

要な課題となっている。中心となっている。そのような中、2014年1月にアルテミシニン耐性関連遺伝子として、K13-propeller 遺伝子が発見された。我々は全流行地を網羅する581例を用いて、本遺伝子のアルテミシニン耐性遺伝マーカーとしての有用性について検討した。

A. 変異サイト解析

アルテミシニン耐性出現の公式レポート以前にアジア、アフリカ、南アメリカ、オセアニアの計14カ国から得られた581検体においてK13プロペラ遺伝子配列を決定した。25の多型サイトがあり、21(84%)のSNPはsingletonであった。非同義置換は19、同義置換は6であった。

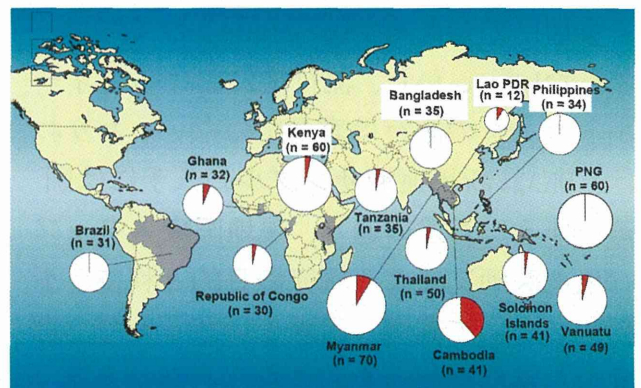
26の塩基によるハプロタイプが見られたが、最もprevalentであったものは、Hap_1 (3D7 strain)であり(546/581, 94%)であり、全ての国において最も良く見られるタイプであった。22(85%)ものハプロタイプはsingleton haplotypeであった。

B. K13プロペラ遺伝子変異の地域分布

変異頻度には地域差がみられた。16のSNPsはサンプリング時にアルテミシニンが第一選択薬として使用されていた3国(カンボジア、タイ、ミャンマー)に存在していた。この地域では16%の原虫が何らかの変異を持っていた。一方、アルテミシニンを使用していない残り11カ国では2%の原虫にしか変異は見られず、観察されたSNPはいずれもsingletonであった。

今回観察されたSNPの多く(17SNPs 68%)

はこれまで報告のないSNPであった。残り8つが報告のあるSNPsのうち、3つ(C580Y、G449AおよびR561H)はアルテミシニン耐性との関連が報告されているSNPs(Ashley et al. 2014; Takala-Harrison et al. 2014)であった。最も頻度の高いSNPはC580Yであり、カンボジアの株の20%に見られた。この580番のみに変異を認めるハプロタイプ(Hap_2)はカンボジアにのみ広く存在し、当地で自然選択を受けている可能性が示唆された。ハプロタイプ多様度はサンプル時にACTを導入している国の方が有意に高い値を示した(P = 0.0049)。



K13プロペラ遺伝子に変異をもつ原虫頻度(赤)

D. 考察

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、迅速・簡便、低コストかつ超高感度なマラリア原虫定量診断装置を開発し、流行動向および治療効果の迅速かつ正確な把握を可能にすることを研究期間終了時の到達目標としている。本年度は研究期間の1年目にあたる。これまで培養原虫を用いた検討で得られた性能が

実際の流行現場でどの程度発揮されるのかについて検討し、課題点を抽出、解決に向けた研究を行うことを目標とした。

研究課題としては、基礎的な検討事項として、血球分離デバイスの改良に関わる研究開発、長期保存が可能な細胞チップへの改良、マラリア原虫染色法に関する技術開発、蛍光検出器の改良に関わる技術開発を本年度の重要課題とした。応用面での研究事項として、新興国での実用化における課題抽出、薬剤耐性分子マーカーの評価を重点的におこなった。

1. フィールドテストに関する考察

本研究グループとしてこれらの研究を進めるにあたっては、フィールドテストを重視した。開発の段階から、将来的に本装置が使用される現場でのニーズを熟知し、そこで求められているものと開発機器の方向性に極力ずれを生じさせないことは、効率的、合理的な医療機器の開発に不可欠の視点と言える。このため、順天堂大学、東京女子医科大学といった医学的な視点から開発に携わる分担研究グループのみならず、基本設計の工学的研究を主に担当するパナソニックと産業技術総合研究所のメンバーも積極的にフィールドテストに携わり、マラリア流行の現場、そしてそこに内在する様々な問題点について感じ取りながら、開発テストを進めていった。

本年度は、メンバーがこれまで何回か調査をおこない、現地スタッフと良好な関係のできているウガンダで主なフィールドテストをおこなった。当地でのサンプリングシステムでは、マラリア関連症状のある

患者、いわゆるsymptomatic patientがテストの中心となるため、開発初期のフィールドテストとして適切である。このような患者からは、症状、鎌状赤血球症などの既往歴や家族歴、薬剤の使用歴など十分な臨床情報を得ることが可能となる。開発機器での診断結果とギムザ染色/PCR結果との単純比較のみでは、機器改良に向けた十分な情報を入手できない。その点、ウガンダのテストでは、上述のような多因子・多方面に渡る情報を入手しながら、じっくりと実証テストを施行することができた。

現在の機器開発スケジュールが順調に進めば、定量診断機能に関しては、次年度のフィールドテストは、ほぼ最終機の確認テストとして位置づけられる。その際のフィールドテスト施行にあたっては、以下の条件が満たされていることが望ましい。

- ① 大量検体を用いたテストが可能
- ② マラリア陰性患者のテストが可能
- ③ 熱帯熱マラリア原虫以外での診断能を検討することが可能、

さらに、新たな採血を被検者に負担させないサンプリング法の開拓も必要となる。

まず、①②については、臨床症例のみならず、無症状患者の検体を評価できるシステムを備えたフィールドのセッティングが必要となる。さらに、無症状患者におけるマラリア陽性率が高い方が、フィールドテストからの課題抽出量が多くなり、その後の開発に有用な情報を得ることができ、これらを一度に解決する方法として、

いわゆるactive case detection (ACD、malario-metric surveyとも称されるが本結果報告書ではACDと表記) と本診断機器の開発テストをドッキングさせる方法がある。

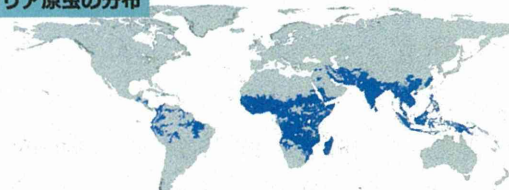
ACDは対象の村や学校において全員血液検査を施行し、マラリア感染率や原虫感染濃度、脾腫等をアセスメント、原虫陽性者には抗マラリア薬を投与するマラリア疫学調査の古典的手法である。この方法では、RDT陰性患者血液を大量に入手することができる。このような血液サンプルの中には、本診断装置のみでしか原虫を検出することができないものも多数含まれると考えられる。このため、本診断装置の性能を評価し、解決すべき課題を抽出することができる有意義なフィールドテストが可能となる。しかしその一方で、調査施行システムの構築に労力を伴う。例えば、調査対象地域における行政システムでの承認に加え、地元の有力者(村長、酋長等)からの了承を合わせて得る必要を生ずることが多々あり、円滑な調査を進めるためには越えるべきハードルがあるのが実情である。

長崎大学が拠点大学形成事業で作りに上げたケニア拠点でのフィールドテスト施行は、上記の困難を解決する一つの方法である。今回、我々は当地を訪れ、フィールドテスト施行のfeasibilityを検討した。結果に記載したとおり、当地には理想的なフィールドテスト環境が整っている。とりわけ、インフォームドコンセントを得るシステムがきわめて合理的に動いており、研究倫理について十分な配慮が組織的になされている点は安心感がある。以上の点を勘案し、次年度はケニアにおいて、次世代

機であるCD型検出器を用いた開発テストをおこなっていく予定である。なお、継続したフィールドでの検討が不可欠な課題であるフィルター性能の現地テスト、薬剤耐性分子マーカーの開発においては、引き続きウガンダにおいて開発を継続していく。

③の課題については、アフリカ以外でフィールドテストをおこなわなければならない。下図に示すように三日熱マラリアはアフリカにはほとんど分布していない。北東部アフリカに存在するが、優占種ではなく、また当地での調査は治安の点から難しい。

熱帯熱マラリア原虫の分布



三日熱マラリア原虫の分布



本年度、流行地における機器の実用化にあたっての課題抽出をミャンマー、パプアニューギニアでおこなった。これらの地域には三日熱マラリア原虫が高い頻度で存在する。とりわけ、パプアニューギニアは世界で最も高い三日熱マラリア原虫感染率を示す地域である。現地調査では、課題抽出と平行して、次年度の調査遂行可能性についての評価を合わせておこなってきた。パプアニューギニアは本研究代表者が東京女子医科大学在籍中の2001年よりJICAの研究パートナーシップとしてマラリアフィールドの共同研究を進めており、

共同研究の関係はすでに構築されている。治安が不安定なことが懸念事項であるが、現在東セピック州のダグア地区、マダン州のマダンにおいてフィールドテスト施行の可能性を探っているところである。また、ミャンマーにおいても、次年度後半を目処にフィールドテスト施行への目処をつけるべく保健省のマラリア担当官と協議を進めている。

④を解決する手段として、我々はマラリア迅速診断キットからの原虫DNA抽出を試みた。現在我々は、マラリア診断のgold standardとして種特異的PCRを用いている。同時に、厚層/薄層ギムザ染色標本による検討も実施、双方の結果を総合的に評価している。ギムザ標本はフィールドにおいてルーチンでおこなわれており、結果の入手は容易であるが、PCRに用いる原虫DNAの入手はルーチンでは不可能であり、インフォームド・コンセントを得た後、新たに採血し、フィルターペーパーに保存しているのが現状である。上述したように、機器の開発が進むにつれて、より多くの検体を用いたフィールドテストが必要となってくるが、現在おこなっている方法では、かかる時間およびコストの点で、必要とされる原虫DNA検体数を満たすことが難しい。そこで我々は使用済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てきた。

原虫の抽出にあたり、以下2つの点に工夫を凝らした。一つはニトロセルロース膜を全て使うこと、もう一つはDNA抽出にchelexを用いたboiling法を用いることである。この方法によって、200万個の赤血球中に1個の感染でも原虫DNAを抽出する

ことが可能となった。フィールドサンプルを用いた検討では、RDTサンプルの保存期間と抽出成功の割合に有意な相関が見られた。また、原虫陽性を示すバンドの強さとの間にも相関が見られた。

さらに、厚層/薄層ギムザ染色標本からのDNA抽出も試みた。本手法によっても、0.05%の感染率を示した臨床検体からDNAを抽出することができた。今後フィールドテストを行う中で、より低感染濃度の臨床検体スライドも入手される可能性がある。このような検体を用いて、DNA抽出を試みる予定である。

これまで、ルーチンの検査後に新たな採血をお願いしていたが、新しい方法では、マラリア感染の疑われた患者におこなうルーチン検査に本機器による診断を加えてもらう。患者からは診断装置で用いる数マイクロの血液を余分にいただくことになるが、新たな採血を必要とせず、かつルーチンでおこなわれる指頭採血で十分なため、実質上のさらなる患者負担は0と言える。

実用化の課題に関する情報収集と解決法への提案

ミャンマー、パプアニューギニアに加え、ウガンダにおいても、実用化の課題に関する情報収集をおこなった。分担研究報告書に詳しく考察がされているが、ここでは本診断機器の有用性と課題を手短にまとめたい。

RDTの普及は、その簡便性にあるが、結果が患者自身の目で確かめられると言う点は大きい。患者は自分の目で感染の証拠

を確認でき、納得することにより正しい治療行動に移る、という考えは広く受け入れられており、本機器の改良にあたり、患者の治療希求行動という観点も取り入れた開発計画が必要とされてくると思われる。一方、顕微鏡検査について見てみると、臨床的に問題となるのは高感染率症例を見つけられない、または低感染率と判断することであり、顕微鏡検査に熟練しているならRDT(+)、顕微鏡検査(-)症例は極めて低感染率症例と考えられ、当面は臨床的に大きな問題は起きにくいと考えられる。しかし、薬剤耐性の観点は大きな問題となる。PCRが施行されたHRP2(+)¹⁵¹⁰例中、Pf(-)は422例(27.8%)であった。これらはCommunityやHCIIのようなRDTのみで診断している施設では投薬治療の対象となる。その多くが不必要な治療であり、耐性原虫出現、拡散のmain driverとなる。今後、これらがアルテミシニン耐性の熱帯熱マラリア原虫の出現に影響する可能性を考えると、診断をRDTのみに頼っている施設にこそ、簡便に感染率を測定できる機器があれば、よりその有意性を発揮できるのではないかと考えられる。

今後、途上国において実用化さらに普及が進むためには、単に価格と使い易さのみならず、以下の課題があると考えられる。

①精度管理

本診断装置が途上国においてどのような精度管理を行うことができるかが課題となる。どのように結果を、今後再検討し、その精度を評価できる体制を作り上げるかが大切である。

②耐久性

途上国の高温・多湿という気候状況に加え、塵埃に対する耐久性を備えることが必要となる。また頻発する停電による機器への影響も考慮する必要がある。途上国では故障が多いと、故障したのが担当者のせいと受け止められやすく、その責任を避けるために使用しなくなるという傾向がある。現実問題として見逃すことができない。

③消耗品

機器そのものの耐久性が高いとしても、消耗品の供給が途絶えれば使用されなくなってしまう。流通のインフラ整備が遅れている途上国では消耗品の供給体制の確保も重要な課題となる。

2. 機器改良に関する基礎的研究

これらについては、パナソニックABS、産業技術総合研究所が中心となり、国内外で研究を行った。考察については、各分担研究計画書に詳しく記載されている。以下においては、これらから本年度の評価、今後の展望に関する事項を抜粋し、総括したい。

マラリア診断用血球分離フィルターに関しては、今回の検証内容より、現状の血球分離フィルターには大きな課題は生じておらず、マラリア診断における検出ノイズ低減のためには必須のツールとなる。課題点としては、白血球除去率の目標である99.9%に達しないフィルターが存在していることである。これは、性能のバラツキ要因

