

材料表面－生体分子相互作用の直接解析に基づく 生体適合性の発現機構の解明

九州大学大学院工学研究科

高 原 淳

The n-octadecyltrichlorosilane (OTS, $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_{17}\text{SiCl}_3$), the [2-(perfluorooctyl)ethyl]trichlorosilane (FOETS, $\text{CF}_3(\text{CF}_2)_7\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SiCl}_3$) and their mixed monolayers were used as the model surfaces for the study of protein adsorption mechanism. The ATR-FT IR flow cell study on protein adsorption behavior revealed that the adsorption amount of bovine serum albumin (BSA) onto each OTS and FOETS monolayer increased remarkably in an initial stage of adsorption experiment and attained an equilibrium within a few minutes at $\text{pH}=7.5$. In the case of the (OTS/FOETS) mixed monolayer, the amount of protein adsorption was apparently suppressed in comparison with the case for the OTS and the FOETS monolayers. The atomic force microscopic (AFM) observation of BSA adsorption behavior onto monolayer surface in a BSA solution at $\text{pH}=7.5$ showed that BSA was preferentially adsorbed onto the FOETS phase of the (OTS/FOETS) mixed monolayer. In contrast, the selective adsorption of BSA onto the FOETS phase was not observed at the isoelectric point of BSA ($\text{pH}=4.7$). The interaction between BSA and the surface of (OTS/FOETS) mixed monolayer was evaluated on the basis of the adhesion force measurement by AFM. When the gold-coated tip was used as a control experiment, the adhesion force between tip and surface was less than 1 nN. In the case of the BSA immobilized tip, the adhesion force was ca. 5 nN and showed multiple minima in retract curve because of the multi-point contacts of BSA with the monolayer surface or the chain unfolding of BSA.

1 緒 言

人工材料が体液と接触した場合、材料表面にはまず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。このため、材料表面の化学構造すなわち親水性、疎水性、荷電、結晶性及びマイクロ相分離構造などがどのようにタンパク質吸着挙動に影響するかを解明することは抗血栓性材料をはじめとする生医学材料を設計するための基礎的な知見となる。高分子表面への生体成分の吸着に関する研究が活発に行われているが、医用材料として最も実用化が進んでいるセグメント化ポリウレタンなどの多相系高分子では表面構造が環境に依存して再編成を示すため、表面構造の制御は極めて困難である¹⁾。高分子材料の生体適合性の発現機構を解明するためには、表面組成が明確で、表面構造の経時変化のない安定なモデル表

面が必要となる。

一般に、両親媒性化合物からなる単分子膜は、膜調製を水面上で行うため、分子レベルでの配向制御が可能である。しかしながら、環境の変化に伴い表面構造が不安定になるため、特に水中での応用には耐えることが出来ない。著者らは、水面上で有機シラン化合物を重合し、基板上に固定化するという新規な高分子化単分子膜調製法で水中でも安定な疎水性表面が形成できることを見いだした²⁻⁸⁾。有機シラン単分子膜は分子間で二次元的に重合し、さらに単分子膜と基板の間に共有結合及び多重の水素結合を形成するため、環境変化に対して安定で表面構造再編成を示さない単分子膜を形成する²⁾。したがって、ラングミュアー法により調製された有機シラン単分子膜は、タンパク質吸着挙動の研究における高分子モデル表面として非常に有用である。

本研究では、表面構造を制御した安定な固定化有機トリクロロシラン単分子膜をラングミュアー法により調製し、その表面へのタンパク質の吸着挙動を多重全反射赤外吸収分光 (ATR-FT-IR) フローセル測定及び原子間力顕微鏡 (AFM) 観察に基づき評価した。さらにタンパク質修飾カンチ



Elucidation of Mechanism of Biocompatibility on the basis of the Direct Analysis of Interaction between Materials Surface and Biological Components

Atsushi Takahara

Graduate School of Engineering,
Kyushu University, Higashi-ku,
Fukuoka 812-8581, Japan

