

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460186

研究課題名(和文)細胞チップを用いた細胞機能解析を可能とするマラリア迅速・高感度検出システムの構築

研究課題名(英文) Development of cell microarray chip for rapid and high sensitive malaria diagnosis in clinical fields

研究代表者

八代 聖基 (YATSUSHIRO, Shouki)

国立研究開発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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：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を、これまで構築してきた細胞チップを用いたマラリア検出法を基礎として、構築しようと考えた。原虫のゲノムを標的とし各チャンバー内でPCR反応を行うことで、治療方針を左右する原虫種同定法の確立。また各チャンバー内でマラリア原虫の1week培養、抗マラリア薬添加による生死判定を行う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法の構築を行った。その結果、各反応ステップの基礎条件を決定するし薬剤耐性マラリア診断の基礎技術を構築することができた。今後すべての反応工程がオンチップ上でできる系を構築する。

研究成果の概要(英文)： The infection rates were 0.08 to 23.6 % by Giemsa staining. On the other hand, the infection rates were estimated as 0.08 to 2.53 % by cell microarray chip system. Although we could not detect good correlation between two methods above 2.0 % (Fig. 3), good correlation was observed according to simple linear regression analysis ($R^2=0.9222$) below the 1.8 %. This cell microarray chip system was developed for the high sensitive detection of malaria infected erythrocytes (100 times higher sensitivity than that of conventional light microscopy),

Although cell microarray chip system could not detect malaria infected erythrocytes exactly (above 2.0 %), accurate detection could be performed in low infection rate (below 1.8 %). Furthermore, the number of patients was not enough to demonstrate the potential of cell microarray chip system for diagnosis system. We will improve the cell microarray chip system for field setting with more number of malaria patient's samples.

研究分野：衛生薬学

キーワード：感染症 マラリア原虫 細胞チップ

1. 研究開始当初の背景

マラリアの制圧戦略の一つとして、早期発見(診断)および適切な治療が提唱されている。しかし、治療へとつながる早期発見に関して問題点が多い。そこで申請者は、微細加工技術をベースにした細胞アレイ技術と、マラリア原虫寄生原理を利用することで原虫の核を指標とした、高感度・迅速・簡易なマラリア感染診断手法を基礎技術とした、治療方針を左右する原虫種同定法の確立およびハイスループットな抗マラリア薬スクリーニング法の構築を目指す。これによりこれまでに開発した細胞チップおよび検出観察手法、一定感染率の培養マラリア原虫を用いて本研究期間内に以下の2つ反応系を構築する。

2. 研究の目的

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(図1)。近年、治療分野では生薬をベースとした抗マラリア薬やワクチンの開発は実を結びつつある。しかし診断法に関しては、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た。

3. 研究の方法

これまでに申請者は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(3百万個)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15分で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た。(PCT/JP2009/065370, PLoS One. (2010) 5(10): e13179. : 図2)。これは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パー(細胞を一定数ずつ格納する小さなくぼみ)を約1万個配置し、そのチャンパーへ正確に一定数の細胞(100±5個)を導入、蛍光スキャナーにより全てのチャンパー内を高速に1細胞レベルで観察す

る技術である。申請者はこの各チャンパーを反応場とし、この中でPCR反応、抗原抗体反応、さらには各チャンパーをwellに見立てる事により各チャンパーで生化学的、分子生物学的解析を行うことができれば、治療方針を左右する原虫種同定法の確立およびハイスループットな抗マラリア薬スクリーニング法構築が可能になりうると考えた。そこで1)原虫のゲノムを標的とし各チャンパー内でPCR反応を行うことで、治療方針を左右する原虫種同定法の確立。2)各チャンパー内でマラリア原虫の1week培養、抗マラリア薬添加による生死判定を行う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法の構築。これによりこれまでのマラリア研究、診断では手の届かなかった、マラリア迅速診断とそれにつづく適切な早期治療、さらには治療そのものに関係する抗マラリア薬開発促進に大きな力を発揮するコア技術になりうると確信し、実験の目的として定め遂行しようと考えた。

4. 研究成果

初年度(平成26年度)は原虫のゲノムを標的としたPCR反応による、治療方針を左右する原虫種同定法の確立に取り組んだ。細胞チップチャンパー内でPCRを行うためには大きく分けて2問題をクリアせねばならなかった。一つ目はチャンパー内には赤血球が100個ずつ格納されていることから、実際の患者の感染率(5%-0.001%程度)を考えると、100個の赤血球の中にマラリア感染赤血球は1個(多くても5個)しかない。また1チャンパー当たりの反応ボリュームは100pL程度である。このような条件下でPCR反応条件を構築する必要がある。二つ目にPCR反応は反応の際、95℃程度まで温度を上げる必要がある。しかし、これまで開発してきた細胞チップはポリスチレン製であり80℃を超えると、変形しチャンパーの形状を保つことが困難なことが確認されている。まずPCRアフリカツメガエル卵母細胞へのRNAインジェクションシステムを用いてチャンパー内のマラリア感染赤血球を含む赤血球をピックアップし、ガラスキャピラリー内(反応量:2μL)でPCR確実にPCR反応進系は確立した(図1)。

