

した。

B-2-3. フィールドテスト用マラリア診断システムの仕様

上記光学系を実装したフィールドテスト用マラリア診断システムの本体図面を図11に示す。

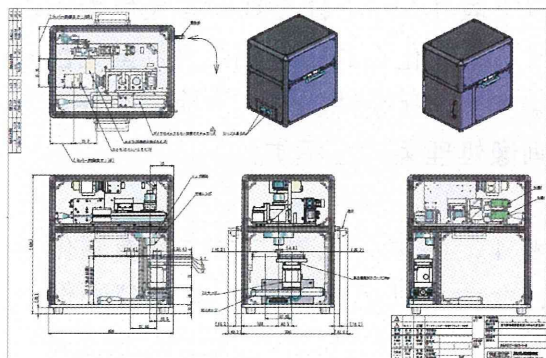


図11. フィールドテスト用診断システム本体図面

光学素子は以下を使用した。

- ・レーザー①

励起波長：488nm（日亜化学製レーザーダイオード NDS4216）

最大励起強度：16mW/mm²

- ・レーザー②

励起波長：635nm（Opnext製レーザーダイオードHL63133DG）

最大励起強度：13mW/mm²

- ・蛍光フィルタ①

OMEGA OPTICAL製 555～575nmバンドパスフィルタ 565WB20

- ・蛍光フィルタ②

OMEGA OPTICAL製 700nmロングパスフィルタ 700ALP

- ・ダイクロイックミラー①：Semrock製 Di03-25×36

- ・ダイクロイックミラー②：Semrock製 Di01-635-25×36

- ・カメラ：BASLER製400万画素CMOSカメラ acA2040-25am

- ・対物レンズ：ミットヨ製 5X M Plan Apo

- ・明視野撮影用白色LEDリング：アームシステム製 LED-R72

その他構成部品として、以下を使用した。

- ・ダイクロイックミラー切り替え電動アクチュエータ：SUS製 XA-35H-100

- ・細胞チップ移動用電動XYステージ：SGSP20-85 (XY)

- ・細胞チップ移動用電動Zステージ：SGSP60-5ZF

B-2-4. 635nmレーザー励起と488nmレーザー励起の検出性能比較

- ・ウェル形状による自家蛍光の比較

635nmと488nm光学系は大部分を共用しているが、それぞれの波長でわずかに光路差が発生し、両波長で励起パターン（励起強度、カメラ検出視野内の均一性）を最適に調整することは困難で、バランスをとった調整が必要となる。実際にバランス調整済みの光学系で撮影した、635nm光源照射時のSYT059蛍光画像と488nm光源照射時のSYT021蛍光画像を図12に示す。



図 1.2. 635nm励起SYTO59染色と488nm励起SYTO21染色による蛍光画像

図 1.2 より、635nm励起SYTO59染色の蛍光画像では、赤血球を格納するためのウェルの淵がわずかに光る（ノイズ光の要因となる）ことと、カメラ検出視野内に励起光を均一照射するためのマイクロレンズアレイのパターンがうっすら見える（ノイズ光の要因となる）ことが分かる。これに対し、488nm励起SYTO21染色の蛍光画像ではこれらは検出されない。ノイズ光削減の観点からは、488nm励起光学系を使用することが好ましい。

・マラリア検出感度の観点

色素の最適化により、635nm励起の際に用いる色素はSYTO59、488nm励起の際に用いる色素はSYTO21と決定した。検討の詳細は、色素検討の業務項目にて記載を行う。

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処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。

・ギムザ染色済み血液サンプルに存在しているマラリア原虫のうち、何%

本システムで検出できたか

・ギムザ染色済み血液サンプルにおいてマラリアが存在しない位置で、どの程度の輝点ノイズが本システムで誤検出されたか

の2点を評価し、マラリア診断原理検証システム精度評価を行った。

以下表 4 に、それぞれの蛍光色素における最適化された検出条件（蛍光色素濃度、励起条件、カメラ検出条件）と画像処理条件を示す。

表 4. 各蛍光色素における最適化されたマラリア検出条件および画像処理条件

マラリア検出条件	SYTO59	SYTO21
蛍光色素濃度	1/50,000希釈	1/8,000希釈
励起光強度	13mW/mm ²	16mW/mm ²
CMOSカメラ露光時間	400mS	
CMOSカメラGain	100/512	

マラリア判定画像処理閾値	SYTO59	SYTO21
輝度	BG平均輝度(※)+9~255LSB	
面積	4~120pixel	
アスペクト比	1.0~3.5	1.0~2.8

※赤血球の存在しないウェル外部の平均輝度

・バックグラウンド平均輝度+4~255LSB かつ面積 200pixel~の領域内の輝点を除く

LSB: Least Significant Bit 量子化単位

産総研四国センターにおいて、マラリア原虫培養赤血球サンプルを用いて得られたマラリア検出性能を表 5 に示す。

表5. フィールドテスト用マラリア診断システムによるマラリア診断性能比較

	リング検出率	トロホゾイト・シズント検出率	ノイズ光発生頻度	備考
SYT021	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
SYT059	38.7%	87.8%	赤血球2,050個に1個	

リングとは、蛍光強度の最も弱い、誕生して間もないマラリア原虫を示す。その後原虫はやや大きく蛍光強度が中程度のトロホゾイトに成長する。最終的には最も大きく蛍光強度の強いシズントに成長する。しかしながら、熱帯熱マラリア感染者においては、末梢血赤血球に含まれるマラリア原虫の大部分がリングであるため、リング期の検出率が最も重視すべき値と考えられる。

SYT059では、リングの40%弱、トロホゾイト・シズントの90%弱を検出できることを確認した。しかしながら、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が残った

一方、SYT021ではリングの85%程度、トロホゾイト・シズントに関しては100%を検出可能であることが分かった。また、ノイズ光の発生頻度はSYT059と比較して半減した。

以上の結果より、フィールドテスト用マラリア診断システムにおいてはSYT021を蛍光色素として用いた488nmレーザー励起が適していることが分かった。

SYT021を蛍光色素として用いた

488nmレーザー励起による実際の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の一例を図13に示す。

