

大きな径のウエハー工程のほうがコスト的なメリットが得られるが、現状はバラツキの低減を重視するために4インチウエハーでの検証を進めている。

立ち上げた装置の外部インターフェースを Fig. 27 に示す。本来の装置構成から、NF 形成時の最適流量、圧力、酸素濃度等を考慮し、ガス供給流量やロータリーポンプの排気速度等に独自設計を施している。プロセスチャンバーにはこれまでと同様、N₂ と O₂ ガスを導入することで O₂ 分圧と全圧を制御することができる。

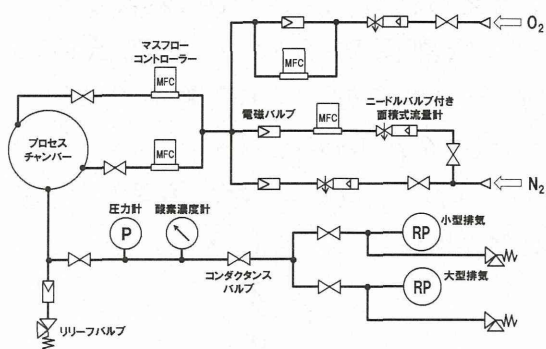


Fig. 27 SiO₂-NF 量産検討機の概要

B-6-2. SiO₂-NF の焼成結果

温度設定値 975°C、O₂ 流量 10sccm、N₂ 流量 1.5slm、全圧 300Pa、焼成時間 30min の条件下で SiO₂-NF を形成すると、目視で判別可能なレベルで分布が確認された (Fig. 28)。



Fig. 28 量産検討機で SiO₂-NF を焼成した結果 (4 インチウエハー)

この分布は、①温度分布、②ガス分布、③Pt 触媒分布、④治具劣化が原因であると考えられるが、SEM による SiO₂-NF 構造の解析結果から、特に①と②の影響が大きいと予想される。

ここで、プロセスチャンバーの模式図を Fig. 29 に示す。

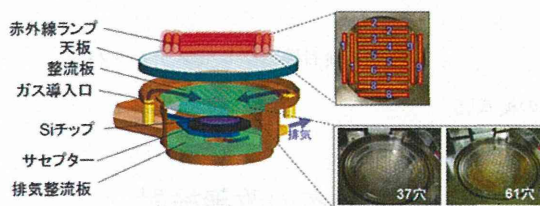


Fig. 29 量産検討機のプロセスチャンバーの模式図

4 インチウエハーは SiC サセプターに設置し、9 セグメントに分類された赤外線ランプで急速加熱される。また、N₂ と O₂ の混合ガスは 2 箇所設置されたガス導入口から等量導入され、整流板を通過してチャンバー内に拡散し、排気整流板を通過して排気される。即ち、温度分布は赤外線ランプの各セグメントの出力調整で、ガス分布は整流板の

設計で改善可能である。

B-6-3. 温度分布の改善検討

TC(Thermo Couple)ウエハーを作製し、リアルタイムで温度をモニタリングしながら、赤外線ランプの各セグメントの出力を調整した(Fig. 30)。その結果、調整前の状態では max-min で 16°C 程度の温度分布があったのに対して、校正後の状態では max-min で 1°C 程度の温度分布まで低減することができた(ウエハー面内 5 点計測結果)。

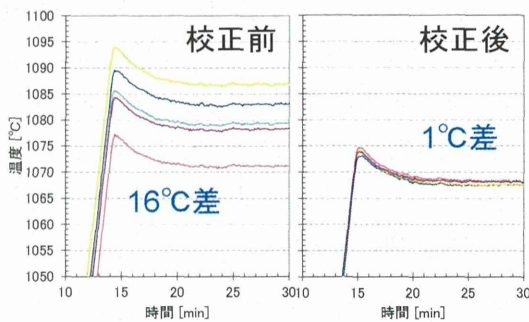


Fig. 30 量産検討機のプロセスチャンバー

の模式図

B-6-4 ガス分布の改善検討

TCウエハー(温度 T_{TC})と N_2 ガス(温度 T_{N_2})の熱移動は、高温側 T_{TC} から低温側 T_{N_2} へ向かって起こる。この熱移動は熱伝導、対流伝熱、輻射伝熱を考える必要がある。

熱伝導は TC ウエハーの熱電対接続部(高温側)から N_2 ガス界面(低温側)へ熱が移動する現象であり、Fourierの法則が適応されるが、各測定点の温度勾配は TC ウエハー温度と N_2 ガスの温度からなり同一系と見なすことが

できる。また、輻射伝熱は TC ウエハーから放出される輻射の量とその絶対温度の 4 乗に比例するため、熱伝導と同様で各測定点は同一系と見なすことができる。

本実験系ではガス流量(流速)に対する熱交換が支配的となる対流伝熱(対流熱伝達)について考える。TC ウエハーと N_2 ガスの接触面で温度境界層を形成し、連続的な熱伝達が起こる。このとき、熱伝達によって移動する熱流束 $q(W/m^2)$ はニュートンの冷却則から

$$q = \frac{Q}{A} = hdT = h(T_{TC} - T_{N_2})$$

で与えられる。ここで、 Q は総熱量(W)、 A は伝熱面積(m^2)、 h は熱伝達率($W/(m^2/K)$)であり、本実験系では強制的対流($100 < h < 1000$)となる。 h は下記の関係があり、「流体の熱伝導率(λ)/温度境界層厚さ(δ)」に等しい。

$$h = \frac{\lambda}{\delta}$$

ここで、 δ は粘性とともに増大するため、レイノルズ(Re)数とともに減少することが分かる。 Re は代表的な速度(N_2 ガス流速) $U(m/s)$ 、代表的な長さ(熱電対に作用する TC ウエハー距離) $L(m)$ 、動粘性係数 $\nu(m^2/s)$ とすると

$$Re = \frac{UL}{\nu}$$

で表され、 N_2 ガスの流速に比例する(Navier-Stokes 方程式からも証明される)。即ち、 N_2 ガス流量が増加すれば Re が増加するため δ は減少し、結果 h が大きくなることで熱量変化が生

じる。故に、「TC ウエハー上のガス流量 \propto 冷却温度」が成り立つ(厳密には TC ウエハーの表面状態や雰囲気状態で僅かに変わるが簡略化する)。この関係を利用してガス分布を評価した(ガス冷却法と称する)。

