

簡便・高効率の油中の水溶液滴生成システムの構築および dd(droplet digital)PCR による病原体検出への応用

群馬大学大学院理工学府環境創生部門
教授 桂 進司

1. 概要

現在、感染症の原因菌・ウイルスの検出には PCR 法が幅広く用いられている。しかし、感染症の主要な感染経路である空気中における病原体を検出するシステムについては、これまでに十分に開発されていない。そこで、本研究では静電気力による病原体微粒子の集塵と dd(droplet digital)PCR を組み合わせることにより、以下の技術要素からなる大気中の病原体を連続的および継続的にモニタリングするフローシステムの構築を目指している。

- ① 大気環境中に浮遊している病原体を電気集塵により回収し、PCR反応溶液と混合する技術
- ② ddPCR に適用可能な単分散油中水溶液滴生成技術
- ③ 病原体の遺伝子を ddPCR(droplet digital PCR)法により目的の細菌・ウイルスの DNA を特異的かつ高速に増幅させる技術
- ④ ③で PCR 増幅した DNA を含む液滴を効率的に検出する技術

これらの技術要素の組み合わせを変更したいくつかのモニタリング方法について検討したので、報告する。

2. 背景

感染症は人類の歴史において度々甚大な被害を発生させ、今日においても大きな問題になっている。とりわけ、2019 年 12 月に中国・武漢市で報告された「COVID-19」(新型コロナウイルス感染症)はいまや世界中に拡散しており、2023 年 4 月時点で、全世界の累積感染者数にあつては 7.6 億人、死亡者数 691 万人に達している。

また、外国との往来が活発になった結果、パンデミックの危険性が高まっているが、この発生を迅速に捉えることは、感染者の発生を抑制させ、国民の健康を守るためにきわめて重要である。さらに、ヒトの感染症のみではなく、豚コレラを代表とする家畜伝染病を効果的に封じ込めるためにも、病原体の存在を早期に検知することは重要であり、これら家畜伝染病の病原菌・ウイルスを迅速に検出する方法は強く求められている。しかし、現在の検査は、感染症患者もしくは患畜が発生してから、遺伝子・抗体検査が行われているため、検査で陽性と判明した時点で既に二次感染が始まってしまっている。そのため、感染者の有無に関わらず、常時環境中の病原体数をモニタリングすることが重要である。2023 年度は「静電噴霧による反応溶液供給と PCR 検出」、「電気集塵により捕捉したモデルウイルスの ddPCR による検出」の 2 つのモニタリング方法を検討したので報告する。

3. 静電噴霧による反応溶液供給と PCR 検出

3.1 静電噴霧による集塵・液滴形成の原理

静電霧化現象とは、液体表面の電界が大きくなると、表面に働く静電気力によって電气流体力学的に不安定になり、液面や液滴が多数の液滴微粒子や噴霧を発生することである。本研究では、図1に示すように、電気集塵部により病原体微粒子に負の電荷を与え、正の高電圧を印加することにより静電噴霧により供給する液滴化した PCR 反応溶液に正の電荷を与え、静電気力により病原体微粒子を PCR 反応溶液液滴に捕集することを目指している。

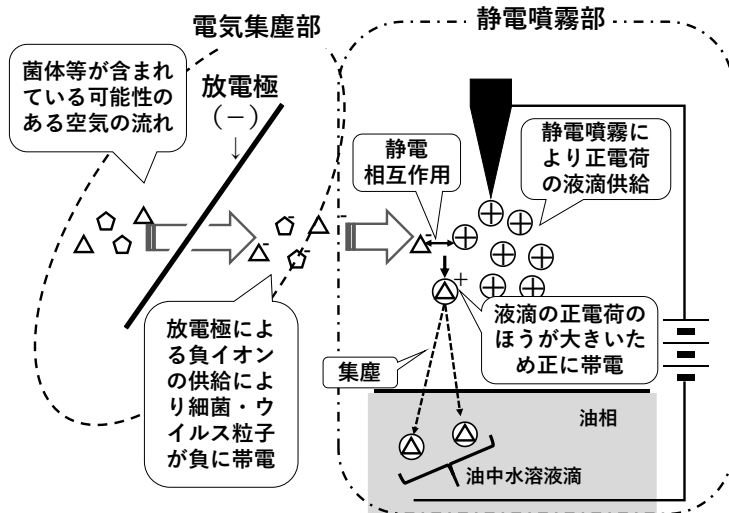


図1 静電噴霧による集塵・液滴形成の原理図

3.2 実験装置の構成

実験に使用した装置の模式図を図2に示す。右側から超音波振動子により噴霧されたモデルウイルス MS2 を電気集塵部に誘導する。集塵極に-8kV を印加することにより、負の電荷を与えられたモデルウイルス含有微粒子は左側の静電噴霧部に移動

