

技術紹介

2 医療・ライフサイエンス分野への取り組み ～産学連携における活動～

Approach to the medical and life science field
～ Joint effort between industry and academia ～

國方 亮太

Ryota Kunikata

商品開発センター

須田 篤史

Atsushi Suda

商品開発センター 技術マネージャー 博士(材料科学)

キーワード: バイオ LSI、電気化学測定、産学連携、新事業領域

Keywords: Bio-LSI, electrochemical measurement, academic-industrial alliance, new business field

要 旨

医療・ライフサイエンス分野は成長著しい分野であり、注目を集めております。われわれは本分野のニーズに対する知見を得るために、東北大学マイクロシステム融合研究開発拠点に参加し、産学連携体制のもと高感度電気化学イメージングを実現できるバイオ LSI チップとその計測システムを開発いたしました。本システムを用いることにより、250 μm ピッチ、400 電極による、1 フレームあたり最高 18 msec の高速電気化学イメージング、あるいはノイズレベル 1 pA 以下の超高感度多点測定が可能となります。現在、本システムを用いた産学共同の応用研究を推進するとともに、本システムを用いたマーケティング活動を行い、ニーズ探索を推進しております。

SUMMARY

The field in medical and life science receive attention because of the remarkable market growth. To obtain the knowledge about the needs of this field, we belong to a new academic-industrial alliance, named R & D Center of Excellence for Integrated Microsystems, Tohoku University, and developed the new "BIO-LSI chip" and the whole system for the electrochemical measurements, which enables the electrochemical high-speed imaging. This system demonstrates up to 18 ms/frame high-speed imaging, or alternatively, high-sensitive multi-measurements with the noise level of less than 1 pA, via the arrayed 400 electrodes (250 μm pitch). Some feasibility studies for applications under the academic-industrial alliance and the marketing activities of the system is now being subjected to promote the need finding.

1. まえがき

当社商品開発センターでは、市場動向の変化にタイムリーに対応する新技術・新商品開発のみならず、将来の事業の柱となり得る新事業領域開拓を目指した研究開発を行っております。そのような新事業領域のひとつが、成長著しく魅力的な分野が医療・ライフサイエンス分野です。現在のところ当社では医療機器向けの部品としての製品展開*はございますが医療機器のコアとなるようなデバイスは販売しておりません。そのようなコアデバイスの上市を目指して、コネクタや光デバイス開発で培った技術を活用した医療・ライフサイエンス分野向けのセンシングデバイス開発を推進しております。

われわれには医療・ライフサイエンス分野に対する知見の蓄積がなく、将来の新規参入障壁の高さが懸念されるため、このような知見を得るべく大学など研究機関との連携を推進しております。そのひとつが東北大学マイクロシステム融合研究開発拠点への協働企業としての参画であり、産学連携体制のもと CMOS-LSI ベースの超高感度多点電気化学測定デバイス“バイオ LSI”の開発、およびその性能実証をおこなってまいりました。本産学連携拠点では同一の Si ウェハ上に複数の研究者グループの LSI を搭載する“乗り合いウェハ”コンセプトにより効率的に研究開発が推進できるのみならず、“産産連携”によるバイオ LSI を用いた医療・ライフサイエンス分野のニーズ探索を推進できる環境が実現できております。本稿では、バイオ LSI チップおよび測定システムの開発を中心に報告いたします。

* 弊社コネクタ製品別検索サイトをご覧ください http://jae-connectors.com/jp/app_jp.cfm

2. 生体由来物質の検出方法について

たんぱく質や核酸をはじめとした生体由来の化学物質を検出し、その空間的な分布あるいは生理学的活性の経時変化を測定するバイオイメーjingとしては蛍光検出の原理に基づく手法がよく知られています。しかしながら、高価な測定機器が必要であり、また測定対象とする蛍光以外の発光や吸光、ラベリング操作による測定対象反応系への影響などの不利な点が多々あります。一方、測定対象物質の選択性に優れる電気化学測定の原理にもとづく電位、電流検出によるバイオイメーjingも広く利用されております。例えば、局所的な電気化学的性質を高い空間分解能で測定するための手法としては、走査プローブ顕微鏡の一種である走査型電気化学顕微鏡(SECM)を用いた手法が知られております。¹⁻⁵⁾ SECMは高い空間分解能を実現できますが、プローブ電極の掃引に時間を要し、また微小なプローブ電極を試料に近づけるための操作が難しいといった特徴を有します。