検討前の整流板は、材質天然石英、外径 ϕ 215mm、厚み 3mm の母体に貫通孔数 61 個、貫通孔径 ϕ 4mm、ピッチ配置 15mm 正三角形頂点で構成される。この整流板を設置して N_2 流量を変えたときの分布を、TC ウエハーを用いたガス冷却法により評価した(Fig. 31)。なお、導入する N_2 流量が異なれば当然冷却量が大きくなるため、全データを各 N_2 流量値で規格している。

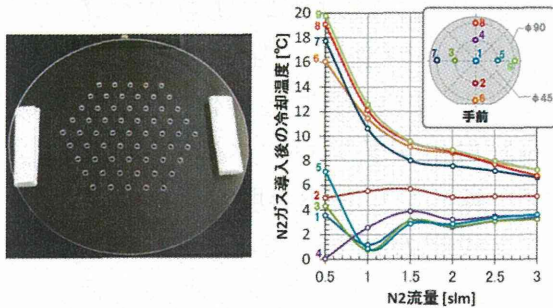


Fig. 31 改善前の整流板を用いたウエハー上のガス分布評価(ガス冷却法)

本整流板を用いた場合、ウエハー中心よりも外周部で冷却量が大きい。つまり、ウエハーの中心よりも外周側において高ガス流量になっていることが分かる。先述の通り、ガス流量は冷却温度に比例するため、TC ウエハー中心部と外周の流量比が見積もれる。

得られた流量比を基に貫通孔径を再設計した整流板を Fig. 32 に示す。但し、 SiO_2 -NF 形成条件の N_2 流量

(1.5slm) の場合に均一分散するように設計している。

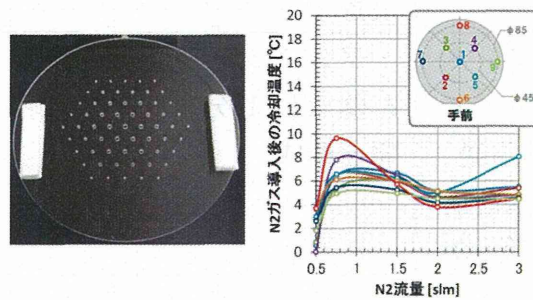


Fig. 32 改善後の整流板を用いたウエハー上のガス分布評価(ガス冷却法)

設計前の整流板と比較し、ガス冷却量の分布が小さく、4 インチウエハー上で1/4のばらつきに改善されたことが確認された。来年度は、設計後の整流板を用いて SiO_2 -NF の作製を進めることで、大きなバラツキ低減効果と歩留り改善効果が期待できる。

C. 研究結果

以下のTable. 1に、今年度の取り組みの結果得られた研究結果を示す。

Table 1. 平成 26 年度の研究進捗および成果

開発目標	進捗
性能達成に向けたプロセス開発	<ul style="list-style-type: none"> ・濾材である SiO_2-NF の成長メカニズムを解明し、構造制御法を確立 ・SiO_2-NF 構造最適化(白血球除去>99.5%/赤血球透過>30%確保) ・品質検査法の立ち上げと有用性を確認

	・量産検討機の立ち上げとばらつき要因の特定・一部改善
ワンス テップ ろ過 機構構 築(<1 分)	・ワンプッシュ型ろ過機構を確立し1分以内の処理時間を達成
マラリア流行 地での 検証	・ウガンダ共和国でデバイスを検証し国内評価と同程度の性能を確認

D. 考察

白血球除去率の目標として99.9%としてきたが、今回の検証結果では99.9%に達しないフィルターが存在することが分かった。フィルターとして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。

また、現在作製中のフィルターはφ5mmで設計されているが、全血30μl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、赤血球の透過率を40%とすると、2000~6000万個の赤血球が回収できる計算となる。これは、赤血球の測定対象個数を200万個としても、十分な赤血球の数となる。つまり、現状のフィルター径よりも小さくすることが可能である。Si ウェ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、設備費の低減に大きな関連性がある。そのため、今後最適なフィルター径を選定することで、より一層コスト競争力のある製品となると考えている。

E. 結論

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。また、マラリア診断のみならず、生化学研究や他の疾病診断においても重要なツールとなることを期待している。

以下のTable. 2に今後の開発目標を記載した。次年度は、①コンパクトディスクへの血球分離デバイス組み込み(チップ径小型化を伴う)、②量産検討(4インチプロセス)をメインに検証を進め、平成28年度のテストに向けて完成度の向上を図る予定である。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告(総括)に纏めて記入

G. 研究発表

なし

Table 1. 血球分離デバイスの開発目標

年度	全体の計画	血球分離デバイス開発目標
平成	マイクロ流路をコンパクトディ	① コンパクトディスク

27年	スク型の細胞チップに組み込むことにより、ワンタッチかつ全自動で診断可能なデバイスへと改良	クへの血球分離デバイス組み込み(一体化) ① 量産検討(4インチプロセス)
平成28年	チップ上からマラリア原虫を抽出、オンチップPCR法等を用いた遺伝子診断による感染種薬剤耐性の同定が効果的に行えるデバイスへと改良	① 海外テストでの信頼性検証 ② 量産検討目処付け、引継ぎ活動

・フィルターデバイス, W02014/064921
(2014/05/01 公開)

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

(1) 公開特許

- ・シリコン構造体およびその製造方法, W02009/034697 (2009/03/19 公開) (JP, US 登録済み)
- ・流路構造体およびその製造方法, W02010/082279 (2010/07/2 公開) (JP, US 登録済み)
- ・フィルターデバイス, W02012/039129 (2012/03/29 公開) (US 登録済み)
- ・フィルターデバイス及びそれを用いた分析デバイス, W02013/061585 (2013/05/02 公開)
- ・バイオチップおよびそれを用いたバイオデバイス, W02013/140748 (2013/09/26 公開)

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）

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

担当責任者 片岡 正俊 研究グループ長
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：我々は微細加工技術を用いてマイクロチャンバー（直径 105 μm 、深さ 50 μm ）をアレイ状に配列したポリスチレン製細胞チップを作製し、マラリア診断への応用を行っている。マラリア検出では、蛍光核染色液 SYTO 59 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。現在は、マラリア流行域を中心とするフィールド使用を見据えた検出システムをパナソニック AIS 社が開発中であり、検出用試作機での使用に適した蛍光核染色液 SYTO 21 によるマラリア核染色法を構築した。ウガンダ共和国での実サンプルを用いた細胞チップでのマラリア検出を行い、既存診断法である光学顕微鏡法、イムノクロマト法および PCR 法による診断結果と比較検討したところ、正確かつ高感度な検出が可能なことが示された。

