

## スマートバイオセンシング

### Smartphone-Based Biosensing

黒田 章夫\*, 西村 智基, 石田 丈典, 吉永 圭佑, 吉田 知哲, 藤野 美穂, 舟橋 久景  
AKIO KURODA\*, TOMOKI NISHIMURA, TAKENORI ISHIDA, KEISUKE YOSHINAGA, CHISATO YOSHIDA, MIHO FUJINO, HISAKAGE FUNABASHI

広島大学・大学院先端物質科学研究科 〒739-8530 広島県東広島市鏡山 1-3-1

\* TEL: 082-424-7758 FAX: 082-424-7047

\* E-mail: akuroda@hirosihima-u.ac.jp

Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, Higashi-Hiroshima, Hiroshima 739-8530, Japan

キーワード: スマートフォン, バイオセンシング, 蛍光顕微鏡, アスベスト, 核酸

Key words: smartphone, biosensing, fluorescent microscope, asbestos, nucleic acid

(原稿受付 2019年3月4日/原稿受理 2019年3月15日)

#### 1. はじめに

近年, 医療現場に加え, 環境モニタリング, 食品の安全検査など様々な分野において, 測定現場で標的検出を行うための技術 (Point of Care Testing, POCT) の開発が求められている。POCT では, 電源など検査に必要な環境が保障されていない場所において検査を行う場合が多く, また測定者は専門の測定技師ではない場合が多い。したがって, 充電式で持ち運びが可能な測定機器を使い, また現場で活躍している人や患者自らが検査を行える様な簡便な手法であることが望まれる。

スマートフォンは, 高性能カメラ, GPS, ネットワークシステム, 加速度などの様々なセンサー, バッテリーがコンパクトにまとめられたコンピューターであり, 今や世界のほとんどの人がポケットに入れて持ち歩いている。ウェアラブル端末などと組み合わせた, いわゆる Internet of Things (IoT) デバイスとしての活用も盛んになされている。スマートフォンは可搬性に優れているため, POCT 開発における測定機器の情報処理部分としての利用が期待される。実際, スマートフォンに小型化したアクセサリを追加することで, 顕微鏡や計測器として利用する試みが始まっている<sup>1)</sup>。例えば, イギリスのナノポア社からは, スマートフォンベースの DNA シーケンサ (SmidgION) も登場しようとしている。「遠く離れたラボに検体や試料を持ち込むのではなく, ラボを人々に届ける」が, バイオ検査の一つの方向性として示されている<sup>1)</sup>。著者らは小型タブレットやスマートフォンをプラットフォームにしたバイオ検査を「スマートバイオセンシング」と名付けて分野横断的な研究開発を行っている。その中には著者らの身の回りの有害・危険物質の検出を個人で可能にするための微細半導体チップやフレキシブルなバイオセンサーの開発なども含まれるが, 本稿では, 開発したスマートフォン蛍光顕微鏡を

プラットフォームにしたスマートバイオセンシングについて主に解説する。

#### 2. スマートフォン蛍光顕微鏡の開発

著者らは以前, タブレット型のコンピューターを利用した蛍光顕微鏡を開発していた。箱型ボディー内部に光学系 (レンズ 20 倍, 開口数 0.4, LED 励起光 470 nm, 蛍光フィルター 510 nm) を収納し, 片手で持てるキャリングハンドルを装備し, モバイルバッテリーで動作可能な蛍光顕微鏡である。天板に iPad を載せることで, iPad の背面内蔵カメラを光路に接続すると, ディスプレイ上の表示倍率において約 300 倍, iPad の表示拡大機能を使えば約 1,000 倍で観察を行うことができた。理論上の分解能は 0.7  $\mu\text{m}$  であった<sup>2)</sup>。

今回, さらに小型化を目指し, スマートフォンの背面カメラを顕微鏡の光路に接続することで, ディスプレイ上に観察画像を表示させることにした。タブレット蛍光顕微鏡と基本的な仕組みは同じであるが, 励起光源や分光フィルターなどの光学系とバッテリーを収納する部分をできるだけ小型なものとし, 持ち運び時には試料ステージや対物レンズを折りたためるようにした。その結果, 試料を入れる暗箱構造は持たないが, 折りたたんだ際は片手に収まるほどのサイズとなった (図 1)。観察範囲を対物マイクロメーターで計測すると, 画面上の表示サイズで 150 倍, iPhone の表示拡大機能を使えば約 750 倍の倍率で観察を行うことができた。当初, 手で試料を動かし視野を移動していたが, 倍率が高いために, 観察位置を調節することが難しかった。そこで X, Y, Z それぞれの方向に微調整できるようメカニカルステージと上下機構を持った台座部を作製し組み合わせた。その結果, 観察・撮影の操作性が上がり, タブレット型蛍光顕微鏡の操作性に近づいた。

