

高密度マイクロリアクターセル分析システムの開発

Analyzer System for High Density Microreactor Cell

プロジェクト代表者：内田 秀和（理工学研究科・准教授）

Asso. Prof. Hidekazu Uchida
Graduate School of Science and Engineering

1 はじめに

ゲノム創薬や機能性分子の探索など分子レベルでの医療が発展するにつれて、DNAアレイやプロテインアレイなどの高速スクリーニングの技術がさらに重要性を増してきており、その分析装置も高度な並列処理と高スループット化の技術開発が重要な課題となっている。本研究では低コストで高精度なマイクロアレイ全自動分析装置を構成することを目標に、アレイの作成と分析のプロセスを単一の装置により実行できる技術の開発を行った。さらに、通常的手法では困難なマイクロアレイ内の個別ウェルで生体分子機能発現を並列観測する手法についても、アレイ基板に導電性高分子を用いることにより個別ウェルの電気化学測定を行う技術を検討した。

2 原理

図1に本システムを用いたアレイの作成と測定の原理図を示す。マイクロアレイは図1(a)のようにフォトリソグラフィにより作製する。アレイ構造に対応する光パターンをDMDで生成し、光学系により基板に結像して感光させる。現像プロセス以降のプロセスはアレイをシステムから取り出して行う。この際、アレイ上でPCR等の化学反応を行う場合には、プロセスのステップ数に対応した数のアレイを作製しておき、2枚のアレイを対向接合することで相対する位置の個別のウェル間で試薬の混合、試料の移送を行うことが可能である^[1]。反応プロセス終了後に分子間アフィニティ等を蛍光観測するには図1(b)のように、観測したい特定のウェル内部を照射する光スポットをDMDで生成し、アレイ作製と同一の光学系にて投射する^[2]。アレイを再設置する際の位置決めに必要な精度を持つ支持枠を利用することで、可動ステージ等による位置決め装置を使用することなく、個別のウェルを適切に励起できる位置整合性の維持が可能である。サンプルからの蛍光は光学系内で励起光と分離され、光電子増倍管により光子カウンティングされる。サンプル中の生体分子機能発現状態を測定する場合には図1(c)のように、照射した光スポットによりアレイ底面の光導電性薄膜を励起することで、特定のウェルを個別に電気化学測定することが可能である^[3]。局所的な電気化学測定の原理は図2のように表面に光導電性薄膜を有する透明電極に収束した励起光を照射することで、有機薄膜が局所的に導通している状態を作り、光を照射した部位に限って外部印加電圧による酸化還元反応を起こさせるものである。センサ表面にイオンチャネル型の感応膜^[4]を構成すれば多くの生理活性物質の検出に

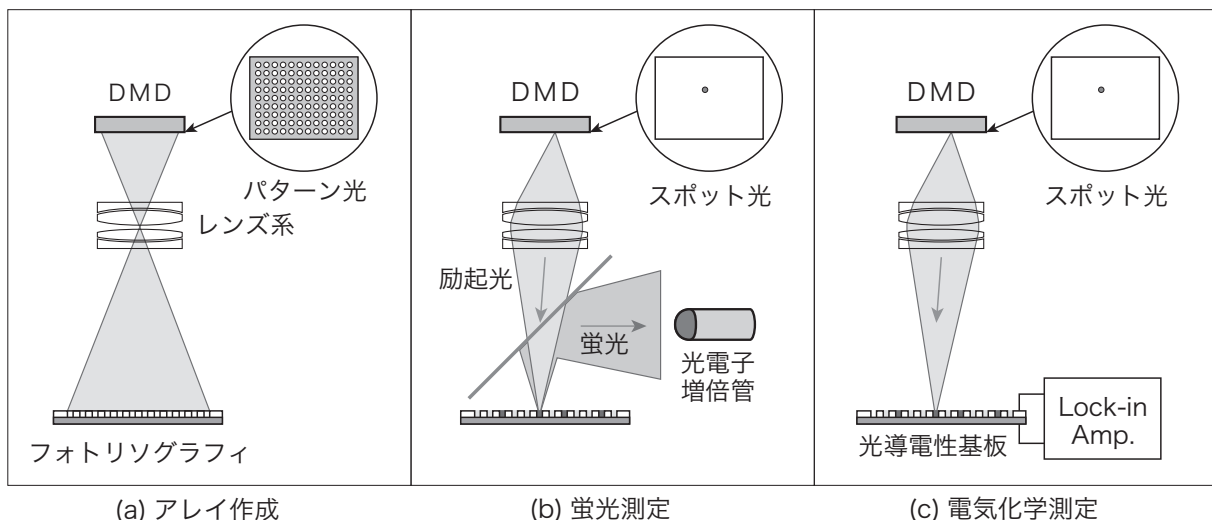


図1 DMDを用いたマイクロアレイの作製と測定の概念図

利用する事が可能である。マイクロアレイの隔壁部分にを形成する事により、励起光スポットを照射したウェルについて酸化還元反応を起こす化学種の濃度を知ることが可能であり、イオンチャンネル型のセンサ^[4]を構成すれば多くの生理活性物質の検出に利用する事が可能である。

