



酸化物デバイスを用いた 病原体センサや細胞機能解析

Contents

酸化物FETを用いた病原体の検出

OCPによる（Digital）Elisa

Active Matrix PZTアレイを用いた1細胞解析

北陸先端科学技術大学院大学

先端科学技術研究科

高村禅

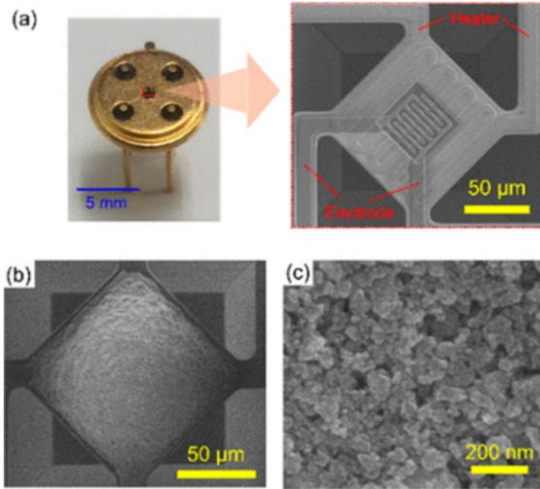
自己紹介

1995. 3 東京大学大学院工学系研究科**金属工学専攻**博士課程 卒
吉田豊信先生、寺嶋和夫先生
：熱プラズマによる酸化物高温超伝導体の成膜
1995. 4 日本学術振興会特別研究員（P D）
1996. 6 文部省宇宙科学研究所助手 栗林一彦先生：微小重力材料
1999. 2 東京大学大学院工学系研究科 マテリアル工学専攻 助手
堀池靖浩先生：半導体技術のバイオ応用
2003. 4 北陸先端科学技術大学院大学材料科学研究科 助教授
民谷栄一先生：バイオセンサー
2011. 5 同 教授

酸化物電子デバイス

圧電素子

酸化スズを用いたガスセンサ



K.Suematsu, et. al, *Analytical Chemistry* **2018** 90 (19), 11219-11223, DOI: 10.1021/acs.analchem.8b03076



eleshop.jp

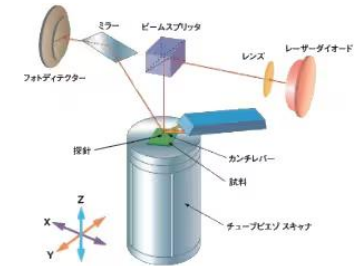
<https://eleshop.jp/shop/g/gE3S367/>



<https://www.ndk.com/jp/products/ultrasound/probe/>



<https://www.epson.jp/products/inkjet/head/lineup.htm>



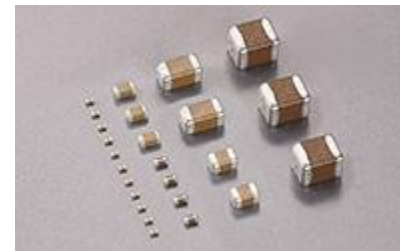
<https://www.an.shimadzu.co.jp/service-support/technical-support/analysis-basics/surface/faq/faq1/index.html>

ディスプレイ



<https://blog.sharp.co.jp/2020/04/14/22774/>

コンデンサー



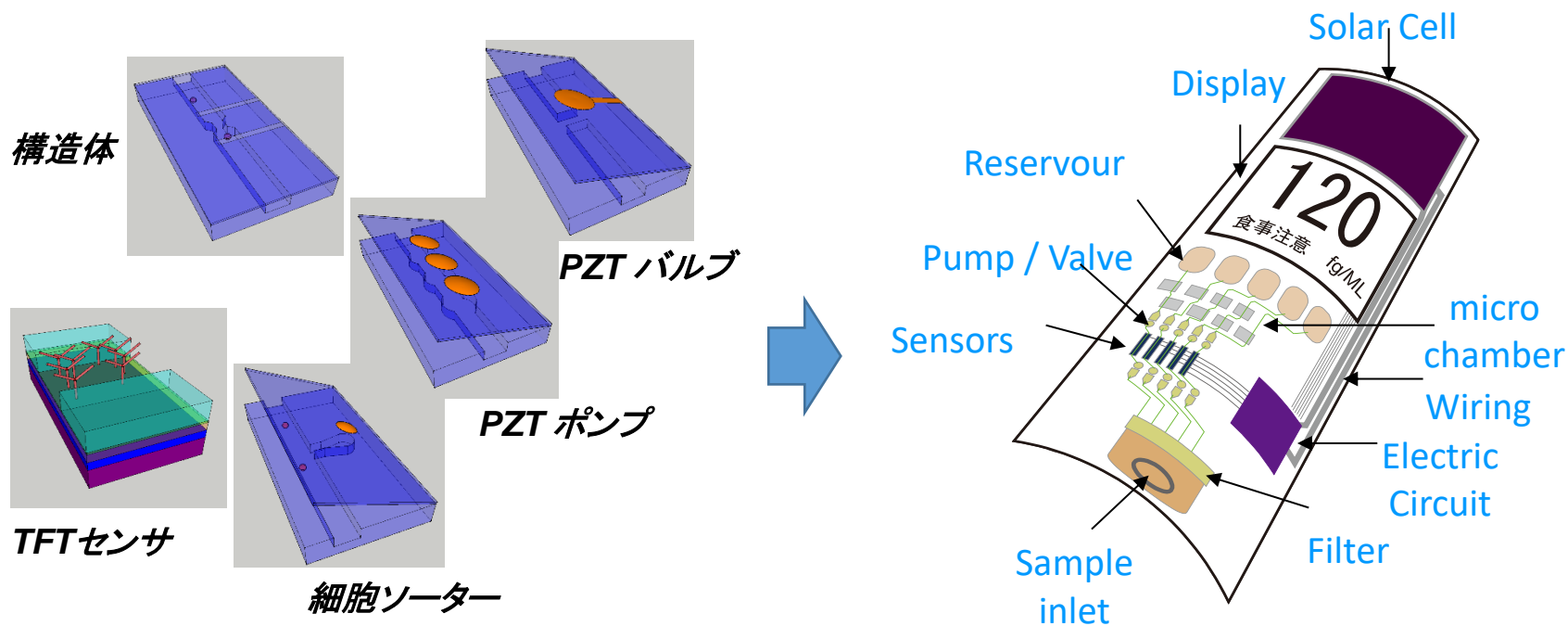
<https://corporate.murata.com/ja-jp/group/fukimurata/products/sekisocondenser>

酸化物を用いる利点

- 空気中で安定
- 有機物と比較して頑丈
- 有機溶媒に溶けない
- 水中で安定
- 溶液からも作成可能
- 高い誘電特性がある
- イオン伝導性がある
- 導体、半導体、圧電体が揃う

有機金属酸化物を用いた能動的デバイス開発

有機金属酸化物（液体）を印刷等の技術でパターンニングして熱処理するだけで、様々な能動素子を作成できる



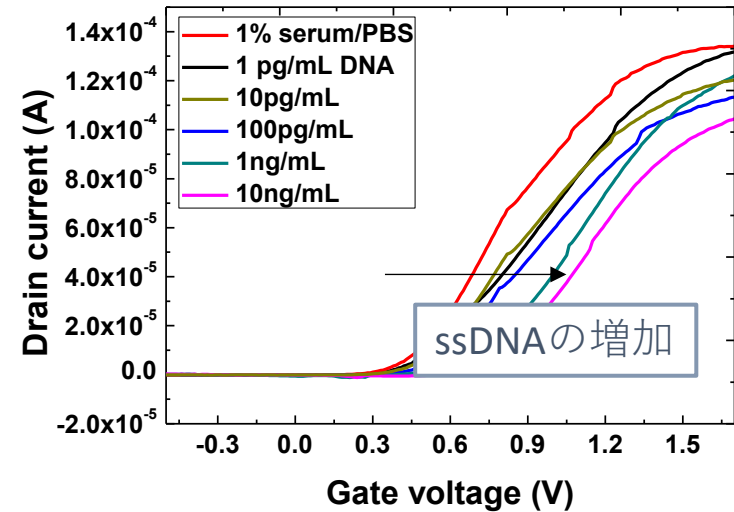
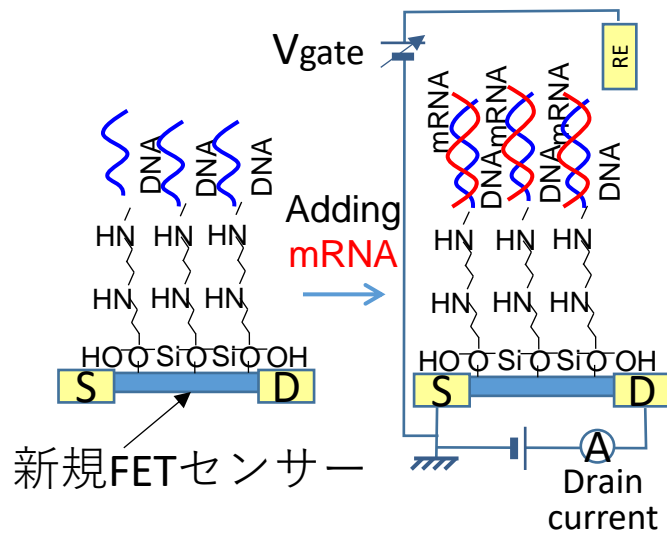
メリット

- ✓ 様々な材料がパターンニングできる。
- ✓ 材料とエネルギーの利用効率が高い
- ✓ 大面積に低コストで能動素子を作成可。

センサーにトランジスタを組み込んで高感度化

配列特異的に捕捉したDNAの電荷を、新規FETが高感度測定。

試料導入→ハイブリダイゼーション (10分) →測定 (1分)



