

第1章 序論

1.1 はじめに

様々な技術の目覚ましい発展により、我々を取り巻く生活環境は日々変化している。いままでSF映画の世界で語られていたことが、実際の日常生活で身近に感じられるようになってきた。人間の持つ想像力とはどまるどころを知らず、常に新しい世界を築き上げようとしている。しかし近年、技術の進歩にも大きな変革が求められるようになってきている。これまでは大量生産・大量消費が前提にされてきたが、現代社会を支えている多くの技術についてすべてを理解しているのだろうか。今後は環境負荷を限りなく少なくする技術の実現が求められている。これを実現させるためには、たとえどんなに小さなことでも一つ一つ確実に理解することが必要であると思う。一つの技術が世に出るまでに長い時間を要するかもしれない、急激な進歩は望めないかもしれないが、それでも目の前にある事実の本当の意味を知ろうとする姿勢は人間にとって重要な行動ではないだろうか。

近年の著しい発展を遂げたエレクトロニクス、オプトエレクトロニクスを基盤として今日の情報化社会は成り立っている。物質のバルクの物性と反応の研究は成熟段階を迎えているが、その一方で走査型プローブ顕微鏡などの開発と進歩により、単一原子・単一分子を対象とした研究が可能となり盛んに研究が行われている¹⁾。そのため 21 世紀の大きな化学の目標として、バルクと単一原

子・単一分子の間をつなぐ数 nm からサブ μm の分子組織体の構築、化学機能を理解することが重要である。

材料科学をはじめ、情報通信(IT)、環境、生命工学などの分野でナノテクノロジーが注目を集めている²⁾。ナノテクノロジーは、ナノメートル程度の大きさの物質や構造に見られる特徴的な現象を基礎として、これまでになかった機能を持つ新しい材料やデバイスを作り上げる技術である。生態関連物質ではタンパク質分子、デオキシリボ核酸(DNA)などがナノ物質である。ナノテクノロジーの応用として、原子や分子を単位とした超微細電子デバイスや超小型ロボットの作製などが期待されている²⁾。

今後の更なる情報通信技術の進歩を実現するためには、さらに高性能、軽量、小型、低消費電力のデバイスが必要である。しかし従来のシリコン半導体集積回路の高集積化には物理的限界がある。そこで加工技術の限界を気にせずにデバイスを作製する方法として、有機分子に固有のスイッチング機能、あるいはメモリ機能を利用して電子デバイス化することが提案されている³⁾。このような分野は分子エレクトロニクスと言われており、生体機能と結びつけばバイオ素子である。個々の機能性有機分子を利用するだけでなく、それらを組み合わせた分子回路、相互に配線したデバイスの作製など拡大化による極限構造デバイスの設計が基本となる³⁾。また次世代の情報処理システムとして、高速で大容量の情報処理が可能となる 3 次元光デバイスの出現が望まれており、ナノテクノロジーはこれらの新しいデバイスを実現するために期待されている技術である²⁾。

分子素子の構築のためには、適切な機能分子の作製とともに、それを固定する技術、および素子の動作確認をする技術の確立も重要である。分子素子はまだ実現していないが、近年の有機超薄膜作成技術および走査型プローブ顕微鏡などの技術の発展は、原子・分子の固定化、操作および動作特性の評価を可能にすると期待されている⁴⁾。

1.2 固液界面におけるタンパク質の吸着

物質の表面は組成、構造、電子状態などバルクとは異なる挙動を示す⁵⁾。触媒作用、電極反応、吸着などの化学過程は、原子・分子レベルで起こる固体表面の化学反応であり表面原子・分子の構造・配列に依存しており、今後ますます表面の極微細構造の設計と制御が求められている。異なる相の間の界面に、いずれかの相の成分が濃縮される現象を吸着といい、潤滑、接着、濡れ、結晶成長、触媒作用などの他の界面現象すべてに関係している⁶⁾。近年の超高真空技術や固体表面解析技術の発展・開発によって、吸着現象をミクロな立場から調べることが可能となってきた⁷⁾。

分子素子を集合化し、相互間を電氣的に接続して回路を構成させるためには、分子を基板上に規則的に固定化しなければならない³⁾。基板は電氣的接続を考慮して金属板(金属蒸着膜も含めて)や半導体結晶が用いられ、その上にイオンビーム蒸着法、分子線エピタキシー法(MBE法)等の物理的手法、あるいはLB法等で有機分子の薄膜を構成する。このような分子膜は、分子素子となる機能性有機分子を選択的に吸着し、原子価結合し、基板上に固定化する役割をもつ。

電気化学センサーの選択性を向上させるために酵素などの生体分子が導入されたバイオセンサーが1960年代に登場した⁸⁾。しかし、生体分子を電気化学センサーに導入するには、生体分子の活性を損なわずに表面に固定化する必要があるためバイオセンサーの設計には生体分子の固定化法が重要である⁹⁾。生体分子を用いたセンサーは発光や吸光を伴う反応を利用することができ、さらに蛍光、燐光などのスペクトル変化パターンとして検出できることから新しい方式

のバイオセンサーのとしても期待されている⁹⁾。5-メチルピラゾール(MP)分子には2つの互変異性体があり、光励起によってエネルギー的に安定な構造から、励起状態を経て準安定な構造に異性化する。このとき光学的な吸収スペクトルあるいは振動スペクトルにわずかな差異が生ずるので、光学的に情報を書き込んだり読み出したりすることが可能である³⁾。光バイオセンサーは光電子倍增管やフォトダイオードの先端に直接生物素子を固定するか、または光ファイバーを介して固定化することにより、被測定物質との相互作用に基づく光学的変化を検出する仕組みになっている。ヘモグロビンの酸素吸着に伴うソーレー帯の光吸収変化などを利用した光バイオセンサーも報告されている⁹⁾。

