

診断医療に向けた半導体バイオセンサの可能性

東京大学大学院 工学系研究科 准教授 坂田 利弥

要 旨 本稿では、半導体バイオセンサにおける検出原理と糖尿病、不妊治療、DNA 解析など種々のアプリケーションの可能性について概説する。特に、対象となるバイオと検出デバイスである半導体との間の界面の重要性について紹介する（本稿は、2016 年 12 月 15 日に開催された弊社主催「ものづくり支援シンポジウム 2016」での、特別講演を基に構成したものです）。

1. はじめに

図 1 に、バイオエレクトロニクス技術の発展を示す。図中赤字が本稿で取り上げる半導体バイオセンサに関連する項目である。MOS (Metal-Oxide-Semiconductor) トランジスタはゲートの金属、間のオキシドの絶縁膜、セミコンダクターで構成されるが、バイオ系の溶液では、ゲートの金属が無く溶液になり、そこにゲートの電極を突っ込むためにリファレンスの電極を入れる構造になっている。

バイオエレクトロニクス技術の現状と先端半導体技術への期待

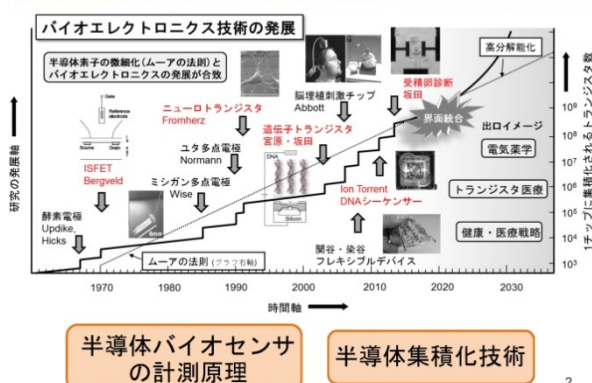


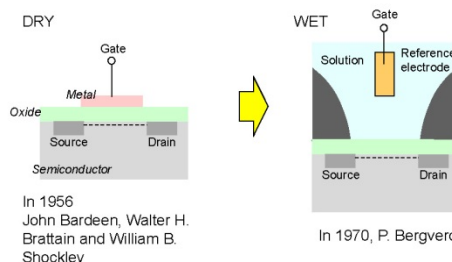
図 1 バイオエレクトロニクス技術の現状と先端半導体技術への期待

1970 年、P. Bergveld により ISFET（イオン感応性電界効果トランジスタ）を水中に入れ、pH センサ、イオンセンサとして使う技術が発表された（図 2）。

半導体材料のバイオ計測応用

○半導体を溶液に入れバイオセンサに！

Ion Sensitive Field Effect Transistor (ISFET)



3

図 2 半導体材料のバイオ計測応用

1991 年、Max-Planck の P. Fromherz が初めてニューロトランジスタの上に神経細胞を培養し、計測した。神経細胞の場合は、非常に短い時間で神経細胞の活動、いわゆるアクションポテンシャルを計測するので、時間スケールとして数 msec からせいぜい 10min である。ヒトの生態機能というのは恒常的に、長時間（日・週・月）スケールで動くことが多く、我々は半導体バイオセンサにより、受精卵のような移植細胞を長時間スケールでモニターするための研究を進めている（図 3）。

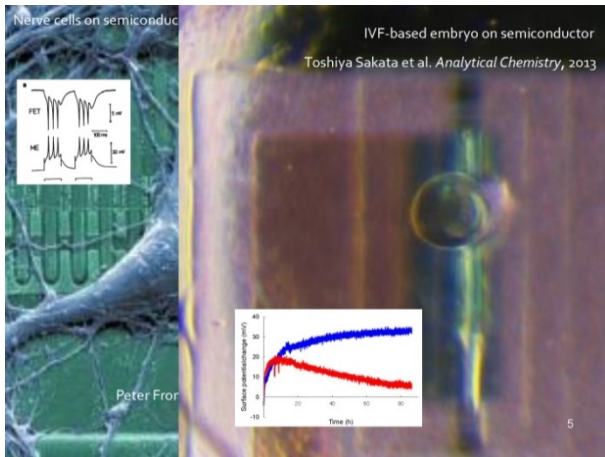


図3 半導体バイオセンサの実用例

歴史的な流れの話で、pH センサという点では、堀場製作所がいろいろな pH センサを開発している。画期的だったのは 2011 年米国ベンチャー企業 Ion Torrent 社が半導体技術で DNA の配列を読む次世代 DNA シーケンサーを開発し、一躍有名になった (図 4)。

半導体バイオセンサの実用例：pH・DNA センサ

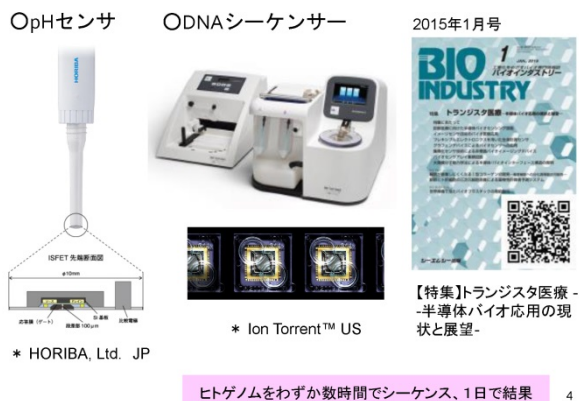


図4 半導体バイオセンサの実用例：pH・DNA センサ

2. バイオセンシングの原理

図 5 に、半導体バイオセンサの模式図を示す。DNA は側鎖にリン酸を、また、プロテインは種々のアミノ酸、カルボキシル基、アミノ基を有しており、溶液中でイオンとして存在している。これら、電荷を持ったイオンがセンサ表面に吸着すると、それらの電荷とシリコンの中の電子が薄い絶縁膜を挟んで、静電的に相互作用し、その結果、Ion channel 部分の電流値が変化する。この変化を表面電荷の変化として捉えることで、バイオ分子の計測ができる。細胞の場合は、細胞とセンサ

