

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：82626

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H02587

研究課題名(和文)有機薄膜トランジスタを用いた非標識バイオイメージング技術の開発

研究課題名(英文)Development of label-free bioimaging technology using organic field-effect transistor

研究代表者

堤 潤也 (Jun'ya, Tsutsumi)

国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・研究グループ長

研究者番号：30573141

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：トランジスタチャネルの蓄積電荷密度が生体物質の吸着に対して敏感に変化することを利用し、その変化を、トランジスタチャネルの電荷分布を可視化する独自技術(ゲート変調イメージング)を用いて可視化することで、生体物質の非標識イメージングが可能な新技術を開発した。数nm程度の吸着物をリアルタイムに可視化可能な感度を達成するとともに、抗体等の生体分子間の特異選択的な吸着の様子を捉えることに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

電気二重層を用いた新原理のイメージング技術を確立し、極微量の生体分子間の相互作用を、非標識・リアルタイム・広視野で観測可能な従来にないイメージング性能を達成した。今後、当該技術の優位性を発揮できるアプリケーションとして、生体組織の未知の動態の可視化や、DNAマイクロアレイやプロテインアレイといった高スループットの生体分子間相互作用スクリーニングへの応用研究を継続し、学術・産業応用の双方にインパクトのある成果につなげていく。

研究成果の概要(英文)：We developed a new label-free bioimaging technique using the gate-modulation imaging technique which visualizes spatial charge distribution in a transistor channel. The method utilizes the phenomenon that charge density of electric double layer, formed at the interface between the transistor channel and electrolyte solution, responds sensitively to adsorption of biological material. We achieved high sensitivity for real-time visualization of biomolecular adsorption with the thickness of a few nanometers, affording visualization of specific adsorption of antibodies.

研究分野：有機エレクトロニクス、バイオエレクトロニクス、バイオセンサー

キーワード：有機薄膜トランジスタ バイオイメージング バイオセンサー 非標識 変調分光

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

創薬や再生医療の発展にともない、細胞や生体分子の機能を計測するバイオイメージング技術の重要性が増している。このような中、バイオイメージング技術に求められる要件も格段に厳しくなっており、創薬分野では膨大な数の生体物質をスクリーニングするという事情から多検体を網羅的かつハイスループットに計測できることが求められる一方、再生医療の分野では観察対象となる細胞を人体に移植するという事情から細胞機能を少しでも変性させる可能性のある計測技術は一切 NG となっている。このような厳しい要求に対し、現在最も広く用いられている蛍光標識を用いたバイオイメージング技術は手軽でこそあるものの、蛍光標識によってスループットが低下することや細胞・生体分子を変性させる恐れがあることが大きな問題となっている。このような背景から、標識を必要としない新原理のバイオイメージング技術の開発が現在強く望まれている。一方、バイオイメージングから少し離れたところでは、トランジスタ型のバイオセンサーを用いて人体の生命活動に係る生体物質をモニタリングする試みが近年盛んに行われている。その測定原理は、トランジスタチャネルの蓄積電荷密度が生体物質の吸着に対して敏感に変化することを利用し、その変化をトランジスタ特性の測定により検出するというものである。この方法は、生体物質を標識なしに検出できるという大きな利点を有するが、蛍光標識を用いた光学的観察法のように生体物質の空間分布に関する情報を得ることは従来できなかった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、有機薄膜トランジスタを用いた非標識のバイオイメージング技術を開発することである。先に述べたように、トランジスタチャネルの電荷密度は生体物質の吸着に対して敏感に変化する。電荷密度変化のメカニズムには2通りあり、1つは、生体分子の吸着によりゲート絶縁膜の実効的なキャパシタンスが減少するというもの、もう1つは、正あるいは負に帯電した生体分子が吸着することでゲート電界が変化するというものである。どちらのメカニズムにおいても、生体分子の吸着サイトの電荷密度が局所的に変化し、吸着した生体分子のフットプリントに対応した電荷の空間分布がチャネル内に形成されることになる。このトランジスタチャネルの電荷分布を何らかの方法で可視化して生体分子の非標識イメージングを実現しようというのが、本研究のアイデアである(図1)。このアイデアの肝は、トランジスタチャネルの電荷分布をどうやって可視化するかであるが、この点で申請者は以下に説明する大きな強みをもつ。我々は、本研究開始当初からさかのぼって数年間にわたり、有機薄膜トランジスタのデバイス動作機構を明らかにするオペランド計測技術として、トランジスタチャネルの空間的な電荷分布をイメージングする技術(図2)を独自に開発してきた。この方法では、有機半導体の光透過率・反射率が、電荷蓄積状態と空乏状態で僅かに変化することを