レバーを用いて探針と有機トリクロロシラン単分子膜表面間に働く力を評価した。

2 実験

有機シラン化合物としてアルキル基を疎水基に有する *n*-octadecyltrichlorosilane (OTS)、及び表面自由エネルギーの低いフルオロアルキル基を疎水基に有する [2- (perfluorooctyl) ethyl] trichlorosilane (FOETS) を用いた。Fig. 1 はラングミュア－法による有機シラン単分子膜の調製過程の模式図である。水面上で重合した OTS、FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分子膜を垂直引き上げ法により水酸化処理を施したシリコンウェハー上に移し取り、固定化した²⁻⁸⁾。フローセルを組み込んだ赤外吸収装置を使用し、ATR-FT-IR 法^{9, 10)}により単分子膜の表面と牛血清アルブミン (BSA) の相互作用を検討した。表面に単分子膜を固定化したシリコンプリズムをフローセルに設置し、BSA リン酸緩衝溶液 ($10\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) を流動させ、赤外吸収差スペクトルの経時変化を追跡した⁴⁾。また、AFM 観察によりタンパク質吸着挙動を評価した。単分子膜を固定したシリコンウェハーを $20\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ の BSA 溶液に浸漬し、BSA 溶液浸漬後の試料を空气中で乾燥後、タッピングモードで AFM 観察を行った。BSA と (OTS/FOETS) 混合単分子膜との相互作用はリン酸緩衝液中での BSA 固定化探針と単分子膜表面間に働くフォースカーブ測定に基づき評価した。金蒸着した AFM のカンチレバーチップの表面に 3,3-ジチオビス (プロピオン酸スクシンイミジル) (DSP) を吸着させ、さらに BSA を DSP と反応させ固定化した¹¹⁾。

3 結果と考察

3.1 混合単分子膜の表面構造

電子線回折 (ED) 像観察により、OTS 及び FOETS 単分子膜は室温においてそれぞれ結晶性及び非晶性であることが明らかとなった²⁻⁸⁾。また、AFM 観察よりこれらの単分子膜は nm レベ

ルで平滑な表面構造を有することが明らかである。Fig. 2 は (OTS/FOETS)(a)(25/75)、(b)(50/50) 及び (c) (75/25) 混合単分子膜の AFM 像である。基板上に単分子膜が固定化されていることを X 線光電子分光測定及び多重全反射赤外分光測定により確認した²⁾。(OTS/FOETS) 混合単分子膜は海島状のドメイン構造を示した。AFM 像の高さプロファイルより評価した島状ドメインとマトリクスの高さの差は約 1.3nm であり、これは OTS と FOETS の分子長の差に対応している。また、島状ドメインの数及び寸法は OTS の分率とともに増加した。島状ドメインの占める面積比は π -A 曲線からの分子極限占有面積より計算される OTS 成分の面積比と一致した。これらの事実から円柱状ドメインは OTS 成分であり、マトリクスは FOETS 成分であると結論できる。また、Fig. 2 (c) の (OTS/FOETS) (75/25) 混合単分子膜の場合、OTS の分率が 75 モル%でも OTS 成分はマトリクスを形成せず、依然として円形のドメインを形成した。さらに、(OTS/FOETS) (75/25) 混合単分子膜の OTS 成分の結晶化が ED 像観察により確認された。結晶 (10) 面間隔は約 0.42nm であり、OTS 単独単分子膜のそれとよく一致した。また、アルキル基を有するシラン化合物同士の混合単分子膜である (OTS/*n*-dodecyltrichlorosilane (DDTS) (非晶性)) 混合単分子膜においても、相分離構造が確認された⁴⁾。これらの結果より、OTS 成分の結晶化が (OTS/FOETS) 混合単分子膜の相分離の駆動力であると結論できる。

3.2 ATR-FT-IR フローセル法による単分子膜表面への BSA 吸着挙動の評価

ラングミュア－法により調製した有機トリクロロシラン単分子膜は、分子配向が制御されており、環境変化に対して安定な表面構造を有するため、タンパク質の吸着実験に適している。有機トリクロロシラン単分子膜と BSA の相互作用を ATR-FT-IR フローセル法に基づき検討した。OTS 及び FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分

