

デジタルエマルション法開発に向けた蛍光試薬の基礎検討

Basic study of fluorescent dyes for digital emulsion assay

産総研¹ ○安浦 雅人¹, 芦葉 裕樹¹, 平間 宏忠¹, 藤巻 真¹

AIST¹, Masato Yasuura¹, Hiroki Ashiba¹, Hirotada Hirama¹, Makoto Fujimaki¹

E-mail: Yasuura-masato@aist.go.jp

昨今の COVID-19 の流行でも見られるように、現在のウイルス感染症に対する検査法は感染初期患者の早期発見が可能な超高感度検出を求められている。反面、イムノクロマトグラフィー (IC) 法のように POCT・その場検出に向けたタイプの現有検査技術は、検体中のウイルス量が少ない感染初期患者の鼻汁等からウイルス検出を行うには感度不足である。近年、極めて高感度のウイルス検査法開発のアプローチの一つとして、サンプルを fL サイズに分画して区画ごとの信号の有無を判定するデジタルアッセイが盛んに研究されている。代表例としてはデジタル ELISA やデジタル PCR(ポリメラーゼ連鎖反応)法などがあり、製品が市販されている。デジタルアッセイ分野では、微小分画を μm サイズのウェルを用いて行う方式が多用されているが、微小分画の総数と測定可能な液量の上限が低く、必要なインキュベーション時間も長いという欠点が存在する。

微小分画をサンプルの油中液滴 (エマルション) 化によって行うデジタルアッセイも研究されており、ドロップレットデジタル PCR(ddPCR)法が実用化されている。エマルション化はウェルによる微小分画に比してサンプルのロスが少なく対応可能な液量の上限も大きくしやすい。そこで本研究では、エマルション方式の微小分画による汎用的なデジタルアッセイ (デジタルエマルション法) 開発の基礎検討の一環として、蛍光試薬に溶存酸素応答性蛍光試薬を用い、エマルション内の溶存酸素濃度を測定対象とした測定系の検討を行った。

真空チャンバーを用いて 2h 脱気した純水と大気圧中に放置した純水の双方に溶存酸素濃度応答性蛍光試薬を添加し、バルクとエマルション化時双方の蛍光輝度を観測した。バルク評価時は、脱気した純水は大気圧中に放置した純水に比して 2~3 倍の蛍光輝度を示したが、エマルション化した際は、液滴と周囲の油相との間に蛍光輝度差が見られず、バックグラウンドとなる油相を含めた観察視野全体に溶存酸素濃度に応じた蛍光強度の変化が見られた。また、脱気した純水を用いたエマルションと大気圧中に放置した純水を用いたエマルションを混合して観測した際は、液滴間に蛍光輝度の差は見られず、大気圧中に放置した純水を用いたエマルションのみを観察した際よりも強いバックグラウンド強度がみられた。

エマルション化によって水相の体積当たりの油相との界面が大きくなるため、測定対象や使用する試薬によっては油相との間の物質流失・流入による影響を受けることになると考えられる。本研究においては、使用した溶存酸素濃度応答性蛍光試薬が油相に流失したと考えられ、汎用的なデジタルエマルション法の開発に際しては、測定対象・使用試薬に応じてエマルション化に際して工夫を要すると判明した。