二酸化チタン含有ポリカーボネート基板への イオンビーム照射による DNA 付着強度向上*

出水 康仁^{*1}, 梅原 徳次^{*2}, 村岡 幹夫^{*3}
今井 潤^{*4}, 赤上 陽一^{*5}, 神田 慎吾^{*6}

Improvement of Adhering Strength of DNA for Polycarbonate Substrate Including Titanium Dioxide with Ion Beam Irradiation

Yasuhito DEMIZU, Noritsugu UMEHARA^{*7}, Mikio MURAOKA,
Jun IMAI, Yoichi AKAGAMI and Shingo KANDA

^{*7} Department of Mechanical Science and Engineering, Graduate School of Engineering, Nagoya University,
Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya-shi, Aichi, 464-8603 Japan

The DNA chip is required of high sensitivity and low cost for practical medical service. We have tried to use polycarbonate (PC) included TiO₂ as a substrate of DNA chip for low cost. However, the PC included TiO₂ cannot adhere DNA easily due to their hydrophobicity. In this work, in order to change the PC included TiO₂ to be hydrophilicity, Ar, N₂ and O₂ ions were irradiated on the surface of specimen by using an Electron Cyclotron Resonance (ECR) ion shower apparatus. We measured the contact angle of water on the surface of specimens with an optical microscope. Surface morphology of specimens were observed by a SEM, and measured by an AFM. Surface of specimen was analyzed by X-Ray photoelectron spectrometry (XPS). Then we measured adhesion force of DNA probe to the surface of specimen by force curve measurement using the AFM in water. The contact angle of untreated specimen were decreased and reached to 8 deg. by N₂ and O₂ ion irradiation. The surface roughness of untreated specimen were increased and reached to 248 nmRa by N₂ ion irradiation. The hydrophilic property was kept during 1 440 hours in air by 2 times irradiation of O₂ ion. XPS showed that hydrophobic groups were formed on the surface of specimens by N₂ ion irradiation. The adhesion force of DNA probe to the surface of specimen was increase by seven times larger than the untreated one by 4 times irradiation of N₂ ion.

Key Words: DNA Chip Substrate, Polycarbonate, Ion Irradiation

1. 緒 言

DNA チップは、チップ基板上に既知 DNA を固定し、検体から得た未知 DNA を明らかにする分析機器である。現在の DNA チップは一般に「研究開発用」であり、高価で、臨床現場には適用できない。そのため、臨床現場で使用可能な安価な「臨床用」DNA チップの開発が求められている。安価な「臨床用」DNA チップとして、従

来のシリコンやガラスなどではない射出成形可能なプラスチック製 DNA チップ基板による DNA チップ(図 1)が提案された¹⁾。しかし、プラスチック基板には、既知 DNA の付着力が弱く、洗浄工程で洗い流され、DNA 検出感度の減少が見られた。原因はプラスチックが疎水性であることであり、表面改質によりプラスチック表面を親水性に改質し、DNA とプラスチックの親和性を向上し、プラスチック基板への DNA の付着強度を増加することが必要である。

本研究では、プラスチック製 DNA チップ基板を実現するために、イオン照射を用いてプラスチック基板の DNA 付着強度向上技術を開発することを目的とする。具体的には、イオン照射における二酸化チタン含有 PC (polycarbonate) の濡れ性および表面粗さに及ぼすイオン種とドーズ量の影響を明らかにする。また、イオン照射によるポリマー基板の親水化処理後、親水性を保たせるために、親水性保持時間に及ぼす保存雰囲気と照射回数の影響を明らかにする。

* 原稿受付 2009 年 10 月 14 日。

^{*1} (株) 福井村田製作所 (☎ 915-0835 越前市岡本町 13-1)。

^{*2} 正員, 名古屋大学大学院工学研究科 (☎ 464-8603 名古屋市千種区不老町)。

^{*3} 正員, 秋田大学工学資源学部機械工学科 (☎ 010-8502 秋田市手形学園町 1-1)。

^{*4} 岩手大学地域連携推進センター (☎ 020-8551 盛岡市上田 4-3-5)。

^{*5} 正員, 秋田県工業技術センター (☎ 010-1623 秋田市新屋町字砂奴寄 4-11)。

^{*6} 川崎重工業(株) (☎ 652-0884 神戸市兵庫区和田山通 2)。

E-mail: ume@mech.nagoya-u.ac.jp

Fig. 1 The proposed DNA chip made from plastic⁽²⁾

2. 試験片及び実験方法

2.1 試験片基板 試験片基板として二酸化チタン含有 PC 板を用いた。二酸化チタンは白色であり DNA 検出時の蛍光マーカの検出を容易とするために含有した。

2.2 ECR イオン照射装置 図 2 に本研究で用いた ECR (Electron Cyclotron Resonance) イオン照射装置を示す。試験片基板をホルダに取り付け、真空チャンバー内を $5.0 \times 10^{-3} \sim 3.0 \times 10^{-4}$ Pa に排気する。そして、プラズマ源内でイオン化された導入ガスの陽イオンを引き出し、試料表面に照射する。本研究では、アルゴン、窒素および酸素イオンを試料表面に照射し、イオンドーズ量 (単位面積当たりのイオンの注入個数, cm^{-2}) を制御して実験を行った。

2.3 濡れ性試験 濡れ性試験は、イオン照射後の基板表面に 0.25 μl の蒸留水を滴下し、光学顕微鏡で接触角を測定し行われた。また、イオン照射後の基板は、大気中および水中に保存し、数時間ごとに接触角を測定した。接触角は 1 つの試料につき、7 点測定し、その平均値を算出した。

2.4 表面分析 イオン照射がプラスチック基板表面の濡れ性に及ぼす影響を調べるために、各種の分析装置を用いて基板表面の状態を分析した。具体的には、SEM による表面形状の観察、AFM による表面粗さ計測、および XPS (X-Ray photoelectron spectrometry) による元素・構造分析を行った。

Fig. 2 ECR ion irradiation apparatus

2.5 DNA 付着強度試験

プラスチック基板への DNA の付着性向上に及ぼすイオン照射の影響を調べるために、水中 AFM フォースカーブ計測による DNA 付着強度測定を行った。DNA 付着強度試験に用いた基板は窒素および酸素イオン照射した基板である。濃度 0.05 μM の DNA 溶液 (SSC バッファ) を基板上に滴下し、乾燥後 UV により DNA を基板に定着させた。DNA は 400 塩基長であり、分子長は 290 nm である。このような高分子は溶液中で熱運動によりランダムコイル状になり、その DNA 分子の平均両端距離の理論値は基板上で約 30 nm となる⁽²⁾。

定着後、洗浄乾燥し、基板を水中に保持して AFM フォースカーブ計測を行った。付着力測定用カンチレバーは、ばね定数 0.03 N/m のシリコン製であり、先端半径は約 10 nm である。また、接触力は約 5 nN とした。ここで、フォースカーブ計測とはカンチレバー探針に作用する力とカンチレバーの移動距離 (カンチレバーと基板表面間の距離) の関係を計測することである。

図 3 にカンチレバーを基板表面から引き離す場合のみのフォースカーブの例を示す。(a)-(c)は、同一基板で異なる位置で計測した結果である。横軸 z はカンチレバーの高さ方向の位置を表すが、 z の原点は任意である。左側の直線的な傾斜部は、探針が表面に接触している状態に対応する。図のように、同一基板内でも場所の違いにより、探針が表面から離れる際に相違が現れる。図 3 (a) では、基板の付着力が作用せず、図 3 (b) では付着力が発生した。一方、図 3 (c) では、基板との付着力に加えて、探針が基板表面から離れても約 65 nm の距離まで付着力が作用している。このような付着力が及ぶ距離は約 30~100 nm であった。この約 30~100 nm に及ぶ引力は、探針からでなく基板表面からの DNA 分子の引き剥がしによるものと考えられる。そこで、引き剥がすときに探針に作用する最大引き離し力を DNA 付着力として算出した⁽²⁾。

3. 実験結果と考察

3.1 二酸化チタン含有 PC の濡れ性に及ぼすイオン照射の影響 各種イオンを二酸化チタン含有 PC に照射したときの水の接触角に及ぼすイオンドーズ量の影響を図 4 に示す。未処理の二酸化チタン含有 PC の水の接触角は約 75° であり、疎水性であることがわかる。窒素および酸素イオンのイオンドーズ量の増加に伴い、接触角が急激に減少し、 $4 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$ 以上のイオンドーズ量で約 75° から 8°

Fig.3 Typical force curves for surface of a DNA chip.

以下まで減少した。一方、アルゴンイオンでは接触角が 60° 程度まで減少するが、その後、イオンドーズ量が増加しても接触角はあまり減少しなかった。基板には、二酸化チタンが含有されており、この二酸化チタンが基板表面の濡れ特性に影響しているのではないかと考え、二酸化チタンを含まない PC でイオン照射を行い水の接触角を測定した。この際に使用したイオンは窒素イオンである。その結果を図 5 に示す。二酸化チタンを含まない PC の接触角はイオンドーズ量の増加に伴い減少するが、 $3.0 \times 10^{19} \text{ cm}^{-2}$ 以上のイオンドーズ量を照射しても接触角は減少せず、ほぼ一定の値になった。二酸化チタンが含まれていない PC の表面はイオン照射によって親水化しないのに対し、含んだ PC は親水化したことから、二酸化チタンが表面の濡れ特性に及ぼす影響は非常に大きいと考えられる。また、二酸化チタンを含まない PC のイオンドーズ量と接触角の挙動は図 4 の二酸化チタン含有 PC にアルゴンイオンを照射したときの挙動と似ていることから、二酸化チタン含有 PC にアルゴンイオンを照射することで、表面の

Fig.4 Effect of ion species on the variation of contact angle of water for the PC included TiO_2 with ion dose Fig.5 Effect of TiO_2 in PC substrate on the variation of the contact angle with ion dose

二酸化チタンがスパッタリング効果により弾き飛ばされ、表面の濡れ特性が向上しなかったと考えられる。

表面形状観察結果として、二酸化チタン含有 PC にアルゴン、窒素および酸素イオンを照射したときの SEM 像を図 6 に示す。いずれのイオン種を照射しても試料表面には突起が形成し、表面から伸びている様子が観察された。また、イオンドーズ量の増加に伴い、突起の長さおよび密度が増加している様子が観察された。窒素イオン照射の場合、突起は円柱形状をしているのに対し、酸素イオン照射では突起の先端が丸い形状となった。以上のことから、照射するイオン種によって、表面に形成される突起の

Fig.6 SEM image of the surface on the PC included TiO_2 after ion irradiation.

先端形状が異なることが明らかとなった。一方、アルゴンイオン照射された表面の突起形状は一部柱状であるが、全体的に乱雑であった。

二酸化チタン含有 PC に各種イオンを照射した時の中心線平均粗さ R_a の変化を図 7 に示す。いずれのイオン種でも中心線平均粗さが約 3 nm から 100 nm 以上へ増加したことがわかる。特に窒素および酸素イオン照射で表面粗さが 3 nm から 200 nm 以上へ顕著に増加した。二酸化チタン含有 PC に窒素イオンおよび酸素イオンを照射することで、突起が形成し、ドーズ量の増加と共に突起の密度、長さが増加した。一方、アルゴンイオン照射では試料表面に突起ができるが、イオンドーズ量の増加に伴って突起が長くならないという現象が起きた。

XPS 分析による二酸化チタン含有 PC に各種イオン照射後の XPS 広帯域スペクトルを図 8 に示す。また、これから得た各元素濃度を表 1 に示す。図 8 より、二酸化チタン含有 PC は各種イオンを照射することで、未処理の試料には検出されなかった Ti2p のピークが現れた。これは、試料のバルク内に含有されている二酸化チタンがイオン照射によって試料表面に現れたことが原因だと考えられる。また、酸素イオンを照射したとき、 Ti2p ピークは最も高いピークを示し、アルゴンイオン照射は最も低いピークを示した。 Ti2p の検出量が多かったイオン種の場合

Fig.7 Relationship between ion dose and average surface roughness on the PC included TiO_2 .

Fig.8 XPS broad spectrum analysis of PC included TiO_2 .

Table 1 Atomic concentration of PC included TiO_2 after ion irradiation.

Ion species	Atomic concentration, %			
	C1s	O1s	N1s	Ti2p
Untreated	84.2	15.8	0.4	0
Ar	80.7	16.1	1.8	1.5
N ₂	60.0	26.4	7.4	6.2
O ₂	36.9	47.7	1.0	14.5

ークを示し、アルゴンイオン照射は最も低いピークを示した。 Ti2p の検出量が多かったイオン種の場合

ほど、図4で示した水の接触角は少ないイオンドーズ量で減少した。そのため、イオン照射による Ti2p の検出量が水の濡れ性に大きな影響を及ぼすと考えられる。ここで、二酸化チタンは結晶構造をしており、結晶表面では、原子の規則的結合が切断されているため、不飽和手が存在する。この不飽和手は空気中の水分と化学結合し、OH 基の構造を形成する。この OH 基の上に水分子が水素結合によって吸着し、さらにその外側に水分子が水素結合によって吸着する⁽³⁾。これより、二酸化チタン含有 PC に窒素イオンおよび酸素イオンを照射することで表面に二酸化チタンが現れ、表面が親水性になったと考えられる。一方、アルゴンイオン照射の場合は、試料表面のスパッタリング効果が高く二酸化チタンが飛ばされてしまい、濡れ性が顕著に向上しなかったと考えられる。

3.2 二酸化チタン含有 PC の親水性保持時間に及ぼすイオン照射の影響

ポリマー材料はプラズマ処理で表面を親水性にした後、大気中に保存しておくとも時間の経過と共に親水性から疎水性になることが知られている⁽⁴⁾。本イオン照射でも、照射後約 3 時間で接触角が急増し、約 24 時間で照射前の接触角に近づいた。そこで、イオンの繰返照射を試みた。図9に窒素イオンの繰返照射における接触角の経時変化を示す。窒素イオンの1回照射では、親水性が約 10 分しか保持されなかったのに対し、2回照射で約 140 時間、3回照射で 330 時間、4回照射で約 960 時間保持されるようになった。一方、酸素イオンの場合、1回照射で 150 時間、2回照射で 1440 時間も親水性が保持されることが明らかになった。窒素イオンと酸素イオンで親水性の保持時間が全く異なることから、親水性保持時間は親水基の影響が大きいと考えられる。二酸化チタン含有 PC に窒素イオンを繰返照射したときの構造分析による官能基濃度の結果を表2に示す。表2より、窒素イオンを繰返照射することで、窒化物の量が増加したことが分かる。XPS の分析では、得られたスペクトラムが異なる結合エネルギーを有するカーブの総和で有ると考えられる。そこで、得られた N1s のスペクトラムを分解することで、窒化物、アミノ基 (NH₂) および塩化アンモニウム (NH₄Cl) が生成していることがわかった。ここで、NH₂は DNA と静電結合する官能基であり、親水基であることも知られている。また、窒素イオン照射を1回および4回行った二酸化チタン含有 PC の深さ方向の窒素元素分析を行った。窒素イオンの1回照射の場合、窒素原子は表面から深くなるほど

Fig.9 Relationship between contact angle and time under air after several times irradiation of Nitrogen ions, '× Number' is ion irradiation times.

Table 2 Functional groups of PC included TiO₂ after several times irradiation of ions.

Ion species	Irradiation times	Functional groups, %		
		Nitride	NH ₂	NH ₄ Cl
Untreated	0	7.7	77.0	15.3
N ₂	1	5.7	94.3	0
	2	20.1	65.3	14.6
	3	22.6	59.6	17.8
	4	25.7	53.4	21.0

減少し、0.1 μm 以上の深さからほとんど検出されなかった。一方、4回照射の場合、6.5 μm の深さまで窒素原子が存在していることがわかった。この結果より、繰返し窒素イオンを照射する事でより多くの窒素が注入されることにより、より長時間効果が保持したと考えられる。

3.3 二酸化チタン含有 PC への DNA 付着に及ぼすイオン照射の影響

水中 AFM フォースカーブ計測によって得られた基板表面の付着強度、および DNA の付着強度を図10に示す。実験は5~7回行い、棒グラフの値は平均値を、エラーバーは標準偏差の値を表している。試料表面の付着強度は探針と基板間に働く力であり、DNA の付着強度は基板表面 DNA 間に働く力である。また、試料表面の付着強度は DNA が存在しない場所で計測した結果を示す。窒素イオンを1回照射した試料において、DNA の付着力は未処理の試料の約 0.09 nN に比べて約 0.13 nN まで大きくなった。また、繰返照射することで、付着力

Fig.10 Adhesion force of DNA probe to the surface of specimen which were ion-irradiated

が増加し、4回照射で約7倍の約0.62 nNとなった。試料表面の付着力も窒素イオンの繰返照射により増加し、DNAの付着力と同様に増加する傾向となった。一方、酸素イオン照射の場合、1回照射でDNAの付着力が生じたが、2回照射では検出されなかった。しかし、基板表面の付着力は存在した。これから、DNAの付着力は酸素イオン照射では生じないことがわかった。

イオンを照射することで、試料表面の付着力が増加した。ここで、カンチレバーはシリコン製であり、探針先端は二酸化シリコンとなっている。水中では表面にOHやO⁻が生成する。カンチレバー探針が試料表面を押込むことで、試料表面の官能基と水素結合などが起こり、付着力を生じたと考えられる。DNAを固定する一般的な方法として、基板上をアミノ基(NH₂)でコーティングし、DNAのリン酸をアミノ基と静電結合させる手法が挙げられる。表2より、窒素イオンを照射することでアミノ基が生成していることから、このアミノ基の生成がDNA付着力を生み出していると考えられる。しかし、繰返照射することでアミノ基が減少していることから、繰返照射によるDNA付着力の増加には他の要素も重要だと考えられる。

4. 結 論

本研究では、プラスチック製DNAチップを実現するために、イオン照射を用いたプラスチック基板のDNA付着強度向上技術を開発することを目的に実験を行った。具体的には、二酸化チタン含有ポリカーボネート(PC)基板にイオンを照射し、水の濡れ性、表面粗さ及び親水性保持時間に及ぼす影響を明らかにした。また、二酸化チタン含有PC基板への

DNA付着に及ぼすイオン照射の影響を明らかにした。主な結果を以下にまとめる。

- 1) 窒素、酸素イオン照射により、水に対する接触角がイオンドーズ量の増加に伴い減少し、約75°(未処理)から8°以下に減少した。
- 2) アルゴン、窒素および酸素イオン照射により、いずれのイオン種でもイオンドーズ量の増加に伴い、中心線平均粗さが約3 nmから100 nm以上へ増加した。その中でも窒素と酸素イオンによって、中心線平均粗さが200 nm以上になった。
- 3) 窒素及び酸素イオンを複数回繰返し照射することで、1回照射に比べて親水性保持時間が長くなった。特に、窒素イオン及び酸素イオンで、それぞれ960時間と1440時間親水性が保持された。窒素イオン複数照射による窒化物の増加が示された。
- 4) 窒素イオンの繰返照射回数の増加に伴い、DNA付着力が増加した。特に窒素イオンを4回照射したときのDNA付着強度は、未処理に比べて約7倍増加した。一方、酸素イオン照射ではDNA付着力が顕著に増加せず、酸素イオンを2回照射したときにはDNA付着力が検出されなかった。

文 献

- (1) Iwabuchi, A., Akagami, Y., Umehara, N., Matsumura, T., Yoshino, M. and Konishi, T., "Substrate and manufacturing process for DNA chip", Japanese Patent Disclosure 2006-284395(2006)
- (2) Kato, M., Muraoka, M. and Akagami, Y., Characterization of adhesion strength of DNA molecule against substrate, Proceedings of JSME M&M2005, (2005), pp.599-600.
- (3) Kiyono, M., *Titanium Oxides* (in Japanese), (1991), p.5354, Gihodo.
- (4) Ishii, T., *Handbook of Wetting Technology* (in Japanese), (2001), p.181, Techno Systems.