

第3章 結果と考察

3.1 タンパク質の吸着

3.1.1 石英表面への吸着

石英ガラス(26 mm×50 mm、アトック)を用いてスラブ光導波路を作成しヘモグロビンの石英表面への吸着挙動を観察した。測定に使用した試料は 50 μ M のヘモグロビン溶液で溶媒には pH7.0 のリン酸バッファ溶液を用いた。実験に用いた石英ガラスは表面を octyltrichlorosilane (OTS)で処理したものとし、ないものを用意した。以下、表面処理をしていないものを Bare-SOWG、OTS で処理したものを OTS-SOWG と記す。

ヘモグロビンの Bare-SOWG 表面及び OTS-SOWG 表面への吸着挙動を観察した。吸収スペクトルの測定条件は照射時間 50 ms で 20 回照射して平均した値を 5 秒おきに測定値として記録することを 50 回続けて行うことによって吸収スペクトルの変化を測定し、得られた値から測定時間に対する吸光度の変化を得た。

図 3-1 に Bare-SOWG 表面、OTS-SOWG 表面へのヘモグロビンの吸着挙動を測定した結果を示す。Bare-SOWG 表面、OTS-SOWG 表面いずれの場合でもヘモグロビンの吸収スペクトルのピークは 410 nm 付近に現れた。これは文献値とほぼ一致している⁵¹⁾。吸収ピークの位置が OTS で表面処理したもののほうがわずかに(1~2 nm)に高波長側に現れる傾向があった。これは導波路表面に OTS 層が生成したために屈折率が若干変化したためと考えられるが、吸収ピークの形状やヘ

ヘモグロビンの吸収ピーク以外のピークは観察されなかったことから、OTS による表面処理はヘモグロビンの表面への吸着挙動にほとんど影響ないと考えられる。

図3-2には410 nmの吸光度の値を測定時間に対してプロットしたものを示す。図3-2から Bare-SOWG 表面を用いたときの吸光度は、測定開始からはじめの数分程度の間上昇しその後はほぼ一定の値を示すことが分かった。このことから Bare-SOWG 表面へのヘモグロビンの吸着は測定開始から数分以内に行われ、吸着したヘモグロビンは安定して表面に吸着していると考えられる。一方、OTS-SOWG 表面を用いたときの吸光度は、測定開始からはじめの数分程度の間大きく上昇しその後もわずかに吸光度が増加していくことが分かった。

以上の結果から OTS-SOWG 表面へのヘモグロビンの吸着は、Bare-SOWG 表面へのときとは異なる挙動を示す。ヘモグロビンの Bare-SOWG 表面への吸着では測定を開始して2~3分以内に吸光度の増加が終了し、その後は一定の吸光度を示すが、OTS-SOWG 表面への吸着では測定時間の経過に伴って吸光度もわずかに増加していくことから表面の状態がヘモグロビンの吸着挙動に大きく影響していることが分かった。また吸光度の値は OTS-SOWG を用いたときのほうが Bare-SOWG を用いたときよりも大きな値を示した。石英ガラスを用いたスラブ光導波路ではOTS溶液で表面を処理したOTS-SWOGのほうがBare-SOWGよりもヘモグロビンが吸着しやすい傾向があることが明らかとなった。

吸着したヘモグロビンの量を見積もるために測定前後の試料溶液を透過法による吸収スペクトルの測定から計算した。OTS-SOWG 表面にヘモグロビンを吸着させ5秒おきに50回測定した後(250秒経過後)にセル内から試料溶液を取り出

しこれを測定後の試料溶液とした。吸収スペクトル測定後の試料溶液では OTS-SOWG 表面上に吸着した分だけヘモグロビンの濃度が減少している。透過法によって得られた吸収スペクトルを測定し吸光度の減少分を試料溶液の濃度の減少分として OTS-SOWG 表面に吸着したヘモグロビンの量を見積もった。

試料溶液の濃度減少分をすべて OTS-SOWG 表面への吸着分とし、ヘモグロビン分子一個の大きさを直径 7 nm の球と仮定して単分子層吸着を考えるとスラブ光導波路表面にヘモグロビン分子が 2.6×10^{12} [個/cm²] 吸着する。濃度減少分から計算したところヘモグロビンの吸着量はほぼ単分子層程度であった。OTS-SOWG を用いたときのほうが Bare-SOWG を用いたときよりも吸光度は大きい値を示したので、いずれの場合でもヘモグロビンの吸着は単分子層程度であると考えられる。

Bare-SOWG では測定開始から数分で吸着は終了し、一方 OTS-SOWG では測定開始から数分で急激に吸光度が増加しその後は緩やかに吸光度が増加していくことから初期の吸光度が急激に増加する部分とその後続く吸光度の緩やかな増加は異なる吸着挙動をしめす 2 段階からなる吸着挙動であると考えられる。

そこで OTS-SOWG を用いて吸収スペクトルの変化を 1 時間以上にわたって観察した。図 3-3 に示したのは OTS-SOWG 表面に 50 μM ヘモグロビン溶液を吸着させたときの 410 nm 付近の吸光度の変化を 1 時間程度観察し測定時間に対してプロットした結果である。図 3-2 に示した様に測定開始から初期の数分で吸光度は急激に増加し、その後もゆるやかに吸光度は増加していく。さらに測定開始から 1 時間以上経過しても吸光度はわずかながら増加しつづけていた。

一方、ODS で表面処理を施したスラブ光導波路を用いてチトクローム *c* の吸

着を観察した報告では、表面を ODS で処理したか処理していないかによらず同様の吸着挙動を示すが、ODS 処理表面の方が未処理表面のときよりも吸光度は低い値を示し、吸着量は少ないと考えられる⁵²⁾。しかしヘモグロビンの場合は、表面を OTS 処理した OTS-SOWG を用いる方が Bare-SOWG を用いるときよりも吸着に要する時間はかかるが吸光度は高い値を示すため吸着量は高いと考えられ、これはチトクローム *c* の結果と異なる。そのためタンパク質の吸着プロセスを理解するためには、表面状態およびタンパク質自体の構造もあわせて検討する必要があると思われる。

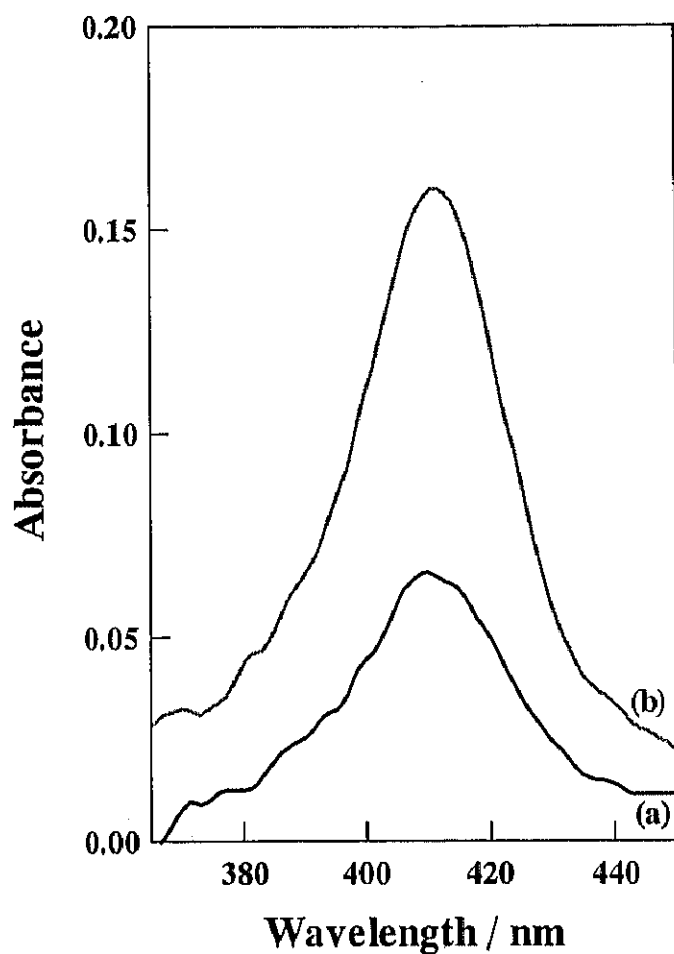


図 3-1 スラブ光導波路(SOWG)を用いた 50 μM ヘモグロビン溶液の吸収スペクトル (測定条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した吸収スペクトルを 5 秒おきに 50 回測定)

(a) : 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b) : 10%(v/v)の octyltrichlorosilane (OTS)溶液により 1 分間表面の疎水処理を行った SOWG (OTS-SOWG)

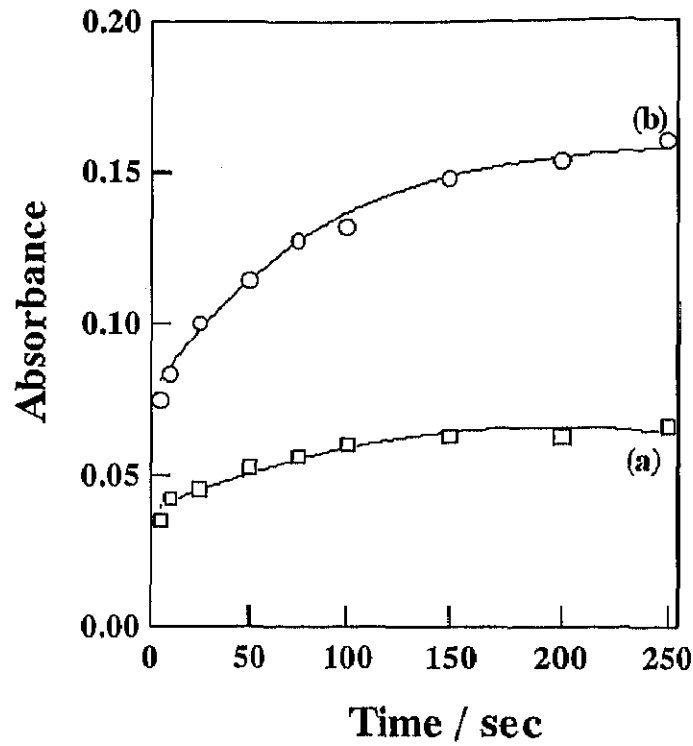


図 3-2 スラブ光導波路(SOWG)を用いた 50 μM ヘモグロビン溶液の吸光度の経時変化 (測定条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した吸収スペクトルを 5 秒おきに 50 回測定を行い、410 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値を測定時間に対してプロットした)