細胞膜を生体内に近い状態で固体表面に固定できれば、細胞膜に含有されるタンパク質やチャンネルが持つ機能の利用や電極などの機能表面と組み合わせるなど、その応用の可能性は計り知れない¹⁰⁾。しかし生体外に取り出した生体分子の物性を、生体内と同一状態で測定することは困難である。そのためまだ明らかにされていない生体分子の電子機能を見出し、素子作りに役立てる方法には大きな期待が寄せられている⁸⁾。

生体分子の中でも、タンパク質分子は細胞の細胞質、細胞核、細胞膜の主要成分であり多様な生体機能を担っている。タンパク質分子を固定化するには、結合部位の制御、分子間相互作用などが影響すると考えられる。そのため固体表面へのタンパク質の吸着はさまざまな分野における重要な界面現象として注目されており、固液界面におけるタンパク質の吸着現象について多くの研究者が研究を行っている。

以下にいくつかの例を示す。

- 食品製造プロセスにおける製造設備への汚れの付着は深刻な問題である。しかし食品を構成する成分は複雑であるために、洗浄条件の確立は困難であると考えられる。汚れの付着の初期過程では有機高分子物質の固液界面への吸着が確認されている。そのため汚れの付着の初期過程をタンパク質の固液界面の吸着を用いて解明することが試みられており、汚れの付着を抑制できると期待されている¹⁾。
- 生化学の分野における材料表面に生体適合性を付与する技術では、材料表面と血液が接触するとはじめに血漿タンパク質の吸着が起き、次いで吸着したタンパク質を介して血液成分の活性化が起こることが知られている。そのためタンパク質の固体表面への吸着が生体適合性のメカニズムを解明する上でも重要な現象として注目されている^{11, 12)}。

人工材料表面に血液が接触すると血漿タンパク質が膜面上に吸着され、膜面上を覆った血漿タンパク層にはアルブミン、フィブリノーゲン(Fgn)、 γ -グロブリンが含まれているが、これらがどのように吸着しているかは人工材料の表面特性により左右される。従来的人工血管は6nm以上の動脈のみでしか利用できないため、その改善、改良が必要になっている。そのため天然の血管や埋入した人工血管と血液との接触表面を解明し、より分子設計的に材料を選択して合目的的に人工血管をデザインすることが重要となってきた¹³⁾。

膜が血液に接触すると必ずと言ってよいほど血液成分の付着が起こる。中でも血漿タンパク質と血球は膜のような人工材料に粘着しやすい性質をもっている。一般の高分子材料に対する血液成分の粘着(adhesion)に関する研究は多いが、膜材料に限定すると比較的少ない。血液濾過膜の Sieving Coefficient を

血液に存在する β_2 -ミクログロブリンについて求めようとしたところポリメチルメタクリレート膜では、このタンパク質が血液側からは消失していくが、濾液には検出できないことが見出されており、膜への吸着が示唆されている。膜型人工肺での付着を示した例は少ないが、例えばフィブリン網、赤血球の付着が報告されている。血液成分付着による透析性能劣化については研究例が少なく判然としないが、有形成分の単なる付着は透析性能にそれほど大きな影響をもたらすことはなく、吸着したタンパク質が変性して不可逆的に付着した場合には性能劣化が生ずるものと考えられている¹⁴⁾。

- 毒性のある化学種の分析などに疎水処理を行った表面が適用されているが、一方、生化学の分野においてもクロマトグラフィーを用いたアニオンとカチオンの分離などの固体表面へのタンパク質分子の吸着現象の基礎的な研究にも適用できることが見出されている¹⁵⁾。

しかし固体表面へのタンパク質分子の吸着については以下のようなことが指摘されており、固体表面に吸着したタンパク質分子についての情報を得ることは困難である。

- タンパク質分子は特異的な生理活性、分子識別機能を支える立体構造が界面で破壊されやすい¹⁶⁾。
- 多くのタンパク質分子は白金、金、カーボン、水銀などの電極と電子のやりとりを行わないと指摘されている¹⁶⁾。
- 疎水性表面への human fibronectin (HFN)の吸着についての報告では、試料溶液の濃度を徐々に増加させながら観察したときのタンパク質の吸着量は最終的な濃度で吸着させたときよりも低い¹⁷⁾。

- 時間の経過により安定な形態への変化など伴う¹⁸⁾。

そのため表面近傍におけるタンパク質分子の固体表面への吸着現象を解明するためには、表面近傍の微量物質を高い精度で測定できる有効な測定方法が重要になる。

1.3 表面・界面のその場測定方法

表面や薄膜は、厚さが数 μm から数 nm 程度というサイズにもかかわらず、触媒反応や電極反応など重要な機能を持つことが多い。しかし測定対象が微小サイズであるため、表面・界面・薄膜の構造や機能を測定するのは困難である。分子などマイクロなものは、サイズ自体は小さいが、多数集めることによってマクロな測定ができる。一方、表面や薄膜はマクロな系同士の界面にあるので、純粋なものを取り出して集めて測定することはできない¹⁹⁾。そのため表面・界面・薄膜の構造や機能を測定するためには、その場測定を行わなければならない。表面の吸着物質の状態や吸着量をその場測定する方法として、原子間力顕微鏡、ラマン分光法、表面プラズモン共鳴測定法、エリプソメトリー、水晶発振子マイクロバランス法などが知られている。以下にそれぞれの測定方法の特徴を示す。

- 原子間力顕微鏡(AFM)

走査型トンネル顕微鏡(STM)が導電性試料を対象としているのに対して、AFMでは試料の種類に制限がなく、測定試料に導電性を必要とせず、大気中だけでなく液体中、真空中などでも測定が可能である^{20), 21)}。そのためこれまでの各種顕微鏡に比べて測定環境の自由度が高いという特長を持ち、その応用は材料化学から生物学にわたる広範囲に及んでいる。AFMの測定原理はカンチレバーの先端に探針を設置した微小プローブで、表面をなぞるように走査して形状を観

