

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 18 日現在

機関番号：12614
 研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21360006
 研究課題名（和文）
 導電性 LB 膜を用いたソフトな電極形成技術の開発とバイオセンサへの応用
 研究課題名（英文）
 Electrical Conducting LB films as soft electrode and the application for biosensor
 研究代表者
 大貫 等 (Ohnuki Hitoshi)
 東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教
 研究者番号：60223898

研究成果の概要（和文）：水面上で薄膜形成を行うラングミュア・プロジェクト(LB) 法や溶液中で単分子形成を行う自己組織化膜(SAM)法は、デリケートな試料を乱すことなくその表面に薄膜形成することができる。本研究ではこの特性に注目し、金属的電気伝導特性を有する LB 膜や高い伝導特性を持つ SAM を用いて生体試料やナノ構造体への電氣的接触を確立することで、これまでデバイス応用が困難とされたソフトな物質群を素子化する技術を開発した。具体的な適用例としてバイオセンサおよび有機超薄膜デバイスの開発を行った。

研究成果の概要（英文）：The Langmuir-Blodgett (LB) technique or self-assembled monolayer (SAM) allows to form ultra-thin films on the soft materials such as biological functional proteins or nano-structure substances, without damaging their functions. In this research, we have developed the methods establishing electrical contact to soft materials by employing electrical conducting LB films and SAMs. Applying these methods, we have fabricated several new devices including biosensors and molecular devices.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
年度			
総計			

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎 ・ 応用物性・結晶工学

キーワード：バイオエレクトロニクス

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、これまでにLB膜を用いた超薄膜分子デバイスの研究開発を手がけ、平成18-20年度科学研究費基盤研究(C)「有機-無機複合ラングミュア・プロジェクト膜による新規グルコースセンサーの開発」において、酸化酵素を用いた超薄膜バイオセンサの試作を行った。この研究により、無機物質であるプルシアンブルー(Fe^{III}₄[Fe^{II}(CN)₆]₃、PBと

略)とグルコース酸化酵素(GOx)による有機-無機ハイブリッド系をLB膜内に構築すると、アンペロメトリー型バイオセンサとして振舞うことを見出した。このセンサはPBナノクラスターの触媒作用により非常に低い印加電圧で計測可能であるため、従来のセンサで問題となっていた他物質からの干渉電流の影響を排除した高精度の測定結果を与える。さらに厚さ数分子層の超薄膜がもたら

す高濃度領域での高い直線性、高速応答性など、これまでにない新規な特性を有する次世代型のセンサである。しかし一方で、固定化担体として超薄膜を用いるため固定化できる酵素数が限られてしまい、他センサに比べ電流信号強度が1-2桁小さいといった、センシング機能の重要な要素に問題があった。

問題を解決するためには、酵素反応を高効率で信号化する技術の開発が必要であると推定された。ごく最近、金属的な電気伝導特性を示す導電性LBでセンサ表面をコーティングしたところ、信号電流値が著しく増大する現象が見出された。この現象は、導電性LB膜が確立する電氣的コンタクトにより電極表面から離れた場所に位置するPBクラスターが活性化され、電流密度の増大が引き起こされたものと考えられた。すなわち導電性LB膜コーティングは、酵素を失活させることなくPBへの電氣的コンタクトを成立させており、本手法が非破壊でソフトな電極作成技術として活用可能なことを示した。

2. 研究の目的

本研究では、成膜時に与えるエネルギーが非常に小さく、たんぱく質等にも適用可能な成膜方法であるラングミュア・プロジェクト法(LB法)の利用を中心に、自己組織化膜(SAM)などを含めた超薄膜による接点形成技術を開発する。これらの手法は生体系物質やナノ構造体との適合性が非常に高く、これまで作成の困難であったソフトマテリアルのデバイス化を比較的簡単に実現することが可能になるものと推定される。本研究では、これら有機超薄膜による電氣的コンタクト形成技術により、ソフトマテリアルによる新しいデバイス構築を目的とする。具体的には次の4つの研究開発を行った：(1) アンペロメトリー型バイオセンサの高感度化、(2) SAM表面固定化酵素によるバイオセンシング、(3) 導電性LB膜電極によるトンネル接合デバイスの開発、(4) 超薄膜アフィニティーセンサの開発

