

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13904

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26709025

研究課題名(和文) MEMS-CMOSイメージセンサ技術による非標識マルチモーダルバイオセンサ

研究課題名(英文) A label-free multi-modal biosensor using MEMS-CMOS image sensor technology

## 研究代表者

高橋 一浩 (Takahashi, Kazuhiro)

豊橋技術科学大学・工学(系)研究科(研究院)・講師

研究者番号：90549346

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではCMOSイメージセンサの各画素上に集積化したMEMSファブリペロー干渉計を用いて、タンパク質をはじめとする生体分子同士にはたらく分子間力をとらえることにより、標識を用いずに分子を検出し、さらに吸着分子の構造変化を捉えることが可能なマルチモーダルセンサの開発を行った。その成果として、従来よりも22倍ストレス感度が高い分子間力センサと100倍高感度なMEMS質量センサの作製に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a label-free multi-modal biosensor using a MEMS Fabry-Perot interferometer integrated with a CMOS image sensor, which can measure intermolecular force of adsorbed molecules as well as structural change of protein. As a result, we demonstrated 22 times higher stress sensitivity and 100 times higher mass sensitivity than that of conventional biosensors.

研究分野：マイクロメカトロニクス

キーワード：バイオセンサ MEMS ファブリペロー干渉計 CMOSイメージセンサ 非標識 タンパク質

### 1. 研究開始当初の背景

生命現象の重要な役割を担っているタンパク質の立体構造変化を可視化することによって分子の機能を解明することは、生命のしくみを理解する上で大きな意義を持つ。MEMS 技術を用いて分子同士の相互作用を表面ストレスとして機械的な変位に読み替えて検出する技術は、標識剤を用いない方法としてタンパク質の高次構造への影響がなく、医療・創薬の分野から期待が高い。本研究では、分子同士の相互作用を電気信号に変換する技術として、ファブリペロー干渉を利用した新規なトランスデューサを提案している(図 1)。このセンサはセンサ機能面と測定対象分子との相互作用に起因する表面ストレスを検出する。すなわち抗原の捕捉に伴う力学的変化を基板の表面ストレス変化として伝え、MEMS キャビティ変位量として検出する。光透過率の非線形な信号変換を利用することにより、従来用いられてきたピエゾ抵抗方式を遙かに凌駕し、100 倍の超高感度分子間力検出が可能である。さらに MEMS ファブリペロー型センサと集積回路技術を融合し、分子の並列・ハイスループット処理も可能となり、従来技術では観測不可能であった生体分子の機能解明が期待できる。

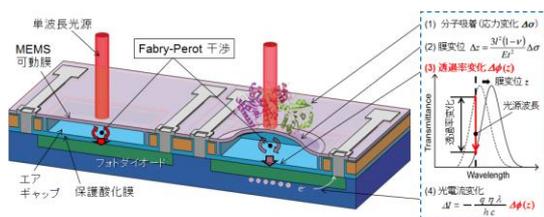


図 1 MEMS 光干渉型表面応力センサの模式図

### 2. 研究の目的

本研究では CMOS イメージセンサの各画素上に集積化した MEMS ファブリペロー干渉計を用いて、タンパク質をはじめとする生体分子同士にはたらく分子間力をとらえることにより、標識を用いずに分子を検出し、さらに機能と分子構造の関係を明らかにすることを目的としている。新規に提案した光透過率の非線形な信号変換技術によって、従来方式を遙かに凌駕し、100 倍の超高感度分子間力検出を目指す。また、生体分子を吸着する可動膜に圧電電極を備えることによって共振駆動を行い、吸着分子質量の同時測定および定量化を行う。生体分子の物理的・化学的応答をリアルタイムに可視化し、ライフサイエンスの分野へ新たな価値を提供する生体分子計測技術を創出する。

