

「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」  
平成 20 年度採択研究代表者

澤田 和明

豊橋技術科学大学 工学部 電気・電子工学系 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. 研究実施の概要

これまで研究代表者グループでは、電荷転送技術(CCD)と CMOS イメージセンサ技術を駆使し、プロトンイオン(H<sup>+</sup>)の動きを 32×32 画素、約 100 ミクロンの画素ピッチでリアルタイム(30frame/sec)に画像化する世界的にも独創性が高い pH イメージセンシングシステム技術を開発してきた。(図 1)

さらに、電荷転送技術を利用することで従来のイオンセンサに比べその感度を 100 倍以上に高感度化できる“累積動作”を発明し、その S/N の向上も実証済みである。また、LSI と生体・化学物質との融合によるこれまでにない高度な機能を持つバイオデバイスの実現の可能性を探ってきた。その一例がイオンイメージセンサに関する研究である。

本研究では大きく分けて次の 2 つのステージで研究開発を行う。まず第 1 のステージとして、バイオテクノロジーとの融合による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である。第 2 のステージとして細胞、神経細胞、人工細胞(脂質二重膜)などの自己組織化を利用し、それらと 2 次元イオンイメージセンサとナノチャンネルを信号入出力デバイスとした、電子細胞集積デバイスに関する開拓研究を行う。

今年度は細胞の活動状況を把握するため、細胞のイオンチャンネルから放出する、K<sup>+</sup>イオン、生体伝達物質のアセチルコリンをリアルタイムにイメージングできるイメージセンサチップの開発を行い、それらを非標識でリアルタイムに画像化することに成功した。今後、実際に細胞などをこれらのイメージセンサ上に固定化させ、細胞からの分泌の観察を行っていく。

### 32x32 pH Image Sensor

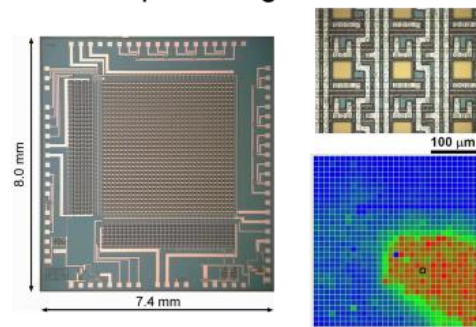


図 1: リアルタイムで水素イオンの挙動を観測できる pH イメージセンサ

## 2. 研究実施内容(文中にある参照番号は 4.(1)に対応する)

### 1. イオンイメージセンサの高解像度化に向けた検討

本年度は 128×128 画素（画素ピッチ 40 ミクロン）のイオンイメージセンサの設計・製作を豊橋技術科学大学集積回路製造設備で製作を実施した。設計ルールとして 1.5 ミクロン CCD/CMOS プロセス、2poly/1Metal プロセスで行った。

製作を行ったイオンイメージセンサの SEM 写真を図 2 に示す。写真を見てもわかるようにセンシングエリアと、センシングエリアの電荷を読み出すソースフォロア回路の製作ができています。センサエリアの周囲にはそれらの信号を順次読み出すための垂直シフトレジスタ、水平シフトレジスタ、さらに各画素のリセット雑音を除去するための CDS（相関二重サンプリング回路）を集積化している。



図 2

### 2. イオンイメージセンサの改良（フルフラット化）

細胞をはじめとする生体物質をセンサ感応膜に密着させるために、イオンイメージセンサは、センシングを含めフルフラット化を実現する必要があります。現時点で開発済みのイオンセンサアレイには約 1.5 ミクロンの段差があり、細胞などを密着することは困難である。そこで、CMP プロセスなどを利用したフルフラット pH イメージセンサアレイのプロトタイプを目指すのが導入が翌年度になるため、本年度はリフロープロセスとエッチバックプロセスを併用しセンサ表面の平坦化を行い、リフローにより表面平坦化が可能であることを明らかにした。

また、CMP プロセスによるフルフラットイオンイメージセンサでは  $\text{Ta}_2\text{O}_5$  薄膜をプロトン感応膜として利用する。 $\text{Ta}_2\text{O}_5$  薄膜はスパッタ法で試みその堆積条件によるセンサ感度、安定性が決まるため、その堆積条件を検討した。その結果、スパッタ法でも従来の窒化珪素膜と同様なセンサ感度、安定性を得ることができ、フルフラットイオンイメージセンサ開発実現への目処が立った。

### 3. センシング感度の向上と酵素反応を利用した神経伝達物質のイメージング

これまで単体の電荷転送型 pH センサにより、従来のイオンセンサの約 100 倍の高感度化を実現し、信号対雑音比に関しても大きな改善を行ってきた。この原理を利用して、グルコース<sup>1,2)</sup>、ペニシリン<sup>5)</sup>、アセチルコリン<sup>4)</sup>のセンシングの実証実験を実施した。電荷転送技術と信号累積技術により、センサの感度、ダイナミックレンジ、LOD（最小検出限度）とともに従来の FET 型酵素センサ、およびアンペアメトリックタイプの酵素センサの性能を凌駕する結果を得た。さらに、これらの有利な能力を利用し、イオンイメージセンサ上にアセチルコリンエステラーゼを物理的に固定化し、もっとも有名な神経伝達物質であるアセチルコリンのノンラベルリアルタイムイメージングを行うことができた。

