生体分子を用いた新しいナノ構造作製方法

—バイオナノプロセス—

熊谷 慎也・山下 一郎

松下電器産業株式会社先端技術研究所 ☎ 619-0237 京都府相楽郡精華町光台 3-4

(2005 年 11 月 2 日受理)

A New Approach for Making Functional Nano-Structures

Utilizing Protein Supramolecules

—Bio Nano Process—

Shinya KUMAGAI and Ichiro YAMASHITA

Advanced Technology Research Laboratories, Matsushita Electric Industrial Co., Ltd.

3-4 Hikaridai, Seika, Kyoto 619-0237

(Received November 2, 2005)

A new process was proposed which exploited protein-supramolecules as scaffolds for producing inorganic, functional nano-structures. This new process was named as “Bio Nano Process” (the BNP) and is applicable in a vast field of nanotechnology. For example, a protein supramolecule, ferritin can be used to form inorganic nanodot in its inner cavity. Using the self-assemble property of the ferritin protein, a two-dimensional array of iron-oxide loaded ferritin molecules can be formed on a Si substrate. Moreover, it is also demonstrated that control of protein-substrate interaction in the solution can realize ferritin placements on designed substrate area at will. Heat treatment removed protein moiety of ferritin molecules and can leave only the nanodots on the substrate. This newly proposed method is a powerful tool for the fabrication of nanometric functional structures.

1. は じ め に

半導体微細加工技術は現在ではデザインルールが 65 nm にまでなっているが、従来の微細化の延長には限界があることも明らかになりつつある。一方で、現在の半導体加工技術の限界を超えるナノスケールの機能構造体が注目されている。ナノサイズのデバイスにより、省エネルギーや速度向上の他、量子効果などを利用する新しい原理の素子の実現も期待される。また健康医療分野では、遺伝子治療などのため個々の DNA をハンドルできるナノスケールの機能構造物への要求が高まりつつある。

著者らは、ある種のタンパク質が持つ無機化合物を形成する機能（バイオミネラリゼーション）と、自己組織化機能を利用することで、ボトムアップ型のナノ機能構造作製法を開発し、「バイオナノプロセス」して提案し

ている。本稿では、バイオナノプロセスの概要を述べた後、新たに取り組んだ基板上任意位置へのナノドット配置の可能性について、タンパク質-基板間相互作用の観点から検討し、実験的に検証した結果を紹介する。

2. バイオナノプロセス

生物を観察すると、生命体は実に巧妙に微小部品から構成されていることがわかる。生物は細胞から作られ、細胞は生体超分子と呼ばれるナノスケールの微小部品から構成されている。生物の高度な機能はこの生体超分子の組み合わせで実現されており、ナノテクノロジーにおいて生物に学ぶことは極めて有用である。

代表的な生体超分子であるタンパク質超分子は、遺伝子情報に従って生成されるため、化学的に全く同一という特徴を持っている。工学的観点から考えると、タンパク質は大量規格品とみなすことができる。一方、自然界では極めて巧妙で多様なナノ構造がタンパク質の自己集合により作り上げられている。このことはタンパク質を

Fig. 1. Proposed application of Bio Nano Process.

利用したナノ構造構築が、従来の微細加工技術の限界を破るひとつの回答であることを示している。ナノ構造を削りだすのではなく、タンパク質=ナノブロックを自己集合により積み上げることでナノ構造を作るのである。相互作用して構造を作るとは高分子や無機材料でも可能であるが、個性の多様性を考えるとタンパク質はきわめて有望で、バイオナノブロックと捉えることができる。

しかし、タンパク質がナノブロックとして理想的であるとしても、現在の工学で要望されるのは主として無機材料である。そこでタンパク質に何らかの方法で無機材料を担持させてバイオナノブロックとし、これを用いてナノ構造を作り、その後何らかの方法でタンパク質を除去して無機材料のナノ構造を作製することを提案する。著者らはこの手法を「バイオナノプロセス」と名づけた。

