

(19) 日本国特許庁(JP)

(12) 特 許 公 報(B2)

(11) 特許番号

特許第5744857号  
(P5744857)

(45) 発行日 平成27年7月8日(2015.7.8)

(24) 登録日 平成27年5月15日(2015.5.15)

| (51) Int. Cl.           | F I    |       |         |
|-------------------------|--------|-------|---------|
| GO 1 N 27/414 (2006.01) | GO 1 N | 27/30 | 3 O 1 K |
| HO 1 L 21/338 (2006.01) | GO 1 N | 27/30 | 3 O 1 Y |
| HO 1 L 29/778 (2006.01) | GO 1 N | 27/30 | 3 O 1 X |
| HO 1 L 29/812 (2006.01) | HO 1 L | 29/80 | H       |

請求項の数 5 (全 29 頁)

|               |                               |           |  |
|---------------|-------------------------------|-----------|--|
| (21) 出願番号     | 特願2012-514477 (P2012-514477)  | (73) 特許権者 | 398061245  |
| (86) (22) 出願日 | 平成22年6月10日 (2010.6.10)        |           | ヘルムホルツ・ツェントラム・ミュンヘン・ドイチェス・フォルシュングスツェントラム・フューア・ゲズントハイト・ウン |
| (65) 公表番号     | 特表2012-529638 (P2012-529638A) |           | トルム・ウムベルト (ゲーエムベーハー)                                     |
| (43) 公表日      | 平成24年11月22日 (2012.11.22)      |           | Helmholtz Zentrum Muenchen Deutsches F                   |
| (86) 国際出願番号   | PCT/EP2010/058183             |           | orschungszentrum fu                                      |
| (87) 国際公開番号   | W02010/142773                 |           | er Gesundheit und U                                      |
| (87) 国際公開日    | 平成22年12月16日 (2010.12.16)      |           | mweil (GmbH)   |
| 審査請求日         | 平成25年5月1日 (2013.5.1)          |           | ドイツ連邦共和国、デー-85764 ノ                                      |
| (31) 優先権主張番号  | 09007719.9                    |           | イハーベルク、インゴルシュテッター・ラ                                      |
| (32) 優先日      | 平成21年6月10日 (2009.6.10)        |           | ントシュトラーセ 1   |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    | (74) 代理人  | 100121728  |
| (31) 優先権主張番号  | 10000550.3                    |           | 弁理士 井関 勝守  |
| (32) 優先日      | 平成22年1月20日 (2010.1.20)        |           | 最終頁に続く   |
| (33) 優先権主張国   | 欧州特許庁 (EP)                    |           |  |

(54) 【発明の名称】 半導体バイオセンサ

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項 1】

( a ) 第一の高電子移動度トランジスタ ( H E M T ) を含む、少なくとも1つの第一の分離領域と、( b ) 前記第一の H E M T に付着した非興奮性細胞と、( c ) 第二の高電子移動度トランジスタ ( H E M T ) を含む、少なくとも1つの第二の分離領域と、を備えており、前記第二の H E M T には細胞が存在していないことを特徴とする外部刺激に応答して生体細胞によって生成される、電気シグナルである細胞シグナルをモニターするデバイスの使用であって、

任意のリアルタイムで、pHの変化を測定すると同時に放射線量の測定および/または放射線量率の測定を行うために用いられる、使用。

【請求項 2】

請求項 1 に記載の使用であって、

外部刺激に応答して生体細胞によって生成される細胞シグナルをモニターすることを含んでいる、使用。

【請求項 3】

請求項 1 に記載の使用であって、

低量の放射線および/または高量の放射線の測定のために用いられる、使用。

【請求項 4】

請求項 1 に記載の使用であって、

マイクログレイ (  $\mu$  G y ) の領域で、放射線を測定する、使用。

10

20

## 【請求項5】

請求項1に記載の使用において、

前記第一及び前記第二のHEMTは、AlGaIn/GaN-ヘテロ構造である、使用。

## 【発明の詳細な説明】

## 【技術分野】

本発明は半導体デバイスに関し、特に、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルを任意のリアルタイム（実時間）でモニターするデバイスに関する。当該デバイスは、(a)高電子移動度トランジスタ（HEMT）を含む少なくとも一つの分離領域と、(b)上記HEMT（HEMT素子）に付着した非興奮性細胞とを含んでいる。好ましくは、上記デバイスと、好ましくはHEMTを含む上記少なくとも一つの分離領域とは、細胞の付着または成長に適した表面を有している。したがって、上記デバイスは、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルを任意のリアルタイムでモニターするための各種使用および方法に適用され得る。同様に、上記デバイスは、細胞に傷害（ダメージ）を引き起こす外部刺激を後退させ、外部刺激から細胞を保護しおよび/または隔離する化合物をスクリーニングするために適用され得る。また、上記デバイスを含むキットは本発明の一側面である。

10

## 【背景技術】

トランジスタは、電流または電圧のスイッチ、電流または電圧の調節および増幅する電気デバイスである。トランジスタは、ソース、ドレインおよびゲートと呼ばれる三つの接続を有する。ゲート-ドレインコンタクトに与えられる電圧は、ソースドレイン間の導電性を決定する。トランジスタには二つの大きなグループがあり、バイポーラトランジスタと電界効果トランジスタ（FETs）とがある。バイポーラトランジスタは、ゲートに与えられる電流に基づいてPN接合領域の空間電荷領域を変化させる。他方で、電界効果トランジスタのソースドレイン間の導電性は、ゲート電位によって誘導される電界に基づいている。

20

イオン感応型電界効果トランジスタ（ISFET）に関する最初のレポートは1972年（Bergveld P., 1972）であった。それ以来、pHセンサー（van der Scoot B.H. et al., 1983; Steinhoff G. et al., 2003a）または液体溶液におけるバイオケミカルプロセス用のディテクター（Matsuo T and Wise K.D., 1974; Baumann W.H. et al., 1999）として働くISFETの理解と改良は、盛んな研究主題となってきた。ISFETの測定原理は、通常のFETの測定原理と類似している。ソースドレイン間の導電性は、電界効果によって生成される空間電荷領域に依存している。しかし、ゲート用の電氣的コンタクトの代わりに、例えばAl<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、Si<sub>3</sub>N<sub>4</sub>またはTa<sub>2</sub>O<sub>5</sub>からなるイオン反応層が存在している。この原理の更なる発展が、pH感応型の高電子移動度トランジスタ（HEMT's）である。図9にその概要が示されている。イオン検出のためにpH反応層を用いる代わりに、異なる分極を有する物質によって生成された二次元電子ガス（2DEG）の電荷感度が利用される（Dimitrov Roman, 2000）。

30

40

放射線生物学の目的は、生物物質に与えるイオン化放射の影響を分析することである。主要な原因となるものは、放射能（ $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 粒子）、X線、および中性子に由来している。ドイツにおける平均的な放射線量は、自然放射線によるものが2.1 mSv/aであり、人工放射線によるものが1.8 mSv/aである（Bundensamt für Strahlenschutz, 2007）。異なる粒子は異なる方法で細胞組織に傷害を与えるので、細胞組織への効果的な放射線量を決定するために異なる放射線量の重み付け要素が用いられている。こうした傷害は、二つの分類に分けられ得る。それは放射線の確定的影響と放射線の確率的影響である。確定的影響は、高放射線量後に生じ、これらはすぐに可視化され得るものである。こうした影響は放射線量に応じてリニアに（線形に）上昇し、閾値が存在する。他方で、確率的影響は、特定の放射線量の後に所定の確

50

率でまさに生じる。放射線の確率的影響と確定的影響との相違は、微視的なレベルで記述されてもよい。つまり、所定量の細胞が放射線で死滅し、目に見える効果が観察されるとすぐに、人は放射線の確定的影響について議論する。細胞修復が可能な放射線量では確率的影響が問題になる。1 Gyの放射線量は、単細胞当たりのDNAにおいて、約40の二本鎖切断(DSB)(Whitaker S. J., 1992)と約1000の一本鎖切断(SSB)(Ward J. F., 1988)とを生成する。それゆえ、二本鎖切断は、修復メカニズムの複雑さのために最も有害な障害である。細胞がDNAストランドの修復を開始するか、または細胞がアポトーシスに入るかは、DSBの数に依存する。

確率的影響用の放射線量反応曲線はリニアであるが、このことは、これらの影響が直接目に見えないために低放射線量用に対して正しいかどうかはまだ分かっていない。放射線の確率的影響は、例えば癌、腫瘍、または白血病である。これらの病気は進行するのに長時間を要し、これらの病気の起源を正確に決定することはできず、かつ、特に低放射線量に由来する影響がどれくらいかを正確に決定することはできない。

それゆえ、外部刺激に対する細胞の応答を理解する際に必要な知識が要求されている。例えば、放射線生物学において、バスタンダー効果、適用反応、遺伝子発現における変化、ゲノムの不安定性、細胞異常を理解することが望ましい。この理解は、放射線量のそれぞれが全体的な放射線リスクに単純に加えられ得るという既存のコンセプトの再考を導くかもしれない。細胞レベルでの情報交換のための複雑な信号システムは、細胞ホメオスタシスを確保するために必要である。細胞通信経路により、細胞膜を横切って一次および二次メッセンジャーの移動が可能になる。ギャップ結合を介する細胞内通信に關与する一次バスタンダーメッセンジャー用の他の候補として、抗酸化物質、 $Ca^{2+}$ 、 $Ip3$ 、およびcAMPがあり、これらは、 $Ca^{2+}$ の代謝系に含まれる重要な二次メッセンジャーである。細胞通信システムの解読は、上述の影響を理解するための鍵である。

【発明の概要】

【先行技術文献】

【非特許文献】

【非特許文献1】

Molecular Biology of the Cell, 4<sup>th</sup> edition (2002)

Alberts Bruce, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, Roberts Keith, Walter Peter

【非特許文献2】

Microelectronicsensor system for microphysiological application on living cells. Sensors and Actuators B 55 (1999)

Baumann W. H., Lehmann M., Schwinde A., Ehret R., Brischwein M., Wolf B.

【非特許文献3】

Catalytic activity of enzymes immobilized of AlGaIn/GaN solution gate field-effect transistors. Applied Physics Letters 89, 183901 (2006)

Baur B., Howgate J., von Ribbeck H.-G., Gawlina Y., Bandalo V., Steinhoff G., Stutzmann M., Eickhoff M.

【非特許文献4】

Biological effects in unirradiated human tissue induced by radiation damage up to 1 mm away. PNAS, Vol. 102, No. 40 (2005)

Belyakov Oleg V., Mitchell Stephen A., Parikh Deep, Randers-Pehrson Gerhard, Marino Stephen A., Amundson Sally A., Geard Charles R., Brenner David J.

【非特許文献5】

Bystander-induced apoptosis and premature differentiation in primary urothelial explants after charged particle microbeam irradiation. Radiation Protection Dosimetry Vol. 99, Nos 1-4 (2002)

Belyakov O. V., Folkard M., Mothersill C., Prise K. M., Michael B. D.

【非特許文献6】

- Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on Volume BME-19, Issue 5 (Sept. 1972)
- Bergveld P.  
【非特許文献 7】
- Spontaneous polarization and piezoelectric constants of III-V nitrides. Phys. Rev. B 56, R10024 - R10027 (1997)
- Bernardini Fabio, Fiorentini Vincenzo  
【非特許文献 8】
- Nonlinear macroscopic polarization in III-V nitride alloys. Phys. Rev. B 64, 085207 (2001) 10
- Bernardini Fabio, Fiorentini Vincenzo  
【非特許文献 9】
- Inositol phosphates and cell signalling. Nature 341 (21 September 1989)
- Berridge Michael J., Irvine Robin F.  
【非特許文献 10】
- DNA end-joining: from yeast to man. Trends in Biochemical Sciences, Volume 23, Issue 10 (1998)
- Critchlow Susan E., Jackson Stephen P.  
【非特許文献 11】 20
- Herstellung und Charakterisierung von AlGaIn/GaN-Transistoren. Selected Topics of Semiconductor Physics and Technology, Vol. 28 (2000)
- Dimitrov Roman  
【非特許文献 12】
- Response of Thyroid Follicular Cells to Gamma Irradiation Compared to Proton Irradiation. I. Initial Characterization of DNA Damage, Micronucleus Formation, Apoptosis, Cell Survival, and Cell Cycle Phase Redistribution. BioOne Volume 155, Issue 1 (2001)
- Green L. M., Murray D. K., Tran D. T., Bant A. M., Kazarians G., Moyers M. F., Nelson G. A. 30
- 【非特許文献 13】
- The silicon-insulated-gate field-effect transistor. Proceedings of the IEEE Volume 51, Issue 9 (Sept. 1963)
- Hofstein S. R., Heiman F.P.  
【非特許文献 14】
- Alterations of intracellular pH homeostasis in apoptosis: origins and roles. Cell Death and Differentiation 11 (2004)
- Lagadic-Gossman D., Hue L., Lecureur V.  
【非特許文献 15】
- Radiation-induced genomic instability and bystander effects: related inflammatory-type responses to radiation-induced stress and injury? A review. Int. J. Radiat. Biol. Vol. 79, No. 1 (2003) 40
- Larimore S. A., Wright E. G.  
【非特許文献 16】
- Zweidimensionale Elektronen- und Lochergase in GaN/AlGaIn Heterostrukturen. Selected Topics of Semiconductor Physics and Technology, Vol. 66 (2004)
- Link Angela  
【非特許文献 17】
- An Integrated Field-Effect Electrode for Biopotential Recording. Biomedical Engineering, IEEE Transactions on Volume BME-21, Issue: 6 (1974) 50

Matsuo Tadayuki, WiseKensall D.

