



学位論文

3 288

免疫センサを目的としたプラズマ重合
有機薄膜の表面修飾と界面現象の評価

平成5年12月20日

指導教官 斎藤正男教授

東京大学大学院工学系研究科

電子工学専攻

六車仁志

目次

第1章 序章	1
1.1 研究目的	1
1.2 本論文の構成	3
第2章 免疫センサ	6
2.1 第2章のまえおき	6
2.2 ヒトの免疫系	6
2.3 免疫測定の意味	6
2.4 免疫センサの分類	8
2.5 免疫センサの動作解析	10
2.6 第2章のまとめ	17
第3章 プラズマ重合膜の作製	20
3.1 第3章のまえおき	20
3.2 プラズマ重合膜選択の理由	20
3.3 プラズマ重合法の基礎的事項	20
3.3.1 プラズマとは?	20
3.3.2 プラズマ重合	23
3.3.3 プラズマ重合機構	24
3.3.4 プラズマ重合装置	25
3.3.5 プラズマ重合膜の性状	27
3.3.6 プラズマ重合膜の応用	28
3.4 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の作製と評価	28
3.4.1 本研究で用いたプラズマ重合装置	28
3.4.2 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の作製	32
3.4.3 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の構造の評価	33
3.4.4 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の電気的特性の評価	33
3.4.5 プラズマ重合膜の熱処理効果	37
3.5 第3章のまとめ	37
第4章 プラズマを利用した表面修飾	38
4.1 第4章のまえおき	38
4.2 プラズマを利用した表面修飾の経緯	38
4.3 XPS法の基礎的事項	39
4.4 化学修飾XPS法での表面での官能基分析	41
4.5 アミノ基の導入とその表面分析	46
4.6 チオール基の導入とその表面分析	62

4.7	プラズマによる官能基導入の機構についての考察	73
4.8	濡れ角による表面修飾の評価	75
4.9	第4章のまとめ	76
第5章	プラズマ重合膜表面への抗体の固定化	77
5.1	第5章のまえおき	77
5.2	抗体の固定化法の選択	77
5.3	抗体の分子構造	77
5.4	抗体の配向固定化の手順	79
5.4.1	物理吸着法	79
5.4.2	共有結合法	80
5.5	酵素免疫測定による固定化量の測定	86
5.6	抗体固定化量の測定結果に対する考察	90
5.7	第5章のまとめ	90
第6章	プラズマ重合膜の溶液中での界面現象の評価	91
6.1	第6章のまえおき	92
6.2	表面電位測定系の作製	92
6.2.1	高入力インピーダンス増幅器の作製	92
6.2.2	プラズマ重合膜と水溶液のインターフェースの作製	94
6.2.3	シールドボックスの作製	94
6.2.4	表面電位測定系	95
6.3	プラズマ重合膜のpHに対しての表面電位の測定	98
6.4	抗体固定化プラズマ重合膜の抗原抗体反応による電位変化の測定	101
6.5	第6章のまとめ	104
第7章	結論	105
	謝辞	109
	参考文献	110
	本研究に関する公表	118
	付録	119

第1章

序章

1.1 序論

最近の医療技術の進歩に伴い、生体計測に対する要求も高度になっている。特に、生体免疫機能は、生体中重要な役割を果たしているため、この免疫機能の状態を計測することは、臨床上極めて重要である。例えば、臓器移植、花粉症、エイズなどがそうである。現在確立されている免疫測定法は、古くは放射線免疫測定法(Radio Immunoassay;RIA)や酵素免疫測定法(Enzyme Immunoassay;EIA)が、最近では化学発光免疫測定法(Chemiluminescent Immunoassay;CLIA)、化学発光酵素免疫測定法(Chemiluminescent Enzyme Immunoassay;CLEIA)があるが測定時間や機器の煩雑さなどの点から臨床上の十分な要求を満足できない。

また、遺伝子工学やタンパク質工学などのバイオ技術の進歩により生体機能物質が単離精製され、これらの物質の機構も明らかにされている。したがってこれらの物質の優れた機能を人工的に利用する考えが出された。生体物質は複雑な構造で極微量しか存在しないが、生体内ではこれらの物質が高選択的に認識され、生命活動が営まれている。この分子認識を利用しようという試みである。

さらに、エレクトロニクスの進歩により、高機能を備えた半導体素子が安価に大量に作られるようになった。

以上のような背景から、臨床測定を簡便に迅速に行なうことのできる免疫センサが考案されている。ここで述べる免疫センサは、生体高分子を検出するセンサのことであり、複雑な生体高分子を認識することに抗原抗体反応を利用している。免疫センサは、バイオセンサの一種であるが、バイオセンサの基本構成は、図1-1に示す様に生体物質の情報(濃度など)の比例して電気信号に変換する。生体物質と信号変換部位によって構成される。

本研究では、図1-2に示すようなISFET型免疫センサ(イオン感応型電界効果トランジスタ)である。抗原抗体反応前後の表面電位変化をFETで検出しようとするものである。そして、その表面電位変化を伝える絶縁膜として、プラズマ重合膜を用いることが本研究の目的であり、また大きな特色である。なぜなら、従来のISFETは、電位変化を伝える絶縁膜は、酸化シリコンか窒化シリコンであり、有機膜でそのような特性を備えた有機分子は他に存

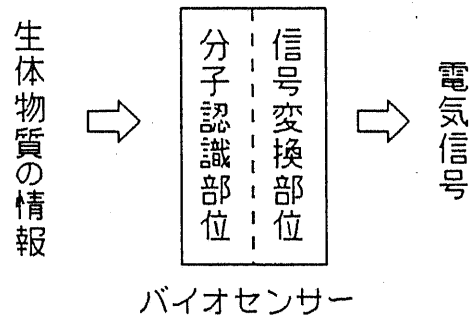


図1-1 バイオセンサの基本構成

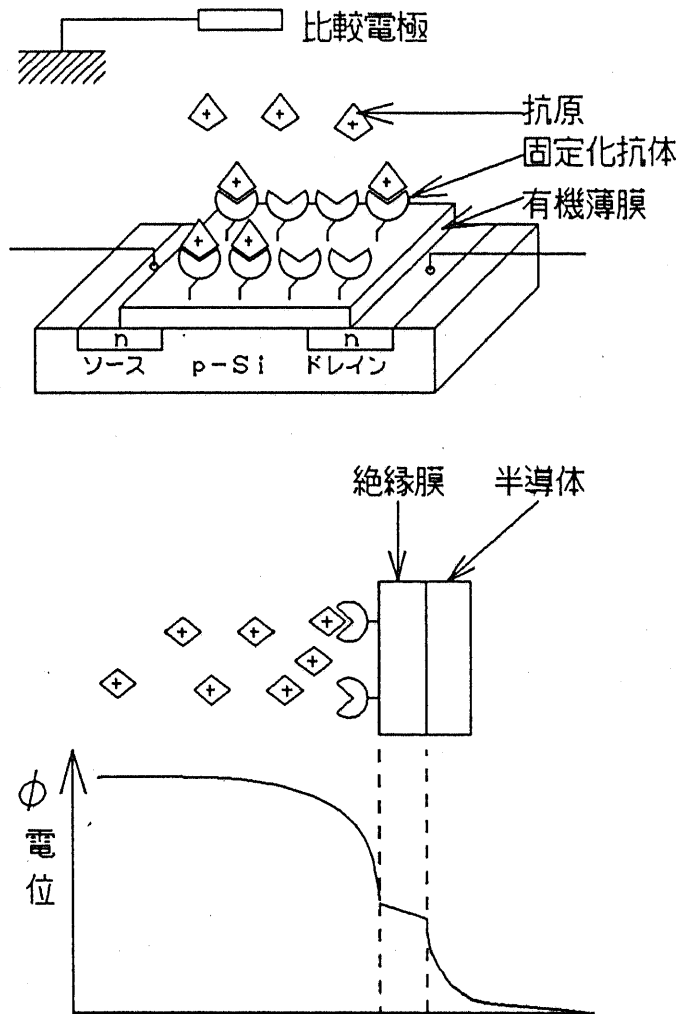


図1-2 ISFET型免疫センサ；抗原抗体反応による電位変化を検出

在しない。

ISFETは、当初は水素イオンのセンサとしてBergveld[1][2]によって考案され、松尾[3]らによって発展させられた。イオンセンサの場合、測定物質が単純で溶液中に高濃度で存在すること（高分子に比べて）、理論がある程度確立されていること（ネルンストの式）などのためにより品質のセンサが開発されている。H⁺センサの他にもK⁺、Na⁺センサ[4]が実現している。ISFETに生体物質を付けて最初にバイオセンサとして利用しようとしたのはJanataである[5][6]。

しかし、免疫センサの研究は凍結している。その理由としては、極微量の測定のために再現性が悪いこと、生体物質は失活しやすいので安定性が悪いこと、さらにはISFET型センサの場合には抗原抗体反応によって生じる電位の発生機構が不明であることなどがあげられる。実験的には、抗体が被覆されていない表面に起こる非特異吸着による感度の低下があげられる。またISFETの開発当初は、長時間使用すると電解質液が浸透して特性が劣化するという問題があった。免疫センサについても同様のことに注意を払わなければならない。

私自身は、免疫センサを実現する上で、それを支える基礎技術不足が根本的な原因であると考えている。半導体デバイスは最初のアイデアから現在まで50年の歴史があるが、バイオセンサはまだ20年の歴史である。本研究では、免疫センサを実現する上で重要となる基礎技術の確立を目的とする。図1-3に本研究の基本姿勢を示す。免疫センサのアイデアが出た当初は、生体内に留置し連続測定を行えることを目標にしていたが、今では途方もない困難な目標である。やはり、100を目指してこけて0になるよりは目標を10にしてそれを確実に実現していくことに切り替えることにする。すなわち、従来の目標の生体内植え込みから、検体検査型にした。これは現在の生化学検査や血液検査の一段上を目標にするということである。また、完全定量測定から、半定量型か定性測定型に下げる。生体測定では必ずつきまとう個体差があるのでこれも妥当でないかと思う。

バイオセンサの基本的な構成は、生体物質と半導体デバイスの組み合わせである。個々の技術は成熟しているが組み合わせによって生じる新たな問題がいくつかある。本研究では、その点を目指においた。生体物質と半導体デバイスの接点となるのが膜の表面、あるいは水溶液中では界面なので、バイオセンサに適した膜の表面改質を行った。また、抗原抗体反応によって生じる界面電気現象は未知の部分が多いので、固体表面に固定化された抗体の界面現象の評価などを行った。

1.2 本論文の構成

第2章では本研究の目標とするISFETの基本原理について述べ、現実に想定されるうる数値を用いて動作解析を行った。また、他の原理の免疫センサとの比較、免疫測定の意義についても述べた。第3章では免疫センサの実現のための鍵となる抗体固定化膜について述べた。抗体固定化膜には、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜を使用しその膜の作製と電気的特性の評価を行いこの膜の有効性を示した。第4章ではプラズマを用いた表

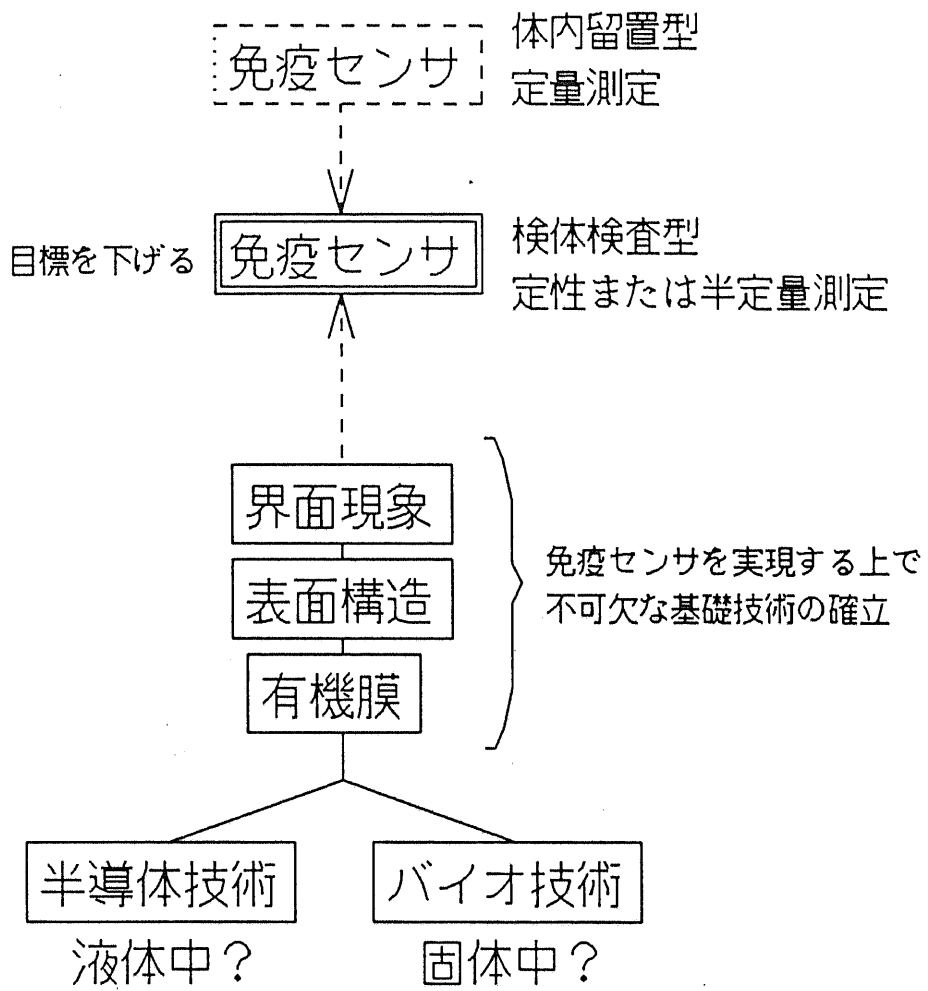


図1-3 本研究の基本姿勢

面修飾について述べた。具体的には生体物質に関係の深い官能基の導入を行い、その評価をラベリングXPSで行った。第5章はプラズマ重合膜表面への抗体の固定化を行いその固定化量を酵素免疫測定で行った。第6章は、プラズマ重合膜の界面現象の評価、具体的にはプラズマ重合膜表面のpH応答性、抗体固定化膜の抗原抗体反応による表面電位の測定を行った。そのための高入力抵抗増幅器の作製、表面電位測定系についても述べた。第7章でまとめて結論とした。図1-4に本論文内容のフローチャートを示す。

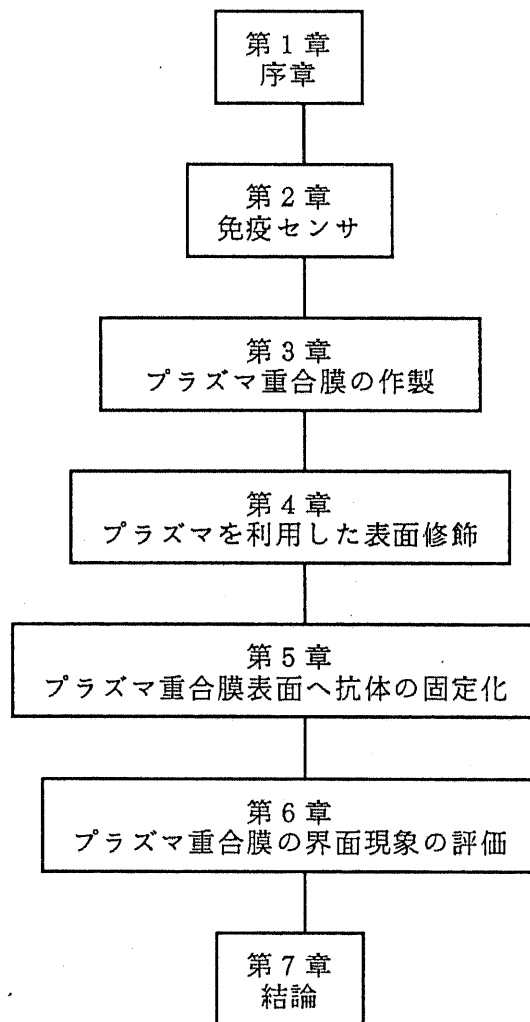


図1-4 本論文内容のフローチャート

第2章

免疫センサ

2.1 第2章のまえおき

本章では、免疫センサに関連する事項を取り上げた。免疫測定を行うことの意義について述べ本研究の価値についてアピールした。また、他の免疫センサとの違いについて歴史を踏まえて述べた。本研究で目指すISFET型免疫センサの動作解析を行い実験の指針とした。

2.2 ヒトの免疫系[1][2]

免疫反応は、生体内に異物が侵入したときに、その異物を認識し排除する機構である。ヒトの免疫系は、図2-1に示す。免疫系は、すべて骨髄の多機能性幹細胞に由来している。多機能性幹細胞は分化してマクロファージ、B細胞、T細胞になる。マクロファージは、病原菌などの異物（抗原）を食べ、その情報をB細胞とT細胞に伝える。B細胞は、抗原の情報を刺激として受け取ると、さらに分化して形質細胞と記憶B細胞になる。形質細胞は抗原に結合する抗体をつくる。T細胞には、免疫系の他の細胞の働きを助けるヘルパーT細胞と他の細胞に特定の機能を誘導するインデューサー細胞がある。また、感染細胞を殺す細胞傷害性T細胞（T4細胞）と免疫系を鎮めるサプレッサーT細胞（T8細胞）もある。抗体の認識力は、極めて大きく光学異性体の区別さえもできる。

2.3 免疫測定の意義

臨床検査において免疫化学測定は重要な位置を占めている。検査項目として使われている例としては、ホルモン、腫瘍マーカー、血中薬剤濃度、血清酵素、感染症マーカーなどがある。ここでは免疫センサが実現された場合にさらに意義を持つ免疫測定について述べる。

●アルブミン測定の意義[3]

ヒト血清アルブミンの測定は、臨床検査の分野で重要な測定項目の一つである。ヒト血

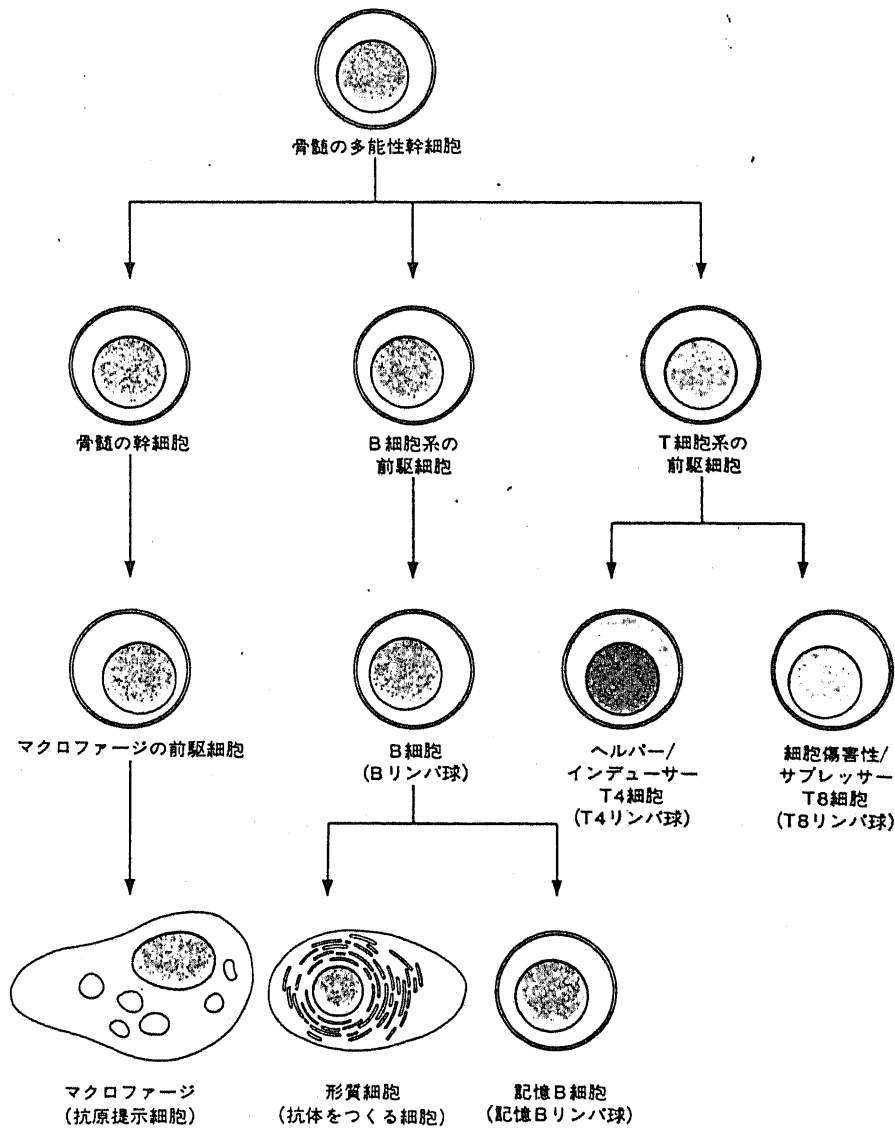


図2-1 ヒトの免疫系

清アルブミンは、血液中の主要なタンパク質として知られており、タンパク質代謝異常の指標として重要である。

例えば、血しょう中の濃度が高く、他の血しょうタンパク質に比べて分子量が小さいことから、血しょう浸透圧の約80%に寄与しており、組織からの血管内への水分や代謝産物の移動に大きく関与している。したがって、その濃度減少は浮腫の原因となる。

また、尿中のアルブミン測定により糖尿病妊婦の妊娠中毒症の診断が可能となっている。妊娠中毒症は、腎機能の障害により胎児の生育が遅れるもので未熟児が生まれやすい。糖尿病では妊娠中に血糖値のコントロールをしていないケースに多い。中毒症を起こす前になると、糖尿病妊婦の尿中アルブミンが急増する。妊娠中期のアルブミン診断が効果的で、アルブミンが1日20mgを越えて増えるようだと中毒症の恐れがある。このようにヒト血清アルブミンセンサの開発は意義が大きい。

●エイズ関連測定の意味[4][5]

ヒト免疫不全ウイルス(HIV)に感染後約3カ月でHIVが体内で発現し活動し始める。その際ヒトの免疫系において、HIV表面の糖タンパクであるgp160の抗体(抗gp160)が生産し始める。エイズ検査ではこの抗gp160を有無で感染の有無を判断している。したがって抗gp160を簡便に測定できるセンサの開発は有効である。

またHIVキャリアは、体内でのHIVが活動しT細胞が破壊され始めるとCD4陽性リンパ球の減少が観測できる。医師はこれに応じてAZTやddIなどの治療薬を投与を行う。したがってCD4を簡便に測定できるセンサの開発は意義がある。

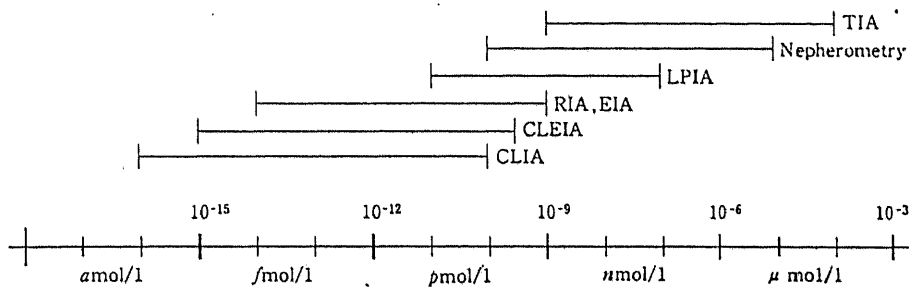
●臓器移植関連測定の意味[6]

臓器移植は、これからの医療においても益々重要性を高めると予想される。臓器移植で問題となるのが移植後の拒絶反応である。医師は、患者の状態を様々な指標をもとにモニターし、免疫抑制剤を投与する。それでも、拒絶反応が抑えられないケースがある。それは、拒絶反応機構が細胞性免疫・液性免疫・サイトカイン・細胞間接着因子などが巧妙にして複雑な免疫ネットワークを組みながら進行するからである。したがって、免疫センサを利用することで患者監視の項目を増やすことで拒絶反応の制御が確実にできると考えられる。

2.4 免疫センサの分類

ISFET型免疫センサは、半導体技術の進歩に伴って考案されたものである。ISFET型免疫センサのことを知るために、免疫センサ全般について述べる。

まず、図2-2に病院の検査部で現在使用されている免疫測定法とその感度[7]を示してある。である。



TIA; Turbidimetric immunoassay : 免疫比濁法 Nephelometry : ネフェロメトリー
 LPIA; Latex photometric immunoassay : ラテックス凝集反応の光学的分析法
 RIA; Radioimmunoassay : ラジオイムノアッセイ
 EIA; Enzyme immunoassay : エンザイムイムノアッセイ
 CLEIA; Chemiluminescent enzyme immunoassay : 化学発光酵素免疫測定法
 CLIA; Chemiluminescent immunoassay : 化学発光免疫測定法

図2-2 病院の検査部で使用されている免疫測定法[7]

表2-1にはこれまでに報告されている免疫センサを示す。

免疫センサ	文献
化学修飾電極	[8-15]
ビーズと酵素反応	[15-18]
酵素反応と免疫修飾電極	[19-23]
化学発光	[24, 25]
光ファイバのエバネセント波	[25-32]
ピエゾ振動子	[33-35]
表面プラズモン	[36, 37]
イメージング	[38]
光のゆらぎ	[39]
界面キャパシタンスの変化	[40]
ISFET	[41-45]

表2-1 免疫センサ

抗原抗体反応の前後では物理的、化学的になんらかの変化が生じるのは確実である。しかしながら理論的にそのメカニズムが明らかにされていない。化学修飾電極を利用した免疫センサの報告がもっとも多く、その次には酵素反応を利用したセンサが多い。表面プラズモンを利用した免疫センサは、ファルマシア社によって実用化されている。表2-9にあげた

免疫センサの中でISFET型のセンサの特徴は次の通りである[46]。

- ①従来のガラス電極ではガラス隔膜を用いているために、微小化すればインピーダンスが大きくなり出力が不安定になって応答も遅くなるが、ISFETでは電極抵抗が問題にならないほど低いため超小型化が可能であり、応答速度も速い。
- ②半導体集積回路の製作技術を基盤としているので、微少でしかも複数のFET単位を一体化した集積素子の製作が比較的容易であり、量産も可能である。
- ③絶縁膜を介してのイオン活量を界面電位の変化として測定する原理に基づくため、表面にさらにイオン選択性有機薄膜を形成させても原理的に測定が可能である。

2.5 免疫センサの動作解析[47][48]

免疫センサの出発となるのが、ISFET型のイオンセンサであるので、まずイオンセンサを説明する。イオンの濃度によってイオン感応膜と溶液の界面で電位差が生じる。この電位差を測定することでイオン濃度を知ることができる。この電位差はネルンストの式で次のように表される。

$$\phi = \phi_0 + \frac{RT}{F} \ln a_i \quad (2.1)$$

F:ファラデー定数 Z:イオンの電荷 R:気体定数
a_i:イオンの活量 T:絶対温度

式(2.1)の場合、20℃でイオンの濃度が10倍異なると58mVの電位差を生じる。

免疫センサはイオン感応膜に抗体を固定化し、この抗体が抗原抗体反応の前後で電位差が変化することを利用する。電位差の変化は抗原の持つ電荷の局在によるものである。この電位発生の機構は電気二重層理論で説明される。その概念については図2-3に示す。電気二重層は、式(2.2)のように記述できる。この式は、Gouy-Chapmanの式と呼ばれる。ただし式(2.2)は1-1'型、2-2型の電解質液の場合である。

$$\phi(\sigma) = \frac{2kT}{Ze} \sinh^{-1} \left(\frac{\sigma}{\sqrt{8n_0 \epsilon_0 \epsilon_r kT}} \right) \quad (2.2)$$

k:ボルツマン定数 T:絶対温度 σ :固体表面電荷の表面密度 Z:イオンの価数
n₀:溶液内部のイオン濃度 e:電気素量 ϵ_0 :真空の誘電率 ϵ_r :比誘電率(水;78.3)

図2-4に、表面電荷密度と発生電位の関係を示す。横軸の電荷密度は現実にあてはまると予想された数値である。この式より表面電荷 σ が多いほど大きな電位が得られる。また、イオン濃度が小さい方が大きな電位が得られる。生体のイオン濃度は0.155である。

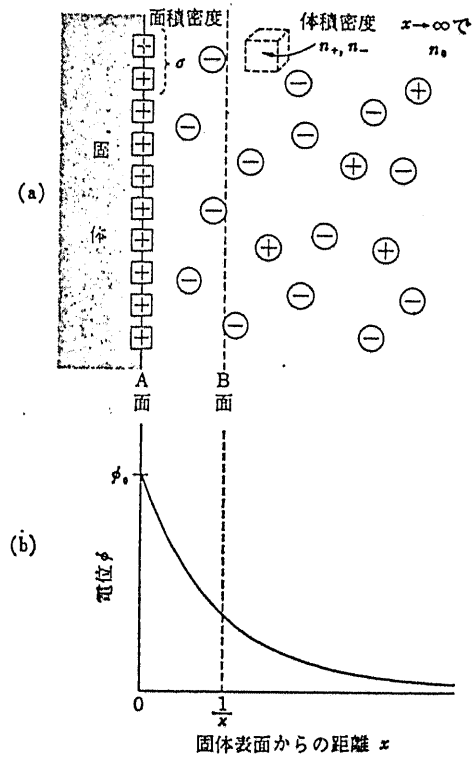


図2-3 電気二重層の概念図

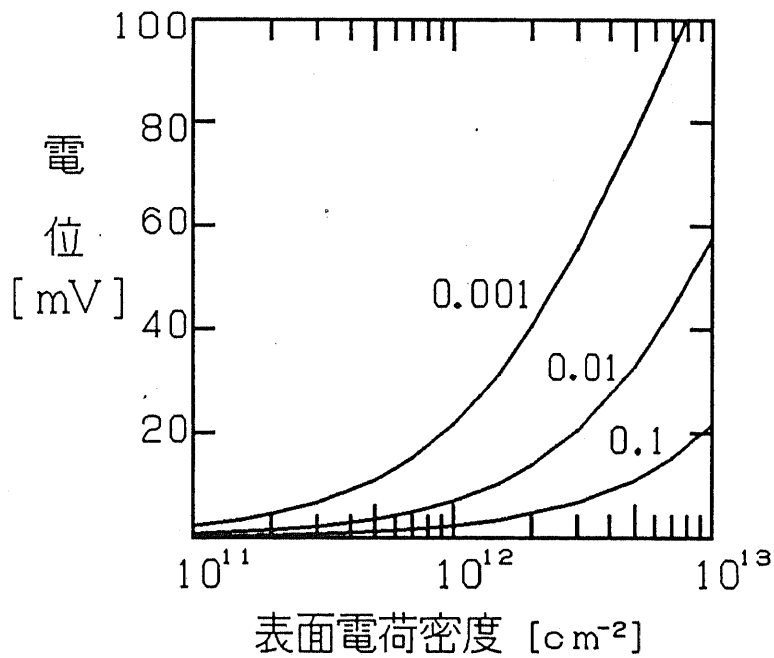


図2-4 表面電荷と発生電荷の関係

免疫センサの場合、表面電荷 σ は抗原抗体反応の量に応じて変化する。抗原はふつうタンパク質であり、タンパク質は電荷を持つからである。したがって、式(2.2)内の σ は抗原濃度の関数 $\sigma([A_g])$ となり次式で表される。

$$\sigma([A_g]) = \frac{D_{ab}Z_{Ag}e}{1 + K_d/[A_g]} \quad (2.3)$$

D_{ab} : 抗体の固定化密度 Z_{Ag} : 抗原の電荷量
 $[A_g]$: 抗原濃度 K_d : 抗原抗体反応の結合定数

図2-5は、抗原濃度と抗体に結合する抗原の割合との関係である。結合定数 K_d の濃度が1/2の割合で抗原抗体反応が起こっている。結合定数 K_d の100以下の濃度の抗原は、抗原抗体反応がほとんど起こらないので検出できない。 K_d は通常 10^{-4} である。

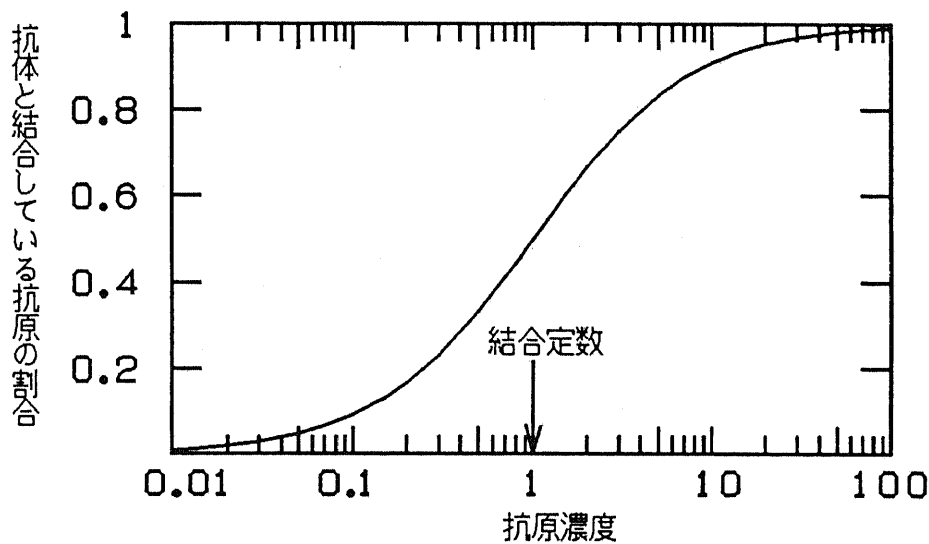


図2-5 抗原濃度と抗体に結合する抗原の割合

また、式(2.2)は次のような仮定の上に成り立つ。

- ① 抗原抗体反応が膜の表面で起こること
- ② 抗原が点電荷でありかつ均質に表面内に分布すること

したがって、現実のセンサに適用する場合には修正が必要になる。すなわち、タンパク質の分子構造は、数nm~数十nmの直径の球状構造(本研究の対象となる水溶性のタンパク質の場合)[49]をしている。その大きさは、界面電気現象を考える上で重要な指標となるデバイ長よりも大きくなる。その場合に点電荷としての仮定は成り立たなくなる。デバイ長 L_D は次式のようになる。

$$L_D = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 k T}{2 n_0 e^2 Z^2}} \quad (2.4)$$

イオン強度	デバイ長 [nm]
0.005	4.3
0.01	3.1
0.02	2.2
0.05	1.4
0.1	0.97
0.2	0.68

表2-2 デバイ長の数値例 (Z=1, T=300K)

式(2.4)の数値例を表2-2に示す。生理的条件では0.78nmであるので、抗原分子は点電荷ではなく大きさをもった電荷の扱いをしなければならない。タンパク質の電荷はアミノ酸残基の電離によるものである。タンパク質の電氣的イメージは図2-6のようになる。さらに、電離に限らず極性のアミノ酸残基(セリン、トレオニン、システイン、チロシン、アスパラギン、グルタミン)によっても双極子が電荷と同様の効果を与えることもある。抗原抗体反応による電位発生を電気二重層理論を基に次の2通りのケースについて考察した。なお、これからの計算ではデバイ長が1nmとして変数を固定した。

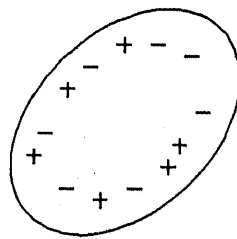


図2-6 タンパク質の電氣的イメージ

【膜に垂直方向の荷電領域が分布する場合】

分布して存在する電荷に基づく電位差の発生は大島[50]によって提案されている。それによると図2-7のような分布する荷電領域のモデルでの計算を行っている。ポアソン-ボルツマンの方程式をそれぞれの領域に分けて作り、境界条件を利用して解いた。大島のモデルについては文献[50]で述べられている。図2-7のモデルでの大島らの計算の追試した結果を図2-8に示す。これより、電荷量が同じであったとしても電荷が分布しているとその分布の度合いが大きいほど発生電位が小さくなるのがわかる。

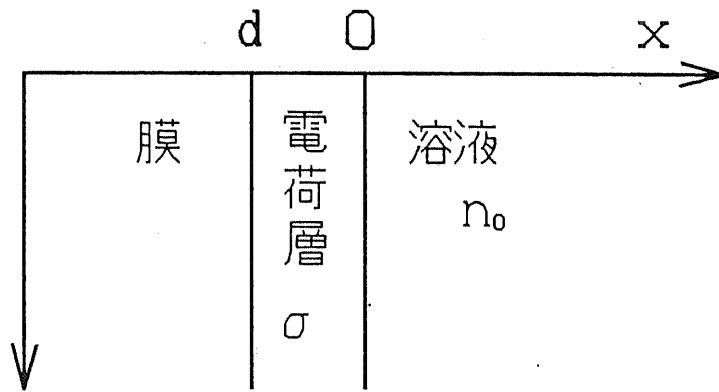


図2-7 分布して存在する電荷に基づく電位差の発生の計算モデル [50]

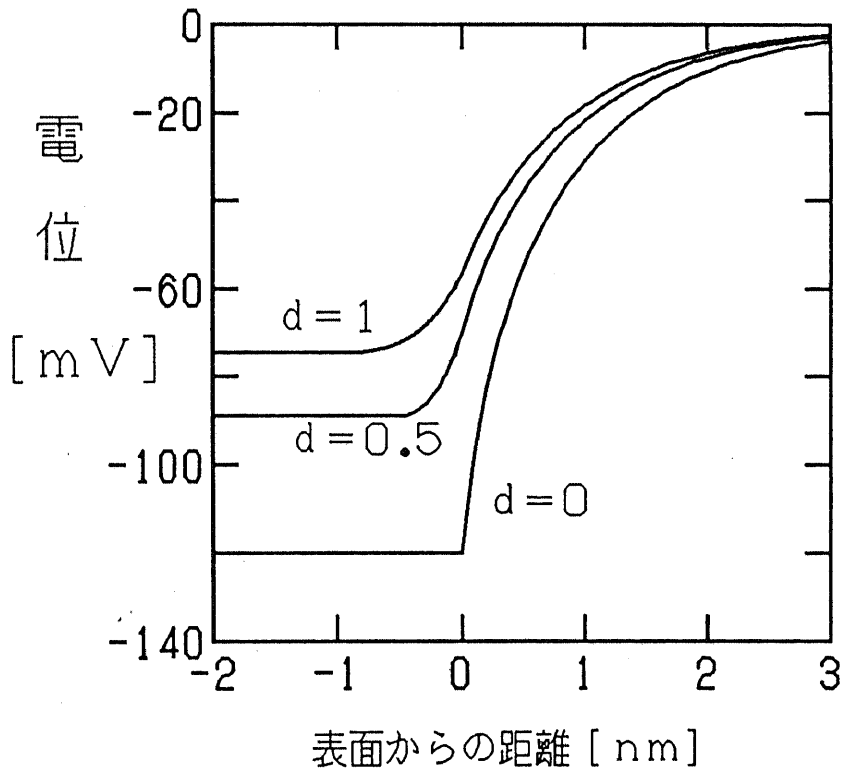


図2-8 分布して存在する電荷に基づく電位差の発生の計算結果 [50]

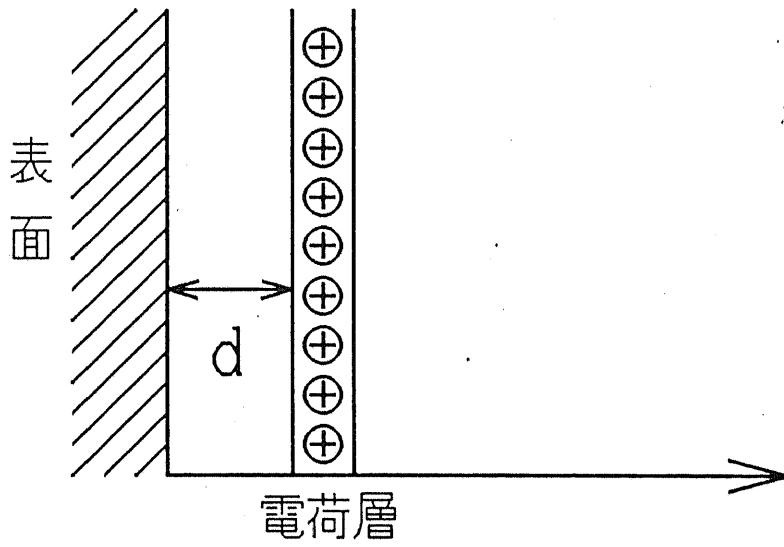


図2-9 電荷層が膜表面から離れた場所にある時に電位差の発生の計算モデル

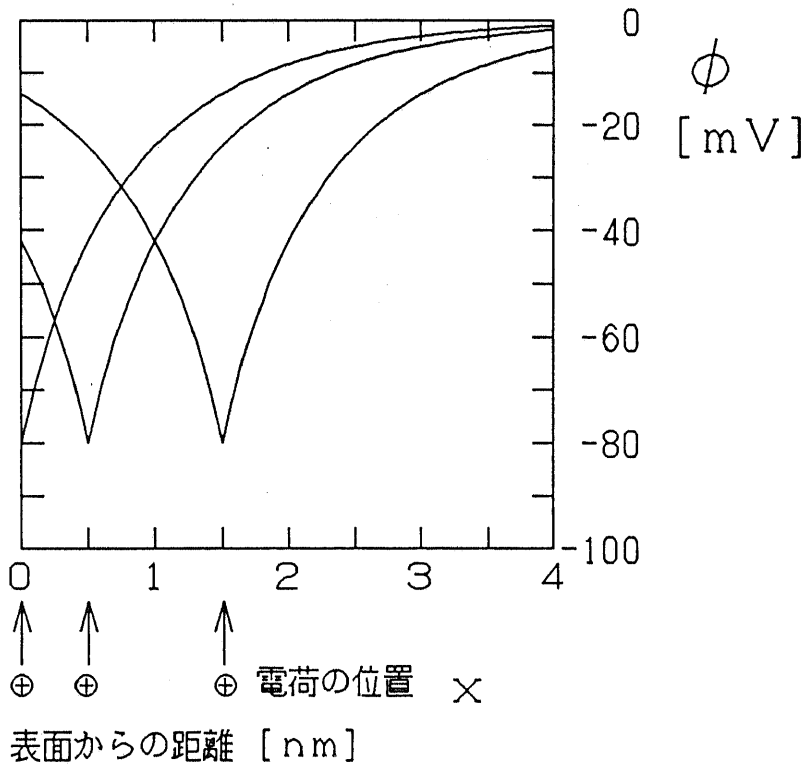


図2-10 電荷層が膜表面から離れた場所にある時に電位差の発生の計算結果

また、実際の抗原抗体反応は膜から離れた場所で起こる。その場合の電位発生を図2-9のモデルを式(2.5)で計算した。結果を図2-10に示す。 $\phi_0=80\text{mV}$ 、デバイ長 1nm での計算である。式(2.5)は、Poisson-Boltzmannの式を解いて得られる解である。

$$\phi(x) = \frac{4kT}{Ze} \tanh^{-1} \left[\tanh \left(\frac{kT\phi_0}{4Ze} \right) \exp \left(-\frac{x}{L_D} \right) \right] \quad (2.5)$$

