総合論文

プラズマ重合膜を用いる新世代バイオセンサー

六車 仁志^{®1}, 平塚 淳典²

Plasma-polymerized thin film for biosensors of a new generation

Hitoshi MUGURUMA¹ and Atsunori HIRATSUKA²

¹ Department of Electronic Engineering, Shibaura Institute of Technology, Shibaura 3-9-14, Minato-ku, Tokyo 108-8548

² Laboratory of Advanced Bioelectronics, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology, Katakura-chou 1404-1, Hachioji-shi, Tokyo 192-0982

(Received 23 January 2004, Accepted 5 March 2004)

A biosensor is a device that converts information on the concentration of chemical or biochemical substances into a quantifiable electronic signal. The typical structure of a biosensor is an integrated product utilizing biological components and transducers. We have indicated that plasma-polymerized thin films have potential for use in the interfacial design between these two components for biosensors. A plasma-polymerized film was achieved in a plasma in the vapor phase. The properties of the film are that they: (i) are extremely thin ($<1\ \mu\text{m}$), (ii) provide good adhesion to the substrate, (iii) are pin-hole free and present a flat surface structure, (iv) are mechanically and chemically stable because of the highly branched and cross-linked structure in the polymer, and (v) allow for large amount of biological components, such as enzymes and antibodies, to be loaded onto the surface of the film. Recently, the trend in biosensors can be addressed concerning two main aspects. One is a micro total analytical system and/or a micro electro mechanical system, which is an analytical system integrated into one chip in order to reduce the solvent, the amount of the sample, and the time and cost of analysis. The other is a post genome research tool, such as a DNA or a protein chip; the former allows an easy and rapid analysis for gene expression and single-nucleotide polymorphism; the latter allows proteome analysis *e.g.*, a capillary electrophoresis chip and analysis for biospecific interaction. In this article, we stress the usefulness of plasma-polymerized films and/or a process for a new generation of biosensors.

Keywords : plasma-polymerized film; immobilization matrix; biosensor; micro total analytical systems; micro electro mechanical systems; surface plasmon resonance; mediator; DNA chip; protein chip; capillary electrophoresis chip.

1 はじめに

特定の化学物質を測定する際、測定試料中には、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、通常の測定では、試料の煩雑な前処理やクロマトグラ

フィーのような大掛かりな装置を必要とする。バイオセンサーは、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、実時間での計測、試料の前処理が不要などの利点があり、医療、環境、農林水産、発酵・醸造、食品などの幅広い分野で利用されている。

バイオセンサーは、1960年代に発明された。それは、グルコースオキシダーゼという酵素と酸素電極を組み合わせたグルコースバイオセンサーである¹⁾²⁾。酵素の基質特異性により実試料（血液、培養液など）の前処理を行うこ

¹ 芝浦工業大学工学部電子工学科: 108-8548 東京都港区芝浦3-9-14

² 独立行政法人産業技術総合研究所バイオニクス研究センター: 192-0982 東京都八王子市片倉町 1404-1

となく、グルコース量を測定できる。この型の酵素センサーは、「酵素修飾電極」と呼ばれ、様々な企業によって製品化されている。現在では、バイオセンサーの概念は次のように確立されている。すなわち、バイオセンサーは2つの部分から構成され、1つは目的とする物質のみを認識する部分（分子識別素子）であり、もう1つは認識したという情報を電気的な信号などに変換する部位（信号変換素子）である。前者は生物由来のもの（主に生体分子）を用いるために「バイオ」センサーと呼ばれる。

分子識別素子に酵素を利用する酵素センサーは、酵素反応の前後に増減する電気化学種を電極で検出する。酵素の触媒作用を利用しているのでキャタリティックバイオセンサーと分類される。生体分子は、酵素のほかにも、抗体、DNA、レセプターなどがある。これらを分子識別素子として利用したバイオセンサーは、表面プラズモン共鳴バイオセンサー³⁾、水晶振動子バイオセンサー⁴⁾、DNAチップ^{5)~7)}などがあり、1990年以降に実用化された。しかし、抗体やDNAを利用するバイオセンサーは、酵素を利用するセンサーと本質的な違いがある。それは、これらの生体物質は結合するだけで終わり（ただし、生体内ではこれに続くアクションはある）で、触媒作用がない。触媒反応は、増幅作用を伴っている上、対象となる化学物質（グルコースなど）は数十mMと比較的高濃度に存在する。したがって、実用化も比較的容易であった。これに対し、対象となる物質（抗原、DNA、ホルモンなど）は極微量（数pM~数十nM程度）であり、増幅作用がないため高感度検出となり、開発が容易ではなく、キャタリティックバイオセンサーよりも遅れて実用化されたのである。特別な信号変換素子を利用することが特徴であるので、それらの名前から、表面プラズモン共鳴バイオセンサー、水晶振動子バイオセンサーなどの名称で呼ばれる。これらのバイオセンサーは、アフィニティバイオセンサーと分類される。

バイオセンサーの最近の動向としては、次の2点が考えられる。1つは、センサーシステムの小型・集積化である^{8)~11)}。酸素電極、流路及び試料挿入口などを小型化し、数cm角のチップ上に集積化することである。このことにより、微小な試料を利用できたり、測定に使用する溶液の量を少なくできたりする。このような技術は、 μ TAS (micro total analytical systems) 又はMEMS (micro electro mechanical systems) と呼ばれる。もう一つは、ポスゲノムにおけるツールである。発現解析や一塩基変異多形をより簡便に遂行できるDNAチップ^{5)~7)}、遺伝子情報に基づいて発現されるタンパク質群であるプロテオーム解析のためのプロテインチップ¹²⁾¹³⁾が挙げられる。後者は、タンパク質の分離解析及びタンパク質や核酸などとの相互作用解析などが中心である。以上のように、バイオセンサーは

「新世代」に入ったと考えられる。新世代バイオセンサーの作製には、半導体技術やマイクロマシーン技術を使用する。ところが、これらの技術はドライプロセスであるのに対して、生体分子は、水溶液中において機能を発揮する。このような状況下では、既存物を組み合わせる手法ではなく、トータルの視点からの設計製作が必要となってくる。

著者らのグループでは、様々な種類やタイプのバイオセンサーの研究を行ってきたが、それらのバイオセンサーを設計製作する上でプラズマ重合膜の有用性について示してきた。例えば、膜表面に生体分子を導入しやすかつドライプロセスで作製されるプラズマ重合膜は、バイオセンサーにおける分子識別機構と信号変換技術を結び付ける「インターフェース設計」として有用である¹⁴⁾。本論文では、新世代バイオセンサーの設計製作におけるプラズマ重合膜の意義について総合的に議論する。

2 プラズマ重合膜

本節では、プラズマ重合膜の概略を述べる。プラズマ重合は、有機モノマーを真空中のグロー放電又はプラズマ状態で重合させポリマー薄膜を直接基板上に形成する技術である¹⁵⁾。このプラズマ重合膜は、(1) 10~100 nm オーダーのピンホールフリーの精密で均質な非晶質膜である、(2) 基板への付着性がよい、(3) 耐熱性及び耐薬品性に優れている、などの性質がある。これらは従来のポリマー膜にない性質であり、3次的に高密度に高架橋化した構造に起因する。

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たい積する。Fig. 1に典型的なプラズマ重合装置を示す。成膜のパラメーターは、放電電力、流量、圧力、基板の位置、基板温度、チャンバーの形状、などが挙げられる。重合反応が高エネルギーのプラズマ中で進行するので、モノマーには不飽和結合が存在しなくても重合可能である。基本的には、どのようなモノマーでも成膜可能である。通常のポリマー（ポリエチレンなど）は繰り返し単位を持つが、プラズマ重合膜の場合はモノマーガスにエチレンを使用したとしても通常の構造にならず、高密度に3次元に架橋化した膜が得られる。また、膜形成の後、適当なガスでプラズマ処理を行うと膜表面にアミノ基¹⁶⁾、チオール基¹⁷⁾、カルボキシル基¹⁶⁾のような官能基を容易に導入することができ、これを利用して膜表面に生体分子を多量に固定化できる。本稿で取り上げるプラズマ重合膜のモノマーは、窒素含有化合物（アセトニトリル、エチレンジアミン¹⁸⁾、1,6-ヘキサジエン¹⁹⁾及びヘキサメチルジシロキサン²⁰⁾である。窒素含有化合物がモノマーのプラズマ重合膜は、窒素と炭化水素が混在したマトリックスを持つため親

