

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⁺)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。

平成 20 年度に神経細胞の情報伝達関連物質である K⁺イオン、アセチルコリンを測定対象にリアルタイムに非標識でイメージングできるイメージセンサ実現を行い、本年度は細胞からのこれらの物質の放出現象をとらえることができるセンサの感度向上、および応答時間の高速化に成功した。また、センサアレイ構造を利用して DNA などの生体物質の検出

32x32 pH Image Sensor

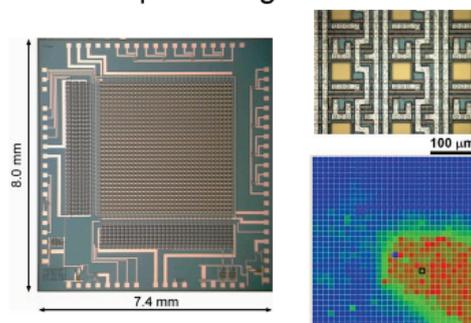


図 1：リアルタイムで水素イオンの挙動を観測できる pH イメージセンサ

センサアレイが実現できることを実証した^{1),2)}。さらに、各単一細胞からの情報伝達関連物質の挙動を観察できるように、バイオイメージセンサの微細化、および高画素化を目指して、センサエリアを微細化することに伴う雑音特性を明らかにし、微細化に起因する雑音を解決する手段を見いだした。同時に微細化したセンサアレイを作るための各種パラメータ抽出を行うための TEG (Test Element Group)の作製を行い、平成 22 年度下半期に完成を目指している 128×128 画素イメージセンサ試作の技術的見通しをつけた。また、イオンイメージセンサと同一平面から対象イオンをターゲットとする細胞に放出させる要素技術（ナノインジェクター）の基礎的検討を行い、CMOS 集積回路プロセスに準拠した方法で製作に成功した。

一方、K⁺イオン、アセチルコリンをリアルタイムに非標識でイメージングできるイメージセンサ上での、神経細胞および株化細胞の培養に関する検討を進めた。その結果、細胞の密着性および分化を効率的に行うための、特殊なセンサ表面の処理方法を見だし、それらの細胞分化培養に成功した。今後、これらの細胞をイメージセンサ上で培養し、実際に細胞からの信号分子やイオン分泌のリアルタイム観察を行っていく。

§ 2. 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

§ 3. 研究実施内容

(文中に番号がある場合は(4-1)に対応する)

1. 生体関連物質イメージングの高性能化

昨年度までに、 K^+ イオン、およびアセチルコリンのノンラベルイメージングの見通しを立てた。今後細胞からそれらの物質をリアルタイム・ノンラベルイメージングするため、性能の向上を目指し、①イオン選択性向上、②応答速度の向上、③高感度化に向けた検討を進めた。まず、 K^+ イオン選択性としてイオン感応膜の組成を検討することで Na^+ イオンとの選択性を3桁とし、細胞観察としては十分な弁別性能を有することができた。 K^+ イオンと Na^+ イオンとの選択性を図2に示す。次に酵素反応を利用したアセチルコリンセンサの応答速度改善を試みた。昨年度までは単純にアセチルコリンエステラーゼをセンサ表面にのせていたが、本年度はポリイオンコンプレックスに酵素を包接し、1ミクロン以下の薄層にアセチルコリンエステラーゼを濃縮しセンサ表面に固定化することを行い、数 msec 以下の早い応答（これまでは数 sec）でアセチルコリンが検出できることに成功した。この方法により細胞からのアセチルコリンの放出をリアルタイムに検出するめどが立った。また最小検出感度に関しても、通常の動作では 1mM 程度までしか検出できないが、本センサの累積動作を行うことで 0.01mM の検出ができることを実証した。細胞からの分泌物質の検出を考えると 0.01mM 程度が必要と予想でき、目標仕様をクリアできる技術基盤の構築ができた。今後、累積動作の機能を最大限に活用できるようなデバイス設計などを通して、さらなる感度改善を来年度進める。実際にプロトンイオンイメージの検出を累積動作の有無で検討した結果を図3に示す。0.1pH 変化は、イオン画像を累積動作無しでは認識が難しかったが、5回の累積を行うと画像化が確認できた。最小 pH 分解能を定義する pH 換算雑音というパラメータを定義し累積動作の効果を検証したところ、5回累積では従来法に比べ2倍以上の高感度化で画像化できることが判明した。