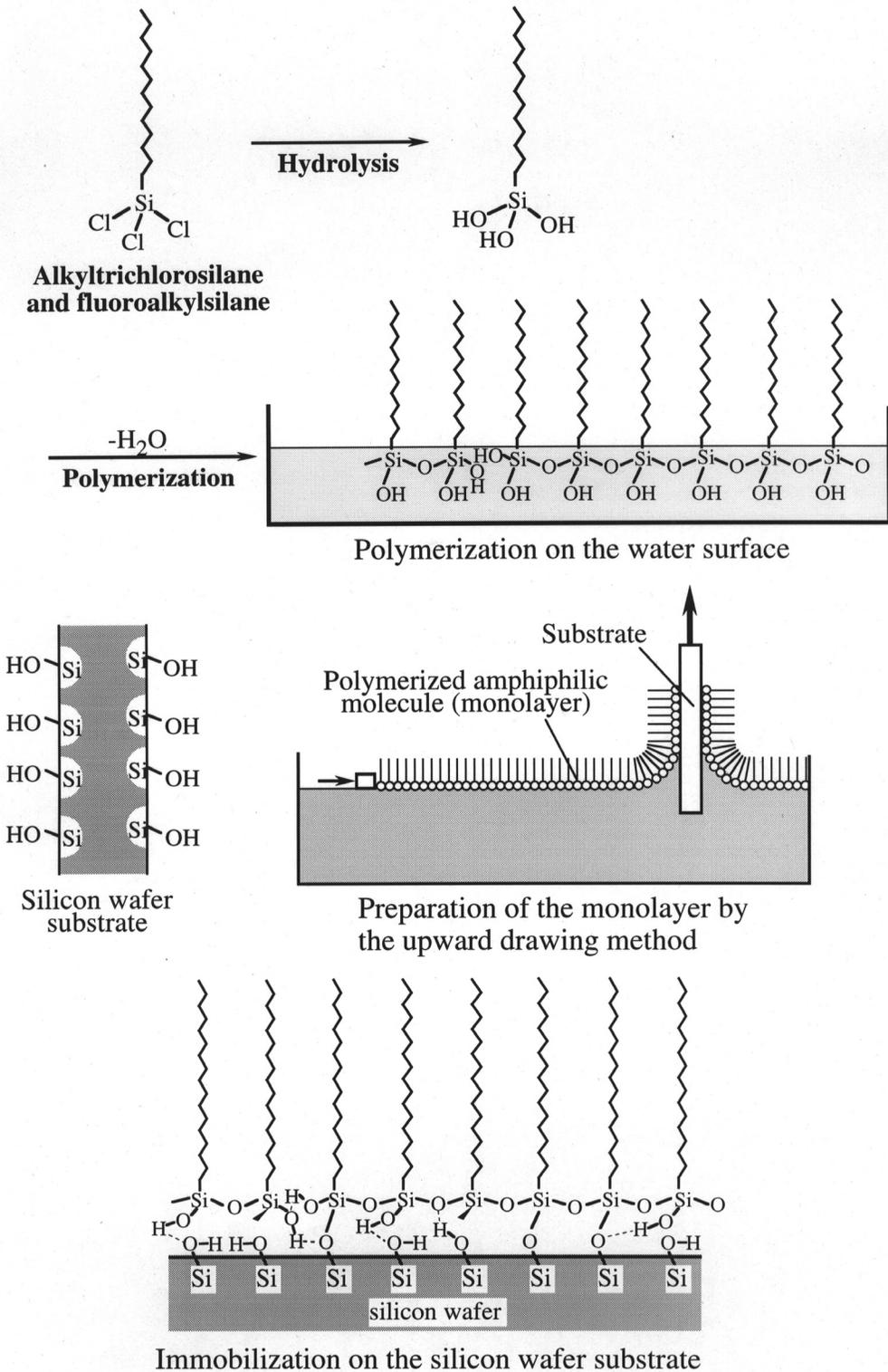


Fig. 1 Schematic representaion of preparation process of organotrichlorosilane monolayer.

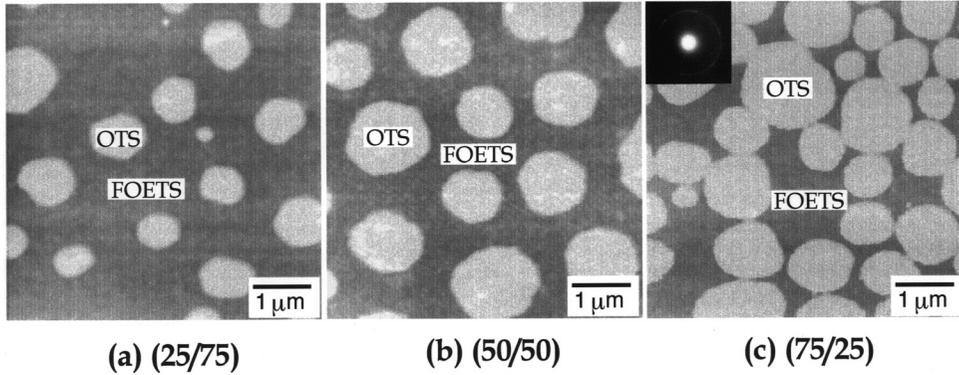


Fig. 2 AFM images of the (OTS/FOETS) (a) (25/75), (b) (50/50), (c) (75/25) mixed monolayers.

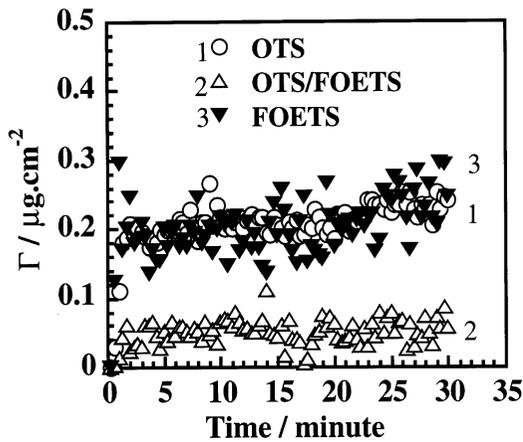


Fig. 3 Variation of amount of adsorbed BSA on the surfaces of the OTS, FOETS monolayers and (OTS/FOETS) mixed monolayer immobilized onto the Si IRE with time.