A. 研究目的

細胞チップによる超高感度マラリア検出を、アフリカをはじめとする流行域での診断装置として利用するため、低コストかつ易操作性のマラリア検出に特化した蛍光検出機をパナソニック AIS 社が開発中である。その中で作製された試作機（図 1）を用い



図1. 蛍光検出用試作機

て、検出用蛍光試薬の最適化を図るとともにウガンダ共和国における実サンプルを用いた実証試験を行った。

B. 研究方法

1. 蛍光検出用プロトタイプ機の作

製：研究分担者であるパナソニック AIS 社がフィールド用蛍光検出機を作製中であるが、まず基盤技術である細胞チップの臨床応用性の高さを実証するため試作機を作製した（図 1）。試作機は診断装置本体（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。半導体レーザーとして 488 nm/635 nm 光源を用いた。

2. 蛍光試薬の選択：上記試作機を用いたマラリアの定量検出において、最適なマラリア核染色法を、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検討しながら、SYTO 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 24, BC および 59 を用いて検討した。なお、各染色液による核染色は、SYTO 59 による染色法を元に（PloS One 2010, e13179）、パナソニック AIS 社が開発した赤血球分離カラムにより回収された赤血球画分に（図 2）、3.8 μ l の各染色液 50 μ M を加え細胞チップ表面への赤血球溶液展開 10 分間で行った。展開静置後、チップ表面をマラリア原虫培養用 RPMI 1640 培地 (Nacalai Tesque, Inc., Tokyo, Japan) で洗浄した後、蛍光検出機により蛍光強度の測定を行

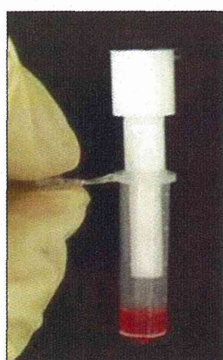


図2. 赤血球分離カラム

った。

3. 実サンプルによるマラリア検出と既存方途の比較：ウガンダ共和国グル市ラチョ病院マラリア外来において、倫理委員会の規定に従い同意の得られた患者について採血を行い、全血を用いて既存診断法である赤血球ギムザ染色による光学顕微鏡法（図 3）、イムノクロマト法（SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan, STANDARD DIAGNOSTICS, INC. Republic of Korea）（図 4）、熱帯熱マラリア検出用 2 段階 PCR 法（Am J Trop Med Hyg 69, 1999:687）、および赤血球分離カラムから精製した赤血球を用いた細胞チップ法により（図 5）、マラリア感染の有無あるいは感染赤血球数の検討を行った。ギムザ染色による光学顕微鏡観察から求めた赤血球感染率は以下の式から求めた。

[感染率(%) = マラリア感染赤血球数 ÷ 観察した赤血球数 × 100]

全血ギムザ染色では最低 3 万個以上の赤血球観察を行い、感染率 0% と判断した場合は、赤血球を 100 万個以上観察してマラリア感染赤血球を認めない場合とした。

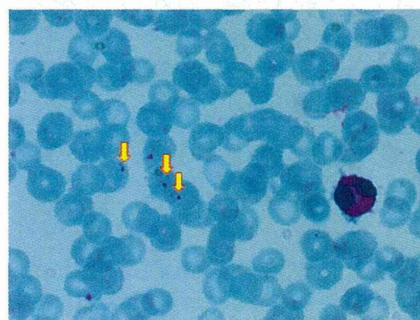


図3. マラリア患者血液中のマラリア原虫(矢印)

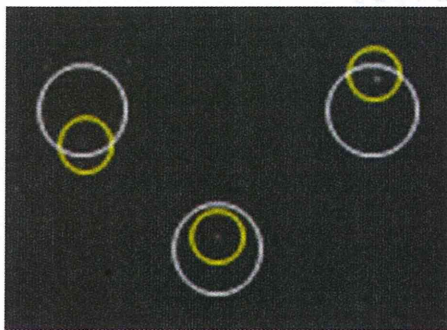


図5. 蛍光検出用試作機において検出されたマラリア感染赤血球(黄丸)とマイクロチャンパー(白丸)。

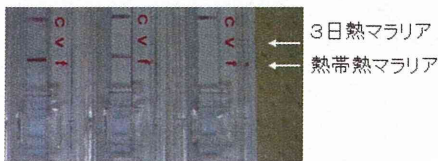


図4. イムノクロマト法によるマラリア感染の判定。熱帯熱マラリア陽性(A, B)および陰性(C)。

(倫理面への配慮)

マラリア患者由来血液を使用するに当たり、ウガンダ共和国グル大学倫理委員会および研究遂行者の所属する(独)産業技術総合研究所倫理委員会より許可を受けている。研究遂行および論文作製において、患者プライバシー保護に努めている。

C. 研究結果

核染色液の検討では、まず培養マラリアで超高感度検出が可能な 635 nm 励起 SYTO 59 の場合、マイクロチャンパーの淵などが非特異的蛍光として試作機において観察された。一方、488 nm 励起 SYTO 9, 11, 12, 13, 14, 16, 21, 24 および BC の中では、SYTO 21 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。そこで、試作機を用いた実サンプルでのマラリア検出は、SYTO 21 を用いることとした。

ウガンダ共和国で得られた実サンプル 48 症例について、全血ギムザ染色の光学顕微鏡観察の結果、マラリア感染率 0% の 4 症例を含め 0.0002%~2.34%の感染率を認めた。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(図6)。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。これら解析した 48 症例について、イムノクロマト法および PCR 法の結果も記載した(表1)。なお、48 症例のうち 14 症例(症例番号 22, 23, 26, 28, 29, 30, 31, 33, 34, 36, 37, 42, 44, 45 および 46)は、同病院においてマラリアに対してコアルテムによる投薬治療中であり、投薬開始 1 日あるいは 7 日後の血液の解析を行っている。

