

CODEN : KDCHEW  
ISSN 0916-0892

# 九州大学中央分析センター報告

— 第17号 —

REPORT

OF

THE CENTER OF ADVANCED INSTRUMENTAL ANALYSIS  
KYUSHU UNIVERSITY

NUMBER 17

1999

九州大学  
中央分析センター

# 目 次

## 機器分析学の進歩

1. 半導体シリコン中の微小欠陥の挙動とプロセス応用	佐道 泰造	2
1. 超臨界二酸化炭素による殺菌・酵素失活	下田 満哉	5

## 研究報告

1. アミノピラジン誘導体化単糖類の キャビラリー電気泳動分析	山本 貢史、浜瀬 健司 吳 薇、財津 潔	7
2. $\alpha$ -アルキル- $\alpha$ , $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタムの 立体化学	永島 英夫、松原 公紀 近藤 英雄、岩松 将一	13
3. 酵母遺伝子発現制御ネットワークの戦略的同定	牟田 滋、田代 康介 久原 哲	21
4. 単分散硫化銀被覆硫化亜鉛超微粒子を利用する 亜鉛イオンセンサの開発	城之園恵子、田村 淳 今任 稔彦	26
5. 酸化ビスマス薄膜のエレクトロクロミック特性と 表面構造-アルカリおよびアルカリ土類添加による 消色特性の改善	島ノ江憲剛、末次 道久 三浦 則雄、山添 昇	33
6. $(C_{10}H_{15}CN)_{0.8}(C_{10}H_{15}Cl)_{0.2}$ の $^{13}C$ -NMRによる研究	小林 宏至、町田 光男	39

# 半導体シリコン中の微小欠陥の挙動とプロセス応用

大学院システム情報科学研究科 電子デバイス工学専攻 佐道泰造

概要:集積回路の微細化に伴い、シリコン中のプロセス誘起欠陥の低減、プロセス感度の向上、およびプロセスの低温化が強く要求されている。加工対象の固体にイオンビームを照射し、照射誘起欠陥の緩和過程においてもたらされる原子再配列効果を積極的に利用すると、低温で局所的に固相反応を誘起でき、新しい非熱平衡デバイス加工プロセスとして応用できる可能性がある。

## 1. はじめに

半導体の結晶成長や微細加工などの集積回路製造工程では、熱エネルギーのほか、プラズマや電子ビーム、イオンビームなどのエネルギーが有効に利用されている。デバイス構造の微細化にともなって、プロセスエネルギーを最小限に抑え、プロセス感度を向上し、かつプロセス誘起欠陥を低減することが強く求められている。

加速されたイオンの照射によって結晶固体中に導入された非平衡濃度の点欠陥は、その緩和過程を経て消滅し、あるいは、複合欠陥などの形成に寄与して安定化する。固体中に導入された点欠陥は、周辺原子の再配列を促すに十分なエネルギーを持っている。このエネルギーは、固相結晶成長、金属シリサイド形成、および酸化膜形成などの集積回路製造工程において積極的に利用できる可能性があり、プロセス温度の低減、加工領域の局所化に有効と期待される。

## 2. 照射誘起欠陥のダイナミクス

イオン照射による非晶質化現象は、入射イオンと結晶原子との核衝突の結果、格子点原子の変位がもたらされ、これによって生成された過剰な点欠陥が、その緩和過程で安定な残留欠陥を形成し、蓄積する効果とみなされる。

シリコン結晶に、25keV程度の低エネルギーのアルゴンイオンを照射し、非晶質化した表面層をエッティングにより選択的に除去する方法を用いて、表面に形成された非晶質層の層厚が、照射時の試料温度にどのように依存するかを実験的に調べた。その結果、非晶質層の層厚は、照射温度の上昇とともに減少し、400°C以上の照射温度では非晶質層が形成されないことがわかった。これは、照射誘起欠陥の回復反応が室温から400°Cの温度範囲で顕著に進行していることを意味しており、低温結晶成長などのプロセス利用の可能性を示唆している。

### 3. 固相界面における原子混合反応

コバルト-シリコン界面の固相シリサイド反応は、その反応温度に依存して、 $\text{Co}_2\text{Si}$ (350~500°C),  $\text{CoSi}$ (375~500°C),  $\text{CoSi}_2$ (405~550°C)の各相の形成をもたらす。イオンビーム照射を併用することにより、各相の形成温度を低下させることが可能である。

コバルト-シリコン積層構造に室温でイオンビームを照射すると、 $\text{CoSi}$ 相が選択的に形成される。照射ドーズに対して形成相の層厚がどのように依存するかを調べた結果、層厚は照射ドーズの1/2乗に比例して増大することがわかった。これは照射による $\text{CoSi}$ 相形成が形成層中の原子移動に律速された現象であることを強く示唆している。

ビーム照射による $\text{CoSi}$ 層形成過程の活性化エネルギーは約0.16eVと見積もられる。この値は、通常の熱反応による形成過程の活性化エネルギー1.7~1.9eVに比べてかなり小さく、ビーム照射により誘起される点欠陥が、 $\text{CoSi}$ 層形成に必要な反応種の供給を促進する結果もたらされる値と考えられ、 $\text{CoSi}$ 層形成反応は、誘起される点欠陥の濃度に対応した増速拡散機構に支配されて進行することがわかる。

イオン照射に集束イオンビームを用いると、微細領域に選択的に照射誘起欠陥を導入できる。照射条件を適切に設定することにより、線幅100nm以下のシリサイド細線構造を再現性良く形成できる。

### 4. 気相-固相界面反応の制御

半導体デバイスに用いられるシリコン酸化膜は、通常、1000°C以上における高温熱処理により形成される。デバイス構造の微細化に伴い、この高温熱処理に起因するデバイス構造の破壊が深刻な問題となりつつある。

イオン照射効果を積極的に用いると、酸化膜形成温度を低減できる。シリコン基板を、アルゴン希釈酸素をプロセスガスとした電子サイクロトロン共鳴プラズマに曝すと、プラズマから供給される 20eV 程度の極低エネルギーのアルゴンイオンが基板に照射する。照射により基板表面の原子振動が励起されることにより、基板表面に吸着した酸素原子の基板内部への拡散が促進される。その結果、比較的良好な電気特性を有するシリコン酸化膜が、130°C 程度の極低温で形成される。酸化膜の成長速度は、シリコン基板に入射するアルゴンイオンのエネルギーと照射レートに強く依存する。また、良好な電気特性を得るためには、酸化初期における入射エネルギーを低減することが重要である。

## 5.まとめ

イオンビーム照射効果によりもたらされる原子再配列効果を有効に利用すると、固相結晶成長や化合物層形成反応を、低温でかつ局所的に誘起できる。シリコン結晶中に導入された照射誘起欠陥は、室温程度の低温で十分に動きやすく、新しい微細構造形成のための低温化プロセス技術として、発展の可能性を有している。

照射誘起反応に寄与する欠陥の挙動の体系的解明は、各種の照射効果を利用する微細加工プロセスの今後の展開に有用な知見をもたらすとともに、照射誘起欠陥の動的特性を積極的に利用した新しいプロセス技術を創造するための手がかりを与えるものと期待される。

# 超臨界二酸化炭素による殺菌・酵素失活

著者

九州大学大学院生物資源環境科学研究科

食品バイオ工学 助教授 下田 満哉

超臨界(臨界点;31.1 °C, 71atm)状態の加圧CO<sub>2</sub>を用いる殺菌および酵素失活化に関する研究は非加熱処理を実現するものとして期待される。今回は、産業技術として展開するために独自に開発したミクロバブル超臨界CO<sub>2</sub>法の特徴ならびに推定される作用機作について述べる。

本法は、1)加圧CO<sub>2</sub>の試料への混合・溶解、2)加圧混合状態の保持、3)加圧CO<sub>2</sub>の解放(除圧)という3つの段階からなる(図1)。殺菌や酵素失活を目的とする場合には細胞膜やタンパク質の疎水性領域をCO<sub>2</sub>で浸潤させ、一定時間経過後にCO<sub>2</sub>を急激膨張させることにより、疎水性構造を崩壊させることが重要となる。従って、殺菌および酵素失活には試料中のCO<sub>2</sub>濃度、疎水領域へのCO<sub>2</sub>の浸潤に要する時間、その時の温度並びに除圧速度が重要なパラメーターとなると考えられる。

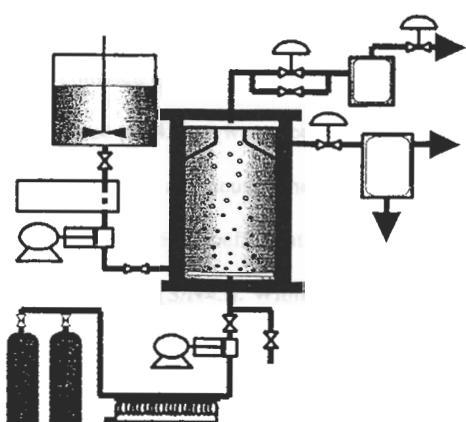


図1 連続ミクロバブル超臨界二酸化炭素処理装置

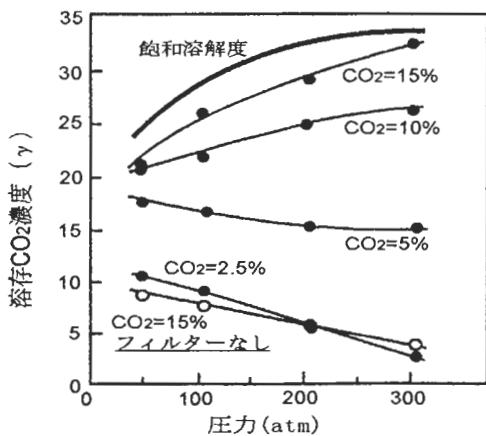
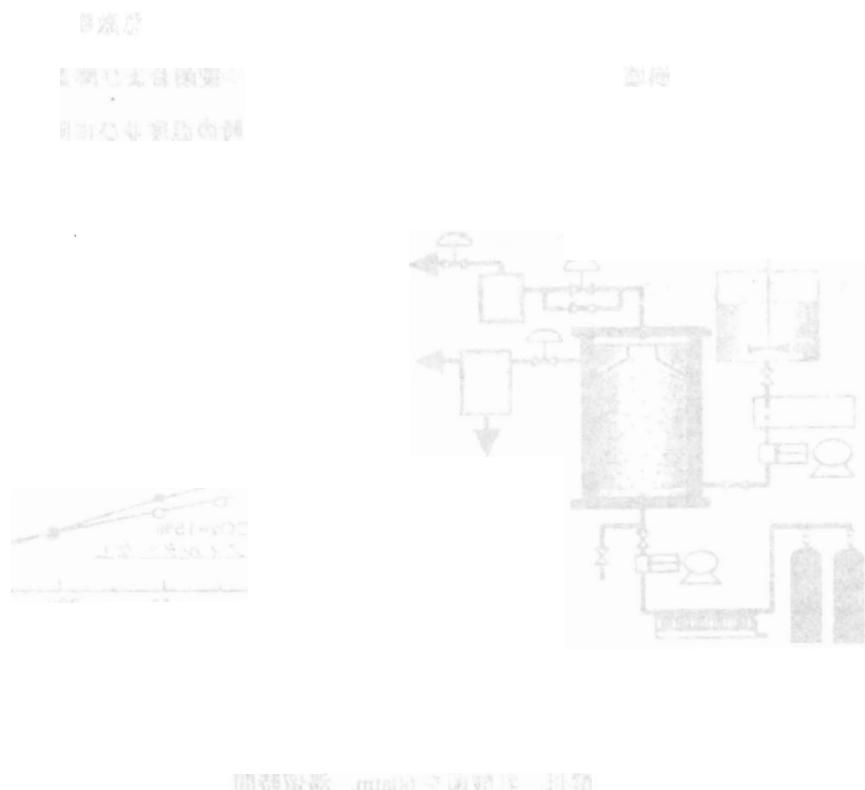


図2 連続ミクロバブル法におけるCO<sub>2</sub>濃度

[非加熱殺菌] 大腸菌、酵母、乳酸菌を60atm、滞留時間13分間の処理で完全に失活させることができた。このとき必要とされるCO<sub>2</sub>流量は対試料比4.4%であり、溶存CO<sub>2</sub>濃度は17g/gであった。このように少ないCO<sub>2</sub>使用量と低い操作圧力は、新技術としての本法の高

い可能性を示すものである。演者らはバッチ法と連続法における殺菌効果の格段の違いを、除圧速度の違いに起因すると考えている。すなわち、連続法では菌体内  $\text{CO}_2$  の急激膨張により生ずる膨圧により菌体が効果的に破裂すると考えた。このことを裏付ける証拠として、瞬間除圧した試料中には核酸およびタンパク質の漏出を示唆する強い紫外線吸収物質の存在を認めている。浸透圧耐性の高い微生物の処理例から、処理圧力及び  $\text{CO}_2$  供給量の殺菌効果に及ぼす影響を示す。

[非加熱酵素失活] 各種酵素および構造既知のタンパク質水溶液を処理することにより、 $\alpha$ -ヘリックス構造が崩壊すること、しかもこれが不可逆的崩壊であることを明らかにしている。このような不可逆的な変性は、タンパク質分子の疎水性領域の  $\text{CO}_2$  による浸潤と溶存  $\text{CO}_2$  による一時的な pH 低下によって引き起こされると推察される。すなわち、 $\text{CO}_2$  による浸潤は疎水性相互作用の崩壊とタンパク質分子鎖の熱運動を活発化するであろうし、溶液 pH の低下は静電的にタンパク質分子構造を不安定化すると考えられる。



# アミノピラジン誘導体化单糖類の キャピラリー電気泳動分析

九州大学大学院薬学研究科 山本 貢史, 浜瀬 健司, 吳 薇, 財津 濑

## Determination of monosaccharides derivatized with aminopyrazine by high-performance capillary electrophoresis

Koji Yamamoto, Kenji Hamase, Wei Wu and Kiyoshi Zaitsu

Graduate School of Pharmaceutical Sciences, Kyushu University

### ABSTRACT

Neutral and *N*-acetylated monosaccharides were derivatized with aminopyrazine and determined by high-performance capillary electrophoresis. Separation conditions were investigated with respect to pH, concentration of the borate buffer and capillary temperature. The eight monosaccharides tested were completely separated within 22 min using 300 mM borate buffer (pH10.0) at 25 °C . The absorbance at 245 nm was used for the determination of each monosaccharide. The calibration curves for *N*-acetylated and neutral monosaccharides were linear from 0.2 - 6 and 0.3 - 12 pmol, respectively with the correlation coefficient of more than 0.998. The detection limits of the monosaccharides were 180 - 300 fmol (S/N=3). Within-day and day-to-day precision of the present method was 1.78 - 5.66 % (R.S.D.).

翻訳文

アミノピラジン誘導体化单糖類のキャピラリー電気泳動分析

アミノピラジン誘導体化单糖類のキャピラリー電気泳動分析

アミノピラジン誘導体化单糖類のキャピラリー電気泳動分析

## 1. 序 論

糖質は生体にとって最も重要なエネルギー源であると共に、複合糖質として生体内での分子認識に深く関わっている。また様々な疾病に糖鎖構造が関与し、病態の分子レベルでの理解に重要であることが明らかになってきた。この様な中、糖質の研究は近年ますます活発になっており、GC<sup>1,2</sup>やHPLC<sup>3-8</sup>、HPCE<sup>9-12</sup>を用いた数多くの分析法が開発、報告されている。当研究室においても、立木<sup>5</sup>、呉<sup>13</sup>等により糖の還元末端に対する新規プレカラム蛍光誘導体化試薬としてアミノピラジンを用いるアニオン交換HPLC法、逆相HPLC法を開発してきた。アミノピラジンは従来糖分析に汎用されている2-アミノピリジン<sup>6</sup>について、その類縁体をスクリーニングすることにより見出した試薬である。アミノピラジンは2-アミノピリジンと比較して約1.3倍の蛍光強度を有しており、励起波長は340nm、蛍光波長は388nmである。一方、アミノピラジン誘導体化单糖類の励起及び蛍光波長はそれぞれ245nm、410nmであり、いずれも試薬であるアミノピラジンのそれらとは異なる。またストークスシフトが大きく、アミノピラジン誘導体化单糖類は試薬を含む他の蛍光物質の妨害をほとんど受けることなく微量分析が可能であるという利点を有している。またアミノピラジンはN-アセチル化糖に対して、中性糖と比較し約4倍の蛍光強度を与えることを明らかにしている<sup>7</sup>。生体中に存在する数多くの糖鎖は還元末端にN-アセチル化糖を有していることが知られており、本試薬は糖鎖分析において優れた特性を有していると考えられる。しかし糖質の構造は非常に多様であり、正確な定量値を得るために一つの試薬に対して分離モードの異なる複数の定量法が望まれる。そこで本研究では、アミノピラジンをプレカラム誘導体化試薬とするアニオン交換HPLC法<sup>5,7</sup>と逆相HPLC法<sup>13</sup>に加える3次元目の分析法として、糖タンパク質中の構成单糖を分析対象とする高感度かつ迅速なキャピラリー電気泳動定量法開発を試みた。なお分析法の確立は、キャピラリー電気泳動における泳動、検出条件の検討を行ったうえで、検量線、検出限界及び再現性を評価することにより行った。

## 2. 実験

### 2.1 試薬及び装置

D-glucose(Glc), D-mannose(Man), D-xylose(Xyl), L-fucose(Fuc), L-rhamnose(Rha), N-acetyl-D-glucosamine(GlcNAc), N-acetyl-D-galactosamine(GalNAc)は和光純薬製、D-galactose(Gal)は石津製薬製、aminopyrazineはナカライトスク製を用いた。水は脱イオン

水をミリQシステム(日本ミリポア製)で精製したものを用い、他の試薬は市販の特級品あるいは得られる最上級品を使用した。

キャピラリー電気泳動は Beckman P/ACE System 5510(Beckman製)を用い、検出には Photo Diode Array Detectorを使用した。キャピラリーは内径 $50\mu\text{m}$ 、有効長 $57\text{cm}$ のフューズドシリカ管を用い、特に記述がない限り泳動用緩衝液は $300\text{mM Na-borate buffer(pH}10.0)$ とし、 $25^\circ\text{C}$ 、 $20\text{kV}$ で泳動を行った。

## 2.2 誘導体化反応

凍結乾燥した8種の単糖混合物(Glc, Gal, Man, Rha, Xyl, Fuc, GlcNAc, GalNAc)各 $500\text{nmol}$ に $0.75\text{M}$ アミノピラジン/酢酸溶液 $50\mu\text{l}$ を加えて $90^\circ\text{C}$ で30分間加熱しカップリング反応させた後、 $0.7\text{M}$ ジメチルアミンボラン/酢酸溶液 $50\mu\text{l}$ を加えて $90^\circ\text{C}$ で5分間還元し安定な誘導体とした(Fig.1)。この反応溶液を減圧乾固し、電気泳動用緩衝液 $500\mu\text{l}$ を加えてHPCE用の試料とした。

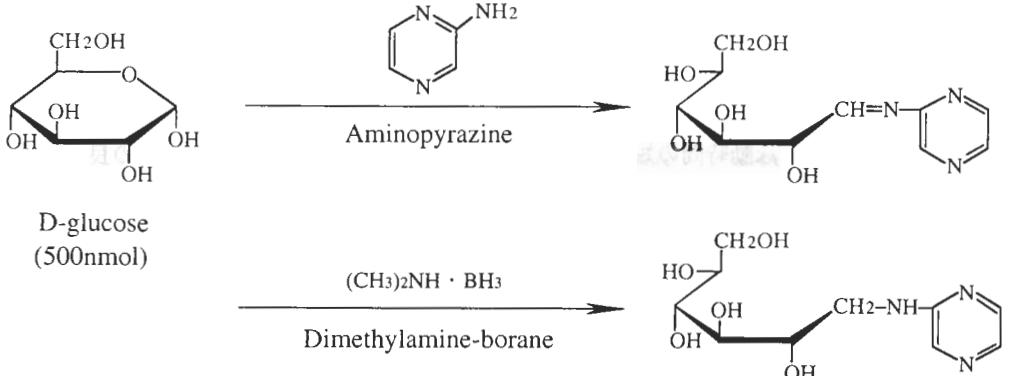


Fig. 1 Reaction scheme for the derivatization of D - glucose with aminopyrazine

## 3. 結果及び考察

### 3.1 分析条件の検討

#### 3.1.1 泳動用緩衝液の検討

8種のアミノピラジン誘導体化単糖類の分離に際し、泳動用緩衝液であるホウ酸塩緩衝液についてpH及び濃度の検討を行った。まずpHについて $200\text{mM}$ ホウ酸塩緩衝液を用いpH7.0 – 11.0の範囲で検討した。その結果、pHの増加に伴っていずれの誘導体化単糖も電気泳動

移動度が増加する傾向が認められた。用いた8種の単糖類のうち、最も分離が困難だったのは GlcNAc, Glc, Man であり、これらについて Man/GlcNAc, Glc/Man, Glc/GlcNAc それぞれの分離係数を示したのが Fig.2(a) である。pH7.0 では Man と GlcNAc, Glc と Man は良好に分離されたが、Glc と GlcNAc が分離されなかった。この他、pH7.0 では Fuc と Xyl も分離されなかった。一方、pH8.0 以上では GlcNAc, Glc, Man 以外は良好に分離され、この3種については、pH10.0 において最も良い相互分離が得られた。そこで、泳動用緩衝液であるホウ酸塩緩衝液の pH は 10.0 としたが、200mM のホウ酸塩緩衝液では完全な分離は達成されなかった。そこで pH10.0 のホウ酸塩緩衝液を用い、ホウ酸濃度について 100 – 300mM の範囲で検討を行った。Fig.2(b) はホウ酸塩緩衝液の濃度と GlcNAc, Glc, Man の分離係数を示したものである。濃度上昇に伴い各誘導体の電気泳動移動度は増加し、GlcNAc, Glc, Man についても良好に分離された。しかし同時に電流値が増加し、300mM を越える濃度では再現性の高い分析が困難になると考えられた。そこで、ホウ酸塩緩衝液の濃度は 300mM とした。

### 3.1.2 キャピラリー温度の検討

300mM ホウ酸塩緩衝液 (pH10.0) を用い 15 – 30°C の範囲でキャピラリー温度の検討を行った。Fig.2(c) は GlcNAc, Glc, Man について分離係数を示したグラフである。30°C では Glc と Man が分離されなかったが、25°C 以下では良好に分離された。一方、電気浸透流は温度上昇に伴って増加し泳動時間の短縮が認められた。従って短い泳動時間で分離の良い 25°C をキャピラリー温度とした。

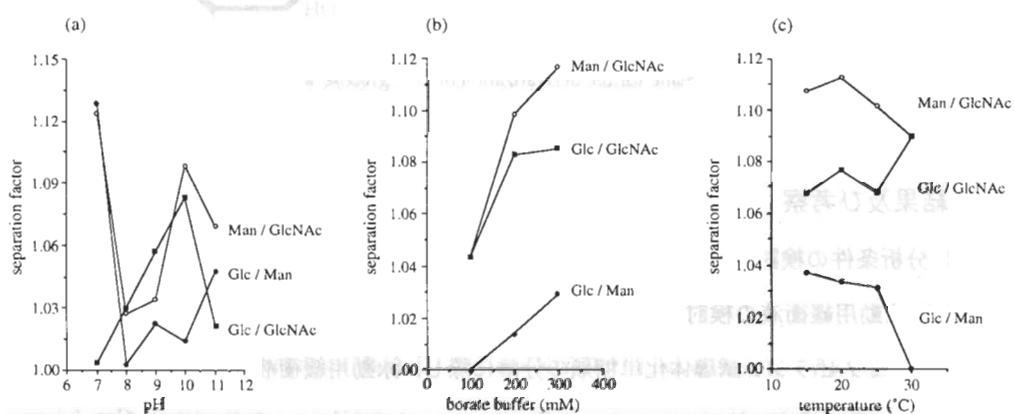


Fig. 2 Effect of pH (a), buffer concentration (b) and capillary temperature (c) on the separation factors of derivatized monosaccharides

### 3.1.3 検出波長の検討

单糖類の検出波長は、アミノピラジン、誘導体化单糖及び泳動用緩衝液についてUVスペクトルを測定し、これらを比較することにより決定した。Fig.3にアミノピラジン、Glc誘導体、Gal誘導体、泳動用緩衝液のUVスペクトルを示す。その他6種の誘導体化单糖についてもGlc誘導体、Gal誘導体と同様のスペクトルが得られ、245nmで極大吸収が認められた。一方試薬であるアミノピラジンの吸収極大波長は230nmであった。従って、検出波長は245nmとした。

以上の条件により得られた8種の誘導体化单糖類のエレクトロフェログラムをFig.4に示す。8種の誘導体化单糖類及びアミノピラジンは約20分で泳動され、良好な分離が達成された。

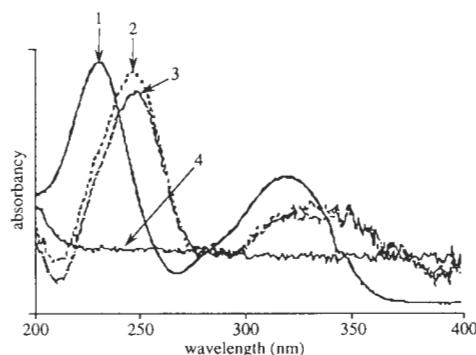


Fig. 3 UV spectrum for aminopyrazine and derivatized monosaccharides

Lines : 1, aminopyrazine;  
2, glucose derivative;  
3, galactose derivative;  
4, running buffer

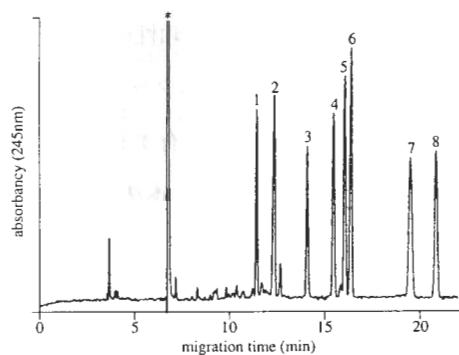


Fig. 4 Electropherogram for derivatized monosaccharides

Peaks : 1, GalNAc; 2, Rha;  
3, Xyl; 4, GlcNAc;  
5, Glc; 6, Man;  
7, Fuc; 8, Gal;  
\*, Reagent

### 3.2 分析法の評価

上記の検討により決定した条件を用いて8種の誘導体化单糖類の検量線、検出限界及び再現性について検討し、分析法の評価を行った。その結果、各单糖の検量線はN-アセチル化糖については0.2 – 6pmol、中性糖については0.3 – 12pmolの範囲でそれぞれ相関係数0.998以上の直線性が得られた。また、各单糖の検出限界(S/N=3)はGalNAc、Rha、GlcNAc、Glc、Manがインジェクション量にして200fmol、Xyl、Fuc、Galが300fmolであった。また、8種の单糖類それについてピーク高さの日内及び日間変動を検討した。その結果、日内変動はR.S.D. 1.78 – 4.49%，日間変動はR.S.D. 2.72 – 5.66%(Table1)であり良好な再現性が得られた。これまでに報告されている方法の検出限界は、2-アミノピリジン及び2-アミノ安息香酸を用いる逆相HPLC法が100fmol<sup>6,8</sup>、PMPを用いる逆相HPLC法が1pmol<sup>3</sup>、ダンシルヒドラジンを用いるHPCE法が200amol<sup>12</sup>等である。これらの方法は検出にそれぞれ蛍光、UV、

LIF検出器を用いており、本法の感度は蛍光及びLIF検出器を用いる方法と比較すると劣るもの、UV検出器を用いる方法と同等あるいはそれ以上であると考えられる。

Table 1 Within-day (a) and day-to-day (b) precision of monosaccharide determination

	GalNAc	Rha	Xyl	GlcNAc	Glc	Man	Fuc	Gal
(a)	4.49	3.51	3.03	1.78	2.37	2.46	2.58	2.93
(b)	3.23	4.51	5.66	4.33	4.45	2.72	3.71	3.89

Each value represents R.S.D.(%) of 5 analyses determined for 6 pmol of each monosaccharide.

#### 4. 結 語

今回確立したアミノピラジンを用いるHPCE法は立木等によるアニオン交換HPLC法<sup>5,7</sup>及び呉等による逆相HPLC法<sup>13</sup>とは全く分離モードの異なる精密分析法であり、これらの分析法を併用することでより信頼性の高い糖質分析が可能になると考えられる。本研究では、試料を複数の波長で同時モニター可能なダイオードアレイ検出器を用いたが、アミノピラジン自身は優れた蛍光特性を有する試薬である。実際に立木等、呉等による蛍光HPLC法の検出限界は数 fmol<sup>5,7,13</sup>であり、本法についても蛍光あるいはLIF検出器の導入により更なる高感度分析が可能であると考えられ、今後の利用が期待できる。

#### 文 献

- 1) G. O. Guerrant and C. W. Moss, *Anal. Chem.*, **56**, 633J (1984).
- 2) S. Honda, *J. Pharm. Soc. Jpn.*, **100**, 871 (1980).
- 3) S. Honda, E. Akao, S. Suzuki, M. Okuda, K. Kakehi and J. Nakamura, *Anal. Biochem.*, **180**, 351 (1989).
- 4) H. Kwon and J. Kim, *Anal. Biochem.*, **215**, 243 (1993).
- 5) K. Tachiki, H. Yoshida, K. Hamase and K. Zaitsu, *Anal. Sci.*, **13**, 509 (1997).
- 6) H. Takemoto, S. Hase and T. Ikenaka, *Anal. Biochem.*, **145**, 245 (1985).
- 7) M. Kiguchi, K. Hamase, W. Wu, K. Yamamoto and K. Zaitsu, *Anal. Sci.*, **15**, 903 (1999).
- 8) K. R. Anumula, *Anal. Biochem.*, **220**, 275 (1994).
- 9) J. Plocek and M. V. Novotny, *J. Chromatogr. A*, **757**, 215 (1997).
- 10) K. Sato, K. Sato, A. Okubo and S. Yamazaki, *Anal. Biochem.*, **251**, 119 (1997).
- 11) A. Guttman, *J. Chromatogr. A*, **763**, 271 (1997).
- 12) S. A. Perez and L. A. Colon, *Electrophoresis*, **17**, 352 (1996).
- 13) 呉 薇, 木口 優, 浜瀬健司, 財津潔, 日本薬学会第118年会(1998, 京都), 講演要旨集 p74.

# $\alpha$ -アルキル- $\alpha$ , $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタムの立体化学

九州大学機能物質科学研究所 永島 英夫, 松原 公紀, 近藤 英雄  
九州大学総合理工学研究科 岩松 将一

## Stereochemistry of $\alpha$ -Alkyl- $\alpha$ , $\gamma$ -dichloro- $\gamma$ -lactams

Sho-ichi Iwamatsu, Kouki Matsubara, Hideo Kondo, and Hideo Nagashima

Graduate School of Engineering Sciences, and Institute of Advanced Material Study,  
Kyushu University

### Abstract

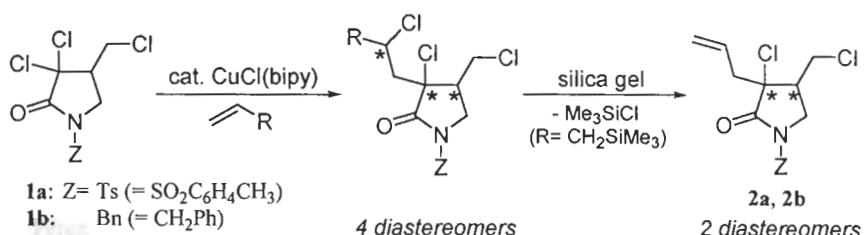
The addition reactions of  $\alpha$ ,  $\alpha$ ,  $\gamma$ -trichlorinated  $\gamma$ -lactams to olefins proceeded at 40~83 °C in the presence of catalytic amounts of CuCl (2,2'-bipyridine). Reactions with allyltrimethylsilane followed by treatment with silica gel afforded  $\alpha$ -allyl- $\alpha$ ,  $\gamma$ -lactams of which diastereomer ratios were 9:1-8:2. Although determination of their stereochemistry by NMR spectroscopy was problematic, crystallographic analysis revealed that stereochemistry of the major isomer was the *cis*-form, which was thermodynamically more stable than the *trans*-form.



# 1. 緒 言

有機化合物において、置換基間の立体配置が異なるいわゆる立体異性体は、融点、沸点などの化学的性質や反応性が異なる。従って、立体異性体が存在する新規化合物については、置換基間の立体配置を正確に決定することが極めて重要である。通常、環状骨格に結合した置換基間の立体配置の決定には、NMRのカップリング定数や*nOe*、あるいは結晶構造解析が用いられる。しかしながら、研究例の多い六員環化合物と比較して、五員環化合物の場合、カップリング定数による立体化学の決定は、とりうる立体配座が測定しにくく、また二面角の問題から隣接した炭素原子に結合した二つのプロトンが、配置によらずよく似た値を与えるため困難である。また、*nOe*測定はメチル基など当方性の置換基については威力を発揮するが、エチル基など非等方性の置換基においてはしばしば値が小さく、有意であるかの判断が難しい。<sup>1)</sup> X線結晶構造解析は測定に単結晶が必要であり、油状物質や結晶性の悪い化合物には適用できない。また、NMRを用いた手法と比べると確実な手法であるとはい、再結晶時に目的物とは異なる非常に結晶性の良い微量成分を測定して帰属を誤る危険性がないわけではない。以上の点から、五員環化合物の立体化学の帰属には慎重な検討が求められている。

遷移金属触媒を用いた*N*-アリルトリクロロアセトアミドの環化反応は、 $\alpha, \alpha, \gamma$ -トリクロロ- $\gamma$ -ラクタムの簡便な合成法として合成化学上有用な反応であり、生成物の塩素原子を用いてさらなる骨格変換が可能といった特徴を有している。<sup>2)</sup>近年、我々は環化反応において高い触媒活性を示す塩化銅(2,2-ビピリジル)触媒(以下 CuCl(bipy))を用いると、環化生成物 **1a**, **1b** の  $\alpha$  位炭素-塩素結合をさらに活性化してオレフィンとの付加反応を行うことができることを見出した。なかでも、アリルトリメチルシランとの反応では、反応後シリカゲル処理を行うことにより付加反応後にクロロトリメチルシランが脱離した、 $\alpha$ -アリル- $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタム **2a**, **2b** が得られる (Scheme1).<sup>3)</sup>



Scheme 1

ラクタム **2a, 2b** には、 $\alpha$ ,  $\beta$  位の不斉炭素にもとづく二つの立体異性体が存在する。これまで **2a, 2b** に類似の  $\alpha$  アルキル- $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタムの立体化学は、二つの研究グループがいずれも  $nOe$  により決定しており、 $^1H$  NMR 化学シフトによる推定法も提案されている。<sup>45)</sup> 研究当初我々はこれらの帰属法を参考にして **2a, 2b** の立体化学の決定を検討した。しかしながら、X線結晶構造解析の結果、 $nOe$  測定による構造決定が困難であること、また Slough らにより提案された化学シフトによる推定法は一般性がないことが明らかとなった。本論文では、X線結晶構造解析を中心とした **2a, 2b** 及びその類縁体の新しい帰属法について報告する。

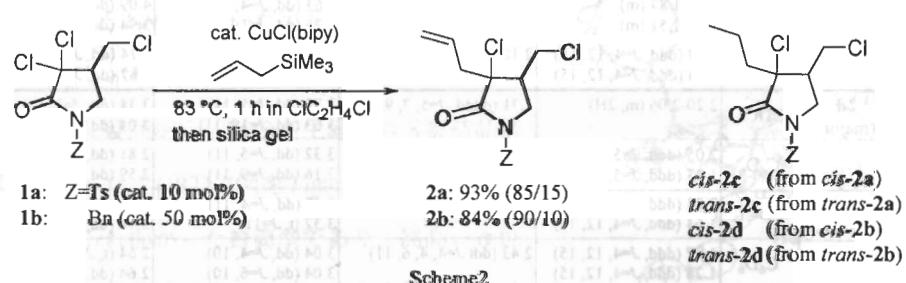
## 2. 実験

アルゴン雰囲気下、塩化第一銅 (2.0 mg, 0.020 mmol)、ラクタム **1a, 1b** (0.20 mmol)、アリルトリメチルシラン (320  $\mu$  L, 2.0 mmol) の脱気ジクロロエタン (2mL) 溶液に 83 °C で 0.2M ビピリジルジクロロエタン溶液 100  $\mu$  L を加え、一時間攪拌した。放冷後シリカゲルカラムを通して触媒を除去し、溶媒を減圧下に留去して得られた残渣を塩化メチレン中シリカゲルと攪拌することにより  $\alpha$ -アリル- $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタム **2a, 2b** を二種類の異性体混合物として得た。異性体の分離精製はシリカゲルカラムクロマトグラフィー (ジエチルエーテル/ヘキサン) により行った。ラクタム **2c, 2b** は、**2a, 2b** の異性体を分離し单一の異性体とした後、それぞれを別個に Wilkinson 触媒を用いて水素化することにより合成した。

IR スペクトルは日本分光 FT/IR-55、NMR スペクトルは日本電子 LA600, LA400、マススペクトルは日本電子 JMS-70 で測定した X線結晶構造解析は四軸型自動 X線回折計を用いて測定した。

## 3. 結果と考察

ラクタム **1a, 1b** とアリルシランとの反応は 40-83 °C で進行し、反応後シリカゲル処理を行うことにより、**2a, 2b** がいずれも 9:1 - 8:2 の異性体比で得られた (Scheme 2)。



シリカゲルカラムクロマトグラフィーにより分離精製した *cis*-2a, *trans*-2a, *cis*-2b, *trans*-2b 及びこれら四つの化合物をそれぞれ別個に水素化して得られた *cis*-2c, *trans*-2c, *cis*-2d, *trans*-2d 計八つの化合物について磁場勾配パルスを併用した H-H COSY (CORrelation SpectroscopY), HMQC (Heteronuclear Multi Quantum Coherence) の各二次元測定を行い, <sup>1</sup>H NMR のシグナルを帰属した結果を Table 1 に示す。CDCl<sub>3</sub>, C<sub>6</sub>D<sub>6</sub> 中, 2a-2d の H2 ( $\beta$ -H) プロトンの <sup>1</sup>H NMR 化学シフトは全て主生成物の方が高磁場側に観測されることが分かった。

2a, 2b は新規化合物であるが, Table 2, Figure 1 に示すように窒素上の置換基がトシリ基の  $\alpha$ -メチル, イソプロピル, 及びベンジル- $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタムは, Slough らが  $\alpha$  位メチレンプロトンと  $\beta$  位メチンプロトンとの *nOe* 測定により立体配置を決定している。さらに, *nOe* 測定により立体配置が決定できない場合, <sup>1</sup>H NMRにおいて *cis* 体の  $\beta$  位メチンプロトンが *trans* 体よりも低磁場に観測されるといった経験的な測定法を提案している。<sup>3)</sup>一方, 窒素上の置換基がベンジル基の  $\alpha$ -ノルマルブチル- $\alpha$ ,  $\gamma$ -ジクロロ- $\gamma$ -ラクタムについては, Ghelfi らが *nOe* により立体配置を決定しているが, 論文中測定値に関する具体的な記述はない。<sup>4)</sup>

Table 1. <sup>1</sup>H NMR chemical shifts at  $\beta$  methine proton of the lactam 2a-2d.

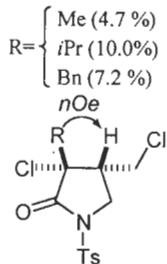
Lactam	solvent	H1( $\alpha$ -CH <sub>2</sub> )	H2 ( $\beta$ -H)	H3 (CH <sub>2</sub> Cl)	H4 (NCH <sub>2</sub> )
2a (major)	CDCl <sub>3</sub>	2.82 (dd, $J=7, 14$ ) 2.77 (dd, $J=8, 14$ )	<b>2.82</b> (dddd, $J=5, 7, 9, 10$ )	3.78 (dd, $J=5, 11$ ) 3.57 (dd, $J=9, 11$ )	4.21 (dd, $J=7, 10$ ) 3.43 (dd, $J=10, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	2.43 (d, $J=7, 2\text{H}$ )	<b>2.09-2.00</b> (m)	3.16 (dd, $J=5, 11$ ) 2.91 (dd, $J=9, 11$ )	3.92 (dd, $J=7, 10$ ) 3.07 (t, $J=10$ )
2a (minor)	CDCl <sub>3</sub>	2.76 (dd, $J=6, 16$ ) 2.48 (dd, $J=8, 16$ )	<b>2.89-2.85</b> (m)	<b>3.70</b> (ddt, $J=4, 11$ ) <b>3.41</b> (dd, $J=9, 11$ )	4.10 (dd, $J=6, 11$ ) 3.92 (dd, $J=8, 11$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	2.47 (dd, $J=6, 16$ ) 1.98 (dd, $J=7, 16$ )	2.15-2.08 (m)	2.89 (dd, $J=4, 11$ ) 2.62 (dd, $J=9, 11$ )	3.73 (dd, $J=6, 10$ ) 3.67 (dd, $J=4, 10$ )
2b (major)	CDCl <sub>3</sub>	2.92 (dd, $J=7, 14$ ) 2.86 (dd, $J=8, 14$ )	<b>2.75</b> (dddd, $J=5, 7, 9, 10$ )	3.79 (dd, $J=5, 11$ ) 3.58 (dd, $J=10, 11$ )	<b>3.35</b> (dd, $J=7, 10$ ) <b>3.03</b> (dd, $J=9, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	2.86 (dd, $J=7, 14$ ) 2.74 (dd, $J=8, 14$ )	<b>2.29</b> (ddt, $J=5, 7, 9, 9$ )	3.37 (dd, $J=5, 11$ ) 3.09 (dd, $J=9, 11$ )	2.76 (dd, $J=7, 10$ ) 2.55 (dd, $J=9, 10$ )
2b (minor)	CDCl <sub>3</sub>	2.93-2.87 (m) 2.58 (dd, $J=8, 16$ )	2.93-2.87 (m)	3.77 (dd, $J=4, 11$ ) 3.41 (dd, $J=10, 11$ )	3.55 (dd, $J=7, 10$ ) 3.15 (dd, $J=4, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	2.77 (dd, $J=6, 16$ ) 2.26 (dd, $J=8, 16$ )	2.45 (ddt, $J=4, 4, 6, 10$ )	3.16 (dd, $J=4, 11$ ) 2.75 (dd, $J=10, 11$ )	3.02 (dd, $J=6, 10$ ) 2.64 (dd, $J=4, 10$ )
2c (major)	CDCl <sub>3</sub>	<b>2.09-1.95</b> (m, 2H)	2.77 (dddd, $J=5, 7, 9, 10$ )	<b>3.76</b> (dd, $J=5, 11$ ) <b>3.60</b> (dd, $J=9, 11$ )	<b>4.22</b> (dd, $J=7, 10$ ) <b>3.43</b> (dd, $J=10, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	1.71 (ddd, $J=5, 12, 14$ ) 1.61 (ddd, $J=5, 12, 14$ )	<b>2.00-1.95</b> (m)	3.09 (dd, $J=6, 11$ ) 2.97 (dd, $J=9, 11$ )	<b>3.95</b> (dd, $J=7, 10$ ) <b>3.10</b> (t, $J=10$ )
2c (minor)	CDCl <sub>3</sub>	1.97-1.87 (m) 1.68-1.51 (m)	2.84 (ddt, $J=4, 4, 6, 10$ )	3.63 (dd, $J=4, 11$ ) 3.31 (dd, $J=10, 11$ )	4.09 (dd, $J=6, 11$ ) 3.94 (dd, $J=4, 11$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	<b>1.59</b> (ddd, $J=4, 12, 15$ ) 1.03 (ddd, $J=4, 12, 15$ )	2.10 (ddt, $J=4, 4, 6, 10$ )	2.78 (dd, $J=4, 11$ ) 2.51 (dd, $J=10, 11$ )	3.74 (dd, $J=6, 10$ ) 3.67 (dd, $J=4, 10$ )
2d (major)	CDCl <sub>3</sub>	2.20-2.06 (m, 2H)	<b>2.71</b> (dddd, $J=5, 7, 9, 10$ )	3.79 (dd, $J=5, 11$ ) 3.63 (dd, $J=10, 11$ )	3.38 (dd, $J=7, 10$ ) 3.05 (dd, $J=9, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	2.05 (ddd, $J=5, 12, 14$ ) 1.93 (ddd, $J=5, 12, 14$ )	<b>2.19-2.12</b> (m)	3.32 (dd, $J=5, 11$ ) 3.16 (dd, $J=9, 11$ )	2.81 (dd, $J=7, 10$ ) 2.59 (dd, $J=9, 10$ )
2d (minor)	CDCl <sub>3</sub>	<b>2.04</b> (ddd, $J=4, 12, 15$ ) <b>1.64</b> (ddd, $J=4, 12, 15$ )	<b>2.87</b> (ddt, $J=4, 4, 6, 11$ )	3.67 (dd, $J=4, 11$ ) 3.32 (t, $J=11$ )	3.54 (dd, $J=6, 10$ ) 3.14 (dd, $J=4, 10$ )
	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	1.87 (ddd, $J=4, 12, 15$ ) 1.28 (ddd, $J=4, 12, 15$ )	2.43 (ddt, $J=4, 4, 6, 11$ )	3.04 (dd, $J=4, 10$ ) 3.04 (dd, $J=6, 10$ )	2.64 (t, $J=11$ ) 2.64 (dd, $J=4, 10$ )

Table 2. Reported chemical shifts for  $\beta$  methine proton.

Z	R	<i>cis</i> : <i>trans</i>	$^1\text{H}$ NMR $\delta(\beta-\text{H})$		Ref.
			<i>cis</i>	<i>trans</i>	
Ts	Me	27:73	<b>2.08</b>	1.48	3 <sup>a</sup>
Ts	Pr <sup>i</sup>	77:23	<b>2.22</b>	2.15	3 <sup>a</sup>
Ts	Bn	95:5	<b>2.18</b>	1.37	3 <sup>a</sup>
Bn (2d)	C <sub>3</sub> H <sub>7</sub>	73:27	2.74	<b>2.92</b>	4 <sup>b</sup>

a) in C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>, b) in CDCl<sub>3</sub>

Figure 1. Reported values of *nOe* enhancement.



2a-2d の  $\alpha$  位メチレンプロトンは全て非等価に観測される。

我々はそれぞれのシグナルについて  $\beta$  位のメチンプロトンとの間の *nOe* 測定を行ったが、有意な値は得られず、立体化学は決定できなかった。そこで化学シフトに注目して検討したところ、 $^1\text{H}$  NMRにおいて 2a-2d の  $\beta$  位メチンプロトンは、測定溶媒によらず全て主生成物が高磁場側に観測される。従って Slough らによって提案された推定法を適用すると主生成物はいずれも trans 体と考えられる。しかしながら、2d は Ghelfi らが立体配置を決定している既知化合物であり、論文値と照合した結果、Ghelfi らの報告に従えば主生成物の立体化学は cis であり、化学シフトによる推定結果との間に矛盾が生じた。

この相反する結果は、ラクタム 1a, 1b の  $\alpha$ -アリル化反応の立体選択性が窒素上置換基がトシリル基の場合とベンジル基の場合で完全に逆転しており、また Slough らの化学シフトによる推定法が *N*-ベンジル体 2c, 2d には適用できないと仮定すれば説明が可能である。しかしながら、立体化学の決定因子を考えた場合、炭素-炭素結合生成時に反応部位から遠い窒素上置換基が、選択性が逆転するほどに影響を及ぼすとは考えにくく、むしろ NMR を用いた上記帰属に問題がある可能性が強く示唆された。

このような疑問から、2a の主生成物の X 線結晶構造解析を行った。<sup>6</sup> ORTEP 図を Figure 1 に示す。環骨格は  $\beta$  位が折れ曲がった封筒型であり、嵩高い  $\alpha$  位のプロペニル基及び  $\beta$  位のクロロメチル基がともに

Figure 2.

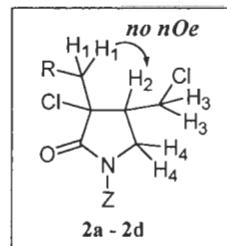
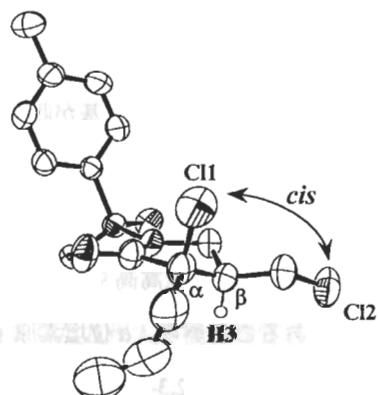


Figure 1. The ORTEP drawing of the major isomer of 2a.



擬エクアトリアルに位置している。 $\alpha$  位塩素原子と  $\beta$  位クロロメチル基の立体化学は *cis* であった。測定した単結晶が間違いなく主生成物のものであることを、測定後の単結晶の  $^1\text{H}$  NMR 測定により確認した。結晶構造において、 $\alpha$  位メチレンプロトンは  $\beta$  位メチンプロトンから遠く離れており、 $n\text{Oe}$  による立体化学の決定が困難なことを示している。

**2a-2d** の  $^{13}\text{C}$  NMR は全て同一の傾向であり、特に Table 3 に示すように主生成物の  $\alpha$  位メチレン炭素は 3-4 ppm 低磁場に観測される。X 線の結果により  $\alpha$  位メチレン炭素は *cis* 体の場合擬エクアトリアルに、*trans* 体の場合擬アキシャルに位置すると考えられる。一般にアキシ

Table 3.  $^{13}\text{C}$  NMR chemical shifts at  $\alpha$ -CH<sub>2</sub>.

lactam	NMR solvent	<i>cis</i> (major)	<i>trans</i> (minor)
<b>2a</b>	CDCl <sub>3</sub>	40.94	37.78
<b>2c</b>	C <sub>6</sub> D <sub>6</sub>	38.75	34.90
<b>2b</b>	CDCl <sub>3</sub>	42.05	38.70
<b>2d</b>	CDCl <sub>3</sub>	39.75	35.81

ャル炭素はエクアトリアル炭素より高磁場シフトすることから、この  $^{13}\text{C}$  NMR の結果は X 線の結果と一致する。よって窒素上の置換基によらず主生成物は *cis* 体であると決定した。

X 線結晶構造解析、及び  $^{13}\text{C}$  NMR より、主生成物は  $\alpha$ ,  $\beta$  位の嵩高い置換基とともにエクアトリアルに位置した、熱力学的により安定な構造である。この構造より反応の立体選択性は生成物の熱力学的安定性に支配されていることが示唆され、Scheme 2 に示す  $\alpha$ -アルキル化反応の際、Scheme 3 に示すような生成物の *cis/trans* 異性化が起こっている可能性が考えられる。そこで単離精製した **2a**, **2b** の *cis*, *trans* 体計四種の化合物を用いて  $\alpha$ -アルキル化反応と同様な条件で *cis/trans* 異性化反応を検討した結果、Table 4 に示すように *cis* 体、*trans* 体どちらからも異性化反応が進行し、*cis/trans* = 9/1 の異性体混合物となることが確かめられた。この結果は、 $\alpha$ -アルキル化反応と同様に、生成物の *cis/trans* 異性化反応が進行することを示しており、いいかえれば、熱力学的により安定な異性体が主生成物として得られることを示唆している。

他のオレフィンを用いた反応の結果を Scheme 4 にまとめる。化合物 3-5 については  $\alpha$ -アリル基より嵩高い置換基が収率良く導入された。生成物は单一の異性体であり、もう一つの異性体が単離できなかったため、最終的な異性体の帰属はできていないが、一般的  $\alpha$ -オレフィンを用いた場合にもアリルシランの場合と同様の異性化反応が起こりうること、及び立体的にそれ程嵩高くないと考えられる  $\alpha$ -アリル化反応の立体選択性が *cis/trans* = 8/2 ~ 9/1 であることから、 $\alpha$  位塩素原子と  $\beta$  位クロロメチル基の立体化学は、いずれも *cis* であると考えている。2,3-ジメチル-1,3-ブタジエンとの反応では 1,4 付加が進行した化合物 **6** が、

1/1の異性体比で得られた。また、1-ヘキセンとの反応では、7a,7bがそれぞれ3:3:1, 1:1の異性体比で得られた。これらの化合物6, 7a, 7aにおいては、 $\alpha$ ,  $\beta$ 位の置換基の立体化学だけでなく、 $\alpha$ 位側鎖の二重結合の幾何異性、もしくは側鎖上の塩素原子に由来する不斉炭素による立体異性が存在するため、四種の異性体が考えられる。これらの化合物についても主生成物の $\alpha$ 位塩素原子と $\beta$ 位クロロメチル基に関する立体化学はcisであると考えている。

Scheme 3.

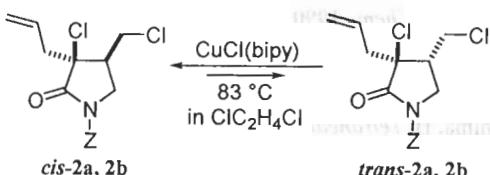
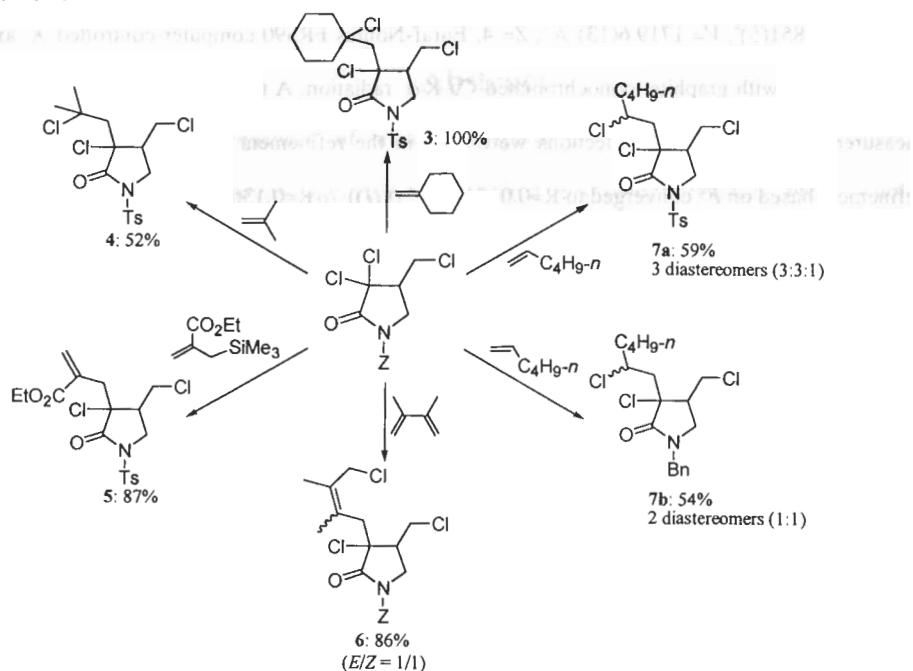


Table 4. Thermal equilibrium between two isomers of 2a and 2b.

Lactam	cat/ mol%	time /h	<i>cis</i> / <i>trans</i>
<i>cis</i> -2a	10	1	88 / 12
<i>trans</i> -2a	10	1	91 / 9
<i>cis</i> -2b	50	1	96 / 4
<i>cis</i> -2b	50	24	93 / 7
<i>trans</i> -2b	50	1	38 / 62
<i>trans</i> -2b	50	24	91 / 9

Scheme 4.



## 謝 辞

立体化学の決定を行うにあたり、重要な御助言を下さいました九州大学機能物質科学研究所加藤修雄助教授に深く感謝いたします。

## 参考文献

- 1) Derome, A. E., *Modern NMR Techniques for Chemistry Research*; Pergamon Press: Oxford, 1987; pp97-127.
- 2) (a)Nagashima, H.; Wakamatsu, H.; Ozaki, N.; Ishii, M.; Seki, K.; Washiyama, M.; Itoh, K. *J. Org. Chem.* **1993**, 58, 464. (b)Nagashima, H.;Wakamatsu, H.; Ozaki, N.; Ishii, M.; Watanabe, M.; Tajima, T.; Itoh, K. *J. Org. Chem.* **1992**, 57, 1682. (c)Nagashima, H.; Seki, K.; Ozaki, N.; Wakamatsu, H.; Itoh, K.; Tomo, Y.; Tsuji, J. *J. Org. Chem.* **1990**, 55, 985. (d)Nagashima, h.; Ozaki, N.; Seki, K.; Ishii, M.; Itoh, K. *J. Org. Chem.* **1989**, 54, 4497.
- 3) Iwamatsu, S.; Kondo, H.; Matsubara, K.; Nagashima, H. *Tetrahedron* **1999**, 55, 1687.
- 4) Rachita, M. A.; Slough, G. A. *Tetrahedron Lett.* **1993**, 34, 6821, 6825.
- 5) Benedetti, M.; Forti, L.; Ghelfi, F.; Pagnoni, U. M.; Ronzoni, R. *Tetrahedron* **1997**, 53, 14031.
- 6) Crystal data for **2a** (major isomer): colorless prism (pentane/ dichloromethane), dimentions 0.06x0.15x 0.30mm, monoclinic, space group  $P2_1/n(\#14)$ ,  $a=3.851(5)$  Å,  $b=8.090(5)$  Å,  $c=16.035(5)$  Å,  $\beta=106.851(5)^\circ$ ,  $V=1719.6(13)$  Å<sup>3</sup>,  $Z=4$ , Enraf-Nonius FR590 computer-controlled  $\kappa$  axis diffractometer with graphite monochromated Cu K $\alpha$  radiation. A total of 3141 reflections were measured and 1865 unique reflections were used in the refinement. Full-matrix least-squares refinement based on  $F^2$  converged to  $R=0.0591(F^2 > 2\sigma(I))$ ,  $\omega R=0.1367(F^2 > 2\sigma(I))$ , GOF 1.06.

# 酵母遺伝子発現制御ネットワークの戦略的同定

九州大学大学院生物資源環境科学研究所

牟田 滋, 田代 康介, 久原 哲

## Strategic approach to determine the yeast genetic regulatory network with microarray technology

Shigeru Muta, Kosuke Tashiro, Satoru Kuhara (Graduate School of Genetic Resources Technology, Kyushu Univ.)

### Abstract

The whole DNA sequences of many organisms are being determined by international collaborations. *Saccharomyces cerevisiae* is the first eukaryotic organism whose whole DNA sequences have been determined. Currently, it is considered that these DNA sequences encode 6,000 genes. A hot research topic on *S. cerevisiae* is to analyze the interactions between genes by systematic experiments and logical analysis.

Our research group has installed a systematic experimental method using microarray technology that observes the changes of expression level of genes by gene disruptions and gene overexpressions. By using this method, we have launched a project whose purpose is to reveal the gene regulatory networks between the 6,000 genes of *S. cerevisiae*. This project consists of two different tasks in addition to the task of experiments. One is to develop algorithms for constructing gene regulatory networks from experimental data and testing the consistency of data with already known gene regulatory networks. The second is to construct a knowledge base of gene regulatory networks that have been already known for various organisms. By combining the results of these tasks, our project will determine a rough figure of the gene regulatory network of *S. cerevisiae*.

## 1. はじめに

これまで細胞や組織における遺伝子発現様式の解析は、様々な状態の細胞や組織から RNA を調製し、調製した RNA をメンブレン上に固定し、解析する遺伝子の特異的プローブを用いてハイブリダイゼーションを行うノーザンプロット(もしくは、ドットプロット)解析法や、各遺伝子に特異的なプライマーを用いた RT - PCR (reverse transcription - polymerase chain reaction) 法等によって行われてきた。一方、生命現象に関わる遺伝子の研究の進展により解析に供する遺伝子数が急速に増加し、更に、ゲノムプロジェクトの進行に伴って、各生物が保持する全遺伝子が明らかになるにつれて、多数の遺伝子の挙動を一度に解析する必要性が高まっている。これに応じて、最近、マイクロアレイ、DNA チップと呼ぶ技術が開発されつつある。<sup>1,2)</sup>これらはメンブレン上に多数の DNA ドットを配置し、DNA もしくは RNA をもとに調製したターゲットを用いて解析する従来の手法をマクロアレイと呼ぶのに対してつけられた名称であるが、マイクロアレイ、DNA チップとともに、1cm 四方に数千個の DNA ドットを配置し、ごく少量のターゲットによるハイブリダイゼーションを行い、同時に検出するという特徴を持っている。これらの技術を用いれば、数千個の遺伝子を保持する微生物では一枚のアレイで、また、ヒト等の哺乳類でも数枚のアレイによって全遺伝子を網羅することが可能であり、1)RNA からのターゲットによる全遺伝子を対象とした遺伝子発現量解析、2)ゲノム DNA をターゲットとすることによる遺伝子欠損等の変異の解析、3)アレイ上に適当なオリゴ DNA を配置することによって、点突然変異の検出が可能と考えられる。

我々は、出芽酵母のゲノムプロジェクトの完了に伴って、全遺伝子を対象とした発現解析を行うことにより、遺伝子発現制御ネットワークの解明を目的とするシステムの構築を行っている。構築しているシステムは、1)全遺伝子をマイクロアレイ化し、遺伝子発現量を定量的に測定する実験系、2)外部刺激における、また、遺伝子破壊・増幅操作株における全遺伝子の発現量変化を計測したデータベース、3)得られたデータベースから、モデル生物の全遺伝子の発現制御回路図を作成する機械的学習アルゴリズム、4)遺伝子発現制御を想定するシミュレーター、からなる。本報告ではこのシステムの中で開発してきた1)の実験系について解説する。

## 2. 実験方法

### 2.1. マイクロアレイ用 DNA の調製

われわれは、出芽酵母で決定された全塩基配列から推定された約 6000 個の ORF の M13 ファージベクターへのクローニングを終了させている。そこで、これらのクローンを鋳型として、ベクター内の共通配列プライマーを用いて PCR 増幅した断片をマイクロアレイ用 DNA として使用した。

96穴PCR反応用プレートを用いて100 μlの反応系で20~30サイクルのPCRを行った。サンプルの一部をアガロースゲル電気泳動し、増幅を確認した後に10 μlの3M酢酸ナトリウム(pH 5.2), 80 μlのイソプロパノールを加えて混合し、室温で20~30分間放置した。3000rpmで20分間遠心することで沈殿を回収し乾燥後、0.5~1 μg/ μlの濃度に2×SSCに溶解した。

## 2.2.RNA試料からのターゲットの調製

酵母からホットフェノール法でRNAを抽出し、さらにポリ(A)RNAを調製した。10 μgポリ(A)RNA, 1×反応バッファー(Super Script II Reverse Transcriptase ; SS II (Gibco BRL)添付), 25ng/ μlオリゴ(dT)プライマー, 0.2mM dTTP, 0.5mM dATP, dGTP, dCTP, 0.1mM FluoroLink dUTP(アマシャム ファルマシア), 10mM DTT, 100U RNasinを含む20 μlの反応系で標識を行った。この際、2種類の細胞からのRNAをそれぞれ、FluoroLink Cy-3dUTP, FluoroLink Cy-5dUTPで標識した。65°Cで2分間加熱後、42°Cに移し200U SS IIを加え、42°Cで30~40分間インキュベートした。更に200U SS IIを加え、42°Cで30~40分間インキュベートした後、20 μl蒸留水, 5 μl 0.5M EDTA, 10 μl 1M NaOHを加えて、65°Cで60分間インキュベートした。1M Tris-HCl(pH 7.5) 25 μlを加えて中和後、溶液をMicrocon-30(ミリポア)を用いて10~20 μlに濃縮した。200~400 μl TEを加えた後、Microcon-30を用いて、10~20 μlに濃縮する操作を2~3回繰り返し、未標識のdNTPを除去した。標識したサンプル1 μlをアガロースゲル電気泳動し、FUJI FLA3000G(富士写真フィルム)を用いて標識を確認した。

## 2.3.マイクロアレイの作製とハイブリダイゼーション

2N NaOH-70%エタノール溶液に1時間以上浸した後、MilliQ水で3~4回すすいだスライドガラス(MATSUNAMI)を10%ポリL-リシン(Sigma)溶液に1時間以上浸した後、遠心(600rpm × 2分)によって水分を除去し、室温で乾燥させた。マイクロアレイ用DNA溶液をSPBIO(日立ソフト)を用いて、スライドガラス上にドットした。70~80°Cで1時間の加熱処理と120mJのUV照射の後、70mM無水コハク酸、0.1Mホウ酸-NaOH(pH 8.0)を含む1-methyl-2-pyrrolidinone溶液に10~20分間浸した。次いで沸騰したMilliQ水中に2分間浸し、エタノールで脱水した後、室温で乾燥させた。完成したマイクロアレイはこの状態で保存した。

蛍光標識したターゲット溶液に終濃度5×SSCとなるように20×SSC, MilliQ水を加え、95°Cで3分間加熱変性後、室温まで冷まし、終濃度0.5%のSDSを加えターゲット溶液とした。マイクロアレイ1枚あたり40~1のターゲット溶液を静かに上層し、カバーガラスを端の

方から気泡をトラップしないように載せ、モイスチャーチャンバー内で65°Cで10~20時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、全体を2×SSC-0.1% SDS溶液に浸し、カバーガラスを静かに外した。マイクロアレイを2×SSC-0.1% SDS溶液で5分間2回、0.2×SSC-0.1% SDS溶液で5分間2回洗浄し、0.2×SSC溶液で2回リンスし、600rpm×20秒遠心後、室温で乾燥させた。乾燥したマイクロアレイを蛍光マイクロアレイスキャナー試験機(富士写真フィルム)で蛍光量の測定を行った。

### 3. 結果と考察

酵母の全遺伝子を配したマイクロアレイに対して、野生型酵母とTUP1欠損型酵母から調製したポリ(A)RNAを錆型として合成した蛍光標識DNAをターゲットとして、各遺伝子の発現量の変化を解析した結果をFig.1に示した。ここではそれを赤と緑で表し、図を合成して表現している。矢じりで示したTUP1のように野生型酵母で多く発現していると、赤が強く示され、TUP1欠損型酵母で多く発現していると緑が強く示されている。また両者で同程度発現しているものは黄色で示され、両者間での遺伝子発現量の変化が1枚のマイクロアレイで計測できることが示された。現在、遺伝子破壊株の系統的な作製を進めており、破壊株、過剰発現株における遺伝子発現量の変化を解析し、データベース化更には計算機科学の手法を取り入れての遺伝子発現制御ネットワークの解明を行いたいと考えている。<sup>3)</sup>

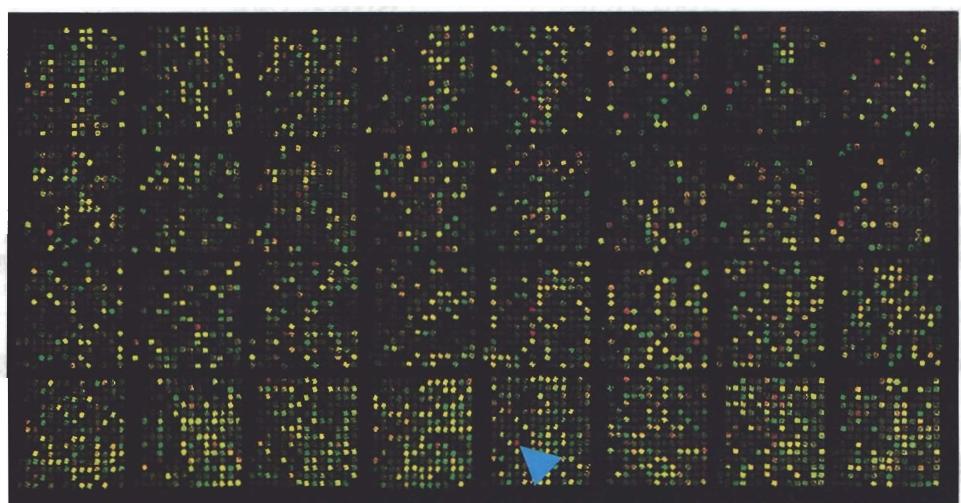


Fig. 1 Two-color fluorescents scan of the yeast microarray containing the all ORFs of yeast. The target mixture consisting cDNA from wild type strain (red; Cy - 3 labeling) and TUP 1 mutant (green; Cy - 5 labeling) was hybridized to the array. The image of Cy - 3 was overlaid the image of Cy - 5. The arrowhead is indicated the ORF corresponds to the TUP 1.

#### 4. 参考文献

- 1) J.L. DeRiesil., V. R. Iyer and P. O. Brown., Science, 278, 680 (1997)
- 2) D. A. Lashkari., J. L. DeRisi., J. H. McCusker., A. F. Namath., C. Gentile., S. Y. Hwang., P. O. Brown and R. W. Davis., Proc Natl Acad Sci USA, 94, 13057 (1997)
- 3) 久原哲, 田代康介, 牟田滋, 数理科学, 432, 33 (1999)

# 单分散硫化銀被覆硫化亜鉛超微粒子を利用する 亜鉛イオンセンサの開発

九州大学工学部 城之園恵子, 田村 淳, 今任 稔彦

## Development of zinc ion-sensor using silver sulfide-coated zinc sulfide monodispersed ultrafine particles

Keiko JYONOSONO, Jun TAMURA, Toshihiko IMATO

Graduate School of Engineering, Kyushu University

A zinc ion-sensor was fabricated by using silver sulfide ( $\text{Ag}_2\text{S}$ )-coated zinc sulfide ( $\text{ZnS}$ ) monodispersed ultrafine particles, which were synthesized by an ion exchange method. The monodispersed ultrafine particles of  $\text{ZnS}$  (ca 400nm in diameter) were prepared by a homogeneous precipitation method from a mixed solution of thioacetamide and zinc nitrate, and then were dispersed into ethanol containing silver nitrate ( $\text{AgNO}_3$ ) at 0 °C for 5 min-2.5 hours in order to coat with an  $\text{Ag}_2\text{S}$  layer on the surface of the  $\text{ZnS}$  particles. The resulting  $\text{Ag}_2\text{S}$ -coated  $\text{ZnS}$  particles were pressed into pellet and some of them were sintered at 300 – 500 °C under  $\text{N}_2$  gas for 3 hours.

The amount of  $\text{Ag}_2\text{S}$  coated on the  $\text{ZnS}$  particles increased with an increase in time of coating reaction. When reaction time was 1 hour, weight content of  $\text{Ag}_2\text{S}$  in the  $\text{Ag}_2\text{S}$ -coated  $\text{ZnS}$  particles was 34 wt%, and the thickness of the  $\text{Ag}_2\text{S}$  layer was estimated to be 21 nm. A sensor membrane using these particles without sintering showed a linear potential response to logarithm of  $\text{Zn}^{2+}$  ion concentration between  $10^{-4}$  –  $10^{-1}$  mol  $\text{dm}^{-3}$  with a slope of 21 mV/ decade. Sintering of the sensor membrane at 300 – 500 °C gave a poor effect on the response to  $\text{Zn}^{2+}$  ion.

## 1. 緒 言

湿式冶金やメッキ工業などの化学工業プロセスにおいて、重金属イオンをオンラインで精度よく計測する技術の確立は、工程管理上極めて重要であり、強く要望されている。従来、これらの分析には発色試薬を用いる吸光光度法、蛍光光度法やキレート滴定法などが用いられており、通常オフラインでの計測が行われている。一方、イオンセンサを用いる電位差分析法は、オンライン計測に極めて適した方法であるが、現在市販されている固体膜型重金属イオンセンサとしては、銀、銅、鉛、カドミウムイオンセンサに限られており、要望の強い亜鉛、ニッケル、コバルトイオンセンサなどは一部特許で報告されているのみ<sup>1)</sup>で、実用化には至っていない。

固体膜型重金属イオンセンサの感応膜は、目的重金属イオンの硫化物塩 MS と硫化銀の粉末を混合成型したもので、銀イオン導電性を持つ、いわゆる固体電解質膜である。これを感應膜とするセンサがその機能を果たすためには、次の三つの条件を満足する必要があることが指摘されている<sup>2)</sup>。すなわち、1) MS の溶解度積が硫化銀のそれよりも大きいこと、2) MS の溶解度が試料液中の  $M^{2+}$  イオンの濃度より小さいこと、3) センサ感應膜表面で各硫化物の溶解平衡で生成する  $M^{2+}$  イオンと  $Ag^+$  イオンの交換反応が十分速いこと、である。亜鉛、ニッケル、コバルトイオンは 1), 2) の条件を満たしているので、それぞれ硫化物と硫化銀を用いて、各イオンセンサの開発が可能であると考えられるが、前述のように実用化されてない。従って、これまで実用化されるほど十分な性能が得られていない原因は、(3) の条件が満たされていないためと推測される。もし、単分散で、ナノメートルサイズの金属硫化物超微粒子を合成し、これにより感應膜を作製することができれば、感應膜/試料溶液界面において、MS と  $Ag_2S$  層間の距離が極めて短くなり、溶解平衡により生成する  $M^{2+}$  イオンと  $Ag^+$  イオンの物質移動が容易になると考えられる。従って迅速なイオン交換が達成され、 $M^{2+}$  イオンセンサの良好な応答が期待される。Kim ら<sup>3)</sup>はチオアセトアミドを沈殿剤とする均一沈殿法により、単分散で粒径が 400nm 以下の ZnS 超微粒子を合成できることを報告している。さらに彼らは、この ZnS 超微粒子の表面を  $Ag_2S$  で被覆する方法を開発している<sup>4)</sup>。本研究では Kim らが報告している  $Ag_2S$  被覆 ZnS 微粒子の合成法を利用し、亜鉛イオンセンサを開発することを目的とし、被覆した  $Ag_2S$  の量および感應膜作製条件の亜鉛イオン応答性に及ぼす影響について検討した。

## 2. 実験

原料となる単分散 ZnS 微粒子は、以下のようにして調製した<sup>3)</sup>。pH を 1.5 に調節した 0.04 mol dm<sup>-3</sup> 硝酸亜鉛水溶液 200 cm<sup>3</sup>を三角フラスコに入れ、70 °C に加熱した。これに、チオアセトアミド 6.02 g を添加した。このときのチオアセトアミドの濃度は 0.4 mol dm<sup>-3</sup> である。チオアセトアミド添加後 5 分間はマグネティックスターラーで溶液を攪拌し、その後は粒子の凝集を防ぐために機械的な攪拌は行わず、70 °C で 40 分間保持した。生成した ZnS 粒子を遠心分離によって回収し、水、エタノールの順に溶媒を変え、超音波分散と遠心分離の繰り返しによって ZnS 粒子を洗浄した。洗浄した ZnS 粒子を減圧乾燥した。次に、エタノール 100 cm<sup>3</sup>を入れた三角フラスコに合成した ZnS 粒子 1.01 g (0.01 mol) を加え、超音波分散させた後、氷浴で 0 °C に保持した。この溶液に硝酸銀六水和物 0.85 g (0.005 mol) を添加した。その後、溶液をマグネティックスターラーで攪拌し続けた。この間にエタノールに溶解した Ag<sup>+</sup> イオンは ZnS 粒子の Zn<sup>2+</sup> イオンとイオン交換反応を起こし、ZnS 粒子の表面は Ag<sub>2</sub>S で被覆された。反応時間は 5 分～2.5 時間とした。Ag<sub>2</sub>S 被覆 ZnS 粒子を遠心分離によって回収し、水、エタノールの順に溶媒を変え、超音波分散と遠心分離の繰り返しによって洗浄した後、減圧乾燥した。生成物の形状は走査型電子顕微鏡 (SEM; 日立製作所製、S-900型) を用いて、亜鉛と銀の分布および ZnS 粒子を被覆している Ag<sub>2</sub>S の定量分析はエネルギー分散型 X 線マイクロアナライザー (EDX; 日立製作所製、S-2300型) を用いて調べた。また、結晶相は X 線回折計 (XRD; 島津製作所製、XD-D1型) で CuK<sub>α</sub> 線を用いて調べた。EDX 分析においては、まず Ag<sub>2</sub>S と ZnS を所定の割合で混合した試料について得られた銀と亜鉛のピーク面積比から検量線を作成し、これを用いて Ag<sub>2</sub>S 被覆 ZnS 粒子中の Ag<sub>2</sub>S の重量比及び被覆層の厚みを求めた。

上記の方法で合成した Ag<sub>2</sub>S 被覆 ZnS 粒子約 0.3 g を 2 t/cm<sup>3</sup> の圧力で、1 分間加圧して直径 10 mm、厚さ 2 mm のペレットを作成し、これをセンサの感応膜とした。一部のペレットについては、成型後、窒素雰囲気下 300 °C または 500 °C で 3 時間焼結を行った (所定の温度までの昇温速度は 10 °C /min)。次に、感応膜に導電性銀接着剤を用いて銀のリード線を接着し、これをアクリルパイプの一方に固定し、センサを組み立てた。このセンサと参照電極を無関係電解質として 0.1 mol dm<sup>-3</sup> KNO<sub>3</sub> を含む Zn<sup>2+</sup> イオン溶液に浸漬し、溶液をスターラーで攪拌しながら起電力を測定した。

## 3. 結果と考察

### 3.1 イオン交換法による Ag<sub>2</sub>S 被覆 ZnS 粒子の合成

種々の反応時間で合成した Ag<sub>2</sub>S 被覆 ZnS 粒子について、EDX により得られた銀と亜鉛の

ピーク面積から  $\text{Ag}_2\text{S}$  被覆 ZnS 粒子中の  $\text{Ag}_2\text{S}$  の重量比および被覆層の厚みを算出した。結果を Table 1 に示す。ZnS 粒子表面に被覆された  $\text{Ag}_2\text{S}$  の重量比は、反応時間の経過とともに増加していることがわかる。また、被覆層の厚みも反応時間とともに増加し、2.5 時間後では 26 nm にも達する。Fig. 1 は被覆前の ZnS 粒子および各反応時間後の  $\text{Ag}_2\text{S}$  被覆 ZnS 粒子の SEM 写真である。Fig. 1 よりわかるように、ZnS 粒子は完全な球状であり、粒子径は 400 nm で均一である。反応時間 5 分および 0.5 時間においても、粒子は均一な球状粒子であり、粒子径及びその表面状態は被覆前とほとんど同じである。しかし 1 時間以上の反応時間では、被覆時間が長くなるにつれて表面の隆起が顕著になり、粒子径が

被覆前よりやや小さくなっていることがわかる。Fig. 2 は各反応時間後の粒子の粉末 X 線回折図である。反応時間 5 分の粒子では、被覆前と同じく  $\beta$ -ZnS による回折ピークのみがみられる。反応時間 0.5 時間以上の粒子では、 $\beta$ -ZnS による回折ピークのほかに  $\beta$ - $\text{Ag}_2\text{S}$  による回折ピークが出現している。また、反応時間が長くなるにつれて、 $\beta$ -ZnS に対する  $\beta$ - $\text{Ag}_2\text{S}$  のピークが大きくなり、 $\text{Ag}_2\text{S}$  の被覆量が増加していることを示している。このことは、EDX による銀と亜鉛の元素分析の結果から算出した重量比の傾向と一致している。

Table 1 Relationship between reaction time and weight ratio of  $\text{Ag}_2\text{S}$  to ZnS and thickness of  $\text{Ag}_2\text{S}$  layer coated on ZnS particle.

Run No.	Time	$\text{Ag}_2\text{S}$ wt%*	Thickness of $\text{Ag}_2\text{S}$ layer ** (nm)
A	5min	7.1	3.5
B	0.5h	11	5.3
C	1.0h	34	21
D	2.5h	41	26

Reaction conditions; Amount of ZnS particles: 0.01 mol, Amount of  $\text{AgNO}_3$  added: 0.005 mol, Temperature: 0 °C, Solvent and volume: ethanol 100 cm<sup>3</sup>.

\* calculated from elemental analysis by EDX.

\*\* calculated from  $\text{Ag}_2\text{S}$  wt% and diameter of ZnS particle.

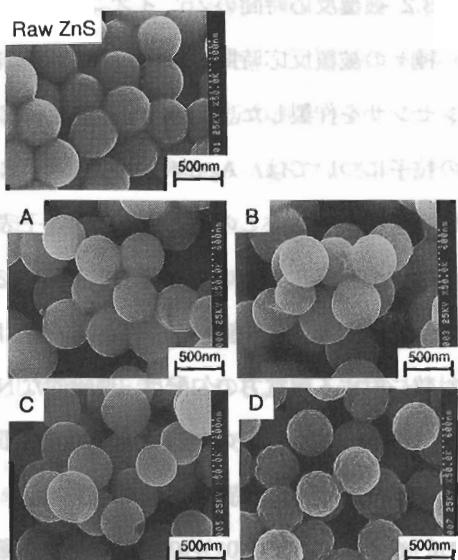


Fig. 1 SEM photographs of raw ZnS and  $\text{Ag}_2\text{S}$ -coated ZnS particles.  
Reaction conditions are given in Table 1.

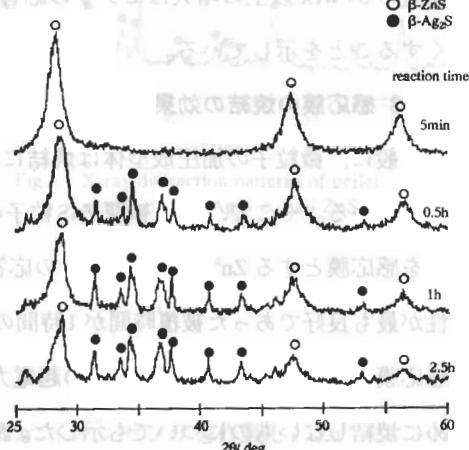


Fig. 2 X-ray diffraction patterns of  $\text{Ag}_2\text{S}$ -coated ZnS powders.  
Reaction conditions are given in Table 1.

### 3.2 被覆反応時間の $Zn^{2+}$ イオンに対する応答に及ぼす影響

種々の被覆反応時間で合成した  $Ag_2S$  被覆  $ZnS$  粒子をペレット状に加圧成型し、 $Zn^{2+}$  イオンセンサを作製した。この場合、感応膜の焼結は行っていない。被覆時間 5 分及び 0.5 時間の粒子については、 $Ag_2S$  の被覆量が少ないためと考えられるが、成型が困難で感応膜が作製できなかった。このことは、 $ZnS$  粒子表面に被覆された  $Ag_2S$  層が、成型する際の粒子間の接触を容易にしているものと推測される。作製したセンサの  $Zn^{2+}$  イオンに対する応答を Fig. 3 に示す。被覆時間が 1 時間の粒子を用いて作製したセンサの場合、 $Zn^{2+}$  イオン濃度の対数に対する起電力の勾配は、理論的な Nernst 勾配 (29 mV/decade) よりやや小さいが、起電力は  $Zn^{2+}$  イオン濃度の対数と良好な直線関係にある。一方、被覆時間が 2.5 時間の場合では、 $Zn^{2+}$  イオン濃度が  $10^{-4} \sim 10^{-2} \text{ mol dm}^{-3}$  の範囲で Nernst 応答に近い応答を示したが、 $Zn^{2+}$  イオン濃度が  $0.1 \text{ mol dm}^{-3}$  のときに大きな起電力の低下がみられる。Table 1 に示すように、被覆時間が 1 時間では  $ZnS$  粒子に被覆された  $Ag_2S$  重量比は 34 wt% であり、2.5 時間では 41 wt% に増加する。このことは、センサの応答性が  $ZnS$  粒子表面への  $Ag_2S$  被覆量によって大きく変化し、 $Ag_2S$  の被覆量の 34 wt% 以上の増大はセンサの応答性を悪くすることを示している。

### 3.3 感応膜の焼結の効果

一般に、微粒子の加圧成型体は焼結によって緻密化し、力学的強度が向上することが知られている。そこで、 $Ag_2S$  被覆  $ZnS$  粒子の加圧成型体を  $300^\circ\text{C}$  と  $500^\circ\text{C}$  において焼結し、これを感應膜とする  $Zn^{2+}$  イオンセンサの応答性を調べた。 $Ag_2S$  被覆  $ZnS$  粒子には 3.2 項で応答性が最も良好であった被覆時間が 1 時間のものを用いた。Fig. 4 は  $300^\circ\text{C}$  と  $500^\circ\text{C}$  で焼結した感應膜を用いた  $Zn^{2+}$  イオンセンサの起電力と  $Zn^{2+}$  イオン濃度の関係を示している。比較のために焼結しないものについても示した。感應膜を  $300^\circ\text{C}$  で焼結した場合、 $Zn^{2+}$  イオン濃度が  $10^{-2} \sim 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$  の濃度範囲では、検量線の傾きは未焼結の感應膜を用いたセンサのそれに比べて Nernst 勾配に近いが、検出下限濃度は  $10^{-3} \text{ mol dm}^{-3}$  である。一方、 $500^\circ\text{C}$  で焼結した

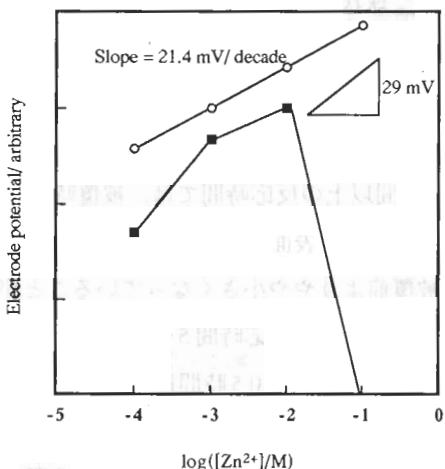


Fig.3 Potential response of  $Zn^{2+}$  ion sensor prepared from  $Ag_2S$  coated  $ZnS$  particle. Coating reaction time; ○:1h, ■:2.5h. No sintering was done after preparation of sensor membrane.

感応膜を用いたセンサは、 $Zn^{2+}$  イオン濃度が  $10^{-2} \sim 10^{-1} \text{ mol dm}^{-3}$  の範囲では、Nernst応答しているが、検出下限濃度は  $300^\circ\text{C}$  のものに比べてさらに高くなっている。この焼結に伴うセンサ応答性の変化の原因を調べるために、焼結後の感応膜のX線回折の測定を行った。結果を Fig. 5 に示す。焼結温度が  $300^\circ\text{C}$  の感応膜では、焼結前と比べて  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>Sによる回折ピークはプロードになるが、一方、 $\beta$ -ZnSによる回折ピークは鋭くなっている。焼結温度が  $500^\circ\text{C}$  の感応膜では、 $\beta$ -ZnSのピークがさらに鋭くなり、プロードであった  $\beta$ -Ag<sub>2</sub>Sのピークも鋭くなっている。このことは、焼結温度の上昇により感応膜中に含まれていた水などの不純物が揮発し、 $\beta$ -Ag<sub>2</sub>Sと $\beta$ -ZnSの結晶性が向上したためと考えられる。 $\beta$ -Ag<sub>2</sub>Sのピークが  $300^\circ\text{C}$ での焼結でプロードになっているのは、粒成長が起こっていることを示唆するものである。また、 $500^\circ\text{C}$ の焼結では新たに $\alpha$ -Ag<sub>2</sub>Sの回折ピークが出現している。従って、この感応膜のX線回折パターンの変化を考慮すると、焼結温度が高いほど $Zn^{2+}$ イオンに対する応答性が低下した原因是、感応膜内のZnSの粒成長及びAg<sub>2</sub>Sの $\beta$ 型から $\alpha$ 型への相転移によるものと考えられる。

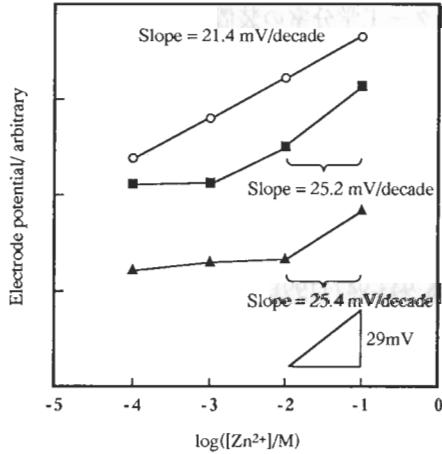


Fig.4 Effect of sintering temperature on response to  $Zn^{2+}$  ion.  
Sintering temperature; ○: not sintered,  
■:  $300^\circ\text{C}$ , ▲:  $500^\circ\text{C}$ .

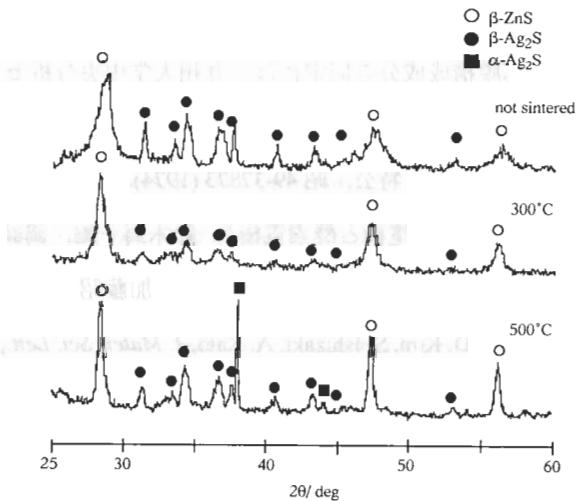


Fig.5 X-ray diffraction patterns of pellet prepared from Ag<sub>2</sub>S-coated ZnS powders.

#### 4. 結 論

Ag<sub>2</sub>S被覆ZnS単分散超微粒子を用いて固体膜型 $Zn^{2+}$ イオンセンサを作製し、 $Zn^{2+}$ イオンに対する応答性について調べた結果、次のようなことがわかった。

- 1) ZnS粒子表面へのAg<sub>2</sub>Sの被覆量は、ZnS粒子とAg<sup>+</sup>イオンの反応時間とともに増加し、

1時間の反応時間で  $\text{Ag}_2\text{S}/\text{ZnS}$  重量比で 34 wt% の  $\text{Ag}_2\text{S}$  が被覆されたことがわかった。また、このときの  $\text{Ag}_2\text{S}$  の被覆層の厚みは 21 nm と推定された。

2)  $\text{Ag}_2\text{S}$  が 34 wt% 被覆された  $\text{Ag}_2\text{S}$  被覆  $\text{ZnS}$  粒子を加圧成型した感応膜では、 $\text{Zn}^{2+}$  イオン濃度  $10^{-4}\sim 10^{-1}$  mol cm<sup>-3</sup> の濃度範囲において、濃度の対数に対してセンサの起電力が 21 mV/decade の勾配をもつ応答性を示すことがわかった。

3) センサ感応膜の焼結は、センサ応答性を悪化させ、焼結温度が高くなるほど  $\text{Zn}^{2+}$  イオンに対する検出下限濃度が高くなかった。これは感応膜中の  $\text{ZnS}$  の粒成長と  $\text{Ag}_2\text{S}$  の  $\beta$  型から  $\alpha$  型への相転移が原因であると推測された。

## 謝 辞

$\text{ZnS}$  粒子の合成に際して、本学工学研究科物質創造工学専攻の北條純一教授に合成装置の御提供を頂いた。ここに深く感謝いたします。

感応膜構成成分の同定には、九州大学中央分析センター工学分室の装置を使用した。

- 1) 平田寛, 特公, 昭 49-37873 (1974).
- 2) “イオン電極と酵素電極”, 鈴木周一編, 講談社 (1981), p. 15.
- 3) 金永道, 米今利夫, 永島聰子, 加藤昭夫, 日本化学会誌, 1995, No. 9, 707-712 (1995).
- 4) Y. D. Kim, S. Ishizaki, A. Kato, *J. Mater. Sci. Lett.*, **15**, 943-947 (1999).

# 酸化ビスマス薄膜のエレクトロクロミック特性と表面構造 —アルカリおよびアルカリ土類添加による消色特性の改善

島ノ江憲剛, 末次 道久, 三浦 則雄\*, 山添 翠

九州大学大学院総合理工学研究科

\*九州大学先端科学技術共同研究センター

## Surface Structure and Electrochromic Properties for Bismuth Oxide Thin Film

### – Improvement of Decoloration Properties by Adding Alkaline or Alkaline Earth Component

K. Shimano, M. Suetsugu, N. Miura\*, N. Yamazoe

Graduate School of Engineering Sciences, Kyushu University

\*Advanced Science and Technology Center for Cooperative Research, Kyushu University

Bismuth oxide – based thin films prepared by sputtering were tested for electrochromic performances in propylene carbonate containing 1M-LiClO<sub>4</sub>. A pure Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> film was found to show a clear electrochromic change between transparent and dark brown on switching between anodic (+1.2 V) and cathodic (−2.0 V) polarization. The change in absorbance after 50th cycles, however, were degraded from that of the initial cycle due to a reduction in decoloration efficiency. AFM images of the surface of the aged bismuth oxide thin film revealed condensation of fine particles of bismuth oxide. It was found that the decoloration properties could be improved more or less by the addition of an alkaline or alkaline earth component to bismuth oxide. Especially, 5at%Ba – added bismuth oxide proved to be stable even after 50th cycle of coloration and decoloration. It is considered that the Ba addition inhibits the condensation of fine particles of bismuth oxide.

## 1. はじめに

エレクトロクロミックディスプレイ (ECD) は電気化学的酸化還元によって光学特性が可逆的に変化する物質を利用した表示素子であり、自然な表示が可能で、メモリー性を有し、視野角依存性が小さいといった特徴を有している。また、エレクトロクロミックを示す材料として、酸化タンゲステン、酸化モリブデン、酸化バナジウム等の遷移金属酸化物が知られているが<sup>[1-4]</sup>、遷移金属以外の酸化物についてはほとんど報告されていなかった。しかし、我々は遷移金属ではない酸化ビスマス薄膜が過塩素酸リチウム ( $\text{LiClO}_4$ ) 含有プロピレンカーボネート (PC) 溶液中で卑な電位で黒褐色、貴な電位で透明を示すことを見出した<sup>[5]</sup>。ところが、この酸化ビスマス薄膜は着消色を繰り返すと、その EC 特性は徐々に変化し、貴な電位で十分に消色せず色残りするという問題点があることが明らかになった。

そこで本研究では、この消色時の問題を解決するために酸化ビスマス薄膜の EC 特性とその表面構造変化について調べ、種々の金属酸化物を添加することによりその EC 特性の改善を試みた。

## 2. 実験方法

酸化ビスマス薄膜は、スパッタリング法を用いて以下のように作製した。すなわち、硝酸ビスマスを硝酸水溶液に溶解し、これにアンモニア水を加えることで水酸化ビスマスを得、これをスパッタリング用ターゲットとした。スパッタリングの条件としてアルゴン:酸素比を 9:1、全圧を 0.67Pa に設定し、100W の RF プラズマを 15 分間発生させ、ITO 透明電極付ガラス基板に厚さ 50 – 100nm の酸化ビスマスを堆積させた。そして、これを大気中 300 °C で 30 分間酸化熱処理を行い、EC 用試料とした。また、第二成分である金属酸化物の添加は、酸化ビスマス粉末にそれぞれの粉末を機械的に混合し、スパッタリング用ターゲットにすることによって行った。

EC 特性の評価には、電解質溶液として 1M の  $\text{LiClO}_4$  を含む PC 溶液を用い、飽和カロメル電極 (SCE) を参照極とし、吸光度を測定しながら +1.2 から – 2.0V の間でサイクリックボルタメトリー (CV) を行った。次に、表面形態観察には原子間力顕微鏡 (AFM) を、また酸化ビスマスの結晶性評価には X 線回折法を用いた。

### 3. 結果と考察

Fig.1に酸化ビスマス単独膜のCV変化、Fig.2にCVに伴う吸光度変化を示す。酸化ビスマス薄膜は、着色側の-1.2V以下で大きなカソーディック電流を、また消色側の-0.3V以上でアノーディック電流を示すことがわかる。ここで、特に注目すべきことはサイクルを重ねるごとにカソーディック電流が大きく変化することであり、膜構造が変化していると考えられる。さらにこれらの吸光度変化は、10サイクル以上では貴な電位にしても十分に消色せず、色残りが観察された。

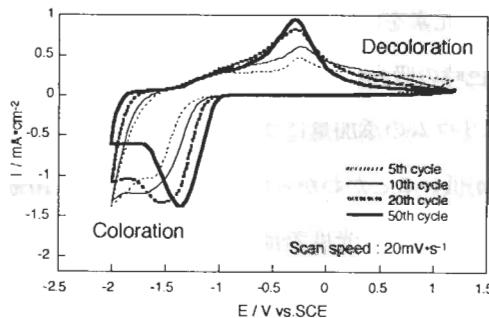


Fig. 1 Cyclic voltammograms of  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  thin film.

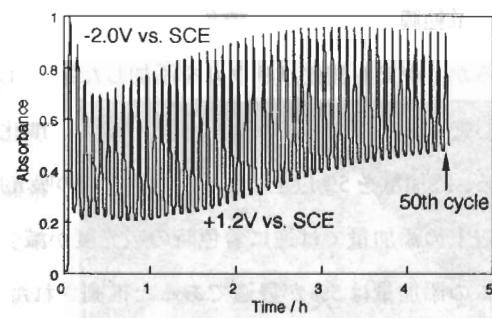


Fig. 2 Change in absorbance at 550 nm for  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  thin film driven at +1.2 and -2.0 V vs. SCE in 1M- $\text{LiClO}_4$ /PC.

そこで、この原因を調べるために0, 5, 20, 50サイクルでの貴な電位の表面形態をAFMにより観察した。Fig.3に、それぞれの5ミクロン範囲のAFM像を示す。この観察像から着消色のサイクルを繰り返すに従い、粒子形状が凝集し、次第に大きくなり、表面が粗くなっていることが明らかとなった。特に、50サイクル目の表面では表面のラフネスが $\pm 0.5 \mu\text{m}$ 以上と非常に粗い状態であった。

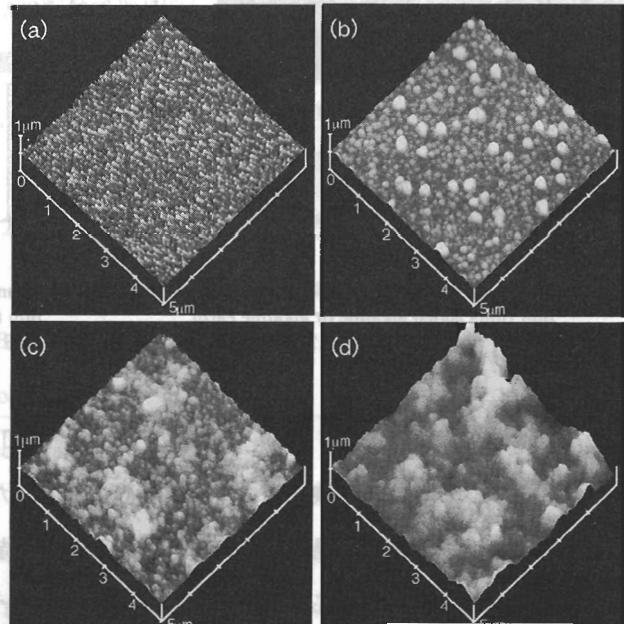


Fig. 3 AFM images of  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  surface of the  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  film driven at +1.2V and -2.0 V vs. SCE repeat-edly in 1M- $\text{LiClO}_4$ /PC. (a) before cycle, (b) after 5th, (c) 10th, and (d) 50th cycle.

これらの結果から、酸化ビスマスのEC特性改善のためには、表面構造を微細化し、Liイオンの注入及び放出の際の抵抗を低減させることが重要であると考えられる。一般に、金属酸化物にアルカリまたはアルカリ土類金属を添加すると組織が微細化され、融点、電気特性など諸物性が大きく変化することが知られている。そこで本研究では、酸化ビスマスにアルカリまたはアルカリ土類金属酸化物を添加し、酸化ビスマス組織の微細化を試みた。

Fig.4に酸化ビスマスに種々の酸化物を元素比で5%添加したときの吸光度の変化、つまり50サイクル目における着色時及び消色時の吸光度とその時の吸光度差を示す。酸化ビスマス単独膜と比べると、消色時の吸光度増加はどの元素を添加したときでも小さくなっているが、中でも酸化バリウムを添加した系では着色時の吸光度も大きく、良好なEC特性を有していることが明らかとなった。次に、酸化バリウムの添加量について検討を行ったところ、添加量を5%以上にすると、消色時の吸光度が低いことがわかった(Fig.5)。しかし、10%以上の添加量では逆に着色時の吸光度が減少し、大きな吸光度差は得られず、酸化バリウムの添加量は5%が最適であると推測された。

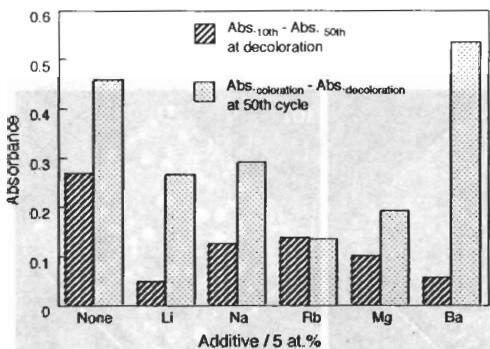


Fig. 4 Change in absorbance at 550 nm for  $\text{Bi}_2\text{O}_3$  thin films added alkaline or alkaline earth metals, which driven at +1.2 and -2.0 V vs. SCE in 1M-LiClO<sub>4</sub>/PC.

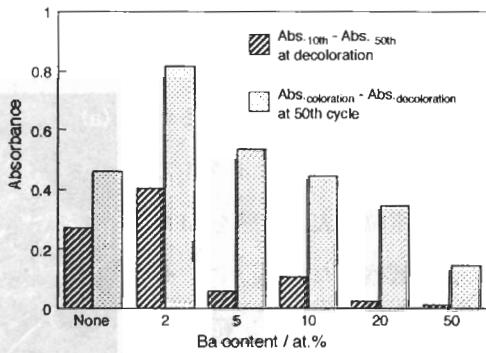


Fig. 5 Change in absorbance at 550 nm for Ba- $\text{Bi}_2\text{O}_3$  thin films driven at +1.2 and -2.0 V vs. SCE in 1M-LiClO<sub>4</sub>/PC.

そこで、最も特性のよかつた5%の酸化バリウムを添加した酸化ビスマス薄膜のCV変化と吸光度を調べたところ、酸化ビスマス単独膜に見られたようなサイクルに伴うカソードイック電流の大きな変動は見られず、ほぼ安定したCV特性を示すことがわかった(Fig.6)。また、Fig.7の吸光度変化からも酸化ビスマス単独膜のようなサイクルに伴う消色特性の劣化はほとんど見られなかった。

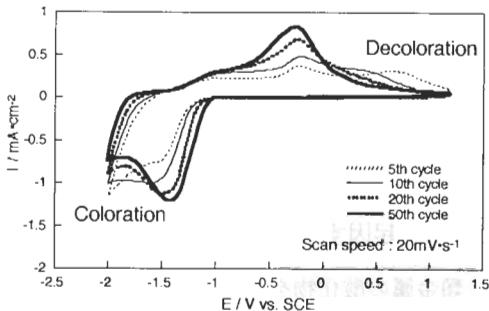


Fig. 6 Cyclic voltammograms of 5at% Ba-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> thin film.

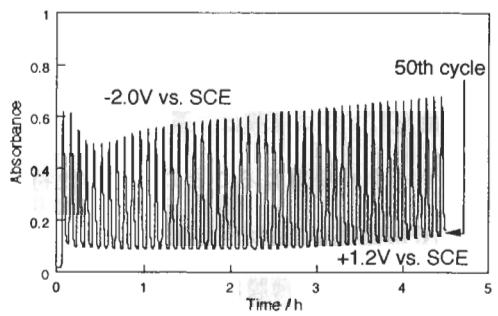


Fig. 7 Change in absorbance at 550 nm for 5at% Ba-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> thin film driven at +1.2 and -2.0 V vs. SCE in 1M-LiClO<sub>4</sub> / PC.

このように酸化バリウムを添加した系では、EC特性がかなり改善できることが明らかとなったが、この原因を調べるために50サイクル後のAFM観察を試みた。Fig.8に5%の酸化バリウムを添加した系のAFM像を示すが、Fig.3の酸化ビスマス単独膜の場合と比較すると、CVにより表面構造は変化するが、表面の粗さが小さいことがわかった。また、薄膜作製後のX線回折結果からは、300°C熱処理後の $\beta$ 型酸化ビスマスのピーク半値幅が酸化バリウムを添加することにより大きくなり、結晶組織の微細化が確認できた。

ここで、これまでの研究結果に基づいて酸化ビスマスのEC反応を推測すると以下のように考えられる。

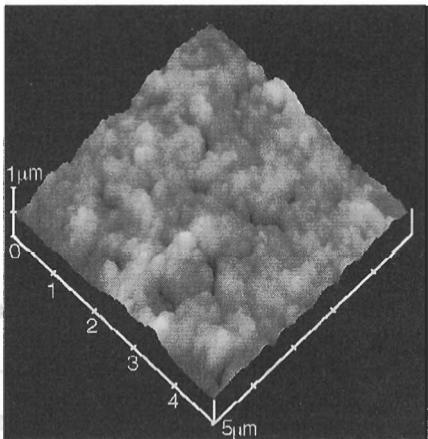
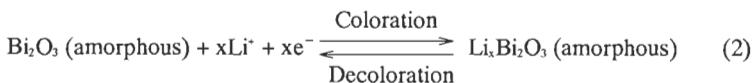


Fig. 8 AFM image of  $5 \times 5 \mu\text{m}^2$  surface of the 5at% Ba-Bi<sub>2</sub>O<sub>3</sub> film driven 50th cycle of coloration and decoloration.

酸化ビスマスは熱処理後に $\beta$ 型の結晶構造を有しているが、初期の分極においてアモルファス化することがわかっている。また、その後の分極ではアモルファス状態を経由して、Liイオンの注入・放出が起こると推測される。このとき、酸化バリウムを添加した酸化ビスマスでは、組織が微細化され、Liイオンの注入・放出がよりスムーズに行われると考えられる。

## 4. まとめ

本研究で得られた結果を以下にまとめた。

- (1) 酸化ビスマス薄膜は、還元時に黒褐色、酸化時に透明を示すEC特性を有しているが、サイクルを重ねることにより消色特性が劣化することが明らかとなった。これは、AFM観察の結果から表面の粒子が凝集することに起因すると考えられる。
- (2) 酸化ビスマス薄膜にアルカリ及びアルカリ土類金属の酸化物を添加したところ、5%の酸化バリウムを添加したとき良好な着消色特性が得られた。
- (3) 酸化バリウムを添加した酸化ビスマス薄膜は、酸化バリウムの添加により酸化ビスマスが微細化され、着消色に伴う凝集が抑制されると考えられる。そのため、Liイオンの注入・放出が起こりやすく、優れたEC特性が得られたと推測される。

## 参考文献

- [1] S. K. Deb, *Appl. Opt. Suppl.*, 3(1969)192.
- [2] C. G. Granqvist, *Solid State Ionics*, 53 ~ 59(1992)479.
- [3] S. Sato and Y. Kiyono, *Vacuum*, 24(1981)568.
- [4] S. Gottesfeld, J. D. E. McIntyre, G. Beni and J. L. Shay, *Appl. Phys. Lett.*, 33(1978)208.
- [5] K. Shimano, M. Suetugu, N. Miura, N. Yamazoe, *Solid State Ionics*, 113 ~ 115(1998)415.

# $(C_{10}H_{15}CN)_{0.8}(C_{10}H_{15}Cl)_{0.2}$ の $^{13}C$ -NMR による研究

九州大学大学院理学研究科凝縮系科学

小林 宏至, 町田 光男

## $^{13}C$ -NMR Study of $(C_{10}H_{15}CN)_{0.8}(C_{10}H_{15}Cl)_{0.2}$

Department of Physics and Chemistry of Condensed Matter, Graduate

School of Science, Kyushu University

Hiroyuki Kobayashi and Mitsuo Machida

Molecular dynamics of mixed compound  $(C_{10}H_{15}CN)_{0.8}(C_{10}H_{15}Cl)_{0.2}$  has been studied by means of high-resolution  $^{13}C$ -NMR. Spin lattice relaxation times ( $T_1$ ) of  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ - carbons of  $C_{10}H_{15}CN$  are analyzed by the Frenkel model based on six orientational tumbling and tilted uniaxial rotational motions.  $T_1$ 's of  $C_{10}H_{15}Cl$  are analyzed by the B. P. P. model. Activation energies of tumbling motion obtained for  $C_{10}H_{15}CN$  and  $C_{10}H_{15}Cl$  are 49.9 (2) and 48.1 (1) kJ/mole, respectively. Obtained activation energy of  $C_{10}H_{15}Cl$  is much greater than of pure substance.

## 1. はじめに

1-シアノアダマンタン( $C_{10}H_{15}CN$ : CN-adm)と1-クロロアダマンタン( $C_{10}H_{15}Cl$ : Cl-adm)は、 $T_d$ の対称性のアダマンタン( $C_{10}H_{16}$ )の1位の水素原子をそれぞれCN基と塩素原子で置換したものであり、共に $C_3$ の対称性を持っている。これらの物質には、空間群Fm3m( $Z=4$ )に属するプラスチック(P)相が存在し、この相では分子は重心をほぼ一定にして等価な配向間を飛び移る無秩序状態にある。

Cl-admには、P相と空間群P2<sub>1</sub>/c( $Z=4$ )に属する秩序(O<sub>cl</sub>)相が存在し、P相からO<sub>cl</sub>相への転移温度は240Kである。P相で存在する回転運動は、<001>の6配向運動(tumbling motion)と分子軸回りの回転(uniaxial rotation)であり、O<sub>cl</sub>相に転移するとtumblingは凍結し uniaxial rotationだけとなる[1]。また、O<sub>cl</sub>相における分子の配向はP相での<001>方向とほぼ一致している。一方、CN-admの場合は、P相を様々な温度にquenchすることができ、温度変化のさせ方により配向グラス(G)相を含むいくつかの相が出現することが知られている。例えば、P相から徐冷すると、立方晶に属する準安定(M)相を介して空間群C2/m( $Z=4$ )に属するO<sub>CN</sub>相に転移する(O<sub>CN</sub>相への転移温度は240Kである)[2]。ここで、O<sub>CN</sub>相での分子配向は、ほぼ<111>方向(P相の結晶軸を基準)となり、P相でのtumblingの方向(<001>方向)と異なっている[3]。

CN-admとCl-admは広い濃度域xで混晶(CN-adm)<sub>1-x</sub>(Cl-adm)<sub>x</sub>を形成する。特に、X<0.3の混晶に対しては、CN-admと同様な相図となることが知られている[4]。しかし、X=0.25の混晶の秩序(O<sub>M</sub>)相は、O<sub>CN</sub>相とは異なり、O<sub>cl</sub>相と同じ対称性を持っている。また、この混晶のG相はfragileとstrongの中間に位置し、CN-admよりstrongなグラスを形成すると言われている。本研究の目的は混晶とCN-admの相異を<sup>13</sup>C-NMRで調べることである。今回は徐冷の測定で得られたX=0.2の混晶の結果を報告する。

## 2. 実験

Aldrich社から購入したCN-admとCl-admをエタノールに解かし、再結晶させることで精製した。精製したCN-admとCl-admを8:2のモル比で再度エタノールに溶解させ、蒸発法により得られた混晶を測定試料とした。<sup>13</sup>C-NMR(76MHz)の実験はChemagnetics社のCMX-300を用いて行った。 $T_i$ はプロントデカップリングとMASを併用した反転回復法( $\pi - \tau - \pi/2$ )で測定した。なお、温度の制御は約±1Kを行った。

### 3. 結果及び考察

Cl-adm と CN-adm の分子構造を図-1に示す。これらの分子には、4つの非等価な炭素が存在し、それらを  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  炭素とする。

置換基は CN-adm の方が分子軸方向により細長くなっている。これに伴い分子間の相関(tumbling motion の相関)は CN-adm の方が Cl-adm より強くなる。実際、 $^1\text{H-NMR}$ ,  $^{13}\text{C-NMR}$  から得られた P 相の活性化エネルギーは CN-adm に対して約 50kJ/mole, Cl-adm に対して約 30kJ/mole である [1,2]。

P 相からの徐冷で測定した混晶の  $^{13}\text{C-NMR}$  スペクトルの温度依存を図-2に示す。P 相では、Cl-adm の  $\delta$  炭素のピークは重なっているが、それ以外の炭素のピークは互いに分離している。温度を低下させるとそれぞれのピークは broadening を起こし、233K付近で最も広幅なスペクトルとなる。しかし、スペクトルから M 相の存在を確認することはできなかった。

図-3 にスピン-格子緩和時間  $T_1$  の温度依存を示す。tumbling motion に由来する  $T_1$  の最小は約 400K ( $1000/T=2.5$ ) に現れている。CN-adm の  $T_1$  は温度の減少に伴い一旦増加し、 $\delta$  炭素を除外すると、290K ( $1000/T=3.4$ ) 付近で減少を開始する。この  $T_1$  の減少は uniaxial rotation によるものである。また、 $T_1$  の第 2 の最小が 210K ( $1000/T=4.8$ ) 付近に現れている。しかし、この混晶の場合は、直接  $O_{\infty}$  相に

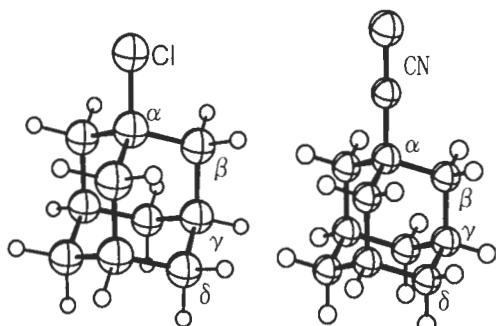


Fig.1 Molecular structures of Cl-adm and CN-adm. There are four non-equivalent carbons. They are denoted as  $\alpha$ -,  $\beta$ -,  $\gamma$ - and  $\delta$ -carbons.

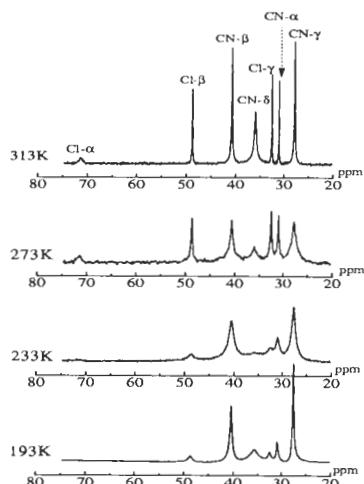


Fig.2 Temperature dependence of  $^{13}\text{C-NMR}$  spectra.

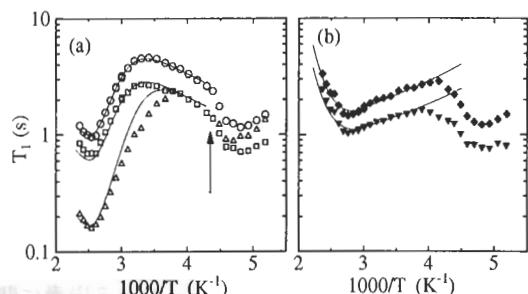


Fig.3 Spin lattice relaxation time  $T_1$  (s) vs  $1000/T(\text{K}^{-1})$ . Open and closed marks are  $T_1$ 's of CN-adm ( $\square$ :  $\beta$ ,  $\circ$ :  $\gamma$ ,  $\triangle$ :  $\delta$ ) and Cl-adm ( $\nabla$ :  $\beta$ ,  $\diamond$ :  $\delta$ ), respectively. Solid lines are calculated values ((a): Frenkel model, (b): B.P.P. model).

は転移しない ( $O_M$  相への転移が完了するのに長時間を要する) ので、 uniaxial rotation による  $T_i$  の最小とすることはできない。また、図中の矢印は P 相を 183K に supercool し、  $O_M$  相への緩和が完了した後、昇温で決定した  $O_M$  相から P 相への転移温度 (230K) を表す。従って、 230K 以上の温度で測定した P 相の  $T_i$  を解析した。

Quiroga と Virlet [5] は、分子軸の tumbling とその回りの uniaxial rotation を含む Frenkel モデルで  $T_i$  を解析することで、  $C_{10}H_{15}F$ ,  $C_{10}H_{14}O$  の P 相での分子運動を調べている。ただし、 $^{13}C$  核とプロトンの双極子相互作用による緩和を仮定している。この Frenkel モデルを CN-adm の  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  炭素の  $T_i$  に適用したが、あまり良いフィッティングの結果は得られなかった。そこで、分子軸の tilt と 6 配向の tumbling, 分子軸回りの uniaxial rotation に基づく Frenkel モデルで解析した [6]。このモデルによると、炭素  $C_\kappa$  の  $T_i$  は次のように表される。

$$\frac{1}{T_i^c(C_k)} = \frac{2}{3} M_2(C_k) \sum_{a=1}^6 \Psi_a(C_k) \left[ \frac{1}{3} L(\omega_c - \omega_H, \tau_a) + L(\omega_c, \tau_a) + 2L(\omega_c + \omega_H, \tau_a) \right]$$

$$L(\omega, \tau) = \frac{\tau}{1 + \omega^2 \tau^2}$$

$$M_2(C_k) = \frac{9}{20} \gamma_C^2 \gamma_H^2 \hbar^2 \sum_l \gamma_{kl}^{-6}, \quad \Psi_a(C_k) = \sum_l \psi_{akl}.$$

ここで、  $l$  に関する和は水素原子が結合した  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  炭素についてとる。 $r_H$ ,  $\omega_H$ ,  $\omega_c$  はそれぞれ C-H 結合距離 (1.09 Å), プロトンと  $^{13}C$  核の Larmor 角周波数である。滞在時間  $\tau$  の温度依存は次のアレニウス型を仮定した。

$$\tau = \tau_0 e^{E_a/kT}$$

ここで、  $E_a$  は活性化エネルギー,  $\tau_0$  は pre-exponential である。最小二乗による精密化では、  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  炭素の  $T_i$  を同時に精密化した。但し、分子軸の tilt と uniaxial rotation の  $\tau$  を同じと仮定した。図における実線 (CN-adm) は計算値を表す。CN-adm と Cl-adm の  $\delta$  炭素のピークはスペクトル上で重なっている。混晶における Cl-adm の比率は 0.2 であるので、ピークは全て CN-adm の  $\delta$  炭素によるものであるとした。 $\delta$  炭素の計算値と実測値のズレはこれに由来するものである。一方、Cl-adm では  $\delta$  炭素に関する情報が得られないで、B.P.P. モデルで解析した [7]。以上の解析から得られた滞在時間に関するパラメータ (活性化エネルギー  $E_a$ , pre-exponential factor  $\tau_0$ ) を表-1 に示す。

Cl-adm, CN-adm の tumbling の活性化エネルギーはそれぞれ 48.1(1), 49.9(2)kJ/mole であり, 純粋な CN-adm と同程度の値になっている。室温における CN-adm と Cl-adm の滞在時間はそれぞれ  $2.6 \times 10^{-10}$ ,  $1.1 \times 10^{-10}$ s である。また, 純粋な Cl-adm の tumbling の活性化エネルギーは約 30 kJ/mole であるので, 混晶中の Cl-adm が強い相関を持って tumbling していると考えられる。

Table1: Activation energies  $E_a$  (kJ/mole) and pre-exponential factors  $\tau_0$ (s).

	$\tau_0$ (s)	$E_a$ (kJ/mole)
<b>CN-adm</b>		
tumbling	$8.5(2) \times 10^{-15}$	49.9(2)
uniaxial rotation	$2.6(3) \times 10^{-10}$	7.5(3)
<b>Cl-adm</b>		
tumbling	$6.9(2) \times 10^{-15}$	48.1(1)
uniaxial rotation	$1.1(2) \times 10^{-10}$	7.9(2)

## 参考文献

- [1] J.P. Amoureaux, M. Bee and J.L. Sauvajol, Mol. Phys., **45**, 709 (1982).
- [2] J.P. Amoureaux, R. Decressain, M. Sahour and E. Cochon, J. Phys. II France, **2**, 249 (199).
- [3] M. Foulon, J.P. Amoureaux, J.L. Cavort and M. Muller, J. Phys. C: Solid State Phys., **17**, 4213 (1984).
- [4] J.F. Willart, M. Descamps, M. Bertault and N. Benzakour, J. Phys. Condens. Matter, **4**, 9509 (1992).
- [5] R. Decressain, J.P. Amoureaux and L. Carpentier, Mol. Phys., **73**, 553 (1991).
- [6] T. Ishino, 九州大学理学研究科修士論文 (1999).
- [7] N. Bloembergen, E.M. Purcell and R.V. Pound, Phys. Rev., **73**, 679 (1948).