

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K07532

研究課題名（和文）マラリア排除のための全自動診断装置の高機能化

研究課題名（英文）Advanced functionality of fully automatic diagnostic equipment for malaria elimination

研究代表者

橋本 宗明（Muneaki, Hashimoto）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・生命工学領域・主任研究員

研究者番号：30407308

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：マラリア排除のために、流行地で使用可能な超高感度な診断デバイスの開発が望まれている。申請者らは、流行地で簡単、迅速、高感度かつ定量的に診断可能なMalaria Cell Disc system (MCD)を開発した。MCDは専用カセットとイメージリーダーからなる。カセット検出部に数百万個の赤血球を単層配列させ、イメージリーダーによる原虫検出、感染率を自動算出する。本研究では、MCDの高機能化をおこない、検出感度はそのままに、原虫種の同定や安定した検出が可能であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は申請者らが独自開発したマラリア診断デバイス（MCD）をさらに改良・発展させ、マラリアの撲滅を考えると極めて重要な原虫種の同定（三日熱マラリアと熱帯熱マラリアの鑑別診断）および薬剤耐性試験を超高感度かつ流行地でも安定に診断できるデバイスの作製を目的とした。本デバイスは流行地での使用を強く意識して作製したものであり、ポータブルかつ易操作、完全自動化で、技師によって結果にばらつきがないため、次世代のゴールドスタンダードになると期待している。

研究成果の概要（英文）：For the elimination of malaria, the development of ultra-sensitive diagnostic devices that can be used in endemic areas is desired. Applicants have developed a Malaria Cell Disc system (MCD) that enables easy, rapid, sensitive and quantitative diagnosis in endemic areas. The MCD consists of a dedicated cassette and an image reader. Several million red blood cells are arranged in a single layer in the cassette detection unit, and the image reader detects the protozoa and automatically calculates the infection rate. In this study, it was suggested that it is possible to identify and stably detect protozoan species by improving the functionality of MCD while maintaining the detection sensitivity.

研究分野：熱帯医学

キーワード：マラリア 検査

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

世界三大感染症の一つであるマラリアの診断は血液ギムザ染色標本の顕微鏡観察がゴールドスタンダードとして 100 年以上おこなわれ続けている。本方法は標本作製および原虫の赤血球に対する感染率(パラシテミア)の算出には熟練が必要であること、顕微鏡下での赤血球および原虫数のカウントには労力および時間がかかる(30分~1時間)。さらに、マラリアの排除(elimination)のためには、顕微鏡観察の検出限界以下の原虫が感染している人々が原虫のドナーになっているため、これらの原虫駆除による伝播阻止が重要である。したがって、無症状感染者にも応用可能な超高感度なマラリア診断デバイス開発が求められている。

申請者らは、ブルーレイディスクの光学系を応用した全自動マラリア診断装置(MCD: Malaria Cell Disc system)の開発を行った。MCDはCD型の使い捨てカセットとCDプレーヤー型のイメージリーダーからなる。まず、カセット中心部の注入口に血液をアプライし、イメージリーダーにセットする。カセットの注入口と検出部の間には白血球除去フィルターが配置されている。イメージリーダーにより、CDプレーヤーの如くカセットを遠心し、遠心力により、血液からフィルターによる白血球除去および赤血球の検出部での単層配列が可能である。検出部には蛍光核染色色素が凍結乾燥されており、赤血球内のマラリア原虫が染色される。イメージリーダーにより、赤血球および染色されたマラリア原虫が検出され、独自開発した専用ソフトウェアを用いることで、パラシテミアが自動算出される。

検出部には数百万個の赤血球が単層配列し、感染赤血球の検出し、その感度はPCR法とほぼ同等である。MCDは専門家を必要とせず、簡便に白血球除去からパラシテミアの算出まで全自動で可能である。またイメージリーダーはポータブルであり、一度に9サンプルまで同時に解析が可能であり、短時間での診断が可能である。

これまでは主に熱帯熱マラリアに特化した診断装置の開発におこなってきた。一方、最適な治療法選択およびマラリア排除には、原虫種の同定および薬剤耐性の解析が必須である。そこで、本研究では、これらが可能なMCDを作製し(高機能化)、マラリア排除に貢献できる診断デバイスの開発を目指した。

