

感温金属酸化物薄膜を用いた酵素センサシステム Enzyme Sensor System Utilizing Temperature-Sensitive Metal Oxide Thin Film

○渋谷龍史, 谷地善光, 柿崎和毅, 久保田恒夫, 高橋政雄, 佐々木圭一, 長田 洋,
千葉茂樹, 関 享士郎

○Tatsushi SHIBUYA, Yoshimitsu YACHI, Kazutake KAKIZAKI, Tsuneco KUBOTA,
Masao TAKAHASHI, Keiichi SASAKI, Hiroshi OSADA, Shigeki CHIBA and Kyoshiro SEKI

岩手大学
Iwate University

キーワード: 金属酸化物 (metal oxide), 真空蒸着法 (vacuum deposition method), 酵
素センサ (enzyme sensor), サーミスタ (thermistor), 測温素子 (temperature
measuring element)

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

現在, サーミスタ¹⁾やバリスタ²⁾をはじめ多くの金属酸化物デバイスが開発され, 計測・制御, 電子回路などの分野で活用されている。それらの多くはバルクまたは厚膜に成形して使用されているが, その薄膜は材料である酸化物の融点が高いため, 作製が困難であり, また均一な組成のものが得られにくい。このような問題を解決するため, 筆者等は融点の低い金属を酸化する

と酸化物になるという特性に着目し, 鉄, ニッケル, マンガン等を真空蒸着法を用いて順次蒸着して多層膜を形成し, その後, 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方法を開発した。本方法では, アニーリング処理後の金属成分比に大きな変化がみられず良好な再現性が得られる。筆者らは, この方式を用いて感温金属酸化物薄膜 (Temperature-Sensitive Metal Oxide Thin-Film: TMT) を試作した^{3),4)}。TMT の膜厚は約 1.0 μm であり, その抵抗は著

しい温度依存性を有しており、 $10^{-2} \sim 10^{-4}^{\circ}\text{C}$ の微小な温度変化を測定する高感度温度センサとして活用できる。ここでは、TMTの作製方法と、その応用として酵素反応熱を利用して生体物質を感知する酵素センサシステムに関して報告する。

2. TMT の作製方法と基礎特性

TMT は金属薄膜を酸化物に転換させた複合膜である。本研究では、複数の金属を順次蒸着し、次いで、これらの膜を高温でアニーリング処理を施し酸化させ、半導体に転換させる方法を検討した。金属酸化物薄膜を作製するには、他に金属酸化物粉末を融点以上の高温で加熱して蒸着させるフラッシュ法等があるが、材料の組成と薄膜の組成にばらつきが生じる等の欠点があった。本方法では、これらのばらつきは比較的良好に押さえることができる。

図1はTMTの作製工程を示す。薄膜の作製は、抵抗加熱法による真空蒸着で行った。基板を真空蒸着装置の上方に設置する。基板は耐熱性があり、かつ、試料に対する電気的影響が少ないアルミナ基板を用いた。まず、Ni, Mn, Feを所望の金属成分比 (Ni : Mn : Fe = 2 : 3 : 1) に応じた膜厚となるように、通電電流や蒸着時間を制御して基板上に順次蒸着する。蒸着時の真空度は 3.0×10^{-5} Torrとした。次いで、電気炉にて、空気雰囲気中でアニーリング処理を行い、両端に電極を蒸着しTMTが作製される。

図2は、アニーリング工程の温度プロファイルを示す。アニーリング工程は温度上昇、定温保持および冷却のプロセスで行わ

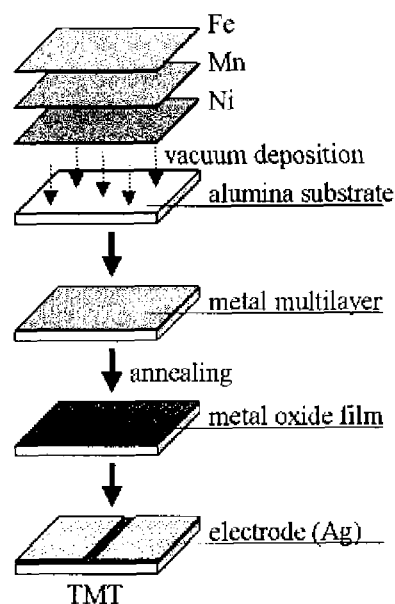


図1 TMTの作製工程
Fig. 1 Preparation process of TMT.

