

# 疑似鋭敏化ステンレス鋼表面とタンパク質の相互作用

## Interaction between Pseudo-Sensitized Stainless Steel Surfaces and Protein

福崎智司・高橋和宏・浦野博水・竹原淳彦

Satoshi FUKUZAKI, Kazuhiro TAKAHASHI, Hiromi URANO, and Atsuhiko TAKEHARA

キーワード 疑似鋭敏化／タンパク質の吸着／洗浄／クロム析出物

KEY WORDS Pseudo-sensitization／ Protein adsorption／ Cleaning／ Chromium precipitates

### 要 旨

316L ステンレス鋼粒子を、減圧下にて 700°C で 100 時間加熱処理して疑似鋭敏化処理した結果、ステンレス鋼粒子の表面に Cr の析出物が形成された。疑似鋭敏化ステンレス鋼粒子の見掛けの表面電荷密度 ( $\sigma_{app}$ ) は、処理前と比較して塩基性の性質を示した。牛血清アルブミン (BSA) の吸着量は、処理前の粒子と疑似鋭敏化粒子の間に有意差はなかった。一方、0.1M 水酸化ナトリウムを用いた回分洗浄および連続洗浄において、疑似鋭敏化粒子からの BSA の除去率は著しく減少する結果となった。この極度に低下した洗浄性は、鋭敏化処理による  $\sigma_{app}$  の著しい増加に起因することが示された。疑似鋭敏化粒子を、減圧下にて 1,050°C で 1 時間加熱して溶体化処理した結果、Cr 析出物が再び固溶され、表面化学組成と  $\sigma_{app}$  は未処理粒子の表面状態に戻った。溶体化処理粒子は、未処理粒子と同等の洗浄性を示した。

### 1 はじめに

オーステナイト系ステンレス鋼は、食品や医薬品分野をはじめ、電子・半導体、化学、船舶、原子力等の分野において、機械装置、タンク類、配管系、バルブ、筐体等の基材として広く用いられている。これは、ステンレス鋼がさびにくい鋼であることをはじめとして、加工性、強度、経済性、無毒性等の点で他の材料にはない優れた特性を有していることによる。一方、オーステナイト系ステンレス鋼の短所として、溶接や高温運転により母材が鋭敏化温度域 (500~850°C) で一定時間加熱されるか、加熱後緩やかに冷却され、この温度域に一定時間保持されることにより、結晶粒界部に Cr 析出物 (炭化物等) が生成して粒界近傍 (熱影響部) に Cr 欠乏層が生じることが挙げられる<sup>1, 2)</sup>。鋭敏化した材料は、耐食性が著しく低下するばかりでなく、汚染性を増加させ、洗浄性にも劣ることが経験的に知られている<sup>3-6)</sup>。耐食性低下の対策として、鋭敏化材料を 1050°C 付近まで加熱して Cr 析出物を固溶させる固溶化熱処理 (溶体化処理) を行うことが有効であるが<sup>1)</sup>、洗浄性の改善にも有効であるか否かは、これまで十分に検討されていない。

本研究では、固液界面での吸・脱着特性に焦点をあてるため、低炭素鋼 (L 材) であるステンレス鋼 SUS 316L の微粒子を用いて、疑似鋭敏化処理および溶体化処理によるステンレス鋼の酸化皮膜の化学組成と表面電荷特性の変化、ならびにタン

パク質の吸着相互作用や洗浄性への影響について検討した。

### 2 実験方法

#### 2.1 材料と試薬

ステンレス鋼は SUS 316L の微粒子 (比表面積: 0.37 m<sup>2</sup>/g) を、タンパク質は牛血清アルブミン (BSA; ナカライテスク(株)) を用いた。

#### 2.2 疑似鋭敏化処理と溶体化処理

疑似鋭敏化処理は、ステンレス鋼粒子 50g を磁性るつぼに入れ、10<sup>-5</sup>Torr まで減圧した加熱炉内にて 700°C で 100 時間保持した。その後、炉を徐冷した (10°C/min)。

溶体化処理は、鋭敏化熱処理粒子 20g を磁性るつぼに入れ、10<sup>-5</sup>Torr まで減圧した加熱炉内にて 1050°C で 1 時間保持した。その後、炉を開放して処理粒子を 500°C 以下まで急冷した (90°C/min)。

#### 2.3 付着・洗浄実験

BSA の吸着実験は、25 ml のガラス製バイアル中に 5 ml の BSA 溶液 (3g/l, pH 5.2, 10<sup>-3</sup> M KNO<sub>3</sub>) と 1.25 g のステンレス鋼粒子を入れ、40°C で 2 時間振とう (140 rpm) して行った。