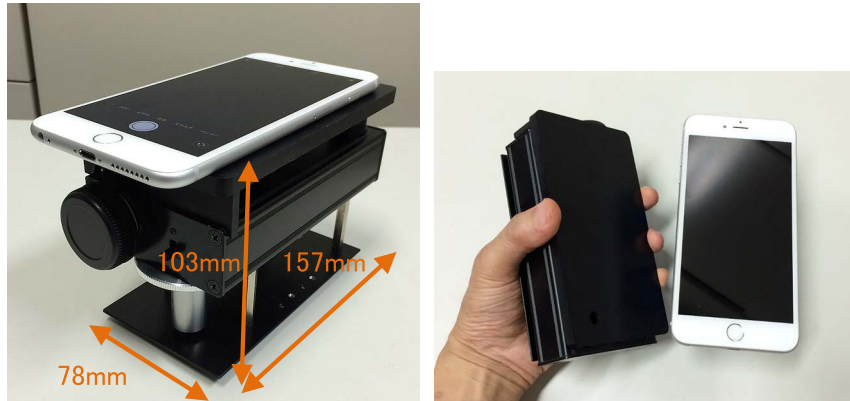


図1. スマートフォン蛍光顕微鏡。組み立てた際の外観（左）。重量は約500グラム。光路を内蔵した箱部分を小型化したことにより、片手サイズに折りたたむことが可能になった（右）。

### 3. スマートフォン蛍光顕微鏡によるアスベスト検査

著者らは、2005年のアスベストショック以来、アスベストの蛍光検出技術を開発してきた。2006年わが国ではアスベストが全面禁止になったものの、アスベストがすでに使われた可能性がある民間の既存建築物は、鉄骨、鉄筋コンクリート造りのものだけで280万棟、木造も合わせると3,600万棟にも及ぶことが知られている（国土交通省、第5回社会資本整備審議会建築分科会アスベスト対策部会資料、2009年）。最近でも、東京霞が関の合同庁舎でエレベーターシャフトからアスベストの飛散が見つかるなど、アスベストの問題は続いている。

従来のアスベストの検査法では、まず大気浮遊物をフィルターに捕捉して位相差顕微鏡で観察することから始まる。位相差顕微鏡で観察して総繊維数が多い場合、アスベストか否かの検査が電子顕微鏡下のX線による元素分析によって行われる。しかし、電子顕微鏡を用いる方法は大変時間がかかるので、迅速に危険を察知して安全を確保するためには、手軽に検査できる方法が必要とされていた。著者らはこれまでに、タンパク質の分子認識能力を利用したアスベスト蛍光染色技術を開発し、簡便で高精度なアスベスト測定方法の確立に取り組んできた。すなわち、自然界のタンパク質や人工的なペプチドライブラリーからアスベストに結合するものを見つけ出し、さらに特異性を高める様な改変技術を駆使して、アスベストに対して選択的な蛍光試薬の開発を行ってきた<sup>3-5)</sup>。この蛍光試薬を使い、フィルター上のアスベストを染色することで、アスベストを蛍光顕微鏡で検出する方法（蛍光顕微鏡法）を開発した。2017年7月に改訂された『アスベストモニタリングマニュアル第4.1版』（環境省）では、位相差モードで検出された繊維を、蛍光モードでアスベストか否かを判定しながら計測する位相差／蛍光顕微鏡法が、解体現場での漏洩監視のための迅速測定法（公定法）として位置付けられた。蛍光によるアスベスト検査方法は電子顕微鏡を利用する従来の方法に比べて格段に迅速なアスベストの判定が可能となった。

実際の解体現場から採取した試料36種を用いて、蛍光法と電子顕微鏡法による計測結果の比較を行い、測定法の違いによる影響を調べた。36種のサンプルについ

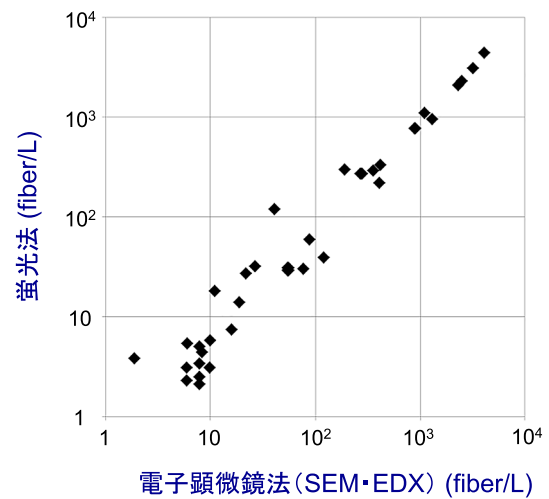


図2. 蛍光法と電子顕微鏡法によるアスベスト計測の相関。サンプルは、解体現場で通常のサンプリング法により取得したフィルター及びリアルタイムモニター・バックアップ・フィルターを使用した。

