

金基板に吸着した BSA 膜の表面自由エネルギー測定

Measurement of the Surface Free Energy of BSA Film Adsorbed on a Gold Substrate

東洋大・理工（正）*中嶋 和弘

Kazuhiro Nakashima

Toyo University

1. 緒言

人工関節は生体関節液中でしゅう動するため、関節液に含まれる蛋白質が摩擦摩耗挙動に影響を与えることが指摘されている¹⁻³⁾。生体関節液中の蛋白質分子が人工関節摩擦面材料に吸着し蛋白質吸着膜を形成するため、人工関節の生体内での摩擦特性を把握するためには蛋白質吸着膜の摩擦特性を把握することが必要である。人工関節摩擦面の直接接触が発生すると蛋白質吸着膜において摩擦が発生する。摩擦はエネルギー散逸過程を反映しているため、蛋白質吸着膜のエネルギー散逸機構を解明することで蛋白質吸着膜の摩擦特性について明らかにできると考えられる。

摩擦試験中に蛋白質吸着膜で発生するエネルギー散逸機構として、吸着蛋白質分子の脱離エネルギー、垂直荷重の圧力による粘弾性変形と蛋白質分子内部の変性、せん断力による粘弾性変形や変性、蛋白質分子や凝集体の転がりによる変形や変性などが考えられる。摩擦によるエネルギー散逸が最も低くなる時は、蛋白質分子がせん断によって表面から脱離するエネルギーが支配的であるときと考えられる。しかし、摩擦試験では垂直荷重が存在するため、上記のエネルギー散逸過程を切り分けて評価することは難しい。そこで、垂直荷重を作用させずにせん断力だけを表面に作用させるために、流体せん断応力を用いて牛血清アルブミン (Bovine Serum Albumin, BSA) のせん断抵抗 (脱離エネルギー散逸) を測定したところ、およそ 0.24 Pa となった⁴⁾。このせん断抵抗から摩擦係数を算出すると、0.0021 となった。BSA 0.1 mass% 溶液中の超高分子量ポリエチレンピンと CoCrMo 合金平板の摩擦試験の摩擦係数はおよそ 0.002~0.006 であった。BSA 分子のせん断抵抗から算出した摩擦係数が実測値の最小の摩擦係数と一致したことから、BSA 分子の脱離によるせん断抵抗が支配的であれば摩擦が最小になると考えられる。しかし、摩擦係数は 0.006 以上の値を示す場合もあり、このような場合では BSA 分子の脱離エネルギー以外のエネルギー散逸の影響が大きくなっていると考えられる。従って、他のエネルギー散逸過程を解明することが蛋白質吸着膜の摩擦メカニズムの解明、ひいては人工関節の摩擦特性の解明へと繋がり、より低摩擦を示す人工関節の開発が可能になると考えられる。

上述したように、せん断抵抗以外のエネルギー散逸過程を摩擦試験中に切り分けて測定することは難しい。従って摩擦試験中のエネルギー散逸を解明するためには、別の手法について検討する必要がある。そこで、摩擦試験前後の蛋白質吸着膜の表面自由エネルギーを比較・検討することで、摩擦試験中のエネルギー散逸過程の一端の解明が可能になると考えた。蛋白質吸着膜の表面自由エネルギーについて検討するためには、蛋白質吸着膜の表面自由エネルギー測定が可能であることが必要条件である。従って、本研究では BSA 吸着膜の表面自由エネルギーの測定を行い、BSA 吸着膜の表面自由エネルギーについて検討を行った。

2. 実験方法

蛋白質吸着膜は BSA (富士フィルム和光純薬, 017-15146) を用いて作製した。BSA を PBS (pH 7.4, gibco, 10010023) へ添加し、濃度 0.10mass% の BSA 水溶液を作製した。被吸着面試料として金蒸着ガラス基板 (アルテック, SPR-Navi slide 10) を用い、BSA 溶液へ一晩浸漬した。金蒸着ガラス基板を BSA 溶液から引き上げ、余分な BSA 溶液を除去し、大気中室温で一晩乾燥させ、金蒸着ガラス基板上に BSA 吸着膜を作製した。

