

戦略的創造研究推進事業 CREST
研究領域「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」
研究課題「生体分子1分子デジタル計数
デバイスの開発」

研究終了報告書

研究期間 平成22年4月～平成28年3月

研究代表者：野地博行
(東京大学・工学系研究科・教授)

§ 1 研究実施の概要

(1) 実施概要

A. 「デジタル計数法開発」グループ

本プロジェクトでは、大きき数ミクロン、体積数フェムトリットル($\text{fL}=10^{-15}\text{L}$)の超微小溶液チャンバーがワンチップ上に百万個以上並んだデバイスを用いて生体分子1分子を検出・定量する手法の開発を行った。特に集中したのが、臨床診断の現場で汎用されている抗原・抗体反応の一種であるELISA(enzyme-linked immunosorbant assay)である。ELISA複合体を形成し、その存在を抗体標識に利用した酵素の活性から1分子レベルで抗原を数え上げる手法を開発した。以降、この手法をデジタルELISAと呼ぶ。本プロジェクトの前半では、まずデジタルELISA法を確立した。その後、この手法によってイノベーションを社会にもたらすことを目的に、デジタルELISA法の自動化やハイスループット化を目的とした開発も行った。このCRESTの成果がきっかけとなり企業との共同研究もスタートし、さらにその成果が基となりJST先端計測開発プログラムも発足した(代表は企業責任者)。CRESTの後半では、この研究グループは先端計測開発プログラムと連動しながら量産化に適したデバイスの開発や自動分注ロボットをによるアッセイ自動化の検討を行った。このように実用化に向けた研究を進める一方で、基礎的なデジタル計測の開発も行った。例えば、多色デジタル計数法の開発、蛍光によるインフルエンザウイルス1粒子の検出、脂質膜アレイチップによる膜輸送体活性の1分子デジタル計数法、ナノロッドやラマン分光を用いたデジタル計数法などである。

B. 「デジタル計数用 CMOS システム開発」グループ

上述のデジタルELISA法をより汎用性の高い物とするためには、デバイスだけではなく測定システムすべてを小型化する必要がある。本プロジェクトでは、当初よりこれを目的とした先進的なレンズレス CMOS イメージングシステムについて開発を行ってきた。まず、イメージセンサ用プロセスを用いて設計の最適化を行い、蛍光検出感度の向上を行った。検出限界は、従来センサの検出限界値の7%程度にまで改善された。また、波長識別を可能とする積層フォトダイオード搭載イメージセンサに置いては、感度および応答の線形性の向上を実現した。面積あたりで、より多くのドロップレットを観察可能とするために、新たな光学系として金属製ライトパイプを用いた構造を提案し、作製プロセスの確立を行った。本手法では、吸収フィルタを充填したライトパイプにより、励起光を減衰させつつ、蛍光を画素へと導波させることにより高い蛍光検出効率が期待される。金属製ライトパイプ法を開発するまでに、シリコンベースのライトガイドアレイ、光ファイバプレートなど複数の光誘導法を検討した。また励起法としても、斜光照明、近接場照明なども検討し、最終的にこの形態に至っている。その結果、1分子デジタル計測が可能な感度に達することに成功した。

C. 「エレクトロアクティブマイクロウェルアレイ開発」グループ

本プロジェクトでは、CREST領域間連携の1つとして藤井グループが有するエレクトロアクティブ法の導入を試みていた。最終年度は、正式に研究分担として藤井グループが参画することになり、細胞内の酵素活性やATP濃度さらにはiPS細胞における未分化マーカーの発現状態など、様々な1細胞解析を実現することに成功した。これらの成果は原著論文として発表されている。

(2) 顕著な成果

<優れた基礎研究としての成果>

1. 金ナノロッドの回転運動超高速イメージング法の確立

ウイルス1粒子検出のために開発した金ナノロッドの配向角度高速イメージング法は、角度分解能 0.5-2.0° 時間分解能 5-10・s を達成しており、他の 1 分子計測技術と比較しても格段に時空間分解能が高い。この技術を回転分子モーターのトルク発生ユニットの構造変化検出に応用したところ、新しい中間構造状態の発見に加え、構造変化時の力計測にも成功した。この手法は原理的に3次元計測にも利用可能であるため、分子機械の構造ダイナミクス計測に広く利用可能である。

2. 脂質二重膜アレイチップの開発

脂質二重膜は膜タンパク質の機能解析に不可欠であるが、シャボン玉のように脆弱なため、最新のマイクロデバイス技術でも一度に数十枚程度しか作成できない。本手法は一度に 100 万個程度の脂質二重膜を作成するものであり、スループット性だけでもずば抜けている。さらに、各膜が超微小溶液チャンバーの蓋となっているため、これまで不可能であった膜輸送体の 1 分子活性計測が可能である。既に ATP 合成酵素 1 分子の計測に成功している。しかし、我々が最も期待するのは、このデバイスを用いた人工細胞システムの再構成である。現在、バクテリア細胞を「生きたまま」デバイスと融合することに成功し、人工 DNA を起動することに取り組んでいる。いずれも未発表データであるが、一連の成果は間違いなく High Impact なものになると期待している。

3. 超並列 1 細胞解析を実現するエレクトロアクティブマイクロウェルアレイの開発

多数の細胞を一つずつマイクロウェルの内部に捕捉した上で、細胞を破碎することによって 1 細胞解析を行うことができるエレクトロアクティブマイクロウェルアレイを実現し、細胞内部の酵素活性や ATP 濃度、さらには未分化マーカーの発現等の解析を行うことに成功した。1 細胞解析は現在、世界的にも注目を集めている分野であり、細胞集団を高効率・高感度で 1 細胞解析が行える技術として、学術的にもまた応用上も高く評価されている。

< 科学技術イノベーションに大きく寄与する成果 >

1. 1 分子デジタル計数技術の確立

本プロジェクトが標榜する「生体分子 1 分子デジタル計数法」として、1 分子デジタル ELISA 法を開発した。本手法は、通常の ELISA より検出感度が 100 万倍以上と飛び抜けて高いため、感染症・癌・アルツハイマーなどの超早期診断や、新規のバイオマーカーの探索が可能となり、臨床分析イノベーションを引き起こすことが期待される。実際、本成果発表後に多方面より問い合わせがあり、臨床分析の世界的企業との共同研究につながっている。実用化研究の一部は、JST 先端機器開発プログラムに引き継がれる。本プロジェクトの後半は、ハイスループットな 1 分子デジタル ELISA 法に加え、ELISA 以外のバイオ分析法を 1 分子デジタル化する。特に、膜アレイチップを用いた 1 分子デジタル計数法は、全く新規なものとなるため、バイオ分析における技術イノベーションを引き起こせる可能性がある。

2. CMOS イメージングデバイスと ELISA デバイスの統合

バイオ分析における技術イノベーションを引き起こすためには、1 分子デジタル計数装置の小型化と低価格化も必須である。現況のシステムは高額かつ大型の顕微鏡システムに立脚しており、規模の大きな企業や大学の研究室以外は導入が不可能である。本プロジェクトでは、最終的に手のひらサイズのシステムを目指している。既に、CMOS イメージングデバイスと反応マイクロデバイスを統合したシステムを開発し、ELISA に用いられる蛍光色素の高感度検出に成功した。感度は確実に向上している。プロジェクト期間中にこれを克服して、1 分子デジタル計数法をより広く普及させ、バイオ分析分野・市場でイノベーションを引き起こしたい。

§ 2 研究実施体制

(1) 研究チームの体制について

①「野地」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
野地 博行	東京大学工学系研究科	教授	H22.10～H28.3
飯野 亮太	同上	准教授	H22.10～H26.5
田端 和仁	同上	講師	H22.10～H28.3
渡邊 力也	同上	助教	H22.10～H28.3
奥野 大地	同上	特定有期雇用職員特任研究員	H23.4～H23.5
榎 佐和子	同上	特定有期雇用職員特任研究員	H23.4～H28.3
Soo Hyeon Kim (金 秀炫)	同上	特定有期雇用職員特任研究員	H23.4～H25.3
池田 朋宏	同上	特定有期雇用職員特任研究員	H23.4～H27.3
長谷川 理恵	同上	特定有期雇用職員学術支援専門職員	H23.4～H23.9
山内 里紗	同上	特定有期雇用職員学術支援職員	H24.4～H27.10
山中 智子	同上	特定有期雇用職員学術支援職員	H24.4～H28.3
山内 恵	同上	特定有期雇用職員学術支援専門職員	H24.4～H25.2
太田 希久代	同上	特定有期雇用職員特任研究員	H23.4～H28.3
谷川原 瑞恵	大阪大学 生命機能研究科	学生	H22.10～H24.3
柳沼 秀幸	東京大学工学系研究科	特定有期雇用職員特任研究員	H22.10～H26.3
游 慧娟	同上	特定有期雇用職員学術支援専門職員	H22.10～H25.3
新木 卓	大阪大学 生命機能研究科	学生	H22.10～H23.3
富山 佳祐	同上	学生	H22.10～H23.3
大坂 拓也	大阪大学工学研究科	学生	H22.10～H23.3
岩井 信乃	大阪大学 生命機能研究科	学生	H22.10～H24.3
伊藤 丈太郎	同上	学生	H22.10～H27.3
UNER NACIYE ESMA	東京大学工学系研究科	特定有期雇用職員学術支援専門職員	H23.4～H25.3

新井 秀信	同上	学生	H23.4～H25.3
塚原 隆博	同上	学生	H23.4～H25.3
雨澤 広海	同上	学生	H23.4～H24.3
安川 純平	同上	学生	H23.4～H24.3
皆川 慶嘉	同上	学生	H25.4～H28.3
紀 十男	同上	学生	H23.4～H26.3
小安 司馬	同上	学生	H23.4～H26.3
十河 孝夫	同上	学生	H23.4～H26.3
栗村 嘉彦	同上	学生	H24.4～H27.3
柴藤 祐介	同上	学生	H24.4～H26.3
岩本 康甫	同上	学生	H24.4～H27.3
城所 柊朋	同上	学生	H24.4～H27.3
森泉 芳樹	同上	学生	H24.4～H28.3
湯川 絢子	同上	学生	H24.4～H27.3
椎橋 麻里奈	同上	学生	H24.4～H25.3
木添 博仁	同上	学生	H25.4～H27.3
大館 真也	同上	学生	H25.4～H28.3
大林 祐介	同上	学生	H25.4～H28.3
岡 晨一郎	同上	学生	H26.4～H28.3
奥村 元	同上	学生	H26.4～H28.3
田崎 智之	同上	学生	H25.4～H28.3
沈 基亨	同上	学生	H25.4～H27.6
芦川 裕樹	同上	学生	H25.4～H28.3
源田 真	同上	学生	H25.4～H28.3
山下 弘展	同上	学生	H25.4～H28.3
中川 佳史	同上	学生	H25.4～H27.9
湯川 豪	同上	学生	H25.4～H26.3
ライ ケー シン	同上	学生	H25.4～H26.3
小野 堯生	同上	特定有期雇用職員 特任研究員	H25.5～H26.12
曾我 直樹	日本学術振興会	特別研究員	H25.4～H28.3
張 翼	同上	外国人 特別研究員	H25.11～H27.11
Oliver Leon Jacobs Harriman	同上	外国人 特別研究員	H26.4～H26.12
Duncan George Glenn McMillan	同上	外国人 特別研究員	H27.4～H28.3

研究項目

- ・超微小溶液チャンバーを用いたデジタル計測法の開発
- ・ナノブラウン振動子計測によるウイルス1粒子計測法の開発

②「太田」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
太田 淳	奈良先端科学技術大学院大学物質創成科学研究	教授	H22.10～H28.3

	究科		
笹川 清隆	同上	助教	H22.10～H28.3
徳田 崇	同上	准教授	H22.10～H28.3
野田 俊彦	同上	助教	H22.10～H28.3
竹原 宏明	同上	特任助教	H27.4～H28.3
小林 琢磨	同上	研究員 (H24.6 退職)	H22.10～H24.6
宍戸 三四郎	同上	D3, 修了	H22.10～H23.3
田川 礼人	同上	D3, 修了	H22.10～H24.3
中島 新	同上	D3, 修了	H22.10～H24.3
Yosmongkol Sawadsaringkarn	同上	D2～D3, 修了	H22.10～H25.3
潘 羿利	同上	D2～D3, 修了	H22.10～H25.3
竹原 浩成	同上	D1～D3, 研究員	H24.6～H28.3
太田 高志	同上	D1～D3	H22.10～H28.3
安藤 圭祐	同上	M2, 修了	H23.8～H24.3
岡林 大恭	同上	M1～M2, 修了	H23.8～H25.3
橋本 力	同上	M1～M2, 修了	H23.8～H25.3
宮澤 和也	同上	M1～M2, 修了	H24.6～H26.3
北口 一樹	同上	M1～M2, 修了	H25.7～H27.3
神山 直也	同上	M1～M2, 修了	H25.7～H27.3
永崎 瑞樹	同上	M1～M2	H26.7～H28.3
太田 安美	同上	研究員	H23.2～H28.3
元山 真由美	同上	研究員	H25.4～H28.3

研究項目

- ・ 蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

③「藤井」グループ

研究参加者

氏名	所属	役職	参加時期
藤井 輝夫	東京大学生産技術研究所	所長・教授	H27.4～H28.3
金 秀炫	同上	助教	H27.4～H28.3
小泉 沙織	同上	派遣職員	H27.4～H28.3
緒方 謙	同上	M2	H27.4～H28.3

(2) 国内外の研究者や産業界等との連携によるネットワーク形成の状況について

本CREST研究を推進するに当たって、研究チームにこだわらず、多くの研究者や企業に協力を求めた。具体的にはチャンバーデバイス作成の労力を低減するため、デバイス材料の検討を複数社の企業と行った。中でも、旭硝子株式会社からは開発チームとの打ち合わせを含め、研究開発品の提供を受け検討を行った。また、デジタルELISA法や計数法に関してはAbbott Japan社や凸版印刷株式会社と共同研究を推進し、Abbott Japan社とはJSTの先端機器プログラムに共同で採択されている。これ以外にも、数社の企業に対して、研究助言などを行っている。一方研究者に対しては、様々なサンプルのデジタルカウンティングに関して相談を受けている。実際に、共同研究としてアルツハイマー病のマーカータンパク質として注目されているタウタンパク質のデジタルカウンテ

イングの検討を行った。

また、基礎研究分野においても我々の超微小溶液チャンバーを用いたシステムは様々な分野で応用されている。例えば、理研生命システム研究所の渡邊グループは、我々のチャンバーにサイトカイン分泌性細胞をチャンバー内に閉じ込め、そこから分泌されるサイトカイン量を1細胞単位で計測することに成功した(Fujita H. et al. *RSC Adv.* 2015)。その他、原著論文にはなっていないが、東京理科大学の政池グループとは回転分子モーターが産出するリン酸の定量計測に、東大の澤田グループとは粘菌 1 細胞による化学振動現象の解析に応用されている。このように、デジタル計数法をベースとした新しいコミュニティはアカデミアと実業界の両方で形成された。

