

フレキシブル有機トランジスタ型センサによる 乳酸のリアルタイム計測法の開発

東 京 大 学 南 豪

Development of a Flexible Organic Transistor-Based Sensor for Real-Time Monitoring of Lactate Levels

by

Tsuyoshi Minami
*Institute of Industrial Science,
The University of Tokyo*

ABSTRACT

A novel flexible biosensor for the lactate detection based on organic thin-film transistors (OTFTs) is demonstrated. Because lactate is well known as a biomarker for assessing physical performance of human body, flexible (and wearable) lactate sensors could contribute the monitoring of human health conditions. The designed OTFT for the flexible biosensor device can be fabricated on a plastic substrate, and it is operated under low-voltage. The flexible OTFT shows stable electric-characteristics. In addition, the fabricated OTFT possesses an extended-gate electrode modified with layers of a lactate oxidase, a horseradish peroxidase, and an osmium-redox polymer for lactate detection in aqueous media, meaning that the continuous measurement of lactate levels has been successfully demonstrated. We believe that insight obtained opens up opportunities for applying OTFTs in wearable and flexible biosensor devices.

要 旨

本研究では、有機薄膜トランジスタ (OTFT) に基づく乳酸検出用フレキシブルセンサの実証実験をおこなった。乳酸は運動生理学における指標として知られており、フレキシブル (かつウェアラブルな) 乳酸センサの実現によって、運動負荷状態のモニタリングに寄与し得る。フレキシブルセンサデバイスのために最適化された OTFT は、プラスチック基板上に実装され、低電圧駆動領域において安定した電気特性を示した。当該 OTFT に対し、水溶液中の選択的乳酸検出に向けた検出機構 (乳酸酸化酵素膜および電子伝達膜) 導入電極 (延長ゲート電極) を組み合わせることで、乳酸濃度の連続計測を達成した。本成果により、フレキシブル OTFT 型センサの活用により、含汗中乳酸のリアルタイム計測技術の実現が可能であることが示された。

緒 言

血中や汗中の乳酸濃度は運動生理学において重要な指標となっており、運動時の血中乳酸濃度の上昇が緩やかなほど、高負荷の運動を長時間持続させることができることが知られている¹⁾。乳酸は解糖系生成物の一種であり、筋肉細胞内においてエネルギー源である糖から分解され体内に蓄積される。乳酸濃度は運動による筋肉への負荷と相関性があることから、その変動を計測することは生理学的観点から意義深い。運動選手のパフォーマンスを効率よく向上させるためには、トレーニング中に乳酸濃度を測定し、そのデータをもとにトレーニングの運動強度及び量をデザインかつファインチューニングできることが理想とされる。とりわけ 2020 年に東京オリンピックを迎える我が国においては、このようなスポーツマネジメントは意義深いと言えるだろう。しかし、血中の乳酸濃度を測定するには、当然皮膚を傷つけ

て血液を採取しなければならない。最近では、ごく少量の血液で分析可能になってきてはいるものの、簡易に測定できるとは言えず、運動中のリアルタイム測定も困難であるため、全く新しいモニタリング法の開発が必要である。その解の有力候補のひとつとして、皮膚に貼ることも可能な有機薄膜トランジスタ (OTFT) があるのではないかと考えた。

OTFT は電子デバイスであるもののしなやかな構造、印刷法による大面積・低コスト製造、低環境負荷・簡便な製作工程といった特色が挙げられる。我々は OTFT をプラスチック基板上に作製することに成功しており²⁾、当該デバイスに生理活性物質検出機構を組み入れたセンサデバイスを種々開発してきた³⁾。そこで本研究では、からだ (皮膚) に直接貼ることで、運動時における含汗中乳酸をリアルタイムで検出できるウェアラブル OTFT 乳酸センサの開発を目的とし、検出用デバイスの最適化およびその検出能について調査をおこなった。

