

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2008 ～ 2012

課題番号：20226009

研究課題名（和文）

バイオCMOSテクノロジーの創成による小型可搬型・遺伝子ベース検査診断システム

研究課題名（英文）

BioCMOS technology and its application to portable biosensor instruments

研究代表者

中里 和郎 (NAKAZATO KAZUO)

名古屋大学・工学研究科・教授

研究者番号：90377804

研究成果の概要（和文）：

検体に特別な処理を施さずに電気的に検出する小型可搬型・遺伝子ベース検査診断システムの実現に向けて、生体分子の新しい電気化学検出法、高精度検出のための新しいアナログ CMOS 集積回路技術、溶液搬送を含む実装技術を開発した。酸化還元電位検出法を用いるにより信号の安定性を2桁向上させ、グルコースおよび DNA 配列の検出に成功した。更に、電位・電流・インピーダンスによるマルチモーダル・センサアレイを開発し、複合検出による高精度化、半導体集積回路チップの汎用化・標準化を図った。

研究成果の概要（英文）：

BioCMOS technology, integration of biomolecules on semiconductor integrated circuit, has been developed, including new electrical detection methods of biomolecules, new design of analog CMOS integrated circuit, and new assembling technology. The target is portable gene-based point-of-care testing (POCT) system. Redox potential detection method has been developed and the signal stability was drastically improved by two orders. Fabricating a redox potential sensor array, accurately determination of glucose levels in human blood and DNA sequencing were demonstrated. A multimodal electrochemical sensor arrays based on the detection of electric potential, current, and impedance, which enables synthetic analysis and makes it possible to standardize biosensor chip, has been developed.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	26,500,000	7,950,000	34,450,000
2009年度	19,400,000	5,820,000	25,220,000
2010年度	14,100,000	4,230,000	18,330,000
2011年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2012年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
総計	75,700,000	22,710,000	98,410,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：電子デバイス・電子機器

キーワード：電子デバイス・集積回路

1. 研究開始当初の背景

ヒトゲノム計画の終了により DNA の塩基配列が解読され、体質の違いや病気が特定の

塩基配列の違いにより引き起こされていることが判明した。この特定の塩基配列を検出することにより、遺伝子ベースの検査診断シ

システムを構築できる。塩基配列の検出法として、蛍光検出型のシステムが用いられているが、検査に蛍光標識の専門技術が求められ、光学装置が大型になる等の問題があった。これらを解決する方法としてトランジスタにより DNA の電荷量を測定する研究が始められたが、電極のみ、あるいは単体トランジスタを用いた研究が主であった。半導体集積回路を用いることにより高精度に瞬時に検査できる小型可搬型のシステムが構築できると予想されたが、半導体チップ表面に溶液や分子等を直接接触させることによる不良、検出信号が不安定で再現性に乏しい、バイオセンサ回路技術が発達していない、等の課題が山積していた。

2. 研究の目的

半導体集積回路とバイオテクノロジーとを融合したバイオ CMOS テクノロジーの基礎を築く。半導体集積回路の医療・健康分野への応用の道を拓くことにより、在宅医療や出先での検診、売り場での遺伝子ベース検査が可能な小型・可搬型装置を実現する。

3. 研究の方法

同時に並行して多数の計測を行うセンサ・アレイ集積チップを実現するためのバイオ CMOS 複合化技術、センサ・インターフェース回路技術、センサ・システム技術、実装技術を研究開発し、バイオ CMOS テクノロジーの基礎を構築する。

半導体集積回路は、実用化の観点から標準 CMOS プロセスを基本とし、バイオ信号の安定な検出を行うバイオ-CMOS 融合化技術の研究を推進する。センサの多機能化と同時並列検出のアレイ化を図る。

4. 研究成果

医療・環境応用では特定の分子があるかないか、あるとすればどの程度の量かを検出することが求められる。BioCMOS センサにおいて、特定の分子の検出は分子機能が担う。分子は特定の分子とのみ反応する特異性がある。検出用の分子を設け、調べたい検体と反応させる。CMOS 集積回路は反応結果を検出回路により電気信号に変換し、情報通信に受け渡す (図 1)。

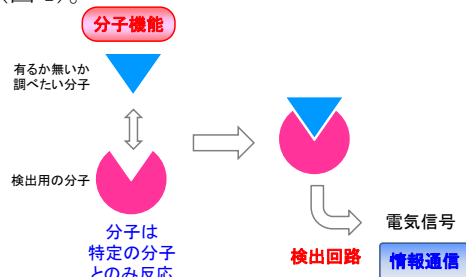


図 1. BioCMOS センサの原理

従来の電氣的バイオセンサはトランジスタのゲート電極を検出用分子に置き代えたバイオトランジスタ方式がとられてきた (図 2)。しかしながらこの方法は半導体基板に直接、検出用分子を固定するため汎用性に乏しく、標準 CMOS 製造ラインが使えない、チップの管理が困難、等の欠点がある。これに対し検出用分子を数 μm のビーズに固定し、反応を標準トランジスタ上に設けた化学反応検出膜で検出する方法を開発した。この方法には次の利点がある。半導体部分を標準 CMOS 製造ラインで製造することができ、チップの標準化が達成できる。ビーズの表面処理により検出用分子の固定が分子個別に最適化される。様々な分子の検出がビーズを交換することにより行え、汎用性が確保できる。更に、洗浄することにより半導体の再利用が可能となる。

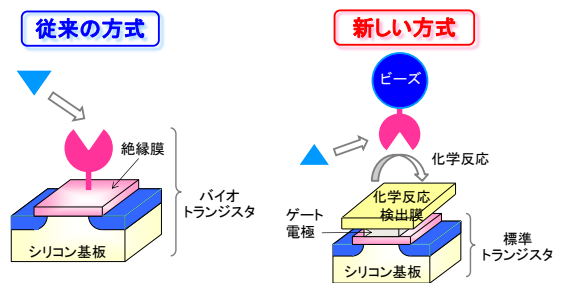


図 2. 反応検出の従来方式と新しい方式

その 1 つの具体例として酸化還元電位検出法を開発した (図 3)。測定対象物質を酵素反応により酸化還元物質に変換し、化学平衡で決まる自然電位を検出する。ビーズに固定する検出用分子が酵素、化学反応検出膜がフェロセン誘導体である。フェロセン誘導体は金電極を稠密かつ安定に被膜し金電極を保護するとともに、フェロセンの電子状態を金電極に伝える。この方法はほとんどの生体分子を検出できる汎用性がある。

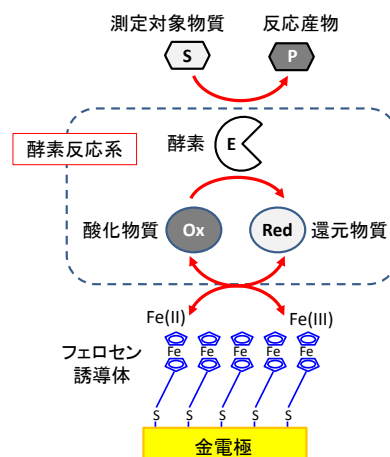


図 3. 酸化還元電位検出法の原理

図4は血糖値を検出した結果である。ヘキソキナーゼ法によりガラクトース・マルトースには応答が無く、グルコースのみ精度0.1mg/dLで検出できた。支持塩濃度に対し0.01mM~100mMの範囲で、pHに対しpH2~10の範囲で、いずれも依存性がみられず、非常に安定した検出が実証された。

この方法により、DNA やペプチドの配列も同定することができる。

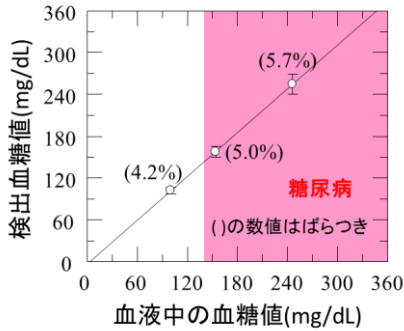


図4. 酸化還元電位検出法を用いたバイオCMOSチップによる血糖値の検出結果。検査医学標準物質機構から購入した血清を使用。

これまで電位検出法について説明してきたが、生体分子の検出には電位検出以外に、電流やインピーダンスを検出する方法があり、検出する対象により適不適がある。また、電位・電流・インピーダンスを同時に検出することにより、精度の向上を図ることができる。本研究で、同時に並行して多数の計測を行うセンサアレイ集積チップを開発した。

①電位検出

電位検出回路として CMOS source-drain follower 回路を提案し、センサアレイを作成した。この回路を用いてプローブ DNA の固定とハイブリダイゼーションの分布を捉えることに成功した。検出電位は電極と分子の界面状態・溶液のイオン分布に依存し、確率的である。DNA ハイブリダイゼーション信号は中央値 12mV、ばらつき(3σ) 10mV の正規分布の他に電極よごれとみられる異常分布からなり、統計的な検出の必要性が示された。

また、多くの生体反応によりプロトンが発生することから、pH 変化の検出は広い応用が期待できる。細菌検査を目的に、乳酸菌の資化反応から生じる酸による pH 変化を観測した。比較実験として、培地(糖類がある溶液)とリン酸緩衝液(糖類がない溶液)の2種類の溶液に乳酸菌を投入し、pH の変化を観測した結果、培地のみ pH 変化を検出した。現在の医療現場における細菌検査は時間を要するので、バイオセンサチップによって短時間で特定できるなら非常に有用なものとなる。

以上は直接電荷を検出する方法であるが、信号の安定性に問題がある。そこで、化学平衡電位を検出する酸化還元電位検出法を検討した。図5は作製した 32x32 センサアレイを示したもので、トランジスタのゲートにフェロセン誘導体 11-FUT (11-Ferrocenyl-1-Undecanethiol) の自己組織化単分子膜を形成し、酸化還元濃度比で6桁の検出が可能であることを示した。

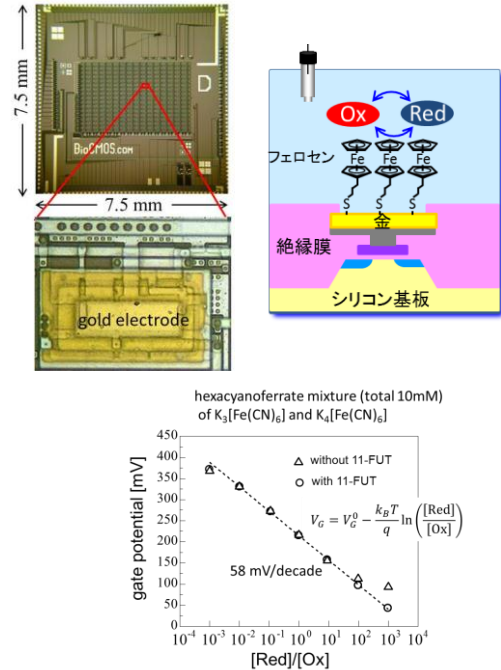


図5. 酸化還元電位センサアレイ

②電流検出

作用電極の周りを補助電極で囲む微小電極アレイを提案した(図6)。

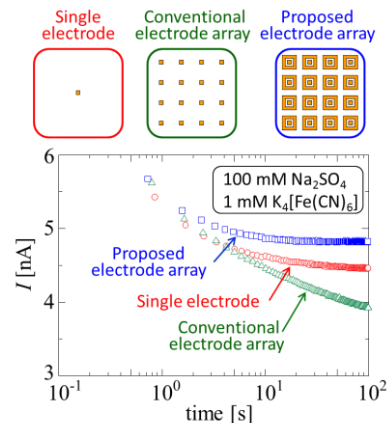


図6. 微小電極アレイによる電流計測結果。

微小電極を単に並べただけでは溶液中で拡散層の干渉が起こり、個別の電流が得られず、また、定常電流が得られない。電極の周辺に補助電極を設けることにより、干渉を除去することができる。また、両電極間でリドック

ス・サイクルが形成され、電流が増幅され定常状態に落ち着く時間も短縮される。更に、常に定常状態を維持する回路方式と電流バッファ回路を新たに考案した。これにより酸化還元電流の2次元分布をリアルタイムで観測することが可能となった。

③インピーダンス検出

インピーダンスは周波数の新たなパラメータにより、電位・電流とは異なる特性を見ることができる。インピーダンス計測では、2つの異なる周波数領域での測定を研究した。1つは低周波(<1 kHz)における電極-溶液界面の電気2重層容量、他の1つは中間周波数(~1MHz)で観測できる電気2重層と直列に入る抵抗成分である。どちらも、分子の結合により、大きな変化が期待できる。低周波領域での電気2重層容量に対し、CBCMをベースに2次元アレイの回路を設計・試作し、DNAの検出を行った。また、基礎的な測定から、DNAハイブリダイゼーションによりDNAの抵抗成分が大きく変化することが示され、中間周波数領域での直列抵抗成分の計測が重要であることが判明し、中間周波数領域でのインピーダンスを計測する回路を新たに考案した。

これらを統合して、図7のように、マルチモーダル・センサアレイを作製した。センサブロックは、電位検出、電流検出、インピーダンス検出、多目的電極の4ユニットから成り、0.24mmピッチで16x16のブロックから構成されている。断面図を図8に示す。標準CMOSプロセス(0.6μm、2-ポリシリコン、3層配線 TSMC アナログ・デジタル混載 CMOS、6インチプロセス)でチップを作製した後、ポストCMOSプロセスとして、金電極(Au 350nm/Cr 50nm)、ポリイミド保護膜(3μm)、SU-8マイクロフルイド(50μm)を形成している。ポリイミドは、最上層配線層の開口部段差が大きく金電極の被覆が不十分となるところを保護する目的を持っている。最上層配線はAlで、Alは電解液との活性が強く少しでも溶液と接すると不良の原因となる。また、SU-8は金電極との密着性が悪く、ポリイミドは中間層の役割もしている。電極にはフェロセン誘導体を設け、閉回路電位と開回路電流およびインピーダンスが計測できる。多目的電極には電位をかけて電気泳道等を行うことができる。

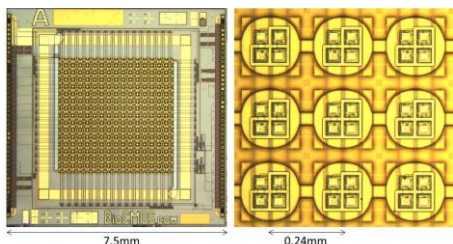
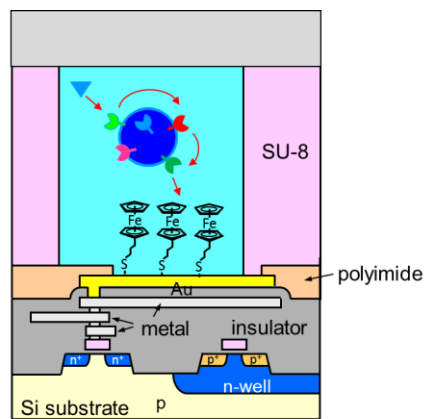


図7.試作したマルチモーダル・センサアレイ



- ▼ target (to be identified)
- ▼ probe (enzyme, antibody, primer, ...)

図8.マルチモーダルセンサの断面構造

バイオCMOSチップを用いてDNAの配列を同定する実験を行った。図9に用いた酵素反応系を示す。DNAの伸長反応に伴って生成されるピロリン酸(PPi)をPPase, GAPDH, Diaphoraseの酵素を用いて、ヘキサシアノ鉄酸塩のイオン濃度比に転写し、酸化還元電位として計測する方法である。この系に対して化学平衡式から酸化還元電位を導出することにより2リン酸濃度[PPi]に対し次式が得られ、実験と良い一致を得た。

$$V = V_0 - \frac{k_B T}{4q} \log_e([PPi])$$

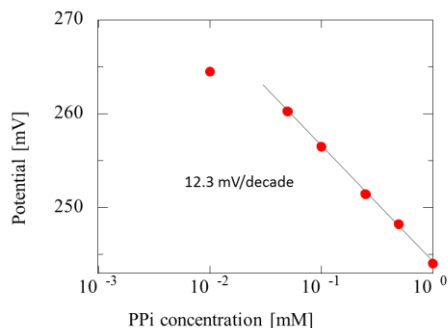
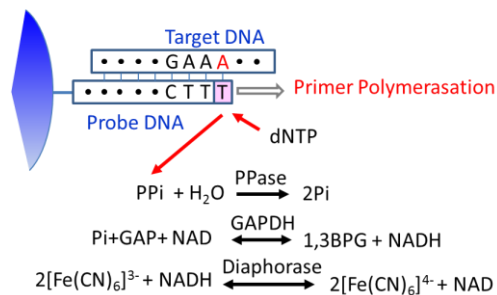


図9. DNA塩基配列を同定する酵素反応

次に示すDNAを使って伸長反応を検出した結果を図10に示す。dTTPのみの投与による

1 塩基伸長反応、dATP、dTTP、dCTP、dGTP を同時に投入した場合の 10 塩基伸長反応の検出に成功した。予想される信号よりも小さい原因は、リン酸の干渉効果にあることが判明し、これを取り除くことにより DNA 塩基配列の高精度検出が可能になる。

プライマー: 3'-CACAC TCACA GTTTT CACTT -5'
 ターゲット: 5'-GTGTG AGTGT CAAA GTGAA ATGAG ATAGC -3'

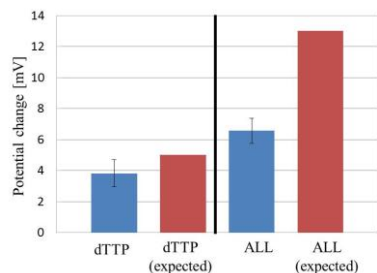


図 10. DNA の 1 塩基伸長反応および 10 塩基伸長反応の検出結果 (青) と予想される検出信号 (茶)

更に、半導体・溶液・分子複合系の 3 次元シミュレーション技術を開発した。溶液中のイオン電荷分布に基づいて半導体界面での電位を計算する方法を開発し、DNA 検出信号に対する支持塩濃度・DNA 密度の最適化が可能になった。また、酸化還元電流を計算する方法を開発し、電極構造の最適化が可能になった。

DNA のハイブリダイゼーションは環境温度の影響を受ける。また、微弱な分子を検出する方法として、分子を増幅しながら検出するリアルタイム PCR 法が有効と考えられる。これを実現するため、チップ上にヒーターと温度計を集積し、溶液を室温から 100°C まで制御することが可能となった。設定温度の 90% に達する時間はおよそ 2 秒であった。

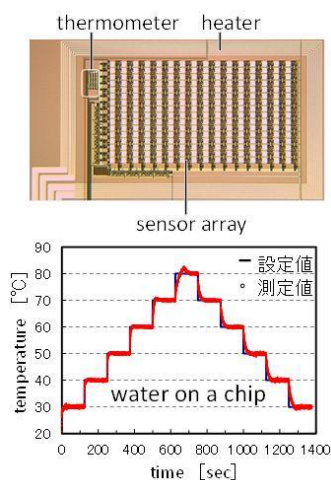


図 11. オンチップ温度制御

チップは電氣的配線部と溶液接触部が混在し、従来の実装技術では不十分なため、パッケージ・IC ソケット・溶液セルを新たに設計した。また、スタンドアローンのデモ機を作製した (図 12)。

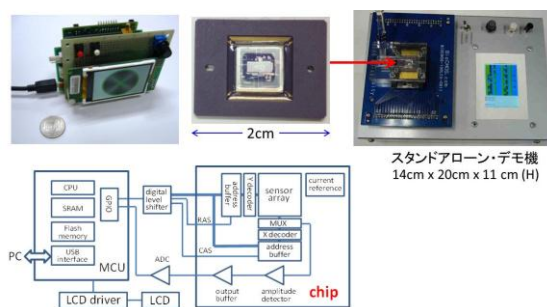


図 12. スタンドアローン・デモ機

現在、このチップを用いて、ペプチドの検出やバクテリアの検出の共同研究が進められている。

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 3 1 件)

1. H. Anan, M. Kamahori, Y. Ishige, and K. Nakazato, Redox-potential sensor array based on extended-gate field-effect transistors with ω -ferrocenylalkanethiol-modified gold electrodes, *Sensors and Actuators B: Chemical* (in press) 査読有, (2012 年 11 月 19 日 WEB 上で出版済 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400512011951>)
2. J. Hasegawa, S. Uno, and K. Nakazato, Amperometric Electrochemical Sensor Array for On-Chip Simultaneous Imaging Circuit and Microelectrode Design Considerations, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **50**, 04DL03, 2011
3. Y. B. Yusof, K. Sugimoto, H. Ozawa, S. Uno, and K. Nakazato, On-chip Microelectrode Capacitance Measurement for Biosensing Applications, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **49**, 01AG05-1-6, 2010
4. S. Uno, M. Iio, H. Ozawa, and K. Nakazato, Full Three-Dimensional Simulation of Ion-Sensitive Field-Effect Transistor Flatband Voltage Shifts Due to DNA Immobilization and Hybridization, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読有, **49**, 01AG07-1-8, 2010
5. K. Nakazato, Integrated ISFET Sensor Array, *Sensors*, **9**, 8831-8851, 2009
6. K. Nakazato, M. Ohura, and S. Uno,

CMOS cascode source-drain follower for monolithically integrated biosensor array, *IEICE Trans. Electron.*, 査読有, **E91-C** (9), 1505-1515, 2008

[学会発表] (計 7 8 件)

1. H. Ishihara, and K. Nakazato, A Study for DNA Polymerization Detection Using FET-Based Redox Potential Sensor with Gold Electrode, 7th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics M&BE7, D-O8, 19 March, 2013, Fukuoka, Japan
2. T. Kuno, and K. Nakazato, Optimization of Microelectrode and Circuits for Amperometric Electrochemical Sensor Array, 7th International Conference on Molecular Electronics and Bioelectronics M&BE7, D-P9, 19 March, 2013, Fukuoka, Japan
3. K. Nakazato, Multimodal Electrochemical Sensor Array for Synthetic Analysis and Standardization of CMOS Biosensor LSI, Ottawa 2012 International Symposium on Biochemistry and Biophysics, 25 Oct. 2012, Ottawa, Canada
4. H. Anan, M. Kamahori, Y. Ishige, and K. Nakazato, Redox Potential Sensor Array by Extended-Gate FET with Ferrocenyl-Alkanethiol modified Gold Electrode, IMCS 2012 - The 14th International Meeting on Chemical Sensors, Nuremberg, Germany, May 20-23, 2012
5. K. Nakazato, BioCMOS LSIs for Portable Gene-Based Diagnostic Inspection System, Proceedings of 2012 IEEE International Symposium on Circuits and Systems, pp. 2287-2290, Seoul, Korea May 20-23, 2012
6. J. Hasegawa, S. Uno, and K. Nakazato, Amperometric Electrochemical Sensor Array for On-Chip Simultaneous Imaging Circuit and Microelectrode Design Considerations, *International Conference on Solid State Devices and Materials*, Tokyo, Japan, Sep. 23, 2010

[図書] (計 6 件)

1. K. Nakazato, Potentiometric, Amperometric, and Impedimetric CMOS Biosensor Array, in State of the Art in Biosensors/Book 1, ISBN 980-953-307-669-5, ed. by T. Rincken, InTech, 2012
2. 宇野重康, 中里和郎, “バイオCMOSテクノロジーによる高感度検出の医療応用”, マイ

クロナノ加工技術によるメディカルエンジニアリング, pp.14-19, 名古屋大学最先端メディカルエンジニアリング編集委員会, ISBN:978-4-86431-159-5, 2013年3月21日

3. 中里和郎, 化学集積素子—化学と半導体の融合デバイス, 未来材料 Vol.12 No.11 pp.22-28, 2012

[産業財産権]

○出願状況 (計 4 件)

名称: 電流検出装置,
発明者: 中里和郎, 長谷川淳一, 宇野重康
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 特願 2010-188538
出願年月日: 2010 年 8 月 25 日
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 2 件)

名称: Material Detector
発明者: K. Nakazato
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: US Patent No. 8, 129, 978
取得年月日: 2012 年 3 月 6 日
国内外の別: 国外

名称: 物質検出装置
発明者: 中里和郎
権利者: 名古屋大学
種類: 特許
番号: 日本国特許第 4883812 号
取得年月日: 2011 年 12 月 16 日
国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ <http://biocmos.com>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 和郎 (NAKAZATO KAZUO)
名古屋大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 90377804

(2) 研究分担者

宇野 重康 (UNO SHIGEYASU)
立命館大学理工学部・准教授
研究者番号: 40420369

小澤 寛晃 (OZAWA HIROAKI)
中央大学理工学部・助教
研究者番号: 50464152
(平成 20 年度まで研究分担者)

(3) 連携研究者 なし