

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 8日現在

機関番号：82626

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22710124

研究課題名（和文） 感染症診断を目指した細胞チップデバイスの構築

研究課題名（英文） Development of a cell microarray chip device for diagnosis of infectious disease

研究代表者

山村 昌平（YAMAMURA SHOHEI）

独立行政法人産業技術総合研究所・健康工学研究部門・研究員

研究者番号：50432141

研究成果の概要（和文）：寄生虫感染症であるマラリアの診断方法としては、血球細胞の顕微鏡観察が主流であり、その他に PCR 法やイムノクロマト法があるが、感度、検出時間、操作性に問題がある。本研究では、既存の診断法では不可能であった自覚症状のない段階（100 万個に 1 個レベル以下のマラリア感染赤血球）での極めて早期に、高感度、短時間に診断するため、100 万個以上の赤血球を均一に配置し、その中から、マラリア感染赤血球を迅速かつ高感度に検出できる高集積型の細胞チップの開発を目標とする。

研究成果の概要（英文）：Malaria is a vector-borne infectious disease caused by protozoan parasites. There are approximately 500 million cases of malaria, killing over two million people each year. The most standard detection method; Giemsa-stained blood smears to detect malaria parasite in erythrocytes is time-consuming and need to technical handling. Although the detection methods based on immunochromatography and PCR were developed, they also have some problems in sensitivity and rapidity. In this study, we have developed a novel cell microarray system to detect malaria-infected erythrocytes with the high-sensitivity (<0.0001%) in a short time.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学、マイクロ・ナノデバイス

キーワード：細胞チップ、マイクロアレイ、バイオチップ、単一細胞解析、ハイスループットスクリーニング、感染症、マラリア

1. 研究開始当初の背景

世界3大感染症の一つであるマラリアは、全世界で年間100万人以上死亡する人類史上最も重篤な寄生虫感染症として知られている。しかし、診断方法としては顕微鏡観察が主流であり、その他にもPCR法やイムノクロマト法があるが、検出感度、検出時間、操作性に問題がある。それらの問題を克服するためには、細胞レベルで高精度に血球細胞を操作、検出を行う必要がある。そこで本研究では、独自の細胞チップの技術を用いることにより、従来の検出方法では不可能に近い検出限界（100万個に1個、0.0001%）である極少数の感染細胞を簡易、迅速に検出できる細胞チップデバイスの構築を目指す。

2. 研究の目的

本研究では、微細加工技術を用いて独自の集積型マイクロアレイチップを作製し、マラリア原虫に感染した赤血球を、一枚のチップ上で迅速、高感度に行える感染症診断システムの開発を目標とする。そのためには、まず多数の赤血球細胞をマイクロアレイ上に均一に配置できるチップを設計し、一枚のチップ上で100万個の赤血球細胞を同時に検出および解析できるシステムの開発を進める。この細胞チップを用いて、従来の検出法（顕微鏡、イムノクロマト法）の検出限界（1万個に1個）をはるかに超える100万個に1個（0.0001%）以下といった極少数のマラリア感染赤血球細胞を検出できるシステムを構築する。さらに、本細胞チップシステムは、従来法の測定時間（顕微鏡：40分、イムノクロマト法：20分）を大幅に短縮（目標10分）することも可能である。よって本研究では、迅速性、簡便性、感度といったすべてのファクターで従来法を卓越したものをを目指す。さらに、チップ上でそのままギムザ染色やPCRなどを行い、単一感染細胞を機能解析できれば、感染症のステージも評価できるため、感染症診断方法だけでなく、細胞の機能評価方法としても期待される。

3. 研究の方法

新しい感染症診断システムとして、迅速、高感度な細胞チップシステムを開発するにあたり、（1）まず、赤血球細胞を均一に配置するマイクロアレイチップを作製する。（2）次に、作製した細胞マイクロアレイチップを用いて、マラリア感染赤血球細胞のみを高感度に検出するための条件検討を行う。さらに、そのままチップ上でギムザ染色やPCRなどを行うことによって単一感染細胞の詳細な解析を目指す。以下に詳細を述べる。

