

## スマートフォン小型蛍光顕微鏡による高感度デジタルインフルエンザウイルス検出 ～高感度デジタル計測の POCT 実用化に期待～

### 1. 発表者：

皆川 慶嘉 (東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 特任研究員)  
上野 博史 (東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 助教)  
田端 和仁 (東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 講師)  
野地 博行 (東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻 教授)

### 2. 発表のポイント：

- ◆高感度で定量性の高い1分子デジタル計測法を、スマートフォンを用いて簡便に計測できる小型蛍光顕微鏡(23 cm x 10 cm x 7 cm)の開発に成功した。
- ◆デジタルインフルエンザ計測を開発した小型蛍光顕微鏡で行うことにより、従来のイムノクロマト法よりも約100倍高い感度を示すことに成功した。
- ◆本研究で開発された小型蛍光顕微鏡を使用することで、高感度なデジタル計測を場所問わず実施できるようになり、早期の診断が可能となることが期待される。

### 3. 発表概要：

がん、ウイルス、細菌の感染に関する標的分子を迅速かつ定量的に測定する高感度バイオセンシング手法として1分子デジタル計測があります。数10万個のマイクロメートルサイズの微小液滴に標的となるバイオマーカーである分子を確率的に1個ずつ閉じ込め、分子に起因する信号を2値化(「0」と「1」)して、「1」の信号を発する液滴の数から標的分子を定量・検出する手法です。微小液滴内に閉じ込められた標的分子が触媒活性を所持している、もしくは酵素で修飾された抗体を結合させた場合、触媒活性によって生じる反応生成物は微小液滴内に濃縮されます。生成物が蛍光であれば、通常の蛍光顕微鏡で迅速に検出することができます。これら技術は、核酸を検出するPCR(注1)や酵素が結合した抗体を用いるELISA(注2)と合わせることによって、従来よりも高感度で定量性の高いデジタルPCRとデジタルELISAとして応用されています。またインフルエンザを液滴内に閉じ込めて、1粒子の検出を行うデジタルインフルエンザも開発されています。しかしながら、これまで1分子デジタル計測を行うためには、微小液滴を観察可能で且つ蛍光を検出するために大型の蛍光顕微鏡が必要でした。そのため、ベッドサイドや在宅で医療従事者が検査を行う臨床現場即時検査(POCT)への実用化のためには、コンパクトな計測系の開発が不可欠でした。こうしたことから、東京大学大学院工学系研究科の皆川慶嘉特任研究員、上野博士助教、田端和仁講師、野地博行教授らの研究グループはスマートフォンを検出器とした持ち運び可能な小型蛍光顕微鏡のプラットフォームを開発しました。大きさは23 cm x 10 cm x 7 cmと小型で簡単に持ち運ぶことが可能です。実際にスマートフォンのカメラを検出器として用いて、酵素(ALP)を用いたデジタル酵素アッセイに成功し、更に1粒子のインフルエンザを検出するデジタルインフルエンザ計測にも成功しています。安価なフィルターと光学系を使用しているため、従来の蛍光顕微鏡に比べて感度は劣りますが、病院で使用されるイムノクロマト法(注3)によるインフルエンザ検出キットよりも100倍も高い感度を示しました。また実際のインフルエンザ患者のうがい液からのウイルス検出にも成功しました。このようにしてスマートフォンを検出器とした小型蛍光顕微鏡を

開発し、高感度デジタル計測を可能としました。これら技術が実際に医療現場に導入されれば、医療機関だけに依存しない地域医療や在宅医療などの充実に繋がるのが予測されます。また他のデジタル計測手法（デジタル PCR、デジタル ELISA）を開発した小型蛍光顕微鏡を行うことにより、幅広い分野項目の検査が可能になることが期待されます。

