

令和元年6月12日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H02318

研究課題名(和文)非線形モード局在型マイクロレゾネータアレイによる超微小質量計測とバイオセンシング

研究課題名(英文)Ultrasensitive biological mass sensing by nonlinear mode localized microresonator array

研究代表者

藪野 浩司 (yabuno, hirosi)

筑波大学・システム情報系・教授

研究者番号：60241791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,200,000円

研究成果の概要(和文)：DNAの伸長や反応などが質量変化によって計測できることが知られており、生体の微小構造を明らかにするためには、微小な質量を精度よく測るための質量計を開発することが喫緊の課題である。従来の方法では微小な質量を測ろうとすると、振動系そのものの質量を小さくしなければならず、限界があった。本研究ではそれを打ち破り超高感度な計測を実現する、振動系を二つ用いた新しい計測法を提案した。さらに、バイオナノテクノロジーへの応用を念頭に置き、液中でも真空中と同様な超高感度な計測を可能にするため、新しいフィードバック制御法を考案し、自励振動と呼ばれる特別な共振現象を振動系に発生させ、液中での超高感度計測を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

質量は基本的な物理量の一つであり、それを正確に計測することはいつの時代も重要な科学的な課題である。近年ナノバイオテクノロジーの発展により、微小質量の精密な計測を可能にする技術の開発が喫緊の課題になっている。本研究では従来法では限界があった、超高感度化を実現する全く新しい質量計測法を数学的な裏付けのもとに提案した。さらにその有効性を実際の計測システムを開発することにより実験的に証明した。測定環境を選ばない点も提案手法の特徴である。従来法では高真空な測定環境が必要であったが、自励振動とよばれる特別な振動を利用することにより、そのような特別な環境は必要なく、液中の微小質量計測をも可能にした。

研究成果の概要(英文)：It is well known that elongation and reaction of DNA are detected by the variation of the mass. High-sensitive mass sensors are required for clarifying the micro/nano-scale constructions of biological samples. To realize such a purpose, the miniaturization of the resonator is necessary in the conventional methods, but is limited in the advanced process for the fabrication. In this research, a new ultrahigh sensitive mass sensing was proposed using weakly coupled resonators. Toward the applications on bio-nano technology, a special control method was applied to produce self-excited oscillation in the resonators for compensating for the viscosity in liquid environments. The theoretically proposed method was verified by conducting experiments using coupled micro cantilevers.

研究分野：非線形力学

キーワード：質量計 MEMS 連成振動 非線形振動 ナノ・バイオセンシング 自励振動 モード局在化 弾性計

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

生体試料を生きたままの状態で計測するには、液中環境下(すなわち粘性環境下)での計測が不可欠で、従来の微小質量計測法(真空中で行われる)ではその実現は非常に難しかった。分子の結合・分離過程の解析は、アトグラムオーダーの質量変化を液中でとらえることにより可能になる。これらを実現するためには、超高感度化にはレゾネータの微細化が必要でそれが頭打ちになっている現状において、本質的に従来とは異なる計測原理を提案し、液体中ではQ値の低下により高分解能が得られない従来法(強制加振)に代わる新たなレゾネータの励振法の開発が必要不可欠である。

2. 研究の目的

DNA や RNA に代表される生体分子の反応過程(分子の結合・分離など)の解明に向け、液体中において超微小質量計測が可能な MEMS センサーの開発を目的とする。弱連成効果と非線形モード局在現象を利用した新しい非線形フィードバック制御法による発振法を提案し、それを実装可能するための MEMS レゾネータアレイを最先端微細加工技術を駆使して実現し、以下の目標を達成する。

- (1) リアルタイムでのアトグラム以下の超微小質量計測の実現
 - (2) 高粘性(100Pa・s以上)環境下で計測可能な計測技術の実現
 - (3) 上記(1)および(2)で提案する手法を実装した MEMS レゾネータアレイの実現
- さらに、開発した MEMS レゾネータにより液中生体試料の質量計測を試みる。

3. 研究の方法

2つの弱連成するカンチレバーの片方に測定質量を付加し、それによるモード変化をとらえることにより、付加された質量の大きさを同定することが研究の根幹である。生体試料の計測と超高感度かをめざし、下記のような方法で研究をおこなった。