（1）微細加工技術であるフォトリソグラフィ

技術を用いて、マイクロアレイチップを作製する。100万個の赤血球細胞が均一に配置可能な高集積化チップを目指す。各マイクロチャンバーに導入できる細胞数を一定にかつ単一層に固定化させるため、チップのデザイン、表面処理、細胞濃度などを検討する。

（2）赤血球に感染するマラリア原虫を対象に核を蛍光染色して、核のない正常な赤血球に対して、マラリア感染赤血球のみを検出できるように蛍光色素の種類や濃度の条件検討を行う。マラリア感染赤血球を0.1%から0.0001%（100万個に1個）に細胞濃度を変化させ、マイクロアレイスキャナーを用いて感染赤血球を蛍光検出するための条件を洗い出す。さらに、感染赤血球の詳細な解析として、チップ上でそのままギムザ染色やPCRを行うために、感染赤血球の固定化方法やチップ基板の素材や表面処理などを検討した。それによって、標的の単一感染赤血球の詳細な機能解析を行うことを目指す。

4. 研究成果

（1）平成22年度は、まず多数の赤血球をマイクロアレイ上に均一に配置できる細胞チップを設計し、一枚のチップ上で100万個の赤血球を同時に解析できるシステムの開発を進めた。細胞チップは、ナノリソグラフィ技術であるLIGAプロセスを用いて、直径100 μm のマイクロチャンバーが約2万個集積化されたポリスチレン製マイクロアレイチップを作製した（図1）。さらに、細胞チップの表面を、反応性イオンエッチング（RIE）装置を用いて親水化処理を行い、チップデザイン、赤血球濃度などの条件と併せて、赤血球の配置条件の最適化を行った。その結果、1枚のチップ上で、100万個以上の赤血球を均一かつ単一層に配置することに成功した（図2）。それによって、100万個の赤血球をマイクロアレイスキャナー等によって約15分程度で検出可能となるため、ハイスループットスクリーニング系としてマラリアの迅速診断法になり得ることが期待される。

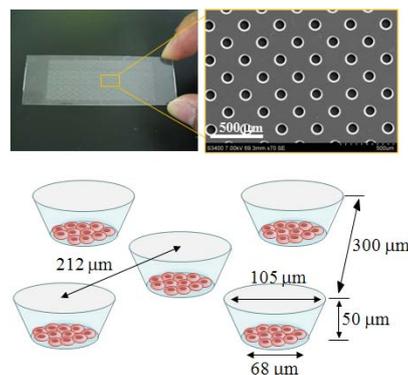


図1. 赤血球配置用の細胞チップ

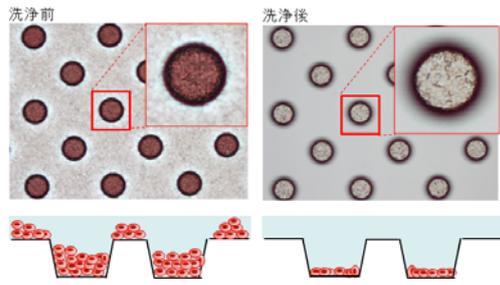


図2. 細胞チップ上での赤血球の単一層配置

(2) 平成23年度は、直径 $100\mu\text{m}$ のマイクロチャンバーが約2万個集積化された細胞チップを用いて、1枚のチップで単一層化された270万個の赤血球中から1個のマラリア感染赤血球を15分間で検出することに成功した(図3)。それによって、従来法であるPCR法の5倍以上、顕微鏡観察やイムノクロマト法の100倍以上の超高感度検出でありながら、簡易、迅速なマラリア診断方法の構築を実現した。さらに、細胞チップ上において、PCRはマイクロチャンバー空間中では困難であったが、標的のマラリア感染赤血球のギムザ染色ができたことから、検出後の詳細な機能解析も可能であることが示された。将来、既存法に置き換わる新しいマラリアの早期診断法として期待されるため、今後、企業などと共同研究を進めながら製品化に繋がってきたいと考えている。

