

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 5月31日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2012

課題番号：22360144

研究課題名(和文) シリコン集積センサ構造リポソームインタクト固定化バイオセンサ技術の安定化・高度化

研究課題名(英文) Studies on development and stabilization of intact liposome biosensor technology for Si-integrated structure

研究代表者

野田 実 (NODA MINORU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授

研究者番号：20294168

研究成果の概要(和文)：

シリコン集積バイオセンサの構成要素としてリポソーム微小液滴保持、超分子形状のインタクト固定化、固定化後の各センシング原理の実証を行ってきたリポソームバイオセンサデバイス、同センシング技術の精度・性能を一層向上、安定化するために、新たな技術考案を行い検討した。また新たに電子デバイス工学技術に基づく検知原理によるリポソームバイオセンサ技術(インピーダンスセンサ技術、蛍光アレイデバイス技術・同検出技術)の開発を進めた。その結果、リポソーム液滴保持検出部での定量性を向上でき、漏れ電流センサ、カンチレバー歪みセンサの感度等性能向上、インピーダンスセンサにて100 nLオーダーでのリポソームターゲットタンパク質間相互作用検知、蛍光アレイセンサでのターゲット分子識別に至る蛍光信号検出を実現することができた。

研究成果の概要(英文)：

In order to improve and stabilize the precision and performance of liposome biosensor and its sensing technologies, a series of technical considerations and resultant improvements have been done on the sensor as a key component of near future Si-integrated microsensor system. The technical developments are started from immobilization of minute droplet of liposome suspension and intact supramolecule structure. Moreover, new biosensing systems of liposome impedance biosensor and fluorescence array sensor are developed, based on electronics techniques. Finally, the sensitivities and performance of both leakage current sensor and cantilever strain sensor are improved because a resultant quantitative capability of immobilization of minute liposome droplet on the sensor becomes improved. We also note that the impedance sensor can detect the interaction between the liposome and target protein with a 100 nL order. And that the fluorescence array sensor system can discriminate different target biomolecules.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
2011年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2012年度	2,100,000	630,000	2,730,000
年度			
年度			
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：集積デバイス工学

科研費の分科・細目：電気電子工学・電子デバイス・電子機器

キーワード：(1) マイクロ・ナノデバイス (2) ナノバイオ (3) バイオデバイス (4) リポソーム (5) 固定化

1. 研究開始当初の背景

本研究の直前に助成いただいた課題番号19360162 基盤研究(B)において、(1)リポソームの Si 集積回路デバイス構造へのインタクトな固定化、(2)インタクトに固定化したリポソームを用いた熱量計測バイオセンサ(マイクロカロリメータ)、(3)インタクトに固定化したリポソームを用いた漏れ電流計測バイオセンサ(マイクロアンメータ)、(4)インタクトにリポソームを固定化したカンチレバー型バイオセンサ、の4つのテーマについて当時最終時点にてまだ進展途上ではあるが相応の研究成果を得ることができた。大きくまとめると、シリコン集積デバイス上で用いることが考えられなかったリポソームを同デバイス上で固定化し、同構造の経時的安定性と同本来の特性を確認した後、種々バイオセンサデバイスを具体的に実現し、その特性確認ができた。

2. 研究の目的

上記具体化した複数センサデバイスはまだ進展途上であり、それらを含め、1) 考察、作製、検討したセンシング技術、センサの**精度・性能を一層向上、安定化**させるとともに、リポソーム系バイオ材料を基盤としたタンパク質等重要バイオ分子の検出・動的挙動の評価について、**さらに新しい検知原理**(特に電子デバイス工学観点に基づく)を構築していくこと、そして前科研(課題番号 19360162 基盤(B))で着手が遅れた2) **Si 集積回路構造・回路システムへの新たな観点での展開技術**を考察、研究していくことを目的とした。

