

氏名(本籍) 横山 康弘(岐阜県)
学位の種類 博士(工学)
学位授与番号 甲第 223 号
学位授与日付 平成 16 年 3 月 25 日
専攻 物質工学専攻
学位論文題目 眼用レンズ材料の合成ならびにその表面へのタンパク質の吸着に関する研究
(Studies on Synthesis of Ocular Lens Materials and Protein
Adsorption on their Surfaces)
学位論文審査委員 (主査) 教授 平松 宏 一
(副査) 教授 杉 義 弘 教授 紘村 知之
助教授 亀山 啓 一

論文内容の要旨

本論文は総合緒言、第1部、及び第2部から構成されており、先ず、総合緒言では医療用高分子材料であるコンタクトレンズの具備すべき物理的、化学的機能の特性を解説すると共に、本研究の目的・意義を述べている。第一部では本研究の主題である医療用高分子界面へのタンパク質吸着に関する種々の研究手法の解説と本研究に適用したATR(Attenuated Total Reflection)法を用いた赤外吸収スペクトル法および実験系へのその具体的適用法を詳述すると共に、実験的に得られた結果とその解析・考察を展開している。第3部では、実際に、コンタクトレンズ装着時におけるPSF(Point Spread Function)アナライザーを用いて得た網膜上の点像のシュミレーション画像の開発とその適用結果を述べている。本研究の成果は以下のように要約される。

本研究では、タンパク質の吸着表面としてコンタクトレンズの基礎材料である、ポリスチレンを基本構造とするシリコーン系ポリマーPoly [tris(tri-methylsiloxy)-silylstyrene] を合成し、分子量分布の鋭い平均分子量 200,000 の、薄膜形成に望ましい高分子の合成に成功し、使用した。涙液中に多く含まれるタンパク質は、リゾチーム、ラクトフェリン、血清アルブミンであり、本実験ではニワトリ卵白リゾチーム(以後リゾチームと略す)およびウシ血清アルブミン(以後血清アルブミンと略す)を使用した。ATR/FT-IRにおける吸着分子数のより厳密な定量化を確立し、吸着過程の速度論的解析を行うと共に、吸着に伴うリゾチーム並びに血清アルブミンの立体構造の変化をスペクトルの解析より評価した。また、高分子表面へのリゾチームおよび血清アルブミンの吸着挙動の比較を行った。

リゾチームの系における結果

1. ATR/FT-IRによる赤外スペクトル測定により、得られたアミドI'吸収領域におけるスペクトルの吸光度面積の解析から吸着量が算出され、リゾチームの吸着量は濃度および吸

着時間の増加と共に増大することが確認された。

2. 吸着速度論的解析から高分子表面における吸着機構は速やかな吸着過程(一次吸着過程)に続く、緩やかな吸着過程(二次吸着過程)が確認され、吸着機構は少なくとも二つの吸着過程からなることが得られた。しかしながら、吸着は 24 時間経過しても定常状態に達しないことが観測され、緩やかな三次吸着過程の存在を示している。

3. 吸着したリゾチーム分子の構造は、吸収スペクトルの形の変化から解析し、吸着と共に α -ヘリックス構造が減少し、 β 構造(β -シート、ターン)およびランダムコイル構造に変化すること知られ、またそれらの構造変化は全吸着量に対する二次吸着量の比に依存しており、吸着層の階層構造が推定された。

血清アルブミンの系における結果

1. リゾチームの系と同様に、血清アルブミンの吸着量は濃度の増加および吸着時間の増加と共に増大することが確認された。血清アルブミンにおいては 10 時間でほぼ平衡吸着量に達することが確認され、吸着等温線の作成が可能である。

2. 吸着量の経時変化と、時定数がバルクの血清アルブミン濃度に依存しないことおよび二次構造の解析結果から吸着機構は、主に一次吸着過程のみからなることが推定された。

3. 高分子表面に吸着した血清アルブミンの二次構造と吸着量(吸着密度)との関連が明確になり、この結果は血清アルブミンの高分子表面上における一層吸着を強く支持するものである。

上記の、高分子表面に対するタンパク質の異なる吸着挙動はそれぞれのタンパク質がもつ固有の立体構造の反映であると推論され、多数の両タンパク質の水溶液中における物理化学的研究結果と矛盾しないものである。