- (1) 測定環境の粘性効果の影響を受けずにカンチレバーのモードを実験的に求めることが可能な発振法を理論的に提案した。線形モードのシフト量を正確に求めるため、線形フィードバックによる自励発振法に加えて、非線形制御による振幅制御法を理論的に提案した。
- (2) 連成マイクロカンチレバーを MEMS 技術により製作し、(1)で理論的に提案した制御法に基づいて発振させ、カンチレバーの発振性能を実験的に検討した。特に、生体試料観察には不可欠な液中観察が、提案した発振制御法により可能になるかどうか検討した。この際、吸着物質が液中で離脱することがないように、模擬的に光造形により測定質量をカンチレバー上に形成した。
- (3) カンチレバーに金膜を付け、実際に生体試料を化学吸着し、質量計測を行った。
- (4) ここまでの研究の進捗過程で発生した問題の解決や得られた知見の他の分野への応用可能性を検討した(フィードバックを持たない自励発振法、粘弾性計への発振原理の応用など)。

4. 研究成果

(1) 液中における微小質量計測法の理論的構築: 自励発振する連成マイクロカンチレバーの振幅低減化法として、van der Pol 振動子の定常振動状態を利用することを提案した。van der Pol 振動子は非線形減衰効果により、そのダイナミクスはリミットサイクルをもち、安定な定常振幅が存在する。さらにその非線形減衰効果が大きい場合、リミットサイクルの半径すなわち定常振幅が小さくなることが知られている。本研究ではこれと同じダイナミクスを連成マイクロカンチレバーで実現することにより、低振幅定常自励発振を実現した。このような非線形減衰はもともとの連成マイクロカンチレバーには存在しないため、マイクロカンチレバーの変位を観測してそれを利用して非線形フィードバックを行い、連成カンチレバーを励振するピエゾアクチュエータの入力とした。フィードバックゲインの大きさは、連成カンチレバーの支配方程式を多重尺度法と呼ばれる一種の特異摂動法で解析的に解くことによって得られた(詳細は雑誌論文を参照)。

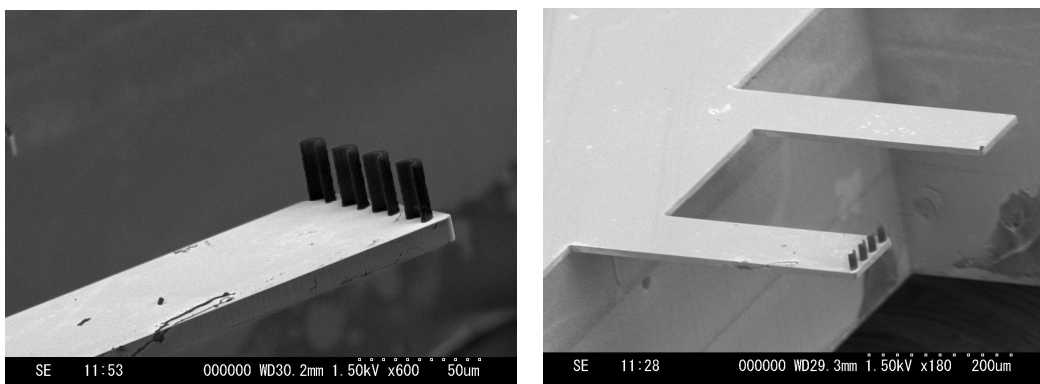


図1 MEMS技術で製作した連成マイクロカンチレバーと光造形で作った測定質量

(2)液中質量計測に関する提案手法の有効性の検討：提案手法に関する液中観察の可能性を調べた。生体試料を想定して、液中観察の可能性を実験的に調べる場合、試料をカンチレバーへいかにして吸着させるかが大きな課題であり、重要な研究課題の一つになっている。そこで、本研究ではまず本来の化学吸着ではなく、図1に示すように、一つのカンチレバーの先端に光造形で、測定対象質量をカンチレバー上に作った。連成カンチレバーを溶液中に入れ測定した結果、低振幅定常自励発振が可能になり、1 ng 精度の質量計測が達成された(詳細は雑誌論文を参照)。

(3)生体分子の連成カンチレバーへの固定法の確立：実際の生体試料の質量測定には、生体試料をカンチレバーに固定する方法を確立しなければならない。本研究ではカンチレバーに金膜をつけ、金-チオール反応を用いた化学吸着に

より計測物質をカンチレバーに付加する。本研究では、以下に示すようなMEMS技術で、物質を化学吸着する連成マイクロカンチレバーを製作した。まず、二つの内の一つのカンチレバーの金膜を生成する方法は、図2のとおりであり、同図には連成カンチレバーをSiO₂ウエハから製作する過程を含めて示してある。これにより生成された金膜が付加された、カンチレバーを図3に示す。

