

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82626

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19938

研究課題名（和文）薬剤耐性菌感染症迅速診断技術の開発

研究課題名（英文）Development of rapid diagnosis technology for drug-resistant bacterial infections

研究代表者

安浦 雅人（Yasuura, Masato）

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員

研究者番号：20760408

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、薬剤耐性菌感染症の迅速診断技術の重要な要素技術となる、油中液滴の高速生成系及び測定系の構築を実施した。5～50 μm の油中液滴を1分以内に総体積1mL以上得る生成系と、油中液滴の油相と水相の屈折率を調整して透明化した液滴を、セルに充填し、シート光照射による2次元測定を断層状に繰り返すことで擬3次元計測を可能とする測定系を開発し、両者を用いて、作成した厚さ10mmの模擬サンプルに含まれる蛍光色素入り液滴を5分で検出・識別することに成功した。これにより、10の9～10乗個の液滴を1分以内に測定するという、既存の油中液滴測定系よりも3桁程度高い処理能力を実現しうる計測系の基盤を確立した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、薬剤耐性菌感染症の迅速診断のための要素技術開発として、油中液滴の高速生成系及び測定系の構築を実施した。開発した液滴高速生成系と擬3次元計測を可能とする測定系は、近年研究が盛んになっているリキッドバイオプシーや、コロナ禍で注目が集まったウイルス検出などにも応用可能な基礎技術であり、薬剤耐性菌感染症診断以外への展開も期待できる。特に、液滴PCR系への応用は、本研究内で行ったPCR法を応用した活性判定技術開発と組み合わせることで、活性のあるウイルスのみを測定する感染リスクの高感度評価に展開しうるため、防疫技術の更なる発展への貢献が期待できる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we developed a rapid generation system and a measurement system for water-in-oil emulsion, an important elemental technology for rapidly diagnosing drug-resistant bacterial infections. We have developed a generation system that can produce droplets in oil with a diameter of 5 to 50 μm in a total volume of 1 mL or more within 1 minute. We have also developed a measurement system that enables pseudo-3D measurement by filling a cell with transparent water-in-oil emulsion adjusting the refractive index and repeating 2D measurements by irradiating sheet light in slices. Using both, we succeeded in detecting and distinguishing droplets containing fluorescent dyes contained in a simulated sample with a thickness of 10 mm in 5 minutes. As a result, we have established a basic technique for a measurement system that can measure billions of droplets within one minute, which is three orders of magnitude higher than existing water-in-oil emulsion measurement systems.

研究分野：バイオセンシング、センサ工学

キーワード：エマルジョン デジタルアッセイ 光センシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

薬剤耐性菌感染症は WHO が “invisible pandemic” と評するほど世界的な問題となっている。現在の薬剤耐性菌検査は、サンプルから培養した菌を菌種同定・薬剤感受性試験に用いる間接法が主流である。しかし、全工程に 3~5 日必要で、その間は効果的な投薬が行えないだけでなく、広域抗菌薬投与による耐性菌発生リスクが数日続くことになる。サンプルを直接抗菌薬が含まれた培地に塗布して耐性菌を検出する直接法もあるが、結果が出るのは翌日以降で耐性菌が検出されてもそれが感染症原因菌であるかは判別できないため、あまり用いられない。効果的な抗菌薬を適切・迅速に投与するために、感染症原因菌がどの抗菌薬に耐性を持つかを素早く判別する技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、測定対象(患者体液など)を細かい液滴に分割して、液滴 1 つ 1 つに対して、検出対象(この場合は感染症原因菌やその固有物質など)の有無を判定することで高感度検出を実現するデジタルエマルジョン法をベースに、薬剤耐性菌感染症の迅速診断技術に必要な要素技術を開発することである。迅速診断技術が開発できれば、診察当日に有効な抗菌薬投与を開始できるよう、1 時間以内に薬剤耐性を持つ感染症原因菌が存在するかを判別可能になる。これにより、即時に適切な抗菌剤投与が可能になり、患者の回復を早めるとともに新たな薬剤耐性菌発生リスクの低減にも貢献できる。

3. 研究の方法

デジタルエマルジョン法をベースとした薬剤耐性菌感染症の迅速診断技術の実現に必要な要素技術として、以下の 2 つの要素技術開発を実施した。

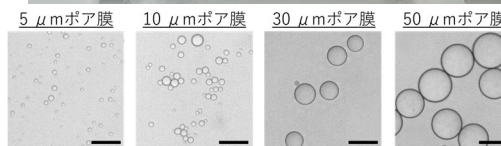
- (1) 1 mL 以上のサンプルを短時間で処理可能な油中液滴高速生成系の開発
液滴生成手法の中でも、多量の生成にすぐれる膜乳化法に着目し、ポアサイズ・流速等の探索により、デジタルエマルジョン法に最適な 5~50 μm (sub-pL~pL サイズ)の油中液滴を安定して自動生成可能な生成系を構築する。
- (2) (1)の生成系で作成した多量の油中液滴を高速に計測可能な測定系の開発
油中液滴の油相と水相の屈折率を調整し、透明化した油中液滴を 3 次元的に充填した状態で測定可能とする技術(研究開始前から保有しており、R3.4 月に特許出願した技術)をベースに、透明化した液滴を角型セルに充填し、シート光照射による 2 次元測定をスライス状に繰り返し行うことで擬 3 次元計測を可能とする測定系を構築する。

