作業を前提とする。

#### 〔機能〕

高感度 POCT 機のスタイルを継承し、操作端末はタブレットとし、以下の操作上の機能をユーザーが操作・選択できるようにする。

#### 1. 作業プロトコルの設定と選択

基本処理動作を組み合わせた定型プロトコルを、研究作業として50種、診断プロトコルとして50種のみがユーザー操作を可能とするなど管理者が設定できるようにする。メーカーが出荷段階で設定を選択することでボタンと画面の表示を選択できるように、ユーザー設定画面、管理者設定画面、メーカー設定画面の3設定画面を用意する。

#### 2. 新規前処理実施前の登録

- ①測定法に合わせて外容器にセットする前処理容器と、試薬の組み合わせ、ピペットチップの組み合わせ、及び測定プロトコルを決定する。
- ②外容器に前処理容器を正しくセットしたものとピペットチップを正しくセットしたものを装置に入れ、〔配置登録〕ボタンを押して配置を登録する。
- ③前処理容器の各列の容器名と、内部の試薬名、液量を登録する。ピペットチップ各列のチップ種類を登録する。
- ④プロトコルを入力し、〔動作チェック〕を押す。  
模擬的に各種モーター位置を動かして衝突がないか確認する。  
模擬的に各前処理容器内の液面推移とチップ先端と液面との差、底との差の時間推移をグラフ化する。PCR 容器蓋、本体の動きグラフ。を表示する。

OK なら準備完了。

#### 3. 登録済み前処理実施

- ①前処理容器列に、実行に必要な種類の容器を選択し並べて、必要な試薬を必要な量入れて測定の準備をする。  
試薬トレーを引き出し、ピペット・組み上がった外容器を乗せて押し込みセットする。
- ②スタートボタンを押し結果を待つ。

#### 4. プロトコルが決まり、試薬容器も準備されている診断を行なう場合。

- ①試薬容器のAIフィルムを外す。ピペットチップを用意する。
- ②検体バーコードを読んで前処理容器列1に滴下。
- ③試薬トレーを引き出し、試薬容器とピペットチップをセット。
- ④診断名を選択しスタート。結果を待つ。

#### 〔装置内容〕

##### 動作原点（モーターM）

1. PCRブロックM開（リミット確認）

2. 発光フィルターM原点 (リミット確認)
3. 受光フィルターM原点 (リミット確認)
4. 前処理ヒーターM下限 (リミット確認)
5. 前処理マグネット M 下限 (リミット確認)
6. 前処理圧空 M 開 (リミット確認)
7. ピペットチップ電動 M (リミット確認)
8. ピペットチップリリース M
9. チャック M 開 (リミット確認)
10. Z 軸 M 原点 (リミット確認)
11. X 軸 M 原点 (リミット確認)
12. Y 軸 M 原点 (リミット確認)

#### 機能部品

1. UV ライト 2. LED 照明 3. 励起 LED 4. 受光 PMT 5. C-MOS
6. 排気ファン 7. 庫内ファン 8. PCR 温調ファン 9. Z 測高センサー (キ-エス IA-100/IA1000) 10. 前処理圧空ポンプ (ON/OFF) 11. マイコン基板2枚 12. ラズベリーパイ基板 13. 電源入りLED表示

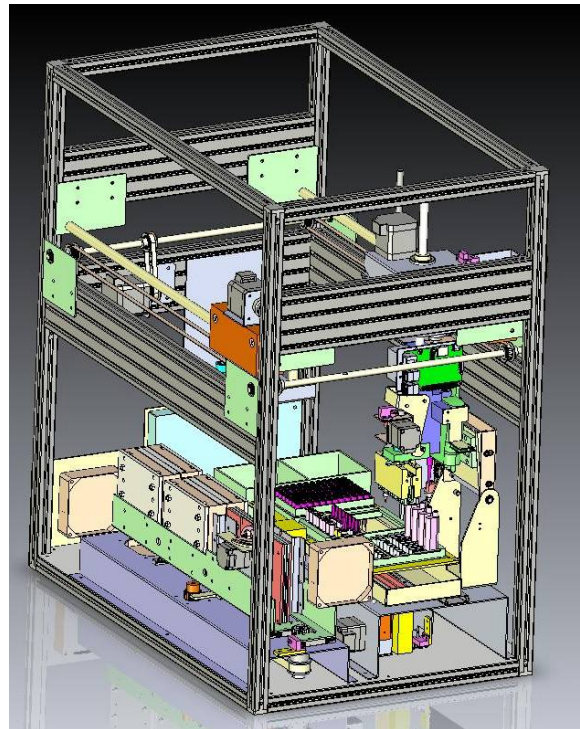
#### 温度センサー

1. 庫内温度測定 PCR 上部2点、前処理上部2点  
1点は排気ファンの ON/OFF
2. PCR ヒーター温度調節 L,M,H 各2熱源に制御用各1点 合計PID6点  
上のL温PID制御用の熱伝対1つを用い、L温が下がらない場合に排気ファンの ON/OFF を行う
3. PCR 熱源温度測定のみ  
L: 2熱源上部各3点  
計6点。M: 2熱源上部各4点計8点。H: 2熱源上部3点計6点。  
合計20点。この20点の常時測定は不要なので1秒おきに20点測定を2分に1回行う。

#### C-MOS の機能

メーカーにて調整中の庫内観察を主目的とする。すなわち、モニターにつないで見えればよい。画像処理などの作業は想定していない。

上記の構想に基づいて設計検討を進めた3Dモデル右に示す。



## 2-2 血中ホルモン診断試薬を開発する（サブテーマ2）

### i) コルチゾールの測定

#### i-1) 概要

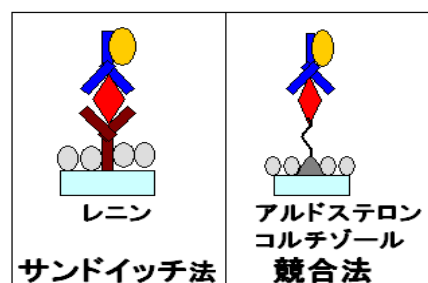
本事業の初年度目標であるい3種のうちいずれかで 1ng/ml を達成という目標を、まずコルチゾールで達成できるかどうか検討した。コルチゾールは分子量の小さいホルモンであるため、抗体の立体障害により所謂サンドイッチ法が採用できず競合法によるアッセイを行なった。

結果として最終目標は達成できた。得られた感度が高いため高濃度の測定には希釈を行なう必要があるという結果も得られた。

#### i-2) 測定プロトコル

コルチゾール・アルドステロンなどのホルモン類は、たんぱく質と比較して分子量が小さく抗原抗体反応における立体障害が感度に影響する。そこで最も汎用的に行われているサンドイッチ法に変えて立体障害に強い競合法によって測定系を構築する。

両法の違いは右図に示したように抗原を二つの抗体で捕捉するのではなく、抗体をひとつとして固相に定量的な抗原を用いることである。固相化した抗原と検体血液中の抗原とが競合的に結合することを利用した測定法である。