て事前の資料調査から判明した使用アスベストの種類は、蛇紋石系のアスベストであるクリソタイル（白石綿）、角閃石系のアスベストであるアモサイト、クロソライトであった。結果を検証したところ両方法による計測結果は、非常に相関性が高いことが分かった（ $r=0.995$ ）（図2）。実際に用いた顕微鏡は小型蛍光顕微鏡であるが、過酷な解体現場での検査を考えた場合、さらに携帯性に優れた蛍光顕微鏡の開発が必要であった。持ち運びが容易なスマートフォン蛍光顕微鏡を利用することにより、解体現場や被災地などでの飛散アスベストの調査に利用できる。実際に蛍光で染色したアスベスト試料を観察すると、明瞭に観察することができた（図3）。また表示拡大機能を使うとアスベストに特徴的な先割れした形状を確認することができた。スマートフォンベースでもアスベスト飛散を迅速に検知することができる。

### 4. カーボンナノチューブやナノ粒子の蛍光検出

カーボンナノチューブ（CNT）は、グラフェンシートが単層または多層で繊維状になった物質で、他ではみ

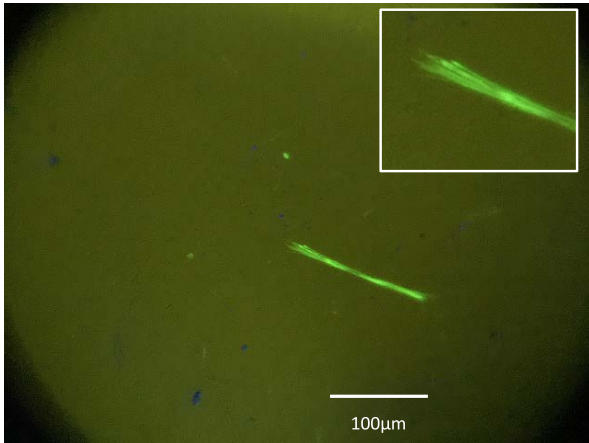


図3. スマートフォン蛍光顕微鏡によるアスベスト検査。試料は、角閃石アスベストであるクロソドライト。標準試料をフィルター上に塗布し、蛍光染色後に観察した。右上の枠内はアスベストの先端部をアイフォンの画面操作によって拡大。

られない特殊な物性をもつことから、エレクトロニクス分野をはじめ様々な分野で応用されている。しかし、多層CNTはアスベストと同じように悪性中皮腫を引き起こすことが報告された。現在、CNTの観察には電子顕微鏡が用いられており、日常的にCNTの飛散をモニタリングする方法は確立されていない。著者らの開発したバイオプローブを用いて蛍光法で観察できる微細クリソタイトの直径は30–35 nmであることがわかっている。ナノ材料は、通常の光学顕微鏡では見ることができないくらい小さいが、蛍光で修飾すれば、その存在は可視化できると考えられる。すなわち、CNTの検出に蛍光法を応用すれば、手間のかかる電子顕微鏡と比べ、はるかに簡便にCNTを検出できると考えられた。

CNT結合ペプチドをビオチン化し、Cy3で標識されたストレプトアビジン(Streptavidin-Cy3)と混合して蛍光標識し、蛍光検出プローブを作製した。この蛍光検出プローブが、CNTに結合するか確認を行うために、発がん性が危惧されている多層CNTへの結合を観察し

た。蛍光検出プローブとCNTをチューブ中で混合し蛍光顕微鏡で観察を行ったところ、CNTが蛍光で光っている様子が観察された(図4)。バイオプローブを用いた蛍光法は非常に簡便なCNT検査法になる可能性がある。

一方、酸化チタンなどのナノ粒子も100 nm以下の非常に小さいサイズを持つことから、生体への影響が懸念されている。一部の研究では、酸化チタンに発がん性があることが報告されており、また銀のナノ粒子は神経毒性が報告されている。酸化亜鉛ナノ粒子は、毒性は低いが一時的な肺の炎症作用を持つことが報告されている。ナノ粒子を管理するためには、測定法が必要となるが、ナノ粒子は通常の光学顕微鏡では見えないことから観察や測定を電子顕微鏡に依存している。簡便な測定法として、これらのナノ粒子を蛍光で簡便に検出する技術の開発を行った。

