

令和 5 年 6 月 15 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B)（海外学術調査）

研究期間：2017～2020

課題番号：17H04650

研究課題名（和文）マラリア高度流行地における独自開発デバイスを用いた無症候感染者の診断法の確立

研究課題名（英文）Establishment of a diagnostic method for asymptomatic infected people using a proprietary device in malaria endemic areas

研究代表者

橋本 宗明（Hashimoto, Muneaki）

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） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は申請者が独自開発した自動マラリア診断デバイスをマラリア流行地の無症候感染者に対し使用し、現行法と比較することでマラリア撲滅のための次世代診断デバイスの開発を目的とした。デバイスの改良をおこない、本デバイスで高い正確性で診断できることが明らかになった。具体的には、nested PCR法をレファレンス法として、本デバイスの感度と特異度は、それぞれ100%、92.8%であった。また、マラリア寄生虫陽性53検体について、本デバイスで算出されたパラシテミア値と顕微鏡検査で算出した値を比較し、本デバイスの高い定量性が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マラリア流行地では無症候感染者（繰返しの感染により部分的な免疫の獲得し、低感染状態の感染者）が原虫のドナーになっており、マラリア撲滅のためには無症候感染者の治療による伝播阻止が鍵になる。このような背景から、流行地でのフィールドワークで無症候感染者にも使用可能な迅速かつ易操作な高感度マラリア診断デバイスの開発が望まれている。申請者はこれらを可能にし得るデバイスを独自に開発した。本研究では罹患率が特に高いマラリア流行地であるケニアにおいて無症候感染者を対象に本デバイスを用いた原虫の高感度検出を可能にし、マラリア撲滅に大きく貢献すると期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to develop a next-generation diagnostic device for eradicating malaria by using an automatic malaria diagnostic device originally developed by the applicants for asymptomatic infected people in malaria endemic areas and comparing it with the current method. After improving the device, it became clear that the device could be used for diagnosis with high accuracy. Specifically, using the nested PCR method as a reference method, the sensitivity and specificity of this device were 100% and 92.8%, respectively. In addition, for 53 malarial parasite-positive specimens, the parasitemia value calculated by this device was compared with the value calculated by microscopy, revealing the high quantification of this device.

研究分野：熱帯医学

キーワード：マラリア 検査

## 1. 研究開始当初の背景

マラリアは世界 3 大感染症の 1 つである。マラリア患者に対する対策は、マラリアを発症し来院した人に対し、治療薬へのアクセスを整備し、治療をおこなうものであるが、年間感染者数は 2 億~3 億人を推移し、2000 年とほとんど変わらない。これはマラリアのハマダラ蚊による伝播阻止がいかに難しいかを示すと共に、マラリア撲滅に向けた新たな対策が必須であることを示している。マラリアの伝播阻止が困難な 1 つの大きな原因として、流行地における「無症候感染者」からの感染の拡大が挙げられる。無症候感染者、すなわち繰返しの感染によって部分的な免疫を獲得し低感染状態にある感染者が少なからず存在し、原虫のドナーになっている。したがって、マラリア撲滅のためにはいかに無症候感染者の治療（原虫の駆除）を行うかが鍵になる。無症候感染者は低感染状態であり、現在の診断のゴールドスタンダードである血液塗抹標本の顕微鏡観察では原虫の検出は困難である。無症候感染の調査は PCR 法により遂行されている。

有症者以上に無症候感染者を診断のために長く引き止めることは困難であり、迅速に解析が行われねばならない。また、流行地での分子生物学的実験が可能な人材を確保することは難しく、PCR による無症候感染の検出は困難である。したがって、マラリア撲滅のためには、無症候感染者の診断が可能な、迅速かつ易操作な高感度診断が可能な次世代の診断デバイスの開発が急務である。申請者らはこれらを可能にし得る独自の診断デバイスの開発に成功した。特に「Malaria Cell Disc (MCD)」テクノロジーを用いたデバイスは *in vitro* で培養したマラリア原虫の高感度検出に成功している。本デバイスの検出感度は PCR と同等、検出は 15 分、感染率の自動算出から重症度の診断も可能であり、次世代の診断デバイスとして非常に有望である。

## 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をマラリア流行地の無症候感染者に対し使用し、現行法と比較することでマラリア撲滅のための次世代診断デバイスの開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

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をマラリア流行地の無症候感染者に対し使用し、現行法と比較することでマラリア撲滅のための次世代診断デバイスの開発を目的とした。無症候感染者血液のサンプリングは高度流行地のケニア ビタ地区で行い、小学校或いは村を訪問し、無作為に採血し、解析をおこなった。得られた結果からアフリカでの使用に際しての問題点を洗い出し、帰国後にデバイスの改良をおこなうべく、フィードバックの繰返しをおこなった。