【非特許文献 1 8】

Bystander responses induced by low LET radiation. *Oncogene* 22 (2003)

Prise Kevin M., Folkard Melvyn, Michael Barry D.

【非特許文献 1 9】

Non-targeted effects of radiation: Bystander responses in cell and tissue models.

*Radiation Protection Dosimetry* Vol. 99, Nos 1-4 (2002)

Prise K. M., Belyakov O. V., Newman H. C, Patel S., Schettino G., Folkard M., Michael B. D.

【非特許文献 2 0】

Evidence for a lack of DNA double-strand break repair in human cells exposed to very low x-ray doses. *PNAS*, Vol. 100, No. 9 (2003)

Rothkamm Kai, Lorich Markus

【非特許文献 2 1】

Hepatocyte gap junctions are permeable to the second messenger, inositol 1,4,5-triphosphate, and to calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86(8), (1989)

Saez J. C, Connor J. A., Spray D. C, Bannet M. V.

【非特許文献 2 2】

$Al_xGa_{1-x}N$ - A new Material System for Biosensors. *Adv. Funct. Matter.*, 13, No. 11 (2003)

Steinhoff Georg, Purrucker Oliver, Tanaka Motomu, Stutzmann Martin, Eickhoff Martin

【非特許文献 2 3】

pH response of GaN surfaces and its application for pH-sensitive field-effect transistors. *Applied Physics Letters*, Volume 83, Number 1 (2003)

Steinhoff G., Hermann M., Schaff W. J., Eastman L. F., Stutzmann M., Eickhoff M.

【非特許文献 2 4】

Recording of cell action potentials with AlGa<sub>N</sub>/GaN field-effect transistors. *Applied Physics Letters* 86, 033901 (2005)

Steinhoff Georg, Baur Barbara, Wrobel Gueter, Ingebrandt Sven, Offenhausser Andreas, Dadgar Armin, Krost Alois, Stutzmann Martin, Eickhoff Martin

【非特許文献 2 5】

Acid pH in Tumors and its Potential for Therapeutic Exploitation. *Cancer Research* 49

(August 15, 1989)

Tannock Ian F., Rotin Daniela

【非特許文献 2 6】

AlN Material Constants Evaluation and SAW Properties on AlN/Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> and AlN/Si. *IEEE Ultrasonics Symposium* 90, 375 (1981)

Tsubouchi K., Sugai K., Mikoshiba N.

【非特許文献 2 7】

The ISFET in Analytical Chemistry. *Sensors and Actuators*, 4 (1983)

van der Schott B. H., Bergveld P., Bos M., Bousse L. J.

【非特許文献 2 8】

DNA damage produced by ionizing radiation in mammalian cells: identities, mechanisms of formation, and reparability. *Prog. Nucl. Acid Res. Mol. Biol.* 35 (1988)

Ward J. F.

【非特許文献 2 9】

DNA damage by drugs and radiation: what is important and how is it measured? *Eur. J.*

10

20

30

40

50

Cancer 28 (1992)

Whitaker S. J.

【非特許文献30】

Elastic properties of zinc-blende and wurtzite AlN, GaN, and InN. J. Appl. Phys. 82,

2833 (1997)

Wright A. F.

【非特許文献31】

First-principles prediction of structure, energetics, formation enthalpy, elastic constants, polarization, and piezoelectric constants of AlN, GaN, and InN: Comparison of local and gradient-corrected density-functional theory. Phys. Rev. B 64, 045208(2001)

10

Zoroddu Agostino, Bernardini Fabio, Ruggerone Paolo

【発明が解決しようとする課題】

これらの影響を理解するのに役立つシステムを提供することが従来技術の要求として存在している。本発明はそのようなシステムを提供するものである。

【課題を解決するための手段】

これから以下に記述されるデバイスは、その分離領域が好ましくは AlGa<sub>1-x</sub>N / GaN - ヘテロ構造であって、例えば長期間にわたる放射線治療実験中の細胞電位を測定することができるものである。GaNチップ測定技術を例えば放射線治療実験に組み合わせることにより、放射線生物学における新しい知見、例えばシグナル経路、Ca<sup>2+</sup>のバースト測定、またはバースト効果の分析を得ることができるであろう。放射線実験中における細胞分析は、人間がX線に晒される危険のせいで、非常に難しい。これらは細胞通信経路のほんの少しの例であるが、こうした全てのシグナルシステムはメッセンジャーの細胞膜を横切る移動をもたらすかもしれない。この帯電粒子束の移動は、本発明の優れた測定システムを用いて測定可能となり、この測定システムはヘテロ構造、好ましくは GaN トランジスタに基づくものである。本発明に係るデバイスは、リアルタイム（実時間）に、例えば放射線に晒されない遠隔からの放射線治療中における細胞分析を達成することを可能にする。

20

今回の研究によると、本発明に係るデバイス（特に分離領域によって構成される HEMT 構造）は生体適合性であると共に生体細胞を扱うことが可能であることが分かっている。細胞の挙動は、ここで記述されたデバイス、特にチップ表面自体によって影響されないことが分かった。また、本発明に係るデバイスは、例えばここで記述した放射線のような外部刺激の前に、中に、および/または後に、生体細胞によって生成される非常に小さいシグナルを検知するのに十分な感度を有していることが分かった。

30

したがって、第1の側面では、本発明は、任意のリアルタイムで、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される、例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターするためのデバイスに関しており、

(a) 高電子移動度トランジスタ (HEMT) を構成する少なくとも1つの分離領域と、  
(b) 上記 HEMT (HEMT 素子) に付着した非興奮性細胞とを含んでいる。

40

特に好ましいことは、上記 HEMT ヘテロ構造は III 族窒化物から構成されている。「III 族窒化物」は当業者にとって良く知られており、窒化ガリウム (GaN)、窒化アルミニウム (AlN)、窒化インジウム (InN)、および、例えば Al<sub>x</sub>Ga<sub>1-x</sub>N、In<sub>x</sub>Ga<sub>1-x</sub>N、Al<sub>x</sub>In<sub>y</sub>Ga<sub>1-x-y</sub>N である III 族窒化物の混合物が特に好ましい。AlGa<sub>1-x</sub>N / GaN ヘテロ構造が特に好ましい。

「ここで定義されたデバイス」などとして記述されることもある「本発明のデバイス」は、高電子移動度トランジスタ (HEMT) を構成する少なくとも1つの分離領域を含むと共に、上記 HEMT に付着された非興奮性細胞を含むデバイスとして実現され得ることは理解されるであろう。本発明に係るデバイスは、細胞が存在していない、高電子移動度トランジスタを構成する少なくとも1つの更なる分離領域を任意に含んでもよい。上記

50

更なる分離領域は、例えば（任意には同時に）上記分離領域で測定された「ブランク値」が減算されて測定された細胞シグナルを分離／調節するために用いられてもよい。本デバイスの設計と獲得されたデータの対応する分析は、ここで詳細に説明される。当業者はもちろん、（例えば所定のHEMTを特徴付ける参照ブランク値を減算することによって）上記細胞シグナルを分離／調節するために用いられてもよい代替の手段に気づくであろう。ある実施形態では、本発明は、細胞が存在しない、高電子移動度トランジスタ（HEMT）を構成する少なくとも1つの分離領域を含むデバイスを用いる。

本発明は更に、上記HEMTに付着される細胞を有さない高電子移動度トランジスタ（HEMT）を構成する少なくとも1つの分離領域を含むデバイスについての実施形態を含んでいる。これらの「細胞フリー」のデバイスは、特に、放射線量率を測定／決定／検知／定量化するのに適している。これについては、ここでの他の箇所ですらに詳細に説明されるであろう。ここで開示された方法および使用は、本発明のデバイス、すなわち、HEMTに付着する細胞を有するデバイス（上記を参照）、またはそうした細胞が存在しないデバイスを用いて実行され得ることが考えられている。

ここで用いられる「細胞シグナル」は、外部刺激にตอบสนองする各細胞／試験細胞の測定可能なシグナルを意味している。「測定可能なシグナル」はしたがって、本発明のデバイスで構成されるHEMT素子によってモニター／定量化／検知／測定され得るシグナルを意味している。本発明に係るデバイスで構成されるHEMT素子は、電気信号となる上記細胞／試験細胞の近隣における電荷キャリアの密度変化（増加または減少）および移動に基づいた全ての種類の細胞シグナルを「伝達する」ものと理解されるであろう。すなわち、本発明に係るデバイス、特に本発明に係るデバイスを構成するHEMT素子は、拘束または非拘束電荷キャリア、電子およびイオン（例えば $H^+$ ）の密度における変化をモニター／定量化／検知／測定することができる。電荷キャリアは、電荷を運ぶ自由粒子を意味している。したがって、モニターされる細胞シグナルは、イオン濃度の変化、電子濃度の変化、pHおよび／または細胞の電気シグナルの変化、例えば電子、ホール、イオンなどの動き、を含んでいることになる。なかでも、上記pHの変化とイオン濃度の変化とが好ましく、pHの変化が特に好ましい。

好ましい側では、上記デバイス、そして好ましくはHEMTを構成する少なくとも1つの分離領域は、細胞の付着または成長に適した表面を有している。「細胞の付着または成長に適した表面」とは、その表面がそのように用いられることを意味しているか、または代替的に、その表面が生物分子、または細胞の付着および／または成長を促進するコーティングで被覆されていることを意味している。そのようなコーティングの例は、良く知られたもの（例えばELISAなどの免疫測定法などから得られるもの、またはBiACOREシステムから得られるもの）であって、例えばポリリジン、フィブロネクチン、アガロオーゼなどを含んでいる。

特に、本発明は、ここで記述されたデバイス、好ましくはAlGaN/GaNヘテロ構造（後述ではまた、GaNチップ、チップ、またはGaNトランジスタとして示される）が、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成された例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターすること、例えば、細胞外の帯電したメッセンジャーによって引き起こされる細胞電位応答を測定すること、が可能であることを実証する。このモニタリングは、外部刺激、好ましくは長期間にわたる好ましくは放射線治療の前に、中で、後に、可能である。

本発明は、pH反応性ゲート層を容易に提供できると共にIII族窒化物の高い化学的安定性から利益を得ることができる、AlGaN/GaNヘテロ構造のような電荷キャリア反応型の電界効果トランジスタを実現するための代替物質システムのアプリケーションを示すものである。二つの物質の接点では、固定空間電荷が二つの物質の分極における相違のために現れ、そして、二次元電子ガス（2DEG）が生成される。電気的特性、それゆえ上記システムの導電性は、チップ表面の電位に依存している。これに加えて、本発明は、トランジスタの物質それ自身は生体細胞に何らの影響も与えない。このため、例えば、X線によって引き起こされるDNAの二本鎖ストランドの破裂についての細胞修復のダイ

10

20

30

40

50

ナミクスは、Ga<sub>2</sub>N表面上に成長する細胞に対して観察されるものである。

トランジスタに関する記録されるデータの広い特徴付けと独立して開発した実験的環境とを続けて解釈するために、ここで説明される内容が実行された。トランジスタは、放射線治療実験中の安定的で繰り返し可能な挙動を示し、例えばX線照射によって傷害を受けていない。さらに、上記システムは、特に放射線生物物理学およびシステム放射線生物学の分野において低放射線量での放射線実験中における細胞応答を測定できることがここで示される。Ga<sub>2</sub>Nトランジスタの感度は0.32 μA / pHに決定される。トランジスタのゲート上に成長する細胞の単分子層は、7.1 mGy / sの放射線量を用いた放射線照射中、トランジスタコンタクトにおける30秒以内で0.13 μAの電流変化を引き起こす。

10

ここで記述される結果からは、本発明に係るデバイスが、細胞応答とそれらの時間的順序とに対する特別な調査を実現可能にする。例えば、放射線が照射された近隣の細胞からの外部刺激に対する応答を記録することにより、あり得るバイスタンダー効果のための定性的および定量的実験を実施できる可能性が上昇する。

本発明のデバイスとその特別な使用は、ここで非常に詳細に、特に付属の実施例において、例示される。これらのデバイス/使用は一般に、本発明の文脈、すなわち、本発明の実施例において適用され得るものである。

好ましくは、本発明の各デバイスは平面的であって、平坦、またはほぼ平坦である。本発明の各デバイスは透過的であって、かつ、このため例えば微視的な分析に晒され得ることがまた好ましい。

20

本発明の文脈において使用される場合における用語「モニタリング」は、例えば電気シグナルである細胞シグナルを検知、定量化、および/または測定することを含む一方で、それらに限定されるものではない。

例えば電気シグナルである細胞シグナルは、リアルタイム、すなわち、放射線照射のような外部刺激の中で、および/または、そのような外部刺激の後、および/または、そのような外部刺激の前に、モニターされてもよい。したがって、本発明の方法/使用および本発明のデバイスは、生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルのリアルタイムでのモニタリングに用いられてもよい、ということである。

「外部刺激」とは、例えば放射線照射、粒子照射、電界、磁場、熱、光、ナノ粒子、薬(薬物)、および/または、試験化合物を用いた刺激、である物理的刺激または生物物理的刺激を含んでいる。本発明の文脈では、1つよりも多くの刺激が同時に使用されること、すなわち、少なくとも二つの異なる種類の刺激が同時に使用されること、例えば、放射線と熱、または放射線と試験化合物、または試験化合物と熱などが使用されること、が考えられる。また、刺激の影響を抑制、後退、または促進させることができる、もしくはできると考えられている、少なくとも1つの物質の中の細胞を刺激することも考えられており、それにより、例えば試験化合物、薬、試験細胞上の核酸など、すなわち、ここで定義された非興奮性細胞の刺激の影響を後退、抑制または促進させるためのそのような物質の能力を試験/スクリーニングする。

30

「試験化合物」とは、その活動、直接的または間接的な影響、または細胞に対する影響が何らかの分析で調査される、すべての化合物のことである。試験化合物は、これらに限定されるものではないが、薬物、薬、抗体、siRNA, miRNA、アプタマー、トリネクチン、アンチセンスRNA、核酸、小分子、大分子、分子錯体、有機分子、無機分子、生物分子、または、これらに限定されるものではないが、脂質、ステロイド、炭化水素、脂肪酸、アミノ酸、ペプチド、たんぱく質、核酸、若しくはこれらの如何なる組み合わせのような生物分子を含むいかなる化合物であってもよい。試験化合物は、合成化合物、自然派生化合物、自然発生化合物の派生物などであり得る。試験化合物の構造は、知られ得るもの、または知られていないものであり得る。本発明の1つのアプリケーションでは、化合物は、細胞粘着または細胞拡散をもたらすことができる、できるであろうと考えられている。さらに別の応用では、化合物は細胞と相互に作用すること(例えば、細胞表面のレセプターに結合したり、所定の細胞内部のシグナルの形質導入経路を抑制したり、

40

50

または、細胞を活性化したりすること)ができる、できるであろうと考えられている。また別の応用では、化合物は、イオンチャネル活動(例えばイオンチャネルをブロックすること)に作用することができる、できるであろうと考えられている。好ましくは、試験化合物の活動メカニズムは、例えば、細胞の生存、細胞粘着、アポトーシス、細胞分化、細胞増殖、細胞形態、細胞周期、I g E依存性の細胞活性若しくは刺激、受容体リガンド結合、細胞数、細胞質、細胞拡散に対する効果、または、イオンチャネル活動(例えばイオンチャネルブロッカー)などに対する効果であってもよい。

生体細胞は異なる方法で応答することができる。その応答は、例えば、変化した環境的影響に起因する細胞電位における変化、細胞修復メカニズムの開始、細胞周期の変化、加えてアポトーシスの誘導であり得る。これら全ての応答は、本発明の手段および方法によ

10

ってモニターされ得る。好ましくは、低放射線量のイオン化放射線を好ましくは用いて、放射線照射の前に、中で、あとで、細胞応答をモニターすることに、今回の焦点が好ましくは存在する。「低放射線量」とは、試験される細胞を死滅させない放射線量を含んでいる。用語「低放射線量」は具体的には、10センチグレイ(c Gy)以下の放射線量での放射線被爆を含んでいる。例えば、DOE Low Dose Radiation Research Program 基金は、10センチグレイ(c Gy)以下での放射線照射によって誘導される応答を決定する基礎研究を行うものであるが、つまり、その用語は当業者においてよく知られている。

上記の試験化合物は、細胞に傷害を引き起こす外部刺激を後退、外部刺激から細胞を保護および/または隔離する化合物をスクリーニングするための、ここで定義されたデバイスの使用に適用されてもよい。これも本発明の一側面である。

20

「放射線」とは、一つの実態によって放出されたエネルギーが媒体や空間を通じて、究極的には他の実態によって吸収されるすべてのプロセスを記述するものである。それはまた、粒子放射線、イオン化放射線(例えば、核兵器、核反応炉、および放射性物質中で生じる)を含むが、それはまた、イオン放射線にもなり得る電磁放射線(すなわち、電波、赤外線、可視光、紫外光、およびX線)と称されたり、音響放射線とも称され得る。本発明の文脈では、放射線が好ましく、イオン化放射線がよりさらに好ましい。

粒子放射線は、動きの速い亜原子粒子を用いたエネルギーの放射線である。粒子放射線は、粒子が光線のようにすべて同じ方向に移動する場合には粒子線と称される。

30

本発明のデバイス/使用/方法に関する特に好ましい実施形態では、外部刺激は放射線であって、モニターされる細胞シグナルはpHの変化であるということが考えられる。

今回のすべての放射線治療実験はX線を用いて行われ、このX線は好ましくは250 keVまでのエネルギーを持つ電磁波である。X線は、Bremsstrahlungと称される電荷キャリアの高加速と、特性X線スペクトルと称される原子または分子中の電子軌道移動とによって生成される。双方の影響がX線チューブ中で生じる。電界中の加速された電子はアノードに衝突することによって急にストップする。特性X線スペクトルは、アノード物質に基づくが、Bremsstrahlungのスペクトルに重なり合う。その効果は、光電子効果、Compton効果、および電子対生成と称される。これらすべての効果は第2の電子を生成し、このため、異なる放射線の性質を持つ放射線を生成する。ここで正確な線量測定は非常に難しい。しかしながら、今回、特に本発明の各デバイ

40

はこの困難性を克服することができる。なぜなら、これらのデバイスは、外部刺激、好ましくは生体細胞への放射線に対する応答がここで述べたようにモニターされ得るという点において、正確な線量測定にとって利用でき得るからである。好ましくは、すべての放射線照射サンプルは、第2の電子を生成するために、上述の影響に対する物質を提供する細胞媒体で被覆されている。

ここで用いられる場合の非興奮性細胞は、活動電位のような電気シグナルを繁殖および拡散させない、つまり、自発的に電気シグナル、好ましくは活動電位を生成しない、細胞のことを意味する。

「非興奮性細胞」は、例えば次のような一次細胞を含んでいる。つまり、がん細胞、線

50

維芽細胞、角化細胞、軟骨細胞、肉腫、癌腫、内皮細胞性細胞、吸熱細胞、肝臓星形細胞、中皮腫細胞、メラノーマ細胞、小柱状網細胞、卵丘細胞、脂肪細胞、ケラチン生成細胞、上皮細胞、大食細胞、リンパ球のような免疫システム細胞、L-929、NIH3T3CHO、COS、HEKなどのような、人間、馬、白鳥、ヤギ、子牛、マウス、またはラット由来の細胞ライン、好ましくは哺乳動物の細胞ラインである。更なる実施形態では、上述の細胞は生体組織中に含まれている。

「一次細胞」はこの点、被験者、好ましくは哺乳動物、より好ましくは、人間、マウスまたはラット、特に好ましくは人間から得られた細胞のことを称する。特に好ましい細胞/試験細胞は線維芽細胞、L292および/またはケラチン生成細胞である。

「興奮性細胞」は、少なくとも、平滑筋細胞、ペースメーカー細胞、プルキンエ細胞および神経細胞を含んでいる。これらの細胞は、具体的には、本発明のデバイス/使用/方法についての文脈で用いられる唯一の種類/型の細胞であるという条件で、本発明から除外される。

本発明の文脈において、粘着細胞、つまり、本発明のデバイスに粘着することができる細胞を用いることが好ましいことが理解されるであろう。当業者は、ここで記述した細胞をどのようにして取得/分離/培養/増殖させるかをよく知っている。

この点、本発明のデバイスの表面は、当該表面への細胞の粘着を許可/改善するために処理されてもよいことが考えられる。そのような処理は当業者にとってよく知られており、例えばフィブロネクチン、ポリリジン、または細胞接着のような生物分子コーティングを用いてデバイスのコーティングを行うことを含んでいる。「生体分子コーティング (biomolecular coating)」または「生体分子コーティング (biological molecule coating)」は一つまたは複数の自然に生じる生体分子または生化学物質に由来または起因する生体分子または生化学物質である分子を含む表面上のコーティングのことである。例えば、生体分子コーティングは、細胞外マトリックス成分 (例えば、フィブロネクチン、コラーゲン)、その派生物を含み、または、自然発生するリジンやオルニチンのような生化学物質に基づいた高分子分子である例えばポリリジンやポリオルニチンのような生化学物質を含む。アミノ酸のような自然に発生する生化学物質に基づく高分子分子は、自然発生の生化学物質の異性体または鏡像異性体を利用することができる。

「細胞外マトリックス成分」は、哺乳動物のような動物の細胞外マトリックスにおいて生じる分子である。それは、いかなる種およびいかなる組織タイプからの細胞外マトリックスの成分になり得る。細胞外マトリックスの制限されない例としては、ラミニン、コラーゲンフィブロネクチン、その他の糖たんぱく質、ペプチド、グリコサミノグリカン、プロテオグリカンなどを含んでいる。細胞外マトリックスの成分はまた、成長因子を含むことができる。

生体分子コーティングは、各細胞の細胞表面の受容体に対する自然リガンド、アゴニストまたはアンタゴニストを含んでもよい (例えば、本発明の細胞に結合してその表面に付着する本発明のデバイスに被覆される抗体を含んでもよい)。

本発明により、被験者の個別化された細胞 (例えばがん患者から得られたがん細胞または被験者から得られた線維芽細胞) の応答をモニターすることが今や可能であり、これは、そのような被験者からそのような細胞を取得し、ここで定義されたHEMTに上記細胞を付着させ、そして、その細胞応答 (例えば、抗体などの抗腫瘍薬のような外部刺激に対する応答) をモニターすることによって可能としている。

したがって、本発明はまた、任意のリアルタイムにて、細胞応答をモニターするデバイスに関し、(a) 高電子移動度トランジスタ (HEMT) と (b) 上記HEMTに付着した非興奮性細胞とを含んでおり、上記非興奮性細胞は被験者から得られたものである。

HEMTは、High Electron Mobility Transistorのことを表しており、ヘテロ構造のFET (HFET) または調整添加されたFET (MODFET) としても知られている。HEMTは、ドーピング領域の代わりにチャネルとして、異なるバンドギャップを有する二つの物質間の接合を組み込んだ電界効果トランジ

10

20

30

40

50

スタである。上述した物質は、物質の組み合わせにおいて通常用いられるIII族窒化物を含むことが考えられている。共通に使用された物質の組み合わせとしては、デバイスのアプリケーションに依存して幅広いバリエーションが存在するが、AlGaAsとGaAsとの組み合わせである。もっとインジウムを組み込んだデバイスは一般的に、より高周波の性能を示す一方で、近年、ガリウムナイトライドHEMTは、その高出力性能のために、研究努力における大きな向上がみられてきた。本発明の文脈では、GaN/AlGaN/ヘテロ構造からなるHEMTが好ましい。

ここで記述されるHEMTはISFETとして実現可能であることも考えられる。「ISFET」とは、溶液中のイオン濃度を測定するために用いられるイオン感応型電界効果トランジスタである。pHのようなイオン濃度が変化するとき、トランジスタを通じた電流は次第に変化する。

10

デバイス中で多数のヘテロ接合が一緒に組み合わせられたことは、二つの用語が相互に交換できるように共通して用いられてはいるが、「ヘテロ構造」と呼ばれている。ヘテロ接合は、非類似の結晶構造の半導体からなる二つの層または領域間に発生するインターフェイスである。これらの半導体物質は、ホモ接合とは反対の不均一のバンドギャップを有している。

一般的に、導通させるために、半導体は、層中で電子の移動を生み出すために不純物を用いてドーパされる必要がある。しかしながら、これにより、電子の速度が遅くなるが、これは、最初の場所において電子を生成するために用いられた不純物と結果的に衝突するからである。しかしながら、HEMTは、こうしたおそらく本来的に未解決な矛盾を解決するための賢いデバイスである。

20

HEMTは、高ドーパされた広いバンドギャップを有するn型ドナー供給層とドーパント不純物を持たないノンドープの狭いバンドギャップを有するチャンネル層とのヘテロ接合を用いて生成された高移動電子を利用することにより、このことを実現している。例えば、n型AlGaAs薄膜層で生成された電子は、完全にGaAs中に落ち込んで、劣化したAlGaAs層を形成する。なぜなら、異なるバンドギャップ物質によって生成されるヘテロ接合は、GaAs側の導通バンド中に量子井戸(深い谷間)を形成するからであり、そこでは、GaAs層がアンドープであるために電子がいかなる不純物と衝突することなく素早く移動でき、GaAs側からは電子が逃げることができない。この効果により、高濃度を持つ非常に薄膜の高移動導通電子を生成することができ、これにより、チャンネルには非常に低い抵抗を与える(言い換えると、「高い電子移動」を実現させる)。この層は、二次元電子ガスと呼ばれている。その他のすべてのタイプのFETと同じように、ゲートに与えられる電圧はこの層の導電性を変化させる。通常は、ヘテロ接合に用いられる二つの異なる物質は(原子間に間隔をあける)同じ格子定数を持たなければならない。例として、わずかに異なる間隔を持つ二つのプラスチックの櫛を一緒に押し合わせることを想像するとよい。通常の間隔で、二つの歯状の塊が一緒になっていることが分かるであろう。半導体では、これらの不連続はある種の「トラップ」であって、デバイス性能を大いに低減させる。

30

ここで用いられるように、「細胞の付着または成長に適した表面を有する上記デバイス」は、デバイス、好ましくはHEMT素子が、関係のある細胞がその表面に生存可能に付着でき、かつ、細胞培養が成長する一方で新しい細胞がその表面に付着し続けることができるような化学的特性または生物学的特性を有することを意味する。しかしながら、デバイス、好ましくはHEMT素子が、セルの生存可能性または成長にとって必要である物質を含むことは必ずしも必要ではない。これらの必要な物質、例えば栄養または成長要素が、媒体中に供給されることも可能である。例えば、生存可能な細胞、機能などが損なわれていない細胞、上皮細胞、または内皮細胞などの本発明の文脈において適用される細胞懸濁液は、少なくとも50%の細胞が12時間以内にその表面に付着する場合に、「細胞付着に適した表面」に加わるものである。より好ましくは、細胞付着に適した表面は、少なくとも70%の細胞がプレーティング(つまり、上記デバイスを構成するチャンバーまたはウェルに細胞を加える)の12時間以内にその表面に付着するように、表面特性を有し

40

50

ている。さらにより好ましくは、細胞付着に適した表面特性は、少なくとも90%の細胞がプレATINGの12時間以内にその表面に付着していることである。最も好ましくは、細胞付着に適した表面特性は、少なくとも90%の細胞がプレATINGの8時間、6時間、4時間、2時間以内にその表面に付着していることである。

上記細胞は、本発明のデバイス、特にH E M T素子に対して融合性を持っていることが好ましい。上記細胞は、単層として成長することがまた好ましいが、上記細胞の多層成長もまた考えられる。好ましくは、まさに一つの細胞の「タイプ」(例えば、線維芽細胞)が、本発明に係るデバイスのH E M T素子上に成長される。しかしながら、一つよりも多い細胞タイプが本発明に係るデバイスのH E M T素子上に成長されることも考えられる。つまり、一つのデバイス、特に本発明のH E M T素子は、2個、3個、4個、5個、6個などの異なる細胞タイプ(例えば、一次細胞と対応する不死化がん細胞)を含んでもよい。これらの異なる細胞タイプは、本発明のデバイス上に位置する、一つの同じH E M T素子および/または分離されたH E M T素子の上に位置してもよい。

本発明に係るデバイスは、H E M T素子を構成する一つよりも多い分離領域を含んでもよく、すなわち、各々が分離領域によって構成された、2個、3個、4個、5個、10個、15個、20個、30個、40個、50個、60個、70個、80個、90個またはそれよりも多くの分離されたH E M T素子を含むデバイスが考えられる。H E M T素子を構成するこれらの分離領域の幾つかは、システムを検査するのに役立つであろう参照物質(例えば単に生体分子コーティング、および/または「試験細胞」、つまり、外部刺激にตอบสนองする例えば電気シグナルである細胞シグナルがモニターされる試験細胞に関する限り異なる起源を持つ細胞、および/または非生体試験細胞など)を含むことが考えられる。本発明のデバイスは、双方がここで定義された同じタイプの非興奮性細胞を含む少なくとも二つの分離されたH E M T素子を含むことが考えられ、そこでは、少なくとも二つのH E M T素子は異なる外部刺激によって刺激される。「異なる外部刺激」は、特別のH E M T素子が、異なる強度、異なる被爆量で適用される同じ種類の刺激(例えば放射線)によって刺激され、および/または異なる種類の刺激(例えば放射線と熱)によって刺激されるということを含んでいる。

代替的にまたは付加的に、本発明のデバイス上における少なくとも二つの分離されたH E M T素子の少なくとも一つは細胞がなく、且つ、生体分子コーティングがないことが考えられる。そのようなデバイスが好ましい。

ここで述べた分離領域は約1、2、3、4、5、6、7、8、9、10またはそれよりも大きい数値の平方ミリメートルのサイズであり、約5平方ミリメートル以下であることが好ましく、約1平方ミリメートルであることが特に好ましい。

今回の実験に用いられたG a Nチップは、ナノメートルスケールで、複数の異なる層からなる半導体材料から構成されている。これらの構造の組成プロファイルは重要であり、それは、そのプロファイルがチップデバイスの局所的なバンド構造を決定するからである。最密六方結晶のIII族窒化物のもっとも重要な特性の一つは、他の物質と比較して非常に自発的で且つ圧電性の分極特性である(D i m i t r o v 2000)。ヘテロ構造における異なる物質の特定および分極により、いかなる追加のドーピングを行うことなく、電荷キャリアをインターフェイス領域に蓄積させることを強いる。これにより、静電位がもたらされる。

さらに、H E M Tを構成する分離領域の少なくとも一つの使用は、任意のリアルタイムで、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターするためのデバイスを製造する使用であって、これは本発明の一側面である。

さらに、H E M Tを構成する分離領域の少なくとも一つの使用は、任意にはリアルタイムで、放射線および/または拘束または非拘束の電荷キャリアの密度における変化をモニター/定量化/検知/測定するためのデバイスを製造する使用であって、これは本発明の一側面である。

さらに、ここで定義されたデバイスの使用は、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生

10

20

30

40

50

成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターするための使用であって、これは本発明の一側面である。

さらに、ここで定義されたデバイスの使用は、細胞に傷害を引き起こす外部刺激を後退させ、この外部刺激から細胞を保護および/または隔離する化合物をスクリーニングする使用であって、これは本発明の一側面である。

「外部刺激」は、物理的、生体物理的、化学的、生物的な刺激、例えば、放射線、粒子放射線、熱、光、ナノ粒子、薬（薬物）および/または試験化合物を用いた刺激であり得る。

また、ここで定義されたデバイスを含むキットは、本発明の目的の一つである。

さらなる側面では、本発明は、ここで定義されたHEMTを構成する少なくとも一つの分離領域と以下の項目の少なくとも一つを含むキットに関する。すなわち、その項目は、

- (a) 上記HEMTに非興奮性細胞を付着させる手段および/または命令
- (b) 非興奮性細胞を成長させる手段および/または命令
- (c) 非興奮性細胞
- (d) 非興奮性一次細胞を分離する手段および/または命令、および
- (e) 外部刺激にตอบสนองして生体非興奮性細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターするための手段および/または命令

別の側面では、本発明は、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターするための方法に関し、

- (a) 上記で定義されたデバイスを設け、および
- (b) 外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターする。

さらに、本発明は、外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターする（好ましくは生体外での）方法に関し、

- (a) HEMTを構成する少なくとも一つの分離領域を設け、
- (b) 上記分離領域上に非興奮性細胞を成長/付着させ、および
- (c) 外部刺激にตอบสนองして生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターする。

本発明のデバイスは、以下の項目のいずれかに応じて用いてもよい。すなわち、その項目は、

- (1) ここで定義されたデバイスの使用であって、細胞成長、細胞粘着および細胞形態に対する外部刺激の影響をモニター/測定するための使用。
- (2) ここで定義されたデバイスの使用であって、外部刺激を与えることなく、細胞成長、細胞粘着および細胞形態をモニター/測定するための使用。
- (3) ここで定義されたデバイスの使用であって、細胞間通信のパラメータ/経路を記録するための使用。
- (4) ここで定義されたデバイスの使用であって、放射線の線量率を測定/検知/定量化するための使用。用語「線量率」は周知のものであって、単位時間あたりに吸収される放射線量（線量）を意味する。

我々は、電荷およびpH感度型溶液ゲートAlGaIn/GaN高電子移動度トランジスタ（HEMT）におけるリアルタイムでのX線照射応答を提示するものである。二つの物質のインターフェイスにおいて、固定空間電荷が物質の分極の相違のために出現し、そして、二次元電子ガス（2DEG）が生成される。電気特性とそれゆえシステムの導電性とはチップの表面電位に大きく依存する。我々は、デバイスが安定的であって、且つ、異なるエネルギーでのX線照射の下で並びに上記X線照射が継続しながら、マイクロレイ範囲の線量に対するリニアな統合応答を含む、再生可能な挙動を実証することができた。溶液中のデバイスの滴定測定によると、リニアなpH反応と感度はX線照射の下で保持されるのみならず、放射線照射応答をも測定された。センサーの活性領域は、約1ミリ平方メートルのサイズであって、この活性領域は、放射線学のアプリケーションにおける線量決定にとって理想的な候補となる。上記デバイスは、生体適合性を有し、且つ、液体中であ

10

20

30

40

50

って且つ激しい放射線下で同時に動作し得る。このセンサーデバイスの開発は、バイオセンシングアプリケーションにおけるオンライン放射線量測定取得の可能性を提供するものであって、放射線生物物理学において巨大なポテンシャルを有している。

このため、本発明は、はじめて、少なくとも1つのHEMT（これには細胞が存在せず、つまり、これに付着する細胞を含まない）が放射線を測定/検知/定量化できるということを開示する。この効果は、付属の実施例において示されており、具体的には、ここで記述されたデバイスが、線量測定の目的に非常に適しており、さらに、溶液動作下での絶対受容放射線量率用の内部較正を提供さえすることを実証するものである。ここで定義されたデバイス、および特にHEMTヘテロ構造を意味する「細胞フリー」の環境におけるHEMTを構成する分離領域によって特徴付けられたデバイスは、そのように用いられ、つまり、細胞が存在しておらず、（そればかりか、分離領域が、HEMTを構成する領域に付着される細胞、好ましくは非興奮性細胞を含むデバイス）が、放射線の測定/検知/定量化のために用いられ、または線量率の測定に用いられる。上記測定/検知/定量は溶液（生体内および生体外の設定を含む）中または空気（説明用に付属の実施例を参照）中で起こり得る。加えて、デバイスは非常に高い累積放射線量に対して動作し、且つ、数100 Gyの放射線照射後には何ら永久的な影響を示さない。上記デバイスは約1  $\mu$  Gy/sから10 mGy/s（高放射線量）の放射線量率に対して試験される。

本発明に係るHEMTベースのデバイスは、好ましくは、AlGaN/GaNヘテロ構造を構成するそれらのデバイスは、 $\mu$  Gyの領域で検知の限界に到達する一方で公知のMOSFETベースの放射線検知器はすでに低mGyの領域で検知の限界に到達している。本発明の一部を構成するHEMTを含むデバイスは、好ましくは、AlGaN/GaNヘテロ構造を構成するそれらのデバイスはそれゆえ、すでに身近なものとなったMOSFETベースの放射線量測定に代わる予期されなかったが優れたものを提供する（付属の実施例を参照）。

「 $\mu$  Gy領域」は、1000  $\mu$  Gy以下の放射線量、好ましくは、約900、800、700、600、500、400、300、200、100  $\mu$  Gyまたはそれよりも小さい値の放射線量、より好ましくは、約90、80、70、60、50、40、30、20、10  $\mu$  Gyまたはそれよりもずっと小さい10、9、8、7、6、5、4、3、2、1  $\mu$  Gy、またはそれよりもずっと小さい例えば0.9、0.8、0.7、0.6、0.5、0.4、0.3、0.2、0.1  $\mu$  Gy、またはそれよりもずっと小さい値の放射線量の値を含んでいる。

（5）ここで定義されたデバイスの使用は、放射線量を測定するための使用である。「放射線測定」は、間接的または直接的にイオン化放射線に晒された結果生じる物質および生体組織内に吸収された線量を計算することである。ここで記述されたデバイス（好ましくは、HEMTベースのデバイス、より好ましくはAlGaN/GaNヘテロ構造を構成するデバイス）は、例えば、好ましくはリアルタイムで、人間の患者上（内）での皮膚線量測定用に用いられてよい。

（6）ここで定義されたデバイスの使用は、任意のリアルタイムで、表面電位測定および放射線測定を組み合わせるための使用である。本発明によって初めて示されたように、HEMTは溶液中での放射線照射の間におけるその表面の電位変化に対する感度を保持する。このため、本発明に係るHEMTベースのデバイスは、好ましくは、AlGaN/GaNヘテロ構造を構成するそれらのデバイスは、pHおよび放射線を同時にまたは時間遅れで測定するために、用いられることができる。本発明に係るHEMTベースのデバイスは、好ましくは、AlGaN/GaNヘテロ構造を構成するそれらのデバイスは、細胞シグナルおよび放射線を同時にまたは時間遅れで測定するために、用いられることができる。

（7）ここで定義されたデバイスの使用は、（試験）細胞に所望の効果を与える試験化合物をスクリーニングするための使用である。「所望の効果」はしたがって実験の意図に基づいており、つまり、細胞に有益または有害（例えば有毒）な効果を与える化合物、がん細胞に反増殖効果を与える化合物、細胞に増殖効果を及ぼす化合物、外部刺激（例えばイ

10

20

30

40

50

オン化放射線)の有害な効果を後退または促進させる化合物、細胞内に所定の生化学経路(例えば病原性環境で含まれる経路)を(例えばアゴニスティックまたはアンタゴニスティックに)もたらす化合物、医療環境で薬物として働き得る化合物、に対してスクリーニングすることが望まれているかもしれない。「化合物」はしたがって複数の試験化合物も含んでいる。「試験化合物」はこの他の場所で定義されてきたものである。

(8)ここで定義されたデバイスの使用は、(試験)細胞に所望の効果を与えるのに必要な試験化合物の効果的な濃度をスクリーニングするための使用である。「効果的な濃度」はしたがって所望の効果を与えるために必要な試験化合物の濃度を意味する。所望の効果は上記で定義されてきたものである。

本発明はまた、上記環境における使用のために用いられるここで定義されたデバイスに関し、特に放射線の測定/定量化/検知および/または拘束または非拘束の電荷キャリアの密度における変化(pHおよび/またはイオン濃度の変化が好ましい)の測定/定量化/検知に関する。ここ以前で述べた変化は細胞シグナル(少なくとも1つのHEMTに付着された細胞)から生じるかもしれないし、または溶液中または双方における変化から生じるかもしれない。

「溶液中」とは生体外および生体内環境を含み、つまり、生体外(例えば、携帯される線量計として)または生体内で、ここで記述されたデバイス、例えば拘束または非拘束の電荷キャリアの変化(pHおよび/またはイオン濃度の変化が好ましく、pHの変化がより好ましい)および/または放射線を(同時にまたは時間遅れで)測定/検知/定量化するデバイスを用いることが考えられる。

上述した測定/使用はリアルタイムまたは時間遅れで実行されることが考えられる。

本発明のデバイスは医療機器であることがさらに考えられる。

スクリーニング目的のための本発明にかかるデバイスの使用は、いかなる適切な環境、例えば高スループット環境、つまり、高コンテンツなスクリーニングに適した環境(つまり、幾つかの異なるパラメータが同時にモニターされる環境)で実行されてもよい。本発明のデバイスをそのような環境に適用させる方法は当業者にとって公知である。

本発明の更なる側面および実施形態は以下のセクションから導き出せる。

ここで記述されたデバイス、好ましくは、AlGaIn/GaNヘテロ構造は、外部刺激に応答して生体細胞によって生成される例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターすることができる、ということを示した。例えば、上記デバイスは、好ましくは、放射線生物学および/または放射線研究の分野において一般に、細胞膜電位を測定するために用いられることが可能である。放射線照射実験後のみならず、放射線照射中においても、細胞電位を測定することができる可能性は、試験の制限を大幅に広げる。こうした試験方法は、非常に広い分野の新しい実験を切り開くものである。本発明によって、好ましくは放射線照射である外部刺激の最初の瞬間から、外部刺激に応答した細胞応答をモニターすることが可能になる。これにより、細胞応答とそれらの時間的順序のための特別な調査が可能になる。

生体細胞、好ましくは外部刺激に応答するチップ上の単細胞によって生成された例えば電気シグナルである細胞シグナルをモニターすることに加えて、単細胞刺激、例えば単細胞放射線照射を開始することが考えられる。この目的のために、単細胞よりも小さいビーム直径を有するマイクロビームが用いられる。この目的は、例えばMunich Tandem AcceleratorでのSNAKE(Superconducting nanoprobe for applied nuclear physics experiments)で実現され得る。

測定ケーブルを接続できることを提供するチップホルダーが開発されることがさらに考えられる。こうした構成の目的は、マイクロビームの放射線照射中に細胞電位を測定することである。放射線照射された細胞の近隣の細胞からの応答を記録することにより、考えられ得るバスタンダー効果のための定性的および定量的な実験を行うことができる可能性が向上する(Belyakov O. V. et al., 2002; Prise K. M. et al., 2003; Prise K. M. et al., 2002; Belyakov O. V. et al., 2005; Larimore S. A. et al., 2003)。このこ

10

20

30

40

50

とは、ここで記述された使用、方法に関連して適用され得る本発明の実施形態である。

本発明のデバイスは、外部刺激、好ましくは放射線、特に好ましくは照射線照射にตอบสนองして生体細胞によって生成された例えば電気シグナルである細胞シグナルを生体内でモニターできるように、埋め込まれてもよい。

[ ナノ構造の好ましいレイアウト ]

後述の文章は、本発明のヘテロ構造の好ましいレイアウトを説明するものであるが、本発明はそれらの設定に限定されるものではないことが理解されなければならない。GaNチップは電気コンタクトを有しており、これらは細胞電位の測定のために用いられている。サファイア基板がAlN核形成層で被覆されている。動作領域は2500nmの膜厚のGaN層と28%のアルミニウム量を含む25nmの膜厚のAlGaNバリア層とから構成されている。これら二つの物質間における二次元電子ガスキャリアの密度は、 $6.1 \times 10^{12} \text{ cm}^{-2}$  (Steinhoff G. et al., 2003b)である。上記デバイスは、3nmの膜厚を有するGaNキャップ層によって被覆されており、この層が、細胞が培養される表面である。

10

[ ナノ構造の説明される取り扱い ]

後述する文章は、本発明のヘテロ構造の好ましい設定を説明するものであるが、本発明はそれらの設定に限定されるものではないことが理解されなければならない。チップは、配線および不動態化の前に、超音波槽中のアセトンおよびイソプロパノールを用いて洗浄された。それぞれの単一の測定の前に、ちょうどGaNサンプルのように、70%のエタノールを用いて洗浄された。研磨された裏面を有する利用可能な1つのGaNサンプルが存在した。全てのその他の使用されたGaNサンプルとチップとは、研磨された裏面を持っていない。これらのサンプルを用いた光学顕微鏡検査はできなかった。

20

[ 可能な測定準備とデータ取得に関する説明 ]

後述する文章は、本発明のヘテロ構造の好ましい環境を説明するものであるが、本発明はそれらの環境に限定されるものではないことが理解されなければならない。GaNチップはサンプルホルダーの上に搭載されて、金配線に接続されており、当該金配線は0.1mmの直径を有している。データの取得は、Keithley Source and Multimeters (Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio 44139)を用いて実現される。それぞれのGaNチップはKeithley 2400 Source-meterに接続されており、当該Keithley 2400 Source-meterは電圧の印加と電流の測定とを同時に実現することを可能にする。SourceMeterは、正確で、低電圧で、高安定のDCパワー供給を、低ノイズで、高反復可能性で、高インピーダンスのマルチメーターに組み合わせる。それは、5-1/2-デジタル解像度を有する0.012%の基礎精度を持つ。5-1/2ディジットにて、SourceMeterは、IEEE488バス (Model 2400 Series SourceMeter User's Manual, Revision G, 1988, Keithley Instruments, inc.)上で一秒間に520リードを行う。電流を同時に測定しながら、120mVの定電圧がGaNトランジスタのソースドレインコンタクトに与えられる。所定の精度は、デバイスの基礎設定に対して有効である。リードのための異なるインテグレーション時間に応じて、その精度は所定の値から異なり得る。Keithleyデバイスはこれらのデータを、Windows XPの基礎PC中にインストールされたGBIP Interface Board, type KPCI-488LP IEEE-488.2 (Keithley Instruments Inc., Cleveland, Ohio 44139)に送る。測定デバイスの制御および読み出しに加えてサンプルデータの蓄積は、LabView 8.6.1 Express (National Instruments Dtl., Munchen, Germany)を用いてなされる。全ての放射線照射実験のために、医療X線デバイス、Stabilipan TR300fのタイプ (Siemens AG, Munchen, Germany)が用いられた。

30

40

50

[ GaNトランジスタの特徴付け ]

細胞電位測定を開始する前に、異なる物理的環境の影響へのトランジスタデバイスの依存性を評価することが考えられる。GaNチップは、光、温度、およびpH値の変化に対して非常に敏感であって、且つ、X線放射に対する応答を示す。測定されたデータの適切な解釈を行うためには、トランジスタの幅広い特徴付けを行うことが、物理的および電気的特性を知るために望ましい。好ましくは、それぞれの単一のチップ（本発明のヘテロ構造またはデバイス）の個別の特徴づけが実行される。

[ 本発明のデバイスに係るpH感度 ]

細胞がアポトーシスを経験するときのpH値の変化を記述する幾つかの刊行物が存在している（Lagadic-Gossmann D. et al., 2004; Tan 10  
nock I. F., 1989）。細胞放射線照射実験中における予期されたシグナルの変化の感触を得るために、GaNトランジスタ電流がpH値に依存して測定される。この目的のために、異なるpH値を持つ溶液が、HClとNaOHとを混合することによって生成された。その溶液のpH値は、pHメータ、CyberScan500のタイプを用いて決定された（Eutech Instruments Europe, Nijk 20  
erk, Netherlands）。

[ 生体適合性および細胞の生命力 ]

幅広い細胞成長実験は、GaN表面上の細胞が生存していること、および基板物質から細胞の影響が何も存在しないことを保証するために、実行された。その形態試験および成長研究は、光学顕微鏡またはレーザー走査顕微鏡および原子間力顕微鏡によって実行され 20  
た。細胞が生存しているか死滅しているかを決定する最も早い方法の一つは、その外部の形状を調べることである。GaNチップ上の細胞成長は、通常の顕微鏡スライド上での細胞成長と比較された。GaN表面上の細胞成長とガラス基板上の細胞成長との間における視認できる相違は存在していない。

[ 参照 ]

上記非特許文献1～31を参照とした。

【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、GaN表面上に成長した線維芽細胞の共焦点レーザー走査顕微鏡画像を示している。細胞膜は、DiO、ローダミン（Rhodamine）-ファロイジン（Phalloidin）を有する重合型アクチン（F-Actin）、およびHoechst 30  
t33342を用いた細胞核によって、ラベル付けされている。（スケールバー：40μm）

【図2】図2は、異なる放射線量率におけるトランジスタ反応を示している。Iは、二つの異なる、名目上同一のX線照射によって引き起こされるトランジスタのソースドレイン電流の変化である。

【図3】図3は、細胞放射線照射実験（7.1mGy/s, 60秒）を示している。三つの曲線は、同時に放射線照射された二つのGaNトランジスタの電流差を計算したものを示している。黒曲線は参照曲線であり、二つのチップ上の細胞媒体についてのもののみを示している。赤線はGaNチップのうちの一つの上に成長した細胞について記録したものであり、緑線は交換測定を用いて記録したものであって参照チップについて記録したもので 40  
ある。

【図4】図4は、参照トランジスタのシグナルを示している。細胞はチップのうちの一つの上に成長した。生体細胞放射線照射のシグナルはX線に晒されている間、上昇を示している（5.1mGy/s, 3分）。赤曲線は、t+180分後に繰り返された同じサンプルへの放射線照射のシグナルを示している。細胞がいまやその生命力を失ったために、生体反応はもはや期待されず、曲線は、図3中の細胞を有さない参照曲線と同程度の、平坦な経過を示している。

【図5】図5は、線量率の関数として、AlGaN/GaNのHEMTのソースドレイン電流を示している（X線、150kV）。差込図は、各種の線量率の交互強度（左差込図）および間欠的強度（右差込図）を用いたパルスX線照射の下、時間の関数として、絶対 50

ソースドレイン電流の測定を示している。差込図における数字は  $mGy/s$  での線量率を示している。二つの放射線照射のシリーズを含む完全な実験が二度実行された。

【図6】図6(A, B)トランジスタシグナルの時間間隔が、空気中の全体の線量に対してリニアな相関を示している。  $1.6 \mu Gy/s$  の線量率に対する典型的な応答シグナルが差込図(C)に示されている。差込図(D)は、パルスの初期でのシグナルの鋭いドリフトを示しているが、  $10 \mu Gy$  に向かってリニアな経過が観察されている。低線量範囲における測定は  $18 kV$  の X 線を用いて実行され、高線量範囲における測定は  $150 kV$  の X 線を用いて実行された。トランジスタは異なる線量率で10分間照射された。

【図7】図7は、  $pH 4$  および  $pH 10$  での  $2.9 mGy/s$  の線量率での放射線照射の前に、中で、後で、溶液中の GaN デバイスの特性曲線を示している。平衡を得るために、最初に、ゲート電圧  $V_G$  を  $0 V$  と  $-4 V$  との間で5回循環させた。図示されたデータは、データ系列毎の5つの連続する周期の平均化によって得られたものである。嵌め込まれた図は、デバイスのヒステリシスの測定を与えるゲート電位の関数として、  $pH 7$  での特性曲線の標準偏差を示している。

【図8】図8は、  $1.4 mGy/s$  の線量率で連続する放射線照射の間における滴定を示している。リニアな  $pH$  反応の勾配は、  $57 mV/pH$  のトランジスタ感度をもたらしている。差込図は滴定された異なる  $pH$  値で測定されたゲート電圧  $V_G$  のセクションである。連続する放射線照射は  $150 kV$  X 線を用いて実行された。

【図9】図9は、HEMTトランジスタを例示した断面図である。

【発明を実施するための形態】

本開示は、付属する図面と共に最善に理解され得るものであり、参照によりここに取り込まれる。さらに、本発明および多くの利点のより良い理解は、例示をもって後述する実施例によって得られるであろうし、また、その例示に限定される意図ではない。

[実施例1] AlGaIn/GaNナノ構造上での刺激を受けた細胞応答のモニタリング

細胞通信経路は、一次メッセンジャーと二次メッセンジャーの細胞膜を横断する移動をもたらす。これらの細胞通信経路の解読は、高度な細胞ホメオスタシスを理解する鍵である。ここで、我々は、長期間の測定における放射線照射実験の間、帯電された外部細胞メッセンジャーによって引き起こされる細胞電位応答を記録することができる、半導体ナノ構造に基づいた測定アプローチを提示する。AlGaIn/GaNヘテロ構造は、電子トランジスタおよびイオン感応型トランジスタのゲート層を提供する。電気特性とそれゆえシステムの導電性とは、細胞膜を横断するイオン束によって変化するチップ表面電位に大きく依存している。このことにより、細胞応答とそれらの時間順序に対する特別な調査が可能となる。本デバイスは放射線に敏感であるが、ヘテロ構造は、X線に晒されている間、安定的で反復可能性のある挙動をもって動作可能である。我々は、放射線照射された細胞によって引き起こされた、60秒以内で  $0.13 \mu A$  までのトランジスタのシグナルの変化を測定した。放射線照射の後のみならず、放射線照射の間についても、細胞電位を測定できることは、試験の制約をかなり広げることである。

生化学通信が後に続く、生体信号の細胞内通信は、細胞増殖の不可欠な部分である<sup>1</sup>。マイクロ電極アレイ<sup>2-4</sup>および電界効果トランジスタ(FET's)<sup>5</sup>は、これらの電気細胞シグナルの記録に用いられる。AlGaIn/GaNナノ構造によって形成された高電子移動度トランジスタ(HEMT's)の開発は、細胞活動の非侵襲性の外部細胞モニタリングを非常に繊細に実現できることをもたらす<sup>6</sup>。ここに、我々は、長期間の調査用のバイオセンサとしてそのような半導体デバイスの利用を報告する。我々は、半導体測定技術と放射線照射実験とを組み合わせることにより、そのデバイス表面の生体適合性を実証すると共に線維芽細胞からのX線刺激による電気信号を記録することを実証する。メッセンジャーとして  $Ca^{2+}$  を利用するために、生体細胞は、  $Insp_3$  またはリアノジン受容体のいずれかを用いることで、高度短バースト  $Ca^{2+}$  放出メカニズムを利用した恒常的制御を克服する<sup>7</sup>。我々は、放射線照射中および後に、生体細胞によって生成される非常に小さい電気信号を検知するための実験的環境を開発した。長期間の測定は、二つの

