

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：博士(工学) 甲223

岐阜大学大学院工学研究科

博士後期課程 物質工学専攻

横山 康弘

目次

総合緒言	… 1
第1部 フーリエ変換赤外 (FT-IR) スペクトル測定法を用いた研究	… 7
第1章. 緒言	… 7
第2章. 実験	…12
2-1 試薬と試料	…12
2-1-1 モノマー (TTSSS) の合成	…12
2-1-1-1 モノマー (TTSSS) の合成方法	…12
2-1-2 ポリマー (PTTSSS) の合成	…15
2-1-2-1 ポリマー (PTTSSS) の合成方法	…15
2-1-3 リゾチーム (hen egg lysozyme)	…15
2-1-4 血清アルブミン (bovine serum albumin)	…18
2-2 実験操作	…21
2-2-1 リゾチーム溶液の調製	…21
2-2-2 血清アルブミン溶液の調製	…21
2-2-3 ポリマー溶液の調製	…21
2-2-4 ポリマー薄膜の製膜	…22
2-2-5 フーリエ変換赤外 (FT-IR) スペクトル測定	…22
2-2-5-1 透過 FT-IR スペクトル測定	…23
2-2-5-1-a リゾチーム、血清アルブミンの透過 FT-IR 測定	…23
2-2-5-1-b ポリマーの透過 FT-IR 測定	…24
2-2-5-2 ATR/FT-IR スペクトル測定	…24
2-2-5-2-a ポリマー薄膜の ATR/FT-IR スペクトル測定	…25
2-2-5-2-b 吸着リゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトル測定	…25
第3章. 結果と考察	…30
3-1 透過 FT-IR スペクトル測定	…30
3-1-1 ポリマーの吸光係数 ε_1 の決定	…30
3-1-2 リゾチームの吸光係数 ε_2 の決定	…32

3-1-3 血清アルブミンの吸光係数 ϵ_2 の決定	… 35
3-2 ATR/FT-IR スペクトル測定	… 37
3-2-1 ATR/FT-IR スペクトル測定の解析方法	… 37
A. 《厚膜試料》	
B. 《薄膜試料》	
3-2-2 吸着リゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトル	… 41
における、非吸着成分の寄与の補正	
A. バルク溶液中に均一に存在する血清アルブミン(非吸着成分)の寄与	
B. ポリマー薄膜の吸光度、及びバルク溶液中の血清アルブミンのうち、 プリズム表面からの距離 d_p 以内に存在する成分の寄与	
3-2-3 ポリマー薄膜の ATR/FT-IR スペクトル測定	… 44
3-2-4 ポリマー薄膜上に吸着するリゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトル測定	… 44
3-2-5 リゾチームの吸着量の決定	… 52
3-2-6 血清アルブミンの吸着量の決定	… 53
3-3 リゾチームの吸着機構の分析	… 54
3-3-1 吸着リゾチームの立体構造分析	… 54
3-3-2 リゾチームの吸着速度の解析	… 61
3-3-3 リゾチームの吸着量の濃度依存性	… 68
3-3-4 リゾチームの吸着に伴う立体構造変化	… 69
3-3-5 リゾチームの吸着等温線について	… 77
3-3-6 リゾチームの吸着の要因について	… 78
3-4 血清アルブミンの吸着機構の分析	… 78
3-4-1 吸着血清アルブミンの濃度依存性	… 78
3-4-2 吸着血清アルブミンの立体構造分析	… 79
3-4-3 血清アルブミンの吸着速度の解析	… 81
3-4-4 血清アルブミンの吸着に伴う立体構造変化	… 87

第2部. PSFアナライザーを用いた研究	…92
第1章. 緒言	…92
第2章. 対象および測定方法	…94
2-1 PSFアナライザーの測定原理	…94
2-2 測定したPSFからの他覚的網膜像のコントラストの導出	…94
2-3 被験眼と測定条件	…95
第3章. 結果	…97
第4章. 考察	…99
第3部. 総括	…113
第4部. 参考文献	…115
第5部. 謝辞	…123

総合緒言

科学・技術の進歩に伴って、これまでに多種多様な人工医用材料が開発されてきた。医用材料は、それぞれがその本来の役割を達成するためには、代替を必要とする臓器の機能と同様の基本機能を持つことが必要である。一般的に人工医用材料の機能、性能は、物理的機能、化学的機能および高次生体機能に分類される。現在までの人工医用材料は、Table 1 に示す様に物理的あるいは化学的基本機能を一応は備えているが、本来の臓器と同等の役割を果たすには、さらに高次の生体的機能を付与することが必須であるとされる。このためには生体成分とのハイブリット化が必要である。以下に具体的に、代替材料に求められる諸機能と生体臓器と諸組織との関係について解説する。これらの諸機能とその具体的内容および応用例を概説するとともに、それらをTable 1 にまとめた。

骨や歯などの硬組織修復用材料には、強度支持と構造保持が最も重要であり、そのため当初は金属材料が用いられたが、その後、セラミックス材料が登場した。しかし、前者は腐食が起こり易く、後者は弾性率が高すぎて脆いという欠点があり、現在では高強力繊維で強化した高分子複合材料の開発がなされている。

軟組織の被覆、閉鎖用には高分子エラストマーや繊維織物が用いられるが、これらは生体用導管も含めて、まず、柔軟性が要求される。また、人工心臓や人工弁では、高強度、耐疲労性および耐摩耗性が必要である。このように、その目的とする内容によって、それぞれ要求される基本機能は広く異なってくる。

生体組織同士あるいは生体組織と人工医用材料とを接合する方法には機械的な固定による物理的方法と医療用接着剤を用いた化学的方法とがある。血液中の病因物質や炭酸ガスを除去するには、高分子膜と吸着剤が用いられる。血液浄化用材料として、濃度差による溶質の拡散作用に基づく透析膜と圧力差に基づく限外濾過膜が広く用いられる。また、吸着剤としては、活性炭、イオン交換樹脂などがあるが、吸着剤表面に精細な化学修飾を施すことが必要となる人工肺などには高性能ガス交換膜の開発が必要となる。

Table 1 生体機能性の分類¹²⁴⁾

機能性の分類	内容	応用例
物理的機能	強度支持・構造保持	人工骨、人工歯根、人工関節
	被覆・閉鎖	損傷皮膚表面、組織欠陥部閉鎖、縫合糸、ステープル、ネジ
	チューブ・ポンプ・バルブ	人工血管、人工食道、人工気管、シャント、カテーテル、人工心臓、人工弁
	電気的特性	ペースメーカー、人工感覚器
	光学的性質	コンタクトレンズ、眼内レンズ
化学的機能	接合・充填	骨セメント、医療用接着剤
	物質移動	血液浄化、人工弁、コンタクトレンズ
	選択吸着	人工肝臓、アフィニティークロマト
高次生体機能	化学計測・化学反応・生体機能	バイオセンサー、バイオリアクター、ハイブリッド人工臓器

生体は、自己修復、恒常性、フィードバック性などの、人工医用材料では不可能な高次機能を備えている。従って、情報伝達や代謝などを含む高次生体機能を人工的に付与するためには、最終的には、生体組織と人工医用材料とを組合せたハイブリッド型人工臓器を開発することが必要となる。¹²⁴⁾

そこで今回、上述した機能を併せ持つ人工医用材料の一つであるコンタクトレンズ材料に着目し、本研究に用いたので、コンタクトレンズ材料の持つ物理的および化学的機能それぞれの特性について以下に述べる。

眼球は、外界の光を網膜まで光を正確に伝達し、同時にその光を一点に集光する役目を果たしている。光が屈折するためには、まず、物質が透明であることが必要である。透明体の一次的屈折要素としては、屈折率、境界面の曲率、中心厚みがあげられる。しかし、眼球は、単一レンズではなく、いわゆる複合レンズと考えられ、眼球の屈折率の算出には、角膜、水晶体などの屈折率、曲率半径、厚みのほかに、それぞれの屈曲面の位置と眼軸長を考慮する必要がある。更には、眼球の全屈折率をもとめるには、二次的屈折要素である涙液、角膜、房水、水晶体、硝子体などの屈折力の総和としての、一体の合成屈折率をもとめなければならない。屈折率は、水晶体(1.386~1.406) > 角膜(1.376) > 涙液=房水=硝子体(1.336)の順になり、曲率の大きさは、境界層となる角膜、水晶体である。中心厚みは、硝子体 > 水晶体 > 房水 > 角

膜>涙液の順になる。

光屈折を目的とした人工医用材料には、コンタクトレンズと眼内レンズなどがある。現在までは、生体安全性、適合性、耐久性、加工性、光透過性の点で優れているポリメチルメタクリレート(屈折率:1.490)系素材が用いられてきた。近年の代表的なコンタクトレンズ材料を以下Table 2, 3に示す。

角膜細胞は、大気中より涙液を介して直接酸素を取り込んでおり、必要な酸素を角膜に供給するために、酸素透過性の高い材料(ポリシロキサニルメタクリレート、ポリフルオロメタクリレートなど)が開発されてきた。一方、ソフトコンタクトレンズでは、ポリ 2-ヒドロキシエチルメタクリレートから始まり、装用感の向上、酸素透過性の向上(含水性ソフトコンタクトレンズでは、コンタクトレンズ中の水を介して酸素が透過するため、酸素透過性は含水率に依存する。)を目的として、ポリメタクリル酸、ポリビニルアルコール、ポリビニルピロリドンなどの高吸水性ポリマーが使用されている。

近年、装用者が著しく増加している使い捨てコンタクトレンズいわゆるデイスポーザブルコンタクトレンズも同様な材料が使用されている。最新の技術として、ソフトコンタクトレンズの優れた装用感と高酸素透過性ハードコンタクトレンズの性能を併せ持つ高酸素透過性の含水性ソフトコンタクトレンズ(シリコーンハイドロジェルコンタクトレンズ)がすでに欧米で開発、商品化されている。これらのコンタクトレンズは、前出のポリシロキサニルメタクリレートと高吸水性ポリマーからなるハイブリッドコンタクトレンズ材料から構成されている。また、本邦におけるハードコンタクトレンズ材料においては、より酸素透過性の高い、ポリトリストリメチルシロキシリルスチレンが開発され新規素材として上市されている。⁷⁰⁾

Table 2 ハードコンタクトレンズの主な材料

商品名(メーカー)	主な材料	酸素透過係数
Z(メニコン)	シロキサニルスチレン/ フルオロメタクリレート	250
S社	シロキサニルメタクリレート/ メタクリル酸	105
H社	シロキサニルメタクリレート/ フルオロメタクリレート	125
T社	シロキサニルメタクリレート/ フルオロメタクリレート	150

酸素透過係数：単位は $10^{-11}(\text{cm}^2/\text{sec}) \cdot (\text{mLO}_2/\text{mL} \times \text{mmHg})$

Table 3 ソフトコンタクトレンズの主な材料

商品名(メーカー)	主な材料	含水率(%)
1ディアキュービュー (ジュンソン&ジョンソン)	2-ヒドロキシエチル メタクリレート/ メタクリル酸	58
フォーカスデイリーズ (チバビジョン)	ポリビニルアルコール	69
ソフトS (メニコン)	アクリルアミド/ ビニルピロリドン	72
シークエンス (ボシュロム)	2-ヒドロキシエチル メタクリレート	38

上述した様に、優れたコンタクトレンズ材料には物質移動が可能な膜、即ち膜透過性能がもとめられる。膜内物質移動における膜の透過性能を評価する場合、膜に接する流体の境膜抵抗とそれに影響する因子を考慮する必要がある。

Fick の第1法則によると、物質A の分子拡散の速度(流速 J_A)は拡散方向における濃度勾配に比例し、次式で表される。

$$J_A = -D_A dc_A / dZ = D_A(c_1 - c_2) / Z_M \quad \dots\dots\text{式(1)}$$

ここで、 D_A は拡散係数(diffusion coefficient)、 dc_A/dZ はZ方向の濃度勾配、 Z_M は膜の厚さ、 c_1, c_2 は膜の両面の膜内における濃度である。

拡散係数 D_A の値は固相や液相では濃度に依存するが、気相では圧力に反比例し、組成によって変わらないことが多い。一般に、温度が高いほど D_A 値は大きくなり、液相の D_A は拡散する物質や溶媒のモル体積が大きいほど小さく、また、溶媒の粘度が高いほど小さくなる。

孔のない膜に溶けた物質が、濃度差を推進力として膜内を拡散するのが拡散的透過であり、その場合の物質移動速度は式(1)に従う。

一方、細孔のある膜を圧力差によって流体の体積流が起こるのが水力学的透過であり、一般に膜の単位面積を単位時間に透過する体積流、すなわち透過流速 J_A は膜の両側の圧力差 ΔP に比例し、膜厚 Z_M と流体の粘度 η に反比例し、式(2)式で表される(Darcyの法則)。

$$J_A = (Q / \eta) \times (\Delta P / Z_M) \quad \dots\dots\text{式(2)}$$

ΔP が流量と粘度に比例するのは層流の特性である。QはDarcyの水力学透過係数で、膜の諸特性の影響をすべて含んでいる。

本研究における試料として用いた生体医療用高分子材料(コンタクトレンズ材料)において、問題となるものは、涙液中にあるタンパク質の吸着にある。コンタクトレンズ材料にタンパク質が吸着することに伴い、

- ① 光線透過率の低下による視力低下
- ② 角膜への物理的な作用による障害に伴う感染症、アレルギー反応が上げられる。

医療に用いられる高分子材料はその使用目的によって異なるが、何れの場合にもその材料が生体側に悪影響を与えたり、生体側から損傷を受けたりすることなく、目的とする機能を十分発揮する事が基本条件である。人工材料が体液と接触した場合、最初のステップとして材料表面に体液中のタンパク

質が吸着し、その後細胞との相互作用が起こる。¹⁾ タンパク質が吸着した高分子材料では表面改質が生じるため、高分子材料の生体適合性はタンパク質吸着に大きく左右されることになる。²⁾ 従って生体適合性医療用高分子材料の開発のためには、吸着の機構を探る必要がある。吸着機構の解明には表面の形態、表面及び吸着分子の構造を分光学などの手法を用いて測定し、同時に吸着過程を熱力学や速度論的解析などのいろいろな角度から把握することによって、固体表面の状態及び吸着相互作用を総合的に考察しなければならない。

従って本研究では、

- ① 第1部としてフーリエ変換赤外 (FT-IR) スペクトル測定法を用いた研究
- ② 第2部として P S F (Point Spread Function) アナライザーを用いた研究

を行った。

第1部 フーリエ変換赤外 (FT-IR) スペクトル測定法を用いた研究

第1章. 緒言

これまで気相-液相、液相-液相の界面における吸着現象は界面活性物質を中心として、液体構造論などの分野で盛んに研究されてきた。しかし固相-液相の界面における吸着現象に関する研究は、前者に比べ立ち遅れ、今なお不明な点が多い。その理由は固体表面という特殊な環境のため理論との比較に耐えうる実験データを得ることが困難であったためである。一般的に、表面に吸着した高分子の形態を表すには、

- ① 単位面積当たりの吸着量あるいは分子数
- ② 界面に接している1高分子当たりのセグメント数 n と重合度 P の比 n/P
- ③ 表面吸着サイトの被覆率 θ
- ④ 吸着層の厚さ t
- ⑤ 吸着層中のセグメント密度の分布 ρ

の5個の値が必要となる。^{2,3)}

それに加え、その時のバルクに存在している高分子の平衡濃度がわかれば、吸着平衡を表す全てのデータがそろふことになる。それぞれの値の測定に関して述べると、吸着量とバルク高分子濃度との関係は測定しやすいが、 ρ と θ の測定には全表面積の広いシリカ表面などへの吸着実験が必要である。また厚さ t を求める手段としてエリプソメトリーがある。これは平坦で光を反射する金属板への吸着実験に用いられる光学的方法であって、偏光解析法ともいわれる。吸着層の平均屈折率 n と箱型のセグメント分布を仮定したときの厚さ t がもとめられ、 n と t から吸着量をもとめることができる。もしセグメント密度の分布 ρ の測定が可能であるならば、理論とその実験データとの比較が最も望まれる値であるが、有用な測定法は確立されていない。

タンパク質のような生体高分子における吸着現象は、その環境に大きく影響を受ける。その中でも pH の影響は大きい。pH によって高分子表面の荷電

が変わる場合、タンパク質と表面の静電的反発や引力の影響をうけるため、吸着量に大きな違いが生じる。また、タンパク質の吸着形態は、上述したセグメント密度の分布だけでは表せられない。合成高分子はタンパク質と同じように鎖状の分子ではあるが、溶液中では糸まりのようにその鎖が絡み合っているか、伸びており、分子ごとに別々の立体構造をとるのが普通である。ところが、タンパク質は生理的な環境下において、アミノ酸配列に応じて決まった立体構造をとるため、タンパク質の吸着形態を表すためには、タンパク質に特異的な立体構造の寄与を考慮する必要がある。タンパク質は固体表面に吸着すると多少なりとも変形あるいは変性することが知られている。例えばポリカチオンとポリアニオンからなる膜へのウシ血清アルブミンの吸着において、ポリアニオン過剰から中性表面への吸着量は少なく、吸着に伴うウシ血清アルブミン分子中の α -ヘリックス含量の低下も少なくないが、ポリカチオン過剰表面では吸着量の増大に伴い α -ヘリックス含量が急激に低下し、界面変性の程度が大きくなる。更に吸着に対する温度効果の例として、ポリスチレンラテックスへのヒト血清アルブミンの吸着が温度上昇と共に増加することが観察されている。この理由としては、温度上昇によるタンパク質分子内の構造的再配列変化により疎水性の高い成分がタンパク質分子表面に出現したためと考えられている。従って、高分子表面へのタンパク質の吸着挙動は、タンパク質表面と高分子表面との化学的な親和性だけでなく、タンパク質の溶液中、及び高分子表面上におけるそれぞれの立体構造の安定性にも大きく影響を受けることになる。以上のような界面における現象を考慮して高分子表面へのタンパク質の吸着挙動の考察を行うことが望まれる。^{4~8)}

表面分析は、種々の材料の表面・界面物性を原子・分子オーダーでの理解するための必須の手段であり、基礎研究からトラブル解決に至る幅広い用途で重要な役割を果たしている。おもな表面分析方法をTable 4に示す。

高分子材料の多くは、電気絶縁性の高分子から構成されており、導電性を有する金属・半導体材料とは異なる性質を有する。Table 4の方法のうち、XPS, AES, SIMS, TOF-SIMS, EPMA, SEM, FE-SEMおよびSTMでは、プローブ・検出信号のいずれかにおいて荷電粒子(イオン・電子)を使用している。これらの方法を高分子材料に適用する場合は、帯電を解決する配慮が必要である。

Table 4 おもな表面分析方法⁶⁹⁾

手法	情報
①X線光電子分光法(XPS,ESCA)	元素, 結合情報(分布)
②オージェ電子分光法(AES)	元素, 分布(結合状態)
③二次イオン質量分析法(SIMS,TOF-SIMS)	元素, 分布(構造情報)
④電子プローブ微小部分分析法(EPMA)	元素, 分布
⑤走査電子顕微鏡(SEM,FE-SEM)	表面形態
⑥走査型プローブ顕微鏡(SPM,STM,AFM)	表面形態, 粗さ, 局所物性
⑦レーザーラマン分光法	化学結合, 配向, 結晶性, 同定
⑧フーリエ変換赤外分光法(FT-IR)	化学結合, 配向, 二次構造, 同定
⑨接触法(液滴法, Wilhelmy法)	濡れ性, 表面自由エネルギー
⑩Point Spread Function 測定法(PSF)	光学特性

XPS : X-ray Photoelectron Spectroscopy,

ESCA : Electron Spectroscopy for Chemical Analysis,

AES : Auger Electron Spectroscopy,

SIMS : Secondary Ion Mass Spectrometry,

TOF-SIMS : Time of Flight SIMS,

EPMA : Electron Probe Micro Analysis,

SEM : Scanning Electron Microscope,

FE-SEM : Field Emission SEM,

SPM : Scanning Probe Microscope,

STM : Scanning Tunneling Microscope,

AFM : Atomic Force Microscope,

FT-IR : Fourier Transform Infrared Spectroscopy,

PSF : Point Spread Function,

また、有機材料は、一般に光・電子・イオンなどに対する耐性が低く、観測による損傷の恐れが大きい。一方、高分子材料の組成分析では、単なる元素組成ではなく、官能基(化学結合)に関する情報がもとめられる。また、個々の分子の構造および分子集合体の配列に関する情報も期待される。従って、高分子材料の表面分析においては、金属・半導体などで有効な手段をそのまま適用するのではなく、調べたい材料の特性に応じた方法を適用する必要がある。⁶⁹⁾

本研究では固体試料表面における吸着現象という特殊な環境であるため、Harrick、Fahrenfortらによって提唱されたATR(Attenuated Total Reflection)法を利用したFT-IR(Fourier Transform Infrared Spectrometry)を用いた。ATR法はバルク分析はもとより、ATRプリズム表面から $m\mu$ オーダーの分析が可能であり、表面への吸着挙動を調べるために広く利用されている。ATRプリズム表面に吸着する高分子の赤外活性な各構造から、高分子の高次構造の情報を得ることも可能である。また時間変化を含めた吸着量を追跡できる特徴があり、吸着もしくは脱着速度の測定にも有用である。^{11~15)}

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り、ポリスチレンを基本構造とするシリコン系ポリマーであるPoly-Tris(tri-methyl siloxy)silylstyrene (以後PTTSSSと略す。)を用い、吸着タンパク質としては、以下の Table 5 示す涙液中に多く含まれるリゾチーム並びに血清アルブミンに着目し、球状タンパク質であるニワトリ卵白リゾチーム(以後リゾチームと略す。)並びにウシ血清アルブミン(以後血清アルブミンと略す。)を用いた。

Table 5 人涙液に含まれるタンパク質

構成成分	濃度(mg/ml)
全タンパク質量	5~9
主なタンパク質	
リゾチーム	2.4±0.7
ラクトフェリン	1.5±0.4
血清アルブミン	0.054

そこで本研究では、ポリマー表面に吸着したリゾチームおよび血清アルブミンの

- ① 吸着量の決定
- ② 吸着機構の分析
- ③ 立体構造分析
- ④ 濃度依存性
- ⑤ 速度論的解析

⑥ 立体構造変化

を ATR/FT-IRにより追跡し、評価を行った。

第2章. 実験

2-1 試料と試薬

本研究に用いた高分子 PTTSSS は、p-Vinylphenylmagnesium(化合物①)と Trimethoxychlorosilane(化合物②)との反応により得られる p-Trimethoxysilylstyrene(化合物③)を Trimethylchlorosilane(化合物④)と反応させ、得られた Tris(tri-methylsiloxy)silylstyrene を以下に述べる方法により重合を行い、吸着実験に供した。

Tris(tri-methylsiloxy)silylstyrene(以後 TTSSS と略す。)は、川上ら^{66, 67)}の方法によって合成を行った。TTSSS の構造式を Fig. 1 に示す。

2-1-1 モノマー(TTSSS)の合成

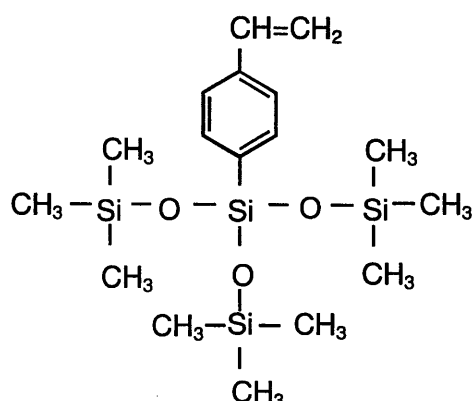


Fig. 1 Chemical structure of Tris(tri-methylsiloxy)silylstyrene

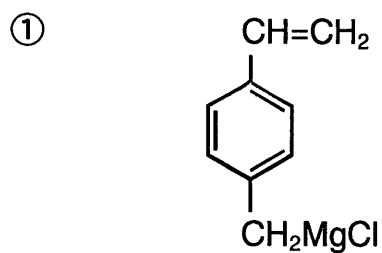
2-1-1-1 モノマー(TTSSS)の合成方法

1. p-ビニルフェニルマグネシウムクロライドは、テトラヒドロフラン(85 ml) 中にてマグネシウム(13.6 g, 148 m mol)とクロロスチレン(10.5 g, 75 m mol)を室温にて反応させ、得られた。構造式を Fig. 2 の①に示す。
2. p-トリメトキシシリルスチレンは、50 °Cにおいて p-ビニルフェニルマグネシウムクロライド(36 m mol) THF 溶液(40 ml)にトリメトキシクロロシラン(8.5 g, 54 m mol)を滴下し、その後、反応溶液を 60~65 °C に保温し、

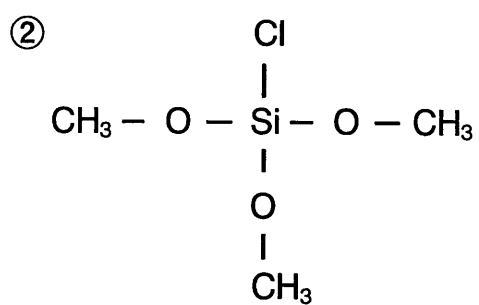
3 時間反応させ、得られた。反応溶媒を留去した後、脱水処理したエチルエーテル(90 ml)を加え塩を生成させ、窒素雰囲気下にて濾過を行い、p-トリメトキシシリルスチレンを得た。収率は、36 %であった。得られた p-トリメトキシシリルスチレンは、核磁気共鳴スペクトル法(NMR)にて確認を行った。(¹H NMR(CCl₄) δ=3.40ppm(s, 9H, CH₃), 5.05ppm(q, 1H, J₁=10.8Hz, J₂=1.5Hz, H-C=C-), 5.60ppm(q, 1H, J₁=17.2Hz, J₂=1.5Hz, H-C=C-), 6.50ppm(q, 1H, J₁=10.8Hz, J₂=17.2Hz, C=C-H), 7.08ppm(d, 2H, J=7.8Hz, C₆H₅Si), 7.40ppm(d, 2H, J=7.8Hz, H₅C₆Si))。構造式を Fig. 2 の③に示す。

3. トリス(トリ-メチルシロキシ)シリルスチレンは、p-トリメトキシシリルスチレン(0.9 g, 4 mmol)とトリメチルクロロシラン(1.3 g, 12 mmol)との混合溶液を蒸留水(4.4 ml)とジエチルエーテル(4.2 ml)の混合溶液に 15 °C 下にて 1 時間かけ滴下し、その後 1 昼夜反応させることにより得た。得られたトリス(トリ-メチルシロキシ)シリルスチレンをエーテルにて抽出した後、カラムクロマトグラフ法にて分取し、その収率は、25 %であった。得られたトリス(トリ-メチルシロキシ)シリルスチレンは、核磁気共鳴スペクトル法(NMR)にて確認を行った。

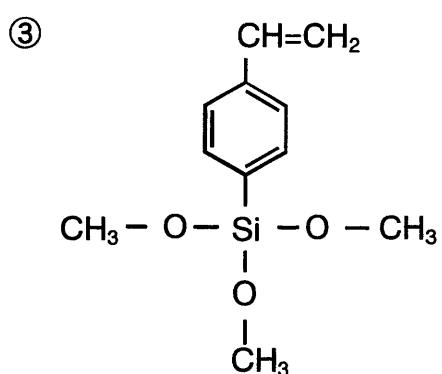
(¹H NMR(CCl₄) δ=0.20ppm(s, 27H, SiCH₃), 5.25ppm(q, 1H, J₁=10.8Hz, J₂=1.5Hz, H-C=C-), 5.73ppm(q, 1H, J₁=17.2Hz, J₂=1.5Hz, H-C=C-), 6.72ppm(q, 1H, J₁=10.8Hz, J₂=17.2Hz, C=C-H), 7.33ppm(d, 2H, J=7.8Hz, C₆H₅Si), 7.51ppm(d, 2H, J=7.8Hz, H₅C₆Si))。



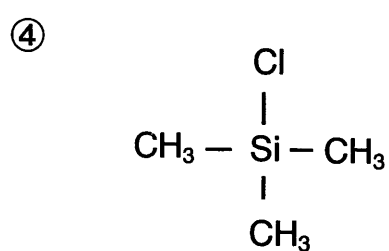
p-Vinylphenylmagnesium



Trimethoxychlorosilane



p-Trimethoxysilylstyrene



Trimethylchlorosilane

Fig. 2 Chemical structures of compounds used for the synthesis of Tris(tri-methylsiloxy)silylstyrene

2-1-2 ポリマー(PTSSS)の合成

2-1-2-1 PTTSSS の合成方法

本研究では、プリズム表面にポリマー薄膜を形成させることによって、実験を行う為、未架橋の線状ポリマーを合成した。溶媒への溶解性を考慮すると、得られるポリマーの分子量は、約 200,000 程度が望ましい。ポリマーの分子量は、重合開始剤量と反応温度に依存する為、各種の条件下において実験を行った結果、分子量制御された PTTSSS を以下のように乳化材を使用せず溶液重合法によって合成可能であることが明らかになった。以下に PTTSSS の合成法を記す。

メタノール 450 ml に、蒸留生成した TTSSS を 50 g と、ラジカル重合触媒である 2,2'-azobis(2,4-dimethyl-valeronitrile) 0.2 g を量り採り、窒素雰囲気下で 50 °C、攪拌速度 350 rpm 前後で 24 時間攪拌して重合し、PTTSSS を得た。得られた PTTSSS の分子量は、ゲルパーミエーションクロマトグラムにて測定を行い、分子量は約 200,000 であることを確認した。また、密度測定を行い、密度 1.19 g/cm³であることを確認した。得られたポリマーは、高酸素透過性コンタクトレンズの基礎材料である。構造式を Fig. 3 に示す。

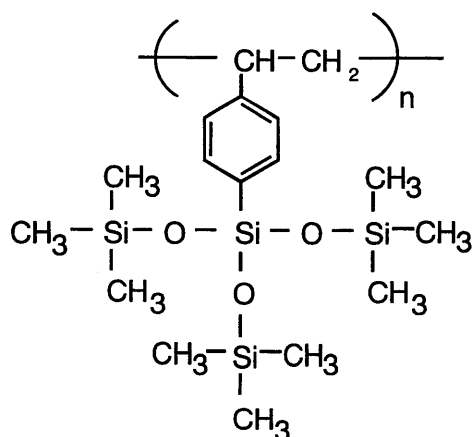


Fig. 3 Chemical structure of the PTTSSS

2-1-3 リゾチーム(hen egg lysozyme)

リゾチームの立体構造に関する研究は古くから行われ、X線解析により立体構造が解明され、詳細な立体構造が明らかにされてきた。それらの結果を以下にまとめた。本研究に使用したニワトリ卵白リゾチーム(hen egg

lysozyme)は、129個のアミノ酸残基からなる1本鎖のポリペプチドで、S-S結合が4ヶ所にあり、分子量14,500、等電点11、1%溶液の吸光度 A_{280nm}^{1cm} が26.9のタンパク質である。

リゾチームのヘリックス含量は、ミオグロブリンなどに比べて少なく、はっきりと規則的なヘリックスを形成している残基は約40個である。しかし、ヘリックス含量を正確に定義することは難しく、不規則な水素結合で形成されているヘリックスも含めると、57個の残基がヘリックス形成にあずかっていることになり、ヘリックス含量は、44%になる。規則的なヘリックスを形成している領域、およびこれらのヘリックスの特徴をTable 6にまとめた。

Table 6 ニワトリ卵白リゾチームのヘリックス部分のパラメーター
(Blakeら, 1967)

ヘリックス	残基	残基あたりの の進み(Å)	残基あたりの の回転(度)	1回転あたりの 残基数
A	5~15	1.51	100.2	3.59
B	24~34	1.48	98.3	3.66
C	80~85	1.66	106.6	3.38
D	88~96	1.45	96.7	3.72

この表にみられるように、5~15、24~34、88~96のヘリックス部分では、1残基あたりの進み、および1回転あたりの残基の数は、Paulingらの提案した α -ヘリックスのパラメーター1.5Å、および3.6残基に近い。しかし、これらのヘリックスでも何箇所かで α -ヘリックスのひずみがみられ、各ペプチド基が回転して、C0基はわずかにヘリックス軸から外に、NH基は内に向いているのが知られ、典型的な α -ヘリックスからのずれは、分子内部にある24~34のヘリックスで最も大きく、5~15のヘリックスでは小さい。この回転によって、各NH基は4残基あとのC0の方を向いているのではなく、3残基あとのC0と4残基あとのC0との間を向いたような形になっている。 α -ヘリックスでは、NH基は4残基目のC0と水素結合をつくるが、リゾチームのある種のヘリックスでは、 α -ヘリックスと3.0-ヘリックスの中間の構造となる。80~85の短いヘリックスは3.0-ヘリックスに近く、119~122はただ1回転だけの3.0-ヘリックスである。また5~15のヘリックスのC末端側は3.0-

ヘリックスに近い。

リゾチームのポリペプチド鎖の規則構造には、上述のヘリックスの他に、逆平行 β 構造が42~54の残基にありまた、17~20、20~23、36~39、54~57、60~63、74~77、98~101、104~107、115~118、124~127には β -ターンが存在することが知られている。