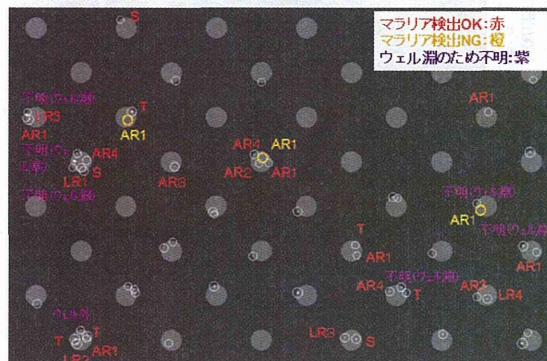


図13. 血液サンプル検出結果とギムザ染色済み血液サンプル顕微鏡観察結果との比較データ

以上の結果より、マラリア原虫検出率、ノイズ光の数においてマラリア診断原理検証システムに対して、検出性能を大きく改善することができた。

B-2-5. 488nm, SYT021によるマラリア感染率スパイク実験

産総研四国センターにおいて、マラリア原虫培養赤血球を用いてサンプルのマラリア原虫感染率を変化させた際の、実際の感染率とフィールドテスト用マラリア診断システムで診断した感染率の相関評価結果を図14に示す。

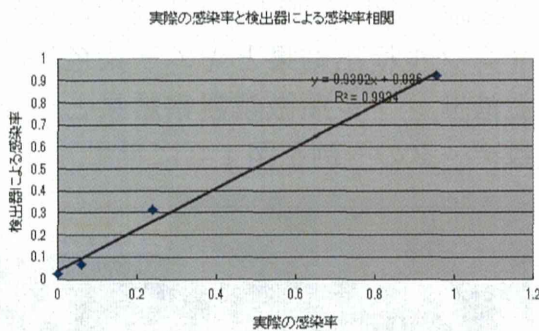


図14. 実際の感染率とフィールドテスト用マラリア診断システムで測定した感染率相関評価結果

図14より、実際の感染率とフィールドテスト用マラリア診断システムによる感染率の相関係数0.996以上を実現した。なお、実際の感染率に関しては薄層によるギムザ染色検体を顕微鏡下で観察し、赤血球100,000個に対するマラリアの個数により算出している。

C. 研究結果

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（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）を達成し

た。

D. 考察

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。この課題に関しては、内外有識者との協議を通じて、画像処理条件の改善や血液サンプル前処理等により検討を継続する必要がある。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。

E. 結論

上記の考察に対して、当初の計画の通り、さらなる小型化、高速化、高解像度化、あるいは多検体測定化が可能であると考えられるコンパクトディスク（CD）型蛍光測定装置の開発を前倒しで進める予定である。

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

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）

光ディスク型超高感度マラリア診断装置に関する研究

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

永富 謙司 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

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

マラリア感染症の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、光学情報を高速再生する技術として、光ディスク装置に着目した。従来の技術を応用することで小型化・高速化・高解像度化・多検体測定が可能であると考えられる。

我々は、新たに開発した光ディスク型プロトタイプ機を用いて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検証を実施し、その検出原理を実証した。また、装置の小型化に向け、その概略設計を完了した。

A. 研究目的

現在、我々がマラリア診断装置として開発を進めている「半導体レーザーと CMOS カメラを用いたマラリア検出装置」（以下、レーザー CMOS 装置と呼ぶ）では、フィルタ抽出後の赤血球（RBC）試料を DNA 蛍光試薬により染色し蛍光撮像する。これにより有核細胞であるマラリア原虫だけを検出することが出来る。そのためレーザー CMOS 装置はギムザ染色による顕微鏡検査を自動化しうる技術に位置づけ

られる。しかしながら検出プレート表面に設けられた複数ウェル内への RBC 固定化プロセスが煩雑であり、得られた蛍光画像内の輝点が原虫もしくはノイズであるかを同定するために別途、明視野画像を取得し比較処理を行う必要がある。また一画像でプレート全体を撮像することができないため、1枚のプレートを複数回に分けて画像取得する必要がある。そのため撮像ごとに検出プレートを移動させる高精度電動 XYZ ステージが必須であり、ス

キャン高速化や装置小型化には限界がある。すなわち、数百万個のRBCを検査する超高感度マラリア診断装置としては課題を有している。

そこで我々は、光学情報を高速再生する技術として光ディスク装置に着目した。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装置である。読取機構は、ディスク回転モータ、粗動モータ、および電磁コイル式アクチュエータから構成されており、小型ポータブル装置を含め広く普及している。なお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 μ m)より微細な構造を読み取り可能である。また取り扱う情報量としては、毎秒36MBと高速再生タイプが製品化されている。レーザーCMOS装置では1枚4MBの画像取得に0.4秒必要であることから、光ディスク装置は高速化への適用性が非常に容易なことが理解できる。

以上のことから、光ディスク上に試料を固定した状態で蛍光スキャンできれば、小型で高速なマラリア診断装置の実現が可能と考えられる。また装置の実現には既存の光ディスク技術を応用できるため、早期の実用化が期待できる。そこで我々は光ディスク技術を応用した蛍光検出装置の開発により、超高速マラリア診断装置の実現を目指す。

B. 研究方法

光ディスク型マラリア診断装置を実現するに当たり、以下の構成要素を開発する必要がある。

(a) 蛍光信号を検出可能な光ピックアップを開発する。特に、光ピックアップヘッドにおける従来の反射光検出機能に加え、蛍光信号検出機能を実現するために光学フィルタ素子の開発および高感度検出素子の採用を試みる。

(b) 蛍光染色試料を固定しうる光ディスクを開発する。具体的には、流路構造およびトラック溝構造を付与した生体試料検出用光ディスクを開発する。特に、集光スポット走査面であるトラック溝平面から試料が離れた場合、光学分解能が低下する。そのため試料固定面をトラック溝平面に近接させる構造を検証する。

(c) 光ディスク上の生体試料検出に適したディスクフォーマットを策定し、フォーマットを読み取り可能な光ディスクドライブ装置を開発する。フォーマットは従来の光ディスク規格ではなくなるため、開発する装置には新たなフォーマット検出回路が必要となる。

