
マイクロセルアレイレーザー顕微光学系および ハイブリッドフィルタを用いた超小型デジタルELISAシステムの開発

Development of Ultra-small Digital ELISA System by using Micro-cell Array Laser Microscopy and Hybrid filter

H29助自42

代表研究者 笹川 清 隆 奈良先端大科学技術大学院大学
先端科学技術研究科 物質科学領域 助教
*Kiyotaka Sasasgawa Assistant Professor, Division of Materials Science,
Graduate School of Science and Technology,
Nara Institute of Science and Technology*

In this study, our goal is to develop a portable assay system based on single molecule detection technique. In order to achieve it, we use “micro-cell laser array microscopy” technique and a hybrid emission filter suitable for lensless fluorescence imaging.

Digital ELISA (enzyme linked immunosorbent assay) is a molecule detection technique. An array of many (10^4 - 10^6) femto-litter droplets with a diameter of several μm is prepared. Each droplet is used as a reaction chamber and target molecule (or that combined with an enzyme molecule) is reacted with substrate. Thus, only the chambers including a target molecule show fluorescence. By counting the number of the fluorescent chambers, the concentration of the target molecule is estimated. This technique can be applied to detect biomarker proteins or viruses with single molecule sensitivity. However, conventional digital ELISA systems are based on lens-based fluorescence microscope. One of the issues is its their large dimensions. Essentially, digital ELISA technique has been used only in laboratory or medical institutions. By developing a portable digital ELISA system based on lensless imaging technique, it would be used in point-of-care assay and contribute to find diseases early and prevent from spreading infection.

One of problems of lensless fluorescence imaging device was its poor excitation light rejection performance. In this study, we developed a “hybrid filter” that is composed of an interference filter and an absorption filter and overcome the problem. And, in order to improve spatial resolution, we fabricated a prototype of micro-cell laser array device and tried to obtain multiple images by scanning the excitation light spot array.

研究目的

本研究では、微小光学系の特長を活かした「マイクロセルアレイレーザー顕微光学系」およびレンズレス観察系に適した高性能蛍光観察フィルタを新たに開発することで、「デジタル

ELISA」装置を小型化し、1分子計測に基づく可搬検査システムを実現することを目的とする。デジタルELISAは、直径が数 μm 程度の微小液滴を多数(10^4 ~ 10^6 個)用意し、個々の液滴内で試料と試薬を反応させ、ターゲット分子の有無を捕獲した液滴からの蛍光によって検出

手法である。がんなどの特定の疾患で体内に増加するタンパク質（バイオマーカー）やウイルス等の1分子レベルでの超高感度検出が可能となる。しかし、既存技術は大型の蛍光顕微鏡を基にした構成となっており、実質的に研究機関や医療機関でしか分析できないことが課題の一つとなっている。これに対し、本提案では新規な微小光学系の開発により、小型かつ簡便な装置を実現する。これにより、広く普及させることが可能となり、疾患の早期発見やウイルスの感染拡大の防止につながる。

本研究では、レンズレスイメージングの利点である小型かつ広視野と、レーザー顕微光学系の高感度・高分解能を両立可能な微小光学系を確立することに特色がある。蛍光は等方的に放射されることから、液滴アレイをガラス基板内での拡散により空間分解能が低下する。そのため、励起光を一樣照射する従来のレンズレスイメージングでは、高空間分解能が実現できなかった。これに対して本研究では、励起光としてレーザー点アレイを走査し、取得画像群を処理することで、従来の課題を打破し、高分解能イメージングを実現する。

一般的にイメージセンサは不透明であり、透過光学系とする必要がある。すなわち、センサに対して、正面から励起光を入射するため、励起光を除去し蛍光のみを透過するフィルタ光学系に非常に高い性能が要求される。一般的な蛍光顕微鏡では、レンズによってほぼ平行にコリメートされた光に対して干渉フィルタを適用することで高い励起光除去性能が実現されているが、本研究で目標としている可搬性の高いレンズレス光学系では、観察試料における光散乱によって、干渉フィルタに斜めに入射する成分が生じ、フィルタを透過する励起光成分が多く発生する。本提案では、独自手法によってこの問題を解決し、可搬性の高い蛍

