

澤田 和明

国立大学法人豊橋技術科学大学大学院工学研究科・教授

イオンイメージセンサ技術を利用した医療生体ナノシステム構築

## §1. 研究実施体制

### (1)「研究代表者」グループ

- ① 研究代表者: 澤田 和明 (豊橋技術科学大学大学院工学研究科 教授)
- ② 研究項目
  - ・高解像度・高感度 神経伝達物質イメージセンサの確立
  - ・イオン局所刺激用 2 次元ナノチャネルアレイデバイスの製作と細胞自己組織化に向けた検討

### (2)「共同研究者」グループ

- ① 主たる共同研究者: 櫻井 孝司 (豊橋技術科学大学大学院エレクトロニクス先端融合研究所 特任准教授)
- ② 研究項目
  - ・イオンセンサへの膜コーティングならびに培養神経細胞の自己組織化の確立
  - ・イオンセンサへ初代培養した神経細胞の機能評価系の確立

## §2. 研究実施内容

### 1. 高解像度・高感度 神経伝達物質イメージセンサの確立

平成 24 年度までに 128×128 画素(画素ピッチ 23 ミクロン)のイオンイメージセンサを製作し、その基本動作を確認した<sup>1),7)</sup>。このセンサの時間分解能は 17msec(57frame/sec)で水素イオンの動画像を取得できるイメージセンサを完成するとともに、このセンサを累積読み出しできる画素構成(Q-trap 構造)・新動作方法(マルチ ICG 法)の開発により、従来のイオンイメージセンサの 10 倍の高感度化、ならびに 10 倍の高分解 pH 分離能力を達成することができた。Q-trap 構造とは、センシングエリア上に電極を設けた構造である。この電極により形成される電位井戸に偽信号の原因となる電荷を流し込むことで、その影響をなくすることが可能となった。図 1(a)に Q-Trap 構造を組み入れた 128×128 画素イオンイメージセンサのチップ写真、(b)に Q-Trap 構造を持つ画素の写真を示す。

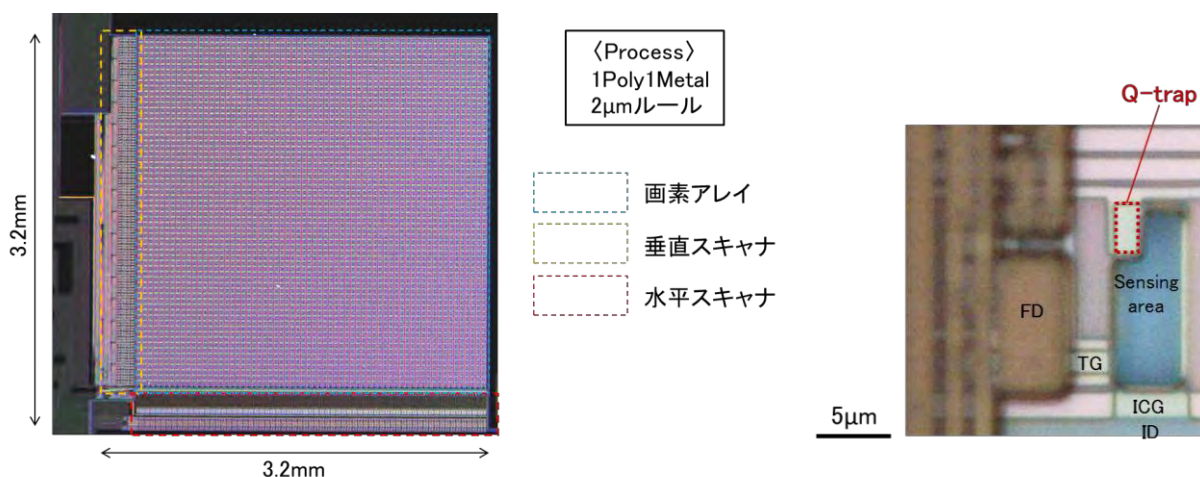


図 1 (a) Q-Trap 構造を組み入れた 128×128 画素イオンイメージセンサのチップ写真、

(b) Q-Trap 構造を持つ画素

マルチ ICG 計測法とは、画素のしきい値を決定する ICG 電圧をしきい値ばらつきに合わせて複数個用意し、測定を行う計測法である。ICG 電圧を個別に設定することで、センシングエリアのしきい値ばらつきを疑似的に抑えることが可能となる。

