

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

マラリアの制圧のためには、正確・高感度・迅速かつ易操作な診断方法の開発が必須である。我々はこれらを可能にし得るマイクロチップ技術を応用したデバイスを開発し、実際にマラリア流行地でその有用性を示すことができた。マラリア原虫を検出するためのマイクロチップ（細胞チップと呼ぶ）には約2万個のマイクロチャンバーが並ぶ。患者の血液から白血球を除去後、細胞チップ上で静置することで、200万個以上の赤血球がマイクロチャンバー内で単層に並び、蛍光核酸染色試薬および蛍光検出機を用いることで、マラリア原虫の高感度検出および感染率の算出が短時間で可能になった。

キーワード：マラリア、診断、フィールドワーク、マイクロチップ、高感度検出

Development of a cell microarray chip system for early and accurate malaria diagnosis

—Finding one parasite in 2 million erythrocytes for elimination of malaria—

Muneaki HASHIMOTO*, Shouki YATSUSHIRO, Shohei YAMAMURA and Masatoshi KATAOKA

Early and accurate diagnosis of malaria is needed to prevent the spread of this parasite. To this end, we developed a novel microarray chip system for the detection of malaria, and evaluated it in Africa. A chip with approximately 20,000 microchambers was developed to detect malaria parasites (hereafter called a cell chip). Leukocytes were removed by filtration columns from whole blood cells. An erythrocyte suspension containing fluorescent nuclear staining dye was dispersed onto the cell chip surface and washed, creating an erythrocyte monolayer in each microchamber that contains more than 2 million erythrocytes. Malaria parasite-infected erythrocytes are then detected using a fluorescence detector. Accurate and rapid detection of the parasites with high sensitivity was achieved by the developed system.

Keywords: Malaria, diagnosis, cell microarray chip, field work

1 研究背景

マラリアはハマダラカが媒介する感染症であり、世界三大感染症の一つである。年間約2億人が感染し、43万人が亡くなっている。マラリアを制圧する世界的な戦略として、迅速かつ正確な診断法の開発が重要な課題の一つとして挙げられている^[1]。マラリア診断は血液薄層ギムザ染色標本の顕微鏡観察（ギムザ染色法）により100年以上前から行われており、ゴールドスタンダードになっている。この方法はマラリアの検出だけでなく、感染率（重症度）も診断することができることから、優れた方法であり、以下のステップで行われる。(1) 患者血液を一滴採取、(2) スライドガラス上で血液薄層標本を作製、(3) 薄層標本をギムザ液で染色する、(4) 染色された赤血球内に寄生するマラリア原虫を顕微鏡観察する。しかし、この方法は熟練した技術者がいないと正確な診断はできず、通常数千個か

ら数万個の赤血球を観察しなければならないため時間もかかり（通常30分～1時間程度）、非常に大変な作業である。したがって、これまでのゴールドスタンダードの方法では迅速診断は難しく、また感染率が低い患者の早期診断は不可能である。

現在発展途上の医療現場ではイムノクロマト法を原理としたRDT (rapid diagnosis test) が迅速(20分)かつ易操作で行うことができ、普及している。しかし、RDTの検出感度はギムザ染色標本の解析と同等であり、擬陽性や偽陰性も多く、ギムザ染色法による確定診断のための、事前のスクリーニング手法として補助的に用いられている。また、RDTは感染率を算出できない（すなわち感染の有無だけの診断）ということも欠点の一つである。最近では、フローサイトメーター法やPCR (polymerase chain reaction) 法を応用した新しい診断法が開発されているが、

産業技術総合研究所 健康工学研究部門 〒761-0301 高松市林町 2217-14
Health Research Institute, AIST 2217-14 Hayashi-cho, Takamatsu 761-0301, Japan * E-mail: muneaki-hashimoto@aist.go.jp

Original manuscript received February 3, 2017, Revisions received February 21, 2017, Accepted February 21, 2017

表1 マラリア診断法の比較

| | ギムザ染色法 | 迅速診断法 (RDT) | PCR 法 | フローサイトメーター法 | 細胞チップ |
|------|--------|-------------|----------|-------------|-----------|
| 検出感度 | 0.01 % | 0.01 % | 0.0005 % | 0.0005 % | 0.00005 % |
| 検出時間 | 60 分 | 20 分 | 6 時間 | 5 分 | 15 分 |
| 難易度 | 超高度 | 易しい | 高度 | 易しい | 易しい |
| 費用* | 低 | 中 | 高 | 超高 | 中～高 |

*人件費を含まない

早期診断には感度が不十分であり、結果を得るまでに数時間かかるなどの問題点がある^{[2]、[6]}。マラリアの早期発見による感染阻止を可能にするためには、高感度・正確・迅速かつ易操作な新たな診断法の開発が求められている。各診断法の特徴を表1に示した。

我々は個々の細胞をハイスループットかつ超高感度・簡便に解析を行うためにマイクロチップ技術に注目し、研究を行っている^{[7]–[10]}。この論文では、この技術を応用し、実際にマラリア流行地でも高感度で診断可能なデバイス開発に至る「シナリオ」をご紹介したい(図1)。