コンタクトレンズ装着時の点像測定

1. モノフォーカルハードコンタクトレンズ装着状態で、網膜上の点像を PSF の測定より求め、そのシミュレーション網膜像のコントラストは経時的には僅少の変化であり、光学的に影響を及ぼすまでのタンパク質の吸着は認められなかった。

論文審査結果の要旨

本論文は、医療用高分子表面とタンパク質との吸着相互作用を解明するために、高分子に対する水溶性タンパク質の微小吸着量を定量的に分析する手法として、ATR(Attenuated Total Reflection)法を用いた赤外吸収分光法(ATR-FT-IR)を導入し、測定系の実験的手法と得られたスペクトルの理論に基づいた厳密な解析法を確立すると共に、タンパク質の吸着速度式、吸着等温線、吸着タンパク質の立体構造、吸着機構などを明らかにしたものである。さらに、コンタクトレンズ着眼時の網膜像のコントラストを導出し、タンパク質吸着の影響を検討している。得られた成果は以下のように要約され、十分に完成された内容を有しているものと認め、博士(工学)論文として相応しいものと判定した。

医療用高分子として、コンタクトレンズの基礎材料であるポリスチレンを基本構造とするシリコン系ポリマー、poly[tris(tri-methylsiloxy)silylstyrene]を合成し、薄膜試料調製に適切な、分子量分布の鋭い、平均分子量 200,000 の試料を得ている。水溶性球状タンパ

ク質として、涙液中に多く存在するリゾチーム、血清アルブミンを選び、それらのタンパク質の上記高分子への吸着挙動を $pD=7.0$ 、 $25^{\circ}C$ で調べている。実験上、使用したタンパク質は、それぞれ、ニワトリ卵白リゾチーム、ウシ血清アルブミンである。

吸着タンパク質の厳密な定量法を確立することに成功し、その結果に基づいて、種々のタンパク質濃度における吸着量の時間依存性を調べ、吸着速度式を導出した。リゾチームの場合、吸着は少なくとも2つの時定数をもつ過程で進行すること、時定数はリゾチームの濃度に依存しないことを明らかにすると共に、各過程における平衡吸着量を求め、吸着等温線の作成に成功している。更に、スペクトルの構造解析から、吸着に伴うリゾチームの立体構造の変化を明らかにすると共に、2つの吸着過程における構造変化と吸着量との関係性を求め、高分子表面に対するリゾチーム分子の階層吸着機構を提案している。主な構造変化は2つの過程とも、 α -ヘリックス構造から β 構造(β -シート、ターン)構造およびランダムコイル構造への変化である。

一方、ウシ血清アルブミンの吸着に関しては、リゾチームの場合と同様の手法を用いて検討し、以下に述べるような結果を得て、タンパク質の種類あるいは立体構造の相違による吸着過程の特異性をも見出している。

血清アルブミンの吸着は、リゾチーム場合と同様に、初期の吸着速度の速い一次吸着過程とそれに続く速度の遅い二次吸着過程からなるが、二次吸着過程は無視できる程度であること、平衡吸着量は血清アルブミンの濃度と共に増加することを明らかにしている。吸着に伴う主な立体構造の変化は α -ヘリックス構造から β 構造およびランダムコイル構造への変化である。この構造変化の程度と吸着量との関係はリゾチームの場合と異なり、吸着量のみ依存することが示され、高分子表面への血清アルブミン分子の一層吸着機構が示唆されている。

両タンパク質の吸着挙動の相違あるいは特異性は両タンパク質の立体構造の特徴を反映するものと理解される。事実、血清アルブミンは環境に応じて容易にその構造を変えるタンパク質として見なされ、一方リゾチームは比較的硬い構造を持つとされていることと矛盾しない。

実際にコンタクトレンズ装眼時に、タンパク質の吸着の視力に与える影響をPSF(Point Spread Function)アナライザーを用いて検討している。

以上の結果は、これまで実験的に困難でもあり、且、複雑な過程を含む、固体表面へのタンパク質吸着に関する知見を明瞭にすると共に、他の高分子-タンパク質系への適用と相互作用機構の解明への端緒となり得るものであり、更なる適用例の集積が期待される。

最終試験結果の要旨

審査委員会は、本論文および論文別刷などを慎重に審査した結果、本論文が提出された論文別刷2編を基にして記述されていることを確認し、更に学位論文として十分に完成された内容を有しているものと認めた。その上で最終試験を開催し審査した結果、合格と判定した。