リゾチームの一次構造から疎水性残基は一様に分布しているのではなく、とくに、39~52の残基はほとんどすべて親水性である。N末端から40番目までには疎水性と親水性の残基があり、疎水性残基はおおよそ3~4残基ごとに出現している。 α -ヘリックスが3.6残基で1回転するラセンであるとする、ヘリックスの片面に疎水性側鎖が集まることになる。5~15、24~34のヘリックス部分は α -ヘリックスに近く、これら2ヶ所のヘリックスの片面に集まった疎水性残基は、互いに相互作用して疎水性領域をつくることができる。同様のことは、ミオグロビンやヘモグロビンのグロブリン部分のヘリックスについても知られている。

35に続く12個の残基はすべて親水性であり、この領域では逆平行 β 構造が形成されている。生合成の場において水とのみ相互作用して、N末端から40番目までの間のヘリックス部分によってつくられた疎水領域とは相互作用することはできないとされる。しかし、55、56番目に疎水性のIleとLeuとが結合すると、初めて水との接触を避けて、すでに形成されていた疎水領域と相互作用することができ、41~54の鎖は折れ曲がって逆平行 β 構造がつけられるとPhillips¹²⁷⁾は提案している。

55に続く56~86の鎖は、かなり不規則に β 構造の部分と接触しながら折りたたまれている。このようにしてでき上がった1~86の鎖は、全体として二つの翼をもったような構造になっている。88~100の間には88~96の間にヘリックスがあり、ここでも部分的ではあるが疎水性の面を形成しているのがみられる。このヘリックスは二つの翼の間の隙間を橋渡しするような位置にあって、疎水性の面は分子内部に埋もれている。しかし、この隙間は88~96の間のヘリックスで完全に満たされることはなく、そのために深い溝が分子中央にできており、この溝は、リゾチームの酵素作用にとって重要な活性部位を形成することになる。最後のC末端側の20個ほどの残基は、N末端側の

40 残基で形成されている球状構造のまわりに巻きついている。

ニワトリ卵白リゾチームの分子内部には、Tyr 23、Trp 28、108、111 で囲まれた Met 105 があって、疎水性の箱を形成している。⁶⁸⁾

2-1-4 血清アルブミン(bovine serum albumin)

血清アルブミンもリゾチームと同様、最もよく研究された代表的な水溶性タンパク質である。以下に血清アルブミンの構造および特徴を簡単に述べる。血清アルブミンは一本鎖のタンパク質であり、本研究に用いたウシ血清アルブミン(BSA)は、582 個のアミノ酸残基からなる⁶⁵⁾ その一次構造、即ちアミノ酸の配列順序は、Brown⁷⁶⁾ によって 1975 年にはじめて発表された。その後、Peters¹²⁶⁾ によって正確なアミノ酸組成が報告されたその結果を Table 7 に示す。

Table 7 ウシ血清アルブミンのアミノ酸組成¹²⁶⁾

アミノ酸	BSA
Asp	41
Asn	13
Thr	34
Ser	28
Glu	59
Gln	20
Pro	28
Gly	16
Ala	46
Val	36
half-Cys	35
Met	4
Ile	14
Leu	61
Tyr	19
Phe	27
Lys	59
His	17
Try	2
Arg	23
計	582
窒素原子数	779
pH7 における実効電荷(計算値)	-18
平均残基量	113.86

構造的長所は、3個のドメインと9個のループから成るものである。^{77~80)} 17個のS-S結合のうち1番目のドメインを除けば他はすべて2個ずつ隣り合って存在する。一次構造から計算するとウシ血清アルブミンの分子量は、66,267となる。

血清アルブミンは血漿という複雑な混合物から単離されるので、精製後も微量の不純物が混ざっている。結晶性血清アルブミンであっても純度は95~98%程度であるとされる。血清アルブミンは長鎖の脂肪酸を強く結合しており⁸¹⁾、脱脂の操作をしなければ、血清アルブミン1分子あたり少なくとも1~2個の脂肪酸を結合している。市販の結晶性血清アルブミンをさらに精製するにはセファデックス G-150によるゲル濾過によって会合体やグロブリンを除き、さらに脱脂の操作をすることによって脂肪酸を除くことがもとめられる。脱脂の一つの方法はpH3で血清アルブミンを活性炭処理することである。^{81, 82)} その他の脱脂方法も提案されている。⁸³⁾

市販の血清アルブミンは二量体や三量体が混ざっていたり、メルカプトアルブミンとノンメルカプトアルブミンの混合物である。更に等電点の異なるものが混ざっていたりする。このようなことを血清アルブミンのマクロな不均一性(macroheterogeneity)と呼ばれている。^{84~88)} また、血清アルブミン分子は生体内でCys 35以外の他のアミノ酸残基側鎖の一部が化学的に修飾されたり、S-S結合対の組合せが異なる成分に変化するなど、血清アルブミンそのものが不均一な組成あるいは構造を持つ分子の集団といわれている。従って血清アルブミンの純度が100%であると仮定しても分子オーダーでの純度を基準にすると純品ではないことになる。分子オーダーにおける不均一性はミクロ不均一性(microheterogeneity)と呼ばれている。¹²⁵⁾

ウシ血清アルブミンは、その溶液のX線小角散乱⁸⁹⁾、Kerr効果の緩和の測定結果など^{90~92)}によると長軸140Å、短軸40Åの扁長回転楕円体であり、蛍光偏光の測定から血清アルブミンは、三つの部分からなるモデルが提唱されている。^{93, 94)} これは前述のBrownによる三ドメイン・モデルと一致している。シャドウイング法によって得られた血清アルブミンの電子顕微鏡写真によっても、同じオーダーの値が得られている。⁹⁵⁾

ウシ血清アルブミン溶液について測定された主要な物理化学的性質の値を

Table 8 に示す。 $A_{1cm}^{1\%}$ の値は、ウシ血清アルブミンの濃度を決めるときに用いられる。表中の値は、中性の pH での値である。

Table 8 ウシ血清アルブミンの物理化学的パラメーター¹²⁶⁾

物理化学的パラメーター	値
分子量	
一次構造から	66, 267
沈降平衡法	66, 700
沈降係数 $S_{20,W} \times 10^{13}$ (S)	
単量体	4. 5
二量体	6. 7
拡散係数 $D_{20,W} \times 10^7$ (cm ² /sec)	5. 9
部分比容 ν_{20} (ml/g)	0. 733
固有粘度 $[\eta]$ (dl/g)	0. 0413
摩擦比 f/f_0	1. 3
比屈折率増分 (578nm), $\times 10^{-3}$	1. 90
吸光係数 $A_{1cm}^{1\%}$ (279nm)	6. 67

血清アルブミンの等電点は通常 pH 4. 2~4. 8 の間にある。等電点の値は正確には Tiselius の移動界面電気泳動法によって決定されるが、その値は溶媒の種類とそのイオン強度の影響をうけて変化する。⁹⁶⁾ これは主として溶媒中のイオン、特に陰イオンが血清アルブミンに結合するためである。若干は温度の影響も受ける。等イオン点の値は pH 5. 2~5. 3 である。^{97, 98)}

タンパク質の α -ヘリックス、 β 構造の含量は円二色性からの平均残基楕円率の値からもとめられ、^{100, 101)} 血清アルブミンに対する α -ヘリックス含量の値としては 55~70 % 程度の値が得られている。^{101~104)} Reed ら¹⁰¹⁾ は pH 7. 4 において α -ヘリックス含量 68 %、 β 構造の含量 18 % を得た。

また α -ヘリックス含量は、旋光分散に対する Moffitt-Yang の式における定数 b_0 の値、平均残基旋光度 $[m']_{233}$ の値からもとめられている。¹⁰⁵⁾ またラマン分光法^{106, 107)} によっても、もとめられている。ヒト血清アルブミンの X 線構造解析結果が Carter ら^{128, 129)} によって発表された。その結果は、上述した三ドメイン構造からなり、全体の形はハート型 (heart shape 構造) であり、流体力学的測定結果と明らかに異なる形である。水溶液における形態と結晶状態における形態とは異なるのかもしれないし、またヒトとウシの種差によ

る相違であるかもしれないが、何れにしろドメイン構造は広く受け入れられている。

2-2 実験操作

2-2-1 リゾチーム溶液の調製

本研究では、試薬として Sigma 社製、L-6876、Lot No. 65H7025 を精製することなくそのまま使用した。リゾチーム溶液はリン酸緩衝重水溶液として調製した。溶液の調製に水ではなく重水を使用したのは、アミド吸収帯領域での水の強い吸収を避けるためである。また、重水溶媒使用のその他の利点として、吸着によるタンパク質の変性をより明確にすることがあげられる。溶媒が水の場合、タンパク質の二次構造の α -ヘリックス、ランダムコイルそれぞれの吸収帯が重複して現れる。その点、重水置換した溶液中においては α -ヘリックスとランダムコイルの吸収が、置換によりそれぞれシフトするため分離がしやすくなる。

まず溶液の調製に先立ち、 Na_2HPO_4 (無水)、 NaH_2PO_4 (無水)を重水に溶かし、凍結乾燥機(IWAKI FREEZE DRYER)を用いて凍結乾燥することによりリン酸塩の重水素置換を行った。重水素置換したリン酸塩及び NaCl を用いて、100mM NaCl、10mM $\text{Na}_2\text{DPO}_4/\text{NaD}_2\text{PO}_4$ のリゾチーム重水溶液を調製した。溶液の重水素イオン濃度は、NaOD 及び DCI の重水溶液を用いて $\text{pD}=7$ ($\text{pH}=6.6$)に調製した。 pD の測定にはDIGITAL pH METER HM-20B(東亜電波工業製)を用いた。

2-2-2 血清アルブミン溶液の調製

本研究では、試薬として Serologicals 社製の Bovine Albumin Crystallized (Lot No. 102)を精製することなくそのまま使用した。アルブミン溶液は、リゾチーム溶液の調製と同様に、調製した。

2-2-3 ポリマー溶液の調製

ヘキサンに塊状の PTTSSS を溶解し、0.03 g/l の PTTSSS/ヘキサン溶液を調製した。PTTSSS は完全に溶解させるため、超音波で 30 分処理した後一晩放置した。

2-2-4 ポリマー薄膜の製膜

本研究では、ポリマー薄膜の製膜はすべて casting 法を用いて行った。casting 法とは調製されたポリマー溶液の一定量を基板上、もしくはプリズム上に直接滴下し乾燥させることにより製膜する方法である。基板として、透過 FT-IR スペクトル測定には CaF_2 の円板(半径 1cm)、ATR/FT-IR スペクトル測定には ZnSe プリズム{反射回数： $N' = 10$ 、屈折率： $n = 2.43(1705 \text{ cm}^{-1} \sim 1575 \text{ cm}^{-1})$, $n = 2.42(1485 \text{ cm}^{-1} \sim 1425 \text{ cm}^{-1})$ }を使用した。

2-2-5 フーリエ変換赤外(FT-IR)スペクトル

タンパク質の吸着の評価は、タンパク質の赤外吸収におけるアミド I' 吸収帯($1705 \text{ cm}^{-1} \sim 1595 \text{ cm}^{-1}$)の測定から行った。

フーリエ変換赤外分光法とは、マイケルソン干渉計を用いて光源からの赤外光を各波数成分に比例する周波数に変調した交流信号(インターフェログラム)として出力し、これをフーリエ変換することによって光の強度の波数依存性(スペクトル)を得る方法である。フーリエ変換赤外分光法は、構造解析、定性及び定量分析に非常に有効な手段である。その理由としては、次のことがあげられる。

- ① 干渉計の移動鏡の位置をレーザーで測距しているため、分光に回折格子を用いる分散型分光法に比べてスペクトルの波数精度が非常に良い。それにより同一試料を同一条件で何回測定しても吸収ピークの位置は変化しないため、定量分析に優れている。
- ② スペクトル全域にわたって一定で高い分解能の測定ができる。それにより試料本来の持っている吸収バンドの形を表現することが可能である。
- ③ 多数回の積算が可能であり、弱い吸収についても精度の良いスペクトルを得ることができ、面積強度、ピーク強度を精度よくもとめることができる。¹⁰⁾

本研究では、透過法及び ATR 法を用いて FT-IR スペクトル測定を行った。フーリエ変換赤外分光光度計として、PERKIN-ELMAR 社の SYSTEM 2000 を使用した。また、透過 FT-IR スペクトル測定、ATR/FT-IR スペクトル測定には MCT(水銀-カドミウム-テルル半導体)検知器を使用した。

赤外吸収測定法では、空気中の水蒸気の存在に注意しなくてはならない。水蒸気は 3000 cm^{-1} 付近、 $2000\sim 1300\text{ cm}^{-1}$ 、 400 cm^{-1} 以下に吸収を示すため、これらの領域での赤外光のエネルギーは分光器内で減少する。¹⁰⁾ そのため、試料の吸収強度測定が不正確になることがあり得る。そこで本研究では分光器内部を乾燥させるため、モレキュラーシーブトラップを通過させた乾燥窒素を分光器内に流すことにより、分光器内の水蒸気を除去した。加えて、水蒸気のスペクトルを別に測定し、試料のスペクトルから差し引くことで窒素により除去できなかった水蒸気による吸収を差スペクトルにより除去した。

2-2-5-1 透過 FT-IR スペクトル測定

本研究では、リゾチーム、血清アルブミン及びポリマーの吸光係数をもとめるために透過法による FT-IR スペクトル測定を行った。試料の吸光度面積 A_{area} 、分子吸光係数を ε 、試料濃度を C 、光路長を l とすると Lambert-Beer の法則より

$$A_{area} = \varepsilon l C \quad \dots\text{式(3)}$$

が成立する。¹⁶⁾ 式(3)よりわかるように試料濃度と吸光度面積は比例関係にある。そのため目的成分を様々な濃度で調製した標準試料を使用して、検量線を作成することによりそれぞれの吸光係数を算出した。(試料濃度 $C \times$ 光路長 l) を横軸に、指定した吸収バンドの吸光度面積 A_{area} を縦軸にとることで、吸光係数 ε がもとめられる。

2-2-5-1-a リゾチーム、血清アルブミンの透過 FT-IR 測定

透過法用セルの窓板として CaF_2 円板(半径 1cm)を使用した。様々な濃度のリゾチーム、血清アルブミン溶液各 $20\ \mu\text{l}$ を、2 枚の CaF_2 板ではさみサンプルとした。この時、 CaF_2 板と同サイズにカットした厚さ 0.01cm のテフロンシートを中心をくりぬき、スペーサーとして使用した。また重水のみ FT-IR スペクトルをバックグラウンドとした。測定条件は、積算回数 400 回、分解能を 4 cm^{-1} とし、測定前に N_2 ガスパージを 5 l/min で 10 分間行った。

2-2-5-1-b ポリマーの透過 FT-IR 測定

リゾチーム、血清アルブミンの場合と同様の CaF₂ 板を使用した。CaF₂ 板上に casting 法にて、厚みの異なるポリマー薄膜を製膜するために、0.03 g/l 濃度のポリマー溶液の滴下量を調製して、板上に存在するポリマー量を調製した。CaF₂ 板のみで測定した FT-IR スペクトルをバックグラウンドとした。測定条件は、積算回数 800 回、分解能 4 cm⁻¹ とし、測定前に N₂ ガスパージを 5 l/min で 10 分間行った。

2-2-5-2 ATR/FT-IR スペクトル測定

ATR 法は固体試料の表面分析用に最も頻繁に用いられる方法である。IRE (Internal Reflectance Element) と呼ばれる屈折率の大きいプリズムに試料を接触させ、IRE に赤外光を入射した際、IRE と試料の界面に発生するエバネッセント波が試料に吸収され、結果として IRE を通過する光量に変化が生じる現象を観測する装置である。この概要図を Fig. 4 に示す。

屈折率の異なる物質(それぞれの屈折率を n_1 、 n_2 とし $n_1 > n_2$ であるとする。)の界面において、大きな屈折率 n_1 を持つ物質側から、小さな屈折率 n_2 を持つ物質側へ入射角 θ で光が入射するとき、 n_1 、 n_2 で決まる臨界角 θ_c より大きい入射角 ($\theta > \theta_c$) では光は 100 % 反射される。臨界角は次式で表される。

$$\theta_c = \sin^{-1} n_2/n_1 \quad \dots \text{式(4)}$$

この全反射の様子を微視的に見ると、光は界面で反射するのではなく、ある深さだけ試料側にしみ込んでから全反射している。このしみ込んだ光をエバネッセント波といい、試料に吸収のない波数領域では光は全反射するが、吸収のある領域では 100 % 全反射するのではなく、吸収の強さに応じてエバネッセント波は減衰する。このエバネッセント波の減衰が全反射吸収スペクトルとして測定される。またプリズムに台形型結晶を用いることで、光に多重反射を行わせ信号強度の増大をはかることができる。多重反射による入射光のエネルギー損失は、積算回数を増やし、検出器として通常用いられる TGS (熱電対) 検知器よりも感度が高く、また測定時間の短い MCT 検知器を使用するこ

とで容易に補うことができる。¹¹⁾ 本研究ではプリズムとして台形型 ZnSe プリズムを、検出器として MCT を使用した。

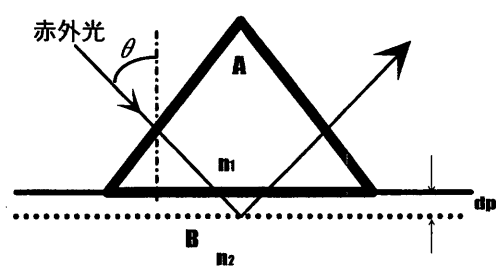


Fig. 4 ATR法原理の概要図

n: 屈折率 $n_1 > n_2$
A: ATR結晶 B: 試料 dp: しみ込み深さ
 θ : 入射角

2-2-5-2-a ポリマー薄膜の ATR/FT-IR スペクトル測定

ATR 測定用の ZnSe プリズム上に製膜したポリマー薄膜の厚みの確認のために、ATR/FT-IR スペクトル測定を行った。プリズムのみの ATR/FT-IR スペクトルをバックグラウンドとした。測定条件は、積算回数 100 回、分解能 4 cm^{-1} とし、測定前に N_2 ガスパージを 5 l/min で 10 分間行った。

2-2-5-2-b 吸着リゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトル測定

ポリマー薄膜上へ吸着するリゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR 測定を次の行程で行った。

- ① ZnSe プリズムを蒸留水、エタノール、ヘキサン、テトラヒドロフラン (THF) 等を用いて洗浄した。
- ② プリズムのみの ATR/FT-IR スペクトルを測定し、ポリマー薄膜スペクトルのバックグラウンドとした。測定条件は積算回数 100 回、分解能 4 cm^{-1} とし、測定前に N_2 ガスパージを 5 l/min で 10 分間行った。
- ③ ZnSe プリズム上にポリマー薄膜を製膜し、ポリマー薄膜の ATR/FT-IR スペクトル測定を行った。測定条件は②と同様である。
- ④ ポリマー薄膜上を重水緩衝溶液で満たし、テフロンシート及び蓋を用いてパッキングし、スペクトル測定を行った。得られたスペクトルを吸着リゾチーム、血清アルブミンスペクトルのバックグラウンドとした。測定条件は②と同様である。

- ⑤ 緩衝溶液を取り除き、ポリマー薄膜上を濃度既知のリゾチーム、血清アルブミン溶液で満たし、④と同様にパッキングした。タンパク質溶液を充填した時点を超着開始時間とした。
- ⑥ リゾチームに関しては、超着開始後、15分でスペクトル測定を行った。測定条件は②と同様である。以後、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、16時間、24時間後に同様のスペクトル測定を行い、超着の経時変化を測定した。血清アルブミンに関しては、超着開始後、15分でスペクトル測定を行った。測定条件は②と同様である。以後、30分、1時間、2時間、4時間、8時間、10時間後に同様のスペクトル測定を行い、超着の経時変化を測定した。サンプルの調製手順の模式図を Fig. 5 に、ATR/FT-IR スペクトル測定の模式図を Fig. 6, 7 に示す。

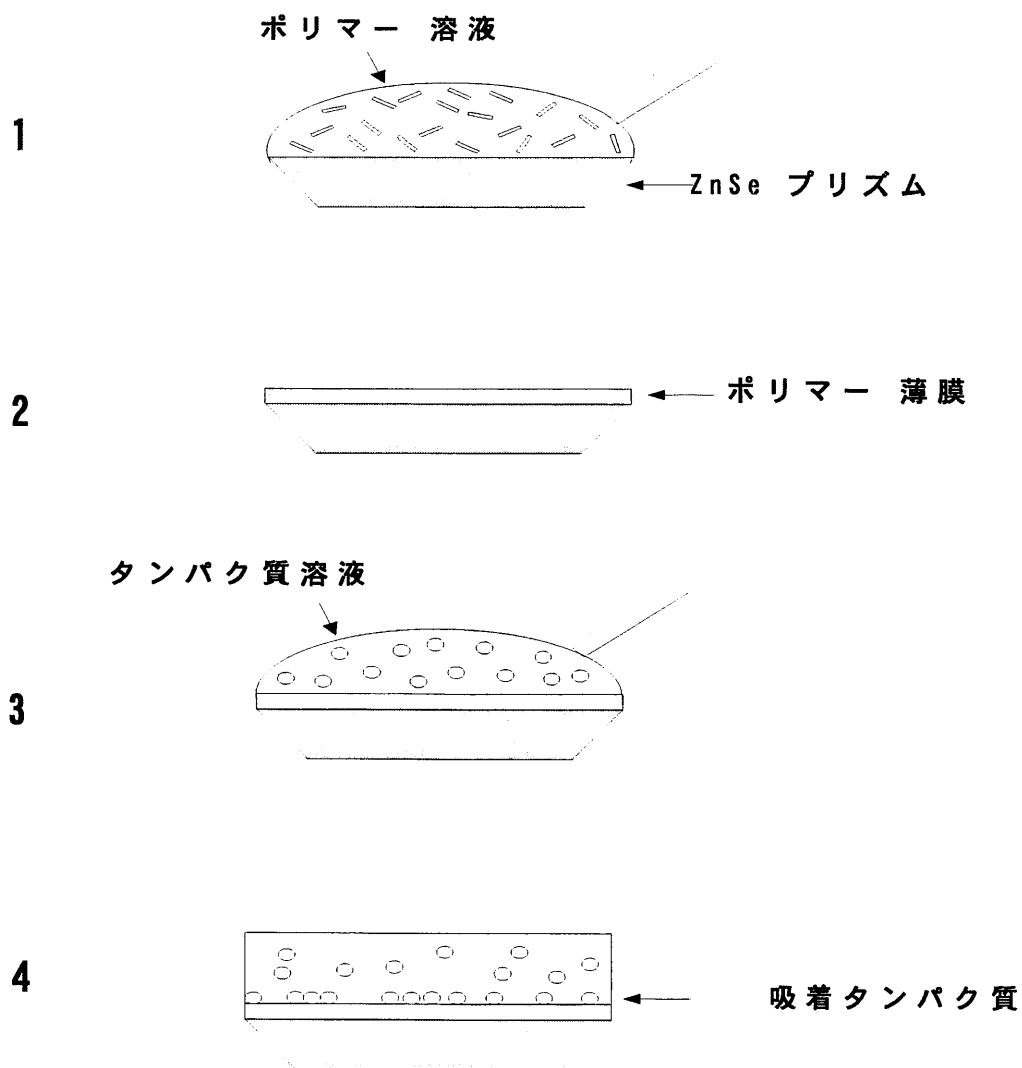


Fig. 5 吸着タンパク質の ATR/FT-IR スペクトル測定の手順調整の模式図

1. ポリマー溶液を ZnSe プリズム上にキャスト
2. ポリマー薄膜の調整
3. ポリマー薄膜上にタンパク質溶液を充填
4. 吸着タンパク質の ATR/FT-IR スペクトル測定

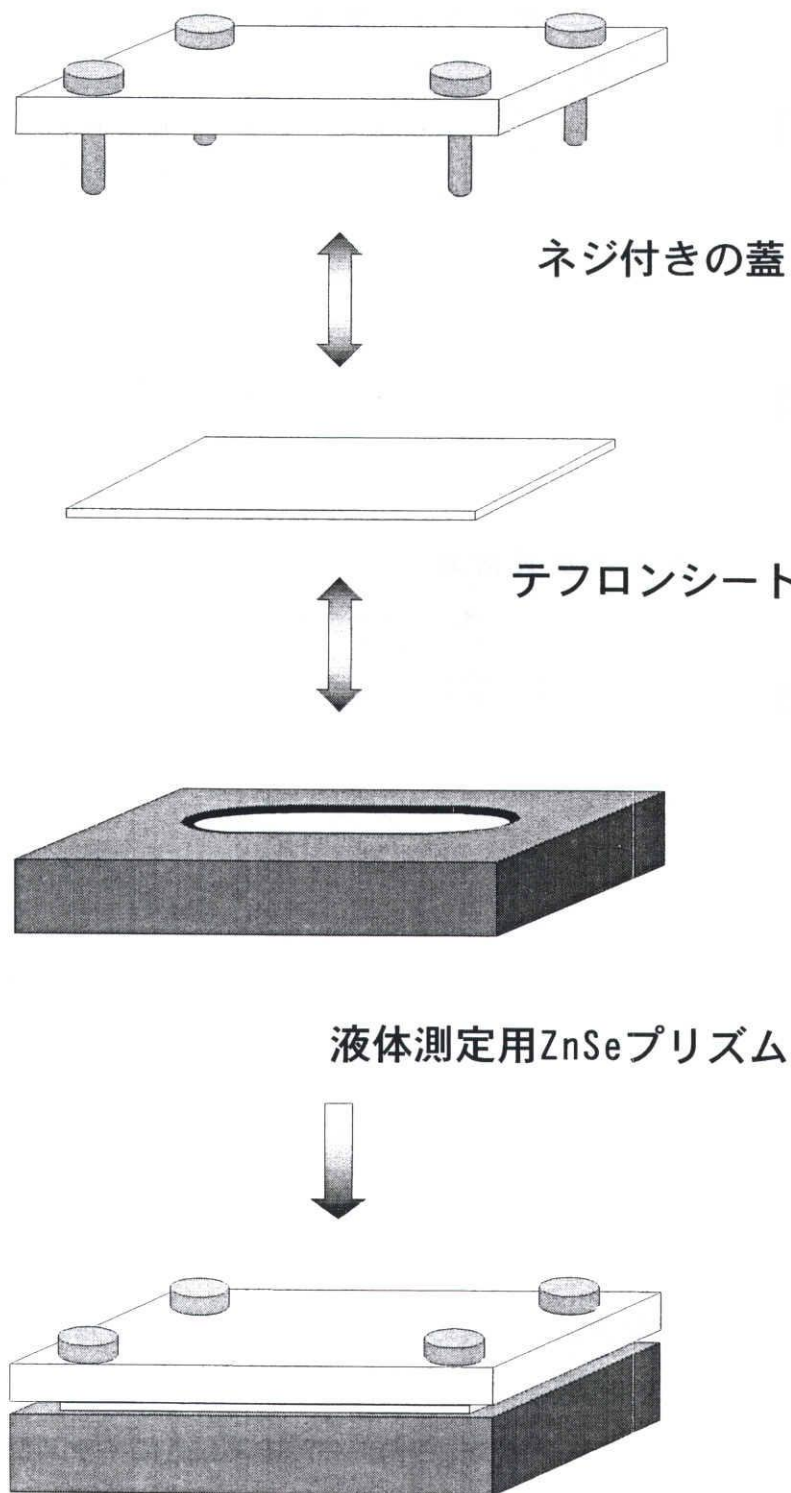


Fig. 6 ATR/FT-IR 測定法模式図(試料溶液測定用)

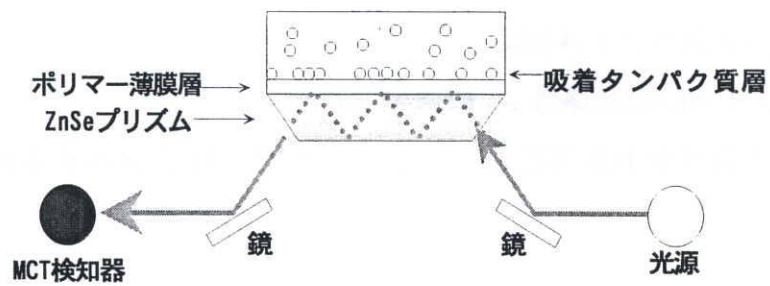


Fig. 7 ATR/FT-IR 測定模式図(吸着タンパク質の測定)

第 3 章. 結果と考察

3-1 透過 FT-IR スペクトル測定

3-1-1 ポリマーの吸光係数 ε_l の決定

透過 FT-IR スペクトル測定によりえられた PTTSSS のスペクトルを Fig. 8 に示す。

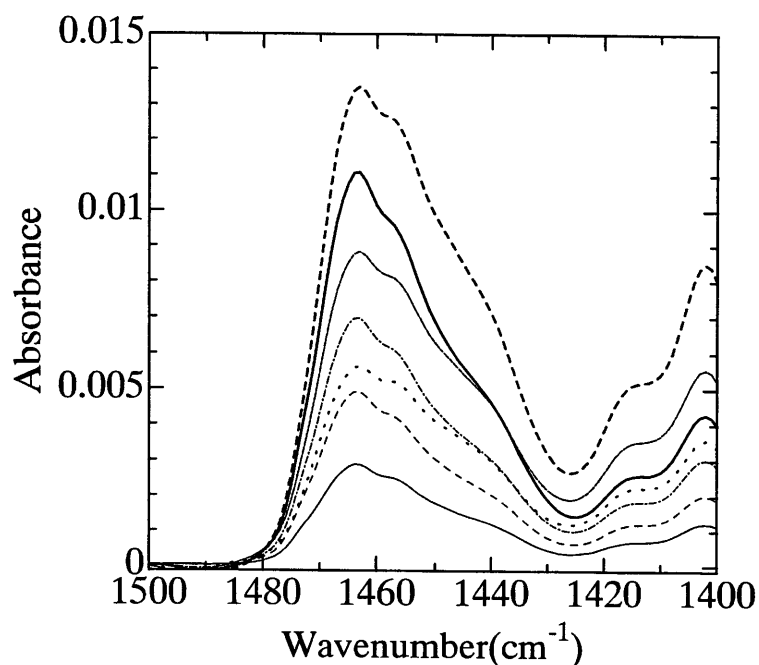


Fig.8 Transmission FT-IR absorption spectra of PTTSSS

— : $1.59 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$, - - - : $3.18 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$
· · · : $3.18 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$, - · - : $4.98 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$
— : $6.37 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$, — : $7.36 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$
- - - : $9.55 \times 10^{-5} \text{ g/cm}^2$

本研究では PTTSSS の吸収帯 ($1485 \text{ cm}^{-1} \sim 1425 \text{ cm}^{-1}$) に注目してスペクトル解析を行い、吸光度面積 A を得た。得られた A 値を用いて、2-2-5-1 に記述した式(3)の Lambert-Beer の法則により検量線を作成し吸光係数 ε_l をもとめた。

式中の右辺= c (試料濃度) $\times l$ (光路長)は CaF_2 円板表面に存在するポリマーの量に相当し、これを表面密度 Γ_1 (単位面積当たりのポリマーの量)とした。横軸に表面密度 Γ_1 、縦軸に吸光度面積 A として作成した検量線を Fig. 9 に示す。

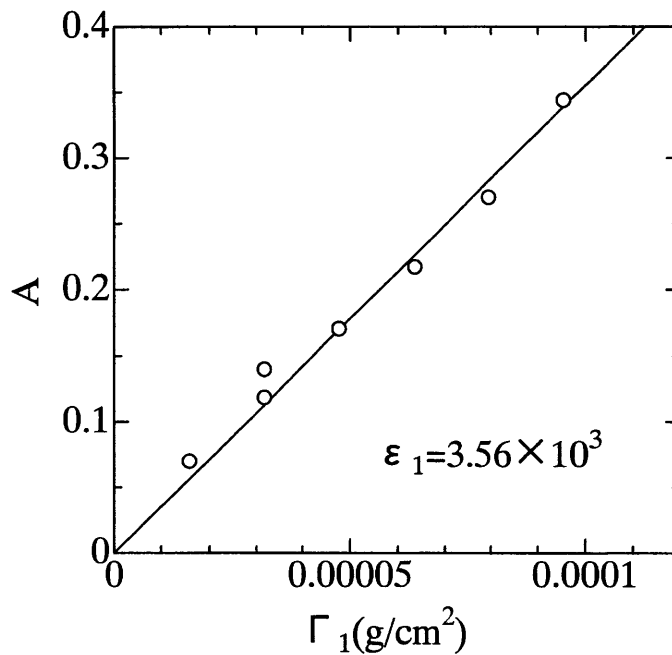


Fig.9 Calibration curve of PTTSSS

A : absorbance area (1485cm⁻¹~1425cm⁻¹)

Γ_1 : surface density of polymer(g/cm²)

