

博士学位論文

プラズマ重合膜 / 酵素複合体を用いる
アンペロメトリックバイオセンサ

芝浦工業大学大学院
理工学研究科
機能制御システム専攻

加瀬 仁啓

論文要旨

【研究の背景と目的】

医療・食品など多分野において化学物質の測定が必要不可欠であるが、測定装置のサイズは大きく価格も高価である。この課題に対し、大型から小型まで対応でき、価格的にも有利なバイオセンサ技術にはニーズがある。バイオセンサにおいて分子認識素子と信号変換素子を結びつける「インタフェースの設計」は、その性能を確保する上で重要なポイントとなる。信号成分を増大しノイズ成分を低減する機能を有するインタフェース、そして半導体加工技術との融合が容易なインタフェースを設計することが、高感度かつ小型で低価格なバイオセンサを実現するための解決策と考えられる。

本研究では上記の要求に対応するため、「プラズマ重合膜/酵素複合体をインタフェースに用いたアンペロメトリックバイオセンサ」を開発し、そのメカニズムを解析することを目的とした。

【本論文の構成および要旨】

本論文は全5章の構成である。

第1章では、本研究の背景・目的および前提条件について記した。

第2章では、測定対象物であるグルコースの信号成分(酸化電流)を検出し、かつアスコルビン酸・アセトアミノフェン・尿酸のノイズ成分(酸化電流)を低減させるため、HMDS プラズマ重合膜の緻密な膜構造を活かしたサイズ効果による妨害物質の影響低減を検討し評価した。結果として、5nm未滿のHMDS プラズマ重合膜厚の場合に、優れたサイズ効果特性が得られた。

次に、グルコースの信号成分(酸化電流)を効率的に得るため、グルコースオキシダーゼ(GOD)とプラズマ重合膜との親和性向上を試み、HMDS プラズマ重合膜の表面にプラズマ処理を行って表面改質し、GODとプラズマ重合膜表面との接触状態・親和性を評価した。この結果、窒素プラズマ処理によって正電荷を有する親水性表面となったHMDS プラズマ重合膜が、GODとの高い親和性を示し、膜全体に均一に単分子層を吸着・形成することがわかった。この膜表面にGODを物理吸着させたデバイスはグルコース応答評価でも良い感度が得られており、正電荷を有する親水性表面とGODとの接触をバイオセンサのインタフェース利用することは効果的と考えられる。

第3章ではウェットプロセスの工程を減らすため架橋試薬を用いず、GODを直接プラズマ重合膜に埋め込み固定して、バイオセンサを作製することを試みた。モノマーにはHMDSおよびアセトニトリス(AN)を利用した。原子間力顕微鏡による埋め込み状態の評価、グルコースバイオセンサとしてのグルコース応答を評価した。その結果、モノマーの差によって、プラズマ重合膜/酵素複合体の形成状態(埋め込まれ方)に差が生じることがわかった。また、グルコース応答に対するセンサ感度にも違いがあり、ANをモノマーに利用したほうが高い感度を得た。しかしモノマーにかかわらずグルコース応答は観測されており、プラズマ状態中にGODがさらされても酵素活性が維持され、プラズマ重合膜/酵素複合体を形成することでバイオセンサとして酵素固定されて

いることが確認された。

第4章では、酸化電位の低電位化および溶存酸素の影響低減を目指して、DMAMFをモノマーとしたプラズマ重合膜にメディエータ機能を付加する検討を行った。プラズマ重合膜にGODを共有結合させたバイオセンサは、0.35Vの酸化電位でグルコース応答が得られた。有酸素状態の溶液に比べて無酸素状態では、若干の電流低下が見られたものの各グルコース濃度に対して明確な電流値増加が見られ、メディエータの電子伝達系が得られていると考える。更なる電流値の増加を目指して、プラズマ重合膜/酵素複合体にメディエータ機能を持たせる試みも実施した。その結果、電流値の大きな上昇が見られた。GODをプラズマ重合膜中に埋め込むことで、活性中心とフェロセンレドックスサイトが近づき、より効率的な電子伝達が可能になったと考察する。

第5章では結論を記した。プラズマ重合膜のサイズ効果を利用することで、所定の妨害物質の影響を低減できた。プラズマ重合膜の表面状態によってGODとの接触状態に違いが生じ、窒素プラズマ処理によって正電荷を持った親水性表面では、GODとの親和性が良く、膜表面に高密度に吸着できた。GODはプラズマ状態中に曝された場合でも酵素活性が維持され、またプラズマ重合膜/酵素複合体を形成することで架橋試薬を利用せず固定化することが可能であった。DMAMFをモノマーとしてプラズマ重合膜/酵素複合体を形成することで、メディエータ機能を付加でき、酸化電位の低電位化を実現した。以上よりプラズマ重合膜/酵素複合体はアンペロメトリックバイオセンサのインタフェースの構成部として有用であり、今後、半導体加工技術との組み合わせを実現していくことで、測定装置の小型化・低価格化に期待が持てると考える。

目次

第 1 章	序論	1
1-1	本論文の研究背景	1
1-1-1	化学物質の測定に対する社会的要求	1
1-1-2	生化学自動分析装置	1
1-1-3	臨床検査で用いる検体に含まれる化学物質	3
1-1-4	バイオセンサ	5
1-1-5	アンペロメトリック（電流検出型）バイオセンサの利点	20
1-1-6	糖尿病と血糖用測定装置	20
1-1-7	血糖測定用バイオセンサ	21
1-1-8	バイオセンサの動向とエレクトロニクス技術	23
1-1-9	プラズマ重合技術	24
1-2	本論文の目的	29
1-3	本論文の構成	30
第 2 章	プラズマ重合膜のサイズ効果ならびに プラズマ重合膜と酵素との接触状態・親和性に関する特性評価	34
2-1	はじめに	34
2-2	アンペロメトリックグルコースバイオセンサ	34
2-3	目的と検証項目	35
2-3-1	検証 1： プラズマ重合膜のサイズ効果による妨害物質の影響低減	35
2-3-2	検証 2： プラズマ重合膜の表面改質による プラズマ重合膜 - 酵素の親和性向上	36
2-4	電極デバイス作製および評価・測定方法	36
2-4-1	検証 1 で用いる電極デバイス作製の流れ	36
2-4-2	検証 2 で用いる電極デバイス作製の流れ	37
2-4-3	第 2 章で用いる評価・測定方法	38
2-5	結果・考察	39
2-5-1	検証 1： プラズマ重合膜のサイズ効果による妨害物質の影響低減	39
2-5-2	検証 2： プラズマ重合膜の表面改質による プラズマ重合膜 - 酵素の親和性向上	47
2-6	まとめ	58
第 3 章	プラズマ重合膜/酵素複合体での酵素埋め込み固定	61
3-1	はじめに	61
3-2	目的と検証項目	61
3-2-1	検証 1： AFM による埋め込み状態の観察	62

3-2-2	検証 2： GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサ特性の検証	62
3-3	電極デバイス作製および評価・測定方法	63
3-3-1	検証で用いる電極デバイスの作製の流れ	63
3-3-2	本章で用いる評価・測定方法	63
3-4	結果・考察	64
3-4-1	検証 1： AFM による埋め込み状態の観察	64
3-4-2	検証 2： GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサ特性の検証	66
3-5	まとめ	69
第 4 章	ジメチルアミノメチルフェロセンプラズマ重合膜を用いた メディエータグルコースバイオセンサ	71
4-1	はじめに	71
4-2	メディエータ型グルコースバイオセンサ	71
4-3	ジメチルアミノメチルフェロセンプラズマ重合膜	72
4-4	検証項目	73
4-4-1	検証 1： DMAMF プラズマ重合膜表面に GOD を共有結合固定させたバイオセンサの評価	73
4-4-2	検証 2： DMAMF プラズマ重合膜に GOD を埋め込み固定させたバイオセンサの評価	74
4-5	電極デバイスの作製および評価・測定方法	74
4-6	結果・考察	77
4-6-1	検証 1： DMAMF プラズマ重合膜表面に GOD を共有結合固定させたバイオセンサの評価	77
4-6-2	検証 2： DMAMF プラズマ重合膜に GOD を埋め込み固定させたバイオセンサの評価	80
4-7	まとめ	88
第 5 章	結論	90
謝辞		93
研究業績		94
付録	基礎事項	96

本論文で用いる略語一覧表

No.	日本語表記	英語表記	略語表記、化学式あるいは図中での表記
1	グルコース	Glucose	D-Glucose
2	血糖自己測定装置	Self-monitoring of blood glucose	SMBG
3	グルコース オキシターゼ	Glucose Oxidase	GOD
4	核酸	Deoxyribonucleic acid	DNA
		Ribonucleic acid	RNA
5	軽鎖	Light chain	L 鎖
6	重鎖	Heavy chain	H 鎖
7	持続型グルコースモ ニタリングシステム	Continuous glucose monitoring system	CGMS
8	超微量天秤(水晶振 動子マイクロバラン ス法)	Quartz crystal microbalance	QCM
9	表面弾性波	Surface acoustic wave	SAW
10	表面プラズモン共鳴 現象	Surface Plasmon resonance	SPR
11	グルタルアルデヒド	Glutaraldehyde	GA
12	グルコノラクトン	Gluconolactone	δ -gluconolactone
13	過酸化水素	Hydrogen peroxide	H ₂ O ₂
14	グルコース デヒドロゲナーゼ	Glucose dehydrogenase	GDH
15	持続型グルコースモ ニタリングシステム	Continuous glucose monitoring system	CGMS
16	μ TAS	Micro total analytical system	μ TAS
17	MEMS/NEMS	Micro electro mechanical systems / nano electro mechanical systems	MEMS/NEMS
18	アリルアミン	Allyamine	
19	ヘキサメチル ジシロキサン	Hexamethyldisiloxane	HMDS
20	原子間力顕微鏡	Atomic force microscopy	AFM
21	酸素	Oxygen	O ₂
22	窒素	Nitrogen	N ₂
23	アスコルビン酸	Ascorbic Acid	AA
24	アセトアミノフェン	Acetaminophen	AMP

25	尿酸	Uric Acid	UN
26	アセトン	Acetone	
27	アルゴン	Argon	Ar
28	クロム	Chromium	Cr
29	白金	Platinum	Pt
30	アンモニア	Ammonia	NH ₃
31	シリコン	Silicone	Si
32	アクリルアミド	Acrylamide	
33	ポリビニルアルコール	Polyvinylalcohol	
34	アセトニトリル	Acetonitrile	AN
35	メディエータ	Mediator	
36	ジメチルアミノメチルフェロセン	Dimethylaminomethylferrocene	DMAMF
37	金	Gold	Au
38	HMDS プラズマ重合膜表面にプラズマ処理せず疎水性表面となったデバイスに GOD を吸着させたデバイス		HMDS-GOD
39	HMDS プラズマ重合膜表面に窒素プラズマ処理して親水性の正帯電状態にしたデバイス		HMDS-N
	更に GOD を吸着させたデバイス		HMDS-N-GOD
40	HMDS プラズマ重合膜表面に酸素プラズマ処理して親水性の負帯電状態にしたデバイス		HMDS-O
	更に GOD を吸着させたデバイス		HMDS-O-GOD

第1章

序論

1-1 本論文の研究背景

1-1-1 化学物質の測定に対する社会的要求

化学物質の測定は、環境、食品、医療、ライフサイエンスなどの分野で必要不可欠である。近年、地球規模での環境問題が大きく取り上げられている。大気汚染・土壌汚染・水質汚染では有害な化学物質が我々の生活のみならず健康や生命にも影響を与えている。例えば経済活動の活発化に伴い、工場や生活排水から有害な化学物質が河川・海に流され、河川・沿岸流域での健康被害や農業・漁業の異変を訴える事態も発生している。健康被害や農業・漁業への影響を確認する手段の一つとして、河川・海に含まれる化学物質の測定・分析調査が重要になる。また、食品分野でも、食品に含まれる栄養成分の含有量評価から異物混入に対する確認評価まで、化学物質の測定は重要な役割を果たしている。食品に含まれる栄養成分の含有量を把握して、献立や病気患者の食事治療の目安、あるいは食品メーカーでは製品中の含有成分の量を測定することで工程品質管理の維持に利用したりする。医療分野では、血液や血清・尿に含まれる血液成分を分析することで治療や投薬の参考情報とし、あるいは健康状態の把握から予防医学への利用に用いたりする。このように化学物質の測定には社会的な要求がある。

一般的に測定試料には、目的の化学物質以外にも様々な化学物質が混在している。そのため化学物質の測定を行う機器分析は、イオンクロマトグラフィー装置や液体クロマトグラフィー装置、原子吸光分光光度計、紫外可視分光光度計、生化学自動分析装置、免疫血清検査装置、電解質測定装置、ラジオ・イムノアッセイ装置など大型機器となるため、主に検査センターや研究機関、大学、病院等の専門機関が所有する。大型機器であるため、その設置スペースや設置作業を要し、その移動にも労力が必要になる。さらに装置価格や維持費も高価である。試料の煩雑な前処理が必要になる場合もある。

1-1-2 生化学自動分析装置

医療機器として血液分析（検査）を行う機器の一つに生化学自動分析装置^[1-3]があり、その検査結果の情報は、病気の診断、治療の方針の決定、治療効果の判定、治療や健康管理のモニタリング、健康診断でのスクリーニングなどに役立てられる。

生化学自動分析装置が対象とする検査は、臨床検査の中で患者からの血液や尿を試料として用いる検体検査であり、さらに検体検査の中でも生化学に分類される項目である。用手法分析の自動化をはじめとした生化学自動分析装置は、検査側の医療環境の変化や患者側の生活習慣の変化また技術の進歩や経営環境の変化もあり、自動化による省力化、分析精度の向上、信頼性の向上、検体/試薬の微量化、検体の処理時間ならびに TAT(turn around time)の短縮化、生化学検査以外の検査との拡張性拡大、項目数の拡大、装置の小型化と集約化、操作の簡単化などが望まれ、

新たな研究開発が行われている。現在主流の装置はディスクリート方式であり、独立した反応容器内で検体（血液・血清・尿等のサンプル）と試薬を反応させ、この反応液を光度計で測定する方式が一般的である。その概念構成図を図 1-1 に示す。主な構成部には、検体試薬分取・サンブラ系、反応機構系、検知測光系の3つがある。検体試薬分取・サンブラ系では、ユーザによって配置された検体容器および試薬容器から反応容器に検体を移送する機能を担当し、マイクロコンピュータによって受付番号順のシーケンシャル管理やバーコードラベルによる検体管理が行われ、また検体や試薬を所定量に分注制御することが行われる。検体および試薬が供給される反応容器は反応機構系に含まれる。反応容器は恒温層中で所定の温度に加熱制御されており、反応が進行する。また測定が終了した反応容器は、水道水や精製水あるいは洗浄剤などの洗浄水で洗浄され、乾燥後に次の分析に利用される。所定時間反応した反応液は反応容器内において、検知測光系の光度計で吸光光度測定され、吸光度から濃度に換算されて測定データとして出力される。ほとんどの装置は反応後のみならず、反応途中の吸光光度測定も行う全反応過程測光方式を採用している。図 1-1 に示すように、試薬保冷库や反応キュベットホイールを円盤状に構成して基本的動作を回転運動の機構系の駆動とさせることで信頼性を高める構造とし、また反応キュベットホイールでは反応容器を円周上に配列させ、反応容器と吸光光度測定容器との両方の役割をさせることで、装置面積を削減する構造となっている。

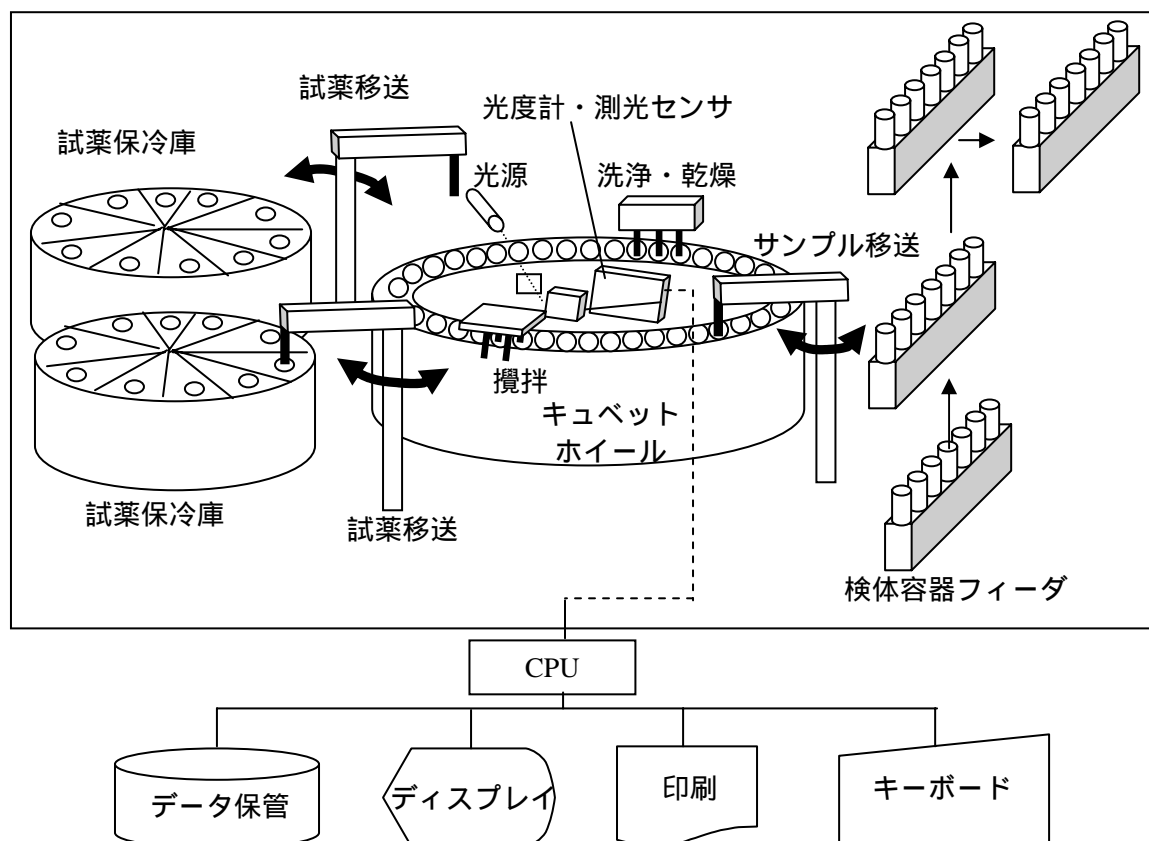


図 1-1 生化学自動分析装置の概念構成図

生化学自動分析装置は、主に検査センターや大規模病院などの専門施設で使用されており、色々な検査項目を分析でき、また多くの検体を短時間に分析できる「多項目多検体処理」への要求が強い。一方で、小規模病院や個人での検査要求もある。小規模病院では、設置場所や装置の導入費やその維持費に課題があり、大型・高価な生化学自動分析装置の導入は難しく、小型で安価で、また頻繁で迅速な検査が要求される項目を分析できる装置が必要とされている。さらには個人においても、日常的な自己測定を必要不可欠とする場合がある。このため、単項目測定専用の生化学自動分析装置や自己測定装置への要求も多く、その代表的な装置の一つとして、血糖値（血液中のグルコース）を測定する血糖専用自動分析装置や血糖自己測定装置（SMBG：self-monitoring of blood glucose）などの血糖用測定装置がある。

1-1-3 臨床検査で用いる検体に含まれる化学物質

血液中には臨床的に意義のある様々な化学物質が含まれ、各成分によって含有量は様々である。血液中に含まれる主な成分とその含有量を表 1-1 に示す[1, 4]。

表 1-1 血中に含まれる主な成分とその含有量

成分	含有量	臨床的意義
赤血球	5×10^6 [個/mm ³]	ヘモグロビンを含有し、酸素の運搬に役割を果たす。
白血球	$5-8 \times 10^3$ [個/mm ³]	免疫反応によって外敵因子の侵入に対する防御機能を担う。顆粒球（好中球、好酸球、好塩基球）、単球、リンパ球を含む。
血小板	$2.5-5 \times 10^5$ [個/mm ³]	巨核球の一部であり、止血に重要な役割を持つ。
アルブミン	3.5-5.3 [g/dl]	血清総タンパクの 50%～70%を占め、血漿膠質浸透圧の維持や各種タンパク質の運搬に重要な役割を果たす。
グロブリン	2.1-3.3 [g/dl]	免疫グロブリンはタンパク質で、特定の抗原に対する抗体の免疫機能を持つ。液体性免疫として血液中で生体防御を行う。
フィブリノーゲン	0.2-0.4 [g/dl]	止血や血栓形成に重要な役割を持つ。フィブリノーゲンの凝固反応でフィブリンが形成される。
グルコース	70-120 [mg/dl]	生体のエネルギー源として重要な物質である。糖尿病患者の自己血糖測定が普及している。
コレステロール	150-250 [mg/dl]	総コレステロールはステロイド核を持った脂質でエステル型と遊離型が存在する。脂質代謝異常（高脂血症、血清脂質異常）の診断に重要な項目である。
尿素	7-15 [mg/dl]	尿素窒素はタンパク質代謝の最終的産物として肝臓で生成され、腎炎・尿毒症等の腎疾患や肝硬変症の場合、高値を示す。
尿酸	3-7.5 [mg/dl]	肝臓で合成される核酸構成成分プリン体の最終的産物である。腎機能障害や痛風などの場合に増加する。

成分	含有量	臨床的意義
クレアチニン	0.2-0.5 [mg/dl]	クレアチンの脱水物であり、代謝最終産物として腎臓から尿中に排出される。腎機能障害の場合に上昇する指標。
ビリルビン	0.1-0.4 [mg/dl]	胆汁色素の主要成分で赤血球中のヘモグロビンの代謝産物である。直接と間接があり黄疸の指標となる。
ナトリウムイオン	1.36-1.42 [mmol/l]	浸透圧の調整に役割を示すイオンである。
カリウムイオン	3.5-5.0 [mmol/l]	カリウム濃度の異常は腎性と腎外性に分けて考えられる。
カルシウムイオン	2.1-2.6 [mmol/l]	神経等の反応や細胞の活性化、生体内シグナル伝達等に必要ないオンである。
塩素イオン	95-105 [mmol/l]	血清中の陰イオンの約70%を占める。体内ではナトリウム値と並行して変動する。

注1) 文献1、文献4

血液に含まれる化学物質は、その物質ごとの含有量（血中濃度）が異なるだけでなく、分子量も異なる。それぞれの化学物質に関する血中濃度と分子量の関係図を図1-2に示す[1, 4]。

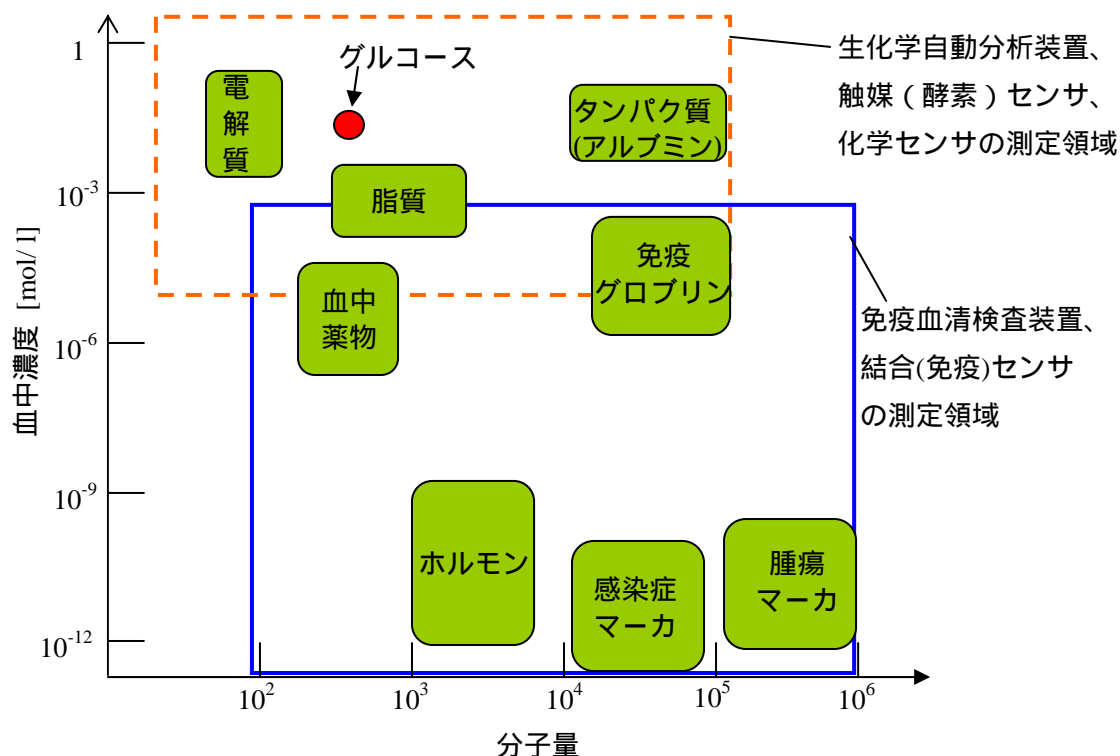


図1-2 血中化学物質に対する血中濃度と分子量の関係

図1-2からわかるように、低分子から高分子まで様々な物質が、低濃度から高濃度までの様々な状態で存在している。このように広範囲な分布状態の化学物質を測定するためには、測定方法

も単純な1種類の方法では難しく、対象とする物質を考慮した測定方法を採用しなければならない。

1-1-4 バイオセンサ

・バイオセンサとは

化学物質を測定する装置の一つとしてバイオセンサの研究開発が進んでおり、実用化に至っているものもある。バイオセンサは、化学物質の測定においてその使用の容易さ、コンパクトなサイズ、リアルタイムでのモニター、試料の前処理が不要、安価などの利点があり、幅広い分野で利用されている[4, 5-8]。

バイオセンサは大きく分けると触媒型バイオセンサと結合型バイオセンサに分類できる。触媒型バイオセンサは、測定対象の化学物質と触媒反応する物質を有し、触媒反応によって得られる信号を検出することで、測定対象の化学物質を測定する。触媒反応は、1つの酵素が1秒間に数万回の反応を触媒するため、増幅作用があり検出が容易である。しかしながら多くの生体物質の相互作用は、2種類の物質が結合しただけとなり、その反応量も微量である。このような反応を行う生体素子を用いたバイオセンサを結合型バイオセンサと呼び、血中濃度が少ない物質ほど、高感度検出の手段が必要になる。グルコースなど触媒反応を利用できる測定対象物質は、アンペロメトリータイプの触媒型バイオセンサを用いた検出が主流である一方で、低濃度で存在して免疫反応を行う化学物質を測定対象物質とする際には、高感度の結合バイオセンサが用いられている。

バイオセンサの基本構成を図1-3に示すように、目的とする物質のみ認識する部分（分子認識素子）と、認識した情報を電気的な信号などに変換する部分（信号変換素子）の二つの構成部からなる。そして、分子認識素子に、生物由来のもの（主に生体分子）を用いるために「バイオ」センサと呼ばれ、この構成がバイオセンサの概念となっている。

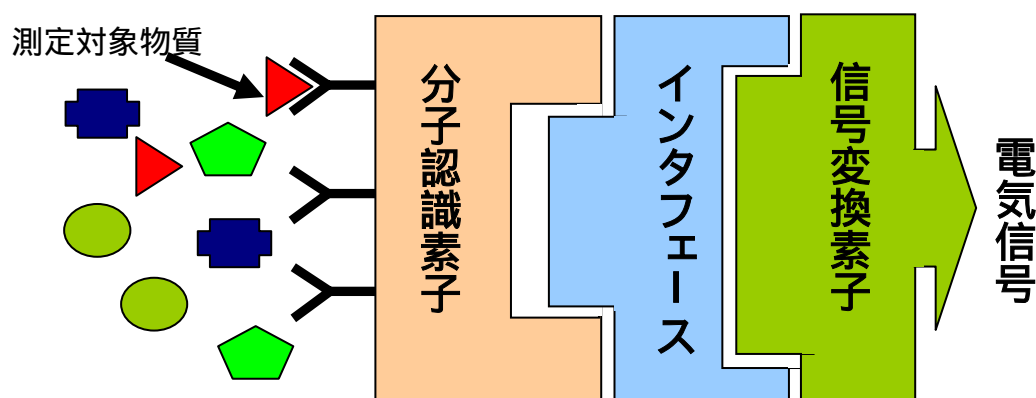


図1-3 バイオセンサの基本構成

分子認識素子には大きく分けて、分子認識機能に加えて触媒機能を持った触媒（カタリティック）タイプと、分子認識機能のみを持った結合（アフィニティー）タイプの二つがある。分子認識素子となる生体材料によって、それぞれのメリット・デメリットがあるため、トレードオフを考慮しながら目的に合う生体材料を適切に選択することが重要である。

・分子認識素子： 触媒型バイオセンサ

触媒型バイオセンサの分子認識素子には、酵素や微生物、オルガネラ、動物・植物細胞等が用いられる。その最も代表的なものとして酵素を分子認識素子に利用した酵素バイオセンサがある。酵素[4,11]には特徴として、極めて高い触媒特異性(多くの化学物質の中から特定の基質のみを選択して作用する基質特異性、及び基質に特定の反応だけを起こさせる反応特異性)を有しているため、分子認識素子に利用されている。

酵素はこれまで約 3000 ~ 4000 種類が知られており、その数は生化学の進歩と共に増加している。タンパク質である酵素は、多くのアミノ酸が結合してできる高分子化合物である。アミノ酸の基本化学式は図 1-4 に示すように、1つの分子内にアミノ基(-NH₂)とカルボキシル基(-COOH)をもつ。

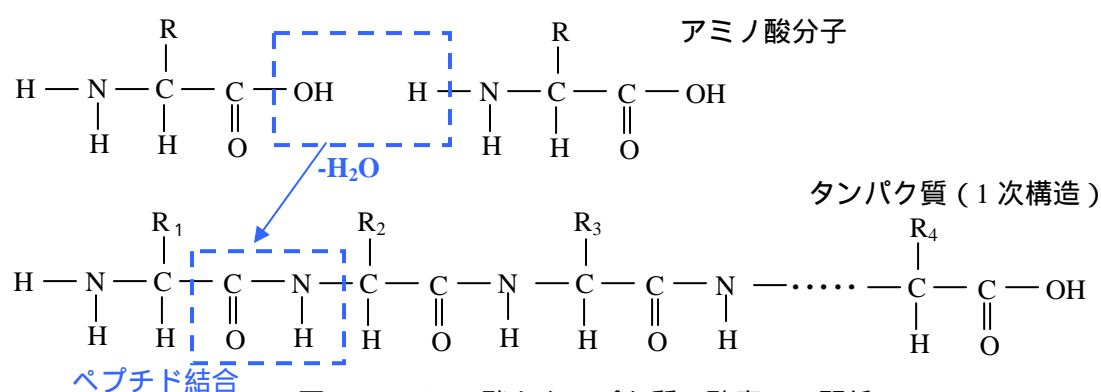


図 1-4 アミノ酸とタンパク質 (酵素) の関係

天然に存在するアミノ酸は 20 種類であり、つまり図 1-4 の置換基 R は 20 種類ある。タンパク質は、あるアミノ酸のアミノ基と他のアミノ酸のカルボキシル基との間で水分子が 1 つ外れ、ペプチド結合(またはアミド結合)によって多数繋がって出来る。タンパク質 (酵素) は平均してアミノ酸が約 100 個程度つながって出来る多様で複雑な分子構造をもつ高分子化合物である。生体機能を持つタンパク質 (酵素) は、アミノ基の配列が決まっており、また、アミノ酸が繋がった長いペプチド鎖は、そのまま長い直線状で存在するのではなく、部分的にある独特の構造を持つ。図 1-5 に示すように長いペプチド鎖が折り畳まれて、それぞれのタンパク質 (酵素) に特別の立体構造 (3 次元構造) を持つことになる。

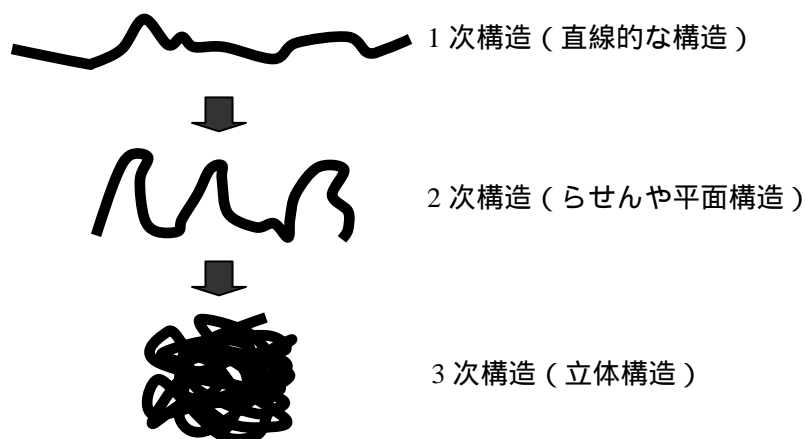


図 1-5 タンパク質 (酵素) の特異的立体構造

酵素作用は、穏和な条件下で特定の化学反応を促進させる触媒作用である。図 1-6 に示すように、A から B に反応が進む場合は、外からエネルギーを加えて高いエネルギーの山(活性化エネルギー ΔG^\ddagger)を越えなければならない。しかし、酵素が存在すると、この活性化エネルギーを下げることができ、その結果反応速度が上がる。これは、 ΔG^\ddagger を小さくすることに対応し、A と B のエネルギー差である ΔG_0 は変化させない。

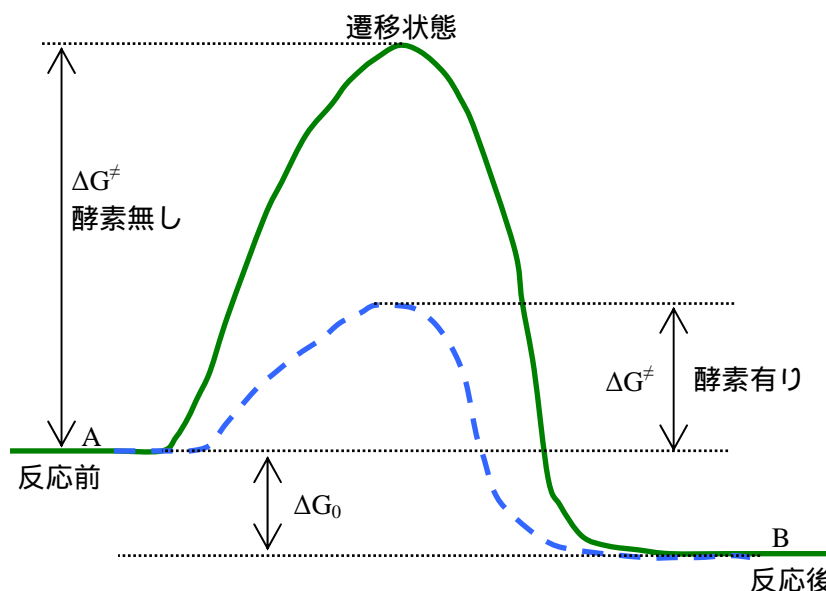


図 1-6 酵素反応の自由エネルギー

酵素作用の特徴は、通常は無機触媒と異なり、常温、常圧で作用する。そして、無機触媒は温度を上げれば上げるほど反応速度は上がるが、酵素の場合は最適温度が存在し、通常は 40[]程度で、生物の体温に近い温度である。また、酵素には特定の基質 (酵素が作用する特定の化学物質)としか作用しない特徴がある。例えば、生体や食品等にはグルコースの他、多く物質が含まれているが、GOD は、この中からグルコースだけを選択的に認識できる。図 1-7 に示すように、酵素は特異的な立体構造をもち、酵素作用を行うに当たって基質と結合する部分がある。これを活性中心と呼ぶ。この活性中心が基質とちょうど合うような構造を持っている為、それ以外の物質は活性中心にはまる事が出来ない。この立体構造は、水素結合、疎水結合、イオン結合などの比較的弱い結合で成り立っている為、何らかの外的要因によって簡単に崩れてしまう。これを酵素の失活と呼び (図 1-8) 失活した酵素には触媒作用がなくなってしまう。

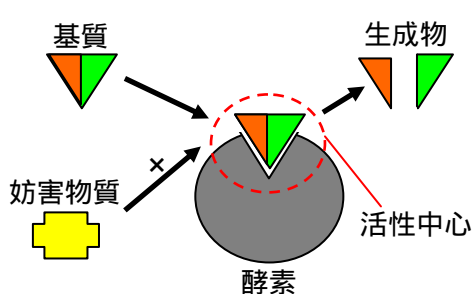


図 1-7 酵素の基質特異性

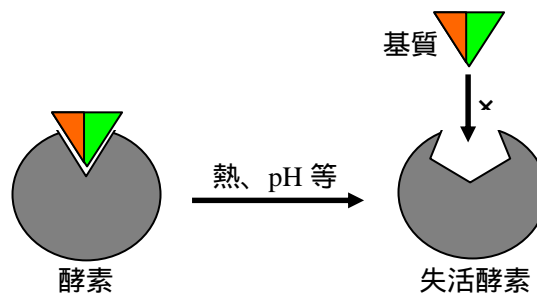


図 1-8 酵素の失活

一般的な酵素は周囲環境に敏感であり、中性・常温・常圧では効率的に反応を触媒するが、熱・酸・アルカリ・高塩濃度等ではタンパク質変性を起こして触媒機能が低下しやすく、低温でも触媒活性が低下する傾向にある。従って、触媒型バイオセンサとして酵素を用いる場合は、それぞれの酵素にあった至適温度、至適 pH の条件で測定を行うことが理想である。そしてこのような点から、分子認識素子として利用される酵素は限られている、という現状がある。主な酵素バイオセンサを表 1-2(a)および表 1-2(b)に示す[9, 10]。

表 1-2(a) 主な酵素バイオセンサ (アンペロメトリー方式)

測定対象	酵素	信号変換素子	安定性	反応速度	測定範囲 (mg/l)
グルコース	グルコース オキシダーゼ	O ₂ 電極	100 日	10 秒	1 - 5×10 ²
		Pt 電極	—	15 秒	1 - 5×10 ³
尿酸	ウリカーゼ	O ₂ 電極	120 日	30 秒	10 - 10 ³
エタノール	アルコール オキシダーゼ	O ₂ 電極	120 日	30 秒	5 - 10 ³
		Pt 電極	—	12 秒	5 - 10 ²
乳酸	乳酸脱水素酵素	Pt 電極	7 日	3 - 10 分	10 - 10 ²
	乳酸 オキシダーゼ	O ₂ 電極	30 日	30 秒	5 - 2×10 ³
コレステロ ール	コレステロール オキシダーゼ	Pt 電極	80 日	3 - 5 分	10 ⁻¹ - 10 ²
		O ₂ 電極	7 日	3 分	10 - 10 ²
無機リン酸	ホスファターゼ	O ₂ 電極	120 日	1 分	10 - 10 ³
過酸化水素	カタラーゼ	O ₂ 電極	30 日	2 分	1 - 10 ²
ヒポキサン チン	キサンチンオキ シダーゼ	O ₂ 電極	—	0.5 - 1 分	8.5 - 2.0×10 ²
イノシン	ヌクレオチドホ スホリラーゼ	O ₂ 電極	—	0.5 - 1 分	1.3×10 ² - 6.7×10 ²
アミノ酸	アミノ酸 オキシダーゼ	O ₂ 電極	—	2 分	10 - 10 ³
		Pt 電極	120 日	12 秒	1 - 10 ²

注) 文献 9、文献 10

表 1-2(b) 主な酵素バイオセンサ (ポテンショメトリー方式)

測定対象	酵素	信号変換素子	安定性	反応速度	測定範囲 (mg/l)
尿素	ウレアーゼ	NH ₄ ⁺ 電極	20 日	30 - 60 秒	10 - 10 ³
ペニシリン	ペニシリナーゼ	pH 電極	14 日	1 分	10 - 10 ³
グルタミン 酸	グルタミン酸 脱水素酵素	NH ₄ ⁺ 電極	2 日	1 分	10 - 10 ⁴
アスパラギ ン	アスパラ ギナーゼ	NH ₄ ⁺ 電極	30 日	1 分	5 - 10 ³

測定対象	酵素	信号変換素子	安定性	反応速度	測定範囲 (mg/l)
グリセロール	グリセリン脱水素酵素	炭素電極	60日	—	—
中性脂質	リパーゼ	pH電極	14日	1分	5 - 50
チロシン	チロシンデカルボキシラーゼ	CO ₂ 電極	20日	1 - 2分	10 - 10 ⁴
クレアチニン	クレアチナーゼ	pH電極	—	2 - 10分	1 - 5×10 ³
ガラクトース	ガラクトースオキシダーゼ	Pt電極	30日	—	10 - 10 ³

注) 文献9、文献10

触媒型バイオセンサの分子認識素子に微生物を用いる場合もある。微生物は生存のために幅広い有機化合物を栄養源として摂取するが、微生物によって摂取しやすい化合物が異なるため、この特徴を分子認識素子に利用する。つまり、目的の化学物質を十分摂取する微生物を選択することが重要になる。

・分子認識素子： 結合型バイオセンサ

一方、結合（アフィニティー）型バイオセンサ[4, 11]の分子認識素子には、抗体や受容体（レセプター）、核酸（DNA: deoxyribonucleic acid、RNA: ribonucleic acid）などが用いられる。結合型バイオセンサに用いる生体物質は触媒型と異なり、2種類の物質が結合しただけの反応で生成物は得られず、その反応量も微量であるため、高感度検出が必要になる傾向がある。信号変換素子に関する事項は後段に記載する。

抗体は、抗原刺激による免疫反応の結果、生体内に誘導される体液性免疫のタンパク質で、B細胞が分化成熟した形質細胞により作られる。抗原とそれに対応する抗体が結合する反応は極めて特異性が高く、また低濃度でも反応する。よって、抗体を利用することで目的の抗原を測定することができ、高感度かつ選択的に微量物質を定量するバイオセンサ（免疫センサ）が構築されてきている。抗体はタンパク質の集団であり、免疫グロブリン（Immunoglobulin）と呼ばれて、5種類のクラス（IgA, IgD, IgE, IgG, IgM）に分類される。免疫グロブリンはそれぞれアミノ酸組成、分子量、電荷、糖含量等が異なり、IgGが最も多量に存在する。すべての抗体分子は共通した基本構造を有しており、2本の軽鎖（L鎖: light chain）と2本の重鎖（H鎖: heavy chain）計4本のポリペプチド鎖から構成されている。これらの4本のポリペプチド鎖は、システイン残基の間で形成されるジスルフィド結合により結合している。抗体の基本構造を模式的に図1-9に示す。