(d) 蛍光像内のマラリア原虫数とRBC数をカウントするための画像解析手法を開発する。蛍光像におけるマラリア原虫は輝点として検出されるが、RBCは核を持たないため蛍光輝点としては検出できない。しかしながら診断の高速化を達成するためには1回の蛍光像スキャンにより輝点数とRBC数を

同時取得することが求められる。そのため、原虫輝点とRBCの同時検出手法について、光学系およびディスク構造を含めて開発する。

以上がマラリア診断装置の実現に必要な構成要素であるが、以下に示すステップで装置実現の可能性を検証することとした。

- (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

これまでに(1) 蛍光検出原理検証および(2) 光ディスクを用いた蛍光スキャン検証を完了し、(3) 小型装置開発を進めている。以下に各ステップにおける検証方法を記す。

(1) 蛍光検出原理検証

光ディスク装置での蛍光検出機能を検証するため、市販の光学読み取りヘッド(光ピックアップ: OPU)に蛍光検出光学系を付与し、原理検証を行った(図1)。使用した市販 OPU は Blu-ray 読み取り機能を有しており、搭載されている波長 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。検出対象には生細胞である CHO (Chinese Hamster Ovary) 細胞を使用し、蛍光色素には生細胞を核染色しうる SYTO® Blue を使用した。ここで、OPU には励起光と蛍光を分離するためのカットオフ波長 435nm の蛍光分離プレートを試作、搭載した。また、蛍光検出素子には冷却機構が不要で

小型、かつ高感度であるアバランシェ・フォトダイオード (APD) を採用した。なお CHO 細胞を保持する光ディスク構造としては2枚のポリカーボネイト基板に PDMS (ポリジメチルシロキサン) シートを挟む構造とし、PDMS に施した直径 1mm のウェル部に染色 CHO 細胞希釈液を封入した。次に低速回転するディスクにフォーカスサーボ制御した状態で、手動ステージによりディスク半径位置を 10um 間隔で移動させながら APD 検出信号をマッピングした(図2)。なお 10um 間隔のスキャンとなるが、CHO 細胞のサイズは直径 10-20um 程度であるため、封入した CHO 細胞の多くが検出されることを想定した。

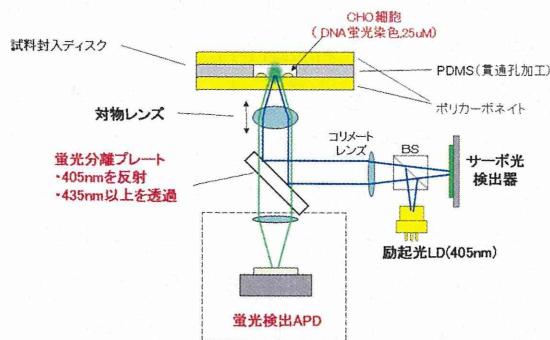


図1 原理検証実験系

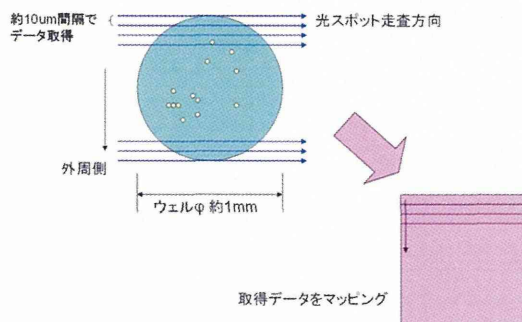


図2 蛍光スキャン条件

(2) 光ディスク蛍光スキャン検証
 蛍光スキャン検証を進めるに当たり、2 μm 程度のマラリア原虫を検出する実験系を構築した。具体的には、光ディスク基板の上に1 μm ピッチの螺旋状のトラック溝を付与すると共に、回転ディスクのトラック溝に励起光を追従するトラッキング制御機能を行うサーボ制御機能を開発した。

試作したディスク構造を図4に示す。光入射面である最下層のディスク基板には、図中上方に1 μm 間隔でスキャンしうるトラック溝を施してある。またトラック溝には放射状のスリットを加えており、これを走査横断する際に生じる反射光パルスを蛍光検出トリガ信号として使用する。なお流路層には、3本の流路構造を打ち抜いたPDMSシートを使用した。このPDMSをディスク基板に貼り付けることで試料をトラック溝表面に近接させることができ、光スポット径1 μm と同等の蛍光像の解像度を確保した。封止層には、流路への注入および脱気作業を容易とするために貫通孔加工を施したポリカーボネイト基板を使用した。

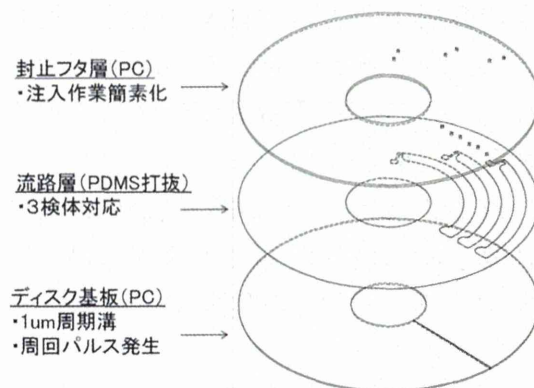


図4 試作ディスク構造

次に、試作装置の外観および内部構成を図5に示す。OPUには光スポット直径が1 μm となる集光対物レンズを搭載し、マラリア原虫サイズ以下とした。装置上段には蛍光検出機能を付与したOPU、光ディスク回転機構および微調整ステージを搭載した。装置下段にはフォーカス制御とトラッキング制御を行うための回路を配置した。APD素子にて検出された蛍光信号はAD変換ボードによりデジタル化され、USBを通じてPCに転送しマッピング処理により画像化される。