### 3. 研究の方法

#### (1) エラストマーナノシートを利用した高ストレス感度表面応力センサの作製

光干渉型表面応力センサは、ファブリペロー干渉計を構成するダイヤフラム部にヤング率の低い材料を用いることによって分子

吸着時に発生するストレスの応答特性を向上することが期待できる。共同研究先の早稲田大学 藤枝先生より提供していただいたポリスチレン-ポリブタジエン-ポリスチレン (SBS) ナノシートは 59 MPa の低ヤング率を備えており、プロトタイプとして用いていたパリレン C を SBS ナノシートに置き換えることによって 100 倍のストレス感度向上が期待できる。SBS ナノシートのバイオセンサデバイスへの応用に向けて、分子吸着時の変形特性評価として、690 nm の膜厚を持つナノシートの自立膜上にアルブミンの抗体 100  $\mu\text{m}/\text{mL}$ 、5  $\mu\text{L}$  を滴下し、30 分静置した後に乾燥して白色干渉顕微鏡でダイヤフラムの形状を評価した。

光干渉法により分子吸着時の表面ストレスを評価するため、SBS ナノシートを可動膜とする MEMS 光干渉計の作製を行った。シリコン基板中にシャロートレンチを形成し、SBS ナノシートの高い凝着力を利用して気相、常温で転写を行い、ナノシートとシリコン基板間にナノキャビティを形成した。このキャビティ長によって決まる干渉特性を利用し、SBS ナノシート可動膜上に分子が吸着したときの膜の動きを干渉特性の変化によって評価を行う。

#### (2) 金属ハーフミラーを用いた高い波長選択性を持つ光干渉計の製作

光干渉型 MEMS センサは、フォトダイオード上に集積化した光干渉計において、光の透過スペクトル幅を狭くすることで分子吸着時の出力応答を向上できる。すなわち、高い波長選択性を持つ光干渉計は可動膜の変位検出感度を増大させ、最少検出限界の向上が可能になる。従来パリレン C を可動膜として用いていたため、反射率が低かった可動膜上とシリコン基板上に反射率の高い Au ハーフミラーを一体化することにより、波長選択性を向上した表面応力バイオセンサを作製する。

#### (3) カルモジュリンの構造変化測定

センサ上に修飾するレセプターを抗体から受容体タンパクに変更し、化学刺激に伴う受容体の構造変化応答によるセンサ出力を評価する。すなわち、検出対象物質そのものの吸着によりセンサの変形応答を発生する系ではなく、受容体プローブの質的变化がセンサの出力に直接的に作用する原理を利用することによって神経伝達物質を非標識に検出することが可能になる。原理検証に用いる受容体タンパクとして、市販されているカルモジュリンをセンサ可動膜表面に修飾してカルシウム刺激に対するセンサの変位量を定量する。

#### (4) グラフェン共振器を用いたマルチモードバイオセンサ

MEMS ダイヤフラムの振動による吸着分

子の質量・分子間力の同時測定のため、導電2次元材料であるグラフェンを用いてキャビティを封止する構造の作製を行った。吸着分子の質量感度は振動膜との相対質量比で決まるため、2次元材料を用いることにより高感度質量検出が期待でき、解析的には質量分解能がヨクトグラム( $10^{-24}\text{g}$ )オーダーを達成できると見積もられている。しかしながら、分子選択性をもつグラフェン共振器センサは報告されていない。この原因は、従来のグラフェン共振器構造では、ウェット処理への耐久性がないことと、空気粘性の影響により大気中で高いQ値が得られないことが挙げられる。これらの課題を解決するために本研究では、グラフェンにより微小キャビティを真空封止したドラム型グラフェン共振器を提案する。本構造はウェット処理への耐久性があると同時に空気粘性による共振器のエネルギー減衰を低減できる。減圧状態でグラフェンを支持するPMMA(Polymethyl methacrylate)フィルムのガラス転移温度以上の加熱処理を行い、対向基板に転写する新規ドライ転写技術により単層グラフェンキャビティ封止構造を形成した。

