

## 《様式B》

**研究テーマ** 「光学干渉型表面応力センサを用いたバイオマーカーのマルチ検出に関する研究」

**研究責任者** 所属機関名 国立大学法人豊橋技術科学大学

官職又は役職 特任助教

氏名 丸山 智史 メールアドレス maruyama@ee.tut.ac.jp

**共同研究者** 所属機関名 該当なし

官職又は役職 該当なし

氏名 該当なし

### 1. 実施内容および成果ならびに今後予想される効果の概要（1,000字程度）

本研究では、表面応力センサを利用し、分子がつかないと変形しないため全血検査に有効である。また、リファレンス測定により外部環境からの影響を切り分ける差分測定を行っており、変化した分だけの出力信号が検出可能であり、CMOS イメージセンサ技術を利用したセンサであるため、センシング領域の集積が可能であり、マルチ検出(並列処理)に有効である。アレイ状に集積したセンサに対して、抗体の塗り分けができれば、抗原の分子修飾反応検出数が増えるため、複数の病気由来のバイオマーカー検出が可能である。抗体と反応する受容体は均一にセンサ上に存在するため、抗体(溶媒)を塗り分けのための構造体を作製し、複数の抗原抗体分子修飾反応を検出する。センサアレイに抗体塗り分け用の微小構造体の壁を作製することで、マルチ検出が可能で、それらを並列処理することで迅速な検出が可能である。本課題では、抗体塗り分けの構造体を作製・検証するとともに、センサ可動膜の材料の検討を行い、光表面応力センサの変位検出下限の評価と非標識分子検出を行った。作製した光干渉型表面応力センサを用いて、1 pg/mL のヒト血清アルブミン抗原の抗原抗体反応の検出を光反射スペクトル変化と電気的測定の同時測定に成功した。また、本センサの最小変位検出は  $116 \mu\text{m}$  であった。これは従来のカンチレバー型表面応力センサと比較して 4.3 倍の検出感度である。一方、抗体塗り分けの構造に関しては、仕切り構造ではなく、センサ表面と溶液を閉じ込めることができるマイクロ流路との一体化の方が塗り分けに適している可能性がある。

先に挙げた改善点が解消した際に、本研究の手法による今後予想される効果としては、次の三点が予想される。①光計測を電子回路で実現することによって、例えば、その計測回路に無線機能を付随したものを絆創膏等に取り付けることで、その人物の状態を知ることができるようになる。②微小なマイクロ流体チャネル内を高速で流れる細胞をリアルタイムでインピーダンス計測すれば、化学処理の結果を電気的に計測する用途として発展可能である。③大規模集積回路設計技術を用いることで、計測に必要な機能を大量に集積化できる。例えば、極小なセンサをチップに製作することにより、従来では測定できなかった大きさの細胞の状態や形状がわかる。また、差分計測方式のセンサを大量に製作することにより、生体分子の個別判別および個別計測を並列で大量に自動処理できる。検出下限評価に関しては、従来のセンサと比べ、低濃度の検出が可能であるため、マイクロ流路との一体化ができれば、実用化に展開し得る可能性がある。

### 2. 実施内容および成果の説明（A4で、5ページ以内）

#### 2.1 表面応力センサの分子修飾原理とセンサ構造

表面応力センサの分子修飾の原理は図1に示す。単一波長の光をセンサ部分に当てた状態で表面処理を行った可動膜の上に抗原を滴下すると抗原の分子同士が反発し合い、可動膜が膨らむ。この膨らみが光路差の変化となり、その変化は電流の変化量となる。



図 1. 表面応力センサの分子修飾

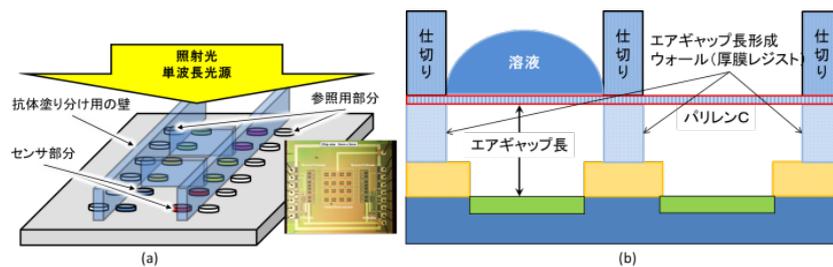


図 2. 提案する構造体の断面図

従来の表面応力センサは、中空構造のエアギャップ長が 300nm と溶液(抗体、抗原)を滴下したときに中空構造が潰れてしまう可能性があり、液中での測定に課題があった。そこで、エアギャップ長形成に厚膜レジストを用い、可動膜となるパリレンCを後工程でドライ転写することで溶液滴下時の水圧による歪み、及び液中測定に耐えうる表面応力センサを提案する(図2)。また、可動膜のパリレンCをドライ転写することで、エアギャップ長を考慮する必要がないため、抗体塗り分けが容易である。

表面応力センサ<sup>(1)</sup>に追加プロセスを行い、SU-8 でセンサの仕切り構造体の作製を行った。まず、センサ表面を覆っているパリレンCをRIE(Reactive Ion Etching)で除去し、パリレンCの下にあるポリシリコン酸化膜はゼノンエッチング装置を用いて、除去を行った(図3-a、b参照)。次に、300nmのエアギャップ長をSU-8 3005を希釈した試薬を用いて2μmのエアギャップ形成し、センサ部分を開口するために両面アライナ(SUSS Micro Tec AG)でリソグラフィを行った(図3-c参照)。図3-eに示すセンサ<sup>(2)</sup>の直径は100μmであるため、露光時の誤差を考慮し、開口部の直径は110μmとした。センサ可動膜はパリレンCシートの転写で構造を形成する<sup>(3)</sup>ため、基板との密着性向上のために転写前に数十nmの膜厚のパリレン蒸着を行う。最後にセンシング部分であるフォトダイオードの上にファブリペロー干渉計を構成する中空構造としたMEMS可動膜を有する構造とするため、パリレンCシートを転写した<sup>(3)</sup>(図3-d)。図3-eは、パリレンシート転写後のセンサ部分を示す。捕獲分子同士の分子間力により中空構造を持った可動膜がたわみ、ファブリペロー干渉計を構成しているエアギャップ長が変化する。特定の波長に対する透過率が変化する、電圧信号で定量評価し、センサ可動膜が膨らむことによって、ファブリペロー干渉計の干渉波長が変化する。ファブリペロー干渉計の光学多層膜はシリコン酸化膜、ポリパラキシレン(パリレン)、空気、パリレンから成る。

## 2. 2 塗り分け構造体の検討

まず、液溜め用の仕切り構造体の予備検討として、IP-3100の仕切り構造で行った。2.5mm内にある4x4のセンサアレイに合わせた仕切り構造体を作製した。シリコン基板上にIP-3100(膜厚1.1μm)を塗布し、スピコートで膜厚を均一にし、センサが2x2の4分割になるようにリソグラフィを行った。センサの中心間の距離は260μm程度あり、今回の仕切り幅は100μmとした。塗布前ベークを160℃で90秒行い、塗布後のベークを110℃で90秒を行った。露光には両面アライナ(SUSS Micro Tec AG)を使用し、現像後、120℃で5分のベークを行った。次に、塗分構造体としての検証として、BSAの蛍光観察を行った。作製した仕切り構造体にピペットでウシ血清アルブミン(Bovine Serum Albumin: BSA)抗体とヒト血清アルブミ

ン(Human Serum Albumin : HSA)抗体を 1 $\mu$ l 滴下し (図 4-a)、1 時間経過後 (図 4-b) にブロッキング処理を行い、リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate buffered saline : PBS) で洗浄後 (図 4-c)、蛍光色素入り BSA 抗原と蛍光色素なし HAS 抗原を塗分構造体に 1 $\mu$ l 滴下して蛍光観察を行った (図 4-d)。

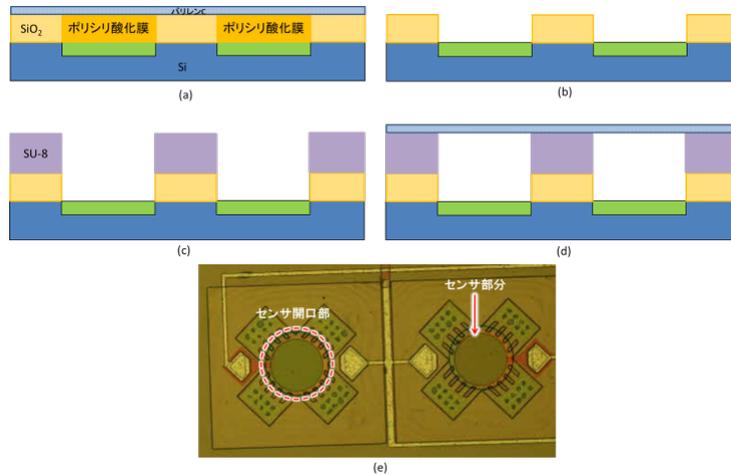


図 3. エアギャップ長形成の製造追加工程

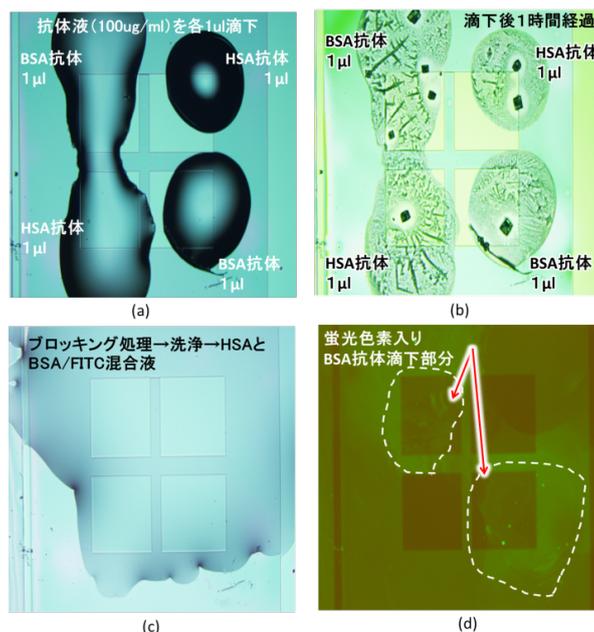


図 4. IP-3100 を用いた仕切り構造体の蛍光観察

抗体の滴下前に仕切り構造体を 180°C で 1 時間のハードベークを行った後に、抗体をピペットで滴下した。図 4-d に示すように BSA 抗体を滴下した箇所が、それ以外の場所よりも光が強いことが確認でき、BSA 抗原と HAS 抗原の混合液の内、選択的に光色素入り BSA 抗原のみが BSA 抗体滴下した箇所と結合したことが確認できた。

次に SU-8 を用いた塗分用微小構造体の製について検証を行った。抗体滴下によるセンサ可動膜上での溶液の広がりを防ぐため、SU-8 3005 試薬を用いて、予備検討時に行った膜厚 1.1 $\mu$ m から 5 $\mu$ m とし、塗分用微細構造体の作製を行った。図 3-e に示す構造体をホットプレート 95°C で 10 分のベークを行った後、SU-8 を塗布し、スピコートで均一にし、ホットプレート 95°C で 3 分乾燥させた。構造体作製のリソグラフィには両面アライナ (SUSS Micro Tec AG) を使用し、95°C で 1 分ベーク後、現像を 2 分行い、IPA による 3 分のリンスを行った。センサ中心間の距離は 260 $\mu$ m であり、膜の歪みに影響の無いように仕切り構造の幅を可能な限り狭くすることを考え、幅 50 $\mu$ m とした。仕切り構造体作製後のセンサを図 5 に示す。SU-8 の仕切り構造体を確認できた。図 5 中の下部部分にわずかな SU-8 の剥離が見られる。これは、今回構造体作製に用いた SU-8 とパリレン C の密着性が高くないことが考えられる。

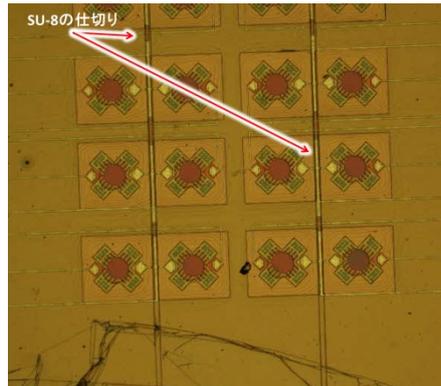


図5. 仕切り構造体作製後のセンサ部分の様子

### 2. 3 光干渉型表面応力センサの変位検出下限評価と非標識分子検出

センサの構造は、光干渉を発生させるためのマイクロキャビティを有するポリジメチルシロキサン (PDMS) 基板上に可動膜となるサブミクロン厚の PMMA/パリレン C 膜からなり、可動膜を基板にドライ転写することによって形成した。抗原抗体反応による光反射スペクトル変化とその変化の電気的出力の同時測定を行った。電気的測定はダイオードチップを用いた。PDMS を使用することでパリレン C との密着性が良いことが判明し、塗り分け構造の材料に適している可能性が判明し、塗り分け材料としての使用・構造は今後の検討課題である。

作製した光干渉型表面応力センサを用いて、1 pg/mL のヒト血清アルブミン抗原の抗原抗体反応の検出を光反射スペクトル変化と電気的測定の同時測定を行った (図6)。また、測定結果と解析結果より本センサの最小変位検出は  $116 \mu\text{m}$  であった (図6-c)。これは従来のカンチレバー型表面応力センサと比較して 4.3 倍の検出感度である。

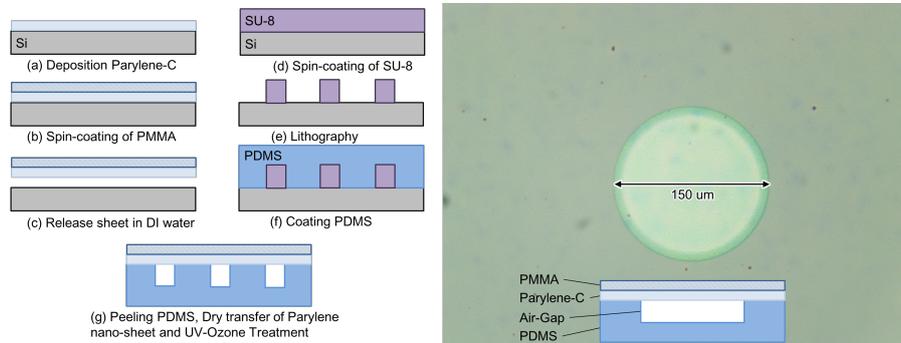


図6. 変位検出下限評価と非標識分子検出に用いたセンサの作製方法と構造

まとめ

本研究では、光干渉型表面応力センサのための抗体塗分手法として、厚膜レジストを用いた塗分用仕切り構造体を提案し、作製を行った。蛍光色素入り BSA 抗原を用いて、蛍光観察による塗分構造体の予備検討を行い、表面応力センサに追加製造工程を行い、厚膜レジスト SU-8 を用いた塗分用仕切り構造体の作製を行った。エアギャップ長形成に厚膜レジストを用い、可動膜となるパリレン C を後工程でドライ転写することで溶液滴下時の水圧による歪み、及び液中測定に耐える表面応力センサを作製した。また、センサ可動膜の材料の検討を行い、光表面応力センサの変位検出下限の評価と非標識分子検出を行った。作製した光干渉型表面応力センサを用いて、1 pg/mL のヒト血清アルブミン抗原の抗原抗体反応の検出を光反射スペクトル変化と電気的測定の同時測定に成功した。

謝辞

研究遂行にあたり、一般財団法人東海産業技術振興財団の研究助成に感謝致します。

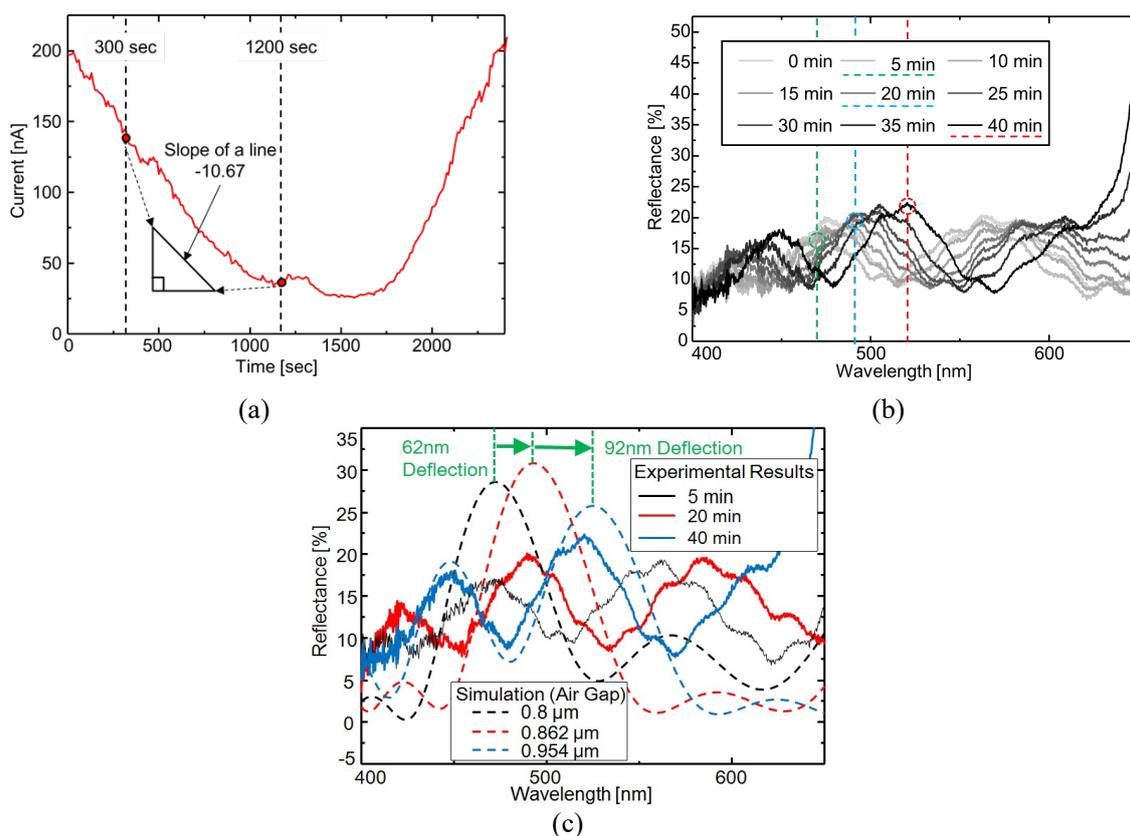


図7. 1 pg/mL HSA 抗原を滴下した際のセンサの変位検出下限評価、(a) ダイオードチップの電流測定結果、(b) 光反射スペクトル変化、(c) 光反射スペクトル変化に対する実測と解析結果からの変位量算出結果

表1. 従来の表面応力センサとの検出下限の比較

Analyte	Limit of detection	Device type	Ref.
PSA	10 ng/mL	Cantilever	(5)
ALCAM	10 ng/mL	Cantilever	(6)
PSA	10 ng/mL	Cantilever	(7)
PSA	0.2 ng/mL	Cantilever	(8)

## 参考文献

- (1) K. Takahashi, R. Ozawa, H. Oyama, M. Futagawa, F. Dasai, M. Ishida and K. Sawada, A CMOS-MEMS-based label-free protein sensor for high-sensitive and compact system, in Proc. IEEE Int. Electron Devices Meeting (IEDM 2012), San Francisco, CA (2012), 553-556.
- (2) S. Maruyama, T. Hizawa, K. Takahashi and K. Sawada, Optical-interferometry-based CMOS-MEMS Sensor Transduced by Stress Transduced by Stress-induced Nanomechanical Deflection, MDPI Sensors 2018, 18(1), 138, doi: 10.3390/s18010138.
- (3) Yong-Joon Choi, S. Maruyama, K. Sawada and K. Takahashi, "Fabrication of PDMS based Fabry-Perot interferometric sensor itegrated with photodiode for bio-sensing," 2018 Asia-Pacific Workshop on Fundamentals and Applications of Advanced Semiconductor Devices (AWAD 2018), July 2-4, 2018, Hotel New Tagawa, Kitakyushu, Japan.
- (4) Joan Bausells, Piezoresistive cantilevers for nanomechanical sensing, Microelectronic Engineering 145 (2015) 9- 20.
- (5) Marcio G. von Muhlen, Norman D. Brault, Scott M. Knudsen, Shaoyi Jiang, and Scott R. Manalis, Label-Free Biomarker Sensing in Undiluted Serum with Suspended Microchannel Resonators, Anal Chem. 2010 March 1; 82(5): 1905- 1910. doi:10.1021/ac9027356.
- (6) Kyung Wook Wee, Ghi Yuun Kang, Jaebum Park, Ji Yoon Kang, Dae Sung Yoon, Jung Ho Park and Tae Song Kim, Novel electrical detection of label-free disease marker proteins using piezoresistive self-sensing micro-cantilevers, Biosensors and Bioelectronics 20 (2005) 1932- 1938.
- (7) Guanghua Wu, Ram H. Datar, Karolyn M. Hansen, Thomas Thundat, Richard J. Cote and Arun Majumdar, Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers, nature biotechnology, Vol.19 Issue 9, September 2001.