§ 3 研究実施内容及び成果

3-1 「デジタル計数法開発」グループ(東京大学 野地グループ)

Droplet 型超微小チャンバーを用いた世界最高の感度を有するデジタル ELISA 法を確立する。デジタル計数用 CMOS システム開発グループと連携し、CMOS 直結型デジタル ELISA 法の開発を行う。Droplet 型マイクロチャンバー内での DNA デジタル計数法を確立する。さらに1細胞内に発現する生体分子に対するデジタル計数法を確立する。膜輸送体の基質輸送活性のデジタル計数法の開発を行う。また、レーザー暗視野法、化学発光法、および金ナノロッドの回転拡散運動から1粒子のウイルスを検出するシステムを開発する。また、これらデジタル計数法から生まれた新しい計測法の開発にも取り組む。

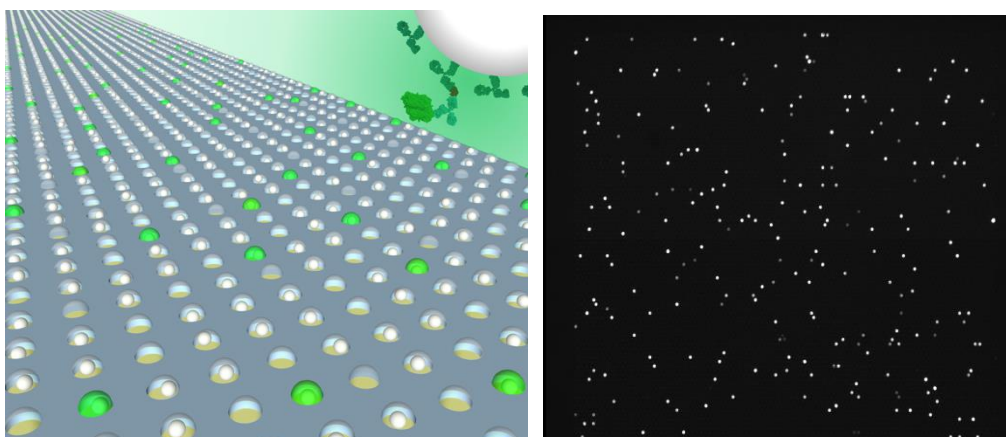


図 1. 1分子デジタル ELISA の概念図(左)と実際に得られた蛍光データ(右)

3-1-1 デジタル ELISA 法の開発(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

1分子デジタル ELISA の基本技術開発は完了したが、標識抗体の非特異的結合のため ELISA 法の検出限界値が理論値より大きくなってしまった。それでも通常 ELISA 法より 100 万倍の感度が得られた。これは、想定内と言えるが、予想していなかったのは成果発表後の内外の反響であった。すなわち、実用化がこれほど強く求められるとは想定外であった。そこで、H25 年度採択の JST 先端計測プログラムにおいて、Abbott Japan 社と実用化に向けた共同研究を開始した。ただし、デバイスの量産化とプロトコルの自動化に関しては、本 CREST で対応を行った。まず、実用化・量産化へ向け、デバイスの検討や完全自動化を試みた。多検体を扱うためには、現在主流となっている 96 穴プレートをベースにしたデバイスを開発する必要がある。そこで、96 穴プレート底面をチャンバーにしたデバイスを作成し(図 4-2 左)、デジタルカウンティングを行ったところ、従来のデバイスと遜色ない結果を得ることが出来た。そのため、この 96 穴プレートデバイスを使用し、自動分注ロボットを使ったデジタル ELISA の全自動化に取り組んだ。自動分注ロボットのプログラミングを行い、実際にアッセイの操作を行わせることに成功したが、各ウェルにおけるドロップ形成効率が低いことが分かった。これは、手で操作しているときに少し振動を与えたり、傾けたりしているステップがロボットで再現できていないためと考えられる。

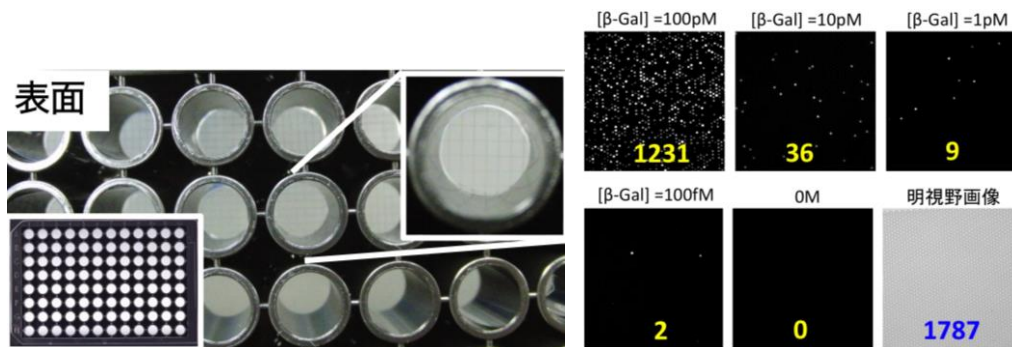


図 2 96 穴プレートデバイス(左)と実際に得られた蛍光データ(右)

3-1-2 デジタル計数法およびデジタル ELISA 法のためのデバイス作成効率化(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

開発した 1 分子デジタル ELISA 法では、撥水性で Droplet を形成し易い非晶質フッ素樹脂をデバイス基材に用いている。しかし、当該樹脂の加工には UV リソグラフィやプラズマエッチングを含む複雑な工程が必要であった。デバイス作製工程を簡略化し、実用化・量産化に繋げるため、より簡便に加工できるデバイス材料を探索した。UV リソグラフィのみで加工が可能な UV 硬化樹脂を主な新材料候補として、株式会社アデカ、東京応化工業株式会社、住友ベークライト株式会社、旭硝子株式会社など各社から材料の供給を受け、デバイス作製と ELISA 法への適性評価を行った。

検討した範囲では材料の撥水性が不足しており、Droplet 体積の均一性や、Droplet 個別化のために必要なシール性に問題があった。そこで、各メーカーに問題点を説明し材料の改善や、別種 of 材料の提供をお願いした。そうしたところ、一部材料では ELISA 法に必要な酵素数分子の活性計測が可能であった。しかしながら、まだ加工性の問題などがあるため、引き続き材料メーカーと共同で開発を行っている。

3-1-3 Droplet 型高機能超微小溶液チャンバーアレイの開発(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

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、ビーズを高い効率で再現性良く導入する手法を確立した。本課題は H24 年度で完了した。

3-1-4 Droplet 型マイクロチャンバーでの DNA デジタル計数法の確立(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

CREST 藤井チームと共同で行った。60-65°C で増幅反応が行える LAMP 法の検討を行った。Droplet 型マイクロチャンバーでは良好な結果は得られていなかった。しかし、野地が技術的指導を行った凸版者では、invader 法と呼ばれる DNA 等温増幅法のデジタル化に成功した。これは CREST の予算で行った研究ではないが、CREST で生まれた技術と知見が、民間企業の新しいイノベーションの目に育ったと言う意味では本プロジェクトの成果とも言えるだろう。この成果は、野地も共著者として現在原著論文として準備段階にある。

3-1-5 細胞生体分子デジタル計数法の確立(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

単一細胞内タンパク質のデジタル計数法のデモンストレーションとして、大腸菌内に存在す

る galactose 分解酵素である β -galactosidase (β -gal) を計数した。大腸菌を溶解し、 β -gal の蛍光基質と混合して、Droplet 型マイクロチャンバーに閉じ込め、蛍光を発するマイクロチャンバーを数え上げることで β -gal を計数した。

当初の研究計画(全体研究計画書)に対する現在の研究進捗状況と得られた成果: 計画通り大腸菌1細胞中の β -gal の分子数を計測することに成功した。現状のデータは平均 400 個程度であることを示している。一方、ほ乳類細胞(U937)を対象とした 1 細胞中の β ガラクトシダーゼの分子数を計測した。すると、およそ 65000 個の β ガラクトシダーゼがあることがわかった。このように、細胞内のタンパク質の絶対定量が可能であることがわかった。今後は、p53 のような病気に関係するタンパク質のデジタル計数システムの開発に取り組む。

3-1-6 DNA の1分子固さ測定(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ブラウン粒子測定で用いる分子紐としての DNA の曲げ弾性を計測するため、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、その曲げ弾性測定に成功した(You et al *Nuc. Acids Res.* 2012)。その結果、DNA リング内側にタンパク質など支えがある場合においては、ゆらぎ測定等から予想された弾性率とほぼ一致することが分かった。本課題は H24 年度で完了した。

3-1-7 レーザー暗視野顕微鏡を用いたウイルスの 1 粒子検出(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

ウイルス 1 粒子は、当初計画ではブラウン粒子の揺らぎ計測から求める予定であったが、予備的実験でその散乱光から直接検出できることが判明した。見えている散乱体がウイルス粒子であることは、走査型電子顕微鏡(SEM)、透過型電子顕微鏡(TEM)等を駆使して実証した(Enoki et al *PLOS ONE* 2012)。本課題は H24 年度で完了した。

3-1-8 インフルエンザウイルスの超高感度検出(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

インフルエンザウイルスの表面に存在する、neuraminidase の活性を指標に、1 粒子の検出を目指した。neuraminidase の基質として、MUNANA を利用した。これは、neuraminidase によって分解されると蛍光色素を形成する基質である。この基質とインフルエンザウイルスを droplet に閉じこめて観察をしたところ、インフルエンザウイルス由来の蛍光を観察することが出来た(図 4-3)。また、ウイルス濃度依存的に蛍光を発する droplet の数が変化することから、1 粒子の検出に成功していることが分かった。本法を用いた検出感度は、 10^1 pfu/ml に達し、免疫反応を利用した従来法と比べ 100 倍程度の高感度化に成功した。また、検出までにかかる時間も 2.5 分以下と従来必要としていた数十分という時間を大幅に低減できることがわかった。

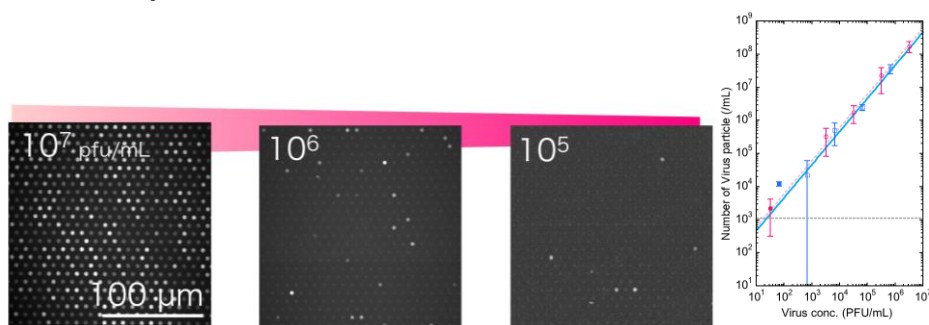


図 3 本法によるウイルス粒子検出(左)と、これを用いて計測したウイルス濃度とウイルス粒子数の関係(右)

3-1-9 膜輸送体活性のデジタル計数法の開発(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

昨年度開発した脂質膜アレイチップを利用し、様々な膜輸送体の 1 分子輸送活性計測に取り組んでいる。具体的には、抗がん剤耐性の原因となる多剤排出タンパク質 (MATE) や、ペプチド輸送体、V 型 ATP 合成酵素などである。それぞれ、計測条件の検討を進めている。また、脂質二重膜の非対称化にも成功した。これにより、細胞膜と同じ脂質二重膜構造を作成することが出来るため、より膜タンパク質の研究を発展させることが出来る。

3-1-10 ナノロッド粒子の回転拡散運動イメージング技術の確立(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

金ナノロッドの角度の高速検出のため、高輝度レーザーを照明光源に用いる暗視野照明方法を利用し、デフォーカス法とフォーカス法で角度の検出を行った。いずれの方法においても、 $10\ \mu\text{s}$ 以上の時間分解能で、ナノロッドの角度を決定することに成功した。ATP 合成酵素の ATP 駆動型モーターである F_1 -ATPase の回転軸に金ナノロッドを結合させて測定したところ、従来の報告通り、 120° ごとに(もしくは、サブステップも検出)ステップしながら回転するのが検出され、このシステムの有用性が実証された。また、2 次元の角度計測のみならず、3 次元の角度の検出も試みた。その結果、3 次元角度の計測も可能であることが分かった(Enoki, S. et al. *Ana. Chem.* 2015)。

3-1-11 ラマン分光を用いたデジタル計数法の開発(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

H25 年度に導入したラマンイメージング顕微鏡を利用し、無染色・無蛍光によるデジタル計数法の開発を試みた。その対象として、様々な酵素を検討した結果、キサンチンオキシダーゼを候補とすることにした。これは、通風薬のターゲットにもなる酵素で、細胞内ではプリン体代謝を担っている。この酵素が触媒する、ヒポキサンチンからキサンチン、尿酸という反応を可視化するため、それぞれの SERS 計測を行ったところ、非常に判別しやすい振動モードをそれぞれの物質が持っていることが分かった。また、実際に顕微鏡上で、ヒポキサンチンとキサンチンオキシダーゼを加えて、そのスペクトルがどのように変化するかを計測したところ、反応が起きたものと起きないもので、それぞれヒポキサンチンと尿酸特有のスペクトルが得られた。今後はこの反応をチャンバー内で行い、デジタル計測することを試みる。

3-1-12 *in vitro* タンパク質合成系を利用した、新たなスクリーニングシステムの開発(東京大学 野地グループ)

(1)研究実施内容及び成果

タンパク質の活性をベースにした大規模なスクリーニングシステムの開発に取り組んだ。本プロジェクトで開発した droplet デバイスを使用し、*in vitro* 翻訳系である PURE system と Venus をコードしたプラスミド 1 分子を閉じこめて、タンパク質合成を行った(図 4-4)。すると、時間とともに Venus に由来する蛍光が観察された。また、蛍光を発するチャンバーの数は、DNA 濃度に依存して変化することから、1 分子のプラスミドから Venus が合成されていることが分かった。さらに、Venus が合成された drop をガラスピペットを用いて回収することにも成功し、その内部に含まれる 1 分子のプラスミドの PCR 増幅にも成功した。このことにより、スクリーニングのモデル実験として β ガラクトシダーゼの人工進化実験に取り組んだ。この実験は、 β ガラクトシダーゼ遺伝子を PCR によってランダムに変異導入し、変異の入った遺伝子を 1 分子となるようにデバイス内に閉じ込め、タンパク質の合成反応を行う。合成されたタンパク質の活性は、 β ガラクトシダーゼによる FDG の分解によって生じたフルオレセインの蛍光強度上昇をモニターすることで評価を行った。すると、変異導入を行った遺伝子群は、行わない物に比べて蛍光を発するチャンバーの数が減っているため、ある一定の効率で変異

