

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 9 月 18 日現在

機関番号：32619

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24560965

研究課題名(和文) プラズマ重合膜/生体分子バイオナノ界面の作製評価およびバイオセンサーへの応用

研究課題名(英文) Fabrication and characterization of plasma-polymerized film/biomolecule interface and its application for biosensors

研究代表者

六車 仁志 (Muguruma, Hitoshi)

芝浦工業大学・工学部・教授

研究者番号：20309719

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：バイオナノ界面研究の研究対象として、プラズマ重合膜とタンパク質分子を選択し、両者の複合体からなるバイオナノ界面に焦点をあてる。生体分子とプラズマ重合膜の複合体からなる十数ナノメートル層のバイオナノ界面の界面構造解析とそのマテリアル/デバイス特性との関係を調べ、性能向上および新機能発現を目的とする。このバイオナノ界面は、医療を支えるバイオマテリアルやバイオセンサにおいて重要な役割を持つ。3年間の研究助成期間で得られた成果は主に、(1)電気物性の制御された炭層カーボンナノチューブ、プラズマ重合膜、生体分子からなる、高感度バイオセンサの作製、(2)二段階プラズマ重合による細胞のパターニング、である。

研究成果の概要(英文)：We focus on bionanointerface composed by plasma-polymerized organic thin film and protein molecule as a target of bionanointerface research. The purpose is the structural analysis of ten nanometer thick bionanointerface composed by plasma-polymerized film and biomolecule and the investigation of the relationship between its structure and material/device characteristics, then, orientate boosting the ability and expressing the new functionality. This bionanointerface is importantly positioned at biomaterials and biosensors supporting medicine. We have achieved the following two matters. (1) The highly sensitive biosensor with electronically-type sorted single-walled carbon nanotube, plasma-polymerized film, and biomolecule is presented. (2) Patterning of endothelial cells and hepatic stellate cells by two step plasma polymerization processes is presented.

研究分野：バイオセンサ

キーワード：バイオセンサ プラズマ重合 カーボンナノチューブ 細胞 パターニング

## 1. 研究開始当初の背景

タンパク質・核酸・多糖類などの生体分子やその他の有機分子は、大きな内部自由度を持つために、ソフトマターと総称される。これらソフトマターが形成する界面は、外部からの刺激によって構造や性質が大きく変化するソフトな特性を持つ。この動的な界面をバイオナノ界面と定義する。バイオナノ界面は溶媒やイオンや基質が介在する3次的に厚みのある境界領域であって、その性質は単なる2次元界面ともバルクとも異なり、生物機能の多様性を支える源になっている。しかし、バイオマテリアルやバイオセンサにおいてバイオナノ界面の重要性は広く認識されているものの、生体高分子、高分子電解質、イオン種、水分子などが複雑に関与するため、未解明の問題が数多く存在する。

プラズマ重合膜は、モノマーを気化させ、重合反応を気相中で行わせ、超薄膜を直接基板上に堆積させたものである。プラズマ中には多種類の活性種（ラジカル、イオンなど）が存在し、重合反応が高エネルギー状態で進行する。プラズマ重合膜は、モノマーの選択や重合条件の設定により、重合度などの制御によって、緻密なガラス質膜から緩い架橋度のゲルのような膜まで、様々な特性を持つ膜が報告されている。

## 2. 研究の目的

バイオナノ界面研究の研究対象として、本研究では、プラズマ重合有機薄膜とタンパク質分子を選択し、両者の複合体からなるバイオナノ界面に焦点をあてる。生体分子とプラズマ重合膜の複合体からなる十数ナノメートル層のバイオナノ界面の界面構造解析とそのマテリアル/デバイス特性との関係を調べ、性能向上および新機能発現を目的とする。このバイオナノ界面は、医療を支えるバイオマテリアルやバイオセンサにおいて重要な役割を持つ。