察する(図 1-1)²²⁾。その際、プローブ先端にかかるたわみ量が一定になるようにプローブを制御する。

近年、固液界面電気現象や形成タンパク質分子同士の分子間相互作用、あるいは DNA の塩基対の相互作用の測定が報告されている²²⁾。しかし AFM 像はプローブの先端形状の影響を受けるため、どんなに先鋭化したチップを使用しても得られる画像のエッジには丸みが出てしまう。AFM では段差の大きな凸凹の激しい試料よりも、平坦な面に存在する微小な段差の検出と計測に最も威力を発揮する²²⁾。

● ラマン分光法

ラマン分光法は、分子に単色光を照射する際に起こる非弾性散乱光により、主として分子振動の振動数を知る分光法であり、水溶液中でも使うことができる²³⁾。図 1-2 にラマン散乱光の発生の模式図を示す。この方法で、コンホメーションなど多くの分子構造に関する情報を得ることができる。しかしラマン散乱の起こる確率(散乱断面積： $10^{-30}\text{cm}^2/\text{molecule}$)は、赤外吸収($10^{-20}\text{cm}^2/\text{molecule}$)に比べて著しく小さい²⁴⁾。そのため集光系・検出器を含めた分光系の高効率化および散乱断面積を何らかの共鳴効果により増強することで高感度化する必要がある。

表面増強ラマン散乱は、原子レベルの表面粗さを持つ金属や金属コロイド粒子の表面に吸着した分子のラマン散乱強度が、非吸着種と比較して $10^4\sim 10^6$ 程度増大する現象である²³⁾。表面増強ラマン散乱(SERS)分光法は表面が 10～数 100nm の大きな凸凹と 1nm 以下の小さな凸凹を持つ金属(金、銀、銅にほぼ限ら

れる)の表面に吸着した分子やイオンのラマンスペクトルを測定する方法で、溶液中に存在する物質のスペクトルが測定されず、表面に存在している物質のスペクトルが強く現れ表面から 1~2nm 位の距離にある物質のスペクトルしか検知されない^{23, 25)}。ラマン散乱の表面増強は、必ずしもコロイド粒子の凝集の程度には依存せず、孤立した粒子も強い表面増強に寄与する。また 1 個の分のみが吸着している粒子からもスペクトルは得られる²³⁾。

生体物質系への適用には、表面増強ラマン散乱の増強メカニズムの解明が非常に重要であり、化学的機構が支配的であれば表面での特性を解析できるし、電磁氣的機構が効果的であればタンパクの 3 次元構造などについての情報が得られる可能性がある。しかし表面増強ラマン散乱はマイクロな表面粗さを必要とするので、吸着サイトが規定される単結晶金属表面に対しては適用が困難である²³⁾。

- 表面プラズモン共鳴(SPR)測定法

表面プラズモン共鳴(SPR)測定法は装置が単純、液体中で測定できる、定量測定に向いている、感度が高いなどの特徴を有する²⁶⁾。表面プラズモンは金属の表面に立つ分極の振動の一種であり、電子線や光によって励起される(図 1-3)。また SPR 測定法は共鳴点を追跡することで得られる入射角度を指標とするため、光源の強度や、受光素子の感度の影響を受けにくい測定法になっている。SPR は局所的測定による金属表面の屈折率センサーであり、金属表面に化学修飾膜をつけて高機能化が図りやすいために化学センサーとして用いられている。表面に直接接触する部分がない化学反応や積層膜を構築するような場合でも反応

の進行状態を観測することができる。光源に近赤外光を用いると測定範囲は薄膜表面から数百 nm になる。SPR 測定は基板側からの観測法で液体試料を測定する場合は、光路が液体のバルク部分を通過しないのでバルクの吸収による影響が少ない。SPR で得られる情報は屈折率であり、分子の状態変化を精密に追跡するのとは異なり、抗体、タンパク質、DNA などの反応を検出し、その反応速度を測定するのに向いている。たとえば、DNA の一本鎖が合成酵素によって二本鎖に伸びてゆく様子がリアルタイムで測定されている²⁶⁾。

- エリプソメトリー

エリプソメトリーは、物質を透過した光、表面で反射した光の偏光状態から、物質の光学的性質を測定する偏光解析法である(図 1-4)。バルク、薄膜材料の光学定数(主に屈折率)および膜厚を非破壊で光学的に測定を行えること、その場測定が可能であることなどを利点としている^{27, 28)}。比較的厚い薄膜に対しては、測定値の解析理論が確立しているため、膜厚や屈折率を容易に算出できるようになっている。一方、単分子層から数分子層程度の物理吸着層への応用においては、測定された偏光解析パラメーターから測定対象の物理量(膜厚、屈折率、吸収率、分極率など)を一義的に導き出せる場合は少なく何らかの仮定が必要になることが多い²⁸⁾。また、表面状態、不純物、光学系の歪み、汚れなどの情報に敏感すぎるため注目する情報だけを取り出す工夫が必要である²⁸⁾。

従来のエリプソメトリーでは、回転検光子を数 10 ヘルツの回転周波数で変調させるために分光計測の制度に優れている反面、消光条件を求める際に時間を要することから表面反応などの実時間計測には不向きであると考えられてきた。

これに対し分光エリプソメトリーでは、光学変調デバイス(PEM)により $\omega = 50\text{kHz}$ に変調された ($\delta(t) = A\sin(\omega t)$) 楕円が形成され、数ミリ秒の分解能で振幅(ψ)と位相(Δ)を決定できるために、プラズマプロセスの表面反応などのその場測定が可能となった²⁷⁾。しかし実際に測定される光学定数は、バルクの成分のほか表面荒さ成分を含む擬似的な光学定数であるため、スペクトル解析によりバルク成分、表面ラフネス成分を各々分離しなければならない。

