

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25249048

研究課題名(和文) リポソームバイオ集積センサの診断チップ化基礎技術の構築

研究課題名(英文) Construction of basic technologies to build up liposome integrated biosensor chip for diagnosis

研究代表者

野田 実 (Noda, Minoru)

京都工芸繊維大学・電気電子工学系・教授

研究者番号：20294168

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,300,000円

研究成果の概要(和文)：シリコン集積バイオセンサとして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・同センシング技術を診断チップ化するために、基礎技術の具体化検討を行った。主項目として、バイオ分子認識ナノ分子素子としてのリポソームの物理的分子状態制御、アミロイドーシスセンサ応用への挑戦、アレイセンサ信号情報処理用電子システムの構成・作製を進めた。特に診断チップ用ターゲット分子の代表としてアルツハイマー病バイオマーカーであるアミロイドに注目し、ヒト血清中での同線維伸長動態を選択的に検出できた。またリポソーム脂質種の選定、低雑音電子回路技術利用により1 nMの高感度検出特性を得た。

研究成果の概要(英文)：In this research, basic technologies are proposed and investigated in order to build up the liposome integrated biosensor chip for diagnosis, based on our previous liposome biosensor and relating sensing technologies that made clear their operation principles. The research consists of three parts: I. Physical control of liposome supramolecule or its droplet, II. Challenge for realizing amyloidosis sensor, and III. Creation of information processing electronic system for array sensor signal. Especially, amyloid-beta is focused as biomarker of Alzheimer's disease from important target biomolecules for diagnosis. Consequently, the aggregation and fibrilization of the protein was detected selectively in human serum by the developed liposome sensor. Also, the sensitivity was markedly improved as low as 1 nM by selecting proper lipid species and applying low noise electronic circuit techniques.

研究分野：集積デバイス工学

キーワード：マイクロ・ナノデバイス ナノバイオ バイオデバイス リポソーム センサ バイオセンサ

### 1. 研究開始当初の背景

従前申請者の科研にて、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、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が、Si 集積エレクトロニクス側からの革新的新技術は未だ十分には顕在化に至っておらず、一方でリポソーム自体が本来有する多様な特性 (膜透過性、分子 (電子) 輸送性、内水相保持性、外来タンパク質分子修復性等) をバイオセンサとしてさらなる高性能化・高機能化を実証しうる可能性があった。

### 2. 研究の目的

従前科研で本センシング技術・センサの精度・性能を一層向上、安定化、さらに新しい検知原理 (電子デバイス工学観点に基づく) を構築し、Si 等センサ集積回路構造・情報処理システムへの新たな観点での展開技術の研究進展が具体的に得られてきたため、バイオエレクトロニクス、バイオセンシング分子技術から今回新たに発展させた研究提案として、**I. バイオ分子認識ナノ分子素子としてのリポソームの物理的分子状態制御、II. アミロイドーシスセンサ応用への挑戦、III. アレイセンサ信号情報処理用電子システム構成・作製**、を行う。

### 3. 研究の方法

本申請研究調査の研究計画に記載した以下の項目について行った。

#### I. バイオ分子認識ナノ分子素子としてのリポソームの物理的分子状態制御

##### 1. 検知部リポソーム分子集合安定化デバイス構造の検討・出力安定性、再現性の向上

- 1) 液滴封止構造の作製
- 2) マイクロ流路構造にて検知部に検知分子リポソームを SAM 共有結合インタクト固定 (単層固定化)

##### 2. リポソーム単一分子センサの有効性、可能性の検討

- 1) リポソーム大型化調製プロセス検討
- 2) 大型リポソームの操作方法の検討

#### II. アミロイドーシスセンサ応用への挑戦

1. 生体膜模擬リポソーム分子の選択と調製
2. 生体膜模擬リポソームアレイセンサチップの作製
3. 生体膜模擬リポソーム分子表面での  $A\beta$  線維伸長の可視像検出技術の検討、開発
4. リポソーム表面可視像測定システムの検討、試作
5. 測定データ処理の検討
6. 後処理としてのアレイ画素の電気電子リ