の界面近傍が一番重要になる。薬が入ることで特定のタンパク質が刺激され、細胞中のイオンが細胞外へ放出される。細胞膜とセンサ界面の近傍で、このイオンの電荷を計測することになるが、この際イオン種の選択性が非常に重要である。

Semiconductor-Based Biosensing Device

Biologically-coupled Field Effect Transistor (BioFET)

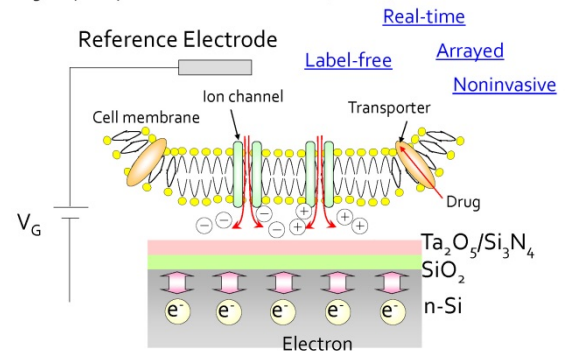


図5 半導体バイオセンサの模式図

バイオセンサの特長として、①リアルタイム計測が可能、②細胞を非侵襲的に計測出来る、③集積（アレイ）化に半導体の集積化技術が転用可能等が挙げられる。図 6 に、バイオセンシングに必要なデバイス 3 要素を示す。ターゲットと検出デバイスの間にはシグナルを変換する界面が必ず必要なので、3 要素がそれぞれ一つになっていないと、基本的にバイオセンサとしては使えない。何を対象にしてどういうセンサを使っているかを明確にし、デバイスを作っている側は何を目的にして、後でどういう界面を入れなければいけないかを念頭に置くことが必要である。

バイオセンシングに必要なデバイス3要素

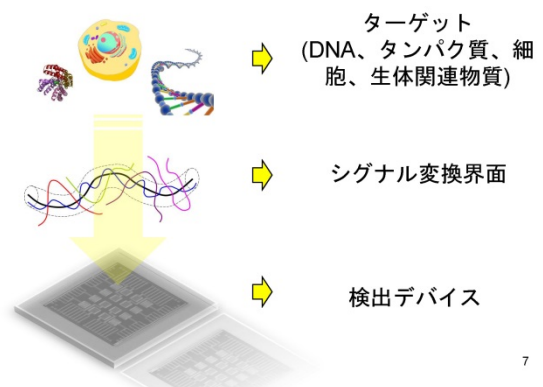


図6 バイオセンシングに必要なデバイス 3 要素

図7に、我々の研究テーマを示す。本稿では、以下3つの研究テーマについて紹介する。①Tear Glucose Sensing (涙のグルコースセンシング)：糖濃度の計測。②Embryo Quality Sensing：細胞(体外受精した受精卵)の評価。③センサの集積(アレイ)化。

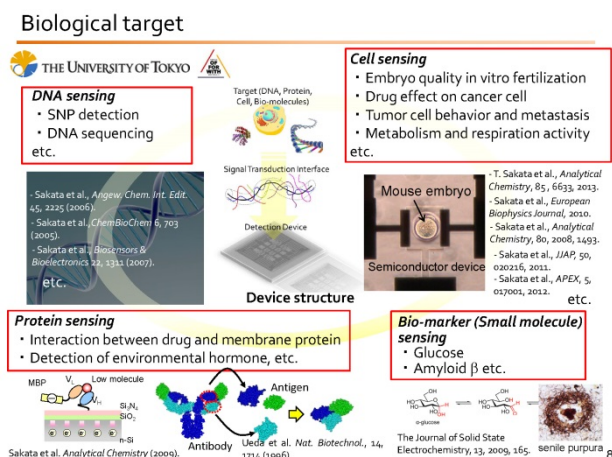


図7 我々の研究テーマ

3. 半導体バイオセンサによる Tear Glucose Sensing

世界中で「針を刺さずに血糖値を涙糖値で評価する」研究は山ほど実施されているが、半導体をうまく使った報告例は無い(図8)。



図8 涙のセンシング

図9左側のグラフは、我々が東大医学部 糖尿病・代謝内科 門脇研究室と共同で実施した、空腹時の健常者に糖を付加し、血糖値が下がっていく様子を見る「糖負荷試験」の結果である。涙のグルコース濃度(赤■)、血糖値(青◆) 何れも時間とともに下がっており、相

関が見られる。従来型の血糖値センサで検出されるグルコース濃度は5.5mM程度で、涙糖値に置き換えると約100分の1の10μM程度と低濃度で、感度の高いセンサが必要になる。