## 3. 研究の方法

研究計画は次の2点に課題を絞って遂行する。

課題1. 電気物性の制御された炭層カーボンナノチューブ、プラズマ重合膜、生体分子からなる、高感度バイオセンサの作製

課題2. プラズマ重合膜の三次元ナノ構造を利用した細胞パターンニング

## 4. 研究成果

2点の課題に対して次のような結果を得た。

### 課題1

○まえおき：カーボンナノチューブは、グラファイトのシートを丸めた筒状の構造であり、その特性を利用した電気化学バイオセンサについて報告されている。多くのカーボンナノチューブは、合成されたものをそのまま利用されることが多く、その構造、およびそれから派生する特性には多様性が存在する。例えば、すべての可能な単層カーボンナノチューブ(SWNT)の三分の一が金属特性を示し、残りの三分の二が半導体特性を示すことが知られている。Hersemらによって、密度勾配超遠心分離法により、金属特性と半導体特性を持つSWNTの分離が報告された。今回の報告では、分離された金属性のSWNTと半導体性のSWNTを利用した。バイオセンサが電氣的性質によりセンサの特性が変化すること、電氣的性質を分離しない合成直後のSWNTより分離したSWNTを用いる方がよいセンサ特性を得られることを期待して研究を行った(図1)。

○実験方法：ガラス基板は、過酸化水素水、アンモニア水、水の1:1:8の混合液中で20分間ボイルングさせたのち、水でよく洗浄した。その基板にシャドーマスクをして、3nm厚のクロムの密着層、150nmの金属をスパッタリングで形成した。電極面積は、 $5 \times 5 \text{ mm}^2$ である。第一アセトニトリルプラズマ重合膜を3nm形成した。アセトニトリルプラズマの条件は、電力200W、圧力0.6Pa、である。アセトニトリルプラズマ重合膜は、親水性を示し、表面にはアミノ基を持った

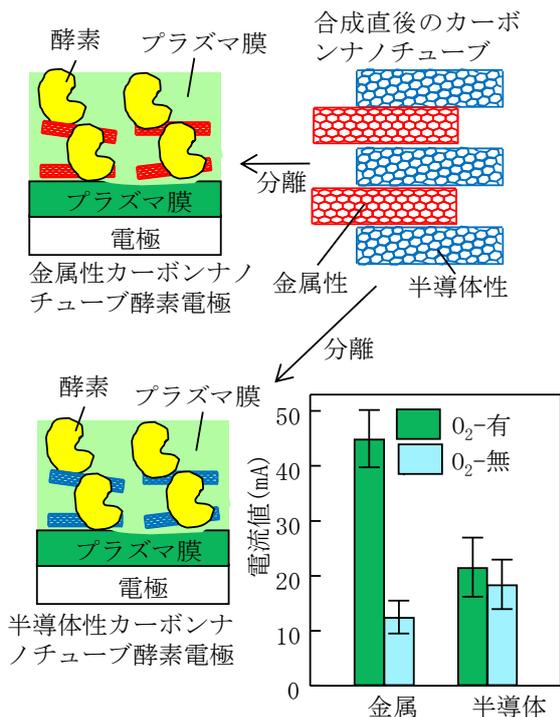


図1 電気物性が分離された酵素センサの作製プロセスおよび結果。

めに酵素と結合しやすい。その上に金属性または半導体性 SWNT の水溶液（濃度：0.01 または 1mg/mL）電極表面に滴下した。乾燥した後、窒素プラズマで 30 秒間処理を行った。窒素プラズマの条件は、圧力 0.6 Pa、放電時間 30 秒である。次に酵素であるグルコースオキシダーゼ(GOx)をリン酸緩衝液に 100 mg/mL の濃度に溶解し、その液を滴下し、乾燥洗浄した。最後に、SWNT と酵素上に第二アセトニトリルプラズマ重合膜を 3 nm 形成した。アセトニトリルプラズマの条件は、電力 200 W、圧力 0.6 Pa、である。作製したデバイスの評価は Bioanalytical System 社製 (Model 701A) のコンピュータ制御式電気化学測定装置を用いて、三電極測定方式にて行った。作用電極は作製したデバイス、参照電極に銀・塩化銀電極、対極に白金電極を用いた。溶液は 20mM リン酸緩衝液 (pH7.4) を使用した。実験は室温 (20° C) にて行った。