#### 4. 発表内容：

##### ● 研究の背景

近年、感度良く迅速にバイオマーカーである分子を検出できる方法として、1分子レベルで標的分子を検出する1分子デジタル計測手法が注目されています。デジタル計測手法では、大きさが3マイクロメートル程度のフェムトリットル（fL：10<sup>-15</sup> 乗 L）体積の微小液滴を小型のマイクロデバイス上に数10万個作製し、バイオマーカーである分子を蛍光基質とともに液滴内に閉じ込めます。液滴内で反応生成物である蛍光色素が濃縮され、分子が入っている液滴は蛍光を発し、入っていない液滴は蛍光を発しないので、信号の有無を「1」「0」でデジタルに計測できるため1分子レベルで標的分子を検出することが可能です。PCRやELISAといった従来法と合わせることで高感度化が成し遂げられています。しかしながらデジタル計測を行うためには、マイクロメートルサイズの液滴を観察するための対物レンズ、蛍光を観察するための励起光源、励起光や背景光を除去するためフィルター、高感度なCMOSカメラが必要のため、大型な蛍光顕微鏡が必要でした。そのため、高感度で迅速な診断ができるにも関わらず、可搬性・簡易性が求められる臨床現場即時検査での実用化は困難でした。

##### ● 研究の内容

本研究グループでは1分子デジタル計測が可能な簡易に持ち運びができる小型蛍光顕微鏡を作製しました。まず光学系を小型化するために、微小液滴のアレイが並んでいるデバイスの土台であるガラス基板を導波路とした全反射照明系を使用しました（図1）。全反射照明ではガラス内を全反射させることによって反射界面に生じるエバネッセント光と呼ばれる染み出し光を励起光として用います。エバネッセント光は界面から100nm程度の限定した領域しか届かないため、安価なフィルターでも十分に励起光に起因した背景光を取り除くことが可能となります。

実際にはマイクロデバイスの端を黒いゴムで挟み込み、LED光をガラス端から入れることによって、全反射を引き起こさない角度の励起光を妨げながらエバネッセント場を生じさせます。次に、大型なCMOSカメラの代わりにスマートフォンのCMOSカメラを蛍光検出器として採用しました。スマートフォンのCMOSカメラは画素サイズが小さく、高感度のため拡大投影すればマイクロメートルサイズの液滴も観察できると期待されたからです。実際に酵素であるアルカリフォファターゼを閉じ込めた微小液滴アレイデバイスの蛍光をスマートフォンで観察しました。アルカリフォスファターゼはELISAの検出用抗体に汎用される酵素です。結果として1分子のアルカリフォスファターゼに由来して蛍光を発する微小液滴をスマートフォンのカメラで観察することに成功しました。また、蛍光を発する微小液滴の数と位置は従来顕微鏡によって同視野を観察した画像と一致しました。更にデジタルインフルエンザ計測を小型蛍光顕微鏡を用いて行いました。デジタルインフルエンザ計測はインフルエンザの外殻に存在するノイラミニダーゼと呼ばれるタンパク質の酵素活性を利用し、微小液滴内に閉じ込められたウイルス1粒子を蛍光で検出する方法で、抗体を使わずに蛍光基質と一緒に閉じ込めるだけで検出が可能のため、臨床現場即時検査に適しています。従来顕微鏡で観察されたインフルエンザ由来の蛍光を発する微小液滴の半数をスマートフォン顕微鏡によって観察することに成功しま

した（図 2）。インフルエンザウイルスのノイラミニダーゼの活性分布が広く、小型蛍光顕微鏡の光学系が安価であるため背景光が高くなり、弱い活性のウイルスは検出することができませんでした。しかしながら小型蛍光顕微鏡の検出限界は一般的に病院で行われるイムノクロマト法による迅速検査キットの 100 倍高感度でした。更に、インフルエンザ患者のうがい液からのデジタルインフルエンザ計測も試み、インフルエンザに起因した信号を検出することにも成功しました。一般的にインフルエンザの検査に使用される鼻咽頭拭い液に比べて低侵襲なうがい液からでも検出可能であることから、患者からの検体採取の負担が減らせる可能性も示しました。