測定操作の簡便性、迅速性と高い空間分解能を両立させるべく、近年ではセンサ電極の集積度向上を目的として半導体微細加工プロセスを利用したセンシングデバイス開発が行われており、1 cm²あたり150万個のセンサ電極、⁶⁾あるいは3 mm角に576個のセンサ電極を集積した例が報告されております。⁷⁾これらの報告例では、センサ電極を高密度に集積するために、信号増幅回路をセンサ電極アレイ領域の外部に組み込んでいますが、電磁ノイズなどの影響を最小限にして検出限界を向上させるためには信号増幅回路を電極により近い位置に設置する必要があります。そのような信号増幅回路内蔵型のセンサ電極アレイとして、例えば128個のセンサ電極を有し、1 pAという高い検出限界電流値を持つ反面検出レンジが1 pA～100 pAと狭いデバイス、⁸⁾あるいは384個のセンサ電極により広い検出レンジと高い感度(1 pA～100 nA)を達成している反面ノイズレベルが高いデバイスといった報告例があります。⁹⁾これら既存のセンシングデバイスの欠点を補うことのできる電流検出型の電極アレイデバイスの実現は、バイオイメーjingのツールとしてだけでなく、DNAチップ等の診断、環境測定、基礎生化学におけるハイスループットな同時多点検出のツールとして、新市場の創出へも繋がるものと大いに期待できます。

3. “バイオ LSI”

産学連携体制のもと、CMOS-LSI をベースとした電気化学測定の実理にもとづく電流検出型センサアレイデバイス“バイオ LSI”を開発いたしました。バイオ LSI は 10.4 mm 角のチップ表面の 5 mm 角の領域に 250 μm ピッチで 20 個 \times 20 列、計 400 個のセンサ電極を配置し、各センサ電極直下には電流検出および増幅回路を集積してユニットセルを構成しております。電流の検出と増幅をセンサ電極直下のスイッチドキャパシタ方式の I-V 変換回路と増幅回路で行うことで、電流増幅前のノイズ混入を防ぎ、極微量の測定対象物質による微弱電流検出が可能となります。また、センサ電極パッド以外の領域に金属層を配置して遮光することで、光照射により増幅回路に生じるノイズを減少させました。さらに、測定限界を低下させる原因の一つである漏れ電流を低減するために、漏れ電流の発生源となる静電保護回路を単なるゲート保護ダイオードに置き換えております。この構成は LSI の長期信頼性を犠牲としますが、通常の回路構成で 15 pA となる漏れ電流を 5 pA 以下に低減することができます。以上の回路設計により、バイオ LSI は検出限界 1 pA 以下という非常に高い感度と 1 pA-100 nA という広い検出レンジを実現しております。

電気化学計測は作用極となるセンサ電極と参照極間の電位差を制御し、センサ電極と対極との間に流れる電流値を検出します。対極と参照極は外部回路ボックス内のポテンショスタット回路にて制御し、信号の読み出しはセンサ電極領域の外周部に配置した列デコーダ回路によって 1 列中 20 個の電極からの信号を並列処理することにより、高い時間分解能を得ることができます。

また、電気化学計測中の液体試料の蒸発は大きな問題となりますので、回路から発生する熱を低減するため、増幅回路の設計を見直してチップの消費電力量を 0.63 W にまで抑制しております。なお、電気化学計測中の液体試料の温度上昇を熱容量の小さなフィルム状の熱電対を用いて測定しましたところ、センサ電極部上方 0.5 mm の位置にて 8.3 $^{\circ}\text{C}$ という結果が得られました。この温度上昇より見積もられる蒸発速度は 4.8 $\mu\text{L}/\text{min}$ であり、通常の短時間の測定では問題にはなりません。将来的には長時間の測定を可能とするよう、水冷ヒートシンクを備えたペルチェ素子をバイオ LSI 直下に設置することにより温度上昇を抑える構成も検討しております。