1. 研究方法

1. 1 OTFT 型センサのデバイス設計

乳酸は我々の体液 (水系媒質) 中に含まれるため、それらを検出するセンサデバイスは湿式雰囲気下において安定した動作を実現する必要がある。すなわち、(1) 活性層となる有機半導体層の測定溶液への曝露の抑制、(2) 電気分解反応が発生しない印加電圧の 2 点に着目してデバイス設計を行うことで、乳酸検出用デバイスの構築に取り組んだ。

安定した検出信号を得るため、信号変化部と検出部を物理的に分離させた延長ゲート型構造のセンサデバイス⁴⁾を構築した (図 1)。当該構造は検出部位とトランジスタによる信号変換部位が分離されており、検出の際に駆動部が直接に水に曝露されないために、安定して動作させることがで

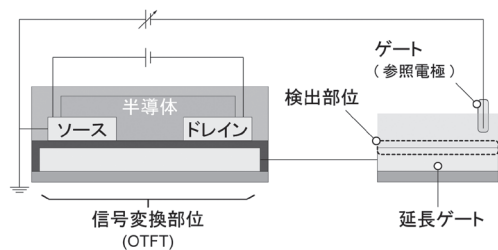


図1 延長ゲート型OTFTの基本構造

きる。具体的には、一部を延伸させたゲート電極上にて標的化学種が捕捉された際、測定溶液/電極界面の電位変化が発生し、これに起因して電界効果の変化が生じることから、トランジスタの出力信号に“ずれ”が生じる。この出力信号の差異は、電極表面における化学種捕捉または電子授受反応に由来し、その濃度に依存した変化を呈することから、OTFTによる電気的化学種検出が達成し得る。また本構造は、検出部位に分子認識材料を容易に修飾することができるため、標的に合わせた自由なセンサ設計が可能となる利点も併せ持っている。延長ゲート電極には、高い化学安定性を有する金薄膜（50nm厚）を用いた。なお、制御電圧（＝ゲート電圧）は、参照電極（Ag/AgCl）を介して印加することで、延長ゲート電極上での電位変化を正確に読み出せるようにしている。一般的な電位差測定型の電気化学セルと比較すると、OTFTを介する本検出法はデバイスの小型化に伴うノイズ増大の抑制が期待でき、また信号増幅回路や無線回路中への組み込みも容易となる利点を有している。

次に、OTFTの低電圧駆動化への取り組みとして、テトラデシルホスホン酸SAMと金属酸化膜を組み合わせた高容量キャパシタをゲート誘電体に適用することとした⁵⁾。SAMは有機半導体/誘電体界面に存在するキャリアトラップ因子を化学的に除去し、またその高度かつ緻密な集合状態に由来して、その上に形成される有機半導体膜の分子配向性や結晶性を高める効果や、デバイスの

歩留まりを劇的に向上することが知られている。OTFT型センサデバイスの実証にあたり、筆者らは広く知られているテトラデシルホスホン酸と酸化アルミニウムの積層膜⁶⁾を適用することで低電圧駆動化（<3V）を達成した。また、活性層には蒸着型の低分子半導体（DNNT）または塗布型の高分子半導体（PBTTT）を用いることで、高い素子の歩留まりを実現し、センサ評価に耐える再現性を担保した。デバイス作製条件の詳細は1.3節および1.4節にて述べる。

1. 2 酵素に基づく乳酸検出部位の構築

標的化学種を延長ゲート電極上にて特異的に捕捉するためには、抗体や酵素などの天然由来の分子認識材料や、ホスト-ゲスト化学に基づき設計された人工レセプタ分子を電極表面に固定する必要がある。本研究では汗中の乳酸のリアルタイムモニタリングを最終目標としていることから、次の点に留意した検出部位の構築に取り組んだ。

(1) 高選択性乳酸認識材料の選定：様々な夾雑物質が存在する水系中において、選択的に乳酸のみを識別する必要があることから、本研究では乳酸酸化酵素を認識材料として用いることとした。酵素は「生体触媒」とも呼ばれ、我々の生命活動における化学反応の介在役として作用しており、標的化学種に対する高い選択性（＝基質特異性）を有していることから、デバイス中に組み込むことで高選択的な標的検出が可能であると考えた。