3. 研究の方法

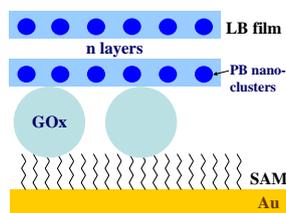


図 1

(1) アンペロメトリー型バイオセンサの高感度化

LB膜内に固定化されたPBとグルコース酵素(GOx)より構成される有機-無機ハイブリ

ッド系超薄膜バイオセンサをとりあげ(図1)、導電性LB膜による表面コーティングによる高感度化の効果を調べた。オクタデシルトリメチルアンモニウム分子(ODTA)をPB分散溶液上に展開し、Au基板上にLB膜形成を行うと、PBナノクラスターを含むLB膜が得られる。このLB膜をGOx溶液中に浸漬することで、PB-GOx複合系LB膜が形成される。さらに、この表面に金属的導電性を示すBEDO-TTF:ステアリン酸の1:1混合分子系LB膜(BO/SA LB膜)をコートした。本試料のグルコースに対するアンペロメトリーバイオセンサ特性を未コート試料の特性と比較し、導電性LB膜コーティングの効果を明らかにした。

(2) SAM表面固定化酵素によるバイオセンシング

(1)のLB膜中に固定化したGOxの研究結果より、アンペロメトリーバイオセンサにおいては電氣的接触の増大が信号強度の増強に大きな役割を果たすことが分かった。ここではこの知見を、SAM上に固定化した超薄膜GOxの信号増大に適用した。アンペロメトリーバイオセンサでは、膜を薄くすることで酵素反応に必要なO₂へのアクセスが容易になり、センサの測定可能範囲である直線領域が飛躍的に増大することが知られている。しかし超薄膜では固定化されるGOx量に限りがあるため微弱な信号強度が問題となっていた。そこで比較的電流を流しやすい分子のSAMを用いることで、信号の増大を目指した。

実験では電気伝導特性の異なるSAMを取り上げ、それぞれの表面上にGOxを固定化し、グルコースに対する応答電流の大きさを比較した。

(3) 導電性LB膜電極によるトンネル接合デバイスの開発

最も基本的な有機超薄膜であるAu基板上的アルカンチオールは、非常に良く整った単分子膜を形成することが知られている。このSAMに対し、SPM針先などで金属-絶縁体(SAM)-金属(MIM)接合を形成すると、接合間を流れる電流はSAM層をポテンシャル障壁とするトンネル現象に支配されることが見出された。しかしSAMを乱さずにMIM構造を作成することの難しさから、これまでナノサイズの接合面で研究が進められてきた。そこで本研究では、導電性LB膜によるソフトな電極形成を適用し、マイクロメートルサイズでのトンネル接合の作成を目指した。

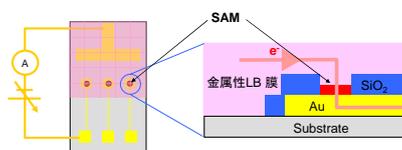


図 2

アルカンチオールSAMによるトンネル接合素子の構造を図2に示す。Au表面をSiO₂絶縁層で覆い、エッチングにより250μmのAu露出部を作成してこの部分にSAMを作成した。さらに、別の部分に形成したAu対極と共に、SAM表面を金属的な電気伝導特性を示すLB膜(BEDO-TTF:ステアリン酸の1:1混合LB膜)で覆った。その結果、Au-SAM-金属性LB膜の接合構造がAu露出部に形成された。トンネル現象は、接合部分における電流-電圧特性を測定することにより評価した。

(4) 超薄膜アフィニティセンサの開発

アフィニティバイオセンサは抗原-抗体反応・DNAハイブリダイゼーション反応などの選択的な吸着反応を検知するセンサである。このタイプのセンサは医療分野における適用範囲が広く将来の発展性が見込めるため、現在活発に研究が行われている。特に診断現場で使用可能な非標識タイプセンサの開発が望まれている。我々はくし型電極と導電性LB膜を電気化学インピーダンス(EIS)法に適用することで、高感度計測が可能な非標識アフィニティセンサが構築できると考えた。

