

厚生労働科学研究費補助金（地球規模保健課題推進研究事業）

Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発

研究代表者 金子 明 大阪市立大学大学院医学研究科 寄生虫学分野 教授  
連携研究者 木村政継 大阪市立大学大学院医学研究科 R I 実験施設 准教授

研究要旨

**Acridine Orange 染色法の改良によるマラリア原虫血症の高感度迅速診断法の開発：**

DNA と RNA を染め分けることのできる塩基性の蛍光色素 Acridine Orange ( A O ) 用いて 1994 年頃 Kawamoto らは薄層血液塗抹標本の A O 迅速染色法( 以下、Kawamoto-A0 法 ) を開発し普及に努めてきたが、現在は忘れられかけている。良好な観察領域の見極めが難しいことやマラリア陰性の場合にその確信を得るのが難しいということなどがその理由であろう。また、記録性の悪さや再染色の問題などもあった。

我々は、Kawamoto-A0 法の、迅速かつ明瞭にマラリア原虫を観察できるという本来の利点を維持しつつ、種々の条件を再検討して、従来 of A O 法の不安定要因を解消した。そしてそれを、ケニアビクトリア湖畔のフィールドにおけるオンサイト調査に適用して、厚層ギムザ法をこえる高感度の検出率を達成した。現地の人々が一般的に使用できるようになるまでにはまだ改良の余地があるが、現在マラリアの迅速診断に使用されている RDT が原虫感染率が分からないのに対し、原虫感染率が分かる迅速診断法である改良 A O 法が今後活躍する余地は十分残されていると思われる。

A . 研究目的

Acridine Orange ( A O ) は一色素で DNA と RNA を染め分けることのできる塩基性の蛍光色素である( 図 1 参照 )。1990 年代半ば、川本 ( F . Kawamoto ) らは薄層血液塗抹標本を高濃度の A O で染め、日光またはハロゲンランプを光源として、低倍率 ( 400 倍 ) でマラリア原虫を検出する A O 迅速染色法 ( 以下、Kawamoto-A0 法 ) を開発した。迅速で高感度であることをセールスポイントとして、東南アジアやアフリカ ( タンザニア ) などに、専用のハロゲンランプと顕微鏡が配布され、その普及がはかられてきたが、現在ではあまり使われていない。日本国内においてすら、これを日常的に用いている大学や研究機関は少なくなっているのが現状である。

このように使われなくなってきたの

には専用の装置が必要なほかに種々の理由が考えられる。Kawamoto-A0 法では、適切な染色領域を探し出す必要があり、初心者にはこれがかなり手間であった。適切な染色領域ではマラリア原虫の核が黄色に染まり、原虫細胞質がオレンジに染まって、マラリア原虫の独特の形が蛍光観察され原虫感染率が分かるが、実際操作で困った点のひとつは、染色操作の微妙な違いで、全体が過剰に染色 ( 原虫や白血球が全てオレンジに染まる ) されてしまうことがしばしば起こったことである。この場合再染色の必要があるが、同じ場所は使えないために、予備の薄層標本が必要になる。また、染色ムラが発生し、ある領域では原虫が良く見えるがすぐ近くでは全く原虫が観察されないなどと染色ムラがあった。これらの結果として、マラリアを疑われる患者を

調べて、感染無しと思われる場合に、その人が確実にマラリアネガティブであるか確信が持てなかった。このことが最大の欠点であり、フィールドでのマスキューニングの際には有効かもしれないが、マラリアの疑いでまれにやってくる日本人の患者に対して、検査の第一選択とはなりにくかった。これらが使用が廃れてきた要因であるように思われる。

我々は、A O 染色液の pH の検討などを行って、核と細胞質の良好な染色が行えるよう改良し、また、染色法を工夫して、マラリアネガティブと判定する場合に、確実にネガティブであると判定できるよう改善した。そしてその方法をフィールドにおけるマスキューニングに適用し、他の方法と比較検討したので報告する。

## B . 研究方法

### B-1 A O 染色液組成の検討

A O の化学的性質や、過去の血液標本の染色応用例などを調べ、A O 染色液のバッファ組成や pH、A O 濃度などをより適切にする条件を探す。これと実験との組み合わせにより、従来のもより原虫判別能力の高い A O 染色液組成を検討する。

### B-2 フィールドオンサイト調査

方法等の事前の検討は、正常末梢血やマウスマラリア感染マウス末梢血を用いてある程度実施できるが、実際にマラリア流行地域の患者血液サンプルで調べるのとでは大きな違いがある。そこで、ケニア国、ビクトリア湖島嶼地域でのフィールド調査において、他の検査と平行して、熱帯熱マラリア感染の有無を、その場で調べることにより、我々の方法（改良 A O 法）の有効性を検討する。

