（報告様式４）

【課題管理番号】

平成 29 年 5 月 24 日

平 成 ２ ８ 年 度　委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事　業　名：（日本語）医療機器開発推進研究事業
（英　語）Medical equipment Development Promotion Research Project

研究開発課題名：（日本語）細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発
（英　語）Development of high-sensitive malaria diagnostic device using cell chip

研究開発担当者　（日本語）順天堂大学　医学部　教授　美田敏宏
所属 役職 氏名：（英　語）School of Medicine, Juntendo University, Professor, Toshihiro Mita

実　施　期　間：平成　28 年 4 月 1 日　～　平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：（日本語）超高感度マラリア診断装置開発に関わる医学的・疫学的研究
（英　語）Medical and epidemiological research for the development of high-sensitive malaria diagnostic device

研究開発分担者　（日本語）順天堂大学・医学部・熱帯医学寄生虫病学講座, 教授 美田 敏宏
所属 役職 氏名：（英　語）Department of Tropical Medicine and Parasitology,
Juntendo University School of Medicine,
Professor, Toshihiro MITA

II. 成果の概要（総括研究報告）

（和文）

WHO はアジア地域におけるマラリア排除を 2030 年までに達成することを目標としている。そのためには診断技術の向上、とりわけ顕微鏡では困難なレベルの超低感染率のマラリア原虫を診断する必要がある。本研究の目的は、超高感度かつ感染率の定量診断が可能なマラリア診断装置の開発である。本装置により誰でもワンタッチでマラリアの定量診断が可能となり、流行地におけるマラリア診断レベルを大きく向上させるとともに、マラリア排除の達成に大きく貢献する。

本装置の基本原理は、血球分離フィルターによる赤血球の分離→赤血球の単層配列→マラリア原虫の染色→蛍光検出による原虫の定量計測である。各ステップはこれまで個別におこなっていたが、染色までのステップをワンタッチで実施すべく CD 型診断デバイス及び CD 型蛍光測定装置の開発がほぼ完了した。

CD 型診断デバイスについては、9 検体/ディスク同時検出構造の開発を完了した。流路ディスクに練りこんだ蛍光体の濃度に関してフィールドでの検証を行い、最適濃度を決定した。さらに赤血球吸着率が 20%から 30%に改善され、1 検体当たり 200 万個以上の赤血球を測定できるようになった。これにより、貧血患者における安定した測定感度を得ることが可能になった。保存環境が良好でない地域での使用が前提となるため、長期保管性の向上に取り組んでいるが、凍結乾燥およびパッケージ技術により実現した＞6 ヶ月の室温保管性能を、さらにアウトガス低減により延長が可能であることを確認した。上記に加え、臨床研究における CD デバイス供給手段の確立を完了した。CD 型蛍光測定装置については、検査時間 10 分/検体、バッテリー駆動にて 5 時間以上の検査可能時間を実現した。さらに S/N 向上(2.5 倍)とヒートパイプ等を用いた防水・防塵構造の策定を完了した。また、熱帯マラリア原虫の正確な検出ができるように画像解析ソフトを最適化した。

これら改良機を用いたフィールドテストを実施、実検体でも赤血球分離と良好な染色が可能であること、ギムザ染色顕微鏡観察と本検出装置による感染率は、R2=0.97 と良好な相関性があることを確認した。また、算出された検出限界 0.0005%であった。さらに、三日熱マラリア原虫は末梢血中に成長したマラリアステージであるトロフォゾイド、シゾントが存在することを利用して、マラリア蛍光の大きさと輝度により、熱帯マラリアと三日熱マラリアとの識別可能性を得た。

マイクロチャンバー中での一細胞 PCR 系も合わせて開発した。オンチップ PCR による薬剤耐性診断に応用できる分子手法として、ごく少量の血液から解析可能となるマルチプレックス PCR 手法を開発した。さらに、我々が開発したミューテータマラリアを用いて、ピペラキンへの耐性候補遺伝子 X を同定した。本遺伝子のフィールドでの意義、および診断デバイスでの遺伝マーカーとしての応用可能性について現在検討中である。さらに、アルテミシニン耐性遺伝子 *Kelch13* の変異が出現する以前に、流行地では原虫遺伝子 Y の変異頻度が増加することを突き止めた。これは、本遺伝子変異がアルテミシニン耐性の早期分子マーカーとして利用できる可能性を示唆している。

（英文）

World health Organization has targeted the malaria elimination in Asia by 2030. To achieve this,

although it is indispensable to detect very low-level parasite infection, current malaria-diagnostic tools have not yet reached to this level. The aims of this research are to develop a new malaria diagnostic system featuring a super-high sensitivity and quantitative evaluation of parasite-infection rate. This system will enable everyone to perform quantitative diagnosis of malaria in a single operation, which enhances the malaria diagnosis performance at local area in malaria-endemic regions, which greatly contributes to achievement of malaria elimination.