アセチルコリンのノンラベルリアルタイムイメージングは世界で初の試みである。その結果を図 3 に示す。

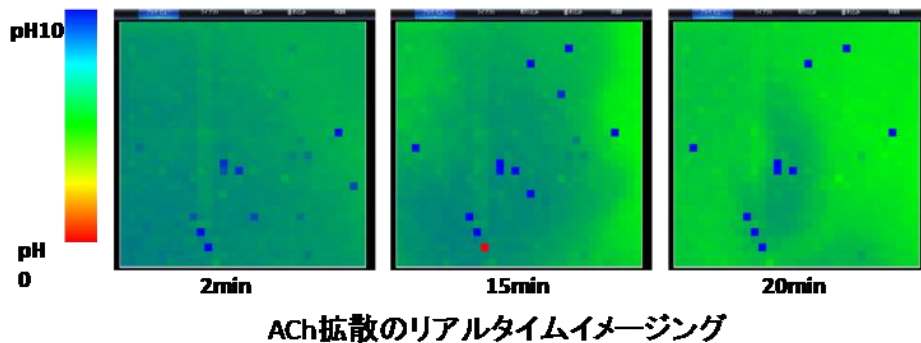


図 3

#### 4. 細胞レベルでの生体活動解明

浜松医科大学では、 $\text{Si}_3\text{N}_4$  のセンサ応答部を持つ  $\text{H}^+$  イオンイメージセンサ上へ細胞培養を行い、細胞培養系の基本技術確立を実施した。神経細胞、癌細胞、破骨細胞などの各種細胞について適用条件を検索した<sup>3, 6, 7)</sup>。神経細胞はラット脳より単離、癌細胞はラット由来のインスリノーマ (INS1) およびヒト脳由来の癌化グリア (U251)、破骨細胞はマウス骨髄由来の幹細胞から分化誘導させたものを、それぞれイオンセンサ上で培養した。INS1 細胞と破骨細胞は無処理のセンサ表面で2日間培養可能であることが確認できた。細胞の形態や機能は倒立式共焦点蛍光顕微鏡で観察・解析した。細胞内カルシウムイオン濃度の変化量を指標とすることで細胞の活性や状態を評価できることがわかった。

### 3. 研究実施体制

#### (1) 「研究代表者」グループ

①研究分担グループ長： 澤田 和明（豊橋技術科学大学、教授）

#### ②研究項目

- ・イオンイメージセンサの医療・生科学分析システムへの展開
- ・イオンイメージセンサのフルフラット化
- ・神経伝達物質のイメージング
- ・神経細胞の培養系確立
- ・ナノチャネルを利用した選択的イオン刺激素子

#### (2) 「共同研究」グループ

①研究分担グループ長： 櫻井 孝司（浜松医科大学、助教）

#### ②研究項目

- ・イオンセンサ上への神経細胞の培養と機能評価系の確立・イオンセンサへ培養した細胞の機能評価系の確立

#### 4. 研究成果の発表等

##### (1) 論文発表 (原著論文)

1. Seung Ro Lee, Kazuaki Sawada, Hidekuni Takao, and Makoto Ishida: "An enhanced glucose biosensor using charge transfer techniques", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 24, Issue 4, pp.650-656, 2008
2. Seung.Ro Lee, Young Tae Lee, Kazuaki Sawada, Hidekuni Takao & Makoto Ishida: "Development of a disposable glucose biosensor using electroless-plated Au/Ni/Copper low electrical resistance electrodes", *Biosensors and Bioelectronics*, Vol. 24, pp.410-414, 2008
3. Hayashi T, Mogami H, Murakami Y, Nakamura T, Kanayama N, Konno H and Urano T: "Real-time analysis of platelet aggregation and procoagulant activity during thrombus formation in vivo", *Pflüger Archives-Eur J Physiol* 456: 1239-51. 2008
4. Seung-Ro Lee, Mohammed Muzibur Rahman, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada: "Development of a highly-sensitive acetylcholine sensor using a charge-transfer technique on a smart biochip." *Trends in Analytical Chemistry*, Vol.28,No.2, pp.196-203, 2009
5. Seung-Ro Lee, M.M. Rahman, Kazuaki Sawada, Makoto Ishida: "Fabrication of a highly sensitive penicillin sensor based on charge transfer techniques." *Biosensors and Bioelectronics*, 24,pp.1877-1882, 2009
6. Suzuki Y, Mogami H, Ihara H and Urano T: "Unique secretory dynamics of tissue plasminogen activator and its modulation by plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells." *Blood* 113, 470-8, 2009
7. Morimoto Y, Hoshino H, Sakurai T, Terakawa S, Nagano A.: "Quantitative evaluation of bone resorption activity of osteoclast-like cells by measuring calcium phosphate resorbing area using incubator-facilitated and video-enhanced microscopy." *Microsc Res Tech.*, 72(4),317-22, 2009

##### (2) 特許出願

平成 20 年度 国内特許出願件数 : 1 件 (CREST 研究期間累積件数 : 1 件)