

【公開版】

令和2年度
戦略的基盤技術高度化・連携支援事業
戦略的基盤技術高度化支援事業

「ペプチド核酸を用いた高感度・オンサイト利用可能な家畜感染ウイルス
検出システムの開発」

研究開発成果等報告書

令和3年5月

担当局 近畿経済産業局
補助事業者 一般財団法人大阪科学技術センター

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	1
2. 研究体制	5
3. 成果概要	5
4. 当該研究開発の連絡窓口	7
第2章 本論	8
【1-1】ウイルス遺伝子の特異的に捕獲し、高感度で可視化する“ペプチド核酸(PNA)クロマトの開発”	8
【1-1-1】ペプチド核酸にトラン化合物を修飾して、検出特異度を95%以上に高める技術	8
【1-1-2】PED ウイルス遺伝子を蛍光ビーズ修飾抗体で標識し、検出感度を10倍高める技術	11
【1-1-3】PED ウイルス検出用パッケージの作成	13
【1-2】ウイルスをシリカモノリスカラム上で濃縮する技術の開発	14
【1-2-1】シリカモノリスの構造設計最適化によるウイルス捕捉能力の高度化	14
【1-2-2】シリカモノリスへのカテキン修飾によるウイルス粒子の最終回収率の高度化	16
【1-2-3】シリカモノリスカラムのピペットチップカラム化	18
【2】オンサイトでウイルスを抽出・検出をする自動化装置の開発	19
【2-1】 オンサイト精製・検査装置の開発	19
【2-2】 ウイルス存在判定アルゴリズムの開発	23
【3】システムの臨床的信頼性立証	25
最終章 全体総括	27
1. 研究開発成果まとめ	27
2. 研究開発後の課題・事業化展開	27
(1) 想定している具体的ユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果	27
(2) 事業化見込み	28

第1章 研究開発の概要

1. 研究開発の背景・研究目的及び目標

<研究開発の背景>

我が国の食料生産基盤を担う畜産現場において、豚流行性下痢、口蹄疫、鳥インフルエンザ、豚熱といったウイルス性伝染病蔓延による生産被害が継続的・断続的に起こることが社会問題となっている。

豚流行性下痢では平成23年から4年間で国内1232件、180万頭が感染し、世界でも未曾有の大規模感染被害が報告されている(図1)。家畜の伝染性疾病の発生予防や蔓延防止については、国がその対応方針を定め、この指針に従って厳重かつ徹底した対策が実行されている。しかしながら、それでも家畜伝染病の発生を抑え込めない。現状では、感染は気づかぬうちに拡大し、対策が後手にまわることで大規模感染に至る為、畜産業界は元より、食品業界や観光産業といった周辺産業にも極めて甚大な影響を及ぼす。したがって、畜産現場



図1. 近年の家畜感染症の発生頭数と被害状況

では、生産者が家畜感染症の病原体を現場で日常的に管理し、感染症状が出る前に発見し、早期の対策をすることが必要とされている。

本研究開発においては、潜伏期間が短く感染力が高いため、被害が急拡大する豚流行性下痢 (PED) ウイルスを対象として、畜産現場で生産者が日常の飼養作業の中で簡便且つ高感度に感染状況を知ること、家畜の健康管理に資することのできる「家畜感染症ウイルス検出システム」の開発を行った。

<研究開発目的及び目標>

現在、畜産現場における感染症防疫は、まず入荷する豚の隔離舎での馴化から始まる。健康状態を経過観察 (臨床観察) し、感染症状がなければ飼育舎に移動させ肥育に移る(図2)。馴化中に

【公開版】

感染が疑わしい症状がみられる場合は、便検体を、専門技術を擁する検査センターに輸送し、専門技術者により遺伝子増幅法（以下PCR法）を行って、ウイルス検出を行う。ウイルスを検出するには精製や培養・増幅に時間と専門技術が必要で、結果を得るには2-3日を要し、この間に隔離舎内で感染が拡大する可能性が高い。また、日常の飼養や出荷に際しては臨床観察が主で、不顕性感染豚（感染し病原体を保有してはいるが発症しない）を検出できずそのまま出荷されることもある。現在の検査システムでは、感染症が発症しないと発見できない状況であり、検査判定までの間に大規模な感染拡大に至る可能性がある点が問題として指摘されている。

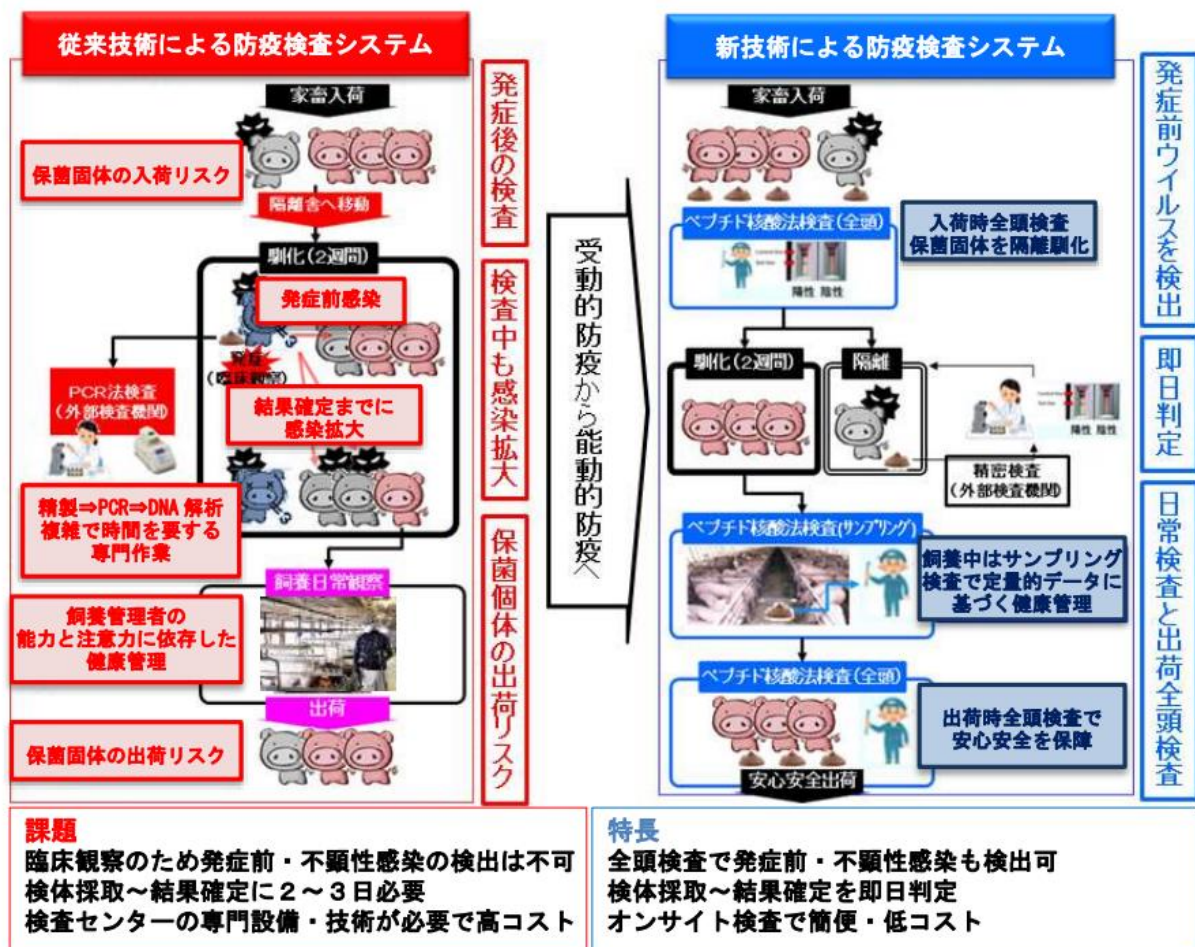


図 2. 防疫検査システムの従来技術と新技術との比較

- ・ 発症前・不顕性感染ウイルスの検出
- ・ 検査の即日判定
- ・ オンサイト検査ができる簡便性と低コスト

【公開版】

を実現することで、感染した家畜の隔離やワクチン投与、出荷制限などの早期の対策につながり、大規模感染を抑え込むことができる。

新システムではペプチド核酸（以下PNA）の持つ核酸識別能力と反応の速さを利用した検査システム（以下PNAクロマト法）を開発し、入荷する豚をオンサイトで即日全頭検査し、ウイルス保有の有無の確認を行い、受入検査で陽性を示した豚を他と隔離することで入荷時の感染拡大を防ぐ。さらに、PNAクロマト法を用いて日常飼養の中で行うサンプリング検査と、出荷する豚の全頭検査をすることで、日常飼養での発症率を抑える健康管理としての感染症防疫を可能とする。それにより畜産生産者への生産性の向上（飼養中の死廃率の低下、防疫費の低減）をもたらし、出荷に際して消費者への食の安心安全保障など畜産農産物の付加価値の向上へつなぐことができる。