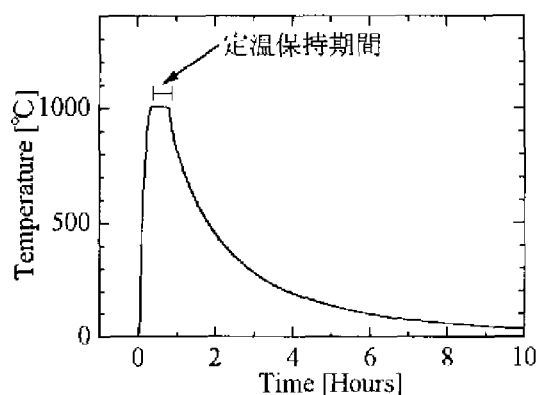


図2 アニーリング工程
Fig. 2 Annealing profile of TMT.

れる。ここで、温度上昇を経て、最高温度の定温保持の工程でNi, Mn, Feの金属膜は固溶体となり、炉内の酸素と結合して金属酸化物に転換する。冷却工程では薄膜にクラックが生じる危険性があるため、冷却時間を約8時間とした。

図3は定温保持温度および時間をそれぞれ 1000°C , 30分としたTMTの金属成分の定量分析結果を示す。同図より、Ni, Mn, Feの金属重量成分比は33 : 50 : 17であり、ほぼ蒸着時の金属成分比を保っている。

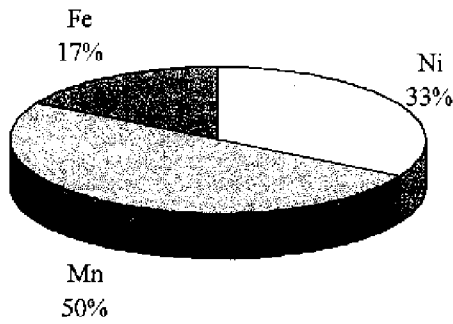


図3 TMTの金属成分比
Fig. 3 Metal components of TMT.

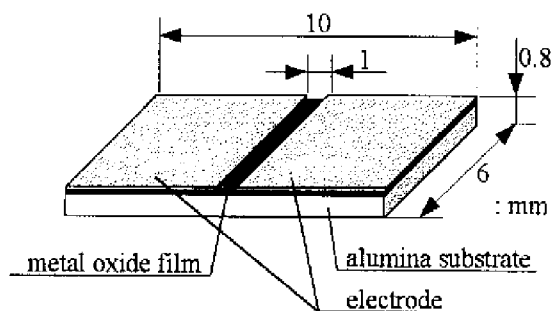


図4 TMTの外形
Fig. 4 Shape of TMT.

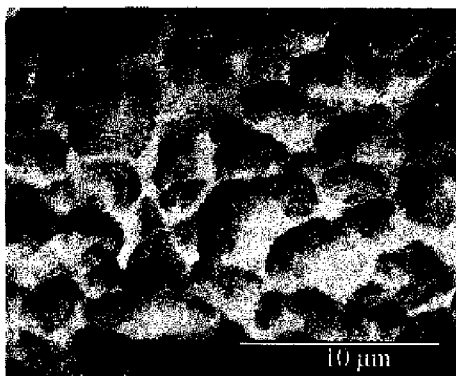


図5 TMTの表面
Fig. 5 Magnified surface of TMT.