1pg/mLを検出, 1zmol相当

従来の高感度検出法

イベント、集会、公共の場所等で発生する**感染リスク**、**クラスター化リスク**を**最小化**するためには、だれでも**簡易にその場**でウイルス等の**付着**、**存在**を検査できる**安価**な方法があると良い。また、**食品中**の感染源による**集団食中毒の防止**、豚コレラなど畜産業の感染の**早期発見**、**バイオテロ**の抑制において、特定の感染源を簡易に測定できる方法が望まれていた。

従来の抗原検出法の例

(定量PCR型)



QIAGEN QIAstat
抽出自動 全1時間
6波長定量PCR+ x 8 Cell

(イムノクロマト型)



富士レビオ エスプライン
手動 30分
タンパク質検出
400コピー以上で一致率9割

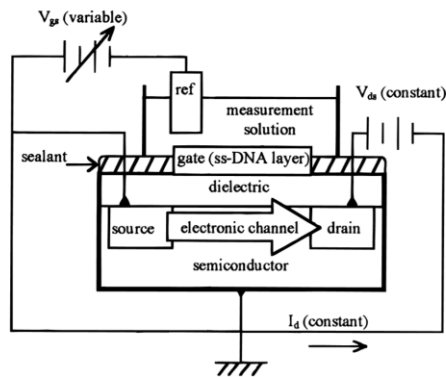
PCR法の問題点

高価 (3万円/件)、長時間
高度なオペレータ必要
要抽出工程 (偽陰性のリスク増)
コンタミ、2次感染の危険
それなりの装置が必要

イムノクロマト型の問題点

感度が低い
手動操作が必要
コンタミ、2次感染のリスク

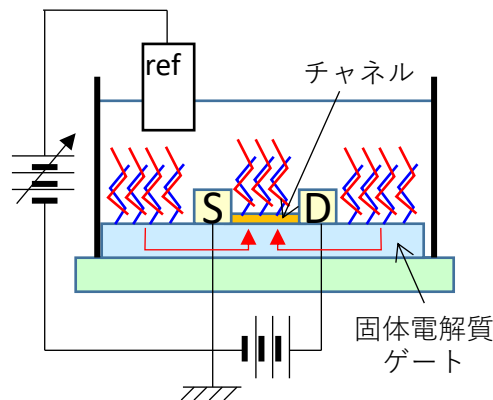
本FETが高感度な理由



J. Phys. Chem. B, Vol. 101, No. 15, 1997 2981

従来のFET型

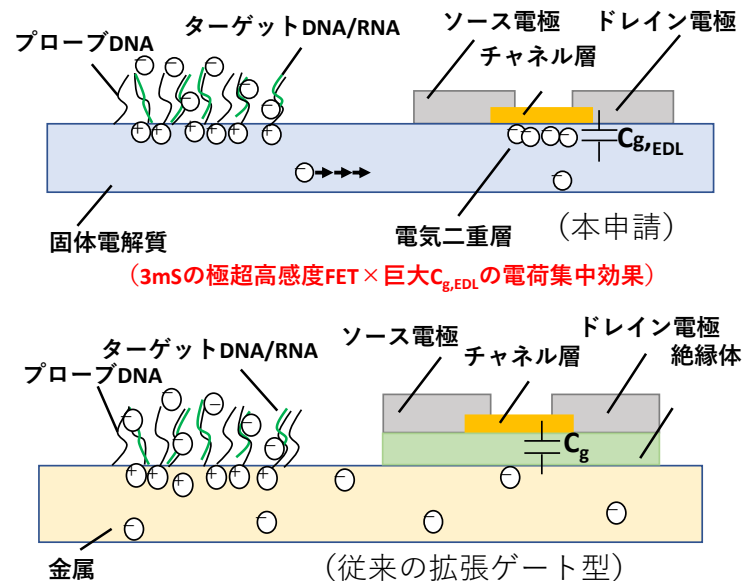
- チャンネルの上だけで測定
- 測定限界：nMオーダー
- 蛋白等夾雑部の影響大
- Bind/free分離必須
- デバイ遮蔽を防ぐため 0.0001xPBS等の極低塩濃度電解質に置換必須



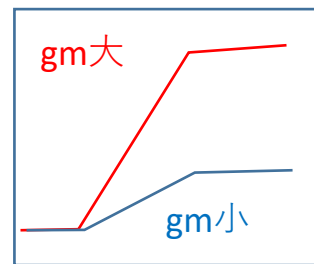
特願2019-230511

本法FET型

- 新材料・構造のFET
- チャンネル+固体電解質ゲート上で測定
- 測定限界：数十分子オーダー（現在）
- 夾雑部の影響軽微



ソース電流
ドレイン電流



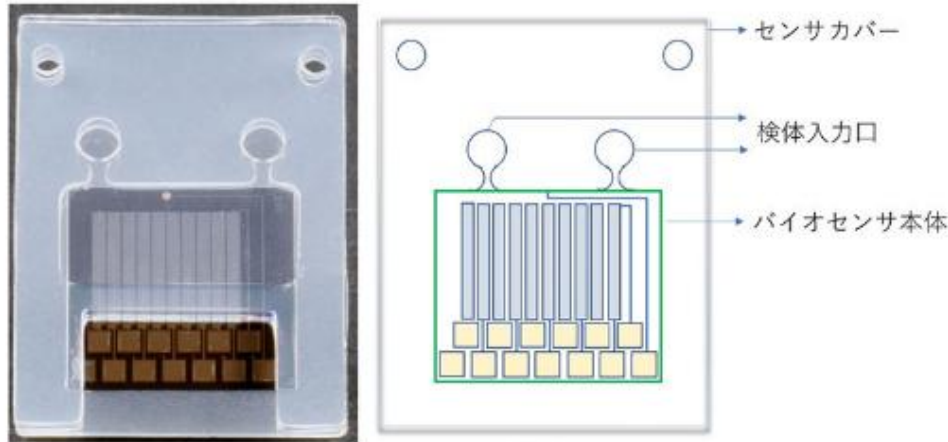
ゲート電圧
(補足されたDNA/RNAによって変化)

FET材料	gm例 [μS]
本FET	~ *3000
Graphene	~ 30
Si/SiO2	~ 3

*Li等, J., J. Appl. Phys. 2020

($\Delta I = g_m \cdot \Delta V$ の係数 g_m が大きい)