○新技術を実現するために解決すべき研究課題

- | |
|---------------------------|
| (十二) 測定計測に係る技術に関する事項 |
| 1 測定計測に係る技術において達成すべき高度化目標 |
| (4) 川下分野特有の事項 |
| 3) その他の川下分野に関する事項 |
| d. 農業分野に関する事項 |
| ①川下製造業者等の特有の課題及びニーズ |
| イ. 農産物等・関連ビジネスの付加価値の向上 |

家畜感染症の検査における“従来技術”としては、ウイルスなどに感染した豚の便検体に含まれる“ウイルス遺伝子を増幅して検出するPCR法”が主流である。PCR法は検体中の微量ウイルス遺伝子を数億倍に増幅して検出できる点で優れるが、検体前処理と遺伝子増幅操作が複雑で、検査結果取得まで数日以上かかり、コストも数万円/頭 必要であることから、オンサイト（畜産現場）での使用には現状不可能である(図3)。

一方、オンサイトで利用可能な検査方法として、病原体ウイルスに対して感染した家畜が体内で生産する抗ウイルス抗体を検出するイムノクロマト法があるが、イムノクロマト法は病原体の存在を家畜由来の成分（抗ウイルス抗体）で間接的に検出するため、感染してまもない個体や、不顕性感染個体を検出できないため非常に有効な方法とは言えない。

そこで本事業では図 3のように、オンサイトで豚流行性下痢を効率的に検出するため、【1-1】、【1-2】、【2】に示す新技術の開発を行った。

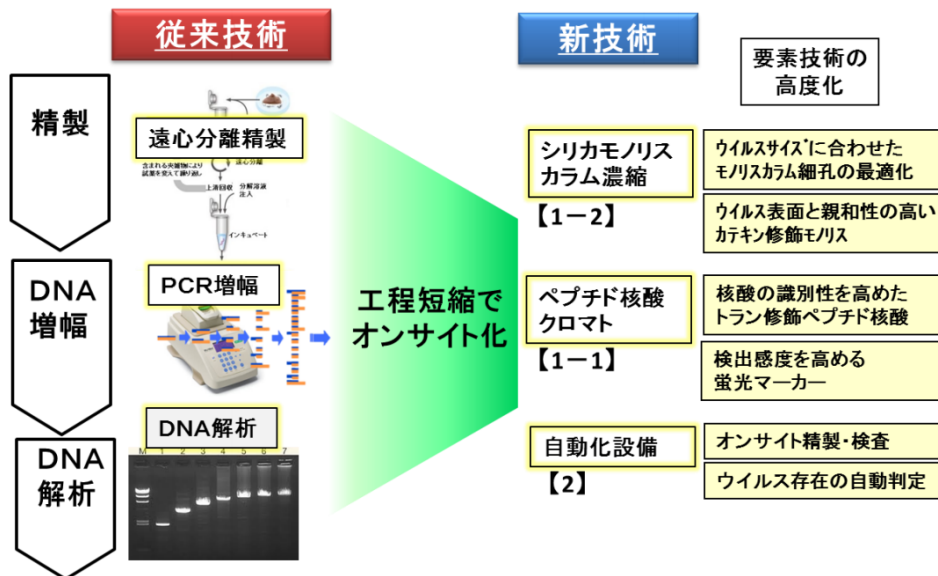


図 3. 遺伝子検出法の従来技術と新技術との比較

【1-1】 ウイルス遺伝子の特異的に捕獲し、高感度に可視化する“ペプチド核酸(PNA)クロマトの開発”：ウイルス遺伝子を強固、且つ選択的に捕獲するトラン修飾ペプチド核酸をキット上に搭載し、捕捉したウイルス RNA を蛍光ビーズで標識する。

【1-2】 ウイルスをシリカモノリスカラム上で濃縮する技術の開発：検体中のウイルスをシリカモノリスカラムでサイズ選択的に捕獲するとともに、モノリス表面にウイルス膜親和性物質を修飾して効果的にウイルスを精製・濃縮する。

【2】 オンサイトでウイルスを抽出・検出をする自動化装置の開発：PNA クロマトキット上でウイルス遺伝子の検出の有無を自動判定アルゴリズムを開発し、さらに検体からウイルス遺伝子を自動抽出するために必要な各種キットとウイルス精製装置を開発する。

上記の研究開発を進め、最終的に【3】を実施する。

【3】 システムの臨床的信頼性の立証

宮崎大学などのアドバイザーの協力を仰ぎながら PED ウイルスに対する、①未感染の個体、②発症前の個体、③発症個体、④不顕性感染個体、を対象にして、ウイルス検出精度と定量化を検証する。さらに、畜産現場で本検査システムの作業性を評価していただき、作業負荷の少ない実用的な検査システムを構築する。

【公開版】

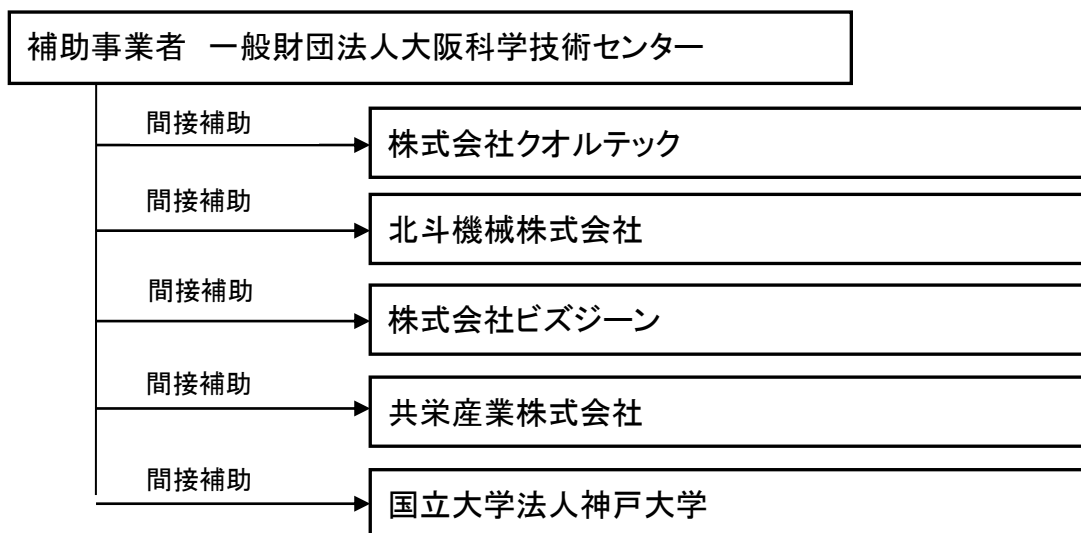
本研究開発における各サブテーマの具体的な開発にあたっては、PED ウイルスを対象として実施した。分析の検体は直腸拭い液(直腸スワブ)を試料とし、検体試料は宮崎大学から提供を受けた。

<これまでの研究開発の関連特許(名称および役割)>

1. 名称：アゾベンゼン架橋型ペプチド核酸を用いたインフルエンザウイルスを測定する方法 (特許第 5796943 号)、役割：ウイルス遺伝子をその場で可視化する PNA クロマト法の提供。
2. 名称：トラン化合物 (特願 2015-184545)、役割：PNA クロマト法に用いる核酸のウイルス遺伝子選択性を高める手法としての活用。
3. 名称：核酸の精製法 (特許第 4811773 号)、役割：シリカモノリスを用いた核酸精製方法。ウイルス精製カラム素材としての活用。
4. 名称：膜融合阻害剤 (特許番号 5579449)、役割：膜ウイルスに結合能の高いカテキン誘導体を利用したウイルスの精製、濃縮技術としての活用。

2. 研究体制

<履行体制図>



3. 成果概要

【1-1】 ウイルス遺伝子の特異的に捕獲し、高感度に可視化する“ペプチド核酸(PNA)クロマトの開発”

- ・ PEDV (豚流行性下痢ウイルス) の特異的な PNA プローブ、高感度の蛍光修飾抗体、PNA クロマト用ハウジングケースの構築を実施し、PNA クロマトキットを開発した。