(a) : 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b) : 10%(v/v)の octyltrichlorosilane (OTS)溶液により 1 分間表面の疎水処理を行った SOWG (OTS-SOWG)

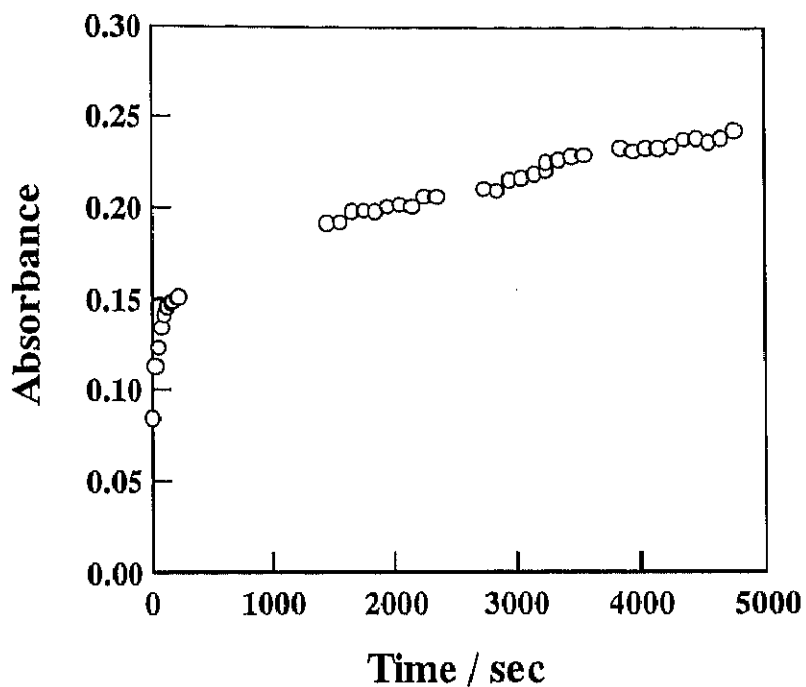


図 3-3 ヘモグロビンの吸光度の時間依存性

10%(v/v)の octyltrichlorosilane (OTS)溶液により 1 分間表面の疎水処理を行ったスラブ光導波路(OTS-SOWG)を用いて、50 μ M ヘモグロビン溶液の吸光度の変化を約 1 時間観察し、410 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値を測定時間に対してプロットした

3.1.2 表面状態の及ぼす影響

3.1.1 章の結果からヘモグロビンは、親水性の表面よりも疎水性の表面により選択的に吸着する性質を持っていると考えられる。そのため OTS 溶液による表面処理が吸着挙動にどのような影響を及ぼすかをより詳細に検討するために、表面処理に用いる OTS 溶液の濃度や処理時間を変えたときのヘモグロビンの吸着と表面の状態について観察した。試料溶液として pH7.0 のバッファー溶液を溶媒とした 50 μ M ヘモグロビン溶液を用いた。

OTS 処理の処理溶液の濃度と処理時間を変化させて表面処理を行った。以下、表面処理を行っていないスラブ光導波路を Bare-SOWG、1%の OTS 溶液で 10 秒表面処理をしたものを 1%-OTS-SOWG-10sec、1%の OTS 溶液で 60 秒表面処理をしたものを 1%-OTS-SOWG-60sec、10%の OTS 溶液で 10 秒表面処理をしたものを 10%-OTS-SOWG-10sec、10%の OTS 溶液で 60 秒表面処理をしたものを 10%-OTS-SOWG-60sec と記す。

一般にシラン化合物による処理は表面を疎水性にすることが知られている¹⁵⁾。表面処理の効果を客観的に評価するための尺度として表面の水濡れ特性を調べた。図 3-4 にスラブ光導波路表面の接触角と吸光度の関係を示す。吸光度の測定は照射時間 50ms で 20 回照射して平均した値を 5 秒おきに 50 回(250 秒)記録した。図中に示した吸光度は測定開始から 250 秒後の 410 nm の値である。

OTS で表面を処理することで表面の接触角が大きく増加しており、OTS 溶液の濃度が濃いほうがより大きい接触角を示すので表面の状態はより疎水性を増すことが確認された。しかし 1%-OTS-SOWG-10sec と 1%-OTS-SOWG-60sec のよ

うに表面処理の時間を 10 秒から 60 秒に変化させても接触角には違いがほとんど見られなかった。これは 10%-OTS-SOWG の場合も同様であった。接触角は処理時間よりも処理溶液の濃度に大きく影響を受けることが分かった。

一方、吸光度の値は OTS で表面処理したほうが高い値を示し、接触角で見られた傾向と同様に OTS 溶液の濃度が高いほうがより高い吸光度を示した。さらにスラブ光導波路分光法による吸光度の測定では OTS 溶液の処理時間による吸光度への影響を観察することができた。接触角の測定では処理時間の影響は見られなかったが、吸光度の測定では OTS 溶液の濃度が同じ時は処理時間が長いほうがより高い吸光度を示すことが分かった。

1%-OTS-SOWG-60sec と 10%-OTS-SOWG-10sec を比較すると、接触角は OTS 溶液の濃度が濃い 10%-OTS-SOWG-10sec の方が大きい値を示すが吸光度はほぼ同じ値を示した。OTS 溶液の濃度処理時間を変えて表面処理を行った結果 OTS 溶液の濃度が濃く処理時間も長い方がより高い吸光度を示す傾向があることが分かった。

Joey らはタンパク質の表面への吸着にはタンパク質自体の等電点や表面の電荷が大きく影響していると報告している⁵²⁾。そのため 1%-OTS-SOWG-60sec と 10%-OTS-SOWG-10sec を用いたときに吸光度がほぼ同じ値を示したのは、試料と導波路表面の電気的相互作用が大きく影響したものと考えられる。Krishna らはトルエンを溶媒に用いた場合、完全に OTS の単一層が生成するには約 90 分かかると報告している¹⁵⁾。10 秒、60 秒ではスラブ光導波路表面に OTS 単一層は生成されていないと考えられるが、スラブ光導波路表面への OTS 層の生成がヘモグロビンの吸着挙動に大きく影響していることが考えられる。

吸光度は表面処理を行うことによって増加する傾向があることから、ヘモグロビンの吸着量は OTS 溶液の濃度、処理時間の両方に依存していることが分かった。

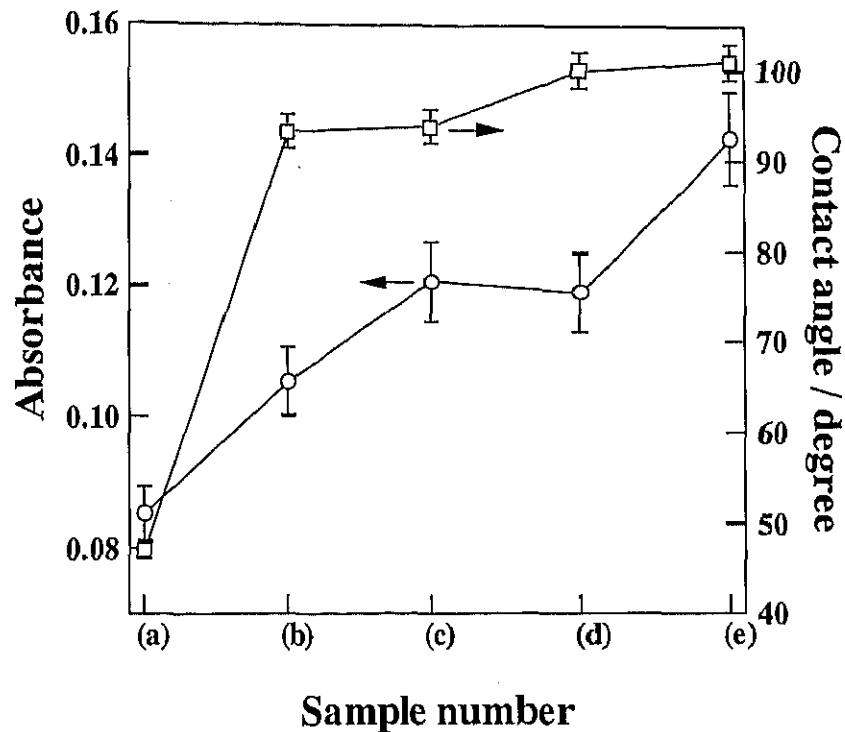


図 3-4 octyltrichlorosilane (OTS)によるスラブ光導波路(SOWG)表面の吸光度と接触角の関係 (吸光度は測定開始から250秒後の410 nm付近の吸収スペクトルのピーク値を示した。接触角は導波路作成直後に測定した値)

(a) : 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b) : 1%(v/v)OTS 溶液による表面処理を10秒間行った SOWG (1%-OTS-SOWG-10sec)