D. 考察

市販 DNA マイクロアレイスキャナーを用いたマラリア核の蛍光染色検出では、共焦点レーザー検出を利用しており、バックグラウンドが低くマラリア核の染色性から SYTO 59 を核染色液として利用した。マラリア流行域を中心としたフィールド使用を考えた場合、高価な DNA マイクロアレイスキャナーの使用は困難であり、そのため廉価な CMOS カメラを試作機に

は用いている。そのため、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。

ウガンダ共和国グル市ラチョ病院における 48 症例の実サンプルについて、ギムザ染色による光学顕微鏡観察

によるマラリアの正確な定量検出が期待される。

症例番号 3, 7, 9, 36 および 45 では、ギムザ染色、免疫クロマト法と細胞チップ法ではマラリア感染陽性判定に対し、PCR 法ではマラリアの存在は認められず PCR 法では偽陰性を示

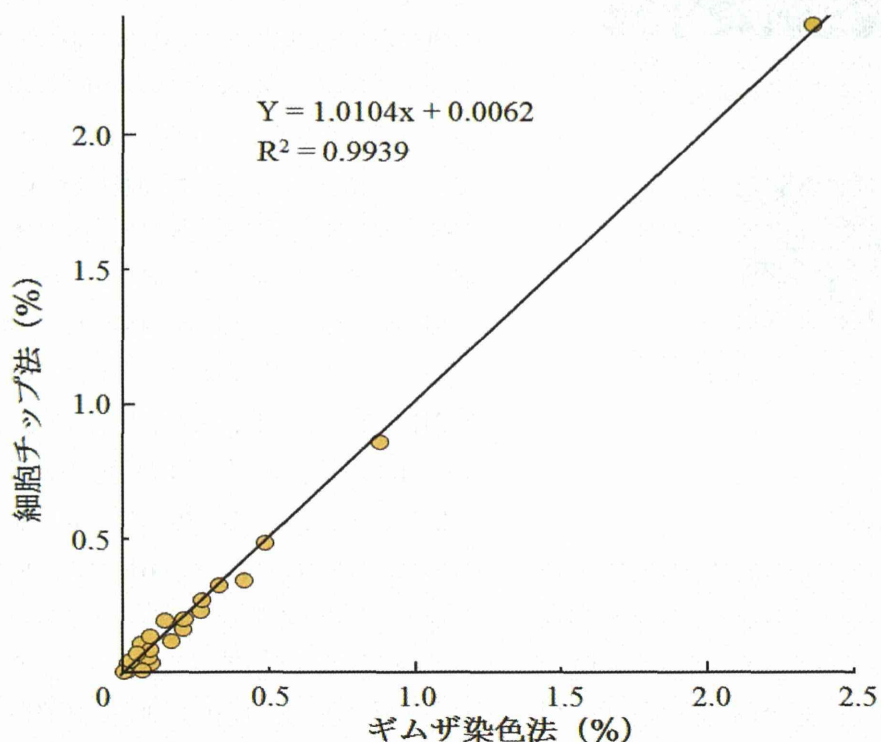


図6. ギムザ染色法および細胞チップ法により測定されたマラリア感染赤血球数の相関。

を行いマラリア感染赤血球の定量検出を行った。感染率は 0.0002% (症例番号 22) ~2.34% (症例番号 47) となっている。ラチョ病院においてマラリアと診断され既にコアルテム投与を開始している症例番号 22 が、全症例の中で最もマラリア感染率が低くなっており、薬剤投与が奏功していると示唆される。図 6 から明らかなように、この感染率の範囲では細胞チップ

している。マラリア感染率は 0.0014%~0.10%と PCR 法での検出可能な感染率である。今回、血液サンプルは、採血後に濾紙に血液を染み込ませ自然乾燥後室温保存し、現地から日本への輸送を経て濾紙から DNA 抽出を行って PCR 反応を行っている (Parasitol Int 2010, 59: 178)。DNA 回収は保存状態にも依存しており、そのため PCR 法ではマラリア感染が認

められなかった可能性がある。症例番号 13 においては、ギムザ染色、PCR 法および細胞チップ法ではマラリア感染が認められたが、イムノクロマト

法ではマラリア感染陰性判定となった。これはイムノクロマト法で偽陰性が示されたと考えられる。

表1. 48症例の各診断法による結果

症例番号.	ギムザ染色(%)	細胞チップ (%)	イムノクロマト法	PCR法
1	0.06210	0.00735	○	○
2	0.08220	0.05409	○	○
3	0.00140	0.00397	○	—
4	0.09660	0.03517	○	○
5	0.15660	0.12660	○	○
6	0.09160	0.05932	○	○
7	0.26100	0.27268	○	—
8	0.04970	0.05359	○	○
9	0.00820	0.00445	○	—
10	0.19220	0.18979	○	○
11	0.31120	0.31168	○	○
12	0.41150	0.35427	○	○
13	0.00620	0.00617	—	○
14	0.00000	0.00388	○	○
15	0.00250	0.05755	○	○
16	0.00820	0.03294	○	○
17	0.47130	0.48086	○	○
18	0.00000	0.00000	—	—
19	0.19840	0.17398	○	○
20	0.00419	0.01669	○	○
21	0.04291	0.08055	○	○
22	0.00020	0.00755	○	○
23	0.02915	0.03900	○	○
24	0.05968	0.06517	○	○
25	0.02486	0.07356	○	○
26	0.00000	0.00000	○	○
27	0.04022	0.04743	○	○

表1. 続き

症例番号	ギムザ染色(%)	細胞チップ (%)	イムノクロマト法	PCR法
30	0.09040	0.09506	○	○
31	0.04875	0.06832	○	○
32	0.00390	0.00759	○	○
33	0.86392	0.86157	○	○
34	0.02991	0.04222	○	○
35	0.26471	0.24103	○	○
36	0.05345	0.10447	○	—
37	0.03586	0.04190	○	○
38	0.06355	0.06670	○	○
39	0.04229	0.05092	○	○
40	0.01456	0.04398	○	○
41	0.02557	0.06194	○	○
42	0.09092	0.13560	○	○
43	0.08200	0.14581	○	○
44	0.00000	0.00000	○	○
45	0.03190	0.05297	○	—
46	0.03286	0.03936	○	○
47	2.34375	2.40156	○	○
48	0.13199	0.19413	○	○