様々なナノ粒子に結合するペプチドが報告されている。ここでは酸化チタン結合ペプチドとCy3で標識されたストレプトアビジンを混合することで、酸化チタン検出用蛍光プローブを作製した。酸化チタン検出用蛍光プローブと酸化チタンナノ粒子とをチューブ中で反応させた後、位相差と蛍光顕微鏡で観察を行った。位相差顕微鏡では、粒子の形態はほとんど観察できないのに対し、蛍光顕微鏡では酸化チタンのナノ粒子を可視化することができた(図5)。Brilliant Blue 515は、最も一般的な蛍光色素であるFluoresceinの約7倍の蛍光強度を持つことが知られている。高輝度蛍光色素であるBrilliant Blue 515が標識されたストレプトアビジンを利用することで検出感度を向上させることができるのではないかと考えられた。蛍光で検出できた酸化チタンナノ粒子の直径を電子相関顕微鏡で解析を行った結果、約28 nmであることがわかった。光学顕微鏡の分解能は250 nm程度であるので(回折限界)、位相差顕微鏡では見ることはできない。一方、蛍光プローブと蛍光顕微鏡を使う蛍光法では、同じく光学的な分解能の限界でナノサイズの正確な計測は出来ないものの、ナノ粒子が光って見えるのでその存在を簡便に検出することが可能である。