3. 研究の方法

本申請研究調書の研究計画に記載した以下の項目について行った。

I. リポソーム固定化バイオセンサの動作・原理本質部の解析

- 1) 漏れ電流センサの動作・原理解析・・・
出力安定性、再現性の向上
①溶液バルク部現象と溶液/電極界面現象の分離、解析
②溶液・液滴供給量、形状の一定・安定化・・・
マイクロ TAS 構造の導入
- 2) カンチレバーセンサの動作・原理解析・・・
出力安定性、再現性の向上
①カンチレバー表面リポソーム液滴形成プロセスの検討
②出力ノイズの低減

II. リポソーム固定化バイオ(高周波:0.1G-数十 GHz 帯)インピーダンスセンサ

- 1) リポソーム固定化材料構造を用いたインピーダンスセンサの構成検討
- 2) 同インピーダンスセンサの設計、作製プロセスの検討

- 3) 同インピーダンスセンサの試作
- 4) 同インピーダンスセンサの評価
- 5) 同インピーダンスセンサ用 Si 信号処理用集積回路の構成検討

III. リポソーム固定化蛍光センサアレイ手法

- 1) リポソーム固定化材料構造を用いた蛍光センサアレイの構成検討
- 2) 同蛍光センサアレイの設計、作製プロセスの検討
- 3) 同蛍光センサアレイの試作
- 4) 同蛍光センサアレイの評価

4. 研究成果

I. リポソーム固定化バイオセンサの動作・原理本質部の解析

- 1) 漏れ電流センサの動作・原理解析・・・
出力安定性、再現性の向上
①溶液バルク部現象と溶液/電極界面現象の分離、解析

リポソーム内に封入する電解質分子・イオンのセンサ電極界面付近での酸化反応が漏れ電流発生メカニズムであることの実験確認を行う必要があり、Cole-Cole plot 測定解析(0.01-10 MHz)を行った結果(図1)、10 MHz に至る高周波領域での半円特性においてリポソームとターゲットタンパク質分子(CAB)との相互作用(おそらく複合体の形成挙動)に伴う変化が検出され、本現象は酸化反応に伴う電子授受の高周波応答が可能な溶液/電極界面反応が支配的であることが分かった。その際の電荷移動抵抗(R_{ct})の初期状態からの変化はタンパク質濃度に依存した。電極接触する溶液の定量制御の重要性が認識され次の②で述べる溶液保持構造、溶液供給制御手法の導入に至った。

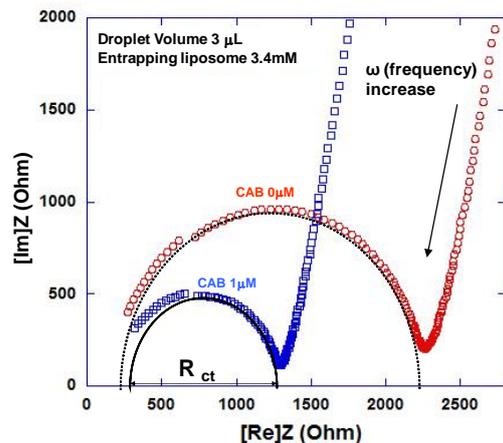


図1 Cole-Cole プロット(ターゲット蛋白質の有無)
②溶液・液滴供給量、形状の一定・安定化・・・
マイクロ TAS 構造の導入

1 μL 前後の定量溶液を形状保持して電極上に接触形成したマイクロ TAS 構造漏れ電

流センサを作製した。これにより多少の供給溶液量変動が生じていても電極付近での安定性は保たれる。液滴保持部への液滴導入は今回科研購入させて頂いた微小液滴生成装置を用いた。本構造で漏れ電流ピーク強度、同電流特性から算出した検出電荷量のターゲット CAB タンパク質分子濃度依存性を図2に示す。低濃度までは原点からほぼリニアな依存性であり中高濃度では傾きが減るが十分なセンサ特性を呈していると考えられる。

