

令和元年6月17日現在

機関番号：12701

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2017～2018

課題番号：17H04737

研究課題名(和文) In situ計測に向けた抗原抗体反応を用いた極薄膜バイオセンシングシステム開発

研究課題名(英文) Bio-sensing system using Antigen-antibody interaction on thin film

研究代表者

太田 裕貴 (OTA, Hiroki)

横浜国立大学・大学院工学研究院・准教授

研究者番号：30528435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、バイオマーカーの超高感度計測用の微細加工電極表面と抗体による電極表面の化学修飾を用いることで高い選択性を有するストレスマーカー検出センサを開発した。更に、ウェアラブルスマートデバイスに向けた、無線伝送システムを構築した。近年、様々なヘルスケア用ウェアラブルスマートデバイスが提案されている。しかし、炎症を伴うような過度な運動量の検出や、慢性的な心理的ストレスの検出など、高度な身体の変調を検出するためのウェアラブルデバイスは存在しない。そこで本研究ではコルチゾール、IL-6といった体液に微量にしか含まれないストレスマーカーをリアルタイムで計測できるセンサ電極表面を開発した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本課題では微細加工と抗原抗体反応を用いてストレスマーカー検出のためのセンサ電極表面を開発した。更に、それをウェアラブルスマートデバイスとして機能するように信号・無線伝送システムを設計した。本研究課題は分子生物学と先進電子デバイス分野を融合する初めての試みとなった。種々の抗体を用いることで電極表面を作成し、様々なバイオパラメータを検出できる医療用のフレキシブルデバイスを提案することもできる。例えば内視鏡に実装することで術中、瞬時に腫瘍マーカーを検出できるような次世代医療器を実現できる。さらに、本研究の基盤となるバイオセンサはスポーツ科学等様々な分野に展開できる。

研究成果の概要(英文)：Stress sensor which takes advantage of “flower-shape” nanostructured microelectrodes for highly sensing of stress makers based on antigen-antibody reaction was developed in this study. In addition, the on-site signal processing circuit was constructed toward wearable electronics. In these years, many wearable devices for healthcare was developed. Currently, wearable protein sensors which can detect biomarkers such as Cortisol and IL-6 is highly demanded. They can indicate more precise body condition related to chronic stress and inflammation etc. However, it is still difficult to detect protein biomarkers having complex structure in wearable electronic, because very small amount of biomarkers circulates in a body. In this study, highly sensitive sensors which can detect protein biomarkers toward next generation wearable devices was developed. At the same time, nanostructured microelectrodes was demonstrated in order to realize this concept.

研究分野：機械工学

キーワード：伸縮電極 バイオセンサー ウェアラブルエレクトロニクス 抗原抗体反応

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

### 1. 研究開始当初の背景

近年のフレキシブルセンサを用いたウェアラブルデバイスのヘルスケア・ライフサイエンス分野への応用の高い需要から、様々なセンサが考案されてきた。従来は、物理センサを利用したバイタルセンシングが主体であった。2016年には基礎生体情報分子である電解質・糖・重金属を計測できる電気化学センサを用いたスマートデバイスが提案されている。これらセンサは汗に含まれるイオンや糖といった低分子を計測することができる。しかし、このようなスマートデバイスは人体の基本生体情報を得ることに對して非常に有効である一方で、近年の健康運動ブームに伴う過度な運動量の検出や、慢性的な心理的ストレスの検出など、高度な身体の変調を検出するには不十分である。特に、身体的・精神的ストレスに對して唾液・汗中で現れるマーカーはストレスマーカーと呼ばれている。その例としてコルチゾール、ニューロペプチド(NPY)、インターロイキン(IL)を挙げることができる。これらバイオマーカーをリアルタイムで簡易的に検出できれば、更に医療・生物学的見地からの高次元なレベルでの身体の変調を検出することができる。