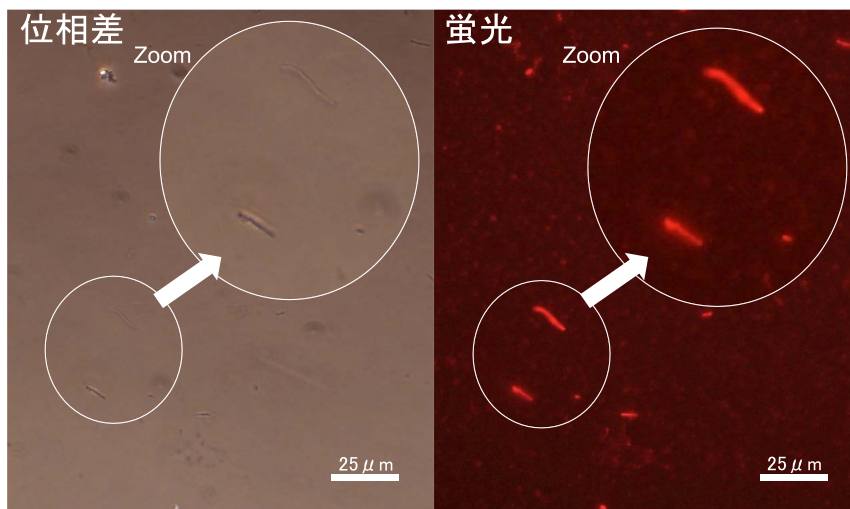


図4. 多層カーボンナノチューブの位相差画像(左)と蛍光画像(右)。

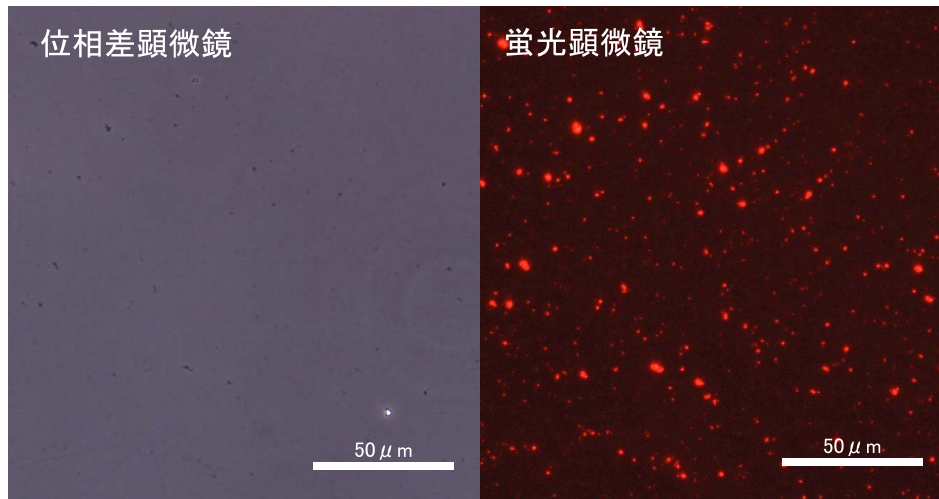


図 5. 酸化チタンナノ粒子の位相差画像（左）と蛍光画像（右）。

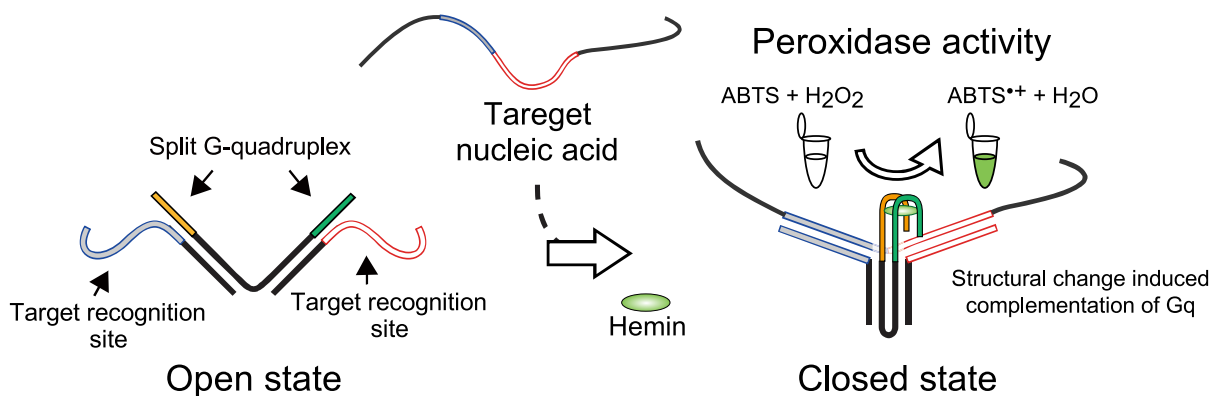


図 6. split-Gq-based DNA-NT の動作原理図。Elsevier から許可を得て転載。Reprinted from Ref. 6, Copyright (2015), with permission from Elsevier.

### 5. 発色による核酸検査

著者らは DNA ナノ構造体を利用した標的核酸検出用の人工的なバイオセンシングプローブを開発している。ここでは、二つのシグナル産生方式を採り上げ、POCT 開発に資するスマートフォンを用いた検出例を紹介する。

特定の DNA 配列の中には、立体構造を形成し酵素活性を示すものが存在する。代表的な例として、グアニンが豊富な DNA 配列は、G-quadruplex とよばれる 4 重鎖構造をとり、ヘミンと複合体を形成すると、ペルオキシダーゼ活性を示すことが知られている。そこで著者らは、グアニンリッチな G-quadruplex 配列を二つに分割し、それらの配列をピンセット構造体の両末端に持つような DNA ナノピンセット構造体 (split-Gq-based DNA-NT) を開発した (図 6) <sup>9)</sup>。この DNA-NT は、標的核酸が存在しない状態では開いた状態であり、分割した G-quadruplex 配列が離れているため、ペルオキシダーゼ活性を示さない。一方、標的核酸が存在する場合、標的認識部位が標的核酸と 2 重らせん構造を形成し、ピンセット構造が開いた状態から閉じた状態へと変化する。このとき両末端に配置されていた分割 G-quadruplex 配列は近接し、G-quadruplex 形成能が回復する。その際、ヘミンとの複合体形成能も回復することから、ヘミン存

在下では標的を認識するとペルオキシダーゼ活性を示すバイオセンシングプローブとして機能する。G-quadruplex の酵素活性は、通常のペルオキシダーゼ活性を測定するための基質、ABTS と過酸化水素を用いた比色法により検出可能である。この split-Gq-based DNA-NT は標的核酸を混合すると酵素活性を示し、溶液はうすい緑色を示す (図 7)。このように標的濃度に依存した発色反応が得られれば、あとは例えばウシオ電機社のスマートフォンを活用した小型分光光度計ピコスコープなどを利用すれば、簡単に定量化が可能である。これまでにモデル 1 本鎖 DNA だけでなく、生体外転写反応により人工的に作製したノロウイルス RNA の一部なども検出に成功している。この時、DNA-NT は標的が存在する場合のみ酵素活性を示すことから、基本的には、測定サンプル、発色基質、センシングプローブを単純に混合し、しばらくした後に吸光度を測るだけであるので、POCT 開発の基本原則としての利用が期待される。

ところで、スマートフォンにはカラーのイメージセンサーによるカメラ機能も搭載されている。スマートフォンで撮影した写真は R (赤)、G (緑)、B (青) の要素から構成され、イメージセンサーの分光感度特性に則ってそれぞれの色の画像が撮影される。したがって、発色反応後の溶液をカメラで撮影し、RGB の各要素に写真