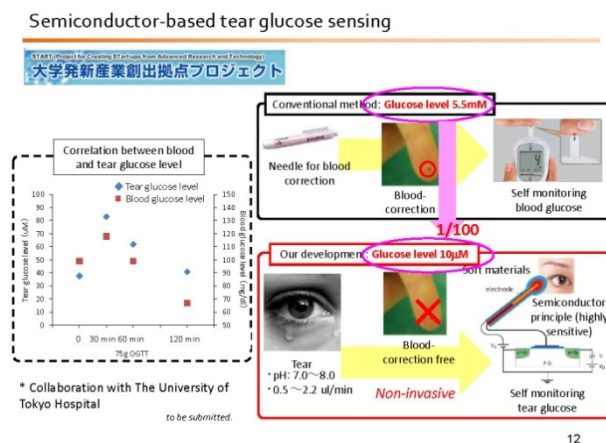


図9 涙のグルコースセンシング

図10に、半導体センサによるグルコース計測の原理を示す。フェニルボロン酸をゲート電極表面のチオール基に結合させコーティングする。フェニルボロン酸は、グルコースとジオール結合し、この際ボロンがマイナスの電荷を持つ。半導体でこの電荷の変化を計測し、糖の結合を計測するもので、酵素を使う方法に比べ簡単に計測できる。課題として、グルコース以外の糖(フルクトース、マンノースなど)ともフェニルボロン酸が結合する点が挙げられるが、モレキュラー・インプリンティング・ポリマー、分子ふるい効果などの技術を使い、グルコースだけを特異的に検出する技術の開発を進めている。

Au/phenylboronic acid(PBA) SAM* gated-FET glucose sensor

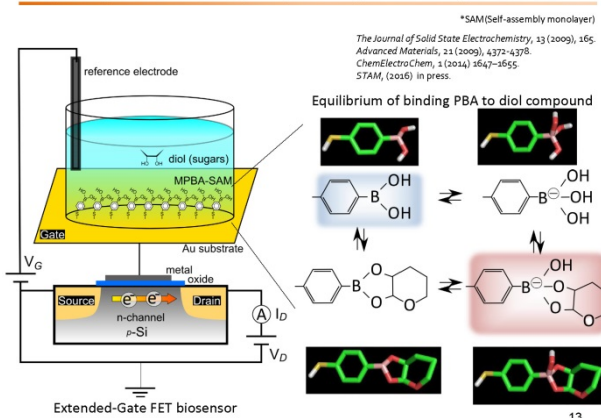


図10 半導体センサによるグルコース計測の原理

図 11 に、我々が開発した半導体センサによるグルコース計測の例を示す。グルコース濃度 10 μ M~40mM の幅広いレンジで、半導体センサで検出される電位はリニアに変化し、本センサが涙のグルコース濃度を十分に捉え、血糖値の範囲もうまく捉えていることが分かる。

Glucose response with BioFET

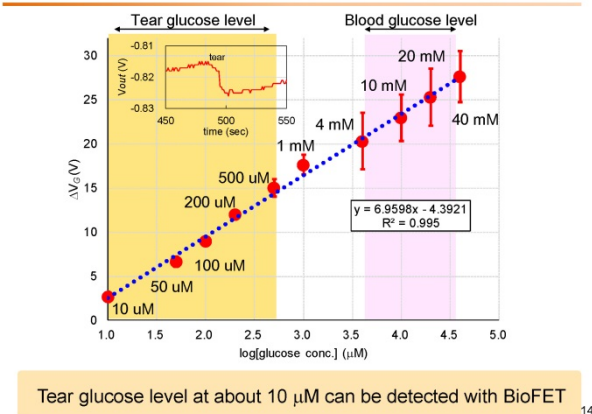


図 11 半導体センサによるグルコース計測の例

Google がコンタクトレンズの開発をしているという話がニュースになったが、我々は涙のセンシングをターゲットとし、先端が交換可能なペン型モジュールの開発を進めている。将来的には、最近の IoT (Internet of Things) の流れにあわせ、モジュールにインターネット機能を持たせる事で、患者のリアルタイム計測値を医者が管理できるようになると見込んでいる。なお、個人情報の管理が課題となるが、実際、欧州では血糖値センサではあるが、インターネットでの情報のやりとりに対し、認可が下りている (図 12)。

Internet of things (IoT)

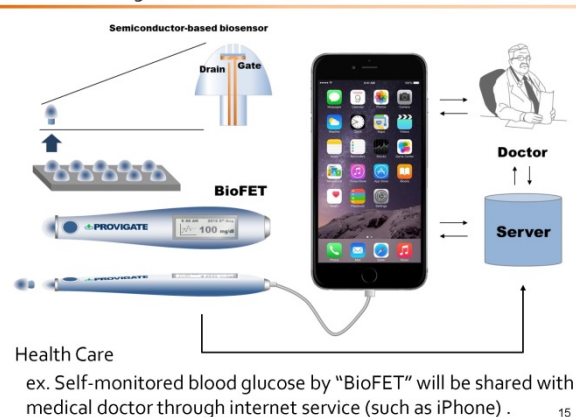
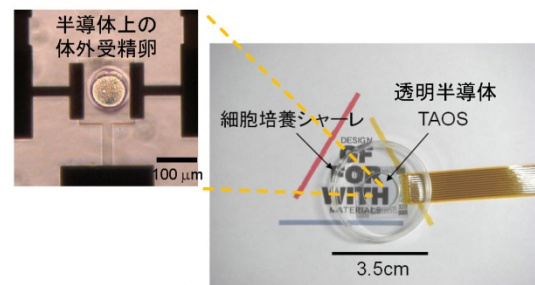