しかしながら、ストレスマーカーの唾液・汗中の濃度は、上述の電解質、生体低分子などの濃度の約一万分の一以下であり、唾液、汗など生体外分泌液から検出することが困難である。現在は断続的に生体外分泌液を採取し、その中からストレスマーカーをELISA法といった先端分子生物学的手法で検出している。これら手法は、生体外分泌液を採取して検出するまでに数時間の時間を必要とする上に、装置が非常に大きく装着して連続的に計測することができない。そのため、これらの手法では日常的に変化するストレスマーカーをリアルタイムで計測を行うことができず、更に高次での身体の変調を計測することができない。

### 2. 研究の目的

本研究では超高感度計測用の微細加工電極表面と抗体による電極表面の化学修飾を用いることで高い生体分子選択性を有するストレスマーカー検出センサを開発することを目的とする。

### 3. 研究の方法

本研究では超高感度計測用の微細加工電極表面と抗体による電極表面の化学修飾を用いることで高い生体分子選択性を有するストレスマーカー検出センサを開発した。第一に、汗成分の中に超微量に含まれるコルチゾール、NPY、IL-6といったバイオマーカーを超高感度検出するために花型の微細構造を有した電極表面を開発した。その電極表面に、免疫反応で使用する抗体を固着させることでバイオマーカーが特異的に接着する電極を作製した。抗原であるバイオマーカーが特定の抗体に對して鍵と鍵穴の関係で接着することを抗原抗体反応という。抗原抗体反応は分子生物学において現在では最も一般的に使用され、選択性の高いバイオマーカー検出方法である。このように、電極表面の加工と、表面の化学修飾を行うことで、今まで実現しなかったストレスマーカーの検出センサの開発をおこなった。更に本研究では、ウェアラブルデバイスへの応用を視野に入れて、無線伝送システムを実装した。

#### 電極表面

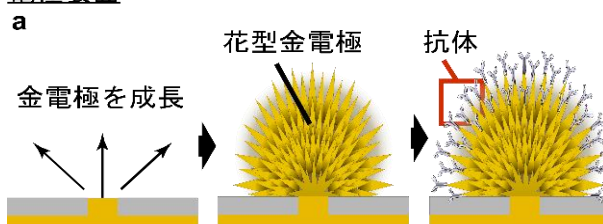


図1 花形電極の加工方法

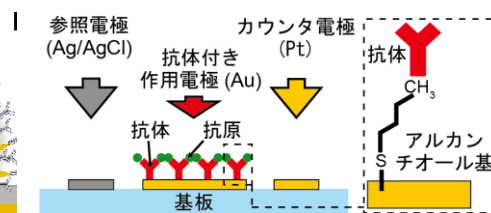


図2 生化学サクリックボルタンメトリ

#### 4. 研究成果

##### ① ストレスマーカーの高感度検出のための花形電極の開発

本研究課題を遂行するためにはストレスマーカーの高感度計測が可能な電極が必要不可欠である。そのために、先行研究で報告された花形電極をフレキシブル基板に構築する(図 1)。上述にある通り、通常の平面の電極設計では、ストレスマーカーであるコルチゾール及び IL-6 を検出することは濃度の低さから困難である。そこで、電極上に更に電気化学的に金を付着させ成長させることで、花のような形をした電極を形成する。この電極では、電極部分を花形に成長させることで 3 次元的な構造を有し表面積が増加する。結果的に検出感度が充進することが期待できる。この電極を実現するために、以下のような方法を用いた。

フレキシブルセンサを形成するために薄膜ポリイミド基板上に、抵抗加熱型の真空蒸着器を用いてクロムと金を蒸着させた。金はポリイミドに対して密着性が悪く、クロムは金とポリイミドとの接着層として必要不可欠である。本研究では最終的に生体からの外分泌液を溶液として用いる。そのため代表的接着層であるチタンよりもクロムを選択した。電極パターンを作製するために SUS 製のメタルマスクを用いた。

電極サイズは直径 1 cm の円とした。花形電極を作製するためには、その中で微小サイズの一部だけ(約 30 $\mu\text{m}$ ~200 $\mu\text{m}$ )が露出した状況を作り出さなければならない。そこで本研究では、絶縁層として AZ フォトレジストを用いた。さらに、フォトリソグラフィ技術を利用してその金電極内の一部に、直径 30  $\mu\text{m}$  から 200  $\mu\text{m}$  の円形の露出口を作製した。実際には、フォトレ