表面自由エネルギーは接触角法により測定した。BSA 分子は α -ヘリックス構造を有するため、BSA 吸着膜の表面自由エネルギーは水素結合成分を含むと考えられる。そのため、水素結合成分を含む表面自由エネルギーを 3 成分系から求める北崎・畑の理論式⁵⁾を用いた。BSA 吸着膜と超純水、ヘキサデカン、ジヨードメタンの接触角を接触角計 (DMo-502, 協和界面科学) で測定した。それらの接触角の値から次に示す理論式を用いて BSA 吸着膜の分散成分 (γ_s^d)、極性成分 (γ_s^p)、水素結合成分 (γ_s^h) を求め、それらの合計を BSA 吸着膜の表面自由エネルギー (γ_s^{total}) とした。

$$\gamma_s^{total} = \gamma_s^d + \gamma_s^p + \gamma_s^h$$

$$\begin{cases} \sqrt{\gamma_{L_1}^d \cdot \gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_{L_1}^p \cdot \gamma_s^p} + \sqrt{\gamma_{L_1}^h \cdot \gamma_s^h} = \frac{\gamma_{L_1}^{total} (1 + \cos \theta_{L_1})}{2} \\ \sqrt{\gamma_{L_2}^d \cdot \gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_{L_2}^p \cdot \gamma_s^p} + \sqrt{\gamma_{L_2}^h \cdot \gamma_s^h} = \frac{\gamma_{L_2}^{total} (1 + \cos \theta_{L_2})}{2} \\ \sqrt{\gamma_{L_3}^d \cdot \gamma_s^d} + \sqrt{\gamma_{L_3}^p \cdot \gamma_s^p} + \sqrt{\gamma_{L_3}^h \cdot \gamma_s^h} = \frac{\gamma_{L_3}^{total} (1 + \cos \theta_{L_3})}{2} \end{cases}$$

ここで、 γ は表面自由エネルギー、添字の $L_1 \sim L_3$ はそれぞれ超純水 (富士フィルム和光純薬, 214-01301)、ヘキサデカン (富士フィルム和光純薬, 088-03681)、ジヨードメタン (関東化学, 25255-30)、 $\theta_{L_1} \sim \theta_{L_3}$ は BSA 吸着膜と各液体

の接触角を表す。各溶液の表面自由エネルギーは既知であるため、表面自由エネルギーの各成分を求めることができる。

コントロールとして金蒸着ガラス基板を用いた。金蒸着ガラス基板は水素結合成分を持たないため、分散成分と極性成分の2成分から表面自由エネルギーを求める Kaelble-Uy の理論式から求めた。接触角には金蒸着ガラス基板と超純水、ヘキサデカンの接触角を用いた。

3. 実験結果および考察

Fig. 1 に金蒸着ガラス基板と BSA 吸着膜の接触角を示す。金蒸着ガラス基板では疎水的な表面であることが確認された。BSA 吸着膜では超純水との接触角の標準偏差が大きく、それ以外では標準偏差が小さく安定した値が測定された。

Fig. 2 に理論式より計算した金蒸着基板と BSA 吸着膜の表面自由エネルギーの各成分を示す。金蒸着ガラス基板の表面自由エネルギーは 30.8 mJ/m^2 となり、Tyson らの結果の 1500 mJ/m^2 よりも大幅に小さい値となった。Tyson らはバルクの金表面の表面自由エネルギーを測定しているが、本研究ではガラス基板上に厚さ 10 nm 程度で蒸着された金薄膜の表面自由エネルギーについて測定しているため、Tyson らの表面自由エネルギーの値と異なった結果になったと考えられる。一方、BSA 吸着膜の表面自由エネルギーの各成分は水素結合成分の標準偏差が大きく、分散成分と極性成分ではどの測定においてもほぼ一定の値となった。従って、本研究で使用したプローブ液体の組み合わせでは水素結合成分が BSA 吸着膜の表面自由エネルギーに対して大きく影響することが考えられる。

BSA 吸着膜では水の接触角と水素結合成分が共に標準偏差が大きくなったため、接触角と水素結合成分に関連性があると考えられた。Fig. 3 に接触角と水素結合成分の関係について示す。ヘキサデカンとジヨードメタンではの接触角と水素結合成分に関係は見られないが、超純水では接触角の増加とともに水素結合成分が線形に減少する関係が見られた。従って、BSA 吸着膜の表面自由エネルギーの変化は表面の親疎水性が支配的であることが明らかとなった。

4. 結言

蛋白質吸着膜の摩擦メカニズムの解明を目指し、BSA 吸着膜の表面自由エネルギーを接触角法により測定した。その結果、超純水、ヘキサデカン、ジヨードメタンを用いた場合では水素結合成分の変化が表面自由エネルギーに対して支配的であることが明らかとなった。

5. 謝辞

本研究の一部は JSPS 科研費 JP21H04535, JP21K12736 の助成を受けたものです。

文献

- 1) K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami: Study on Wear Reduction Mechanisms of Artificial Cartilage by Synergistic Protein Boundary Film Formation, JSME C, 48, 4 (2005) 555.
- 2) K. Nakashima, Y. Sawae, T. Murakami, S. Michler: Behavior of Adsorbed Albumin Film on CoCrMo Alloy under in-situ Observation, Tribology Online, 10, 2 (2015) 183.
- 3) D. Nečas, Y. Sawae, T. Fujisawa, K. Nakashima, T. Morita, T. Yamaguchi, M. Vrbka, I. Krupka, M. Hartl: The Influence of Proteins and Speed on Friction and Adsorption of Metal/ UHMWPE Contact Pair, Biotribology, 11 (2017) 51.
- 4) 中嶋・黒田: 流体せん断応力を用いた吸着アルブミン分子のせん断強さ評価, 臨床バイオメカニクス, 44 (2023) 291.
- 5) T. Hata, Y. Kitazaki, T. Saito: Estimation of the Surface Energy of Polymer Solids, J. Adhesion, 21, 3-4 (1987) 177.
- 6) W. R. Tyson, W. A. Miller: Surface free energies of solid metals: Estimation from liquid surface tension measurements, Surf. Sci, 62, 1, (1977) 267.

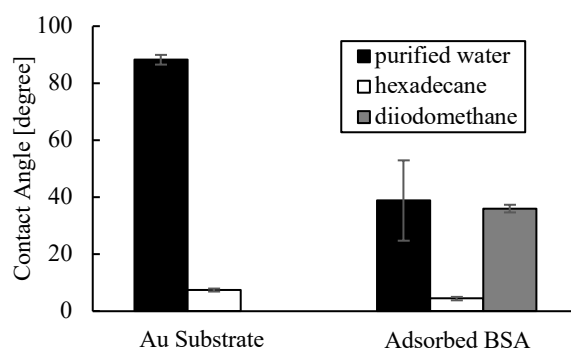


Fig. 1 Contact angle of Au substrate and adsorbed BSA on Au substrate. Error bars: S. D.

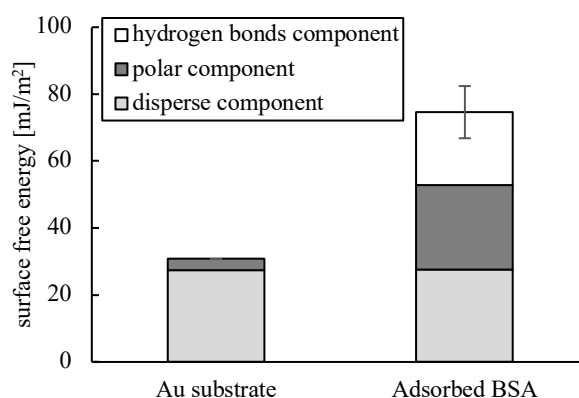


Fig. 2 Surface free energy and surface energy component. Error bars: S. D.

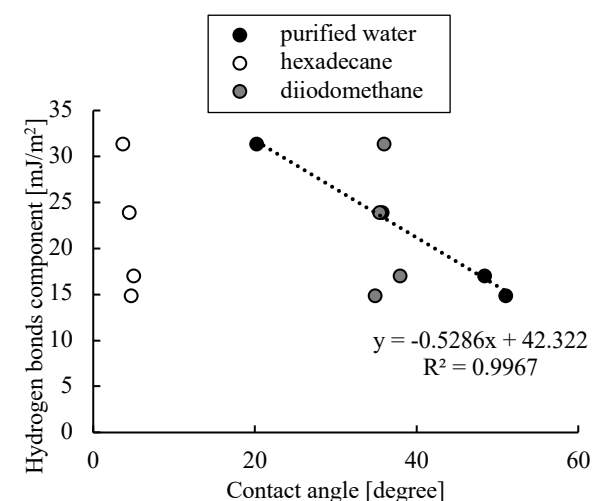


Fig. 3 Contact angle and surface energy component.