

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 16 日現在

機関番号：22604

研究種目：新学術領域研究

研究期間：2009 年度 ～ 2011 年度

課題番号：21200056

研究課題名（和文）

有機 EL と有機フォトダイオードをオンチップ化したマイクロ化学分析システムの開発

研究課題名（英文）

Development of micro total analysis system with an organic light-emitting diode and an organic photodiode for fluorescence detection

研究代表者

中嶋 秀 (HIZURU NAKAJIMA)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号：10432858

研究成果の概要（和文）：本研究では、小型で安価なマイクロチップ用蛍光検出システムを開発することを目的として、有機 EL を光源とし、有機フォトダイオードを検出器とする新規マイクロ化学分析システムを開発した。また、コンパクトディスク型マイクロチップを開発し、チップの回転により生じる遠心力を利用して液体を送液する方法を開発した。さらに、開発したシステムによる酵素免疫測定法について検討した。その結果、本システムにより得られた定量値と 96 穴マイクロプレートを用いる従来法により得られた定量値は良い一致を示し、本システムをイムノアッセイに適用できることが確かめられた。本システムはレーザー、顕微鏡、ポンプ、バルブなどの大型で高価な周辺機器が不要で、分析システム全体を小型化することが可能なので、オンサイトでの環境計測やベッドサイドでの医療検査に極めて有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：A novel micro total analysis system with an organic light-emitting diode and an organic photodiode for fluorescence detection has been developed in order to miniaturize the total size of the analytical system. A compact disk (CD)-type microfluidic device and the solution sending system using centrifugal force was developed. The enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) using the developed system was evaluated. The quantitative values obtained on the developed system were in excellent agreement with that on the conventional ELISA using a 96-well microtiter plate. Since the micro total analysis system developed in this study does not require large size and expensive devices such as laser, microscope, pump and valve, the system would be useful for on-site analysis, such as environmental monitoring, food safety testing and point-of-care testing.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	8,400,000	2,520,000	10,920,000
平成 22 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
平成 23 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
総計	23,800,000	7,140,000	30,940,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード： μ TAS, 有機 EL, 有機フォトダイオード, CD, ELISA

1. 研究開始当初の背景

我々人間社会を豊かで安全で住みよいものにするには、科学技術研究に携わるものの使命である。近年、人類が作り出した数々の化学物質の中には人体に有害であるものも多く、ダイオキシンをはじめとする有害化学物質による環境汚染が問題になっている。また、食生活に目を向けると、食の安全性を脅かす残留農薬や0-157などの細菌あるいはそば粉などのアレルギー物質による問題が深刻になっている。最近では、新型インフルエンザや結核などの新興感染症や再興感染症の流行も社会問題になっている。しかし、これら環境計測や食品検査、医療検査等で使用される従来の分析装置は高価であるものが多く、測定に時間を要し、またオンサイトやベッドサイドで計測できるようなポータブルな分析システムではない。このため、現場で、誰もが、簡便、迅速かつ高感度に測定できる小型の新しい分析システムの開発が求められている。

このような要求に応えうる分析システムとして、マイクロ化学分析システム(μ TAS)が近年注目を集めている。 μ TASは、ガラスやプラスチックなどの基板上に数十〜数百 μ mサイズの微細な流路(マイクロチャネル)を作製し、この基板(マイクロチップ)上に、試料導入、反応、分離、検出などの化学分析に必要な要素を集積化したシステムである。 μ TASは①分析時間の短縮、②試薬量の低減、③コストの低減、④装置の小型化など多くの優れた特徴を有しており、革新的な新技術として将来の発展が期待されている。しかし、送液システムと検出システムの集積化については進展が遅れており、試薬や試料の送液に用いるポンプやバルブ、あるいは分離した試料の検出に用いるレーザーや顕微鏡が大型化かつ高価であるという共通した問題を抱えている。このため、 μ TASの研究が始まって約20年経過した現在もほとんど実用化には至っていないのが現状である。

2. 研究の目的

著者らは μ TASの検出システムを小型化するために、無機LEDと光ファイバーをオンチップ化した蛍光検出システムを開発し、マイクロチップ電気泳動によるアミノ酸誘導体の分離定量に成功している。しかし、検出システムのさらなる小型化やアセンブリーの低コスト化は容易ではなく、新しい光源や検出系の開発が求められている。