This malaria-diagnosis system is comprised of three element devices: 1) a one-step filter device to separate erythrocytes, 2) a cell chip for quantifying Plasmodium parasites by monolayer formation of erythrocytes, and 3) a battery operated fluorescent detection device.

We completed the integration of a few components of the erythrocyte filter device into one compact disc, which can analyze nine samples simultaneously. We also optimized the concentration of fluorescent dye on the chip surface for stable operation. Improvement of erythrocyte pick-up rate from 20% to 30% makes it possible to measure more than two million erythrocytes per sample, which expand this machine's availability to anemia patients. We achieved a prolonged storage of disc more than six months by the introduction of dry-freeze technique and package with the reduction of outgas inside disc. Furthermore, we completed the disc-supply system for forthcoming clinical evaluation study. We have improved the fluorescence detector system, which realized the 10 minute per sample for diagnosis, battery operation more than 5 hours and increase in 2.5 times S/N. We completed the water- and dust-protective system by using a heat-pipe.

Field test in several malaria-endemic countries revealed that the latest equipment showed an excellent performance of erythrocyte recovery and enough staining for fluorescent diagnosis. We also confirmed the nealy complete concordance (R2=0.97) of parasite-infection rate determined by our developing system and Giemsa-staining. Detection limit of 0.0005% was obtained. In vivax malaria, developed parasite stages such as trohpzoite and schizont can be observed in peripheral blood. By using this phenomenon, we successfully obtained the clue for the differentiation between falciparum and vivax malaria through size and brightness of fluorescence.

We successfully developed a one-cell on-chip PCR system, which is performed inside micro-chamber. We also developed novel molecular detection methods for drug-resistant parasites that can be applied to by the developed on-chip PCR system. One is a multiplex PCR which can easily and quickly detect the artemisinin-resistant related genetic changes from a tiny amount of blood. Second is the identification of potential piperaquine-resistant marker X by the mutator-malaria system that we developed. We are now verifying the potential field applicability of this genetic change for the detection of piperaquine-resistance in our developing malaria-diagnosis system. Our large-scale analysis revealed that prevalence of particular allele in Y gene is likely to increase before the emergence of P. falciparum parasites harboring Kelch13 mutations in the field. This suggests that the allelic change in X gene may be used as useful molecular marker for the early discovery of the emergence of artemisinin resistance.

III. 成果の外部への発表

（1）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌　3　件、国際誌　14　件）

1. 美田敏宏. 蚊媒介感染症に関する最近の話題：マラリア. 臨床と微生物. 東京: 近代出版, 2017; 71-6.
2. 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. Absence of in vivo selection for K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda. Malar J 2017; 16: 23.
3. 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. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. Scientific reports 2016; 6: 30136.
4. Pongvongsa T, Nonaka D, Iwagami M, Nakatsu M, Phongmany P, Nishimoto F, Kobayashi J, Hongvanthon B, Brey PT, Moji K, Mita T, Kano S. Household clustering of asymptomatic malaria infections in Xepon district, Savannakhet province, Lao PDR. Malar J 2016; 15: 508.
5. Mita T, Tachibana S, Hashimoto M, Hirai M. Plasmodium falciparum kelch 13: a potential molecular marker for tackling artemisinin-resistant malaria parasites. Expert Rev Anti Infect Ther 2016; 14: 125-35.
6. Mita T, Culleton R, Takahashi N, Nakamura M, Tsukahara T, Hunja CW, Win ZZ, Htike WW, Marma AS, Dysoley L, Ndounga M, Dzodzomenyo M, Akhwale WS, Kobayashi J, Uemura H, Kaneko A, Hombhanje F, Ferreira MU, Bjorkman A, Endo H, Ohashi J. Little Polymorphism at the K13 Propeller Locus in Worldwide Plasmodium falciparum Populations Prior to the Introduction of Artemisinin Combination Therapies. Antimicrobial agents and chemotherapy 2016; 60: 3340-7.
7. Honma H, Niikura M, Kobayashi F, Horii T, Mita T, Endo H, Hirai M. Mutation tendency of mutator Plasmodium berghei with proofreading-deficient DNA polymerase delta. Scientific reports 2016; 6: 36971.
8. 美田敏宏. 特集未来への投資 マラリア撲滅へ 「薬剤耐性マラリア拡大の解明と対策」 国際人流. 東京: メジカルビュー社, 2015; 12-6.
9. 川合覚、丹羽孝介、川瀬三雄、美田敏宏. STH-PAS 法を活用したマラリア遺伝子診断ツールの開発. Clinical Parasitology 2015; 26: 86-9.

