

金属酸化物薄膜を用いた熱型バイオセンサの 酵素反応特性

Enzyme Reaction Characteristics of Thermal Biosensor Utilizing Metal Oxide Thin Film

伊藤 清隆, 谷地 善光, 久保田 恒夫, 徳田 春男,
千葉 茂樹, 長田 洋, 関 享士郎

Kiyotaka ITOU, Yoshimitsu YACHI, Tuneo KUBOTA, Haruo TOKUTA,
Shigeki CHIBA, Hiroshi OSADA and Kyoshiro SEKI

岩手大学

Iwate University

キーワード：金属酸化物薄膜 (metal oxide thin-film), 真空蒸着法 (vacuum deposition method)
バイオセンサ (biosensor), 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, 生体化学分野への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. エレクトロニクス技術は, 主にトランジューサー部に用いられ, 測温素子としてはサ - ミスタ薄膜が広く実用化されている.

本研究では, 真空蒸着法を用いて比較的融点の低い金属 (Fe, Ni, Mn 等) の多層膜を形成後, 高温でアニーリング処理を施して金属酸化物に転換する薄膜作製方法を開発した. 本方式では, アニーリング処理前後の金属成分比に大きな変化が見られず良

好な再現性が得られる. この方法を用いて作製した金属酸化物薄膜 MOT (Metal Oxide Thin-Film) は, 温度変化に伴い著しく抵抗値が変化する半導体特性を有しており, $10^{-2} \sim 10^{-3}$ の微小な温度変化を計測する高感度温度センサとして活用できる. ここでは MOT の作製と, その応用として酵素反応熱に伴う発生熱を用いて生体物質を計測するバイオセンサシステムの構成について報告する.

2. MOT の作製と基礎特性

MOT の主原料としては、比較的融点が低く、サーミスタの主原料にもなっている Fe, Ni, Mn, を使用した。

図 1 に MOT の作製工程を示す。まず、基板上に Fe, Ni, Mn, を蒸着させて 3 層の金属多層膜 MMF (Metal Multilayered Film) を形成する。真空蒸着装置を用いて MMF の膜厚が約 1.0 μm 程度となるように、各層を抵抗加熱法により蒸着した。なお、重量成分比は、Fe : Ni : Mn = 1 : 2 : 3 となるように調整した。基板は熱処理に耐える耐熱性があり、かつ、試料に電気的な影響を与えないアルミナ基板を用いた。次いで、電気炉にてアニーリング処理を行った後、両端に銀電極を蒸着し MOT が作製される。アニーリング工程は電気炉にて大気中で、昇温 (30 分)、温度保持 (温度 : 1000 , 時間 : 30 分)、冷却 (9 時間) というプロセスで行った。温度上昇後の最高温度での定温保持工程において、Fe, Ni, Mn の各金属層は、固溶体となり炉内の酸素と結合して金属酸化物に転換する。冷却工程は薄膜にクラックが生じる危険性を回避するため、徐冷 (冷却時間を約 9 時間) とした。

図 2 は、それぞれ MMF と MOT の金属の重量成分比を示す。MMF と MOT に含まれる各種金属 (Fe, Ni, Mn) の重量成分 (wt%) は、それぞれ (16.7, 33.5, 49.8), (17.4, 33.3, 49.3) となっている。MMF と MOT の成分比はほぼ同じ割合となり、アニーリングによる Ni や Mn の飛散がなく、MOT は MMF の組成を忠実に再現していることが分かる。

図 3 は MOT の形状を示す。アルミナ基板 (5 mm \times 10 mm, 厚さ 0.5 mm) の上に 1.0 μm の金属膜が蒸着されており、その両端に銀電極が設置されている。同図に示すように、電極の設置パターンを横型と縦型とし、電極間距離 L の異なる数種類の MOT を作製した。