図 12 半導体センサと IoT (Internet of Things)

4. 半導体バイオセンサによる Embryo Quality Sensing

最近の再生医療では、人工的に作った細胞を体の中に戻すことがよくやられるが、安全性の観点から移植前の細胞クオリティー評価は重要であり、非侵襲計測が可能な半導体センサは活用が期待される (図 13)。

移植前の細胞クオリティーを評価



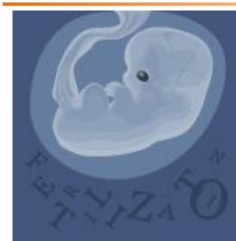
細胞センシング

移植する細胞を診断・薬の副作用を診断

図 13 移植前の細胞クオリティー評価

G. Edwards により開発され、2010 年ノーベル賞を受賞した体外受精において、体外受精した細胞、受精卵を評価する必要がある (図 14)。

2010 Nobel Prizes MEDICINE



The Father of the Test Tube Baby
MEDICINE Robert G. Edwards, the 2010 Nobel Laureate in Physiology or Medicine, battled societal and establishment resistance to his development of the in vitro fertilization (IVF) procedure, which has so far led to the birth of around 4 million people.



New technology is required to estimate noninvasively IVF embryo quality condition in the field of assisted reproductive.

図 14 2010 年ノーベル生理学・医学賞

「生殖補助医療 (Assisted Reproductive Technology; ART)」は、不妊治療で体外受精した受精卵を培養してから母親に戻すものであるが、この際、品質評価が必要である。現在は医師と胚培養士が光学顕微鏡による形態観察で評価しており、半導体センサを使うことで、曖昧さ、ばらつきの影響を排除し、信頼性を上げるための検討を進めている (図 15)。

生殖補助医療(Assisted Reproductive Technology;ART)



図 15 生殖補助医療

図 16 に、細胞の呼吸・代謝メカニズムの模式図を示す。グルコースと O_2 が細胞に入り、解糖系、電子伝達系、クエン酸回路により、グルコースが変化し、その過程でピルビン酸、乳酸が生成する。ミトコンドリアの中で ATP を合成し、エネルギーを作って細胞は生きていくが、最終的に CO_2 と H_2O が生成する。生成した CO_2 が溶液中に溶けると水素イオン H^+ の濃度が変化するので、 H^+ の濃度を認識することで、細胞の呼吸活性が評価できる。

Metabolism (Cellular Respiration)

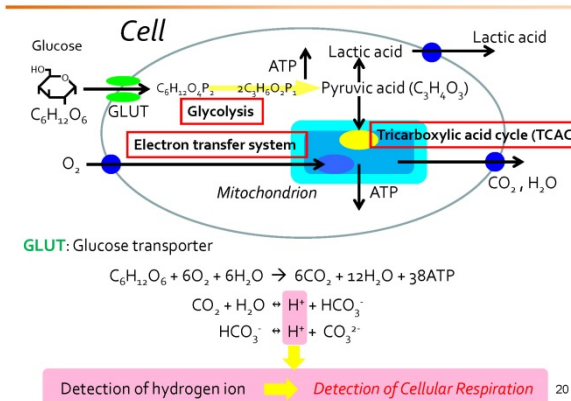


図 16 細胞の呼吸・代謝メカニズム

図 17 に、水素イオン H^+ 濃度の検出例を示す。半導体上に酸化物があり、その上に溶液がある。溶液の H^+ 濃度が変化すると、酸化物表面のヒドロキシ基が、アルカリ側で OH^- が H^+ が取れて O^- になることでマイナスの、酸性側で OH^- に H^+ が付いて OH_2^+ となることでプラスの電荷を、それぞれ持つ。図中グラフに示す通り、1 pH 当たり 58mV 程度変化している。

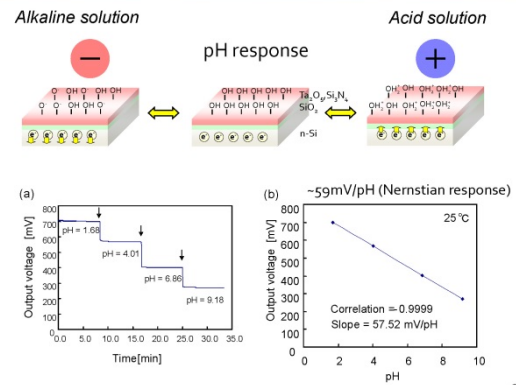
 H^+ charge detection図 17 水素イオン H^+ 濃度の検出