しかし水素化アモルファスシリコンの基板上への堆積初期過程で、ガラス基板上の成長では基板と体積シリコン膜との反応に基づく界面層が形成されるのに対して、Crなどの金属基板上では、島状に核形成-合体後、均質成長が観測されるなど、成長初期過程が基盤の種類に強く依存することが報告されている²⁷⁾。

- 水晶振動子マイクロバランス法(QCM)

水晶振動子を用いた回路の発振周波数は振動子表面に物質が付着すると、付着した物質の質量に比例して発振周波数が低下する。このとき周波数変化は通常6~7桁の精度で測定することができ、5~10MHzの振動子を用いればナノグラムオーダーの質量変化を検出することができる²⁹⁾。図1-5にQCMの模式図を示す。

電子機器の接点として多く使用されているAuの大気環境下での腐食特性を検討するには、Au表面上への水の吸着・脱離挙動が重要な課題とされ、QCM法を用いることにより容易に水の吸着・脱離特性のその場測定が可能である³⁰⁾。QCM法は屈折率や透過率の点で測定が困難な試料についても適用可能であり溶解速度を検討する上で有用な手段になるものと考えられている。

従来、溶液中において分子層オーダーの微小質量変化を定量できる適当な手法がなかったことから薄膜の溶液中での溶解特性の解析や、固液界面の反応系への導入が試みられている³⁰⁾。しかし水晶振動子の発振周波数は、付着層の質量だけでなく、粘弾性、温度、ストレス、振動子に接する流体との物理的および化学的相互作用など、さまざまな要因に影響を受けることが明らかになっている²⁹⁾。そのため正確な質量変化測定が行えるのは限られた条件下のみであることがわかってきた。液相系における測定では、発振周波数、共振周波数ともに大きく低下し抵抗値は大きく増加する。これは気相中では振動子のみが振動するのに対し、液相中では振動子付近の液体が振動子に引きずられて振動するため、振動子とともに振動する液体の質量が周波数の低下として反映される。また液体の振動により振動エネルギーが熱エネルギーに変化し損失する分が抵抗値の増加として反映される。液相系の測定では振動子とともに振動する液体の量は振動子表面の粗さや新媒性によって変化するため、周波数変化から性格に振動子の質量変化を求めるには抵抗値が変化しないことが必要条件である。水晶振動子の質量感度は電極の中央部ほど高く、辺縁部ほど低いことが報告されている²⁹⁾。電極全体の質量変化を平均して観測することはできないので、薄膜被膜電極の場合、均一な厚さを持つ膜を作製しなければならない。有機膜の場合は膜の粘弾性的性質のために正確な質量測定は困難である場合が多い。振動子とともに振動する溶液の量または粘性等が変化している可能性が報告されているため、単分子層レベルの超薄膜でも液相中では抵抗値の変化に注意しなければならない²⁹⁾。

1.4 スラブ光導波路を用いた表面のその場測定

以上述べてきたその場測定方法は、表面・界面をその場測定するためによく用いられている方法である。しかし分子の形状、質量、厚さ、屈折率といった物理的パラメーターを測定する方法は、形状の変化や酸化還元反応による組成の変化が予想され、タンパク質分子のような有機物質では測定条件の変化が影響を大きな影響を及ぼすと考えられる。またラマン分光法で得られるスペクトルは分子状態の情報を持つが、有機物から得られるラマンスペクトルはその帰属が困難であると予想される。

近年の光通信システムの発展による多様な光制御デバイスの需要から、小型集積化、信頼性、量産性に優れる光デバイスとして光導波路が注目されている³¹⁾。さらに光導波路を用いた測定方法は、上記のような困難を解決するその場測定方法としても注目されている。光導波路を用いた測定方法は、薄膜の構造モニタリングから表面反応のダイナミクス測定、さらには化学センサーなど幅広い応用が期待される手法である¹⁹⁾。

通常、光を用いる物質のセンシングの利点は、主に電気化学的な手法と比べて、以下のようなものが挙げられる³²⁾。

- (1)電磁気的なノイズに強い
- (2)防爆型である。
- (3)精密な定性測定が可能(特に赤外やラマン)
- (4)今後さらに発展するであろう光ファイバーシステムとのマッチングがよい。

これらに加えて光導波路では、装置をコンパクト化できる、高感度化できる可能性がある。

光導波路の代表としては光ファイバーが挙げられる。分析化学でも、近年光ファイバーの利用が急速に広まっており、光ファイバー化学センサーの開発が活発に行われている。光ファイバーを用いたセンサーとして、アミノ酸の超高感度検出に適用されているが、光ファイバーを蛍光検出法に適用した場合、光ファイバー自体が蛍光を発しそれが測定の妨害となるなど欠点もある。しかし光導波路を用いる最大の利点は、分光測定の空間的な制約が著しく緩和されることにある。高温、高圧、放射線など分光装置を持ち込めない雰囲気下、測定困難な微小部分、生体のその場の分光測定が可能となる³³⁾。

光を高屈折率の薄膜層内に閉じ込め導波させる光導波路もある。このような光導波路はスラブ光導波路(Slab Optical Waveguide : SOWG)と呼ばれ、1970年代前半から光集積回路の中心的な技術として本格的に研究が行われている。スラブ光導波路は透明な平面基板の上に基板よりも高い屈折率を持つ層(コア層)を設けたものである。この技術を界面や薄膜の分光測定に利用するのがスラブ光導波路法であり、1970年代後半から研究が行われている³³⁾。例えば、ガラス基板上に K^+ をドーピングして薄膜($n=1.51$)を導波層とし、 $SbCl_3$ をドーピングした SnO_2 フィルム($n=2.0$)でコートした光導波路電極(光路長 1cm)を用いて、電極表面に吸着したメチレンブルーの還元反応を吸光法によりモニターした場合、感度は通常法に比べ 20~40 倍高かったと報告されている³⁴⁾。

スラブ光導波路法では、光が表面の薄膜を導波するとき光はその波長程度表面から外部に漏れ出る。この光はエバネッセント波と呼ばれる。エバネッセン

ト波は導波路内を多重反射して導波していくので、導波路の界面の現象のみを極めて高感度に測定できる。モード選択などにより、ある程度選択的に目的領域のみに光を導波することができ、通常法で問題となる他領域からの光散乱、バックグラウンド吸収などの影響を最小限できる³³⁾。

スラブ光導波路のコア層、基板、クラッド層のそれぞれの屈折率 n_f , n_s , n_c が $n_f > n_s > n_c$ の関係にあるとき、スラブ光導波路内を光が伝播する(図 1-6)。コア層内に入射された光は、コア層内部で全反射しながら伝播していく。コア層内の光の伝播は内部全反射によるもので、コア層の厚さが光の波長と比較して十分大きいときは、コア層とクラッド層の屈折率比によって決まる臨界角以下の伝播角を持つ光が伝播する。一方、コア層の厚さが光の波長と比較して十分厚くない場合は、光の波動性により位相整合条件を満たす特定の伝播角を持つ光のみコア層内を伝播する。そのためコア層内を伝播する光は離散的な角度依存性(伝播モード)を示すようになる³⁵⁾。コア層の厚さがある程度厚い場合には、同時に複数のモードが存在し、更に厚い場合にはモードはほとんど連続的になる。逆にコア層の厚さが薄くなるに従い、モードは少なくなる。0 次のみの場合をシングルモード、複数のモードがあるときをマルチモードと呼ぶ。光導波路内での伝播モードは全反射の条件と位相整合条件から決定され、光導波路を計測に利用する場合重要である³⁵⁾。光導波路内を伝播する光のモードに関する詳細は解説書に詳しい³⁷⁾。

光導波路のコア層の外側にもれる光はエバネッセント波と呼ばれており、導波路を用いた光計測では特に重要である。エバネッセント波の強度はコア層の表面から離れるにしたがって急激に減少する³⁸⁾。エバネッセント波は導波路の

コア層内を内部反射した光がコア層表面にしみ出したものであり、通常の光と同様に物質との相互作用がある。エバネッセント波は表面から 100nm～数 100nm の範囲で染み出すといわれている。このためコア層表面に置いた試料物質がエバネッセント波を吸収すると、界面近傍の選択的な光吸収測定が可能となる。

スラブ光導波路法は、現在開発中の手法だが、界面における超微量物質の挙動を高感度にその場測定する新しい手段として注目されている。

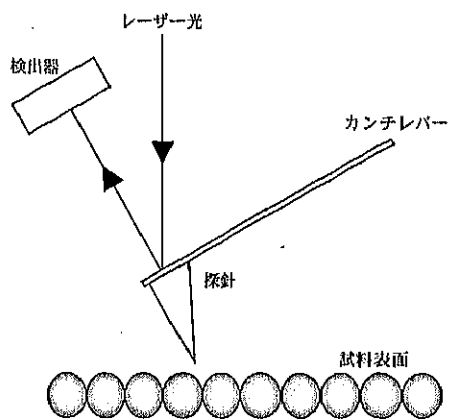


図 1-1 AFM のカンチレバーの模式図

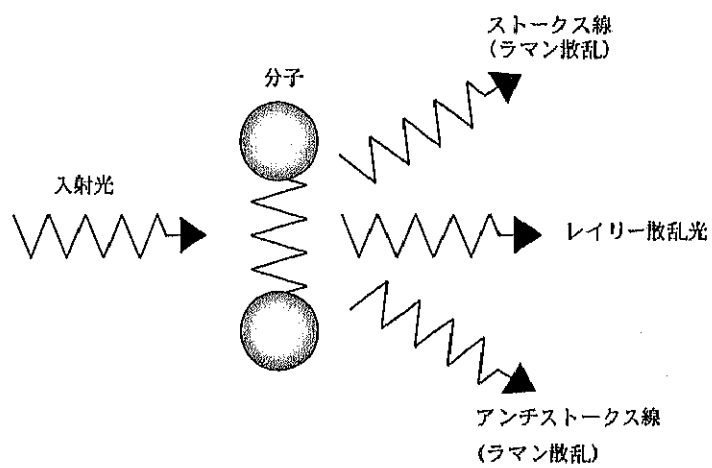


図 1-2 ラマン散乱の発生

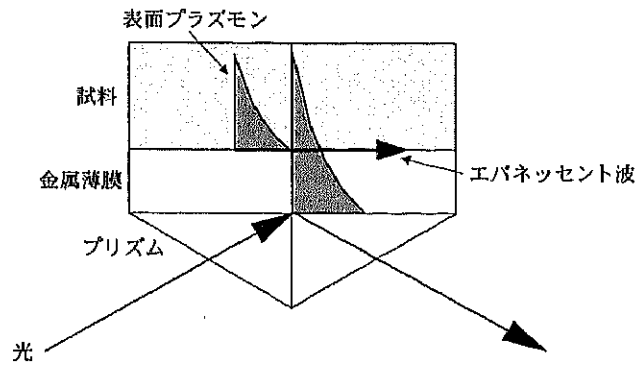


図 1-3 表面プラズモン共鳴現象の原理

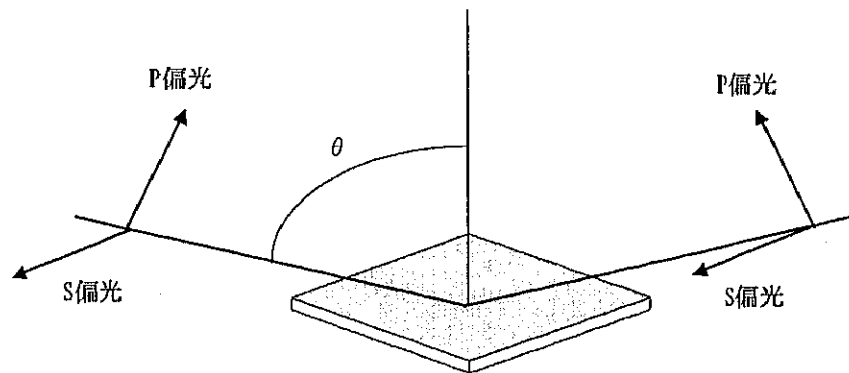


図 1-4 表面で反射した光の偏光状態

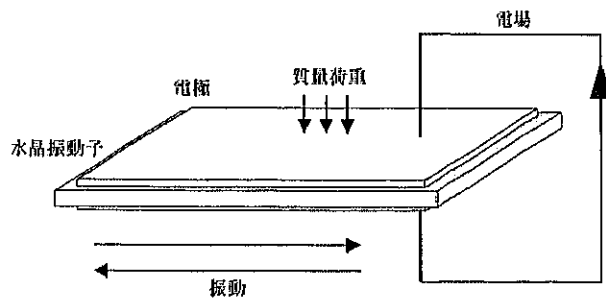


図 1-5 水晶振動子マイクロバランスの模式図

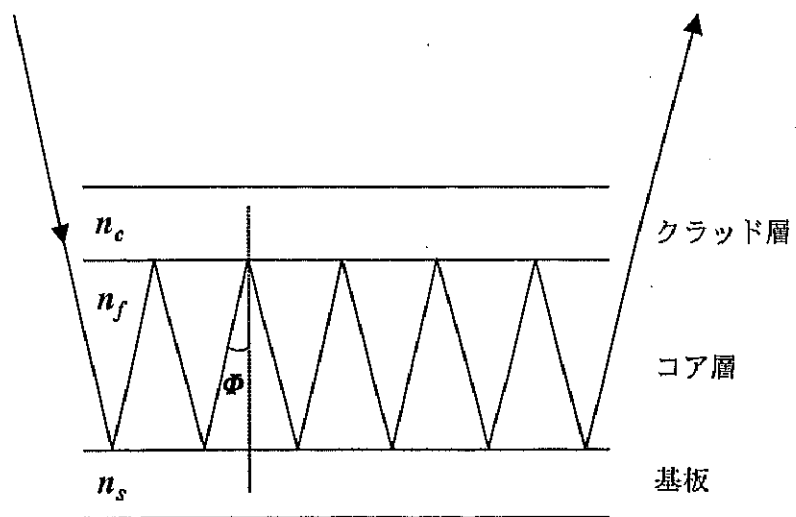


図 1-6 スラブ光導波路内を伝播する光の内部全反射

1.5 スラブ光導波路分光法

スラブ光導波路を利用した分光法がスラブ光導波路分光法である。スラブ光導波路分光法は、光源に広い波長範囲の白色光源を利用し、導波路表面に存在する物質の吸収スペクトル測定が可能である。

スラブ光導波路分光法はスラブ光導波路のコア層の上に試料を置き、導波路表面付近に吸着した試料のエバネッセント波の吸収スペクトルを測定する方法である。スラブ光導波路分光法には従来の光導波路法に加えて、光源に用いる光の波長域が紫外・可視領域に渡る広範囲であること、さまざまな光学材料を利用できること、内部反射素子として非常に薄いコア層を導波路として用いることができるなどの特徴がある^{35, 38)}。

本来、波長範囲の広い光源からの光を入射するためには各波長ごとに異なる入射角で光導波路に入射させなければならない。これはコア層の厚さが光の波長と比較して十分厚くない場合は、位相整合条件を満たす伝播角を持つ光だけがコア層内を伝播できるためである。そのため入射させる光の波長ごとに、入射角を調整しなければならない。しかし本研究室では光源からの光を凸レンズで集光して光導波路内に入射させることにより、ある入射角で光を同時に入射できる方法を見出した^{35, 38)}。この方法により適当な入射角度と光路長を選択することにより簡単に波長範囲の広い光源からの光を非常に薄いコア層内に導入することが可能となった。

以下にスラブ光導波路分光法による吸収スペクトルの測定例を示す。

スラブ光導波路をラングミュアプロジェクト(LB)膜の製膜基板とし、基板であるスラブ光導波路の片側に LB 膜をつけて、LB 膜のある部分とない部分の比から吸収スペクトルが測定されている。LB 膜はアラキシン酸 Cd を主成分とするもので、1.5mol%の色素(ポルフィリン銅錯体)を混合したものを利用しており、得られた吸収スペクトルの 400 及び 420nm 付近に LB 膜内で会合体を作っているために分裂したポルフィリンの 2つの吸収ピークが観察された³⁵⁾。

ローダミン 6G を用いた例では、透過法により得られる吸収スペクトルではモノマーの吸収ピークのみが観察されるが、スラブ光導波路分光法により得られた吸収スペクトルでは測定時間の増加とともにモノマーとダイマーの吸収ピークが観察され、表面近傍ではモノマーとダイマーが共存していることが示唆された³⁶⁾。さらに Octadecylsilane(ODS)により疎水処理をしたスラブ光導波路ヘローダミン 6G を吸着させたときに得られる吸収スペクトルは、モノマーの吸収ピークのみが観察され表面の状態が固液界面における化学種の吸着に大きな影響を与えていると考えられる³⁶⁾。

このように光源を従来の光導波路法のレーザーなどの単色光から白色光に置き換えたことにより、スラブ光導波路分光法では表面に吸着した物質の吸収スペクトルをその場測定することが可能となった。光の吸収は物質の形状などの物理的パラメーターに依存しないため表面近傍に吸着した物質を選択的に観察することができ、得られる吸収スペクトルから物質の化学状態に関する情報も得ることができる。スラブ光導波路分光法で観察している吸収スペクトルの強度は表面に吸着している物質の吸着量に依存している。しかしスラブ光導波路分光法では光源に幅広い波長の光を利用しているため、得られる吸収スペクトル