#### ● 今後の展望

本研究で開発したスマートフォンを検出器とした小型顕微鏡は、これまで必要だった高価な蛍光顕微鏡を用いなくても高感度な 1 分子デジタル計測を行うことを可能にしました。今回はデジタル酵素アッセイとデジタルインフルエンザ計測に成功しましたが、今後はデジタル ELISA やデジタル PCR といった他の 1 分子デジタル計測も行えるようにすることで、多項目の検査を臨床現場で即時に行えるようにすることが課題となります。またスマートフォンを検出器として使用しているため、インターネットを介して遠隔での診療やクラウド上でのデータ管理なども可能となります。そのため医療施設が不足している地域での医療や在宅医療といった医療の質の向上にも役立つことが期待されます。

#### ● 本研究の助成事業

本成果は、以下のプログラム・研究開発課題によって得られました。

内閣府 革新的研究開発推進プログラム (ImPACT)

<http://www.jst.go.jp/impact/>

プログラム・マネージャー：野地 博行

研究開発プログラム：豊かで安全な社会と新しいバイオものづくりを実現する

人工細胞リアクタ研究開発課題：人工細胞デバイスおよび計測システム開発ならびにゲノム起動法の開発

研究開発責任者：田端 和仁（東京大学大学院工学系研究科 講師）

研究期間：平成 27 年 3 月～平成 31 年 3 月

本研究開発課題では、微小チャンバーが高集積に並んだ人工細胞リアクタと、当該リアクタを用いた小型で簡単に操作可能な計測システムとを一体的に開発し、実用化を目指しています。

#### 5. 発表雑誌：

雑誌名：*Lab On a Chip*（オンライン版：2019 年 7 月 17 日）

論文タイトル：Mobile imaging platform for digital influenza virus counting

著者：Yoshihiro Minagawa, Hiroshi Ueno, Kazuhito V. Tabata, and \*Hiroyuki Noji

DOI 番号：10.1039/c9lc00370c

アブストラクト URL：<https://pubs.rsc.org/doi/C9LC00370C>

#### 6. 問い合わせ先：

<研究に関すること>

東京大学大学院工学系研究科 応用化学専攻

特任研究員 皆川 慶嘉 (みながわ よしひろ)  
〒113-0033 東京都文京区本郷 7-3-1

<報道対応>

東京大学大学院工学系研究科 広報室  
〒113-8656 東京都文京区本郷7-3-1

## 7. 用語解説：

### 注1：PCR (Polymerase Chain Reaction)

目的の DNA 配列を特異的に酵素反応を用いて指数増幅させる手法です。ウイルスや細菌のゲノムの DNA を配列特異的に増やせるため、遺伝子検査手法としても使用されます。

### 注2：ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)

ELISA は酵素が結合した抗体によって、標的抗原を補足し検出する検査手法です。酵素の触媒活性によって発光・蛍光する基質を使用することによって、酵素によって信号が強調されるため、低濃度での測定も可能です。

### 注3：イムノクロマト法

イムノクロマト法とは、抗原抗体反応を利用した検査手法の1つです。検出用のマーカーが結合した抗体と検体を混合し、部分的に固定化された別の抗体と標的抗原をサンドイッチすることで、固定化された抗体に検出マーカーが集まり検出されます。ウイルス検査や妊娠検査などに用いられています。