QCM や SPR 等のバイオセンサにタンパク質や細胞のような生体試料を吸着する際は、自己組織化単分子膜(SAMs:Self-Assembled Monolayers)が広く用いられている。本研究では、金(Au)とチオール基(R-SH)の配位結合であるS-Au結合(12, 13)を用いて金表面へのSAMsの形成を、細胞のトラップやタンパク質のラベル化に用いられているピオチン-アビジン結合を用いてSAMs膜上への生体試料の吸着を実現した。図4にSAMsを利用した生体試料の吸着の模式図を示す。片側の末端がチオール基(R-SH)、反対側の末端がピオチンで修飾されたアルカン鎖が溶けた溶液を滴下すると(図4(a))、

金(Au)とチオール基(R-SH)の間で、電子を共有する配位結合が生じ、金表面上にアルカン鎖が結合する(図4(b))。時間が経過すると最終的に表面がピオチンで覆われた高配向な単分子膜が形成される(図4(c))。次にストレプトアビジンが溶けた溶液をピオチンSAMs基板に滴下することで、ピオチンとストレプトアビジンが結合し、表面がストレプトアビジンで覆われたSAMs基板となる(図4(d))。本実験で用いるストレプトアビジンは、1個あたりにピオチンと結合する受容部が4箇所あるため、ピオチン-ストレプトアビジン-ピオチン-1次抗体というようにストレプトアビジンを介して任意の1次抗体をセンサー上に固定することが可能となる(図4(e))。このときターゲットとする生体試料と特異的に反応する1次抗体をSAMs膜状に固定することで、任意の生体試料をセンサー上に吸着することが可能になる(図4(f))。

(4)生体物質の吸着実験と質量計測結果：(3)で開発した装置を実際に液中に入れ、液中に測定対象の物質を滴下し、物質の吸着によるカンチレバーの振幅比の変化から、吸着された質量の大きさを計測することができた。しかしながら、吸着する過程で測定物質が液中を動かため、

