



Title	分子間力顕微鏡を用いた各種表面間相互作用の計測
Author(s)	廣島, 通夫
Citation	大阪大学, 1999, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://doi.org/10.11501/3155511
rights	
Note	

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

分子間力顕微鏡を用いた各種表面間相互作用の計測

博士学位論文 1999 年 1 月

廣島通夫

目次

要旨	3
序論	4
1 章 分子間力顕微鏡による計測	10
1-1. 序	
1-2. 概要	
1-3. カンチレバー	
1-3a. カンチレバーの特性に関する理論	
1-3b. カンチレバーの製作と弾性定数の評価	
1-4. フィードバック制御	
1-4a. 光フィードバックの理論	
1-4b. フィードバック回路と外力の制御	
1-4c. 外力の算出	
2 章 疎水表面間相互作用の測定	32
2-1 序	
2-2 材料および計測	
2-2a. 表面疎水性修飾および計測用試料の作成	
2-2b. フォースカーブ測定	
2-2c. プローブ尖端の曲率半径、および接触角測定	
2-3 結果	
2-3a. プローブ尖端の曲率半径測定	
2-3b. フォースカーブ	
1. オクチルシラン表面間	
2. トリメチルシラン表面間	
2-3c. 指数関数によるフィッティング	
2-3d. 接触角計測	
1. オクチルシラン表面	
2. トリメチルシラン表面	

2-4 考察

2-4a. 他の引力相互作用との関連

1. VdW 力

2. 静電相互作用

2-4b. 疎水修飾による影響

2-4c. 相互作用プロファイル

2-4d. 指数関数による近似

2-4e. 接触角との相関

2-4f. 総括

3 章 表面近傍の表面間相互作用

..... 69

3-1 序

3-2 材料および計測

3-2a. 計測用試料の作成

3-2b. フォースカーブ測定

3-2c. 計算機シミュレーション

3-3 結果

3-3a. フォースカーブ

3-3b. 計算機シミュレーション

3-4 考察

結論

..... 89

謝辞

参考文献

要旨

筋収縮や細胞内の情報伝達など生体内における各種機能の発現は、関係する個々の生体分子間の相互作用が集積した結果である。これらの相互作用機序を明らかにするためには、相互作用を構成する分子間力の種類や性質を知る必要がある。実際の生体分子間相互作用は、いくつかの相互作用の複合であると考えられるため、その解釈には構成する各相互作用それぞれについての知見が要求される。そこで本研究では、近年開発した高感度分子間力顕微鏡を用いて、各種の性質を持つ均一表面、特に疎水性表面を有する微小プローブに作用する力を計測、解析した。

生体分子サイズ程度のプローブ(曲率半径 17nm)表面をシランカップリング剤により疎水性に修飾し、同様に修飾したガラス基盤との間に作用する力を溶液中において測定した。得られた結果の主な点は、以下の通りである。

1)長距離引力の存在と溶液塩強度への依存性

純水中において約 200nm の長距離に及ぶ引力が観測された。この引力の作用距離は、溶液中の塩強度の増加に伴い減少を示した。得られた力のプロファイルは、二つの指数関数でよく近似され、減衰定数の一方は塩強度に関わらずほぼ一定であったが、他方には塩強度に対する依存性が見られた。しかし、帯電表面間における静電相互作用の減衰定数(デバイ長)の塩強度依存性とは傾向が異なっている。

2)巨視的現象との相関

溶液の液滴と疎水表面間の接触角の巨視的計測結果より、表面疎水性(表面張力)の度合いと、引力の作用距離及び減衰定数に相関があることが示された。このことは同時に、観測された長距離力が、水(分子)と疎水表面との相互作用を反映したものであるということを示唆している。

疎水表面間の相互作用については未だに解明されていない点が多いが、生体分子サイズ程度の表面にも長距離引力が作用することを示した初めての結果である。

また、修飾を施していないプローブ/基盤間の相互作用についての測定もおこなった。わずかに帯電しているこれらの表面間には、遠傍より微弱な静電斥力が観測されたが、表面近傍においては、表面間力の挙動を記述する DLVO 理論に従わない点が見られた。近傍におけるこの微小な相互作用に対して考察を加える。

序論

筋収縮や遺伝子情報の転写・複製・翻訳をはじめ、細胞内における情報伝達、蛋白質のフォールディングなど生体内での各種機能の発現は、アクチン-ミオシンや DNA-RNA ポリメラーゼ等といった介在する各種生体分子間に働く、分子レベルでの相互作用の結果にほかならない。これら相互作用のメカニズムを詳細に解明するためには、結合・解離の可否や頻度を明らかにするだけでなく、その素過程を構成する分子間力の種類や性質、および程度を知ることが必要である。近年、ガラスニードル、レーザートラップや原子間力顕微鏡 (Atomic Force Microscope、以下 AFM) 等の測定手法を用いて、各種生体分子間の相互作用が測定されている (アクチン-ミオシン間: ガラスニードル [1][2]、レーザートラップ [3]、キネシン-微小管間: レザートラップ [4]、相補的 DNA 塩基対間: ガラスニードル [5]、AFM [6]、アビジン-ビオチン間: AFM [7])。これら相互作用力のほとんどはピコニュートンレベルの非常に微小なものであり、いずれの測定手法もこれらの微小な力を検出可能な感度を備えている。

上記の測定手法の中で、AFM は 1986 年にビニツヒ (Binnig) らによって開発されて以来 [8]、主に各種材料の表面形状の二次元観察に用いられ、多くの成果を上げてきた。試料表面上を走査する板バネ様のカンチレバーのたわみを計測し、その形状を画像化する。試料によっては、オングストロームレベルに達する面内分解能が得られている。また、電子顕微鏡と異なり測定雰囲気を選ばず、またトンネル顕微鏡の様に試料の導電性に影響されないといった利点があるため、活性を保持している生体分子の液中観察にも多く用いられてきた。しかし、プローブ (探針) の走査により蛋白質などの柔らかい生体分子は損傷を受けるほか、分解能の低下も避けられない。現在も様々な技術

の開発が続けられおり、その性能も年々改善されつつあるが、他の測定手法と比較し、特に卓越しているといった状況にはない。前述のとおり、最近では表面形状観察の他に、その感度を活かし生体分子間に働く相互作用の測定にも用いられてきている。ただし、現在のところ、それらの測定は対分子間の結合が破断するときの力(結合力)を計測したものであり、結合するまでの相互作用を、分子間距離の関数として測定したものではないため、分子間力相互作用の理解に繋がるとは言えない。相互作用力を分子間距離の関数で表すことのできる、非接触での相互作用測定が必要である。このような測定にはさらなる高感度が要求される。報告されている生体分子間の接触相互作用の力が数ピコニュートンレベルであることを考慮すると、このような非接触相互作用を計測するにはサブピコニュートンの感度が必要だと考えられる。

各種生体分子間の相互作用は、分子表面の形状や性質に依存する。帯電表面間に働く静電相互作用や、無極性表面間に働く疎水相互作用をはじめとする各種の相互作用が存在するが、各種表面が混在する場合、計測される力は各々の表面間相互作用が複合した結果となる。そのため、計測された分子間力の解釈には、各種の相互作用についてそれぞれの特性を把握しておくことが、必要である。各々の相互作用の性質は、均一な表面を用いた各種表面間力の計測から明らかにすることが出来る。表面間力測定装置(Surface Force Apparatus、以下 SFA) [9]をはじめとする種々の測定装置により、各種の性質を持つ表面間に働く相互作用の測定がおこなわれてきた。なかでも、静電相互作用に関しては理論も確立しており、理論と一致する計測結果も示されている [10]。しかし、疎水表面間に働く相互作用に関しては確立した理論がなく、計測においても、力の作用範囲をはじめ一致した見解が得られていない。また、SFA を用いた実験では、曲率半径が数センチメートルの曲面を用いているため、数十ナノメートルの大きさである蛋白質分子等の生体分

子間相互作用のモデル系としては適しているとはいえない。近年では AFM を用いて、プローブの微小表面に作用する表面間力の測定もおこなわれているが、その先端曲率半径および尖端角は分子サイズに値する程度の微小なものではない。生体分子間の相互作用において重要な役割を果たしている、疎水表面間相互作用に関して生体分子サイズのプローブを用いた計測が必須である。

本研究の目的は、各種の均一表面間に働く相互作用を、曲率半径が約 20nm の生体分子サイズのプローブを用いて測定し、生体分子間相互作用を構成する各種の表面間相互作用の特性を明らかにすることである。特に、その性質が明らかではない疎水表面間の相互作用の計測は、今後生体分子間の相互作用計測結果の解釈をおこなううえで重要となる。

各種表面間力の測定に際し、本研究では、分子サイズレベルの表面に作用する微小な力を感度よく検出するために、AFM を改良した高感度の分子間力顕微鏡を用いた。サブピコニュートンレベルの相互作用を高感度で計測するためには、カンチレバーの弾性定数を 0.1pN/nm ($=10^3\text{N/m}$) 程度にまで小さくする必要がある。しかし、従来 AFM 技術においては、大量生産技術の限界もあり、このようなカンチレバーは市販されていなかった。また、たとえ技術的に製作可能であっても、そのまま非接触測定に応用することはできない。例えば、 0.1pN/nm のカンチレバーの場合、約 37nm (peak-to-peak) に達する大きな熱ゆらぎが生じてしまい、プローブと試料表面間の間隙距離を制御することが不可能となるからである。そこで、(1)弾性定数が 0.1pN/nm 程度のカンチレバーの自作技術、(2)カンチレバーの熱ゆらぎを抑え、プローブー試料表面間の間隙距離を制御する技術、の二点の新しい技術を開発し、要求される感度が得られるようにした。既に徳永・青木らにより、この分子間力顕微鏡を用いて、シランカップリング剤で修飾した帯電表面間に作用する溶液中

における静電斥力の測定がおこなわれており[10][22]、距離－力曲線のプロフィール、および溶液塩強度に対する依存性について、理論とよく一致する結果が得られている。同時に、この分子間力顕微鏡がサブピコニュートンの力分解能を有することが、実際に確かめられた。これは従来 AFM の約 100 倍の感度に相当する。

本研究では、静電相互作用の測定と同様、シランカップリング剤で修飾した疎水性表面を用いて、溶液中の疎水表面間に働く相互作用の計測をおこなった。前述の通り、疎水表面間の相互作用に関しては、未だに解明されていない点が多い。疎水表面が互いに接近する際には、それぞれの表面の溶媒和帯が重なった部分において、水分子の構造的再配置を要求するため、他の相互作用と比べ長距離にわたって作用するであろうことが予測される。事実、数々の手法により、この長距離性は実験的に示されてきた。しかしながら、観察された表面間力の作用距離は、用いられた表面修飾剤の種類や溶液条件によりばらつき、実験により数 nm [11]から数百 nm [19]といった差がみられる。また、塩強度などの溶液条件への依存性についても、塩強度の増加と主にその作用距離が減少する傾向は報告されているが [16][17]、それが何に起因するものかははっきりしていない。さらに、生体分子サイズ程度の微小疎水表面における相互作用の測定例はなく、巨視的平面で得られている結果がそのまま適用可能かどうかについても問題が残る。こうした問題点に対する解答を得るために、(1)溶液(純水および塩溶液)中における微小疎水表面に働く相互作用力の測定 (2)疎水修飾剤を違えた際の相互作用力の測定 (3)溶液の液滴と疎水表面の間の接触角測定 をおこない、生体分子サイズの疎水表面に働く相互作用の性質の解明と、この微小領域の相互作用と巨視的現象との相関を探った。

さらに、修飾を施していない、弱く帯電している表面(酸化亜鉛およびガラ

ス)間についての力計測も併せて行い、表面近傍における相互作用について解析をおこなった。得られた結果について、静電相互作用と、表面近傍で支配的に作用する Van der Waals 力(以下 VdW 力)との複合理論である、DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) 理論との整合性を含め考察した。

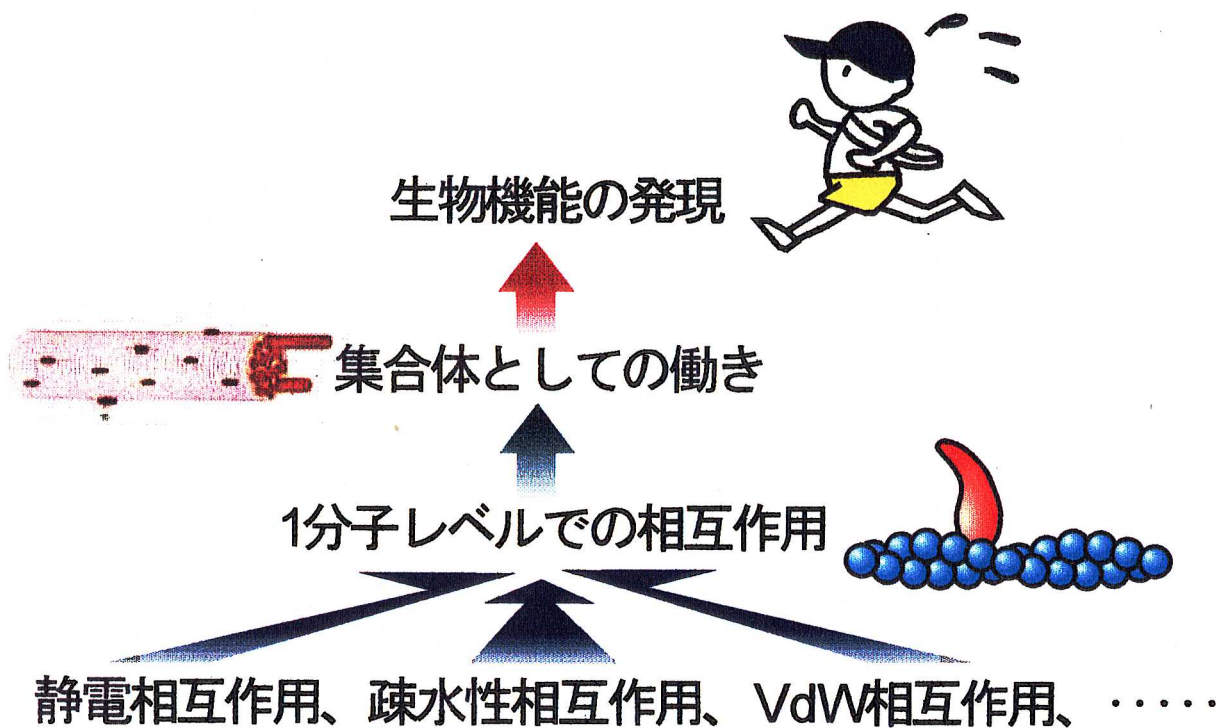


Fig. 1

生物機能の発現に至るメカニズムを知るためには、根底を成す各種相互作用に関する知見が必要。

1 章

分子間力顯微鏡

1-1 序

実際の生体分子間相互作用のモデル系としての表面間力測定をおこなうために、本研究では数十 nm の曲率半径を有する微小表面を用いている。そのため、この表面に作用する力は巨視的表面を用いる系と比較し非常に小さく、ピコニュートンレベルである。このような微小な力に対する感度を備えた測定系として、本研究室において AFM を基に近年開発されたサブピコニュートンの感度を持つ分子間力顕微鏡を用いた。高感度計測を達成するために開発した新たな技術は以下の 2 点である。

(1)弾性定数が 0.1pN/nm 程度の柔らかいカンチレバー

(2)カンチレバーに生ずる熱ゆらぎを制御するフィードバック

カンチレバーの熱ゆらぎを制御するフィードバックは同時に、表面間距離をナノメートルレベルで精確に制御できる利点を有している。このため、従来の SFA をはじめとする測定系において引力の測定時に不可避であった、作用力の変化がスプリングの弾性定数を上回った際に発生する表面同士の吸着を防ぐことが出来る。

本研究では、この高感度分子間力顕微鏡を用いて、全ての表面間相互作用の測定をおこなった。以下、測定系についての詳細を述べる。

1-2 概要

本研究で用いた分子間力顕微鏡(Fig. 2)は、ベースとして市販の AFM (NV2000 : オリンパス光学)を使用している。顕微鏡部分にはAFM 本体に加え、カンチレバー及び試料表面観察用の光学顕微鏡(反射型微分干涉顕微鏡 BH2-UMA : オリンパス光学)が付属している。これらに、顕微鏡を操作するコントローラ、及び各種アプリケーションソフトを利用するためのワークステーション(Apollo 9000 : ヒューレット・パッカー)が接続され、1つのシステムを形成している。なお、液中観察が可能なように、対物レンズには $\times 40$ の水浸用レンズ(WPlan 40 $\times$ UV : オリンパス光学)が採用されている。分子間力顕微鏡への改造は、上記の市販部分に、フィードバックのための回路(CF201 : センテック)やレーザー、光学部品を追加する形でおこなった。また、顕微鏡本体は、振動対策のため防震台(HG-107LM : ヘルツ)の上に設置してある。

出力 3mW の変位計測用レーザー(半導体レーザー、波長 780nm)光は対物レンズを通過し、カンチレバー背面上に集光される。カンチレバー上の金蒸着面により反射されたレーザー光は、再び対物レンズを経て変位計測用センサ(4 分割光センサ)に入射する。この光センサの出力電圧値から、臨界角方式(Fig. 3(a)) [25]と呼ばれる方法により変位が計算される。一般的には、臨界角方式ではなく、光てこ方式(Fig. 3(b))と呼ばれる変位検出法が用いられる。この方法は、カンチレバーのたわみにより生ずる、分割センサ上でのレーザー光入射位置のずれから変位を算出する。一方、臨界角方式は、焦点位置(一定位置にあるカンチレバー背面上、図中 A)より対物レンズに入射する平行光束が、プリズム面状で臨界角をとるように設定したとき、カンチ

レバーのたわみのため焦点位置からずれた光束がプリズムを透過し、分割センサ上に光量の差が生ずることを利用している。対物レンズの焦点位置とレーザー光の集光位置が一致するため、光学顕微鏡下においてカンチレバーの背面に焦点を合わせれば、センサの光学調整も済む簡便さに加え、光でこ方式がカンチレバー背面の水平面内での傾きに敏感なのに対し、臨界角方式はそれほど影響されないという利点がある。

カンチレバーの変位シグナルは、位置制御のためのフィードバック回路に伝えられ、回路により最大出力 20mW の位置制御用レーザー（波長 680nm）の強度が調節される。強度変調されたレーザー光は、対物レンズを透過し、カンチレバー背面に照射され、変位の制御が行われる。なお、カンチレバーにより反射され、対物レンズを透過した位置制御用レーザー光が位置計測に影響することのないよう、分割センサの直前に赤外線透過フィルタ（ $>750\text{nm}$ 透過：朝日分光）を入れてある。カンチレバー及びフィードバック回路に関しては次項以降に詳述する。

カンチレバーの変位シグナルおよび制御用レーザーの出力は共に、オシロスコープ（CS-8010：ケンウッド）によりモニターし、同時に DAT レコーダ（RD-102TE：TEAC）を用いて、サンプリング周波数 24kHz にて記録する。記録されたデータの解析には、波形、スペクトル解析ともに FFT アナライザ（R9211A：アドバンテック）を使用した。