新規酸化物TFTによる大腸菌の測定例



模式図

新開発のバイオセンサ

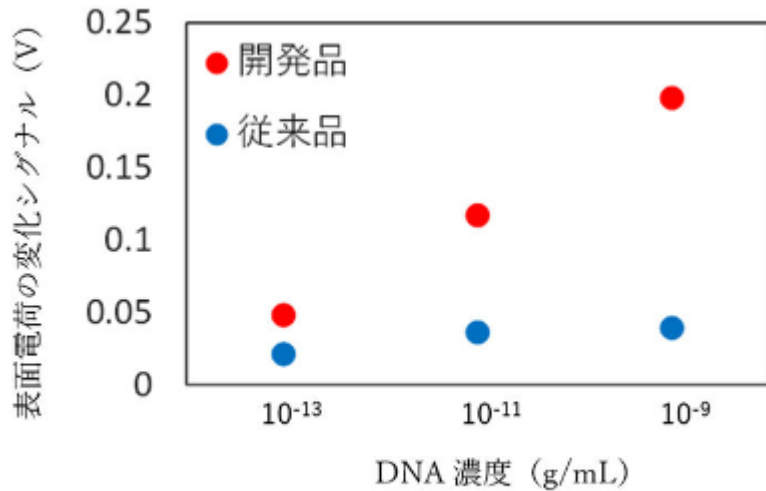


図1 新規開発品によるシグナル増強について

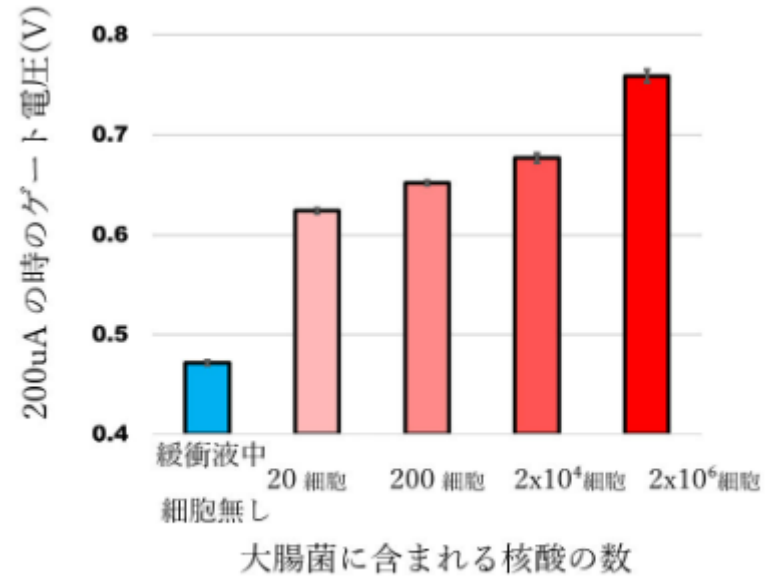
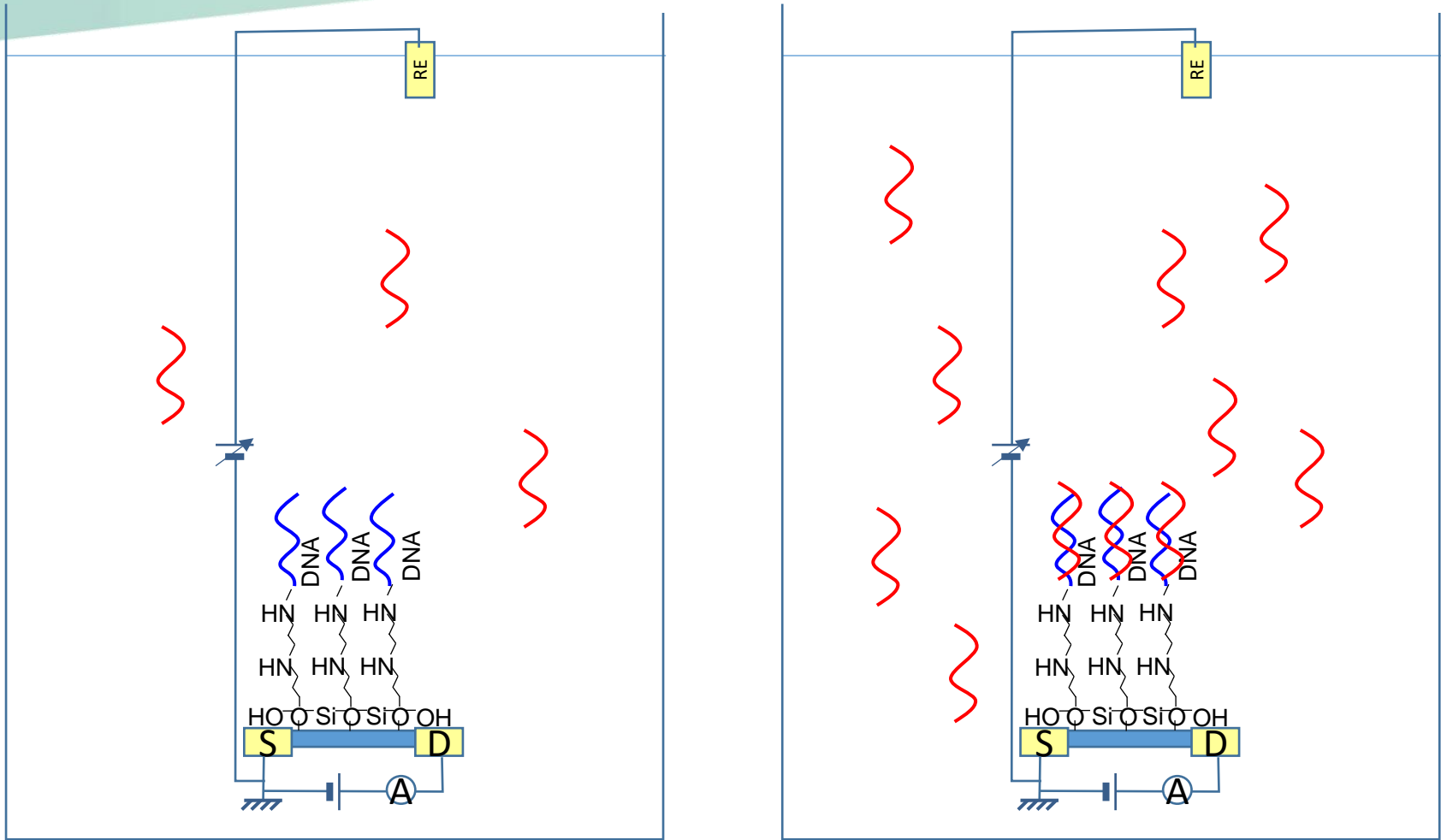


図2 大腸菌検出結果

多項目を同時に測定できる
 PCRのような増幅なしで高感度
 強力な薬品混在化でも動作
 保管に冷蔵庫が要らない

FET だけでは 微量検出に時間がかかる



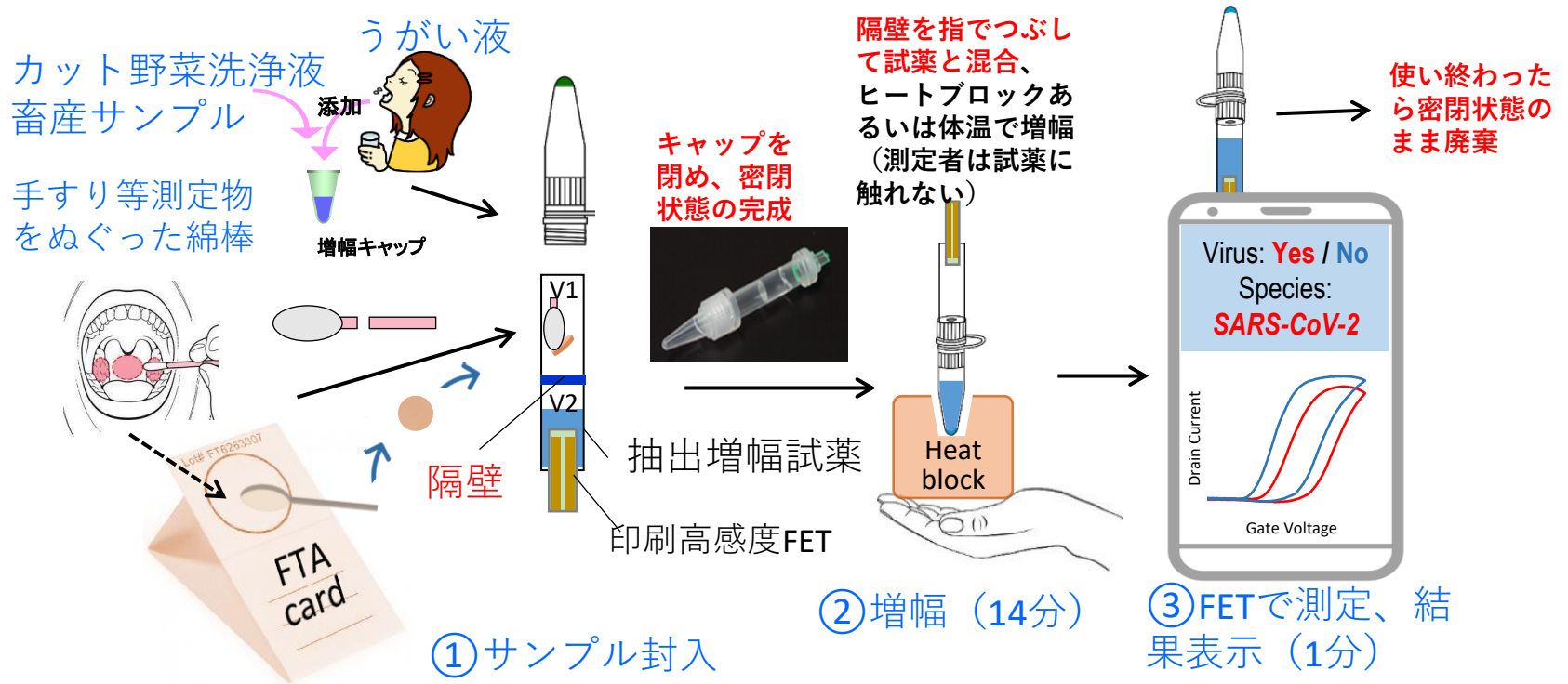
増やしながらか測ればよい

等温増幅法 + FET測定

令和2～4年度 A-STEP 育成研究

高感度FETと等温増幅法によるウイルス・病原菌センサー開発

様々なサンプルからの、**簡便**、**安価**、**ハイスループット**、**その場**、**迅速な検査法**を提供



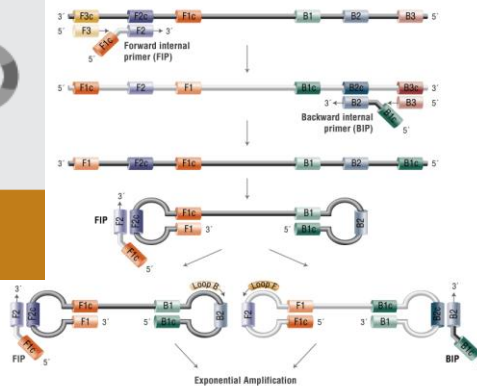
15分で、唾液中のコロナウイルスを数十コピーレベルで検出可能に

従来の等温増幅法の例

<https://www.nebj.jp/>

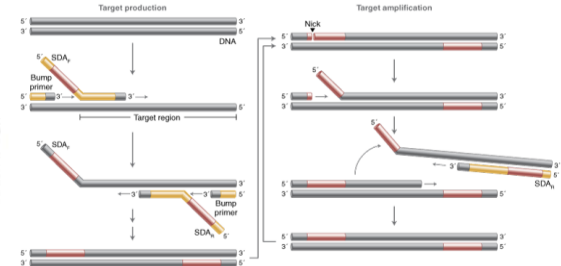
① LAMP (65°C)

Loop-Mediated Isothermal Amplification (LAMP)



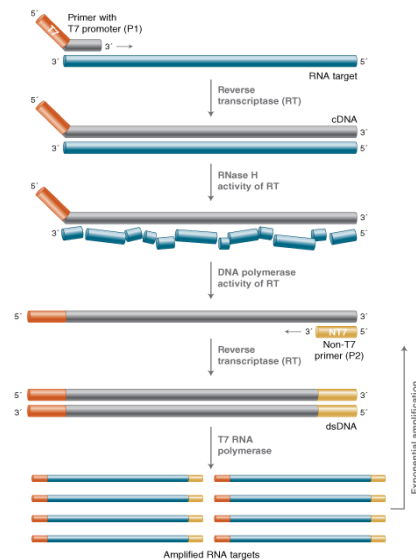
② SDA/NEAR (60°C)

Strand Displacement Amplification (SDA)



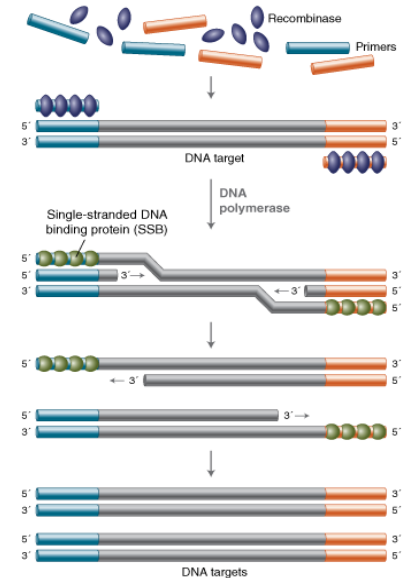
③ NASBA (40-55°C)

