

難治性中耳炎の診断および活動性を評価する新しいキットの開発

森田 真也 [北海道大学病院／講師]
 中丸 裕爾 [北海道大学大学院医学研究院／准教授]
 仲野 瞬 [株式会社セロテック 江別研究所／所長代理]

背景・目的

難治性中耳炎であるANCA関連血管炎性中耳炎や好酸球性中耳炎は、一般的な中耳炎である滲出性中耳炎や急性中耳炎とは異なり、治療抵抗性で重篤な合併症を引き起こす。しかし、初期段階でこれらの中耳炎を鑑別診断することは容易ではなく、早期治療を実現できていない。そこで本研究代表者らは、難治性中耳炎の診断および疾患活動性を評価するバイオマーカーの有用性を示し、特許に出願した。本研究事業では、この技術を臨床応用して、難治性中耳炎に対する診断および疾患活動性を評価するための新しいキットの開発を目標とする。この開発により難治性中耳炎の早期診断に基づく適切な治療を実現させる。

内容・方法

事業計画全体のタイムラインとして、「基礎研究」「前臨床」「臨床性能試験」「承認申請・審査」の4つに大別され、本研究開発期間内では、特許技術をもとに難治性中耳炎（ANCA関連血管炎性中耳炎、好酸球性中耳炎）に対する診断および疾患活動性を評価するための新しいキットの試作品（プロトタイプ）開発を企業と連携して行う「前臨床（1年目）」の位置づけとなる。試作品を製造するために以下の①～③を達成目標とした。

- ・達成目標①:試作品製造に向けて仕様・規格設定を行う。
- ・達成目標②:試作品を製造して、品質評価および測定感度を検証する。
- ・達成目標③:上記①②を通じて、臨床性能試験に向けた試作品の完成度向上を目指す。

これらの達成目標に向けて、「1:検査キットの仕様・規格設定」、「2:試作品の製造と品質評価」、「3:試作品を用いた非臨床性能評価」を開発サイクルとし、CMCに関する検討課題と解決方法を立案した。

結果・成果

1:検査キットの仕様・規格設定

本研究事業における開発製品イメージは、特許に出願したバイオマーカーの発現をイムノクロマト法で定性的に測定する迅速キットである（図1）。ハーフ・テスト・ストリップ（ディップ・スティック）を試作品（プロトタイプ）として作成した。

2:試作品の製造と品質評価

■検出(呈色)抗体の金コロイド標識確認

金コロイド標識した抗DNA抗体はテスト・ストリップ上に固相化されたDNAに捕捉され、視認可能なドット・プロットが検出された。

■コントロールラインの確認（図2）

テスト・ストリップ上に抗IgG2a抗体をドット・プロットしてラテラル・フローにて金コロイド標識抗DNA抗体を展開したところ明瞭なドットを検出した。

■テストラインの確認（図3）

モデル・サンプルとして、タンパク質とDNAの複合体であるHistone-DNA複合体の検出を試みた。展開液中の界面活性剤(Tween20)濃度が0.06%以下の時、モデル・サンプルが検出可能であった。

