

金属酸化物薄膜を用いた代謝物センサの構成

Construction of Metabolite Sensor Utilizing Metal Oxide Thin-Film

谷地 善光, 千葉 茂樹, 長田 洋, 関 享士郎

Yoshimitsu YACHI, 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)

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

長田 洋, Tel.: 019(621)6381, Fax.: 019(621)6381, E-mail: osada@dragon.elc.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, 主にトランジスタ部に用いられ, 測温素子としてはサーミスタ薄膜が広く実用化されている。しかし, サーミスタ薄膜の作製はスパッタ法によるものであり, 真空蒸着法による金属酸化物薄膜の作製は, 金属酸化物の融点が高いことや, 金属酸化物の蒸着量の制御が困難なため, 均一のもので得られ難く, これまでほとんど検討されていなかった。

そこで本研究では, 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 MOT をセンサとして用いて酵素反応熱により科学物質を識別, 定量する代謝物センサシステムを構成した。また, 酵素反応に対応した論理回路的シミュレーションを行って, 代謝メカニズムの解析を試みた。

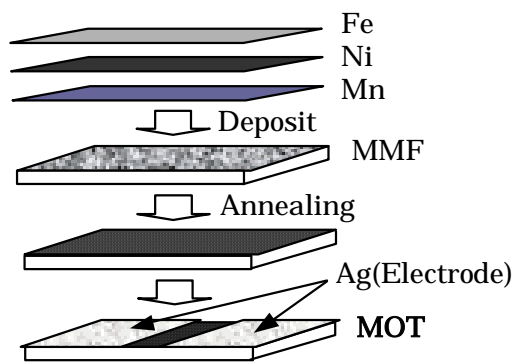


図 1 MOT の作製工程

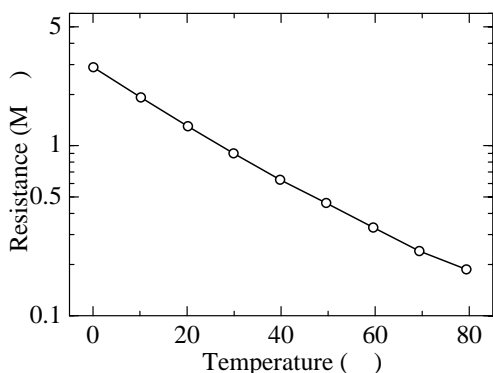


図 2 MOT の抵抗 - 温度特性

2. MOT の作製と基礎特性

図 1 に MOT の作製工程を示す 基板上に金属多層膜 MMF (Metal Multilayered Film) を形成する。なお, MOT は, サーミスタの主原料を参考にして, Fe, Ni, Mn からなる 3 層の金属多層膜とした。

真空蒸着装置を用いて MMF の膜厚が約 1.0 μm 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すると MOT が作製される。なお, アニーリング処理は,

雰囲気大気とした電気炉により大気雰囲気中で, 昇温 (30 分), 温度保持 (温度: 1000 $^{\circ}\text{C}$, 時間: 30 分), 冷却 (9 時間) のプロセスで行った。アニーリング処理における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, MOT の電気抵抗の温度特性を示す。同図より, MOT の抵抗は温度上昇に伴い減少する傾向が見られ, 顕著な温度依存性を有することがわかる。

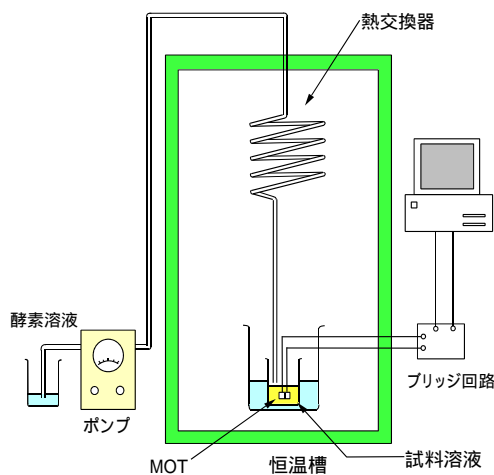


図 3 代謝物センサの構成

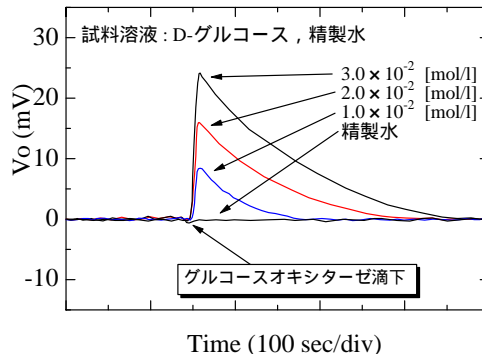


図 4 精製水および D-グルコースに対する応答特性

3. 代謝物センサの酵素反応特性

図3は, MOT を用いた代謝物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, ビーカー内で酵素反応が起こり, 反応熱が発生する. この酵素反応熱を MOT で検出し, ブリッジ回路により電気信号に変換して出力する. ブリッジ回路の印加電圧は 2.0 V である. また, 反応熱が微少であるため, 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(容量 50 ml) 内部に設置し, さらに全体を恒温槽内に配置して, 一定温度(35)に保持した.