(2) 電子伝達機構の導入：乳酸のリアルタイム計測のためには、濃度変化に追従するよう応答系を酵素—デバイス間に挿入する必要がある。酵素が反応する際は、標的化学種—酵素間において電子の授受が発生することから、OTFT—酵素間の電子移動を可能にする仕組みをデバイス中に組み込むことで、連続的な乳酸濃度変化＝酵素反応の変化を電気的に読み出すことができるものと考えた。そこで本研究では、乳酸酸化酵素と延長ゲー

ト電極の間に電子伝達層となるオスミウム錯体ポリマーと西洋ワサビペルオキシダーゼ (HRP) の混合膜⁷⁾を延長ゲート電極上に修飾し、その上に乳酸酸化酵素を塗布後、グルタルアルデヒドによって架橋することで、電極上への乳酸検出系の構築を達成した。酵素修飾電極作製手順については、次節以降にて述べる。

1. 3 OTFT による乳酸検出検証実験

1. 1 節・1. 2 節において示したデバイス設計指針に基づき、原理実証実験として分離型センサデバイスの作製と乳酸検出能の調査をおこなった。本実験では、OTFT を用いて、水溶液中の乳酸が電気特性変化により選択的に検出できることを実証することを目標とした。

デバイスの構造を図2に示す。信号変換部位となる OTFT はガラス基板 (Corning 社 Eagle[®] XG, 20×25mm 角) 上に作製した。はじめにゲート電極となるアルミニウム薄膜 (膜厚: 30nm) を真空蒸着法によって形成した。電極パターンは、メタルマスクを併用することでおこなった。次に、絶縁膜として酸化アルミニウム (膜厚: 約 5nm) とテトラデシルホスホン酸 SAM (膜厚: 約 2nm) からなる二重層を形成した。酸化アルミニウムは、アルミニウムゲート電極の表面に酸素ガスによる

反応性イオンエッチング処理を行うことで、表面酸化膜として形成した。なお、この際の酸化条件は、電界出力 300W, 反応時間 50min とした。次に、当該基板を 2-プロパノールを溶媒としたテトラデシルホスホン酸 (TDPA) 溶液 (1mM) に 16 時間・室温にて浸漬させ、その後 2-プロパノールによる洗浄および窒素乾燥をおこなうことで、TDPA-SAM を形成した。ソース・ドレイン電極は、メタルマスクを介し、金薄膜 (膜厚: 30nm) を真空蒸着することでパターニング形成 (電極形状の形成) をおこなった。この際のチャネル長とチャネル幅はそれぞれ 50 μm と 1000 μm であった。その後、半導体層を選択的にパターニング形成するため、撥液性バンク層をマイクロディスペンス装置 (武蔵エンジニアリング社) によって形成した。この際、1wt% となるよう調製したテフロン溶液 (Teflon[®] AF1600, 溶媒: FC-43) を基板上にディスペンスした後、基板をベーキングすることで十分に乾燥させた (100℃ /10min)。次に、PBTtT (poly{2,5-bis (3-hexadecylthiophene-2-yl) thieno[3,2-b]thiophene}) の 0.03wt% 溶液 (溶媒: 1,2-ジクロロベンゼン) を調製し、窒素雰囲気下にて基板の撥液性バンク層内にドロップキャストすることで半導体層を形成した。この際、溶媒が乾燥した後に基板をアニーリング (150℃