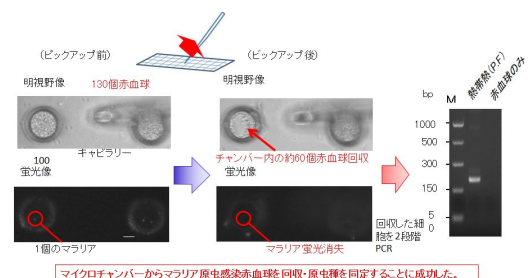


図1. チャンパーから細胞ピックアップPCR反応

さらにこの反応条件をもとに各チャンパーでのPCR反応も確立した。表面処理やチャンパー径の関係により細胞チップ表面が

乾燥しやすいため、2万チャンパー全てを確実にとはいかないが約6割程度のチャンパーにおいてチャンパー内反応液量が250pL程度のPCR反応系を確立に成功した(図2)。

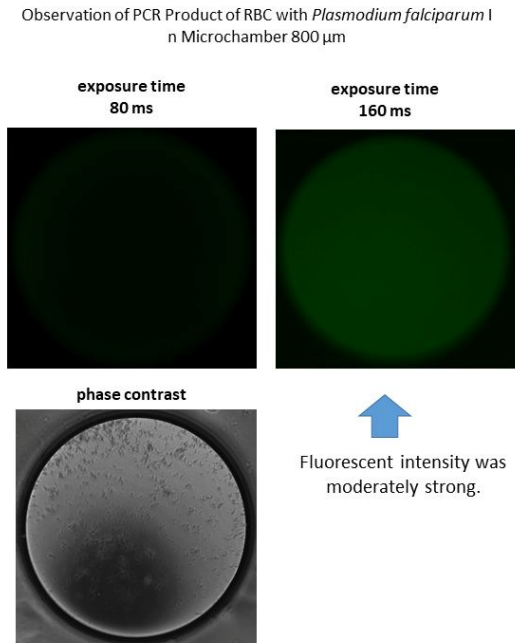


図2. マイクロチャンパー内でのPCR反応

2年目(平成27年度)にはでチップ成型業者が非常に苦労していた耐熱性材料での細胞チップ成型がいくつもの材料と混合比の組み合わせを用意し主としてCOCを主材料として、PCR反応条件下にさらし評価する事、さらにはそのあとに続く培養の操作の事も踏まえて最適な細胞チップを作成することができた。細胞チップ作成と並行して、培養、抗マラリア薬添加による生死判定を行うことで抗マラリア薬スクリーニング法の構築を試みた。マラリア原虫は赤血球に寄生することで生命を維持している。赤血球に寄生し、赤血球内で自身を数十個に増やし赤血球を破壊し、再度新たな赤血球へ寄生を繰り返す。赤血球内で数十倍に増えるという性質から、薬剤スクリーニングを行う場合、感染率0.01%(赤血球1万個にマラリア原虫1個)の割合でマラリアを調整しなくてはならず、材料として大量の赤血球細胞を必要とする。また薬剤がどのステージで効いたか、ギムザ染色で確認する必要があり労力が大きい。これまで、大量(数百万個)の血球細胞の中からたった一つのマラリア感染赤血球を見つけ出すために、血球細胞を百個ずつ均一かつ、アレイ状に整列する技術確立し、マラリア迅速高感度検出手法の研究開発を行ってきた。そこでこの技術を基礎として細胞を格納整列させるチャンパー径および形状の改変することで、数万個ずつ正確に並べる技術へと改良する。また、細胞チップのまま培養する技術の確立(チャンパー内の培地・ガス交換法確立)することで、簡便な操作で大量の細胞を(チャンパー数100-200程

度)培養条件に合わせて整列させ、そのまま観察できる技術になりうると考えている。そこでこれまでのマラリア検出用細胞チップ(細胞を100個ずつ整列)および今回新たに作成した大径(直径800μm)のPCR反応、培養用細胞チップを用いて70%エタノールおよびエチレンガス滅菌法を使いプラスチック基板である細胞チップに過剰な熱をかけずに無菌化・洗浄処理および、細胞展開液を培養液への置換法などを検討する事で、細胞チップ内で1week日程度の培養方法を確立した(図3)。