Nucleic Acid Sequences Based Amplification (NASBA)



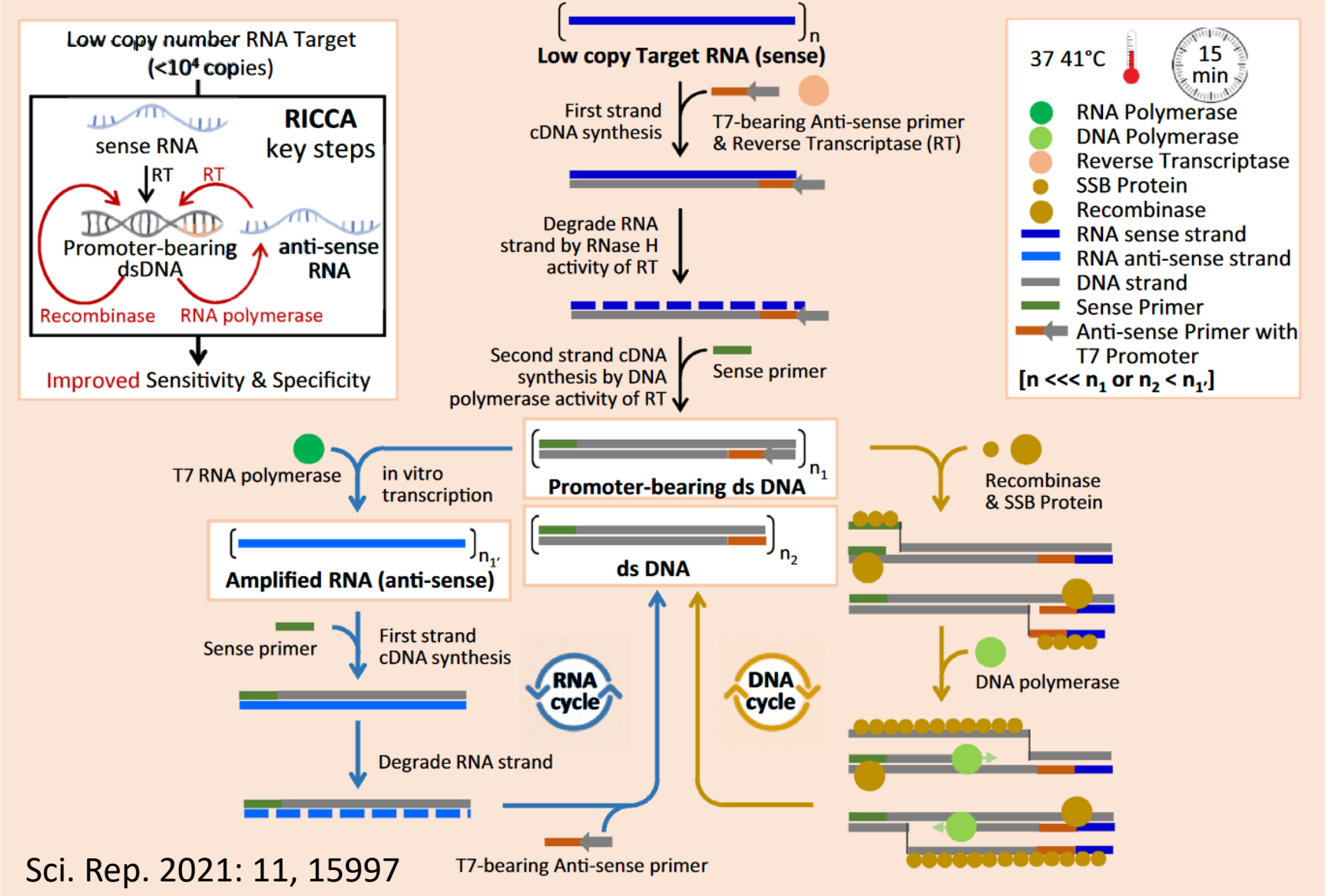
④ RPA (37°C)

Recombinase Polymerase Amplification (RPA)



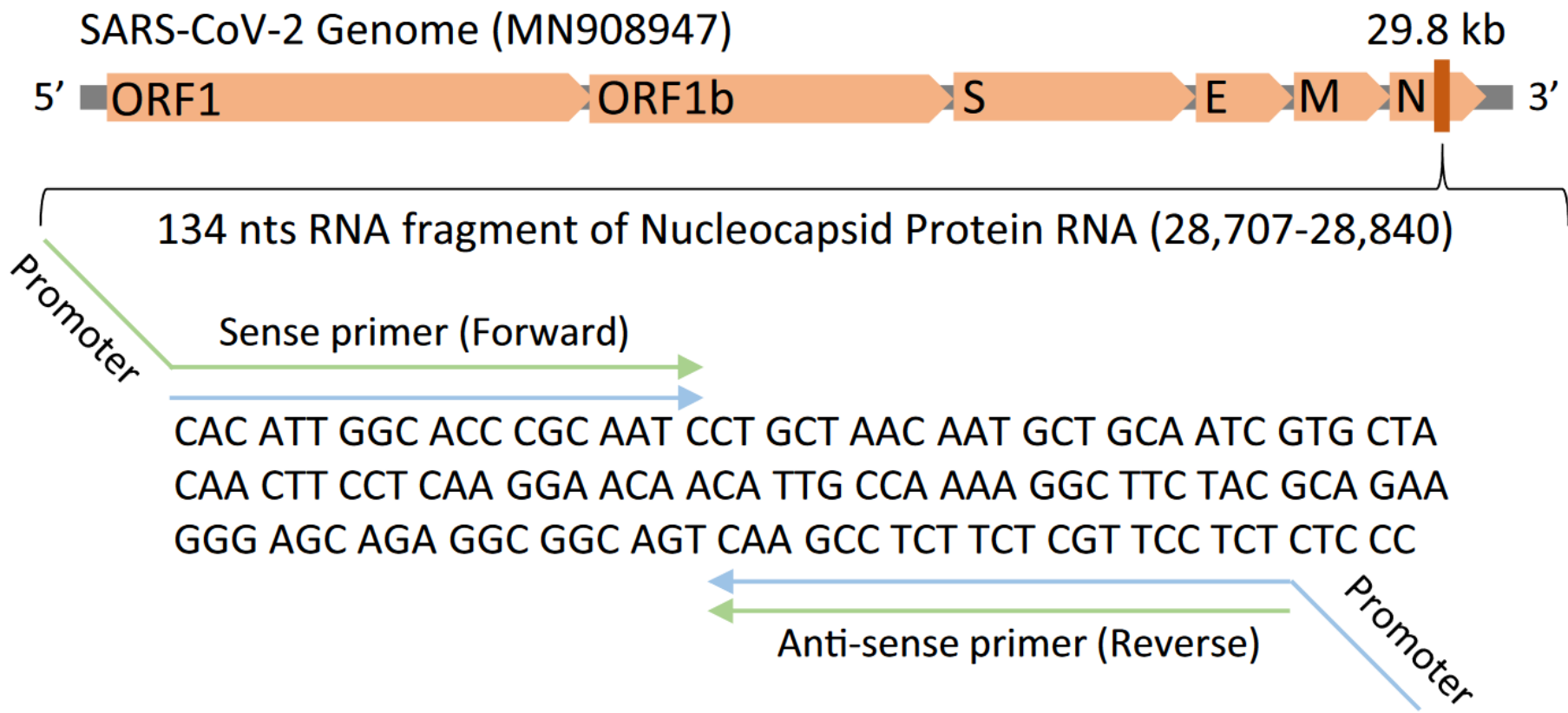
温度が高い、感度が十分でない、特異性が低いなどの問題点があった。

RNA Isothermal Co-assisted and Coupled Amplification (RICCA)

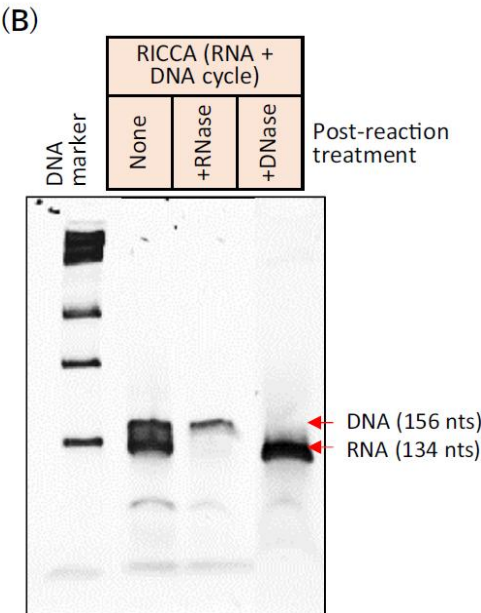
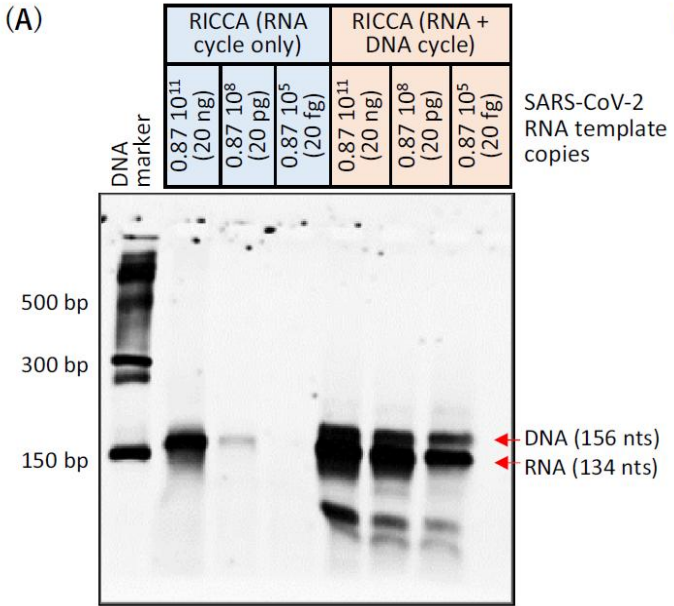