* 産学連携の協働企業である株式会社トッパン・テクニカル・デザインセンターにより 0.18 μm ルールの CMOS プロセスにて設計・製造されました

4. バイオ LSI チップ

“乗り合いウェハ”上の LSI チップをバイオ計測に利用できる“バイオ LSI チップ”に加工する工程は以下の通りです。LSI チップのセンサ電極は Al と Cu の合金であるため、そのままでは電気化学測定の作用極として用いることはできません。したがって、このセンサ電極上にスパッタ装置を用いて Ti 接着層、Pt 層、厚さ 600 nm の Au 層を、200 μm 角のサイズで積層しました。この Au/Pt/Ti 膜は Al-Cu 合金のセンサ電極パッドを覆うだけではなく、LSI 回路の遮光も兼ねており、先述のユニットセルの遮光用金属層と同様、光照射を伴う顕微鏡観察下で行われる生化学実験において有利な構造となっております。その後、LSI 表面の作用極のサイズ制限のため、エポキシ系のネガ型フォトリソグレイ(Microchem 製 SU-8)により厚さ $\sim 4\text{ }\mu\text{m}$ の絶縁層を形成し、実効的な電極面積が直径 40 μm となるように加工します。直径 40 μm の電極は、電気化学検出における均一な反応表面を得るためにユニットセル内の平坦な領域に配置しました。バイオ LSI のセンサ電極部を図 1 に示します。

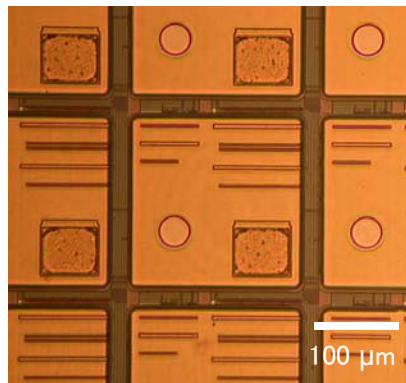


図 1. バイオ LSI センサ電極部

表面に加工を施した後の 10.4 mm 角の LSI チップは、外部回路ボックスと接続するための配線がパターニングされたセラミック基板(厚さ 1.0 mm、幅 32.5 mm、長さ 46.5 mm)上に、銀ペーストにより接着しました。続いて LSI チップの I/O パッドとセラミック基板上の Au 配線を、Au ワイヤにより接続しました。その後に試料溶液保持のため、また電気接続部の防水のためにアクリルと PDMS (ポリジメチルシロキサン)で配線部を保護します。このように作製したバイオ LSI チップの外観を図 2 に、仕様を表 1 に示します。

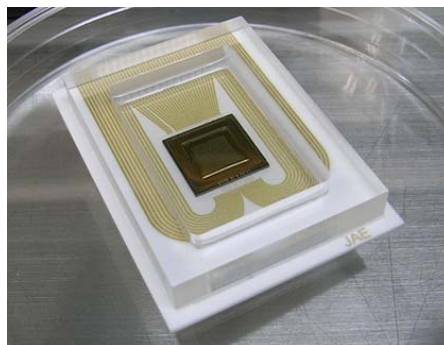


図 2. バイオ LSI チップ

表 1. バイオ LSI チップ仕様

電極	数/配置 : 400 個 / 20×20 グリッド配置、ピッチ 250 μm 形状 : $\phi 40 \mu\text{m}$ (エポキシ系材料(SU-8)により形状規定) 材質 : Au/Pt/Ti 積層膜
試料保持部(測定セル)	内側寸法 : W19.0×D29.0×H3.8 mm 容量 : $\sim 2 \text{ ml}$ 材質 : ポリカーボネート、PDMS
外形寸法	W32.5×D46.5×H6.0 mm

5. バイオ LSI 測定システム

測定システムへのバイオ LSI チップの接続は、チップ端をテフロン製チップ保持機構のガイドレールに沿ってピンコネクタに挿入するという簡単な方法により行える構造としました。バイオ LSI チップと外部回路ボックスを接続し、さらに作用極と対極をセットした状態を図 3 に示します。

