

磁性薄膜による代謝物センサの構成と基礎特性

Construction and Basic Characteristics of Metabolite Sensor Utilizing Magnetic Thin Film

柿崎 和毅, 伊藤 清隆, 谷地 善光, 徳田 春男,

千葉 茂樹, 長田 洋, 関 享士郎

Kazutake KAKIZAKI, Kiyotaka ITOU, Yoshimitsu YACHI, Haruo TOKUTA,
Shigeki CHIBA, Hiroshi OSADA, and Kyoshiro SEKI

岩手大学

Iwate University

キーワード：磁性薄膜 (magnetic thin film), スパッタ法 (sputtering method),
代謝物センサ (metabolite sensor), 酵素反応(enzyme reaction)

連絡先：〒020-8551 岩手県盛岡市上田 4-3-5 岩手大学工学部電気電子工学科
電子システム工学講座

関享士郎, Tel.019(621)6380, Fax.019(621)6380, E-mail:seki@iwate-u.ac.jp

1. 緒言

近年, 生体化学分野へエレクトロニクス技術の導入により, 各種のバイオセンサが開発されている. それらの一つに代謝物センサがある. 代謝物センサは, 試料と酵素との反応熱を検出することで試料の識別および定量を行う方法が主流であり, 主にサーミスタの電気特性を用いたものが開発されている^{(1),(2)}.

磁性薄膜 MTF (Magnetic Thin Film) は, 感温フェライトを RF スパッタした後, アニール処理を施して作製される感温磁性

薄膜であり, その磁気特性が顕著な温度依存性を有するため, 高感度温度センサとして使用できる⁽³⁾⁻⁽⁵⁾.

本報告は, MTF を用いた微小酵素反応熱を磁気的に計測するシステムの構成および基礎特性に関するものである. 本システムは, 酵素反応熱を磁気的に計測するため, センサ部と信号処理分が分離可能であり, サーミスタ等で構成される従来のセンサシステムに対して, より柔軟なシステムを構成できる.

2 . MTF の作製と基礎特性

MTF はスパッタリングとアニーリングの工程を経て作製される . Fig. 1 に MTF の作製工程を示す . 主原料である Fe_2O_3 , MnO , ZnO などの金属酸化物を混合し , 800 ~ 900 で仮焼成する . これをボールミルを用いて数 μm まで粉砕した後 , バインダを加えて加圧成形後 , 1200 ~ 1400 で4時間本焼成を行いバルク状の感温フェライト TSF (Temperature-sensitive Ferrite) を作製する . 次に , TSF をターゲットとして RF スパッタリングにより Si 基板 (縦 8.0 mm , 横 4 mm , 厚さ 0.65 mm) 上に薄膜を形成する . スパッタは Ar 雰囲気 60 mTorr で 4 時間 , RF パワーは 200 W の条件下で行った .

Fig. 2 はアニーリング工程における温度プロファイルを示す . 作製されたスパッタ薄膜 STF (Sputtered Thin Film) は非晶質であり , 磁性をほとんど生じない . そこで , 結晶構造 (スピネル) を再現するため , アニーリング処理を施した . アニーリングは Ar 雰囲気中で 1000 で 8 時間熱処理を行った . また , クラック , 剥離の発生を防止するため , その後 , 100 /h で 10 時間徐冷し , 室温まで冷却することで MTF が作製される .

Fig. 3 は TSF と MTF の金属成分を示す . 測定は X 線マイクロアナライザー (EDX) を用いて行った . TSF と MTF の Fe , Mn および Zn の主成分金属組成比 (mol%) はそれぞれ (67.07 , 14.73 , 18.20) , (67.55 , 14.75 , 17.70) であり , スパッタリングおよびアニーリングの前後で組成にはほとんど変化がみられず , MTF は TSF の金属組成を忠実に再現している .

Fig. 4 は MTF と STF の XRD パターンを

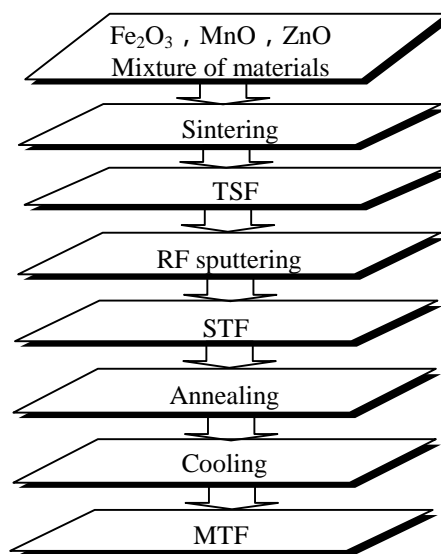


Fig. 1 Preparation profile of MTF .