本研究ではヒト免疫グロブリン(IgA)を検知するセンサを試作した。すなわち、Auくし型電極上にIgAと抗原-抗体結合する抗IgA抗体を固定化し、この認識部位におけるIgA吸着量をEIS測定により評価するセンサを作成した(図3)。また、同様のメカニズムで動作する、アビジン固定化くし型電極を用いるビオチンセンサを試作した。さらに表面を導電性LB膜で覆うことにより電極間ギャップを実質的に狭め、より効率的な信号変換ができるものと推定される。

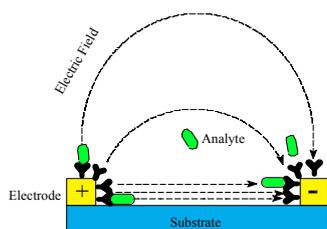


図3

4. 研究成果

(1) アンペロメトリー型バイオセンサの高感度化

図4は、導電性BO/SA LB膜コーティングを施した試料(赤)と通常試料(青)でのグルコース応答特性を比較したグラフである。1回目測定を実線、2回目測定の結果を点線で示す。また矢印は、1mMに相当するグルコースの100s毎に投入した際のタイミングを示している。図より、全ての試料においてグルコース投入と共に系を流れる電流密度が

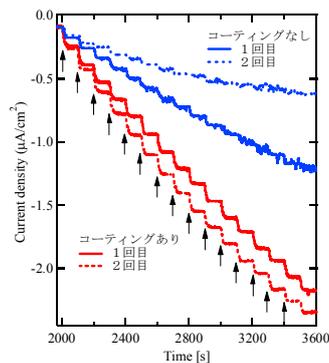


図4

大きく変化し、階段状のプロファイルとなるのが分かる。コーティング試料と通常試料を比較すると、コーティング試料では約二倍の電流密度が得られ、大幅な電流値の増大が実現されていることが分かる。さらに従来試料ではグルコース濃度が高くなるに従い、信号のノイズ成分が増大する傾向があるが、コーティング試料ではノイズ成分が全濃度領域で非常に小さく抑えられている。従って、導電性LB膜コーティングはセンサ性能の顕著な向上をもたらすことが明らかである。

注目すべき点は、コーティング試料の2回目計測における再現性の高さである。通常試料では、2回目測定において大幅な電流密度の減少がみられ、センサ性能は劣化してしまう。ところが、コーティング試料では1回目と2回目ではほぼ同じプロファイルとなり、同一の性能を保っている。このことは、導電性LB膜コーティングによりPBおよびGOxの脱離が防止され、高い再現性が実現される可能性を示唆している。この点を確認するため、アンペロメトリー計測前後の変化を、赤外反射吸収スペクトルにおいて比較した。すると、アンペロメトリー計測後に通常試料ではGOxおよびPBが脱離するが、コーティングを施した試料では殆ど脱離しないことが分かった。

これらの実験結果を模式図にまとめたものが図5である。表面付近に存在するPBナノクラスターは通常試料では電気的な孤立状態であるため不活性であるが、導電性LB膜コーティングを施すと電気的な接触が確立されて活性化し、新たな電流を生成する。結果的にコーティング試料ではグルコース1mM当たりの生成電流密度(センサ感度)が増大する。また、導電性LB膜は、小さなグ

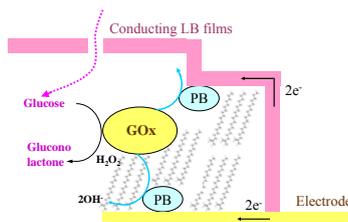


図5

ルコース分子は透過させるが、大きな GOx や PB は内部に保持する性質がある。このようなフィルター効果により GOx や PB の脱離が抑制され、高い再現性が実現されていると考えられる。

(2) SAM 表面固定化酵素によるバイオセンシング

本研究で取り上げた SAM 構成分子は、長さの異なるアルキル鎖、またはベンゼン環を有するチオール分子である (図 6)。これらは垂直方向における SAM 膜の電気伝導特性が大きく異なっており、この違いがセンサ特性にどのような影響を及ぼすか調べた。

各 SAM 終端の COOH 基を 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)