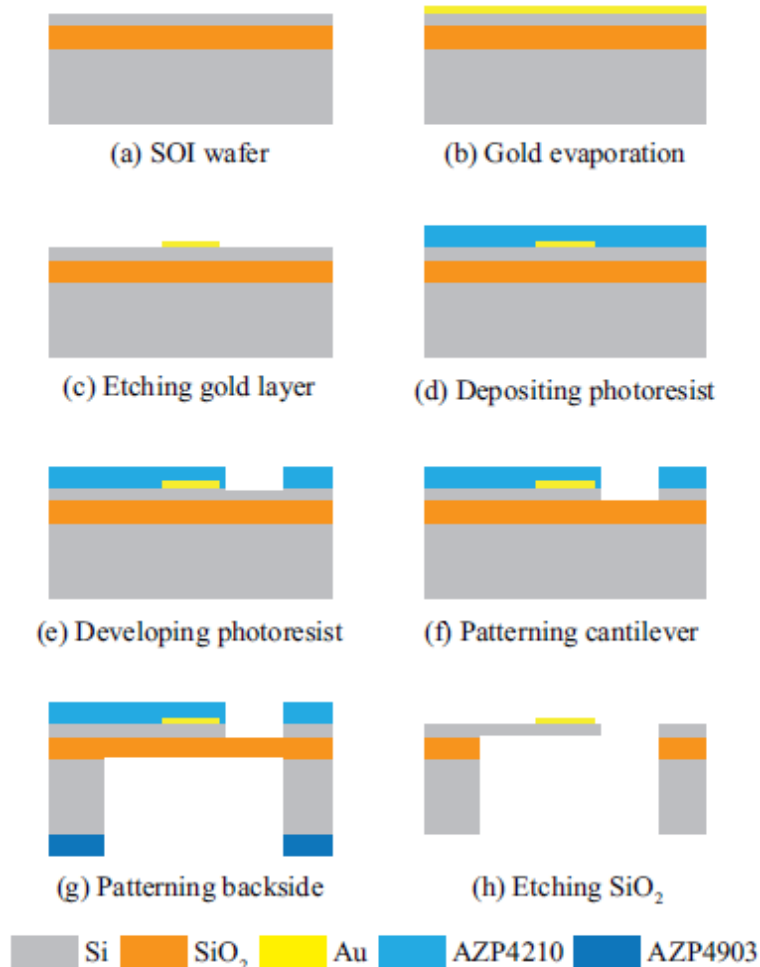


図2 MEMSによる連成カンチレバーの製作と金の蒸着

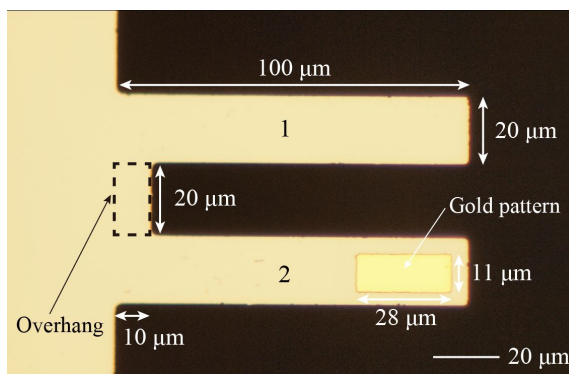


図3 金膜を蒸着した連成カンチレバー

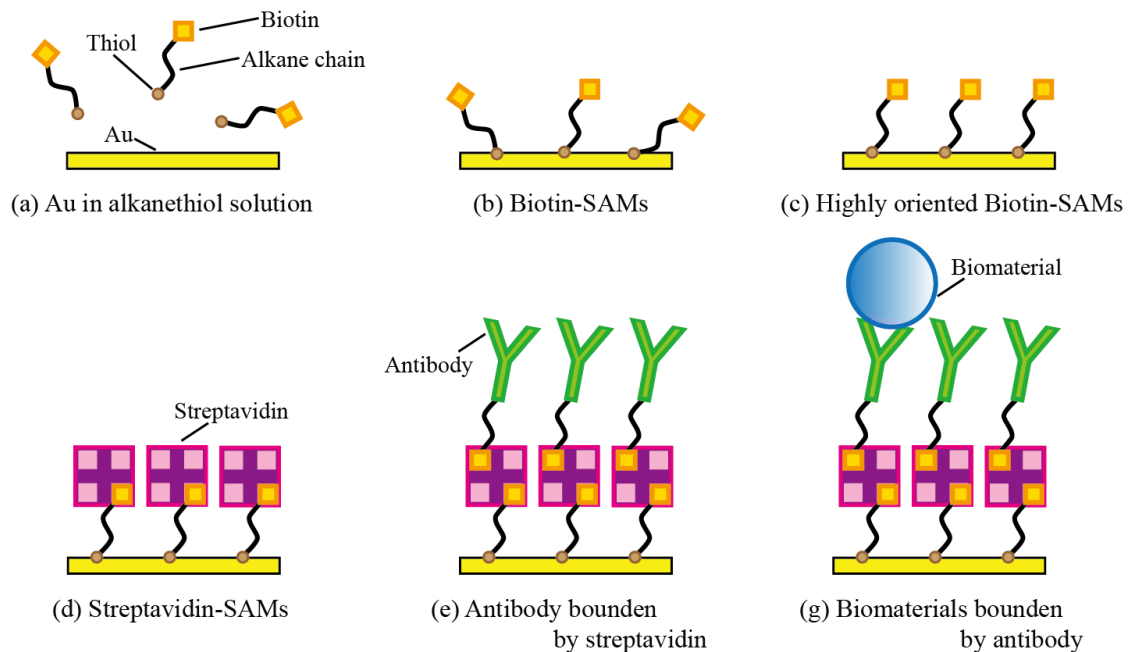


図4 化学吸着の方法

自励発振のためのフィードバックに用いる変位センサーのレーザー光を遮った場合、発振が停止するという状況が発生した。これに対する解決法として、フィードバックを用いない自励発振法を下記の(5)のように開発した。

(5) センサレス自励発振法の構築：(4)で明らかになった問題点を克服するため、シングルカンチレバーに対するセンサレス自励発振法をアクチュエータの回路系のダイナミクスを用いることにより提案した(後述の雑誌論文を参照)。本手法は連成カンチレバーに対しても応用は容易であると考えられる。

(6) バーチャルカンチレバーを用いたさらなる高精度化法：連成カンチレバーを用いた質量計測は、等しい力学特性をもった2つのカンチレバーを弱連成させることがその計測原理の基本になっている。しかしながら、このような条件を実際の連成カンチレバーで完全に実現することは不可能である。そこで、二つの内の片側のカンチレバーをコンピューター内で数値解析によりバーチャルに実現し、連成効果もコンピューター内でバーチャルに実現することを考えた。本方式はマクロカンチレバーを用いた実験によりその有効性が確かめられており、今後応用が広がるものと考えられる(この提案は下記出願状況欄にある通り特許出願を完了している)。

(7) 粘弾性計測への応用展開：自励発振によって測定環境の粘性効果を打ち消す方法を考案してきたが、これを逆手にとって、粘性さらには粘弾性効果を同定するために、本研究で開発した手法が利用できることに気づいた。その基本的な概念を発表したのが、下記5.の雑誌論文である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

Yabuno, H., Review of applications of self-excited oscillations of highly sensitive vibrational sensors, *Zeitschrift für Angewandte Mathematik und Mechanik*, 2019, 印刷中.