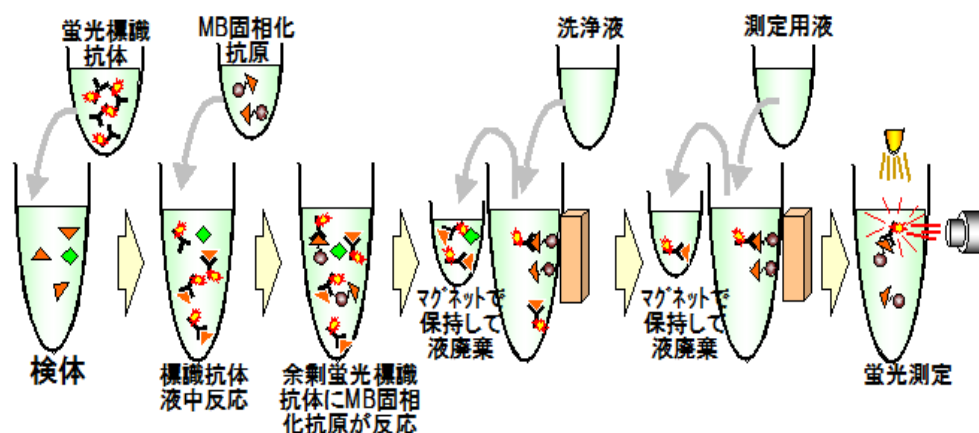


コルチゾールの測定は、固相としてマグネットビーズを用いて液中にて反応させる。

操作プロトコルは次の通りである。

1. 検体 100  $\mu$ L に蛍光標識抗体 10  $\mu$ L を投入し 10 回ピッティングする。
2. MB 固相化抗体 10  $\mu$ L を投入し 10 回ピッティングする。
3. マグネットで保持し液を廃棄する。
4. 洗浄液 100  $\mu$ L を投入し 5 回ピッティングする。
5. マグネットで保持し液を廃棄する。
6. 測定用液 100  $\mu$ L を投入し 5 回ピッティングする。
7. LED 励起して蛍光測定する。

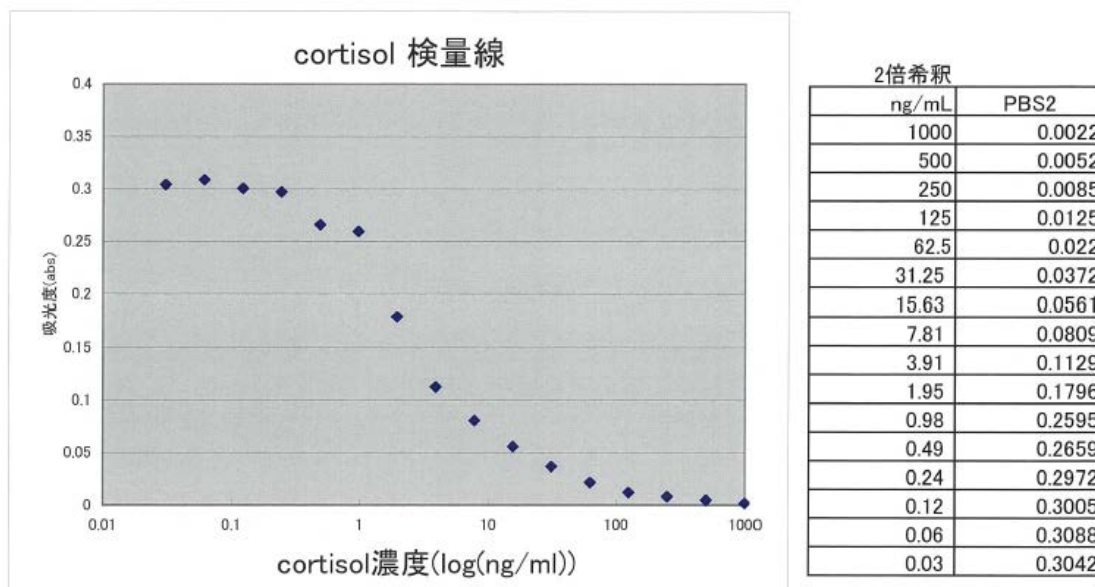
プロトコルを次に図示する。



### i-3) 測定結果

高感度化のために、競合材料として BSA-3CMO-コルチゾールを用いた競合法を行った。検量線を次に示す。検量線のシグモイドカーブを見ると、定量範囲の下限が概ね 1 ng/ml であることが読み取れる。

#### コルチゾール試作結果



以上の通り、初年度目標の1種 1 ng/ml から最終目標の 600ng/ml まで達成できた。高濃度コルチゾール領域は希釈血清により希釈して測定する。

### ii) アルドステロンの測定

#### ii-1) 概要

アルドステロン濃度は各種病態や診断に必要な負荷試験などによって様々な値を示す。従って、その目的に応じてさまざまな測定範囲のアルドステロン測定系の開発が要求されている。本開発項目では、カプトプリル負荷試験におけるアルドステロンの測定系の開発を試みた。日本内分泌学会による診断の手引きでは、血漿中のアルドステロンの濃度は 120pg/mL 以上で陽性となるため、目標の感度は 100 pg/mL である。このアルドステロンの診断系の検討は、国立大学法人北陸先端科学技術大学院大学と共同で実施した。

#### ii-2) ELISA 法によるアルドステロン測定

高感度にアルドステロンを測定するために、まず ELISA によるアッセイ系を構築する事とし、その最適化のための検討を行った。具体的なにはサンプルと1次抗体との混合時間、1次抗体の濃度、HRP 抗体の濃度、マイクロウエルへの抗原固定量について検討した。測定対象であるアルドステロン類は低分子化合物であり、ELISA においては競合法において測定される。操作の手順は以下のとおりである。

- ① マイクロチューブにて、サンプル 50  $\mu$ L と 1 次抗体 10  $\mu$ L を混合する。
- ② マイクロウエルに混合液 60  $\mu$ L をアプライ。室温で 30 分ローリング
- ③ 洗浄 3 回
- ④ HRP 標識抗体 50  $\mu$ L をアプライ。室温で 30 分ローリング
- ⑤ 洗浄 3 回
- ⑥ TMB 液 100  $\mu$ L にて発色
- ⑦ 7~10 分後に停止液にて発色を止める
- ⑧ 450nm にて吸光度を測定

また、使用した抗体は以下のとおりである。

- 1 次抗体：11 種類の抗体の中からスクリーニングされたモノクローナル抗体 2 種とウサギポリクローナル抗体の 3 種類。
- HRP 標識抗体：HRP 標識抗マウス IgG 抗体