## 4. 研究成果

### (1) 流行地での使用のための MCD の設計

MCD は、スキャンディスクと蛍光イメージリーダーから構成されている。DVD と同じ直径 120mm のスキャンディスクは、フローパスディスク部品と原虫染色ユニットを備えた光ディスク部品を備えている。スキャンディスク上に、全血から分離した赤血球を染色ユニットに単層配列させることが可能である。染色ユニットでは、マラリア原虫を核特異的蛍光染色剤 Hoechst 34580 で蛍光染色する。蛍光イメージリーダーは、蛍光染色されたマラリア原虫の核を検出する（次ページの図 1 を参照）。

申請者らは、全血から白血球と血小板を除去するプッシュカラムナノファイバーフィルターを報告していた。本研究ではスキャンディスク型 SiO<sub>2</sub> ナノファイバーフィルターユニットを開発した。孔径と SiO<sub>2</sub> ナノファイバーの形成に要する時間を厳密に制御した。この改良により、ほぼすべての白血球と血小板がナノファイバーに捕捉され、赤血球のみがこのろ過システムを通過することが可能になった。これに伴い、遠心分離の条件も 1000rpm、30 秒と最適化した。全血からの白血球の平均除去率は 99.7%、血小板の平均除去率は 90.2%であった。これらの結果は開発した赤血球精製システムは、全血サンプルから白血球および血小板の大部分を除去できることが示された。

### (2) ケニア ビタ地区における研究対象者のマラリア陽性率

本研究に参加いただいたケニア ビタ地区の方々（いずれも発熱等の症状はない）274 名を対象に熱帯熱マラリア原虫の 18S rRNA 遺伝子に対して、常法に従った nested PCR (nPCR) 解析を行ったところ、56 検体 (20.2%) がマラリア原虫陽性と判定された。参加者の平均年齢は 8.4 歳であった。研究対象者の平均ヘモグロビン値は 12.2g/dL であった。ヘモグロビン値が 7g/dL 未満であったのは 3 名のみであった。nPCR で判定したマラリア寄生虫陽性サンプルにおける顕微鏡測定寄生虫症の割合の中央値は 0.04% (範囲：0.00043~1.3%) であった。RDT の感度と特異度はそれぞれ 98.1%と 54.8%であった。