ϵ_1 : absorption coefficient of polymer(cm²/g)= 3.56×10^3

検量線の傾きから PTTSSS の吸光係数 $\epsilon_1 = 3.56 \times 10^3$ cm²/g を得た。

3-1-2 リゾチームの吸光係数 ε_2 の決定

リゾチームのペプチド鎖のアミド結合 (RCONH_2) による吸収帯領域のスペクトルの一例を Fig. 10 に示す。

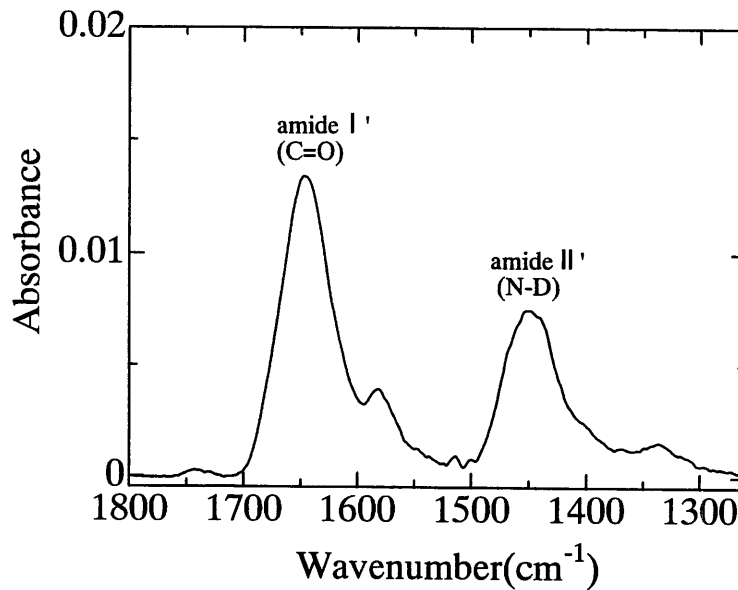


Fig.10 FT-IR spectra of lysozyme in amide region
— : 1.93×10^{-9} M

Fig. 10 で示すようにアミドによる吸収帯領域のピークをそれぞれ、アミド I' (1650 cm^{-1})、アミド II' (1450 cm^{-1}) に分類することができる。アミド I' 吸収帯は主にペプチド結合部の C=O 伸縮振動に起因する。またアミド II' は、水素-重水置換の起こった結合部の N-D 変角振動に起因する吸収帯である。これらの吸収帯の帰属は Green らの記述に従った。⁴⁾

特にアミド I' 吸収帯は、タンパク質の二次構造の情報となる。アミド I' 吸収帯は、タンパク質の二次構造である α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルなどにそれぞれ帰属される吸収ピークの複合吸収ピークである。^{4, 12)} そのためアミド I' 吸収帯の変化を追跡することで、タンパク質の定量分析とともに構造分析にも有用である。それに対しアミド II' 吸収帯におい

では重水溶媒中に混入した H-O-D 変角振動に起因する吸収による大きな影響を受ける可能性がある。以上の理由から本研究では、リゾチームの FT-IR スペクトルにおけるアミド I' 吸収帯による面積強度から、リゾチームの吸着挙動を追跡した。透過 FT-IR スペクトル測定により得られた種々の濃度のリゾチームのスペクトルを Fig. 11 に示す。

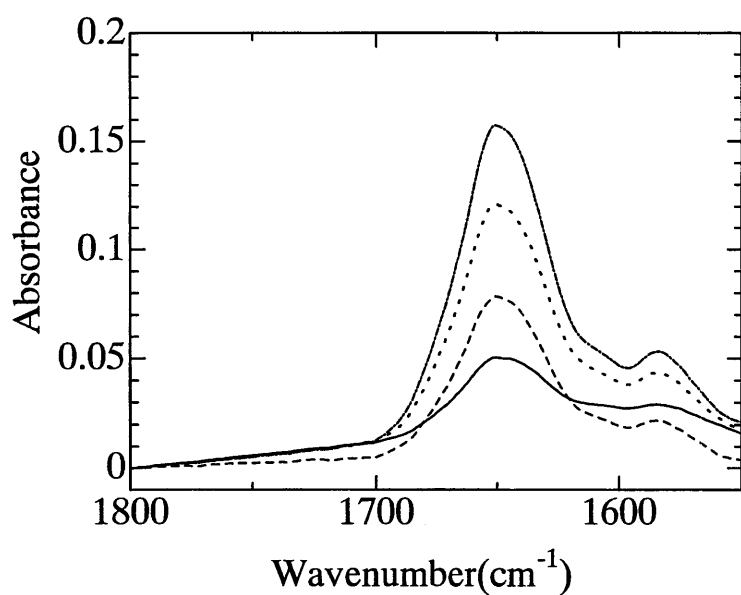


Fig.11 Transmission FT-IR absorption spectra of lysozyme

——: 6.21×10^{-10} M, - - - -: 1.35×10^{-9} M
.....: 1.93×10^{-9} M, — — — —: 2.60×10^{-9} M

3-1-1と同様に式(3)を用いて、アミドI'吸収帯の吸光度面積 A とリゾチーム溶液濃度 c との関係から吸光係数 ϵ_2 をもとめた。横軸に(c :リゾチーム溶液濃度 $\times l$:光路長=0.01cm)、縦軸に吸光度面積 A として作成した検量線をFig. 13に示す。

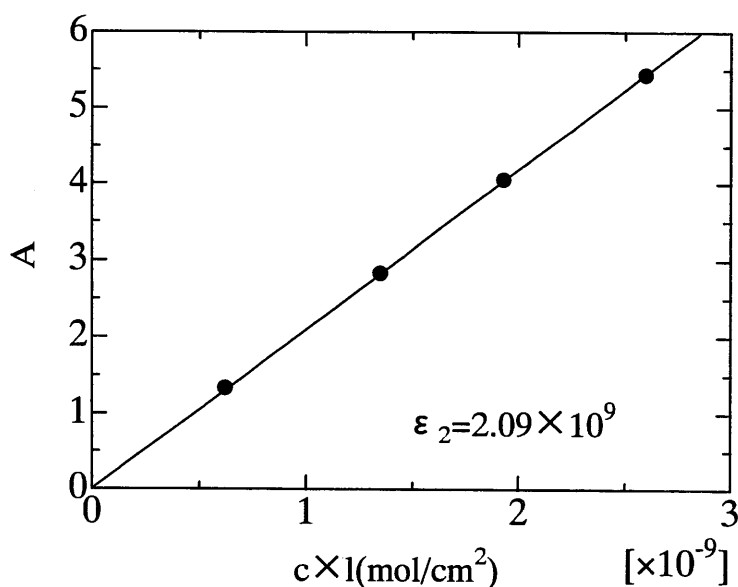


Fig.13 Calibration curve of lysozyme

- A : absorbance area (1705cm⁻¹~1595cm⁻¹)
- c : lysozyme concentration(mol/cm³)
- l : light pass length of the cell(cm)
- ϵ_2 : molar absorption coefficient of lysozyme(cm²/mol) = 2.09×10^9

検量線の傾きからリゾチームの吸光係数 $\epsilon_2 = 2.09 \times 10^9$ cm²/mol を得た。

3-1-3 血清アルブミンの吸光係数 ϵ_2 の決定

3-1-2 項で述べたリゾチームの吸光係数 ϵ_2 の決定法に従い、透過 FT-IR スペクトル測定により得られた種々の濃度の血清アルブミンのスペクトルを Fig. 12 に示す。

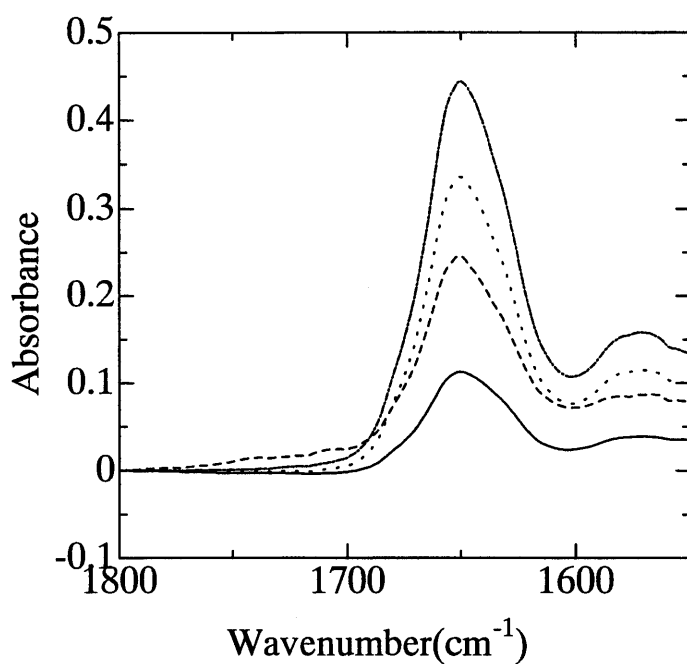


Fig.12 Transmission FT-IR absorption spectra of BSA

— : 5.21×10^{-10} M, - - - : 9.52×10^{-10} M
· · · : 1.41×10^{-9} M, — — — : 1.80×10^{-9} M

3-1-1と同様に式(3)を用いて、アミドI'吸収帯の吸光度面積 A と血清アルブミン溶液濃度 c との関係から吸光係数 ϵ_2 をもとめた。横軸に(c :血清アルブミン溶液濃度 $\times l$:光路長=0.01 cm)、縦軸に吸光度面積 A として作成した検量線をFig. 14に示す。

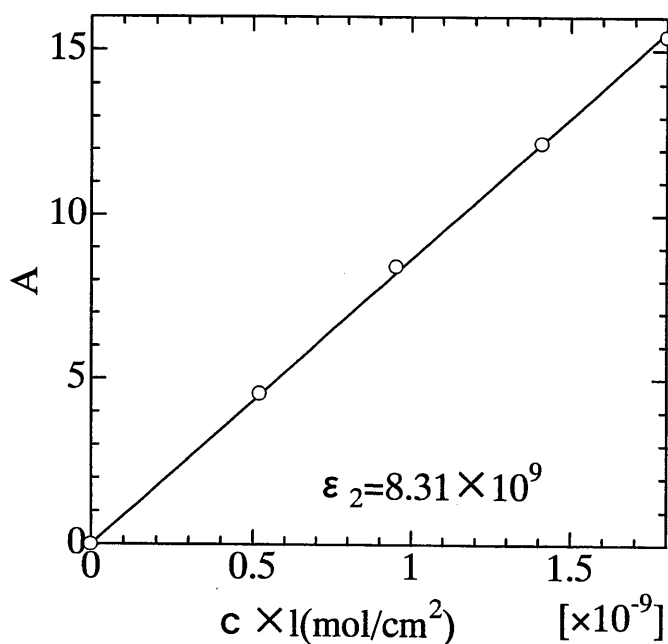


Fig.14 Calibration curve of BSA

A : absorbance area(1705cm⁻¹~1595cm⁻¹)
 c : BSA concentration(mol/cm³)
 l : light pass length of the cell(cm)
 ϵ_2 : molar absorption coefficient of
 BSA (cm²/mol)=8.31 $\times 10^9$

検量線の傾きから血清アルブミンの吸光係数 $\epsilon_2 = 8.31 \times 10^9$ cm²/mol を得た。

3-2 ATR/FT-IR スペクトル測定

3-2-1 ATR/FTIR スペクトルの解析方法

ATR/FT-IR のスペクトル解析は Harrick らの方法に従って行った。¹²⁾ 前述したように、全反射条件で赤外光は 100 % 反射するのではなく、光は界面よりわずかながらしみ込んでエバネッセント波を生じる。エバネッセント波は吸収のない媒体中でもその強度が、界面からの距離によって指数関数的に減衰する定在波である。Fig. 4 において波長 λ の光のエバネッセント波の電場が、界面での強度の $1/e$ になる距離をエバネッセント波のしみ込み深さ d_p と定義すると、

$$d_p = \frac{\lambda}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - (n_2/n_1)^2}} \quad \dots \text{式(5)}$$

が与えられる。 n_1 、 n_2 は媒質の屈折率、 θ は入射角度である。

ATR スペクトルの吸光度は試料の濃度や吸光係数だけでなく、エバネッセント波の強度と、試料へのエバネッセント波のしみ込みの程度に依存する。従って、エバネッセント波の強度やしみ込み深さ d_p が、プリズムや試料の屈折率及び入射角度によって変化するのに伴って、吸光度が影響を受けることを考慮しなければならない。また、試料の厚さと赤外光のしみ込み深さ d_p との関係によっても、ATR スペクトル測定による吸光度の解析方法は異なってくる。そのことから、膜の厚さの違いによる解析方法の違いを次に述べる。

A. 《厚膜試料》

厚膜とはエバネッセント波のしみ込み深さ d_p より膜厚 d が十分に厚い膜を意味する。ここでは、プリズム (媒質 1) と厚膜試料 (媒質 2) との界面の、媒質 1 側の全反射を考える。

直交座標系の Z 軸を界面に垂直に、Y 軸を入射光に垂直にとる。Fresnel の反射と屈折の式に従って媒質 1 内の入射光及び反射光についての Maxwell の方程式を定義すると、その足し合わせによって界面に垂直な定在波が媒質 1

内に合成される。その界面における電場の振幅 E_0 は、各方向成分について考慮すると、

$$E_{0x} = E_{ix} \frac{2 \cos \theta \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}}$$

$$E_{0y} = E_{iy} \frac{2 \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2}} \quad \dots \text{式 (6)}$$

$$E_{0z} = E_{iz} \frac{2 \cos \theta \sin \theta}{\sqrt{1 - n_{21}^2} \sqrt{(1 + n_{21}^2) \sin^2 \theta - n_{21}^2}}$$

で表される。ここで E_i は入射光の電場の振幅、 θ は入射角度、 $n_{21} = n_2/n_1$ は媒質 2 の屈折率 (n_2) と媒質 1 (n_1) の比、添字の x 、 y 、 z は各方向成分を示す。この E_0 の値を境界条件として媒質 2 側における電場の分布を計算すると、プリズム表面から距離 d_p (式 5) で減衰する定在波として表される。

一般に光が吸光係数 α を持つ厚さ d の媒質を通過するとき、透過率は Lambert の法則に従って、

$$\frac{I}{I_0} = \exp(-\alpha d) \approx 1 - \alpha d \quad \dots \text{式 (7)}$$

と表される。 I_0 、 I はそれぞれ入射光と透過光のエネルギーである。これと同様に ATR 分光法における反射率 R (透過率に対応している) と媒質の吸光係数との相関を

$$R = 1 - \alpha d_e \quad \dots \text{式 (8)}$$

とおき、また台形型の多重反射プリズムを用いて N 回の内部反射による測定をした場合は

$$R^N = (1 - \alpha d_e)^N \approx 1 - N \alpha d_e \quad \dots \text{式 (9)}$$

と書き直すことができる。(式)5 と(式)7 を比較すると Nd_e が d に対応しており、 d_e は反射 1 回あたりの見かけの光路長である。Harrick は d_e を、エバネッセント波による媒質 2 へのしみ込み深さ d_p を振幅 E_i の光が媒質 2 を通過した距離に換算したものとみなし、エバネッセント波のしみ込み深さ d_p 及び入射角 θ より、 d_e を、

$$d_e = \frac{n_{21}}{2 \cos \theta} \left(\frac{E_0}{E_i} \right)^2 d_p \quad \cdots \text{式(10)}$$

と表した。ここで d_e 及び α が異方性を持つことを考慮にいれて(式)9 を変形すると

$$\ln R^N = -N(\alpha_x, \alpha_y, \alpha_z) \cdot (d_{ex}, d_{ey}, d_{ez}) \quad \cdots \text{式(11)}$$

となり、さらに吸光度 $A = -\log R^N$ 、吸収体分子の吸光係数 $\varepsilon = \alpha / (c \ln 10)$ 及び濃度 c を用いて

$$A = Nc(\varepsilon_x, \varepsilon_y, \varepsilon_z) \cdot (d_{ex}, d_{ey}, d_{ez}) \quad \cdots \text{式(12)}$$

とすることができる。以上をまとめて、入射光として P 偏光(偏光面が入射面に平行)、S 偏光(偏光面が入射面に垂直)を用いた場合に対してそれぞれ吸光度は次式で与えられる。

$$A_p = \frac{Nn_{21}cd_p}{2 \cos \theta} \left\{ \varepsilon_x \left(\frac{E_{0x}}{E_{ix}} \right)^2 + \varepsilon_z \left(\frac{E_{0z}}{E_{iz}} \right)^2 \right\}$$

$$A_s = \frac{Nn_{21}cd_p}{2 \cos \theta} \varepsilon_y \left(\frac{E_{0y}}{E_{iy}} \right)^2 \quad \cdots \text{式(13)}$$

B. 《薄膜試料》

薄膜とは膜厚 d が d_p より十分に小さい膜のことである。この場合、プリズム(媒質 1)と試料(媒質 2)に加え、試料に接する第 3 層(媒質 3)を考慮しなくてはならない。厚膜の場合と同様に Fresnel の反射と屈折の式に従って、媒質 2 内及び媒質 3 内における界面に垂直な定在波を計算すると、そのプリズム・試料界面での電場の振幅は

$$\begin{aligned}\overline{E_{0x}} &= E_{ix} \frac{2 \cos \theta \sqrt{\sin^2 \theta - n_{31}^2}}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2}} \\ \overline{E_{0y}} &= E_{iy} \frac{2 \cos \theta}{\sqrt{1 - n_{31}^2}} \quad \dots \text{式(14)} \\ \overline{E_{0z}} &= E_{iz} \frac{2 n_{32}^2 \cos \theta \sin \theta}{\sqrt{1 - n_{31}^2} \sqrt{(1 + n_{31}^2) \sin^2 \theta - n_{31}^2}}\end{aligned}$$

次に有効光路長 d_e をもとめる。この場合膜厚 d は d_p に比べて非常に小さく、またエバネッセント波の電場の振幅は一定であると仮定すると、

$$d_e = \frac{n_{21}}{\cos \theta} \left(\frac{\overline{E_0}}{E_i} \right) d \quad \dots \text{式(15)}$$

これらの式を用いて、プリズムの反射回数 N として厚膜試料の場合と同様に偏光スペクトルの吸光度を計算すると

$$\begin{aligned}A_p &= \frac{N n_{21} c d}{\cos \theta} \left\{ \varepsilon_x \left(\frac{\overline{E_{0x}}}{E_{ix}} \right)^2 + \varepsilon_z \left(\frac{\overline{E_{0z}}}{E_{iz}} \right)^2 \right\} \\ A_s &= \frac{N n_{21} c d}{\cos \theta} \varepsilon_y \left(\frac{\overline{E_{0y}}}{E_{iy}} \right)^2 \quad \dots \text{式(16)}\end{aligned}$$

が得られる。

3-2-2 吸着リゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトルにおける、 非吸着成分の寄与の補正

今回用いた 45 度入射の ZnSe プリズム表面から重水中へのエバネッセント波のしみ込み深さ d_p は、アミド領域において 8.77×10^2 nm と計算される。それに対し、今回調製したポリマー薄膜の厚みは約 30 nm 以下であり、タンパク質の吸着層を考慮したとしても d_p に比べ十分に薄いと考えられる。従って、本研究のタンパク質の吸着実験で得られる ATR/FT-IR スペクトルの吸光度は、ポリマー/タンパク質溶液界面に吸着するタンパク質のみならず、バルク中に存在するタンパク質(非吸着成分)の吸収の寄与も含まれる。そのため、吸着タンパク質のみによる真の吸光度を得るために、バルク中のタンパク質による吸収を差し引かなくてはならない。そこで赤外光のしみ込み深さが吸光度に影響を及ぼすことを考慮し補正を行った。⁵⁾ ポリマーを調製していないプリズム上に添加したタンパク質溶液全体を厚膜試料、そのうち、プリズム表面からの距離 $d (< d_p)$ 以内のタンパク質溶液を薄膜試料に想定し、それらの差として膜厚 d のポリマー表面上に添加したタンパク質溶液による理論吸光度を算出した。

A. バルク溶液中に均一に存在するリゾチーム、血清アルブミン(非吸着成分)の寄与

プリズムから比較的遠い $l \geq d_p$ のバルク溶液中に均一に存在するタンパク質の吸光度算出には厚膜試料測定理論を適用した。この場合媒質 1 はプリズム、媒質 2 は重水となる。本研究で偏光を考慮しなかったため、

$$A = (A_p + A_s) / 2$$

とした。また吸光係数の異方性はないと近似して

$$\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = \varepsilon$$

とした。従って、厚膜の吸光度 A_{thick} は

$$A_{thick} = \frac{1}{4} \frac{N n_{21} c d_p}{\cos \theta} \varepsilon \left\{ \left(\frac{E_{0x}}{E_{ix}} \right)^2 + \left(\frac{E_{0y}}{E_{iy}} \right)^2 + \left(\frac{E_{0z}}{E_{iz}} \right)^2 \right\} \quad \dots \text{式(17)}$$

で表される。

バルク溶液中に均一に存在するタンパク質による吸光度 A の決定には、 n_1 にプリズムの屈折率、 n_2 に重水の屈折率、反射回数 $N=8.10$ を使用した。反射回数が前述したものと異なっているが、これはプリズムを液体サンプル用の装置にパッキングすることにより生じた反射回数の変化を考慮し、校正した値である。プリズムの反射回数の校正には、タンパク質重水溶液を用い、透過法と ATR 法の測定によって得られる吸光係数が異なることを利用して、それぞれの吸光係数を比較することにより導出した。ここで d_p は入射角度 45 度として算出した。またリゾチームの吸光係数は、検量線より得られた $\varepsilon_2 = 2.09 \times 10^9 \text{ cm}^2/\text{mol}$ 、血清アルブミンの吸光係数は、 $\varepsilon_2 = 8.31 \times 10^9 \text{ cm}^2/\text{mol}$ を用いた。各屈折率は Table 9 に記す。なお、今回の解析で使用した絶対屈折率の値は Frey らの論文から引用した。¹⁵⁾

Table 9 ATR スペクトルの解析において使用した屈折率 n の値
(Frey らの論文から引用¹⁵⁾)

Absorbance area	Wavenumber/ nm^{-1}	ZnSe プリズム	PTTSSS	N_2	D_2O
Amide I'	$1700 \text{ cm}^{-1} \sim 1600 \text{ cm}^{-1}$	2.43	1.27	1	1.32
Si-O	$1485 \text{ cm}^{-1} \sim 1425 \text{ cm}^{-1}$	2.42	1.17	1	

B. ポリマー薄膜の吸光度、及びバルク溶液中のリゾチーム、血清アルブミンのうち、プリズム表面からの距離 d_p 以内に存在する成分の寄与

プリズム上に製膜したポリマー薄膜の厚さ決定、及びポリマーを製膜していないプリズム上に添加したバルク溶液のうち、プリズムからポリマー厚 ($= d_{poly}$) 分以内に存在するタンパク質による吸光度の算出に薄膜試料の測定理論を適用した。厚膜の時と同様、偏光を考慮しなかったため

$$A = (A_p + A_s) / 2$$

である。また

$$\varepsilon_x = \varepsilon_y = \varepsilon_z = \varepsilon$$

とした。従って、吸光度 A_{thin} は

$$A_{thin} = \frac{1}{2} \frac{N n_{21} c d}{\cos \theta} \varepsilon \left\{ \left(\frac{\bar{E}_{0x}}{E_{ix}} \right)^2 + \left(\frac{\bar{E}_{0y}}{E_{iy}} \right)^2 + \left(\frac{\bar{E}_{0z}}{E_{iz}} \right)^2 \right\} \quad \dots \text{式 (18)}$$

となる。ATR プリズム上に製膜したポリマー薄膜の厚さを確認するための ATR スペクトル測定では、第 3 層は N_2 ガスにあたることから n_3 は N_2 ガスの屈折率である。反射回数 $N=8.10$ であり、 d_p は入射角度 45 度として算出した。また吸光係数 ε_1 は PTTSSS : $3.56 \times 10^3 \text{ cm}^2/\text{g}$ であり、ポリマーの密度は PTTSSS : 1.19 g/cm^3 である。この場合、

$$c \times d = \text{ポリマー密度} \times d_{poly} \quad \dots \text{式 (19)}$$

として、ポリマーの膜厚を算出した。

吸着タンパク質の ATR スペクトル測定における、ZnSe プリズム表面からポ

リマー厚 (d_{poly}) 分以内に存在するバルク中のタンパク質による吸光度の算出の場合、第 3 層は重水にあたり、 n_3 は重水の屈折率となる。また反射回数 = 8.10 であり、 $d = d_{poly}$ とした。

3-2-3 ポリマー薄膜の ATR/FT-IR スペクトル測定

ZnSe プリズム上に製膜したポリマー薄膜の膜厚を確認するために、ATR/FT-IR スペクトル測定を行った。吸収帯 ($1615 \sim 1575 \text{ cm}^{-1}$) のピークにベースラインを設定し、吸光度面積 A_{poly} をもとめた。 A_{poly} から ATR/FT-IR スペクトル解析方法で述べた《薄膜試料》の解析方法における、式(18)、(19)を用いてポリマー厚 d_{poly} を決定した。

3-2-4 ポリマー薄膜上に吸着するリゾチーム、血清アルブミンの ATR/FT-IR スペクトル測定

種々の濃度のタンパク質溶液における ATR/FT-IR スペクトル測定により得られたポリマー表面への吸着タンパク質のスペクトルを Fig. 11, 12 に示す。アミド I' 吸収帯 ($1705 \sim 1595 \text{ cm}^{-1}$) 領域にベースラインを設定し、吸光度面積 A_L をもとめた。しかし前述したようにここでもとめられた吸光度面積 A_L は真の吸着タンパク質によるものではなく、バルク溶液中のタンパク質の吸収による寄与も含まれている。そのため ATR/FT-IR スペクトル解析方法で述べた《厚膜試料》、《薄膜試料》の解析法をもとに吸光度補正を行った。ポリマー薄膜が製膜されていないプリズム上に添加されたバルク溶液中に均一に存在するタンパク質による吸光度を、《厚膜試料》と仮定することで算出した吸光度面積を A_{thick} とする。そのうちの、プリズム表面からポリマー膜厚 (d_{poly}) 分以内に存在するタンパク質による吸光度を、《薄膜試料》と仮定することで算出した吸光度面積を A_{thin} とする。実際にポリマー薄膜が製膜されているときには、プリズム表面から d_{poly} までの領域にはタンパク質は存在しないのだから、バルク溶液中に存在するタンパク質による吸光度の総和を A_{bulk} とすると、

$$A_{bulk} = A_{thick} - A_{thin}$$

として近似した。従って、吸着タンパク質のみによる吸光度面積を A_{RL} として、

$$A_{RL} = A_L - A_{bulk}$$

と算出した。このようにバルク溶液中のタンパク質の吸収による寄与を考慮し、差スペクトル法により補正した吸着タンパク質の種々のバルク濃度におけるスペクトルを Fig. 15~Fig. 21 に示す。

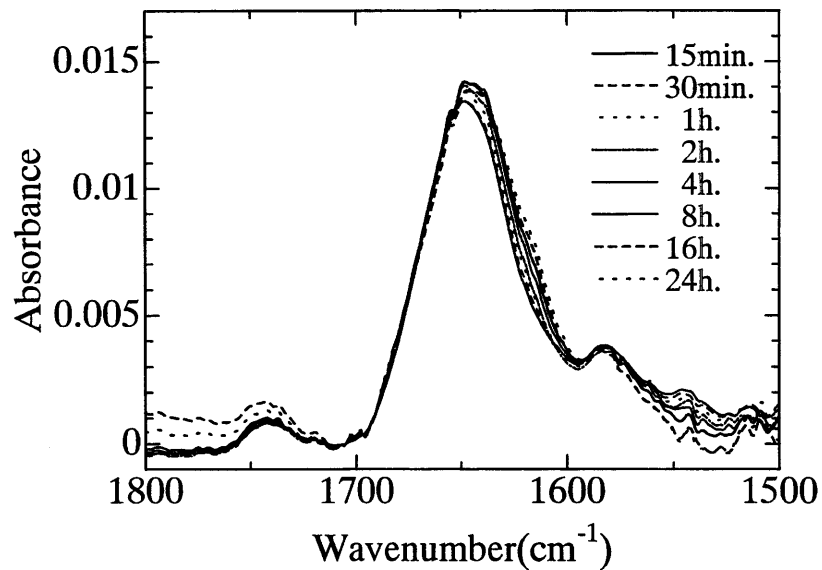


Fig.15 Time dependent ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $2.00 \times 10^{-5} \text{M}$

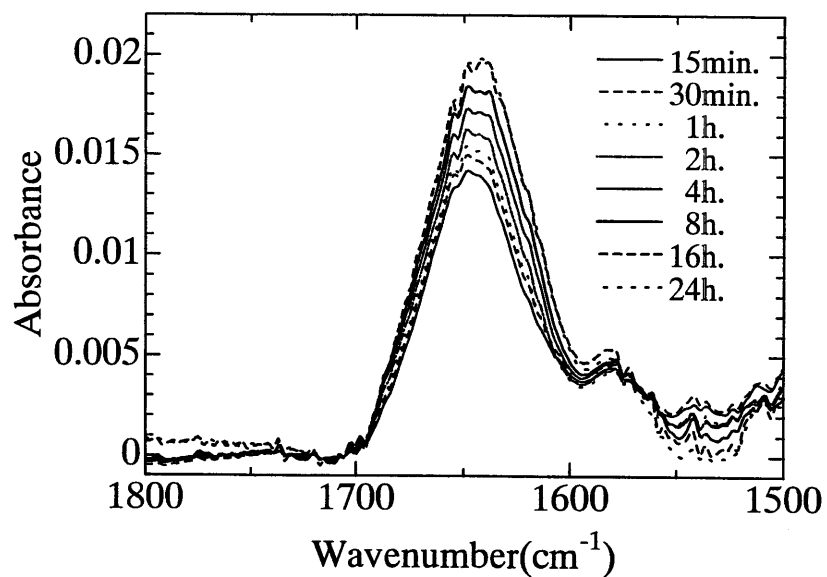


Fig.16 Time dependent ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $4.49 \times 10^{-5} \text{M}$

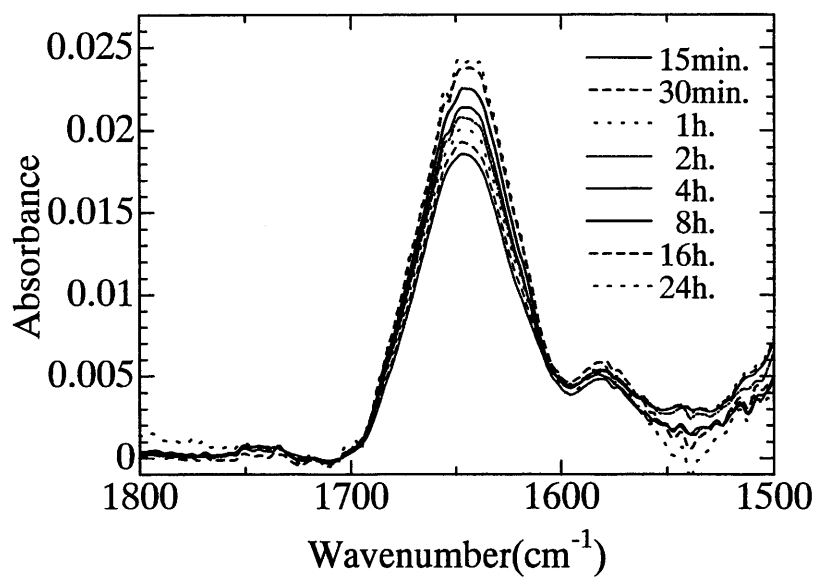


Fig.17 Time dependent ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $1.15 \times 10^{-4} \text{M}$

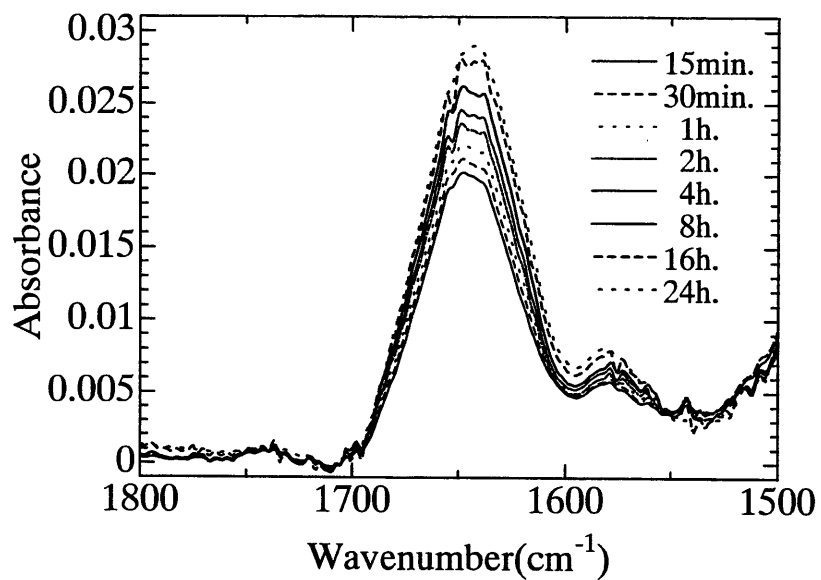


Fig.18 Time dependent ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $1.52 \times 10^{-4} \text{M}$

