

フジサンケイビジネスアイ賞

高感度タンパク質検出システム“RAY-FAST[®]”の
研究開発

¹東レ株式会社 先端融合研究所、²株式会社鎌倉テクノサイエンス

妙本 陽¹ 笹島 義志¹ 北浦 奈知¹
石井 健太郎²

1. 緒言 医療環境の変化とわが国の課題

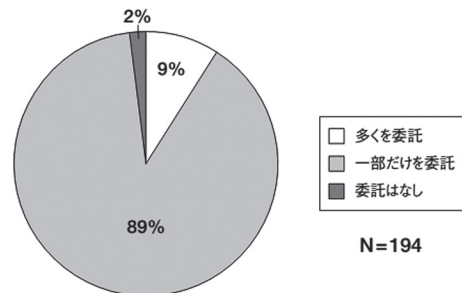
わが国の国民医療費^{1,2)}は増加を続けており、2013年度に40兆円を超えた。中でも医科診療費が最も多く全体の71.8%(約28.7兆円)を占め、入院医療費が37.4%(約15.0兆円)、入院外医療費が34.4%(約13.8兆円)となっている。また、年齢階級別では65歳以上の老年人口に対する医療費は全体の57.7%(約23.1兆円、内、医科診療費は17.1兆円)に達している。即ち、わが国では国民医療費の多くが患者の診察と治療に、特に高齢者医療に費やされていることが分かる。

2010年の国勢調査からの人口推定^{3,4)}によると、65歳以上の老年人口は2010年から2030年にかけて2,948万人から3,685万人(総人口の31.6%)に増加し、15～64歳に相当する生産年齢人口は8,173万人から6,773万人(総人口の58.1%)に減少するとされている。これは医療財源の確保が難しくなることを示唆しており、医療費の削減と医療の質の維持の両立がわが国の喫緊の課題であると言える。

2. 医療現場の現状およびニーズ

わが国の医療施設は一日平均で100万人を超える外来患者を受け入れる状況にある。これが外来診療における待ち時間の6割が1時間未満、診察時間は20分以下という状況を生み、患者の不満に繋がっている^{5,6)}。

私たちはわが国の医療現場の状況分析と独自調査から、医師、患者ともに「適切な治療提供を実現する簡便かつ迅速な診察」に対する強い要望があることを理解するに至った。しかし、現在普及している診断用医療機器の多くは、主に大学病院や検査センターといった大規模医療施設で普及しており、わが国の外来診療の多くを担う、いわゆる中小病院と呼ばれる医療施設では検査の一部または多くを外部委託に頼らざるを得ない状況にある(図1)⁷⁾。これは患者の再来院を意味しており、結果として待ち時間を増加させ、適切な治療提供を実現する壁になっている事実が浮かび上がってきた。



(注)「検体検査の価値と役割に係わる調査」(日本臨床検査医学会)データの無回答群などを除く母集団による再集計

図1 臨床検査の外部委託の割合
(文献7からの転載)

3. 患者状態を迅速に把握するための検査技術

そこで私たちは、全ての臨床現場で患者の状態を迅速かつ正確に把握し、治療方針をその場で決定できる医療環境の実現を目指し、研究を開始した。

臨床検査において血液は採取が容易であり、血球、タンパク質、糖、脂質、電解質、凝固因子、遺伝子などの検査に広く利用され、中でもタンパク質は、酵素、ホルモン、腫瘍マーカー、ウイルス抗原・抗体、アレルゲンなど、様々な検査で用いられている。しかし、検査には血液の液体成分である血清や血漿の分離(前処理)を要する項目も多く、測定では試料の

分注、洗浄、反応といった複数の処理が必要になる。加えて、患者血液を用いた検査では血液媒介性感染症対策が課題となる⁸⁾。

前述の大学病院や検査センターなどで広く普及する検査機器は、ロボティクスを利用した自動測定により、医療従事者が血液に触れる機会を低減させている。しかし、この方式は装置が大型になるため、中小病院で導入することは難しい。そこで私たちは血液の前処理からタンパク質測定までを迅速かつ安全に行う検査を実現する技術開発を進め、高感度タンパク質検出システム“RAY-FAST[®]”として完成させた。