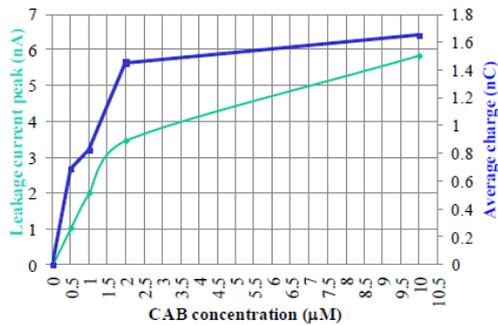


図2 漏れ電流、電荷量のタンパク質分子濃度依存性

③リポソーム溶液・液滴中バイオ化学特性

さらに検出能を向上するために、リポソームセンシング分子として、ターゲットタンパク質との相互作用性を高めるバイオ化学側知見からタンパク質変性剤である GuHCl(塩酸グアジニン)をターゲット溶液滴下時に添加した。その結果タンパク質が native 状態から MG 状態(活性状態)に変化し電流検出能として12.9倍向上できた(図3)。

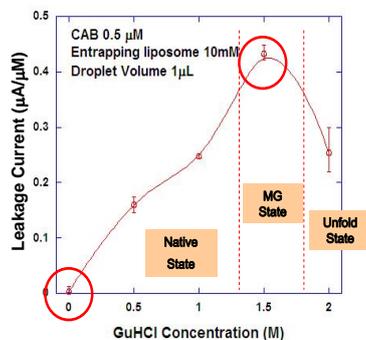


図3 漏れ電流のタンパク質変性剤濃度依存性

2) カンチレバーセンサの動作・原理解析・・・出力安定性、再現性の向上

①カンチレバー表面リポソーム液滴形成プロセスの検討

カンチレバー表面にリポソーム分子をインタクトに(球形閉鎖分子形状を保持して)形成する必要があるが、そのプロセスは前回の科研と同様にリポソーム固定化前に従来からインタクト固定化が確立されている SAM 膜をカンチレバー表面に形成した。今回試作したカンチレバーセンサ構造を図4に示す。後の③で説明の通り、今回は新たにカンチレ

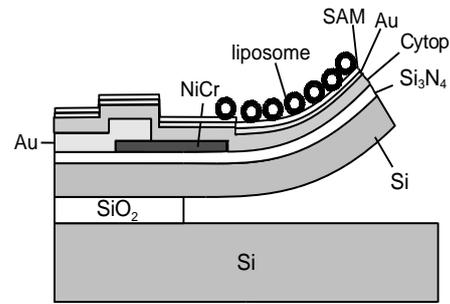


図4 NiCr 薄膜歪ゲージカンチレバーセンサ断面図

バー歪検出抵抗を Ni/Cr 層とした(今回は Si 注入層)ため、Ni/Cr 層より上層の形成プロセス条件を変更したが SAM 層は同様に形成できた。

②溶液・液滴供給量、形状の一定・安定化・・・マイクロ TAS 構造の導入

前述の漏れ電流センサと同じ目的でカンチレバー上に固定化する液滴の定量化、固定化、蒸散防止をマイクロ TAS 液滴保持封止構造の導入で図った(図5)。液滴保持部への液滴導入は今回科研購入させて頂いた微小液滴生成装置を用いた。本構造は後の③の内容と合わせてバイオ相互作用検出時の安定性向上に非常に効果があり、前回の科研で苦しんだ出力ドリフトを大幅に低減できた。

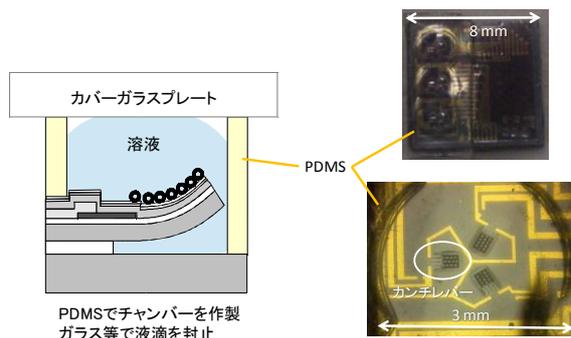


図5 カンチレバーセンサ液滴封止構造

③出力ノイズの低減

本センサの出力はカンチレバー歪変化に伴う抵抗変化であるが、①に記したように歪抵抗材料を以前の Si 注入層から Ni/Cr 金属層に変更することで出力安定性がセンサ単体で2桁程度向上した。その結果数時間にわたる測定安定性が向上しバイオ相互作用に伴う力発生の考察が可能となった。図6にアミロイドベータ(Aβ(1-43))タンパク質添加後の出力の経時特性を示す。溶媒である純水のみでは出力変化はほぼ見られない。Aβ(1-43)添加後はカンチレバーが下に撓む極性出力で単調増加するが次第に飽和する特性が得られている。カンチレバー上リポソームと特に相互作用せず沈降後物理付着しただけの Aβ(1-43)分子の存在が考えられるが、

