

機関番号：16101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2008～2010

課題番号：20360056

研究課題名（和文）ボロンドープした半導体ナノダイヤモンドの開発と  
グルコースセンサーへの応用研究課題名（英文）Development of boron doped nano-diamond film and application  
for glucose sensor

研究代表者

村上 理一 (MURAKAMI RI-ICHI)

徳島大学・大学院リソテックサイエンス研究部・教授

研究者番号：00112235

研究成果の概要（和文）：

本研究は導電性ナノダイヤモンドの形成に最適なボロンドープ量を決定し、グルコースオキシターゼを広範囲に固定するための導電性ナノダイヤモンドの化学修飾する方法を開発したものである。また、グルコースオキシターゼを固定した導電性ナノダイヤモンド薄膜を用い、グルコースセンサーへの応用を試みた。その結果、導電性ナノダイヤモンド成膜時のボロン導入量が多いほど微量のグルコースを検出でき、再現性が高いことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have developed the surface treatment method to immobilize an enzyme on the boron doped nano-diamond film and we have also developed glucose sensor using immobilized enzyme on the boron doped nano-diamond film. As a result, we clarified the glucose sensor indicates high sensitivity when the diamond film has high boron concentration.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2009年度	5,600,000	1,680,000	7,280,000
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	4,530,000	19,630,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械工学，機械材料・材料力学

キーワード：材料加工・処理，導電性ダイヤモンド，グルコースセンサー，表面・界面物性

## 1. 研究開始当初の背景

絶縁体であるダイヤモンドにホウ素(B)をドープすると導電性を示すことが知られている。報告者らはこれまでにマイクロ波プラズマCVD法を使ってボロンドープダイヤモンド薄膜を作製してきた結果、ナノサイズのダイヤモンド結晶となることがわかっている。ナノダイヤモンドは、その粒境にsp<sup>2</sup>構造の炭素があり、マイクロダイヤモンドに比べて電子場放射効果や電気伝導性に優れている。

このような導電性を持つナノダイヤモンド薄膜表面に化学修飾を施すことで表面に酵素を結合させるとが可能になる。一方、従来の電極材料では固定した酵素による反応が起こる前に電極材料が酸化還元反応するので、酵素の作用によって生じた電流を正確に検出できない。これに対し、ボロンドープダイヤモンド薄膜の電位窓は約4Vと広いため、酵素反応が生じる電位でも導電性ダイヤモンドの酸化還元反応は生じない。したがって、

酵素を固定した導電性ダイヤモンドを用いると、酵素による酸化還元反応に伴う電流を検出可能となり、酵素反応量を即時に直接検出できる新しいバイオセンサとしての利用が期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究で用いる化学修飾法は、ダイヤモンド薄膜表面をカルボキシル基にしてバイオ物質と共有結合しやすい状態を作り出し、従来の接着剤による間接固定法に比較して簡便で強固な酵素の固定が実現できる特徴を持っている。一方、導電性ナノダイヤモンドは化学的に安定、かつ広い電気窓の性質を持つため電極材料として有望である。これまでに成膜に成功してきた導電性ナノダイヤモンド薄膜は、平均 50nm のナノダイヤモンド粒子の集合体であり、表面が平滑かつ化学修飾による末端が多数存在するため、酵素などの機能性有機物と強固に共有結合し、ナノダイヤモンド薄膜の表面で起こる酵素による電気化学反応が活発になると予想できる。しかし、導電性ナノダイヤモンド薄膜を利用してグルコースセンサーを開発するための技術的問題点として、1) ナノダイヤモンド基板上の広範囲にグルコースオキシターゼの固定化方法の開発、2) 酵素反応によって発生した電流の検出システムの開発がある。そのため、本研究では1) 導電性ナノダイヤモンドの形成に最適なボロンドープ量の検討、2) グルコースオキシターゼを広範囲に固定するのに適した導電性ナノダイヤモンドの検討、及び 3) 酵素反応検出に適した導電性ナノダイヤモンドの検討を目的とし、新しいグルコースセンサーの開発を試みた。