図 4 は MOT の基礎特性として、電気抵抗

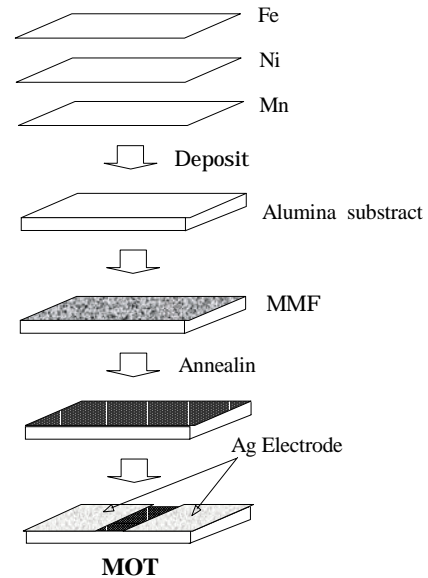


図 1 MOT の作製工程

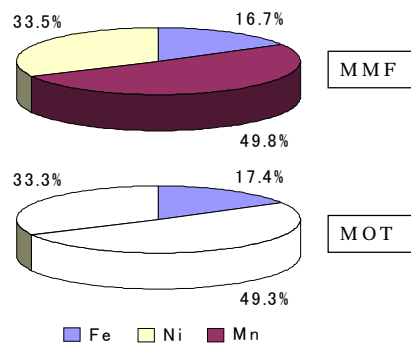


図 2 MMF と MOT の金属成分比

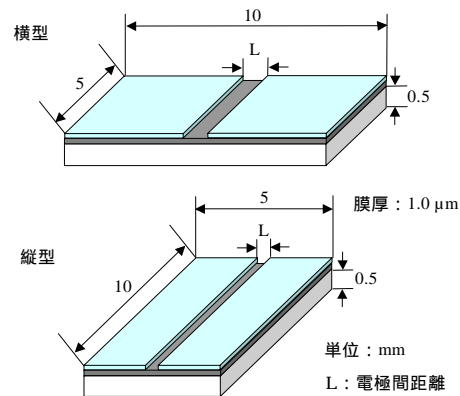


図 3 MOT の形状

の温度特性を測定した結果である。形状 (横型, 縦型), 電極間距離 (1, 0.5 mm) の違いが電気抵抗へ及ぼす影響を検討した。同図より、すべての試料において MOT の抵抗は温

度上昇に伴い減少する傾向が見られる。なお、MOT の抵抗 - 温度特性は、試料を恒温槽内に設置し、槽内の温度を 0 ~ 80 まで変化させたときの抵抗変化をデジタルマルチメータにより計測した。MOT の抵抗と温度の関係は、サーミスタと同様に下式のように表すことができる。

$$R = R_0 e^{B/T} \dots (1)$$

ここで、 R_0 と B は定数、 T は温度である。 B は感温デバイスの性能を表すサーミスタ定数である。上式から、 R は温度依存性を有し、温度が上昇すると低下することが伺われる。MOT の抵抗 - 温度特性の測定結果から算出した結果、 B 定数は約 3600 ~ 3700 K 程度であった。この値は一般のサーミスタとほぼ同等である。また、 B 定数は形状や電極間距離によらずにほとんど変化が見られないが、抵抗値は形状および電極間距離により大きく異なり、電極間距離が短くなるほど、また横型より縦型の方が小さな値を示す。

3. MOT のバイオセンサへの応用

MOT 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熱型バイオ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（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、受容体として酵素を使用することにより、多成分系であっても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。

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。

$$Q = C_s \times T = -n_p \times H \dots (2)$$

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。

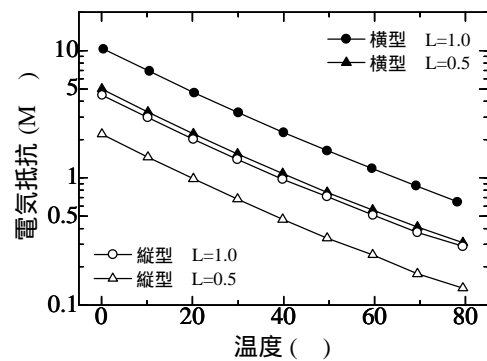


図4 抵抗の温度依存性

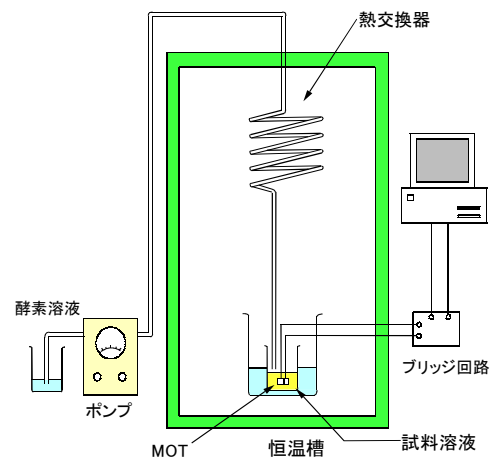


図5 熱型バイオセンサシステムの構成

したがって反応系の温度変化 T は、

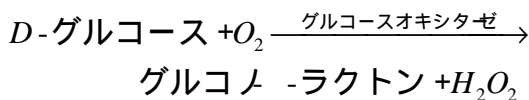
$$T = -n_p \times H / C_s \dots (3)$$

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が、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、この熱を検出するには高感度の熱計測デバイスが必要となる。MOT の電気抵抗は、著しい温度依存性を有しており、微小な温度変化に対して鋭敏に反応するため、酵素反応熱計測デバイスとして応用が可能である。