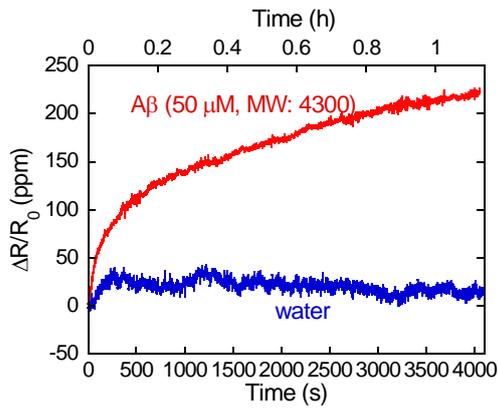


図6 アミロイドベータ(Aβ(1-43))タンパク質添加後のカンチレバー出力の経時特性

その場合はその分子重力による撓みが直線的に増加するだけだが本飽和特性はそうではない。またかつ分子量計算からは単なる分子重力による出力は約 1/3 と小さい。よって本特性はリポソームとターゲット Aβ(1-43)分子の相互作用に基づく反応動特性を示していると考えられる。測定終了後のカンチレバーSEM 写真から Aβ(1-43)の線維伸長現象に対応すると思われる残骸物がリポソーム固定化表面のみに検出されている。

II. リポソーム固定化バイオ(高周波:0.1G-数十GHz帯)インピーダンスセンサ

1) リポソーム固定化材料構造を用いたインピーダンスセンサの構成検討

高周波線路、高周波デバイス構造の一部としてバイオ液滴を形成してその高周波特性の変化内容からリポソームタンパク質等バイオ分子間相互作用を検出するが、導入するバイオ液滴は高周波素子における誘電体の一部と考えられる。そしてその誘電率変化をセンサ出力として検出する。高周波では前述の漏れ電流センサでの酸化反応と異なり、電磁界分布はそれほど極端に電極表面には局在せずバイオ液滴全体にある程度分布すると思われるため、デバイス電極上インタクトリポソーム以外の液滴中リポソームの変化も寄与すると考えている。一方本インピーダンスセンサの電極はAuであり、従来リポソームのインタクト固定性が確認、報告されている。

2) 同インピーダンスセンサの設計、作製プロセスの検討

CPW (CoPlanar Waveguide)線路構造、並びにCPW型インターデジタルキャパシタ(IDC)構造の上部、内部に上記バイオ液滴を形成した高周波センサ回路をマイクロ波シミュレータ、3次元完全電磁界解析を用いて設計した。図7にCPW線路(液滴保持構造は無し)、図8にIDC(液滴保持構造有)を用いた場合のインピーダンスセンサの設計概要(3次元形状)を示す。CPW線路センサではバイオ相互作用による誘電率変化をSパラメータS₂₁の透過損失、位相シフトそのものから、