回分式洗浄実験は、BSA が吸着したステンレス鋼粒子 1 g と洗浄液 (0.1M NaOH) 5 ml を 25 ml のガラス製バイアルに入れ、密栓した後、湯浴中で 2 時間振とう (40°C, 140 rpm) して行った。

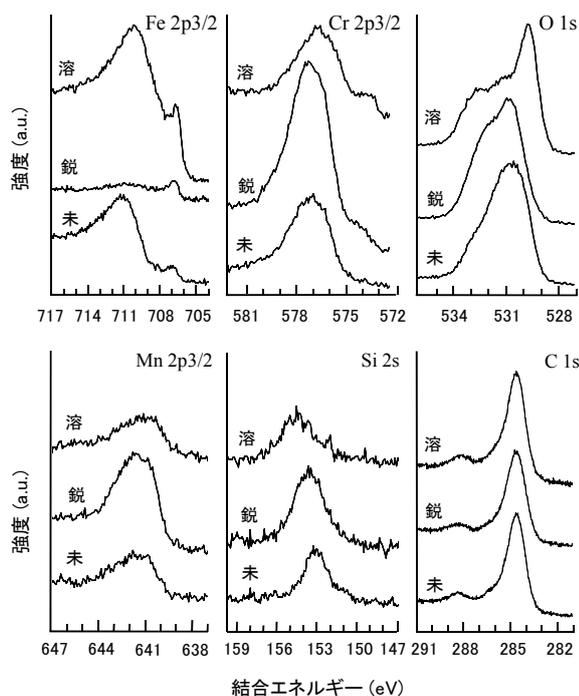


図1 未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理ステンレス鋼粒子のXPSスペクトル (\*Arエッチング処理なし)

表1 未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理ステンレス鋼粒子の不動態化皮膜の化学組成\*

ステンレス鋼	成分 (atom %)								
	Fe	Cr	Ni	Mo	O	Mn	Si	Ca	C
未処理	5.2	4.8	0.3	0.2	59.2	1.5	7.0	0.4	21.4
疑似鋭敏化処理	1.2	9.4	0.3	0.2	57.1	3.0	10.3	0.4	18.1
溶体化処理	9.3	4.7	0.9	0.6	56.0	1.6	7.3	0.1	19.5

\*Arエッチング処理なし

連続式洗浄実験は、BSA が吸着したステンレス鋼粒子 1 g をステンレス鋼製カラム (内径 4 mm × 長さ 50 mm) に充填しカラムオープン内 (40°C) に垂直に設置した後、0.1M NaOH 溶液を 0.25 ml/min の流速でカラム底部から供給して行った。

## 2.4 分析方法

ステンレス鋼粒子の最表面の化学組成は X 線光電子分光分析 (JPS-9200 ; 日本電子株) で、見掛けの表面電荷密度 ( $\sigma_{app}$ ) は電位差滴定法で<sup>7)</sup>、BSA は Lowry-Folin 法で測定した<sup>8)</sup>。

## 3 結果と考察

### 3.1 表面での Cr 析出物の生成と固溶

図 1 に、未処理ステンレス鋼粒子、疑似鋭敏化処理粒子、疑似鋭敏化粒子を溶体化処理した粒子の最表面の主元素の XPS スペクトルを示す。最も顕著な変化は、Fe2p3/2 と Cr2p3/2 のスペクトルに現れた。すなわち、疑似鋭敏化処理により Fe<sup>3+</sup>酸

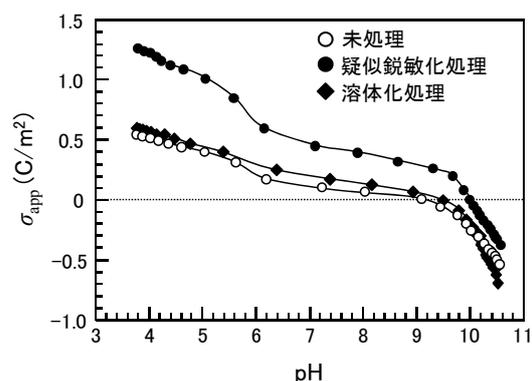


図2 未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理ステンレス鋼粒子の見掛けの表面電荷密度 ( $\sigma_{app}$ )