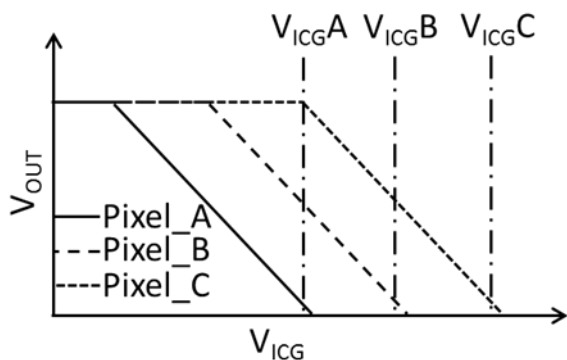


図 2 マルチ ICG によって各画素の閾値のばらつきを押さえる事ができる

図3にQ-Trap構造、マルチICG計測法を取り入れることにより取得したイオン画像を示す。(a)は累積動作を行わなかった場合、(b)はそれらの手法を用いて10回の累積動作を行ったとき、pH9.18緩衝溶液を取得した画像である。カラーバーのフルスケールは1pH(8.5から9.5)としてある。

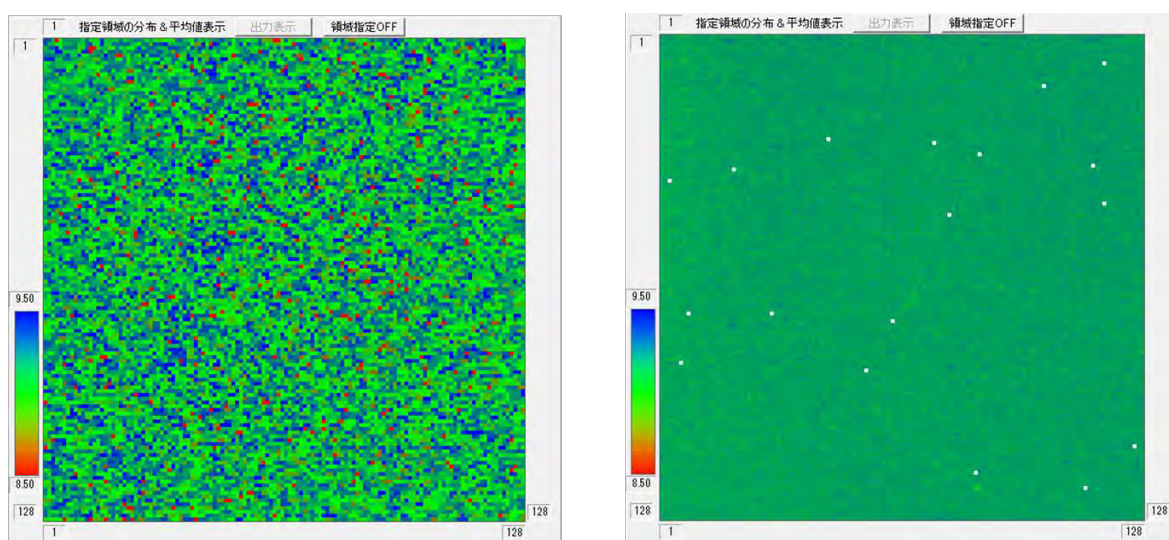


図3 (a) 累積動作無し (b) 10回の累積動作

明らかに、累積動作を行うことで画像の信号対雑音比が向上していることが分かる。この画素の出力信号のヒストグラムを図4に示す。累積を10回行うことで、 $2\sigma$ までであれば、測定精度 $\pm 0.01$ が達成できていることが確認できた。この結果は、累積によるランダムノイズ低減の計算値に合致しており、累積により、理論式に基づいた高精度化を確認することができた。また、この手法によってpH9溶液にpH9.18を挿入したときの動画のスナップショットを図5に示した。