10

20

30

40

50

GaNトランジスタへの放射線の同時照射と、このため、いかなる直接的なX線に関連する偽シグナルおよび温度ドリフトの補償により、実現可能となる。III族窒化物は生理学的条件下で化学的に安定であり、生体細胞に対して無毒であり<sup>8</sup>、高X線照射量に耐える。本質的な影響が誘導されたいかなる放射線をも除外するために、我々は、注意深く、X線照射に対するAlGaN/GaNヘテロ構造の応答を特徴付けた。ナノ構造は、放射線照射条件下で安定的で且つ反復可能性のある動作を示す。さらに、トランジスタ表面の生体適合性はDNA修復および細胞成長研究(図1)によって保証された。結果は、これまでに発行されたデータに匹敵するものである。HEMTデバイスの製造および物理的特性はG. Steinhoffら<sup>10</sup>によって記述されている。

トランジスタは、フローティングゲートおよび120mVの一定のソースドレインバイアスで動作させた。配線および不動態化の前に、チップは、超音波洗浄機内でアセトンおよびイソプロパノールを用いて洗浄された。各測定の前に、チップ表面は70%エタノールで洗浄されて、そして、UV-C光の下で30分間殺菌された。続いて、チップは、37、30分間、フィブロネクチン溶液(ハックス平衡塩1ml中、12.5μlのフィブロネクチン)を用いて、コーティングされた。我々の細胞実験のために、マウス結合性線維芽細胞L-929は、37、97%の湿度で、10%のウシ胎仔血清(FBS)および1%のペニシリン/ストレプトマイシ(10000units/mlのペニシリン、10mg/mlのストレプトマイシン)を有するRPMI1640 Medium(w5.5g/l Phenol red, w2.0g/l NaHCO<sub>3</sub>, w25mM HEPES, wstable glutamine)培地で培養された。細胞は融合層に成長した。放射線照射実験は、医療用X線機器Stabilipan TR300f(Siemens AG, 80333, München, Germany)を用いて実行された。

トランジスタのゲートのpH値とソースドレイン電流とのリニアな関係は、従前の刊行物で実証されたものである<sup>9</sup>。本デバイスはpH依存性を持ったものであり、このことは、5.6-8.4のpHでの適定によって確認されたものであって、関係領域において-0.32μA/pHの感度を示した。HClおよびNaOHのpHは、pHメータであるタイプCyberScan500(Eutech Instruments Europe, Nijkerk, Netherlands)を用いて測定された。いかなる可能性のあるX線に関するトランジスタの偽応答を評価するために、我々は、1mGy/s~12mGy/sの間の異なる線量率を用いて、一つのベアチップに放射線照射を行った。放射線に対する各暴露は、再現可能性を分析するために、一度繰り返された。トランジスタは、それぞれ1分間、異なる放射線量で、それぞれの放射線照射の間隔を4分として、放射線照射がなされた。この場合、トランジスタのシグナルは減少する。さらに、チップは、放射線照射の影響を調べるために、複数回、同じ放射線量だが異なる放射線照射時間の下で、放射線照射がなされた。異なる放射線照射の間隔はまた4分であった。ソースドレイン電流 / の放射線依存変化は高放射線量率まで観察され得る(図2)。細胞放射線照射実験は4mGy/s~7mGy/sの放射線量率を用いて典型的に実行された。それにより、トランジスタは活性領域にて動作される。X線依存の再現可能性を実証するために、我々は、名目上同一の条件(緑シンボルと緑ライン)の下で、各測定を繰り返した。測定電流の上昇は明確に放射線量率および放射線時間(図示せず)に依存する。我々のトランジスタは、放射線治療実験の間、安定的で再現可能性のある性能を示し、我々は、一方が細胞を含んでおり他方が参照として機能する二つの同一のトランジスタに放射線を同時に照射することにより、直接的な放射線応答を填補することができた。

それから、二番目の参照トランジスタからのシグナルは他方のトランジスタの測定シグナルから減算される。その結果がセンサー反応 $I_{SD}$ である。製造、配線および不動態化プロセスのために、双方のトランジスタは完全には同一ではないので、参照曲線は外部物理パラメータ(温度、pHおよび放射線)から完全には独立したものではないが、我々の参照方法はそれでもかなり、それらの影響を低減する。

細胞照射による最も顕著な影響は図3に示されている(線量率7.1mGy/s)。下方のトレース(黒曲線)では、我々は、時間関数として参照反応 $I_{SD}$ (細胞は存在しな

10

20

30

40

50

いがバッファ溶液が存在する)を記述している。生体細胞がセンサー領域の一つ(赤曲線)の上で存在していた場合に対して、同じ量がプロットされている。明確なことは、我々は、参照曲線と比較して、シグナルが減少していることが分かる。しかしながら、今回、我々は、生体細胞が二つのセンサー領域間でやり取りされる場合に対して、同じ実験を示す(緑曲線)。緑曲線は放射線照射中に僅かな上昇を示す一方で、赤曲線はおよそ同じ勾配で減少する。放射線照射中の大きなセンサー反応は上述した光作用によるものであることが分かる。それにもかかわらず、我々は、生体細胞への放射線照射は小さいが検知できるセンサー反応をもたらすということを確実に述べるができる。細胞によって引き起こされるシグナルの変化は、参照曲線と比較して  $0.13 \mu A$  である。

生体細胞への参照放射線照射と生命力を失った細胞とを比較することは、この仮説をサポートする。細胞応答による要求されたシグナル生成と、例えばX線の生体物質との単純な相互作用である、物理的なシグナル生成とを区別することが可能である。図4は、従前の実験と同じようにではあるが  $5.1 mGy/s$  の放射線量を用いた生存細胞への照射中のシグナルの増加  $I_{SD}$  を示している。室温にて3時間後に、細胞はその生命力を失い、センサー反応は、ちょうど細胞を有さない参照測定と同じように、再びフラットになる(図4、赤曲線)。このことははっきりと、生体細胞によって生体シグナルが生成されることを示している。

結論として、半導体ナノ構造は、バイオセンサとして利用され得るものであって、刺激を受けた細胞の応答の長期間の測定を可能にするものである。そのシステムは、X線照射下での安定的および再現可能なセンサー反応を示し、外部細胞メッセンジャーを検知するために十分な感度を有している。このことは、放射線生物学において、例えばシグナル通信路、 $Ca^{2+}$  バースト測定、または細胞間通信の分析において、新しい知見を与えるものである。

<sup>1</sup> Hereditary Effects of Radiation, UNSCEAR Report 2001

<sup>2</sup> C. A. Thomas Jr., P. A. Springer, G. E. Loeb, Y. Berwald-Netter, and L. M. Okun, *Exper. Cell Res.* 74, 61-66 (1972)

<sup>3</sup> P. Connolly, P. Clark, A. S. G. Curtis, J. A. T. Dow, and C. D. W. Wilkinson, *Biosens. Bioelectron.* 5, 223-234 (1990)

<sup>4</sup> F. Heer, W. Franks, A. Blau, S. Taschini, C. Ziegler, A. Hierlemann, and H. Balt

*es, Biosens. Bioelectron.* 20, 358-366 (2004)

<sup>5</sup> P. Bergveld, J. Wiersma, and H. Meertens, *IEEE Trans. Biomed. Eng.* 23, 136-144 (1976)

<sup>6</sup> G. Steinhoff, B. Baur, G. Wrobel, S. Ingebrandt, A. Offenhausser, A. Dadgar, A. Krost, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, *Appl. Phys. Lett.* 86, 033901 (2005)

<sup>7</sup> M. J. Berridge, *Journ. Exper. Biol.* 200, 315-319 (1997)

<sup>8</sup> G. Steinhoff, O. Purruicker, M. Tanaka, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, *Adv. Funct. Mater.* 13, 841-846 (2003)

<sup>9</sup> K. Rothkamm, M. Lorch, *PNAS*, Vol. 100, No. 9, 5057-5062 (2003)

<sup>10</sup> G. Steinhoff, M. Hermann, W. J. Schaff, L. F. Eastman, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, *Appl. Phys. Lett.* 83, 177-179 (2003)

[ 実施例 2 ] 生体適合性溶液ゲート AlGaIn/GaN の HEMT デバイスのリアルタイム X 線応答

我々は、電荷および pH 感応型溶液ゲート AlGaIn/GaN 高電子移動度トランジスタのリアルタイム X 線照射応答を提示する。本デバイスは、 $\mu Gy$  の範囲に入る線量に対するリニアな統合応答を含む、X 線照射下および続いて起きる X 線照射に対して安定的で且つ再現可能な挙動を示す。溶液中のデバイスの適定測定によると、リニアな pH 反応と感度が、X 線照射下で保持されるばかりではなく、放射線応答が測定され得ることを明らかにしている。デバイスが生体適合性であって、当該デバイスは液体中で且つ激しい放射

10

20

30

40

50

線下で同時に動作され得るので、当該デバイスは、医療放射線測定およびバイオセンシングのアプリケーションの双方に対して大変適している。生体システムを原位置でモニターできることは、近代の医療社会にとって極めて重要である。今回の研究の一側面は、放射線暴露の前に、間に、および後に、細胞に対する放射線のリアルタイムの影響を研究する方法を開発したことである。近年、広いバンドギャップの半導体はこの研究分野の入口に立ち、GaNは特に有望な特徴を示してきた。たとえば、AlGaN/GaN高電子移動度トランジスタ(HEMTs)は生体適合的であることが報告されている<sup>1, 2</sup>。GaNキャップ層を付加的に用いることで、このデバイスは、水溶液中で動作され得、かなりの程度に化学的に不活性であり、そして、高リニアなpH感度を示す<sup>3</sup>。さらに、これらのデバイスは、気体、極性流体、特定イオン、および細胞応答の検知のために用いられてきた<sup>1-4</sup>。ここで、我々は、同時液相pH測定と、AlGaN/GaNのHEMTに基づくイオン感応型電界効果トランジスタ(ISFETs)を用いた放射線検知とを実証することにより、アプリケーションの範囲を広げる。本デバイスは、X線に対して安定的で、反復可能で、そして敏感な応答を示し、放射線照射中のpH感度を保持する。これらのサイズの小ささと湿潤な環境における動作性のために、そのようなデバイスは、生体内測定にとって大変適しており、これらは激しい環境における生化学応答および放射線応答を同時に測定するための手段を提供する。この研究のために用いられるHEMTデバイスは、2.6nmの膜厚のGaNキャップ層を用いたTopGaN(Warsaw, Poland)による工業用MOCVDベースの成長プロセスを用いて製造された。HEMTデバイスの製造方法および物理的特性は、従前の刊行物に記述されている<sup>5, 6</sup>。測定環境は、標準的なガラス電極(pH/Ion-Meter Metrohm 781)、Ptカウンター電極、Ag/AgCl参照電極、および作動電極としてのISFETを備えた単一電気化学的細胞から構成された。トランジスタの活性領域(0.88mm<sup>2</sup>)は、動作中、4mmのAlフィルターを用いた医療用X線システム(Stabilipan TR300f, Siemens AG)によって放射線照射がなされ、空気中の線量の参照測定は面積線量計(Diamantor M4, PTW)を用いて記録された。低線量実験用には、キャビネットX線システム(MX-20, Faxitron X-ray LLC)が利用された。溶液測定は、10mMのHEPESバッファおよび0.1MのNaClまたはKClの溶液中で実行された。この溶液は、バッファで希釈されたNaOHまたはKOHおよびHClを用いて適定されたものであった。すべての実験は、トランジスタの光感度のために、完全に暗い環境で実行された。X線照射下およびそれに続くX線照射におけるデバイス性能の安定性および再現可能性を確認するために、多数のシリーズの線量率依存性輸送測定が実行された。図5は、120mVの固定電位と線量率に対してプロットされたフローティングゲート電位での、ソースドレイン電流 $I_{SD}$ の変化に伴う、150kVのパルスX線照射シリーズの結果を示している。図5の差込図に示されるように、10分間のパルスで15分の間隔を間に設けて放射線照射が実行された。光励起キャリアの生成により、X線の線量率に応じたソースドレイン電流の単調増加が観察された。放射線シリーズの繰り返しから得られた結果を比較することで、トータルの線量が60Gyを超えた後には、何らの顕著な永久性能の変化を伴うことのない素晴らしい再現性が得られた。これらの小さい偏差は、本デバイスが放射線測定アプリケーションにとって大変適していること、且つ、本デバイスが溶液動作下で絶対受容線量率に対する内部較正を提供することを実証している。我々は、溶液条件中でのソースドレイン電流反応の測定が、本デバイスのいかなる特別の表面処理を行うことなく、同様の再現性を示したことを指摘する。

トランジスタ反応の大きさが上記線量率に相関する一方で、蓄積されたトランジスタのシグナルはトータルの吸収線量に比例することが予期される。図6は、空気中の統合トランジスタ反応を示している。我々は、非常に低い線量範囲(10 $\mu$ Gyまでの)でさえ、異なる線量に対して高リニアな関係を観察する。比較として、MOSFETベースの放射線検知器は、放射線学において重要なツールになったが<sup>7-10</sup>、低mGy範囲<sup>7, 8</sup>において検知の限界に到達する。本GaNデバイスは、図6(AとB)に示すように、 $\mu$ G