(c) : 1%(v/v)OTS 溶液による表面処理を60秒間行った SOWG (1%-OTS-SOWG-60sec)

(d) : 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を10秒間行った SOWG (10%-OTS-SOWG-10sec)

(e) : 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を60秒間行った SOWG (10%-OTS-SOWG-60sec)

3.1.3 機能についての検討

表面に吸着したヘモグロビンの安定性を調べるためにヘモグロビン吸着後のスラブ光導波路から試料溶液を取り除き、溶媒であるリン酸バッファー溶液のみをスラブ光導波路セルに満たして吸光度の測定を繰り返した。

試料溶液として 50 μM のヘモグロビン溶液を用いて 5 秒おきに 50 回(250 秒)測定した後、スラブ光導波路セルから試料溶液を全て取り除き pH7.0 のリン酸バッファー溶液をスラブ光導波路セル内に満たして同様に 5 秒おきに 50 回(250 秒)測定した。この操作を 2 回繰り返し合計 4 回(1000 秒)の測定を行った。

pH7.0 のリン酸バッファー溶液を用いたのは、ヘモグロビン溶液の溶媒なので溶液を取り替えたときにリファレンスの吸収スペクトルは変わらずヘモグロビンの吸着のみを観察できると考えたからである。なおスラブ光導波路には 10%-OTS-SOWG-60sec を用いた。

図 3-5 に 4 回(合計 1000 秒)測定した結果を示す。これまでの結果と同様にヘモグロビンは測定開始から数分以内で吸光度が急激に増加した。その後、スラブ光導波路セルよりヘモグロビン溶液を全て取り除きリン酸バッファー溶液を入れて続けて吸光度の測定を行った。リン酸バッファー溶液に入れ替えた直後は吸光度がヘモグロビン溶液の値よりもわずかに低下したが、その後、数分後にはほぼヘモグロビン溶液のときと同じ値を示した。次にスラブ光導波路セルからリン酸バッファー溶液を取り除き、ヘモグロビン溶液を入れ直して吸光度の測定を続けると 1 回目のヘモグロビン溶液の値よりも高い吸光度を示した。さらに測定時間の増加とともにゆるやかに吸光度は増加した。再度ヘモグロビ

ン溶液を取り除いてリン酸バッファー溶液を入れなおして吸光度を測定すると、先ほどと同様に溶液を入れ替えた直後に吸光度が若干低下しその後はほぼ一定の吸光度を示した。

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。光導波路法では、エバネッセント波の染み出す範囲に存在する物質のエバネッセント波の吸収を観察しているため、観察された吸収ピークがバルクに存在する物質によるものか、表面近傍に存在する物質によるものかを判断することはできない。図 3-5 の結果から、ヘモグロビンの吸着後に溶液を入れ替えても吸光度の低下はほとんど起こらなかった。この結果から 50 μ M ヘモグロビン溶液では、表面に単分子層程度吸着したヘモグロビンを選択的に観察し手いることが確認され、さらに OTS-SOWG 表面に吸着したヘモグロビンは安定に存在していることがわかった。

リン酸バッファー溶液に入れ替えたときに吸光度が若干低下したが、これは溶液を入れ替えたときに吸着していたヘモグロビンの一部が脱離しその後再び吸着したか、溶液を入れ替えた際に吸着しているヘモグロビンの構造が変化しただけに吸収スペクトルに影響が出たとも考えられる。しかしリン酸バッファー溶液を用いた吸収スペクトルの形状はヘモグロビン溶液のときとほぼ同じ形状を示しているため構造変化が起きたのではなく、吸着したヘモグロビンの一部が脱離し再び吸着が起きていると考えられる。2 回目にリン酸バッファー溶液を入れたときに吸光度が若干低下した後ほぼ一定の値を示したのは、表面から吸着したヘモグロビンがわずかに脱離したと考えられる。

以上の結果から、得られた吸収スペクトルは表面に吸着したヘモグロビンの

ものであり、吸光度の低下はわずかであるので吸着したヘモグロビンの大幅な脱離は起きていないと結論される。またヘモグロビン溶液を入れなおした際に吸光度が増加したが、これは図 3-3 の結果から OTS-SOWG 表面へのヘモグロビンの吸着は約 1 時間経過しても吸光度が緩やかに増加していくことが確認されているので、ヘモグロビンの吸着挙動がさらに進行したために吸光度の増加が観察されたと考えられる。

ヘモグロビンを構成する 4 つのサブユニットの中心には Fe イオンが反応中心として存在しており、酸化体と還元体ではそれぞれ異なる吸収ピークを示す^{38,39,51)}。

表面に吸着したヘモグロビンが酸化還元機能を保持しているか確認するために、OTS-SOWG 表面にヘモグロビンを吸着させた後ヘモグロビン溶液をスラブ光導波路セルから取り除き還元剤として 0.1 M の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を入れて吸収スペクトルの測定を行った。

試料溶液として 50 μM ヘモグロビン溶液を用いた。まずスラブ光導波路セル内に 50 μM ヘモグロビン溶液を入れて 5 秒おきに 50 回(250 秒)吸収スペクトルを測定しヘモグロビンを吸着させた。次にスラブ光導波路セル内からヘモグロビン溶液を全て取り除き $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を入れ同様に 5 秒おきに 50 回(250 秒)吸収スペクトルを測定した。

図 3-6 に 50 μM ヘモグロビン溶液、 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液、1 時間経過後の吸収スペクトルを示す。図に示した吸収スペクトルは 5 秒おきに 50 回(250 秒)測定したときのものを示した。

ヘモグロビン溶液のときは 410 nm 付近に吸収スペクトルのピークが現れたが

Na₂S₂O₄ 水溶液を入れるとすぐに吸収スペクトルのピークは 430 nm 付近にシフトした。ヘモグロビンの還元体は酸化体よりも高波長側に吸収ピークをもつことから、スラブ光導波路表面に吸着したヘモグロビン中の反応中心である Fe イオンが Na₂S₂O₄ 水溶液によって還元体に還元され Fe イオンの 3 価から 2 価 (Fe^{III} → Fe^{II}) への還元反応が起きているものと考えられる。Na₂S₂O₄ 水溶液により還元体となったヘモグロビンは吸光度が若干低下した。さらにスラブ光導波路セル内に Na₂S₂O₄ 水溶液を保持した状態で大気中、約 1 時間保持した後、再度吸光度を測定した。その結果、吸収スペクトルのピークは再び還元前の 410 nm 付近に戻った。410 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値は最初のヘモグロビン溶液の値までは戻らなかったが、還元体のときよりも高い値を示した。吸収スペクトルのピークが 410 nm に戻ったのは、Na₂S₂O₄ 水溶液により還元体になったヘモグロビンが大気中の酸素などにより酸化され再び酸化体 (Fe^{II} → Fe^{III}) に戻ったものと考えられる。

還元体になったときに吸光度が低下したことについては図 3-5 からスラブ光導波路セル内の溶液が変わることによって若干吸光度が低下することが考えられるが、図 3-5 の結果よりも吸光度の低下が大きかった。そのためスラブ光導波路セル内の溶液を Na₂S₂O₄ 水溶液に入れ替えることにより吸着していたヘモグロビンが脱離したか、酸化体と還元体では吸着したヘモグロビンの構造に違いがあるために吸光度が低下したものと考えられる。

表面に吸着したヘモグロビンは酸化還元により吸光度は若干低下したが、酸化還元の機能は維持されたまま表面に吸着していることが確認された。

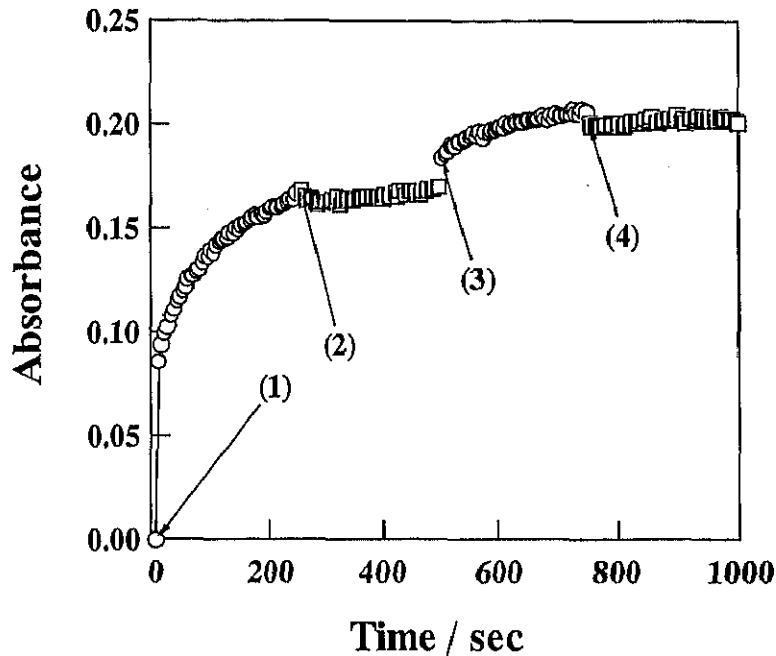


図 3-5 10%(v/v)の octyltrichlorosilane (OTS)溶液により 1 分間表面の疎水処理を行った SOWG (OTS-SOWG)表面に吸着させたヘモグロビンの安定性
(測定条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した吸収スペクトルを 5 秒おきに 50 回測定を行い、410 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値を測定時間に対してプロットした)