48 症例のうち 4 症例（症例番号 14,18, 26 および 44）はギムザ染色の光学顕微鏡観察でマラリアの存在が確認されず、感染率は 0%とした。この感染率 0%の場合は、PCR の検出感度を参考に赤血球 100 万個以上を光学顕微鏡で直接観察して、マラリア感染が無いことを確認している。症例番号 18 では、ギムザ染色、イムノクロマト法、PCR 法および細胞チップ法の全てでマラリアは検出されておら

ず、細胞チップで正確に判定されている。症例番号 26 および 44 では、ギムザ染色と細胞チップ法ともにマラリアは検出されていない。しかしながら、イムノクロマト法と PCR 法ではマラリア感染陽性判定となっている。本症例では、薬剤治療開始後に採血しており、免疫反応が陽性でさらに血中にマラリア DNA が残存して PCR においても擬陽性を示している可能性がある(Malaria J 2013, 12: 349)。症例番

号 14 では、ギムザ染色ではマラリアは確認されず、細胞チップ法では感染率 0.0038%と判断され、さらに免疫クロマト法および PCR 法ではマラリア感染陽性と判断された。前述の症例番号 26, 44 のように免疫クロマト法や PCR 法では擬陽性の可能性がある。赤血球ギムザ染色の光学顕微鏡観察はマラリア診断のゴールドスタンダードとされており、ギムザ染色陰性が事実であれば、細胞チップ法でも擬陽性の可能性が示唆される。細胞チップ法では、感染率は 0.0038%と低感染率として判断されていることから、試作検出機において、非特異的な蛍光発色をマラリア感染と判断した可能性がある。擬陽性検出率としては、免疫クロマト法や PCR 法が 48 症例中 3 症例である一方、細胞チップ法では 1 症例とその頻度は少ない。しかしながら、正確なマラリア診断デバイスとして臨床応用を考える場合、擬陽性は極力抑える必要があり、今後さらの実サンプルでの解析を進め染色法等の検討を加えて、信頼性の高い診断デバイスを開発する。

E. 結論

マラリア流行地域で患者血液を対象に、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った。マラリア感染の偽陰性判定は認められ

なかった。しかし既存の免疫クロマト法や PCR 法に比較してその頻度は低い擬陽性と判断される場合があり、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などの改良を加え、偽陰性や擬陽性の無いマラリア感染赤血球の定量検出が可能な診断デバイス開発を進める。

F. 健康危険情報

委託業務成果報告（総括）に纏めて記入

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表

Development of cell microarray chip for rapid and high sensitive malaria diagnosis. Shouki Yatsushiro, Shohei Yamamura, Kaori Abe, Eriko Obana, Toshihiro Mita, Toshihiro Horii, Masatoshi Kataoka. Beating Malaria London. July 7, 2014. London, UK.

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

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）

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

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
林 拓哉 主任技師

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

研究要旨

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ために、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の開発を目指している。我々は、半導体レーザーとCMOS（もしくはCCD）カメラを組み合わせることで、マラリア流行地域でのフィールドテスト実施、マラリア患者データサンプリングが可能な原理検証用蛍光検出装置を開発した。また、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た。さらに、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。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を達成した。

A. 研究目的

感染症であるマラリアは、現在ではギムザ染色による赤血球の顕微鏡観察が主流であるが、熟練技術者が必要であることと、目視で診断を行うために診断精度に限界があり、また診断に時間がかかる。これを解決するために、現地で誰でも使用できる簡易蛍光検出装置を開発し、高感度、短時間、自動でマラリア感染を診断することを目的とする。

細胞チップを用いた診断方法を確立するためには、マラリア流行地域でのフィールドテスト実施、マラリア患

者データサンプリングが可能な原理検証用蛍光検出装置の開発が不可欠である。それに対し、半導体レーザーとCMOSカメラを組み合わせた簡易な構成での原理検証用蛍光検出装置を目指す。また、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の構築を目指す。

現在のギムザ染色による顕微鏡観察では赤血球10,000個に対して1個のマラリア原虫検出が限界といわれている。また診断には1時間程度を要し、検査技師の技量によりその精度が大きく変わる。我々は、それに対して同

等以上の感度および短時間診断を自動検出システムにより実現することを目指している。そのためには、以下の点を実現する必要がある。

- ・マラリア検出におけるS/N比向上や測定ノイズの減少
- ・装置構成の検討による測定時間の短時間化

B. 研究方法

研究方法に関しては、下記の順序に従い記述する。

B-1. マラリア診断原理検証システムによる課題抽出

B-2. フィールドテスト用マラリア診断システムの開発

(倫理面への配慮)

本業務項目においては、培養マラリアサンプルのみを検討に用いており、倫理上の課題は発生しないと判断される。

B-1. マラリア診断原理検証システムによる課題抽出

本マラリア診断システムの基盤技術は産総研四国センターによって開発された。基盤技術では、蛍光処理を施した血液サンプルを細胞チップ上に展開し、高性能蛍光スキャナ（日立ソリューションズ製CRBIO II）内にセットする。蛍光スキャナ内で血液サンプルに励起光を照射すると同時に蛍光画像を撮影することで、蛍光処理が施されたマラリア原虫が蛍光を発生し、

マラリア原虫検出が可能となる。高精度蛍光スキャナの仕様を表1に示す。

表1. 高精度蛍光スキャナ（日立ソリューションズ製CRBIO II）仕様

スライドガラスサイズ	日本規格(76mm×26mm)、米国規格(3"×1")、ヨーロッパ規格(25mm×75mm)
解像度	5、10、20、30 μm(プレビューモードは50 μm)
検出感度	0.1蛍光分子/μm ²
読取速度	5 μm: 13分、10 μm: 5分、50 μm: 1分(23m×60mm範囲)
フィルタ部	最大4枚を搭載可能(標準でCy3用、Cy5用蛍光フィルタ2枚を搭載)
搭載レーザー波長	Cy3用: 532nm、Cy5用: 635nm
検出器	光電子増倍管(PMT)
検出器感度調整	高圧電源可変(リアルタイムの調整可能)
フォーカス	焦点深度: ±25 μm
可変範囲	±1mm
出力ファイル形式	TIFF(16bit)
使用環境	10℃～35℃(推奨温度: 20℃～30℃)
外形寸法	360(W)×530(D)×270(H)mm
消費電力	1200W
電源	AC100V 50/60Hz
消費電力	約70W
電源	AC100V 50/60Hz

