関西大学理工学会誌
理工学と技術
Vol.25(2018)

解　説

水晶を用いたデバイスと生体分子計測への応用

伊藤　健*

Detection of biomolecules using quartz crystal devices

Takeshi ITO

1．はじめに

1.1　水晶とは

ガラスは、建物や自動車などの窓材料として広く使われているし、スマートフォン、PCや液晶テレビの画面としても利用されていて私たちの身近に存在している。ガラスは、非晶質であり、主にSiO_2（二酸化ケイ素）から成る材料である。二酸化ケイ素と微量な混合物を変化させることで多種多様なガラスを作り出すことができる。一方で、二酸化ケイ素が結晶化したものが水晶である。水晶は、地球を構成する岩石の多くに含まれており、主に山梨県などで採掘されている。山梨県の約4500年前の遺跡から、水晶石器加工址が発見されるなど水晶は古くから私たちの身の回りに存在していた。結晶中に鉄が含まれると宝石としても価値のあるアメジスト（紫水晶）となることは広く知られている。

水晶は、現代の私たちの生活においても欠かせない材料となっている。天然の水晶は必要量を確保することが難しく、原料としても無駄が多かったため20世紀に入り人工的に作られるようになった。水晶を人工的に作製する技術は、1905年にイタリアのG. Speziaが水熱合成法により人工水晶を育成したのが始まりである。国内でも村田製作所、セイコーエプソン、日本電波工業などが生産を行っている。水晶は、圧電素子としても良く知られている。水晶に圧力を加えると電荷が発生することは、圧電効果（圧電現象）と呼ばれ広く知られている。圧電効果は、1880年にキューリー兄弟により発見され、1903年にノーベル賞を受賞している。また、1881年には、電圧を印可すると水晶が変動する（逆圧電効果）現象も確認している。私たちは、現在この現象に基づいたデバイスを身近なところで利用している。水晶に加える電圧が高周波の場合には、特定の周波数で共振する。この特性を利用して、ATカット水晶振動子、音叉型水晶振動子など様々なデバイスに利用されている。

1.2　水晶振動子を用いたデバイス（SAW, QCM）

水晶は、結晶から切り出す角度によって電気的特性が異なる。X軸に対して垂直に切り出した水晶板はXカット、y軸に対して垂直に切り出した水晶板をYカットといい、さらにこれをX軸回りに回転させてz軸となす角を約35°としたものをATカット、約42°にしたものをSTカットと呼んでいる。ATカットは、常温（25℃）において周波数変化の小さい材料として見出されたものである。また、ATカットは、図1に示すように水晶板表面に対して平行な方向に振動する「ずり振動」を生じる。

水晶振動子を用いた最も販売数の多いデバイスといえばSAW（Surface Acoustic Wave：弾性表面波）デバイスであろう。SAWデバイスは、物質の表面を伝播する波を利用したデバイスで、電磁波のフィルターとして携帯電話（スマホ）やPCなどに広く普及している。SAWデバイスにはSTカットといわれる水晶振動子が利用されている。携帯電話は世界規模で見れば、多くの周波数帯が使われている。近年は、1つの携帯電話で世界中のどこでも使用できるようにするため周波数帯の異なる複数のSAWフィルターが搭載されている。SAWフィルターを利用することで、入力

原稿受付　平成30年9月22日
*システム理工学部 機械工学科 教授

された高周波信号を水晶基板の圧電効果により数μm程度の波長の表面波に変換し、その表面波を水晶板上に伝播させ必要な周波数のみを取り出すことができる。また、SAWを用いたガスセンサの開発も行われている。

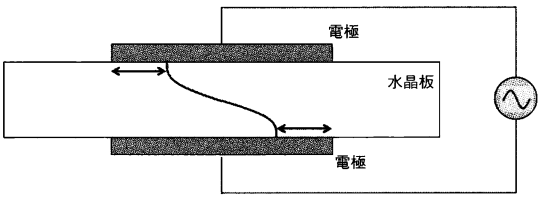


図1　水晶振動子に交流電圧を印可した時の断面模式図

QCM（Quartz Crystal Microbalance：水晶振動子マイクロバランス）法は、図1に示すようにATカット水晶に対して、電極を上下で挟み込んだデバイスを用いる。水晶を振動させる電極上に物質が吸着すると、振動が妨げられるために共振周波数が低下するという原理に基づいた微量の天秤として利用されている。この関係は、Sauerbrey式として知られている。