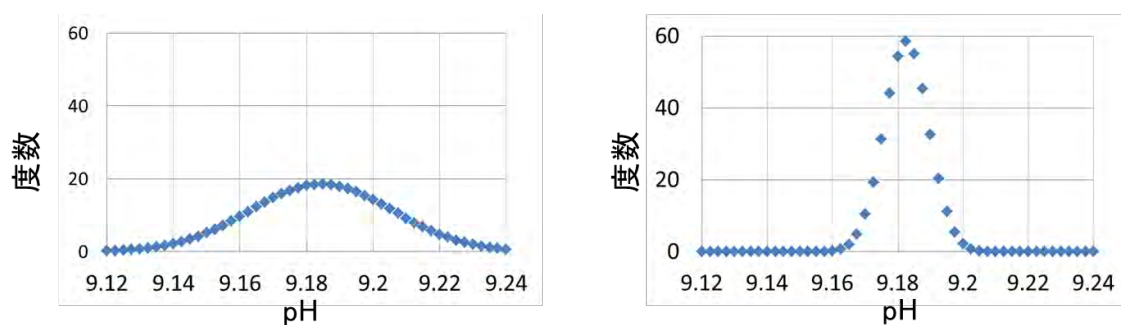


図4 (a) 累積動作を行わない場合の出力信号の分布 (b) 累積動作10回を行ったときの出力分布

画素ピッチ約10ミクロン、 $1024 \times 1024$ 画素(100万画素)のイオンイメージセンサの試作にも成功した。この狭ピッチ化を実現するために、画素共有化技術の導入により達成を図った。この技術

は、画素毎に搭載されている読み出し回路を複数画素で共有化するものである。これにより、1画素が占めるMOSFET数を削減することができるため、1画素のサイズを小さくすることが可能になる。この技術を取り入れ、読み出し回路を4画素で共有する構造に変更した結果、1画素の持つMOSFETの数を6個から3.75個に削減することができた。その結果、1画素のサイズを10マイクロピッチとすることができた。この画素を用い、1024×1024画素の高画素密度センサを設計試作に成功した。100万画素のチップ写真を図6に示す。このセンサを測定した結果、イオンイメージセンサとしての動作を確認できた。

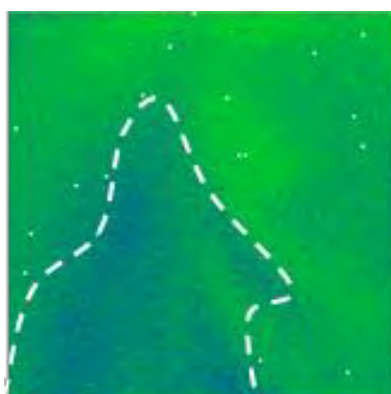


図5 pH9 溶液に pH9.18 を挿入したときの動画像のスナップショット

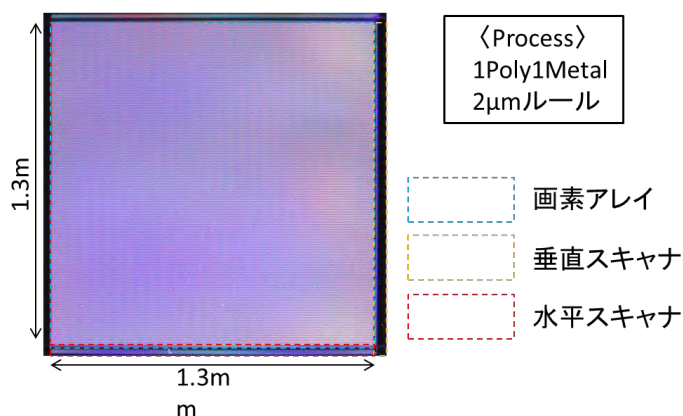


図6 試作した1024×1024画素(100万画素)のイオンイメージセンサ

## 2. イオンイメージセンサの医療・生化学分析システムへの展開

本イメージセンサを医療・生化学分析システムとしての展開を図るために、昨年度まで開発のめどが立った  $K^+$ およびアセチルコリンの検出膜を、高解像度化したイメージセンサに堆積させ高解像度な神経伝達物質検出可能なセンサに仕上げ、神経のグルタミン酸応答の非標識2次元解析に成功した(図6)。また、本年度は従来開発した物に加えATPを検出することが可能なバイオイメージセンサが開発できた(図7)。また、医療・生化学分析のための有用なシステムにするために、倒立形蛍光顕微鏡と本バイオイメージセンサを一体化し(図8)、さらに細胞などの培養環境、化学・電気的な刺激が出来る機能を組み込んだ分析システムとして仕上げ、平成23年度に取り組んだ“脳虚血による神経細胞死の解明”の取り組みを通じた医療関係の研究者が使えるシステム化として構築できた。このシステムは細胞内のイオンは蛍光により、細胞外のイオンの挙動はイオンイメージセンサで同時に取得することができた。本イオンイメージセンサと蛍光法がそれぞれの特徴を生かすシステムとしての出口が期待できる<sup>1)</sup>。