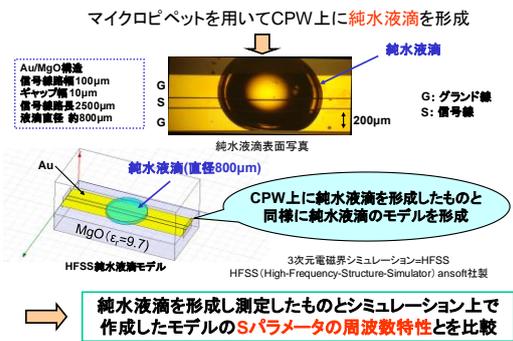


図7 CPW 線路(液滴保持構造は無し)インピーダンスセンサ設計概要

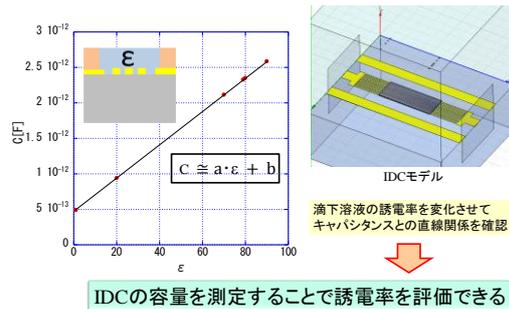


図8 IDC(液滴保持構造有)インピーダンスセンサ設計概要

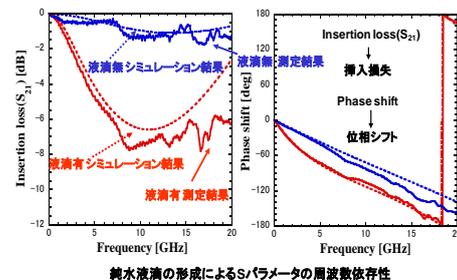
IDCセンサではSパラメータからYパラメータY₂₁= -jωC を導出しCから誘電率変化を導出する。

3) 同インピーダンスセンサの試作

IDCセンサの液滴保持構造はマイクロTASで用いられるSU-8厚膜レジスト、またはPDMS膜を加工形成した。液滴保持部への1 μL前後の液滴導入は今回科研購入させて頂いた微小液滴生成装置を用いた。

4) 同インピーダンスセンサの評価

CPW線路センサ、IDCセンサ双方の評価結果の概要を図9、10、11に各々示す。図9でのCPW線路センサでのシミュレーション結果と測定結果を比較から、定性的に両者は一致しており線路上に形成する液滴(この場合純水)の存在、その誘電率の変化を検出しうる事が分かった。同系にてリポソームコレステロール混合液滴を用いると図中純水での特性から十分な変化が観察され、コレステロール検出として確認された。図10はIDC



Sパラメータの周波数特性がほぼ一致同様の特性が得られた

図9 CPW 線路(液滴保持構造は無し)インピーダンスセンサの評価結果

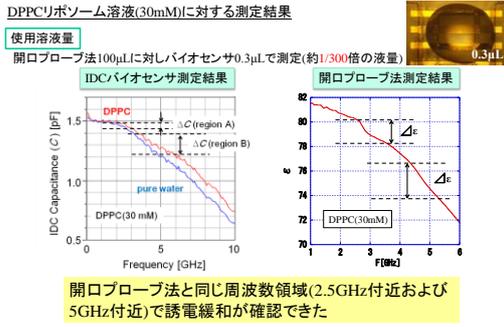


図 1 0 IDC(液滴保持構造有)インピーダンスセンサの評価結果

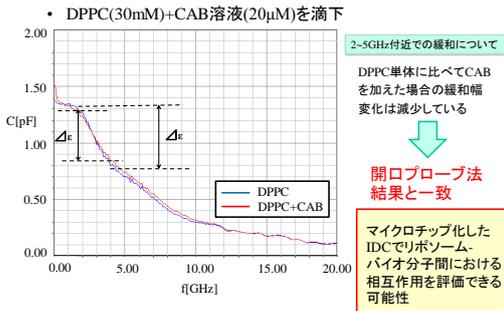


図 1 1 IDC(液滴保持構造有)インピーダンスセンサの評価結果

センサでの純水とDPPCリポソームでの誘電分散測定特性を比較しており、DPPCリポソームについて従来法である開口プローブ法での測定結果とほぼ同様の結果が得られている。その測定体積比較から感度は300倍向上していると言える。図 1 1 は IDCセンサにてリポソームとCABの相互作用に伴う誘電緩和幅変化を示す。ノイズが見えるが誘電緩和幅変化は開口プローブ法と同様の結果となっており、本センサの使用可能性が示唆された。