図5 試作した光ディスク蛍光スキャン装置(左図) 試作スキャン装置(右図) 装置内部構成

(3) 小型装置開発

これまでに開発した光ディスク蛍

光スキャン装置は、スキャン条件を検証するための微調整ステージや多機能制御回路を搭載しており大型であった。今後マラリア感染地域でのフィールドテストを進めるにあたり、装置の小型化が必須となる。現在開発中の小型装置概略構成を図7に示す。スキャン装置はノート PC の外付けドライブを想定し、A4 サイズ以下、重さ 5kg 以下と持ち運び容易なサイズに収める。OPU にはスリムタイプと呼ばれる薄型品を採用し、摺動メカとの一体化を行うこととした。また専用のサーボ制御基板回路を開発し、装置の小型化とともに消費電力の低減を目指す。電力供給は非電化地域を想定し、バッテリーもしくは PC からの USB 給電を検討している。さらに光ディスク構造としては、多検体を同時にスキャンしうる構造とし、必要なフォーマット構造を策定する。なお、得られた画像からマラリア原虫を検出する画像解析ソフトを、併行して開発する予定である。

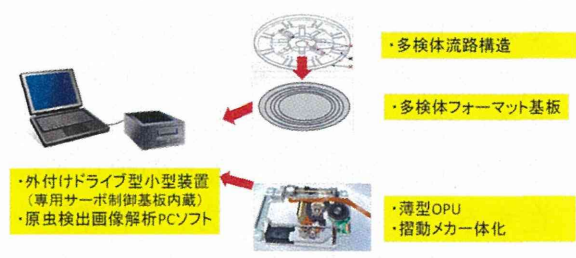


図7 小型装置概略設計案

(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。

C. 研究結果

(1) 蛍光検出原理検証

上述条件にて測定を行った結果を図3に示す。左図が測定対象ウェルの明視野像であり、PDMS 孔内に封入された CHO 細胞が分散し一部が集塊している様子が確認できる。右図は APD 信号をマッピングした像であり、青色から黄色、赤色へと検出信号強度が高いことを示す。マッピング像における信号強度分布が、明視野像での CHO 細胞分布を再現していることが伺える。なお別途、蛍光染色を施さない CHO 細胞を用いて同様の実験を行ったところ APD 信号のマッピング像に起伏が得られなかった。このことから市販 OPU に蛍光分離プレートと APD 素子を付与した実験系により生体細胞の蛍光信号を検出可能と確認した。

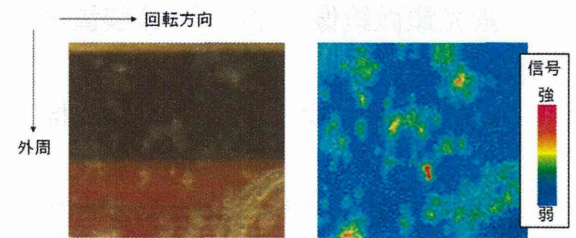


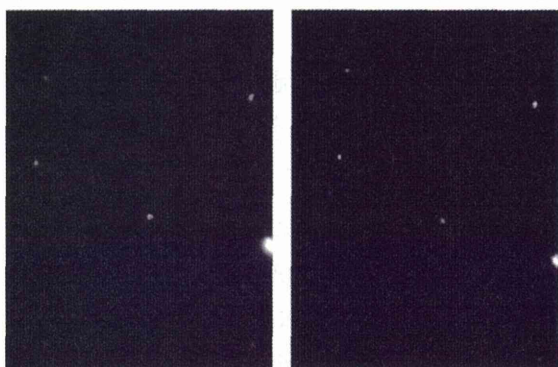
図3 CHO 細胞を用いた蛍光信号検出実験

結果 (左図) 封入 CHO 細胞の明視野像 (右図) APD 検出信号のマッピング像

(2) 光ディスク蛍光スキャン検証

試作装置の蛍光検出性能を確認するため、マラリア原虫の培養血液を用いた蛍光スキャン実験を実施した (於：産業総合研究所 健康工学部門)。

染色条件は上述したCHO細胞実験と同一である。測定箇所を蛍光顕微鏡で観測し、スキャン画像と比較した(図6)。左図の蛍光顕微鏡像において、大きさと輝度の異なる輝点が複数確認できる。試作装置にてスキャン取得した蛍光画像においては、これら全ての輝点がより高輝度に確認できることを確認した。この結果から、蛍光検出機能を付与した光ディスク装置により、蛍光染色したマラリア原虫培養血を検出可能と判断した。



(a) 蛍光顕微鏡像 (b) 装置検出像

図6 培養マラリア原虫の検出像

以上、高速マラリア診断を目的とし、光ディスク装置を用いたマラリア原虫検出実証を行った。この中で、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、微弱光検出素子であるAPDを搭載したOPUを試作した。その結果、光ディスク上に封止した蛍光染色CHO細胞の蛍光像を取得することに成功した。

また、マラリア原虫培養血を用いて

蛍光検出実験を行った。その際、2 μ mサイズのマラリア原虫を検出可能とするため、光スポット直径を1 μ mとし1 μ m間隔でスキャン可能なトラック溝を付与した光ディスク基板を開発した。併せて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と比較した結果、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。現在、フィールドテスト実施に向けて装置小型化を進めている。

D. 考察

「半導体レーザーとCMOSカメラを用いたマラリア検出装置」での課題は、①検出ノイズ低減、②小型化、③高速化、④高解像度化、⑤多検体測定化が挙げられる。②、③、⑤に関しては、上述の通りコンパクトディスク型検出装置による実現が可能であると考えられる。ただし、①、④に関しては検討が必要な内容となる。

①検出ノイズ低減に関しては、蛍光の輝点が赤血球の中に存在するのか、それとも赤血球の中に存在するのか、を見分けることが重要なポイントである。マラリア原虫は赤血球内に存在するため、赤血球中に蛍光の輝点が存在することとなる。一方、「半導体レーザーとCMOSカメラを用いたマラリア検出装置」においてノイズ要因となっていた樹脂ゴミや赤血球以外の血液成分によるノイズは、赤血球の外に存在している。このことから、蛍光輝点と赤血球との位置関係によりノイ

ズ判別が可能と考えられる。なお波長405nmのレーザーを用いた場合、赤血球中のヘモグロビンが光を吸収することにより、他の箇所よりも暗く画像上で表示されることが確認できている。つまり、波長405nmの光源を用いる本装置では、画像処理により赤血球位置を認識することが可能であると考えられるため、開発のポイントとして取り組んでいく。