Fig. 1 Schematic representation of typical apparatus for plasma-polymerized films

水性であり、膜表面にはアミノ基が高密度に存在する。そのアミノ基は、生体物質との固定化に利用できる。ヘキサジェンがモノマーのプラズマ重合膜は、炭化水素が高度に架橋された三次元マトリックスで、基本的にはプラズマ重合ポリエチレンと同様の構造を持つ。ヘキサメチルジシロキサンモノマーのプラズマ重合膜は、シロキサンが骨格のマトリックスを持ち、疎水性であり、シリコンやガラス表面へ密着性がよいことが知られている。

プラズマ重合は、現象自体は古くから知られていたが、その重合膜が、プラスチックの接着性向上のための表面処理⁽²¹⁾⁽²²⁾、金属腐食防止のためのコーティング⁽²³⁾⁽²⁴⁾、淡水処理のための逆浸透膜⁽¹⁸⁾、コンタクトレンズの表面コーティング⁽²⁵⁾、半導体デバイスのパシベーション⁽²⁶⁾、光導波路⁽²⁷⁾、などに利用されたところから注目されるようになった。また、ガスセンサーの感応膜⁽²⁸⁾⁽²⁹⁾としても利用されている。

3 キャタリティックバイオセンサー

キャタリティックバイオセンサーは、その名のとおり生体触媒（酵素）を利用している。酵素反応によって電極活物質の増減を電極で電気化学的に検出する。「酵素修飾電極」のことであり、酵素センサーのことである。プラズマ重合膜の酵素センサーへの利用は、Kampfrath ら⁽³⁰⁾やYoshimura ら⁽³¹⁾によって以前から報告されていたが、以下に取り上げるように著者らのグループによって多用されるようになった。

3・1 薄膜グルコースバイオセンサー⁽³²⁾⁽³³⁾

市販されているグルコースセンサーは内部液を含む酵素

Fig. 2 Procedure of device fabrication

1: Glass substrate (10 × 20 mm); 2: Hexamethyldisiloxane plasma-polymerized film; 3: Platinum electrodes sputtered onto the surface through a metal mask; 4: Acetonitrile plasma-polymerized film, introducing amino groups onto the surface; 4': 3-(Aminopropyl)triethoxysilane layer; 5: Immobilized glucose oxidase via glutaraldehyde

電極（クラーク型）を修飾した基本構造を持つ。これに対して、電極を半導体技術で容易に作製できるようになり、バイオセンサーの構造もより微小になってきた。このセンサーは、プレーナー型で一度に複数作製でき、薄膜バイオセンサーと呼ばれる。このような観点から、Fig. 2 に示す構造のグルコースセンサーを作製した⁽³²⁾⁽³³⁾。ガラス基板上にスパッタリング法で白金薄膜を作製し、それをアセトニトリルのプラズマ処理を行った。この処理で白金薄膜は約 100 nm のプラズマ重合膜によってコートされる。この膜表面には多数のアミノ基が存在し、これとグルコースオキシターゼ（GOD）をグルタルアルデヒドで架橋固定化を行った。プラズマ重合膜の有効性を示すために、比較試料として白金薄膜を 3-(アミノプロピル)トリエトキシシランで処理した後、同様に酵素固定化したデバイスも作製した。銀/塩化銀を参照電極として、酵素反応を電気化学測定で評価した。このセンサーは、酵素反応により、式(1)のように過酸化水素が生成される。

Fig. 3 Time base measurement of glucose in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4)

Applied potential, +700 mV *vs.* Ag/AgCl; Device based on (a) plasma-polymerized film and (b) 3-(aminopropyl)triethoxysilane matrix

D-グルコース + O₂

生成した過酸化水素は、電極を +700 mV に設定することにより式(2)のような反応が起こり、電流値が増加する。この電流値の増加を測定することでグルコースの濃度が測定できる。

センサー特性を Fig. 3 に示す。結果をまとめると、(1) 60 mM の高濃度のグルコースでも電流値が飽和することなく測定できた（糖尿病患者用では、5～20 mM の濃度範囲をカバーできればよい）、(2) 応答速度が 10 秒程度であった、(3) 電流値の時間応答の信号/雑音比が 3-(アミノプロピル)トリエトキシシラン膜を用いたデバイスに比べて 3 倍以上よかった、(4) プラズマ重合膜はきょう雑物質（電極反応を起こす化学物質、例えば、血中に存在するアスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンなど）の影響を抑えることができた。

以上の結果を考察すると、プラズマ重合膜は、従来のポリマー薄膜と異なり高度に架橋化された 3 次元網目構造を持つ。そのため、サイズ効果によって過酸化水素のような低分子のみを効率よく通過させることができ¹⁹⁾、きょう雑物質の影響を抑えることができ、かつセンサー応答の S/N 比がよいと考えられる。また、膜厚が約 100 nm の極薄膜であるので、酵素反応中心と電極の距離が近いために応答速度が速い。更に、酵素が膜表面に 2 次元的に高密度に固定されていて、反応に必要な酸素の量が少量ですむ

ため、酸素枯渇の影響を受けることなく高濃度のグルコースまでも測定できると考えられる。もう一つの特徴としては、通常のグルコースセンサーに使用されているメディエーター（酵素反応によって生じる酸化還元電子の伝達を効率よく電極に媒介する化学物質³⁴⁾³⁵⁾）を使用しないで、たった 1 分程度のプラズマ処理により機能発現できることである。しかも、ドライプロセスなので半導体加工技術との融合が容易であり、極微小化が可能である。

3.2 半導体技術を用いるニードル型グルコースバイオセンサー³⁶⁾³⁷⁾

この膜の利点を生かしてニードル（微小針）型バイオセンサーも作製している³⁶⁾³⁷⁾。ニードル型のバイオセンサーは、医療分野において生理学的に重要な化学物質の測定用に開発研究が進められている。ニードル型バイオセンサーの大きな利点は、センシング部分が微小であるために *in vivo* 計測が可能なことである。これまで開発されているニードル型センサーの基本構造は、直径 1 mm 以下の金属ワイヤをベースに作製されたものである^{38)~40)}。しかし、この構造のニードル型センサーは、センサーに不可欠な参照電極や対極電極との一体化が困難であること、酵素を固定化するために金属ワイヤをポリマー膜などで修飾するが、この方法では再現性、密着性、生産性などに問題がある。

そこで、作製したセンサーの特徴は、主に次の 2 点である。第 1 は、銀/塩化銀参照電極を薄膜化させたことである⁴¹⁾。通常の銀/塩化銀参照電極は、ガラスタイプの大きな構造を持つ。従来の微小センサーには単なる金属電極を参照電極にしていることが多いが、これでは、安定で正確な電位を得ることは困難であった。第 2 には、本稿の主題でもあり、酵素固定化膜にプラズマ重合膜を用いることである。特に、ドライプロセスであるために半導体技術との融合が容易である。酵素固定化膜に従来用いられているポリマー膜やシランカップリング試薬は、ウェットプロセスであり、プラズマ重合膜と同様の性能を発揮できない。