○結果と考察:電気的性質を分離しない合成直後の SWNT (比較のため)、金属性 SWNT、半導

体性 SWNT をそれぞれ使用した電極のサイクリックボルタモグラムを調べた結果、グルコースの濃度に応じて電流値が増加していた。SWNT 層をドロップキャスト法で生成するための SNWT 溶液濃度が混合物 SWNT で 1mg/mL と分離した SWNT で 0.01mg/mL とのセンサ応答はほぼ同じである。これは、電気的性質を分離するために使用したサーファクタントが SWNT の非凝集化を促進し、均一な SWNT 層が形成され酵素との電気的接続が上昇したためと考えられる。サーファクタントは、センサ特性に全く影響を与えず、高感度応答には不可欠であることを示している。酸素存在下では、金属性 SWNT を用いたセンサが半導体 SWNT のそれに比べて高い応答を示した。酸素が存在しないと金属性 SWNT を用いたセンサは応答が 5 分の 1 に低下したのに比べて、半導体性 SWNT を用いたそれは、応答がほとんど変化しなかった (図 1)。電気化学インピーダンス測定は、半導体性 SWNT を用いたセンサが金属性 SWNT を用いたそれに比べて、低いインピーダンスを示すことがわかった。原子間力顕微鏡の観察では、両者の SWNT の表面モルフォロジーには大きな違いは見られなかった。サイクリックボルタメトリの測定も行った。以上より、金属性と半導体性 SWNT の酵素センサでは、動作機構が異なり、金属性では、過酸化水素経路であるが、半導体性では、直接電子伝達経路であると推測する。

## 課題 2

○まえおき:プラズマ重合膜の三次元ナノ構造を利用した細胞パターンニングについて行った。プラズマ重合膜の作製法は、真空チャンバーの中に適当な圧力、流量でモノマーをガス化して満たした後に電磁界を供給してプラズマ状態にすると、そのまま基板上に膜が堆積する。プラズマ重合膜は、ナノメートルサイズの膜の作製が可能であり、かつ、表面制御が容易であるために、この利点を活かした細胞パターンニングを行う。

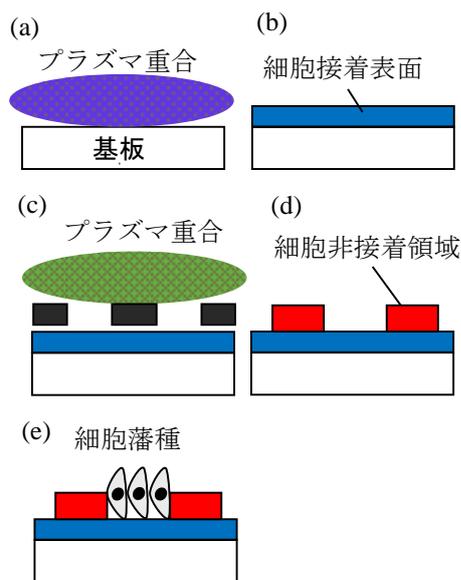


図2 二段階プラズマ重合を利用とする細胞パターンニング。(a)プラズマ重合。(b)細胞接着層の形成。(c)シャドウマスクを用いて部分的にプラズマ重合。(d)細胞非接着層の形成。(e)細胞パターンニングの完了。

○実験方法：細胞パターンニングの作製手順を図2に示した。以下の手順で基板を作製する。表4-1、表4-2に各基板の表面処理を示す。HMDS：疎水性によるBSA接着、AN：アミノ基含有膜の形成、N<sub>2</sub>：アミノ基の導入、O<sub>2</sub>：親水性であるカルボキシル基の導入(アミノ基との比較)である。HMDS、AN、N<sub>2</sub>、O<sub>2</sub>は気圧0.6Pa、電力50Wの条件で10分間放電した。細胞のパターンニングを確認したものはメタルラインマスクのラインの幅を狭く設定していく。ガラス基板を蒸留水、アンモニア水、過酸化水素水が8：1：1の混合液で70℃で20分間以上消毒する。その後、アルゴン銃で乾かす。ガラス基板上にプラズマ重合膜を用いて細胞接着領域を形成する。ガラス基板にメタルラインマスクを被せる。メタルラインマスクの上からガラス基板上にプラズマ重合膜を用いて細胞非接着領域(BSA接着領域)を形成する(工程2、4における細胞接着領域と細胞非接着領域は可逆順不同とする)。メタルラインマスクを外す。細胞の培養は、蒸留水、エタノールを分注する。蒸留水、エタノール、蒸留水の順番で、作製した基板を洗浄し乾かす。洗浄した基板