体温程度の低い温度で、等温増幅が可能。RNAとDNAの両方を増幅

RICCAによる新型コロナウイルスの検出

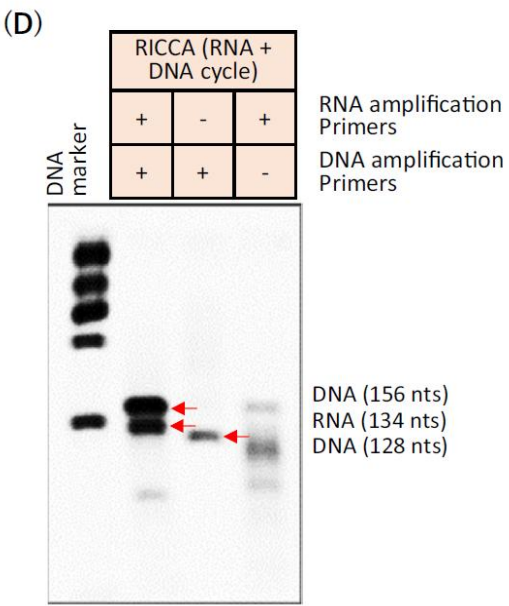
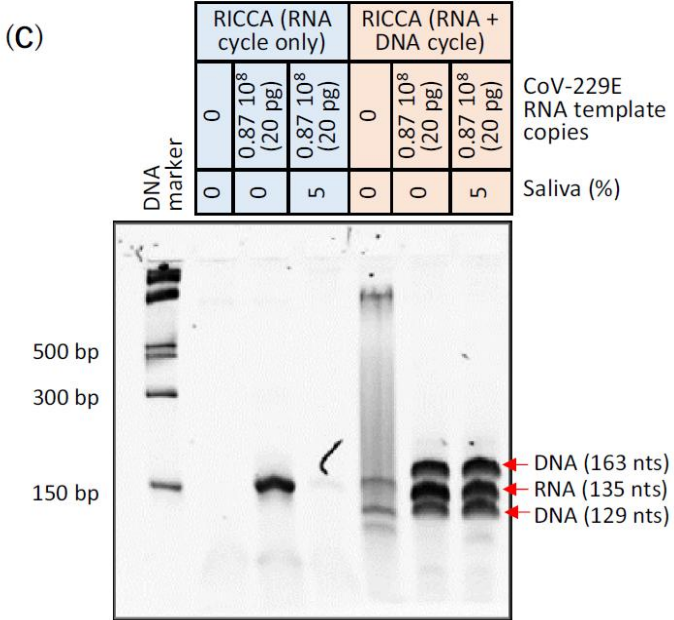


RICCAによる新型コロナウイルス配列の検出



RNA増幅だけでは 10⁸ コピーまで

RNA増幅 + DNA増幅では 10⁵ コピーでも強い信号



RNA増幅 + DNA増幅では 5%唾液中でも強い信号

将来構想



増幅キャップ

自主診断、早期発見



集会での入り口全検査



空港での水際全検査、
バイオテロの発見



空調機のフィルタ・マスクの検査による
クラスタリスクの早期発見、将来は自動化も
電車、カラオケ、夜の街（テーブル毎）

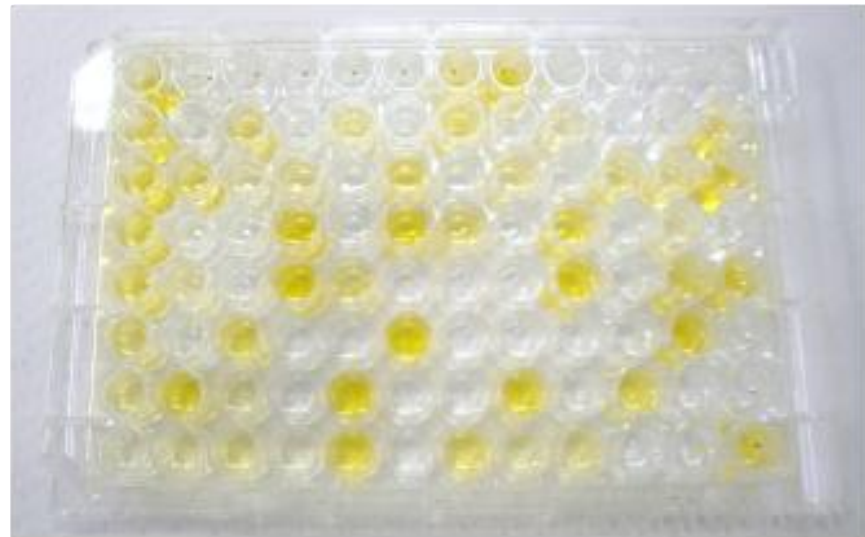


カット野菜、給食等
集団食中毒の予防。
作ってから食べるまで2時間の間に

抗原検査をさらに高感度化する試み

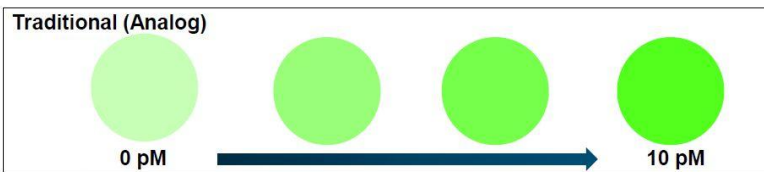
Analog ELISA (enzyme linked immunosorbent assay)

ELISA: An example of an assay using a 96-well plate.



The yellow color indicates that the target protein is present. The higher degree of the color, the higher concentration of the target protein.

(<https://ruo.mbl.co.jp/bio/e/support/method/elisa.html>)



信号が全体のサンプルに希釈される

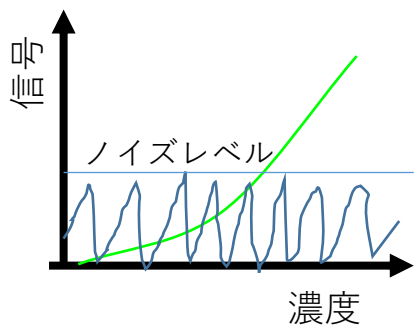
低感度

LOD~ pM (10^{-12}) level

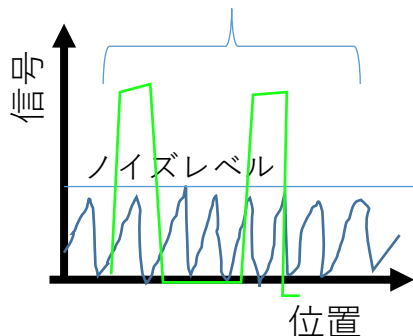
※LOD : Limit of detection

Digital 計測技術の台頭

アナログ計測



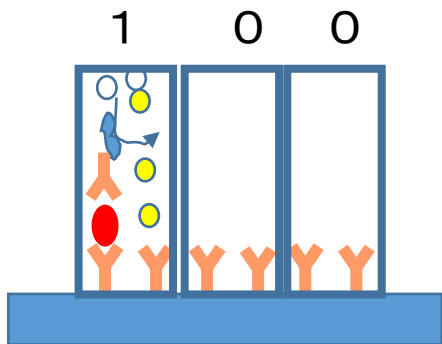
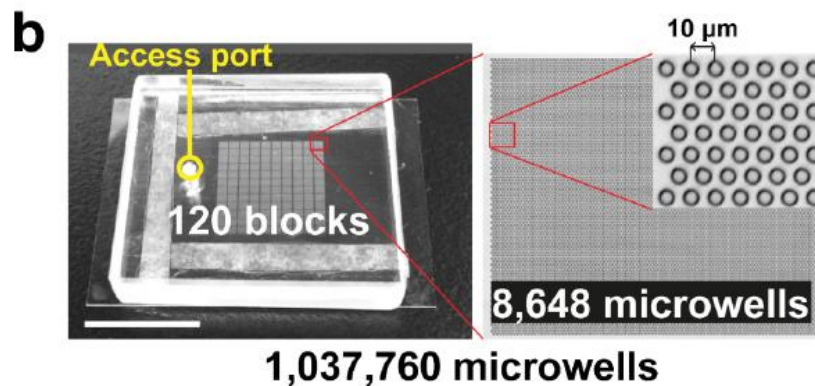
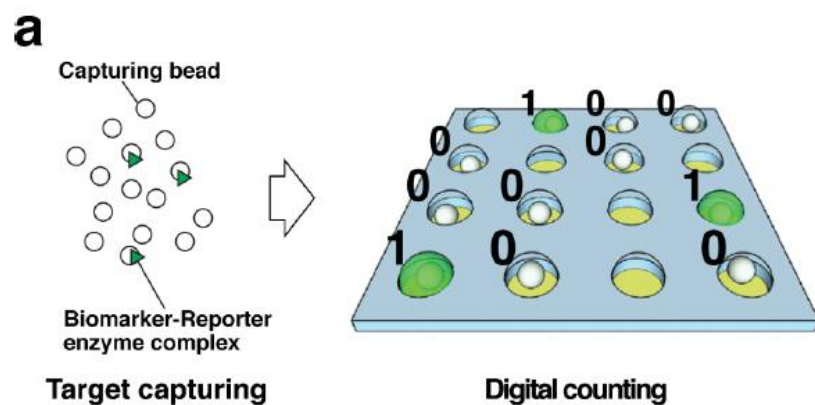
デジタル計測
数を数える