- (1):ヘモグロビン溶液を投入
- (2):ヘモグロビン溶液を取り除きリン酸バッファー溶液を投入
- (3):リン酸バッファー溶液を取り除き再度ヘモグロビン溶液を投入
- (4):セルから溶液を取り除きリン酸バッファー溶液を投入

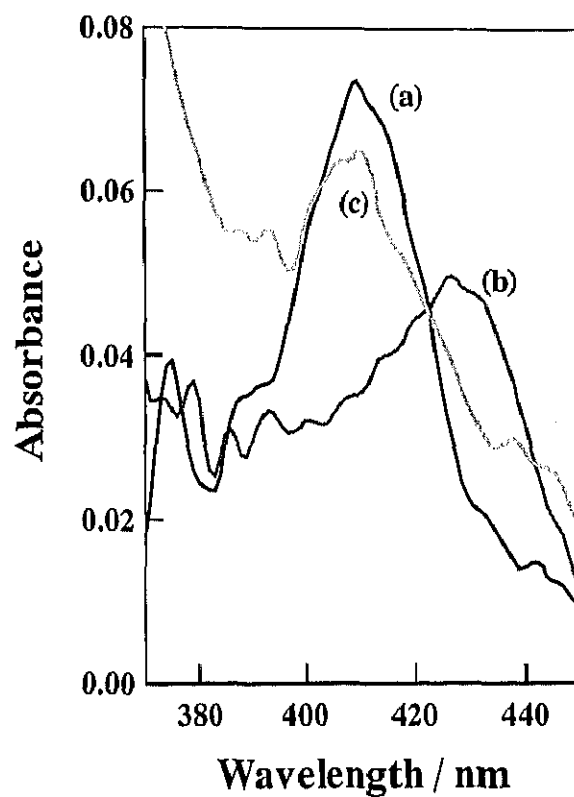


図 3-6 スラブ光導波路(SOWG)表面に吸着したヘモグロビンの吸収スペクトルの変化

- (a) : 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)を用いて 50 μM ヘモグロビン溶液を導波路表面に吸着させて 250 秒後の吸収スペクトル
- (b) : ヘモグロビン溶液を取り除き 0.1 M の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を投入して 250 秒後の吸収スペクトル
- (c) : 0.1 M の $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ 水溶液を投入して約 1 時間経過後の吸収スペクトル

3.2 吸着現象の理論的検討

3.2.1 吸着過程の検討

タンパク質の表面への吸着過程についてはすでにくつかの報告がなされているが、疎水性表面に対しての吸着過程について報告したものがほとんどである^{53, 54)}。これまでの結果からヘモグロビンの吸着挙動は表面の状態に大きく影響を受けることが分かったので、ヘモグロビンの吸着過程を理解するためには表面の状態も合わせて考慮する必要があると考えられる。

表面の状態として親水性表面と疎水性表面のスラブ光導波路を用いたヘモグロビンのスラブ光導波路表面への吸着過程の検討を行った。スラブ光導波路の材質として 50 μm 厚のガラス薄膜を用いた。以下、表面処理をしていないものを Bare-SOWG、1 分間 10%(v/v)OTS 溶液で処理したものを OTS-SOWG-1M および 1 時間 10%(v/v)OTS 溶液で処理したものを OTS-SOWG-1H とする。

作成したスラブ光導波路について吸収スペクトルの測定を行う前に表面の接触角を測定し表面状態の確認を行った。図 3-7 にそれぞれの表面の接触角を測定した結果を示す。OTS 溶液で表面処理をすることにより接触角は大きく増加した。疎水性表面の OTS-SOWG-1M と OTS-SOWG-1H では処理時間が長い方が接触角は大きくなる傾向が見られた。これらの結果は 3.1.2 章の結果とよく一致している。

吸収スペクトルの測定には 1 μM ヘモグロビン溶液を用いた。吸収スペクトルの測定は、試料溶液をスラブ光導波路セル内に添加した約 20 秒後から露光時間

50 ms で 20 回平均した値を 5 秒間隔で 120 回(600 秒)記録した。図 3-8 に Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H 表面の 1 μ M ヘモグロビン溶液を用いた時の吸収スペクトルを示す。図中には測定開始から 10 分経過後の吸収スペクトルを示した。

いずれの場合でも吸収スペクトルのピークは 410 nm 付近に現れており文献値とも良く一致した。また疎水性が増すと吸収スペクトルの形状が親水性表面のときより若干ブロードになる傾向が見られた。この吸収スペクトルの形状の違いは、親水性表面であるガラス薄膜に OTS 溶液により表面処理によって OTS 層が形成されるために表面の屈折率がわずかに変わったものと考えている。

図 3-8 の結果から疎水性表面である OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H よりも親水性表面である Bare-SOWG の方が高い吸光度を示したが、3.1.2 章の結果では親水性表面の方が疎水性表面を用いたときよりも高い吸光度を示したのと異なる。これはスラブ光導波路の材質の違いに起因していると考えられる。Joey らの報告ではタンパク質の吸着は表面の電荷状態などのさまざまな影響を受けることから、スラブ光導波路の材質がヘモグロビンの吸着に影響を与えたと考えられる⁵²⁾。

図 3-9 に 410 nm 付近の吸光ピークの値を測定時間に対してプロットした結果を示す。親水性表面 Bare-SOWG では測定開始から数分で吸光度は増加しその後はほぼ一定の値を示す。一方、疎水性表面 OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H では測定開始直後に吸光度は大きく増加し、その後も緩やかに吸光度は増加していった。吸着量は表面の状態やタンパク質の電荷などから影響を受けるが、吸着挙動そのものは表面の状態にのみ大きく影響を受けると考えられる。また疎

水性表面 OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H では吸光度がほぼ同じ値を示したので、ガラス薄膜を用いたスラブ光導波路では接触角と吸光度に相関性はみられなかった。

以上の結果から 1 μ M ヘモグロビン溶液のスラブ光導波路表面への吸着過程は表面の材質によらず、

- 親水性表面では短時間(~2 分)で吸着が終了し、その後ほぼ一定の吸光度を示す。
- 疎水性表面では、最初、親水性表面のときと同様に短時間(~2 分)で吸光度が大きく増加するが、その後(10 分以上)緩やかに吸光度が増加していく 2 つのステップから成る吸着過程を示す。

ということが分かった。

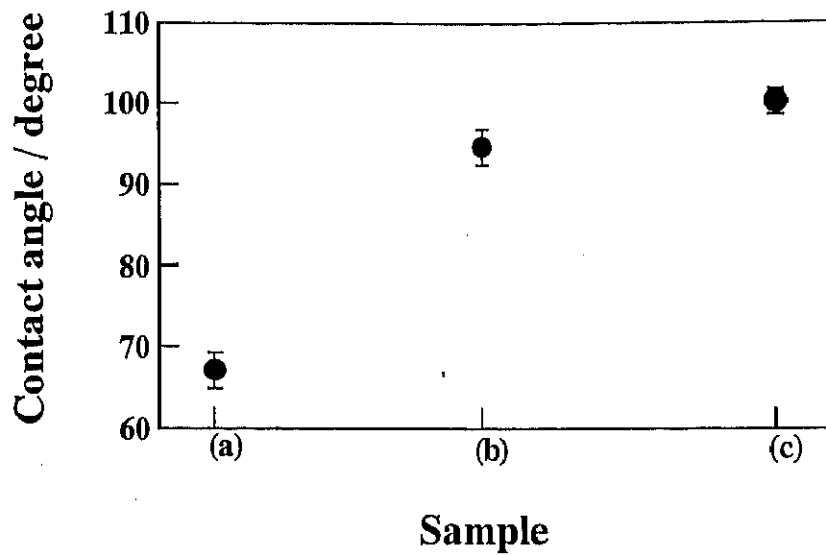


図 3-7 octyltrichlorosilane (OTS)によるスラブ光導波路表面(SOWG)の疎水処理と接触角の関係

- (a) : 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)
- (b) : 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)
- (c) : 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 時間行った SOWG (OTS-SOWG-1H)

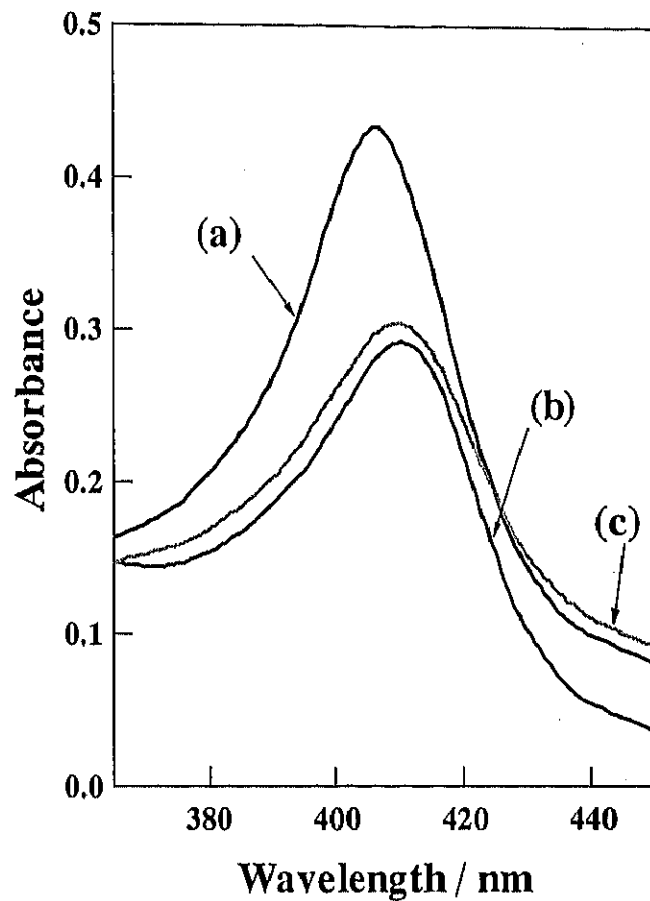


図 3-8 スラブ光導波路(SOWG)を用いた1 μM ヘモグロビン溶液の測定開始から600秒後の吸収スペクトル

(a): 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b): 10%(v/v)octyltrichlorosilane (OTS)溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)