導入がなされていることがわかった。また、変異を入れた遺伝子群では、光るチャンバーの数は少ないが、蛍光強度上昇が早いチャンバーがみとめられた。このチャンバーから遺伝子を回収し配列の決定と再度大腸菌に導入し、活性を測定したところ、遺伝子中に1カ所変異が認められ、活性も WT の 2 倍に上昇していた。1 度の選択でこのようなサンプルが得られたため、複数回繰り返すことでさらに活性の上昇した変異体を得ることができると考えられる。

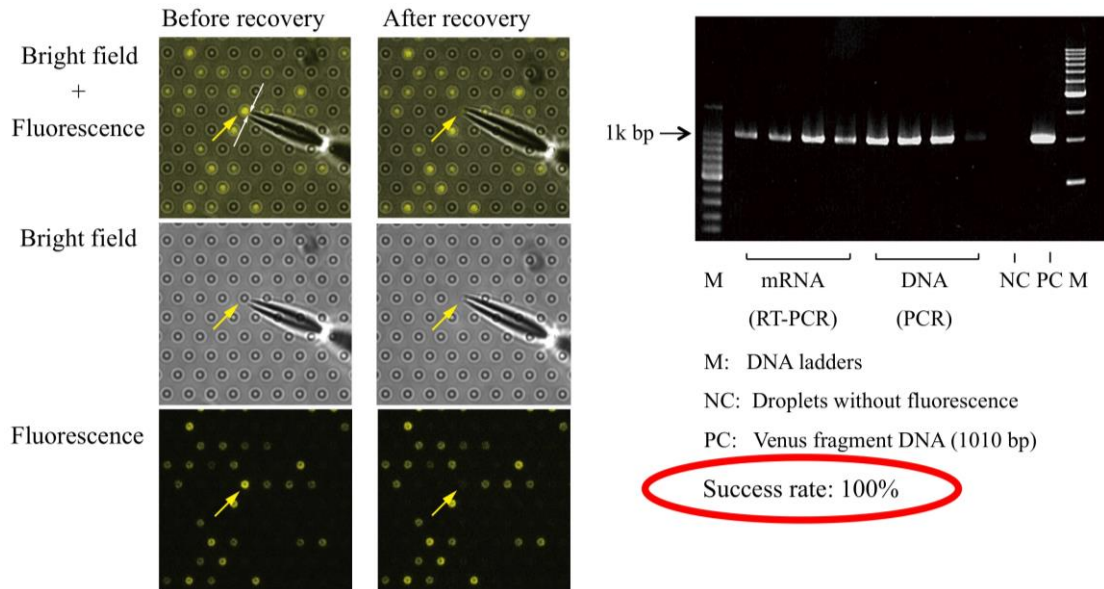


図 4 Venus を合成している drop の回収(左)と、回収したドロップ内に含まれる 1 分子プラスミドの PCR(右)

3-2 デジタル計数用 CMOS システム開発(奈良先端科学技術大学院大学グループ)

(1)研究実施内容及び成果

テーマ名: CMOS センサを利用した生体分子デジタル計数デバイスの開発

本テーマでは、CMOS 集積回路技術および微細加工技術を用いて、デジタル計数専用の小型デバイスを開発することを目的とする。従来のデジタル ELISA システム等で用いられている大型の蛍光顕微鏡等を不要とすることにより、小型システムの実現が可能となる。小型化により、可搬性が高くなることは、デジタル計数システムが広く普及するための重要な要素であると考えられる。

本研究では、以下の3つの項目について研究を推進した。デジタル ELISA システムに最適化された専用の CMOS イメージセンサからの開発を行うことで、小型かつ高機能なデバイスを実現することを目指した。

1. 蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発
2. チャンバー間のクロストークの無い CMOS システムの開発
3. 10^4 個のチャンバーを解析する CMOS システムの開発

3-2-1: 蛍光計測用 CMOS センサシステムの開発

(a) センサ高感度化

第一次試作として、標準 CMOS プロセスを用いた CMOS イメージセンサを試作し、更にファイバオプティックプレート(FOP)を用いたレンズレス小型デバイスを構築した。図 5 にそのシステム構成を示す。CMOS イメージセンサ上に吸収フィルタを形成し、更にその上に FOP を搭載することで、光学的クロストークの抑制を図っている。FOP の上にガラスプレートを載せ反応を行うドロブレットチャンバを形成する。

このレンズレスデバイスを用いて、ドロプレットチャンバアレイを用いた酵素アッセイに成功し、 $10\mu\text{M}$ の fluorescein 蛍光検出を確認した。しかし、イメージセンサが最適化されておらず、感度が不十分なことから、蛍光検出可能になるまで長い反応時間が必要であった。

そのため、第二次試作として、標準プロセスではなく、イメージセンサ専用のプロセスを用いてパラメータを最適化したデジタル ELISA 用高感度 CMOS イメージセンサを設計・試作した。(図 6)

画素に低暗電流を実現できる埋め込みフォトダイオード (PD) 及び高感度化が実現できる 4-Transistor Active Pixel Sensor (APS) 構造を採用した。また、画素寸法を光学系の分解能に合わせ従来の $7.5\mu\text{m}$ から $15\mu\text{m}$ とし、画素内の受光面積比を向上させた。結果として、従来センサと比較して新規センサでは感度が 5 倍程度向上した。検出限界は、従来センサでは 3.2 fW/pixel ($130\mu\text{W/m}^2$)、新規センサでは 1.5 fW/pixel ($9.1\mu\text{W/m}^2$) であった。すなわち、従来センサの検出限界値の 7% 程度にまで、改善された。

(b) 積層フォトダイオード構造導入センサ

小型デジタル ELISA 装置では、励起光に対して非常に弱い蛍光を検出しなければならない。このため吸収フィルタを通過する励起光は無視できない。センサ画素が光の波長を見分ける能力を備えることで誤検出を抑制することができる。

図 6 の断面図に示すように縦方向に2個のフォトダイオード (PD1、PD2) を積層した構造のセンサとすることで、波長識別を可能とする。本構成は従来の汎用 CMOS プロセスで1次試作を行い、基本特性を確認した。更に特性改善を目的として、CMOS イメージセンサ専用プロセスを用いて PD1 と PD2 の電気的な分離性能の改良を図った。また、画素レイアウトの工夫で読み取りを 4T-APS 方式にすることで高感度化も実現している。撮像例を図 7 に示す。従来センサと比較して高いコントラストの画像が得られている。励起光、

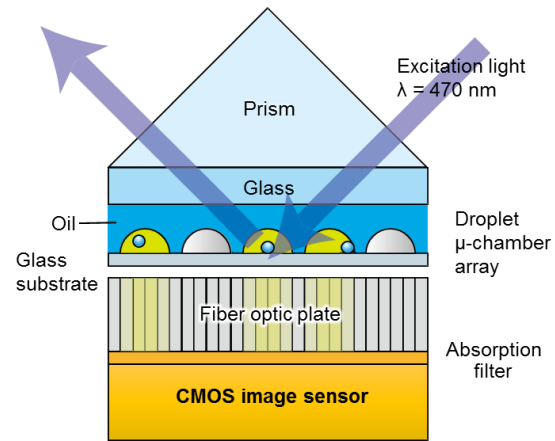


図 5 ファイバーオプティックプレートを用いた小型レンズレスデジタル ELISA システム

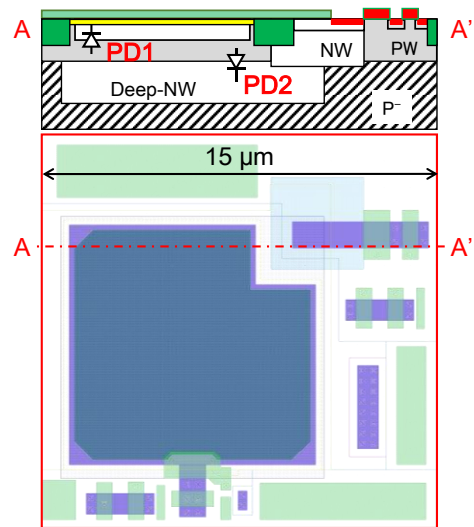


図 6 積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ画素レイアウトと断面図

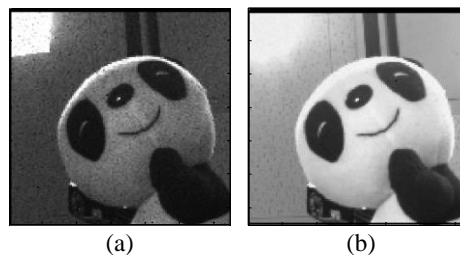


図 7 4T-APS 積層フォトダイオードセンサ取得画像。(a) PD1 画像、(b) PD2 画像。

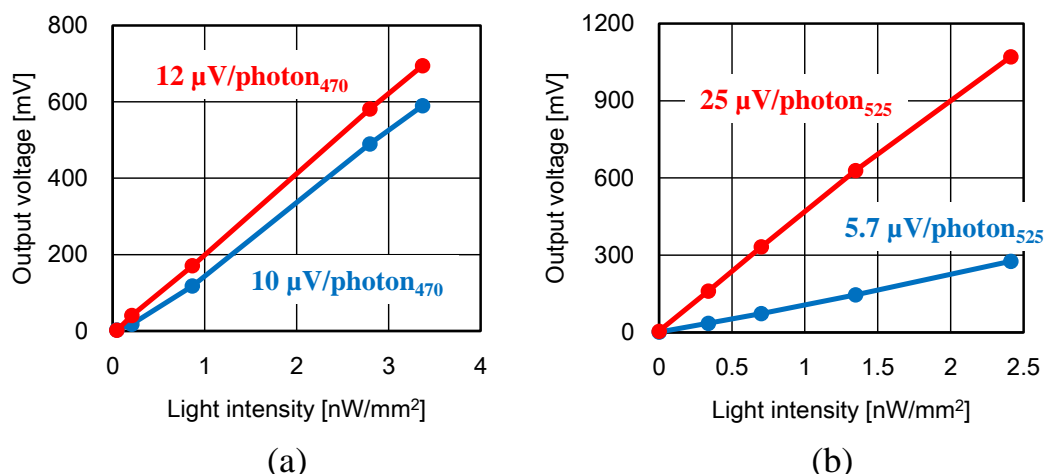


図8 4T-APS 積層フォトダイオードセンサにおける LED 照射光強度と出力画素値の関係。
(青線) PD1 (赤線) PD2。 光源波長(a) 470 nm LED、(b) 525 nm LED。

蛍光を模擬した 2 波長 (470、525 nm) の LED を光源として感度を比較した (図 8)。シリコン中への光の侵入長が波長依存性を持つため、出力電圧比が入射波長によって大きく変化していることがわかる。すなわち、励起光中の蛍光を判別することが可能である。

3-2-2: チャンバー間のクロストークの無い CMOS システムの開発

(a) ライトパイプアレイ構造の試作

FOPシステムより更に高効率に蛍光を集光し、励起光を排除するために図9のような反応チャンバーと吸収フィルタを充填した金属製ライトパイプを密着した構造を考案した。CMOS イメージセンサは1ユニットに1画素を割り当てている。

レンズを使用しないコンタクトイメージングでは、発光源(ドロップレット)から受光部までの距離が課題となる。また、光退色の影響を考慮して励起光強度は極力下げておく必要がある。提案する金属製ライトパイプ構造では、金属壁面での反射によって、等方的に放射される蛍光を高効率に画素へと導波、集光し、受光部に到達させる。また、金属を用いることで反応チャンバーの機械的強度を高めつつ、パイプ内に充填した吸収フィルタで励起光を除去することができる。作製にあたっては、厚膜フォトレジストパターン周辺に電解めっきにより銅を成膜する方法を開発した。図10には、銅めっき後、厚膜フォトレジストを除去した状態の

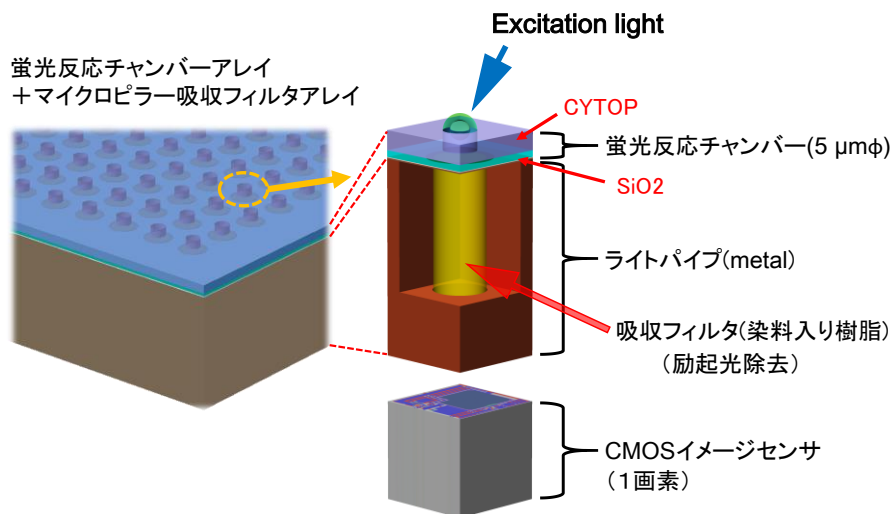


図9 マイクロピラー吸収フィルタアレイと蛍光反応チャンバーアレイの構成

SEM 写真を示した。

作製したライトパイプアレイに充填する吸収フィルタの母材としては自家蛍光の少ない透明2液混合型低粘度エポキシ樹脂を使用し、吸収材としては、黄色染料を選定した。少量のシクロペンタノンに染料を溶解した後、主剤、次いで硬化剤と混合したものに、銅ライトパイプアレイを浸漬し減圧と常圧を繰り返すことでパイプ内を完全に埋め込むことができた。

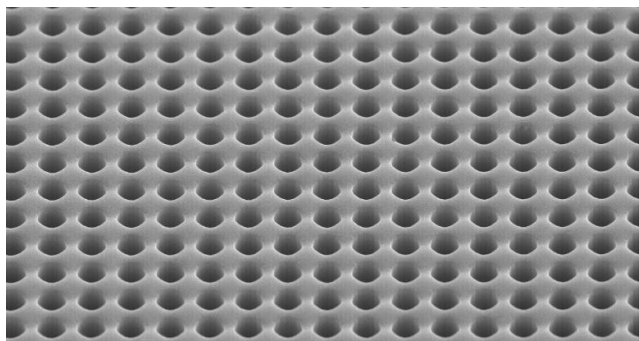


図 10 銅ライトパイプアレイパターン
(15 μm ピッチ)