図 18 は、半導体センサ上で培養している体外受精させたマウス受精卵の写真である。

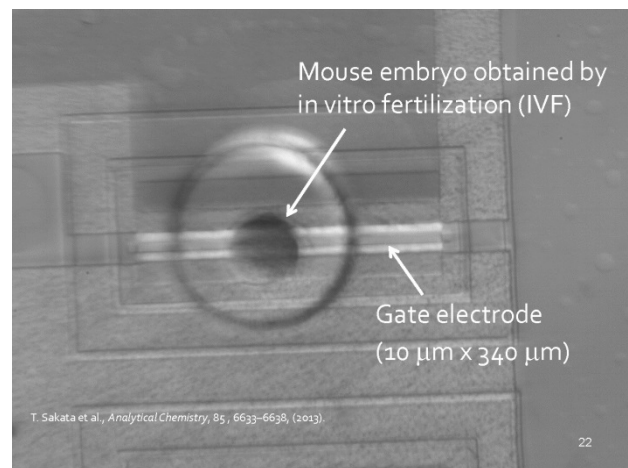
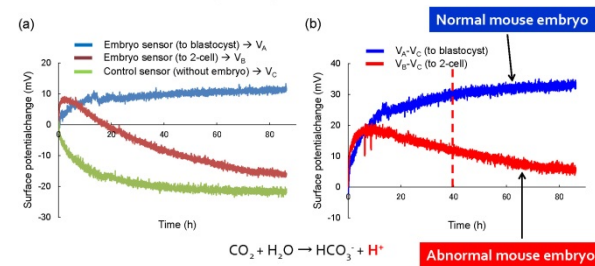


図 18 半導体センサ上のマウス受精卵

図 19 に、受精卵をセンサに乗せ、センサで検出される電気的変化を 80hr (正常培養で胚盤胞になる手前) までの計測した結果を示す。青線は正常培養されたもので、時間とともに増加し、酸性側 (H^+ 濃度の増加) に変化している。緑線は受精卵をセンサ上に乗せていないコントロールで、時間とともに減少し、培養液のアルカリ側への経時変化を示している。赤線は分割が 2 セルで止まり細胞が死んだもので、一旦増加するが、減少する。なお、正常培養されたものの H^+ 濃度の変化は、pH 0.2 程度であり、システムとして高い安定性が必要である。

Embryo-based transistor

O Measurement of mouse embryo activity

T. Sakata et al., *Analytical Chemistry*, 85, 6633–6638, (2013).

Noninvasive monitoring of mouse embryo obtained by in vitro fertilization (IVF) using semiconductor devices

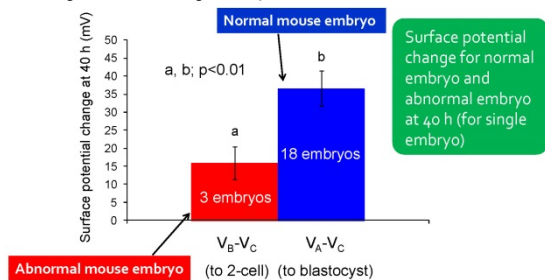
23

図 19 半導体センサによるマウス受精卵の計測例

図 20 は、半導体センサにより、21 個の受精卵の胚芽を評価した結果である。正常培養されたものと、途中で死んだものを有意に評価出来ることを示している。

Estimation of embryo with semiconductor

O Electrical signal for mouse single embryo condition

T. Sakata et al., *Analytical Chemistry*, 85, 6633–6638, (2013).

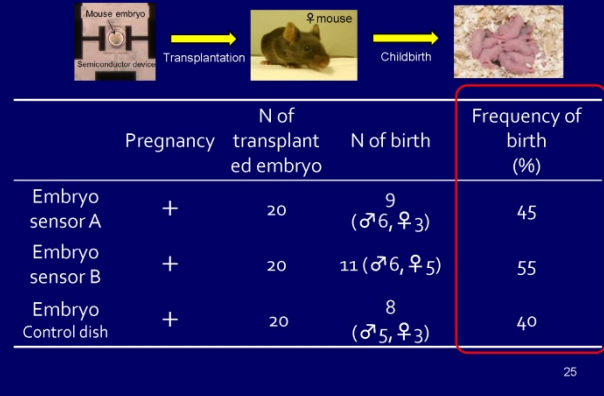
Estimation of quality grade of embryo obtained by in vitro fertilization

24

図 20 半導体センサによる胎芽の評価

図 21 に、半導体センサ上で培養された細胞の安全性について評価した結果を示す。半導体センサ上で培養した A と B と、通常の細胞培養皿で培養したコントロールを、母親のレシピエントマウスに移植した。マウスの場合、最終的に子供が産まれる割合はコントロールで 40～50%程度で、A 45%、B 55%であり、安全性に問題が無いことを示している。

Estimation of safety for embryo culture on semiconductor



25

図 21 半導体センサ上で培養された細胞の安全性評価

図 22 に、半導体センサの移植前診断への適用の可能性と診断デバイスへの要求事項のまとめを示す。不妊治療と同様、家畜改良でも受胎率向上のため、顕微鏡に代わる信頼性の高い受精卵の評価技術が求められている。再生医療では、自家軟骨細胞などの移植前の評価、iPS 細胞の分化挙動が可能性として考えられる。白血病患者に対する癌治療で、癌血液細胞を取り除き、元の血液の幹細胞を入れて血液細胞を作る時、移植が必ず必要になり、造血幹細胞のクオリティーの評価が非常に重要となる。半導体センサによる電気的計測は、非侵襲的にリアルタイムで定量評価が可能との特長（客観性）を有するが、医師・培養士からは従来の顕微鏡観察を同時にやりたい（主観性）との希望がある。この実現のためには、デバイス側からの観察を可能とする透明性の高いデバイスの開発が必要である。