図4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 ΔH は - 80.0 kJ/mol である.

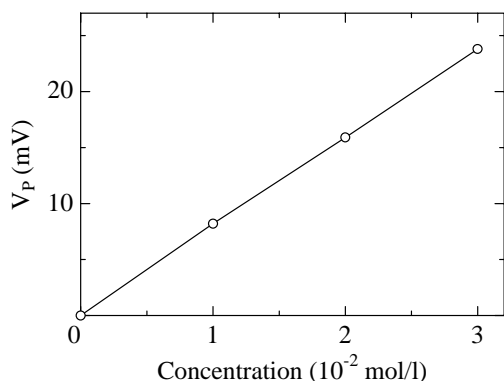
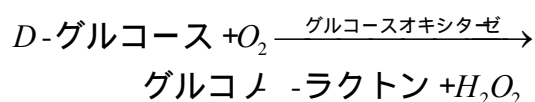
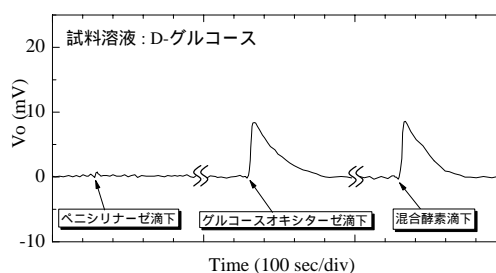


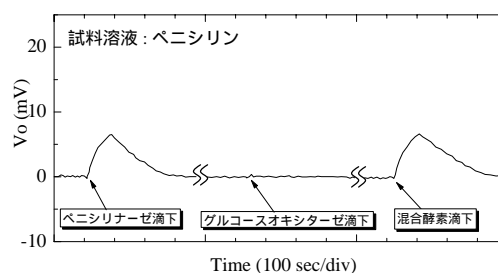
図5 D-グルコースの濃度 - 出力特性

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, 応答を示さないが, D-グルコースに対してはパルス状の反応が見られる. 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ため, 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5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直線的な関係が得られた. 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から被測定物質の定量が可能である.



(a) グルコース単体



(b) ペニシリン単体

図6 単体溶液に対する酵素反応の選択性

4. 酵素反応の選択性に関する実験

酵素は、特定の物質にしか反応しないという反応特異性を有している。反応特異性を確認するために、種々の実験を行った。なお、実験で用いた試料溶液及び酵素は、それぞれ同濃度、同容量（試料溶液： 1.0×10^{-2} mol/l, 5 ml, 酵素：0.1 w%, 0.5 ml）である。

図 6 (a) は、D グルコース単体溶液にペニシリナーゼ、グルコースオキシターゼ、及びその 2 種類の混合酵素をそれぞれ滴下した際の応答特性である。ペニシリナーゼを滴下した際は応答が無かったが、グルコースオキシターゼを滴下した際は、8.2 mV のピーク値をもつパルス電圧が生じた。混合酵素を滴下した際もほぼ同じ波形が得られた。

図 6 (b) は、ペニシリン単体溶液にそれぞれの酵素を滴下した際の応答特性である。ペニシリナーゼと混合酵素を滴下した際は、6.5 mV のピーク値をもつほぼ同じ波形のパルス電圧が生じたが、グルコースオキシターゼを滴下した際は応答が無かった。これらの結果から、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。

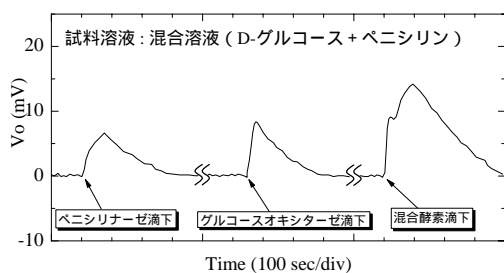


図 7 混合溶液に対する酵素反応の選択性

図 7 は D グルコースとペニシリンの混合試料溶液に対してそれぞれの酵素を滴下した場合の応答特性である。混合溶液に対しては、パルス波形及びピーク値が異なり、ペニシリンとペニシリナーゼ、D グルコースとグルコースオキシターゼがそれぞれ反応しており、試料が多成分系であっても厳密に反応選択性を再現できることが分かる。また、混合酵素を滴下した際は、凹凸のある波形が得られた。これは、それぞれの酵素と試料が反応する際の応答時間の差（ペニシリンとペニシリナーゼは約 90 秒、D グルコースとグルコースオキシターゼは約 10 秒）によるものであると思われる。

5. 論理回路シミュレーション

以上より、MOT を用いた代謝物センサは、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ため、この現象を用いて各種の生体物質を識別できる。そこで、酵素反応の論理的なシミュレーションを試みた。

図 8 は、単体試料溶液と 2 種類の酵素との応答特性（図 6 の実験結果）を表したものである。試料溶液（D グルコース： D_g 、ペニシリン： P_g ）に対して、酵素（グルコースオキシターゼ： G_o 、ペニシリナーゼ： P_n ）を入力した場合の選択性を伴う酵素反応の論理的シミュレーション（出力 X）を示す。入力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。(a)

図は，図 6 (a) に対応しており，グルコースオキシターゼ：Go を入力した場合に応答（出力 X_1 ）があることを示す．また，(b) 図は，図 6 (b) に対応しており，ペニシリンナーゼ：Pn を入力した場合に応答があるため， X_2 は同図のように表現できる．

図 9 は，図 7 の実験結果を基に，しきい値を変化させた場合の論理的シミュレーション（出力 Y）を示す．同図 (a) の回路図で，Dg と Pg に対する応答電圧の小さい方（この場合 Pg）をしきい値とすると，(a) に示す論理的な真理値となり，Dg と Pg に対する応答電圧の和をしきい値とすると，(c) に示す論理的な真理値となる．

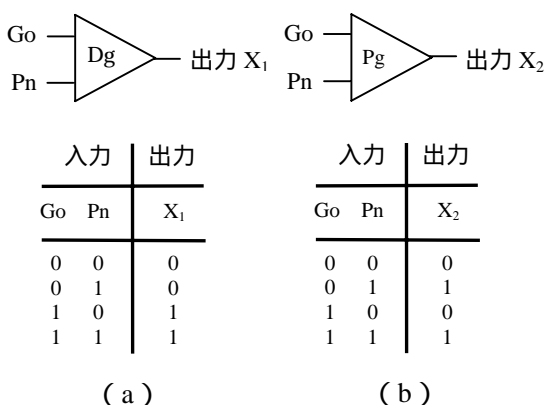


図 8 単体試料溶液との応答結果

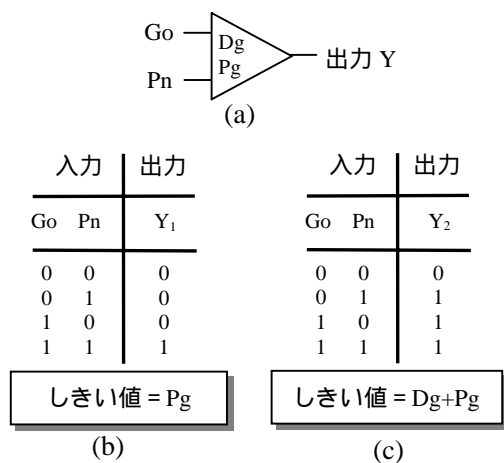


図 9 混合試料溶液との応答結果

6. 結言

以上，代謝物センサの酵素反応特性と論理回路シミュレーションについて報告した．酵素反応には，定量と識別の反応特異性があり，特に識別に関する応答特性を論理的にシミュレーションした結果は，生体物質の代謝メカニズムの解析に有効であると思われる．

参考文献

- (1) 伊藤，谷地，久保田，徳田，千葉，長田，関：計測自動制御学会東北支部第 194 回研究集会，194-11（2001）
- (2) 谷地善光，長田 洋，千葉茂樹，関 享士郎：TOF 高感度温度センサの作製と酵素反応熱検出への応用，電子通信情報学会論文誌 C，Vol.J83-C，No.9，pp.1-7（2000）
- (3) 谷地善光，千葉茂樹，長田 洋，岡 英夫，関 享士郎：感温金属酸化物半導体薄膜の作製と酵素センサへの応用，粉体および粉末冶金協会誌，Vol.47，No.8，pp.838-843（2000）
- (4) Y.Yachi, S.Chiba, H.Osada, H.Oka, O.Michikami, N.Tayama and K.Seki : Magnetic Enzyme Sensor Utilizing Pyro Magnetic Film , IEEE Trans. Magn. , Vol.36 , No.5 , pp.3730-3732 (2000)
- (5) Yoshimitsu Yachi, Kiyotaka Ito, Shigeki Chiba, Hiroshi Osada, Keiichi Sasaki, Masao Takahashi, Tsuneo Kubota, Kyoshiro Seki : Thermal Enzyme Sensor Utilizing Temperature-Sensitive Magnetic Thin Film , JJAP , Vol.41, No.2 (2002)