

平成 22 年 3 月 31 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2009  
 課題番号：19560351  
 研究課題名（和文） 脂質二分子膜カプセルの電気崩壊性を利用した  
 電子回路中へのバイオセンサ素子の配列化  
 研究課題名（英文） Development of a Bio-sensor in a circuit

研究代表者 磯田隆聡（Takaaki Isoda）  
 北九州市立大学国際環境工学部 環境生命工学科 講師

研究者番号：70284544

研究成果の概要（和文）：筆者らはこれまでにMEMS技術を利用し、微小な生物・化学センサを集積したデバイス開発を目指している。これは極微量の血液・体液に含まれる抗体や蛋白の種類を認識し、電気信号に変換するためのセンサ素子である。本研究では、電気回路内に種々のバイオセンサ素子を高密度に配列化するための方法の確立を目指した。第1番目に、ガラス基板上に電極センサを構築し、その電極上に薄膜を形成させ、この薄膜表面に細胞由来の生化学物質が固定化できるように化学構造を最適化した。この表面にIgG(イムノグロブリン)抗原を集積させ、IgG抗体の応答についてセンサ応答性機能を調査した。この結果、電極に電流を負荷させると条件によっては電極や薄膜が崩壊し、信号の検出が難しいことが分かった。そのため第2段階の検討事項として、薄膜に添加物を加えることによる安定な信号検出が可能なセンサ電極表面の製造方法を検討し、特許出願を行った。

研究成果の概要（英文）：

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	600,000	180,000	780,000
2009年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,100,000	630,000	2,730,000

研究分野：工学

分科・科研細目：電子デバイス/電子機器・バイオデバイス

キーワード：センサ, バイオセンサ, MEMS, 抗原, 抗体

#### 1. 研究開始当初の背景

本研究は細胞から生産される極微量の抗体を測定し、病態との関連を評価するための「バイオセンサ素子」の開発を目標としている。抗原との特異反応を利用して試料に含ま

れる抗体量を測定する方法に「Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA: 酵素結合免疫吸着法)」が広く行われている。このアッセイでは、ハンドリングに数時間～数日かかること、測定装置を含めコ

ストが高いこと、試料量が数 100  $\mu\text{l}$  以上必要であること、検出には蛍光抗体や発色酵素等が別途必要であること等課題が多い。

一方、本研究ではチップ平面に配列した微小電極に、抗原を固相化できる絶縁感応膜を成膜し、微量液滴中に含まれる抗体を反応させる。(図 1) 反応前後では感応膜/液滴界面の誘電分極が変化するため、電極間に電圧を負荷させるとこの変化量が電圧変化となって検出できる。そのため試料量を 10  $\mu\text{l}$  程度まで低減できること、蛍光標識化処理が不要となること、検出は数秒であり測定時間を大幅に縮小できる等、従来法での課題を克服できることが期待される。

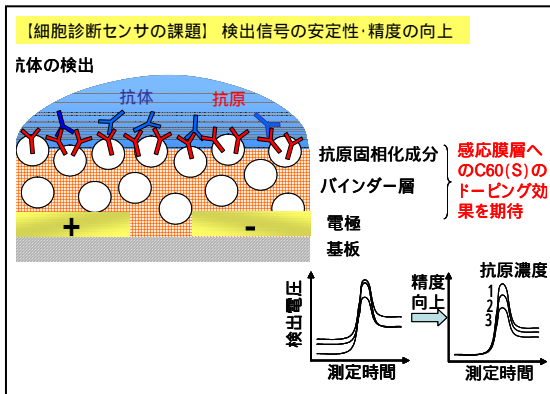


図 1 バイオセンサ素子による抗原-抗体反応の検出原理と開発課題

しかし細胞から分泌される抗体は極めて微量であることから、センサの検出電圧の精度をいかにして向上させるかが課題となっている。そのためには、感応膜界面で誘電分極が安定に発現し、抗体濃度に対して線形応答を示す感応膜の開発が必要である。

## 2. 研究の目的

そこでこれらの課題を解決するため、本研究ではバイオセンサ素子のセンサ検出機能の精度の向上を目的として、種々の材料の中からフラレーンの添加効果に着目した。実施項目は以下の 3 段階で行った。

- (1) フラレーンの溶剤可溶成分(以下 C60(S))をドーピングしたセンサ感応膜の作製方法の確立
- (2) C60(S)成分ドーピングセンサ感応膜の Na イオン検出精度評価
- (3) C60(S)成分ドーピングセンサ感応膜のイムノグロブリン抗体(以下 IgG)検出精度評価

## 3. 研究の方法

図 2 にフラレーンの溶剤中での相変化について、スキームにまとめた。Case1 ではフラレーンが特定の溶剤に可溶化する性質を利用して、その可溶成分(C60(S))を分別し、

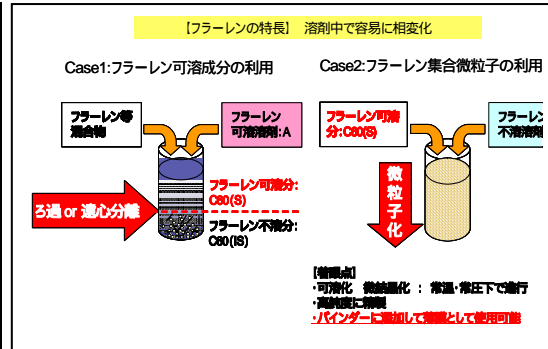


図 2 フラレーンの溶剤中での相変化

溶液形態で利用する方法である。フラレーンを可溶化する溶媒としては、トルエン、ジクロロベンゼン等が知られている。いずれも可溶化率は 10wt%前後である。

Case2 では C60(S)にフラレーンを可溶化しない溶媒を混入させて、フラレーン結晶の集合微粒子を形成させる。この場合は、微粒子が溶剤に分散した形態で利用する方法である。どの場合も高純度に C60 が含まれ、また溶剤に均一に溶解あるいは分散した状態であるため、バインダーに添加して薄膜状態に成型することが可能である。

以下 2 つのケースについて、センサ素子上に感応膜を構築した。

### (1) C60(S)成分をドーピングした均一溶解膜の構築

図 3 にセンサ素子の概観と構造を示す。ガラス基板上に Cr/Au を積層させ、フォトリソグラフィにて電極をパターンニングした。さらに光感応性樹脂を積層させ、同様に電極上部にウェル開口部をパターンニング形成した。

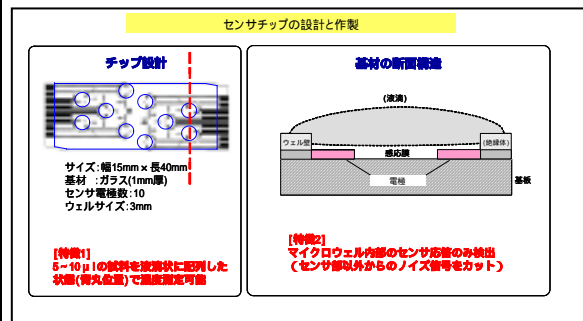


図 3 センサ素子の概観と構造

図 4 に、溶剤に均一に溶解した C60(S) (図 2 Case1 に対応)をドーピングしたセンサ感応膜の作製方法を示す。(以下、均一溶解膜と記載)市販 C60 に、ジクロロベンゼンを混合、溶解させ、遠心分離で可溶成分を分離した。この C60(S)をポリイミド系樹脂含有溶剤と 1:1 比で混合した溶液を、図 3 で作製したセンサ素子チップに滴下し、スピコート

リング法で電極上に薄膜を成型させた。

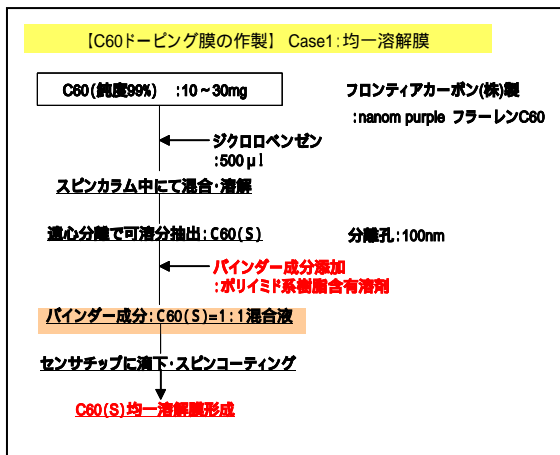


図4 C<sub>60</sub>ドーピング膜の作製 (均一溶解膜)

(2) C60(S)成分をドーピングした微粒子分散膜の構築

図5に、溶剤に均一に分散したC<sub>60</sub>結晶微粒子(図2 Case2 に対応)をドーピングしたセンサ感応膜の作製方法を示す。(以下、微粒子分散膜と記載) Case1と同様にC60(S)溶液を調製した。このC60(S)を塩化ビニル系樹脂含有溶剤と1:1比で混合した溶液を、図3で作製したセンサ素子チップに滴下し、スピノコーティング法で電極上に薄膜を成型させた。

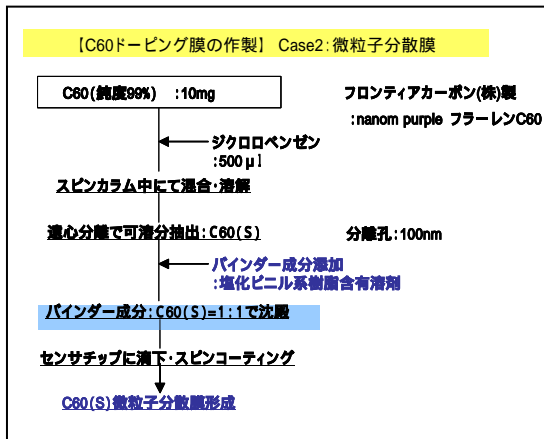


図5 C<sub>60</sub>ドーピング膜の作製 (微粒子分散膜)

4. 研究成果

4-1 C60(S)成分をドーピングしたセンサ感応膜成型方法の確立

図6に均一溶解膜の顕微鏡写真を示す。左はC60(S)をドーピングした膜である。右は比較のために不溶分(C60(IS))を混入させたものである。C60(S)は感応膜中に均一にドーピングされていることが明白である。

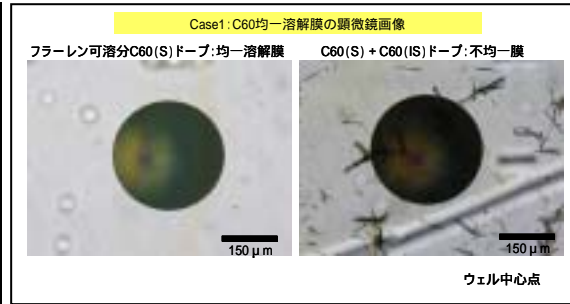


図6 C<sub>60</sub>ドーピング膜の顕微鏡画像 (均一溶解膜)

図7に微粒子分散膜の顕微鏡写真を示す。左はC60(S)をドーピングした膜である。右は比較のためにドーピング無の場合である。画像中の白色微粒は、抗体を固相化させるための添加成分である。膜中に粒径10~20 μmの黒点が観察された。(図中矢印)

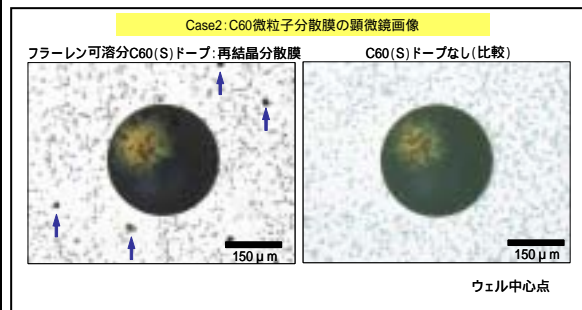


図7 C<sub>60</sub>ドーピング膜の顕微鏡画像 (微粒子分散膜)

図8に図7の低倍率画像を示す。C60(S)の再結晶微粒子は、ウェル内部の感応膜に広範囲に分散して存在していることが明らかである。

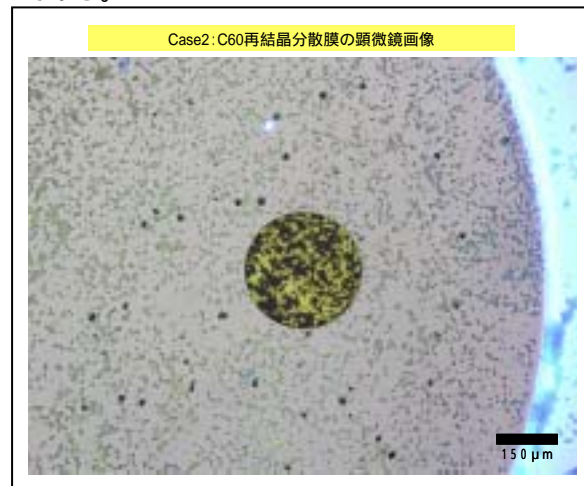


図8 C<sub>60</sub>ドーピング膜の顕微鏡画像 (微粒子分散膜)

#### 4-2 C60(S)成分ドーピングセンサ感応膜のNaイオン検出精度試験

図9に開発したセンサ測定機器を示す。(バイオセンサモジュール2006モデル：アーズ株式会社製)測定はセンサチップを子機端末(画面左)に装着し、チップ上に所定濃度の生理食塩水(以下PBS×N：N=規定濃度1に対する濃度比)を所定量滴下した。センサ検出電圧(アナログ信号)は子機中の信号回路でデジタル変換され、無線回路によって親機(画面右)へ常時送信される。親機で受信した信号はPCへ転送され、時間vs電圧のグラフが表示、保存される。



図9 センサ測定機器概観(バイオセンサモジュール2006モデル：アーズ株式会社)

図10に、C60(S)ドーピング量を変えた均一溶解膜のセンサチップを用いて、各ウェルに蒸留水4μlを滴下した場合の、C60(S)ドーピング量(注:分離前のC60の総量)と検出電圧の関係を示す。比較のためC60不溶分(C60(IS))を混入させた場合のセンサチップでの結果も示す。

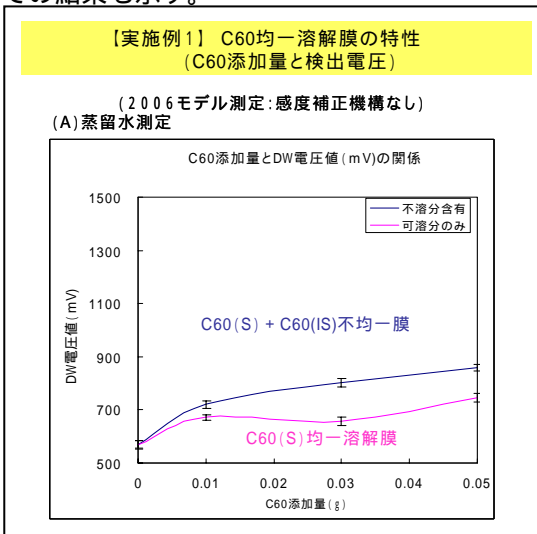


図10 C60(S)ドーピング量と検出電圧の関係 (測定試料：4μl 蒸留水)

蒸留水測定の場合、検出電圧は700mVと小さく、またC60(S)ドーピング量に関係なくほぼ一定値を示している。これは蒸留水の場合、センサ感応膜の界面で生じる誘電分極が小さいため、膜の組成による影響が現れないことを示している。

図11に、C60(S)ドーピング量を変えた均一溶解膜のセンサチップを用いて、各ウェルにPBS×1溶液4μlを滴下した場合の、C60(S)ドーピング量(注:分離前のC60の総量)と検出電圧の関係を示す。比較のためC60不溶分(C60(IS))を混入させた場合のセンサチップでの結果も示す。PBS測定の場合、検出電圧はC60(S)のドーピング量に大きく依存し、ノンドープで1300mVであるのが、ドーピング10mgで最大値1800mVを示している。これは感応膜に不溶分が含まれている場合は変化が緩慢になっている。このことからC60(S)をドーピングすると、センサ感応膜の界面で生じる誘電分極が顕著に増加することを示している。

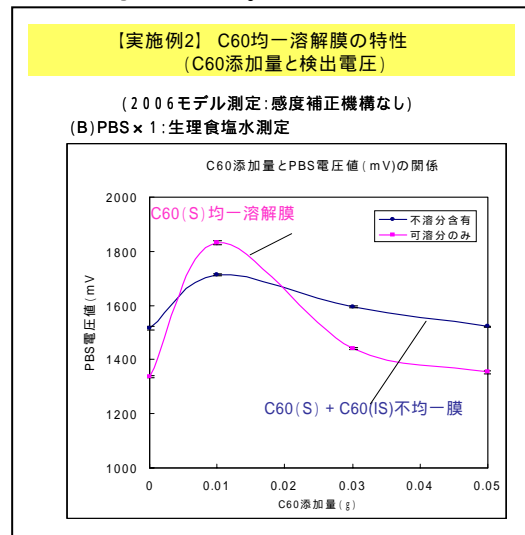


図11 C60(S)ドーピング量と検出電圧の関係 (測定試料：4μl PBS×1)

図12に感応膜の種類を変えたセンサチップを用いて、各ウェルにPBS×0.2, 1, 2.3の濃度になるようにPBS溶液を4μlずつ滴下した場合の、検出電圧とPBS濃度の関係を示す。図左は感応膜がポリイミド系樹脂膜(バインダー)のみ、図中央はC60(S)均一溶解膜、図右はC60(S)+C60(IS)不均一溶解膜を成膜した場合の結果である。図中のプロットは、5センサで得られた検出電圧の平均値であり、プロット上のバーはバラツキの最大値、最小値を示している。また図中には最小二乗による一次近似直線と、R<sup>2</sup>値(相関係数)を示した。グラフはバー表示が小さい程、バラツキが小さいことを示す。また相関係数は理想直線では1.0となるため、R<sup>2</sup>=1.0に近い程、濃度との相関が高いことを示す。



PBS×1の主成分はNaイオンであり約3%含まれる。各々の感応膜での相関係数は、ポリイミド系樹脂膜では0.9959、C60(S)均一溶解膜では0.9960、C60(S)+C60(IS)不均一溶解膜では0.9996であり、理想直線に極めて近い応答を示している。このようにPBS濃度と検出電圧の間には良好な相関が見られ、主成分であるNaイオン量と感応膜の誘電分極量が線形的に応答していることが明らかである。

しかしプロットのバラつきは、大きい方からC60(S)+C60(IS)不均一溶解膜>ポリイミド系樹脂膜>C60(S)均一溶解膜の序列となっている。このことからC60(S)のドーピングは、5センサの検出電圧のバラつきを減少させる効果があることが明らかである。

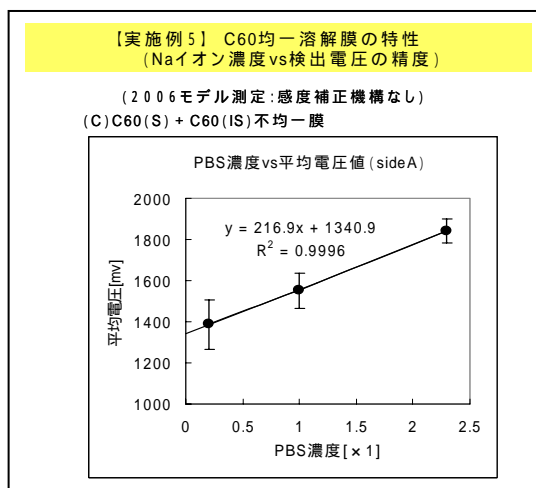
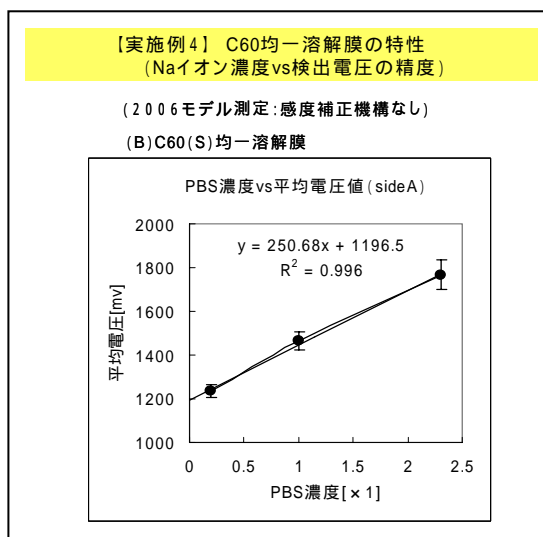
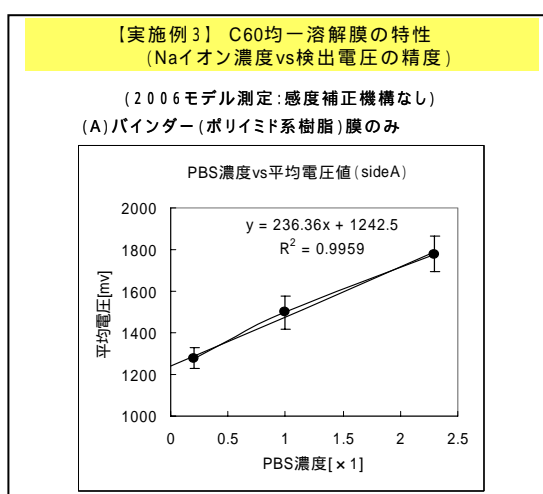


図12 感応膜の違いによるNaイオン応答性への影響

(感応膜:ポリイミド系樹脂膜(バインダー)のみ(実施例3);C60(S)均一溶解膜(実施例4);C60(S)+C60(IS)不均一溶解膜(実施例5),測定試料:PBS×N(N=0.2,1,2.3)各4μl)

#### 4-3 C60(S)成分ドーピングセンサ感応膜のイムノグロブリン抗体検出精度試験

図13にバインダーを感応膜としたセンサチップにイムノグロブリン抗体(IgG)を固相化し、抗原(抗IgG)試料を滴下した場合の、抗原濃度とセンサ相対応答値の関係を示す。バインダー組成は塩化ビニル系樹脂膜に抗体固相化剤を添加した。センサ試験に先立ち、予めFITC標識IgG抗体を用いて、抗体濃度、量、ウェル滴下時間を変えた固相化条件の最適化を行った。その結果、感応膜上への抗体固相化は、100μg/ml IgG溶液5μlを各々のウェルに滴下し5分間放置後、蒸留水で洗浄することで条件を統一した。各ウェルには予めPBS×0.2溶液4μlを滴下し、一定時間後、マウス抗IgG=0.5,1,4,7,10μg/ml溶液(各12μl)を、各々のウェルに滴下した。センサ相対応答値は、最小検出電圧と最大検出電圧の応答幅に対して、抗原滴下後の平衡電圧の比とした。図13の左右のグラフは、同一センサチップの左側5センサ及び右側5センサを測定し、2回の測定から再現性を確かめたものである。バインダーのみを感応膜とした場合、相関係数は同一チップの左側測定で0.1625、右側測定で0.3837であり、抗原濃度とセンサ応答性の相関は低い。また再現性も乏しい。

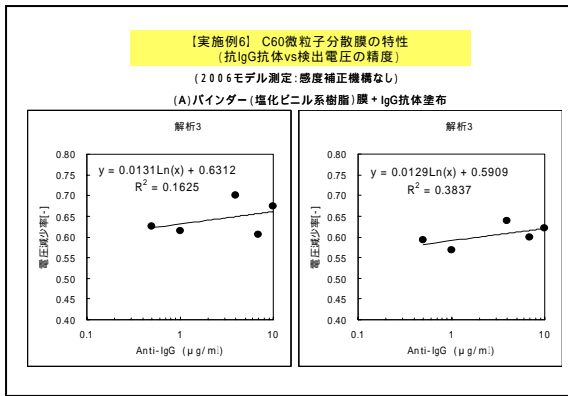


図 13 感応膜の違いによるイムノグロブリン抗体応答性への影響  
(感応膜: 塩化ビニル系樹脂膜(バインダー)のみ; 同一センサチップの左側測定(左図)および右側測定(右図), 固相化物質: マウス IgG, 測定試料: マウス抗 IgG = 0.5, 1, 4, 7, 10 μg/ml) 各 12 μl)

図 14 に、C60(S)微粒子分散膜に IgG を固相化し、抗 IgG 試料を滴下した場合の、抗原濃度とセンサ相対応答値の関係を示す。バインダー組成は図 13 の実施例と同一である。バインダー中に C60(S)が分散している感応膜での抗 IgG 測定では、相関係数は同一チップの左側測定で 0.8846、右側測定で 0.8355 である。バインダーのみを感応膜とした場合と比較して、高い精度が得られている。またチップ左右の側での測定で、再現性が向上している。このことから C60(S)の微粒子融合体のドーピングは、センサ検出のバラつきを低下させ、再現性を高め、抗原濃度測定における濃度と応答値の相関性を向上させる効果があることが明らかとなった。

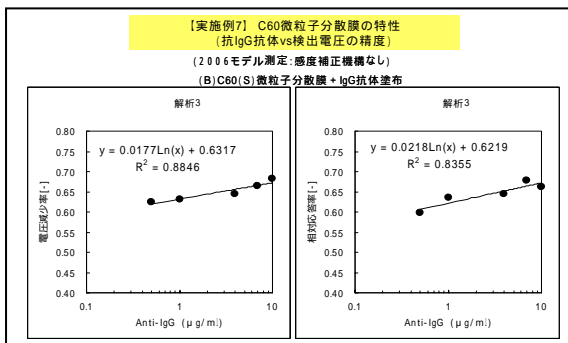


図 14 感応膜の違いによるイムノグロブリン抗体応答性への影響  
(感応膜: C60(S)微粒子分散膜(バインダー組成は図 13 と同一); 同一センサチップの左側測定(左図)および右側測定(右図), 固相化物質: マウス IgG, 測定試料: マウス抗 IgG = 0.5, 1, 4, 7, 10 μg/ml) 各 12 μl)

## 【まとめ】

本研究では、電気回路内に種々のバイオセンサ素子を高密度に配列化するための方法の確立を目指した。第 1 番目に、ガラス基板上に電極センサを構築し、その電極上に薄膜を形成させ、この薄膜表面に細胞由来の生化学物質が固定化できるように化学構造を最適化した。しかし生理食塩中で電極に電流を負荷させると、条件によっては電極や薄膜が崩壊し、信号の検出が難しいことが分かった。そのため第 2 段階の検討事項として、薄膜に添加物を加えることによる信号検出が安定なセンサ電極表面の製造方法を検討した。この調査過程で、特に溶剤に可溶化したフラーレンをドーピングすることが信号安定性に寄与することを見出した。溶液中の Na 濃度と検出電圧の相関性については、理論値に匹敵する線形性が得られた。またこの表面に IgG(イムノグロブリン)抗原を集積させ、IgG 抗体の応答についてセンサ応答性機能を調査したところ、検出精度の向上が見られた。

フラーレンは感応膜に均一に溶解、あるいは微粒子状で分散していることが確認できたことから、センサ基板の各々のセンサ素子(ウェル)上には、均一に感応膜が形成したものと推察される。そのため感応膜界面で生じる誘電分極がどのセンサ素子でも一定値を示すようになり、検出電圧の精度向上に反映したものと考えられる。

このように電気回路中へのバイオセンサ素子の構築には、センサ素子が微小になるほど、感応膜をはじめとする材料の材質や微細構造の均一性が検出精度に影響する点を今後も追求する必要がある。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

【雑誌論文】(計 5 件) 全て査読有

(1) T. Isoda, H. Makimoto, H. Imanaga, R. Imamura, J. Pawlat, T. Ueda., Development of a Source-Drain Electrode coated with an Insulation Layer for Detecting Concentration Changes in a Nitrate Ion Solution, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 123(2007) pp.805-815.

(2) T. Isoda, N. Takahara, H. Imanaga, S. Hashizume, R. Imamura., Optical Sensitivity of a Micro-electrode in Contact with an Electrolyte, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 123(2007) pp.983-992.

(3) T. Isoda, I. Urushibara, M. Sato, H. Uemura, H. Sato, N. Yamauchi, Development of a Sensor-array Chip with Immobilized Antibodies and the Application of a Wireless Antigen- screening System, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 129(2008) pp.958-970.

(4) T. Isoda, I. Urushibara, K. Umino, Y. Ishida, H. Sato, Factors influencing the Capillary Separation of Leukocytes from Whole Blood in a Plastic-based Microfluidic Chip, *Sensors & Actuators: B. Chemical*, 133(2008) pp.213-221.

(5) T. Isoda, T. Tsutsumi, K. Yamazaki, T. Nishihara Measurement of Plaque-forming Macrophages Activated by Lipopolysaccharide in a Micro-channel Chip, *Journal of Periodontal Research*, 44(2009) pp.609 -615.

〔学会発表〕(計 1 件) 招聘講演

磯田隆聡, バイオセンサのチップ化とモバイルセンサネットワーク技術による新しい予防医学の可能性, (財)マイクロマシンセンター 第 19 回先端技術交流会, 2009.10.28.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称: 溶液成分センサとその製造方法

発明者: 磯田隆聡

権利者: 北九州市産業学術推進機構

種類: 特許

番号: 特願 2009-248227

出願年月日: 2009.10 月

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.isodalab.jp>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

磯田隆聡 (Takaaki Isoda)

北九州市立大学国際環境工学部

環境生命工学科 講師

研究者番号: 70284544

(2) 研究分担者: 無

(3) 連携研究者: 無