(b) 蛍光検出感度比較

本研究では、前述したようにライトパイプアレイ(LPA)以外にファイバーオプティックプレート(FOP)を用いた蛍光検出システムを試作し、実際にドロップレットチャンバ内の反応により10μM の fluorescein 蛍光検出に成功している。その場合、従来型の CMOS イメージセンサ、すなわち 3T-APS を用いていた。FOP と LPA の性能比較を表 1 に示す。LPA と 4T-APS CMOS イメージセンサと組み合わせることにより、200 倍の感度向上が、更に積層 PD 型 CMOS イメージセンサを用いることで 1000 倍の感度向上が予想され、1μM 以下の蛍光検出が期待できる。

表 1 ファイバーオプティックプレート(FOP)とライトパイプアレイ(LPA)を用いた場合の感度比較

光学構造	FOP			LPA		
	3T-APS	4T-APS	SPD-4T	3T-APS	4T-APS	SPD-4T
蛍光CE/画素	1	1	1	100	100	100
画像処理	1	1	1	2	2	2
CIS感度	1	2	5	1	2	5
トータル感度	1	2	5	200	400	1000

CIS: CMOS image sensor, 3T-APS: 3-transistor active pixel sensor, SPD: Stacked photodiode
CE: Coupling efficiency, FOP: Fiber optic plate, LPA: Light pipe array

3-2-3:10⁴個のチャンバーを解析する CMOS システムの開発

上記の研究結果を踏まえて、128×128 画素のデジタル ELISA 用 CMOS イメージセンサの設計・試作を行い、10⁴個のチャンバーを有するデジタル ELISA システムの構築を行った。

図 7 には、本デバイスを用いて観察を行うための固定治具を示す。図 9 に示すような蛍光反応チャンバーアレイをマイクロピラー吸収フィルタアレイ上に高い歩留まりで形成するために、マイクロ流路を導入する事により、全面にチャンバーが形成できるようにする。これを用いて予備の実験を行ったところ、図 12 のように酵素分子の 1 分子デジタル計測に成功した。今後これをデジタル ELISA 実験へと展開する。

マイクロライトパイプアレイを使用した
レンズレスデジタルELISA装置

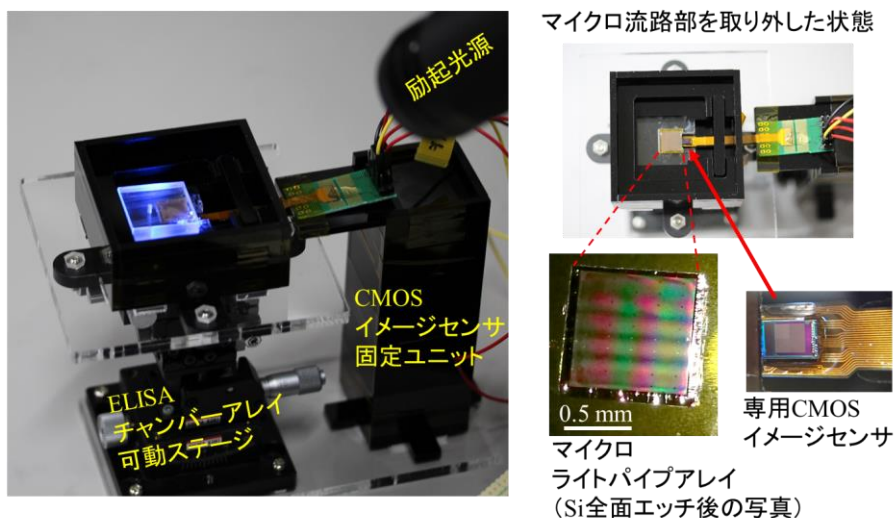


図 11 マイクロライトパイプアレイを搭載したレンズレスデジタル ELISA システムの構成



図 12 レンズレスデジタルシステムを用いた酵素の 1 分子デジタル計測データ

3-3 エレクトロアクティブマイクロウェルアレイの開発(東京大学 藤井グループ)

3-3-1 実施方法・実施内容・成果

ES/iPS 細胞の分化誘導を時空間的に制御する際に、細胞の分化状態を定量的にモニタリングするため、1細胞レベルで、その内容物を解析する方法を考える必要がある。従来の細胞成分分析は細胞集団を対象とするため、反応体積は数 100 μL 程度であり、単一細胞の内容物を取り出すと大幅に希釈されてしまうため、その定量分析は極めて困難である。これに対し、細胞内容物を微小な体積のマイクロウェルに閉じ込める方法を用いれば、単一細胞の内容物を希釈することなく、定量的な測定を行うことができる。

以上のような着想から、単一細胞内容物の解析のためのエレクトロアクティブマイクロウェルアレイの開発を行った。具体的には、マイクロウェルアレイに数百～数千個の ES/iPS 細胞を一つずつ捕捉し、それぞれ単一細胞レベルでの計測を行うことによって、細胞集団の分化状態を定量的にモニタリングすることを試みる。解析ターゲットとしては、iPS 細胞の分化状態を考え、未分化マーカーの発現分布変化を捉えることを目標とする。

マイクロウェルアレイに数千個の細胞を一つずつ捕捉するため、9 mm² に 3500 個のマイクロウェルを有するデバイスを開発した。マイクロウェルの底面部分に電極があるため、解析対象細胞を誘電泳動によって効率よくウェル内にトラップすることが可能であり、エレクトロレーションによって細胞の内容物を取り出すことができる(図 13a)。このデバイスを用い、未

分化マーカーと同期するマーカー遺伝子(GFP)を発現するiPS細胞を一つずつ捕捉し、それぞれ一細胞レベルでの GFP 発現量の定量計測を行うことによって、細胞集団の分化状態を定量的にモニタリングした。培養された iPS 細胞をデバイス内に注入した後、マイクロウェル内の電極に交流電圧をかけると、誘電泳動によって浮遊する細胞がマイクロウェル内に捕捉される。マイクロウェルを閉めた後、捕捉された細胞に強いパルス電圧をかけると、エレクトロポレーションによって細胞内容物を取り出すことが可能であることを確認した。マイクロウェル内の細胞内容物は希釈されず高い濃度であるため、単一細胞内容物の測定が可能である。さらに、マイクロウェルの体積は一定であるため、測定対象物質(GFP)の検量線を用いて定量的な精密測定が可能である。このエレクトロアクティブマイクロウェルアレイを用い、分化誘導された細胞集団の GFP 発現量分布の定量的測定を1細胞レベルで達成した(図 13b)。具体的には、同じ条件で培養された iPS 細胞の中でも、GFP の発現量は 5×10^5 から 3×10^6 分子/細胞で幅広い分布することを確認した。さらに、iPS 細胞が分化すると未分化マーカーの発現量が減少し、発現量分布の平均値が下がるだけでなく、その幅も狭くなることを確認した。

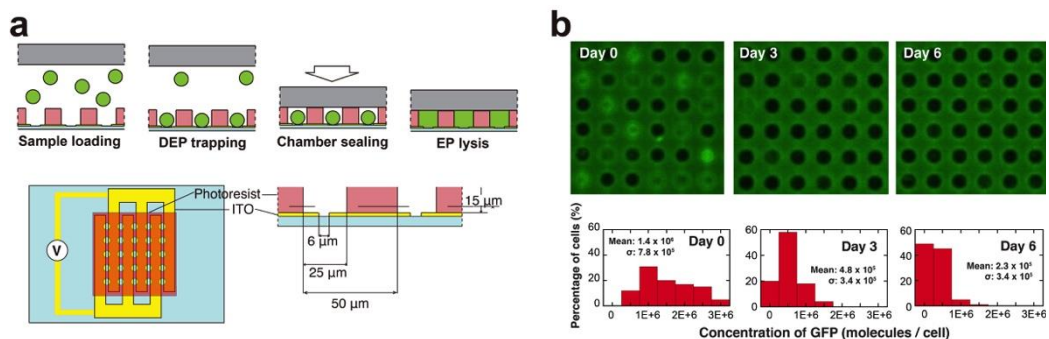


図 13 エレクトロアクティブマイクロウェルアレイのコンセプトと構造 (a) 、 iPS 細胞集団の GFP 発現量分布の変化 (b)

エレクトロアクティブマイクロウェルアレイをさらに発展させ、がん細胞の1細胞解析へ適用した。駆体的には、エレクトロアクティブマイクロウェルアレイにがん細胞をトラップした後、マイクロ流体デバイスの inlet に必要な試薬を順番に加える事で、免疫染色、生死・アポトーシスアッセイ、Fluorescent In Situ Hybridization などの解析に成功した(図 14) (Kobayashi et al., *PLoS ONE*, 2015)。

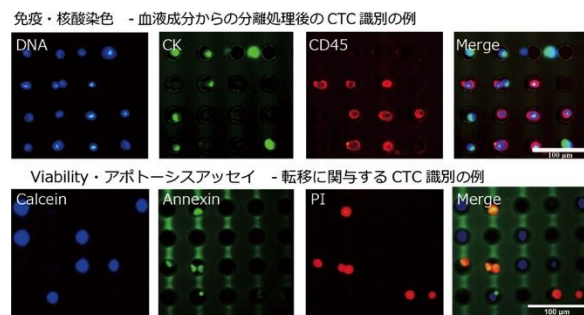


図 14 エレクトロアクティブマイクロウェルアレイを用いた免疫染色

さらに、血液中に稀に存在する血中循環腫瘍細胞(CTC)などの希少細胞の1細胞解析を実現するため、CTC の分離・1細胞解析が可能な総合 CTC 解析プラットフォームの構築を検討した。まず、音波泳動でがん細胞を濃縮することが可能な Acoustofluidic デバイスとエレクトロアクティブマイクロウェルアレイを結合させ(図 15)、サンプル処理能力を 10 倍以上向させた(Kim et al., *Lab Chip*, 2015)。また、細胞のトラップ効率を改善するため、細胞と同じサイズのトラップウェル上に反応ウェルを配置したエレクトロアクティブダブルウェルアレイを開発した(図 16)。ダブルウェルのサイズを最適化するとともに、マイクロ流路の構造を改良することにより細胞のトラップ効率を 95%まで上げることに成功した(Kim et al., *Lab Chip*, accepted)。

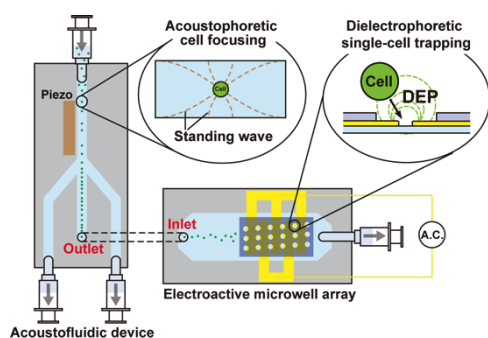


図 15 Acoustofluidic デバイスとエレクトロアクティブマイクロウェルアレイの結合

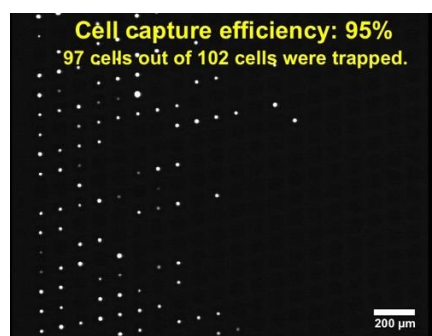


図 16 エレクトロアクティブダブルウェルアレイを用いたがん細胞トラップ

3-3-2 成果の位置づけ

本研究項目は、ES/iPS 細胞の分化誘導に関する実験を行う際に、細胞集団としての平均的な挙動を解析するだけでなく、個々の細胞レベルでの分化状態を調べ、その分布を把握することを目的として、領域内共同研究として追加したもので、当初計画では想定されていなかった研究項目である。前述のように、マイクロウェルアレイに数百～数千個の iPS 細胞を一つずつ捕捉し、エレクトロポレーションによって iPS 細胞の内容物を取り出すことで、未分化マーカーの発現量の定量的に測定することに成功した。このエレクトロアクティブマイクロウェルアレイをさらに改良することによって、分化誘導蛋白質の発現量の定量測定など、細胞分化に関わる様々な解析に適用可能である。また、患者から採取した CTC やがんの組織などの臨床サンプルを用いた解析への応用によって、がん転移メカニズムの解明などの生物学の基礎研究への貢献が期待されるだけでなく、がんの病態についての正確な情報を得ることが可能ながん診断プラットフォームを確立することが期待される。

§ 4 成果発表等

(1)原著論文発表 (国内(和文)誌 1 件、国際(欧文)誌 48 件)

1. *Matsumoto Y, Hayama K, Sakakihara S, Nishino K, Noji H, *Iino R, Yamaguchi A. Evaluation of multidrug efflux pump inhibitors by a new method using microfluidic channels. *PLOS ONE*. 6: e18547. 2011
2. *Iino R, Araki S, Kim SH, Sakakihara S, Noji H. Femtoliter microdroplet array device for single-molecule digital enzyme-linked immunosorbent assay. *Proceedings of 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2011)*. 1: 24-26. 2011
3. Nakano M, *Imamura H, Nagai T, *Noji H, Ca²⁺ regulation of mitochondrial ATP synthesis visualized at the single cell level, (2011) *ACS Chemical Biology*, 6, 709-715.
4. Kishikawa J, Fujikawa M, Imamura H, Yasuda K, Noji H, Ishii N, Mitani S, *Yokoyama K., Expression of ATP sensor protein in *Caenorhabditis elegans*, *Microscopy Research and Technique*, 75, 1, 15-19.2011
5. *Kiyotaka Sasagawa, Keisuke Ando, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, "Complementary metal-oxide-semiconductor image sensor with micro chamber array for fluorescent beads counting," *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 51, No. 2, 2012