ジストである AZ を電極薄膜上にスピコートを用いて塗布した。スピコーターを用いてコーティングすることによって AZ の膜厚を 20~30  $\mu\text{m}$  程度に制御した。AZ はポジティブフォトレジストであることから、UV 光を照射した部分が溶解する。そのため、フィルムマスクを用いることで露出にだけ UV 光が露光するようにした。その後、NWD 現像液に基板を浸すことで光が露光した部分のフォトレジストのみを基板上から溶解させた。最終的に、純水にて基板を洗浄した。フォトリソグラフィにより電極上のフォトレジストは除去されているものの、マイクロ・ナノスケールでの表面を考慮すると電極上がフォトレジストによって汚染している可能性があった。そのため、更なるクリーニングとして酸素プラズマ装置に暴露した。本研究に関わる先行研究を見ると厚膜フォトレジストである SU-8 で数十  $\mu\text{m}$  の絶縁層から Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> の 1  $\mu\text{m}$  に満たない薄膜まで様々な厚さの絶縁層を使用していた。そのため、これら報告から絶縁層の厚さに関しては大きな影響がないと判断して AZ を使用した。将来的にウェアラブルデバイスなど、センサの中・長期的な使用を視野に入れるのであれば、SiO<sub>2</sub>、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub> などの生体適合性が高い絶縁層を作製する必要がある。薄膜電極を作製後、薄膜電極とシステムとの接続を行うために、作製した電極の対極にあるパッドとワイヤを銀ペーストで導通した。更に、エポキシ樹脂によりワイヤを固定した。銀ペーストだけでは電極とワイヤ部分の接続が不安定にな

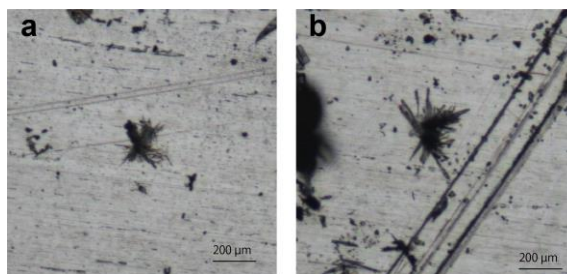


図3 花形電極. a. 50  $\mu\text{m}$  の露出孔、b. 100  $\mu\text{m}$  の露出孔

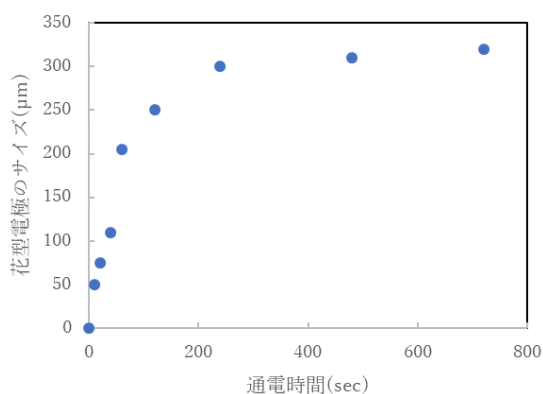


図4 花型電極のサイズと通电時間

るためエポキシ樹脂を用いることによって両端子の電氣的安定を維持した。50 mM HAuCl<sub>4</sub>の溶液を作製し、電極をその溶液に浸潤させた。その後、本電極を作用電極に、銀・塩化銀電極を参照電極に、白金電極を対極に用いて 0V のアンペロメトリー法を行った。60 sec の通電の後、金花型の金電極を作製した。通電することにより露出した電極部分に金が成長し、結果的に図 3 のような、花形の電極が形成される。花形電極は 3 次元の構造を有し、単位当たりの表面積が非常に高い一方で、非常に繊細であるため IPA で優しく洗浄し、圧縮空気により電極表面を乾燥させた。