【1-1-1】ペプチド核酸にトラン化合物を修飾して、検出特異度を95%以上に高める技術

- ・PEDウイルスに特異的に結合するPNAプローブを設計・合成し、蛍光偏光解消法によりPNAプローブが95%以上の特異度であることを確認した。

【1-1-2】PEDウイルス遺伝子を蛍光ビーズ修飾抗体で標識し、検出感度を 10^4 コピー/ μL ウィルス粒子を可能とする技術の開発

- ・蛍光ビーズ修飾抗体によりPNAウイルスの蛍光検出を3倍高感度化した。
- ・目標であったウイルス濃度 10^4 コピー/ μL の検出には至らなかったが、 10^5 コピー/ μL を検出することは可能であった。

⇒さらなる高感度化により発症前 10^4 コピー/ μL の検出を目指す。

【1-1-3】PEDウイルス検出用パッケージの作成

- ・PNAクロマトを専用のハウジングケースに組み込み、簡易的利用が可能なクロマトキット化を達成した。

【1-2】ウィルスをシリカモノリスカラム上で濃縮する技術の開発

- ・シリカモノリスのPEDウイルスに適したメソ細孔の構造最適化しウイルス捕捉能力向上、
- ・カテキン装飾により回収率の高度化を実施しピペットチップカラムを開発した。

【1-2-1】シリカモノリスの構造設計最適化によるウイルス捕捉能力の高度化

- ・シリカモノリスのマクロ細孔を3段階で通液試験による検討を実施し、マクロ細孔サイズを決定した。
- ・シリカモノリスのメソ細孔を4段階で検討を実施し定量PCRによりウイルスRNA量を測定し、ウイルスの捕捉能力が最も向上するメソ細孔を決定した。

【1-2-2】シリカモノリスへのカテキン修飾で、ウイルス粒子の最終回収率を高度化

- ・ウイルスとの親和性が高いカテキンでシリカモノリスを修飾することにより、ウイルス粒子の最終回収率が95%以上となることを確認した。

【1-2-3】シリカモノリスカラムのピペットチップカラム化

- ・ピペットチップの金型を設計し、安定的にシリカモノリスを搭載でき、デッドボリュームの少ない形状のピペットチップを射出成型法により作成した。
- ・ピペットチップに高い信頼度でシリカモノリスを挿入する自動挿入機を作成し、シリカモノリス搭載ピペットチップカラムを完成させた。

【2】 オンサイトでウイルスを抽出・検出する自動化装置の開発

- ・ 15分で自動判定が可能な小型軽量安価な自動ウイルス濃縮検出装置を開発した。
- ・ コンタミを防止する取り外し簡便なプリパックを開発した。

【2-1】 オンサイト精製・検査装置の開発

- ・ デバイスの最終設計値に基づき、装置機構を小型軽量設計し、制御回路を本体一体化して最終試作機（プロトタイプ2号機）を製作した。目標 40cm 立方に対し、36cm (B) ×21(D)×28 (H) で容積 1/3 の装置を開発した。
- ・ 射出成型によりワンタッチでセット可能な試薬と検体チューブを搭載できるプリパック容器を製作した。

【2-2】 ウイルス存在判定アルゴリズムの開発

- ・ バックグラウンドとテストラインとのシグナルのコントラスト差が大きく検出感度の高いカメラの選定を行った。
- ・ 選定したカメラで撮ったテストラインの蛍光強度から、ウイルスの存在判定を行うアルゴリズムを作成し、自動でウイルスの存在の有無を判断することが可能であることを確認した。

【3】 システムの臨床的信頼性の立証

- ・ 糞便検体中の PED ウイルスを使って検証を実施した。
- ・ 畜産関係者に検査システムの動画での WEB アンケートを実施して事業化における課題抽出を行った。

4. 当該研究開発の連絡窓口

〒660-0083 兵庫県尼崎市道意町7丁目1番3

尼崎リサーチ・インキュベーションセンター 304号室

株式会社クオルテック

Tel: 072-226-7175 (代表)

栗原 賢次 kuwaharak@qualtec.co.jp

第2章 本論

【1-1】ウイルス遺伝子を特異的に捕獲し、高感度で可視化する“ペプチド核酸(PNA)クロマトの開発”

ウイルス検出システム

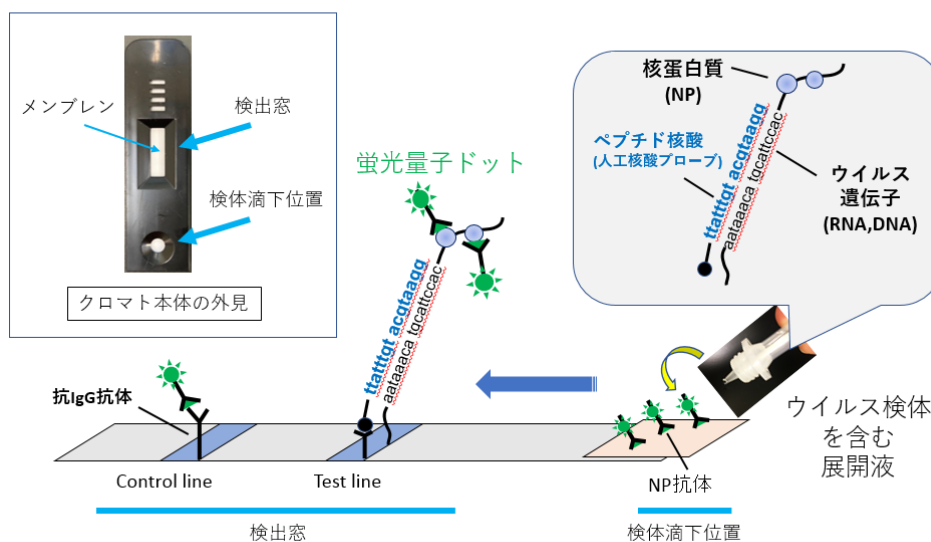


図 4. PNA クロマトによるウイルス検出システム

【1-1-1】ペプチド核酸にトラン化合物を修飾して、検出特異度を95%以上に高める技術

人工核酸の合成・精製の検討

PNAプローブ用配列の候補配列領域を、以下の条件で探索した。

条件①PEDウイルスのゲノムで保存性の高い配列（PEDウイルスの遺伝子と正確に結合する配列）

条件②PEDウイルスのゲノムに固有な配列（PEDウイルス以外の遺伝子とは結合しない配列）

探索の結果、図5のORF1aとORF1bの2カ所から配列候補を選択した。PNAプローブ配列の設計をもとに合成を行った。



PEDウイルスの
模式図



図 5. ウイルス構造の模式図(左)と PED ウイルスのゲノム配列 (RNA 鎖) (右)

合成した PNAプローブを高速液体クロマトグラフィー (HPLC) (図 6) による精製条件の検討を進めた。さらに、微量分光光度計 (図 7) により PNAプローブを測定し、精製度と濃度の確認を行った。さらに、設計した PNA プローブ試薬の再合成・再精製および合成法 (合成収率の向上) の改良を実施し、PNA の疎水性による非特異的な結合を減らすため、PNA プローブの親水性を増加する修飾法を確立した。

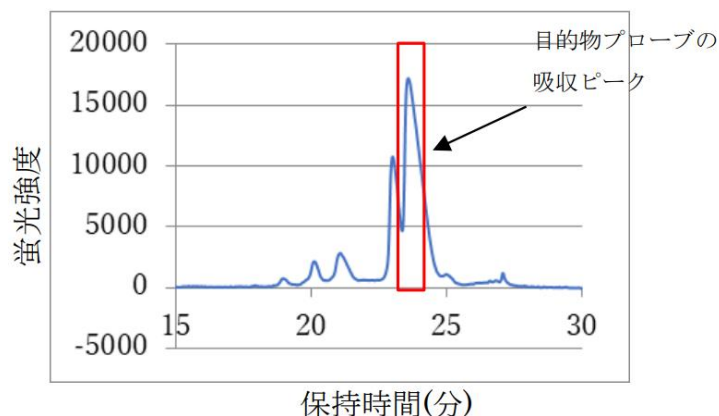


図 6. HPLC の装置(左)およびその結果(右)。縦軸が蛍光強度、横軸が保持時間を示す。ピークの保持時間でサンプルを集めることで均一の核酸を分取することが可能となる。赤四角の部分は目的の PNA プローブのピークを示す。

