［研究助成（A）］

非接触・非侵襲で病原体を回収するシステムの開発

Development of non-contact and non-invasive collection system for pathogens

2221029

研究代表者　慶應義塾大学　理工学部　准教授　松　原　輝　彦

［研 究 の 目 的］

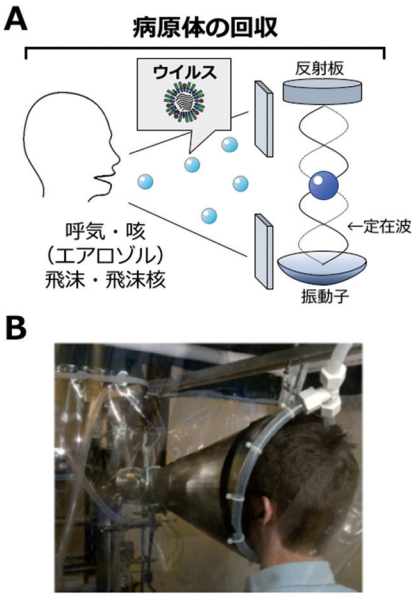
人類は常に新興ウイルス感染症の脅威下にあり，2020 年には新型コロナウイルスの蔓延を許した。当初の検査法は PCR のみであり，検査の需給がひっ迫した。また検体を採取する医療従事者を危険に晒すことが問題視され，検査を機械で置き換え自動化するニーズがあることが明らかになった。我々は，患者と非接触・非侵襲で病原体を含む検体を得て，遺伝子検出できるセンサー開発を目指している。本研究では，患者と接することなく（非接触），呼気などのエアロゾル（非侵襲）に含まれる病原体（ウイルスなど）を回収し，検出する技術を開発する。検出する際には，事前に準備できる化学試薬を用い，病原体のゲノム解析結果があれば，世界中で一斉に検出が開始できる検査環境の整備が期待できる。

［研究の内容，成果］

【背景】

2019 年に発生して流行した新型コロナウイルス感染症（COVID-19）対策では，鼻腔ぬぐい液や唾液などを PCR（polymerase chain reaction）法やイムノクロマト法（ウイルス抗原などを検出）で検査を行い，診断やサーベイランスが行われた。PCR 法は，ウイルスゲノムの特徴的な一部の遺伝子情報さえあれば解析が可能である。また PCR 装置は世界中の研究および教育機関で普及し，解析技術を有する人材も豊富であることから，当初の診断法として世界中で利用された。しかしながら，患者からの検体採取，梱包やウイルス溶解などの作業は人の手で行う必要があった。特に患者から検体の採取を行う際に感染リスクが高いことから，防護服が必須である。感染リスクだけでなく，防護服の着用による身体的な負担も強いられることが問題視された。

そこで我々は，ウイルスを非接触・非侵襲で回収する方法を開発する（図 1A）。簡易的には，患者の呼気をビニール袋に回収することが



（D. K. Milton, 2013）[1]

図 1　（A）非接触・非侵襲で病原体を回収および検出する装置のイメージ。（B）既存のエアロゾル回収装置

可能であるが，採取できる量が少ないことや，ビニールの内面に付着したエアロゾルを手作業で拭き取りする必要があり，感染リスクが高い。またエアロゾル回収装置も報告されているが（図 1B），大掛かりな装置を各医療機関に設置することは現実的ではない。我々は片手で持ち運びできる程度の大きさで，患者自身の操作（もしくは自動運転）で，居住空間の空気中に漂うエアロゾルに含まれる病原体の検出が可能なシステムを開発する。

【回収装置および検出の概要】

本研究では音響浮揚装置を用い，反応溶液を空気中に浮揚させ，そこに患者の呼気を含むエアロゾル（咳，くしゃみなどの飛沫および飛沫核）を吹きかけることによって病原体検出するシステムを構築する（図 1A）。回収した病原体の核酸を遺伝子増幅や抗体などによって検出を行うことが期待できる。例えば病原体の種類により色が変わるなど，同時に複数の病原体を判別可能となることが期待できる。