図5は、MOT を用いた熱型バイオセンサシステムを示す。試料溶液をビーカー（容量 10 ml）に入れ、この中心に MOT を設置する。酵素溶液をマイクロチューブポンプにより一

定の速度と量で注入するとピーカ内で酵素反応が起こり、反応熱が発生する。この酵素反応熱による MOT の抵抗値変化をブリッジ回路により電気信号変化へと変換して出力する。ブリッジ回路の印加電圧は 2 V である。MOT はノイズ等を考慮し、抵抗値の一番低い形状のもの（縦型、電極間距離 0.5 mm）を用いた。なお、MOT の保護のためエポキシ系樹脂でコーティングを施した。また、反応熱が微少であることから、外部からの熱的干渉を抑えるため、試料の入ったビーカーをウォータージャケット（水の入ったビーカー、容量 50 ml）内部に設置し、さらに全体を一定温度（35℃）に保たれた恒温槽内に配置した。

図 6 は、精製水および被測定物質として D グルコース溶液（濃度： $1.0 \sim 3.0 \times 10^{-2}$ mol/l、容量：5 ml）を用い、グルコースオキシターゼ酵素溶液（0.1 wt%、0.5 ml）を滴下したときの出力電圧 V_o の特性を示す。また、これら 2 つの溶液の反応式は下式で表され、この反応系のエンタルピー変化 H は -80.0 kJ/mol 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ため、本システムは応答を示さないことが分かる。また、濃度が高くなるに従って、出力電圧のピーク値も増大し、8.2 mV、15.9 mV、23.8 mV の値を示した。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。

図 7 は、D グルコースの濃度と出力電圧のピーク値 V_p 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。したがって、同図を検量線として用いることで、出力電圧のピーク値

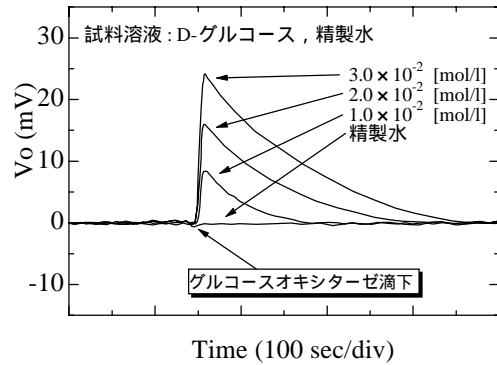


図 6 精製水，D - グルコースに対する応答特性

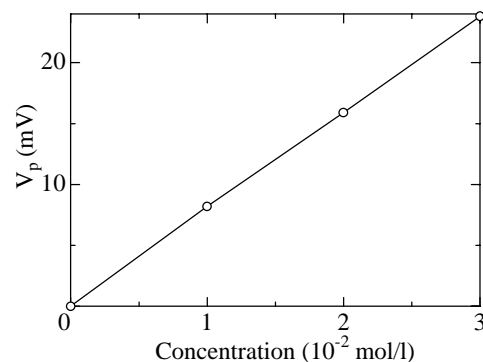


図 7 D - グルコースの濃度 - 出力特性

から被測定物質の定量が可能である。

図 8 は D グルコース溶液と過酸化水素水（各 1.0×10^{-2} mol/l、5 ml）にグルコースオキシターゼ酵素溶液とカタラーゼ酵素溶液（各 0.1 w%、0.5 ml）を滴下した際の応答を示す。