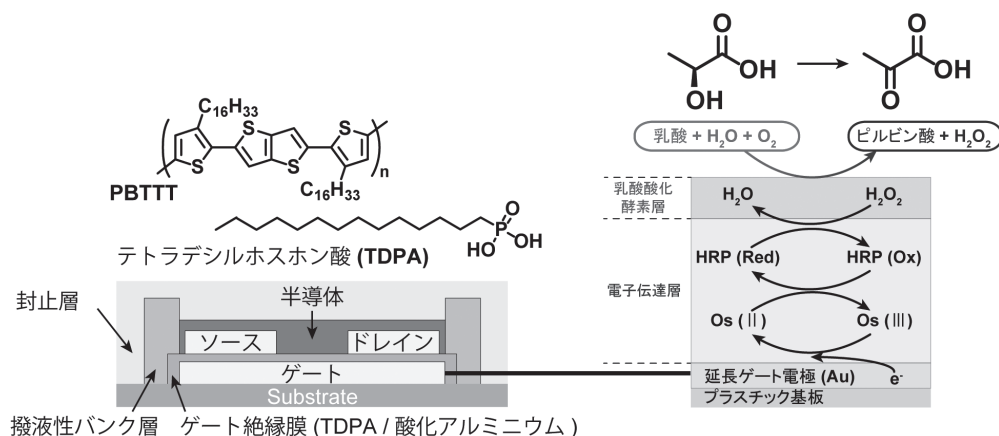


図2 原理検証用OTFTの構造

/30min) 処理することで、液晶相熱転移による半導体分子の自己整列を誘発させ、再現性の良い半導体薄膜の形成を達成した。最後に、フッ素樹脂サイトップ（旭硝子社製 CTL-809M）を基板の上に滴下してスピコート成膜後、ペーキング（100℃/10min）することでデバイスの封止層を形成し、OTFT を完成させた。

延長ゲート部位としては、ポリエチレンナフタレートフィルム（帝人デュポン社製）を基板とし、真空蒸着機を用いて金薄膜を蒸着成膜することで延長ゲート電極を形成した（膜厚：70nm）。次に、オスミウム錯体ポリマーと西洋ワサビペルオキシダーゼの混合水溶液を電極上に塗布し、12時間低温乾燥（4℃）させることで電子伝達層を形成した。次に、0.5units/ μ l に調整した乳酸酸化酵素とグルタルアルデヒド混合水溶液を電子伝達層上に塗布し、30min 室温にて乾燥させることで、酵素修飾型検出電極を完成させた。

作製した OTFT と延長ゲート電極は導電ケーブルによって接続し、イオン交換膜と内部液（3 M NaCl）を擁する Ag/AgCl 参照電極（BAS 社製 RE-1S）および延長ゲート電極を併せて測定溶液中に浸漬させることで、滴定実験をおこなった。なお、電圧源および電流計としてソースメーター（ケースレー社製 2636B）を用いることで、電気特性評価および乳酸滴定実験をおこなった。また、乳酸溶液は緩衝水溶液（緩衝剤：100mM HEPES, pH7.4）を媒質として調製した。

1. 4 ウェアラブル化に向けた検証実験

次に、OTFT 型センサのウェアラブル化を指向した検証実験として、フレキシブル（プラスチック）基板の上に OTFT および検出部位が実装・集積化された一体型 OTFT の作製をおこない、水溶液中に含まれる乳酸の連続濃度変化測定に取り組んだ。

デバイスの構造を図 3 に示す。フレキシブル基

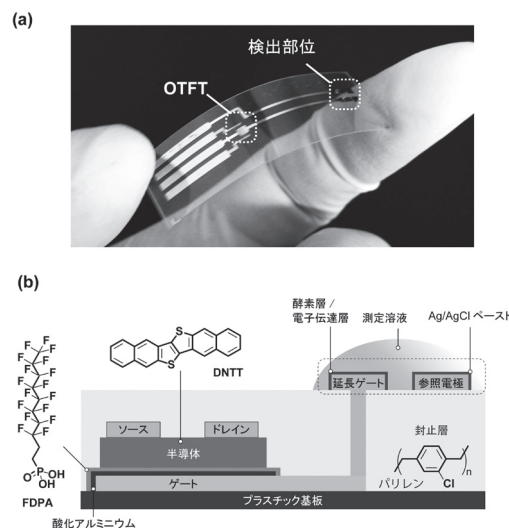


図3 一体型OTFT乳酸センサの(a)外観および(b)構造

板には、耐溶剤性・耐熱性や機械的強度を考慮して、前節の延長ゲート電極同様ポリエチレンナフタレート基板（膜厚：125 μ m）を用いた。デバイス構成要素は前節に記載した原理検証用 OTFT をほとんど踏襲しているが、フレキシブル化に伴う歩留まり向上のため、下記の点において改良を加えた。なお、検出電極上の酵素および電子伝達層の形成は、前節の条件を踏襲した。

(1) 酸化アルミニウムの形成：プラスチック基板へのダメージを低減させるため、反応性イオンエッチング装置による酸化時間を 15min に短縮した。

(2) SAM 材料の変更：(1) における酸化時間減少に伴うゲート表面の反応点（水酸基）数の減少と、それに伴う SAM 密度の低下が予想されたことから、フッ素化アルキル鎖を有するホスホン酸誘導体（FDPA; 1H, 1H, 2H, 2H-Perfluoro-n-decylphosphonic acid）へと SAM 材料を変更することで、キャリアトラップ因子への影響を低減させた。

(3) 蒸着系半導体の適用：フレキシブル基板の適用と反応性イオンエッチング処理によっ

て、ゲート絶縁膜表面の平滑性が損なわれていることが予想されたため、基板表面の凸凹に追従して薄膜形成が可能な蒸着プロセスによる半導体層形成をおこなった。具体的には、DNTT (Dinaphtho[2,3-*b*:2',3'-*f*]thieno[3,2-*b*]thiophene) を半導体材料として適用することで、フレキシブル基板上においても再現性の良い OTFT 特性が得られるようデバイス構築をおこなった。

(4) 塗布型参照電極の形成：フレキシブル基板上には、イオン交換膜および内部液を擁する Ag/AgCl 参照電極を実装できないため、市販の Ag/AgCl インク (BAS 社製) をゲート電圧印加用金電極 (膜厚：100nm) に塗布することで疑似参照を形成した。

(5) パリレン封止膜の適用とビアホールによる検出部位—OTFT の接続：フレキシブル基板上に OTFT と検出部位を実装・集積化するため、パリレン薄膜 (膜厚：1 μm) を化学気相成長法によって OTFT 上に形成・封止した後、OTFT から延伸させた配線上にスクラッチ法によりビアホールを開けた。続いて、ビアホール上に延長ゲート電極およびゲート電圧印加用電極として金薄膜 (膜厚：100nm) を真空蒸着法によって形成し、検出部位の構築および OTFT への電気的接続を達成した。

3. 実験結果

3. 1 乳酸検出の原理検証⁸⁾

作製した原理検証用 OTFT (図 2) の基礎特性を評価したところ、低電圧印加 (3V 以下) においても安定性の良い電気特性が得られた。そこで当該デバイスを用いて乳酸滴定実験をおこなったところ、乳酸濃度変化に伴う OTFT の信号変化 (閾値電圧変化) がみられた (図 4)。一方で、汗中に含まれることが知られている乳酸以外の化学種 (例：グルコース、塩化ナトリウム、塩化カルシウム、尿素など) に対する滴定実験を同様に試みたところ、トランジスタ特性の変化はみられな

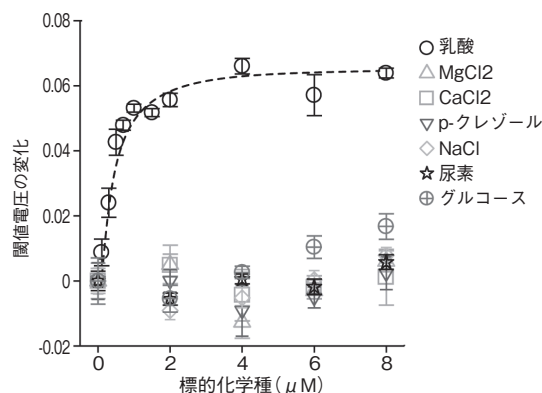


図 4 OTFT による乳酸の選択的検出結果

かったことから、酵素の基質特異性による選択的検出の達成を確認することができた (図 4)。また、乳酸に対する電気的応答は、1 μM 程度の低濃度域で得られており、汗中での乳酸検出に耐えうる感度を有することがわかった。このような OTFT の選択的かつ高感度な乳酸応答結果により、多種多様な妨害物質が存在する汗から乳酸濃度変化の追従して計測可能であることが示された。

3. 2 一体型 OTFT 乳酸センサによる連続乳酸濃度の検知⁹⁾

フレキシブル基板上に構築した OTFT (図 3) の基本特性を評価したところ、低電圧印加 (3V 以下) においてもヒステリシスのない良好な伝達・出力特性を示した (図 5)。このため、また、直流バイアスストレス試験をおこなったところ、長時間の電圧印加をおこなっても電気特性にほとんど変化が生じないことがわかった (図 6 (a))。また、60 回の連続電圧印加・電流測定をおこなったところ、バイアスストレス試験同様に電気特性 (ドレイン電流) にほとんど変化が見られなかった (図 6 (b))。このことから、当該フレキシブルデバイスが乳酸の連続計測に適用し得る安定性を有することがわかった。そこで、作製した OTFT 型センサを用い、連続的な乳酸濃度変化を追従可能であるかを検証したところ、乳酸濃度の

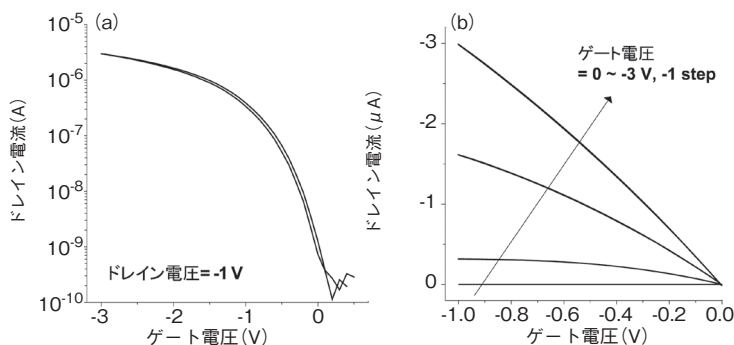


図5 一体型OTFTの (a)伝達特性および (b)出力特性

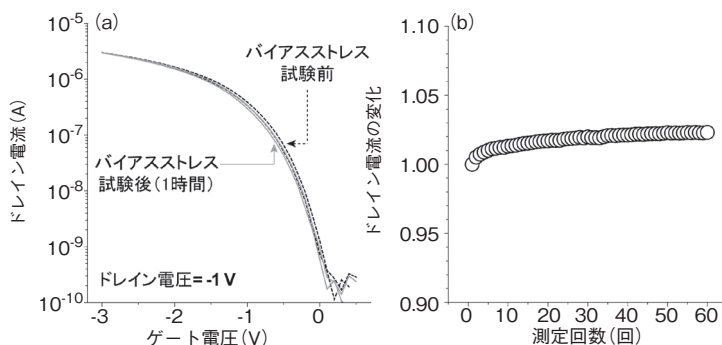


図6 一体型OTFTの安定性評価結果

(a)バイアスストレス試験による伝達特性の比較 (b)繰り返し測定によるドレイン電流の変化

連続的な変化に依存した電気特性の変化を示した (図 7)。本結果から、適切に設計した一体型 OTFT を活用することで、乳酸のリアルタイム電気計測が可能であることがわかった。