## 3. 研究の方法

### 3-1 供試材および成膜方法

基板には比抵抗  $10^{13} \Omega \text{ cm}$  のシリコンウェハーを使用した。まず、シリコン基板をダイヤモンドスラリーと耐水研磨紙で研磨後、アセトン中で超音波洗浄を行った。次にダイヤモンド結晶核の生成を促進するために、ダイヤモンドパウダーとエタノールの混合溶液中に基板を入れ、超音波洗浄機により傷付け処理を行った。

ボロンドープダイヤモンドの成膜にはマイクロプラズマ CVD 装置を使用した。成膜条件を表 1 に示す。成膜に際しては、流量を調整した水素(純度 99.9999%)を用い、一部の水素ガスはキャリアガスとしてバブラー

表 1 成膜条件

マイクロ波周波数	2.45 GHz
マイクロ波出力	250 W
原料水素ガス流量/ キャリア水素ガス流量	80 sccm/20 sccm
溶液中のボロン濃度	500~5000 ppm
成膜圧力	60Torr/90 Torr
基板温度	1073K/1173K
成膜時間	4 hours

を通してからチャンバ内に導入し、所定の圧力になるように調整した。図 1 にバブラーの概略図を示す。バブラーにはアセトン(純度 99.5%)とメタノール(純度 99.8%)を 9:1 の割合で合計 50ml 入れた。この溶液の中に任意の量の酸化ボロン粉末(純度 95%)を混ぜてボロン源とした。以上のようにして作製したボロンドープダイヤモンド薄膜被覆材を試験片として用いた。

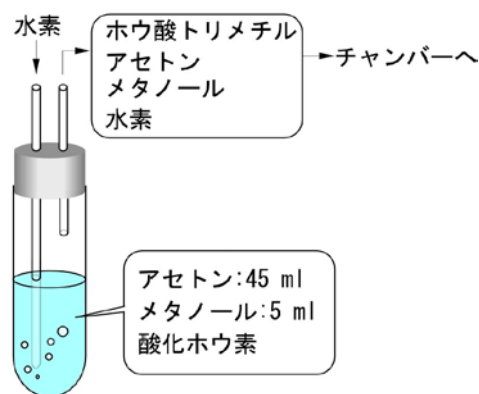


図 1 バブラーの概略図

### 3-2 化学修飾法および酵素固定化法

まず、ダイヤモンド表面のケトン化を行った。濃硫酸( $\text{H}_2\text{SO}_4$ :96%)と濃硝酸( $\text{HNO}_3$ :60%)を 9:1 の割合で混合させた。スターラーピースとともに三角フラスコに移し、ホットスターラー上で  $90^\circ\text{C}$  程度に加熱しながら混合した。溶液から気泡が発生するまで加熱を続け、気泡が発生したらテフロンテープで保護した試験片を溶液内に混入させ、30 分間反応させた。反応後、溶液から取り出した試験片を蒸留水で洗浄した。

次に薄膜表面のカルボキシル化処理を行った。水酸化ナトリウム(0.1M NaOH)を 50ml をかく拌しながらホットスターラーで加熱した。液温が  $90^\circ\text{C}$  になればケトン化処理後の試験片を加え、その状態のまま 2 時間反応させた。その後、試験片を取り出し蒸留水で洗浄した。続いて、塩酸(0.1M HCl)を 50ml をかく拌しながらホットスターラーで  $90^\circ\text{C}$  まで加熱した。その後、水酸化ナトリウム処理後の試験片を加え、その状態のまま 2 時間反応させた後、試験片を取り出し蒸留水で洗浄した。

酵素の固定化には化学修飾後の試験片を用いた。酵素にはグルコースオキシターゼ(GOD)を用いた。酵素とダイヤモンドの結合には EDC (1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)カルボジイミド塩酸塩)を用いたカルボジイミドカップリングを採用した。固定化は、EDC95.85mg, GOD 約 8000Unit を蒸留水に溶解させ、10ml とした後、試験管に入れ、表面修飾した試験片と 3 時間反応させた。

### 3-3 酵素反応測定

導電性ペーストを用いてカルボキシル基化させた試験片に銅線を接続し、検出部以外

の部分をつフロンテープを巻いて保護した。酵素反応による電流の測定にはポテンションスタットを用いた。酵素反応を図2に示し、実験の概略図を図3に示す。参照電極 RE 電極の側には塩化カリウム水溶液を満した。対電極 CE 電極と作用電極 WE 電極側には pH を 5 に調整した 0.1M クエン酸緩衝液の中にフェリシアン化カリウムを 200mM になるように混合した溶液を満した。塩橋はガラス管に塩化カリウム：寒天：純水を 30:3:100 の割合（質量比）で混合したものである。