10. Tsukahara T, Ogura S, Sugahara T, Sekihara M, Furusawa T, Kondo N, Mita T, Endo H, Hombhanje F. The Choice of Healthcare Providers for Febrile Children after Introducing Non-professional Health Workers in a Malaria Endemic Area in Papua New Guinea. Front Public Health 2015; 3: 275.
11. Tanabe K, Zollner G, Vaughan JA, Sattabongkot J, Khuntirat B, Honma H, Mita T, Tsuboi T, Coleman R. Plasmodium falciparum: genetic diversity and complexity of infections in an isolated village in western Thailand. Parasitol Int 2015; 64: 260-6.
12. Murai K, Culleton R, Hisaoka T, Endo H, Mita T. Global distribution of polymorphisms associated with delayed Plasmodium falciparum parasite clearance following artemisinin treatment: genotyping of archive blood samples. Parasitol Int 2015; 64: 267-73.
13. Mita T, Jombart T. Patterns and dynamics of genetic diversity in Plasmodium falciparum: what past human migrations tell us about malaria. Parasitol Int 2015; 64: 238-43.
14. Mita T. Current Research Topics in Tropical Diseases; Towards Successful Control and Elimination. Juntendo Medical Journal 2015; 61: 358-9.
15. Hirai M, Mita T. Challenging Malaria Control. Juntendo Medical Journal 2015; 61: 370-7.
16. Mita T, Ohashi J, Venkatesan M, Marma AS, Nakamura M, Plowe CV, Tanabe K. Ordered accumulation of mutations conferring resistance to sulfadoxine-pyrimethamine in the Plasmodium falciparum parasite. J Infect Dis 2014; 209: 130-9.
17. Honma H, Hirai M, Nakamura S, Hakimi H, Kawazu S, Palacpac NM, Hisaeda H, Matsuoka H, Kawai S, Endo H, Yasunaga T, Ohashi J, Mita T, Horii T, Furusawa M, Tanabe K. Generation of rodent malaria parasites with a high mutation rate by destructing proofreading activity of DNA polymerase delta. DNA research: an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes 2014; 21: 439-46.

（2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum isolates with ex-vivo ring-stage survival assay in Uganda. ポスター. Mita T, Ikeda M, Kaneko M, Balikagala B, Tachibana S-I, Sakurai-Yatsushiro M, Yatsushiro S, Takahashi N, Hashimoto M, Katuro O, Olia A, Obwoya P, Auma M, Anywar D, Odongo-Aginya E, Hirai M, Palacpac N, Kataoka M, Tsuboi T, Kimura E, Horii T. Keystone Symposia Conference: Malaria: From Innovation to Eradication. Speke Resort & Conference Centre, Kampala. February 19 - February 23. 2017. 国外
2. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria. ポスター. Kataoka M, Yatsushiro S, Yamamoto T, Oka H, Okello-Onen J, Odongo-Aginya E, Palacpac N, Mita T, Baba Y, Horii T. Keystone Symposia Conference: Malaria: From Innovation to Eradication. Speke Resort & Conference Centre, Kampala. February 19 - February 23. 2017. 国外