子膜をシリコン単結晶の内部反射エレメント上に垂直引き上げ法により固定化した。Fig. 3はATR-FT-IRフローセル法により評価した種々の有機トリクロロシラン単分子膜表面へのBSAの吸着量の経時変化である^{5, 6)}。流動させたBSAの溶液濃度は、 10mg mL^{-1} である。BSAの吸着量は、 1550cm^{-1} に観測されるamide IIの吸収強度から計算した。有機トリクロロシラン単分子膜表面へのBSA吸着量は吸着初期から高い値を示し、10分以内で吸着平衡に到達した。OTS及びFOETS単分子膜表面へのBSAの平衡吸着量は $0.18 \sim 0.20\ \mu\text{g cm}^{-2}$ であったのに対し、(OTS/FOETS)混合単分子膜では $0.05\ \mu\text{g cm}^{-2}$ 程度であり、相分離単分子膜表面へのBSAの吸着は抑制されるこ

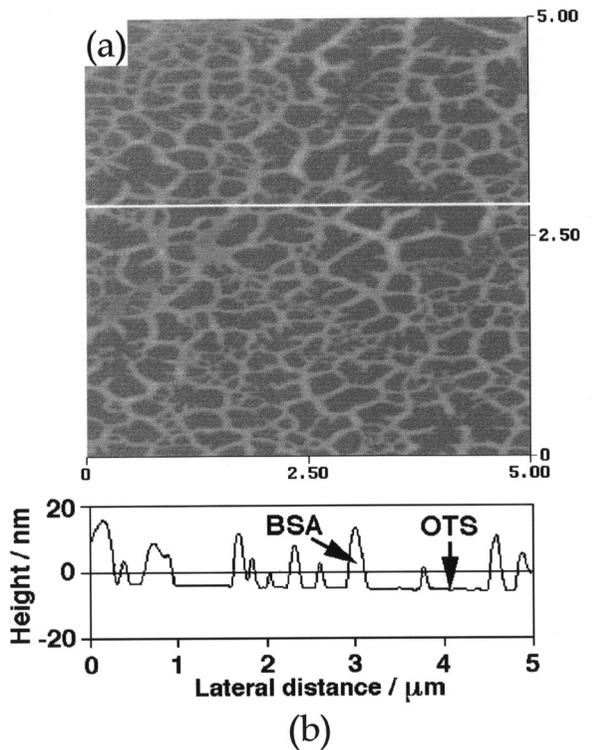


Fig. 4 (a) Tapping mode AFM image of the OTS monolayer surface after exposure to a BSA 0.1mg mL^{-1} solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

とが明らかとなった。これは、(OTS/FOETS)混合単分子膜表面が表面自由エネルギーの異なる相から構成される相分離構造を有していることと相関があると考えられる。この吸着機構に関しては、AFM観察の結果に基づき次節で詳細に議論する。

3.3 AFM 観察による有機トリクロロシラン単分子膜表面への BSA 吸着挙動の評価

OTS 及び FOETS 単分子膜及び (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面への BSA の吸着状態 (分布及び配向状態) の AFM 観察を行った。Fig. 4(a)は、 0.1 mg mL^{-1} BSA の PBS 溶液へ室温で 10 分間浸漬した後の OTS 単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。像中明るい部分は OTS 単分子膜表面に吸着した BSA に相当する。Fig. 4(a)より、BSA は OTS 単分子膜表面に二次元網目状に吸着することが明らかとなった。また、Fig. 4(b)より、BSA 吸着層の厚みは約 14 nm であった。X 線構造解析に基づき BSA は $4.1 \times 14.1\text{ nm}^2$ の回転楕円体であることが明らかにされている^{12, 13)}。本吸着実験では BSA を有機トリクロロシラン単分子膜表面へ吸着した後、PBS によりリンスを行っているため、弱い相互作用で吸着している BSA はリン

スにより除去されることが考えられる。以上の結果は、BSA は OTS 単分子膜表面へ end-on の状態で吸着していることを示唆している。

Fig. 5(a)は、 0.1 mg mL^{-1} BSA の PBS 溶液へ室温で 10 分間浸漬した後の FOETS 単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。AFM 像より BSA は FOETS 単分子膜表面に均一に吸着することが明らかである。吸着層の厚みを評価するため、コンタクトモードでカンチレバーに斥力をかけた状態で走査を行うことにより吸着した BSA を除去し穴を形成させた (Fig. 5(c))。像中暗い部分は FOETS 単分子膜表面に対応する。Fig. 5(d)はそのラインプロファイルである。BSA 吸着層の厚さは約 4 nm であったことから、BSA は FOETS 単分子膜表面に side-on の状態で吸着していることを示唆している。

