

令和元年6月25日現在

機関番号：55401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14281

研究課題名(和文) マイクロ波誘電泳動を用いた腫瘍マーカーの広帯域インピーダンス計測

研究課題名(英文) Development of Dielectrophoretic Impedance Measurement Devices for Biomarker Detection

研究代表者

江口 正徳 (Eguchi, Masanori)

呉工業高等専門学校・電気情報工学分野・准教授

研究者番号：60613594

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)：研究は、バイオマーカー(腫瘍マーカー)とされる生体細胞や生体分子の電気的特性を明らかにすることを目的としたデバイスの開発を行なった。生体細胞測定用デバイスは、平行平板電極とリング共振器で構成されており、細胞固有の誘電特性を共振周波数として測定する手法を考案した。また、生体分子測定デバイスを用いて、DNA懸濁液を注入し、誘電泳動により懸濁液中のDNAを伸張させ、電極間に架橋した。DNAが架橋したデバイスのインピーダンスの周波数特性を測定し、その有効性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイクロ波帯における誘電泳動およびインピーダンス計測は、電極の微細(ナノオーダー)化と電極形状の設計の難しさから、いまだ誰もなし得ていない。本研究では、癌腫瘍マーカーとして注目されている循環腫瘍細胞やDNA等の生体分子の電気的測定を明らかにするための測定手法およびデバイスを開発した。腫瘍マーカーのマイクロ波帯における誘電特性の違いが明らかになれば、この違いに基づいた高感度検出・同定により、癌をはじめとする疾患の早期診断が可能となり、その社会的意義も極めて高い。

研究成果の概要(英文)：We developed dielectrophoretic devices that enable the impedance measurement of biological cells and molecules. The device for the electrical evaluation of biological molecules consists of a microchannel and two aluminum electrodes. Operation of the device was demonstrated using DNA molecules by applying an AC voltage of 20 V peak-to-peak and 1 MHz to the device. The DNA molecules were stretched and immobilized between the electrodes. The electrical properties of the DNA has been determined by measuring impedance changes the electrodes.

研究分野：微細加工技術，電磁気学

キーワード：ナノテクノロジー 誘電泳動 広帯域インピーダンス計測

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

生体細胞や生体分子(タンパク質, DNA等)は, その構造および組成の違いにより, 特有の電気的特性を持つことが知られている. 近年, 電気的特性の違いを利用した誘電分光法(物質が分散した水溶液のインピーダンスの周波数特性を測定)によるタンパク質の同定に関する研究が行われている. 溶液中に分散したタンパク質の緩和周波数(複素誘電率が変化する周波数)は4~8GHzで観測され, タンパク質の分子構造の違いにより, その特性は異なることが報告されている. しかしながら, この手法では, ①溶液中に複数種の物質が存在する場合, それらの平均的な特性を測定する, ②水の分極率にタンパク質の誘電緩和が隠れてしまう, といった問題点から, 特定のタンパク質を高感度に計測することは極めて困難である.

一方, 誘電特性の違いを利用した手法の一つとして, 誘電泳動現象が挙げられ, 生体細胞やタンパク質などの分離・検出に応用されている. この現象は, 不均一電界下に存在する溶液中の物質が, その誘電特性に基づいて移動する現象をいう. 溶液中の物質に生じる誘電泳動力は, 電界強度の2乗の勾配, 物質の直径の3乗に比例するので, 生体分子であるDNAやタンパク質(直径数nm程度)には, 極めて微小な力しか生じない. したがって, 誘電泳動をタンパク質の操作・分離等に応用するためには, 電界強度を大きくする必要があり, 不均一電界を発生する電極間隔を極微細(ナノオーダー)化が必要となる.

### 2. 研究の目的

本研究では, このマイクロ波帯におけるタンパク質の挙動および電気的特性に注目し, マイクロ波誘電泳動もしくはマイクロウェルによる生体細胞・生体組織の選択的集積と, 高周波インピーダンス計測を組み合わせることにより高感度な検出・定量・同定法の開発を行う. つまり, 例えば生体分子であるDNAの場合, 誘電泳動によりナノギャップ電極間に架橋させ, そのインピーダンスを低周波数帯からマイクロ波帯まで広帯域計測を行う. さらに得られた結果をもとに, 電気的特性に基づいたDNAの検出・定量・同定を行う.

