

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590165

研究課題名(和文) 抗マラリア薬スクリーニングを見据えた迅速マラリア原虫検出手法の開発

研究課題名(英文) Development of the malaria detection system that can be used for antimalarial drug screening

研究代表者

八代 聖基 (Yatsushiro, shouki)

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号：90399155

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：これまで研究してきたマラリア原虫の生物学的研究と大量の細胞を正確に並べる工学的技術を融合し、分離・濃縮・検出をワンステップで行うことで数百万個(300万個程度)の赤血球中からたった一個のマラリア感染赤血球の有無を15分程度で検出する新しい高感度マラリア感染赤血球迅速検出法を構築するため今年度は300万個を一度に並べることを可能とする細胞チップを作成した。これら技術とDNAマイクロアレイスキャナー、DNA蛍光染色色素を用いて300万個の中から1個でもマラリアがいれば検出できる原理を構築した。今後これらの技術を基盤として抗マラリア薬スクリーニング手法へと発展させて行きたいと考えている。

研究成果の概要(英文)：We have developed a basic technology for a malaria diagnosis system using a cell microarray chip. The chip, with 20,944 microchambers (105 microm width and 50 microm depth) was made from polystyrene. About 130 erythrocytes were accommodated in each microchamber with monolayer formation, there being over 2,700,000 erythrocytes in total on a chip. This detection method promises the potential of a cell microarray chip for the early detection of malaria offering 100 times higher sensitivity than of light microscopy with Giemsa staining.

We are now developing the system based on cell microarray chip technology including erythrocytes isolation column and exclusive fluorescence detector in cooperation with electrical appliance manufacturer. We examined 17 blood samples which were obtained from malaria patients in Hospital using developing diagnosis system. Good correlation was observed between cell microarray chip method and conventional light microscopy.

研究分野：薬学

科研費の分科・細目：環境衛生薬学

キーワード：マラリア原虫 細胞チップ 薬剤スクリーニング

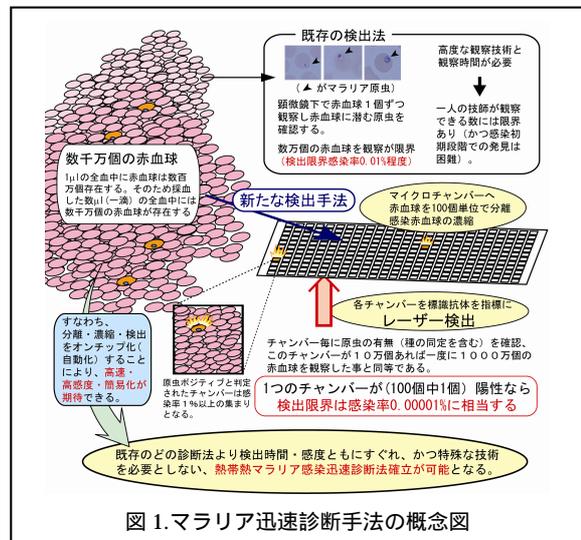
1. 研究開始当初の背景

マラリア原虫はヒトの赤血球に寄生を繰り返し、年間感染者数 3 億人以上うち 200 万人以上が死亡している人類史上最も重篤な寄生虫感染症である。感染症マラリアの深刻な問題としてキナクリンに代表される抗マラリア薬に対する薬剤耐性マラリア原虫の出現や、地球規模の環境変動（特に温暖化）・交通手段の発達によるグローバル化によって感染者数の増加・感染地域の拡大が上げられる。このような背景のなか WHO などの国際機関ではマラリア撲滅指針の一つに「早期発見および適切な早期治療」を掲げている。近年、予防・治療分野では薬剤を塗布した蚊帳による感染予防は大きな成果を上げ、また生薬をベースとした抗マラリア薬の開発は実を結びつつある。しかし診断法に関しては、免疫クロマト法や PCR 法が開発されているものの、検出感度や検出時間などの面から今だ 100 年以上前に確立されたギムザ染色による顕微鏡下での観察診断が主流とされている。そのため特に感染初期段階での診断に多大な時間と労力を必要とし、早期発見とその先に続く治療の大きな妨げとなっている。そのため感染症マラリア撲滅にはギムザ染色法に代わる感染初期に感染の有無を見極める事のできる迅速な診断手法の開発が急務と考えられる。そこで申請者は小胞輸送関連タンパク質を標的としたマラリア特異的抗体と、大量の血球細胞を一定数ずつ正確に並べる（整列させる）事ができる細胞チップと名付けた微細加工プラスチック基盤を用いることで、大量（数百万個）の血球細胞の中からたった一個のマラリア感染赤血球を見つけ出すことを可能とする簡便かつ迅速なマラリア診断手法を確立しようと考えた。

