

疾病を引き起こす遺伝子のエアロゾルからの回収と検出法の開発

慶應義塾大学 理工学部

松原 輝彦

1. はじめに

人類は常に新興ウイルス感染症の脅威下にある。それまで毎年流行していたインフルエンザに取って代わり、2020年には新型コロナウイルス（SARS-CoV-2）による感染症（COVID-19）の蔓延を許した^[1]。当初の検査法は、ウイルスの核酸増幅を行なって検出を行うリアルタイム逆転写（RT）-ポリメラーゼ連鎖反応（PCR）のみであった。患者数の増加で検査の需給がひっ迫するだけでなく、検体を採取する医療従事者を危険に晒すことが問題視された。感染症に罹患した場合、患者は医療機関に出向き、検体採取や診断を受けることとなる。しかしこれは医師や看護師、検査技師などの医療従事者が感染リスクに晒されることを意味し、実際に SARS-CoV-2 に感染して亡くなる医師がいたとの報道もあった。今回のパンデミックにおいては、医療従事者が防護服を着用する対策が行われたが、第5類感染症移行後の日常において、常時着用することは現実的ではない。今回のコロナ禍の経験から、医療従事者を守る視点が欠けていたことが明らかになった。

PCRのような核酸増幅法よりも、手軽に COVID-19 を診断できる検査法として、2020年5月に「イムノクロマト法」による抗原検査キットが認可され^[2]、普及することとなった。この種のキットはすでにインフルエンザの迅速診断キットとして臨床現場で用いられており、同じ原理に基づいて SARS-CoV-2 の検出が行える（使用する抗体を、抗インフルエンザウイルス抗体から抗 SARS-CoV-2 抗体に入れ替えるだけである）。ただしリアルタイム RT-PCR 法と比較し、その検出感度は 100～1,000 倍程度低い^[3]。抗体を用いるため特異度は 90%以上と高いものの、感度は 80%程度の場合もあり、偽陰性の可能性を見込んだ上で活用していく必要がある。一方で我々の研究グループは、新しい原理に基づいたウイルス検出を行うバイオセンサーを開発してきた。インフルエンザウイルスに結合する人工ペプチドをダイヤモンド電極に固定化することで、PCR と同程度の高い感度でウイルス検出できることを示してきた^{[4][5]}。しかし迅速診断キットもバイオセンサーでも、まずは患者から検体を採取する必要があり、医療従事者を守るという課題を解決するものではない。

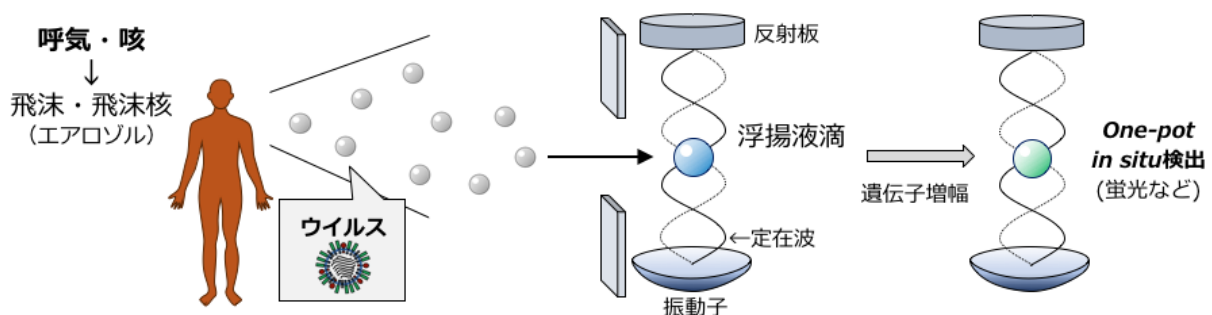


図1 本研究が想定するウイルス検出のイメージ。感染者が出した咳や呼気のエアロゾルに含まれるウイルスを浮揚液滴で回収し、*in situ* で検出する。

そこで発想を変え、任意の居住空間（病院、電車、学校、会社など）に漂っているウイルスを常時モニタリングするシステムを発案した（図 1）。感染者が排出する咳や呼気はエアロゾルとして空气中を浮遊するが、このエアロゾルにはウイルスが含まれている。このエアロゾル内のウイルスをその場検出することができれば、もはや自ら検査のために医療機関に出向くことも不要であり、診断のための医療従事者の労力も軽減されることが期待できる、と考えた。

