

201434004A

厚生労働科学研究委託費

医療機器開発研究事業

(委託業務題目) 細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発

平成26年度 委託業務成果報告書

業務主任者 美田 敏宏

平成27(2015)年 3月

本報告書は、厚生労働省の平成26年度厚生労働科学研究委託事業（医療機器開発推進研究事業）による委託業務として、順天堂大学（受託者の名称）が実施した平成26年度「【細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発】（契約書第1条で定めた委託業務題目）」の成果を取りまとめたものです。

## 目 次

I. 委託業務成果報告（総括）	
細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発に関する研究	----- 1
美田 敏宏	
II. 委託業務成果報告（業務項目）	
1. マラリア診断用血球分離フィルターに関する研究	----- 26
岡 弘章	
2. 原虫検出のためのマラリア染色技術の最適化に関する研究	----- 43
片岡 正俊	
3. 半導体レーザーとCMOSカメラを用いたマラリア検出装置に関する研究	-- 50
岡 弘章	
4. 光ディスク型超高感度マラリア診断装置に関する研究	----- 62
岡 弘章	
5. 細胞チップの長期保存に関わる技術開発に関する研究	----- 69
片岡 正俊	
6. マラリア原虫定量診断装置の開発に関する疫学的研究	----- 74
美田 敏宏	
7. 実用化の課題に関する情報収集と解決法への提案に関する研究	----- 89
遠藤 弘良	
III. 学会等発表実績	----- 99

## 細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発に関する研究

業務主任者 美田 敏宏 順天堂大学医学部・熱帯医学寄生虫病学 教授

### 研究要旨

本研究は日本発の新規基幹技術である細胞チップ技術を応用した、迅速・低コストなマラリア原虫定量診断装置の開発を目的としている。本年度は基本機能の改良として、血球分離デバイス、染色法の改善、細胞チップ保存法の改良、細胞チップのコンパクトディスク（CD）への組み込みと蛍光測定装置の評価をおこなった。改良にあたっては、ウガンダを中心としたフィールドテストでの検証結果により課題を抽出、国内の開発研究での解決というステップを踏んだ。さらに、流行地での実用化の課題に関する情報収集を進めた。これらの結果は定期的に関催した開発運営委員会で情報共有され、解決法への議論を積み重ねた。血球分離デバイス、染色法、細胞チップの保存法については、ほぼ実用化に近いレベルの結果が得られた。蛍光測定装置としては、半導体レーザーを用いた装置では、小型化、高速化、多検体測定化の点で実用化に難点が示され、コンパクトディスク型検出装置の開発を前倒しでおこなっている。

### 【研究代表者】

美田 敏宏 順天堂大学医学部 熱帯医学  
寄生虫病学 教授

### 【分担研究者】

岡 弘章 パナソニック(株) AIS社技術本  
部 グループマネージャー

片岡 正俊 産業総合技術研究所 健康  
工学研究部門 バイオマーカー解析研究  
グループ研究グループ長

遠藤 弘良 東京女子医科大学 国際環  
境熱帯医学講座 教授

### A. 研究目的

マラリアを制圧するためには、誰もが使える定量的診断手法の開発が急務となっている。本研究は、日本発の新規基幹技術である細胞チップ技術を応用し、迅速・低コストなマラリア原虫定量診断装置の開発をゴールとしている。本装置によりこれまで不可能と考えられてきた超低濃度マラリア原虫感染の診断がワンタッチで誰にでも可能になる。さらに、チップ上から

マラリア原虫を抽出、遺伝子診断による感染種や薬剤耐性の同定が効率的に行える総合診断装置へと改良すべく基盤形成を行う。

本診断装置の導入により、流行地での迅速な流行動向や患者治療効果の把握が容易となり、非マラリア患者への不必要な投薬による様々な不利益を防止するとともに、マラリア対策にかかる莫大な費用の削減をもたらす。本研究の目指す先端技術によるマラリア制圧・根絶への取り組みは、産学連携による国際協力という観点から意義深い。基盤となる技術は日本が得意とする微細加工技術であり、様々な分野における戦略市場を創造する可能性が高い。マラリア定量診断デバイスは、本技術の実用化で最先端を走っており、民間イノベーションの促進による日本産業の再興という波及効果も大いに期待できる。

## B. 研究方法

### (研究機関)

本研究は、順天堂大学、東京女子医科大学、パナソニック株式会社及び産業総合研究所からなる産学連携プロジェクトである。

### (3年間の研究計画の概要)

本デバイスの原理は、血球分離デバイスにより分離した赤血球の染色→細胞チップ上への単層配列→蛍光の検出によるマラリア原虫の定量計測である。3年間の研究計画として、以下に沿って進めていく。

初年度(本年度)：血球分離デバイス及び細胞チップのマイナーな改良を行い、基

本性能を確固たるものとする。

次年度：多検体処理を一度に可能とするために、細胞チップのコンパクトディスク(CD)への組み込みと、蛍光測定装置のバッテリー駆動型への改良を行う。

最終年度：厳しい自然環境や乏しいインフラのもとでも安定して能力を発揮できる頑丈な診断装置とすべく、様々な流行地で実サンプルを用いた評価を中心に行い、商品開発に向けた課題の抽出及び解決を行なう。最終機は測定装置をノートパソコンに組み込んだ小型機となる。

### (プロジェクトの推進手法)

プロジェクトはPDCAサイクルで実施する。研究成果が厚生科学分野での施策へと生かされるべく、PMDAによる助言を受けながら研究計画を年度毎に修正していく。定期的なチェックシステムのもとフィードバックを受けながらプロジェクトを進めていく。

以上の概略に沿って、各分担研究を進めていった。分担研究の研究方法については、それぞれの業務項目毎に作成されている業務成果報告書に記載されているため、割愛する。

### (倫理面への配慮)

不利益は採血時の痛みのみであり、本点について説明と同意を得ている。

## C. 研究結果

本年度は主に、以下7つの項目について研究をおこなった。詳細な内容については、分担研究者の作成した業務成果報告書に記載されている。本総括では、これらの記

載をもとにした項目毎の概要を述べる。

## 1. マラリア診断用血球分離フィルターに関する研究

本診断装置の原理は、核の染色→染色された核の正確かつ高感度な検出にある。このため、核が染まりfalse positiveの原因となる血液中の白血球をできるだけ除去する必要がある。この目的を達成するために、我々は血球分離デバイスを採用することとした。