4. RAY-FAST[®] システムの特徴

RAY-FAST[®] システムは血液の前処理である血漿分離と、血漿中のタンパク質を測定するELISA (Enzyme-Linked Immuno-Sorbent Assay) 測定を1つの小型のデバイス内で実現したシステムであり、試料の注入から検査結果を得るまでの全工程がおよそ20分で完了する。ELISA 測定とは、タンパク質 (抗原) に特異的に結合する1種または複数の抗体を用いてタンパク質を測定する免疫学的測定法の総称であり、一般的には抗体に標識した酵素が基質を分解するときを生じる色、蛍光または発光の変化を指標に定量する。

RAY-FAST[®] システムはこの血漿分離と ELISA 測定を行うデバイスである“チップ (図2a)”と、チップを装着して試料/反応液の分離や送液など一連の操作および測定を全自動で行う“装置 (図2b)”から構成され、チップは独自の流路構造を持つ本体と、測定に用いる試薬を充填したリザーバの2つのユニットからなる。チップ本体は“血漿分離部”、“多段送液部”および“反応部”の3つの構造を持ち (図3)、試料を添加したチップを装置に装着することで測定を実現する。このとき装置はチップを回転または停止させることで試料と試薬に遠心力と重力を繰り返し与え、測定を実現する。

a)



b)



図2 RAY-FAST[®] システム
チップ(a)および装置(b)

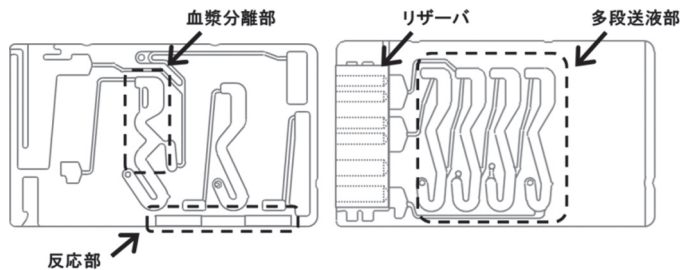


図3 RAY-FAST[®] システムのチップ構造

(1) 血漿分離技術

血液中のタンパク質の検査には血漿または血清の分離が前処理として必要になる。従来法は医療従事者が患者由来血液に触れる際の感染防止が課題であった。そこで、私たちは血液の使用量を減らし、血漿分離を自動化する前処理技術を開発した。

具体的には図4のように、⑥の試料注入口から添加した血液を①の構造体まで遠心力を用いて送液する。このとき、破線を越える血液は②の流路構造によって③の廃液槽に送られ、血液は①の流路構造で規定される容積で計量される。そして引き続き遠心力が加わることで、比重の違いから血漿が血液から分離される。その結果、およそ100~200 μ Lの血液から約2分で正確に20 μ Lの血漿が分離される。この分離された血漿の成分分析は従来法と同等であり(表1)、私たちはこの技術により、迅速かつ安全な血液の前処理を実現した。

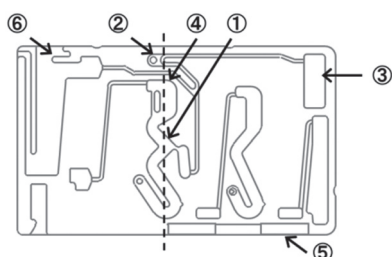


図4 血漿分離の流路構造および反応部

①計量部、②オーバーフロー流路、③廃液槽、
④試薬保持部、⑤反応室、⑥試料注入口

表1 血漿分離前後の試料に含まれる血球成分および血小板量

Blood Cell Type	Pre-separation	Plasma
White cell [$\times 100/\mu$ L]	54.3	0.1
Red cell [$\times 1,000/\mu$ L]	37.8	0.0
Hemoglobin [g/dL]	11.8	0.1
Hematocrit [%]	34.5	0.0
platelet [$\times 1,000/\mu$ L]	18.4	0.3