Large-scale femtoliter droplet array for digital counting of single Biomolecules

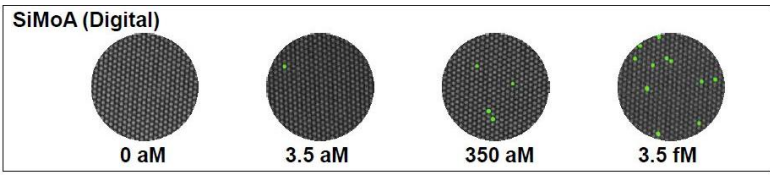
Soo Hyeon Kim, Shino Iwai, Suguru Araki, Shouichi Sakakihara, Ryota Iino and Hiroyuki Noji,

Lab Chip, 2012, 12, 4986–4991



狭い空間に閉じ込めることで
ノイズレベル以上に

Digital ELISA

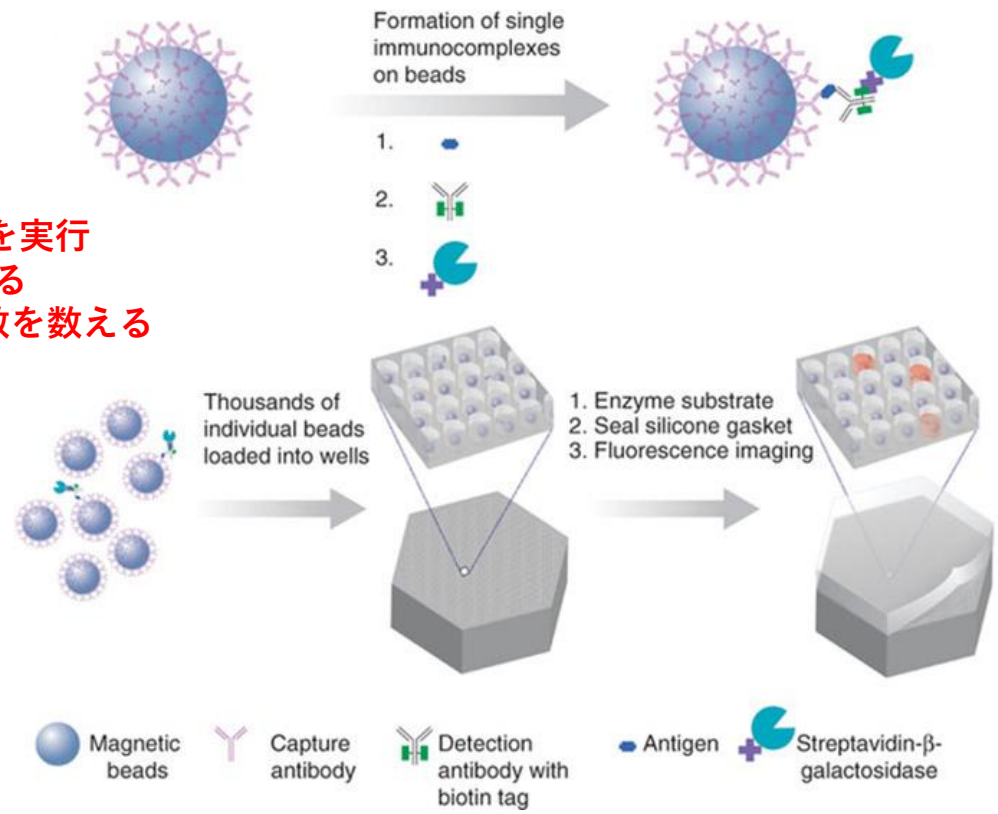


各ユニット内でELISAを実行
 1分子が検出可能になる
 検出したユニットの数を数える

高感度
 LOD~ aM (10^{-18}) level



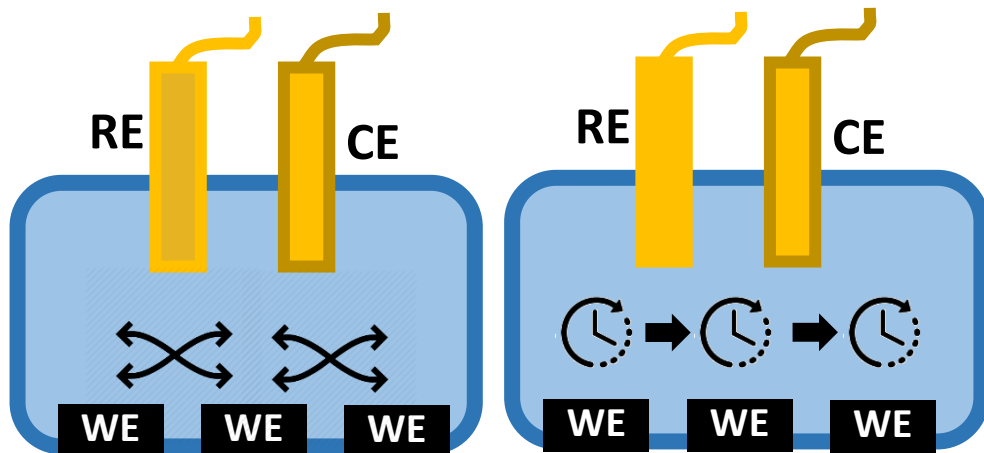
Simoa HD-1 digital
 ELISA Analyzer
 大きな装置が必要
 POCT 不可



(Rissin D M, Kan C W, Campbell T G, et al. Single-molecule enzyme-linked immunosorbent assay detects serum proteins at subfemtomolar concentrations[J]. Nature biotechnology, 2010, 28(6): 595-599.)

ポテンシオメトリの方がマルチ測定に向いている

アンペロメトリ

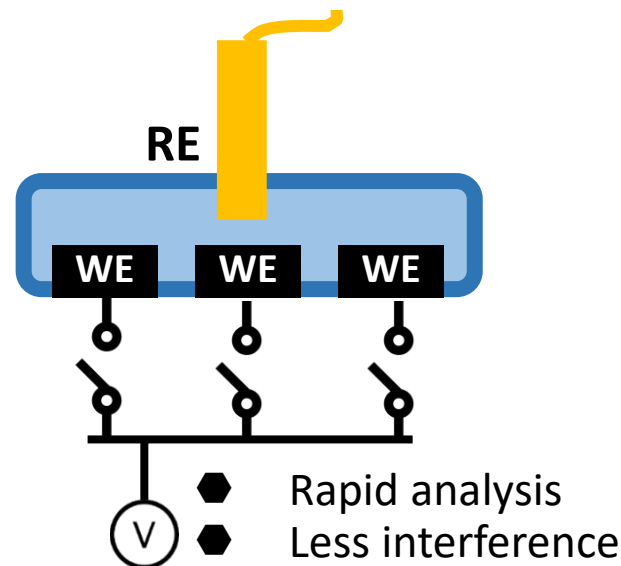


同時に測定すると
電極同士が干渉する

順番に測定すると
時間がかかる

マルチ測定に向かない

ポテンシオメトリ



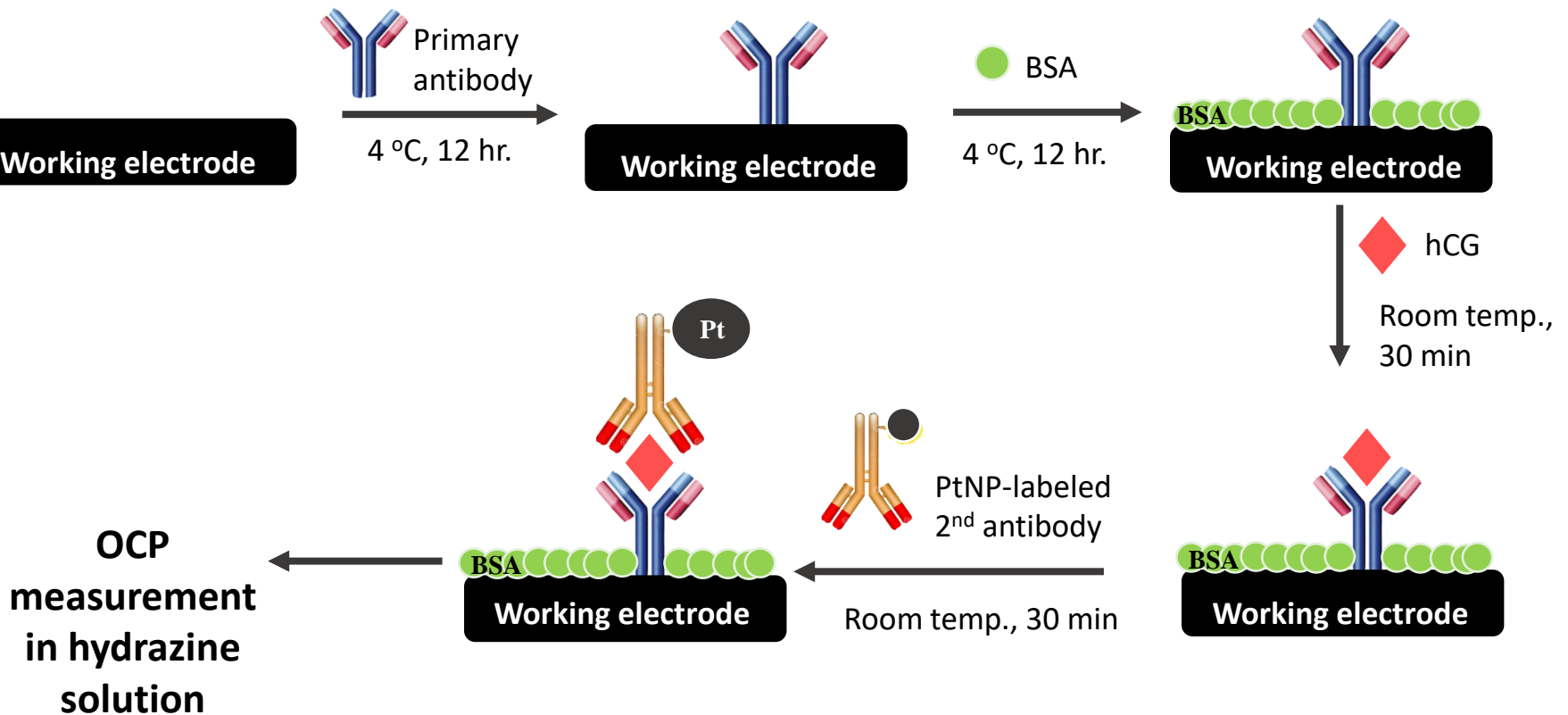
各電極電位を高速
にスキャン可能

大規模なマルチ測定が可能



白金ナノ粒子を用いたOCPセンサー

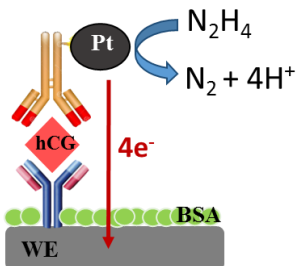
OCP: Open circuit potential 溶液中で、接続されていない電極が持つ電位





OCP detection of hCG

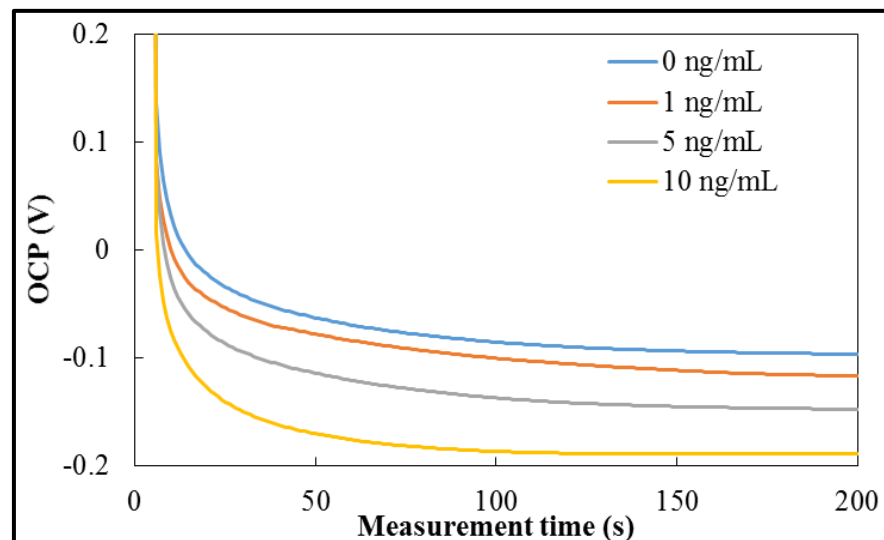
Ptナノ粒子とOCPを用いた hCG のイムノアッセイ



The different amounts of PtNPs on electrode surface affected to the **catalytic activities towards the oxidation of hydrazine** that result in the change of OCP signal.

Excellent electrocatalytic of hydrazine

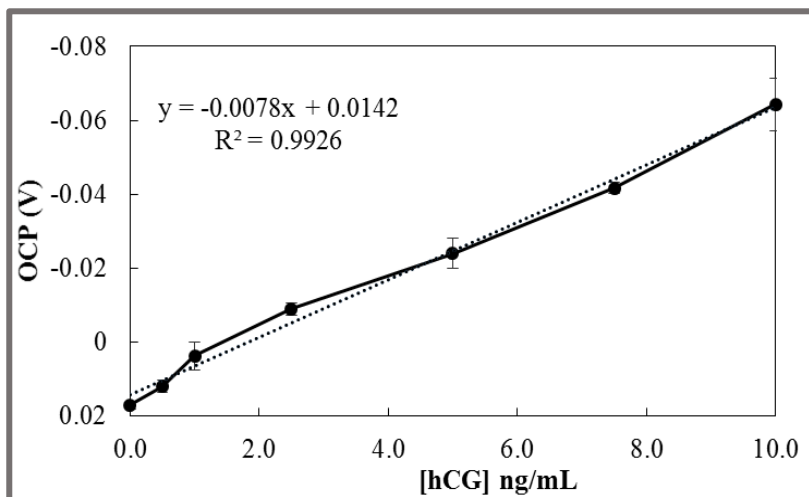
- ◆ The detection of hCG **was successful**.
- ◆ The potential was **shifted negatively** with increasing of hCG concentration.



Analytical performance



Calibration curve

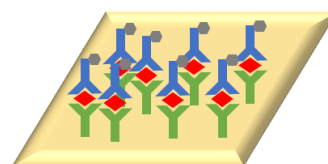
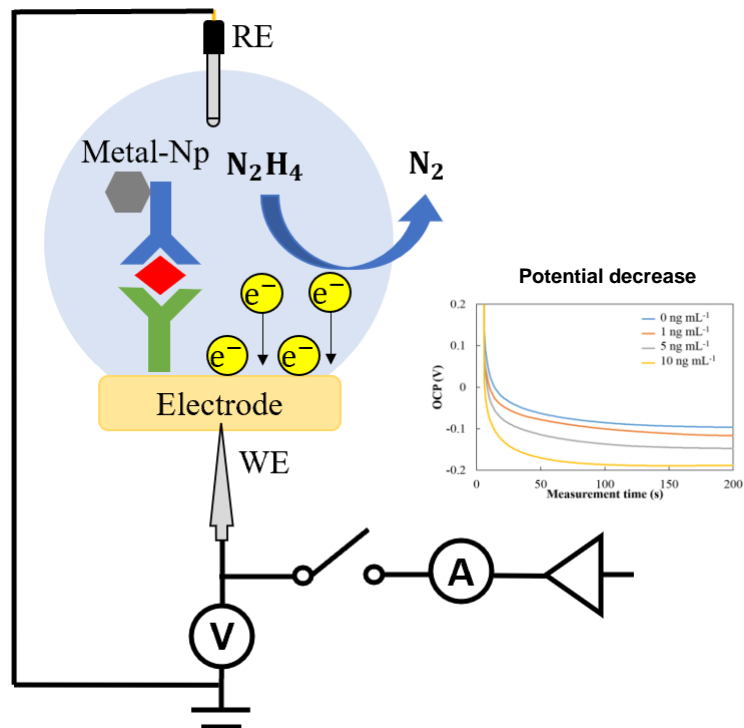


- **Linearity**
0.5 to 10 ng/mL
- **LoD**
0.28 ng/mL

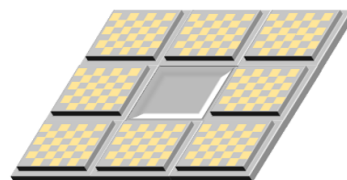
- The obtained LoD is low enough to screen hCG concentration in clinical diagnostic applications.
- Our proposed PtNPs based method **shows simpler electrochemical detection procedure** than those obtained from AuNPs based method with an acceptable sensitivity and reproducibility.

このOCPは電極面積によらない
 電極面積を小さくすれば、1分子の有り無しを検出できるのでは？

Open circuit potential (OCP) biosensor development



Analog sensor



Digital sensor
(Sensor array)

Advantages of this OCP biosensor

- Simple , High speed , Low cost
- Miniaturization possible
- Can achieve single molecule detection using small electrode
- Can achieve digital measurement by sensor array