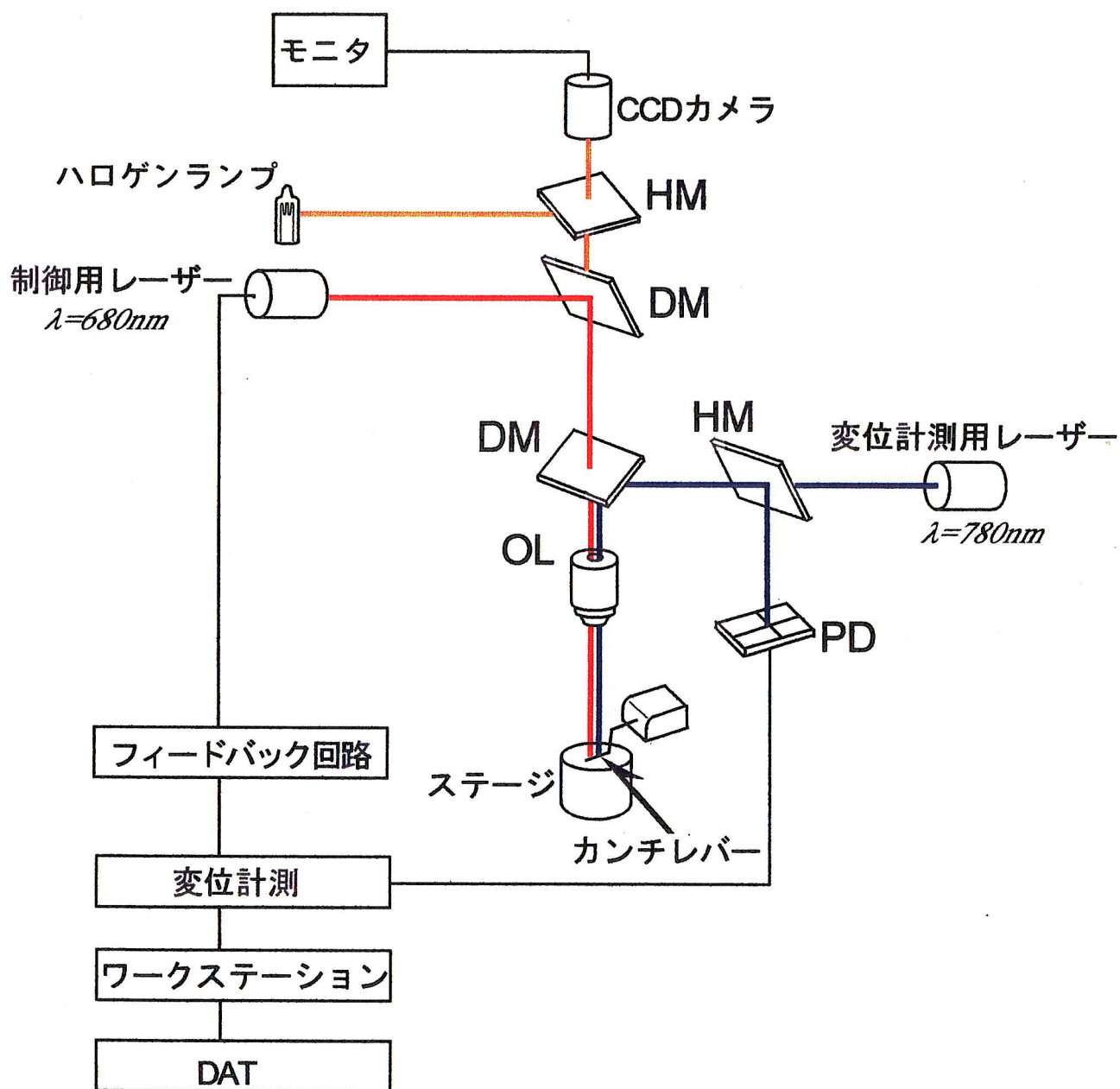


Fig. 2

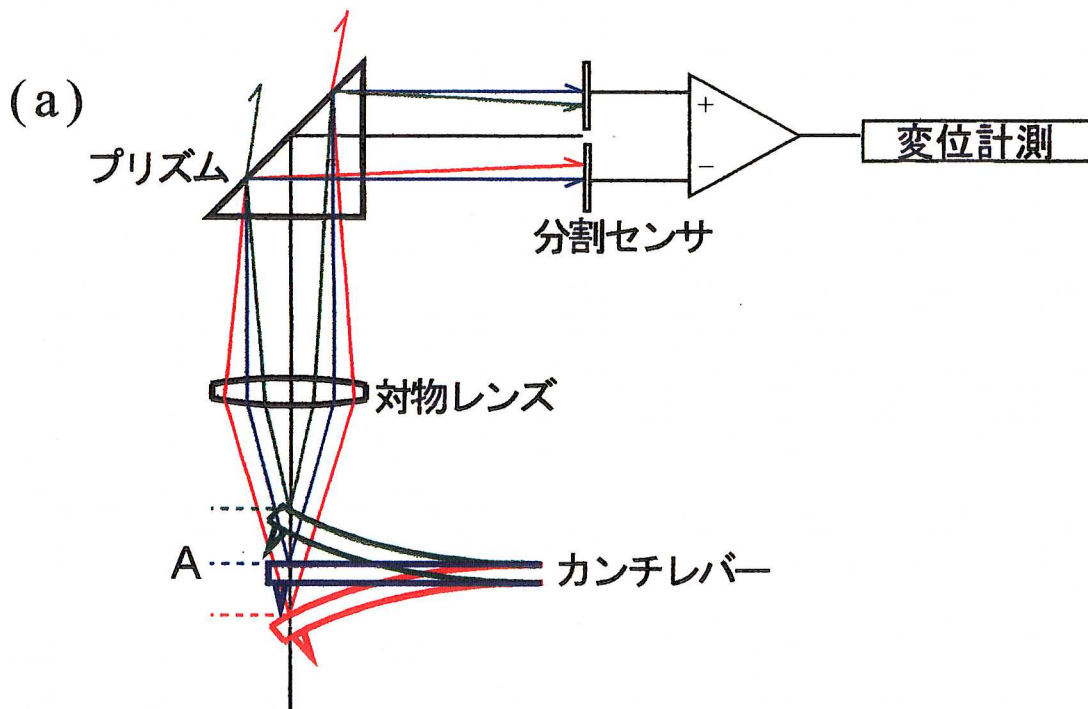
測定系（分子間力顕微鏡）の全体図

PD: フォトダイオード（光分割センサ）

OL: 対物レンズ

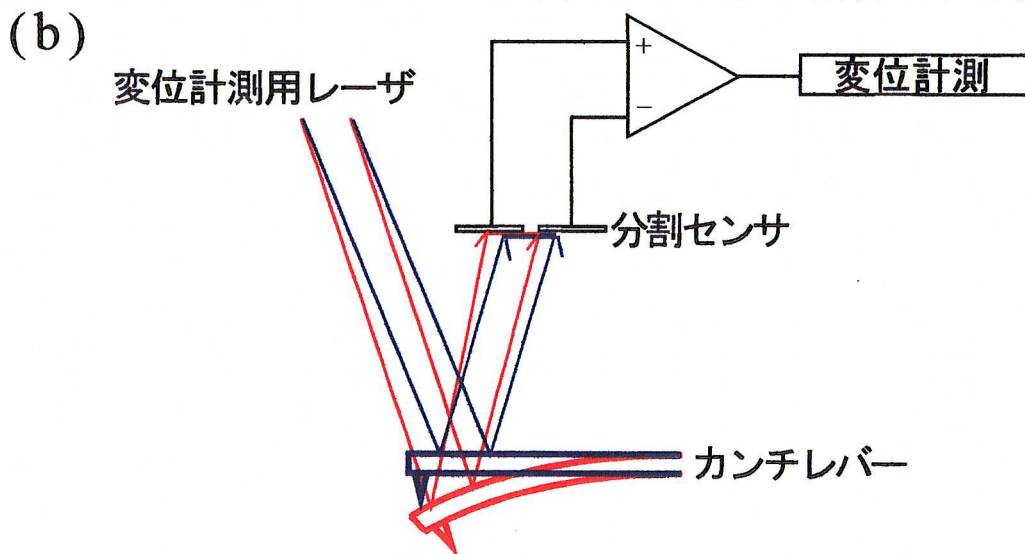
DM: ダイクロイックミラー

HM: ハーフミラー



<臨界角法式>

Aの位置（焦点）からの平行光束に対し臨界角となるよう設置したプリズムにより、焦点位置より外れた位置からの光の一部はプリズムを透過する。その際生ずる分割フォトダイオードの差出力から変位が計算される。



<光てこ方式>

カンチレバーのたわみにより、センサ上のレーザー光スポットの位置が移動する。その結果生ずる分割フォトダイオードの差出力から変位が計算される。

Fig. 3

臨界角方式と光てこ方式

1-3 カンチレバー

1-3a. カンチレバーの特性に関する理論

AFM はカンチレバーに生じたたわみを光学的に計測し、その変位量を計測する。この変位量に弾性定数を乗ずれば、カンチレバーに作用した力を求めることができる。変位測定系の分解能は機器毎に定まっているため、作用力に対する感度は、用いるカンチレバーの弾性定数に依存する。つまり、カンチレバーの弾性定数が小さい(柔らかい)ほど、外力に対しての変位量が大きくなり感度は増加する。しかし、このことは同時に、測定すべきシグナル(信号)以外のノイズ(雑音)によるカンチレバーの変位も増加することを意味している。ここで、カンチレバーの弾性定数と、計測におけるシグナル／ノイズ比(以下 S/N 比)との相関について以下に述べる。

外力 F が弾性定数 K のカンチレバーに作用した際、検出されるカンチレバーの変位 Δz_F は、フックの法則より、

$$\Delta z_F = F/K$$

で表される。一方、ノイズが全て熱ゆらぎに起因すると考えると、熱ゆらぎによるカンチレバーの変位 Δz_N は、統計力学の等分配則を用いて、

$$\frac{1}{2}K\langle \Delta z_N^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$$

より、

$$\sqrt{\langle \Delta z_N^2 \rangle} = \sqrt{\frac{k_B T}{K}}$$

と求められる。 k_B はボルツマン定数、 T は絶対温度である。上記より S/N 比は、

$$\begin{aligned}\frac{\Delta z_F}{\sqrt{\langle z_N^2 \rangle}} &= \frac{F/K}{\sqrt{k_B T/K}} \\ &= \frac{1}{\sqrt{K}} \cdot \frac{F}{\sqrt{k_B T}}\end{aligned}$$

と表される。つまり、S/N 比は弾性定数の平方根に反比例する。たとえば、弾性定数が 100 倍小さいカンチレバーを用いれば、S/N 比は 10 倍上昇することになる。従って、弾性定数が小さいほど、作用力を高い S/N 比で感度よく検出できる。本研究では、カンチレバーとして弾性定数が 0.1pN/nm 前後のものを使用している。この場合、室温(300K)中において 1pN の外力を計測した場合、S/N 比は 1.6 前後となり、ノイズとの分離が可能となる。ちなみに 1pN/nm のカンチレバーの場合、S/N 比は 0.49 となり、シグナルはノイズに埋没し、分離は不可能である。

通常市販されているカンチレバーは、弾性定数が最も小さいものでも 10pN/nm 程度である。これは、ほとんどがシリコンプロセスを経て生産されており、さらに小さい弾性定数になると反りや、巻きなどといった問題点が発生し、歩留まりが非常に悪くなるためである。そこで本研究では、材質にガラスを用いて弾性定数 約 0.1pN/nm のカンチレバーを自作している。実際にこのようなカンチレバーを製作するために必要とされるサイズがどの程度であるかを、以下に示す計算より割り出すことができる。矩形型のカンチレバーの弾性定数 K は、材質のヤング率 E (ガラス : $7 \times 10^{10} \text{N/m}^2$)、長さ L 、幅 w 、厚 t をもちいて、

$$K = \frac{wL^3E}{t^3} \quad \dots(1)$$

と表される。この式から、弾性定数を小さくするためには長く、薄いものを作製すれば良いことになる。しかし、長さを増せば、溶液中などの粘性雰囲気

で計測をおこなう場合、速い現象に追従不可能となる。従って、要求される周波数特性を満たすように、長さを定めることが必要である。弾性定数 K 、質量 m のカンチレバーの運動についての周波数特性 $\Phi(f)$ は、ランジュバン方程式を解くことにより、以下の式によって表される [26]。

$$\Phi(f) = \frac{4k_B T \gamma}{(K - 4\pi^2 m f^2)^2 + (2\pi \gamma f)^2} \dots (2)$$

ここで γ はカンチレバーの粘性係数である。後頁の表に、製作可能なカンチレバーのサイズの例と、 $4\pi^2 m f^2 / K$ の値を示す。実際の測定において、計測時の周波数帯域は 100Hz 程度である。 $f=100\text{Hz}$ の場合の $4\pi^2 m f^2 / K$ の値は $10^3 \sim 10^4$ であるため、(2) 式の分母中、 $4\pi^2 m f^2$ の項は無視することができる。従って、(2) 式は以下のように簡略化できる。

$$\begin{aligned} \Phi(f) &= \frac{4k_B T \gamma}{K + (2\pi \gamma f)^2} \\ &= \frac{4k_B T \gamma}{K^2 \left[1 + \left(\frac{f}{f_c} \right)^2 \right]} \dots (3) \end{aligned}$$

$$\text{ここで、} f_c = K / 2\pi \gamma$$

上式で、 f_c はパワー $\Phi(f)$ が $1/2$ となる周波数である。この式で示されるとおり、カンチレバーの周波数特性はローレンツ型のパワースペクトルとなり、高周波数域では f に比例して減衰する。 z 方向の γ は、カンチレバーの形状を楕円体近似することにより、

$$\gamma = 0.24 \times \frac{4\pi \eta L}{\ln \left(\frac{2L}{w} + \frac{1}{2} \right)} \dots (4)$$

と表される。カンチレバーの様な片持ち梁の場合には、実効の粘性として係数 0.24 を乗ずる必要がある。(4) 式を(3) 式に代入すると、以下の式が得られ

る。

$$f_c = \frac{K \ln\left(\frac{2L}{w} + \frac{1}{2}\right)}{3\pi^2 \eta L}$$

後頁の表に各サイズにおけるコーナー周波数の値を同時に示す。

以上では、z方向(高さ)におけるカンチレバーの挙動について検討したが、その柔らかさゆえに、カンチレバーが熱ゆらぎによりねじれる方向に変位することも考えられる。仮にねじれが生じた場合、先端のプローブがx(水平)方向に変位し、測定精度への支障を来すことが予測される。このねじれがどの程度のものかを以下の計算により見積もる。幅 w 、厚 t の矩形板のねじれ方向の弾性定数は、以下の式で表される。

$$C = \frac{kwt^3G}{L}$$

上式において、 G は材質のずれ弾性率であり、 k は w と t の比から得られる係数である。カンチレバーのねじれ方向の弾性エネルギーと、熱ゆらぎの回転方向のエネルギーとが等しいと考えると、等分配則により以下の式が成り立つ。

$$\frac{1}{2} C \langle \theta^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

ここで、 θ はねじれ角、 C はカンチレバーのサイズに依存するねじれ定数を示す。弾性定数0.1pN/nmのカンチレバーのサイズの一例として、幅30 μ m、長さ350 μ m、厚さ0.2 μ mのものを考える。このとき、 $C=6.8 \times 10^{-12}$ N $\cdot$ mとなり、カンチレバーのねじれ角は、

$$\sqrt{\langle \theta^2 \rangle} = 1.4 \times 10^{-3} [\text{deg}]$$

と計算される。この振れ角はpeak-to-peakで 8.4×10^{-3} degに相当する。先端のプローブである、ZnOウィスカーの長さを約10 μ mとすると、その振れ幅は、

0.24nm (peak-to-peakで1.5nm)となる。非接触測定をおこなう以上、プローブには広範囲からの力が作用し、原子レベルの面内分解能は期待できない。結局、上記程度の振れ幅ならば、計測への影響はほとんどないと考えられる。

表 1. カンチレバーのサイズと特性

幅 [μm]	長さ [μm]	厚 [μm]	$4\pi^2mf^2/K$	コーナー周波数 [Hz]
10	200	0.17	9.3×10^{-4}	111
20	200	0.13	1.5×10^{-3}	92
30	200	0.11	2.0×10^{-3}	82
10	250	0.21	1.5×10^{-3}	93
20	250	0.16	2.3×10^{-3}	79
30	250	0.14	3.1×10^{-3}	70
10	300	0.25	2.1×10^{-3}	81
20	300	0.20	3.4×10^{-3}	69
30	300	0.17	4.4×10^{-3}	61

1-3b. カンチレバーの製作と弾性定数の評価

カンチレバーの製作手順は (1)レバー部分の作製 (2)反射面の形成 (3)プローブ(探針)の接着 の3工程からなる。なお、カンチレバーに細かなゴミ等が付着し汚れると、平坦な反射面が形成されず計測に支障を来たすほか、コンタミネーションの要因となる。そのため、製作は全てクリーンルーム中において行っている。以下にその詳細を示す (Fig. 4(a)参照)。

(1) レバー部分の材質には、加工が容易であることからガラス(厚 0.03mm : 松浪ガラス)を使用している。この薄ガラスを約 4mm 幅の短冊状に切り、微小電極などの作製に用いられるニードルプラーで二度引きすると、幅数十 μm 、厚さ 1 μm 未満の矩形断面をもつ板状の部分が得られる。小さい弾性定数を保ちつつ、優れた周波数特性を得るためには、前述のとおり板厚を薄くすることが有効である。そのため、ヒーターの温度を、適当な板厚が得られるよう細かく調節する。次にこの薄い板状のガラスを、土台となるカバーガラス(厚さ 0.17mm)にエポキシ系接着剤を用いて接着し、接眼マイクロメーター付きの実体顕微鏡下で、300 μm 程度の長さで眼科用ばさみを用いて切断する。

(2) レバーの背面には、変位計測および制御用レーザー光を反射させるための金属を蒸着する。酸化に強く、水中でも化学的に安定である理由から金(Au)を用いる。市販されているカンチレバーのように背面一面に蒸着をおこなうと、薄いのがために反りが生じる。そこで、先端の一部のみに行うことでこの問題を解決している。蒸着前にマスキング用のカバーガラスの小片を土台ガラスに軽く貼り付け、レバーの先端 50~100 μm だけが蒸着されるように根元側を覆う。蒸着には電顕試料作製の蒸着装置(JEE400 : 日本電子)を用いる。膜厚計をモニターし、蒸着金の厚さを約300オングストロームに調節する。この厚さでレーザー光は 70%以上反射される。蒸着後、マスキング用のカバーガラス小片を取り除く。

(3) 生体分子サイズの微小表面を持つプローブとして、酸化亜鉛の針状結晶である ZnO ウィスカー (whisker) を採用した。力学的強度が高いことに加え、先端の曲率半径が約 17 nm (2 章参照) とタンパク質の分子サイズに近い。また、表面の性質上、ガラスと同様に、疎水修飾をはじめ種々の修飾が容易である。形状がテトラポッド型をしているため、水平な面に接着した場合、自然と一端が垂直方向を向く。レバーに取り付ける前にあらかじめ各種修飾をおこない、微量の接着剤を塗布したレバー先端に、ガラスニードルで拾い接着する。上述の工程を経て完成したカンチレバーの微分干渉顕微鏡像を、Fig. 4(b) に示す。

作製したカンチレバーを計測に用いるためには、弾性定数を正確に見積もる必要がある。そのため、二つの方法を併用している。

(1) クロスキャリブレーション法 (Fig. 4(c) 参照)