加えて、上記の要素技術と組み合わせることで応用範囲の拡大が期待できる、ポリメラーゼ連鎖反応(PCR)法などの核酸検出系への応用技術の開発を並行して実施した。

4. 研究成果

- (1) 1 mL 以上のサンプルを短時間で処理可能な油中液滴高速生成系の開発

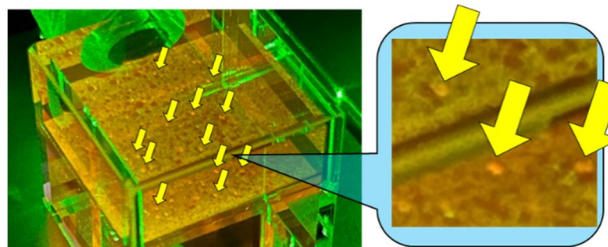
乳化コネクタの両端にシリンジを直列につけることで、多孔膜を通す形でシリンジ内の液を往復させることが可能な自動装置(右写真上)を用いて、5~50 μm の油中液滴を 1 分以内に、総体積 1 mL 以上得ることに成功した。測定に供する油中液滴の総体積量を増やすことで、希薄サンプルに対する検出限界の改善が期待できる。開発した油中液滴高速自動生成系を用いて、4 水準の粒径の液滴を作成した(右写真下、スケールバーは 50 μm)。油中液滴粒径の安定性は、測定の精度・分解能や各液滴からの信号強度に大きく影響する。この成果により、重要な要素技術である、油中液滴高速生成系を開発した。

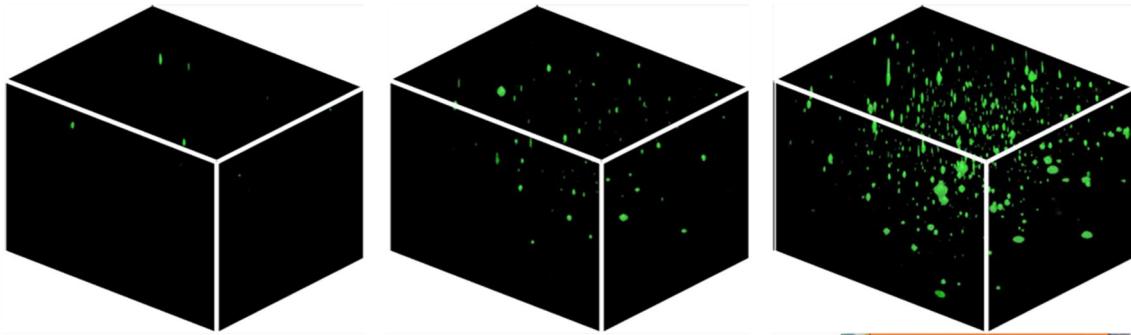


Scale bars: 50 μm

- (2) (1)の生成系で作成した多量の油中液滴を高速に計測可能な測定系の開発

(1)で開発した油中液滴の高速生成系を用いて作成した模擬サンプルを用いて、厚さ 10 mm の液滴集合体に含まれる蛍光色素入り液滴を 5 分で検出・識別することに成功した(右写真)。厚さ 10 mm 以上の試料を光学観察するために、油中液滴の油相成分の屈折率を



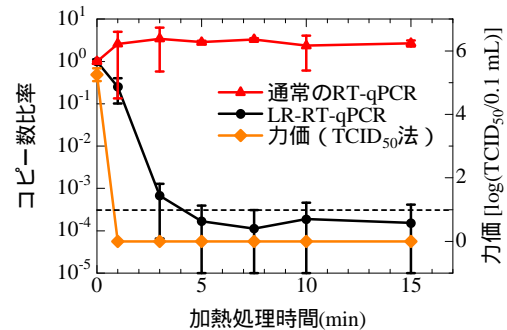


調整し、 10^{-4} レベルでの屈折率整合を実現し、シート光照射による蛍光断層像の撮影に成功した。更に、Z ステージと液体レンズを用いて、試料に対するシート光照射高さの変化に伴い観察面までの光路長が変化してしまう問題に対応し、Z 軸方向に試料を封入したセルを掃引すると同時に液体レンズへの印可電圧を掃引することで、焦点がずれることなく蛍光断層像(上図。蛍光観察で捉えた液滴を緑で示している。観察方向は図中上方から。)を自動測定可能な試作装置(右写真)を開発した。これにより、10の9~10乗個の液滴を1分以内に測定するという、既存の油中液滴測定系よりも3桁程度高い処理能力を実現しうる計測系の基盤を確立した。