半導体原理による移植前診断

□ 移植前診断

・体外受精卵、iPS細胞、体幹細胞などを生体内に移植する前に、*in vitro*で細胞のクオリティーを診断すること



- ・不妊治療：患者の肉体的・精神的・経済的負担軽減（乾MC）
- ・家畜改良：健康胚選別による受胎率向上（家畜改良センター）
- ・再生医療：自家軟骨細胞などの移植前の異常を発見（Harvard Univ.）
：iPS細胞の分化挙動（東大医科研）
- ・癌治療：造血幹細胞移植による白血病治療（東大医科研）

□ 診断デバイスへの要求事項

- ・主観性：医師・培養士による（倒立型）顕微鏡での形状観察が可能
- ・客観性：健康状態を非侵襲・定量的・リアルタイムに計測が可能

➡ 透明性の高いデバイスによる計測原理が必要

26

図 22 半導体原理による移植前診断

図 23 に、透明な機能性材料として、半導体 IGZO、電極 ITO、絶縁膜 SiO₂を用いた、透明半導体デバイス (IS-TGT) 設計の例を示す。

透明な機能性材料を用いたIS-TGTの設計

□ IS-TGT (Ion Sensitive Transparent Gate Transistor) の設計

1. IGZO : 透明・高移動度のn型酸化物半導体
2. ITO : 透明・導電性の酸化物
3. SiO₂ : 透明・絶縁性水素イオン応答膜

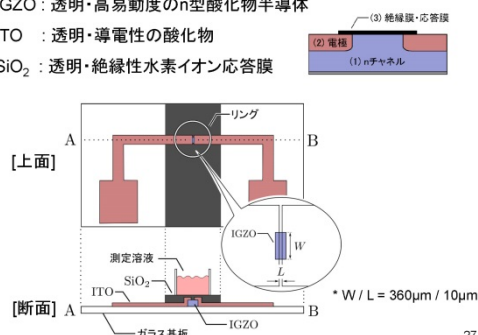


図 23 透明な機能性材料を用いた IS-TGT の設計

図 25 に、図 23 の設計で作製したデバイス (図 24) による評価結果を示す。pH が 6.41~7.43 まで段階的に変化するのに伴い、電気信号はヒステリシス無く階段状に変化しており、本デバイスが pH センサとして利用出来る事を示している。

電気特性(溶液下)の評価

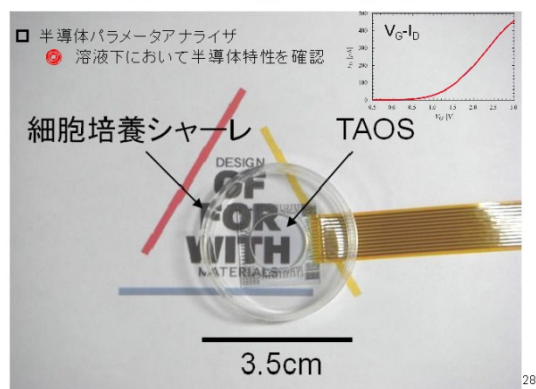


図 24 電気特性 (溶液下) の評価

H⁺ 応答性の評価

水素イオン応答

- リアルタイム測定器(リン酸緩衝液6点, 室温)
- 約56mV/pHの応答性(理論値58 mV/pH)
- 元のpHに戻すと電位もほぼ元の値に戻る

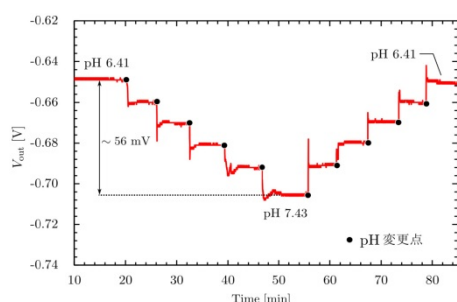
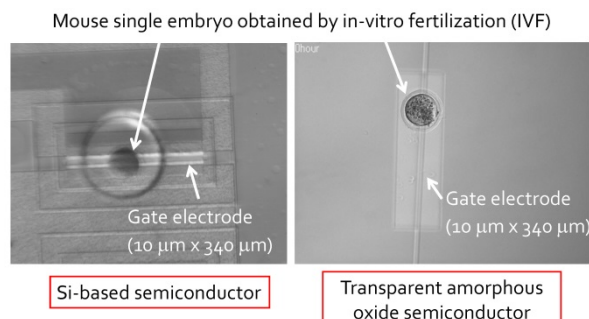


図 25 H⁺ 応答性の評価

図 26 に、透明半導体デバイスによる受精卵の評価例を示す。左側の従来型デバイスに比べ、右側の透明デバイスの映像がクリアなのが見える。

Cell division of single mouse embryo on semiconductor



T. Sakata et al., *Analytical Chemistry*, 85 (2013), 6633.

THE UNIVERSITY OF TOKYO

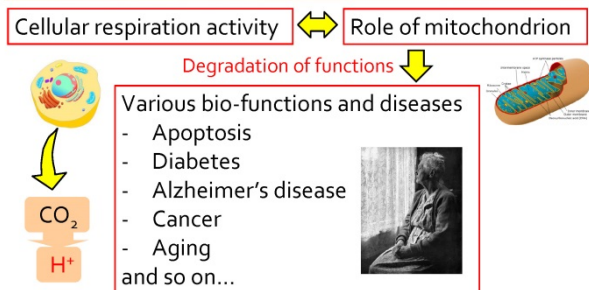
T. Sakata et al., *Analytical Chemistry* (in revision).