(2) リキッドハンドリング技術

臨床検体の取り扱いでも感染リスク低減が課題となる。私たちは、チップの回転と停止により生じる遠心力と重力の2方向の力を制御することで、チップ内部での試料および試薬のリキッドハンドリングを自動化し、感染リスクを低減させた(図5)。

遠心力による送液

回転により生じる遠心力は試料または試薬を送液する駆動力になる。遠心力はリザーバ内の試薬を破線矢印方向に送液し、複数の液体は同一流路を通過するとき混合される(液体1と液体2)。また、遠心力は遠心力方向と流路方向が直交する流路で液体を壁面凹部に押し付けて保持する(液体3および液体4)。

重力による送液

回転停止により生じる重力は試料または試薬を図中の破線矢印の方向に送液する（液体4と液体5）。このとき、同一流路を通過する試薬は流路内で混合される（液体6）。

この方式は一般的な大型検査機器に比べて複雑な機構を必要としないため、装置の小型化にも貢献し、設置面積が限られる臨床現場にも対応できる可能性が高い。

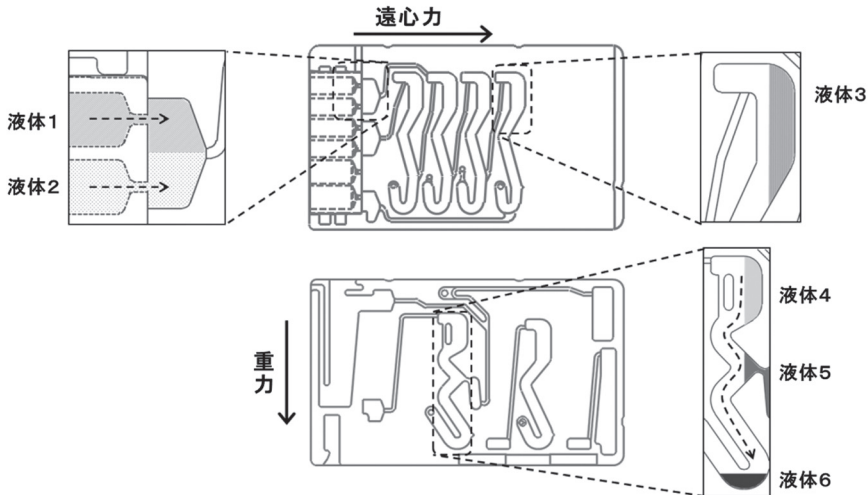


図5 RAY-FAST®のリキッドハンドリング技術

(3) 微量タンパク質検出技術

RAY-FAST®システムは前述の通り使用できる試料の液量は非常に少ない。そのため、測定には高い測定感度が要求される。そこで、私たちは血漿中の微量タンパク質を検出できる高感度タンパク質測定法を開発した。

当該測定法はサンドイッチ ELISA 法を基本原理とする。そのため、測定には基材表面への抗体固相化が必要であるが、従来法は抗体を物理的吸着にて基材表面に固相化するため、抗体の抗原結合部位である Fab 領域（図6a）が基材上で不規則に吸着してしまう欠点があり（図6b）、これが抗体のタンパク質の捕捉効率を低下させ、血漿中微量タンパク質の高感度検出の課題となっていた。また、抗体は数10nmの大きさを持つ極性分子であるため、この物性が抗体間の立体障害を引き起こし、抗体の基板上でのタンパク質捕捉効率低下の原因であることが分かってきた（図6c）。即ち、血漿中微量タンパク質の高感度検出には、抗体間の立体障害を回避し、抗体の配向性を揃える固相化技術が必要となる。

抗体などの生体分子の固相化技術としては、基材上にリンカーを結合し、このリンカーに生体分子に結合させる技術が知られている。しかしながら、血漿中の微量タンパク質の高感度検出には感度面と精度面に課題があった。そこで、自社のポリマー技術を応用し、抗体の Fc 領域を特異的に認識し、基材表面から一定の距離を保ち抗体を基材上に高密度に固相化する技術を開発した（図6d）。この技術により、私たちは RAY-FAST® による血漿中微量タンパク質の高感度検出を達成した（図7）。