Fig. 4(a) に 1 枚のガラス基板上に長さ 50 mm、幅 0.88 mm のニードル型センサーのアレイ図及び写真を示す。このプロセスで同時に 25 個のデバイスを作製できる。このデバイス（一パッチと呼ぶ）をダイシングソーで切断して個々のデバイスになる。Fig. 4(b) はその写真である。デバイスは、50 × 220 × 0.15 mm³ のガラス基板に作製する。金属電極薄膜は、スパッタリングでたい積させ、リフトオフによってパターン形成を行った。作用電極と対極電極は、白金を用いる。参照電極部分は、銀を用いた。これらの電極窓をポリイミド膜で形成した。参照電極の銀部分を 0.1 M 塩酸に浸して表面を塩化銀化処理を行い、銀/塩化

Fig. 4 (a) Overview of arrayed needle biosensors 1: Biosensors array are cut into each device. 2: A piece of the device, a: 50 mm, b: 19.1 mm (reference electrode), c: $1 \times 0.5 \text{ mm}^2$ (working electrodes), e: contact pads. (b) Picture of the arrayed needle biosensor. 1: A piece of the device, 2: a device incorporated in a needle (18G), 3: 56 of biosensors array

銀参照電極薄膜を形成した⁴¹⁾。金属薄膜の厚さは、表面プロファイラーで測定した。作用電極表面（センシング部位）に約 100 nm のアセトニトリルプラズマ重合膜を形成した。プラズマ条件は、放電電力 80 W、圧力 2.1 Pa、流量 $15 \text{ cm}^3/\text{min}$ 、放電時間 1 分である。この膜表面には高密度のアミノ基が存在する¹⁹⁾。グルタルアルデヒドを架橋試薬として酵素（グルコースオキシダーゼ）の固定化を行った。固定化の条件は、次のとおりである。2.5% のグルタルアルデヒド溶液を膜表面に浸し、水洗浄をする。次に、2077 Units/g の酵素溶液を滴下する。10 分後、リン酸緩衝液で洗浄する。これを「デバイス 1」と表現する。プラズマ重合膜の有用性を示すために、従来の固定化膜 {3-(アミノプロピル)トリエトキシシラン, APTES} を用いて同様に酵素固定化を行った。APTES 膜は、10% (v/v) APTES のトルエン溶液を滴下し、115°C で 12 時間放置することによって作製される⁴²⁾。これを「デバイス 2」と表

Fig. 5 Calibration of a device in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4)

The oxidation current at +600 mV *vs.* Ag/AgCl under cyclic voltammetry was used. Each point represents the average and the vertical bars designate the standard deviation ($n = 4$). (a) linear range (>0.98); 5~20 mM, sensitivity; $3.08 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$. (b) linear range (>0.98); 5~20 mM, sensitivity; $1.36 \mu\text{A mM}^{-1} \text{cm}^{-2}$

現する。センシング部位の電極面積は、 0.2 cm^2 である。

電気化学測定は、Bioanalytical Systems 製 (BAS-50W) の装置を用いた。作製したセンサーの 3 電極を測定器に装着して測定を行う。センシング部位を測定セル (5 ml) に浸し、測定対象物質を滴下し、目的の濃度にする。溶液は、20 mM、pH 7.4 のリン酸緩衝液を用いた。グルコースの場合は、0.1 及び 1 M 濃度の溶液、その他の妨害物質は 0.1 M の溶液を利用した。

Fig. 5 に電流値の増加とグルコース濃度の関係を示した。これより、生理的意義のあるグルコース濃度の範囲で増加電流値との相関性が得られている。また、応答速度は約 10 秒である。これは、プラズマ重合膜が薄く、かつ電極と酵素の活性中心の距離が近いために迅速な応答が得られたと考えられる。デバイス 1 とデバイス 2 を比べると、前者の電流値増加が大きい。これは、プラズマ重合膜と APTES 膜を比較したときにどちらの膜表面にもアミノ基が存在するが、プラズマ重合膜 (PPF) 表面により多量の酵素が固定化されたと考えられる。

3.3 プラスチック BioMEMS⁴³⁾

前節では、半導体技術を利用したマイクロバイオセンサーについて述べた。最近では、更にセンサーシステム全体を微小化するという研究が盛んに行われている^{8)~11)}。すなわち、多くのバイオセンサーは、複数の試料を短時間で測定するためには、フロー系で利用される。フロー系は、送液ポンプ、チューブ、インジェクション部、センシング部、データ処理部、廃液などから成る。このフロー系をす

Fig. 6 Procedure of the device fabrication

1: "Unit A" PMMA substrate ($30 \times 30 \times 2 \text{ mm}^3$); 2: Hexamethyldisiloxane (HMDS) plasma-polymerized film; 3: Platinum electrodes sputtered onto the surface through a metal mask; 4: Sputtered silver layer for Ag/AgCl reference electrode; 5: Acetonitrile plasma-polymerized film having primary amine groups for subsequent immobilization of glucose oxidase via glutaraldehyde; 6: "Unit B" PMMA substrate ($10 \times 30 \times 2 \text{ mm}^3$) having grooves (width $800 \mu\text{m}$, depth $500 \mu\text{m}$)

べてワンチップに集積したものは、 μTAS あるいはMEMSと呼ばれる。これらの技術は、測定のための移動溶媒を激減できることだけでなく、少ない量の試料で測定が可能なのが利点である。当初は、キャピラリー電気泳動⁴⁴⁾のように微小流路を利用したクロマトグラフィーが中心であった。最近ではマイクロバイオセンサーを組み合わせることで、"BioMEMS"が報告されるようになった。更に、従来MEMSの基板は、シリコンやガラスなどの無機材料が利用されていたが、プラスチック基板を利用したMEMSも報告され始めている。プラスチック基板を用いる利点は、加工が容易であり、特に高いアスペクト比の流路形成が得られやすいことである⁴⁵⁾。

プラスチックBioMEMSを作製するためには、疎水的なプラスチック表面を改質する必要がある。プラズマ重合膜あるいはプラズマ処理は、プラスチックBioMEMS作製には有効な手段である。手始めに、Fig. 6に示すような手順でデバイスを作製した。プラスチックの基板の材料は、ポリメタクリル酸メチル (PMMA) である。Unit Aは、まず、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ処理を行い、次いで白金電極薄膜をスパッタリングにより形成する。電極パターンは、メタルマスクを用いて行っている。電極は、作用極、対極、参照極の3電極である。最初のプラズマ重合膜は、金属電極薄膜と基板の密着性をよくさせる役割がある。次に、アセトニトリルプラズマ重合膜を形成する。この膜表面にはアミノ基が高密度に存在する。最後に、プ

Fig. 7 Overview of the device

1: Working electrode; 2: Reference electrode; 3: Counter electrode; 4: Capillary inlet; 5: Ag/AgCl layer for reference electrode

ラズマ重合膜上にグルタルアルデヒドとの共有結合により酵素を固定化する。参照電極上には銀を形成する。一方、Unit BはUnit Aより大きさが小さく、その上に幅 0.8 mm 、深さ 0.5 mm の溝を形成する。最後に、Unit AとBを張り合わせてデバイスが完成する (Fig. 7)。このデバイスは毛細管現象によって測定液をセンシング部に導入できる。毛細管現象を起こさせるためには、表面を親水性化させる必要がある。ここでは、窒素プラズマ処理により表面の親水性化を行った。Fig. 8がこのデバイスのグルコースに対する応答である。グルコース濃度に比例した電流値が得られており、センサーとしての機能を果たすことが分かる。

3・4 メディエーターバイオセンサー⁴⁶⁾

前節までに取り上げたグルコースバイオセンサーは、式(1)のように、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した。これに対し、血糖値管理用の使い捨て血糖値センサーには、別の大きな特徴がある。それは、メディエーターを使用している点である³⁴⁾³⁵⁾。メディエーター型のバイオセンサーは、酵素反応によって

Fig. 8 Cyclic voltammogram of plasma polymerized vinylferrocene deposited in platinum electrode thin film in 0.1 M $\text{Et}_4\text{NClO}_4/\text{CH}_3\text{CN}$

a ~ e: 5, 10, 20, 50, 100, and 200 mV s^{-1} , respectively. Insets: dependence of peak current (I_p) on square root of potential sweep rate