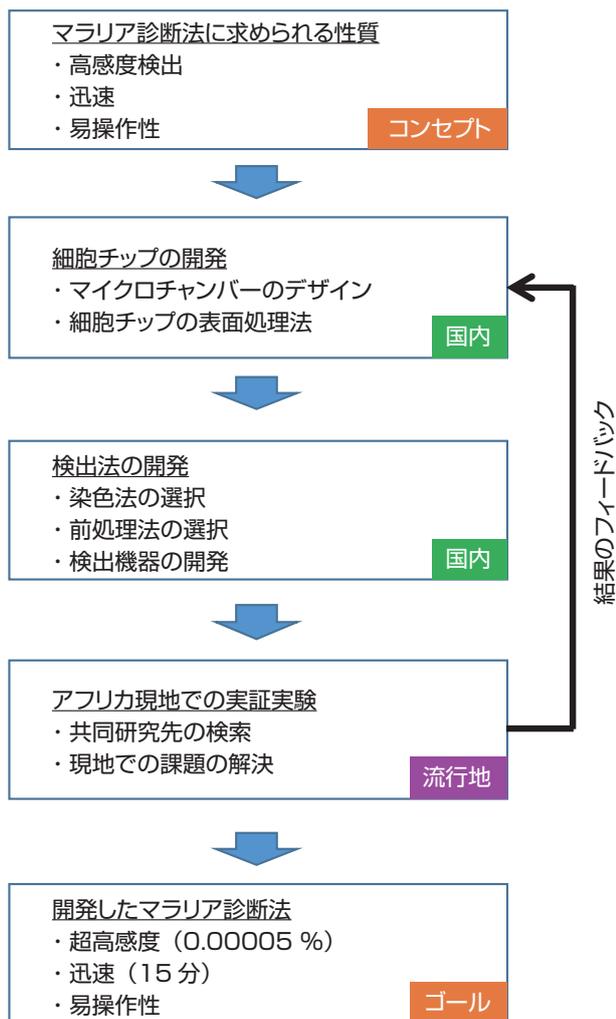


図1 この研究の進め方(シナリオ)のフローチャート

2 マラリア診断を目的とした細胞チップの開発

マラリアの診断法の開発を始めるにあたり、発展途上国の医療現場における診断およびその後の効果的な治療を進めるために、感染の有無だけでなくマラリアの重症度を示す感染率(患者赤血球の何%が原虫に感染しているか)の測定が必須であると考えた。なぜなら、早期診断が遅れる可能性、また、それを防ぐために発熱等の症状だけで薬を処方してしまうと、薬剤耐性原虫の出現のリスクを高めてしまうからである。そのことから、感染の有無のみを検出するPCR法やイムノクロマト法等の既存の方法の改良という選択はしなかった。すなわち、PCR法やイムノクロマト法は擬陽性偽陰性の問題もあり、ギムザ染色法がゴールドスタンダードと言われ、最も汎用されている現状、並びに正確性の高さを考慮すると、原虫の数を数える方法がよいと考えた。既存法の中で細胞の数を数える方法としては、フローサイトメーター法があり、これを用いれば感染率の算出は可能である。しかし、測定精度を上げるためには測定細胞数を多く解析する必要があり、数百万の赤血球に一匹の原虫といった低感染率を検出しようとする、100以上の原虫数のカウントが必要となる(参考: https://www.bc-cytometry.com/FCM/immunologyFCM_02.html)。そのため先に述べた数百万個に1個という割合を加味すると1億個以上の赤血球をカウントすることを意味することから、検出時間が長くなり、迅速な診断法にはなりえないと考えた。さらに、将来的にアフリカ等の発展途上国で用いる、あるいは販売するとなると、高額すぎて現実的ではない。そのような中で我々の研究グループはMEMSやμTAS等の分野で用いられる微細加工技術を応用し、プラスチック製の基板の上に種々の細胞をマイクロアレイ上に一個ずつ並べる技術を赤血球に応用し、できるだけ多くの赤血球を単層に並べ、そこからマラリア原虫が感染した赤血球を探し出し、感染率を算出しようと考えた。

詳細は後述するが、核を蛍光染色したマラリア原虫感染赤血球を細胞チップ上に静置すると、赤血球がマイクロチャンバー内で単層に並び、そこから原虫のみを検出することが可能である。PCR法と同程度あるいはそれ以上の検出感度を目標として、約2万個のマイクロチャンバーを有する

ポリスチレン製の細胞チップを作製し、使用することを考えた。細胞チップの最適化に関しては、感染率を求めようから、測定対象となる細胞数を一定に制御するというのが大前提であった。フローサイトメーター法のように細胞を流しながら検出機器で赤血球を数えることによって測定対象細胞数を求めるようなデザインもあるが、我々が目指したのは数えなくても迅速かつ正確に細胞数を一定に制御すること、さらに言えば、新たなデザインによって、これまでの細胞生物学的ハンドリング技術を発展させて、個々の細胞を一定数ずつ正確に配列することであった。煩雑な操作がなく、一定数の細胞を配列できる可能性のある細胞チップのデザインを考案したときは、この方法は画期的なものになると直感した。色々と共同研究者と議論を重ね、マイクロチャンバーの直径と深さをコントロールすることで、細胞を各マイクロチャンバーに単層かつ複数個並べることが可能ではないかと考えた。また、マイクロチャンバーの直径は、100 個程度の赤血球を並べるのが最適ではないかと考えたが、これはチャンバー内に 1 個の原虫が存在すれば感染率 1 %となること、また、その後の、薬剤耐性試験等の培養や反応に使いやすくすることを考慮したためである。すなわち、従来の方法で薬剤耐性試験を行うには、血液全体を対象にする必要があったが、この細胞チップでは感染が見つかったチャンバー中の細胞だけを対象とすればよい点が大きな特長であり、細胞数も 100 個程度であれば、試験を行ううえでも問題が少ないと考えたためである。上記のことや赤血球のサイズを考慮し直径は 105 μm とした。また、