の低減に一層取り組むとともに、より確度の高い完成品検査手法を検討していく必要があると考えられる。

現在作製中のフィルターはφ5mmで設計されており、全血30u1程度は安定的に白血球が除去でき、さらに目詰まりすることなく赤血球が得られている。これは、赤血球の測定対象個数を200万個とした場合、十分な赤血球数となる。従って、さらなるフィルター径の狭小化により、白血球除去の性能を上げることが可能である。Siウエハプロセスにおいて、1チップ辺りの面積を低減させることは、直接/間接材料費、労務費、設備費の低減をもたらす、一層コスト競争力のある製品となると考えている。

今後の開発目標として、次年度は、コンパクトディスクへの血球分離デバイス組み込み(一体化)と量産検討(4インチプロセス)を、最終年度は、海外テストでのさらなる信頼性検証と量産検討目処付けを考えている。

原虫検出のためのマラリア染色技術の最適化に関しては、実験室レベルのみならず、フィールドテストにおいても、細胞チップを基盤技術とするマラリア検出に核蛍光染色液SYTO 21を用いることで、既存診断法のゴールドスタンダードとされる赤血球ギムザ染色の光学顕微鏡法に匹敵するマラリアの定量検出が可能になることが示された。また、偽陰性判定も認められなかった。課題としては疑陽性の問題がある。その頻度は、既存イムノクロマト法やPCR法に比較して低いものの、今後さらに蛍光検出時の非特異的蛍光発色を抑える染色法の改良を加える必要があると考

えている。

蛍光検出器の改良に関わる技術開発に関しては、①半導体レーザーとCMOSカメラを用いた検出器、②光ディスクを用いた検出器の開発を進めている。①に関しては、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した(リング期検出率85.7%, ノイズ数1個/4, 200 RBC)。また、広視野検出可能なCMOSカメラの導入により測定時間の短時間化

(15.5min/1,000,000 RBC)を達成することができた。しかし、現状の最も大きな課題は4,200赤血球に1個の割合で出ているノイズ光である。また、1~2umサイズのマラリアとその他のノイズ要因との判定に画像処理を用いる際、より正確に判定するためには、上記システムでは分解能が不足していると考えられる。さらに、上記システムの課題としては、これ以上の小型化や高速化、あるいは多検体測定化等が困難であると考えられる。

これらの課題を解決する手段として、②の開発を前倒しで進めている。本検出装置により、①における課題である、小型化、高速化、多検体測定化は実現可能であると考えられる。ただし、検出ノイズ低減と高解像度化については、さらなる改善を目指す必要がある。

まず、検出ノイズ低減に関しては、蛍光の輝点が赤血球の内外いずれに存在するのを見分けることが必要である。これは、蛍光輝点と赤血球との位置関係からノイズ判別が可能と考えられるため、開発のポイントとして取り組んでいく。また、高解

像度化に関しては、スポット径調整や狭ピッチスキャンを進める予定である。

細胞チップの長期保存に関わる技術開発に関しては、細胞チップ表面の酸素プラズマ処理後、酢酸、硫酸、リン酸やクエン酸溶液での保存を行うことで7ヶ月間に渡りチップ表面の親水性は保持され、各マイクロチャンバーには定量的に100個の赤血球が単層配列されることがあきらかになった。しかし、保存液に対する化学物質としての輸出規制の可能性を考慮して、酢酸を表面処理保存液として選択した。さらに細胞チップの保存法としては室温での簡単なアルミパッキングを利用、高温多湿のフィールド環境に十分に対応していると考えている。

3. 応用面での研究事項

応用面での研究事項として、新興国での実用化における課題抽出、薬剤耐性分子マーカーの開発、オンチップPCRに関する技術開発を進めている。新興国での課題抽出は1. フィールドテストにすでに記載している。

薬剤耐性分子マーカーの開発においては、新規遺伝子であるアルテミシニン耐性関連遺伝子K13-propellerの変異解析をおこなった。薬剤耐性原虫の出現とその広がりを検討する際に、分子疫学的手法を用いる利点は、簡便かつ客観的なデータが得られることである。本診断装置の薬剤耐性への実用を考えた場合、その信頼性は使用した分子マーカーの質に大きく依存する。発見されたK13プロペラ遺伝子は、アルテミ

シニン耐性の直接的な原因遺伝子である可能性が高い。今回、全流行地を網羅する大規模サンプルを用いておこなった多型検討によりベースライン多型レベルは極めて低く、アルテミシニンの使われていない集団にみられる多型とアルテミシニンにより選択された多型が一致していないことがあきらかになった。今後、アルテミシニン分子マーカーとして非常に有用であることが期待される。さらなる検討により、地域固有のアルテミシニン耐性関連SNPを明らかにし、オンチップPCR解析に向けた条件の洗い出しを進めることが、マラリアの定量から感染種～薬剤耐性診断まで包括する総合マラリア診断装置としての本開発機器の進化につながる。

E. 結論

本研究は迅速・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。その原理は、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。本年度の研究により、血球分離デバイス、染色法、細胞チップ保存法については、ほぼ実用化のレベルに到達することができた。蛍光測定装置としては、実用化に向けた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た。さらなるフィールドテストによる課題の抽出、解決を進め、基本性能をより強固にし、実用可能な診断装置への改良を進めていく。

F. 健康危険情報

なし

G～H

各業務項目における委託業務成果報告
に記載。

厚生労働科学研究委託費（医療機器開発推進研究事業）
委託業務成果報告（業務項目）

マラリア診断用血球分離フィルターに関する研究

業務担当責任者 岡 弘章 グループマネージャー
山本 健樹 チームリーダー
野上 貴裕

パナソニック株式会社 オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社
技術本部

片岡 正俊 研究グループ長

八代 聖基 主任研究員

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

研究要旨

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。一般的な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を可能にする。我々が目指す超高感度マラリア定量診断を実現するためには、血液中の白血球を 99.9%以上除去しつつ、検査の目的物質である赤血球を 30%以上透過する必要がある。上記の血球分離性能を開発目標とし、分離のコアである濾材の SiO₂-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について検証した結果、ワンプッシュ型ろ過機構により 1 分以内の処理時間で、白血球除去>99.5%かつ赤血球透過>30%の分離性能を開発することができた。また、その性能は、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性を証明することができた。

また、ウェハレベルでの生産が可能な NF 形成装置の装置内分布が課題となっていたが、その分布の原因を温度分布とガス分布と特定し、改善を実施し、バラツキ低減への目処付けが完了したことを報告する。

A. 研究目的

我々が目指す超高感度マラリア定量診断を実現するためには、血液中の白血球を 99.9%以上除去しつつ、検査の目的物質である赤血球を 30%以上透過する必要がある（開発当初は 40%以

上を目標としていたが、現行の検出器に要求される赤血球数に再設定した）。

本稿では、上記の血球分離性能を開発目標とし、分離のコアである濾材の SiO₂-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

理検証について記載する。また、量産性向上を考えた際に、ウェハレベルでの生産が可能な NF 形成装置の装置内分布が生産上の課題となっており、分布の改善に関して検証した結果を記載する。

B. 研究方法

(倫理面への配慮)

本研究に関しては、マラリア患者由来血液を使用するにあたり、既にウガンダ共和国グル大学倫理委員会および研究代表者、分担者の所属機関において、許可を受けている。全研究対象者からはインフォームド・コンセントの取得がなされており、さらに研究、プロトタイプ開発、論文発表などにおいて十二分に患者プライバシーの保護に努めるように配慮している。

B-1. 血球分離デバイスの構成

開発当初の血球分離デバイスの模式図を Fig. 1 に示す。

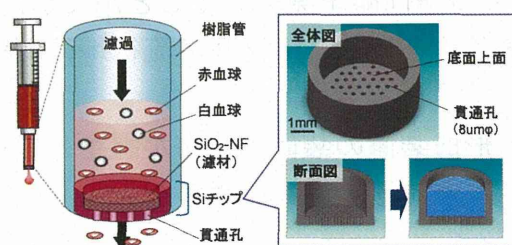


Fig. 1 血球分離デバイスの模式図

デバイスは樹脂管の先端に Si チップを実装することで構成される。Si チップはお椀形状で底面に複数の貫通孔が設けられており、底面上面にのみ濾材である SiO₂ ナノファイバー

(SiO₂-NF)を形成させた構造である。尚、Si チップは Si を母体として形成された構造物であり、Si-MEMS (Micro Electro Mechanical Systems)技術によって加工されている。図のようにデバイスを注射器に装着した後、血液サンプルを透過させる。このとき、SiO₂-NF を透過した成分のみが貫通孔から取り出される仕組みになっている。つまり、SiO₂-NF で白血球が除去され、赤血球のみが貫通孔から得られる。

B-2. SiO₂-NF の概要

B-2-1. SiO₂-NF の特性と形成メカニズム

これまでに我々は、VSD (Vaporized Substrate Deposition) 法を用いることで、Fig. 2 のような非結晶性 SiO₂-NF の新規形成法の開発に成功した。この製法で得られる SiO₂-NF は、従来のフィルター用繊維より細く (10nm ~ 500nm)、高比表面積化 (> 数 10m²/g) が容易であり、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、SiO₂-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。

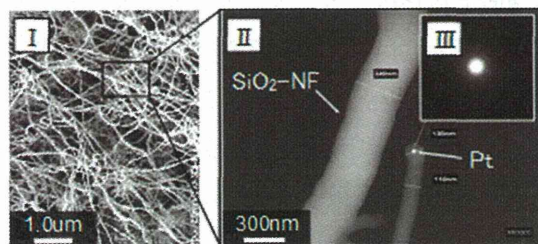


Fig. 2 SiO₂-NF の I. 走査型電子顕微鏡画像、II. 走査透過電子顕微鏡画像、III. 反射高速電子線回折パターン

VSD 法は、液状ナノ粒子の低融点材料にファイバー材料の蒸気を溶融させ、溶融材料が過飽和に達することでナノ固相を析出する気相成長法であり、Fig. 3 の①～⑥の過程を経て SiO₂-NF が形成される。

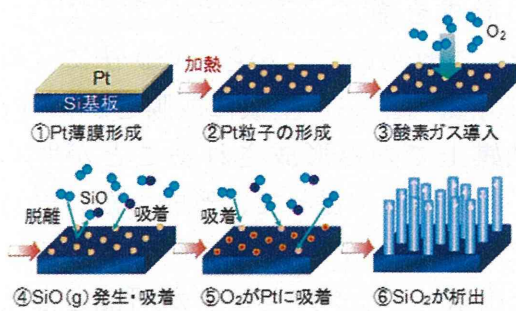


Fig. 3 VSD 法における SiO₂-NF の形成メカニズム

蒸着法により、触媒となる Pt 薄膜を Si 基板上に形成する(①)。これを減圧下にて 1000℃以上に加熱すると、Pt 薄膜が溶融し、液層状態の Pt ナノ粒子が形成される(②)。ここに O₂ を導入すると Si 基板と反応し、基板から直接 SiO が生成される(③)、固相表面よりも液相表面の方が、付着係数が大きい(④)。このとき、液相の Pt と固相の Si が共存した状態となる。これは、Pt-Si の二次元状態図からも証明される。この状態が進むと、Pt 触媒内において Si の過飽和状態が起きる。過飽和状態では、液相よりも固相のケミカルポテンシャルが低い(⑤)ため、雰囲気中の O₂ と反応して固相を析出することでエネルギーを低

減させる(⑤)。即ち、Pt 粒子を核とした NF を基板側に析出していき、上方に伸びていく(Fig. 2 の走査透過電子顕微鏡画像で NF 先端に Pt が存在することが確認されている)。この過程を繰り返すことで SiO₂-NF が形成される(⑥)。

VSD 法は基板から原料が直接輸送されるため、Pt 触媒付近での SiO の密度が高い。例えば、外部から原料が供給されるため Pt 触媒直上での SiO 密度が低い VLS (Vapor-Liquid-Solid) 法と比べて、気液界面の反応が活発的に行われる。そのため、成長速度が速く短時間で SiO₂-NF を形成することができる。また、基板から SiO が生成されることで Pt 触媒に対してランダムな方向から SiO が供給され、屈曲した構造が形成される。このような理由から、VSD 法を用いることで迅速且つ高密度な SiO₂-NF の生成が可能となる。

B-2-2. SiO₂-NF の成長様式

Si は、温度および O₂ 分圧によって SiO₂ 膜の成長様式が異なり、低温または高 O₂ 分圧では SiO₂ 膜成長、高温または低 O₂ 分圧では雰囲気中に SiO の全脱離が生じることが知られている。この 2 つの現象の境界近傍には、表面での SiO₂ 成長と SiO 脱離が共存する領域が存在する。この領域において VSD 法における SiO₂-NF の形成が可能である(Fig. 4)。また、温度と O₂ 分圧によって SiO₂ 膜成長と SiO 脱離の割合が決まり、その割合に応じて SiO₂-NF の径の制御が可能となることを見出した。

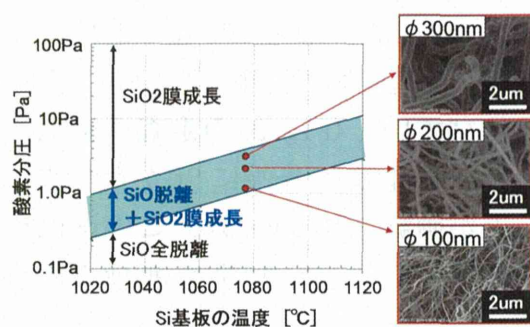


Fig. 4 SiO₂ 膜成長と SiO₂-NF 構造の関係

また、焼成時の温度が高いほど SiO₂-NF 径と膜厚が増大することを確認した。これは、高温下では O₂ や SiO の分子振動が活発化され拡散係数（熱速度×平均自由行程）が増加することが寄与していると考えられる。このことは、アレニウスの式（A：頻度因子（温度依存性なし）、E：活性化エネルギー、R：気体定数、T：絶対温度）

$$k = A \exp\left(-\frac{E}{RT}\right)$$

から、温度が上昇すると反応速度が増加することからも説明できる。よって、高温領域ほど SiO の揮発量が増加し、同時に拡散係数から Pt 触媒への衝突頻度も増加するため、径と膜厚の増加が観察されたと考えられる。