検討項目は以下のとおりである。

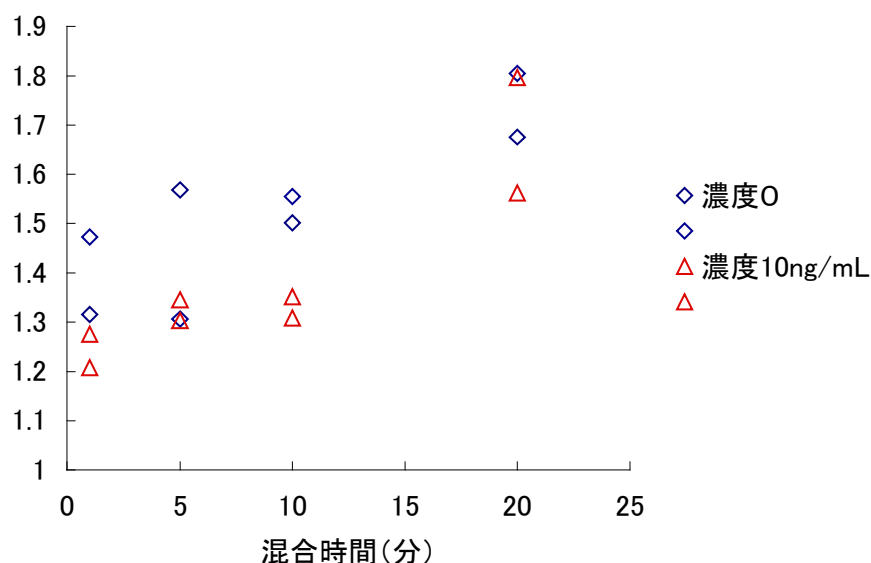
- サンプルと 1 次抗体との混合時間
- 1 次抗体の濃度
- HRP 抗体の濃度
- マイクロウエルへの抗原固定量

作製された測定法のパフォーマンス

バッファーおよびヒトプール血漿に対し任意の量のアルドステロンをスパイクしてサンプルを調製し、構築された ELISA を用いてアルドステロン濃度を測定する。得られた結果より検量線を作成し、検出範囲を明らかにする。

## ii-2-1) サンプルと 1 次抗体との混合時間

ELISA は競合法であるので、あらかじめサンプル中の抗原と 1 次抗体を反応させてからマイクロウエルに混合液をアプライする必要がある（操作①、②）。その際の反応に必要な時間を検討した。検討にはモノクローナル抗体 42133 を用い、アルドステロン濃度が 0、10 ng/mL の場合でその差を比較した。反応時間を 1 分、5 分、10 分、20 分と変化させた場合の測定結果を次図に示す。

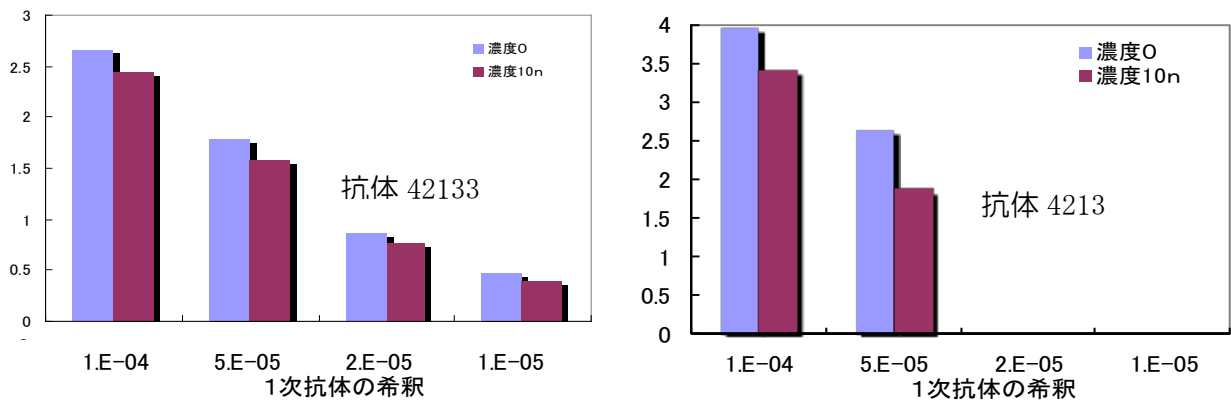




混合時間 1 分と5分の際の濃度 0 の測定値が各 1 点、何かの都合ではずれ値である可能性があり、考察からはずした。混合 1 分後から 10 分後までは濃度 0 と濃度 10 ng/mL の間に十分な吸光度の差がみられた。また、混合 5 分後と 10 分後では値の変化がすくなくかったため、サンプルと 1 次抗体の混合時間は 5 – 10 分間とした。

### ii - 2 - 2) 1 次抗体の濃度

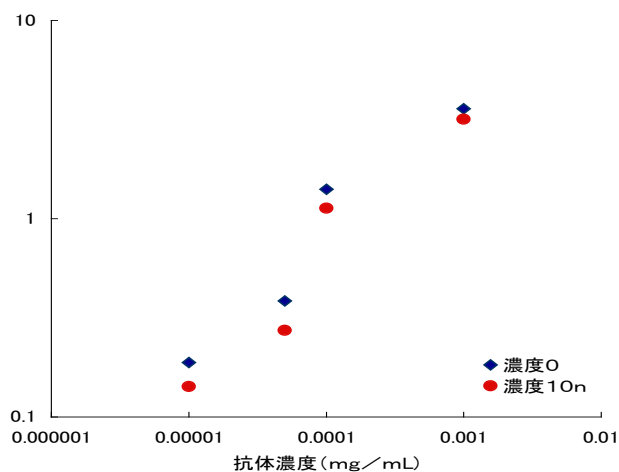
使用した 3 抗体をそれぞれ 1 万倍～1 万倍に希釈し、アルドステロン濃度 0、10 ng/mL の場合で ELISA を実施した。得られた結果を次図に示す。残りのポリクローナル抗体 1 種はほとんど変化せず不適と思われる。濃度による差が最も大きいのは 50,000 倍希釈（抗体濃度：50 ng/mL）した抗体 4213 であった。本アッセイ系での 1 次抗体濃度はどちらの抗体とも 50 ng/mL とした。



ELISA への 1 次抗体希釈率の影響

### ii - 2 - 3) HRP 標識抗体の濃度

本開発では、1 次抗体が少量であったため抗体への HRP 標識が困難であった。そのため結合した 1 次抗体へさらに HRP 標識抗体を結合させる工程を加えた ELISA となった。今後製品化にあたっては、1 次抗体に直接 HRP を標識した複合体を用いることによりこの工程は省くことができる。得られた結果を次図に示す。

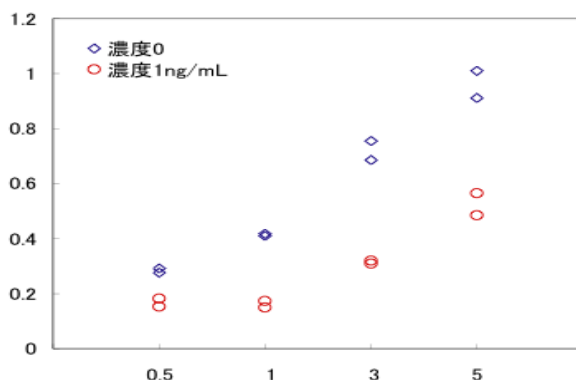


希釈倍率 5 万倍の 1 次抗体 42133 を用い、HRP 抗体の濃度を変化させ、アルドステロン濃度 0、10 ng/mL の場合で ELISA を実施した。アルドステロン濃度による差異が最も大きいのは HRP 標識抗体を 5,000 倍希釈（抗体濃度は 500 ng/mL）した場合であった。本アッセイ系での HRP 標識抗体濃度は 500 ng/mL とした。

ii-2-4) マイクロウエルへの抗原固定量

ELISA に用いるマイクロウエルへの抗原固定量を変化させ、アルドステロン濃度 0、10 ng/mL の場合で ELISA を実施した。1 次抗体としては、4.2.の項でより有効と思われた 4213 を用いた。得られた結果を次図に示す。