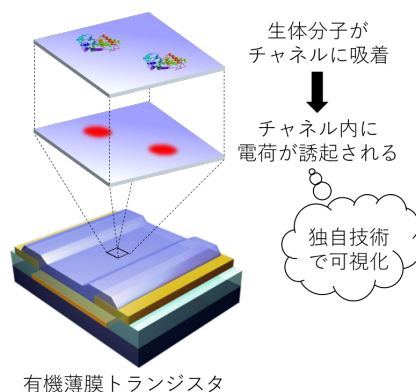


図1. 本研究のコンセプト

を利用し、その変化を CMOS カメラを用いて光学的に撮影することで電荷の空間分布イメージを得る。他手法にない特徴として、プローブ光の回折限界で決まる高い空間分解能(数百 nm)と、最高 50 ns の時間分解能での時間発展イメージングが可能なが挙げられる。これら特徴により、多結晶有機薄膜トランジスタの不均一なチャネル内電荷分布や粒界のミクロな伝導機構を明らかにすることに成功している。本研究では、このユニークな技術を発展させ、非標識のバイオイメージング技術として確立するための研究開発を実施した。

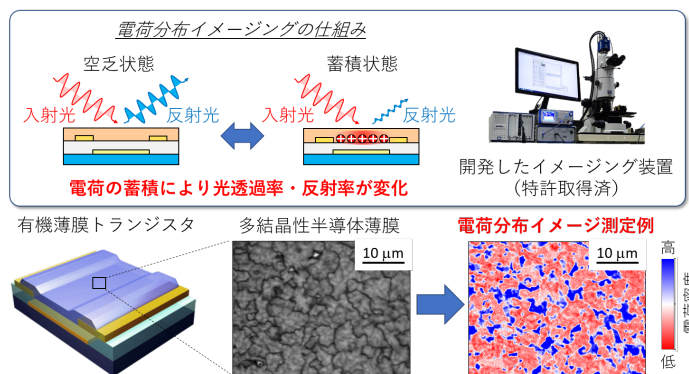


図2. トランジスタチャネルの電荷分布イメージング技術

3. 研究の方法

有機薄膜トランジスタを用いた非標識のバイオイメージング技術の実現に向け、以下の研究を実施した。

(1) 電気二重層トランジスタによる感度向上

本研究のイメージング技術にて生体物質を高感度に可視化するためには、生体物質の吸着によりトランジスタチャネルに誘起される電荷密度変化が当該技術の検出下限 ($1 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$) よりも大きい必要がある。このため、高い蓄積電荷密度が期待できる電気二重層トランジスタを用いて生体物質の吸着による電荷密度変化を1桁以上大きくすることを試みた。具体的には、生体分子を溶解したリン酸緩衝液等のイオンを含む水溶液を有機半導体層上に直接滴下することで、有機半導体-水溶液界面に電気二重層を形成し、これを極薄のゲート絶縁層として用いた(図3)。このようなデバイス構造を用いて本研究のイメージングを行った場合、生体物質が吸着した箇所では電気二重層の形成が阻害され、周囲よりも低い蓄積電荷密度となることで、吸着の判別が可能になると期待される。