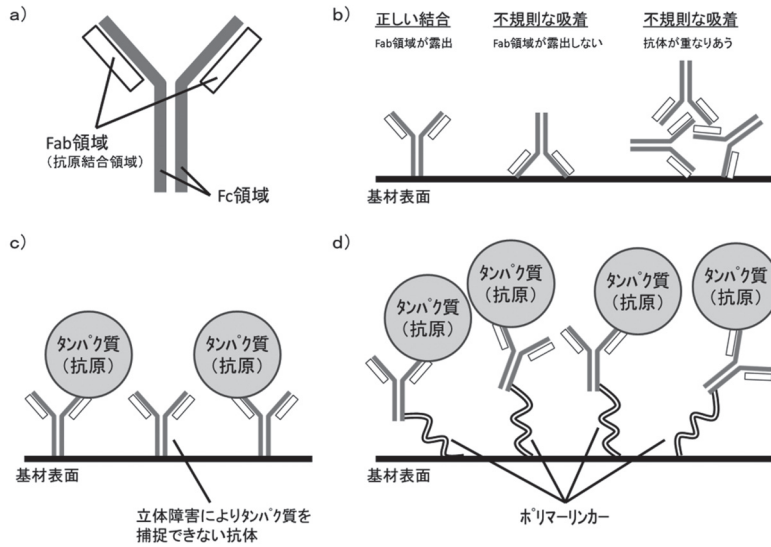


図6 抗体の構造と抗体の基材表面への結合様式

- a) 抗体の構造。抗体はタンパク質(抗原)が結合する Fab 領域と結合しない Fc 領域からなる。
 b) 従来法での抗体の固層化状態。Fab 領域が基材上で不規則に吸着している。
 c) 従来法での抗体とタンパク質(抗原)の結合状態。立体障害のため結合できない抗体が存在する。
 d) ポリマーリンカーを用いた固相化技術。抗体の配向性、自由度が向上し、結合効率が向上している。

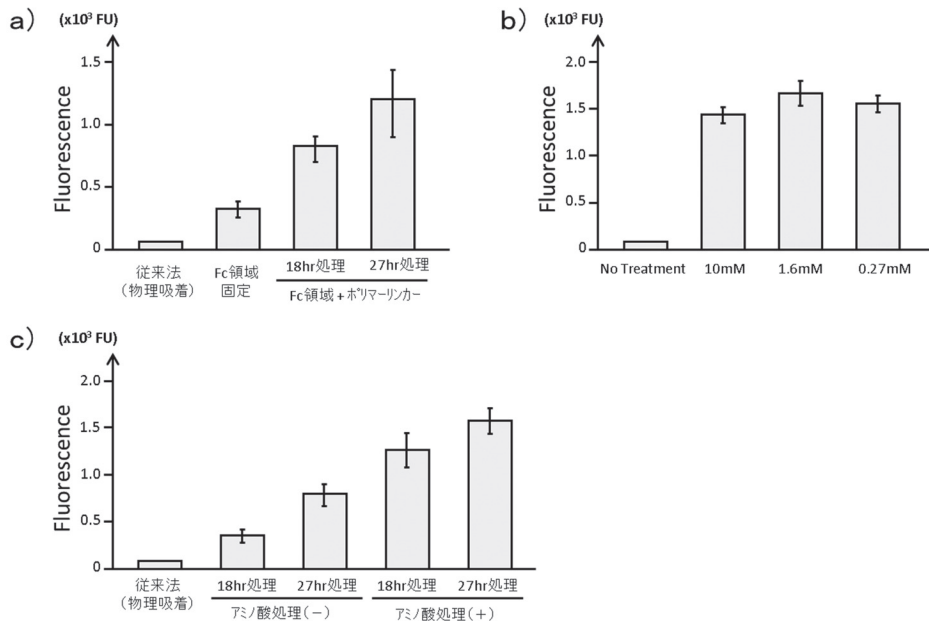


図7 ポリマーリンカーによる抗体固相化の効果

- a) Fc 領域にポリマーリンカーを結合した抗体固相化と従来法の比較
 b) ポリマーリンカー濃度の影響
 c) 抗体固相化におけるアミノ酸処理の効果
 縦軸：IL-6 タンパク質の ELISA 測定における蛍光値