ルは様々な波長領域の情報を含み、得られる吸収スペクトルには複数の化合物や物質の状態変化の情報などが含まれる。そのため固体表面に吸着したタンパク質の吸着量を見積もるだけでなく、吸着したタンパク質の形態変化などの定性的な検討が可能である。

そのためスラブ光導波路分光法は、これまで測定困難であったタンパク質分子の表面への吸着のその場測定に適していると考えられる。

1.6 スラブ光導波路表面へのタンパク質分子の吸着

我々の研究室では代表的なタンパク質であるミオグロビン、チトクローム *c*、ヘモグロビンのスラブ光導波路表面への吸着現象について検討を行っている。ヘモグロビン、ミオグロビン、電子伝達に関与するシトクロム類は代表的なヘムタンパク質として知られている^{39, 40)}。図 1-7 にヘモグロビンの構造とサブユニットの化学式を示す。

ミオグロビン、チトクローム *c*、ヘモグロビンを 2 種類の方法で光導波路表面に吸着させて吸光度を測定した。

①：試料溶液の濃度を 5 μM 、20 μM 、100 μM 、500 μM と徐々に増加させて吸着させたとき

②：20 μM 、100 μM 、500 μM の濃度の試料溶液を直接吸着させたとき

その結果、ミオグロビン、チトクローム *c* の場合は①と②の方法によって得られる最終的な吸光度は異なった。しかしヘモグロビンの場合は①と②のどちらの方法でヘモグロビンを導波路表面に吸着させてもほぼ同じ吸光度を示した(図 1-8)⁴¹⁾。

また溶媒としてリン酸バッファー溶液と純水を用いて試料溶液を調整して、最終的に 500 μM の濃度になるように試料を導入させたときの吸光度の変化を観察した。このときミオグロビン、チトクローム *c* では純水を溶媒として調整した試料溶液のほうが、リン酸バッファー溶液を溶媒として調整した試料溶液を用いたときよりも高い吸光度を示した。さらに試料溶液の濃度を 200 μM としても吸光度の変化はあまり観察されなかった。一方、ヘモグロビンの場合では

リン酸バッファー溶液を溶媒として調整した試料溶液のほうが、純水を溶媒として調整した試料溶液を用いたときよりも高い吸光度を示し、リン酸バッファー溶液を溶媒として調整した試料溶液では試料溶液の濃度の増加とともに吸光度も増加していった(図 1-9)⁴¹⁾。

タンパク質は軟らかい球状であるが、固体表面へ吸着すると形態が変化するとされている^{18, 40, 42)}。溶液中で球状を維持していたタンパク質が固体表面に吸着すると楕円状に幅が広がると仮定する(図 1-10)。その結果、単位面積あたりに吸着できるタンパク質が減少するため、観察される吸光度に違いが出ると予想される。ミオグロビン、チトクローム *c* で観察された傾向は、吸着したタンパク質の形態が変化したために吸光度に違いが出たとも考えられる。しかしヘモグロビンではミオグロビン、チトクローム *c* とは異なる吸着挙動が観察された。これはヘモグロビンの固体表面への吸着は、吸着したタンパク質の形態変化の影響が少ない吸着過程を示すと推察される。そのためヘモグロビンの固体表面への吸着を観察することは、固体表面へのタンパク質の吸着現象に関するより多くの知見が得られると考えた。

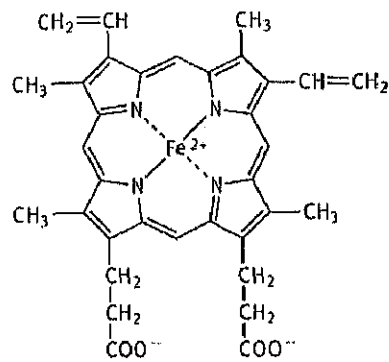
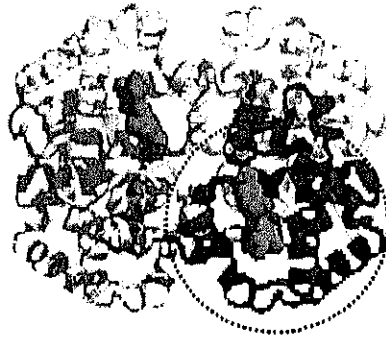


図 1-7 ヘモグロビンの構造

上：ヘモグロビンの構造

下：点線で囲まれたヘモグロビンのサブユニットの化学式

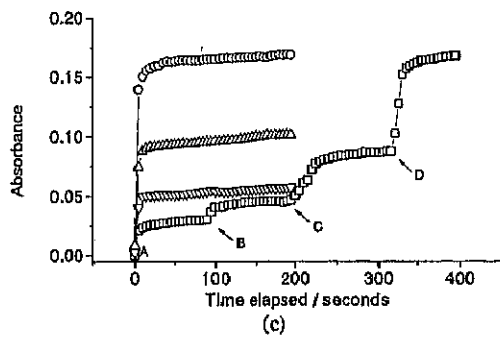
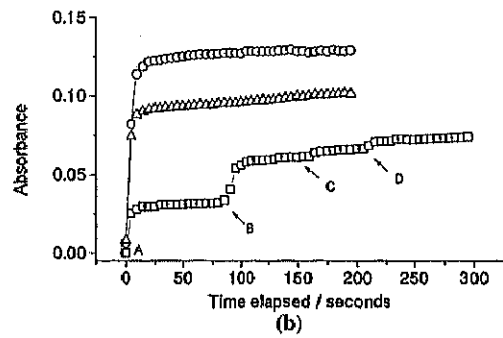
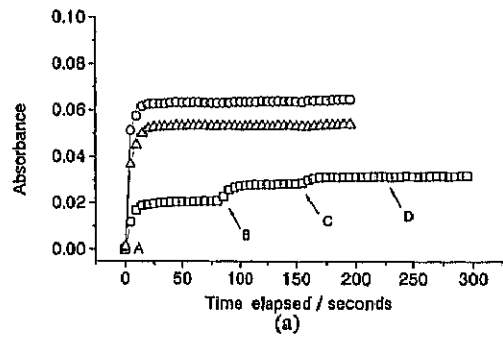