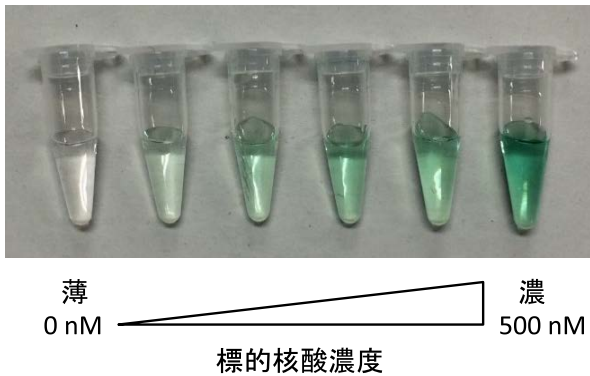


図7. split-Gq-based DNA-NT による標的核酸の発色検出。測定サンプル、発色基質、センシングプローブを単純に混合するだけで、標的核酸濃度に応じた発色が得られる。ノロウイルス RNA 配列の一部を模した合成オリゴ DNA (49 塩基) を用いて発色させた例。

を分割後に輝度を評価すれば、吸光度計などを用いなくても、発色具合が評価可能であると考えられる。そこで、split-Gq-based DNA-NT を用いて発色させた溶液を、スマートフォンカメラで撮影し、Image-J<sup>7)</sup> を用いて RGB それぞれに分割した画像を作成した。その結果、特に B 画像において、標的核酸 (39 塩基のモデル 1 本鎖 DNA) 濃度に対応した輝度の減少が認められた (図 8)。ABTS 発色反応の B 画像領域部分の波長が吸収された結果と考えられる。定量性や、定量濃度領域に課題は残るものの、スマートフォンによる写真撮影とソフト処理だけでも標的核酸の定性的な検出が可能になると期待される。

## 6. スマートフォン蛍光顕微鏡による核酸検査

蛍光共鳴エネルギー移動 (FRET) は、近接した 2 個の蛍光色素分子の間でエネルギーが移動する現象である。二つの蛍光色素が十分離れている場合は、ドナーと呼ばれる蛍光色素が吸収した励起エネルギーはドナーから蛍光として放出される。この時、アクセプターと呼ばれる蛍光分子は何のシグナルも発しない。しかし、二つの蛍光色素が近接した場合、ドナーが吸収した励起エネルギーはアクセプターに移動し、アクセプターから蛍光として放出される。そこで、特定の標的を認識するとこの二つの蛍光色素間の距離が変化するような分子をデザインすることにより、標的を認識すると FRET シグナルを発するようなバイオセンシングプローブの開発が可能である。このようなセンシングプローブは、標的を認識した場合のみシグナルを発することから、基本的には、測定サンプルとセンシングプローブを単純に混合し、しばらくした後に蛍光を測るだけで標的の検出が可能なので、POCT 開発の基本原則としての利用が期待される。しかし一般に、FRET シグナルの解析においては、複数種の蛍光強度を測定することが必要であるため、蛍光スペクトロメーターやフィルター切り替え装置付きの蛍光顕微鏡などが利用される。これでは折角プローブ側で実現した簡便な測定操作という特長を生かしきれない。しかし先の項で述べたように、スマートフォンで撮影した写真は R (赤), G (緑), B (青) の要素から構成されることから、イメージセンサーの分光感度特性に

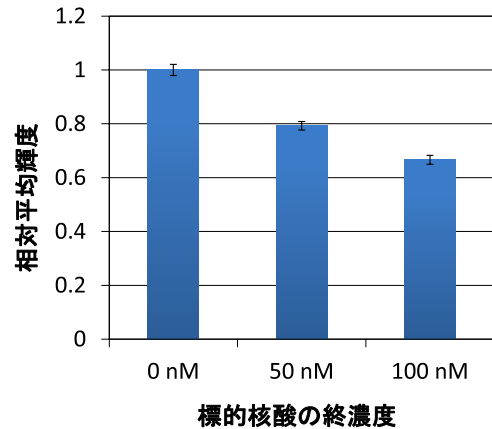


図8. B 画像における発色部分の標的核酸濃度依存性。発色反応後の溶液をスマートフォンのカメラを用いて撮影し、RGB の各要素に写真を分割した。B 画像における発色部分の平均輝度を算出し、0 nM における平均輝度を用いて相対評価を行った。