また、④高解像度化に関しては、現状光スポット直径1umを1um間隔でスキャンしているが、スポット径調整や狭ピッチスキャンを実施することによって高解像度化が可能である。

なお、「半導体レーザーとCMOSカメラを用いたマラリア検出装置」から励起波長を変更しているため、405nmの青紫色レーザーダイオードに最適な蛍光色素および蛍光染色プロトコルの最適化が必要であり、この点に関しても引き続き取り組んでいく。

E. 結論

今後、海外フィールドテストに適した小型装置、複数検体対応のフォーマットディスク、蛍光像からマラリア原虫およびRBCを検出する手法（検出ノイズ低減）、高解像度スキャン方法の開発を行っていく。また併せて、バッテリー駆動化（駆動回路最適化による消費電力の低減やバッテリー機構の最適化）や自動制御/測定化（検出装置制御ソフトおよびマラリア原虫検出画像解析ソフトの開発）に関しても取り組んでいく。

上記取り組みにより、現地サンプルを用いたマラリア検出性能の検証および診断技術開発を実施する。

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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

（1）公開特許

- ・試料保持担体およびそれを用いた蛍光検出装置， W02013/161543（2013/10/3 公開）
- ・蛍光検出装置， W02013/146365（2013/10/03 公開）
- ・試料保持担体およびそれを用いた蛍光検出システム、蛍光検出装置， W02013/146364（2013/10/03 公開）

（2）出願特許

- ・試料検出プレート、およびこれを用いた蛍光検出装置， PCT/JP15/000416（2015/01/30 出願）
- ・検出プレート， PCT/JP14/004224（2014/08/19 出願）
- ・蛍光検出装置， PCT/JP13/00638（2013/10/29 出願）
- ・試料保持担体およびそれを用いた蛍光検出装置， PCT/JP13/006387（2013/10/29 出願）

（3）出願予定特許

- ・蛍光検出装置（2015/3 出願予定）

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

細胞チップの長期保存に関わる技術開発に関する研究

業務担当責任者 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：我々は約2万個の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用いることで、各マイクロチャンバー底に赤血球を100個ずつ定量的に単層配列させて、一枚の細胞チップで赤血球200万個を観察する技術を開発している。この細胞チップ技術を基盤として、赤血球に寄生するマラリア原虫の核を標的とすることで既存診断法と比較して超高感度な新規なマラリア診断法の構築を進めている。細胞チップ上に形成したマイクロチャンバー底に、赤血球を定量的かつ単層に配列するには、マイクロチャンバー形状に加えマイクロチャンバー底への細胞接着のためにチャンバー表面の親水性付与が必要になる。臨床診断への応用を見据えて、細胞チップ表面の親水性を長期保持させ、赤血球を定量的に単層配列させるために希酢酸溶液中でのチップの保存法を構築した。

A. 研究目的

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を可能にするため、ポリスチレン製マイクロチップ基板上に、微細加工技術を用いて直径105 μm 、深さ50 μm のマイクロチャンバーを20,944個作製した細胞チップを基盤技術として、マラリア診断へ応用した（図1, PloS One e13179, 2010）。赤血球画分を核染色液SYTO59で懸濁後、ピペットマンで細胞チップ表面に展開し10分間静置することでマイクロチャンバー内外に赤血球を重層させる。その後、ピペットマンを用いて細胞チップ表面をマラリア原虫培養液RPMI 1640で洗浄

すると余剰な赤血球は洗い流され、マイクロチャンバー底にのみ赤血球は単層配列される。各マイクロチャンバーには赤血球は 130 ± 5 個ずつ定量的に配列され、200万個以上の赤血球を一枚の細胞チップで観察することが可能になる。市販DNAマイクロアレイスキャナーによる5分間の蛍光検出により、核が蛍光染色されたマラリア感染赤血球を検出感度0.0001%以上の超高感度検出が可能になった（図2）。