あらかじめ弾性定数の分かっている基準ニードルと作製したカンチレバーを接触させ、互いのたわみ量より、カンチレバーの弾性定数を見積もる方法である。基準ニードルをマニピュレータにより接触点より d [μm] 動かす。その際のカンチレバーのたわみ x [nm] を顕微鏡下で実測する。一方、基準ニードルは $d-x$ [μm] たわんでいる。ニードルの弾性定数を K_r [pN/nm] とすると、たわみ x [μm] に反比例するカンチレバーの弾性定数 K_x [pN/nm] は、次式から求まる。

$$K_x = K_r \frac{d-x}{x}$$

(2) 熱ゆらぎから求める方法

他に外力が作用していない場合、水溶液中でのカンチレバーの弾性エネルギーは熱ゆらぎのエネルギーと等しいと考えることができる。等分配則から、

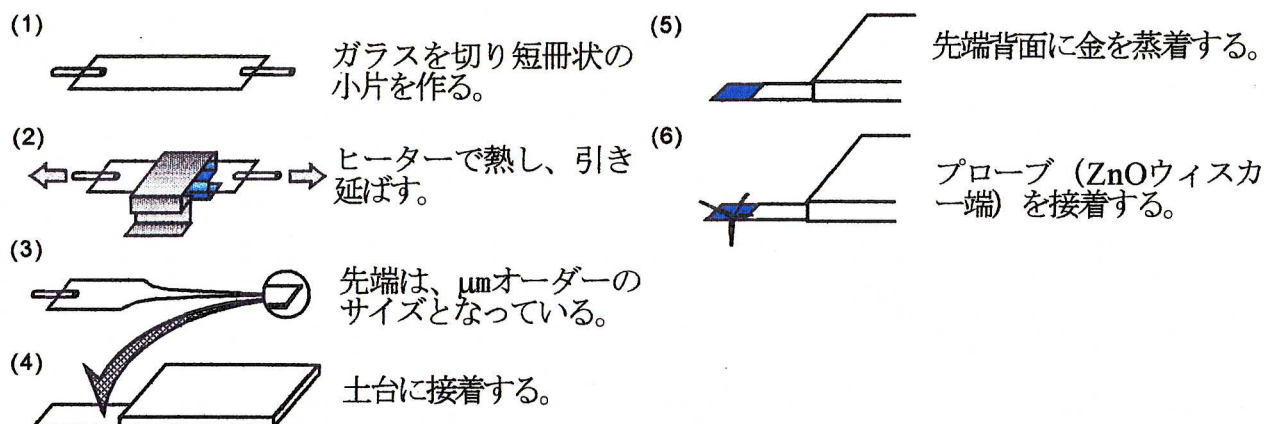
$$\frac{1}{2} K \langle x^2 \rangle = \frac{1}{2} k_B T$$

が成り立つ。ゆらぎ $\langle x^2 \rangle$ は、カンチレバーの位置 x [nm] の分散であり、AFM 上においてナノメートル計測することにより求まる。

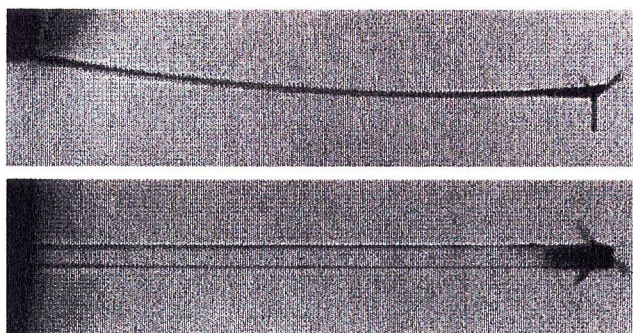
カンチレバーの位置 x [nm] は、分割光センサの出力電圧値より計算するが、この際、センサの出力電圧値と変位 x [nm] との間の係数が必要である。カンチレバー毎に変位計測用レーザー光の反射面(金蒸着面)の状況が異なっているため、計測に使用したカンチレバーそれぞれについて係数を算出する。この係数は、カンチレバーの保持台(ホルダ)に取り付けられている積層圧電体をファンクションジェネレータ(FG-273 : ケンウッド)で駆動し、一定の振幅をもつ正弦波(10Hz)でカンチレバーを振動させた時の分割センサの出力値から求めることができる。圧電の印加電圧に対する変位の係数は既知(1.9mV/nm)であるため、振動の振幅は印加電圧値により調節する。本研究では、peak-to-peak で 100nm、50nm、25nm、12.5nm、6.25nm の 5 種類以上の振幅にわたって計測をおこない、各振幅での係数の平均値をそのカンチレバーの係数として用いた。この係数により、センサ出力電圧値をカンチレバーの変位 x [nm] に換算する。さらに、ドリフト由来の低周波成分および電気ノイズ由来の高周波成分を除くため、 x [nm] の時系列データのパワースペクトル密度を計算し、ノイズを除去、Lorentzian で近似する。このスペクトルの面積を積分することで $\langle x^2 \rangle$ が求まる。

以上の両方法より求めた弾性定数は、比例係数 0.91 で正比例し、ほぼ一致する。弾性定数は実験毎に測定し、正確さを期している。

(a)



(b)



カンチレバーの微分干渉顕微鏡図

(上) 横断面図

(下) 上面図

先端に見えている突起がウィスカ。

(スケールバーは、 $50\mu\text{m}$)

(c)

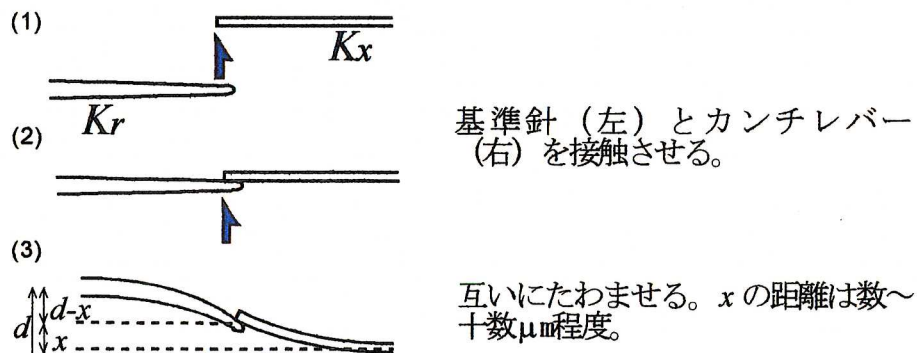


Fig. 4

カンチレバー

(a) 製作手順

(b) 微分干渉顕微鏡像

(c) クロスキャリブレーション法

1-4 フィードバック制御

1-4a. 光フィードバックの理論

柔らかいカンチレバーには、測定に支障を来す規模の熱ゆらぎが生ずるという不可避の問題が存在する。例えば0.1[pN/nm]のカンチレバーに生ずる熱ゆらぎは

$$\frac{1}{2}K\langle x^2 \rangle = \frac{1}{2}k_B T$$

の関係より、 $\langle x^2 \rangle^{1/2} \sim 6\text{nm}$ と求められる。これはpeak-to-peakでは約40nmに相当する。また、熱ゆらぎによる変位のほか、外力に対する変位も無視できない。数ピコニュートンの力にすら、数十nm変位する。従って、試料とプローブとの間隙を制御した計測をおこなうためには、何らかの制御をおこない、カンチレバーの位置を一定に保たねばならない。そのためにいくつかの方法が考えられる。例えば、試料ステージをカンチレバーの変位に合わせて上下させることは、従来のAFMにおいても、試料にかかる力を一定に保つためにおこなわれてきた。また、カンチレバーの根本を変位させるという方法も考えられる。しかし、いずれの方法も測定系の振動やカンチレバーの発振といった問題から有効ではない。

本研究で用いた分子間力顕微鏡では、光(レーザー光)の輻射圧を利用し、カンチレバーの先端位置を直接制御するといった方法を採用した。すなわち、プローブと試料間の斥力のためにカンチレバーが上方向に変位した場合には、レーザー出力を強くすることで押さえ、逆に引力のために下方向に変位した場合には、出力を下げカンチレバーの復元力で元の位置に戻す。なお、引力が加わった際のために、あらかじめレーザー出力にバイアスをかけておく。このフィードバック制御により、前述の問題点を回避し、カンチレバーの位

置を一定に保つことができる。こうした遠隔的なプローブの位置制御は、他にも磁場を利用した例などが報告されており、機構的複雑さを要求せずに位置制御を行える利点から、今後もひろく応用されると考えられる。

光の輻射圧の原理、および 0.1pN/nm 程度のカンチレバーに生ずる熱ゆらぎ等の変位を抑えるために必要な光の出力の見積もりを以下に述べる。

光は光子としての運動量を持つため、表面に衝突し、反射または吸収されたときその表面に対し力を及ぼす。光子 1 個の運動量は、

$$\frac{h\nu}{c}$$

で与えられる。ここで、 h はプランク定数、 c は光速、 ν は振動数である。

1 個の光子が表面と完全弾性衝突した場合に、表面に及ぼす力積は、

$$\frac{h\nu}{c} - \left(-\frac{h\nu}{c} \right) = \frac{2h\nu}{c}$$

と表される。一方、出力 W [mW] のレーザー光に含まれる光子数は、単位時間当たり

$$\frac{W}{h\nu}$$

であるので、1mW のレーザー光が全反射したとき表面に及ぼす力は、

$$\begin{aligned} \frac{W}{h\nu} \times \frac{2h\nu}{c} &= \frac{2W}{c} \\ &= \frac{2 \times (1.0 \times 10^{-3} \text{ (J / s)})}{3.0 \times 10^8 \text{ (m / s)}} \\ &= 6.8 \times 10^{-12} \text{ (N)} \\ &= 6.8 \text{ (pN)} \end{aligned}$$

となる。(他、ポインティングベクトルを用いた輻射圧の原理の解説については青木を参照)

0.1pN/nm のカンチレバーに生ずる熱ゆらぎの振幅は、peak-to-peak で約 40nm であり、これは力に換算するとおよそ

$$0.1 [pN/nm] \times 40 [nm] = 4 [pN]$$

となる。上記の計算より、この熱ゆらぎを抑えるためには、レーザーの出力は 1mw もあれば足りる。また、生体分子間に作用する力の大きさが数ピコニュートンであることを考えれば、数 mW から 10mW の出力のレーザーを使用すればカンチレバーの位置を一定に保つためには十分である。

1-4b. フィードバック回路と外力の制御

前項で述べた、光によるカンチレバー位置のフィードバック制御を実行する回路について、詳述する(Fig. 5(b)参照；以下、括弧内の記号は Fig. 5 を参照)。カンチレバーの面上で反射された変位計測用レーザー光は、分割光センサに入射し、計測回路によって変位信号(V_{in})が出力される。この電圧信号はフィードバック回路に伝達されたのち、比較入力値(V_{ref})との偏差に対し増幅される。ここでの増幅率は可変であり、その範囲は 1~500 倍となっている。増幅された信号は、電気ノイズ等の高周波ノイズを除去するため、帯域 50kHz 以下のローパスフィルタ(LPF1)を通過する。その後、再び増幅され(増幅率 1~256 倍)、オフセット電圧(V_{off})が加算される。オフセット電圧を加算した電圧値がフィードバック回路の出力(V_{out})となり、制御用の半導体レーザー(L1)に入力される。カンチレバーに作用する外力はこの電圧値に反映されているため、出力電圧を DAT に記録し相互作用のフォースカーブを得る。このレーザーに入力される回路の出力電圧を、帯域 <1kHz のローパスフィルタ(LPF2)に通したものが、オフセット電圧として用いられる。すなわち直前のカンチレバーの変位に対するフィードバックの制御電圧に、それ以降の変位の変化量に対応する制御電圧を加算する。変位が熱ゆらぎのみに起因するのであれば、カンチレバーの変位平均は 0 であるため、オフセット電圧として一定の電圧値を用いれば良い。しかし、実際の力測定時にはプローブと試料間の各種相互作用力をはじめ、種々の要因から発生するドリフトなど、低周波域におけるカンチレバーの継続した変位が生ずる。このような変位を制御するためには、オフセット電圧として、カンチレバーの変位に対する制御電圧を用いる必要がある。実際にこれら二通りのオフセット電圧(一定値の場合 5V)を用いて、矩形波で変位させたカンチレバーのフィードバック制御をおこなったところ、低周波域における制御効果に大きく差が生ずるこ

とが確かめられた [27]。

以上のフィードバック系により、熱ゆらぎや外力に伴うカンチレバーの変位は、カンチレバーの弾性定数に関わらず、2 乗平均(rms)変位にして 1nm 以下まで抑えられる。また、スキャナステージの上昇速度はナノメートルのオーダー[nm/s]で、任意の値に設定可能なため、カンチレバー先端のプロブとステージ上との試料の間隙距離をナノメートル精度で制御することができる。さらに、引力測定時には、カンチレバーの位置を一定に保つことによる大きな利点が存在する。フィードバック制御が不可能なために、スプリングやカンチレバーなどのバネ要素が外力に従って変位する従来の力測定では、引力の変化が弾性定数を超えるとバネ要素はその位置を保つことが不可能となり、表面に吸着(jumping)する。そのため、弾性定数の小さな(柔らかい)スプリングを用いた高感度の力測定は不可能であった。結果として、微小な表面間に作用する微小相互作用の測定はできない。SFA の中には、弾性定数の異なる2種類のスプリングを備え、吸着を避けるよう改良したものも存在するが、機構が複雑になる上、広範囲にわたる力の変化量を2種類の弾性定数でカバーするのには自ずと限界がある。本研究での分子間力顕微鏡はカンチレバーの位置をフィードバック制御により一定に保つことができるため、外力の変化の程度には影響されることはない。測定可能な力のレンジ(範囲)は、制御用レーザーの出力レンジに依存する。制御用レーザーの出力レンジは、現在のところ 0-20mW であるため、先述の値を用いると、単純計算で 0-約 140pN の力に対応可能となる。しかし、実際には、光路中での強度ロスや、カンチレバーの反射面の状況により、測定可能な力の最大値は幾分低下し、0-数十 pN 程度となっている。

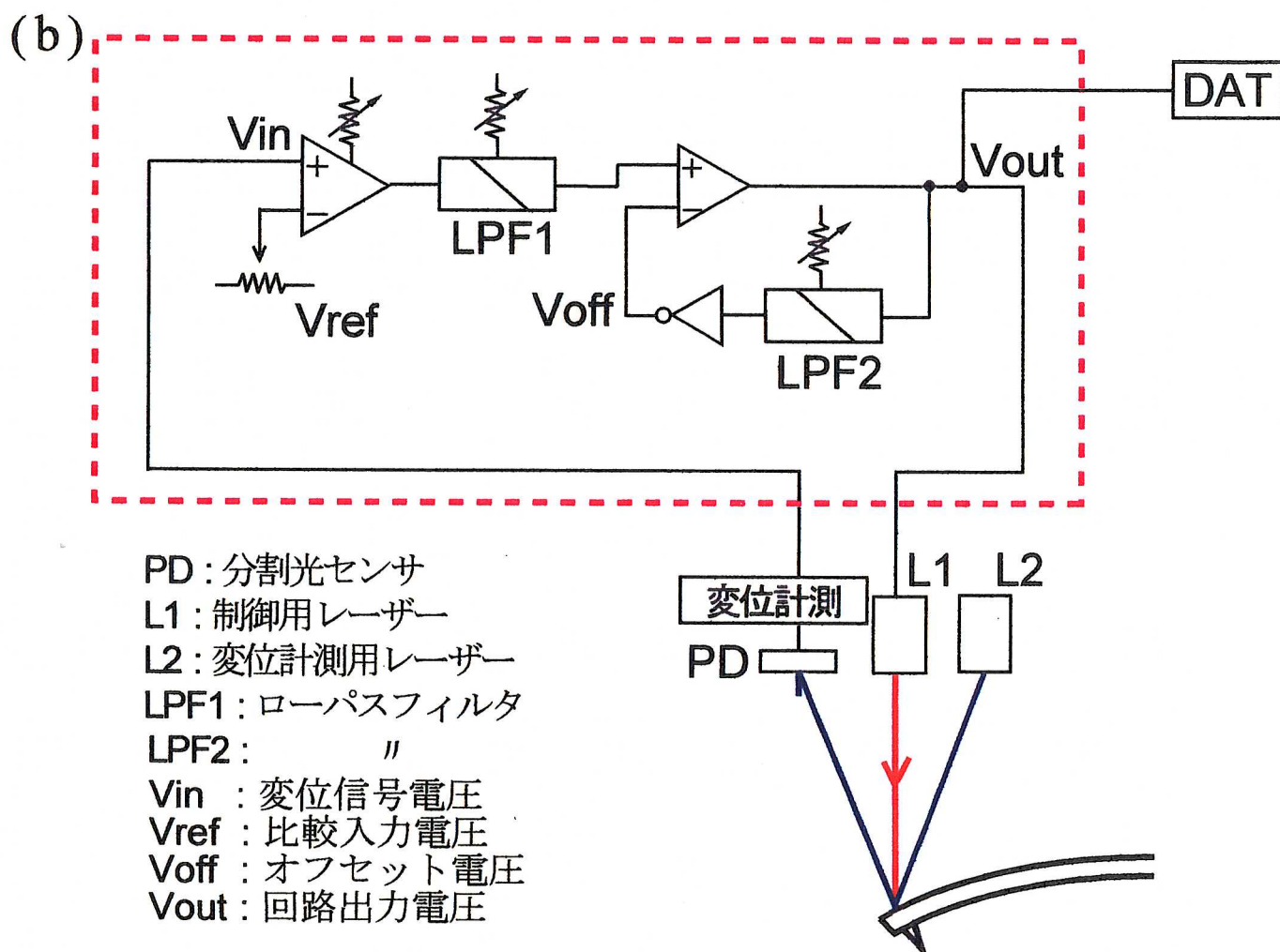
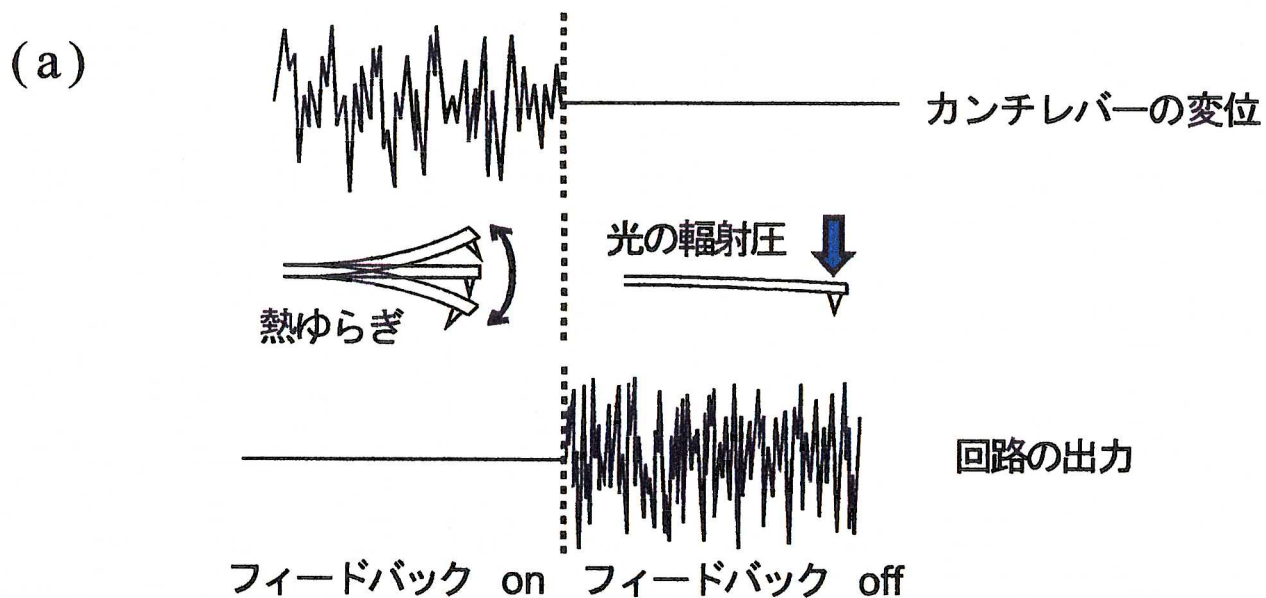


Fig. 5
光フィードバック

(a) 概念

(b) フィードバック制御回路

1-4c. 外力の算出

カンチレバーに加わる外力は、フィードバック回路の出力値より求める。外力と回路出力との間には線形の相関があるため、この係数を算出する。算出方法を以下に述べる。

- 1) 弾性定数のキャリブレーション時と同じく、カンチレバーのホルダに取り付けられているピエゾ素子により、カンチレバーを一定の振幅をもつ正弦波(10Hz)で振動させる。振幅はピエゾへの印加電圧により調節する。
- 2) フィードバック制御をおこなうことにより、カンチレバーの正弦波の変位は抑えられ、位置は一定となる。このときのフィードバック回路の出力は、カンチレバーに加わる外力を反映し、正弦波となる。
- 3) カンチレバーに加わる外力は、弾性定数にピエゾによる振動の振幅を乗じたものであるため、回路出力の正弦波の振幅(電圧値)を読みとり、レーザー出力[mV]と外力[pN]との相関係数を算出する。