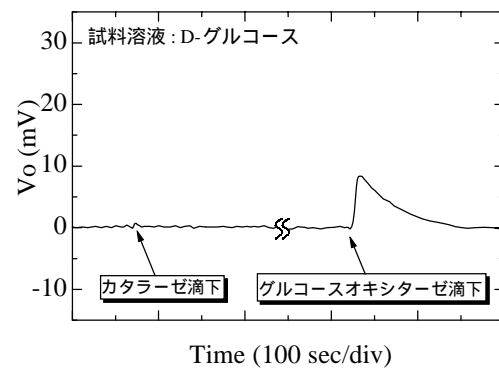
同図（a）は、D グルコース溶液にカタラーゼ、グルコースオキシターゼの順で酵素を滴下した場合の応答特性である。カタラーゼ（過酸化水素水と反応する酵素）を滴下すると、ほとんど応答が得られないが、グルコースオキシターゼを滴下すると、D グルコース溶液はグルコースオキシターゼ酵素に反応してピーク値が 8.2 mV のパルス電圧が発生する。

同図（b）は、過酸化水素水にカタラーゼ、グルコースオキシターゼの順で酵素を滴下した場合の応答特性である。過酸化水素水は、

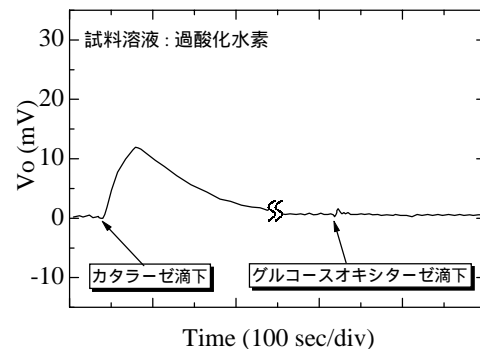
カタラーゼ酵素に反応して 11.9 mV のピーク値をもつパルス電圧を生ずるが、グルコースオキシターゼ酵素に対してはほとんど応答を示さないことが分かる。このように、試料溶液である基質は特定の酵素にのみ応答し、他の酵素には応答しないという鋭い選択性を有しているため、この現象を用いて各種の生体物質の識別が可能である。

図 9 は、D グルコース溶液と過酸化水素水 (各 1.0×10^{-2} mol/l) の混合溶液 (5 ml) にカタラーゼ、グルコースオキシターゼの順で酵素を滴下した場合の応答特性である。カタラーゼ酵素を滴下した場合、ピーク値が 11.8 mV のパルス電圧が発生し、図 (b) の波形とほぼ同じ応答が得られた。また、グルコースオキシターゼ酵素を滴下した場合、8.1 mV のパルス電圧が発生し、図 (a) の波形とほぼ同じ応答が得られた。これらの結果から、パルス電圧の大きさや反応時間 (過酸化水素とカタラーゼ酵素の反応は約 2 分、D グルコースとグルコースオキシターゼ酵素の反応は約 10 秒) による波形の違いにより、過酸化水素はカタラーゼ酵素にのみ応答し、D グルコースはグルコースオキシターゼ酵素にのみ応答するという、厳密な反応特異性を再現できることが分かる。

以上より、MOT を用いた熱型バイオセンサは、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、試料や酵素の種類や濃度によって種々変化することが分かった。また、基質は特定の酵素にのみ応答し、他の酵素には応答しないという鋭い選択性を有しているので、この現象を用いて各種の生体物質を識別できる。そこで、このことに着目し、酵素反応を論理的に表現する方法を検討した。図 10 は選択性を伴う酵素反応の論理的表現を示す。入力をグルコースオキシターゼ (Go) とカタラーゼ (Ca) とし、それぞれに反応する



(a)



(b)

図 8 基質による酵素の選択性

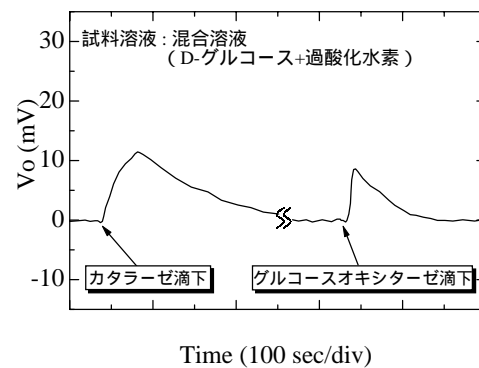


図 9 混合溶液に含まれる被測定物質の識別特性

D グルコース (Dg) と過酸化水素 (Hy) を図のように組み合わせた。入力はそれぞれの酵素を注入する場合を 1、しない場合を 0 とし、出力は反応する場合を 1、しない場合を 0 とした。酵素の選択性により、入力及び出力は ~ のように論理的に表現できる。したがって、図 10 に対応する論理回路をバイオセ