3. Epidemiology of antimalarial drug resistance in Papua New Guinea. 口頭. 関原誠, 橘真一郎, 美田敏宏. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 北海道大学、札幌. 5 月 27-29 日. 2017. 国内
4. 宿主内競争による熱帯熱マラリア原虫のクロロキン感受性の回復. 口頭. 橘真一郎, 池田美恵, Balikagala B, 櫻井美樹, 八代聖基, 関原誠, 山内祐人, Auma MA, 平井誠, 森稔幸, Palacpac N, 片岡正俊, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 北海道大学、札幌. 5 月 27-29 日. 2017. 国内
5. ウガンダにおける熱帯熱マラリア原虫キニーネ感受性の実態. 口頭. 山内祐人, 橘真一郎, 池田美恵, 関原誠, Balikagala B, 八代-櫻井美樹, 平井誠, Palacpac N, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 北海道大学、札幌. 5 月 27-29 日. 2017. 国内
6. ネズミマラリア原虫の有性生殖関連分子の機能解析. 口頭. 前多晟壮, 森稔幸, 平井誠, 美田敏宏. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 北海道大学、札幌. 5 月 27-29 日. 2017. 国内
7. ウガンダにおける in vivo 薬剤耐性試験および RSA を用いたアルテミシニン耐性疫学調査. 口頭. 池田美恵, 橘真一郎, 山内祐人, Auma M, 関原誠, 森稔幸, 平井誠, Palacpac N, 木村英作, Aginya E, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 86 回日本寄生虫学会大会. 北海道大学、札幌. 5 月 27-29 日. 2017. 国内
8. Absence of in-vivo selection of K13 mutant after Artemether plus Lumefantorine treatment in Uganda. ポスター. Balikagala B, Sakurai M, Ikeda M, Yatsushiro S, Takahashi N, Auma M, Ntege E, Ito D, Takashima E, Palacpac N, Okello JO, Kataoka M, Eisaku K, Horii T, Mita T, Tsuboi T. ASTMH 65th Annual Meeting. Atlanta Marriott Marquis and Hilton Atlanta, Atlanta. November 13-17. 2016. 国外
9. Detection of artemisinin-resistant Plasmodium falciparum isolates using novel ex-vivo assay in Uganda. 口頭. Mita T. TICAD VI Pre-event; The 3rd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan. - Life Innovation and Green Innovation. JICA Ichigaya Building, Tokyo July 13. 2016. 国内
10. 全世界の熱帯熱マラリア原虫株を用いたアルテミシニン耐性進化の集団遺伝学的解析. 口頭. 橘真一郎, 平井誠, 美田敏宏. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎市民プラザ、宮崎. 3 月 18 日～22 日. 2016. 国内
11. アフリカ大陸におけるアルテミシニン耐性マラリアの出現. 口頭. 池田美恵, 金子恵, 橘真一郎, Balikagala B, 櫻井美樹, 八代聖基, 橋本宗明, Olia A, Anywar D, Auma M, Palacpac N, 平井誠, 片岡正俊, 木村英作, Emmanuel A, 坪井敬文, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎市民プラザ、宮崎. 3 月 18 日～22 日. 2016. 国内
12. 新規 ex-vivo 薬剤耐性検出法を用いた高度感染地域におけるアルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫の検出. 口頭. 美田敏宏. 第 15 回分子寄生虫マラリア研究フォーラム. 帯広畜産大学、帯広. 8 月 22 日. 2016. 国内
13. 細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発. 口頭. 美田敏宏. 革新的医療技術創出拠点プロジェクト・プロジェクト連携シンポジウム. 国立研究開発法人日本医療研究開発機構・読売ビル、東京. 1 月 28 日. 2016. 国内
14. 細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発. 口頭. 美田敏宏. 臨床研究情報センターセミナー. 先端医療振興財団・臨床研究情報センター、神戸. 5 月 24 日. 2016. 国内