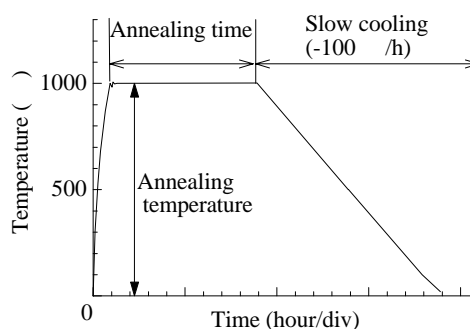


Fig. 2 Annealing profile.

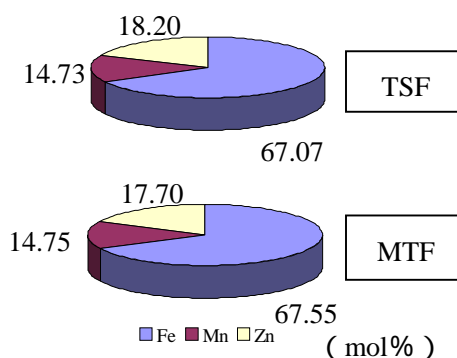


Fig. 3 Metal components of TSF and MTF.

示す．同図よりアニーリング処理を行わない STF はピークが現れず 非晶質を示すが，MTF は (220)，(311)，(400)，(440) 面でピーク値が見られ，これらのピーク値より MTF はスピネル構造を有していることが分かる．

Fig. 5 は MTF (試料 1) の磁化ループの温度依存性を示す．同図より，MTF の飽和磁化は，試料温度が 0 のとき 195 emu/cm^3 を示すが，温度の上昇に伴って減少し，30 では 75 emu/cm^3 ，60 になると 7 emu/cm^3 まで低下することがわかる．0 と 60 の飽和磁化の比は 0.04 となり，顕著な温度依存性を有する．

Fig. 6 はキュリー温度の異なる 2 種の MTF 試料の飽和磁化の温度特性を示す．両試料は，いずれも温度の上昇により飽和磁化が減少する傾向が見られる．試料 2 の場合，0 で 150 emu/cm^3 の飽和磁化は 30 で 48 emu/cm^3 へと低下し，50 ではほとんど消失する．1 当りの磁化の変化量 M_s は約 2.2 emu/cm^3 であった．

3 . 代謝物センサシステムの構成

MTF の応用として，酵素反応における微小温度変化を検知する代謝物センサシステムを構成した．酵素反応は定常，定温・定圧下で行われ，その大部分は熱変化，すなわちエンタルピー変化を伴う．この熱変化を測定装置で検出できれば，容易に反応系物質を定量できる．また，多成分系であっても酵素を受容体として用いることで，その厳密な反応特異性から，特定の分子やイオンを選択的に識別できる．

Fig. 7 は代謝物センサ MS の測定原理を示す．MTF 下部に磁気抵抗素子 MR と永久

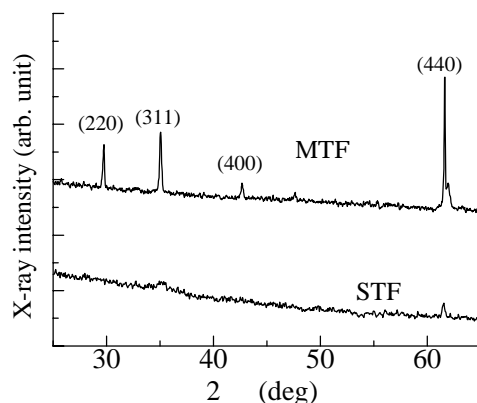


Fig. 4 XRD patterns of STF and MTF.

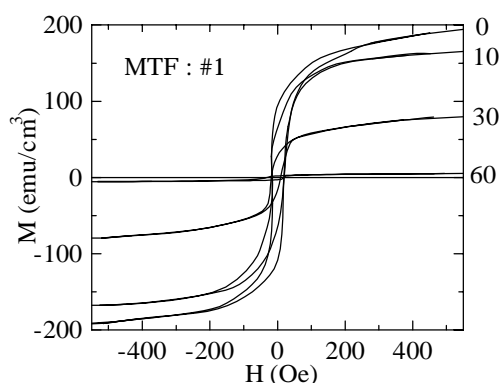


Fig. 5 Magnetization loop of MTF (#1) with temperature change.

