

「プロセスインテグレーションによる機能発現ナノシステムの創製」
平成 22 年度採択研究代表者

H24 年度 実績報告

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. 研究実施体制

(1)「デジタル計数法開発」グループ

- ① 研究代表者:野地 博行 (東京大学工学系研究科、教授)
- ② 研究項目
 - ・Droplet 型超微小溶液チャンバーアレイの開発
 - ・デジタル計数法およびデジタル ELISA 法の開発
 - ・ナノロッド粒子の回転拡運動イメージング技術の開発
 - ・DNA の1分子固さ測定
 - ・レーザー暗視野顕微鏡を用いたウィルスの 1 粒子検出

(2)「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

- ① 主たる共同研究者:笹川 清隆 (奈良先端科学技術大学院大学部室創成科学研究科、助教)
- ② 研究項目
 - ・蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

§ 2. 研究実施内容

(1)「デジタル計数法開発」グループ

・Droplet 型超微小溶液チャンバーアレイの開発

CREST 藤井プロジェクトとの共同研究によるエレクトロアクティブアレイ技術の改善を行い、ビーズを再現性良く導入する手法を確立した。

・デジタル計数法およびデジタル ELISA 法の開発

実際の抗原抗体反応を用いた 1 分子デジタル ELISA 法を確立し、前立腺がんマーカー PSA (前立腺特異抗原)を用い検出限界値 2 aM を達成した(図1)¹⁾。

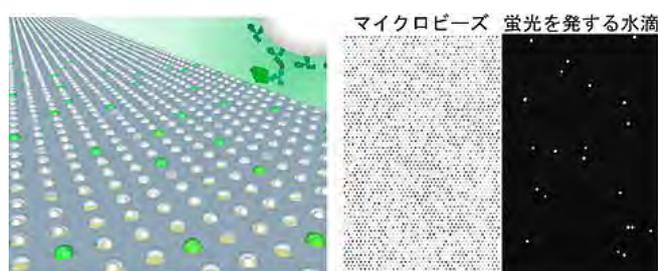


図1. (左)1 分子デジタル ELISA 法の模式図 (右)測定例

・ナノロッド粒子の回転拡運動イメージング技術の開発

平成 24 年度は下記の「レーザー暗視野顕微鏡を用いたウィルスの 1 粒子検出」を優先したため着手しなかった。

・DNA の 1 分子固さ測定

回転分子モーターを分子ベアリングとして用いた DNA 固さ測定の実験系を確立し、その曲げ弾性測定を行った²⁾。

・レーザー暗視野顕微鏡を用いたウィルスの 1 粒子検出

散乱イメージングによって得られた像が実際のウィルス 1 粒子であるかを検証するため、電子顕微鏡を用いた実験を行った。具体的には、走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)により多角的に検証した³⁾。

(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

蛍光計測用 CMOS イメージセンサの回路およびレイアウトのパラメータ最適化を行い、特性改善を実現した。図2(a)に従来センサとの感度曲線の比較を示す。感度の線形性が向上し、低照度時の感度が向上している。また、撮像例の比較結果を図1(b)に示す。画素毎の特性の均一性が向上し、固定パターン雑音が低減されている。これにより画像処理時における誤差が低減される。