### ポソームセンサ測定

#### 7. 将来的展開の検討、考察

### III. アレイセンサ信号情報処理用電子システムの構成・作製

1. 蛍光センサアレイ出力パターン統計的識別手法の検討
2. 各開発センサアレイ出力からの相互作用情報の抽出処理方法の検討

### 4. 研究成果

#### I. バイオ分子認識ナノ分子素子としてのリポソームの物理的分子状態制御

##### 1. 検知部リポソーム分子集合安定化デバイス構造の検討・出力安定性、再現性の向上

###### 1) 液滴封止構造の作製

液滴の溶媒蒸散を抑制する樹脂膜封止構造を PDMS で形成した。そのゴム弾性による大きな復元力により、シリンジ針による液滴の導入後、導入孔が自然に塞がり液滴の蒸散を抑制できた。カンチレバー近傍周辺部表面と液滴封止構造材料とする PDMS 樹脂との接触性、また液滴保持開口部と密閉のためのカバーガラスとの良好な接触性も検討し、0.1  $\mu\text{L}$  オーダーの 1 日オーダーでの揮発抑制を実現でき検出特性が安定化しカンチレバーセンサ出力の十分な経時特性測定を可能とした (図 1 参照)。同一濃度で異なるターゲット蛋白質分子にて定性的・定量的に顕著に異なるセンサ出力の 1 日以上経時特性を得た。

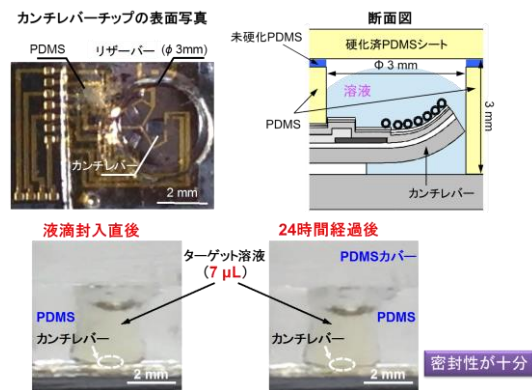


図 1 カンチレバーセンサ液滴封止構造表面、断面図

2) マイクロ流路構造にて検知部に検知分子リポソームを SAM 共有結合インタクト固定 (単層固定化)

マイクロ流路構造リポソーム SAM インタクト固定化後、良好な検出出力を実測確認できた。PDMS を用いて作製したマイクロ流路構造を SAM 単分子層を形成したカンチレバーセンサチップ上に設置した。この流路内で WSC と NHS を溶解させた 1,4-ジオキサン・

水の混合溶液による SAM 活性化処理に続いて、リポソームとして DMPC を分散させた水溶液を連続的に流入させた。その後、 $A\beta$  (1-40)水溶液を流入させた。図2に示すように、溶液の供給時にも安定な出力を得ることが可能であることを示した。また、24時間後に流路を取り外して表面を顕微鏡で観察したところ、図3のように線維様のものが多数確認でき、流路内で固定化されたリポソームに  $A\beta$  を線維成長可能とした。