抗原抗体反応による荷電領域が表面から d の距離にある場合、 d の位置から膜表面に至るまでにデバイ長 L_D の大きさの割合で減衰し、発生電位が小さくなる。これは、抗原抗体反応が起こった位置から膜に近い方向にイオンが回り込んで電位を遮蔽するためである。

以上より、センサとして感度をよくするには、抗原抗体反応の起こる位置を膜から垂直な方向ではそろえる必要がある。いいかえると、抗体の活性部位をそろえて膜に固定化する必要がある。また、抗原抗体反応の起こる位置はできるだけ膜表面に近い方がよい。また、抗原抗体反応が起こっている位置から膜表面へはイオンをできるだけ透過させないほうがよい。固定化膜がイオンを透過させないことは言うまでもない。これは、第3章で述べるが、プラズマ重合膜が非常に有効である。

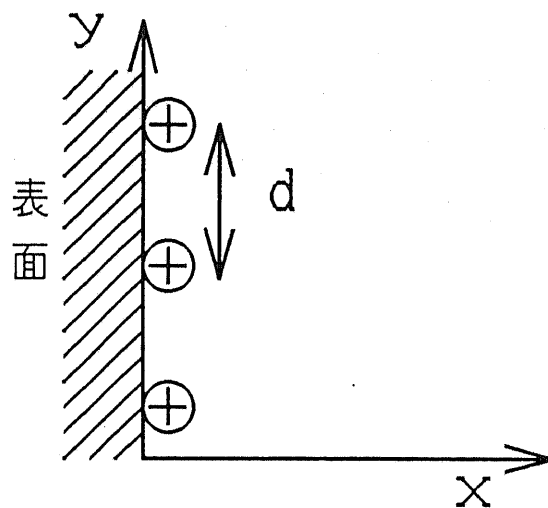


図2-11 膜面内に電荷が分布したときの電位計算のモデル

【膜の面内の荷電領域が分布する場合】

電位発生理論では、イオンなどの電荷の分布は膜に垂直方向の距離の関数で行っている。イオンセンサの場合この仮定で充分である。しかし、免疫センサの場合、抗体の固定化の行われていない表面についての記述が必要である。すなわち、膜面内に電荷が分布する場

合の電位発生について考慮する必要がある。そこで、図2-11のように電荷（点電荷）が間隔 d で周期的に存在した場合の電位発生について考える。これは次式のデバイ-ヒュッケルの式を用いて計算を行った。

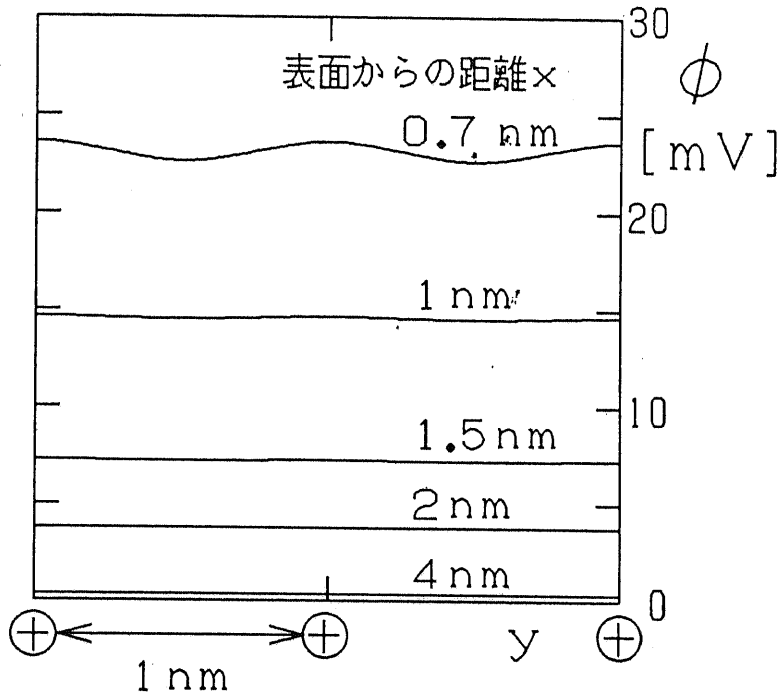
$$\phi(r) = \sum_i \frac{q_i}{4\pi\epsilon_r\epsilon_0 r_i} \exp\left(-\frac{r_i}{L_D}\right) \quad (2.6)$$

結果を図2-12に示す。これより電荷の間隔 d がデバイ長よりも大きい場合には場所によって電位のゆらぎが大きい。また電荷量が同じでも局在度が大きいとさらにゆらぎが大きくなる。ゆらぎが大きい荷電状態、つまり電荷の間隔がデバイ長よりも大きい場合では、電荷のない場所に他の電荷が来ると電位分布の変化が大きい。これは現実の免疫センサで感度低下の原因となっている非特異吸着である。対策としては、デバイ長以下の間隔で電荷を集める必要がある。いいかえると抗体の固定化密度を大きくするという当然の結論である。

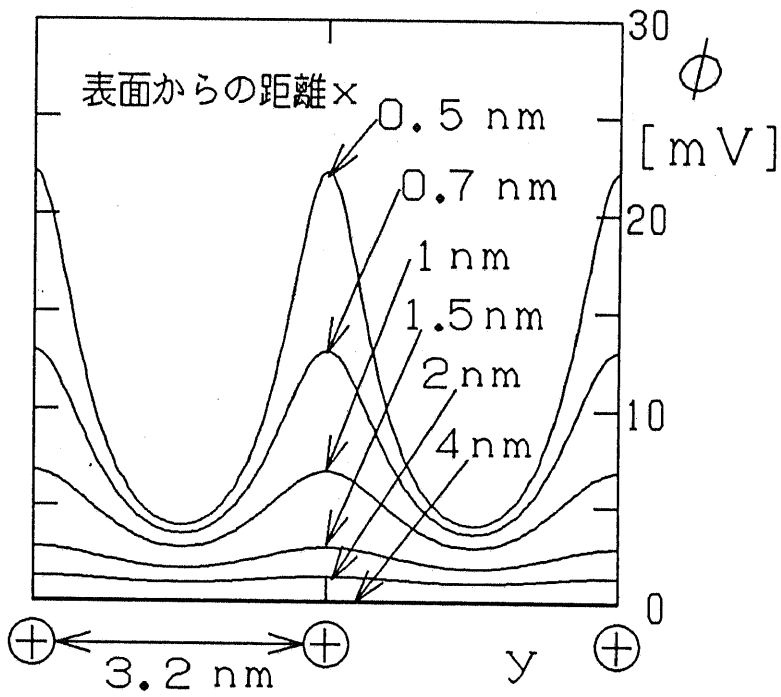
2.6 第2章のまとめ

本章では免疫センサの基礎的事項について述べた。そして本研究では、ISFET型の免疫センサを目指しているので、このISFET型免疫センサの動作解析を行った。抗原抗体反応で電荷が表面に局在化することによって発生する電位は、Gouy-Chapmanの式で記述される。これより、一価の電子が表面に 10^{12} 個/cm²存在し、イオン強度が0.001の時約20mVの電位が発生することがわかった。これより、イオン強度が大きい場合、電荷が膜表面に垂直方向に広く分布すると発生電位は小さくなる。さらに、電荷が膜表面から離れると発生電位は小さくなる。電荷の表面内にデバイ長以上で存在した場合発生電位のゆらぎが大きくなる。以上より、センサの感度をよくするには抗体の配向性をよくすること、抗原抗体反応はできるだけ膜表面に近い場所で行わせること、抗体の固定化量を大きくすることが大切である。

デバイ長: 1nm



(b) 電荷密度: 10^{14} cm^{-2}



(a) 電荷密度: 10^{13} cm^{-2}

図2-12 膜表面内に電荷が分布するときの発生電位電位 (電荷密度の違い)

デバイ長：1nm

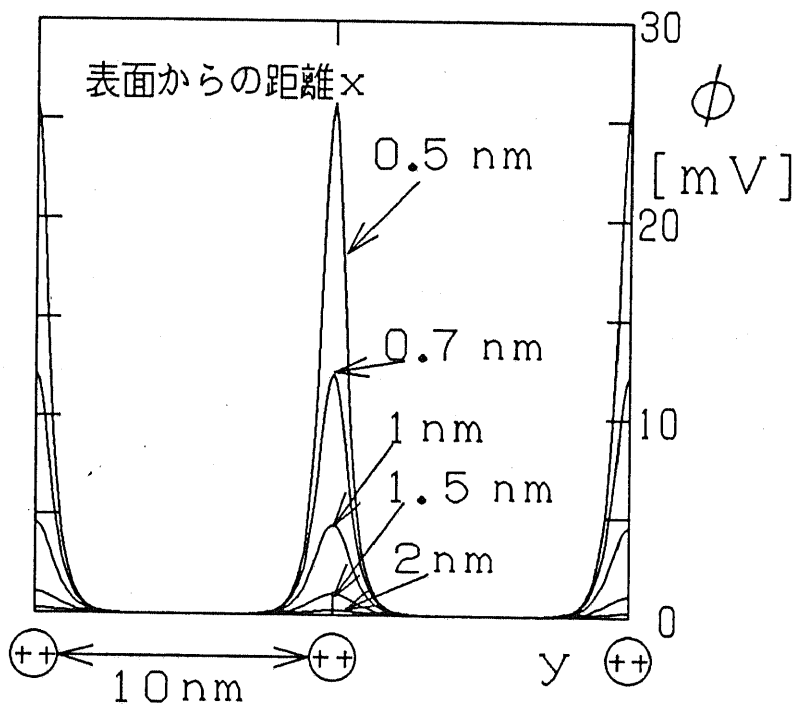
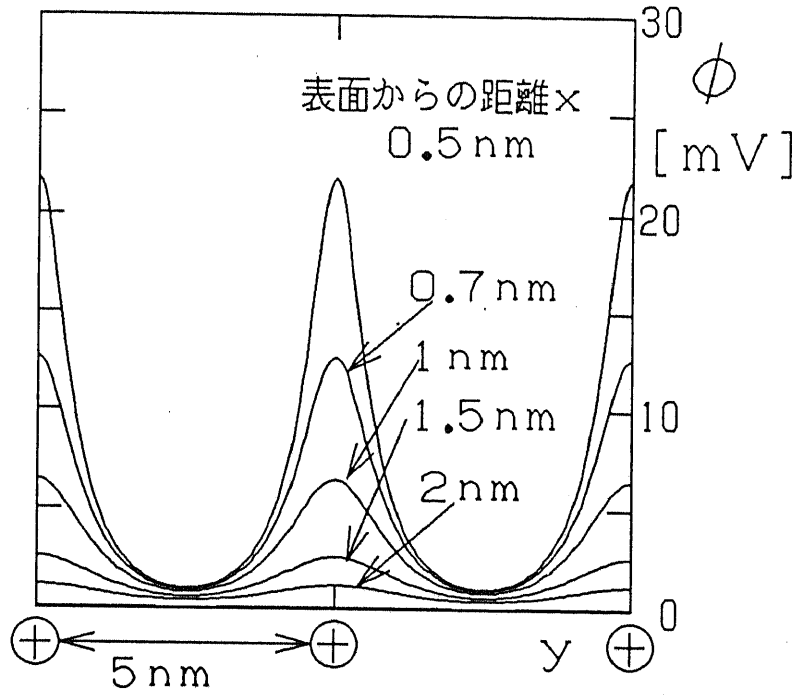


図2-12 膜表面内に電荷が分布するときの発生電位電位（局在度の違い）

第3章

プラズマ重合膜の作製

3.1 第3章のまえおき

ISFET型免疫センサの開発には抗体固定化膜の作製に関して十分な検討を行う必要がある。本研究では、有機薄膜の中からヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜を選択し、その作製と評価を行った。また、プラズマ重合法を理解する上で必要な基礎的事項を示した。

3.2 プラズマ重合膜選択の理由

有機薄膜の生成法としては、キャストリング、真空蒸着、LB法、プラズマ重合法が候補に上げられる。本研究で使用する薄膜は、ISFET型免疫センサの抗体固定化膜であり、その条件は次の通りである。

- ①100nmオーダーの薄膜形成可能である。
- ②イオンの透過性の小さい緻密な膜である。
- ③水溶液中でも長時間安定である。
- ④生体適合性がある。

以上の条件を考慮した場合、キャストリングでは薄膜が得にくい、基板との付着性が悪い、膜の均質性に欠けるなどの問題点がある。真空蒸着法は、膜の安定性が悪い。特に水溶液に浸した場合短時間で溶解することが多い。ただし最近蒸着重合法[1]が研究されており将来的には有効であるかもしれない。LB膜は単分子膜が作製可能であるが、ピンホールが多くイオンに対してよい絶縁性が得られない。以上よりプラズマ重合膜が最も有効であると考え、本研究で利用することにした。

3.3 プラズマ重合法の基礎的事項

3.3.1 プラズマとは

プラズマとは電離によってできた電子と正イオンがほぼ等しい密度となって全体として

中性になっている物質の状態のことである。プラズマは、自然に存在するものと人為的に発生させるものがある。電荷密度とエネルギーから図3-1[2]のようなものがある。機構は、光、X線、 γ 線の照射、放電、燃焼、衝撃波、レーザー投射、アルカリ金属蒸気と恒温金属板との接触などがある。電離によってつくられた電子、正イオン対は一般に短時間のうちに再結合して中性原子や分子にもどる。そのとき、電子、正イオンがもっていたエネルギーの一部は電磁波、再結合粒子の運動エネルギー、または分子の解離エネルギーとして消費される。分子が解離するときには多くの場合ラジカルを生成する。また電子の一部は中性原子・分子に接触して負イオンをつくる。したがって、プラズマは電子、正・負イオン、励起原子・分子、ラジカルなどが混在した状態である。また、プラズマ中の反応素過程は非常に複雑である。プラズマ中の分子種は広いエネルギー分布であり、その分布はマクスウェル-ボルツマン分布である。表3-1にプラズマ中の主要な反応分子種、表3-2にプラズマ中の主要な反応素過程[3]を示す。プラズマの反応は次の3つに大別される。

- ① プラズマ空間における反応
- ② プラズマと固体との界面における反応
- ③ 固体内における反応

①については、②③と比べて多くの研究知見があるが、プラズマプロセスを利用するには、これら3つすべてを考慮しなければならない。

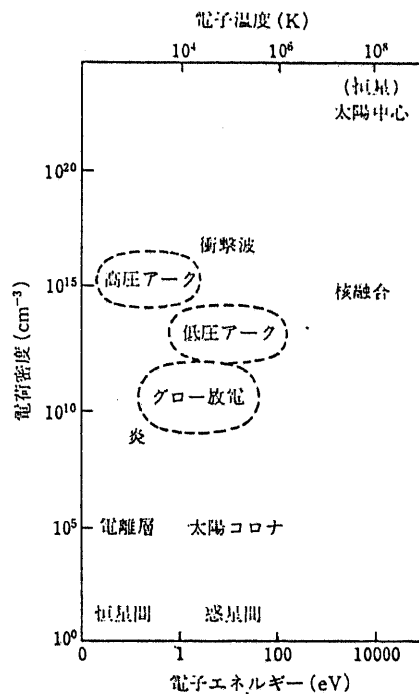


図3-1 プラズマ状態の密度とエネルギー [2]

1) 不安定分子種

荷電分子種：電子、正イオン、負イオン、
 中性分子種：励起原子・分子、フリーラジカル、

2) 安定分子種

通常の安定な原子・分子

表3-1 プラズマ中の主要な反応分子種[3]

$AB + \text{energy}$	$\rightarrow AB^+ + e^-$: 直接イオン化 ($A^+ + B^+ + e^-$, $A^+ + B^-$ なども含む)
	$\rightarrow AB'$: 超励起
	$\rightarrow AB^*$: 励起
AB'	$\rightarrow AB^+ + e^-$: 自動イオン化
	$\rightarrow A + B$: 解離
	$\rightarrow AB''$: 内部転換など
AB^+	$\rightarrow A^+ + B$: イオン解離
$AB^+ + AB$ or S	\rightarrow 生成物	: イオン分子反応
$AB^+ + e^-$	$\rightarrow AB^*$: 電子・イオン再結合
$AB^+ + S^-$	\rightarrow 生成物	: イオン・イオン再結合
$e^- + S$	$\rightarrow S^-$: 電子付着
$e^- + nAB$	$\rightarrow e^-_{s.o.i.v}$: 溶媒和
AB^*	$\rightarrow A + B$: 解離
	$\rightarrow AB''$: 内部転換、系間交差
	$\rightarrow BA$: 異性化
	$\rightarrow AB + h\nu$: 発光
$AB^* + S$	$\rightarrow AB + S^*$: エネルギー移動
	$\rightarrow AB + S^+ + e^-$: ペニングイオン化
$AB^* + AB$	$\rightarrow (AB)_2^*$: エキシマー生成
$2A$	$\rightarrow A_2$: ラジカル再結合
	$\rightarrow C + D$: 不均等化
$A + AB$	$\rightarrow A_2B$: 付加
	$\rightarrow A_2 + B$: 引き抜き

表3-2 プラズマ中の主要な反応素過程[3]

3.3.2 プラズマ重合[2]

プラズマ重合は、主としてプラズマ（放電）中で有機高分子合成を行うことである。歴史的には極めて古く1798年に炭化水素、1862年にアセチレンの放電中での反応実験を行った例がある。1874年に、ThenardとWideは炭化水素の蒸気に放電を起こすと器壁に固体物質が生成することを認めている。1930年にはメタンに対するグロー放電を行い、室温で溶媒不溶の淡黄色の堆積物が器壁に生成することが見いだされている。AustinとBlackはベンゼン、トルエン、シクロヘキサン、p-キシレンなど環状炭化水素化合物に対しテスラコイルによる放電実験を行い、赤褐色、黒色、無色と条件によって色相の異なる溶媒不溶性の物質を得ている。1934年には、Stewartらが 10^{-5} Torrで炭化水素ガスから絶縁性被膜を合成するようになった。その他の有機化合物の放電による高分子の生成実験は数多くなされているが、それらの多くはやっかいな副反応生成物であり、生成物の性質、構造を制御して応用しようとする試みはなされていなかった。

有機化合物の放電によって生成する薄膜が基板に対してすぐれた接着性と均一性をもつことに注目し、メタルコーティングへの応用を検討したのは、1960年のGoodmanの研究である。これ以後、ピンホールフリーのサブミクロン薄膜の新合成法として注目され、1960年代には活発な研究が開始されるようになった。ひとたびプラズマ重合による薄膜が、絶縁性、接着性、均一性、化学的・物理的安定性に優れたコーティング材として評価を受けるや、合成法の容易さとあいまって主として応用研究を中心に幅広い研究展開がなされ現在に引き継がれている。

プラズマ重合法の大きな特徴は次の3つ上げられる。

- ①基板にポリマーコーティングする際、通常の方法と比較すると、通常の方法はすくなくとも、1)高分子の合成、2)塗布溶液の調整、3)基板の洗浄、4)コーティング、5)乾燥、6)キュアリング、と六個の過程を必要とする。これをプラズマ重合で行った場合、モノマーからスタートしていきなり完了してしまう。
- ②ビニルモノマーや環状化合物に加えて通常の方法では重合しない飽和炭化水素や芳香族化合物、有機金属化合物まで容易に重合する。
- ③重合反応後に真空槽内に反応性のガスを導入し、同様なグロー放電を施すことにより膜表面に官能基の導入を行うことができる。これは第4章で説明する表面修飾である。

プラズマ重合膜の特性を一般的に述べると

- ①10nm～100nmオーダーのピンホールの少ない均質な膜である。
- ②非晶質である。
- ③重合度が極めて高い。
- ④耐熱性がある。
- ⑤耐薬品性がある。

3.3.3 プラズマ重合機構[3]

プラズマ中で起こる化学反応は非常に複雑で、その重合機構はいまだに解明されていない。その複雑さはまず第一にプラズマ中に電子、イオン、ラジカル、励起分子・原子・光子などの数多くの化学活性種が存在することである。そして、それら活性種が気相中、固体表面、気相-固相間で様々な反応を引き起こすことが系をさらに複雑にしている。しかし、それらの反応の中で重合に寄与しているのはごく一部である。

【1】重合が進行する場所 重合が気相で進むのか、固体表面で進むのかは古くから議論されているが結論には至っていない。

【2】重合活性種 過去の研究からラジカルであることが有力である[2, 3]。

【3】プラズマ重合動力学 プラズマ重合における動力学の研究は、容易にコントロールできるパラメータを変化させ、重合速度を解析することで進められている。それらのパラメータとは、圧力、基板温度、モノマー流量、プラズマ出力などである。圧力変化については一般に圧力の増加にともなって重合速度も上昇するが、ある程度の圧力以上になると重合速度は一定になる。しかし、圧力変化ということには、電子エネルギー、電子密度、およびモノマー濃度の変化があり、それらの効果が相乗して重合速度に影響を与えるため、一概に圧力が高いほうが重合効率がよいといえない。モノマー流量に関しては、一定の出力で放電を行ったとき、一般にそれが小さいと重合活性種が効率よく生成し、導入されたモノマーも効率よく重合される。流量が高いとモノマー濃度は高くなるが、それぞれのモノマー分子に与えられるエネルギーは減少し、重合速度が下がることもある。もうひとつの重要なパラメータはプラズマ出力で、一般には出力が高くなると重合速度も上昇するが、一定のモノマー流量では出力を上げすぎると重合するモノマーが不足する状態になり、重合速度は出力に比例して上昇しなくなる。また、条件によっては逆に重合速度が減少する場合もある。これは、系が重合からアブレーションにシフトするためである。安田はこのようなプラズマ中での現象をまとめ、CAP(Competitive ablation polymerization)機構[4]を提案した(図3-2)。プラズマ中では常に重合とアブレーションが競争して起こっており、それらを切り離して議論することはできない。そして、重合が優先して起こる場合においても、モノマーが単純に重合膜を形成するのではなく、モノマーの一部が破壊されまたアブレーションされた原子とも影響し合いながら重合体を形成していく。プラズマ重合によって得られる膜が、モノマーの構造とはかけ離れて架橋しているのはこのためである。個々のパラメータ依存性は重要であるが、それぞれの反応器によって大きな差がでるシステム依存性の強いプラズマ重合は個々のパラメータを議論するよりはむしろそれらパラメータを総合した複合パラメータが有意性を持つ。複合パラメータとしてはいくつか提案されたが、最近では多くの研究から W/FM がプラズマ重合挙動および重合膜の性質に密接に関連づけられており、広く使われるようになった。ここで、 W はプラズマ出力、 F はモノマー流量、 M はモノマーの分子量で、 W/FM の単位はSI系で J/kg となりモノマーの単位重量当たりに与え

られるエネルギーを表す。

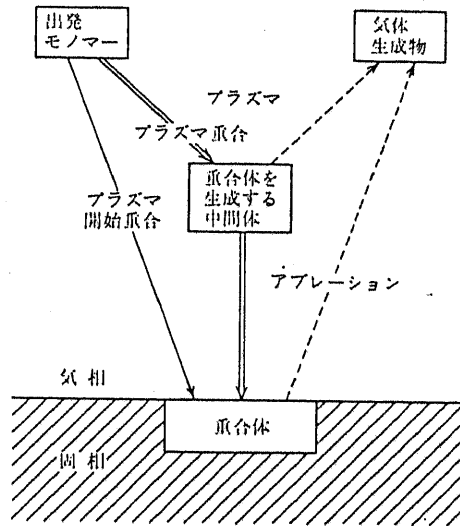


図3-2 安田によるプラズマ重合概念図 (CAP機構) [4]

3.3.4 プラズマ重合装置 [3]

一般的なプラズマ重合のパラメータを整理してみると図3-3のようになる。ここであきらかなことは、反応器の構造、動作条件、使用モノマーなどのいずれかが異なった場合、そのデータのほかの実験結果との直接的比較は困難である。特に反応器構造の詳細について知る必要がある。一般的には、次のような基本条件が同じであれば、同じモノマーを用いる場合においては、ほぼ同様の実験結果を再現できると考えてよい。

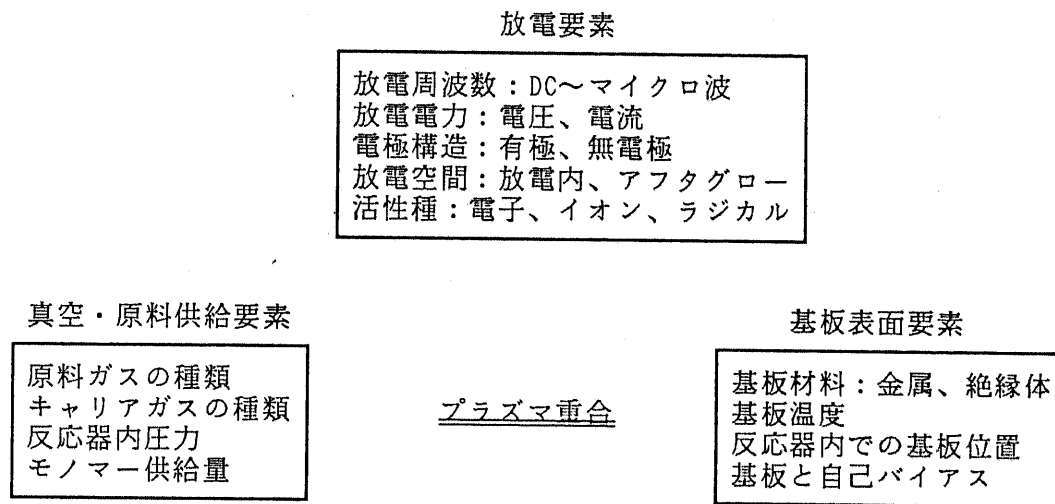


図3-3 プラズマ重合プロセスでの各種パラメータ

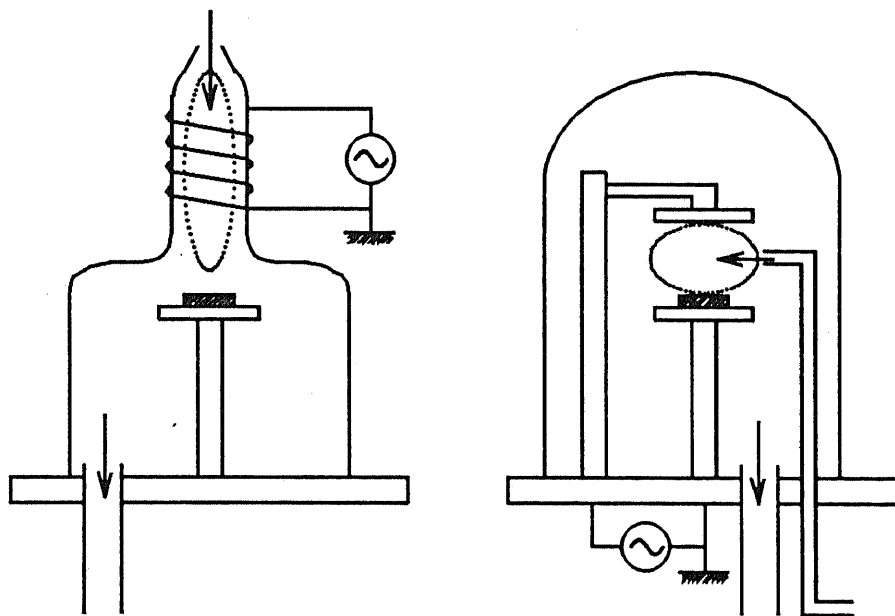
基本条件

- ① 反応器構造、放電形式、…反応器パラメータ
- ② 電源、周波数、…放電パラメータ
- ③ 圧力モノマー供給量、フロー形態、…圧力・モノマー供給パラメータ

【1】反応器パラメータ プラズマ重合の素過程は極めて複雑であって、反応領域が動作条件により、気相での反応と基板表面での反応のいずれか、また両者が混在する形で進行することである。さらに重合過程を支配する因子が、イオン種のような荷電粒子であるか、ラジカル種のような中性の活性種を積極的に活用するのかが、これらの基本的な要素により反応器の構造が大きく異なる。プラズマ反応器を設計する上で、放電域と基板の幾何学的関係は重要なプラズマ装置パラメータとなる。プラズマ重合装置に最もよく用いられている放電形式は、アフタグロー方式（図3-4(a)）と平板平行方式（図3-4(b)）がある。

アフタグロー方式は外部電極であり、その方式は図3-5に示す3通りがある。基板上的の試料表面に吸着したモノマーが放電空間で生成したラジカルなどの活性種を取り込み、近傍の未反応モノマーに付加重合していく。この場合の基板近くでの電子エネルギーは極めて小さく2~5eVくらいである。利点は、反応がラジカル主導の重合であり重合物の表面はイオン衝撃を受けにくいこと、重合物の付着による汚染がないことがある。

平行平板方式は有電極であり、一对の平行電極から構成される。利点は、電極間の電位分布、放電電流、バイアス電圧を簡単に設定できることである。この方式が最も広く普及している。



(a) アフタグロー方式

(b) 平行平板方式

図3-4 主なプラズマ重合装置の放電形式

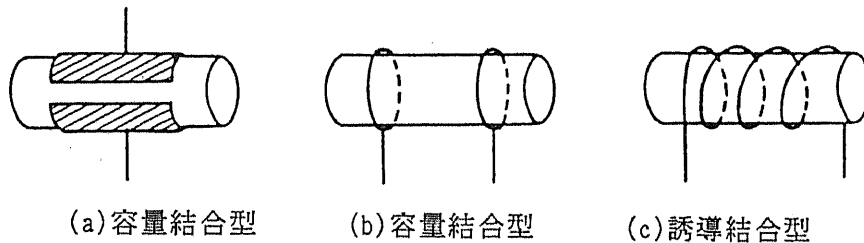


図3-5 外部電極の種類

【2】放電パラメータ プラズマの発生にはいろいろな種類の励起のための電源が使用されている。商用周波数（50Hzまたは60Hz）、高周波（ラジオ波）、マイクロ波領域までの各種の電源が用いられる。一般には、13.56MHzの高周波電源が研究用および工業用にも数多く使用されている。この理由は、高周波の場合、負荷との結合が比較的容易で、適当なインピーダンス整合回路を経てプラズマ負荷（数百 Ω ～数k Ω ）に結合させる。さらに高周波では、直流放電のように電極に絶縁膜が形成された場合においても放電電流が減少せず放電条件を一定に保持できることがあげられる。

【3】圧力・モノマー供給パラメータ 均質な膜を得るには、電極と基板の位置関係、モノマーの供給口と排気口の位置関係が重要であり、これらは実験によって最適な構造が決定される。また、プラズマを一定の形態に保つためには電界強度 E と圧力 P との比 E/P を一定に保つ必要がある。なぜなら反応器内の圧力変動は間接的に電界の強度を変化させるからである。

3.3.5 プラズマ重合膜の性状[2]

プラズマ重合膜の一般的な構造の特徴としては

- ①枝分かれや高密度の橋かけ構造である
- ②不飽和二重結合や芳香族化合物の酸化によって生じるカルボニル基や水酸基が付随することがあげられる。高度に橋かけし、溶剤に不溶であり、高温でも安定であり、これが構造解析には大きな障害であり詳しい構造がわかっていないのが現状である。一例として、Tibbittらによって、エチレンのプラズマ重合の際に得られる油状生成物の赤外線吸収スペクトルとNMRスペクトルの結果からエチレンのプラズマ重合体中の官能基の定量を行い、これを薄膜状生成物にまで拡張してモデル構造を示した（図3-6）[5]。この図よりエチレンのプラズマ重合体には、通常法のポリエチレンのように $-\text{CH}_2-$ の規則的な繰り返しの単位構造はなく、多くの不飽和結合、芳香環、側鎖を有している。薄膜は高度に橋かけ構造を有し、その程度は、約6～10の炭素連鎖に対し1個の橋かけが存在するほどである。

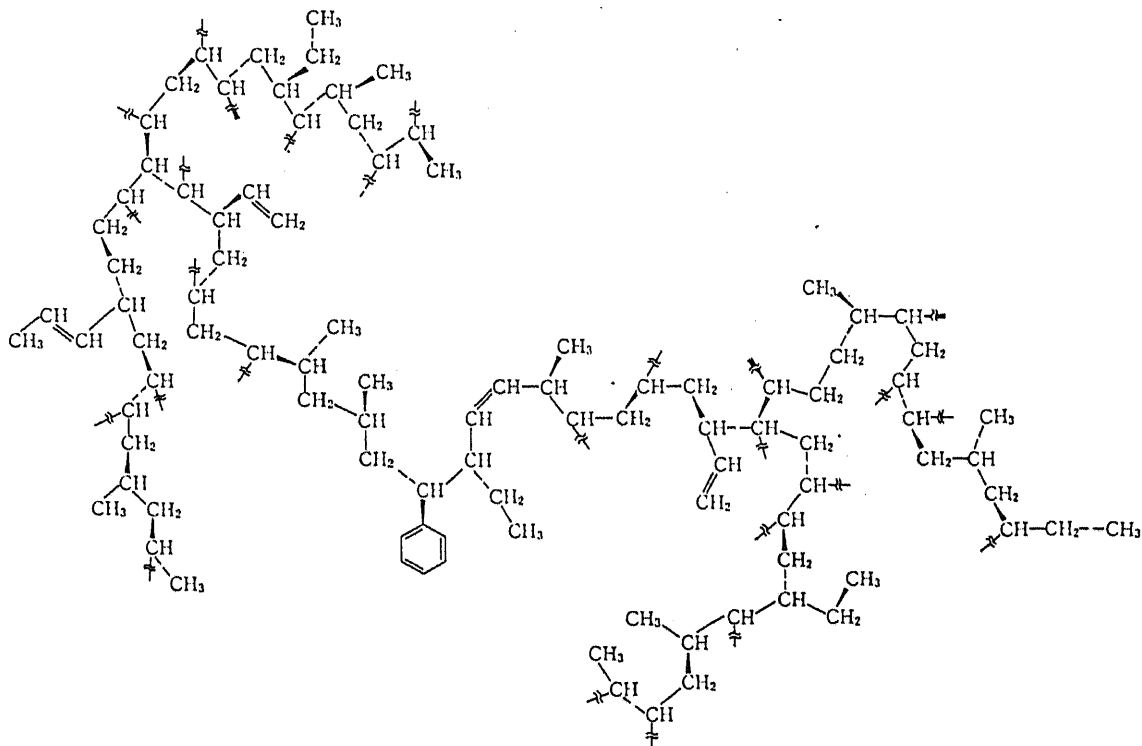


図3-6 エチレンプラズマ重合体の分子構造モデル[5]

3.3.6 プラズマ重合膜の応用[2, 3]

プラズマ重合膜の性質を生かして様々な方面で利用されている。表3-3にプラズマ重合膜の主な応用例を示す。

分離膜：逆浸透膜、気体分離膜、液体分離膜
表面保護膜：金属保護膜、表面硬化膜、耐摩耗性膜
光学材料：レーザー核融合ターゲットコーティング、光IC
医用材料：抗血栓性、
電子材料：絶縁体、

表3-3 代表的なプラズマ重合膜の応用

3.4 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の作製と評価

3.4.1 本研究で用いたプラズマ重合装置

本研究で使用したプラズマ重合装置のダイアグラムを図3-7に、写真を図3-8に示す。放電形式は、アフターグロー、外部誘導方式である。コイルの形状は、外径8mmの銅パイプを66mmの直径で3.5巻したものである。供給源は、液体の場合リザーバーで蒸気圧で行い、気

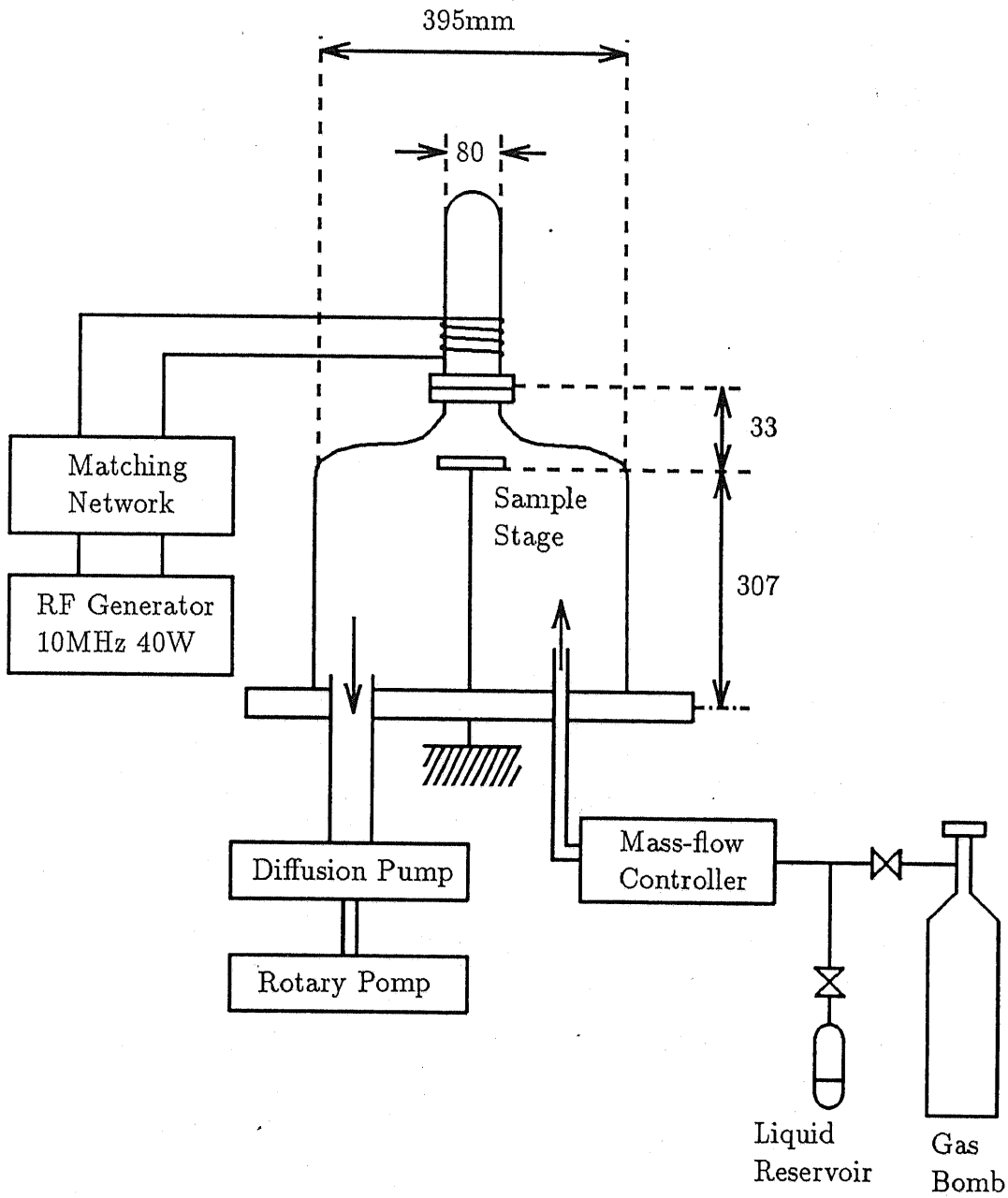
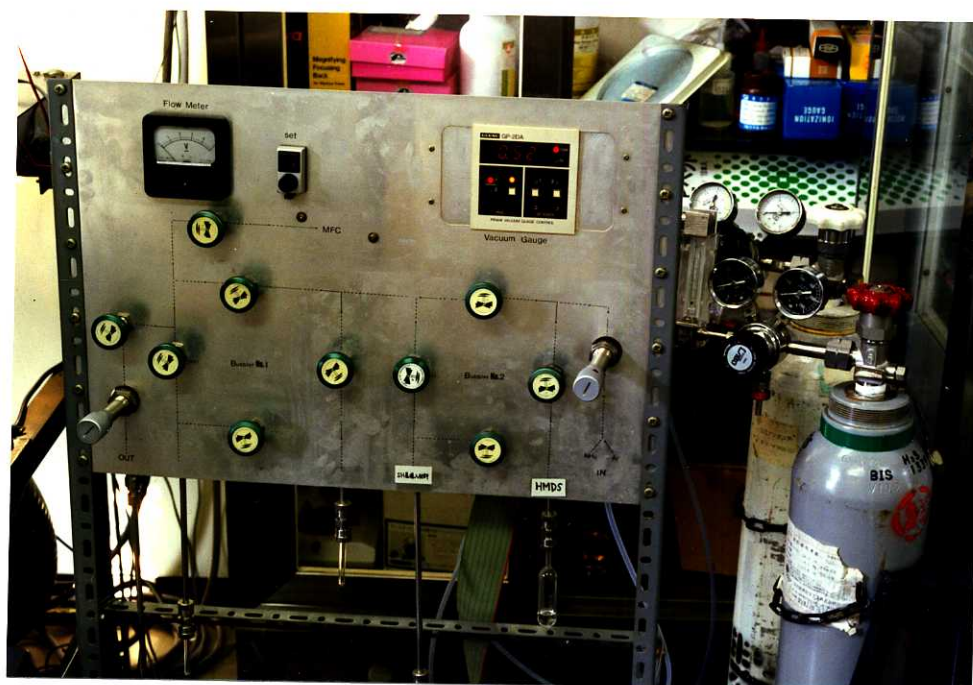