PCR 法と同等以上の検出感度を目指していたことから必要なマイクロチャンバーの数を決定した。最終的にデザインした細胞チップは 20,994 のマイクロチャンバーを有しており、各チャンバーは直径 105 μm 、深さ 50 μm である (図 2)。

マイクロチャンバー内で赤血球が積み重なると感染赤血球を見落とす可能性があるため、顕微鏡やマイクロアレイスキャナーでの解析を可能にするためには単層に並べる必要があった。赤血球を細胞チップ上に 10 分間静置すると、重力で赤血球はチャンバー内に堆積する。しかし、細胞チップ表面を緩やかに生理食塩水等で洗浄すると、チャンバー底面に吸着した最下層の赤血球のみが残り、他のものは洗い流されて赤血球の単層化が可能であることを見出した (図 3)。各チャンバーに入る赤血球数は 130 ± 6 個とほぼ一定であり、赤血球を数えなくても一定に制御できるようになった。この細胞チップは約 270 万個の赤血球を一度に解析することができ、PCR 法と同等以上の検出感度が得られることとなった。

簡単な操作で赤血球を単層に並べることができるマイクロチャンバーの設計はさまざまな形状 (直径の大きさや深さ等) のものを試行錯誤することによって行った。最近、コンピューターシミュレーションによるマイクロチャンバー内の液の流れがシミュレートされ、下層から 10 μm はほとんど流れが起こらないことが示された^[7]。これにより最下層の赤血球のみが洗浄操作でも洗い流されないことが理論的に裏付けされた。今後は異なるサイズのマイクロチャンバーの設計や最適化にこのシミュレーション技術が大きく役に

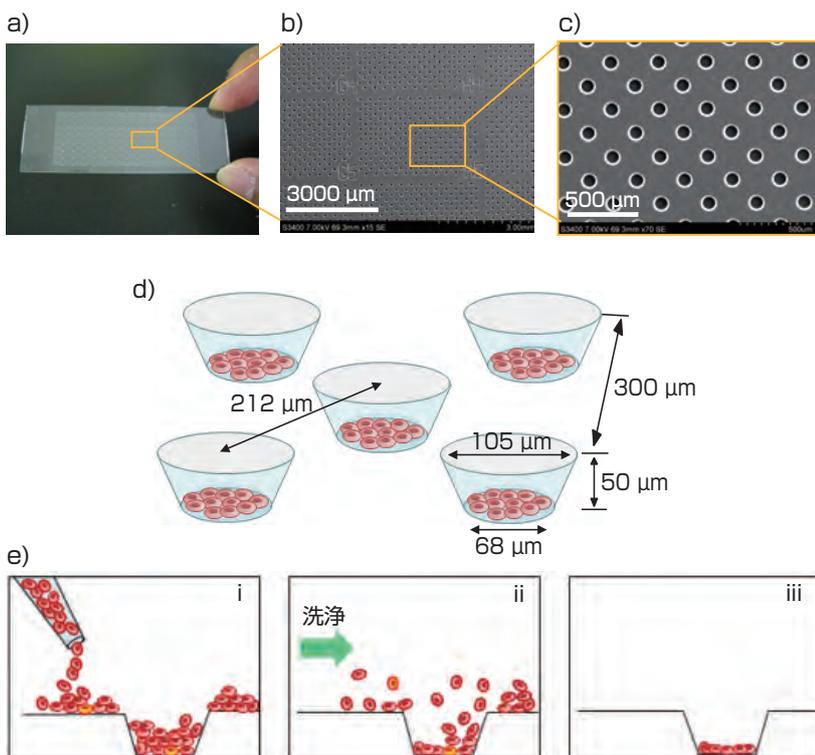


図 2 細胞チップの構造とマイクロチャンバー内での赤血球の単層化^[8]

(a) 細胞チップの大きさはスライドガラスとほぼ同じである。(b, c) 細胞チップの SEM 像。細胞チップはポリスチレン製で、20,944 のマイクロチャンバーを有する。細胞チップは 187 のマイクロチャンバーからなるクラスターが 112 (14×8) 並んで形成される。(d) マイクロチャンバーは直径 105 μm 、深さ 50 μm 、チャンバー間が 300 μm 離れて配置されている。チャンバーの底面は直径 68 μm であり、チャンバーは円錐状になっている。この形状は赤血球を単層化するのに適している。(e) マイクロチャンバー内で赤血球が単層化する過程を示す。(i) 赤血球を細胞チップ上に静置、(ii) 不要な重層した赤血球を除く、(iii) 赤血球が単層化する。

立つと考えている。さらにマイクロチャンバー内で赤血球を単層に並べるうえで重要なのは細胞チップ表面の酸素プラズマ処理による親水化処理である。この処理により赤血球のチャンバー底面への接着力が増し、単層形成を制御しやすくなる。プラスチック基板の親水化は山村の専門であり、このプロジェクトを始める前から、種々の細胞に最適化された親水化処理を行ってきた。そのお陰もあり、赤血球に対しても順調に最適化を行うことが可能であった。