6. *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* 12: 3923–3929. 2012
7. You H, Iino R, Watanabe R, *Noji H. Winding single-molecule double-stranded DNA on a nanometer-sized reel. *Nucleic Acids Research* 40: e151. 2012
8. 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* 12: 4986–4991. 2012
9. 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* 7: e49208. 2012
10. Hatsugai N, Koldenkova VP, Imamura H, Noji H, *Nagai T, Changes in Cytosolic ATP Levels and Intracellular Morphology during Bacteria-Induced Hypersensitive Cell Death as Revealed by Real-Time Fluorescence Microscopy Imaging, *Plant and Cell Physiology*, 53, 10, 1768–1775.2012
11. *Muraoka T, Shima T, Hamada T, Morita M, Takagi M, Tabata, K, Noji H, *Kinbara, K, Ion Permeation by a Folded Multiblock Amphiphilic Oligomer Achieved by Hierarchical Construction of Self-Assembled Nanopores, *J Am Chem Soc*, 134, 48, 19788-19794.2012
12. Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, *Imamura H, In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATPbiosensor optimized for low temperatures, *Anal Chem*, 85, 7889–7896.2013
13. *Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Kazuya Miyazawa, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, Lensless CMOS-based imaging device for fluorescent femtoliter droplet array counting, *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013)*, 1: 1565–1567, 2013
14. *Osaki T, Kamiya K, Kawano R, Iino R, Noji H, Takeuchi S. Uniform-sized proteoliposome formation by using electrospray for microscopic membrane protein assays. *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013)*. 2013
15. Watanabe R, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, Soga N, Kim SH, Suga H, Noji H. High throughput formation of sub-million lipid membrane arrays for measuring membrane protein activities. *Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013)*. 2013
16. Tsuyama T, Kishikawa J, Han YW, Harada Y, Tsubouchi A, Noji H, Kakizuka A, Yokoyama K, Uemura T, Imamura H, In vivo fluorescent ATP imaging of *Drosophila melanogaster* and *Caenorhabditis elegans* by using a genetically encoded fluorescent ATPbiosensor optimized for low temperatures, *Anal Chem*, 85, 7889–7896. 2013
17. Toei M and Noji H, Single-molecule analysis of FoF1-ATP synthase inhibited by N,N-dicyclohexylcarbodiimide, *J Biol Chem*, 288, 25717–25726. 2013
18. Okuno D, Nishiyama M and Noji H, Single molecule analysis of the rotation of F1-ATPase under high hydrostatic pressure, *Biophysical Journal*, 105, 1635–1642. 2013
19. Minagawa Y, Ueno H, Hara M, Ishizuka-Katsura Y, Ohsawa N, Terada T, Shirouzu M, Yokoyama S, Yamato I, Muneyuki E, Noji H, Murata T and Iino R, Basic properties of rotary dynamics of the molecular motor *Enterococcus hirae* V₁-ATPase, *J.Biol.Chem*, 288, 45, 32700–32707. 2013
20. Watanabe R, Hayashi K, Ueno H and Noji H, Catalysis-enhancement via rotary

- fluctuation of F1-ATPase, *Biophys. J*, 105, 2385–2391. 2013
21. Kioka H, Kato H, Fujikawa M, Tsukamoto O, Suzuki T, Imamura H, Nakano A, Higo S, Yamazaki S, Matsuzaki T, Tkafuji K, Asanuma H, Asakura M, Minamino T, Shintani Y, Yoshida M, **Noji H**, Kitakaze M, Komuro I, Asano Y and Takashima S, Evaluation of intra-mitochondrial ATP levels identifies G0/G1 switch gene 2 as a positive regulator of oxidative phosphorylation, *PNAS*, 111, 273–278. 2013
 22. Tanaka T, Nagashima K, Inagaki N, Kioka H, Takashima S, Fukuoka H, **Noji H**, Kakizuka A and Imamura H, Glucose-stimulated single pancreatic islets sustain increased cytosolic ATP levels during initial Ca²⁺ influx and subsequent Ca²⁺ oscillations, *J Biol Chem*, 289, 2205–2216. 2013
 23. Kim SH, He X, Kaneda S, Kawada J, Fourmy D, **Noji H** and Fujii T, Quantifying genetically inserted fluorescent protein in single iPS cells to monitor Nanog expression using electroactive microchamber arrays, *Lab on a Chip*, 14, 730–736. 2014
 24. Shibafuji Y, Nakamura A, Uchihashi T, Sugimoto N, Fukuda S, Watanabe H, Samejima M, Ando T, **Noji H**, Koivula A, Igarashi K and Iino R, Single-molecule imaging analysis of elementary reaction steps of Trichoderma Reesei cellobiohydrolase I (Cel7A) hydrolyzing crystalline cellulose I α and III, *J Biol Chem*, 289, 14056–14065. 2014
 25. Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Lisa Yamauchi, Kazuki Kitaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hitoyuki Noji, Jun Ohta, SINGLE-MOLECULE ENZYME ASSAY WITH A LENSLESS FLOUORESTCENT IMAGING DEVICE, Proceedings of 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2014), 2300–2302, 2014
 26. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “A CMOS image sensor with stacked photodiodes for lensless observation system of digital enzyme-linked immunosorbent assay,” *Jpn. J. Appl. Phys.*, Vol. 53, No. 4S, 2014
 27. Watanabe R and **Noji H**, Characterization of the temperature-sensitive reaction of F1-ATPase by using single molecule manipulation, *Scientific Reports*, 4, 4962_1–6. 2014
 28. Watanabe R and **Noji H**, Timing of inorganic phosphate release modulates the catalytic activity of ATP-driven rotary motor protein, *Nature Communications*, 5:3486, 1–7. 2014
 29. Kishikawa J, Seino A, Nakanishi A, Esmat Tirtom N, **Noji H**, Yokoyama K, Hayashi K, F-subunit reinforces torque generation in V-ATPase, *European Biophysics Journal*, 43, 415–422. 2014
 30. Arai HC, Yukawa A, Iwatate JR, Kamiya M, Watanabe R, Urano Y and **Noji H**, Torque generation mechanism of F1-ATPase upon NTP binding, *Biophys J*, 107, 156–164. 2014
 31. Ikeda T, Iino R and **Noji H**, Real-Time Fluorescence Visualization of Slow Tautomerization of Single Free-Base Phthalocyanines under Ambient Conditions, *Chem. Commun*, 50, 9443–9446, “Journal Cover”. 2014
 32. Ikeda T, Tsukahara T, Iino R, Takeuchi M and **Noji H**, Motion Capture and Manipulation of Single Synthetic Molecular Rotors by Optical Microscopy, *Angew. Chem. Int. Ed*, 53, 10082 - 10085, “Journal Back Cover”, “Hot Paper” and “Newspaper”. 2014
 33. Watanabe R, Matsukage Y, Yukawa A, Tabata KV and **Noji H**, Robustness of the Rotary Catalysis Mechanism of F1-ATPase, *J Biol Chem*, 289, 19331–19340. 2014
 34. Watanabe R, Soga N, Fujita D, Tabata KV, Yamauchi L, Kim SH, Asanuma D, Kamiya M, Urano Y, Suga H and **Noji H**, Arrayed Lipid Bilayer Chambers Allow

- Single-Molecule Analysis of Membrane Transporter Activity, *Nature Communications*, 5:4519, 1–8. 2014
35. Yaginuma H, Kawai S, Tabata KV, Tomiyama K, Kakizuka A, Komatsuzaki T, **Noji H** and Imamura H, Diversity in ATP concentrations in a single bacterial cell population revealed by quantitative single-cell imaging. *Scientific Reports*, 4:6522, 1–7. 2014
 36. Watanabe R, Minagawa Y and **Noji H**. Thermodynamic analysis of F1-ATPase rotary catalysis using high-speed imaging, *Protein Science*, 23, 1773–1779. 2014
 37. Yukawa A, Iino R, Watanabe R, Hayashi S and **Noji H**, Key Chemical Factors of Arginine Finger Catalysis of F1-ATPase Clarified by an Unnatural Amino Acid Mutation, *Biochemistry*, 54, 472–480.2014
 38. Watanabe R, Koyasu K, You H, Tanigawara M and **Noji H**, Torque transmission mechanism via DELSEED loop of F1-ATPase, *Biophysical Journal*, 108, 1144–1152. 2015
 39. Enoki S, Iino R, Niitani Y, Minagawa Y, Tomishige M and **Noji H**, High-speed angle-resolved imaging of single gold nanorod with microsecond temporal resolution and one-degree angle precision, *Analytical Chemistry*, 87, 2079–2086. 2015
 40. Yukawa A, Watanabe R and **Noji H**, Effects of an ATP analogue, adenosine 5'-[α -thio] triphosphate, on F1-ATPase rotary catalysis, torque generation, and inhibited intermediated formation, *Biochem Biophys Res Commun*, 458, 515–519. 2015
 41. Fujita H, Esaki T, Masujima T, Soo H Kim, **Noji H** and Watanabe MT, Comprehensive chemical secretory measurement of single cell trapped in micro-droplet array with mass spectrometry, *RSC Adv*, 5, 16968–16971. 2015
 42. Hironari Takehara, Mizuki Nagasaki, Kiyotaka Sasagawa, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, and Jun Ohta, "A micro light pipe array with an excitation attenuation filter for lensless digital enzyme-linked immunosorbent assay," *Jpn. J. Appl. Phys.*, 55, 03DF03, 2015.
 43. 笹川 清隆, 竹原 浩成, 永崎 瑞樹, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 徳田 崇, 野地 博行, 太田 淳, デジタルELISAに向けた蛍光および非蛍光計測用レンズレスCMOSイメージングシステム, 電気学会論文誌E, Vol. 136, No. 1, 2015
 44. Soga N, Watanabe R and **Noji H**, Attolitre-sized lipid bilayer chamber array for rapid detection of single transporters, *Scientific Reports*, 5, 11025. 2015
 45. Hayashi R, Sasaki K, Nakamura S, Kudo S, Inoue Y, **Noji H**, Hayashi K, Giant Acceleration of diffusion observed in a single-molecule experiment on F1-ATPase, *Physical Review Letters*, 114, 248101-. 2015
 46. Obayashi Y, Iino R, **Noji H**, A single-molecule digital enzyme assay using alkaline phosphatase with a coumarin-based fluorogenic substrate, *Analyst*, 140, 5065–5073, 2015, DOI: 10.1039/C5AN00714C.
 47. R Watanabe, N Soga, and **H Noji**, Novel Nano-Device to Measure Voltage-Driven Membrane Transporter Activity, (2015) *IEEE TRANSACTIONS ON NANOTECHNOLOGY*, 15, 70–73, DOI:10.1109/TNANO.2015.2498167
 48. S. H. Kim, M. Antfolk, M. Kobayashi, S. Kaneda, T. Laure and T. Fujii, "Highly efficient single cell arraying by integrating acoustophoretic cell pre-concentration and dielectrophoretic cell trapping," *Lab Chip*, vol.15, 4356, 2015.
 49. M. Kobayashi, S. H. Kim, H. Nakamura, S. Kaneda and T. Fujii, "Cancer cell analyses at the single cell-level using electroactive microwell array device", *PLoS ONE*, 10(11): e0139980, 2015.

(2)その他の著作物(総説、書籍など)

1. Iino R, Nishino K, Noji H, Yamaguchi A, *Matsumoto Y. A microfluidic device for simple and rapid evaluation of multidrug efflux pump inhibitors. *Frontiers in Microbiology*. 2012. 3: 40. Published online
2. 野地博行, 「バイオ分子の1分子デジタル計数法」, *パリティ* 27: 75-77.2012
3. *飯野亮太. 全反射照明蛍光顕微鏡. 先端バイオマテリアルハンドブック 秋吉一成、石原一彦、山岡哲二 監修. 第4編第2章14節. P132-137. NTS 2012
4. *游 慧娟, 飯野亮太. DNA を巻き取る分子リール—F₁-ATPase のおもちゃ—. *生物物理*, 53: 160-161.2013
5. *飯野亮太. 1分子デジタル ELISA による感染・疾病バイオマーカーの超高感度検出. 超精密 2013.
6. *Iino R, Matsumoto Y, Nishino K, Yamaguchi A, and Noji H. Design of a large-scale femtoliter droplet array for single-cell analysis of drug-tolerant and drug-resistant bacteria. *Frontiers in Microbiology*. 2013 Published online
7. 野地博行. No Border. *生物物理* . 53: 233 .2013
8. Watanabe R, **Noji H**, Chemomechanical coupling mechanism of F₁-ATPase: Catalysis and torque generation , *FEBS Letters*, 587, 1030-1035. 2013
9. 野地博行「1 分子ナノバイオ計測の歴史」*化学フロンティア* 1 分子ナノバイオ計野地博行(編), 18~30, 化学同人.2014
10. 野地博行, 柳田敏雄、永井健治、林重彦「<座談会>1 分子ナノバイオ 熱いユメを語る分子計測と計算化学のマッチングがもたらすパラダイムシフト」*化学フロンティア* 1 分子ナノバイオ計野地博行(編), 3~17, 化学同人.2014
11. 野地博行 編 *化学フロンティア* 「1 分子ナノバイオ」,化学同人,2014
12. 野地博行, 柳田敏雄、永井健治、林重彦「<座談会>1 分子ナノバイオ 熱いユメを語る分子計測と計算化学のマッチングがもたらすパラダイムシフト」*化学フロンティア* 1 分子ナノバイオ計野地博行(編), 3~17, 化学同人.2014
13. 野地博行,石北央 「酵素の振る舞いを計算で解く -2013年ノーベル化学賞を授賞した A. ウォーシェル博士に聞く-」*現代化学*, No.521, 34-39 東京化学同人. 2014
14. 野地博行「理論家と実験家で連携しよう! -髪の色を書けた2人の男の挑戦-」*現代化学*, No.527, 28-29 東京化学同人. 2015
15. 野地博行, 「1分子生物学の30年」, *パリティ* Vol. 30, No. 04: 3-5.丸善. 2015
16. 野地博行,「デジタルバイオ分析序論」、*現代化学*、東京化学同人、2016年3月

(3)国際学会発表及び主要な国内学会発表

① 招待講演 (国内会議 67 件、国際会議 39 件)

1. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Mechanochemistry of F₁-ATPase motor protein, NAMIS International Autumn School 2010, Tokyo (Japan), 2010/10/10
2. 飯野亮太(東大). 中身を出し入れできる細胞サイズのうつわを創る. 細胞を創る研究会 3.0 シンポジウム, 器をつくる. 2010年11月12日、東京
3. 飯野亮太(東大). 1分子技術で生体回転ナノモーターを視る・操る. 特定領域研究「高次系分子科学」若手の会研究会. 2010年11月26日、仙台
4. Ryota Iino (The University of Tokyo). Single-molecule studies on the fluctuation and function of a rotary motor protein ATP synthase. The 4th International Symposium "Molecular Science of Fluctuations toward Biological Functions" November 30th, 2010. Shiga. Japan.
5. 野地博行(東大) 細胞再構成のための2つのナノバイオ技術. 第33回日本分子生物