15. ミューテーターマラリア原虫ライブラリーから薬剤耐性原虫の単離. 口頭. 平井誠, 池田美恵, 橘真一郎, 美田敏宏. 第 85 回日本寄生虫学会大会. 宮崎市民プラザ、宮崎. 3 月 18 日～22 日. 2016. 国内
16. Baseline polymorphisms of artemisinin-resistant marker, Pfkelch13-propeller, in geographically widespread Plasmodium falciparum parasite populations: genotyping of archive blood samples. 口頭. Mita T. Scientific Workshop to Explore e-ASIA Research Collaboration Opportunities Focused on Emerging Infectious Disease and Cancer Priorities in South East Asia and the Pacific Rim. Inya Lake Hotel, Yangon, Myanmar. August 13-14. 2015. 国外
17. ウガンダにおける Ring Stage Survival Assay を用いたアルテミシニン感受性低下熱帯熱マラリア原虫のスクリーニング. 口頭. 金子恵, 池田美恵, Balikagala B, 櫻井美樹, 矢代聖基, 加納永将, 佐伯亜美, Palacpac N, 片岡正俊, 坪井敬文, 木村英作, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 84 回日本寄生虫学大会. 杏林大学、東京. 3 月 21 日～22 日. 2015. 国内
18. マラリアミューテーターを用いたピペラキン耐性原虫の迅速単離と耐性機構の解明. 口頭. 池田美恵, 平井誠, 美田敏宏. 第 84 回日本寄生虫学大会. 杏林大学、東京. 3 月 21 日～22 日. 2015. 国内
19. ウガンダにおけるマラリア対策を見据えた包括的熱帯熱マラリア薬剤耐性研究. 口頭. 美田敏宏. 第 56 回日本熱帯医学会大会・サテライトシンポジウム. 大阪大学, 大阪. 12 月 4 日. 2015. 国内
20. 臨床医から熱帯医学への転身：薬が効かないマラリアをどう制圧するか. 口頭. 美田敏宏. 肝細胞研究ジャーナルクラブ 第 110 回記念特別講演会. 東京慈恵会医科大学、東京. 12 月 19 日. 2015. 国内
21. アルテミシニン耐性熱帯熱マラリア原虫出現以前の大規模検体を用いた耐性候補遺伝子 K13-propeller のベースライン多型解析. 口頭. 美田敏宏, 高橋延之, 遠藤弘良, 大橋順. 第 84 回日本寄生虫学大会. 杏林大学、東京. 3 月 21 日～22 日. 2015. 国内
22. 高頻度突然変異マラリア原虫を活用した薬剤耐性機構解明への挑戦. 口頭. 平井誠, 池田美恵, 橘真一郎, 美田敏宏. 第 75 回日本寄生虫学会東日本支部大会. LEN 貸会議室御茶ノ水ニコライ堂前、東京. 9 月 26 日. 2015. 国内
23. ウガンダにおける ex vivo 薬剤感受性試験を用いた熱帯熱マラリア原虫のクロロキン感受性の回復. 口頭. 櫻井美樹, Balikagala B, 矢代聖基, 池田美恵, Ntege E, 佐伯亜美, 本間一, Palacpac N, 片岡正俊, 坪井敬文, 木村英作, 遠藤弘良, 堀井俊宏, 美田敏宏. 第 84 回日本寄生虫学大会. 杏林大学、東京. 3 月 21 日～22 日. 2015. 国内
24. Worldwide distribution of polymorphisms associated with delayed clearance of malaria parasites following artemisinin-based combination therapy. 口頭. Mita T, Sakurai M, Yatsushiro S, Kataoka M, Horii T. SASA Annual Scientific Conference. Kampala, Uganda. May 6-10. 2014. 国外
25. Development of cell microarray chip for rapid and high sensitive malaria diagnosis: Experimental study of cell microarray chip diagnosis system in Uganda. 口頭. Kataoka M, Yamamura S, Abe K, Obana E, Mita T, Sakurai M, Horii T. SASA Annual Scientific Conference. Kampala, Uganda. May 6-10. 2014. 国外

26. 熱帯熱マラリア原虫に対するアルテミシニンの治療遅延に関連する新規 SNPs の世界的分布. 口頭. 村井謙治, ジン・ゼィヤー・ウィン, 内藤俊夫, 礒沼弘, 久岡英彦, 遠藤弘良, リチャード・カレトン, 美田敏宏. 第 83 回日本寄生虫学会. 愛媛大学. 3 月 29 日. 2014. 国内
27. マラリア原虫の薬剤耐性から進化を考察する. 口頭. 美田敏宏. 第 85 回日本動物学会. 東北大学. 9 月 12 日. 2014. 国内
28. マイクロサテライトを用いた熱帯熱マラリア原虫集団の近交係数の推定. 口頭. 美田敏宏, 塚原高広, Hombhanje F, 遠藤弘良, 大橋順. 第 83 回日本寄生虫学会. 愛媛大学. 3 月 29 日. 2014. 国内