2. エアロゾル回収: 音響浮揚現象の活用

エアロゾルとは、媒質が気体に浮遊する $1\text{ nm}\sim 100\text{ }\mu\text{m}$ の液体もしくは固体の粒子状物質であり、感染者が排出する咳や呼気が空气中に漂う状況は、その範疇に含まれる。咳などの比較的大きな飛沫は重力で自由落下するが、水分が蒸発した後にできる小さな飛沫（ $5\text{ }\mu\text{m}$ 未満）となると、数十分以上空气中を漂う場合がある。この飛沫が浮遊している間に、他の人の鼻腔や上気道に付着すると、ウイルス感染する可能性がある。呼気のエアロゾルの約 9 割は $1\text{ }\mu\text{m}$ 程度であるが、これは約 0.52 fL （フェムトリットル）に該当する。この大きさのエアロゾルにウイルス（ウイルス直径 $100\text{ nm}=0.52\text{ aL}$ アトリットル）が含まれたとすると計算上、1,000 粒子のウイルスを含めることが可能である。1 pfu（プラーク形成単位）を 100 粒子で換算すると 1,000 粒子は 10 pfu に相当し、PCR 法などで十分検出できる粒子数である。

これまで、エアロゾルを回収するには、大掛かりな装置（Milton ら^[6]）やビニール袋のような簡易な捕集具などが用いられてきたが（図 2A）、装置や袋の内壁に付着したウイルスを回収する作業が必要であった。この作業は手間もかかるだけでなく、作業者の感染リスクを伴う。ここで例えば、エアコンに装備されているような集塵フィルターなどでエアロゾルを回収するのは容易であるが、かなり大量のエアロゾルを回収しないと、検出できるだけのウイルス数を集めることができないと計算される。そこで我々は、エアロゾルを水滴と接触させ、中に含まれるウイルスを生きたまま回収することを考えた。ここで水滴を用いて回収することが 1 つの鍵となる。溶液のままエアロゾルを回収すれば、対流や拡散によってウイルスが液滴内を移動し、検出する仕掛けと出会う確率を上げて濃縮効果を付与することが可能である。つまり回収するエアロゾルが少なくても済む。

そこで我々は、音響浮揚現象（acoustic levitation）に着目した。振動子を用いて音波もしくは超音波を発生させ、その近くに反射板を置くと、定在波が発生する。ここで定在波の節（node）の位置にかかる音圧を利用すれば、空气中や液体中で物体を捕捉させることができる（図 2B, 左）。物質を浮かせる技術は、磁気、低温超伝導、光、電気、空気力学を用いるものなど、いくつかの選択肢がある。しかし繊細な生体物質を扱うには水溶液であることが望ましく、そうすると必然的に常温・常圧で使える条件に限られる。つまり音響浮揚現象が、最も条件の合う手法であると考えた。

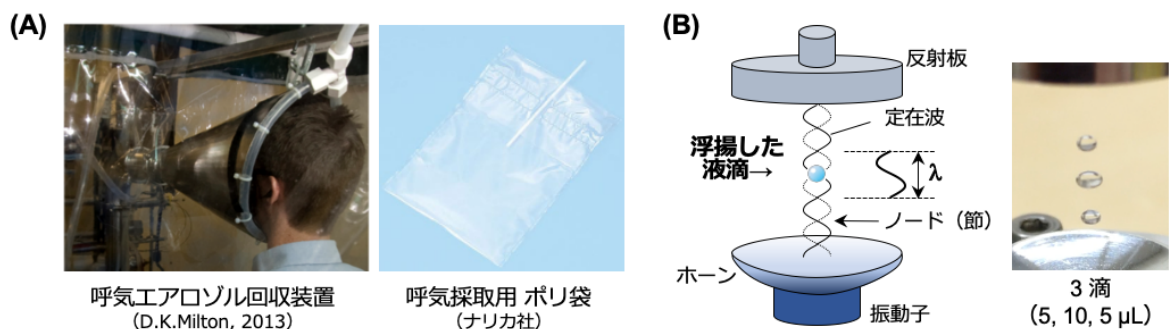


図 2 (A) 既存のエアロゾル回収装置^[6] (左) および捕集用袋 (右)。(B) 本研究で用いた超音波浮揚装置 (左)。3 滴 (上から $5\text{ }\mu\text{L}$ 、 $10\text{ }\mu\text{L}$ および $5\text{ }\mu\text{L}$) を浮揚させた様子^[7] (右)。