しかしながら、赤血球のマイクロチャンバー内での単層配列にはチャンバー形状と細胞チップ表面の酸素プラズマ処理による親水性付与が不可

欠になる。細胞チップ表面の高親水性は通常では2週間程度しか保持されず、長期間保存により親水性の喪失に伴

う細胞剥離を引き起こしてしまう。そこで、マラリア流行域での使用を踏ま

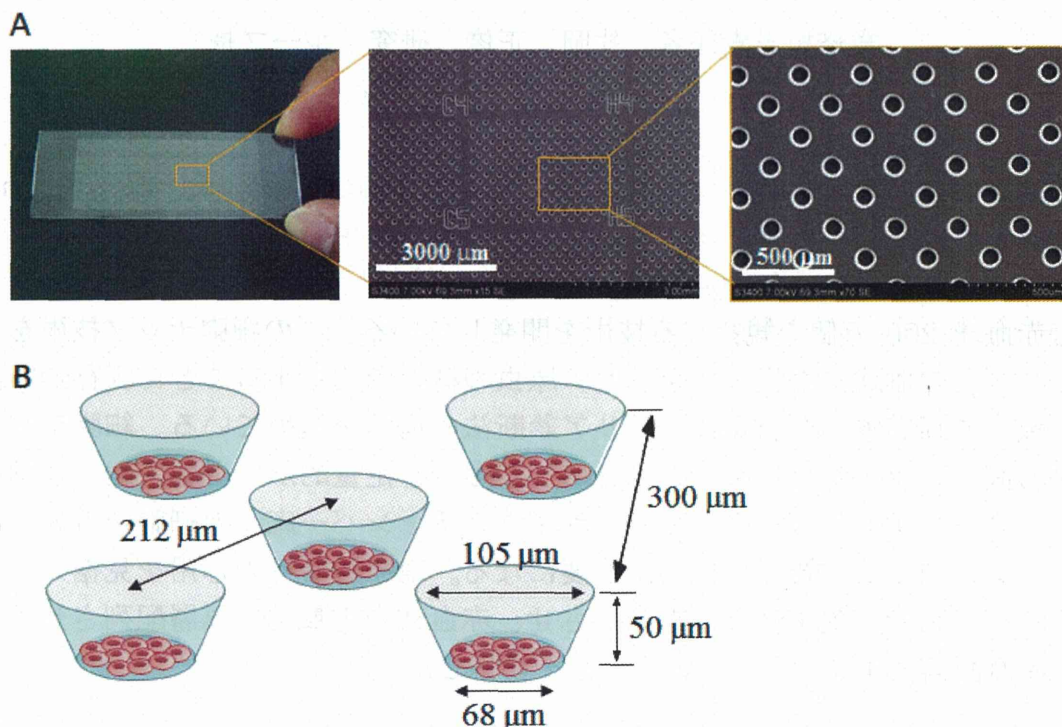


図1. ポリスチレン製マイクロチップ基板(A)。直径105 μm、深さ50 μmのマイクロチャンバー20,944個をアレイ状に配列(B)。

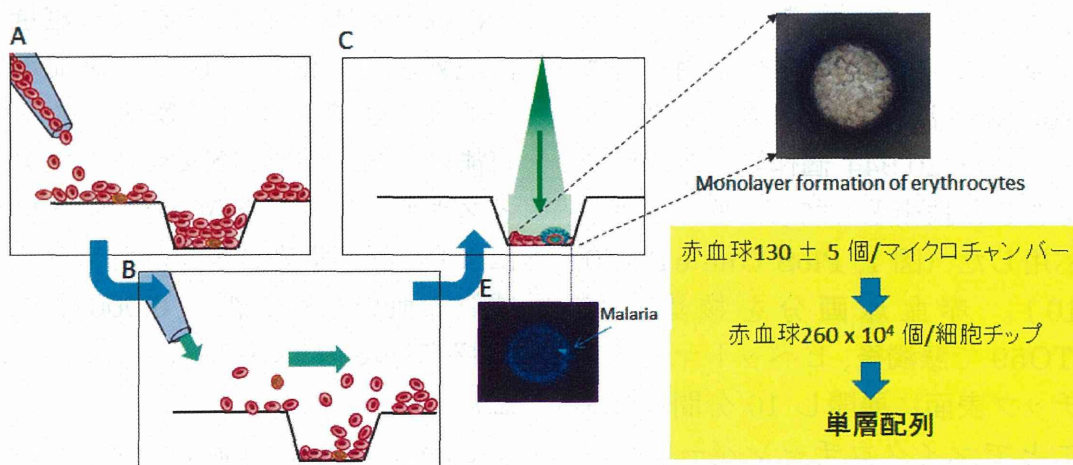


図2. 細胞チップでのマラリア感染赤血球検出。蛍光核染色液SYTO59と赤血球懸濁液を細胞チップ表面へ展開10分(A)。マラリア用培地RPMI 1640で細胞チップ表面の洗浄(B)。市販DNAマイクロアレイスキャナーを用いた5分間のスキャン(C)。マイクロチャンバー底で単層配列された赤血球(D)と蛍光染色されたマラリア感赤血球(E)。各マイクロチャンバーには定量的に130個ずつ赤血球は単層配列され、一枚の細胞チップで約260万個の赤血球が観察される。

え、フィールドでの長期保存を目的として、少なくとも3ヶ月以上は安定してマイクロチャンバー内に安定して赤血球の定量的な単層配列を可能にする細胞チップの保存法を開発した。

B. 研究方法

酸素プラズマによる細胞チップ表面処理により、マイクロチャンバー底表面を含め細胞チップ表面全体に親水性を付与している。この親水性は通常では2週間程度しか保持されずこれ以降ではマイクロチャンバー底で細胞の付着は期待できない。アフリカなどマラリア流行地域での使用を考えた場合、数ヶ月単位での室温保存が必要とされることから、簡単かつ低コストな細胞チップ表面の親水性長期保存法を検討した。

酸素プラズマ処理により高分子の分子結合の切断と酸化を介して、カルボキシル基など官能基が導入されるが、このカルボキシル基が細胞チップ表面に親水性を付与すると考えられる。しかしながら、このカルボキシル基は時間経過とともに減少するが、これは分子鎖運動により細胞チップ表面に局在できなくなるため、表面親水性さらに細胞接着能を喪失するものと考えられる。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、酢酸、硫酸、リン酸等があげられるが、将来フィールド使用を考えて輸出規制の可能性が低い酢酸を用いて細胞チップの表面

処理後酢酸溶液中での保存を行った。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(図3)。

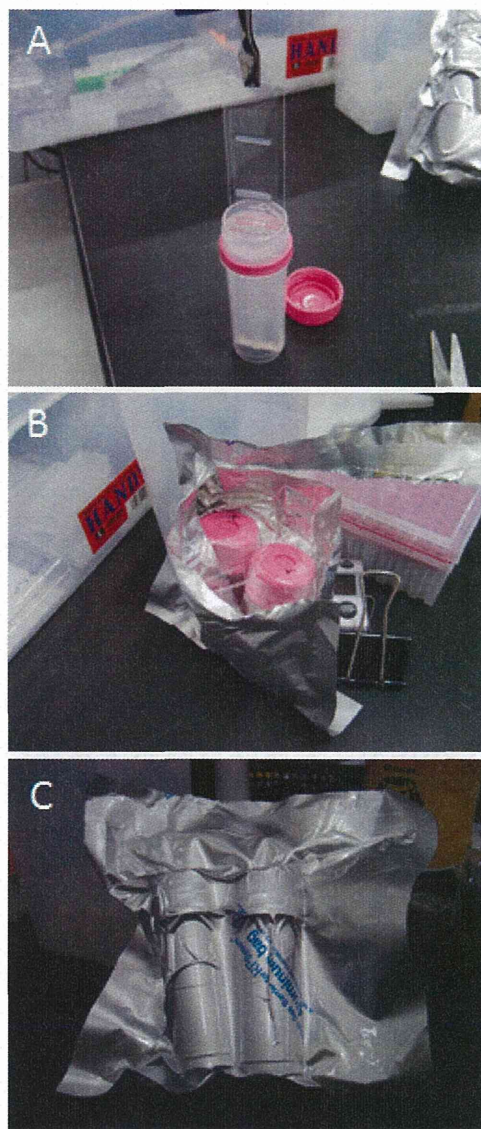


図3. 細胞チップの保存。細胞チップの希酢酸溶液への浸染(A)。アルミパックシーラー中に保存(B)。脱気後室温保存(C)。

(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

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ヶ月においても、細胞チップ表面の親水性は保持された。さらに各マイクロチャンバー底に付着して定量的に単層配列される赤血球数を検討した。表面処理直後に50個をランダムに選択して光学顕微鏡にて単層配列された赤血球数は、 100 ± 5 個であるが、水に対する接触角同様7ヵ月後にも有意な変化は認められず 99 ± 3 個となった。