III. リポソーム固定化蛍光センサアレイ手法

1) リポソーム固定化材料構造を用いた蛍光センサアレイの構成検討

従来の本研究者らの状況から、マイクロTASプロセスを用いて将来的にアレイ数を十分増大可能で、リポソームのインタクト固定性も考慮した蛍光センサアレイの作製検討を行った。また効率的な統計的解析のためにもある程度のアレイ規模が必要であるが、その場合蛍光測定システムもそれに応じた開発が必要と考えられたため、本研究開始当初の状況に応じた測定システム検討を行い、独自の蛍光測定システムを構成した。

2) 同蛍光センサアレイの設計、作製プロセスの検討、試作

本研究では未知のターゲットバイオ分子の識別センシングを目標としたが、本手法での既存データライブラリはまだないので、使用リポソーム用脂質膜種は比較的特性の異なる3種類DPPC, DSPC, POPCにとどめた。各相転移温度が異なるため室温時における膜の硬さが異なり相互作用時のパラメータとなると考えた。アレイではx方向には上記リポソーム用脂質膜種を変化させ、y方向にはター

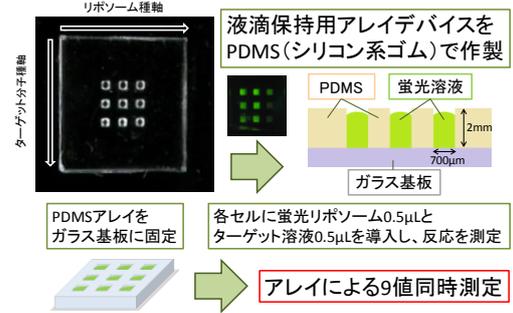


図 1 2 蛍光アレイセンサの設計、構造

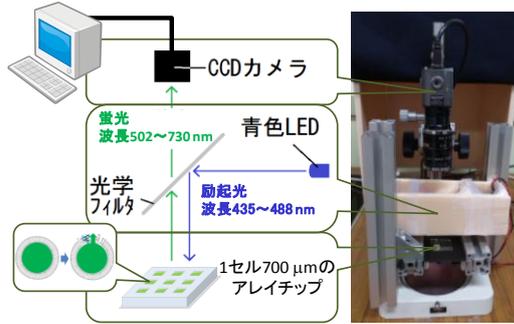


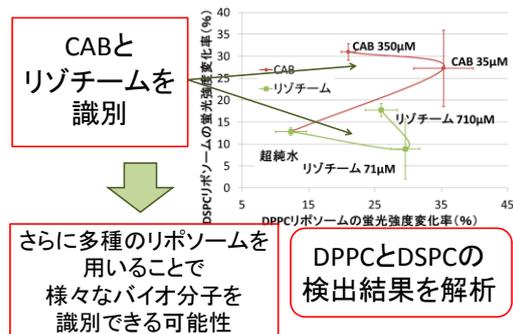
図 1 3 蛍光測定システムのハード構成

ゲット分子種3種CAB、リゾチーム、純水を変化させることとした。上述のリポソームのインタクト固定性と従前の基本特性との整合性の点でアレイ中各液滴保持部ピクセル底面となる基板は親水性を確認したglassとし、保持形状はPDMS生体親和材料を用いた。これらの様子を図 1 2 に示す。

尚、各液滴保持部ピクセルへの1 μL前後の液滴導入は前記微小液滴生成装置を用いた。また蛍光測定時にはアレイ表面全面にカバーガラスを置き液滴の蒸散変動を回避した。

3) 同蛍光センサアレイの評価

今回開発した蛍光測定システムのハード構成を図 1 3 に示す。アレイチップからの反射光を検出する簡易な構造としており、蛍光検出エリアとしても十分な面積を得ている。開発した蛍光測定システムではRGB独立検出から蛍光波長依存性を評価できるが本研究ではG緑の発光強度に着目して測定した。図 1 4 にターゲット識別センシングの一例を示す。さらに各ターゲットの濃度をパラメータとした。本比較の程度では一目でターゲット間の違いを認識できるため統計解析は不要であるが、さらなる識別のために本測定システムが