生じる電子を直接電極で検出する。グルコースオキシダーゼの活性中心にフラビンアデニンジスクレオチド (FAD) という補酵素が存在し、この FAD が酸化還元されることで電子の移動が起こる。しかし、FAD は巨大な分子の内部に埋もれているために FAD から直接電極に電子を受け渡すことができない。そのために、メディエーターを利用することによって電極への電子伝達を可能にしている。

メディエーターを利用した酵素反応は、次式のようになる。

グルコース + メディエーター (酸化)

メディエーター (還元)

この反応には酸素が必要ないので、溶存酸素の影響を受けない。特に、糖尿病患者は、高濃度のグルコースを測定する必要があり、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濃度を測定できない。

このほかには、血液中には、電極反応する成分が存在す

る。この成分は、きょう雑物質と呼ばれ、アスコルビン酸、尿酸、アセトアミノフェンなどがある。このきょう雑物質の存在によっても電流値が増加するので、正確なグルコース濃度を測定することはできない。この対策としては、妨害物質を除去する膜を電極上に使用することは前章でも述べた。メディエーターを使用することで更にきょう雑物質の影響を抑えることができる。その理由は、次のとおりである。すなわち、過酸化水素電極では、過酸化水素を検出するためにアノードを +0.6 V (銀/塩化銀参照電極に対して) に設定する。これに対し、メディエーターを使用した場合にはアノードを +0.3 ~ 0.4 V でよい。よって、より低い電位で検出に十分な電流値を得ることができる。言い換えると、アノード電位が低いときょう雑物の酸化が抑制されて選択性を高めることができるので、正確な血糖値を測定することができる。

以上のように、メディエーターを利用するバイオセンサーの利点は多いが、欠点もある。メディエーターは低分子であるために水に不溶であっても、長時間使用すれば徐々に電極から脱離する。フェロセンのような不溶性メディエーターでも酸化型になると水に可溶となる。そこで、メディエーターを高分子マトリックスに組み込んだレドックス高分子が様々提案されている^{47)~51)}。しかし、レドックス高分子は設計製作が困難である。すなわち、いかに効率よくレドックスサイトを分散させるかだけでなく、レドックスサイトの反応場 (親水性や疎水性) を適切に設計しなければ、有効な電子伝達を起こすことができない。更に、レドックスポリマーをセンサー化するプロセスはキャストイングやスピンコートなどで行う。そのため、センサー特性に影響を与える薄膜化や均一化は困難である。そこで、著者らのグループではメディエーターのレドックスポリマーをプラズマ重合により作製し、バイオセンサーに利用した。Fig. 8 はビニルフェロセンプラズマ重合膜のサイクリックボルタンメトリーである。酸化電流ピーク値はスキャン速度の 2 乗根に比例していることから、レドックスサイトが機能を果たしていることが分かる。ビニルフェロセンプラズマ重合膜を作製する際には、プラズマ放電電力の最適化が必要である。放電電力が低いとレドックスサイトの密度が低いので酸化還元電流が低く、放電電力が高いとフェロセンサイトが壊れ、電気化学的に不活性な Fe(III) になると考えられる。Fig. 9 は、ビニルフェロセンプラズマ重合膜上にアセトニトリルプラズマ重合膜を形成し、酵素を固定化したグルコースバイオセンサーである。グルコースに対して 450 mV 付近にピークが観測されており、酵素反応による電子伝達が観測されている。ここで、アセトニトリルプラズマ重合膜は酵素固定化のマトリックスだけでなく、電子伝達機能に重要な役割を担っている。なぜなら、アセトニトリルプラズマ重合膜なしで直接ビニルフェ

Fig. 9 Cyclic voltammograms obtained using the device in 20 mM phosphate buffer (pH 7.4) (a) without glucose and (b) 10 mM of glucose; The scan rate was 10 mV s^{-1}

Fig. 10 Resonant frequency response in 0.1 M PBS at 30°C : QCM coated with (a) nothing (gold), (b) ethylenediamine plasma-polymerized film, (c) polyethylenimine, and (d) 3-(aminopropyl)triethoxysilane

ロセンプラズマ重合膜上に酵素を固定化すると、Fig. 9 のような電流ピークは得られなかったからである。このように、プラズマ重合は、塗れ制御 (wettability control) が容易であるため、メディエーターバイオセンサーの設計が容易である。

4 アフィニティバイオセンサー

プラズマ重合膜の結合バイオセンサーへの利用は、著者のグループが先駆的に行っている。アフィニティバイオセンサーは、キャタリティックバイオセンサーに用いられている電極とは異なり、特殊な信号変換素子を利用するためにプラズマ重合膜の利用は有効である。

Fig. 11 Schematic illustration of the SPR sensor chip on which the gold surface was modified by (a) carboxylated dextran (Sensor Chip CM5) and (b) plasma-polymerized film (Sensor Chip PPF), where k_m , k_a , and k_d denote the mass transport coefficient, the association coefficient, and the dissociation coefficient, respectively

4.1 水晶振動子バイオセンサー⁵²⁾⁵³⁾

水晶は電界によって規則正しく振動するが、その表面にリガンド (生体分子) を固定化し、相互作用によってアナライト (対象物) が結合すると質量が変化し、水晶振動子の振動周波数を変化させる。その周波数の変化を測定することでアナライトの濃度を測定することができる。つまり、水晶振動子は微量でんびんとして機能を有するというのである。このセンサーの構造は、水晶上に金電極薄膜を形成し、その電極表面にリガンドを固定化する。金表面に直接生体分子を固定化することは困難であるので、通常はポリマー膜 {3-(アミノプロピル)トリエトキシシラン重合体, ポリエチレンイミンなど} が利用される。しかし、これらの方法では、膜が不均質であり、しかも密着性が弱く、水晶振動子の安定した振動状態を得ることが困難である。プラズマ重合膜はこの困難を解決できる⁵²⁾。Fig. 10 に示すように、水晶振動子の金電極表面上にプラズマ重合膜は薄く均質に形成されるので、水溶液中でも安定な振動状態が得られる。これに対し、通常のポリマー膜では振動状態が不安定である。したがって、生体分子をプラズマ重合膜を用いて固定化することでセンサーの感度、再現性、安定性、再使用性などが改善できた。

Fig. 11 に、プラズマ重合膜を利用した水晶振動子バイオセンサーの特性を示す。典型的な生体分子間の相互作用である抗原抗体反応を使用した。センサーの基本構造は、水晶振動子表面にプラズマ重合膜を介して抗体を固定化している。測定試料を注入するとセンサーの表面で特異的な結合反応 (抗原抗体反応) が起こり、振動周波数が下がる。抗原抗体反応を解離させるため pH 2.4 のグリシン-塩酸緩衝液 (ABG) に代えると溶液の粘性が変化したため周波数は大きく下がる。そして、再びリン酸緩衝液 (PBS) に戻すと周波数 (ベースライン) が元に回復した。再び抗

Fig. 12 Schematic illustration of the SPR sensor chip on which the gold surface was modified by (a) carboxylated dextran (Sensor Chip CM5) and (b) plasma-polymerized film (Sensor Chip PPF), where k_m , k_a , and k_d denote the mass transport coefficient, the association coefficient, and the dissociation coefficient, respectively

原を流すと1回目と同様に周波数が低下した。抗原抗体反応前後での周波数変化が80%を確保できるのは、10回程度であった。このように、プラズマ重合膜を用いることにより実時間で再使用が可能なセンサーを実現できた。

また、この方法で、アレキサンドリウム抗体を水晶振動子の表面に固定化し、赤潮の原因となるアレキサンドリウムアフィンのセンサーを作製した⁵³⁾。このセンサーは、赤潮原因の毒性プランクトンの増殖を肉眼よりも早く検知できるので、養殖魚への赤潮被害を低減させることに貢献できる。