しかしながら、高精度蛍光スキャナは数千万円オーダーの装置となり、マラリア蔓延国での普及は困難であると考えられる。それに対し、我々は半導体レーザーとCMOS（もしくはCCD）カメラを組み合わせることで、細胞チップを用いたマラリア流行地域でのフィールドテスト実施、マラリア患者データサンプリングが可能な原理検証用蛍光検出装置の開発を検討した。その際、上記蛍光スキャナの仕様をリフ

アレンスとして開発をスタートした。実際に試作した検出装置を図1に示す。

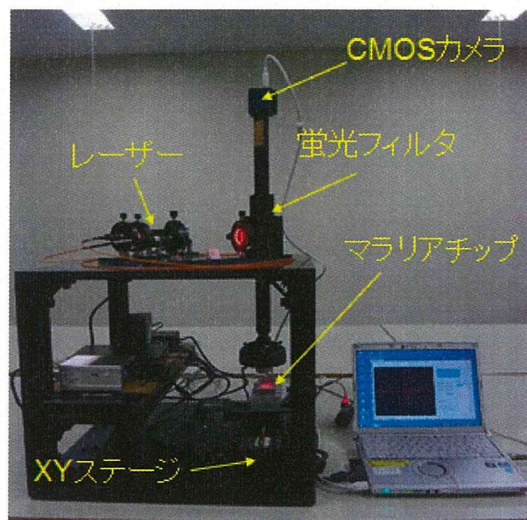


図1. 試作した検出装置

次に血液サンプルを展開する細胞チップ（産総研四国センター設計）の説明を図2に示す。

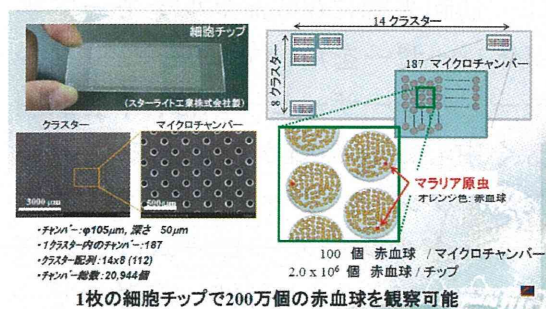


図2. 血液サンプルを展開する細胞チップ説明図（産総研四国センター提供）

適切に血液サンプル前処理を行うことで、図2の細胞チップに搭載された各マイクロチャンバー内部に、赤血球が100個ずつモノレイヤーに並べら

れる。マイクロチャンバー外部の赤血球は除去される。細胞チップには約20,000個のマイクロチャンバーが搭載されているため、細胞チップ全体をマラリア診断原理検証システムで検出することで、自動的に2,000,000個の赤血球に対するマラリア原虫感染赤血球の数が分かる。すなわちマラリア原虫感染赤血球の割合＝マラリア原虫感染率を定量的に診断可能である。

本マラリア診断原理検証システム開発にあたり、上記血液サンプルを検出（蛍光画像撮影）した後、測定済み血液サンプルの固定化处理およびギムザ染色を行った。その後、以下の観点でギムザ染色済み血液サンプルの顕微鏡観察を行った。

- ・撮影した蛍光画像上で輝点が検出された位置に本当にマラリア原虫が存在しているか
- ・マラリアが存在している位置に輝点が検出できているか

実際に撮影した血液サンプル蛍光画像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の例を図3に示す。

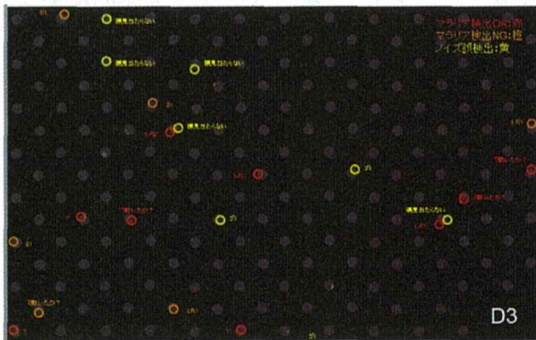


図3. 撮影した血液サンプル蛍光画像とギムザ染色済み血液サンプル顕微鏡観察結果との比較データ

上記の結果より、マラリア起因となる蛍光輝点が検出できたものの、マラリア原虫感染率定量診断実現に対しては検出感度が不十分であり、ノイズ光が多いという課題を有していることが判明した。

また、細胞チップ上に展開された1,000,000個の赤血球を検出するのに約40分かかっていた。さらに、本マラリア診断システム実現と商品化に向けては、マラリア流行地域でのフィールドテスト実施、マラリア患者データサンプリングが不可欠である。しかしながら図1に示した検出装置では輸送や現地での取り扱いにおける利便性、堅牢性の点で不十分であると考えた。

B-2. フィールドテスト用マラリア診断システムの開発

上記課題に対する改善手段を盛り込んだフィールドテスト用マラリア診断システムを開発した。検出装置は本体（半導体レーザー、CMOSカメラ、

対物レンズ、自動ステージ等）とコントロールボックス（各種電源、コントローラ）の2つから成る。試作した検出装置を図4に示す。



図4. 試作した検出装置

B-2-1. 改善内容

フィールドテスト用マラリア診断システムに実装した内容を以下に示す。

・カメラ検出視野を均一に励起するための光学系変更

マラリア診断原理検証システムでは、励起光源に635nmマルチモード半導体レーザーを用いていた。シングルモードのレーザービームは、中心が明るく中心から距離が離れるほど弱くなるガウシアンビームであるが、マルチモードのレーザービームはこれ以外のモードを含んでおり、複数のピークが現れる。このため、マルチモードのレーザービームはきれいに成形（集光、フラットトップビーム形成等）することが困難であるが、レーザービームを3m長の方角コア光ファイバ内を透過させることで、カメラ検出視野内の励起均一性を向上させながら装置

コストを抑制していた。しかしながらカメラ検出視野内の均一性は十分ではなく、光ファイバの巻き加減のわずかな変動等でカメラ検出視野内の照射パターンが変化し、再現性や安定性に課題があった。このためフィールドテスト用マラリア診断システムにおいては、励起光源にシングルモード半導体レーザーを用い、カメラ検出視野内を均一に照射するためのマイクロレンズアレイを実装した。