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

ここで、F_0は共振周波数、ΔFは共振周波数の変化量、Δmは付着した物質の重さ、Aは電極面積、ρは水晶の密度、μは水晶の弾性率を示す。

QCM法を用いたデバイスは、原理、製造が簡便であり、安価、小型化が容易などの点からガスセンサ、バイオセンサ、環境センサなどへの応用が期待されている。バイオへの応用を考えた際には、ラベル化が必要ない、リアルタイム計測が可能などの利点もある。一方で、検出原理から分子量の小さな物質の計測が困難である。本稿では、その欠点を解決するために、電極上にナノ構造を作製することで比表面積を増加させ、高感度化について検討した結果について報告する。

2．QCM法の原理と高感度化

(1) 式から、電極表面への物質吸着に伴う周波数変化は、共振周波数の二乗に比例することから、QCM法を用いたデバイスを高感度化するには共振周波数を上昇させることが一つの手段である。共振周波数と水晶の厚み（t [mm]）との関係は次式で示される。

$$F_0 = \frac{1670}{t}\ [KHz] \quad (2)$$

現在市販されている基本モードでの共振周波数で最も大きなものは30MHzであり、(2) 式からその厚みは約55μmとなる。この厚みの水晶は、非常に割れやすく扱うのが難しい。共振周波数が30MHz、電極面積が7.75mm^{2}である場合には、1Hzの周波数変化は37pgに相当し、かなりの高感度な天秤といえる[1]。しかし、体内に存在する微量な生体分子を測定するには十分な感度とは言えない。例えば、ストレスホルモンであるコルチゾールは分子量が362であり、血液中には数ng/mL、唾液中には数百pg/mLで存在している[1]。つまり、モル濃度に換算すると10^{-8}Mとなり、簡単には測定できない。そのため、バイオセンサーとしてQCM法を利用するにはさらなる高感度化の技術が求められている。Ogiらは、極薄の水晶を用いたQCM法を提案しているが[2]、極薄の水晶板の取り扱いが難しく、さらに特殊な電源を必要とするなどの課題がある。私たちは、水晶振動子上にナノ構造を作製することで物質が吸着できる表面を増加させることでセンサを高感度化する取り組みを行ってきた。ナノ構造は比表面積が大きいことで知られ、自己組織的に簡便に作製することができる。このような大きな比表面積を利用することで計算上は10倍以上の表面積増加を達成できる。

3．事例紹介

3.1　電極上に金樹状構造をめっきで作る

電解めっきは、電子デバイスを作製する際に良く利用されている技術である。めっき液中に導電体を浸漬し、一定の電圧（または電流）を加えることで導電体表面にめっきしたい金属材料を析出させる。また、めっき液に添加物を加えることで金属光沢が得られたり、逆に表面を荒らすことも可能である。添加物としてポリエチレングリコール（PEG）を加えると、PEG分子が電極材料に部分的に吸着することでめっきを妨げる。この効果によって、ところどころでめっきが進む箇所と抑制される場所ができる。本稿では、チオール結合により簡単にタンパク質を固定できることから、電極材料として金を用いた例を紹介する[3]。金薄膜に添加物を加えて金めっきを行った結果、図2に示すような樹状構造を作製することができた。図2は、めっき時間を5分とし、電圧を−0.9〜−1.05Vに変化させて作製した樹状構造を走査型電子顕微鏡（SEM）を用いて観察した写真である。図2より、めっき時の電圧が高いと、PEGによる抑制効果よりも電着効果が上回るため樹状構造が形成されない。一方、電圧が低いと成長が遅くなることがわかる。PEGの濃度を変化させると、めっきされた構造が変化することが確認でき、PEG濃度の上昇とともに平坦化されることが分かった。以上の結果から、PEG濃度は50ppm、めっ

き電圧は－0.95Vが樹状構造を得るのに最適な条件であることがわかった。

次に、水晶振動子上の電極にめっき時間を1、1.5、2分と変化させ、電圧を－0.95Vに設定して電解めっきを行い樹状構造を作製した。この電極に、抗体(anti Mouse-IgG)を固定化し、続いて非特異吸着防止のためウシ血清アルブミン（BSA）を固定化した。これを抗原抗体反応を計測するバイオセンサとして利用した。抗原であるMouse IgGを滴下して周波数変化をモニターした。比較のため、樹状構造を作製していないフラットな電極も同様に測定を行った。結果を図3に示す。抗原の滴下から5分程度で周波数変化は安定した。また、めっき時間1分とめっきをしていないセンサーの周波数変化量はほとんど変わらないが、めっき時間を増加させることで周波数変化量が増加していくことが確認できた。これは、めっき時間の増加により垂直方向または枝の成長が行われ、吸着表面積が増加したことに由来すると考えられる。