LOD



POCT

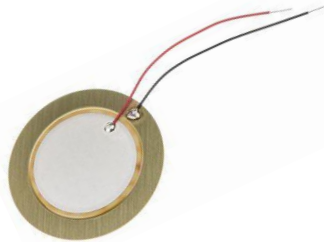
To address each position

Valves array will be integrated by

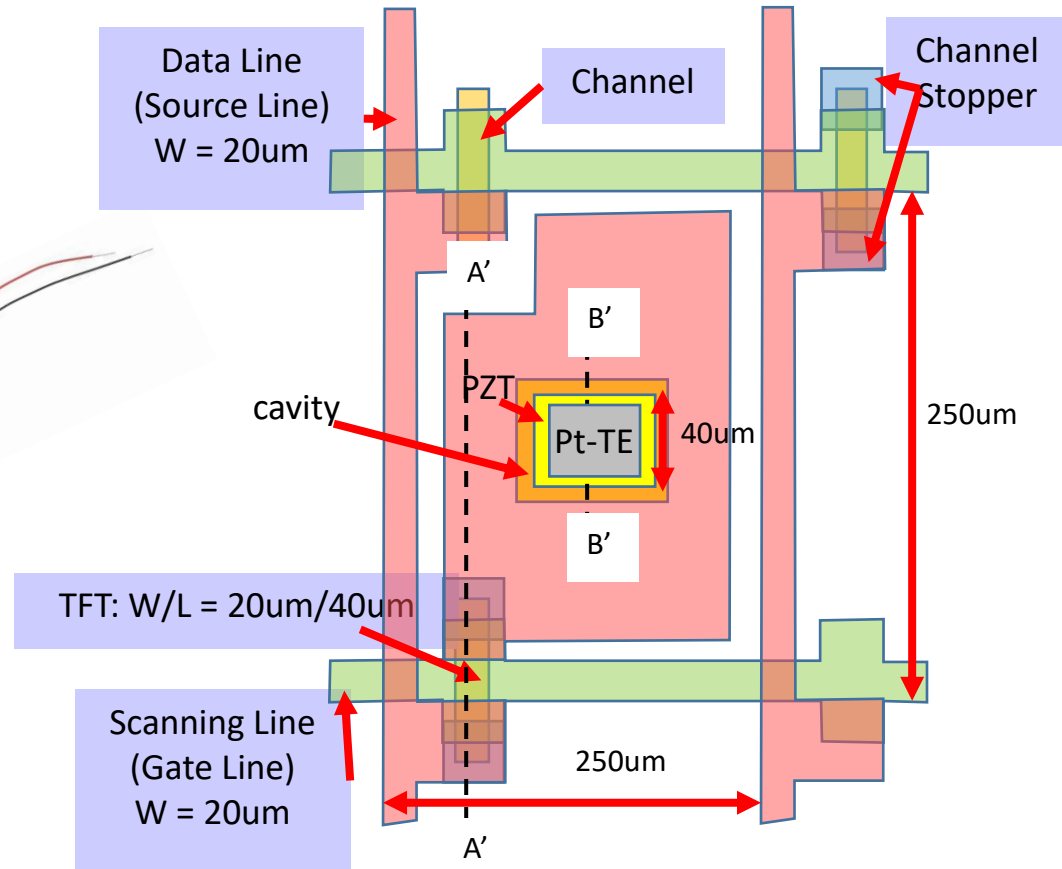


TFT Active matrix array

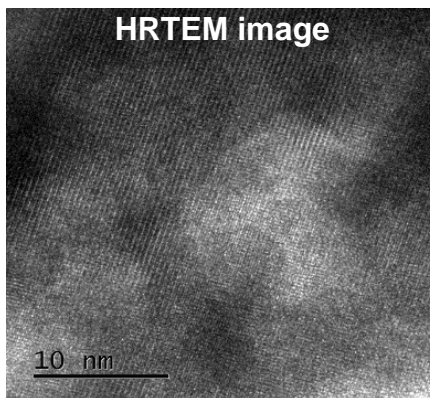
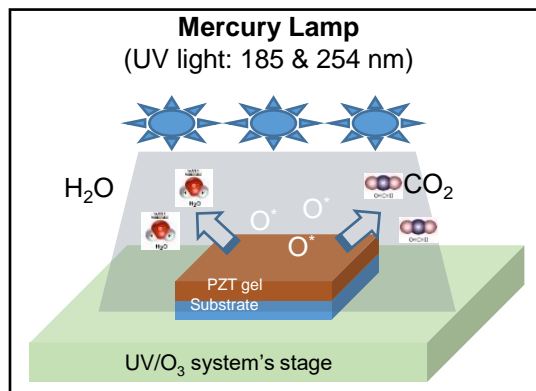
Image from <https://www.j-display.com/news/2014/20140327.html>



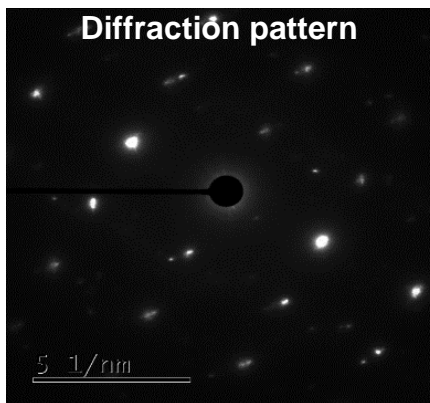
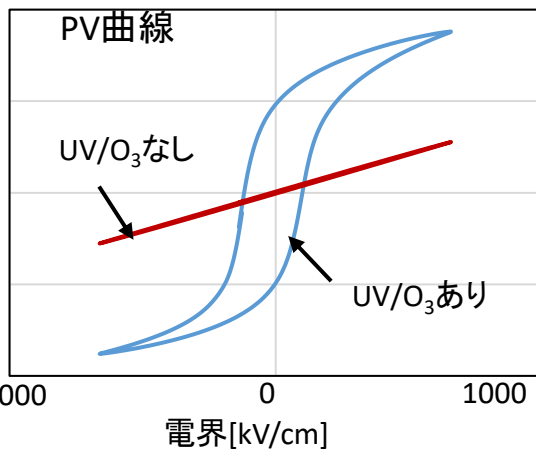
PZT Piezo electric actuator



450°C低温PZT成膜プロセスの発見



従来は700°C
圧電素子の集積化
張り付け→直接堆積が可能に

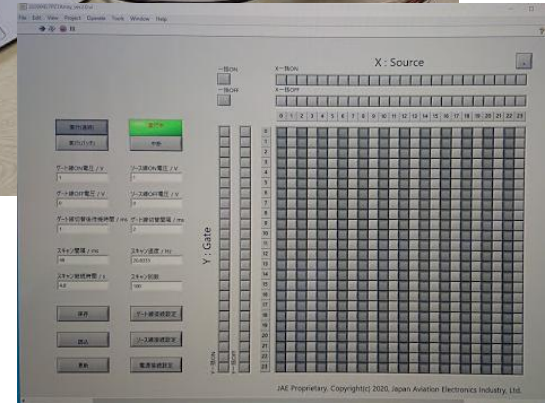
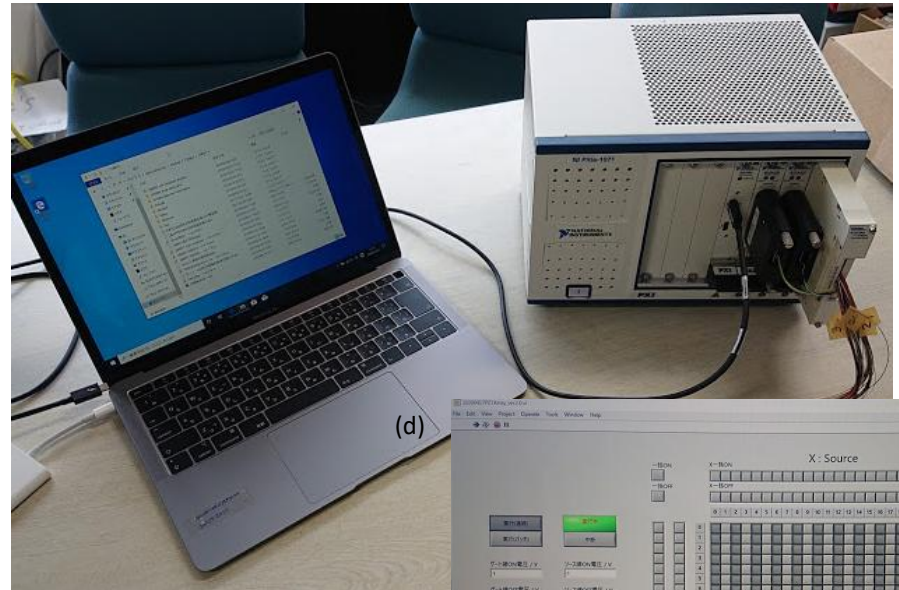
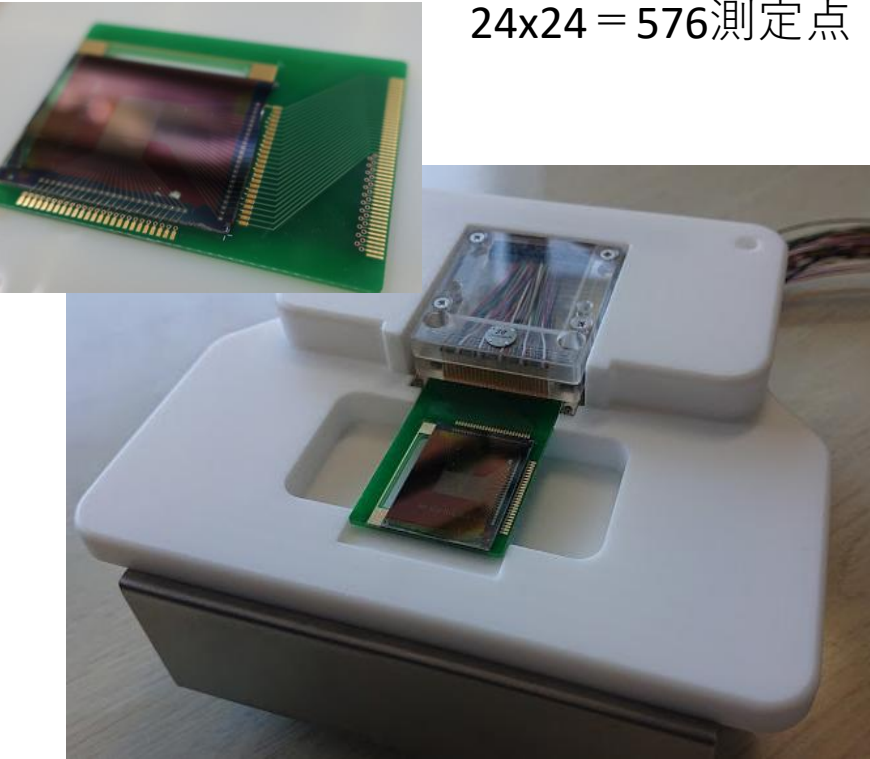


特許
→ 三菱マテリアルより販売中

低温 PZT (450 °C)

作成したチップとその制御装置

24x24 = 576測定点



まとめ

- 酸化物を用いることで、能動素子をチップ内に集積化することができ、高度なバイオセンサ・バイオデバイスを実現できる
- 溶液法で作成した酸化物TFTを集積化したセンサーでは、増幅なしで20細胞の大腸菌を検出可能に。増幅と組み合わせて、10コピー程度のコロナウイルスを15分程度で検出可能に。
- OCPと電位センサーアレイを用いることで、**Digital** 計測が可能な1チップセンサーが開発できる可能性が示唆された。
- 圧電材料PZTを450°Cで以下で溶液から作成するプロセスを開発し、アクティブマトリックスTFTアレイを作成した。これにより、組織や培養細胞ネットワーク中の一細胞を、位置情報を保存してRNA-Seq解析可能なデバイスを作成。