10

20

30

40

50

y 範囲内までその制限を広げる。

乾燥条件下での X 線応答の特徴に加えて、我々は、本トランジスタが、溶液中での放射線照射の間における GaN 表面での電位変化に対する感度を保持することを示す。図 7 は、120 mV の一定のソースドレイン電圧  $V_{SD}$  に対するゲート電位の関数として、ソースドレイン電流を示している。本トランジスタは、150 kV、2.9 mGy/s の線量率での X 線照射の前に、間に、後に、それぞれ、pH 4、pH 7、pH 10 の特性を示した。GaN バッファ層およびキャップ層における電子対の光生成が主要な理由で、それぞれの完全な特性曲線は放射線照射中の高電流に対してオフセットされる。このような放射線依存性オフセットは、独立した放射線照射測定を行うために、-3.5 よりも小さいマイナスのゲートバイアス下で用いられ得た。図 7 において、我々は、ソースドレイン電流がヒステリシスを示すことから、ゲート電圧  $V_G$  に対する周期的な測定から平均値をプロットした。平均化された周期の標準偏差は、図 7 の差込図に示されるように、ゲート電位の関数としてヒステリシスの大きさを与え、且つ、非照射デバイスと照射デバイスとの間の非常に小さい差異を示す。pH 依存性は、サイト結合モデルを用いて説明され得るが<sup>1</sup>  $1 - 1^3$ 、非照射と照射ケースの両方で類似している。

Steinhoff<sup>3</sup> によって報告された非照射デバイスと類似する方法で、照射されたデバイスが pH に対してリニアに反応するかどうかを確認するために、トランジスタは水溶液中で連続的に照射される一方で当該 pH は滴定によって変化した。pH 毎の表面電荷差異を得るために、120 mV の一定のソースドレイン電圧を用いてゲート電位を調節することにより、ソースドレイン電流  $I_{SD}$  が一定に保持された。 $V_G$  の調節された変化は、図 8 において読まれる pH 電極の関数としてプロットされた。57 mV/pH の pH 感度に対応する勾配は、鋭いドリフトの減算に続くリニアな後退によって得られた。この値は、56 mV/pH の放射線なしでの感度に匹敵しており、そして、我々の実験が室温で実行され、上記参照 3 は 20 で制御されたために、僅かに上昇した動作温度の結果に関して異なっている。我々は、電解質溶液内での 1.4 mGy/s の線量率は、図 5 に示される空気中での GaN デバイスのシグナル応答の自己較正曲線を用いて決定されたことを指摘する。

結果として、我々は、電解質内で動作する ISFET として構成された GaN の HEMT デバイスは、安定的且つ再現可能な態様で、X 線照射中の pH 感度を保持することを見出した。さらに、我々の発見は、基本的なデバイス特性が、デバイスの動作安定性を構成することなく、pH 反応から放射線照射シグナルを分離するために用いられ得る。X 線量率を用いたソースドレイン電流の再現可能性を高めることはさらに、水溶液下で受けた光子束に対する内部較正を提供すると共に、そのようなデバイスが、厳しい環境領域における激しい放射線およびイオン感度の組み合わせの測定にとって十分に適したものであることを確立することになる。本デバイスはこのため、将来統合される放射線測定およびバイオセンシング医療アプリケーションにとって理想的に適したものである。

<sup>1</sup> G. Steinhoff, O. Purrucker, M. Tanaka, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, Adv. Funct. Mater. 13, 841 (2003).

<sup>2</sup> G. Steinhoff, B. Baur, G. Wrobel, S. Ingebrandt, A. Offenhausser, A. Dadgar, A. Krost, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, Appl. Phys. Lett. 86, 033901 (2005).

<sup>3</sup> G. Steinhoff, M. Hermann, W. J. Schaff, L. F. Eastman, M. Stutzmann, and M. Eickhoff, Appl. Phys. Lett. 83, 177 (2003).

<sup>4</sup> M. Eickhoff, J. Schalwig, G. Steinhoff, O. Weidemann, L. Gogens, R. Neuburger, M. Hermann, B. Baur, G. Mueller, O. Ambacher, and M. Stutzmann, phys. stat. sol. (c) 6, 1908 (2003).

<sup>5</sup> R. Dimitrov, M. Murphy, J. Smart, W. Schaff, J. R. Shealy, L. F. Eastman, O. Ambacher, and M. Stutzmann, J. Appl. Phys. 87, 3375 (2000).

<sup>6</sup> M. J. Murphy, K. Chu, H. Wu, W. Yeo, W. J. Schaff, O. Ambacher, L. F. Eastman, T. J. Eustis, J. Silcox, R. Dimitrov, and M. Stutzmann, Appl. Phys. Lett. 75, 3653 (1999).

10

20

30

40

50

<sup>7</sup> T. T. Yoshizumi, P. C. Goodman, D. P. Frush, G. Nguyen, G. Toncheva, M. Sarder and L. Barnes, *American Journal of Roentgenology* 188, 1332 (2007)

<sup>8</sup> D. J. Peet and M. D. Pryor, *The British Journal of Radiology* 72, 562 (1999)

<sup>9</sup> D. J. Brenner, *Med. Phys.* 32, 3225 (2005)

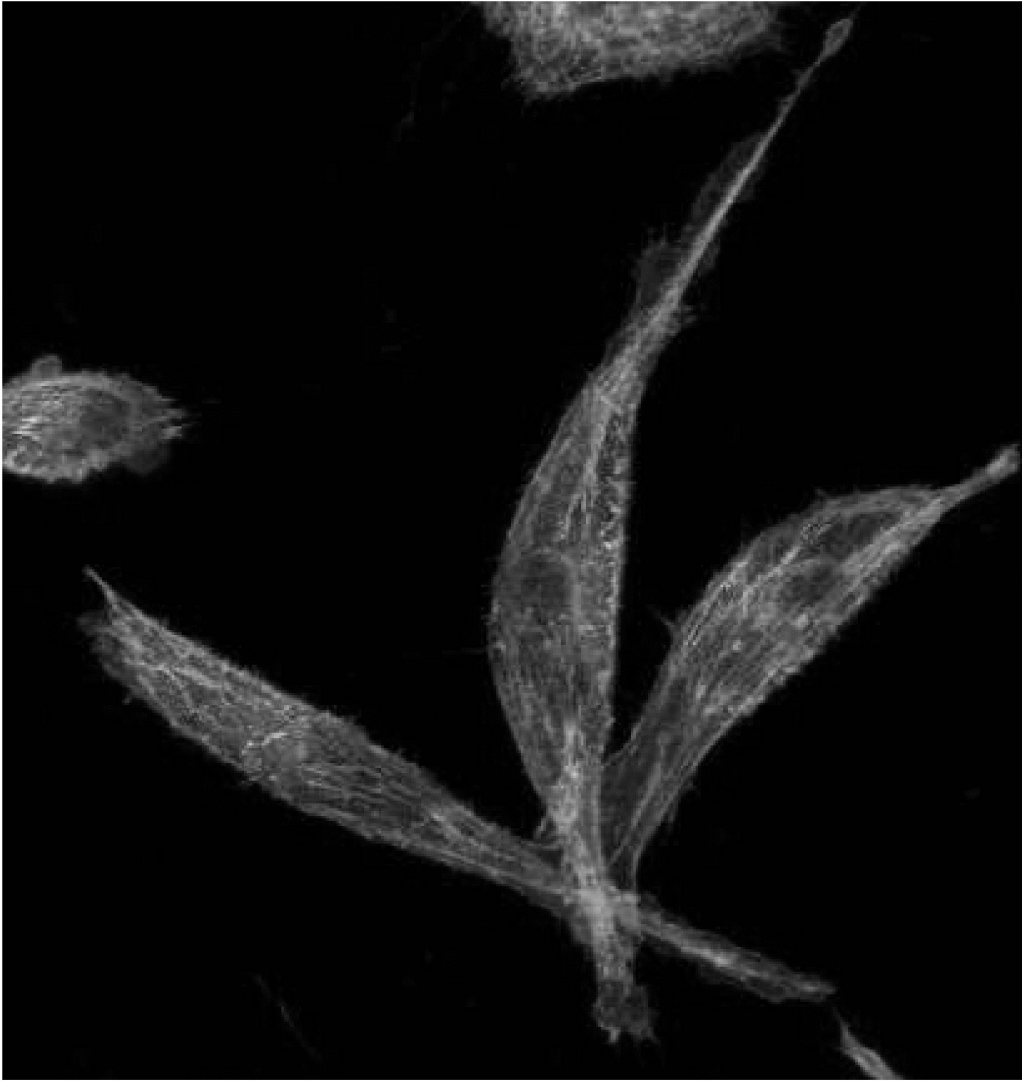
<sup>1 0</sup> C. F. Chuang, L. J. Verhey, and P. Xia, *Med. Phys.* 29, 1109 (2002)

<sup>1 1</sup> D. E. Yates, S. Levine, and T. W. Healy, *J. Chem. Soc., Faraday Trans.* 170, 1807 (1974).

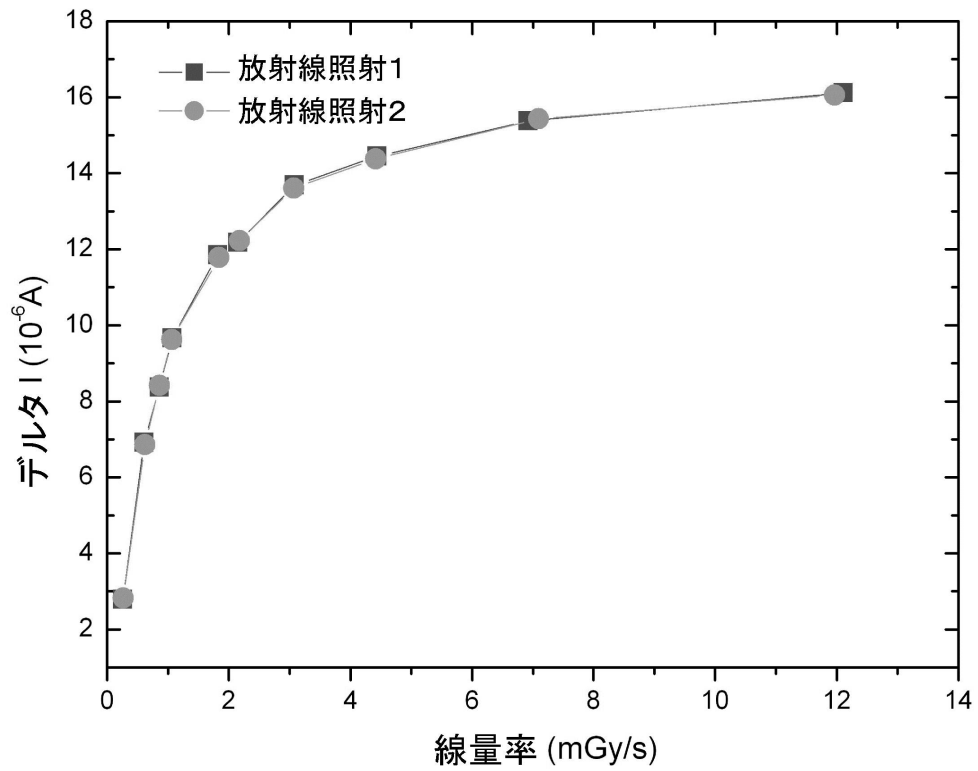
<sup>1 2</sup> L. Bousse, N. F. De Rooij, and P. Bergveld, *J. IEEE Trans. Electron Devices* ED-30, 1263 (1983).

<sup>1 3</sup> C. D. Fung, P. W. Cheung, and W. H. Ko, *IEEE Trans. Electron Devices* ED-33, 810 (1986).