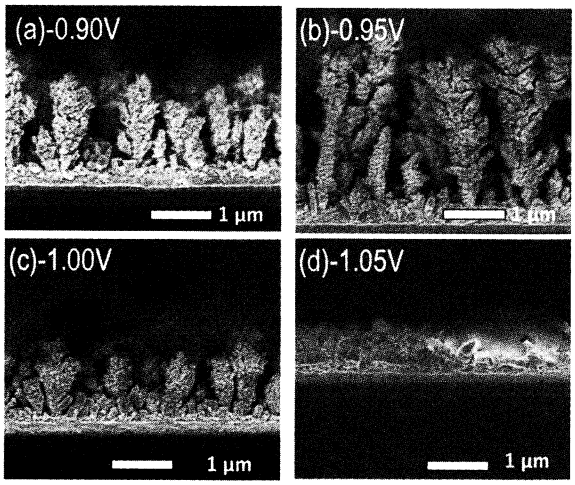


図2　5分間のめっき後の断面SEM像

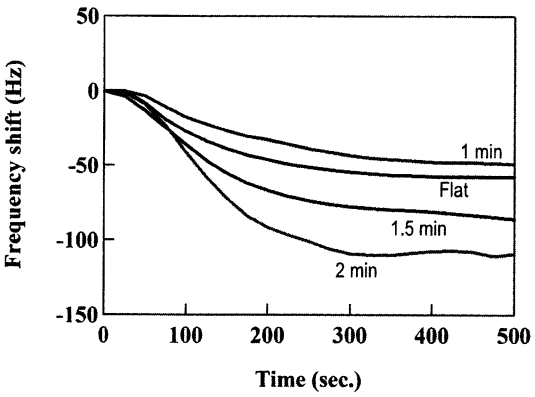


図3　樹状構造を作製した電極を用いて抗原抗体反応に伴う周波数変化を計測した例

3.2　ポーラスなナノ構造を電極上に作る

3.1で示したように、電極の上側に凸型のナノ構造を形成した場合には、ナノ構造を大きくすることで水晶の共振に必要なエネルギーが大きくなると共にノイズが大きくなることが分かった。その欠点を改善するため、凹型のナノ構造を作製するというアイデアに至った。陽極酸化アルミナ（AAO）は、電解液中でアルミニウムを陽極とし電圧を印可することでアルミニウムを酸化し、酸化被膜を作製する技術として工業的に利用されてきた。電解液として硫酸、リン酸、シュウ酸など酸性溶液を利用すると、酸化物層が酸および電場の作用により局所的に溶解し、ナノホールと呼ばれる自己組織的に規則配列した細孔を有する円筒状の微小孔を形成する[4]。そこで、水晶振動子上にアルミニウム薄膜を形成した後、その薄膜を陽極酸化することで無数の微小孔を形成することにした。

作製法を以下に記す。スパッタリングによりTi（膜厚：25nm）、Al（膜厚：1000nm）を順番に水晶振動子上（共振周波数9MHz）に製膜した。その後、シュウ酸（0.3M）溶液中でAl薄膜を電圧40Vの条件で陽極酸化した。陽極酸化だけでは、微小孔の直径が約30nmと極小であるため、リン酸に浸漬することでAAO層を徐々に溶解させて直径を拡大した。図4に作製したデバイスをSEMで観察した断面像及び上面像を示す。断面像から、微小孔は基板に対して垂直にあけられており、その直径は60nm程度であることが分かる。また、上面像から、密度は約100個/μm^2であった。以上の結果から、表面積は平坦な場合に比べて10倍ほど増加したことになる。