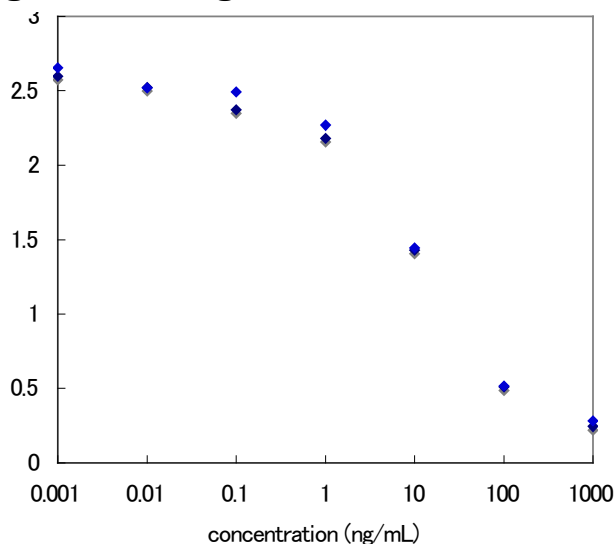
マイクロウエルへ 50  $\mu$ L 添加する抗原溶液濃度が 0.5, 1, 3, 5  $\mu$ g/mL の場合の各アルドステロン濃度における吸光度の比（濃度 1ng/mL / 濃度 0）はそれぞれ 0.58, 0.39, 0.44, 0.55 で、抗原固定量が 1  $\mu$ g/mL のマイクロウエルを使用した場合に最も濃度 0 から 1ng/mL 領域での吸光度差が大きいことが示された。



以上のように ELISA の諸条件の最適化を行った結果、1 次抗体としてモノクローナル抗体 4213（濃度：50 ng/mL）を用い、サンプルと抗体の混合時間は 5 - 10 分間、1  $\mu$ g/mL の抗原 50  $\mu$ L を用いて固定したマイクロウエルを使用することとした。

ii-2-5) 作製した ELISA のパフォーマンス

1% BSA を含む TBS バッファーに任意の濃度のアルドステロンをスパイクしてサンプルを調製し、作製した ELISA にて濃度を測定した。得られた検量線を次に示す。測定レンジは 100 pg/mL - 100 ng/mL 程度であることが示された。



アルドステロンの TBS バッファー中での検量線

さらにヒトプール血漿（ヘパリン処理）に任意のアルドステロンをスパイクしてサンプルを調製し、作製した ELISA にて濃度を測定した。血漿中のアルドステロンの初期濃度

は未測定であるが、バッファー中とほぼ同等の検量線が得られた。測定レンジはバッファー中と同様 100 pg/mL – 100 ng/mL 程度であった。

### ii-3) 目標アッセイ系でのアルドステロン測定

次に目標アッセイ系にて、同様の検討を行い血清にアルドステロンを添加した系にて検量線を作成した。結果を次表に示す。

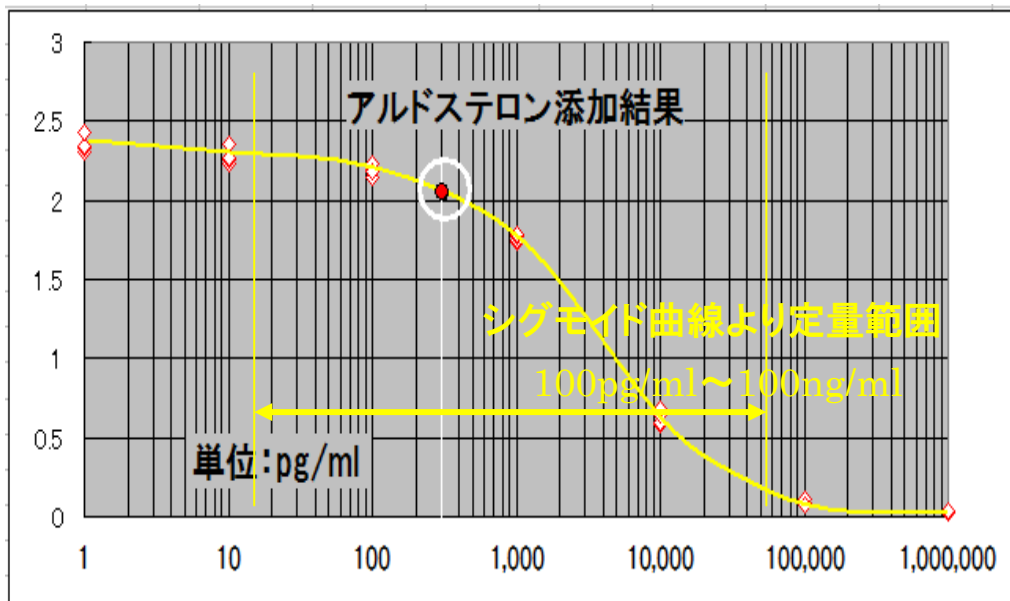
濃度 pg/ml	光量	濃度 pg/ml	光量	濃度 pg/ml	光量	濃度 pg/ml	光量
1	2.31	100	2.2	10,000	0.58	1,000,000	0.02
1	2.33	100	2.23	10,000	0.6	1,000,000	0.04
1	2.34	100	2.15	10,000	0.64	1,000,000	0.03
1	2.43	100	2.18	10,000	0.68	1,000,000	0.04
10	2.23	1,000	1.73	100,000	0.09		
10	2.26	1,000	1.75	100,000	0.11		
10	2.27	1,000	1.77	100,000	0.08		
10	2.35	1,000	1.79	100,000	0.07		

結果を次図に示した。

シグモイド曲線を描き、定量範囲を求めると定量範囲は 100pg/ml から 100ng/ml までと十分な定量性が確認された。

この結果より、

アルドステロンについて最終目標感度である、300pg /mL を達成した。



アルドステロン検量線

### ii-4) 新規抗体作成

上述のように目標感度は達成されたが、使用した抗体は全て米国からの輸入抗体を用いて検討を行っていた。今後の商品化においては抗体の性能安定と供給安定性が不可欠となる。そこでアルドステロンとレニンの新規抗体の作成を行なった。

#### ii-4-1) 作成方式

アルドステロンは、ホルモンであって分子量が小さい。そのためマウスによる一般的な抗体作成法では目標の抗体が取れない可能性が高い。そこで各種の抗体作成法を比較して、抗原をアルドステロン-BSAとしたファージディスプレイ法を採用した。