2. 研究の目的

これまでに提案者は、真核細胞におけるオルガネラ（小胞）形成の普遍的機構である小胞輸送の観点から、赤血球内でのマラリア原虫寄生維持のために、必要な分子基盤およびその仕組みをタンパク質機能解析の手法を用いて研究を進めてきた。これまでに原虫外膜系の形成と宿主血球膜へのタンパク輸送に、小胞輸送系が関与するいくつかの証拠を発見し報告している(Yatsushiro, et. al. BBA Biomembranes. 2005;1717:89-96. Moriyama, et al, J Bioenerg Biomembr. 2003;35:367-75.)。具体的には、真核細胞の小胞輸送に本質的な液胞型 ATPase (V-ATPase) や、N-ethylmaleimide sensitive factor (NSF)などの原虫ホモログを同定し、赤血球内で原虫外膜系の

形成に関係していることを実証した。申請者は研究を進めていく中で、原虫外（赤血球）へと輸送されるこれら蛋白質の特徴がマラリア検出マーカーの条件に合致していると考えた。さらに、申請者らは微細加工技術を駆使しスライドガラスと同程度の大きさのプラスチック基板上にチャンバー（細胞を一定数ずつ格納する小さなくぼみ）を約 2 万個配置し、そのチャンバーへ正確に一定数の細胞（ $130 \pm 6$  個）を導入、蛍光スキャナーにより全てのチャンバー内を高速に観察する技術を開発している（特願 2008-334179, PLoS One. (2010) 5(10): e13179.）。そこで、本申請においてこれまで研究してきたマラリア原虫の小胞輸送関連タンパク質に関する生物学的研究と大量の細胞を正確に並べる工学的技術を融合し、分離・濃縮・検出をワンステップで行うことで数百万個(300 万個程度)の赤血球中からたった一個のマラリア感染赤血球の有無（種を含めて）を 15 分程度で検出する（図 2：概念図）新しい高感度マラリア感染赤血球迅速検出法を構築する。さらに、この検



出手法は正確な数の細胞 2 万を超える各チャンバーに簡便に格納できることから、各チャンバーを 1 枚のシャーレに見立て本チップおよび検出手法と一定感染率の培養マラリア原虫を用いることで、ハイスループットな抗マラリア薬スクリーニング系が立ち上げることが可能であると考えている。そのため原虫の生死を蛍光強度、形状で判定することを見据えて迅速検出手法を構築する。

3. 研究の方法

熱帯熱マラリア原虫の小胞輸送関連タンパク質をターゲットとし、細胞分離・検出用細胞チップを用いることに血液数  $\mu\text{L}$  程度といった微量サンプルにて、迅速かつ高感度なマラリア感染診断方

法の確立ために、申請期間中に1)膜輸送関連タンパク質、原虫核を標的とした原虫検出用バイオマーカーの選定、2)細胞チップ上での最適なバイオマーカー検出条件の検討、3)大量(300万個)血球細胞の分離・整列条件の決定を行う。さらに本検出システムを応用し、膜輸送関連タンパク質及び原虫核を標的とした蛍光指示薬(抗体を含む)の検討により赤血球寄生時の原虫の生死判別を行うことにより、抗マalaria薬スクリーニング法の基礎技術を確立する。「抗マalaria薬スクリーニングを見据えた迅速マalaria原虫検出手法の構築」ために1)~3)に示す目標をクリアする。これにより細胞チップ上でマalaria特異的タンパク質を検出する検出法を確立する。本申請課題である「抗マalaria薬スクリーニングを見据えた迅速マalaria原虫検出手法の構築」ために、申請期間中に1)~3)に示す目標をクリアする。これにより細胞チップ上でマalaria特異的タンパク質を検出する検出法を確立する(図1概念図参照)。

1) 特定タンパク質検出抗体(バイオマーカー)の選定: 本研究課題成功の鍵としてマalaria原虫の特定タンパク質のみを正確に認識できる抗体(感染初期段階のように原虫タンパク質含有量が少ないサンプルでも感度良く検出可能)を入手できるかが上げられる。そのため原虫膜外へ大量に放出される膜輸送関連タンパク質をその標的タンパク質とすることは、目的に合致していると考えられる。これまでの研究過程で小胞輸送に関連するタンパク質の幾つかは、すでに抗体を作製している(Yatsushiro, et al., BBA-Biomembranes.(2005); 1717:89-96 等)ことから、すぐに細胞チップ上でそれら抗体の評価が可能である。さらに、新たな膜輸送関連蛋白質の抗体の作成および評価・マalaria原虫核を標的とした蛍光標識法の検討を行う(4種類のマalaria種特異的配列の検討、各種核染色による原虫の生死判別も視野に入れる)。これまでの研究からマalariaの小胞輸送に関連するタンパク質群の構造と機能について多くの知識と情報を有していることから、抗体作成には時間を有するものの、必ずクリアできる課題と考えている。

2) 細胞チップ上での簡便な抗原抗体反応による検出系の確立: 抗体の選定とともに細胞チップ基盤上でどのような手法(条件)により目的タンパク質を検出するかという点が研究課題達成に向けたもう一つの大きな問題となる。これまでに申請者は様々な基盤上で抗体固

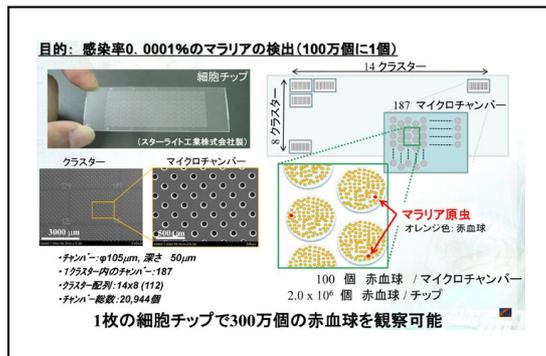
定(基盤表面の処理)、抗体ラベル(効率の蛍光標識、蛍光増幅)法を駆使し血液中のバイオマーカー(タンパク質)を数ng/ml濃度のオーダーで定量的に検出を行ってきた(Maeda, et al. Electrophoresis. (2008) 29(9):1902-1909)。具体的には通常 96 well プレート等で行う ELISA 法をマイクロチップ基盤上にスケールダウンした系での反応を可能としている。この技術を生かしマalaria特異的タンパク質(現時点では作成済み NSF 抗体を使用する)の検出に合った手法を確立する。条件検討のパラメータは多いが、上述の論文を含め多くの血中バイオマーカーを検出している経験から諸問題が生じた場合でも十分対応可能であると考えている。

3) 大量血液細胞を整列可能な細胞チップの作成: マalaria原虫はヒト赤血球内に感染・寄生を維持する。マalaria迅速診断を阻む一番の理由は、感染初期段階において赤血球中に潜む原虫の割合が非常に少ないからである(感染率 0.0001% : 100 万個に 1 個)。従って、いかに大量の血球細胞の中から数個の感染した赤血球を検出できるかが本技術のもう一つのポイントとなる。申請者らは微少なチャンパー内(くぼみのようなもの)に細胞を一定の数ずつ分け入れ、個々の細胞を観察する方法を見いだした。現在 100 万個の細胞を並べることに成功している。しかし、マalariaの迅速かつ高感度(低感染率)診断のためには 300 万個程度を並べ、かつ正確に観察する必要がある。そのためには赤血球の性状(膜の性質、大きさ等)に合わせたチップの材質(表面処理)、チャンパー深さを含めたチャンパーの形状等を設計しなくてはならない。また正確な観察のためにはチャンパーの底に細胞が1層なるのが好ましい。マalaria感染迅速診断の目的に見合った細胞チップの作成および、細胞展開の条件検討を行う。連携研究者の山村(産総研)は細胞チップの設計・作成のスペシャリストでありこれまでも大腸菌から動物細胞にいたるまで様々な細胞を扱い細胞チップによる分離のノウハウを蓄積していることから確実にクリアできると確信している。(特に、山村は細胞チップの設計・作成およびチップの供給を担当する)