2. 研究の目的

本研究は申請者らが独自開発したマラリア診断デバイス(MCD)をさらに発展させ、原虫種の同定および薬剤耐性試験を超高感度かつ流行地でも安定に診断できるデバイスの作製を目的とした。現在のMCDは熱帯熱マラリアの診断に特化したものであるが、フィールドテストの結果、無症状感染者に対しても、高い正確性をもって診断できることを示した。さらなる改良により、マラリアの排除にも使用可能な、最適な診断、および詳細な解析が可能になる。本デバイスは流行地での使用を強く意識して作製したものであり、ポータブルかつ易操作、完全自動化で、技師によって結果にばらつきがないため、次世代のゴールドスタンダードになると期待している。

3. 研究の方法

本研究はMCDの高機能化を目的として、下記の実験をおこなう。

- (1) MCDを用いたFISH法による原虫種の同定法の開発
- (2) 蛍光核染色によるMCDでの熱帯熱マラリア原虫(Pf)と三日熱マラリア原虫(Pv)の鑑別法の開発
- (3) MCDを用いた薬剤耐性試験法の開発
- (4) MCD用ポジティブコントロールピースの開発

4. 研究成果

- (1) FISH法を応用したMCDによる種の同定法の開発

FISH (fluorescent *in situ* hybridization) 法とは、蛍光標識したオリゴヌクレオチドプローブを用い、標的遺伝子と細胞内でハイブリダイゼーションさせ、特異的に検出する方法である。マラリア原虫に対しても rRNA を標的としたプローブを用い、血液薄層標本上で FISH をおこなう、種を鑑別する方法が開発され (Shah *et al*, 2015)、流行地の病院での診断に有用であることが報告されている (Kandie *et al*, 2018)。本研究では培養可能な熱帯熱マラリア原虫の rRNA 特異的なプローブを作製し、MCD で原虫を検出する方法を確立を目指した。FISH 反応はエッペンドルフチューブ内でおこない、MCD を用いて蛍光ラベルされた原虫を高感度で検出を試みた。FISH 法のためには赤血球を固定する必要があるが、MCD に固定化した赤血球を単層配列を試みたところ、非常にディスクの検出部位への付着能が低下しており、固定化の方法、またはディスクの親水化剤を改良する必要があることが明らかになった。

- (2) 蛍光核染色による熱帯熱および三日熱マラリア原虫の鑑別

熱帯熱マラリア原虫 (Pf) に次いで、世界的に広く分布する三日熱マラリア原虫 (Pv) は肝臓での休眠体による再発を起こすし、治療法が異なる。したがって、Pf と Pv の鑑別はマラリアの

適切な診断、ひいてはマラリアの排除に非常に重要な問題である。MCD では DNA 特異的な蛍光色素（ヘキスト 34580）を用いて原虫の核を染色し、検出している。本色素は DNA の AT 配列の副溝に結合する。Pv の核の大きさは Pf と比較し一般的に大きく、血液ギムザ染色標本の顕微鏡観察による鑑別における一つの重要なポイントになっている。さらに、Pf ゲノム中の AT 含有率 80.6%と高く、Pv ゲノム中の 57.5%と比較して、ヘキスト 34580 染色による輝度が大きく異なることが予想される。

パプアニューギニアでのフィールド調査をおこなった。大部分の Pv 感染者は Pf との混合感染であることが、顕微鏡観察および PCR 検査により明らかになった。少数ではあるが、数名の Pv の単独感染者の血液サンプルの MCD での解析に成功し、実際に十分に原虫数が確保できれば、統計学的に Pf と Pv を鑑別可能であることが示唆された。今後、さらに例数を増やし、種に特異的な蛍光シグナルの面積および輝度の閾値を明らかにし、独自開発した MCD 用ソフトウェアを改良し、Pf と Pv の鑑別を目指したい。

（ 3 ）薬剤耐性試験が可能な MCD の開発

多種のマラリア治療薬が存在するが、適切な診断、治療、ひいては排除には、感染しているマラリア原虫の薬剤耐性を調べることは非常に重要である。一般的に、薬剤耐性は種々の濃度の薬剤を含む培地中で数日培養後、原虫の増加を顕微鏡観察やサンドイッチ ELISA 法などで解析することで、薬剤耐性を有するかを判定する。流行地でのマラリア原虫の培養は設備や試薬の調達に難しく、結果が得られるまでに数日かかる。ミトコンドリアの膜電位のインジケータ（JC-1）を用いたマラリア原虫の生死判定法が報告された（Pasini *et al*, 2013）。JC-1 が生きた原虫に取り込まれるとミトコンドリアが強い蛍光を発するが、死んだ原虫の場合は蛍光を発しないことから、培養不要のハイスループットな薬剤耐性試験の開発を示唆する。一方、流行地においては蛍光顕微鏡の調達が難しい。