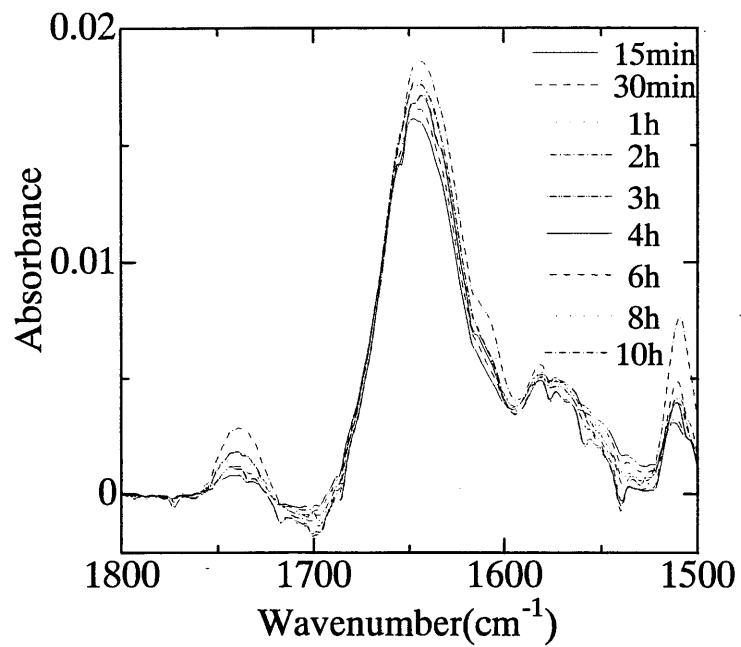


Fig.19 Time dependent ATR/FT-IR spectra of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $6.00 \times 10^{-5} \text{M}$

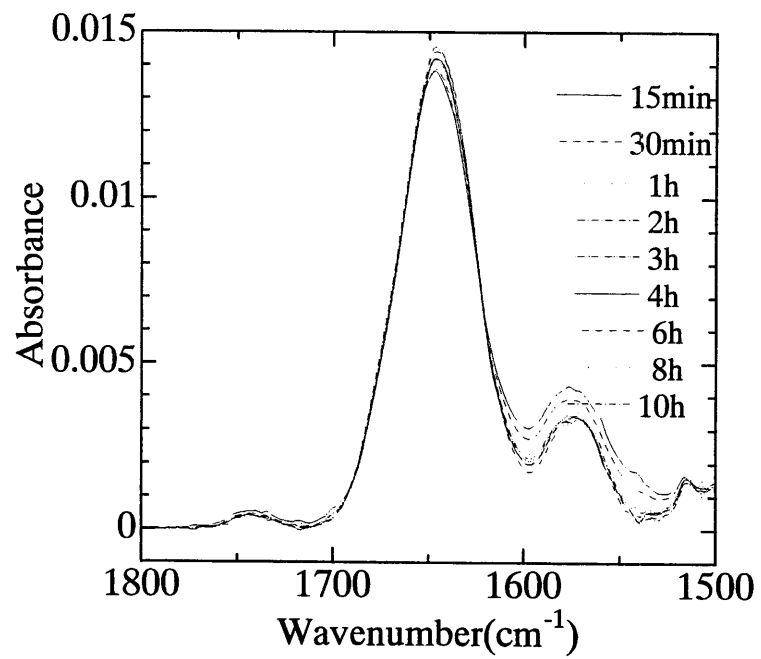


Fig.20 Time dependent ATR/FT-IR spectra of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $1.10 \times 10^{-5} \text{M}$

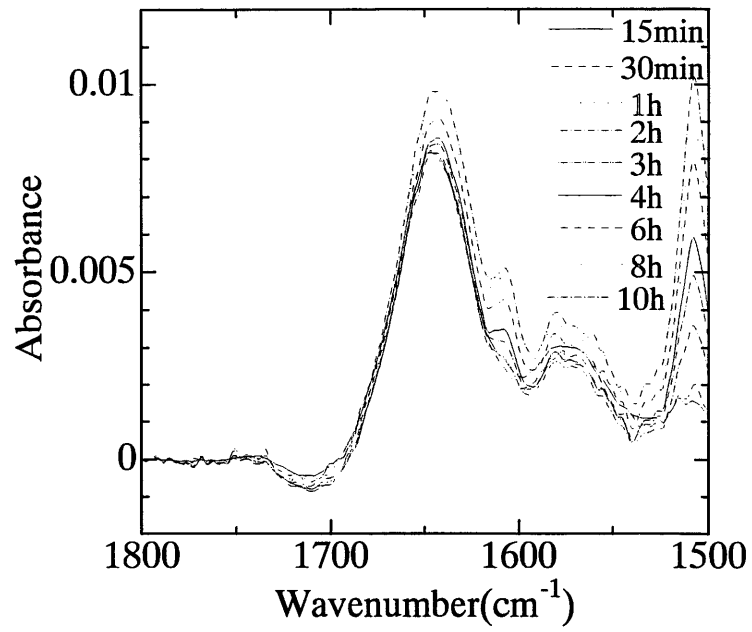


Fig.21 Time dependent ATR/FT-IR spectra of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $1.06 \times 10^{-7} \text{M}$

3-2-5 リゾチームの吸着量の決定

吸着リゾチームのスペクトルより得られたアミドI' 吸収帯による吸光度面積 A_L を補正操作して吸光度面積 A_{RL} を算出し、ポリマー薄膜表面上に吸着したリゾチームの単位面積当たりの分子数を決定した。種々の濃度における吸着量の経時変化を Fig. 22 に示す。

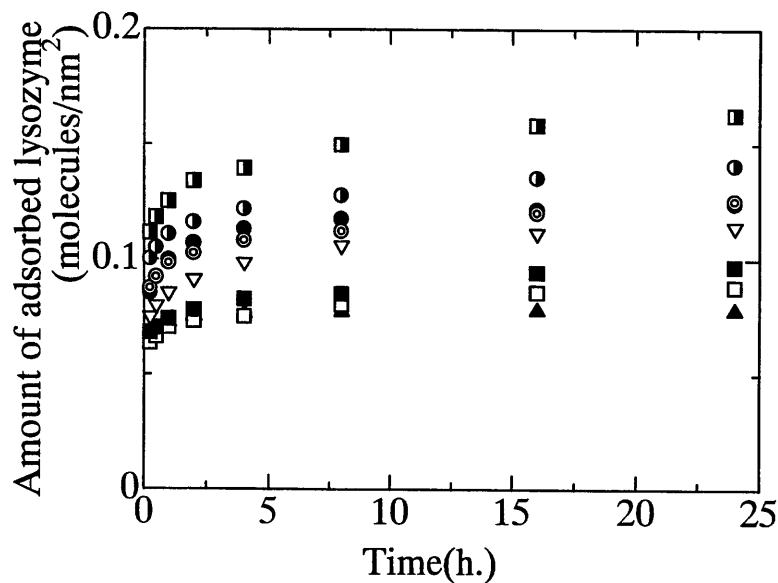


Fig.22 Adsorption kinetics of lysozyme on PTTSSS surface

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ▲ : 2.00×10^{-5} M | ● : 6.70×10^{-5} M |
| □ : 2.85×10^{-5} M | ◎ : 7.85×10^{-5} M |
| ■ : 3.92×10^{-5} M | ○ : 1.15×10^{-4} M |
| ▽ : 4.49×10^{-5} M | ■ : 1.52×10^{-4} M |

グラフの横軸は吸着時間、縦軸はリゾチームの吸着量である。Fig. 22 よりポリマー表面においてリゾチームの吸着量は濃度と共に増加しているのがわかる。吸着時間初期の段階(15分以内)で吸着速度が速い吸着過程があり、その後十数時間にわたる緩やかな吸着過程が観察できる。

リゾチームは約 $4.6 \times 3 \times 3 \text{ nm}^3$ の大きさの球状タンパク質である。⁴⁾ 仮に、リゾチームがすべて横長の状態で、ポリマー表面上に密に吸着したとするならば、あるいはすべて縦長の状態で密に吸着したとすると、それぞれ $0.07 \text{ molecules/nm}^2$ 、及び $0.11 \text{ molecules/nm}^2$ の吸着量を示すと予測される。この値と測定により得られた吸着量を比較すると、リゾチームの配向は考慮しないとしてもかなり密な状態で、あるいは1層をわずかに越える層状構造で各ポリマー表面上に吸着していることが予測される。

3-2-6 血清アルブミンの吸着量の決定

屈折率 $n_1 = \text{ZnSe}$ 、 $n_2 = \text{ポリマー}$ 、 $n_3 = \text{D}_2\text{O}$ 、反射回数 $N=8.1$ 、吸光度面積 A_{RL} (補正により得られた吸着血清アルブミンのみによる吸光度面積) を用い、薄膜条件の解析方法に従って、ポリマー薄膜表面上に吸着した血清アルブミンの単位面積あたりの分子数を決定した。血清アルブミンの単位面積あたりの分子数を吸着量とし、グラフの横軸に吸着時間、縦軸に血清アルブミンの吸着量を取り、種々の濃度における吸着量の経時変化を Fig. 23 に示す。血清アルブミンの吸着量は濃度と共に増加し、吸着の初期段階 (15 分以内) では速い吸着過程があることがわかる。これは、リゾチームの系と同様であった。

但し、血清アルブミンの系における吸着過程は、リゾチームの系において観察された吸着時間初期段階 (15 分以内) の吸着速度が速い吸着過程以後にみられる数時間にわたる緩やかな吸着過程が観察されず、吸着の初期段階 (15 分以内) で概ね吸着過程が完了していることが観察された。

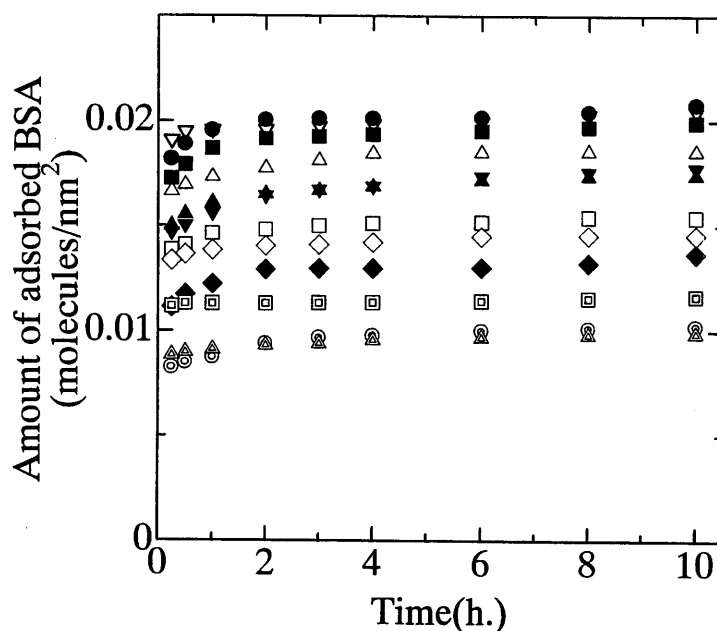


Fig.23 Adsorption kinetics of BSA on PTTSSS surface

- | | |
|-----------------------------|-----------------------------|
| ▲ : 1.06×10^{-7} M | ▲ : 1.10×10^{-5} M |
| ◎ : 4.06×10^{-7} M | ▼ : 1.72×10^{-5} M |
| ◻ : 8.13×10^{-7} M | △ : 2.82×10^{-5} M |
| ◆ : 3.56×10^{-6} M | ■ : 3.77×10^{-5} M |
| ◇ : 5.09×10^{-6} M | ▽ : 4.99×10^{-5} M |
| □ : 8.61×10^{-6} M | ● : 6.00×10^{-5} M |

3-3 リゾチームの吸着機構の分析

3-3-1 吸着リゾチームの立体構造分析

ポリマー表面への吸着に伴うリゾチームの立体構造の変化を調べた。まず、吸着リゾチームの各測定時間のスペクトルから測定 15 分のスペクトルを差し引いた差スペクトルを導出した。即ち二次吸着過程に相当するスペクトルを得た。またここで、例えば吸着開始から 24 時間経過した試料として測定 24 時間後あるいは 24h. と表記する。測定 24 時間後にバルクのリゾチーム溶液を重水緩衝溶液で無限希釈(洗浄)し測定したスペクトルについても、吸着 15 分

後のスペクトルとの差スペクトルを併せて比較した (Fig. 24~Fig. 27)。

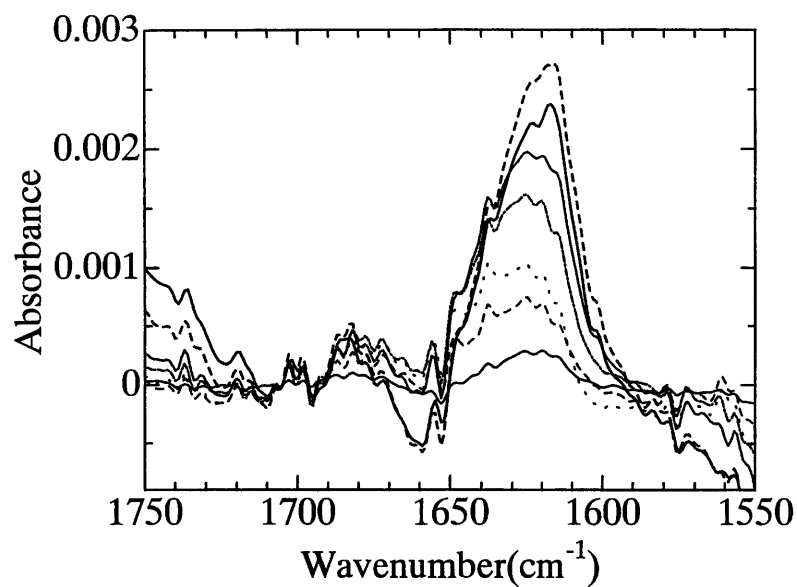


Fig.24 Difference ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $2.00 \times 10^{-5} \text{M}$

-----: 24h. - 15min. , ———: 16h. - 15min.
———: 8h. - 15min. , ———: 4h. - 15min.
.....: 2h. - 15min. , - - - - : 1h. - 15min.
———: 30min. - 15min.

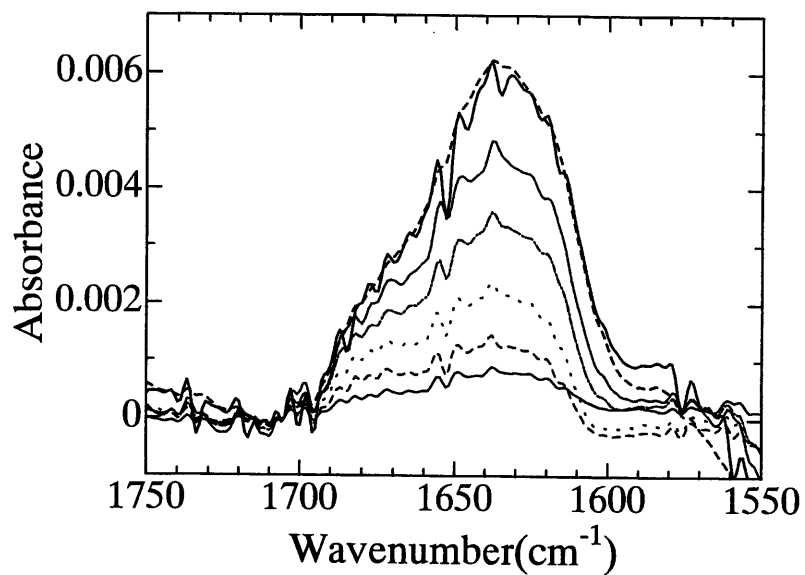


Fig.25 Difference ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $4.49 \times 10^{-5} \text{ M}$

-----: 24h. - 15min. , ———: 16h. - 15min.
 ———: 8h. - 15min. , ———: 4h. - 15min.
: 2h. - 15min. , -----: 1h. - 15min.
 ———: 30min. - 15min.

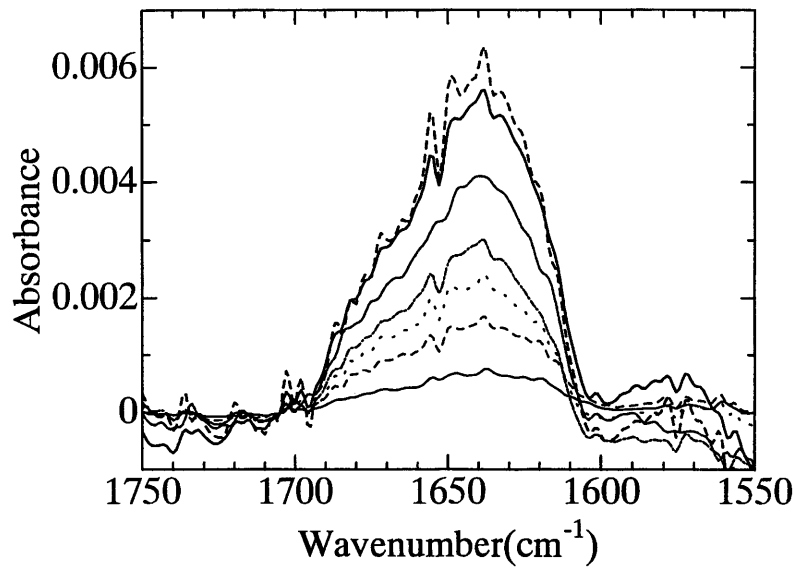


Fig.26 Difference ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $1.15 \times 10^{-4} \text{M}$

-----: 24h. - 15min. , ———: 16h. - 15min.
 ———: 8h. - 15min. , ———: 4h. - 15min.
: 2h. - 15min. , -----: 1h. - 15min.
 ———: 30min. - 15min.

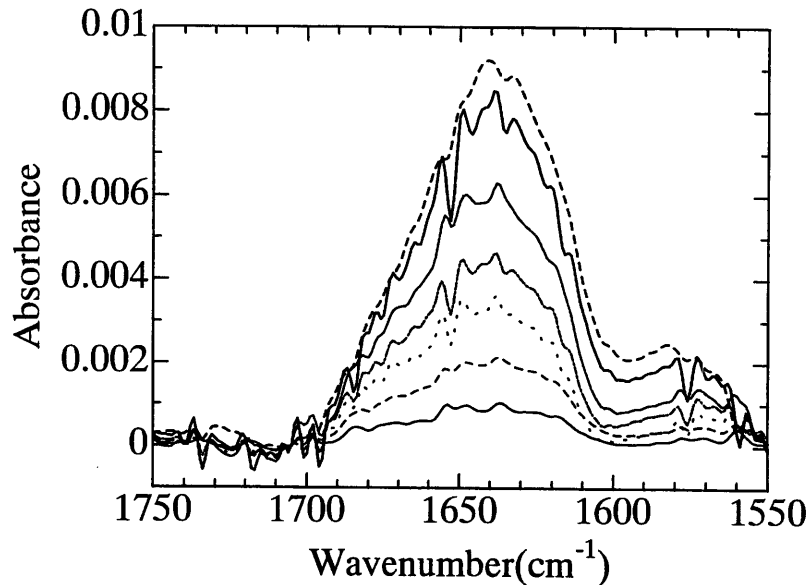


Fig.27 Difference ATR/FT-IR spectra of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of lysozyme is $1.52 \times 10^{-4} \text{M}$

-----: 24h. - 15min. , ———: 16h. - 15min.
 ———: 8h. - 15min. , ———: 4h. - 15min.
: 2h. - 15min. , -----: 1h. - 15min.
 ———: 30min. - 15min.

それぞれの差スペクトルの形状を観ると Fig. 10 に示したような天然リゾチームの形状とは明らかに違うことがわかり、時間とともに β -シート構造に帰属される吸収帯領域が主に増加しているように観察される。構造の詳細については、後述する。また、洗浄後の各スペクトルの形状から見ても β -シート構造の脱離が一番少ないことから、 β -シート構造はリゾチームのポリマー表面への吸着において最も安定な二次構造であると考えられる。この結果を受けて、吸着リゾチームの二次構造変化の形態を探るために、吸着時間 15 分で前述したように洗浄し、その後の経時変化を調べた (Fig. 28)。

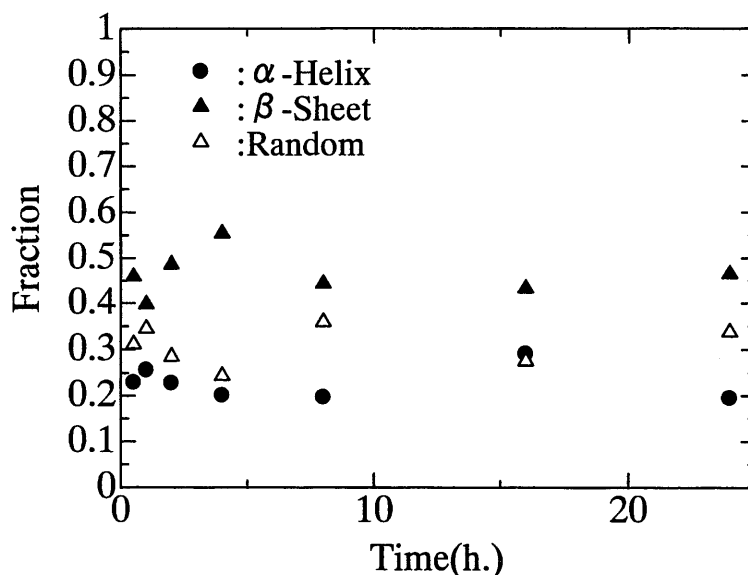


Fig.28 Time dependency of the secondary structure of lysozyme adsorbed during the 15min. of adsorption time in a lysozyme-free buffer solution

Fig. 28 の洗浄後のスペクトルの経時変化から、立体構造にあまり変化は観られない。従って、Fig. 24~27 にみられる吸着 15 分以降の構造変化は、ポリマー表面上に吸着したリゾチームにおいて自発的に起きているのではなく、吸着する際に安定な立体構造をリゾチームがとっているか、あるいは新たなリゾチームの吸着によって、既に吸着していたリゾチームの構造変化が誘導されたと考えられる。

次に立体構造の変化を定量的に示すために Fig. 15~18 に示したポリマー表面における吸着リゾチームのスペクトルを二次構造成分について分離した。この分離の解析には、各二次構造に帰属されるピークをローレンツ関数分布と仮定し、各ピークの高さ、半値幅、波数領域を変数としてフィッティングするという Veronique Cabiaux ら⁶⁰⁾によって提唱された方法により行なった。その例を Fig. 29 に示す。

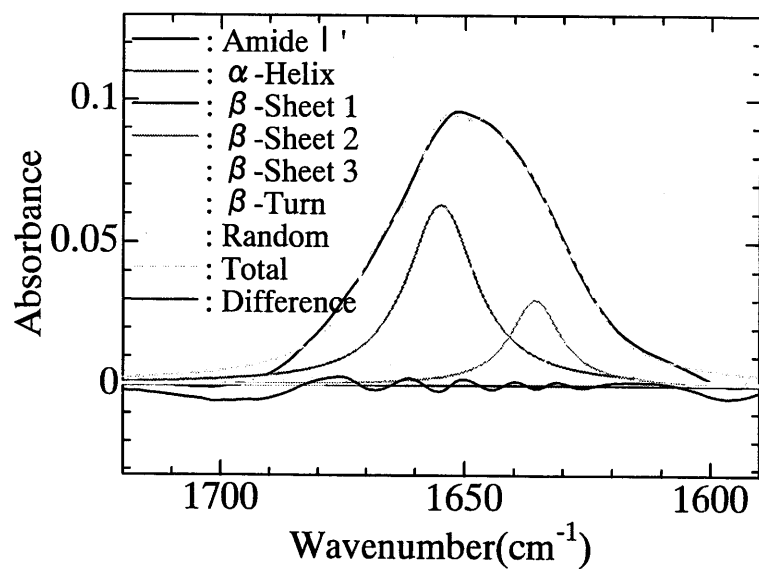


Fig.29 Curve-fitting of secondary structure of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface

Amide I' : 1705cm⁻¹~1595cm⁻¹
 α-Helix : 1661cm⁻¹~1648cm⁻¹
 β-Sheet 1 : 1689cm⁻¹~1682cm⁻¹
 β-Sheet 2 : 1638cm⁻¹~1628cm⁻¹
 β-Sheet 3 : 1628cm⁻¹~1615cm⁻¹
 β-Turn : 1682cm⁻¹~1661cm⁻¹
 Random : 1645cm⁻¹~1638cm⁻¹

3-3-2 リゾチームの吸着速度の解析

吸着量の経時変化や差スペクトルの解析から吸着過程が吸着速度の速やかな一次吸着過程と緩やかな二次吸着過程の二段階のものであり、それぞれ一定の吸着速度と、二次構造をもつと仮定した。まず 3-3-1 で分離した各二次構造成分の経時変化及び、その和がどのような吸着速度式として表されるか検討した。

最初に Langmuir の吸着速度理論をもとに、一次吸着過程における吸着リゾチームの二次構造成分の吸着速度について検討する。ポリマー表面に α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイル構造が吸着できる平衡吸着サイト数をそれぞれ A_1 、 B_1 、 C_1 とし、吸着した二次構造成分の数をそれぞれ x_1 、 y_1 、 z_1 とする。吸着リゾチーム間に相互作用がないとすれば、一次吸着過程の時定数を k_1 とすると、二次構造成分の吸着速度はそれぞれ、

α -ヘリックス構造について

$$\frac{dx_1}{dt} = k_1(A_1 - x_1) \quad \dots \text{式 (20)}$$

β -シート構造について

$$\frac{dy_1}{dt} = k_1(B_1 - y_1) \quad \dots \text{式 (21)}$$

ランダムコイル構造について

$$\frac{dz_1}{dt} = k_1(C_1 - z_1) \quad \dots \text{式 (22)}$$

で表され、吸着数はそれぞれ、

α - ヘリックス構造について

$$x_1 = A_1 \{1 - \exp(-k_1 t)\} \quad \dots \text{式 (23)}$$

β - シート構造について

$$y_1 = B_1 \{1 - \exp(-k_1 t)\} \quad \dots \text{式 (24)}$$

ランダムコイル構造について

$$z_1 = C_1 \{1 - \exp(-k_1 t)\} \quad \dots \text{式 (25)}$$

と表すことができる。従って、一次吸着成分の吸着リゾチームの数を L_1 とすると、

$$L_1 = x_1 + y_1 + z_1 = \{A_1 + B_1 + C_1\} \{1 - \exp(-k_1 t)\} \quad \dots \text{式 (26)}$$

と表すことができる。

続いて、二次吸着過程における吸着リゾチームの二次構造成分の吸着速度について検討する。一次吸着過程と同様に、 α - ヘリックス、 β - シート、ランダムコイル構造が吸着できる平衡吸着サイト数をそれぞれ A_2 、 B_2 、 C_2 とし、吸着した二次構造成分の数をそれぞれ x_2 、 y_2 、 z_2 とし、吸着リゾチームの数を L_2 、時定数を k_2 とすると、

$$L_2 = x_2 + y_2 + z_2 = \{A_2 + B_2 + C_2\} \{1 - \exp(-k_2 t)\} \quad \dots \text{式 (27)}$$

と表すことができる。(式) 24、25 から総和の吸着量を L とすると

$$L = L_1 + L_2$$

$$= \{A_1 + B_1 + C_1\} \{1 - \exp(-k_1 t)\} + \{A_2 + B_2 + C_2\} \{1 - \exp(-k_2 t)\} \quad \dots \text{式(28)}$$

という関係式で表すことが出来る。従って式(28)の第一項は一次吸着過程、第二項は二次吸着過程について表しており、各濃度の吸着リゾチームにおける各二次構造成分の経時変化を式(28)にフィッティングすることで各数値を算出し、吸着曲線を作成した(Fig. 30~33)。

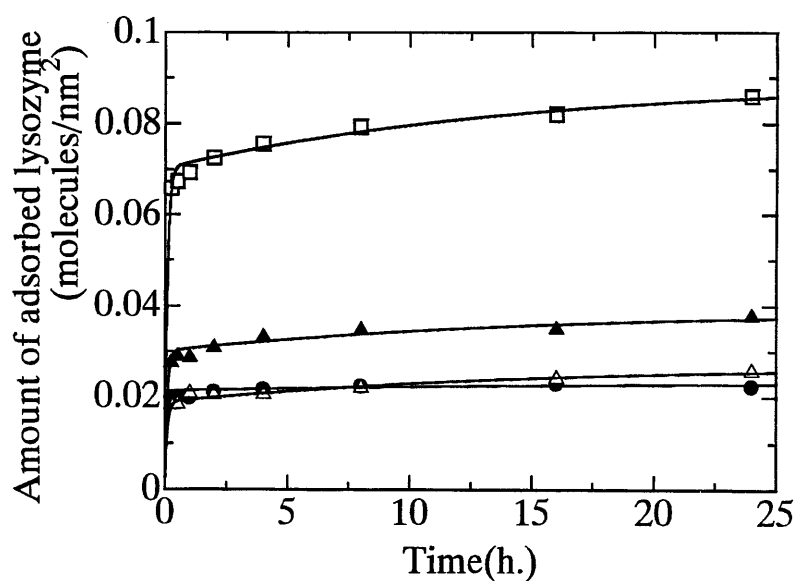


Fig.30 Adsorption kinetics of secondary structure of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface.
Bulk concentration of lysozyme is $2.00 \times 10^{-5} \text{ M}$

● : α -Helix, Δ : Random, \blacktriangle : β -Sheet
□ : Total, - : Fitting curve

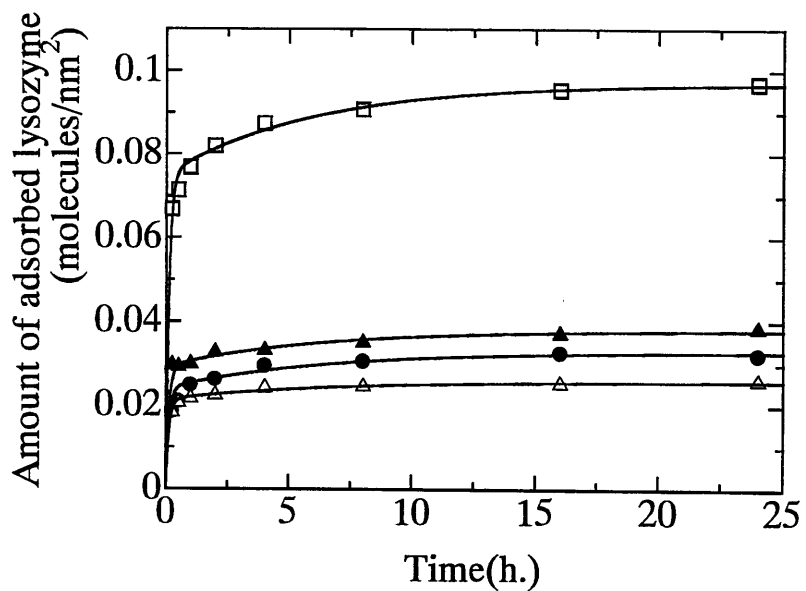


Fig.31 Adsorption kinetics of secondary structure of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface.
 Bulk concentration of lysozyme is $4.49 \times 10^{-5} \text{ M}$
 ● : α -Helix , △ : Random , ▲ : β -Sheet
 □ : Total , - : Fitting curve

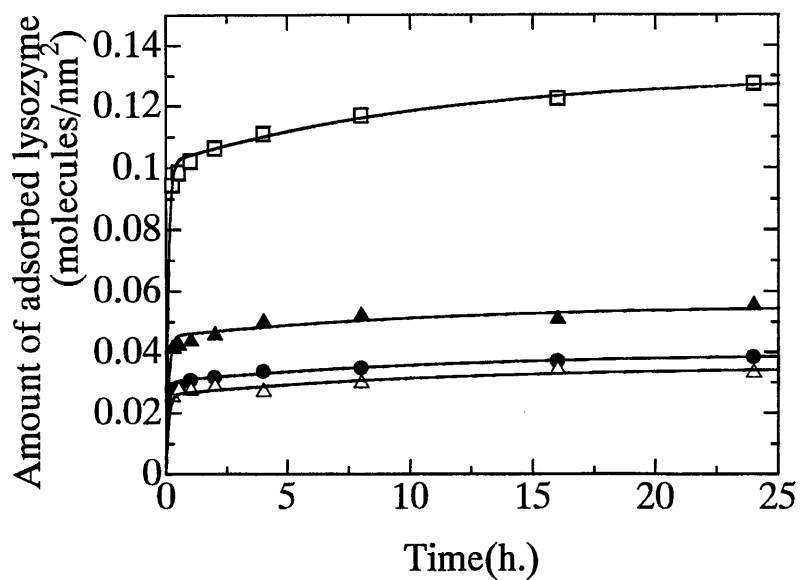


Fig.32 Adsorption kinetics of secondary structure of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface.
Bulk concentration of lysozyme is $1.15 \times 10^{-4} \text{ M}$

● : α -Helix , \triangle : Random , \blacktriangle : β -Sheet
□ : Total , — : Fitting curve

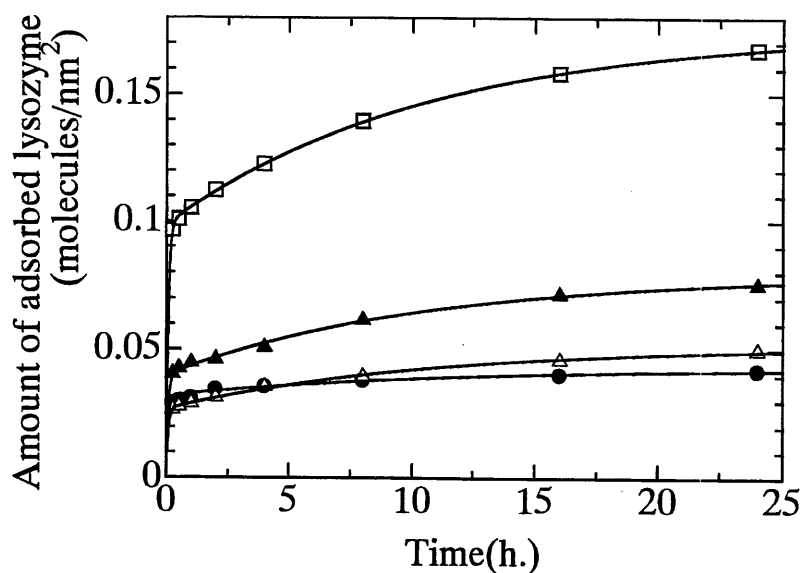


Fig.33 Adsorption kinetics of secondary structure of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface.
Bulk concentration of lysozyme is $1.52 \times 10^{-4} \text{ M}$

