

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26282143

研究課題名(和文) 体外受精卵のクオリティーを選別するマルチ卵重計の創製

研究課題名(英文) Development of multi-sensing mass-sensor for quality evaluation of in-vitro fertilized egg

研究代表者

曾根 逸人 (SONE, Hayato)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：80344927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、体外受精卵の非侵襲な精密診断法の開発を目指して、受精卵の重量と呼吸活性の連続測定が可能な、ピエゾ抵抗カンチレバに半導体センサを搭載したマルチ卵重計の創製を目的とした。受精卵を搭載可能にするため集束イオンビーム加工によってホルダ型ピエゾ抵抗カンチレバを作製し、カンチレバの共振周波数検出法および変位検出法を用いて、マウス受精卵およびウニ卵子の質量を測定することに成功した。また、受精卵質量を検証するため、沈降測定法を開発してマウス受精卵と未受精卵の密度および質量を測定した。さらに、Siナノワイヤセンサを開発して、イオン検出による呼吸活性の高感度測定の可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：In this research, a multi-sensing mass-sensor using piezoresistive cantilever with semiconductor sensor was investigated to measure the mass and respiration activity of a fertilized egg for non-invasive quality evaluation of in-vitro fertilized egg. We fabricated a holder-type piezoresistive cantilever using focused ion beam processing to place a single fertilized egg on the cantilever. Then, we measured a single mouse fertilized egg and sea urchin egg mass by a resonance frequency detection method and deflection detection method using the holder-type cantilever. To verify the fertilized egg mass, we measured the mass and density of a mouse fertilized egg and non-fertilized egg using a sedimentation measurement method. We also developed a Si nanowire sensor, and we demonstrated to detect a low-concentration biomolecules for respiration activity measurement of the fertilized egg.

研究分野：ナノメートル計測加工

キーワード：カンチレバ-半導体複合型バイオセンサ 受精卵質量測定 ピエゾ抵抗カンチレバ Siナノワイヤバイオセンサ 検査・診断システム モニタリング

1. 研究開始当初の背景

不妊症治療に生殖補助医療技術 (Assisted Reproductive Technology; ART) が導入され、その役割が年々高まりつつある。ART では体外受精-胚移植を実施する際に良好胚を選択することが着床および出産成功のための重要な要因であるが、現在のヒト胚の品質評価では、医師および生殖補助医療胚培養士による形態の評価がほとんどである。そこで、定量的かつ客観的に品質評価する方法として、マイクロタクトイルセンサを用いた超音波印加による硬さ評価法およびバイオトランジスタを用いた受精卵から放出されるイオンモニタリング法が開発されている。受精卵の成長に伴って質量が変化することが予想されるが、これまで質量を測定した報告はない。

2. 研究の目的

本研究では、移植前の育成期間中に受精卵質量を連続測定できるようにカンチレバを直接駆動する磁気駆動方式に改良した上で、受精卵を搭載可能なカンチレバの作製と高精度な搭載回収システムを開発する。さらに、ピエゾ抵抗カンチレバに半導体センサを搭載したマルチ卵重計を試作して、受精卵の質量と呼吸活性の同時連続測定を目指す。

3. 研究の方法

受精卵の質量と呼吸活性の同時連続測定を可能にするために、まずカンチレバ型バイオセンサを連続測定可能な測定方式への改良と受精卵を搭載可能な形状への加工を試した。さらに、高感度ナノワイヤセンサを開発して、イオン検出による呼吸活性の測定を目指した。これらを達成する方法として、以下の内容について研究を推進した。

- (1) カンチレバ型バイオセンサの磁気駆動方式への改良と液中連続測定システムの開発
- (2) LabVIEW を用いたカンチレバセンサ自励発振システムの試作
- (3) FIB 加工による受精卵保持型カンチレバの作製とマウス受精卵質量測定
- (4) カンチレバ変位検出法の開発とウニ卵子質量測定
- (5) 沈降測定法の開発とマウス受精卵質量測定
- (6) 電子線リソグラフィを用いた Si ナノワイヤ (NW) バイオセンサの試作と低濃度生体分子測定

4. 研究成果

(1) カンチレバ型バイオセンサの磁気駆動方式への改良と液中連続測定システムの開発

カンチレバ型バイオセンサの高周波駆動を目指して、直径 0.6 mm のパーマロイを芯材とした低インダクタンスの電磁石を作製した。ピエゾ抵抗カンチレバに Co 薄膜を成

膜し、ピエゾ抵抗からの信号を増幅して電磁石へ正帰還した結果、大気中では共振周波数での自励発振が確認できた。しかし、水中では発振が確認できなかった。そこで、ピエゾ抵抗カンチレバに Ni 薄膜を成膜して、ネオジウム磁石を距離 1 mm まで接近させたところ、0.95 μm の変位が得られた。しかし、試作した小型電磁石を用いて同様の測定を行った結果、変位は得られなかった。電磁石の磁力が弱いこと、カンチレバに成膜した磁性膜の磁荷が弱いことが原因と考えている。

(2) LabVIEW を用いたカンチレバセンサ自励発振システムの試作

磁気駆動では水中測定ができなかったことから、培養液中でのカンチレバセンサの共振安定化を目指して、LabVIEW および電流アンプを用いてカンチレバのピエゾ抵抗からの検出信号を駆動素子へ正帰還させる自励発振システムを試作した。当初は自励発振システムでカンチレバの振幅が増加する問題が生じたが、サンプリングレートと収録時間の最適化および PID 制御の導入によって解決し、連続測定が可能なシステムを作製できた。

(3) FIB 加工による受精卵保持型カンチレバの作製とマウス受精卵質量測定

(1) で課題となったカンチレバの磁荷を増強するため、集束イオンビーム (FIB) 装置内に 3 軸移動機構を用いたマイクロマニピュレータを組込んで、カンチレバ先端へのパーマロイ薄片の固定を試みた。FIB を用いて受精卵を保持するための内径 90 μm の穴を加工したパーマロイ薄片の作製には成功した。しかし、これをカンチレバ先端へ接触させ、FIB のカーボンデポジションによる固定を試みたが、接合部の形状、デポジション条件等を調整しても固定できなかった。

そこで、磁気駆動については断念して、FIB を用いてカンチレバに受精卵を保持する穴や壁を加工して、ホルダ型カンチレバを作製した。形状の異なるホルダ型カンチレバを試作してマウス受精卵の搭載を試験したところ、最終的に図 1 に示すホルダ型カンチレバに 2 細胞期のマウス受精卵 1 つを搭載することに成功した。図 1 (a) は FIB 加工後のホルダ型カンチレバの走査イオン顕微鏡 (SIM) 像である。図 1 (b) はマウス受精卵搭載後の顕微鏡像で、ホルダ型カンチレバの中央部に

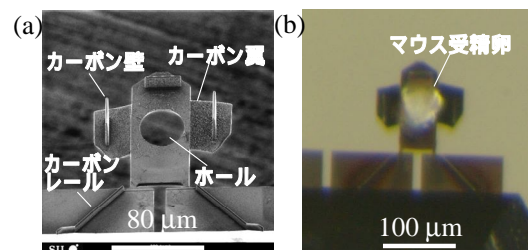


図 1 ホルダ型カンチレバ; (a) SIM 像、
(b) マウス受精卵搭載後の顕微鏡像

$$\rho_p = \frac{18v_s\eta}{D_p^2g} + \rho_f \quad (2)$$

ここで ρ_p は測定物の密度、 v_s は沈降速度、 η は溶液の粘度、 D_p は測定物の直径、 g は重力加速度、 ρ_f は溶液の密度である。まず、光学顕微鏡を用いてマウスの未受精卵と2細胞期受精卵各20個の直径を測定した。平均直径は未受精卵が $92.1 \mu\text{m}$ (± 4.1)、受精卵が $95.4 \mu\text{m}$ (± 2.2)であった。次に未受精卵と受精卵の溶液中沈降速度を10サンプルずつ測定した結果、平均速度はそれぞれ 0.104 mm/s 、 0.110 mm/s となった。これらの値と事前にピクノメータを用いて測定した溶液密度とウペローデ型毛細管粘度計を用いて測定した粘度を(2)式に代入して、未受精卵密度 1025 kg/m^3 、質量 419 ng および、受精卵密度 1027 kg/m^3 、質量 467 ng が得られた。この結果から、マウス受精卵は受精によって密度がわずかに増加し、質量が増加することが明らかになった。

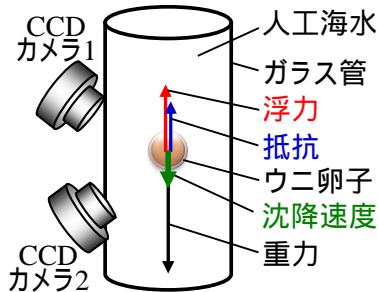


図6 2方向観察沈降測定システムの模式図

(6) 電子線リソグラフィを用いたSiナノワイヤ(NW)バイオセンサの試作と低濃度生体分子測定

フォトリソグラフィで電極と絶縁膜、電子線リソグラフィでSilicon on Insulator (SOI)基板に幅 $80 \sim 200 \text{ nm}$ のSiナノワイヤ(NW)を形成してSiNWセンサを作製した。図7(a)は設計NW幅 200 nm のSiNWのSEM像である。両側に配置されたTi電極に架橋するNW幅 190 nm のSiNWが確認できる。また、両側のTi電極およびNWの端部を被覆する絶縁膜が形成できていて、長さ $10 \mu\text{m}$ のNW中央部のみが露出していることが確認できる。図7(b)-(e)は、それぞれ設計NW幅 $200, 150, 100, 80 \text{ nm}$ のSiNWのSEM像である。設計NW幅 200 nm と 150 nm のSiNWは全て形成されていて、SEM像から計測した平均NW幅は、それぞれ 190 nm と 160 nm であった。設計NW幅と 10 nm の差が生じたのは、SEM像から確認できるようにSiNWのエッジラフネスが原因と考えている。NW幅 100 nm と 80 nm のSiNWに関しては、途中で断線しているものが多く、全体が繋がっているものは一部であった。

図8は平均NW幅 $160, 190 \text{ nm}$ のSiNWの表面をアミノシラン処理後、イムノグロブリンG(IgG)溶液と反応させた後の抵抗値 R' と

バッファー液のPBS中での抵抗値 R から求めた抵抗変化率 $\varepsilon = (R' - R)/R$ である。いずれのNWも濃度の上昇に伴って抵抗変化率が増加している。そして、NW幅の細い 160 nm の方が 190 nm より抵抗変化が大きいうことが確認できる。NW幅 190 nm のSiNWバイオセンサではIgG濃度が100倍上昇するごとに約5%ずつ抵抗変化率が増加し、NW幅 160 nm のSiNWバイオセンサでは約8%ずつ抵抗変化率が増加している。これはNW幅の減少によって体積比表面積が増加して、IgGの付着に伴うNW内部の空乏層変化が大きくなったことを示している。そして、いずれのNW幅でも今回測定した最低濃度の 6 fM で約5%の抵抗変化が得られた。低濃度IgG抗体と反応させた結果、濃度 6 fM の超低濃度IgGで約5%の電流

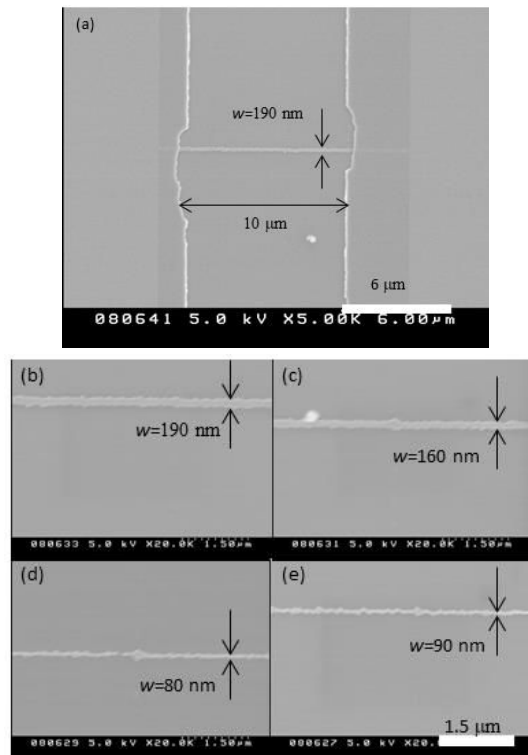


図7 SiNWバイオセンサのSEM像; (a) Ti電極間に架橋するNW幅 $w = 190 \text{ nm}$ のSiNW, (b) $w = 190 \text{ nm}$, (c) $w = 160 \text{ nm}$, (d) $w = 80 \text{ nm}$, (e) $w = 90 \text{ nm}$

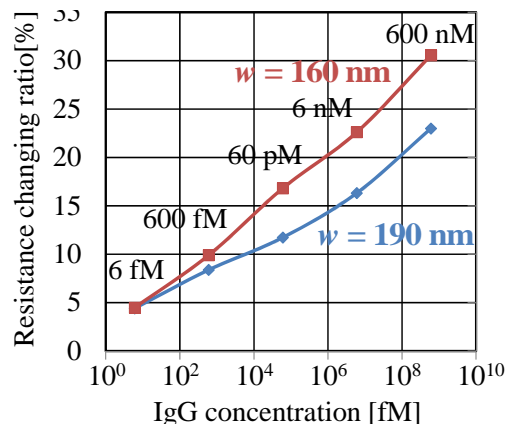


図8 NW抵抗変化率のIgG濃度依存性

減少を得た。

この SiNW センサは、IgG 等の生体分子が持つ電荷に反応して動作することから、溶液中のイオン濃度変化にも反応する可能性がある。したがって、受精卵の呼吸活動に伴って放出されるイオン濃度を高感度測定できる可能性があることから、今後カンチレバ型センサに組込んだマルチ卵重計の開発に繋がりたいと考えている。

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2件)

T. Tashiro, H. Zhang, K. Oshima, Y. Sakurai, T. Suzuki, N. Ohshima, T. Izumi and H. Sone, Fabrication of N-type Silicon Nanowire Biosensor for Sub-10-Femtomolar Concentration of Immunoglobulin, Key Engineering Materials, in print, 2018, 査読有.

田代朋也, 大嶋 駆, 櫻井裕也, 張慧, 鈴木孝明, 大嶋紀安, 和泉孝志, 曾根逸人, 電子線リソグラフィを用いた Si ナノワイヤバイオセンサの作製と低濃度抗体検出, 電気学会 バイオ・マイクロシステム研究会資料, Vol. BMS-17-49, 2017, pp. 11 - 16, 査読無.

[学会発表](計14件)

曾根逸人, “受精卵質量測定のためのホルダ型 piezoresistive cantilever の試作と評価”(依頼講演), ナノプロブテクノロジー第167委員会第88回研究会, 産業技術総合研究所臨海副都心センター, 東京 (2018.4.13).

佐山雄基, 角田一樹, 高城翔太, 齋藤暁子, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “有限要素解析による受精卵搭載ホルダ型カンチレバセンサの振動解析”, 第65回応用物理学会春季学術講演会, 早稲田大学, 東京 (2018.3.18).

H. Sone, T. Tashiro, K. Oshima, Y. Sakurai, H. Zhang, T. Suzuki, N. Ohshima and T. Izumi, “Fabrication of Silicon Nanowire Biosensor Using Electron Beam Lithography and Low-Concentration Antibody Detection”, 4th International Symposium of Gunma University Medical Innovation, Maebashi, Japan (Nov., 2017).

吉川朝哉, 佐藤稜也, 高城翔太, 齋藤暁子, 佐々木直哉, 外山吉治, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “2方向観察沈降測定法によるマウス受精卵質量測定”, 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 福岡国際会議場, 福岡 (2017.9.5).

吉川朝哉, 高城翔太, 佐藤稜也, 齋藤暁子, 佐々木直哉, 保坂純男, 坂田利弥,

曾根逸人, “受精卵質量測定のための2方向観察沈降測定法の開発”, 第64回応用物理学会春季学術講演会, パシフィコ横浜, 神奈川 (2017.3).

H. Sone, R. Satou, S. Taki, A. Saito, S. Hosaka and T. Sakata, “Sea urchin egg mass measurement using piezoresistive cantilever and sedimentation measurement method”, The 42nd Intern. Conf. on Micro- and Nano-Engineering 2016, Vienna, Austria (Sep., 2016).

高城翔太, 佐藤稜也, 吉川朝哉, 齋藤暁子, 佐々木直哉, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “受精卵質量測定のための沈降測定法の開発”, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 新潟 (2016.9).

佐藤稜也, 高城翔太, 齋藤暁子, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “受精卵質量測定のための交流ブリッジ回路型変位検出システムの試作”, 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 朱鷺メッセ, 新潟 (2016.9).

網野慶明, 齋藤暁子, 高城翔太, 角田一樹, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “ホルダ型 piezoresistive cantilever を用いたマウス受精卵質量測定”, 第63回応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学, 東京 (2016.3).

H. Sone, T. Kawakami, A. Saito, S. Hosaka and T. Sakata, “Fabrication of holder-type piezoresistive cantilever for embryo mass measurement”, The 41st Intern. Conf. on Micro- and Nano-Engineering 2015, Hague, Netherlands (Sep., 2015).

網野慶明, 高城翔太, 齋藤暁子, 角田一樹, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “受精卵質量測定のためのホルダ型 piezoresistive cantilever の改良”, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 名古屋 (2015.9).

高城翔太, 網野慶明, 齋藤暁子, 佐藤稜也, 保坂純男, 坂田利弥, 曾根逸人, “受精卵質量測定のための変位検出型 piezoresistive cantilever センサの試作と評価”, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場, 名古屋 (2015.9).

曾根逸人, 川上智之, 齋藤暁子, 須藤寛文, 保坂純男, 坂田利弥, “受精卵質量測定のためのホルダ型 piezoresistive cantilever の試作と評価”, 第62回応用物理学会春季学術講演会, 東海大学, 平塚 (2015.3).

曾根逸人, 川上智之, 齋藤暁子, 須藤寛文, 保坂純男, 坂田利弥, “受精卵質量測定のためのホルダ型 piezoresistive cantilever の設計と作製”, 第75回応用物理学会秋季学術講演会, 北海道大学, 札幌

(2014.9).

〔その他〕

ホームページ等

http://www.st.gunma-u.ac.jp/research_tpics/ei_sone/

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 逸人 (SONE, Hayato)

群馬大学・大学院理工学府・教授

研究者番号：80344927

(2) 研究分担者

坂田 利弥 (SAKATA, Toshiya)

東京大学・大学院工学系研究科・准教授

研究者番号：70399400

保坂 純男 (HOSAKA, Sumio)

群馬大学・大学院理工学府・名誉教授

研究者番号：10334129

(3) 研究協力者

齋藤 暁子 (SAITO, Akiko)

東京大学・大学院工学系研究科・学術支援

員