Fig. 1 はバイオナノプロセスにより実現を目指しているいくつかの量子効果素子を示している。現在、特にフローティングゲートメモリに注力し、そのキーコンポーネントであるナノドット2次元配列を、フェリチンタンパク質を用いて実現し、そのメモリー動作を確認している^{1, 2)}。

3. フェリチンタンパク質を用いたナノドットの作製

生物の無機材料の取り込みはバイオミネラリゼーションと呼ばれている。著者らは量子効果ナノドットを作製するためにフェリチンと呼ばれる球殻状タンパク質を取り上げた。フェリチンは生物界に広く存在し、生体内の鉄濃度を調節する鉄保存タンパク質である。Fig. 2 はその模式図で、1本のポリペプチド鎖からなるサブユニットが非共有結合で24個集まり、分子量約46万の球殻状タンパク質を形成している。外径は約12 nmで、中心に約7 nmの空洞を持ち、高い熱安定性とpH安定性を示す。生体中の二価鉄イオンは鉄酸化活性部位で酸化された後、空洞内表面の負電荷領域で核形成し、鉄酸化物

Fig. 2. Schematic drawing of the ferritin molecule viewed down along a four-fold axis. The spherical protein shell consists of 24 subunits. One subunit is colored black and the size of the core is shown by broken line. The outer diameter of the shell is approximately 12 nm and the core size is 7 nm.

Fig. 3. TEM image of CdSe-ferritin molecule. The ferritins are negative stained by aurothioglucose. The black dots encircled by white ring are CdSe nanodots in the ferritin cavities.⁴⁾

(ferrihydrite, $5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 結晶のコアを形成する³⁾。野生種フェリチンのサブユニットには、分子量がわずかに異なる2種類(L-タイプとH-タイプ)が存在するが、著者らは、L-タイプだけからなるL型-リコンビナントフェリチンを遺伝子工学的に作製し使用している。

内部が空洞のL-型リコンビナントフェリチンは、生体内と同様、鉄酸化物コアを形成する能力を持つが、他の無機化合物をコアとして導入することもできる。一例として、化合物半導体であるCdSeコアを内部に合成したフェリチン粒子の電子顕微鏡観察像をFig. 3に示す⁴⁾。この他にも、コバルトやインジウム、銅、ニッケル、ZnSe等、種々の金属酸化物や金属、半導体材料等からなるコアを形成することが可能となってきた^{3~14)}。

4. 自己集合によるフェリチン粒子の2次元結晶化

量子効果素子作製に供するため、ナノドットを内包したフェリチンタンパク質の自己集合能を利用して2次元結晶作製を行った。手法としては気液界面に2次元結晶を作製する2つの方法を用いている。1つは古野ら¹⁵⁾が開発したPBLH (poly-1-benzyl-L-histidine, 合成ポリペプチド) を用いる方法に変更を加えたもので、もう1つは吉村らが開発した変性タンパク質膜法である^{16, 17)}。

前者の方法をFig. 4に示した。テフロン製のトラフに、20 mM の NaCl と 5~10 mM のカルシウムまたはマグネシウムイオンを加えた 10 mM MES pH 5.8 の緩衝液に入った低濃度 (20~40 $\mu\text{g}/\text{ml}$) のフェリチン溶液を満たす。溶液上に PBLH を静かに展開し表面に薄膜を作製する。液面の PBLH 膜は大気面が疎水性となり液面側は親水性で、弱酸性よりアルカリ側条件下でプラスに帯電している。フェリチン粒子は pH 5.8 付近では全体としてマイナスに帯電しているため、PBLH 膜の直下に濃縮され静電的に吸着する。その後、室温で放置して吸着が完了した後に、38℃ でアニーリングを行いフェリチン粒子の2次元結晶化を促す。このとき PBLH 膜は僅かな歪を吸収し、良質なフェリチン2次元結晶膜が得られる。以上の手法で作製された2次元結晶膜は、疎水处理したシリコン基板、もしくは電顕メッシュに転写できる。Fig. 5は作製したフェリチンの2次元結晶のシリコン基板に転写した高分解能 SEM 像である。フェリチン粒子のほぼ完全な2次元結晶が得られている。このようなフェリチンの2次元結晶膜が得られるのはフェリチン粒子の2回対称軸の表面付近にある2価イオン結合部位による。この部分でフェリチン同士が特異的に結合して2次元結晶を作っている¹⁸⁾。なおこの他に、現在ではシリコン基板に、アルカリイオンフリーで直接2次元結晶を作製することもできる。