(c): 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 時間行った SOWG (OTS-SOWG-1H)

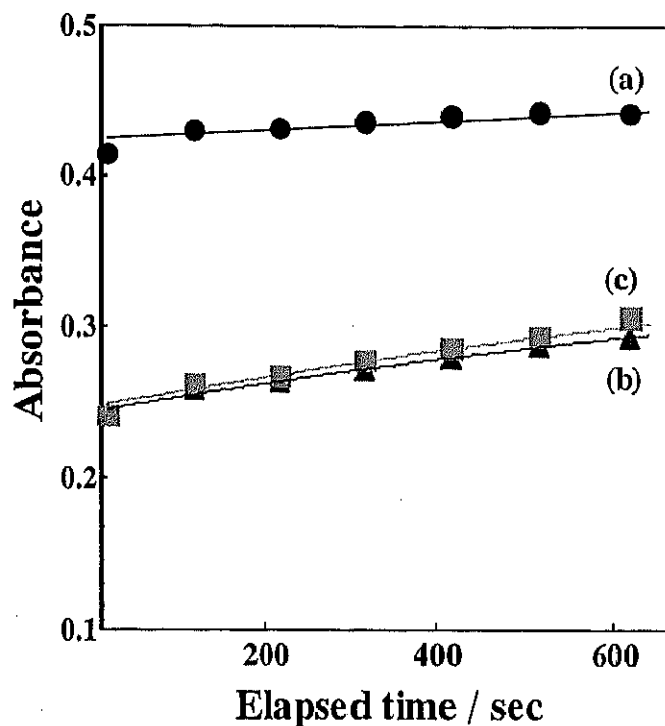


図 3-9 スラブ光導波路(SOWG)を用いた 1 μ M ヘモグロビン溶液の吸光度の経時変化 (測定条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した吸収スペクトルを 5 秒おきに 50 回測定を行い、410 nm 付近の吸収スペクトルのピーク値を測定時間に対してプロットした)

(a): 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b): 10%(v/v)octyltrichlorosilane (OTS)溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)

(c): 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 時間行った SOWG (OTS-SOWG-1H)

3.2.2 時間分解測定

これまでの測定では測定開始直後に急激に吸光度が増加している様子が観察されていたが、初期吸着過程に注目すると吸光度の急激な増加のために吸着過程を詳細に検討するのは困難であった。そのため初期吸着過程における吸光度の微小な変化を観察するためには、微小時間における観察が必要であると考えた。このような微小時間に対する変化を観察するには時間分解測定が適している。

図 3-10 に Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H 表面への 1 μ M ヘモグロビン溶液を用いた時の時間分解測定の結果を示す。親水性、疎水性表面のいずれの場合でも測定開始直後の吸光度が連続的に増加している様子を観察することができた。

1 μ M ヘモグロビン溶液を用いて図 3-9 では測定開始から約 10 分間の吸着過程を観察したが、この結果と図 3-10 の結果を合わせて考えると測定開始直後(~12 秒)に少なくとも半分程度の吸光度の増加が見られることから、親水性、疎水性表面いずれの場合でも測定開始直後の初期吸着過程が吸着過程全体から見ても重要であると考えられる。

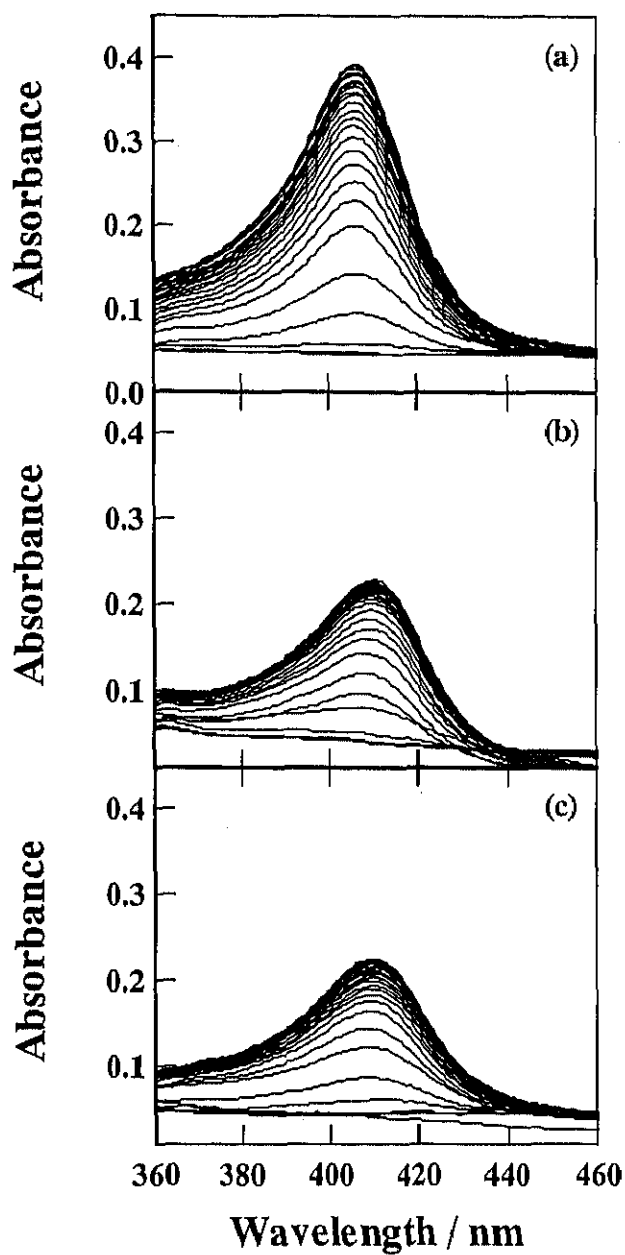


図 3-10 1 μM ヘモグロビン溶液のスラブ光導波路(SOWG)分光法による時間分解測定による吸収スペクトル (時間分解測定の測定条件は露光時間 50 ms で 250 回測定)

(a): 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b): 10%(v/v) octyltrichlorosilane (OTS) 溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)

(c): 10%(v/v) OTS 溶液による表面処理を 1 時間行った SOWG (OTS-SOWG-1H)

3.2.3 初期吸着過程の検討

1 μM ヘモグロビン溶液を用いた場合でも表面の状態によってヘモグロビンのスラブ光導波路表面への吸着挙動が異なることが明らかとなったが、親水性、疎水性表面いずれの場合でも吸光度は測定開始直後に大きく増加している。このことから測定開始直後にヘモグロビンのスラブ光導波路表面への吸着は起こり、吸着は数分で終了すると考えられる。さらに疎水性表面の場合は、測定開始直後にヘモグロビンの吸着が進行し、その後、吸着したヘモグロビンが形状変化などを起すと推察される。そのため測定開始直後のヘモグロビンのスラブ光導波路表面への吸着に注目し初期吸着過程についてより詳細な検討を試みた。

タンパク質の表面への吸着過程についてはこれまでも幾つかの報告がなされており、その吸着メカニズムは以下のような 2 つのステップから成る吸着過程を示すと考えられている^{53,54}。

- ① 吸着の初期過程でタンパク質は可逆的に表面に吸着する。
- ② その後、表面に吸着したタンパク質は形態変化を起し、より安定な状態へと変化する。形態変化後のタンパク質は不可逆な吸着挙動を示す。

Krisdhasima らは QCM を用い長時間(～480 分)の測定を行い、疎水性表面へのタンパク質の吸着過程を考察している⁵³。この報告では上記に示したような 2 つのステップから成る吸着過程を用いて考察している。QCM による測定でも疎水性表面へのタンパク質の吸着過程は、測定開始直後に大きく吸着量が増加しその後も緩やかに吸着量が増加していく挙動を示し、スラブ光導波路分光法で観察された吸着挙動とほぼ同様の結果を示した。一方 Walton らの報告によれば、

測定開始直後の初期吸着過程に限ればタンパク質は可逆的な吸着挙動を示し、その吸着過程は Langmuir 吸着等温式のような近似式に従うと推察している⁵⁵⁾。

これまでの結果から表面に吸着したタンパク質は非常に安定に吸着しており、表面からの脱離はほとんど起きていないと考えられる。そのためタンパク質の表面への吸着過程は Langmuir 吸着等温式と厳密には定義が一致しない⁵⁶⁾。しかしタンパク質の表面への吸着が飽和したときを吸着平衡と考えた場合、Walton らが報告したような測定開始直後の初期吸着過程では Langmuir 吸着等温式で表されるような 1 次曲線による近似に従うと考えられるので、親水性表面への吸着過程と疎水性表面への初期吸着過程は Langmuir 型の吸着等温式によって解釈が可能であると考えた。

図 3-10 から得られた結果をもとに、親水性、疎水性表面いずれの場合でも測定開始直後の吸着過程は Langmuir 型の吸着等温式に従うものとして検討を行った。

本研究では Langmuir 型の吸着等温式に基づく検討を行うにあたり以下のような条件を設定した。

1. 測定開始から 12 秒以内に吸着量は飽和する。
2. 全ての吸着サイトに均一に吸着する。
3. 吸着した分子は単分子層を越えず相互作用も起らない。
4. 吸着した分子の形態変化も起らない。
5. 吸着した分子はほとんど脱離しない。