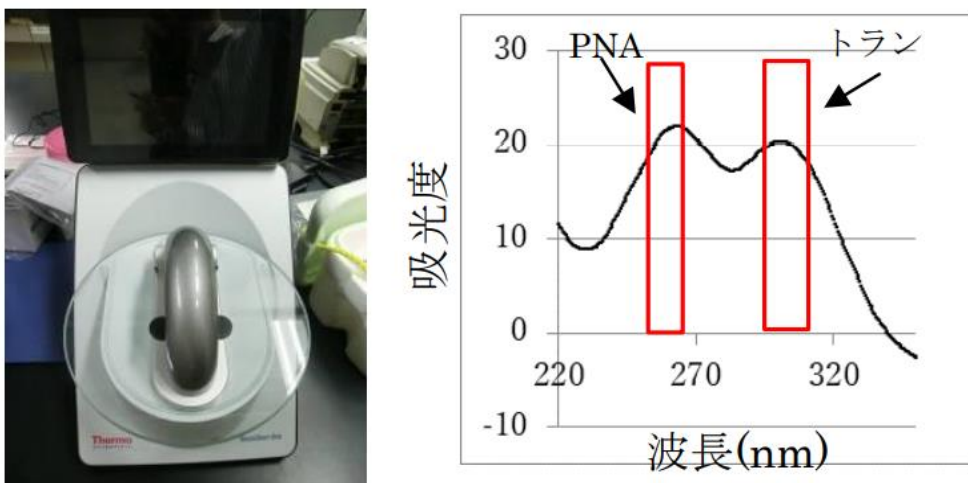


図 7. 微量分光光度計(左)とその結果(右)。縦軸が吸光度、横軸が波長を示す。吸光度の高さから核酸の精製度と濃度を算出することができる。260nm 付近のピークは PNA で、300nm 付近のピークはトランの存在を示す。

PNA プローブ分子と RNA の相互作用の検出

蛍光偏光解消法により PNA プローブと RNA との相互作用を計測し、PNA プローブが PED ウイルスの遺伝子配列に対して 95% 以上の特異度であることを確認した。これにより PED ウイルスと特異的に結合する PNA プローブの作成が実現した。

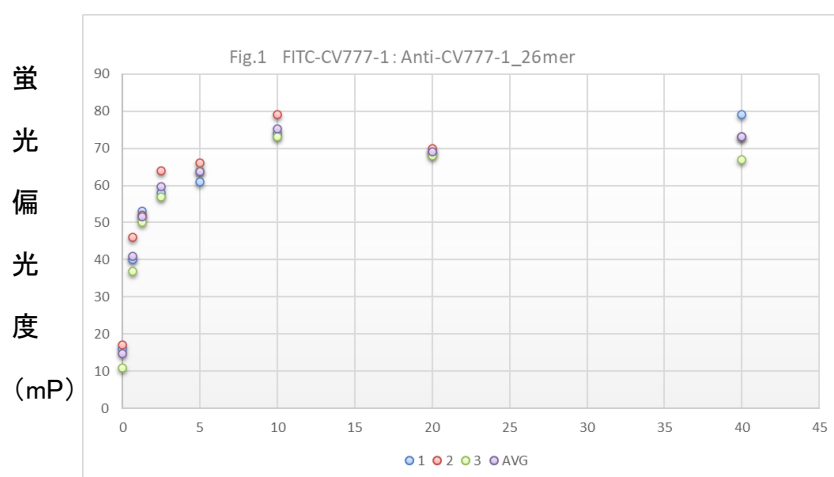


図 8. 蛍光偏光解消法によるワクチン株RNAと蛍光修飾 PNA プローブとの相互作用

縦軸は蛍光偏光度、横軸が核酸濃度を示す。PNA プローブと RNA が結合する際に RNA に修飾した蛍光物質の動き(回転)が抑制されることで蛍光偏光度が減少する。その減少度から PNA プローブと RNA の相互作用を計測する。

【公開版】

ワクチン株ゲノム RNA の配列の一部 20-26mer を化学合成し、蛍光修飾した PNA プローブとの相互作用をマイクロプレートリーダーにより蛍光偏光解消法で確認した (図 8)。その結果、蛍光修飾核酸は標的 RNA に対し解離定数が nM オーダーの親和性を有することが確認された (解離定数が小さいほど強い結合を示す)。一方、この 蛍光 PNA プローブは、変異を含んだ配列に対しては有意な結合を示さなかった。この測定を 20 回以上実施し、再現性を検討した結果、PNA プローブの特異性は 95%以上であることを確認した。

【1-1-2】 PED ウイルス遺伝子を蛍光ビーズ修飾抗体で標識し、検出感度を 10 倍高める技術

蛍光ビーズ修飾抗体を用いた PNA クロマトキットによるウイルス検体の検出条件の検討

ウイルスの測定評価についてリアルタイム PCR 装置を使用し、ウイルス遺伝子抽出およびウイルス遺伝子の定量の方法の検討を行った。

その結果、ワクチン株 PED ウイルス をアフリカミドリザルの腎培養(Vero)細胞に感染させて、増幅する手法により、感染細胞の培養上清から PED ウイルス を回収し、当該ウイルスの感染力を測定するシステムを確立した。PED ウイルスを界面活性剤で溶解し、ウイルス粒子内の遺伝子(viral RNA)を溶出させ、viral RNA 精製キットを用いて単離できることを紫外可視スペクトルにより確認した。遺伝子増幅装置を用いて、ウイルス RNA のコピー数を定量的に同定することにも成功した。

蛍光ビーズ抗体修飾

蛍光ビーズ修飾抗体を用いた PNA クロマトキットによる PED ウイルスの検出条件を確立した。ウイルスの検出に使用している抗体と、蛍光ビーズとの修飾法を検討し、蛍光方式の免疫クロマトリーダー装置による、蛍光ビーズ試薬の検出を行った (図 9)。蛍光ビーズの抗体への複数の修飾方法 Covalent type 方式および Carbodiimide 方式について検討を行った。また、FITC 蛍光修飾 PED ウイルス 抗体試薬によるウイルスの検出条件について検討を行った (図 10)。

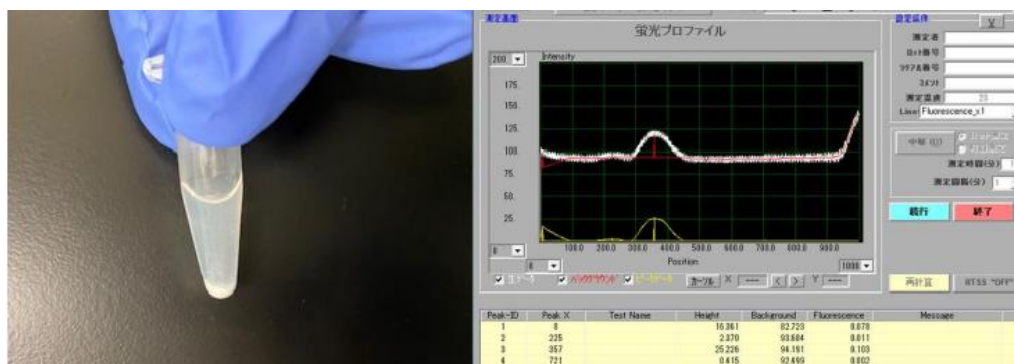


図 9. 蛍光ビーズ試薬(左)と免疫クロマトリーダーによる蛍光ビーズの検出(右)

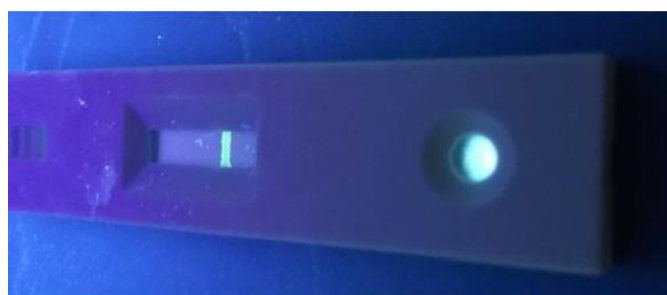


図 10. FITC 蛍光修飾抗ウイルス抗体による蛍光ラインの検出

結果として、PED ウイルス検出の蛍光ビーズ試薬を比較検討し、Quartz Dot 200nm サイズ（古河電工製）を採用した。蛍光ビーズ試薬のウイルス検出用抗体への修飾は、二価性架橋試薬を用いた化学結合法により行った。蛍光ビーズ修飾抗体をライン上で可視化する評価方法を確立し、ウイルス検出に適した抗体試薬（抗ウイルス核タンパク抗体）を選定した。蛍光粒子感作抗体による検出系で対象ウイルスをライン上で検出し、ライン上の輝度を数値化した。結果として、ウイルスの陽性(+)・陰性(-)のライン上の輝度に差があり、ウイルスの検出が可能であることを確認した（図 11）。