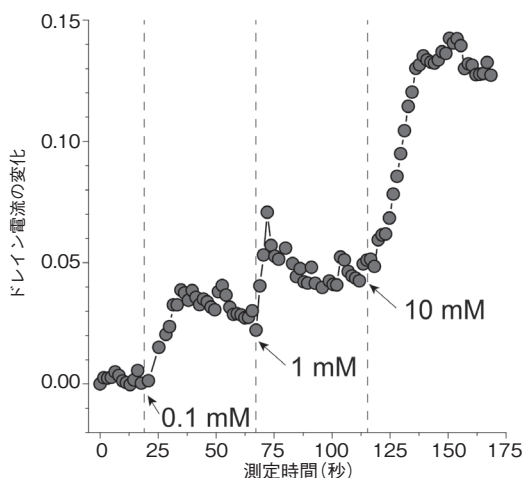


図7 一体型 OTFT による乳酸濃度変化の検知

4. 考 察

観測された OTFT の閾値電圧 (オフ状態からオン状態へと急峻に電流が増幅する際の印加ゲート電圧) の変化は、電氣的に浮遊状態にあるゲート電極電位が乳酸濃度増大によって変化したことを示唆している。すなわち、酵素反応により乳酸がピルビン酸へと変換することで、乳酸酸化酵素層—電子伝達層間および電子伝達層—電極間における電子の移動サイクルが生じ (図 2)、電極層全体の電位が変化したことで、乳酸濃度変化に依存した閾値電圧のズレが生じたものと考察される¹⁰⁾。本電子サイクルにより誘発される閾値電圧変化は、OTFT のドレイン電流値も同様に比例的に変化させることから、電子回路中に当該 OTFT を導入した際も、乳酸濃度に依存した回路特性の変化が期待される。

5. 総 括

以上のように、適切なデバイス設計と乳酸検出機構の導入を図ることで、水溶液中に含まれる乳酸を連続的・選択的に検出可能であることが示された。当該 OTFT 型乳酸センサと様々な周辺回路（オペアンプ、情報処理回路、無線伝送回路など）を組み合わせることによって、ウェアラブルセンサによる乳酸のリアルタイム計測が可能と考えられる。これまでは、濃度調整された乳酸水溶液を用いた原理検証実験をおこなってきたが、ヒト汗中に含まれる乳酸検知については現在検証中であり、今後追って報告していきたい。

謝 辞

本研究に対して研究助成を賜りました公益財団法人石本記念デサントスポーツ科学振興財団に深く感謝申し上げます。また、本研究遂行に尽力してくれた当研究室の南木創博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Robergs R. A., Ghiasvand F., Parker D., Biochemistry of exercise-induced metabolic acidosis, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **287**, R502-16 (2004)
- 2) Fukuda K., Minamiki T., Minami T., Watanabe M., Fukuda T., Kumaki D., Tokito S., Printed Organic Transistors with Uniform Electrical Performance and Their Application to Amplifiers in Biosensors, *Adv. Electron. Mater.*, **1**, 1400052 (2015)

- 3) Minami T., Exploratory Research of Chemical Sensors Based on Organic Transistors with Self-Assembled Monolayer-Functionalized Electrode, *Kobunshi Ronbunshu*, **73**, 453-463 (2016)
- 4) Minamiki T., Minami T., Kurita R., Niwa O., Wakida S., Fukuda K., Kumaki D., Tokito S., Accurate and reproducible detection of proteins in water using an extended-gate type organic transistor biosensor, *Appl. Phys. Lett.*, **104**, 243703 (2014)
- 5) Klauk H., Zschieschang U., Pflaum J., Halik M., Ultralow-power organic complementary circuits, *Nature*, **445**, 745-748 (2007)
- 6) Fukuda K., Hamamoto T., Yokota T., Sekitani T., Zschieschang U., Klauk H., Someya T., Effects of the alkyl chain length in phosphonic acid self-assembled monolayer gate dielectrics on the performance and stability of low-voltage organic thin-film transistors, *Appl. Phys. Lett.*, **95**, 203301 (2009)
- 7) Vreeke M., Maidan R., Heller, A., Hydrogen peroxide and .beta.-nicotinamide adenine dinucleotide sensing amperometric electrodes based on electrical connection of horseradish peroxidase redox centers to electrodes through a three-dimensional electron relaying polymer network, *Anal. Chem.*, **64**, 3084-3090 (1992)
- 8) Minami T., Sato T., Minamiki T., Fukuda K., Kumaki D., Tokito S., A novel OFET-based biosensor for the selective and sensitive detection of lactate levels, *Biosens. Bioelectron.*, **74**, 45-48 (2015)
- 9) Minamiki, T., Tokito S., Minami, T., Fabrication of a flexible biosensor based on an organic field-effect transistor for lactate detection, Submitted
- 10) Bergveld P., Thirty years of ISFETOLOGY: What happened in the past 30 years and what may happen in the next 30 years, *Sens. Actuators B*, **88**, 1-20 (2003)