化物に帰属するピーク (710.9 eV) は消失し、溶体化処理によって再び出現した。一方、Cr<sup>3+</sup>に帰属するピークの位置は、疑似鋭敏化処理により 576.9 eV (酸化物) から 577.5 eV にシフトするとともに、ピーク強度が著しく増加した。しかし、溶体化処理によって Cr のピーク位置および強度は未処理粒子とほぼ同等な状態に戻った。

表 1 に、未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理粒子の最表面の化学組成を示す。未処理粒子の化学組成と比較すると、疑似鋭敏化処理により Cr 含量の増加と Fe 含量の減少が見られた。このような変化は、鋭敏化の特徴的な現象の一つである<sup>1)</sup>。Cr の表面濃縮に関しては、疑似鋭敏化処理粒子の C1s のスペクトルには Cr 炭化物 (Cr<sub>x</sub>C<sub>y</sub>) のピーク (282.5 ~ 283.0 eV) は見られなかった (図 1)。一般に、L 材でないステンレス鋼の場合は Cr 炭化物が生成することから<sup>1, 2)</sup>、L 材の表面には炭化物ではない Cr 析出物が生成したことが示唆された。また、疑似鋭敏化により Mn (MnO ~ MnO<sub>2</sub>) と Si (SiO<sub>2</sub>) の含量も増加した。一方、溶体化処理粒子の化学組成は、Fe の濃縮を除けば未処理粒子とほぼ一致していた。このように、溶体化処理を施すことによって、疑似鋭敏化処理で表面に濃縮した Cr 析出物が固溶し、最表面の化学組成が元の未処理粒子の状態に改質されることがわかった。

### 3.2 表面電荷特性の変化

図 2 に、未処理ステンレス鋼粒子、疑似鋭敏化処理粒子、溶体化処理粒子の  $\sigma_{app}$  曲線を示す。未処理粒子の見掛けの零電荷点 ( $pzc_{app}$ ) は 9.1 (pH 単位) であった。疑似鋭敏化処理により、pH 3~10 の範囲において正の  $\sigma_{app}$  値が増加し、 $pzc_{app}$  は 10.0 へ移動した。これは、(i) 表面に生成した Cr 析出物が高い正の  $\sigma_{app}$  を有するか、(ii) 強塩基性を示す MnO の表面濃度の増加に起因しているのではないかと考えられる。一般に、Cr 酸化物 (Cr<sub>2</sub>O<sub>3</sub>) に富んだステンレス鋼は、正・負の  $\sigma_{app}$  値が小さく、 $pzc_{app}$  は

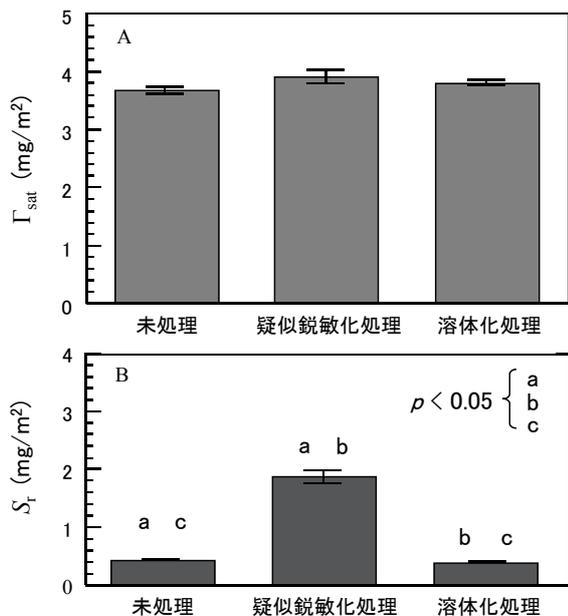


図3 未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理ステンレス鋼粒子に対するBSAの飽和吸着量( $\Gamma_{sat}$ )とアルカリ洗浄(0.1M NOH)後の残存量( $S_r$ )

6.0~6.8 に位置することが知られている<sup>9-11)</sup>。これらの結果は、疑似鋭敏化処理により表面に濃縮したCrは酸化物皮膜としてではなく、析出物として存在していることを示唆している。

一方、疑似鋭敏化粒子を溶体化処理した結果、正の $\sigma_{app}$ 値は減少し、 $pzc_{app}$ は9.5へ移動するなど、未処理粒子と類似の $\sigma_{app}$ 曲線に戻った。このような $\sigma_{app}$ 曲線の変化は、溶体化処理によってCr析出物やMnOが粒内に固溶したことに起因すると考えられる(表1参照)。