図4はTMTの外形を示す。アルミナ基板（縦：6 mm，横：10 mm，厚さ0.8 mm）上に1.0 μmの金属酸化膜が形成されており，その膜上に電極（Ag）が設置されている。

図5は，TMTの表面拡大写真である。粒子が緻密に結合されていることがわかる。また，冷却に時間をかけているためク

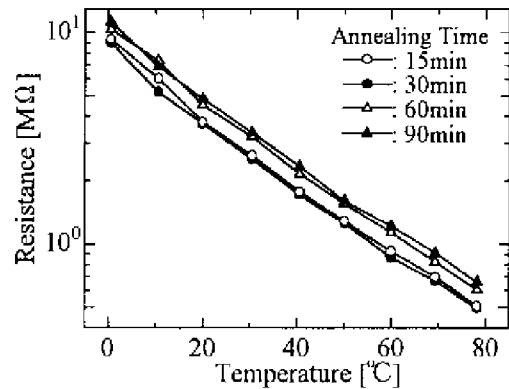


図6 アニール時間が異なるTMTの抵抗の温度特性

Fig. 6 Temperature dependence on the resistance of TMT with annealing time.

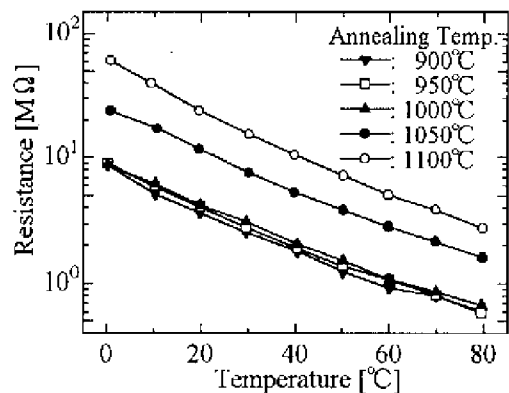


図7 アニール温度が異なるTMTの抵抗の温度特性

Fig. 7 Temperature dependence on the resistance of TMT with annealing temperature.

ラックは生じていない。

図6および7は，それぞれアニール工程における定温保持期間の時間および温度を変えた場合のTMTの抵抗の温度依存性を示す。両図より，いずれの条件においても，TMTの抵抗は温度の上昇に伴い減少する傾向を示し，著しい温度依存性を有しており，サーミスタの特性に類似した半導体特性を示すことが分かる。アニール時間を15分～90分と変化させた場合，30分を境に長くなるに伴い，全体的に抵

抗値が高くなる傾向を示した。また、TMTの抵抗はアニリング温度が1000℃まではほとんど同じ特性を示すが、それ以上においてはアニリング温度が高いほど抵抗が大きくなる傾向が明確に現れている。

TMTの抵抗 R はサーミスタ同様、次式で表せる。

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

ただし、 R_0 と B は定数、 T は温度である。

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。また、温度係数 α は下式で示される。

$$\alpha = \frac{1}{R} \frac{dR}{dT} \dots\dots\dots (2)$$

式(2)を用いてTMTの温度係数 α を計算すると約-4.9%となり、一般的に使用されているサーミスタと同等かそれ以上である。また、TMTは、ビード型サーミスタ等と比べ、熱容量が小さく、温度依存性が極めて大きいという特徴を有する。

3. TMTの酵素センサへの応用

酵素センサは $10^{-2} \sim 10^{-4}^{\circ}\text{C}$ という微小な温度変化をとらえ、試料中の特定酵素成分を計測するバイオセンサである。酵素反応は定常、定温、定圧下で行われ、その大部分は発熱変化を伴う。この熱変化を簡易な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。多成分系であっても、酵素を受容体として用いることで、特定の分子やイオンを選択的に識別できる。

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⁸⁾。

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

ただし、 C_s は熱容量、 ΔT は温度変化、 n_p

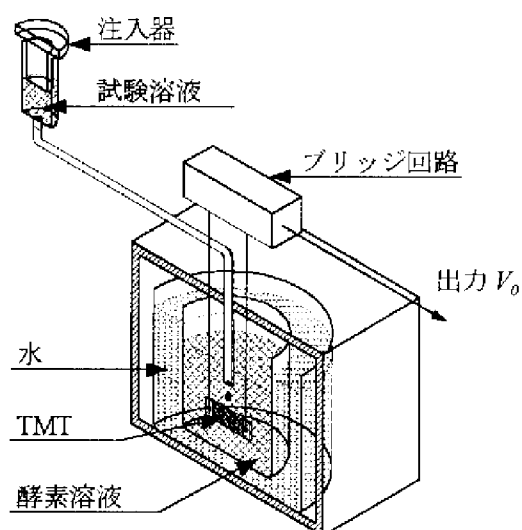


図8 TMTを用いた酵素センサシステム
Fig. 8 Enzyme sensor system utilizing TMT.