● : α -Helix, \triangle : Random, \blacktriangle : β -Sheet
□ : Total, — : Fitting curve

但し、式(28)はそれぞれ吸着過程が独立に進行している場合について成立する式であり、リゾチームの吸着層が積層になっている場合、あるいは一次吸着層の生成によって二次吸着のサイトが生じる場合は厳密には異なる。しかしながら吸着量の経時変化の結果から、それぞれの吸着過程における吸着速度の値が大きく異なることが予想されるため、近似的に式(28)を解析に使用した。

この結果により得られた時定数 k (h^{-1}) 値を Fig. 34、35 に示す。

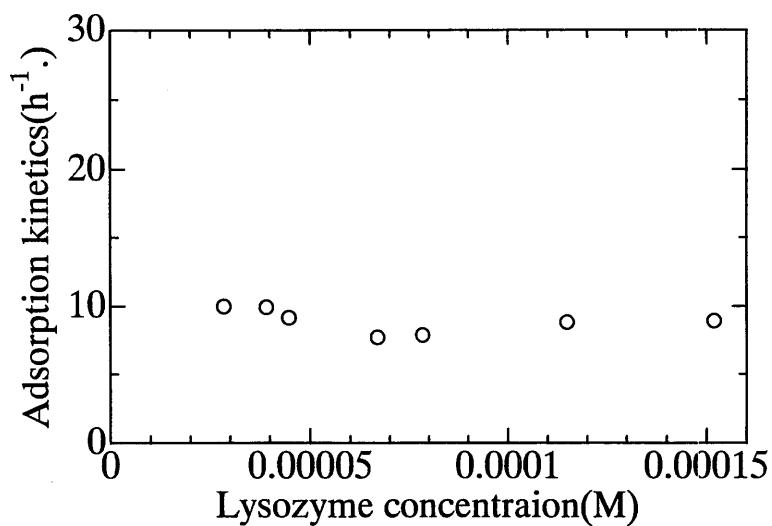


Fig.34 Adsorption kinetics of lysozyme on primary adsorption

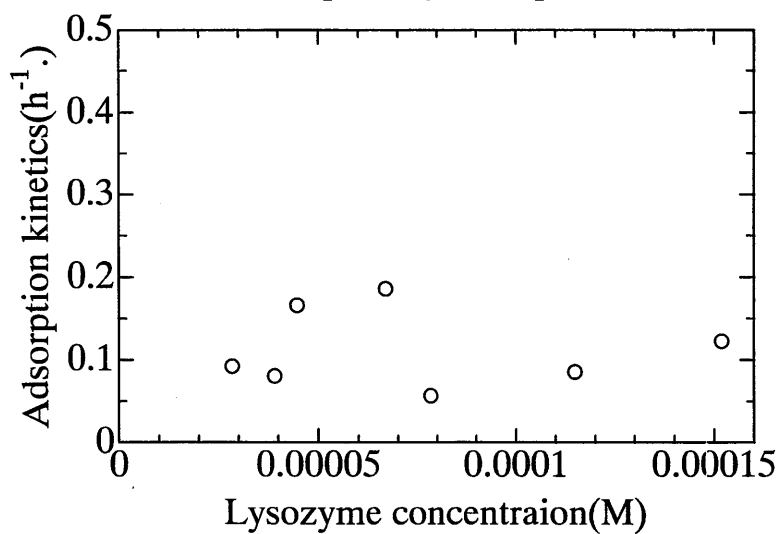


Fig.35 Adsorption kinetics of lysozyme on secondary adsorption

各吸着過程における時定数は、バルクのリゾチーム濃度が異なってもほぼ一定の値を示した。

3-3-3 リゾチームの吸着量の濃度依存性

リゾチーム溶液の濃度に対する、吸着時間 15 分および 24 時間後の吸着量、加えて 24 時間後の吸着量から 15 分後の吸着量を差し引いたものをプロットしたグラフを Fig. 36 に示す。

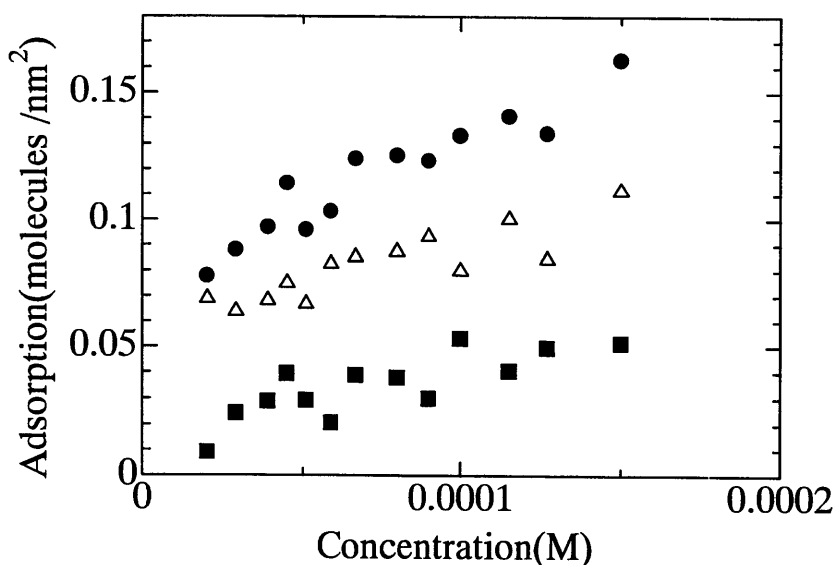


Fig.36 Amount of adsorbed lysozyme versus concentration of lysozyme solution

- (Adsorption amount : after 24h.)
- △ (Adsorption amount : after 15min.)
- (Adsorption amount : after 24h.-15min.)

吸着速度の解析から吸着時間 15 分では既に一次吸着は終了していた。そのことから 15 分後の吸着量はおおよそ一次吸着によるものである。それに対して 24 時間までの増加した吸着量は、一次吸着以降の吸着によるものであると考えた。従ってグラフにプロットした吸着量の差は、二次及び三次吸着による吸着量を示していることになる。Fig. 36 によると $1.0 \times 10^{-4} \text{M}$ を境とした低濃度領域では、24 時間後の吸着量の濃度依存性は吸着時間 15 分以降の吸着成分によるものであると判断でき、これは二次もしくは三次吸着によるものであると考える。それに対し高濃度側における 24 時間の吸着量の濃度依存性に見

られる増加は、15分以降の吸着成分によるものだけでなく、15分までの吸着量の増加もまた大きく影響していることが判断できる。このことから高濃度領域においては、15分間までの間にも、一次吸着以外の吸着成分が存在することが予測できる。

3-3-4 リゾチームの吸着に伴う立体構造変化

吸着速度論的解析から得られた理論上の平衡吸着量を用いて、一次吸着過程、二次吸着過程、全吸着過程に分けて吸着等温線を作成した (Fig. 37~39)。

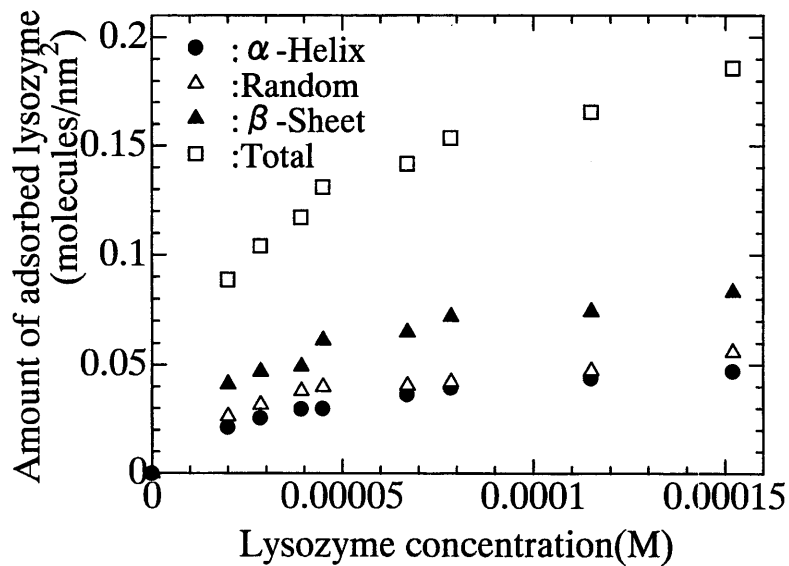


Fig.37 Theoretical adsorption isotherm of lysozyme adsorbed on PTTSSS surface

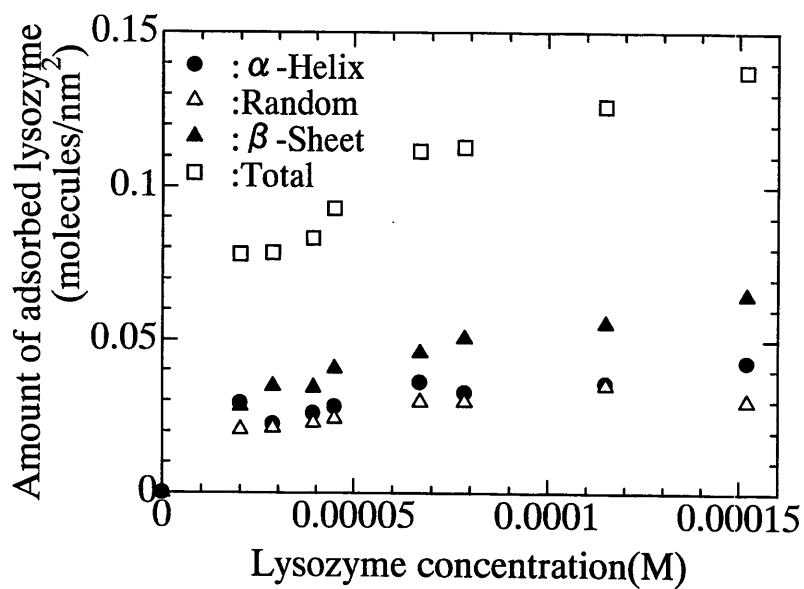


Fig.38 Theoretical adsorption isotherm of primary adsorption on PTTSSS surface

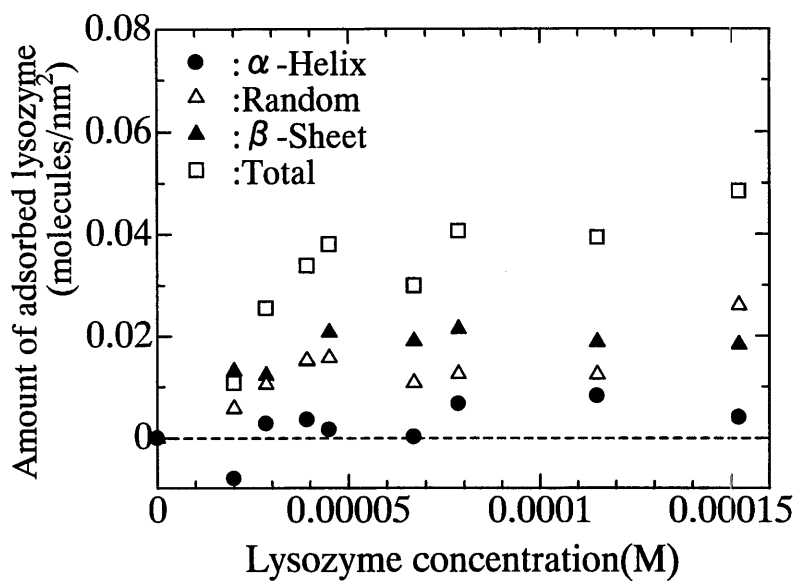


Fig.39 Theoretical adsorption isotherm of secondary adsorption on PTTSSS surface

これらの吸着等温線は全吸着量とは別に各二次構造成分に対してプロットした。また、一次吸着過程、二次吸着過程における各二次構造成分のフラクションをプロットしたものを Fig. 40~42 に示す。

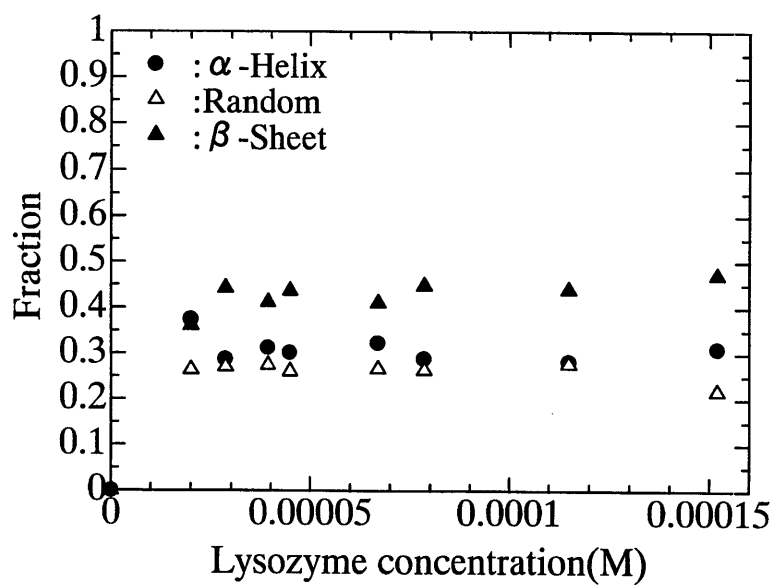


Fig.40 Fraction of secondary structure for primary adsorption on PTTSSS surface

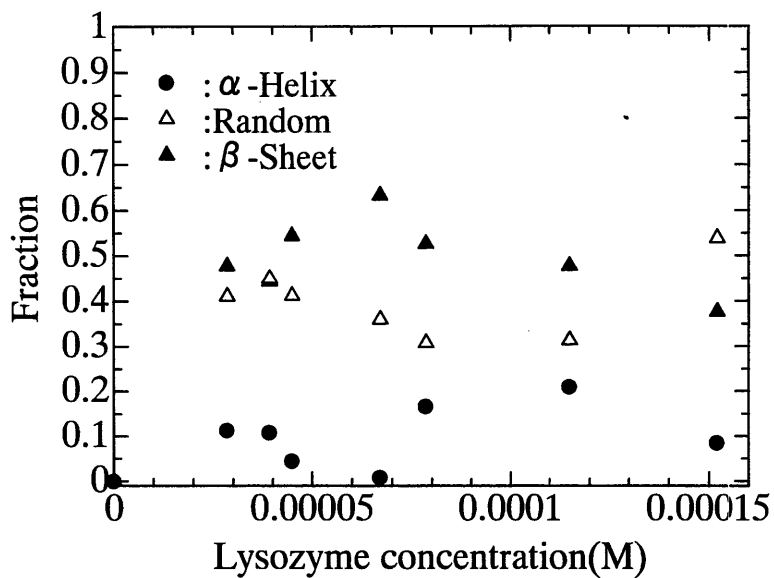


Fig.41 Fraction of secondary structure for lysozyme adsorbed at secondary adsorption process

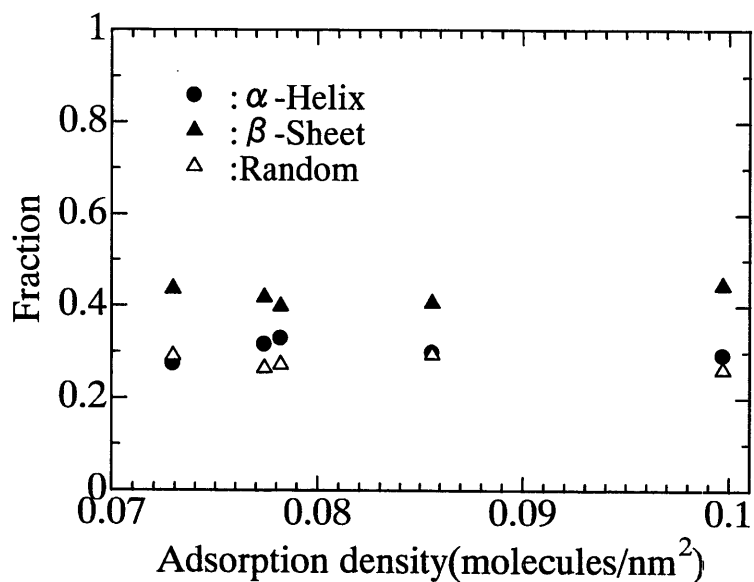


Fig.42 Fraction of secondary structure for lysozyme adsorbed during the 15min. of adsorption time

PTSSS 表面では Fig. 37~39 によると、バルク濃度によって吸着の際に生じる立体構造の違いはあまり見られない。

これらの結果を受けて、PTSSS 表面においては、全バルク濃度に対する二次構造成分のフラクションの平均値を一次吸着過程、二次吸着過程について算出した。この値を天然リゾチームの二次構造成分のフラクションと併せて Table 10 に示す。

Table 10 Fraction of secondary structure

PTSSS表面	α-Helix	β-Sheet	Random
一次吸着過程	0.31±0.03	0.43±0.03	0.26±0.02
二次吸着過程	0.10±0.07	0.50±0.08	0.40±0.08
天然リゾチーム	0.38	0.36	0.26

Table 10 を見ると、一次吸着過程はポリマー表面において、天然リゾチームと比較すると α -ヘリックス構造成分が減少し、 β -シート構造成分が増加していることがわかる。二次吸着過程ではポリマー表面において、天然リゾチームと比較すると α -ヘリックス構造成分が更に減少し、その代わりに β -シート、ランダムコイル構造成分が増加していることがわかった。上述した事項を、時間と吸着量に対するリゾチームの二次構造成分をフラクシオン毎にプロット (Fig. 58~60) することで、各フラクシオン毎の変化量を明確に評価することが可能となった。

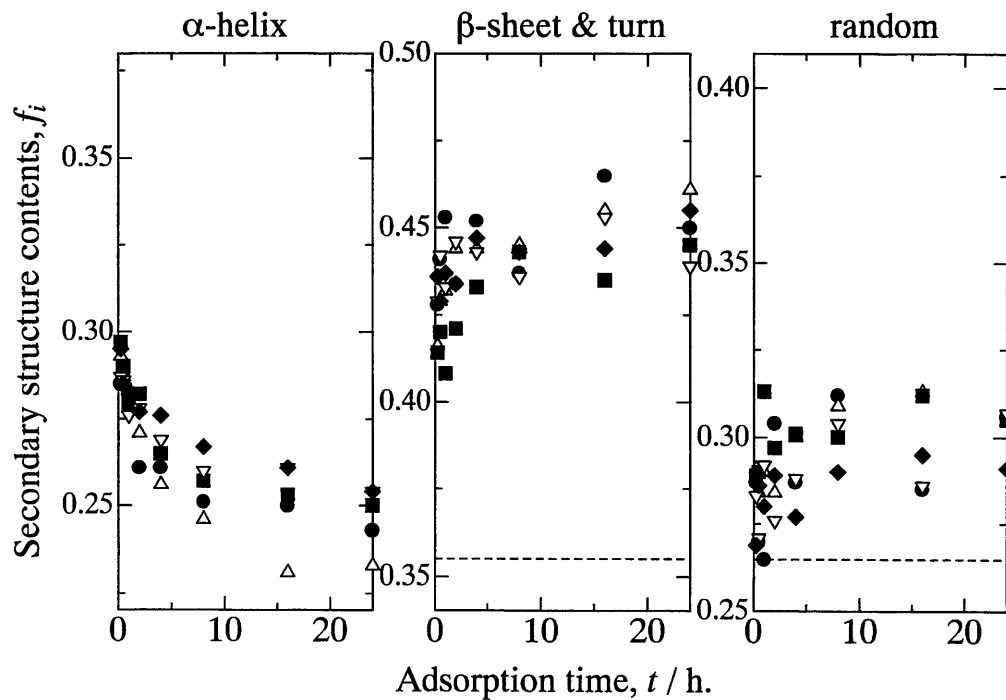


Fig.58 Secondary structure change of adsorbed lysozyme dependent on the adsorption time

-----: secondary structure contents of lysozyme dissolved in the D_2O solution
 ● : $4.08 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, Δ : $6.44 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, \blacksquare : 1.12 g l^{-1}
 ∇ : 1.64 g l^{-1} , \blacklozenge : 2.17 g l^{-1}

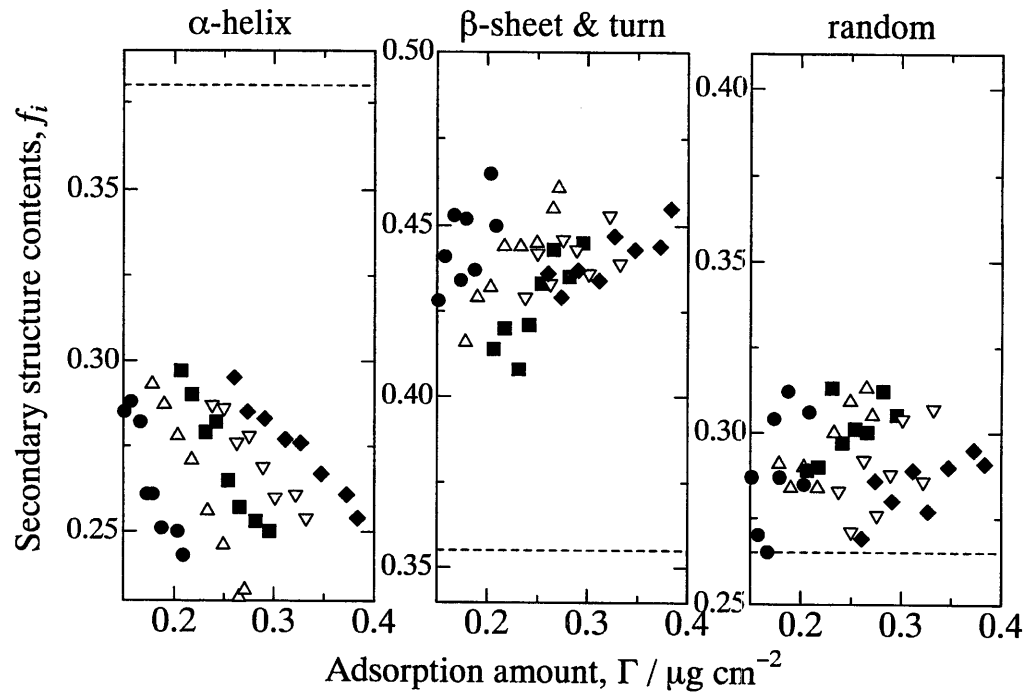


Fig.59 Secondary structure change of adsorbed lysozyme dependent on the adsorption amount

-----: secondary structure contents of lysozyme dissolved in the D_2O solution
 ● : $4.08 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, Δ : $6.44 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, \blacksquare : 1.12 g l^{-1}
 ∇ : 1.64 g l^{-1} , \blacklozenge : 2.17 g l^{-1}

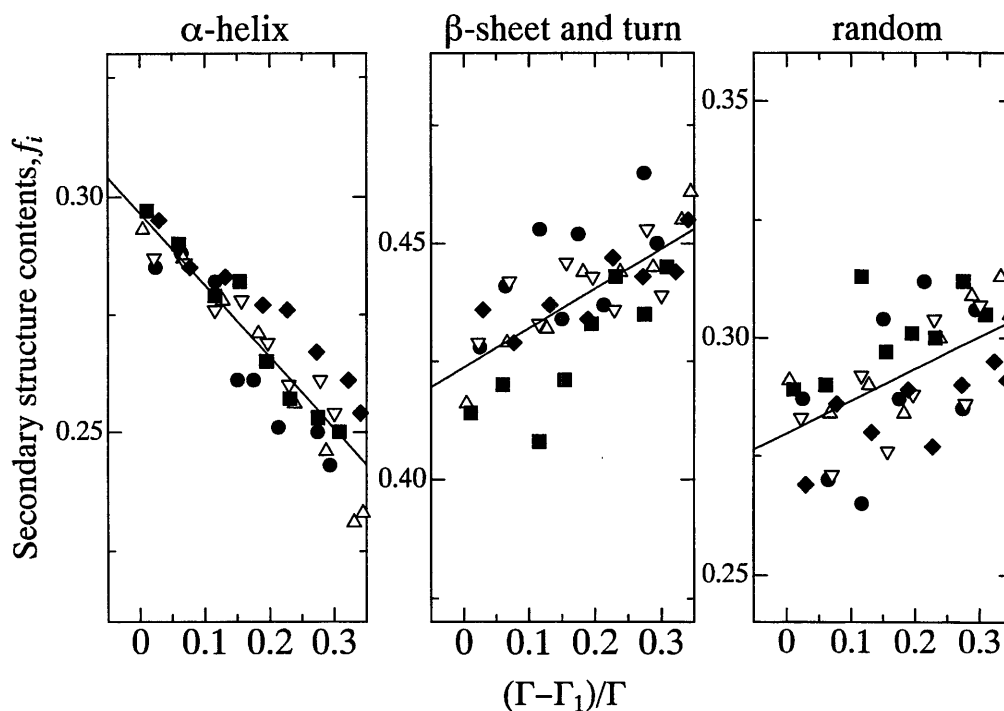


Fig.60 Secondary structure change of lysozyme with the progress of adsorption

● : $4.08 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, △ : $6.44 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, ■ : 1.12 g l^{-1}
 ▽ : 1.64 g l^{-1} , ◆ : 2.17 g l^{-1}

3-3-5 リゾチームの吸着等温線について

3-3-4 の速度論的解析において、ポリマー表面における吸着速度はバルクの リゾチーム濃度に対して変化しなかった。これに対し、吸着等温線ではポリマー表面におけるリゾチームの平衡吸着量がバルク濃度の増加と共に増加している。Langmuir の吸着速度論によれば速度定数とバルクの濃度とは相関関係にあるが、今回の吸着速度解析の場合には見られなかった。この原因はリゾチームのような生体高分子におけるポリマー表面への吸着現象を考える場合、拡散律速以外の律速段階が吸着過程にあることが考えられる。例えば、吸着に安定な立体構造をとる際の活性化エネルギーによる影響、あるいは以下の 3-3-6 で記述する静電的斥力作用による影響などであると考えられる。

3-3-6 リゾチームの吸着の要因について

吸着の要因としては疎水性相互作用、静電的相互作用、ファンデルワールス相互作用が考えられる。ポリマー表面と溶媒との界面自由エネルギーを減少させるために、リゾチームが吸着したとすれば、一次吸着過程は強い疎水性相互作用により速やかに吸着したと考えられる。また、二次吸着過程も同様に疎水性相互作用による吸着であるが、 $pD=7.0$ ($pH=6.6$)の溶液中で、等電点(isoelectric point)が $pH=11$ のリゾチームは正に帯電しているはずであり、ポリマー表面に吸着したリゾチーム分子とバルクのリゾチーム分子の間には静電的斥力作用が生じるため、一次吸着過程に比べて吸着速度が遅くなると考えられる。また、各吸着過程において吸着に有利な立体構造に変化する事により安定化し吸着すると考えられる。今回の解析結果から考察すると、吸着に伴って β -シート構造成分が増加することにより表面の疎水性が高くなり、疎水的な引力で吸着したと考えられる。

3-4 血清アルブミンの吸着機構の分析

3-4-1 吸着血清アルブミンの濃度依存性

Fig. 43 は、15分後、10時間後の血清アルブミンの吸着量および、15分から10時間の間に吸着した血清アルブミンの吸着量の濃度変化をプロットした。

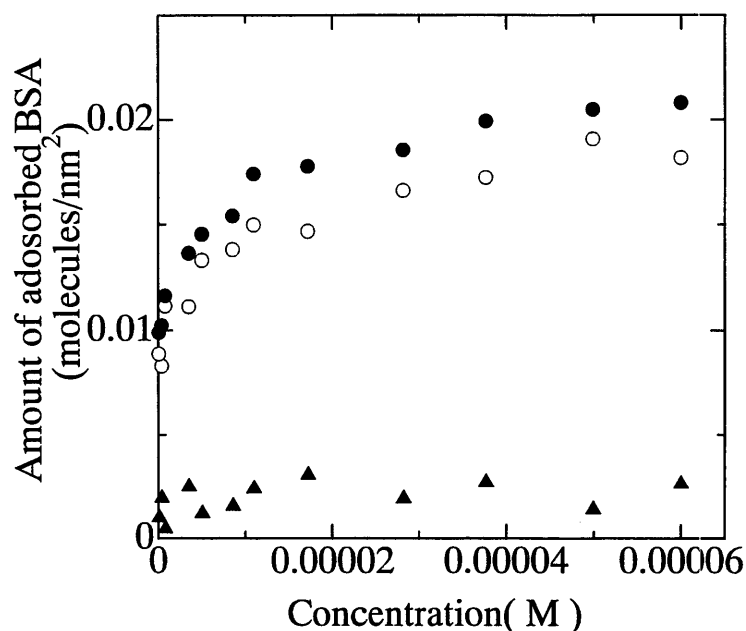


Fig.43 Amount of adsorbed BSA versus concentration of BSA solution

- (Amount of adsorbed BSA : after 10h.)
- (Amount of adsorbed BSA : after 15min.)
- ▲ (Amount of adsorbed BSA : 10h. - 15min.)