4・2 表面プラズモン共鳴バイオセンサー⁵⁴⁾⁵⁵⁾

表面プラズモン共鳴は、金属薄膜の表面において極めて特異的な角度で光が入射したときに起こる現象である。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なので、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、結果として共鳴角が変化する。これによって生体分子の特異的相互作用を測定することができる。表面プラズモン共鳴の起きるエバネッセント波の領域は金表面の極近傍(300 nm以下)であるので、この領域内に相互作用を起こす必要がある。プラズマ重合膜はこのコーティング固定化膜として有用である⁵⁴⁾。金表面に均質に極めて薄く形成されるだけでなく、膜表面にはアミノ基のような官能基が存在し、膜表面がナノメートルスケールで平坦でピンホールフリーのために生体分子を2次的に高密度に固定

Fig. 13 Overlaid sensor grams showing injection of analyte at a concentration of 14.9 nM, with (a) 1820 RU of ligand immobilized on the surface of a sensor chip PPF, (b) 1441 RU of ligand immobilized on the surface of a sensor chip CM5, and (c) 12890 RU of ligand immobilized on the surface of a sensor chip CM5. The RUs are normalized using the maximum change

化することができる (Fig. 12)。また、表面プラズモン共鳴を起こさせるのに必須の金薄膜(約50 nm)もスパッタリングのようなドライプロセスで形成されるので、製造プロセスが有利である。

表面プラズモン共鳴バイオセンサーのもう一つの大きな利点は、生体分子間の解離速度定数(k_a)や結合速度定数(k_d)を算出することにある。これらの定数の観測は生化学の分野では重要である。しかし、それらの速度定数を算出するに当たっては、センサーチップ表面での相互作用が反応律速である必要がある。センサー表面上での物質移動は次のように表される。

ここで、 A は測定対象物(アナライト)、 B はセンサー表面に固定化された生体分子(リガンド)、 AB はリガンドとアナライトの複合体、 k_m はセンサー表面への拡散速度定数である。 $k_m > k_a, k_d$ の条件(相互作用律速)でなければ速度定数は算出できない。PPFを用いたセンサーチップは、従来のセンサーチップ(例えば、カルボキシメチルデキストラン膜を利用したチップ)に比べて拡散律速の影響を受けにくいために速度論解析に有効である⁵⁵⁾。Fig. 13に示すように、プラズマ重合膜を用いたチップの共鳴角変化の速度が、従来のチップのそれに比べて大きいことが分かる。これは、プラズマ重合チップが拡散律速の影響を受けにくく、このセンサーグラムから算出した速度定数が真値に近いことを示す。それは、プラズマ重合膜表面にリガンドが2次的に高密度に固定化され、アナライト

Fig. 14 Schematic diagram of immobilized probe DNA on hexamethyldisiloxane (HMDS) plasma-polymerized film (PPF) coated surface

の進入が容易であるためであり、これに対し、従来のチップではリガンドが3次元的に固定化されていて拡散律速になりやすいためであると考えられる。Fig. 13のように、リガンドの固定化量を変えるとセンサー応答の速度が変化している。これは、センサー表面で拡散律速になっていることを示している⁵⁶⁾。

4.3 DNA チップ⁵⁷⁾

ゲノム情報の全容が解明されたという背景を踏まえ、ゲノム情報を簡便に測定できる遺伝子チップの開発が盛んに行われている^{5)~7)}。遺伝子チップは、チップ上に多種類、高密度のオリゴヌクレオチドアレイを形成することが中心技術である。一般に、DNAチップは表面をポリ-L-リジンなどでコートした担体が利用されている。しかし、このような固定化法ではプローブが担体から容易にはく離してしまふばかりでなく、表面が正電荷を持つため配列とは関係なくターゲットが静電的に非特異吸着を起こす。これが原因でハイブリダイゼーション効率が低下するばかりでなく、吸着によるバックグラウンドが上昇するため、得られたデータの解釈が難しくなることがある。その問題点をプラズマ重合膜を用いることで解決できる。

ヘキサメチルジシロキサンをモノマーガスとしたプラズマ重合膜の表面は疎水性であり、そこにプローブを強固に固定化することは困難である。このため、末端をビオチン標識したオリゴヌクレオチドをプローブとして使い、ストレプトアビジンと結合させてプローブを固定化することを試みた。まず、ビオチンを保持したままストレプトアビジンを疎水性膜で固定化する方法を検討した (Fig. 14)⁵⁷⁾。その結果、疎水性プラズマ重合膜を形成させた担体にストレプトアビジンを吸着させ、そこに2層目のプラズマ重合膜を3~4.5 nm 成膜させてもビオチンとの結合能が保持されることが分かった。なお、2層目のプラズマ重合膜がない場合 (0 nm) ストレプトアビジンが担体からはく

(a) Poly-L-lysine Coated Array

(b) PP Coated Array

Fig. 15 Fluorescence scanning before and after the washing procedure

(a) Poly-L-lysine-coated array. (b) PP-coated array. The locations of *invA* oligonucleotides are indicated by closed arrows [(a) *invA* oligonucleotides, (b) biotinylated *invA* probe]. The location of verotoxin probes are indicated by open arrows [(a) verotoxin oligonucleotides, (b) biotinylated verotoxin probe]. Chips were hybridized with fluorescein-labeled target DNA (*invA* target) at 45°C for 1 h

離し、また、6~9 nm の間で著しくビオチンとの結合能力が落ちることから、ストレプトアビジンはプラズマ重合膜の表面にビオチンとの結合部位を突出した状態で固定化されたと推定される。更に驚くべき点は、重合の際に高エネルギーのプラズマ状態にストレプトアビジンがさらされるが、それにもかかわらずタンパク質の活性 (結合能力) が失われていない点である。

この手法を用いて作製した DNA アレイは、担体表面が疎水性であることから、既存のアレイと比較してバックグラウンドが低く抑えられ、洗浄時間の短縮化、S/N 比の向上につながる事が分かった。従来、オリゴヌクレオチドをチップ上に固定化するためにはポリ-L-リジンでチップをコートし、静電作用を利用する。しかし、非特異的な相互作用によりバックグラウンドが大きく現れる。結果を Fig. 15 に示す⁵⁷⁾。ポリ-L-リジンでコートしたチップは、ハイブリダイゼーション後の蛍光画像では、スポットとバックグラウンドが全く同じ強度で区別できない。しかし、

Fig. 16 Construction of the electrochemical protein chip: (a) decomposed structure shown layer by layer; (b) picture of the chip (R.E., reference electrode; A.E., auxiliary electrode; W.E., working electrode); (c) the chip mounted on a chip carrier. Picture seen from the reverse side

洗浄後に特異的なハイブリダイゼーションによるスポットが観測できる。これに対し、プラズマ重合膜を用いてオリゴヌクレオチドを固定化したチップは、洗浄なしでハイブリダイゼーションによる特異的なスポットを観測できる。

SNP (single nucleotide polymorphism) は、ゲノム DNA に多く存在する一塩基変異を持つ遺伝的多型である。SNP はヒトの個体間での病気に対する感受性や予防診断、薬剤反応性に関連する遺伝子を探索する際の有用な多形マーカーになると考えられている。しかし、DNA チップを用いた一塩基変異検出法で確立されたものはない。そこで、一塩基変異検出を行う際 DNA チップ表面の性質がどのように影響するかを検討するため、性質の異なる 2 種類のプラズマ重合膜を用いて DNA チップを作製した。その結果、チップ表面が疎水性の場合、配列特異的にハイブリダイゼーションを検出でき、親水性の場合一塩基変異を見分けることが困難になることから、DNA チップを用いて一塩基の違いを検出するには、プローブの配列ばかりでなくアレイ表面の性質が結果に大きく影響する可能性があることが分かった⁵⁷⁾。

4・4 抗体チップ⁵⁸⁾

前節で述べた DNA チップは、遺伝子の発現解析や一塩基変異を迅速簡便に検出できる手段として開発された。これは、従来のサザンブロッティング法の延長線上にある。一方、ヒトゲノム解読が終了した現在、ゲノム情報に従って発現するタンパク質群、すなわち、プロテオームの解析に焦点が移りつつあることも事実である。プロテオーム解析では、細胞や血液などにどのくらいの質量のタンパク質がどれだけ存在しているか、あるいは、タンパク質にどのようなタンパク質が結合するかを調べるのが焦点である。前者は発現解析、後者は相互作用解析である。