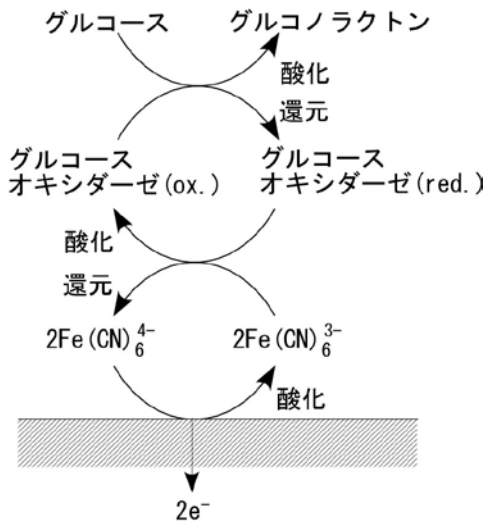


図2 酵素反応

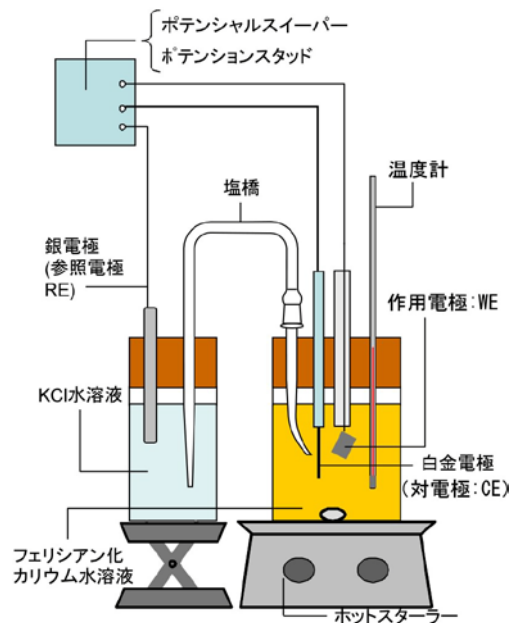


図3 装置の概略図

酵素は温度によって活性が変化し、酵素が作用を發揮する最適の温度を至的溫度が存在する。一般に反応速度は温度によって上昇するが、酵素はたんぱく質であるため高温では変質し、活性が逆に低下する。そのため、フェリシアンカリウム水溶液をホットスターラーで 30℃~40℃ になるように加熱し、ス

ターラーピースで攪拌しながら実験を行った。酵素活性反応は、フェリシアンカリウム液中に、一定時間ごとにグルコースを導入し、その時の電流の変化を測定することで、ダイヤモンド電極表面に存在するグルコースオキシターゼの酵素活性を測定した。実験条件を表2に記す。

表2 実験条件

温度	35℃
buffer種	0.1Mクエン酸緩衝液 (pH5.0)
電圧	450 mV
掃引速度	20mV/s

#### 4. 研究成果

##### 4-1 表面形状

図4に、薄膜表面のSEM画像を示す。これらの図から、いずれの成膜圧力においても、ボロン濃度が増加するほど粒径が増加していることがわかる。次に粒子の形状に着目すると、90Torrで成膜を行ったCVDダイヤモンドにおいて、ボロンを導入したものは多角形状の結晶が見られる。これに対し、60Torrで成膜したボロンドープダイヤモンドおよびボロンを導入していないCVDダイヤモンドのSEM画像ではカリフラワー型のダイヤモンドが見られる。ただし、これらは一つの結晶ではなく、グラファイトがダイヤモンドの周りを取り囲んでいる可能性も考えられる。