Okahata らは QCM を用いてタンパク質の表面への吸着過程について検討した⁵⁷⁻⁵⁹⁾。host である表面に測定試料である guest が吸着する過程を考えたとき、Okahata らによれば吸着平衡が以下の式のように書けるとき、



ある時間 t における吸着量 Δm_t は次のように表すことができる。

$$\Delta m_t = [host/guest]_t = [host/guest]_{\infty} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (3-2)$$

$$\Delta m_t = \Delta m_{\infty} (1 - e^{-t/\tau}) \quad (3-3)$$

$$\tau^{-1} = k_1 [guest] + k_2 \quad (3-4)$$

ここで平衡に達した時の吸着量を Δm_{∞} 、吸着の速度因子を k_1 、脱離の速度因子を k_2 、溶液の濃度を $[guest]$ とする。

また式(3-3)は以下のように書き換えることができる。

$$t/\tau = \ln[\Delta m_{\infty} / (\Delta m_{\infty} - \Delta m_t)] \quad (3-5)$$

Okahata らは QCM を用いて表面への吸着量を測定しているが、本研究ではスラブ光導波路分光法による吸収スペクトルを測定している^{60, 61)}。吸収スペクトルから得られる吸光度は表面に吸着した分子に依存する。そのため単分子層程度の吸着における吸光度は、表面を被覆した分子の被膜率とほぼ相関できると考えた。そこで吸着量 Δm_t 、 Δm_{∞} を吸光度 A_t 、 A_{∞} としてそれぞれ表した。

$$t/\tau = \ln[A_{\infty} / (A_{\infty} - A_t)] \quad (3-6)$$

実際の計算に用いた吸光度の値は 350 nm と 450 nm の各点を結んで得られる直線をベースラインとして実測値を補正した値を用いた。また測定時間 $t=0$ の時に吸光度 $A=0$ となるように補正した。さらに測定時間内 (~12 秒) における吸

光度の最大値を平衡に達した時の吸光度と仮定すると式(3-6)の右辺が発散してしまうため、計算の都合上それよりもわずかに大きい値(1×10^{-7})を足した値を吸光度の最大値 A_{∞} とした。補正に用いた 1×10^{-7} の値は、測定装置が記録するデータの桁が 6 桁なのでそれよりももう 1 桁小さい値としているので計算結果に影響はないと考えている。

実際の計算は以下の手順で行った。

- ① はじめに式(3-6)に測定時間 t 、各測定時間 t における吸光度 A_t 、さらに右辺 A_{∞} に吸光度の最大値 A_{∞} を代入し各測定時間 t における仮の τ を求める。
- ② 次に測定時間 t 、式(3-6)から得られた仮の τ と各測定時間 t における吸光度 A_t を式(3-3)に代入して吸光度 A_{∞} の計算値を求める。
- ③ 各測定時間 t 、式(3-6)から得られた仮の τ と吸光度 A_{∞} の計算値を吸着量 Δm_{∞} として式(3-3)に代入して左辺の値を求める。これを各測定時間 t における吸光度 A_t の計算値とする。
- ④ 各測定時間における吸光度 A_t の実測値を全て足した値から各測定時間における吸光度 A_t の計算値を全て足した値の差を求め、その値が最も小さいものを選ぶ。
- ⑤ ④で求めた値を満たす仮の τ を真の τ として決定した。

図 3-11 に初期吸着過程における測定時間に対する吸光度 A_t の実測値と Langmuir 型の吸着等温式から得られた曲線を示す。吸光度 A_t の実測値は点で、Langmuir 型の吸着等温式から得られた曲線は実線で示した。

検討の結果、Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M、OTS-SOWG-1H とともに Langmuir 型の吸着等温式とよく一致する結果が得られた。吸着量の一番大きかった

Bare-SOWG の測定終了後、試料溶液を取り出し透過法により吸光度を測定した。試料溶液の濃度減少分をすべてスラブ光導波路表面への吸着とするとヘモグロビン分子の吸着量はほぼ単分子層程度であった。

これらの結果から測定開始直後(~12 秒)における 1 μ M ヘモグロビン溶液のスラブ光導波路表面への初期吸着過程は表面の状態が親水性、疎水性によらず Langmuir 型の吸着等温式に従うことが明らかとなった。これは Langmuir 型の吸着等温式で初期吸着過程を検討するにあたり設定した仮定

1. 測定開始から 12 秒以内に吸着量は飽和する。
2. 全ての吸着サイトに均一に吸着が起こる。
3. 吸着した分子は単分子層を越えず相互作用も起こらない。
4. 吸着した分子の形態変化も起こらない。
5. 吸着した分子はほとんど脱離しない。

のうち、1 番以外は初期吸着過程における挙動として特徴付けることができると考えられる。1 番の吸着量が飽和するという仮定は計算を行う上で設定したものであるため、測定開始から 12 秒で吸着量が飽和すると言いきれない。

親水性、疎水性いずれの表面を用いた場合でも初期吸着過程に限定すると Langmuir 型の吸着等温式によく従うことから、ヘモグロビンの初期吸着過程は表面の影響を受けず選択的に吸着過程が進行すると考えられる。また測定開始から数分経過すると吸着挙動が異なってくることから、表面状態が吸着した分子に大きく影響していると考えられる。

初期吸着過程に限定すると 1 μ M ヘモグロビン溶液の親水性表面、疎水性表面への吸着過程には Langmuir 型の吸着等温式が適用されることが明らかとなった。

そこで 0.5、1.0、2.0 μM ヘモグロビン溶液を用いて τ^{-1} と試料溶液の濃度についての相関関係を検討するために時間分間測定を行い、Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M 表面へのヘモグロビンの初期吸着過程を観察した。

図 3-12 に Bare-SOWG 表面への初期吸着過程における測定時間に対する 410 nm 付近の吸光度の実測値と Langmuir 型の吸着等温式から得られる曲線を示す。同様に図 3-13 には OTS-SOWG-1M 表面に対する結果を示す。吸光度の実測値は点で、Langmuir 型の吸着等温式から得られた曲線は実線で示した。また図 3-14 に式(3-4)から求めた τ^{-1} と試料溶液の濃度の関係を示した。表 3-1 には Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M を用いたときの結合定数、吸着の速度定数、脱離の速度定数をそれぞれ示す。結合定数は吸着の速度定数、脱離の速度定数から次式で求めることができる。

$$K = k_1/k_2 \quad (3-7)$$

図 3-14 結果から試料溶液の濃度と τ^{-1} はよい比例関係を持つことが分かった。また表 3-1 の結果からスラブ光導波路表面を OTS 溶液で処理することによって K 、 k_1 、 k_2 の値は小さくなる傾向が見られた。 k_1 の値が小さいということは吸着しにくいということを示している。ガラス薄膜を用いて作製したスラブ光導波路の比較的短い測定時間(~ 10 分)における 0.5 \sim 2.0 μM ヘモグロビン溶液の吸着過程では、疎水性表面の方が親水性表面よりも吸光度が低くなる傾向と一致した。一方、 k_2 の値は Bare-SOWG、OTS-SOWG-1M いずれの場合でも k_1 の値に比べてとても小さいので、表面に吸着したヘモグロビンは表面状態によらず安定に存在しておりほとんど脱離しないことが示された。

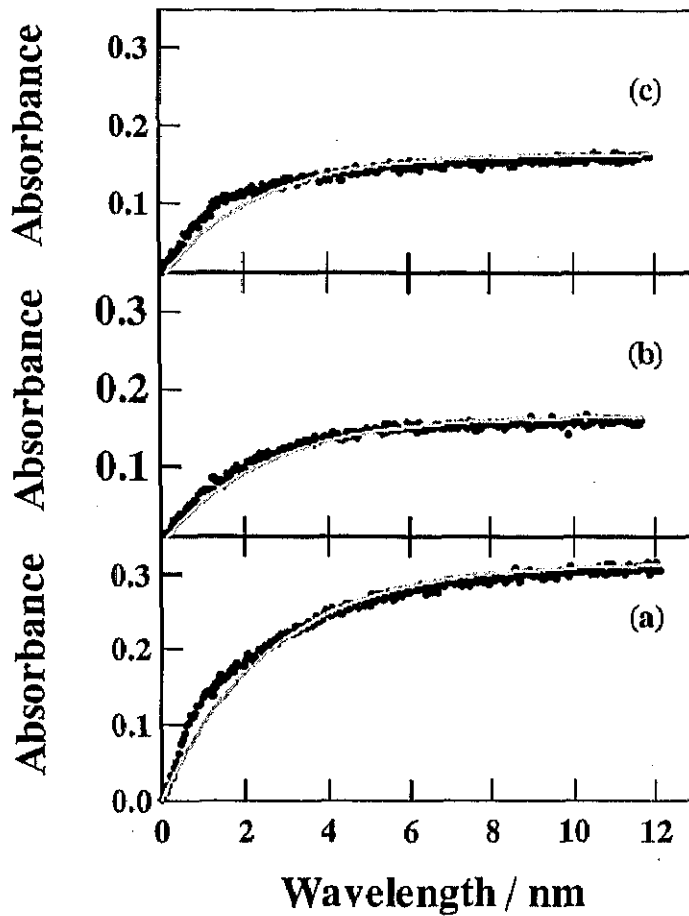


図 3-11 スラブ光導波路(SOWG)分光法で得た 410 nm の吸光度の時間依存性を Langmuir 型の吸着等温式により検討した結果、時間分解測定の実験条件は露光時間 50 ms で 250 回測定、図中の点はベースラインを考慮した実験値、実線は Langmuir 型の吸着等温式より求めた曲線

