

研究報告書

「光干渉型分子間力センサによる高感度マルチバイオマーカー検出システム」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 2015 年 10 月～2019 年 3 月

研究者: 高橋 一浩

1. 研究のねらい

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することを目的としている。センサ機能面への分子の吸着によるストレス変化を検出する本方式では、材料・トランスデューサ・信号処理回路の 3 つのアプローチによって、従来方式を 2 桁以上上回る超高感度分子間力検出、および超ハイスループット分子スクリーニングが可能である見込みを得た。

本提案では、**センサの超高感度化により腫瘍マーカー基準値である 1 ng/mL の濃度を 1 分以内の検出、および 1000～1 万ピクセルの並列処理**を目的に以下の項目に取り組む。

- (1) 低ヤング率高分子膜の薄膜化による表面ストレス応答の 10 倍向上
- (2) 光干渉トランスデューサの信号伝達特性の 10 倍向上
- (3) CMOS イメージセンサ技術を用いた低ノイズ、低消費電力信号処理、1000～10 万ピクセルの並列処理によるハイスループットマーカー検出の実現

以上の課題遂行による成果物として、検出時間の 100 分の 1 への時間短縮と、マルチマーカー検出により、桁違いの情報処理エネルギー効率の向上を実現する。

2. 研究成果

(1) 概要

光干渉型表面応力センサにおいて可動膜として用いる材料は、ヤング率が高く変形量の小さい半導体に限定されず、ソフトマテリアルを用いて分子吸着に対する変形量を増大させることが可能である。また、表面応力センサは膜厚の 2 乗に反比例して検出感度が向上するため、可動膜の薄膜化による感度向上も期待できる。そこで可動膜材料として、ポリレン C、ポリスチレンーポリブタジエンーポリスチレントリブロック共重合体 (SBS)、グラフェンの 3 種類の膜をセンシング材料として作製を行い、各材料によって形成したサスペンデッド膜により MEMS 光干渉計の形成に成功した。特にサスペンデッドグラフェンを利用した表面応力センサでは、解析的な応力検出下限が 3 桁向上できることが示唆された。

光の干渉を利用する提案技術は、干渉スペクトルを鋭くするほど膜変位に対する透過率の変化は急峻になるため、信号変換効率は波長選択性の設計により向上することができる。可動膜の上部および下部基板上に反射率を向上する膜厚 50 nm の金ハーフミラーを一体化し、6.6 倍の信号変換効率を有するセンサの作製に成功した。

MEMS 光センサを CMOS イメージセンサの各画素上に形成することによって、多項目の分子を同時に、かつ短時間にスクリーニング処理することができる。CMOS 検出回路一体化型

のセンサチップを作製し、光反射スペクトル変化とセンサ部で受光した光信号を信号処理回路で電流-電圧変化し、電圧-時間変化測定を行った。チップをエタノール雰囲気中に暴露したときの反射光強度変化と、出力電圧の時間変化が一致していることから、膜の変形量を電圧で出力できていることが示せた。さらに、32x32 イメージセンサを作製し、各画素に入射した光の強度変化を画像出力として取得可能な測定システムを構築した。

バイオマーカー分子の検出のため、ダイヤフラム直径 300 μm の 150 nm PMMA/100 nm パリレン C 膜上でヒト血清アルブミン(HSA)をモデル分子として抗原抗体反応評価を行った。HSA の終濃度は $10^{-9} \sim 10^{-15}$ g/ml として滴下 25 分後の最大波長シフト量を比較したところ、濃度に依存して波長シフトが変化する様子が確認され、1 fg/ml の抗原に対しても生理食塩水との有意差が示された。ここで応答が確認できた検出下限濃度は、蛍光標識法で最も感度の良い digital ELISA に近い数値(検出限界 60 ag/mL)であり、原理的に多項目の検出が不可能な digital ELISA 技術に対して、単素子でその検出下限に迫る値を取得できた。