係数は、レーザー光の反射面の状況などにより変化するので、カンチレバー毎に計測する。カンチレバーに与える振動の振幅は、peak-to-peak で、50nm、25nm、12.5nmなど計3種類以上とし、各振幅での係数の平均をそのカンチレバーの係数として用いている。

測定で得られたデータ(フィードバック回路の出力値)を力に換算するには、上記の係数により線形変換をおこなえばよい。なお、レーザー出力がカンチレバーに加わった外力を正確に反映するのは、外力の変化がカンチレバーのコーナー周波数以下の場合である。この周波数以上での変化に対しては、線形性が保証されないことが示されている。また、フィードバック制御をおこなうと、カンチレバーの位置は外力に関わらず一定となり、見かけ上弾性定数は無限大となる。しかし、カンチレバーの変位はフィードバック回路の出力にそのまま反映されており、従って、弾性定数を小さくすることによる高S/N比

などの利点は保たれる。

2 章

疎水相互作用の測定

2-1 序

蛋白質のフォールディングや脂質ミセルの形成に代表されるように、生体分子間の相互作用において、疎水性相互作用は重要な役割を担っている。しかしながら、この疎水性相互作用の性質に関しては未知の部分が多く、特に生体分子程度の微小表面においてどのような挙動を示すかという点については、報告もなく分かっていない。

表面間力測定装置(SFA)など巨視的平面(曲率半径 数センチメートル)を用いた研究により報告されている力の作用距離は一定しておらず、その値は純水中において約10nmから約300nmと非常に広範囲にわたっている。([11]~[21]) また、溶液の塩強度依存性についても塩強度の増加とともに作用距離が減少することが示唆されている([16][17]) が、表面疎水性の安定性の問題から、はっきりとした結果は得られていない。ただし、いずれの結果も、得られたフォースカーブ(力-距離曲線)は指数曲線であることについては共通している。また、指数関数フィッティングをおこなった場合、特にフォースカーブが長距離にわたる際には、一つの指数関数よりも二つの指数関数和の方がよくフィットすることが経験的に知られている [21]。

表面の疎水性を表す指標として、液滴と疎水表面がなす角、接触角が知られている。接触角は疎水表面、液滴、空気各々の表面エネルギー(表面張力)から定まる巨視的量であり、表面疎水性が大きいほど接触角も大きくなる。過去に接触角と表面間力の性質に相関があることが、Yoon らによって示されている [21]。巨視適量である接触角と、微視的量であるフォースカーブの相関は、疎水表面間に作用する力がどのような相互作用に起因しているかを知るうえで重要である。

この章では、生体分子程度のサイズの微小疎水表面を持つプローブに作用する表面間力の測定と解析について記述する。この表面間力の溶液条件依存性、表面修飾剤に対する依存性について検討を加える。また、各種疎水表面と各種溶液との間の接触角測定から、巨視的現象との相関を探る。

2-2 材料および計測

2-2a. 表面疎水修飾および計測用試料の作成

疎水表面の形成は、シランカップリング剤により、プローブ及びガラス表面に炭化水素基を導入することで行った。シランカップリング剤は2種類から数種類の異なる種類の反応基をその分子中に有している。反応基のうちの一つは、メキシ基やエトキシ基などのアルコキシシリル基(Si-OR)である。加水分解されるとシラノール基となり、縮合反応を経て無機表面と結合形成(Si-O-M)が可能となる。本研究では、一端が疎水基(無極性基)となっているシランカップリング剤を選び、上記の性質を利用して、他端と表面とを化学的に結合させ、疎水基修飾をおこなった(Fig. 6(b))。

シランカップリング剤を用いて、プローブとなるZnOウィスカーと、基盤となるカバーガラスを修飾する手順について詳述する。

1) カバーガラス(サイズ $32 \times 24 \times 0.17\text{mm}$: 松浪ガラス)は、0.1M KOH中において、約30分～1時間超音波洗浄を行い、表面を浸食洗浄する。蒸留水で3回程すすぎ、約10mMの HClに浸してKOHを完全に中和させる。蒸留水中で暫く超音波洗浄をおこなった後、蒸留水で数回、次いでエタノールに換えて数回すすぐ。一方、ウィスカーは、アルカリ溶液による溶解や、衝撃による構造の欠損を防ぐために、KOH洗浄および超音波洗浄を行わない。また、水分が残留していてもシランとの反応効率が落ちるため、エタノール洗浄のみを行う。チューブ内でウィスカーとエタノールを混合して緩やかに攪拌、ウィスカーが自然に沈殿した後、ピペットによって液交換を行う。

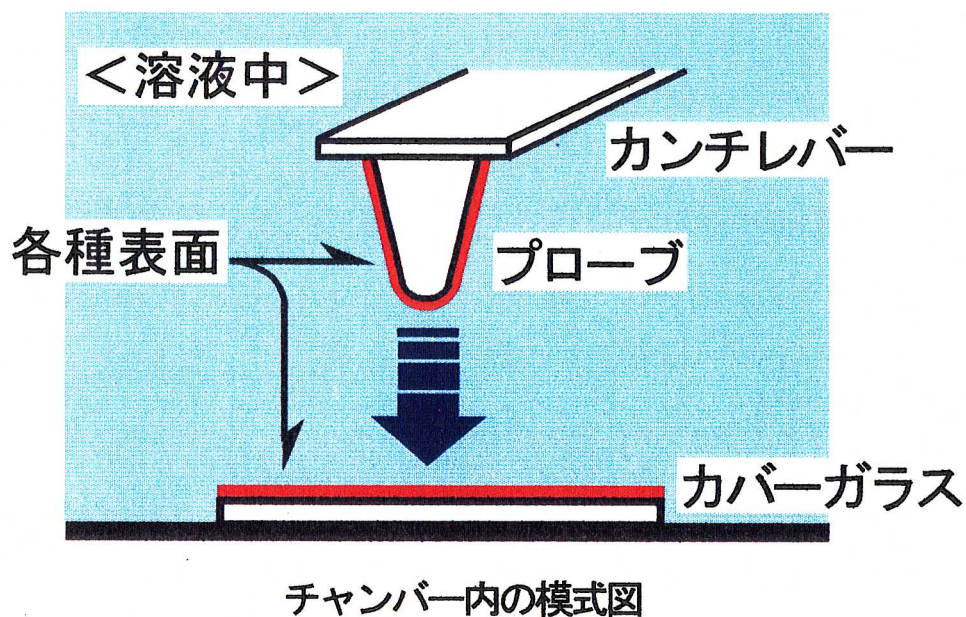
2) 疎水基を反応基として持つシランカップリング剤(オクチルトリエトキシシラン、またはエトキシトリメチルシラン: 信越化学)を、エタノールで希釈した80°Cの反応溶液中で、1時間以上反応させる。反応溶液中のシランカップリン

グ剤濃度(V/V)は、実験目的に応じて定める。シラン以外の溶液組成は、2.9% H_2O 、0.01% HCl である。反応溶液の蒸発を防止するために、カバーガラスの場合はラップやガムテープで、ウィスカーの場合はスクリューキャップ付きのチューブを使うなどして、密封する。

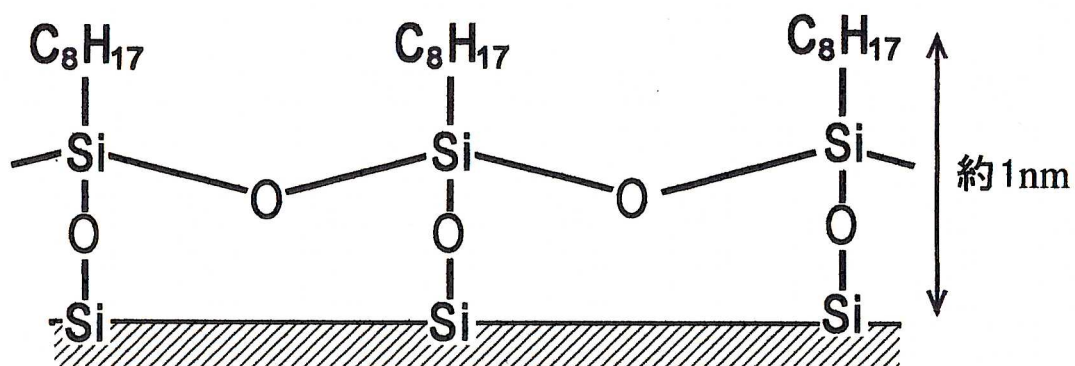
3) 反応が終了したら、エタノール2回、蒸留水3回の洗浄を行う。さらにエタノールで数回すすいだ後、エタノール中において保存する。前述したとおり、ウィスカーはプローブとして、カンチレバーのレバー部分に取り付ける。

計測用試料の作成は、まず、疎水修飾したカバーガラスを、蒸留水中において超音波洗浄し、表面に付着した細かなゴミ、および吸着している未反応のシランカップリング剤を取り除く。同時に、 $\Phi 30\text{mm}$ のプラスチックシャーレの底面に、ガラス基板を設置するためのアクリル製の台が取り付けある測定用チャンバー(Fig. 6(a))もよく洗浄しておく。このチャンバーに蒸留水を満たし、カバーガラスをチャンバー中の台上に設置する。疎水性表面は、乾燥すると細かな埃やゴミが付着しやすくなるため、一連の作業中に外気に触れることのないよう留意する。ガラスを設置し終えたら、蒸留水を還流させ洗浄した後、AFMのスキャナステージ上に乗せ、カンチレバーをチャンバー内に導入する。なお、還流液の液温と外気温の差によりチャンバー内に泡が発生することのないように、還流液はあらかじめ外気温以上にしておく。ゴミや泡の存在は計測対象を狂わせ、実験が失敗する大きな要因となる。次いで、制御用レーザーをONにし、フィードバック制御を開始する。オシロスコープ上でカンチレバーの変位を確認しながら、回路のゲイン(増幅率)やカンチレバー上のレーザー光の照射位置を調節し、最も変位が小さくなるよう設定する。ゲイン及び照射位置は、一通りの計測が終わるまで一定に保ち、万一、ドリフトなどにより照射位置にずれが生じた場合は直ちに修正する。

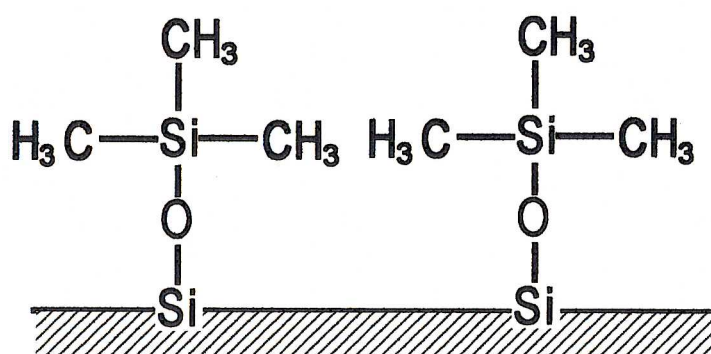
(a)



(b)



オクチルシラン表面の模式図



トリメチルシラン表面の模式図

Fig. 6

表面間力計測

(a) 測定チャンバー

(b) シラン修飾表面

2-2b. フォースカーブ測定

フォースカーブの測定は、フィードバック制御によりカンチレバーの位置を一定に保ちながら、チャンバーの乗ったステージを上昇させておこなう。ステージの上昇速度は 5nm/sec ~10nm/secに設定した。同一プローブ同一表面間の相互作用測定を、異なる溶液条件で行う必要のあるときは、ステージ上でチャンバー内の溶液を還流し、溶液交換を行った。この際、チャンバー容積(約11ml)の4倍量以上の液量を還流し、完全に溶液が交換されるようにした。

一通りの測定終了後に、カンチレバーの弾性定数、及びプローブに作用した外力を算出するためのデータをカンチレバー毎に収集する。表面間相互作用の計測を含め、一連の実験を通じてDATに記録されるデータは、1.光分割センサの出力電圧値(カンチレバーの変位)、2. フィードバック回路の出力電圧値、3.カンチレバーホルダを駆動するファンクションジェネレータの出力電圧値 の3種類である。1.の分割センサの出力は、ステージ速度の算出(後述)に使用されるほか、3.のファンクションジェネレータの出力と併せ、弾性定数を見積もる際に必要なセンサ出力と変位の間の係数を求める(前述)ために使用される。一方、2.の回路出力は、プローブに作用した外力の算出(前述)に使用されるほか、ファンクションジェネレータの出力と併せ、回路出力と外力の間の係数を求める(前述)ために使用される。

得られたセンサ出力、フィードバック回路出力の両者の時系列データから、相互作用の力-距離曲線(フォースカーブ)を求める方法を以下に述べる。

1. 引力の場合 (Fig. 7(a))

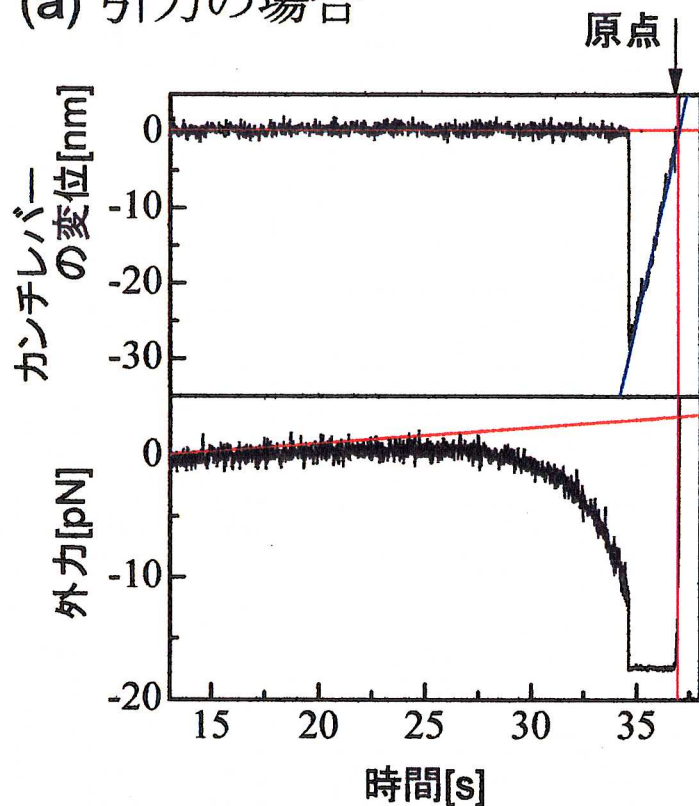
疎水性相互作用の場合、測定により得られる結果は引力である。相互作用の原点は、分割センサの出力電圧値から算出したカンチレバーの変位より決定する。引力の際、たいいていの場合でカンチレバーは表面近傍でフィードバ

ックの制御範囲を脱し、表面と吸着する。このときの変位は数十nmである。吸着した後、カンチレバーはステージと共に上昇する。スキヤナの手ヒステリシスは0-300nmの範囲では無視できるレベルにあるため、上昇時のカンチレバーの単位時間当たりの変位が、ステージ速度となる。上昇するカンチレバーはフィードバックが機能していた位置に再び達するが、この地点が相互作用の距離の原点となる(Fig. 7(a)中、矢印で示した地点)。従って、各時分におけるプローブ及びガラス表面間の間隙距離は、この原点到達時刻より逆算した時間にステージ速度を乗じて求める。一方、プローブに作用した外力は、フィードバック回路の出力電圧値から算出する。表面間距離が充分長い地点での外力を0とし、表面近傍での力を計算するが、同時に、間隙距離全般にわたって存在する相互作用力以外のドリフト成分を求め、除去する。以上より、表面間距離と外力が求まり、フォースカーブ(力-距離曲線)が得られる。

2. 斥力の場合 (Fig. 7(b))

静電相互作用の場合、同一符号の帯電表面には斥力が働く。この場合、原点はプローブがガラス表面と接触した地点である(Fig. 7(b)中、矢印で示した地点)。接触した後、カンチレバーはステージと共に上昇する。この上昇時のカンチレバーの単位時間当たりの変位が、引力の場合と同様、ステージ速度となる。各時分におけるプローブ及びガラス表面間の間隙距離は、やはり原点到達時刻より逆算した時間にステージ速度を乗じて求める。プローブに作用した外力も、上記と同じく、表面間距離が充分長い地点での外力を0として、計算する。同時にドリフト成分の除去もおこなう。本研究では、無修飾プローブとガラス表面間に作用する弱い静電斥力(電気二重層斥力、以下 二重層斥力)が観察された。

(a) 引力の場合



カンチレバーの変位[nm]

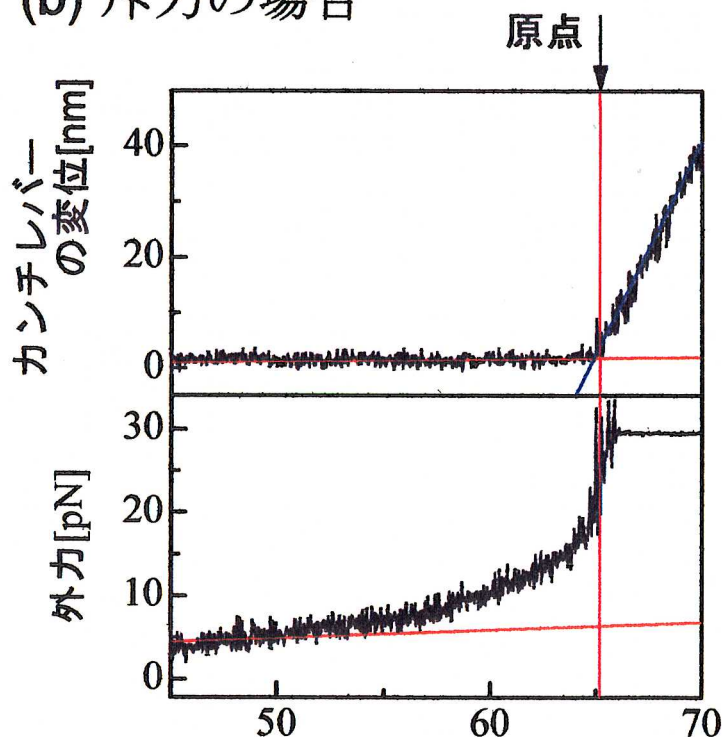
センサ出力より計算。ステージ速度は、吸着地点からの変位である青い直線の傾きに相当する。矢印で示してある原点（表面間距離 0 の地点）は、赤い直線と青い直線との交点となる。表面間距離は、逆算した時間にステージ速度を乗じて求める。

ステージ速度 12[nm/sec]

外力[nm]

フィードバック回路の出力電圧値センサ出力より計算。赤い直線は、外力以外のドリフト成分を示す。ドリフト成分は、除去する。

(b) 斥力の場合



カンチレバーの変位[nm]

センサ出力より計算。ステージ速度は、接触地点からの変位である青い直線の傾きに相当する。矢印で示してある原点（表面間距離 0 の地点）は、赤い直線と青い直線との交点となる。表面間距離は、逆算した時間にステージ速度を乗じて求める。

ステージ速度 8.9[nm/sec]

外力[nm]

フィードバック回路の出力電圧値センサ出力より計算。赤い直線は、外力以外のドリフト成分を示す。ドリフト成分は、引力の場合と同様、除去する。

Fig. 7
外力の算出

- (a) 測定された外力が引力の場合
- (b) 測定された外力が斥力の場合

2-2c. プローブ尖端の曲率半径の計測、および接触角測定

プローブとして用いるZnOウィスカーの尖端のサイズを、実際に評価する必要がある。そのため、透過型電子顕微鏡により、オクチルシランを用いて表面修飾を行ったウィスカー、および表面修飾を施していないウィスカーの尖端像をそれぞれ撮影した。撮影した写真は、スキャナーによりコンピュータ (G266M : ゲートウェイ) に取り込み、曲率半径および先端の開き角を解析した。なお、スケールとして、同時に撮影したトロポミオシンのパラクリスタルの周期構造を利用した。

2-2d. 接触角測定

表面の疎水性の度合いを示す指標として、液滴と表面とがなす角、すなわち接触角が通常用いられる。本研究では、表面疎水性を巨視的に定量するため、および巨視的現象と微小領域での相互作用との相関を調べるために、各種溶液と各修飾表面間の接触角を計測した。接触角は表面の湿度に影響を受けるため、表面をよく乾燥させ、清浄にする。溶液 1 μ l程度を表面上に垂らし、実体顕微鏡下 (SZH- : オリンパス光学) でTVカメラにより撮影、ビデオテープに記録した。表面と液滴のなす角の解析には、エクセルを使用した。

2-3 結果

2-3a プローブ先端の曲率半径測定

透過型電子顕微鏡により撮影した像を Fig. 8(a)に示す。解析したプローブ (ウィスカー) の先端曲率半径、および先端の開き角の平均値は以下の通りである。

表 2. ウィスカーの先端曲率半径・先端開き角

		半径 [nm]	開き角 [度]
オクチルシラン修飾ウィスカー	(n=50)	17.3 (±7)	23.4 (±11)
無修飾ウィスカー	(n=56)	16.0 (±8)	27.3 (±11)

先端曲率半径の値は、修飾および未修飾ウィスカーの間で、誤差の範囲内で一致した。従って、修飾による表面形状の変化はないと考えられる。一方、先端角についても、誤差の範囲内で一致している。

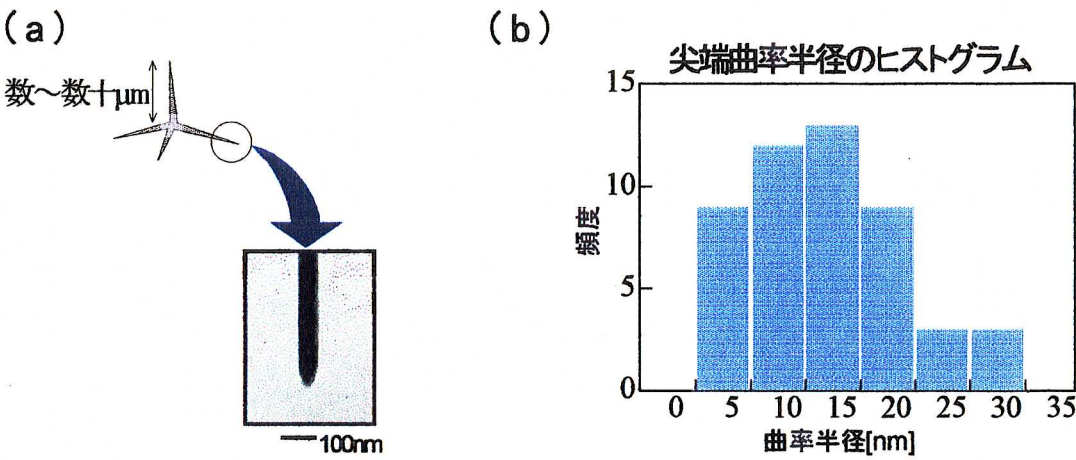


Fig. 8
ZnO ウィスカーの先端曲率半径
(a) 先端の透過型電顕像
(b) 計測した先端(オクチルシラン)半径のヒストグラム

以降、各種計算にプローブ尖端の形状が必要になる際は、全てこれらの値を利用した。

2-3b. フォースカーブ

疎水表面間の実験は以下に挙げる種々の条件下において行った。

①オクチルシラン表面間

微小表面に作用する疎水表面間引力のプロファイル及び塩強度依存性を調べた。修飾時のオクチルシラン濃度は2%である。以下の溶液条件で測定を実施した。

1. 純水中
2. 1mM KCl中
3. 10mM KCl中

対照実験として無修飾ウィスカーとオクチルシラン間表面の相互作用測定を行った。

②トリメチルシラン表面間

表面修飾剤の違いと、および表面疎水性の違いが表面間力に及ぼす影響を調べた。以下の表面修飾条件で実験をおこなった。

1. 修飾濃度 5%
2. // 10%
3. // 30%

対照実験として無修飾ウィスカーとトリメチルシラン間表面の相互作用測定を行った。

1.オクチルシラン表面間 (Fig. 9(a))

純水中における測定では、約200nmに及ぶ長距離引力が観察された。30nm付近で引力がフィードバックのレンジを越え、プローブが基盤に一気に吸着している。この吸着したプローブを基盤から引き剥がす力を測定することはできなかった。カンチレバーの弾性定数が小さいため、引き剥がすために

必要な弾性エネルギーを得るには、変位の検出が不可能な位置までステージを下げなければならないためである。表面間引力は、吸着直前で20pN程度であった。

還流により溶液中の塩強度を KCl 1mMとすると(プローブおよび基盤は同一)、長距離引力の作用距離は約70nmに減少した。単に原点側にシフトしたのではなく、プロファイル自体も変化している。さらに塩強度を増し、KCl 10mMの場合、作用距離は約30nmにまで減少した。この変化が可逆的か否かを調べるため、再び溶液を純粋に還流し、表面間力を測定した。引力の作用距離、およびプロファイルともに最初の純水中で測定した際のものとほぼ一致し、上記の一連の変化が可逆的であることが示された。若干異なっているのは、塩が液中にわずかに残留しているためと思われる。なお、プローブの違いによるプロファイルの差はほとんど見受けられなかったが、フォースカーブの比較は同一のプローブを用いた結果に限定して行った。プローブ毎の曲率半径の差が、若干とはいえ結果に影響を与えられられるためである。

対照実験である、無修飾ウイスキーとオクチルシラン修飾表面との間の表面間力測定では、表面間距離が60nm以上の地点で、弱い斥力が観察された。無修飾ウイスキーの表面は若干負に帯電しているため、この斥力は、シラン修飾表面も同じく負に帯電していることに起因する静電相互作用であろう。従って、上記の長距離引力には、シラン表面間に作用する二重層斥力が加算されていると考えられる。

2. トリメチルシラン表面間(Fig. 9(b))

修飾濃度5%、10%、30%の3種類の表面を用意し、同一濃度で修飾した表面間において相互作用測定をおこなった。全て純水中で測定した。なお、上記

の濃度は修飾時の条件に過ぎず、表面の疎水性が修飾濃度に比例していることを示すものではない。表面疎水性の定量は後述する方法によりおこなっている。

トリメチルシラン表面間においても、長距離に及ぶ引力が観察された。引力の作用距離は、表面修飾濃度の増加に伴い、増加した。5%で約120nm、10%で約200nm、30%で約270nmとなっている。また、オクチルシラン表面間の測定には修飾濃度2%の表面を用いていたが、この際得られたフォースカーブのプロファイルは、10%のトリメチルシラン表面間で得られた結果とほぼ一致した。

無修飾ウイスキーとトリメチルシラン表面間の表面間力測定では、オクチルシランの場合と同様、表面間距離が60nm以上の地点で、弱い斥力が観察された。トリメチルシラン表面間の長距離引力にも、シラン表面間に作用する二重層斥力が加算されていると考えられる。

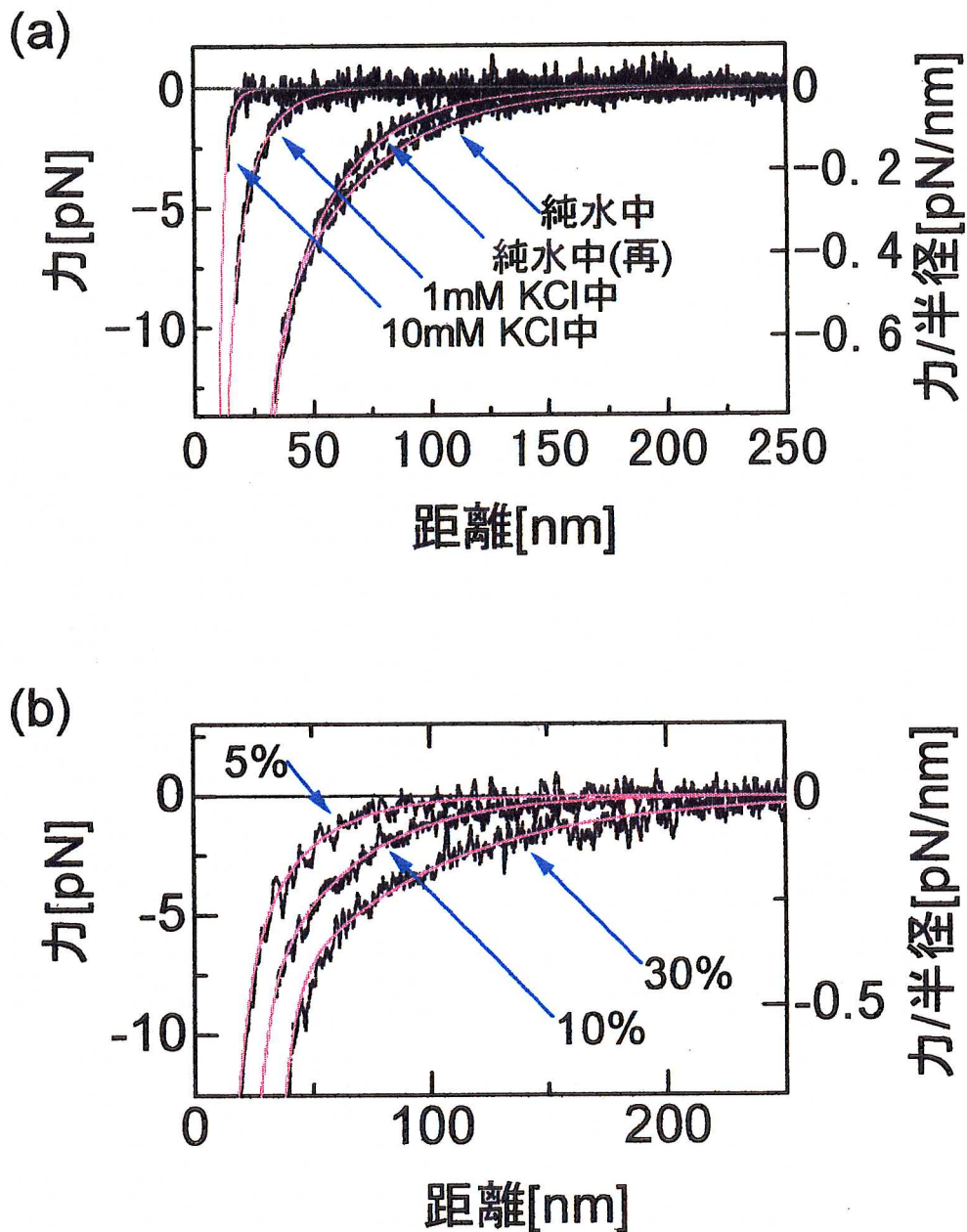


Fig. 9

各種疎水表面間で得られたフォースカーブ

- (a) オクチルシラン表面間：溶液塩強度は、純水および
1mM KCl、10mM KCl
- (b) トリメチルシラン表面間：修飾濃度は5%および10%、
30%

2-3c. 指数関数によるフィッティング

上記で得られた、疎水表面間に作用する引力のフォースカーブに、指数関数による最小2乗近似をおこなった (Fig. 9)。純水中の場合、先述した様に二重層斥力が加算されていると考えられるため、純粋な疎水表面間の相互作用を得るためには、この斥力成分を差し引く必要がある。そのため、対照実験のフォースカーブの斥力成分を、次章で述べる関数により近似し、シラン表面側の電荷密度を算出した (データ非表示)。この際、無修飾表面 (プローブ) 側の表面電荷密度として、無修飾表面間の相互作用を解析して得られた値 ($6.8 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$ 、次章参照) を使用した。得られたシラン表面の電荷密度を以下に示す。

表 3. 各シラン表面の電荷密度

	表面電荷密度 $\times 10^{-4} [\text{C/m}^2]$	デバイ長 [nm]
オクチルシラン表面	8.5	67
トリメチルシラン表面	6.0	67

以上のシラン表面の電荷密度から、シラン表面間の二重層斥力成分を計算し、疎水表面間のフォースカーブより差し引いた。

従来の研究では、フォースカーブを近似する関数として、単一または2つの指数関数 (和) や、べき級数などが用いられている。経験的に、引力が長距離に及ぶ場合、二つの指数関数和を用いた場合に最もよい近似が得られることが知られている。本研究では、以下に示す指数関数2種類によるフィッティングをおこなった。

$$\text{指数関数 (単一)}: F(D) = A \cdot \exp(-D/\lambda)$$

$$\text{(二つ)}: F(D) = A_1 \cdot \exp(-D/\lambda_1) + A_2 \cdot \exp(-D/\lambda_2)$$

D は表面間距離、 λ , λ_1 , λ_2 は減衰長と呼ばれるフォースカーブの減衰定数である。次頁の表に各パラメータの値をまとめる。(Fig. 8に二つの指数関数による近似で得られた曲線を示す。)

表 4. 単一指数関数による近似で得られた値

		$A \times 10^2$ [pN]	λ [nm]
<オクチルシラン表面間>			
溶液濃度 / 表面修飾濃度			
純水中 / 2%	($n=12$)	0.43	36.4(± 5)
1mM KCl中 / 2%	($n=8$)	0.38	11.9(± 2)
10mM KCl / 2%	($n=8$)	5.9	3.7(± 1)
純水中(再) / 2%	($n=8$)	0.42	26.7(± 2)
<トリメチルシラン表面間>			
溶液濃度 / 表面修飾濃度			
純水中 / 5%	($n=7$)	0.27	27.5(± 5)
純水中 / 10%	($n=7$)	0.15	40.0(± 0)
純水中 / 30%	($n=8$)	0.36	53.4(± 10)

表 5. 二つの指数関数による近似で得られた値

(Fig. 9(a): オクチルシラン表面、9(b): トリメチルシラン表面)

		$A_1 \times 10^2$ [pN]	λ_1 [nm]	$A_2 \times 10^2$ [pN]	λ_2 [nm]
<オクチルシラン表面間>					
溶液濃度 / 表面修飾濃度					
純水中 / 2%	($n=12$)	0.35	39.8(± 5)	5.9	5.5(± 1)
1mM KCl中 / 2%	($n=8$)	0.28	13.2(± 1)	0.86	4.6(± 0.6)
10mM KCl / 2%	($n=8$)	23	2.2(± 0.1)	0.23	5.0(± 0.2)
純水中(再) / 2%	($n=8$)	0.34	29.7(± 0.2)	12	4.6(± 0.7)
<トリメチルシラン表面間>					
溶液濃度 / 表面修飾濃度					
純水中 / 5%	($n=7$)	0.24	29.6(± 5)	3.4	3.9(± 0.2)
純水中 / 10%	($n=7$)	0.24	39.9(± 0.1)	0.63	4.8(± 0.0)
純水中 / 30%	($n=8$)	0.24	60.0(± 8)	19	6.1(± 0.3)

オクチルシラン表面間では、溶液塩強度が増加するに伴い、指数関数の減衰長、べき級数の係数ともに減少している。興味深い事に、二つの指数関数とで近似した場合、一方の減衰長が塩強度に依存しているのに対し、他方の減衰長は約5nmで一定であった。トリメチルシラン表面間の場合、表面修飾濃度の上昇に伴い、指数関数の減衰長、べき級数の係数ともに増加している。二つの指数関数とで近似した場合は、一方の減衰長が修飾濃度に依存しているのに対し、他方の減衰長は約5nmと一定で、オクチルシラン表面と同様の傾向を示した。

2-3d. 接触角計測

接触角計測の際、溶液量は一律 $1\mu\text{l}$ とした。しかし、溶液量を数倍程度変化させても得られる接触角の値は同じであり、溶液量に依存することはなかった。

1. オクチルシラン表面

結果を以下の表に示す。

表 6. オクチルシラン表面上における各種濃度の塩溶液液滴の接触角

液滴条件		接触角[度]
純水	($n=12$)	72.1(± 2.7)
1mM KCl	($n=13$)	64.9(± 4.2)
10mM KCl	($n=13$)	61.4(± 3.1)

オクチルシラン表面(修飾濃度 2%)と、純水および各種塩溶液(KCl 1mM、KCl 10mM)の各液滴との間の接触角は、液滴の塩強度の増加に伴い、減少した。また、塩溶液の濃度に対し接触角の余弦をプロットすると、線形の相関が見られた(Fig. 10(a))。

2. トリメチルシラン表面

結果を以下の表に示す。

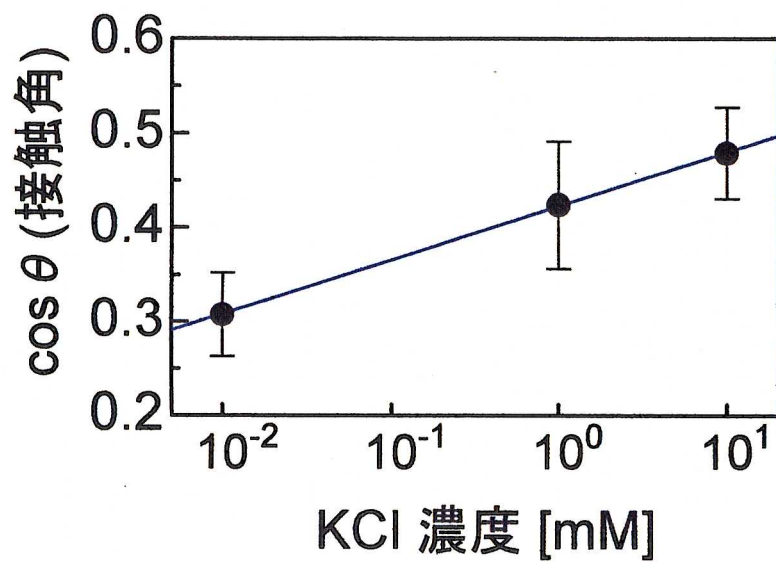
表 7. 各修飾濃度でのトリメチルシラン修飾表面上での純水液滴の接触角

表面修飾条件		接触角[度]
5%	($n=85$)	68.6(± 3.8)
10%	($n=47$)	71.5(± 4.1)
30%	($n=51$)	78.7(± 3.3)

各修飾濃度(5%、10%、30%)のトリメチルシラン表面と、純水液滴との間の接

触角は、修飾濃度の上昇に伴い、増加した。修飾濃度に対し接触角の余弦をプロットすると、線形の相関が見られた (Fig. 10(b))。すなわち、修飾シランの濃度を増せば、表面疎水性は増加する。

(a) オクチルシラン表面／塩溶液液滴間の接触角



(b) トリメチルシラン表面／純水液滴間の接触角

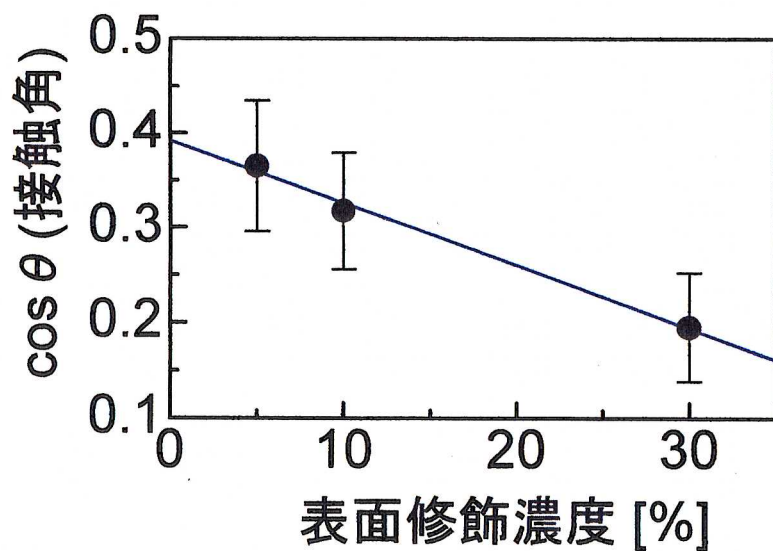


Fig. 10

各種表面と液滴間の接触角(余弦)

(a) オクチルシラン表面／塩溶液液滴間

(b) トリメチルシラン／純水液滴間

2-4 考察

2-4a. 他の引力相互作用との関連

表面間力が引力となる相互作用は、疎水表面間の相互作用のほか、異種電荷間による静電相互作用やファンデルワールス力 (Van der Waals force : 以下 VdW力) がある。純水中において、オクチルシランやトリメチルシラン表面間に観察された200nmに及ぶ長距離引力は、果たして純粋に疎水基間の相互作用を反映したものであるのか、考察する必要がある。

1. VdW力

VdW力は、主に、無極性分子中の電子密度の瞬間的な偏りにより生ずる分子の分極が、近傍の分子に誘電分極を引き起こすことにより生ずる相互作用力(この要因によって生ずる力は、分散力 またはLondon力と呼ばれる)である。従って、分子の種類によらず、発生すると考えられている。この力は、一般に表面のごく近傍でのみ(<20nm)作用するが、他の表面間力と同じく表面の形状に大きく依存するため、実際にプローブの形状に沿って理論計算し、測定した疎水表面間力中の寄与を評価した。Fig. 11に、計算に用いたプローブの形状を示した。

プローブの形状を考慮した計算式は以下の通りである。なお、真円球と平面間では、単純に係数 A に $-R/6D^2$ を乗じた力となる。

プローブの形状を二つの部分に分けて計算する。

R : 尖端曲率半径 [nm]

D : 表面間距離 [nm]

z : プローブ尖端からの距離(垂直方向) [nm]

α : 先端開き角 [度]

A : Hamaker定数 [] (Fig. 11(b)参照)

(1) 下部球部分 ($F_{sphere}(D)$; Fig. 11(a)参照)

$$F_{sphere}(D) = - \frac{dW_{sphere}(D)}{dD}$$

$$W_{sphere}(D) = -2A \cdot \int_0^{R(1-\sin \alpha)} \frac{(2R-z)z}{(D+z)^3} dz$$

(2) 上部錘体部分 ($F_{upper}(D)$; Fig. 11(a)参照)

$$r = R \cos \alpha + \{z - R(1 - \sin \alpha)\} \tan \alpha \text{ とおく。}$$

$$F_{upper}(D) = - \frac{dW_{upper}(D)}{dD}$$

$$W_{upper}(D) = -2A \cdot \int_{R(1-\sin \alpha)}^{\infty} \frac{r^2}{(D+z)^3} dz$$

以上より、プローブに作用する力は、上記の二つの力の和

$$F = F_{sphere}(D) + F_{upper}(D)$$

となる。この計算式より算出したVdW力をFig. 12に示す。明らかに、疎水表面間に観察された引力よりもその作用距離は短い。観察された引力に加算されていたとしても、長距離引力の要因とはならない。

2. 静電相互作用

引力を生ずる要因として、異なる符号を持つ電荷間に働く静電相互作用が考えられる。プローブおよびガラスの両表面は、無修飾状態において、ともに負に帯電しており(3章参照)引力の要因とはならない。また、疎水基修飾は同一のシラン修飾剤を用い、同一の方法によりおこなっているため、互いに異なる符号の帯電表面が形成されるとは考えにくい。

実際、負に帯電している無修飾プローブと疎水表面間において相互作用測

定をおこなったところ、60nm付近より長距離側において、数pNの斥力が観察された。このことは、疎水表面が若干負に帯電していることを示唆しており、静電相互作用が引力にならないことを示している。さらに、オクチルシラン表面間に作用する引力を指数関数近似して得られた、減衰長の塩強度依存性は、静電相互作用における減衰長(デバイ長)の塩強度依存性とはその傾向が大きく異なっている(Fig. 12)。

以上より、VdW引力・静電相互作用力ともに、観察された長距離の引力には、寄与していないことが示唆される。従って、この長距離引力は、疎水修飾した表面と溶媒との相互作用に由来するものと考えられる。

ファンデルワールス力および
静電フィッティングに用いた
プローブの形状

$$A \approx \frac{3}{4} k_B T \left(\frac{\epsilon_1 - \epsilon_3}{\epsilon_1 + \epsilon_3} \right) \left(\frac{\epsilon_2 - \epsilon_3}{\epsilon_2 + \epsilon_3} \right) + \frac{3\hbar\nu_e}{8\sqrt{2}} \frac{(\epsilon_1^2 - \epsilon_3^2)(\epsilon_2^2 - \epsilon_3^2)}{(\epsilon_1^2 + \epsilon_3^2)^{1/2}(\epsilon_2^2 + \epsilon_3^2)^{1/2} \{ (\epsilon_1^2 + \epsilon_3^2)^{1/2} + (\epsilon_2^2 + \epsilon_3^2)^{1/2} \}}$$

先端曲率半径: $R=17(\text{nm})$ / 先端角: $\theta=11.5(\text{度})$

誘電率: ϵ_3 (水)=78.5(25 °C), $\epsilon_{1,2}$ (オクチルシラン)=2.05

屈折率: $n_3(\text{水})=1.33(25^\circ\text{C})$, $n_{1,2}(\text{オクチルシラン})=1.43$

A: Hamaker定数(J)、 h : Planck定数(J·s)、 k_B : Boltzman定数(J/K)、

T:絶対温度(K)、 ν_e :電子吸収振動数(s^{-1})

Fig. 11

ファンデルワールス力の計算に用いた プローブの形状とパラメータ

(a) プローブの形状

(b) Hamaker定数の表式

(詳細は本文参照)

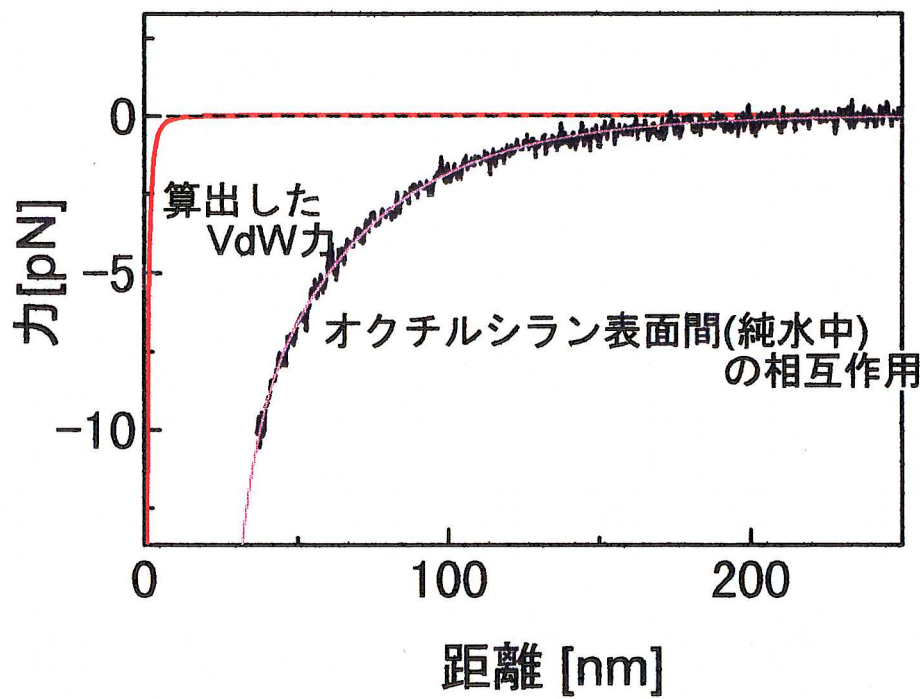


Fig. 12
オクチルシラン表面間の相互作用とVdW力の比較

2-4b. 疎水修飾剤による影響

観察された長距離引力が、表面疎水修飾剤の構造に起因している可能性がある。修飾基が多層構造を形成、あるいは伸長するなどの構造変化をおこし、その寄与が引力の起源に関与しているならば、表面の疎水性に基づく純粋な疎水性相互作用を測定したことにはならない。また、相互作用の原点の位置も変わってくるため、表面間距離の見積もりも困難なものとなる。

オクチルシラン修飾の場合、液温80度で短時間のうちに表面と反応させ、オクチルシラン分子同士の重合反応をわずかにとどめるようにし、重合シランの表面への吸着を妨げている。表面は単層構造を形成していると考えられるが、修飾表面の構造による影響を明確にするため、分子の構造上、単層以外には形成し得ないトリメチルシラン修飾表面を用いた相互作用測定をおこなった。フォースカーブについては、オクチルシラン修飾2%のプロファイルとトリメチルシラン修飾10%のプロファイルがほぼ一致した。ただし、異なる修飾剤による修飾を比較した場合、修飾効率等の差異もあり、修飾濃度の数値が表面疎水性を反映しているわけではない。表面が単層であるトリメチルシラン表面間とオクチルシラン表面間で同様のフォースカーブが得られたことは、オクチルシラン表面も同じく単層であることを示唆するものであり、表面の構造が引力の要因ではないことが明らかとなった。

2-4c. 相互作用プロファイル

従来の研究では、疎水基を持つイオン(例えば、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムイオン(CTA⁺)や、ジメチルジオクタデシルアンモニウムイオン(DDOA⁺))を基盤表面の負電荷を利用したり [11][16]、LB膜法により吸着させる[15]などして、疎水表面の形成がおこなわれてきた。シランを用いた例としてはオクタデシルトリクロロシラン(OTS)が報告されている [21]。実験毎に多種多様な修飾剤が用いられているのが現状である。修飾分子自体の大きさも多様であり、分子量が約1000になる巨大な分子が使用された例もある [19]。一方、塩の非存在下での溶液条件として、純水のほか、修飾剤の表面からの解離を防ぐために、修飾剤を溶液中に拡散させている例が報告されている。これらの研究においてSFAやAFMを用いて観察された、疎水性相互作用の長距離引力の作用距離は、10nm[11]、90nm[17]、300nm[19]と広い範囲にわたっている。なお、AFMによる測定では、約60nm[20]、約150nm～[21] 程度の作用距離が観察されている。初期の研究と比較し、近年の結果は、作用距離がより長距離となっている場合が多い。その理由として、使用した修飾剤に由来する静電相互作用の寄与の大きさを挙げ、初期の結果は実際の相互作用よりも短距離となっている、とする論文もある[13]。本研究においては、純水中において約150nm以上に達する引力が観察された。曲率半径がマイクロメートル以上の平面を用いた他の結果で報告されている値の範囲内にほぼ収まっている。しかし、引力の大きさは、ナノメートルオーダーの表面を用いているため、従来報告されている大きさより遥かに小さく、ピコニュートンレベルである。前述した幾つかの制約により、従来の方法ではこのような微小引力は測定不可能であった。従って、生体分子サイズ程度の大きさの疎水性表面間にも、長距離引力が作用することを初めて明らかにした結果である。

本研究において観察された長距離引力は、溶液中塩強度の増加に伴い、

作用距離が減少している。また、この変化は可逆的であることから、表面の構造や性質が塩の影響を受け、不可逆的变化を起こしていないことが示唆される。塩強度による疎水性相互作用への影響は、以前にもSFAを用いた巨視的な実験により、Claessonらが指摘している[15]。(他に[16]、[17]、[18])しかし、なぜ塩濃度の増加が表面間力に影響するか、という点については未だ解明されていない。本研究で用いた疎水修飾表面はわずかに帯電しているため、表面上へのイオンの吸着がその一因として考えられる。ただし、塩濃度を増加させたときのフォースカーブのプロファイルから、帯電表面の遮蔽という形ではなく、表面近傍の溶液構造を変化させるという形で、上記の現象に寄与していると考えられる。なお、この塩強度依存性については、デバイ長、および接触角との相関を絡めて、再述する。

2-4d. 指数関数による近似

幾つかの関数を用いて、得られた疎水表面間相互作用のプロファイルを近似することは、初期の頃の研究より試みられてきた。近似に際しては、指数関数が専ら用いられてきており、単一指数関数を用いた近似の場合には減衰長として、1nm[11]、15nm[17]、60nm[19]といった数値が得られている。力の作用距離と同じく、この減衰長に関しても数値が広範囲にわたっている。また、引力が長距離に及んで観察された場合、力の変化量の急激な増加が、表面近傍において観察されることが多い。このような場合、二つの指数関数を用いるとより良く近似するといった経験則がある。二つの指数関数を用いた近似により、5.5nmと1.2nm[14]、25nmと2.1nm[20]といった値が、純水中において得られている。本研究においても、単一指数関数を用いた場合に比べ、二つの指数関数を用いた場合の方が、長距離領域から短距離領域までより良く近似した。他の関数を用いた近似の例では、べき級数を用いた例がある[21]。本研究においても、べき級数を用いた近似を試みたが(データ非表示)、指数関数を用いた場合と比較し近似の程度は悪い。

一方、塩濃度が変化することによる減衰長の影響について考察する。相互作用プロファイルに見られるように、溶液塩濃度の増加はプロファイルの形状を変化させている。単一指数関数近似の際の減衰長は、塩強度の増加に伴い減少した。二つの指数関数による近似の場合も、一方の減衰長(長距離成分)は、塩強度の増加に伴い減少している。しかし、他方の減衰長(短距離成分)は、塩強度の変化に依存せず、ほぼ5nmと一定の値であった。同様の傾向は、SFAを用いた巨視的実験により、疎水性相互作用の塩強度依存性を調べた研究[]からも得られている。このとき得られた減衰長は、純水中において、5.5nmと1.2nm、塩(KBr)濃度 10mMの溶液中においては、4.5nmと1.2nmであった。観察された引力の作用距離が短いことを反映し、両者の値とも

本研究で得られた減衰長の値より小さい。測定装置の感度の差が影響している。しかしながら、この傾向自体は、塩溶液中における疎水表面間相互作用の本質の一端を現わしていると考えられる。

塩強度に対する、疎水表面間相互作用の減衰長の変化は、静電相互作用における減衰長(デバイ長)の変化と比較すると緩やかである(Fig. 13)。この点に関しても、上記の研究により報告されている。このことは、塩強度による減衰長の変化が、静電相互作用の寄与に因るものではないことを示唆する。

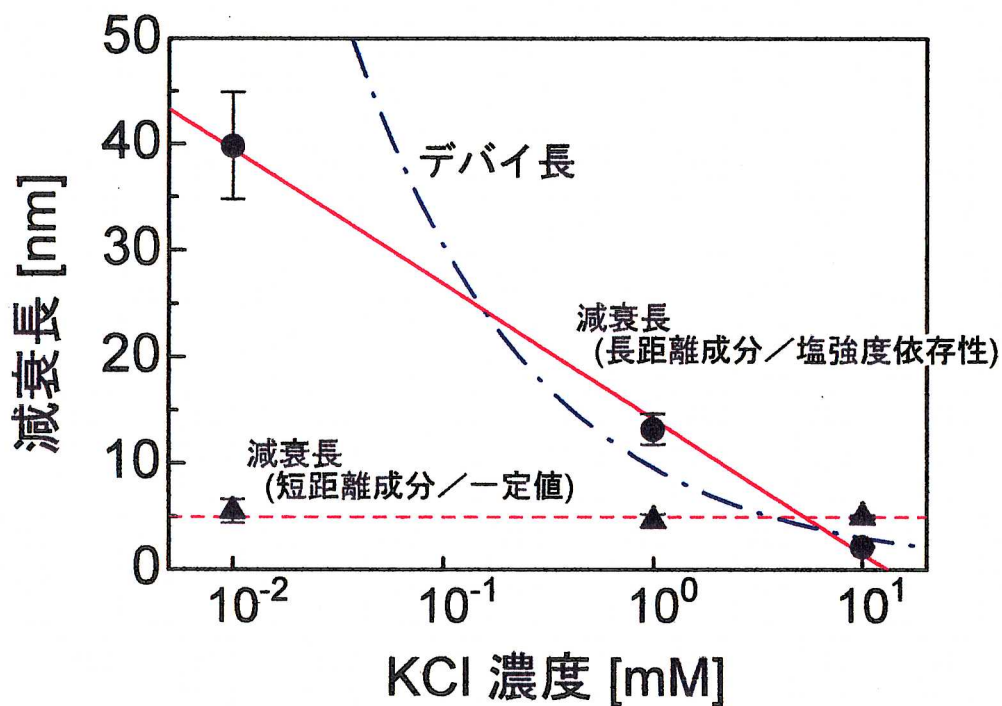


Fig. 13

減衰長と塩濃度の相関

デバイ長の塩強度依存性とは異なる相関を示す。

※なお、デバイ長 $\kappa^{-1} \text{ nm}$ は溶質が 1:1 電解質であり、濃度が $c [\text{M}]$ の場合、

$$\kappa^{-1} = 0.304 / c^{(1/2)}$$

で表される。

2-4e. 接触角との相関

オクチルシラン表面と、塩溶液液滴との間の接触角は、塩濃度の増加に伴い減少した。疎水表面自体の構造変化はないことから、表面と塩溶液間の相互作用の変化を反映していると考えられる。また、修飾濃度の異なるトリメチルシラン表面と純水液滴の間の接触角は、修飾濃度の増加に伴い上昇した。これは、表面疎水性の増加を反映した結果である。すなわち、この変化もオクチルシラン表面と塩溶液液滴の場合と同じく、表面と純水間の相互作用の変化を反映していると考えられる。接触角は、溶液/表面、表面/空気、空気/溶液それぞれの界面における界面エネルギー(または界面張力；界面を単位面積拡張する際の自由エネルギー)の釣り合いで定まる、熱力学的な量である^[1]。従って純粋に巨視的な量である。この巨視的量と、微視的量である表面間相互作用の減衰長との間の相関を調べた。Fig. 14では、接触角(余弦)に対し、減衰長(長距離成分；塩強度依存性)をプロットした。その結果、オクチルシラン表面を用いた測定で得られた減衰長と、接触角との間に線形の相関が見受けられた。一方、トリメチルシラン表面を用いた測定で得られた減衰長と、接触角との間にも線形の相関が見受けられた。この相関関係は、Fig. 14において全てのポイントが直線上にあることが示しているように、オクチルシラン表面での計測で得られた相関と、ほぼ一致する。これは疎水表面間の相互作用が、表面の種類や溶液塩濃度に関わらず、水(溶液)と表面との相互作用を反映していることを強く示唆するものである。

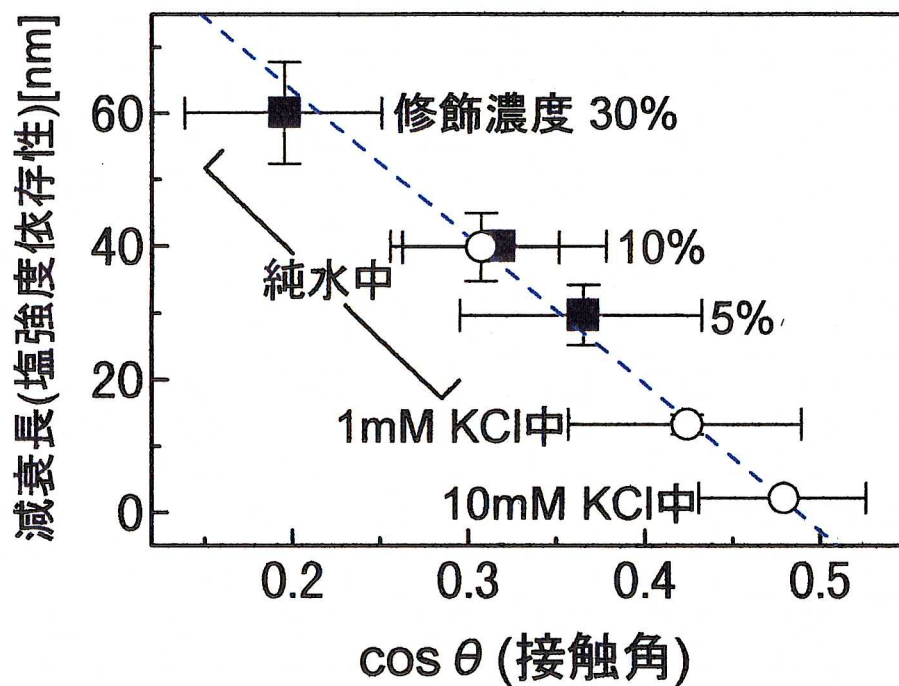


Fig. 14

減衰長と接触角の相関

減衰長は疎水性表面と溶液との相互作用を反映している。

2-4f. 総括

本研究では、プローブ位置制御技術を備えた高感度分子間力顕微鏡により、生体分子サイズ程度の微小表面に作用する、疎水表面間相互作用の計測に初めて成功した。さらに、表面間力の長距離性、溶液塩強度による影響など、種々の性質について明らかにした。幾つかの点では、過去に報告されている巨視的計測で得られた結果と一致した。また、接触角測定の結果より、観察された長距離引力が、疎水表面と水、または溶液(分子)間の相互作用を反映していることが明らかとなった。