各条件により花形電極ができるかどうかを検討する必要があったため、露出する電極のサイズを変更して実験を行った。実際には露出させる電極部分のサイズを 10 μm~200 μm まで変更させた。その結果、10 μm~50 μm 未満では花形電極が作製することができなかった。直径 50 μm 以上露出した部分を有する電極では花形電極を作製することができた(図 3)。さらに、電極作製のための電界負荷の時間が関係している可能性があったため、その時間を変化させた結果が図 4 である。図にあるように 200 sec までは負荷時間に依存する形で電極が成長していた。本実験結果から、電極サイズによってある程度までのサイズ制御をすることが可能であるが、上限が存在することがわかる。

## ② 抗原抗体反応を利用したストレスマーカー検出のためのバイオセンサの開発

次に、抗原抗体反応を用いたストレスマーカー検出センサを実現する。抗原抗体反応は、たんぱく質などの生体内の複雑な 3 次元構造を有する高分子を高感度に検出できる技術である。生物学、分子生物学の研究では、多用されている反応系である。実際には、3 次元構造を持つ抗体を基板上に化学的に接着させる。その抗体の三次元構造と相補的な構造を持つたんぱく質(抗原)は、基板に接着している抗体に特異的に接着することができる。抗原は、電氣的な偏りを有するため、電気化学計測を行うことにより、ターゲットたんぱく質の量の特定を行う。本手法は ELISA 法など一般に浸透している手法であり、十分な信頼性があると考えられる。抗体を固着させた上で、ウェアラブルデバイスとして使用できるようにゲルによるコーティングを行った。作製した金電極にエキシマランプ下で表面を親水性にさせる。その上で、アルカンチオール基を金属表面から成長させるためにアパタマーを添加する。アパタマーに露出した電極表面を 30 分 37°C 下でインキュベートした。インキュベート後に生理食塩水を用いてアパタマー表面を優しく洗浄した。最終的に圧縮空気によるブローで乾燥させた。この方法で抗体と金表面が化学的に結合する表面を作製した。その上で IL-6 のラット由来モノクローナル抗体を表面修飾させた金表面に添加した。以上の方法を用いて IL-6 の抗体を表面に固着させた。その後、表面をゲルでコーティングした。ゲルでコーティングする理由として、ウェアラブル端末などで使用する際、ヒトは動作を行う。その際に、センサ部分、つまりは端末とヒトとのインターフェース部分はどうしても力学的な摩擦が生じてしまう。代表者の過去の論文で行った電解質及びグルコースでのセンシングに関しても、ランニングの際に電極表面が摩耗してしまい。結果として、センサ表面が失活しシグナルが出なくなってしまう。本研究の場合、そのような電解質等のセンサに加えて、花形の電極を用いつ抗体を用いている。そのため今後ウェアラブルデバイスなどの応用を考えた際にセンサ表面のロバストネスは必ず問題となる。本研究では、以上の改善するために電極表面をハイドロゲルで包み込んだ。ハイドロゲルであれば、汗などの液体成分の吸収が高く容易に電極表面に達することができる。また、生体適合性も高い。アガロースゲル(アガゲル)の作成方法および塗布方法を以下に示す。主に DNA やたんぱく質の電気泳動に用いられるアガロースゲルの濃度は実験に応じて 0.5%~4%に渡る。今回は 2%のアガロースゲルを作製した。第一に、アガロース粉末、TAE 溶液、水を混合する。ポ

リマー化を加速させるために電子レンジに入れて溶液が透明になるまで加熱する。スターラーで攪拌しつつ、自然に冷めるのを待つ。50~55℃になったら電極表面にゆっくり滴下する。ゲルに気泡ができた場合はピペットチップで取り除く。ゲルが固まるまで室温で固まるまで静置する。実際にはゲルの加熱後に溶液状態で45℃程度まで冷めるのを確認後、電極表面に滴下した。抗体は非常に温度に対して耐久性を有しないため55℃の高温状態にさらされ分子構造が破綻することを防ぐため45℃程度まで下げてから電極上でゲル化した。ゲル化後、電極上の花形電極が崩れていないことを確認し、実験に使用した。

以上の表面処理を行った作用電極、白金による対極、銀塩化銀による参照電極を用いてボルタンメトリーを行った。ボルタンメトリーの基礎は他者の研究を参考にしている。電極表面の修飾に関する技術は応募者が過去に携わった研究で習得している。参考文献より0.6V付近に還元電位が存在するため0.6Vにおける電位の相関とIL-6の量の計測を行った。IL-6 standard