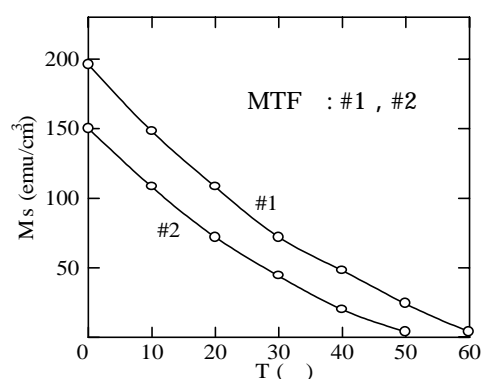


Fig. 6 Temperature dependence on saturation magnetization M_s of MTFs, #1 and #2.

磁石 MG を配置し，MTF - MR - MG - MR - MTF なる磁気ループを構成する．MTF 上

に基質（試料）をのせ、上部の注入器から酵素を滴下すると、両者が混合して酵素反応が起こり発熱する。この発熱により MTF の温度が上昇して磁気特性を変える。この変化は磁気ループ内の磁束を変化させるため、MR の抵抗の変化として読み出すことができる。

基質と水が関与する反応系における熱変化量を Q とすれば、 Q は次式で与えられる。

$$Q = C_s \times T = -n_p \times H \quad (1)$$

ただし、 C_s は熱容量、 T は温度変化、 n_p はモル数、 H はエンタルピー変化量である。

したがって、反応系の温度変化 T は

$$T = -n_p \times H / C_s \quad (2)$$

となる。よって T を測定すれば、特定成分の濃度を求めることができる。酵素反応時の温度変化 T は $10^{-1} \sim 10^{-3}$ オーダーの微小熱であるため、この熱を検出するため高感度の温度センサが必要となる。そこで、MTF の磁気の感温特性と酵素の触媒作用を利用すると、代謝物センサシステムを構成することができる。

Fig. 8 は、MS を用いた代謝物センサシステムを示す。試料水溶液を試験管に入れ、この中に MS を設置する。なお、防水のため、MS はエポキシ樹脂でコーティングを施した。試験管は、外部からの熱的干渉が少なくなるように、水を入れたビーカー（容量 50 ml）内部に設置し、さらに全体を一定温度（35℃）に保たれた恒温槽（縦 550 mm、横 550 mm、高さ 800 mm）内に配置した。酵素水溶液が入る注入器は、試験管の上方に設置した。

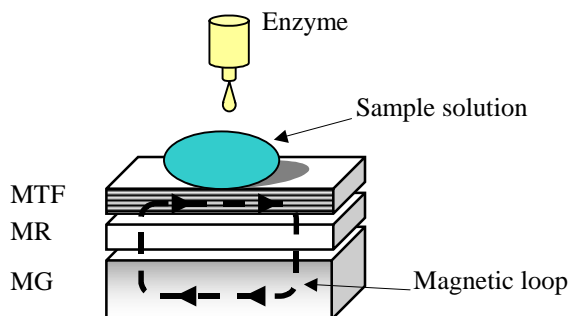


Fig. 7 Principle of metabolite sensor MS utilizing MTF.

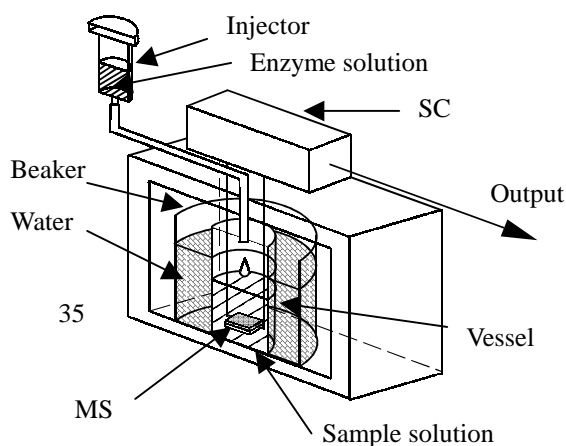


Fig. 8 Metabolite sensor system utilizing MS.

酵素水溶液を注入すると、試験管の試料溶液と反応してエンタルピー変化を生じ、MS で MTF の磁性の変化は MR の抵抗の変化となって現れる。抵抗値の変化は信号変換回路 SC（ブリッジ回路と増幅回路）に導かれ電気信号に変換され電圧として出力される。なお、ブリッジ回路の印加電圧は 0.2 V である。

Fig.9 は、精製水（5 ml）に対してペニシリナーゼ酵素溶液（0.01 wt%、0.5 ml）を滴下した場合の応答特性である。同図より、精製水へ酵素溶液を滴下した場合には、エンタルピー変化を伴わないことから、本システムは応答を示さないことが分かる。

次に酵素反応によるエンタルピー変化を伴う場合についての応答を、酵素としてペニシリナーゼ (0.01 wt% , 0.5 ml) , 反応基質としてペニシリン GK (5 ml) を用いて測定を行った。この反応式は次式で与えられる。また、この反応系のエンタルピー変化 H は -67.0 kJ/mol である。



Fig.10 は、ペニシリン GK 溶液の濃度をパラメータとして、ペニシリナーゼ酵素溶液を滴下した場合の応答特性である。同図より、ペニシリン GK 溶液の濃度が高くなるに従って、出力電圧のピーク値も増大することがわかる。また、いずれの濃度においても、パルス状出力電圧発生後、次第に元の値に戻ることから、本システムが酵素反応熱のみを検知していることが分かる。

Fig.11 は、ペニシリン GK 濃度と出力電圧のピーク値との関係を示す。同図より、濃度と出力電圧のピーク値との間に良好な直線関係が得られた。よってこれを検量線として、出力電圧のピーク値から被測定物質の定量が可能であることが示された。

Fig.12 はペニシリン GK (5 ml , $0.5 \times 10^{-2} \text{ mol/l}$) に対するペニシリナーゼ酵素とオキシターゼ酵素 (各 0.5 ml , 0.01 wt%) の反応の応答特性を示す。まず、ペニシリン GK 溶液にペニシリナーゼ酵素を滴下すると、先程と同様にパルス電圧 (7.4 mV) が発生する。続いてオキシターゼ酵素溶液を滴下すると、応答は得られない。すなわち、ペニシリン GK はペニシリナーゼに対しては鋭敏に反応するが、オキシターゼには全く反応しないことが分かる。

また、Fig.13 は D-グルコース (5 ml , 0.5

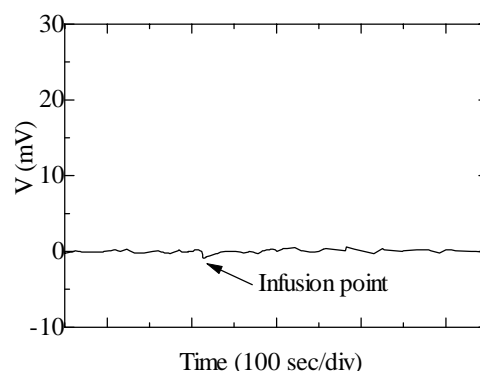


Fig.9 Transient response of distilled water to penicillinase enzyme solution.

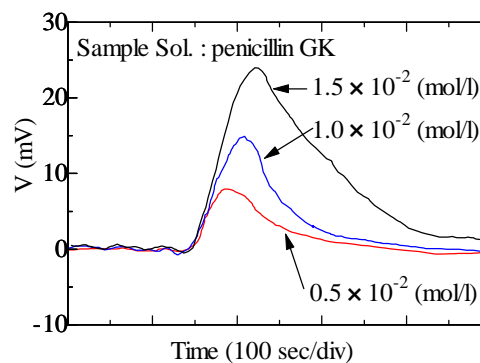


Fig.10 Transient response of penicillin GK to penicillinase enzyme solution.

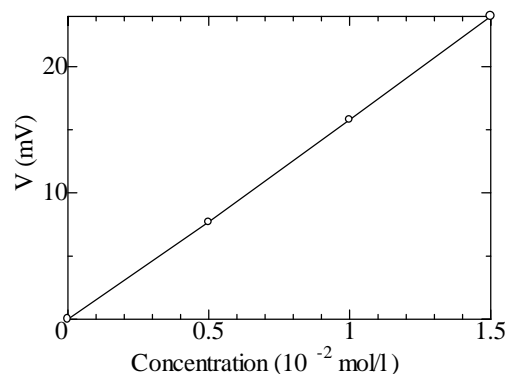


Fig.11 Dependence of the peak value on the concentration of penicillin GK .