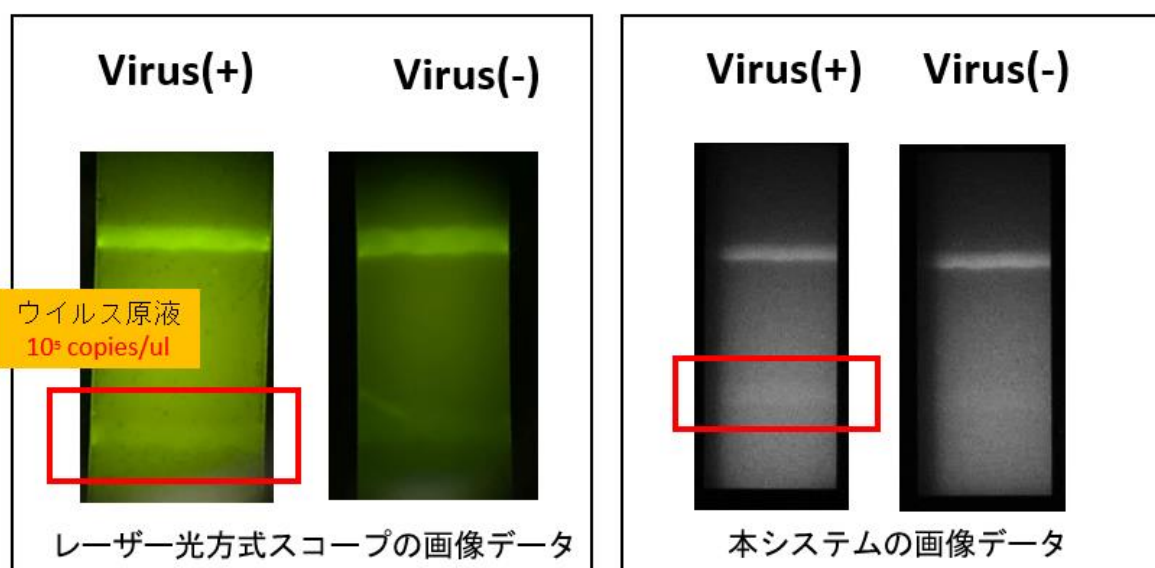


図 11. 蛍光ビーズ修飾抗体によるクロマトの蛍光検出。蛍光スコープ(左)、本システム(右)

【1-1-3】 PED ウイルス検出用パッケージの作成

クロマトキットの試作品の開発

本サブテーマでは、検出感度を増感するため、蛍光ビーズ修飾抗体試薬および最適な部材（コンジュゲートパッド、ニトロセルロースメンブレン、吸水パッドなど）を選定し、試作品を開発した。PNA クロマトについて以下の検討を行った(図 12)。

- ・ラテラルフローのサイズの検討
- ・検出用抗体試薬の調整
- ・発色用金コロイド抗体の感作条件、至適濃度の検討
- ・コンジュゲートパッドの作成条件
- ・クロマト抗体試薬のメンブレン塗布条件の検討

蛍光ビーズ修飾抗体を検出するためのメンブレン塗布試薬および塗布条件を検討し、蛍光ビーズ修飾抗体のクロマトメンブレン中の通液性を評価し、検出に適したニトロセルロースメンブレンを選定した。蛍光ビーズ修飾抗体核酸クロマト法に最適な展開液組成物（溶出液）を開発し、感度変化に関連する展開液中の因子を解明した。

⇒検体洗浄液、検体を展開する溶出液をパッケージしたプリパッケージを開発し、試作品としてパッケージ化できた。

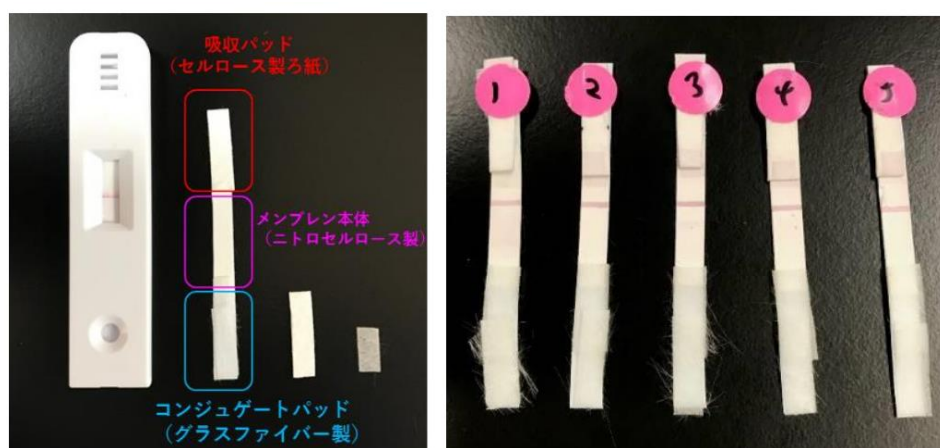


図 12. PNA 検出用クロマトの構成(左)とその試作品(右)

ハウジングケースの作成

クロマトキットのハウジングケースは、PNA クロマトのニトロセルロースメンブレンをセットし、不純物が侵入しにくい形状を検討し、2種類の候補となる形状を設計した(図 13)。まずハウジングケースを切削加工により試作し、PNA クロマトとして問題なく使用することが可能なことを確認した。次に、ハウジングケースへメンブレンを内挿し、検体液を滴下した際の溶液流れ性を検証するために多数のハウジングが必要となった。そこで、射出成形金型を作成して下図 A タイプ、B タイプの2種類のハウジングケースを成型した。各ハウジングケースの展開性能を繰り返し検討した結果、A タイプでより安定した結果を出すことができたため、A タイプの形状を選定した。ハウジングケースの材質の色は自家蛍光を減らすために黒色を採用した。



図 13. ハウジングケースの射出成型品(上:Aタイプ、下:Bタイプ)

【1-2】 ウイルスをシリカモノリスカラム上で濃縮する技術の開発

【1-2-1】 シリカモノリスの構造設計最適化によるウイルス捕捉能力の高度化

発症前の獣畜から採取された糞便検体は、多くの夾雑物を含んでいる。本サブテーマでは、その糞便検体から、PED ウイルスを高効率で捕集でき、95%以上を溶出液に回収できるカラムの作成を目標とした。

シリカモノリスの体積最適化の検討

試作したシリカモノリス搭載ピペットチップにより核酸濃縮の検討を行った（図 14）。ウイルス溶解液、洗浄液、溶出液のフロースルー溶液内のウイルス量を定量 PCR 法で測定し、シリカモノリスの体積検討を行った。小型のシリカモノリス(1.0mm φ、1.0mm t) を使用しウイルス結合量を求め、PNA クロマトに必要なウイルス量を捕捉できるシリカモノリスの体積を決定した。ピペットチップの容量は 1000 μ L とした。

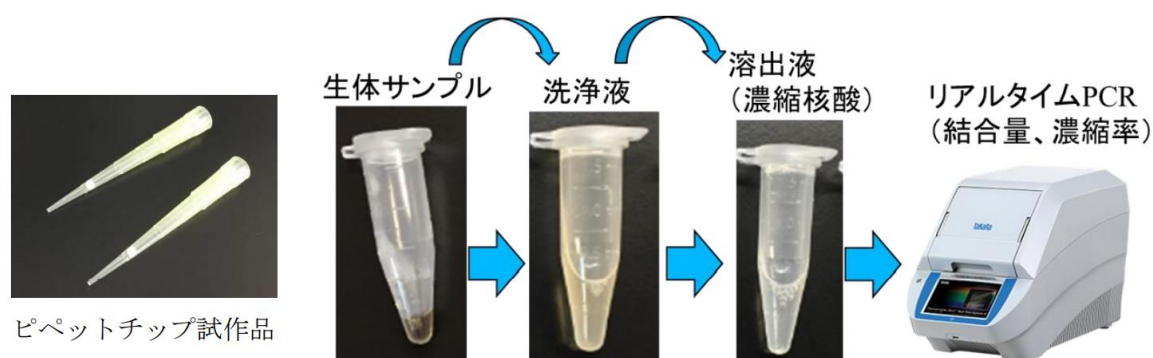


図 14. シリカモノリスを搭載したピペットチップ(左)、それを使用した核酸濃縮(中)、リアルタイム PCR による DNA の定量(右)

マクロ細孔の最適化



図 15. シリカモノリス搭載ピペットチップと糞便サンプル(左)およびそれらの通液試験(右)

糞便サンプルを使用し、マクロ細孔 3 サイズの通液試験（図 15）を行った。検討した結果、上清を吸引・吐出したが、3 サイズのシリカモノリスとも目詰まりすることはなかった（図 15右）。シリカモノリスが吸引・吐出圧力により外れることはなかったが、自動分注機を使用した吸引吐出実験では、一度目の溶液吸引でシリカモノリスが濡れると、シリカモノリス上部のピペットチップの内部圧力が変化することで、二度目の吸引で正確に吸引・吐出がで

きないことがあった。特にシリカモノリスのマクロ細孔サイズが小さい場合に顕著に起こることが分かった。逆にマクロ細孔が大きくなるにつれて粒子捕捉能力が下がってしまうため、最適な中間サイズのマクロ孔サイズのものを選択決定した。