血球分離デバイスとは、血液中の赤血球と白血球をワンステップで分離することができるデバイスである。これまでおこなってきた遠心分離法と比較し操作性に優れ、専門知識、特別な技術は一切必要とせず、誰でも簡単に高精度な分離が可能になる。しかし、白血球を除去するためにフィルターの性能を上げれば上げるほど検査の目的物質である赤血球も同時に除去されてしまう。根本的に相反する二つの性能的要求に対し、どのように折り合いを付けていくかは今後のフィールドテストの結果を参考にしながら、すすめていく必要がある。高度流行地ウガンダでのフィールドテストの結果をふまえ、「白血球を99.9%以上除去しつつ、赤血球を30%以上透過」というレベルを設定し、そのための改良を進めた。今年度具体的におこなった項目は、分離のコアである濾材のSiO<sub>2</sub>-NFの構造制御、ワンステップろ過機構の開発、マラリア流行地での原理検証、3点である。

### A. 濾材のSiO<sub>2</sub>-NFの構造制御

フィルターの成分はシリコンを原材料

とするナノファイバーである。我々の作成した非結晶性SiO<sub>2</sub>-NFは、従来のフィルター用繊維より細く、高比表面積化が容易となっている。このため、生体分子の高適合性、耐薬品性、防汚性、防食性、耐傷性などの材料特性を有する。また、SiO<sub>2</sub>-NF表面に存在する水酸基により粘着材料の化学的修飾が容易となるだけでなく、高い白血球吸着性を示すことが知られている。さらに、その作成にVSD (Vaporized Substrate Deposition)法を用いることで迅速且つ高密度なSiO<sub>2</sub>-NFの生成が可能となっている。

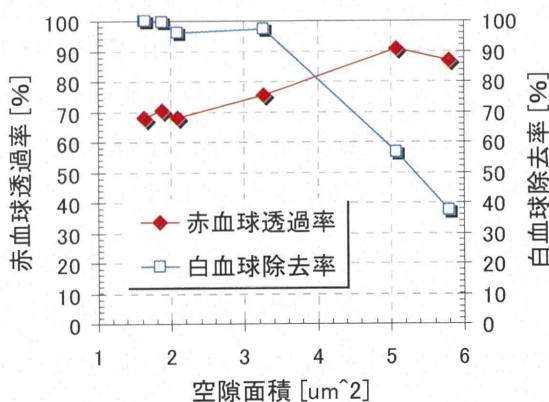
白血球を除去し、赤血球を回収する場合、(1)血球のサイズや変形する能力(変形能)を利用する方法(サイズ分離法)、(2)繊維への血球粘着性の違いを利用する方法(粘着法)があるが、SiO<sub>2</sub>は、材料表面に存在する多くの水酸基によって白血球の粘着性が高いため、前者の方法を採用した。

白血球と赤血球のサイズは非常に似通っているが、赤血球は直径1.5um程度の毛細血管を通過するための変形能を保有している。このサイズの毛細血管では、白血球は通過することができない。直径1.5umの毛細血管の断面積は約1.8um<sup>2</sup>と計上される。即ち、空隙面積を1.8um<sup>2</sup>程度に制御することで白血球のみを除去することができると考えた。そこで、SiO<sub>2</sub>-NFの形状と空隙面積の制御技術を確立することで最適化を図った。

その結果、SiO<sub>2</sub>-NFの形状については、4PaのO<sub>2</sub>分圧を用いることによって、血球との接触頻度が最も高まる厚いSiO<sub>2</sub>-NFが形成でき、かつ円錐台の形状を得ることがあきらかになった。また、空隙面積の最適化については、VS成長の時間(焼成時間)を長く

するほどSiO<sub>2</sub>-NFの径が増大していくため、任意の空隙面積の制御が可能となることを解明した。以上の技術を用いてフィルター性能最適化の基盤を作成することができた。

核酸(蛍光波長520nm)の染色剤であるAcridine Orange(AO)溶液を用いた方法により、フィルター性能の評価法を標準化、最適化したフィルターの性能を評価した。その結果、下図に示すように、空隙面積が2μm<sup>2</sup>以下の領域において99.9%以上の高い白血球除去率と、マラリア診断に適応可能な赤血球透過率(30%以上)が得ることができた。



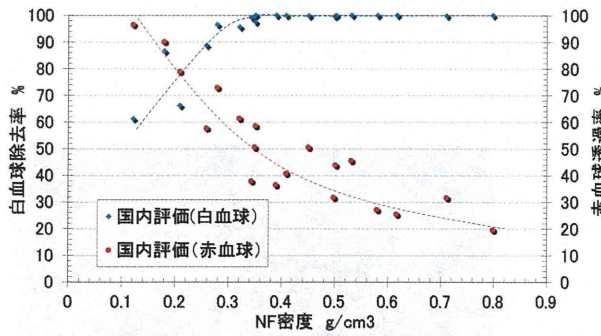
### B. ワンステップろ過機構の開発

特別な装置を必要としない操作性の優れた濾過方法がマラリア流行地で使用するために必須となる。本年度は、その開発に取り組んだ。



濾過装置の構造を示す。中空の樹脂管にSiO<sub>2</sub>-NF形成後のSiチップ、Siゴム製のOリング、封止材のAlシールが設けられている。これを血液が入った容器に挿入しAlシールを剥がすだけで、ワンステップで自動濾過される構成となっている。Siチップおよび樹脂管以外は汎用の部材となっている。また、樹脂管も樹脂成型により簡単に作製できるものであるため、コスト的にも優位性がある構成であると考えている。Siチップの径はφ5mmとしている。