Fig. 43 から血清アルブミン溶液の濃度の増加に伴って 15 分後、10 時間後吸着量が増加していること、10 時間後—15 分後の吸着量は血清アルブミン濃度に依存しないことが確認できた。

3-4-2 吸着血清アルブミンの立体構造分析

非吸着成分の補正を行った ATR/FT-IR スペクトル Fig. 19~Fig. 30 のアミド I' 吸収帯に対して二次構造解析を行った。これらのピークの変位は、吸着リゾチームの立体構造分析と同様に、Veronique Cabiaux ら⁶⁰⁾によって提唱された方法により行なった。それぞれの二次構造に関する周波数領域は、 α -ヘリックス; 1661~1648 cm^{-1} 、 β -シート 1 ; 1689~1682 cm^{-1} 、 β -シート

2 ; 1638~1628 cm^{-1} 、 β -シート 3 ; 1628~1615 cm^{-1} 、ランダムコイル ; 1645~1638 cm^{-1} 、 β -ターン ; 1682~1661 cm^{-1} とした。この解析によって得られたピーク分離の結果の例を Fig. 44 に示す。

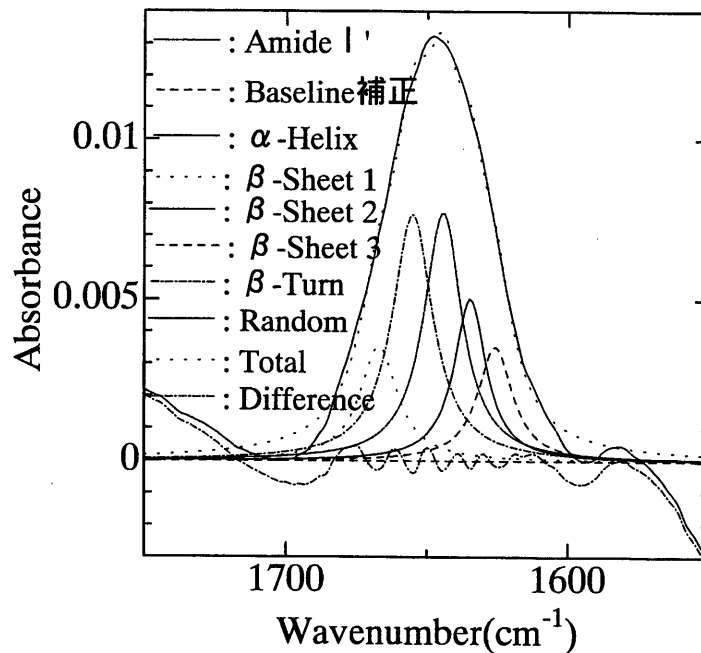


Fig.44 Curve-fitting of secondary structure of BSA adsorbed on PTTSSS surface
 Amide I' : 1705 cm^{-1} ~1595 cm^{-1}
 α -Helix : 1661 cm^{-1} ~1648 cm^{-1}
 β -Sheet 1 : 1689 cm^{-1} ~1682 cm^{-1}
 β -Sheet 2 : 1638 cm^{-1} ~1628 cm^{-1}
 β -Sheet 3 : 1628 cm^{-1} ~1615 cm^{-1}
 β -Turn : 1682 cm^{-1} ~1661 cm^{-1}
 Random : 1645 cm^{-1} ~1638 cm^{-1}

解析結果より、 α -ヘリックス、 β -シート1、 β -シート2、 β -シート3、ランダムコイル、 β -ターンそれぞれの面積とフラクションの値を得た。ここで β -シート= β -シート1 + β -シート2 + β -シート3 + β -ターンとした。得られた10時間後の α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルの吸光度面積をタンパク質分子数に換算した値の濃度変化をプロットし

Fig. 45 に示した。

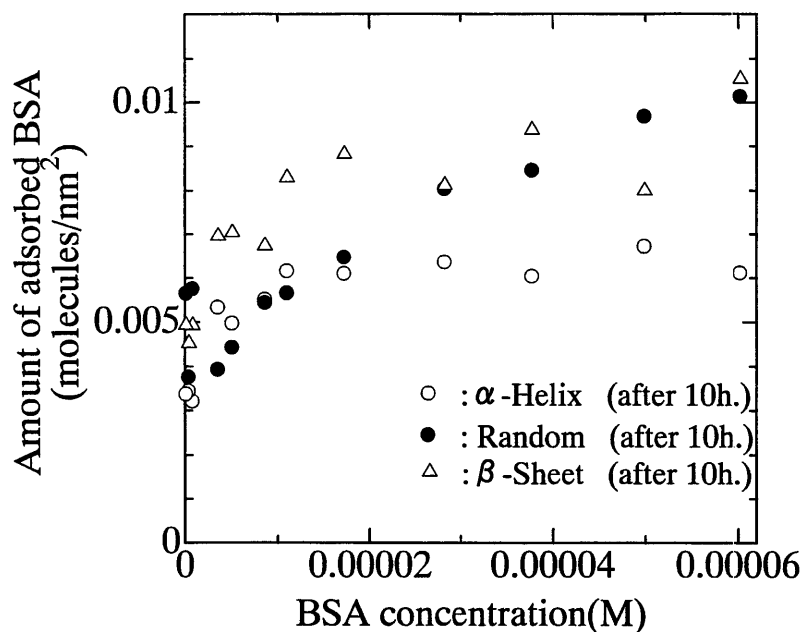


Fig.45 Theoretical adsorption isotherm of BSA adsorbed on PTTSSS surface

Fig. 45 より、濃度の増加に伴ってランダムコイルの量はほぼ直線的に増加し、 α -ヘリックスの量は約 1.0×10^{-5} M までは濃度の増加に伴って増加するが、それ以上の濃度ではほぼ平衡に達していることが確認できた。また、 β -シート量は濃度の増加に伴って緩やかなカーブを描いて増加していることが確認できた。この結果より濃度増加に伴う吸着量の増加は主に β -シートとランダムコイルの増加であることが推測できる。

3-4-3 血清アルブミンの吸着速度の解析

二次構造解析によって得られた α -ヘリックス、 β -シート、ランダムコイルのそれぞれに帰因する吸着量の経時変化の速度論的解析をリゾチーム吸着速度の解析と同様の方法で行った。

フィッティングの結果の例を Fig. 46～49 に示す。

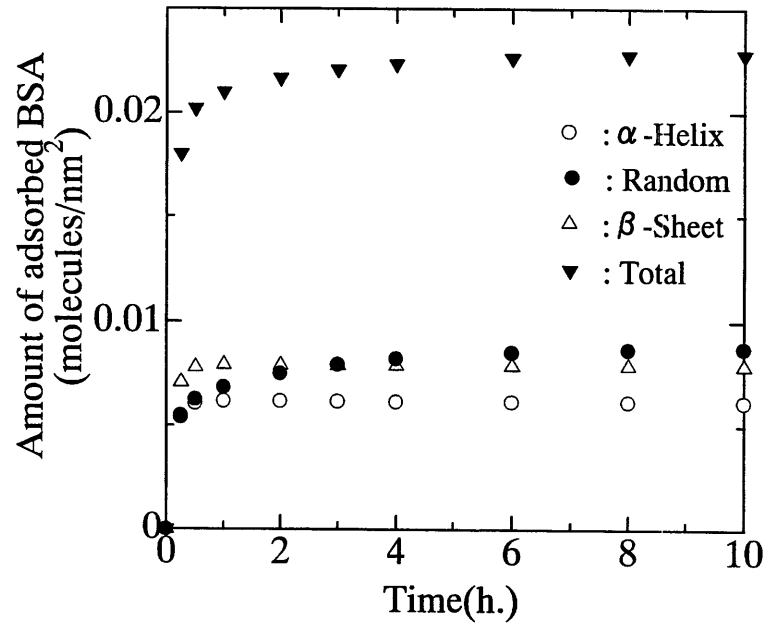


Fig.46 Theoretical adsorption kinetics of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $2.82 \times 10^{-5} \text{M}$

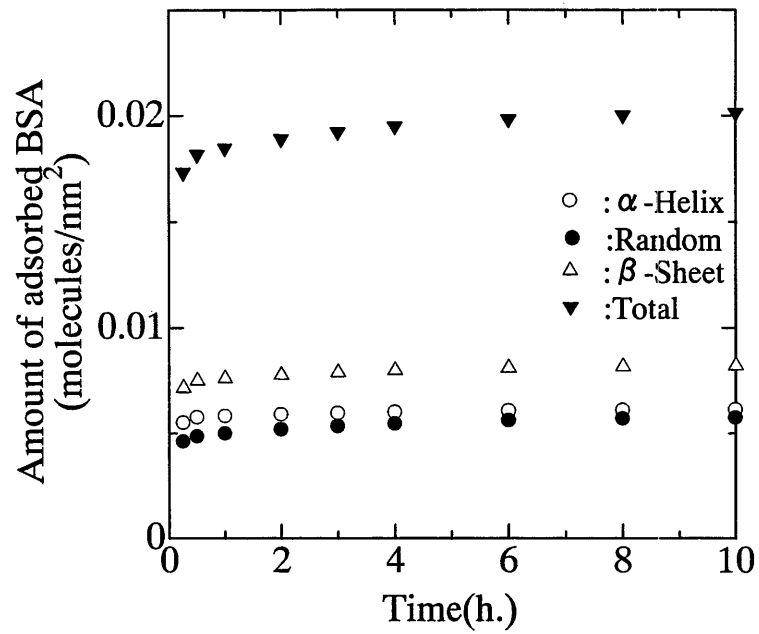


Fig.47 Theoretical adsorption kinetics of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $1.10 \times 10^{-5} \text{M}$

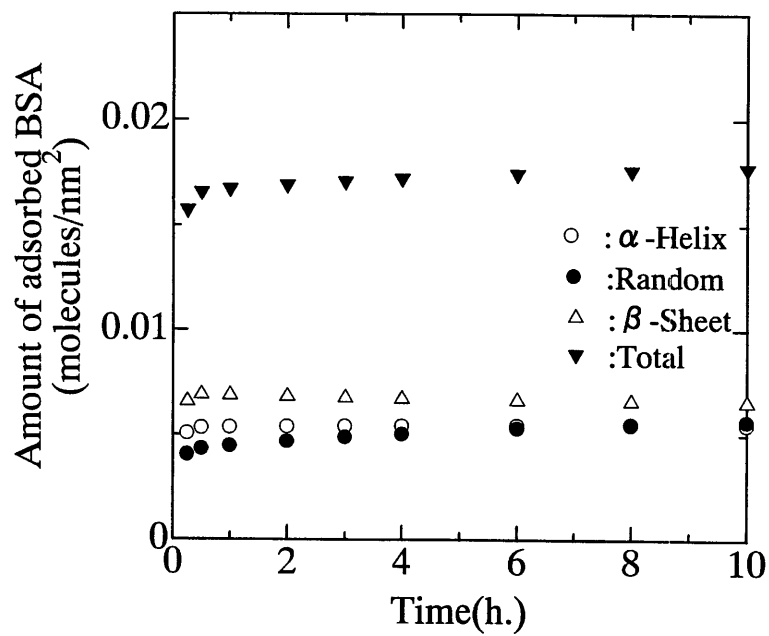


Fig.48 Theoretical adsorption kinetics of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $8.61 \times 10^{-6} \text{M}$

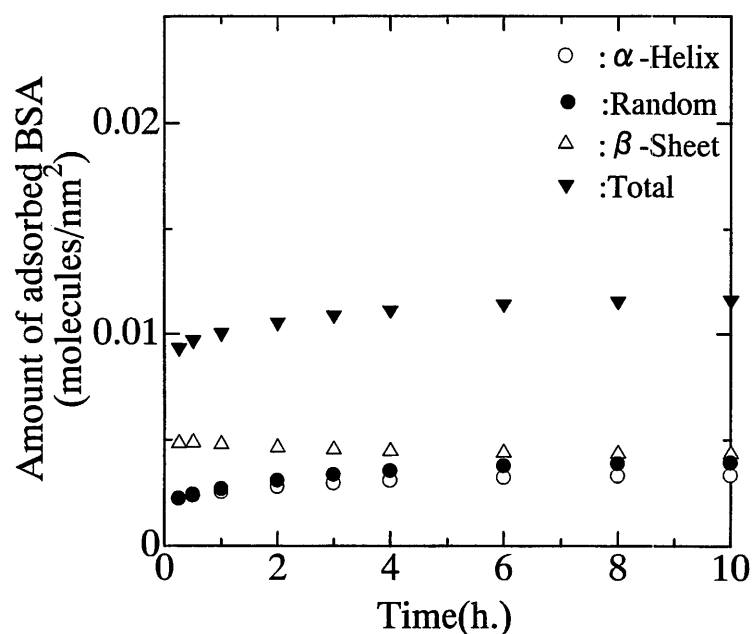


Fig.49 Theoretical adsorption kinetics of BSA adsorbed on PTTSSS surface. Bulk concentration of BSA is $4.06 \times 10^{-7} \text{M}$

但し、式(28)はそれぞれ吸着過程が独立に進行している場合について成立する式であり、血清アルブミンの吸着層が積層になっている場合、あるいは一次吸着層の生成によって二次吸着のサイトが生じる場合、厳密には異なる。しかしながら、2つの速度定数の値が大きく異なる場合には近似的に同様に扱うことができる。解析結果より得られた時定数 k (h^{-1}) 値を Fig. 50、51 に示した。

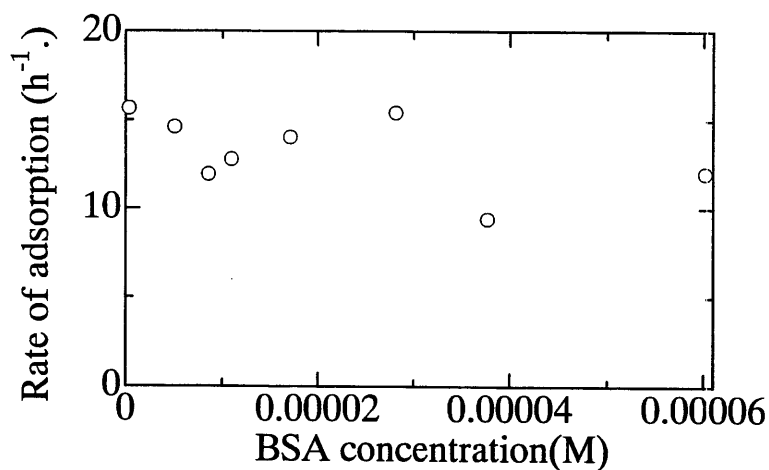


Fig.50 Adsorption kinetics of BSA on primary adsorption

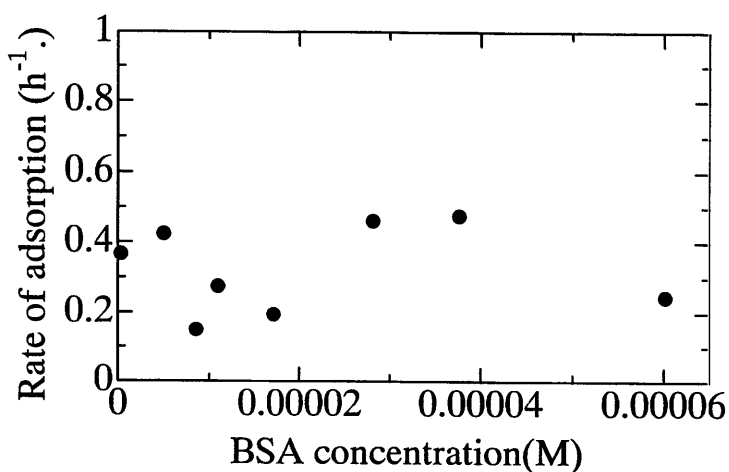


Fig.51 Adsorption kinetics of BSA on secondary adsorption

Fig. 50、51 より一次吸着過程、二次吸着過程において吸着速度の濃度依存性は見られなかった。理由として拡散律速(濃度)以外に、構造の変化が起こるための活性化エネルギーによって生じる律速段階が吸着過程にあるためであると考えられる。

3-4-4 血清アルブミンの吸着に伴う立体構造変化

速度論的解析より得た値を用いて、一次吸着過程、二次吸着過程において濃度に対する各二次構造成分に帰因する吸着量を血清アルブミンにおいてプロットした (Fig. 52~53)。

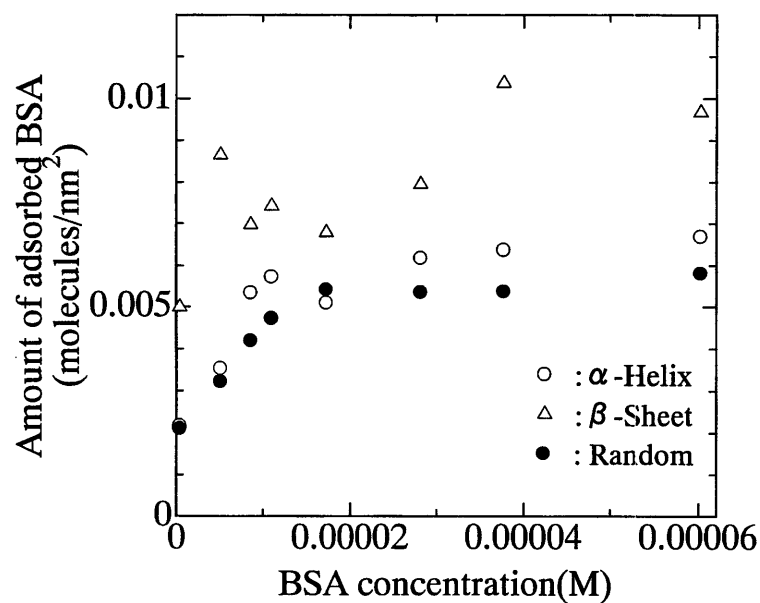


Fig.52 Theoretical adsorption isotherm of BSA on primary adsorption on PTTSSS surface and secondary structure contents of adsorbed BSA

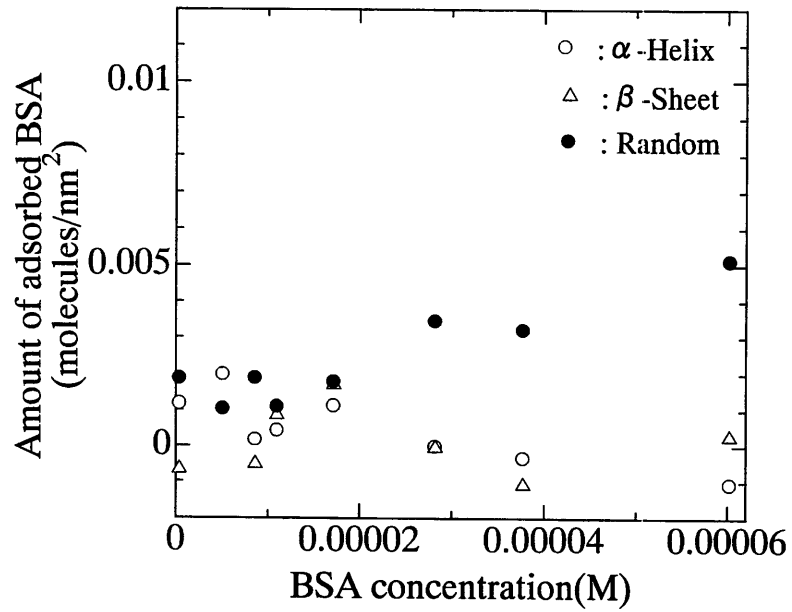


Fig.53 Theoretical adsorption isotherm of BSA on secondary adsorption on PTTSSS surface and secondary structure contents of adsorbed BSA

また、時間と吸着量に対する血清アルブミンの二次構造成分をフラクション毎にプロットした (Fig. 56~57)。

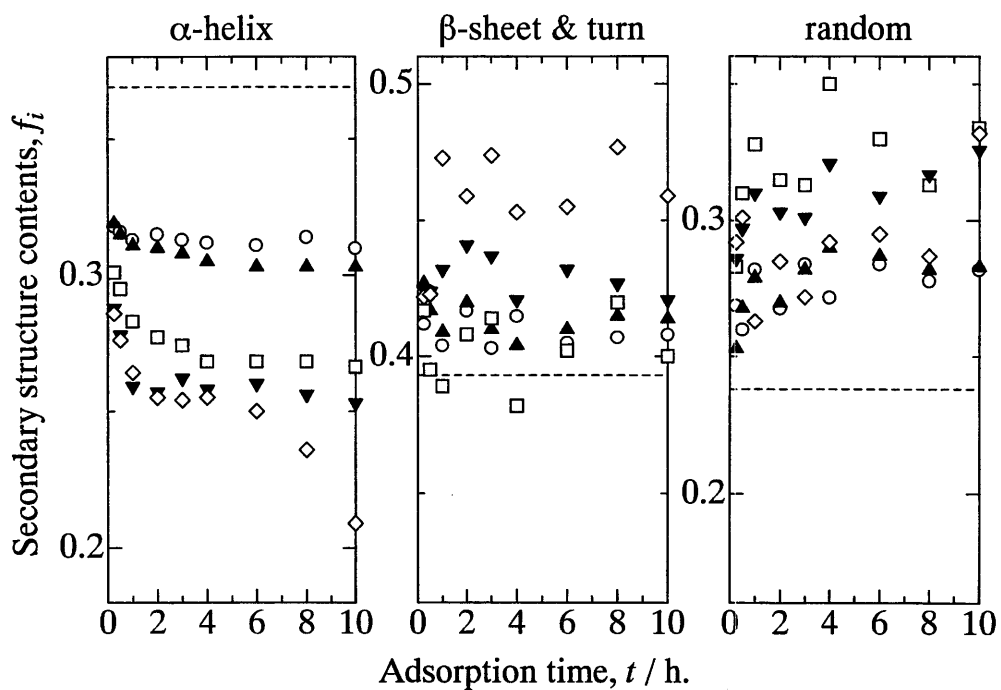


Fig.56 Secondary structure change of adsorption BSA dependent on the adsorption time

----- : secondary structure contents of BSA dissolved in the D_2O solution
 \circ : $5.72 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, \blacktriangle : $7.30 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, \square : 1.87 g l^{-1}
 \blacktriangledown : 2.50 g l^{-1} , \diamond : 3.98 g l^{-1}

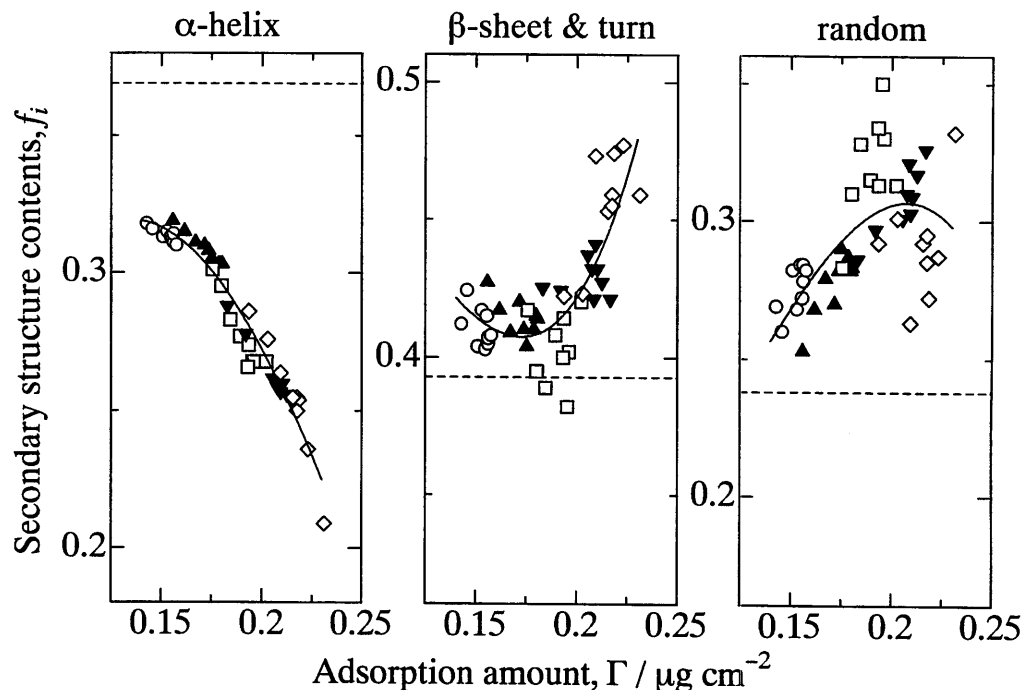


Fig.57 Secondary structure change of adsorbed BSA dependent on the adsorption amount

-----: secondary structure contents of BSA dissolved in the D_2O solution
 ○ : $5.72 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, ▲ : $7.30 \times 10^{-1} \text{ g l}^{-1}$, □ : 1.87 g l^{-1}
 ▼ : 2.50 g l^{-1} , ◇ : 3.98 g l^{-1}

血清アルブミン溶液中の二次構造の割合は、Fig. 12 の透過スペクトルより α -ヘリックス 37%、 β -シート+ β -ターン 39%、ランダムコイル 24% である。Fig. 56~57 によれば、ネイティブに比べて α -ヘリックス は減少し、 β -シート並びにランダムコイルが増加することが確認できた。また、吸着量の増加に伴い α -ヘリックスの割合は減少し、かわりに β -シート並びにランダムコイル構造の割合が増加していることが分かった。15 分後と 10 時間後を比較すると同じような変化をしていることから、一次吸着過程に引き続き同じような構造変化が二次吸着過程でも起きていることが分かった。 β -シート並びにランダムコイルは一次吸着過程、二次吸着過程において同じよ

うに増加していることが確認できた。また、吸着量の増加に伴う構造変化はあまり見られなかったが、15分後と10時間後を比較すると、15分後に比べて10時間後では α -ヘリックスの割合が減少し、ランダムコイルの割合は増加し、 β -シートの割合には変化が見られなかった。このことは、吸着速度論解析による各吸着過程における二次構造含量のバルク濃度による変化が、血清アルブミンでは大きく変化していることに対応している。これらのことから、PTSSS表面上に吸着した血清アルブミンの二次構造は時間に伴う変化はあまりおこらず、吸着量（吸着密度）に伴って変化すると考えられる。

上述したリゾチームと血清アルブミンの吸着過程を模式図に表すと Fig. 61 に示す様になると考えられる。

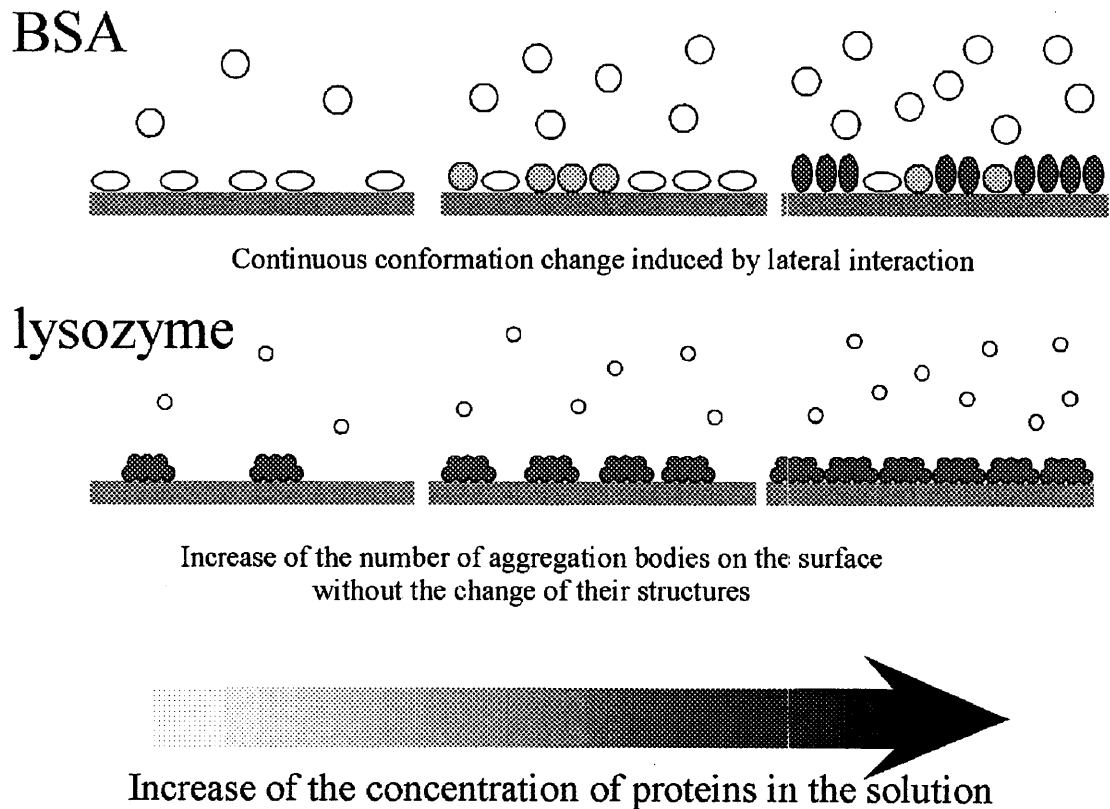


Fig.61 Schematic drawing of the adsorption behaviors of BSA and lysozyme on PTSSS surface with increase of their concentrations in bulk

第2部. PSFアナライザーを用いた研究

第1章. 緒言

コンタクトレンズ（以後 CL と略す。）装着眼の modulation transfer function（以後 MTF と略す。）による光学特性の評価に関しては、これまでに、バイフォーカル CL デザインに関して中心部分が近用、遠用どちらが適しているかを計算機シミュレーションにより検討した報告^{108, 109)}、偏位した場合のバイフォーカル CL の光学特性について回折型と屈折型との比較に関する報告¹¹⁰⁾、試作模型眼を用いた網膜の結像状態の光学的評価法とその評価条件についての報告¹¹¹⁾ などがある。また、実際に人眼に CL を装着した状態での MTF の評価に関しては、モノフォーカル CL の装着による角膜の非点収差の改善効果を double-pass 測定法によって示した報告¹¹²⁾、ディスポーザル CL を1ヶ月間装用した場合の光学的変化を、正視の人の MTF から導かれるひとつの代表値であるメリット関数の変化に関して検討した報告¹¹³⁾、正視の人のメリット関数、コントラスト感度、視力等の基準値をディスポーザルソフト CL 装着眼が満たしていることを示した報告¹¹⁴⁾ がある。これらの報告が示すように、実際に CL を装着した眼の MTF を他覚的に測定し、その光学特性の客観的評価を行うことは重要であり、さらに、自覚検査のパラメータである視力、コントラスト感度等との対応を見ることで、眼光学系の光学系部分から、大脳神経系の特性まで、総合的な評価が可能となる。

今回われわれは、double-pass 法による point spread function（以後 PSF と略す。）測定法を用いて、CL 装用眼の光学特性の評価を行った。double-pass 法による PSF 測定法の原理は、点光源からの光を眼球光学系に投影し、網膜に点像をつくり、再度眼球光学系を通して出てくる網膜からの反射光をフォーカシングレンズを使って CCD(charge coupled device)上に結像させ、その像から、網膜上の点像を導出するというものであり、2回眼球光学系を通るので、一般に double-pass と呼ばれる。double-pass の点像をフーリエ変換することで、光学系の MTF が求められる。しかしながら、従来報告されてい

る double-pass 測定法では網膜での散乱光をすべて使っているため、それによりもとめられる MTF は自覚的な測定から得られる MTF に比べて、若干低い値となることが報告¹¹⁵⁾ されている。

今回の測定に用いた新たに開発された PSF アナライザー^{116~118)} は、double-pass 測定法において、網膜での散乱光の代わりに、入射偏光を保持した反射光のみを用いる方法であり、いくつかの眼球光学系の特性評価において、その有効性がこれまでに報告されている。本研究では、PSF アナライザーでモノフォーカルハード CL、バイフォーカルハード CL 装着眼の PSF を測定し、そのときの網膜像のコントラストを導出し、自覚検査であるコントラスト感度の測定結果と比較することにより、コンタクトレンズ装着眼の光学特性の評価を第 1 部との関連において行うこととした。

第2章. 対象および測定方法

2-1 PSF アナライザーの測定原理

本研究で使用した装置は、double-pass PSF 測定法に改良を加えた装置で、その実験装置測定部の概略を Fig. 62¹¹⁶⁾ に示す。まず、被験者が自動雲霧用固視標(TA)を固視することで、被験眼(SE)が雲霧状態に保たれる(但し、今回の実験は、全て散瞳下で行ったので、この機能は用いていない)。波長 840nm の SLD (super luminescent diode) 照明による直径 $5.0\mu\text{m}$ のピンホールを測定用点光源(PS)とし、この点光源からでた光をレンズ L1 (焦点距離; $f=30\text{mm}$) によって平行光線束とした後に眼球に入射させ、網膜上に点像を作る。この点像は、眼球光学系の光学特性を反映した像といえる。この点像からの反射光は再び眼球光学系を通り、もう一度平行光に近い状態にもどり、1/4 波長板、ロータリープリズム、偏光ビームスプリッター、人工射出瞳(AP0) (直径 2mm から直径 6mm まで可変) を経て、レンズ L2 (焦点距離; $f=150\text{mm}$) により、CCD 上に眼底からの鏡面反射成分のみによる点像 (double-pass PSF) が形成される。

2-2 測定した PSF からの他覚的網膜像のコントラストの導出

得られた点像つまり double-pass PSF から網膜像のコントラストをもとめる方法を示す。まず、得られた double-pass PSF をフーリエ変換すると double-pass MTF が得られる。この MTF の平方根をとると、single-pass MTF が得られる。single-pass とは、角膜、水晶体、網膜までの光学系の片道分であり、これが実際の眼球光学系を反映する MTF となる。single-pass MTF を逆フーリエ変換すると、single-pass PSF を得ることができる。Fig. 63¹¹⁷⁾ には、乱視のある場合の処理の流れを示した。前後焦線それぞれに垂直な方向の断面の点像強度分布 (spread function) から、矯正により正視となった場合の double-pass PSF をもとめ、フーリエ変換、逆フーリエ変換を経て single-pass PSF が導出される。今回のハードコンタクトレンズ装用眼の評価についても同様の手法で PSF を導出した。

このようにして得られた single-pass PSF を用いてシミュレーション網膜像の他覚的コントラストをもとめるには、網膜に映す図形の輝度分布に single-pass PSF を合成積(コンボリューション)演算を行う。

即ち、PSF そのものは点光源の光学系によるボケを表しているので、物体の輝度分布を PSF でぼかすことになる。ここでは網膜に映る物体としてランドルト環視標を想定した例を Fig. 64¹¹⁷⁾ に示す。網膜像の他覚的コントラストは Fig. 65 に示すように Landolt 環の切れ目の部分の輝度の最大値と最小値を使って、 $\text{コントラスト} = (\text{最大値} - \text{最小値}) / (\text{最大値} + \text{最小値})$ をもとめた。MTF の数値だけからは、被験眼の網膜像を客観的に創造することは困難であるが、このように視標の網膜像をシミュレーション画像として示すことによって、また網膜像のコントラストを数値化することによって網膜像の光学特性を明確に把握することが可能となる。

2-3 被験眼と測定条件

被験眼は 1 眼で、オートレフラクトメーターによる屈折測定値は、S-4.75, C-0.5, Ax39°、検査距離 5 m でのランドルト環視標による視力は、V. A. =0.1 (1.2×-4.5D = C-0.5D Ax40°) である。今回、実験用に我々が試作した CL は、モノフォーカルハード CL (ベースカーブ: 7.95mm、屈折力: -3.75、直径: 9.4mm、中心厚み: 0.12mm) とバイフォーカルハード CL (ベースカーブ: 7.95mm、屈折力: -3.75、直径: 9.8mm、中心厚み: 0.15mm、付加度数: 2D) で、実験に用いたバイフォーカルハード CL の光学デザインは、Fig. 66 のごとくである。これらの CL の素材は、トリストリメチルシロキシシリルスチレンを主成分とするコポリマーで、人工涙液(総タンパク質量: 4.65mg/ml) に浸漬した際、タンパク質の飽和吸着量は、30 分でほぼ飽和吸着 ($1.13 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) に達することを蛍光分光光度計による測定において確認されている。また、PSF アナライザーを用いた CL 装着眼測定に際して問題となるコンタクトレンズと角膜との位置関係に関しては、使用した CL の直径がそれぞれ 9.4mm と 9.8mm と大きく、また、瞬目による位置ずれは殆ど生じていないことを細隙灯顕微鏡検査により予め確認した上で今回の測定を行った。

まず、PSF アナライザーの CL 装着眼への適応の有効性を検討する目的で、PSF より他覚的に導出された網膜像コントラストと自覚的検査結果であるコントラスト感度を比較検討した。方法は、これら 2 種類の CL 挿入眼それぞれについて、PSF アナライザーを用いて、散瞳下で直径 3, 4, 6mm の各人工入射瞳孔における PSF を測定し、得られた PSF からそれぞれの網膜像コントラストをもとめた。なお、網膜像のコントラスト値は 100 倍して%の表示とした。一方、自覚的検査として、同被験眼で、PSF 測定と同条件下の直径 3, 4, 6mm の人工瞳孔径において、CL 装用時および眼鏡矯正時のそれぞれにおける視力とコントラスト感度を CSV-1000 (VECTOR VISION 社) を用いて測定した。検査距離は 2.5m (検査距離が 2.5m であるため、S-4.25, C-0.5, Ax40° で矯正を行った)、視力検査には Landolt 環 log MAR 視力測定用チャート : CSV-1000LanC を用いて log MAR 視力を、コントラスト感度検査にはコントラスト感度測定用チャート : CSV-1000E を用いて 3, 6, 12, 18c/deg におけるコントラスト感度を測定した。