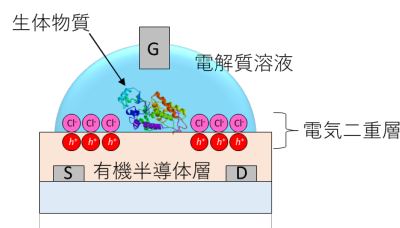


図3. 電気二重層トランジスタ

(2) 非標識バイオイメージングの実証

本研究の非標識バイオイメージングの実証に向け、通常の顕微鏡では不可視の極微量のアルブミンや抗体等の生体分子の可視化に取り組んだ。また、生体物質の機能を損なうことなくイメージングできることを検証するため、抗体の特異吸着の可視化実験を行い、抗体の特異選択性が損なわれていないか検討した。

4. 研究成果

(1) 電気二重層トランジスタによる感度向上

はじめに、電気二重層トランジスタの作製とチャネルの蓄積電荷量の検討を行った。ガラス基板上にソース・ドレイン電極を製膜し、ポリマー半導体の P3HT をスピコートした上に、生体環境に近い電解質水溶液である pH7・100 mM のリン酸緩衝液を数 mL 滴下・保持した。緩衝液中にゲート電極を浸漬して-0.4~0.8 V 程度のゲート電圧を印加してトランジスタ特性を測定したところ、正孔電荷が蓄積されていることを示すトランジスタ特性を確認した。さらに、電荷変調スペクトルの測定を行って、電荷蓄積による半導体の光透過率・反射率変化を調べたところ、厚さ 100nm のシリコン酸化膜をゲート絶縁膜とした場合の数十倍の強度の電荷誘導吸収を観測し、高い蓄積電荷密度が達成できていることが分かった。本研究のイメージング技術にて高い測定感度を達成するため、複数の半導体材料を用いて同様の実験を行い、同一の蓄積電荷密度で比較したところ、P3HT が最も電荷誘導吸収の信号強度が大きく、すなわち高い感度が得られることが分かった。また、水溶液環境という半導体にとってあまり好ましくない状況が、電荷誘導吸収の信号強度に与える影響を検討するため、信号の経時変化を調べたところ、P3HT についてはゲート電圧が-0.45V 以下であれば2日以上信号強度が劣化しないことを明らかにした。上記検討により、電気二重層の蓄積電荷を高感度かつ安定的に可視化できる目処が立ったことから、細胞膜のモデル材料としてアルカン分子のテトラテトラコンタンを測定対象とし、非標識イメージングの実証実験に取り組んだ。P3HT 上にテトラテトラコンタンを数 nm 吸着させたのち、リン酸緩衝液を滴下し、本研究の非標識イメージング技術による可視化を試みたところ、テトラテトラコンタン吸着箇所にて、電気二重層の電荷密度低下に由来するコントラストを得ることに成功した。しかしながら、観測されたコントラストは、テトラテトラコンタンの誘電率と膜厚から想定されるよりもずっと低く、思ったような感度が得られていないことが分かった。考察の結果、半導体分子間の空隙に電解質水溶液中のイオンが侵入し、その結果、電気二重層の厚さが半導体層の厚さ程度の不均一性を有することが原因と分かったため、半導体層の厚さを 3 nm 程度まで極薄化したところ、コントラストの大幅改善に成功した。上記改善後に、テトラテトラコンタンの厚さと積算時間を系統的に変えてイメージングを行ったところ、テトラテトラコンタンの単分子層に相当する厚さ (5.5 nm) 以上では1秒以下の積算時間で可視化可能であり、単分子層以下であっても数秒積算すれば十分なコントラストが得られることを明らかにした(図4)。以上より、極微量の吸着物質を非標識・リアルタイムに可視化可能なイメージング技術の開発を達成した。

アルカン分子吸着膜アレイ
(1つの吸着サイトのサイズは $0.1 \times 0.1 \text{ mm}^2$)

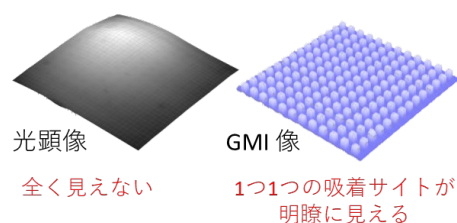


図4. テトラテトラコンタン吸着膜の光顕像と本研究のイメージング像 (GMI 像)

(2) 非標識バイオイメージングの実証

本研究の非標識イメージング技術による生体物質可視化の実証のため、代表的な生体物質としてアルブミンと抗マウス抗体を P3HT 上に微量吸着させ、可視化を試みた。その結果、光学顕微鏡では全く見えないものの、本研究のイメージング技術では明瞭なコントラストを得ることに成功した (図 5)。イメージングの実験終了後、アルブミン吸着試料について原子間力顕微鏡による吸着膜厚の評価を行ったところ、わずか数 nm の厚さであった。次に、抗マウス抗体を逐次滴下しながら、イメージの信号強度をモニタリングすることで、濃度に対する感度の検証を行った (図 6)。イメージング開始後、信号強度のドリフトが観測されたが、30 分程度で落ち着き、それ以上変化しなかったことから、30 分以降に抗マウス抗体の滴下を実施した。その結果、最高で 70 nM の濃度に対する明確なレスポンスを確認することができた。また、信号強度の濃度依存性を調べたところ非線形な相関関係が得られたが、電気二重層のキャパシタンスが吸着物の膜厚の逆数に比例することと、吸着物の膜厚が BET の吸着等温式に従うことを考慮したモデルでフィッティングを行ったところ、非常によく再現することができた (図 6 (b))。最後に、抗体の特異選択的分子認識の可視化の実証実験として、P3HT 上に抗マウス抗体を吸着させたのち、これに特異吸着するマウス抗体を逐次滴下して濃度に対する信号強度の変化を調べた。その結果、抗マウス抗体同士の非特異吸着を調べた結果と比較して、抗マウス抗体-マウス抗体の特異吸着の場合に信号強度の変化が大きく、吸着しやすい傾向が明らかになった (図 6 (c))。以上の実験により、本研究で開発した非標識バイオイメージング技術により生体分子間の特異選択的分子認識機能を損なうことなく可視化できることを実証した。

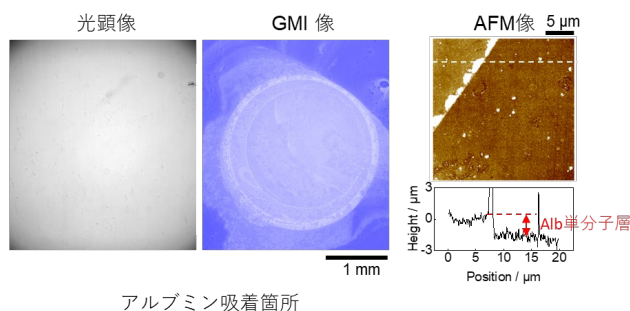


図 5. アルブミン吸着試料の光顕像、本研究のイメージング像 (GMI 像)、ならびに吸着膜の厚さを示す AFM 像

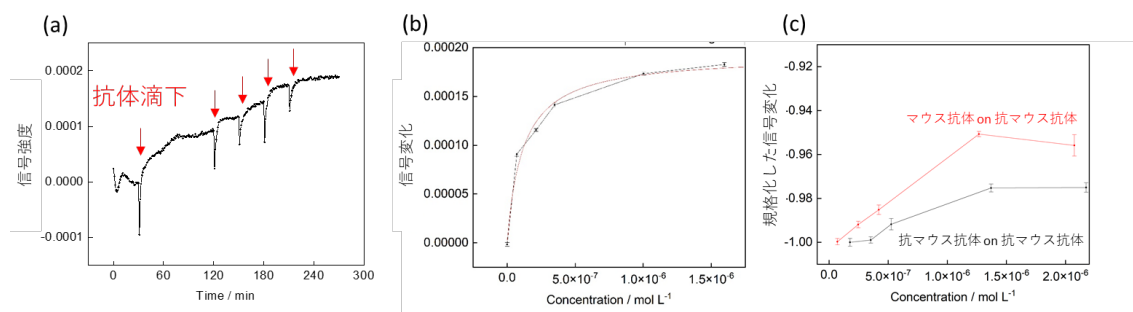


図 6. 抗マウス抗体の逐次滴下による信号の (a) 経時変化と (b) 濃度依存性. (c) 抗マウス抗体の特異吸着と非特異吸着の場合の信号変化の濃度依存性

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6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 Tsutsumi Jun'ya, Turner Anthony P.F., Mak Wing Cheung	4. 巻 177
2. 論文標題 Precise and rapid solvent-assisted geometric protein self-patterning with submicron spatial resolution for scalable fabrication of microelectronic biosensors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biosensors and Bioelectronics	6. 最初と最後の頁 112968 ~ 112968
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.bios.2021.112968	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 Uemura Yohei, Matsuoka Satoshi, Tsutsumi Jun'ya, Horiuchi Sachio, Arai Shunto, Hasegawa Tatsuo	4. 巻 14
2. 論文標題 Birefringent Field-Modulation Imaging of Transparent Ferroelectrics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Physical Review Applied	6. 最初と最後の頁 024060-1 ~ 8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevApplied.14.024060	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 Uemura Y., Arai S., Tsutsumi J., Matsuoka S., Yamada H., Kumai R., Horiuchi S., Sawa A., Hasegawa T.	4. 巻 556
2. 論文標題 Ferroelectrics field modulation imaging: A useful technique for domain and domain-wall observations	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Ferroelectrics	6. 最初と最後の頁 37 ~ 43
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/00150193.2020.1713339	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 S. Arai, K. Morita, J. Tsutsumi, S. Inoue, M. Tanaka, and T. Hasegawa	4. 巻 30
2. 論文標題 Layered Herringbone Polymorphs and Alkyl-Chain Ordering in Molecular Bilayer Organic Semiconductors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Advanced Functional Materials	6. 最初と最後の頁 1906406-1~10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/adfm.201906406	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 Tsutsumi Jun'ya	4. 巻 2
2. 論文標題 High-Throughput Nanoparticle Chemisorption Printing of Chemical Sensors with High-Wiring-Density Electrodes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Electronic Materials	6. 最初と最後の頁 72~81
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/electronicmat2020007	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 -

1. 著者名 Matsuoka Satoshi, Tsutsumi Jun'ya, Hasegawa Tatsuo	4. 巻 16
2. 論文標題 Giant Enhancement of Excitonic Electro-optic Response in Trap-Reduced Organic Transistors	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Physical Review Applied	6. 最初と最後の頁 044043-1-8
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1103/PhysRevApplied.16.044043	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 -

[学会発表] 計21件(うち招待講演 0件/うち国際学会 3件)