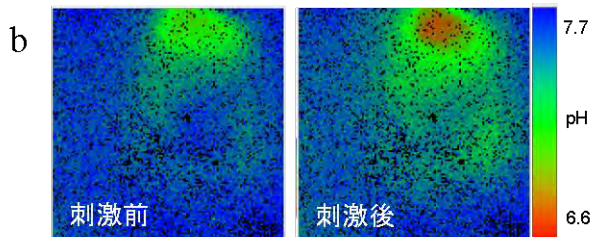
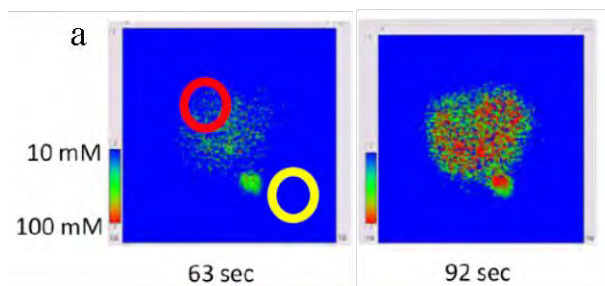


図6 (a) K<sup>+</sup>および(b) AChのイメージング

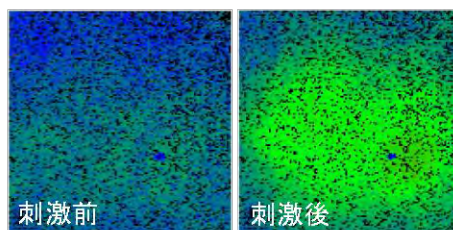


図7 ATPのイメージング

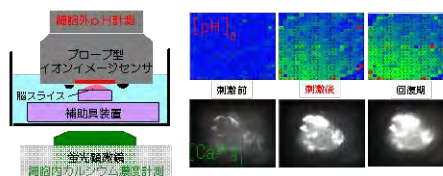


図8 化学・光学融合顕微鏡

### 3. 細胞などの自己組織化を利用した電子細胞集積デバイスに関する開拓研究

平成23年度までに、ナノチャンネル構造にゲート電極を設け、ナノチャンネル内の電気二重層の状態を変化させることで、チャンネルコンダクタンスが変化することを確認し、イオンの拡散現象を制御できる見通しが付いていた<sup>5)</sup>。平成24年度までに改良したMEMSプロセスによりゲート付ナノチャンネルデバイスを用いて、選択的にイオンの通過をON、OFFできることを原子吸光法、並びにイオン拡散電流を測定することで確認することができた。図9に改良した製作プロセスで試作したナノチャンネルデバイスを示す。ナノチャンネルはこれまで通り、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>で囲まれた40nmの流路ではあるが、このチップ表面には細胞の培養・接着が容易な最表面はエポキシ系フィルムレジストで覆われている。このナノチャンネルの入り口には1MのKCl、出口を1μMのKClで満たした後、両端の電流を測定した。この両端に流れる電流はそれぞれのイオンの拡散によるものである。