D. 考察

細胞チップ表面の酸素プラズマ処理後、酢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。結果的に、少なくとも細胞チップ表面処理後7ヶ月は200万個の赤血球観察が細胞チップで可能となり、赤血球200万個に1個のマラリア感染の検出が期待され、既存のマラリア診

断のゴールドスタンダードされる赤血球のギムザ染色による光学顕微鏡観察やイムノクロマト法に比べ2桁以上、さらにはPCR法と同等以上に超高感度なマラリア検出が期待される。

今回、細胞チップの親水性保持には酢酸溶液を選択した。結果は示していないが、処理に用いた酸として硫酸、リン酸やクエン酸があり、これら酢酸以外の酸を用いても、同様に細胞チップの親水性は長期間保持された。マラリア流行域がアフリカや東南アジアを中心としていることを考慮すると、将来的に診断装置として利用する場合は保存液にも輸出を対照とする化学物質としての規制がかかる可能性が高い。硫酸は麻薬原料として、リン酸は誘導体が兵器原料、さらにクエン酸が食品添加物としての規制がある。今回、親水性保持に用いた各酸性溶液の濃度は0.01~1%で、実際には規制対象外となり事前の届出や報告の義務は生じない。しかしながら、年間患者数数億人のマラリア診断を考えた場合では、大量の輸出が予想され関連省庁等への相談が必要と推察される。そこで、これらの規制が存在しない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しており、アフリカを中心とするフィールド使用に十二分に対応していると考えている。

E. 結論

従来の酸素プラズマによる細胞チ

チップ表面処理では、室温保存において2週間程度しか表面親水性は保持されない。我々が開発した酢酸溶液中での細胞チップ保存法では、少なくとも7ヶ月は細胞チップ表面の親水性は保持されており、マイクロチャンバー中に定量的に赤血球を単層配列させることが可能になる。将来、アフリカ等のマラリア流行域への細胞チップ輸出を考慮した場合、酢酸は輸出規制がかからず低コストであり診断デバイス保存法として極めて効果的と判断される。

F. 健康危険情報

該当せず

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）

マラリア原虫定量診断装置の開発に関する疫学的研究

業務担当責任者 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。本年度の分担研究として、①円滑なフィールドテストへ向けたシサンプリングシステムの合理化を目的とした、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、②最終機への搭載が予定されている薬剤耐性診断機能を見据えた遺伝子マーカーを開発するためのアルテミシニン耐性関連遺伝子 **K13-propeller** のベースライン多型を、全流行地を網羅する 581 例を用いて解析した。①に関しては、最適な DNA 抽出条件の設定により、200 万個の赤血球中に 1 個の感染率であっても RDT から原虫 DNA を抽出しうることが示された。本手法を用いることにより、診断装置のフィールドテストが大幅に合理化される可能性がある。また、②に関しては、アルテミシニン開始以前の検体では、25 個の SNPs を認めたが、変異率は 2% と低かった。耐性との関連が示唆されている SNP は見られなかった。今後、アルテミシニン開始後の検体における変異を解析し、耐性診断分子マーカーとして、本診断機器で用いる SNP を同定する予定である。

A. 研究目的

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、円滑なフィールドテストへ向けたシステムの効率化、とりわけサンプリングシステムの

合理化は円滑なフィールドテストにとって最も重要である。本研究課題では、マラリア迅速診断キットからの原虫 DNA 抽出の試み、をおこなった。

さらに、最終機への搭載が予定されている薬剤耐性診断機能を見据えた遺伝子マーカーを開発するため、②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い、その有用性を検討した。

B. 研究方法

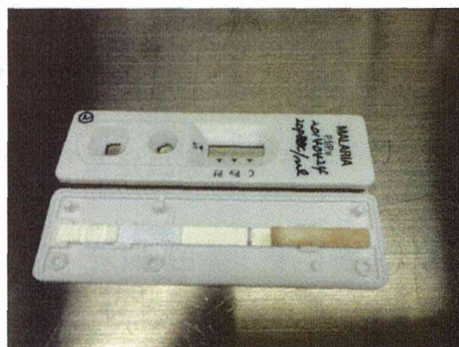
1. マラリア迅速診断キットからの原虫 DNA 抽出の試み

1) 材料として、マラリア (FCR3) 感染血液を各々調整 (2 原虫/ul, 20 原虫/ul, 200 原虫/ul, 2000 原虫/ul, 10000 原虫/ul) し、5ul を RDT kit に添加し、プロトコールに従い結果判定後、プラスチックバッグに乾燥材と共に入れ室温保存したものを材料として用いた。

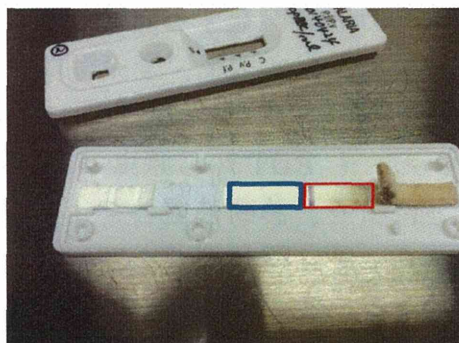
2) マラリア迅速診断キットは SD BIOLINE Malaria Ag P.f/Pan を用いた (Cat. No. : 05FK60)。本キットは、熱帯熱マラリア原虫の HRP-II 抗原およびヒトマラリア (熱帯熱、三日熱、四日熱、卵形) 原虫全てに共通する pLDH 抗原に対する抗原抗体反応で原虫の有無を診断する。