そこで本研究では、小型で安価なマイクロチップ用蛍光検出システムを開発することを目的として、真空蒸着法やインクジェット法などの安価なプロセスによってガラスやプラスチック基板上に容易に作製できる有

機EL(OLED)を光源とし、有機フォトダイオード(OPD)を検出器とする新規マイクロ化学分析システムを開発した。すなわち、コンパクトディスク(CD)上に多数の溶液溜めとマイクロチャネルを作製し、CDの回転による遠心力を利用してマイクロチャネル内に試薬及び試料を導入し、試料中の各成分をマイクロチャネル内壁に固定した種々のレセプタータンパク質との相互作用により分離した後、OLEDとOPDを用いる蛍光検出システムにより多成分を同時に検出する、新規オンサイト測定用マイクロ化学分析システムを試作し、その性能を評価した。

3. 研究の方法

(1) OLED デバイスの作製

真空蒸着法により、ITO ガラス基板上にTPD(40 nm)/6 wt%- Ir(ppy)₃:CBP(20 nm)/BPhen(10 nm)/Alq₃(30 nm)/Mg-Ag(100 nm)/Ag(10 nm)の層を形成した。次に、グローブボックス内で、上記基板とガラス基板とをUV硬化樹脂を用いて接合することによりOLEDデバイスを作製した。

(2) OPD デバイスの作製

真空蒸着法により、ITO ガラス基板上にPcCu(II)(57 nm)/C₆₀(35 nm)/BCP(10 nm)/Ag(50 nm)の層を形成した。次に、グローブボックス内で、上記基板とガラス基板とをUV硬化樹脂を用いて接合することによりOPDデバイスを作製した。

(3) マイクロチップの作製

シリコン基板上にネガ型フォトリソグラフィ(SU-8)を滴下し、500 rpmで20秒間回転させた後、さらに2000 rpmで20秒間回転させた。この基板を95°Cで10分間ベークした後、目的流路を描写したフォトマスクを重ね、紫外線を露光した。次に、95°Cで3分間ベークした後、専用現像液で現像し、さらに200°Cで3分間ベークして、マイクロチップの鋳型となる凸型テンプレートを作製した。

このテンプレートを用いてポリジメチルシロキサン(PDMS)製のマイクロチップを作製した。テンプレート上に触媒を添加したPDMSプレポリマーを流し込み、60°Cで1時間ベークして硬化させた。これをテンプレートから剥離し、溶液溜め用の穴(直径4mm)を開けた後、ポリカーボネートディスクと張り合わせ、CD型マイクロチップ(直径12cm)を作製した。マイクロチャネルの幅は500 μ m、深さは50 μ mである。

(4) ターンテーブルの開発

CD型マイクロチップを回転させるためのターンテーブルを作製した。本ターンテーブ

ルは電圧を変化させることにより回転数を7895rpmまで変化させることができる。

4. 研究成果

(1) OLED の性能評価

作製した OLED デバイスの発光スペクトルを図1に、電流密度と量子効率の関係を図2に、電流密度と印加電圧の関係を図3に示す。このように、最大発光波長 512 nm、最大外部量子効率約 7.2%、電流密度 10 mA/cm²における発光強度 1.7 mW/cm²の高効率な有機 EL デバイスが得られた。図4に 10 mA/cm²における発光強度の時間変化を示す。駆動開始後10分から20分の間に3~4%程度の発光強度の低下が観察され、発光強度は1時後に半減することがわかった。マイクロチップを用いるイムノアッセイに要する時間は通常10分以内であることから、OLEDの耐久性については十分であると考えられる。発光強度の低下は蛍光測定において問題となるが、マイクロチップの参照チャンネル内の標準物質を同時に測定することによりその変化を補正できるので、OLEDを蛍光検出器の光源として使用することは可能であると考えられる。

(2) OLEDを光源とする蛍光検出システムの性能評価

開発した OLED デバイスは発光スペクトルの半値幅が 55 nm 程度あるので、蛍光検出の光源として使用した場合、バックグラウンド信号の増加による感度の低下が予想される。そこで、バンドパスフィルターを用いた蛍光検出システム(図5)を構築し、レゾルフィン(Ex 571 nm, Em 586 nm)を用いてシステムの評価を行った。このとき、マイクロチップは幅 1 mm、長さ 40 mm、深さ 50 μm のマイクロチャンネルを 5 本有する PDMS 製マイクロチップを用いた。OLED は 10 mA/cm² で駆動し、そのときの輝度は 3000 cd/m² であった。レゾルフィンに対する検量線は相関係数 0.994 の良好な直線性を示し、SN 比を 3 としたときの検出限界は 7.8 μM (9.4 × 10² fmol) であった。これらの結果から、本システムの感度は、レーザー誘起蛍光法と比べて濃度比で 2 桁程度低い感度であるが、ELISA で蛍光検出を行うには十分であることが分かった。