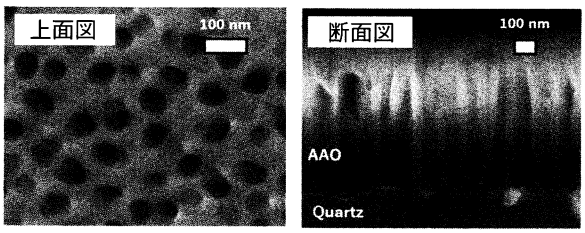


図4　水晶振動子上に堆積したアルミニウム薄膜を陽極酸化した後のSEM像
（左：上面図、右：断面図）

この水晶振動子をバイオセンサーとして利用するため、AAO構造に抗体を固定化した。3.1で述べたように、素材が金であればチオール結合を利用できるが、AAOはタンパク質に対して活性な結合基を持たない。そのため、AAO表面にアミノ基を有する自己組織化単分子膜（Self-Assembled Monolayer：SAM）を形成させた。アミノ基を介してタンパク質とアミド結合を行い、Anti Mouse-IgG及び非特異吸着防止のため

にBSAを順に結合させた。それぞれの作業後に共振周波数を測定したところ、プロトコルに従って共振周波数の低下が見られた。これは、（1）式に示したように電極表面に物質が吸着したことを意味しており、バイオセンサーとしての処理ができていることを示している。このセンサを用いて3.1と同様にMouse-IgGの抗原抗体反応を計測したところ、図5に示すような検量線を得た。ここで、ナノ構造の作製されていない金電極を用いたセンサを比較として測定した。図から、AAOを作製したセンサで得られた検量線の傾きはフラットな電極のセンサに比べて2～3倍となり高感度化に成功した。しかしながら、表面積の拡大から期待されるような10倍ほどの高感度化には至らなかった。この原因として、微小孔の径が小さすぎるために一度タンパク質が孔の中で結合すると、静電力などの影響により他のタンパク質が孔の深部まで入り込まないのではないかと考えている。

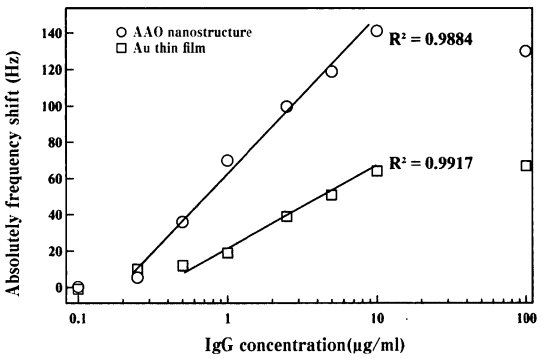


図5　AAOを電極としてもつセンサとフラットなセンサによる抗原抗体反応の計測結果

4．おわりに

本稿では、水晶振動子を用いたデバイスについて解説し、その応用先として生体分子を計測する技術について述べた。生体分子計測は、医療や創薬、基礎生化学などの多岐にわたり必要な技術である。国内では生活習慣病による患者数の増加が医療費の多くを占めることが問題となっており、国民医療費の削減には日々の生活のコントロールや発病する前の危険な状況をモニタリングする技術の開発が急務である。水晶振動子を用いたバイオセンサーはマイクロフルイディクスとの融合により安価、簡便な診断ツールとして期待されている。今後は、水晶振動子デバイスと光計測との融合により今まで計測できなかった生体分子の変形などをリアルタイムに捕えることができるデバイスの開発を行っていきたい。

謝辞

本研究の一部は、関西大学研究拠点形成支援事業、文部科学省私立大学戦略的研究基盤形成支援事業「三次元ナノ・マイクロ」、村田学術振興財団研究助成金を受けて実施された。

参考文献

[1] T. Ito, N. Aoki, S. Kaneko, K. Suzuki, "Highly sensitive and rapid sequential cortisol detection using twin sensor QCM", Anal. Methods, 6, 7469-7474 (2014).

[2] H. Ogi, K. Motohisa, T. Matsumoto, K. Hatanaka, M. Hirano, "Isolated Electrodeless High-Frequency Quartz Crystal Microbalance for Immunosensors", Anal. Chem., 78, 6903-6909 (2006).

[3] N. Asai, H. Terasawa, T. Shimizu, S. Shingubara, T. Ito, "Highly sensitive quartz crystal microbalance based biosensor using Au dendrite structure", J. J. Appl.Phys., 57, 02CD01 (2018).

[4] P. Hoyer, K. Nishino, H. Masuda, "Preparation of regularly structured porous metal membranes with two different hole diameters at the two sides", Thin Solid Films, 286, 88-91 (1996).