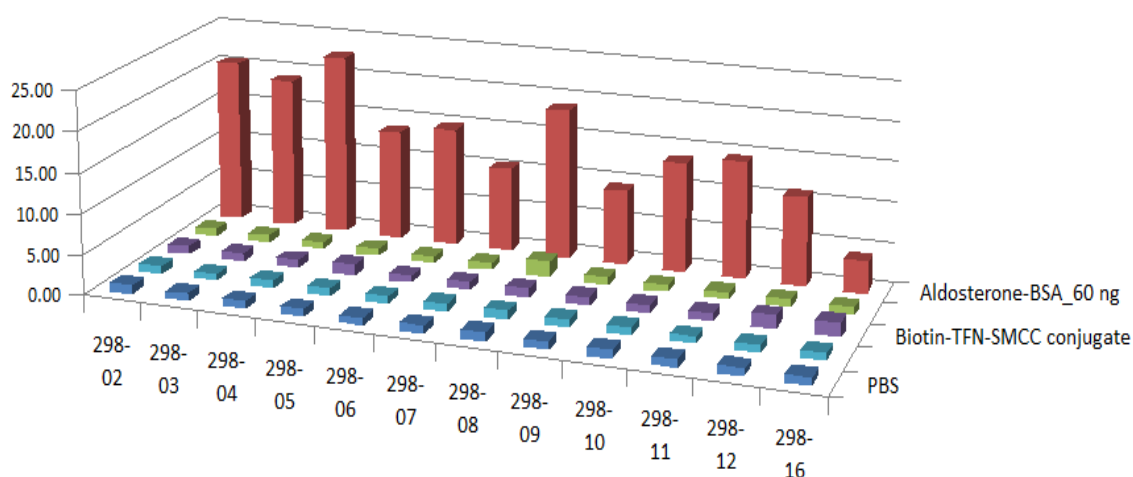
### ファージディスプレイ法

遺伝子工学的手法でファージ（細菌に感染するウイルス）粒子に多様な抗体タンパク質の抗原認識部位を発現提示させ、抗原と反応するファージを回収して、モノクローナル抗体を作製する方法です。なお、同じ操作を複数回繰り返すため必要な抗原量が多くなり、かつ作製に時間を要します。

### ii - 4 - 2) 作成結果

得られた抗体から感度・特異度を考慮して12種類に絞り競合法 ELISA により評価した。結果を次に示す。

absorbance / average												
<>	298-02	298-03	298-04	298-05	298-06	298-07	298-08	298-09	298-10	298-11	298-12	298-16
Aldosterone-BSA_60 ng	1.24	1.14	1.36	0.82	0.89	0.63	1.12	0.56	0.82	0.88	0.66	0.24
Biotin-BSA-MBS conjugate	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.12	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06
Biotin-TFN-SMCC conjugate	0.06	0.06	0.06	0.08	0.06	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.10	0.11
Streptavidin	0.05	0.05	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06
PBS	0.06	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06
S/N (vs.PBS)												
<>	298-02	298-03	298-04	298-05	298-06	298-07	298-08	298-09	298-10	298-11	298-12	298-16
Aldosterone-BSA_60 ng	20.58	18.94	22.65	13.72	14.81	10.54	18.73	9.41	13.65	14.59	11.05	4.07
Biotin-BSA-MBS conjugate	0.90	0.91	0.90	0.90	0.89	0.89	2.00	0.99	0.88	0.93	0.92	0.96
Biotin-TFN-SMCC conjugate	1.00	1.00	1.02	1.33	0.93	1.00	1.15	1.03	1.01	1.01	1.66	1.81
Streptavidin	0.91	0.90	0.93	0.94	0.94	0.94	1.08	0.99	0.96	0.91	0.93	0.94
PBS	1.02	0.97	0.98	0.97	0.92	0.97	1.13	1.04	1.02	1.00	1.00	1.01



上表から、いずれの抗体も特異度が高く、感度も期待できる。アルドステロンの感度は前述のようにクリアしたが、新抗体を用いて最適化や長期データなど実用に向けた検討を、本事業完了後に行う事で成果に結びつけるつもりである。

### iii) レニンの測定

### iii-1) 概要

レニンは最も高感度を要求される対象で、種々検討を行い、抗体も新規に作成し期末になって目標感度をやっと達成したという状況である。初期の抗体は、米国からの輸入品で安定性も悪く感度も目標に達しなかった。新規抗体の中から高感度を達成できる組み合わせを見つけ、40pg/mlの感度を達成した。抗体が新規になったこともあり、本事業完了後にアルドステロンと共に、系の最適化・長期特性把握などを続け商品化を急ぐ。

### iii-2) 目標アッセイ系でのレニン測定

#### iii-2-1) プロトコル

##### <競合法>

レニン固定ビーズ2 $\mu$ Lをチューブにとる

- ↓ 任意の濃度のレニン溶液を TBS-BSA(pH7.5)で調製する
- ↓ HRP 標識ペプチドを TBS-BSA(pH7.5)で5倍に希釈し、20 $\mu$ Lをレニン溶液に混和する
- ↓ 5分後に上記溶液をビーズに混和する
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で3回洗浄
- ↓ TMB液を25 $\mu$ L添加し、一定時間後1M硫酸で反応を停止
- ↓ 450nmで吸光度を測定。吸光度が3以上の場合は希釈し、測定値に希釈倍数をかけて吸光度とした

##### <サンドイッチ法A>

レニン抗体（モノクローナル）固定ビーズ2 $\mu$ Lをチューブにとる

- ↓ 任意の濃度のレニン溶液を TBS-BSA(pH7.5)で調製し、ビーズに混合する
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で1回洗浄
- ↓ HRP 標識ペプチドを TBS-BSA(pH7.5)で5倍に希釈し、20 $\mu$ Lをビーズに混和
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で3回洗浄
- ↓ TMB液を25 $\mu$ L添加し、一定時間後1M硫酸で反応を停止
- ↓ 450nmで吸光度を測定。吸光度が3以上の場合は希釈し、測定値に希釈倍数をかけて吸光度とした

##### <サンドイッチ法B>

レニン抗体（ポリクローナル）固定ビーズ2 $\mu$ Lをチューブにとる

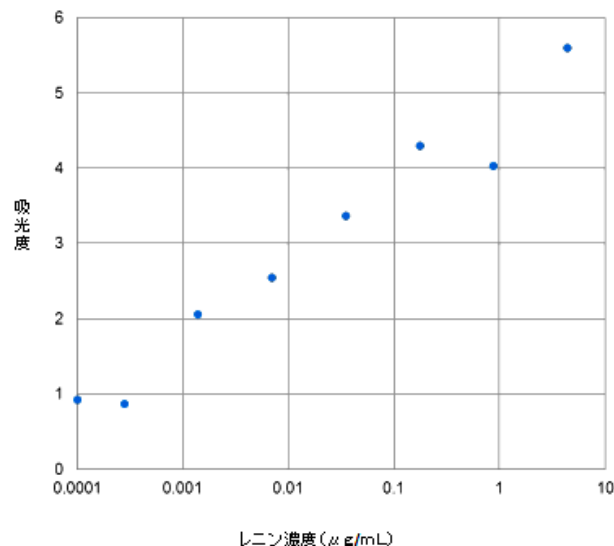
- ↓ 任意の濃度のレニン溶液を TBS-BSA(pH7.5)で調製し、ビーズに混合する
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で1回洗浄