図3-7 本実験で使用したプラズマ重合装置のダイアグラム

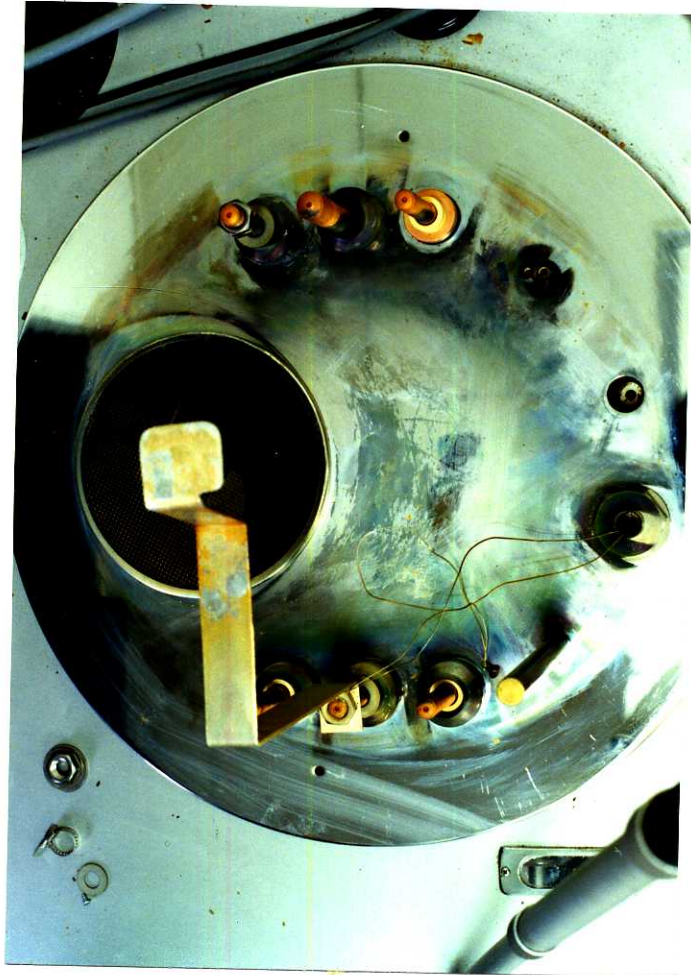
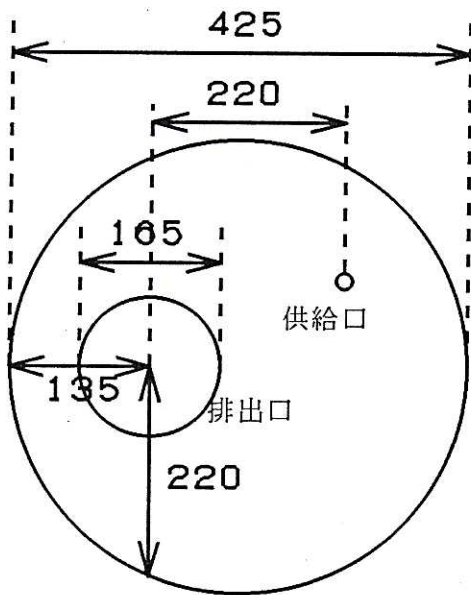


(a) プラズマチャンバー



(b) ガス供給ユニット

図3-8 本実験で使用したプラズマ重合装置



(c)上からみた図と写真

図3-8 本実験で使用したプラズマ重合装置

体の場合ポンペで行う。流量はマスフローコントローラーで、圧力は油拡散ポンプの排気口の開閉で調整する。圧力はピラニーゲージでモニターする。

3.4.2 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の作製

本研究ではプラズマ重合膜をISFET型免疫センサの抗体固定化膜として利用する。それには、まずモノマーの選択が重要であり、本研究ではヘキサメチルジシロキサン (HMDS) を使用した。以下プラズマ重合膜といえばHMDSプラズマ重合膜のことを示すことにする。HMDSの構造式は図3-9に示す。HMDSプラズマ重合膜の特徴は次にあげる。

- ①シリコン基板に付着性がよい
- ②生体適合性がある
- ③蒸気圧が高くプラズマを制御しやすい。

これより、HMDSプラズマ重合膜はISFET型免疫センサには最適であることがわかる。HMDSプラズマ重合膜はこれまでよく研究されており、気体透過膜[6, 7]、パシベーション膜[8]、などに利用されている。また、電気特性もよく調べられている[8, 9, 10]。

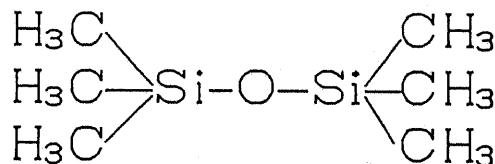


図3-9 ヘキサメチルジシロキサンの構造式

まず、HMDSプラズマ重合膜の作製を行い、これまで報告されている特性と同様の膜が得られたかを確認した。プラズマ重合膜の作製手順を次の通りである。チャンパーにシリコン基板を入れ、真空度を 3×10^{-6} Torrにする。HMDS蒸気をよりチャンパー内を満たし圧力を調整する。この場合圧力の調整のみで流量の調整は行わなかった。放電を一定時間行い基板を取り出す。プラズマ条件は表3-4に示す。この条件では、放電時間1分で約500nmの膜が生成する。図3-10はHMDSの放電の様子の写真である。

放電電力：40W
周波数：10MHz、FM変調
モノマー圧力：0.035Torr

表3-4 HMDSプラズマ重合膜のプラズマ条件

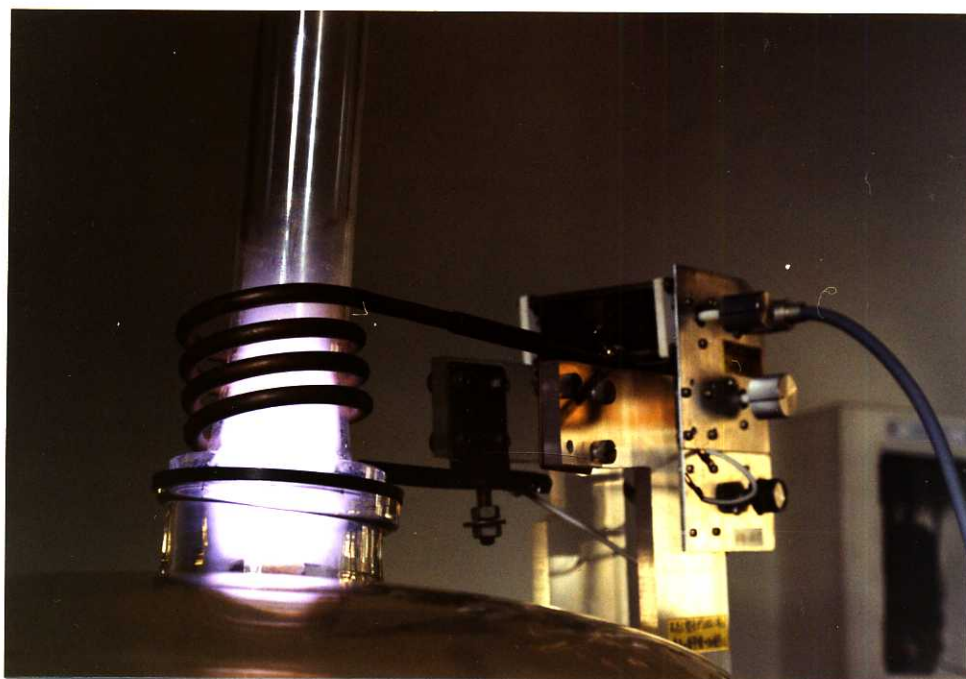


図3-10 HMDSのプラズマ重合放電の様子

3.4.3 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の構造の評価

図3-11にHMDSプラズマ重合膜のFTIRスペクトルを示す。吸収ピークの帰属は、次の通りである。すなわち、 2960cm^{-1} ; CH_3 -伸縮振動(ν)、 2900cm^{-1} ; $-\text{CH}_2$ -伸縮振動(ν)、 2123cm^{-1} ; Si-H 伸縮振動(ν)、 1260cm^{-1} ; Si-CH_3 対称変角はさみ振動(δ_s)、 $1200\text{-}1000\text{cm}^{-1}$; Si-O-C , Si-O-Si ;伸縮振動(ν)、 840cm^{-1} ; Si-CH_2 面外変角縦揺れ振動(ω)、 800cm^{-1} ; Si-CH_2 面外変角横揺れ振動(τ)である。これらのピークは文献[7, 11, 12]にほぼ一致する。 $1200\text{-}1000\text{cm}^{-1}$ のピークが広がっているのは、 Si-O-Si と Si-O-C の構造が非常に複雑であるためである。

図3-12にXPSスペクトルを示す。この組成比は、 $\text{C}:\text{Si}:\text{O}=6.1:2.4:1$ であり、モノマーの組成比($\text{C}:\text{Si}:\text{O}=6:2:1$)と同様であることがわかる。

田島らは他に ^{13}C と ^{29}Si の固体NMRを調べ図3-13のような推定構造を提案している[11]。それによると、様々な構造の高度の架橋であり、酸素原子がシリコン原子を取り囲んでいる。また、表面とバルクとでは表面の方が酸素組成が小さい。

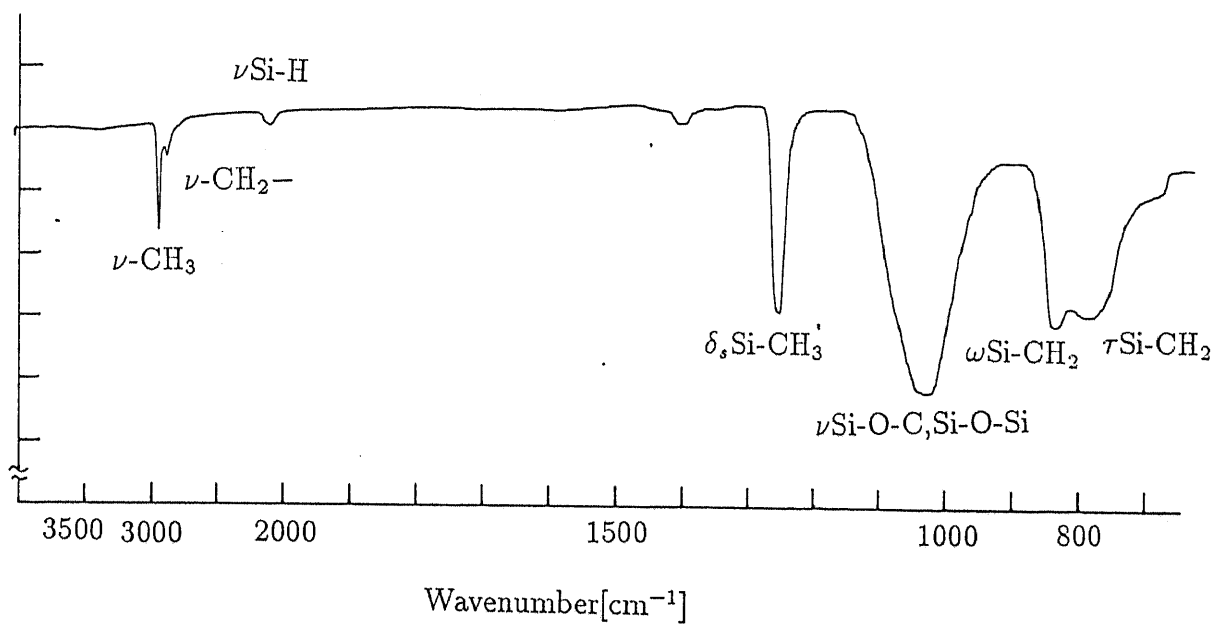


図3-11 HMDSプラズマ重合膜のIRスペクトル

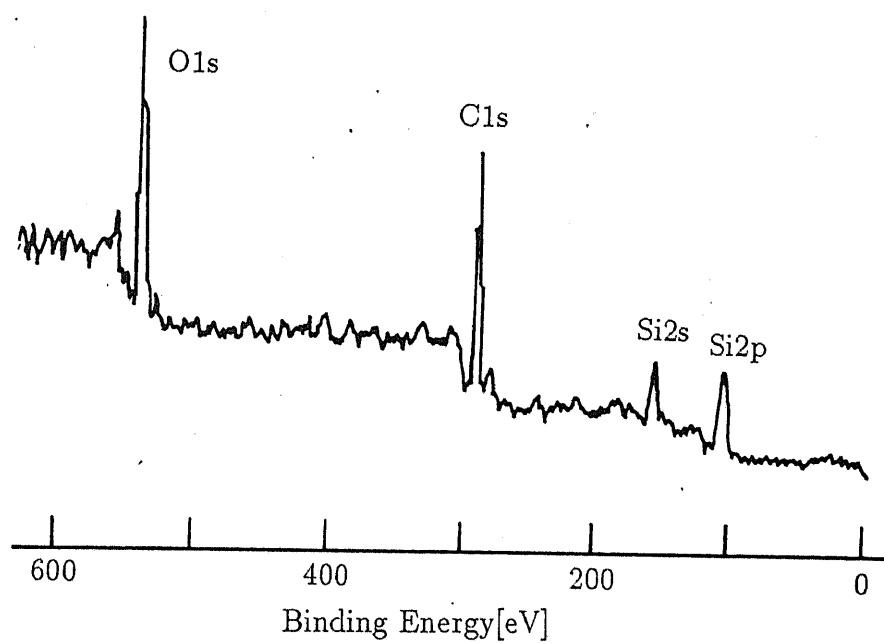


図3-12 HMDSプラズマ重合膜のXPSスペクトル

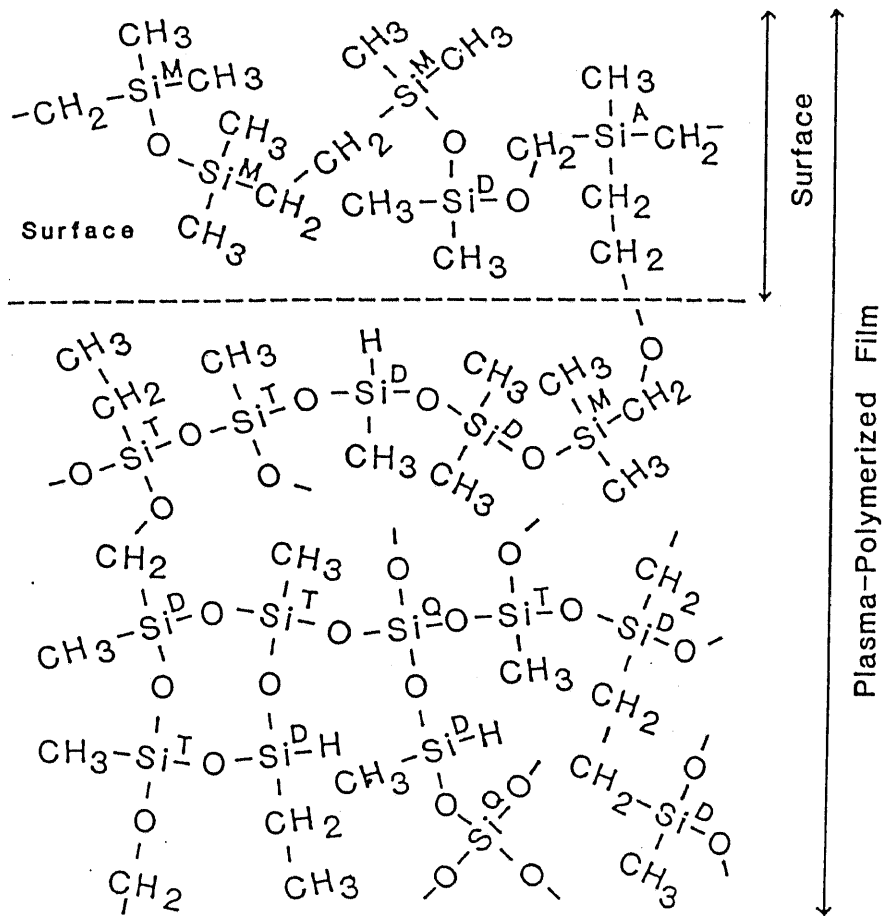


図3-13 HMDSプラズマ重合膜の推定構造図[11]

3.4.4 ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の電気的特性の評価

プラズマ重合膜をセンサに用いるには、その電気的特性のキャラクタリゼーションが必要である。本研究の場合には、抗原抗体反応によって生じる電位変化を伝える絶縁膜として利用するので、容量が重要なパラメータになる。プラズマ重合膜の容量を測定した。測定試料の形状は図3-14の通りである。n型ハイドープシリコン基板(0.018Ωcm)を洗浄し、裏面にアルミニウムを蒸着させる。鏡面にプラズマ重合膜をデポジットし、熱処理する。プラズマの条件は、3.4.2に、熱処理の条件は3.4.5に示す。最後に電極としてアルミニウムを膜上に蒸着させる。電極面積は1mmφである。容量の測定ははHP社のLCZメータ4077Aを使用した。測定周波数は10kHzである。放電時間を変えたときの容量と誘電損失を表3-5に示す。測定は5つのサンプルの平均値である。容量の測定ができたので、ピンホールのない絶縁膜であることがわかる。その容量値もSiO₂やSi₃N₄にかわらない値である。誘電損失についても文献[14]と変わらない値である。プラズマ重合膜の誘電損失は、通常のポリマーに比べて一桁大きいことが知られている。それは、ポリマー構造の不飽和性が高く、残留ラジカル濃度が大きいためである。その対策として熱処理が有効である。これについては3.4.5で述べる。また参考までに表3-6にプラズマ重合膜と代表的な無機の絶縁膜の電気諸特性を示す。これより、プラズマ重合膜はかなりよい絶縁膜であることがわかる。

放電時間	容量[pF]* ¹	誘電損失
10s	228	1.12×10 ⁻³
20s	110	1.01×10 ⁻³
60s	47	0.68×10 ⁻³
計算値* ²	153	

*1 電極面積1mmφ
測定周波数10kHz
*2 比誘電率2.2[13]
面積1mmφ
膜厚100nmでの計算値

表3-5 HMDSプラズマ重合膜の容量

絶縁体	比誘電率	耐圧[V/cm]	導電率[S/cm]
HMDS	2.2	5.5~7.5×10 ⁶	10 ⁻¹⁵ [8]
SiO ₂	3.9	2×10 ⁶	
Si ₃ N ₄	7.4	1×10 ⁷	

表3-6 代表的な絶縁体の諸特性

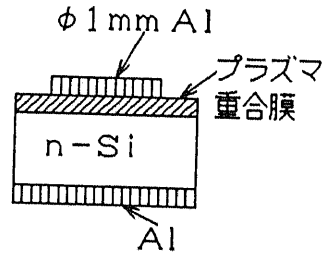


図3-14 プラズマ重合膜の電気特性評価のための電極図

3.4.5 プラズマ重合膜の熱処理効果

プラズマ重合膜を絶縁膜として使用する場合には、膜内の残留ラジカルが問題となる。この対策として熱処理が有効である。プラズマ重合膜の熱処理効果については神保によって研究されている。それによると、窒素中200°C、10分間の熱処理で膜内の残留ラジカルは消失すると報告されている[15]。図3-15にキシレンプラズマ重合膜の熱処理前後のESRスペクトルを示す。これより、重合後未処理の状態では、 10^{12} cm^{-2} オーダーのラジカルが熱処理によって定量限界以下 ($< 10^{11} \text{ cm}^{-2}$) に現象していることがわかる。したがって、プラズマ重合膜をセンサに利用する際には熱処理が必要である。

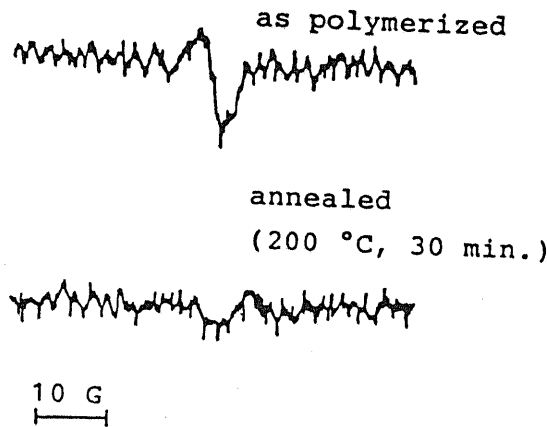


図3-15 キシレンプラズマ重合膜の熱処理前後のESRスペクトル[15]

3.5 第3章のまとめ

本章では、抗体固定化膜にはプラズマ重合膜が適していると考え、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜の作製を行いその評価を行った。その結果、ヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜はISFET型免疫センサの抗体固定化膜に利用できることを示した。

第4章

プラズマを利用した表面修飾

4.1 第4章のまえおき

第3章においてプラズマ重合膜はバルクとしては（電気的特性）ISFET型免疫センサの抗体固定化膜として利用できる条件を備えていることを示した。次には、この膜を生体物質の存在する水溶液に浸すことになるので、表面改質により生体適合性などのセンサとして利用し得る特性を与えることが重要になる。表面改質法は、多くの手段があるが本研究ではプラズマ重合膜を用いているので、プラズマを利用した表面改質が有効である。本章では、プラズマを利用した表面改質を行った。具体的には、プラズマを利用してアミノ基やチオール基のような生体物質と関係の深い官能基の導入を行った。表面に官能基の導入を行うので、表面改質というよりは表面修飾という言葉が適しているので、こちらを使うことにする。

4.2 プラズマを利用した表面修飾の経緯

プラズマによる官能基の導入のためには、プラズマガスの選択が重要となる。これまで研究では、ポリマーの接着性の向上や親水性の向上という目的で行われ、酸素、アルゴン、窒素、水素のプラズマ処理について調べられている[1][2]。官能基のカルボキシル基、カルボニル基、水酸基、の量が接着性あるいは親水性に大きな関係があると報告されている。本研究のような生体適合性を与える研究は、Hollahan[3]らによってアンモニアあるいは窒素と水素の混合プラズマによりアミノ基を導入し、そのアミノ基を利用してヘパリンを固定化して抗血栓表面を得ている。プラズマを用いたチオール基の導入法については研究報告がない。

本章では、生体適合性のある官能基の導入のためのプラズマガスの探求を行い、それらのガスによる表面修飾とXPSによる表面分析の評価を行い、プラズマによる官能基の導入法の確立を行った。

4.3 XPS法の基礎的事項

本研究では表面分析の手段にXPSを用いた。XPSの基礎的事項を述べる。XPSは軟X線の照射により内殻電子を放出させその運動エネルギーを測定することにより束縛エネルギーの値を求めるものである。その概念図を図4-1に示す。内殻電子は光電子とオージェ電子の2種類の過程を伴っているが、XPS測定で利用されるのは光電子である。光電子の運動エネルギーKEは次式のように表される。

$$KE = h\nu - BE - \phi \quad (4-1)$$

$h\nu$ は軟X線のエネルギーである。XPSでは、 $MgK\alpha$ (1253.6eV)か $AlK\alpha$ (1486.6eV)のどちらかがよく使われる。BEは電子の結合エネルギーであり、物質の固有の値である。 ϕ は検出器の仕事関数である。内殻電子の束縛エネルギーの値は各原子に固有のものでありかつその微妙な変動(化学シフト)がその原子の結合状態に関する情報を含んでいる。したがって、XPSスペクトルの詳細な解析を行うことにより試料の構成元素に関する半定量分析と同時にある程度化学構造に関する知見も得られる。また、XPSが感度を有する範囲は、光電子の脱出深さであり有機材料の場合5nm程度であるので、本研究における薄膜の表面分析には極めて有効な手法である。本研究で利用したXPSの測定器、測定条件などを表4-1に示す。

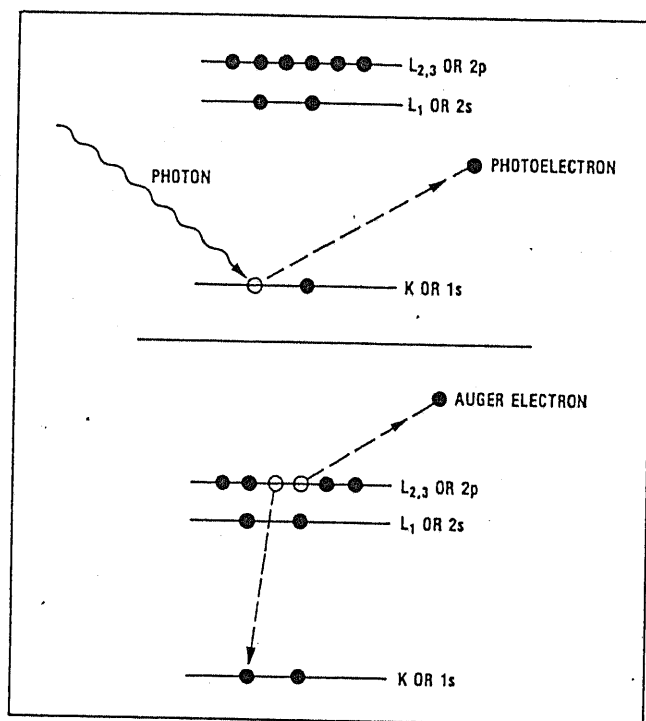


図4-1 XPSの概念図

XPSのスペクトルの強度から組成比を推定するには、それぞれの元素スペクトルの相対感度係数が必要である。本研究で使用した相対感度係数[4]を表4-2に示す。

測定メーカー：島津ESCA750
 X線の種類：MgK α
 X線のパワー：240W(8kV;30mA)
 測定真空度： 5.3×10^{-8} Torr

表4-1 XPS測定条件

軌道	結合エネルギー	感度係数
C1s	287	0.25
O1s	531	0.66
N1s	402	0.42
F1s	686	1.00
S2p	165	0.49
Ag3d _{5/2}	368	3.10
Hg4f _{7/2}	100	3.15

表4-2 本研究でXPSスペクトルの結合エネルギーと相対感度係数[4]

化学シフトの絶対値で議論するには、基準のスペクトルが必要でありそれにはAg3dの368.2eVを利用した。それは、測定試料の表面に銀ペーストを少し塗ることでピークを出した。図4-2にAg3dのスペクトルを示す。

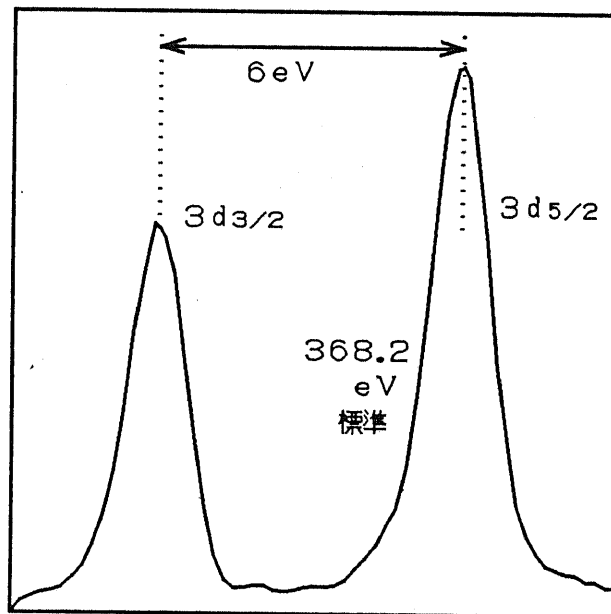


図4-2 Ag3dのXPSスペクトル

4.4 化学修飾XPS法での表面での官能基分析

表面の官能基を分析するにはアミノ基ではN1sスペクトル、チオール基ではS2pスペクトルの化学シフトを調べるのが一般的である。しかし、化学シフトの位置が一致したとしても必要条件を満たしただけであり、表面の標準値自体が不正確な場合もある。したがって、官能基特異的に反応する試薬で化学修飾し、その誘導体の新元素のスペクトルを調べるというラベリング法（化学修飾法）が用いられる。ラベリング法の概念図を図4-3に示す。この方法はEverhart[5]らによって始められた。ラベリングの原子は、散乱断面積の大きな元素、いかえると相対感度係数の大きな元素が望ましい。また、ラベリングの試薬は分子量が小さく、表面の官能基と立体障害を起こすことなく反応し、非特異的吸着を起こさないことが重要である。

この方法を用いたもう一つの理由は、XPSの情報は表面から5nmの範囲の平均の情報である。本研究ではバイオセンサとして利用するので水溶液に浸し、水溶液と相互作用する表面が研究対象である。つまり、表面単原子層の官能基を調べたいのである。そのため化学修飾法は溶液で反応させるので本研究の目的と合致する。

本研究では、アミノ基、カルボキシル基、カルボニル基、チオール基の化学修飾試薬にそれぞれ、ペンタフルオロベンズアルデヒド(PFB)[5]、ペンタフルオロベンジルブロミド(PFBBR)[5]、ペンタフルオロベンズヒドラジン(PFBH)[5]、クロロ安息香酸第二水銀(CMB)[6]をもちいた。図4-4に反応のダイアグラムを示す。また試薬の反応条件は次の通りである。

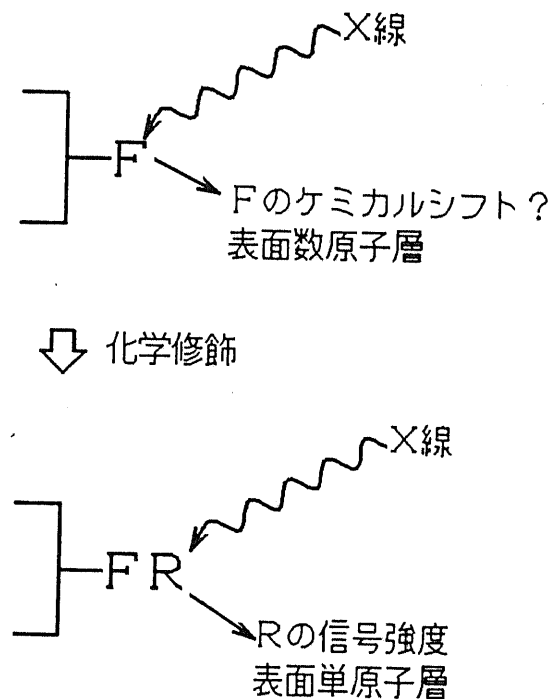
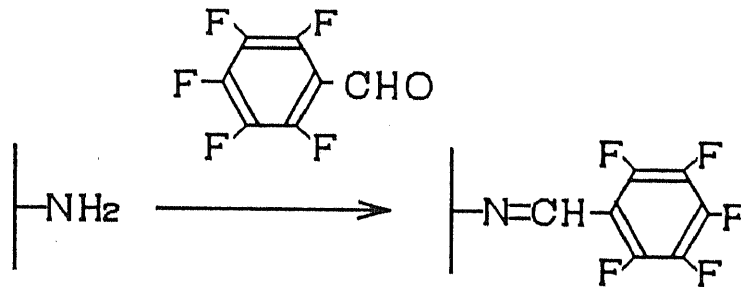
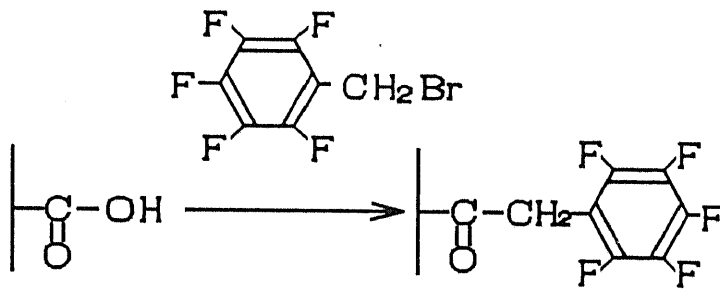


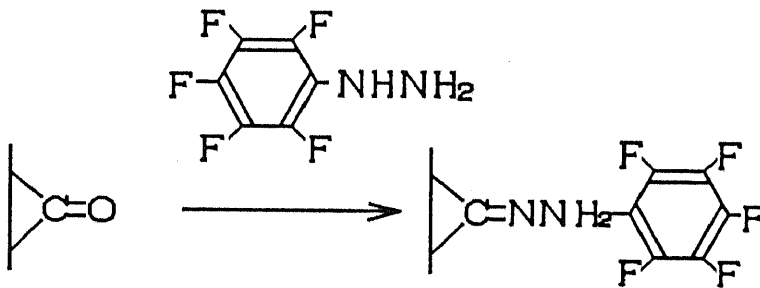
図4-3 表面官能基分析の概念図（ラベリング法）



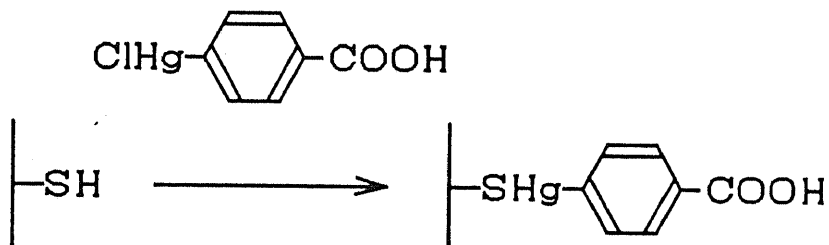
(a) アミノ基：ペンタフルオロベンズアルデヒド(PFB) [5]



(b) カルボキシル基：ペンタフルオロベンジルブロミド(PFBB) [5]



(c) カルボニル基：ペンタフルオロベンズヒドラジン(PFBH) [5]



(d) チオール基：p-クロロ安息香酸第二水銀(CMB) [6]

図4-4 官能基誘導体反応

PFB 0.1mlを含むペンタン5mlの溶液中
35°C、2時間反応
ペンタンで洗浄
ヘキサン中で12時間保存

表4-3 アミノ基修飾の条件[5]

KOH200mgを含むイソプロパノール300mlに30秒
イソプロパノールで洗浄
ベンゼンで洗浄
PFBBr0.5mlを含むベンゼン15mlの溶液中
室温、15時間反応
ベンゼンで洗浄
エーテル中で12時間保存

表4-4 カルボキシル基修飾の条件[5]

PFBH150mgと濃塩酸1滴を含む95%エタノール水15ml中
室温で2時間反応
100%エタノールで洗浄
エーテル中で12時間保存

表4-5 カルボニル基修飾の条件[5]

0.1mol/lのCMB、NaOH(0.2mol/l)に7時間室温で反応
NaOH(0.2mol/l)で洗浄
NaOH(0.2mol/l)中で2時間放置
蒸留水中で8時間放置

表4-6 チオール基修飾の条件[6]

また、本章の実験では表面修飾する表面はプラズマ重合膜ではなく、低密度ポリエチレンを用いた。これは、表面分析を容易にするためである。ポリエチレンは次の通りである。

National Institute of Standards and Technology製
コード042 M.W. 50,000, n25/D 1.5k, Density 0.92,
厚さ0.4mmのフィルムに成形

表4-7 本研究で使用した低密度ポリエチレンの正体

はさみで3mm×3mmに切断、
アセトンで超音波洗浄、
イソプロパノールで超音波洗浄、
イソプロパノール70℃で4h、
イソプロパノール中で保存

表4-8 ポリエチレンの洗浄法[5]

図4-5にこの低密度ポリエチレンのXPSのサーベイスペクトルを示す。

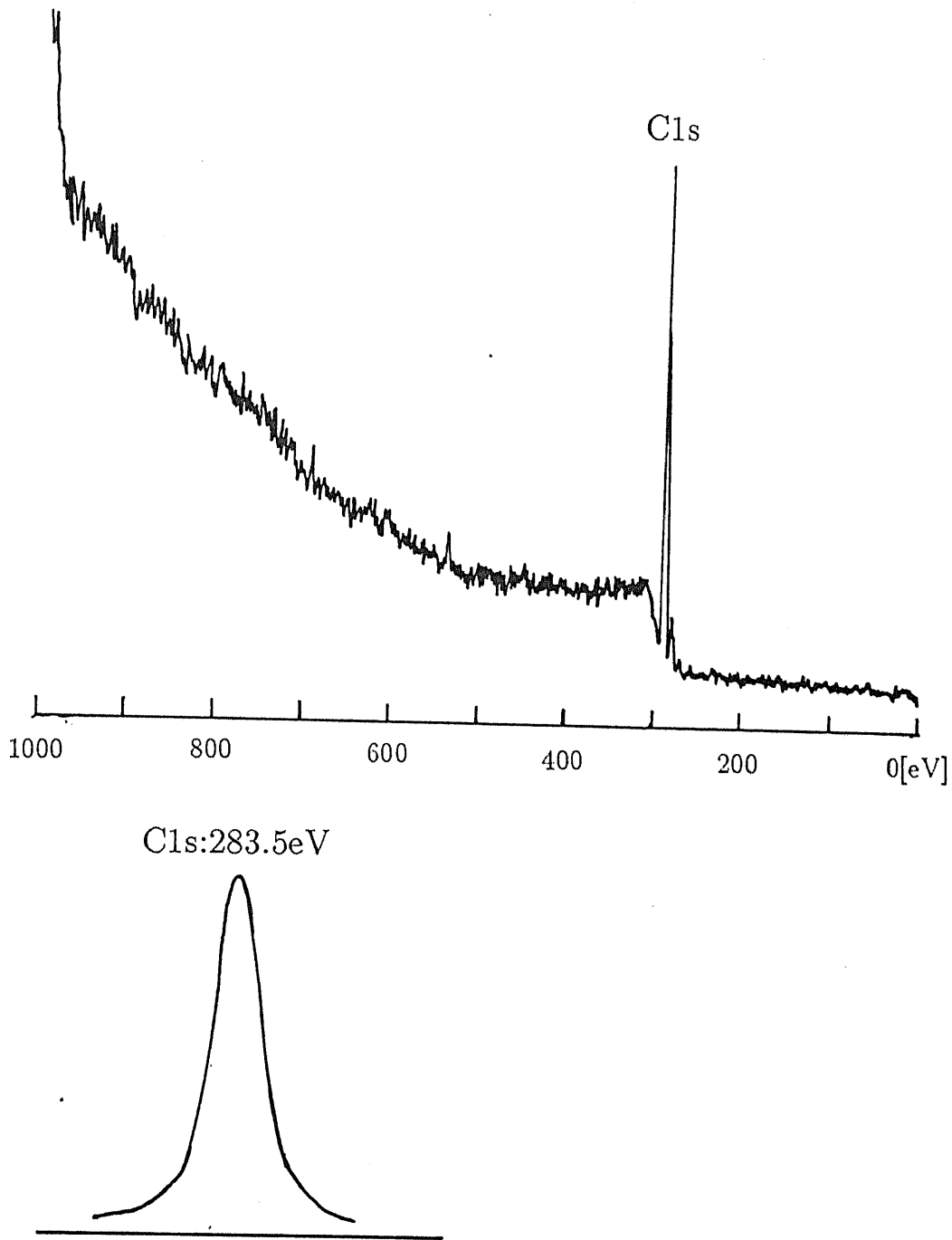


図4-5 本実験で使用した低密度ポリエチレンのXPSサーベイとC1s

4.5 アミノ基の導入とその表面分析

【実験】

アミノ基の導入のためのプラズマガスは、窒素、アンモニア[3, 5]の報告があるだけである。一方、窒素原子を含んだプラズマ重合膜は、親水性のある膜の開発として研究されている[7, 8, 12]。そして、アセトニトリル[9, 12]、アリルアミン[10, 12]、ピリジン[11]、プロピルアミン[12]のプラズマ重合膜の構造が調べられている。

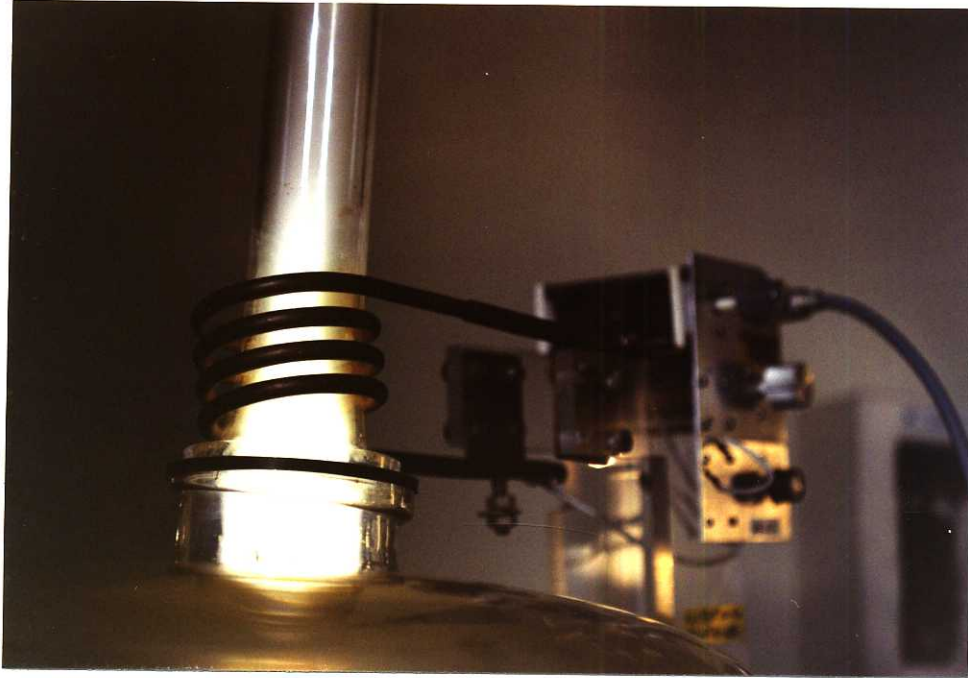
アミノ基導入のプラズマガスの原料は次の観点から選択した。

- ① 窒素原子を含む物質であること
- ② 窒素の他には炭素、水素のみを含む物質であること
- ③ 安価に入手できること

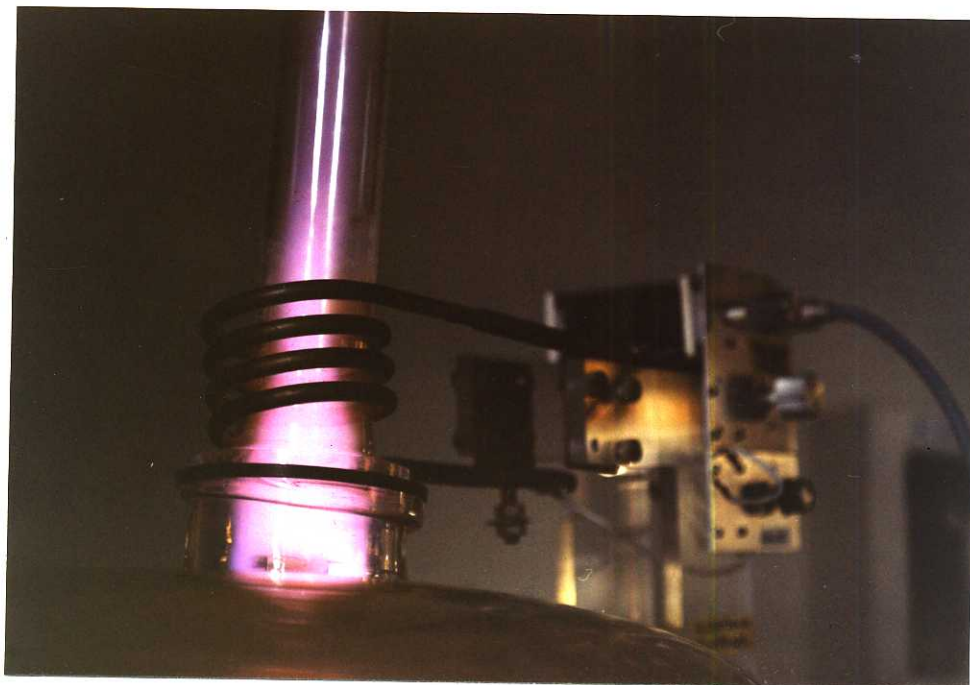
表4-9にその候補となるプラズマガスをあげた。プラズマの条件は全ての材料で表4-10に示す。図4-6に、アンモニアとエチレンジアミンのプラズマの写真を示す。この条件では、ガスの種類によっては成膜するものもあり、アリルアミン、ピリジン、アセトニトリルがそうである。この場合には表面修飾というよりは、新しい表面を作ることだといえる。