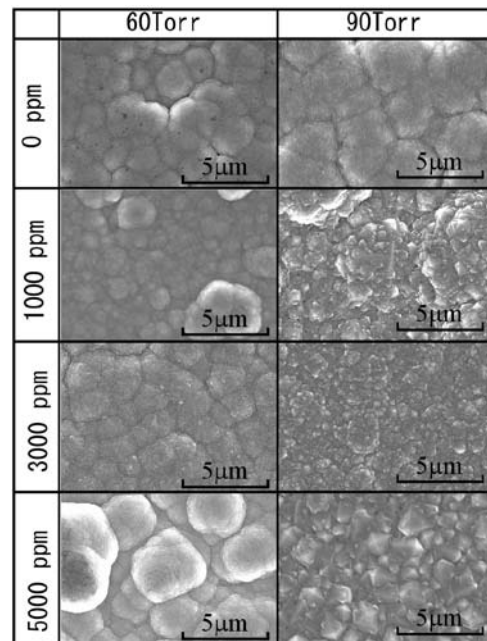


図4 ダイヤモンド薄膜表面の様相

##### 4-2 電気抵抗

四探針法を用いて薄膜の電気抵抗率の測定を行った。測定は各試料につき3回行い、平均値をその試料の電気抵抗率とした。図5に測定結果を示す。導入ボロン濃度を1000ppm以上にすると、薄膜の電気抵抗率は概ね1Ωcmを下回った。さらに導入ボロン濃

度を増加させることで、薄膜の電気抵抗率が低下していることがわかる。導入ボロン濃度が 10000ppm の場合では、その値を 0.03~0.04 $\Omega$  cm まで低下させることができた。R. Ramamurtiらは、本章の緒言で述べたジボランを用いた方法で導電ダイヤモンド薄膜を作製し、同様に測定を行っている。その結果は、およそ  $1\sim 10^{-3}\Omega$  cm であり、本研究での測定結果とほぼ同等の値である。このことから、本研究で用いたバブラーを用いた方法で作製した導電ダイヤモンド薄膜が、ジボランなどの気体を用いた方法で作製したものと遜色ない結果が得られていると考えられる。

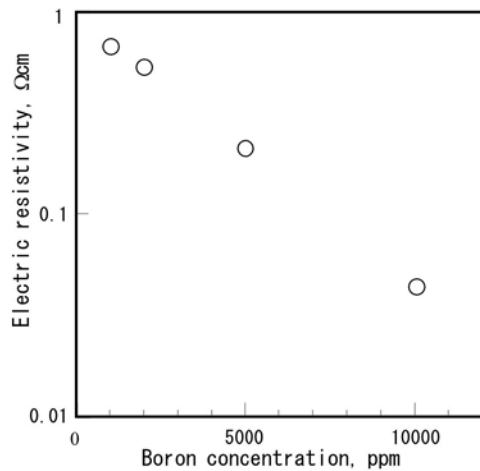


図5 ダイヤモンド薄膜の比抵抗

#### 4-3 酵素反応試験

図6に導入ボロン濃度5000ppmのBDD薄膜に酵素固定化処理を施した試験片で酵素反応量を調べた代表的な結果を表す。図中のcurrent NGはグルコースを添加せず、電圧のみを負荷した結果を示し、current Gは一定時間ごとにグルコースを添加した結果を示す。グルコース濃度は5分ごとに合計2mM, 4mM, 6mM, 8mM, 10mM, 20mM, 30mM, 40mM, 50mMとなるように添加していった。同図より、グルコースを添加しなかったものは、時間によって電流値に変化がないのに比べ、グルコースを添加したものはグルコース濃度に応じて電流値が増加していることが分かる。このことから、カルボキシル基化を行ったBDD薄膜表面ではグルコースオキシターゼが固定化され、添加したグルコースを分解することで電流が検出されたのであると考えられる。グラフにおいて経過時間15~25分のときと、37~40分のときに電流値が減少している。これは、その時間にホットスターラーでフェロシアンカリウム水溶液を加熱したため、それが外乱として影響したためであると思われる。