さらに、本濾過装置における高い性能安定性を確保するために、品質検査手法の立ち上げに取り組んだ。リーク検査機とレーザー変位計を用いることで、SiO<sub>2</sub>-NFの空隙面積を非破壊で導出することが可能になった。そこで、本装置により、非破壊測定したSiO<sub>2</sub>-NFの密度と血球分離精度を検討したところ、両者に高い相関があることを確認した。我々が実用レベルと考えている、赤血球透過率30%以上、白血球除去率99.5%以上を満たすSiO<sub>2</sub>-NF密度は0.35-0.55g/cm<sup>3</sup>であり、この領域を良品の規定値とした。



SiO<sub>2</sub>-NF密度と血球分離性能の関係  
(マラリア非感染ヒト血液)

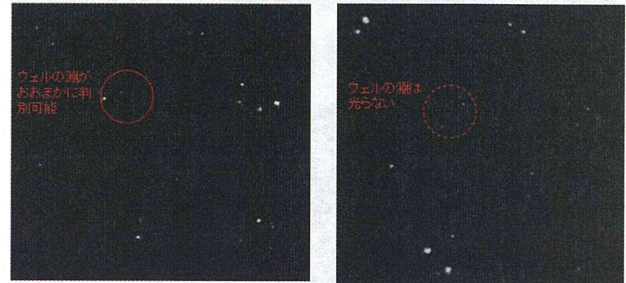
## 2. 原虫検出のためのマラリア染色技術の最適化

我々が開発したマラリア診断装置における原虫診断の基本原理は、マラリア原虫核の染色とそれを適切に検出するシステムにある。このため染色の最適化は診断感度及び特異度向上の鍵を握る因子の一つである。

これまで、蛍光核染色液SYTO59を用いて赤血球画分を染色、市販DNAマイクロアレイスキャナーによる蛍光検出を行うことで、200万個の赤血球中に1個のマラリア感染赤血球を検出可能な超高感度検出法を構築した。この検討は、条件の整った実験室における培養原虫を用いた系でおこなわれている。しかし、実際の現場では、核染色により診断装置の感度、特異度に大きく影響を与える残存白血球、血小板、dust等、様々な因子が影響を与えうる。そこで我々はフィールドにおいても頑強な結果を得ることができる染色条件の検討をおこなった。

まず、診断装置本体（半導体レーザー、CMOSカメラ、対物レンズ、自動ステージ等）およびコントローラーボックス（各種電源、

コントローラー)の2つからなる検出装置を作成、本機器を用いて染色条件を検討した。培養マラリアの系では超高感度検出が可能であった635 nm励起SYTO59を用いた検討をおこなったところ、マイクロチャンバーの淵などが非特異的蛍光として観察されることが判明した。



635nm励起、蛍光色素SYTO59の蛍光画像

488nm励起、蛍光色素SYTO21の蛍光画像

このため、細胞膜を自由に通過し、核DNAを染色する類似の染色液、SYTO 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 24, BCおよび59を用いて、マラリア核の染色性や細胞チップ自体の非特異的蛍光発色によるノイズ光の大きさを評価しながら染色法の最適化を進めた。その結果、SYTO21がマラリア核を特異的に、かつ低いノイズで正確に検出しうるということが明らかになった。

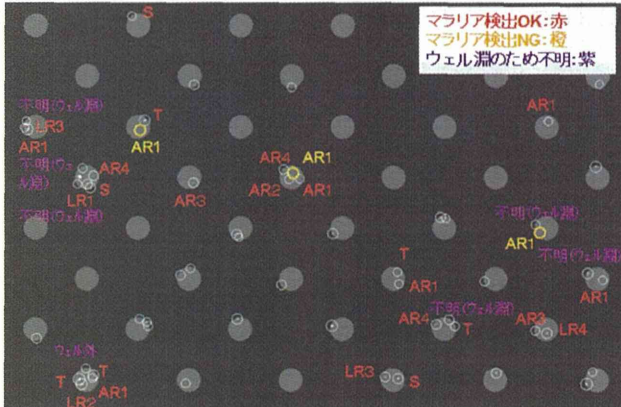
	リング検出率	トロフォゾイト・ジント検出率	ノイズ光発生頻度	備考
SYTO21	85.7%	100%	赤血球4,200個に1個	マラリア検出率は原虫41匹のギムザ染色確認データ
SYTO59	38.7%	87.8%	赤血球2,050個に1個	

## 3. 蛍光検出器の改良に関わる技術開発

分担研究機関のパナソニックAISが中心となって、これまでに蛍光染色されたマラリア核を検出する方法として、半導体レーザーとCMOS(もしくはCCD)カメラを組み合わせた原理検証用蛍光検出装置を開発、さらに開発中の細胞チップを検出プレートとして用いるためのシステムを構築して



きた。本年度は装置構成の最適化や画像処理ソフトの改良により、マラリア検出におけるS/N比向上や測定ノイズの減少を達成することができた。また、広視野検出可能なCMOSカメラを選定することにより測定時間の短時間化も達成された。



血液サンプル検出結果とギムザ染色済み血液サンプル顕微鏡観察結果との比較データ

上記の装置と平行して、光ディスク型マラリア診断装置の開発も進めている。

光ディスク再生装置では、回転する光ディスクの記録面に刻まれたデジタル情報を、集光スポットを100nm以下の精度でトラック溝に高速追従させて反射光を読み取る。デジタル情報はサブミクロンサイズであり、マラリア原虫サイズ(2 $\mu$ m)より微細な構造が読み取り可能である。これらの技術は基本的に、従来の技術の応用であり、我々が開発を目指しているマラリア診断装置に求められる装置の小型化、高速かつ多検体測定が可能という条件を満たしうる。

開発のスケジュールとして、1) 蛍光検出原理検証、(2) 光ディスク蛍光スキャン検証、(3) 小型装置開発およびマラリア診断検証、(4) 全自動診断プロトタイプ装置の順番におこなっているが、本年度は予定より前倒しで開発が進み、これまで