3 細胞チップ上のマラリア原虫を検出する方法の開発

細胞チップの開発によって赤血球を単層に並べ、容易に測定対象細胞数を一定に制御することが可能になった。次に、細胞チップに適した原虫の検出法を検討した。原虫の検出法としては、操作をできるだけシンプルにというのが基本的なコンセプトである。このため、界面活性剤等による膜透過性の付与や数回の洗浄操作を必要とする方法、すなわち原虫を特異的に認識する抗体を使用する方法は望ましくなかった。我々は赤血球には核がなく、マラリア原虫は赤血球のみに寄生する病原体である性質を利用することを考えた。すなわち、核の有無の指標となる核酸(DNA)を蛍光試薬で染色し、蛍光シグナルを有する赤血球を感染赤血球として検出することにした。

上記の検出法のコンセプトは、できるだけ操作をシンプルにということであり、核酸の染色方法としても、原虫を生かしたまま(固定等の必要なし)、簡便迅速に染まる(洗浄の必要なし)、蛍光法で高感度に検出できることを必要条件と考えた。DNAやRNAを染色する蛍光色素で市販のものを網羅的にほぼすべて(膜透過性の有無に関わらず)比較検討した。その結果、膜透過性かつ安定した染

色が可能なものとして SYTO 系試薬が優れていることを見出し、その中でもバックグラウンドが低い SYTO21 を選択した。

実際のマラリア患者にこれを応用するためには、有核細胞である白血球を血液から除かなくてはならない。マラリア流行地では遠心機等の使用が、電気が安定して供給されないなどの理由で、難しいことが多い。そこで、遠心機を必要としないプッシュカラムを何種類か使用し、必要な血液量や白血球の除去率等を比較検討した結果、パナソニック社製の silicon oxide ナノファイバーを用いたカラムを使用することで、血液から 99.9 % 以上の白血球(血液中の基準値 白血球:3200 ~ 9000/ μ L、赤血球:360 ~ 500万/ μ L)が除去できることを確認した。また、このプッシュフィルターはマラリア流行地で多い鎌状赤血球症の患者に対しても同様に用いることが可能であった。

検出機器はパナソニック社製の蛍光検出器を付けた CCD カメラシステム (EZBLMLH01T) を使用した。細胞チップのスキヤニングを 5 分間で終了させるために、480 nm 半導体レーザー、対物レンズ、最適化された蛍光検出用フィルター、および XYZ 軸自動電子ステージを搭載した。原虫の検出のために、細胞チップを検出器にセット後、“analyze” ボタンを押すだけで、蛍光陽性の赤血球を検出することが可能である。この機器の解像度は 1.1 μ m である。原虫感染赤血球は検出された蛍光の形から特異的に検出することが可能である。非感染赤血球の蛍光シグナル強度の 1.3 倍以上、7.5 倍以下をマラリア原虫感染赤血球とした。また、蛍光スポットのアスペクト比(縦横比)が 2.8 以上またはその面積が 4.8 μ m² 以下または 45 μ m² 以上の場合をノイズとして検出するようプログラミングした。実際

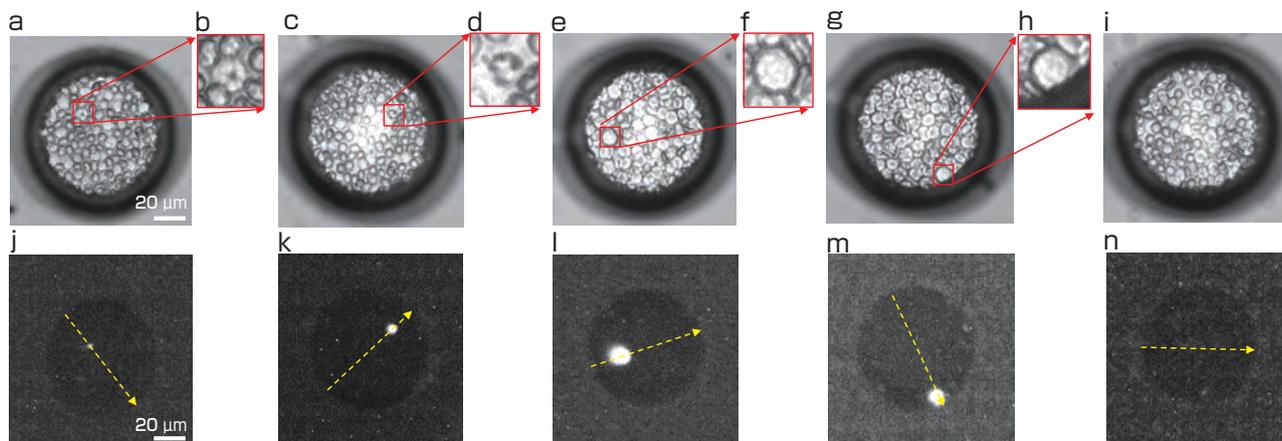


図3 マイクロチャンバー内での白血球と感染赤血球の区別

(a, c) マイクロチャンバー内の感染赤血球の明視野顕微鏡像を示す。(b, d) 感染赤血球の拡大写真、(e, g) マイクロチャンバー内の全血内の細胞の明視野顕微鏡像を示す。(f, h) 白血球の拡大写真、(i) マイクロチャンバー内の非感染赤血球の明視野顕微鏡像を示す。(j-n) 各チャンバー内の細胞を SYTO21 で染色し、CCD カメラで撮影した蛍光像を示す。マラリア原虫と白血球ではそのシグナル強度と大きさが大きく異なることがわかる。