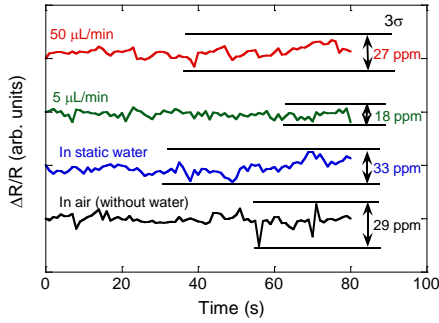


図2 マイクロ流路内のカンチレバー出力安定性

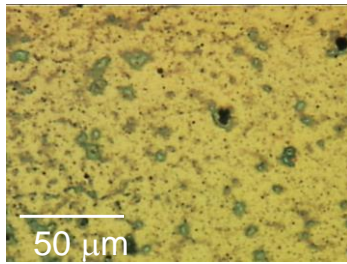


図3 マイクロ流路内で  $A\beta$  溶液流入後の顕微鏡写真

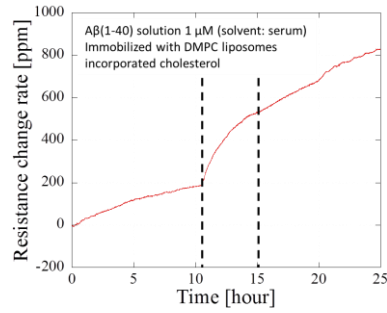
## 2. リポソーム単一分子センサの有効性、可能性の検討

当研究の他の研究項目との整合性に鑑み、また出力安定性、再現性の観点で当研究としては従来の多分子利用を優先することとした。

### II. アミロイドシスセンサ応用への挑戦

#### 1. 生体膜模擬リポソーム分子の選択と調製

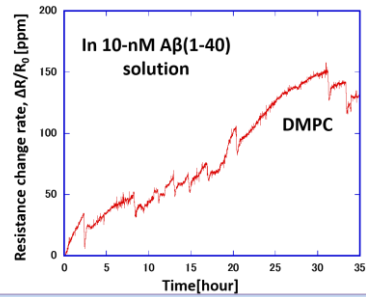
従来生体膜構成比率が最も高い DPPC リポソームに特化していたが、親水基、疎水基が異なり、室温での膜流動性の異なる DSPC, POPC, DMPC, DPPE, DPPG リポソームを調製し、同等サイズ約 100nm 径の調製条件を得た。さらに実際の生体膜状態に近い cholesterol 分子封入した各リポソームを調製した。これら異脂質種リポソームセンサ分子をカンチレバーセンサ、誘電分散解析(相互作用に伴う水和水動態変化検出)、蛍光アレイに適用した。それらの主な結果を図4から図7に各々示す。特に重要マーカー分子  $A\beta$  では近年モノマーよりオリゴマーが毒性発現原因物質と認識されているが DMPC/cholesterol ではモノマー検出が抑制



時間	抵抗	$A\beta$ の状態	$A\beta$ との相互作用	血清との相互作用
0-11 h	増加	モノマー	○	×
11-15 h	急激に増加	凝集体	○	○
15 h-	増加率減少	$A\beta$ 線維	×	○

抵抗変化の傾向から血清中においても  $A\beta$  の凝集過程検知可能であることが示唆

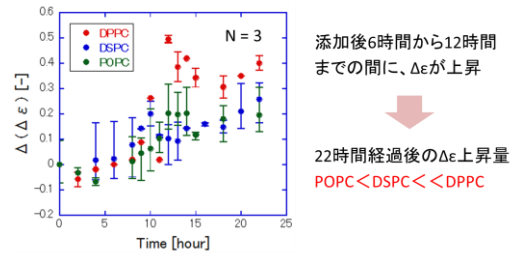
図4 DMPC/cholesterolを用いたヒト血清中  $A\beta$  凝集線維化のカンチレバーセンサ出力経時特性



■  $A\beta$  10 nM中で最大抵抗変化率は約 150 ppm  
■ アルツハイマー病患者の血中濃度程度の  $A\beta$  濃度を検出できることが示唆された

図5 DMPCでの  $A\beta$  10 nM凝集線維化カンチレバーセンサ出力経時特性

DPPC, DSPC, POPC各リポソームに  $A\beta$  (1  $\mu$ M) を添加し、22時間まで領域IIの  $\Delta\epsilon$  を経時観察(比較のため、従来結果を再掲)