1. 発表者名 都築 誠二、小山 奏汰、下位 幸弘、堤 潤也、井上悟、松岡悟志、荒井俊人、長谷川達生
2. 発表標題 交互積層型有機半導体結晶中の分子間相互作用
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 悟志、太向 弘明、堤 潤也、長谷川 達生
2. 発表標題 VUV光照射したCytopゲート絶縁層のエレクトレット効果とTFT特性
3. 学会等名 第68回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 悟志、堤 潤也、長谷川 達生
2. 発表標題 トラップレス単結晶有機FETにおける弱束縛励起子を介したキャリア誘起巨大退色効果
3. 学会等名 日本物理学会2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堤 潤也
2. 発表標題 ゲート変調イメージング法の非染色バイオイメージングへの応用
3. 学会等名 日本物理学会2020年秋季大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 堤 潤也
2. 発表標題 ゲート変調イメージング法を用いた非染色のバイオイメージング
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 松岡 悟志、堤 潤也、長谷川 達生
2. 発表標題 高撥水な界面を用いたトラップレス有機FET におけるキャリア誘起巨大退色効果
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上村洋平、松岡悟志、堤潤也、堀内佐智雄、荒井俊人、長谷川達生
2. 発表標題 複屈折変調イメージングによる透明強誘電体の分極ドメイン観察
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村洋平、荒井俊人、堤潤也、松岡悟志、山田浩之、熊井玲児、堀内佐智雄、澤彰仁、長谷川達生
2. 発表標題 Field Modulation Imaging of Ferroelectric Domains and Domain Walls in Organic Ferroelectric Films
3. 学会等名 2019 IEEE ISAF-ICE-EMF-IWPM-PFM Joint Conference (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村洋平、松岡悟志、堤潤也、堀内佐智雄、荒井俊人、長谷川達生
2. 発表標題 複屈折変調イメージングによる透明強誘電体の分極ドメイン観察
3. 学会等名 日本物理学会2019年秋季大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡悟志、堤潤也、長谷川達生
2. 発表標題 結晶性有機半導体におけるトラップ敏感イメージング
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上村洋平、荒井俊人、堤潤也、松岡悟志、山田浩之、熊井玲児、堀内佐智雄、澤彰仁、長谷川達生
2. 発表標題 Ferroelectric Field-Modulation Imaging for Proton-Transfer-Type Organic Ferroelectric Thin Films
3. 学会等名 2019 MRS FALL MEETING & EXHIBIT (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡悟志、木村智貴、堤潤也、長谷川達生
2. 発表標題 Cytopゲート絶縁層からなる単結晶有機FETの特異なゲート変調信号増幅効果
3. 学会等名 第67回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松岡 悟志, 小川 和馬, 井上 悟, 都築 誠二, 東野 寿樹, 堤 潤也, 荒井 俊人, 長谷川 達生
2. 発表標題 非対称置換BTBT-TCNQ誘導体によるドナーアクセプター型錯体の積層構造と分子間相互作用
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 折尾 響, 佐藤 晴輝, 堤 潤也, 解良 聡, 吉田 弘幸
2. 発表標題 溶液法で作製した高結晶性C8-BTBT薄膜のイオン化エネルギーと電子親和力測定
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 潤也, 須丸 公雄
2. 発表標題 ゲート変調イメージング法を用いた非染色のバイオイメージング
3. 学会等名 第82回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松岡 悟志, 上村 洋平, 堤 潤也, 原田 潤, 荒井 俊人, 長谷川 達生
2. 発表標題 Visualization of ferroelectric domains in molecular ferroelectric films using field modulation imaging technique
3. 学会等名 Materials Research Meeting 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 潤也
2. 発表標題 ゲート変調イメージング法を用いた非染色の生体物質観察技術の開発
3. 学会等名 第15回分子科学討論会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 堤 潤也, 森下 加奈, 内田 欣吾, 須丸 公雄
2. 発表標題 電気二重層変調イメージング法を用いた非染色の細胞状態イメージング
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒須 淳, 金井 要, 堤 潤也
2. 発表標題 電気二重層変調イメージング法を用いた非染色の抗体可視化技術
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 木内 大貴, 臺 知紀, 堤 潤也, 園田 与理子, 金井 要
2. 発表標題 Melem 水和物の単結晶の育成と発光特性の評価
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都築 誠二, 堤 潤也, 井上 悟, 松岡 悟志, 荒井 俊人, 長谷川 達生
2. 発表標題 交互積層型有機半導体結晶中の分子間相互作用: BTBTのアルキル鎖長、TCNQのフッ素置換が与える影響
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 液体中の物質観察方法及びその装置	発明者 堤 潤也	権利者 国立研究開発法人産業技術総合研究所
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-139497	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

産総研・電子光基礎技術研究部門・メソスコピック材料グループ ホームページ
<https://unit.aist.go.jp/riaep/meso-matg/>

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
研究協力者	金井 要 (Kanai Kaname) (10345845)	東京理科大学・理工学部物理学科・教授 (32660)	
研究協力者	黒須 淳 (Kurosu Jun)	東京理科大学・理工学部物理学科・学部生 (32660)	

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
---------	---------