- ↓ レニンモノクローナル抗体を TBS-BSA(pH7.5)で 1000 倍に希釈し、20  $\mu$ L を  
ビーズに混和
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で1回洗浄
- ↓ HRP 標識抗マウス IgG抗体を TBS-BSA(pH7.5)で 1000 倍に希釈し20  $\mu$ L  
をビーズに混和
- ↓ 室温で10分間静置後、磁気でビーズを分離し上澄を取り除く。  
洗浄バッファー TBS-tween 20(pH7.5)で3回洗浄
- ↓ TMB液を25  $\mu$ L 添加し、一定時間後1 M硫酸で反応を停止
- ↓ 450nmで吸光度を測定。吸光度が3以上の場合は希釈し、測定値に希釈倍数を  
かけて吸光度とした

### iii-2-2) 測定結果

結果を次頁図に示す。

測定に直線性はあるが、この時点ではやはり目標感度には届いていない。



### iii-3) レニン抗体の作成

前項にて感度が十分でないことと、やはり抗体は不安定なので新規に作成する事とした。

#### iii-3-1) 作成方式

レニンは、蛋白なので通常の抗体作成法でも出来そうに見えるが、PA 診断に使うためには、レニンに蛋白が結合したプロレニンとの分離特異性がないと実用にならない。そのためマウスによる一般的な抗体作成法では目標の抗体が取れない可能性が高い。レニンとプロレニンの骨格はほとんど差が無いので、やはりファージディスプレイ法を採用した。抗原としては、プロレニンとの結合部位の構造のペプチドを用いた。

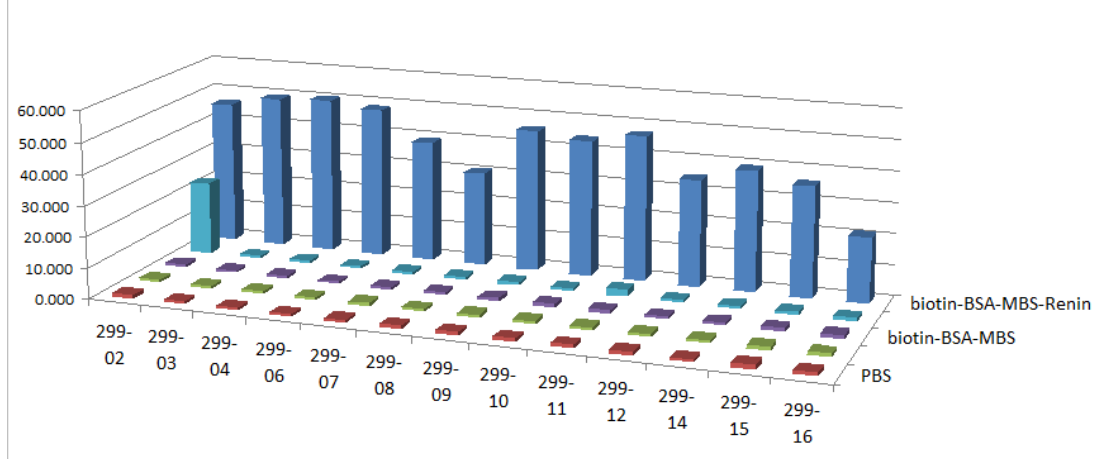
#### iii-3-2) 作成結果

得られた抗体から感度・特異度を考慮して13種類に絞り、競合法 ELISA により評価した。  
結果を次頁に示す。

一番左の 299-02 は、下の図からわかるようにプロレニンと反応しているので使えない。  
その他の中から感度が期待できるものをピックアップしてアッセイ系を構築する。

absorbance / average		299-02	299-03	299-04	299-06	299-07	299-08	299-09	299-10	299-11	299-12	299-14	299-15	299-16	
<>															
biotin-BSA-MBS-258-04	100	1.415	1.510	1.540	1.484	1.196	0.933	1.404	1.350	1.442	1.057	1.196	1.095	0.649	
	50	1.408	1.450	1.455	1.464	1.150	0.969	1.394	1.394	1.420	1.036	1.134	1.081	0.589	
	25	1.402	1.378	1.466	1.412	1.123	0.858	1.269	1.265	1.380	0.950	1.093	1.031	0.515	
	12.5	1.436	1.354	1.381	1.327	0.974	0.411	1.163	1.166	1.303	0.795	1.008	0.957	0.330	
	6.25	1.428	1.112	1.166	1.170	0.637	0.093	0.892	0.952	1.135	0.450	0.830	0.651	0.125	
	3.125	1.259	0.826	0.886	0.887	0.199	0.046	0.593	0.662	0.704	0.157	0.561	0.353	0.055	
	1.5625	0.975	0.519	0.560	0.531	0.052	0.037	0.325	0.402	0.175	0.051	0.211	0.087	0.038	
	0.78125	0.646	0.275	0.320	0.277	0.035	0.034	0.173	0.218	0.063	0.039	0.100	0.061	0.034	
	0.390625	0.341	0.140	0.166	0.147	0.030	0.033	0.096	0.107	0.037	0.033	0.053	0.036	0.032	
	0.1953125	0.182	0.087	0.094	0.085	0.028	0.031	0.061	0.067	0.040	0.031	0.040	0.043	0.035	
biotin-BSA-MBS-258-05		0.722	0.023	0.025	0.023	0.023	0.030	0.030	0.029	0.074	0.028	0.029	0.028	0.032	
biotin-BSA-MBS		0.030	0.023	0.024	0.024	0.024	0.029	0.032	0.032	0.033	0.028	0.030	0.036	0.032	
biotin-TFN-SMCC		0.031	0.026	0.024	0.026	0.026	0.029	0.032	0.032	0.031	0.029	0.029	0.032	0.032	
Streptavidin		0.036	0.025	0.025	0.023	0.026	0.034	0.032	0.035	0.035	0.034	0.028	0.041	0.038	
PBS		0.042	0.026	0.025	0.024	0.027	0.027	0.032	0.037	0.035	0.030	0.028	0.031	0.034	
		PBS av 0.0305													
S/N (vs. PBS)		S/N: 5 - 10			S/N: 10 - 20			S/N: 20 - 30			S/N: 30 - 40			S/N: 40<	
<>		299-02	299-03	299-04	299-06	299-07	299-08	299-09	299-10	299-11	299-12	299-14	299-15	299-16	
biotin-BSA-MBS-Renin	100	46.400	49.540	50.508	48.659	39.218	30.605	46.040	44.269	47.282	34.662	39.226	35.922	21.283	
	50	46.181	47.551	47.728	48.020	37.731	31.789	45.707	45.707	46.565	33.977	37.208	35.471	19.325	
	25	45.978	45.194	48.084	46.309	36.839	28.127	41.632	41.504	45.265	31.145	35.861	33.805	16.875	
	12.5	47.098	44.409	45.291	43.535	31.953	13.476	38.129	38.259	42.744	26.075	33.067	31.394	10.830	
	6.25	46.834	36.488	38.255	38.369	20.890	3.052	29.268	31.213	37.237	14.747	27.225	21.364	4.102	
	3.125	41.303	27.102	29.073	29.100	6.532	1.515	19.434	21.703	23.083	5.149	18.391	11.577	1.815	
	1.5625	31.974	17.006	18.377	17.420	1.699	1.199	10.661	13.179	5.728	1.671	6.914	2.842	1.238	
	0.78125	21.179	9.007	10.488	9.079	1.156	1.125	5.686	7.140	2.075	1.266	3.288	1.986	1.100	
	0.390625	11.173	4.592	5.438	4.823	0.999	1.069	3.145	3.493	1.214	1.091	1.740	1.176	1.056	
	0.1953125	5.974	2.847	3.067	2.794	0.902	1.009	2.011	2.193	1.310	1.027	1.297	1.422	1.143	
biotin-BSA-MBS-Prorenin		23.688	0.758	0.823	0.751	0.751	0.979	0.969	0.936	2.417	0.910	0.948	0.920	1.035	
biotin-BSA-MBS		0.971	0.749	0.781	0.777	0.779	0.941	1.048	1.045	1.091	0.925	0.976	1.184	1.035	
biotin-TFN-SMCC		1.012	0.854	0.787	0.843	0.853	0.943	1.059	1.041	1.002	0.961	0.966	1.033	1.051	
Streptavidin		1.191	0.810	0.820	0.751	0.846	1.105	1.053	1.151	1.148	1.109	0.913	1.332	1.240	
PBS		1.366	0.846	0.807	0.800	0.900	0.871	1.035	1.223	1.143	0.974	0.923	1.000	1.110	