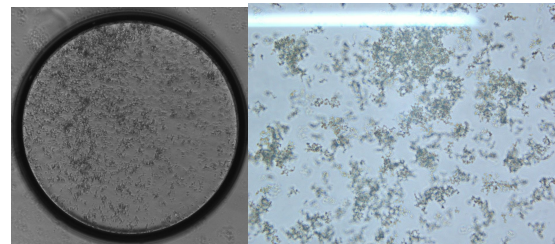


図3. マイクロチャンパー内でのマラリア培養

最終年度(平成28年度)は、患者サンプルによる感染原虫種の同定、感染マラリアの薬剤耐性試験実施しようと準備を開始した。これまでに開発したマラリア検出用細胞チップの開発に伴い、国際特許出願、国外の学会(特にアフリカ地域)に参加し、本チップの有用性、特色をアピールしている。実際にマラリア患者を診断しているウガンダ(グル大学)などの医師らが興味を持ち始めている。現在これらのネットワークを使い、現地でのフィールド試験への展開を考えている。それと並行して昨年度まで積み上げてきた各チャンパーに一定数赤血球が入る(約8500個)条件にて、PCR反応での薬剤耐性評価(細胞の展開、格納、培養、PCR反応)をオンチップ化することに取り組んだ。すべての行程を連続させて行い培養後のマラリア原虫の遺伝子(actin-1)は検出できたものの、耐性遺伝子の検出(タイピングを含む)が確認できなかった(培養の行程において目的遺

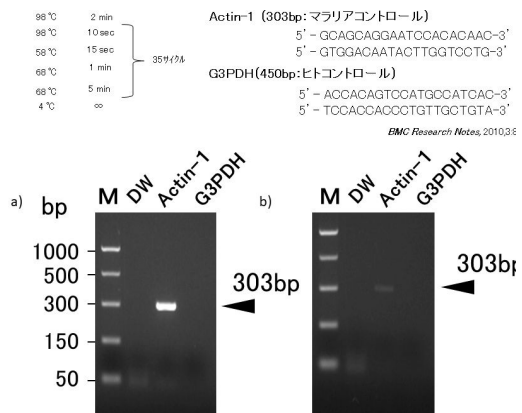


図4. 1 week 培養後のPCR反応

伝子を持つ原虫がチャンバーからはがれ出てしまい、チャンバー内の標的遺伝子が検出限界以下となっている事が確認できている：図4)。今後も薬剤耐性の有無をオンチップ化で一つの行程で確認できるようこれまでの各条件を参考に粘り強く検討していく。

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 4件)

1. “Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda.” S Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana SI, Auma M, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NM, Egwang TG, Onen JO, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T. Malar J. (2017) 16 (1): 23.doi: 10.1186/s12936-016-1663-1.
2. “Prognostic Impact of Circulating Tumor Cell Detected Using a Novel Fluidic Cell Microarray Chip System in Patients with Breast Cancer.” Sawada T, Araki J, Yamashita T, Masubuchi M, Chiyoda T, Yunokawa M, Hoshi K, Tao S, Yamamura S, Yatsushiro S, Abe K, Kataoka M, Shimoyama T, Maeda Y, Kuroi K, Tamura K, Sawazumi T, Minami H, Suda Y, Koizumi F. EBioMedicine. (2016) 173-182. doi:10.1016/j.ebiom.2016.07.027.
3. “Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda.” Yatsushiro S, Yamamoto T, Yamamura S, Abe K, Obana E, Nogami T, Hayashi T, Sesei T, Oka H, Okello-Onen J, Odongo-Aginya EI, Alai MA, Olia A, Anywar D, Sakurai M, Palacpac NM, Mita T, Horii T, Baba Y, Kataoka M. Sci Rep. (2016) 6:30136. doi: 10.1038/srep30136.
4. 「細胞チップを用いた迅速高感度マラリア感染症診断法の開発～200万分の1の感染を見出しマラリアに立ち向かう～」橋本宗明、八代聖基、山村昌平、片岡正俊 Synthesiology (2017) 10; 33-40.

[学会発表](計 2件)

1. “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 2014. London, UK (2014).
2. “Development of cell microarray chip

for rapid and high sensitive malaria diagnosis in clinical fields.” Shouki YATSUSHIRO, Shohei YAMAMURA, Kaori ABE, Eriko OBANA, Toshihiro MITA, Toshihiro HORII, Masatoshi KATAOKA. Pacificem 2015 meeting. Hawaii US (2015).

[図書](計 0件)

1.

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
八代 聖基 (YATSUSHIRO Shouki)
(国研)
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

(2)研究分担者 ()

研究者番号：