はモル数、 ΔH 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 ΔT を測定すれば、特定成分の濃度を求めることができることから、TMTの抵抗の感温特性と酵素の触媒作用を利用した酵素センサも構成を検討した。

図8はTMTを用いた酵素センサシステムの構成を示す。被試験物(試験溶液)を入れた試験管中にTMTを浸し、酵素または精製水を注入器により試験管内に注入すると試験管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TMT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。TMTはノイズ等を考慮し、抵抗の線形性及び安定性の面で優れていた定温保持温度および時間をそれぞれ1000℃、30分としたものを用いた。また、TMT表面の保護のため、エポキシ系樹脂でコーティングを行った。また、反応熱が微少であることから、外部からの熱の影響を抑えるため、試験管は水の入ったビーカーに入れ、全体を恒温槽内に

設置し温度を一定 (35°C) に保持した。

図 9 は、カタラーゼ酵素溶液 (容積: 10 ml, 濃度: 10 mg/ml) 中に試験溶液である過酸化水素水 (容積: 0.1 ml, 濃度: 0~5%) を滴下した場合の本システムの応答特性を示す。出力 V_o は、試験溶液濃度が 0% (精製水) の場合は応答をほとんど示さないが、それ以外の濃度においては過酸化水素を滴下してから約 150 秒後から立ち上がり、300~350 秒後にピーク値を示す。また、ピーク値の大きさは試験溶液濃度に比例し、濃度が高くなるほど大きな値を示した。

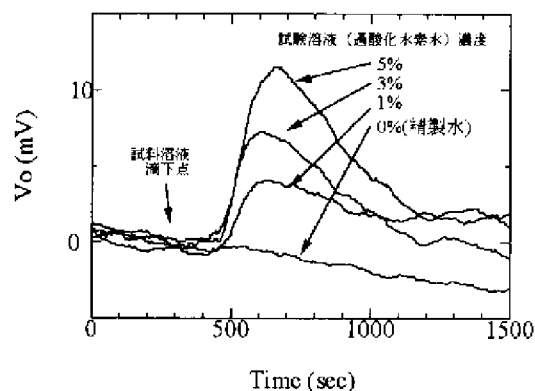


図 9 カタラーゼ-過酸化水素水に対する酵素センサシステムの過渡応答特性
Fig. 9 Transient response of enzyme sensor system to catalase - hydrogen peroxide.

図 10 は、ウレアーゼ酵素溶液 (容積: 10 ml, 濃度: 10 mg/ml) 中へ尿素溶液 (容積: 0.1 ml, 濃度: 0~50 mg/ml) を滴下した場合の応答を示すが、過酸化水素水とカタラーゼ酵素との試験結果と同様に、試験溶液濃度が 0 mg/ml (精製水) の時には出力 V_o に大きな変化が見られなかったのに対し、濃度が増すにつれて、 V_o が大きくなる傾向が見られた。

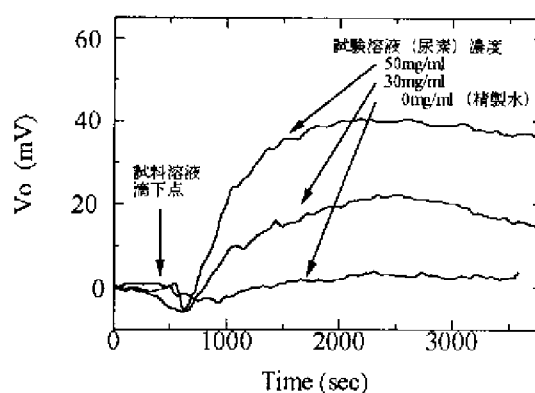


図 10 ウレアーゼ-尿素に対する酵素センサシステムの過渡応答特性
Fig. 10 Transient response of enzyme sensor system to urease - urea.