【音響浮揚装置の原理】

1980 年代より，物質を浮かせる技術は磁気（magnetic），低温超伝導（superconducting），光（optical），電気（electric），空気力学（aerodynamic）などが知られていた（図 2A）。ここで化学反応および生物を取り扱いたい場合には，常温・常圧である必要がある。もっとも身近な技術は磁性を利用するものであるが，対象物が磁性体である必要があるため，水溶液は利用できない。他にも超伝導では，極めて低い温度にする必要があり，溶液が凍ってしまうために利用できない。そこで本研究では，常温・常圧で利用可能な音響浮揚現象（acoustic levitation）に着目した。振動子を金属で構築し，さらに超音波を用いることで，水分に耐性があり可聴音がない装置を実装した。

音響浮揚とは，音波もしくは超音波（音響波）の定在波の節の位置に物体を捕捉（浮揚）させることができる現象である（図 2B）。ここで定在波の音圧は数 Pa（$=N/m^2$）であることから，数 mm 程度の小さくて軽い物質であれば水中や空気中で捕捉させることができる。

浮揚装置は，周波数 60 kHz のランジュバン型の超音波振動子に凹型ホーンを装着し，反射板を設置した。ここで波長 λ(m)，空気中の音速 c，周波数を f(Hz) とすると，この周波数での音波は，

$$\lambda = c/f$$

の式より，25℃ で λ 5.67 mm を持つことが計算でき，約 2.8 mm 間隔で節が生成される。実装した装置では，1〜20 μL の範囲の水滴を定在波の節に安定に浮揚可能であった（T. Matsubara, 2020）[2]。

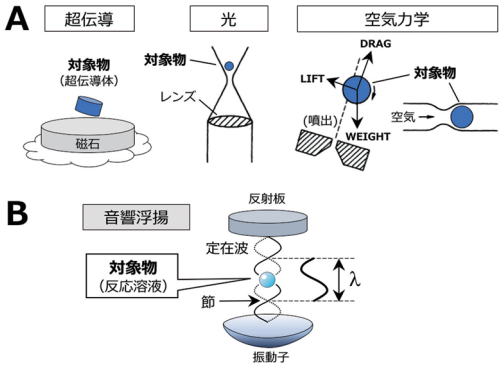


図 2　(A) 物質を浮かせる技術（超電導，光，空気力学）。(B) 音響浮揚の概要

【エアロゾル発生装置の開発および回収】

人間の呼気や咳，くしゃみなどはエアロゾルとして空気中に浮遊する。咳などの飛沫の多くは自由落下するが，一部の小さな飛沫（5〜10 μm）は数十分空気中を漂い，付着した鼻腔や上気道から感染する。飛沫の水分が蒸発した飛沫核（2〜3 μm）となると落下せず，空気中を漂い続ける。呼気のエアロゾルの約 9 割は 1 μm 程度である。

人工的にエアロゾルを発生させ，浮揚液滴にエアロゾルを回収できるシステムを開発した（図 3）。ジェット噴霧装置（ネブライザー）に

ペリスタポンプで水溶液を送液し，一方で加圧した空気を送り込んで噴霧させ，エアロゾルを発生させた。化合物 A を含むエアロゾルに浮揚液滴を露出すると，化合物を回収することができることを実証した。人工的にエアロゾルの発生と回収を行う研究用装置を構築することができた。

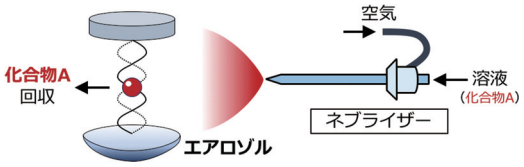


図 3　ネブライザーを用いたエアロゾルを発生装置の構成および噴霧溶液の液滴回収

【液滴操作の基礎技術の開発】

空気中で水溶液を浮揚させると徐々に水分が蒸発し，例えば 10 μL を室温付近で浮揚させると，60 分程度で蒸発してしまう（図 4 上）[5]。浮揚状態を維持するために，定期的に水分の添加を行う必要がある。数分おきに水を添加して容量を回復させ，4 時間浮揚させことに成功した（図 4 下）。