(3) OLEDを光源とする蛍光検出システムを用いる酵素免疫測定法

開発したシステムを用いて、ストレスマーカーの一種として知られているイムノグロブリン A (IgA) の測定を行った。マイクロチャンネル内に抗 IgA 抗体、BSA、種々の濃度の IgA、HRP 標識抗 IgA 抗体および過酸化水素を含む Amplex® Red 溶液を順次導入し、生成したレゾルフィンの発光強度を測定することにより IgA の定量を行った。

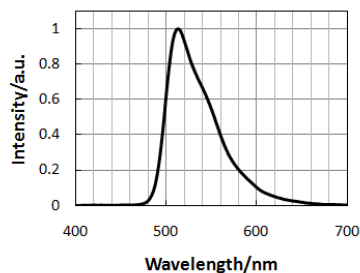


図1 OLEDの発光スペクトル

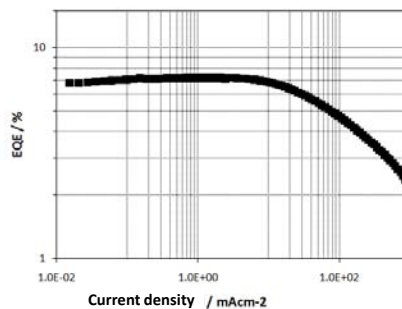


図2 電流密度と量子効率の関係

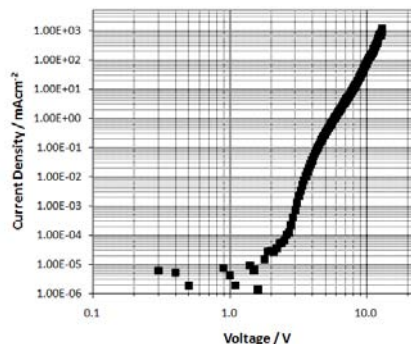


図3 電流密度と印加電圧の関係

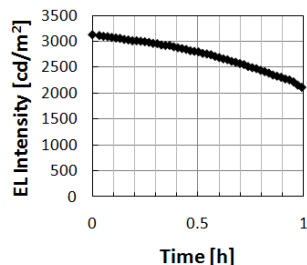
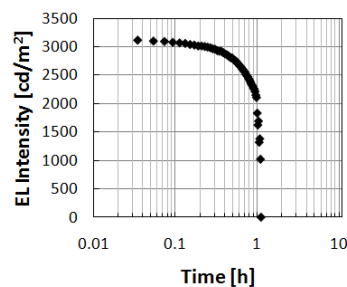


図4 発光強度の時間変化

図6にIgAに対する検量線を示す。IgAに

対する検出限界(S/N=3)は16.5 ng/mLであった。IgAはヒトの唾液中に110~220 $\mu\text{g/mL}$ 含まれることが報告されていることから、本システムはヒトのストレス評価には十分な感度を有しているといえる。

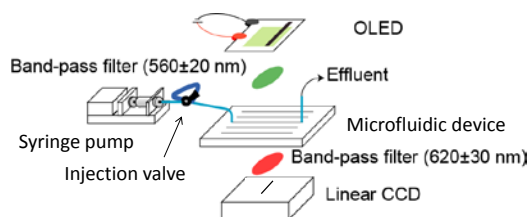


図5 OLEDを光源とする蛍光検出システム

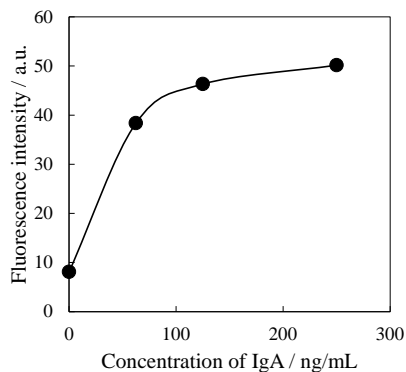


図6 IgAに対する検量線

(4) OPDの性能評価

作製したOPDの電圧と電流密度の関係を図7に、波長と量子収率の関係を図8に示す。作製したOPDは400~800 nmの可視光に感度を有し、OPDの材料の吸収に対応する430 nm, 620 nmおよび690 nmに特に高感度であった。このOPDのフィルファクターとエネルギー変換効率はそれぞれ、 $F.F = 0.50$ および $\eta = 0.75\%$ と見積もられた。