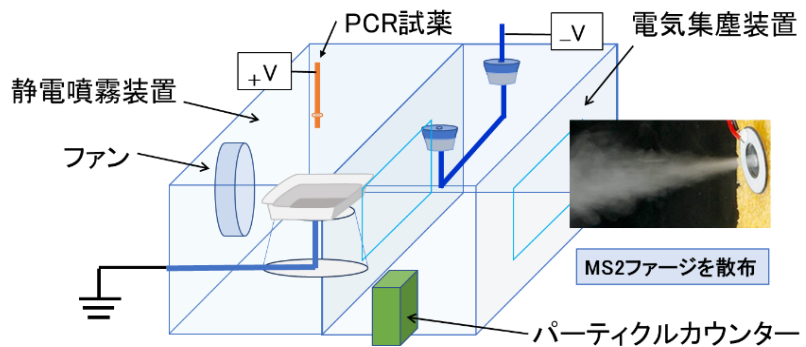


図2 実験装置模式図

する。PCR 反応溶液供給ノズルに+15kV を印加することにより静電噴霧された蛍光プローブを含む PCR 反応液滴に負電荷のモデルウイルス含有微粒子は捕捉され、シリコン栓中心部に設置された接地電極上の油層に回収されることになる。その後、回収された油中水溶液滴を PCR 増幅し、液滴の蛍光を蛍光顕微鏡により観察することにより、PCR 増幅の有無を確認した。

3. 3 静電噴霧による液滴形成と回収液滴の PCR 増幅結果

静電噴霧により形成された PCR 反応液滴により PCR 増幅が可能であるか確認するために、モデルウイルス MS2 を含む PCR 反応溶液を用いて静電噴霧を行い、その回収した液滴で PCR 増幅を行い、蛍光顕微鏡で観察した結果を図3に示す。図3(a)の明視野像の結果か

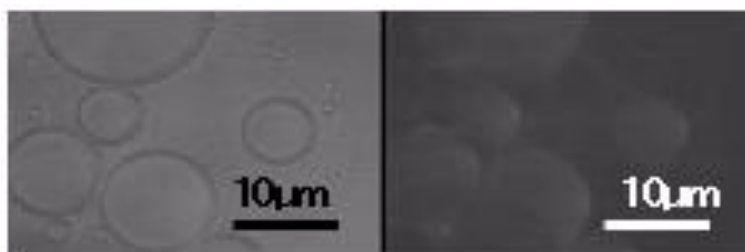


図3 静電噴霧により形成された液滴の PCR 増幅結果
(a)明視野像 (b)蛍光像

らは、PCR 後の液滴は直径 1~20 μm までの幅広いサイズに分布していることが確認された。生成された液滴径が幅広く分布していることは均一な PCR 増幅には不適當なので、今後の改良が必要である。一方で、図3(b)の蛍光像からは蛍光を発する液滴を複数確認できた。これらの結果より、静電噴霧による液滴形成および PCR は可能であると言える。

3. 4 空気中から回収したモデルウイルスの PCR 増幅結果

超音波振動により試料空气中にモデルウイルスを散布した後、集塵極に負の高電圧 (-8kV) を印加することにより、モデルウイルス含有微粒子に負の電荷を与え、その後、静電噴霧により生成された PCR 反応液滴に捕捉し、PCR 増幅を行った。PCR 増幅後の液滴の蛍光顕微鏡観察結果を図4

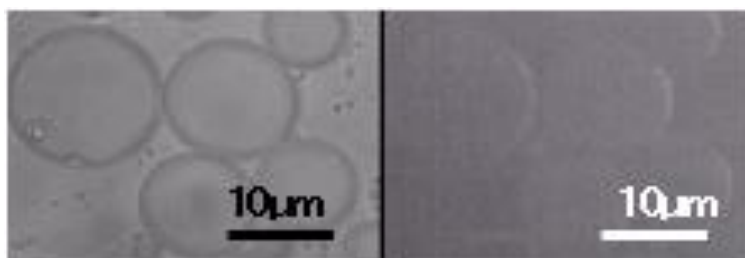


図4 空気中から回収したモデルウイルスの PCR 増幅結果
(a)明視野像 (b)蛍光像

に示す。図4(b)より蛍光を発する液滴を確認することができた。また、粒径の大きい粒子の方が比較的に蛍光を強く示す傾向があることも確認した。このように、電気集塵装置と静電噴霧装置を組み合わせることにより、空気中のモデルウイルスの回収、PCR 増幅を確認できたことは、本システムによりモデルウイルスの検出が可能であり、一般の病原体微粒子の検出にも適用できる可能性があることを示唆している。