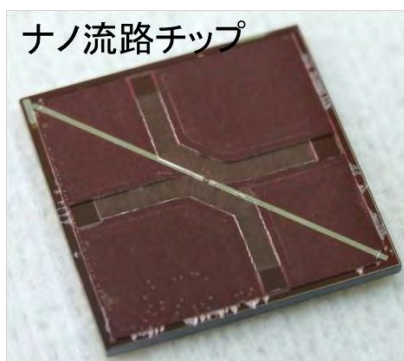


図9 改良したナノチャンネル型イオン刺激デバイス

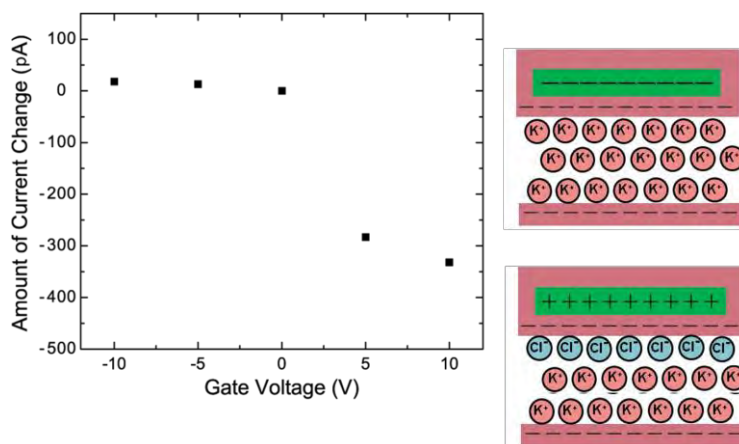


図10 ゲート電圧によるイオン拡散の制御が可能

さらに改良プロセスで用いた最表面はエポキシ系フィルムレジストであり、その上での細胞培養の見通しも立てることができた。その表面写真を図 11 に示す。

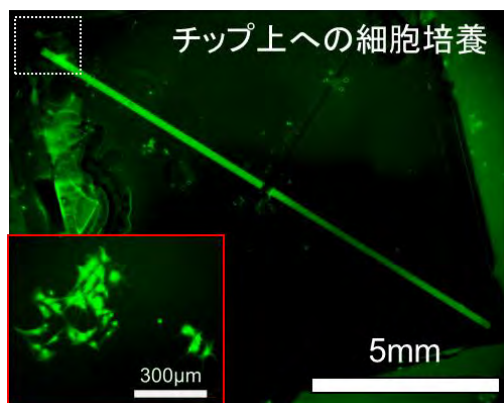


図 11 ナノチャンネルデバイス上神経細胞の培養を行ったときの蛍光顕微鏡写真

#### 4. イオンセンサへ初代培養した神経細胞の機能評価系の確立

局所的なイオン刺激を神経細胞ネットワークに施すことにより、神経細胞ネットワークの自己組織化を促進させ、“学習”する、電子・細胞集積回路形成を最終目標としている。本年度は化学的・電気的な刺激による、神経細胞の自己組織化の促進の検討を開始した。用いる細胞は PC12 細胞およびラットの海馬の初代細胞を利用し、神経栄養因子や伝達物質の化学刺激法により投与したところシリコン基盤上において神経突起伸展が観察された(図 12)。また、自己組織化によるネットワーク形成の課程を容易に観察するために、イオンイメージセンサ上に細胞伸展を制限するマイクロ流路を形成し、突起伸展の方向制御が可能であることを確認できた<sup>8)</sup>(図 13)。