3 章

表面近傍の相互作用 —DLVO理論の検証—

3-1 序

溶液中における帯電表面間の相互作用力測定では、表面のごく近傍 (<5nm) において、巨視的な観点で記述した理論とは異なる挙動が観察される場合が多々ある。主に長距離領域を支配する静電斥力と、短距離域を支配するVdW力を線形結合し、主にコロイドの安定性の理論として提案されている有名な理論として、DLVO (Derjaguin-Landau-Verway-Overbeek : いずれも人名) 理論がある。この理論では、帯電表面間における相互作用は、長距離領域においては斥力、表面近傍の短距離領域においては引力が観察されることになるが、実際溶液中でおこなわれた表面間力測定において、このような力のプロファイルが明確に観察された例はない。ほとんどの場合、静電斥力のプロファイルから連続的に変化し、表面近傍の数nmより急激に増加する斥力が観察されている [28][31]。理論から外れるこの表面間力の挙動について、DLVO理論の前提を崩さずに、幾つかの解釈が試みられてきた。いずれも、巨視的取り扱いの限界を念頭に置いた解釈であり、溶媒および溶質分子の粒子的な性質が無視できなくなり、連続体としての扱いが不可能となる点に着目している。最も有力な説が、水和斥力の存在である。帯電表面に吸着した対イオンに水和している水分子を脱水するためのエネルギーが、斥力を生ずるとしている。介在する溶媒分子が数分子程度となる間隙距離 1nm以下の領域では、表面が非常に平滑である場合に限り、溶媒(水)分子の大きさに由来する周期で振動する力の存在が、理論やシミュレーションにより示唆され [33]、実験的に確認されている[9][34]。しかしながら、この作用は、対イオンの存在する塩溶液中において成立するものであり、対イオンの存在しない純水中においては、その効果は観察されなくなる。本研究において、プロー

ブおよび基盤平面の無修飾表面間(酸化亜鉛/ガラス)に働く相互作用の測定をおこなった際、純水中での測定にも関わらず、表面近傍において急激に増加する斥力が観察された。この章では、観察された表面近傍での斥力が何に起因しているのか、また、静電斥力とVdW力の単純な加算で表面間相互作用が記述できるとするDLVO理論は、表面間のどの領域においても成立するのか、測定結果や計算機による数値計算の結果を踏まえ、考察する。

3-2 材料および計測

3-2a. 計測用試料の作成

カバーガラスは、0.1M KOH中において、約30分～1時間超音波洗浄を行い、表面を浸食洗浄させたのち、KOH中において保存する。この状態のガラスは全く水をはじかず、接触角の測定は不可能であった。ウイスキーは、KOH洗浄はおこなわず、蒸留水で数回、次いでエタノールに換えて数回洗浄する。洗浄したウイスキーは、エタノール中で保存する。

計測用試料の作成手順は、疎水表面を用いる場合とほぼ同じである。カバーガラスを蒸留水中で超音波洗浄し、洗浄した測定用チャンバー中の台の上に設置する。次いで、蒸留水を還流させチャンバー中を洗浄した後、AFMのスキャナステージ上に乗せ、カンチレバーを導入する。制御用レーザーをONにし、フィードバック制御を開始する。オシロスコープ上でカンチレバーの変位を確認しながら、最も変位が小さくなるよう、回路のゲイン(増幅率)やカンチレバー上のレーザー光の照射位置を調節する。ゲイン及び照射位置は、一通りの計測が終わるまで一定に保ち、ドリフトなどにより照射位置にずれが生じた場合は直ちに修正する。

3-2b. フォースカーブ測定

無修飾表面間におけるフォースカーブの測定およびデータ処理の方法は、疎水表面間の相互作用測定の場合と同様である。

表面間力測定は、フィードバック制御によりカンチレバーの位置を一定に保ちながら、チャンバーの乗ったステージを上昇(ステージ速度：5nm/sec ～ 10nm/sec)させておこなった。DAT上には、1.光分割センサの出力電圧値(カンチレバーの変位)、2.フィードバック回路の出力電圧値、3.カンチレバーホルダを駆動するファンクションジェネレータの出力電圧値、の3種類のデータを記録する。一通りの測定終了後、弾性定数および外力算出のためのデータを、カンチレバー毎に収集した。

フォースカーブは、記録したセンサ出力、フィードバック回路出力の両者の時系列データから求めた。斥力の場合には、プローブがガラス表面と接触した地点が、引力の場合には、基盤に吸着しステージと共に上昇するカンチレバーが元の位置に再び達した地点が、それぞれ間隙距離の原点となる。表面間の間隙距離は、原点到達時刻より逆算した時間に、ステージ速度を乗じて求める。プローブに作用した外力は、表面間距離が充分長い地点での外力を0として計算する。

3-2c. 計算機による数値計算

表面近傍付近のフォースカーブを解析するため、計算機による数値計算を、測定と同一の条件に対しておこなった。

まず、数値計算に用いるパラメータを得るため、フォースカーブを近似し、表面電荷密度およびデバイ長の見積もりを行った。近似に用いた関数について以下詳述する。

電荷密度 σ_1 を持つプローブ表面と、 σ_2 を持つガラス基盤表面が、距離 z_e 離れて溶液中に存在する場合、両面間に作用する静電圧力 p_e は以下の式で与えられる。[24]

$$p_e = \frac{2 (\sigma_1^2 + \sigma_2^2) + \sigma_1 \sigma_2 [\exp(\kappa z_e) + \exp(-\kappa z_e)]}{\epsilon_0 \epsilon_3 [\exp(\kappa z_e) - \exp(-\kappa z_e)]^2}$$

式中、 ϵ_0 は真空誘電率、 ϵ_3 は溶液の比誘電率、 κ はデバイ長の逆数でを表す。ここで、溶液は両表面の裏側にはまわり込まないものとする。 $\exp(\kappa z_e) \gg \exp(-\kappa z_e)$ の場合、上式は、

$$p_e = \frac{2}{\epsilon_0 \epsilon_3} [(\sigma_1^2 + \sigma_2^2) \exp(-2\kappa z_e) + \sigma_1 \sigma_2 \exp(-\kappa z_e)]$$

と簡略化できる。プローブに作用する表面間力 F_e が、表面に存在する電荷にのみ由来すると仮定すれば、 F_e は p_e をプローブ表面にわたって積分することで得られる。ここでプローブの形状は、2章でVdW力を計算する際に用いたものと同じとすると、この積分は以下の式で表される。

$$F_e = 2\pi \int_D p_e \cdot r \cdot \frac{dr}{dz_e} \cdot dz_e \cdots (5)$$

ここで、 D はプローブ先端とガラス基盤間の距離(間隙距離)、 r は距離 z_e におけるプローブの水平方向の半径を示す。(Fig. 10参照)

r は尖端球部分($D < z_e < D + R(1 - \sin \theta)$)において、

$$r = \sqrt{R^2 - (D + R - z_e)^2}$$

と表され、また錘体部分($D + R(1 - \sin \theta) < z_e$)では、

$$r = (z_e - D - R + R/\sin \theta) \cdot \tan \theta$$

と表される。(5)式に以上を代入し積分を行うと、 F_e として以下の式を得る。

$$F_e = a \cdot \exp(-2\kappa D) + b \cdot \exp(-\kappa D)$$

$$\text{ただし, } a = \frac{\pi(\sigma_1^2 + \sigma_2^2)}{\epsilon_0 \epsilon_3 \kappa^2} [\tan^2 \theta + 2\kappa R + \exp(-2\kappa R) - 1]$$

$$b = \frac{4\pi\sigma_1\sigma_2}{\epsilon_0 \epsilon_3 \kappa^2} [\tan^2 \theta + \kappa R + \exp(-\kappa R) - 1]$$

...(6)

この式を用いて、得られたフォースカーブを近似した。なお、真空誘電率 ϵ_0 および溶液(水)の比誘電率 ϵ_3 の値としてそれぞれ、 $8.85 \times 10^{-12} \text{ C}^2/\text{J} \cdot \text{m}$ 、78 を代入した。尖端の半径 R には、17nm、角度 θ には11.5度と、それぞれ電顕写真の解析より得た値を使用した。

ここで注意しなければならないのは、 $\exp(\kappa z_e) \gg \exp(-\kappa z_e)$ という条件が用いられていることである。すなわち、上式は、 $z_e \geq \kappa^{-1}$ のとき、つまり表面間距離にして、 $D \geq \kappa^{-1}$ の場合に対し、導出された式である。従って、この式によって与えられる相互作用プロファイルおよびパラメータが、表面近傍においても信頼できるという保証はない。表面近傍におけるフォースカーブの解析にあたって、近似で得られたパラメータは、計算機による数値計算の参考とする程度にとどめるべきである。

計算機による数値計算について以下に詳述する。

溶液中のプローブ表面(溶液とプローブの境界部)に作用する静電力 F_e は、

マクスウェルの静電圧力テンソルの z 方向成分 T_z と、溶液中に存在する対イオン間の浸透圧 p を用いて、

$$F_e = 2\pi \cdot \int_D^{\infty} (T_z + p) \cdot r \cdot \frac{dr}{dz_e} \cdot dz_e$$

と表される。 r は距離 z_e におけるプローブの水平方向の半径であり、近似に用いる関数の導出に用いたものと同一である。 T_z は、

$$T_z = \epsilon_0 \epsilon_3 (E_z^2 - \frac{\vec{E}^2}{2} + E_r E_z)$$

である。 $\vec{E}$ は電場を表し、電位 Φ を用いて

$$\vec{E} = -\nabla \Phi$$

と表される。一方、 p は、単位体積あたりのイオン密度 n_i および バルクにおける濃度 n_i^{∞} を用いて、

$$p = k_B T \sum_i (n_i - n_i^{\infty})$$

と、全てのイオン種にわたる和により与えられる。溶液部分における電位 Φ は、デバイ-ヒュッケルによる静電遮蔽を考慮した、ポアソン・ボルツマン方程式より、

$$\Delta \Phi_e = -\frac{\rho}{\epsilon_0 \epsilon_3} = -\frac{1}{\epsilon_0 \epsilon_3} \cdot \sum_i z_i \cdot e \cdot n_i^{\infty} \cdot \exp(-\frac{z_i \Phi}{k_B T}) \cdots (6)$$

またプローブ内部では、電荷が存在しないとし、

$$\Delta \Phi_s = 0$$

で表される。なお、プローブに回転対称性があることから、

$$\Delta \Phi = \frac{d^2 \Phi}{dr^2} + \frac{1}{r} \frac{d\Phi}{dr} + \frac{d^2 \Phi}{dz^2}$$

と考えることができる。

また、境界部分でのポアソン式から、境界条件は以下で与えられる。

$$\Phi_s = \Phi_e$$

$$\epsilon_1 \frac{d\Phi_s}{dn} = \epsilon_3 \frac{d\Phi_e}{dn}$$

ϵ_1 はプローブの材質の比誘電率である。後者は、境界面に垂直な方向の微分を表す。

以上の方程式を解くために、半径方向の軸 r と高さ方向の軸 z のそれぞれについて、間隔 h_0 の平行な直線群を考え、各直線の交点(格子点)各点において、近似値を数値計算する。

その際、変微分方程式は、差分方程式に書き換えることができ、各格子点 (r_j, z_l) における $\Delta\Phi_{j,l}$ は、

$$\Delta\Phi_{j,l} = \frac{1}{h_0} \left(\frac{\Phi_{j+1,l} - \Phi_{j,l}}{h_0} - \frac{\Phi_{j,l} - \Phi_{j-1,l}}{h_0} \right) + \frac{1}{h_0} \frac{\Phi_{j,l+1} - \Phi_{j,l-1}}{h_0} + \frac{1}{2r_j h_0} (\Phi_{j+1,l} - \Phi_{j-1,l})$$

$$= \frac{1}{h_0^2} (\Phi_{j+1,l} + \Phi_{j-1,l} + \Phi_{j,l+1} + \Phi_{j,l-1} - 4\Phi_{j,l}) + \frac{1}{(j-1)2h_0^2} (\Phi_{j+1,l} - \Phi_{j-1,l})$$

で表される。この式を(6)式に代入することにより、以下の式が得られる。

$$\Phi_{j,l} = \frac{1}{4} (\Phi_{j+1,l} + \Phi_{j-1,l} + \Phi_{j,l+1} + \Phi_{j,l-1}) + \frac{1}{8(j-1)} (\Phi_{j+1,l} - \Phi_{j-1,l}) + \frac{h_0^2}{4\epsilon_0 \epsilon_3} \sum n_i e z_i$$

...(7)

プローブの領域では、最終項を除けばよい。

(7)式中、最終項が溶液中のイオンの遮蔽による電圧変化(表面電荷が正の時は降下)を引き起こすことになる。

数値計算をおこなう際は、電位変化が連続的となるよう、隣り合う電位の差がわずかになるまで、繰り返し計算をおこなう。本研究では、800回程度おこなった。また、ほとんどイオンの存在しない溶液条件を想定したため、イオンによる遮蔽がわずかであり、電圧も長距離にわたって降下し続ける。そのため、フォースカーブのプロファイルおよびプローブ形状より計算範囲を、高さ

方向 (z_i) についてはプローブ先端より170nm、半径方向 (r_j) については中心より50nmとなるよう設定した(格子点間隔 0.5nm、格子点数 r_j 方向 100点、 z_i 方向 340点)。また、間隙距離の増加により、プローブ表面の積分範囲が減少することを避けるため、プローブ先端からの積分距離が常時一定となるようにした。また、溶質として 1:1電解質を仮定している。計算は、間隙距離 1~100nmに対しておこなった。

3-3 結果

3-3a. フォースカーブ

無修飾表面間には、原点付近で 5～10pN程度の弱い斥力が観察された。これは、両平面とも若干負に帯電していることによる影響と考えられる。全体を通じてプロファイルは単調に変化し、間隙距離が短くなるのに従い、斥力が上昇している。表面より 6nm以下の近傍域において、その変化の程度は急激に増しており、DLVO理論より予測されうるVdW引力の存在は、全く確認できなかった。なお、同様の傾向は、以前に青木ら[10]が行った、帯電表面(アミノシラン修飾剤により修飾)間の相互作用測定においても観察されている。

3-3b. 計算機による数値計算

無修飾表面間におけるフォースカーブの平均プロファイル($n=4$)を、(7)式により近似、その結果得られたパラメータを、表 8. に示す。なお、表面近傍域はデバイよりも短い間隙距離であるため、フォースカーブの全範囲以外にも、複数の範囲を設定し、近似を試みた。

表 8. 近似により得られた各パラメータ

近似範囲 [nm]	表面電荷密度 σ_1		表面電荷密度 σ_2		デバイ長 κ^{-1} [nm]	r値
	$\times 10^{-4}[\text{C}/\text{m}^2]$	$\times 10^{-3}[e/\text{nm}^2]$	$\times 10^{-4}[\text{C}/\text{m}^2]$	$\times 10^{-3}[e/\text{nm}^2]$		
0～	8.0	5.0	8.0	5.0	70	0.99
20～	6.6	4.1	6.6	4.1	89	0.98
80～	7.6	4.7	7.6	4.7	81	0.91

注) 近似範囲 0 nm～ : 全範囲

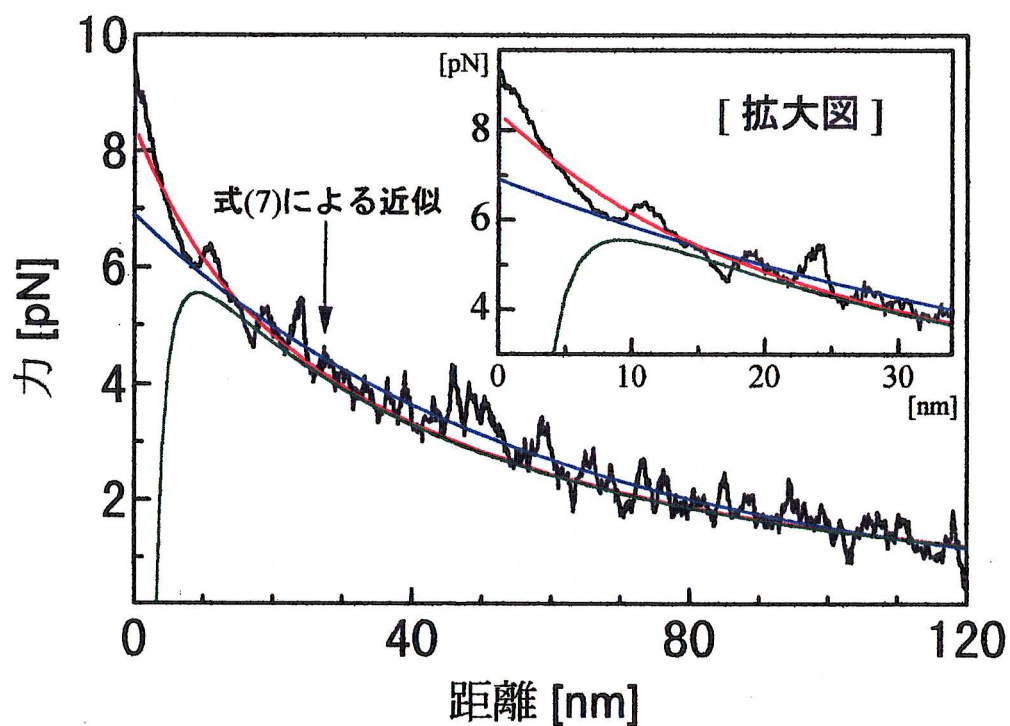
20 nm～ : DLVO理論で予測されるVdW引力の寄与が、
少ない領域

80 nm～ : デバイ長より長距離の領域

Fig. 15に、20nm～の範囲で近似した結果を示す。近似により得られた曲線と測定で得られたフォースカーブのプロファイルは、間隙距離 6nm付近の原点近傍において、フォースカーブの斥力が急激に変化するまではほぼ一致している。しかし、間隙距離が6nm以下になると、両プロファイルに差異が見受けられる。この差異は、間隙距離がデバイ長よりも短いために生じた、近似式の誤差の可能性がある。

計算機による数値計算には、上記の近似により得られたパラメータ値を参考に、電荷密度として $6.7 \times 10^{-4} \text{ C}/\text{m}^2$ ($4.2 \times 10^{-3} e/\text{nm}^2$)、溶液イオン強度として 0.011mM (デバイ長 92nm)の値をそれぞれ用いた。その結果をFig. 15に示す。近似で得たプロファイルとは異なり、原点近傍での急激な斥力上昇

が見られ、実際の測定で得られたフォースカーブに近い。近似曲線とフォースカーブ間に生ずる差異が、近似式の誤差に起因している可能性は高いといえる。



— : 計算機シミュレーション結果
 — : 上記にVdW力を加算した結果

式(7)では近似し得なかった、表面近傍におけるフォースカーブの斥力増加を、計算機シミュレーションにより再現することができる。

- ・(7)式による近似範囲 : 20~400nm
- ・シミュレーションに使用した値 :
 電荷密度 $6.7 \times 10^{-4} \text{ C/m}^2$
 電解質(1:1)濃度 $1.1 \times 10^{-2} \text{ mM}$

※挿入図は表面近傍の拡大図

Fig. 15
 無修飾表面間の相互作用

3-4 考察

帯電表面間における相互作用に関する理論としてDLVO理論がある。コロイド粒子の挙動など表面間の相互作用により決定される現象は数多くあるが、これらの表面間相互作用が、静電斥力とファンデルワールス引力の単純和で記述できるとする理論である。静電斥力の表面近傍における変化が緩やかであるのに対し、VdW力はべき法則に従う変化をするため、遠距離領域では静電斥力が、近距離域ではVdW力が支配的になると考えられている。

実験的には、雲母 [30][32]をはじめシリカ(ガラス) [28]、脂質膜など各種の表面間相互作用の測定が、各種雰囲気中で数多くおこなわれてきた。それらの結果のほとんどは、測定された表面間力がおおよそその範囲でDLVO理論に従うことを示している。しかしながら、数nm以下の表面近傍では、多くの結果でDLVO理論からの逸脱が観察されている [28][40][41]。これは、溶媒や溶質分子が有限の大きさを持つことによる影響であると考えられている。すなわち、連続体理論であるDLVO理論は巨視的物理量で記述されているため、分子の離散的性質が支配的になる領域での相互作用を、完全に記述することは不可能なのである。

こうした、表面近傍においてDLVO理論から外れる力(非DLVO力)の起源については、水和などの溶媒和や、表面を被覆する分子の存在などが考えられている。このうち、溶媒和に起因する力(溶媒和力)は、帯電表面上に存在する半ば規則的に配列した溶媒分子の層が、対表面の接近により破壊または変化するために生ずる [36]。この表面近傍の溶媒分子の層は、溶媒和した対イオンの表面への吸着により形成されと考えられるため、希薄塩溶液中では力が減少することが予測される [37][38]。シミュレーション実験も幾つかおこなわれており、振動力または指数関数様の斥力が得られている

[9][36]。一方、熱的に励起されて突出した表面被覆分子の頭部や鎖部などの分子サイズの突起が、対表面上に存在する表面被覆分子の突起部と重なるために生ずる斥力が、立体斥力である [39]。これらの斥力は、DLVO力に単純加算される付加的な力として扱われており、あくまでDLVO理論の枠組みを逸脱しないメカニズムとして考えられている。

雲母に代表される平滑な表面を用いた研究では、DLVO理論と一致した力が観察されるのは電気二重層力が支配的な領域にほぼ限られており、VdW力が支配的となる表面近傍では理論から外れ、指数関数的な斥力が観察される。この斥力は、対イオン濃度が少ない希薄塩溶液や、プロトンのみが表面に結合するような低pH溶液中において減少または消失することから、溶媒和(水和)斥力であると考えられている。一方、シリカ(ガラス)表面を用いた実験では雲母と異なり、希薄イオン環境においても同様の斥力が表面近傍で観察されている[28]。この現象は、シリカ表面のゲル化した構造の一部が表面より液中に突出し、ファンデルワールス力の原点となるファンデルワールス面と静電斥力の原点となる電荷面の位置が、0.5nm(対面を考慮すると 1.0nm)とわずかにずれることに起因すると解釈されている。表面に構造体が突出することになるため、1nm以下の間隙距離において立体力の存在も示唆されている。

本研究で得られた無修飾の酸化亜鉛(プローブ)/ガラス(基盤)表面間のフォースカーブには、表面近傍で急激に上昇する斥力が観察されている。この表面近傍の斥力を解析するため、ポアソン-ボルツマン方程式の数値解を計算して得られた静電斥力のプロファイルは、測定されたフォースカーブとほとんど一致した(Fig. 15)。同時にVdW力も計算し、数値計算から得られた静電斥力のプロファイルに加算した。しかし、VdW力を加算した結果(古典的DLVO力)は、静電斥力のみの場合と異なり、測定結果とは一致しなかった

(Fig. 15)。

数値計算により算出した二重層力は、測定データと良く一致したが、DLVO力に付加的斥力が加算され、見かけ上一致している可能性がある。表面からの距離が数nm以下の領域においては、先述の通り、溶媒和斥力及び立体斥力の存在が考えられる。溶媒和斥力の発生には、相当量の対イオンが表面に吸着することが前提である。測定時の溶液条件を、近似や数値計算より得られるデバイ長から逆算したところ、約 0.01mMの希薄電解質(1:1電解質)溶液に相当した(実際の溶液条件は純水)。このような希薄溶液条件下で、VdW力を凌ぐ溶媒和斥力が6nm近辺より発生することは、メカニズム上、あまり考えられない。事実、報告されている他の研究結果においても、 10^{-4} M以下の電解質濃度では、付加的な斥力はほとんど観察されていない [29][30]。一方、プローブ、基盤のそれぞれが、表面修飾を受けていない酸化亜鉛の結晶およびガラスであること、フォースカーブがガラス表面の異なる数点での測定結果の平均であることを考慮すると、表面全面より6nmの距離にわたって構造体が突出し、立体斥力を発生するとは考えられない。これらから、表面近傍の斥力の要因は、DLVO力に単純加算される斥力ではないことが結論づけられる。

本研究で観察された表面近傍における非DLVO力は、同様に稀薄溶液下で測定された、前述のシリカ表面間の斥力に近い特徴を有している。では、本研究で観察された斥力もその起源を、電荷面とVdW面の位置の差に求めることができるのであろうか。この仮説を提唱したVigil et al. [28]の測定において、各パラメータ値は表面電位 70mV、表面電荷密度 $2.6 \times 10^{-3} \text{C/m}^2$ であった。これらの値から電解質濃度を求めると 0.15mMとなる。本研究における値と比較すると、表面電荷密度に約4倍の開きがある。VdW力が表面電荷や溶液条件に依存しないため、Vigilらの測定では、DLVO力中に静電斥力が占め

る割合が増している。本研究における表面形状(プローブ／基盤)を用いて、単純加算した場合のDLVO力、および電荷面とVdW面を 1nm(片面あたり 0.5nm)ずらして加算した場合のDLVO力を、各々の測定から得られたパラメータ値について計算した。ただし、力の本質を比較するために、材質に関しては本研究と同じ(酸化亜鉛とガラス)ものとした。計算した結果を Fig. 16に示す。Vigilらのパラメータ値について計算した場合、ずれが存在すると、1nm 以上の間隙における引力の寄与は大きく減少する。しかしながら、彼らが報告している結果とは異なり、完全に消失してはいない。一方、本研究で得られたパラメータ値を用いた場合、ずれが存在しても、引力の寄与はほとんど残ったままである。このように、Vigilらのパラメータから得た結果と、本研究のパラメータ値から得た結果を比較すると、引力の寄与の大きさに差異が見られた。この差異は、表面電荷密度の違いに起因すると考えられる。前述したとおり、Vigilらのパラメータ値を用いて計算したプローブ／基盤間の相互作用では、引力が完全に消失しなかった。これは、表面の形状の違いに原因があると考えられるため、表面形状を Vigilらの測定時と同一(円筒面／円筒面(SFA))にして計算した。材質は上記と同じく酸化亜鉛とガラスを用いた。その結果、Vigilらのパラメータ値を用いた場合、ずれが存在すると引力は完全に消失した。一方、本研究で得られたパラメータを用いた場合には、引力が消失することはなく残った。結局、Vigilらによって提唱された表面近傍で観察される斥力の起源は、電荷密度および表面形状の両条件に依存するものであり、常にこの斥力を説明できるものではない。

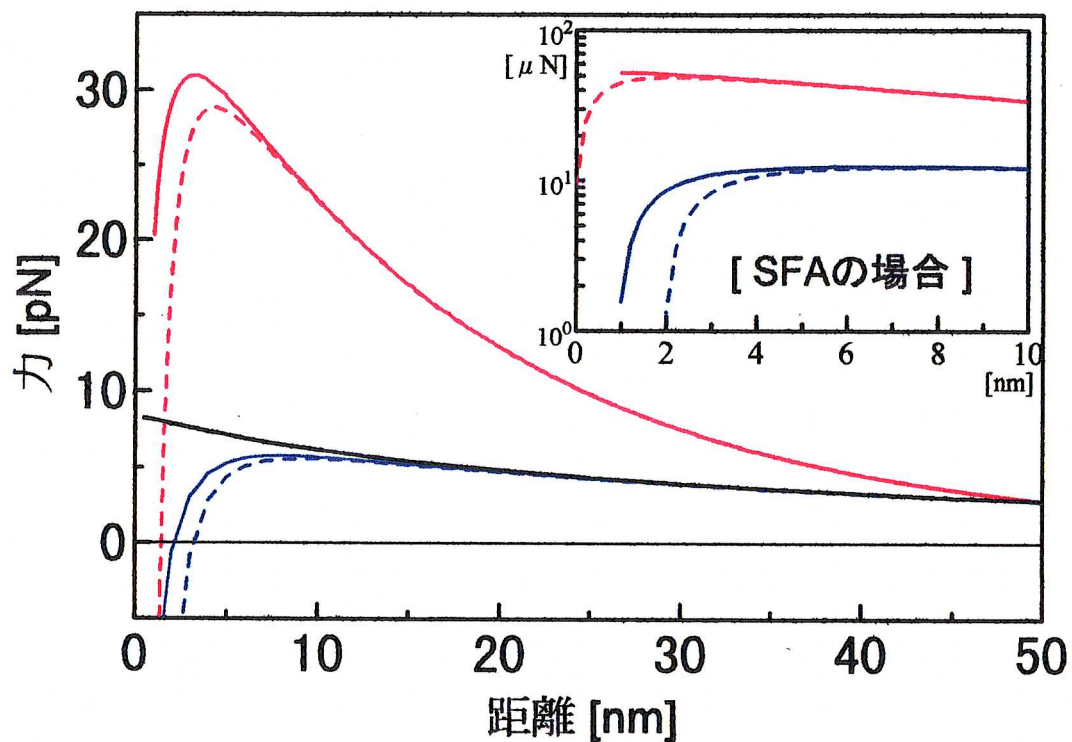
本研究以外にも Yoon et al. [21]が、AFMのカンチレバーの先端に取り付けたガラスビーズ(径 約15 μ m)をプローブとして、シリカ基盤との相互作用を純水中において測定し、表面近傍で同様の斥力を得ている。上記と同様、彼らの測定における、電荷密度($1.3 \times 10^{-3} \text{C/m}^2$)と溶液塩濃度($5.0 \times 10^{-2} \text{mM}$)お

よび表面形状を用いて、OHP/VdWP間にずれがある場合に得られるフォースカーブを計算したところ、この場合にも引力が消失することはなかった(データ非表示)。

それでは、この表面近傍における斥力の起源として考えられる要因は何であろうか。数値計算により得られた静電斥力の計算結果が、測定で得られたフォースカーブとほぼ一致し、さらに付加的な斥力の存在も否定できることから、フォースカーブが静電斥力とVdW力との単純和で表されてはいないことが示された。実際、シリカ以外を用いた他の表面間力測定でも、VdW力が支配的と考えられる領域において、吸着以外の現象により引力の存在が示された例はない。計算によりフォースカーブを再現するためには、状況によって定まる何らかの係数をVdW引力に乘じ、静電斥力と加算する必要性が考えられる。VdW力の起源は、無極性分子の電子雲密度が瞬間的に偏りを生じ、そのために対表面の分子が誘電分極を引き起こすことにあるとされる。従って、無極性分子によって構成された表面間相互作用であるVdW力と、帯電表面間の相互作用である静電斥力をそのまま加算することが、実際に観察される表面間相互作用を完全に記述できるかどうかは疑問である。また、表面に水のような自由度の高い分子がVdW力によって集合すれば、その面でVdW力は遮蔽されてしまう可能性がある。実際、表面に近づく際に引力は観察されないが、一旦表面と接触するとプローブは吸着する。従って、表面の溶媒分子を除去すれば、VdW力は作用するようである。この場合、互いを引き剥がす力が、理論より予想されるVdW力の大きさに近くなると考えられる。残念ながら、前章で述べた通り、本研究で用いた系においては、吸着力を測定することができない。

実験や結果の解釈の複雑さもあり、DLVO理論に関しての検証は容易ではないが、連続体理論に依存しない、実質的な表面間力の解釈が今後必要と

なろう。



プローブ／基盤間で計算した、二重層斥力+VdW力
 挿入図は円筒／円筒間(SFAで用いられる表面形状)
 で計算した結果

- (red) : Vigil et al. のパラメータを代入し計算
 実線: OHPとVdWPを1nmずらした場合
 破線: VdW力と二重層斥力を単純加算
- (blue) : 本研究において得られたパラメータを代入し計算
 実線: OHPとVdWPを1nmずらした場合
 破線: VdW力と二重層斥力を単純加算
- (black) : 二重層斥力のシミュレーション結果

ずらした場合は、1nm～を図示

※パラメータ：表面電荷密度、溶液塩強度

Fig. 16
 Vigil et al. の説の検証

結論

高感度分子間力顕微鏡を用いて、疎水性および帯電した微小表面間に働く相互作用を計測した。

疎水性表面間には、純水中で 200nm 以上に渡る長距離引力が観察された。この引力は溶液塩強度、表面疎水性に依存し、その作用距離が変化した。また、二つの指数関数で近似したところ、一方の減衰長（長距離成分）は条件の変化と相関したが、他方（短距離成分）は条件に関わらず一定値となった。巨視的な疎水性の指標である接触角と、減衰長の長距離成分との間には、一定の関数であらわされる相関が見受けられた。これら一連の結果から、疎水表面間に見られる長距離引力は、水と表面との相互作用を反映していることが示唆された。

帯電表面間で観察された相互作用は、間隙距離が長い領域では表面間力の挙動を記述する DLVO 理論にしたがっているが、約 5nm 以下の表面近傍域では、急激に上昇する斥力が観察され、理論と異なった振る舞いを示した。この斥力の起源を探るため、計算機による数値計算を行い静電斥力の厳密解を求めたところ、斥力上昇は静電斥力のみで説明できることを示唆する結果を得た。これは従来幅広く受け入れられてきた DLVO 理論が、同様の条件下においては成立しないことを意味する。溶媒を連続体として近似できないことに原因があると考えられる。

以上は、従来の測定系では実現できなかった、生体分子サイズ程度の微小表面に対する結果である。今後、生体分子間の相互作用を考える上での重要な知見となりうるほか、実際に計測で得られた相互作用力の解釈にも応用できるであろう。

謝辞

この学位論文を記すにあたり、お世話になったすべての方々に感謝いたします。

柳田敏雄教授には、この研究を行う機会を与えていただきました。常日頃よりの御指導と有益な助言に感謝いたします。

葛西道生教授と村上富士夫教授には、お忙しい中本論文の副査をしていただきました。深く感謝いたします。

国立遺伝学研究所の徳永万喜洋助教授には本研究の直接の御指導をいただきました。また研究の方向性について多様な助言をいただきました。深く感謝いたします。

科学技術振興事業団の青木高明博士ならびに大阪大学医学部の曾和義幸君には、共同研究者ならびに同じ仕事に関わる者として、とてもお世話になりました。この場を借りて感謝いたします。

最後に、第一生理学教室ならびに一分子過程プロジェクトのメンバーの方々には、日ごろより有益な議論・示唆をしていただきました。心より感謝いたします。

1999年1月

廣島通夫

参照文献

- [1] A. Ishijima, T. Doi, K. Sakurada and T. Yandgida, *Nature* **352**, 301 (1991)
- [2] A. Ishijima, H. Kojima, H. Higuchi, Y. Harada, T. Funiatsu, and T. Yandgida
Biophys. J. 70, **383** (1996)
- [3] J. T. Finner, R. M. Simmons, and J. A. Spudich, *Nature* **368**, 113 (1994)
- [4] K. Svoboda, C. F. Schmidt, B. J. Schnapp, and S. M. Block, *Nature* **365**, 721
(1993)
- [5] B. Essevaz-Roulet, U. Bockelmann, and F. Heslot, *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**,
11935 (1997)
- [6] G. U. Lee, L. A. Chrisey, and R. J. Colton, *Science* **266**, 771 (1994)
- [7] A. Chilkoti, T. Boland, B. Ratner, and P. Stayton, *Biophys. J.* **69**, 2125 (1995)
- [8] G. Binnig, C. F. Quate, and Ch. Gerber, *Phys. Rev. Lett.* **56**, 930 (1986)
- [9] J. N. Israelachvili, "Intermolecular and surface forces" *Academic Press* (1985)
- [10] T. Aoki, M. Hiroshima, K. Kitamura, M. Tokunaga, & T. Yanagida,
Ultramicroscopy **70**, 45 (1997)
- [11] J. N. Israelachvili and R. Pashley, *Nature* **300**, 341 (1982)

- [12] J. N. Israelachvili and R. M. Pashley, *J. Colloid Interface Sci.* **98**, 500 (1984)
- [13] R. M. Pashley, P. M. McGuiggan, & B. W. Ninham, *Science* **229**, 1088 (1985)
- [14] P. M. Claesson, C. E. Blom, P. C. Herder, & B. W. Ninham, *J. Colloid Interface Sci.* **114**, 234 (1986)
- [15] Y. I. Rabinovich and B. V. Derjaguin, *Colloids Surf.* **30**, 243 (1988)
- [16] P. M. Claesson and H. K. Christenson, *J. Phys. Chem.* **92**, 1650 (1988)
- [17] H. K. Christenson, P. M. Claesson, J. Berg, & P. C. Herder, *J. Phys. Chem.* **93**, 1472 (1989)
- [18] H. K. Christenson, J. Fang, B. W. Ninham, & J. L. Parker, *J. Phys. Chem.* **94**, 8004 (1990)
- [19] K. Kurihara, S. Kato, & T. Kunitake, *Chem. Lett.* **9**, 1555 (1990)
- [20] Y-H. Tsao, D. F. Evans, & H. Wennerstrom, *Science* **262**, 547 (1993)
- [21] R-H. Yoon, D. H. Flinn, & Y. I. Rabinovich, *J. Colloid Interface Sci.* **185**, 363 (1997)
- [22] M. Tokunaga, T. Aoki, M. Hiroshima, K. Kitamura, & T. Yanagida, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **231**, 566 (1997)

- [23] H. Kado, K. Yokoyama, & T. Tohda, *Rev. Sci. Instrum.* **63**, 3330 (1992)
- [24] H. J. Butt, *Biophys. J.* **60**, 777 (1991)
- [25] R. Kaneko, S. Oguchi, S. Hara, R. Matsubara, T. Okada, H. Ogawa, and Y. Nakamura, *Ultramicroscopy* **42-44**, 1542 (1992)
- [26] 石島秋彦 新技術開発事業団柳田生体運動子プロジェクト 技術資料 (1994)
- [27] 青木高明 博士学位論文 (1997)
- [28] G. Vizil, Z. Xu, S. Steinberg, and J. Israelachvili, *J. colloid Interface Sci.* **165**, 367 (1994)
- [29] R. M. Pashley, *J. colloid Interface Sci.* **80**, 153 (1981)
- [30] R. M. Pashley, *J. colloid Interface Sci.* **83**, 531 (1981)
- [32] H. K. Christenson, *J. Phys. Chem.* **90**, 4 (1986)
- [33] J.R. Henderson, M and .M. Lozada-Cassou, *J. Colloid Inteerface Sci.* **114**, 180 (1986)
- [34] J. N. Israelachvili and R. M. Pashley, *Nature* **306**, 249 (1983)
- [35] H. K. Christenson, *J. Phys. Chem.* **90**, 4 (1986)

- [36] H. E. Stanley and J. Teixeira, *J. Chem. Phys.* **73**, 3404 (1980)
- [37] R. M. Pashley, *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 57 (1982)
- [38] R. M. Pashley and J. N. Israelachvili, *J. Colloid Interface Sci.* **97**, 446 (1984)
- [39] T. J. McIntosh and S. A. Shimon, *Biochemistry* **28**, 4058 (1986)
- [40] Y. I. Ravinovich, B. V. Derjaguin and N. V. Churaev, *Adv. Colloid Interface Sci.* **16**, 63 (1982)
- [41] G. Peschel, P. Belouschek, M. M. Muller, M. R. Muller, and R. Konig, *Colloid Polymer Sci.* **260**, 444 (1982)
- [42] T. J. McIntosh and S. A. Shimon, *Biochemistry* **28**, 4058 (1986)