バイオ LSI 測定システムの全体像を図 4 に示します。システムはセラミック基板上にマウントされたバイオ LSI チップ、参照極、対極、外部回路ボックス(北斗電工株式会社製)、直流電源ユニット(北斗電工株式会社製)、制御ユニット(National Instruments 製 NI PXI-1031, NI PXI-8106, NI PXI-6255)、モニタ、キーボードから構成されます。

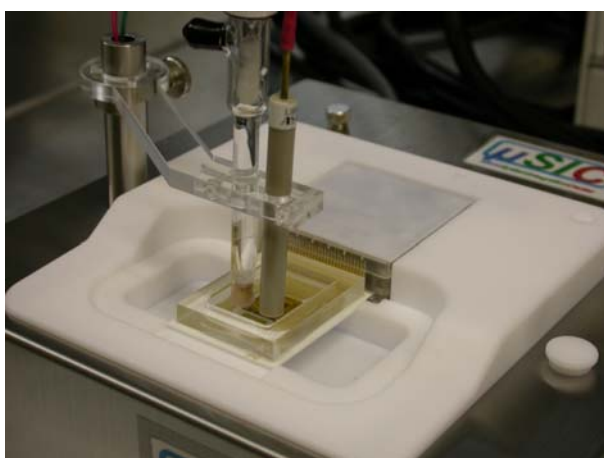


図 3. 測定システムへのバイオ LSI チップ接続

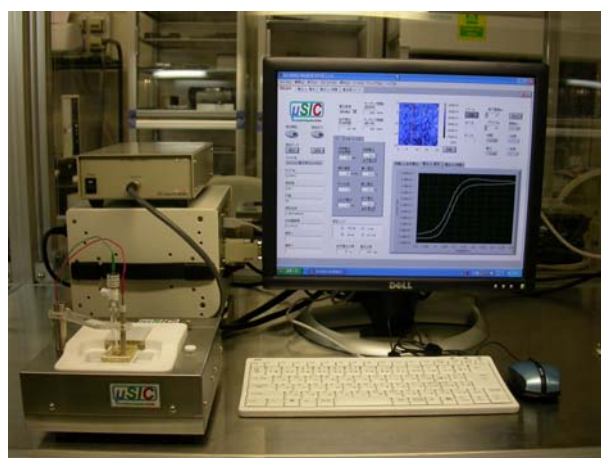


図 4. バイオ LSI 測定システム全体像

システムの制御とデータ加工のためのソフトは、National Instruments 製 LabVIEW を用いて構成し、400 個のユニットセルからの出力データは出力バッファを通過し、A/D 変換を受けたのち、コンピュータに蓄積されます。測定結果はリアルタイムでモニタに表示され、テキストで保存されます。開発したソフトにより自然電位測定、サイクリックボルタンメトリー、アンペロメトリーを行うことができます。サイクリックボルタンメトリーとアンペロメトリーにおいては、検出レンジを $\pm 0.1 \text{ nA}$ 、 $\pm 1 \text{ nA}$ 、 $\pm 10 \text{ nA}$ 、 $\pm 100 \text{ nA}$ から選択できます。測定中は 400 個のセンサ電極における電流値のカラーマップ、および指定したセンサ電極の自然電位の経時変化、サイクリックボルタモグラム、

アンペログラムをリアルタイムでモニタに表示できます。また必要に応じて、指定ユニットセルのキャパシタにおける充電電荷の変化についてもモニタすることができます。400 個のセンサ電極の測定結果のデータ、および 1 つのユニットセル中のキャパシタ充電量変化のデータは測定条件のデータとともにテキスト形式で保存されます。バイオ LSI 計測システムの仕様を表 2 に示します。

表 2. バイオ LSI 計測システム仕様

[制御出力]

最大出力電圧(CE-WE 間)	±3.0 V
制御電圧範囲(RE-WE 間)	±2.0 V
電位制御確度	±3 mV
電位制御分解能	0.3 mV

[電位・電流検出]

電位検出範囲	±2.0 V			
電位検出確度	±3 mV			
電位検出分解能	0.2 mV			
電流検出レンジ設定	100 nA	10 nA	1 nA	0.1 nA
電流検出レンジ	±100 nA	±10 nA	±2 nA	±100 pA
ノイズレベル*1	< 2 nA	< 30 pA	< 10 pA	< 1 pA
サンプリング間隔	18 ms	47 ms	120 ms	125 ms
電流検出確度	読取値の±3 % (Typical)			
電流検出分解能	0.024 % f.s.	0.013 % f.s.	0.016 % f.s.	0.015 % f.s.
入力インピーダンス	10 ¹³ Ω			
入力バイアス電流	0.1 pA			

*1: 2 mM フェロセンメタノール水溶液を測定溶液とした時の典型的な値

8 pF という小さなキャパシタにより±1 pA から±100 nA という広い電流検出範囲を実現させるための制御法について以下に述べます。各ユニットセルのスイッチドキャパシタ回路は、式 1 に従い作用極上で発生した電流を電圧へと変換しています。

$$V = \frac{Q}{C} = \frac{\int Idt}{C} \quad \text{式 1}$$

ここで、 V はキャパシタ電位差(V)、 Q はキャパシタに充電された電荷量(C)、 C はキャパシタの静電容量(F)、 I は作用極上で発生した電流(A)、 t は電荷蓄積開始からの経過時間(sec)を表します。スイッチドキャパシタ回路のキャパシタ短絡スイッチは $t=0$ で開放となり、電極上で電流が発生するに従い電荷が蓄積されます。nA オーダー以下の高感度な電流検出のためには、長い充電時間を設けてキャパシタに十分な電荷充電を行い、信頼性の高い出力電圧を得ることができるプログラムとし、第 1 列から第 20 列までの信号の読み出しの間、キャパシタ短絡スイッチは常

に開放としています。この処理では、 $t=0$ において 400 個のユニットセルのスイッチドキャパシタ回路の短絡スイッチを全て開放し、その後 400 個のユニットセルからの信号を第 1 列から第 20 列まで順番に読み出します。400 個のユニットセル全ての信号を読み出すのにかかる時間は 4 ms であり、これには読み出し時に発生するスイッチングノイズ減衰のための待ち時間も含まれています。400 個のユニットセルの読み出しを 25 回行った後、キャパシタ短絡スイッチを短絡して電荷をリセットします。測定された電流値のデータは、125 ms ごとにその強弱をカラーマップとして表示することが可能です。サイクリックボルタモグラムは、参照極に対する作用極の電圧を掃引しながら、このような電流値測定を繰り返すことによって得られます。一定の入力電圧を印加すれば、同様にアンペログラムが得られます。

一方で、大電流の測定ではキャパシタの飽和が問題となります。 V が LSI チップの動作電圧 (± 2.5 V) を超えると、キャパシタが飽和することにより I - V 変換ができなくなります。そのため、飽和の前にキャパシタを短絡し、 Q をリセットする必要があります。式 1 より明らかなように、 V の値が限定される中、 I の広い検出範囲を得るためには、 C をより高くする必要があります。しかしながら、キャパシタの大きさは容量と比例関係にあり、かつ LSI の中で大面積を占めるため、これ大きくすることによって電気化学バイオイメージングに応用した際の空間分解能の低下を招いてしまいます。キャパシタの飽和を防ぐためには列毎の読み出しのたびにスイッチドキャパシタ回路をリセットします。この大電流測定モードでは、まず第 1 列のキャパシタ短絡スイッチのみを開放とし、電荷の蓄積を開始します。第 1 列の信号が、1、10、100 nA レンジモードにおいてそれぞれ 84、24、4 回読み出され、電流値に変換されます。この信号の読み出しの後、第 1 列のキャパシタ短絡スイッチを短絡して電荷がリセットされ、次の第 2 列の読み出しに移ります。全 20 列におけるスイッチ処理と信号読み出しが同様に行われます。400 ユニットセルからの 1 イメージを表示するための電流データ 1 セットを得るには、1、10、100 nA レンジモードにおいてデータ処理時間を含み、それぞれ 120、47、18 ms の時間が必要です。

測定ソフトの表示例をいくつか紹介します。図 5 は初期設定画面の一例です。この画面で電気化学測定の電位のスキャン範囲、掃引速度、サンプリング間隔、サイクル数などを入力し、測定中に任意の電極のサイクリックボルタモグラムと 2 次元電気化学イメージをリアルタイムでモニタできます。図 6 に示しますのは、測定した 2 次元電気化学イメージのデータ解析のための“再生”画面です。測定したデータの経時変化を再生、任意の電位値での停止操作が可能です。

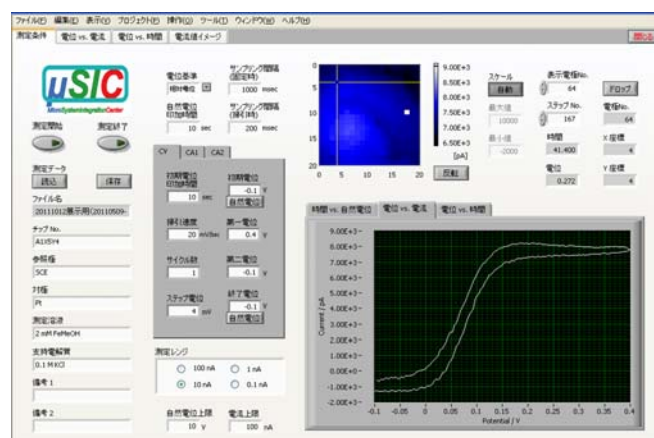


図 5. バイオ LSI 計測ソフト画面 (初期設定およびモニタ画面)

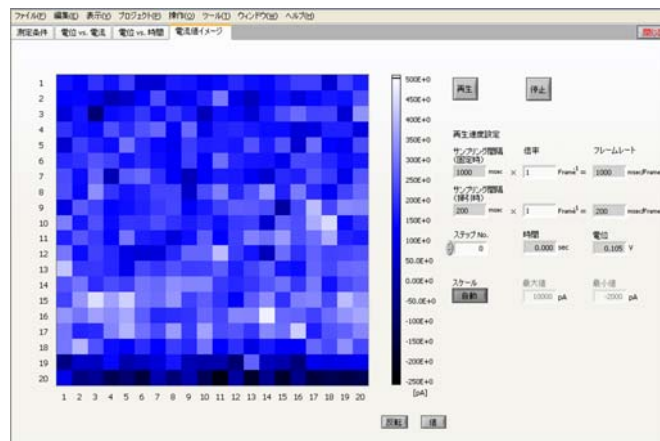


図 6. 電気化学イメージング再生画面

400 個のセンサ電極によるサイクリックボルタモグラム測定結果の一例を図 7 に示します。各グラフに 20 電極分のデータが表示されております。このデータは測定溶液中の酸化還元物質としてとして 2 mM の $K_4[Fe(CN)_6]$ 、支持電解質として 0.1 M の Na_2SO_4 、参照極として銀-塩化銀電極、対極として Pt 線、電位掃引範囲は 0～0.5 V、掃引速度は 10 mV/sec、サンプリング間隔は 200 msec として測定したときの結果であり、400 個のセンサ電極が均一に動作していることが確認できました。

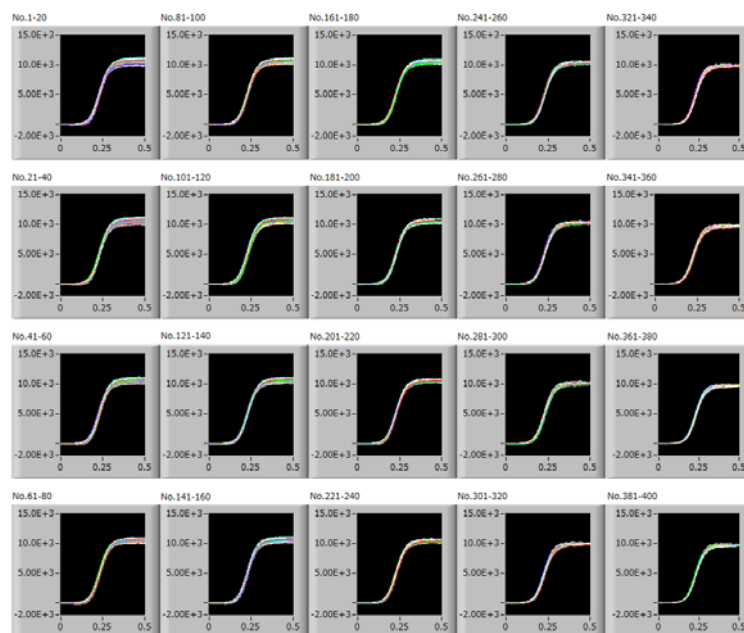


図 7. 400 個のセンサ電極によるサイクリックボルタモグラム

以上のように作製したバイオ LSI チップと測定システムを用いて、共同研究により過酸化水素の濃度変化のリアルタイムイメージングを行うことに成功しております。また、酵素固定化バイオ LSI を使ってグルコースオキシダーゼの酵素反応によるグルコース酸化反応のリアルタイムイメージングにも成功しております。詳細は参考文献をご参照下さい。¹⁰⁾

6. まとめ

産学連携体制の下、高感度電気化学イメージングを実現できるバイオ LSI チップとその計測システムを開発いたしました。本システムを用いることにより、250 μm ピッチ、400 個のセンサ電極による、1 フレームあたり最高 18 msec の高速電気化学イメージング、あるいはノイズレベル 1 pA 以下の超高感度多点測定が可能となります。

現在、大学をはじめとした研究機関との共同研究により、本システムを用いた応用研究を推進しております。また、本システムを用いたマーケティング活動を行い、新たな共同研究体制を構築しております。今後はコネクタを主力とする部品メーカーとしての蓄積技術を生かしつつ、より使いやすい構造、またそのような構造を実現し得る新規微細成形技術の開発を推進してゆきます。

本研究開発は文部科学省の科学技術振興調整費、先端融合領域イノベーション創出拠点の形成プログラムのひとつである東北大学マイクロシステム融合研究開発拠点プロジェクトにおいてなされました。

[参考文献]

- 1) M. V. Mirkin and B. R. Horrocks, *Anal. Chim. Acta*, 2000, **406**, 119–146.
- 2) T. Yasukawa, T. Kaya and T. Matsue, *Electroanalysis*, 2000, **12**, 653–659.
- 3) H. Shiku, T. Takeda, H. Yamada, T. Matsue and I. Uchida, *Anal. Chem.*, 1995, **67**, 312–317.
- 4) Z. Lin, Y. Takahashi, T. Murata, M. Takeda, K. Ino, H. Shiku and T. Matsue, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2009, **48**, 2044–2046.
- 5) K. Ino, W. Saito, M. Koide, T. Umemura, H. Shiku and T. Matsue, *Lab Chip*, 2011, **11**, 385–388.
- 6) A. L. Ghindilis, M. W. Smith, K. R. Schwarzkopf, K. M. Roth, K. Peyvan, S. B. Munro, M. J. Lodes, G. Stöver Axel, K. Bernards, K. Dill and A. McShea, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, **22**, 1853–1860.
- 7) J. Rothe, M. K. Lewandowska, F. Heer, O. Frey and A. Hierlemann, *J. Micromech. Microeng.*, 2011, **21**, 054010.
- 8) M. Schienle, C. Paulus, A. Frey, F. Hofmann, B. Holzapfl, P. Schindler-Bauer and R. Thewes, *IEEE J. Solid-State Circuits*, 2004, **39**, 2438–2445.
- 9) P. Kruppa, A. Frey, I. Kuehne, M. Schienle, N. Persike, T. Kratzmueller, G. Hartwich and D. Schmitt-Landsiedel, *Biosens. Bioelectron.*, 2010, **26**, 1414–1419.
- 10) K.Y.Inoue, M.Matsudaira, R.Kubo, M.Nakano, S.Yoshida, S.Matsuzaki, A.Suda, R.Kunikata, T.Kimura, R.Tsurumi, T.Shioya, K.Ino, H.Shiku, S.Satoh, M.Esashi, and T.Matsue, *Lab chip*, 2012, **12**, 3481-3490.