RAY-FAST®システムで抗体はマイクロビーズ表面に固相化されており、図4の⑤に充填され、測定ではタンパク質を含む液体が反応室を通過する際に抗体に捕捉される。私たちはタンパク質の捕捉効率を最大化するため、マイクロビーズを反応室に最密充填する技術を開発し、比表面積率の最大化に成功した。また、試料にはマイクロビーズに非特異的に吸着することで測定を阻害する物質も含まれる。私たちは抗体固相化に用いた表面処理技術に非特異的吸着を抑制する効果があることを見出し、この課題を克服した。

臨床検体を用いた検証から、RAY-FAST®システムの性能は大型検査機器と同等であることが示されており(図8)、私たちは100~200μLの血液から、前処理からタンパク質測定までをおよそ20分で完了する迅速かつ安全に行う測定技術を完成させることに成功した。

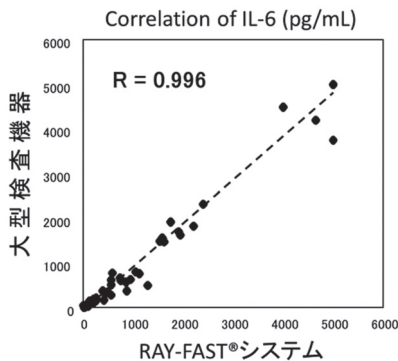


図8 RAY-FAST®システムと既存大型検査装置との相関性(n=108)

6. 最後に

私たちは、わが国の外来診療の多くを担う医療施設が外部委託に頼らず、自らが検査を行い、迅速かつ適切な医療を提供できる技術としてRAY-FAST®システムを完成させた。

このような検査技術はPOCT(Point-Of-Care Test)と呼ばれ、わが国では感度や精度に加えて迅速性や簡便性、安全性なども含めたガイドライン化の動きがある⁹⁾。また、世界的にPOCTは医療のリソースが限定される国、地域などで医療の質を向上させる技術として、また診察室、ベッドサイド、手術室だけでなく、在宅、屋外など様々な環境において適切な医療を提供する技術として注目が高まっている^{10, 11)}。

私たちは、現在、一般外来の中でも特に緊急性が求められる救急外来、ICU(Intensive Care Unit)における迅速かつ適切な医療の実現に貢献したいと考えている。そして更にその将来では、高齢者医療を含むより多くの一般診療で利用していただくことで、より多くの患者に適切な医療が提供され、国民医療費の削減と入院患者の減少に繋がることを願っている。

7. 引用文献

- 1) 平成25年度 国民医療費の概況、厚生労働省
- 2) 平成26年度 医療費の動向、厚生労働省
- 3) 平成26年版高齢化社会白書、内閣府
- 4) 日本の将来の推定人口(平成24年1月推計)、国立社会保障・人口問題研究所

- 5) 平成26年度(2014)医療施設(静態・動態)調査・病院報告の概要、厚生労働省
- 6) 平成25年 我が国の保険統計、厚生労働省
- 7) 我が国における臨床微生物検査業務委託の進行状況とその医療経済的背景、モダンメディア54巻2号2008、22-30
- 8) 検査前工程の標準化ガイドライン(初版)、一般社団法人日本衛生検査所協会
- 9) Evaluating Diagnostic Point-of-Care Tests in Resource-Limited Settings. *Lancet Infect Dis.* 14 (3) 2014. 239-249.
- 10) Existing and Emerging Technologies for Point-of-Care Testing. *Clin Biochem Rev.* 35 (3) 2014. 155-167.
- 11) POCT ガイドライン第3版(2013年4月1日). 日本臨床検査自動化学会会誌. 第38巻 Suppl.1号 2013年. 3-116.
- 12) 医薬品、医療機器等の品質、有効性及び安全性の確保等に関する法律