・2波長による励起が可能な光学系の導入

マラリア診断原理検証システムでは、励起光源に635nm半導体レーザー(Max13mW/mm²)を用いていた。しかしマラリア検出感度が不十分でノイズ光が多い課題があった。これを解決する手段の一つとして、新規に488nm半導体レーザー(Max16mW/mm²)光学系を追加し、488nm/635nm光源を任意に選択できる光学系を作製した。

・視野絞りの導入


マラリア診断原理検証システムではカメラ検出視野サイズは約1280um×1024umであったが、励起光はこれより広い領域に照射されていた。この励起光を照射した状態でマラリア原虫の蛍光を観察していると、秒単位で蛍光強度が減衰していくことが判明した。これは、自動ステージで血液サンプルを移動させながら順次蛍光画像を撮影する本方式において、実際に撮影する以前にも励起光が照射され、既に蛍光強度が減衰していることを示

す。すなわちマラリア検出感度低下の原因となる。このためフィールドテスト用マラリア診断システムでは、カメラ検出視野内にのみ励起光が照射される視野絞りを導入した。

・広視野検出可能なCMOSカメラの導入

マラリア診断原理検証システムにおいて、視野サイズが約1280um×1024umとなるCMOSカメラを搭載していたが、細胞チップ上に展開された1,000,000個の赤血球を検出するのに約40分かかっていた。このため、検出時間短縮を目指し2000um×2000umの視野を撮影できる400万画素CMOSカメラを導入した。これにより1,000,000個の赤血球を約15分で検出することを可能とした。検討したカメラの仕様比較を表2に示す。また130万画素CMOSカメラと400万画素CMOSカメラで実際に撮影したマラリア蛍光画像を図5に示す。

表2. 検討したカメラの仕様比較

	【現行品】アールイ ARTCAM130-M	セナチク/ロジ- STC- SB202POE	BASLER acA2040-250m
撮像素子	1/2inch CMOS	1/1.8inch CCD	1inch CMOS
画素数	1280×1024 130万画素	1624×1236 200万画素	2048×2048 400万画素
画素サイズ	5.2um×5.2um	4.4um×4.4um	5.5um×5.5um
露光時間(蛍光像)	500ms	50ms	50ms
露光時間(明視野像)	500ms	100~200ms	100~200ms
明視野像 イメージ			
撮影枚数	100枚	100枚	448枚
検査時間	約40分/1,000,000RBC	20分以下/1,000,000RBC	15分以下/1,000,000RBC
感度	△	○	○
分解能	1um	0.86um	1.1um
サイズ	×	○	△
価格	約550\$	約900\$	約1800\$



400万画素CMOSカメラでのマラリア検出画像



130万画素CMOSカメラでのマラリア検出画像

図5. 400万画素、130万画素CMOSカメラで撮影したマラリア蛍光画像

図5は同一マラリアサンプルの同一の位置を撮影している。これより400万画素CMOSカメラでも130万画素CMOSカメラとほぼ同等のマラリア原虫検出感度を得られることを確認した。

・検出フローチャートの改善

最後に、本マラリア診断原理検証システムにおける診断フローチャートを図6に示す。

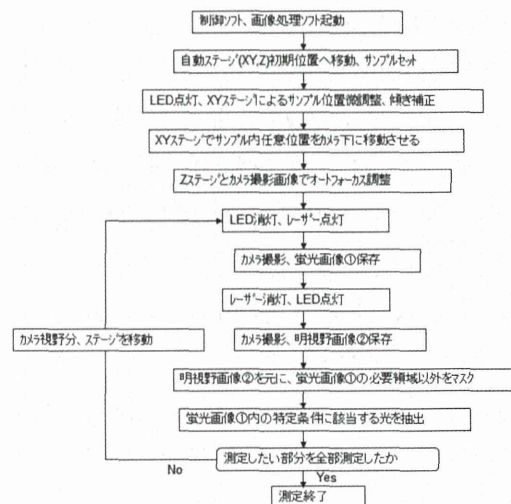


図6. 原理検証システムフローチャート

図6に示すように、本マラリア診断原理検証システムにおいては635nm/488nm励起光源を用いた蛍光画像だけでなく、白色LED光源を用いた明視野画像も撮影している。この理由だが、本マラリア診断原理検証システムでは診断精度向上のため、細胞チップのウェル内のみを検出範囲としている。これを実現するために、撮影された明視野画像における細胞チップのウェル形状を、システムにあらかじめパターン認識させている。検出時には、自動ステージで細胞チップを移動させるたびに明視野画像を撮影、各明視野画像におけるウェル位置を自動認識させる。蛍光画像は明視野画像と同一の位置で撮影するため、ウェル領域以外をマスクすることにより、ウェル内のみ蛍光検出を実現している。最終的にはマラリアと判定された全輝点数、検出した全赤血球数、マラリア原虫感染率をCSVファイルに出力す

る。

B-2-2. 最適カットフィルタの選定

- ・ 635nm半導体レーザーに対するカットフィルタ選定

635nm半導体レーザーで励起が可能なSYTO Red系蛍光色素の一例として、SYTO59スペクトル特性を図7に示す。

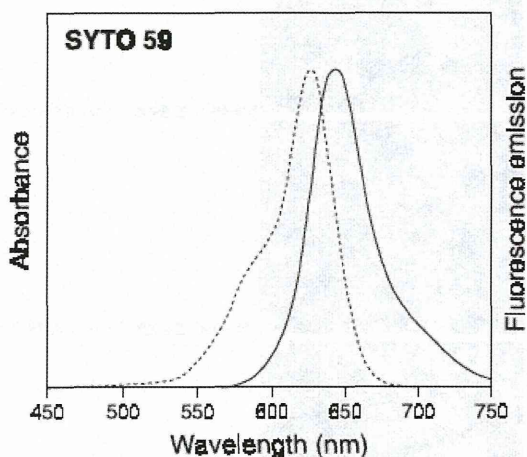


図7. SYTO Red系蛍光色素SYTO59スペクトル特性

図7よりSYTO59は、622nmの光源を用いることで最も効率よくマラリア原虫を励起でき、その際645nmの蛍光を最も強く放出する。ただし蛍光強度は励起光強度の1/100,000程度と非常に弱く、蛍光を検出するためには励起波長の光を遮断するための蛍光フィルタが必要であり、そのカットオフ波長選択が非常に重要である。上記を念頭におき励起・蛍光検出光学系の検討を行った。励起光源にはハロゲンランプ、LED等を用いることもできるが、直進性・安定性が高く比較的小型で単一波長であるレーザーを用いることとした。具体的には、