- 学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会. 神戸. 2010 年 12 月 7 日
6. 飯野亮太(東大). ATP 合成酵素を1分子技術で視る・操る. 光塾第 2 回研究会. 2010 年 12 月 11 日、大阪
 7. 野地博行(東大) Single Molecule Biophysics of ATP synthase. 生命化学研究会. 仙台. 2011 年 1 月 7 日
 8. 飯野亮太(東大). 分子モーターの性質を調べる1分子計測技術. (社)日本電気計測器工業会 関西支部 第 29 回戦略的基盤技術検討委員会. 2011 年 2 月 7 日、大阪
 9. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Imaging of dynamics and catalysis of ATP synthase. 2nd International Symposium on Photonic Bioimaging 2011. (Hokkaido, Japan), 2011/2/8
 10. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Femto-liter Reactor Array for Single-molecule Bioanalysis, PITTCON2011, Georgia World Congress Center (USA), 2011/3/15.
 11. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Femtoliter Chamber Array for Single Molecule Bioassay, IUPAC International Congress on Analytical Sciences 2011, Kyoto International Conference Center (Kyoto, JANAN), 2011/5/25.
 12. 野地博行(東大). Intrinsic cooperativity of a3b3 complex of F1-ATPase.分子モーター討論会. 東京大学理学部 2011 年 6 月 21 日
 13. Ryota Iino (The University of Tokyo). Single-molecule studies of ATP synthase, a complex of two rotary nanomotors. The Symposium on Bioinspired Materials and Functionalities. June 22th, 2011. Groningen, Netherlands.
 14. Ryota Iino (The University of Tokyo). Single-molecule FRET measurement of rotary motor protein dynamics in living cells. The 5th Symposium "Molecular Science for Supra Functional Systems". July 13th, 2011. Sapporo, Japan
 15. 野地博行(東大). ATP 合成酵素の 1 分子生物物理と「創る」研究への展望. 生命科学夏の学校. 八王子 2011 年 9 月 3 日
 16. 飯野亮太(東大). Single-molecule imaging of ATP synthase in vitro and in living cells. 第 49 回日本生物物理学会年会シンポジウム, New experimental tools for structural changes of membrane proteins: Beyond X-ray structures. 2011 年 9 月 17 日、姫路
 17. 野地博行(東大). F1-ATPase の 1 分子ロボティクス. 生化学「分子ロボティクス」シンポジウム. 京都 2011 年 9 月 21 日
 18. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single Molecule Digital ELISA, IUPAB congress 2011, Beijing International conference center (China), 2011/10/31.
 19. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Recent advance in single molecule biophysics of ATP synthase, BIOPIC meeting, Peking University, (Beijing, China) 2011/11/2.
 20. 飯野亮太(東大). 生体回転ナノモーターの1分子可視化計. H23 年度日本分光学会生細胞分光部会シンポジウム. 2011 年 11 月 25 日. 横浜
 21. 野地博行(東大). ATP 合成酵素の 1 分子生物物理の最前線. ATI25 周年記念研究会 2011 年. 明治大学 紫紺館 2011 年 11 月 29 日
 22. 野地博行(東大). Single Molecule ELISA. 分子細胞生物学会年会. パシフィコ横浜. 2011 年 12 月 14 日
 23. 飯野亮太. F₁ ナノモーターの1分子計測のこれから: 観る、操作するを超えて. 財団法人新世代研究所 2011 年度第 2 回バイオ単分子研究会. 2012 年 2 月 17 日. 千葉
 24. 野地博行(東大). 1 分子実験による分子シミュレーションの検証. 文部科学省「次世代ナノ統合シミュレーションの研究開発」公開シンポジウム 2012 年 3 月 5 日
 25. 飯野亮太(東大). Operation mechanism and design principle of ATP synthase. 総合研究大学院大学 統合生命科学教育プログラム 『統合生命科学シリーズ』. 2012

年7月2日. 岡崎

26. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Mechanical Modulation of Catalytic Power of F₁-ATPase, The 26th Annual Symposium of The Protein Society, Manchester Grand Hyatt (San Diego, USA), 2012/8/7.
27. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-Molecule Digital Bioassay with a Million Droplets Array, International Conference Session 5 (JASIS), (Chiba, Japan), 2012/9/7.
28. 野地博行(東大). フェムトリットルチャンバーを用いた 1 分子・1細胞計測技術の基礎と応用. 応用生物物理学学会シンポジウム「ナノバイオセンシングの新たな挑戦」. 松山 2012年9月11日
29. 飯野亮太、榎佐和子、野地博行(東大). ATP 駆動モーターの揺らぎとメカニズム. 新学術領域「揺らぎと生体機能」「水和と ATP」 合同公開シンポジウム「ゆらぎと水-生命のエネルギーと機能の分子機構を探る」 2012年9月14日. 大阪
30. Ryota Iino (The University of Tokyo). Rotary catalysis of the stator ring of F₁-ATPase. The 17th European Bioenergetics Conference (EBEC 2012). September 16th, 2012. Freiburg, Germany.
31. 野地博行(東大). 1分子デジタルELISA. 生物物理学学会年会シンポジウム「1分子生物学と生化学の狭間に潜むナノシステム動作力学の理解を目指して」名古屋大学東山キャンパス. 2012年9月22日
32. 飯野亮太(東大) 単分子デジタルイムノアッセイ 公益財団法人 新世代研究所 2012年度第1回バイオ単分子研究会. 宮城. 2012年10月5日
33. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-molecule digital counting of proteins, Paradigm Innovation in Biology: Novel Strategy and Thinking, Academia Sinica, (Taipei, Taiwan), 2012/10/17
34. Ryota Iino (The University of Tokyo). Rotary catalysis of the stator ring of F₁-ATPase, a nanomotor made by protein. 1st International Conference on Emerging Advanced Nanomaterials (ICEAN). October 22th-25th, 2012. Brisbane, Australia.
35. 野地博行(東大). ATP 合成酵素の 1 分子生物物理&そこから生まれた応用技術. 京都産業大学総合生命科学部バイオフィオーラム 21. 京都産業大学. 2012年11月16日
36. 野地博行(東大). ATP合成酵素の回転ダイナミクスと新型ATPセンサーを用いたバクテリア1細胞 ATP イメージング. 生化学会シンポジウム「少数性: 生化学の新たな視点」福岡国際会議場 マリンメッセ福岡. 2012年12月16日
37. 野地博行(東大). フェムトリットルチャンバーを用いた 1 分子・1細胞計測技術の基礎と応用. 生産研奨励会特別委員会(先端バイオデバイス). 東大生産研. 2012年12月18日
38. 野地博行(東大). 1 分子デジタル計測法による超高感度バイオアッセイ. 次世代マクロ化学チップコンソーシアム. 東大本郷. 2012年12月25日
39. 野地博行(東大). 1 分子ナノバイオと 1 分子デジタル計数デバイス. GRENE project ナノ・バイオコース. 新川崎・創造のもり(川崎市). 2013年1月21日
40. 飯野亮太(東大) 1分子計測とマイクロデバイスを用いた感染・疾病バイオマーカー分子の超高感度検出 精密工学会 超精密加工専門委員会 第65回研究会「ナノバイオエンジニアリングが拓く次世代基盤技術」. 大阪. 2013年1月29日
41. 野地博行(東大). ATP 合成酵素の 1 分子生物物理. 電子研セミナー. 北海道. 2013年2月22日
42. 野地博行(東大). マイクロデバイスを用いた超高感度バイオセンシング. 塩野義製薬セミナー. 大阪. 2013年3月4日
43. 飯野亮太(東大). タンパク質分子機械の1分子計測のこれから: 改造して理解するデザイン原理. 自然科学研究機構 分子科学研究所 所長招へいセミナー. 2013年3

- 月 5 日. 岡崎
44. Ryota Iino (The University of Tokyo). Operation mechanism of rotary molecular motor F_1 probed by single-molecule techniques. American Physical Society March Meeting 2013. Session G43: Focus Session: Motor dynamics – from Single Molecules to Cells II. March 19th, 2013. Baltimore, USA.
 45. 野地博行(東大). ATP合成酵素の1分子生物物理. 日本化学会 ケミカルバイオロジーシンポジウム. 滋賀. 2013年3月22日
 46. 野地博行(東大). マイクロデバイスを用いた超高感度バイオセンシング. 電子研セミナー. 北海道. 2013年3月25日
 47. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Mechanical modulation of catalytic power of F_1 -ATPase rotary motor protein. *JSPS Core-to-Core Program and Specially Promoted Research Joint Symposium*, Tokyo, Japan, March 28, 2013.
 48. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Femtoliter chamber array for digital ELISA and single cell analysis. Workshop on Technologies for Single Cell Analysis. Hitachi Research Institute. 2013/4/4.
 49. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo) (The University of Tokyo). Single-Molecule Technology, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei(Taiwan), 2013/4/11.
 50. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-Molecule Biophysics of ATP synthase, Single-Molecule Biophysical Chemistry Workshop, Taipei(Taiwan), 2013/4/11.
 51. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single molecule biophysics of ATP synthase', Single Molecule Workshop. National Taichung University. 2013/4/12
 52. 野地博行(東大). 1分子デジタル計数法によるタンパク質定量法. 日本顕微鏡学会第69回学術講演会. 大阪. 2013年5月22日
 53. 野地博行(東大). ATP合成酵素の1分子生物物理の最前線. 生化学会中部支部連絡会. 名古屋. 2013年5月25日
 54. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-Molecule counting of biomolecules with femtoliter droplet chamber array, The 17th International Conference on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems, Barcelona International Convention Centre(Barcelona Spain), 2013/6/17.
 55. 飯野亮太(東大). 生体分子モーターの揺らぎと機能. 国際高等研究所「分子基盤に基づく生体機能への揺らぎとダイナミックネットワークの解明」第2回研究会. 2013年8月9日. 京都
 56. 野地博行(東大). ATP合成酵素の1分子生物物理. 高遠シンポジウム. 滋賀. 2013年8月29日
 57. 野地博行. ATP合成酵素の分野横断的1分子生物物理. 生物物理夏の学校. 静岡. 2013年9月7日
 58. 野地博行(東大). 超微小溶液アレイ技術を用いた1分子・1細胞分析技術. 生化学会年会 シンポジウム「使える! マイクロデバイス」. 横浜. 2013年9月11日
 59. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Torque-generation mechanism of F_1 -ATPase, The 13th KIAS Conference on Protein Structure and Function, Seoul(Korea), 2013/9/27
 60. 野地博行(東大)「回転分子モーターの1分子計測とその技術の応用例について」高分子学会若手の会交流会. つくば(つくばセミナーハウス)2013年10月7日
 61. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-molecule digital counting with femtoliter chamber array, *International Symposium on Nanomedicine Molecular Science 2013(NMMS2013)*, The University of Tokyo (JAPAN), 2013/10/9
 62. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Novel single-molecule systems to monitor the rotary dynamics and proton-pumping of FoF₁-ATP synthase, *ITALY IN JAPAN*

2013 WORKSHOP (Methods for the investigation of ion transport machinery in biological Membranes), Istituto Italiano di Cultura (Tokyo JAPAN), 2013/10/16

63. 野地博行(東大)「「膜」チャンバーアレイを用いた人工細胞創出の展望」細胞を創る研究会 6.0. 秋田(慶應義塾大学鶴岡タウンキャンパス) 2013年11月14日
64. 野地博行(東大)「ATP合成酵素の1分子生物物理学の最前線」第851回分子研コロキウム, 岡崎(分子科学研究所) 2013年11月15日
65. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Recent advances of Single molecule biophysics of ATP synthase, *The 8th International Conference on Advanced Materials and Device (ICAMD2013)*, Ramada Plaza Jeju Hotel (Korea), 2013/12/12
66. 野地博行(東大)「回転分子モーターF1-ATPaseにおける構造ゆらぎの役割」新学術領域研究「ゆらぎと構造」第1回領域会議招待講演、静岡(KKR ホテル熱海) 2013年12月25日
67. 野地博行(東大)「オンサイト超高感度バイオ検査を可能とするマイクロデバイス技術」CREST「ナノプロセス融合がもたらす GREEN&LIFE Innovation」シンポジウム、東京ビッグサイト,2014年1月19日
68. 野地博行(東大)「超微小溶液チャンバーを用いた超高感度バイオ分析」産業科学研究所次世代バイオナノ研究会、東京ビッグサイト 2014年1月20日
69. 野地博行(東大)「Single-molecule biophysics of ATP synthase」理化学研究所創発物性科学センターコロキウム 埼玉(理化学研究所) 2014年3月12日
70. 野地博行(東大)「おもろいことは境界で起こる」さきがけ交流会招待講演、東京(JST本部)2014年3月14日
71. 野地博行(東大)「超微小溶液チャンバーを用いた1分子・1細胞分析手法」花王栃木研究所 2014年3月25日
72. 野地博行(東大)「オンサイト超高感度バイオ検査を可能とするマイクロデバイス技術」2014年5月17日 HAB研究会 昭和大学
73. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Torque generation mechanism of F1-ATPase, *Tokyo ATPase Workshop (TAW)*, The University of Tokyo (Tokyo, Japan), 2014/6/2
74. 野地博行(東大)「Single molecule biophysics of ATP synthase and derivative technology」2014年6月11日 大阪大学ナノフoton研究センター主催セミナー
75. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-Molecule Digital ELISA and Prospects of its Applications, *World Lecture Series on Micro/Nanofluidics*, Keio University (Kanagawa, Japan), 2014/7/2.
76. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Arrayed Lipid Bilayer Chamber for single-molecule analysis of transporters, *European Bioenergetics Conference (EBEC2014)*, Faculdade de Ciências(Lisbon, Portugal), 2014/7/13.
77. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Single-molecule biophysics on ATP synthase, *2014 International Biophysics Congress (IUPAB2014)*, Brisbane Convention & Exhibition Centre(Brisbane, Australia), 2014/8/7. (**Keynote lecture**),
78. 野地博行(東大)「バクテリアサイボーグ創成の試み」2014年7月29日 大阪大学四方研究室 物質生命境界学研究会
79. 野地博行(東大)「ATP合成酵素」2014年9月20日 埼玉県立春日部高校特別授業
80. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Perspective of redesigning of F1-ATPase, *2015 Biophysical Society annual meeting* (Sapporo, Japan) 2014/9/26
81. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA), 第14回「関西コロキウム電子デバイ