8. 添付資料：

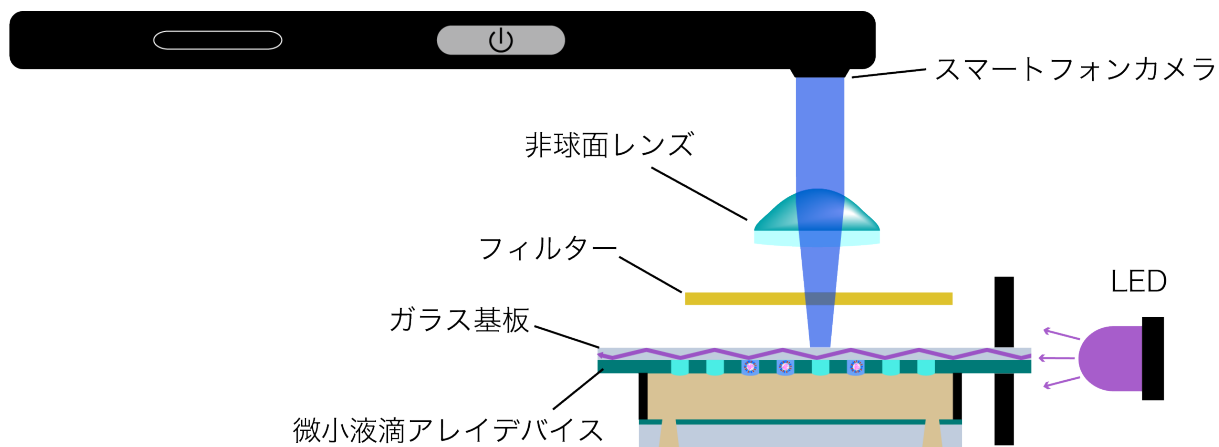


図1 スマートフォンを用いた小型蛍光顕微鏡の光学系の模式図

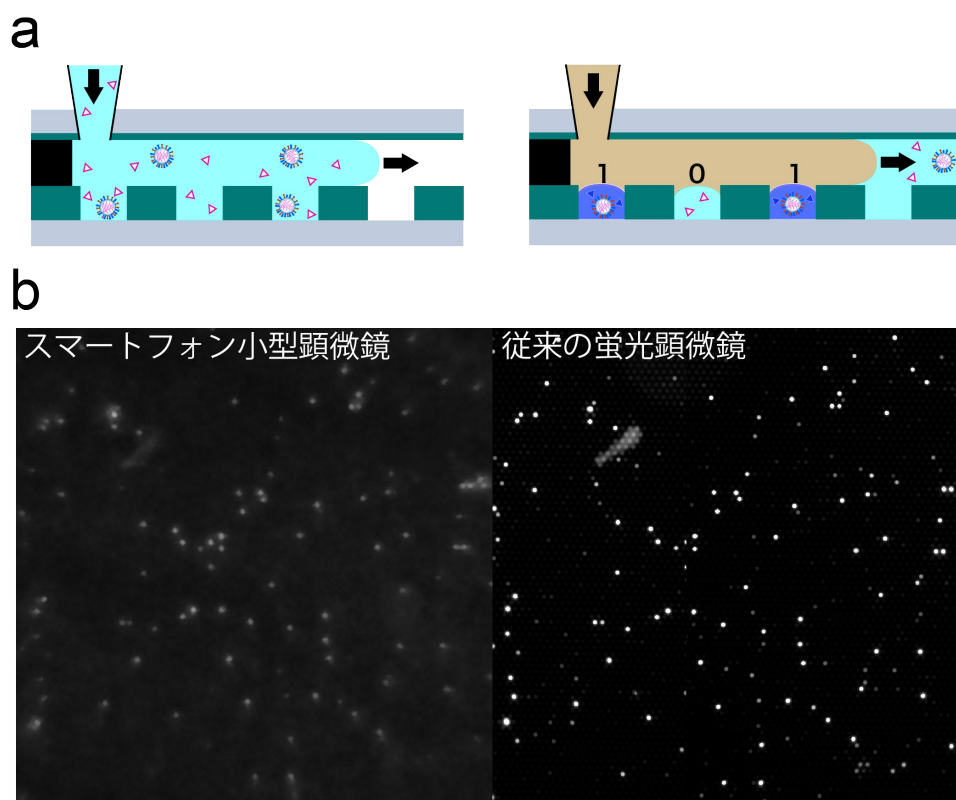


図2 スマートフォン小型蛍光顕微鏡によるデジタルインフルエンザ計測

(a)微小液滴内への1粒子インフルエンザウイルスの閉じ込め (b) スマートフォン小型蛍光顕微鏡と従来の蛍光顕微鏡で同視野を観察した蛍光画像