後者の相互作用の解析に際し、多数のタンパク質を同時に検出する認識素子として、抗原抗体反応を利用した抗体チップを試作した (Fig. 16)⁵⁸⁾。チップの作製に当たっては、多試料の同時検出、量産性に優れた生体認識素子の固定化、の観点から、半導体加工技術を利用して 36 個の作用極を持つ電極アレイチップを試作し、プラズマ重合を用いて作用極上に抗体を強固に固定化した。チップ構造は、ガラス基板上に白金作用極を 36 個、銀塩化銀参照極を 2 個、白金対極を 2 個フォトリソグラフィーにより形成し、ポリイミド層により電極部を確定・絶縁しており、作用極

Fig. 17 Dependence of the output on the method of immobilization

(a) Antibodies were embedded between two layers of PPF; (b) antibodies were adsorbed physically on a single layer of PPF; (c) no antibodies were immobilized in the PPF. The above figures illustrate the situation for the respective cases. Enzyme-labeled goat anti-mouse IgG antibodies were bound to the immobilized mouse anti-human IgG antibodies for (a) and (b)

のサイズは $0.6 \times 0.6 \text{ mm}^2$, アレイチップサイズは $17 \times 17 \text{ mm}^2$ である。Fig. 16 中の (c) は電気シグナル取り出し用のジグにチップを装着した写真であり、これを用いて迅速に多サンプルの検出を行うことが可能となる。ここでは認識反応として抗原抗体を利用し、電極上に IgG 抗体を固定化した。使用した抗体は Y 字型の構造をしており、先端部は抗原結合性フラグメント (F_{ab}) と呼ばれ、抗原を認識するサイトがあり、Y 字型の中央部から下は結晶性フラグメント (F_c 鎖) と呼ばれ、抗体が細胞に結合したり補体を活性化する機能を持ち、疎水性となっている。

従来法では抗体の固定化は抗体の F_c 鎖とプラスチック基板との疎水的相互作用により固定化しているが、今回作製したチップでは、抗体の固定化には疎水性膜が成膜可能なヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜を用いて行った。作製したチップの評価は酵素免疫センサーの反応を利用して行った。使用した酵素免疫測定法 (ELISA) の原理及び検出原理は以下のとおりとなる。あらかじめ目的とするモデル抗原 (グルコースオキシダーゼ標識抗マウス IgG) と特異的に結合されるモデル抗体 (マウス IgG) をチップ上に固定化しておき、チップを目的とするタンパク質が含まれた試料中に浸す。チップの抗体と試料中のタンパク質が抗原抗体反応により、抗体と特異的に結合する。このとき標識された GOD も作用電極上に固定化されることにな

Fig. 18 Schematic representation of sandwich method

り、酵素の基質であるグルコースを加えると、酵素反応により過酸化水素を生成する。生成した過酸化水素を電極で検出することによって抗原を定量することが可能になる。また、緩衝溶液にはリン酸緩衝液、ブロッキング剤として乳清を使用した。抗体固定化において、プラズマ重合膜の役割を示すために、抗体をプラズマ重合膜で包括固定して膜中に埋め込んだチップ、抗体をプラズマ重合膜上に吸着させたチップ、表面に何もつけていないチップについて電極反応を調べ、結果を Fig. 17 に示した。これによると、抗体をプラズマ重合膜に埋め込んだデバイスでは抗原抗体反応による応答が顕著であることが分かり、また抗体を物理的にプラズマ重合膜表面に吸着する方法では、応答が得られていない。これにより、プラズマ重合による抗体の固定化、ここでは、抗体の F_c フラグメントがプラズマ重合膜内に埋め込まれていることにより、その効果が十分現れていると言える。また、未反応あるいは非特異的反応によるバックグラウンドの電流値が低く抑えられている。これは、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜は、疎水的な表面を持つため、非特異的吸着などを抑える効果があることが分かる。これは、前節で述べた DNA チップと同様の結果である。

次に、Fig. 18 の模式図に示したサンドイッチ免疫アッセイ法で、実際にタンパク質の検出を行った。抗原として肝細胞がんのしゅようマーカーとして使用されている α -1-フェトプロテイン (AFP: $50 \mu\text{l}$, 450 units/ml) とヒト β_2 -ミクログロブリン ($\beta_2\text{MG}$: $50 \mu\text{l}$, $20 \mu\text{g/ml}$) を、一次抗体 (固定化抗体) にウサギ抗ヒト AFP とウサギ抗ヒト $\beta_2\text{MG}$ を、二次抗体にマウス抗ヒト AFP とマウス抗ヒト $\beta_2\text{MG}$ を、そして三次抗体として GOD 標識ヤギ抗マウス IgG をそれぞれ使用した。結果を Fig. 19 に示す。グルコース溶液添加により酵素反応で過酸化水素が生成し、それぞれの抗原の検出が可能となった。また AFP, $\beta_2\text{MG}$ それぞれの一次抗体を隣り合うように (モザイク状に) 配置、固定化してチップを作製し、それぞれの抗原を個別に

Fig. 19 Cyclic voltammograms obtained when detecting hydrogen peroxide in the sandwich immunoassay

添加した。その結果は、Fig. 20 に示すように、固定化された位置のみで対応する抗原がモザイク状に検出され、多種成分の検出が可能となった。

4.5 電気泳動チップ⁵⁹⁾

前節でも触れた、プロテオーム解析においてキャピラリー電気泳動 (CE) はしばしば利用される。この方法はゲルを利用した分離分析法と比較して、試料の分離能が優れており、均一なバックグラウンド吸収に由来する再現性、信頼性のある検出が可能となっている。現在利用されている CE デバイスは細いキャピラリー管が作製されており、現在のスラブゲルで利用されているような 2 次元構造は作製されていない。微量なタンパク質を検出するためには高感度な検出法や微小なデバイスが作製されることが必要であり、様々な種類のタンパク質を再現性よく、かつ高い分離効率で検出するためにはキャピラリー内壁とタンパク質との相互作用を最適化する必要がある。またプロテオーム研究では、タンパク質分離法として二次元電気泳動法がよく利用される。この方法で利用されている等電点電気泳動法では、内壁や溶液内マトリックスとタンパク質との相互作用がないことが望ましい。本研究で作製したキャピラリーは、そのままではガラス内壁と試料溶液の接する部分が帯電し電気浸透流が発生する。そのため、試料タンパク

Fig. 20 Detection of AFP and β_2 MG at the multiple electrodes

The antibodies for AFP and β_2 MG were immobilized at the sites in red and blue, respectively. Current increases were measured when AFP (a) and β_2 MG (b) were added separately onto the chip

質の等電点に関係なくタンパク質が移動することとなり、タンパク質の分離定量が難しくなる。更にタンパク質の中には電荷を帯びた物質と静電的に容易に結合する物質も存在し、これらの物質がガラス内壁に吸着し、キャピラリー内壁の帯電状態が変化 (ζ 電位が変化) し、定量的なタンパク質の分離分析が難しくなる。これらの問題に対処するためには内壁の改質が必要であるが、一般に利用されている化学修飾法を利用した内壁修飾法は、ピンホール等の欠陥が生じ、修飾膜の膜質や膜厚の制御が難しいなどの問題がある。また、この方法は逐次加工法であり、一括で大量に作製することは困難である。そのため、これらの問題を解決するため新しい内壁修飾法としてプラズマ重合膜が利用できる。

Fig. 21 に作製したキャピラリー電気泳動チップの構造

Fig. 21 Schematic illustration of isoelectric focusing capillary electrophoresis glass chip