#### 4. 研究成果

(1) エラストマーナノシートを利用した高ストレス感度表面応力センサの作製

SBS ナノシートで形成した直径  $200\ \mu\text{m}$ 、膜厚  $690\ \text{nm}$  のダイヤフラムに対し、アルブミンの抗体  $100\ \mu\text{m}/\text{mL}$ 、 $5\ \mu\text{L}$  を滴下して、分子吸着時の応力による膜変形を評価したところ、ダイヤフラムの高低差は最大  $5\ \mu\text{m}$  程度のものが観察された(図 2)。従来のパイレネ C を用いたダイヤフラムでは、変形量の典型値は数十ナノメートルオーダーであったことから、分子吸着によるストレス感度の向上を示唆しているものと考えられる。さらに乾燥後に 30 分後 1 時間後に形状を測定したところ、形状は徐々に元の状態へ戻っていく様子が観察された。タンパク質は空気中では 30 分程度で形状を維持できなくなり失活することが知られているため、ダイヤフラムの形状変化はタンパク質の活性に依存して膜にストレスが印加されているものと考えられる。

ドライ転写により形成したナノキャビティのアスペクト比は最大  $667:1$  が得られた。 $-50\ \text{kPa}$  の減圧状態でダイヤフラムが  $500\ \text{nm}$  変形する様子を観測し、転写膜のよい密着性が確認できた。また、溶液中において SBS は液体を透過せずにキャビティが保持されていることが確認できた。分子修飾時のスペクトル測定では、滴下した溶液の乾燥によって測定中に可動膜へのストレス変化が生じないように、チップを完全に溶液中に沈めての測定を行った。また、SBS の表面にはキトサンとアルギン酸の交互積層膜(トータル膜厚  $40\ \text{nm}$  程度)を共同研究先の早稲田大学藤枝先生に成膜していただき、キトサンのア

ミノ基と抗体との静電吸着により分子の修飾を行った。キャビティの深さ  $3.3\ \mu\text{m}$ 、直径  $50\ \mu\text{m}$  の液中測定用チップを用いて、ネガティブコントロールとして生理食塩水(PBS buffer)では 60 分間の測定中に一貫して干渉ピークのブルーシフトが観察されたため、可動膜は基板方向に沈む動きが発生していることを示した(図 3(a))。これは、可動膜表面に分子吸着が無いため膜が膨らむ力が働かず、水圧によって膜が徐々に沈む動きを捉えているものと考えられる。また、60 分間ブルーシフトが続いている理由としては、SBS ナノシートにガス透過性があることから、水圧で膜が沈むにつれて密閉されたキャビティ内の空気が少しずつ抜けることで、60 分観測し続けても徐々にブルーシフトしたと考えられる。次に、anti-BSA 溶液中に沈め 60 分間干渉スペクトル変化を測定した結果、測定開始から 10 分間は PBS buffer のときと同様にブルーシフトが確認されたが、測定開始 10 分後からレッドシフトが観察された(図 3(b))。これは、徐々に可動膜表面にタンパク質抗体が吸着していくことで膜が膨らむ力が水圧を上回り、可動膜が膨らんだことを示唆する結果である。Parylene C を用いた従来構造のスペクトルシフト量は  $0.0625\ \text{nm}/\text{min}$  であったが、今回の SBS ナノシートを用いた構造では  $1.41\ \text{nm}/\text{min}$  程度のシフト量が得られ、約 22 倍ストレス感度が向上したという結果が得られた。