に蛍光検出原理検証および光ディスクを用いた蛍光スキャンの検証が完了している。

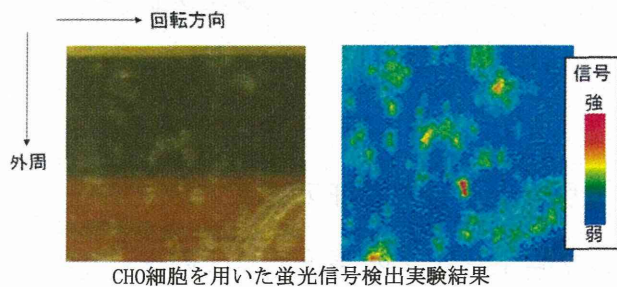


試作スキャン装置

原理としては、光学読み取りヘッドに蛍光検出光学系を付与、波長405nmの青紫色レーザーダイオードを励起光として利用する。

本年度は、光ディスク装置での蛍光検出可能性を検証するため、励起光と蛍光を分離する光学フィルタ素子を開発した。蛍光検出素子には、アバランシェ・フォトダイオード(APD)を搭載した。APDは微弱光検出素子であり、冷却機構が不要で小型、かつ高感度という特徴を持っている。

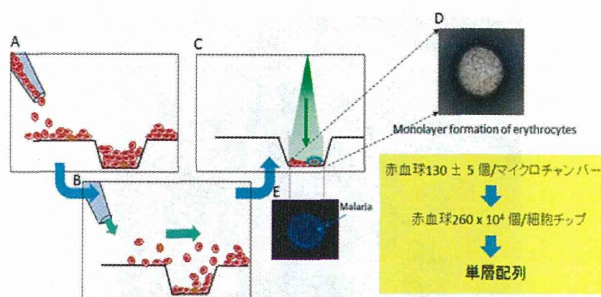
生細胞であるCHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞をSYTO Blueで染色、本試作器を用いて、蛍光像を検討したところ、信号強度分布が、明視野像でのCHO細胞分布を再現しており、市販光学読み取りヘッドに蛍光分離プレートとAPD素子を付与した系により生体細胞の蛍光信号を検出可能と確認した。



次に、マラリア原虫培養血を用いて蛍光検出実験を行った。

まず、光ディスク基板の上に、1 $\mu$ mピッチの螺旋状のトラック溝を付与、2 $\mu$ m程度のマラリア原虫を検出可能とした。さらに、トラック追従機能を付与したサーボ制御装置を開発した。培養血をスキャン測定し蛍光顕微鏡像を比較した結果、光ディスク装置によるマラリア原虫の蛍光検出が可能と判断した。

必須となる。本機能を左右する因子として、チャンバー形状に加え、親水性の保持がある。細胞チップ表面の酸素プラズマ処理により、細胞チップ表面の親水性を付与しているが、通常はその機能は2週間程度しか保持されない。このため、マラリア流行地においても長期間保存可能な保存法の開発が重要な課題となっている。

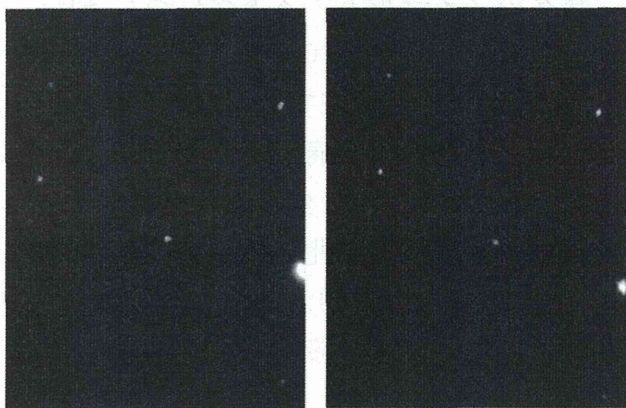


細胞チップでのマラリア感染赤血球検出(単層配列)

親水性の付与は、酸素プラズマ処理による細胞チップ表面上の高分子の分子結合の切断と酸化を介したカルボキシル基などの官能基導入によると考えられる。カルボキシル基の減少は分子鎖運動が原因である可能性が高く、細胞チップ表面からの非局在化により表面親水性さらに細胞接着能が喪失すると考えられる。我々は、この分子鎖運動を抑制するために、酸性水溶液中での細胞チップの保存法を検討した。

保存用の酸としては、フィールドでの使用を考え、輸出を規制される可能性が低い酢酸を用いて検討した。その後、外気に触れないようにアルミパックシーラー中での室温保存法を開発した。

その結果、酢酸処理による細胞チップ表面の水に対する接触角は、酸素プラズマおよび酢酸処理直後は $6 \pm 1^\circ$  となり、その後有意な変化は認められず処理後7ヶ月にお



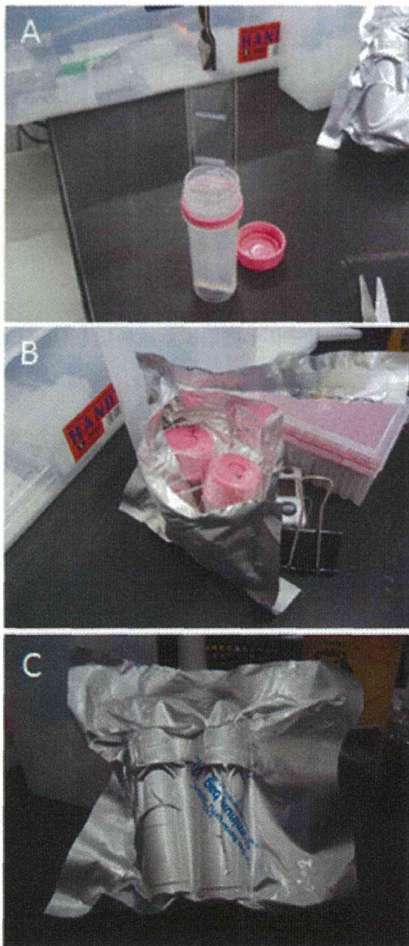
(a) 蛍光顕微鏡像 (b) 装置検出像  
培養マラリア原虫の検出像

#### 4. 細胞チップの長期保存に関わる技術開発

本診断装置は、マイクロチャンバー底にのみ単層配列された赤血球におけるマラリア原虫のカウントを基本原理としている。そのため、各マイクロチャンバーにおける赤血球数が定量 ( $130 \pm 5$  個) であること、および正確に単層配列していることが

いても、細胞チップ表面の親水性は保持されることがあきらかになった。各マイクロチャンバー底への定量的、および単層配列性も7ヵ月後も保持されていることを確認した。

なお、酢酸以外に硫酸、リン酸やクエン酸でも検討したが、酢酸同様に細胞チップの親水性は長期間保持された。



細胞チップの保存

## 5. フィールドテスト

プロトタイプの実証を検証し、さらなるバージョンアップのためのフィールドテストをウガンダで2回おこなった。また、実用化の課題に関する情報収集と解決法への提案のための調査をウガンダ、ミャン

マー、パプアニューギニアでそれぞれ1回ずつおこなった。

### ウガンダでの実証テスト

プロトタイプの実証としてのフィールドテストはアフリカのウガンダ国でおこなった。

ウガンダは高度マラリア流行地であり、ほとんどのヒト感染マラリア原虫は熱帯熱マラリアである。症状を示す高い原虫感染率を示す患者から、無症状の低い原虫感染率を示す患者まで様々な臨床像を呈する患者、感染者が存在するため、本診断装置の開発に向けたフィールドテストを行うには適切な流行現場と言える。

我々がフィールドテストを行った場所は首都カンパラから300km北にあるグル県のSt. Mary Lacor病院である。本病院はグル大学医学部の附属病院として、ベッド数400、救急外来を含む全ての診療科が開設されているウガンダ北部の代表的医療機関となっている。近隣で発生したエボラの感染者を収容する施設としても機能している。



グル県の位置



開発テストセンターラボの様子



St. Mary Lacor病院

フィールドテストは2014年の5—6月、10—11月にかけて2度施行している。フィールド調査総括、ロジスティクス担当、技術担当（医師、工学博士、理学博士）、技能担当からなるチームを編成し、各メンバーが2～4週間現地に滞在して、開発テストを行った。現地の治安は良好と言えず、公共交通機関も貧弱なため、宿泊地とSt. Mary Lacor病院への移動は（車で30分）レンタカーを借り上げておこなった。

サンプリングは現地医師がおこなった。発熱、関節痛等のマラリア感染を疑わせる症状のある外来患者に対し、指頭血採血をおこないRDTでマラリア感染の有無をスクリーニングした。さらに、厚層ギムザ染色用の標本も作製、顕微鏡用診断をおこない、RDT結果と合わせマラリア感染の有無を評価した。感染陽性と診断された患者に対し、医師、現地保健スタッフ（ウガンダ国内でも言語が異なるため、ウガンダ人医師の通訳も兼ねる）が、本研究の説明をおこなった。小児に関しては、親族に対しても説明をおこない、同意の得られた患者について、1mLの静脈血を肘部表在静脈から採血、開発テスト用の検体として用いた。



スクリーニング風景。現地人医師（右）が中心となり、マalaria患者の診断をおこなう。



RDT検査は臨床検査室で施行する。同時にギムザ染色もおこなわれる。

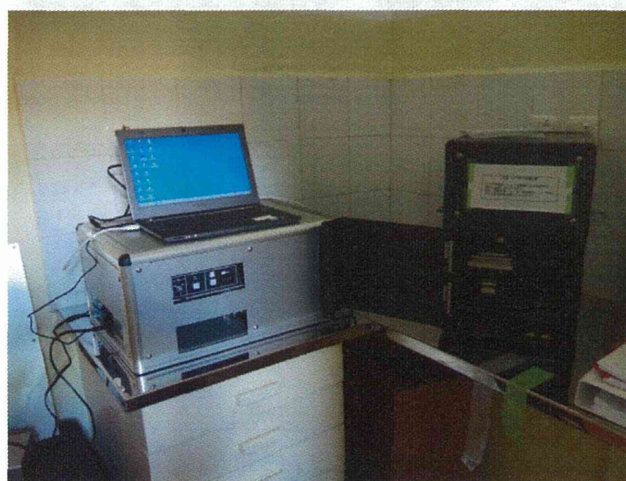


開発テスト参加患者のリクルート風景。利益と不利益をしっかりと説明し、不参加による不利益がないことを理解してもらう。



同意の得られた患者は開発テスト用の採血を受ける

得られた血液は、開発テスト、ギムザ染色用スライド、アルテミシニンを含む薬剤感受性試験、遺伝子解析用の濾紙採血に分けた。まず、10%ギムザ液で染色をおこない、厚層標本で原虫陽性を再確認したのち、正確な感染率を測定した。合わせて薄層標本も作製、こちらは主に原虫の形態観察に用いた。



プロトタイプ（レーザー型）のフィールドセンターラボでの設置



プロトタイプ（レーザー型）を用いたフィールドテスト



原虫遺伝子解析用のサンプルは濾紙に保存し、乾燥させ、日本へ運搬する。

5月の調査では、マラリア感染が疑われる288人にRDTを施行、118人がマラリア原虫陽性と診断された。うち、81人がイニシャルスクリーニングのギムザ染色による顕微鏡検査でマラリア原虫陽性が確認されたため、開発テストにリクルートされた。

10月の調査では、マラリア感染が疑われる384人にRDTを施行、105人がマラリア原虫陽性と診断された。うち、89人がイニシャルスクリーニングのギムザ染色による顕微鏡検査でマラリア原虫陽性が確認さ

れたため、開発テストにリクルートされた。

今回の開発テストでは、想定内の問題のみならず、以下に示すようなトラブルに見舞われた。

① 血液の粘度が高く、フィルターの通過が難しい症例が見られたこと。日本での検討ではこのような例は見られていない。

② 貧血が予想以上に多く、想定していた必要採血量だと、信頼できる検査となる血液量を満足しないことがあった。

③ 採血時の溶血により、測定誤差が生じることが明らかになった。当地では赤血球の形態異常が多く、膜の脆弱性により溶血が起こりやすいことは想定していたが、溶血レベルと測定誤差の関連性は現地でのフィールドテストにより明らかになった。