物質名	分子式	構造式	分子量	融点℃	沸点℃
アンモニア	H_3N	NH_3	17.03	-78	-33
窒素	N_2	N_2	28.01	-210	-195.8
エチレンジアミン	$C_2H_8N_2$	$H_2N(CH_2)_2NH_2$	60.10	8.5	118
ヘキサメチレンジアミン	$C_6H_{16}N_2$	$H_2N(CH_2)_6NH_2$	116.21	42-45	204-5
ヒドラジン	H_4N_2	N_2H_4	32.05	1.4	113.5
n-プロピルアミン	C_3H_9N	$CH_3(CH_2)_2NH_2$	59.11	-83	48
トリエチルアミン	$C_6H_{15}N$	$(C_2H_5)_3N$	101.19	-115	88.8
ジエチルアミン	$C_4H_{11}N$	$(C_2H_5)_2NH$	73.14	-50	55
ピリジン	C_5H_5N	C_5H_5N	79.10	-42	115
アリルアミン	C_3H_7N	$CH_2=CHCH_2NH_2$	57.10	-88	53
アセトニトリル	C_2H_3N	CH_3CN	40.05	-48	82

表4-9 アミノ基導入のためのプラズマガス



(a)アンモニアプラズマ



(b)エチレンジアミンプラズマ

図4-6 アミノ基導入のためのプラズマガス

圧力：20～50mTorr
 放電電力：40W
 周波数：10MHz、FM変調
 放電時間：1分

表4-10 アミノ基導入のためのプラズマの条件

【結果】

表4-9にあげたプラズマガスを表4-10の条件でプラズマ処理したポリエチレンの表面分析を行った。表面分析には化学修飾XPS法で行った。アミノ基の化学修飾は、表4-3の条件で行った。この場合F原子がラベルとなりこのF1sピークの大きさで官能基の大きさを比較できる。それぞれのXPSサーベイスペクトルを図4-7に示す。実験は2回の平均値である。また、化学修飾の際には、条件を同じにするために同じビーカー内で行った。またそれらの結果をまとめて表4-11に示す。相対感度係数は、表4-2の値を、ピーク強度面積を使用した。表4-11中には、2種類の表面のスペクトルを調べていて、表面A、表面Bとした。

表面A：プラズマ処理後化学修飾した表面

表面B：プラズマ処理のみで未修飾の表面

表面Aの組成比は、F1s、C1s、N1s、O1sの合計を100%としたものであり、表面Bの組成比は、C1s、N1s、O1sの合計を100%とした。アミノ基の表面密度は、PFBの構造式よりF原子5個がアミノ基1個に相当すると考え、C1sに対するF1sの比率を求め、ポリエチレンのメチレン基-CH₂-の表面密度が $5 \times 10^{14} \text{cm}^{-2}$ [13]であることから計算した。図4-8には、アミノ基の表面密度を棒グラフで表し比較しやすいようにした。N1sのピーク位置は、Ag3dの368.2eVを基準とした。図4-9にエチレンジアミン処理表面BのN1sスペクトルとC1sスペクトルを示す。表4-11中の”ウェット”と書いてあるのはプラズマとウェットプロセスを併用したアミノ基の導入法 [14] である。その条件を表4-12に示す。また、図4-10にその反応ダイアグラムを示す。文献 [14] ではこの方法で導入したアミノ基の密度をラジオアイソトープを用いて測定を行い $3.1 \times 10^{14} \text{cm}^{-2}$ であると報告している。

水プラズマ処理1分（条件は表4-10と同じ）
 CrO₃:H₂O:H₂SO₄=1:15:24 3分
 水で洗浄、アセトンで洗浄、乾燥
 1.6ml塩化チオニル/2mlDMF 2時間
 ジクロロメタンで洗浄、乾燥
 エチレンジアミン 30分
 ジクロロメタンで洗浄、乾燥

表4-12 プラズマとウェット法を併用したアミノ基導入法 [14]

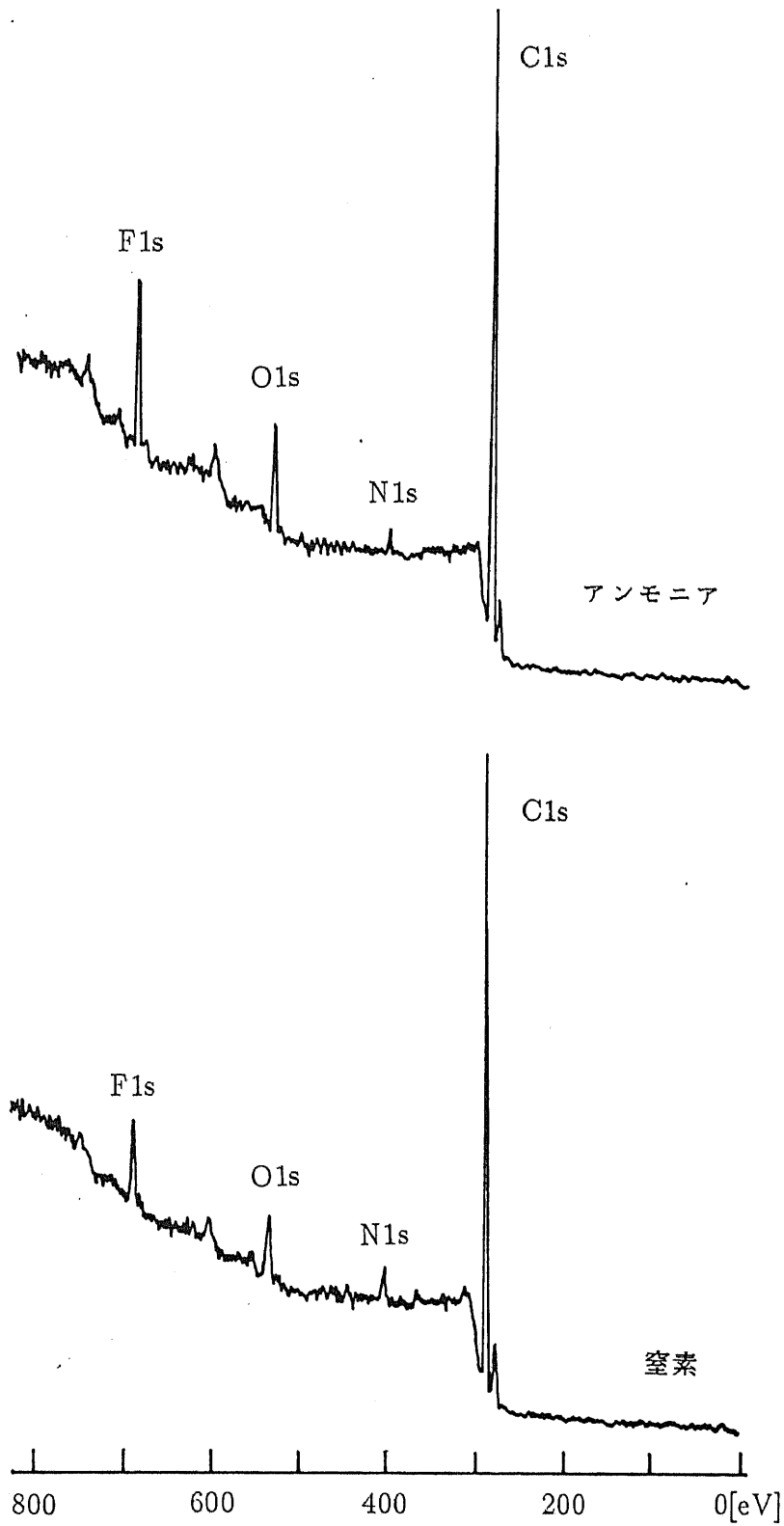


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

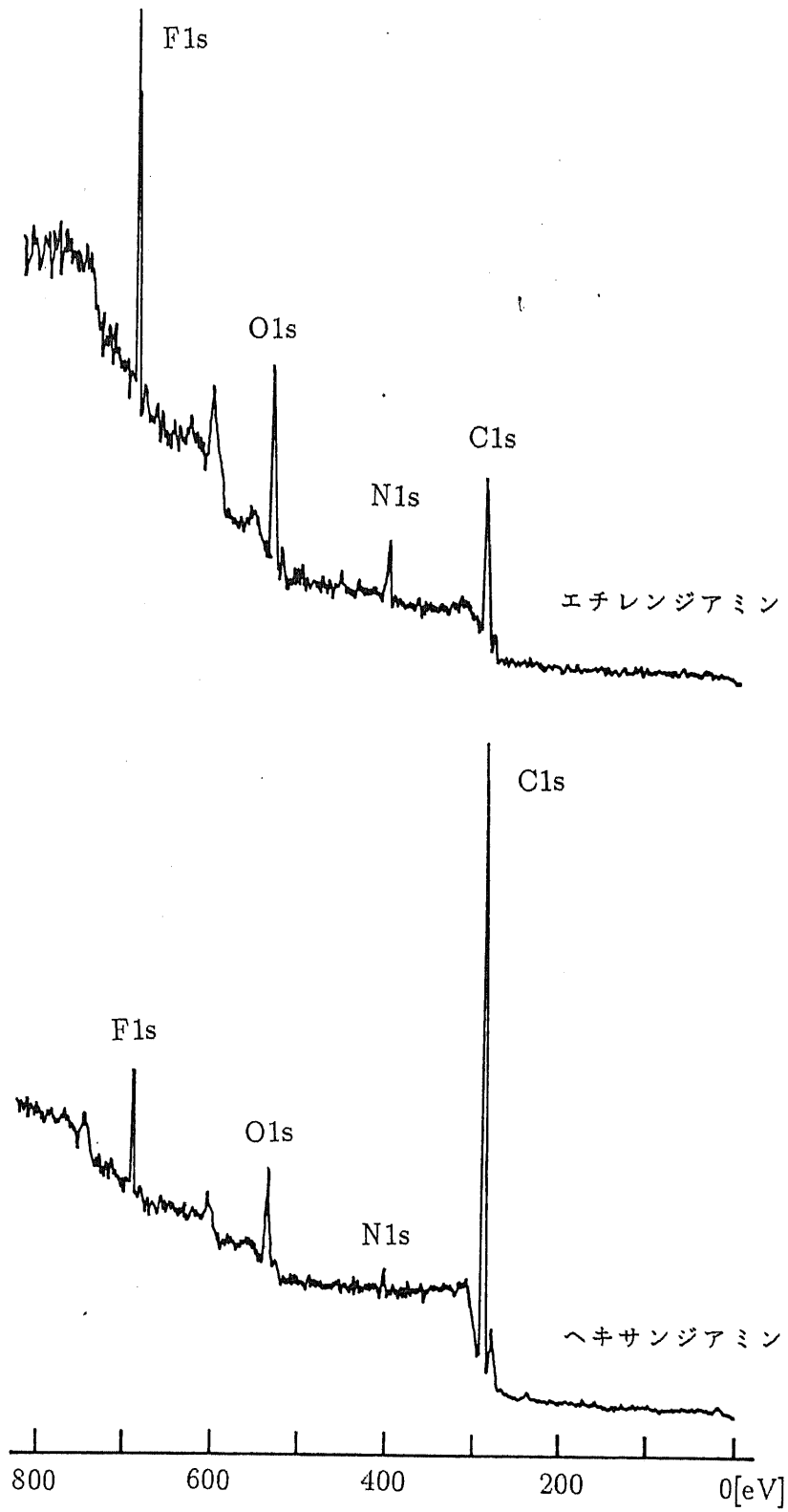


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

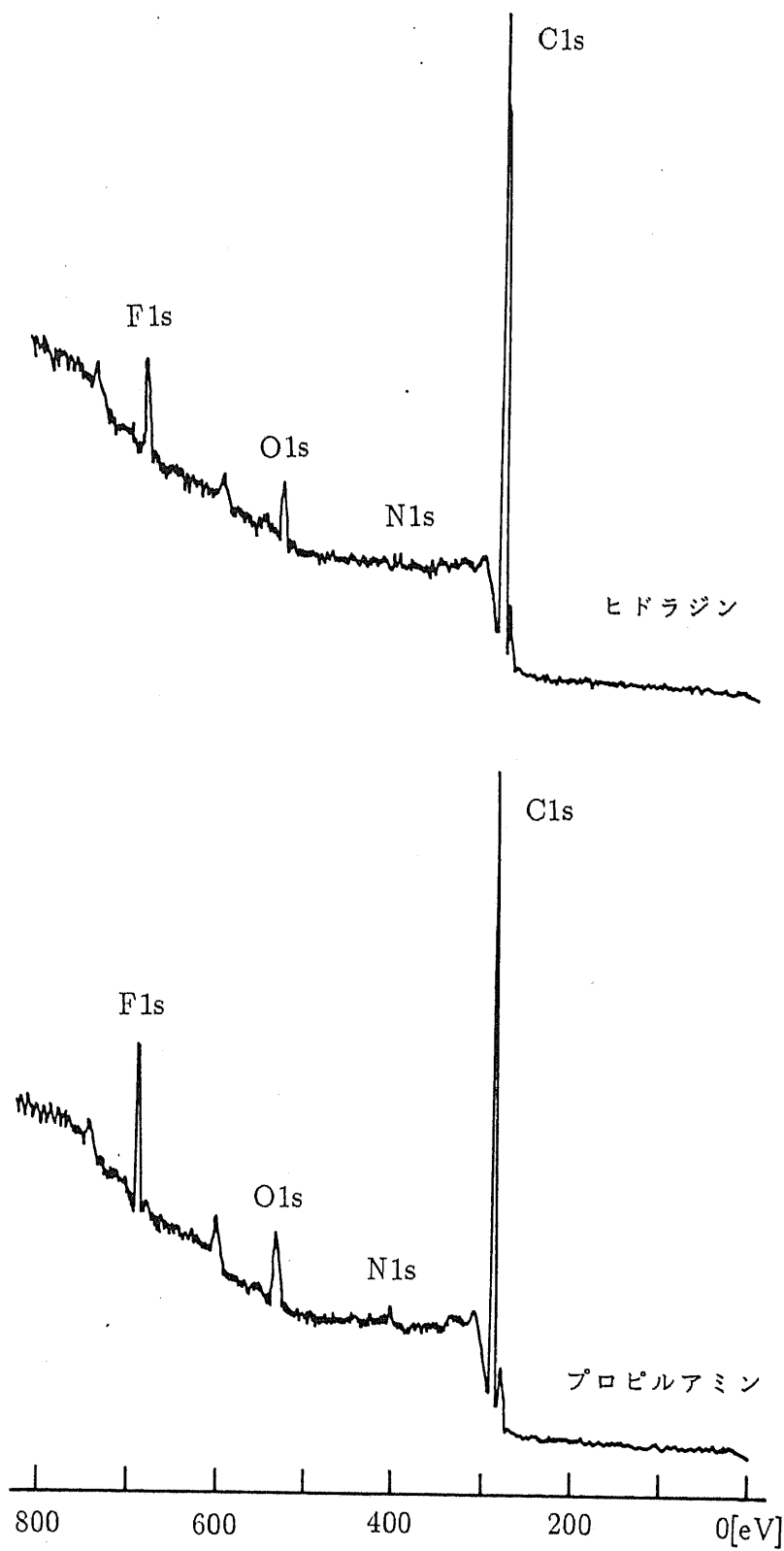


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

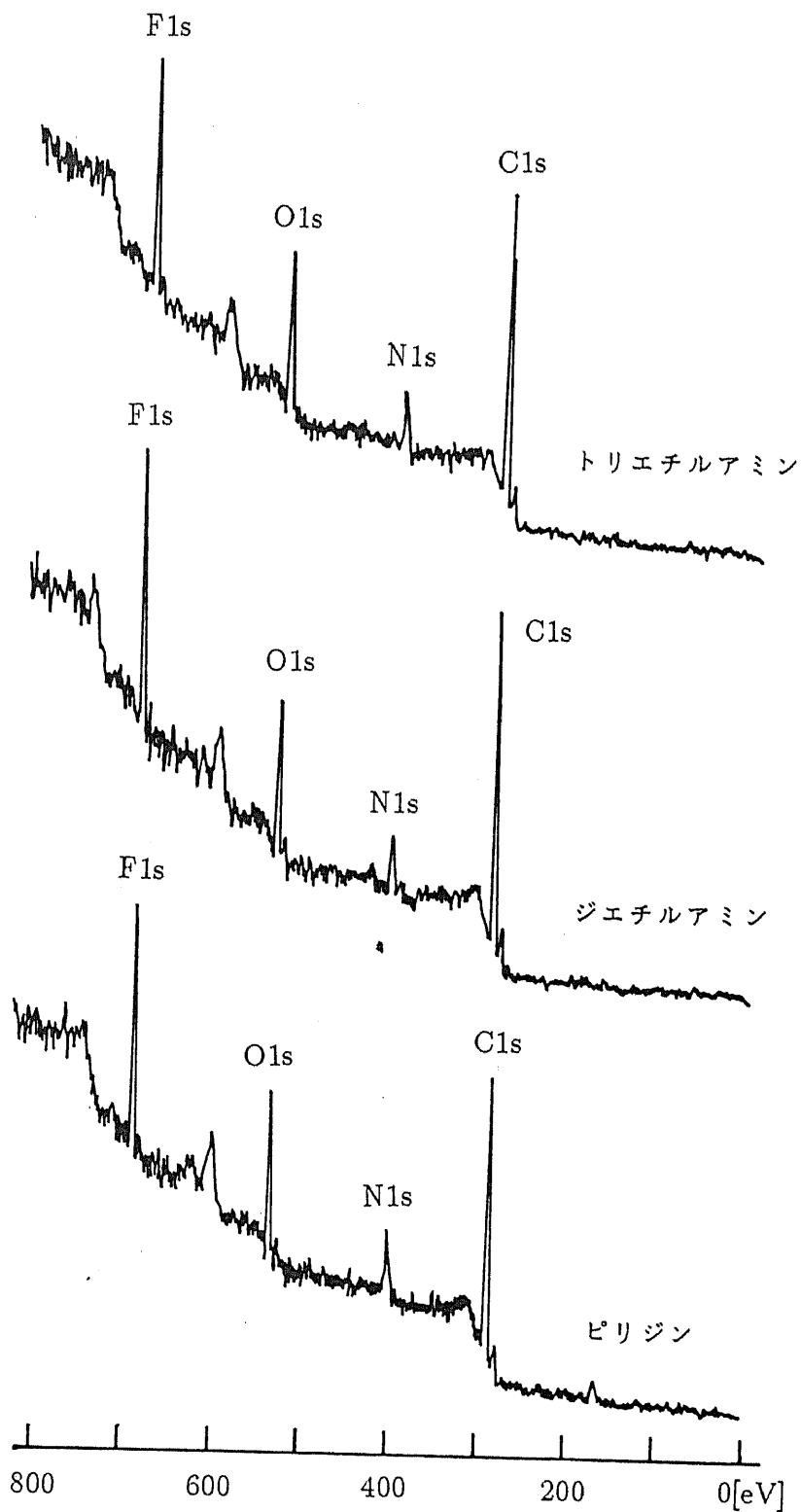


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

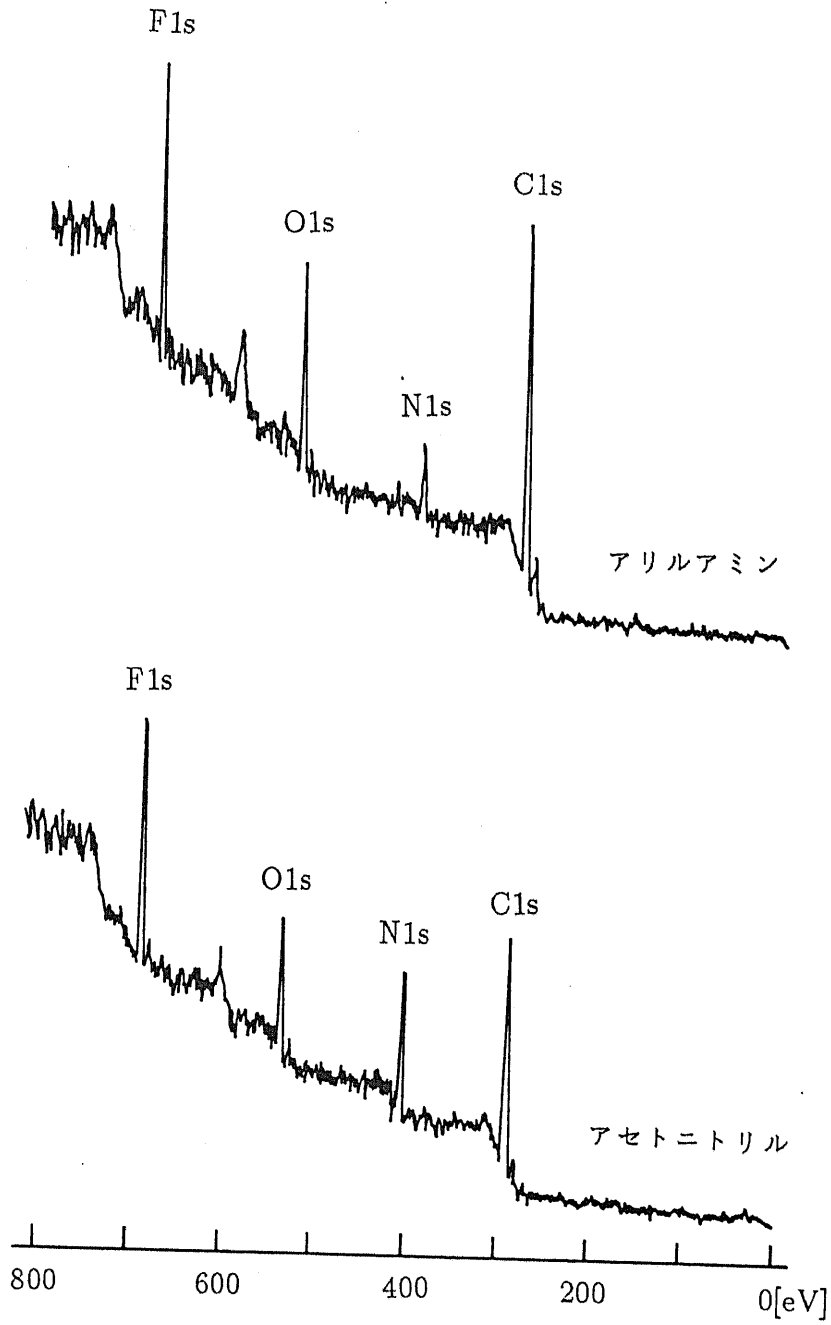


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

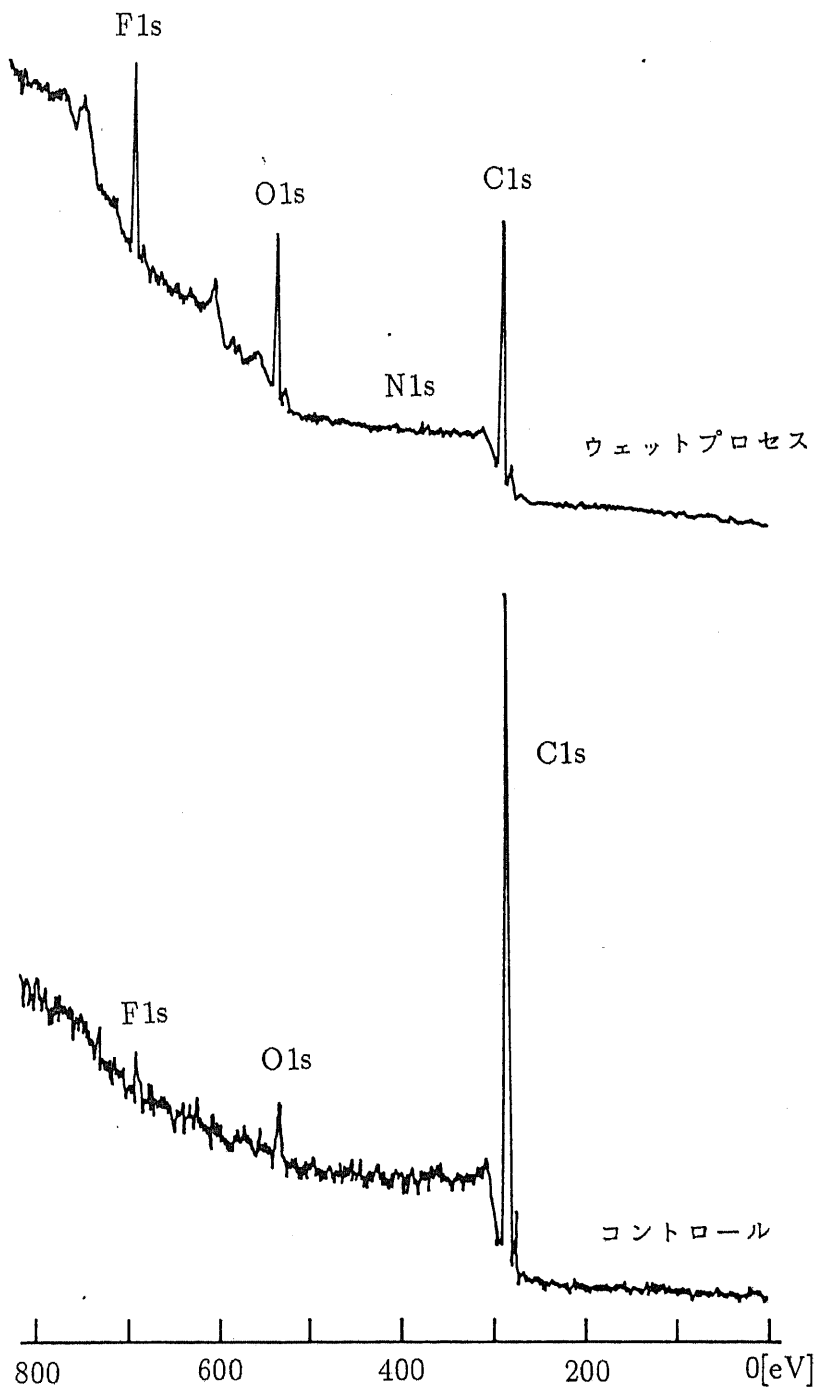


図4-7 アミノ基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

	F1s[%] 表面A* ¹	N1s[%] 表面B* ²	O1s[%] 表面B	F1s/C1s [%]表面A	アミノ基濃度 [個/cm ²]* ³	N1s [eV]
アノニア	16.5	10.9	10.1	37.5	3.8×10^{13}	398.3
窒素	12.4	10.8	9.2	27.8	2.8×10^{13}	398.3
エチレンジアミン	26.8	17.9	14.1	58.6	5.9×10^{13}	398.4
ヘキサメチレンジアミン	15.4	4.5	9.2	33.1	3.3×10^{13}	398.5
ヒドラジン	13.4	5.7	7.0	29.0	2.9×10^{13}	398.6
n-プロピルアミン	11.4	9.2	8.1	23.5	2.4×10^{13}	398.1
トリエチルアミン	13.8	9.7	11.3	20.3	2.0×10^{13}	398.0
ジエチルアミン	14.2	12.4	10.4	21.0	2.1×10^{13}	398.0
ピリジン* ⁴	14.2	12.9	10.9	22.9	2.3×10^{13}	397.8
アリルアミン* ⁴	13.3	11.5	10.2	20.2	2.0×10^{13}	398.1
アセトニトリル* ⁴	13.9	20.7	7.8	26.1	2.6×10^{13}	397.3
ウェットプロセス* ⁵	5.6	4.2	10.1	10.6	1.1×10^{13}	398.6
コントロール* ⁶	1.2	0.0	0.0	1.3	1.1×10^{12}	

Bu-NH ₂ * ⁷						398.7
Ph-NH ₂ * ⁷						399.2
ピリジン(-N=)* ⁷						399.6
Ph-CN* ⁷						399.0
Ph-N=N-Ph* ⁷						399.9
Me-NO ₂ * ⁷						406.0
Ph-NO ₂ * ⁷						405.7

- *1 プラズマ処理後PFBでアミノ基を修飾した表面 (表4-3)
 *2 プラズマ処理のみの表面
 *3 ポリエチレンの-CH₂-が $5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ であることを利用した計算値[13]
 *4 このプラズマ条件では成膜するガス
 *5 H₂O⁺プラズマ、CrO₃/H₂SO₄、SOCl₂、エチレンジアミンでアミノ基導入 (図4-10) [14]
 *6 ポリエチレンそのままアミノ基修飾試薬で処理した表面
 *7 化学シフトの位置[15]

表4-11 アミノ基導入のXPS測定の結果

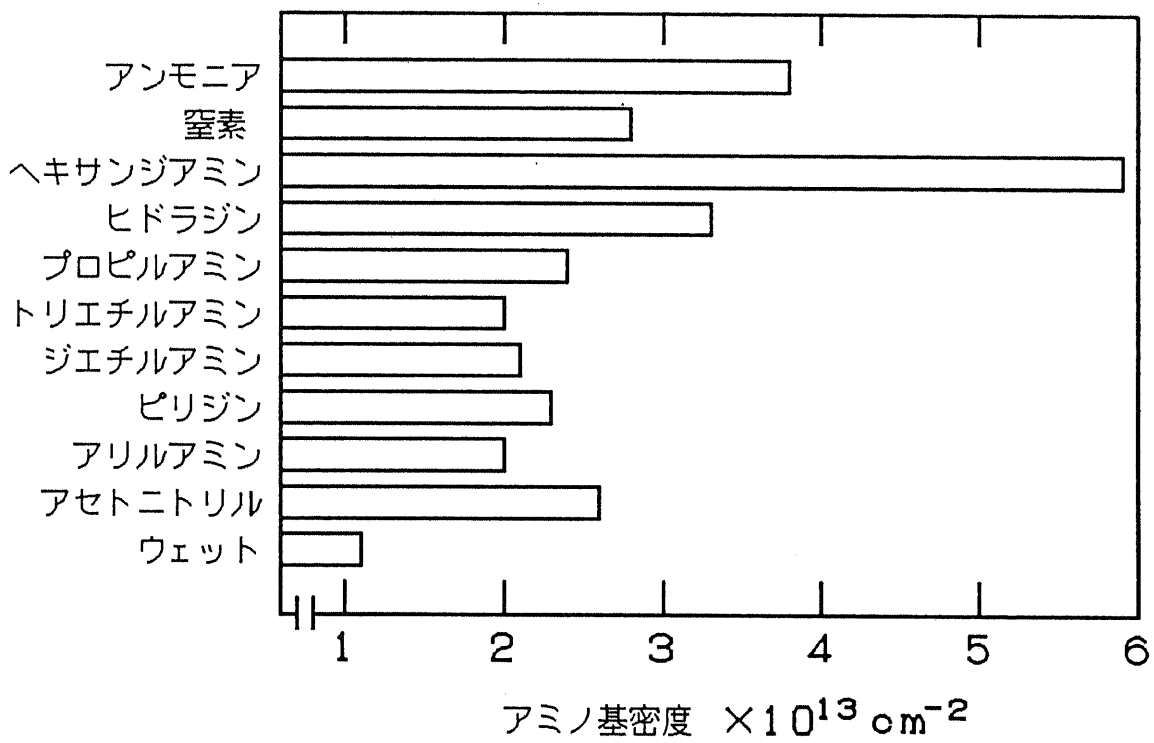


図4-8 プラズマガスの種類によるアミノ基の表面密度

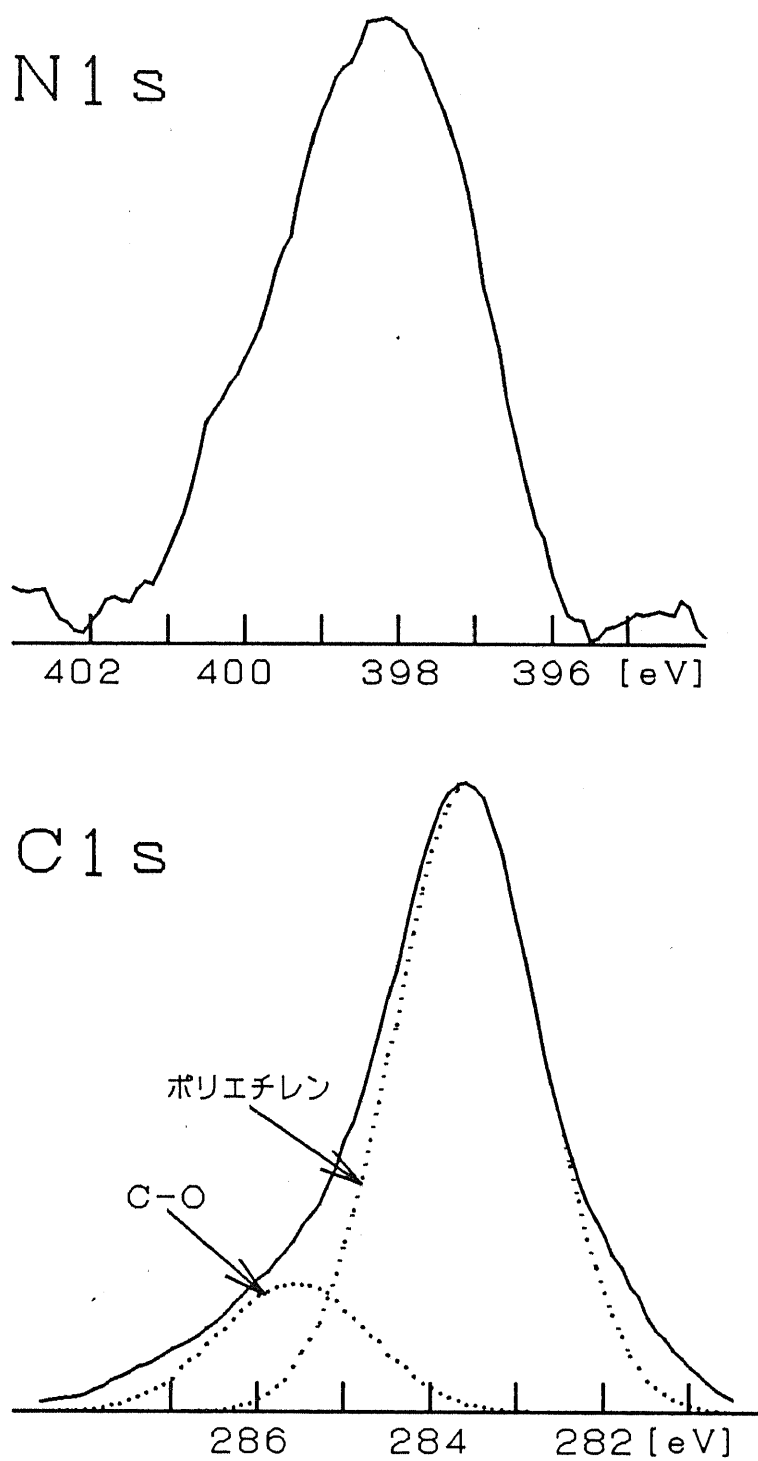


図4-9 エチレンジアミンプラズマ処理したポリエチレンのXPS、N1s、C1sピーク

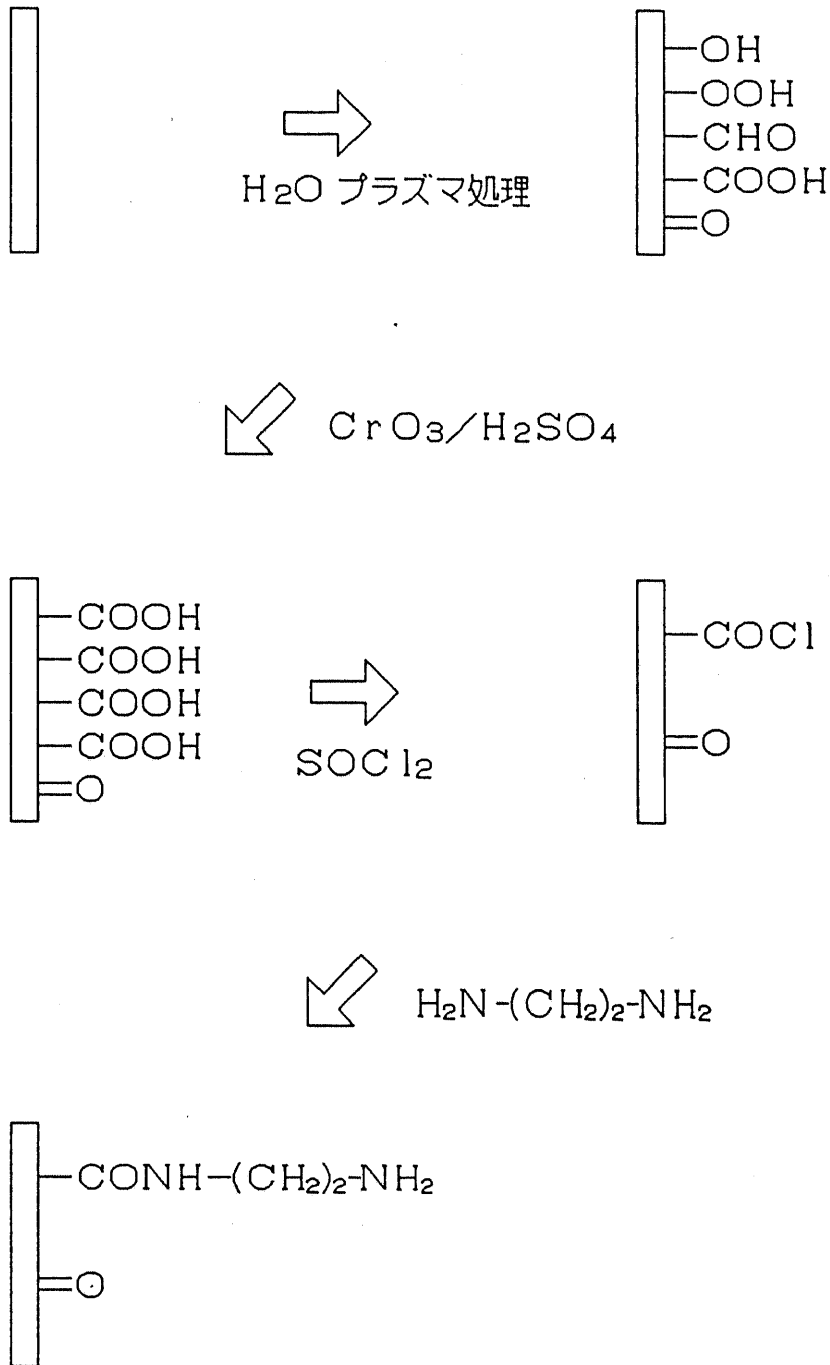


図4-10 プラズマとウェットを併用したアミノ基の導入[14]

また、アミノ基以外の官能基の存在についても調べた。とくに少量の残留酸素によって、炭素原子が酸化してカルボキシル基やカルボニル基が存在することが報告されているのでそれについて調べた。カルボキシル基の修飾条件は、表4-4、カルボニル基の修飾条件は、表4-5のように行った。プラズマガスは表4-9中の、アンモニア、エチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミンについて調べた。図4-11にカルボキシル基修飾した表面のXPSサーベイスpekトル、図4-12にカルボニル基修飾した表面のXPSサーベイスpekトルを示した。

【考察】

表面AでF1sの組成比が多い表面は、表面に多くのアミノ基が存在している。本実験で調べたガスのなかでは、エチレンジアミンが最も多くのアミノ基が導入できることがわかる。他のプラズマガスでもF1sの組成比からアミノ基が存在し、しかもその密度は 10^{13}cm^{-2} でエチレンジアミンとオーダーでは変わらない。したがって窒素原子を含む炭化水素のプラズマガスでアミノ基の導入が可能であるといえる。

アセトニトリルプラズマ処理した表面は、表面Bでは窒素の組成が他のプラズマに比べて多いがラベルされたアミノ基の量は少ない。これは、アミノ基以外の構造をとる窒素原子が多いからであろう。これは、プラズマ中でもシアノ基(-CN)が壊されにくいからであろう。

ウェットの方法で導入したアミノ基のXPSで求めた値は、 $1.1 \times 10^{13}\text{cm}^{-2}$ であるのに対しラジオアイソトープでは $3.1 \times 10^{14}\text{cm}^{-2}$ で一桁違う。この場合XPSは絶対定量は厳密ではないので、アイソトープの値がまだ真の値に近いのではないかと考えられる。

表面BのN1sの組成比は、ラベルの密度から調べたアミノ基の組成比と比べて大きいことがわかる。これは、表面にアミノ基以外の窒素の構造が存在していることと、表面から内部のアミノ基は化学修飾されていないなどが考えられる。アミノ基以外の構造として考えられるものは、-NH-、-N=、-CNである。それは、表面BのN1sの結合エネルギーが、399~399.5eVであり、-NH₂、-NH-、-N=、-CNの化学シフトの位置[15]に一致する。

O1sのピークが存在するが、酸素は窒素と直接結合して-NO_xのような構造は存在しない。それは、-NO_xのN1sの化学シフトは403~405eVであるためである。酸素は炭素と結合してカルボキシル基やカルボニル基などの構造をしている。それは、図4-11、図4-12の結果からいえる。また、C1sのメインの炭化水素から高エネルギーにシフトしているサブピークは酸素原子に関係していることからいえる。

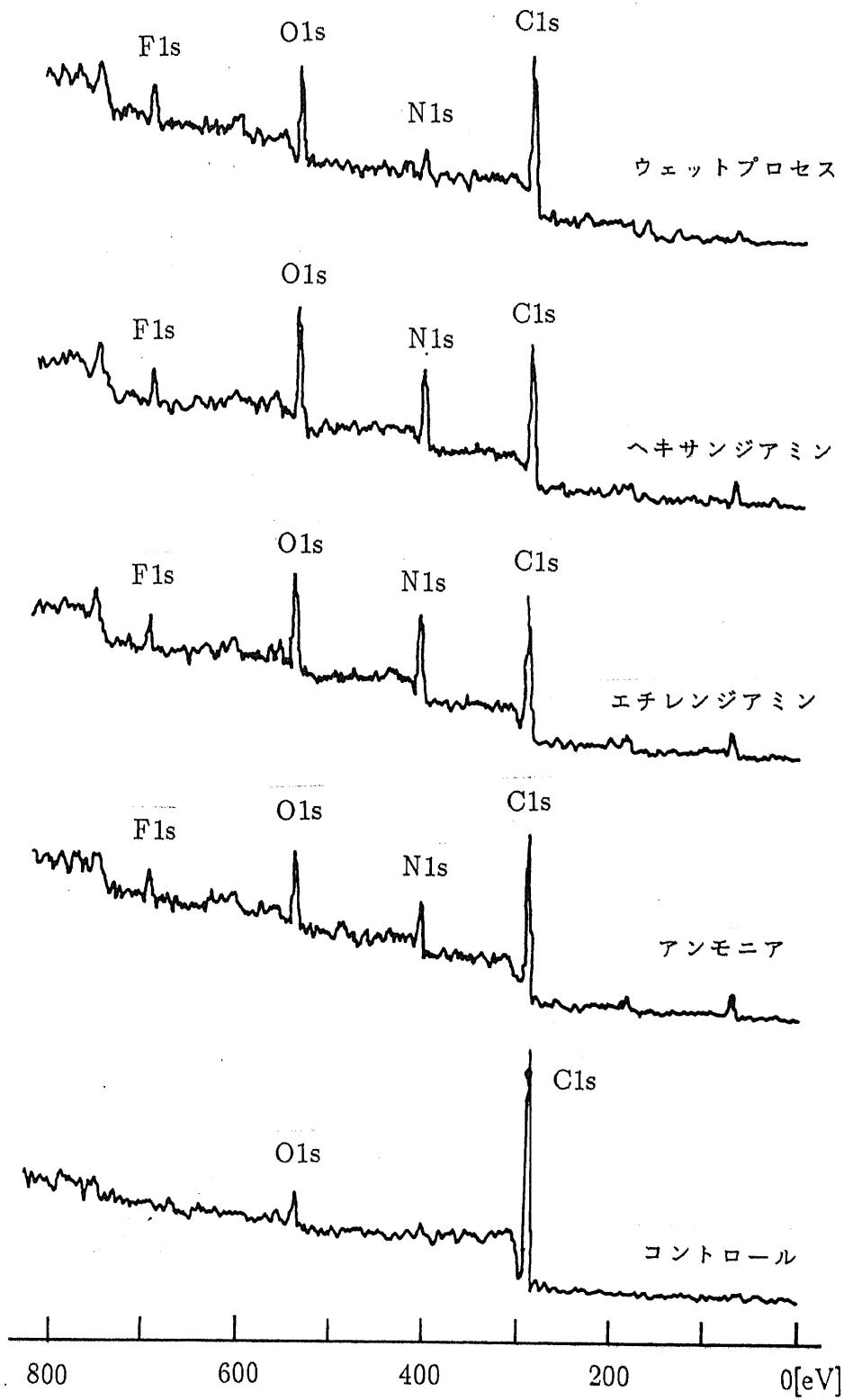


図4-11 カルボキシル基ラベル修飾ポリエチレン表面のXPS

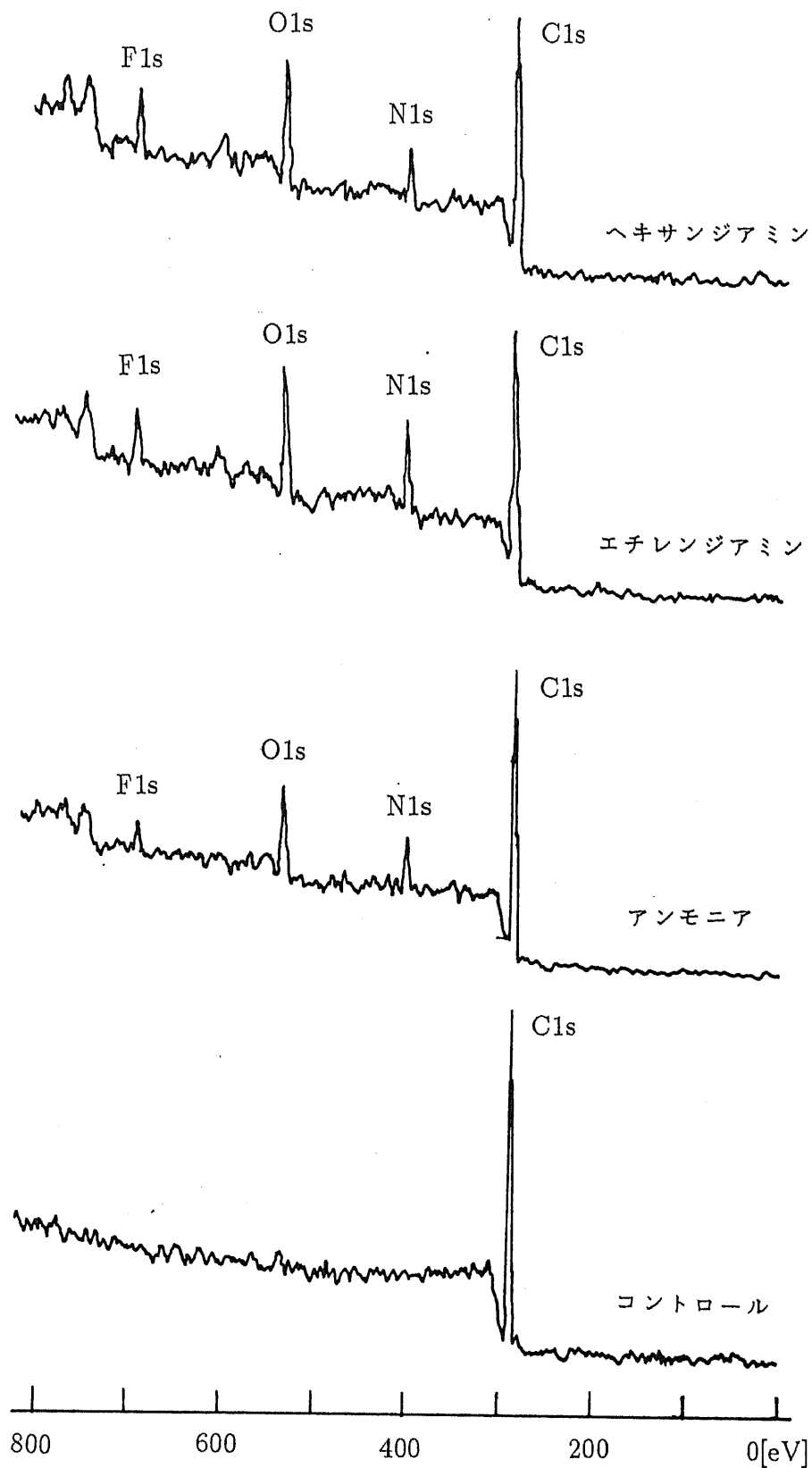


図4-12 カルボニル基ラベル修飾ポリエチレン表面のXPS

4.6 チオール基の導入とその表面分析

【実験】

プラズマを用いたチオール基の導入についての報告はない。ただし、光CVDや熱CVDを利用した報告はある[16]。しかし、その報告ではFTIRでチオール基の存在を示しているだけである。硫黄原子を含んだプラズマ重合膜の研究報告さえない。チオール基はタンパク質中では重要な役割をはたしている。例えば、離れた場所に位置するシステイン残基（チオール基）どうしが酸化してジスルフィドラル結合を作り、タンパク質の三次構造をつくる上で重要な役割を果たしている[17]。したがって表面にチオール基を導入することは生体適合性をもたせることの基本操作のひとつである。いくつかの官能基の中でチオール基が血液適合性がよいという報告もある[18]。

さて、チオール基を導入するためのプラズマガスの条件は次の通りである。

- ①硫黄原子を含む物質であること
- ②硫黄の他には炭素、水素だけを含む物質であること
- ③安価に入手できること

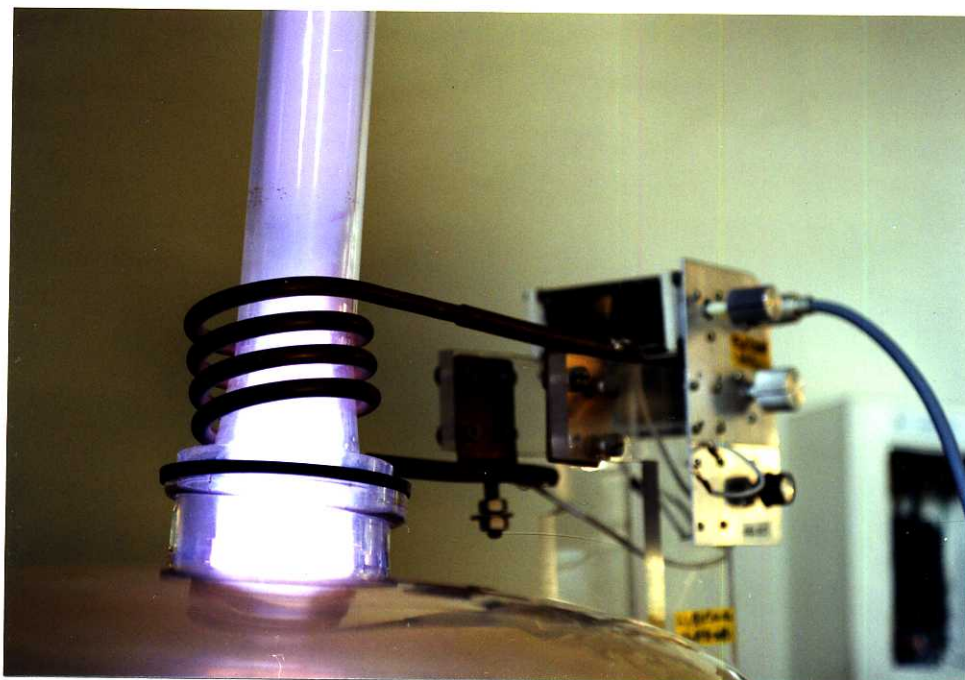
表4-13にその候補となるプラズマガスをあげた。プラズマの条件は全ての材料で表4-14に示す。図4-13に硫化水素とエタンジチオールのプラズマの写真を示す。

物質名	分子式	構造式	分子量	融点℃	沸点℃
硫化水素	H ₂ S	H ₂ S	34.08	-85	-60
二硫化炭素	CS ₂	CS ₂	76.14	-112	46
硫化ジメチル	C ₂ H ₆ S	(CH ₃) ₂ S	62.14	-98	38
二硫化メチル	C ₂ H ₆ S ₂	CH ₃ SSCH ₃	94.20	-85	109
エタンチオール	C ₂ H ₆ S	CH ₃ CH ₂ SH	62.14		35
エタンジチオール	C ₂ H ₆ S ₂	HS(CH ₂) ₂ SH	94.20		144-6
チオフェン	C ₄ H ₄ S	C ₄ H ₄ S	84.14	-38	84

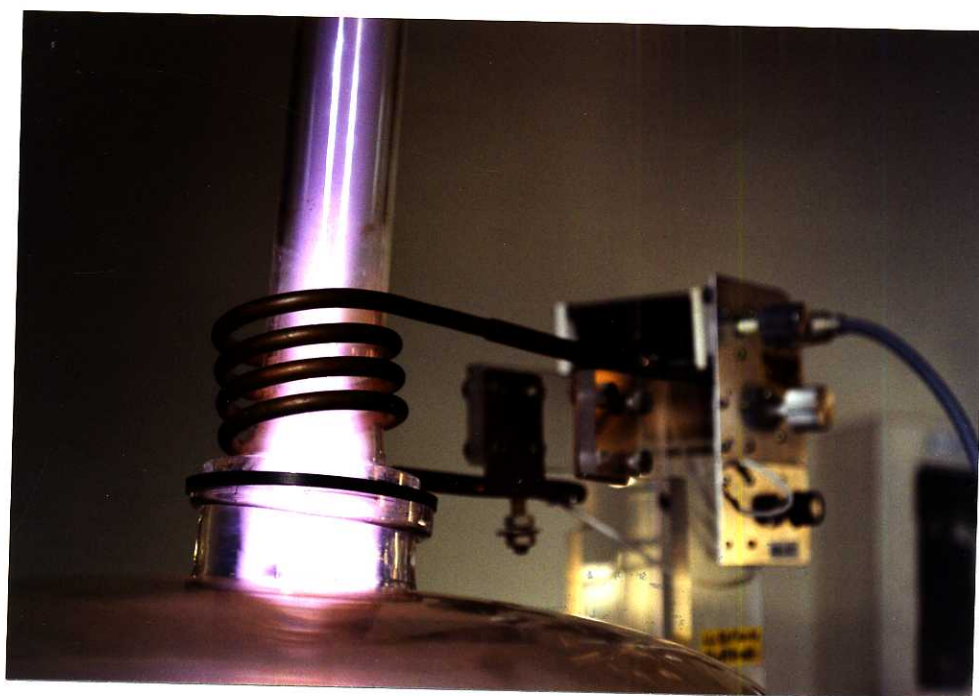
表4-13 チオール基導入のためのプラズマガス

圧力：20～50mTorr
 放電電力：20W
 周波数：10MHz、FM変調
 放電時間：1分

表4-14 チオール基導入のためのプラズマの条件



(a) 硫化水素プラズマ



(b) エタンジチオールプラズマ

図4-13 チオール基導入のためのプラズマガス

【結果】

表4-13にあげたプラズマガスを表4-14の条件でプラズマ処理したポリエチレンの表面分析を行った。表面分析には化学修飾XPS法で行った。チオール基の特異的修飾試薬は、多くあるがXPS用に利用した報告がないので、自ら調べて試みた。その結果クロロ安息香酸第二水銀が最適である判断した[6]。それは、分子構造が比較的簡単であるので非特異吸着が少なく、表面での立体障害なしに反応が行えること、Hgの感度係数が非常に大きいこと、Hg4fのスペクトル図4-14に示すように軌道分裂にて2つのピークが出るので検出しやすいという利点がある。化学修飾は、表4-6の条件で行った。この場合Hg原子がラベルとなりこのHg4fピークの大きさで官能基の大きさを比較できる。それぞれのXPSサーベイスペクトルを図4-15に示す。またそれらの結果をまとめて表4-15に示す。相対感度係数は、表4-2の値を、ピーク強度面積を使用した。表4-15中には、2種類の表面のスペクトルを調べていて、表面C、表面Dとした。

表面C：プラズマ処理後化学修飾した表面

表面D：プラズマ処理のみで未修飾の表面

表面Cの組成比は、Hg4f、C1s、S2p、O1sの合計を100%としたものであり、表面Dの組成比は、C1s、S2p、O1sの合計を100%とした。チオール基の表面密度は、Hg原子1個がチオール基1個に相当すると考え、C1sに対するHg4fの比率を求め、ポリエチレンのメチレン基-CH₂-の表面密度が $5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ であることから計算した。図4-16には、チオール基の表面密度を棒グラフで表し比較しやすいようにした。S2pのピーク位置は、Ag3dの368.2eVを基準とした。S2pは図4-17のように2つのピークにローレンシアンフィッティングにより2つのピークに分解することができ、結合エネルギーの大きな位置のピークのエネルギーを示している。また、システイン(-SH)、メチオニン(-S-)、シスチン(-SS-)の粉末を直接XPS測定し、S2pスペクトルも調べ、表4-15中に示している。

また、チオール基は酸化されると-SO₃Hになることが知られている[16]。プラズマ処理した後、酸化剤で処理したポリエチレンのS2pスペクトルを図4-18に示す。プラズマガスはエタンジチオールである。酸化剤は0.02MKMnO₄で10分間処理した。

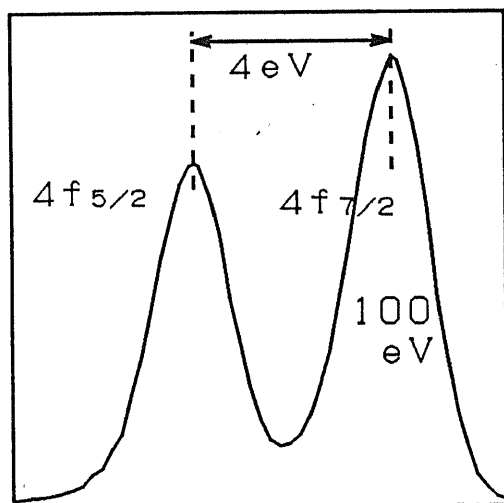


図4-14 Hg4fのXPSピーク

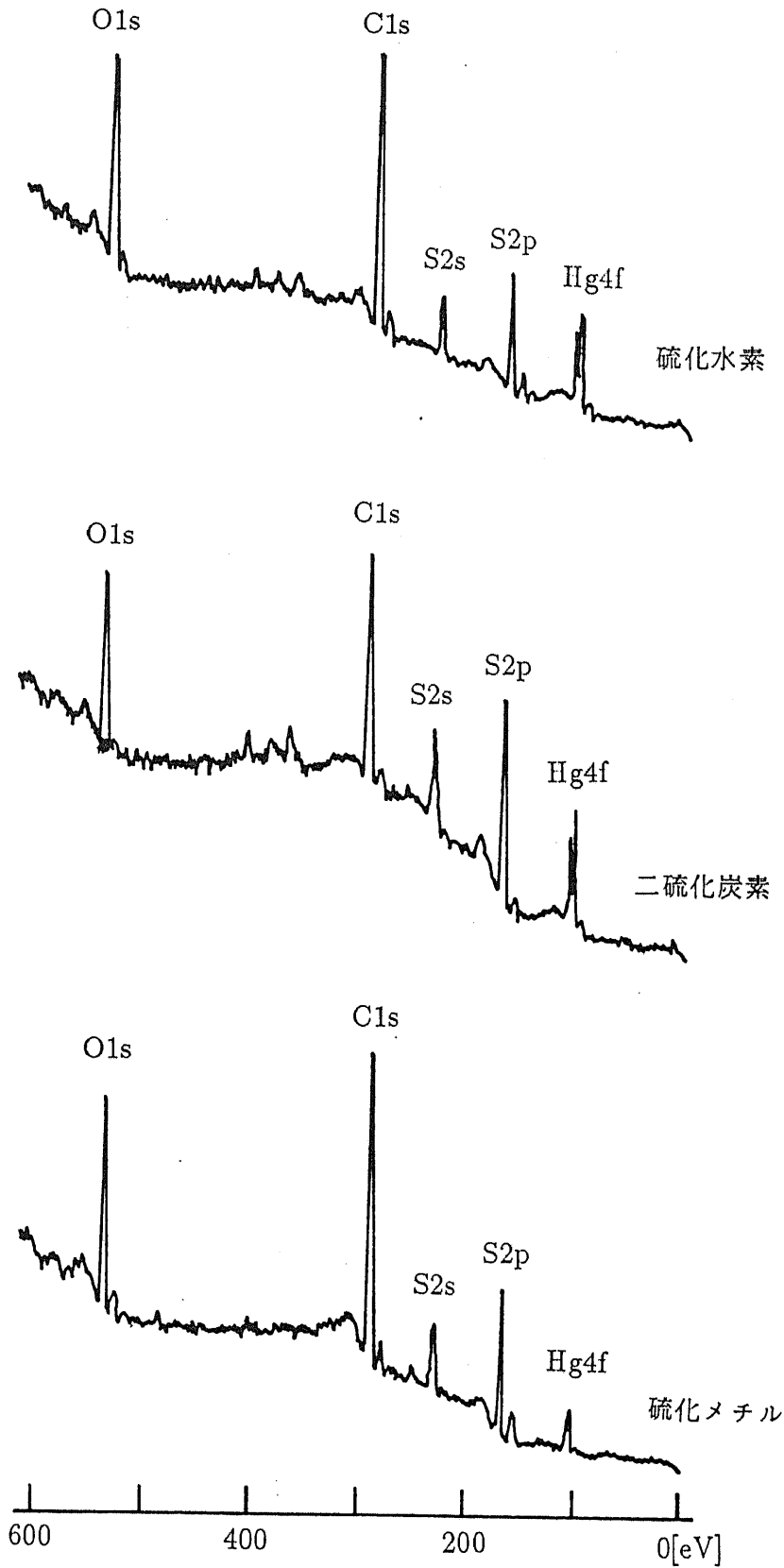


図4-15 チオール基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

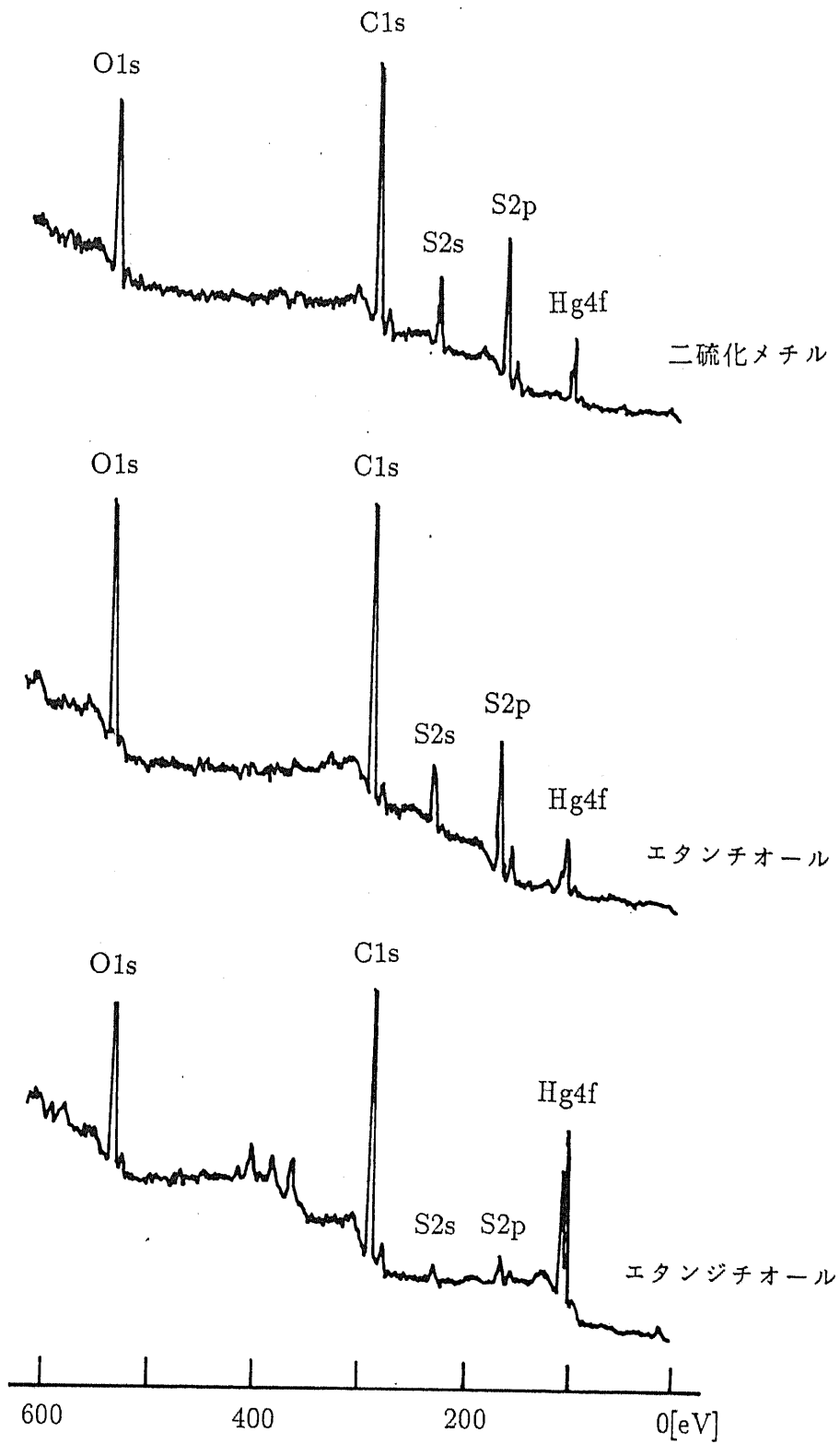


図4-15 チオール基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

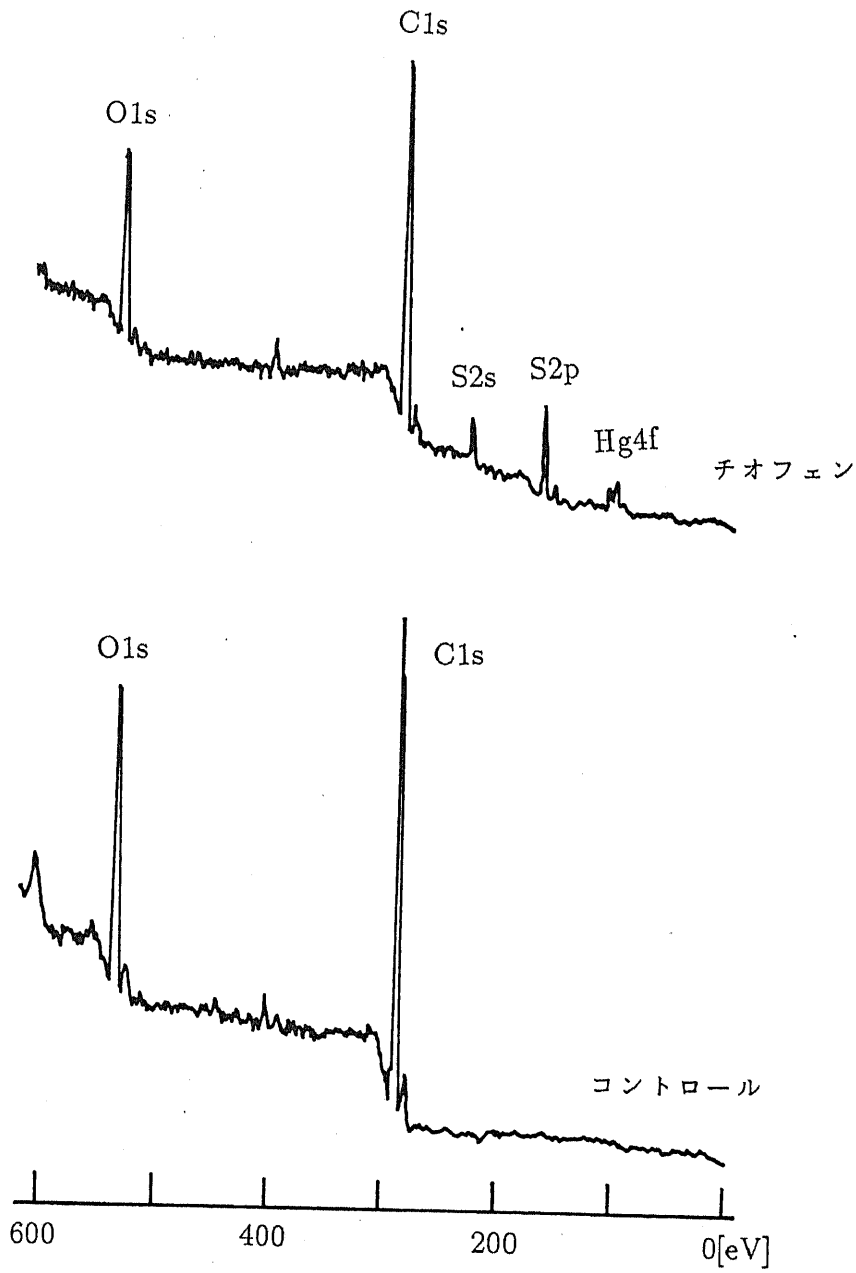


図4-15 チオール基ラベル修飾ポリエチレンのXPS

	Hg4f[%] 表面C* ¹	S2p[%] 表面D* ²	O1s[%] 表面D	Hg4f/C1s [%]表面C	チオール基濃度 [個/cm ²]* ³	S2p* ⁴ [eV]
硫化水素	1.78	19.2	9.7	1.58	0.79×10^{13}	162.9
二硫化炭素	2.11	29.9	14.2	3.70	1.85×10^{13}	162.5
硫化メチル	0.62	21.2	8.3	0.95	0.48×10^{13}	162.4
二硫化メチル	1.04	26.2	8.4	1.66	0.83×10^{13}	162.0
エタンチオール	0.73	25.5	7.8	1.15	0.58×10^{13}	162.4
エタンジチオール	3.39	10.2	14.8	4.79	2.40×10^{13}	162.6
チオフェン* ⁵	0.55	14.2	9.8	0.79	0.40×10^{13}	162.0
コントロール* ⁶	0.06			0.065	0.03×10^{13}	

システイン(-SH)* ⁷						163.1
メチオニン(-S-)* ⁷						163.6
シスチン(-SS-)* ⁷						163.5
Ph-SH* ⁸						162.8
Ph-S-Ph* ⁸						163.0
Ph-SS-Ph* ⁸						163.7
チオフェン(-S-)* ⁸						164.2
Ph-SO ₂ Na* ⁸						166.2
Ph-SO ₃ Na* ⁸						168.0

- *1 プラズマ処理後CMBでチオール基を修飾した表面(表4-6)
- *2 プラズマ処理のみの表面
- *3 ポリエチレンの-CH₂-が $5 \times 10^{14} \text{ cm}^{-2}$ であることを利用した計算値[13]
- *4 オリジナルピークを2個のピークに分解した高エネルギー側の値
- *5 このプラズマ条件では成膜するガス
- *6 ポリエチレンそのままチオール基修飾試薬で処理した表面
- *7 本実験で測定した化学シフト
- *8 文献の化学シフト[15]

表4-15 チオール基導入のXPS測定結果

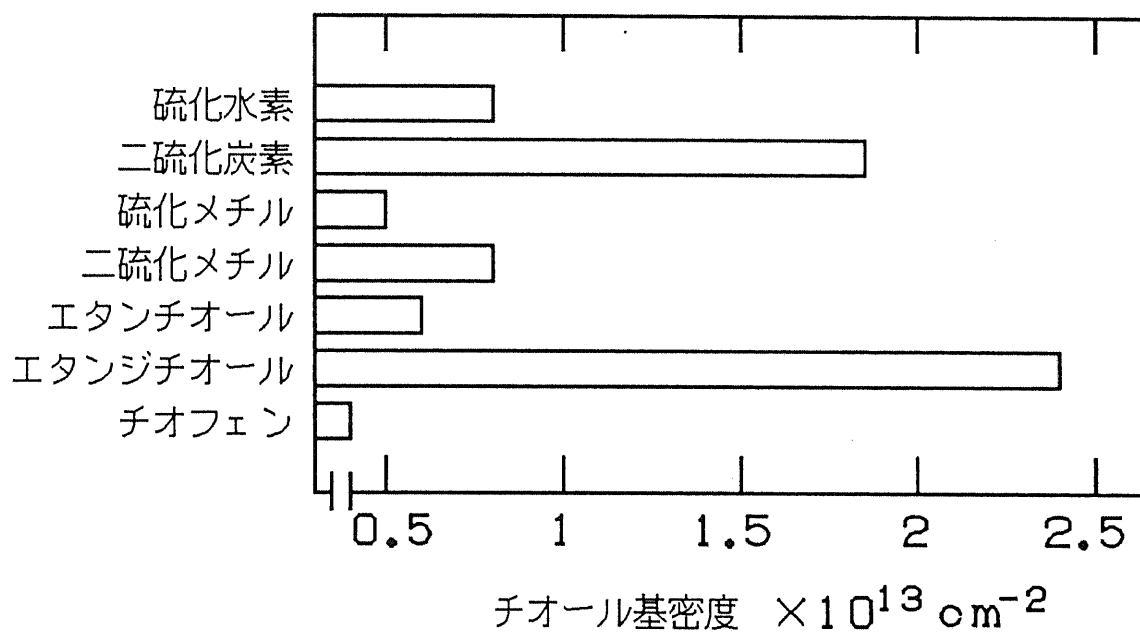


図4-16 プラズマガスの種類によるチオール基の表面密度

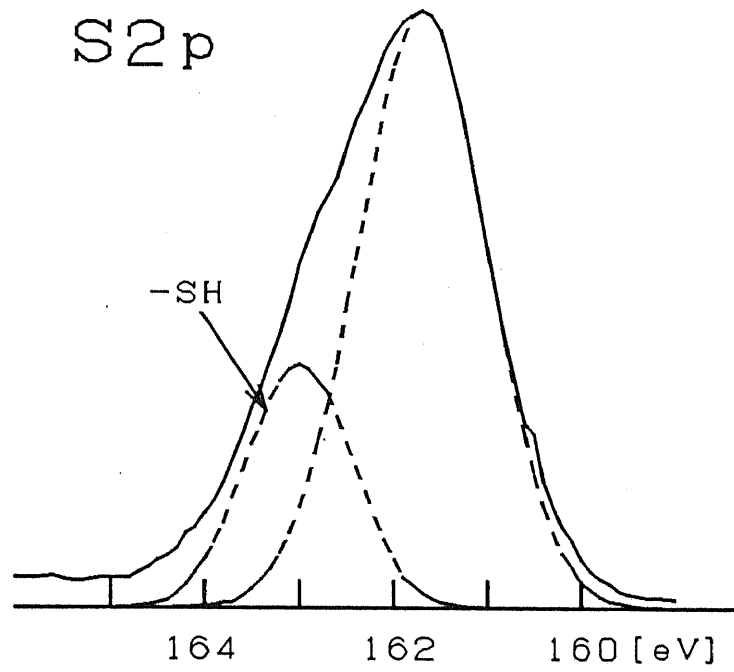


図4-17 エタンジチオールプラズマ処理したポリエチレンのXPS、S2pピーク

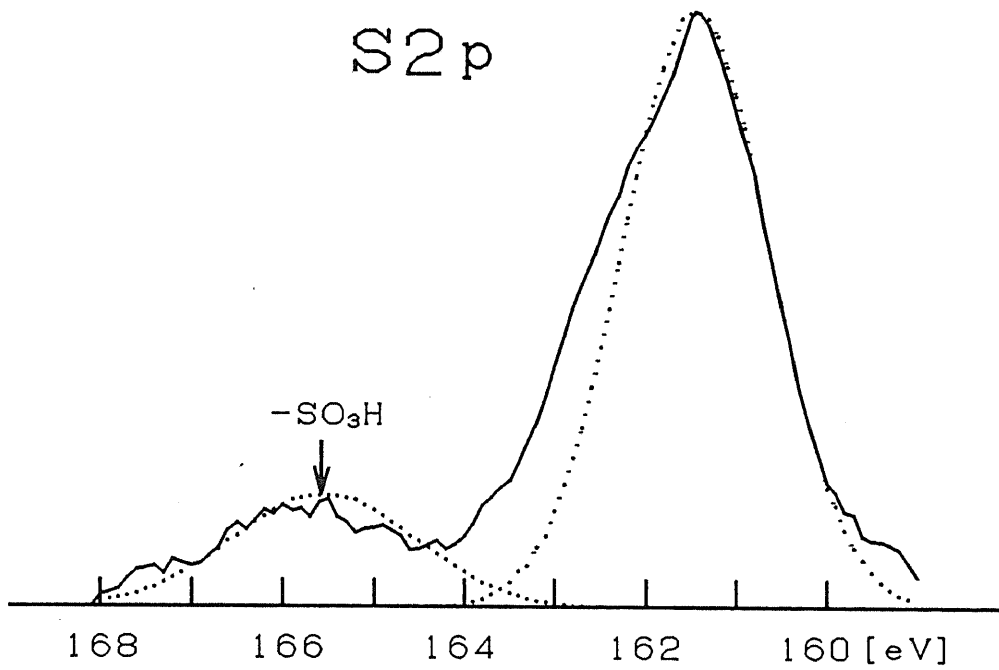


図4-18 エタンジチオールプラズマ処理したポリエチレンのXPS、S2pピーク
(プラズマ処理後KMnO₄処理)

【考察】

表面CでHg4fの組成比が多い表面は、表面に多くのチオール基が存在している。本実験で調べたガスのなかでは、エタンジチオールが最も多くのチオール基が導入できることがわかる。他のプラズマガスでもHg4fの組成比からチオール基が存在しするが、二硫化炭素以外はチオール基密度が1ケタ低い。アミノ基と比べてチオール基はプラズマガスの種類によってチオール基の密度に違いが顕著である。モノマーが硫黄原子を含有するだけでなく、チオール基を有することも必要である。ただし二硫化炭素についてはこの限りではない。したがって、チオール基導入にはエタンジチオールプラズマが最適であるといえる。

表面DのS2pの組成比は、ラベルの密度から調べたチオール基の組成比と比べて大きいことがわかる。これは、表面にチオール基以外の窒素の構造が存在していることと、表面から内部のチオール基は化学修飾されていないなどが考えられる。チオール基以外の構造として考えられるものは、-SS-、-S-、-C=S、である。それは、表面DのS2pの結合エネルギーが、162~163eVであり、-SS-、-S-、-C=S、の化学シフトの位置に一致する[14]。

01sのピークが存在するが、酸素は窒素と直接結合して-SO₃Hのような構造は存在しない。それは、-SO₃HのS2pの化学シフトは167eVであるためである。これは、アミノ基の場合と同様に、酸素は炭素と結合してカルボキシル基やカルボニル基などの構造をしていると考えられる。

図4-18のようにKMnO₄処理した表面のS2pは主ピークの他に高エネルギーの約167eVにもピークが存在する。これは酸化処理により-SHから-SO₃Hに変化したためであると考えられる。これは文献[16]の知見に一致する。ただし酸化処理を過剰におこなうとS2pのピークは完全に消えてしまう。

4.7 プラズマによる官能基導入の機構についての考察

第3章でも述べたが、プラズマの関係因子は多くて複雑である。本研究において官能基の導入機構を考察する場合、プラズマ空間における反応とプラズマと固体との界面における反応と、固体内における反応のすべてについて考慮しなければならない。また、表3-1の反応分子種や表3-2の反応素過程についても考慮しなければならない。アンモニアプラズマでのアミノ基の導入のメカニズムについては図4-19のように考察されている。すなわち、プラズマ空間においては加速電子や励起原子やフォトンなどによってアンモニア分子から一個の水素が解離してラジカルになる。一方ポリエチレン表面では、同様にメチレン鎖から水素原子が引き離されてラジカルになる。これら2個のラジカルが再結合してアミノ基が導入される。このように構造が単純な分子についてはこのような考察が可能であるが、それでも他の経路も複雑に絡んでいる。窒素プラズマでは、ポリエチレン表面の水素が遊離して窒素と絡んでアミノ基が導入されると考えられるがその機構はかなり複雑である。

図4-19にならってエチレンジアミンプラズマによるアミノ基の導入機構の考察を図4-20のように試みた。エチレンジアミン分子がどのように活性化されるかがポイントである。つまり、加速電子や励起原子やフォトンによってどのようなフラグメントに分かれるかである。ここでは、マススペクトル[19, 20]が参考になると考えた。エチレンジアミンのマススペクトルでは、 $-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ が最も多く次に $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{NH}_2$ が多い。したがってエチレンジアミンの活性化されるとこの2個のラジカル分子が主であると考えられる。ポリエチレン表面の活性化は同様であり、このラジカルの再結合によってアミノ基が導入されると考えられる。

エタンジチオールによるチオール基導入についても図4-21のように説明を試みた。エタンジチオールのマススペクトルでは、 $-\text{CH}_2-\text{SH}$ が最も多く、 $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $\text{S}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ 、 $\text{HS}-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{SH}$ の順である。ポリエチレン表面の活性化は同様であるから図4-21にチオール基が導入される。

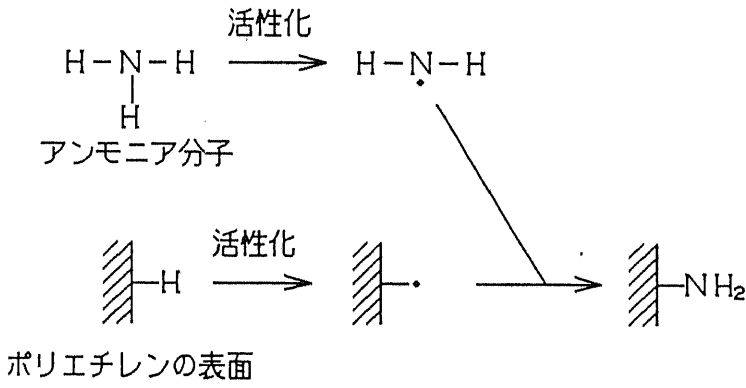


図4-19 アンモニアプラズマでのアミノ基導入の機構

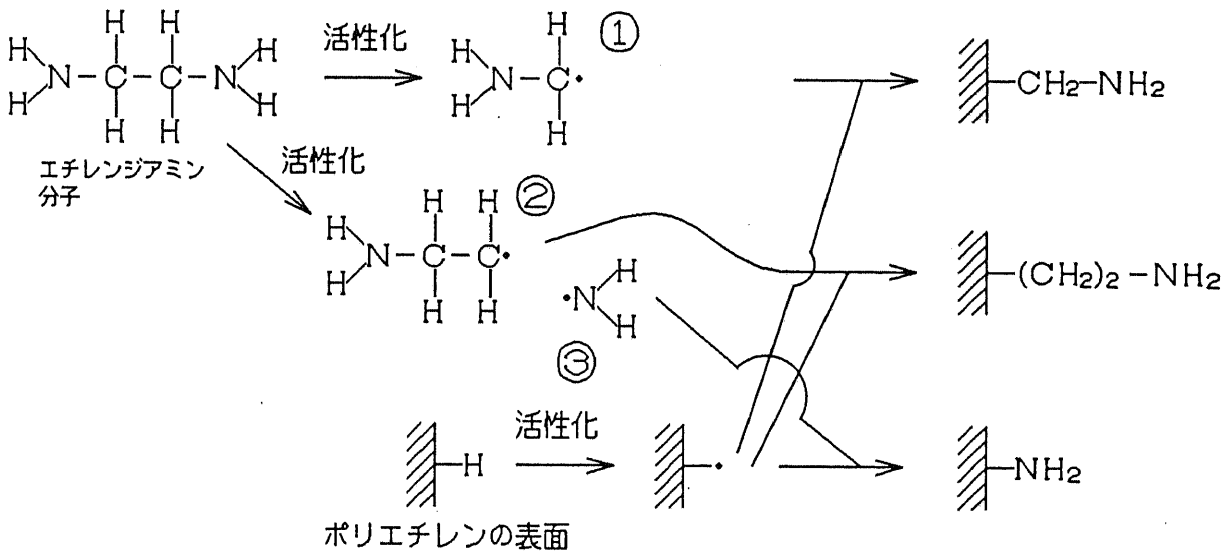


図4-20 エチレンジアミンプラズマでのアミノ基導入の機構の推定

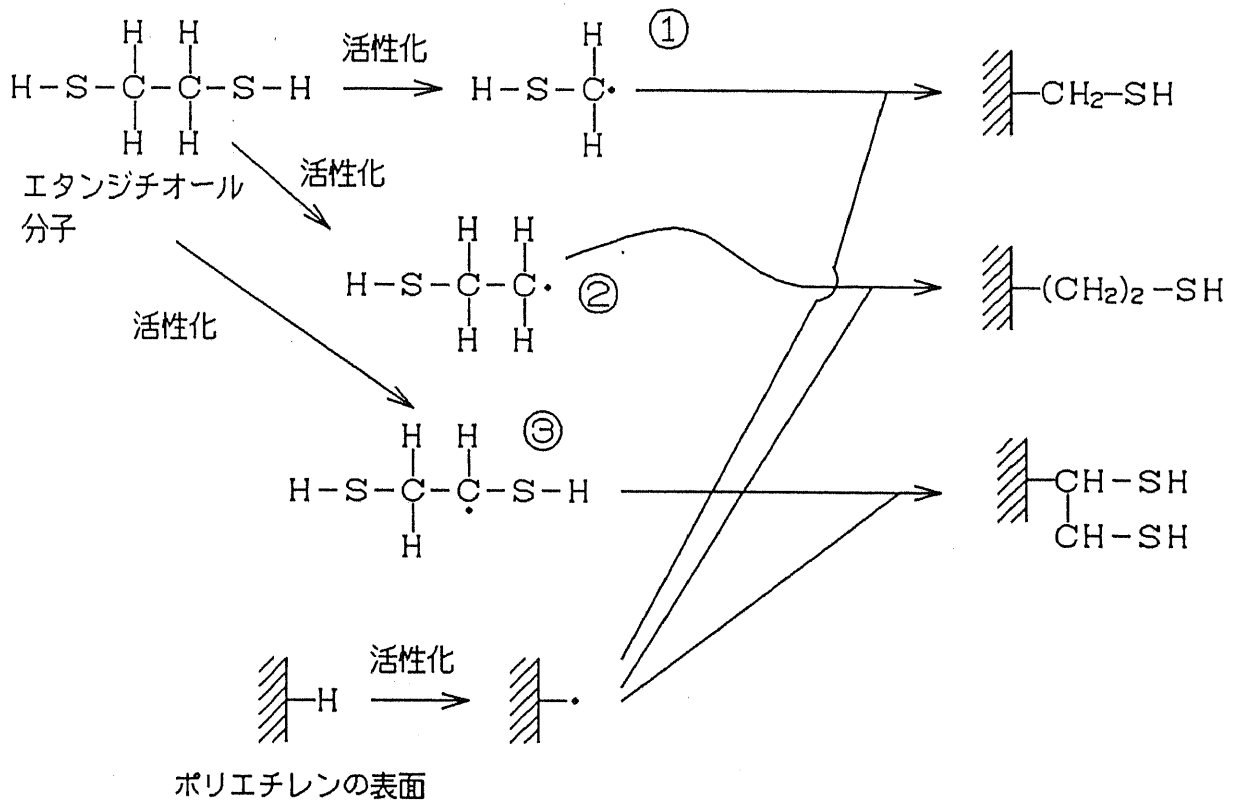


図4-21 エタンジチオールプラズマでのチオール基導入の機構の推定

4.8 濡れ角による表面改質の評価

プラズマによる表面改質を確認するために水との接触角の測定を行った。表1に結果を示す。これより、未修飾の表面は疎水性であるのに対して、アミノ基やチオール基を導入した表面は親水性に改質されていることがわかる。図4-22にアンモニアプラズマ処理の前後での表面水の濡れ写真である。この結果からは、マクロレベルでの表面改質が行われたということである。

プラズマ	接触角
未処理	125
アンモニア(-NH ₂)	48
エタノールチオール(-SH)	52

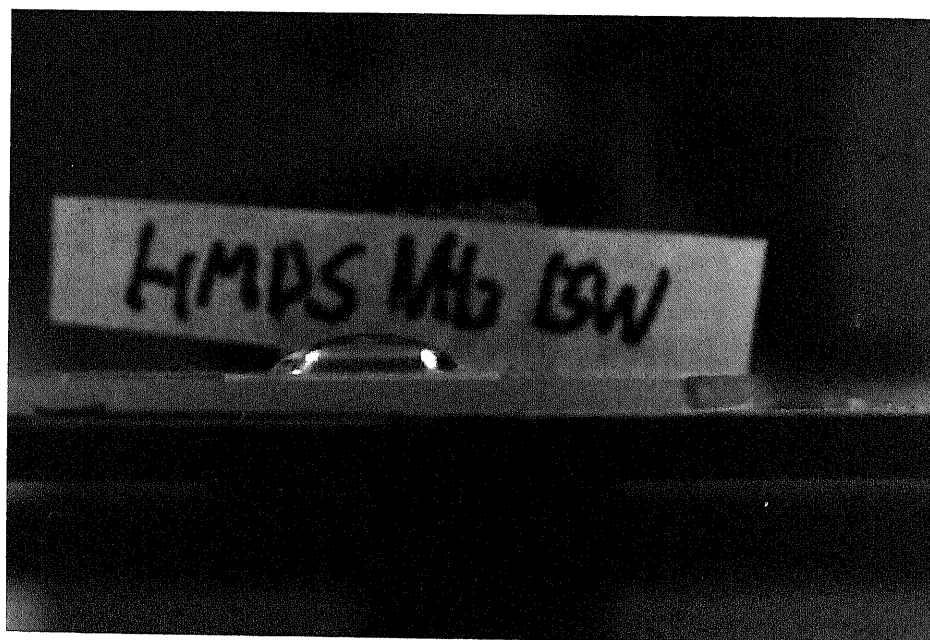
表4-16 HMDSの表面修飾による接触角

4.9 第4章のまとめ

本章では、プラズマを利用して表面へアミノ基とチオール基の導入を行い、その存在を化学修飾XPS法で調べた。その結果、エチレンジアミンプラズマ処理した表面は、アミノ基が $5.9 \times 10^{13} \text{cm}^{-2}$ の密度で存在することがわかった。エタノールチオールプラズマ処理した表面は、チオール基が $2.4 \times 10^{13} \text{cm}^{-2}$ の密度で存在することがわかった。また、官能基導入の機構についてマスマスペクトルのデータを中心に考察した。



(a)HMDSプラズマ重合膜表面（重合直後）



(b)HMDSプラズマ重合膜表面（アンモニアプラズマ処理）

図4-22 HMDSプラズマ重合膜表面の水との濡れ具合

第5章

プラズマ重合膜表面への抗体の固定化

5.1 第5章のまえおき

前章まででプラズマ重合膜の作製とそのプラズマによる表面改質を行った。本章ではそれらを踏まえて、膜表面への抗体の固定化について述べる。バイオセンサの基本概念は生体物質と物理化学デバイスを集積することにあることはすでに述べたが、膜表面への抗体の固定化がそれに相当する。したがって本章は免疫センサを実現するための心臓部であるといえる。

5.2 抗体の固定化法の選択

抗体の固定化は少し広い範疇でいうとタンパク質の固定化である。固定化をいいかえると不溶化である。タンパク質を含めた生体物質は水溶液中で機能しているが、これを人工的に使用する場合に”固定化”という操作が必要になる。固定化については特に酵素について多くの研究がなされている[1]。その主な固定化法を図5-1に示す。本研究の目的であるISFET型のバイオセンサに利用するには、センサの構造を考慮すると担体結合法でなければならない。本研究ではこの担体がプラズマ重合膜となる。担体結合法の中では、共有結合法か物理吸着法のどちらかが候補となる。共有結合法は安定性は優れているが、プロセスが複雑である。物理吸着法はプロセスは簡単であるが、安定性に欠ける。本研究では両者について行いその優劣は後の結果において判断することにした。

5.3 抗体の分子構造

抗体の固定化を行うには抗体の分子構造を知る必要がある。ここでいう抗体は免疫グロブリンのことであり、その中でよく研究されているIgGのことを示す。タンパク質には様々な構造があるのに対して、抗体は共通の構造を持つことが知られている。IgGの分子構造を図5-2に示す[2]。IgGは、相同な2本のH鎖と2本のL鎖からなり、ヒンジ領域での鎖間ジスル

フィド結合 (SS結合) により大きく開いたY字形をしている。抗原を認識するのはY字の先端である。そこはFab部と呼ばれている。Y字の根元はFc部と呼ばれ抗原の結合を引き金とする生物活性の発現部位である。

本研究で用いた抗原と抗体は表5-1に示す通りである。これらの抗原や抗体は比較的安価に購入できる理由で用いた。

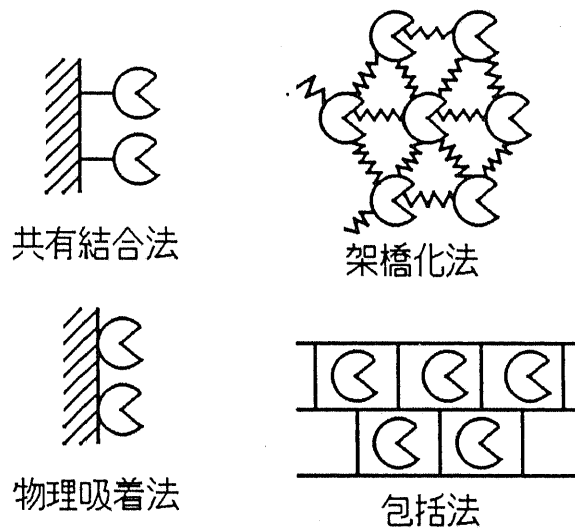


図5-1 抗体固定化法

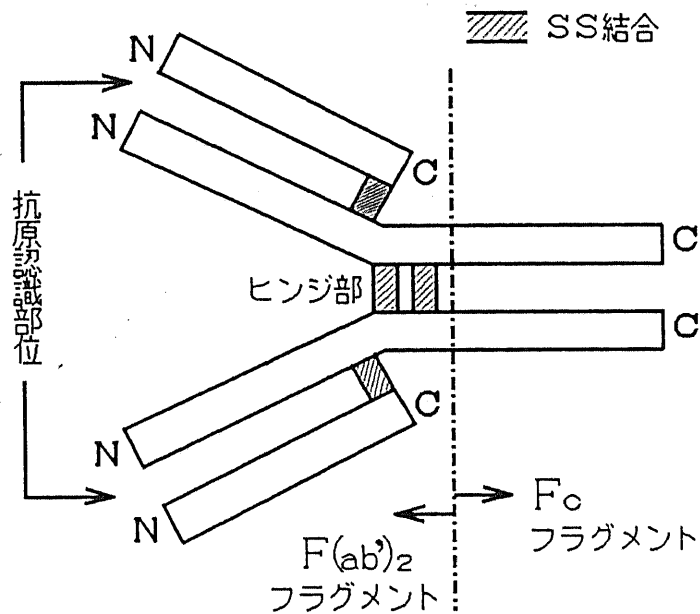


図5-2 抗体の分子構造[2]

抗原：ヒト血清アルブミン（生化学用；和光純薬）
分子量 67,000 等電点 4.8
抗体：抗ヒト・アルブミンIgG分画、
免疫動物—ヤギ、Kappel社、コード0201-0341
分子量 146,000
標識抗抗体：抗ヤギIgG[F(ab') ₂]ペルオキシダーゼ標識、
免疫動物—ウサギ、Kappel社、コード3206-0112

表5-1 本実験で使用した抗原、抗体、抗抗体

5.4 抗体の配向固定化の手順

第2章においてセンサの感度をよくするには、抗体の活性部位をそろえて固定化することが大切であることを述べた。したがってこの”活性部位をそろえて固定化（配向固定化）する”考えのもとに次の様に行った。

5.4.1 物理吸着法

抗体中のFc部は、疎水性が強いので疎水的な表面に吸着しやすいことが知られている[3]。これを利用して固定化を行う。疎水的表面はヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜を利用した。固定化の概念図は図5-3に示す。固定化の条件は表5-2の通りである。

5mm×5mmのシリコン基板にデポジットしたHMDSプラズマ重合膜
抗体1mg/mlの濃度のリン酸ソーダサリン緩衝液（0.1M, pH7.4）、
4℃、2時間放置
リン酸ソーダサリン緩衝液（0.1M, pH7.4）

表5-2 物理的吸着による抗体固定化の条件

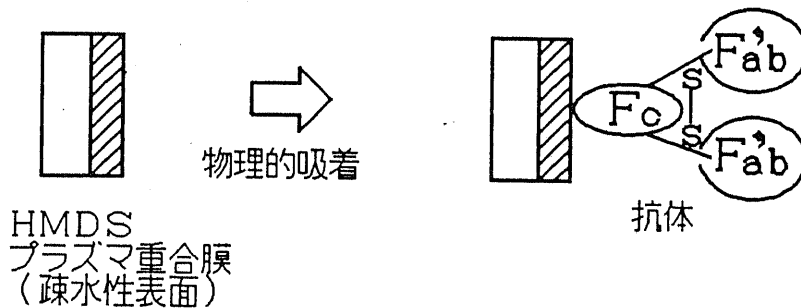


図5-3 物理的吸着による抗体固定化の概念図

5.4.2 共有結合法

共有結合で固定化するには、表面と抗体のそれぞれに化学反応性の大きい官能基を利用する必要がある。表面にはプラズマ処理によりアミノ基やチオール基が導入できることを4章において示したのでそれを利用することにした。抗体分子の官能基はアミノ基、カルボキシル基、水酸基、チオール基など多く存在するが、これらの官能基によっては活性部位に存在する場合があります。配向固定化の観点からこのような官能基を利用するのは好ましくない。抗体の分子構造から次のように考えた。抗体をペプシンで消化すると図5-4のような $F(ab')_2$ フラグメントが得られる[2]。その $F(ab')_2$ のヒンジ部のSS結合を還元すると $Fab'-SH$ が得られる。このチオール基は Fab' の他の部分にはないので、このチオール基を用いて固定化すると活性部位がそろって外に向けて固定化することができる。この方法は酵素免疫測定法の抗体の標識に利用されておりそれがオリジナルである[4]。表面の官能基はアミノ基かチオール基を用いた。アミノ基はエチレンジアミンプラズマ処理して導入した。チオール基はエタンジチオールプラズマ処理して導入した。表面の官能基と抗体 $Fab'-SH$ のカップリングは、二価の架橋剤を用いた。有機膜表面のアミノ基と抗体を結合する架橋剤は、 $N-(\epsilon\text{-マレイミドカプロキシ})$ スクシニイミド;EMCS[4]、チオール基と抗体は N,N' -*o*-フェニレンジマレイミド;PDM[4]である。抗体の処理法を表5-3、表面のアミノ基を利用した固定化条件を表5-4、固定化のダイアグラムを図5-5、表面のチオール基を利用した固定化条件を表5-4、固定化のダイアグラムを図5-6に示す。

ペプシン処理をした市販品の抗体を利用、
 抗体：抗ヒト・アルブミンIgG、 $F(ab')_2$ フラグメント、
 免疫動物—ヤギ、Kappel社、コード0301-0341
 抗体 $F(ab')_2$ 10mg/1ml リン酸ソーダ緩衝液 (0.1M, pH6.0)
 0.1M 2-メルカプトエチルアミン、
 5mMEDTAの濃度のリン酸ソーダ緩衝液 (0.1M, pH6.0) 100 μ lを添加
 37°C、90分インキュベート
 Ultrogelカラム (ϕ 1.0cm \times 30cm)
 上記EDTA-リン酸ソーダ緩衝液、
 流速0.4ml/min、分画1.0ml、Sephadex G-25でゲルろ過
 抗体 $Fab'-SH$ の溶液

表5-3 抗体の処理法[4]

図5-7にゲルろ過の装置の写真を示す。図5-8にゲルろ過時の溶出プロファイルを示す。このプロファイルより最も抗体濃度の高い分画を後の固定化の試料として用いた。また、 $Fab'-SH$ フラグメントの確認をSDSポリアクリルアミド電気泳動法[5]で調べた。これについては付録に示す。

5mm×5mmのシリコン基板にデポジットしたHMDSプラズマ重合膜
デポジット後そのままエチレンジアミンプラズマ処理
EMCSを20mg/mlの濃度でDMFに溶かす。
EMCS-DMF液50 μ lとリン酸ソーダ緩衝液(0.1M, pH7.0) 500 μ lを混合
この溶液にプラズマ重合膜を浸す。30 $^{\circ}$ C、5時間放置、
リン酸ソーダ緩衝液(0.1M, pH6.0)で洗浄
前記抗体の処理で得られたFab'-SHのEDTA-リン酸ソーダ緩衝液に浸す。
4 $^{\circ}$ C、一晚放置
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
pH8.3の炭酸ソーダ緩衝液で洗浄
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
pH8.3の炭酸ソーダ緩衝液で洗浄
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
リン酸ソーダサリン緩衝液(0.1M, pH7.4)で洗浄

表5-4 表面アミノ基を利用した抗体Fab'-SHの固定化[4]

5mm×5mmのシリコン基板にデポジットしたHMDSプラズマ重合膜
デポジット後そのままエタンジチオールプラズマ処理
PDMを50mg/mlの濃度でDMFに溶かす。
PDM-DMF液50 μ lとリン酸ソーダ緩衝液(0.1M, pH6.0) 1mlを混合
この溶液にプラズマ重合膜を浸す。30 $^{\circ}$ C、5時間放置、
リン酸ソーダ緩衝液(0.1M, pH6.0)で洗浄
前記抗体の処理で得られたFab'-SHのEDTA-リン酸ソーダ緩衝液に浸す。
4 $^{\circ}$ C、一晚放置
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
pH8.3の炭酸ソーダ緩衝液で洗浄
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
pH8.3の炭酸ソーダ緩衝液で洗浄
pH4.0の酢酸緩衝液で洗浄
リン酸ソーダサリン緩衝液(0.1M, pH7.4)で洗浄

表5-5 表面チオール基を利用した抗体Fab'-SHの固定化[4]

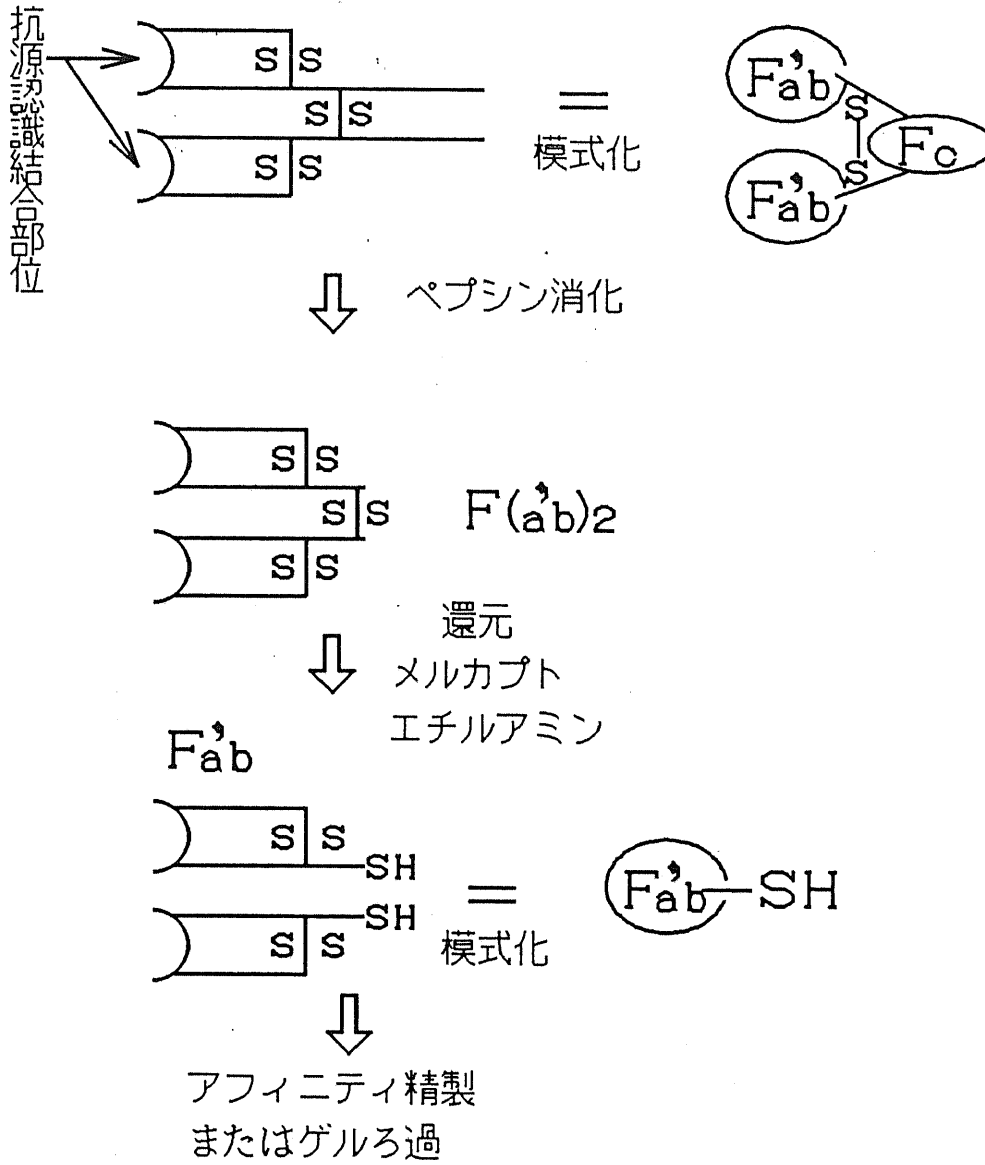


図5-4 抗体Fab'フラグメントの調整法

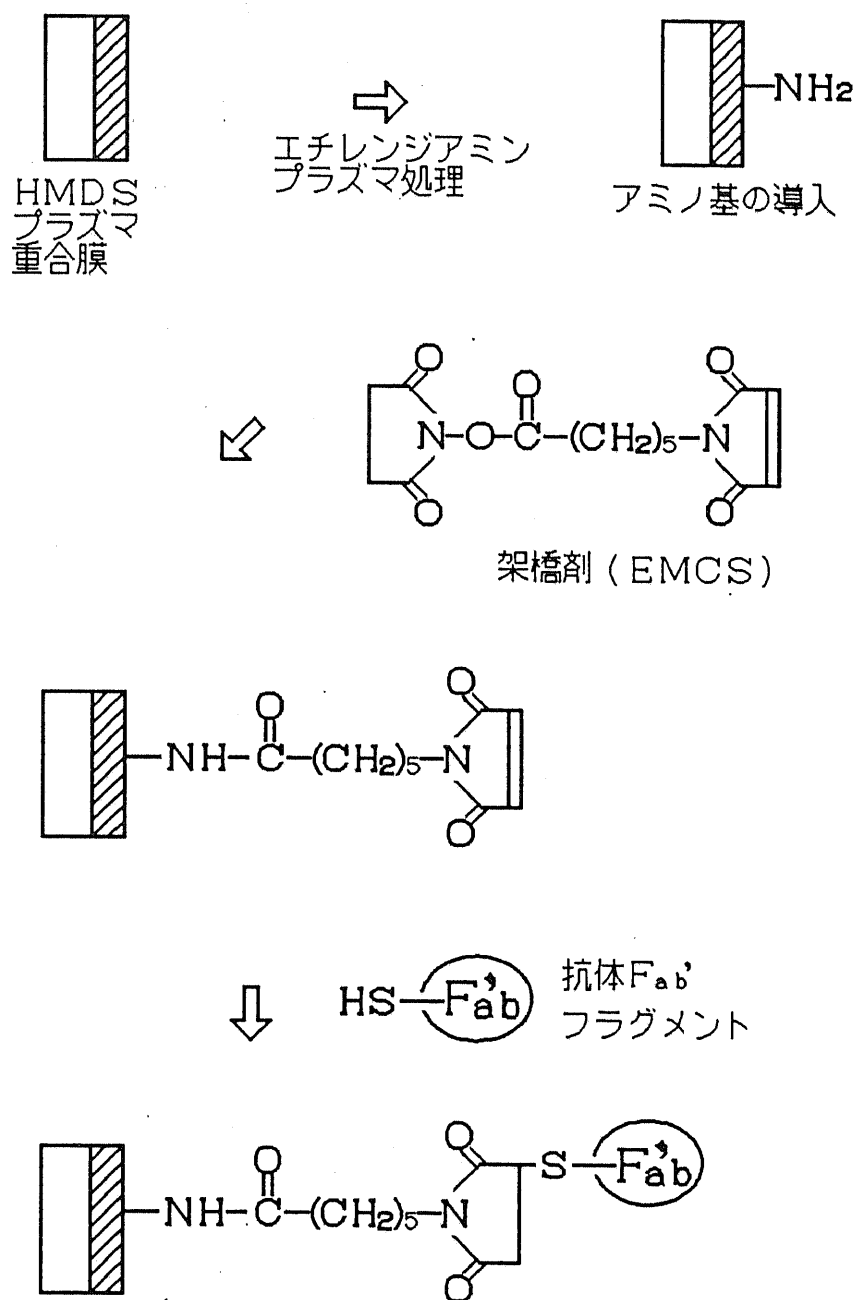


図5-5 表面アミノ基を利用した抗体固定化のダイアグラム

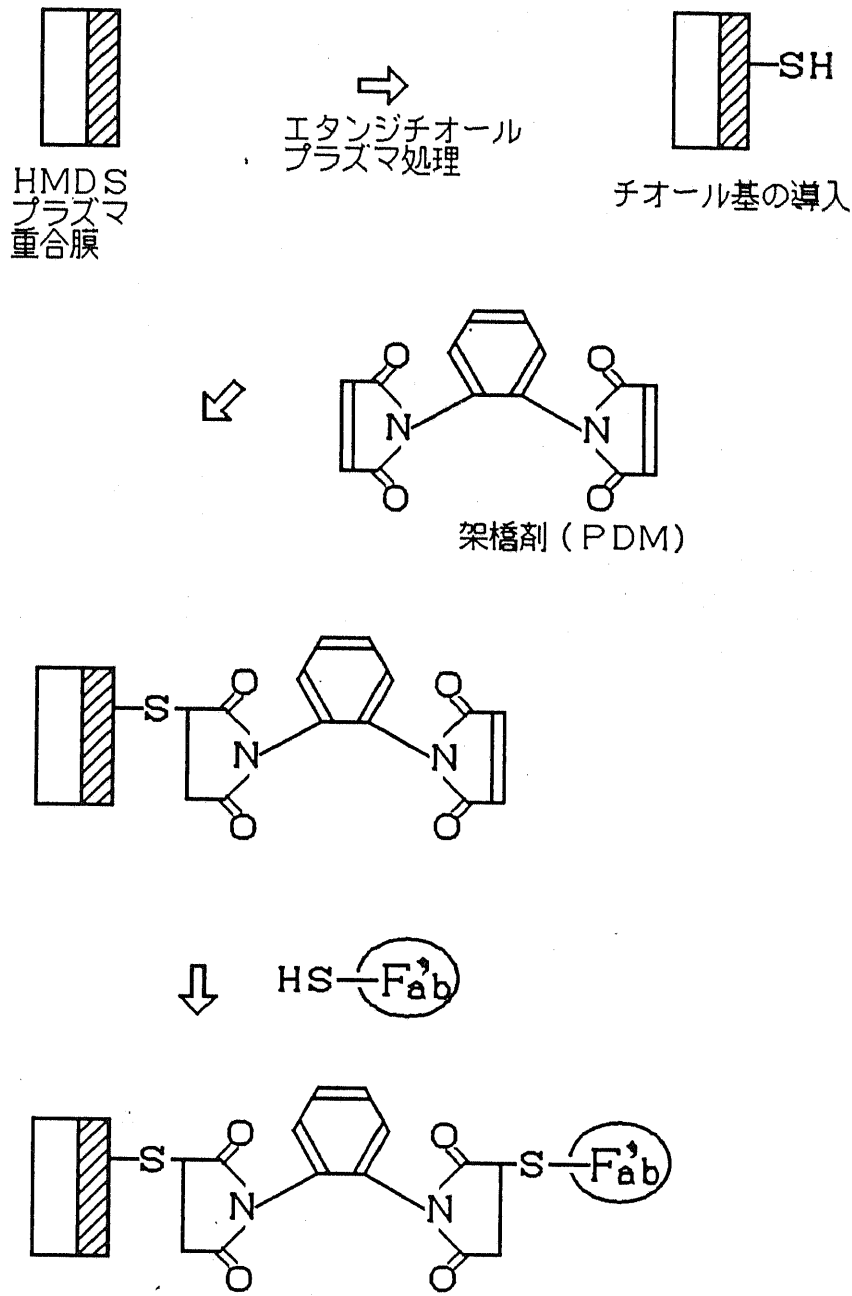


図5-6 表面チオール基を利用した抗体固定化のダイアグラム



図5-7 本研究で用いたゲル濾過装置（バイオ・ラッド社製）

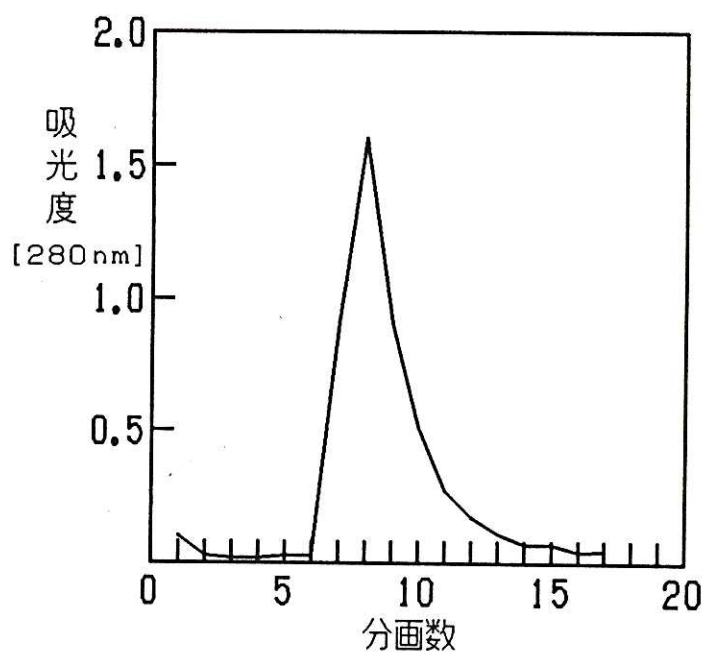


図5-8 抗体Fab'のゲル濾過時の溶出プロファイル

5.5 酵素免疫測定法による抗体の固定化量の測定

5.4の方法で抗体の固定化を行ったが、抗体が生理活性を保持したまま表面に存在している証拠を知る必要がある。それはセンサの特性のパラメータの一つとなるからである。しかし、表面の固定化量は極微量 (pg~ngオーダー) であるために高感度測定が必要である。現在確立されている測定法は放射線免疫測定法 (Radio Immunoassay; RIA) か酵素免疫測定法 (enzyme Immunoassay; EIA) [4] である。前者は、抗体の量を放射線量に置き換えた方法であり、後者は酵素活性に置き換えた方法である。前者は、直接的に信頼性の高い測定法であるが放射性物質を使用することに欠点がある。後者は、間接的で測定に熟練を要し信頼性もやや劣るが通常の実験設備でできる。本研究の目的上では、固定化量を正確に知る必要はなくある程度の目安で充分であるので後者のEIAを用いて調べることにした。EIA法 の概念図を図5-9に示す。

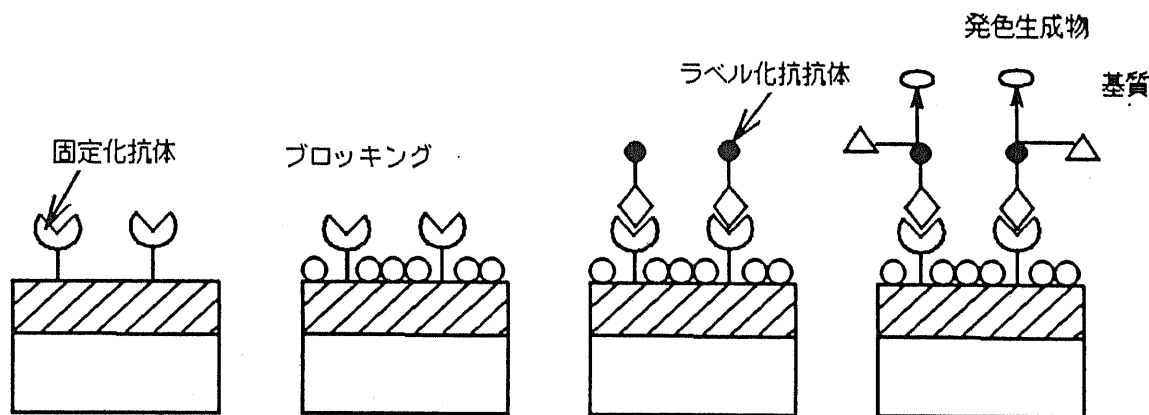
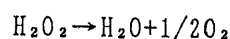


図5-9 酵素免疫測定法 (EIA) の概念図

表面の固定化量を調べる上で注意しなければならないのは、表面で行わせた抗原抗体反応が特異的であるのか非特異的反応であるかを区別する必要がある。また、抗体や酵素の失活に注意しなければならない。再現性のあるデータを得るためにはできるだけ実験条件を同じにし、サンプルも数多く用いるなどしなければならない。このような点に注意を払いながら実験を行った。

本実験のEIAで用いた酵素は、西洋ワサビペルオキシダーゼである。分子量は40,000、次のような化学反応を触媒する。



酸化によって発色する基質を共存させ、発色量を吸光度で定量化できる。実験手順は次の通りである。

(1) 標識抗体処理

5.3 であげた固定化抗体 (5mm×5mm シリコン基板)
ウシ血清アルブミン 10mg/ml で
リン酸ソーダサリン緩衝液 (0.1M, pH7.4) に浸す
室温、30分間、(ブロッキング)
リン酸ソーダサリン緩衝液 (0.1mol/l, pH7.4) で洗浄
ペルオキシダーゼ標識抗体 2mg/ml で
リン酸ソーダサリン緩衝液 (0.1M, pH7.4)
室温、2時間、抗体のある片側の表面にのみ浸るようにする。
リン酸ソーダサリン緩衝液 (0.1M, pH7.4) で十分に洗浄

(2) 酵素活性測定

固定化抗体の基板またはブランク基板を小試験管に入れる
基質液 0.6ml を加える
基質液：3,3',5,5'-テトラメチルベンチジンを
DMF 1ml に 55mM の濃度に溶かし、
0.1M 酢酸ソーダ緩衝液、pH5.5 100ml と混合
30°C に設定 (恒温槽中)
0.1% 過酸化水素水 0.2ml を加える (酵素反応開始)
酵素反応時間：5分
2M 硫酸 0.2ml を加える (酵素反応停止)
450nm の吸光度を測定

(3) 検量線の作製

ペルオキシダーゼを定量する ($E_{403nm} = 2.275 \text{ cm}^{-2} \text{ mg}^{-1}$)
希釈液でそれぞれの濃度に希釈する
希釈液：0.1M NaCl、1mg/ml ウシ血清アルブミン
を含む 10mM リン酸ソーダ緩衝液、pH7.0
それぞれの濃度のペルオキシダーゼ溶液 10 μ l と
基質液 (上記) 600 μ l を混合、30°C に設定 (恒温槽中)
0.1% 過酸化水素水 0.2ml を加える (酵素反応開始)
酵素反応時間：5分
2M 硫酸 0.2ml を加える (酵素反応停止)
450nm の吸光度を測定
横軸に 10 μ l 中の酵素の量を縦軸に吸光度をプロット → 図 5-10

表 5-6 酵素免疫測定法の実験手順 [4]

	吸光度			固定化密度 個/cm ² **4	最密に対する 比率*5
	a*1	b**2	c**3		
①	0.37	0.20	0.17	1.9×10 ¹⁰	0.0082
②	0.48	0.26	0.22	2.5×10 ¹⁰	0.011
③	0.51	0.25	0.26	3.1×10 ¹⁰	0.013

①物理的吸着法（図5-3、表5-2）

②表面アミノ基を利用した共有結合法（図5-5、表5-4）

③表面チオール基を利用した共有結合法（図5-6、表5-5）

【表5-7の注】

* ブランクサンプルは、①はHMDSプラズマ重合膜表面、②③は架橋剤まで反応させた表面である。

**データは6個の平均値である。

*1 a = (抗原抗体反応の量) + (非特異吸着量)

*2 b = (非特異吸着量)

*3 c = a - b

*4 吸光度から固定化密度の求め方

吸光度からペルオキシダーゼの量xを図5-10の検量線で求める。xを次式に代入する。

$$\text{固定化量} = \frac{x(\text{質量}) \times 6 \times 10^{23} (\text{アボガドロ数})}{40,000 (\text{分子量}) \times [0.5\text{cm}]^2 (\text{表面積})} = x[\text{ng}] \times 10^{10} \text{ 個/cm}^2$$

*5 抗体のFab'の大きさは7nmである。直径7nmの円の最大充填量を想定すると最大固定化量は、2.3×10¹²個/cm²である。図5-11のようになる。

表5-7 EIAによる抗体固定化密度の測定結果

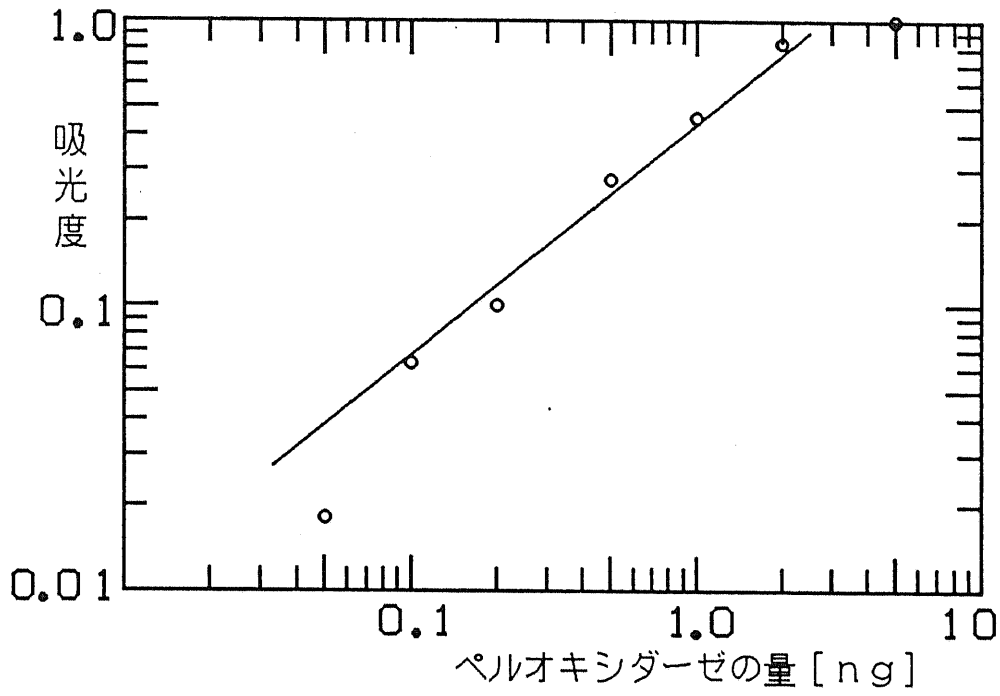


図5-10 ペルオキシダーゼの酵素活性の検量線

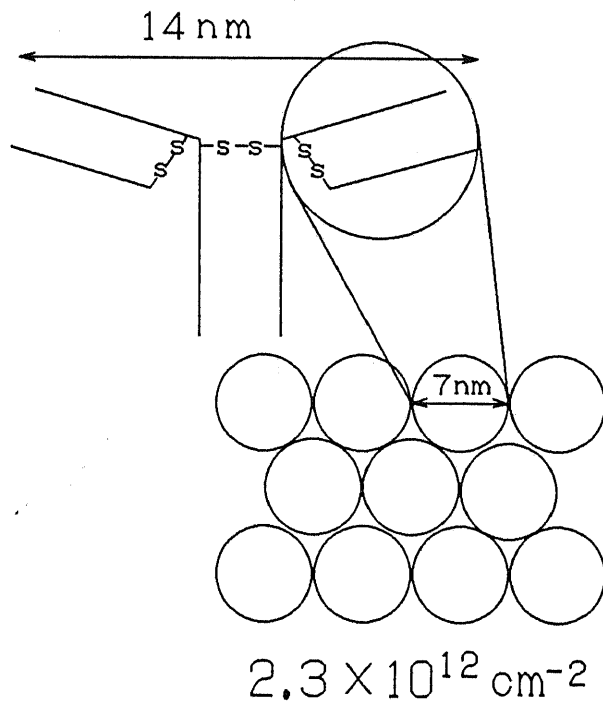


図5-11 抗体の最大固定化量の推定

5.5 抗体固定化量の測定結果に関する考察

酵素免疫測定法による固定化量の測定結果の考察を行う。

測定バックグラウンド(表中b)が大きく、真の測定値(表中a)の約半分ある。これはSN比が2でありかなり感度の低い測定であるといえる。やはり標識抗体が非特異的に反応しており、ウシ血清アルブミンのブロッキングしても起こっている。これをなくすために様々な試みを行っており、その一つは抗原抗体反応を起こした後pH2.5にして解離した抗体が実際の固定化量であると考えて行った。結果はここであげているものとあまり変わらなかった。結局この測定法自体に限界があるのであまり方法を懲りすぎても意味がないと判断した。またこの測定値も一つの目安であり絶対視はできない。

どの固定化方法も最大固定化量の1%オーダーでありかなり低い。表面での抗原抗体反応が、立体障害やポリクローナル抗体であるので充分に行われなかった可能性が充分考えられる。また固定化中の抗体の失活などにもよる。ポリスチレンのマイクロスフィアのウシ血清アルブミンの吸着量を調べた報告では、 9×10^{11} 個/cm²[6]であることを考えると、実際には固定化量はもう少し多いと考えられる。物理吸着法では最大量の1/3くらい、共有結合法でも最大量の1/10くらいはあると考えられる。

共有結合の固定化法は、一部には吸着によって固定化されている可能性もある。それを防止するため固定化の後pH4とpH8.3[7]とpHを変えて吸着した抗体は落とすようにしたが充分でないかもしれない。

どの固定化方法がよいということはこの測定では結論できないが、どの方法を用いても表面に活性を保持した状態で抗体が固定化できるといえる。

5.6 第5章のまとめ

本章では、プラズマ重合膜表面への抗体の固定化を行った。抗体はセンサの感度を考え抗体の活性部位をそろえるようにした。固定化方法は、抗体のFc部を吸着させる、膜の官能基と抗体Fab'フラグメントヒンジ部のチオール基を架橋剤で結合させた。そして、表面の固定化量を酵素免疫測定法によって測定し、表面に抗体が存在していることを確認した。

第6章

プラズマ重合膜の界面現象の評価

6.1 第6章のまえおき

第3章においてプラズマ重合膜の作製を行いヘキサメチルジシロキサンプラズマ重合膜がISFET型免疫センサのゲート絶縁膜に適していることを示した。第4章においてプラズマを用いての表面修飾によりセンサとして使用し得る特性を与えることが適していることを示した。第5章においてプラズマ重合膜への抗体の固定化を行い抗体が膜表面に活性を保持したまま固定化されていることを示した。これらの内容を踏まえて本章では、抗体固定化プラズマ重合膜の抗原抗体反応による表面電位の変化の測定を行った。

表面電位の測定を行うために、まず高入力インピーダンス増幅器の作製を行った。第2章で示したように、免疫センサは、イオンセンサの延長上に位置するので、表面電位測定系がイオン応答をするかを確認した。その上で抗原抗体反応による表面電位の測定を行った。ISFET型免疫センサでは、表面電位の変化をソースドレイン間電流の変化としてとらえることが基本原理であるので、このデバイス構造を作製する以前に表面電位の変化を直接測定することは大切である。また、抗原抗体反応による表面電位の変化かがどのような機構で起こるのかは不明な点が多いので、実際に測定を行うことは意義が大きい。

6.2 表面電位の測定系の作製

6.2.1 高入力インピーダンス増幅器の作製

絶縁体の表面電位の測定には高入力インピーダンス増幅器が必要である。本実験ではオペアンプを用いて増幅器を作製した。その回路図を図6-1に、その写真を図6-2に示す。この増幅器の利得は20である。抵抗は5%誤差のものを使用している。入力初段にはエミッタフォロアでインピーダンス変換を行い、オペアンプはFET入力、高入力抵抗、超低バイアス電流のAD515ALを用いた。このオペアンプは、入力抵抗が $10^{15}\Omega$ 、バイアス電流が75fAで、電気化学測定によく使用されている。回路の配線は、交差を最小にし、入力部(3番ピン)

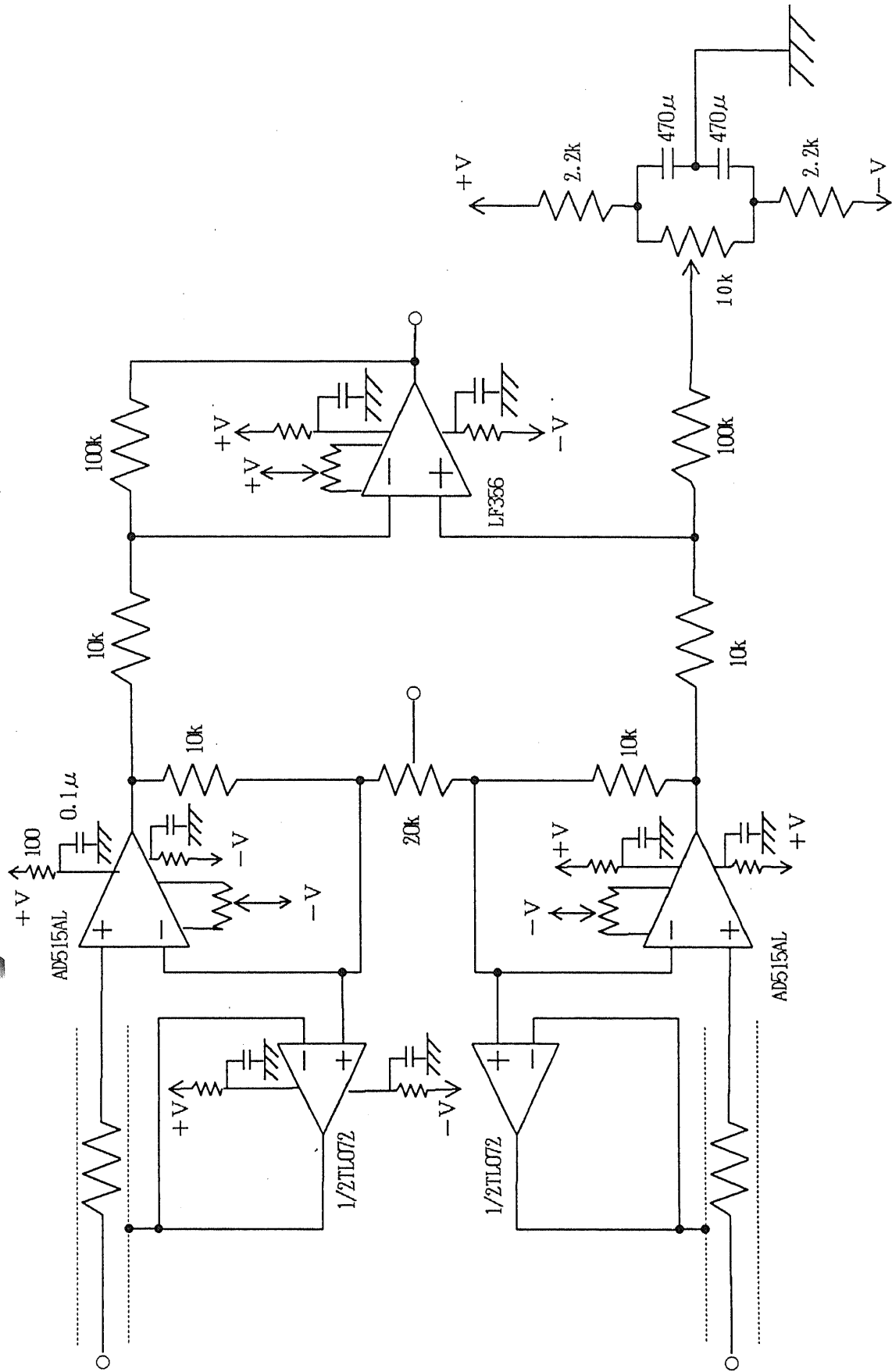


図6-1 本実験で使用した高入力抵抗増幅器の回路図

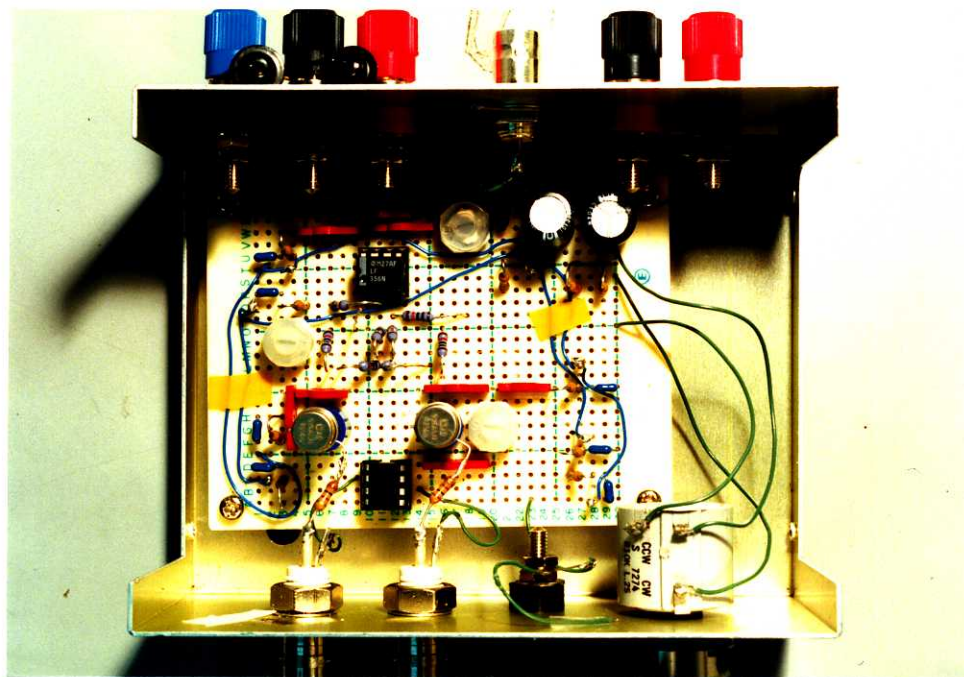


図6-2 試作した高入力抵抗増幅回路

はソケットにささずにプリント基板から浮かして取りだした。また他の配線からはできるだけ離れた。入力部はBNCを利用し、その外心はブーストラップした。2段めのレファレンスは、0点調整のためであり、本測定では電位がかなり大きくずれることが予想されるので、±約10Vの範囲が調整可能にした。この可変抵抗は10回転のものを使用した。電源の影響を抑えるために470 μ Fの電解コンデンサを並列に入れた。一方、オペアンプの電源入力部は100 Ω の抵抗を入れ、それぞれのオペアンプ同士を独立させた。さらに、0.1 μ Fのセラミックコンデンサを並列に入れローパスフィルターとした。オフセット調整はそれぞれのオペアンプについて行った。また増幅器自体が発振していないかも確認した。

6.2.2 プラズマ重合膜と水溶液のインターフェースの作製

プラズマ重合膜に限らず膜をセンサとして使用するには水溶液に浸す必要がある。その際、水溶液に浸らなければならない部分（絶縁膜）と浸ってはいけない部分（金属）がある。その境界をどのように作るかは大きな問題である。特に長時間水溶液に浸す場合に、隙間などに電解質液がしみこんでセンサが応答しないことがある[1]。本実験ではデバイス実現の前段階であるので短時間の測定には十分な系を作った。

膜はハイドロシリコン基板上に作製する。裏面にはアルミニウムを蒸着する。プラズマ重合膜作製後は、200 $^{\circ}$ C、5分の熱処理によって膜内の残留ラジカルを消失させた（第3章3.4.5参照）。図6-3に示す。電極はシリコン基板を通して裏面から取り出すことになる。またハイドロシリコンを使用することで接触抵抗をできるだけ小さくした。

次に、プラズマ重合膜の付いたシリコン基板の裏面を図6-4に示すようなパターンのプリント基板に銀ペーストで粘着した。プリント基板はエッチングして作製した。銀ペーストが乾燥したのち、エポキシ樹脂で膜表面以外は全て覆った。特にシリコン基板と膜の境界が直接水溶液に浸らないようにそのエポキシ樹脂を塗った。図6-5がその写真である。

次にそのユニットの膜表面が水溶液に浸るようにして上部が他の電極と接触させることで電気的につながるようにした。ユニットの支持台はアクリル板で作製したが、絶縁体であるため容量が生じるおそれがあるのでアルミホイルで包んだ。ユニット支持台の写真を図6-6に示す。

6.2.3 シールドボックスの作製

信号源が高入力であるので周りの雑音を避けるためにシールドボックスを作製した。材料は1.5mm厚のアルミ板である。つなぎ目は接着剤でくっつけたが、電気的につながるように配慮した。すべてを遮断し、溶液の注ぎ口は最低限の大きさにした。溶液を注ぐ際に雑音になりやすいので、注ぐパイプは金属性で接地した。ボックスから信号源はBNCで取り出す。図6-7にシールドボックスの写真を示す。この中に6.2.2で作製したユニット支持台を入れた。図6-8はその様子の写真である。信号源はボックス内ではできるだけ離して浮かせるようにして、浮遊容量を避けた。

6.2.4 表面電位測定系

図6-9に表面電位測定系の全体写真を示す。シールドボックスは、攪拌器の上に乗せ溶液中にスターラーをいれて攪拌させた。増幅器の電源は安定化電源を2個使用した。出力は、マルチメータ、オシロスコープ、アナライジングレコーダーでモニターした。記録はアナライジングレコーダーで行った。測定系はすべてグランド共通とし、シールドボックスから増幅器に至るBNCの外心のみを浮かせた。この測定系は、50Hzのハム雑音が数十 μ オーダーでは観測されたが、測定のサンプリング時間は0.5~1秒であるので影響はない。

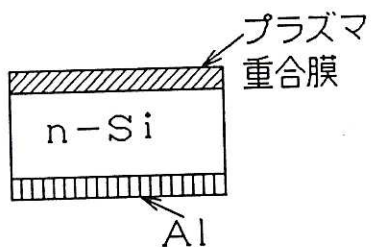


図6-3 基板の上のプラズマ重合膜

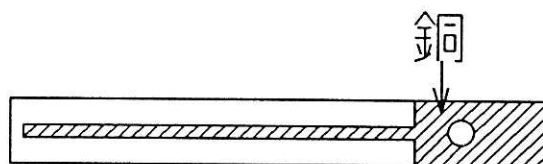


図6-4 プリント基板のパターン

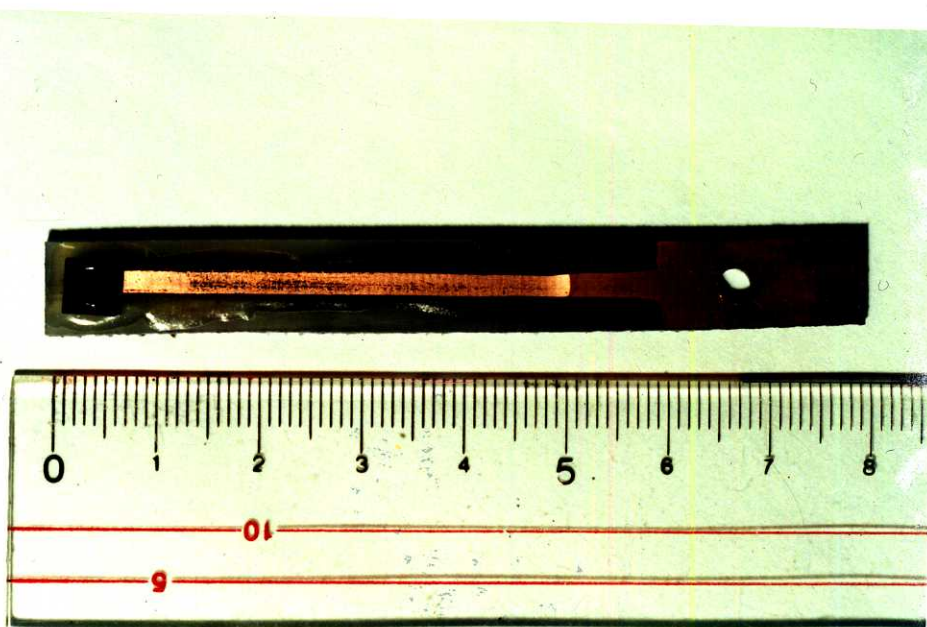


図6-5 プラズマ重合膜と水溶液の接続部

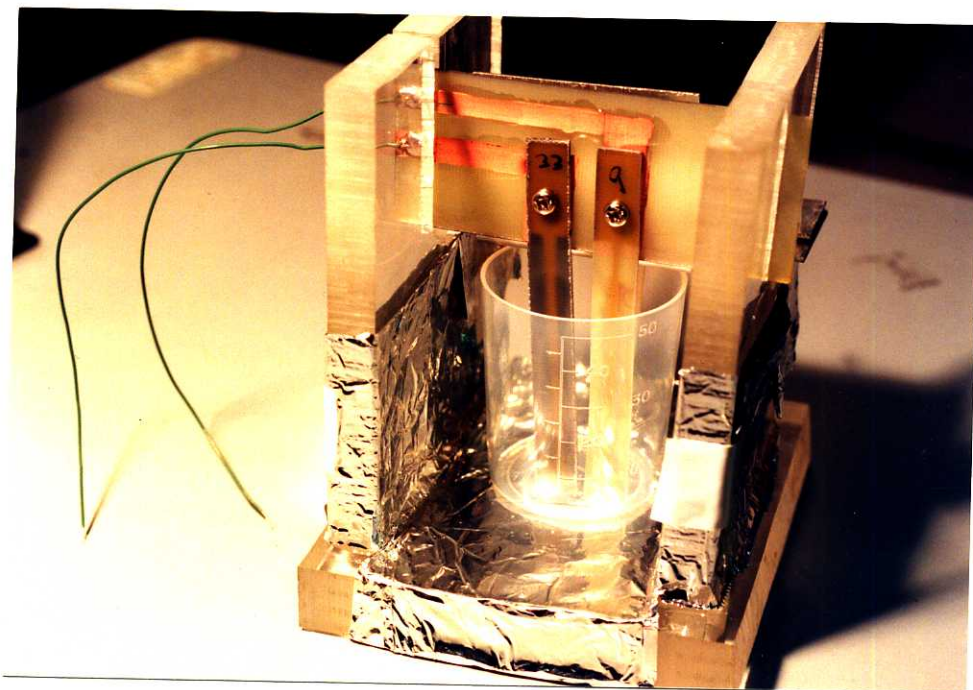


図6-6 膜と水溶液接続ユニットの指示台

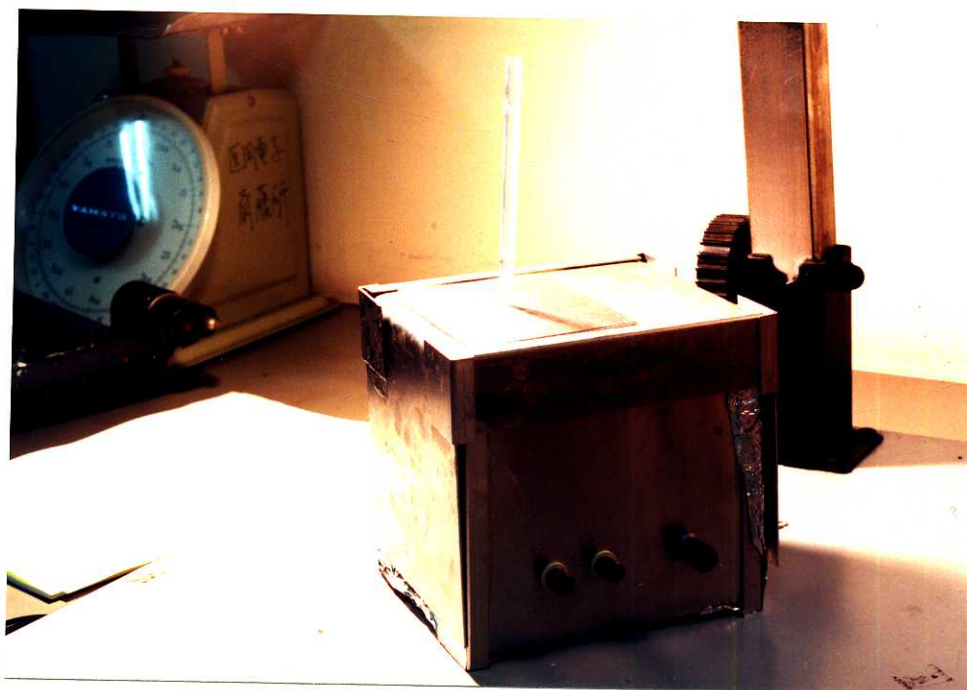


図6-7 試作したシールドボックス

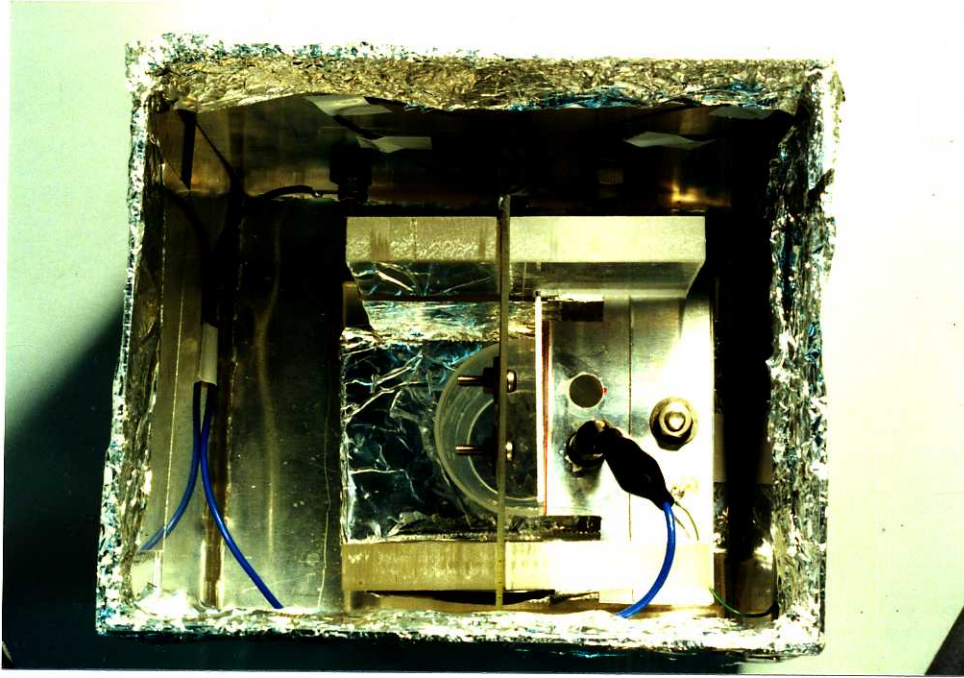


図6-8 膜と水溶液接続ユニットの指示台を入れたシールドボックス



図6-9 表面電位測定系全体

6.3 プラズマ重合膜のpHに対しての表面電位の測定

6.2で作製した表面電位の測定系が動作をするかどうか、プラズマ重合膜が水溶液中でも安定で絶縁性を保っているかどうかを調べるために、pH変化による表面電位の変化を測定した。これは次節の抗原抗体反応による電位の測定を行う以前の重要なステップである。

pHの応答性は、ネルンストの式で記述され25°Cの場合、58mV/pHであることが知られている。このオーダーの電位変化は測定しやすく、実際この原理がガラス電極pH計に使用されている。ISFET型のイオンセンサの場合、ゲートに窒化シリコン膜(Si_3N_4)を使用するとが理論式に近い応答が得られることが松尾ら[2]によって見いだされている。このように酸化シリコンや窒化シリコンのpH応答は知られているので、これを基にして、プラズマ重合膜表面のpH応答、さらに次節の抗原抗体反応による表面電位の変化の測定へと進めていく。

測定系は図6-10に示す通りである。図6-1の差動増幅器の片方を使用し、他の片方は接地した。プラス入力側を接地したので出力電位は反転している。pHの変化による電位の変化値は、温度ドリフトに比べてはるかに大きいので差動の必要はない。電位基準にはAg/AgCl比較電極を用いた。このAg/AgCl比較電極の必要性については、文献[3]に示されている。測定温度は18°Cである。

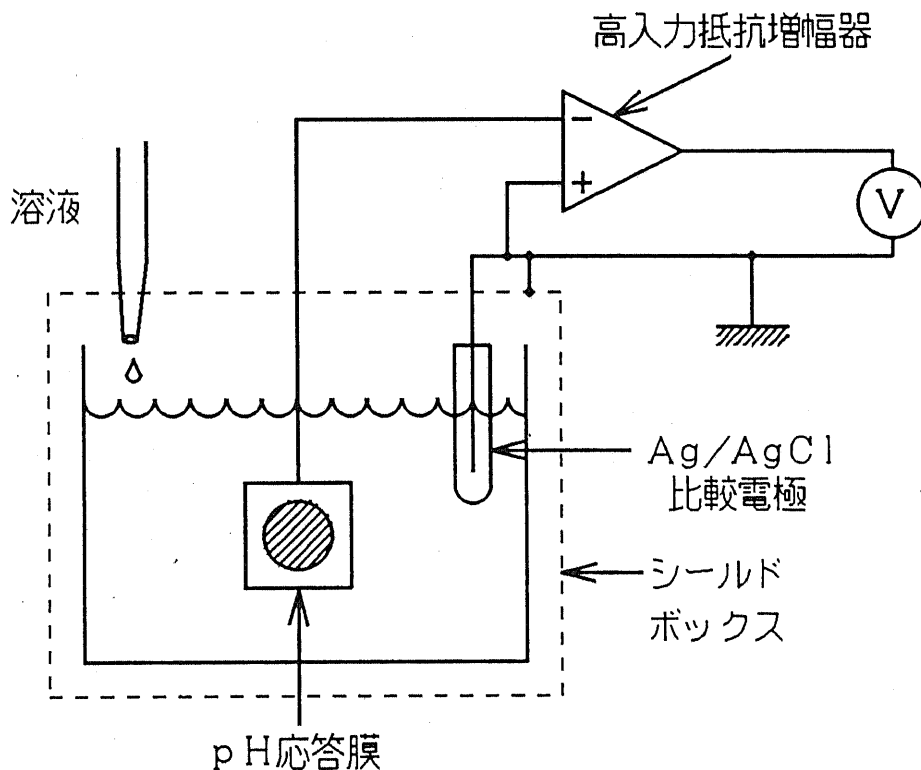


図6-10 pHによる表面電位の変化の測定系

本実験ではpH変化は、0.01N塩酸(HCl)と0.01N水酸化ナトリウム(NaOH)の中和滴定で行った。0.01N NaOH10mlと0.01N HCl15mlの溶液(pH11.3)にHCl10mlを加える(pH2.8)。再びNaOH 20ml加える(pH11.3)。この条件では、中和点で約8.5のpH変化が生じる。測定した膜、pH応答の結果は表6-1に示す。測定データは、図6-11に示す。測定時の電位は、サンプル時間0.25秒でモニターした。モニターはYHP社製アナライジングレコーダーを用いた。

絶縁膜	pH応答[mV/PH]
Si ₃ N ₄ * ¹	39
HMDS* ²	18
HMDS-NH ₂ * ³	31
HMDS-SH* ⁴	33

* 測定温度：18℃

*1 プラズマCVD、約70nm

*2 HMDSプラズマ重合15秒（表3-4、膜厚約100nm）、200℃5分熱処理、

*3 HMDSプラズマ重合15秒（表3-4、膜厚約100nm）

エチレンジアミンプラズマ処理（表4-10、アミノ基）、200℃5分熱処理、

*4 HMDSプラズマ重合15秒（表3-4、膜厚約100nm）

エタンジチオールプラズマ処理（表4-14、チオール基）、200℃5分熱処理、

表6-1 プラズマ重合膜のpH応答の測定結果

Si₃N₄では、pH応答していることがわかる。その応答度は、39mV/pHでありこれは松尾らによって報告されたISPETの50mV/pH[2]には及ばないものの良好なpH応答している。同様に金属で中和滴定を行うとほとんど応答しなかったことからこの表面電位測定系は正しく動作していることがわかる。

HMDSプラズマ重合膜でのpH応答は、未修飾表面では18mV/pHで低い。これは、HMDSプラズマ重合膜の表面は疎水的であるので、水素イオンの応答性が低いためである。表面修飾によってアミノ基やチオール基を導入して親水化すると30mV/pHとなり水素イオンの感応性がよくなった。水素イオンの応答の原因は、ガラス表面の水酸基[4, 5]であることが知られているので、HMDSの表面は、図3-18からもH⁺に反応するような構造は少ない。アミノ基やチオール基が導入されるとH⁺に反応しやすくなるが、これはアミノ基やチオール基以外に残留酸素によって表面に酸化物が生じて、これも反応に関係してくると考えられる。これは、第4章の表面分析でそう考えられる。また、アミノ基やチオール基のpK値は約10付近であ

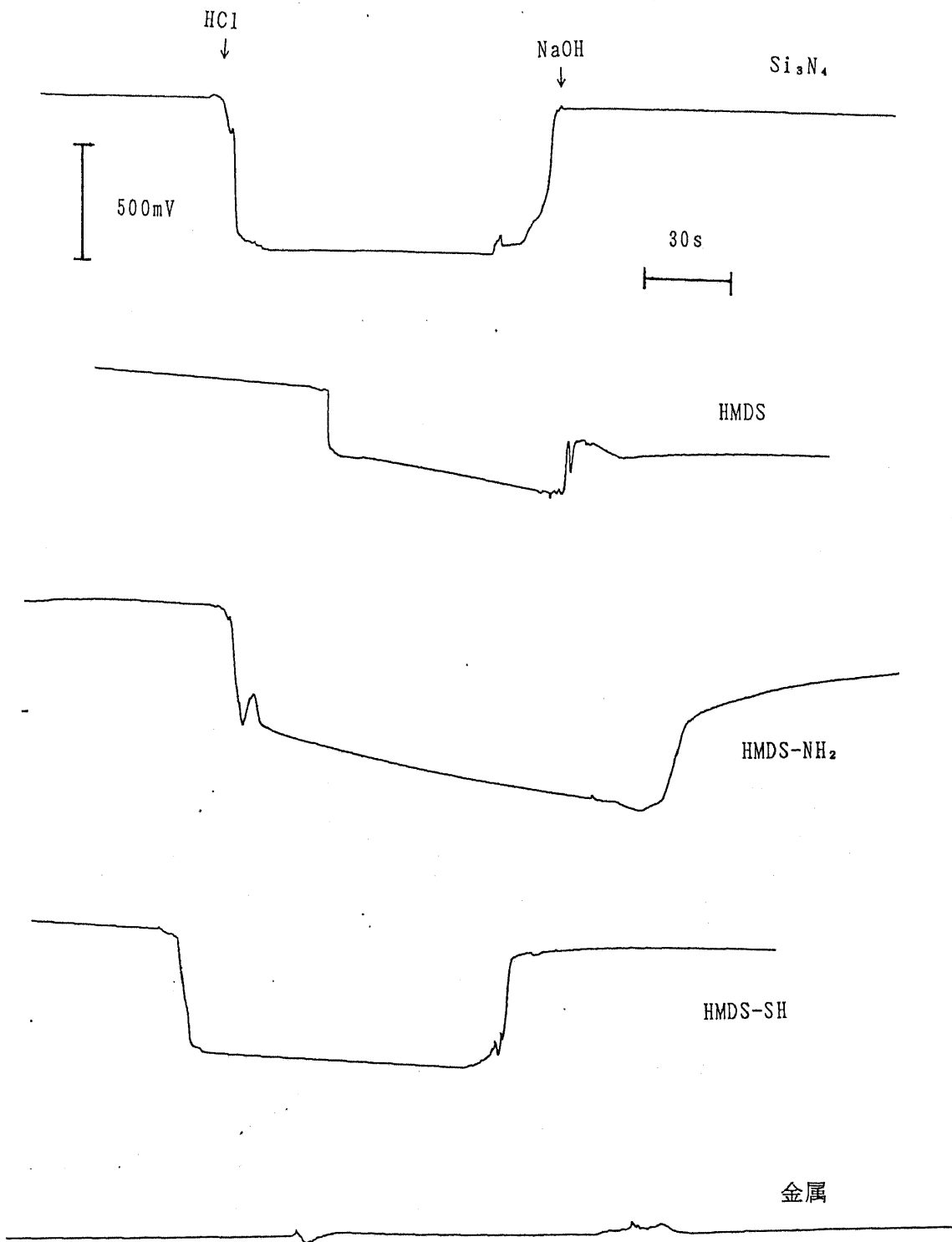


図6-11 pH変化による表面電位変化の測定データ

るのでこの官能基が原因で電位変化がシグモイド関数状になると予想したがそのようなことはなかった。

この測定ではシリコン基板上に直接有機膜を作製してこのように電位変化を測定できているので、プラズマ重合膜は水溶液中においても十分に絶縁性が保たれていることがわかる。架橋密度が大きい緻密な膜であるのでイオンの阻止能力もあり、この膜の大きな特徴が表れている。ガラスに近い絶縁性がある。さらにHMDSの場合ガラスと違って疎水性の表面であるので次節で述べる抗原抗体反応の検出にも適している。他の有機膜ではそのような膜は見あたらない。なぜなら、他の膜でセンサとして使用するには、シリコン基板上に直接付けなくて、酸化シリコンを介して有機膜をつけている。

6.4 抗体固定化プラズマ重合膜の抗原抗体反応による電位変化の測定

6.2節で作製した表面電位の測定系が正しく動作していることを、6.3節においてpH応答を測定できることで示したので、いよいよ抗原抗体反応による表面電位の変化を測定する。

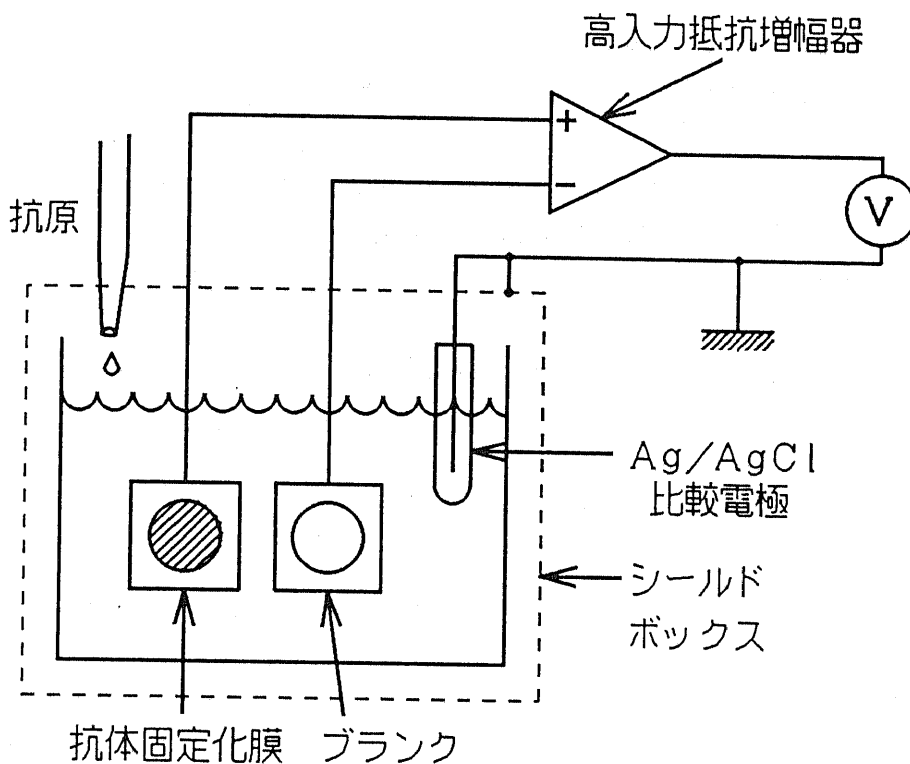


図6-12 抗原抗体反応による表面電位変化の測定系

抗原抗体反応による電位の変化は数mVオーダーであることが予想される。したがって数mVオーダーで電位を安定させる必要がある。数mVオーダーでの電位不安定の要因は温度ドリフトである。このドリフトを抑えるためには差動増幅が有効であり、その有効性を差動をとらない場合と比べて確認した。図6-12に電位変化の測定ダイアグラムを示す。差動は抗体固定化膜と固定化しない膜との間で行う。このようにすると温度ドリフトを抑えられるだけでなく、非特異吸着などの影響も防ぐことができ、抗原抗体反応のみの電位変化を測定しやすくなる。図6-12中の増幅器は、図6-7の回路のことである。

測定は、電位が安定してから抗原溶液を注いで電位変化をみた。増幅器のスイッチを入れてから電位が安定するまでには1~3時間を要した。抗原溶液の注ぎ方によっては電位が一時的に不安定になるので、注ぐときには注意を要する。また、電位変化が抗原に特異的であるかないかを知るために非抗原溶液も注いでその応答も調べた。

測定溶液は、pH8.5、0.01M、Tris-HCl緩衝液を用いた。イオン強度を小さくし、pHを大きくして電位変化を観測しやすい条件にした。抗原のヒト血清アルブミン(HSA)の等電点は4.8であるので生理条件(pH7.4)よりは抗原は多くの電荷を持つためである。測定温度は18°Cである。

プラズマ重合膜の測定条件は第3章の表3-4通りである。膜厚は100nmである。200°C、5分の熱処理も行った。抗体の固定化は、物理的吸着法で行った。その条件は第5章の表5-2の通りである。この方法にしたのは、共有結合法に比べて簡単であるからである。また、疎水性表面を利用した法がイオンの応答の影響が少なくできると考えたからである。共有結合法の利点である安定性は、現段階ではまだ必要がない。将来的には考慮しなければならない。

測定結果は、図6-13の通りである。最初に非抗原タンパク質であるリゾチームを0.05g/1の濃度になるように溶液を注いだ。応答がないことを確認した後に抗原(ヒト血清アルブミン(HSA))を0.5g/1の濃度になるように抗原溶液を注いだ。溶液全体は約20mlである。注ぐ抗原溶液等は1ml以下である。そそいだ直後は電位が乱れるがすぐに回復してから電位が下がり始めた。HSAは等電点が4.8で測定時のpHでは負に帯電している。したがってこの電位変化の方向は妥当である。約7分で抗原抗体反応が終了し電位が一定になった。再び非抗原を1g/1の濃度になるように注いでも電位の変化はなかった。抗原抗体反応時間は、抗原の濃度が大きいので妥当である。ISPET型の免疫センサの報告[6,7]では濃度にもよるが、10~30分くらいである。抗原抗体反応の前後で約2.5mVの電位変化が生じた。そして、それは確かに抗原抗体反応に起因するといえる。

この測定データは3個中1個の割合である程度の再現性は確保できた。特に電位変化の2.5mVはほとんどかわらなかった。再現性が得られない原因としては、膜の不均質と抗体の活性固定化量のばらつきなどが考えられる。高入力抵抗の測定であるので測定系の環境を注意しないとちょっとしたことで電位が変わってしまうことも困難な要因である。特に抗原溶液の注ぎ方をもっと再現性よくできるように工夫しなければならない。

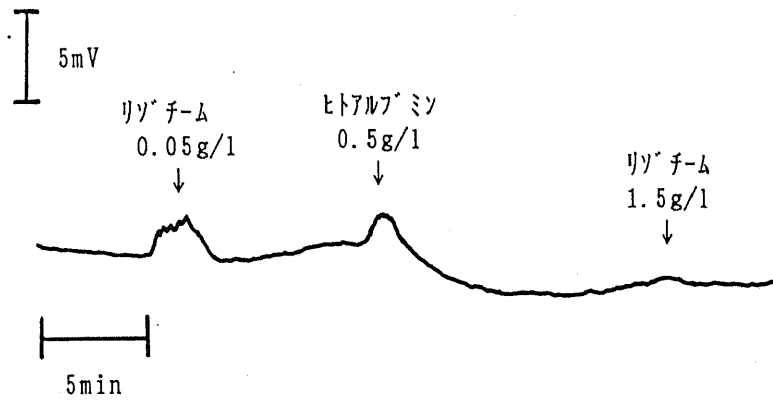


図6-13 抗原抗体反応による電位変化の測定データ

抗原抗体反応による電位の変化がどのような機構で生じるのかについて考察する。本研究の抗原抗体反応の場合、抗原は測定条件では負の電荷を持つ。抗原抗体反応が起こる以前の状態では、固定化抗体、膜表面、イオンの間で平衡状態になり、電気二重層を形成する。この平衡状態になるまでには時間を要する。溶液を注ぐなどの擾乱で電気二重層が乱れる。これらは、実験事実である。次に、抗原溶液を注ぐ。本実験で使用した抗原は測定条件のpHでは負の電荷を持つので、抗体反応により膜表面に負の電荷が局在する。すると膜表面付近で局所的に電荷量が変わり、その電荷の影響でイオン分布が変化する。電位はイオン分布で決まるので電位変化が観測される。本実験で測定された2.5mVの電位変化は、第2章で考察した予想値よりも一桁以上低めである。それは、第一には、抗原抗体反応が膜表面から少し離れた場所で起こることで、電位変化が表面に至るまでに減衰して膜内への電界効果がわずかしか伝わらない。第二には、抗体の活性部位がランダムに配向したために電位の発生が小さくなった。第三には、抗体の被覆されていない部分へのイオンの透過によって、抗原抗体反応の電荷の局在が緩和されることなどがあげられる。この場合、実際に使用する場合にはこの部分への非特異吸着が大きな問題となる。