にどのようにしてこれらの数値を決定したかであるが、多くのマラリア患者血液サンプルを細胞チップおよびギムザ染色像の顕微鏡観察で比較解析し、蛍光源（白血球、血小板、壊れた細胞の破片等）を特定し、マラリア原虫のみを特異的に検出することを可能にした。採血から原虫解析までのワークフローは図4で示した。

4 流行地での細胞チップを用いた解析

ウガンダ共和国グル地区はマラリア高度流行地域であり、ここを研究拠点とし、検証実験を行った。研究拠点はLector Hospitalであり、大阪大学堀井教授、順天堂大学美田教授らが、それぞれワクチン開発や薬剤耐性マラリアの調査のためにフィールド研究を行っており、そこに同行させていただけることになった。共同研究先を一から探すことは、共同研究の契約の締結を含め、時間も労力もかかるので、非常にありがたかった。来院した41人の患者血液サンプルのギムザ染色像の解析を顕微鏡観察で行ったところ、37人で原虫が確認され、感染率は0.0039%から2.34%であった。同じ検体に対して、細胞チップを用いて解析を行ったところ、感染率は0.0033%から2.39%であった（図5）。ギムザ染色と細胞チップを用いて算出された感染率は値がほぼ一致し、正の相関を示した ($R^2=0.9945$)。

実際は上記のデータを得るためには大変な苦勞があった。まず、電源の問題である。グル市はウガンダの首都カンパラに次ぐ大きな都市であるが、停電が頻発する。半日以上停電が続くこともあるため高品質の無停電電源装置が必須であった。また、機材の輸送も困難であった。日本からグル市までは約2日かけて移動するため保冷が必須な試

薬は使えない。さらに、機器類を飛行機に預けると、予想以上に手荒に扱われて使いものにならなくなり、現地で修理する術もない。常温でも安定な試薬の選定、機械装置のコンパクト化、または信頼のおける輸送ルートの確保が非常に重要であることを痛感した。

上記の問題を解決し、実験のセットアップを終えて、あとはデータを取るだけだと考えていた。しかし、フィールド研究の開始当初は、患者の血液サンプルがほとんど我々の元には届かなかった。共同研究先の病院には多くのマラリア患者が来院しているのに不思議であった。共同研究先の医師に問い合わせたところ、現地医師による患者の研究へのインフォームドコンセント（説明と同意）の取得、研究用血液の採血、我々までの輸送手段が機能していなかった。病院は患者でごったがえしており、致し方がない部分もある。これを構築するために何度も関係者と話し合い、研究の重要性を理解してもらう必要があった。これらの苦難を経て協力して頂いた41人の血液サンプルは大変貴重なものであった。我々は、国際的な認知度の高いWorld malaria reportへこの診断システムを掲載するため、約500症例の実証データを得ることを目標としている。日本国内の病院の感覚からすると500症例は容易に集められると思われるかもしれないが、アフリカ現地では上記のような苦勞があるのである。

5 考察・今後の展望

我々の細胞チップ技術は赤血球270万個に一つのマラリア原虫（感染率0.00005%）を検出するポテンシャルを有している。これまでの研究では、マラリア流行地という過酷

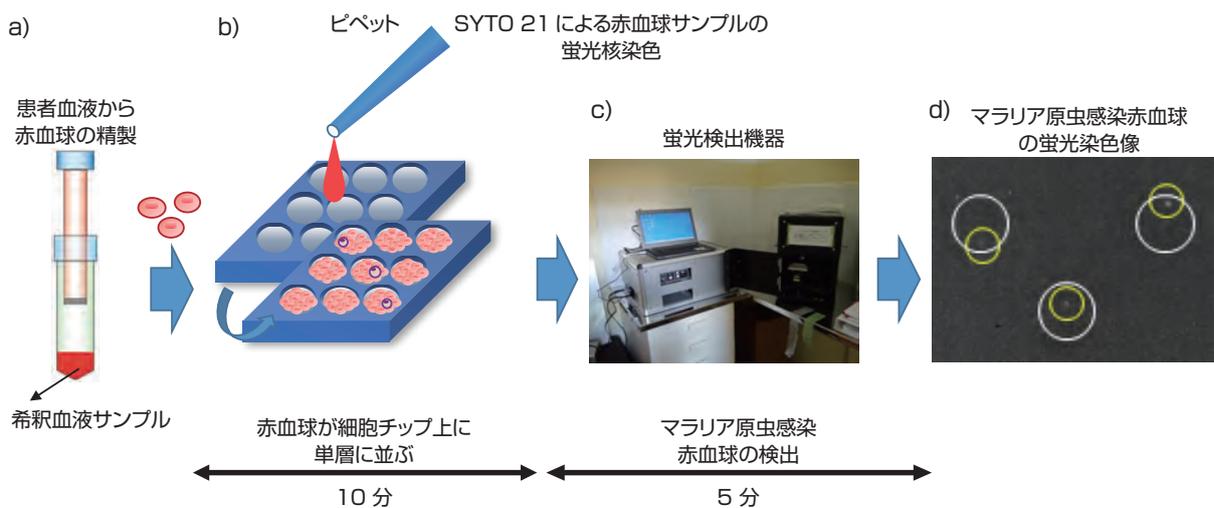


図4 細胞チップを用いたマラリア原虫感染赤血球の検出のワークフロー¹⁸⁾

(a) プッシュカムを用いて患者血液から赤血球を単離する。(b) 赤血球を蛍光核染色試薬(SYTO21)で染色し、マラリア原虫の核染色をする。その後、赤血球を細胞チップ上に静置することでチャンパー内の赤血球を単層化する。(c) 蛍光を検出することにより、マラリア原虫を検出する。(d) 自動画像解析を行い、検出された原虫数をカウントする。チャンパー内に入っている赤血球数は一定であるため、感染率を算出することが可能である。