#### 4-4 導入ボロン濃度による比較

図7~9に、ボロン濃度1000ppm, 2000ppm, 10000ppmで成膜したボロンドープダイヤモンドに酵素を結合させた試験片でポテンシ

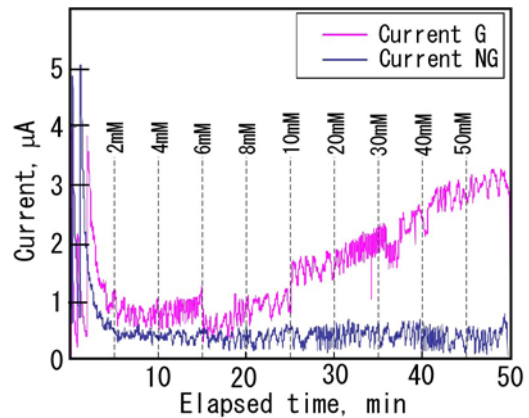


図6 酵素反応測定結果 (5000ppm)

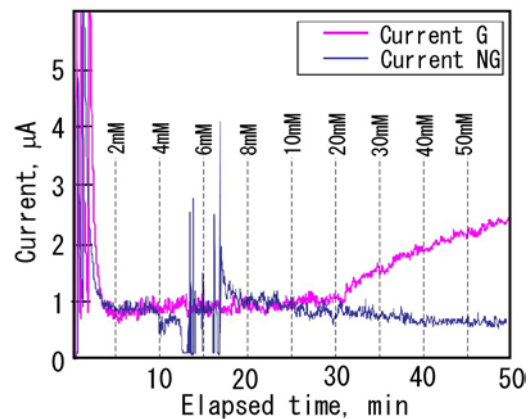


図7 酵素反応測定結果 (1000ppm)

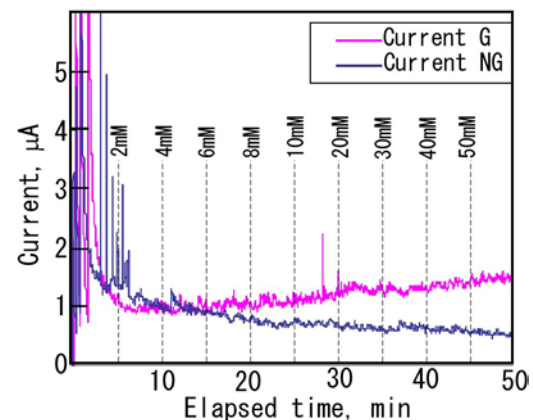


図8 酵素反応測定結果 (2000ppm)

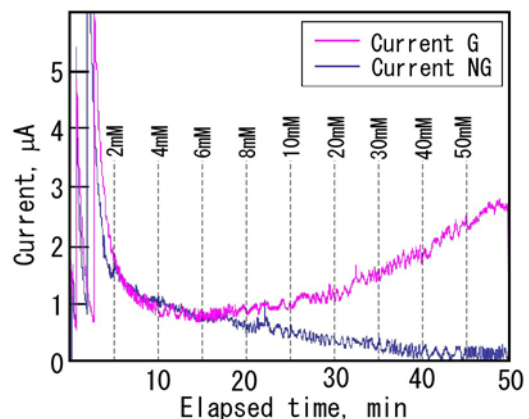


図9 酵素反応測定結果 (10000ppm)

ポテンシostatを用いた酵素活性量の測定を行なった代表的な結果である。すべての電極でグルコースの添加によりその濃度に応じた電流が検出された。電流の変化が生じたグルコース濃度に注目すると、ボロン濃度の低い1000ppmのものはグルコース濃度が20mMのときから電流値が増加し始めている。これは、1000ppmのボロン濃度で成膜したCVDダイヤモンド薄膜上に酵素を結合させた電極はグルコースに対する感度が低いことを表す。導入ボロン濃度2000ppmで成膜したものは1000ppmで成膜したものに比べ低いグルコース濃度で電流が検出できた。これは、2000ppmのものが1000ppmのものに比べ感度が良いことを示している。10000ppmのものは添加グルコース濃度が6mMよりも高めであるが、6mMを超えたところで急激に電流値が増加しており、グルコースに酵素が反応したことがはっきりと分かる。

次に、ボロン濃度とラマンピーク強度の比率の関係を図10示す。グラフはグラファイトとダイヤモンドピーク強度の比率を表したものである。ボロン濃度が2000ppmのときもっともグラファイトの量が多く、ボロン濃度が増加していくほどグラファイトの量が減少している。さらに、G-band/D-bandのラマンピーク強度比率でも2000ppmが最大でボロン濃度が増加するほど減少していく。これらの結果から、高いボロン濃度でしかグルコースの検出ができなかったのは、ボロンドープダイヤモンド中のグラファイトが原因であると考えられる。また、各グラフの電流値のぶれ幅もラマンピーク強度比に応じて変化している。グラファイトの量が多く、欠陥が多いほど電流値のぶれ幅が増加している。電流値が安定しないのは、薄膜表面上のグラファイトが電気抵抗に影響を与えるためだと思われる。