4. 電気集塵により捕捉したモデルウイルスの ddPCR による検出

4. 1 超音波振動による油中 PCR 反応液滴の生成

本研究では、dd(droplet digital)PCR に適用可能な低コストかつ液滴径の揃った油中水溶液滴を大量に生成できる方法として、膜乳化技術を用いた油中水溶液滴の作製法を検討した。ddPCR に応用するには、少ない反応溶液量で液滴形成を行う必要があるために、三方コックを用いた図5のような装置を用いた。具体的には、気泡の発生を防ぐため、まず油相をフィルターホルダーまで供給し、油相を回収した。その後、フィルターホルダーにフィルター(フィルターポアサイズ $10\mu\text{m}$)を設置し、PCR 溶液の入った水相を三方コックへ供給した。再度油相を供給し、PCR 溶液が内包された w/o エマルションを生成させ、チューブに回収し、PCR を行った。液滴化の際には、フィルターを振動させるために、フィルターホルダーに高音域スピーカー(4Ω)を接触させ、ピーク電圧:22V,周波数:21kHz で駆動した。

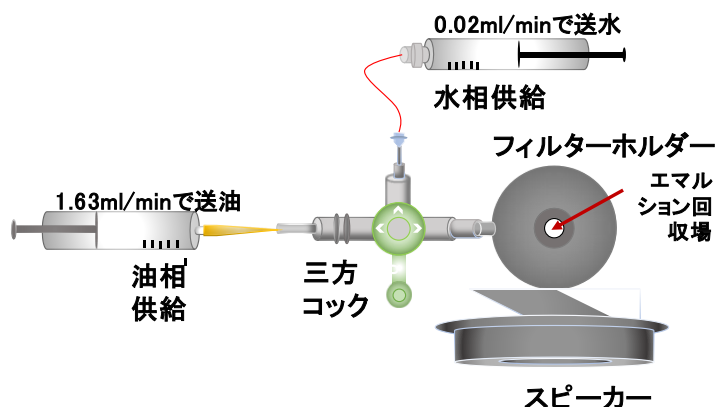


図5 膜乳化法模式図

図5のような装置を用いた。具体的には、気泡の発生を防ぐため、まず油相をフィルターホルダーまで供給し、油相を回収した。その後、フィルターホルダーにフィルター(フィルターポアサイズ $10\mu\text{m}$)を設置し、PCR 溶液の入った水相を三方コックへ供給した。再度油相を供給し、PCR 溶液が内包された w/o エマルションを生成させ、チューブに回収し、PCR を行った。液滴化の際には、フィルターを振動させるために、フィルターホルダーに高音域スピーカー(4Ω)を接触させ、ピーク電圧:22V,周波数:21kHz で駆動した。

4.2 大気環境中のモデルウイルスに対する回収システム

電気集塵技術を用いることによって空気中のモデルウイルスの回収を試み、前述の膜乳化法により PCR 反応液滴を生成し、PCR 増幅を行った。そのモデルウイルス回収のための装置図を図6に示す。非帯電のバランスディッシュに $50\mu\text{l}$ の回収液滴を滴下した。この際、バランスディッシュにアルミテープを貼り付け、その上からビニールテープを覆った。その後、バランスディッシュを縦 13.5cm × 横 10cm × 高さ 18cm の透明な直方体の下部に設置した。また、直方体の側面に針を取り付け、この針を放電極とした。直方体の上部に取り付けた超音波噴霧のスイッチを入れた後、電極針に -6kV の電圧を供給した。その後、超音波噴霧器に

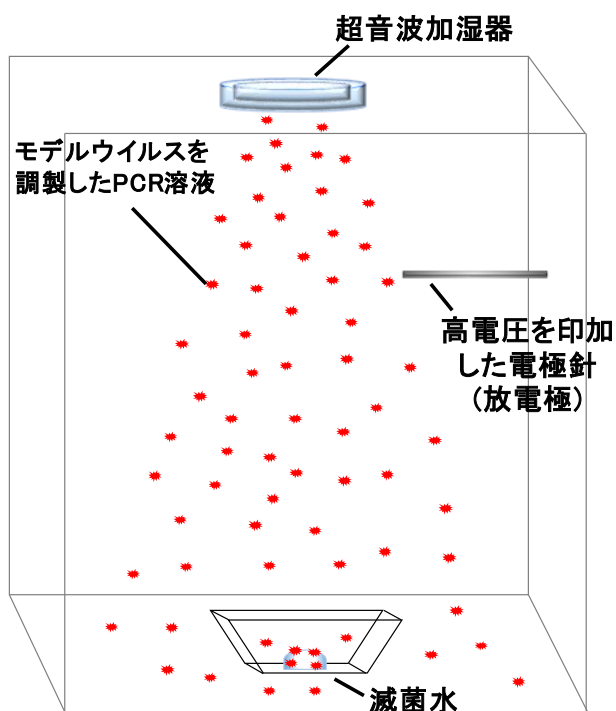


図6 モデルウイルス集塵装置模式図

モデルウイルスを滴下し、空気中に噴霧させた。本法により回収された試料を前述の膜乳化法により液滴化し、その後、逆転写 PCR 増幅を行い、その後、蛍光顕微鏡で観察を行った。