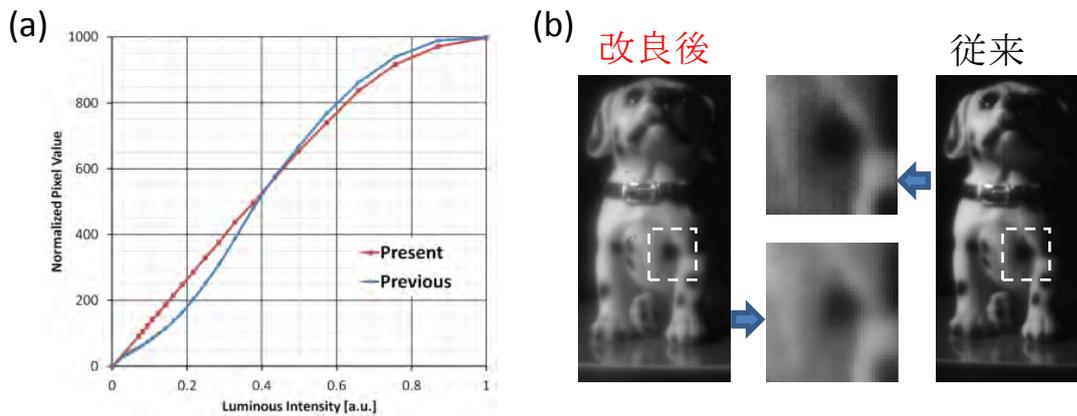


図2. (a)従来センサと改良後のセンサの感度曲線 (b)撮像例の比較

これまでに蛍光顕微鏡によるデジタル計数に用いられているドロプレットチャンバアレイを観察するためのレンズレス CMOS イメージングシステムの試作を行なった。レンズレスとすることで大面積を一括計測可能な小型システムの実現が期待される。図3(a)に試作したデバイスの構成を(b)に外観を示す。本デバイスでは、プリズムを介して励起光を試料ガラス底面で全反射させ、更に吸収フィルタで散乱成分を吸収する。レンズレスであるため、ガラスおよび吸収フィルタ層内の伝搬によって解像度が低減するが、これを画像処理によって復元する。図4に蛍光ビーズを封入した取得した試料を観察し、画像復元をした結果を示す。これにより $35\mu\text{m}$ 以下の空間分解能を達成した。

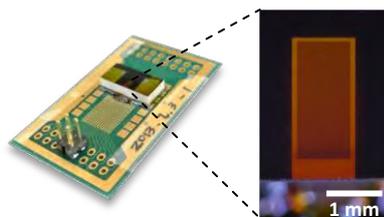
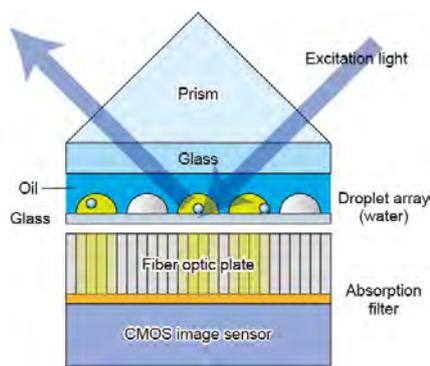


図3. (a)試作デバイス構成 (b)外観

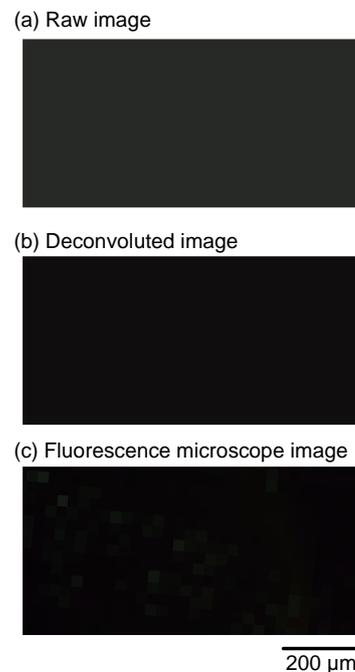


図4. 蛍光ビーズ撮像結果比較

§3. 成果発表等

(3-1) 原著論文発表

● 論文詳細情報

1. Kim SH, Iwai S, Araki S, Sakakihara S, Iino R, Noji H
Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single biomolecules.
Lab Chip 2012. 12: 4986-4991. DOI: 10.1039/c2lc40632b.
2. You H, Iino R, Watanabe R, Noji H.
Winding single-molecule double-stranded DNA on a nanometer-sized reel.
Nucleic Acids Research 2012. 40: e151. DOI: 10.1093/nar/gks651.
3. Enoki S, Iino R, Morone N, Kaihatsu K, Sakakihara S, Kato N, Noji H
Label-free single-particle imaging of the influenza virus by objective-type total
internal reflection dark-field microscopy.
PLOS ONE 2012. 7: e49208. DOI: 10.1371/journal.pone.0049208.
4. Iino R, Hayama K, Amezawa H, Sakakihara S, Kim SH, Matsumoto Y, Nishino K,
Yamaguchi A, Noji H.
A single-cell drug efflux assay in bacteria by using a directly accessible femtoliter
droplet array.
Lab Chip 2012. 12: 3923-3929. DOI: 10.1039/C2LC40394C

(3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 1 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 3 件)