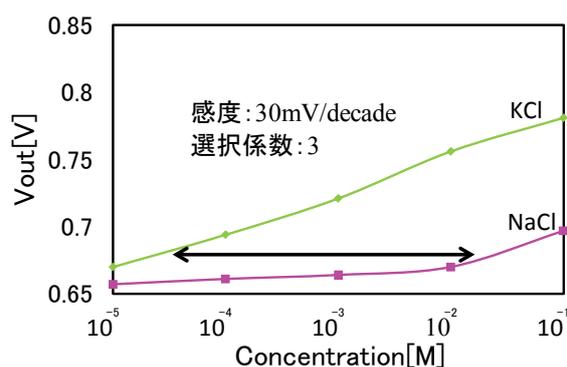


図2 K^+ イオンの選択性

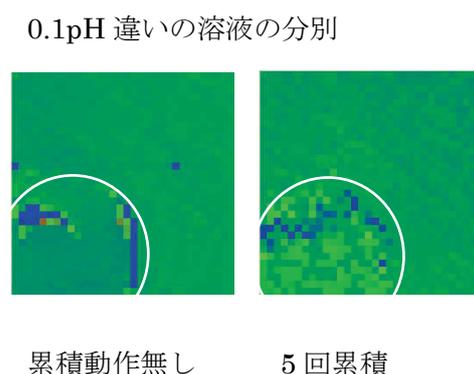


図3 累積動作による高感度画像化

また、本イオンセンサアレイは、電位検出型のバイオセンサアレイとして活用でき、新規な分子間相互作用解析法として展開の可能性を秘めている。その実証実験として DNA のハイブリダイゼーションの検出を試みた。本センサは 1000 個のバイオ物質を同時に検出できることの特徴を持つ。図4に DNA をアレイで検出した一例を示す^{1),2)}。

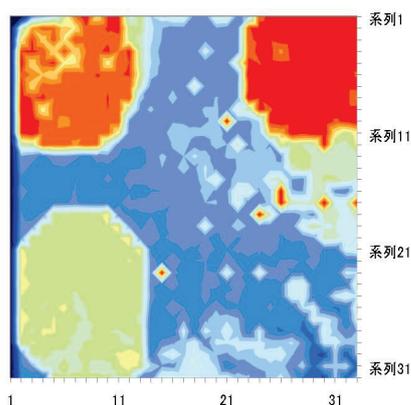


図4 DNAアレイチップとしての実証実験

2. イオンイメージセンサの高解像度化に向けた検討

平成20年度に行った 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実施したが、微細加工時の加工精度が不足したことで正常に動作が確認できなかった。現在本学で製作プロセスを見直し、設計ルールとして1.5ミクロンCCD/CMOSプロセス、2poly/1Metalプロセスで行っている。一方、新たな取り組みとしてメーカーの製作ラインを活用し、 128×128 画素、 256×256 画素、 512×512 画素を製作するためにメーカーでの電荷転送型イオンセンサアレイ製作に向けた設計パラメータ抽出のためのTEGを協力メーカーで製作しているところである。この投入で得られたパラメータを元に高画素密度イオンイメージセンサを来年度製作する。

3. プレーナプロセスを利用した生体物質エミッションデバイスの検討

本プロジェクトのもう一つの大きな課題は、シリコンマイクロチップから2次元的に様々なイオンや生体関連物質を自在に放出する生体物質エミッションデバイスを実現することである。ただし、最終的には生体関連物質のイメージングデバイスとケミカル刺激デバイス一体化のためのイメージングデバイスを製作するCMOSプロセスに準拠する必要がある。本年度はシリコンプレーナプロセスを用い、ケミカルナノチャネルアレイを作るプロセスの確立に成功した。さらにナノチャネル中に電気二重層を伸展させ電氣的にイオン伝導が制御できることを実証した。製作したイオンチャンネルデバイスの模式図を図5に示し、上部からの写真（図6）、およびナノチャネルのTEM写真をそれぞれ図7に示す。ナノチャネルは集積回路プロセスで一般的な多結晶シリコンを40nm堆積させてそれを犠牲層として、エッチングして作製した。TEMで確認したところナノチャネルの形成が確認でき、形としては構造としてスポンジのような構造となっていることが予想できた。このナノチャネルが電気二重層で埋まることをイオン伝導によるコンダクタンスとして確認した（図8）。計算通り1mMのKC1で電気二重層がナノチャネル全体に伸びていることが確認できた。現在、電氣的に電気二重層幅を制御できる電極を埋め込んだデバイスを製作中であり、電気二重層が制御し、イオン放出の制御ができることを今後確認する。

