

THE KANTO CHEMICAL CO., INC. CHEMICAL TIMES

2013 No.4 (通巻230号)

ISSN 0285-2446

含フッ素化合物を用いたナノインプリントリソグラフィ用離型材料の開発	山下 恒雄 森田 正道	2
マイクロ波加熱の化学反応への適用：貴金属ナノ粒子の合成	國井 勝之 和田 雄二	7
新・私の古生物誌(10) — 生きている化石ヘラチョウザメ —	福田 芳生	12
ViewaBlue® Stain KANTO染色によるアガロースゲルからのDNA回収における問題点の解消 高橋 宏和 松本 敦子 金原 浩子 杉山 滋 小堀 俊郎 山崎 裕之 千室 智之 小林 崇良		19
最近のトピックス		24



含フッ素化合物を用いた ナノインプリントリソグラフィ用離型材料の開発

Novel Fluorinated Compounds as Release Materials in Nanoimprint Lithography

ダイキン工業株式会社 化学研究開発センター 研究員 山下 恒雄

TSUNE YAMASHITA

主任研究員 森田 正道

MASAMICHI MORITA

Chemical R&D Center, Daikin Industries, Ltd.

1. はじめに

1995年にS.Chou教授(プリンストン大)により提唱された「ナノインプリント」¹⁾は、ガラス転移点(T_g)以上に加熱したガラスや熱可塑性ポリマーにあらかじめナノメートルスケールのパターンを刻んだモールドを押し付け、その後冷却する熱ナノインプリントで50nm以下のパターンが容易に形成できることを示した。現在では紫外線硬化材料(モールド材料)に石英やニッケル(Ni)電鍍、酸化アルミニウムなどのモールドを押し付けた後、紫外線を照射する紫外光(UV)ナノインプリントが主流になってきている。この事は、ナノインプリントがLEDの高輝度化、ディスプレイ用光学フィルム、次世代のハードディスク(HDD)であるビットパターンドメディア(BPM)等の応用分野で実用化段階に入り、またロールトゥーロール(R to R)による連続パターンニング方法の進歩により生産性向上・大面積化・パターンの微細化が進んでいる事を示している。

その中でG.Willson教授(テキサス大)は2001年Molecular-Imprints Inc.(MII)を立ち上げ、インクジェット技術を活用したJet and Flash Imprint Lithography(J-FIL)装置とレジスト材料を開発し2Xnm以降1X~Xnmノードを目指したナノインプリントリソグラフィ(NIL)の実用化を推進した。その結果、次世代リソグラフィ技術(NGL)が要求する解像性や欠陥減少を達成し²⁾、極端紫外光(EUV:Extra Ultraviolet)や誘導型自己組織化(DSA:Directed Self Assembly)と比肩するほど大きく進展している。

その一方、様々な応用分野で実用化が近づくにつ

れて生産性向上や欠陥減少の要因である離型性の向上が強く望まれる課題となってきた。我々は石英や酸化アルミモールド用離型処理剤としてパーフルオロポリエーテル(PFPE)、主鎖としてシランカップリング基を導入したオプツールDSX、Ni電鍍テンプレート用にオプツールHD2100を商品化³⁾しているが、工業的な量産適応に伴い耐久性^{4),5)}や離型性の向上要求が厳しさを増している。そこで我々が培ってきた含フッ素材料を利用した撥液レジストの技術⁶⁾や界面活性剤の技術を応用し、レジストやインプリント材料に添加することで離型性を向上できる材料を設計することとなった。本稿では、UV-NILで最も重要な課題とされる離型に着目し、各種のフッ素材料を用いた基礎的な材料開発の検討に関して報告する。

2. ナノインプリント離型処理方法

ナノインプリントでは加工サイズが小さくなる、パターンが複雑になる、またアスペクト比が大きくなるほど離型性能の向上が求められる。現在、離型処理方法として主に図1に示すものが提案されている。モールドとレジスト(又はモールド樹脂)に離型処理を施さない場合(タイプ1)、モールドをリリースする時にパターンが壊れテンプレートに付着して欠陥やモールドの汚染の要因となり、大きな離型力がかかるため基板からの剥離が起こる。これらは欠陥となり製品の歩留まりを著しく低下させる。その解決方法が各研究機関やメーカーで開発されている⁷⁾。我々はタイプ2、タイプ3、タイプ4の処理方法に用いられる含フッ素材料の製品化ならびに開発を行っ

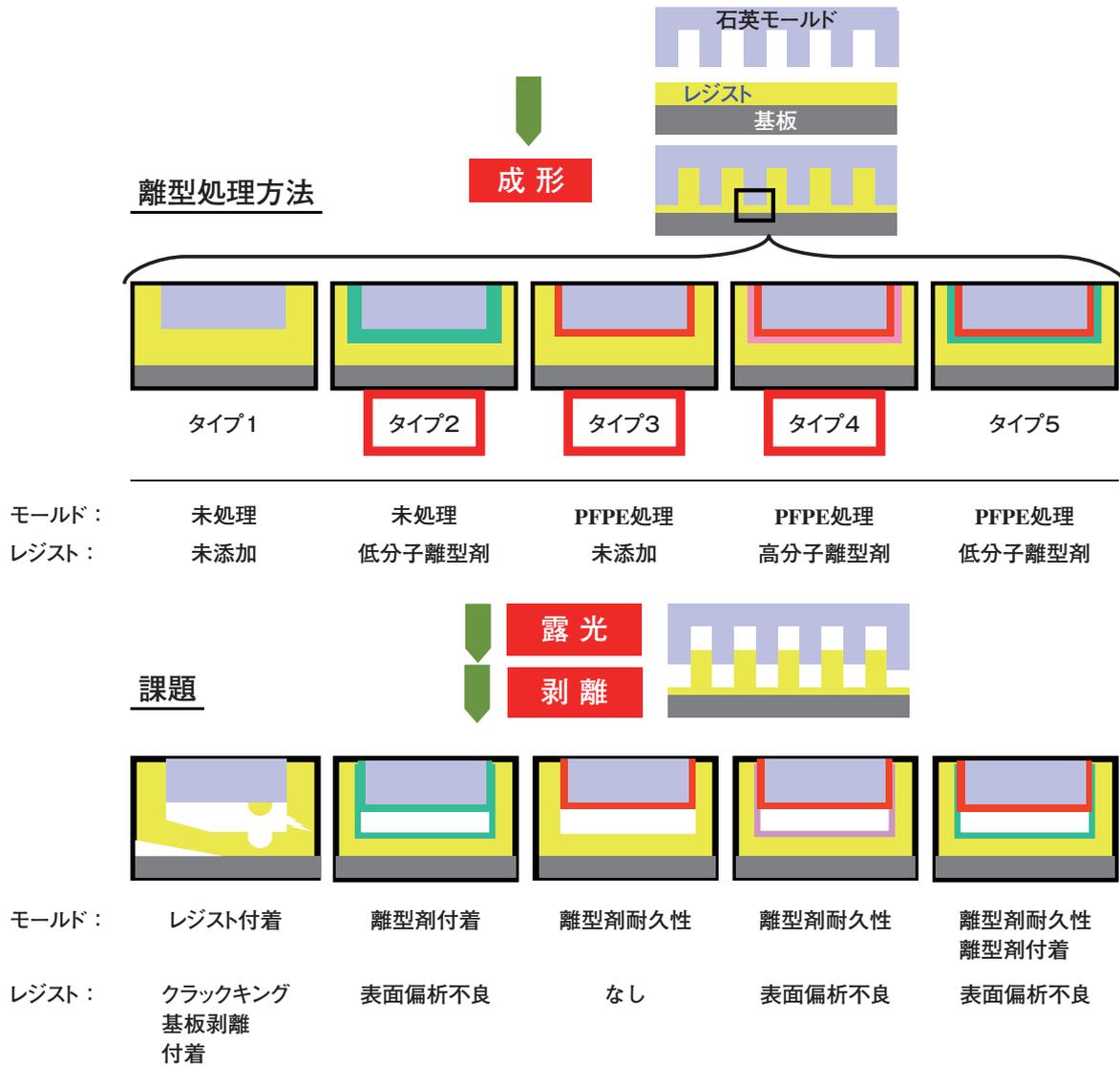


図1 ナノインプリント離型処理方法の概要

ている。

以下各タイプの離型材料開発の現状を述べる。

3. モールド塗布型離型剤

パーフルオロポリエーテル (PFPE) を主鎖としシランカップリング基を導入したオプツールDSX (ダイキン工業社製)、Ni電鍍モールド用にオプツールHD2100 (ダイキン工業社製) はモールド塗布型の離型剤としてデファクトスタンダードとなっている。この材料の離型機構は図2に示すように数Åの薄膜が基材と親油性材料 (モノマー等) との接触を防ぐ界面を形成することで基板にモノマーやポリマーが付着する事を防いでいる。

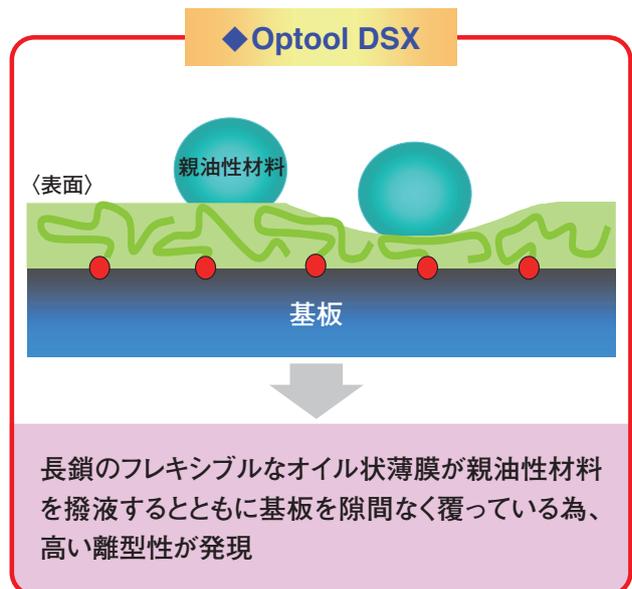


図2 オプツールDSXの離型機構

またPFPE表面特有の優れた動的静的接触角から表面自由エネルギーが低くなる事がわかり(表1)、硬化樹脂は高い表面自由エネルギーであるため両者の界面がより離型し易くなる。

表1 オプツールDSXの静的ならびに動的表面性能

測定項目	単位	未処理ガラス	直鎖系パーフルオロ処理剤	Optool DSX
耐水接触角	度	<10	110	115
耐オイル転落角	度	(90)	24	3
動摩擦係数		0.57	0.34	0.13
粘着テープ剥離力 =離型性	N	3.62	2.35	0.93

この二つの効果の相乗作用により高い離型性が発現されている。しかし、近年UV-NILにおいて光照射時に発生するラジカルをPFPEの炭素-酸素結合が吸収することが電子スピン共鳴分析(ESR)で確認され⁴⁾、またUV-NILによる連続パターン形成において1000回以下で石英モールド表面のPFPE鎖が消失することが報告された⁵⁾。そのため、より耐久性の高いモールド用離型剤の開発が望まれている。

4. 含フッ素共重合体型離型剤(タイプ4)

含フッ素共重合体型離型剤はこれまでのフッ素系離型剤(低分子)と違い、モールドへの転写が起こらず、またレジスト硬化時に発生するラジカル種からモールドの離型処理層を保護し耐久性が向上する効果が見込まれる。また長鎖パーフルオロアルキル基を用いずC₄F₉を側鎖とする α Clアクリレートの主モノマーとした環境対応型でもある(図3)。

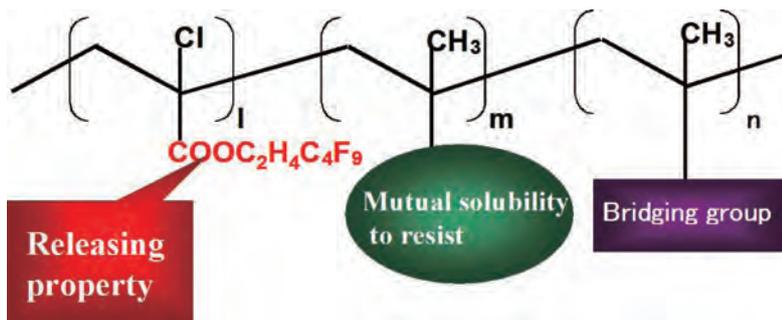


図3 含フッ素共重合体型離型剤の基本構造

我々は、UV-NILへの適用を目指し、種々の光硬化性モノマーに溶解するよう設計した含フッ素共重合体を合成した。含フッ素モノマーは離型性能を受け持ち、レジストやインプリント材料に溶解させるため共重合モノマーの種類とモノマー比率を合わせ込むテラーメドを基本コンセプトとしている。

表2 含フッ素共重合体のn-HDに対する静的接触角とPAK-02に対する溶解性

RUN	含フッ素共重合体組成 (mass%)						静的接触角 (n-HD)	PAK-02への溶解性 (mass%)
	Rf (C4) α Cl acrylate	iBMA	TM-0701T	TISMA	GMA	HEMA		
1	60	40					64	0.5
	60	30			10		62	-
2	60	30			5	5	61	-
3	45	55					62	1.0
4	45	45			10		61	0.5
	45	45			5	5	59	0.5
	30	70					60	2.0
	60	40					63	0.5
6	45	55					61	0.5
7	30	70					59	0.5
	30	60			10		59	-
	60			40			65	-
8	45			55			63	1.0
	30			70			61	1.0

iBMA : Isobolnyl methacrylate
 TM-0701T (JCN K. K.)
 TISMA : 3-(Triisopropoxysilyl)propyl methacrylate
 GMA : Glycidyl methacrylate
 HEMA : 2-Hydroxyethyl methacrylate

この含フッ素共重合体をシリコンウエハーに100nm程度の膜厚になるようスピコートし、乾燥後のノルマルヘキサデカン(n-HD)に対する静的接触角を測定した(表2)。その結果、非常に高い撥油性を示す事がわかった。またUVナノインプリント用樹脂PAK-02(東洋合成工業社製)への溶解性を測定したところ0.5~2.0mass%を示す含フッ素共重合体が見出された。PAK-02に対して溶解する含フッ素共重合体を表3に示した量を添加しスピコートして薄膜を作成、大気下で高圧水銀灯により1000mJ/cm²

照射して硬化後の n-HD に対する静的接触角を測定した。その結果、含フッ素共重合体未添加の PAK-02 は 26° と親油性を示したのに対して、添加した硬化体表面はほぼ含フッ素共重合体単独と同等の撥油性を示した。

表3 含フッ素共重合体型離型剤添加による撥油性向上効果

RUN	含フッ素共重合体	添加量 (mass%)	静的接触角 (n-HD)
1	Rf(C4)/iBMA=60/40	0.5	52
2	Rf(C4)/iBMA/GMA/HEMA=60/30/5/5	0.5	48
3	Rf(C4)/iBMA=45/55	1.0	56
4	Rf(C4)/iBMA/GMA=45/45/10	0.5	46
5	Rf(C4)/iBMA=30/70	2.0	55
6	Rf(C4)/TM-0701T=45/55	0.5	43
7	Rf(C4)/TM-0701T=30/70	1.0	54
8	Rf(C4)/TISMA=45/55	1.0	61
PAK-02	—	—	26

含フッ素共重合体型離型剤の添加量は塗布する主材料に対して数 mass% 程度であり、硬化体の表面が高い撥油性を示したことは添加した量の殆どが表面に偏析している事を示す。我々は表面に偏析した含フッ素共重合体層の厚みを斜め切削、飛行時間型二次イオン質量分析 (TOF-SIMS) の測定により数 nm であることを明らかとしている。また兵庫県立大学松井教授のグループは X 線光電子分光法 (XPS) により 3nm 以下であると報告している⁶⁾。このように主材料の膜厚に対して非常に薄い膜を形成するため、離型性を付与しながら主材料の性能を損なわない。表面に偏析させるには基板と表面との表面自由エネルギー差が大きくかつ表面側の表面自由エネルギーが低いほどよく偏析する。この偏析をコントロールする分子設計と工程が重要なファクターとなる⁸⁾。現在、複数社にてタイプ 3+タイプ 4 の実用化検討が進んでいる。今後、含フッ素共重合体が表面に偏析することで光硬化中に発生するラジカルとモールド離型剤との接触を妨げる効果、つまり ArF 液浸リソグラフィーで用いられるトップコートレスレジストと同様の機構を示す事が分かれば、現在のモールド離型剤の課題である耐久性の向上の一助になる可能性がある。

5. 含フッ素低分子型離型剤(タイプ2)

本材料は 1Xnm 以下シングルナノメーターと称されるパターンニング、例えば次世代半導体などにおいて利用するために必要とされる。PFPE によるモールド離型処理層は数 Å の皮膜を形成するため、その厚みのばらつきがシングルナノメーターパターンニングでは線幅 (CD) の均一性に大きく影響する。そこでモールド離型処理を行わず、主材料に添加するだけで離型性を発揮する材料が望まれている。しかし通常の界面活性剤系添加剤を離型剤として利用する場合 2 つの問題点がある。一つはモールド表面に付着する事によるモールドやパターンの汚染、これは欠陥の原因となる。もう一つは表面張力が低下することによりレジストやインプリント材料を塗布する工程において大きな問題を発生する。例えば上記インクジェット方式を採用した J-FIL ではインク滴の径が不揃いになり、また滴下後目的とした範囲以上に広がってしまう。我々は下記に示すコンセプトで新しい材料設計を行い、表 4 に示す化合物を合成した。

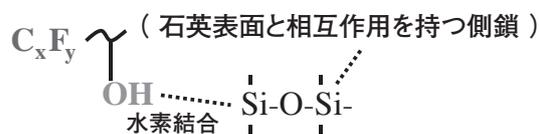
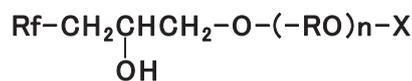


表4 新規含フッ素低分子化合物の構造

RUN	Rf	R			X
		C ₂ H ₄	C ₂ H ₄ +C ₃ H ₆ ブロック 共重合体	C ₃ H ₆	
DSN-403N	C ₆ F ₁₃	非開示	-	-	非開示
1	C ₆ F ₁₃	Mw=200	-	-	Rf and OH
2	C ₆ F ₁₃	Mw=1000	-	-	Rf and OH
3	C ₄ F ₉	Mw=200	-	-	Rf and OH
4	C ₄ F ₉	Mw=400	-	-	Rf and OH
5	C ₆ F ₁₃	-	Mw=1250	-	Rf and OH
6	C ₆ F ₁₃	Mw=350	-	-	OCH ₃
7	C ₄ F ₉	Mw=400	-	-	Rf and OH
8	C ₄ F ₉	-	Mw=1250	-	Rf and OH
9	C ₄ F ₉	Mw=350	-	-	OCH ₃
10	C ₄ F ₉	-	-	Mw=200	Rf and OH
11	C ₄ F ₉	-	-	Mw=400	Rf and OH



その結果、離型性を発現しながら表面張力の低下を抑制する材料を見出した(表5)。主材料に東洋合成社製PAK-02を用い、比較例として高い溶解性と優れた離型性能を示したフッ素系界面活性剤ユニダインDSN-403N(ダイキン工業社製)を用いた。離型性能はいずれの化合物もDSN-403Nとほぼ同等であったが

添加後の表面張力低下が抑制されている事がわかる。表面張力低下抑制と構造の相関は1)フッ素鎖を短くする(C₆→C₄)、2)ポリエチレンオキシドをポリプロピレンオキシドに変える、3)末端はメチルなどでキャップする、ことで効果がある。今後、モールドへの離型剤の付着が発生するか、定量的な離型力の評価を行う。

表5 新規含フッ素低分子離型剤のPAK-02に対する溶解性と2.0mass%添加時の表面張力と離形性

化合物	溶解性(mass%)			表面張力 mN/m	離型性*
	1.0	3.0	5.0		
5	○	○	○	26	良好
8	○	○	○	27	良好
9	○	○	○	27	良好
10	○	○	○	27	良好
11	○	○	○	27	良好
DSN-403N	○	○	○	14	良好
PAK-02	—	—	—	28	不良

* : 良好=基板・モールドに残渣なし
不良=基板・モールドに残渣あり

5. おわりに

近年急速に実用化に向けてナノインプリント技術開発が進む中で、「離型」という課題に対しての我々が行っている取り組みを述べてきた。

次世代の微細パターン形成技術や次世代リソグラフィ技術としてのナノインプリントは電子・電気に止まらず医療、ライフサイエンスやエネルギー分野など多様な応用が検討されている。その中でハード面ではロールトゥーロール(R to R)プロセスによる大面積製造法の確立や半導体リソグラフィ技術としてはスループットの向上と欠陥の減少が必須になってくる。ナノインプリントを応用してデバイスを作成する技術開発と同時に材料に対しては離型性能の向上に焦点があたってきた。今後、我々はモールド用離型剤のみならずフッ素材料を素材にした量産化に向けて新たな離型材料を継続的に研究開発し市場に提供していくことで、ナノインプリント分野の進展に貢献していきたい。

参考文献

- 1) Regents of the University of Minnesota. U.S.Pat. 5,772,905. ; U.S.Pat. 6,309,580. ; Chou, S.Y.; Krauss, P.R.; Renstorm, P.J. Appl. Phys. Lett. 1995, 67, 3114. ; Science. 1996, 272, 85-87.
- 2) Colburn, M.; Johnson, S.; Stewart, M. ; Damle, S.; Bailey, T.; Choi, B.J.; Wedlake, M.; Michaelson, T.; Steenivasan, S.V.; Ekerdt, J.; Willson, C.G. Proc. SPIE 3676. Santa Clara, USA, 1999, 379-389. ; Ye, Z. et.al. Presented at NNT2012. Napa, USA, October 2012.
- 3) ダイキン工業株式会社. 特開2002-283354. ; ダイキン工業株式会社. 特開2004-351693.
- 4) Truffer-Boutry, D.; Zeismann, M.; De Girolamo, J.; Boussey, J.; Lombard, C.; P-Donat, B. Appl. Phys. Lett. 2009, 94, 044110.
- 5) Usuki, K.; Wakamatsu, S.; Oomatsu, T.; Hattori, A.; Tarutani, S.; Kodama, K.; Tanabe, H.; Shitabatake, K. Proc. SPIE 8323. San Jose, USA, 2012, 832305.
- 6) Daikin Industries, Ltd. WO 2006/129800. ; Morita, M.; Kinoshita, Y.; Adachi, Y.; Yamashita, T.; Yamamoto, I. J.PhotoPolym.Sci.Technol. 2011, 24(4), 401-404. ; Oyama, T.; Okada, M.; Iyoshi, S.; Haruyama, Y.; Miyake, H.; Mizuta, T.; Matsui, S. J.PhotoPolym.Sci.Technol. 2013, 26(1), 129-132.
- 7) 中川 勝. 高分子. 2012, 61, 706-709.
- 8) Yamashita, T.; Yamamoto, I.; Morita, M. Presented at NNT2012. Napa, USA, October 2012. ; Yamashita, T.; Mitsuhashi, H.; Morita, M. Proc. SPIE 8680. San Jose, USA, 2013, 868012

マイクロ波加熱の化学反応への適用： 貴金属ナノ粒子の合成

Application to chemical reactions in microwave heating : Synthesis of noble metal nano particles

四国計測工業株式会社 國井 勝之
Katsuyuki Kunii
Shikoku Instrumentation Co., Ltd.

東京工業大学 大学院理工学研究科 応用化学専攻 教授 和田 雄二
Yuji Wada (Professor)
Tokyo Institute of Technology

1. はじめに

マイクロ波加熱技術は、調理用電子レンジとして一般家庭に普及している。一方、あまり知られていないが、マイクロ波加熱技術は、産業技術としても活躍している。具体的には、ゴム加硫、食品乾燥、木材乾燥、薬剤乾燥造粒に用いられてきた¹⁾。マイクロ波加熱の迅速加熱、熱伝導に依らない内部加熱という特性がこれらの利用技術の中心となっている特長である(図1)。マイクロ波技術は、その後、Gedyeら²⁾ならびにGiguereら³⁾により化学反応に初めて適用され、現在では、有機・無機合成のみならず、製鉄、コーティング等様々な分野で利用されている。マイクロ波の加熱原理は、変化する電界に配向しようとする分子あるいは分子集合体の回転運動エネルギーが、周囲分子との相互作用により熱として散逸する過程として理解できる。その結果として、被加熱物へマイクロ

波が照射されると、従来の加熱法である熱伝導とは異なり、分子レベルで内部から均一に加熱される。さらに、マイクロ波加熱の特徴としては、急速加熱や「内容物は加熱されるが容器は加熱されない」というような、選択加熱等が挙げられる。これらのマイクロ波加熱の特徴を化学反応に適用することにより、反応速度の著しい向上^{4),5),6)}、結晶形状の制御⁷⁾、さらに最近では、光学活性物質の選択性のコントロール⁸⁾など、従来の加熱法にはない様々なマイクロ波による効果が報告されている。特に、ある種の有機反応については、マイクロ波照射下で行うと、従来の加熱法と比較して、1桁~2桁の反応速度の増大、あるいは100%に近い反応選択性の向上等、際だった特徴が報告されており、化学者の間では、これをマイクロ波の特殊効果と呼ぶこともある。また、2013年1月には、NHKの科学情報番組「サイエンスZERO」においてマイクロ波技術が取り上げられ、マイクロ波技術は単なる加熱源としてではなく、21世紀の革新的反応プロセスになりうる技術の一つとして報告⁹⁾された。

四国計測工業(株)では、東工大和田グループと共同で、マイクロ波加熱を化学実験へ適用するための専用の装置を開発し、これまでに様々な化学反応を試み、マイクロ波利用化学の有用性を報告している¹⁰⁾。本稿では、マイクロ波加熱の特徴を生かした貴金属ナノ粒子の合成事例について紹介するとともに、入門機として最適な卓上タイプの化学実験用マイクロ波加熱装置、ならびにスケールアップ装置を紹介する。ここで、ナノ粒子とは、一般に100 nm以下の大きさの粒子とされており、比表面積がきわめて大きいこと、および量子サイズ効果等の特有の効果を示すことなど、その特性が、バルクの物性と大きく異

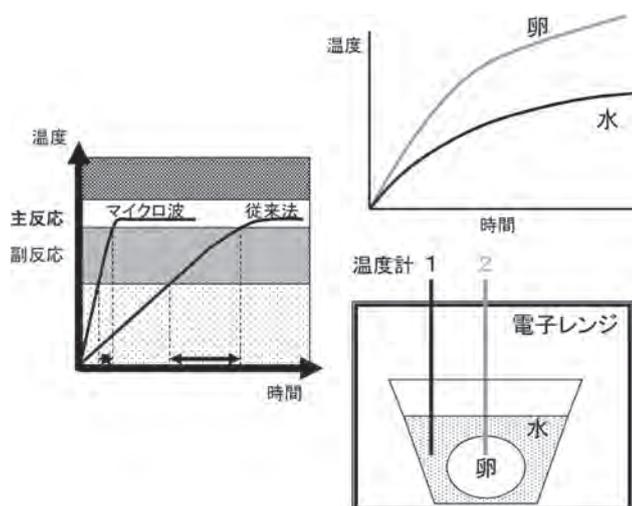


図1 マイクロ波加熱と従来の加熱法の特徴(左:迅速加熱、右:内部加熱)

なっていることから、様々な分野で研究が進められている。金属ナノ粒子の合成法については、金属バルク材料の蒸発ガス化と急速冷却凝縮過程を用いて合成する物理法と金属イオン溶液の還元によって合成する化学法に大別される。ここでは、マイクロ波加熱による報告例の多い、化学還元法に限定して解説する。

2. マイクロ波加熱の特徴とナノ粒子の研究開発応用例

2.1 マイクロ波利用化学による銀ナノ粒子合成の例

最初にマイクロ波加熱の利用がいかにナノ粒子合成に有用であるか銀ナノ粒子合成を例として示す。銀の長鎖カルボン酸塩を加熱分解すると銀粒子が析出する(図2)。この反応をマイクロ波照射下で行うと、温度が100K低下し、反応時間も1/24で、粒径の揃ったナノ粒子合成が可能となる。銀の長鎖カルボン酸を1-ヘキサノール中に分散し、マイクロ波照射5min、413Kで反応させると走査電子顕微鏡(図3)に示すように粒径の揃ったナノ粒子が合成できる。通常の加熱法(オイルバス)でできる限り



図2 マイクロ波照射下における銀ナノ粒子合成反応

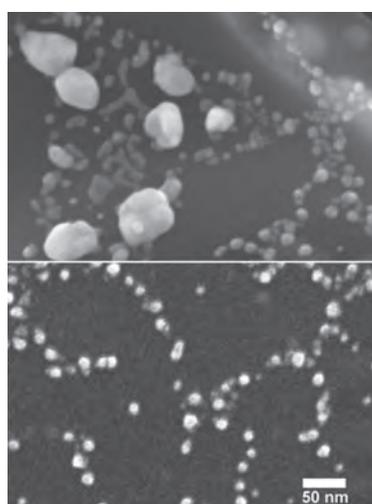


図3 マイクロ波照射下で合成した銀ナノ粒子と通常加熱法との比較(上:オイルバス、下:マイクロ波)

迅速に加熱することで合成した銀粒子では、巨大な粒子が発生しており、マイクロ波加熱の手法がナノ粒子合成に最適であることが一目瞭然である。この系で、1-ヘキサノールは、マイクロ波を効率よく吸収して高温を実現する溶媒かつ還元剤として働いている。

2.2 ナノ粒子合成におけるマイクロ波加熱の特徴

化学還元法において金属ナノ粒子を合成する場合には、通常、金属塩(前駆体)を溶解した溶液中に還元剤を混入し、加熱することによって、合成を開始する。そこでこの金属ナノ粒子合成は、初期の金属核発生とそれに続く粒子成長の二つの過程から成っている。

従来の加熱法では、反応器内の反応溶液は、まず反応器壁からの熱伝導により壁際の溶媒が加熱され、溶液の対流によって系全体に熱が移動してゆく(図4)。この加熱プロセスでは、反応溶液と熱源との間の温度勾配により、ナノ粒子合成の初期に起こる金属核発生が時間的にも空間的にも不均一なものとなり、結果的に成長したナノ粒子も広い粒径分布を持つこととなる。一方、マイクロ波加熱は、熱伝導とは独立の内部加熱法である。マイクロ波加熱を用いれば、従来の加熱法で問題になる反応系内の温度勾配を避けることができ、内部からの均一加熱により、反応系全体で同時に核の発生が可能となり、それに引き続き起こる粒径成長過程も制御可能となるため、粒径の揃ったしかも粒径分布の狭いナノ粒子が得られる(図4)。和田らは、銀ナノ粒子表面に吸着したローダミン6G分子が表面増強ラマン散乱(SERS)を与えることを利用し、Agナノ粒子発生時間をマイクロ波照射下と通常加熱下で特定することに成功し、マイクロ波照射下では、反応器内の中心と器壁で同時に銀ナノ粒子発生

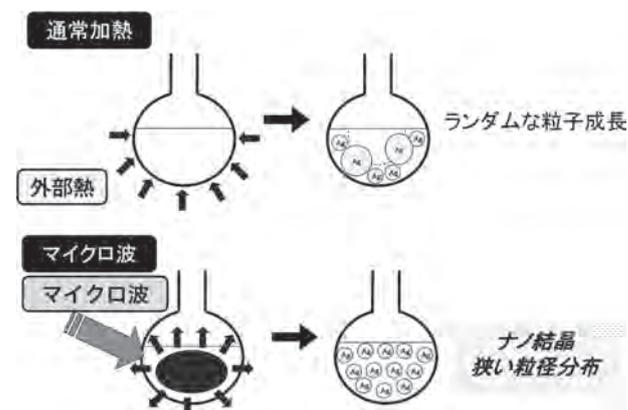


図4 マイクロ波加熱と従来の加熱法におけるナノ粒子発生スキーム

が起こっていることを証明した(図5)¹¹⁾。

マイクロ波加熱の特長としての迅速加熱も粒径分布の狭小化に有利に働いている。図1には、マイクロ波加熱と従来の加熱法における昇温曲線を示している。主反応が生じる温度よりも幾分低い温度領域は、一般に副反応が進行しやすいとされている。この温度域を通過するのに要する時間をマイクロ波加熱と従来の加熱法で比較した場合、従来の加熱法ではゆっくりと時間をかけて通過するのに対し、マイクロ波加熱では、短時間で通過す

ることが可能となる。ナノ粒子合成において、この温度領域は、核発生や粒成長が開始するとされる温度域であり、従来の加熱法ではゆっくりとその温度域を通過することから、長い時間の間に起こる不均一な核発生となり、その結果、広い粒径分布をもつナノ粒子となる。一方、マイクロ波加熱では短時間にこの温度域を通過することにより、均一核発生とそれに続く均一な粒成長が可能となり、粒径分布の狭いナノ粒子が得られることとなる。

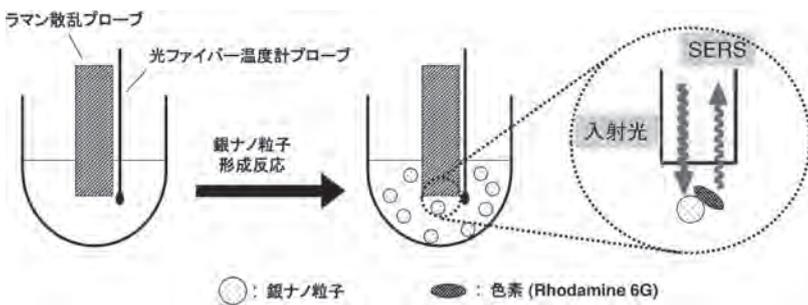


図5 ラマン分光を用いたマイクロ波照射下での in situ ナノ粒子発生観測

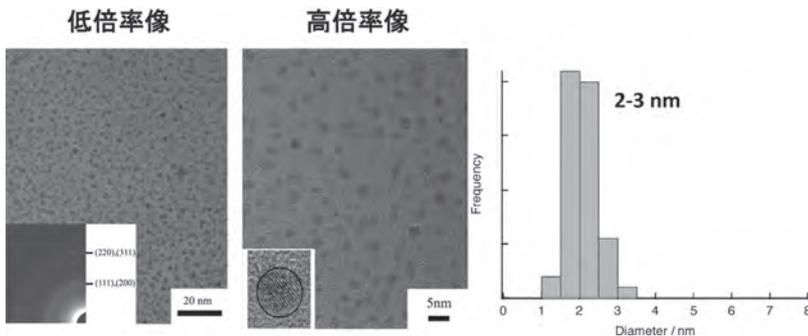


図6 ミリスチン酸銅を前駆体としてマイクロ波利用合成した銅ナノ粒子

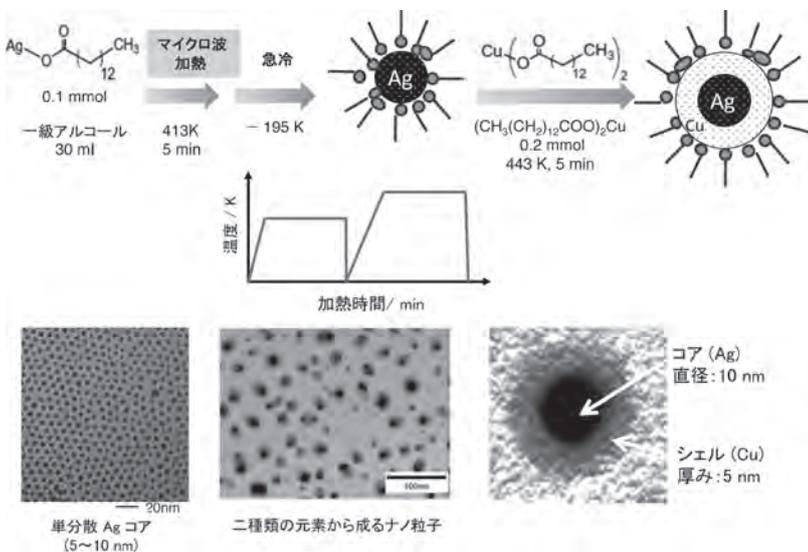


図8 マイクロ波照射による構造精密制御ナノ粒子合成: 銀コア-銅シェル粒子

2.3 貴金属ナノ粒子の研究開発応用例

和田らは、マイクロ波加熱を用いて、銅ナノ粒子合成方法¹²⁾(図6)、ニッケルナノ粒子合成方法¹³⁾(図7)を開発した。それぞれ、従来の方法に比べて、小さなナノサイズ化・粒径分布の狭小化が達成され、粒径の制御も可能となっている。マイクロ波の高い制御性を用いることによりハイブリッド構造を有するナノ構造体を精密合成できることもわかっている。図8には、銀のナノサイズのコアに銅のシェルを被覆した構造体、銀コア-銅シェルナノ粒子合成を示した¹⁴⁾。

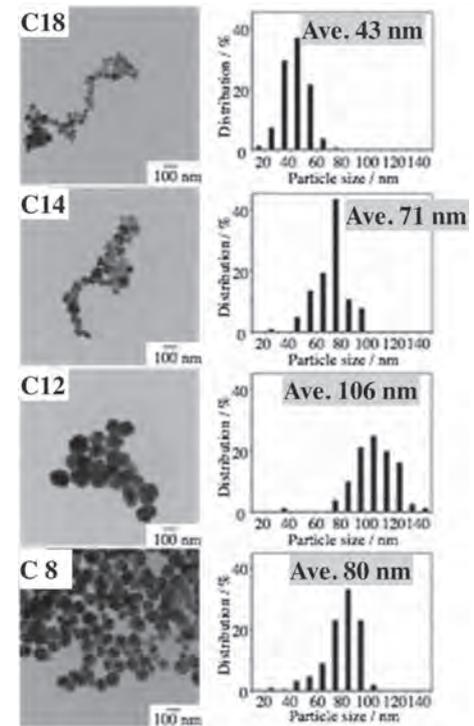


図7 マイクロ波合成したニッケルナノ粒子: C18(オレイルアミン)、C14(ミリスチルアミン)、C12(ラウリルアミン)、C8(オクチルアミン): 463 K、10min マイクロ波照射

3. 銀ナノ粒子の合成

マイクロ波加熱による銀ナノ粒子の合成は、和田らの報告¹⁵⁾をはじめ、多数のグループ¹⁶⁾により研究されている。銀ナノ粒子の用途として最も注目されている分野は、接合やプリンティングの分野であり、銀ナノ粒子をインクとして使用することを目的としている。これらの分野において、銀ナノ粒子が使用される理由として、ナノ粒子化による融点の急激な低下が挙げられる。すなわち、バルクの銀の融点は960℃付近であるが、ナノ粒子化することで、粒径や合成法にもよるが、250℃以下にまで融点を下げることが可能となる。しかしながら、銀ナノ粒子をインクとして使用するためには、高濃度化・大量合成技術が不可欠であり、さらに、電子部品に使用する場合、窒素、硫黄、リン等の元素の混入は避ける必要がある。一方で、ナノ粒子が安定に独立分散して存在するためには、ナノ粒子の表面を表面修飾剤で覆うことが不可欠とされており、その表面修飾剤の多くには、これらヘテロ元素を含むオレイルアミン等のアミン類、ポリビニルピロリドン等の高分子が使用されている。

國井らは、東工大和田グループと共同で、マイクロ波加熱による新規の銀ナノ粒子合成法を開発した。この系では、銀ナノ粒子は標準で10% (w/w) 濃度であり、リッタースケール(1.5L~6.5L)まで対応可能である。さらに、表面修飾剤に窒素、硫黄原子等は含まれておらず、銀以外に含まれている元素は炭素、酸素、水素のみである。*n*-ヘキサンで希釈して測定した銀ナノ粒子の透過型電子顕微鏡画像を図9に示すが、粒径が均一で狭い粒径分布を有することが分かる。現在、この銀ナノ粒子の

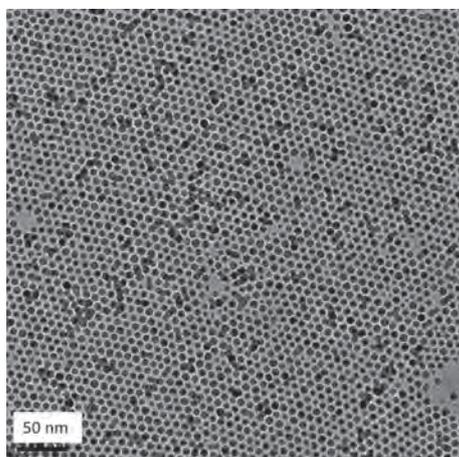


図9 マイクロ波加熱により合成した銀ナノ粒子

ほか、白金や金ナノ粒子の合成法も確立し、多岐な用途への発展を図っている。

4. マイクロ波加熱装置について

4.1 卓上型マイクロ波加熱装置「μリアクターEx」

ナノ粒子合成のような化学反応をマイクロ波加熱で行う場合、攪拌や温度制御などが不可欠であり、再現性の面も含めて、市販の電子レンジでは対応が困難である。化学実験に使用可能な卓上タイプのマイクロ波加熱装置は、種々のメーカーから販売されているが、四国計測工業(株)も、図10に示すような卓上タイプの化学反应用マイクロ波加熱装置「μリアクターEx」を開発し、製造販売を行っている。装置の仕様は、周波数2.45 GHz、最大出力1 kWであり、マイクロ波の一定出力またはPID出力制御による加熱が可能である。特徴としては、化学反応に必要なとされる攪拌機能(マグネチックスターラ、またはメカニカル攪拌)、温度計測機能、還流管の取り付けが可能であること等が挙げられる。その他、安全対策としては、マイクロ波照射下でのドア開閉時の緊急停止、上限温度設定および温度異常による緊急停止機能を有し、管理面では、付属のロガーによるマイクロ波出力および温度データの取り込みを可能としている。



図10 μリアクターExの外観写真

4.2 マイクロ波大型反応装置

マイクロ波加熱装置を大型化する場合、単に卓上型装置を大きくするだけでは、小スケールで得られた実験の再現に至らない場合が多い。小スケールでの実験において、マイクロ波のどのような効果の実験結果に影響しているかを見極め、装置設計に反映することが重要である。

ナノ粒子合成の場合、前述のように、均一加熱、急速加熱が重要なファクターであり、均一加熱を実現するためには、使用する溶媒でのマイクロ波の半減深度を考慮した釜サイズの設計が求められる。また、急速加熱からは、昇温速度と使用する溶媒の比熱により、必要とされるマイクロ波出力ならびに釜容量が算出される。ナノ粒子合成を目的の一つとして作られた、大型釜型反応装置を図11に示す。釜容量は6.5L(最大8Lまで)であり、釜容量から見れば大型とは言い難いが、マイクロ波の急速加熱による反応時間の短縮を考慮すれば、その生産能力は同サイズの従来法の装置と比較して数倍~10数倍となる。マイクロ波出力に関しては1.5~6 kWの発振器が3台接続可能であり、必要とされる昇温速度に応じてマイクロ波出力を決定する。また、本装置はバッチ反应用的の装置であるが、複数の釜を連結することにより、連続槽型反応装置としても使用可能である。四国計測工業(株)では、ナノ粒子以外にも重縮合反応など、種々の反応に適した実用化装置を手がけており、詳細については、ホームページ¹⁷⁾に紹介されている。

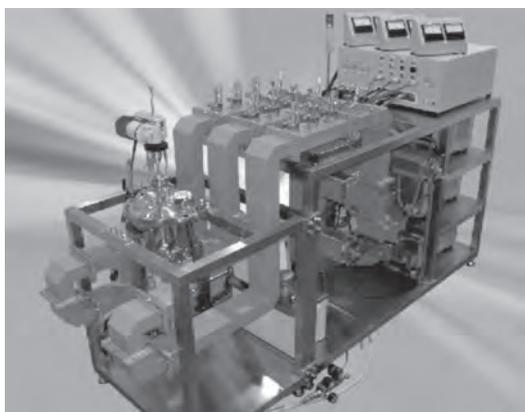


図11 大型釜型反応装置

5. おわりに

マイクロ波加熱は、電子レンジとして一般家庭にまで普及している加熱技術であるが、内部加熱、急速加熱、選択加熱等の特徴を化学反応へ適用することにより、一加熱技術にとどまらず、様々な効果が期待される。金属ナノ粒子合成では、マイクロ波の内部加熱、急速加熱の特徴を生かすことで、粒子径が均一で狭い粒径分布を有するナノ粒子が得られることを示した。また、マイクロ波加熱装置については、卓上型マイクロ波加熱装置および大

型釜型反応装置を示し、ナノ粒子合成での大型化の事例について紹介した。

本稿で取り上げた技術あるいは製品によって、科学技術の発展に寄与できれば幸いである。

参考文献

- 1) 越島哲夫編集. マイクロ波加熱技術集成. (株)エヌ・ティー・エス, 1994, 800p.
- 2) Gedye, R.; Smith, F.; Westaway, K.; Ali, H.; Baldisera, L.; Laberge, L.; Rousell, J. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 279-282.
- 3) Giguere, R.J.; Bray, T.L.; Duncan, S.M.; Majetich, G. *Tetrahedron Lett.* 1986, 27, 4945-4948.
- 4) 竹内和彦, 和田雄二監修. マイクロ波化学プロセス技術II. (株)シーエムシー出版, 2013, 300p.
- 5) Edited by Loupy, A. *Microwaves in Organic Synthesis.* Wiley-VCH, 2006.
- 6) Kappe, C.O.; Dallinger, D.; Murphree, S.S. *Practical Microwave Synthesis for Organic Chemists.* Wiley-VCH, 2009, 310p.
- 7) Tsuji, M.; Miyamae, N.; Hashimoto, M.; Nishio, M.; Hikino, S.; Ishigami, N.; Tanaka, I. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2007, 302(1-3), 587-598.
- 8) Nushiro, K.; Kikuchi S.; Yamada T. *Chem. Lett.* 2013, 42(2), 165-167.
- 9) <http://www.nhk.or.jp/zero/contents/dsp414.html>
- 10) 和田雄二, 鈴木榮一. *触媒.* 2013, 55(1), 44-50.
- 11) Tsukahara, Y.; Nakamura, T.; Kobayashi, T.; Wada, Y. *Chem. Lett.* 2006, 35(12), 1396-1397.
- 12) Nakamura, T.; Tsukahara, Y.; Sakata, T.; Mori, H.; Kanbe, Y.; Bessho, H.; Wada, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2007, 80(1), 224-232.
- 13) Yamauchi, T.; Tsukahara, Y.; Sakamoto, T.; Kono, T.; Yasuda, M.; Baba, A.; Wada, Y. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* 2009, 82(8), 1044-1051.
- 14) Nakamura, T.; Tsukahara, Y.; Yamauchi, T.; Sakata, T.; Mori, H.; Wada, Y. *Chem. Lett.* 2007, 36(1), 154-155.
- 15) Yamamoto, T.; Wada, Y.; Sakata, T.; Mori, H.; Goto, M.; Hibino, S.; Yanagida, S. *Chem. Lett.* 2004, 33(2), 158-159.
- 16) Edited by Horikoshi, S.; Serpone, N. *Microwaves in Nanoparticle Synthesis: Fundamentals and Applications.* Wiley-VCH, 2013, 352p.
- 17) <http://www.yonkei.co.jp/products/industrial/micro/>

新・私の古生物誌(10)

New Series of My Paleontological Notes (10)

— 生きている化石ヘラチョウザメ —

— Paddlefish as Living Fossils —

医学博士 福田 芳生
M. Dr. YOSHIO FUKUDA

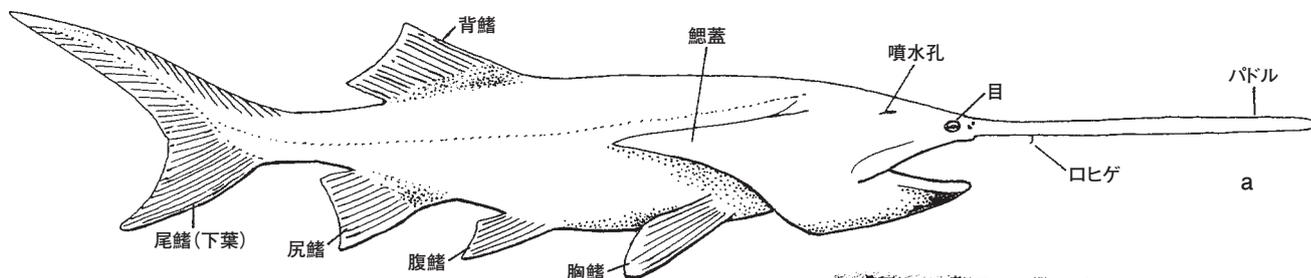
1. はじめに

前回チョウザメについて述べました。このチョウザメの卵はキャビアとして知られ、世界の3大珍味の筆頭に挙げられています。このチョウザメの仲間にヘラチョウザメがいます。

上顎にパドルを備えた、奇怪な姿をしているためでしょ

うか、いつもチョウザメの陰になって、一向に目立ちません。でも、8,000万年もの長大な歴史を、その体内に秘めているのです。

このヘラチョウザメは微小なプランクトンを栄養源にする、大変地味な生活を送っています。今回、ヘラチョウザメにスポットライトを当て、身体の仕組みや独特のパドルに係わる進化について述べることにします。



2. ヘラチョウザメの身体を探る

2.1 ヘラチョウザメとパドル

ヘラチョウザメは硬骨魚の仲間に入っています。でも、脊柱が軟骨なので、特別に軟質垂網という網目が設けられています。現在、ヘラチョウザメは北アメリカのミシシッピ河流域に生息するヘラチョウザメと、中国の長江(揚子江)に棲むヨウスコウヘラチョウザメの2種類があります。本論ではアメリカ産のヘラチョウザメについて述べることにします。

ヘラチョウザメは上顎が扁平な突起となって伸び出しています(図1のa)。この突起はボートを漕ぐ櫂(かい)によく似ています。英語で櫂を指して、パドルと呼びます。そして英語のパドルフィッシュは、実によくヘラチョウ

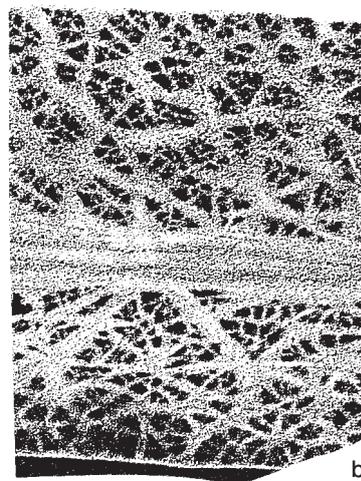


図1 aは現生のヘラチョウザメ、bはパドルを支える籠状の骨組織(aはM.ジョリー、bはL.グランデとW.E.ベミスによる)。

ザメの特徴を言い表しています。和名のヘラチョウザメは、学名のスパチュラ(ヘラ)に由来しています。

このパドルは体長の1/3近くあります。ちなみに、ヘラチョウザメの成魚は体長1.8メートル、重量も80キログラムに達します。全長7メートルもの大物がいるとの話ですが、記録では3メートルが最大です。全体に雄よりも雌の方が大型で、それは抱卵することによっています。

パドルは骨で支えられています。この骨が緻密な板状であったなら、身体の重心が体前方に偏ってしまうので、遊泳に支障を来すでしょう。そこは実にうまい具合になっていて、全体に目の粗い竹籠にそっくりな構造になっています(図1のb)。それだと適度に強度を保ち、重量も抑えられます。外側は皮膚で覆われます。このパドル下面後方に、1対の短いヒゲがあります。

2.2 ヘラチョウザメの微小な鱗

チョウザメでは、チョウの羽根を思わせる大形の板状

硬鱗が体表にずらりと並んでいます(図2)。ところが、ヘラチョウザメでは尾鰭の付け根や鰓蓋の表面に、1ミリメートル以下の微小な鱗が認められるにすぎません(図3)。

尾鰭は上方が大きく下方が小型の、いわゆる異尾です。背側後方に背鰭があり、胸鰭、腹鰭、尻鰭が順に並びます。鰓蓋は大形で、その末端は鋭く尖ります。口は通常の魚と同様、体前方にあって、大きく開くことができます。パドルの基部に1対の小さな目があります(図1のa、図6のb)。鰓蓋上方の側線は、体後方に向かって走ります。

2.3 ヘラチョウザメの感覚器

ヘラチョウザメの食物は、専ら水中の微小な動物性プランクトンです。短い口ヒゲは水中の食物探査には、あまり役立っているとは思えません。スウェーデンのヨルゲンセン博士のグループは、魚類の感覚器官について

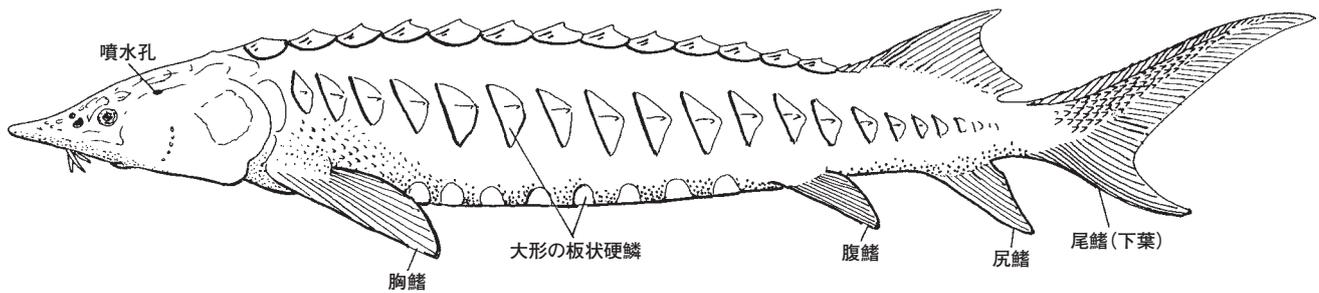


図2 体表にチョウの羽根のような板状硬鱗を持つチョウザメ(M.ジョリーによる)。

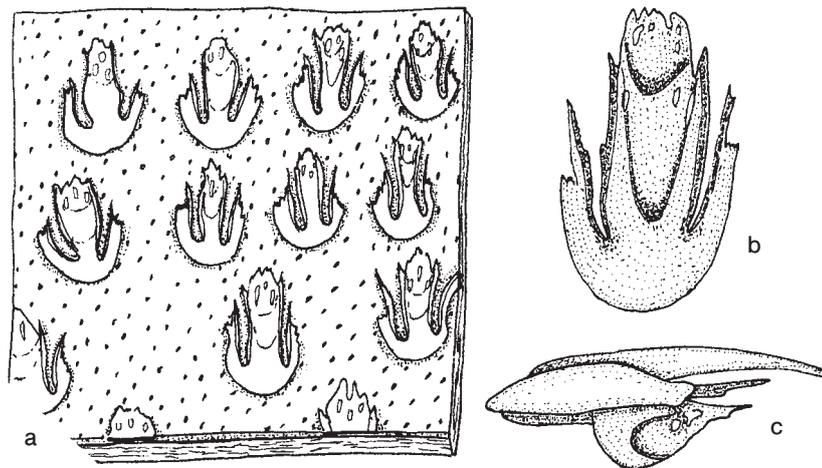


図3 ヘラチョウザメの微小な鱗。aは鰓蓋表面の鱗の分布状態を示す。b~cは鱗の拡大。bは上側、cは側面、鱗は長さ1ミリメートルほどある(G.F.ワイゼルによる)。

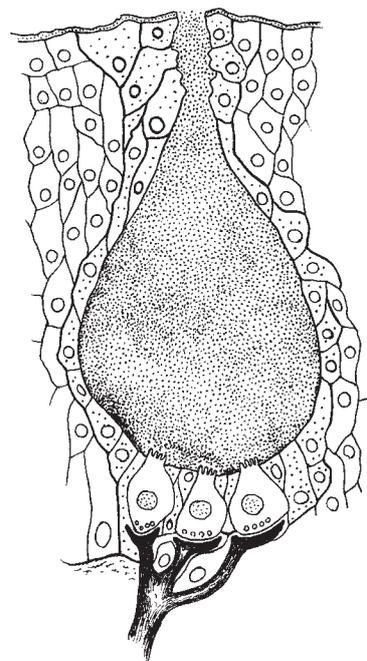


図4 ヘラチョウザメのパドル下面にあるローレンツィニ器官。図は縦断面を示す。上から順に開口部、短い管、次いでビン状の膨大部。内部はニカワ状の物質で満たされている。底部に3個の感覚細胞が並んでいる。細い神経線維(黒色部)が、感覚細胞に接している(J.M.ヨルゲンセンほかより改写)。

数々の優れた研究成果を発表しています。

このヨンゲルセン博士のグループは、ヘラチョウザメのパドルに分布する感覚器官を調べ、それがサメ類の持つローレンツィニ器官と基本的な構造に於いて、ほとん

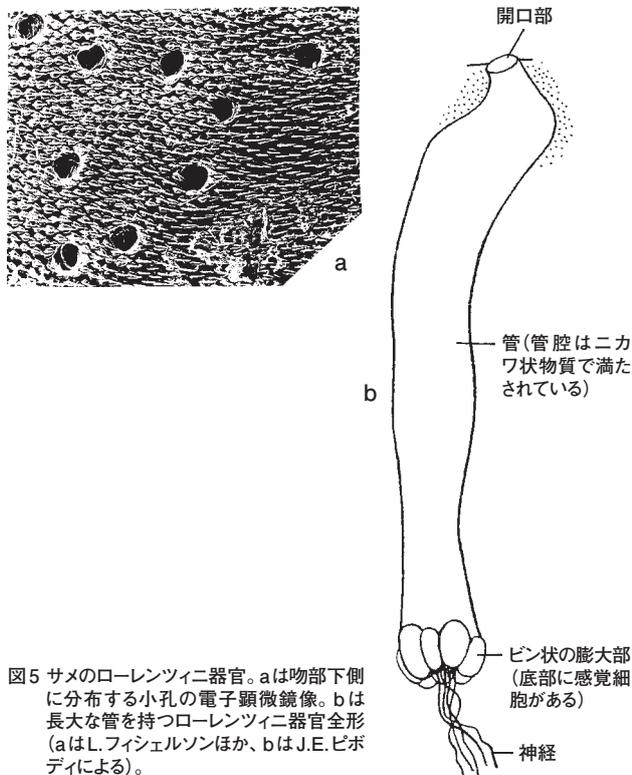


図5 サメのローレンツィニ器官。aは吻部下側に分布する小孔の電子顕微鏡像。bは長大な管を持つローレンツィニ器官全形(aはL. フィッセルソンほか、bはJ.E. ビボディによる)。

ど変わらないことを突き止めました(図4)。

そこで、ローレンツィニ器官とは如何なるものか、その構造と機能について説明しましょう。サメ類の吻部下側の皮膚表面には、無数の小孔が開いています(図5のa)。小孔に続く細長い管は、ドロリとしたニカワ状物質で満たされ、体表下に深く埋没しています(図5のb)。

その末端が膨れ上がってピンのような形になっています。ピンの底部に感覚細胞群があり、神経線維と連絡していて、その刺激が中枢(脳)に送られます。第二次大戦直前の1938年、サンド博士の研究報告によって、海水温の変化を察知する温度受容器と考えられました。

近年になって研究が進み、ローレンツィニ器官の密集するサメの吻部を透明な電気絶縁膜で覆うと、獲物に全く反応しなくなることが分かりました。獲物は魚で、ローレンツィニ器官は相手の筋肉や心拍動によって生じる活動電流をキャッチする、高性能の電気受容器であることが、はっきりしたのです。

ヘラチョウザメはパドル下面のローレンツィニ器官で、微小なミジンコや小エビの筋運動・心拍動によって生じる活動電流を感知し、その所存を確認します。次いで、口を大きく開いて水と一緒にプランクトンを呑み込みます(図6のa)。

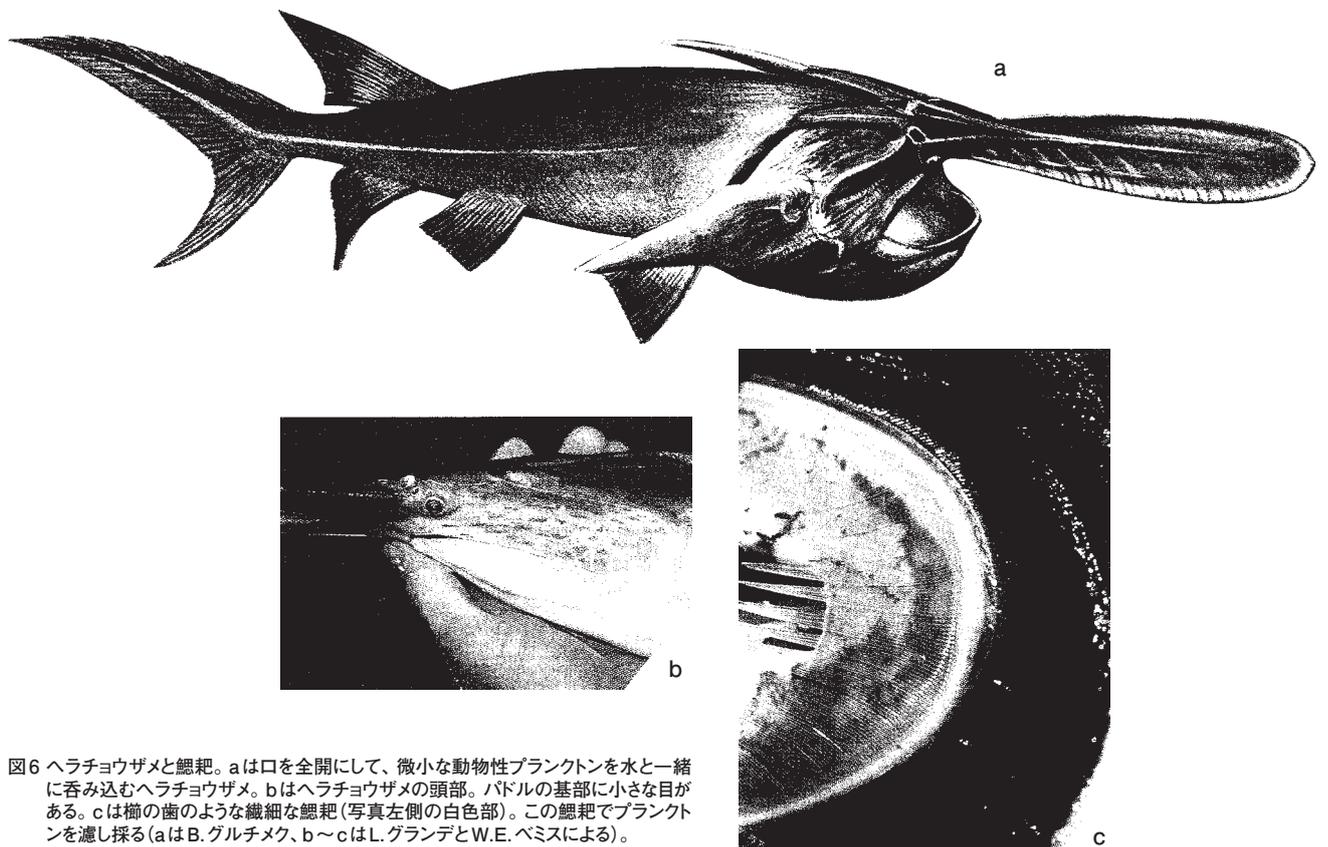


図6 ヘラチョウザメと鰓耙。aは口を全開にして、微小な動物性プランクトンを水と一緒に呑み込むヘラチョウザメ。bはヘラチョウザメの頭部。パドルの基部に小さな目がある。cは櫛の歯のような繊細な鰓耙(写真左側の白色部)。この鰓耙でプランクトンを濾し採る(aはB. グルチメク、b~cはL. グランデとW.E. ベミスによる)。

3. ヘラチョウザメの鰓耙と消化管

ヘラチョウザメの口内には、全く歯を認めることができません。細かな櫛(くし)の歯のような鰓耙(さいは)が咽頭部両側にあります。ヘラチョウザメは、この鰓耙で食物となる動物性プランクトンを濾し採ります(図6のc)。

細かい鰓耙の表面には、密に粘液分泌細胞が並んでいて、不純物を分泌液で包み、体外に捨て去ります。食物は食道を経て胃に送られます。

3.1 胃と腸管

モンタナ大学の動物学者ワイゼル博士は、ヘラチョウザメの消化管について、その構造を熱心に光学顕微鏡で観察しました。まず胃の近位部を切り開くと、内壁に幾筋もの柱状構造が認められます(図7のa)。

チョウザメと同様、繰り返すまでもなくヘラチョウザメには歯がありません。チョウザメでは胃壁に厚い筋層を備え、鳥類の砂肝(すなぎも)のように食物を押し潰します。それは歯の代わりということになります。

ワイゼル博士は柱状構造について、当初歯の代用をする筋肉の束と考えました。組織標本を顕微鏡で覗くと、何とそれは脂肪の塊だったのです(図7のb)。胃壁の脂肪柱は胃内に溜まったプランクトンを、そっと包むようにして、後方の腸に送り出す仕掛なのだそうです。ヘラチョウザメは微小なプランクトンを、さらに細片にする必要はないのでしよう。

胃と腸の接続部に、広い腔所を有する幽門垂があります(図7のa)。ワイゼル博士は、この幽門垂の働きについて次のように述べています。腔所の内部で水分を吸収し、プランクトンの密度を高め、消化液と混合するというものです。後方に螺旋弁を備えた腸が続きます。その様子は、他のチョウザメ同様です。

ただ、純淡水性のヘラチョウザメでは、腸管内部に吸虫や条虫類が常在しています。それらの寄生虫による、腸内壁の損傷に対処するためでしょうか、多数のリンパ節が認められるそうです。

4. ヘラチョウザメの生息場所と繁殖

ヘラチョウザメはミシシッピ河流域の、水深が1メートル以上あって、流れの比較的緩やかな場所に生息しています。そして、水底が粘土質の場所を好みます。

ヘラチョウザメは夜行性で、昼間は水底でじっとしています。粘土の細粒が混じった水域に棲み、視力が弱く、索餌は専らパドルのローレンツィニ器官に頼らざるを得ないのも、生息環境と大いに関連があります。

水温が13℃に達する4月から5月にかけて、上流の小石の間に産卵します。1週間ほどで孵化し、すぐに泳ぎ始めます。稚魚は体長30ミリメートルを超えると、パドルが明瞭になります。この段階になると、もうマイクロの餌を探し始めます。

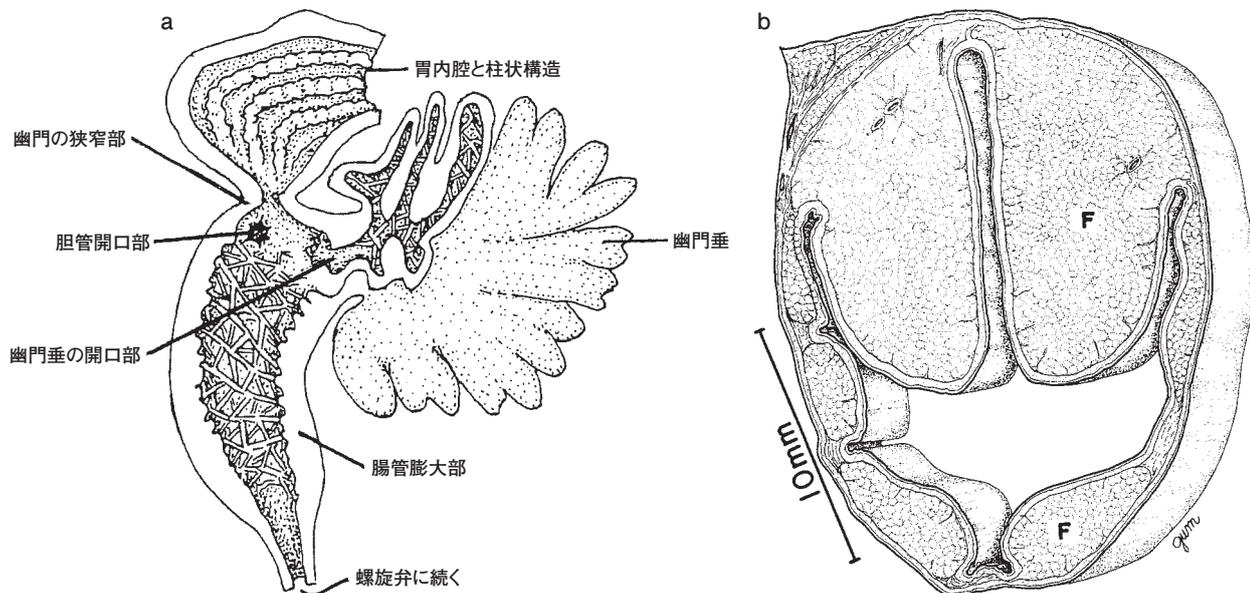


図7 ヘラチョウザメの胃壁の構造。aは胃近位部の幽門垂、幽門に続く腸管、胃内壁に縦走る柱状の隆起物がある。bは胃壁断面。柱状の隆起物は脂肪の塊。図中のFは脂肪組織を示す(G.F. ワイゼルによる)。

5. ヘラチョウザメの化石と進化

5.1 進化の分岐点に位置するペイピアノステウス

孵化後間もないヘラチョウザメの稚魚には、パドルがありません。1億2,500万年前の白亜紀初期に、中国大陸の湖に出現したヘラチョウザメに近いペイピアノステウス・パニイもパドルを持っていませんでした(図8のa)。

このペイピアノステウスは体長3.2メートルもあって大形の目を持ち、口が頭部正面に開いています。昼間活発に泳ぎ回り、微小なプランクトンを鰓耙で濾し採っていました。

グランデとベミス両博士(1996)の研究では、ペイピアノステウスの口中には濾過採餌用の鰓耙の他に、立派な歯が認められ、時には魚や甲殻類も捕食していたようです。

ペイピアノステウスは、チョウザメと後のヘラチョウザメの分岐点に位置する魚ということになります。冒頭のヘラチョウザメの稚魚は、出現初期のヘラチョウザメ類の特徴をよく反映していると申せましょう。

5.2 モンタナのヘラチョウザメ

恐竜化石の産地として有名なモンタナ州から、約8,000万年前(白亜紀後期)のヘラチョウザメの化石が発見されています。それは1940年のことです。古生物学者のマックアルピン博士は、モンタナ州の恐竜時代の

地層を調査していました。その折り、当時の湖の堆積物から、頭と尾の一部が残った不完全な魚の化石を見つけました(図8のb)。

詳しく調べると、上顎が異常に伸長していて、それは現生のヘラチョウザメのパドルに相当することが分かりました。このモンタナの化石は、復元すると体長1メートルほどになります。パレオブセフルスと命名され、目下最古のヘラチョウザメと目されています。

5.3 5,000万年前の巨大な湖

鉱物標本屋さんで足を運ぶと、北アメリカのグリーンリバー層産と称する小さな淡水魚の化石が店頭に並んでいます。このグリーンリバー層はワイオミング・コロラド・ユタ州に分布し、その総面積は65,000平方キロメートルに及びます。

それは今から約5,000万年前の巨大な湖の堆積物によって構成されています。その主体は石灰分の多い木目細かな頁岩層からなり、厚さ600メートルにも達しています。なにしろ1,500万年もの間、巨大な湖として存続したのですから、地層中に含まれる化石は莫大な量にのぼります。

化石は大変保存が良く、第三紀始新世の動物や植物の情報を今に伝えていています。様々な淡水魚の他に、熱帯に生育するヤシ、そしてヘビやワニ、スッポン、鳥類の他にコウモリの化石が報告されています。

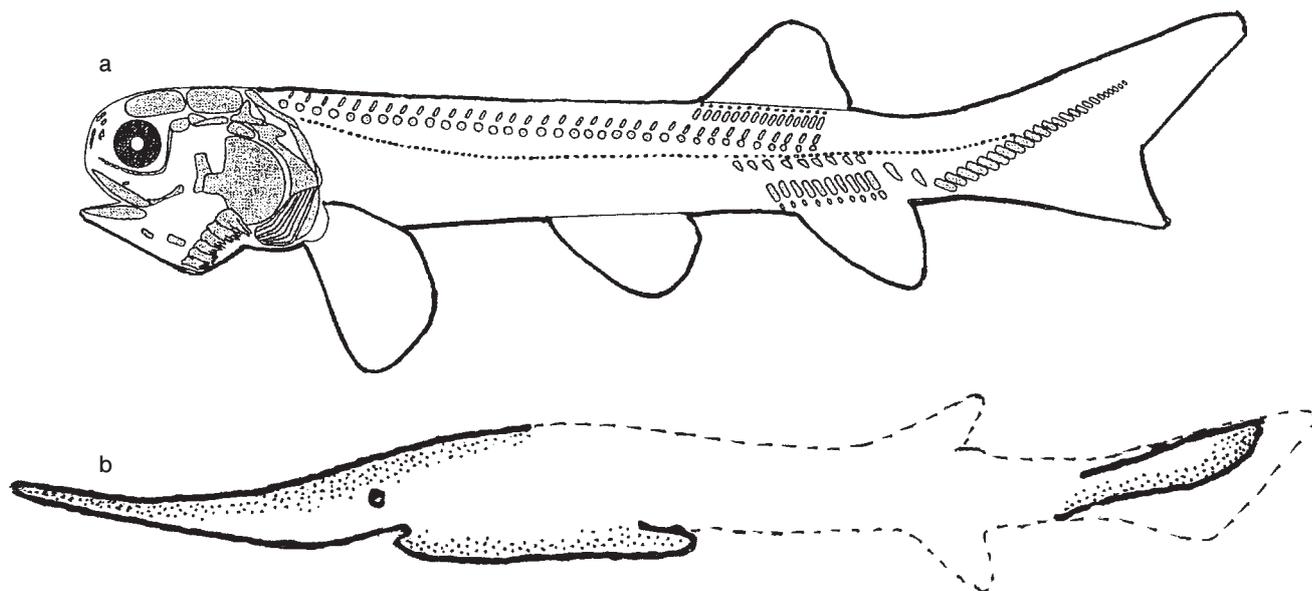
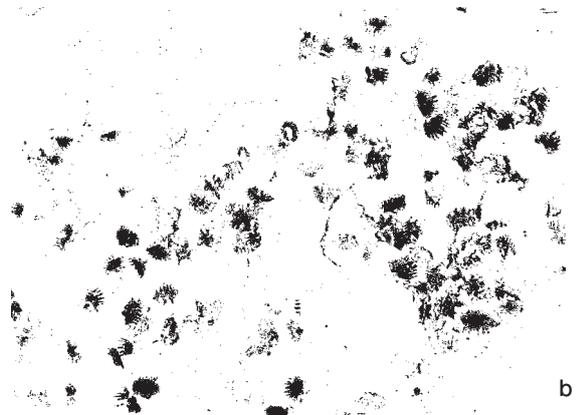


図8 恐竜時代のヘラチョウザメ。aは中国大陸の1億2,500万年前(白亜紀初期)の湖に生息していたヘラチョウザメの先駆者ペイピアノステウス・パニイの復元図。体長3.2メートルもあった。bは北アメリカモンタナ州の約8,000万年前のヘラチョウザメ、パレオブセフルス。体長1メートルほどあった(aはL.グランデとW.E.ベミス、bはA.マックアルピンによる)。



図9 約5,000万年前の巨大な湖に生息していたヘラチョウザメ。aはクロソフォリス・マグニコウダタスの全形。体長50センチメートルほどであった。この標本はかつてコープ博士の研究した記念すべきもの。bはクロソフォリスの体表に分布していた鱗。大きさは1ミリメートルほど(a～bはL.グランデによる)。

イリノイ州シカゴの自然史博物館に勤務するグランデ博士は、1984年にグリーンリバー層の化石を網羅した、300ページもの分厚い論文を出版しています。その研究成果からすると、当時の湖は岸辺にヤシの茂る、かなり温暖な気候のもとにあったことが分かります。



5.4 グリーンリバー層のヘラチョウザメ

さて、グリーンリバー層の古生物に関する最初の科学的な論文は、パーカーが1840年に、ついでフレumontが1845年にそれぞれエビの化石について述べています。

そして、ジョン・エバンスが1856年にグリーンリバー層から掘り出した魚の化石を丁寧にスケッチして、論文にしました。以来、多くの古生物学者が、グリーンリバー層の脊椎動物に注目するようになりました。

1883年のことです。恐竜化石の大家コープ博士の研究室に、全長50センチメートルほどある奇妙な魚の化石が運び込まれました(図9のa)。博士は化石を慎重に調べ、上顎の突出物に着目し、その構造が

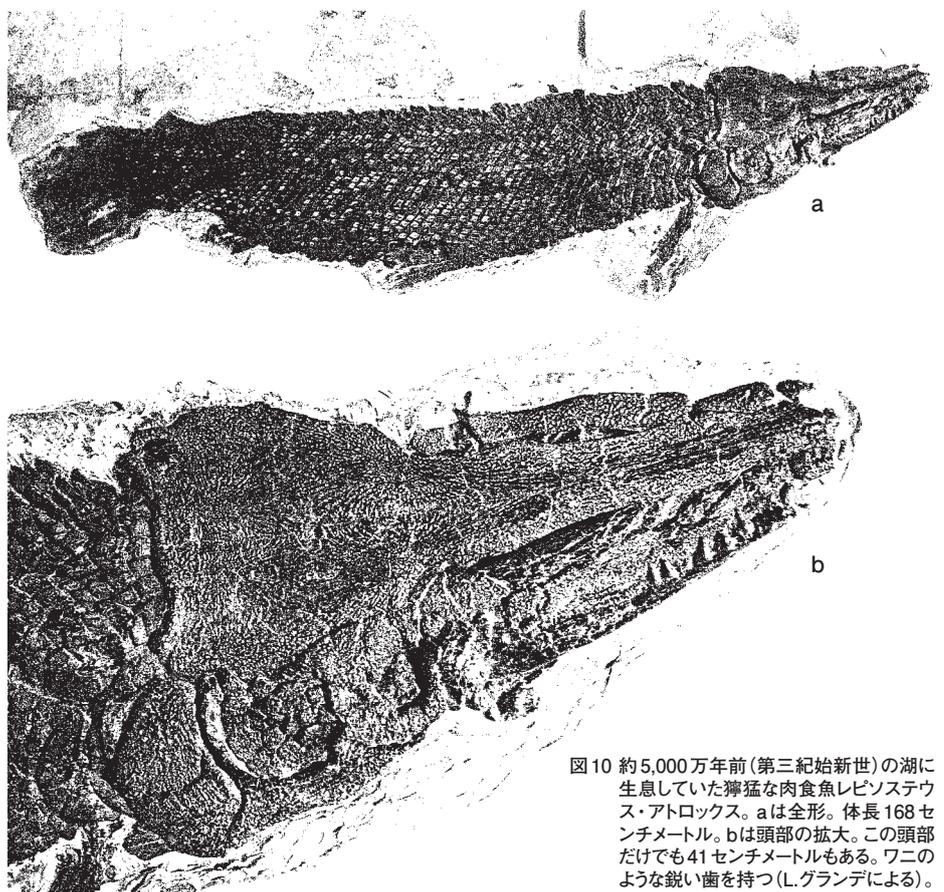


図10 約5,000万年前(第三紀始新世)の湖に生息していた獐猛な肉食魚レピソステウス・アトロックス。aは全形。体長168センチメートル。bは頭部の拡大。この頭部だけでも41センチメートルもある。ワニのような鋭い歯を持つ(L.グランデによる)。

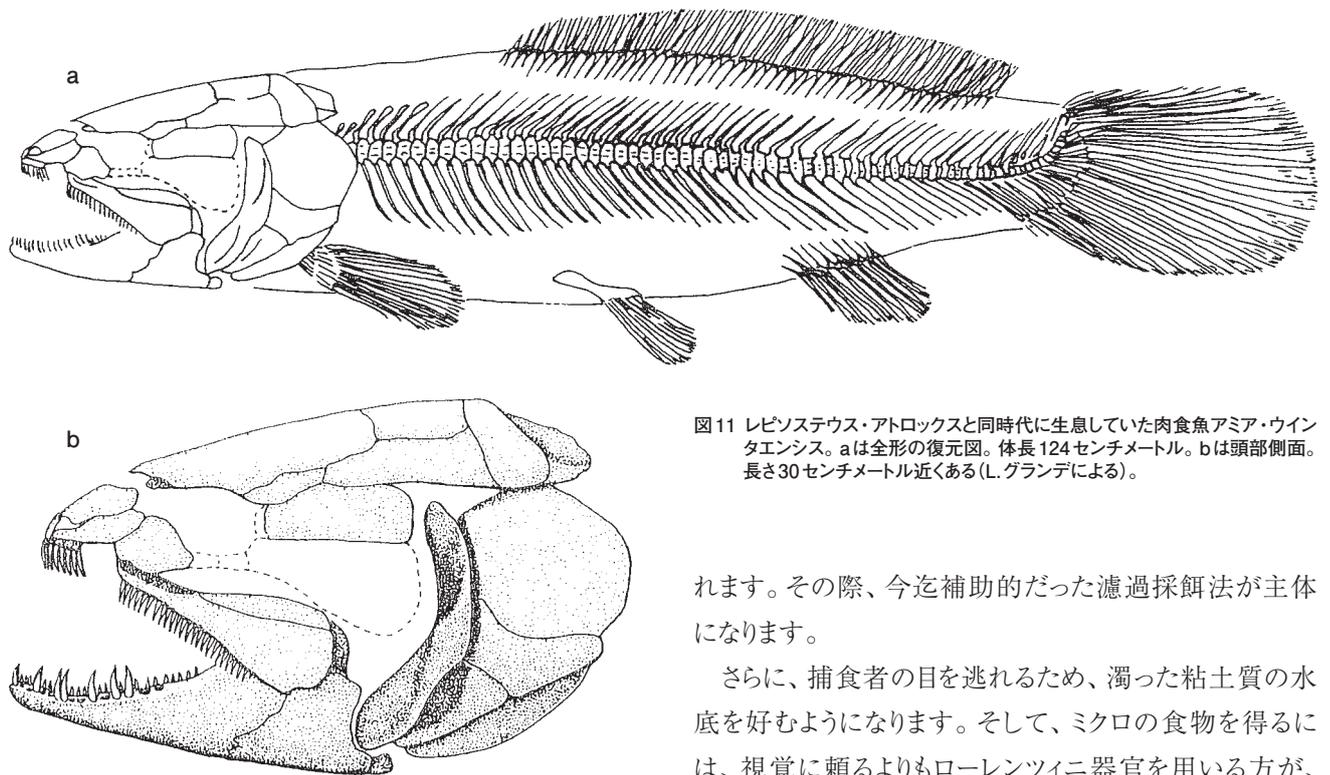


図11 レピソステウス・アトロックスと同時代に生息していた肉食魚アミア・ウインタエンシス。aは全形の復元図。体長124センチメートル。bは頭部側面。長さ30センチメートル近くある(L.グランデによる)。

現生のヘラチョウザメの持つパドルと変わらないことを知りました。かくして、奇妙な魚の化石は、ヘラチョウザメであることが明らかになりました。そして、クロソフォリス・マグニコウダタスと命名しました。クロソフォリスは全身小さな鱗で覆われています(図9のb)。

5.5 パドルの機能が確立する

恐竜時代のヘラチョウザメの化石を発見して有名になったマックアルピン博士は、グリーンリバー層のヘラチョウザメ、クロソフォリスを再検討し、頑丈な歯を持っていることを突き止めました。

そして、胃内に魚の骨や甲殻類、砕かれた貝殻があることに気がきました。その結果、マックアルピン博士はクロソフォリスが、パドルを用いて川底の泥を掘り起こし、それらの動物を捕食していたと考えました。それはパドルが、シャベルのような機能を持っていたということになります。

この太古のヘラチョウザメ、クロソフォリスが生息する湖で、ワニのような鋭い歯を持つ獰猛な肉食魚レピソステウス(図10)やアミア(図11)が勢力を増します。ヘラチョウザメは次第に湖から、その周辺の河川に追いやら

れます。その際、今迄補助的だった濾過採餌法が主体になります。

さらに、捕食者の目を逃れるため、濁った粘土質の水底を好むようになります。そして、ミクロの食物を得るには、視覚に頼るよりもローレンツニ器官を用いる方が、ずっと効率が良いことです。パドル下面にローレンツニ器官が集中します。パドルで水底の泥を掘る行為は、精巧なローレンツニ器官の損傷を招きます。

泥掘りを止めたことで、パドルは専ら索餌用のセンサー並びに安定版として、機能するようになったのでしょう。それが現在のヘラチョウザメという訳です。無論、そうなる迄に気の遠くなるような時間が掛かっています。

6. 終わりに

以前、北アメリカのミシシッピ河流域には、多くのヘラチョウザメが生息していました。でも、ダム建設や深刻な水質汚染によって、絶滅が危惧される事態になっています。人畜無害とは、正にヘラチョウザメを指す言葉と言っても過言ではないでしょう。

イラク戦争によって、キャビアの生産量が激減しました。するとヘラチョウザメに目を付けて乱獲し、その卵からキャビアを生産しました。かくして、ヘラチョウザメは絶滅寸前まで、追い詰められました。

現在、アメリカ政府は厳しく捕獲制限し、稚魚の放流を行うなど、その保護に懸命になっています。努力が実を結んで、徐々に個体数が増加し始めたとのニュースに、筆者はほっと胸を撫で下ろしています。

ViewaBlue[®] Stain KANTO染色による アガロースゲルからのDNA回収における問題点の解消

Resolution of technical issues on DNA recovery from agarose gel by ViewaBlue[®] Stain KANTO

(独)農業・食品産業技術総合研究機構 食品総合研究所 食品工学研究領域

高橋 宏和、松本 敦子、金原 浩子、杉山 滋、小堀 俊郎

Hirokazu Takahashi, Atsuko Matsumoto, Hiroko Kanahara, Shigeru Sugiyama, Toshiro Kobori

Food Engineering Division, National Food Research Institute, National Agriculture and Food Research Organization

関東化学株式会社 技術・開発本部 伊勢原研究所 生化学研究室 山崎 裕之、千室 智之

Hiroyuki Yamazaki, Tomoyuki Chimuro

Isehara Research Laboratory, Technology & Development Division, Kanto Chemical Co., Inc.

関東化学株式会社 試薬事業本部 試薬部 技術部 バイオケミカル課 小林 崇良

Takayoshi Kobayashi

Biochemicals, Reagent Development Department, Reagent Division, Kanto Chemical Co., Inc.

In this paper, we describe the results of DNA staining with ViewaBlue[®] Stain KANTO, a reagent for recovering DNA from agarose gels. ViewaBlue[®] stained DNA migrated as a band in the gel after or during electrophoresis, and DNA bands were easily visualized under natural light. The DNA recovered from the band showed little damage because the visible light spectrum only slightly covers ultraviolet wavelengths in the laboratory environment. In addition, ViewaBlue[®] had little mutagenicity; therefore, ViewaBlue[®] provides a simple and safe means of performing experimental procedures including staining, observation, and recovery of desired DNA without dedicated devices.

1. はじめに

デオキシリボ核酸(DNA)やリボ核酸(RNA)を検出する際、アガロースゲルによる電気泳動で分離した試料をエチジウムブロミド(EtBr)によって染色し、ピーク波長が260 nmの紫外線(UV-C)を照射することによって可視化することが一般的である。染色方法は二通りに大別され、予めEtBrを添加してアガロースゲルを作製して電気泳動に使用する、いわゆる「先染め」と、EtBrを添加せずにアガロースゲルを作製し、電気泳動後にEtBr染色液に浸す「後染め」である。「先染め」は電気泳動中に核酸の分離状況を確認することが可能であり、泳動後にゲルを染色する必要がないことから検出時間が短縮できる。ただし、EtBrは変異原性物質¹⁾であるため、ゲルや電気泳動緩衝液の取り扱いには注意を払う必要がある。「後染め」は、電気泳動緩衝液の取扱いは簡便であるが、検出まで時間がかかる(約30分)、染色液や染色後のゲルの取り扱いには注意が必要である。このよ

うに、いずれの方法にも長所と短所があるためどちらを採用するかは研究室によって異なるものの、EtBr染色は試薬の安定性、ランニングコスト、高い検出感度の点から、アガロースゲル電気泳動での核酸検出に汎用されている。

アガロースゲルで分離したDNAをゲルから回収して別の実験(例えば塩基配列解析やクローニング)に使うことがしばしばあるが、EtBr染色ではアガロースゲルからDNAを回収する工程で細心の注意を払わないと継続して行う実験がうまくいかない。DNAはチミンやシトシンのピリミジン塩基とアデニンとグアニンのプリン塩基から構成されるが、このピリミジン塩基が2つ近接しているときにUV-Cが照射されると、2個の塩基間で架橋が生じてピリミジンダイマー(図1)が形成される²⁾。ピリミジンダイマーが生成したDNAは、PCRや塩基配列解析の反応の鋳型としても、またはプラスミド等を利用した大腸菌などの宿主細胞によるクローニングにおいても著しく効率が低下する。そのためアガロースゲル中のDNAを回収する

場合には工夫が必要となる。すなわち、DNAを確認用レーンと回収用レーンの二つのレーンに分けて泳動を行い、確認用レーンにだけ紫外線を照射して目的DNAの位置を確認する一方で、回収用レーンではアルミホイル等で覆うことにより紫外線を照射せず、確認用レーンでの位置を参照して目測で目的DNAを切り出す(図2)、といった手技がとられる。またこの操作は、確認用レーンから目的DNAを目視で確認するために暗室で行い、さらに実験者を有害な紫外線から目や皮膚を防御するために専用の保護具を使用するといった結構手間のかかる手法が未だに使われている。また、現在ではUV-CのみならずUV-AやBの照射を選択できる機器があり、UV-C

照射に比べてEtBrの蛍光強度が減少するものの、DNAへのダメージを低減させることを第一に考えてUV-AやUV-Bで作業を行うこともある。ただし、暗室でUV照射を短時間で行う必要があるなど、UV-C照射と同様に操作上の制約がある。

そのためDNA回収を簡便に行うために、近年EtBrに代わる様々な核酸検出用蛍光色素が各社から販売されている。これらの蛍光色素は励起波長が紫外光ではなく可視光(400-800 nm)であるため、DNAに対するダメージはほとんどない。しかし、暗室等に加えて可視光を照射する専用の機材と試薬が必要であり、新たにシステム導入のための初期投資が必要となる³⁾。多くの研究室には既にEtBr染色用の機材が導入されているため、アガロースゲルからのDNA回収のためだけにこうした試薬や機材を新たに導入するにはいささか抵抗があると思われる。

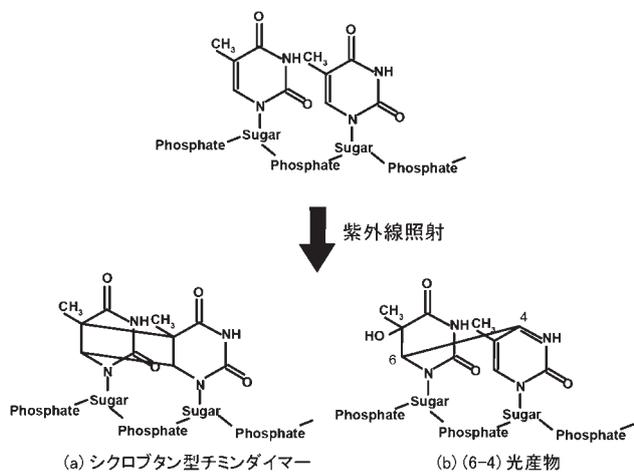


図1 紫外線照射によって形成される主なピリミジンダイマー

2. 塩基性核酸染色試薬

アガロースゲルにおける核酸染色試薬としては非蛍光の染色薬、例えばメチレンブルー等の塩基性の染色薬が古くから知られている⁴⁻⁵⁾。これらの塩基性染色試薬の中でも酢酸カーミン溶液は、小中学校の顕微鏡観察でも細胞の核を染めるのにも使われているので聞き覚えがある人も多いかと思う。核酸はその構造中に多数のリン酸基があるため全体として負電荷を帯びた分子であり、正電荷を帯びている塩基性染色試薬と静電的に結合する。また、色素自身が特定の色を有しているためDNA検出に紫外線照射や検出用機器が不要である。さらに核酸との結合様式がEtBrとは異なり2本鎖DNA内にインターカーレートしないため、使用者にとっても安全な核酸染色試薬として認知されている。一方、塩基性の核酸染色試薬は染色液の調製が煩雑であることに加えて、検出時間が長く感度が低いといった短所があるため⁶⁻⁷⁾、通常分子生物学実験で用いられることは少ない。

アガロースゲルからのDNA回収における問題点を踏まえて、筆者らは導入費用が安価で、DNA回収に十分な検出感度を持ち、かつ簡便で安全性の高いDNA染色試薬の開発を要望していた。本稿では、DNA回収に適した新しいDNA染色試薬であるViewaBlue® Stain KANTO(以下ViewaBlue®)の使用事例を報告する。

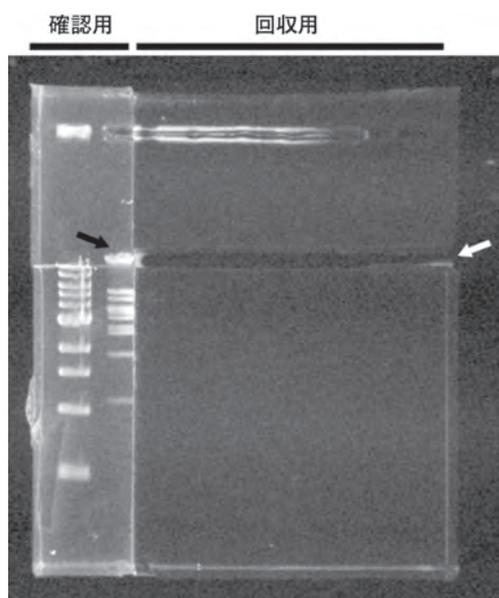


図2 EtBr染色におけるアガロースゲルからの目的DNA断片の回収
確認用ゲルの目的DNA(黒矢印)を目安として、回収用ゲルから目的DNA
があると予想されるゲル部分(白矢印)を切り出し、回収する。

3. ViewaBlue® Stain KANTOによるDNA染色

ViewaBlue®によるアガロースゲルのDNA染色には、EtBr染色と同様に「先染め」と「後染め」の2通りの染色方法が選択できる。一般的な塩基性のDNA染色試薬が「後染め」であるため利便性が向上したと言える。そこで、各染色方法で検出までにかかる時間と検出感度を評価した。この際、試料DNAとしてプラスミドDNAのpAcGFP-1(クローンテック社)を制限酵素EcoRIで切断して精製した後、段階希釈により様々な濃度に調製したDNA溶液を用いた。

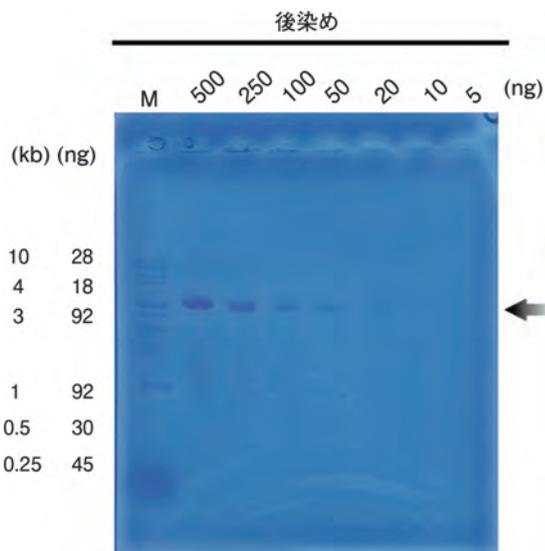


図3 後染めにおけるViewaBlue® Stain KANTOの検出感度
レーン上部の数字は泳動に使用したDNA量 (ng)を示す。また、黒矢印は目的DNA (pAcGFP-1, EcoRI切断済み)の位置を示す。

初めに、「後染め」法において検出までに要する作業時間と検出感度を検討した。アガロースゲル電気泳動(約30分間)後、ゲルをViewaBlue®に浸し、5分間静置した。その後、ゲルを精製水に浸して5分間振盪する脱色作業を2回繰り返した後、自然光下で目的DNAを観察した(図3)。「後染め」における作業時間は電気泳動の時間を含めても1時間以内に終了するため、EtBr染色の「後染め」と同程度である。ゲルに白色光を照らし、コントラストを上げると、目視で約5~10 ngのDNAが確認でき、EtBr染色したゲルをポラロイドカメラで撮影した場合には4 ng程度のDNAが確認できることから、検出感度も同程度であった。ちなみに、脱色作業を30分程度延長すればより鮮明な泳動像を得ることができる。

次に、「先染め」での検出までに要する作業時間と検出感度を検討した。ViewaBlue®を最終濃度で1%となるように添加したアガロースゲルと泳動用緩衝液(1xTAE)を電気泳動に使用した。電気泳動中にDNAバンドを観察できるかどうかを検討するため、泳動開始から15分および30分後に自然光下で目的DNAを観察した(図4)。泳動像そのものは「後染め」に比べて分離能が劣るが、白色光下の目視では、約20~50 ng程度のDNAが視認された。「後染め」法と比べると、ゲルおよび泳動用緩衝液の作製に多少の手間がかかる上、検出感度も低下しているが、泳動中あるいは泳動後すぐに観察できるため、DNA回収等の作業に速やかに移ることができるという利点がある。

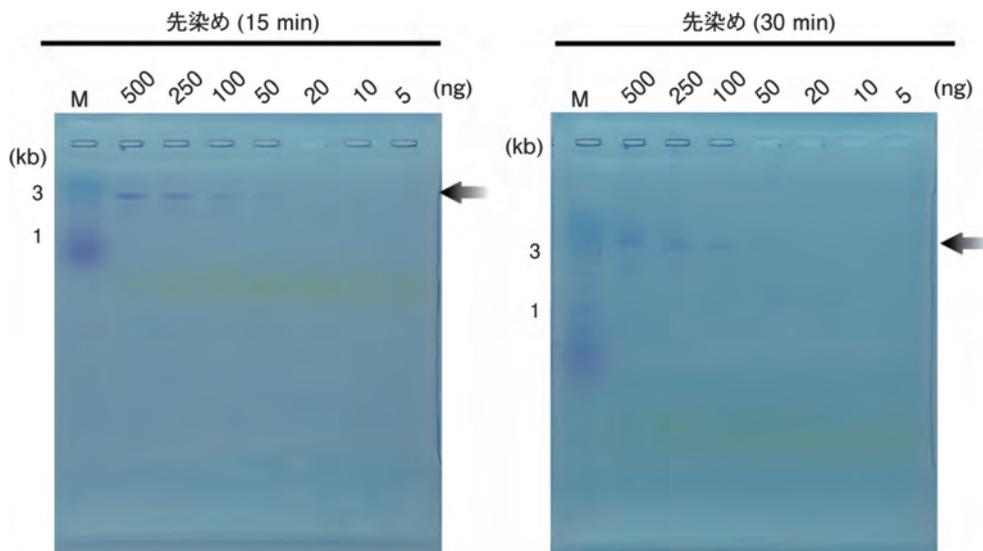


図4 先染めにおけるViewaBlue® Stain KANTOの検出感度
左は泳動後15分後、右は30分後に観察。レーン上部の数字は泳動に使用したDNA量 (ng)を示す。また、黒矢印は目的DNAの位置を示す。

市販のDNA回収用キットを用いてDNAを回収する場合、100 ng以上のDNAを回収用アガロースゲル電気泳動に供することが一般的である。ViewaBlue®を用いた「後染め」と「先染め」では20 ng程度のDNAが確認できるため、キットを用いた通常のDNA回収法にそのまま適用できる。従って、ViewaBlue®の試薬としての安全性や可視光下で作業できる簡便性等を考慮すれば、電気泳動におけるDNA検出や回収においてViewaBlue®はEtBr染色等の蛍光系染色試薬より使い勝手がよいだろう。

しかし、蛍光系DNA染色試薬とは異なり、ViewaBlue®を用いたDNA検出には2つの課題がある。1つは、目視で非常に薄しか見えないDNAバンドをデジタルカメラ等で記録することが難しく、露光やシャッタースピードで強度を上げられる蛍光試薬による染色とは異なる。2点目として、一般的な泳動用のローディングダイに含まれる色素であるプロモフェノールブルーやキシレンシアノールと色調が干渉することが挙げられる。ViewaBlue®で染色した場合、これらの色素と標的DNAのバンドとが重なると両者を区別することができない。そのため、ViewaBlue®用のローディングダイには色調が異なるオレンジGのみを添加した別売の6倍濃縮ローディングバッファー オレンジGを使用することが望ましい。

4. アガロースゲルからの回収効率の比較

アガロースゲルからのDNAの回収効率について、自然光下で作業できるViewaBlue®と、UV-C下で行うEtBr染色、および青色光下で行うSYBR-Safe(インビトロジェン社)と比較した。前述の制限酵素EcoRIで切断した3 μgのpAcGFP-1を電気泳動したゲルをそれぞれの染色試薬で「後染め」した後(図5)、pAcGFP-1のバンドを切り出し、DNA回収用キットであるWizard Gel and PCR purification system(プロメガ社)を用いて切り出したアガロースゲルからDNAを回収した。回収DNA量はどの染色方法を用いても大きな差は見られなかった。現在市販されているDNA回収用キットは、高濃度のカオトロピック塩存在下でDNAをシリカメンブレンやシリカビーズに選択的に吸着させるものが主流である。そのためViewaBlue®によってDNAのシリカへの吸着が阻害される可能性も考えられたが、実際にはほとんど影響しないことが確認された。また、エタノール含有溶液で洗浄する工程で、DNAに吸着しているViewaBlue®はDNAから遊離して洗い流されたため、UV吸光度測定や蛍光試薬による回収DNAの濃度検定には影響しなかった。