$\times 10^{-2} \text{ mol/l}$) に対して前図と同様に、最初にペニシリナーゼ、次にオキシターゼ (各 0.5 ml , 0.01 wt%) の順で酵素を滴下した場

合の応答特性である。同図より、D-グルコースはペニシリンナーゼに対しては全く反応しないが、オキシターゼには鋭敏に反応し、22.3 mV の出力電圧のピーク値を示すことがわかる。これらの結果から、本システムは、各基質が特定の酵素のみに応答し、他の酵素には応答しないという厳密な反応特異性を再現することがわかる。

以上より、MTF を用いた代謝物センサMSは、被測定物質に対し、特定の酵素に反応して発熱し、鋭いパルス電圧を発生させ、そのピーク値は、試料や酵素の種類そして濃度によって、種々変化することが分かった。

4. 結言

以上、スパッタ法による磁性薄膜 MTF の作製と、MTF を用いた代謝物センサシステムの構成及び基礎特性について報告した。

MTF は、感温フェライトをターゲットとし、シリコン基板上に RF スパッタリングした薄膜に、アニーリング処理を施すことで作製される。MTF の磁性は顕著な温度依存性を有し、温度が上昇すると磁化が減少する傾向を示し、高感度温度センサとしての機能を有している。

MTF の応用として酵素反応熱を検知する代謝物センサシステムを構成し、滴下法により各種の試料に対して酵素反応試験を試みたところ、各反応熱に応じたパルス状電圧が得られた。パルス状電圧のピーク値は測定物質の濃度に依存しており、濃度が高いほどパルスのピーク値が大きくなった。従来の代謝物センサとしてサーミスタの電気特性を用いたものが知られているが、本方式は熱による磁気特性の変化を利用した

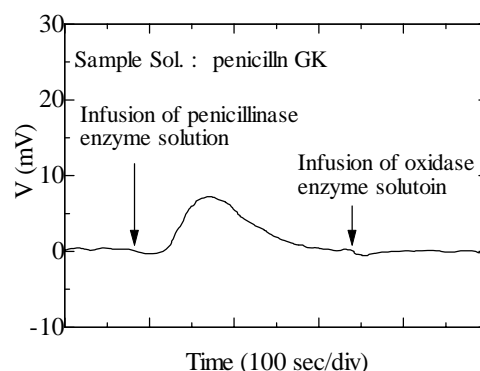


Fig.12 Transient response of penicillinGK to penicillinase and oxidase enzyme solution.

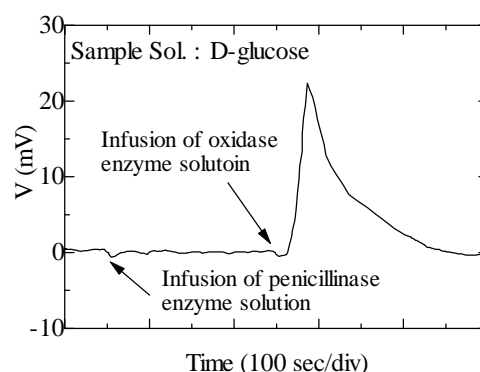


Fig.13 Transient response of D-glucose to penicillinase and oxidase enzyme solution.

ものであり、今後の展開が期待できる。

参考文献

- (1) 二木：“感温半導体”，産報出版（1988）
- (2) B. Danielsson: "The Enzyme Thermistor", Applied Biochemistry and Biochemistry, 7, 127-134 (1982)
- (3) 長田, 安宍, 菊池, 田山, 関, 菊地, “感温磁性薄膜センサの作製と基礎特性”, 日本応用磁気学会誌 20 2, pp. 565-568 (1996)
- (4) 石井, 安宍, 島津, 長田, 千葉, 菊池, 関, “スパッタ法による感温磁性薄膜の作製と特性評価”, 計測自動制御学会東北支部第 160 回研究集会, 160-5 (1996)
- (5) 安宍, 長田, 千葉, 田山, 関, “感温磁性薄膜センサの磁気特性とその熱処理効果”, 第 21 回日本応用磁気学会学術講演会, 2aE-12 (1997)