合わせた蛍光色素を選択することにより、高額な蛍光測定装置を用いなくても FRET の解析が可能であると考えられる。そこで、著者らが開発した標的核酸を認識すると FRET シグナルを産生する FRET-based DNA-NT<sup>8,9)</sup> を基盤技術として、スマートフォン蛍光顕微鏡による標的核酸のイメージング検出法を開発している。具体的には、ドナー蛍光色素として 6-FAM、アクセプター蛍光色素として ATTO590 を修飾した FRET-based DNA-NT を作製した (図 9)。この FRET-based DNA-NT は、通常はピンセットが開いたような構造をしており、6-FAM を励起すれば 6-FAM 由来の緑色の蛍光を発する。ところが標的核酸を認識すると構造変化を起し、ピンセットが閉じた構造に変化し、二つの蛍光色素が近接する。その結果、6-FAM を励起すると FRET 現象により、6-FAM から ATTO590 へエネルギーの移動が起り、ATTO590 が蛍光を発する。スマートフォンでの写真撮影画像を用いることを想定すると、溶液のままではピントの合わせ方など解析が難しいと考えられる。著者らはビーズ表面へ FRET-based DNA-NT を修飾し、このビーズにピントを合わせて写真を撮影することによって FRET の定量解析が行えると考えた。そこで、ピンセット構造のヒンジ部分にビオチンを修飾した FRET-based DNA-NT を作製し、ストレプトアビジン修飾磁性ビーズと混合することによって FRET-based DNA-NT 修飾磁性ビーズを作製した。標的核酸 (39 塩基のモデル 1 本鎖 DNA) と混合後、この溶液を滴下してプレパラートを作製した。このプレパラートを磁石の上に 2 分ほど置くことで、磁性ビーズをスライドガラス上に整列させた。この操作により、一枚の写真でも複数のビーズに焦点があった画像の撮影が可能になった。そこでスマートフォン蛍光顕微鏡で励起しながら蛍光画像を撮影した。得られた画像は Image-J を用いて R, G, B 画像に分割し、Analyze Particle 機能を利用してビーズ部分の輝度を算出した。各ビーズの輝度について、R 画像の輝度 ÷ G 画像の輝度の値を FRET 効率として算出し、評価した。その結果、標的核酸濃度を反映した FRET 効率の上昇が認められた (図 10)。このようにスマートフォン蛍光

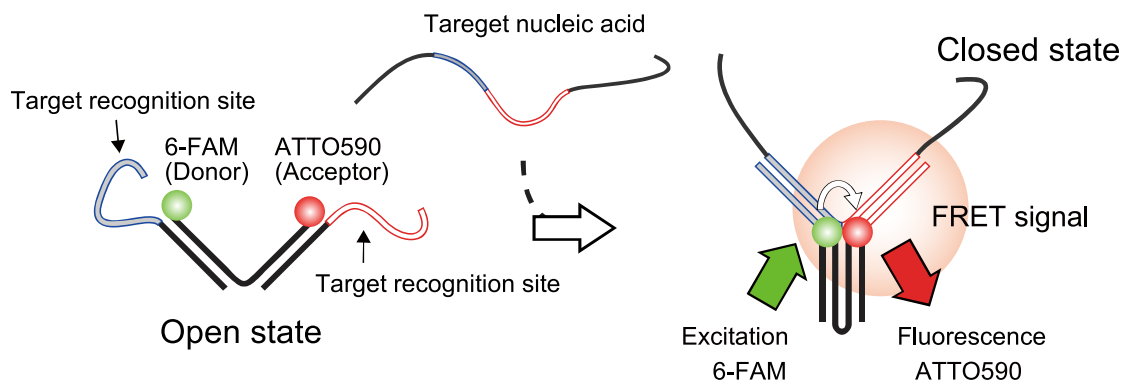


図9. スマートフォン検出用 FRET-based DNA-NT の例。参考文献 8) の図を改変した。Modified and reproduced from Ref. 8 with permission from The Royal Society of Chemistry.