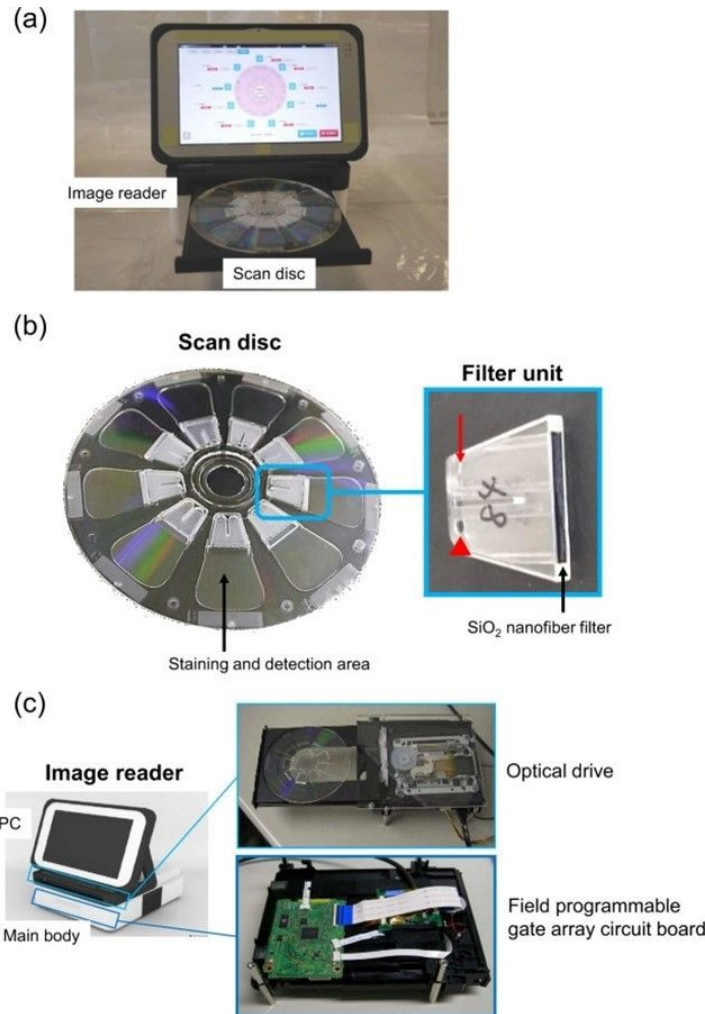


図1. マラリア流行地で使用可能なMCDの設計

(a) MCDは画像読取装置(上)とスキャンディスク(下)で構成される。

(b) スキャンディスク(左)とフィルターユニット(右)の構造を示す。フィルターユニットには、空気抜き口(矢印)と試料注入口(矢印)がある。

(c) 蛍光イメージリーダーは、タブレットPC(上)と、ブルーレイの光学系を搭載した本体(下)で構成されている。

### (3) MCDによるパラシテミアの測定

MCDに適宜希釈した全血をアプライし、スタートボタンを押すと、白血球と血小板の除去、赤血球をスキャンディスク上に単層配列、核特異的蛍光色素(Hoechst 34580)による染色が自動でおこなわれ、赤血球内の感染マラリア原虫の蛍光像が得られた。ヘモグロビンは励起波長400nmに強い吸収ピークを持つため、赤血球は診断装置のイメージリーダーで可視化することができ、赤血球の数を視覚的にカウントすることが可能である。そのため、蛍光イメージリーダーのソフトウェアにより、計数された赤血球のうち感染赤血球の割合を測定することができる。

ディスク上の検出領域上の赤血球の平均数は、マラリア原虫陽性サンプルでは836,863個、陰性サンプルでは912,556個であった。マラリア原虫と診断された蛍光陽性スポットの数は、陽性サンプルで23~5,130個であった。一方、陰性サンプルでは、1サンプルあたり平均16.1スポットがマラリア原虫と誤認識された。nPCRをレファレンス法として、MCDの感度と特異度は、それぞれ100%(95%CI, 93.3-100%)、92.8%(95%CI, 88.5-95.8%)であった。nPCRで非検出だった陰性検体では特異度は92.8%(95%CI, 88.5-95.8%)。低パラシテミア(0-0.01%)群では感度100%が確認できた。MCDで得られた特異度は、RDTで得られた特異度(54.8%)よりも有意に高かった。

### (4) MCDのパラシテミア測定の定量性の評価

マラリア寄生虫陽性53検体について、MCDで求めたパラシテミア値と顕微鏡検査で算出した値の相関の程度を評価した。パラシテミアの値は両法とも正規分布を示さなかったため、データは対数変換した。Pearsonの相関検定により、2つの方法で測定した寄生虫血症割合値の間に有意な相関が認められた( $r = 0.80$ ,  $P = 1.2 \times 10^{-12}$ )。また、スピアマンの順位相関テストでも

強い相関が得られた ( $r = 0.83$ ,  $P = 2.6 \times 10^{-29}$ )。これらの結果から、MCD で得られたパラシテミアの値と顕微鏡検査で得られた値の間には直線的な相関があることが示された。

#### ( 5 ) 今後の展望

申請者らは、ブルーレイの光学系を利用した新規な定量的なマラリア診断が可能な自動検出デバイスを開発し、ケニアでのフィールドテストにより、本診断システムは高い診断精度を有することを明らかにした。ゴールドスタンダードの顕微鏡観察と比較して、MCD は、検査時間の短縮、人的ミスの少なさ、高い特異性、パラシテミアの定量的な測定が可能であることが示された。これらの結果は、インフラの整備が不十分なマラリア流行地域の医療施設で使用される従来の方法の有効な代替法として、MCD の導入が有効である可能性を示している。しかし、MCD の適用性を検証するためには、さらに大規模なサンプルサイズを用いた研究をおこなう必要があると考える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5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 -