5. ナノドットの基板上へ任意配置

5.1 静電相互作用を利用したフェリチン選択配置

フェリチンを用いて作製したナノドットを工業的に応用するためには¹⁹⁾、直接基板上の任意の位置にフェリチンを配置させる技術も重要になる。その配置にはフェリチンタンパク質部分が持つ、正負の電荷や疎水/親水性等の性質を利用することが有効であると考えられる。

ナノドットの任意パターン配置^{20~23)}を実現するためには、基板上への単一フェリチン分子配置が基本となる。ラスタースキャンのように、単一フェリチン分子配置の繰り返しで、任意のパターン配置が可能になるためであ

Fig. 4. Process flow of ferritin 2D crystallization. Ferritin solution is preserved in the trough and PBLH film is spread over the solution. After annealing, ferritins are ordered to form 2D array under the film. The ordered ferritin 2D array is transferred onto the hydrophobic Si substrate.

Fig. 5. An HR-SEM image of the two-dimensional array of ferritin on Si substrate. The array at the PBLH layer is transferred onto the Si substrate coated with a hydrophobic layer. The white dots represent the iron oxide cores of the ferritin molecules. The distance between cores is approximately 12 nm.

る。ここでは溶液中におけるフェリチン-基板間の静電相互作用を制御することで基板上への単一フェリチン分子選択配置を実現した例を示す²³⁾。

シリコン酸化膜は pH 7 付近で、表面 OH 基の解離反応の結果、負に帯電する。フェリチンタンパク質分子は pH 7 付近で正負両方の電荷を持つが、分子全体としては負に帯電している。ここで基板を表面修飾することで正の電荷を導入することができれば、フェリチン-表面修飾部間に引力が働き、フェリチン-基板間には斥力が働くため、フェリチンを選択的に配置させることが可能になると考えられる。

そこでシリコン酸化膜表面をアミノシラン化合物である 3-aminopropyltriethoxysilane (APTES) で修飾した。APTES はシリコン酸化膜表面と結合してアミノ基を表面に提示するため、pH 7 付近で APTES 修飾面は正に帯電しており、電子ビーム描画によりフェリチンと同等の大きさの APTES 修飾表面をシリコン基板上に作れば、

単一フェリチン分子吸着が可能となると考えられる。

しかし、この表面修飾を利用した静電吸着方法をナノスケールでの単一フェリチン分子選択配置に適用するためには、さらに溶液中における静電相互作用距離である Debye 長, λ ($\lambda = \sqrt{\epsilon_0 \epsilon_r kT / 2e^2 I}$, ϵ_0 : 真空中の誘電率, ϵ_r : 比誘電率, k : ボルツマン定数, T : 温度, e : 素電荷, I : イオン強度) を考慮しなければならない²⁴⁾。タンパク質を取り扱う通常の溶液条件では Debye 長が 1 nm~100 nm のオーダーになっているからである。