本研究では、ミトコンドリア膜電位インジケータを用いた薬剤耐性試験を行うことが可能な MCD による検出法の開発を試みた。具体的には、現在の MCD のレーザーで検出可能なインジケータ（AIE Mitochondria Blue, AIEgen 社など）を用いて、ミトコンドリアの蛍光強度を測定を試みた。しかし、MCD で検出するには蛍光シグナルが非常に弱く、検出が困難であった。現在、JC-1 で検出すべく、MCD に搭載しているレーザーを長波長に対応すべく交換し、本色素で検出可能な MCD の作製を目指している。

（ 4 ）ポジティブコントロール用ビーズの開発

マラリアは主に（亜）熱帯地域の途上国で流行しており、高温多湿、土埃が多い、電源が不安定など、理想的でない環境での診断が求められる。このような環境において安定した結果を得るためには、イメージリーダーが正常に機能しているか、試薬の劣化がないかを確認できるポジティブコントロールの開発が必須である。本研究では、MCD で使用可能なマラリア原虫感染赤血球を模したビーズの作製をおこなう。

これまでに申請者らは、マラリア原虫の核を模した DNA を吸着させた DEA ビーズの作製に成功している（Hashimoto *et al*, *J. Parasitol.*, 2018）。このビーズをアルギン酸カルシウムのゲル状粒子に内包させることで、感染赤血球に模したビーズの作製を試みた（図 1 参照）。顕微鏡で観察すると、明視野像は本ビーズの形態は赤血球に非常によく似ていた。また、蛍光核染色剤（アクリジンオレンジ）で染色したところ、ビーズのみ特異的に検出された。さらに、本ビーズを高温（40℃）、多湿（80%）でも品質が損なわれることが確認された。現在、本ビーズの大量生産方法について検討している。

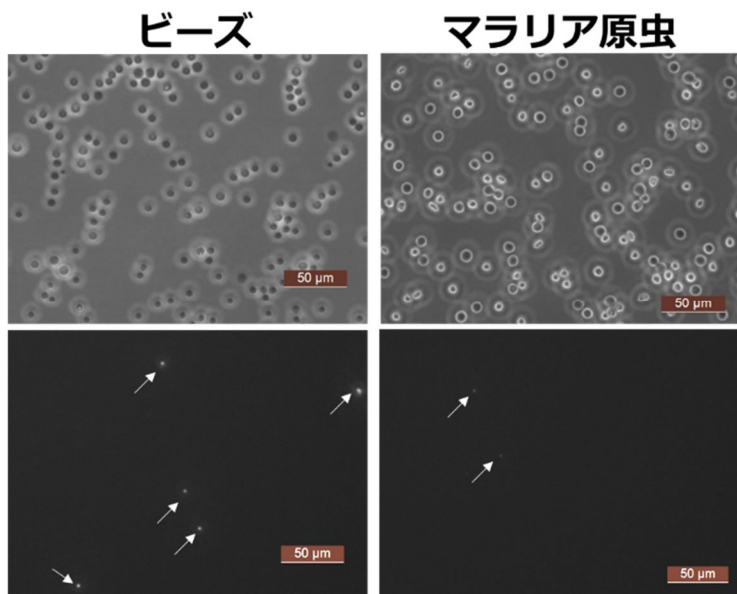


図 1. ポジティブコントロール用ビーズ(左)熱帯熱マラリア原虫感染赤血球(右)の明視野(上)と蛍光核染色(下)の顕微鏡像の比較。矢印は得られた蛍光シグナル。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Yamamoto Kenichi, Hyodo Tomonori, Matsushita Kiichiro, Minakawa Noboru, Mita Toshihiro, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using, LUNA-FL, A Fluorescent Cell Counter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1356 ~ 1356
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8091356	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Matsumoto Musashi, Tatsumi Atsuro, Nakajima Yoshihiro, Mita Toshihiro, Minakawa Noboru, Oka Hiroaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 8
2. 論文標題 Highly Sensitive and Rapid Quantitative Detection of Plasmodium falciparum Using an Image Cytometer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Microorganisms	6. 最初と最後の頁 1769 ~ 1769
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/microorganisms8111769	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Bando Mika, Kido Jun-ichi, Yokota Kazumichi, Mita Toshihiro, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 73
2. 論文標題 Nucleic acid purification from dried blood spot on FTA Elute Card provides template for polymerase chain reaction for highly sensitive Plasmodium detection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 101941 ~ 101941
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2019.101941	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------