領域IIから脂質の違いによる相互作用強度の違いを検知できる可能性有

図6 誘電分散解析による  $A\beta$  1  $\mu$ M凝集線維化に伴う各脂質膜表面の水和水動態変化検出

されオリゴマー検出が強くなる結果を得た。またヒト血清中多数タンパク質が脂質膜と相互作用の経時的変化をほとんど示さない中、 $A\beta$ のリポソーム脂質膜上動態(線維伸長)を同 DMPC/cholesterol で検出できた。また次項2. の電子回路技術によりさらにカンチレバーセンサで  $A\beta$ (1-40) 1 nM(AD患者血中濃度と同等以下)の高感度検出を達成した。

#### 2. 生体膜模擬リポソームアレイセンサチップの作製

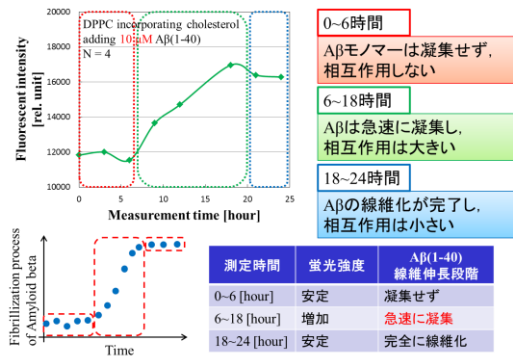


図7 DPPC/cholesterolを用いたAβ凝集線維化の蛍光(分子漏れ)センサ出力経時特性

溶液の連続的な注入・排出を目指してマイクロ流路構造を作製した。厚膜レジスト(SU-8)を用いてフォトリソグラフィによりモールドを作製し、PDMSの原液を流し込み、熱硬化させPDMSの微細構造を作製した。それをSiのチップ上に自己吸着により固定し、高さ300μm、幅1.4mm、長さ10mmのマイクロ流路を作製し、センサ検知部への溶液の連続的な注入と排出を可能とした。マイクロ流路構造にて検知部に検知分子リポソーム固定を継続で進め、多チャンネルアレイ化用に溶液混合流路を試作し、任意の割合での溶液混合に成功した(図8, 9)。さらにカンチレバーアレイ化と共に、ブリッジ回路導入、ローパスフィルタ処理にて環境温度の周期的変動成分を除去し、を昨年度の1/10に雑音低減、出力安定性、再現性を十分向上した(図10)。

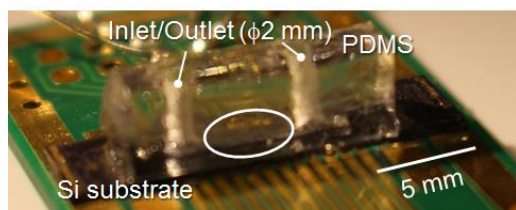


図8 カンチレバーセンサチップ上に設置したPDMSマイクロ流路

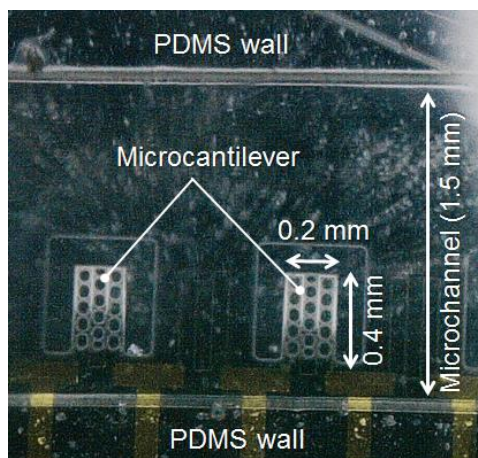
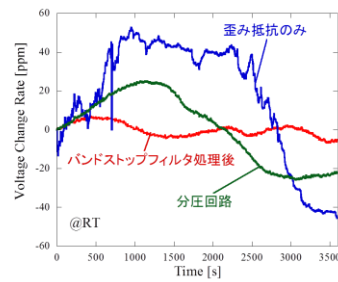


図9 PDMSマイクロ流路中のマイクロカンチレバー



本手法を用いることで更に1桁低濃度のAβを検出することが可能であると示唆

図10 分圧回路、バンドストップフィルタ回路導入によるカンチレバーセンサ出力の低雑音化

3. 生体膜模擬リポソーム分子表面でのAβ線維伸長の可視像検出技術の検討、開発
4. リポソーム表面可視像測定システムの検討、試作
5. 測定データ処理の検討
6. 後処理としてのアレイ画素の電気電子リポソームセンサ測定
7. 将来的展開の検討、考察(上記3-6まとめて記載)

可視光/近赤外光領域で光像直接ではなくモフォロジー情報を検出すべく、微小紛体測定実用化技術からの統計学的な測定原理の増強、光学調整自体、制御システム検討を進めた。繊維伸張ラフト形状の散乱スペクトルに着目した光学的検出技術の検討、検証のための光学系の構築を進めた。線維伸長モードを模したモフォロジーと散乱スペクトルの関係を調べる機能を実装した。構成は、蛍光センサアレイをターゲットとした蛍光顕微鏡イメージャシステムに暗視野照明と分光器を付加するものとした。同システムを用いて、ターゲット標準粒子懸濁液(粒径500-1000 nm)の散乱特性の評価に成功した(図11)。同システムを用いてリポソーム懸濁液からの散乱も検出できており(図12)、線維伸長ラフト形状の散乱スペクトルの工学的検出技術の可能性を示唆した。

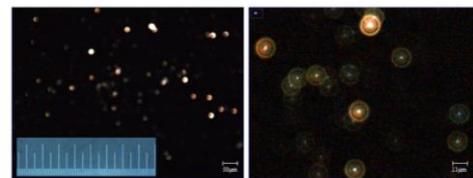


図11 標準粒子懸濁液の散乱検出結果

### Ⅲ. アレイセンサ信号情報処理用電子システムの構成・作製

1. 蛍光センサアレイ出力パターン統計的識別手法の検討
2. 各開発センサアレイ出力からの相互作用

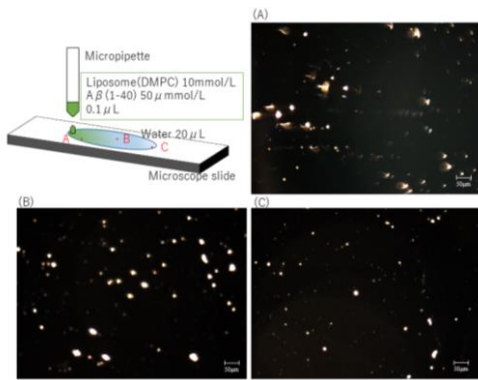


図 1 2 リポソーム懸濁液の散乱検出結果

### 情報の抽出処理方法の検討(上記 1, 2 まとめて記載)

ソフトウェアプラットフォームを構築し、複数ハードウェアに対応すると共に、信号処理・統計的識別フェーズを共通モジュールとして開発できるようにし、信号処理モジュールも開発できた。具体的に統計的識別フェーズ用モジュールで多次元ライブラリの収集・管理、主成分・独立成分各分析、サポートベクタマシンの各識別器等を機能設計・実装した。3x3 アレイ出力パターンはライブラリ構築できた。前二者分析機能は同ライブラリを用い検証した(蛍光アレイ結果での有意な識別結果獲得)。蛍光イメージング、信号処理、統計的識別、の全過程を本システム内で

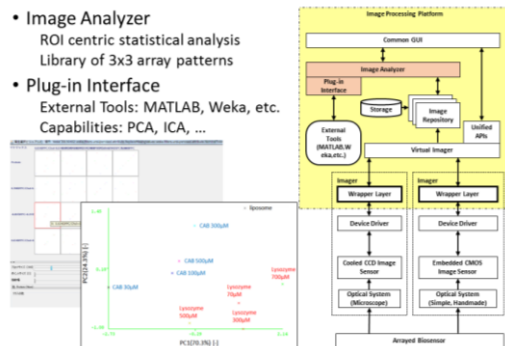


図 1 3 システムのモジュール構成と開発モジュールを用いた統計的識別過程

System type	光学特性リファレンス	簡易光学系プロトタイプ
Optical system	Fluorescent microscope	Hand-made
Imager	Cooled 16bit CCD camera	Embedded 8bit CMOS camera
Size	450 x 550 x 500 mm	150 x 250 x 400 mm
Picture		
Cost	\$20,000	\$600
Development period	4 months*	2 months