3. 音響浮揚装置の実装

超音波振動子（ランジュバン型）にホーンを装着し、反射板をホーンから 15 mm 程度の距離に設置した装置を実装した。ここで波長 λ (m)、空気中の音速 c (340 m)、周波数を f (60 kHz) とすると、この周波数での音波は $\lambda = c/f = 5.67$ mm となる。この時の音圧は強くはないものの（計算上は 10 Pa より小さい）、数 mm 程度の小さい物質であれば捕捉させることができる。実装した装置では、1~20 μ L の範囲の水滴を定在波の節に安定に固定することができ、また複数の節で 2 つ以上の水滴が同時に浮揚可能であった（図 2B, 右）^[7]。

研究を始めた当初、音響浮揚させた液滴内部で、生体分子を取り扱った研究例は多くはなかったため、まず酵素反応の進行の確認を行なった。酵素反応の進行を可視化するため、西洋ワサビペルオキシダーゼを用いた発色反応を行なった^[7]。比色基質として *o*-フェニレンジアミン（OPD）を用いたところ、過酸化水素（H₂O₂）存在下で発色し、試験管内と同じ 20 分程度で十分着色することが示された（図 3A）。さらにプラスミドを制限酵素で切断できることが示され、浮揚液滴内部において、生体分子の明らかな分解や失活がないことを確認できた（図 3B）。

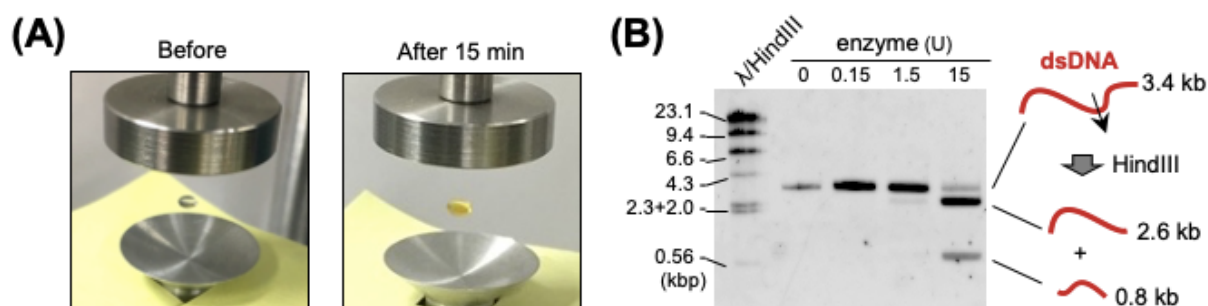


図 3 (A) 浮揚液滴内におけるペルオキシダーゼの着色反応。(B) 制限酵素 *Hind*III によるプラスミド DNA の切断^[7]。

生命科学分野で超音波は、器具洗浄はもちろん、細胞破碎を破壊するなど、いわゆるキャビテーション効果で生体分子を破壊する操作でよく用いられる。例えばホモジナイザーは、100 W 以上の強力な出力で、20 kHz~100 kHz の超音波を発生させる装置である。しかし一方でリポソームを作製するほか、エコー（超音波）検査など、医療現場において非侵襲の診断装置としても利用されている。つまり超音波は、周波数と出力の組み合わせで音響エネルギーを選択し、生体に与える影響がない条件を設定することが可能である。本研究で用いる超音波の強度は、最大で 1.6 W/cm² であり、Miller らによる先行研究^[8]では DNA にダメージを与えることはほとんどないとされる出力である。この条件であればウイルスゲノムの遺伝子増幅が可能であると考えられる。