そして、PSF アナライザーから推定した網膜像のコントラストと自覚検査によるコントラスト感度の関係を見るために、測定した各空間周波数において、自覚的コントラスト感度 (×100%) / 推定網膜像のコントラスト (%) の演算を行った。

さらに今回は、CL 装着後、CL に吸着した涙液中のタンパク質が光学特性に与える影響について検討すべく、CL 装着直後、30 分後、1 時間後の PSF を経時的に測定し検討した。

第3章. 結果

はじめに、モノフォーカルハード CL およびバイフォーカルハード CL 装着眼における PSF アナライザーにより得られたシミュレーション網膜像コントラストの解析結果について示す。Fig. 67 は、モノフォーカルハード CL 装着眼のシングルパス PSF からもとめた Landolt 環視標のシミュレーション網膜像である。瞳孔径が大きくなるに従って像のコントラストが低下するのがわかる。このシミュレーション像での切れ目(垂直方向)のコントラスト変化を Fig. 68 のグラフに示す。グラフの横軸は本来空間周波数 (c/deg) で表すべきであるが、自覚検査である視力検査結果との比較を容易にするため、ここでは対応する小数視力値で示してある(その対応小数視力 0.1, 1 はそれぞれ、約 3c/deg, 30c/deg の空間周波数に対応させている)。縦軸は、コントラスト (%) を対数目盛りで示してある。瞳孔径が 3, 4, 6mm と大きくなるに従って、全体的にコントラストが低下している。ここでは示さないが、水平方向のコントラスト変化は垂直方向とほぼ同じであった。

Fig. 69 にバイフォーカルハード CL の single-pass PSF からもとめた Landolt 環視標のシミュレーション網膜像を、Fig. 70 にシミュレーション網膜像からもとめられたコントラストの結果を示す。Fig. 70 のごとく、バイフォーカルハード CL 装着眼のシミュレーション網膜像のコントラストは同様に、瞳孔径が 3, 4, 6mm と大きくなるに従って全体的に低下するが、特に低周波数においてコントラストの低下が著明であった。

また、この結果を Fig. 68 に示すモノフォーカルハード CL の結果と比較すると、3mm の瞳孔径では、バイフォーカルハード CL のほうが周波数によらず全体的にわずかに低かったのに対して、瞳孔径 6mm では特に低周波数でバイフォーカルハード CL の低下が著明であるが高周波数では両者にあまり差がみられなかった。また、図には示さないが、バイフォーカルハード CL 装着眼においても、水平方向のコントラスト変化は垂直方向とほぼ同様であった。

自覚検査の結果について示す。まず、視力検査の結果、モノフォーカルハード CL 装着眼の視力は log MAR で $(-0.1 \times C - 0.5D \text{ Ax}40^\circ)$ 、すなわち小数視

力換算で (1.25)、バイフォーカルハード CL 装着眼の視力は log MAR で (-0.1 × C-0.75D Ax70°)、すなわち小数視力換算で (1.25)、眼鏡矯正下による視力は (1.25) で、いずれも矯正視力に差がなかった。コントラスト感度の測定結果は Fig. 71 のごとくで、3mm の瞳孔径ではモノフォーカルハード CL 装着眼、バイフォーカルハード CL 装着眼、眼鏡矯正下ともに同程度のコントラスト感度であったが、瞳孔径 6mm ではバイフォーカルハード CL 装着眼のコントラストは、モノフォーカルハード CL 装着眼および眼鏡矯正下よりも低周波数でコントラスト感が低かった。

つぎに、PSF アナライザーから推定した網膜像のコントラストと自覚検査によるコントラスト感度の関係を見るために、(コントラスト感度)/(網膜像のコントラスト)の演算を行った結果を Fig. 72 に示す。図に示される如く、この値の特性においてモノフォーカルハード CL 装着時とバイフォーカルハード CL 装着時での違いは殆どなく、低周波数でピークをもつ形をしており、瞳孔径によって異なることが分かる。さらに瞳孔径 3mm と 6mm では 6mm の方が低周波数で高い値を示した。

Fig. 73 にモノフォーカルハード CL 装着眼において、PSF 測定より求めたシミュレーション網膜像のコントラストの経時的変化を示す。測定時の瞳孔径は 3mm である。図のごとく、導出された網膜像のコントラストは経時的にほとんど変化がなかった。

第4章. 考察

バイフォーカルハード CL 装着眼の PSF 像は、CL の遠用部を通過した光は広がりのない鋭い点像となるが、近用部を通過した光は広がるため、全体の点像は広がった光の中心に鋭いピークをもった形となる。瞳孔径が大きい場合には、近用部の面積が増えるので、ボケの量が多くなり、そのことが、低周波領域のコントラストの低下に寄与していると考えられる。一方、モノフォーカルハード CL 装着眼の場合は、すべて遠用部であり、この広がりをもった光は生じない。その為、低周波領域のコントラストはバイフォーカルハード CL 装着眼よりも高いものと考えられる。

PSF により求めた網膜像コントラストと自覚的検査結果である視力、コントラスト感度との関係であるが、前者は、眼球光学系のみ特性値、後者は眼球光学系、網膜、大脳神経系の特性を含めた視覚系全体の特性値であると考えられる。従って、(自覚検査によるコントラスト感度)/(推定網膜像のコントラスト)の値は網膜から大脳神経系の伝達特性を示すと考えられ¹¹⁹⁾、Campbell¹²⁰⁾らが干渉縞を網膜に直接投影して求めた特性に対応するものであるともいえる。実際、今回得られた、低周波数でピークを持つ形は、Campbell の求めたカーブに類似している。この特性が、今回の実験の結果から示されたように光学特性の異なるモノフォーカルハード CL およびバイフォーカルハード CL 装着眼の条件で差が生じず、装着眼の瞳孔径に依存し、瞳孔径 6mm の時の方が低周波数で高い特性が得られたことは、この特性が網膜照度で変わることの意味している。また、網膜から大脳神経系における伝達特性は個人、網膜照度によって変わるものではあるが、ある平均的な特性を用意すれば、PSF アナライザから推定される網膜像コントラストよりコントラスト感度をある程度推定することが可能であることも示唆された。また、PSF により求めたコントラストは、モノフォーカルハード CL 装着眼およびバイフォーカルハード CL 装着眼のいずれにおいても高周波数領域では、双方で一致していた。一方自覚検査である矯正視力もモノフォーカルハード CL 装着眼およびバイフォーカルハード CL 装着眼で一致していた。従って、網膜から大脳での閾値を

超えることで視力が得られるものと考えられる。

今回は、被験眼が1眼のみであったこと、並びに18c/deg以上のコントラスト感度は測定していないため、高空間周波数での他覚値と自覚値の比較を行っていない。今後、さらに被験眼を増やし、かつ、高空間周波数におけるコントラスト感度測定も併せて比較検討することにより、PSFによるシミュレーション網膜像のコントラストとコントラスト感度、視力との関連をさらに明確にできると思われる。さらに、今回はモノフォーカルハードCL装着眼とバイフォーカルハードCL装着眼について検討したが、今後はソフトCLや、デザインの異なるバイフォーカル、マルチフォーカルCL等の装着眼の光学的機能評価などを行うことにより、最適なCLの開発に役立つデータが得られるものと期待される。

最後に、今回のもう一つの検討項目であるCLに吸着した涙液中のタンパク質が光学機能の及ぼす影響については、起こりうる光学的な変化は主として散乱光の増加であり、これによりコントラストが低下する可能性が考えられる。しかし、今回の測定では、タンパク質の吸着量がほぼ飽和吸着に達すると考えられる30分後および、さらに60分後においてもCL装着眼のPSFにより導出されるコントラストには経時的変化はほとんど認められず、装着後の涙液中のタンパク質が光学特性に及ぼす影響は少ないものと考えられた。

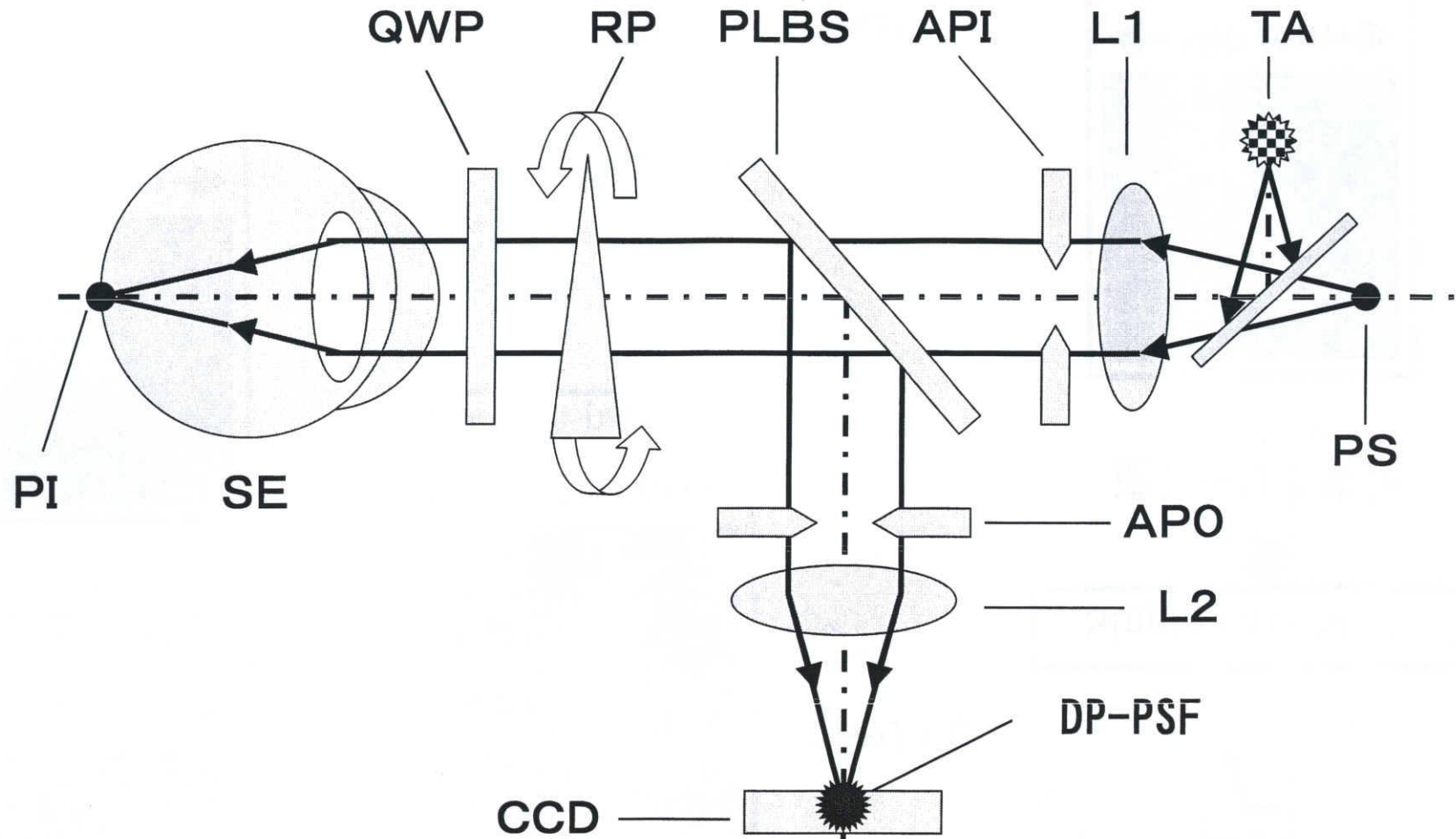


Fig. 62 実験装置測定部概略図

(TA:自動雲霧用固視標,L1:コリメータレンズ,API:人工入射瞳,PLBS:偏光ビームスプリッター,
 RP:ロータリープリズム,QWP:1/4波長板,SE:被験眼,PI:点像,APO:人工射出瞳,L2:フォーカシングレンズ,
 DP-PSF:ダブルパスPSFイメージ 小林 他,視覚の科学,Vol.22,No.2,P47,2001)

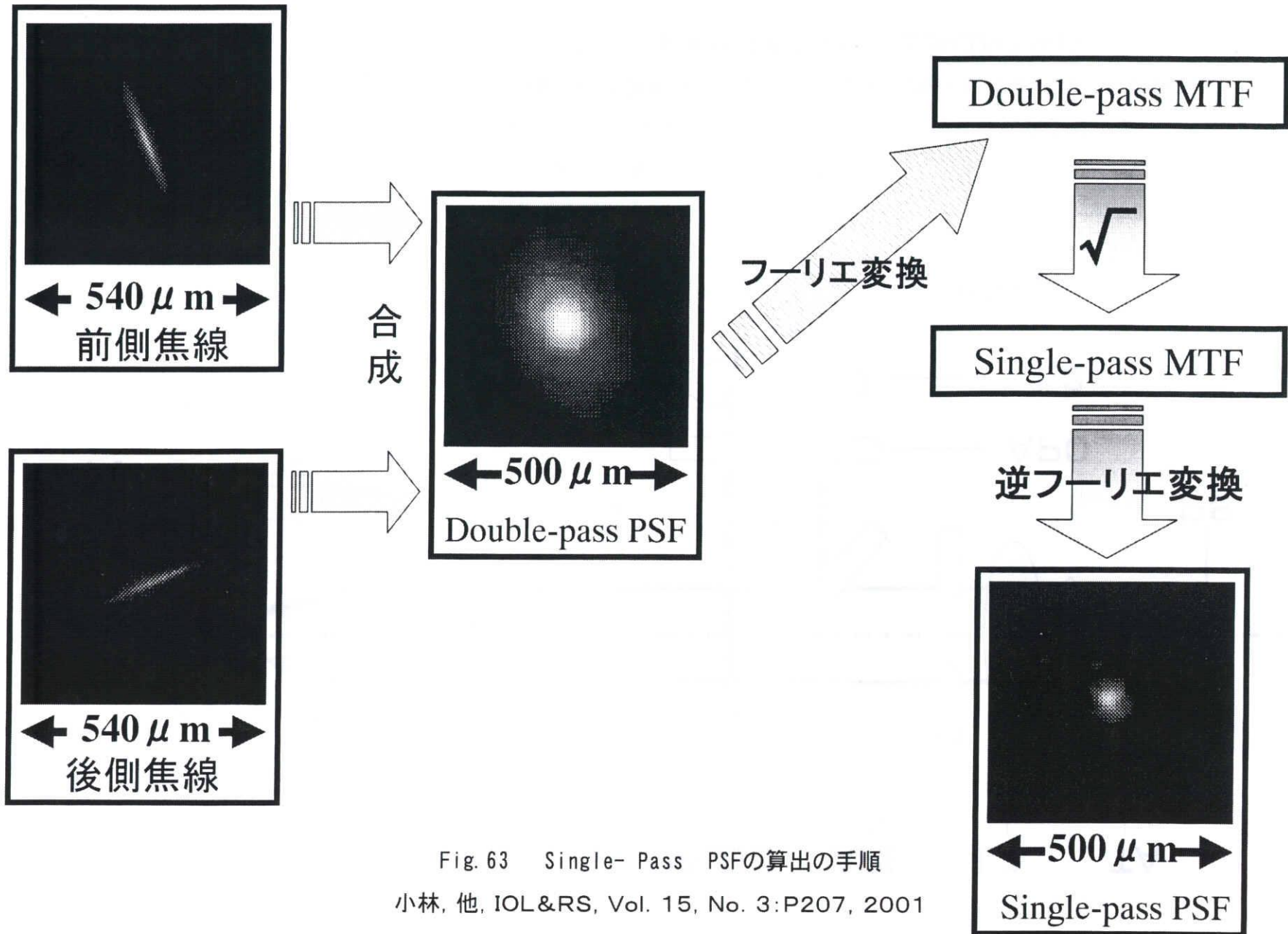


Fig. 63 Single-Pass PSFの算出の手順
 小林, 他, IOL&RS, Vol. 15, No. 3:P207, 2001

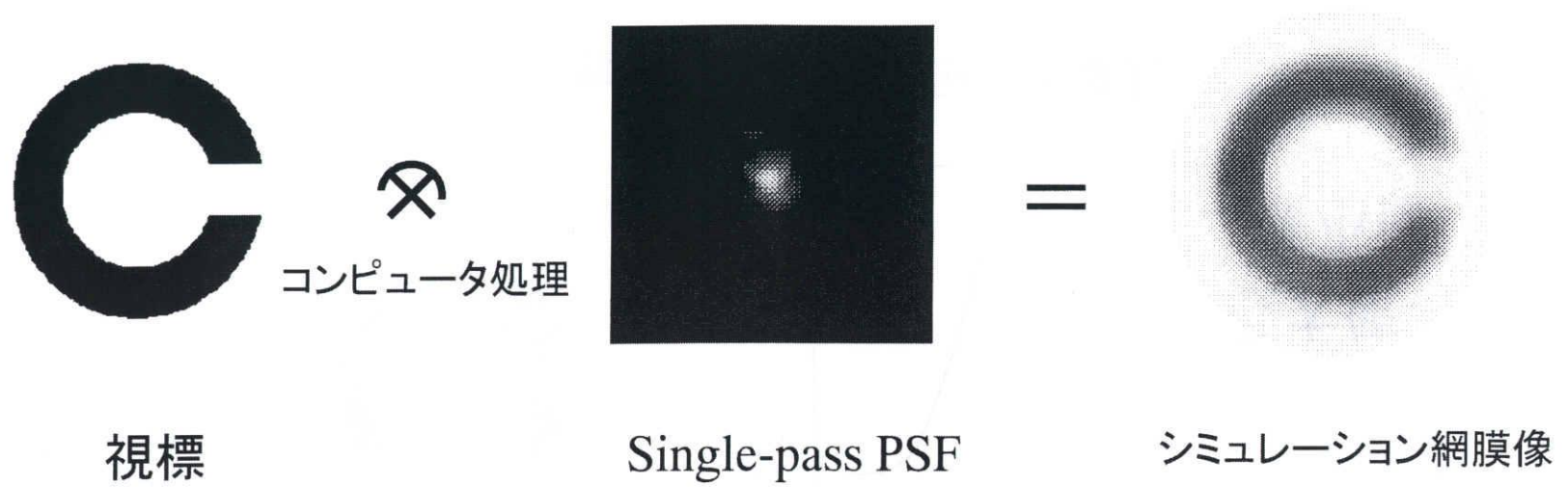


Fig. 64 コンピューターによる網膜像のシミュレーション
小林, 他, IOL&RS, Vol. 15, No. 3:P207, 2001

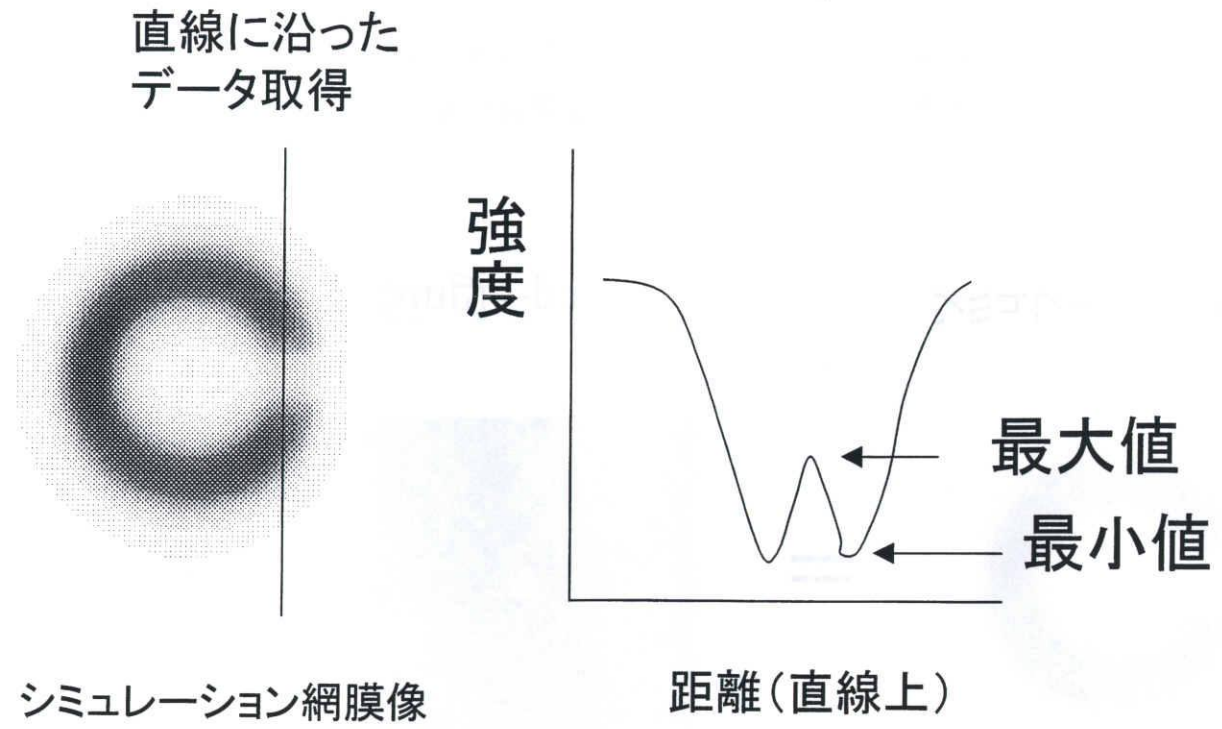


Fig. 65 コントラストの計算

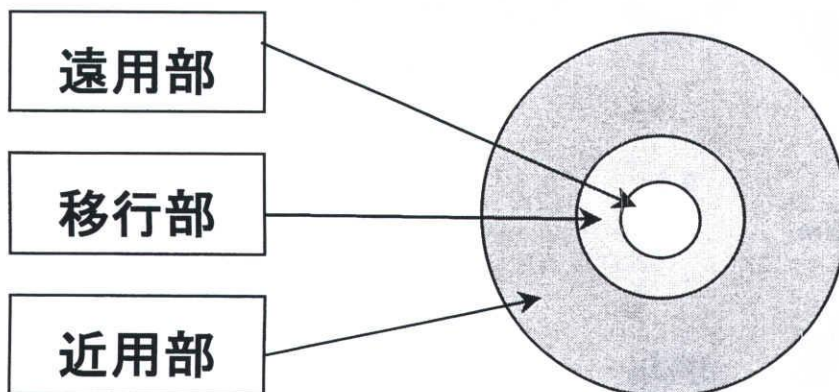


Fig. 66 バイフォーカルハードCLのレンズデザイン

ベースカーブ:7.95mm、屈折力:-3.75、直径:9.8mm、中心厚み:0.15mm、
付加度数:2D、遠用部直径2.0mm、移行部直径4.5mm、近用部直径8.5mm

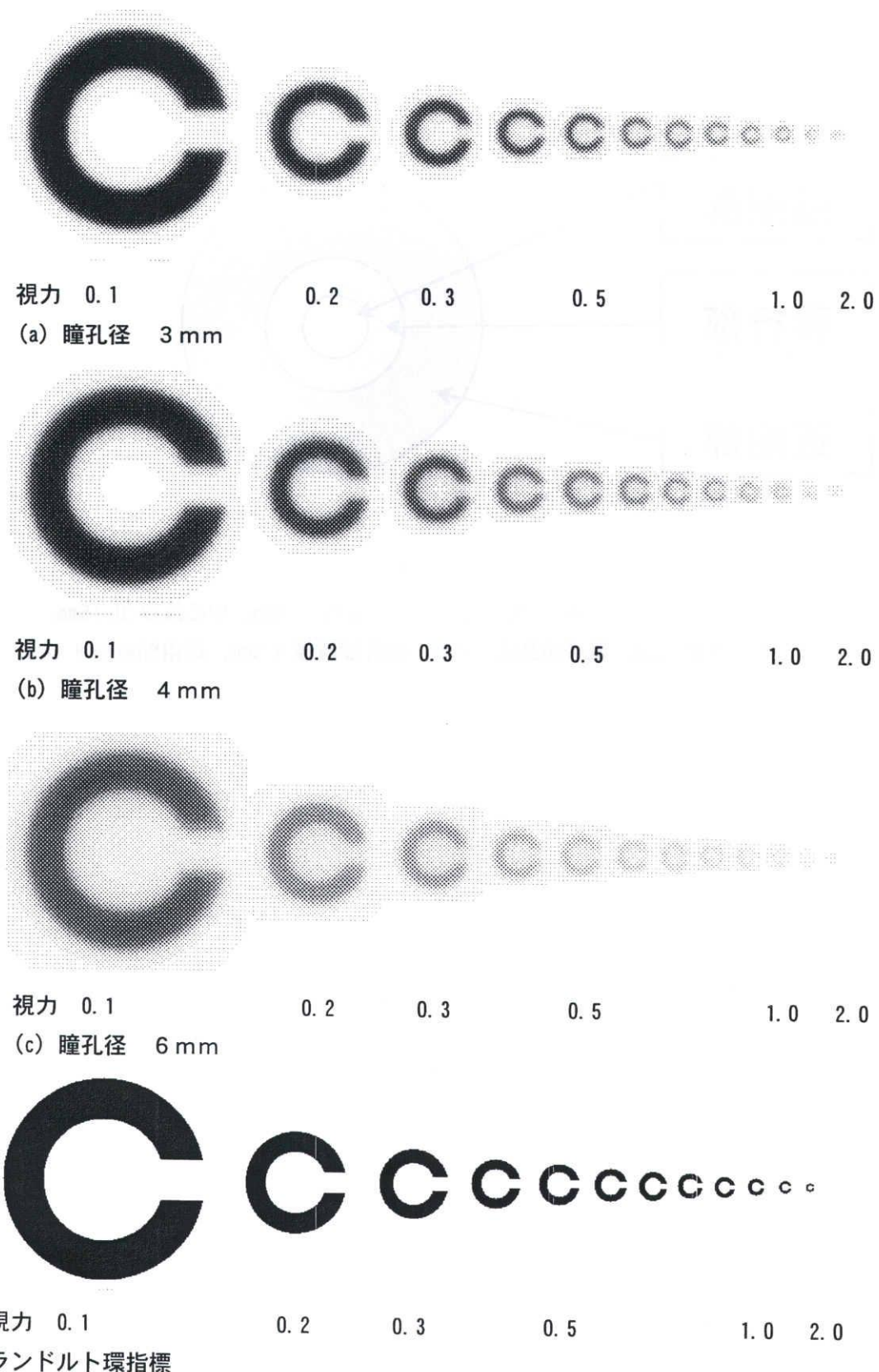


Fig. 67 モノフォーカルハードCL装着眼でのランドルト環視標の網膜像シミュレーション

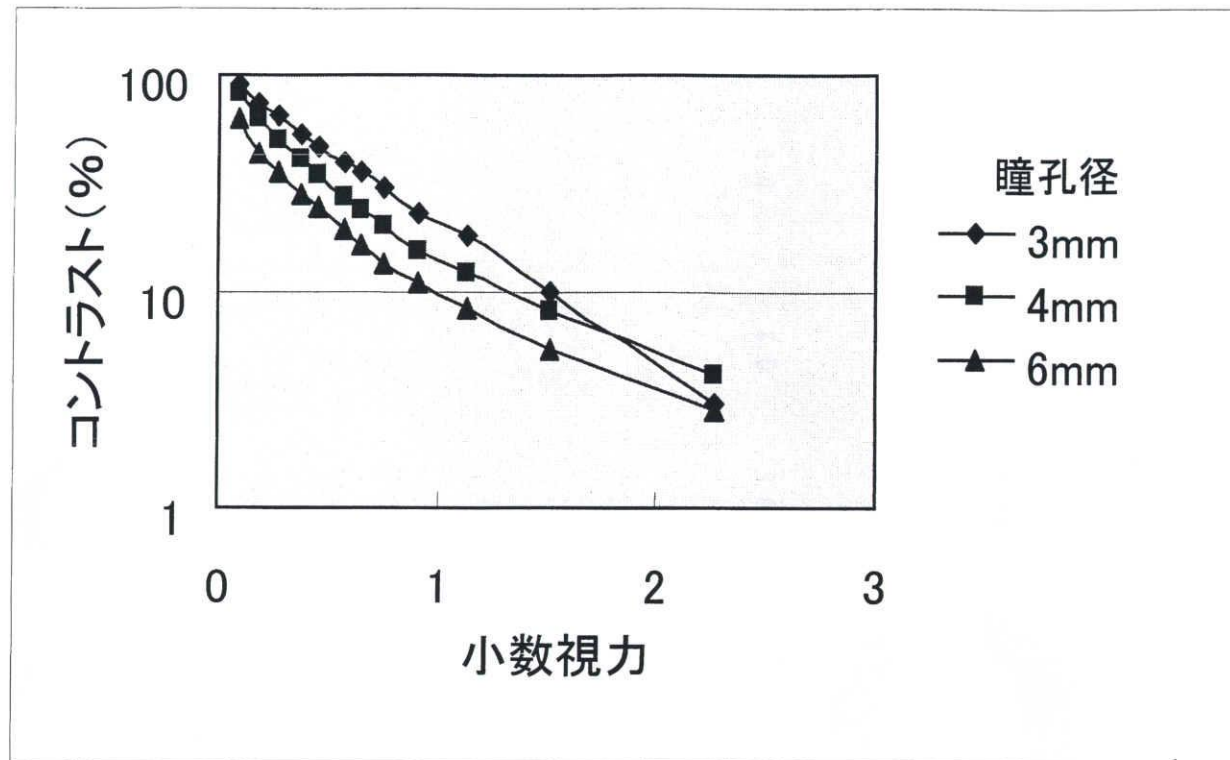


Fig. 68 モノフォーカルハードCL装着眼のコントラスト変化

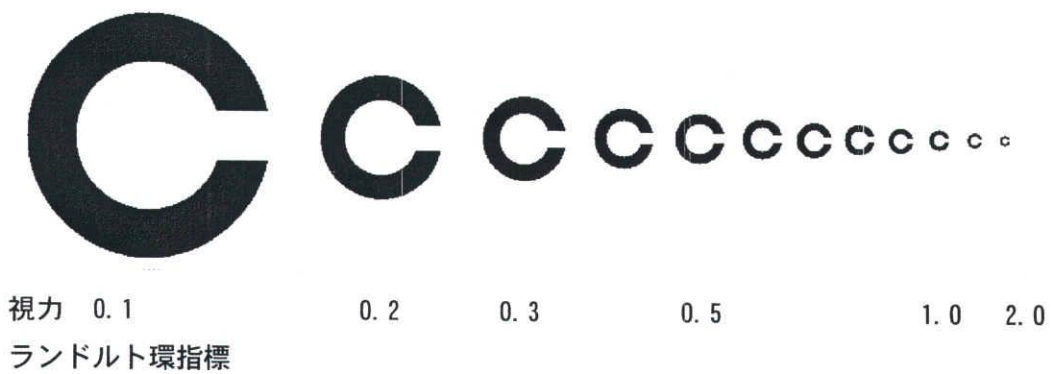
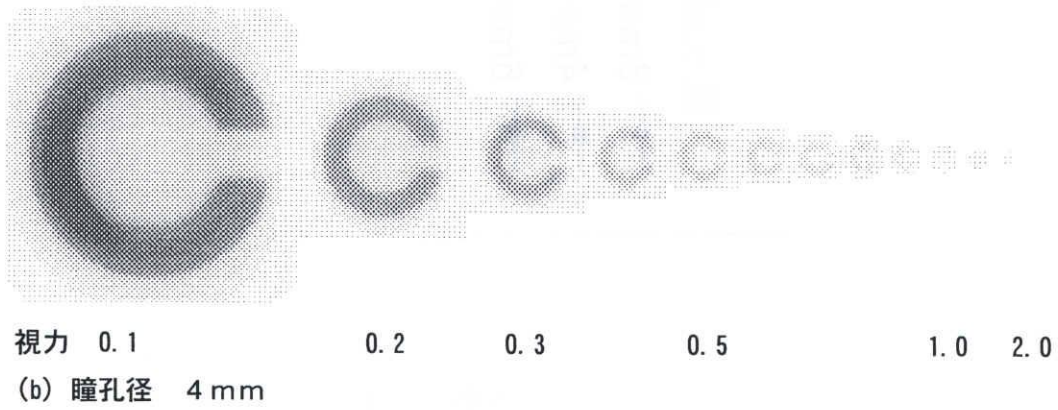
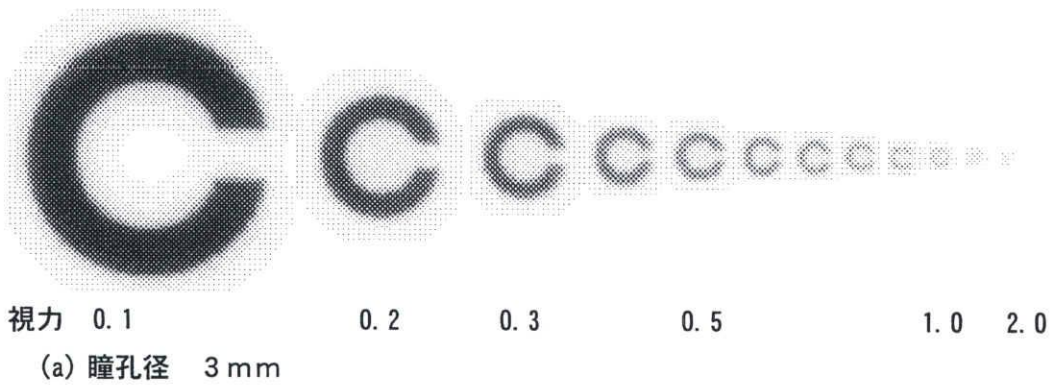