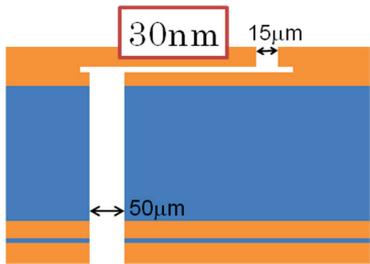


図5 生体物質エミッションデバイス

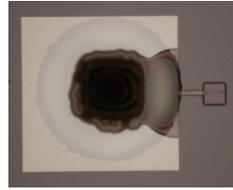


図6 作製デバイスの写真

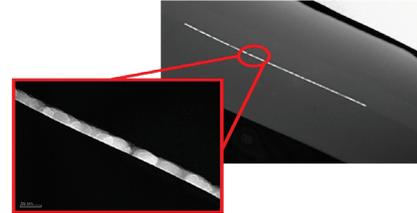


図7 ナノチャネルのTEM写真

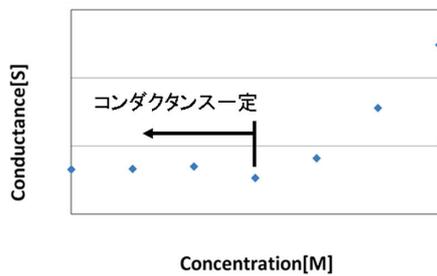


図8 ナノチャネルデバイスのイオン電気伝導特性

4. 細胞レベルでの生体活動解明

浜松医科大学では、 Si_3N_4 のセンサ応答部を持つ H^+ イオンイメージセンサおよび神経伝達物質分解酵素膜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、破骨細胞など試験する細胞数を増やし、各種細胞について適用条件を検索した。

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、細胞の存在位置は光センサで検出できた。神経細胞ならびにヒト脳由来の癌化グリア (U251) はアセチルコリン水解酵素膜をコートしたガラス上で7日間培養でき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シリコンおよびガラス基板のいずれにおいても同等に評価できることがわかった。

§ 4. 成果発表等

(4-1) 原著論文発表

- 論文詳細情報

- 1) Y. Maruyama, S. Terao and K. Sawada :
“Label free CMOS DNA image sensor based on the charge transfer technique”, *Biosensor and Bioelectronics* , Vol.24, pp.3108-3112 , 2009, DOI:10.1016/j.bios.2009.03.031

- 2) Yuki Maruyama, Makoto Ishida, Kazuaki Sawada :
“Multiwavelength Photosensor for On-Chip Real-Time Monitoring of Fluorescence and Turbidity”,
Japanese Journal of Applied Physics , Vol.48 No.6
pp.067003-067006,2009,DOI:10.1143/JJAP.48.067003

- 3) Medina J, Yamada S, Kojima I :
“Identification of differentially expressed genes during proliferative response of the liver induced by follistatin”, *Endocr J*.56(9),pp.1067-77,2009, DOI:10.1507/endocrj.K09E-224

- 4) Eisuke Adachi , Yutaka Kazoe , Yohei Sato, Yuko Suzuki, Tetsumei Urano, Takehiko Ueyama, Naoaki Saito, Viacheslav O. Nikolaev, Martin J. Lohse, Makoto Tominaga, Hideo Mogami :
“A technique for monitoring multiple signals with a combination of prism-based total internal reflection fluorescence microscopy and epifluorescence microscopy”, *Pflüger Archives-European Journal of Physiology*, Springer, Vol.459 pp. 227-234, 2009, DOI:10.1007/s00424-009-0705-8

- 5) Hirokazu Nakazawa, Hiroyasu Ishii, Makoto Ishida, and Kazuaki Sawada:
“A Fused pH and Fluorescence Sensor Using the Same Sensing Area”, *Appl.Phys.Express*, No.3, 047001-3, 2010 ,DOI:10.1143/APEX.3.047001

- 6) Hirokazu Nakazawa, Makoto Ishida and Kazuaki Sawada:
“Progressive-Type Fused pH and Optical Image Sensor”, *JJAP Special Issue vol 49 No.4*, Received September 28, 2009, accepted December 28 2009.

(4-2) 知財出願

CREST 研究期間累積件数 (国内 1 件)