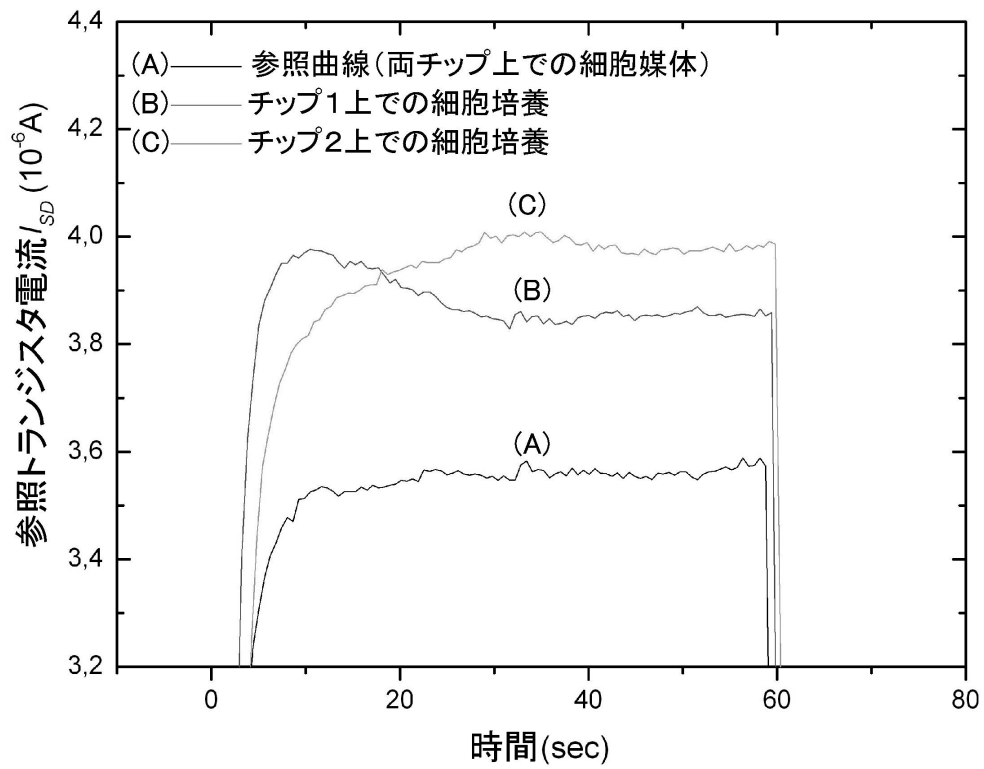
【 図 1 】



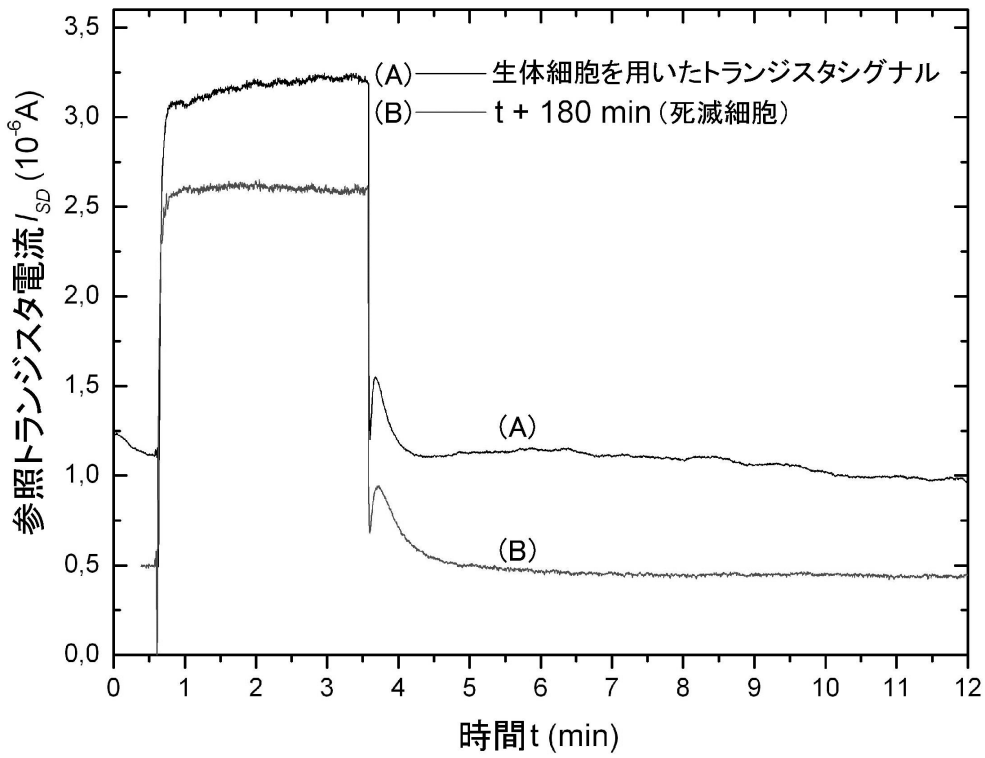
【図2】



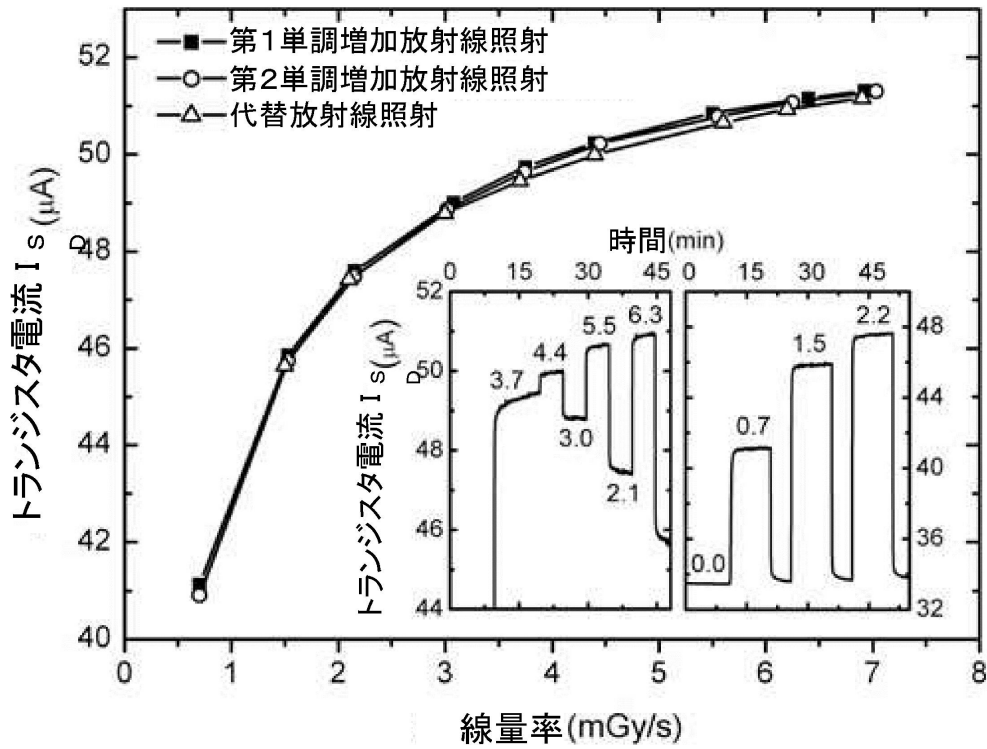
【図3】



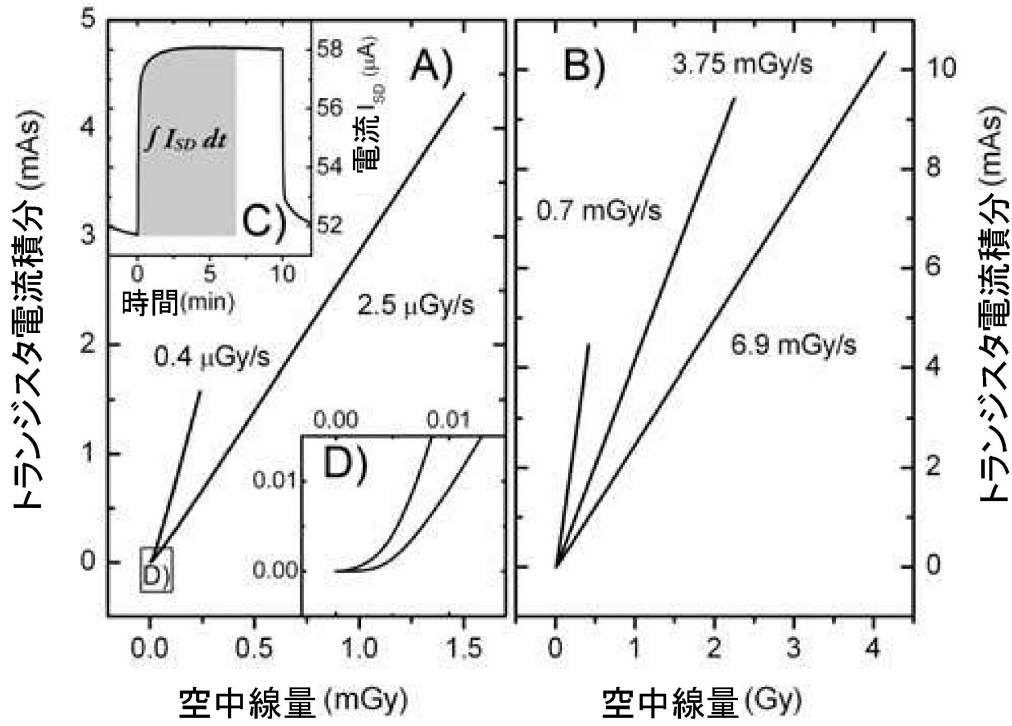
【 図 4 】



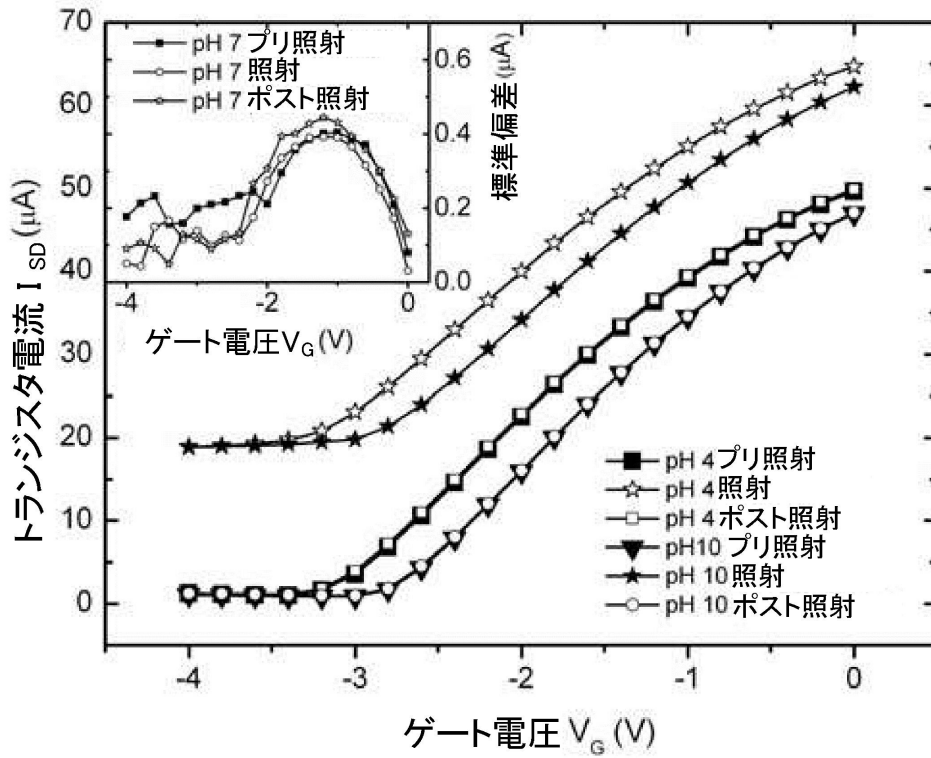
【 図 5 】



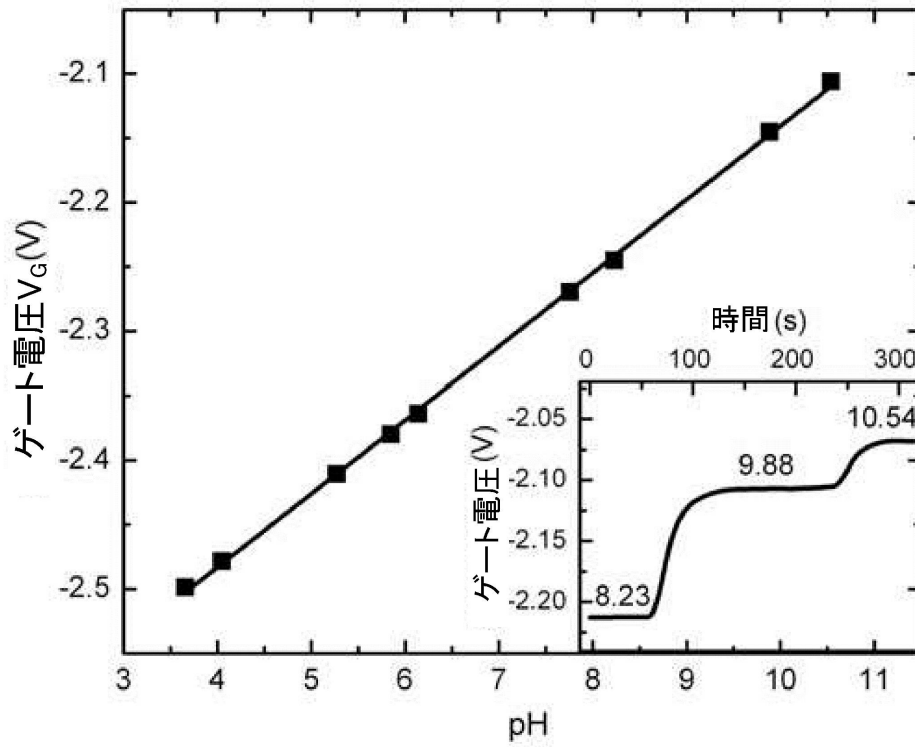
【 図 6 】



【 図 7 】



【図8】



【図9】



## フロントページの続き

- (74)代理人 100129997  
弁理士 田中 米藏
- (72)発明者 タールハンマー ステファン  
ドイツ 80639 ミュンヘン プリンツェンシュトラッセ57
- (72)発明者 ホフステットター マルクス  
ドイツ 84432 ホーエンポルディング ケラーシュトラッセ5
- (72)発明者 ハウゲイト ジョン  
ドイツ 80335 ミュンヘン ダッハウアーシュトラッセ27
- (72)発明者 ストゥッツマン マルティン  
ドイツ 85435 エルディング アリボシュトラッセ9

審査官 櫃本 研太郎

- (56)参考文献 特表平11-503316(JP,A)  
特開2006-090932(JP,A)  
特開2005-077210(JP,A)  
特表2002-522028(JP,A)  
YU J, ALGAN/GAN HETEROSTRUCTURES FOR NON-INVASIVE CELL ELECTROPHYSIOLOGICAL MEASUREMENTS, BIOSENSORS AND BIOELECTRONICS, 2007年 7月21日, VOL. 23, NO. 4, PAGES 513-519

- (58)調査した分野(Int.Cl., DB名)  
G01N 27/414  
G01N 27/416  
JSTPlus/JST7580(JDreamIII)