導入ボロン濃度の増加にしたがって薄膜表面上のグラファイトが減少する傾向が見られた。本実験で作成したCVDダイヤモンド薄膜がグラファイトがダイヤモンドの周りを取り囲んでいる構造を持っているとするならば、薄膜表面が水素終端となっている部分が薄膜中のグラファイト量に応じて少なくなる。薄膜に化学修飾を行っても水素終端となっている部分しかカルボキシル基に置換しないため、酵素との結合も行うことができない。また、グラファイトの量が多いと薄膜表面上の水素がカルボキシル基に置換しにくくなる場合も考えられる。これらの原因から、グルコースオキシターゼの結合量が少なくなり、グルコースが検出できなかったのだと思われる。なお、ボロン濃度500ppmのボロンドープダイヤモンドに関しては、電流値が測定できなかった。これは、ボロンドープダイヤモンドの電気抵抗値が高すぎて、電

極として機能しなかったためであると考えられる。

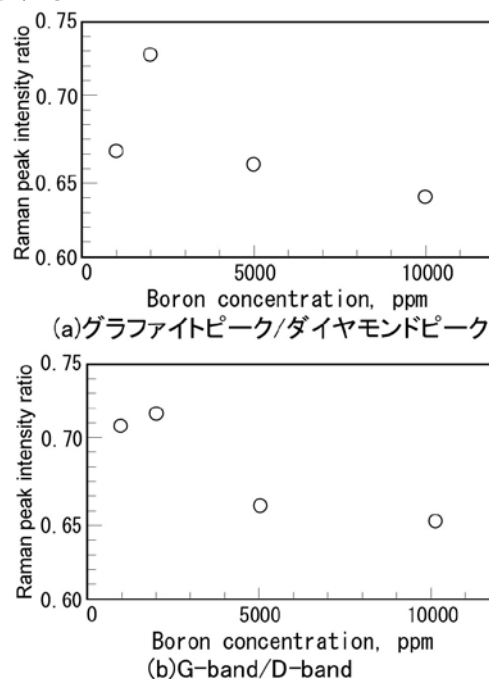


図10 ボロン濃度とラマン強度の関係

#### 4-5 酵素結合からの時間経過の影響

酵素を結合した直後にポテンシostatを用いて電流値の測定を行ったものと、同じ電極を1日-20℃の冷凍庫で保管し、電流値の測定を行った結果を図11に示す。グルコースオキシターゼを結合させた直後に電流値を測定したものがグルコースを添加した際の反応性がよい。これは、放置している間にグルコースオキシターゼが活性を失い、グルコースに反応するグルコースオキシターゼの数が減少したためであると考えられる。