Fig.1. QC-ELISA / SN比 (抗原量 100 pmol/well)



### iii-4) 新抗体による目標アッセイ系でのレニン測定

#### iii-4-1) 抗体組み合わせの検討

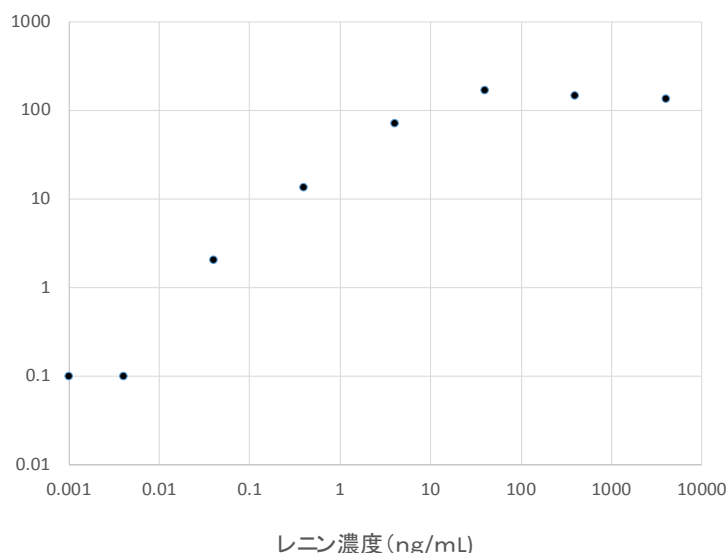
サンドイッチに用いる新規抗体の組み合わせを検討した。5種類の新規抗体および、市販の抗体を用いてアッセイ系を構築し、サンドイッチアッセイが行える抗体の組み合わせをイムノクロマト法で検討した。新規抗体間では有効なサンドイッチコンジュゲートを形成するペアが見つからない結果となった。これは、これらの抗体が同じペプチドエピトープを用いて作成したため、レニンの同じ側を認識しているものと考えられる。

そこで、市販の抗体を組み合わせに入れて、再度評価したところ有効なペアを得た。

#### iii-4-2) 新抗体によるレニン測定結果

このペアを用いて、メンブレン側に市販の抗体を使って、TBS 中でのレニンを測定した検量線を次図に示す。

(右) 縦軸は線形軸で任意単位。(左) 縦軸は 10 を底にした対数軸。



この結果から、40pg/mL は十分な定量領域に入っている事が読み取れる。

以上より目標感度である、レニン 40pg/mL の検出が達成できた。

新規抗体を作成しそれを用いることで目標感度は達成したが、今後最適化や長期特性の検討を行い商品化につなげる予定である。

## IV) 高感度 POCT 装置分注閉塞機の試作

〔製作目的〕

ストークスシフトが大きい蛍光物質を使った高感度 POCT 装置は、本事業が目的としている次世代の診断市場 POCT 化をささえる重要な開発品となるはずです。

それは POCT 装置と、診断項目毎に用意されたデバイスにより構成される。診断項目毎のデバイスは、前項までに述べた反応容器に診断項目毎に必要な試薬を充填しアルミシールされ、それが包装されたキットになってはじめて使用可能となる。

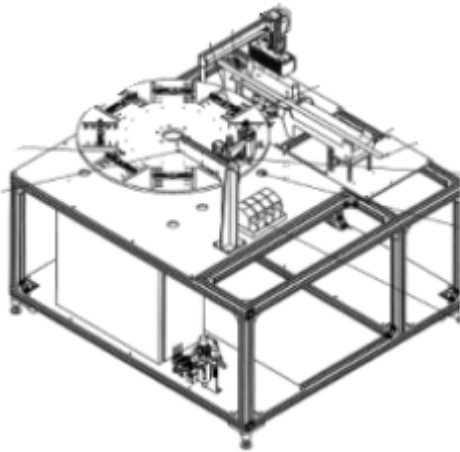
そのため POCT システムを完成させるためには、反応容器に診断毎に必要な試薬を充填し、アルミシールを打ち抜いてシールシマガジンに並べて出力する高感度 POCT 装置



分注閉塞機と、そのマガジンを受けて説明書などと共に包装する高感度 POCT 診断薬カートナーを作らねば完成しない。本事業では、本格機を製作する技術蓄積のために、充填機ならびにカートナーの研究用試作機を開発することとした。