有する機能の複合的使用、そして種々の統計処理技術の導入が必要になると考えるが、本研究の目的としたターゲット識別同時センシングを本リポソームアレイ技術により実現できたと考えている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 11 件)

1. Toshinori Shimanouchi, Keiichi Nishiyama, Azusa Hiroiwa, Huong Thi Vu, Nachi Kitaura, Hiroshi Umakoshi, Ryoichi Kuboi, "Growth Behavior of A β Protofibrils on Liposome Membranes and Their Membrane Perturbation Effect", *Biochem. Eng. J.*, (査読有) **71**, pp.81-88 (2013).
2. M. Sohgawa, D. Hirashima, Y. Moriguchi, T. Uematsu, W. Mito, T. Kanashima, M. Okuyama, H. Noma, "Tactile sensor array using microcantilever with nickel-chromium alloy thin film of low temperature coefficient of resistance and its application to slippage detection" *Sensors and Actuators A: Physical*, (査読有) **186**, pp.32 - 37 (2012).
3. M. Noda, P. Lorchirachoonkul, T. Shimanouchi, K. Yamashita, H. Umakoshi, and R. Kuboi: "Sensitivity Enhancement of Leakage Current Microsensor for Detection of Target Protein by Using Protein Denaturant", *IEEE Sensors Journal*, (査読有) **11**(11), pp.2749-2755 (2011).

[学会発表] (計 60 件)

1. M. Noda, K. Takada, M. Nakai, K. Yamashita, T. Shimanouchi, and H. Umakoshi: "A new intact immobilization of liposome as sensing bio nano-particle on oxidized metal electrode structure", *IEEE Sensors 2012*, A1L-B2, pp. 25-28, Taipei, Taiwan, Oct. 29-31 (2012).
2. K. Takada, K. Yamashita, M. Noda, T. Shimanouchi, and H. Umakoshi: "A new biosensing by dielectric dispersion analysis of interaction between lipid membrane of liposome and target biomolecules up to 20 GHz range", *IEEE Sensors 2012*, B2L-B3, pp. 935-938, Taipei, Taiwan, Oct. 29-31 (2012).
3. **(Invited Talk)** M. Noda: "Electrical and Physicochemical Biosensor Using Liposome as Detection Element", *EPS Global International Forum of Analytical Science*, pp.30-32, Bangkok, Thailand, Jan. 17-18 (2012).
4. P. Lorchirachoonkul, T. Shimanouchi, K. Yamashita, H. Umakoshi and M. Noda: "A new planar-type leakage current and

impedance microsensors for detection of interaction between electrolyte-entrapping liposome and protein", *Euroensors XXV*, C2L-C1, Athens, Greece, Sep. 4-7 (2011).

5. M. Sohgawa, D. Hirashima, Y. Moriguchi, T. Uematsu, W. Mito, T. Kanashima, M. Okuyama, H. Noma, "Fabrication of Tactile Sensor Array Using Microcantilever with Low-TCR Nickel-Chromium Alloy Thin Film for Slippage Detection", *EUROSENSORS XXV*, A5P-L-24, Athens, Greece, Sep. 4-7 (2011).

[その他]

<http://www.cis.kit.ac.jp/~led/>

http://www.es.kit.ac.jp/upload/labs/ele_device.pdf

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 実 (NODA MINORU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：20294168

(2) 研究分担者

島内 寿徳 (SHIMANOUCHI TOSHINORI)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：10335383

山下 馨 (YAMASHITA KAORU)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：40263230

福澤 理行 (FUKUZAWA MASAYUKI)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：60293990

寒川 雅之 (SOHGAWA MASAYUKI)

大阪大学・基礎工学研究科・助教

研究者番号：70403128

(3) 連携研究者

久保井 亮一 (KUBOI RYOUICHI)

大阪大学・基礎工学研究科・名誉教授

研究者番号：40029567

馬越 大 (UMAKOSHI HIROSHI)

大阪大学・基礎工学研究科・教授

研究者番号：20311772

奥山 雅則 (OKUYAMA MASANORI)

大阪大学・基礎工学研究科・名誉教授

研究者番号：60029569