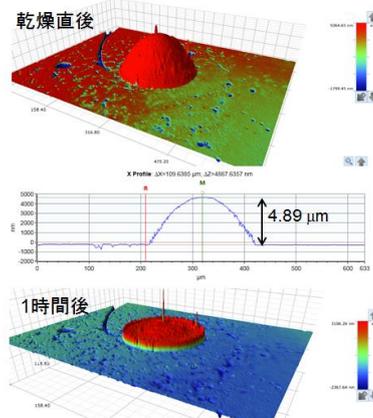


図 2 BSA 抗体修飾後のダイヤフラム形状と乾燥後 1 時間の形状

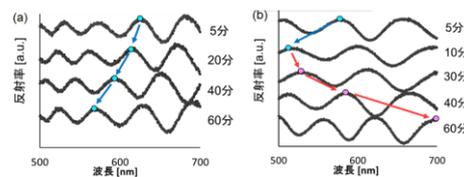


図 3 PBS と BSA 抗体溶液中のセンサ干渉スペクトル変化

(2) 金属ハーフミラーを用いた高い波長選択を持つ光干渉計の製作

センサの最少検出限界向上に向け、センサ可動膜上部・下部に金ハーフミラーを集積して信号変換効率(可動膜変形時の出力信号変化の比)の向上を実現するデバイスの製作を

行った。ハーフミラー材料には金を用いることで信号変換効率の向上だけでなく、チオール基を有する SAM 分子の導入が容易となり、センサ上への分子修飾が可能となる。光干渉計の信号変換効率はセンサ上に光を照射した際の反射光を分光測定し、反射スペクトルの勾配を計算することで評価することができる。分光測定の結果、光学解析に近い特性が得られており、従来構造と比較して 6.6 倍の信号変換効率を実現した(図 4)。さらに、集積化した金ハーフミラー上にアルブミン抗体 100  $\mu\text{g/mL}$  を吸着させ、アルブミン抗原 10  $\mu\text{g/mL}$  を滴下した時に最大で 40.3 nm の波長シフトを観測した(図 5)。これは抗原抗体反応により、可動膜が上方に膨らみ、エアギャップが増加することで長波長側に波長シフトが生じたと考えられる。以上の結果から、Au ハーフミラーを集積した MEMS 光干渉型センサにおいて、波長選択性を向上し非標識バイオセンシングが可能であることが示された。

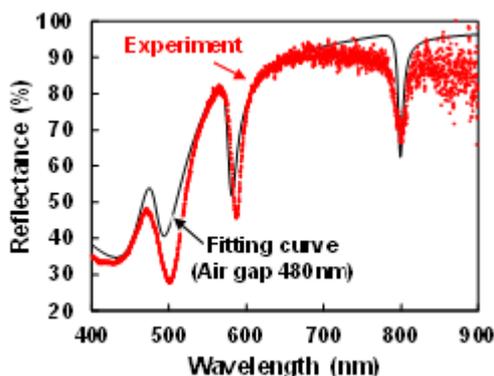


図 4 製作した光干渉計の反射スペクトル特性

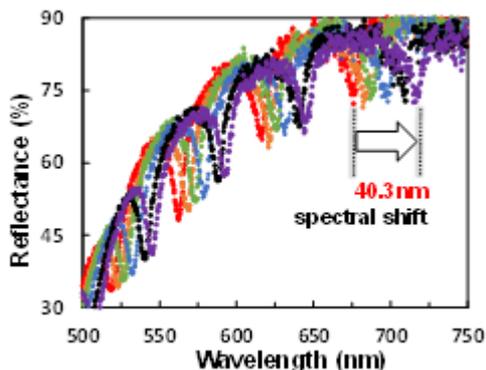


図 5 BSA 抗原抗体反応に起因する波長シフトの様子

### (3) カルモジュリンの構造変化測定

カルモジュリン 2 mg/mL に 4 時間センサチップを浸し、ダイヤフラム上にカルモジュリンを修飾したときのセンサの表面プロファイルを白色干渉顕微鏡で測定した結果を図 6(a)に示す。このときの測定は、装置の制約上溶液内のチッププロファイル測定が困難なため、チップの乾燥直後に測定を行った。ダイヤフラムは上に膨らむ形状に変形して

いる様子が観察され、修飾したカルモジュリン同士の反発力によって形状変化が得られたと考えられる。このセンサチップに対し、1 mM の  $\text{CaCl}_2$  でカルシウム刺激を行ったところ、ダイヤフラムはさらに 600 nm 程度膨らむ様子が観察された(図 6(b))。これは、カルシウムイオンを取り込んだカルモジュリンが構造変化を起こし、カルモジュリン同士の反発力がさらに増したことを示唆する結果である。ただし、この実験では乾燥状態でカルモジュリンからの表面ストレスの評価を行っていたため、変形量の乾燥後の時間変化が大きく、より厳密な評価を行うためにはマイクロ流路中で溶液交換を行ってセンサからの出力を取得する必要があると考えられる。