30

図 26 透明半導体デバイスによる受精卵の評価

本稿では、受精卵の評価結果を取り上げ、半導体デバイスによる細胞呼吸について紹介したが、細胞呼吸はミトコンドリアの機能に深い関わりがあり、このことから、種々の疾患との関わりについても評価出来る様になる可能性がある (図 27)。

半導体バイオセンサによる細胞呼吸の計測



The platform based on monitoring of cellular respiration with semiconductor principle is suitable for clinical diagnosis and drug screening system.

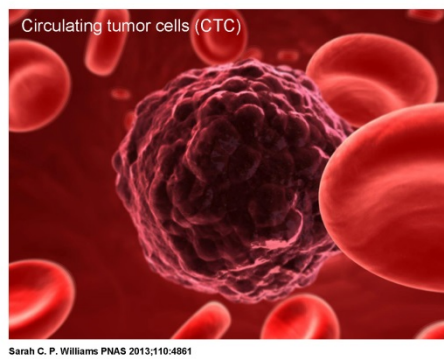
31

図 27 半導体バイオセンサによる細胞呼吸の計測

5. 半導体バイオセンサの集積化

採血による適切な治療法の選択と治療効果のモニタリングマーカーの1つとして、血中循環腫瘍細胞 (CTC、Circulating Tumor Cells) による診断技術が注目されている (図 28)。細胞 30 億から 10 個を探す必要があるが、半導体バイオセンサを集積 (アレイ) 化し、細胞一つ一つを計測する事で、実現出来る可能性がある。

A circulating tumor cell has sloughed off cancerous tissue and moves through the bloodstream to a new site.

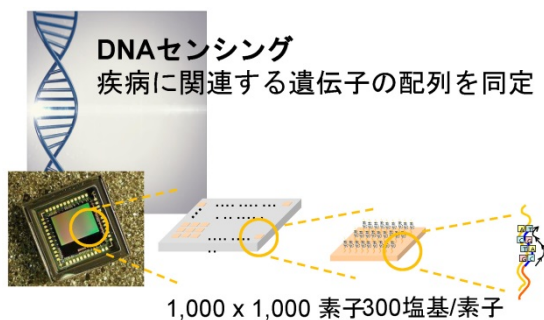


Sarah C. P. Williams PNAS 2013;110:4861

33

図 28 血中循環腫瘍細胞 (Circulating tumor cells, CTC)

DNA センシングには半導体バイオセンサが使われるが、その概念は1つの素子で300個配列を読み、1000×1000素子の情報をつなぎあわせて30億のゲノムを一気に解析するものである (図 29)。



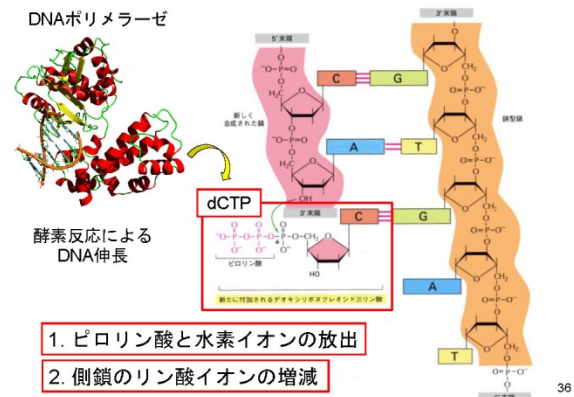
ヒトの30億のゲノムを一気に解析

35

図 29 DNA センシング

DNA 配列を読むやり方は、DNA が持っている塩基 (アデニン(A)、グアニン(G)、チミン(T)、シトシン(C)) に酵素反応させ、その際に発生する水素イオンと DNA に残るリン酸の電荷を計測するものである (図 30)。

DNA伸長反応



36

図 30 DNA 配列を読むやり方

米国 Ion Torrent 社は、本原理に基づく DNA シーケンスを開発している (図 31、32)。

ARTICLE

doi:10.1038/nature10242

An integrated semiconductor device enabling non-optical genome sequencing

Jonathan M. Rothberg¹, Wolfgang Hinz², Todd M. Rearick¹, Jonathan Schultz², William Miles¹, Mel Davey¹, John H. Leamon¹, Kim Johnson¹, Mark J. Milgrew¹, Matthew Edwards¹, Jeremy Hoon¹, Jan F. Simons¹, David Marrari¹, Jason W. Myers¹, John F. Davidson¹, Annika Branting¹, John R. Noble¹, Bernard P. Puc¹, David Light¹, Travis A. Clark¹, Martin Huber¹, Jeffrey T. Branciforte¹, Isaac B. Stoner¹, Simon E. Cawley¹, Michael Lyons¹, Yutao Fu¹, Nils Homer¹, Marina Sedova¹, Xin Miao¹, Brian Reed¹, Jeffrey Sakina¹, Erika Feilerstein¹, Michelle Schorri¹, Mohammad Alanjary¹, Eileen Dimadina¹, Devin Dreyman¹, Rachel Kashtan¹, Tanya Sokolsky¹, Jacqueline A. Fidanza¹, Eugeni Namsaraev¹, Kevin J. McKernan¹, Alan Williams¹, G. Thomas Roth¹ & James Bustillo¹