4. 浮揚液滴を用いてエアロゾルを回収するシステムの開発

エアロゾルを回収するシステムの構築に先立ち、エアロゾル発生装置として、質量分析装置で使われるネブライザーを用いることとした。この器具は溶液と気体を流し込むことで液体を噴霧し、エアロゾルを発生させることが可能である。緑色の蛍光物質を準備し、音響浮揚装置と 5~35 cm の距離でエアロゾルにして噴霧し、液滴に取り込ませた（図 4A）。紫外線を照射することにより、蛍光物質が液滴内に捕集されていることを確認できた（図 4B）。また液滴の蛍光強度より、取込まれたエアロゾルの個数を定量的に算出した。距離および噴霧時間依存的に取り込まれたエアロゾルの個数が増えることが明らかになり、空気中のエアロゾルを浮揚液滴で捕集できることが明らかになった。

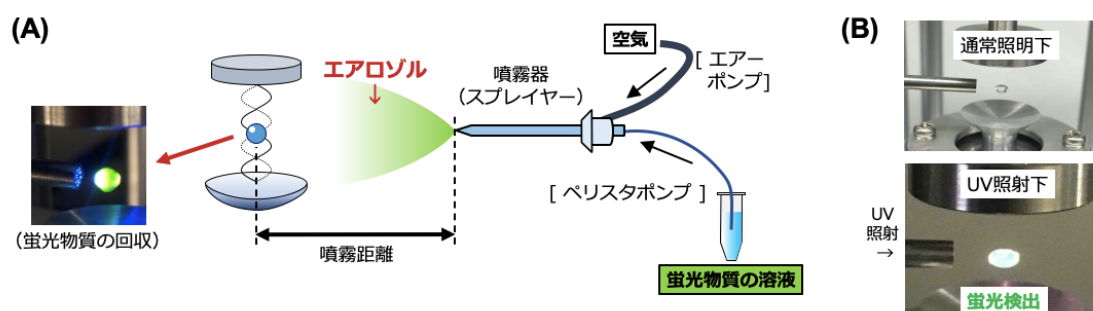


図4 (A) 浮揚液滴を用いてエアロゾル回収装置を構築し、浮揚液滴に緑色の蛍光物質を回収した。
(B) 浮揚液滴をUV照射下で緑色蛍光を検出することができた。

5. ウイルス遺伝子検出のための増幅システム

エアロゾルに含まれるウイルスの個数は少ないため、PCRのように増幅しないと検出することができない。しかし通常のPCRは温度の上げ下げが必要である。今回目指す手法で温度の上げ下げをすると装置が複雑になってしまうため、室温でかつ等温（＝温度の動きがない条件）で遺伝子増幅する方法を適用することとした。等温で遺伝子増幅可能な手法は複数提案されているが、室温付近で実施可能であり、酵素や抗体などの取り扱いが繊細（低温で保管が必須）な分子は用いないほうが望ましい。そこで、これらの条件に合致する hybridization chain reaction (HCR) 法を検討した（図 5A）。この手法は、合成オリゴヌクレオチドの遺伝子のみ準備すれば良く、保存安定性に優れており、酵素や抗体のように冷凍保存する必要がない。ヘアピン型の Hp1 および Hp2 のプライマー（オリゴヌクレオチド）を設計し、増幅した遺伝子を蛍光で検出する系を構築した。

インフルエンザウイルスゲノムの遺伝子の一部を複数、候補として検討したところ、遺伝子増幅するヌクレオチド配列を決定することができた。また、試験管内でオリゴ核酸 Hp1、Hp2 プライマーを 25℃ で 4 時間インキュベート後、アガロースゲル電気泳動を行ったところ、HCR 反応で遺伝子の増幅が確認できた（図 5B）。さらに、蛍光標識したプライマーを新たに準備し、10 分程度で遺伝子増幅に伴う蛍光強度の増加を観察した（図 5C）。この蛍光強度の増加はターゲット遺伝子 (I_{target}) の量比に依存し、最適な濃度（今回の条件では 3 μM ）を見出すことができた。

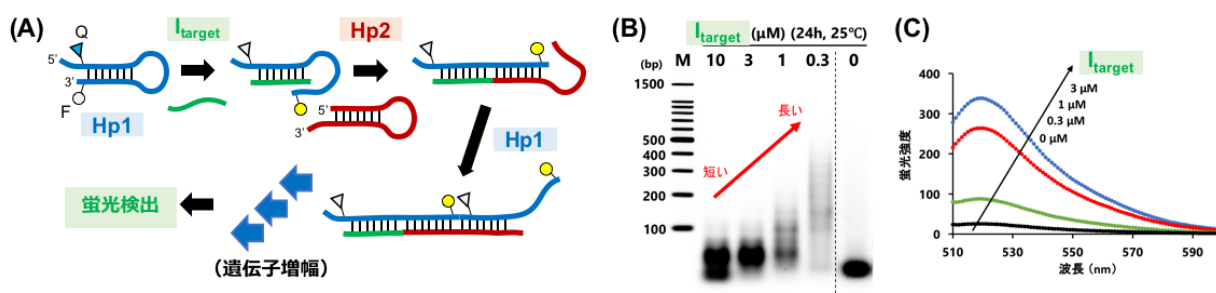


図 5 (A) HCR 法によるウイルス遺伝子増幅のための分子設計。ターゲット遺伝子に短鎖ヘアピン核酸 Hp1/Hp2 がハイブリダイズして特異的な増幅をする。(B) 増幅した遺伝子をゲル電気泳動にて確認した。
(C) 蛍光標識した Hp1/Hp2 プライマーにより、数分で遺伝子の増幅を確認できた。

6. まとめ

研究課題の成果により、浮揚液滴を用いてエアロゾルを回収するシステムを開発することができ、さらにウイルス遺伝子検出のための蛍光増幅システムを構築することができた。今後は、これらの成果を組み合わせ、実際に浮揚液滴中で遺伝子の増幅、および検出を迅速に行う（数分程度）ことを計画している。さらに複数のウイルスゲノムを標的とした分子を設計することで、どのウイルスがエアロゾルに含まれているかを判断することができると考えられる。

この検出系が実用化されれば、非侵襲的に、また日常的に居住空間でウイルス流行の監視が容易になる。例えば本人の自覚がなくても、発症者が特定の空間内にいることがわかるようになる。現状では発症してからでないと病院に赴いたり、診断を受けることはない。この方法では、発症者が自覚する前にもウイルス感染症の流行が正確に把握できることから、既存の公衆衛生の概念を覆す社会を構築することが期待できる。

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ご支援を頂きました。ここに記して謝意を示します。

参考文献

- [1] 新型コロナウイルス感染症について（閲覧日：2024年12月14日）、感染症情報、厚生労働省、https://www.mhlw.go.jp/stf/seisakunitsuite/bunya/0000164708_00001.html
- [2] 新型コロナウイルス感染症の体外診断用医薬品（検査キット）の承認情報（更新日：2024年6月21日）、厚生労働省、https://www.mhlw.go.jp/stf/newpage_11331.html
- [3] Sakai-Tagawa, Y.; Yamayoshi, S.; Halfmann, P.J.; Kawaoka, Y., Comparative Sensitivity of Rapid Antigen Tests for the Delta Variant (B.1.617.2) of SARS-CoV-2. *Viruses* 2021, 13, 2183.
- [4] Matsubara, T.; Ujie, M.; Yamamoto, T.; Akahori, M.; Einaga, Y.; Sato, T., Highly sensitive detection of influenza virus by boron-doped diamond electrode terminated with sialic acid-mimic peptide, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2016, 113(32), 8981.
- [5] Matsubara, T.; Ujie, M.; Yamamoto, T.; Einaga, Y.; Daidoji, T.; Nakaya, T.; Sato, T., Avian Influenza Virus Detection by Optimized Peptide Termination on a Boron-Doped Diamond Electrode, *ACS Sens.* 2020, 5(2), 431.
- [6] Milton, D. K.; Fabian, M. P.; Cowling, B. J.; Grantham, M. L.; McDevitt, J.J., Influenza Virus Aerosols in Human Exhaled Breath: Particle Size, Culturability, and Effect of Surgical Masks. *PLoS Pathog.* 2013, 9(3), e1003205.
- [7] Matsubara, T.; Takemura, K., Containerless Bioorganic Reactions in a Floating Droplet by Levitation Technique Using an Ultrasonic Wave. *Adv. Sci.* 2020, 8, 2002780.
- [8] Miller, D.L.; Thomas, R.M.; Frazier, M.E., Single strand breaks in CHO cell DNA induced by ultrasonic cavitation in vitro. *Ultrasound Med. Biol.* 1991, 17, 401.