〔機器組図と完成写真〕

開発する試作機の組み立て図と完成品写真を示す。



試薬充填とシールのテストを行い性能を確認した。

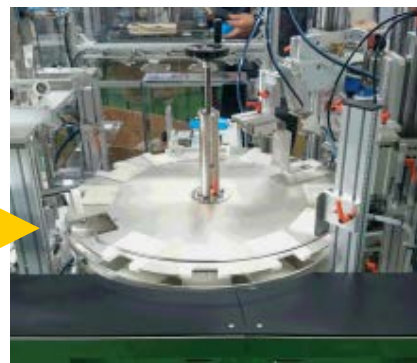
V) 高感度 POCT 診断薬カートナーの試作

〔試作機器写真〕

開発する試作機の組み立て図と完成品写真を示す。



予定の箱の自動組み立てと全部品の充填が可能であることを確認した。



以上より本装置制作は完了した。

## 最終章 全体総括

### 1. 複数年の研究開発成果

#### (1) 高感度な POCT 装置を開発する（サブテーマ1）

##### i) サブテーマ1 達成目標と結果

###### <平成26年度>

目標1 高感度 POCT 装置の測定可能な試作品ができること。

結果1 達成した。

高感度 POCT 装置の試作品を製作した。

目標2 測定感度は、開発アイテム3種のうち1つについて1 ng/ml が測定できる。

結果2 達成した。

アルミシールなどはH27年度となったが、試作した高感度 POCT 装置と試作反応容器により測定できる状態になった。

###### <平成27年度>

目標1 高感度 POCT 装置の一体型試作機ができること。

結果2 達成した。

高感度 POCT 装置の一体型試作機を製作した。

特徴は、投影床面積が A3 サイズの小型コンパクトで量産を指向した低価格。

目標2 開発アイテムアルドステロン・レニン・コルチゾールの3種が測定できる。

目標感度：コルチゾール 600ng/ml、アルドステロン 300pg/ml、

レニン 40pg/ml

結果2 達成した。

#### (2) 血中ホルモン診断試薬を開発する（サブテーマ2）

##### i) サブテーマ2 初年度達成目標と結果

###### <平成26年度>

目標1 3種のアッセイ系の反応が確認されること。

結果1 達成した。

アルドステロン・レニン・コルチゾールのいずれも抗原抗体反応が確認された。

目標2 1種について1 ng/ml を達成していること。

結果2 達成した。

アルドステロン・コルチゾールの2種について1 ng/ml が確認された。

###### <平成27年度>

目標1 アルドステロン・レニン・コルチゾールの3種のアッセイ系を開発する。

結果1 達成した。

アルドステロン・レニン・コルチゾールの3種のアッセイ系を開発した。

目標2 コルチゾール 600ng/ml、アルドステロン 300pg/ml、レニン 40pg/ml  
の測定感度を達成する。

結果2 達成した。

## 2. 研究開発後の課題・事業化展開

### (1) 研究開発後の課題

特になし

### (2) 事業化展開

#### 1) 想定している具体的なユーザー、マーケット及び市場規模等

〔想定する市場〕

事業の高感度POCTシステムの市場は、大きく分けて二つの方向性を持っている。高感度POCTシステムを自社商品開発に活かす方向と、同システムを他社に利用してもらう方向である。

自社商品の最初の市場は、PA関連の血中3ホルモンの診断薬市場である。他社に利用してもらう市場は体外診断薬のかなりの範囲になると予想される。販売も国内だけとは考えていないので、海外の体外診断市場についても本来は考えなくてはならないことになる。

市場規模の議論については、高感度POCTシステムが全くの新システムであることと、PA関連3ホルモンについてはPAの診断治療が黎明期であることから、いずれも明確に既存市場の大きさを出すことは難しい。

すると根拠を持って挙げる方法は、ポテンシャル市場規模をあげるしか方法が無いということになる。しかし市場の大きさと市場がどれだけ取れるかという議論をするには、市場のポテンシャルでは議論できず、販売までの実現時期について考慮しなければ単なる絵に描いた餅に過ぎない。ポテンシャルが非常に大きい市場について言及する場合は、このような迷路あるいは隘路に迷い込まざるを得ない。本事業の対象市場は、まさにこの状態なので、合理的市場規模についてコメントできない状況にある。

それを承知で市場規模として既存市場の大きさについて述べるしかないので以下に述べる。

ターゲット市場（代替可能市場）は、〔1（1）研究開発の背景〕に図示したように2010年度で、化学発光700億円、EIAとイムノクロマトが各400億円、LA定量とその他が何れも300億円であり、合計2,100億円が日本市場である。

#### 2) 事業化見込み（目標となる時期・売上規模）

本事業の成果が直接販売に繋がるものとして次の①～③の3種と、今後開発する④と、自社又は他社の新商品である⑤のグループがある。ここでは①～③までを計上する。

①～③の事業化時期は、何れも薬事取得後の平成 30 年度になる。本事業申請時と変化が無いので以下に本事業申請値を示す。

- ①汎用高感度蛍光免疫POCT診断装置。
- ②PAスクリーニングキット（アルドステロン／レニン比）
- ③AVSキット（アルドステロン／コルチゾール比）
- ④副腎温存手術キット（アルドステロン）
- ⑤は診断各社の検査センター向け商品をPOCT用に新商品として再開発するもの。

販売見込み数 まとめ						計算法	
販売数 件数	28年度	29年度	30年度	31年度	32年度	需要数は非常に多いので、販売台数1台当たりの年平均使用数から人数(処置件数)を計算。	
1 POCT機器 新規台数	0台	0台	100台	200台	600台	初年度 平均使用数	前年度までの機器 平均使用数
累計台数	0台	0台	100台	300台	900台		
2 PAスクリーニング	0人	0人	5,000人	25,000人	75,000人	50人/台・年	150人/台・年
3 AVS	0人	0人	800人	8,800人	26,400人	8人/台・年	24人/台・年
4 副腎温存手術	0人	0人	0人	0人	0人	最初の売上が35年度からになるので売上計上しない。	
5 診断薬メーカー POCT検査移行項目	0人	0人	0人	0人	0人		
販売金額見込み まとめ							
売上金額(千円)	28年度	29年度	30年度	31年度	32年度	一件単価	
1 POCT機器	0千円	0千円	50,000千円	100,000千円	300,000千円	50万円/台	
2 PAスクリーニング	0千円	0千円	10,000千円	50,000千円	150,000千円	2,000円/回	
3 AVS	0千円	0千円	8,000千円	88,000千円	264,000千円	10,000円/回	
4 副腎温存手術	0千円	0千円	0千円	0千円	0千円	25,000円/回	
5 診断薬メーカー POCT検査移行項目	0千円	0千円	0千円	0千円	0千円	未定	
合計	0千円	0千円	68,000千円	238,000千円	714,000千円		

### 3) 事業化に至るまでの遂行方法や今後のスケジュール

本事業は、目的の試作品、目的の診断法と目的感度など、概ね成功裏に完了することができた。しかし各項目記述でも示したように、装置についてはしっかりした市場評価に基づいた鍛錬と改造が必要であり、アッセイ系についても良好な抗体が得られたことからしっかりしたメドは経ったものの、最適化や長期特性採取、さらには薬事を想定した非臨床データ採取も行う必要がある。

現在これらの事を考慮し、POCT 本格機の開発に移行している。引き続き薬事の臨床試験を行う予定である。平成 29 年度には薬事を取得して平成 30 年度に前項で述べた①～③を同時に販売開始することを目指している。

日本および海外の学界活動や国際共同研究を行って販売前の周知を図る。

スケジュール	年度	28年度	29年度	30年度	31年度	32年度
	本格機製作 サンプルの出荷		→			
薬事準備 薬事申請		→	→			32年度から
日本販売開始 (大塚製薬)				販売開始		販売が本格化
検査センター項目の POCT試薬化検討 (診断薬メーカー)					研究・薬事・販売と続く	販売開始は36年度から
海外学会活動 海外共同研究			→	→	→	→
CEマーク・FDA 申請準備 逐次CEマーク・FDA 申請			→	→	→	海外販売は 32年度 から開始
逐次海外販売開始			→	→	→	→
製品等の生産			→	→	→	→
製品等の販売			→	→	→	→

以上