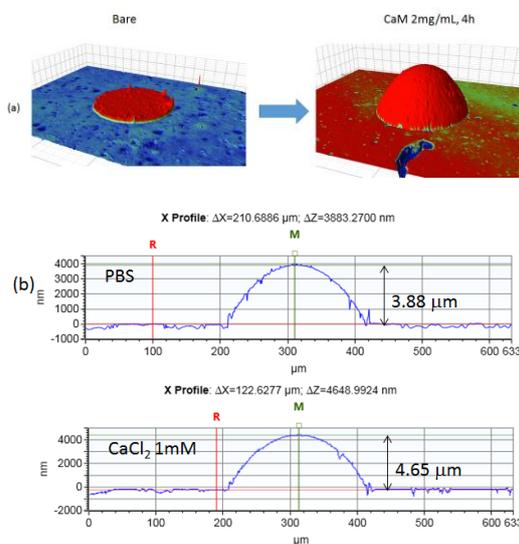


図 6 (a)カルモジュリン修飾前後のダイヤフラム形状 (b)カルシウム刺激前後のダイヤフラム形状

### (4) グラフェン共振器を用いたマルチモードバイオセンサ

図 7 に減圧ドライ転写技術により製作したグラフェンドラムの電子顕微鏡画像を示す。直径 1.2~4.5  $\mu\text{m}$  のサンプルにおいて、外気(SEM チャンバ)圧力( $\sim 10^{-5}$  Pa)とキャビティ内圧力( $\sim 10^3$  Pa)との圧力差によりグラフェンが上方に膨らんでいる様子が確認できた。次にグラフェンドラムの真空封止性を確認するために、ラマンシフトによる歪み評価を行った。グラフェンには引張歪みの印加によりラマンピークは低波数側にシフトすることが知られている[Nat. Commun. 3, 1024 (2012)]. 各サンプルにおけるラマンスペクトルより、真空封止されているグラフェンドラムのみが G ピークが  $4 \text{ cm}^{-1}$ 、2D ピークが  $11 \text{ cm}^{-1}$  低波数側にシフトしている様子が観測され、ラマンシフトとひずみ量の関係を調査した文献値[Nano Lett, 10(1), 6 (2010)]より、 $0.05 \pm 0.01 \%$  の 2 軸歪みが印加されていることが示唆された(図 8)。直径 30  $\mu\text{m}$  のグラフェン共振器を常温、圧力 6.0  $\times$

$10^{-2}$  Pa の環境で機械共振特性を評価した結果、共振周波数 1.35 MHz、Q 値 300 が得られ (図 9)、これらの数値より質量検出限界は  $7.4 \times 10^{-20}$  g/ $\mu\text{m}/\sqrt{\text{Hz}}$  と見積もることができた。この値は高性能なシリコン共振器と比較して約 2 桁程度小さな質量を検出できることを示している [Sens. Actuat. B 160, 1120 (2011)]。今回の測定では、計測器の周波数レンジから封止されていないデバイスのみの評価を行ったが、レーザー励起による振動計測により [Nanoscale 7, 877 (2015)]、さらに高い共振特性の取得が期待できる。