3) 以下に示すように、キットのニトロセルロース膜に保存されている血液を用いて、原虫の DNA 抽出を試みた。

① RDT kit を開封するには、スパークテル (平たい方) を使用した。接合部にスパークテルを差し込み、上下にひねるようにすれば、こじ開けることができる。スパークテルは RDT ごとに火炎で処理したものを使用した。



②青枠で囲まれた (近位 proximal : 血液、バッファー添加部位側) および赤枠で囲まれた (遠位 distal : 血液吸収部位側) 部位のニトロセルロース膜をそれぞれ切り出した。



③ 1.5ml チューブに細切したニトロセルロース膜を入れ、以下 2 に記載する Chelex-100™(BIORAD 社)を用いたマラリア原虫 DNA 抽出法を用いて原虫 DNA の抽出を試みた。

4) ニトロセルロース膜の入った 1.5ml チューブに 0.5%の saponin-PBS (関東化学, 鹿 1 級 ; PBS タブレット: Takara 社)を 500ul 入れて Vortex、常温で 30 分間インキュベートした。10000rpm 4°Cで 5 分間遠心分離して、上清を丁寧に除去、PBS を 1000ul 入れ

て転倒混合した。更に 10000rpm 4°Cで 5 分間遠心分離して、上清を除去した。そして再び PBS を 1000ul 入れて転倒混合、10000rpm 4°Cで 5 分間遠心分離して、上清を除去した。滅菌水 110ul と 20ul Chelex-100 懸濁液を入れ、Vortex, spin down, 100°Cで 10 分間インキュベートした。最後は 4°Cでサンプルを冷やして、上清を丁寧に 0.2ml Eppendorf tube に移した。その上清に 1ul を取り、Nested PCR のテンプレートとして使った。

5) PCR による原虫 DNA の確認

以下に示す原虫遺伝子を nested PCR にて増幅し、原虫 DNA の有無を確認した。

SsrRNA

Pfprt K76T

mt DNA (CoxI)

beta-tubulin

6) フィールドサンプルを用いた検討
以上の結果について、フィールドから得られた 120 検体の RDT を用いて、原虫 DNA の抽出を試みた。フィールドサンプルを用いておこなった検討では、フィールドでの長期間保存が与える影響、RDT のバンドの強さが抽出に与える影響に重点を置いて検討をおこなった。

7) 血液ギムザ染色後のスライドからの原虫 DNA 抽出

フィールドテストにおいて、特別な手続きを行わずに得られる検体とし

ては、使用済 RDT の他に血液ギムザ染色スライドがある。このギムザ染色スライドから原虫 DNA を抽出できれば、より円滑なフィールドテストが可能となる。そこで、使用済ギムザ染色スライドを用いた Chelex 法により原虫の DNA 抽出を試みた。

検体としては培養原虫によるスライド、ウガンダの調査で得られたスライドを用いた。実スライドは原虫陽性率に応じて選択した。

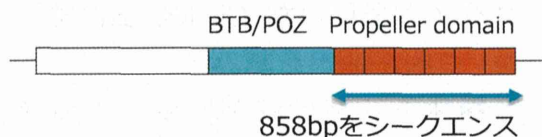
2. アルテミシニン耐性関連遺伝子 K13-propeller の変異解析

平成 26 年 1 月に発見された 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く、今後、我々が開発している診断装置のアルテミシニン耐性診断遺伝子マーカーとして導入しうる可能性がある。そのためには、まず流行地におけるベースライン変異を明らかにする必要がある。

本年度は、ART 耐性原虫報告以前に採取した熱帯熱マalaria原虫検体を用いて K13 プロペラ遺伝子のベースライン多型を検討した。検体はアジア、アフリカ、メラネシア、南米の全流行地を網羅する 13 カ国から得られている。

K13 プロペラ遺伝子は下図に示すように 6 つのプロペラドメインを内包する。これまでアルテミシニン耐性と関連した部位はこのプロペラドメイ

ンに集中していることが報告されている。本検討では、プロペラドメインを含む 858bp を nested PCR により増幅し、ABI3130 により直接シーケンスにより決定した。



C. 研究結果

1. マラリア迅速診断キットからの原虫 DNA 抽出の試み

培養原虫を用いた基礎実験

RDT のニトロセルロース膜は、全て、遠位、近位の 3 つに分けて検討した。それぞれから得られた DNA 抽出液を用いて PCR を行った。結果は表 1 に示す。

表に示すように、すべてのニトロセルロース膜を用いた検討において、最も低原虫感染率の検体を増幅しうることが明らかになった。培養原虫を用いた系では、1 マイクロリットルあたりわずか 2 個の原虫感染でも mitochondriaDNA を用いた PCR では増幅が可能であった。*Pfprt* 遺伝子はクロロキン耐性に関連し、原虫の第 7 染色体にシングルコピーで存在する。本遺伝子の増幅もニトロセルロース膜を用いれば、1 マイクロリットルあたり 20 個の原虫感染で可能となる。

フィールドサンプルを用いた検討
今回使用した 120 検体はいずれも

ミャンマーから得られたものである。採取時期は、実験の 1 年 4 ヶ月前のものから 2 ヶ月前と幅広い。また、RDT の原虫陽性を示すバンドの強さも 3 段階に分類して検討した。原虫 DNA の有無は、第 13 番染色体に存在する MAL13 という SNP サイトを nested PCR にて増幅し、2% のアガロースゲル電気泳動にて確認した。

検査後 3 ヶ月以内に原虫 DNA の抽出がおこなわれた 60 例の結果を表 2 に示す。RDT の原虫陽性を示すバンドがはっきり見える症例 (strong) では 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 の質は低下していた。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 (表 3)。

血液ギムザ染色後のスライドからの原虫 DNA 抽出

原虫感染率 0.05%、0.1%、0.5%、1% の臨床検体を用いて、厚層標本スライド (標本サイズ、約 1cm) から原虫 DNA 抽出を試みた。

スライドからの標本の剥離は数日から古いスライドでは 1 週間程度かかったが、全ての検体において、原虫 DNA を抽出、PCR で増幅を確かめることができた (図 1)。

2. アルテミシニン耐性関連遺伝子 K13-propeller の変異解析