Luo, Y., Yabuno, H., Yamamoto, Y., and Matsumoto, S., Identification of the parameters of the Maxwell model using self-excited oscillation, *Journal of Sound and Vibration*, 査読有, 442, 2019, pp. 598-608, 10.1016/j.jsv.2018.11.015.

Endo, D, Yabuno, H., Yamamoto, Y., Matsumoto, S., Mass Sensing in a Liquid Environment Using Nonlinear Self-Excited Coupled-Microcantilevers, *Journal of Microelectromechanical Systems*, 査読有, 27, 2018, pp. 774-779, 10.1109/JMEMS.2018.2866877.

藪野浩司, モード連成を利用した自励発振型マイクロレゾネーターによる超微小質量計測, *システム/制御/情報*, 査読有, 62, 2018, 99-104.

Tanaka, Y, Kokubun, Y, and Yabuno H., Proposition for sensorless self-excitation by a piezoelectric device, *Journal of Sound and Vibration*, 査読有, 419, 2018, pp. 544-547, 10.1016/j.jsv.2017.11.033.

〔学会発表〕(計11件)

Yabuno, H., Applications of self-excited oscillation to ultrasensitive microsensors, *Recent Advances in Nonlinear Mechanics*, May 7-10, 2019, Lodz. 【基調講演】

Kasai, Y. and Yabuno, H., Amplitude control of coupled cantilevers with computational

coupling, First International Nonlinear Dynamics Conference, February 17-20, 2019, Rome.

Nakamura, T., Yabuno, H., Yamamoto, Y., and Matsumoto, S., Effect of nonlinear feedback control on a coupled cantilevers, Colloquium 603 Dynamics of micro and nano electromechanical systems: multi-field modelling and analysis, September 5-7, 2018, Porto.

Tei, S. and Yabuno, H., Experiments on nonlinear characteristics of parametric resonance in microcantilever, Colloquium 603 Dynamics of micro and nano electromechanical systems: multi-field modelling and analysis, September 5-7, 2018, Porto.

Yabuno, H., Self-excited oscillation in some mechanical systems - analysis, control, and applications, 4th International Conference on Vibro-Impact Systems (ICoVIS) and Systems with Contact and Friction, July 30 - August 3 2018, Kassel. 【基調講演】

Yanagisawa, N. and Yabuno, H., Mass sensing using self-excited oscillation in viscous environments, 10th International Conference on Structural Dynamics (EURODYN), September 10-13, 2017, Rome.

Nakamura T. and Yabuno, H., Mass sensing of microbeams using weakly coupling, PhysCon2017 8th conference on Physics and Control, July 17-19, 2017, Florence.

Luo, Y. and Yabuno, H., Identification of the parameters of the Maxwell model using self-excited oscillation, PhysCon2017 8th conference on Physics and Control, July 17-19, 2017, Florence.

Yabuno, H., Self-excited oscillation for high-viscosity sensing and self-excited coupled oscillation for ultra-sensitive mass sensing, IUTAM Symposium on Nonlinear and Delayed Dynamics of Mechatronic Systems, October 17-21, 2016, Nanjing.

Endo, D., Yabuno, H., Yamamoto, Y., and Matsumoto, S., Utilization of self-excited oscillation for mass sensing in liquid, International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, August 21-26, 2016, Montreal.

Yamane, S. and Yabuno, H., Identification of fractional order of viscoelastic materials by feedback control, H., International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, International Congress of Theoretical and Applied Mechanics, August 21-26, 2016, Montreal.

〔産業財産権〕

出願状況（計1件）

名称：計測装置、計測装置用の部品及び計測装置用の演算処理装置

発明者：藪野浩司、山本泰之、松本壮平

権利者：同上

種類：特許

番号：特願2018-197993

出願年：2018年

国内外の別：国内

6. 研究組織

研究分担者氏名：山本 泰之

ローマ字氏名：Yamamoto Yasuyuki

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：計量標準総合センター

職名：主任研究員

研究者番号（8桁）：00398673

研究分担者氏名：松本 壮平

ローマ字氏名：Matsumoto Sohei

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：エレクトロニクス・製造領域

職名：副研究センター長

研究者番号（8桁）：70358050

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。