な現場においても感染率 0.0033 % の感染者の血液で原虫の検出に成功しており、現在のゴールドスタンダードのギムザ染色法の検出限界 (0.01 %) を上回っている。すなわちギムザ染色法では検出されない感染早期段階での検出が可能である。なお、0.0033 % という数字は 0.00005 % という値に比べて 2 桁ほど高い値であるが、これは患者の多くに感染が進行した段階で病院に来ているためで、感染直後の初期段階での血液サンプルを入手できれば、より低い感染率でも検出が可能と考えられる。一方、擬陽性の問題に関しては、41 サンプル中ギムザ染色法で検出されなかった 4 サンプルについては細胞チップ法でも検出されなかった。一方、RDT や PCR 法では陽性となったものがあり、擬陽性が起こりやすいことが示された。PCR 法による擬陽性に関しては、マラリア治療後の原虫 DNA が血中に残ったことが原因となる場合が報告されている^[11]。細胞チップの結果は、実際に赤血球が寄生しているマラリア原虫を検出し、可視化できるので擬陽性が起こることがないことも大きな特長の一つである。

現在、マラリア治療はアルテミシニン併用療法 (ACT: artemisinin-based combination therapy) によって行われている。適切な診断は ACT の使い過ぎを防ぐことで、コストを削減し、薬剤耐性マラリアの出現と拡散を抑制するために重要である^[12]。すなわち、ハイスループットな高感度診断法の開発は、膨大な時間やコストが必要な新薬開発を必要とせず、既存の治療薬を最大限に有効利用し、マラリア制圧向け、大きく貢献できると考えられる。細胞チップを用いた診断法は高感度、迅速かつ易操作である。さ

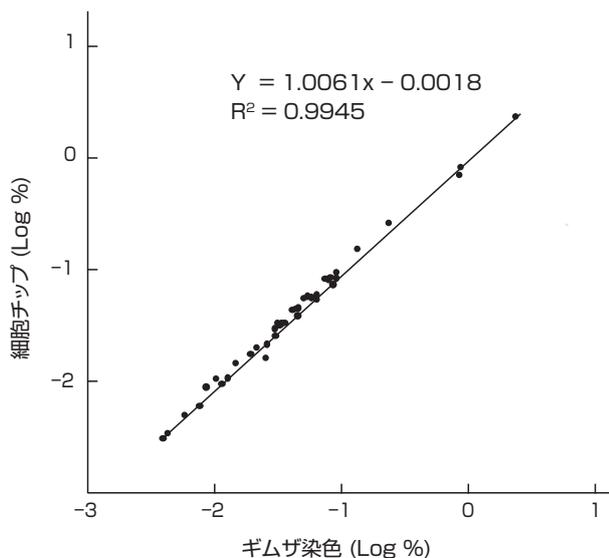


図5 マラリア流行地での細胞チップを用いた感染率の測定^[8] 細胞チップ (縦軸) およびギムザ染色 (横軸) により、ウガンダでのマラリア感染者の感染率を算出し、比較解析を行った。

らに、この診断に用いる消耗品 (細胞チップ、SYTO21、ブッシュカラム) は比較的安価 (2 USD 以下) であるといった特長があるが、検出機器が高価 (8,000 USD) で、サイズが大きく携帯性が悪いなど、村や小学校等でのフィールドワークでの使用は難しいといった問題がある。

すでに、検出器の小型化および低価格化 (WHO は一人当たりの検査費として 1 USD 以下を目指している) に関しては、プロトタイプ機の開発を進めており、今後、幅広いフィールドでの使用およびマラリア流行地域でも購入可能なデバイスを作製し、商品化を目指していきたい。さらに将来的には、マラリアをより高度に診断することで、感染初期段階での治療や薬剤耐性を誘起する恐れのない治療を可能とし、ひいてはマラリアの制圧へとつなげていきたい。高度診断のためには、マラリア原虫の超高感度検出だけでは不十分であり、5 種類存在する原虫種の同定および薬剤耐性の有無の判定が可能な「高機能診断細胞チップ」の開発が不可欠であり、現在、この開発を進めている。

謝辞

この成果は、文部科学省および国立研究開発法人日本医療研究開発機構創薬等ライフサイエンス研究支援基盤事業 (創薬等支援技術基盤プラットフォーム事業) および公益社団法人グローバルヘルス技術振興基金の支援により得られました。検出機器開発において、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の方々に感謝申し上げます。また、ウガンダにおけるフィールド実証研究において、グル市 Lector Hospital、大阪大学微生物研究所難治感染症対策研究センター分子原虫学分野、および順天堂大学医学部熱帯医学・寄生虫病学講座の諸先生方に感謝申し上げます。