次に、493 nmと592 nmに最大発光波長をもつ2つのLED光をモデル光として用い、作製したOPDの感度を評価した。図9にOPDの光電流値と光強度の関係を示す。OPDの光電流値は光強度に比例し、493 nmと592 nmにおけるOPDの感度はそれぞれ、0.07 A/Wおよび0.11 A/Wと見積もられた。

(5) OPDによるルミノールの化学発光検出

作製したOPDによるルミノールの化学発光検出について検討した。図10に示すように、ルミノール、過酸化水素およびp-ヨードフェノールを含む水溶液が入った石英セルにHRP溶液を加え、その発光を作製したOPDで検出した。OPDの光電流値は数十秒で増加し、その後徐々に減少した。この結果はOPDがルミノールの化学発光検出に十分な感度を有し

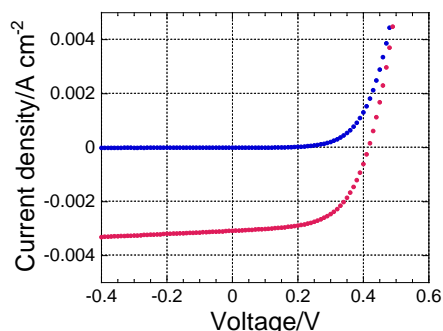


図7 電圧と電流密度の関係

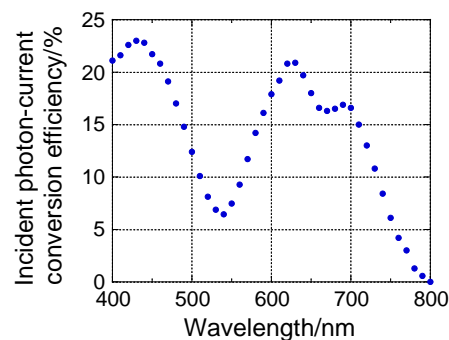


図8 波長と量子収率の関係

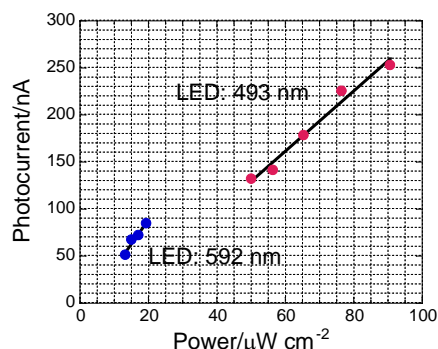


図9 OPDの光電流値とLEDの光強度の関係

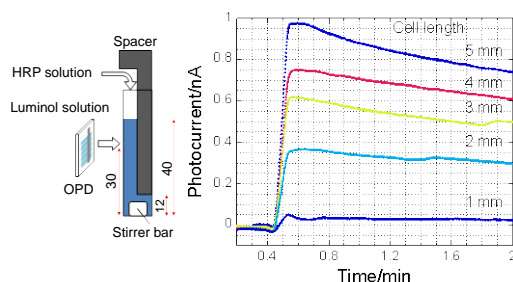


図10 OPDによるルミノールの化学発光測定

ており、溶液の厚さに依存することを示している。このとき測定された電流値は約0.1 nAであり、これは0.1~0.3 $\mu\text{W/cm}^2$ に相当する。

(6) OPD を検出器とする蛍光検出システムの性能評価

図 11 に示すような蛍光検出システムを構築し、レゾルフィンを用いてその性能を評価した。5 μM 以上のレゾルフィン濃度で OPD の著しい応答が観察され、相関係数 0.993 の良好な直線性を示す検量線が得られた。このときの検出限界 ($S/N = 3$) は 0.03 nA ($1\mu\text{M}$) であった。これらの結果から、作製した OPD の感度は ELISA の蛍光検出器として十分であることが分かった。

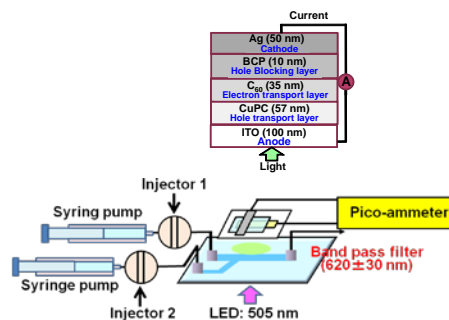


図 11 OPD を検出器とする蛍光検出システム

(7) OPD を検出器とする蛍光検出システムを用いる酵素免疫測定法

開発したシステムを用いて、ストレスマーカーの一種として知られているイムノグロブリン A (IgA) の測定を行った。マイクロチップ内に抗 IgA 抗体、BSA、種々の濃度の IgA、HRP 標識抗 IgA 抗体および過酸化水素を含む Amplex® Red 溶液を順次導入し、生成したレゾルフィンの蛍光強度を測定することにより IgA の定量を行った。IgA に対する検量線を図 12 に示す。OPD の光電流値は濃度 120 ng/mL まで直線的に増加し、120 ng/mL よりも高濃度ではその増加はゆるやかになった。また、250 ng/mL の IgA の繰り返し測定による再現性は 21 RSD% ($n = 10$) であった。この値はレーザー誘起蛍光を用いたマイクロチップ ELISA における再現性と同等である。また、IgA の結合定数は $3 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$ と見積もられた。この値は多くの抗原抗体反応で報告されている値と比較して妥当な値である。

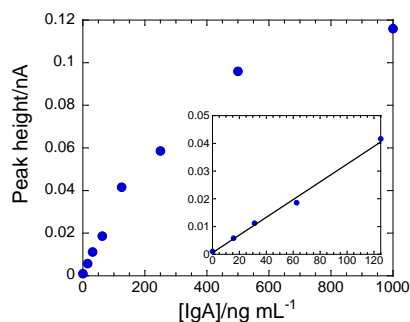


図 12 IgA に対する検量線

(8) 遠心力を利用した送液

作製した CD 型マイクロチップの溶液溜めに色素溶液を中心に近い液溜めより 20, 25, 30, 35, 40 μL ずつ加えてチップを回転させたときの溶液の流れを観察した。図 13 に溶液が流れる様子を示す。CD 型マイクロチップの回転数が増加するにしたがって、チップの外側の溶液溜めから溶液が順番に流れだし、CD 型マイクロチップの回転数を変化させることにより、溶液の送液順を制御できることが確かめられた。

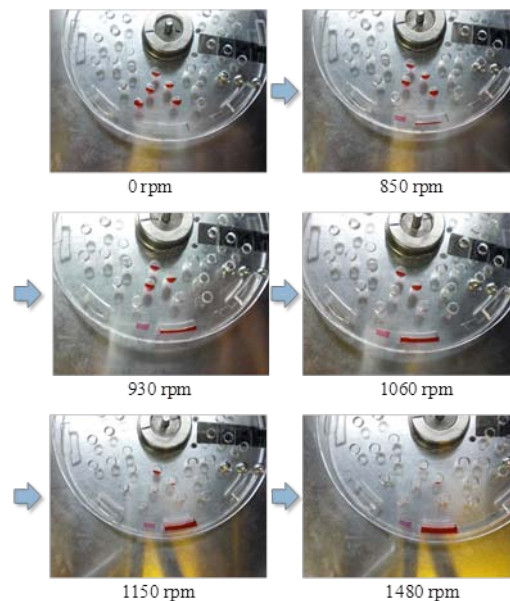


図 13 CD の回転により液だめから溶液が流れ出る様子

(9) CD 型マイクロチップを用いる酵素免疫測定法

図 14 に示す蛍光検出システムを構築し、CD 型マイクロチップを用いる酵素免疫測定法による IgA の測定について検討した。CD 型マイクロチップの検出部位に予め抗 IgA 抗体を固定化し、BSA によるブロッキングを行った後、種々の濃度の IgA、HRP 標識抗 IgA 抗体および過酸化水素を含む Amplex® Red 溶液を CD 型マイクロチップの液溜めに入れ、CD 型マイクロチップを回転させることにより

これらの溶液を順次 CD 型マイクロチップの検出部位に導入した。

IgA 濃度と蛍光強度との関係をプロットした検量線 (図 15) は、225 ng/mL 以下の濃度範囲において直線性を示し、それよりも高濃度の領域では一定となった。96 穴マイクロプレートを用いる従来法で得られた結果と本法