Fig. 22 Isoelectric focusing of cytochrome c, hemoglobin and phycocyanin in (a) non-coated, (b) acrylamide-coated, (c) hexamethyldisiloxane-coated (d) acetonitrile-coated, and (e) hexadiene-coated glass capillaries

Applied potential 2000 V, injection volume 2 μl at cathode. Photographs taken at increasing protein concentration: 2.22 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ protein; 3.66 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ protein and 5.00 $\mu\text{g } \mu\text{l}^{-1}$ protein. The time taken in minutes for complete separation is indicated on the right of each photograph

Fig. 23 Focusing time of capillary chip with some kinds of coating materials: (a) non, (b) acrylamidegel, (c) hexamethyldisiloxane plasma-polymerized film, (d) acetonitrile plasma-polymerized film, and (e) hexadiene plasma-polymerized film

を示す。キャピラリーチップは、ガラスを基板とし、幅 10 mm、長さ 80 mm、厚み 1.1 mm の基板上に、幅 0.9 mm、長さ 70 mm、深さ 0.1 mm の溝を形成させている。キャピラリー構造を形成させるため、両端に直径 4 mm のリザーバー用の穴が開けられたガラスカバーを、光感光性接着剤で接合させた。キャピラリー内壁は、化学修飾化剤及びプラズマ重合薄膜により修飾化させた。

モノマーとしてヘキサジエン、ヘキサメチルジシロキサン、アセトニトリルを利用し、疎水性で無電荷、疎水性で負電荷、親水性で正電荷の薄膜をもつプラズマ重合内壁化チップを作製した。また比較対象のため修飾化なし、アクリルアミド内壁修飾化でのチップも作製した。そしてキャピラリー等電点電気泳動法でタンパク質を濃縮 (focusing)

し、これらチップの評価を行った。タンパク質試料は、可視領域で検出可能な 2 種のタンパク質が含まれている等電点マーカータンパク質 (ファルマシア製) を利用した。青いタンパク質はフィコシアニン ($pI = 4.45$) を、赤いタンパク質はヘモグロビン ($pI = 7.0$) を示す。

実験は以下のように行った。最初に試料をキャピラリー全体に満たした。次に陰極側リザーバーに陰極液として 25 μl の NaOH を、陽極側リザーバーに陽極液として 25 μl の H_3PO_4 を添加した。最後に両リザーバー間に 1 kV の電圧を印加した。タンパク質の focusing の様子を Fig. 22 に示す。また、Fig. 23 に示すように、修飾化なしとアクリルアミド修飾化とでの比較では、修飾化したチップでは少しだけ focusing 完了時間が短くなることが観察され

Fig. 24 Stage of biosensor integration

た。また、プラズマ重合内壁化チップを利用した場合は、アクリルアミドの修飾化チップで得られた時間の約半分の5分で focusing が完了し、キャピラリーの内壁へのタンパク質の吸着や相互作用を抑制したことが示された。また、電気泳動が完了した後のバンド位置及びバンド幅から、分離度及び濃縮度を比較した結果、バンド幅から得られる濃縮度は、フィコシアニンに関しては明確な違いが確認できなかったが、ヘモグロビンに関しては、ヘキサジエンでの内壁修飾化チップで3.7 mm となり、他のチップと比較して最良の結果を示した。また、バンド位置から得られる分離度に関しては、ヘキサメチルジシロキサン内壁修飾化チップが、他のチップとは異なり2つのバンド全体が陽極方向へ移動し、ヘキサメチルジシロキサンが持つ強い負電荷が電気泳動プロセスに影響を及ぼしたことが示された。また、バンド位置の位置再現性に関しては、ヘキサジエン内壁化チップが良い結果を示した。今回試作したチップ

は、ヘキサジエンプラズマ重合膜修飾化チップが、短時間（泳動時間：4分）で、高濃縮（バンド幅：3.3 mm（フィコシアニン）、3.7 mm（ヘモグロビン））、かつ高い再現性での分離度（誤差：1.2 mm（フィコシアニン）、0.6 mm（ヘモグロビン））での等電点電気泳動が可能となった。

5 総 括

酵素センサー研究の第一人者である Scheller の提案したバイオセンサーの成長段階⁶⁰⁾を参考にして次のように定義する (Fig. 24)。すなわち、第一世代では、酵素をメンブランに閉じ込めたり結合したりして独立のコンポーネントとし、それを電極と組み合わせる。電極自体もそれだけでは酸素センサーとして機能する。第二世代では、酸素電極のセンサーヘッドを直接酵素で修飾した「酵素修飾電極」である。酵素、固定化膜、電極は切り離すことができるが、それぞれは独立しては成立しない。第三世代では、酵素、固定化膜、電極が一体となり切り離すことができない。また、第二世代では主に酵素センサーが中心であったが、第三世代からは、酵素センサーのほかにアフィニティバイオセンサーが含まれる。よって、信号変換素子は、電極だけではなく半導体電子デバイス、表面プラズモン共鳴、水晶振動子などが挙げられる。そして、第四世代では、複数種類の分子識別素子と複数種類の信号変換素子からなり、より高度な情報を検出するバイオセンサーとなっている。本稿の対象は、主に第四世代である。

第四世代センサーでは、既存物を組み合わせる手法ではなく、トータルの視点からの設計製作が必要となってくる。信号変換素子は半導体/マイクロマシーン技術を使用し、これらの技術はドライプロセスであるのに生体分子は水溶液中において機能を発揮する。ドライプロセスであるプラズマ重合膜を利用することで、バイオセンサーの作製プロセスは、ウェットプロセスを最小限にすることができる。ウェットプロセスは、行程の最後に遂行することが理想である。しかし、本報告により生体分子はプラズマプロセス中でもほとんど壊れることがないことが分かっているため、どの行程にも組み込むことができる。表面プラズモン共鳴バイオセンサーや水晶振動子バイオセンサーの信号変換素子の作製のプロセスには、金属のスパッタリングが不可欠であり、更にその金属上の微小部分に生体分子を固定化する必要がある。このような状況ではプラズマ重合膜は好適となる。更にスパッタリングとプラズマ重合膜を真空一貫プロセスで行えば、高効率で高品質のデバイスが作製できる。実際、著者らのグループではこのような装置でのバイオセンサーの作製を行っている。また、プラズマプロセスは、古くからポリマーの表面改質に利用された実績があるので、プラスチック BioMEMS や電気泳動チップの表面処理及びコーティングとしても有用である。

今後も微小分析システム, DNA チップ及びプロテイン チップなどの新世代のバイオセンサーの研究開発が進み, プラズマ重合/プロセスはそれらを陰から支える重要な技術であり続けると考えられる。