B-2-3. SiO₂-NF のパターニング技術の開発

B-2-1 項から、SiO₂-NF は粒径が nm オーダー Pt 粒子を核に成長していることを見出した。この特性を利用して、Pt 触媒のパターニングもしくは SiO が発生し難い下地材料（例えば SiO₂ など）をパターニングすることで SiO₂-NF のパターン形成が可能である

と想定される。

そこで、フォトリソグラフィとエッチング装置を用いて、基板の上に Si のみ、Si+Pt 触媒、SiO₂+Pt 触媒の 3 つの領域をつくり、SiO₂-NF を形成した (Fig. 5)。結果、Si と Pt 触媒の共存下のみで SiO₂-NF の形成が確認された。一方、Si 単体もしくは SiO の発生し難い SiO₂ と Pt 共存下では SiO₂-NF の形成を確認することができなかった。これらのことから、VSD 法による SiO₂-NF は、Si 基板に成膜された Pt 触媒上でのみ形成されることが明らかになった。従って、形成したい部分にのみ Si+Pt 触媒にすることで、SiO₂-NF のパターニングが可能となる。これらは、SiO₂-NF の形成メカニズムの妥当性を支持する結果であるとも言える。

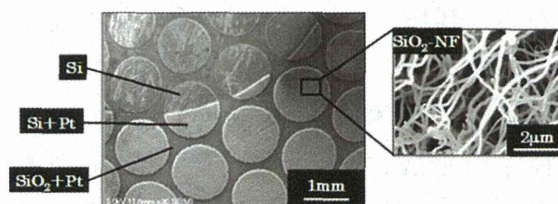


Fig. 5 SiO₂-NF のパターニング写真 (走査電子顕微鏡像)

B-2-4. Si チップの加工方法

SiO₂-NF を形成するまでのプロセスフローを Fig. 6 に示す。はじめに ICP ドライエッチング装置を用いて貫通孔を作製した (①~③)。次に、血液のリザーバーとして用いるキャビティを形成した (④~⑥)。さらに、Pt をチップ全面に成膜し、エッジ部分のレジストを除去することで、ダイアフラムにのみ Pt 薄膜がパターニングで

きる (⑦~⑧)。最後に、VSD 法を用いて SiO_2 -NF を形成する (⑨)。このとき、 SiO_2 -NF は B-2-3 項からも説明できるように、パターンニングされた Pt 薄膜上にも形成される。

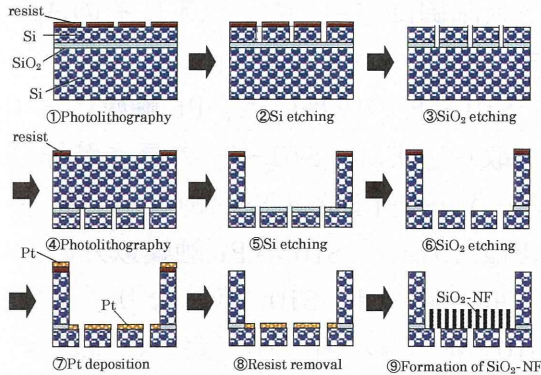


Fig. 6 SiO_2 -NF を形成するまでのプロセスフロー

ここで、 SiO_2 -NF の形成には小型 RTA (Rapid Thermal Annealing) 炉 (ULVAC 製 MILA-5000) を用い、Fig. 7 のように外部インターフェースを構築した。この RTA に N_2 と O_2 ガスを導入することで、 O_2 分圧を 0.1~20Pa、全圧を数十 Pa~数 kPa に制御し、さらに 1050~1200°C の熱処理を施すことで SiO_2 -NF を形成した。

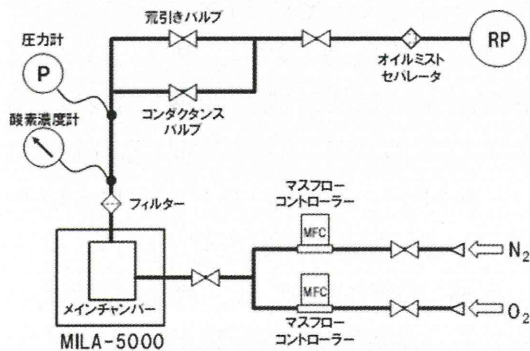


Fig. 7 SiO_2 -NF 作製装置の概要

B-2-5. SiO_2 -NF 構造の最適化検討 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。 SiO_2 -NF の構成材である SiO_2 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ことが知られている。そのため、 SiO_2 -NF を前者 (1) のサイズ分離に適した構造にする取り組みを主軸とした。

一般的なフィルターにおいてサイズ分離法を利用する場合、隣接するフィルター繊維間により形成される空間 (Fig. 8 の空隙面積) は出口に向かって段階的に小さくなっている。これは、段階的に大きいものから除去することで、フィルターの目詰まりを少なくし、目的物を高い透過率で回収するためである。

また、サイズ分離でのフィルター性能を決定する要因としては、空隙面積 (μm^2) を任意に制御することが最も重要となる。

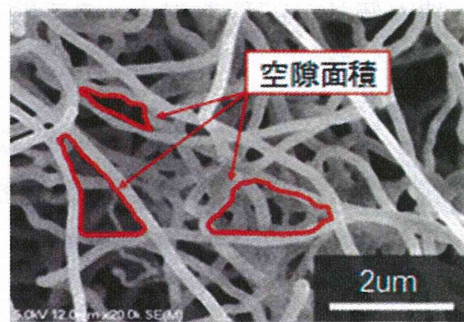


Fig. 8 SiO_2 -NF のパターンニング技術

赤血球は平均径が 7~8 μm 、厚さが 2~3 μm 程の両面中央が凹んだ円盤形状をしている。一方、白血球は球形であり、平均径が 6~30 μm と種類によって

異なる。このように、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 $1.5\mu\text{m}$ 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。ここで、直径 $1.5\mu\text{m}$ の毛細血管の断面積は約 $1.8\mu\text{m}^2$ と計上される。即ち、空隙面積を $1.8\mu\text{m}^2$ 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られる。

ここで、空隙面積は画像解析を用いて Fig. 9 の手順で算出した。解析ソフトには、National Institutes of Health 製の ImageJ を使用し、①同じ加速電圧で SEM 画像を撮影、②SEM 画像のスケールとピクセル長を設定、③画像内の輝度分布を測定し、その平均値で $\text{SiO}_2\text{-NF}$ と空隙面積を規格 (SEM 画像内の輝度バラツキの補正)、④画像の 2 値化と $\text{SiO}_2\text{-NF}$ と空隙の境界を明確化、⑤測定する空隙面積の最小値を設定 (今回は $0.5\mu\text{m}^2$ 以上とした)、⑥空隙の個数と面積を出力、の手順により処理した。