- スワークショップ」, 大阪, 2014/11/17
82. Jun Ohta, “CMOS Image Sensor Technologies in Biomedical Applications,” International Display Workshop, Niigata, Japan, 2014/12/4
 83. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Digital Biology, *2nd Bioscience and Biotechnology International Symposium* (Tokyo Institute of Technology, Tokyo, Japan) 2015/1/29
 84. Hiroyuki Noji (The University of Tokyo). Digital Biology, *UTokyo-HKUST-NUS joint workshop, ‘Bioengineering’* (The University of Tokyo, Tokyo, Japan) 2015/3/17
 85. 野地博行(東大)「バクテリアサイボーグ創成の試み」 2014年11月14日四方ERATO 終了シンポジウム 中央大学
 86. 野地博行(東大)「Digital Biology」 2015年3月25日 第二回少数性生物学でバイス研究会「時計研究」つなぎ温泉 ホテル紫苑
 87. 野地博行(東大)「回転分子モータータンパク質 F1-ATPase の 1 分子ダイナミクス」 昨日物性融合研究会シリーズ2 ソフトダイナミクス 2015年4月2日 東京大学物性研究所
 88. Jun Ohta, “Optoelectronic Devices for Biomedical Applications,” International Conference on Electronics Packaging, Kyoto, Japan, 2015/4/15
 89. 野地博行(東大)「ATP 合成酵素の 1 分子生物物理とデジタルバイオアッセイ」 第 55 回構造生物応用研究会 2015年5月8日
 90. 「ATP 合成酵素の 1 分子生物物理とデジタルバイオアッセイ」 第 55 回構造生物応用研究会 熱海 アカオリゾート公園 2015年5月8日
 91. Digital Bioassay, *2015 Asian Biophysics Association Symposium* (Hangzhou, China) 2015/5/09
 92. 野地博行(東大)「驚異の回転分子モーターATP 合成酵素」 読売ゴールドメダル授賞記念講演 2015年5月15日 東京読売本社
 93. 野地博行(東大)「Digital Biology」 科学技術交流財団第5回「カーボンバイオセンサーの医療応用研究会」 2015年6月18日 科学技術交流財団交流センター(ウインク愛知)
 94. 野地博行(東大)「回転分子モーターの 1 分子生物物理とデジタルバイオ」 電子情報通信学会システムナノ技術に関する時限研究専門委員会主催第二回研究会「バイオ・ケミカルが必要とするシステムナノ技術」 2015年6月19日
 95. 野地博行(東大)「回転分子モーターの 1 分子生物物理とデジタルバイオ」 電子情報通信学会システムナノ技術に関する時限研究専門委員会主催第二回研究会「バイオ・ケミカルが必要とするシステムナノ技術」 2015年6月19日
 96. 「解析の次にやらなきゃ行けないこと」少数性生物学サマースクール 2015年8月3日 大阪大学産業科学研究所
 97. 「Bacteria cyborg」 日本生物物理学会年会 2015年9月14日 金沢大学
 98. Single molecule biophysics of ATP synthase and digitalization revolution of bioassay, POSTECH seminar, POSTECH(Pohang University of Science and Technology, Korea) 2015/9/24
 99. Redesigning of F1-ATPase, *Pacific Chem.* (Hawaii, US) 2015/12/15
 100. Single molecule analysis of transporter protein with arrayed lipid bilayer chamber, *Pacific Chem.* (Hawaii, US) 2015/12/18
 101. 「人工細胞デバイスによる新しいバイオ技術」 ナノ学会シンポジウム、NanoTech 2016 2016年1月28日 東京ビッグサイト

102. 「人口細胞デバイスによる新しいバイオ技術」 産研シンポジウム 2016年2月11日
大阪大学産業科学研究所
103. 「人工細胞リアクタを用いたデジタルバイオ計測とものづくりへの展望」 木原財団第
23回バイオビジネスパートナーリング基調講演 2016年2月23日 ステーションカンパ
アレンス東京
104. 「人工細胞リアクタを用いたデジタルバイオ計測とものづくりへの展望」 学振分子ナノ
研究会 2016年3月2日 京都大学東京オフィス
105. 「1分子生物物理学&デジタルバイオ計測」 フロンティアサロン講演会 2016年3月
8日 ホテルオークラ(東京)
106. 「Recent advancement of single-molecule biophysics on F1-ATPase」 電子研アイデア
セミナー 2016年3月11日 北海道大学電子科学研究所

② 口頭発表 (国内会議 17件、国際会議 17件)

1. Kiyotaka Sasagawa, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Yumiko Hatanaka, Hideki Tamura, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, “Implantable CMOS sensor for in-vivo brain imaging of freely moving mouse,” CMOS Emerging Technologies 2011, Whistler, Canada, 15 Jun. 2011.
2. Kiyotaka Sasagawa, Keisuke Ando, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Yumiko Hatanaka, Hideki Tamura, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, “An Implantable CMOS Image Sensor with Light Guide Array Structure and Fluorescent Filter,” Hakodate, Jun. 9, 2011.
3. K. Sasagawa, K. Ando, T. Kobayashi, T. Noda, T. Tokuda, R. Iino, H. Noji, J. Ohta, “CMOS image sensor for fluorescent beads counting”, 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials, Nagoya, 29 Sep. 2011.
4. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta, “A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA),” 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials, Nagoya, Sep. 29, 2011, G-4-4
5. *Iino R, Araki S, Kim SH, Sakakihara S, Noji H. Femtoliter microdroplet array device for single-molecule digital enzyme-linked immunosorbent assay. 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2011). Seattle, USA. Oct. 2-6, 2011.
6. 岡林 大恭, 安藤 圭祐, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “ライトガイドアレイ構造による蛍光イメージング励起光除去特性の向上,” 電気学会全国大会, 広島工業大学, 2012/3/23
7. 岡林 大恭, 若間 範充, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, “65nm プロセスを用いた二層構造オンチップメタル偏光子搭載イメージセンサ,” 映像情報メディア学会年次大会, 19-2, 広島市立大学, 2012/8/30
8. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, 太田 淳, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, “デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた高感度蛍光検出用 CMOS イメージセンサの開発,” バイオ・マイクロシステム研究会, BMS-13-012, 2013/3/26, 東京大学
9. 宮澤 和也, 岡林 大恭, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA 法に向けた Fiber Optic Plate と画像処理によるオンチップ蛍光計測デバイスの開発,” 応用物理学会春季講演会, 28a-G17 - 8, 2013/3/28, 神奈川工科大学
10. Hironari Takehara, Kiyotaka Sasagawa, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda,

- Kazuya Miyazawa, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “A CMOS Image Sensor with Low Fixed Pattern Noise Suitable for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA),” International Meeting for Future of Electron Devices, Kansai (IMFEDK 2013), A-5, Jun. 5, 2013, Osaka, JAPAN
11. Kiyotaka Sasagawa, H. Takehara, Kazuya Miyazawa, Daisuke Okabayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “Lensless Imaging Device for Digital Counting of Fluorescent Micro-droplet Chambers,” The 10th Conference on Lasers and Electro-Optics Pacific Rim (CLEO-PR 2013), TuJ2-1, Kyoto, Japan Jul. 2, 2013
 12. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA),” 2013 International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM), G-4-4, Sep. 26, 2013, Fukuoka, JAPAN
 13. Watanabe, R., Soga, N., Yamanaka, T., & Noji H. “High throughput formation of sub-million lipid membrane arrays with an asymmetric lipid composition” Proceedings of 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2014). 2014 1: 1808-1810, San Antonio, USA Oct.26-30
 14. Soga, N., Watanabe, R., Yamanaka, T., & Noji H. “Attoliter-sized arrayed lipid bilayer chamber system for higher sensitive transporter assay” Proceedings of 18th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2014). 2014 1: 1993-1995, San Antonio, USA Oct.26-30
 15. Osaki T, Kamiya K, Kawano R, Iino R, Noji H, Takeuchi S, Uniform-sized proteoliposome formation by using electrospray for microscopic membrane protein assays. Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013). 2013 1: 1698-1700. Oct.27-31, 2013
 16. Sasagawa K, Kim SH, Miyazawa K, Takehara H, Noda T, Tokuda T, Iino R, Noji H, Ohta J, Lensless CMOS-based imaging device for fluorescent femtoliter droplet array counting. Proceedings of 17th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2013). 2013 1: 1565-1567. Oct.27-31, 2013
 17. Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Kazuya Miyazawa, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta, “Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay”, Proc. SPIE, vol. 8933, 89330N, 2014 (doi:10.1117/12.2039948)
 18. Kiyotaka Sasagawa, H. Takehara, Kazuya Miyazawa, Daisuke Okabayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “Dual-mode lensless imaging device for digital enzyme linked immunosorbent assay,” Photonics West 2014, 8933-22, Feb. 2, 2014, San Francisco, CA, USA
 19. 笹川 清隆, 竹原 浩成, Soo Hyeon Kim, 山内 里紗, 北口 一樹, 野田 俊彦, 徳田 崇, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, 1分子計測に向けたレンズレスCMOS蛍光観察デバイス, 映像情報メディア学会情報センシング研究会, 東京, 2014/9/29
 20. 北口 一樹, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, レンズレスデジタル ELISA 法に向けた高感度蛍光計測用 CMOS イメージセンサの設計, 映像情報メディア学会年次大会, 大阪, 2014/9/2
 21. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim,

- 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレスデジタル ELISA システム向け積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの開発,” 映像情報メディア学会年次大会, 15-7, 工学院大学 新宿キャンパス, 8月30日.
22. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “Digital ELISA に向けた高感度 CMOS イメージセンサと画像処理によるレンズレスオンチップ蛍光計測デバイスの開発,” 応用物理学会秋季学術講演会, 16a-C4-1, 同志社大学 京田辺キャンパス, 9月16日
 23. 笹川 清隆, 竹原 浩成, 宮澤 和也, 野田 俊彦, 徳田 崇, 金 秀炫, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “レンズレスイメージングデバイスによるマイクロドロップレットアレイ蛍光観察,” バイオ・マイクロシステム研究会, BMS-13-042, 東京大学生産技術研究所, 10月8日.
 24. 竹原浩成, 宮澤和也, 笹川清隆, 野田俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野亮太, 野地博行, 太田 淳, “デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた積層フォトダイオード CMOS イメージセンサの開発,” 第 61 回応用物理学会春季学術講演会, 17a-E14-2, 青山学院大学 相模原キャンパス, 2014年3月17日.
 25. 北口一樹, 宮澤和也, 山内里紗, 竹原浩成, 笹川清隆, 野田俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野亮太, 野地博行, 太田 淳, “レンズレス CMOS 蛍光計測デバイスによる酵素アッセイ,” 電気学会全国大会, 3-123, 愛媛大学 城北キャンパス, 2014年3月18日
 26. 永崎 瑞樹, 竹原 浩成, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 野地 博行, 太田 淳, デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた遮光層付ドロップレットアレイ搭載 CMOS イメージセンサの開発, 映像情報メディア学会年次大会, 東京, 2015/8/26
 27. 竹原 浩成, 永崎 瑞樹, 笹川 清隆, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 徳田 崇, 野地 博行, 太田 淳, 蛍光検出 CMOS イメージセンサを用いたレンズレスデジタル ELISA システム, 映像情報メディア学会情報センシング研究会, 東京, 2015/3/25
 28. 北口 一樹, 竹原 浩成, 笹川 清隆, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, レンズレスデジタル酵素結合免疫吸着法に向けた高感度 CMOS イメージセンサの設計, 応用物理学会春季学術講演会, 神奈川, 2015/3/11
 29. 永崎 瑞樹, 竹原 浩成, 竹原 宏明, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 野地 博行, 太田 淳, デジタル酵素結合免疫吸着法に向けた遮光層付ドロップレットアレイ搭載 CMOS イメージセンサの開発, 映像情報メディア学会年次大会 2015, 2015/5/26, 東京理科大学葛飾キャンパス
 30. Hironari Takehara, M. Nagasaki, K. Sasagawa, H. Takehara, T. Noda, T. Tokuda, H. Noji, and J. Ohta, “A micro light pipe array with an excitation attenuation filter for lensless digital enzyme-linked immunosorbent assay,” Eighth International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics (M&BE8), D-O06, 2015/06/23, Tower Hall Funabori, Tokyo, Japan
 31. 金秀炫, 藤井輝夫, “Electroactive double-Well Array を用いた希少細胞の1細胞解析,” 2015年度精密工学会秋季大会学術講演会, pp. 783-784, 2015/09/04, 東北大学川内北キャンパス
 32. Hironari Takehara, Mizuki Nagasaki, Kiyotake Sasagawa, Hiroaki Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “High Coupling Efficiency Contact Imaging System Having Micro Light Pipe Array for a Digital Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, IEEE BioCAS, 2015/10/24, Atlanta, USA.
 33. Soo Hyeon Kim and Teruo Fujii, “Highly efficient trapping and analysis of rare cells using an electroactive double-well array,” 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015), pp. 73-75,

- 2015/10/26, Hwabaek International Convention Center (HICO), Gyeongju, KOREA
34. 竹原浩成, 永崎瑞樹, 中本悠太, 笹川清隆, 竹原宏明, 野田俊彦, 徳田崇, 太田淳, 1分子酵素アッセイのコンタクトイメージング用マイクロライトパイプアレイ蛍光検出システム, Optics & Photonics Japan 2015 第9回 新画像システム・情報フォトニクス研究討論会, 2015/10/30, 筑波大学東京キャンパス

③ ポスター発表 (国内会議 12 件、国際会議 11 件)

1. Kiyotaka Sasagawa, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Yumiko Hatanaka, Hideki Tamura, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, "Implantable CMOS sensor for in-vivo brain imaging of freely moving mouse," CMOS Emerging Technologies 2011, Whistler, Canada, 15 Jun. 2011.
2. Kiyotaka Sasagawa, Keisuke Ando, Takuma Kobayashi, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Yumiko Hatanaka, Hideki Tamura, Sadao Shiosaka, Jun Ohta, "An Implantable CMOS Image Sensor with Light Guide Array Structure and Fluorescent Filter," Hakodate, Jun. 9, 2011.
3. K. Sasagawa, K. Ando, T. Kobayashi, T. Noda, T. Tokuda, R. Iino, H. Noji, J. Ohta, "CMOS image sensor for fluorescent beads counting", 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials, Nagoya, 29 Sep. 2011.
4. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Heyon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta, "A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Lensless Observation System of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)," 2011 International Conference on Solid State Devices and Materials, Nagoya, Sep. 29, 2011, G-4-4
5. *Iino R, Araki S, Kim SH, Sakakihara S, Noji H. Femtoliter microdroplet array device for single-molecule digital enzyme-linked immunosorbent assay. 15th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μ TAS2011). October 2-6, 2011. Seattle, USA.
6. Hironari Takehara, Daisuke Okabayashi, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji and Jun Ohta "Lensless Digital Fluorescent Detector using CMOS Image Sensor", (Poster), International Conference on BioElectronics, BioSensors, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2012 (Bio4Apps 2012), National University of Singapore Singapore, Nov. 19 and 20, 2012
7. 岡林 大恭, 安藤 圭祐, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "ライトガイドアレイ構造による蛍光イメージング励起光除去特性の向上," 電気学会全国大会, 広島工業大学, 2012/3/23
8. 岡林 大恭, 若間 範充, 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, "65nm プロセスを用いた二層構造オンチップメタル偏光子搭載イメージセンサ," 映像情報
9. 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, "デジタル酵素結合免疫吸着法に向けたオンチップ蛍光計測システム," (ポスター), 情報センシング研究会, 埼玉大学東京ステーションカレッジ, 2012/5/28
10. 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, "デジタル ELISA に向けたレンズレスオンチップイメージングデバイスに関する研究," (ポスター), 第11回関西学生関西学生研究論文講演会,