### B-3 スライドの準備

患者からフィンガープリックで採取した 5  $\mu$  L の血液でスライドグラスに薄層塗抹標本を作る。このとき、赤血球が互いに重ならないよう強めに引き、長めのスミアーを作るようにする。

薄層塗抹標本は、風乾した後、100%エタノールを吹き付けて固定する。固定操作には通常メタノールが用いられるが、エタノールは毒性が低いほかに、メタノールよりも固定が弱いエタノールのほうが A O 染色の際には良いことが分かっている。

### B-4 A O 染色液

A O 粉末はあらかじめ、0.1% (1000 ppm) の濃度で純水に溶解し、これをフィルター (0.33  $\mu$  m) でろ過して高濃度ストック液とする。

この液を、トリスバッファ (5 mM EDTA, 20mM Tris pH 6.8) で 10 倍希釈して、A O 染色の Working Solution (100 ppm A O, pH 6.8) とする。

A O 染色液が酵母などで汚染すると検査の大きな障害となるので、トリスバッファ及び EDTA の抗菌的性質は重要である。EDTA は、また、RNA の高次構造をほぐす働きがあるので、細胞質の RNA の染まりも良くなる。

### B-5 改良 A O 染色法

図 2 に概要を示す。

机上の吸水紙の上に置いたカバーガラス (18  $\times$  18 mm) に、15  $\mu$  L の A O 染色液をスポットする。

薄層塗抹標本は裏返しにして上から軽く A O 染色液のスポットに触れさせる。その位置は、薄層塗抹の先端部が良い。

-----表面張力で A O 染色液はカバーガラス全体に広がるが、このとき A O は組織に少しずつ吸収されて広がり瞬時に A O 濃度勾配が

スメア（塗抹）の先端部からスメア開始部の方向にできると考えられる。

Option：ここで、図に示すような斜めのポジションで、1分ほど放置する場合もある。

-----その目的は、1分ほどの間は染色が進むが、その間スメア開始部の方向にわずかにAO液が移動し、AO濃度勾配がよりできやすくなるからと考えている。

スライドを上向きにし、顕微鏡観察に入る。ハロゲン光源の専用顕微鏡、または水銀ランプの蛍光顕微鏡を用いる。AOの実質濃度はスポット部（スメアの先端部）が高く、スメア開始部の方向に低くなっているため、まず倍率100倍で、スポット部からスメア開始部の方向に視野を横方向に移動させながら白血球の染まり具合を見て行くと、はじめ白血球はオレンジ色に見えるだけであるが、白血球の核が黄色、細胞質がオレンジ色に見える領域に行き当たる。

その場所で、倍率を倍率400倍に上げ、今度は視野を上下に移動させて、白血球が染め分けられている視野で白血球周辺を調べる。原虫がいれば、そこで核と細胞質が染め分けられたマラリア原虫が見つかる（図3（a）参照）。

上下に視野を移動させつつ、少しずつスメア開始部方向にずらして観察を続けると、白血球の核だけが黄色く染まっている領域に次第に達する。その付近では、白血球は色素不足であっても、非常に小さいマラリア原虫は局所的に色素量が足りて原虫がきれいに2色に染め分けられていることが多い。

-----白血球がきれいに染め分けられている領域はスライドガラス上で5 mm程度の幅があり、その部分で染め分けられている白血球の周りを調べ、白血球200個あたりのマ

ラリア原虫数を調べることができる。

この方法で染色がうまくいかない理由のひとつに、薄層スメアが濃過ぎる場合がある。その場合、積み重なった赤血球などに吸収されて、AOが原虫に集まりにくくなるために、原虫RNAがうまく染まらなくなったり（図3（b）参照）、原虫が全く染色されない場合も起こりうるため注意が必要である。

## 研究結果

### C-1 AO染色液pHの検討

AO-Kawamoto法では、細胞質のオレンジ色が薄い傾向がある。一方、文献的にはpHが低いほど、AOはスタッキングしやすくなりオレンジ色が強く出るようである。

そこで、細胞質のオレンジ色を強くする目的で、pH4.0、pH5.2（以上酢酸バッファ）、およびpH6.8、pH8.0、pH8.8（以上トリスバッファ）の5通りのバッファで調べたところ、pH8.8ではオレンジの発色が少なく、一方、pH4では核も薄いオレンジ色になった（データ略）。一方、pH6.8では黄色とオレンジのバランスが良かった。pH6.8はトリスバッファとして最低のpHに近く、pH6.8でも十分赤色が発色していたので、これをAOバッファのpHとした。