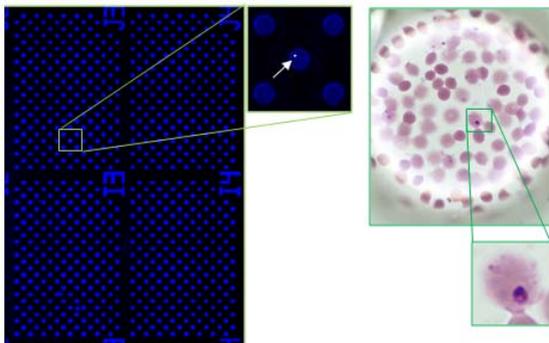


図3. 細胞チップ上でのマラリア感染赤血球の検出とギムザ染色

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 5件)

- ① 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*, 査読有、7, 2012, e32370
DOI: 10.1371/journal.pone.0032370
- ② Yamamura S, Yatsushiro S, Abe K, Baba Y,

Kataoka M., Development of a cell microarray chip for detection of circulating tumor cells, *J. Phys. Conf. Ser.*, 査読有、352, 2012, 12041

DOI: 10.1088/1742-6596/352/1/012041

- ③ Yamaguchi Y, Yatsushiro S, Yamamura S, Abe H., Abe K., Watanabe M., Kajimoto K., Shinohara Y., Baba Y., Kataoka M., Ribonuclease protection assay on microchip electrophoresis, *Analyst*, 査読有、136, 2011, 2247-2251
DOI: 10.1039/c0an01044h
- ④ Yatsushiro S*, Yamamura S*, (*These authors contributed equally), Yamaguchi Y, Shinohara Y, Tamiya E, Horii T, Baba Y, Kataoka M, Rapid and Highly Sensitive Detection of Malaria-Infected Erythrocytes Using a Cell Microarray Chip, *PloS One*, 査読有、5, 2010, e13179
DOI:10.1371/journal.pone.0013179
- ⑤ 山村昌平, 八代聖基, 山口裕加, 民谷栄一, 片岡正俊, 細胞チップを用いた細胞の機能解析および診断システムの開発、電気学会論文誌C、査読有、130, 2010, 1795-1799
DOI:10.1541/ieejieiss.130.1795

[学会発表] (計 8件)

- ① 山村昌平, 阿部佳織、八代聖基、片岡正俊、生活習慣病の診断用マイクロチップ、ヘルスケア・イノベーションフォーラム (HCIF) 第11回事例研究部会(招待講演)、2011/11/25、香川県
- ② Yamamura S, Yatsushiro S, Abe K, Baba Y, Kataoka M, Development of a cell microarray chip for detection of circulating tumor cells, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), 2011/11/18, 愛知県
- ③ Abe K, Yatsushiro S, Yamamura S, Tanaka M, Ooie T, Baba Y, Kataoka M, Quantitative analysis of serum interleukin-6 by immunoassay on microchip, The Asia-Pacific Interdisciplinary Research Conference 2011 (AP-IRC 2011), 2011/11/17, 愛知県
- ④ 山村昌平、各種疾患診断を目指した細胞チップの開発、第3回若手異分野連携体セミナー(招待講演)、2011/7/15、岡山県
- ⑤ 山村昌平、八代聖基、山口裕加、片岡正俊、細胞チップを用いた感染症迅速診断法の開発、日本化学会第91春季年会、2011/3/28、神奈川県
- ⑥ Yamamura S, Yatsushiro S, Yuka Yamaguchi, Kataoka M, Cell microarray chip for rapid and highly sensitive detection of malaria-infected erythrocytes, The 5th International Workshop on Approaches to Single-cell Analysis, 2011/3/4、東京都

- ⑦ Yatsushiro S, Yamamura S, Kataoka M, Rapid and highly sensitive detection system for malaria parasite with a cell microarray chip, The 3rd Stakeholders Meeting of the African Network for Drugs and Diagnostics Innovation (ANDI), 2010/10/11、Kenya(Nairobi)
- ⑧ 八代聖基、山村昌平、山口裕加、堀井俊宏、片岡正俊、細胞チップを用いたマalaria原虫迅速検出手法の構築、第51回日本生化学会中国四国支部会、2010/5/14、山口県

[その他]

ホームページ等

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山村 昌平 (YAMAMURA SHOHEI)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・
研究員

研究者番号：50432141