

令和 2 年 6 月 24 日現在

機関番号：12608

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03246

研究課題名(和文) ナノ空間中の電気インピーダンス測定によるウイルスセンシング法の創成

研究課題名(英文) Development of virus sensing method by electrical impedance response in nano-space

研究代表者

山本 貴富喜 (Yamamoto, Takatoki)

東京工業大学・工学院・准教授

研究者番号：20322688

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,800,000円

研究成果の概要(和文)：感染症の早期発見に基づく安全・安寧な社会の実現をめざし、高電界非線形電気インピーダンス法を利用したウイルスの電気的測定法の創成を目的として、ナノポア型とナノ流路型のウイルスセンサーの開発を行った。その結果、定量性には課題が残るものの、インピーダンス測定データをウイルスの電気的等価回路モデルを元に解析することによって、ウイルス種の同定が可能となることを示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の免疫染色やPCR法などに代表されるウイルス検出法は、ヒトを調べる技術であるため感染後で無くては検出することが出来ない。一方、CORVID-19のようなウイルス感染によるパンデミックを防止するためには感染を未然に防ぐ技術も重要であり、すなわちヒトに感染する前の環境中のウイルスを検出するためのセンシング技術が必要になる。本研究は、大気中や水中の様々な環境におけるウイルスをセンシングするための基礎技術に取り組み、将来的には空調機器や携帯デバイスなどに内臓することにより、24時間・365日ウイルスを監視して感染を未然に防ぐ安全で安心な社会の実現を目指すものである。

研究成果の概要(英文)：In order to realize a safe and secure society based on the early detection of infectious diseases, the development of nanopore type and nanochannel type viral sensors was developed using an electrical measurement method of the virus taking the advantage of high electric field nonlinear electrical impedance method. As a consequence, the result which indicated that the identification of the virus species became possible by analyzing the impedance measurement data on the basis of electrical equivalent circuit model of the virus.

研究分野：ナノ流体力学, MicroTAS, BioMEMS, バイオナノテクノロジー

キーワード：ウイルスセンサー バクテリアセンサー 感染予防 電気インピーダンス計測 バイオセンサー 環境
ウイルスセンシング ナノ流路 マイクロ流路

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。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ナノメートルサイズの微小空間(ナノ空間)は静電操作と非常に相性が良い。例えば、電極間隔が 100nm である場合、わずか 0.1V の印加電圧で 1MV/m もの高電界を得る事ができるので、ナノ空間は高電界を活用した静電力や電気測定を実現する最適な場となる。一方、ナノの世界は様々なバイオナノ粒子、生体分子(<10nm)、ウイルス(数 10~数 100nm)、バクテリア(数 100nm~数 μm)と同等のサイズになるため、ナノ流路はバイオナノ粒子を 1 粒子ずつ流しながら逐次処理可能な唯一無二のプラットフォームと言っても過言では無い側面を持つ。

我々は、このような「ナノ+電気」の特徴に着想を得て、バイオナノ粒子を 1 粒子レベルで電氣的に測定する、言わば究極感度のバイオナノ粒子測定法の実現に取り組んでおり、これまでは、その実現に不可欠となるナノ空間の基礎的理解を深めてきた。特に、電極間隔をナノスケールまで短くすると、電極界面の電気二重層が見かけ上消失するナノ空間特有の現象を世界で初めて電気インピーダンス測定により直接計測して実証することに成功し、その特性が表面電荷制限を加えた Debye-Hückel-Onsager 式で説明できることを実証した。さらに、高電界に伴う電気泳動や誘電泳動などの静電力を作用させて立体構造や動きを制御しながら測定して得られる非線形なインピーダンス応答により、DNA の 1 分子計測にも成功した。これを契機に、積極的に測定対象に静電力による外乱を与えることにより測定感度を非線形的に向上させる高電界非線形電気インピーダンス法の確立を目指し、バイオナノ粒子計測を通じて本手法の学理の深化と応用展開を図っている。