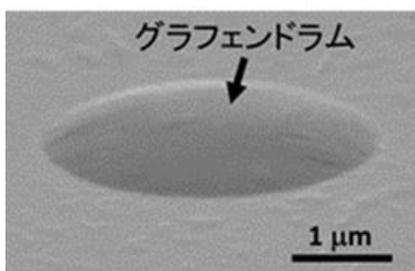


図 7 ドラム型グラフェン共振器の SEM 写真

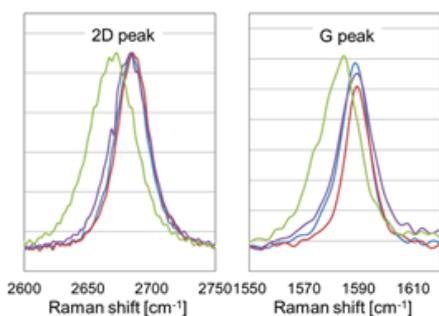


図 8 サスペンデットグラフェンのラマン分光測定結果

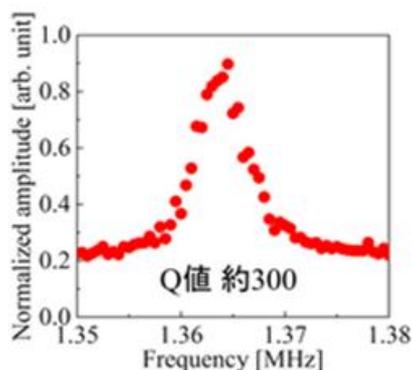


図 9 直径 30  $\mu\text{m}$  のグラフェン共振器の共振特性

##### 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 5 件)

[1] H. Kumagai, N. Sato, S. Takeoka, K. Sawada, T. Fujie, and K. Takahashi, “Optomechanical characterization of

freestanding stretchable nanosheet based on polystyrene-polybutadiene-polystyrene copolymer,” Applied Physics Express, vol. 10, no. 1, 011601 (2017)

- [2] K. Takahashi, T. Fujie, N. Sato, S. Takeoka, K. Sawada, “An elastomer-based MEMS Fabry-Perot interferometer for physical and biological sensing by dry transfer technique,” 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), January 22 - 26, 2017, Las Vegas, NV, USA, pp. 704-707.
- [3] H. Ishida, T. Iwata, K. Sawada, K. Takahashi, “Development of graphene drum resonator with nanocavity by low-pressure dry transfer technique,” 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), January 22 - 26, 2017, Las Vegas, NV, USA, pp. 928-931.
- [4] T. Iwata, H. Doi, K. Okumura, T. Horio, T. Hattori, K. Takahashi, and K. Sawada, “Comparative study on the deposition of enzyme-entrapped membranes with spatial homogeneity for bioimaging,” Sensors & Actuators B, vol. 239, pp. 800-806 (2017)
- [5] Y. N. Lee, K. Okumura, T. Iwata, K. Takahashi, T. Hattori, M. Ishida, and K. Sawada, “Development of an ATP and hydrogen ion image sensor using a patterned Apyrase-immobilized membrane,” Talanta, vol. 161, pp. 419-424 (2016)

[学会発表] (計 34 件)

- [1] R. Teramoto, S. Maruyama, T. Fujie, N. Sato, S. Takeoka, K. Sawada, and K. Takahashi, “An elastomer-based MEMS Fabry-Perot interferometric surface-stress sensor for biomarker detection,” 9th Int. Conf. on Molecular Electronics and Bioelectronics, (M&BE9), 26-28 June, 2017, Kanazawa, Japan, accepted.
- [2] T. Takahashi, T. Hizawa, N. Misawa, M. Taki, K. Sawada, and K. Takahashi, “Fabry-Perot interferometric surface-stress sensor with high wavelength selectivity for label-free biosensing,” The 19th Int. Conf. on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers 2017), June 18-22, 2017, Kaohsiung, Taiwan, W2A.005
- [3] H. Ishida, T. Iwata, K. Sawada, K. Takahashi, “Development of graphene drum resonator with nanocavity by low-pressure dry transfer technique,” 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), January 22 - 26, 2017, Las Vegas, NV, USA, pp. 928-931.