### 3. 研究の方法

本研究では, シリコンもしくはガラス基板上にフォトリソグラフィもしくは電子線リソグラフィを用いて, 生体細胞や生体分子等の測定対象の大きさに見合ったインピーダンス測定用電極を試作した. 試作した電極上に, 厚さ100 $\mu\text{m}$ のシリコンゴムをスペーサーとしたチャンバーを配置し, チャンバー内に細胞等を懸濁した液を滴下後, カバーガラスを用いて封入した. 試作した電極には, ファンクションジェネレータにより交流電圧を印加することで, 生体細胞, DNA等を電極間に配置・架橋し, その様子をデジタルマイクロスコープで観察した. また, 各種電気的特性の測定にはインピーダンスアナライザもしくはネットワークアナライザを用いて, 周波数特性を測定した.

### 4. 研究成果

#### (1) 電子線リソグラフィを用いたナノギャップ電極の試作

DNAやタンパク質などの生体分子の電気的特性を測定するために, 電子線リソグラフィを用いて, 下記の手順によりナノギャップ電極を試作した. 試作したナノギャップ電極を図1に示す.

- ① シリコン基板をアセトンとIPAで超音波洗浄(5 min)後, 流水洗浄.
- ② シリコン基板に100 nmの酸化膜を成膜.
- ③ ZEP-520Aをアニソールで希釈した溶液(1:1)を滴下し, スピンコーターで塗布(5000 rpmで60秒間回転)後, 180 $^{\circ}\text{C}$ で5分間加熱した.
- ④ 電子ビーム描画装置(ELS-7500)で電極パターンを描画(加速電圧: 50 kV, ビーム電流: 100 pA, ドーズ量: 300  $\mu\text{C}/\text{cm}^2$ )後, 5 $^{\circ}\text{C}$ のMIBKとIPAを1:1で混合した現像液に30秒間浸し, 流水洗浄.
- ⑤ スパッタ装置でAlを40 nm成膜し, 超音波洗浄機を使用して80 $^{\circ}\text{C}$ のジメチルスルホキシドでリフトオフ.

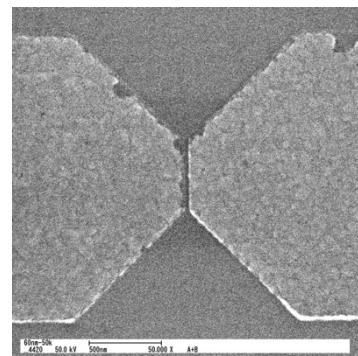
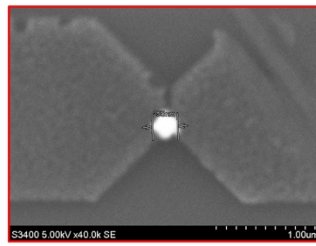
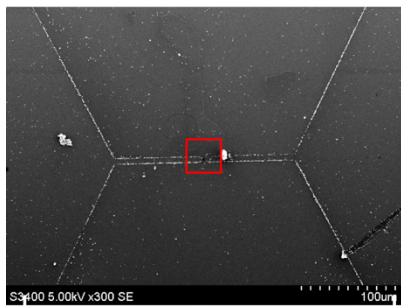


図1. 試作したナノギャップ電極  
電極間隔: 30 nm

試作したナノギャップ電極を用いて, ナノ粒子の電極間集積実験を行った. 対向電極間に交流電圧: 10Vpp, 周波数: 1MHzを印加し, ナノ粒子懸濁液を滴下後, 電子顕微鏡を用いてナノ粒子の集積・架橋の様子を確認した. 架橋の様子を図2に示す. ナノ粒子は不均一交流電界によって正の誘電泳動を示し, 電極エッジに集積していることが確認できた. また, 電極中心においては, 電極間にナノ粒子が架橋された. 次にDNA架橋のための基礎実験として, DNAと同程度の大きさのグラフェンナノリボンを用いて, 架橋実験を行なった. 架橋の様子は, ナノ粒子と同様に, 電子顕微鏡を用いて観察した. 図3に示す通り, グラフェンナノリボンは電極間に架橋していることが確認できた.



電極中心の拡大図

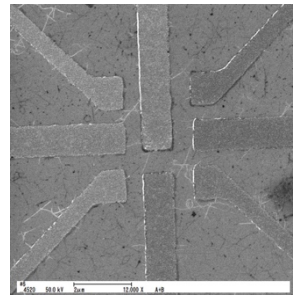
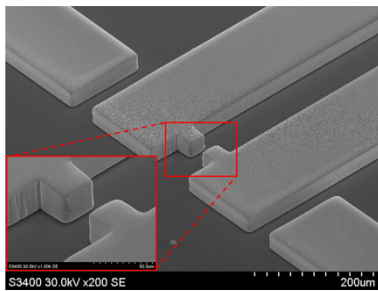


図 2. ナノギャップ電極を用いたナノ粒子(直径:260nm)架橋の様子.  
印加電圧: 10Vpp, 周波数: 1MHz.

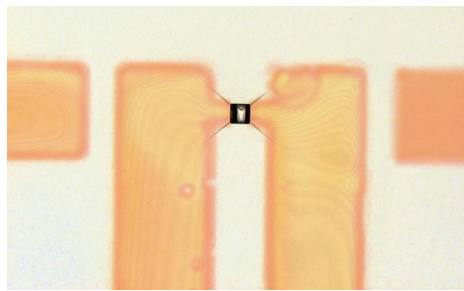
図 3. グラフェン架橋の様子.

(2)細胞の電気特性測定用デバイスの試作

細胞の電気的測定用デバイスとして、細胞固有の誘電特性を共振周波数として測定可能なリング共振器を有する平行平板電極を考案し、電磁界解析ソフトを用いて評価・試作を行なった。試作したリング共振器を有する平行平板電極を図 4 に示す。電磁界解析には、癌細胞の代わりに誘電定数が既知の T リンパ球と B リンパ球を用い、細胞の有無や細胞の種類によって、共振周波数の差異を確認した。しかしながら、細胞や血液による損失が大きいことから共振時の分解能を示す Q 値が小さいという課題が明らかとなった。また、デバイスの有効性を確認するために、細胞の代わりにチタン酸バリウムマイクロ粒子が分散された水溶液を用いた共振周波数測定実験を行なったところ、平行平板電極間のチタン酸バリウム粒子の有無により、共振周波数の差異があったことを確認できた。



(a) 平行平板電極の電子顕微鏡写真

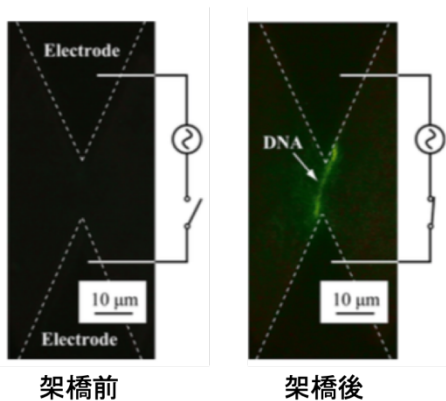


(b) 細胞補足用ウェル(平行平板電極部)

図 4. リング共振器を有する平行平板電極

(3)DNA 架橋およびインピーダンス計測

フォトリソグラフィを用いて、DNA インピーダンス測定デバイスを試作した。試作したデバイスは、ガラス基板上にアルミ薄膜をパターンニングした構造で、PDMS 製のマイクロ流路を用いて、λDNA を分散された溶液を電極部に流入させることが可能である。DNA 流入後、電極間に 20 V<sub>pp</sub>、1 MHz の交流電圧を印加し、誘電泳動現象を用いた DNA の伸張・電極架橋を行なった。DNA 電極架橋の様子を図 5 に示す。DNA を電極間に架橋後、周波数を 100 Hz から 5 MHz までのインピーダンスの Cole-Cole プロットを図 6 に示す。図 6 より、電極架橋前後でインピーダンス特性が変化しており、DNA の電気的特性測定が可能であることを確認した。今後は、さらなるインピーダンスの広帯域計測化を行い、DNA の電気的特性解析を目指す。



架橋前

架橋後

図 5. DNA 電極架橋時の蛍光顕微鏡写真.  
印加電圧: 20Vpp, 周波数: 1 MHz.