図 1-8 2 種類の異なる方法で試料をスラブ光導波路表面に導入したときの測定時間に対する吸光度の変化を比較したもの (□: 試料溶液の濃度を徐々に増加させて導入したとき; A: 5 μ M, B: 20 μ M, C: 100 μ M, D: 500 μ M、任意の濃度の試料溶液を直接導入したとき; ∇ : 20 μ M, Δ : 100 μ M, \circ : 500 μ M, 試料溶液はリン酸バッファー溶液で調整)

- (a) チトクローム c
- (b) ミオグロビン
- (c) ヘモグロビン

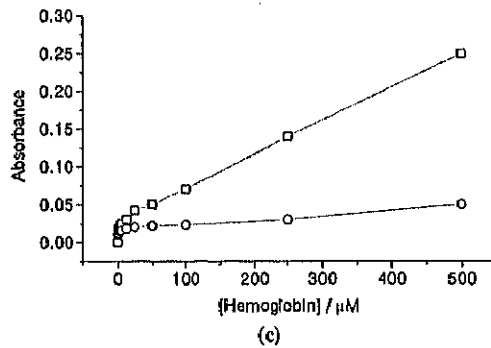
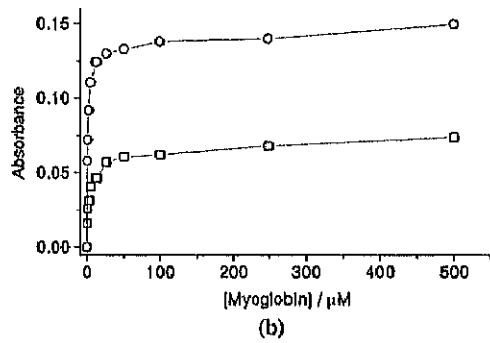
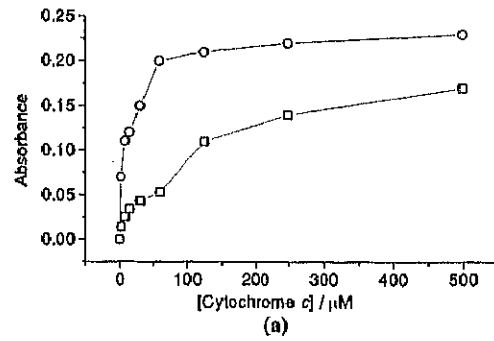


図 1-9 試料溶液の濃度に対して吸光度をプロットしたもの (□:リン酸バッファー溶液を溶媒として調整したとき、○:純水を溶媒として調整したとき)

(a) チトクローム *c*

(b) ミオグロビン

(c) ヘモグロビン

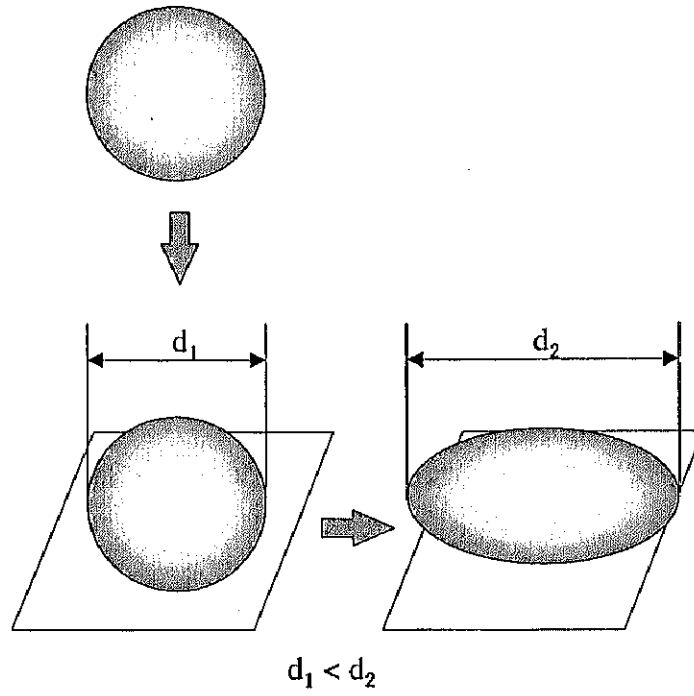


図 1-10 表面に吸着したタンパク質の形態の変化

1.7 本研究の目的

石英ガラスやガラス薄膜は、加工しやすく電極などを付加しやすいことから多くの分野で使用されている。そのため生体内からとりだしたタンパク質の石英ガラスやガラス薄膜の表面への吸着現象を解明することは、タンパク質の性質の基礎的検討やその機能を応用したセンサー等を実現するために大きく寄与すると考えられる。

我々の開発したスラブ光導波路分光法は紫外から可視の広い波長範囲の光を同時に伝播させる事が可能で、界面に極微量だけ吸着した物質の吸収スペクトルのその場測定を行うのに特に適している⁴³⁻⁴⁹⁾。

本研究ではヘモグロビンの固体表面への吸着に注目し、スラブ光導波路分光法を用いて吸収スペクトルのその場測定を行い以下のことを明らかにすることを試みた。

- (1) : 表面状態がヘモグロビンの吸着に及ぼす影響
- (2) : 表面に吸着したヘモグロビンの機能
- (3) : ヘモグロビンの固体表面への吸着過程の理論的解明