### C-2 他の方法との判定の比較

2013年8月13日のビクトリア湖沿岸地域、Ungoyeでの調査でAOの検出感度を他の方法と比較した。

その日は315人の来訪者中、脾臓肥大と判定された108人全員についてAO観察をオンサイトで行った。オンサイトでは同時にRDT（Rapid Diagnostic Test:

マラリア原虫抗原を抗体で検出する方法)も行った。後に、厚層塗抹ギムザ染色法とPCR法(cox 法)による診断結果が得られたのでそれらも加えて比較した(表1)。

PCRでは108人中、3例だけが陰性であったが、この3例は他の3つの検出系でも全て陰性であった。そこで、PCR陽性の105個を真の陽性とする、擬陰性率は、RDT:14.3%(15/105)、AO法:26.7%(28/105)、厚層ギムザ法:39.0%(41/105)となり、AO法はスタンダードである厚層ギムザ染色法より偽陰性率がかなり低く、これは改良AO法が厚層ギムザ法より検出感度が高いことを示す。これまでのAO-Kawamoto法ではこれほどの良い結果は報告されていない。

なお、このAO観察は、染色操作から顕微鏡観察、記録までを、一人が5時間ほどで行ったものである。

#### D. 考察

AOは目的に応じてさまざまな濃度とpHで細胞染色に利用されてきた。その範囲は、濃度では、6ppmから1000ppmに及び、pHは中性領域以外に低いpH(pH3.5)も使われている。染色時間に関しては1-2分間で済ます迅速染色から30分から数時間を要する緩慢染色まで幅広い。

それらのなかでも、比較的濃度の高いAOを用いる迅速染色として、Lauerら(J Clin Microbiol. 1981 Aug; 14(2): 201-205)は細菌汚染を調べる目的で、100ppm, pH3.5のAO染色液を用い、グラム染色よりも感度良く微生物を検出したと報告している。彼らは、メタノール固定した血液標本を2分間つけた(flooded)後、流水で洗って乾燥させ観察した。やや高めのpH(pH5)で、この方法による薄層塗抹標本の染色を試みたが、白血球はすべてオレンジに染ま

りマラリア原虫の良好な観察もできなかった。

また、Hayashiらの末梢血液の超生体染色(supravital staining)では、1000ppmの高濃度AO液をスライドに前もって塗って乾燥させておき、そのスライドに血液を1滴垂らしカバーガラスを当てて、蛍光顕微鏡観察に持ち込むという方法がとられた(Mutation Research, 245 (1990) 245-249)。彼らの総括(Mutation Res.278 83-98,1992)によると、この方法はPRBCの観察などに非常に便利であるが、欠点として次の2点を挙げている。

ひとつはAOを塗布したスライドは長持ちしないので要時調製しなければならないこと、もうひとつは染色ムラのために、観察に良い領域を捜す必要があることである。

かれらが挙げた欠点はここでも当てはまるので注意が必要ではあるが、我々の改良AO法では、多数の2色に染め分けられた白血球の周りを調べるので問題にならないというのがこれまでの結論である。また、蛍光の退色で保存性がないという問題は、カバーガラスをはずし、未染色領域を再染色するという方法をすでに確立している。

改良AO法はある程度マラリア原虫がいればほとんど直ちに発見できるが、(顕微鏡レベルで)マラリア陰性の場合には、本当に陰性であることを確認するためには5分程度の時間は最低限必要と考えられる。マラリア感染者が高率で存在する今回のような場合は、1検体あたりの検査速度が相対的にスピードアップされた側面はあるだろうが、1枚あたり、染色から結果まで2-3分以内という迅速性は大きな利点である。

AO法は、もともとマラリア原虫が暗い視野のなかで明瞭に区別されて見えるため、低倍率(400倍)で十分観察が

可能という特長があった。この改良AO法によって、AO法を再評価してもらいたいものである。

なお、これまでは光源にハロゲンランプを使用してきたが、光源をLEDランプに変える取り組みを進めている。

#### E．結論

我々は、Kawamotoらが開発したマラリア原虫のAO迅速染色法の細部を再検討することにより、迅速高感度を保持しつつ、安定的にマラリア原虫の存在／非存在を決定できるよう改良した。これを用いれば迅速にオンサイトで、厚層ギムザ法より高い感度で原虫感染率を決定できる。将来は、RDTと組み合わせて、フィールド調査時だけでなく検疫などの輸入マラリアに対する検査手段として利用できることを想定し、更に簡便さを追及したい。

#### G．研究発表

1. 論文発表  
該当なし

2. 学会発表  
2015年3月21日、第84回日本寄生虫学会大会で発表

#### H．知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得  
特になし

2. 実用新案登録  
特になし

3. その他  
特になし