をシャーレに移す。UV下に6h以上放置し、滅菌する。DMEM、PBS(―)を分注し、トリプシンと共に37[℃]に温める。先代フラスコ内のDMEMを吸い取る。PBS(―)で3回洗浄する(5ml×3回)。トリプシン(0.5ml)を注入し、インキュベータ内に1分間放置する。BAECが剥がれていることを確認し、フラスコの側面を叩いて一カ所に集める。DMEM(10ml)を加え、懸濁液を遠沈管に移す。遠心分離にかける(800rpm、5分)。BAECの沈殿を確認したら、ピペットを用いて上澄みを吸い取る。DMEMを加え、よくピペッティングを行う。フラスコ1個につき5ml、シャーレ1個につき2ml培養フラスコ、基板の入ったシャーレに懸濁液を播き、インキュベータ内に15分放置する。フラスコ、シャーレ内にDMEMを吸い取る。PBS(―)で2回洗浄する。フラスコは5ml×2回、シャーレは2ml×2回。新たにDMEMを加える。フラスコ1個につき5ml、シャーレ1個につき2ml。再びインキュベータを継続する。3、4日に1度フラスコ、シャーレ内のDMEMを新しいものと取り換える。工程6~18を、期間をおいて繰り返すことによって定期的な細胞培養が可能となる。BAECは継代数Pc6~Pc10のものを扱った。細胞が古くなった場合新たに冷凍細胞を解凍し工程6とする。シャーレ(作製基板上にBAEC培養済)を倒立位相差顕微鏡で観察する。パターンニング確認はラインマスク(400μm、200μm)で行い、パターンニングが確認出来たサンプルはマスク間隔を操作し観察を行う。パターンニングが確認できないものはインキュベータの圧迫になるので破棄する。

○結果と考察：イメージングエリプソメトリーにより、マスクと同じ100μm幅、100μm間隔、段差数十nmのグリッドパターンを確認した。その表面上に細胞を播種し、顕微鏡で観測した。用いた血管内被細胞や星細胞は、形を持たず、単層で存在するので、接着力と繁殖力が弱い。パターンニングを達成することができた(図3)。アセト

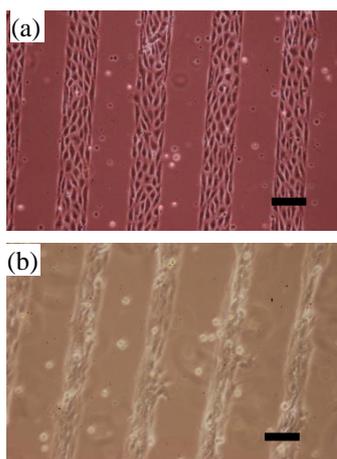


図3 (a)ウシ血管内皮細胞パターンニング。(b)ラット星細胞パターンニング。バーは、100 $\mu$ m相当。

ニトリルプラズマ重合膜表面には、窒素原子を多く含むために、細胞の接着性に優れているためである。血管内被細胞は、段差の大きさには依存しなかったが、星細胞は、段差が 20nm 以上でのみパターンニングが形成された。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① H. Muguruma, T. Hoshi, R. Fujita, T. Sumii, S. Kudo, “Adhesion and alignment of nonparenchymal cells onto a patterned surface with a two-step plasma polymerization process,” *Plasma Processes and Polymers*, 2015, in press.
- ② H. Muguruma, T. Hoshino, K. Nowaki, “Electronically type-sorted carbon nanotube-based electrochemical biosensors with glucose oxidase and dehydrogenase,” *ACS Applied Materials and Interfaces*, 2015, 7, 584-592.
- ③ T. Hoshino, T. Inoue, H. Muguruma, “Amperometric biosensor with composites of carbon nanotube, hexaamineruthenium(III)chloride, and plasma-polymerized film,” *IEICE Transaction on Electronics*, 2013, E96-C, 1536-1540.
- ④ T. Hoshino, H. Muguruma, “NADH sensing using

neutral red functionalized carbon nanotube/plasma-polymerized film composite Electrode,” *IEICE Transaction on Electronics*, 2012, E95-C, 1300-1303.

- ⑤ T. Hoshino, H. Muguruma, Selective detection of NADH with neutral red functionalized carbon nanotube/plasma-polymerized film composite electrode, *Electrochemistry*, 2012, 80, 85-87.
- ⑥ 六車仁志、ドライプロセスを基盤とするバイオナノ界面の作製評価およびバイオセンサへの応用、*Chemical Sensors*, 2012, 28, 62-70.

[学会発表] (計 13 件)

- ① K. Nowaki, Y. Shimizu, T. Hoshino, H. Muguruma, “Amperometric biosensor with electronic type-controlled single-walled carbon nanotube,” 8th International Symposium on Organic Molecular Electronics, 15-16 May, 2014, Tokyo, Japan.
- ② K. Nemoto, T. Naito, K. Nowaki, H. Muguruma, Amperometric biosensor based on multilayer containing glucose oxidase, carbon nanotube, plasma-polymerized film, and electron transfer mediator,” 8th International Symposium on Organic Molecular Electronics, 15-16 May, 2014, Tokyo, Japan.
- ③ H. Muguruma, T. Hoshino, R. Fujita, T. Sumii, S. Kudo, Patterning of Endothelial Cells and Hepatic Stellate Cells with Two Step Plasma-polymerized Processes, 5th International Conference on Plasma Medicine (ICPM5), Nara, Japan, 18-23 May 2014.
- ④ Y. Kase, H. Muguruma, Structure observation of enzyme embedded in plasma-polymerized film and its biosensor performance, ISPlasma2014 / IC-PLANTS2014:6th International Symposium on Advanced Plasma Science and its Applications for Nitrides and Nanomaterials / 7th International Conference on Plasma-Nano

Technology & Science, Nagoya, Japan 2-6 March 2014

- ⑤ Y. Kase, H. Muguruma, “An electron transfer-mediated amperometric biosensor based on plasma-polymerized thin film,” Bio4Apps 2013: International Conference on BioSensors, BioElectronics, BioMedical Devices, BioMEMS/NEMS and Applications 2013 & 5th Sensing Biology Symposium, 29-30 October, Tokyo, Japan.
- ⑥野脇航平、星野達也、六車仁志、カーボンナノチューブの電気物性が電気化学バイオセンサ特性に及ぼす影響、2015年電気化学会春季大会、第55回化学センサ研究会、2015年3月
- ⑦野脇航平、星野達也、六車仁志、電気物性が分離されたカーボンナノチューブを用いる酵素センサの動作機構の解明、2015年春季第62回応用物理学関係連合講演会、2015年3月
- ⑧六車仁志、星野達也、藤田陵介、隅井干城、工藤奨、二段階プラズマ重合法を用いる血管内被細胞および星細胞のパターニング、18a-PG5-4、2014年春季第61回応用物理学関係連合講演会、2014年3月
- ⑨内藤晃誠、井上貴博、星野達也、六車仁志、カーボンナノチューブと電子伝達媒介物質を用いる酵素センサ動作の低電位化、17p-B2-12、2013年秋季第74回応用物理学会学術講演会、2013年9月
- ⑩野脇航平、星野達也、六車仁志、電気的性質の分離したカーボンナノチューブとグルコース酸化酵素を用いるアンペロメトリックセンサ、17p-B2-13、2013年秋季第74回応用物理学会学術講演会、2013年9月
- ⑪菅原篤、岩瀬祐介、星野達也、六車仁志、電気物性が分離されたカーボンナノチューブとグルコース脱水素酵素を用いるバイオセンサ、17p-B2①-14、2013年秋季第74回応用物理学会学術講演会、2013年9月
- ⑫野村亮太、中村竜介、六車仁志、大気圧プラズ

マ重合による有機薄膜の作製評価、18a-C1-2、2013年秋季第74回応用物理学会学術講演会、2013年9月

- ⑬星野達也、六車仁志、プラズマ重合膜と金属性カーボンナノチューブを用いるグルコースバイオセンサ、2012年度電子情報通信学会ソサイエティ大会、2012年9月

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

六車 仁志 (MUGURUMA, Hitoshi)  
芝浦工業大学・工学部・電子工学科・教授  
研究者番号： 20309719

### (2)研究分担者

工藤 奨 (KUDO, Susumu)  
九州大学・工学(系)研究科・教授  
研究者番号： 70306926