OTS 及び FOETS 単分子膜の単独系での吸着

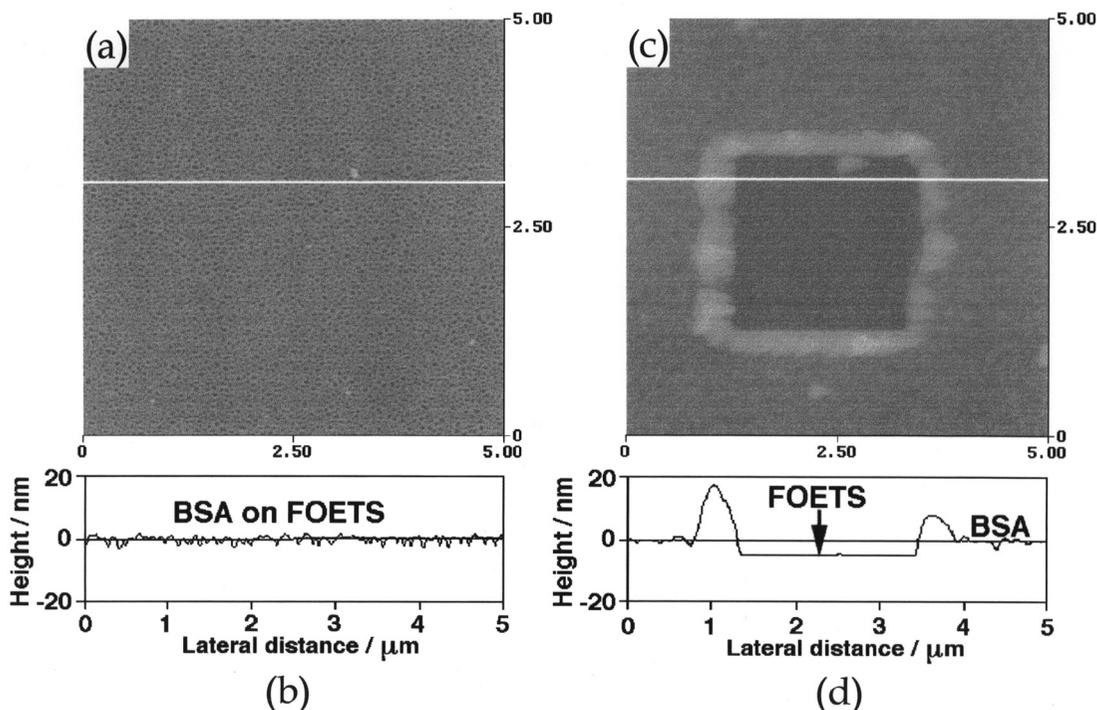


Fig. 5 Tapping mode AFM image of the FOETS monolayer surface after exposure to a BSA 0.1 mg mL^{-1} solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a). The square hole at center of the image shown in (c) was formed by operating AFM in the constant mode at repulsive imaging force. (d) The height profile along the line shown in (c).

挙動について以下議論する。FOETS 単分子膜は OTS 単分子膜より表面自由エネルギーが低いいため、FOETS 単分子膜の水との界面自由エネルギーは OTS に比べて大きい値となる。FOETS 単分子膜表面に BSA は side-on の状態で吸着するため、BSA 分子と FOETS 単分子膜表面との接触面積は end-on の状態で吸着する OTS 単分子膜の場合のそれと比較して大きい。また、CD スペクトル測定より、BSA は界面自由エネルギーが大きい FOETS 単分子膜への吸着の場合の方がより大きなコンホメーション変化が生じていることが明らかになっている⁶⁾。したがって、BSA 分子は OTS 単分子膜表面と比較して、FOETS 単分子膜表面へより強固に吸着していると結論できる。

Fig. 6 (a)は、 0.1mg mL^{-1} BSA の PBS 溶液 (pH=7.5) へ室温で 10 分間浸漬した後の (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分の高さプロファイルである。BSA は side-on の状態で FOETS 相のみに選択的に吸着した。ATR-FT-IR フローセル法から得られた結果と対応させるため、BSA の濃度を 10mg mL^{-1} として同様な観察を行った結果、 0.1mg mL^{-1} の場合と同様、BSA の FOETS 相への選択吸着が観測された⁶⁾。このように、(OTS/FOETS) 混合単分子膜における FOETS 相への BSA の選択吸着は BSA の溶液濃度に強く依存しない。また、in situ AFM 観察より、FOETS マトリクス上の BSA の吸着面は時間とともに増加するが、OTS ドメイン上には BSA の吸着はほとんど起こらないことが明らかとなった。これらの結果より、(OTS/FOETS) 混合単分子膜表面における BSA の吸着の抑制は BSA の FOETS マトリクスへの選択吸着に起因すると結論できる。