(2) 詳細

研究テーマ A「サスペンデッド膜形成技術の確立」

シリコン基板上に CVD 法により成長した 100 nm のパリレンCを基板から剥離し、キャビティを形成した被転写基板に転写を行うことにより、パリレン C の可動膜の形成を行った。このとき、被転写基板側には同じくCVDで成膜を行ったパリレンCをバインダとして使用し、パリレンC同士を接着させ、160 度以上で加熱を行い、強固な接着力が得られることを確認した(図1(a))。なお、パリレンC膜上には 150 nm 程度のポリメタクリル酸メチル(PMMA)を成膜しており、UV/O₃によって表面を酸化することによりカルボキシル基を形成し、このカルボキシル基を利用して抗体分子の固定化を行う。

次に、エラストマー材料である SBS をナノ薄膜化したシートを使って、光干渉センサの作製を行った[JJAP 57, 010302 (2018)]。膜厚 600 nm の SBS ナノシートを用いて作製した干渉計の反射スペクトルから、エアギャップ長のフィッティングを行ったところ、2.42 μm のエアギャップでよい一致が見られた。エラストマーを使用することにより従来のパリレンCを用いたセンサと比較し応力感度が 7 倍程度向上する結果が得られた。

表面応力センサは膜厚の 2 乗に反比例して検出感度が向上するため、グラフェンの自立構造を作製し、可動膜材料とすることで単位面積当たりのストレス感

度は大幅な向上が期待できる。銅箔上に CVD 成長したグラフェンを、PMMA を支持膜としてピックアップし、シリコン基板に転写を行うことによって、キャビティが封止された自立ラフエン構造を作製した。図 1(c)に示すように自立グラフェンが形成された箇所に光干渉が発生してお

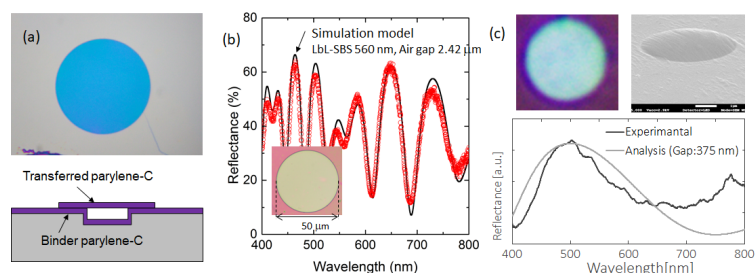


図 1 (a)パリレン C, (b)SBS, (c)グラフェンを用いた光干渉センサ

り、青い干渉色が確認できる。光干渉の理論式を用いて、基板と自立グラフェンとのギャップ長をパラメータとして数値計算を行ったところ、設計値に近い 375 nm の時に測定したスペクトルとの一致が見られ、ギャップ長を光干渉測定によって評価できることが分かった。

研究テーマ B「光干渉トランスデューサ技術の確立」

光の干渉を利用して吸着分子の反発力による膜の変形を高感度に検出する MEMS 光干渉型センサは、干渉スペクトルを鋭くするほど、膜変位に対する透過率の変化は急峻になるため、信号変換効率は波長選択性の設計により向上することができる。干渉計の波長選択性は、エアギャップを挟んで対向する材料表面の反射率に依存するため、可動膜のポリレン C の上部および下部基板上に膜厚 50 nm の金ハーフミラーを一体化した。分光測定を行った結果、近赤外波長領域においてミラーの無い光干渉計と製作した光干渉計の反射スペクトル勾配を比較すると、6.6 倍急峻になっている結果が得られたことから、高い信号変換効率を有する MEMS 光干渉計の作製に成功した(図 2)[JMM]。