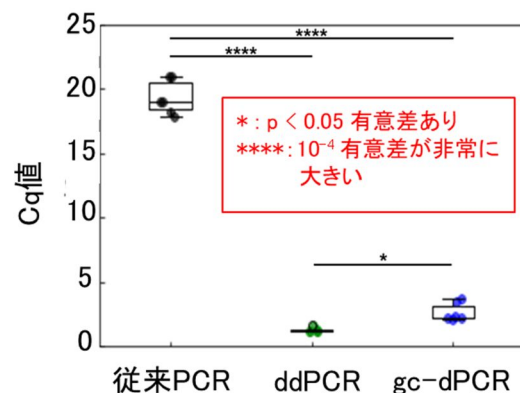
(3) 活性のある病原体のみを検出する手法の要素技術開発

(1)(2)の要素技術との組み合わせが期待できる、活性のある病原体のみを検出するための、ロングレンジ逆転写定量 PCR(LR-RT-qPCR)法を用いた検出方法を開発・性能評価し、モデル病原体をインフルエンザウイルスとした際に、UV・加熱・薬剤消毒による不活化を反映可能であることを明らかにした(右図は加熱消毒の影響を示している)。LR-RT-qPCR 法では、通常の PCR 法と異なり、測定対象とする病原体固有の核酸配列がセグメントのほぼ全域にわたるため、UV などの外的要因による核酸へのダメージが結果に反映されやすく、この性質を利用して、UV のみならず加熱や薬剤消毒による不活化を反映した検出法の開発に成功した。



(4) 開発した液滴生成・測定系の PCR への応用に必要な、高い熱安定性を有するゲルカプセル法の要素技術開発

多量の油中液滴に対して、PCR 法を応用する際には、mL 単位の油中液滴に対して、素早く均一な熱交換を行い、サーマルサイクルを行う必要がある。PCR 法におけるサーマルサイクルの一般的な温度幅は、55 程度~95 程度となっており、液滴には高い熱安定性が求められる。これまでのドロップレットデジタル PCR(ddPCR)法では、油相にフッ素オイルを用いることで熱安定性を高めた系が利用されているが、近年フッ素オイルの環境負荷に対する批判が強まっていることもあり、代替手段が求められていた。そこで、本研究では、アルギン酸をベースとするハイドロゲルを利用し、油中液滴の外周部分だけをゲル化し、内部は液状のまま PCR のサーマルサイクルに掛けることが可能な、ゲルカプセルデジタル PCR(gc-dPCR)法を開発した。開発した gc-dPCR 法を通常の PCR 法及び ddPCR 法と比較し、gc-dPCR 法が ddPCR 法とほぼ同等の核酸増幅効率を示し(右図) 尚且つ大豆油などの環境負荷の低い油を分散媒にしても実施可能であることを実証した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yasuura Masato, Nakaya Yuki, Ashiba Hiroki, Fukuda Takashi	4. 巻 22
2. 論文標題 Investigation on the applicability of a long-range reverse-transcription quantitative polymerase chain reaction assay for the rapid detection of active viruses	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 BMC Microbiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12866-022-02723-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Tan Zheng Lin, Yasuura Masato, Horiguchi Yukichi, Ashiba Hiroki, Fukuda Takashi	4. 巻 190
2. 論文標題 Hydrogel capsule-based digital quantitative polymerase chain reaction	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Microchimica Acta	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00604-023-05827-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 芦葉 裕樹、安浦 雅人、藤巻 真、福田 隆史
2. 発表標題 膜乳化法で生成した微小液滴によるデジタルウイルス検出
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安浦 雅人、芦葉 裕樹、堀口 諭吉、福田 隆史
2. 発表標題 感染性ウイルス検出のための検討 - 不活化処理の核酸検出への影響 -
3. 学会等名 第83回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安浦 雅人、芦葉 裕樹、堀口 諭吉、陳 政霖、福田 隆史
2. 発表標題 抗体修飾磁性粒子を用いたウイルスセンサ実用化のための抗体長期安定性評価
3. 学会等名 第70回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 隆史、安浦 雅人、芦葉 裕樹、堀口 諭吉、陳 政霖
2. 発表標題 迅速性・高感度の両立に向けた多粒子格納型デジタルイムノアッセイ技術の開発
3. 学会等名 日本化学会 第103春季年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	芦葉 裕樹 (Ashiba Hiroki) (90712216)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・ 製造領域・主任研究員 (82626)	
研究 分担者	平間 宏忠 (Hirama Hirotada) (40748779)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・ 製造領域・主任研究員 (82626)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------