光観察システムを実現する。

概 要

デジタルELISA (Enzyme linked immunoassay) は、直径数 μm の微小液滴アレイを多数用意し、それぞれの液滴を反応チャンバとして用いることで高感度にタンパク質やウイルスを計測する手法である。使用する反応は一般的なELISA法と同様であるが、微小な反応チャンバを用いることでターゲット分子が一分子でも基質から蛍光物質を生成させ、蛍光顕微鏡で検出することが可能となる。この手法は、非常に高い検出性能を実現することができることから、バイオマーカーやウイルスの超早期検出に応用できるものと期待される。しかし、高性能な蛍光顕微鏡を用いた装置は、可搬性が低くPOCT (Point-of-care test) へ適用することは困難であった。本研究では、この課題を解決するため、小型デジタルELISAシステムを実現するための技術開発を行った。

デジタルELISAは多数の微小な液滴チャンバを蛍光観察することが必要である。すなわち、可搬性が高いという制限の下、大面積かつ高感度な蛍光観察を可能とすることが求められる。本研究では、これらの条件を同時に満たすためにレンズレス蛍光イメージング手法を用いる。レンズレスイメージングは、米国UCLAやCALTECH、ベルギーIMEC等で開発がなされており、レンズの排除によるシステムの小型化、および、センサの面積積化による広範囲の高分解能観察が実証されている。しかし、従来の報告の多くは明視野観察であり、蛍光イメージングについての報告は少なかった。

その理由の一つとして、レンズレス系における励起光除去フィルタの性能が低かったことが挙げられる。一般的な蛍光顕微鏡は、高性能な干渉フィルタによって励起光が除去され

るが、レンズレス系ではその性能を活かすことができない。これは、干渉フィルタの透過スペクトルが入射角によって変化し、傾くに従って短波長側にシフトすることによる。レンズ光学系では、対物レンズによって観察対象家の光をほぼ平行な光線として干渉フィルタに入射させることができる。一方、レンズレス光学系では、観察対象の近傍直下にフィルタが配置されるため、散乱光はフィルタに斜めに入射することになる。

吸収フィルタを用いることにより、透過スペクトルの入射角依存性の問題を回避することができる。また、フィルタ厚を大きくすることにより励起光透過率は指数関数的に減少させることができる。しかし、吸収フィルタはそれ自体が蛍光を発するため、一部は蛍光としてフィルタを透過する。すなわち、厚さをそれ以上大きくしても実効的な励起光除去性能が改善しなくなる限界が存在する。

本研究では、新たに干渉フィルタと吸収フィルタを用い、それぞれの問題点を相補的に補う「ハイブリッドフィルタ」を提案し、レンズレス系における励起光透過率 10^{-8} の高い性能を実現した。従来のレンズレス蛍光イメージングデバイスよりも飛躍的に高い励起光除去性能を実現し、一般的な蛍光顕微鏡と同程度の性能が実現された。

レンズレス蛍光イメージングのもう一つの大きな課題は、空間分解能にある。明視野観察用のレンズレスイメージングでは、光の位相情報を用いて観察対象の像を復元する手法で高い空間分解能が実現されているが、蛍光観察では、入射励起光の位相情報は失われる。本研究では、励起光としてレーザースポットアレイを照射し、これを走査して得た複数の画像を統合することによって高空間分解能像を得る手法を用いる。空間分解能はレーザースポッ

ト径で決定されるため、検出器となるイメージセンサの空間分解能は低くても良く、画素面積が大きく高感度なものが利用可能となる。アレイ化しているため個々のレーザースポットの走査範囲は狭くても良く、簡便な走査系で観察領域を網羅できる。

－以下割愛－