(a): 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

(b): 10%(v/v)octyltrichlorosilane (OTS)溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)

(c): 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 時間行った SOWG (OTS-SOWG-1H)

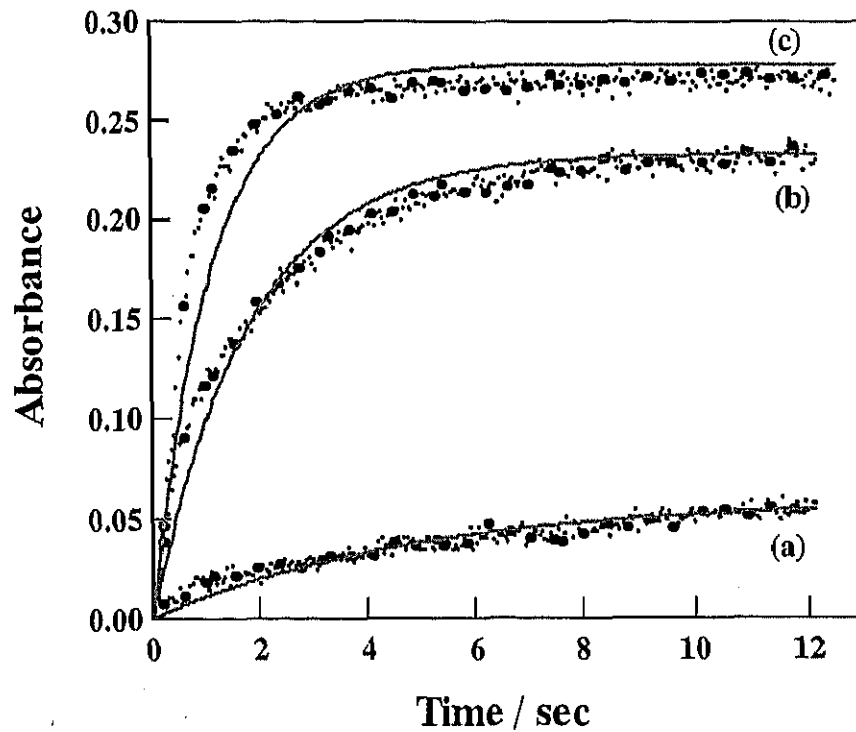


図 3-12 スラブ光導波路(SOWG)分光法で得た 410 nm の吸光度の時間依存性を Langmuir 型の吸着等温式により検討した結果 (時間分解測定の実験条件は露光時間 50 ms で 250 回測定、図中の点はベースラインを考慮した実験値、実線は Langmuir 型の吸着等温式より求めた曲線、SOWG には表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG) を用いた)

(a): 0.5 μM ヘモグロビン溶液

(b): 1.0 μM ヘモグロビン溶液

(c): 2.0 μM ヘモグロビン溶液

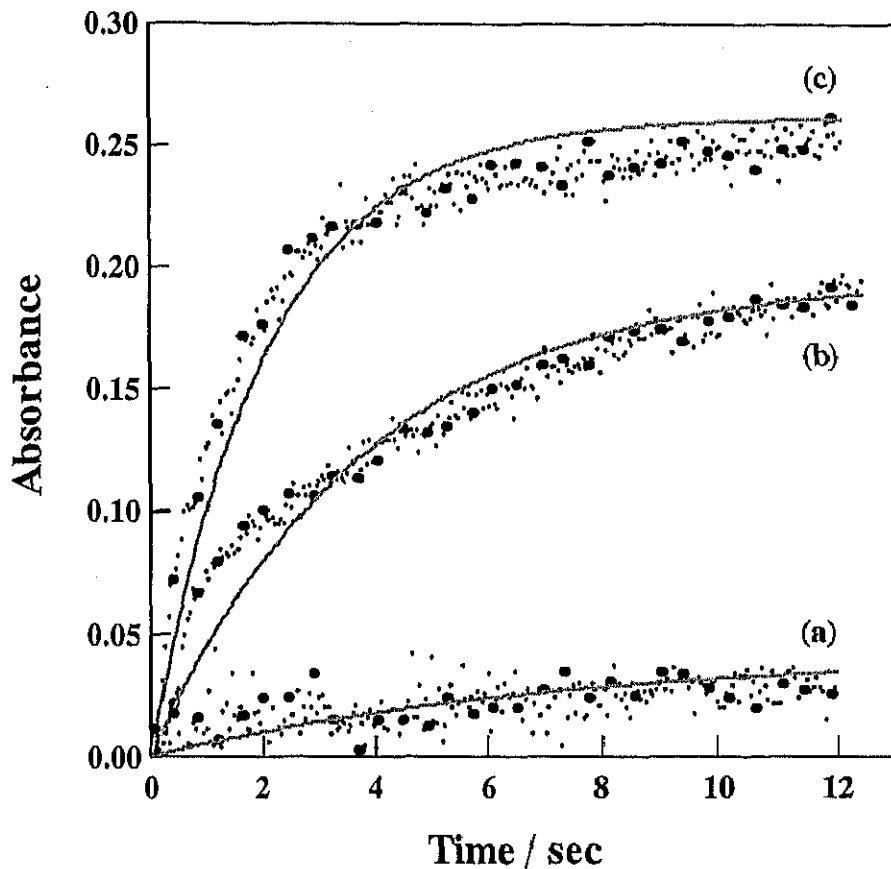


図 3-13 スラブ光導波路(SOWG)分光法で得た 410 nm の吸光度の時間依存性を Langmuir 型の吸着等温式により検討した結果 (時間分解測定の実験条件は露光時間 50 ms で 250 回測定、図中の点はベースラインを考慮した実験値、実線は Langmuir 型の吸着等温式より求めた曲線、SOWG には 10%(v/v)OTS 溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)を用いた)
 (a): 0.5 μM ヘモグロビン溶液
 (b): 1.0 μM ヘモグロビン溶液
 (c): 2.0 μM ヘモグロビン溶液

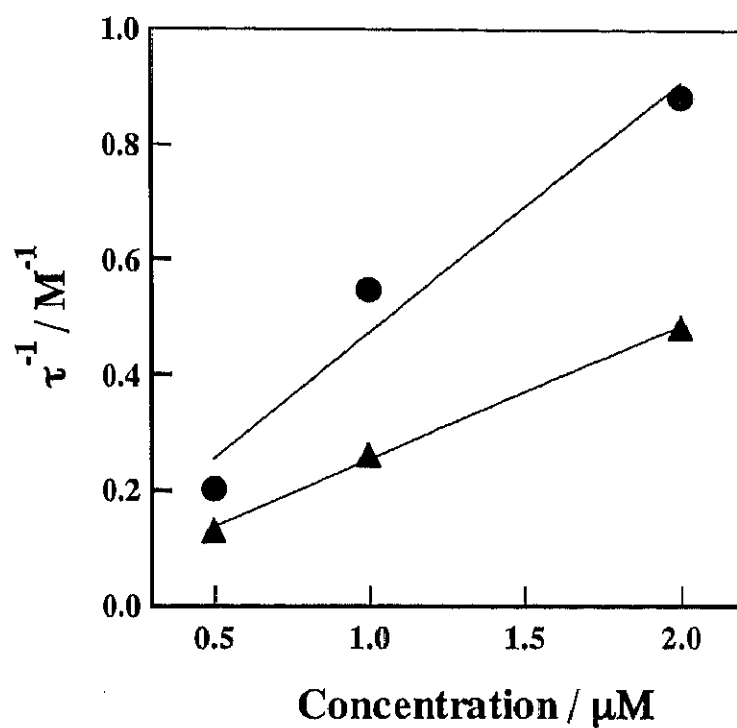


図 3-14 τ^{-1} とヘモグロビン溶液の濃度の関係

●:表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)

▲:10%(v/v) octyltrichlorosilane (OTS)溶液による表面処理を1分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)を用いたときの結果

表 3-1. スラブ光導波路と結合定数、吸着の速度定数、脱離の速度定数の関係

	$K / 10^6 \text{ M}^{-1}$	$k_1 / 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$	k_2 / s^{-1}
Bare-SOWG	12.1	4.4	0.04
OTS-SOWG-1M	11.6	2.3	0.02

3.2.4 親水性表面の吸着挙動

これまでの結果から親水性表面への $0.5\sim 2.0\ \mu\text{M}$ ヘモグロビン溶液の吸着挙動は短時間(~ 2 分)で吸光度はほぼ一定の値を示すことから、測定開始直後(~ 12 秒)で吸着過程のほとんどが終了していると考えられる。そのため $0.5\sim 2.0\ \mu\text{M}$ ヘモグロビン溶液を用いた親水性のスラブ光導波路表面への初期吸着過程は Krisdhasima らの用いた複雑な吸着過程ではなく、Langmuir 型の吸着等温式に従う吸着過程によって解釈可能であると考えられる。

そのため初期吸着過程に限定しなくてもヘモグロビンの親水性表面への吸着過程は Langmuir 型の吸着等温式によって解釈可能であると考えられる。親水性表面への吸着過程全体について Langmuir 型の吸着等温式を適用するにあたり、初期吸着過程として限定した 12 秒間ではなく吸光度がほぼ一定となったところを吸着過程の終了として検討を行った。

$1\ \mu\text{M}$ ヘモグロビン溶液を用いて Bare-SOWG 表面への吸着過程を約 20 分にわたって測定した。得られた吸収スペクトルから $410\ \text{nm}$ 付近の吸光度のピーク値を測定時間に対してプロットしたものを図 3-15 に示す。図中に点で示したものは $410\ \text{nm}$ 付近の吸光度のピークを表しており、実線でかかれた曲線は Langmuir 型の吸着等温式より得られた近似値を示している。Langmuir 型の吸着等温式の適用は前述した①～⑤の手順に従った。