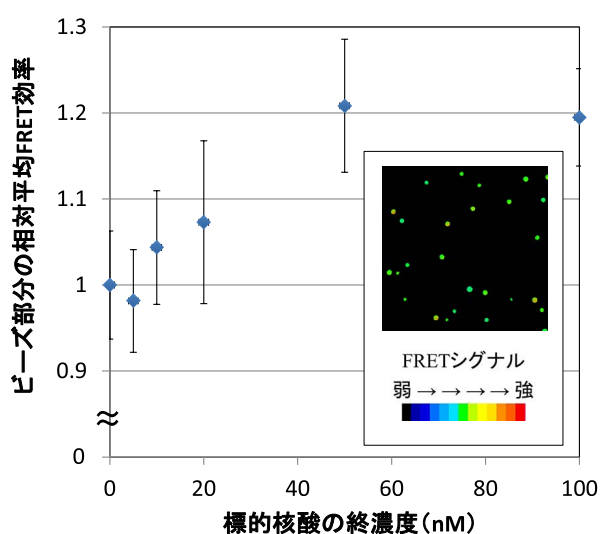


図10. ビーズ部分における FRET 効率の標的核酸濃度依存性。スマートフォン蛍光顕微鏡を用いて撮影した画像を RGB の各要素に分割し、バックグラウンド処理を行った。各ビーズ部分について、R 画像の輝度 ÷ G 画像の輝度の値を FRET 効率として算出した。0 nM における平均 FRET 効率を用いて相対評価を行った。グラフ内の図は、スマートフォン蛍光顕微鏡を用いて撮影した画像から作成した FRET シグナルイメージの例。直径 3  $\mu\text{m}$  の磁性ビーズに FRET-based DNA-NT を修飾したものを利用した。

顕微鏡による単純な写真撮影、さらにソフト処理だけでも FRET 解析が可能であったことから、このシステムの POCT への応用が期待される。本システムで利用した FRET-based DNA-NT は、一度閉構造を取ったあとは比較的安定して閉構造を取り続けると考えられる。したがって、FRET-based DNA-NT 修飾磁性ビーズを用いることにより、大容量のサンプル中に存在する少量の標的をビーズを用いて回収することが可能になり、そのビーズの FRET 効率をイメージングによって評価することで高感度化が期待できる。

## 7. まとめ

著者らは小型タブレットやスマートフォンをプラットフォームにしたバイオ検査をスマートバイオセンシングと名付けて研究活動を続けている (<http://sbcs.hiroshima->

u.ac.jp)。今回詳細は割愛したが、アスベストが映し出された画像はスマートフォンの通信機能により、離れた分析室でもリアルタイムで観察することができる。さらにアスベスト計測用に開発したソフトウェアを使えば、非熟練者でも現場での分析が可能になった。遠隔でも自動画像解析できることが活かされると考えられる。スマートバイオセンシングの研究拠点では、身の回りの有害・危険物質の検出を個人で可能にし、さらには自身の生体情報を感知するウェアラブルなスマートバイオセンシングの発展へと繋げて行きたいと考えている。

## 文 献

- 1) Perkel, J.M. 2017. Pocket laboratories. *Nature*. 545: 119–121.
- 2) Kuroda, A., T. Nishimura, T. Ishida, R. Hirota, and K. Nomura. 2008. Detection of chrysotile asbestos by using a chrysotile-binding protein. *Biotechnol. Bioeng.* 99: 285–289.
- 3) Ishida, T., M. Alexandrov, T. Nishimura, K. Minakawa, R. Hirota, K. Sekiguchi, N. Kohyama, and A. Kuroda. 2013. Molecular engineering of a fluorescent bioprobe for sensitive and selective detection of amphibole asbestos. *PLoS ONE*. 8(9): e76231.
- 4) Alexandrov, M., E. Ichida, T. Nishimura, K. Aoki, T. Ishida, R. Hirota, T. Ikeda, T. Kawasaki, and A. Kuroda. 2015. Development of an automated asbestos counting software based on fluorescence microscopy. *Environ. Monit. Assess.* 187: 4166.
- 5) Kuroda, A., M. Alexandrov, T. Nishimura, and T. Ishida. 2016. Rapid on-site detection of airborne asbestos fibers and potentially hazardous nanomaterials using fluorescence microscopy-based biosensing. *Biotechnol. J.* 11(6): 757–767.
- 6) Nakatsuka, K., H. Shigeto, A. Kuroda, and H. Funabashi. 2015. A split G-quadruplex-based DNA nano-tweezers structure as a signal-transducing molecule for the homogeneous detection of specific nucleic acids. *Biosens. Bioelectron.* 74: 222–226.
- 7) Rasband, W.S. ImageJ, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, <https://imagej.nih.gov/ij/>, 1997–2018.
- 8) Funabashi, H., H. Shigeto, K. Nakatsuka, and A. Kuroda. 2015. A FRET-based DNA nano-tweezer technique for the imaging analysis of specific mRNA. *Analyst*. 140(4): 999–1003.
- 9) Shigeto, H., K. Nakatsuka, T. Ikeda, R. Hirota, A. Kuroda, and H. Funabashi. 2016. Continuous monitoring of specific mRNA expression responses with a FRET-based DNA nano-tweezer technique that does not require gene recombination. *Anal. Chem.* 88(16): 7894–7898.