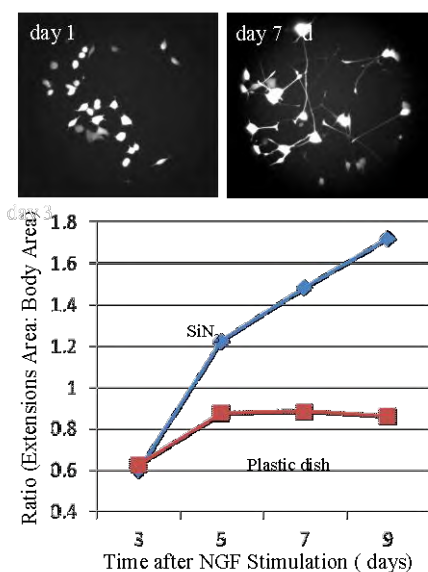


図 12 突起伸展の促進

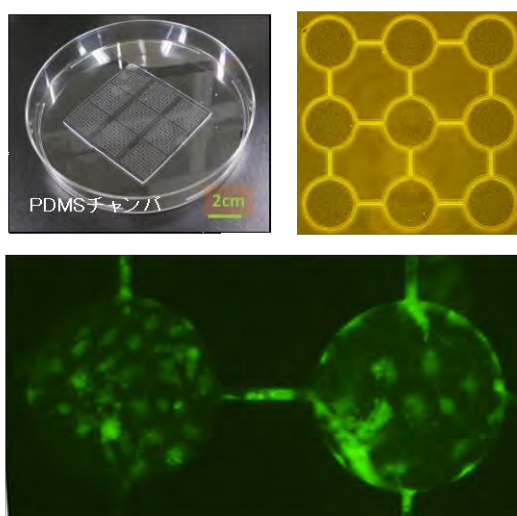


図 13 軸索伸展ガイドの製作

### §3. 成果発表等

#### (3-1) 原著論文発表

##### ● 論文詳細情報

1. Takashi Sakurai, Hidenori Taki, Koichi Okumura, Yasuko Fukushi, Susumu Terakawa, and Kazuaki Sawada, “[pH]o imaging in proton releasing cells by an ion image sensor-based chemical microscopy”, Proceedings of The 14th International Meeting on Chemical Sensors ( IMCS2012 ), pp.273-274, 2012(DOI:10.5162/IMCS2012/3.2.4)
2. Toshiaki Hattori, Yusuke Kojima, Kenta Tokunaga, Yoshitomo Masaki, Ryo Kato and Kazuaki Sawada, “CCD-Type Multi-Ion Image Sensor with Two Kinds of Plasticized Poly(vinyl chloride) Membranes”, Proceedings of The 14th International Meeting on Chemical Sensors ( IMCS2012 ), pp.967-970, 2012(DOI:10.5162/IMCS2012/P1.3.14)
3. Kazuaki Sawada, “CCD Based Ion Image Sensors for Novel Bio Imaging-Fusion of Sensor Technology LSI Technology”, Proceedings of IEEE Optical MEMS and Nanophotonics Conference 2012, pp.214-215, 2012(978-1-4577-1513-6/12/\$26.00)
4. Susumu Terakawa, Yasuko Fukushi, Hidenori Taki, Takashi Sakurai, Koichi Okumura and Kazuaki Sawada, “Direct Imaging of Acid Release from Biological Specimens on a Solid State 2D Detector”, Extended Abstracts of the 2012 International Conference on Solid State Devices and Materials(2012 SSDM), Kyoto, pp.31081-1082,2012
5. Kazuhiro Takahashi, Junpei Nishimoto, Yoshinaga Uemura, Kazuya Atsumi, Toshiaki Hattori, Masato Futagawa, Koichi Okumura, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada, “Gate Controlled Ionic Transport Nanofluidic Channel Fabricated by Silicon Planer Process”, Extended Abstracts of the 2012 International Conference on Solid State Devices and Materials (2012 SSDM), Kyoto, pp.390-391, 2012
6. Takashi Sakurai, Hidenori Taki, Junpei Nishimoto, Kazuhiro Takahashi, Makoto Ishida, Koichi Okumura, Kazuaki Sawada, “DEVELOPMENT OF OPTO-CHEMICAL MICROSCOPE SYSTEM FOR SPATIO-TEMPORAL ANALYSIS OF SIGNALS IN SELF-ORGANIZED NEURONS”, Proceedings of The 16<sup>th</sup> International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (μTAS 2012), pp.734-736, 2012.(978-0-9798064-5-2/μTAS 2012/\$20©12CBMS-0001)
7. Hirokazu Nakazawa, “Bio-image Sensor for real-time pH and optical imaging”,

Proceedings of International Expo and Conference on Analytix & HPLC 2012, Journal of Chromatography & Separation Techniques, Vol.3 Issue6 pp.61, 2012.(DOI:10.4172/2157-7064.S1.004)

8. Johan Medina, “Determination of trimethoprim in livestock and fishery products with UPLC-ESI-MS/MS”, Proceedings of International Expo and Conference on Analytix & HPLC 2012, Journal of Chromatography & Separation Techniques, Vol.3 Issue6 pp.63, 2012. (DOI:10.4172/2157-7064.S1.004)
9. Carl Frederik Werner, Shoko Takenaga, Hidenori Taki, Kazuaki Sawada, Michael J. Schöning, “Comparison of label-free ACh-imaging sensors based on CCD and LAPS” , Sensors and Actuators B: Chemical, Vol.177,pp.745-752, 2013( DOI:10.1016/j.snb.2012.11.012)

### (3-2) 知財出願

- ① 平成 24 年度特許出願件数(国内 2 件)
- ② CREST 研究期間累積件数(国内 6 件)