2. 研究の目的

ナノ流路を活用した分析は世界的に広まって久しいが、単一バイオナノ粒子の電氣的計測に関する研究は未開と言っても過言ではない。本研究は、数あるバイオナノ粒子の中から、感染症の早期発見に基づく安全・安寧な社会の実現の上で極めて重要であるウイルスやバクテリアに焦点を絞り、高電界非線形電気インピーダンス法を利用したウイルスやバクテリアの電氣的測定法の創成を目的とし、具体的には以下の項目に集中して研究を行った。

項目 1: 単一ウイルス、バクテリアセンシングの実証

高電界中での非線形な電気インピーダンス応答を活用して、ナノ流路を流れるウイルスやバクテリアを単一粒子レベルで測定するセンシング法を実証する。

項目 2: 種類を同定する解析法の開発

項目 1 で得られた測定データを元に、ウイルスやバクテリアの種類を同定する解析法の実現を目指す。一方、インピーダンス応答とウイルスやバクテリアの構成物質や構造との因果関係を明らかにすることで、さらなる高感度・高精度化を図ると共に、インピーダンス応答からウイルスやバクテリアの構造を推定するような構造解析法としての可能性も検討する。

3. 研究の方法

項目 1: 単一ウイルス、バクテリアセンシングの実証

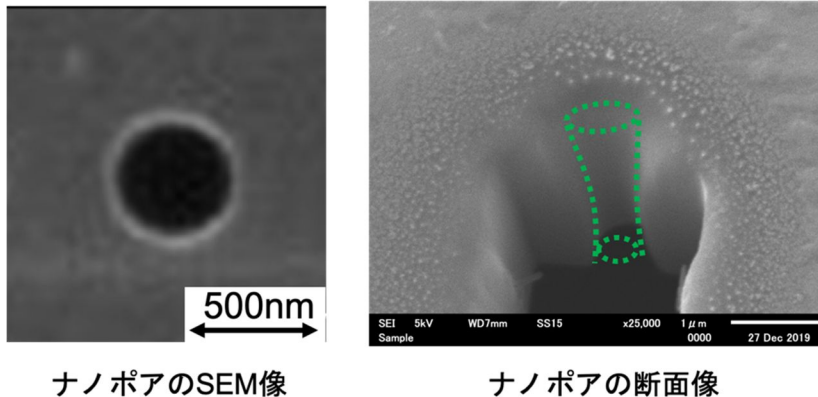
近年、DNA シークエンシングやエクソソームの計測にナノポア型センサーが世界的に普及しつつあることを反映して、当初の計画には無かったものの、我々が研究を進めてきたナノ流路型に加えてナノポア型も検討した。特にナノポア型センサーに関しては、一般的に複雑である微細加工プロセスを見直して、より簡単に作製できる我々独自の作製法の開発も行った。バイオナノ粒子サンプルとしては、当初予定していたウイルスだけでなく、感染症対策の上でウイルスと同様に重要なターゲットであるバクテリアに関してもセンシング対象を拡大することにした。測定方法としては、これらバイオナノ粒子を蛍光色素と蛍光顕微鏡で可視化しながらセンサーに供給し、バイオナノ粒子がセンシング部位を横切際の電気応答を測定し、得られた測定データの解析を行った。なお、ナノポア型センサーは主に直流測定における電流変化値、ナノ流路型は交流測定によるインピーダンス値を評価した。ウイルスサンプルに関しては、申請者のラボに現有的インフルエンザウイルス、タバコモザイクウイルス(TMV)、バキュロウイルス、GA フェージ、Q フェージなどを用い、バクテリアに関しては大腸菌や、市販のヨーグルトから単離培養した乳酸菌やピフィズス菌などを用いた。

項目 2: 種類を同定する解析法の開発

電氣的等価回路モデリング(解析解)および有限要素法(数値解)を利用して得られた解と、インピーダンスの実測値とを比較検討しながら、構造とインピーダンス応答の因果関係の解明に取り組んだ。等価回路モデルでは、ウイルスやバクテリアの大きさ、形、外殻構造(細胞膜や細胞質)などの物質と構造を反映した電氣的等価回路をモデリングし、次にインピーダンススペクトルにフィッティングすることにより等価回路の各素子を数値化して解析した。フィッティングには、これまでの研究で実績のある Complex Nonlinear Least Squares 法を利用した。

4. 研究成果

ナノポア型センサーは、厚さ $4\mu\text{m}$ のガラスフィルムに直径約 $100\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ の孔(ナノポア)を収束イオンビーム(FIB)で穿孔し、別途、超音波ドリルで孔を空けたガラス基板に我々が以前に開発した真空紫外光による表面励起接合を利用して接合することで、ナノポア型のセンサーチップを作製した。作製したナノポアの一例を図1に示す。



ナノポアのSEM像

ナノポアの断面像

図1 作製したナノポア例

本プロセスは、従来の CVD などによる膜付や様々なエッチング法を利用して作製する方法に較べて圧倒的に簡素化・高速化されており、従来は数日以上を要したプロセスを1時間以内に短縮することに成功した。

ナノ流路型ウイルスセンサーに関しては、我々が以前に1分子測定デバイス用に開発した加工プロセスを利用して、測定用のナノ電極を埋め込んだ断面サイズが数 $100\text{nm}\sim 1\mu\text{m}$ のナノ流路を有する測定デバイスを作製した。図2はナノ流路型測定チップの作製例である。

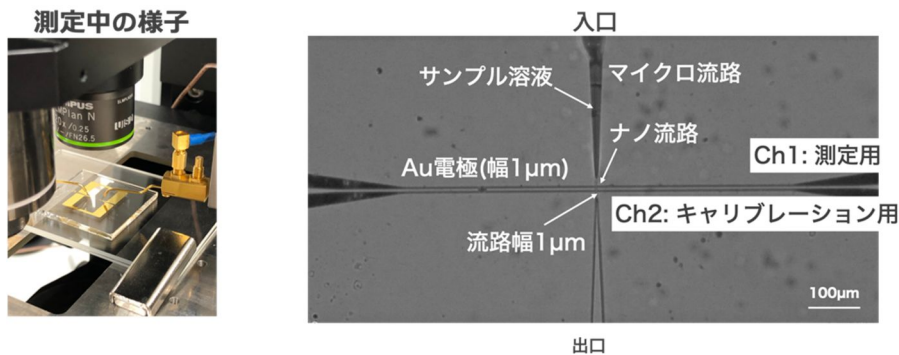


図2 ナノ流路型測定チップ

図3はナノポア型チップを用いた不活化インフルエンザ粒子の測定例である。横軸は時間で、縦軸は電流変化を示している。ウイルスやバクテリアなどは、直流計測では絶縁体と見なせるため、ウイルスがナノポアを通過している間は図中の下方向(電流が流れにくい方向)にスパイクが発生する。この電流スパイクの幅や高さがウイルス粒子の表面電位や大きさと相関があるため、電流スパイクを分析することによりウイルス種の同定ができる可能性がある。以上、作製プロセスは大幅に簡素化しつつも、ここで開発したナノポアチップはウイルスやバクテリアを計測するに十分な感度が得られることが明らかとなった。

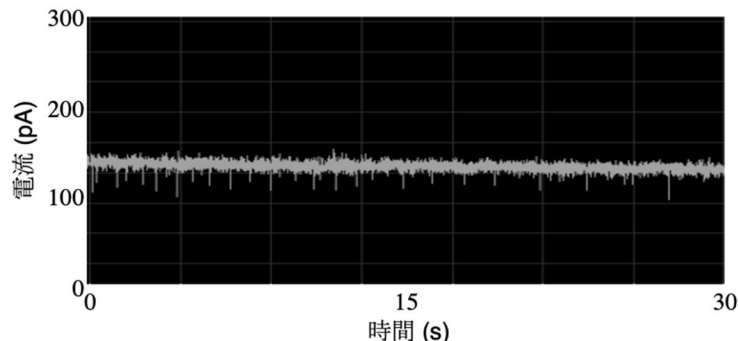


図3 ナノポアで測定したインフルエンザウイルスの電流応答例

図 4 はナノ流路型チップでの測定例であり、測定中にウイルスなどが電極を通過する様子を観察しながら測定できるため、画像情報を元に夾雑物を排除できる点が特徴の 1 つになっている。ここではウイルス内部の核酸(RNA や DNA)とウイルスを取り巻くエンベロープ(脂質)を別の蛍光色素で二重染色することにより夾雑物の影響と極力取り除いて、RNA とエンベロープの両方を有する(すなわちウイルスの可能性が高い)粒子のみを測定データとしている。

図 5 は同デバイスでのインピーダンス測定結果の一例である。各プロット点は実測データ、各曲線は図中に示すウイルスの等価回路モデルを Complex Nonlinear Least Squares 法を用いて実測値から抽出したパラメーターを元にプロットしたものである。実測データ点群と、等価回路モデルのフィッティングカーブが良く一致していることから、等価回路モデルでウイルスの特徴を抽出できていることが明らかである。すなわち、抽出した各パラメーター値(R_s や C_s など)を元に、ウイルスの種類を同定できる可能性が示された。ただし図 5 において、周波数の掃引中はウイルスが電極ギャップに留まっていることが必要で、一方、本デバイスでは流速制御をナノ流路に発生する毛管力に依存しているため細かい位置制御が出来ない。その結果、測定の誤差が大きくなってしまいう傾向があり、図 5 は可読性を上げるためにエラーバーを外した平均値のみをプロットしている。今後は流速を制御するなどして改めて定量的な議論の必要があるものの、インピーダンス測定データを等価回路モデルで解析することによってウイルス種の同定が可能となることを示唆する結果が得られた。

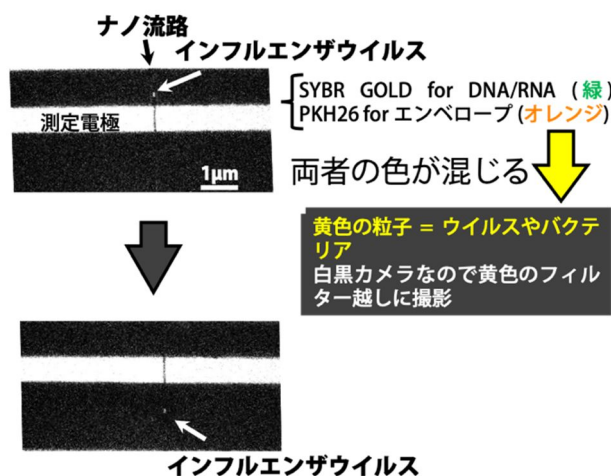


図 4 ナノ流路型センサーでの測定中の様子

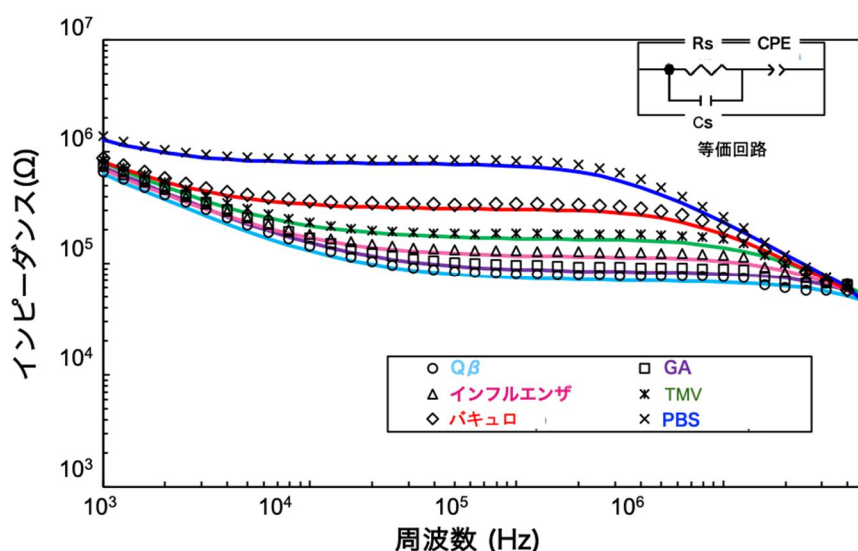


図 5 インピーダンスの測定結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Porpin Pungetmongkol and Takatoki Yamamoto	4. 巻 10
2. 論文標題 Single-Molecule Detection of DNA in a Nanochannel by High-Field Strength-Assisted Electrical Impedance Spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 189-203
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi10030189	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yuki Hashimoto Satoshi Matsuzawa Takatoki Yamamoto	4. 巻 50
2. 論文標題 Subsurface investigation of the surface modification of polydimethylsiloxane by 172 nm vacuum ultraviolet irradiation using ToF SIMS and VUV spectrometry	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Surface and Interface Analysis	6. 最初と最後の頁 752-756
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/sia.6471	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yuki Hashimoto, Takatoki Yamamoto	4. 巻 9
2. 論文標題 Fabrication of an Anti-Reflective and Super-Hydrophobic Structure by Vacuum Ultraviolet Light-Assisted Bonding and Nanoscale Pattern Transfer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Micromachines	6. 最初と最後の頁 186-197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/mi9040186	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 伊藤 健地, 山本 貴富喜
2. 発表標題 ブラウン運動を利用して補足した細菌1細胞の電気インピーダンス計測
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 仲本 平, 山本 貴富喜
2. 発表標題 薄膜ガラスを用いた透明ナノポアチップ作製法の開発
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土井智亮, 山本貴富喜
2. 発表標題 合成樹脂の真空紫外光エッチングにおけるサイドエッチ評価
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木 翔, 山本 貴富喜
2. 発表標題 誘電泳動力を利用した細菌1細胞捕捉デバイスの開発
3. 学会等名 マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Y. Hashimoto, K. Mogi, and T. Yamamoto
2. 発表標題 STUDY ON THE MECHANISM OF DIRECT BONDING OF PLASTICS BY VACUUM ULTRAVIOLET LIGHT LESS 160-NM WAVELENGTH
3. 学会等名 The 21st International Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences (MicroTAS 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Y. Hashimoto, S. Matsuzawa, T. Yamamoto
2. 発表標題 Improvement of transmittance in silicone at vacuum ultraviolet region by irradiation with 172 nm Xe2* lamp
3. 学会等名 The 17th IEEE International Conference on Nanotechnology (IEEE NANO 2017) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 鈴木 翔, 茂木 克雄, 山本 貴富喜
2. 発表標題 電気力学的操作による細菌細胞の単離と破碎の研究
3. 学会等名 日本機械学会第8回マイクロ・ナノ工学シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 橋本 優生, 山本 貴富喜
2. 発表標題 波長160nmの真空紫外光照射による高分子材料の 表面改質と固体間直接接合
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土井 智亮, 橋本 優生, 山本 貴富喜
2. 発表標題 真空紫外光による合成樹脂の微細パターンニング法の研究
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 坂田 健士郎, 楊 路, 山本 貴富喜
2. 発表標題 リキッドゲートサンプリング機構における防汚効果の評価
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 村田 遼介, 山本 貴富喜
2. 発表標題 微細キャピラリーを用いた静電インクジェットによる 大腸菌および乳酸菌の細菌1細胞分離
3. 学会等名 第35回「センサ・マイクロマシンと応用システム」シンポジウム
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔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
---------------------------	-----------------------	----