メソ細孔の検討

4 種類 (A - D) のメソ細孔サイズの異なるシリカモノリスで検討を行った。ウイルス溶解液、洗浄液、溶出液のそれぞれについて、シリカモノリスを通過したフロースルー液からウイルス RNA を抽出し、逆転写を行ったあと、そのウイルス RNA 量を定量 PCR 法により測定し、もとのウイルス溶解液のウイルス RNA 量と比較した。検討した結果、サイズ B のメソ細孔で最大 95% のウイルスを回収することができ (表 1)、メソ細孔の最適化を完了した。

表 1. シリカモノリスのメソ細孔によるウイルス結合率および、流出率、回収率

メソ細孔	A	B	C	D
ウイルス溶解液(結合率)	83%	95%	78%	80%
洗浄液(流出率)	1%以下	1%以下	1%以下	1%以下
溶出液 (回収率)	6.6%	100%	1.3%	8.7%

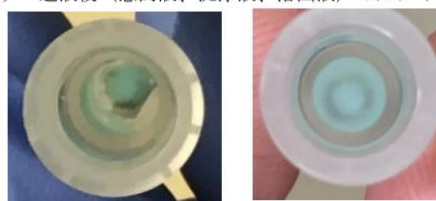
* PED ウイルスの大きさは 95~190nm(平均 130nm)で、表面に 18~23nm のスパイクを有している。

【1-2-2】シリカモノリスへのカテキン修飾によるウイルス粒子の最終回収率の高度化

カテキン修飾シリカモノリスカラムによるウイルス粒子の捕獲法の検討

抽出溶液中の PED ウイルスを、カテキン修飾シリカモノリスで吸着・洗浄・溶出する手法の確立を検討した。有機溶媒にカテキンを超音波により完全に溶解させた。シリカモノリスに 1% w/v カテキン溶液を通液させ、シリカモノリスにカテキンを吸着させた。吸着させたカテキンはメチレンブルーにより呈色させ、結合量を色濃度で測定した(図 16)。

・バッファー通液後（懸濁液、洗浄液、溶出液）のカテキンの結合状態



Blue-green
120-150 (image)

Blue-green
189-191 (image)

・溶媒（メタノールとイソプロパノール）によるカテキンの結合状態

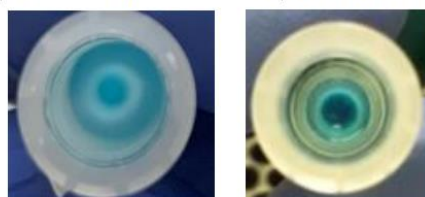


図 16. メチレンブルーによるシリカモノリスへのカテキン修飾の検討。左上:バッファー通液前、右上:バッファー通液後、 左下:メタノールによるカテン修飾、右下:イソプロパノールによるカテキン修飾。

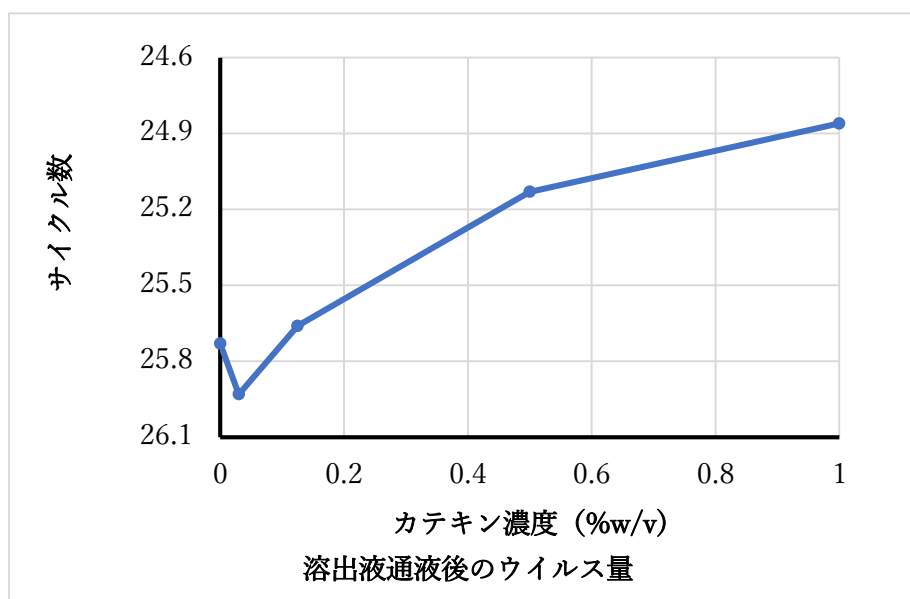


図 17. シリカモノリスへのカテキン修飾量ごとのウイルスの結合量

シリカモノリスにカテキンを吸着させたものについて、カテキン有（濃度 1%w/v）とカテキン無（濃度 0%w/v）で比較した結果、PCR サイクルが 1 減少し、ウイルス RNA 量が約 2 倍あることを分かった。これは、カテキン修飾によってウイルスの吸着量が 2 倍増加したことを示す（図 17）。これによりウイルスの捕獲量を増加させるカテキン修飾シリカモノリスが完成した。

【1-2-3】 シリカモノリスカラムのピペットチップカラム化

[1-2-1]、[1-2-2]で開発したシリカモノリスのピペットチップへの組み込み成型を目指した。

ピペットチップにシリカモノリスを安定的に組み込む工法の確立検討

ピペットチップの形状は、安定的にシリカモノリスを搭載でき、デッドボリュームの少ない形状で、材質はピペットチップでよく使用されているポリプロピレン（PP）を使用した。また、シリカモノリス以外の、他物質のコンタミネーションを防止のためのフィルターの挿入を検討した。

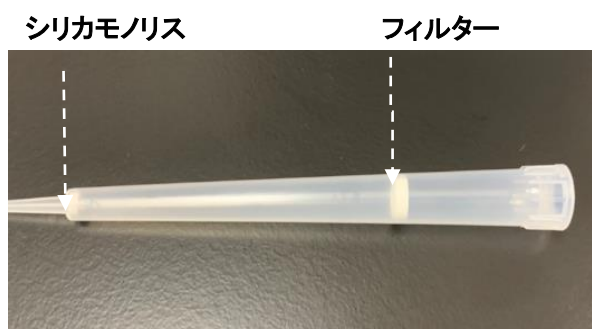


図 18. シリカモノリス搭載ピペットチップカラム試作品



図 19. ピペットチップの金型(左)および成形品(右)

ピペットチップへのシリカモノリス自動挿入機の開発

量産化した場合の安定した供給を検討するために、ピペットチップへのシリカモノリスの自動挿入器の作成を検討した（図 20）。シリカモノリスを挿入した時に安定して固定されるために熱風によりシリカモノリス挿入部を柔らかくし、その部分にシリカモノリスを挿入してゆく自動機を考案・作成した。熱風の効果具合を確認するために熱風の吹き出し口の検討をし、熱風の吹き出し口を多方向にすることで安定することが確認でき、量産に向けて自動化の目途が立った。



図 20. シリカモノリス自動挿入機

通液検査機

品質問題としてシリカモノリスの割れや隙間による漏れの有無の確認の為に通液検査機を検討した。液(アルコールと水の混合)を一定量通過させ、その通液時間を測定することで漏れの有無が確認できる試作機を製作した(図 21左)。試作機の検証にて漏れの有無の確認が可能であるとの確証を得られたので、複数同時検査が可能な2号機の製作を実施し、4本のピペットチップカラムの同時検査が可能となった。これにより多くの研究開発用シリカモノリス搭載ピペットチップカラムを供給することが可能となった(図 21右)。

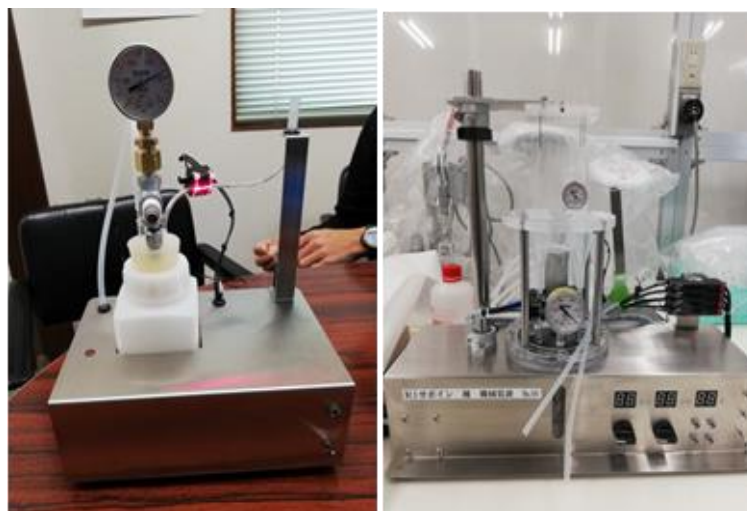


図 21. 通液検査試作機(左)および通液検査機 2号機(右)