図 11 は、ウレアーゼ酵素溶液 (容積: 10 ml, 濃度: 10 mg/ml) 中へ尿素溶液 (容積: 0.1 ml, 濃度: 30, 50 mg/ml) 単独、および尿素溶液 (容積: 0.1 ml, 濃度: 30 mg/ml) と過酸化水素水 (容積: 0.1 ml, 濃度: 3%) との混合溶液を滴下した場合の応答を示す。同図より、酵素溶液中へ混合溶液を滴下した場合の出力 V_o は、そのピーク値や過渡応答の波形等が同濃度の尿素溶液に滴下した場合の応答と近い応答特性を示し、混合溶液に対しても物質の特定と濃度計測が可能であることが分かる。

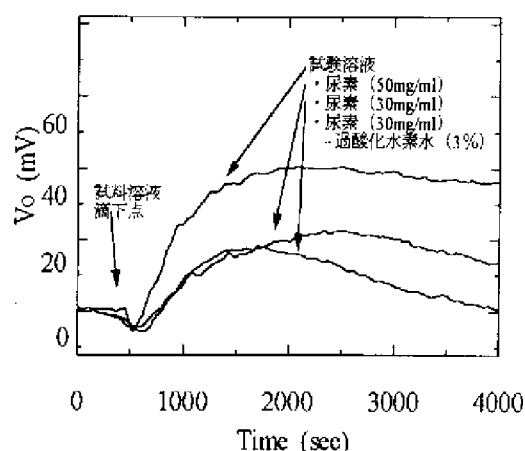


図 11 ウレアーゼ-尿素, 過酸化水素水に対する酵素センサシステムの過渡応答特性
Fig. 11 Transient response of enzyme sensor system to urease - urea, hydrogen peroxide.

以上から、TMT は酵素反応熱を検出しており、かつその濃度に応じた抵抗値変化

を示すことが分かった。

4. 結言

以上、真空蒸着法による感温金属酸化物薄膜 TMT の作製と酵素センサへの応用について報告した。

TMT は、Ni, Mn, Fe 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。TMT 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、サーミスタと同等の特性を有する。本研究で作製した薄膜は再現性が良く、蒸着時間等を調整することにより所望の膜厚に成形することができる。また、TMT の応用として熱型の酵素センサシステムを構成し、酵素反応を測定したところ、発熱反応による TMT の抵抗変化に伴う出力電圧が得られ、そのピーク値は試験溶液の濃度に依存し、濃度が多い程値が大きくなることが分かった。また混合溶液に対しても物質の特定と濃度計測が可能であることが分かった。従来の熱型酵素センサとしてビードサーミスタを用いたものが知られているが、TMT は薄膜であるため、ビード型に比べて熱容量が小さく、より分解能を挙げられることが期待できる。

参考文献

- 1) 二木久夫：「感温度半導体」，産報出版（昭 63）
- 2) 加藤禎彦：「セラミック半導体」，技研，111~123（昭和 63）
- 3) 菊池隆之，築瀬 仁，横田博久，千葉茂樹，長田 洋，関 享士郎，菊地新喜：「金属複合膜の作製とバイオセンサへの応用」電気関係

学会東北支部連大 2G7（平成 8-8）

- 4) 安永善史，長田 洋，石井 修，島津誠一，千葉茂樹，関 享士郎，古田豊彦：「スパッタ法による感温磁性薄膜の作製と特性評価」，電気学会マグネティックス研究会（平成 8-10）
- 5) G. Decristoforo, B. Danielsson: "Flow Injection Analysis with Enzyme Thermistor Detector for Automated Determination of β -Lactams, Anal. Chem. 56, 263-268 (1984)
- 6) K. Mosbach, B. Danielsson: "Thermal Bioanalyzers in Flow Streams Enzyme Thermistor Devices, Anal. Chem. 53, 1, 83A-86A(1981)
- 7) B. Danielsson: "The Enzyme Thermistor", Applied Biochemistry and Biotechnology, 7, 127-134 (1982)
- 8) K. Mosbach, 佐藤生男：「酵素サーミスタ」，蛋白質核酸酵素，30, 4, 285-298 (1985)