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. マラリアの脅威とそれに立ち向かう新規技術の開発（招待講演・市民講座）, 美田敏宏, 第 57 回日本熱帯医学会総会市民講座「蚊がもたらす感染症から身を守る」, 一橋大学一橋講堂 東京, 11 月 6 日 2016, 国内.
2. 研究医が語る寄生虫の不思議とその制圧（講演・市民講座）, 美田敏宏, 高校生のための夏休み医学教室：研究医とのサイエンストーク, 順天堂大学 本郷お茶の水キャンパス, 7 月 26 日 2016, 国内.
3. 細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発(招待~~講演),~~ 美田敏宏, 臨床研究情報センターセミナー, 先端医療振興財団・臨床研究情報センター 神戸, 5 月 24 日 2016, 国内.
4. 美田敏宏. 寄生虫感染症について：薬剤耐性マラリア. 第 3 回日本微生物学連盟市民公開フォーラム. 東京、東京大学 4 月 26 日 2014, 国内.

（4）特許出願

（報告様式４）

【課題管理番号：16hk0102007h0103】

平成　29 年 5 月 29 日

平 成 28 年 度　委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事　業　名：（日本語）医療機器開発推進研究事業

（英　語）Medical equipment Development Promotion Research Project

研究開発課題名：（日本語）細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置の開発

（英　語）Development of high-sensitive malaria diagnosis device using a cell microarray chip system

研究開発担当者　（日本語）パナソニック株式会社 オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社　技術本部 センシングソリューション開発センター　生体センシング開発部　部長　岡弘章

所属 役職 氏名：（英　語）Automotive & Industrial Systems Company, Engineering Division, Sensing Solution Development Center, Biological Sensing Department, General Manager, Hiroaki Oka

実 施 期 間：平成　28 年 4 月 1 日　～　平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：（日本語）血球分離フィルターおよび蛍光測定装置の開発

（英　語）Development of blood cell separation filter and fluorescence measurement system

研究開発分担者　（日本語）パナソニック株式会社 オートモーティブ&インダストリアルシステムズ社　技術本部 センシングソリューション開発センター　生体センシング開発部　部長　岡弘章

所属 役職 氏名：（英　語）Automotive & Industrial Systems Company, Engineering Division, Sensing Solution Development Center, Biological Sensing Department, General Manager, Hiroaki Oka

II. 成果の概要（総括研究報告）

研究開発代表者：順天堂大学　医学部　美田敏宏　総括研究報告を参照。

III. 成果の外部への発表

（１）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌　0 件、国際誌 1 件）

1. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. Shouki Y, Takeki Y. Scientific Reports. 2016, 6, 30136

（2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. マラリア診断システム，展示，岡　弘章，山本　健樹，TICAD（アフリカ開発会議）Ⅵ　公式サイドイベント　ジャパンフェア，ナイロビ（ケニア），2016/8/26-8/28，国外

（3）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

特になし

（4）特許出願

特許出願番号の公開を希望しない

（報告様式４）

【課題管理番号】

2017 年 5 月 31 日

平 成 28 年 度　委 託 研 究 開 発 成 果 報 告 書

I. 基本情報

事　業　名：（日本語）医療機器開発推進研究事業
（英　語）Medical Equipment Development Promotion Research Project

研究開発課題名：（日本語）細胞チップを応用した超高感度マラリア診断装置開発
（英　語）Development of high-sensitive malaria diagnosis device using cell microarray chip

研究開発担当者　（日本語）順天堂大学　医学部　教授　美田敏宏
所属 役職 氏名：（英　語）School of Medicine, Juntendo University, Professor, Toshihiro Mita

実 施 期 間：平成 26 年 4 月 1 日　～　平成 29 年 3 月 31 日

分担研究開発課題名：（日本語）高感度マラリア検出技術の評価、細胞チップの改良、オンチップ PCR 法の構築
（英　語）Development of a cell microarray chip system for high sensitive detection of malaria-infected erythrocyte and on chip PCR for DNA analysis.

