

野地 博行

東京大学工学系研究科 教授

生体分子1分子デジタル計数デバイスの開発

§1. 研究実施の概要

疾病マーカーや病原性因子を1分子レベルで超高感度に計測するデジタル計数法を確立するため、マイクロドロプレット型超微小溶液チャンバーアレイの開発を行った。100 万個/チップのドロプレットアレイデバイスを開発し、Streptavidin-Biotin 結合をモデル反応としたデジタル計数法で検出限界 50 zM を達成した(特願 2011-50629)。また、ウイルスを1粒子レベルで検出することを目的に、ナノロッド粒子の回転拡散運動イメージング技術の開発を行った。10 μ s の高時間分解能での回転拡散運動の計測に成功し、ウイルス粒子モデルであるナノビーズの金ナノロッドへの結合を検出することに成功した。さらに、顕微鏡を必要としない CMOS イメージセンサ直結型のデジタル計数法を開発するため、レジストフィルターおよび干渉フィルターの性能評価およびセンサ上への搭載を行った。

§2. 研究実施体制

(1)「デジタル計数法開発」グループ

- ① 研究分担グループ長：野地 博行（東京大学工学系研究科、教授）
- ② 研究項目
 - ・ドロプレット型超微小溶液チャンバーアレイの開発
 - ・ナノロッド粒子の回転拡散運動イメージング技術の開発

(2)「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

- ① 研究分担グループ長：笹川 清隆（奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究科、助教）
- ② 研究項目
 - ・蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

§3. 研究実施内容

(1)「デジタル計数法開発」グループ

・ドロップレット型超微小溶液チャンバーアレイの開発

100mm²の面積に 100 万個以上のドロップレットチャンバーを同時に再現性よく作成できるマイクロデバイスを開発した。様々な形状のフローセルをデザインしてドロップレットチャンバーアレイへのビーズの封入効率を 60%程度まで改善した。このシステムを用い、Streptavidin-Biotin 結合をモデル反応としてデジタル計数法による検出限界濃度の下限値を決定した結果、蛍光分光器を用いた既存法よりも 10 万倍以上感度の高い 50 zM を達成した(図1. 特願 2011-50629)。さらに、本デジタル計数法で aM-zM の 5 ケタ以上に渡る高いダイナミックレンジを達成し、理論値と実測値の差が 20%以下の高い定量性を実現した。

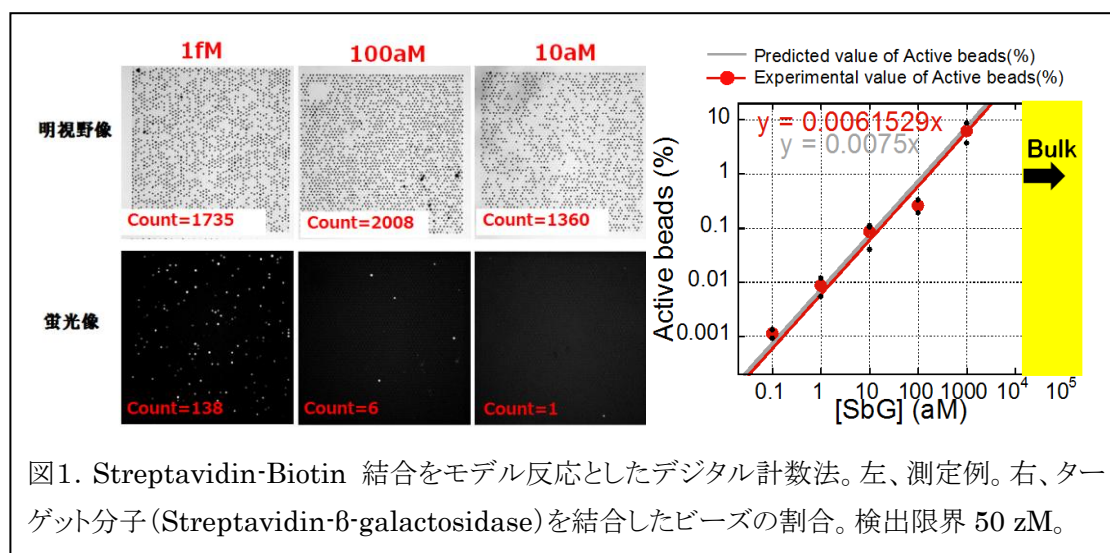


図1. Streptavidin-Biotin 結合をモデル反応としたデジタル計数法。左、測定例。右、ターゲット分子(Streptavidin- β -galactosidase)を結合したビーズの割合。検出限界 50 zM。

・ナノロッド粒子の回転拡散運動イメージング技術の開発

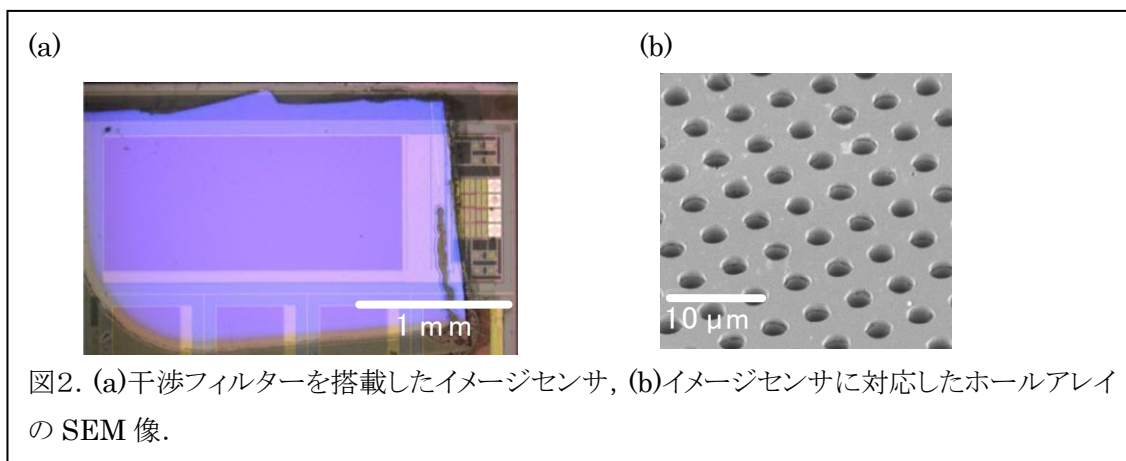
レーザーを用いた暗視野偏光イメージング法を確立し、10 μ s の高い時間分解能での金ナノロッドの角度測定を達成した。回転モータータンパク質 F₁-ATPase の回転軸に金ナノロッドを結合させて本手法で測定した結果、120°間隔で停止するステップ回転が検出され、本手法の有用性が実証された。

(2)「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

・蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

CMOS イメージセンサ上にドロップレットチャンバーアレイを統合することにより、従来のデジタル ELISA システムにおける光学顕微鏡を不要とし、安価なシステム構築の可能性を拓く。CMOS イメージセンサ上にドロップレットチャンバーアレイを搭載する前段階として、イメージセンサ上への干渉フィルターの搭載、および、蛍光観察時の励起光除去性能向上のためのホールアレイ構造

の構築を行った。Fluorescein の蛍光波長を含む 500nm より長波長の成分を透過する干渉フィルターを Si 基板上に形成した。イメージセンサ上に接着層としてフッ素樹脂を塗布し、干渉フィルターを接着した後、Si 基板を Deep Reactive Ion Etching (DRIE)により除去した。本手法により、CMOS イメージセンサ上への干渉フィルター搭載に成功した。また、画素アレイに対応したホールアレイを形成することに成功し、イメージセンサへの垂直入射成分が選択的に検出されることを確認した。



§4. 成果発表等

(4-1) 知財出願

- ① 平成22年度特許出願件数(国内 1件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 1件)