本研究を行う機会を与えていただいた軽部征夫教授 (東京工科大学バイオニクス学部長) に深謝します。

文 献

- 1) L. C. Clark, Jr., C. Lyons: *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **102**, 29 (1962).
- 2) S. J. Updike, G. P. Hicks: *Nature*, **214**, 986 (1967).
- 3) V. Silin, A. Plant: *Trends Biotech.*, **15**, 353 (1997).
- 4) C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault: *Biosensors Bioelectron.*, **14**, 663 (1999).
- 5) G. Ramsay: *Nature Biotech.*, **16**, 40 (1998).
- 6) 竹中繁織: 高分子, **52**, 123 (2003).
- 7) M. C. Pirrung: *Angew. Chem. Int. Ed.*, **41**, 1276 (2002).
- 8) G. T. Kovacs, K. Peterson, M. Albin: *Anal. Chem.*, **68**, 407A (1996).
- 9) P.-A. Auroux, D. Iossifidis, D. R. Reyees, A. Manz: *Anal. Chem.*, **74**, 2637 (2002).
- 10) J. Wang, M. Pumera, M. P. Chatrathi, A. Escarpa, R. Konrad, A. Griebel, W. Dorner, H. Lowe: *Electrophoresis*, **23**, 596 (2002).
- 11) H. Nakamura, Y. Murakami, K. Yokoyama, E. Tamiya, I. Karube, T. Suda, S. Uchiyama: *Anal. Chem.*, **73**, 373 (2001).
- 12) 軒原清史: 蛋白質核酸酵素, **47**, 626 (2002).
- 13) 杉本直己, 安田恭子: 未来材料, **3**, 40 (2003).
- 14) H. Muguruma, I. Karube: *TrAC-Trends Anal. Chem.*, **18**, 62 (1999).
- 15) H. Yasuda: "Plasma Polymerization", (1985), (Academic Press, New York).
- 16) D. S. Everhart, C. N. Reilley: *Anal. Chem.*, **53**, 665 (1981).
- 17) H. Muguruma, I. Karube, M. Saito: *Chem. Lett.*, **1996**, 283.
- 18) A. T. Bell, T. Wydeven, C. C. Johnson: *J. Appl. Polym. Sci.*, **19**, 1911 (1975).
- 19) A. Hiratsuka, H. Muguruma, R. Nagata, R. Nakamura, K. Sato, S. Uchiyama, I. Karube: *J. Membr. Sci.*, **175**, 25 (2000).
- 20) I. Tajima, M. Yamamoto: *J. Polym. Sci., Polym. Chem. Ed.*, **23**, 615 (1985).
- 21) F. P. M. Mercx: *Polymer*, **35**, 2098 (1994).
- 22) D. Briggs, C. R. Kendall: *Int. J. Adhesion Adhesives*, **1**, 13 (1982).
- 23) Y. Lin, H. Yasuda: *J. Appl. Poly. Sci.*, **60**, 543 (1996).
- 24) H. P. Schreiber, M. R. Wertheimer, A. M. Wrobel: *Thin Solid Films*, **72**, 487 (1980).
- 25) C.-P. Ho, H. Yasuda: *J. Biomed. Mater. Res.*, **22**, 919 (1988).
- 26) D. Brosset, B. Ai, Y. Segui: *Appl. Phys. Lett.*, **33**, 87 (1978).
- 27) P. K. Tien, G. Smolinsky, R. J. Martin: *J. Appl. Opt.*, **11**, 637 (1972).
- 28) E. Radeva: *Sens. Actuators B*, **44**, 275 (1997).
- 29) S. Kurosawa, N. Kamo, D. Matsui, Y. Kobatake: *Anal. Chem.*, **62**, 353 (1990).
- 30) G. Kampfrath, R. Hintsche: *Anal. Lett.*, **22**, 2423 (1989).
- 31) K. Yoshimura, T. Kitade, K. Kitamura, K. Hozumi: *Microchem. J.*, **43**, 133 (1991).
- 32) A. Hiratsuka, H. Muguruma, S. Sasaki, K. Ikebukuro, I. Karube: *Electroanalysis*, **11**, 1098 (1999).
- 33) H. Muguruma, A. Hiratsuka, I. Karube: *Anal. Chem.*, **72**, 2671 (2000).
- 34) N. C. Foulds, C. R. Lowe: *Anal. Chem.*, **60**, 2473 (1988).
- 35) A. Heller: *Acc. Chem. Res.*, **23**, 128 (1990).
- 36) 六車仁志, 平塚淳典, 小嶋謙一, 鈴木博章, 池袋一典, 軽部征夫: 電気学会誌 E 部門誌, **E-121**, 445 (2001).
- 37) A. Hiratsuka, K. Kojima, H. Suzuki, H. Muguruma, K. Ikebukuro, I. Karube: *Analyst*, **126**, 658 (2001).
- 38) C.-Y. Chen, M. Gotoh, H. Makino, Y.-C. Su, E. Tamiya, I. Karube: *Anal. Chim. Acta*, **265**, 5 (1992).
- 39) Q. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins: *Electroanalysis*, **9**, 1252 (1997).
- 40) Q. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins: *Biosensors Bioelectron.*, **14**, 203 (1999).
- 41) H. Suzuki, A. Hiratsuka, S. Sasaki, I. Karube: *Sens. Actuators B*, **46**, 104 (1998).
- 42) R. F. B. Turner, D. J. Harrison, R. V. Rajotte, H. P. Baltes: *Sens. Actuators B*, **1**, 561 (1990).
- 43) A. Hiratsuka, H. Muguruma, K.-H. Lee, I. Karube: *Biosensors Bioelectron.*, in press.
- 44) C. S. Effenhauser, G. J. M. Bruin, A. Paulus, M. Ehrat: *Anal. Chem.*, **69**, 3451 (1997).
- 45) H.-K. Chang, Y.-K. Kim: *Sens. Actuators B*, **84**, 342 (2000).
- 46) A. Hiratsuka, K. Kojima, H. Muguruma, K.-H. Lee, H. Suzuki, I. Karube: submitted.
- 47) J. Tkáč, I. Voštier, P. Gemeiner, E. Šturdík: *Bioelectrochemistry*, **55**, 149 (2002).
- 48) S. Yabuki, F. Mizutani, Y. Hirata: *Electroanalysis*, **13**, 380 (2001).
- 49) H. Liu, H. Li, T. Ying, K. Sun, Y. Qin, D. Qi: *Anal. Chim. Acta*, **358**, 137 (1998).
- 50) D.-M. Zhou, H.-X. Ju, H.-Y. Chen: *Sens. Actuators B*, **40**, 89 (1997).
- 51) H. Bu, A. M. English, S. R. Mikkelsen: *Anal. Chem.*, **68**, 3951 (1996).
- 52) K. Nakanishi, H. Muguruma, I. Karube: *Anal. Chem.*, **68**, 1695 (1996).
- 53) K. Nakanishi, M. Adachi, Y. Sako, Y. Ishida, H. Muguruma, I. Karube: *Anal. Lett.*, **29**, 1247 (1996).
- 54) R. Nakamura, H. Muguruma, K. Ikebukuro, S. Sasaki, R. Nagata, I. Karube, H. Pedersen: *Anal. Chem.*, **69**, 4649 (1997).
- 55) H. Muguruma, R. Nagata, R. Nakamura, K. Sato, S. Uchiyama, I. Karube: *Anal. Sci.*, **16**, 347 (2000).
- 56) "BIATECHNOLOGY Handbook", Chap. 5, (1994), (Pharmacia Biosensor AB, Uppsala, Sweden).
- 57) H. Miyachi, A. Hiratsuka, K. Ikebukuro, K. Yano, H. Muguruma, I. Karube: *Biotech. Bioeng.*, **69**, 323 (2000).
- 58) K. Kojima, A. Hiratsuka, H. Suzuki, K. Yano, K. Ikebukuro, I. Karube: *Anal. Chem.*, **75**, 1116 (2003).
- 59) S.-W. Tsai, M. Loughran, A. Hiratsuka, K. Yano, I. Karube: *Analyst*, **128**, 237 (2003).
- 60) F. W. Scheller, F. Schubert, R. Renneberg, H.-G. Muller, M. Janchen, H. Weise: *Biosensors*, **1**, 135 (1985).

要 旨

バイオセンサーは、生物の持つ優れた分子識別力を物理的信号変換素子に結合させることにより、特定の化学物質の情報を電気信号に変換する電子デバイスである。これまで、著者らはプラズマ重合膜が生体物質と信号変換素子を効率よく接続させるインターフェース設計に有効であることを示した。プラズマ重合膜は、重合反応を気相中で行わせ、基板表面に直接に極薄膜として形成される。バイオセンサーのトレンドは、主に次の2点に集約される。第1は、バイオセンサーを微小分析システムに組み込むことである。溶媒の節約、微量の測定サンプル、分析時間や費用の低減などの利点があり、その利用価値は大きくなる。第2は、ポストゲノム指向のバイオセンサーの開発である。例えば、遺伝子の発現解析や一塩基変異多形を簡便に検出できるDNAチップ、遺伝情報に基づいて発現するタンパク質群プロテオーム解析を簡便に行うことのできるプロテインチップなどは有用である。本論文では、「新世代」バイオセンサーの設計製作におけるプラズマ重合膜の意義について総合的に議論する。