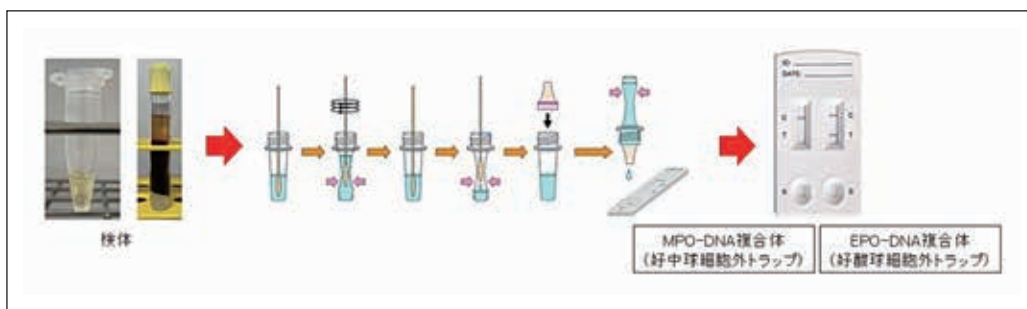


図1

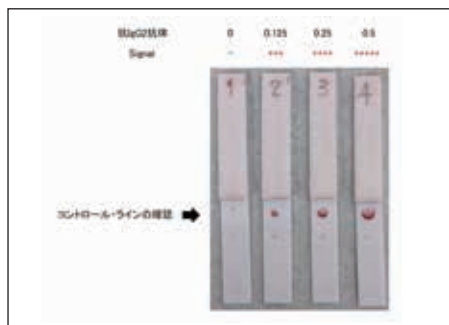


図2

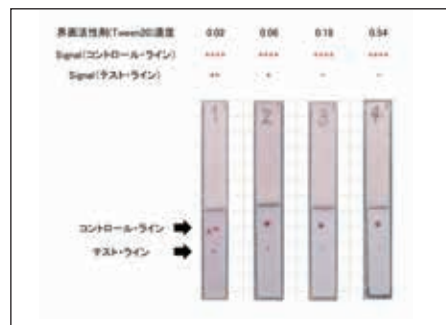


図3

3:試作品を用いた非臨床性能評価

反応条件の至適化と感度向上に伴う課題として、界面活性剤(Tween20)濃度を中心とした展開液組成の検討が挙げられた。界面活性剤(Tween20)濃度がシグナル検出感度に影響すると予測され、様々な濃度で至適化を行った。予測された通り、界面活性剤(Tween20)濃度によっては標的バイオマーカーと金コロイド標識抗DNA抗体の結合体がニトロセルロース・メンブレン上に展開できず、テスト・ストリップの下部に滞留(スタック)してしまうことが分かった(図4)。

■本研究開発事業である前臨床(1年目)における成果と課題のまとめ

- ・本研究事業の内容で掲げた目標①②③は概ね達成できた。
- ・試作品(プロトタイプ)はハーフ・テスト・ストリップ(イムノクロマト法)で作成した。
- ・コントロールラインにおける標的バイオマーカーのシグナル検出感度は良好であった。
- ・テストラインにおける標的バイオマーカーのシグナル検出は0.06%以下の界面活性剤(Tween20)濃度で可能であった。

- ・検出感度の向上には、界面活性剤(Tween20)濃度を中心とした展開液組成の検討が課題になる。
- ・今回の成果をもとにして前臨床(2年目)の段階では、標的バイオマーカーのシグナル検出感度の向上と安定化を得て、仕様・規格の最終決定として市販で汎用されるフル・テスト・ストリップでの形態を目指す。

今後の展望

本研究開発の目標とした難治性中耳炎であるANCA関連血管炎性中耳炎や好酸球性中耳炎の有無を早期診断する上で有用な根拠を得ることができる迅速キットの試作品(プロトタイプ)を作成した。今後は「前臨床(2年目)」に進み、仕様・規格のアップデートを行うことで試作品の完成度向上を目指す。試作品の仕様・規格の最終決定に目途がついた時点で、さらにステージアップして「臨床性能試験」を準備する。また、同時にPMDA対面助言を受け、最終的に厚生労働省の承認と審査を目指す。

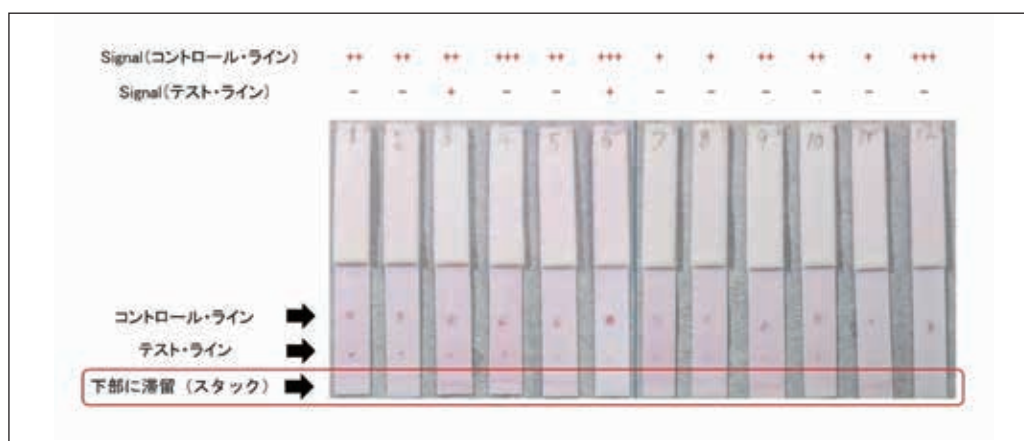


図4