1. 著者名 Yamamoto Takeki, Hashimoto Muneaki, Nagatomi Kenji, Nogami Takahiro, Sofue Yasuyuki, Hayashi Takuya, Ido Yusuke, Yatsushiro Shouki, Abe Kaori, Kajimoto Kazuaki, Tamari Noriko, Awuor Beatrice, Sonye George, Kongere James, Munga Stephen, Ohashi Jun, Oka Hiroaki, Minakawa Noboru, Kataoka Masatoshi, Mita Toshihiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Development of a quantitative, portable, and automated fluorescent blue-ray device-based malaria diagnostic equipment with an on-disc SiO2 nanofiber filter	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 6585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-63615-2	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, Yatsushiro Shouki, Yamamura Shohei, Tanaka Masato, Sakamoto Hirokazu, Ido Yusuke, Kajimoto Kazuaki, Bando Mika, Kido Jun-ichi, Kataoka Masatoshi	4. 巻 16
2. 論文標題 Hydrophilic-treated plastic plates for wide-range analysis of Giemsa-stained red blood cells and automated Plasmodium infection rate counting	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 321 ~ 321
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-017-1975-9	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, Numata Masahiko, Yatsushiro Shouki, Ido Yusuke, Tanaka Masato, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 104
2. 論文標題 Pseudo-Infected Red Blood Cell Beads as Positive Control for Cell Microarray Chip?Based Detection of Plasmodium-Infected RBCs	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Parasitology	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1645/17-144	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 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki, Sakamoto Hirokazu, Ido Yusuke, Tanaka Masato, Yatsushiro Shouki, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 17
2. 論文標題 In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of Plasmodium species in wide-range thin blood smears	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Malaria Journal	6. 最初と最後の頁 235 ~ 235
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12936-018-2381-7	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, Ido Yusuke, Tanaka Masato, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 69
2. 論文標題 Small-scale culture of Plasmodium falciparum using $\mu$ -Slide Angiogenesis followed by automatic infection rate counting to assess drug effects	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Parasitology International	6. 最初と最後の頁 54 ~ 58
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.parint.2018.11.005	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 -

1. 著者名 Yamamoto Takeki, Yatsushiro Shouki, Hashimoto Muneaki, Kajimoto Kazuaki, Ido Yusuke, Abe Kaori, Sofue Yasuyuki, Nogami Takahiro, Hayashi Takuya, Nagatomi Kenji, Minakawa Noboru, Oka Hiroaki, Mita Toshihiro, Kataoka Masatoshi	4. 巻 132
2. 論文標題 Development of a highly sensitive, quantitative, and rapid detection system for Plasmodium falciparum-infected red blood cells using a fluorescent blue-ray optical system	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 375 ~ 381
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2019.02.064	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 -

1. 著者名 Ido Yusuke, Hashimoto Muneaki, Yatsushiro Shouki, Tanaka Masato, Yokota Kazumichi, Kajimoto Kazuaki, Kataoka Masatoshi	4. 巻 105
2. 論文標題 Loop-Mediated Isothermal Amplification in Microchambers on a Cell Microarray Chip for Identification of Plasmodium Species	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Parasitology	6. 最初と最後の頁 69 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1645/18-107	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 -

1. 著者名 Hashimoto Muneaki	4. 巻 5
2. 論文標題 Sensitivity of Loop-Mediated Isothermal Amplification Increases 100-Fold after Triton X-100 Treatment of Plasmodium-Infected Erythrocytes	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 SOJ Microbiology & Infectious Diseases	6. 最初と最後の頁 1 ~ 2
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.15226/sojmid/5/4/00177	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5件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Muneaki Hashimoto, Shohei Yamamura, Hirokazu Sakamoto, Masato Tanaka, Shouki Yatsushiro, Kazuaki Kajimoto, Masatoshi Kataoka
2. 発表標題 Preparation of a uniform monolayer of Giemsa-stained red blood cells on hydrophilic-treated plastic plates for malaria diagnosis
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Muneaki Hashimoto, Shouki Yatsushiro, Shohei Yamamura, Masato Tanaka, Hirokazu Sakamoto, Yusuke Ido, Kazuaki Kajimoto, Mika Bando, Jun-ichi Kido, Masatoshi Kataoka
2. 発表標題 Preparation of a uniform monolayer of Giemsa-stained red blood cells on hydrophilic-treated plastic plates for malaria diagnosis
3. 学会等名 AMERICAN SOCIETY OF TROPICAL MEDICINE and HYGIENE (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 宗明、坂本 寛和、井戸 佑介、田中 正人、八代 聖基、梶本 和昭、片岡 正俊
2. 発表標題 In situ loop-mediated isothermal amplification (LAMP) for identification of Plasmodium species in wide-range thin blood smears
3. 学会等名 日本寄生虫学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Muneaki Hashimoto
2. 発表標題 The malaria cell disc system: Development of a portable and highly sensitive CDplayer-like automatic malaria diagnosis device
3. 学会等名 日本熱帯医学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 橋本宗明
2. 発表標題 赤血球を単層配列させる技術をマラリア診断・研究に応用する
3. 学会等名 分子寄生虫学ワークショップ・分子寄生虫・マラリア研究フォーラム
4. 発表年 2018年



〔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
---------	---------