④ 日本でのラボレベルでは室内のホコリ等は問題なかったが、ラボ内でもホコリが多くホコリによる疑陽性が生じることがフィールドテストで明らかになった。

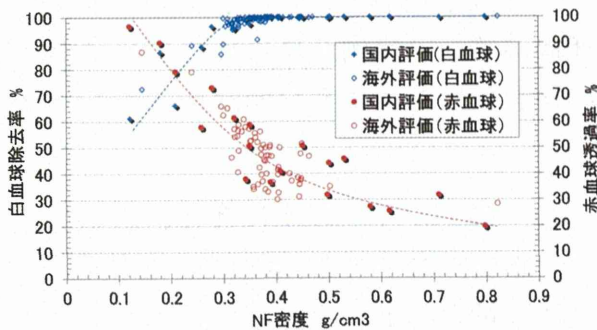
⑥ 不十分な処理によるヒト血清の混入により、サンプリングの固着が不十分になることが明らかになった。

⑦ ウガンダのフィールドは首都から8時間車での移動となる。途中からは未舗装路となり、精密機械にとっては難しい環境である。実際、プロトタイプ1型では、ラフな輸送により光軸がずれ、結果に大きな影響を来たしてしまうことがあった。

以上により、開発テストを施行することができた実サンプルはリクルート数を大

きく下回った。これらの課題はすでに機器開発に活かしている。

### A. 血液分離フィルターの検証



SiO<sub>2</sub>-NF密度と血球分離性能の関係(マラリア感染ヒト血液)

流行地におけるマラリア感染ヒト血液を用いてフィルターの性能を検証した。上図に示すように、マラリア感染血液においても非感染血液の評価結果と同様の分離挙動が得られた。本サンプルには、顕微鏡下で明らかな鎌状赤血球症の赤血球形状を有しているものが散見されたほか、大半の症例で、ヘモグロビン量が小児全般の貧血基準である11g/dlを下回るものが大半であった。以上のことから、開発中の血球分離フィルターは、鎌状赤血球など赤血球異常症が多いマラリア流行地においても有用であると考えられる。

本結果は、我々が目標とするマラリア診断用の前処理フィルターとして有用性が高いことを示している。なお、ろ過前後でマラリア感染率(全赤血球に対するマラリア感染赤血球の割合)に変化がないことも、ギムザ染色法より確認している。

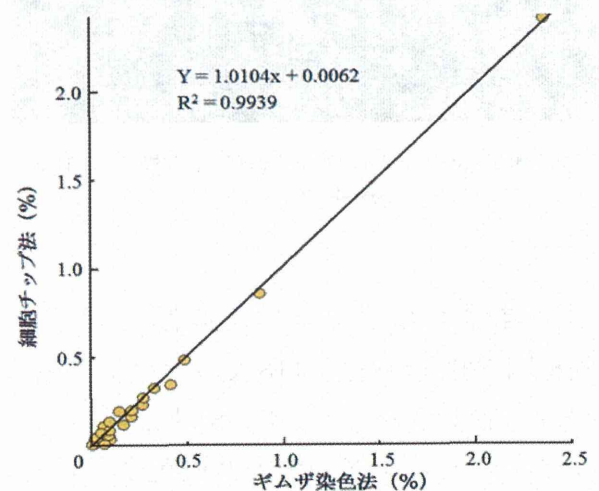
しかし、重度貧血あるいは採血時の溶血により、血液中に含まれる赤血球の割合が少ない患者が多数存在していた。今後の課題として、このような赤血球数のバラツキ

に対応する診断プロトコルの構築が必要であると考えられる。

### B. プロトタイプの性能評価

開発テストを施行することができた実サンプルは48症例となった。本プロトタイプでは、ポリスチレン製基板上でノイズとなる非特異的蛍光が低いSYTO 21を、蛍光核染色液として選択している。

感染率は0.0002%から2.34%となっている。この結果を、細胞チップによるマラリア感染赤血球数との回帰曲線を作製した。その結果、 $Y=1.0104x+0.0062$   $R^2=0.9939$ と高い相関が認められ、細胞チップでのマラリア検出の正確性が認められた。なおこの中には、その後の検討において、顕微鏡観察の結果、マラリア感染率0%であった4症例も含んでいる。



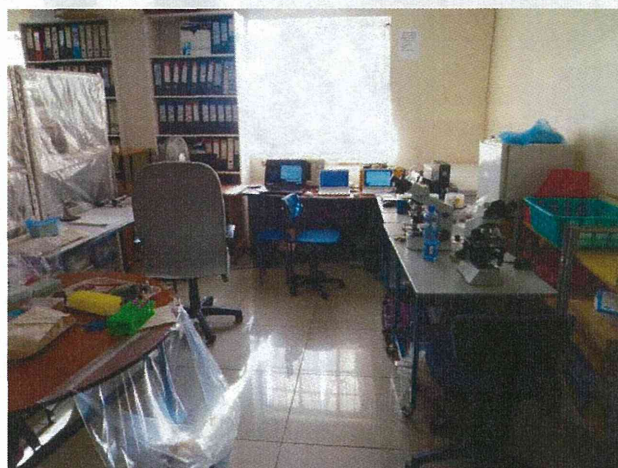
ギムザ染色法および細胞チップ法

これら解析した48症例について6例では、PCRで陰性を示した。うち4例ではギムザ染色において明らかな原虫を認めており、PCRの偽陰性と判断した。

## ケニアでの予備フィールドテスト

### A. ケニア拠点視察

長崎大学 熱帯医学研究所は、ケニアに3拠点を構える日本有数の感染症の研究機関である。長崎大学のケニア拠点（特にビタ拠点）では、マラリア感染の実態調査 Domestic severances study という枠組みにおいて、大規模なマラリア実体調査が実施されている（主に小学校の生徒を対象として、集団検診のような仕組みで行われている）。また、現地スタッフの体制も含めて、検体数を取得するための体制、設備および検体評価技術が確立されている。これらのことから、我々が開発中の診断装置のスペック実証のためには、最適なフィールドテスト現場であると考えており、その実地調査および我々の開発中のディスク型蛍光検出装置の課題抽出を行った。