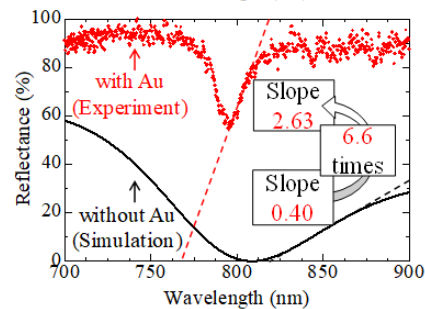


図 2 金ハーフミラーを備えた光干渉トランスデューサの反射スペクトル

研究テーマ C「イメージセンサ回路による並列処理技術の確立」

膜変形時の光強度変化の検出には、微細化・高集積化された CMOS イメージセンサの信号処理技術を用いることができる。吸着分子間の反発力を信号変換する MEMS 光干渉計を CMOS イメージセンサの各画素上に形成することによって、多項目のターゲット分子を同時に、かつ短時間にスクリーニング処理することが期待できる。CMOS 検出回路一体化型のセンサチップを作製し、光反射スペクトル変化とセンサ部で受光した光信号を信号処理回路で電流-電圧変化し、電圧-時間変化測定を行った(図 3(a))。波長 530 nm の単波長光源を使用し、チップをエタノール雰囲気中に暴露したときの反射光強度変化と、出力電圧の時間変化が一致していることから、膜の変形応答を電圧変換できていることが示せた[Sensors 18, 138 (2018)]。さらに、32x32 イメージセンサを作製し、各画素に入射した光の強度変化を画像出力として取得可能な測定システムを構築した(図 3(b))。

研究テーマ D「抗原抗体反応評価」

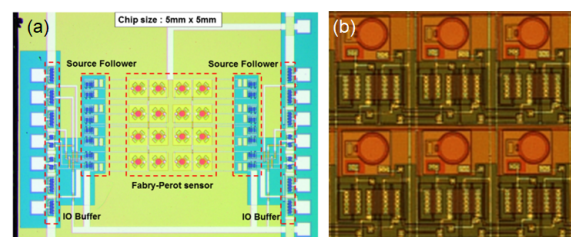


図 3 (a) CMOS-MEMS センサ (b) 32x32 イメージセンサの素子

バイオマーカー分子の検出のため、ダイヤフラム直径 300 μm の 150 nm PMMA/100 nm パリレン C 膜上でヒト血清アルブミン(HSA)をモデル分子として抗原抗体反応評価を行った。抗原溶液を加える際には、ブロッキング処理まで行ったセンサチップを生理食塩水(PBS)中において膜の動きが発生しないように安定化を行った後に、HSA 抗原を溶かした PBS を注入した。終濃度が 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ になるように HSA 抗原溶液を滴下した場合の反射特性では、干渉ピークが 25 分経過後に約 35 nm レッドシフトする様子が得られた。HSA 抗原濃度の依存性を評価した結果を図 4 に示す。HSA の終濃度は $10^{-9} \sim 10^{-15}$ g/ml として 25 分後の最大波長シフトをプロットしたところ、濃度に依存して波長シフトが変化する様子が確認され、1 fg/ml の抗原に対しても PBS との有意差が示された。

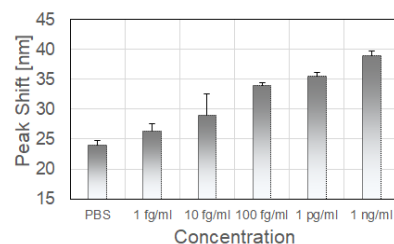


図 4 抗原抗体反応の濃度依存性

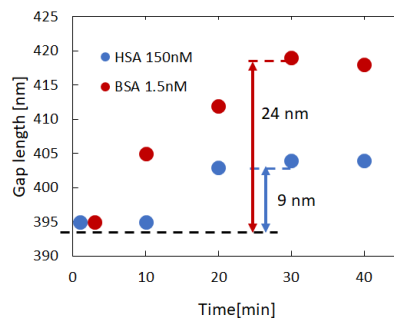


図 5 自立グラフェン上での分子検出

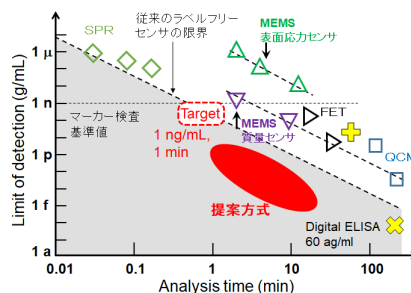


図 6 他方式との比較

自立グラフェン上での分子修飾は、 π スタッキングによってグラフェン表面に結合する 1-ピレンブタン酸スクシンイミジルエステル(PBSE)を介して抗体修飾を行った。BSA 抗体を修飾したサスペンデッドグラフェンに対し、濃度 100 ng/mL の BSA 抗原溶液と 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の HSA 溶液にそれぞれチップを入れて分子吸着による表面応力応答を測定した。直径 6 μm の自立グラフェンにおける反射測定を行い、HSA 溶液中で 19 nm, BSA 抗原液中で 43 nm のピークシフトが得られた。これは 100 倍の濃度の HSA よりも、BSA 抗原が抗原抗体反応で多く吸着し、自立グラフェンが大きく上方向に膨らんだ結果であると考えられる。