- [4] K. Takahashi, T. Fujie, N. Sato, S. Takeoka, K. Sawada, "An elastomer-based MEMS Fabry-Perot interferometer for physical and biological sensing by dry transfer technique," 30th IEEE Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS 2017), January 22 - 26, 2017, Las Vegas, NV, USA, pp. 704-707.
- [5] R. Teramoto, T. Fujie, N. Sato, S. Takeoka, K. Sawada and K. Takahashi, "Surface Stress Evaluation Induced by Biomolecular Adsorption on Freestanding Elastomer Nanosheet," 29th Int. Microprocesses and Nanotechnology Conf. (MNC 2016), November 8-11, 2016, ANA Crowne Plaza Kyoto, Kyoto, Japan, 11P-11-86.
- [6] K. Go, H. Ishida, K. Sawada and K. Takahashi, "Fabrication of Microstructures on Dry-transferred Freestanding Graphene for Nanomechanical Resonator," 29th Int. Microprocesses and Nanotechnology Conf. (MNC 2016), November 8-11, 2016, ANA Crowne Plaza Kyoto, Kyoto, Japan, 11P-11-93.
- [7] K. Takahashi, "MEMS optical interferometric surface-stress sensor for multi-biomarker detection," The Irago Conference 2016, 1-2 Nov. 2016 (**Invited**)
- [8] H. Ishida, K. Sawada, M. Ishida, and K. Takahashi, "Estimation of strain in freestanding graphene developed by dry transfer technique," 7th International Symposium on Control of Semiconductor Interfaces /International SiGe Technology (ISCSI-VII/ISTDM2016), June 7-11 Nagoya, FP4-A-2
- [9] H. Ishida, K. Sawada, M. Ishida, and K. Takahashi, "Edge-clamped graphene diaphragm with nano cavity using dry transfer technique," Asia-Pacific Conference of Transducers and Micro-Nano Technology 2016 (APCOT 2016), 26-29 Jun., 2016, Kanazawa, Japan
- [10] H. Ishida, M. Ishida, K. Sawada, and K. Takahashi, "Resonant mass sensor using ring-shape PZT thin film toward a multimodal biosensor," Irago conf. 2015, 22-23 Oct., 2015, Irago, Japan
- [11] Y. Masuya, R. Ozawa, M. Ishida, K. Sawada, and K. Takahashi, "Fast mechanical biosensing in liquid using MEMS Fabry-Perot interferometric surface-stress sensor," Proc. 18th Int. Conf. on Solid-State Sensors, Actuators and Microsystems (Transducers'15), 21-25 June, 2015, Anchorage, Alaska, USA, pp. 1613-1616.
- [12] K. Takahashi, Y. Masuya, R. Ozawa, M. Ishida, and K. Sawada, "Development of nanocavity sealing process for MEMS optical interferometric biosensor," 2015 Int. Conf. on Electronics Packaging & iMAPS All Asia Conf., 14-17 Apr., 2015, Kyoto, Japan, pp. 120-123.
- [13] K. Takahashi, R. Ozawa, M. Ishida, and K. Sawada, "Estimation of diaphragm deformation induced by molecular adsorption on MEMS optical interferometric biosensor," Int. Conf. on Optical MEMS & Nanophotonics 2014, 17-21 Aug., 2014, Glasgow, Scotland, pp. 5-6.
- [14] Y. Masuya, K. Takahashi, R. Ozawa, T. Hizawa, M. Ishida, and K. Sawada, "Highly sensitive MEMS Fabry-Perot interferometric biosensor with Ag half-mirror and responsivity photodiode," 7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, June 29-July 2, 2014, Daegu, Korea, 8-1.
- [15] R. Ohashi, K. Takahashi, M. Ishida, and K. Sawada, "Fabrication of large area graphene resonator for capacitive mass sensing," 7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, June 29-July 2, 2014, Daegu, Korea, 11-8.
- [16] K. Takahashi, C. Sasaki, M. Tani, T. Koyama, M. Akamatsu, Y. Yasuda, M. Ishida, and K. Sawada, "Piezoelectric MEMS resonator based on PZT thin films for chemical and biological sensing," 7th Asia-Pacific Conference on Transducers and Micro/Nano Technologies, June 29-July 2, 2014, Daegu, Korea, 2-2.

他国内学会 18 件 (招待講演 2 件含む)

[産業財産権]

○取得状況 (計 1 件)

名称：物理・化学センサおよび物理・化学現象センシングデバイスならびにこれらの製造方法

発明者：高橋一浩、澤田和明、大山泰生

権利者：国立大学法人豊橋技術科学大学

種類：特許登録

番号：特許第 5988055 号

取得年月日：2016 年 9 月 7 日

国内外の別：国内

[その他]

ホームページ

<http://int.ee.tut.ac.jp/icg/wp/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高橋 一浩 (TAKAHASHI, Kazuhiro)

豊橋技術科学大学・工学研究科・講師

研究者番号：90549346