3 実験

光線追跡プログラムを用いて図3に示すシステムを設計・製作し、蛍光標識としてGFPを用いる場合に合わせてフィルタの最適化を行った。励起光源には青色LED (波長430nm) を使い、ロード型インテグレータにより均一分布光としてからDMDへ照射し、反射光をテレセントリック系対物レンズでアレイ基板に結像するものとした。励起光と蛍光の分離にはGFP用のダイクロイックミラーと光学フィルタの組み合わせによる蛍光顕微鏡用フィルタセットを用いた。フィルタセットを交換することで波長を変えて、一般的に利用される蛍光標識に広く対応が可能である。このシステムを用いてアレイの作製および蛍光検出感度の評価を行った。評価用の蛍光標識としてGFPに比較して耐久性の高いLucifer Yellowを用いた。また、局所酸化還元電流の観測用の光導電性有機膜としてポリチオフェン、PPV、ポリピロール、ポリビニルカルバゾールについて検討し、ITO基板上にウェットプロセスにより有機薄膜を作製し、水溶液中の赤血カリ／黄血カリ酸化還元系を用いてサイクリックボルタメトリの酸化還元種濃度依存性と光スイッチングの評価を行った。

4 結果

蛍光測定では1 μg/ml～1mg/mlの範囲でPMT出力に直線的な蛍光標識濃度依存性が得られた^[5]。実用レベルには検出感度が不十分であり、高感度化の対策が必要となるが、SN比の解析から光学フィルタを用いた蛍光分離手法では励起光にレーザーを用いなければ十分な蛍光分離ができない可能性が示差された。また、光路内における散乱迷光はフィルタへの入射角度が不定となるために十分に励起光を減衰できないことも考えられ、今後はナノ秒励起の時間分解蛍光観測により検出感度の向上を行う。また、光導電性有機膜による局所酸化還元電流の観測実験により、本原理に基づく化学センサの基礎データが得られ、特にポリビニルカルバゾールにクマリンをドーピングした膜において光スイッチングが可能な優れたアンペロメトリックセンサを構成できる事がわかった。

- [1] 西垣功一, 田山貴紘, 木下保則, 内田秀和, 特願2005-042885, 「多種微量試料の注入、移行方法」
- [2] 内田秀和, 西垣功一, 特願2005-268483, 「微小試料の蛍光検出方法および装置」
- [3] 内田秀和, 特願2007-79288, 「化学センサ」
- [4] H.Aoki, K.Hasegawa, K.Tohda, Y.Umezawa, Biosens. and Bioelec., 18 (2003) pp.261-267
- [5] N.Sato, Y.Hayashi, H.Uchida, Proc. of the 23rd Sensor Symposium 2006, pp.109-113

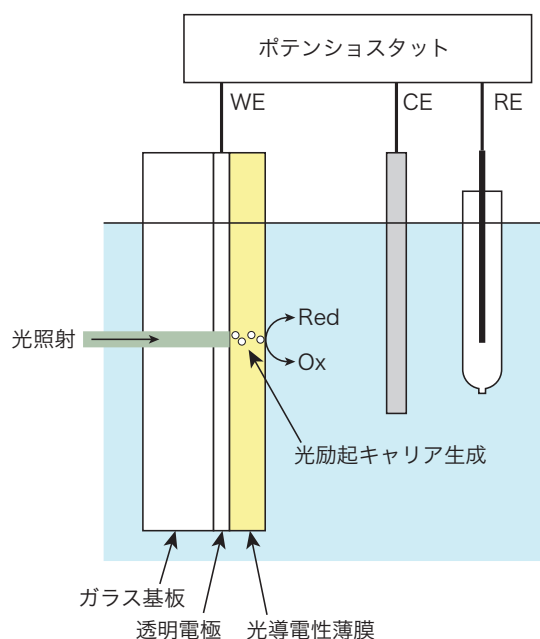


図2 光導電性薄膜を用いた局所酸化還元電流の観測

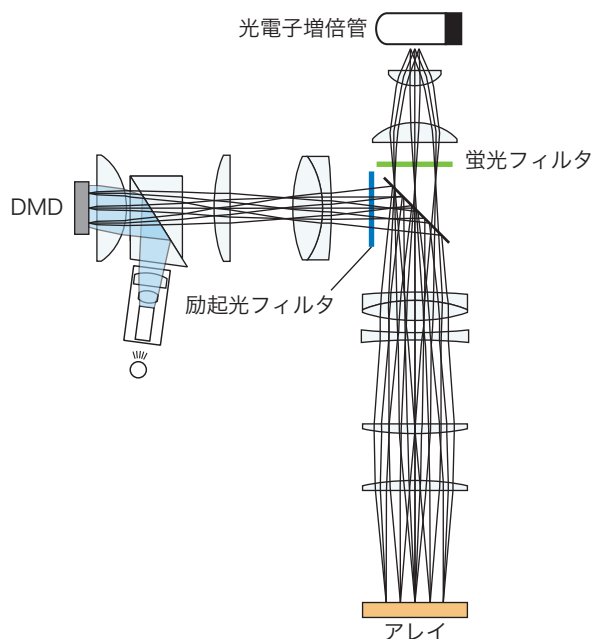


図3 マイクロアレイ作成・測定システムの光学系