ケニア拠点 地図(上)、全景(中)、ラボ(下)



Domestic severances studyにおける調査は、KEMRI (Kenya Medical Research Institute) との共同プロジェクトとして実施されている。小学校内では定期診断としての位置付けになっており、住民の理解が進んでいる。検査の事前に、小学校への説明と調査の概要や利益/不利益の説明がなされた後、同意書の取得が実施されている。

調査は医師、看護師、長崎大スタッフにより校舎外で実施されていた（全員現地スタッフ）。調査対象のエリアには児童数30～300名の小学校が十数校あるとのこと。小学校はいずれも長崎大のプロジェクト拠点から車で30分から1時間程度のところ



にある。約2週間の期間中に約1600名分の調査を実施していた。問診（病歴、蚊帳の使用状況、年齢等）の後、顕微鏡観察用スライド作成、RDT（迅速診断キット）、簡易ヘモグロビン測定、PCR用フィルタペーパー作成を行っていた。発熱（ $>37.5$ 度）があり、RDTが陽性の場合には抗マラリア薬を医師の判断で投与する。



現地調査風景

## B. パイロット調査

今回の調査では、RDT陽性を示した小学生は全体で7割程度あった。RDT陽性サンプル7割のうち、3割程度はギムザ染色によってマラリア原虫が観察されない結果となった。この中には、ギムザ検出感度を下回る超低感染率サンプルであるものも含

まれるが、ほぼ擬陽性サンプルであると考えられる。

定期診断調査では、RDT陽性かつ体温が $37.5$ 度以上の場合、抗マラリア薬（コアルテム）が提供されることになっている。しかし、マラリア血中感染濃度との比較では、必ずしも感染濃度の高い患者に抗マラリア薬が投与されているわけではないことがあきらかになった。また、RDTでのマラリア陽性率が同程度の地域であっても、血中感染濃度の高い患者の多い地域と低い地域が存在することが分かった。いずれもRDT陽性という定性診断だけでなく、定量診断によりもたらされた情報である。

地域におけるマラリア対策の立案、推進に関しては、このような地域におけるマラリア疫学の差を考慮にいたれた方針の決定が望ましい。この点からも、RDTでは取得できない定量データを、我々が開発中の装置によって提供可能であることの重要性を再確認した。

また電化地域は限られており、サンプリング現場における電源供給は期待できないことが分かった。そのため集団検診の場合にはバッテリーや車からの電源供給が不可欠である。

## C. フィールドテストでの課題抽出

今回のフィールドテストでは上述の実態調査が実施される中で余剰分の血液をいただき、パイロットテストをおこなった。テストには、光ディスク型検出器を用いた検討を行った。本装置を用いたフィールドテストは初めてであり、実用化における課題の抽出を本パイロット調査でのテーマ

とした。

調査において以下のような課題を抽出した。

① ディスクの反りが発生することにより、トラッキング（ディスク上の蛍光信号の走査）不良が多発した。これは、現地（最高温度35度）と日本のディスク作製環境（約23度）の違いによるものであることが分かった。今回のディスクは、ペットフィルム/PMDS（Siゴムシート）/ポリカーボネイト(PC)の3層構造であったが、ペットフィルムとポリカーボネイトの熱膨張係数が異なる。そのため、35度の環境下では、熱膨張係数差による反りが発生した。反り量がトラッキング追従可能な領域（±0.5mm）を超えると、トラッキング不良が発生することが判明した。国内帰国後に、PC/PDMS/PCの3層構造を採用することで、熱膨張により反りを低減できることを見出した。

② ①と関連する事象であるが、室内の温度が35度であったため、その時の装置内部は50度に近い状態であった。検出感度の温度依存性等に注意するとともに、温度依存性のない構成部品の採用や温度補償技術の構築等が必要であると思われる。

③ ヘパリン付きマイクロチューブを用いることにより、赤血球の付着性が低下することが判明した。赤血球の付着性の低下は血球感染率(parasitemia)を測定する上で、分母に当たり、検出下限の悪化につながる。これまでの国内を含めたテストでは、抗凝固剤としてEDTAを用いることが通常であった。今回は、EDTA付きのマイクロチューブの現地入手が困難であったため、ヘパリンを抗凝固剤として用いた。詳細な

原因は不明であるが、ヘパリンによって赤血球もしくはディスク表面の表面電位が変化することにより、赤血球を吸着するための静電引力が低下したためであると推定している。今後、赤血球吸着メカニズムの解明とEDTAマイクロチューブの入経経路の確保が必要であると思われる。

④ 血小板による検出ノイズが懸念された。これは、通常は血小板が含まれない培養マラリアサンプル測定時には判明していなかったことであり、実マラリアサンプルを評価することによって初めて判明した課題である。今後の方針として、以下の項目を検討していく必要性が明らかとなった。（1）血小板のノイズレベルとマラリア蛍光のS/Nレベルを向上させる（2）血球分離フィルタにより血小板を除くことが可能な製品範囲を見出す（3）赤血球外に発生する輝点をノイズと判定するための画像処理条件を確立する。

これらの課題は上述に通り、開発会議でのディスカッションを経て、国内での装置改良に繋げている。次年度は改良したプロトタイプを用いたフィールドテストをおこなう予定である。