これらの結果から自立グラフェンにおける選択的分子検出を実験的に示せた。

ここで応答が確認できた検出下限濃度は、蛍光標識法で最も感度の良い digital ELISA に近い数値(検出限界 60 ag/mL)であり、原理的に多項目の検出が不可能な digital ELISA 技術に対して、単素子でその検出下限に迫る値を取得できた。

3. 今後の展開

さきがけ研究期間では、抗原分子濃度の検出下限 1 fg/mL が得られ、この数値は非標識バイオセンサとしてはこれまでに実現されていない値であるが、Digital ELISA と比較すると一桁程度の差がある。光干渉センサの可動膜として検討した 3 種類の可動膜材料中、抗原抗体反応を最も安定的に評価することができた PMMA/パリレン膜は、材料の感度的には最も劣るため、SBS やグラフェン膜上で適切な界面構築を行うことにより単素子で Digital ELISA の検出限界を上回る性能が期待できる。また、提案する表面応力センサは分子の吸着によるストレス変化を検出する原理を用いているため、応答の原理的には、夾雑物の影響が少な

い検出原理である。このため、血液サンプルの測定などを行い、夾雑物による影響を評価することにより、検査における前処理を経ずとも使用可能な簡易測定チップ実現に向けた評価を進める。さらに、ユーザーのもとへセンサチップを供給するためには検出回路との一体化が必要である。そのためファウンダリ試作による検出回路上へ MEMS ポストプロセスを行ってバイオセンシング動作を実証し、ディスプレイ CMOS-MEMS チップの量産化によって、抗原抗体反応によるセンサ応答の並列処理を行うことができ、包括的なデータ取得が期待できる。

4. 自己評価

さきがけの課題提案段階で、目標としたマーカー分子の検出下限 1 ng/mL に対して、得られた数値はその 100 万分の 1 の 1 fg/mL であり、当初の目標を大幅に上回る性能を実現できた。また、CMOS イメージセンサ技術との融合により、32x32 アレイセンサの画像出力による解析システムの構築を実現し、マーカーのマルチ検出に向けたプラットフォームを確立できた。一方で、分子の選択性や素子毎の抗体塗り分け技術は改善の余地があり、可動膜（特にエラストマー、グラフェン）上の生体分子界面構築技術の充実が求められる。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

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*, **2017**, vol. 10, no. 1, 011601.
2. S. Maruyama, T. Hizawa, K. Takahashi, and K. Sawada, “Optical-interferometry-based CMOS-MEMS sensor transduced by stress-induced nanomechanical deflection,” *Sensors*, **2018**, vol. 18, 138.
3. K. Takahashi, H. Ishida, and K. Sawada, “Vacuum-sealed microcavity formed from suspended graphene by using a low-pressure dry transfer technique,” *Applied Physics Letters*, **2018**, vol. 112, 041901.
4. T. Takahashi, T. Hizawa, N. Misawa, M. Taki, K. Sawada, and K. Takahashi, “Surface stress sensor based on MEMS Fabry-Perot interferometer with high wavelength selectivity for label-free biosensing,” *Journal of Micromechanics and Microengineering*, **2018**, vol.28, no. 5, 054002.
5. K. Takahashi, T. Fujie, R. Teramoto, I. Takahashi, N. Sato, S. Teraoka, and K. Sawada, “Elastomer-based MEMS optical interferometric transducer for highly sensitive surface stress sensing,” *MRS Communications*, *in press*.

(2)特許出願

研究期間累積件数 1 件(公開前の出願件名については件数のみ記載)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

学会発表

1. K. Takahashi, “MEMS optical interferometric surface-stress sensor for multi-biomarker detection,” The Irago Conference 2016, 1-2 Nov. 2016 **(Invited)**
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. 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, pp. 476-479.
5. S. Kidane, H. Ishida, K. Sawada, and K. Takahashi, “Optical interferometry-based surface stress sensor using suspended graphene,” 2018 Int. Conf. on Optical MEMS and Nanophotonics 2018 (OMN 2018), July 29-Aug. 2, 2018, Lausanne, Switzerland, TH3.4