静電相互作用を利用した選択吸着の原理を Fig. 6 に示す。Debye 長が短い場合、フェリチンは容易に基板表面修飾部に到達することができる (Fig. 6 (a))。しかしながら斥力ポテンシャル領域も小さくなるため、フェリチンはシリコン酸化膜表面近傍にも容易に到達できるようになり、最終的に近接相互作用 (van der Waals 相互作用, 疎水/親水性相互作用等) により基板に吸着される。Debye 長が長い場合、表面修飾部からの引力ポテンシャルは周囲のシリコン酸化膜表面からの斥力ポテンシャルによって完全に遮蔽される (Fig. 6 (c))。この場合、フェリチンは斥力ポテンシャルによって阻まれるため基板に到達することができない。この2つの場合の間に最適な Debye 長があると考えられる (Fig. 6 (b))。この状況においては、表面修飾部近傍においてのみ斥力ポテンシャルが弱められるため、表面修飾部にフェリチンは吸着されるが、それ以外のシリコン酸化膜表面には斥力ポテンシャルに阻まれるため吸着されない。この選択吸着を実現するポテンシャル障壁高さは、Debye 長、表面修飾パターンサイズ、正負電荷の定量的なバランスによって変化する。すなわち、単一フェリチン分子吸着のためには、フェリチンと同等の大きさの APTES 表面修飾部分とシリコン表面の、正負電荷分布によるポテンシャル障壁を、Debye 長により制御し、Fig. 6 (b) の最適状態を実現しなければならない。

5.2 ポテンシャル障壁の評価

基板上への単一フェリチン分子吸着を実現するポテンシャル障壁を明らかにするため、シミュレーションを行った。ポテンシャル障壁はフェリチン、基板、溶液を含む系の相互作用自由エネルギーの変化量から評価した。相互作用自由エネルギー F は次式で与えられる^{25, 26)}。

$$F = \frac{1}{2} \int \epsilon_0 \epsilon_r (\nabla \phi)^2 dV + kT \sum_i \int \left(n_i \ln \left(\frac{n_i}{n_{i0}} \right) - n_i + n_{i0} \right) dV - \frac{A}{6} \left(\frac{a}{H} + \frac{a}{2a+H} + 2 \ln \frac{H}{2a+H} \right) \quad (1)$$

ここで ϕ は静電ポテンシャル, V は溶液中体積, n は溶液中イオン密度を表し、添字の i , 0 はそれぞれ i 種であること、バルク溶液中であることをそれぞれ示して

Fig. 6. Schematic drawing of ferritin adsorption onto the nanopatterned APTES area using electrostatic interaction in solution with, (a) short, (b) medium and (c) long Debye lengths.

Fig. 7. Calculated electrostatic potential distribution. The calculation geometry of ferritin, APTES pattern and SiO₂ surface is shown in the inset. The APTES pattern center is located at 0 nm on the Y position axis. Ferritin position is 60 nm above the APTES pattern. Debye length is 14 nm (ionic strength 0.5 mM).

いる。 a はフェリチンの半径, H はフェリチン表面-基板表面の間隔距離であり, A は Hamaker 定数²⁷⁾である。右辺第一項は静電エネルギー項, 第二項はエントロピー項, 第三項は van der Waals 項に相当する。ここで相互作用自由エネルギーはフェリチン表面-基板表面の間隔距離が無限大の時に 0 となるように定義している。

van der Waals 項はフェリチン表面-基板表面の間隔距離の関数として計算することが可能であるが、静電エネルギー項およびエントロピー項を計算するためには、以下に示す溶液中での Poisson-Boltzmann 方程式を数値的に解いて、溶液中の静電ポテンシャル分布、イオン密度分布を求めなければならない。

$$\Delta\phi = -\frac{1}{\epsilon_0\epsilon_r} \sum_i e z_i m_0 \exp\left(-\frac{e z_i}{kT} \phi\right) \quad (2)$$

ここで z_i は i 種イオンの価数を表す。

シミュレーションでは溶液条件に応じて 100 nm 立方程度の計算領域を考え、基板領域の中心に円形の APTES パターンを設定した。この計算ユニットは基板水平方向に無限に繰り返されていると仮定している。単一フェリチン分子配置を実現するため、APTES パターンサイズをフェリチンと同程度の直径 15 nm に設定した。Poisson-Boltzmann 式を解く上ではフェリチン、シリコン酸化膜、APTES の表面電荷密度が必要になる。ここでは各表面は均一に帯電していると仮定して、ゼータ電位の実験値をもとに表面電荷密度を決定し、計算に用いた²³⁾。

静電ポテンシャルの計算結果の一例を Fig. 7 に示す。基板上の APTES 領域において斥力静電ポテンシャルが弱められているが、APTES パターンの上には依然として静電ポテンシャルの障壁が形成されていることがわかる。

この静電ポテンシャルの計算結果を用いて、各 Debye 長においてフェリチンが APTES 円板中心へ垂直方向から接近するときの相互作用自由エネルギー変化を評価した。なお、幾何的配置から、APTES パターンの中心を通る垂線に沿ってフェリチンを APTES パターンに接近させる時に、最小のポテンシャル障壁を通過する。また、APTES 円板を有しないシリコン酸化膜表面へフェリチンが接近する時の相互作用自由エネルギー変化を同様に評価した。結果を Fig. 8 に示す。Debye 長 1 nm では引力ポテンシャル特性が示されているが、それ以外の Debye 長では基板表面近傍でポテンシャル障壁が形成され

ていることがわかる。フェリチンは基板に接近するときこのポテンシャル障壁を乗り越えることができれば、基板に吸着されることになる。コロイド理論によると、粒子間の凝集を避けるために 16 kT 以上のポテンシャル障壁高さが提案されている^{28, 29)}。図中における破線はこのポテンシャル障壁高さを示している。シミュレーションの結果からは Debye 長 14 nm の条件でフェリチンはシリコン酸化膜上に吸着せず、APTES パターン上のみ選択吸着すると判断される。よってこの条件を適用することで基板上への単一フェリチン吸着を実現することができると考えられる。

5.3 単一フェリチン分子選択吸着配置

このシミュレーションの有効性を実証するため、APTES のナノパターンを作製し、基板上への単一フェリチン分子選択吸着配置を試みた。厚さ 3 nm のシリコン酸化膜を持つシリコン基板に電子線レジストを塗布し、電子線リソグラフィー技術により 100 nm 間隔で直径 15 nm のパターンを描画した。レジストパターンの付いた基板と APTES 溶液を密閉容器内に設置し、20 時間保持した。この保持過程で蒸気となった APTES 分子が基板表面に堆積する。電子線レジストを溶解し、APTES 薄膜をリフトオフすることで、直径 15 nm の APTES パターンを得る。原子間力顕微鏡による測定ではこの APTES 膜厚は約 1 nm であった。シミュレーションの状況を再現するため、フェリチン溶液濃度を 0.4 mg/mL とし、緩衝液濃度を調整して Debye 長 14 nm を実現した。このフェリチン濃度条件では、シミュレーションの計算領域の中に 1 個のフェリチンが存在する。このフェリチン溶液を APTES パターンの付いた基板に滴下し、リンス、スピン乾燥を行った。

フェリチン吸着後の基板表面の SEM 写真を Fig. 9 に

Fig. 8. Interaction free energies as a function of ferritin-substrate separation distance with a parameter of Debye length. Open and closed circles correspond to the ferritin approaches vertically onto SiO₂ surface and APTES center, respectively.

Fig. 9. Nano patterned ferritins. Generally, each APTES pattern has one ferritin molecule although small number of APTES patterns bears two. Ferritin adsorption on the SiO₂ surface is hardly observed.

Fig. 10. XPS signals of (a) N 1s and (b) C 1s from bare silicon and ferritin adsorbed substrates after heat treatment under oxygen gas. The dotted and broken lines correspond to bare silicon and ferritin adsorbed substrates, respectively. The dashed and solid lines correspond to the ferritin adsorbed sample after heat treatment under oxygen gas at 400°C and 500°C, respectively.

示す。シリコン酸化膜上へのフェリチンの吸着が抑制され、APTES パターン上への単一フェリチン分子の選択配置が実現されている。この結果よりポテンシャル障壁の計算およびフェリチン吸着の評価が妥当であったことがわかる。静電相互作用を適切に調節することでナノスケール領域でのフェリチン分子の選択配置が可能であるといえる²³⁾。

6. タンパク質の除去による量子効果素子のキーコンポーネントの実現

フェリチンタンパク質部分はナノドットを基板上に配置させる上で重要な役割を果たすが、デバイスやその他の応用を考えると、タンパク質部分を除去しナノドットのみを配置させる必要がある。ここでは熱処理によりタンパク質除去を実現した結果を示す³⁰⁾。

フェリチンをシリコン基板上に吸着させた後、その基板を急速加熱 (Rapid Thermal Annealing) 炉に設置し、酸素流量 100 sccm で、処理温度を 400°C および 500°C に設定して、昇温速度 20°C/秒で加熱し、10 分間熱処理を行った。熱処理後、X 線光電子分光法 (XPS) により基板表面の残留元素分析を行った。比較のため、熱処理をしていないフェリチン吸着基板およびペアシリコン基板の測定も行った。窒素および炭素の XPS スペクトル, N 1s, C 1s スペクトルをそれぞれ Fig. 10 (a), (b) に示す。窒素の N 1s スペクトルのピークに関しては、熱処理後明らかに消失していることがわかる。炭素のピークについては熱処理温度が高くなるにつれて減少し、熱処理温度 500°C ではペアシリコン基板のコンタミレベル以下になっていることがわかる。さらに SEM 観察により、熱処理によって基板上のフェリチンナノドットの位置が変化しないことも確認している。

熱処理のほか、ここではデータを示さないが、UV オゾン処理も、タンパク質部分の選択的除去に有効である。

7. おわりに

生体分子の自己集合能とまたその無機材料内包の能力に注目し「バイオナノプロセス」を提案した。その有効性を示すため、化学的、構造的に全く同一分子であるフェリチンを用いて、その自己集合能を利用したナノドット配列の作製、溶液中におけるフェリチン-基板間の相互作用制御による基板上へのフェリチン分子選択配置、熱処理によるタンパク質除去を実現した。

電子デバイスへの応用を考えると、本稿で取り上げたナノドット以外にも、ナノスケールの配線が重要となる。この要求に対しては、直線状で中心に空間を持つチューブ状タンパク繊維、例えば TMV (タバコモザイクウイルス) を応用することができる。この他、リング状タンパク質を利用する方法も考えられる。TRAP と呼ばれるタンパク質はリング状で、積み重ねることでチューブ状構造を作製できる可能性がある³¹⁾。これらチューブ状繊維の最外側のタンパク質部分を、うまくフェリチンと相互作用させれば配線とナノドットが一挙に実現できる。

バイオナノプロセスの技術開発はまだ始まったばかりであり、その可能性は無限である。生物に学び、そのメカニズムについて理解を深めることがナノテクノロジーにおいては重要である。そしてその理解をもとにバイオテクノロジー技術と工学技術とを融合・結合していくことで、種々の工学要求に答えるナノスケールの機能構造体を実現することが可能であろう。

謝 辞

本研究を実施するにあたり有益な議論をさせていただいた共同研究者の松下電器産業株式会社 先端技術研究所 吉井重雄氏, 山田聖人氏, 松川望氏, 西尾晃博士, JST CREST 岩堀健治博士, 塚本里加子氏, 奈良先端技術大学院大学 藤原勇氏に感謝いたします。