研究開発分担者　（日本語）国立研究開発法人　産業技術総合研究所
研究グループ長
片岡正俊
所属 役職 氏名：（英　語）National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST)
Group Leader
Masatoshi Kataoka

II. 成果の概要（総括研究報告）

1. 細胞チップを用いたマラリア原虫検出系の構築

超高感度・迅速なマラリア原虫検出デバイス開発を目指して、細胞チップを基盤技術とする赤血球単層配列と蛍光核染色によるマラリア原虫定量検出法のウガンダ共和国における実証試験を行った。細胞チップはポリスチレン製で、直径 105 μm、深さ 50 μm のマイクロチャンバーを

20,944 個アレイ状に配列している（図１）。

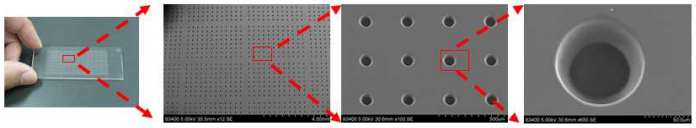


図1. ポリスチレン製細胞チップ：直径105 μm、深さ 50 μmのマイクロチャンバーを20,944個アレイ状に配列.

アフリカなどマラリア流行地域でのインフラ事情を考慮して、遠心分離に依存しない SiO_2 ナノファイバーを用いたプッシュカラム式の赤血球回収システムによる赤血球回収と白血球の除去（図２）、さらに市販で高価な DNA マイクロアレイスキャナーを用いた蛍光検出に代わり CCD カメラによる蛍光陽性マラリア原虫核の検出と解析ソフトをパナソニック株式会社が開発し、患者血液を用いてプロトタイプとしての診断システムを構築した（図３）。患者血液の解析結果から、既存マラリア診断法のゴールドスタンダードである赤血球ギムザ染色の光学顕微鏡観察法と比較して、正確かつ高感度なマラリア原虫の定量検出が可能となった（図４）。マラリア診断法として、赤血球単層配列とマラリア原虫核を標的とする蛍光検出法の有用性を確認した(Sci Rep 6:30136)。

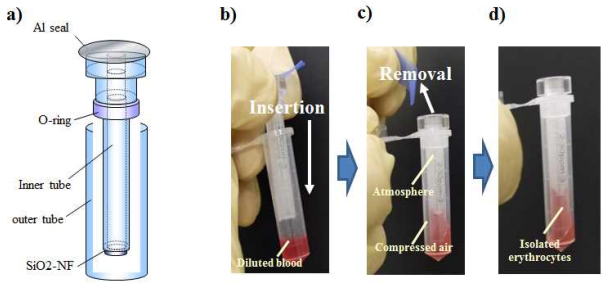


図2. 赤血球分離用プッシュカラム(a)。外筒中の希釈全血に内筒を挿入(b, c)、SiO_2ナノファイバーにより赤血球が内筒部に回収される(d)。

2. フィールド使用に適したマラリア診断デバイス開発

上記で有用性が確認された赤血球単層配列と蛍光核染色によるマラリア原虫の検出技術を基盤として、パナソニック社が CD 型診断デバイスと蛍光検出機と解析ソフトの開発による製品化を進めた。フィールド使用を考慮して、赤血球分離用 SiO_2 ナノファイバーの CD 型デバイスへの埋め込みなど、全血 2.0 μl を CD 型デバイスへ添加以降は全自動での解析が可能になった。CD 型デバイスでの解析と同時に、同一血液を用いて赤血球ギムザ染色の光学顕微鏡観察によるマラリア原虫感染率を算出し比較検討したところ正確かつ高感度な検出が確認された(Y=0.9226X－0.0012, R^2=0.97)。

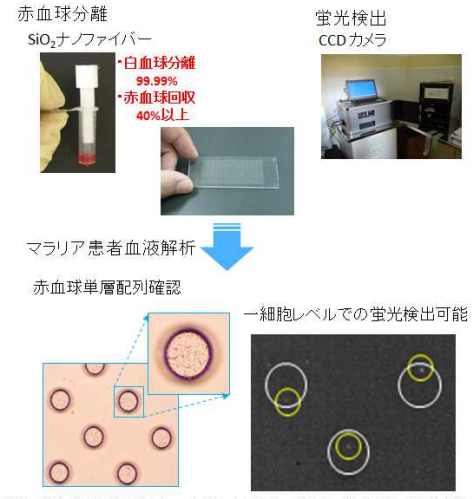


図3. 赤血球分離用プッシュカラムとCCDカメラによるマラリア患者血液解析。患者血液から赤血球単層配列が確認され、一細胞レベルでのマラリア原虫感染赤血球が検出可能(黄色)。