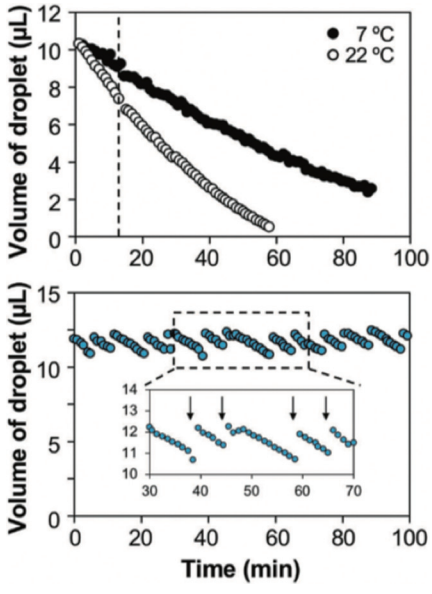


図 4　浮揚液滴の容量の経時変化（上）および水の添加による容量の維持（下）[5]。矢印の位置で 2-3 μL を添加した

【浮揚液滴の遠隔操作】

空気中で液滴を浮揚させる操作は，ピペッターなどを用いて水溶液を吐出することで実現できる。しかし本研究の目的では，人の手で行うのではなく，遠隔操作を行うことが必須である。そこでロボットアームを導入し，ピペッターをパソコン（PC）で制御して液滴を遠隔で浮揚させる装置を開発した（図 5）。

電動ピペッターをアームと連結し，水をピペットに吸い取り，定在波の節の位置で吐出を行って遠隔浮揚に成功した。この技術により，遠隔地であっても，患者が隔離された施設内であっても，液滴操作をすることができることが示された。

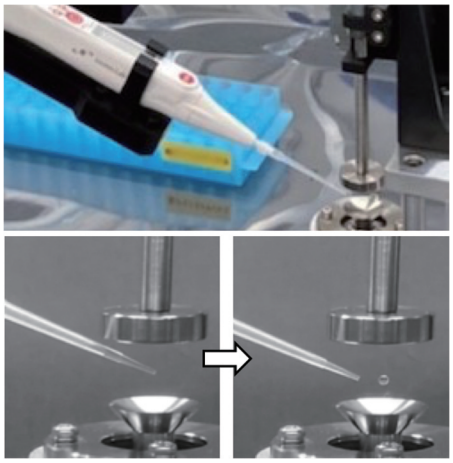


図 5　遠隔操作を可能にする液滴浮揚システムの外観（上）。水溶液の吐出による液滴の遠隔浮揚の前後の写真（下）

【浮揚液滴内での遺伝子増幅技術の開発】

ウイルスなどの病原体を特異的に検出するには，抗体との結合やゲノム遺伝子増幅による操作が必須である。失活しやすく，高価な抗病原体抗体を多数，常に医療機関が取り揃えておくことはできないが，遺伝子増幅に必要なオリゴ核酸は安価で数時間で合成可能である（千円程度で数十回の反応が可能）。ゲノム解析の結果が得られた翌日には，世界中で PCR 反応が一斉に可能となる。しかし PCR 反応では温度を繰り返し上げ下げする（95 度～55 度付近）必

要がある。そこで一定温度で遺伝子増幅が可能な HCR（hybridization chain reaction）法に着目した[3]。室温付近で遺伝子増幅が可能であり，本研究で用いる音響浮揚と親和性が良いと考えられる。

HCR 法は，ステムループ構造を有したヘアピン鎖 1（Hp1）の突出末端と，そこに相補的な配列を有する標的遺伝子セグメント（I_{target}）がハイブリダイズし，ヘアピン構造が開かれることで伸長反応が開始する（図 6）。Hp1 が開き，新たに露出した配列は，別のヘアピン鎖 2（Hp2）の突出末端とハイブリダイズする。ここで Hp2 でも新たに配列が露出するため，別の Hp1 分子の突出末端とハイブリダイズし，2 本鎖となった DNA が伸長する。ここでヘアピン型 Hp1 に fluorescence resonance energy transfer（FRET）を引き起こす 2 種の蛍光性官能基を連結しておくことで，Hp1 が開いて 2 本鎖となった際，蛍光を発する仕組みを導入する。つまり，遺伝子 I_{target} が存在すると 2 本鎖 DNA が伸長するとともに，強い蛍光が出る，という検出系を構築した。