参考文献

- [1] H. C. Slater, A. Ross, A. L. Ouédraogo, L. J. White, C. Nguon, P. G. Walker, P. Ngor, R. Aguas, S. P. Silal, A. M. Dondorp, P. La Barre, R. Burton, R. W. Sauerwein, C. Drakeley, T. A. Smith, T. Bousema and A. C. Ghani: Assessing the impact of next-generation rapid diagnostic tests on *Plasmodium falciparum* malaria elimination strategies, *Nature*, 528 (7580), S94–101 (2015).
- [2] F. Perandin, N. Manca, A. Calderaro, G. Piccolo, L. Galati, L. Ricci, M. C. Medici, M. C. Arcangeletti, G. Snounou, G. Dettori and C. Chezzi: Development of a real-time PCR assay for detection of *Plasmodium falciparum*, *Plasmodium vivax*, and *Plasmodium ovale* for routine clinical diagnosis, *J. Clin. Microbiol.*, 42 (3), 1214–1219 (2004).
- [3] M. B. Jiménez-Díaz, J. Rullas, T. Mulet, L. Fernández, C. Bravo, D. Gargallo-Viola and I. Angulo-Barturen: Improvement of detection specificity of *Plasmodium*-infected murine erythrocytes by flow cytometry using

- autofluorescence and YOYO-1, *Cytometry A*, 67 (1), 27–36 (2005).
- [4] B. E. Gama, E. Silva-Pires Fdo, M. N. Lopes, M. A. Cardoso, C. Britto, K. L. Torres, L. de Mendonça Lima, J. M. de Souza, C. T. Daniel-Ribeiro and M. Ferreira-da-Cruz: Real-time PCR versus conventional PCR for malaria parasite detection in low-grade parasitemia, *Exp. Parasitol.*, 116 (4), 427–432 (2007).
- [5] Q. Li, L. Gerena, L. Xie, J. Zhang, D. Kyle and W. Milhous: Development and validation of flow cytometric measurement for parasitemia in cultures of *P. falciparum* vitally stained with YOYO-1, *Cytometry A*, 71 (5), 297–307 (2007).
- [6] W. K. Peng, T. F. Kong, C. S. Ng, L. Chen, Y. Huang, A. A. Bhagat, N. T. Nguyen, P.R. Preiser and J. Han: Micromagnetic resonance relaxometry for rapid label-free malaria diagnosis, *Nat. Med.*, 20 (9), 1069–1073 (2014).
- [7] T. Sawada, J. Araki, T. Yamashita, M. Masubuchi, T. Chiyoda, M. Yunokawa, K. Hoshi, S. Tao, S. Yamamura, S. Yatsushiro, K. Abe, M. Kataoka, T. Shimoyama, Y. Maeda, K. Kuroi, K. Tamura, T. Sawazumi, H. Minami, Y. Suda and F. Koizumi: Prognostic impact of circulating tumor cell Detected using a novel fluidic cell microarray chip system in patients with breast cancer, *EBioMedicine*, 11, 173–182 (2016).
- [8] S. Yatsushiro, T. Yamamoto, S. Yamamura, K. Abe, E. Obana, T. Nogami, T. Hayashi, T. Sesei, H. Oka, J. Okello-Onen, E.I. Odongo-Aginya, M.A. Alai, A. Olia, D. Anywar, M. Sakurai, N.M. Palacpac, T. Mita, T. Horii, Y. Baba and M. Kataoka: Application of a cell microarray chip system for accurate, highly sensitive, and rapid diagnosis for malaria in Uganda, *Sci. Rep.*, 6, 30136 (2016).
- [9] S. Yamamura, S. Yatsushiro, Y. Yamaguchi, K. Abe, Y. Shinohara, E. Tamiya, Y. Baba and M. Kataoka: Accurate detection of carcinoma cells by use of a cell microarray chip, *PLoS One*, 7 (3), e32370 (2012).
- [10] S. Yatsushiro, S. Yamamura, Y. Yamaguchi, Y. Shinohara, E. Tamiya, T. Horii, Y. Baba and M. Kataoka: Rapid and highly sensitive detection of malaria-infected erythrocytes using a cell microarray chip, *PLoS One*, 5 (10), e13179 (2010).
- [11] World Health Organization: *World Malaria Report 2009*, (2009).
- [12] B. Aydin-Schmidt, M. Mubi, U. Morris, M. Petzold, B.E. Ngasala, Z. Premji, A. Björkman and A. Mårtensson: Usefulness of *Plasmodium falciparum*-specific rapid diagnostic tests for assessment of parasite clearance and detection of recurrent infections after artemisinin-based combination therapy, *Malar. J.*, 12, 349 (2013).