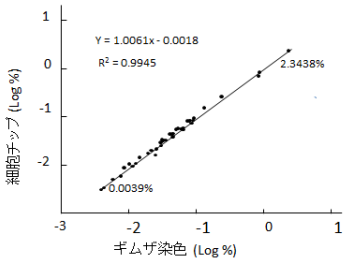


図4. 細胞チップ法と赤血球ギムザ染色法によるマラリア原虫感染率の相関

3. 種の同定など遺伝子解析可能なマラリア診断デバイス開発

感染マラリア原虫種の同定などを診断ディスクで同時に判定するため、マイクロチャンバーを用いたマイクロ空間での遺伝子解析系の構築を行った。そのため、まず一個のマラリア原虫感染赤血球から目的の遺伝子増幅が可能かについて検討した。培養マラリア系を用いて、直径 105 μm、深さ 50 μm のマイクロチャンバーに単層配列した 130 個の赤血球中に存在する熱帯熱マラリア原虫感染赤血球を蛍光核染色液に染色後、蛍光顕微鏡にて位置特定化を行いマイクロキャピラリーで回収した。赤血球回収後、既存 Nested PCR 法で熱帯熱マラリア原虫遺伝子の増幅を行ったところ、同原虫遺伝子の増幅を確認され一細胞からのマラリア同定が可能になり、診断ディスクでの超高感度マラリア原虫検出と一細胞からの遺伝子解析への応用性の高さが示された（論文投稿準備中）。

III. 成果の外部への発表

（1）学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌　　件、国際誌　6　件）

1. Balikagala B, Mita T, Ikeda M, Sakurai M, Yatsushiro S, Takahashi N, Tachibana S, Auma-Alai S, Ntege EH, Ito D, Takashima E, Palacpac NM, Egwang T, Okello-Onen J, Kataoka M, Kimura E, Horii T, Tsuboi T. Absence of *in vivo* selection of K13 mutations after artemether-lumefantrine treatment in Uganda. Malaria Journal. 2017, 16: 23.
2. 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. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda. Scientific Reports. 2016, 6: 30136.
3. Tawa K, Yamamura S, Sasagawa C, Shibata I, Kataoka M. Sensitive detection of cell surface membrane proteins in living breast cancer cells. ACS Applied Materials & Interfaces. 2016, 8: 29893-29898.
4. Goya K, Yamachosi Y, Fuchiwaki Y, Tanaka M, Ooie T, Kataoka M, Abe K. Femtosecond laser direst fabrication of micro-grooved textures on a capillary flow immunoassay microchip for spatially-selected antibody immobilization. Sensors and Actuators B-Chemical. 2016, 269: 1275-1281.
5. 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. Prognostic impact of circulating tumor cell detected using a novel fluidic cell microarray chip system in patients with breast cancer. EBioMedicine. 2016, 11: 173-182.
6. Fuchiwaki Y, Tanaka M, Abe K, Kataoka M, Ooie T. Microfluidic sandwich ELISA utilizing a concave microchannel surface generated by nanosecond laser ablation. Sensors and Materials. 2015, 27: 847-857.

（2）学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria. Poster. Kataoka M, Yatsushiro S, Yamamoto T, Oka H, Okello-Onen J, Odongo-Aginia EI, Palacpac NM, Mita T, Baba Y, Horii T. 2017 Keystone Symposia Conference, Kampala, Uganda. 2017/02/21. 国外
2. Accurate detection of circulating tumor cells using cell microarray chip. Oral. Yamamura S, Hashimoto Y, Hayashi N, Yamada E, Yatsushiro S, Baba Y, Kataoka M. International conference on single-cell research 2016. Tokyo, Japan. 2016/11/17. 国内
3. High-throughput screening and analysis for circulating tumor cells using a cell microarray chip. Oral. Yamamura S, Hashimoto Y, Yatsushiro S, Baba Y, Kataoka M. Biosensors 2016. Gothenburg, Sweden. 2016/05/28.国外
4. Rapid and high sensitive malaria diagnosis. Yamamura S, Yatsushiro S, Horii T, Kataoka M. Oral. 2nd International Symposium for the Promotion of Science and Technology Innovation Cooperation between Africa and Japan. Nairobi, Kenya. 2016/01/14. 国外

（３）「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

（４）特許出願