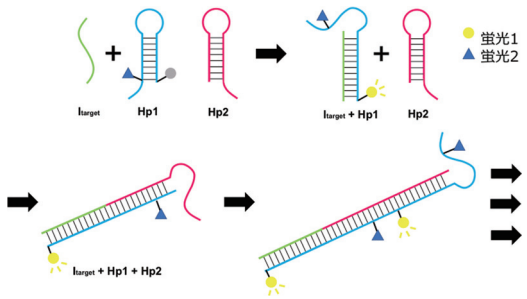


図 6　HCR 法による遺伝子増幅の概要。FRET を引き起こす 2 種の蛍光性官能基を Hp1 に修飾することで，標的病原体の蛍光検出が可能となる

アメリカ国立生物工学情報センター（NCBI）から A 型インフルエンザウイルスの遺伝子のデータを取得し，これを用いて ClastalW で配列のアライメントを作成した（ClastalW は DNA 配列やタンパク質配列の多重整列を調べるツールである）。標的部位に対する Hp1，Hp2 プライマーの二次構造をシミュレーションし，各プライマーの融解温度（tm）値などのパラメータが既報（R. M. Dirks, 2004）[4] と最も近いプライマーを選択した（図 7A）。

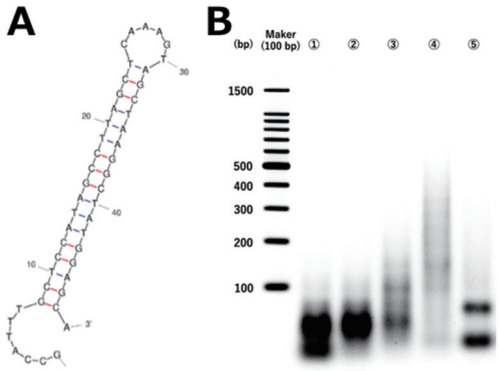


図 7　（A）インフルエンザウイルスの遺伝子を用いて設計したヘアピン構造。（B）HCR 反応後の 2 本鎖 DNA のゲル電気泳動。レーン④で最も長い DNA が検出された

選択した Hp1，Hp2 プライマーと，標的核酸（人工的に合成したインフルエンザウイルスの遺伝子配列を使用）を混合し，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。その結果，標的核酸の濃度が高いほど，分子量が小さい二重鎖 DNA が生成され，設計したプライマーで HCR 反応が進行していることを確認することができた（図 7B）。この反応は浮揚液滴中でも進行し，遺伝子増幅が可能であることを示すことができた。

【最後に】

本研究期間では，浮揚液滴によるエアロゾル回収，液滴の遠隔操作と遺伝子増幅の実証中心に成果を出すことができた。これらの技術をさらに進め，最終的に要素技術を複合化することで，回収および検出システムの実装が期待できる。

［参考文献］

［1］ D. K. Milton, M. P. Fabian, B. J. Cowling, M. L. Grantham, J. J. McDevitt, Influenza virus aerosols in human exhaled breath: particle size, culturability, and effect of surgical masks, ***PLoS Pathog.***, 9 (3),

e1003205（2013）.
［2］ T. Matsubara, K. Takemura, Containerless Bioorganic Reactions in a Floating Droplet by Levitation Technique Using an Ultrasonic Wave. ***Adv. Sci.***, 8, 2002780（2020）.
［3］ D. Evanko, Hybridization chain reaction, ***Nature Methods***, 1, 186（2004）.
［4］ R. M. Dirks, N. A. Pierce, Triggered amplification by hybridization chain reaction, ***Proc. Natl. Acad. Sci. USA***, 101(43), 15275–15278（2004）.

［成果の発表，論文など］

［5］ T. Arai, T. Sato, and T. Matsubara, Effective Cell Transfection in An Ultrasonically Levitated Droplet for Sustainable Technology, ***Adv. Sci.***, 9, 2203576（2022）.
［6］ 松原輝彦，次世代のウイルス検出センサーおよびバイオリアクターの開発，第 2 回ヘルステック・デバイス・フォーラム 2022，盛岡市，2022 年 8 月 6 日