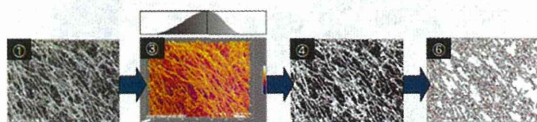


Fig. 9 ImageJ を用いた SEM 画像解析の手順

以上から、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の形状と空隙面積の制御技術を確認することで最適化を図った。詳細は以降に記載する。

・ $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の形状制御

$\text{SiO}_2\text{-NF}$ の単位面積当りの本数が不

変で枝分かれがない場合、出口に向かって空隙面積を段階的に小さくするためには、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の径を出口に向かって徐々に太くする必要がある。そこで、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の成長モードを解明し、形状制御に応用した。以下にその成長モードについて説明する。

$\text{SiO}_2\text{-NF}$ の成長には、Pt 触媒に SiO が取り込まれ、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の長さが伸びる Vapor-Liquid-Solid (VLS) 成長 (Fig. 10 (a))、SiO が Pt 触媒以外の NF に取り込まれ SiO_2 膜となり、結果 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の径が太くなる Vapor-Solid (VS) 成長 (Fig. 10 (b)) の 2 つの成長モードから成る。

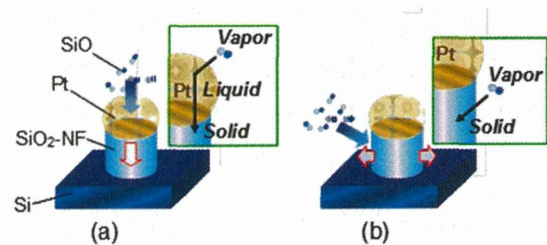


Fig. 10 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の成長モード ((a) VLS、(b) VS 成長)

これらの成長モードは、 O_2 分圧を制御することで、その割合を変えることができる (Fig. 4 参照)。即ち、VLS 成長律速または VS 成長律速であれば円柱状の $\text{SiO}_2\text{-NF}$ が形成される (Fig. 11 の a 及び c)。これに対して、VLS 成長と VS 成長を同時に起こしながら $\text{SiO}_2\text{-NF}$ を形成すれば円錐台の形状が得られ、空隙面積を段階的に小さくすることができると考えられる (Fig. 11b)。

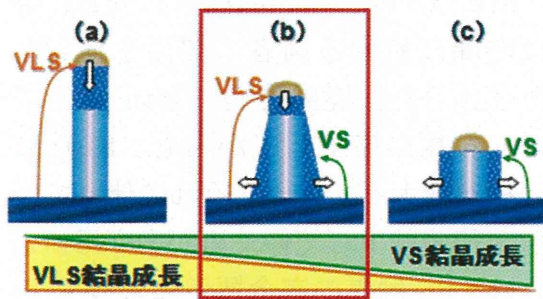


Fig. 11 VLS/VS 結晶成長の割合と SiO₂-NF 形状

そこで、焼成温度 1110°C、全圧 700Pa、焼成時間 10min とし、O₂ 分圧を変えて成長モードを観察した (Fig. 12)。なお、SiO₂-NF の先端を上層、Si 基板側を下層、その中間を中層とした。

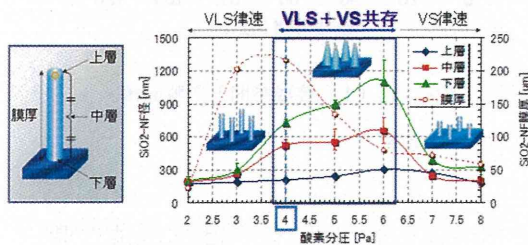


Fig. 12 O₂ 分圧における VLS/VS 成長の割合

Pt 触媒に吸着可能な単位時間当たりの SiO 量 (限界溶解速度) は一定であり、これ以下の速度で SiO が Pt 触媒に吸着されると、VLS 成長が成長律速となる。2~4Pa の低 O₂ 分圧下では、NF 径は変わらず厚さが増加するため、この成長が律速となる。ここから、SiO 吸着速度が Pt 触媒への限界溶解速度を超えると、VLS と VS の成長が同時に起こる。O₂ 分圧が 4~6Pa のとき、この領域となる。即ち、フィルター構造に適した構造 (出口に向かって空隙面積が小さくなる円錐台の SiO₂-NF) が形成される。この SiO₂-NF 形状にする

ことで、サイズの異なる血球を濾過してもフィルターが詰まりにくくなる (Fig. 13)。

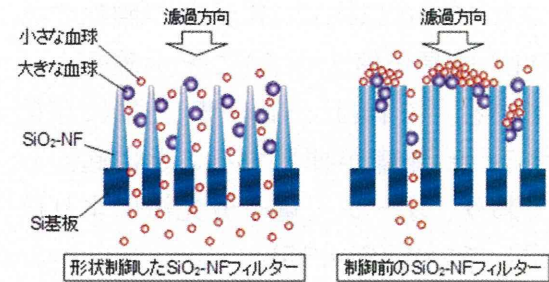


Fig. 13 形状制御前後での SiO₂-NF フィルターイメージ

なお、ここでは血球との接触頻度が最も高まる厚い SiO₂-NF が形成でき、かつ円錐台の形状を得る条件として、4Pa の O₂ 分圧を最適値とした。本条件下で得られたフィルターの SEM 断面写真を Fig. 14 に示す。

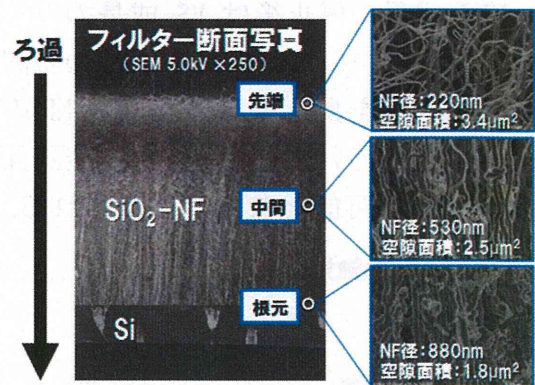


Fig. 14 形状制御後の SiO₂-NF フィルター断面写真

• SiO₂-NF の空隙面積制御

次に、得られた SiO₂-NF の形状制御条件を基に、空隙面積の最適化を検討した。SiO₂-NF の生成本数は Pt 触媒の分散に依存するが、分散条件は一定としている。そのため、SiO₂-NF の径が

太くなれば、空隙面積が小さくなる。

1050-1120°Cで SiO₂-NF が形成される領域においては、いずれの O₂分圧下でも 10min 以内に NF 長さが飽和する (VLS 成長が停止する) ことが確認されている。これは、SiO₂-NF 先端に存在する Pt 触媒が揮発することに起因しており、オージェ電子分光法により確認している (Fig. 15)。

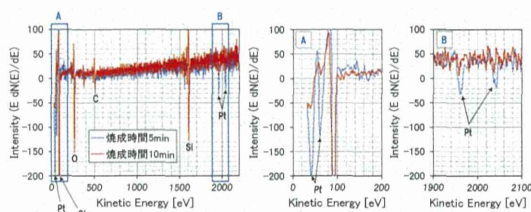


Fig. 15 焼成時間に対する SiO₂-NF 先端の Pt 触媒の分析結果 (オージェ電子分光法)