2013/3/6, 和歌山大学

11. 小田 有城 , 野田 俊彦, 笹川 清隆, 徳田 崇, 太田 淳, CMOS イメージセンサによる蛍光ビーズのオンチップ計測, 第 10 回関西学生研究論文講演会, 奈良先端科学技術大学院大学, 平成 24 年 3 月 7 日
12. 笹川 清隆, 安藤 圭祐, 小林 琢磨, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, 蛍光ビーズ計数用 CMOS イメージセンサの試作, 第 59 回 応用物理学関係連合講演会, 早稲田大学, 平成 24 年 3 月 15 日
13. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 岡林 大恭, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA 法に向けた画像処理によるレンズレスオンチップ蛍光検出デバイスの開発,” (ポスター), 情報センシング研究会, IST2013-25, 埼玉大学東京ステーションカレッジ, 5 月 31 日.
14. 竹原 浩成, 宮澤 和也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地博行, 太田淳, “デジタル ELISA 蛍光観察向け積層フォトダイオード CMOS イメージセンサ,” (ポスター), 応用物理学会関西支部平成 25 年度第 2 回講演会「関西のグリーン・バイオエレクトロニクス研究の現状と若手からの発信」, P-39, 奈良先端科学技術大学院大学, 2013 年 10 月 9 日.
15. Hironari Takehara, Kazuya Miyazawa, Toshihiko Noda, Kiyotaka Sasagawa, Takashi Tokuda, Soo Hyeon Kim, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, “A CMOS Image Sensor Having Stacked Photodiodes for Fluorescence Observation of Digital Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ,” International Conference on BioSensors , BioElectronics , BioMedical Devices , BioMEMS/NEMS and Applications 2013 (Bio4Apps 2013) , PNM-4, Oct. 30, 2013, Tokyo, JAPAN.
16. Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Kazuya Miyazawa, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hiroyuki Noji, Jun Ohta, LENSLESS CMOS-BASED IMAGING DEVICE FOR FLUORESCENT FEMTOLITER DROPLET ARRAY COUNTING, MicroTAS 2013, Freiburg, GERMANY, 2013/10/30
17. 宮澤 和也, 竹原 浩成, 北口 一樹, 神山 直也, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, “デジタル ELISA に向けたレンズレス CMOS イメージングデバイスの高感度化,” 第 12 回関西学生研究論文講演会, 16, 神戸大学, 2014 年 3 月 10 日
18. 竹原 浩成, 笹川 清隆, 野田 俊彦, 徳田 崇, Soo Hyeon Kim, 飯野 亮太, 野地 博行, 太田 淳, デジタル ELISA 向けレンズレス蛍光観察システムの設計, 映像情報メディア学会情報センシング研究会, 東京, 2014/6/2
19. *Kiyotaka Sasagawa, Soo Hyeon Kim, Lisa Yamauchi, Kazuki Kitaguchi, Hironari Takehara, Toshihiko Noda, Takashi Tokuda, Ryota Iino, Hitoyuki Noji, Jun Ohta, SINGLE-MOLECULE ENZYME ASSAY WITH A LENSLESS FLOUORESTCENT IMAGING DEVICE, MicroTAS 2014, San Antonio, TX, USA, 2014/10/29
20. 金秀炫, 小泉沙織, 藤井輝夫, “希少細胞の 1 細胞アッセイのためのダブルウェルアレイの開発,” pp. 76, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 2015/11/27, 北九州国際会議場
21. 緒方謙, 金秀炫, 藤井輝夫, “エレクトロアクティブマイクロウェルアレイを用いた高効率 1 細胞解析,” pp. 34, 化学とマイクロ・ナノシステム学会 第 32 回研究会, 2015/11/26, 北九州国際会議場
22. Soo Hyeon Kim, Maria Antfok, Linus Jonsson, Koizumi Saori, Shohei Kaneda, Teruo Fujii and Thomas Laurell, “Integration of acousto- and dielectrophoresis allows tumor cell separation and enrichment followed by arraying of target cells

toward analysis of circulating tumor cells at the single-cell level,” 19th International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2015), pp. 346-348, 2015/10/27, Hwabaek International Convention Center (HICO), Gyeongju, KOREA

23. Soo Hyeon Kim and Teruo Fujii, “Highly efficient single cell trapping and analysis of small number of cancer cells with a microwell array utilizing electrostatic forces,” Cold Spring Harbor Laboratory 2015 meeting on SINGLE CELL ANALYSES, pp. 44, 2015/11/12, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, USA

(4)知財出願

①国内出願 (6 件)

1. ビーズ封入方法、ターゲット分子を検出する方法、アレイ、キット及びターゲット分子検出装置、*野地博行、新木卓、飯野亮太、独立行政法人科学技術振興機構、2011年3月8日(日本)、特願2011-50629.
2. ウイルス粒子の検出方法、独立行政法人科学技術振興機構、榎佐和子、飯野亮太、*野地博行、2011年12月7日、特願2011-268414。(日本)
3. 検出装置および検出方法、金秀炫、*野地博行、飯野亮太、太田淳、徳田崇、笹川清隆、野田俊彦、国立大学法人 東京大学、2012年8月31日(日本)、特願2012-191513.
4. 高密度微小チャンバーアレイおよびその製造方法、*野地博行、渡邊力也、菅裕明、藤田大士、国立大学法人 東京大学、2013年8月21日(日本)、特願2013-171493

②海外出願 (2 件)

《発明の名称、発明者、出願人、出願日、出願番号、出願国》

1. ビーズ封入方法、ターゲット分子を検出する方法、アレイ、キット及びターゲット分子検出装置、*野地博行、新木卓、飯野亮太、独立行政法人科学技術振興機構、March 7th 2012、PCT/JP2012/055884.
2. 検出装置及び検出方法、*野地博行、金秀炫、飯野亮太、太田淳、徳田崇、笹川清隆、野田俊彦、国立大学法人 東京大学、August 29th 2013、PCT/JP2013/073147.

(5)受賞・報道等

①受賞

1. 飯野亮太(東大)が英国王立化学会の学術雑誌 *Lab on a Chip* で Emerging Investigator 2012 の一人として紹介された。
2. 金秀炫(東大)が2012年9月7日に千葉で行われた The Royal Society of Chemistry-Tokyo International Conference 2012 で RSC Best Poster Presentation Award (1st Prize)を受賞した。
3. 金秀炫研究員(東大)が2013年3月27日に東京で行われた JSPS Core-to-Core Program and Specially Promoted Research Joint Symposium で Poster Presentation Awardを受賞した。
4. VDEC デザインアワード敢闘賞、竹原浩成、2013/8/24
5. 柳沼秀幸研究員(東大)が2013年9月12日に第86回日本生化学会大会の鈴木絃一メモリアル賞を受賞した。
6. *野地博行が、2013年9月20日に山崎貞一賞(一般財団法人材料科学技術振興財

団)を受賞した。

7. *野地博行が、2013年12月4日に井上學術賞(井上科学振興財団)を受賞した。
8. *野地博行が、2015年3月12日に中谷奨励賞(公益財団法人中谷医工計測技術振興財団)を受賞した。
9. *野地博行が、2015年4月16日に読売テクノフォーラム第21回ゴールド・メダル賞(読売新聞)を受賞した。
10. VDEC デザイナーズフォーラム共有賞, 竹原浩成, 2015/08/29

②マスコミ(新聞・TV等)報道

1. 2012年8月31日に1分子デジタル ELISA 開発の成果のプレス発表を文部科学省で行った。下記の多数のメディアで紹介された。
2. 「疾病・感染バイオマーカーの検出感度 従来より100万倍向上 新しいELISA法確立 東大」科学新聞(2012年9月14日付4面)
3. 「従来の100万倍の感度 - JSTと東大が「1分子デジタルELISA法」を開発」マイナビニュース(2012年9月4日付)
4. 「がん検出、感度100万倍 - 東大 抗原抗体反応を利用」日経産業新聞(2012年9月4日付10面)
5. 「たんぱく質検出感度、100万倍に」日本経済新聞(2012年9月4日付14面)
6. 「がん検出 感度100万倍 - 東大チーム新技術開発」読売新聞(2012年9月1日付2面)その他にも、CRESTの成果が下記で報道された。
7. 「DNAを人工的に巻き取り - 東大が「分子リール」システム開発 - 医療など広範分野での応用展開に期待」化学工業日報(2012年8月31日付3面)
8. 「東大、DNAをきつく折り曲げるのに必要な力を直接計測することに成功」マイナビニュース(2012年7月19日付)
- 9.

③その他

「1分子歯車 性能評価 回転の様子も観察 東大」日刊工業新聞 (2014年7月10日付23面)

(6)成果展開事例

① 実用化に向けての展開

- 成果である特願 2011-50629、PCT/JP2012/055884 について、民間企業と実施権許諾の交渉中
- 本研究で得られた1分子デジタル ELISA 技術について民間企業1社(守秘義務有)と共同研究中
- 本研究で得られた1分子デジタル計数技術について、民間企業1社(守秘義務有)と共同研究中
- デジタル計数法やデジタル ELISA の元になっている超高感度検出の活用法に関して複数の企業に助言などを行った。
- JST「先端計測分析技術・機器開発プログラムライフイノベーション領域(要素 技術タイプ)」に採択され、現在実施中 課題名「超早期診断に向けた超高感度デジタル ELISA 検査システムの開発」(H25~27)
- 内閣府の ImPACT プログラムの PM として野地代表が採択された。(H27~30)

②社会還元的な展開活動

ここで開発されたデジタル計数法を、中高生に対して模擬授業や実験を行いアウトリーチ活動

に活用している。H26 年度から3年連続で県立富山高校の高校生3-5名を3日間に渡り実験指導し、酵素のデジタル計数法を利用したアボガドロ数を求める実験と解析を体験してもらっている。その他、H26 年度は私立富士見高校の見学、H27 年度は埼玉県立春日部高校の見学を受け入れ、デジタル計数法の説明を行った。

§ 5 研究期間中の活動

5. 1 主なワークショップ、シンポジウム、アウトリーチ等の活動

年月日	名称	場所	参加人数	概要
H25年7月19-20日	分子モーター討論会	東大	120名程度	分子モーターを中心とする1分子計測やデバイスの研究会を主催
H25年8月8日	東京大学高校生のための模擬授業「1分子計測によるナノバイオテクノロジー」	東大	450名以上	高校生とその父兄を対象とする模擬授業。CRESTの成果である1分子デジタルELISAを含むナノバイオの意義を説明
H25年9月11日	日本生化学会シンポジウム「使える！マイクロデバイス」	パシフィコ横浜	150名以上	バイオ研究者へのマイクロデバイス技術情報の発信するシンポジウムを主催
H26年7月2日	シンポジウム「World Lecture Series Series on Micro/Nanofluidics」	慶應義塾大学	50名程度	μ TAS分野に影響力のある講師陣を迎えて企業人や大学人に対してその応用などを講義

§ 6 最後に

・研究の目標等から見た達成度

本プロジェクトは、当初「超微小溶液チャンバーを用いたデジタル計測の確立」「ブラウン粒子の振動超高速計測にもとづくウイルスの1粒子デジタル検出」を2つの大きな柱として発足した。チャンバーを用いたデジタル計測に関しては、計画通り抗原抗体反応の一種ELISAのデジタル化に成功し、通常条件と比較して100万倍の高感度化を達成した。この値は、理論値より劣るものの実用化を考える上で十二分であり、その後の実用化研究を加速することとなった。また、ブラウン粒子の超高速計測にもとづくウイルスの1粒子計測は、その開発初期にウイルス1粒子からの直接散乱光でも検出できることが判明した。しかし、特異性の問題が残っており、一方のチャンバーを用いたデジタル計測でもウイルス粒子が検出しうるということが分かったため、ブラウン粒子超高速計測のウイルス検出への応用は中止することとなった。現在、この手法は分子機械の構造変化の超高速計測に応用されており、1分子生物物理分野への応用が大きく期待されている。実際、この技術は東京大学物理工学の富重准教授のグループ、台湾大学李弘文のグループとの共同研究に発展している。ウイルス1粒子の計測は、チャンバーを用いたデジタル計測に成功し、既に

知財化と原著論文の準備段階にある。以上の通り、本プロジェクトは、当初掲げていた目標を十二分に達成したと自己評価する。

さらに、チャンバーを用いたデジタル計測の早い達成によってその次の展開をはかる時間的余裕が生まれ、2つの当初想定していなかった効果があった。1つ目は実用化研究である。CREST 領域総括と領域事務そして JST 知財部の強力なサポートによって、ELISA を用いた臨床検査ビジネスで世界1位の国際企業との緊密な共同研究に発展した。また、国内企業とも共同研究が進み、遺伝子の1分子デジタル計測に成功した。2つ目の効果は、デジタル計測以外への展開である。特に、超微小溶液チャンバー内で無細胞タンパク質合成反応を実現することに成功し、機能成分子の超並列型スクリーニング技術の基礎が生まれつつある。これによって、既存の酵素の機能を格段に改善することができる。この技術は、将来デジタル計測法のシステム開発に還元され、その実用化をより加速するものと期待される。さらに、脂質二重膜でシールされた超微小溶液チャンバーの開発にも成功し、膜タンパク質への応用が内外から非常に期待されている。ここに、バクテリア細胞を融合させることでバクテリアサイボーグとも言えるシステム構築にも成功した。これは、今後人工細胞開発の基礎となるものとして期待している。これらの成果は、ImPACT プロジェクトへと受け継がれる予定である。

・得られた成果の意義等の自己評価

超微小チャンバーを用いたデジタル計測：予定通り超高感度化を達成し、社会的にインパクトを与えることができた。この成果を基に、国際企業との緊密な共同研究が進んでいることは上述した通りである。このように、本プロジェクトは近い将来社会実装されることが見込まれ、基礎研究の成果を実社会へ還元する道筋ができたことが本プロジェクトの意義であると考え。中・長期的には、CREST で取り組んだ「デジタル計測技術の小型化」が重要なポイントになると考える。現在、前例の無い速度で進む高齢化社会を迎えるにあたり、健康寿命を延ばす技術の社会実装は喫緊の課題である。超高感度なデジタルバイオ計測技術を小型化することで町のクリニックや個人が使えるようにすることで、様々な疾病を非常に早期に検出することができ、高齢者の健康寿命増進に大きく役立つことが期待される。

・研究代表者としてのプロジェクト運営について

本プロジェクトはテーマを掲げてそれに向かっていくトップダウン型プロジェクトではあるが、分担研究者を含めてメンバー全員が伸びやかに研究に没頭できる雰囲気づくりに心がけた。その効果は、メンバーが自主的に発掘してきた当初予想していなかった研究成果として見る事ができる。上述の、脂質二重膜でシールしたチャンバーデバイスを用いた膜タンパク質の超高感度センシング、無細胞遺伝子発現系を搭載した機能性分子スクリーニング技術などがその例である。研究分担の奈良先端大学のグループとは頻りに意見交換をしながら計測システムの小型化に取り組んだ。CMOS イメージングセンサーの作成環境の変化(受託企業の統廃合等)もあり困難な時期もあったが、多くの原著論文を生み出すことになり十分な連携が組めたと自己判断する。研究費の使用に関しては特段の特徴は無いと考えるが、すべて有効に活用したと判断する。

写真



研究室メンバー



本 CREST で導入したラマンイメージング装置