【2】 オンサイトでウイルスを抽出・検出をする自動化装置の開発

【2-1】 オンサイト精製・検査装置の開発

自動検査装置として、検体キット・ピペットチップカラム・PNAクロマトキットのワンタッチ取付け、取付け後スタートボタン1プッシュで結果判定まで15分以内で行われること、卓上型検査装置として、全ての機能を40cm立方以内に集約させることを目標とした。

自動精製・検査装置プロトタイプの作成

装置開発は3段階で実施した。まず、第1段階に机上検討で設定された装置動作仕様を元に、装置の基本となる液体ハンドリングポンプ部の実験装置を作成し、シリンジポンプ方式の採用を決定した(図 22)。

第2段階においては、並行して進むプロセス開発やデバイス開発の状況を踏まえ、精製・検査の方法決定までに仕様の変更が予想されることを鑑み、ある程度機能に冗長度を持たせた設計の

プロトタイプ1号機を設計・製作し、専ら精製動作や、デバイスの取り扱い方法の検証を進めた（**図 23**）。この段階では本体はまだプロジェクトの目標サイズには収まっておらず、本体以外にも専用パソコンやモニターが必要な状況であった。

第3段階に入り、精製や抽出・検出のプロセス仕様が固まり、現場での使用条件なども見えてきたことにより、機能を絞り込んで、設計コンセプトを作り直した。

- ① 精製⇒抽出⇒検出のプロセス動作順序は最終条件で固定して、それぞれの工程における条件（吸引量、回数、待機時間等）はパラメータとして変更可能にする。
- ② 畜産現場使用を簡易にするため、商用電源（100V）で全駆動し、制御機能も本体内に内蔵させた上、持ち運び可能なサイズまで縮小する。
- ③ 事業化時のコストダウンを念頭に、部品の複合化による部品点数削減、運動ガイド機構の簡素化を徹底する。
- ④ 極小空間に機能を詰め込むが、装置の製造とメンテナンスの容易性を鑑み、検体やデバイスをセットしハンドリングする「プロセススペース」、その動作を作っている「メカスペース」、全体の制御や電源を納める「制御スペース」は分離させるという条件下でプロトタイプ2号機の設計・製作を行った。

その結果目標40cm立方に対し、36cm（B）×21（D）×28（H）で容積1/3の装置を開発した（**図 24右**）。そして、クロマト画像の撮影に必要なカメラ・照明を本体内に装着した（**図 25**）。検査デバイス（ピペットチップ、プリパック、クロマトキット）を使用し、畜産現場で想定される処理プロセスでプログラムを作成し（**図 24下**）、ドライ状態（実検体・バッファを用いない）で動作確認を行ない精製～抽出のプロセスは5分以内で一連動作ができることを確認した。

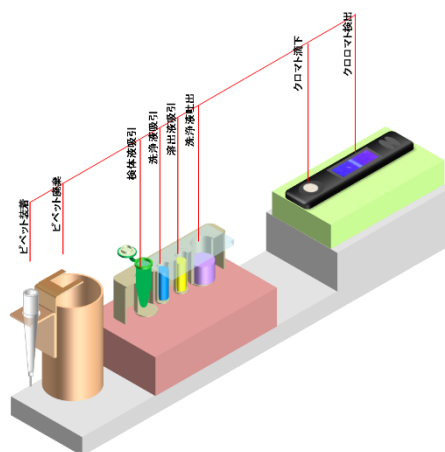


図 22. 装置内部構造の模式図



図 23. 自動ウイルス濃縮検出装置プロトタイプ1号機の外観（左）および内部（右）



図 24. プロトタイプ2号機の外観(上右)とプロトタイプ1号機(上左)との比較、プログラミング画面および操作画面(下)



図 25. 自動ウイルス濃縮検出装置プロトタイプ2号機に組み込んだ検出部

プリパックの試薬の作成

コンタミリスクの高い畜産現場で各種の試薬液を扱うため、必要な溶液をプリパックすることにより、検査者が薬液に触れる必要がなくなり、作業を大幅に軽減し、検査者に起因するコンタミを防ぐことが可能となった。オンサイト精製・検査装置にワンタッチでセットできることを目指して形状検討を行い真空成形にて展開した（図 26左）。

自動濃縮・検出機プロトタイプ2号機を製作し評価する中で、真空成形品では差し込んだ検体チューブの軸にブレが生じる問題が発生し、真空成形品の改善では対応できないことが判明し新たに射出成形金型を製作した（図 26右）。その結果、プロトタイプ2号機での稼働において問題のないプリパックとして成立した。このプリパックにPNAクロマトに必要な試薬を詰めて、アルミシールを貼ることにより試薬の保存性を高めた。また、自動濃縮・検出機にはピアッシングニードルが搭載されており、アルミシールを自動で穿孔させることで試薬に作業者および消耗部材が触れることがなくなるので、コンタミ防止対策とした。



図 26. プリパックの真空成型品(左)、再検討品(中央)、射出成型品(右)

【2-2】 ウイルス存在判定アルゴリズムの開発

ウイルス存在判定アルゴリズムの試作を実施し、従来のクロマトキット上の検出バンド定量アルゴリズムと比較し、蛍光検出バンド対応で同等以上の開発を目指した。

テストライン検出の検討（カメラテスト）

PNA クロマトのテストラインを検出する機器に使用するカメラの光源・フィルター等を選定し、検出器の仕様検討を行った。

A. モノクロカメラを使用時の装置構成（図 27）

カメラ： 1/3 インチ VGA

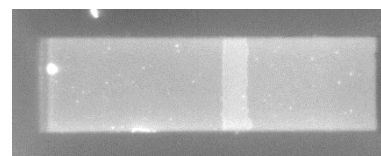


図 27.テストラインの蛍光画像

B. カラーカメラを使用時の装置構成(図 28)

カメラ： 1/3 インチ VGA



図 28. カラーカメラの画像

テストラインをバックグラウンドとのコントラストで比較した。検討した結果、カラーで RGB 比較をしたがフィルタリングすると全体のシグナルが下がりバックグラウンドとの差があまりでなかった。また、モノクロカメラの機器価格の方が安価であるため、モノクロカメラを採択した。カメラテストにより選定した自動ウイルス濃縮検出器に組み込んだ。

ウイルス存在判定アルゴリズム

カメラテストで検討したカメラを使用し、写真画像からウイルスの存在を示すテストライン判定のアルゴリズムの試作を行った。クロマトキットにウイルス濃度既知のサンプルを滴下し、

【2-1】で作成した検査装置で蛍光撮影を行った（図 29）。撮影した画像から、開発したウイルス判定アルゴリズムにより蛍光強度を求め、陽性、陰性、判定不能の判定を自動で行えるか確認した。図 29の青線で囲まれるコントロールライン（抗体を含む溶液が流れたことを示す）および赤線で囲まれるテストライン（PED ウイルスが含まれていたことを示す）の平均蛍光強度を画像から算出し、統計解析を行った結果、 10^6 copy 数で陽性と陰性で有意差があった（図 30）。この解析をもとに、自動ウイルス検出アプリケーションを作成した（図 31）。ウイルス存在判定アルゴリズムが完成した。今後の展開として、AI による判定の高度化について検討し、AI

学習用の多様な画像を多く集め、AIによるバンドの認識を行い、より精度の高いアルゴリズムの開発を予定している。

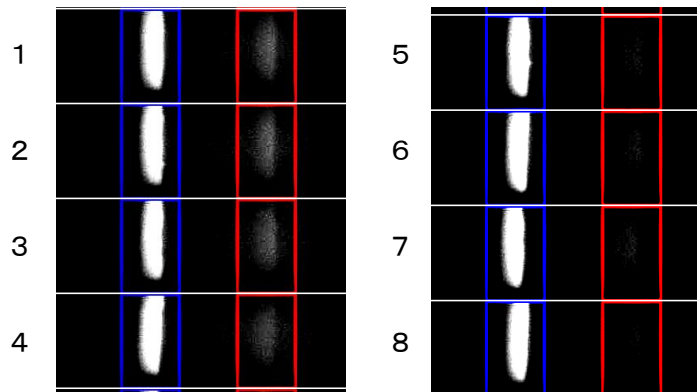


図 29. 自動検出装置による PNA クロマトの蛍光検出画像(左:陽性、右:陰性)。

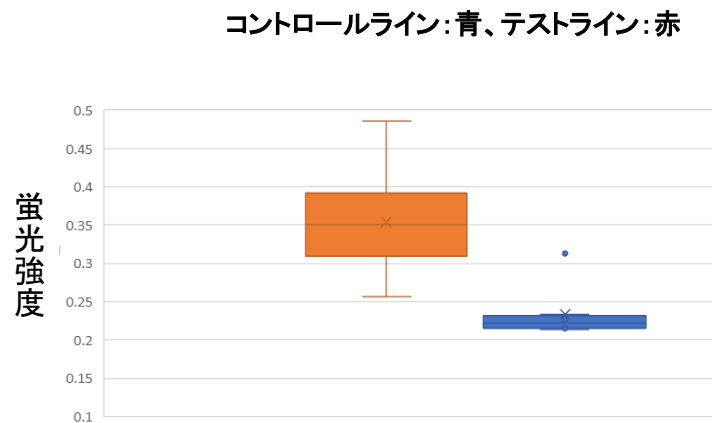


図 30. テストラインの平均蛍光強度(赤:陽性、青:陰性)