で得られた結果とを比較したところ、その間に有意な相関が見られた。IgAは唾液中に110~220 $\mu\text{g/mL}$ 含まれ、ストレスによりその濃度が増加することが報告されている。実際に本法により唾液の分析を行ったところ、唾液中にIgAが148 $\mu\text{g/mL}$ 含まれていることが確認された。本法におけるIgAの検出限界(S/N=3)は34.9 ng/mLであるので、本法の検出感度はヒトのストレス評価には十分である。今後、CD型マイクロチップとOLEDおよびOPDを組み合わせることにより、システム全体の集積化と小型化が可能になると考えられる。

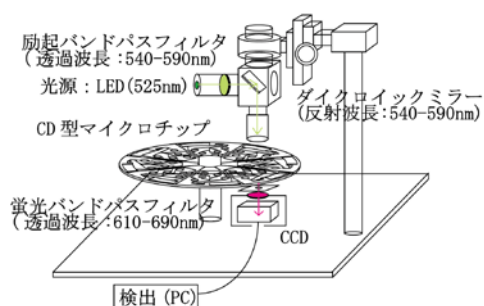


図14 CD型マイクロチップを用いる
蛍光検出システム

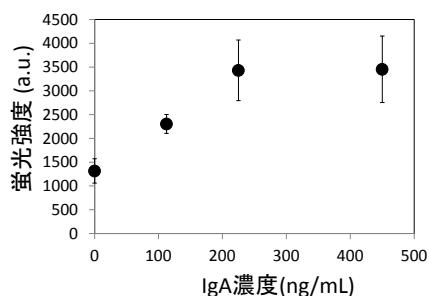


図15 IgAに対する検量線

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 12件)

1. Mayo Miyake, Hizuru Nakajima, Akihide Hemmi, Masayuki Yahiro, Chihaya Adachi, Nobuaki Soh, Ryoichi Ishimatsu, Koji Nakano, Katsumi Uchiyama, Toshihiko Imato, Performance of an organic photodiode as an optical detector and its application to fluorometric flow-immunoassay for IgA, *Talanta*, In Press, Available online 10 February 2012.
2. Hizuru Nakajima, Yukiko Okuma, Kazuhiro Morioka, Mayo Miyake, Akihide Hemmi, Tatsuya Tobita,

Masayuki Yahiro, Daisuke Yokoyama, Chihaya Adachi, Nobuaki Soh, Koji Nakano, Shuhua Xue, Hui Zeng, Katsumi Uchiyama, Toshihiko Imato, An Integrated Enzyme-linked Immunosorbent Assay System with an Organic Light-emitting Diode and a Charge-coupled Device for Fluorescence Detection, *J. Sep. Sci.*, 34, 2906-2912, (2011).

[学会発表] (計 66件)

1. Mayo Miyake, Yukiko Okuma, Akihide Hemmi, Daisuke Yokoyama, Masayuki Yahiro, Chihaya Adachi, Toshihiko Imato, Katsumi Uchiyama and Hizuru Nakajima, An integrated fluorescence detection system using organic light emitting diodes as light source, Pacificchem 2010, Honolulu, Hawaii, USA, (2010年12月19日).
2. Yukiko Okuma, Mayo Miyake, Akihide Hemmi, Toshihiko Imato, Masayuki Yahiro, Chihaya Adachi, Katsumi Uchiyama, Hizuru Nakajima, An Integrated Fluorescence Detection System Using Organic Light Emitting Diodes As Light Source, Pittcon2010, Orlando, Florida, USA, 930-62P, (2010年3月1日).

[図書] (計 1件)

1. 中嶋秀, 他 56名, 分析化学用語辞典, 全461ページ, 日本分析化学会分析化学用語辞典編集委員会編, オーム社 (ISBN 978-4-274-21091-4), (2011).

[その他]

ホームページ等

<http://www.comp.tmu.ac.jp/uchiyama/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中嶋 秀 (HIZURU NAKAJIMA)

首都大学東京・都市環境科学研究科・准教授

研究者番号: 10432858

(2) 研究分担者

今任 稔彦 (TOSHIHIKO IMATO)

九州大学・工学研究科・教授

研究者番号: 50117066

(3) 連携研究者

なし