#### 4. 研究成果

本申請においてこれまで研究してきたマalaria原虫の小胞輸送関連タンパク質に関する生物学的研究と大量の細胞を正確に並べる工学的技術を融合し、分離・濃縮・検出をワンステップで行うこ

とで数百万個(300 万個程度)の赤血球中からたった一個のマラリア感染赤血球の有無を 15 分程度で検出する新しい高感度マラリア感染赤血球迅速検出法を構築するため今年度は300万個を一度に並べることができる細胞チップを作成した。これを使って細胞(赤血球)



が並ぶ事、これら技術と DNA マイクロアレイスキャナー、まく透過性の DNA 蛍光染色色素を用いて 300 万個の中から 1 個でもマラリアがいれば検出できる原理を構築した。さらには様々な細胞が混ざっている全血中から効率的に赤血球だけを選別することで効率的なマラリア検出を可能とする基礎技術も構築している。これら技術を総合することでより効率的なマラリア検出が可能になると考えている。今後これらの技術を基盤として抗マラリア薬スクリーニング手法へと発展させて行きたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

1. Yatsushiro S, Akamine R, Yamamura S, Hino M, Kajimoto K, Abe K, Abe H, Kido J, Tanaka M, Shinohara Y, Baba Y, Ooie T, Kataoka M. Quantitative analysis of serum procollagen type I C-terminal propeptide by immunoassay on microchip. *PLoS one*. 6(4), e18807. (2011)
2. Yamamura S, Yatsushiro S, Yamaguchi Y, Abe K, Shinohara Y, Tamiya E, Baba Y, Kataoka M. Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip. *PLoS one*. 7(3), e32370. (2012)
3. Abe K, Hashimoto Y, Yatsushiro S, Yamamura S, Bando M, Hiroshima Y, Kido J, Tanaka M, Shinohara Y, Baba Y, Ooie T, Kataoka M. Simultaneous immunoassay analysis of plasma IL-6 and TNF-alpha on a microchip. *PLoS one*. 8(1), e53620. (2013)

[学会発表](計 4 件)

1. 八代 聖基 「細胞チップを用いたマラリア迅速検出法の確立」第 33 回 薬剤と生体膜の相互作用シンポジウム 2011 年 10 月 岡山大学(岡山市)
2. Yatsushiro S, Yamamura S, Kataoka M “Rapid and high sensitive detection system for malaria parasite using a cell microarray chip” PITTCON 2013 2013 年 3 月 フィラデルフィア(米国)
3. Obana E, Abe K, Yatsushiro S, Yamamura S, Kataoka M. “Application of microchip electrophoresis for the rapid and accurate identification of Plasmodium falciparum substitute for second PCR in nested PCR” Advances in Biodetection & Biosensors 2014 2014 年 3 月 ベルリン(ドイツ)
4. Abe K, Obana E, Yatsushiro S, Yamamura S, Kataoka M. “Recovery of malaria-infection erythrocyte from a cell microarray chip with a micromanipulator and PCR analysis for species identification of malaria” Advances in Biodetection & Biosensors 2014 2014 年 3 月 ベルリン(ドイツ)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

<http://unit.aist.go.jp/hri/>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

八代 聖基 (産総研・主任研究員)  
研究者番号: 90399155

(2)研究分担者

( )

研究者番号:

(3)連携研究者

山村 昌平 (産総研・主任研究員)  
研究者番号: