

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 4 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2016

課題番号：16K13652

研究課題名(和文) 挟込み電極組込み型低アスペクト比ポアを応用した1粒子形状解析法の創成

研究課題名(英文) Electrode-embedded low-aspect-ratio pores for single-particle shape analysis

研究代表者

筒井 真楠 (Tsutsui, Makusu)

大阪大学・産業科学研究所・准教授

研究者番号：50546596

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、低アスペクト比ポアによる粒子形状測定能を検証した。まず、電子線描画法等の微細加工技術を駆使して、窒化シリコンメンブレン中に1個の細孔とサラウンド電極を組み込んだ電極挟込み型ポアを形成した。そして複雑な形状を有する数種の細菌についてポア計測を行った結果、ポアの直径を検出対象の細菌と近い大きさに設計することで、観測されるイオン電流波形には細菌表面の細かな形状が反映されることが分かった。以上の結果より、低アスペクト比ポアが単一粒子の形状測定に応用可能なセンサであることを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：In this research, a capability of low thickness-to-diameter aspect ratio pore sensors for measuring single-particle shape was investigated. For this, a surrounding-gate electrode-embedded pore was fabricated on a silicon wafer using MEMS technologies. The resistive pulse measurements revealed peculiar feature in the ionic spike signal patterns that reflect the morphologies of single-particles translocated through a channel having appropriate size and length, whereby provided a proof-of-concept of single-particle shape analysis using low-aspect-ratio pores.

研究分野：マイクロ・ナノセンサ

キーワード：ナノポア バイオナノテクノロジー センサ

1. 研究開始当初の背景

ナノポア構造を用いたバイオセンシングは、高感度細菌・ウイルス検出や高速 DNA シークエンサーに向けた新しい分析技術として、国内外でその研究開発が精力的に進められている。これまでのナノポアセンサでは、コルターカウンターと同様に、細孔を通るイオン電流を計測し、単一粒子が当該細孔を電気泳動的に通過する際に生じる粒子の大きさを反映したイオン電流変化を計測することで、粒子の体積の違いを識別することができた (Di Ventra et al., Rev. Mod. Phys. 80 (2008) 141)。そして近年では、グラフェンなどの極薄メンブレン材料を応用して細孔の深さを極端に浅く作ることによって、ナノポアセンサの空間分解能を向上させた低アスペクト比ポアが注目されている (Drndic et al., Nat. Nanotechnol. 9 (2014) 743)。しかしその一方で、低アスペクト比構造になると、ポア内部の電気抵抗に比して電極-ポア間の溶液抵抗成分 (アクセス抵抗) が大きくなるため、ポアセンサの空間分解能が著しく劣化するという致命的な問題が指摘されている (Wang et al., RSC Adv. 4 (2014) 7601)。

それに対し、申請者はこれまで液体中における 1 粒子・分子検出に向けた電流計測技術に関する研究を展開し、その中で低アスペクト比ナノポアによる粒子形状解析の可能性を実証してきた。そして電極組込み型ナノポアを作製し、ナノ電極間のイオン電流計測を基盤とする 1 粒子検出法の創成に成功してきた。さらに最近では、イオン電流信号の粒子通過位置依存性など、低アスペクト比ポアセンサにおけるアクセス抵抗に関連する本質的な課題を明らかにした。以上の経緯を通して、イオン電流計測用電極間距離が 50 nm 以下になる挟込み電極組込み型ポア構造を新規に作製・応用することで、アクセス抵抗を低減させた低アスペクト比ポアセンサを創製すると共に、これを用いて 1 粒子形状解析を可能にする超解像度ナノポアセンシング技術が創成できると確信し、本研究計画を構想するに至った。

2. 研究の目的

本研究では、ポアを通るイオン電流計測を基盤とする 1 粒子形状識別法を創成する。そのために、まず挟込み電極組込み型低アスペクト比ポアセンサ構造を開発する。そして微小電流計測系を立ち上げ、これを応用して挟込みナノ電極間のイオン電流計測による標準ポリスチレン微粒子と金ナノロッドの 1 粒子検出を実施する。さらにそこで得られるデータをもとに、理論シミュレーションの観点から微粒子によるイオン電流阻害機構を明らかにすると共に、計算結果をフィードバックすることでイオン電流波形から 1 粒子形状を導出するプロトコルを構築する。そして以上の結果を集約し、挟込み電極間イオン電流計測による細菌形状解析を実証する (図 1)。

3. 研究の方法

はじめに、低アスペクト比ポアの上下にイオン電流計測用ナノ電極を配置した挟込み電極組込み型ポアセンサ構造を、Si 基板上の SiN メンブレン (厚さ 50 nm) 中に作製する。ポアの設計は、申請者が開発した低アスペクト比ポア構造 (ACS Nano 6 (2012) 3499) を採用する。そしてこのナノ構造を用いて、電解質溶液中における組込み電極間の電流-電圧特性を測定し、有限要素解析によるイオン輸送シミュレーション結果 (ACS Nano 5 (2011) 8391) と比較することで、開口状態にあるポアを通るイオン電流におけるアクセス抵抗の寄与を明らかにする。

開発する挟込み電極組込み型ポアセンサと自動制御プログラムを用いて、ナノ電極間イオン電流計測により得られるイオン電流波形のパターン分析による 1 粒子形状解析を実証する。測定対象にはサイズや形状が類似した細菌を用い、イオン電流波形パターン解析を通して 1 細胞レベルでの細菌形状識別を実証する。

4. 研究成果

まずはじめに、電極挟込み型ポア構造の作製及びその動作実証を試みた。ポア径は 1 μ m ~ 3 μ m とし、メンブレン厚さは 50nm とした。作製プロセスは以下のとおりである。まず、窒化膜付き Si ウエハの片面に、フォトリソグラフィ法によりマイクロ電極パターンを描画し、マグネトロンスパッタ法により Cr/Au 層を蒸着後、*N,N*-ジメチルホルムアミド中で超音波洗浄することで、マイクロ電極を形成した。そして今度は裏面から KOH 水溶液を用いたウェットエッチングによりメタルマスクを用いて形成した SiN 窓を用いて Si 層を部分的に除去し、サブミリサイズの SiN メンブレンを作製した。続いて電子線描画法によりポアを描画し、現像後、反応性イオンエッチングにより細孔を貫通させた。残ったレジスト層は *N,N*-ジメチルホルムアミドにより除去した。そして再度、電子線描画によりサラウンドゲート電極パターンを描

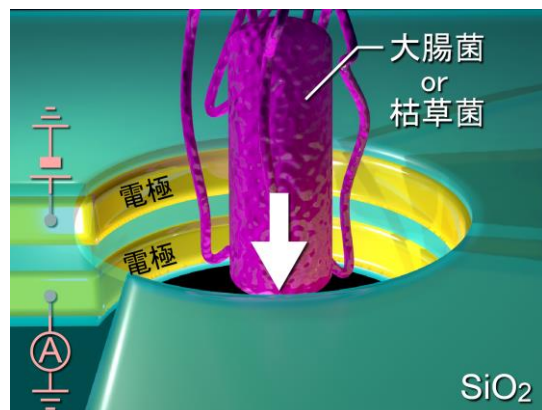


図 1. 挟込み電極組込み型低アスペクト比ポアセンサを用いた細菌形状識別。

画し、現像後、スパッタ法により Pt 薄膜を蒸着した。そして、*N,N*-ジメチルホルムアミド中に基板を 12 時間以上浸した後、メンブレンを壊さないよう、慎重にリフトオフ処理を行った。

イオン電流計測を行う際には、最初にポリジメチルシロキサン (PDMS) で作られた微小流路付きブロックを酸素プラズマ処理後、ポアの上下に貼り付けた。そして、当該ブロックにあらかじめ空けた貫通孔を通して、測定対象とした微粒子を懸濁した PBS バッファを導入し、電極間に直流電圧を印加した状態でポアを通るイオン電流を、高速電流アンプ及びデジタル並びに RAID システムを用いて 1MHz のサンプリングレートで計測・記録した。

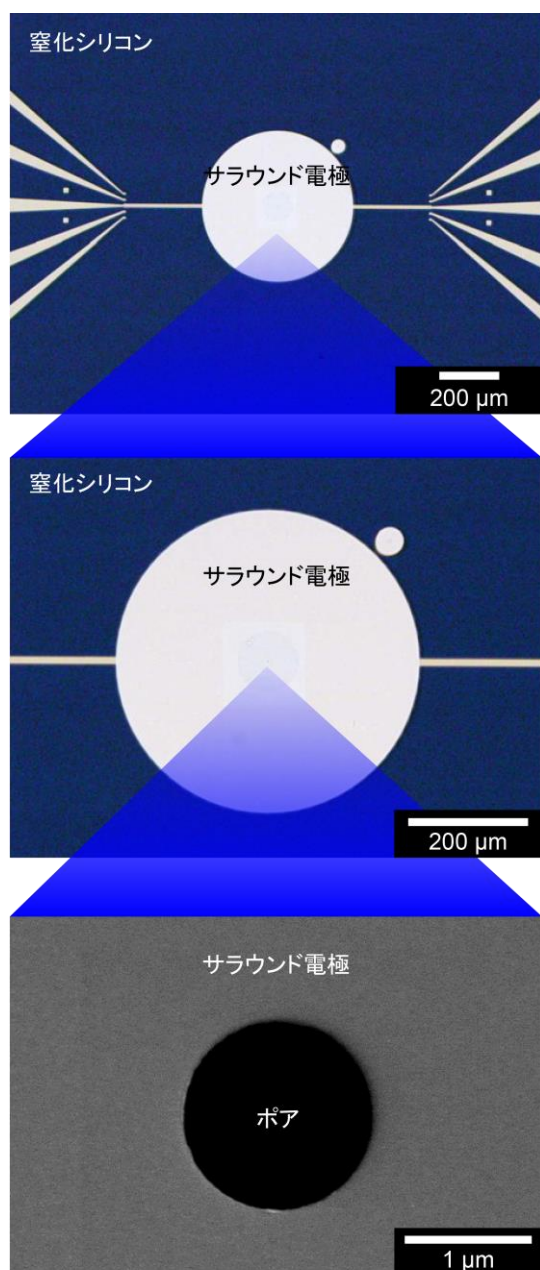


図 2. 挟込み電極組み込み型低アスペクト比ポアセンサの光学(上、中図)及び走査電子顕微鏡像(下).

まず、直径が異なる円形の Pt 電極を直径 $1.2\mu\text{m}$ のポア周囲に作製し、微粒子検出にとって適当な Pt サラウンド電極サイズを調べた。その結果、直径 $100\mu\text{m}$ の電極サイズでは、バッファと接する Pt 表面が十分でなく、観測される電流が Pt 電極/液体界面での電気化学的な反応速度によって律速となることが確認された。そこで、Pt 電極サイズを直径 $500\mu\text{m}$ から $900\mu\text{m}$ まで大きく作ったところ、観測されるイオン電流が電極サイズによらない傾向が観測された。これにより、Pt 電極サイズは $500\mu\text{m}$ サイズ以上のものとする事とした(図 2)。

次に、Pt サラウンド電極を用いたイオン電流計測を実施し、サブマイクロメートルサイズのカルボキシル基修飾ポリスチレン微粒子の検出を試みた。その結果、微粒子が 1 個ポアを通過することを示唆するスパイク状の電流シグナルが観測された。同じデバイスを用いてサラウンド電極を用いない従来の計測法でも微粒子検出を実施したところ、電流波形形状は類似しているものの、波高や波幅が異なるシグナルが得られた。これは、ポアの近傍に電極を設けることで、イオン電流に対するアクセス抵抗の寄与が低減したことを示唆している。

さらに、低アスペクト比ポアを用いたイオン電流計測による細菌検出を行った。測定対象には特徴的な形状を有する数値種類の細菌を選択した。その結果、ポアの直径が細菌と比較して大きい場合には、細菌の細かな形状がイオン電流波形に現れない傾向が確認できた。一方、細菌の大きさに合わせたサイズのポアを用いると、細菌の形状を反映した特徴的な電流波形が観測されるようになった。この結果はイオン電流シミュレーションと良い一致をみるものであった。なお、当該ポアセンサの空間分解能を算出したところ、メンブレン厚さである 50nm 程度であることが分かった。今後、より薄いメンブレンを採用することで、更なるポアセンサの空間分解能の向上が期待できる。

以上のとおり、本研究では低アスペクト比ポアが粒子形状測定に応用可能なセンサデバイスであることを明らかにすることができた。

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 件)

1. Y. Zhang, Y. He, M. Tsutsui, X. S. Miao, and M. Taniguchi, Scientific Reports, Accepted.
2. S. Ryuzaki, M. Tsutsui, Y. He, K. Yokota, A. Arima, T. Morikawa, M. Taniguchi, and T. Kawai, Nanotechnology 28, 155501 (2016).
3. Y. He, M. Tsutsui, R. Scheicher, X. S.

Miao, and M. Taniguchi, ACS Sensors 1, 807-816 (2016).

〔学会発表〕（計 4 件）

1. M. Tsutsui, “Machine learning approach for resistive-pulse analysis in pore sensors. New Quantum Materials and Transport Seminar, National Shiao Tung University, Taiwan (2017 年 3 月 8 日).
2. M. Tsutsui, “Machine learning approach for resistive-pulse analysis in pore sensors. Research Center for Applied Sciences Seminar, Academia Sinica, Taiwan (2017 年 3 月 9 日).
3. M. Tsutsui, “Single-particle analysis using low-aspect-ratio pore sensors”, Analytix 2017, ヒルトン福岡シーホーク, 福岡 (2017 年 3 月 24 日).
4. 筒井真楠, 横田一道, 有馬彰秀, 殿村渉, 谷口正輝, 鷺尾隆, 川合知二, “超低アスペクト比ポアによる細菌形状識別”, 第 77 回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 福岡 (2016 年 9 月 14 日) .

〔図書〕（計 1 件）

1. Y. He, M. Tsutsui, and M. Taniguchi, Nanofluidics: Edition 2, Chapter 6, Royal Chemical Society (2016).

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

筒井 真楠 (TSUTSUI, Makusu)
大阪大学・産業科学研究所・准教授
研究者番号：50546596

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし