

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2017

課題番号：26289111

研究課題名(和文) CMOSペーパークロマトグラフィの創成と超小型バイオセンシング機器への応用展開

研究課題名(英文) Research on CMOS Paper Chromatography and Its Application to Small Biosensing System

研究代表者

宇野 重康 (UNO, Shigeyasu)

立命館大学・理工学部・教授

研究者番号：40420369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、半導体集積回路技術とクロマトグラフィペーパー技術を組み合わせることにより、電気化学的に生体分子を検出することを目的としている。半導体集積回路技術は微細なデバイス構造や電極構造、そして電子回路を微小チップに集積することに長けており、センシングにおける計測・信号処理・通信に不可欠なものである。一方で、クロマトグラフィペーパーは分析化学・医療分野で既に幅広く用いられており、検体溶液の採取・濾過・輸送・化学反応の場として適している。本研究では、ペーパー電気化学センサー、ペーパー流路、それらの半導体集積回路チップとの統合に関する研究を行い、その知見と可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In this research project, we aimed to combine the semiconductor integrated circuit technology and chromatography paper technology to realize electrochemical biomolecule sensing. The integrated circuit technology is known to be beneficial for fabricating microscale devices and electrodes, as well as high level of electronic circuit integration, which is indispensable for readout, signal processing, and communication. Meanwhile, chromatography paper is widely used in analytical chemistry and clinical medicine, and it is suitable for collection, filtration, transfer, and chemical reaction of sample solution under test. In this research, we have investigated various aspects regarding paper-based electrochemical sensor, paper-based fluidic devices, and their integration with semiconductor integrated circuits.

研究分野：電気化学センサー及び半導体集積回路

キーワード：バイオセンサー 半導体集積回路 電気化学

1. 研究開始当初の背景

現在でもそうであるように、研究開始当初から既に、医療技術と情報通信技術の融合による新しい技術革新への社会からの期待は高まっていた。特に半導体技術に関しては、過去数十年間の技術革新を支えてきたトランジスタ微細化の技術的限界が叫ばれ続けており、新しい成長戦略の一つとしてその医療技術との融合に注目が集まっていた。国際固体素子回路学会 (ISSCC) や国際電子デバイス会議 (IEDM) における半導体技術のバイオ・医療応用に関する発表件数の増加はその表れであり、半導体微細加工技術と集積回路技術の特徴を生かした様々な研究開発が世界中で行われていた。

その多くはトランジスタ動作原理や半導体微細構造を応用したセンサーデバイスによる溶液中分子・タンパクの高感度検出や、そのようなセンサーをチップ上にアレイ化した高集積センシング、あるいはそれらのための集積回路の設計などである。このような研究開発は新しい潮流を作り出し、なかには製品化に至った技術もある。

これらの研究の多くがセンサーデバイスとその回路に注目したものであるが、実際のバイオセンシングの応用ではそれだけでは不十分であり、溶液検体を採取し、不純物を濾過し、様々な試薬類と化学反応させ、センシング部分へ輸送する、という前処理が不可欠である。しかしながらそのような機能は半導体センサーや回路と一体化されているとはいえず、本研究代表者はこの点に着目した。すなわち、半導体技術によるセンサー・回路技術の長所を最大限に引き出すためには、溶液採取・輸送・反応を担う技術を融合することが重要であると考えた。

このような検体溶液の採取・輸送・反応を行うものとして、研究代表者は「クロマトグラフィーペーパー」と呼ばれる化学分析用の「紙」に注目した。これはすでに各種ウイルス・細菌類の迅速検査キット、妊娠・排卵検査キット、尿検査紙、などで医療応用されているものであり、分析化学・医療分野では長い歴史を持つ部材である。加えて研究開始当初時期には、このようなクロマトグラフィーペーパーを加工することでマイクロ流路を作製し3次元積層する技術[引用]や、ペーパー上にインク電極を塗布・印刷することによる電気化学的センシングを行う技術[引用]が世界的に注目されはじめ、このようなペーパーによる流路・センサー技術を半導体技術と融合させる環境が整いつつあった。

2. 研究の目的

以上のような背景のなかで、本研究では検体採取・濾過・輸送・化学反応に適したクロマトグラフィーペーパー技術と、電気化学的検出・信号処理・機器小型化に適した半導体集積回路技術を、直接・間接的に統合することにより、小型で自己完結したバイオセンシ

ングの実現を目指した。具体的には、(1) ペーパーを用いた電気化学的バイオセンシング、(2) ペーパーを用いた微小流路作製、(3) 半導体集積回路チップ上でのペーパー流路統合と電気化学センシング、(4) バイオセンシングのためのセンサー集積回路設計、そして(5) スマートフォン接続型電気化学センシング集積回路とペーパーバイオセンサーの統合、に着手した。

3. 研究の方法

まず(1) ペーパーを用いた電気化学的バイオセンシングにおいては、クロマトグラフィーペーパーを電気化学的センシングで用いるための様々な課題に取り組んだ。現時点ではまだ半導体技術との統合に至らないものであっても、将来的にその可能性が含まれるものについては幅広く着手したため、ペーパー電気化学センシング技術全般への貢献となった。当然ながら、後述する半導体集積回路チップ上でのセンシングやその他半導体センシング機器との統合に生かされたものも含まれている。また(2) ペーパーを用いた微小流路作製においては、元来親水性を有するペーパー上に疎水性領域をパターンニングすることで流路を形成し、更にそのペーパーを積層することで横方向だけでなく縦方向の流れも生じさせることに着手した。次に(3) 半導体集積回路チップ上でのペーパー流路統合と電気化学センシングにおいては、半導体集積回路チップ上に電気化学的に安定であり安価・簡易に作製可能なカーボンインク電極を形成し、それを用いた電流検出型・電位検出型バイオセンシングを行った。そして(4) バイオセンシングのためのセンサー集積回路設計においては、上記(3)で用いるための電流検出回路やアナログデジタル変換回路などの設計・試作を行った。最後に(5) スマートフォン接続型電気化学センシング集積回路とペーパーバイオセンサーの統合においては、他研究課題で開発されたスマートフォンと接続可能な電気化学センシング集積回路に、本研究課題で研究開発されたペーパーバイオセンサーを接続することで、可搬型センサー機器としての応用に着手した。

4. 研究成果

本節では最初に実施項目ごとに具体的内容と成果について解説し、末尾に総括と今後の展望について述べる。

(1) ペーパーを用いた電気化学的バイオセンシング

最も応用範囲の広い、酵素反応を活用した電流検出方式での溶液中生体分子検出をペーパーにより行った。まずペーパー上に鉛筆で直接描画することでカーボン電極を作製して作用電極・対向電極とし、併せて銀塩化銀インクを塗布することで参照電極として、電気化学測定に必要な3電極系を実現し

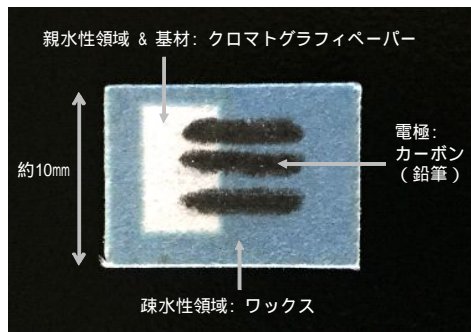


図1 ペーパーバイオセンサーの一例

た。ペーパー上にワックスプリンターで疎水性領域を定義し、親水性領域には酵素と電子伝達分子を乾燥固定した[図書]。グルコース測定では酵素:グルコースオキシダーゼと電子伝達分子:フェリシアン化イオンを用い、ヒト血中グルコース濃度を網羅する範囲で濃度比例する電流を観測した[雑誌論文]。単一のペーパー片上に、検体溶液吸引・化学反応・電極電気化学反応、などのバイオセンシングに必要な殆ど全ての機能を実現したという点において意義があり、特に鉛筆による描画によってカーボン製電気化学測定電極とする点が特徴的である。

上記と同様の酵素反応電流検出方式ペーパーバイオセンサーによりガスセンサーを実現した。ペーパーセンサー作製方法は上記と同様であるが、酵素:アルコールオキシダーゼとペルオキシダーゼ、電子伝達分子:フェロシアン化イオンを用い、ペーパーをリン酸緩衝液で湿潤した状態でその表面にエタノールを含む気体を吹きかけることで測定した。気相中エタノール分子がペーパーに担持された溶液中に拡散して溶液中にて電気化学反応が生じることで、飲酒運転呼気アルコール検査基準の気体中エタノール濃度を網羅する範囲において濃度比例する電流を観測した[雑誌論文]。クロマトグラフィーペーパーを湿潤させることで気体中の分子を捕獲し、溶液内での電気化学反応によりセンシングを行うという点で特徴的である。また、従来の半導体型ガスセンサーの難点であった選択性を酵素という生体由来分子により実現している点も特徴的である。

上記エタノールガスセンサーの基本性能をより詳細に調査し作製プロセスを最適化するため、鉛筆ではなく市販スクリーン印刷電極を用いたエタノール測定を行い、酵素・電子伝達分子固定化の温度・時間を最適化することで検出限界が改善することを明らかにした[雑誌論文 ⑩]。センサーの検出限界(LOD)を改善するためバックグラウンド電流を低減する方法を理論的に考察し、実験により実証した点で意義がある。

極微量分子検出において感度向上が期待されるレドックスサイクリング現象を、ペーパーを2つの電極で挟み込むという全く新し

い発想に基づいた構造で実現し、不可逆性酸化還元分子が夾雑物として含まれる場合でも可逆性酸化還元分子のみを選択的に濃度定量できることを実証した[雑誌論文]。従来のレドックスサイクリングは微細加工技術により微小な電極間ギャップを定義して実現するものが殆どであり、チップ作製に高価な装置と手間が必要であったが、本研究で提案するような、ペーパーの厚みによって電極間隔を定義する方式は他に類を見ず、全く新しい着想でレドックスサイクリングを実現した点が特徴的である。

イムノクロマトグラフィの基本原理である金ナノ粒子の凝集を、目視ではなく電気化学インピーダンス測定値により定量化することを目指し、ペーパー中の金ナノ粒子濃度とインピーダンス値の相関を実験的に検証し、目視困難な低濃度凝集であってもインピーダンス値の変化により検出できる可能性を示した[雑誌論文]。既に広く医療応用されているイムノクロマトグラフィの読み取りを、定量的かつ電氣的に行うことを試み、前向きな結果を得た点で意義がある。

ペーパー上に鉛筆で直接描画したカーボン電極と銀塩化銀インクにより、カーボン電極のpH感応を電位検出方式により測定し、pH5.0 ~ 9.0の間でpHセンサーとしての動作を実証した[雑誌論文]。鉛筆によりペーパー上に直接描画された線がpH電極として機能するという報告は他になく、新しい可能性を指摘することができた。

(2) ペーパーを用いた微小流路作製および(3)半導体集積回路チップ上でのペーパー流路統合と電気化学センシング

クロマトグラフィーペーパーは親水性のセルロース繊維により作製されているが、ここにシリコン樹脂塗布あるいはワックスプリンター印刷により疎水性領域を定義することで任意パターンの2次元流路を作製した。また、このペーパー流路を積層して周囲をシリコン樹脂で接着硬化させることにより3次元流路を作製した[雑誌論文]。

半導体集積回路チップ上の電極パッド上にカーボンインクを塗布・乾燥させることでカーボン電極を形成して作用・対向電極とし、同一チップ上に銀塩化銀インクによる参照電極を形成することで、チップ上に安価・簡易に電気化学3電極系を形成した。このチップ上に前述のペーパー流路を直接設置することで検体溶液の吸引・濾過を可能とし、更にチップと直接接触するペーパーに前述の技術により酵素・電子伝達分子を乾燥固定することで生体分子のセンシングを可能とした。グルコースオキシダーゼとフェリシアン化イオンを用いたグルコース測定系を作製し、反応による電極電位変化を測定するセンサーでのグルコース濃度依存電位を確認した[雑誌論文]。また電流検出方式による同様のセンサーにも取り組んだ[雑誌論文]。クロマトグラフィーペーパーと半導体集積

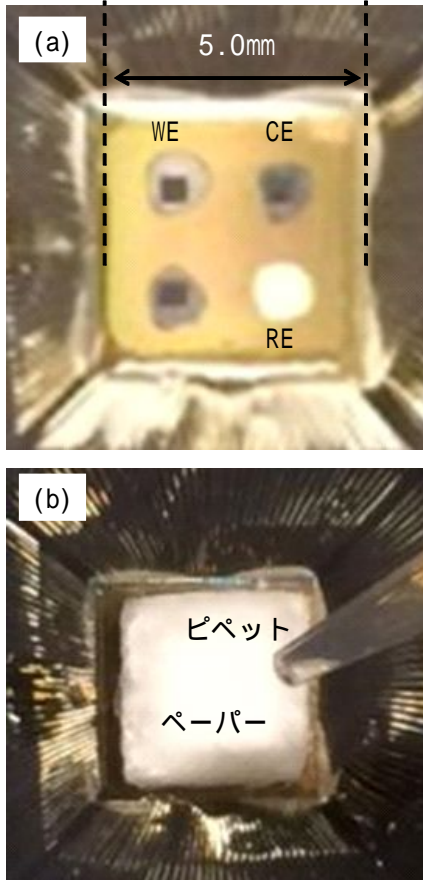


図2 CMOS集積回路とペーパーバイオセンサー統合の一例。(a) チップ表面写真、WE: 作用電極、CE: 対向電極、RE: 参照電極。(b) チップ上に直接設置されたペーパーセンサー。

回路を直接統合する初めての試みであり、バイオセンシングに必要な全ての機能を超小型化できる可能性を示した点で意義がある。(4) バイオセンシングのためのセンサー集積回路設計

上記(3)の用途で用いることを目指した電流センシング回路(ポテンシオスタット回路)やアナログデジタル変換回路(デルタシグマ変調回路)を試作した。その結果、ペーパー流路を設置した半導体集積回路チップ上電極でのグルコースの酵素反応電流を、同一チップ上に集積された電流センシング回路により測定し出力した[学会発表]。

(5) スマートフォン接続型電気化学センシング集積回路とペーパーバイオセンサー統合

他研究課題で研究開発された、スマートフォンのイヤホンジャックに接続することでエネルギーハーベスティングと電流検出型バイオセンシングを行いその結果をアプリで表示・保存する用途で設計された CMOS 集積回路に、本研究課題で開発された酵素反応電流検出型ペーパーバイオセンサーを組み合わせることで、溶液中グルコース測定および気体中エタノール測定を行った[雑誌論文

]。ペーパーバイオセンサーを単にセンサー単体として開発するだけでなく、センシングを実際に行う現場での使用を想定した実践的な機器と組み合わせて測定し、センサーが問題なく機能することを確認した点で意義がある。

以上のように、本研究課題を通してクロマトグラフィーペーパーを活用した様々な電気化学的センシング、微小流路作製、それらの半導体集積回路との直接的な統合、そして半導体技術に基づく可搬型測定機器との間接的な統合、などにおける新しい知見や可能性を明らかにすることができた。ペーパーに試薬を固定化する技術、加工により流路を形成する技術、塗布・描画により電極形成する技術などは、計測とデータ通信を除くすべての機能がフレキシブルで安価な基板により実現でき、それを誰でも容易に作製できることを示しており、これのみでフレキシブルエレクトロニクス・センシングとしての新たな展開が今後可能であろう。また、半導体集積回路チップ上に直接ペーパーを統合する技術は、未だ多くの課題を残しているが、計測・データ通信技術をペーパーセンサーに付加する一つの選択肢として今後も引き続き検討されるに値するものであろう。

<引用文献>

W. Martinez et al., Analytical Chemistry 82(1), pp. 3-10 (2010).
Z. H. Nie et al., Lab on a Chip 10(4), pp.477-483 (2010).

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

(査読有:招待論文) 宇野重康, 河原翔梧, 藤本拓也, 釜塚政男, "モバイルヘルスケアのための CMOS 集積回路とペーパーバイオセンサーの統合", 電子情報通信学会和文論文誌, vol. J101-C, no.3, pp. 156-165 (2018).
http://search.ieice.org/bin/summary.php?id=j101-c_3_156&category=C&year=2018&lang=J&abst=

(査読有) S. Yamamoto and S. Uno, "Redox Cycling Realized in Paper-Based Biochemical Sensor for Selective Detection of Reversible Redox Molecules Without Micro/Nano Fabrication Process", Sensors, vol. 18, issue 3, p. 730 (2018). DOI: 10.3390/s18030730

(査読有) M. Motooka and S. Uno, "Improvement in Limit of Detection of Enzymatic Biogas Sensor Utilizing Chromatography Paper for Breath Analysis", Sensors, vol. 18, issue 2,

p. 440 (2018). DOI: 10.3390/s18020440

(査読有) R. Kawahara, P. Sahatiya, S. Badhulika and S. Uno, "Paper-based Potentiometric pH Sensor using Carbon Electrode Drawn by Pencil", *Jpn. J. Appl. Phys.*, vol. 57, p. 04FM08 (2018). DOI: 10.7567/JJAP.57.04FM08

(査読有) T. Fujimoto, S. Kawahara, Y. Fuchigami, S. Shimokawa, Y. Nakamura, K. Fukayama, M. Kamahori, and S. Uno, "Portable Electrochemical Sensing System Attached to Smartphones and Its Incorporation with Paper-based Electrochemical Glucose Sensor", *International Journal of Electrical and Computer Engineering (IJECE)*, vol. 7, no. 3, pp. 1423-1429 (2017). DOI: 10.11591/ijece.v7i3.pp1423-1429

(査読有) S. Kawahara, Y. Fuchigami, S. Shimokawa, Y. Nakamura, T. Kuretake, M. Kamahori, and S. Uno, "Portable Electrochemical Gas Sensing System with a Paper-Based Enzyme Electrode", *TELKOMNIKA*, vol. 15, no. 2, pp. 895-902 (2017). DOI: 10.12928/telkomnika.v15i1.6142

(査読有) K. Yamaoka, J. Eguchi, and S. Uno, "Potentiometric Glucose Detection by Paper-based Electrochemical Sensor on CMOS Chip", *TELKOMNIKA*, vol. 15, no. 2, pp. 836-841 (2017). DOI: 10.12928/telkomnika.v15i1.6129

(査読有) K. Fukayama, S. Yamamoto, and S. Uno, "Electrochemical Redox Cycling Realized by Chromatography Paper-based Sensor", *TELKOMNIKA*, vol. 15, no. 2, pp. 842-846 (2017). DOI: 10.12928/telkomnika.v15i1.6130

(査読有) J. Eguchi, K. Yamaoka, and S. Uno, "Simultaneous Electrochemical Measurement using Paper Fluidic Channel on CMOS Chip", *TELKOMNIKA*, vol. 15, no. 2, pp. 847-852 (2017). DOI: 10.12928/telkomnika.v15i1.6131

(査読有) T. Kuretake, S. Kawahara, M. Motooka and S. Uno, "An Electrochemical Gas Biosensor Based on Enzymes Immobilized on Chromatography Paper for Ethanol Vapor Detection", *Sensors*, vol. 17, issue 2, p. 281 (2017). DOI: 10.3390/s17020281

(査読有) F. Hori, Y. Harada, T. Kuretake, and S. Uno, "Impedance Analysis of Colloidal Gold Nanoparticles in Chromatography Paper for Quantitation of Immunochromatographic Assay", *Analytical Sciences*, vol. 32, issue 3, p. 355 (2016). DOI: 10.2116/analsci.32.355

[学会発表](計 25 件)

(招待講演) S. Uno, "Electrochemical Biosensors based on CMOS LIS Chips", 233rd ECS Meeting, 2018.

R. Kawahara and S. Uno, "Paper-based Potentiometric pH Sensor using Carbon Electrode Drawn by Pencil", *International Conference on Solid State Devices and Materials (SSDM2017)*, 2017.

S. Yamamoto and S. Uno, "Redox Cycling Realized in Paper-based Electrochemical Biosensor for highly-selective Detection of Potassium Ferrocyanide in the presence of Ascorbic Acid", 5th International Symposium on Sensor Science (I3S2017), 2017.