タンパク質分子と単分子膜表面間における相互作用の強さは疎水基を水界面に配向した有機トリクロロシラン単分子膜の場合、疎水性相互作用に強く依存する。また、BSA の等電点は pH=4.7 付近であり、pH=7.5 では BSA は負に荷電しているため、BSA 分子間のイオン反発は BSA の吸着状

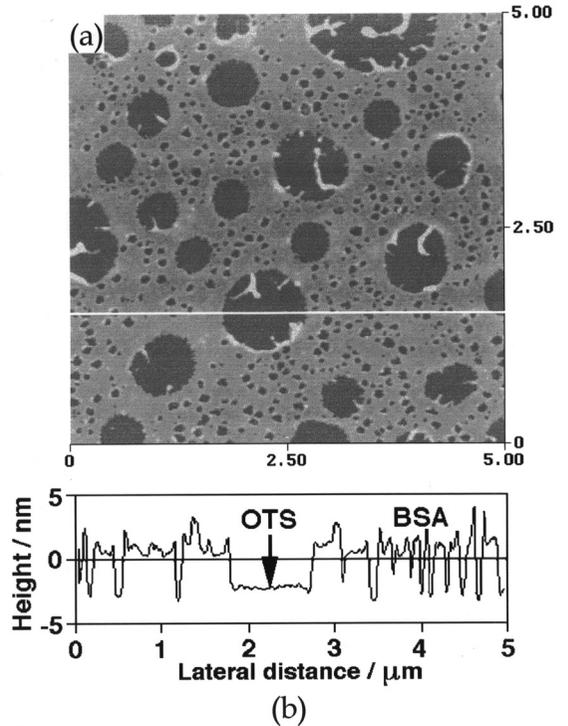


Fig. 6 (a) Tapping mode AFM image of the OTS monolayer surface after exposure to a BSA 0.1mg mL^{-1} solution in PBS (pH=7.5) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

態に大きな影響を与えられ。さらに、疎水性の単分子膜表面と水との間の界面自由エネルギーを極小にするために、BSA が単分子膜表面に吸着する際、大きなコンホメーション変化が生じる必要がある。Fig. 7 は (OTS/FOETS) 混合単分子膜における BSA の FOETS 相への選択吸着過程の模式図である。(OTS/FOETS) 混合単分子膜の場合、OTS 相あるいは FOETS 相への BSA の吸着挙動は、BSA と単分子膜表面との相互作用と吸着された BSA と溶液中に存在する BSA との静電的反発に依存すると予想される。吸着の初期過程において、BSA が FOETS 相に吸着されると、OTS 相に吸着した場合と比較してより大きな界面自由エネルギーの低下が生じるため、FOETS 相への優先的な吸着が生じる。吸着の進行に伴い、FOETS 相に吸着した BSA はコンホメーション変化することで定常状態に到達する。一方、OTS

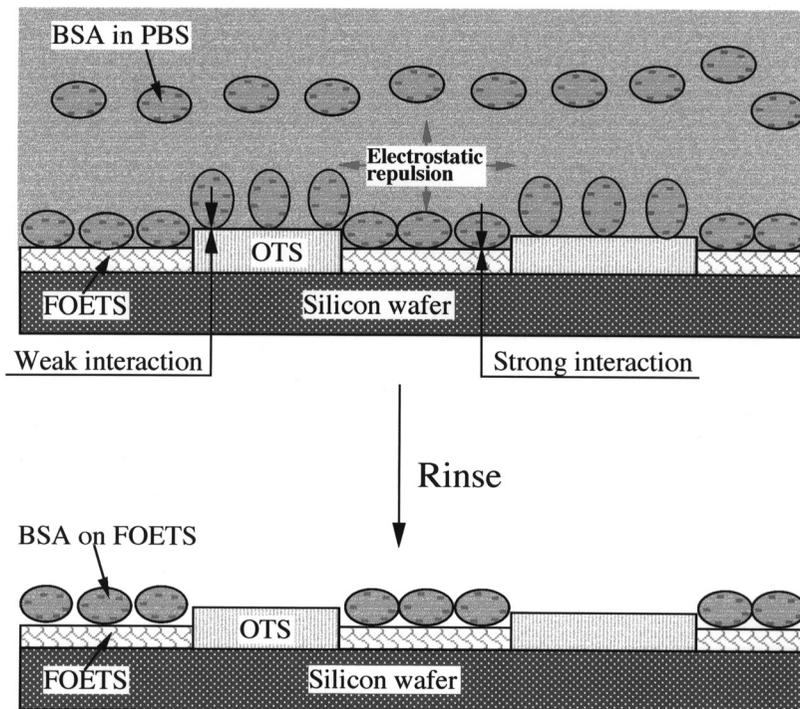


Fig. 7 Schematic representation of preferential adsorption of BSA onto the FOETS phase in the (OTS/FOETS) mixed monolayer.

相においては BSA と OTS 単分子膜表面間の弱い疎水性相互作用及び FOETS 相に吸着された BSA と溶液中にある BSA との間の静電的反発のため、BSA は end-on で吸着し接触面積積と吸着相互作用はより小さい。このため、OTS 相に吸着した BSA はリンスにより容易に除去され、OTS 相への BSA の吸着はほとんど観測されなかったと考えられる。

この選択吸着機構を確認するため、BSA の等電点である $\text{pH}=4.7$ の条件で (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面への BSA の吸着挙動を評価した。Fig. 8(a)は、 0.1mg mL^{-1} BSA の PBS 溶液 ($\text{pH}=4.7$) へ室温で 10 分間浸漬した後の (OTS/FOETS) 混合単分子膜表面のタッピングモードでの AFM 像及び (b) 白線部分のラインプロファイルである。等電点 $\text{pH}=4.7$ の場合、 $\text{pH}=7.5$ と同じ吸着時間では、BSA はより速い速度で単分子膜表面に吸着した。また、Fig. 8 より明らかなように、静電

的反発がない状態では、BSA 分子は OTS 相及び FOETS 相に均一に吸着することが明らかとなった。この結果は、混合単分子膜表面の BSA 吸着において、BSA 分子間の静電的反発は、選択吸着の発現の重要な要因であることを示している。したがって、(OTS/FOETS) 混合単分子膜における $\text{pH}=7.5$ での BSA の FOETS 相への選択吸着は、単分子膜表面と水溶液間の界面自由エネルギーの極小化と負に荷電した BSA 分子間の静電的反発により発現していると結論できる。

3.4 タンパク質と相分離表面間に働く力

AFM はチップと表面に働く力を高精度で検出することが出来る。AFM を用いて BSA 固定化チップと単分子膜表面間に働く力を測定した。Fig. 9 はリン酸緩衝液中で AFM により測定した金蒸着チップ及び BSA 固定化チップと混合単分子膜の OTS 相と FOETS 相との間働く典型的なフォ

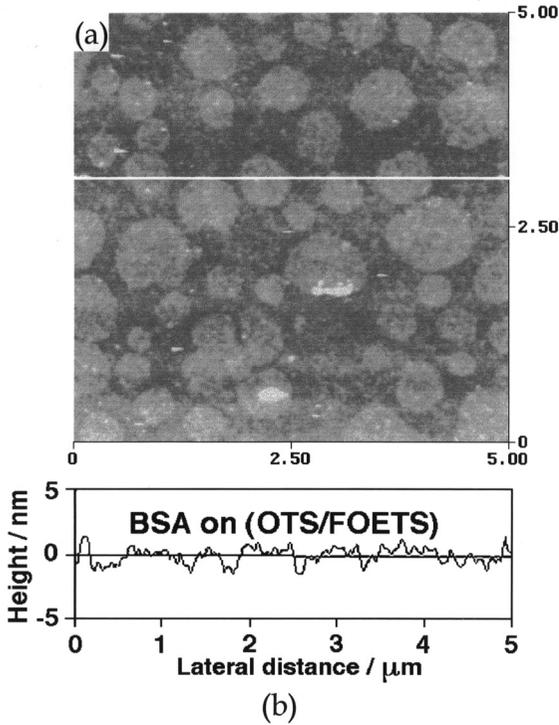


Fig. 8 (a) Tapping mode AFM image of the (OTS/FOETS) mixed monolayer surface after exposure to a BSA 0.1 mg mL^{-1} solution in PBS (pH=4.7) at 293 K for 10 min and (b) the height profile along the line shown in (a).

ースカーブである。チップと単分子膜との相互作用はチップが単分子膜表面から離れていく際の凝着力から評価できる。BSAを固定化していない金蒸着チップの場合、凝着力が1 nN以下であったが、BSA固定化チップを用いた場合は5 nN程度であった。また、金蒸着チップでは凝着力が単一ピークを示すが、BSA固定化チップでは多数の極小値を示した。これはBSA分子の単分子膜表面との多点接触あるいはBSAの分子鎖のunfoldingと関連するものと考えられる。これらの結果は、BSAとOTS相あるいはFOETS相の間に働く凝着力の値には大きな差はなく、むしろpH = 7.5でのBSAの負の帯電によるFOETSマトリクスに吸着したBSAと溶液中のBSAの静電的反発がBSAのFOETS相への選択吸着と関連していることを示唆している。