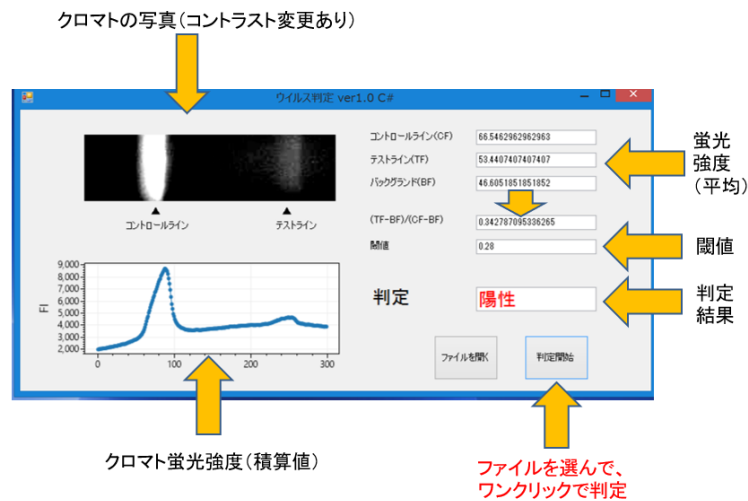


図 31. PNA クロマト自動ウイルス検出アプリケーション

【3】システムの臨床的信頼性立証

PNA クロマトキットによる糞便ウイルス検体（野外株）の検出条件の検討

PNA クロマトキットによる実検体中の PED ウイルスの検出条件について検討を行った。PED ウイルスを含む糞便検体は宮崎大学から提供を受けた。

【1-1】で PNA クロマトを開発した後に、便由来の各検体（便検体を希釈した溶液）を検出できるかを検討したところ、PNA クロマトにより野外株の検出に成功した。

実験室条件での検体の検出試験については実施したが、野外での実検体を使用した検証（オンサイトでのフィールド検証）については、コロナ禍で実施できなかった。

標準株 PEDV(+) PEDV(-)
(NK94) (#61) (#2)←



図 32. PNA クロマトによる検体の検出例(左)、糞便検体(右)

Number	サンプル名	検体の種類	コピー数 copy/ μ l	検出結果
34	1	糞便(-)	-	-
35	2	野外株の培養液	7.45E+06	++
36	3	糞便(+)	1.17E+06	-
37	4	糞便(+)	1.07E+06	++
38	5	糞便(+)	2.77E+04	+
39	6	糞便(+)	1.46E+03	+

図 33. PED ウイルスクロマトテストー1

Number	サンプル名	検体の種類	コピー数 copy/ μ l	検出結果
40	7	糞便(+)	6.74E+02	+
41	8	糞便(+)	7.75E+01	++
42	9	環境拭き取り	6.85E+01	-
43	10	糞便(+)	8.87E+05	+
44	11	糞便(+)	6.02E+05	+
45	12	糞便 (+) フィルター処理	1.07E+06を10倍希釈	++
46	13	糞便 (-) フィルター処理	-	-

図 34. PED ウイルスクロマトテストー2

	PEDV infected Total 11	Not-PEDV infected Total 2
POCT Test kit	A=9 True-positive	B=0 False positive
	C=2 False-negative	D=2 True negative
	Sensitivity $A/(A+C) \times 100$ = 81.8%	Specificity $D/(B+D) \times 100$ = 100%

図 35. PED ウイルス(野外株)における PNA クロマトの感度と特異度

自動精製・検査装置プロトタイプの作業性の検証

畜産現場の作業者に作業負荷のない実用的な検査システムの構築をすることを目指して、本検査システムの実機により作業性を評価して頂く計画をしていた。しかしながら、コロナ禍のため予定していたフィールドで実機を用いて行う検証は実施できなかった。そこで、検査システムの実際の動画（糞便採取/前処理/装置動作/判定）を撮影して、それに基づいた WEB アンケートを考えて畜産現場で検査を担っている獣医師に評価して頂いた。

アンケート結果によると装置使用および結果判定については「とても使用しやすい」「使用可能」の回答が多かった。しかしながら、前処理（サンプル処理、遠心分離）について「使用不可」との結果が複数あった。現状として、【1-2】のピペットチップカラムによるウイルス濃縮の前に、前処理として遠心分離を糞便サンプルの残渣を沈殿させるために行っている。遠心分離については小型で安価な遠心機を使用して頂くことを想定していたが、代替法を検討する必要があることがわかった。

感染症の検査装置についてのニーズについては元々、オンサイトで判定可能、操作が簡単、であることはわかっていたが、今回のアンケートでは、昨今の家畜感染症の状況変化のため、複数の感染症の同時検査のニーズが高まっていることがわかった。

本ウイルス検査装置は PNA クロマトのテストストリップを変えることで複数の検査項目に対応することができる。今後の課題としては、PED ウイルスだけではなく、複数の感染症に対応する PNA クロマトの開発を進める必要があることが分かった。今後とも継続的に WEB アンケートによる検証を続けてよりよいシステムの構築を行う。

最終章 全体総括

1. 研究開発成果まとめ

3年間の事業において、以下の成果が得られた。

○ウイルス検出技術（PNA クロマトキット）

PED ウイルスを95%以上の特異度で捕捉できる PNA プローブを設計し合成した。目標であった10倍高感度に到達できなかったが、3倍高感度化した蛍光ビーズ修飾抗体を作成した。PNA クロマト用ハウジングケースの金型を設計し射出成型品を作成した。それらを一つに組み込むことで安価簡易的に利用できる PNA クロマトキットの開発を完了した。PNA クロマトキットにより糞便検体からのウイルス検出が可能であることを確認した。

○ウイルス濃縮技術（シリカモノリス搭載ピペットチップカラム）

シリカモノリスのメソ細孔を PED ウイルスに最適化し、カテキン修飾することでウイルス捕捉能力を高めたシリカモノリスカラムの開発に成功した。シリカモノリスカラムを安定して組み込み可能なピペットチップを設計した。シリカモノリス搭載ピペットチップカラムのウイルス回収率が95%以上であることを確認した。

○自動ウイルス濃縮・検査装置

目標 40cm 立方に対し、36cm (B) × 21(D) × 28 (H) で容積 1/3 の装置を開発した。検査デバイス（ピペットチップ、クロマトキット）を使用し、畜産現場で想定される処理プロセスで前処理から判定までの一連の動作を15分以内でできることを確認した。

2. 研究開発後の課題・事業化展開

（1）想定している具体的ユーザー、マーケット及び市場規模等に対する効果

地域としては、畜産経営の規模が大きく、飼育豚頭数が85万頭で全国の飼育頭数の10%にあたる宮崎県を中心とした地域を宮崎大学のパイプも活用しながら最初のターゲット市場とする。農場規模としては、検査センターを有する大規模農場を第1に展開を考える。第2には、多数の中規模農場と共済契約している JA 宮崎中央、多くの獣医が所属している宮崎県農業共済組合等の団体や事業者への展開を考えていく。

(2) 事業化見込み

令和3年度は、宮崎県の大規模農場へサンプル出荷をして、評価を進める計画であったが、WEB アンケートの結果より昨今の感染症の状況は、PED から PRRS(豚繁殖・呼吸障害症候群)へ流行が移行していること、判定できる感染症のマルチ化のニーズが高まっていること等がわかった。よって、PRRS のキット開発、装置のマルチ化対応への改良などを優先して進めると同時に商品化のための補完研究や商流の検討なども進めていくこととする。また WEB アンケートの結果より初期投資を抑えるために、装置は販売よりもレンタルのニーズが高いことが判明した。今後、多くの農場・獣医に幅広く拡販できるよう各種のビジネス形態も検討を進める。