VLS 成長の停止後は VS 成長のみ進行する (Fig. 16)。即ち、VS 成長の時間 (焼成時間) を長くするほど SiO₂-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と推測される。

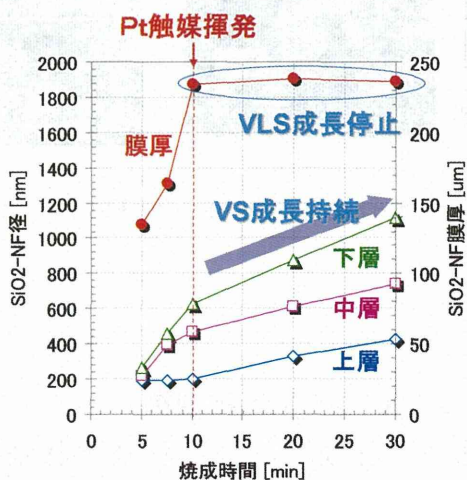


Fig. 16 焼成時間に対する SiO₂-NF 構造の変化 (VLS/VS 成長モード)

SiO₂-NF 径と空隙面積に注目し、焼成時間に対する両者の関係を検討した (Fig. 17)。焼成時間 10min 以上で VLS 成長が停止してからも、SiO₂-NF の径が増大していき、それに伴って空隙面積が減少していくのが分かる。これは、Pt 触媒の完全揮発によって VS 成長のみが進行した結果である。

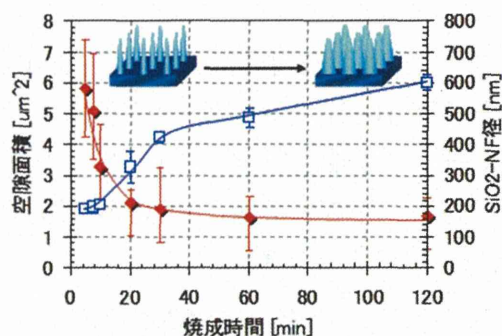


Fig. 17 (I) 焼成時間と空隙面積・

SiO₂-NF 径の関係

以上から、本条件下では、焼成時間により空隙面積が制御できることを解明した。これにより、SiO₂-NF の空隙面積を制御することが可能となった。

B-2-6. フィルター性能評価

・フィルター性能の評価方法

マラリア非感染のヒト全血 5ul に、培地の RPMI1640 (pH7.1) を 244.5ul、蛍光色素の Acridine Orange (AO) 溶液を 0.5ul 加えることで 50 倍希釈の血液サンプル (全量 250ul) を調製した。以降に記載する検討結果は、全てこの方法で調製された血液サンプルを使用している。

AO 溶液は、核酸 (蛍光波長 520nm) の染色剤であるため、白血球の核のみを染色する。この染色処理により、白血

球のみが蛍光視野下で蛍光標識されるため、赤血球と白血球の区別が可能となる (Fig. 18)。なお、濾過前と濾過後の血液サンプル中に含まれる白血球数と赤血球数は、セルカウンターで計数することにより定量化した。

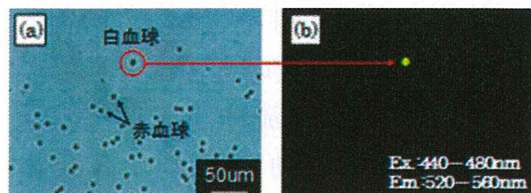


Fig. 18 A0溶液によって染色された赤血球と白血球混合溶液の (a) 明視野顕微鏡画像、(b) 暗視野顕微鏡画像

・ SiO₂-NF の空隙面積の最適化

空隙面積を最適化するため、B-2-5 項で得られた SiO₂-NF 構造で血球の分離性能を評価した。空隙面積に対する白血球除去率と赤血球透過率の関係を Fig. 19 に示す。

空隙面積が 2 μm^2 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) が得られた。これは、B-2-5 項で説明した赤血球のみが通過できる毛細血管の断面積 (約 1.8 μm^2) とよく一致する。即ち、白血球を除去して赤血球のみを通す SiO₂-NF 構造になっていることが実証された。

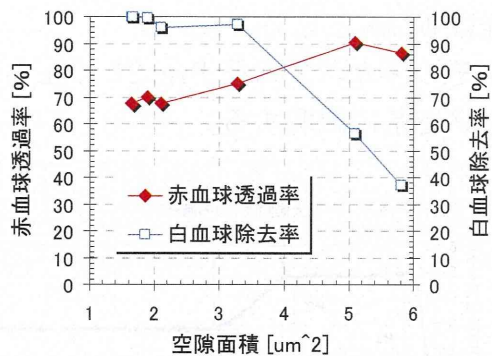


Fig. 19 空隙面積と血球分離性能の関係。

B-3. ワンステップ濾過機構の開発

マラリア流行地で使用するために、操作性の優れた (特別な装置を必要としない) 濾過機構の開発に取り組んだ。提案した濾過機構の模式図を Fig. 20 に示す。



Fig. 20 新規ろ過機構の模式図とそのフィルター手順

中空の樹脂管に SiO₂-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便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。

そのメカニズムを Fig. 21 の圧力データを基に説明する。

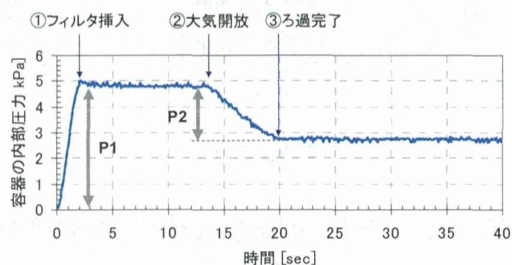


Fig. 21 各ステップでの容器の内部圧力変化

まず、樹脂管(フィルター)を容器に挿入する。このとき、容器内は0リングで圧縮されるため圧力が上昇する(P1)。次に、Al シールを取り外すと、樹脂管中空部が大気開放され、容器内との圧力差が発生する。圧力は高压側から低压側に移動するため、この圧力差で血液輸送が可能となる(P2)。

ここで、P1 はフィルターの性能、P2 は血液輸送量に関係してくる。各圧力の最適値は、 $P1 < 30\text{kPa}$ 、 $P2 > 4.2\text{kPa}$ であることを確認した上で設計した。以降に記載する検討結果は、全てこのろ過機構でろ過されたデータである。

B-4. 品質検査手法の立ち上げ

B-4-1. 検査機の導入

高い性能安定性(良品判定精度)を確保するため、B-3 節で記載した新規血球分離デバイスの品質検査手法の立ち上げに取り組んだ。先述の通り、血球分離の性能は $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の空隙面積と密接に関係している。単位体積当り

の $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の本数・屈曲度は一定であると仮定できるため、空隙面積は単位体積当りの空隙率に比例する。

ここで空隙率の算出方法を考える。今回のような $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の径(nm オーダー)にガスを流した場合、レイノルズ数が低く流動が層流であるため運動エネルギーの損失は小さい。このとき、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ を粒子物質の充填層と見なすと、粒子層の中を流体が流れる現象(充填層透過流動現象)は下記の Kozeny-Carman 式が適応される。

$$\frac{\Delta P}{L} = \frac{180\mu(1-\varepsilon)^2}{D_{ps}^2 \varepsilon^3} \cdot u$$