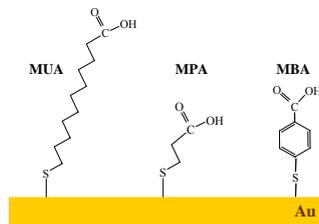


図 6

carbodiimide hydrochlorid と N-hydroxysuccinimide (NHS) で活性化した後、GOx 水溶液に 12h 浸漬することで GOx を SAM 表面に化学結合させた。SAM 膜に含まれるピンホール等の欠陥の割合を評価するため、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ を含む溶液中でサイクリックボルタメトリー (CV) 測定を行った。また GOx 固定化を評価するため、赤外反射吸収スペクトル法 (IR-RAS)、および原子間力顕微鏡 (AFM) 測定を行った。

Au および各種 SAM における CV 測定の結果を図 7(a) に示す。Au において観察される、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ 酸化還元に対応する大きな電流ピークは、各種 SAM 表面では減少するのが分かる。これは SAM 形成により $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ の電極への接近が阻害されるためであり、逆に言えば、ピーク電流の大きさは SAM 中でのピンホール形成を反映している。すなわち MPU は緻密な膜を形成するが、MBA、MPA となるに

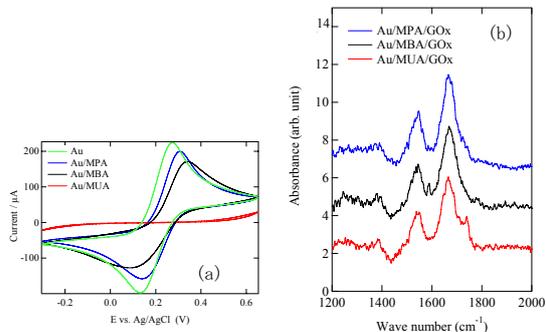


図 7

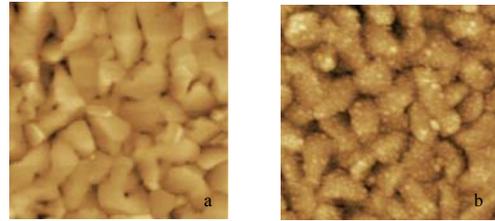


図 8

従いピンホールの割合が増加し、これらの試料では被覆率の大幅な低下が推定される。一方、SAM の表面に GOx を固定化した試料の IR-RAS 測定では、GOx に由来するアミド I・II の吸収ピークの強度が SAM の種類に関わらず一定であり、これにより GOx の固定化量は SAM 層によらないことが分かった (図 7(b))。

ピンホールの数によらず GOx 吸着量が一定となるメカニズムを調べるため、MPA-SAM 上の GOx を AFM で観察した (図 8)。左図 (a) は GOx 吸着前、右図 (b) は GOx 吸着後のイメージである。解析の結果、GOx は 5-6 個の GOx 分子からなるクラスターを形成し、表面に結合されることが明らかになった。

上記の結果より、SAM 上での GOx は図 9 のように考えると全ての結果を矛盾なく説明できる。すなわち、GOx はクラスターを形成し、このクラスターが下地である SAM のピンホールの数に影響されることなく 2 次元的な充填構造で固定化されるため、GOx 総量は一定となる。

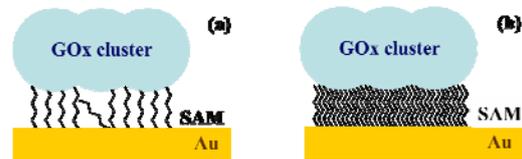


図 9

SAM の電気伝導特性による違いはアンペロメトリー型バイオセンサに大きく影響を与える。図 10 は、異なる SAM を用いた際の、出力電流密度とグルコース濃度の関係をプロットしたグラフである。MBA、MPA、MUA の順で電流密度の生成が減少していくのが観察された。GOx 固定化量は一定であることから、電流密度の変化は SAM 特性により引き起こされる変化である。電流は SAM 層を横切って電極に到達することから、SAM の厚さ方向の電荷伝達効率 (charge transfer rate) の違い (MBA:MPA:MUA=39:1:4 $\times 10^{-5}$) と考えると、実験結果を定性的に説明することができることが判明した。