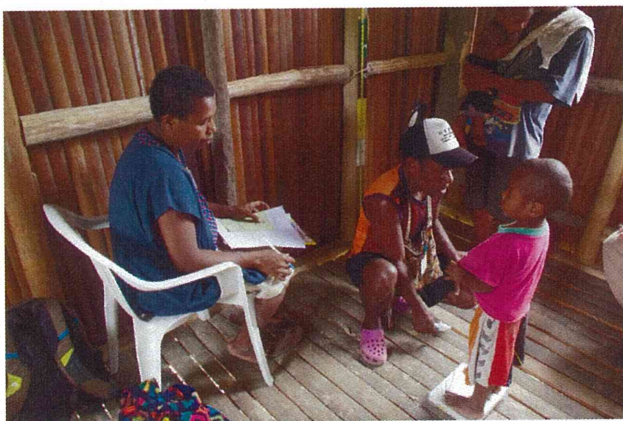
#### 実用化の課題に関する情報収集と解決法への提案

本研究事業で開発されるマラリア原虫定量診断装置は開発途上国の実地フィールドで実用化することを目的としている。フィールドにおける現地ニーズや実用化の課題点を明らかにするために、マラリア疫学の異なるウガンダ、ミャンマー、パプアニューギニアにおいて聞き取り調査お

よび資料収集をおこなった。

ウガンダでは2014年10月のマラリア流行期にフィールドテストと平行して、St. Mary Lacor病院において、現在、ウガンダのNational Malaria Control Policy (NMCP adopted in 2012) では全医療施設およびコミュニティにおいて年齢を問わず顕微鏡検査またはRDTによる parasite-based diagnosis が推奨されている。顕微鏡検査が gold standard とされている。

パプアニューギニアでは2014年12月に東セピック州の主要都市ウェワクの3医療施設、ダグアヘルスセンター、また同地区17集落のコミュニティヘルスボランティアを対象に調査を行った。調査地域におけるマラリア診断のツールはRDTが主であり、顕微鏡診断が可能な施設は一病院のみであった。いずれの施設も情報管理がほとんど行なわれていないために、検査結果データの入手は困難であり、RDT、顕微鏡診断の感度・特異度についての調査は実施されていない。他地域で過去におこなわれた検討によると、感度50-90%、特異度80-88%であった。



コミュニティヘルスボランティアの活動 (パプアニューギニア)



現地の様子 (パプアニューギニア)

ミャンマーでは12月にヤンゴンの国立マラリア研究施設を訪問し、JICAの同国マラリア対策専門家の中村正俊氏から聞き取り調査ならびに資料収集を行った。ミャンマーでは顕微鏡検査が gold standard となっている。JICAのプロジェクトサイトにおけるRDTの感度は顕微鏡検査を gold standard とした場合、98%となっている。試薬代、マイクロスコピストの養成費用等、種々のコストを総合して計算した結果の1検体あたりの検査コストはRDTが1米ドルに対し、顕微鏡検査は0.19米ドルと試算されている。しかし当地では、顕微鏡検査での確定診断数は減少し、一方RDTによる確定診断数が増加しているという報告が出されている。



マラリアチェックポイントクリニック (マラリア診断に特化したクリニックであり、無料で診察が受けられる。スタッフは看護師のみである。)



マラリア常在の村(左)、今回の調査を手伝ってくれた近隣の村の  
コミュニティヘルスボランティア

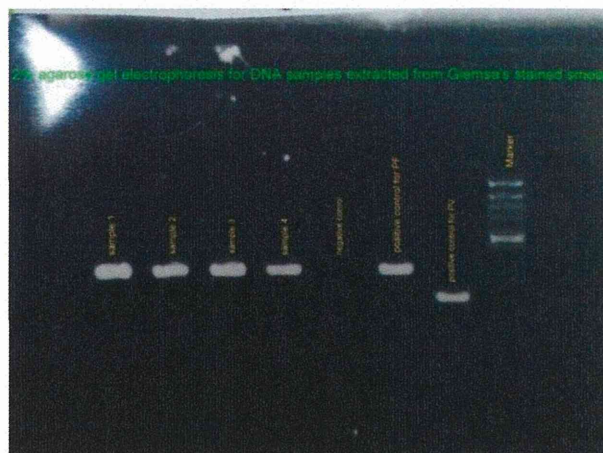
## 6. 使用済マラリア迅速診断キット (RDT) からの原虫DNA抽出の試み

本診断装置開発のゴールは、実地フィールドでの実用化にある。そのためには、フィールドテスト→課題抽出→開発→フィールドテストを繰り返し、装置の機能をより実地に即した形でup-gradeしなくてはならない。しかし、流行地におけるフィールドテストの施行は容易ではない。とりわけ、DNA診断用血液サンプルの入手には困難を伴う。上述の通り、現地医療スタッフ（現地医師）による研究の目的と利益、不利益について説明、同意を得たうえで、患者から新たな採血をおこなう必要があるため、フィールドテストの律速因子となっている。園解決のため、我々は使用済RDTキットおよび血液ギムザ染色標本から原虫DNAを抽出する方法について検討をおこなった。

DNA抽出法としてはChelexによる方法を採用した。RDTのニトロセルロース膜はすべて使うことによりDNAの収量を上げることができた。本抽出法により、培養原虫を用いた系では血液1マイクロリットルあたりわずか2個の原虫感染でもRDTキットから解析に十分な原虫DNAを抽出することができた。

さらにフィールドサンプルを用いた検討では、検査後3ヶ月以内に原虫DNAの抽出がおこなわれた場合は80%のRDTで原虫DNAを抽出することができた。一方、検査後3ヶ月以上起ったRDTにおいては、原虫DNAの質は低下しており、バンドがはっきり見える症例においても、PCRの成功率は42%にとどまっていた。

血液ギムザ染色後のスライドからの原虫DNA抽出も合わせておこなったところ、原虫感染率0.05%、0.1%、0.5%、1%の臨床検体全ての検体において、原虫DNAを抽出、PCRで増幅を確認することができた。



熱帯熱マラリア原虫、三日熱マラリア原虫の診断を低～高感染濃度のスライドから抽出、全ての検体について種特異的PCRでの増幅を確認した。

## 7. アルテミシニン耐性関連遺伝子 K13-propellerの変異解析

最終機への搭載が予定されている薬剤耐性診断機能に用いる遺伝子マーカーの決定は急務である。現在、全ての流行地において、マラリア治療の基本はアルテミシニンと併用薬のcombination therapyがおこなわれており、アルテミシニン耐性原虫の早期診断、蔓延、拡散の監視が対策上重