なお、圧力損失 ΔP 、粒子充填層の高さ L 、流体の粘性 μ 、充填層粒子の流形度 D_{ps} 、空隙率 ε 、充填層外の流体速度 u である。 μ 、 D_{ps} 、 u が一定であれば、 $\Delta P/L$ は ε に反比例することがわかる(L が同じ場合、 ΔP が大きくなるほど ε が低い)。即ち、 $\text{SiO}_2\text{-NF}$ の ΔP と L (膜厚)が測定できれば空隙率が算出され、そこから空隙面積の情報が得られる。

はじめに、 ΔP を測定するため、Fig. 22 に示すリーク検査機を立ち上げた。

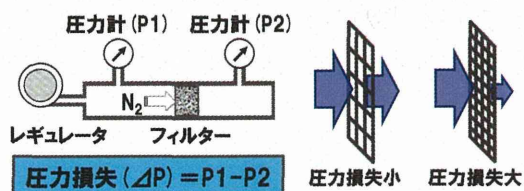


Fig. 22 圧力損失を測定するためのリーク検査機の概要

配管にセットされた $\text{SiO}_2\text{-NF}$ 形成後の Si チップに、 μ 、 u 一定で不活性 N_2

ガスを流すと、Si チップの入口と出口で圧力差 (ΔP) が得られる。

次に、L を測定するため、Fig. 23 に示すレーザー変位計を立ち上げた。

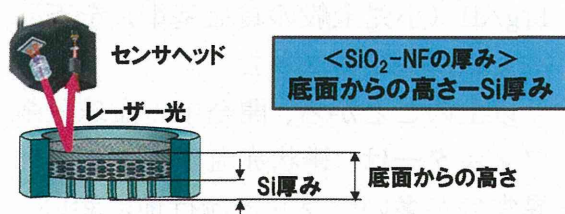


Fig. 23 SiO₂-NF の膜厚を測定するためのレーザー変位計の概要

Si チップ底面から SiO₂-NF 表面までの高さをレーザーにて測定し、既知の Si 厚みを引くことで SiO₂-NF のみの厚さ (充填層の高さ) L が得られる。

単位体積当りの空隙率が分かれば密度が計算できる。ここで、実際に立ち上げた検出器から得た $\Delta P/L$ の値と SiO₂-NF の密度の関係を図. 24 に示す。

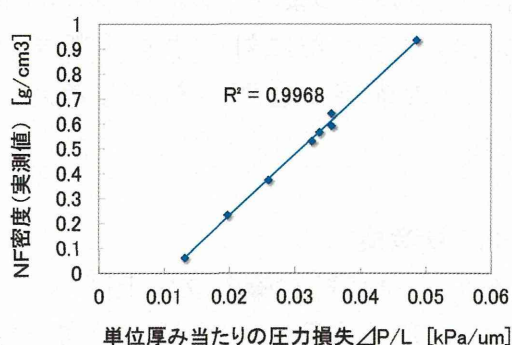


Fig. 24 立ち上げた検出器で得た $\Delta P/L$ と SiO₂-NF 密度の関係

$R^2=0.997$ と高い相関性が得られ、リーク検査機とレーザー変位計を用いることで SiO₂-NF の密度 (≒空隙面積) を非破壊で導出することが可能になっ

た。

B-4-2. SiO₂-NF 密度とフィルター性能の関係

B-4-1 節で立ち上げた検査機を用いて非破壊測定した SiO₂-NF の密度とマラリア非感染ヒト血液で性能評価した結果を図. 25 に示す。

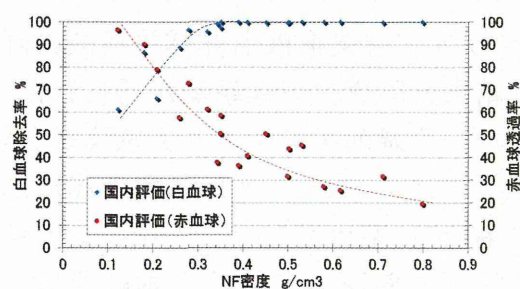


Fig. 25 SiO₂-NF 密度と血球分離性能の関係 (マラリア非感染ヒト血液)

SiO₂-NF と血球分離挙動に高い相関性があることを確認した。赤血球透過率 30%以上、白血球除去率 99.5%以上を満たす SiO₂-NF 密度は 0.35-0.55g/cm³ であり、この領域を良品の規定値とした。

B-5. マラリア流行地での原理検証

マラリア感染ヒト血液で検証するため、ウガンダ共和国にてテストを実施した。SiO₂-NF 密度と血球分離性能の結果 (65 検体) を Fig. 26 に示す。なお、マラリア感染は、ギムザ染色法と RDT (Rapid Diagnostic Test) を用いて判定した。

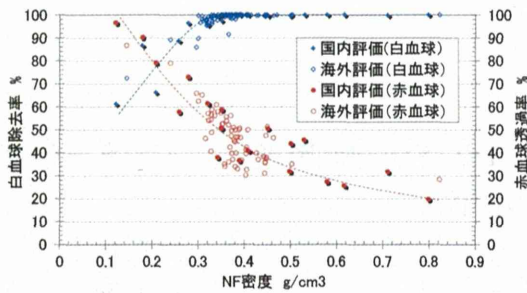


Fig. 26 SiO₂-NF 密度と血球分離性能の関係(マラリア感染ヒト血液)

マラリア感染血液も非感染血液の評価結果と同様の分離挙動が得られた。また、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)に変化がないことをギムザ染色法より確認している。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結果を示した。

鎌状赤血球症は、サハラ以南アフリカでは地域によっては、人口の40-60%がヘテロ接合体(軽度)で、その地域の新生児の1-4%がホモ接合体(重度)の鎌状赤血球症であると推定されている(N Engl J Med 2008; 359:2254-2265 November 20, 2008)。上記検証サンプルの中でも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。

また、Uganda Malaria Indicator Survey 2009 P. 58によればウガンダのグル(Mid Northernに位置する)では、5才以下の子供の中で73.8%もの確率で11g/dl(小児全般の貧血基準)を下回ることが報告されている。この中に

は、8g/dl以下のsevereの状態と判断されるものも15.9%含まれている。上記検証サンプルの中でもヘモグロビン分析装置(ヘモキュー Hb201+)によって測定されたヘモグロビン量が11g/dl(小児全般の貧血基準)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。

補足的な知見としては、上記のように貧血状態の割合が高いために、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する。中には、正常血液の1/3程度しか赤血球数を持たない場合がある。また、現地医師による採血の際に、溶血していると思われるものも多数存在した。医師の技術レベルの問題はあるが、そのレベル向上は容易ではない。つまり、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-6. 量産検討

B-6-1. 量産検討機の立ち上げ

SiO₂-NFの作製にはPt粒子の均一分散が重要な要因である。そのため、昇温中のオストワルド成長の時間を短くすることが好ましく、急速加熱が必要である。この理由から、原理検証機と同様、RTA(ULVAC製 RTP-6)を量産検討機に採用した。RTP-6は6インチウエハーに対応できる装置である。より