

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K04539

研究課題名（和文）CMOSインピーダンスセンサーアレイによる単一細胞の非標識非侵襲計測技術の研究

研究課題名（英文）CMOS Impedance Sensor Array for Non-invasive Realtime Single Cell Monitoring

研究代表者

宇野 重康（Shigeyasu, Uno）

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：40420369

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではCMOS集積回路チップ上に高密度でアレイ化された数マイクロメートル程度のサイズの微小電極を用いたインピーダンス計測を可能にし、チップ上に接着した細胞の非侵襲的かつリアルタイムな計測に向けたセンサー技術を研究開発した。一辺4.0マイクロメートルの微小電極を256個アレイ化しデジタル信号によりそのうち一つをランダムアクセスできる集積回路チップを試作してインピーダンス計測を可能にするるとともに、そのチップを細胞培養ディッシュ底面に実装した。また、微小電極による単一細胞インピーダンス計測を再現する数値シミュレーション技術を確立し、それを解析式により表現し等価回路モデルに組み入れた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、今まで殆ど解明されていなかった微小電極による接着細胞のインピーダンス計測に関する理論的知見を明らかにするとともに、それを実現するためのCMOS集積回路チップ上の微小電極作製技術と測定用電子回路技術を発展させたことにある。また社会的意義は、本研究成果を基盤として、単一細胞の電気的特徴量を非侵襲リアルタイムで計測可能とすることにより、様々な細胞生理・薬理に関する新たな知見が期待され、それにより医学・薬学研究に新たなツールを提供できる可能性にある。

研究成果の概要（英文）：The major outcomes of this research are as follows: (a) Realization of CMOS integrated circuit chips with high density arrays of microelectrodes as small as 4.0 μm where single electrode can be random-accessed by digital circuits for impedance-based living cell sensing, (b) Implementation of the CMOS chip in a widely-used cell culture dish for easy and reliable handling, (c) Sophisticated numerical computer simulations of impedance spectroscopy with a microelectrode underneath single adherent cell, and (d) Mathematical model and analytical formula for distributed impedance in the cell-substrate (electrode) gap, as well as incorporation of such analytical formula into equivalent circuit model of the impedance in a wide frequency range.

研究分野：バイオセンシングおよび集積回路

キーワード：インピーダンス 細胞 CMOS 集積回路 電気化学 センサー

1. 研究開始当初の背景

疾病の多くは細胞生理に生じた異変に起因しており、薬剤は細胞膜表面の受容体に働くことで効果を生じる。このため医学・薬学研究では細胞の挙動を何らかの形で計測する必要があり、細胞を非侵襲的かつリアルタイムにモニタリングする技術が重要になる。一般的には蛍光顕微鏡を用いた工学的手法が広く使用されているが、事前の蛍光体による標識が不要である電気化学インピーダンス法に基づくものも広く研究の場で使用されている[1]。これらは主に細胞サイズに比べて大きな数 mm 程度の電極上で多数の細胞を培養し、細胞群からの平均的な特性を取得する。一方、細胞個々の性質を解明する単一細胞計測が可能になれば、この平均値のみでは判らない細胞集団の特性分布や細胞個々の特徴を観測でき、今までにない知見が得られることが期待される。特に受精卵などを取り扱う際は、単一細胞の性質そのものに決定的な重要性がある。哺乳類の細胞は一般的に 10~30 μm 程度の大きさを持つため、単一細胞のインピーダンスを測定するにはそれと同程度かそれ以下の大きさの電極を用いる必要があるが、そのような微小電極の近傍に細胞を正確に配置することは困難である。そもそも微小電極による単一細胞インピーダンス計測については学術的に殆ど明らかになっていない状況であった。

2. 研究の目的

そこで本研究では CMOS 集積回路技術により多数の微小電極を高集積化し、そのチップ上で細胞のインピーダンスを計測する技術の確立を目指した。CMOS 技術を用いれば細胞サイズと同程度かそれ以下の大きさを持つ電極を平面上に高密度で多数配置し、任意の一つを選択して測定を行うことが比較的容易に実現できる。また計測に要する電子回路を必要に応じて同一チップ内に集積すれば、ノイズや寄生効果を低減した計測が可能になる。

このような CMOS センサーチップを用いれば、測定で用いる微小電極近傍に細胞を配置しようと苦心するのではなく、逆に発想を転換して、平面上で自由にランダムに存在する細胞の直下にある電極をひとつ選択して測定を行うことで、容易に単一細胞インピーダンス計測が可能になる。また、細胞に比べて十分小さい電極を高集積化することができれば、単一細胞の各場所でのインピーダンス値をマッピングして 2 次元画像化することができ、いわば「インピーダンス顕微鏡」と呼べる新しい観測手法を提供することにつながる。

3. 研究の方法

以上のような目的に基づき、本研究では次の各項目に沿った研究開発に取り組んだ: (1) CMOS 集積回路チップ上に数 μm 程度の微小電極をアレイ化し微小電極による電気化学インピーダンス測定を可能にする。(2) そのような測定において必要となる各種集積回路を設計試作しセンサーチップ内に集積する。(3) センサーチップを底面に実装した細胞培養ディッシュを開発試作する。(4) 細胞直下の微小電極によるインピーダンス計測値を再現する数値シミュレーション技術を確認する。(5) 数値シミュレーション結果と良く一致し細胞の特徴抽出を可能にする等価回路モデルおよび数理モデル(解析式)を確認する。

4. 研究成果

図 1 は本研究でのセンサーチップを CMOS 集積回路により実現する概略を示したものである。計測対象である細胞は培養ウェル(ディッシュ)と呼ばれる専用の培養容器の中で培養液に浸漬されており、接着性細胞の場合はディッシュ底面で層状に分布しながら細胞分裂を繰り返し増殖する。このディッシュ底面の一部に微小電極をアレイ化したチップを実装するのであるが、CMOS 集積回路は本来そのような用途で開発されたものではないため、標準 CMOS プロセスで製造可能な何らかの構造によりセンサーアレイを実現する必要がある。そこで本研究では、最上層の

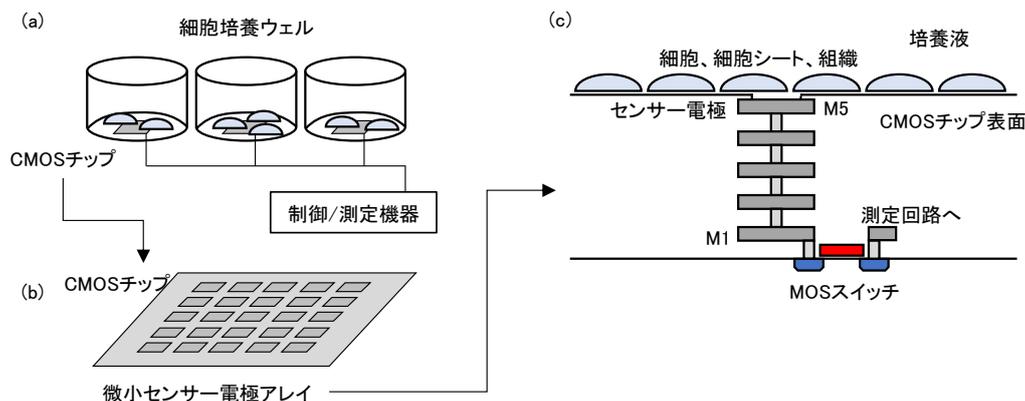


図 1: CMOS インピーダンス計測センサーチップ概念図。 [2]より引用。

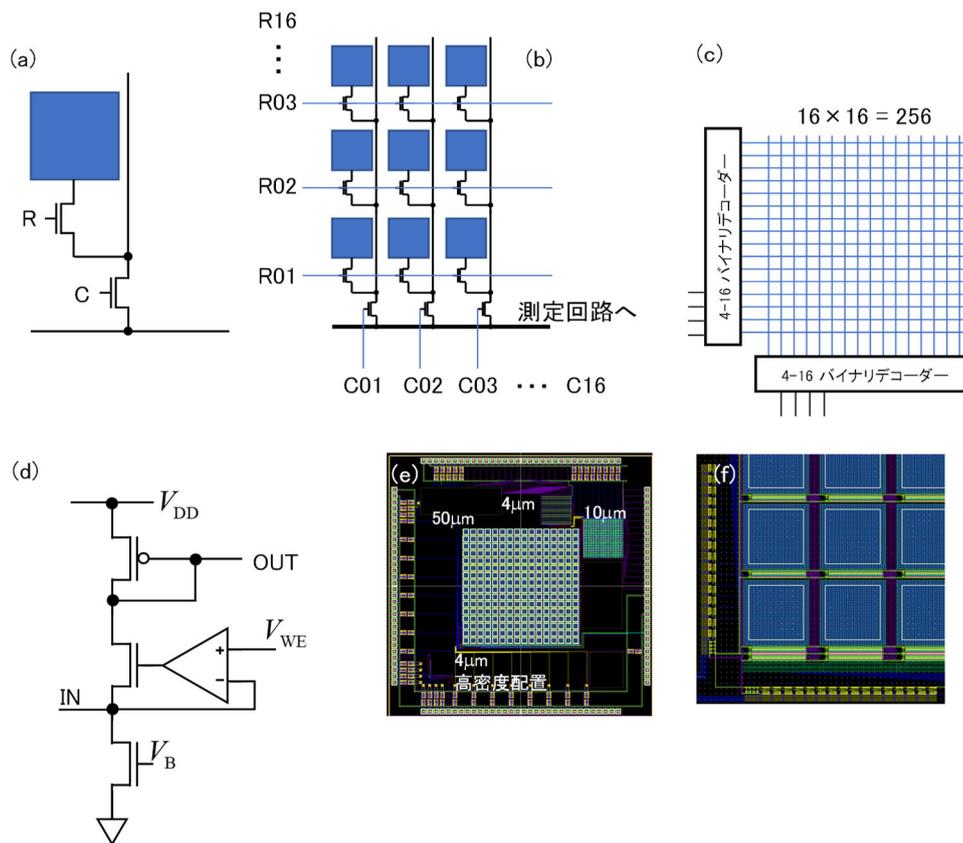


図 2: CMOS 回路概略図と CAD レイアウト画面。(a)-(c)微小電極周辺回路模式図 (d) トランスインピーダンスアンプ回路図 (e)-(f) 設計試作された微小電極アレイ CAD レイアウト図面。[2]より引用。

配線電極を露出させた PAD をセンサー電極として用い、この電極に MOSFET によるスイッチを接続することで電気的に選択・非選択を行えるようにした。

図 2 はより具体的な回路の概略を示しており、電極周辺にはチップ外からのデジタル信号により任意の微小電極を選択するためのデジタル回路が配置されている[2]。具体的には、一辺が $50\ \mu\text{m}$ 、 $10\ \mu\text{m}$ 、 $4.0\ \mu\text{m}$ の正方形の微小電極を PAD として実現し、各サイズの電極が $16 \times 16 = 256$ 個アレイ状に配置されたチップを試作した。インピーダンス計測はチップ外に接続されたインピーダンスアナライザー (Keysight 社製 E4990A) により行い、デジタル信号で 256 個の電極のうち一つのみを電気的に選択すると、その電極によるインピーダンス計測が可能になる。この方法でもある程度の単一細胞の特徴がインピーダンス計測により観測されるが、後述するコンピューターシミュレーションの知見によると、高周波数 (1MHz 以上) での計測が可能になれば、細胞膜の電気容量や細胞内部 (細胞質) の電気伝導度など細胞固有の電気的特徴を観測することが可能になる。しかしながらこのような周波数での現実の測定では、CMOS チップ外のプリント基板 (PCB) や配線において生じる寄生容量の影響により、本来の細胞起因のインピーダンスを計測する事が困難になる。このような状況に備えるため、CMOS チップ内に集積してインピーダンス計測を実行するための各種集積回路の開発と設計も行った。具体的には図 2(d) に示されているトランスインピーダンスアンプや直交検波を行うための差動増幅回路などを試作設計し、その動作を確認した。

図 3 は実際に試作されたチップの写真およびその表面のセンサー電極の顕微鏡像を示している[3]。このような CMOS チップは計測においてチップの各辺に沿って配置されたボンディングパッドからワイヤボンディングによりプリント基板上配線へと接続されるが、本研究ではチップ上に直接溶液が接するため、このボンディングワイヤ類が溶液に接してしまわないよう封止を行う必要がある。図 3(d) では CMOS チップにそのような封止を行ったうえでプリント基板上に直接実装された様子が示されており、デジタル制御信号を発生させる機器 (Arduino Uno) や測定器と接続して計測を行う。このような計測システムを構築することにより、電極アレイの任意の単一電極を用いたインピーダンスの周波数依存性を測定することが可能になり、またそれを 256 個の電極に対して自動的に行うことで図 3(g) に示されたようなインピーダンス値のグレースケールマッピングを構成することが可能になった。ここで示された結果は細胞に対するものではなくシリコン樹脂により電極アレイの一部が覆い隠された様子を示したものであるが、同様の原理により細胞や組織のインピーダンス計測の様子をマッピングして 2 次元画像化することが可能である。

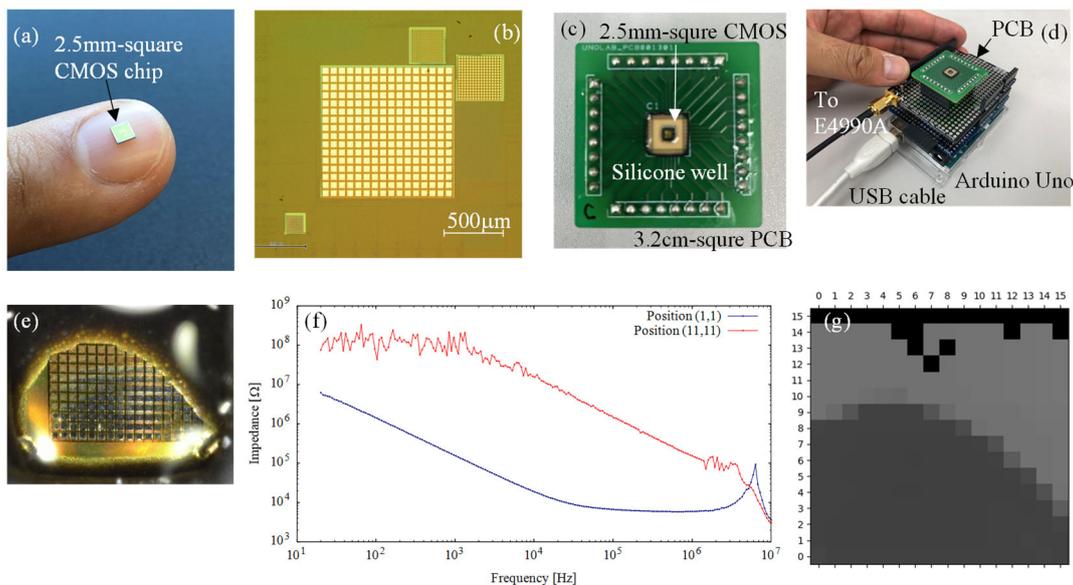


図3: (a)-(b) 実際に試作された CMOS チップ写真 (c)-(d) PCB での実装 (e) 溶液滴下後のセンサーアレイ顕微写真 (f) 選択された単一微小電極による電気化学インピーダンス計測例 (g) 256 個の電極によるインピーダンス測定値のグレースケールマッピング像。[3]より引用。

このような原理実証を経て実際に細胞計測を行うためには、チップ上で細胞培養を行う際に作業員(医学薬学研究者など)が取り扱いやすい形にする必要があり、最終的には生化学実験で広く用いられている細胞培養ディッシュに近い形状をもつ容器の底面にセンサーチップを実装する必要がある。これに向けて図4のような培養ディッシュを開発し試作した。ここでは細胞培養専用のディッシュから底面のみを切り取り、それをセンサーチップが中央に実装されたプリント基板上に設置し、細胞毒性が低いとみられるシリコン樹脂によりプリント基板を被覆した。このようにすることでチップ上に数 10mL 程度の培養液を注入し、CO₂ インキュベーター内で数日間にわたる長期間の細胞培養および計測が可能になる。

以上のような回路設計および実験的な開発と並行し、本研究では理論的側面でも研究を行った[3, 4]。単一の接着性細胞の底面基板上に微小電極があるとき、その微小電極によるインピーダンス特性がどのようになるのか、細胞のどのような特徴が観測可能なのか、ということについては殆ど知られておらず、コンピューターシミュレーションおよび理論による検証を受けるに値する。本研究では有限要素法に基づくマルチフィジクスシミュレーションが可能な商用ソフトウェアを使用し、様々な状況での細胞インピーダンス周波数依存性のコンピューターシミュレーションを行う技術を確認した。その一例として、図5(a)では直径 10 µm の半球状の細胞が基板上に接着しているとき、その直下の電極を用いたインピーダンス値の周波数依存性コンピューターシミュレーションを示している。このようなシミュレーションにより、電極サイズが単一細胞サイズと同程度かそれ以上のときには殆ど観測不可能であった細胞の膜や内部の様子を表す特徴量(細胞膜容量および細胞質電気伝導度)が、電極サイズを細胞より小さくすることにより桁違いで明瞭に計測可能になることが示唆された[3, 5]。これは、CMOS チップ微細化を進めていくことにより細胞インピーダンス計測において明らかな利点が生じることを明確に示しており、今後の研究開発において CMOS のスケールリングによるメリットを見出せることを物語っている。このような微小電極による細胞インピーダンス計測では、細胞基板間に存在する数 10 nm 程度の間隙におけるインピーダンスが特異かつ重要な意味を持ち、電気回路的には分布乗数回路のような特性を示す。ここでの性質を詳細に解析し、理論的にモデル化することができれば、全ての周波数領域において細胞インピーダンス計測の結果を数式により表現し、等価回路モデルと組み合わせることで解析的に表すことができる。このような等価回路モデ

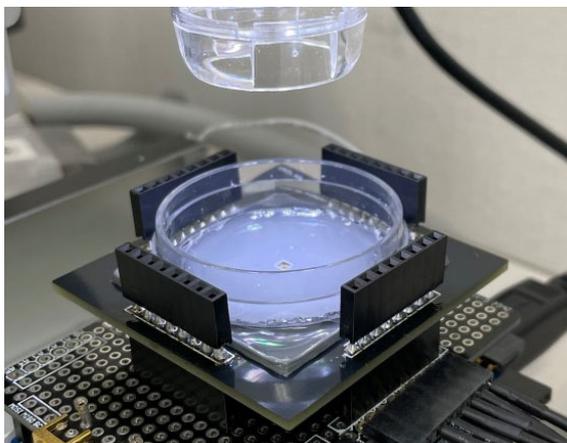


図4: センサーを底面中央に実装した細胞培養ディッシュ

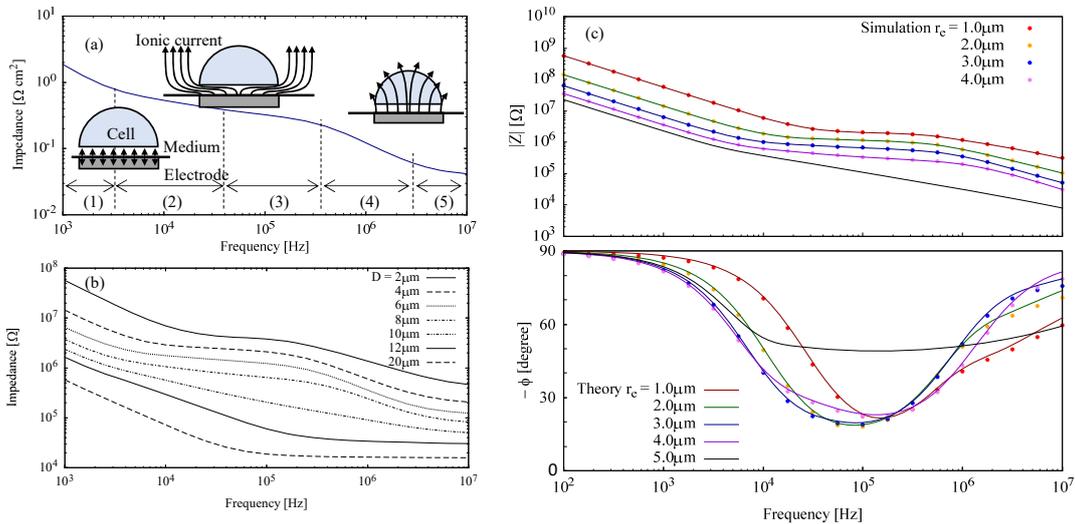


図 5: 細胞直下の微小電極によるインピーダンスの周波数依存性コンピュータシミュレーション。(a) インピーダンスの周波数依存性と角周波数領域で観測される細胞周辺での電流経路 (b) 直径 10 μm 電極の細胞直下にある様々なサイズの微小電極によるインピーダンス周知シミュレーション。[3]より引用。(c) 半径 5.0 μm (直径 10 μm) の細胞直下にある様々な半径(r_c)の微小電極による細胞基板間インピーダンスの周波数依存性を再現する解析式 (実線)と数値シミュレーション(点印)の比較。[4]より引用。

ルおよび解析式モデルは、センサー構造を最適化するうえでの指針を与えるだけでなく、実際に測定されている細胞の電気的特徴量を実測値から逆算することに使用できる。しかしながら、細胞サイズより小さな電極が細胞基板間の領域のインピーダンス計測においてどのような結果をだすのかを理論的に予測する数式は皆無であったため、我々はそのような状況でのインピーダンスを数式により理論的に導出し、図 5(c)に示されているように数値シミュレーション結果を極めて高精度に再現する解析式を世界で初めて構築した[4]。この解析式を等価回路モデルに組み入れることにより、微小電極を用いた単一細胞インピーダンス計測を完全に理論的に記述することが可能になった。

以上のように、本研究では CMOS センサーチップの開発、そこで使用されるアナログ・デジタル集積回路の設計、センサーチップの電気化学的評価とインピーダンスマッピング実証、細胞培養ディッシュ底面への実装、数値シミュレーション技術および数式モデルの確立、といった幅広い方面での研究成果を出すことができた。今後はこのチップの信頼性を高めるとともに、細胞培養とリアルタイム計測に向けた更なる研究開発を要するが、最終的には本研究成果により今まで明らかになっていなかった細胞生理の新しい知見獲得につながることを期待される。

参考文献

- [1] Applied Biophysics, <https://biophysics.com>
- [2] (招待講演) 宇野重康, "CMOS 集積回路チップを基板とした電気化学インピーダンス法による細胞モニタリングセンサー", 2021 年電子情報通信学会総合大会, CI-4. スマートヘルスケアを支える集積回路技術と応用, オンライン(2021 年 3 月 11 日) CI-4-4.
- [3] (Invited) Shigeyasu Uno, "Electrochemical Impedance Sensor for Noninvasive Living Cell Monitoring toward CMOS Cell Culture Monitoring Platform", 4th International Symposium on Devices, Circuits and Systems (ISDCS2021), March 3, 2021, Session 3, no, 1, <https://doi.org/10.1109/ISDCS52006.2021.9397893>
- [4] Masataka Shiozawa, and Shigeyasu Uno, "An Analytical Formula for Determining the Electrical Impedance between a Single Adherent Cell and Sensor Substrate", <http://arxiv.org/abs/2205.15521>
- [5] 「測定方法及び測定装置」特願 2019-214818, 特開 2021-083369

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shigeyasu Uno
2. 発表標題 Electrochemical Impedance Sensor for Non-invasive Living Cell Monitoring toward CMOS Cell Culture Monitoring Platform
3. 学会等名 4th International Symposium on Devices, Circuits and Systems (ISDCS2021), March 3, 2021 (Hiroshima: virtual), Session 3, no. 1. (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇野重康
2. 発表標題 CMOS集積回路チップを基板とした電気化学インピーダンス法による細胞モニタリングセンサー
3. 学会等名 2021年電子情報通信学会総合大会、CI-4. スマートヘルスケアを支える集積回路技術と応用、オンライン(2021年3月11日) CI-4-4. (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masataka Shiozawa and Shigeyasu Uno
2. 発表標題 Electrochemical Impedance Simulation for Single Cell Analysis Using a Microelectrode
3. 学会等名 14th International Conference on Biomedical Electronics and Devices (BIODEVICES2021), February 12, 2021 (Virtual), 21-5A, no.2 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 塩沢昌剛, 宇野重康
2. 発表標題 微小電極を用いた単一細胞インピーダンス解析の等価回路モデル
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会, 10p-S402-6.
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川原綾太郎, 田中伸哉, 宇野重康
2. 発表標題 対面電極を用いた電気化学インピーダンス測定における細胞の面内位置依存性
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会, 18p-E202-7.
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中伸哉, 高野滉己, 川原綾太郎, 宇野重康
2. 発表標題 電気化学インピーダンスシミュレーションによる細胞接着の理論解析
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会, 18p-E202-8.
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 測定方法及び測定装置	発明者 宇野重康	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2019-214818, 特開2021-083369	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------