図 3-15 から吸光度の実測値と Langmuir 型の吸着等温式から得られた曲線はほぼ一致した。吸光度は測定開始直後から数分で大きく増加した後、20 分にわたって測定を続けたがその間ほぼ一定の値を示した。そのためヘモグロビンの

Bare-SOWG 表面への吸着過程は測定開始直後の吸着過程で終了し、その後、吸着した分子は表面に安定に存在しており形態変化などは起きていないと考えられる。このため Langmuir 型の吸着等温式を適用するにあたり設定した仮定のうち 2.~5.についてはほぼ満たしているものと考えられる。さらに測定開始から数分経過後は吸光度がほぼ一定になっていることから測定開始から数分で吸着量は飽和に達し、吸着過程が終了したと考えられる。

図 3-15 の結果から 1 μM ヘモグロビンの Bare-SOWG 表面への吸着挙動は初期吸着過程に限らず Langmuir 型の吸着等温式で相関できることが示された。

さらにヘモグロビン溶液の濃度を 10 μM にして同様に吸着過程に Langmuir 型の吸着等温式の適用を試みた。図 3-16 に 10 μM ヘモグロビン溶液を Bare-SOWG 表面への吸光度の変化を測定時間に対してプロットしたものを示す。比較のために 10 μM ヘモグロビン溶液を OTS-SOWG-1H 表面に吸着させたときの吸光度の変化も合わせて示す。吸収スペクトルは露光時間 50 ms で 20 回平均した値を 5 秒間隔で 250 回(20 分)連続して測定した。図中に点で示したものは 410nm 付近の吸光度のピークを表しており、実線でかかれた曲線は Langmuir 型の吸着等温式より得られた近似値を示している。

ヘモグロビン溶液の濃度を 10 μM と濃くしても 1 μM のときと同様に Bare-SOWG 表面への測定開始から数分でほぼ一定の吸光度を示した。一方、OTS-SOWG-1H 表面への 10 μM ヘモグロビン溶液の吸着過程はこれまでの結果と同様に、測定開始から数分で吸光度が大きく増加しその後は緩やかに吸光度は増加していった。Langmuir 型の吸着等温式を Bare-SOWG 表面への吸着過程に適用した結果、20 分間にわたる吸着過程でも実測値とよく一致した。しかし

OTS-SOWG-1H 表面への吸着過程で吸光度は緩やかに増加しており、明らかに Bare-SOWG 表面への吸着過程と様子が異なるため Langmuir 型の吸着等温式だけでは吸着過程全体を説明できないと考えられる。

初期吸着過程における吸着量は、疎水性表面の方が親水性表面よりも低いにもかかわらず 10 μ M ヘモグロビン溶液を用いて 20 分にわたり吸光度の変化を観察すると両者の吸光度はほぼ同程度になった。そのため疎水性表面におけるヘモグロビン溶液の吸着過程を理解するためには、Krisdhasima らの用いたような分子の形態変化や吸着分子層の複合化の影響も考慮に入れた複雑な吸着過程を用いて検討する必要があると考えられる。

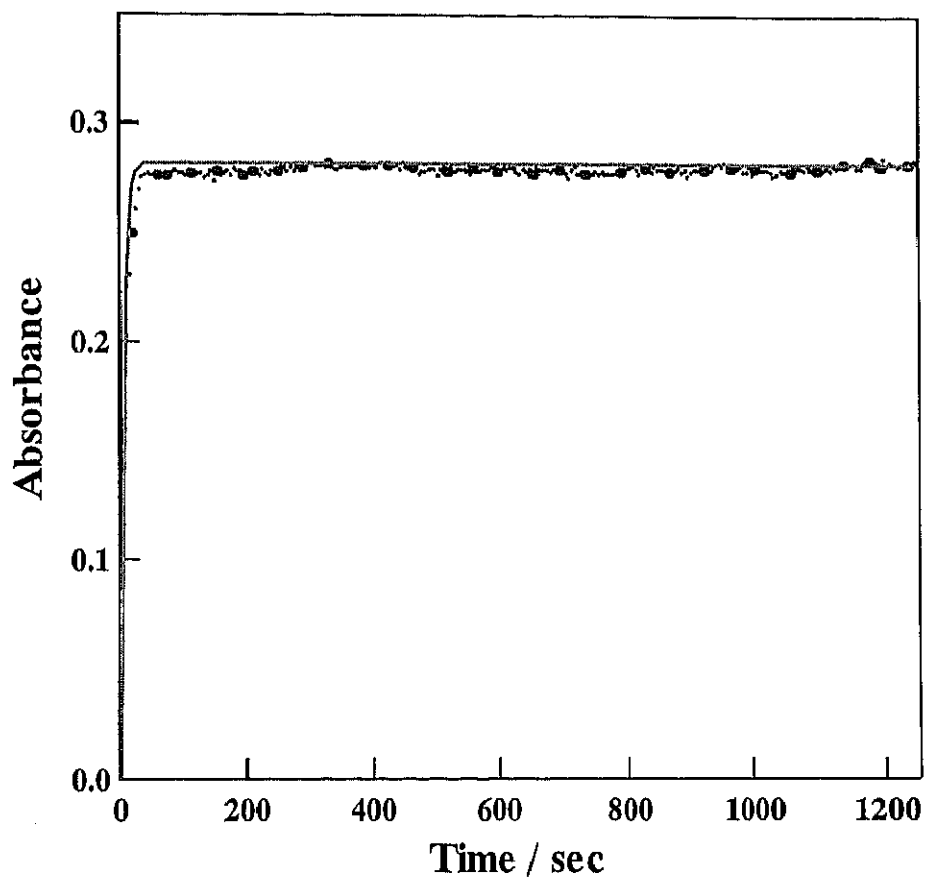


図 3-15 1 μM ヘモグロビン溶液を用いてスラブ光導波路(SOWG)分光法で得た 410 nm の吸光度の時間依存性を Langmuir 型の吸着等温式により検討した結果 (時間分解測定の測定条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した値を 5 秒おきに 250 回測定、図中の点はベースラインを考慮した実験値、実線は Langmuir 型の吸着等温式より求めた曲線、SOWG には表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG)を用いた)

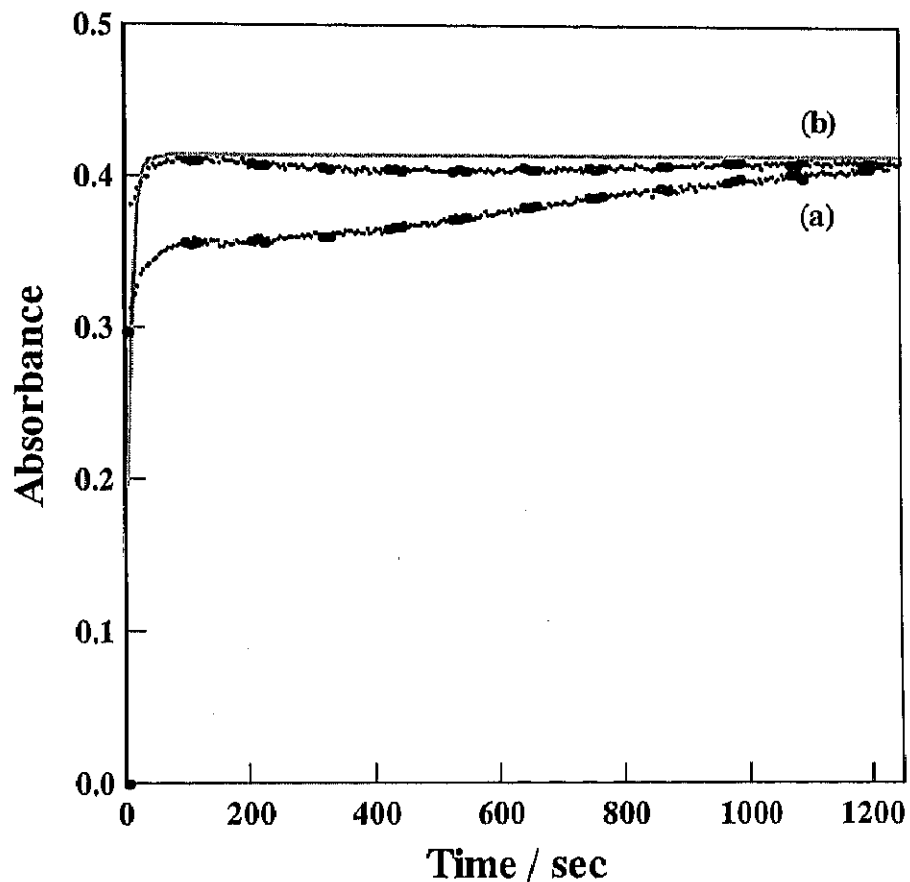


図 3-16 10 μM ヘモグロビン溶液を用いてスラブ光導波路(SOWG)分光法で得た 410 nm の吸光度の時間依存性を Langmuir 型の吸着等温式により検討した結果 (時間分解測定の実験条件は露光時間 50 ms で 20 回平均した値を 5 秒おきに 250 回測定、図中の点はベースラインを考慮した実験値、実線は Langmuir 型の吸着等温式より求めた曲線)

(a): 10%(v/v) octyltrichlorosilane (OTS) 溶液による表面処理を 1 分間行った SOWG (OTS-SOWG-1M)

(b): 表面の疎水処理を行っていない SOWG (Bare-SOWG) を用いた結果