回収した各々のDNAの一部(25 ng)は、20 μlでライ

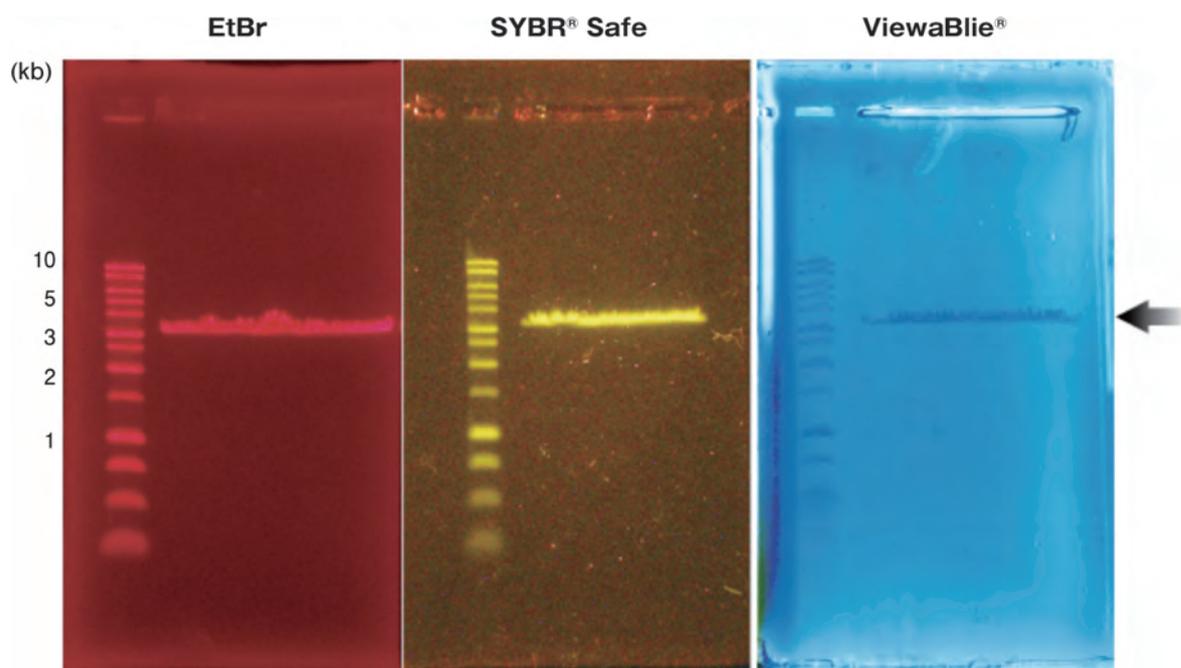


図5 アガロースゲルからの目的DNAの回収。
アガロースゲルに、それぞれ3 μgのEcoRI切断したpAcGFP-1を泳動後、EtBr、SYBR®Safe、ViewaBlue® Stain KANTOで染色後、EtBr染色は紫外線で、SYBR®SafeはSafe Imager™ blue light transilluminator(インビトロジェン社)と専用フィルターで可視化した。ViewaBlue® Stain KANTO染色したゲルは、スキャナーで画像を取り込んだ。黒矢印は目的DNA(pAcGFP-1, EcoRI切断済み)を示す。

ゲーション反応を行い、そのうち5 µl (DNA量で6.25 ng)を用いて大腸菌を形質転換することにより、回収したDNAの品質を評価することとした。もし回収DNAにピリミジンダイマーのような損傷が入っていれば、形質転換されて生育できる大腸菌のコロニー数が減少する。EtBr染色とUV-Cの組み合わせでは、DNAにピリミジンダイマーが生成することが知られているため、UV-Cは15秒間と30秒間照射する試験区を設けた。その結果、青色光照射下で作業を行うSYBR®-Safe染色と、自然光下で作業するViewaBlue®染色では、非常に多くの形質転換された大腸菌コロニーが観察された(図6)。一方、EtBr染色したゲルから回収したDNAを用いた場合は、UV-Cの照射時間が長くなるにつれて形質転換体のコロニー数が減ることが明らかとなった。以上の結果から、自然光下で作業できるViewaBlue®染色したアガロースゲルから回収したDNAを用いたクローニング効率は、DNA損傷が生じないSYBR®-Safeで染色した場合と同程度であった。つまりViewaBlue®を用いた場合でもUVを用いないためゲルからの回収時にDNAに損傷が入らず、その後の実験に適用できることが判明した。

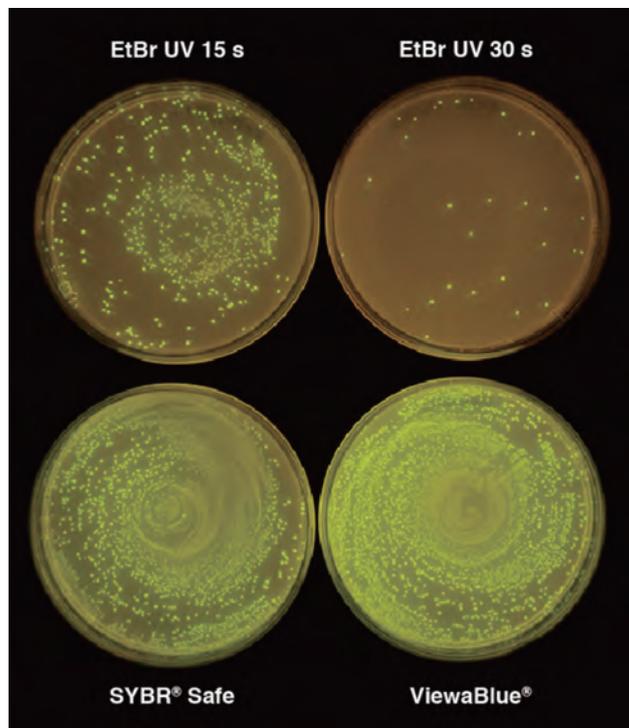


図6 回収したDNAの損傷度の比較

pAcGFP-1によって形質転換された大腸菌は蛍光タンパク質であるGFPを発現するため、GFPを発現した形質転換体のコロニーを可視化した。SYBR® SafeおよびViewaBlue® Stain KANTOで染色したゲルから回収したプラスミドDNAを用いた場合、非常に多くの形質転換されたコロニーが観察される。一方でEtBr染色後に紫外線照射されたDNAは、照射時間の増加に伴ってDNAが損傷するため、形質転換体のコロニーの数も減少する。

5. おわりに

EtBr染色したアガロースゲルにUV-Cを照射して移動度を確認した後にDNAを回収してクローニングを行うと、ピリミジンダイマーの形成により著しく効率が低下する。また、EtBrは変異原性物質であるため、染色廃液や観察後のゲル等の廃棄物の処理方法については以前より議論の対象となっている。ViewaBlue®によるアガロースゲル染色の利点は、EtBrで認められる上述の課題を克服できることである。蛍光系染色試薬とは異なり、観察に特別な機材を必要としない、または滅菌蒸留水で脱色できる等、利便性が高く一般的な研究室であればすぐに導入できる。一方、ルーチンで電気泳動像を観察するには、写真撮影で融通が利く蛍光系染色試薬の方が優れていると思われる。そのため我々の研究室では、電気泳動像を撮影する際には蛍光系染色試薬でゲルを染色し、DNA回収にはViewaBlue®を使っている。特にアガロースゲルからのDNA回収は、作業工程の多さや安全性を考えるとViewaBlue®を使うメリットは大きい。また、検出条件によっては、EtBrに近い検出感度である上に利便性や安全性が高いため、大学や高校教育における学生実験でも十分活用できる核酸染色試薬であろう。

参考文献

- 1) Singer, V. L.; Lawlor, T. E.; Yue, S. *Mutat. Res.* 1999, 439, 37-47.
- 2) Cariello, N.F.; Keohavong, P.; Sanderson, B.J.; Thilly, W.G. *Nucleic Acids Res.* 1988, 16, 4157.
- 3) Martineau, C.; Whyte, L.G.; Greer, C.W. *J. Microbiol. Methods.* 2008, 73, 199-202.
- 4) Flores, N.; Valle, F.; Bolivar, F.; Merino, E. *BioTechniques.* 1992, 13, 203-205.
- 5) Adkins, S.; Burmeister, M. *Anal. Biochem.* 1996, 240, 17-23.
- 6) Turgut-Balik, D.; Çelik, V.; Moreton, K.; Brady, R.L. *Acta Biol. Hung.* 2005, 56, 389-397.
- 7) Raymer, D.M.; Smith, D.E. *Electrophoresis.* 2007, 28, 746-748.

最近のトピックス

アルカリ性 Cu CMP 後洗浄液「CMP-B200シリーズ」

半導体デバイスの高集積化に伴い、配線幅や配線間のピッチの微細化が進んでいる。また、縦方向にも多層配線化が進んでおり、一層を平坦に積み上げることによって、より高精細な構造体を造ることが出来る。半導体デバイス製造プロセスにおいては、CMP (Chemical Mechanical Polishing: 化学的機械研磨) でウェハ表面の平坦化を行っている。CMPは、スラリーに含まれる研磨砥粒 (シリカ、セリア等) の機械的効果と薬液成分 (酸化剤、防食剤等) の化学的効果との相乗効果により、ウェハ表面を平坦化する技術である。CMP後のウェハ表面は、パーティクル (スラリー中の砥粒、防食剤と配線材料の錯体由来の有機系残渣等) や金属不純物 (スラリー、配線材料由来) で汚染されているため、ブラシスクラブと薬液を併用した洗浄を行う。この時に使用される薬液は、「CMP後洗浄液」と呼ばれ、高いパーティクル洗浄性能、金属不純物洗浄性能、配線材料へのダメージ抑制などの機能が要求される。関東化学で新たに開発したアルカリ性のCu CMP後洗浄液「CMP-B200シリーズ」について紹介する。

1. 「CMP-B200シリーズ」の製品ラインナップと特徴

1-1) 製品ラインナップ

品名	成分		pH (100倍希釈時)	推奨希釈倍率	備考	
	塩基性化合物	その他				
CMP-B201	有機アルカリ	キレート剤	9	100~200	・基本組成 ・ボラスlow-k材料に対応	
CMP-B202			8			
CMP-B203		キレート剤 添加剤	11	100		・高い有機残渣除去性 ・Cu/バリアメタル材料間のガルバニック腐食抑制が可能
CMP-B204			11			

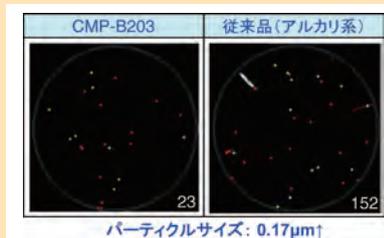


図1 パーティクル除去性評価結果

- ウェハ: Cu/Si ウェハ
- 評価プロセス: Cu CMP → バリアメタル CMP → 洗浄 → 乾燥
- 洗浄液: CMP-B203 (100倍希釈品)、従来品 (アルカリ系)

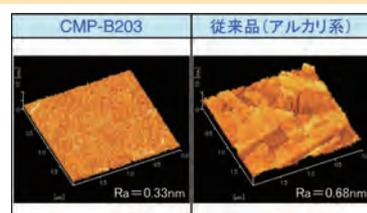


図2 AFMによる洗浄後のCu表面状態確認結果

- ウェハ: Cu/TaN パターンウェハ
- 評価プロセス: Cu CMP → バリアメタル CMP → 洗浄 → 乾燥
- 洗浄液: CMP-B203 (100倍希釈品)、従来品 (アルカリ系)

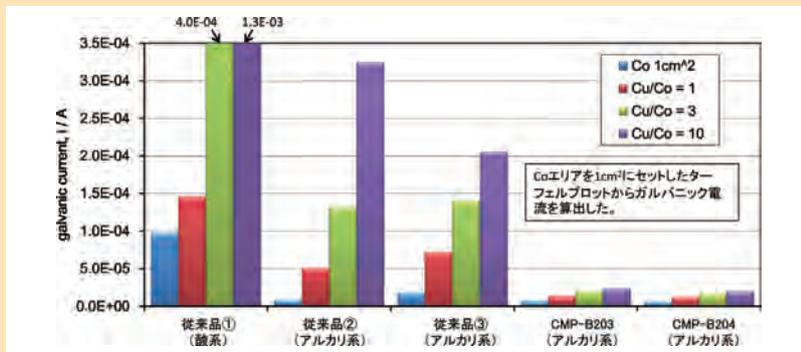


図3 Cu/Coの接液面積比におけるガルバニック電流

1-2) 特徴

- ① CMP後のパーティクル (砥粒、有機残渣)、金属不純物汚染の除去性が高く、B203およびB204は、特に有機残渣除去性に優れる
- ② 金属 (Cu、Ti、Ta等) および層間絶縁膜 (SiO₂、low-k等) をアタックせず、Cuと新規バリアメタル (Co、Ruなど) とのガルバニック腐食を抑制可能
- ③ 処理後のCu表面を安定に維持可能 (酸化の進行を抑制)
- ④ 高い希釈倍率 (100倍以上) により、洗浄プロセスの低コスト化が可能
- ⑤ 危険性、有害性が低い (TMAHフリー等)

2. 性能

2-1) パーティクル除去性評価結果

Cuプランケットウェハにおけるパーティクル除去性評価結果を図1に示す。B203は従来品よりも、良好な洗浄結果が得られている。

2-2) 洗浄後のCu表面状態確認結果

AFMによる洗浄後のCu表面状態の確認結果を図2に示す。B203は従来品よりも、Cuに対するダメージが小さく、Cu/TaN構造ウェハにおけるガルバニック腐食が小さいことが解る。

2-3) Cu/Coの接液面積比におけるガルバニック電流

次世代のバリアメタル材料として候補に挙がっているCoやRuを用いたプロセスへの適用も進めている。各種CMP後洗浄液における、Coエリアを1cm²にセットしたターフェルプロットからガルバニック電流を算出した結果を図3に示す。Cu/Co面積比10の場合は、酸系やアルカリ系の従来品①~③と比較し、B203およびB204は特にガルバニック電流が小さくなるため、Cu/Coバリア構造などの次世代デバイスへの適用が期待される。

3. まとめ

CMP-B203、CMP-B204は、Cu-BTA錯体などの有機系残渣の除去性の向上、Cuへのダメージを低減できることから、洗浄後のウェハ表面の欠陥数を大幅に低減することができると考える。更に次世代バリアメタル材料として注目されているCoやRuを用いたプロセスへの適用も期待できる。また、各特殊基板へ対応できる組成提案・開発も可能である。今後も環境・安全面、コスト面への配慮を行いつつ、シリーズ拡充を行う。