- ・ 励起波長635nm/蛍光フィルタカッ

トオフ波長660nmロングパスフィルタ
・ 励起波長635nm/蛍光フィルタカットオフ波長700nmロングパスフィルタを用いて検討を行った。検討結果を図8に示す。

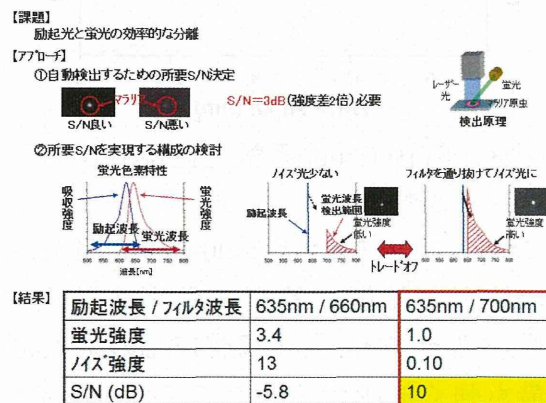


図8. 励起波長・蛍光フィルタカットオフ波長検討結果

図8より、蛍光強度とバックグラウンド強度のS/N比10dBを実現可能な励起波長635nm/蛍光フィルタカットオフ波長700nmロングパスフィルタ（オメガオプティカル製700ALP）の組み合わせを選定した。

- ・ 488nm半導体レーザーに対するカットフィルタ選定

488nm半導体レーザーで励起が可能なSYTO Red系蛍光色素の一例として、SYTO21スペクトル特性を図9に示す。

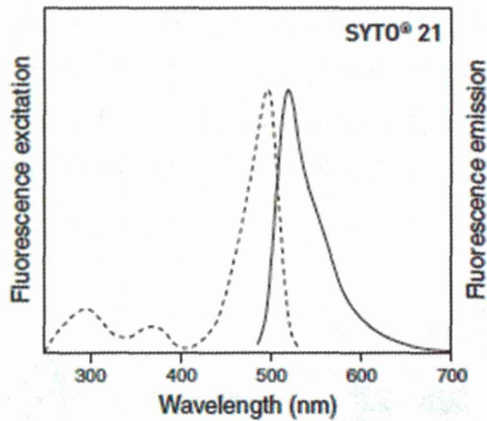


図9. SYTO Green系蛍光色素SYTO59スペクトル特性

図9よりSYTO21は、490nmの光源を用いることで最も効率よくマラリア原虫を励起でき、その際517nmの蛍光を最も強く放出する。ここで、488nm励起光学系に関しては、SYTO21波長帯（マラリア）以外の大気パーティクル等の自家蛍光を減らすためにバンドパスフィルタの採用を検討した。具体的には515～543nm透過品／528～562nm透過品／555～575nm透過品／575～595nm透過品／573～607nm透過品を用いて、細胞チップに展開したマラリアサンプル蛍光画像を撮影して比較した。各蛍光フィルタ使用時の蛍光画像比較を図10に、各蛍光フィルタ使用時のマラリア原虫とバックグラウンドとのS/N比較結果を表3に示す。

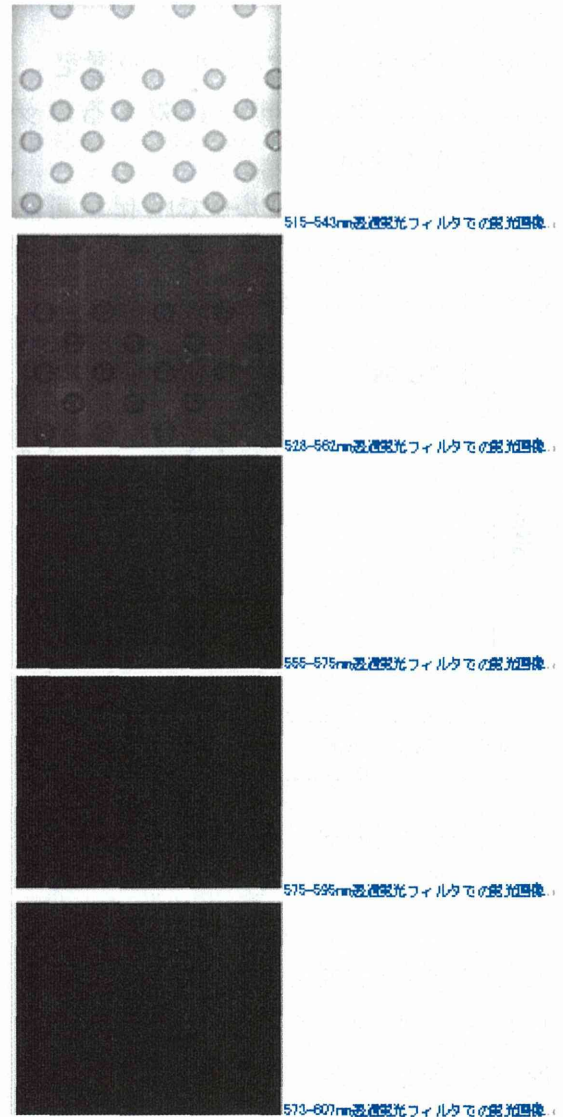


図10. 各蛍光フィルタ使用時の蛍光画像比較

表3. 各蛍光フィルタ使用時のS/N比較結果

	515-543nm透過品1.4μ	528-562nm透過品1.4μ	555-575nm透過品1.4μ	573-607nm透過品1.4μ
バックグラウンド強度	151	37	15	12
マラリア原虫強度	185 (S/N11.28)	106 (S/N12.86)	40 (S/N12.87)	29 (S/N12.42)
マラリア原虫強度	181 (S/N11.86)	148 (S/N12.89)	38 (S/N12.53)	26 (S/N11.63)
バックグラウンド強度	130 (S/N11.50)	32 (S/N12.21)	23 (S/N12.63)	21 (S/N12.19)
備考		S/N比較もよい	S/N比、バックグラウンドのレベルもよい	

図10、表3より555～575nm透過バンドパスフィルタを用いたときに細胞チップの自家蛍光が検出されず、S/N比を確保できたため、これを採用