#### 4-6 反応検出量に及ぼす導入ボロン濃度の

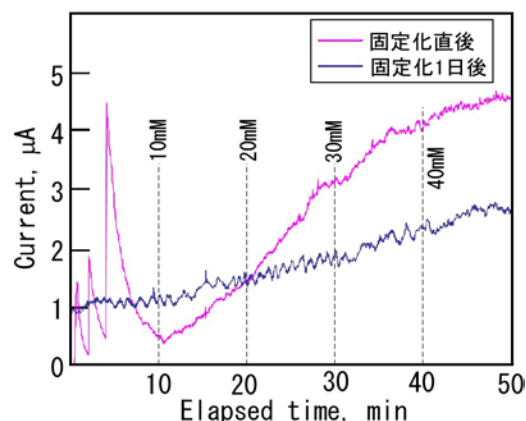


図11 固定化後の経過時間と検出感度

#### 影響

本実験では昨年度成膜したボロンドープダイヤモンドにグルコースオキシターゼを付着させ、ポテンシostatを用いて酵素活性を電氣的に測定した。ボロン濃度

5000ppm の CVD ダイヤモンドに酵素を結合させ、グルコースを添加したところグルコースの濃度に応じて電極に流れた電流が増加した。このことから、グルコースオキシターゼはボロンドープダイヤモンド表面上で正常に反応したと言える。導入ボロン濃度 1000ppm, 2000ppm, 5000ppm, 10000ppm の CVD ダイヤモンド電極においてもグルコースと電流値の検出ができたが、導入ボロン濃度 1000ppm のものは添加グルコース濃度が他よりも高い 20mM となってから電流値の検出が始まった。これは、導入ボロン濃度が低いとカルボキシル基終端となる表面積が減少してしまい、酵素が結合する量が少なくなったためであると思われる。また、同条件で成膜した試験片でも、導入ボロン濃度が 1000ppm および 2000ppm のダイヤモンド電極の場合はグルコースを検出することができないものがあった。これは、成膜時に圧力の微調整とバブラーの調整を手動で行なっているため、ボロン導入量が少ないものはその誤差を受けやすくなるためだと考えられる。

また、ラマンピーク強度と電流値の比較を行なったところ、ダイヤモンドに対してグラファイトのラマンピーク強度が低いダイヤモンド電極の方が、電流値のぶれ幅が小さかった。これらのことから、ダイヤモンド電極表面のグラファイトが少ないほど正確に電位の変化が測定でき、バイオセンサ用ダイヤモンド電極として適していると思われる。

各ボロン濃度別に成膜したボロンドープダイヤモンドにグルコースオキシターゼを結合させ、ポテンションスタッドを用いて電気的に測定を酵素活性を測定した。電極として作用したのは 1000ppm, 2000ppm, 5000ppm, 10000ppm であったが、安定してグルコースの検出ができたのはそのうち 5000ppm と 10000ppm のものだけであった。これは、導入ボロン濃度が小さいと表面にグラファイトが存在し水素終端となっている面積が少ないため、化学修飾を行ってもグルコースオキシターゼが十分な量だけ結合されなかったと考えられる。ラマンピーク強度比率から、グラファイトが少なくボロン濃度が高いものほど電流値のぶれ幅が少ない。そのため、ボロン濃度の高いボロンドープダイヤモンドが、低濃度のそれに比べてより正確にグルコースを分解した際に発生する電位を測定できるのではないかと考えられる。すなわち、本実験ではボロン濃度 10000ppm で成膜したボロンドープダイヤモンドが、バイオセンサ用のダイヤモンド電極として最も適していると言える。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- (1) Pankaj M. Koinkar, Sandip S. Patil,

Tae-Gyu Kim, D. Yonekura, Mahendra A. More, Dilip S. Joag, Ri-ichi Murakami, Enhanced field emission characteristics of boron doped diamond films grown by microwave plasma assisted chemical vapor deposition, *Applied Surface Science*, Vol. 257, pp. 1854-1858, 2011, 査読有り.

〔学会発表〕(計 3 件)

- (1) 石川洋三, 米倉大介, 村上理一, MPCVD 法により成膜した導電性ダイヤモンド薄膜の表面化学修飾の評価, 日本機械学会中国四国支部・九州支部合同企画 徳島講演会, 2010 年 10 月 16 日.

- (2) P. M. Koinkar, D. Yonekura, T. G. Kim, M. A. More, R. Murakami, Field emission investigation of boron doped diamond thin films synthesized by microwave plasma chemical vapor deposition : Effect of vacuum annealing, 2009 22nd International Vacuum Nanoelectronics Conference, pp.247-248, Hamamatsu, Japan, 22. July 2009.

- (3) K. Oka, D. Yonekura and R. Murakami, Electrochemical Properties of Boron-doped Diamond Deposited by Microwave Plasma CVD Method, International Conference on Advanced Materials Development & Performance 2008, Beijing, 14. Oct. 2008.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

村上 理一 (MURAKAMI RI-ICHI)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・教授  
研究者番号 : 00112235

### (2) 研究分担者

( )  
研究者番号 :

### (3) 連携研究者

米倉 大介 (YONEKURA DAISUKE)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・准教授  
研究者番号 : 70314846

コインカー パンカジ (Koinkar Pankaj)  
徳島大学・大学院ソシオテクノサイエンス  
研究部・助教