まず、電極針に高電圧を印加せずにサンプルを回収後、PCR 増幅を行った結果を図7に示す。このように、高電圧未印加時、すなわち、電気集塵を行っていない状態では、わずかの液滴しか蛍光を示していない。他の視野から得られた結果もまとめると、約 110 個の液滴中 2 個の液滴のみが蛍光を示していた。供給したモデルウイルス量から算出すると、高電圧を印加しない状態で空気中に噴霧すると約 1.5%のエマルジョン中にサンプルを回収されたことになる。また、得られた液滴は比較的分散が小さく、単分散の液滴生成に用いられる膜乳化法は PCR 反応液滴の膜乳化にも有用であることを示している。

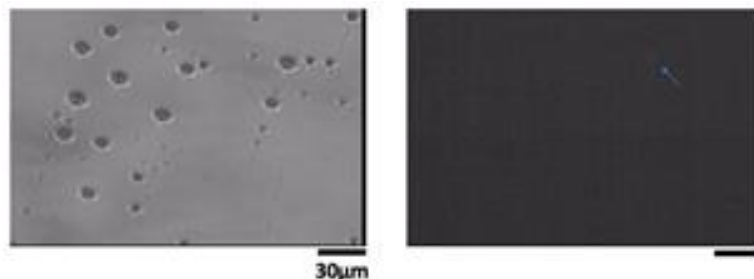


図7 高電圧未印加で試料回収し、PCR 増幅を行った結果
(a)明視野像 (b)蛍光像

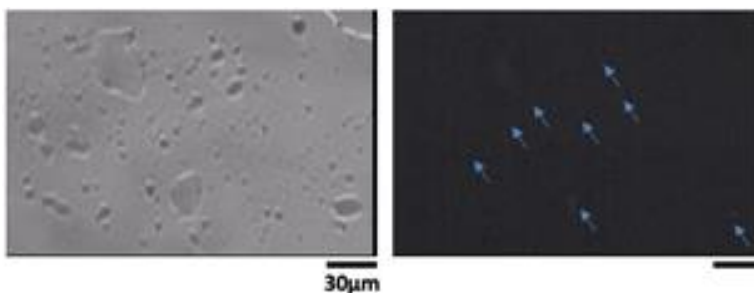


図8 高電圧印加で試料回収し、PCR 増幅を行った結果
(a)明視野像 (b)蛍光像

一方で放電極に-6kV 印加すると、図8に示すように、多くの液滴に蛍光が見られた。他の視野から得られた結果もまとめると、約 135 個のエマルジョン中 18 個のエマルジョンが蛍光を示した。これより、高電圧を印加した状態では空気中に噴霧したモデルの約 13%のエマルジョン中のモデルウイルスが検出されることが分かった。このように、電気集塵によりモデルウイルスの回収効率は大きく向上し、効果的な病原体微粒子の検出に適用できると考えられる。

5 結言

2023 年度は「静電噴霧による反応溶液供給と PCR 検出」、「電気集塵により捕捉したモデルウイルスの ddPCR による検出」の2つのモニタリング方法を検討したが、どちらの方法も空気中に散布したモデルウイルスを検出することが可能であった。しかし、静電噴霧により生成された液滴はその液滴径が広く分散しているために、何らかの方法で分散を減らす方法を今後検討していく必要がある。

6 今後の展開

空気中に浮遊する細菌とウイルスの濃度をリアルタイムにモニターし、感染の危険性を定量化することを目的として、

- ① 大気環境中に浮遊している病原体を電気集塵により回収し、PCR反応溶液と混合する技術
- ② ddPCR に適用可能な単分散油中水溶液滴生成技術
- ③ 病原体の遺伝子を ddPCR(droplet digital PCR)法により目的の細菌・ウイルスの DNA を特異的かつ高速に増幅させる技術
- ④ ③で PCR 増幅した DNA を含む液滴を効率的に検出する技術

について開発を行い、空気中に散布したモデルウイルスを検出することができた。今後は、液滴の単分散化および回収率向上を進めるとともに、各技術を集約し、連続処理が可能なフローシステムの構築を行う。

7 謝辞

本研究を遂行するにあたり、公益財団法人天野工業技術研究所から多大なるご支援を賜りましたこと、厚く御礼申し上げます。