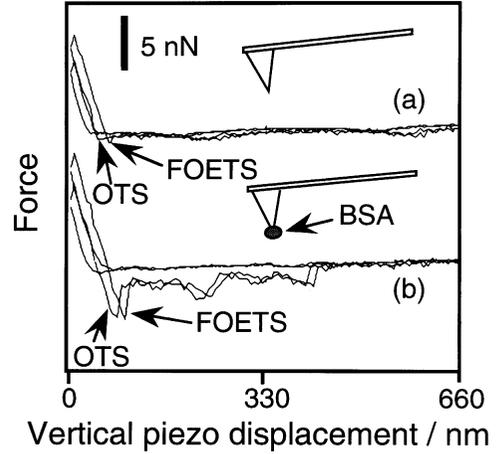


Fig. 9 Force-distance curves between AFM tip and OTS or FOETS phase in PBS. (a) unmodified tip (b) BSA immobilized tip.

4 結論

ラングミュアー法により (OTS/FOETS) 混合単分子膜を調製すると相分離構造が形成されることを見いだした。この海島状相分離構造形成には構成成分の結晶化挙動が非常に重要な因子であることを明らかにした。ATR-FT-IR フローセル法及びAFM観察により、混合単分子膜へのBSA吸着挙動において、単分子膜表面と水溶液間の界面自由エネルギーの極小化と負に荷電したBSA分子間の静電的反発により、選択吸着が発現されることを明らかにした。

参考文献

- 1) A. Takahara, N. J. Jo, and T. Kajiyama, Surface Molecular Mobility and Platelet Reactivity of Segmented Poly(etherurethaneureas) with Hydrophilic and Hydrophobic Soft Segment Components, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **1**, 19, 1989.
- 2) S. R. Ge, A. Takahara and T. Kajiyama, Aggregation Structure and Surface Properties of

- Immobilized Organosilane Monolayers Prepared by the Upward Drawing Method, *J. Vac. Sci. Technol.*, **A 12**, 2530, 1994.
- 3) S. R. Ge, A. Takahara and T. Kajiyama, Phase Separated Morphology of Immobilized Organosilane Monolayer Studied by Scanning Force Microscope, *Langmuir*, **11**, 1341, 1995.
 - 4) T. Kajiyama, S. R. Ge, K. Kojio and A. Takahara, Scanning Force Microscopic Study of Surface Structure and Properties of (Alkylsilane/Fluoroalkylsilane) Mixed Monolayers, *Supramolecular Science*, **3**, 123, 1996.
 - 5) A. Takahara, K. Kojio, S. R. Ge and T. Kajiyama, Scanning Force Microscopic Studies of Surface Structure and Protein Adsorption Behavior Organosilane Monolayers, *J. Vac. Sci. Technol.*, **A 14**, 1747, 1996.
 - 6) S. R. Ge, K. Kojio, A. Takahara, and T. Kajiyama, Bovine Serum Albumin Adsorption onto Immobilized Organotrichlorosilane Surface: Influence of Phase Separation on Protein Adsorption Behavior, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **9**, 131, 1997.
 - 7) K. Kojio, S.-R. Ge, A. Takahara, T. Kajiyama, Molecular Aggregation State of n-Octadecyltrichlorosilane Monolayer Prepared at an Air/Water Interface, *Langmuir*, **14**, 971, 1998.
 - 8) A. Takahara, S.-R. Ge, K. Kojio, T. Kajiyama, Scanning Force Microscopy of Surface Structure and Surface Mechanical Properties of Organotrichlorosilane Monolayers Prepared by Langmuir Method, *ACS Symposium Series Vol.694*, American Chemical Society, chapt 12, 1998.
 - 9) D. J. Fink, R. M. Gendreau, Quantitative Surface Studies of Protein Adsorption by Infrared Spectroscopy I. Correction for Bulk Concentrations, *Anal. Biochem.*, **139**, 140, 1984.
 - 10) W. G. Pitt, S. L. Cooper, FTIR-ATR Studies of the Effect of Shear Rate Upon Albumin Adsorption onto Polyurethaneurea, *Biomaterials*, **7**, 340, 1986.
 - 11) U. Dammer, M. Hegner, D. Anselmet, P. Wagner, M. Dreler, W. Huber, H.-J. Guntherodt, Specific Antigen/Antibody Interactions Measured by Force Microscopy, *Biophys. J.*, **70**, 2437, 1996.
 - 12) T. A. Horbett and J. L. Brach (Eds), *Protein at Interfaces*, ACS Symposium Series Vol. 602. American Chemical Society, Washington DC, 1995.
 - 13) T. Peters, Jr., Serum Albumin, *Adv. Protein Chem.*, **37**, 161, 1985.