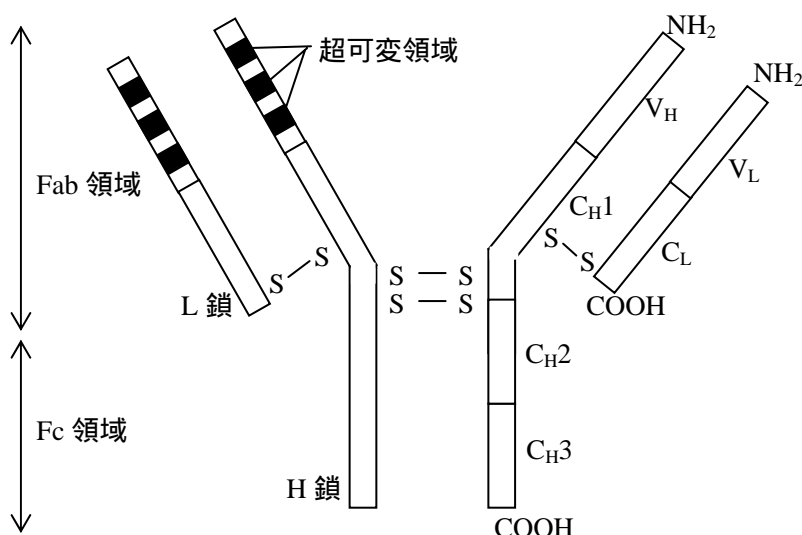


図 1-9 抗体の基本構造

免疫グロブリンの中で、基礎研究から応用まで最も幅広く利用されているのが IgG であり、IgG について記載する。IgG は、2 個の同一 Fab フラグメントと 1 個の Fc フラグメントに分かれる。Fab フラグメントは L 鎖全体と H 鎖の N 末端断片からなり、Fc フラグメントは H 鎖の C 末端側半分の 2 本からなる。抗原は抗体中に存在する 2 個の Fab 領域の先端部に結合する。H 鎖と L 鎖はそれぞれ複数個のドメイン構造からなる。Fab 領域の一部は、異なった抗体間でアミノ酸配列が大きく異なり、この部分を含んだドメインを可変領域 (V_H と V_L) と呼ぶ。可変領域のアミノ酸配列の多様性は、生体が無数の抗原を認識する抗体を作り出せると示している。可変領域の中でも、アミノ酸配列の多様性が特に大きい領域として超可変領域がある。H 鎖と L 鎖には 3 箇所ずつの超可変領域が存在し、これらの領域が立体構造をとった時には相互に近接した位置に存在するように配置される。そして、この立体構造の特異性により、結合する抗原が決定される。抗体と抗原は、非共有結合により結合されており、接触面におけるアミノ酸残基に働く水素結合、ファンデルワールス力、静電的相互作用および疎水性相互作用等の総合力と考えられる。定常領域である Fc フラグメント (C_{H1}、C_{H2}、C_{H3}、C_L) は抗体間でアミノ酸配列に高い共通性がみられる。

その他、DNA はプローブ DNA をあらかじめ蛍光色素などで標識化しておけば、そのハイブリダイゼーションを利用して蛍光を検出し、ターゲット DNA を検出できる。また、分子インプリントポリマーを分子認識素子として利用する場合もある。

・信号変換素子

測定対象の化学物質の濃度値を電気信号値に変換するための信号変換素子には、電気化学デバイス (電極)、光検出素子、圧電素子、サーミスタなどがある。

・信号変換素子： 電気化学デバイス (アンペロメトリタイプ)

電気化学デバイスは、電極で生じる電気化学反応を利用したデバイスで、図 1-10 に示すように酸化反応が起こる電極をアノード、還元反応が起こる電極をカソードと呼び、電極表面での化学

反応を検出測定する。測定方法としては大きく分けて電流検出型測定と電位検出型測定の2種類がある[4,12,13]。電流検出型測定(アンペロメトリー)は、電極電位を一定にした際の電流応答解析であり、電気化学反応(酸化還元反応)によって変化した電極表面近傍に存在する化学物質(電極活物質)の量と、その反応時間に流れた電気量(電流値)との比例関係を利用した測定法である(但し、物質移動律速の条件下であること)。つまり電極電位を一定にして電流値を測定することで、電極近傍に存在する化学種(電極活物質)の濃度の状態・変化が、明確に測定電流値に反映されることを原理としている。

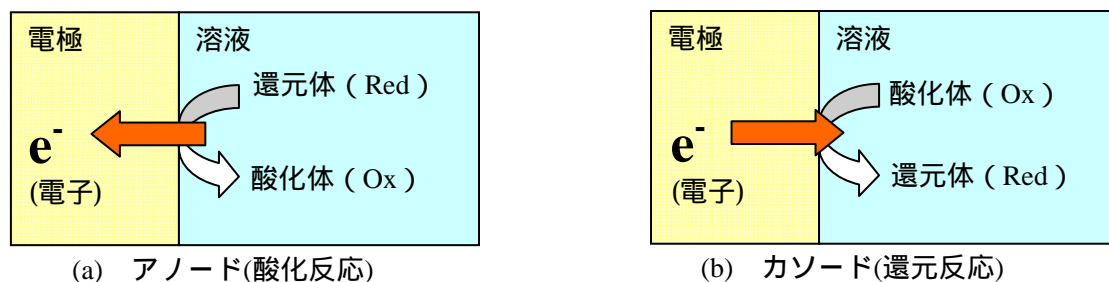


図 1-10 電極部での酸化・還元反応

化学物質(電極活物質)の量と電気信号(電流値)との関係は図 1-11 に示されるように、センサによって測定できる範囲に限られている。化学物質の濃度を検出できる電流値の最低量は、検出限界を示す。一般的には信号対雑音比は、3 程度が目安となる。ところが化学物質の濃度が高すぎる場合、それに伴う電流値が得られない。これは電流応答の飽和状態を意味し、検出可能な濃度範囲をダイナミックレンジという。検出限界が高く、かつダイナミックレンジが高いデバイスほど高性能であるといえる。そして図 1-12 に示すように、測定を始めてから結果が出るまでにかかる時間をデバイスの応答時間と呼び、短いほど高性能なデバイスであるといえる。

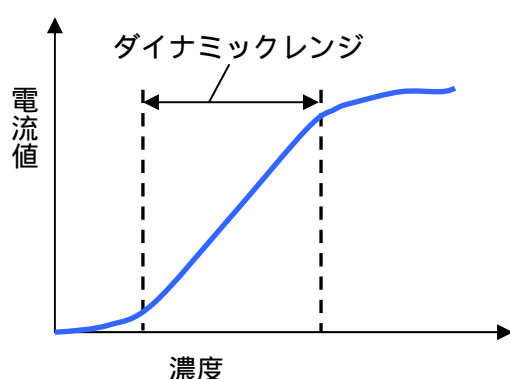


図 1-11 デバイスの情報量と電気信号の関係

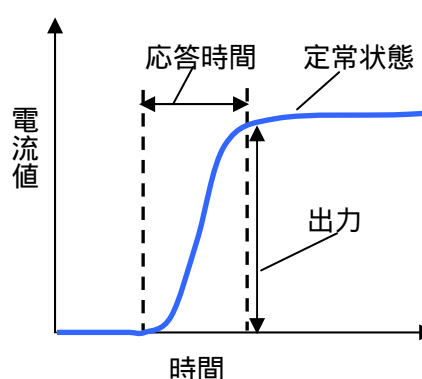


図 1-12 デバイスの時間特性

アンペロメトリーは定量性の良い測定法であり、測定原理が単純で測定系・測定回路も複雑ではなく装置が安価で小型化でき、さらに反応液の濁りや着色に影響されないことから、触媒型バイオセンサの測定法として研究から実用レベルまで幅広く利用されている。この方式を用いた酵素センサ(触媒型バイオセンサに含まれる)は、酵素から電極に電子を伝達する。この電子伝達

の方法に関して大きく分けて3つあり、(a)拡散物質による電子伝達、(b)メディエータによる電子伝達、(c)直接電子伝達に分類されている[7,11,14]。これらの基本原理の模式図を下記図 1-13 に示す。

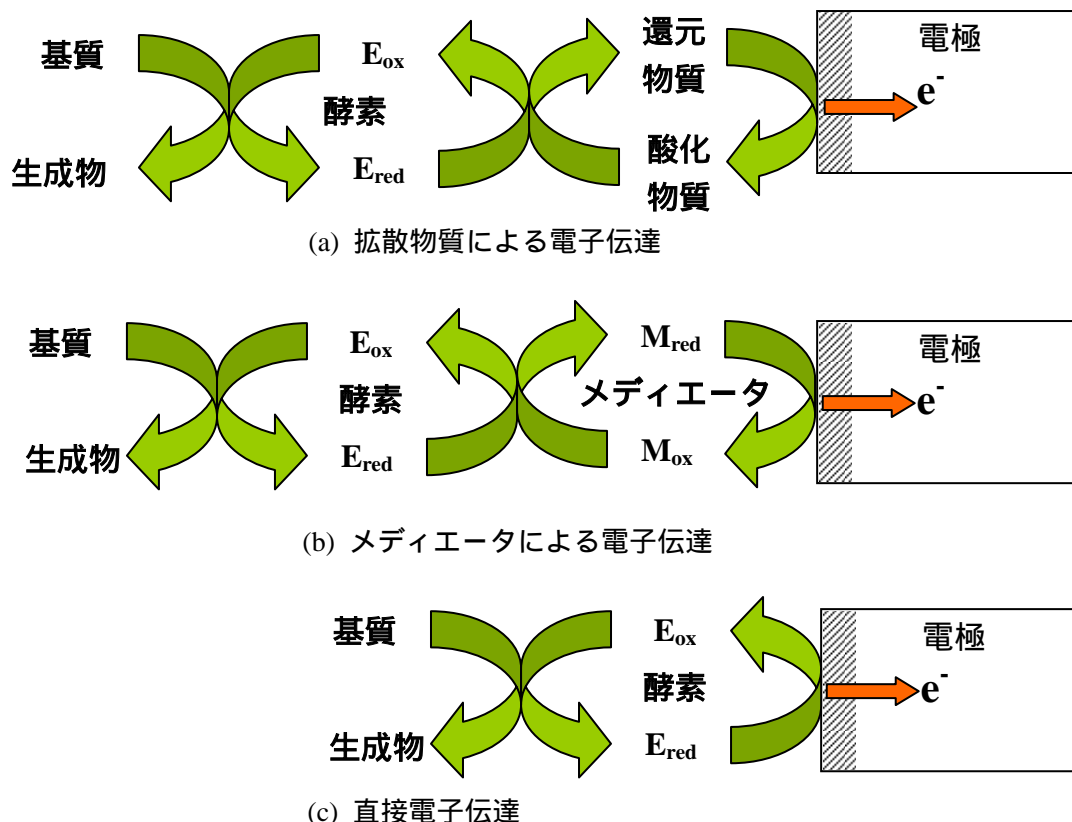


図 1-13 アンペロメトリックバイオセンサの電子伝達概念

拡散物質による電子伝達の原理を用いたバイオセンサは 1967 年に“酵素電極”として報告され、現在も基本原理のバイオセンサは利用されている。その後、メディエータによる電子伝達の原理を用いたバイオセンサが報告された。これは酸化還元反応と電極反応とを電子伝達メディエータを介して共役したものであり、電極電位で酵素反応を制御できる利点がある。さらに、直接電子伝達の原理を用いたバイオセンサについても研究が進んでいる。分子量が数万程度の小さな電子伝達タンパク質を用いて、酸化還元部位近傍のタンパク質表面を、表面処理した電極表面に配向させることで、酸化還元タンパク質と電極との直接電子移動を容易に実現できることが明確になっている。また、ラッカーゼやペルオキシダーゼ、D-フルクトース脱水素酵素、セロビオース脱水素酵素、スーパーオキシドジスムターゼ等も酵素と電極間との間で直接電子移動が実現されている。その他、酵素表面に電子メディエータ分子を化学修飾するなど、効率的な電子移動の方法が研究されている。

・信号変換素子： 電気化学デバイス（ポテンシオメトリックタイプ）

電位検出型（ポテンシオメトリック）デバイス[4,12,13]はイオン濃度を、2つの電極間（参照電極と作用電極）の電位の変化として測定するデバイスで、電極近傍でのイオン濃度差が電圧差を生

じさせることにより成り立つ。例えば、リパーゼを分子認識素子に用いるバイオセンサの場合、リパーゼは脂質を加水分解して脂肪酸とグリセリンの発生させる反応を触媒するが、その際の酵素反応によって水素イオンが発生する。この水素イオン濃度の変化が作用電極表面の電位変化を引き起こし、その電位変化を検出することで脂質濃度を測定する。この電位検出型は免疫センサや、電極活物質の増減が起こらない酵素センサに利用されている。

作用電極の電極反応を観測する電気化学測定では、作用電極・参照電極・対極からなる3つの電極を用いた3電極方式を利用することが多い。これは、2電極間の電位差を測定する2電極方式に対して、3電極方式のほうが測定対象となる電極（作用電極）の正確な電位が測定可能となるためである。作用電極の電位は、参照電極を基準とした参照電極 - 作用電極間の電位差を測定すればよいが、参照電極で酸化還元反応が生じた場合、参照電極部で電位変動が発生し、作用電極の電位測定に影響を与えてしまう。このため、参照電極に流れる電流を下げ、一方で作用電極 - 対極間に電流を流す構造とした3電極方式が、参照電極部の電位変動を抑えて、正確な電位測定を可能にする。3電極方式の概念図を図1-14に示す。

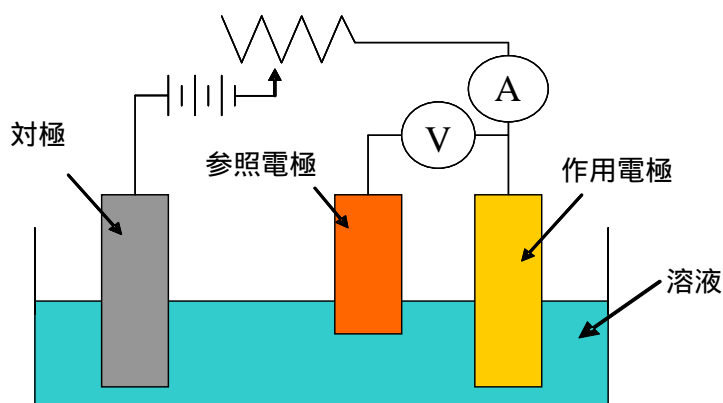


図 1-14 3電極方式の概念図

3電極方式では一般的に図1-15に示すようなポテンシostatを利用することが多く、作用電極の電位を測定できるだけでなく、所定の電位を加えて反応を起こし、作用電極と対極の間に流れる電流値を測定することもできる。

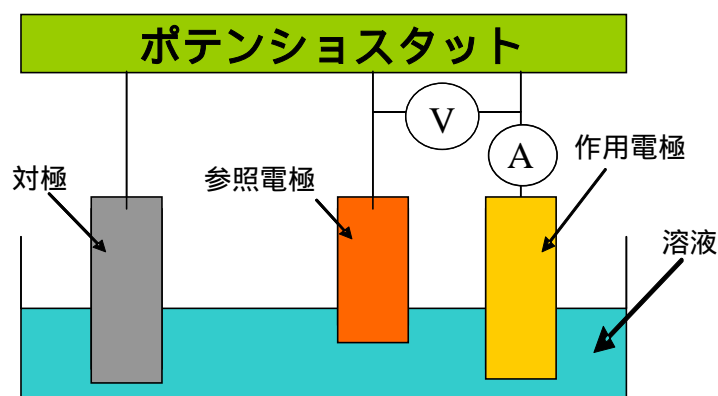


図 1-15 定電位測定とポテンシostatの概念図

・信号変換素子： 圧電デバイス（QCM デバイス）

水晶振動子を利用した超微量天秤(QCM: quartz crystal microbalance)デバイスや表面弾性波(SAW: surface acoustic wave)デバイスなどの圧電素子も信号変換素子に用いられる。水晶振動子[4,6,11,15]は、水晶の結晶から特定の角度で切り出した水晶板の両側に金属薄膜電極を取り付けて振動電場（高周波の電圧）を印加することにより、水晶振動子表面が共振するため、一定の振動数で発振し続ける。水晶板の金属薄膜電極上に物質が付着するとその質量に依存して振動数が変化する。これは見かけ上水晶板の膜厚が増加することにより振動数がわずかに減少するためである。このように水晶振動子は、電極上に付着した物質の質量を発振周波数の変化として定量的に変換することから、QCMとして知られている。取り扱いの容易なものとして、ATカットと呼ばれるZ軸に対して $35^{\circ}15'$ の角度で切り出された結晶面の水晶振動子がある（図1-16参照）。ATカットでは、常温付近で基本振動数がほとんど一定で温度制御をせずに実用に耐えうる特性を得ることができる。

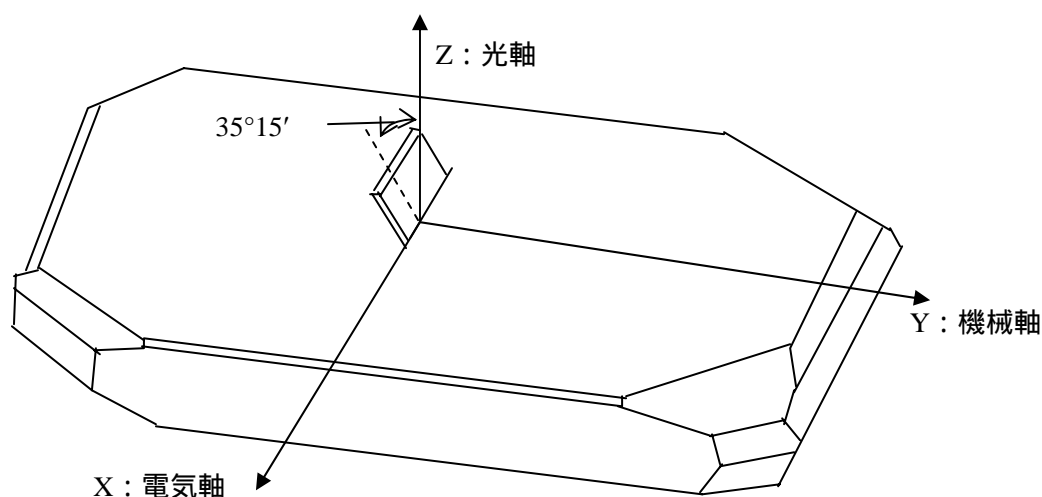


図 1-16 水晶の基本座標軸

振動数の変化量と付着物質の質量との関係は、Sauerbrey の式と呼ばれる、式(1-1)に表される。

$$\Delta F = - \frac{2F_0^2}{A\sqrt{\mu\rho}} \cdot \Delta m \quad \cdots (1-1)$$

ここで、 ΔF は水晶発振子の振動数変化量（単位は Hz）、 F_0 は基本振動数（単位は Hz）、 A は水晶板に取り付けた金属薄膜電極の面積、 μ ($= 2.947 \times 10^{11} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{s}^{-2}$) は水晶の弾性率、 ρ ($= 2.648 \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}$) は水晶の密度、 Δm は電極に付着した物質の質量それぞれを示す。この式において、 $\Delta m/A$ を単位面積あたりの付着した物質の質量 m とし、残りの定数項を K とおくと次のように単純化できる。

$$\Delta F = - K \Delta m \quad \cdots (1-2)$$

ここから、水晶振動子の振動数変化を検出することでその電極上の物質の質量変化を計測できることが分かる。

免疫測定を行う際は、水晶板に金などの薄膜電極を設け、その表面に抗体分子層を固定化・形成させてセンサとする。このセンサ表面に抗原溶液を流すと抗原抗体反応が起こり質量の増加あるいは減少に伴って共振周波数が徐々に減少あるいは増加していく。この減少あるいは増加が抗原濃度に依存する。そしてセンサ表面に固定化された抗体のすべてに抗原が結合するとセンサ応答は定常状態になる。図 1-17 に水晶表面上でみられる抗原抗体の特異的相互作用の断面概略図を示す。また、測定システムを図 1-18 に示す。

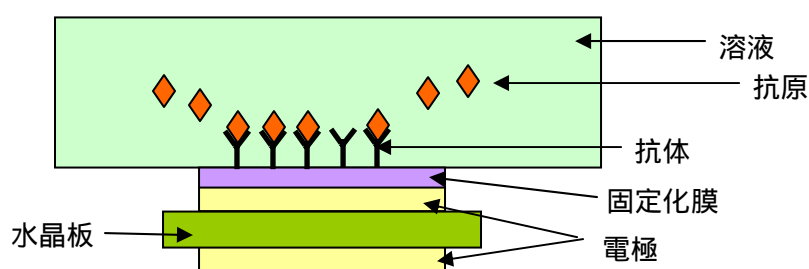


図 1-17 水晶表面上での抗原抗体の特異的相互作用を断面からみたイメージ

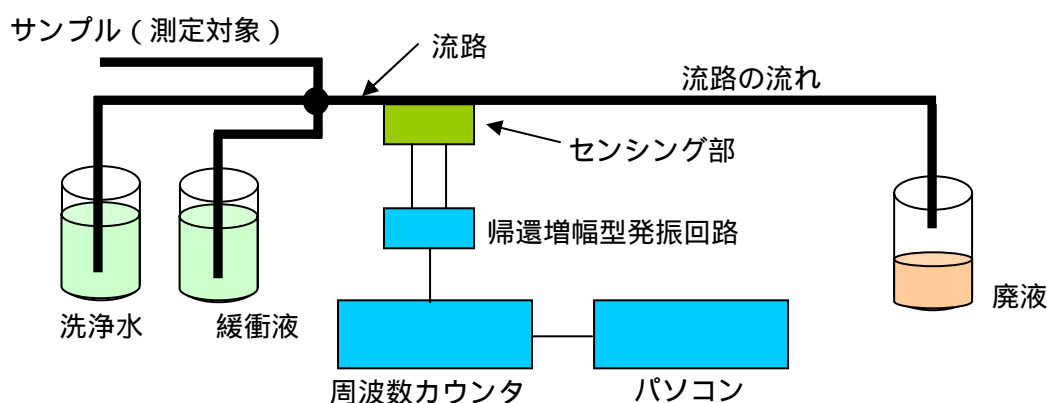


図 1-18 水晶振動子を用いたバイオセンサを含む測定システム構成

上記のように、触媒反応を必要としないバイオセンサとして利用できる水晶振動子だが、測定感度が周波数に依存するため、水晶振動子の物理的性質による周波数限界(100MHz)以上の高感度化を期待することは難しい。

・信号変換素子：圧電デバイス (SAW デバイス)

圧電素子を用いる他のデバイスとして SAW デバイス[6,16]がある。これは、圧電素子上に表面弾性波を発生させた際、圧電素子表面の状態によってその表面弾性波の伝搬周波数が変動することを利用したものである。圧電基板の表面上に 2 対の楕円型電極を作製し、その楕円型電極に高周波信号を入力すると、逆圧電効果によって楕円型電極部分で振動が生じる。そしてその振動が表面弾性波として圧電基板表面を伝わり、もう一方の楕円型電極に達することで圧電効果によって再び電気信号に変換される。表面弾性波が伝わる圧電基板上に抗原抗体反応を行う測定部を配置するこ

とで、その質量変化によって振動が変化し発振周波数も変化することから、その抗原濃度を測定できるセンサとなる（図 1-19）。水晶振動子を用いた QCM デバイスより周波数を高く設定でき、より高感度化が期待されている。

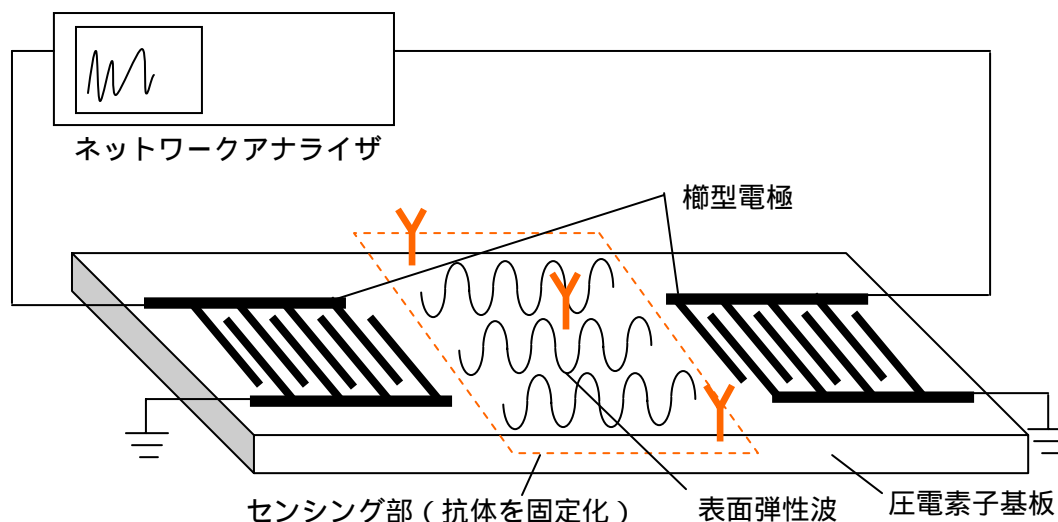


図 1-19 SAW デバイスと測定システムの模式図

・信号変換素子： 光検出素子（表面プラズモン共鳴現象デバイス）

光検出素子の一つに表面プラズモン共鳴現象（SPR: surface plasmon resonance）を原理に用いたバイオセンサ[4,17,18]もある。表面プラズモン共鳴は、金属薄膜の表面において、光が極めて特異的な角度で入射したときのみ、金属表面のプラズモン波と光波が共鳴する現状である。この共鳴角は金属薄膜近傍の媒質の屈折率に極めて敏感であり、相互作用をこの範囲に起こさせると媒質の屈折率が変化し、その結果、共鳴角が変化する。この共鳴角変化を測定することで相互作用を測定することができ、金属薄膜表面に抗体を固定化し、抗原との相互作用を測定するバイオセンサに利用されている。典型的な SPR バイオセンサの測定概念図を図 1-20 に示す。

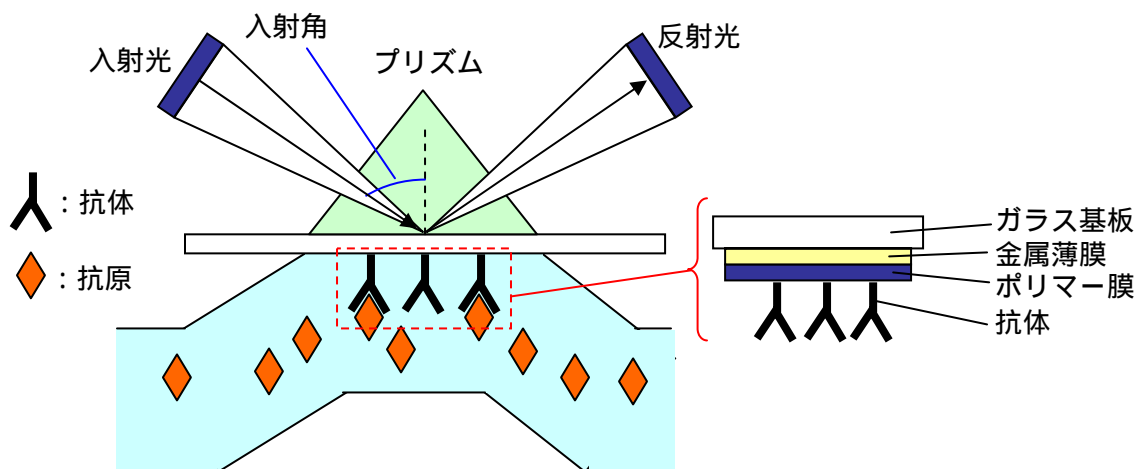


図 1-20 典型的な SPR バイオセンサの測定概念図

・信号変換素子： その他

その他の信号変換素子として、測定試料と分子認識素子との反応によって生じる光吸収や蛍光・発光反応などの光の変化を検出するために光源や光学フィルタ・受光素子・撮像素子等の光学素子を併用することが多く、具体例として、光電子増倍管やフォトダイオード、イメージセンサ(CMOS イメージセンサ: complementary metal oxide semiconductor image sensor や CCD イメージセンサ: charge coupled device image sensor) などがある。また、素子自身の温度変化が電気変化となって現れるデバイスであるサーミスタを信号変換素子としてバイオセンサに利用するものもある。

・固定化技術

バイオセンサは分子認識素子と信号変換素子の組合せからなり、生体物質である酵素を分子認識素子に利用することは、先に記した。酵素は水溶液中で効力を発揮するが、バイオセンサとして繰り返し使用する場合、水溶液中に酵素が析出すると考えられ、安定した測定はむずかしい。このため、水溶性の酵素を不溶化して信号変換素子に組み合わせる技術が必要であり、この技術を固定化技術[4,5,6]という。酵素の固定化は、不溶性物質(担体)に酵素を担持させて行うことが主であり、表 1-3 のような化学的方法と物理的方法がある。しかし、酵素の固定化は、いずれの方法も一長一短であるため、目的に応じて使い分けることが必要である。以下に主な固定化法を記す。

(1) 物理吸着法

物理吸着法として吸着させる担体を用いる吸着法がある。抗体にはアルミナ、木炭、セルロースなどが挙げられる。結合する動力は水素結合、分子間力、静電気力、疎水性相互作用などが挙げられる。この方法は、簡単にできる反面、結合の大きさや量が pH、イオン強度、温度などに左右されやすい。また、結合が弱いので徐々に脱離し、バイオセンサとして利用する際に、センサ応答の低下を招く可能性がある。また、高分子に酵素分子を閉じ込めて固定する包括法もある。包括法に利用するポリアクリルアミドゲルの構造例(包括法ではゲル内部に酵素を埋め込んで固定化する)を図 1-21 (a)に示す。

(2) 共有結合法

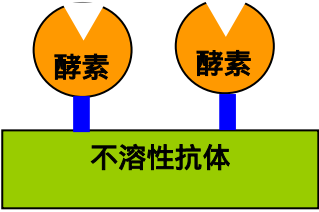
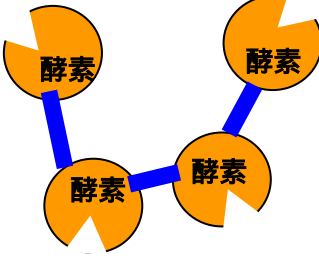
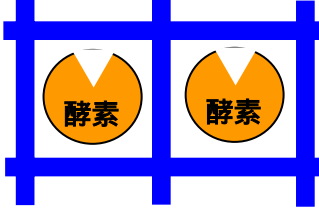

共有結合法とは担体に酵素と反応性の高い官能基を導入し、酵素と共有結合させる方法である。酵素にはアミノ酸由来の側鎖の官能基が存在し、そのアミノ基、カルボキシル基、チオール基、水酸基などが利用される。図 1-21(b)に 2 価の架橋試薬であるグルタルアルデヒドを用いて、担体表面のアミノ基と酵素に存在するアミノ基の両者を架橋する固定化方法を示す。

この方法の利点は、安定に酵素を固定化できるので、センサの繰り返し利用や長期利用に有利である反面、官能基の存在が前提なので、適用範囲が狭く、操作も煩雑になりやすい。また、酵素の活性中心付近の官能基がつぶされた場合、酵素の基質特異性が変わったり、活性を失ったりする。

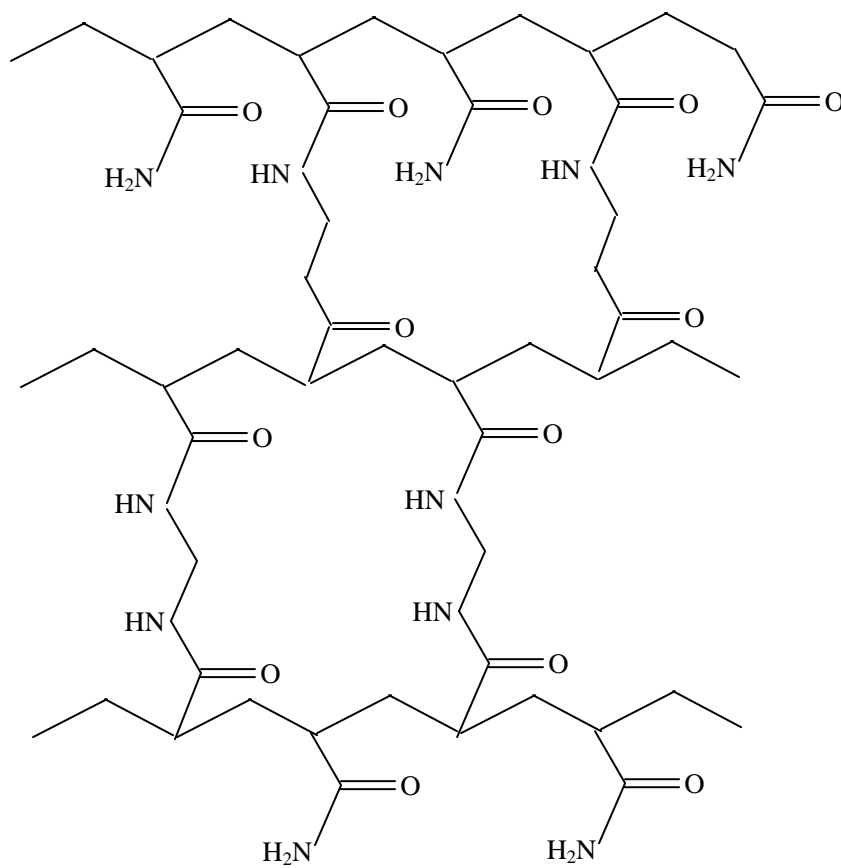
(3) 架橋化法

架橋化法とは酵素どうしを2価の架橋試薬によって結合して不溶化させる方法であり、酵素のアミノ基を利用する。架橋化試薬としてグルタルアルデヒドを用いることが多い。特徴は、(2)項の共有結合法と同じである。

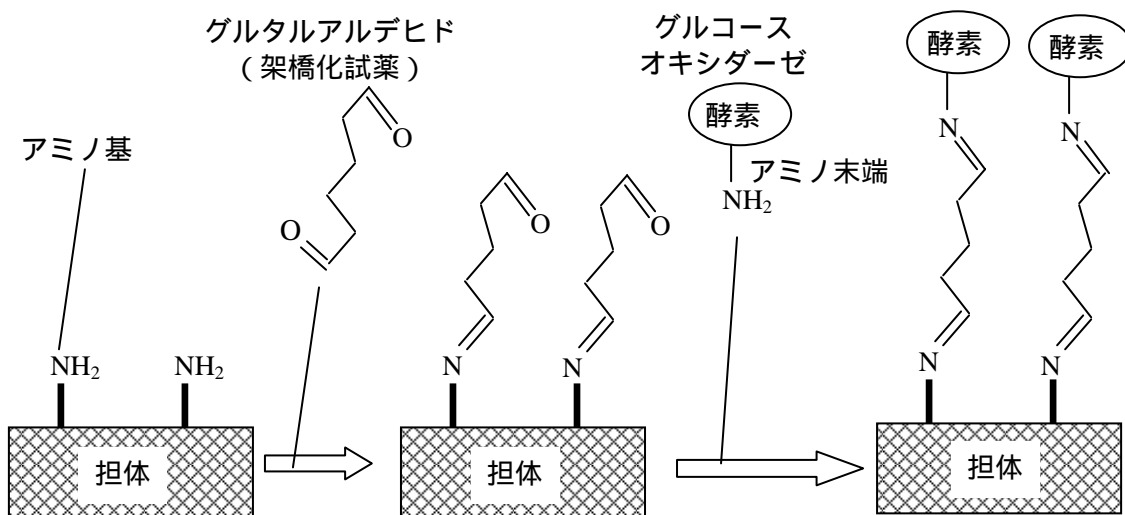
表 1-3 酵素の固定化

区分	結合方法	内容	メリット デメリット	概念図
化学的方法	共有結合法	担体（繊維状高分子の膜、ガラス表面）と酵素との間に共有結合を形成する。	固定化時の化学反応によって酵素の活性が低下しやすいが、固定化後の安定性には優れている。	
	架橋化法	官能基を複数もつ試薬（グルタルアルデヒドなどの架橋剤）を用い、酵素間に共有結合の“橋”をかけ、酵素の膜を作る。		
物理的方法	包括法	高分子ゲル（アクリルアミドゲルやポリビニルアルコールゲルなど）の中に、酵素分子を閉じ込める。	多量の酵素を固定化しやすい。また多種の酵素に対応できる。しかし、高分子の基質である酵素には適用が難しい。	
	吸着法	担体に酵素を物理吸着させる。結合の要因として、水素結合、分子間力、静電気力、疎水性相互作用などが上げられる。	容易に結合するが、吸着力は弱い。イオン強度やpH、温度に影響されやすく、容易に溶出するため、半透膜で覆って保護するのが一般的である。	

注) 文献 4、文献 5、文献 6



(a) 包括法に用いるポリアクリルアミドゲルの構造



(b) グルタルアルデヒドを用いた共有結合法

図 1-21 共有結合法および包括法の参考例

分子認識素子で認識した信号を信号変換素子で効率よく、電気信号に変換することが、バイオセンサの性能にとって重要であるが、上記のように、分子認識素子や信号変換素子の選定・組み合わせ数は多数にわたるため、目的に合わせた素子を構成することが大切である。血糖値・尿糖（グルコース）センサ以外にも、乳酸オキシダーゼまたは乳酸デヒドロゲナーゼを用いた乳酸センサやグルタメートデヒドロゲナーゼを用いたグルタミンセンサなどが市販されている。しかし多くの酵素では“安定性”を確保することや“試料の微量化、測定に悪影響を与える共存物質（妨害物質）に対する選択性能力の向上、高感度化、低価格化”などに課題があり、これらの課題を解決するため、研究分野では数多くの検討がなされている。

1-1-5 アンペロメトリック（電流検出型）バイオセンサの利点

信号変換素子として用いる素子には、目的に合わせた複数の素子から選択できることを上記で述べたが、その一つに電極を用いたアンペロメトリー（電流検出法）タイプのバイオセンサがある〔6-8〕。歴史が古く、多用されているバイオセンサとして、この方式を用いたアンペロメトリックグルコースバイオセンサがあげられる。これは、測定対象となるグルコースの濃度を、酵素反応および電気化学反応を利用して、電流値に変換し、その変換した測定電流値からグルコース濃度を換算するバイオセンサである。

アンペロメトリータイプの検出方式には、機構・回路構成がシンプルという利点がある。他の検出方式では、例えば光学系機構や高周波制御回路などが必要であり複雑になる。従ってアンペロメトリータイプは、小型化・安価・生産性・品質等の点で優れており、各分野で幅広く利用されている。血糖測定用バイオセンサの代表的な測定方式でもある。

1-1-6 糖尿病と血糖用測定装置

血糖用測定装置が求められる背景の一つに糖尿病患者の増加がある〔11,19,38〕。生活習慣や社会生活の変化に伴い、糖尿病患者は世界的に増加しており、糖尿病の診断や治療および血糖状態把握のために、血糖測定の需要が拡大すると考えられている。2000年から2030年までで世界の糖尿病患者数の合計は表1-4のように増加すると推測されている。

表 1-4 推定糖尿病患者数

年	2000年	2003年	2025年	2030年
推定糖尿病患者数	1億7100万人	1億9400万人	3億3300万人	3億6600万人

注) 文献 19

日本国内でも糖尿病患者数が増加している。厚生労働省は、平成9年と平成14年に「糖尿病実態調査」を実施し、平成14年の結果では、「糖尿病が強く疑われる人」が約740万人、「糖尿病の可能性を否定できない人」が約1620万人と、日本国民の人口の約13%が糖尿病の可能性のあることを示した。また、表1-5から分かるように糖尿病の可能性のある人は5年間で約250万人も増加している。

表 1-5 日本の糖尿病の可能性のある人の推移

状態	平成 9 年	平成 14 年
糖尿病が強く疑われる人	約 690 万人	約 740 万人
糖尿病の可能性を否定できない人	約 680 万人	約 880 万人

注) 文献 38

糖尿病患者あるいはその可能性を否定できない人が、この病気に対する治療や予防をせず、これを放置すると網膜症や腎症、神経障害などの慢性合併症を引き起こす可能性がある。糖尿病は体内の血糖値（グルコース濃度）を調整できなくなる病気であり、例えば高血糖状態が継続することで血管が硬くもろくなり、特に毛細血管にダメージが生じて、合併症につながると考えられている。従って、糖尿病の合併症を予防するためには、血糖値を測定し、コントロールすることが重要になる。また、血糖値は、空腹時と満腹時で濃度差が大きく変化し、低血糖は生命の危機に直接つながることから、迅速にあるいは連続的に、血糖値を測定できることも望まれている。血糖測定装置は小規模病院・ベッドサイドモニタリング・自己測定での使用環境が主であり、安価・携帯/移動性・操作性・メンテナンス性に優れた血糖測定装置が求められ、バイオセンサによる測定方式が主流になっている。

1-1-7 血糖測定用バイオセンサ

血糖測定は市場で必要とされており、血糖測定用バイオセンサの製品化も進んでいる。ここでは、血糖自己測定装置である血糖測定用バイオセンサについて述べる。血糖測定用バイオセンサには酵素として、GOD あるいはグルコースデヒドロゲナーゼ(GDH)が用いられている。特に GOD は、安価・長期安定性が良く、扱いやすい酵素であり、酵素量が一定であった場合、酵素とグルコースとの反応量がグルコース濃度に比例する。これが測定原理の基本である。具体例として、過酸化水素を電子伝達に利用する“過酸化水素型バイオセンサ”の動作原理の概略図を図 1-22 に示し、反応式を(1-3)・(1-4)に示す(但し、過酸化水素型バイオセンサの信号変換素子を電極とし、酵素を GOD とする)。

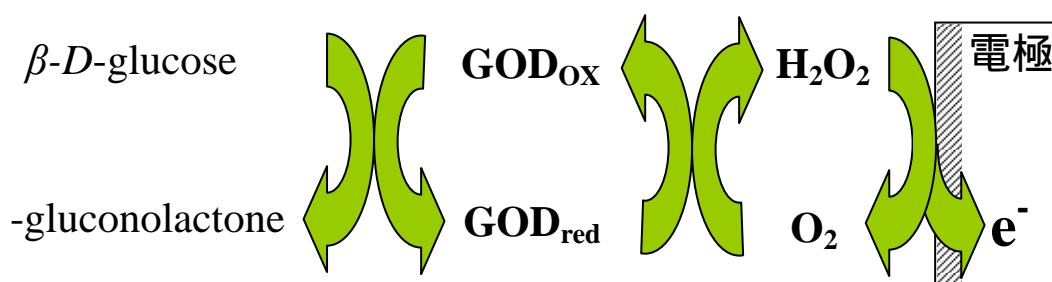
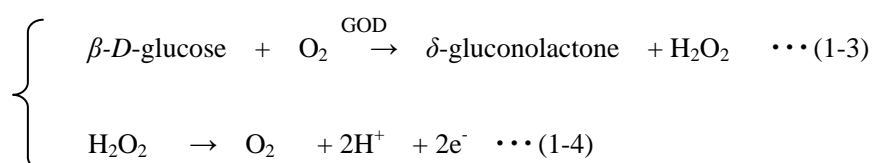


図 1-22 過酸化水素型グルコースバイオセンサの動作原理概略図



血液（血清）中のグルコースと GOD が酵素反応して、過酸化水素とグルコノラクトン (gluconolactone) を生成する。生成された過酸化水素は電極表面で電気化学反応によって酸素と水素イオンおよび電子を放出し、その電流値を測定することで、グルコース濃度を測定可能にする。

バイオセンサを用いた血糖自己測定装置は、過酸化水素型以外にも複数の測定原理があり、多数の装置メーカーが開発・参入している。現在までに市販された主な血糖自己測定装置の比較表を表1-6に示す [11,20]。さまざまな原理の血糖自己測定装置があるが、測定原理ごとに課題もある。GOD 比色法では、一般的に、妨害物質となる還元性物質（例えばアスコルビン酸）が過酸化水素と競争反応することで、低値寄りの測定結果を導く傾向がある。また、GOD 電極法では妨害物質となる還元性物質が電極と電気化学反応することで高値寄りの測定結果を導く傾向があり、さらに溶存酸素の影響を受ける可能性もある。GDH を用いた測定では、GDH がグルコース以外の糖（マルトースなど）とも酵素反応するため、高値寄りの測定結果を導く傾向がある。従って、高い安全性が要求される血糖自己測定装置は、更なる精度向上が求められている。

表 1-6 市販された血糖自己測定装置の比較表

装置 No.	血液量 [ul]	測定時間 [sec]	測定範囲 [mg/dl]	重量 [g]	測定原理 (メーカ)
1	3	30	10-600	100	GOD 電極法(フェリシアン化カリウム)
2	2	15	20-600	45	GOD 電極法(フェリシアン化カリウム)
3	0.6	15	20-500	53	GDH 電極法(フェリシアン化カリウム)
4	0.3	15	20-500	80	GDH 電極法(フェリシアン化カリウム)
5	0.3	7	20-500	39	PQQGDH 電極法(オスミウム複合体)
6	1	5	20-600	42.5	GOD 電極法(フェリシアン化カリウム)
7	1-2	5	10-600	56	PQQGDH 比色法
8	1.5	8	10-600	120	PQQGDH 比色法
9	4	26	10-600	87	GDH 電極法(フェリシアン化カリウム)
10	2.5	18	20-900	77	GOD 電極法(フェリシアン化カリウム)
11	3.5	20	20-600	40	GOD 電極法(フェロセン)
12	2.5	20	20-500	79	NADGDH 電極法(プラスチック)
13	3	20	30-450	312	NADGDH 電極法(フッ素樹脂)
14	1.2	10	20-600	45	GOD 比色法
15	4	10-60	20-600	210	GOD 比色法

注) 文献 11、文献 20

従来の血糖測定では測定タイミングでしか血糖状態を把握できない。しかし、集中治療室における低血糖モニタリング、食後の高血糖や夜間の低血糖など“隠れ高血糖・低血糖”の発見検査、さらに自動インスリン投与機能のための血糖モニタリングなど、連続的に血糖状態を把握する要望が高く、対応するための持続型グルコースモニタリングシステム (CGMS: continuous glucose monitoring system) の研究開発や製品化も進んでいる[7,21]。主な持続型グルコースモニタリング

システムの比較表を表 1-7 に示す。

表 1-7 市販された持続型グルコースモニタリングシステムの比較表

装置 No.	測定対象	測定頻度 [分ごと]	測定範囲 [mg/dl]	使用期間 [日]	インスリンポンプ連動	キャリブレーション頻度	測定原理 (電子移動方式)
1	細胞間質液	5	40-400	3or6	有り (分離型)	1回/12時間	GOD (過酸化水素型)
2	細胞間質液	3	40-400	2	無し	1回/12時間	GOD (過酸化水素型)
3	細胞間質液	1	20-500	5	無し	5回/日	GOD (直接電子移動型)
4	細胞間質液	5	40-400	7	無し	1回/12時間	GOD (過酸化水素型)

注) 文献 7、文献 21

現状の CGMS の使用方法としては、測定対象を細胞間質液とし、センサ部を常時体内に侵襲させる。体内に侵襲する点から毒性などの問題を考える必要があり、米国食品医薬品局では使用可能なメディーターを制限している。このため現状の CGMS は測定原理として過酸化水素またはメディーターであるオスミウム錯体を電子伝達に利用している。その他、血糖自己測定装置と比較して次のような課題がみられる。例えば、血中グルコース濃度と細胞間質液中のグルコース濃度では数分から十数分程度の時間差が生じており、血糖値との測定結果に時間的ズレが生じる。また、1 日数回の校正が不可欠になっており、グルコースセンサとしての精度や安定性が血糖自己測定装置より劣ると考えられる。センサの寿命は 2~7 日程度である。よって、CGMS でも、今後更なる性能向上が求められる。

市販の CGMS の中に、インスリンポンプと連動する機能を有するものがある。また海外では、無線による測定データ転送機能を有したものもある。このように、今後グルコースセンシング以外の機能も付加・連動する傾向は強まると思われる。

1-1-8 バイオセンサの動向とエレクトロニクス技術

血糖測定のみならず、従来の血液検査・診断から細胞、ウイルス、DNA や RNA の解析検査まで含めて、その検査・診断のための測定技術は向上しており、その技術を背景にした臨床現場即時検査 (POCT: point of care testing) が急速に普及し始めている。将来的には数千億円から数兆円規模になることも見込まれている[22]。

血糖測定用バイオセンサのみに限定することではないが、この流れに呼応したバイオセンサの動向として、 μ TAS (micro total analytical system) MEMS/NEMS (micro electro mechanical systems / nano electro mechanical systems) と呼ばれるセンサ類を小型化・集積化して組み合わせてシステム化された分析装置の研究・開発が進んでいる[23,27]。センサ電極、流路、試料挿入口などを小型

化してチップ上に集積化することで、微小な試料を利用でき、測定に使用する溶液の量を少なくでき、また反応時間の短縮も可能となり、さまざまな利点が得られる。小型化・集積化を実現する技術にエレクトロニクス技術が使われている。例えば、バイオセンサ部の基本部品である微小電極や光導波路の作製、あるいは人工分離構造（例えば分子サイズで物質を分離するためのピラーアレイ構造）などの形成は、リソグラフ技術やドライエッチング技術を用い、パターンニング用マスクアナライザやステッパ、電子線露光装置、レーザー描画装置、成膜用にスパッタ装置や蒸着装置、化学気相成長装置、エッチング装置、さらにはダイシングソーやサンドブラスト装置、陽極接合装置などの装置を使用することになる。これらは半導体加工技術になるが、当然同じ技術で電子回路・電子チップ・電気基板を作成することができる。従って、今後の分析装置は μ TASやMEMS/NEMS技術を利用した小型化・機構の集積化にとどまらず、電子回路や電子機能との一体化や組み合わせが進むものと考えられる。そして分析装置の機能に他の機能を付加された新たな分析装置システムが展開されると考える。例えば、分析装置の測定結果をデータ処理して無線通信でパソコンやスマートフォンに転送する分析装置システムが、小さな腕時計規模で実現できると想像する。信号変換素子を中心に述べたが、分子認識素子の多様化も進んでいる[6,25]。分子認識素子として、昔から酵素が用いられてきたが、DNAやタンパク質を用いたDNAチップやプロテインチップの研究・開発も進んできた。さらに、生体由来の物質では高温や極端なpHの条件下では変性してしまう弱点があり、これを克服した安定な人工分子認識素子である分子インプリントポリマーの研究・開発も進んでいる。分子認識素子の新技術も含めて、新たな分析装置システムが展開されると想像する。

1-1-9 プラズマ重合技術

小型化・集積化に向かう分析装置の研究開発に、半導体加工技術が利用されることを述べたが、プラズマプロセスおよびプラズマ重合技術もこれに含まれる。

プラズマとは荷電粒子である電子とイオンおよび中性粒子からなる状態のことであり、電離した気体で、導電性を保つ[28]。正負の電荷量が同じであり、全体として見れば中性である。しかし、プラズマ内部の一部を見ると、正イオンと電子あるいは正イオンと負イオンが対でつくられており、中性でないところが存在する。また、プラズマ中の中性粒子でもエネルギーを得てラジカル状態、つまり活性化状態の粒子も存在する。

プラズマ重合プロセス[29,30]は、グロー放電、コロナ放電、高周波放電などの放電によってイオン化された気体（プラズマ）を利用してモノマー分子を活性化させ、重合活性種を生成させて高分子化する重合法であり、基板上に直接ポリマー重合膜を形成する方法である。プラズマ中には、様々な活性種（電子、イオン、励起粒子、ラジカル、二次反応による中性の活性種など）が存在するため、その重合反応は特異的になる。例えば、不飽和結合や特定の反応基を持たない有機分子でも直接、高分子薄膜化することができる。

プラズマ中には数多くの活性種が存在するため重合膜作成プロセスを例示することは難しいが、プラズマによる化学反応によって重合体が生成するメカニズム説明の一つに、CAP（Competitive ablation and polymerization）機構がある（図1-23）[29,30]。その機構によると、プラズマ重合過程は、プラズマ開始重合、プラズマ重合、アブレーションの三つによって決まると考えられている。プラズマ開始重合とプラズマ重合は重合膜の生成を促し、アブレーションは重合膜の生成を妨げ

る。プラズマ開始重合とは、プラズマ(例えばアルゴンプラズマ)によりモノマーを活性化させ、その活性化されたモノマーによりその後重合することであり、プラズマ重合とはプラズマ化されたモノマーが反応して重合することを意味する。一方アブレーションとは、プラズマにより反応性の高くなった成分が重合膜を攻撃して重合膜の生成を妨げることであり、一般にモノマーの化学構造や基板の化学構造に大きく影響する。例えば成膜の際、炭化水素のプラズマ重合では、プラズマ中での反応性が低いためアブレーションを考慮する必要はあまり無いが、フッ素や酸素原子を含むモノマーの場合には、反応性の高いフッ素原子や酸素原子が形成される為、形成された重合膜を攻撃して重合膜の生成を妨げることになり、アブレーションを考慮しなければならない。このようにプラズマ重合膜の生成は、重合とアブレーションのバランスによって決定され、プラズマ重合条件による反応の程度の違いが、重合膜の形成速度に違いを生むと考えられている。

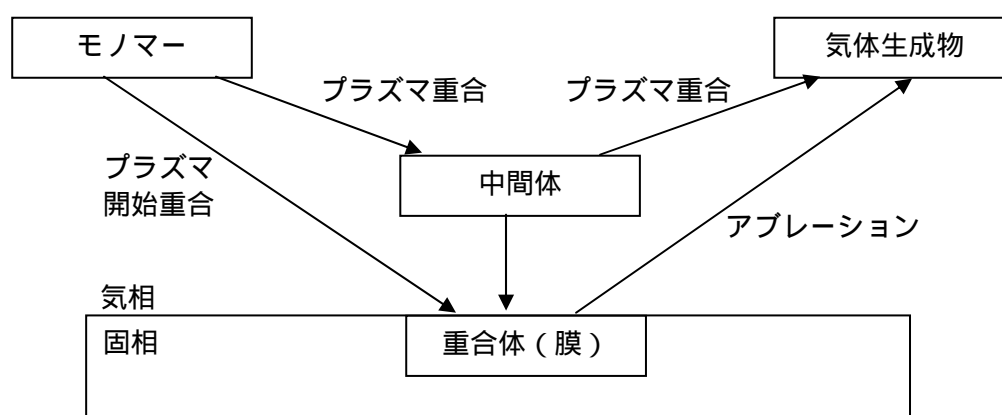


図 1-23 プラズマ重合概念図 (CAP 機構)

プラズマ重合プロセス(非重合性ガスを用いたプラズマ処理も含む)およびこの方法により作製されたプラズマ重合膜は、次のような特徴を持つ。

- ・ 高分子合成と薄膜作製工程を1つの作業で、短時間で行える
- ・ 重合膜の表面改質を容易に行うことができる
- ・ 重合膜のぬれ性を容易にコントロールできる
- ・ 重合膜の作製が、低温かつドライプロセスである
- ・ モノマーの選択肢が広い
- ・ 超薄膜(100nm以下)においてピンホールが生じ難く、緻密で均一な非晶質膜である
- ・ 重合膜は高密度な架橋構造のため、溶剤に溶けにくく化学的・機械的に安定で耐久性に優れる

などがあげられる。

上記に述べたように、プラズマ重合膜はプラズマ中ドライ状態で合成される有機薄膜である。プラズマ重合膜の作製では、真空状態とした真空チャンバー内に適当な圧力、流量でモノマーガスを満たした後、RF電源回路から電圧を印加して電磁界を供給することでモノマーをプラズマ状態にして重合化し、基板上に重合膜が堆積されて成膜されることになる。図 1-24 に典型的なプラズマ重合装置を示す。成膜のパラメータは放電電力、流速、圧力、基板の位置、基板温度、チャ

ンバーの形成などが挙げられる。

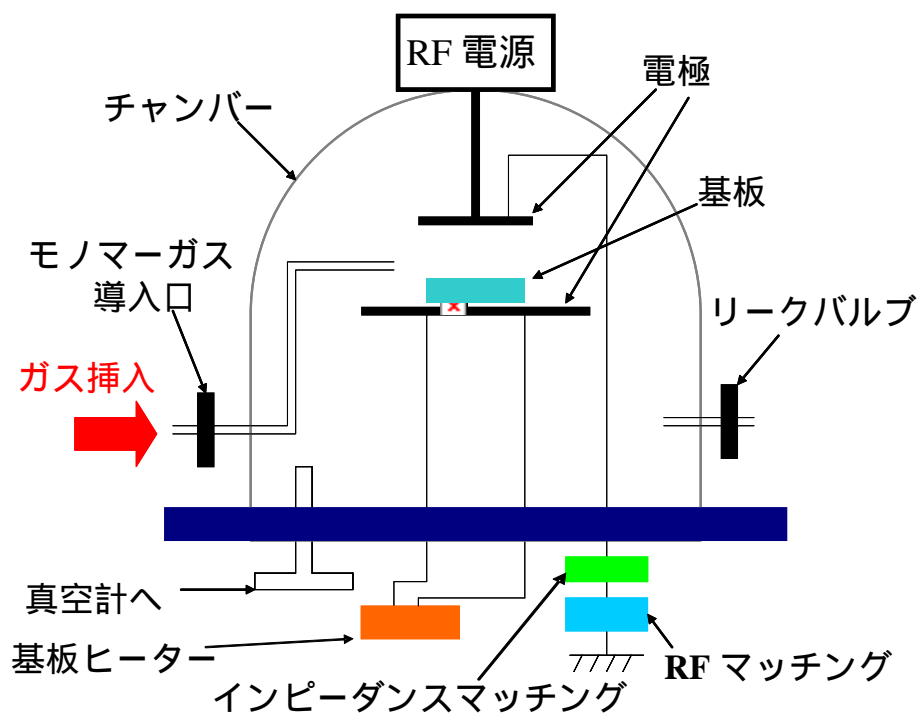
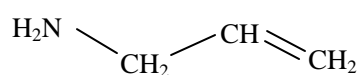
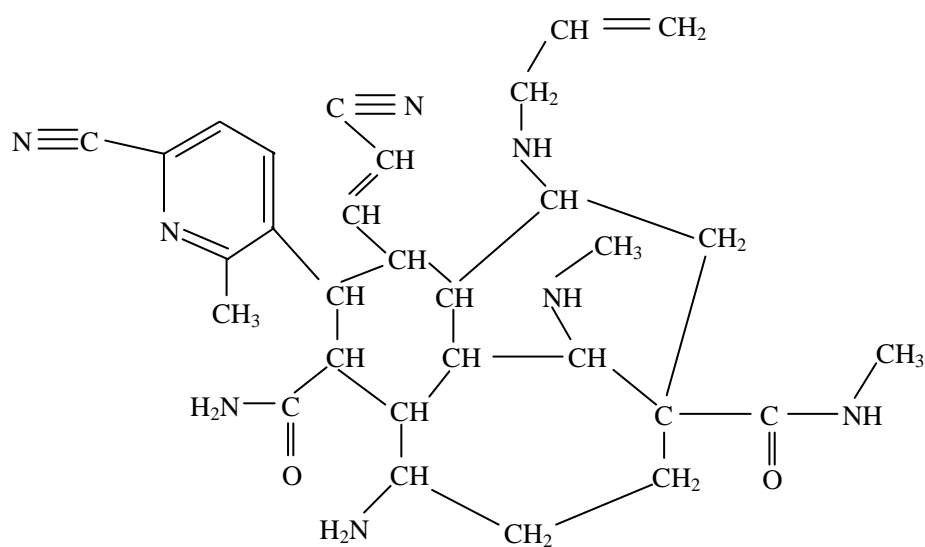


図 1-24 プラズマ重合装置(内部電極型)

重合反応がプラズマ内で行われるためモノマーに不飽和結合がない場合でも重合が可能である。また図 1-25 に、窒素原子が含有したアリルアミンの構造式およびアリルアミンをモノマーとしたプラズマ重合膜の構造図を示す[31]。さらに図 1-26 に、ヘキサメチルジシロキサン構造式およびヘキサメチルジシロキサンをモノマーとしたプラズマ重合膜の構造図を示す[32]。膜形成の後、適当なガス（例えば、窒素ガスや酸素ガス）を用いてプラズマ処理を行うことで膜表面にアミノ基、カルボキシル基などの官能基を容易に導入することもできるため、これを利用して膜表面に化学物質や生体物質を固定化することも可能となる[33]。

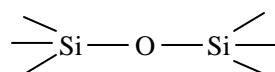


(a) アリルアミンの構造式

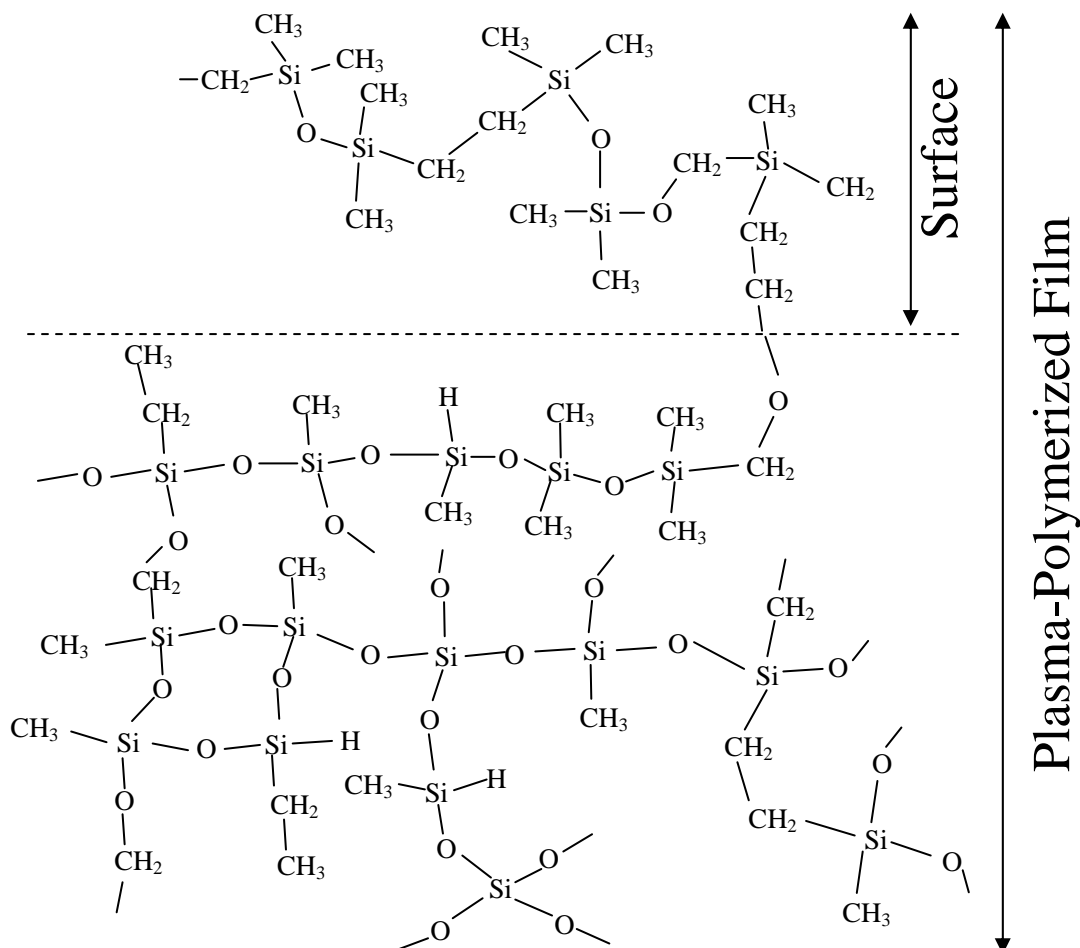


(b) アリルアミンプラズマ重合膜の構造式

図 1-25 アリルアミンに関する構造式と構造図



(a) ヘキサメチルジシロキサンの構造式



(b) ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の構造式

図 1-26 ヘキサメチルジシロキサンに関する構造式と構造図

バイオセンサに用いる分子認識素子は酵素等の生体分子であり、水溶液中にて機能を発揮する。バイオセンサの構成を考えた場合、ドライ環境を要求する信号変換素子部やその周辺部と、ウェット環境を要求する分子認識素子部とを結びつける「インタフェース設計」は重要であり、ドライプロセスでありながら生体物質との親和性に優れた特徴をもつプラズマ重合法およびプラズマ重合膜は、そのインタフェース設計に有用と考える。そしてプラズマ重合膜を用いたバイオセンサの研究・開発は進んでいる[34-36]。バイオセンサと電子回路・微細機構との連携や一体化を視野に入れると、バイオセンサの作製に半導体加工技術と関連性の深いプラズマ重合法を用いること事は、今後の展開で大きな利点になると考える。

1-2 本論文の目的

バイオセンサは医療・食品・環境と様々な分野で利用されており、その主な理由は、検出したい化学物質を小型・安価な機器で簡便に測定できる点にあると考える。また、測定項目や測定数（検査数）の拡大・増大も市場からの要求として見込まれ、今後もバイオセンサのニーズは増加すると予測できる。他方でバイオセンサとしても、新しい分子認識素子（新たな酵素・新たな生体物質・人工的に酵素の持つ機能と模擬する分子インプリントポリマーなど）をターゲットにした研究開発が進み、さらに、異なる技術（ μ TAS や MEMS/NEMS など）との融合とその活用も進んでおり将来に向けて、検出可能な対象物の拡大、測定精度・ダイナミックレンジ・サンプル量・測定時間などの性能向上、Lab on chip のような微細機構との一体化やデータ処理・通信機能と連携する新しい機能の付加など、進展に期待が持てる。

バイオセンサは、その性能向上の為に進化している。例えば、アンペロメトリックグルコースバイオセンサでは検出電流を増加させるため、その電子伝達原理が過酸化水素型からメディエータ型で発展し、更なる展開となっている。しかしながら、アンペリメトリックグルコースバイオセンサを体内での持続型グルコースモニタリングシステムに利用する場合には、メディエータの毒性を考慮しなければならず、古くからある過酸化水素型も重要な技術となっている。いろいろな方面での発展が見込まれるバイオセンサは、その市場要求も多岐にわたるため、新しい発展的な事項のみならず従来から研究されていた基礎的な事項も重要である。

バイオセンサの性能を左右する重要な部分に、分子認識素子と信号変換素子を結びつける「インタフェース設計」がある。これは、バイオセンサにとって基礎的な部分でもあり、検出対象の化学物質を電気信号に変換する変換特性に大きく影響する。良い変換特性を得る為、インタフェースの設計では、「検出対象の化学物質をどれだけ高感度で検出できるか」そして「ノイズ成分をどれだけ抑えることができるか」がポイントになる。

本論文の上位にある目的として、次の 2 つを掲げる。

- ・ 高感度なバイオセンサを実現するためのインタフェース設計手法の確立
- ・ 微細な機構や電子回路との融合・一体化が容易なバイオセンサを実現するためのインタフェース設計手法の確立

この上位目的を満たす方法として、インタフェース設計にプラズマ重合膜を用いる方法がある。インタフェース設計に有用とされるプラズマ重合膜は、その膜表面に生体分子を高密度に吸着し、かつ電極との親和性にも優れる。さらにドライプロセスで成膜されるプラズマ重合膜は半導体加工技術との組み合わせも優れる。

本論文では、高感度なバイオセンサを実現するために電子伝達性能の向上とノイズ要因の低減を目指す。そして微細な機構や電子回路との融合・一体化を容易にするために半導体加工技術との融合が簡単なドライプロセス化を目指す。これらを実現する手法として、プラズマ重合膜/酵素複合体を用いてバイオセンサを作製する。最終的な到達点として血糖値センサへの利用を意識し、本論文の目的を下記に定める。

本論文の目的：

測定対象であるグルコースが効率よく検出できると共に妨害物質であるアスコルビン酸の影響が低減でき、さらにドライプロセス技術を利用して作製できる「プラズマ重合膜/酵素

複合体を用いるアンペロメトリックバイオセンサ」を開発し、そのメカニズムを解析する。

・本論文での前提条件

本論文で目指すバイオセンサは、血糖用測定装置である血糖値バイオセンサを前提とする。将来的には血液を検体に考えるが、一般的な血糖値バイオセンサでは固定化した酵素膜よりも外側にポリカーボネート膜のような高分子膜を積膜する。これは、高分子であるタンパク質や血球などの粒子の透過を抑制し、グルコース等の低分子物質を透過する機能を持つ[1]。よって血液によって生じる高分子等の課題は今後の検討事項として、本論文の対象には含めず、前提条件として血清を検体に考える事とする。血中のグルコース濃度は健康人の空腹時でおよそ5mM、糖尿病患者では20mM以上となる[37]。従って、本論文ではグルコースの測定濃度範囲の目安を0mM~20mMにする。また、血清中にはグルコース以外にも低分子の妨害物質が存在するが、すべての物質に対する影響を評価することは時間的に難しい。このため、妨害物質に関するグルコースセンサへの影響は、他の報告で利用されている代表的な物質に限定して評価することとする。グルコースを検出する酵素としては、保管期間・長期期間に関して安定性に優れ、費用面でも他の酵素より利点のあるGODを用いることとする。信号変換素子と検出方式は、血糖値センサでの利用実績の多い、電極を用いたアンペロメトリー方式をターゲットとする。

1-3 本論文の構成

本論文の構成を図1-27のフローチャートに示す。第2章~第4章では実際に行った研究に関して結果・考察を交えてまとめる。第2章は、測定対象であるグルコースを効率よく検出するため、そして妨害物質の影響は低減するために、プラズマ重合膜の特性に着目した2点の研究を取り扱う。1点目は、プラズマ重合膜のサイズ効果に関する研究で、プラズマ重合膜のサイズ効果がもたらすバイオセンサへの効果を評価し、妨害物質の影響低減を試みる。2点目は、プラズマ重合膜が酵素と接触する状態・親和性を調査・解析する。グルコースの効率よい検出に導くため、プラズマ重合膜と酵素との良好な接触状態・親和性を目指す。これらの解析結果より導き出した条件を基にその後の研究を行う。第3章では、酵素の固定化にドライプロセス技術の利用を試みる。半導体加工プロセスを用いたバイオセンサデバイスの一括製造に近づけるため、架橋化試薬を用いずに、酵素をプラズマ重合膜で直接埋め込み、固定化させる“プラズマ重合膜/酵素複合体”の作製・評価を行う。複合体の形成は、酵素の活性中心とプラズマ重合膜の距離を近づけ、あるいは酵素とプラズマ重合膜との接触面積を増やし、また酵素と電極の距離を近づけ、第4章につながる狙いもある。第4章では、グルコースを効率よく検出するため、プラズマ重合膜にメディエータを導入した2点の研究を行う。1点目はメディエータを含んだモノマーを用いてプラズマ重合膜を成膜し、共有結合で酵素の固定化を行うことで、プラズマ重合膜がメディエータ機能を有するか評価する。2点目は、メディエータを含んだモノマーを用いて、プラズマ重合膜/酵素複合体を形成させ、バイオセンサデバイスとして機能するか評価する。そして第5章にて本論文の総括を述べる。

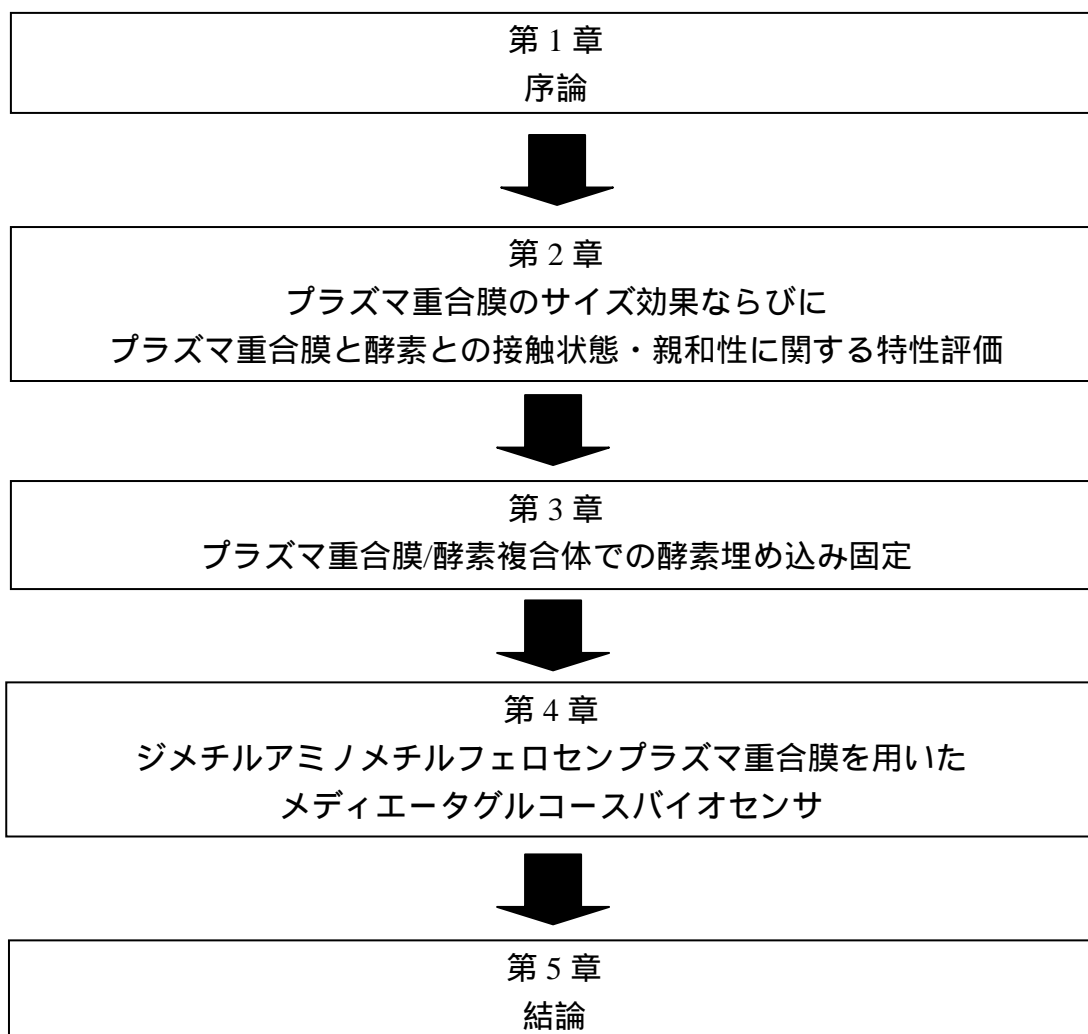


図 1-27 本論文の構成フローチャート

第1章の参考文献

- [1] 社団法人 電子情報技術産業協会 編者: 「新 ME 機器ハンドブック」, コロナ社, 2008.
- [2] 植田康弘: 「血液自動分析装置のシステム化: その現状と将来」, 計測と制御, 45 (2006) 972.
- [3] 篠原弘生、大沼武彦: 「血液検査を迅速・効率化する生化学自動分析装置」, 東芝レビュー, 66 (2011) 34.
- [4] 六車仁志 著: 「バイオセンサー入門」, コロナ社, 2003.
- [5] 鈴木周一 編著: 「バイオセンサー」, 講談社サイエンティフィック, 1989.
- [6] 軽部征夫 編著: 「バイオセンサーのはなし」, 日刊工業新聞社, 2012.
- [7] 軽部征夫、三上あかね: 「バイオセンサーを用いた医療用連続モニタリングシステム開発の現状と展望」, 臨床検査, 57 (2013) 671.

- [8] 長田義仁 編集代表: 「バイオメテックスハンドブック」, エヌ・ティー・エス, 2000.
- [9] 軽部征夫: 「バイオセンサー」, Biomedica, 5(1990)448.
- [10] 高橋清、佐々木昭夫 著: 「アドバンストセンサハンドブック」, 培風館, 1994.
- [11] 軽部征夫 監修: 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」, 株式会社テクノシステム, 2007
- [12] 電気化学会 編者: 「電気化学測定マニュアル(基礎編)」, 丸善, 2002.
- [13] 藤嶋昭、相澤益男、井上徹 著: 「電気化学測定法(上)」, 技報堂出版, 1985.
- [14] 加納健司、池田篤治: 「バイオセンサー」, ぶんせき, (2003) 576.
- [15] 岡畑恵雄 編著: 「バイオセンシングのための水晶発振子マイクロバランス法」, 講談社サイエンティフィック, 2013.
- [16] 廣田晃一: 「イムノセンサー」, 臨床検査, 47 (2003) 1677.
- [17] 六車仁志: 「表面プラズモン共鳴」, ぶんせき, (2003) 38.
- [18] 橋本せつ子: 「表面プラズモン共鳴現象を利用する生体分子相互作用の解析」, ぶんせき, 5 (1997) 362.
- [19] Wild S, Roglic G, Green A, Sicree R, King H.: “Global Prevalence of Diabetes: Estimates for the year 2000 and projections for 2030”, Diabetes Care. 27 (2004) 1047.
- [20] 中尾光孝、花野佐千子、稲葉英佐、芝寄和志、山内啓子、植本英宣、濱西徹、英肇: 「血液透析患者における血糖測定の問題点」, 医学検査, 61 (2012) 572.
- [21] 小野佳一、大竹奈都子、鈴木淳史、蔵野信: 「持続グルコースモニター検査」, 検査と技術, 41 (2013) 1134.
- [22] 野澤哲生: 「エレクトロニクスでウイルスを追え」, 日経エレクトロニクス, 1123 (2013) 55.
- [23] P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyees, A. Manz: “Micro total analysis systems. 2. analytical standard operations and applications”, analytical chemistry, 74 (2002) 2637.
- [24] 民谷栄一: 「バイオ分子デバイス」, 応用物理, 74 (2005) 903.
- [25] 六車仁志、平塚淳典: 「プラズマ重合膜を用いる新世代バイオセンサー」, 分析化学, 53 (2004) 393.
- [26] 堀内勉、林勝義: 「半導体技術を応用した有機/バイオ素子作製」, 応用物理, 74 (2005) 366.
- [27] 川浦久雄、馬場雅和、飯田一浩、佐野亨、井口憲幸、阪本利司: 「ナノバイオチップによるDNA分離」, 応用物理, 72 (2003) 1404.
- [28] 行村建 編著者: 「放電プラズマ工学」, 株式会社オーム社, 2008.
- [29] 長田義仁 編著: 「プラズマ重合」, 東京化学同人, 1986.
- [30] 長田義仁 編著: 「低温プラズマ材料化学」, 産業図書株式会社, 1994.
- [31] 穂積啓一郎、北村桂介、北出達也、栗山みつる、武河亜木子、藤井久美: 「アリルアミンをモノマーとするプラズマ重合物の化学構造」, 高分子論文集, 42 (1985) 55.
- [32] H. Yasuda: “Plasma Polymerization”, Academic Press, 1985.
- [33] D. S. Everhart, C. N. Reilley: “Chemical derivatization in electron spectroscopy for chemical analysis of surface functional groups introduced on low-density polyethylene film”, analytical chemistry, 53 (1981) 665
- [34] H. Mugaruma, I. Karube: “Plasma-polymerized films for biosensors”, trends in analytical chemistry, 18 (1999) 62.

- [35] A. Hiratsuka, K. Kojima, H. Suzuki, H. Muguruma, K. Ikebukuro, I. Karube: “Integration of microfabricated needle-type glucose sensor devices with a novel thin film Ag/AgCl electrode and plasma-polymerized thin film: mass production techniques”, *analyst*, 126 (2001) 658.
- [36] A. Hiratsuka, H. Muguruma, K. H. Lee, I. Karube: “Organic plasma process for simple and substrate-independent surface modification of polymeric BioMEMS devices”, *biosensors and bioelectronics*, 19 (2004) 1667.
- [37] 横山憲二、小出哲: 「バイオセンサーのための機能性ポリマー」, *高分子*, 47 (1998) 687.
- [38] 厚生労働省健康局: 「平成 14 年度糖尿病実態調査報告」, 厚生労働省のウェブサイト http://www.mhlw.go.jp/toukei/kouhyo/indexkk_4_2.html, 平成 16 年 6 月.

第 2 章

プラズマ重合膜のサイズ効果ならびに プラズマ重合膜と酵素との接触状態・親和性 に関する特性評価

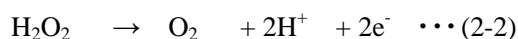
2-1 はじめに

センサの性能を確保する上では、S/N 比の向上が重要となり、次の 2 点が大切になる。1 点目は、必要な信号成分のみをどれだけ効率よく検出できるか、つまりノイズ成分の除去が重要である。2 点目は、測定対象物をどれだけ効率よく検出できるか、つまり信号成分自体を増やすことが重要になる。バイオセンサでは、ノイズ成分となる妨害物質により生じる電気信号の影響を削減すること、そして信号成分となる測定対象物の基質を効率よく電気信号に変換することが重要になる。

本章では、妨害物質によって生じる電気信号を削減させる為[1]、プラズマ重合膜の膜厚特性に着目して、プラズマ重合膜がセンサ性能に与える影響を評価する。また、測定対象物である基質（グルコース）を効率よく電気信号に変換させる為[2]、酵素（GOD [3-4]）とプラズマ重合膜の親和性に着目してセンサ性能に与える影響を評価し、そのメカニズムを解明する。

2-2 アンペロメトリックグルコースバイオセンサ

バイオセンサの中で最も代表的なものとしてアンペロメトリックグルコースバイオセンサがある。酵素に GOD、信号変換素子に電極を用いた過酸化水素計測形アンペロメトリックグルコースバイオセンサの動作原理式を下記に示す。



グルコースが GOD と酵素反応し、過酸化水素を発生する。これより発生した過酸化水素と電極との間で電気化学反応が起こり、酸化電流が得られる。検出された電流値をグルコース濃度に換算して測定することになる。

GOD を電極に固定する方法として、電極上に担体となるプラズマ重合膜を成膜し、架橋試薬で GOD とプラズマ重合膜を結合させる方法が提案されている[5]。この方法で作製されるグルコースバイオセンサの構造概念図を図 2-1 に示す。

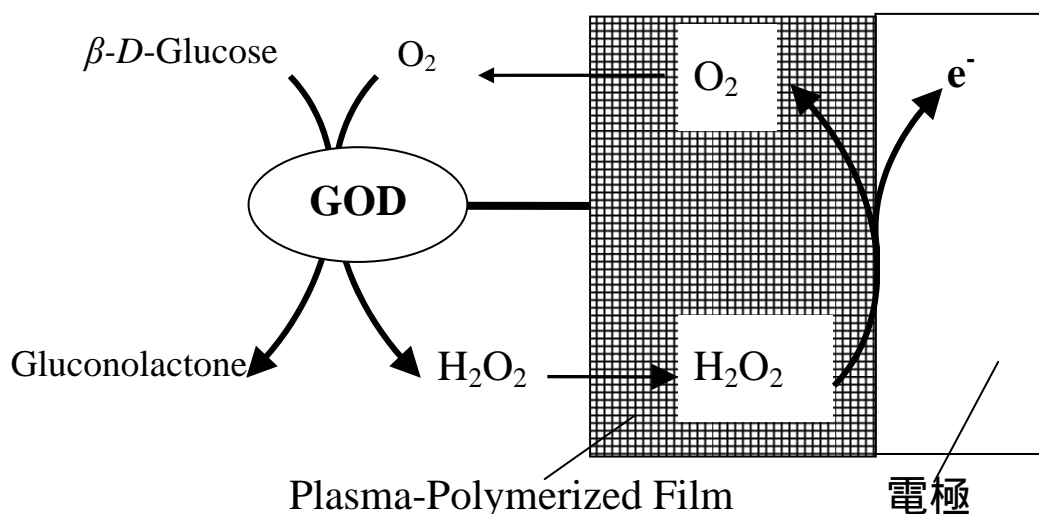


図 2-1 プラズマ重合膜を固定化膜に用いたグルコースバイオセンサの構造概念図

2-3 目的と検証項目

第 1 章の“1-1-9 プラズマ重合技術”で示したように、プラズマ重合により成膜されるプラズマ重合膜には多くの特徴があり、その一部として“(1) ナノメートルオーダーの極薄膜の成膜が可能であり、膜厚制御も容易である、(2) プラズマ重合膜表面の改質が可能である”ということがあげられる[6-7]。

本章では、グルコースバイオセンサの性能に大きな影響を与えるインタフェース部であるプラズマ重合膜に着目し、プラズマ重合膜の特性がセンサ性能に与える効果とそのメカニズムを解析する。検証項目は次の 2 つとする。

2-3-1 検証 1： プラズマ重合膜のサイズ効果による妨害物質の影響低減

検証 1 では、プラズマ重合膜の極薄膜で緻密な構造を活かし、プラズマ重合膜を使って分子サイズの大きな妨害物質の拡散を妨げ、妨害物質による悪影響の低減を試みる。あわせて膜厚による影響の解析も行う。プラズマ重合膜のモノマーはヘキサメチルジシロキサン (HMDS: Hexamethyldisiloxane) とし、その他の詳細は以下とする。

2-3-1-1： 妨害物質に対する HMDS プラズマ重合膜のサイズ効果およびその膜厚依存性

ここでは、電極活物質である信号成分、および電極活物質であるノイズ成分（つまり妨害物質）を用いて、HMDS プラズマ重合膜が妨害物質の影響のみを削減し、信号成分を選択して抽出できるか評価する。信号成分となる電極活物質には、過酸化水素計測形アンペロメトリックグルコースバイオセンサの中間生成物となる過酸化水素を利用する。そしてノイズ成分となる妨害物質には“1-2 本論文の目的”の“本論文での前提条件”に記載された通り、グルコースバイオセンサ

の代表的な妨害物質とされるアスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸を電極活物質として評価に用いる[8]。さらに、プラズマ重合膜の膜厚差によるサイズ効果への影響も評価する。評価では電極活物質の濃度ごとにサイクリックボルタンメトリーを行う。

2-3-1-2 : HMDS プラズマ重合膜と GOD を共有結合させたバイオセンサのグルコース応答性

上記“2-3-1-1”では信号成分として過酸化水素を用いた評価を行うが、ここでは作製した電極デバイスがグルコースバイオセンサの機能を有するか、酵素反応を伴ったグルコースに対する応答性を評価する。基質であるグルコースの溶液に対して、サイクリックボルタンメトリー及び定電位時間電流測定を行う。

2-3-2 検証 2 : プラズマ重合膜の表面改質によるプラズマ重合膜 - 酵素の親和性向上

検証 2 では、プラズマ重合膜の表面改質による親水性向上特性を利用し、プラズマ重合膜への GOD の安定的な固定化によるグルコース応答性の向上を試みる。あわせてプラズマ重合膜の表面状態がプラズマ重合膜 - GOD の接触状態およびグルコース応答に、どのように影響するか解析を行う。詳細は以下とする。

2-3-2-1 : HMDS プラズマ重合膜の表面状態が GOD 吸着状態に与える影響評価 1_AFM 観察

生物物質である GOD はウェット状態で効果を発揮するため、GOD と接触するプラズマ重合膜の表面も親水性が良いと推測できる。ここでは HMDS プラズマ重合膜表面を改質し、窒素プラズマ処理により正帯電した親水性表面、酸素プラズマ処理により負帯電した親水性表面、そしてプラズマ表面処理無しによる疎水性表面の 3 条件[9,10]に対する GOD の静的な接触状態を原子間力顕微鏡 (AFM: Atomic force microscopy) で観察し、その差異を評価する。

2-3-2-2 : HMDS プラズマ重合膜の表面状態が GOD 吸着状態に与える影響評価 2_QCM 観察

上記“2-3-2-1”では、静的な接触状態を観察できるが、ここではプラズマ重合膜に対する GOD の吸着・解離が起こる動的な接触状態を観察し、よりグルコースバイオセンサの使用環境に近い状態で観察する。

2-3-2-3 : HMDS プラズマ重合膜の表面状態が与えるグルコース応答性

HMDS プラズマ重合膜表面の親水化が GOD との親和性向上に効果的で、グルコース応答性に有利であることを検証する。HMDS プラズマ重合膜表面にプラズマ表面処理を施さない疎水性表面、窒素プラズマ表面処理を施して表面改質した親水性表面にしたそれぞれの表面に、GOD 溶液を滴下して物理吸着させ、それぞれの電極デバイスを作製し、基質であるグルコースの溶液に対してサイクリックボルタンメトリーを行う。

2-4 電極デバイス作製および評価・測定方法

2-4-1 : 検証 1 で用いる電極デバイス作製の流れ

- (1) マイクロスライドガラスを基板とし、基板洗浄を行う。まず、50%濃度の硝酸水で 1 時間浸け置き洗浄を行い、その後アセトンと蒸留水でリンスを行って、アルゴンガスで水垢を除去する。
- (2) 洗浄後のガラス基板をスパッタ用チャンバーに入れ、クロムを密着層としてスパッタリングする。この際の膜厚は 4nm とする。
- (3) 白金を電極層として、クロム上部にスパッタリングする。この際の白金膜厚は 250nm とする。
- (4) 電極のセンサ面積 ($1 \times 0.3 \text{cm}^2$) を調整するため、絶縁層となる光感光性ポリイミドを白金電極にて滴下してスピコートにて均一な膜状にし、これをマスクアライナにて露光、現像、キュアリングすることで電極のパターニングを行う。その後、ダイシングソーにてガラス基板の切り出しを行う。
- (5) 切り出したガラス基板をプラズマ重合用のチャンバーに入れ、HMDS をモノマーとしてプラズマ重合し、HMDS プラズマ重合膜の成膜を行う。重合条件は、真空度 4.6Pa、流量 15mL/min、放電電力 150W、成膜速度は 20nm/min、放電時間がそれぞれ 5sec (1.7nm)、15sec (5nm)、30sec (10nm)、60sec (20nm) の 4 種類の電極を作製する。
- (6) 更に、酵素の固定化を容易にするため、これらの電極表面に窒素プラズマ処理を行う。放電条件は、真空度 3Pa、流量 15mL/min、放電電力 100W、放電時間 20sec とする。
- (7) 次に酵素の固定化を行う。ここでは共有結合による酵素の固定化を実施する。窒素プラズマ処理した電極表面に、2.5% グルタルアルデヒド溶液を滴下し、20 分後に蒸留水で洗浄する。
- (8) 次に酵素溶液 (GOD 溶液) を滴下し、10 分後にリン酸緩衝溶液で洗浄する。これにより、電極表面の窒素と GOD が共有結合し、酵素の固定化が行われる。

なお、過酸化水素および妨害物質であるアスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸を電極活物質とする検証では、上記(1) - (6)までの作製工程が完了したものを電極デバイスとする。一方、GOD が固定化されたグルコースバイオセンサの特性検証では、上記(1) - (8)までの作製工程が完了したものを電極デバイスとする。

2-4-2: 検証 2 で用いる電極デバイス作製の流れ

- (1) 基板となるマイクロスライドガラスを混合溶液 (蒸留水、アンモニア水、過酸化水素水) で 70、10 分程度ボイリングした後、ガラスを取り出して、蒸留水でリンスし、アルゴンガスで水垢を除去する。
- (2) 洗浄後のガラス基板をスパッタ用チャンバーに入れ、密着層としてクロムを 40nm にスパッタリングで成膜する。
- (3) その後、クロム上部に電極層として、白金を 200nm にスパッタリングして成膜する。
- (4) 成膜したガラス基板をプラズマ重合用のチャンバーに入れ、白金電極上部に、プラズマ重合膜を成膜する。RF13.56MHz、外部電源方式、誘電結合方式のプラズマ重合装置を使用する。プラズマ重合膜のモノマーには HMDS を用いる。重合条件は、電力: 200W、圧力: 0.6Pa、成膜速度: $22.2 \pm 2.8 \text{nm/min}$ とする。AFM 観察に用いるデバイスおよび QCM に用い

る電極デバイスでは、放電時間：60sec（膜厚：約 20nm）とし、グルコースバイオセンサデバイスでは、放電時間：5sec（膜厚：約 2nm）とする。プラズマ重合膜の表面状態が異なる複数の電極デバイスを作製するため、プラズマ重合膜の成膜後に“プラズマ処理無し、窒素プラズマ処理（電力：100W、圧力：3Pa、放電時間：20sec、流量：15mL/min）、酸素プラズマ処理（電力：100W、圧力：3Pa、放電時間：20sec、流量：15mL/min）を行う。

- (5) 次に、プラズマ重合膜上に、GOD 溶液を滴下し、約 1 時間自然乾燥させ、その後、非吸着の GOD を蒸留水、リン酸緩衝溶液で洗い流す。
- (6) 最後にガラスカッターで適当な大きさに切り出し、カプトンテープで不要な白金を覆うことにより絶縁し、センサ面積(0.5×0.5cm²)の調整を行う。デバイス作成後は、冷蔵庫(4)にて使用まで冷蔵保管し、使用時にはリン酸緩衝溶液にて洗浄して使用する。

なお、AFM 観察に用いるデバイスは、ガラス基板ではなくシリコン基板を用いることとし、シリコン基板上で(4)～(5)の工程を行って作製する。また QCM に用いる電極デバイスは、ガラス基板は使用せず、QCM 用金電極上に(4)の工程を行って作製する。この際、両者のデバイスとも HMDS プラズマ重合膜の放電時間は 60sec とする。

2-4-3： 第2章で用いる評価・測定方法

- (1) 作製する電極デバイスを作用電極とする 3 電極方式による電気化学測定：

・測定系

3 電極方式による電気化学測定の実験系を図 2-2 に示す。3 つの電極を電圧・電流制御のためのポテンシostatに接続する。ポテンシostatはユーザインタフェースとなる PC に接続し、PC は各種制御と測定結果の表示を行う。必要に応じて、測定容器内にある攪拌子を攪拌器にて攪拌し、測定溶液を均一化できる測定系とする。

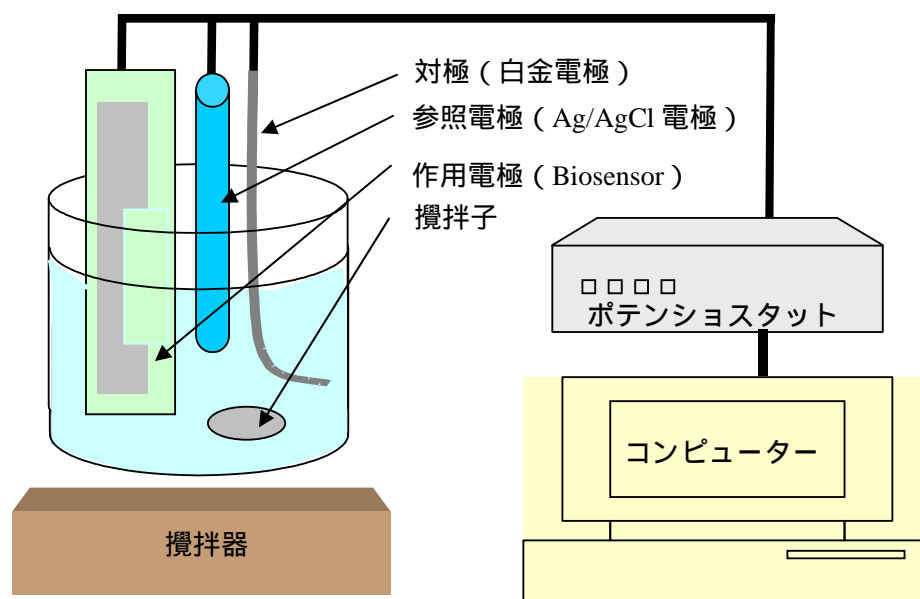


図 2-2 3 電極方式の電気化学測定系の概略図

・サイクリックボルタンメトリー：

リン酸緩衝容液 (pH7.4) を使用し、所定濃度の電極活物質溶液 (過酸化水素、アスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸) あるいはグルコース溶液を用いて、印加電位を変動させ、電圧—電流特性を評価する。設定電位は 0V - 0.8V、掃引速度は 50mV/sec とする。

(2) AFM による観察：

HMDS プラズマ重合膜と GOD との静的接触状態・固定状態を視覚的に観測し評価するため、AFM 像およびその断片プロファイルを用いて観測する。AFM 観察は、大気中測定にてタッピングモードで行い、走査速度は 0.6Hz に設定する。

(3) QCM による観察：

HMDS プラズマ重合膜と GOD との吸着状態を水晶振動子の周波数変化によって観測する。水晶振動子の電極表面に、プラズマ処理無し・窒素プラズマ処理・酸素プラズマ処理された HMDS プラズマ重合膜を成膜する。この水晶振動子電極デバイスを、20mM リン酸緩衝容液 (pH 7、25) 中に配置する。そして所定濃度の GOD 溶液を滴下する。GOD 溶液の滴下により生じる時間 - 周波数変化を観測し、HMDS プラズマ重合膜と GOD の動的接触状態・吸着状態を評価する。

2-5 結果・考察

2-5-1 検証 1： プラズマ重合膜のサイズ効果による妨害物質の影響低減

プラズマ重合膜は、成膜時の放電条件 (放電電圧や放電時間) によって膜質が異なる。この放電条件をコントロールすることでプラズマ重合膜の緻密性を変化させることも可能である[9]。例えば、高い放電電力で成膜するほど緻密なプラズマ重合膜が得られ、分子サイズの大きな物質を排除し、分子サイズの小さな物質を選択する分離機能を得られる。この機能を用いることで、グルコースバイオセンサのノイズ要因となるグルコース分子より大きなサイズの妨害物質の影響を低減できると考える。以下の図 2-3 に、成膜時の放電条件が異なる HMDS プラズマ重合膜表面の AFM 画像、また参考としてバイオセンサ作製の際に HMDS プラズマ重合膜を積層する土台とした白金表面の AFM 画像を示す[11]。この画像から、放電電力の高い条件で成膜された HMDS プラズマ重合膜のほうが低い条件の時よりも、色変化が少なく緻密で均質な表面になっていることが見てとれる。また放電時間(膜厚)の違いによっても緻密性の差が見てとれ、特に 1.5nm と 3nm でその違いが見やすくなっている。

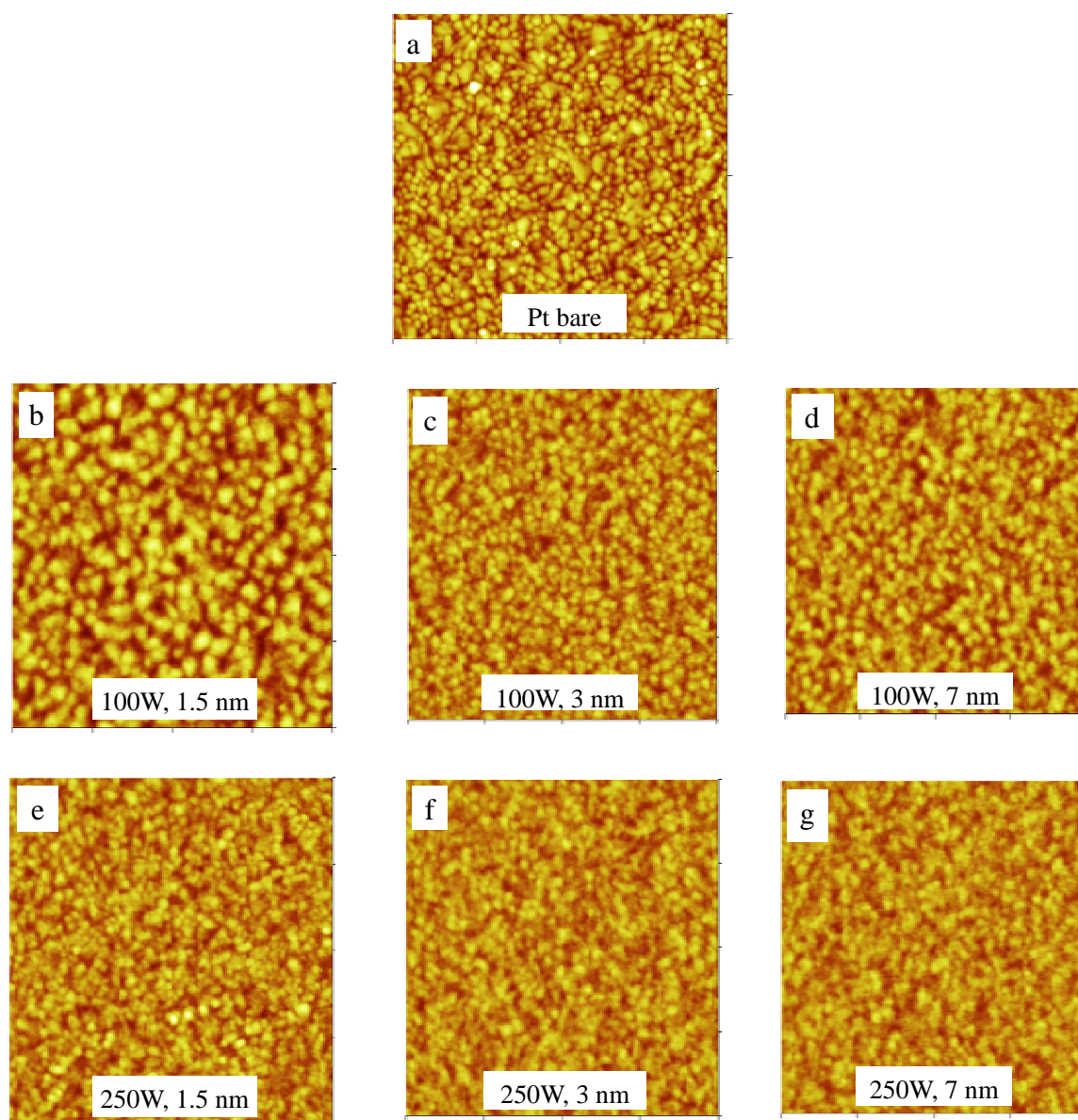


図 2-3 スパッタリングにて成膜された白金電極上の HMDS プラズマ重合膜をタッピングモードで撮影した AFM 画像。以下に各画像の成膜条件を示す（但し HMDS プラズマ重合膜の放電圧力は 0.6Pa）。

(a) HMDS プラズマ重合膜が成膜されていない白金電極。

(b) 放電電力は 100W、膜厚は 1.5nm。(c)放電電力は 100W、膜厚は 3nm。

(d) 放電電力は 100W、膜厚は 7nm。(e)放電電力は 250W、膜厚は 1.5nm。

(f) 放電電力は 250W、膜厚は 3nm。(g)放電電力は 250W、膜厚は 7nm。

画像サイズは $1\mu\text{m}$ 、z-scale(contrast)は 10nm、scan rate は 0.6Hz。

表面データは以下のとおり：

・ $R_q =$ (a) 1.01, (b) 1.13, (c) 0.83, (d) 0.75, (e) 0.79, (f)0.66, (g)0.64 nm。

・ $R_a =$ (a) 0.80, (b) 0.92, (c) 0.66, (d) 0.60, (e) 0.62, (f)0.53, (g)0.52 nm。

2-5-1-1： 妨害物質に対する HMDS プラズマ重合膜のサイズ効果およびその膜厚依存性

HMDS プラズマ重合膜の膜厚が異なる複数の電極デバイスを作製し、信号成分となる過酸化水素を電極活物質としたサイクリックボルタンメトリーを行った。この電極デバイスに GOD は吸着・固定させていない。サイクリックボルタンメトリーより得たサイクリックボルタモグラムを図 2-4 に示す。この図から、HMDS プラズマ重合膜を白金電極上に成膜しても、過酸化水素に対する酸化反応のあることが見て取れる。これは過酸化水素が HMDS プラズマ重合膜を拡散して白金電極まで到達して、電気化学反応が起きていることを示す。一方で、膜厚が増加するごとに酸化電流が小さくなっている。これは、膜厚が増加するほど過酸化水素溶液のバルクから白金電極までの距離が長くなるため、バルクから電極まで過酸化水素の到達する割合が小さくなると考えられる。さらに、HMDS プラズマ重合膜が緻密な 3 次元構造の膜であるため、物質が拡散中にプラズマ重合膜に衝突するなどして、プラズマ重合膜が拡散の障害物となると考えられる。そして HMDS プラズマ重合膜による拡散障害の影響が大きくなり、過酸化水素の拡散が更に妨げられると考えられる。よって、HMDS プラズマ重合膜の膜厚を厚くするほど酸化電流が小さくなる。言い換えると、HMDS プラズマ重合膜の膜厚を薄くするほうが過酸化水素の拡散を妨げないため、グルコースバイオセンサの信号成分となる過酸化水素の酸化電流は得やすくなる。

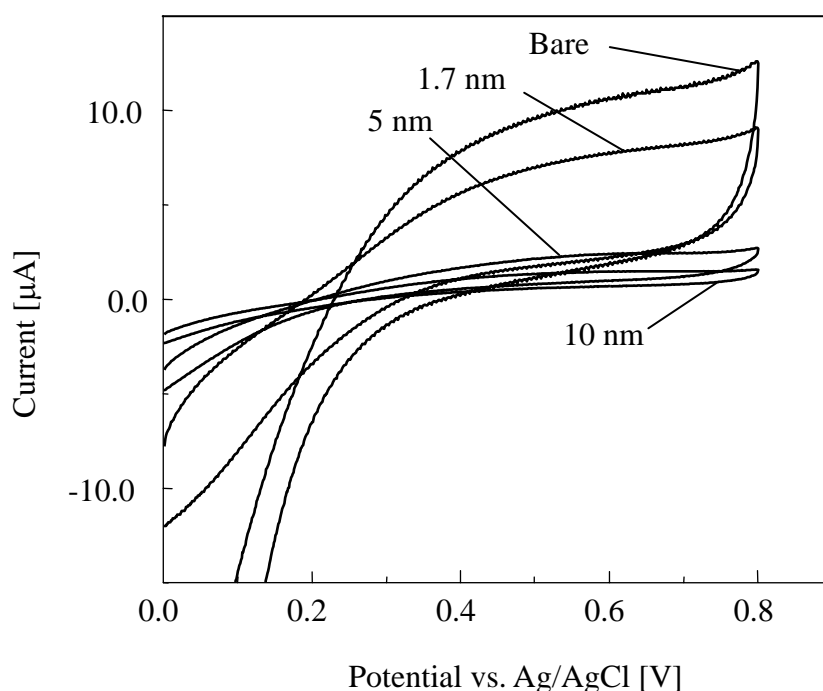


図 2-4 白金電極上に HMDS プラズマ重合膜を成膜した電極デバイスの過酸化水素に対するサイクリックボルタモグラム。HMDS プラズマ重合膜の膜厚はそれぞれ 0nm、1.7nm、5nm、10nm。0.37mM 過酸化水素を電極活物質とし、掃引速度は 50mV/sec に設定した。

次に同様の条件で作製した電極デバイスを使用し、妨害物質であるアスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸を電極活物質にしてサイクリックボルタンメトリーを実施した。サイクリ

ックボルタモグラムの酸化電位 +0.6V から酸化電流値を抽出し、算出したセンサ感度および過酸化水素の選択性を表 2-1 に示す。

表2-1 白金電極上にHMDSプラズマ重合膜を成膜した電極デバイスの各電極活物質に対するセンサ感度

白金電極上に成膜された HMDSプラズマ重合膜の膜厚		Analyte (0-0.69mM)			
		過酸化水素	アスコルビン酸	アセトアミノフェン	尿酸
0 nm (Bare)	感度 ^a	21.0	50.4	41.0	25.0
	選択性 ^b	1	0.42	0.51	0.84
1.7 nm	感度	10.7	1.64	4.88	1.83
	Bareとの割合 ^c	0.511	0.033	0.119	0.073
	選択性	1	6.5	2.2	5.9
5 nm	感度	3.35	1.17	2.21	0.91
	Bareとの割合	0.16	0.023	0.054	0.037
	選択性	1	2.9	1.5	3.68
10 nm	感度	3.15	0.79	1.83	0.71
	Bareとの割合	0.15	0.016	0.045	0.029
	選択性	1	4.0	1.7	4.4
20 nm	感度	2.75	0.83	0.87	0.90
	Bareとの割合	0.13	0.016	0.021	0.036
	選択性	1	3.3	3.2	3.1

^a $\mu\text{A mM}^{-1}$

^b “選択性” の定義： [過酸化水素に対する感度]/[各妨害物質に対する感度]

^c “Bareとの割合” の定義： [各膜厚電極の感度]/[Bare電極の感度]

アスコルビン酸・アセトアミノフェン・尿酸に関して、HMDS プラズマ重合膜無し (Bare) の電極デバイスに対して、HMDS プラズマ重合膜が存在する場合には膜厚によらず、約 10% からそれ以下の感度しか得られず、大きな感度低下を示している。これも過酸化水素の場合と同様であり、HMDS プラズマ重合膜の拡散ブロック効果によって、アスコルビン酸・アセトアミノフェン・尿酸の溶液バルクから電極までの拡散が HMDS プラズマ重合膜によって阻害され、その結果、電極部で生じる電気化学反応が低減されたためにノイズ信号となるはずだった酸化電流を削減できたと考えられる。

さらに各妨害物質 (アスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸) に対する過酸化水素の選択性を見ても。HMDS プラズマ重合膜無し (Bare) の電極デバイスでは、各妨害物質の選択性が 1 以下を示しており、過酸化水素の感度よりも各妨害物質の感度のほうが大きくなっている。よって、グルコースバイオセンサとしてはノイズ成分の悪影響を受けやすい状態となっている。一方で、HMDS プラズマ重合膜が成膜されている場合には、各妨害物質の選択性が 1 以

上を示しており、過酸化水素の感度に比べて各妨害物質の感度は、非常に小さくなっている。つまり過酸化水素に対する選択性が得られている。HMDS プラズマ重合膜の拡散ブロック効果によって、過酸化水素ならびに各妨害物質の拡散が妨げられて感度低下が引き起こされることは上記に述べた。しかし、過酸化水素と各妨害物質とでは、HMDS プラズマ重合膜の拡散ブロック効果による感度低下の割合が異なり、各妨害物質の感度低下が著しい。このために過酸化水素の選択性を得る結果になったと考える。過酸化水素の選択性を得る為には、HMDS プラズマ重合膜の拡散ブロック効果が、過酸化水素と各妨害物質とで異ならなければならない、さらに過酸化水素に対する HMDS プラズマ重合膜の拡散ブロック効果が小さくなければならない。過酸化水素と各妨害物質の違いとして、分子量に差がある。アスコルビン酸の分子量は 176、アセトアミノフェンの分子量は 151、尿酸の分子量は 168 と、各妨害物質の分子量はおおよそ 150 ~ 170 程度であるのに対して、過酸化水素の分子量は 34 であり分子サイズが小さくなる。従って、分子サイズの小さい物質ほど 3 次元構造のプラズマ重合膜内を拡散しやすく、一方、分子サイズが大きい物質は膜に阻害されて拡散できないと考えられ、これに伴って過酸化水素の選択性が得られているを判断する。HMDS プラズマ重合膜のサイズ効果とは、拡散する物質の分子サイズによって膜内の拡散が制御される効果のことを言い、HMDS プラズマ重合膜はサイズ効果を有して妨害物質に基づくノイズ成分を低減する機能を持つと考えられる。

表 2-1 の結果から、“Bare との割合”つまり “[Bare 電極の感度]に対する[各膜厚電極の感度]の割合”に着目して、図 2-5 にグラフ化する。

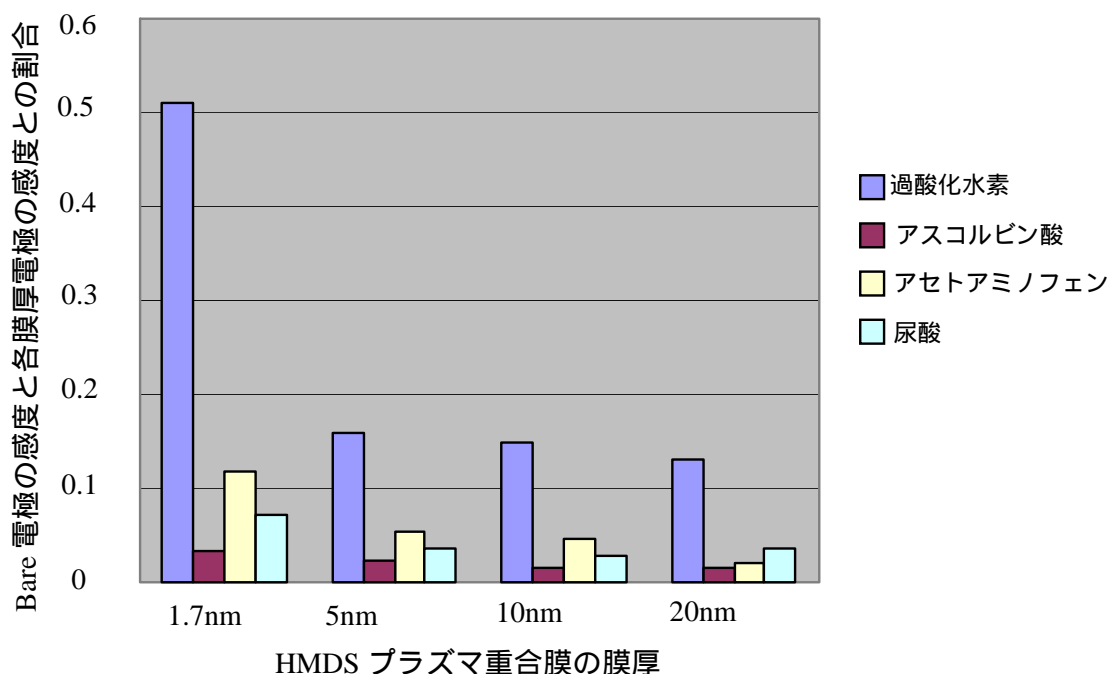


図 2-5 HMDS プラズマ重合膜の膜厚とサイズ効果

この図から、グルコースバイオセンサとして最適な HMDS プラズマ重合膜の膜厚を算出する。その結果 1.7nm ~ 5nm が最適と判断する。各妨害物質では、1.7nm から 20nm まで膜厚に関係なく、Bare 電極の感度と各膜厚電極の感度との割合が 10%以下となっている。一方、過酸化水素では 5nm から 20nm まで膜厚に関係なく、Bare 電極の感度と各膜厚電極の感度との割合は 15%程度となっているが、しかし 1.7nm の膜厚ではその割合が 50%程度と非常に高い。従って、HMDS プラズマ重合膜が 1.7nm の時、グルコースバイオセンサとして最も効率的なサイズ効果を得られると判断する。但し、プラズマ重合膜の成膜精度を考慮すると、1.7nm レベルの膜厚制御は難しいため、1.7nm ~ 5nm に最適な膜厚があると考えられる。

HMDS プラズマ重合膜の膜質に関して考察を行う。過酸化水素およびアスコルビン酸の体積に関しては、表 2-2 のように見積ることができる。これらの結果より HMDS プラズマ重合膜のホール体積は、おおよそ $0.021 \sim 0.23 \text{ nm}^3$ の間にあると考えられ、これは、可変陽電子寿命測定法によって見積もられたホール体積 $0.19 \sim 0.36 \text{ nm}^3$ と合致する[12]。

表 2-2 HMDS プラズマ重合膜のホール体積

物質名	参考資料からの情報	考察による見積もり体積
過酸化水素	<ul style="list-style-type: none"> ・ O-H 結合の長さ = 0.096nm [13] ・ O-O 結合の長さ = 0.146nm [14] 	0.021 nm^3
アスコルビン酸	<ul style="list-style-type: none"> ・ アスコルビン酸の最大円面積 = 0.454nm^2 [15] 	0.23 nm^3

以上より、緻密な構造を持つ HMDS プラズマ重合膜は、電極活物質の拡散を妨げる特性を持つことがわかった。またこの膜は、分子サイズが 30 程度の小さな過酸化水素は拡散させやすく、分子サイズが百数十程度の大きな妨害物質は拡散させにくい傾向を示しており、サイズ効果の特性を有していた。グルコースバイオセンサに HMDS プラズマ重合膜の利用を考えると、ノイズ成分は小さくしながら信号成分は大きくする必要があるので、過酸化水素と妨害物質の選択性を向上させなければならない。単純に膜厚を厚くしても過酸化水素の選択性は得られないため、過酸化水素の拡散妨害が生じにくく、妨害物質のみ拡散妨害できる“極薄膜状態のプラズマ重合膜”を利用することがよいと判断できる。

2-5-1-2 : HMDS プラズマ重合膜と GOD を共有結合させたバイオセンサのグルコース応答性

HMDS プラズマ重合膜に架橋化試薬で GOD を共有結合させた電極デバイスを作製し、グルコースを滴下した時の酸化電流値をサイクリックボルタンメトリーで測定した。サイクリックボルタンメトリーより得たサイクリックボルタモグラムを図 2-6 に示す。この図から、グルコースの濃度増加に伴う酸化電流の増加、また酸化電位は $+0.6\text{V}$ であることが見てとれる。従って、HMDS プラズマ重合膜は悪影響を与えず、グルコースバイオセンサとしての機能を有する電極デバイスを作製できた。グルコースと GOD との酵素反応が過酸化水素を発生させ、その過酸化水素が HMDS プラズマ重合膜内を拡散して白金電極に到達し、電極上で電気化学反応を起こして酸化電流を増加させるフローが構築されていると判断する。

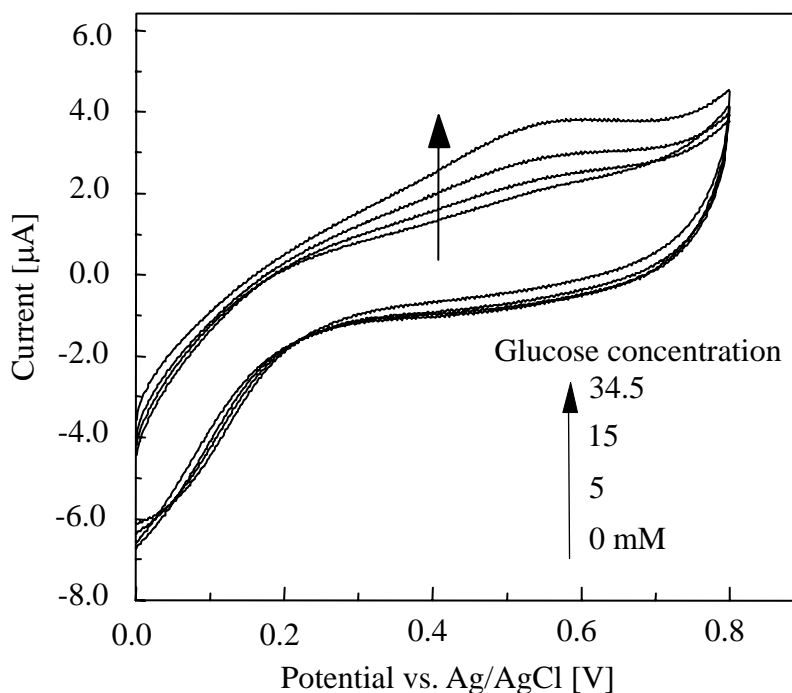


図2-6 HMDS プラズマ重合膜上にGODを架橋化共有結合させたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対するサイクリックボルタモグラム。HMDS プラズマ重合膜厚は5nmで掃引速度50mV/secに設定している。

次に、HMDS プラズマ重合膜の膜厚が異なる複数の電極デバイスを用意し、各デバイスにGODを架橋化共有結合(図1-21(b)参照)させてグルコースバイオセンサを作製し、サイクリックボルタメトリーによるグルコース測定を行った。その測定結果から作成した検量線を図2-7に示す。各膜厚の電極デバイスともグルコース濃度の増加にともなう酸化電流の増加が確認できる。また、センサ応答の範囲は臨床での有効範囲(約5~20mM)をカバーできている。さらにHMDS プラズマ重合膜の膜厚の薄い方が高いセンサ感度を示している。これは、薄膜のほうが白金電極と溶液バルクの距離が短くなり、グルコース反応で生成された過酸化水素が容易に白金電極に到達できるからと考えられる。

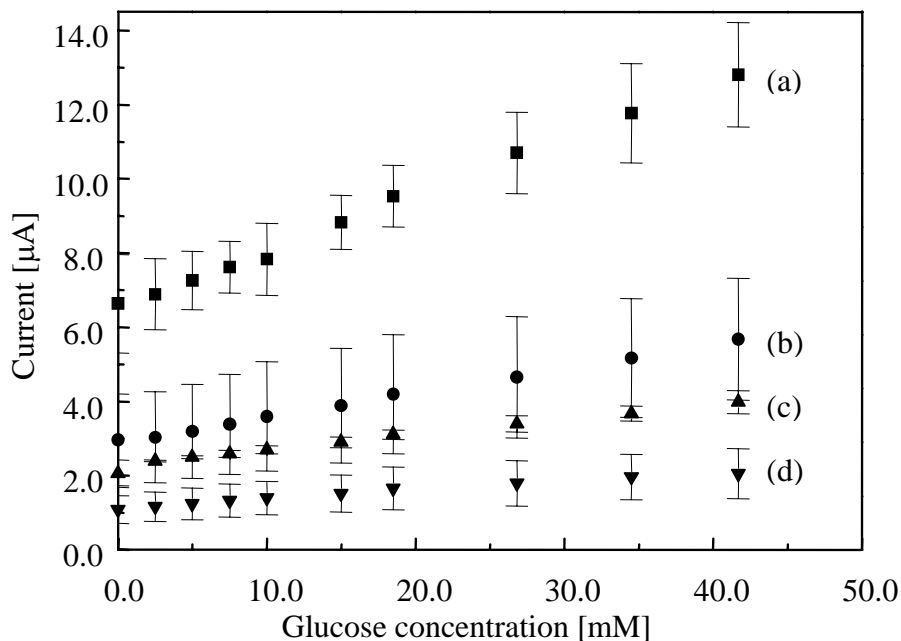


図 2-7 HMDS プラズマ重合膜上に GOD を架橋化共有結合させたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対する検量線。印加電圧+600mV vs. Ag/AgCl でのサイクリックボルタンメトリーから算出した酸化電流を用いた。HMDS プラズマ重合膜厚の膜厚:(a)1.7nm、(b) 5nm、(c)10nm、(d)20nm。各センサの感度:(a)0.15 μ A/mM; $r>0.998$ 、(b)0.066 μ A/mM; $r>0.999$ 、(c) 0.043 μ A/mM; $r>0.992$ 、(d) 0.024 μ A/mM; $r>0.991$ 。電極面積は 0.3cm²。

作製したグルコースバイオセンサの時間応答を図 2-8 に示す。Ag/AgCl 参照電極に対して +600mV を設定し、グルコース溶液滴下に伴う出力電流値を連続測定した。反応容器内の溶液は常に攪拌し、溶液濃度を均一化した。反応時間はおおよそ 10 秒と迅速な応答性が見られた。これは GOD と白金電極の距離は短いため、過酸化水素の拡散が容易であったためと考えられる。

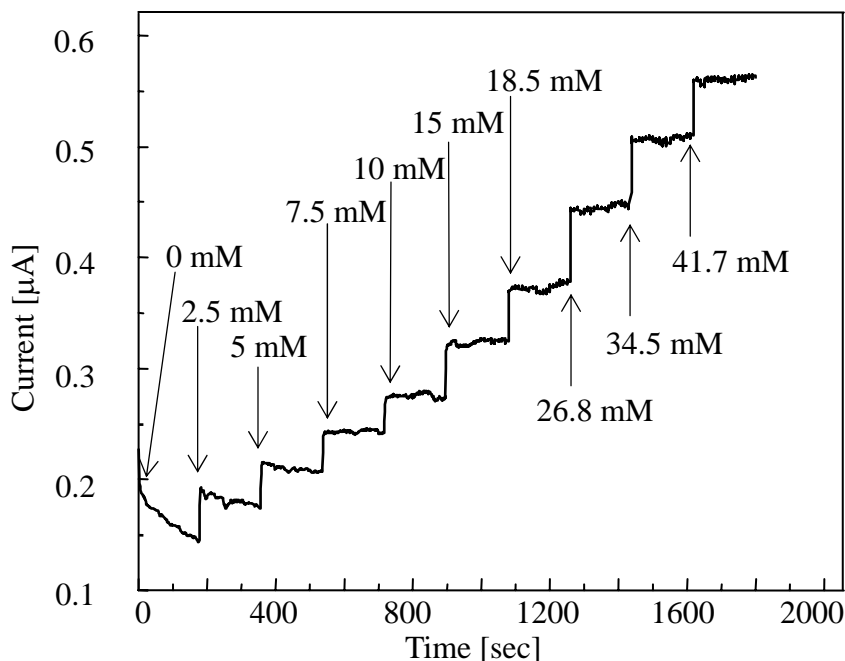


図 2-8 20mM、pH 7.4 のリン酸緩衝溶液中でのグルコースの定電位時間電流測定。
HMDS プラズマ重合膜厚の膜厚は 5nm。連続でグルコース溶液を滴下。

以上より、HMDS プラズマ重合膜上に GOD を架橋化共有結合させた電極デバイスは、グルコースに反応でき、グルコースバイオセンサの機能を果たすことが確認できた。また、膜厚を薄くするほうがセンサ感度の向上が見られ、上記 2-5-1-1 で確認した過酸化水素の挙動に一致する結果となった。本デバイスは、HMDS プラズマ重合膜上に GOD を共有結合させているため、上記 2-5-1-1 で示されたサイズ効果機能も有しており、妨害物質（アスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸）によるノイズ耐性の強いグルコースバイオセンサになっていると考える。

2-5-2 検証 2： プラズマ重合膜の表面改質によるプラズマ重合膜 - 酵素の親和性向上

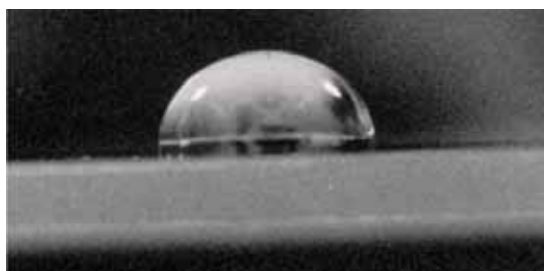
・HMDS プラズマ重合膜の表面状態が GOD の吸着に与える影響評価

グルコースバイオセンサでは、グルコースと GOD との効率良い酵素反応が重要視される。このためには、多量の GOD が電極平面にまんべんなく吸着・固定化させること、GOD の 3 次元構造が維持され高い酵素活性が得られることなどが必要になる。ここでは、HMDS プラズマ重合膜の表面状態を制御して膜と GOD との吸着・接触状態の向上を目指す。

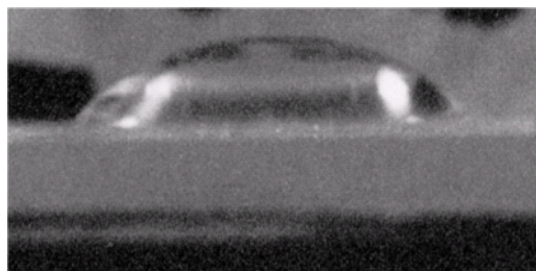
・HMDS プラズマ重合膜の表面状態

プラズマ重合膜の表面状態を制御するため、HMDS プラズマ重合膜の表面にプラズマ表面処理を行うが、見た目としてどのような違いが生じるかを、下記の図 2-9 に示す。これは、プラズマ表面処理を実施しない場合と実施した場合それぞれの HMDS プラズマ重合膜表面に、水滴を滴下し、その水滴と膜との接触状態を比較した写真である。この写真を見ると、窒素プラズマ表面処理していない HMDS プラズマ重合膜表面では水滴をはじき、きれいな半球状態（接触角が 100 度程度）が維持されている一方、プラズマ表面処理を実施した HMDS プラズマ重合膜

表面では半球状態が崩れて、半楕円状態（接触角が 50 度程度）となっている。この状態の違いは明らかであり、窒素プラズマ表面処理していない HMDS プラズマ重合膜表面は疎水性を示している一方、窒素プラズマ表面処理した HMDS プラズマ重合膜表面は親水性を有していることがわかる。これは、HMDS プラズマ重合膜に窒素プラズマ処理することで、プラズマ重合膜表面にアミノ基が導入され[7]、親水性が得られたと考えられる。図 2-9 には示していないが、プラズマ重合膜の表面を酸素プラズマ処理した場合は、膜表面にカルボキシル基や水酸基が導入されるため[7]、親水性が得られる。



(a) 表面処理していない HMDS プラズマ重合膜表面と水滴との接触状態。



(b) 窒素プラズマ表面処理した HMDS プラズマ重合膜表面と水滴との接触状態。

図 2-9 プラズマ表面処理の有無による HMDS プラズマ重合膜表面と水滴との接触状態の違い

このように、各表面処理によって表面の状態が異なるため、HMDS プラズマ重合膜に表面処理を行わない状態（HMDS）、HMDS プラズマ重合膜表面に窒素プラズマ処理を行った状態（HMDS-N）、HMDS プラズマ重合膜表面に酸素プラズマ処理を行った状態（HMDS-O）それぞれの表面状態を、表 2-3 に整理する。この表に示すとおり、窒素プラズマ処理した場合には pH7 の溶液状態で膜表面に正電荷、酸素プラズマ処理した際には pH7 の溶液状態で膜表面に負電荷を有する状態となる。

表 2-3 HMDS プラズマ重合膜の表面状態

HMDS プラズマ重合膜の表面状態	膜表面の親・疎水性状態	膜表面の荷電状態
プラズマ処理無し ：HMDS	疎水性	—
	水との接触角：100 度	—
窒素プラズマ処理 ：HMDS-N	親水性	pH7 で正電荷を持つ
	水との接触角：50 度	ゼータ電位：約 10mV
酸素プラズマ処理 ：HMDS-O	親水性	pH7 で負電荷を持つ
	水との接触角：50 度	ゼータ電位：約 -20mV

注) 水との接触角は断面写真より算出。

注) ゼータ電位は大塚電子社製 ELS800（電気泳動光散乱光度計）を用いて測定。ポリスチレン粒子の電気泳動移動度を求め、Smoluchowski の式からゼータ電位に変換して算出。

HMDS プラズマ重合膜の表面と GOD との吸着状態を AFM 画像で評価するにあたり、吸着前の HMDS プラズマ重合膜表面の状態を把握しておく必要がある。よって HMDS プラズマ重合膜表面を AFM 観測した。この AFM 画像を図 2-10 に示す。非常に平坦な膜表面になっている。

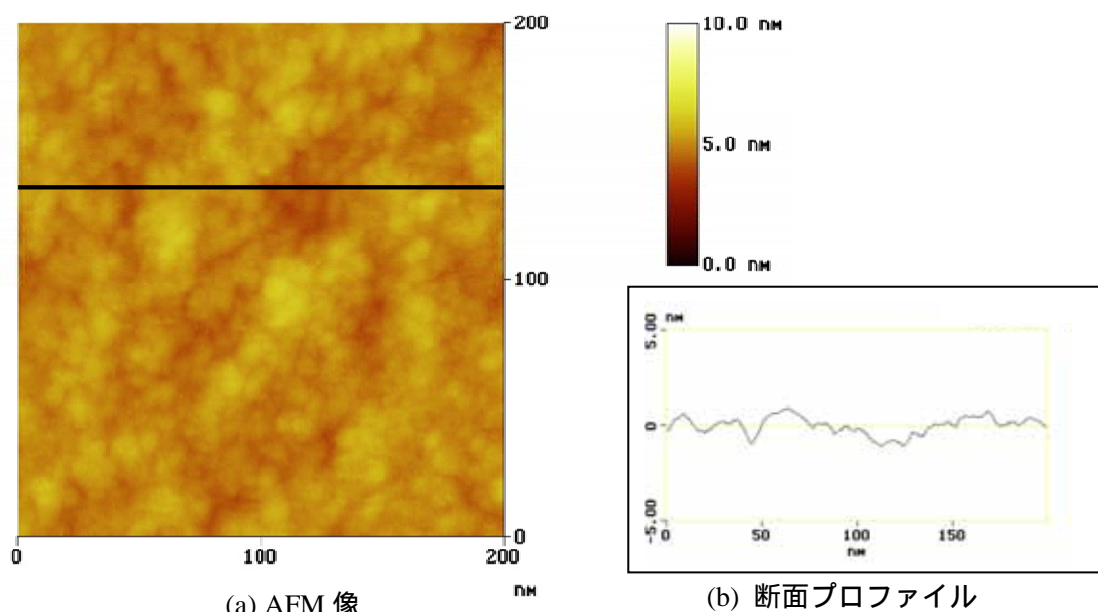


図 2-10 シリコン基板上に成膜した HMDS プラズマ重合膜の AFM 像と断面プロファイル。大きさ 200nm、コントラスト 10nm、二乗平均粗さ(R_q) 0.35nm、最大段差(R_{max}) 0.22nm。

2-5-2-1：HMDS プラズマ重合膜の表面状態が GOD 吸着状態に与える影響評価 1_AFМ 観察

HMDS プラズマ重合膜と GOD との吸着・接触状態をビジュアル的に観察する。プラズマ処理せず疎水性表面となった HMDS プラズマ重合膜表面に、GOD を滴下固定し、固定化されない余った GOD を洗浄したデバイス(HMDS-GOD)、窒素プラズマ処理して親水性の正帯電状態となった HMDS プラズマ重合膜表面に、GOD を滴下固定し、固定化されない余った GOD を洗浄したデバイス(HMDS-N-GOD)、そして酸素プラズマ処理して親水性の負帯電状態となった HMDS プラズマ重合膜表面に、GOD を滴下固定し、固定化されない余った GOD を洗浄した デバイス(HMDS-O-GOD)を AFM で観測し、その結果を図 2-11 のそれぞれ(a)、(b)、(c)に示す。

図 2-11(a)では、表面プラズマ処理なしの HMDS プラズマ重合膜に対して、GOD がクラスタ化しており、膜表面に不均一な吸着状態であることが示されている。膜表面に対して GOD で覆われている範囲は、おおよそ 60%であった(図 2-11(a)の色の差分から判断)。GOD で覆われていない範囲の表面の粗さは、表面プラズマ処理なしの HMDS プラズマ重合膜表面と類似しており、GOD が未吸着の状態になっていると判断できる。表面プラズマ処理なしの HMDS プラズマ重合膜表面と吸着した GOD クラスターの段差は $8.9 \pm 0.2 \text{ nm}$ で、AFM 画像の最大段差は 14nm を示している。この最大段差値は GOD の長軸長に近いので、膜表面に対して垂直方向に吸着する傾向があると考えられる。そして GOD クラスターの成長方向は膜表面に対して垂直方向ではなく水平方向である。図 2-12 の(a)に吸着状態のイメージ図を示す。

図 2-11(b)では、窒素表面プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜表面に対して、GOD がク

ラスタを形成せず、均一に吸着していることが見てとれる。矢印に示した物体は $12.2 \pm 1.2 \text{ nm} \times 8.3 \pm 0.9 \text{ nm}$ の2次元形状を示し、その段差は $2.7 \pm 0.2 \text{ nm}$ であった。また AFM 像の最大段差は 6.6 nm を示していた。物体の段差が 2.7 nm を示したのは、GOD 同士の隣接が影響した結果と思われ、AFM 像の最大段差が GOD と HMDS プラズマ重合膜の段差を示すものと考えられる。これらの結果より、この矢印の物体は GOD の1分子に相当し、この N_2 表面処理した HMDS プラズマ重合膜に対して、GOD の長軸方向が水平になるよう吸着していると判断できる。そして、GOD がプラズマ重合膜上に単分子層を形成していると考えられる。図 2-12 の(b)に吸着状態のイメージ図を示す。GOD 同士が凝集せず、クラスタの形成が無く、均一に膜へ吸着していることを考慮すると、吸着密度が高く、GOD 同士の凝集がないことで GOD の3次元構造を維持でき、効率的な酵素反応を担えると期待できる。親水性を有するこの膜表面は、生体物質である GOD との親和性に優れていることを示す結果となった。窒素プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜は、膜表面にアミノ基が導入され[10]、pH7 の水溶液中ではゼータ電位がプラス電位を示す。また GOD は酸性タンパク質で等電点が 4.2 であることから、pH7 の水溶液中では負電荷を持つ。従って、膜表面と GOD との静電引力が強いため、GOD (タンパク質) 同士の凝集力に勝って、膜表面に均一に吸着されたと考えられる。そして、本方法は1分子のタンパク質を観察可能にする方法になるとも思われる。

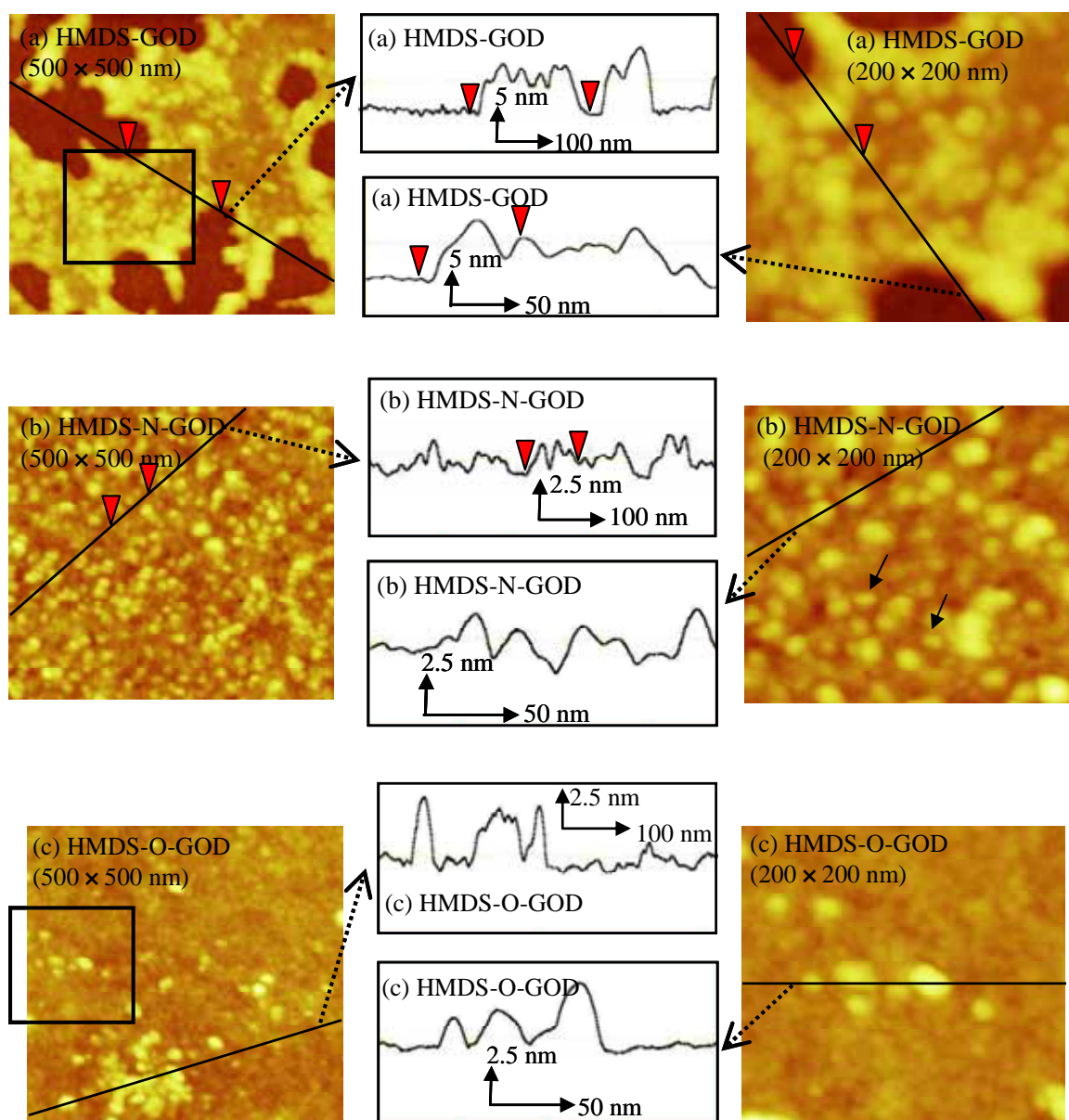


図 2-11 各表面処理した HMDS プラズマ重合膜表面に GOD を吸着させた膜表面の AFM 像とその表面プロファイル。(a) プラズマ処理無しの HMDS 表面(HMDS-GOD)、 $R_q=2.8$, $R_a=2.3$, $R_{max}=14$ 。(b) 窒素プラズマ処理した HMDS 表面(HMDS-N-GOD)、 $R_q=0.73$, $R_a=0.56$, $R_{max}=6.6$ 。(c) 酸素プラズマ処理した HMDS 表面(HMDS-O-GOD)、 $R_q=0.62$, $R_a=0.39$, $R_{max}=6.1$ 。吸着のため滴下した GOD 溶液濃度は 10mg/mL。(b)の矢印は 1 つの GOD を示す。

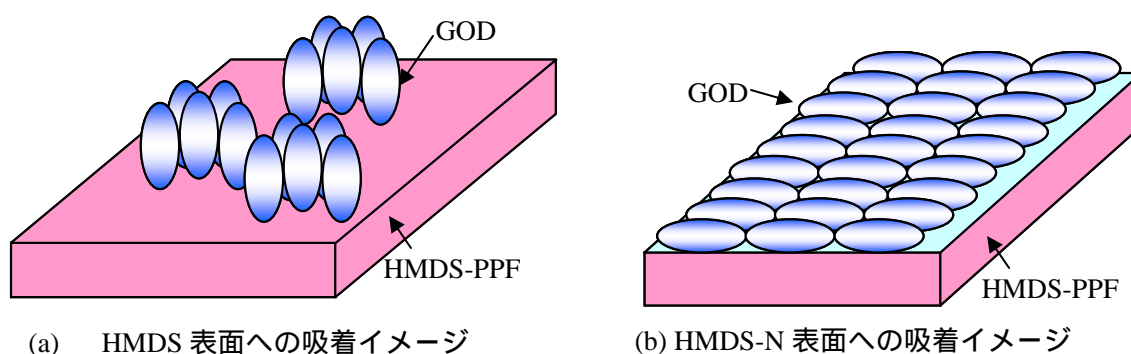


図 2-12 HMDS プラズマ重合膜表面への GOD の吸着イメージ図

図 2-11(c)に、酸素表面プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜表面に対する GOD の吸着状態を観察した AFM 像を示す。この画像では HMDS プラズマ重合膜の表面にわずかに吸着した GOD の単分子が観察された。GOD の段差は $4.2 \pm 0.2 \text{ nm}$ で、図 2-11(b)に近い値となっている。最大段差も図 2-11(b)に近い値となっており、膜に対して、GOD の長軸方向が水平になるよう吸着していると判断できる。一方で膜の荒さ平均 R_a は酸素表面プラズマ処理した膜表面よりも小さく、これは GOD の吸着量が少ないことを裏付けている。酸素表面プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜の表面は親水性であるが、カルボキシル基が導入され負帯電の状態となる。このためプラズマ重合膜と pH7 の水溶液中で負電荷を持つ GOD との反発作用によって、膜への GOD の吸着状態が悪くなると考えられる。

2-5-2-2：HMDS プラズマ重合膜の表面状態が GOD 吸着状態に与える影響評価 2 QCM 観察

溶液中で、HMDS プラズマ重合膜と GOD との動的な吸着・接触状態を観察する。AFM 観察では、HMDS プラズマ重合膜上に GOD 溶液を滴下して接触・吸着させ、GOD が移動できない状態で測定している。一方 QCM は溶液中での測定となるため、HMDS プラズマ重合膜への接触や離脱の動的状態を観察できる。ここでは QCM を利用して、HMDS プラズマ重合膜表面にプラズマ処理無しのデバイス (HMDS)、窒素プラズマ処理したデバイス (HMDS-N)、酸素プラズマ処理したデバイス (HMDS-O) を用い、リン酸緩衝溶液に滴下した GOD 溶液との吸着・接触状態を観察した。3 種類の表面での GOD の吸着状態を図 2-13 に示す。

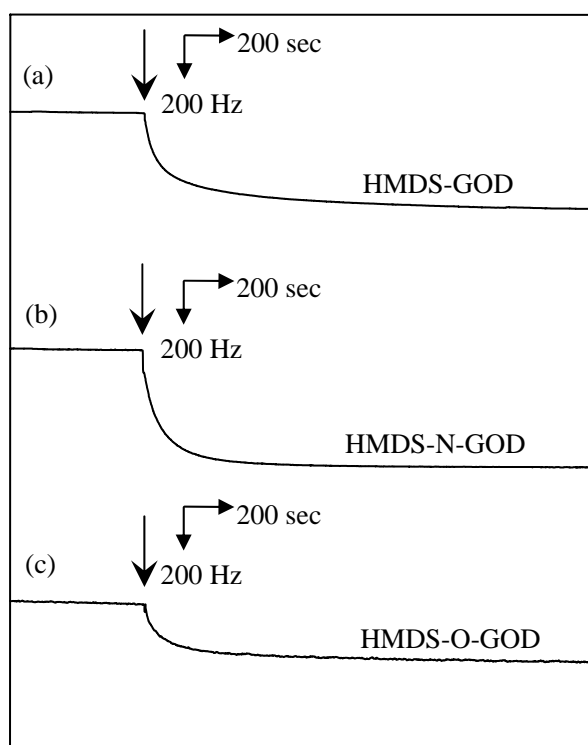


図2-13 QCMによる20mMリン酸緩衝溶液での共振周波数。(a) プラズマ処理無しのHMDS表面、(b) 窒素プラズマ処理したHMDS表面、(c) 酸素プラズマ処理したHMDS表面、のデバイスにGODが吸着していく状態。矢印は0.1mg/mLのGOD溶液を滴下したタイミング。

3種類の表面状態とも、GODの滴下により周波数が変化し、その後、時間とともに測定周波数が安定した。これはGODの滴下により、HMDSプラズマ重合膜表面でGODの吸着と離脱が起こり、時間経過とともに吸着状態が安定したためと考える。膜とGODの間の相互作用が高いほど、GODの吸着量が多くなり、そしてより早く飽和して吸着安定状態となる。窒素プラズマ表面処理したデバイス(HMDS-N)での周波数変化は507Hzであった。Sauerbreyの式に従うと $314 \pm 50 \text{ ng/cm}^2$ のGODが吸着していたと導かれる。この窒素プラズマ処理したデバイスへのGODの吸着量は、AFM画像で観測された2次元アレイ表面に、最も吸着する際の計算値に近い。すなわち $12.2 \times 8.3 \text{ nm}^2$ の観測された物体を楕円状のGODとし、密集した単分子層を形成していると仮定した場合、最も吸着するGODの濃度は $1.6 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ と見積られる。そしてその結果、160kDの2量体酵素であるGODはおおよそ 300 ng/cm^2 となる。従ってQCMの結果からも、窒素プラズマ処理したデバイス表面にGODが単分子層で密集して吸着されると裏づけられる。QCMにより求められたHMDS表面、およびHMDSに酸素プラズマ処理したデバイス表面へのGODの吸着量はそれぞれ、 280 ng/cm^2 、 172 ng/cm^2 であった。これは上記2-5-2-1の結果(AFM画像からみたHMDS表面へのGOD吸着状態)と同様の傾向であり、上記2-5-2-1の結果を裏づけるものと考えられる。一方で、QCMとAFMの吸着量は完全には一致せず、QCMによる算出質量値のほうが高かった。これは、AFMで用いるデバイスはデバイス作製時に未吸着や弱い吸着のGODを洗い流すが、QCMはGOD溶液中での測定となるため弱い吸着のGODも検出するた

めと考える。また、HMDS-N では周波数変化が安定するまでの飽和時間がおおよそ 500 秒だったが、HMDS 表面および HMDS に酸素プラズマ処理したデバイス表面では飽和までに 2500 秒以上を要した。ここからも HMDS に窒素プラズマ処理したデバイス表面は、HMDS 表面および HMDS に酸素プラズマ処理したデバイス表面に比べて GOD の吸着力が強いと判断できる。

GOD 溶液濃度の違いが、プラズマ重合膜表面への吸着にどのような違いを与えるか確認するために、異なる GOD 溶液濃度をリン酸緩衝溶液に滴下して QCM 評価を行った。十分に安定な吸着状態になるよう、プラズマ重合膜を溶液に浸して接触させる時間は 1 時間とした。パラメータとして GOD の溶液濃度を変化させ、その結果を図 2-14 に示す。この結果からも、「HMDS-N の膜が他の膜より吸着量が多く、膜と GOD の親和性が高い」ということが読み取れる。さらに、「GOD の溶液濃度の増加に伴って吸着量は変化し、溶液濃度が低い場合 (0.001mg/mL) には吸着量が少なく、溶液濃度が高い場合 (0.1mg/mL) には吸着量が多くなっている。また、図 2-14 は、一定の溶液濃度以上になると吸着量が飽和状態になることも示している。

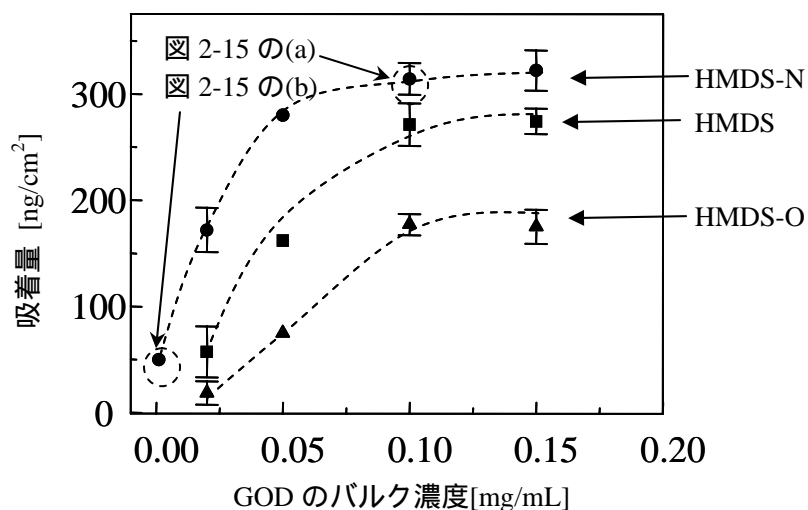
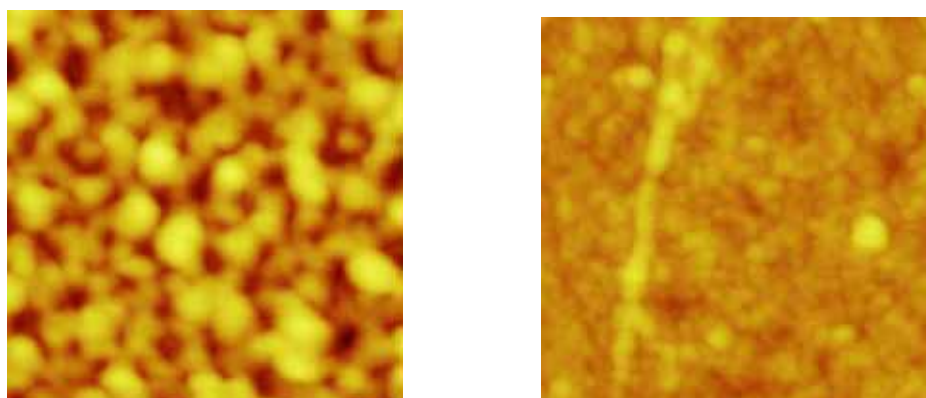


図 2-14 GOD バルク濃度の異なる溶液に対する QCM の測定結果

GOD 溶液濃度の違いが与える GOD の吸着状態 (吸着量) の違いは、図 2-15 に示す AFM 画像からも確認することができる。溶液濃度が高い場合には GOD と認識できる凹凸差が見られるが、溶液濃度が低い場合にはその凹凸差がはっきりしないことが分かる。



(a) GOD の溶液濃度： 0.1 mg/mL

(b) GOD の溶液濃度： 0.001 mg/mL

図 2-15 窒素プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜表面へ、各バルク濃度に含まれる GOD を吸着させたときの AFM 画像。

各溶液濃度での GOD とプラズマ重合膜との物理吸着のための接触付け置き時間は 60 分とし、付け置き後の AFM 像はタッピングモードでの測定とする。画像サイズは 200nm、z-scale(contrast)は 10nm、走査速度は 0.6Hz とする。

図 2-14 の結果を用いて、GOD と各 HMDS プラズマ重合膜 (HMDS-N、HMDS プラズマ重合膜、HMDS-O の膜) との吸着の違いを定量化するため、次の Langmuire 等温吸着式(式 2-3)に従うか検討した。

$$\frac{C}{m_{\text{eq}}} = \frac{1}{m_{\text{max}}} C + \frac{1}{m_{\text{max}} \cdot K_{\text{eq}}} \quad \dots (2-3)$$

ここで、 C は GOD 溶液濃度 (バルク濃度)、 m_{eq} は GOD の平衡吸着量、 m_{max} は GOD の最大吸着量、 K_{eq} は平衡定数 (吸着定数) を示す。HMDS-O の膜と GOD との吸着状態を式 2-3 に当てはめようとしても、直線性がまったく得られず、Langmuire 等温吸着式に従わないものであった。図 2-11(c)に示された通り、この条件では GOD が不均一に膜表面の一部しか吸着していないため、Langmuire 等温吸着式に従わないと思われる。また、HMDS プラズマ重合膜と GOD との吸着状態を式 2-3 に当てはめようとした結果、相関係数 R^2 は 0.7352 と不適當ではないレベルの直線性であったが、想定される最大吸着量が $634\text{nm}/\text{cm}^2$ と見積もれ、図 2-13 から確認された GOD の吸着量と大きな差が生じた。図 2-11(a)の吸着状態を見ると、GOD が凝集して膜表面に不均一に吸着しており、この場合も Langmuire 等温吸着式に従う事例でないと考えられる。しかしながら、HMDS-N の膜と GOD との吸着状態を式 2-3 に当てはめると、相関係数 R^2 が 0.9926 で直線性があり、想定される最大吸着量も $350\text{ng}/\text{cm}^2$ で図 2-13 から算出した吸着量と一致する。従って、HMDS-N と GOD との吸着は Langmuire 等温吸着式に従い、単分子層を形成すると考えられ、平衡定数 (吸着定数) K_{eq} は $7.98 \times 10^{-5}\text{ml}/\text{ng}$ と求まる。HMDS-N に対する GOD の Langmuire プロットを図 2-16 に示す。

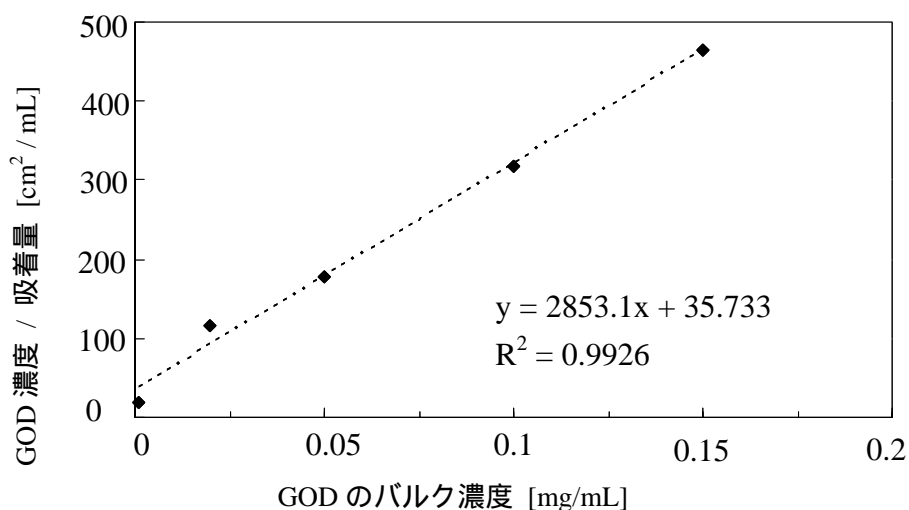


図 2-16 HMDS-N に対する GOD の Langmuir プロット

以上より、グルコースバイオセンサの GOD と電極との固定を考える上で、GOD とプラズマ重合膜との接触面に親和性を持たせるためには、親水性かつ正帯電の特徴を有する、窒素表面処理した HMDS プラズマ重合膜を用いることが効果的である。

2-5-2-3 : HMDS プラズマ重合膜の表面状態が与えるグルコース応答性

プラズマ表面処理無しの HMDS プラズマ重合膜に GOD を物理吸着させた電極デバイス (HMDS-GOD) と、窒素プラズマ表面処理した HMDS プラズマ重合膜に GOD を物理吸着させた電極デバイス (HMDS-N-GOD) を作製し、グルコースを滴下した時の酸化電流値をサイクリックボルタメトリーで測定してグルコースバイオセンサの特性を評価した。サイクリックボルタモグラムおよび酸化電位 +0.6V から算出した検量線を図 2-17 に示す。この図から、HMDS プラズマ重合膜の表面状態にかかわらず、グルコースの増加に伴い、酸化電流の増加が見られた。これは膜表面の状態によらず、HMDS プラズマ重合膜と GOD が接触 (物理吸着) しても、GOD の酵素活性は維持されると判断できる。一方で、窒素プラズマ表面処理した HMDS プラズマ重合膜に GOD を物理吸着させた電極デバイスとプラズマ表面処理を施さない HMDS プラズマ重合膜に GOD を物理吸着させた電極デバイスでは、窒素プラズマ表面処理した HMDS プラズマ重合膜に GOD を物理吸着させた電極デバイスの感度のほうが、約 2 倍感度が高く、センサ応答の範囲としても臨床での有効範囲 (約 5 ~ 20mM) をカバーできていた。膜表面の状態によって感度が異なる原因は GOD の吸着量が異なるためと考えられ、AFM や QCM の評価結果からも裏付けられる。

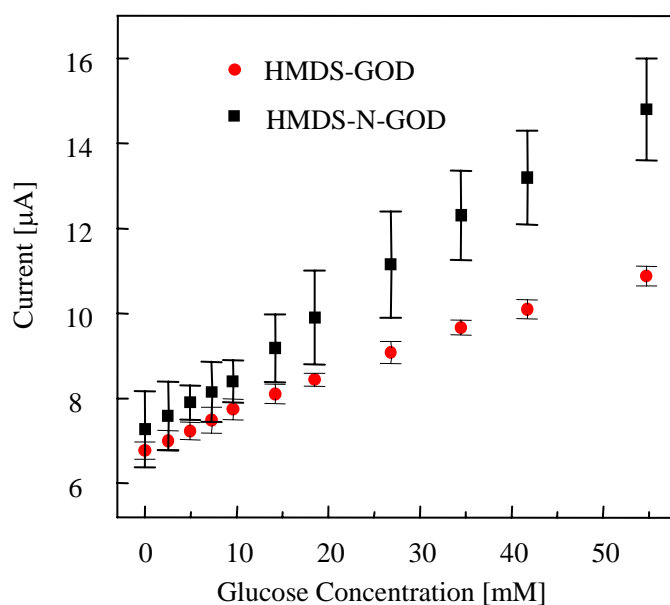
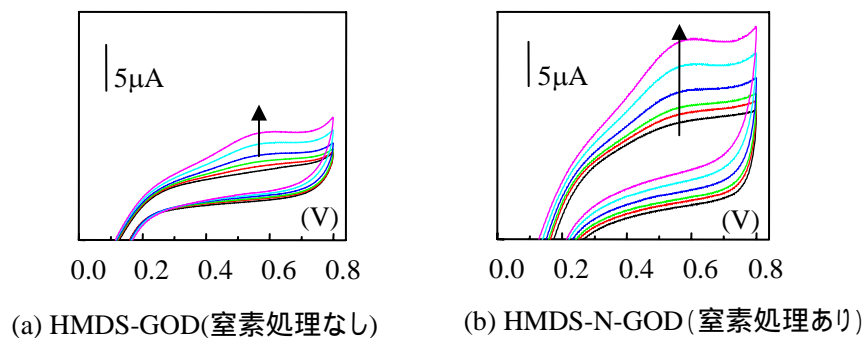


図2-17 HMDSプラズマ重合膜表面へのプラズマ窒素処理の有無の差を確認したサイクリックボルタモグラム、およびそのサイクリックボルタモグラムから求めた検量線。検量線を求める際の印加電圧は+600mV。検証線に関して、HMDS-GODデバイスでは感度が76.6[nA/cm²/mM]、線形性は $r>0.97$ 、対象範囲は0～18.5mM。HMDS-N-GODデバイスでは感度が146[nA/cm²/mM]、線形性は $r>0.97$ 、対象範囲は0～26.8 mM。

金電極に酵素を直接吸着させた場合、徐々に電極から解離して酵素活性の低下を引き起こした報告がある[16]。一方、我々の検討では帯電したプラズマ重合膜に酵素を吸着させた場合、30回以上のサイクリックボルタメトリーを行ってもセンサ応答が得られている。さらに、作製したバイオセンサデバイスに60・1時間の熱処理を行い、熱による処理でのセンサ感度への悪影響を確認した(図2-18)が、この場合も十分なセンサ応答が得られている。グルコースバイオセンサの使用用途の一つに、ユーザの負担(測定ごとの準備、測定コストなど)を低減するため、センサ(GODを含む)の連続使用・繰り返し使用が考えられる。この際、GODの電極への固定がポイントになるが、窒素プラズマ表面処理したHMDSプラズマ重合膜にGODを接触・物理吸着させた場合でも、グルコース応答を繰り返し実現できることがわかった。

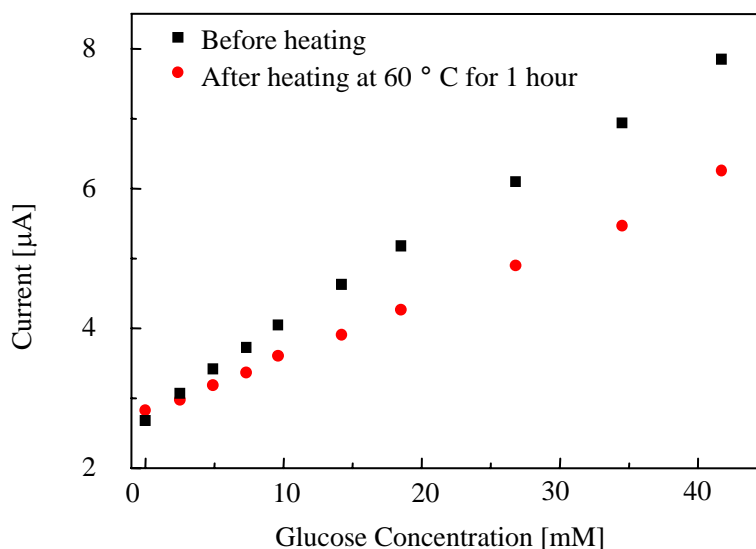


図2-18 GODを物理吸着させたバイオセンサデバイスに対する熱処理有無でのグルコース濃度 - 酸化電流値の検量線。サイクリックボルタンメトリーの酸化電位0.6Vでの酸化電流値を利用。白金電極上の窒素プラズマ表面処理を行ったHMDSプラズマ重合膜に、GODを物理吸着させたデバイスを使用。熱処理未実施デバイスのセンサ感度：122 nA/mM、熱処理実施デバイスのセンサ感度：80.4 nA/mM。

以上より、HMDS プラズマ重合膜の表面状態によって、センサ感度および吸着状態に大きな影響を与えるため、膜表面の状態をコントロールすることはグルコースバイオセンサへの応用に重要である。そしてHMDS プラズマ重合膜を窒素プラズマ処理して親水化および正帯電状態とすることがGODの吸着にとって有利となる。

2-6 まとめ

本章では、妨害物質（アスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸）の悪影響に対してHMDSプラズマ重合膜が与える効果を検証した。その結果、HMDSプラズマ重合膜は1.7nmの極薄膜で妨害物質となる電極活物質の拡散を抑制していた。一方で分子サイズの小さい過酸化水素はHMDSプラズマ重合膜をすり抜けることができ、サイズ効果によって過酸化水素の選択性を得ることができていた。一方でHMDSプラズマ重合膜の膜厚を厚くすると過酸化水素の拡散も抑制され選択性の低下を示していた。よって、ナノレベルオーダで極薄膜を成膜できるプラズマ重合は利点がある。また、GODをHMDSプラズマ重合膜に架橋試薬で共有結合してもGODの活性を維持し、グルコースバイオセンサの機能を果たすことが確認できた。そしてプラズマ重合膜の膜厚を増加するほどセンサ感度の低下が見られ、過酸化水素の拡散性低下と一致する結果を示した。

また本章ではHMDSプラズマ重合膜の表面状態を制御することでGODとプラズマ重合膜との

親和性・吸着状態への影響を評価した。AFM と QCM を用いたこの結果について、窒素プラズマ処理したプラズマ重合膜では GOD の吸着量が多く、均一な単層を形成していた。一方酸素プラズマ処理したプラズマ重合膜では、膜のところどころに単分子の吸着が見られたが、吸着量は少なく、親和性が良好とはいえない状態であった。プラズマ表面処理無しのプラズマ重合膜では、GOD が凝集してクラスタを形成し HMDS プラズマ重合膜表面の面積に対して 60% 程度の範囲で吸着が見受けられた。よって、膜表面を親水性でかつ正帯電状態となる窒素プラズマ処理したプラズマ重合膜表面が GOD との親和性に優れ、グルコースバイオセンサの特性向上に効果的である。さらに HMDS プラズマ重合膜の各表面状態で GOD を物理吸着させ、グルコース応答を評価すると、窒素プラズマ処理した HMDS プラズマ重合膜の電極デバイスが一番良好なセンサ感度を示した。以上より、GOD と接触する HMDS プラズマ重合膜の表面状態は、GOD の吸着状態やセンサ感度に大きな影響を与えるため、膜表面の状態をコントロールすることがグルコースバイオセンサへの応用に重要であると確認できた。

第 2 章の参考文献

- [1] A. Hiratsuka, H. Muguruma, R. Nagata, R. Nakamura, K. Sato, S. Uchiyama, I. Karube: “Mass transport behavior of electrochemical species through plasma-polymerized thin film on platinum electrode”, *Journal of membrane science*, 175 (2000) 25.
- [2] H. Muguruma, A. Hiratsuka, I. Karube: “Thin-film glucose biosensor based on plasma-polymerized film: Simple design for mass production”, *analytical chemistry*, 72 (2000) 2671.
- [3] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg: “Crystal structure of glucose oxidase from *Aspergillus niger* Refined at 2.3 Å resolution”, *analytical chemistry*, 53 (1981) 665
- [4] D. Losic, J. G. Shapter, J. J. Gooding: “Scanning tunneling microscopy studies of glucose oxidase on gold surfaces”, *Langmuir*, 18 (2002) 5422.
- [5] H. Muguruma, I. Karube: “Plasma-polymerized films for biosensors”, *trends in analytical chemistry*, 18 (1999) 62.
- [6] 長田義仁 編著: 「プラズマ重合」, 東京化学同人, 1986.
- [7] D. S. Everhart, C. N. Reilley: “Chemical derivatization in electron spectroscopy for chemical analysis of surface functional groups introduced on low-density polyethylene film”, *analytical chemistry*, 53 (1981) 665.
- [8] T. Matsumoto, M. Furusawa, H. Fujiwara, Y. Matsumoto, N. Ito: “A micro-planar amperometric glucose sensor unsusceptible to interference species”, *sensors and actuators B*, 49 (1998) 68.
- [9] H. Yasuda: “Plasma Polymerization”, Academic Press, 1985.
- [10] D. S. Everhart, C. N. Reilley: “Chemical derivatization in electron spectroscopy for chemical analysis of surface functional groups introduced on low-density polyethylene film”, *analytical chemistry*, 53

- (1981) 665
- [11] H. Muguruma, N. Itazu, S. Miura: “Characterization of diffusion-controlled mass transport through nanoporous and nanothin films plasma polymerized on a sputtered platinum electrode”, *journal of physical chemistry B*, 109 (2005) 18839.
- [12] C. L. Wang, Y. Kobayashi, H. Togashi, K. Kato, T. Hirotsu, K. Hirata, R. Suzuki, T. Ohdaira, and T. Mikado, : “Plasma-polymerized hexamethyldisiloxane films characterized by variable-energy positron lifetime spectroscopy”, *journal of applied polymer science*, 74 (1999) 2522.
- [13] D. W. Oxtoby, N. H. Nachtribe, and W.A. Freeman: *chemistry: science of change*, saunders college publishing, New York, 1990.
- [14] G. C. Pimentel and R.D. Spratley: *chemical bonding: clarified through quantum mechanics*, Holden-Day, (p.174 in the Japanese edition) 1969.
- [15] R. C. Tucker, I. Song, J. H. Payer, and R. E. Marchant: “Analysis of charge rejection by an ionometric plasma polymerized film for biomedical sensor applications”, *journal of applied electrochemistry*, 27 (1997) 1079.
- [16] A. Szucs, G. D. Hitchens, J. O. Bockris: “On the adsorption of glucose oxidase at a gold electrode”, *journal of the electrochemical society*, 136 (1989) 3748.

第 3 章

プラズマ重合膜/酵素複合体での酵素埋め込み固定

3-1 はじめに

本章では、プラズマ重合膜に酵素を埋め込むことでプラズマ重合膜/酵素複合体を形成し、架橋試薬を用いないで酵素の固定化を行うバイオセンサを提案する。バイオセンサに用いる酵素は水溶液中で反応するのが一般的であるため、そのまま使用すると水溶液に溶けて、生体物質の回収が困難になる。酵素の状態がこのようでは、バイオセンサの測定精度は不安定なものになる。よって、酵素を電極に固定化する技術が、酵素脱離による測定値への影響軽減に重要である。酵素の固定化は、不溶性物質(担体)に酵素を担持させて行うことが主であり、化学的方法と物理的方法がある[1-3]。

従来、酵素などの生体物質の固定化膜に用いられているポリマー膜や試薬は、ウェットプロセスである[4]。しかし、簡便・大量生産の可能な半導体加工技術との組み合わせが難しい。この問題を解決するため、プラズマ重合膜を担体に用いる方法が研究されてきた[5-6]。これは、電極との密着性に優れたプラズマ重合膜を電極上に成膜し、さらにグルタルアルデヒドなどの架橋剤によって、酵素とプラズマ重合膜を共有結合させて固定化する方法である。さらに、生体物質を直接プラズマ処理するというプロセスも試みられている[7-9]。

3-2 目的と検証項目

本章では架橋試薬を用いず、酵素を直接プラズマ重合膜に埋め込み、プラズマ重合膜/酵素複合体を形成することで電極への固定化を行うことを目的とする。このことにより、架橋工程が簡略化できる。さらにプラズマ重合膜にメディエータを組み込んだ際にはメディエータ - 酵素間の距離を短縮でき、電子授受の効率も可能になると考える(次章参照)。

プラズマ重合膜による酵素埋め込み固定が可能であるか、確認評価の概略を次に示す。

- ・プラズマ重合膜への GOD の埋め込み状態(埋め込み無し、半埋め込み、全埋め込み)の AFM 観察
- ・プラズマ重合膜に GOD の埋め込み固定されたグルコースバイオセンサのセンサ特性評価

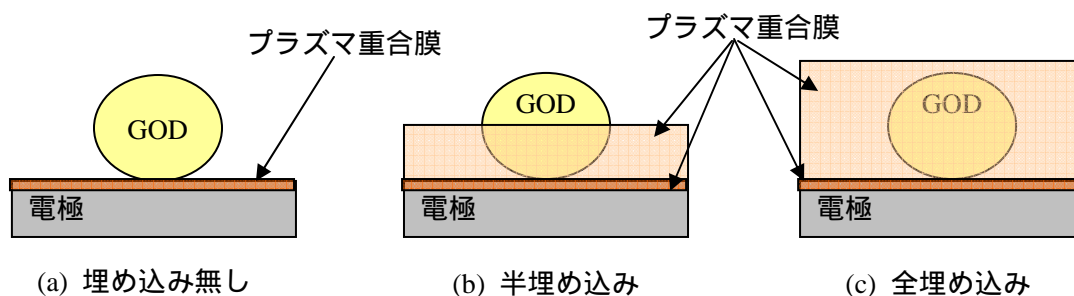


図 3-1 プラズマ重合膜/酵素複合体の概略図 (GOD の埋め込み状態)

3-2-1 検証1: AFMによる埋め込み状態の観察

プラズマ重合膜の成膜条件によって、GOD がどのようにプラズマ重合膜に埋め込まれるかを観察評価する。観察では、各条件で作製されたプラズマ重合膜/酵素複合体の表面を AFM により観察する。観察対象の第二層プラズマ重合膜の成膜条件は次のようになる。

表 3-1 AFM 観察で用いるデバイスの成膜条件

No.	モノマー	放電パラメータ			備考
		電圧 [W]	圧力 [Pa]	埋め込み膜厚 [nm]	
1	HMDS	200	0.6	0	埋め込み無し
2		200	0.6	4	N/A
3		200	0.6	12	N/A
4	アセトニトリル	200	1.0	4	N/A
5		200	1.0	12	N/A

3-2-2 検証2: GODが埋め込み固定されたグルコースバイオセンサ特性の検証

プラズマ重合膜に埋め込み固定された GOD が酵素活性を維持しているか、またプラズマ重合膜への埋め込み状態や膜質差がセンサ性能にどのような影響を与えるかを、サイクリックボルタンメトリーおよび定電位時間電流測定で検証する。検証するデバイスの第二層プラズマ重合膜の成膜条件は下記表に示す。

表 3-2 グルコースバイオセンサ特性の評価で用いるデバイスの成膜条件

No.	モノマー	放電パラメータ			備考
		電圧 [W]	圧力 [Pa]	埋め込み膜厚 [nm]	
1	HMDS	200	0.6	0	埋め込み無し
2		200	0.6	4	N/A
3		200	0.6	12	N/A
4		100	0.6	11	N/A
5	アセトニトリル	200	1.0	4	N/A
6		200	1.0	12	N/A

3-3 電極デバイス作製および評価・測定方法

3-3-1： 検証で用いる電極デバイスの作製の流れ

- (1) 基板となるマイクロスライドガラスを混合溶液（蒸留水、アンモニア水、過酸化水素水）で 70、10 分程度ボイリングした後、ガラスを取り出して、蒸留水でリンスし、アルゴンガスで水垢を除去する。
- (2) 洗浄後のガラス基板をスパッタ用チャンバーに入れ、密着層としてクロムを 40nm にスパッタリングで成膜する。
- (3) その後、クロム上部に電極層として、白金を 200nm にスパッタリングして成膜する。
- (4) 成膜したガラス基板をプラズマ重合用のチャンバーに入れ、白金電極上部に、第一層となるプラズマ重合膜を成膜する。RF13.56MHz、外部電源方式、誘電結合方式のプラズマ重合装置を使用する。プラズマ重合膜のモノマーである HMDS の重合条件は、電力：200W、圧力：0.6Pa、成膜速度：22.2±2.8nm/min とする。AFM 観察に用いるデバイスでは、シリコン基板上に直接、放電時間：60sec（膜厚：約 20nm）で成膜する。一方、グルコースバイオセンサデバイスでは、放電時間：5sec（膜厚：約 2nm）とする。プラズマ重合膜の表面を親水性にするため、プラズマ重合膜の成膜後に窒素プラズマ処理（電力：100W、圧力：3Pa、放電時間：20sec、流量：15mL/min）を行って、アミノ基を導入する。
- (5) 次に、作製途中の電極デバイスをチャンバーから取り出し、第一層のプラズマ重合膜上に酵素溶液（GOD）を滴下し、約 1 時間自然乾燥させ、その後、非吸着の酵素を蒸留水、リン酸緩衝溶液で洗い流す。
- (6) 第一層のプラズマ重合膜上に存在する酵素を固定化するため、作製途中の電極デバイスを再度チャンバーに入れ、第二層の酵素埋め込みプラズマ重合膜を所定（表 3-1 および表 3-2 を参照）のモノマー・放電パラメータで成膜する。
- (7) 最後にガラスカッターで適当な大きさに切り出し、カプトンテープで不要な白金を覆うことにより絶縁し、センサ面積（0.5×0.5cm²）の調整を行う。デバイス作成後は、冷蔵庫（4）にて使用まで冷蔵保管し、使用時にはリン酸緩衝溶液にて洗浄して使用する。

3-3-2： 本章で用いる評価・測定方法

- (1) AFM 観察：

GOD がプラズマ重合膜に埋め込まれた状態の観察を AFM で行う。プラズマ重合膜/酵素複合体の表面状態を AFM 画像およびその断片プロファイルで観測する。AFM 観察は、大気中測定にてタッピングモードで行い、走査速度は 0.6Hz に設定する。

測定方法には作製したセンサを作用電極とする 3 電極方式の電気化学測定を、リン酸緩衝液（pH7.4）中で行う。測定系に関しては、第 2 章の 2-4-3(1)と同じとする。測定種類は次の 2 種類である。

- (2) サイクリックボルタンメトリー：

所定の電気化学種溶液あるいはグルコース溶液を所定量追加していき、各濃度での電圧一

電流特性を評価する。

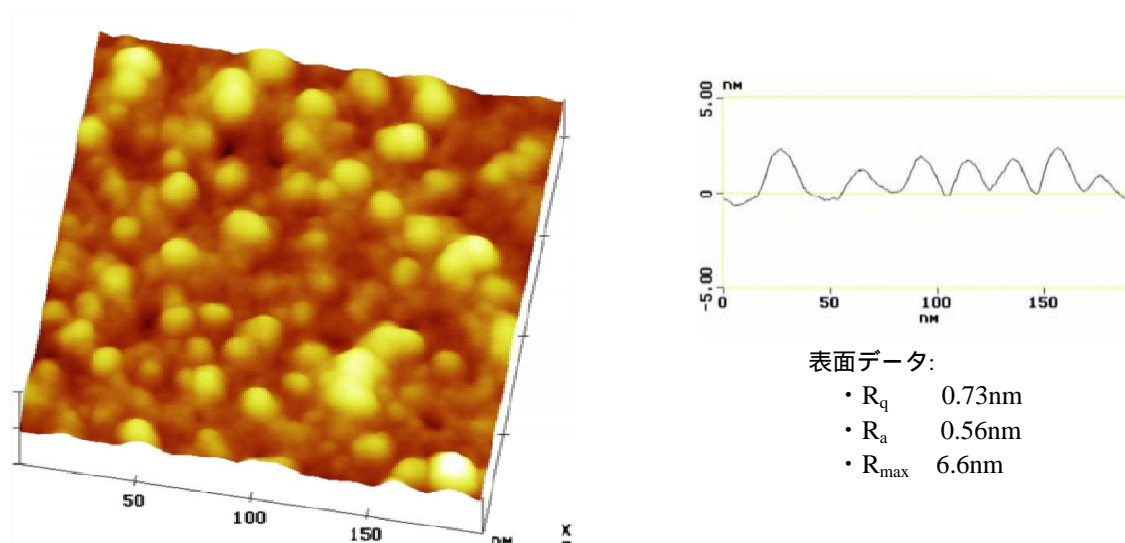
(3) 定電位時間電流測定法

所定の電位を設定し、測定開始から所定時間ごとに、グルコース溶液を所定量ずつ滴下していき、各濃度での時間—電流特性を評価して、電極の感度やセンサの検出濃度範囲・応答性を確認する。

3-4 結果・考察

3-4-1 検証1： AFM による埋め込み状態の観察

GOD が吸着したシリコン基板に、第二層となるプラズマ重合処理を行い、その表面を AFM で観察した。図 3-2-1 はプラズマ重合膜による埋め込みを実施していない状態での AFM 観測結果である。図 3-2-1 では、明確に球状物質の点在が確認できる。この試料の最大段差は、6.6nm であり、報告されている GOD の楕円形状[11]が 6.0nm×5.2nm×7.7nm であることから照らし合わせても、この球状物質は酵素に相当すると考えられる。

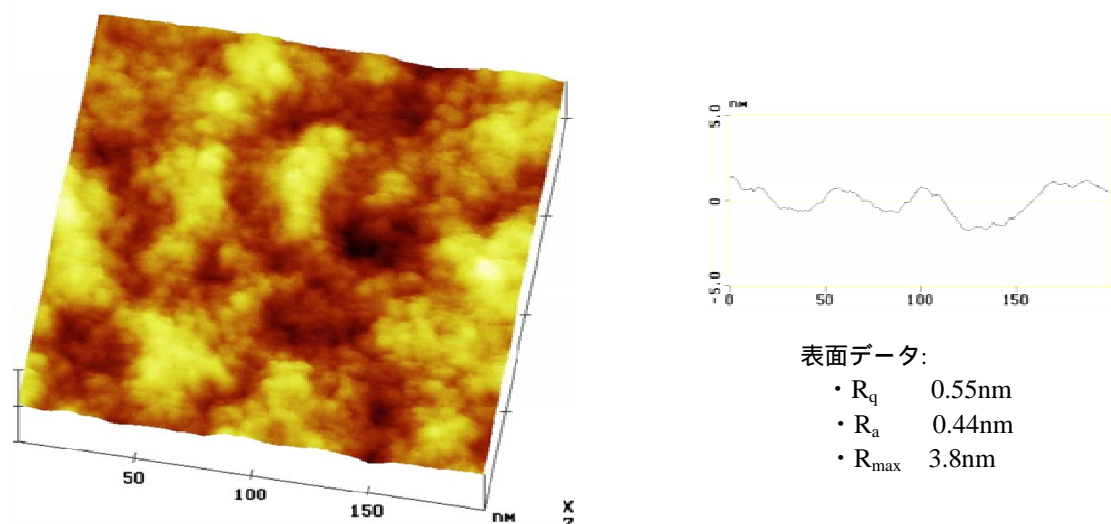


デバイス No.1：埋め込み無しの AFM 画像と断面プロファイル

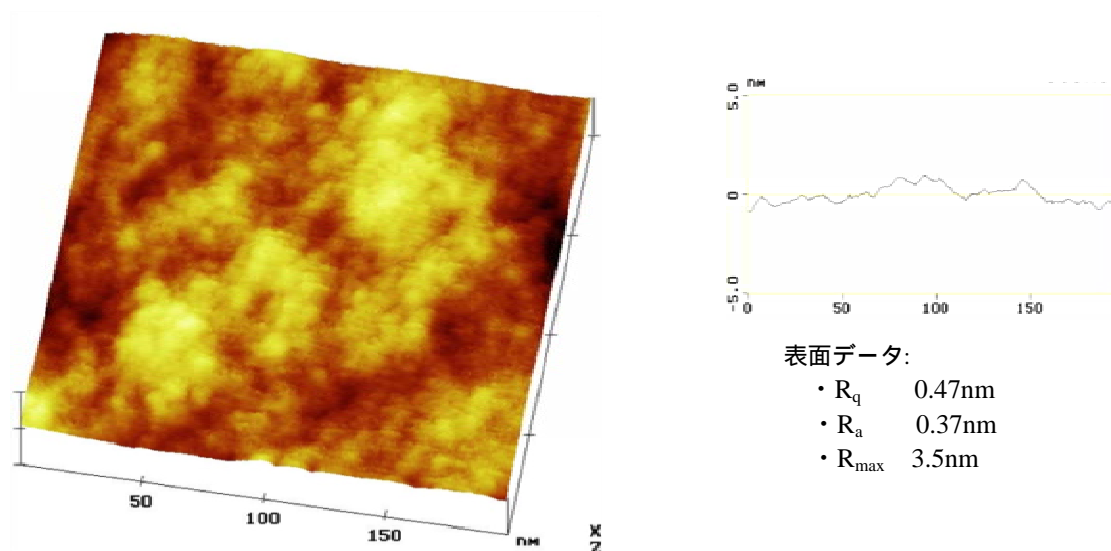
図 3-2-1 プラズマ重合膜へ GOD を埋め込み固定したデバイスの AFM 観察(埋め込みなし)

図 3-2-2(a)・(b)はモノマーに HMDS、図 3-2-3(a)・(b)はモノマーにアセトニトリルを用いて埋め込み固定化を実施した状態での AFM 観測結果である。図 3-2-2(a)、図 3-1-3(a)は膜厚が 4nm で吸着した GOD が半分埋め込まれる条件、図 3-2-2(b)、図 3-2-3(b)は膜厚が 12nm で、吸着した GOD が完全に埋め込まれる条件でプラズマ重合処理を行っている。図 3-2-2(a)・(b)から、HMDS プラズマ重合膜で、半埋め込みの場合には GOD の形状に由来する明確な山が見られるが、全埋め込みではこの山が不明確になっている。このため、膜厚の増加に伴い、GOD が HMDS プラズマ重

合膜に埋め込まれていったと考えられる。一方、アセトニトリルプラズマ重合膜は、図 3-2-3(a)・(b)より、膜厚が 4nm と 12nm で平坦性にほとんど差が無いように見受けられる。HMDS プラズマ重合膜は、GOD を避けて成長するのに対し、アセトニトリルプラズマ重合膜は GOD 上でも成長でき、第一層のプラズマ重合膜上への成膜とともに GOD 上にも成膜されたと考えられる。モノマー成分や放電条件の違いが、成膜・積層過程に差を生じさせたと考えられる。

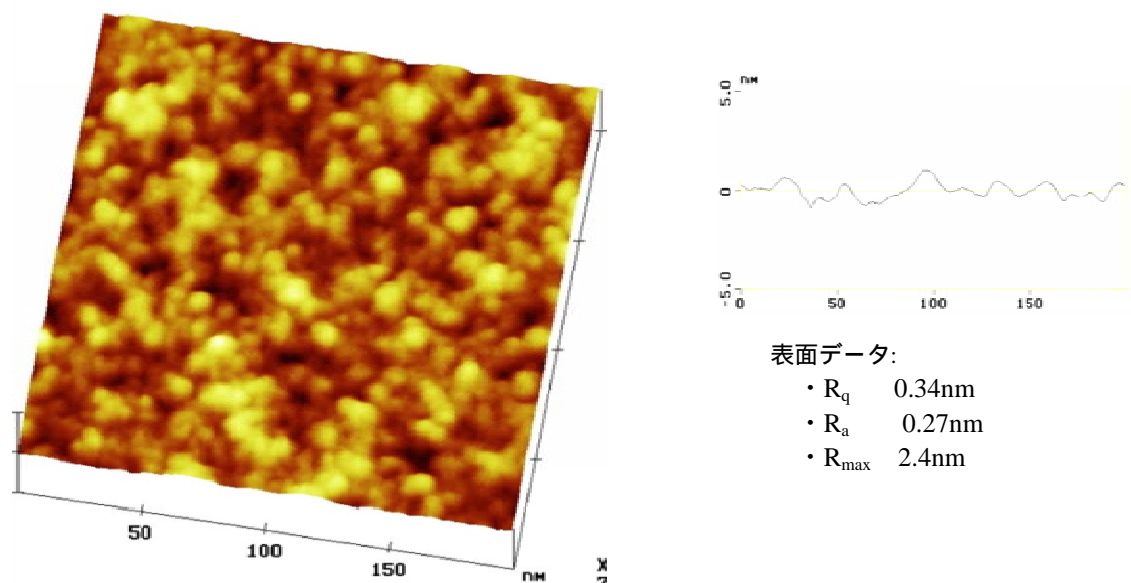


(a) デバイス No.2 : HMDS プラズマ重合膜厚 4nm での埋め込み AFM 像と断面プロファイル

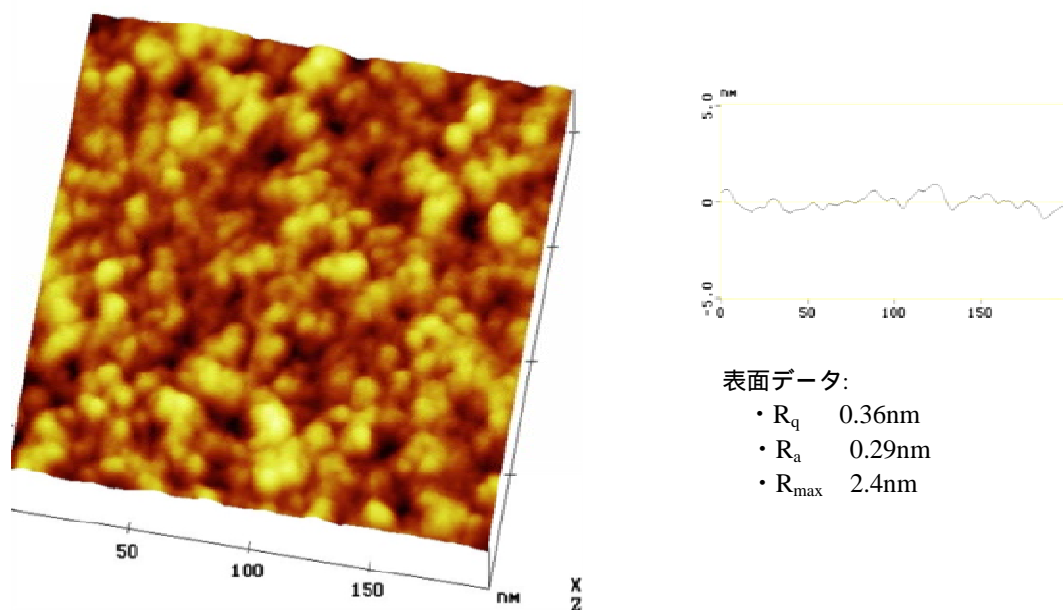


(b) デバイス No.3 : HMDS プラズマ重合膜厚 12nm での AFM 像と断面プロファイル

図 3-2-2 HMDS プラズマ重合膜へ GOD を埋め込み固定したデバイスの AFM 観察



(a) デバイス No.4 : アセトニトリルプラズマ重合膜厚 4nm の AFM 像と断面プロファイル



(b) デバイス No.5 : アセトニトリルプラズマ重合膜厚 12nm の AFM 像と断面プロファイル

図 3-2-3 アセトニトリルプラズマ重合膜へ GOD を埋め込み固定したデバイスの AFM 観察

3-4-2 検証 2 : GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサ特性の検証

グルコースバイオセンサ特性と GOD のプラズマ重合膜への固定化状態との関係について調査した。プラズマ重合膜への GOD の埋め込み条件は表 3-2 に示すとおりである。

図 3-3 は作製したセンサを作用電極とした 3 電極方式のサイクリックボルタモグラムを示している。

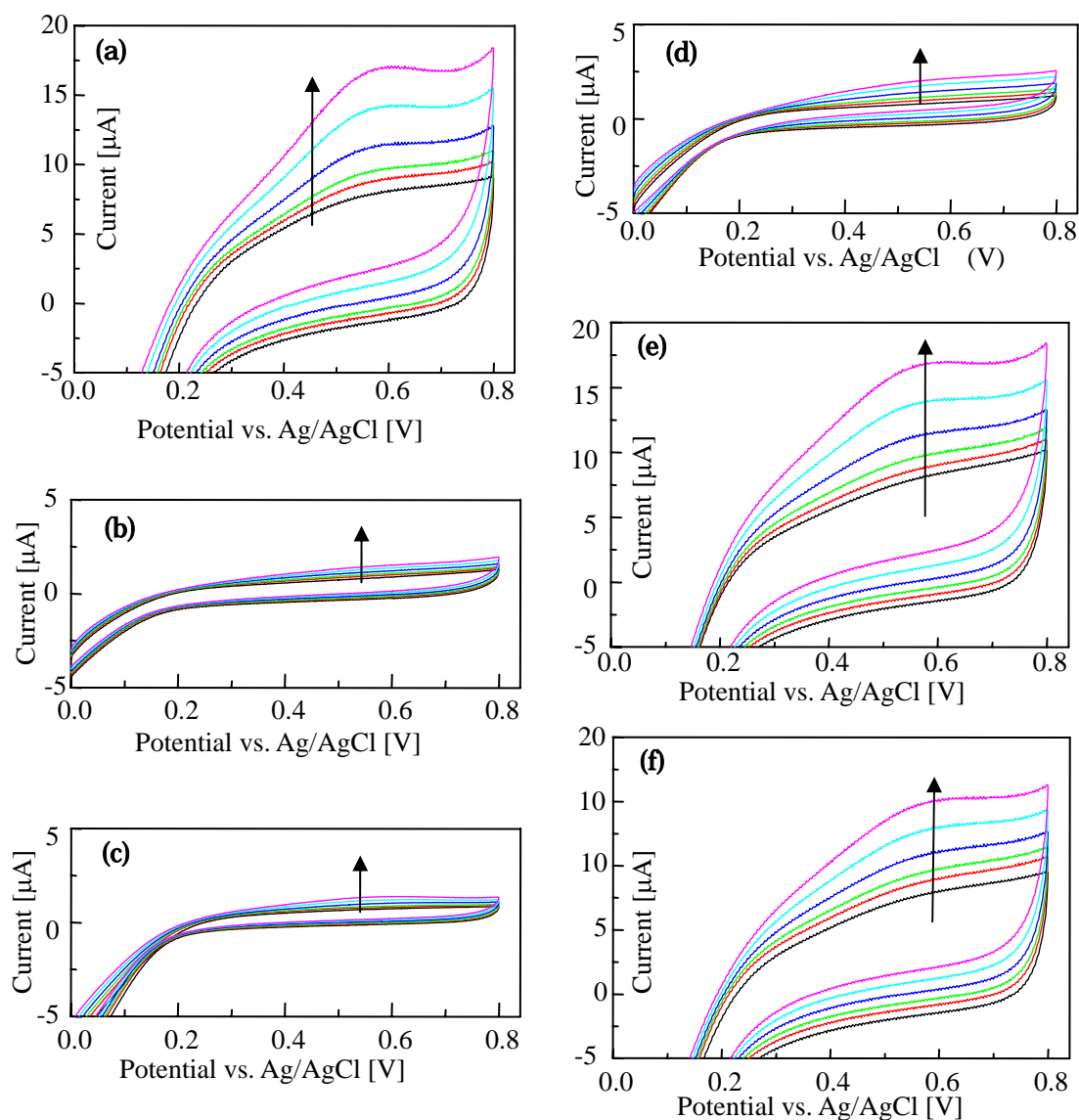


図 3-3 グルコース応答のサイクリックボルタモグラム。各図と表 3-2 との関係：(a)No.1、(b)No.2、(c)No.3、(d)No.4、(e)No.5、(f)No.6。測定溶液：リン酸緩衝溶液 (pH7.4、20mM)。Sweep rate : 50mV/s。グルコース濃度変化：矢印の方向に 0、4.9、9.6、18.5、34.5、54.7mM。

グルコース濃度が 0、4.9、9.6、18.5、34.5、54.7mM となるようにグルコースを追加していき、それぞれの濃度での電流値を測定した。この図では、グルコース濃度が高くなるほど、+0.6V の電圧値で大きな酸化電流が検出されている。このことより GOD 上にプラズマ重合膜を形成しても、重合時のプラズマ状態によるダメージの無いことがわかる。

更にサイクリックボルタメトリーの酸化電位+0.6V で得られた酸化電流値からグルコース応答に対する電流検量線を図 3-4 に示す。この図より、モノマーの違いによって、酸化電流値に大きな違いの生じていることが見てとれる。アセトニトリルプラズマ重合膜は親水性であるのに対

し、HMDS プラズマ重合膜は疎水性である。このため、アセトニトリルプラズマ重合膜に比べ HMDS プラズマ重合膜では、グルコースの拡散性が阻害されたと考える。

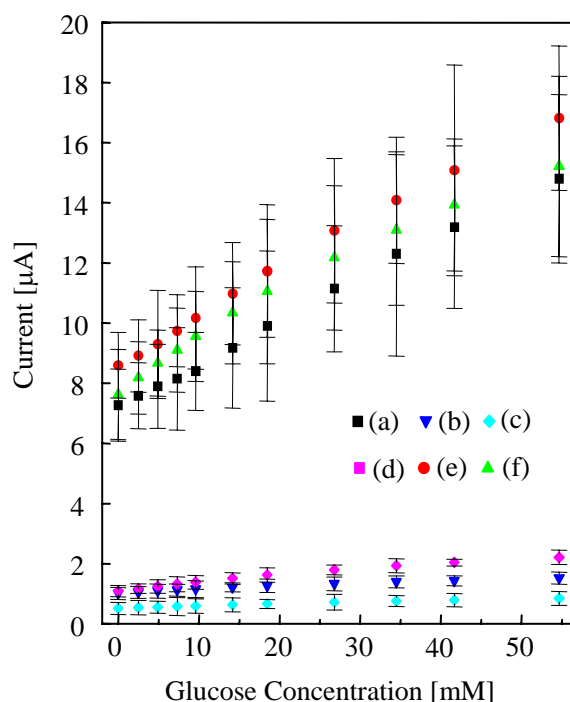


図 3-4 サイクリックボルタンメトリーの酸化電位+0.6V に基づくグルコース応答に対する電流検量線。グルコース濃度：0、2.5、4.9、7.3、9.6、14.2、18.5、26.8、34.5、41.7、54.7mM。各検量線と表 3-2 との関係： モノマー/放電電力[W]/圧力[Pa]/膜厚[nm]、(a) HMDS/-/-/0、(b) HMDS/200/0.6/4、(c) HMDS/200/0.6/12、(d) HMDS/100/0.6/11、(e) AN/200/1.0/4、(f) AN/200/1.0/12。測定溶液：リン酸緩衝溶液 (pH7.4、20mM)。

GOD を埋め込み固定したグルコースバイオセンサの耐久性に関して、サイクリックボルタンメトリーの繰り返し測定と、温度ストレス評価を行った。サイクリックボルタンメトリーの繰り返し測定を行った結果、30 回以上繰り返しても、センサ応答はおおむね維持されていた。また温度ストレス評価では、センサに 1 時間 60 度の温度ストレスを加えても、センサ応答が観測されなくなることは無く、おおむねセンサ応答が維持される結果となった。これより、GOD のプラズマ重合膜への埋め込み固定化法は、GOD の安定性と酵素活性を維持でき、かつ、膜に GOD が固定された状態 (膜から GOD が離脱しない状態) を維持できた考える。金電極上に GOD を吸着固定させた際の耐久性はあまりよくないとの報告があるが[10]、上記の結果を得られたプラズマ重合膜を用いた埋め込み固定は、固定化法としての一案になると考える。

図 3-5 は作製したセンサを作用電極とした 3 電極方式のアンプロメトリーによる時間応答を示している。印加電圧はサイクリックボルタンメトリーで得られた酸化電圧 +0.6V を設定し、グルコース濃度が 0、2.5、4.9、7.3、9.6、14.2、18.5、26.8mM となるようにグルコースを追加していき、時間 - 応答電流値の関係を測定した。この図から、グルコース濃度の増加に伴う電流増加が見られる。埋め込み膜厚が 4nm の場合よりも 12nm のほうが、大きなノイズが観測され、センサ

特性(S/N 比)が悪くなっている。この要因として、GOD をプラズマ重合膜で完全に埋め込むことで、プラズマ重合膜内を拡散するグルコースの距離が長くなり、グルコースの拡散が膜に阻害されることが考えられる。このように、GOD を埋め込み固定する際には、最適な埋め込み膜厚のあることが示された。また、同等の膜厚である HMDS プラズマ重合膜を埋め込み膜に用いても、成膜の際の放電電力を変えることにより、センサ特性が異なった(図 3-5(c)と(d))。放電電力 200W に比べて 100W で成膜した場合のほうが、大きな電流値を得られている。これは放電電圧によって架橋度合いが異なり、100W のほうが緩い架橋度合いになっているため、グルコースの拡散が容易であったと考えられる。応答時間は 10 秒以下であった。これは GOD と電極との距離が近傍に固定されているためと判断する。

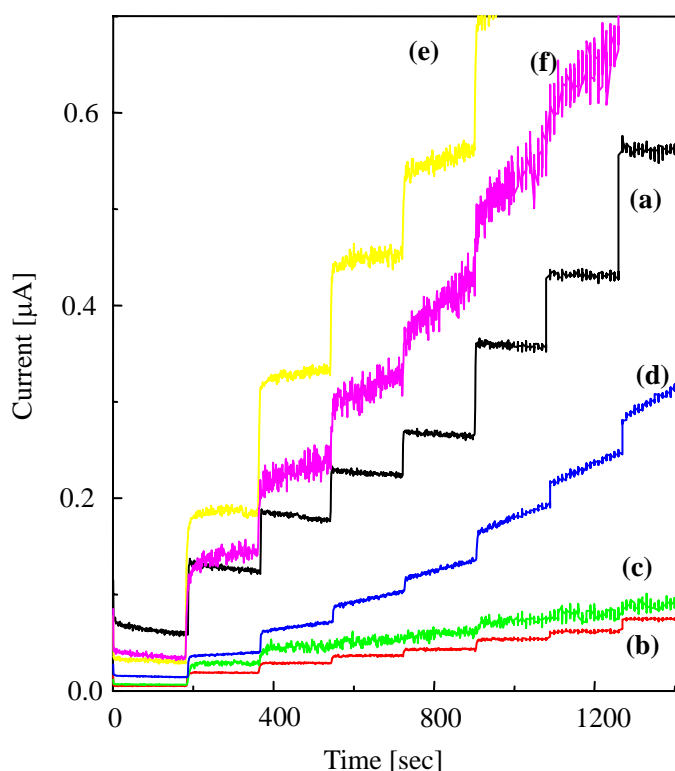


図 3-5 グルコース測定の定電位時間電流測定。各波形と表 3 - 2 との関係：モノマー/放電電力[W]/圧力[Pa]/膜厚[nm]、(a)HMDS/-/-/0、(b) HMDS/200/0.6/4、(c) HMDS/200/0.6/12、(d) HMDS/100/0.6/11、(e) AN/200/1.0/4、(f) AN/200/1.0/12。測定溶液：リン酸緩衝溶液 (pH7.4、20mM)。印加電圧：+0.6V vs. Ag/AgCl。グルコース濃度変化：0、2.5、4.9、7.3、9.6、14.2、18.5、26.8mM となるよう一定時間ごとにグルコースが追加される。

3-5 まとめ

本章では、GOD をプラズマ重合膜に埋め込むことで固定化を行い、埋め込み状態の観察および埋め込み状態とセンサ特性との関係を調査した。その結果、埋め込み方によって半埋め込みから完全な埋め込みまでできることが観察された。モノマー種の違いによって GOD の埋め込まれか

たの異なることも観察できた。そして、GODをプラズマ状態下にさらして、埋め込み固定化を行っても、酵素活性を維持できることが確認でき、本方法がバイオセンサの酵素固定化法として活用できることを示した。グルコースセンサの特性を見ると、臨床的に意義のある測定範囲(約5mM~20mM)での線形性も確保でき、10秒以下という短時間応答もできていた。また、GODを埋め込むプラズマ重合膜のモノマー種、放電電力、膜厚がパラメータとなって、膜の親水・疎水性、架橋度合い、グルコースの拡散距離に寄与し、センサ特性に影響を与えていた。

第3章の参考文献

- [1] 鈴木周一 編著: 「バイオセンサー」, 講談社サイエンティフィク, 1989.
- [2] 六車仁志 著: 「バイオセンサー入門」, コロナ社, 2003.
- [3] 軽部征夫 編著: 「バイオセンサーのはなし」, 日刊工業新聞社, 2012.
- [4] R. J. Retama, L. E. Cabarcos, D. Mecerreyes, B. Lopez-Ruiz: “Design of an amperometric biosensor using polypyrrole-microgel composites containing glucose oxidase”, *biosensors and bioelectronics*, 20 (2004) 1111.
- [5] H. Muguruma, A. Hiratsuka, I. Karube: “Thin-film glucose biosensor based on plasma-polymerized film: Simple design for mass production”, *analytical chemistry*, 72 (2000) 2671.
- [6] H. Muguruma, I. Karube: “Plasma-polymerized films for biosensors”, *trends in analytical chemistry*, 18 (1999) 62.
- [7] H. Miyachi, A. Hiratsuka, K. Ikebukuro, K. Yano, H. Muguruma, I. Karube: “Application of polymer-embedded proteins to fabrication of DNA array”, *biotechnology and bioengineering*, 69 (2000) 323.
- [8] K. Kojima, A. Hiratsuka, H. Susuki, K. Yano, K. Ikebukuro, I. Karube: “Electrochemical protein chip with arrayed immunosensors with antibodies immobilized in a plasma-polymerized film”, *analytical chemistry*, 75 (2003) 1116.
- [9] H. Miyachi, K. Ikebukuro, K. Yano, H. Aburatani, I. Karube: “Single nucleotide polymorphism typing on DNA array with hydrophobic surface fabricated by plasma-polymerization technique”, *biotechnology and bioengineering*, 20 (2004) 184.
- [10] A. Szucs, G. D. Hitchens, J. O. Bockris: “On the adsorption of glucose oxidase at a gold electrode”, *journal of the electrochemical society*, 136 (1989) 3748.
- [11] H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg: “Crystal structure of glucose oxidase from *aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution”, *journal of molecular biology*, 229 (1993) 153.

第4章

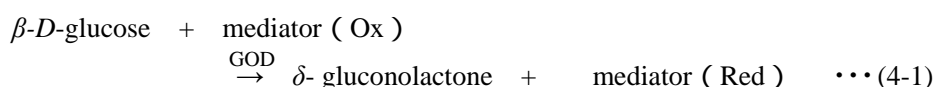
ジメチルアミノメチルフェロセンプラズマ重合膜を用いたメディエータグルコースバイオセンサ

4-1 はじめに

第2章・第3章では、過酸化水素型のグルコースバイオセンサに関する評価を行ってきた。これは、酵素反応によって増加する過酸化水素の量を電極で電流値として検出する原理に基づくものであった[1-2]。過酸化水素型のグルコースバイオセンサの場合、測定値が溶存酸素濃度に依存してしまう。このため、高濃度のグルコース測定が必要となる場合、酵素反応に必要な酸素量が不足すると電流値が飽和して正確なグルコース測定ができなくなる。さらに、酸素の還元と過酸化水素の酸化を行う際には、600~700mVの比較的高い電位が必要であり、他の電極活性物質の影響を受けやすくなる。言い換えれば、酸素や過酸化水素を介さず、酸化電位の低いメディエータを媒介させて酵素反応で生じた電子を電極に伝達できるため、電子伝達の効率がよく高い電流値を得られることが期待でき、また、妨害物質の影響さらに溶存酸素の影響も低減されると期待できる。このような理由から、メディエータ型のグルコースバイオセンサに関する研究も進んでいる[3-5]。第4章では、過酸化水素の代わりに電極とGODとの反応を媒介するメディエータを用いたメディエータ型のグルコースバイオセンサを検討する。

4-2 メディエータ型グルコースバイオセンサ

メディエータを利用した酵素反応は次のようになる。



この反応には酸素が必要ないため、溶存酸素の影響を受けず、高濃度な血糖状態の糖尿病患者に対するグルコース測定も可能となる。また、過酸化水素型グルコースバイオセンサの場合、過酸化水素を検出するためにはアノード電位を+0.6V (Ag/AgCl 参照電極に対して) に設定しなければならないが、メディエータを使用する場合にはメディエータ種を考慮することで、アノード電位を+0.3~0.4V (Ag/AgCl 参照電極に対して) に設定することができる。このような低電位で、グルコース応答の検出を行えば、アスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンのような妨害物質となる他の電極活性物質の電極反応を抑制することができ、グルコース測定の正確性向上も可能と

なる。

一方で、メディエータを利用するバイオセンサには欠点もある。メディエータは低分子であるため水に不溶であっても、使用とともに電極から離脱する。またこの対策として、メディエータを高分子マトリクスに組み込んだレドックス高分子も提案されているが、レドックス高分子はレドックスサイトの効率的な分散や適切な親水性制御を行うことに難しさがある。さらに、高分子膜の薄膜化や均一化も難しく、センサ特性に大きな影響を与えてしまう。

そこで、緻密な架橋構造を有し、薄膜化・均一化も容易なプラズマ重合膜は、これらの欠点解決に効果的な役割を果たすと考え、本章ではプラズマ重合膜にメディエータを組み込んだグルコースバイオセンサを作製・評価する。

4.3 ジメチルアミノメチルフェロセン (DMAMF) プラズマ重合膜

メディエータとして研究・利用される物質は多数あるが、よく用いられるものの一つにフェロセンやフェロセンを含有したビニルフェロセンなどがある[5]。メディエータをモノマーとしてプラズマ重合膜を成膜する場合、固体であるフェロセン単体をモノマーにしてプラズマ重合処理することはむずかしく、またビニルフェロセンをモノマーにするとプラズマ重合は可能であるが膜の疎水性が強く、水溶液中での強固な固定に難点がある。よって、これらの物質はバイオセンサへの利用には最適な物質ではないと考える。

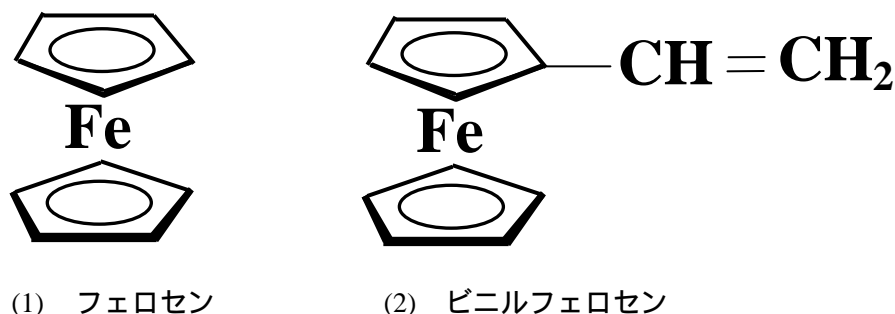


図 4-1 フェロセンおよびビニルフェロセンの化学構造式

本研究ではジメチルアミノメチルフェロセン(DMAMF: Dimethylaminomethylferrocene)をモノマー物質に選定し、プラズマ状態で重合化した DMAMF プラズマ重合膜をグルコースバイオセンサの構成部材として利用することとする。DMAMF プラズマ重合膜の Electron Spectroscopy for Chemical Analysis (ESCA 分析) によるとプラズマ重合化を行っても 50% ~ 80% の鉄がフェロセン単位で存在している。また赤外スペクトルからもフェロセン単位での存在が確認できる[6]。さらにアミノ基は、脱離や転移が見られたものの 50% 以下の割合で存在している[7]。従って DMAMF プラズマ重合膜は、酵素との親和性を有すると共に、メディエータの機能も実現できる可能性があると考えた。DMAMF の化学構造式を図 4-2 に示す。また作製するバイオセンサには安定性のよい GOD を用いる。DMAMF の酵素反応は式 4-3、式 4-4、式 4-5 に従うと仮定する。

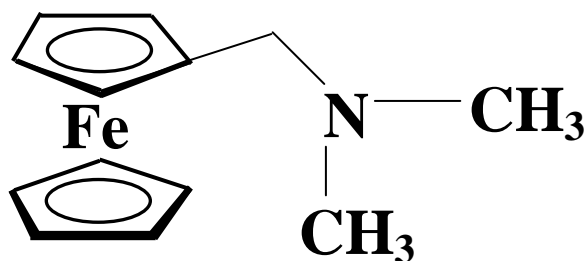
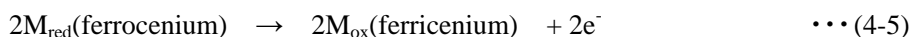
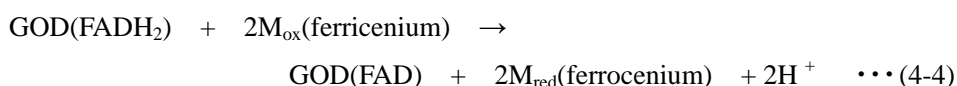


図 4-2 ジメチルアミノメチルフェロセン(DMAMF)の化学構造式



4-4 検証項目

4-4-1 検証1: DMAMF プラズマ重合膜表面に GOD を共有結合固定させたバイオセンサの評価

メディエータの役割を担う DMAMF プラズマ重合膜自体の電子伝達性に着目して評価するため、GOD はプラズマ重合膜には埋め込まず、従来のウェットプロセスによる架橋試薬(グルタルアルデヒド)を使った共有結合で GOD を DMAMF プラズマ重合膜に固定化する。

4-4-1-1: メディエータプラズマ重合膜でのグルコース応答に関するメディエータ機能評価

メディエータとなる DMAMF モノマーをプラズマ重合し、DMAMF プラズマ重合膜のフェロセン部を介した GOD と電極との電子伝達性、およびグルコースバイオセンサのセンサ特性をサイクリックボルタンメトリー、およびその結果から求めるグルコース濃度—酸化電流値の検量線より評価する。

4-4-1-2: メディエータプラズマ重合膜による溶存酸素の影響低減評価

過酸化水素型、酸素型グルコースバイオセンサでは、GOD - 電極間の電子伝達が酸素・過酸化水素にゆだねられていた。ここでは、メディエータ型グルコースバイオセンサとして DMAMF プラズマ重合膜を用いることで、グルコース応答による GOD - 電極間の電子伝達が、フェロセンメディエータにゆだねられることを評価する。評価方法として、+350mV v.s. Ag/AgCl 設定での定電位時間電流測定を実施し、通常の大気圧溶液下での測定結果と、窒素ガスパージにより溶存酸素が除去された溶液下での測定結果を比較することで行う。

4-4-2 検証 2： DMAMF プラズマ重合膜に GOD を埋め込み固定させたバイオセンサの評価

ドライプロセスでのデバイス一括製造に近づけるべく、GOD を DMAMF プラズマ重合膜に埋め込み固定させた電極デバイスを作製評価する。埋め込み固定することで、GOD - フェロセン間距離を近づけ、グルコース応答による酸化電流値の増加も試みる。

4-4-2-1： AFM によるメディエータプラズマ重合膜への GOD 埋め込み状態観察

GOD の上から DMAMF モノマーをプラズマ状態で成膜し、GOD を埋め込んだ DMAMF プラズマ重合膜の表面を AFM で観測して、GOD が埋め込まれたことを視覚的に確認評価する。

4-4-2-2： DMAMF プラズマ重合膜への GOD 埋め込みグルコースセンサの特性評価 (サイクリックボルタンメトリー)

GOD を埋め込み固定した DMAMF プラズマ重合膜とグルコースバイオセンサ特性との関係を、サイクリックボルタンメトリーおよびその結果から求めるグルコース濃度—酸化電流値の検量線より確認評価する。

4-4-2-3: DMAMF プラズマ重合膜への GOD 埋め込みグルコースセンサの特性評価 (定電位時間電流測定)

妨害物質 (アスコルビン酸) が与える、GOD が埋め込み固定された DMAMF プラズマ重合膜を用いたグルコースバイオセンサへの影響を、定電位時間電流測定で評価する。

4-5 電極デバイスの作製および評価・測定方法

本章では、大きく分けて次の 2 種類の検証評価を行う。

検証 1 DMAMF プラズマ重合膜に GOD を共有結合固定させたグルコースバイオセンサデバイスの評価

検証 2 DMAMF プラズマ重合膜に GOD を埋め込み固定させたグルコースバイオセンサデバイスの評価

上記の 2 種類で電極デバイスの作製方法および測定方法に差異があるため、それぞれを記載する。

4-5-1-1： 検証 1 で用いる電極デバイスの作製の流れ

電極デバイスの作製の流れと、作製する電極デバイスの構造概念図を図 4-3 に示す。

- (1) 基板となるマイクロライドガラスを混合溶液 (蒸留水、アンモニア水、過酸化水素水) で 70、10 分程度ボイリングした後、ガラスを取り出して、蒸留水でリンスし、アルゴンガスで水垢を除去する。
- (2) 洗浄後のガラス基板をスパッタ用チャンバーに入れ、密着層としてクロムを 40nm にスパッタリングで成膜する。
- (3) その後クロム上部に電極層として、金を 200nm にスパッタリングして成膜する。

- (4) ガラスカッターでガラス基板を適当な大きさに切り出し、カプトンテープで不要な金を覆うことにより絶縁し、センサ面積 ($0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$) の調整を行う。
- (5) ガラス基板をプラズマ重合用のチャンバーに入れ、金電極上部に、GOD を共有結合させるための基盤となる DMAMF プラズマ重合膜を成膜する。RF13.56MHz、外部電源方式、誘電結合方式のプラズマ重合装置を使用する。DMAMF の重合条件は、電力：50W、圧力：5.0Pa、放電時間：1min (膜厚：約 20nm) とする。
- (6) プラズマ重合用のチャンバーからガラス基板を取り出し、DMAMF プラズマ重合膜と GOD を共有結合させるため、DMAMF プラズマ重合膜上に 2.5% グルタルアルデヒド溶液を滴下し、その後に、余剰のグルタルアルデヒドを蒸留水で洗い流す。
- (7) 最後に、DMAMF プラズマ重合膜上に、酵素溶液 (GOD) を滴下し、自然乾燥させ、その約 10 分後に非吸着の GOD を蒸留水で洗い流す。
- (8) 電極デバイス作成後は、冷蔵庫 (4) にて使用まで冷蔵保管し、使用時にはリン酸緩衝溶液にて洗浄して使用する。

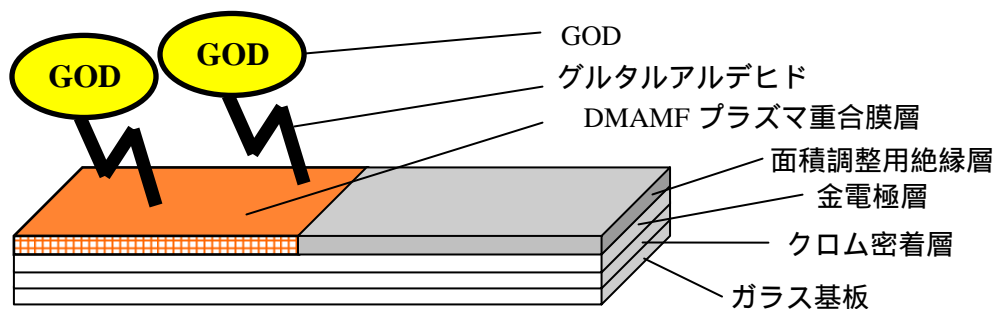


図 4-3 検証 1 に用いる電極デバイスの構造概念図

4-5-1-2: 検証 1 で用いる評価・測定方法

本研究では、測定方法にリン酸緩衝液 (pH7.4) を用いた 3 電極方式による電気化学測定を用いる。Ag/AgCl を参照電極、Pt を対極とし、作製した電極デバイスは作用電極とする。測定系に関しては、第 2 章の 2-4-3(1)と同じとする。測定種類は次の 2 種類である。

- (1) サイクリックボルタンメトリー：
グルコース溶液を所定量追加していき、各濃度での電圧—電流特性を評価する。
- (2) 定電位時間電流測定：
所定の電位を設定し、測定開始から所定時間ごとに、グルコース溶液を所定量ずつ滴下していき、各濃度での時間—電流特性を評価して、電極の感度やセンサの検出濃度範囲・応答性を確認する。

4-5-2-1: 検証 2 で用いる電極デバイスの作製の流れ

電極デバイスの作製の流れと、作製する電極デバイスの構造概念図を図 4-4 に示す。

- (1) 基板となるマイクロスライドガラスを混合溶液 (蒸留水、アンモニア水、過酸化水素水) で 70 、10 分程度ボイリングした後、ガラスを取り出して、蒸留水でリンスし、アルゴン

ガスで水垢を除去する。

- (2) 洗浄後のガラス基板をスパッタ用チャンバーに入れ、密着層としてクロムを 40nm にスパッタリングで成膜する。
- (3) その後クロム上部に電極層として、金を 200nm にスパッタリングして成膜する。
- (4) ガラス基板をプラズマ重合用のチャンバーに入れ替え、金電極上に GOD が 2 次元均一的に物理吸着できるように、金電極上に第一層となる HMDS プラズマ重合膜を成膜する。RF13.56MHz、外部電源方式、誘電結合方式のプラズマ重合装置を使用する。第一層 HMDS プラズマ重合膜の重合条件は、電力：100W、圧力：0.6Pa、放電時間：28sec（膜厚：約 2nm）とする。（なお、AFM 像観察に用いるデバイスでは、HMDS をモノマーとして重合条件、電力：200W、圧力：0.6Pa、成膜速度：22.2±2.8nm/min、放電時間：60sec（膜厚：約 20nm）で、シリコン基板の上に直接成膜する。）その後、GOD と HMDS プラズマ重合膜の親和性を高めるため、窒素プラズマ処理を行い膜表面へのアミノ基の導入を行う。窒素プラズマ処理条件は、電力：100W、圧力：3Pa、放電時間：20sec とする。
- (5) 作製途中のデバイスをプラズマ重合用のチャンバーから一度取り出し、ガラスカッターでガラス基板を適当な大きさに切り出し、カプトンテープで不要な金を覆うことにより絶縁し、センサ面積（0.5×0.5cm²）の調整を行う。
- (6) 第一層プラズマ重合膜上に GOD を物理吸着させるため、重合膜上に酵素溶液（GOD）を滴下し、約 1 時間の自然乾燥させた後、非吸着の酵素を蒸留水で洗い流す。
- (7) GOD を埋め込み固定するための、そしてメディエータ機能を持たせるための、第二層となる DMAMF プラズマ重合膜を GOD 上に成膜する。RF13.56MHz、外部電源方式、誘電結合方式のプラズマ重合装置を使用する。DMAMF の重合条件は、電力：50W、圧力：20Pa、放電時間：1min（膜厚：約 20nm）とする。
- (8) 電極デバイス作成後は、冷蔵庫（4 ）にて使用まで冷蔵保管し、使用時にはリン酸緩衝溶液にて洗浄して使用する。

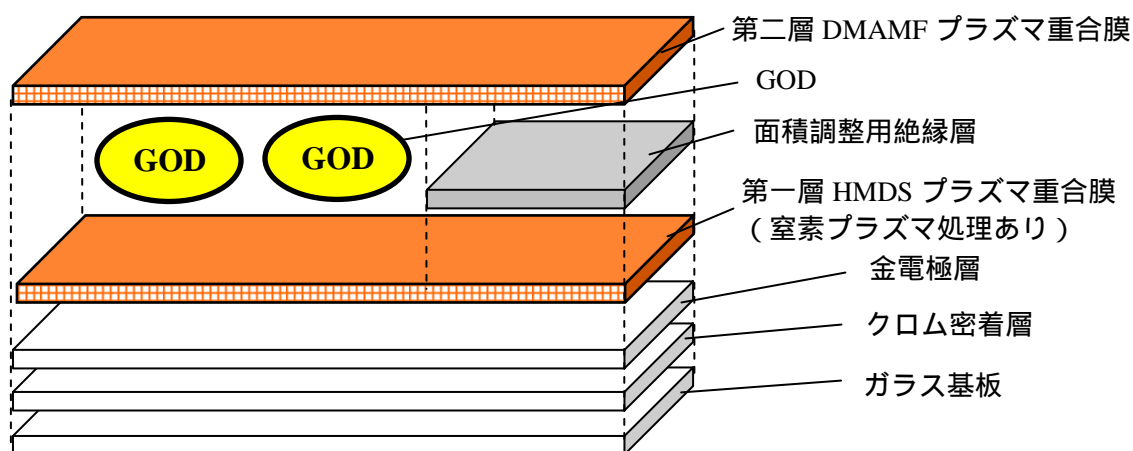


図 4-4 検証 2 に用いる電極デバイスの構造概念図

4-5-2-2: 検証2で用いる評価・測定方法

本研究では、AFMを用いて、GODがDMAMFプラズマ重合膜に埋め込まれた状態の観察を行う。また、測定方法にリン酸緩衝液(pH7.4)を用いた3電極方式による電気化学測定を用いる。Ag/AgClを参照電極、Ptを対極とし、作製した電極デバイスは作用電極とする。測定系に関しては、第2章の2-4-3(1)と同じとする。測定種類はサイクリックボルタンメトリーと定電位時間電流測定の種類である。

(1) AFM観察:

第一層プラズマ重合膜の表面やGODが物理吸着した表面状態、そしてGODをDMAMFプラズマ重合膜に埋め込んだ複合体の表面状態を、AFM画像およびその断片プロファイルで観測する。AFM観察は、大気中測定にてタッピングモードで行い、走査速度は0.6Hzに設定する。

(2) サイクリックボルタンメトリー:

電極デバイスのクリーニングのためにサイクリックボルタンメトリーを行う。また、グルコース溶液を所定量追加してサイクリックボルタンメトリーを行い、各濃度での電圧—電流特性を評価する。

(3) 定電位時間電流測定法:

所定の電位(+300mV)を設定し、測定開始から所定時間ごとに、グルコース溶液や他の電極活性物質(妨害物質)を所定量ずつ滴下していき、各濃度での時間—電流特性を評価して、電極の感度やセンサの検出濃度範囲・応答性を確認する。

4-6 結果・考察

4-6-1 検証1: DMAMFプラズマ重合膜表面にGODを共有結合固定させたバイオセンサの評価

作製した電極デバイスを用いて、異なるグルコース濃度溶液中で行ったサイクリックボルタンメトリーの結果を図4-5に示す。グルコースが無い場合と比較してグルコースがある場合、+350mV付近で酸化電流の増加していることが確認できる。この電流増加より、DMAMFプラズマ重合膜にGODを固定化され、グルコースとGODが酵素反応していると判断できる。また酸化電位が+600mVよりも低い+350mVで確認できることから、酵素反応により生じる電子伝達がメディエータを介して電極反応に達していると判断できる。この結果から、DMAMFプラズマ重合膜は、フェロセンレドックスをメディエータとするグルコースバイオセンサに利用できることが確認できた。

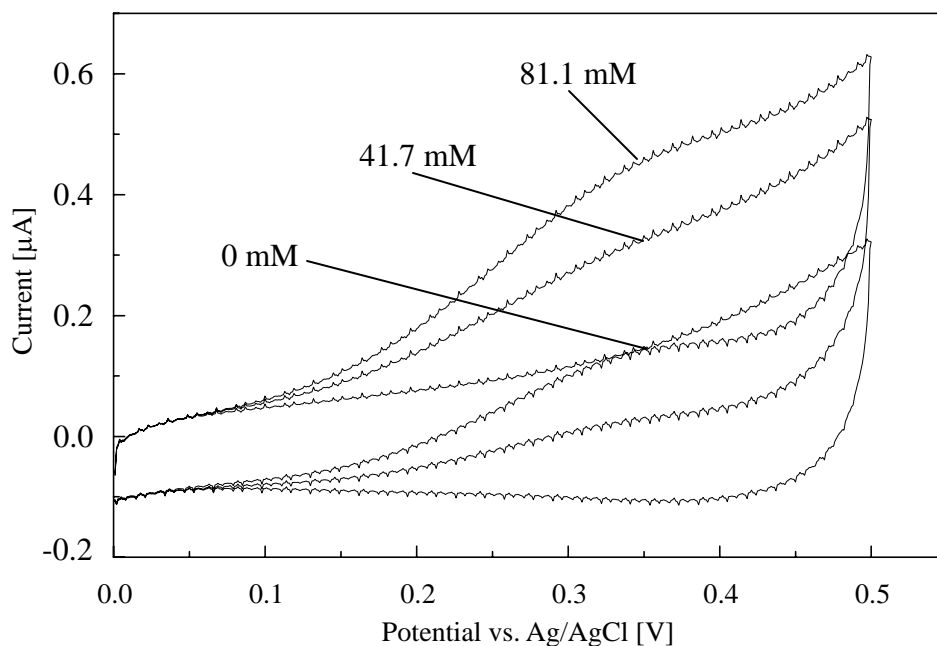


図4-5 DMAMF プラズマ重合膜に GOD が共有結合で固定されたグルコースバイオセンサのサイクリックボルタモグラム。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4)、グルコース濃度：0、41.7、81.1mM。掃引速度：5mV/sec。

図 4-6 には、20mM リン酸緩衝溶液中で行ったサイクリックボルタメトリーから抽出した、グルコース濃度の増加に伴う酸化電流の検量線を示す。この結果、1.3mM から 81mM までの非常に広範囲なダイナミックレンジを有しており、グルコース測定の臨床要求をカバーする結果であった。

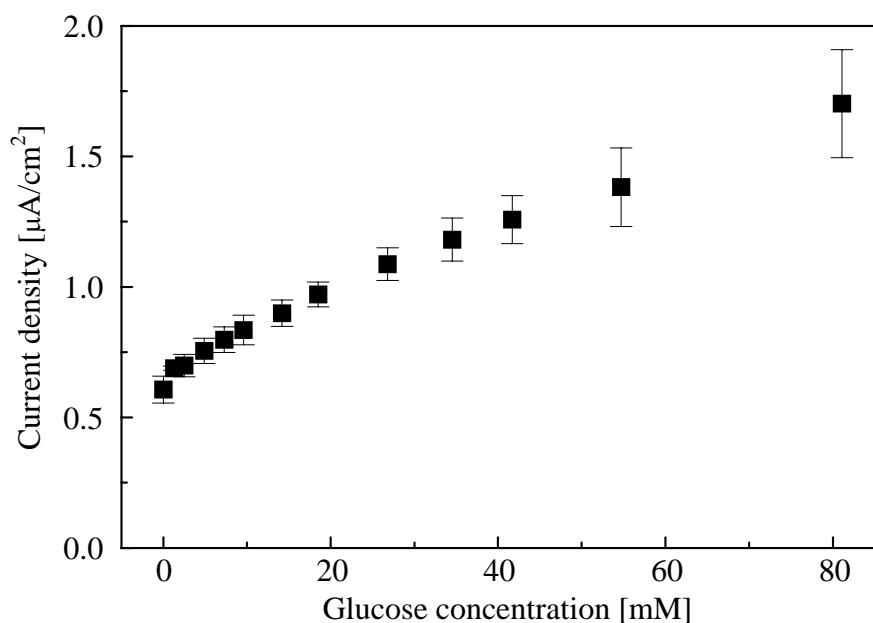


図 4-6 DMAMF プラズマ重合膜上に GOD が共有結合で固定されたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対する検量線。サイクリックボルタモグラムでの酸化電位 + 350mV vs. Ag/AgCl における酸化電流より算出。

図 4-7 は、Ag/AgCl 参照電極を用いて+350mV の定電位時間電流測定を行った時間応答の波形を示す。この測定では、一定時間ごとにグルコースを滴下してグルコース濃度を増加させている。また、溶存酸素の影響を確認するため、溶存酸素の有無それぞれの環境で測定を行っている。この図からグルコースの増加に伴って、ステップ状に酸化電流の増加が観測された。そしてグルコースの増加に伴い酸化電流が上昇する際、電流変化が安定（変化量の95%に到達）するまでの応答時間は10秒以下と非常に短時間であった。この要因としては、GOD を膜表面に固定したDMAMF プラズマ重合膜が非常に薄いため、GOD の活性中心と電極の距離が近く、酵素反応がフェロセンを介して迅速に電極反応に結びつくものと考えられる。また、DMAMF プラズマ重合膜はアミノ基を有していることから膜表面と GOD との親和性・吸着状態が良く吸着量も多く、酵素反応自体が効率的に行われると考えられる。これも短時間応答の要因の一つと思われる。

更に、2.5mM ~ 10mM のグルコース濃度に着目してみると、溶存酸素無し（アルゴンパージ）と有りの環境下で、酸化電流値の差は小さく、その差は5%程度であった。これは、酵素反応に与える酸素の影響は少なく、フェロセンレドックスがメディエータの役割を果たしている裏づけとなる。また、若干の電流値差が発生した要因としては、フェロセンと酸素との競争反応が生じたためと考える。

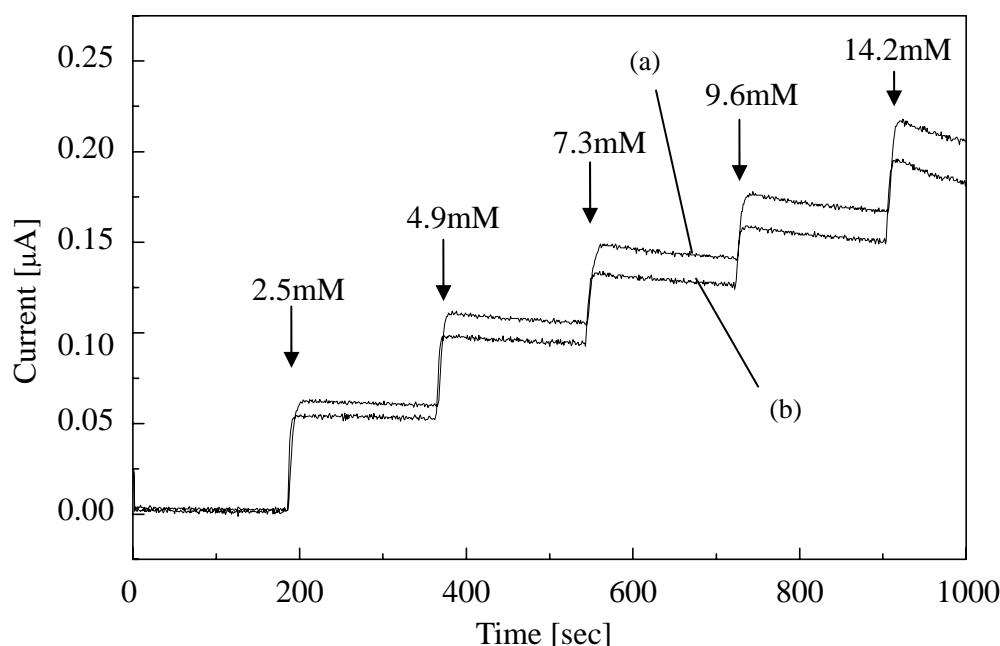


図 4-7 DMAMF プラズマ重合膜上に GOD が共有結合で固定されたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対する時間応答。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液（pH7.4）。(a):測定溶液は大気圧状態。(b): 測定溶液は無酸素状態（窒素置換状態）。

以上より、DMAMF プラズマ重合膜に GOD を共有結合させた電極デバイスはグルコースバイオセンサとしての機能を果たすこと、つまりグルコース濃度を測定することが可能であると確認できた。DMAMF プラズマ重合膜を用いることにより+350mV の低電位でグルコースに起因した酸化電流を得ることができ、フェロセンレドックスがメディエータとして機能していた。+350mV

の定電位時間電流測定ではグルコース増加に伴うステップ状の電流増加が生じ、10 秒以下の短時間応答が得られた。さらに、溶存酸素の影響を低減する効果も得ることができた。

4-6-2 検証 2： DMAMF プラズマ重合膜に GOD を埋め込み固定させたバイオセンサの評価

4-6-2-1： AFM による埋め込み状態の観察

DMAMF プラズマ重合膜への GOD 埋め込み状態を AFM で観察した。図 4-8(a)は HMDS プラズマ重合膜の表面に窒素プラズマ処理した後、GOD を物理吸着させた状態の膜表面を AFM 観察している。図 4-8(b)および(c)は、図 4-8(a)の GOD が物理吸着した状態から更に、DMAMF プラズマ重合膜を成膜させて GOD を埋め込み状態にした膜表面を AFM 観察したものである。(b)は埋め込み膜厚が 10nm であり、吸着した GOD の大半が DMAMF プラズマ重合膜に埋め込まれる条件、そして(c)は埋め込み膜厚が 20nm であり、吸着した GOD が余裕を持った状態で完全に埋め込まれる条件である。

HMDS プラズマ重合膜自体は、ピンホールや欠損が少なく、シリコンやマイカの表面と類似の平坦な荒さであるが、図 4-8(a)では、明確な球状・楕円状物質の点在が確認できる。これは第 2 章でも述べたように GOD に相当すると考えられる。10nm の DMAMF プラズマ重合膜の埋め込み固定化を行った図 4-8(b)では、図 4-8(a)と似たような荒さ・段差を示しており、GOD の完全な埋め込みはできていないと判断できる。これに対し図 4-8(c)では、荒さ・段差が小さくなっており GOD が完全に DMAMF プラズマ重合膜の下部に埋め込まれていると考えられる。GOD が完全に膜内に埋め込まれることで、DMAMF プラズマ重合膜に含まれるフェロセンレドックスと GOD の活性中心との距離が近づき、酵素反応により生じる電子伝達に好影響を与えると思われる。

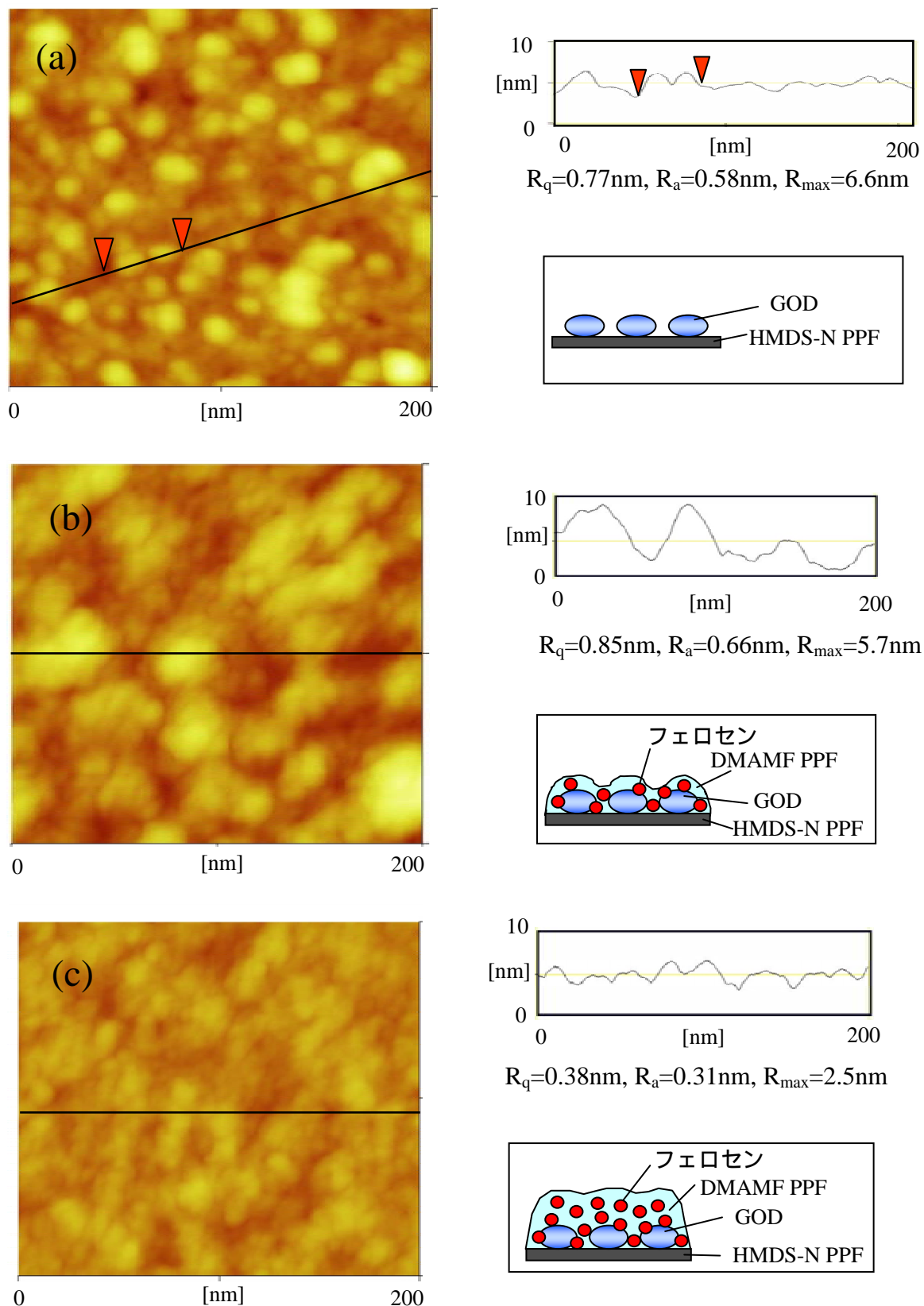


図 4-8 GOD が埋め込まれた DMAMF プラズマ重合膜表面の AFM 像と断面プロファイル及び断面構造模式図。(a):埋め込み DMAMF プラズマ重合膜(PPF)=0nm。(b):埋め込み DMAMF プラズマ重合膜(PPF)=10nm。(c):埋め込み DMAMF プラズマ重合膜(PPF)=20nm。

4-6-2-2 : GOD を DMAMF プラズマ重合膜に埋め込み固定化させた電極デバイスの特性評価

ここからは、グルコースバイオセンサの特性について評価する。一般的な話として、高分子固定化膜に埋め込まれたレドックスメディエータ分子を安定的に定着させることは大きな課題であり、小さい分子サイズのレドックスメディエータは高分子固定化膜から解離する傾向がある。そしてこの解離に伴い、電子伝達が起こりにくくなり、信号となる電流が減少してしまう。本研究の評価に悪影響となるこの現象を取り除くため、作製した電極デバイスの使用前に、安定したレドックス状態となるまで繰り返しサイクリックボルタンメトリーのスキャンを実施し、安定してプラズマ重合膜化していない余剰の物質を除去した。その際のサイクリックボルタモグラムを図 4-9 に示す。この図からサイクリックボルタンメトリースキャンを繰り返すほど測定電流の減少が見てとれ、安定的にプラズマ重合膜化できていない余剰のフェロセンレドックスが解離されたと考える。

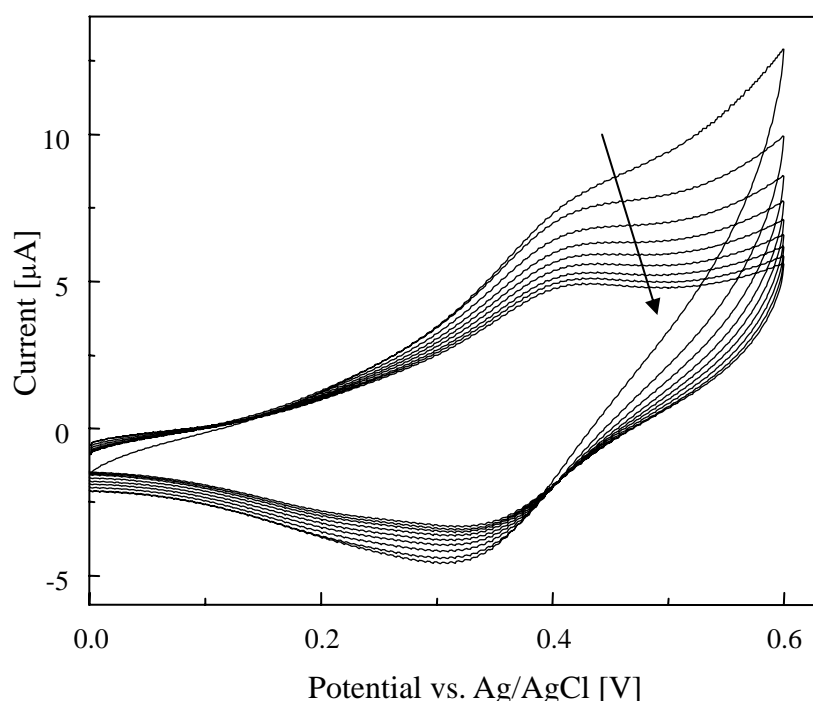


図 4-9 DMAMF プラズマ重合膜に GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサのコンディショニングの為にサイクリックボルタモグラム。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液 (pH7)。グルコース濃度は 0mM。掃引速度：50mV/sec。サイクリックボルタンメトリーの掃引回数が増加するほど、矢印の方向の波形となる。各波形はそれぞれ、1,4,7,10,13,16,19,22,25 回目の掃引した波形となる。

次に、リン酸緩衝溶液にグルコースを滴下した場合と滴下しない場合のそれぞれの状態で、作製した電極デバイスを用いてサイクリックボルタンメトリーを行った。そのサイクリックボルタモグラムを図 4-10 に示す。グルコースが存在しないときに対し、グルコースを滴下した時には電流値が大きく増加した。このことから、埋め込み固定した GOD とグルコースで酵素反応が起こり、電極部での酸化反応に至ったことがわかる。GOD が埋め込み固定される際、GOD

はプラズマ雰囲気曝される。この結果から、GOD はプラズマ状態に曝されたにもかかわらず、酵素活性の維持されることが確認できた。1分程度の緩やかな低温有機プラズマ照射である為、GOD の活性中心近傍の三次元構造にダメージを与えないと考えられる。また測定波形は安定しており、メディエータを含むプラズマ重合膜からレドックスフェロセンが解離することは少ないと思われる。

更に、GOD の DMAMF 表面に共有結合させた電極デバイスを用いた酸化電流 (図 4-5) に対して、GOD を DMAMF プラズマ重合膜内に埋め込み固定した電極デバイスを用いた酸化電流 (図 4-10) では大きな電流値が得られた。これは、フェロセンレドックスサイトと GOD の活性中心が非常に近接したためと考える。

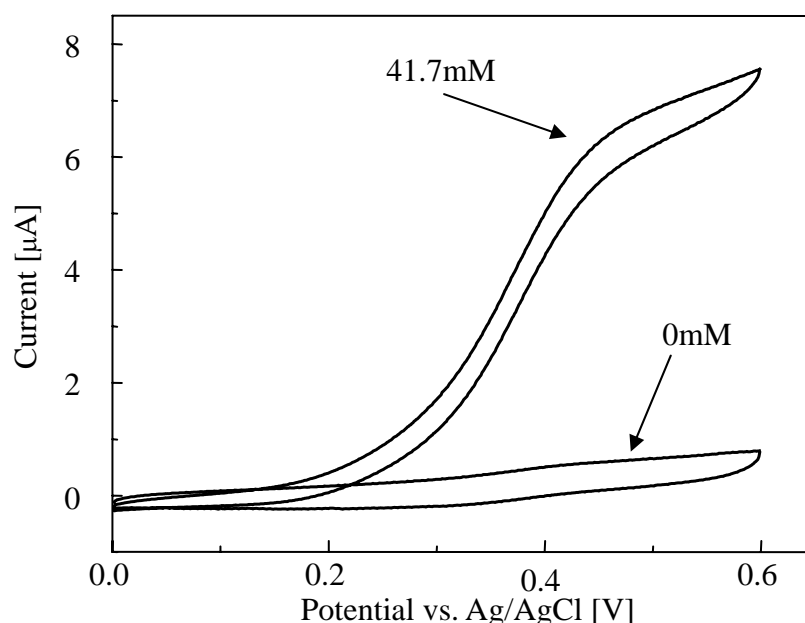


図 4-10 DMAMF プラズマ重合膜に GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサのサイクリックボルタモグラム。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4)、アルゴンガス置換を実施。グルコース濃度：0、41.7mM。掃引速度：5mV/sec。電極面積：0.25cm²。

図 4-11 には、DMAMF プラズマ重合膜の成膜条件を変えた数種類のグルコースバイオセンサ (電極デバイス) を使用して得られたグルコース応答を示す。電極デバイスの成膜条件は、プラズマ放電電力と放電時間 (膜厚) とした。

黒丸印は放電電力を 50W、白丸印は放電電力を 100W とし、膜厚は両者とも同じ 20nm とした。50W の電極デバイスでは良好な酸化電流が得られた。一方で 100W の電極デバイスでは、グルコース濃度に対する電流値の増加が見られず、センサ感度が非常に悪かった。これは、放電電圧が高いことで、DMAMF 内のフェロセンサイトが破壊され、GOD-電極間の電子伝達が抑制されたためと考えられる。

また黒四角印の膜厚は 10nm、黒丸印の膜厚は 20nm、黒三角印の膜厚は 40nm を示し、その放電電力は 50W である。この結果より、20nm の膜厚がグルコースバイオセンサの応答として

最適であるとわかった。これは、膜厚が 40nm のように厚膜の場合には溶液バルクから GOD の活性中心へのグルコース拡散が DMAMF プラズマ重合膜に阻害され、膜厚が 10nm のように薄膜の場合は GOD の活性中心から電極への電子伝達が不十分になるため、グルコースバイオセンサの感度が低下し、20nm の膜厚が効果的であったと考える。

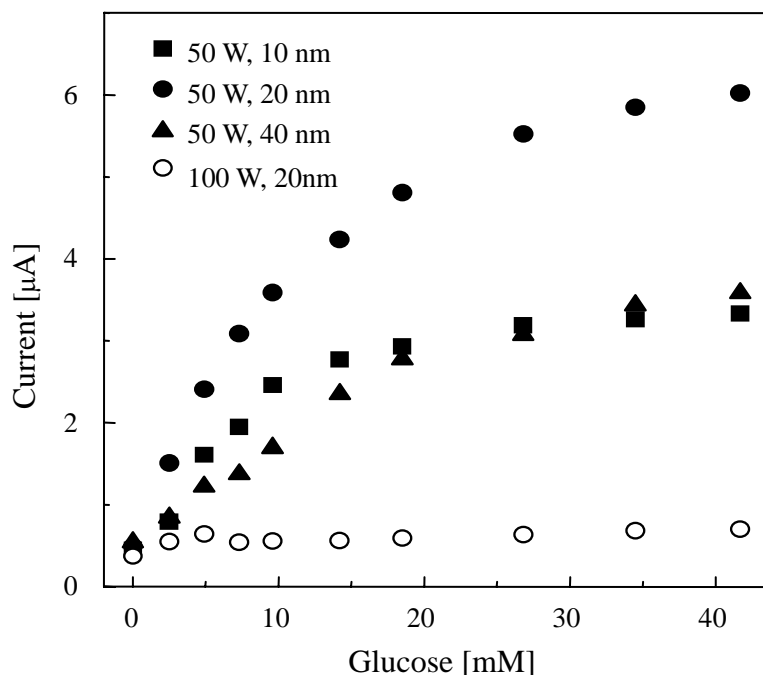


図 4-11 各プラズマ条件で成膜された DMAMF プラズマ重合膜内に GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対する検量線。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4)、サイクリックボルタモグラムでの酸化電位 +450mV vs. Ag/AgCl における酸化電流より算出。成膜条件とセンサ感度は、
 50W,10nm: 感度=0.56 $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$, $r > 0.97$ 、測定範囲：0 ~ 18.5mM、
 50W,20nm: 感度=0.72 $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$, $r > 0.97$ 、測定範囲：0 ~ 26.8mM、
 50W,40nm: 感度=0.40 $\mu\text{Acm}^{-2}\text{mM}^{-1}$, $r > 0.97$ 、測定範囲：0 ~ 26.8mM。

放電電圧 50W、膜厚 20nm の DMAMF プラズマ重合膜で GOD を埋め込み固定した電極デバイスを用いて、グルコース応答に対する時間測定を実施した (図 4-12)。Ag/AgCl 参照電極に対して +300mV の定電位を印加し、アスコルビン酸及びグルコースを所定量滴下して、その際の応答を確認した。

0.5mM のアスコルビン酸に対して電流変化は観測されなかった。これは下記 2 つの原因があると考えられる。一つ目は、DMAMF プラズマ重合膜のサイズ効果によって、アスコルビン酸が電極に拡散することを妨げたためである。そして 2 つ目の理由は、メディエータを利用することで印加電圧が +300mV に設定できるため (メディエータを用いず、過酸化水素型とした場合、印加電圧は +600 ~ 700mV となる)、アスコルビン酸の酸化反応自体が抑えられていることによる。

グルコース溶液を適時滴下していくと、グルコース濃度の増加に呼応して酸化電流値も増加

し、ステップ応答が観測された。従ってここからも、溶液バルクのグルコースが埋め込み固定された GOD と酵素反応し、GOD から電極にフェロセンを介して電子伝達されることが示された。また、このグルコースバイオセンサはグルコースの応答時間が 10 秒以下ときわめて短い。これはプラズマ重合膜によって GOD を電極の近傍に固定化できているため GOD-極距離の距離が非常に近く、電子伝達の時間も短くなるためと考えられる。

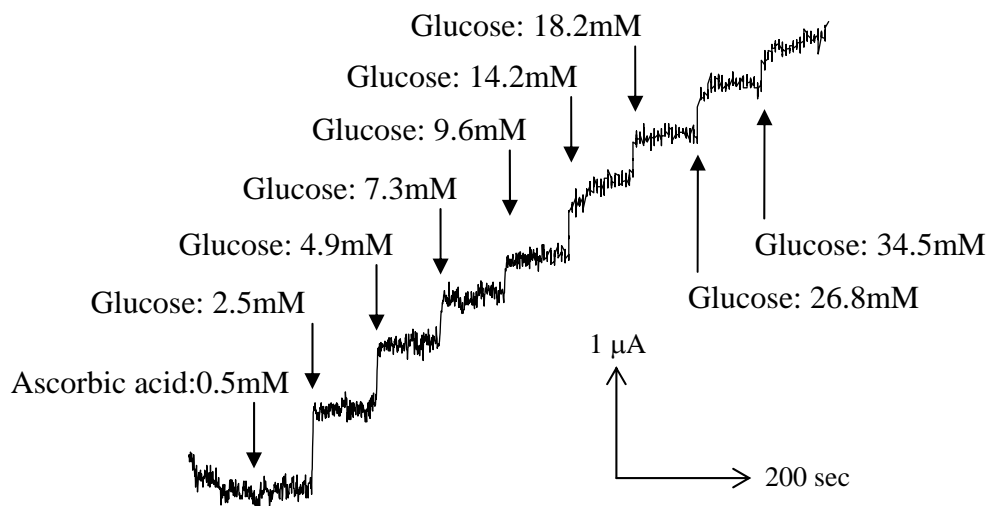
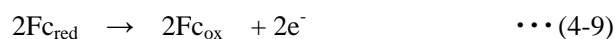
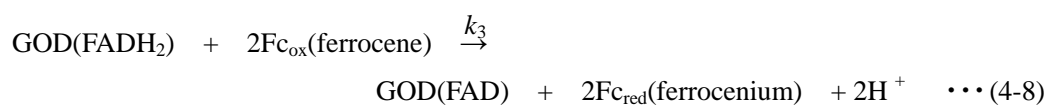
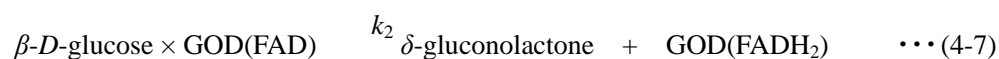
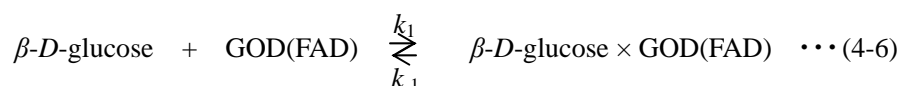


図 4-12 DMAMF プラズマ重合膜内に GOD が埋め込み固定されたグルコースバイオセンサのグルコース応答に対する定電位時間電流測定。DMAMF プラズマ重合膜の成膜条件は、放電電力：50W、膜厚：20nm。測定溶液：20mM リン酸緩衝溶液 (pH7.4) アルゴンガス置換を実施。印加電位：+300mV vs. Ag/AgCl。最初にアスコルビン酸を滴下し、その後グルコースを所定の濃度になるよう追滴下した。

DMAMF プラズマ重合膜で GOD を埋め込み固定したグルコースバイオセンサのセンシングメカニズムについて考察する。グルコースの存在下では、カタリティック電流を i_{cat} として、以下に示す式に従ったメカニズムでグルコースバイオセンサの反応が引き起こされると考える [8]。



$$k_{\text{red}} = k_1 k_2 / (k_1 + k_2) \quad \dots (4-10)$$

$$1/i_{\text{cat}} = (1/2FS\Gamma_E) \cdot \{ (1/k_3[\text{Fc}]) + 1/k_2 + (1/k_{\text{red}}[\text{G}]) \} \quad \dots (4-11)$$

この式において、 F はファラデー定数、 S は電極の表面面積、 Γ_E は DMAMF プラズマ重合膜に埋め込まれた GOD の被覆濃度、 $[\text{Fc}]$ は DMAMF プラズマ重合膜に埋め込まれたフェロセンおよびフェロセニウムの総濃度、 $[\text{G}]$ はグルコース濃度を表す。さらに、次の放電条件(放電電力：50W、膜厚：20nm)で成膜される DMAMF プラズマ重合膜に、GOD を埋め込んで、DMAMF プラズマ重合膜グルコースバイオセンサを作製し、サイクリックボルタンメトリーを行って検量線を求め(図 4-11 を参照)、そしてその検証線から Michaelis-Menten モデル (Lineweaver-Burk プロット) を算出した(図 4-13)。

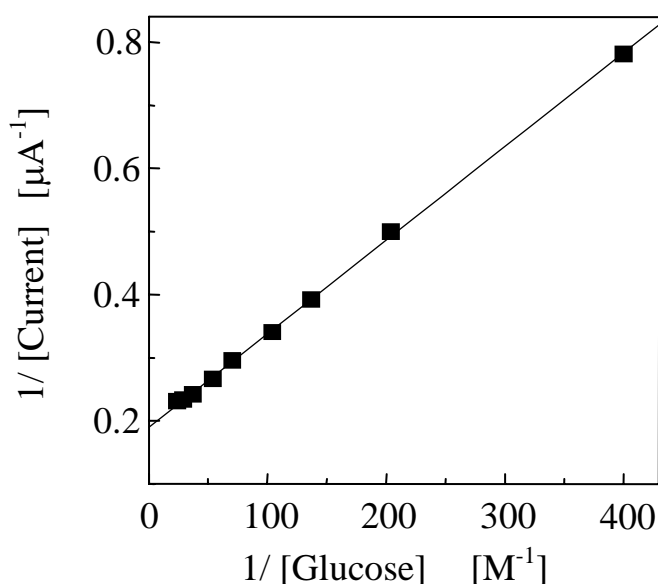


図4-13 DMAMFプラズマ重合膜にGODを埋め込み固定したグルコースバイオセンサの特性によるMichaelis-Menten モデル。

算出したグルコースバイオセンサのDMAMFプラズマ重合膜厚は20nm、放電電圧は50W。

この図を用いると、最大の酵素反応速度(最大電流値)と見かけ上のミカエリス定数はおよそ $5.2\mu\text{A}$ 、 0.026M と求まる。GOD のミカエリス定数に関して多数の報告がなされているが、その定数は数 mM 程度との見解が多く、この場合、本研究で作製したバイオセンサに含まれる GOD の基質に対する親和性は減少する結果となった。しかし、GOD の固定化によって、例えば図 2-18 に示すとおり、測定環境が変化しても酵素量を維持でき、安定性に優れる。また GOD を電極に保持できるため、連続測定や繰り返し測定なども実現でき、測定コストを低減することも考慮すると、使用用途は格段に増える。従って、本センサは GOD が固定化されながらも、見かけ上のミカエリス定数として 0.026M を確保できており、今後の応用に期待が持てるものとする。

Γ_E は、GOD の形状が約 $12.2 \times 8.3 \text{ nm}^2$ の楕円形状であり、GOD が電極表面(厳密には、白金電極に積層された HMDS プラズマ重合膜の表面)に単層に吸着していると考えて計算し、 $1.6 \times 10^{-12} \text{ mol/cm}^2$ と見積もった。またこれに、式(4-6)~(4-11)および図 4-13 を考慮して、 $k_3[\text{Fc}]$ は 160 s^{-1} 、 k_{red} は $8.1 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ と見積もった。この結果、 k_{red} は大きな値を示しており、溶液バルクから GOD へのグルコースの拡散およびこれに従う電子の移動は迅速に行われていたと判断する。これは、GOD を埋め込んだ膜厚が 20nm と薄く、バルクと GOD との距離が 20nm 以下と非常に近いこと、GOD へのグルコースのすばやい供給が可能であるためと考える。一方で、 $k_3[\text{Fc}]$ は小さな値を示しており、GOD からフェロセンへの電子伝達系が律速であると思われる。しかしこの値は、他の複雑な作製方法によって得られた回転速度(ターンオーバー数: 25 で 600 s^{-1}) [9] と桁数は同じであり、大きな差のあるものではない。本研究で取り組んだバイオセンサの作製方法は容易な方法でありながら、効果的な電位伝達を実現できる方法になると期待できる。

本研究では、GOD を埋め込んだ DMAMF プラズマ重合膜と金電極との間に HMDS プラズマ重合膜を成膜している。このため、GOD の活性中心から金電極に電子が伝達される際、HMDS プラズマ重合膜を経由する事になるが、下記のような理由で GOD の活性中心から金電極への電子伝達を実現されたと考える。

伝達ステップ 1: 活性中心から GOD 表面近傍に存在するフェロセンに電子伝達する。

伝達ステップ 2: GOD 表面近傍に存在するフェロセンから、金電極へ直接あるいは、他のフェロセンを経由して金電極に電子伝達する。

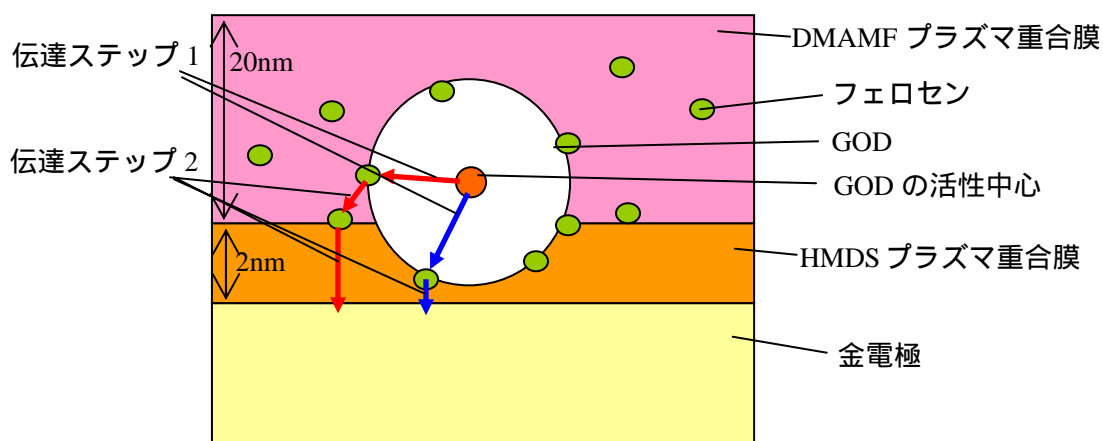


図 4-14 GOD の活性中心から金電極への電子伝達に関する概略考察

伝達ステップ 1 に関しては、活性中心のフラビン - アデニンジヌクレオチド (FAD: flavin-adenine dinucleotide) から DMAMF プラズマ重合膜に含まれるフェロセンへ電子が伝達される。GOD の楕円短軸を 5nm 程度、フェロセンが GOD 表面近傍に存在するとした場合、2nm より短い距離は電子伝達できると考えられる。また、GOD 内での活性中心の位置や溶液中での GOD の柔軟性を考えると、その電子伝達距離はさらに小さくなると思われる。

伝達ステップ 2 に関しては主に 2 つの経路があると考えられる。1 つ目は GOD の活性中心から電子を受け取ったフェロセンが、直接金電極に電子伝達する経路、2 つ目は GOD の活性中心から

電子を受け取ったフェロセンが、他のフェロセンを經由して金電極に電子伝達する経路である。どちらも HMDS プラズマ重合膜を經由して金電極へ電子伝達を行う必要があり、結果としてこれを実現している。この理由として、HMDS プラズマ重合膜に欠損が生じ、HMDS プラズマ重合膜を經由せずにフェロセンから金電極に電子伝達できる状態、あるいは HMDS プラズマ重合膜の膜厚が薄く 2nm 未満の膜厚を通過して電子伝達できる状態になっていることが要因と考えられる。HMDS プラズマ重合膜の成膜条件として膜厚が 2nm となるよう、放電電圧と放電時間を設定した。しかし、2nm の HMDS プラズマ重合膜を均一に成膜することは、成膜時間が短く難しい。第 2 章の過酸化水素の拡散を評価した際も、HMDS プラズマ重合膜の膜厚が 5nm 未満では一部の過酸化水素が拡散できる膜質となっていることが確認できている。従って、HMDS プラズマ重合膜の膜厚が 2nm 以下であり、あるいは電子伝達ができる程度の欠損が生じ、GOD の活性中心から金電極への電子伝達が実現したと考える。

以上より、DMAMF プラズマ重合膜によって GOD の埋め込み固定を行った電極デバイスはグルコースバイオセンサとしての機能を果たすこと、つまりグルコース濃度を測定することが可能であると確認できた。AFM 観測により、DMAMF プラズマ重合膜の膜厚によって GOD の埋め込み状態が変化し、膜厚 20nm では GOD が完全に埋め込まれていた。そしてセンサ特性として、+350mV 以下の低電位で、グルコースの増加に伴う酸化電流の増加が観測された。この結果から、GOD が電極上に固定化でき、グルコースと GOD の酵素反応により生じる電子がメディエータとなるフェロセンを介して電極に電子伝達されたと判断できる。また、グルコースの応答時間も短く、さらに妨害物質であるアスコルビン酸の影響も抑えることができた。

4-7 まとめ

本章では、プラズマ重合膜にメディエータ機能を持たせたメディエータグルコースバイオセンサを作製し、その特性評価を行った。大きく分類して 2 種類の電極デバイスを作製した。1 種類目は架橋試薬を用いて DMAMF プラズマ重合膜に GOD を固定化したグルコースバイオセンサ、2 種類目は GOD を DMAMF プラズマ重合膜へ埋め込み固定したグルコースバイオセンサである。

前者では、グルコースの増加に伴う酸化電流の増加が観測され、その酸化電位は+350mV であった。よって DMAMF プラズマ重合膜のフェロセンがメディエータとして機能することが分かった。また、+350mV の定電位測定では、グルコースの増加に伴うステップ状の電流上昇が観測され、その応答時間は 10 秒以下で非常に短時間であった。さらに溶存酸素の影響も削減できた。

さらに後者では、DMAMF プラズマ重合膜を用いて GOD を埋め込み固定し、その結果でも、グルコースの増加に伴う酸化電流の増加が観測され、その酸化電位は+350mV であった。この方法であれば、架橋試薬を用いる手間を省くことができ、一括ドライプロセスに近づくこととなる。ただし、DMAMF プラズマ重合膜の成膜条件には注意が必要であった。放電電力は 50W が最適であり、フェロセン構造を維持し、かつプラズマ重合構造を維持する必要がある。そして膜厚は 20nm が最適である。中途半端な埋め込みを避け、GOD を完全に膜内に埋め込むことで確実に固定し、GOD の活性中心とフェロセンレドックスの距離を近づけることが重要となる。また、埋め込み過

ぎによってグルコースの拡散が阻害されて GOD への到達が困難になる状態は避ける必要がある。その他、GOD がプラズマ重合雰囲気中に曝されても活性が維持されること、グルコースに対して 10 秒以下という短時間応答が可能なこと、妨害物質であるアスコルビン酸の影響を回避できることも確認できた。

以上より、DMAMF プラズマ重合膜の利用は、グルコースバイオセンサの機能に有益な効果をもたらすと判断できる。

第 4 章の参考文献

- [1] H. Muguruma, A. Hiratsuka, I. Karube: “Thin-film glucose biosensor based on plasma-polymerized film: Simple design for mass production”, *analytical chemistry*, 72 (2000) 2671.
- [2] H. Muguruma, I. Karube: “Plasma-polymerized films for biosensors”, *trends in analytical chemistry*, 18 (1999) 62.
- [3] A. Heller: “Electrical wiring of redox enzyme”, *Acc. Chemistry. Res* , 23 (1990) 128.
- [4] N. C. Foulds, C. R. Lowe: “Immobilization of glucodr oxidase in ferrocene-modified pyrrole polymers”, *analytical chemistry*, 60 (1988) 2473.
- [5] S. Koide, K. Yokoyama: “Electrochemical characterization of an enzyme electrode based on a ferrocene-containing redox polymer”, *journal of electroanalytical chemistry*, 468(1999) 193.
- [6] H. S.Munro, J. G. Eaves: “The modification of electrodes by the deposition of plasma polymerized dimethylaminomethylferrocene”, *polymer communications*, 28(1987) 339.
- [7] H. S.Munro, J. G. Eaves: “ESCA studies of metal-containing plasma polymers. . plasma polymerization of ferrocene, vinylferrocene, and dimethylaminomethylferrocene”, *journal of polymer science*, 23(1985) 507.
- [8] N. Anicet, A. Anne, J. Moiroux, J. Saveant: “Electron transfer in organized assemblies of biomolecules. Construction and dynamics of avidin/biotio co-immobilized glucose oxidase/ferrocene monolayer carbon electrodes”, *journal of the american chemical society*, 120(1998) 7115.
- [9] I. Willner, V. Heleg-Shabtai, R. Blonder, E. Katz, G. Tao: “Electrical wiring of glucose oxidase by reconstitution of fad-modified monolayers assembled onto au-electrodes”, *journal of the american chemical society*, 118(1996) 10321.

第5章

結論

本論文では、バイオセンサの構成部となる分子認識素子と信号変換素子をつなげるインタフェース部に着目して、バイオセンサの性能向上を目指した。バイオセンサの小型化・微細化に対して有効な作製法となる半導体加工技術は、プラズマ重合プロセスとの組み合わせに優れる。インタフェース設計には、プラズマ重合プロセスを用いることとし、プラズマ重合プロセスの特徴・プラズマ重合膜の特性を利用してバイオセンサの性能向上を検討した。

分子認識素子には酵素 (GOD) を、そして信号変換素子には電極 (白金、金) を用い、この両者をプラズマ重合膜によって接触・固定化させたアンペロメトリックバイオセンサデバイスを作製し評価した。インタフェース設計の基礎となる“プラズマ重合膜と酵素との接触状態・親和性”について着目し、解析を行った。また、酵素を直接プラズマ処理したプラズマ重合膜/酵素複合体に焦点をあて、酵素の埋め込み固定状態やバイオセンサの性能・特性を評価した。さらに、プラズマ重合膜/酵素複合体へのメディエータ (フェロセンレドックスサイト) の導入を行い、本複合体の持つ機能を解析した。バイオセンサのセンサ性能・機能向上を目指して、プラズマ重合膜/酵素複合体を用いたバイオセンサメカニズムの解明、研究を行った。

第2章では、妨害物質によって生じる電気信号 (バイオセンサにおけるノイズ成分) を低減させるため、プラズマ重合膜の膜質・膜厚特性に着目して、HMDS プラズマ重合膜 (GOD を共有結合で固定化する前のプラズマ重合膜) が電極活物質の拡散に与える影響を評価した。白金電極上に HMDS プラズマ重合膜が成膜されたデバイスは、成膜されていないデバイスに比べて、過酸化水素による酸化電流値が低くなった。また膜厚が厚くなるほど、酸化電流値の低減が観測された。これよりプラズマ重合膜は膜厚が増加するほど、電極活物質の自由な拡散を抑制する効果があると示された。さらに妨害物質であるアスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸を電極活物質とした場合、1.7nm の非常に薄いプラズマ重合膜でもプラズマ重合膜が成膜されていないデバイスに比べて、酸化電流値がおおよそ 10% を割り込む状態であった。一方、過酸化水素を電極活物質とした場合には、1.7nm のプラズマ重合膜では未成膜のデバイスに比べて、酸化電流値の低減率が約 50% を割り込むにとどまった。これは、極薄膜のプラズマ重合膜の場合、分子サイズの小さい過酸化水素は拡散が容易に行えるのに対し、分子サイズの大きい妨害物質は拡散が阻害された結果と言える。よってプラズマ重合膜はサイズ効果の機能を有し、ノイズ成分を低減しながら、必要な検出信号を抽出する特性を持つと確認できた。ただし、重合膜の厚さを増していくと分子サイズの小さな過酸化水素でも酸化電流値が減少し、S/N 比の悪化する傾向がみられるため注意が必要であり、この点でも薄膜のコントロールが可能なプラズマ重合法には利点がある。HMDS プラズマ重合膜に共有結合で GOD を固定化したバイオセンサデバイスを用いてグルコースを測定した結果、+600mV 程度の酸化電位が観測され、グルコース濃度の増加とともに酸化電流値の増加も観測された。これらの結果、HMDS プラズマ重合膜をインタフェースに用いることで、妨害物質 (アスコルビン酸、アセトアミノフェン、尿酸) の影響を軽減したグルコースバイ

オセンサの作製が可能であることを示した。次に、プラズマ重合膜と酵素 (GOD) との接触状態を観察・評価し、バイオセンサのインタフェースに最適となるプラズマ重合膜表面の状態を探った。AFM 観察では、1 分子の GOD を認識することが可能であった。溶液中でのプラズマ重合膜表面の状態を“疎水表面”、“正電荷を持った親水表面”、“正電荷を持った親水表面”の 3 パターンを設けてそれぞれ GOD と物理吸着させた (3 パターンとは、pH7 のリン酸緩衝溶液中での状態を示す。また GOD の物理吸着は、大気中で GOD 溶液をデバイスに滴下して実施した)。その結果、疎水表面では GOD がクラスター状に膜表面のおおよそ 60% に凝集し、正電荷を持った親水表面では膜表面に 1 分子 1 分子が均質にかつ高密度に吸着し、負電荷を持った親水表面では膜表面に 1 分子がまばらに吸着していることが、AFM 像で観測できた。バイオセンサのインタフェース設計としては、GOD を電極表面積に均質にまんべんなく高密度に吸着しているほうが、酵素反応さらには酵素反応から電極電気化学反応への電子の移行でも効果的であると考えられ、プラズマ重合膜表面に窒素プラズマ処理などでアミノ基の導入された状態が良いと判断する。また水溶液中での、プラズマ重合膜と GOD の接触・吸着状態を QCM にて評価した。飽和時間が早いなど QCM の結果からも、窒素プラズマ処理された表面状態が、GOD との吸着に適していると示された。物理吸着による GOD 固定のグルコースバイオセンサを用いてグルコースを測定した結果、疎水表面よりも感度が高い検量線となった。以上より、GOD と接触するプラズマ重合膜表面の状態を“正帯電した親水表面”にコントロールすることがバイオセンサの性能向上に重要である。

第 3 章では、正電荷を持った親水性表面のプラズマ重合膜に GOD を物理吸着させ、その GOD をプラズマ重合膜で埋め込み、埋め込み状態を AFM で観測した。埋め込み無しの場合には 1 分子 1 分子が膜全体に均一に吸着しているが、HMDS プラズマ重合膜 4nm の埋め込みを行った際には埋め込み無しに比べて膜表面の凹凸差が小さいものの GOD の形状に由来する山が見られ、12nm になると膜表面の凹凸差が無くなり完全に埋め込まれていることが断面プロファイルから確認できた。一方、アセトニトリルプラズマ重合膜の場合、4nm と 12nm の埋め込みでは膜表面の凹凸差は小さかった。アセトニトリルプラズマ重合膜を埋め込みに用いた場合、GOD を含んだ膜表面に、均一にプラズマ重合膜が成膜されて、膜表面の凹凸差が小さくなったと考える。プラズマ状態において、モノマーと GOD のそれぞれの構成成分の相互作用が、プラズマ重合膜の成膜に影響を及ぼしたと思われる、モノマーの選定が成膜パラメータの一つに含まれると判断する。AFM 観測以外に、GOD をプラズマ重合膜で埋め込み固定したグルコースバイオセンサを作製し、その特性を評価した。グルコース濃度の増加に伴い酸化電流が増加し、バイオセンサとしての応答を得ることができた。この結果、酵素である GOD をプラズマ環境下に曝しても、酵素活性を維持できることを確認した。また、埋め込みを行うプラズマ重合膜に関して HMDS よりもアセトニトリルの方が高い酸化電流を得られた。これは、疎水性の HMDS プラズマ重合膜に対して親水性のアセトニトリルプラズマ重合膜の方がグルコースの拡散を優位にし、酵素反応も優位に実現できたためと判断する。さらに、プラズマ重合膜の放電電力の差によってもバイオセンサの性能に影響することが確認できた。

第 4 章では、プラズマ重合膜のモノマーにメディエータとなるフェロセンを含む DMAMF を用いたメディエータ型バイオセンサを作製した。金電極上に DMAMF プラズマ重合膜を成膜し共有結合で GOD を固定化したバイオセンサデバイスは、+350mV vs. Ag/AgCl 程度の低電圧でグルコースを検出でき、サイクリックボルタモグラムから導いたグルコース濃度 - 酸化電流の検量線で

は、1.3mM から 81mM までの非常に広範囲なダイナミックレンジを有した。また、溶存酸素有無それぞれの状態で、グルコース濃度 2.5mM ~ 10mM の範囲の電流値を測定した結果、溶存酸素有無の差による電流値差は 5%程度であった。これらの結果から、DMAMF プラズマ重合膜のフェロセンがメディエータの役割を果たしていると判断できる。次に、DMAMF プラズマ重合膜/酵素複合体を形成し GOD の埋め込み固定を行ったバイオセンサデバイスを作製して、グルコースに対する酸化電流を測定した結果、グルコース濃度が増加するごとに酸化電流も増加した。これより DMAMF プラズマ重合膜の成膜過程のプラズマ環境下でも酵素活性機能が破壊されないと確認できた。また DMAMF プラズマ重合の放電条件によってバイオセンサの特性が変わり、放電電力 50W・膜厚 20nm が最適であった。放電電力が高すぎるとフェロセンレドックスサイトが変性し、膜厚が厚すぎるとグルコースの拡散を妨げるため、バイオセンサの性能が低下する（酸化電流が得られない）と考えられる。また、アンペロメトリーにより妨害物質であるアスコルビン酸の影響を評価した結果、アスコルビン酸の影響は無かった。この理由は、DMAMF プラズマ重合膜のサイズ効果による拡散妨害、フェロセンのメディエータ機能による酸化電位の低電位化、の 2 点によると考える。

以上のことから、プラズマ重合膜と生体分子との接触状態・親和性の解析、生体物質の固定化技術確立と半導体加工技術によるバイオセンサデバイスの一括製作を目指したプラズマ重合膜/酵素複合体の形成とバイオセンサへの利用、プラズマ重合膜/酵素複体内でのメディエータ機能の実現、そしてバイオセンサのメカニズム解明とセンサ性能向上といった本論文の目的に対して、一定の成果を得ることができたと思われる。一方で、市販品・製品化への展開を考えると、例えば医療機器をターゲットとした場合、実サンプルでの影響、再現性、生産性等の課題もあり、今後の検討が必要である。しかし、本研究を通して、バイオセンサの性能確保にはインタフェース設計が重要であること、そしてそのインタフェースにプラズマ重合膜/酵素複合体を活用することが有用であることを提案する。

謝辞

本研究の実施ならびに本論文の作成にあたり、長期にわたりご指導くださった六車仁志先生に心より感謝いたします。学会発表、国際会議、研究活動など様々な面で親身になった丁寧なご指導・ご助言をくださり、また研究者としての沢山の経験をさせていただいたことに深く感謝いたします。さらに、社会人である私を、研究室に暖かく迎え入れてくださったことに改めて感謝いたします。

本研究を実施するにあたり、励ましと共にご協力くださった研究者の皆様、研究室メンバーに深く感謝いたします。

博士論文審査においてご支援・ご指導いただきました先生方に心より感謝いたします。

社会人生活と学生生活の両立にあたり、ご支援・ご協力くださった職場および大学院・MOT事務課の皆様に深く感謝いたします。

最後に、これまであらゆる面で支えてくださった父母に心より感謝いたします。

研究業績

学術論文

- [1] H. Muguruma, Y. Kase, “Structure and Biosensor Characteristics of Complex between Glucose Oxidase and Plasma-Polymerized Nanothin Film,” *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 737-743, December, **2006**.
- [2] H. Muguruma, Y. Kase, N. Murata, K. Matsumura, “Adsorption of Glucose Oxidase onto Plasma-Polymerized Film Characterized by Atomic Force Microscopy, Quartz Crystal Microbalance, and Electrochemical Measurement,” *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 26033-26039, December, **2006**.
- [3] H. Muguruma, Y. Kase, H. Uehara, “Nanothin Ferrocene Film Plasma Polymerized over Physisorbed Glucose Oxidase: High-Throughput Fabrication of Bioelectronic Devices without Chemical Modifications,” *Analytical Chemistry*, 77, 6557-6562, October, **2005**.
- [4] Y. Kase, H. Muguruma, “Amperometric Glucose Biosensor Based on Mediated Electron Transfer between Immobilized Glucose Oxidase and Plasma-Polymerized Thin Film of Dimethylaminomethylferrocene on Sputtered Gold Electrode,” *Analytical Sciences*, 20, 1143-1146, August, **2004**.
- [5] Y. Kase, H. Muguruma, A. Hiratsuka, I. Karube, “A Thin-Film Glucose Biosensor Based on Hexamethyldisiloxane Plasma-Polymerized Film: Influence of Its Film Thickness on the Platinum Electrode,” *IEICE Transaction on Electronics*, E87-C, 142-147, February, **2004**.

国際会議

- [1] Y. Kase, H. Muguruma, “Structure Observation of Enzyme Embedded in Plasma-Polymerized Film and Its Biosensor Performance,” 6th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials / 7th International Conference on Plasma-Nano Technology & Science (ISPlasma2014/IC-PLANTS2014), Nagoya, Japan, 2-6 March, **2014**.
- [2] Y. Kase, H. Muguruma, “An Electron Transfer-Mediated Amperometric Biosensor Based on Plasma-Polymerized Thin Film,” International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2013 & 5th Sensing Biology Symposium (Bio4Apps 2013), Tokyo, Japan, 30-31 October, **2013**.

学会発表

- [1] 六車仁志、加瀬仁啓、酵素ノプラズマ重合膜複合体の形成と評価およびそのバイオセンサー特性、電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会、信学技報、2005年12月

- [2] 上原英之、加瀬仁啓、六車仁志、フェロセンプラズマ重合を用いるメディエータバイオセンサー、電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会、信学技報、2005年12月

- [3] 六車仁志、加瀬仁啓、プラズマ重合膜・タンパク質複合体の形成と評価およびそのバイオセンサー特性、2005年秋季 第66回応用物理学会学術講演会、2005年9月

- [4] 六車仁志、加瀬仁啓、プラズマ重合膜表面に吸着した酵素のAFM観測とそのバイオセンサー特性、電子情報通信学会2004年ソサイエティ大会、2004年9月

- [5] 上原英之、加瀬仁啓、六車仁志、ジメチルアミノメチルフェロセンプラズマ重合を用いるバイオセンサー、日本分析化学会第53年会、2004年9月

- [6] 加瀬仁啓、六車仁志、平塚淳典、軽部征夫、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜を基盤とした薄膜グルコースバイオセンサ、電子情報通信学会有機エレクトロニクス研究会、信学技報、2002年6月

付録

基礎事項

1 サイクリックボルタンメトリー^[1-3]

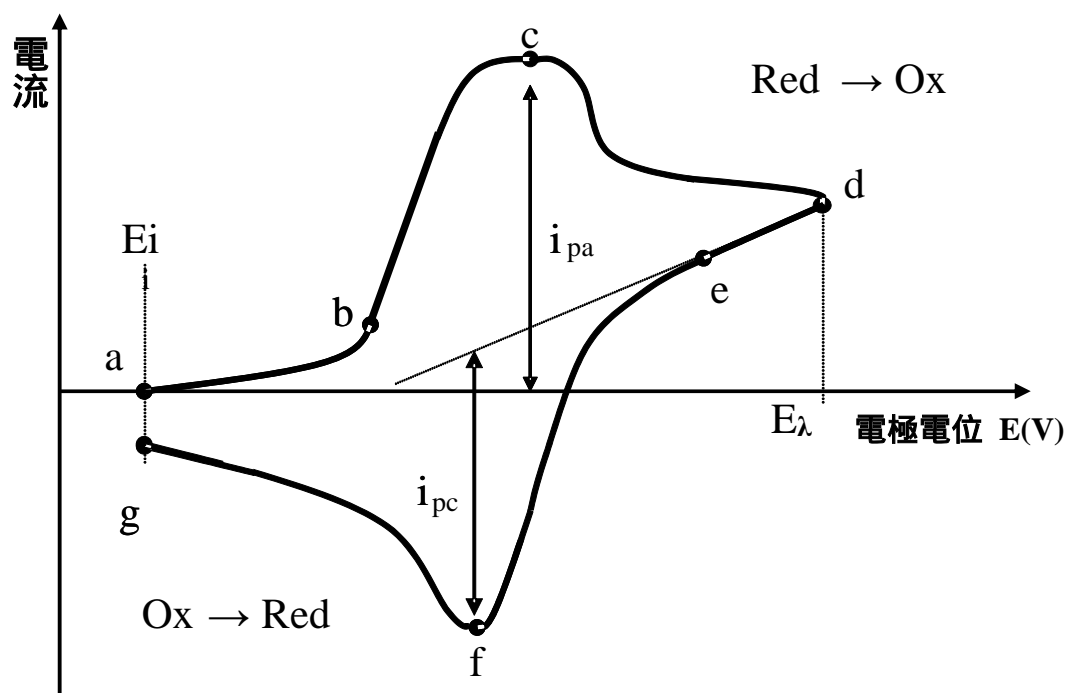
本研究では、3 電極方式による電気化学測定を用いてバイオセンサの検討・評価を行っている。測定系は本文第 2 章の図 2-2 に示しているが、ここでは測定に用いたサイクリックボルタンメトリーについて、その基礎事項を示す。

サイクリックボルタンメトリーとは、ある特定の 2 つの電位の間で電極電位を掃引させ、そのとき流れる電流を測定する測定方法で、本文第 2 章の図 2-2 のような測定系を用いて取得した電流 電圧曲線のグラフをサイクリックボルタモグラムという。

測定対象の作用電極で次のような電極反応が起こる場合を考える。これは電極表面で、還元体 Red が電子を放出し、酸化されて還元体 Ox となることを示す。



サイクリックボルタンメトリーによって得られるサイクリックボルタモグラムの説明図を付録図 1 に示す。



付録図 1 サイクリックボルタモグラム

サイクリックボルタンメトリーでは、作用電極の電位を順方向（電位を高くしていく方向）に掃引し、そして次に電位 E_{λ} で反転して逆方向に掃引する。電極反応の速度（つまり測定される電流値）は一般的に「電荷移動」と「物質移動」の速度により支配される。電荷移動とは、電極表面の酸化還元反応によって、電極 - 化学種間で発生する電子授受のことであり、また物質移動とは、化学種が電極に向かって拡散・移動することをいう。バイオセンサの電極評価では、電荷移動は十分速く、物質移動が遅い状態を利用することが多く、ここではこの状況について記載する。順方向に掃引した場合、酸化電流が増加していきピーク電流 i_{pa} が観測される。次いで、酸化電流が減少していく。この現象は次のように考えられている。掃引開始点 a では、電極反応は発生していないため酸化電流はほとんど流れない。その後、電位が上昇して b 点付近に至ると、酸化反応が起き始め、酸化電流が流れる。さらに c 点に至ると、電流値は最大値を示す。これ以後は、電位は上昇しても電極表面近傍の還元体 Red の供給が間に合わず Red 濃度が減少するため、酸化電流も減少することになる。従って、c 点 - d 点間の電流減少カーブは拡散によって周囲から電極に Red が供給される速度に従うことになる。電位が E_{λ} (d 点) に至ったら、掃引方向を逆転させる。d 点 (E_{λ}) の設定は、目的によって適宜に選定することになる。逆方向の掃引で観察される還元電流は、酸化体 O_x から還元体 Red への変化に対応するものとなる。

この測定方法を用いて得たサイクリックボルタモグラムから反応の起こる電位や、電極近傍での電子伝達現象の定性分析、また反応分子の拡散係数等が求められることになる。

2 原子間力顕微鏡 (Atomic force microscope: AFM) ^[4-5]

本研究では、プラズマ重合膜への酵素の吸着状態やプラズマ重合膜表面の状態をビジュアル的に観察するため、原子間力顕微鏡 (AFM) を用いて検討・評価を行っている。ここではその基礎事項を示す。

原子間力顕微鏡とは

絶縁体試料表面の観察を可能にするため 1986 年に開発された走査プローブ顕微鏡が、原子間力顕微鏡である。プローブと試料の間に働く力を計測し、試料の表面観察を行うものである。プローブと試料の間に働く力とは原子間力であり、試料の表面形状を画像化することができる。主な観察対象となる試料は、半導体、金属、生体細胞などであり、また測定モードは摩擦力、剛性、粘弾性などの複数の特性を測定することができる。原子間力顕微鏡の代表的な測定モードを付録表 1 に示す。

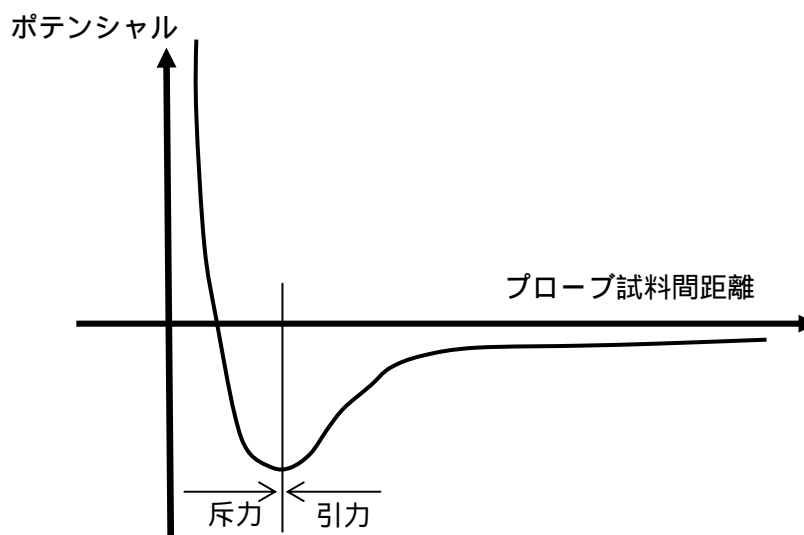
付録表1 原子間力顕微鏡の各種測定モード

測定モード	検出する力	特徴
タッピングモード	斥力	生体試料など柔らかい試料や粘性の高い試料に適する
コンタクトモード	斥力	原子間力顕微鏡の原型
非接触モード	van der Waals 力に基づく引力	原子分解能を達成するプローブは、試料に非接触
摩擦力モード	摩擦力	試料の表面状態、表面物性の違いを画像化できる
力変調モード	弾性力	試料の弾性を測定できる

面内方向の空間分解能はプローブ先端径程度を得ることができるため、先端の原子スケールにまで先鋭化することで原理的には原子分解能を達成することが可能となる。ただし、検出する相互作用の働く距離がナノメートルスケール以下であるため、高空間分解能を実現するには、プローブを試料に近接させて走査する技術が必要になる。

原子間力顕微鏡の原理

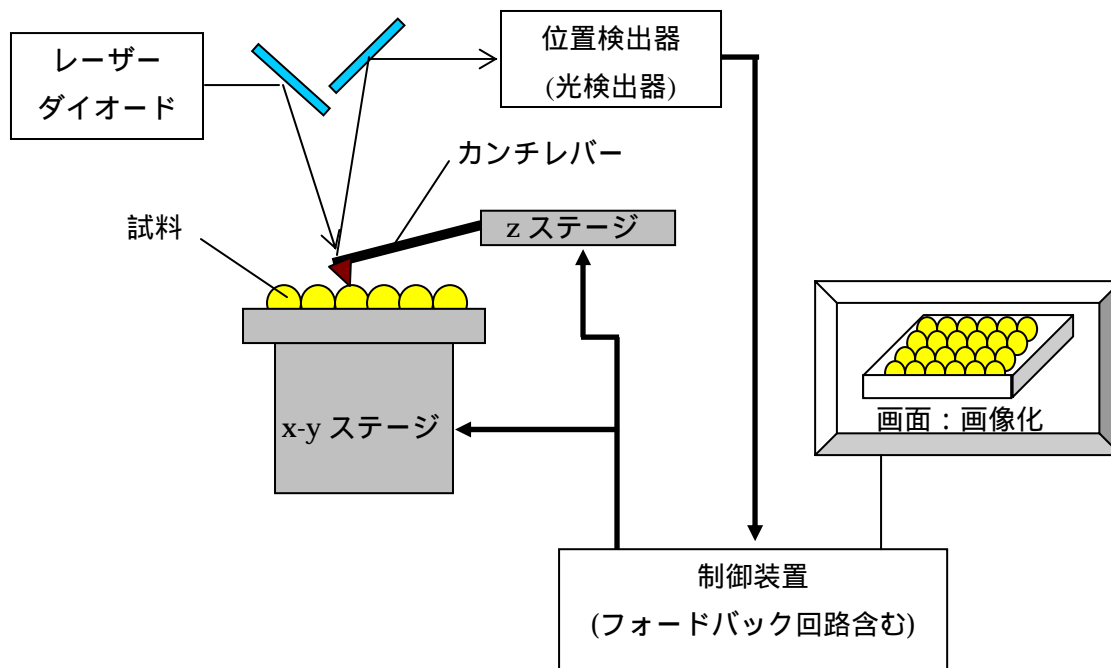
プローブ先端がナノスケール以下に先鋭化され、そのプローブを試料に近接させていくと、プローブ先端の原子と試料の原子間にはレナード・ジョーンズ・ポテンシャル (Lennard-Jones potential) による力が近似的に働く。プローブが試料に近づいていく場合、付録図2に示すように、はじめは van der Waals 力による引力が働き、更に近づくと、パウリの原理に基づく斥力が働く。



付録図2 レナード・ジョーンズ・ポテンシャル

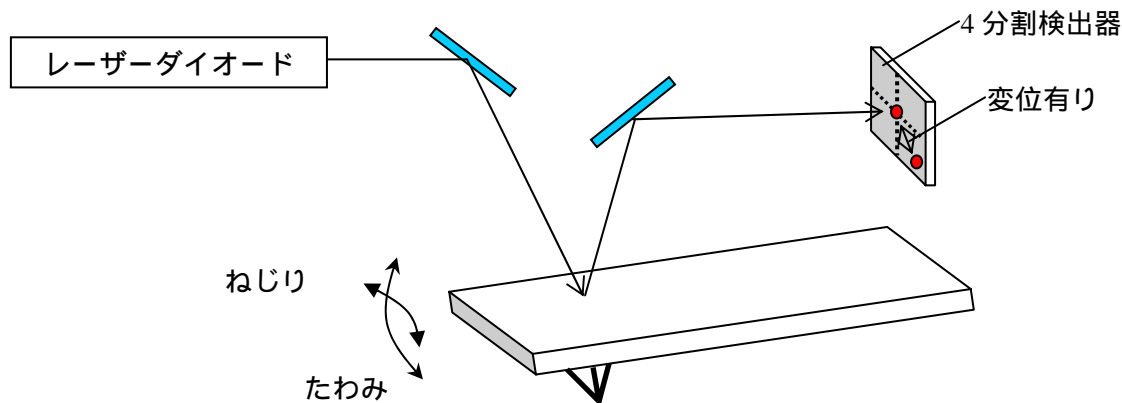
原子間力顕微鏡は、このプローブ先端に働く力を、カンチレバーと呼ばれる板ばねにより検出する。具体的には、力が加わることで板ばねが弾性変形し、その変位量(z)とバネ定数(k)からフック

の法則($F=kx$)によりその力(F)が求まる。プローブに働く力が一定になるように、プローブ(あるいは試料)の z 方向の位置を、フィードバック回路によって調整しながら、試料(あるいはプローブ)を面内方向に走査することで、試料の表面構造を再構成する。これは、原子間力顕微鏡の動作原理であり、その基本構成を付録図3に示す。



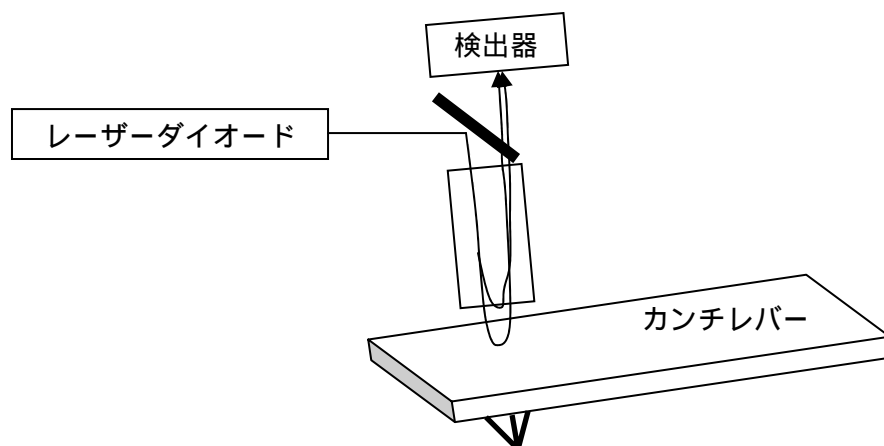
付録図3 原子間力顕微鏡の基本構成図

カンチレバーはシリコンプロセスにより作製され、プローブ先端は主に Si や Si_3N_4 から構成されている。カンチレバーの変位を検出する代表的な方法である光てこ方式を付録図4に示す。これはカンチレバーの背面にレーザー光を照射し、カンチレバーのたわみによる変位で生じる反射光の偏光位置を分割型フォトディテクターで検出する方式である。



付録図4 カンチレバーの変位検出法(分割型フォトディテクターを用いた方式)

光てこ方式以外に、光ファイバーをカンチレバー背面に近づけ、カンチレバー背面に反射した光とファイバーの端面で反射した光を干渉させることで検出する光干渉方式（付録図 5）などもある。



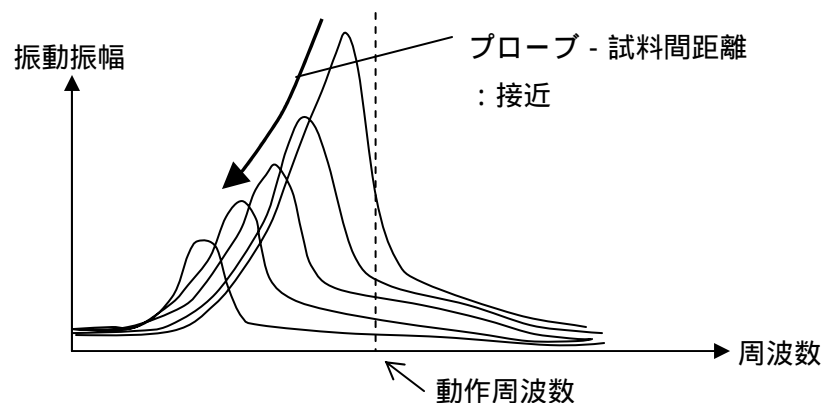
付録図 5 カンチレバーの変位検出法（光干渉方式）

タッピングモード (tapping mode)

生体試料を測定する場合はタッピングモードが適しており、本研究でもタッピングモードでの測定を行った。ここでは、タッピングモードについて記載する。

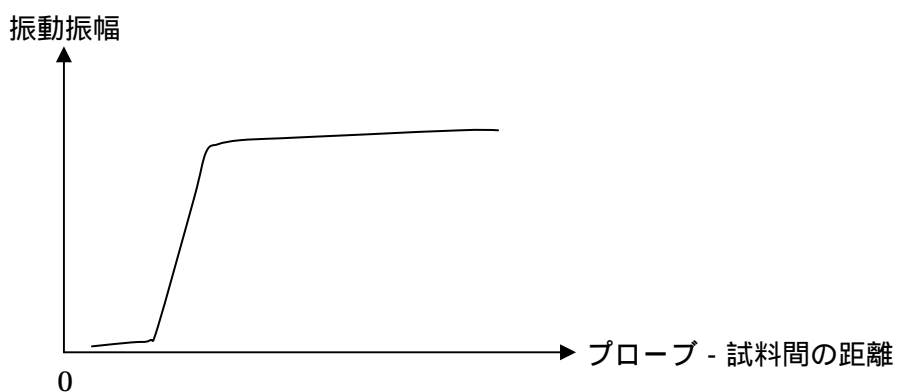
タッピングモードは、サイクリックコンタクトモードとも呼ばれ、カンチレバーをその共振周波数で微小振動させ、試料表面にプローブを軽く周期的に接触させることで、斥力を検出する測定モードである。振幅振動が一定になるようにプローブの z 方向の位置に対してフィードバックをかけることで、試料形状を測定する。コンタクトモードと比べると、弱い斥力を検出することから、生体試料等の柔らかな試料の形状を測定することにむいている。また、粘性のある試料に対して、コンタクトモードではプローブ先端が吸着して測定できないことがあるが、タッピングモードでは吸着の影響を受けにくい。これは、タッピングモードでは $5 \sim 40 \text{N/m}$ と比較的バネ定数の大きいカンチレバーを用い、またタッピング動作による慣性があるため、試料表面にプローブが接触した時にプローブ - 試料間にキャピラリーフォースが生じた場合でも、プローブが試料に吸着されずに上下振動を続けることができる。周期的にプローブが試料表面から離れることから、試料にダメージを与えにくい方法でもある。

タッピングモードにおけるカンチレバーの共振周波数とプローブ振動振幅およびプローブ - 試料間距離の関係を付録図 6 に示す。プローブと試料との平均距離が近づくに従って振動振幅は減少し、共振特性の振幅のピーク周波数も減少していく。



付録図 6 プローブ - 試料間の距離変化に伴う共振特性の変化

タッピングモードで設定する動作周波数において、プローブ先端と試料表面の平均距離に対する振動振幅の変化を付録図 7 に示す。プローブが試料に接触し始めると、距離に比例して振動振幅が減少していく。プローブは試料に衝突するが、カンチレバーは共振状態にあり、プローブと試料表面には微弱な力しか働かない。



付録図 7 プローブ - 試料間の距離変化に伴う振動振幅の変化

付録の参考文献

- [1] 電気化学会 編者: 「電気化学測定マニュアル(基礎編)」, 丸善, 2002.
- [2] 藤嶋昭、相澤益男、井上徹 著: 「電気化学測定法(上)」, 技報堂出版, 1985.

- [3] 直井勝彦、森満博: 「サイクリックボルタンメトリー(水溶液系)」, *Electrochemistry*, 67 (1999) 1006.
- [4] 井上康志、河田聡: 「総論: 入門ナノテクノロジー」, *ぶんせき*, (2004) 2.
- [5] 軽部征夫 監修: 「バイオセンサ・ケミカルセンサ事典」, 株式会社テクノシステム, 2007