を用いてキャリブレーションを行った結果が図5である。従来の電極を用いた方法と比較した場合、約5倍の感度の向上が確認された。しかしながらハイドロゲルでコートしていない場合に比べると感度の低下が見込まれる。これは部分的に抗体がハイドロゲル内に滞留してしまった可能性が考えられる。この結果は、過去にShana O. Kelleyグループで行われたDNAなどの高検出研究に対応しており、本研究の花形電極でも十分な効果が認められた。

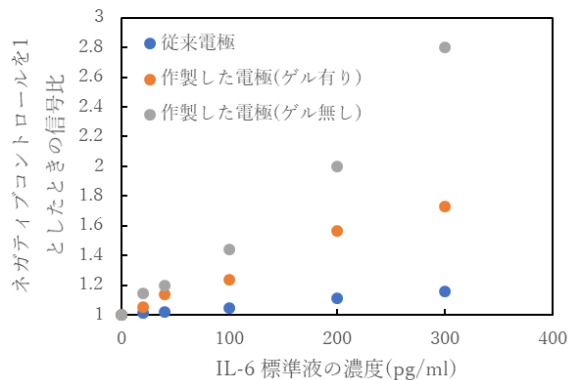


図5 IL-6標準液とシグナルの関係

### ③ ストレス検出のためのウェアラブルスマートデバイスの開発

以上のような方法によって電極を作製することで高感度バイオマーカー検出電極を実現できた。本研究の最終的なゴールは開発したセンサをウェアラブルデバイスに使用できるようにシステム化することになる。そのため、次に、本電極からでてきた信号をスマートフォンなどのスマートデバイスに転送するための電子システムを構築した。このシステムは代表者が関わってきた論文を元にシステム構築を行った[1]。システムの簡素のため三極式から銀・塩化銀電極と作製した電極からなる二極式に変更をした。実際のシステムとしては、検出した電流値をTransimpedance amplifier(TIA)を用いて、電圧値に変換しその後、Inverter及びLow-pass filter(LPF)を通すことで信号をクレンジングした。その信号データをMicrocontroller(MCU)で集約し解析することで、Bluetoothモジュールへスマートフォンに転送した。スマートフォン上では自作のアプリを用いて経時的に計測できるようにした。バッテリーは小型のリポバッテリーを使用した。現在までに以上のシステム構築は完成しているものの、センサから出てくる信号がシステムに対して小さいためSN比(Signal Noise ratio)が非常に低くスマートフォン上に表示できていない。今後、信号のクレンジング方法に関してはLPF及びAmplifierの設定を変更する必要があると考えられる。特に電極を開発するときを使用したポテンチオスタットは電気化学計測用に最適化されたシステムであり、ウェアラブル化するためにシステム自体の最適化設計を行う必要がある。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 1 件）

1. L.-C. Tai, W. Gao, M. Chao, M. Bariya, Q. P. Ngo, Z. Shahpar, H. Y. Y. Nyein, H. Park, J. Sun, Y. Jung, E. Wu, H. M. Fahad, D.-H. Lien, H. Ota, G. Cho, A. Javey, "Methylxanthine drug monitoring with wearable sweat sensors", 1707442, Advanced Materials, 2018 (査読有)

〔学会発表〕（計 5 件）

1. K. Matsubara, H. Ota, Stretchable liquid metal wiring with three-dimensional helical structure., 2019 IEEE 32nd International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (2019)

2. 太田裕貴、液体金属を使用した環境センサの開発., 第 9 回マイクロナノ工学シンポジウム (2019)

3. H. Ota, Liquid-state Environmental Sensors Using Liquid Metal., AiMES 2018(2018)

4. H. Ota, Y. Gao, A. Javey, Microfluidic Environmental Sensors Using Liquid Metals., APCOT 2018(2018)

5. H. Ota, Microfluidic Environmental Sensors Using Liquid Metal for Wearable Applications. IEEE NEMS 2018(2018)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

なし

※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。