執筆者略歴

橋本 宗明 (はしもと むねあき)

2005年順天堂大学大学院医学研究科博士課程修了。博士(医学)。順天堂大学医学部准教授を経て、2016年より産総研健康工学研究部門に配属。マラリア診断デバイスのさらなる高機能化を目指す。この論文では、主にマラリア流行地域での診断デバイスの実証実験に従事。



八代 聖基 (やつしろ しょうき)

2001年岡山大学自然科学研究科博士後期過程修了。博士(薬学)。日本学術振興会特別研究員(PD)、就実大学薬学部助手を経て、2007年より産総研健康工学研究部門に配属。この論文では、主にマラリア原虫の検出法の開発に従事。



山村 昌平 (やまむら しょうへい)

2002年北陸先端科学技術大学院大学材料化学研究科博士後期過程修了。文部科学省知的クラスター創成事業：とやま医薬バイオクラスター博士研究員、北陸先端科学技術大学院大学マテリアルサイエンス研究科助教を経て、2008年より産総研健康工学研究部門に配属。この論文では、主に細胞チップのデザインおよび開発に従事。



片岡 正俊 (かたおか まさとし)

1990年徳島大学大学院歯学研究科修了。歯学博士。徳島大学歯学部にて臨床と研究に従事後、同ゲノム機能研究センター遺伝子発現分野助教授として研究に従事。2006年より産総研健康工学研究部門に配属。2007年から同研究グループ長。この論文では全体構想のとりまとめを行った。



査読者との議論

議論1 全体について

コメント(田尾 博明:産業技術総合研究所)

この論文は、世界三大感染症の一つであるマラリア感染症の早期検出デバイスの開発に関するものです。アフリカ現地で使用するための診断法のコンセプト、コンセプトを実現するための独創的な技術である細胞チップ開発や試薬類の選定の経緯、ゴールドスタンダードであるギムザ染色法をはじめとする他法との比較、アフリカ現地での実証試験で使用の際の問題点と解決策、将来展望等が記述されており、診断機器類の研究開発から社会実装を目指す研究者の参考になるものが多いため、シンセシオロジー論文として掲載する意義があると考えます。

コメント(湯元 昇:国立循環器病研究センター)

マラリア診断のため、マイクロチップ技術を応用して、正確・高感度・迅速かつ易操作な診断デバイスを開発した過程が記載されています。これまでの診断法では困難な課題を解決するため、明確なシナリオのもと、国際的な産学官連携により、流行地でのフィールド試験まで進んでいるものであり、シンセシオロジー誌の論文としてふさわしいものと判断します。

議論2 シナリオの明確化

コメント(田尾 博明)

この研究の進め方(シナリオ)は、「診断法のコンセプト」→「コンセプトを実現する装置・試薬の研究開発」→「アフリカ現地での実証試験」→「新たな技術開発ニーズの発見」の4つのプロセスを繰り返しながら、診断法を高度化し社会実装につなげるといった戦略になると考えられます。これを図として第1項の最後に示しておく、研究全体が分かりやすくなると思います。また、第2項に、チャンパー内の液の流れのシミュレーションや最下層の細胞の吸着性を制御するための親水性処理等についても言及しては、いかがでしょうか。当

初の経験に基づいた設計だけでなく、シミュレーションによる理論的裏付けがあること、将来、異なるサイズのチャンバーの最適化や設計にシミュレーション技術が役立つことを記載するとよいのではないのでしょうか。また、細胞チップとしては、各チャンバーに一つの細胞しか入らないように設計されたものがあると思いますが、それらと比べたこの細胞チップの長所も記述しておくとういと思います。

コメント（湯元 昇）

シンセシオロジー誌の研究論文としては、シナリオやその要素構成（選択・統合）についての著者の独自性が論文としての要件となっています。現在の原稿では、全体像は把握できますが、著者がシナリオに基づいて、どのように要素を構成していったかが少し理解できにくい構成になっています。この研究でシナリオの実現の鍵となったのは細胞チップの開発だと思います。そこでは、基板の選択、デザイン、加工、表面処理といった技術要素を組み合わせることで実現されたと思いますが、その点の記述が少ないものとなっています。またフィールド試験では、WHO 等から出された課題をどのように解決しようとしているか、どのように共同研究先を見出したかなどを記述して頂いた方がよいと思います。

回答（橋本 宗明）

- ・シナリオのフローチャートを図1として追加しました。
- ・細胞チップを作製するにあたっての各技術要素について出来る限り、追記しました。シミュレーションについては、最近報告された論文を引用しつつ、第2項の最終段落に追記し、それが将来的にも有用であることも記述しました。親水化処理についても同段落に

追記しました。この細胞チップは一つのマイクロチャンバーに100個程度赤血球が並べられることから、例えば感染率が1%の場合、一つのチャンバーに一つのシグナルが検出されます。したがって、ある程度感染率が高い場合、いくつもチャンバーを解析する必要がない点が、この細胞チップの目指したところの一つであり、メリットです。これについても追記しました。基板の選択ですが、実際は多くのプラスチック素材を試してみましたが、大きくは結果が変わらなかったため、この論文では記述していません。

- ・WHO 等からの課題ということですが、一番はコストだと思います。細胞チップはランニングコストはもう少し頑張れば何とかなりそうですが、検出機器が高額なのが問題となっております。現在、企業と開発を進めているものは検出原理は同じなのですが、それをクリアするものと考えております。これについては、WHO が1人当たりの解析料が1 USD になる必要があると主張しているため、第5項、第3パラグラフで明記しました。
- ・どのように共同研究機関を探したかですが、第4項、第1パラグラフに追記しました。

議論3 既存の方法との比較

コメント（田尾 博明）

ギムザ染色法、イムノクロマト法、PCR 法、フローサイトメーター法、この細胞チップ法の原理、長所、短所を一覧表にしておく、現在のマラリア診断法の全体像と本法の特徴が理解しやすくなると思います。

回答（橋本 宗明）

表1として新たに作成しました。