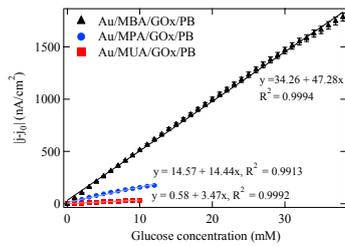


図 10

(3) 導電性 LB 膜電極によるトンネル接合デバイスの開発

はじめに、金属的導電性を有する BO/SA LB 膜がソフトな電極として有効に動作するか確認するため、SAM 膜形成のない Au 電極上に導電性 LB 膜を累積した試料の電流-電圧特性を測定した。オームの法則に従った直線的な特性が得られることから、導電性 LB 膜は良好な電極として使用可能であることが分かった。

次に MIM 構造を、炭素原子 12 個から成る長鎖アルキル基を有するアルカンチオール SAM である C12-SAM を電極上に形成し、さらに BO/SA LB 膜を累積して作成した。この素子の電流-電圧特性を図 11 に示す。図より分かるように、この試料ではオームの法則に従わない非線形な振る舞いが見られた。これら二つの電流-電圧特性の違いは、C12-SAM の有無によってもたらされている。過去の研究では、SAM 膜の膜厚方向における電荷移動はトンネル過程で説明可能との結論が示されている。そこで本研究での測定結果も、同様にトンネル過程で説明可能であるかについて検討した。

ここでは、最も単純なポテンシャルモデルである Simmon モデルによるシミュレーションを行った。本モデルでは、両端の金属電極のフェルミレベルは一致していると仮定し、矩形のポテンシャルの障壁高さとして SAM の膜厚と LB 膜のアルキル鎖長の和の 45 Å と固定できる。図 11 にポテンシャル障壁の高さを 1.45eV、障壁幅を 45Å とした場合のシミュレーション結果を示す (図 11 実線)。図より、このシミュレーション結果が実験をよく再現することが分かる。一方、過

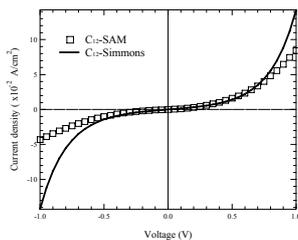


図 11

去の研究において、アルキル鎖のポテンシャル障壁高さが Au フェルミレベルに対し 1.42 eV と求められおり、この値は本シミュレーションでの 1.45eV とほぼ一致している。従って、本実験で得られた非線形な電流-電圧特性は、SAM 膜が形成するポテンシャル障壁を電子が通過する際のトンネル現象に起因ものと結論することができる。なお、同様の振る舞いはアルキ鎖長の異なる C18-SAM においても認められている。本試料に対しても同じく Simmon モデルによるフィッティングより、ほぼ同一の障壁高さが得られた (1.58eV)。

(4) 超薄膜アフィニティーセンサの開発

フォトリソグラフィを用いて石英基板上に電極間隔 20 μm の Au/Ti くし形電極パターンを作製した。この表面上に MPA SAM (図 12) を形成し、その後に EDC/NHS により COOH 終端を活性化して anti-IgA を化学結合により固定化した。

くし形電極間に微弱な交流電場を印加し、その応答電流を周波数ごとに計測する交流インピーダンス法 (EIS) によりセンサ特性を調べた。濃度の異なる IgA 抗体溶液中に試料を浸漬し、 $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-/4-}$ を含む溶液中で範囲で測定したスペクトル (1 Hz - 100 kHz) の Nyquist プロットを Fig. 2 に示す。図に示されるように、浸漬した IgA 濃度の上昇とともに、高周波側 (図の左側) の半円の大きさが増大するのが確認された。半円の直径は表面での電荷伝達に伴う抵抗 (電荷移動抵抗: R_{ct}) に相当することから、抗原-抗体反応による IgA 吸着が引き起こされ、電荷移動抵抗が増大したことが分かる。

等価回路によるシミュレーションを通じて半円の直径に相当する R_{ct} を正確に求め、その初期状態からの変化量 ΔR_{ct} を IgA 対数濃度に対してプロットしたグラフが図 13 である。IgA 濃度 0.1-100 ng/mL において直線

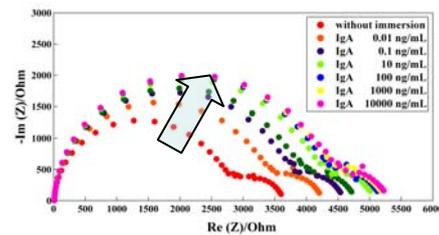


図 12

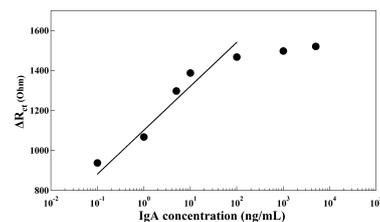


図 13

的な関係が見出せることから、試料はこの濃度範囲における IgA センサとして用いることができる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