Fig. 69 バイフォーカルハードCL装着眼でのランドルト環視標の網膜像シミュレーション

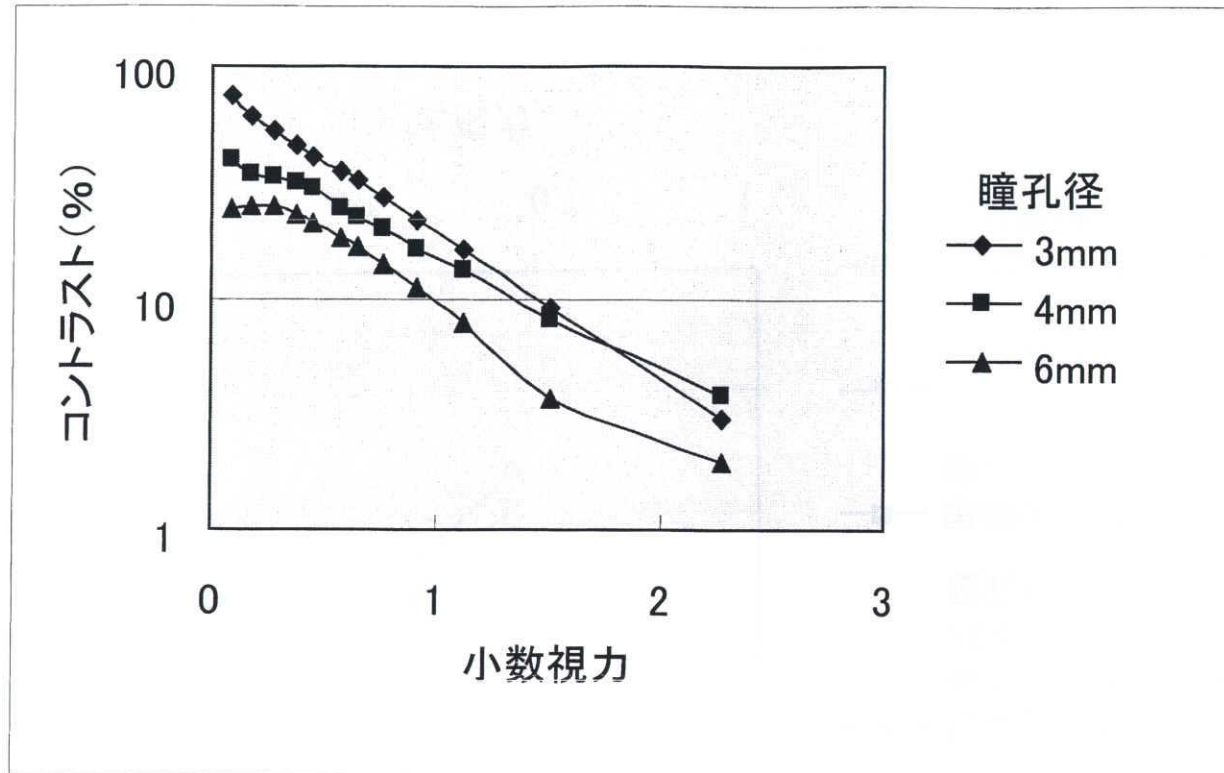


Fig. 70 バイフォーカルハードCL装着眼のコントラスト変化

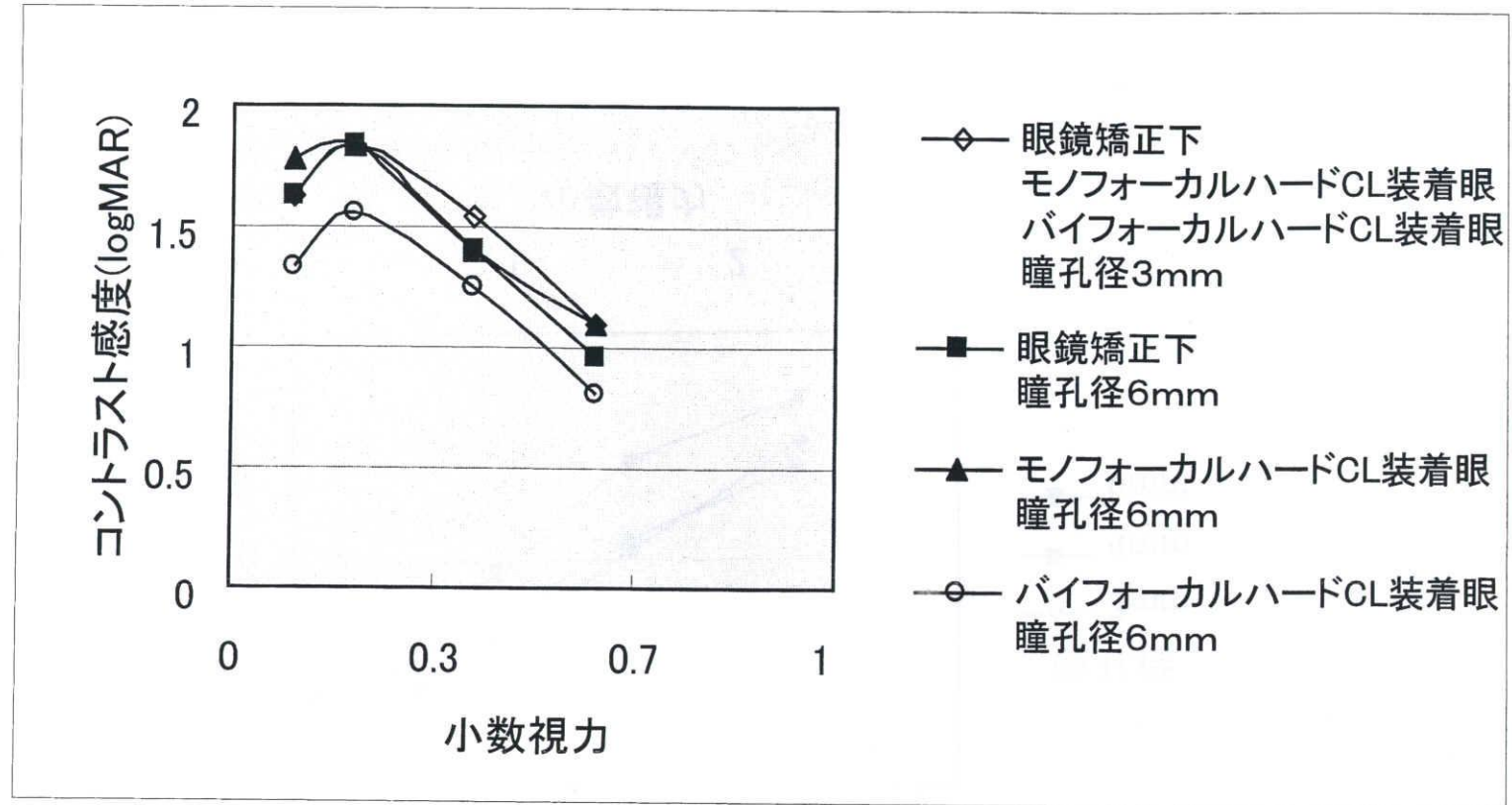


Fig. 71 眼鏡矯正下、モノフォーカルハードCL装着眼、
バイフォーカルハードCL装着眼のコントラスト感度

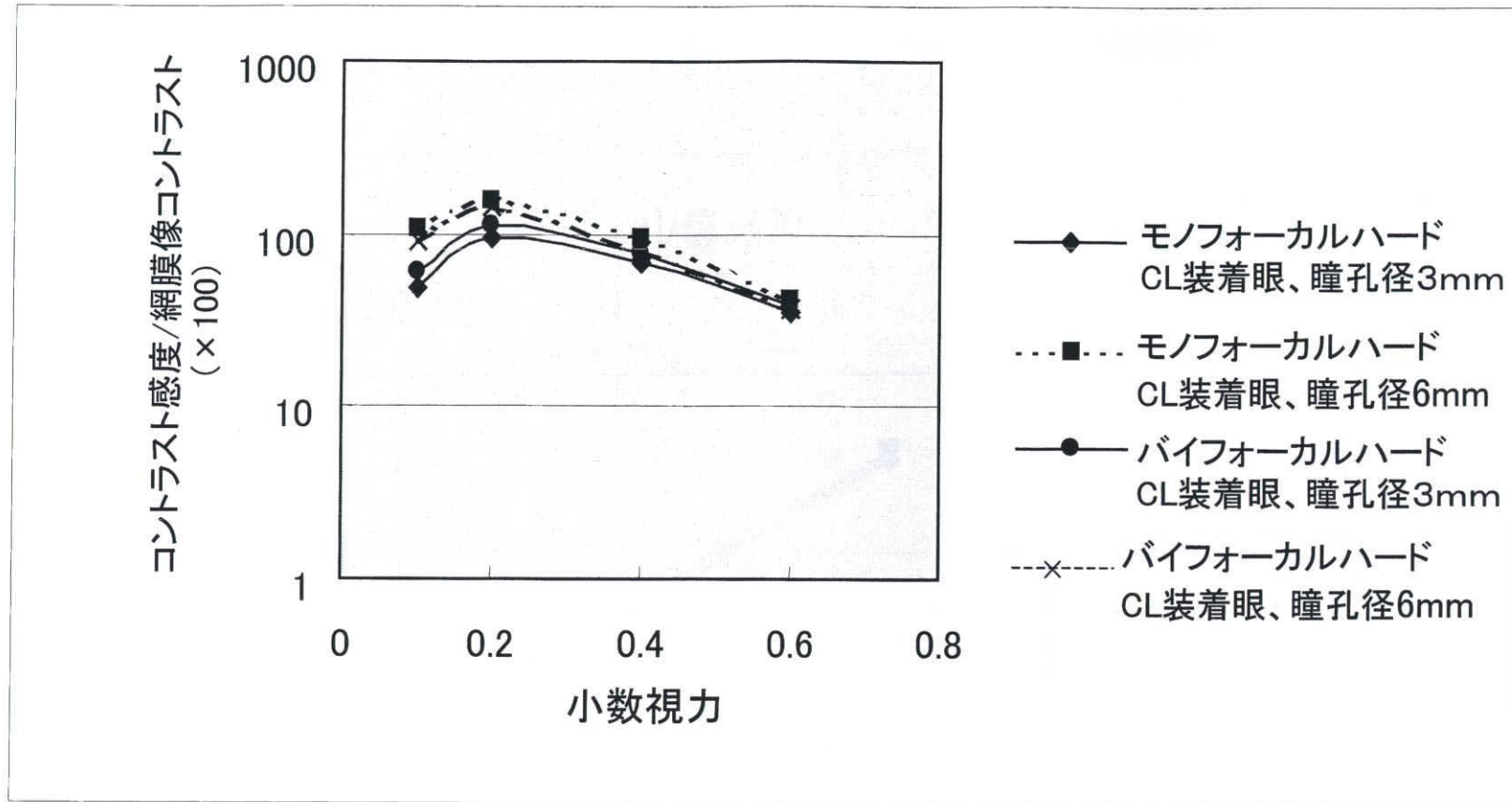


Fig. 72 自覚的コントラスト感度測定値とPSFアナライザーによる網膜像コントラストの比

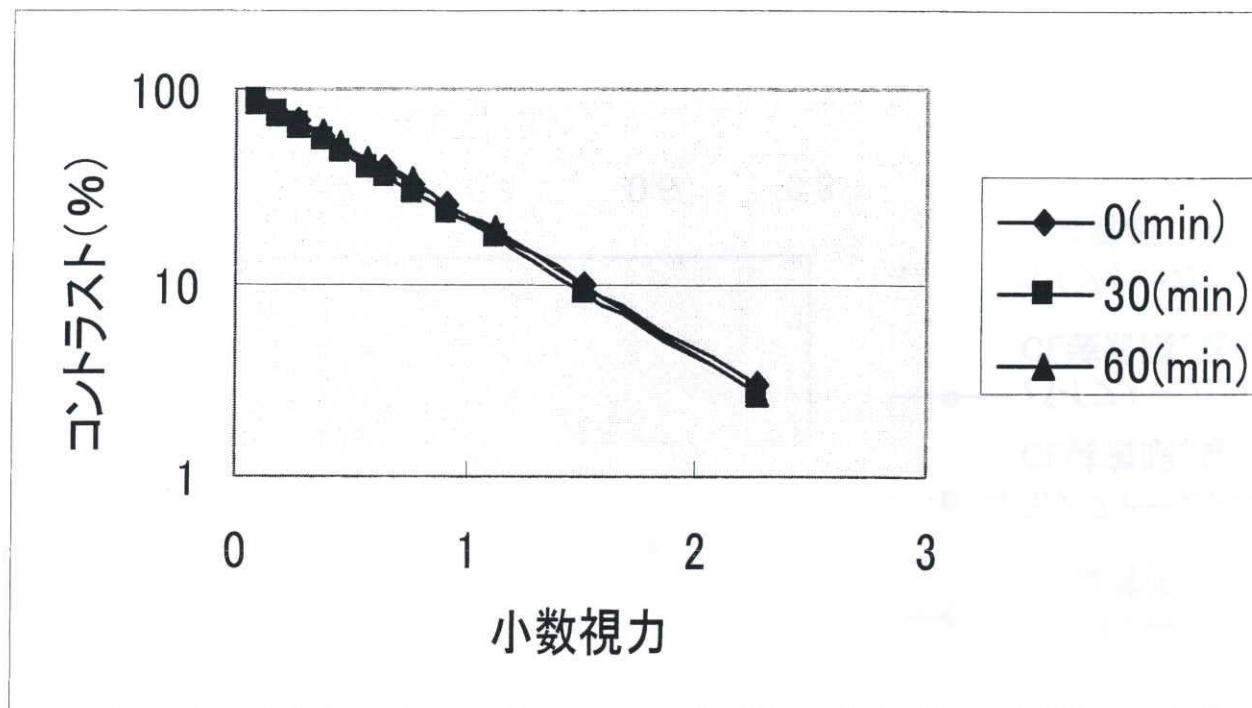


Fig. 73 PSFアナライザーにより測定したモノフォーカルハードCL装着眼のコントラスト特性の経時変化

第3部 総括

リゾチームの系

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。
2. 吸着速度論的解析からポリマー (PTSSS) 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、少なくとも一次、二次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が示唆された。
3. 吸着リゾチームの構造は、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が増大することが知られ、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示唆された。

血清アルブミンの系

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た。
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明らかとなった。
3. ポリマー (PTTSSS) 表面上に吸着した血清アルブミンの二次構造は、時間に伴う変化はおこらず、吸着量(吸着密度)に伴って変化することが確認された。このことは血清アルブミンのポリマー (PTTSSS) 表面上における一層吸着を示唆するものである。

人眼装着時の系

1. モノフォーカルハードコンタクトレンズ装着眼において、PSF 測定より求めたシミュレーション網膜像のコントラストの経時変化測定を行ったところ、導出された網膜像のコントラストは経時的にほとんど変化がみられず、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。

第4部 参考文献

- (1) R. E. Baier and R. C. Dutton; *J. Biomed. Mat. Res.* , 3, 191 (1969).
- (2) 白浜博幸; *表面.* , 27, 29 (1989).
- (3) 近藤精一; *吸着の科学*, 丸善 (2001).
- (4) Green, R. J. and I. Hopkinson; *Langmuir.* , 15, 5102-5110 (1999).
- (5) J. S. Joen, R. P. Sperline, and S. Raghavan; *Appl. Spectrosc.* , 46, 1644-1648 (1992).
- (6) M. Muller and F. J. Schmitt; *Macromol. Symp.* , 119, 269-276 (1997).
- (7) Ace M. Baty and Petera. Suci; *J. Colloid Interface Sci.* , 177, 307-315 (1996).
- (8) Arto Pihlajamaki, Pasi Vaisanen and Marianne Nystrom; *Colloids Surface, A*, 138, 323-333 (1998).
- (9) 田隅三生; *FT-IR の基礎と実際*, 東京化学同人 (1986).
- (10) 錦田晃一; *チャートで見る FT-IR*, 講談社 (1995).
- (11) Dong. A and Prestrelski. S. J; *J. Pharm. Sci.* , 84, 415 (1995).
- (12) Harrick, N. J. ; *J. Opt. Soc. Am.* , 55, 851-857 (1965).
- (13) Ryo Ishiguro, Tomoharu Matumoto and Sho Takahashi; *Colloids and Surfaces.* , 11, 153-165 (1998).
- (14) Ryo. Ishiguro, Tomoharu. Matumoto and Sho, Takahashi ; *Biochemistry.* , 35, 4976-4983 (1996).
- (15) Frey, S. , Tamm, L. K. , *Biophys. J.* , 60, 922-930 (1991).
- (16) 北原文雄・青木幸一郎 共訳; 第3版 *コロイドと界面の化学*, 廣川書店 (1983).
- (17) 井上祥平・中林宣男・松本博志・三浦維四・渡辺佳弘; *医用材料の化学*, 日本化学学会編 (1978).
- (18) 前田浩孝; *赤外分光法を用いた医療用高分子とタンパク質との相互作用に関する研究* (岐阜大学修士論文 1999).
- (19) 鈴木壮二郎; *赤外分光法を用いた医療用高分子とタンパク質との相互作用に関する研究* (岐阜大学修士論文 2000).

- (20) Grinnel, F. , Intern. Rev. Cytol. 53, 65-114 (1978).
- (21) Taylor, A. C. , Exp. Cell Res. Suppl. 8, 154-173 (1961).
- (22) Ratner, B. D. , Horbett, T. , Hoffman, A. S. and Hausckka, S. D. and J. Biomed. Mater. Res. 9, 407-422 (1975).
- (23) Lee, R. G. and Kim, S. W. , J. Biomed. Mater. Res. 8, 393-398 (1974).
- (24) Kim, S. W. , Lee, R. G. , Oster, H. , Coleman, D. , Andrade, J. D. , Lentz, D. J. and Olsen, D. , Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs 20, 449-455 (1974).
- (25) Lyman, D. J. , Metcalf, L. C. , Albo, D. Jr. , Richards, K. F. and Lamb, J. , Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs 20, 474-478 (1974).
- (26) Lyman, D. J. , Knutson, K. , McNeill, B. , Shibatani, K. and Trans. Amer. Soc. Artif. Intern. Organs 21, 49-54 (1975).
- (27) Kondo, A. , Oku, S. and Higashitani, K. , J. Colloids Interface Sci. 143, 214-221 (1991).
- (28) Norde, W. and Favier, J. P. , Colloids Surfaces 64, 87-93 (1992).
- (29) Haynes, C. A. and Norde, W. , Colloids Surfaces B2, 517-566 (1994).
- (30) Haynes, C. A. and Norde, W. , J. Colloids Interface Sci. 169, 313-328 (1995).
- (31) Giacomelli and C. E. , Norde, W. , J. Colloids Interface Sci. 233, 234-240 (2001).
- (32) Vermeer, A. W. P. , Giacomelli, C. E. and Norde, W. , Biochim. Biophys. Acta 1526, 61-69 (2001).
- (33) Janshoff, A. , Galla, H. J. and Steinem, C. , Angew. Chem. Int. Ed. 39, 4004-4032 (2000).
- (34) Laschitsch, A. , Menges, B. and Johannsmann, D. , Appl. Phys. Lett. 77, 2252-2254 (2000).
- (35) Dyr, J. E. , Rysava, J. , Suttnar, J. , Homola, J. and Tobiska, P. , Sensors Actuators B 74, 69-73 (2001).
- (36) Barret, D. A. , Hartshorne, M. S. , Shaw, P. N. and Davies, M. C. , Anal. Chem. 73, 5232-5239 (2001).

- (37) Tiefenthaler, K. and Lukosz, W., *J. Opt. Soc. Am. B* 6, 209–220 (1989).
- (38) Ramsden, J. J., *J. Stat. Phys.* 73, 853–877 (1993).
- (39) Ball, V. and Ramsden, J. J., *Colloids Surfaces B* 17, 81–94 (2000).
- (40) Lavallo, Ph., DeVries, A. L., Cheng, C.-C., Scheuring, S. and Ramsden, J. J., *Langmuir* 16, 5785–5789 (2000).
- (41) Martensson, J. and Arwin, H., *Langmuir* 11, 963–968 (1995).
- (42) Arwin, H., *Thin Solid Films* 377–378, 48–56 (2000).
- (43) Ball, A. and Jones, R. A. L., *Langmuir* 11, 3542–3548 (1995).
- (44) Baty, A. M., Suci, P. A., Tyler, B. J. and Geesey, G. G., *J. Colloid Interface Sci.* 177, 307–315 (1996).
- (45) Muller, M., Werner, C., Grundke, K., Eichhorn, K. J. and Jacobasch, H. J., *Mikrochim. Acta Suppl.* 14, 671–674 (1997).
- (46) Bauer, H. H., Muller, M., Goette, J., Merkle, H. P. and Fringeli, U. P., *Biochemistry* 33, 12276–12282 (1994).
- (47) Muller, M., Rieser, T., Dublin, P. L. and Lunkwiz, K., *Macromol. Rapid Commun.* 22, 390–395 (2001).
- (48) Chittur, K. K., *Biomaterials* 19, 357–369 (1998).
- (49) Zeng, H., Chittur, K. K. and Lacefield, W. R., *Biomaterials* 20, 377–384 (1999).
- (50) Giacomelli, C. E., Bremer, M. G. E. G. and Norde, W., *J. Colloid Interface Sci.* 220, 13–23 (1999).
- (51) Czarnik-Matusiewicz, B., Murayama, Wu, Y., Ozaki, Y. and *J. Phys. Chem. B* 104, 7803–7811 (2000).
- (52) Rossier, J. S., Gokulrangen, G., Girault, H. H. and Svojanovski, S., Wilson, G. S., *Langmuir* 16, 8489–8494 (2000).
- (53) Belfer, S., Fainchtain, R., Purinson, Y. and Kedem, O., *J. Membrane Sci.* 172, 113–124 (2000).
- (54) Harrick, N. J. and du Pre, F. K., *Appl. Opt.* 5, 1739–1734 (1996).
- (55) Harrick, N. J., *Internal Reflection Spectroscopy*, Wiley Interscience, New York (1967).

- (56) Jin Ho Lee, Hai Bang Lee, Joseph D. Prog. Polym. Sci, 20, 1043(1995).
- (57) Smith, A. L. , Handbook of Spectroscopy 2, CRC Press, Cleveland(1974).
- (58) Susi, H. , Timasheff, S. N. and Stevens, L. , Biol. Chem. 242, 5460-5466 (1967).
- (59) Timasheff, S. N. , Susi, H. , Timasheff, S. N. and Stevens, L. , J. Biol. Chem. 242, 5467-5473(1967).
- (60) Cabiaux, V. , Brasseur, R. , Wattiez, R. , Falmagne, P. , Ruyschaert, J. M. and Goormaghtigh, E. , J. Biol. Chem. 264, 4928-4938(1989).
- (61) Ramsden, J. J. , Surfactant Sci. 75, 321-361(1998).
- (62) Iordanskii, A. L. , Dmitriev, E. V. , Kamaev, P. P. and Zaikov, G. E. , Intern. J. Polymeric Mater. 46, 629-639(2000).
- (63) Schmidt, C. F. , Zimmermann, R. M. and Gaub, H. E. , Biophys. J. 57, 577-588 (1990).
- (64) Soderquist, M. E. and Walton, A. G. , J. Colloid Interface Sci. 75, 386-397(1980).
- (65) 青木幸一郎・高木俊夫・寺田弘 編；血清アルブミン 生体におけるその役割、講談社サイエンティフィック(1984).
- (66) Yuhsuke Kawakami, Hiroo Karasawa, Toshiki Aoki, Yoshihiro Yamaura, Hirofumi Hisada, and Yuka Yamashita; Polymer Journal, 17, 1159-1172 (1985).
- (67) YUSUKE KAWAKAMI, HIROKI KAMIYA, HIROSHI TODA, and YUKA YAMASHITA; Journal of Polymer Science:Part A:Polymer Chemistry, 25, 3191-3204 (1987).
- (68) 浜口浩三 著；蛋白質機能の分子論、学会出版センター(1976).
- (69) 日本表面科学会編；表面分析図鑑、共立出版株式会社(1994).
- (70) 渡辺剛士；多様化するコンタクトレンズの成形加工、プラスチック成形加工学会誌、第14巻 第6号 (2002).
- (71) Day, E. D. "Advanced Immunochemistry", The Williams & Wilkins Co., Baltimore. (1972).

- (72) Tanford, C. "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes", John Wiley & Sons, New York. (1973).
- (73) 大井龍夫, 佐藤了編 "生命の物理的・化学的基礎", 現代生物科学 1, 岩波書店(1975).
- (74) 山村雄一編 "免疫 I", 現代生物科学 13, 岩波書店(1972).
- (75) Kauzmann, W. Some factors in interpretation of protein denaturation. *Adv. Protein Chem.* 14:1-63(1959).
- (76) J. R. Brown, *Fed. Proc.*, 34, 591(1975).
- (77) T. Peters, Jr., *The Plasma Proteins*, vol. 1 (ed. F. W. Putnam), p. 133, Academic Press(1975).
- (78) V. M. Rosenoer, M. Orsatz and M. A. Rothschild (ed.), *Albumin: Structure, Function, and Uses*, Pergamon Press(1975).
- (79) R. N. M. Weijers, *Clin. Chem.*, 23, 1361(1975).
- (80) R. G. Reed, F. W. Putnam and T. Peters, Jr., *Biochem. J.*, 191, 867(1980).
- (81) R. F. Chen, *J. Biol. Chem.*, 242, 173(1967).
- (82) M. Sogami and J. F. Forester, *Biochemistry*, 7, 2172(1968).
- (83) W. Scheider and J. K. Fuller, *Biochim. Biophys. Acta*, 221, 376(1970).
- (84) R. W. Hartley, Jr., E. A. Peterson and H. A. Sober, *Biochemistry*, 1, 60(1962).
- (85) L. O. Andersson, *Biochim. Biophys. Acta*, 117, 115(1966).
- (86) J. Janatova, J. K. Fuller and M. J. Hunter, *J. Biol. Chem.*, 243, 3612(1968).
- (87) J. Janatova, O. Mikes and J. Sponar, *Collect. Czech. Chem. Commun.*, 33, 788(1968).
- (88) E. M. Spencer and T. P. King, *J. Biol. Chem.*, 246, 201(1971).
- (89) V. Luzzati, J. Witz and A. Nicolaieff, *J. Mol. Biol.*, 3, 379(1961).
- (90) P. Moster, P. G. Squire and C. T. O'Konski, *J. Phys. Chem.*, 70, 744(1966).
- (91) A. K. Wright and M. R. Thompson, *Biophys. J.*, 15, 137(1975).
- (92) P. G. Squire, P. Moser and C. T. O'Konski, *Biochemistry*, 7, 4621(1968).
- (93) M. Sogami, K. Itoh and Y. Nemoto, *Biochim. Biophys. Acta*, 393, 446(1975).

- (94) J. F. Foster, M. Sogami, H. A. Petersen and W. J. Leonard, Jr., *J. Biol. Chem.*, 240, 2495 (1965).
- (95) E. M. Slayter, *J. Mol. Biol.*, 14, 443 (1965).
- (96) 青木幸一郎ほか、最新電気泳動法, p. 187, 廣川書店(1987).
- (97) K. Wallevik, *Biochem. Biophys. Acta*, 322, 75 (1973).
- (98) M. A. Evenson and H. F. Deutsch, *Clin. Chim. Acta*, 89, 341 (1978).
- (99) B. Jirgensons, *Biochim. Biophys. Acta*, 200, 9 (1970).
- (100) Y. H. Chen, J. T. Yang and K. H. Chau, *Biochemistry*, 13, 3350 (1974).
- (101) R. G. Reed, R. C. Feldhoff, O. L. Clute and K. H. Chau, *Biochemistry*, 14, 4578 (1975).
- (102) I. Sjoholm and I. Ljungstedt, *J. Biol. Chem.*, 248, 8434 (1973).
- (103) M. J. Geisow and G. H. Beaven, *Biochem. J.*, 163, 477 (1977).
- (104) R. Wetzel, M. Becker, J. Behlke, H. Billwitz, S. Bohm, B. Ebert, H. Haman, J. Krumbiegel and G. Lassmann, *Eur. J. Biochem.*, 104, 469 (1980).
- (105) B. Jirgensons, *Optical Activity of Proteins and Other Macromolecules*, 2nd ed., Springer-Verlag (1973).
- (106) M. C. Chen and R. C. Lord, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 990 (1976).
- (107) J. L. Lippert, D. Tyminski and P. J. Desmeules, *J. Am. Chem. Soc.*, 98, 7075 (1976).
- (108) Young G, Grey C P and Papas E B. , Simultaneous vision bifocal contact lenses: a comparative assessment of the in vitro optical performance., *Optom, Vis, Sci.*, 67(5):339-45. (1990).
- (109) Chateau N and Baude D. , Simulated in situ optical performance of bifocal contact lenses., *Optom, Vis, Sci.*, 74(7): 532-9. (1997).
- (110) Woods R L, Saunders J E and Port M J. , Optical performance of decentered bifocal contact lenses., *Optom, Vis, Sci.*, 70(3): 171-184. (1993).
- (111) 畑田豊彦、バイフォーカルコンタクトレンズの光学特性、あたらしい眼科、18(4):423~427, (2001).

- (112) Torrents A, Gispets J and Pujol J., Double-pass measurements of retinal image quality in monofocal contact lens wearers., *Ophthalmic Physiol Opt.*, 17(4):357-66. (1997).
- (113) Lorente A, Pons A M, Malo J and Artigas J M. , Standard criterion for fluctuations of modulation transfer function in the human eye: application to disposable contact lenses., *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 17(3): 267-72. (1997).
- (114) Pons A M, Lorente A, Albarran C, Montes R and Artigas J M., Characterization of the visual performance with soft daily wear disposable contact lenses., *Ophthalmic Physiol. Opt.*, 18(1): 40-8. (1998).
- (115) Williams. D R, Brainard D H, McMahan M, and Navarro R, Double-pass and interferometric measures of the optical quality of the eye. , *J, Opt, Soc, Am*, 11: 3123-3135 (1994).
- (116) 小林克彦、渋谷雅博、竹内 稔、大沼一彦、三宅洋一：鏡面反射成分を用いた Point Spread Function による人眼眼球光学系シングルパス MTF の測定、*視覚の科学*, 第 22 巻, 2 号, 44-53, (2001).
- (117) 小林克彦、根岸一乃、PSF アナライザーによる術後網膜像の評価、*IOL&RS*, 第 15 巻, 3 号, 205-210, (2001).
- (118) 小林克彦、渋谷雅博、竹内 稔、大沼一彦、ほか、Point Spread Function を利用した人眼網膜像のシミュレーションと視力の予測、*視覚の科学*, 第 22 巻, 3 号, 85-92, (2001).
- (119) 鶴田匡夫、光学系の MTF と視覚の伝達特性、第 3・光の鉛筆、197-208, (株)新技術コミュニケーションズ, (1993).
- (120) Campbell F W & Green G D, Optical and retinal factors affecting visual resolution, *J Physiol* 181, 576-593, (1965).
- (121) T. Kasemura, S. Takahashi, T. Okada, T. Maegawa, T. Oshibe, T. Namura, *J. Adhesion*, 59, 61 (1996).
- (122) T. Kasemura, S. Takahashi, N. Nakane, T. Maegawa, *Polymer*, 37, J. 3659 (1996).

- (123) S. Takahashi, T. Kasemura, K. Asano, *Polymer*, 2107 (1997).
- (124) 医療機能材料 高分子学会編 (1990).
- (125) 寺田弘著、タンパク質と核酸の分離精製－基礎と実験－(2001).
- (126) Peters, T., Jr. *Adv. Protein Chem.* 37, 161-236 (1985).
- (127) Phillips, D. C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.* 57, 484-495(1967).
- (128) Carter, D. C., He, X. M., Munson, S. H., twigg, P. D., Gernert, K. M., Broom, M. B., and Miller, T. Y. Three-dimensional structure of human serum albumin . *Science* 244, 1195-1198(1989).
- (129) Carter, D. C., and Ho, J. X. Structure of serum albumin. *Adv. Protein Chem.* 45, 153-204(1994).

第 5 部. 謝辞

本研究を進めるに当たり、終始数々の温かい御指導を直接賜りました工学部 生命工学科 生体物質工学講座 平松 宏一教授、亀山 啓一助教授、石黒 亮助手に対し深く感謝の意を表します。また、論文を書き進めるにあたり、適切なお指導を頂きました杉 義弘教授、新村 知之教授に感謝致します。そして、日頃の実験を共にし、数々の面でお世話になりました前田 浩孝さん、鈴木 壮二郎さんをはじめ院生、卒研究生のみなさんにも併せて感謝致します。