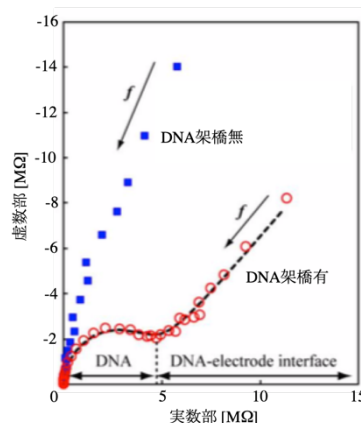


図 6. DNA 電極架橋時の Cole-Cole Plot  
印加電圧: 20Vpp, 周波数: 1 MHz.

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Takahiro Himuro, Shota Tsukamoto and Yoji Saito, “Electrical Evaluation of DNA Stretched and Immobilized Between Triangular-Shaped Electrodes,” Journal of Electronic Materials, Vol. 48, pp. 1562-1567, 2019. 査読有
- ② Faisal Budiman, Takumi Kotooka, Yoichi Horibe, Masanori Eguchi and Hirofumi Tanaka, “Electric property measurement of free-standing SrTiO<sub>3</sub> nanoparticles assembled by dielectrophoresis,” Japanese Journal of Applied Physics, Vol. 57, 06HE07, 2018. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- ① Hadiyawardman, Masanori Eguchi and Hirofumi Tanaka, “Short-term and long-term memory of random aggregation device using Ag-Ag<sub>2</sub>S nanoparticles,” 第66回応用物理学会春季学術講演会, 2019.
- ② Faisal Budiman, Kotooka Takumi, Masanori Eguchi, Yoichi Horibe, Koichi Takase and Hirofumi Tanaka, “Size Dependent Magnetic and Electric Properties of Free-Standing La<sub>2</sub>CuO<sub>4</sub> and SrTiO<sub>3</sub> Nanoparticles Synthesized by Sol-Gel Method,” International Conference on Nanoscience and Technology (ICN+T), 2018.
- ③ Hadiyawardman, Yurina Amamoto, Masanori Eguchi and Hirofumi Tanaka, “Neuromorphic behavior of atomic switching network using Ag-Ag<sub>2</sub>S core-shell nanoparticles,” International Conference on Nanoscience and Technology (ICN+T), 2018.
- ④ Hadiyawardman, Yurina Amamoto, Masanori Eguchi and Hirofumi Tanaka, “Memristive behavior of random aggregation device using Ag-Ag<sub>2</sub>S core-shell nanoparticles,” 第79回応用物理学会秋季学術講演会, 2018.
- ⑤ Hadiyawardman, Masanori Eguchi, W.G. van der Wiel and Hirofumi Tanaka, “Neuromorphic behavior of the aggregation of Ag-Ag<sub>2</sub>S nanoparticles,” ACSIN-14 & ICSPM26, 2018.
- ⑥ Masanori Eguchi, Keiichi Horio, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato and Takeshi Yamakawa, “Development of Pillar Electrode Array for Electrorotation Analysis of Single Cells,” World Automation Congress, 2018.
- ⑦ 氷室 貴大, 塚本 翔太, 齋藤 洋司, “先鋭電極間に伸長固定した DNA の電気的特性評価,” 日本機械学会, 2018.
- ⑧ Masanori Eguchi, Keiichi Horio, Futoshi Kuroki, Hiroko Imasato and Takeshi Yamakawa, “Development of Microwell Array for Dielectric Characterization of Circulating Tumor Cells,” World Automation Congress, 2016.

[図書] (計 0 件)

[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) 研究分担者

研究分担者氏名：氷室 貴大

ローマ字氏名：(HIMURO, Takahiro)

所属研究機関名：成蹊大学

部局名：理工学部

職名：助教

研究者番号 (8 桁)：70803964

### (2) 研究協力者

研究協力者氏名：黒木 太司

ローマ字氏名：(KUROKI, Futoshi)

※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。