① 大貫 等、遠藤 英明、今久保 達郎、和泉 充、有機-無機ハイブリッド超薄膜によるバイオセンサの開発、電気学会論文誌A、査読有、Vol. 130, 2010, pp.141-146, https://www.jstage.jst.go.jp/FF01S040Init/char/ja/?sourceurl=%2Farticle%2Fieejfm%2F130%2F2%2F130_2_141%2F_pdf

② Huihui Wang, Mitsuru Izumi, Hideaki Endo, and Hitoshi Ohnuki, Preparation of amperometric biosensor based on organic-inorganic hybrid system, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 査読有, Vol. 35, 2010, pp. 327-330.

③ T. Muramatsu, H. Ohnuki, H. Ushio, K. Hibi, M. Igarashi, T. Hayashi, H. Ren, and H. Endo, Int. J. Environ. Anal. Chem., 査読有, Vol. 91, 2011, pp. 161-173, DOI: 10.1080/03067319.2010.500725.

④ Huihui Wang, Hitoshi Ohnuki, Hideaki Endo, and Mitsuru Izumi, Thin Film Biosensor Based on Organic-inorganic Hybrid System, Transactions of the Materials Research Society of Japan, 査読有, Vol. 36, 2011, pp. 161-164.

⑤ Huihui Wang, Hitoshi Ohnuki, Hideaki Endo, and Mitsuru Izumi, Preparation of Amperometric Glucose Biosensor Based on 4-Mercaptobenzoic Acid, Physics Procedia, 査読有, vol. 14, 2011, pp. 2-6, DOI: 10.1016/j.phpro.2011.05.003.

⑥ Kengo Mochizuki, Hitoshi Ohnuki, Keiichi Ikegami, Tatsuro Imakubo, and Mitsuru Izumi, Fabrication of Metal-Insulator-Metal Junction with Metallic Conductive Langmuir-Blodgett Films, Physics Procedia, 査読有, vol. 14, 2011, pp. 134-138, DOI: 10.1016/j.phpro.2011.05.003.

⑦ Huihui Wang, Hitoshi Ohnuki, Hideaki Endo, and Mitsuru Izumi, Organic-Inorganic Hybrid Ultra-Thin Films Applied to Glucose Biosensors, IEICE Transactions on Electronics, 査読有, vol. E94-C, 2011, pp. 1855-1857, DOI:

10.1587/transele.E94.C.1855.

⑧ Huihui Wang, Hitoshi Ohnuki, Hideaki Endo, Mitsuru Izumi, Effects of self-assembled monolayers on amperometric glucose biosensors based on an organic-inorganic hybrid system, Sens. Actuators B: Chem., 2012, pp. 249-255, DOI:10.1016/j.snb.2012.04.018.

[学会発表] (計 25 件)

① Hitoshi Ohnuki, Kengo Mochizuki, Keiichi Ikegami, Tatsuro Imakubo, and Mitsuru Izumi, Fabrication of soft electrode with metallic conducting Langmuir-Blodgett films, 13th International Conference on Organized Molecular Films, 2009.3.15-19, Tours (フランス)

他 24 件

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: ラングミュア・プロジェクト絶縁薄膜およびその作成方法

発明者: 池上敬一、杉本 崇、蛭名武雄、星靖、大貫 等、望月健吾

権利者: 産業技術総合研究所, 東京海洋大学

種類: 特願

番号: 2010-47499

出願年月日: 2010. 3. 4

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大貫 等 (Ohnuki Hitoshi)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・助教
研究者番号: 60223898

(2) 連携研究者

遠藤 英明 (Endo Hideaki)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号: 50242326

(3) 連携研究者

今久保 達郎 (Imakubo Tatsuro)

長岡科学技術大学・工学部・準教授
研究者番号: 60291332

(3) 連携研究者

和泉 充 (Izumi Mitsuru)

東京海洋大学・海洋科学技術研究科・教授
研究者番号: 50159802