M. Motooka and S. Uno, "Improvement in Limit of Detection of Paper-Based Electrochemical Enzymatic Biogas Sensor", 5th International Symposium on Sensor Science (I3S2017), 2017.

J. Eguchi, K. Yamaoka and S. Uno, "Electrochemical Current Measurement by CMOS Potentiostat Integrating Chromatography Paper Fluidic Channel and CMOS LSI Chip for Small Biosensors", 5th International Symposium on Sensor Science (I3S2017), 2017.

(依頼講演) 宇野重康, "電気化学的バイオセンサーを用いた簡易迅速診断のためのデバイスと集積回路", 応用物理学会有機分子・バイオエレクトロニクス分科会講習会「バイオセンシングの新展開」2016.

(依頼講演) 宇野重康, 河原翔梧, 藤本拓也, 釜塚政男, "モバイルヘルスケアのための CMOS 集積回路とペーパーバイオセンサーの統合", 2016 年電子情報通信学会ソサエティ大会, 2016

K. Fukayama, S. Uno, and S. Yamamoto, "Enhancement of Electrochemical Current by Redox Cycling Realized by Chromatography Paper-based Biochemical Sensor", The International Conference on Electrical, Electronic, Communication and Control Engineering (ICEECC2016), 2016.

K. Yamaoka, J. Eguchi, and S. Uno, "Potentiometric Detection of Glucose in Liquid Sample by Chromatography Paper Fluidic Channel and CMOS LSI Chip", The International Conference on Electrical, Electronic, Communication and Control Engineering (ICEECC2016), 2016.

J. Eguchi, K. Yamaoka, and S. Uno, "Simultaneous Electrochemical Current Measurement Using Chromatography Paper Fluidic Channel and CMOS LSI Chip for Biosensor Applications", The International Conference on Electrical, Electronic, Communication and Control Engineering (ICEECC2016), 2016.

T. Fujimoto, S. Kawahara, Y. Fuchigami, S. Shimokawa, Y. Nakamura, K. Fukayama, M. Kamahori, and S. Uno, "Portable Electrochemical Sensing System Attached to Smartphones and Its Incorporation with Paper-based Electrochemical Glucose Sensor", The International Conference on Electrical, Electronic, Communication and Control Engineering (ICEECC2016), 2016.

S. Kawahara, Y. Fuchigami, S. Shimokawa, Y. Nakamura, T. Kuretake, M. Kamahori, and S. Uno, "Electrochemical Quantitative Analysis of Ethanol Gas Using Paper-Based Electrode with Immobilized Enzymes by Sensing System Attached to a Smartphone", The International Conference on Electrical, Electronic, Communication and Control Engineering (ICEECC2016), 2016.

F. Hori and S. Uno, "Electrochemical Impedance Spectroscopy of Colloidal Gold Nanoparticles in Chromatography Paper for Immunochromatographic Assay", International Conference on Solid State Devices and Materials

(SSDM 2014), 2014.

Q.N. Hassanuddin, M. Miki, and S. Uno, "An Enzymatic Amperometric Alcohol Sensor on CMOS Chip using Carbon Ink Electrode and Chromatography Paper", Malaysia Japan Academic Scholar Conference 2014 (MJASC 2014), 2014.

S. Iwahara, Y. Harada, S. Uno "Dependence of Electrochemical Impedance on Latex Beads Density of Electrolytic Solution in Chromatography Paper", 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies (EMNT2014), 2014.

Y. Harada, S. Iwahara, S. Uno "Basic Study of Electrochemical Measurement with Chromatography Paper", 10th International Symposium on Electrochemical Micro & Nanosystem Technologies (EMNT2014), 2014.

その他国内発表 9 件

〔図書〕(計 1 件)

宇野重康、河原翔梧、藤本拓也、シーエムシー出版、「細胞・生体分子の固定化と機能発現」第一章:紙ベースの酵素固定化とバイオケミカルセンサー、2018年(総 294 ページ)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

宇野 重康 (UNO, Shigeyasu)

立命館大学・理工学部電気電子工学科・教授

研究者番号 : 40420369