本研究の一部は文部科学省リーディングプロジェクトとして実施した。

文 献

- 1) A. Miura, T. Hikono, T. Matsumura, H. Yano, T. Hata-yama, Y. Uraoka, T. Fuyuki, S. Yoshii and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**, L 1 (2006).
- 2) T. Hikono, T. Matsumura, A. Miura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, M. Takeguchi, S. Yoshii and I. Yamashita: *Appl. Phys. Lett.* **88**, 023108 (2006).
- 3) F.C. Meldrum, B.R. Heywood and S. Mann: *Science* **257**, 522 (1992).
- 4) I. Yamashita, J. Hayashi and M. Hara: *Chem. Lett.* **33**, 1158 (2004).
- 5) J. Fleming and J.G. Joshi: *Proc. Natl. Acad. Sci.* **84**, 7866 (1987).
- 6) D.J. Price and J.G. Joshi: *J. Biol. Chem.* **258**, 10873 (1983).
- 7) F.C. Meldrum, V.J. Wade, D.L. Nimmo, B.R. Heywood and S. Mann: *Nature* **349**, 684 (1991).
- 8) S. Mann: *Nature* **365**, 499 (1993).
- 9) F.C. Meldrum, T. Douglas, S. Lei, P. Arosio and S. Mann: *J. Inorg. Biochem.* **58**, 59 (1995).
- 10) T. Douglas, P.E.D. Dickson, S. Betteridge, J. Charnock, C.D. Garner and S. Mann: *Science* **269**, 54 (1995).
- 11) T. Douglas and V.T. Stark: *Inorg. Chem.* **39**, 1828 (2000).
- 12) M. Okuda, K. Iwahori, I. Yamashita and H. Yoshimura: *Biotechnol. Bioeng.* **84**, 187 (2003).
- 13) K. Iwahori, K. Yoshizawa, M. Muraoka and I. Yamashita: *Inorg. Chem.* **44**, 6393 (2005).
- 14) R. Tsukamoto, K. Iwahori, M. Muraoka and I. Yamashita: *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **78**, 2075 (2005).
- 15) T. Furuno, H. Sasabe and K.M. Ulmer: *Thin Solid Films* **180**, 23 (1989).
- 16) H. Yoshimura, T. Scheybani, W. Baumeister and K. Nagayama: *Langmuir* **10**, 3290 (1994).
- 17) H. Yoshimura: *Adv. Biophys.* **34**, 93 (1997).
- 18) I. Yamashita: *Thin Solid Films* **393**, 12 (2001).
- 19) H. Kirimura, Y. Uraoka, T. Fuyuki, M. Okuda and I. Yamashita: *Appl. Phys. Lett.* **86**, 262106 (2005).
- 20) H. Masuda, H. Hogi, K. Nishio and F. Matsumoto: *Chem. Lett.* **13**, 812 (2004).
- 21) T. Yoshinobu, J. Suzuki, H. Kurooka, W.C. Moon and H. Iwasaki: *Electrochimica Acta* **48**, 3131 (2003).
- 22) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa and I. Yamashita: *J. Photopolym. Sci. Technol.* **18**, 495 (2005).
- 23) S. Kumagai, S. Yoshii, K. Yamada, I. Fujiwara, N. Matsukawa, K. Iwahori and I. Yamashita: to be published in *Appl. Phys. Lett.* (2006).
- 24) 北原文雄, 古澤邦夫, 尾崎正孝, 大島広行: “ゼータ電位” (サイエンティスト社, 1995).
- 25) M. Manciu and E. Rukenstein: *Langmuir* **19**, 1114 (2003).
- 26) S. Bhattacharjee and M. Elimelech: *J. Colloid Interface Sci.* **193**, 273 (1997).
- 27) R.A. Curtis, J. Ulrich, A. Montaser, J.M. Prausnitz and H. W. Blanch: *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 397 (2002).
- 28) J.N. Israelachvili: “Intermolecular and Surface Forces, 2ND edition” (Aademic Press, London, 1992).
- 29) A. Sharma, S.N. Tan and J.Y. Waltz: *J. Colloid Interface Sci.* **190**, 390 (1997).
- 30) S. Yoshii, K. Yamada, N. Matsukawa and I. Yamashita: *Jpn. J. Appl. Phys.* **44**, 1518 (2005).
- 31) A.A. Antson, E.J. Dodson, G. Dodson, R.B. Greaves, X. Chen and P. Gollnick: *Nature* **401**, 235 (1999).