図 1 4 ソフトウェアプラットフォームを共通化できた複数の蛍光イメージャ(ハードウェア)

完結できた(図 1 3, 1 4)。信号処理以降のモジュールは線維伸長ラフト形状検出の光学系にも利用できる。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 3 件)

- "A cantilever-based biosensor for real-time monitoring of interactions between amyloid- $\beta$ (1-40) and membranes comprised of phosphatidylcholine lipids with different hydrophobic acyl chains", Z. Zhang, Y. Murakami, T. Taniguchi, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda: *Electroanalysis*, (査読有) **29**(3) (2017) 893-899.
- "Biosensing of interaction between phospholipid membrane of liposome as model cell membrane and amyloid-beta protein in human serum by dielectric dispersion analysis", T. Yoshikawa, Z. Zhang, K. Yamashita, M. Noda: *Sens. Actuators B: Chemical*, (査読有) **236**(11) (2016) 1028-1035.
- "Real-time characterization of fibrillization process of amyloid-beta on phospholipid membrane using a new label-free detection technique based on a cantilever-based liposome biosensor", Z. Zhang, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda: *Sensors and Actuators B: Chemical*, (査読有) **236**(11) (2016) 893-899.
- "A Micromechanical Cantilever-Based Liposome Biosensor for Characterization of Protein-Membrane Interaction", Z. Zhang, M. Sohgwawa, K. Yamashita, M. Noda, *Electroanalysis*, (査読有) **28**(3) (2016) 620-625.
- "Contactless Liquid Sensing Technique Using a Quartz Oscillator", T. Susa, T. Watanabe, M. Sohgwawa: T. Abe, *Sensors and Materials*, (査読有) **28**(4) (2016) 289-294.
- "微量液体に対応した水晶共振回路式液体濃度センサの開発", 柳田祐太, 須佐翼, 寒川雅之, 安部隆: 電気学会論文誌 E, (査読有) **136**(7) (2016) 319-322.
- "水晶振動子を用いた液体分析用コンポセンサにおける形状最適化", 坂井了, 今井寛明, 寒川雅之, 安部隆: 電気学会論文誌 E, (査読有) **136**(8) (2016) 343-347.
- "Detection of Amyloid Beta Fibril Growth by Liposome-immobilized Micro-cantilever with NiCr Thin Film Strain Gauge", M. Sohgwawa, Z. Zhang, T. Akai, K. Takada, K. Yamashita, M. Noda: *IEEE Sensors Journal*, (査読有) **15**(12) (2015) 7135-7141.

9. "水晶発振回路を用いた非接触型液体濃度センサ", 須佐 翼, 渡部 尊, 寒川雅之, 安部 隆: 電気学会論文誌 E, (査読有), **135**(6) (2015) 210-213.
10. "BiFeO<sub>3</sub>圧電体薄膜を用いたマイクロカノンチレバー触覚センサの検討", 三原雅人, 野沢瑛斗, 安部隆, 奥山雅則, 野間春生, 東 輝明, 寒川雅之: 電気学会論文誌 E, (査読有) **135**(5) (2015) 158-164.
11. "Sensitivity modification of piezoelectric diaphragm-type ultrasonic microsensors by poling and influence of in-plane stress", K. Yamashita, H. Tanaka, A. Morimoto, Y. Yang, M. Noda: *IEE Japan Transactions on Sensors and Micromachines*, (査読有) **143**(5) (2014) 119-124.
12. "水晶振動子式メタノール濃度センサに関する数値計算と実証", 渡部 尊, 外山晋二郎, 寒川雅之, 安部 隆: 電気学会論文誌 E, **134**(7)(2014)224-228.
13. "Piezoelectric vibratory-cantilever force sensors and axial sensitivity analysis for individual triaxial tactile sensing", K. Yamashita, Y. Yang, T. Nishimoto, K. Furukawa, and M. Noda: *IEEE Sensors J.*, (査読有) **13**(3) (2013) 1074-1080.

[学会発表] (計 5 6 件)

1. "Dielectric Dispersion Analysis of Interaction with Plural Phospholipid Species of Liposome by Arrayed Cells System Using Small Open-Ended Coaxial Probe", M. Kawasaki, K. Yamashita, M. Noda: C-4-117, *IEEE Sensors 2016*, (査読有) Orlando, USA, Oct. 30–Nov. 2 (2016) 1368.
2. "A Highly Sensitive Amyloid- $\beta$  Detection by Cantilever Microsensor Immobilized with Liposome with Incorporated Cholesterol and Phosphatidylcholine Lipid with Short Hydrophobic Acyl Chains", Y. Murakami, T. Taniguchi, Z. Zhang, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: A-4-115, *IEEE Sensors 2016*, (査読有) Orlando, USA, Oct. 30–Nov. 2 (2016) 208.
3. "Improvement of sensitivity for A $\beta$  Protein on Cantilever Biosensor by Incorporating DPPC Liposome with Cholesterol", Y. Murakami, T. Taniguchi, Z. Zhang, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: W189h, *MicroTAS 2016*, (査読有) Dublin, Ireland, Oct. 9–13 (2016) 1390.
4. "Detection of Fibrillization Process of Amyloid Beta Protein Using Arrayed Biosensor with Liposome Encapsulating

- Fluorescent Molecules", R. Imamura, T. Shimanouti, N. Murata, K. Yamashita, M. Fukuzawa, M. Noda: MP.FLU-4-8198, *The 30th European Conference on Solid-State Transducers (EuroSensors2016)*, (査読有) Budapest Hungary, Sep. 4–7 (2016) 1414–1417 (in *Procedia Engineering*, vol. 168).
5. "A High-Sensitive Detection of Several Tens of nM of Amyloid-Beta by Cantilever-Type Biosensor Immobilized DPPC Liposome Incorporated with Cholesterol", Y. Murakami, Z. Zhang, T. Taniguchi, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: MP.CHM-25-8204, *The 30th European Conference on Solid-State Transducers (EuroSensors2016)*, (査読有) Budapest Hungary, Sep. 4–7 (2016) 565–568 (in *Procedia Engineering*, vol. 168).
6. "Enhanced sensitivity of cantilever-based liposome biosensor for detection of A $\beta$  aggregation and fibril growth by incorporating DPPC liposome with cholesterol", Z. Zhang, Y. Murakami, T. Taniguchi, M. Sohgawa, K. Yamashita, M. Noda: *Biosensors 2016*, (査読有) Gothenburg, Sweden, May 25–27 (2016)

[その他]

<http://www.cis.kit.ac.jp/~led/>  
[http://www.es.kit.ac.jp/upload/labs/eled\\_device.pdf](http://www.es.kit.ac.jp/upload/labs/eled_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・電気電子工学系・教授  
 研究者番号: 20294168

### (2) 研究分担者

山下 馨 (YAMASHITA KAORU)  
 京都工芸繊維大学・電気電子工学系・准教授  
 研究者番号: 40263230

福澤 理行 (FUKUZAWA MASAYUKI)  
 京都工芸繊維大学・情報工学・人間科学系・准教授  
 研究者番号: 60293990

寒川 雅之 (SOHGAWA MASAYUKI)  
 新潟大学・自然科学系・准教授  
 研究者番号: 70403128