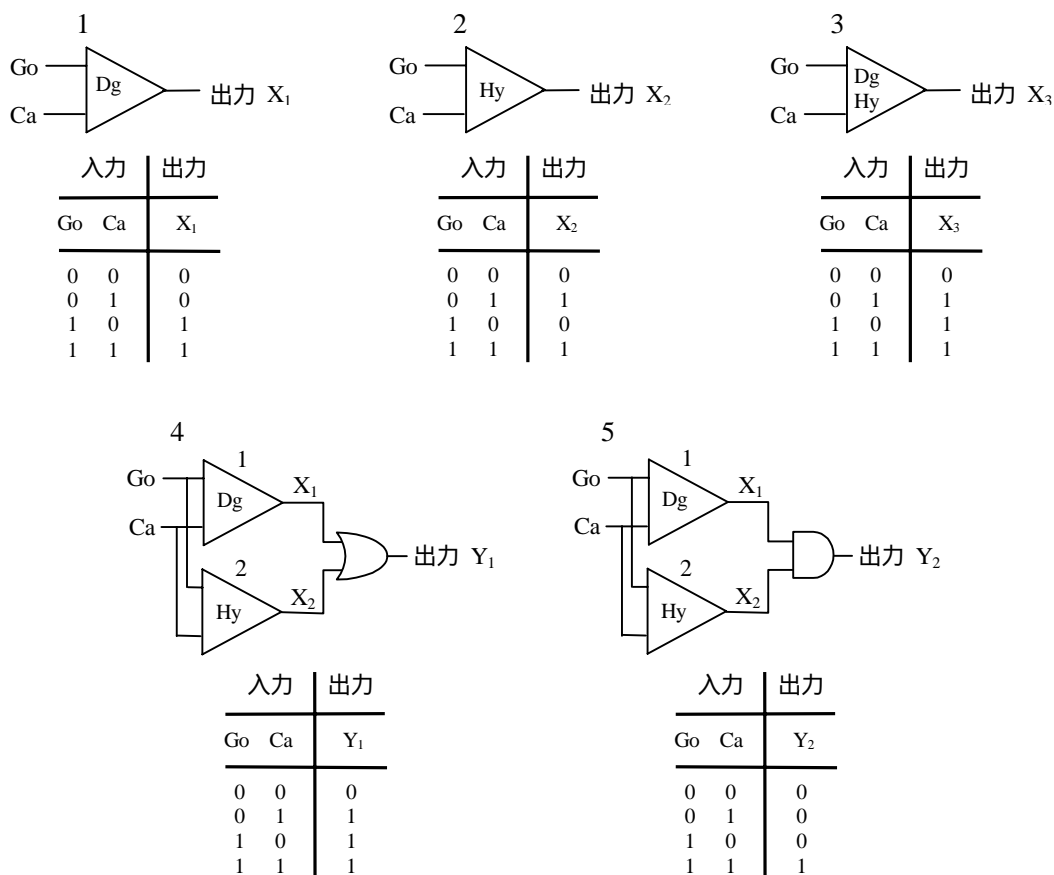


図 10 酵素反応の論理的表現

ンサに応用すると、生体物質の自動判別が可能であると思われる。

4. 結言

以上、真空蒸着法による金属酸化物薄膜 MOT の作製と、MOT を用いた熱型バイオセンサの酵素反応特性について報告した。

MOT は、Fe, Ni, Mn, の各粉末を順次アルミナ基板に蒸着した後、アニーリング処理を施すことにより作製される。MOT の抵抗は、顕著な温度依存性を有し、温度が上昇すると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。

MOT の応用として酵素反応熱を検知する熱型バイオセンサシステムを構成し、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、濃度が高いほどそのピーク値が大きくなった。また、酵素には厳密な選択性があるため、本システムでの被測定物質の識別が可能である。さらに選択性を伴う酵素反応の表現方法について検討したところ、論理的に表現することができた。

参考文献

- (1) 二木：“感温半導体”，産報出版（1988）
- (2) 軽部，民谷：「バイオエレクトロニクス」，朝倉書店（1994）
- (3) 谷地，長田，千葉，関，“TOF 高感度温度センサの作製と酵素反応熱検出への応用”，電子情報通信学会誌，Vol.J83-C No.9 pp.884-890（2000）
- (4) 柿崎，伊藤，谷地，徳田，千葉，長田，関，“磁性薄膜による代謝物センサの構成と基礎特性”，計測自動制御学会東北支部第 187 回研究集会，187-16（2000）