The seminal importance of DNA sequencing to the life sciences, biotechnology and medicine has driven the search for more scalable and lower-cost solutions. Here we describe a DNA sequencing technology in which scalable, low-cost semiconductor manufacturing techniques are used to make an integrated circuit able to directly perform non-optical DNA sequencing of genomes. Sequence data are obtained by directly sensing the ions produced by template-directed DNA polymerase synthesis using all-natural nucleotides on this massively parallel semiconductor-sensing device or ion chip. The ion chip contains ion-sensitive, field-effect transistor-based sensors in perfect register with 1.2 million wells, which provide confinement and allow parallel, simultaneous detection of independent sequencing reactions. Use of the most widely used technology for constructing integrated circuits, the complementary metal-oxide semiconductor (CMOS) process, allows for low-cost, large-scale production and scaling of the device to higher densities and larger array sizes. We show the performance of the system by sequencing three bacterial genomes, its robustness and scalability by producing ion chips with up to 10 times as many sensors and sequencing a human genome.

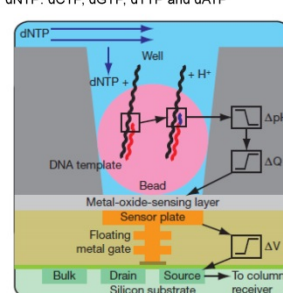
水素イオン濃度の計測でDNAシーケンシング！

37

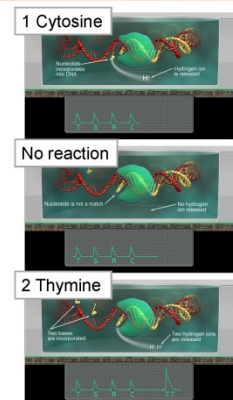
図 31 水素イオン濃度計測による DNA シーケンシング

DNA sequencing based on pH sensing

dNTP: dCTP, dGTP, dTTP and dATP



水素イオン濃度の計測で DNAシーケンシング！



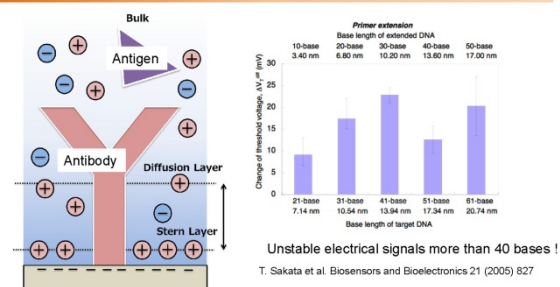
38

図 32 pH 計測による DNA シーケンシング

6. 半導体バイオセンサの課題

半導体バイオセンサの課題として、大きなバイオ分子を見ようとすると、溶液中のイオンの影響を受け、センサ近傍電荷の変化しか見られないということがある。実際に DNA に残るリン酸由来信号は、長くなればなるほど信号強度が減少し、ある長さまでしか計測出来ない。酵素反応の際に発生する水素イオンについては、ウェル型の構造を作ること、長さに依存しない計測が可能である (図 33)。

Problems of FET biosensor



Shielding of antigen-antibody charges by counter ions outside
Debye length at around device/solution interface

PCCP, (2016) in press.
Chem. Phys. Lett., 619 (2015) 152-157.
ChemElectroChem, 1 (2014) 1516-1524.
JAP, 52 (14) (2013).

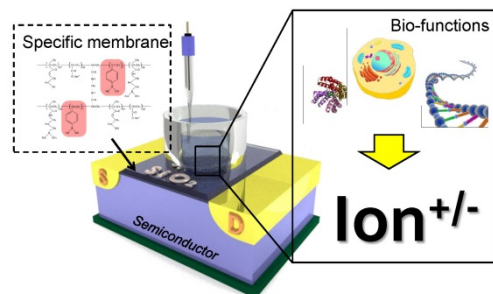
分子動力学シミュレーションによる検討

42

図 33 半導体バイオセンサの課題

半導体バイオセンサでは、対象となるバイオ由来のイオンが重要であり、検出デバイスであるトランジスタが信号を捉えるような、特異性を有する界面を作り出すことが重要である (図 34)。

Summary



Biologically-coupled Field Effect Transistor (BioFET)

Focusing on ionic behaviors caused by
biological phenomena !

43

図 34 まとめ

我々の研究室では、医療と半導体産業をうまくつなぎ合わせて、トランジスタ医療を実現できればと考えている (図 35、36)。

「医療」×「半導体産業」=「トランジスタ医療」



44

図 35 「医療」×「半導体産業」=「トランジスタ医療」

Biosensing Materials Lab.



Sakata lab.

MEMBERS

T. Sakata Associate Professor
A. Saito Technical Staff
I. Watanabe Secretary
Y. Maekawa Postdoc
H. Satake D₁
H. Yang D₁
N. Nishi M₂
S. Nishitani M₂
K. Ito M₁
A. Fujita B₄
S. Miyasaka B₄
B. Lowe JSPS Reasercher
K. Sekimizu Provigate.com
T. Kajisa Provigate.com
Y. Yanagimoto Provigate.com
Katayama Provigate.com
M. Honda Provigate.com



Acknowledgements

- ImPACT
- MEXT START
- JST Sentan-keisoku
- JST CREST
- JSPS (Wakate A)
- Center for NanoBio Integration,
(CNBI) Univ. of Tokyo



45

図 36 東京大学大学院 工学系研究科 マテリアル工学専攻 坂田研究室

坂田 利弥 (さかた としや)

東京大学大学院 工学系研究科 准教授