本研究では電位が発生しやすい条件で行ったとしてもなんとか測定できたという感じであった。実際にデバイスとして動作させるにはまだまだ多くの困難がある。その多くの問題点を一つ一つ解決していかなければならない。特に界面現象の分子レベルでのメカニズムを解明することは重要であろう。

6.5 第6章のまとめ

高入力インピーダンス増幅回路並びにシールドボックスなどを含めた表面電位測定系を作製しプラズマ重合膜の水溶液中での界面電気現象の評価を行った。HMDSプラズマ重合膜は、水溶液中でも安定でよい絶縁性を示すことがわかった。親水性に改質した表面ではpH応性もよいことがわかった。そして、抗原抗体反応による表面電位の変化を測定した。pH 8.5、イオン強度0.01で抗原抗体反応によって表面電位が2.5mV変化することを検出できた。また、非抗原ではこの様な電位変化が観測されなかった。

第7章

結論

本研究ではISFET型免疫センサの開発を目的として次のような結論を得た。

1. センサの心臓部となる抗体固定化膜には、プラズマ重合膜を選択した。その理由は、第一には表面電位の検出ができる緻密な膜であること、第二には生体物質との適合性がよいこと、のためである。
2. プラズマ重合のモノマーにはヘキサメチルジシロキサンを使用した。その理由は、第一にはシリコン基板に付着性がよい、第二には生体適合性がよい、第三には蒸気圧が高いのでプラズマの制御がしやすいことである。
3. ISFET型免疫センサの動作解析を行った。抗原抗体反応で電荷が表面に局在化することによって発生する電位は、Gouy-Chapmanの式で記述される。これより、一価の電子が表面に 10^{12} 個/cm²存在し、イオン強度が0.001の時約20mVの電位が発生することがわかった。これより、イオン強度が大きい場合、電荷が膜表面に垂直方向に広く分布すると発生電位は小さくなる。さらに、電荷が膜表面から離れると発生電位は小さくなる。電荷の表面内にデバイ長以上で存在した場合発生電位のゆらぎが大きくなる。以上より、センサの感度をよくするには抗体の配向性をよくすること、抗原抗体反応はできるだけ膜表面に近い場所で行わせること、抗体の固定化量を大きくすることが大切である。
4. プラズマ重合膜を作製し電気的特性の評価を行った。プラズマ重合膜はシリコン基板上にデポジットした。膜厚は100nmオーダーである。電極はアルミニウムで面積は2mm ϕ である。容量は、10kHzで500nF、抵抗は30M Ω 以上であり表面電位の変化を伝えるのに十分な膜であることを示した。また、電界質溶液中での膜の安定性ならべに絶縁性を調べ、免疫センサとして使用し得る必要条件を満たすことを示した。

5. プラズマ重合膜表面に反応性プラズマを利用して官能基の導入を行った。エチレンジアミンプラズマはアミノ基の導入が可能であることを化学修飾XPS法で調べた。そして、表面に 5.9×10^{13} 個/cm²のアミノ基が存在することがわかった。同様に、エタンジチオールプラズマはチオール基の導入が可能であり、表面に 2.4×10^{13} 個/cm²のチオール基が存在することがわかった。

6. プラズマ重合膜表面に抗体の固定化を行った。抗体は、抗ヒト・アルブミンIgG分画を用いた。抗原は、ヒト血清アルブミンを用いた。抗体の活性部位の方向をそろえて固定化した。それは抗体Fab'-SHフラグメントのチオール基と表面の官能基を二価の官能基でカップリングする方法を利用した。抗体の固定化量を酵素免疫測定法により測定し、 2.4×10^{11} 個/cm²の活性抗体が存在することがわかった。これは最密固定化量の1%であると考えられる。

7. 抗体固定化膜の抗原抗体反応による表面電位の変化の測定を行った。増幅器はオペアンプを組み合わせて作製した。前段にAD515のエミッタフォロアで次段に差動増幅した。一方を抗体を固定化した膜、一方を抗体を固定化しない膜で差動増幅分が抗原抗体反応による電位変化である。溶液はpH8.5、イオン強度0.01のトリス塩酸緩衝液を用いた。電位が安定すると抗原溶液を注入する。そして電位の変化を時間の関数として測定した。その結果2.5mVの電位が観測され、抗原抗体反応を電位で検出することができた。これは、抗原にのみ応答することがわかった。

本論文では、ISFET型の免疫センサを目指して様々な研究を行ったことを述べ、プラズマ重合膜が優れた材料であることを示した。すなわち、FETのゲート絶縁膜と抗体タンパクの担体の2つの役割を果たし、抗原抗体反応の電位変化を効率よく伝える材料であるということである。今後は、プラズマ重合膜を使ってISFETを作製したいと考えている。FETを作製する際には、半導体と絶縁体の界面がデバイス特性に大きな影響を与えることになる。本研究でのプラズマ重合膜と半導体界面では、熱処理効果などにより十分に解決されるであろうと予想される。しかし、どんなに改善されたとしてもシリコン-酸化シリコンには及ばないと考えられる。したがって、非常に薄い酸化シリコン膜(数nm)をはさんでプラズマ重合膜を付けた構造がよいと考えられる。

しかしながら、ISFET型免疫センサでは次にあげる点で本質的に実現が困難である。

1. 抗原抗体反応による電位発生の機構が不明である。また、仮に予想がついたとしても数mVオーダー程度でかなり弱い。

2. 水溶液中の電位はかなり不安定である。本研究での、電位が安定するまでにかかなりの時間を要した。また、電位が安定したとしても擾乱でまた不安定な状態が続いた。このような状況では研究段階ではデータは出せたとしても実用的には不可能に近い状況である。

3. また、抗体の固定化量が少なく、抗体が被覆されていない表面に非特異的に吸着がおこる。また、抗体はタンパク質であるので失活しやすい。

したがって、将来的には新しい原理のデバイスを考案する必要がある。これから、新しい原理のデバイスについて考察する。ISFET型のセンサは電位で動作するが、この電位測定タイプは原理的には、「穴が一つでも空いてはいけない」という発想である。つまり抗体の固定化を100%に近い状況にしなければならないということであり、100%が、99%、98%となるにつれて性能が指数的に落ちる。本研究では、固定化密度が1~10%であり、それを100%近くにすることは不可能に近い。したがって、この現象の裏に当たる「穴が一つ空けばよい」という原理を利用することが大切である。すぐに浮かんでくるのが酵素による化学増幅である。一つ反応が起こるとそれが連鎖的に増えるものである。酵素免疫測定法、あるいは酵素を利用したセンサは研究されているが、センサ本来の目的である測定の簡便さからは少し逸脱しているように思う。やはり、できるならばISFETのように情報を電気信号として取り出すのは大きな魅力である。

このような場合には、「生体に学べ」という教訓がある。これから考えると、生体の情報伝達機構を模倣できないかと思う。すなわち、レセプターが結合したときにイオンチャネルが開くことである。これを免疫センサにおきかえると、抗原が一つ結合しただけで膜に穴があきイオン透過性、あるいはインピーダンスの大きな変化によって捕らえられるのである。具体的なイメージとしては、脂質二重膜にタンパク質を埋め込んだ構造である。今後は、このような原理の免疫センサを探求したいと考えている。

また、ISFETの場合には、半導体技術のバックアップが大きかったと考えられる。MOSFETは、すばらしい発明であるが、本来は電子部品のような用途のために開発されているので、これをバイオセンサとして利用するには100%の要求に応えることは必ずしもできない。例えば、バイオセンサの場合どうしても水溶液に浸さなければならないので、電解質の侵食や水溶液中での安定性などにおいて限界がある。バイオセンサは、生化学と電子デバイスの融合された技術であるがその接点においてどうしてもバイオ側の歩み寄りが大きいようにおもわれる。ISFETにおいても、シリコン基板にまずガラスのような半導体材料になじみやすいものを利用している。そこで、電子デバイスをバイオ側に歩み寄れないだろうか考える。大きくは、バイオチップのことを指すかもしれないが、ここでは現実的な物を考えている。それは、生体は有機物であるので有機物を利用したデバイスを考案したい。有機物には絶縁体が多い中、最近では導伝性の有機分子も多く研究されているのでそれを利用したいと考えている。また、バイオは液相をどうしても避けられないので、液体そのものをデバイス化できないであろうかと考えられる。

酵素や抗体のような生体物質は、失活することは避けられない。生体内では、新陳代謝

によってすぐに新しい物質が分泌される。「生体に学べ」という言葉を100%受け取って、生体の全てを利用することは必ずしも正しくない。例えば、抗体の分子認識機能を利用することは正しいがだからといって抗体そのものを用いるのはあまり得策でもない。分子認識の役目を果たすのは、抗原認識部位の極一部のアミノ酸配列である。Fc部は免疫システムの中では有益な役割を果たしているが、*in vitro*では無用の長物である。したがって、生体の優れた機能を一部絞りこんで人工的に作ることがよいのではないかと思う。

以上取り留めのない考察であったが、免疫センサの夢を失わずに今後の研究に励みたいと思う。

謝辞

研究者あるいは教育者としての手本を自ら示して下さい、多くの御指導御鞭撻頂きました指導教官 斎藤正男教授に深く感謝致します。3年前突然押し掛けて行ったにもかかわらず暖かく迎えて下さいましたことにも感謝致します。

また、研究生の中で様々な方面においてお世話になりました渡辺瞭助教授、池田研二博士に感謝致します。池田先生には本研究の回路の作製において懇切丁寧に御指導頂きました。

様々な雑務などにおいてよき環境を整えて下さいました、岩屋玉江女史、岩屋照子女史、宮川一枝女史に感謝致します。

榊裕之教授には、先生の御尽力で量子波プロジェクトでの貴重な体験をさせて頂きまして感謝致します。堀田収博士（松下電器）には、有機合成をはじめ多くの方面で御指導頂きましたので感謝致します。。

卒業研究、修士課程時代にお世話になりました、東京工業大学、末松安晴元学長、荒井滋久助教授、浅田雅洋助教授に感謝致します。

花尻達郎氏（河東田研）、松本善哉氏（東洋大学）にはXPSの測定においてたいへんお世話になりましたので感謝致します。

鈴木誠一博士には、実験をはじめ多くの方面でたいへんお世話になりましたので深くお礼を申し上げます。

研究室内においては、喜びも悲しみも楽しみも苦しみもわかち合いました、森反俊幸博士、星野聖博士、田中利幸博士、寄山陽二郎博士、余地寛氏、田谷紀彦氏、片山貴文氏、助川直伸氏、小林伸二氏、土井正幸氏、白石将氏、近藤秀幸氏、岡田久美子嬢、佐藤功一氏、鈴木信行氏に感謝致します。

ここまで、育てて頂きました両親にも感謝致します。

苦しく辛いことの多かった3年間でありましたが、これら多くの体験が今後の自分自身大きな恵みを与えてくれると思っております。医学部医用電子研究施設斎藤研究室での3年間のすべてに感謝を捧げつつ本論分を終えたいと思います。

参考文献

第1章の参考文献

- [1] P. Bergveld: "Development of an Ion-sensitive Solid-State Device for Neurophysiological Measurements," *IEEE Tran. Biomed. Eng.*, BME-17. 70/71, 1970.
- [2] P. Bergveld: "Development, Operation, and Application of the Ion-Sensitive Field-Effect Transistor as a Tool for Electrophysiology," *IEEE Tran. Biomed. Eng.*, BME-19. 342/351, 1972.
- [3] T. Matsuo and K. D. Wise: "An Integrated Field-Effect Electrode for Biopotential Recording," *IEEE Tran. Biomed. Eng.*, BME-21. 485/487, 1974.
- [4] 片柳幸夫, 中嶋秀樹, 松尾正之, 安斎順一, 長哲郎: "クラウンエーテルを用いた化学修飾形 ISFET の試作," *電子通信学会技術報告*, MBE84-74, 15/21, 1984.
- [5] S. D. Caras, D. Petelenz, and J. Janata: "pH-Based Enzyme Potentiometric Sensors. Part 2. Glucose-Sensitive Field Effect Transistor," *Anal. Chem.*, 57, 1920/1923, 1985.
- [6] S. D. Caras and J. Janata: "pH-Based Enzyme Potentiometric Sensors. Part 3. Penicillin-Sensitive Field Effect Transistor," *Anal. Chem.*, 57, 1924/1925, 1985.

第2章の参考文献

- [1] I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male: *Immunology 2th*, Gower, NY, 1989.
- [2] 井口三重, 井口傑: *免疫学入門 (改訂2版)*, オーム社, 1990.
- [3] 後藤正男: *生体素子を用いた FET バイオセンサの開発*, 東京大学学位論文, 1991.
- [4] *サイエンス別冊 81, エイズへの挑戦*, 日経サイエンス社, 1987.
- [5] *化学*, 化学同人, Nov., 47, 1992.
- [6] 猪子英俊 編著: *移植と免疫*, 中外医学社, 1993.
- [7] *月刊新医療*, エム・イー振興協会, Feb., 21, 1994.
- [8] N. Yamamoto, Y. Nagasawa, S. Shuto, and H. Tsubomura: "Potentiometric and Spectroscopic Investigation of the Reaction of Fluorescein Isothiocyanate with an Amine Chemically Bound on Solid Surfaces," *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 54, 323/326,

- 1981.
- [9] I. Taniguchi, I. Tsuji, H. Eguchi, K. Yasukouchi, T. Fujiyasu, and M. Unoki: "Potentiometric Human Chorionic Gonadotropin (hCG) Sensor Based on Monoclonal Antibody Immobilized Polytyramine Modified Electrode," *DENKI KAGAKU*, No.9, 785/789, 1988.
- [10] 山本直登, 首藤定伸, 坪村宏: 化学修飾したチタン電極による生体物質の検出と電極の性質, *日本化学会誌*, No.10, 1562/1567, 1980.
- [11] R. L. Solsky and G. A. Rechnitz: "Preparation and Properties of an Antibody-Selective Membrane Electrode," *Anal. Chim. Acta.*, **123**, 135/141, 1981.
- [12] P. D'Orazio and G. A. Rechnitz: "Ion Electrode Measurement of Complement and Antibody Levels Using Marker-Loaded Sheep Red Blood Cell Ghosts," *Anal. Chem.*, **49**, 2083/2086, 1977.
- [13] K. Shiba, Y. Umezawa, T. Watanabe, S. Ogawa, and S. Fujisawa: "Thin-Layer Potentiometric Analysis of Lipid Antigen-Antibody Reaction by Tetrapentylammonium (TPA⁺) Ion Loaded Liposomes and TPA⁺ Ion Selective Electrode," *Anal. Chem.*, **52**, 1610/1613, 1980.
- [14] N. Yamamoto, Y. Nagasawa, S. Shuto, H. Tsubomura, M. Sawai, and H. Okumura: "Antigen-Antibody Reaction Investigated with Use of a Chemically Modified Electrode," *Clin. Chem.*, **26**, 1569/1572, 1980.
- [15] J. Boitieux, G. Desmet, and D. Thomas: "An Antibody Electrode Preliminary Report on a New Approach in Enzyme Immunoassay," *Clin. Chem.*, **25**, 318/321, 1979.
- [16] A. Seki, E. Tamiya, and I. Karube: "Sensitive Amplification Immunoassay for Human IgG and Anti-Human IgG by using an enzyme cascade system," *Anal. Chim. Acta.*, **232**, 267/271, 1990.
- [17] M. J. O'Sullivan, E. Gnemmi, D. Morris, G. Chierigatti, A. D. Simmonds, M. Simmonds, J. W. Bridges, and V. Marks. "Comparison of Two Methods of Preparing Enzyme-Antibody Conjugate: Application of These Conjugates for Enzyme Immunoassay," *Anal. Biochem.*, **100**, 100/108, 1979.
- [18] M. E. Meyerhoff and G. A. Rechnitz: "Electrode-Based Enzyme Immunoassaya Using Urease Conjugates," *Anal. Biochem.*, **95**, 483/493, 1979.

- [19] 芳賀信, 板垣宏, 岡野定輔: ドラッグセンサー—インシュリンの酵素免疫電極—, 日本化学会誌, No.10, 1549/1553, 1980.
- [20] I. Karube, T. Matsunaga, T. Satoh and S. Suzuki: "A Catalytic Immuno-Reactor for the Amperometric Determination of Human Serum Albumin," *Anal. Chim. Acta.*, **156**, 283/287, 1984.
- [21] M. Aizawa, A. Morioka, S. Suzuki, and Y. Nagamura: "Enzyme Immunosensor Amperometric Determination of Human Chorionic Gonadotropin by Membrane-Bound Antibody," *Anal. Biochem.*, **94**, 22/28, 1979.
- [22] I. Taniguchi, I. Tsuji, H. Eguchi, K. Yasukouchi, and M. Unoki: "Application of Polytyramine Modified Electrodes to Amperometric Enzyme Immunoassay for Human Immunoglobulin G," *DENKI KAGAKU*, No.12, 55/56, 1988.
- [23] M. Aizawa, A. Morioka, and S. Suzuki: "An Enzyme Immunosensor for the Electrochemical Determination of the Tumor Antigen α -Fetoprotein," *Anal. Chim. Acta.*, **115**, 61/67, 1980.
- [24] Y. Ikariyama, H. kunoh, and M. Aizawa: "Electrochemical Luminescence-Based Homogeneous Immunoassay," *Biochem. biophys. Res. Comm.*, **128**, 987/992, 1985.
- [25] Y. Ikariyama, S. Suzuki, and M. Aizawa: "Solid-Phase Luminescent Catalyst Immunoassay for Human Serum Albumin with Hemin as Labeling Catalyst," *Anal. Chim. Acta.*, **156**, 245/252, 1984.
- [26] J. V. Gent, P. V. Lamback, H. J. M. Kreuwel, G. J. Gerritsma, E. J. R. Sudholter, D. N. Reinhoudt and Th. J. A. Popma: "Chromoionophores in Optical Ion Sensors," *Sensors and Actuators*, **17**, 297/305, 1989.
- [27] C. P. Cockshott and S. J. Pacaud: "Compensation of an Optical Fibre Reflective Sensor," *Sensors and Actuators*, **17**, 167/171, 1989.
- [28] PH. M. Nellen and W. Lukosz: "Integrated Optical Input Grating Couplers as Chemo- and Immunoassays," *Sensors and Actuators*, **B1**, 592/592, 1990.
- [29] A. N. Sloper, J. K. Deacon, and M. T. Flanagan: "A Planar Indium Phosphate Monomode Waveguide Evanescent Field Immunosensor," *Sensors and Actuators*, **B1**, 589/591, 1990.
- [30] W. Lukosz, PH. M. Nellen, CH. Stamm and P. Weiss: "Output Grating Couplers on Planar waveguides as Integrated Optical Chemical Sensors," *Sensors and Actuators*,

- B1, 585/588, 1990.
- [31] S. M. Gautier, L. J. Blum and P. R. Coulet: "Alternate Determination of ATP and NADH with a Single Bioluminescence-based Fiber-optic Sensor," *Sensors and Actuators*, **B1**, 580/584, 1990.
- [32] B. J. Tromberg, M. J. Sepaniak, J. P. Alarie, T. Vo-Dinh and R. M. Santella: "Development of Antibody-Based Fiber-Optic Sensors for Detection of aBenzo[a]pyrene Metabolite," *Anal. Chem.*, **60**, 1901/1908, 1988.
- [33] H. Muramatsu, K. Kajiwara, E. Tamiya and I. Karube: "Piezoelectronic Immuno Sensor for the Detection of *Candida albican* Microbes," *Anal. Chim. Acta.*, **188**, 257/231, 1986.
- [34] H. Muramatsu, J. M. Dicks, E. Tamiya and I. Karube: "Piezoelectric Crystal Biosensor Modified with Protein A for Determination of Immunoglobulins," *Anal. Chem.*, **59**, 2760/2763, 1987.
- [35] H. Muramatsu, E. Tamiya and I. Karube: "Detectamination of Microbes and Immunogloblins Using a Piezoelectric Biosensor," *J. Membrane Sci.*, **41**, 281/290, 1989.
- [36] 孫曉春, 松井義和, 塩川祥子, 窪田寛: 表面プラズモンを用いた免疫センサ, 電子情報通信学会論文誌 C-2, **J74-C-2**, 443/449, 1991.
- [37] D. C. Cullen and C. R. Lowe: "A Direct Surface Plasmon-Polariton Immunosensor: Preliminary Investigation of the Non-specific Adsorption of Serum Components to the Sensor Interface," *Sensors and Actuators*, **B1**, 576/579, 1990.
- [38] M. Suzuki, E. Tamiya, T. Kataoka, T. Tokunaga, and I. Karube: "Rapid Detection of Leukemia Cells by Use of a Complement-Mediated Cytolytic Reaction and ab Imaging Sensor System," *Clin. Chem.*, **33**, 558/561, 1987.
- [39] 南波昭宏, 武者利光: ラテックス粒子の前方散乱光の直交偏光成分強度ゆらぎによる免疫反応の検出, *医用電子と生体工学*, **26**, 170/175, 1988.
- [40] F. Gardies and C. Martelet: "Feasibility of an Immunosensor Based upon Capacitance Measurement," *Sensors and Actuators*, **17**, 461/464, 1989.
- [41] J. Janata: "Chemical Selectivity of Field-Effect Transistors," *Sensors and Actuators*, **12**, 121/128, 1987.
- [42] S. Collins and J. Janata: "A Critical Evaluation of the Mechanism of Potential Response of Antigen Polymer Membrane to the Corresponding Antiserum," *Anal. Chim.*

- Acta., 136, 93/99, 1982.
- [43] R. B. M. Schasfoort, P. Bergveld, J. Bomer, R. P. H. Kooyman and J. Greve: "Modulation of the ISFET Response by an Immunological Reaction," *Sensors and Actuators*, 17, 531/535, 1987.
- [44] R. B. M. Schasfoort, C. E. J. M. Keldermans, R. P. H. Kooyman, P. Bergveld and J. Greve: "Competitive Immunological Detection of Progesterone by Means of the Ion-step Induced Response of an ImmunoFET," *Sensors and Actuators*, B1, 368/372, 1990.
- [45] M. Gotoh, M. Suzuki, I. Kubo, E. Tamiya, and I. Karube: "Immuno-FET Sensor," *J. Mole. Catalysis*, 53, 285/292, 1989.
- [46] 輕部征夫: 半導体加工技術を用いるマイクロバイオセンサー, *東京医学*, 96, 81/86, 1989.
- [47] 北原文雄, 渡辺昌 編: 界面電気現象, 共立出版, 1972.
- [48] 花井哲也: 膜とイオン, 化学同人, 1978.
- [49] 和田昭允 監修: CG でバイオ分子をみる, 東京化学同人, 1988.
- [50] H. Ohshima and S. Ohki: "Donnan Potential and Surface Potential of a Charged Membrane," *Biophys. J.*, 47, 673/678, 1985.

第3章の参考文献

- [1] 飯島正行, 高橋善和: "蒸着重合法による高分子薄膜の作成と応用," *IONICS*, 7, 53/56, 1990.
- [2] 長田義仁, 角田光雄, 中島薫, 宮村雅隆, 森田慎三: プラズマ重合, 東京化学同人, 1986.
- [3] 旗野嘉彦 編: プラズマ理工学ハンドブック, オーム社, 1990.
- [4] H. Yasuda: "Glow Discharge Polymerization," *J. Poly. Sci. Macromole. Rev.*, 16, 199/293, 1981.
- [5] J. M. Tibbitt, M. Shen and A. T. Bell: "Structural Characterization of Plasma Polymerized Hydrocarbones," *J. Macromol. Sci.*, A-10, 1623, 1976.
- [6] N. Inagaki, S. Kondo, M. Hirata and H. Urushihara: "Plasma Polymerization of Organosilicon Compounds," *J. Appl. Poly. Sci.*, 30, 3385/3395, 1985.
- [7] 坂田二郎, 山本豊, 平井正名: "プラズマ重合膜の気体透過性に及ぼす重合条件の影響," *高分子論文集*, 45, 499/503, 1988.

- [8] D. Brosset, Bui Ai and Y. Segui: "New method of GaAs passivation with thin polymer films," Appl. Phys. Lett., **33**, 87/89, 1978.
- [9] Z. Ogumi, Y. Uchimoto and Z. Takehara: "Tonically Conductive Thin Polymer Film Prepared by Plasma Polymerization," J. Electrochem. Soc., **136**, 625/630, 1989.
- [10] Z. Ogumi, Y. Uchimoto and Z. Takehara: "A New Thin Film of Solid Polymer Electrolyte Prepared by Plasma Polrmerization," Chem. Lett., 1811/1814, 1988.
- [11] I. Tajima and M. Yamamoto: "Spectroscopic Study on Chemical Structure of Plasma-Polymerized Hexamethyldisiloxane," J. Poly. Sci. Poly. Chem., **23**, 615/622, 1985.
- [12] V. Krishnamurthy and Ihab L. Kamel: "Fourier Transform Infrared Analysis of Plasma-Polymerized Hexamethyldisiloxane," J. Appl. Poly. Sci., **38**, 605/618, 1989.
- [13] P. K. Tien, G. Smolinsky and R. J. Martin: "Thin Organosilicon Films for Integrated Optics," Appl. Opt., **11**, 637/642, 1972.
- [14] 水谷照吉: "プラズマ重合膜の電気物性," 静電気学会誌, **13**, 477/484, 1989.
- [15] 神保泰彦: プラズマ技術を利用した有機機能性薄膜の作成とその生体計測への応用, 東京大学学位論文, 1988.

第4章の参考文献

- [1] 筏義人 編: 高分子表面の基礎と応用 (上), 化学同人, 1986.
- [2] 日本化学会 編: 表面の改質, 化学総説, **44**, 1984.
- [3] J. R. Hollahan, B. B. Stafford, R. D. Falb and S. T. Payne: "Attachment of Amino Group to Polymer Surface by Radiofrequency Plasmas," J. Appl. Poly. Sci., **13**, 807/816, 1969.
- [4] D. Briggs and M. P. Seah: Practical Surface Analysis by Auger and X-ray Photoelectron Spectroscopy, John Wiley & Sons Ltd., 1983,
- [5] D. S. Everhart and C. N. Reilley: "Chemical Derivatization in Electron Spectroscopy for Chemical Analysis of Surface Functional Group Introduced on Low-Density Polyethylene Film," Anal. Chem., **53**, 665/676, 1981.
- [6] D. Deme, O. Durieu-Trautmann and F. Chatagner: "The Thiol Group of Rat Liver Cystathionase: Influence of Pyridoxal phosphate, *L*-Homoserine and *L*-Alanine on the Effect of *p*-Chloromercuribenzoate and 5.5'-Dithiobis-(2-nitrobenzoate) on the Enzyme., **20**, 269/275, 1971.
- [7] H. Yasuda and C. E. Lamaze: "Preparation of Reverse Osmosis Membrane by Plsama

- Polymerization of Organic Compounds," J. Appl. Poly. Sci., 17, 201/222, 1973.
- [8] H. Yasuda, H. C. Marsh, E. S. Brandt and C. N. Reilley: "Preparation of Composite Reverse Osmosis Membrane by Plasma Polymerization of Organic Compounds. 4. Influence of Plasma-Polymer (Substrate) Interaction," J. Appl. Poly. Sci., 20, 543/555, 1976.
- [9] I. Tajima, T. Suda, M. Yamamoto, K. Satta, and H. Morimoto: "A Solid-State ^{13}C and ^{15}N NMR Study of Plasma Polymerized Acrylonitrile," Poly. J., 20, 919/922, 1988.
- [10] 穂積啓一郎, 北村桂介, 北出達也, 栗山みつる, 武河亜木子, 藤井久美: "アリルアミンをモノマーとするプラズマ重合膜の化学構造," 高分子論文誌, 42, 55/91, 1985.
- [11] K. Hozumi, K. Kitamura, H. Hashimoto, T. Hamaoka, H. Fujisawa, and T. Ishizawa: "Spectroscopic Elucidation of Chemical Structure of Plasma-Polymerized Pyridine," J. Appl. Poly. Sci., 28, 1651/1655, 1983.
- [12] A. T. Bell, T. Wydeven and C. C. Johnson: "A Study of the Performance and Chemical Characteristics of Composite Reverse Osmosis Membrane Prepared by Plasma Polymerization of Allylamine," J. Appl. Poly. Sci., 19, 1911/1930, 1975.
- [13] D. Briggs and C. R. Kendall: "Derivatization of discharge-treated LDPE: an extension of XPS analysis and a probe of specific interactions in adhesion," Int. J. Adhesion Adhesives, 13/17, 1982.
- [14] R. G. Nuzzo and G. Smolinsky: "Preparation and Characterization of Functionalized Polyethylene Surfaces," Macromolecules, 17, 1013/1019, 1984.
- [15] C. D. Wagner: Handbook of X-ray Photoelectron Spectroscopy," Perkin-Elmer Corporation Edenprairie Minnesota.
- [16] D. A. Olsen and A. J. Osteraas: "Sulfur Modification of Polyethylene Surfaces," J. Poly. Sci. Part A-1, 7, 1913/1932, 1969.
- [17] P. C. Jocelyn: Biochemistry of the SH group, Academic Press, London, 1972.
- [18] R. D. Falb, R. I. Leininger, J. P. Crowley: Ann. N. Y. Acad. Sci., 283, 396, 1977.
- [19] E. Stenhagen, S. Abrahamsson and F. W. McLafferty: Registry of Mass Spectral Data, John Wiley & Sons, Ink., 1974.
- [20] A. Cornu and R. Massot: "Compilation of Mass Spectral Data," Heyden & Son Limited, 1966.

第5章の参考文献

- [1] 千畑一郎編：固定化酵素，講談社サイエンティフィック，1975.
- [2] I. Roitt, J. Brostoff, and D. Male: Immunology 2th, Gower, NY, 1989.
- [3] P. Bagchi and S. M. Birnbaum: "Effect of pH on the Adsorption of Immunoglobulin G on Anionic Poly(vinyltoluene) Model Latex Particles," J. Colloid Interface Sci., **83**, 460/478, 1981.
- [4] 石川栄治，河合忠，宮井潔：酵素免疫測定法，第3版，医学書院，1987.
- [5] 電気泳動学会 編：新版 電気泳動実験法，東京文光堂本郷，1989.
- [6] H. Shirahama, K. Suzuki, and T. Suzawa: "Bovine Hemoglobin Adsorption onto Polymer Latices," J. Colloid Interface Sci., **129**, 483/490, 1989.
- [7] Pharmacia: Affinity Chromatography principles & methods, 1988.

第6章の参考文献

- [1] T. Matsuo and M. Esashi: "Methods of ISFET fabrication," Sensors & Actuators, **1**, 77/80, 1981.
- [2] H. Abe, M. Esashi, and M. Matsuo: "ISFETs using inorganic gate thin films," IEEE Trans. Electron Devices, **ED-26**, 1939/1948, 1979.
- [3] P. Bergveld, N. F. DeRooji, and J. N. Zemel: "Physical mechanisms for chemically sensitive semiconductor devices," Nature, **273**, 438/443, 1978.
- [4] T. Matsuo and H. Nakajima: "Characteristics of reference electrodes using a polymer gate ISFET," Sensors & Actuators, **5**, 293/305, 1984.
- [5] W. M. Siu and R. S. C. Cobbold: "Basic Properties of the Electrolyte-SiO₂-Si System; Physical and Theoretical Aspects," IEEE Trans. Electron Devices, **ED-26**, 1805/1815, 1979.
- [6] M. Gotoh, M. Suzuki, I. Kubo, E. Tamiya, and I. Karube: "Immuno-FET Sensor," J. Mole. Catalysis, **53**, 285/292, 1989.
- [7] 宮原裕二，塩川祥子，森泉豊栄，松岡英明，輕部征夫，鈴木周一： "半導体技術を用いたバイオセンサ，" 電子通信学会技術研究報告，電子材料，**CPM91-93**, 61/68. 1982.

本研究に関する公表

【原著論文】

H. Muguruma and M. Saito,

"Introduction of thiol(SH) group to polymer surface by exposure to ethanedithiol RF plasma,"

Japan. J. Appl. Phys. (投稿中)

六車仁志、斎藤正男

「硫黄原子を含むRFプラズマを利用したポリエチレン表面へのチオール基の導入」
高分子論文集 (投稿予定)

H. Muguruma, K. Ikeda and M. Saito,

"Measurement of surface potential of plasma-polymerized film immobilized by Antibody," Frontiers of Medical and Biological Engineering, (投稿予定)

【国際会議】

H. Muguruma, T. Hanajiri and M. Saito,

"Study of introduction methods of amino or thiol(SH) group to polymer surface by exposure to new reactive plasma,"

Proceedings of the 2nd International Conference on Reactive Plasmas and 11th Symposium on Plasma Processing,
pp. 491-494, Yokohama, Japan, Jan. 1994.

【大会発表】

六車仁志、小林伸二、岡田久美子、近藤秀幸、鈴木誠一、田中利幸、斎藤正男

" プラズマ重合膜を用いた免疫センサ実現のための表面電位の測定"

第39回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集 29p-N-10 千葉 1992年3月

六車仁志、花尻達郎、斎藤正男

" RFプラズマによるポリマー表面へのSH基の導入"

第40回応用物理学関係連合講演会 講演予稿集 1p-ZK-7 東京 1993年3月

六車仁志、鈴木誠一、斎藤正男

" 免疫センサのための配向固定化した抗体固定化膜の表面電位変化による抗原抗体反応の高感度検出の効果"

第32回日本M E学会大会論文集 2-4-166 山梨 1993年5月

六車仁志、斎藤正男

" 非特異吸着を考慮したISFET型免疫センサの動作解析"

第9回エル・エス・ティ学会大会 B-1 東京 1993年11月

付録

SDSポリアクリルアミド電気泳動による抗体Fab'の確認

使用する試薬の略名

AA:アクリルアミド BIS:N,N'-メチレンビスアクリルアミド

Tris:トリスヒドロキシメチルアミノメタン

SDS:ドデシル硫酸ナトリウム APS:過硫酸アンモニウム

TEMED:N,N,N',N'-テトラメチルエチレンジアミン

CBB:クマシブリリアントブルー BPB:プロモフェノールブルー

ゲルの作製

A液 AA22.5g BIS0.6g 水を加えて100ml

B₁液 0.5mol/l pH6.8 トリス塩酸緩衝液

B₂液 1.5mol/l pH8.8 トリス塩酸緩衝液

C液 SDS10%溶液

D液 APS10%溶液

スタックゲル:

A液 2.0ml, B₁液 2.3ml, C液 0.09ml, D液 0.09ml, TEMED 0.02ml, 水 4.7ml

セパレートゲル:

A液 13ml, B₂液 6.0ml, C液 0.24ml, D液 0.18ml, TEMED 0.05ml, 水 4.8ml

それぞれ上記の様に薬品を混合してゲルを作製

試料の作製

タンパク質 0.5~4.0mg/mlの濃度の溶液0.5mlに、C液 0.2ml,メルカプトエタノール0.05mlを混合して、沸騰水に3分暖める。0.2%BPB液0.05ml、シヨ糖少々加える。

電気泳動 (図A-1参照)

泳動バッファ: Tris 3g グリシン14.4g SDS 1g 水を加えて1l

泳動時間約3時間

染色液に1時間浸す

脱色液に一晩浸す

染色液 0.25% CBB液 (メタノール:酢酸:水=5:1:5)

脱色液 酢酸:エタノール:水=1:2:7

泳動試料

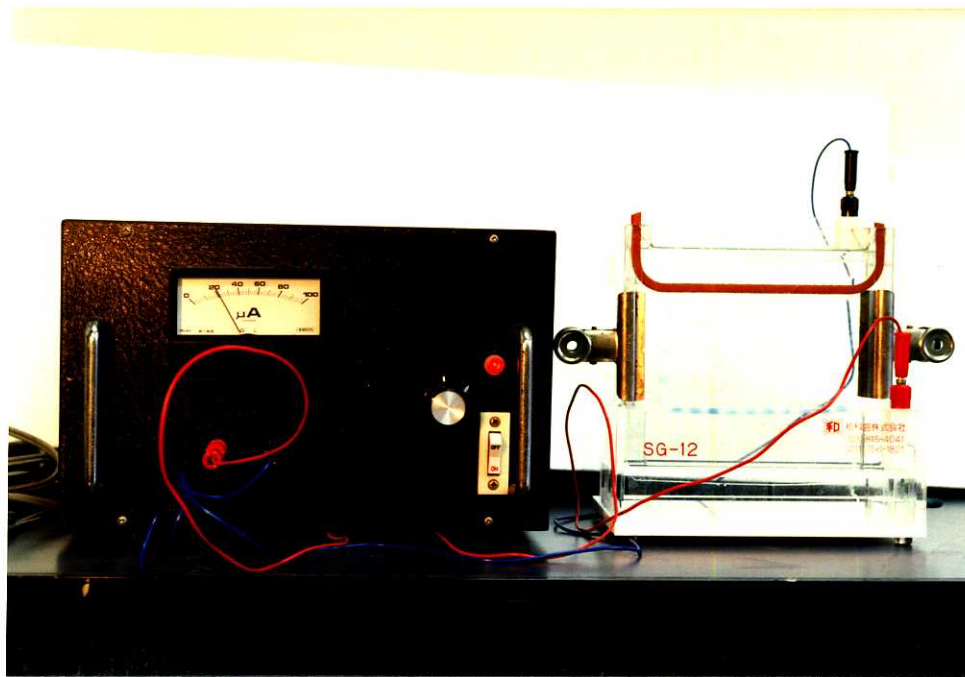
「試料の作製」に書いた処理をした試料

1. Fab'-SH (メルカプトエチルアミン処理) 46kD
2. F(ab')₂ (メルカプトエチルアミン処理無し) 92kD
3. 抗体分子そのもの 146kD

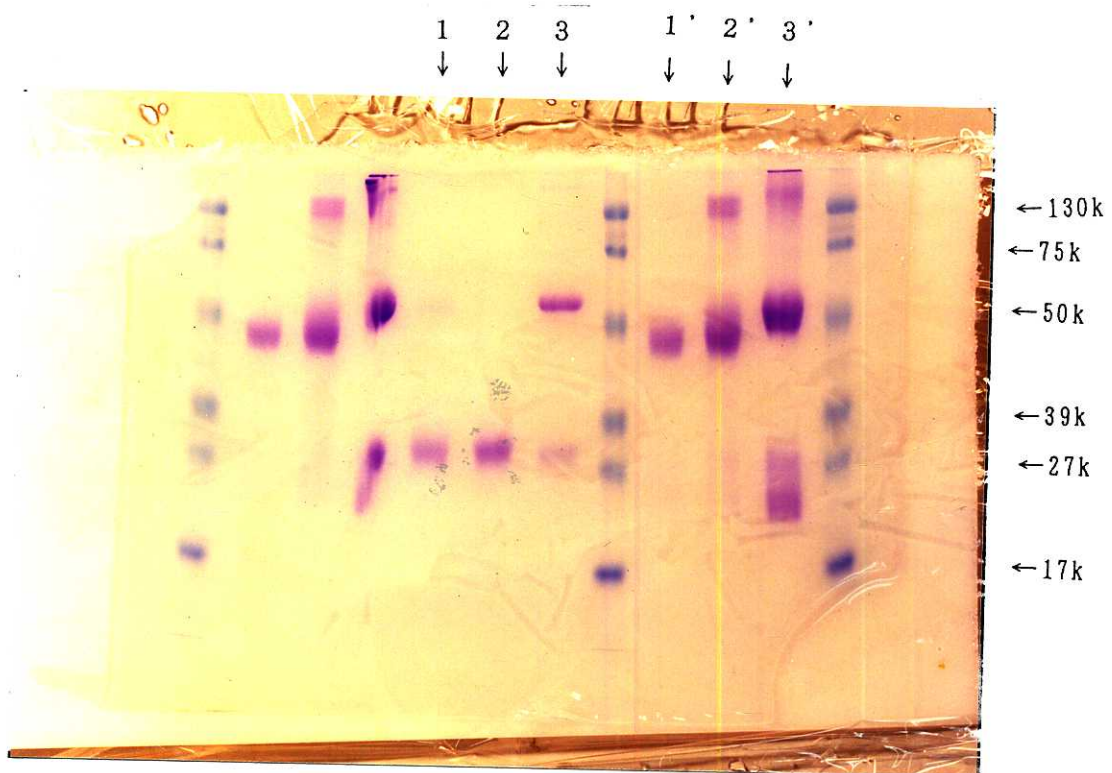
「試料の作製」に書いた処理でメルカプトエタノール処理を除いた試料

- 1'. Fab'-SH (メルカプトエチルアミン処理) 46kD
- 2'. F(ab')₂ (メルカプトエチルアミン処理無し) 92kD
- 3'. 抗体分子そのもの 146kD

泳動結果は図A-2に示す。試料1と試料2は、抗体のL鎖に相当する23kDのみにバンドが出た。試料3は、抗体のH鎖に相当する50kDのバンドが出た。これは、メルカプトエタノールの処理により全てのSS結合(図5-2参照)が還元されるからであろう。この処理をしない試料1'と試料2'では、Fab'フラグメントに相当する46kDにバンドが出た。試料2'ではさらにF(ab')₂に相当する92kDにもバンドが出ている。これらの結果よりFab'-SHの構造が確認された。



図A-1 電気泳動装置



図A-2 泳動結果