### 3.3 BSAの吸着と相互作用

BSAの吸着親和性に及ぼす鋭敏化処理と溶体化処理の影響について検討した。未処理ステンレス鋼粒子、疑似鋭敏化処理粒子、溶体化処理粒子に対するBSAの飽和吸着量( $\Gamma_{sat}$ )は、各々3.61±0.15、3.90±0.22、3.72±0.13mg/m<sup>2</sup>であった(図3A)。いずれの吸着量にも有意差は見られなかった( $p < 0.05$ )。

一方、BSAが飽和吸着した各粒子を0.1M NaOH溶液で回分洗浄処理した後の残存量には顕著な変化が見られた(図3B)。未処理、疑似鋭敏化処理および溶体化処理粒子での残存量( $S_r$ )は、各々0.39±0.03、1.87±0.23、0.32±0.01mg/m<sup>2</sup>であり、いずれの残存量にも有意差が見られた( $p < 0.05$ )。疑似鋭敏化処理粒子では、BSAの $\Gamma_{sat}$ は変化しないものの、アルカリ洗浄では除去されにくい強固な吸着が起こっていることが示唆された。一般に、タンパク質は親水性の固体表面に対して

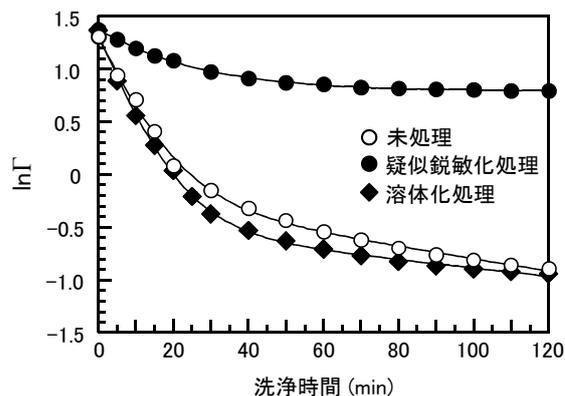


図4 アルカリ洗浄(0.1M NOH)における未処理、疑似鋭敏化処理、溶体化処理ステンレス鋼粒子からのBSAの脱着曲線

カルボキシル基を向けた配向で吸着する傾向が強いため、正に帯電した固体表面には強い相互作用力で吸着することになる<sup>8, 12-14)</sup>。おそらくは大きな正の $\sigma_{app}$ を有する疑似鋭敏化処理粒子では、BSA分子鎖の負に帯電したカルボキシル基との静電的な相互作用が強くなるため、BSAが強固に吸着するのではないかと考えられる。この理論に従うと、溶体化処理によりCr炭化物やMnOを固溶し、正の $\sigma_{app}$ を未処理粒子と同等なレベルまで低下させたことが、 $S_r$ を大きく減少させる要因であったと解釈できる。

### 3.4 BSAの脱着速度論

図4に、未処理ステンレス鋼粒子、疑似鋭敏化処理粒子、溶体化処理粒子にBSAを一定量吸着させた後、0.1M NaOH溶液で連続洗浄したときのBSAの脱着曲線を示す。未処理粒子におけるBSAの脱着と比較すると、疑似鋭敏化処理粒子ではアルカリ洗浄におけるBSAの脱着はきわめて緩慢であり、脱着速度は著しく小さいことがわかった。一方、疑似鋭敏化処理粒子を溶体化処理した結果、脱着速度や脱着効率は、未処理粒子とほぼ同等なレベルまで改善された。未処理粒子、疑似鋭敏化処理粒子、溶体化処理粒子における洗浄終了時の残存量は、各々0.41、2.21、0.39mg/m<sup>2</sup>であった。

著者らは、脱着速度を定量的に評価するために、吸着タンパク質分子の脱着が速度論的に2種類の機構(速い脱着と遅い脱着)で起こると仮定し以下の脱着モデルを誘導して解析に用いている<sup>15)</sup>：  

$$\ln \Gamma = \ln \{ \exp(\ln \Gamma_0^f - k^f t) + \exp(\ln \Gamma_0^s - k^s t) \} \quad (1)$$
ここで、 $t$ は洗浄時間、 $\Gamma$ は時間 $t$ でのBSAの残存量、 $\Gamma_0$ は $t = 0$ での初発BSA吸着量、 $k$ は $\Gamma$ に関する一次脱着速度定数、添え字 $f$ と $s$ は、各々速い脱着と遅い脱着を意味する。 $k^f$ と $k^s$ は、各々洗浄初期と後期の脱着速度を主として反映する。

図4の各測定点を結ぶ実線は、(1)式と非線形

表2 (1) 式の適合で得られた速度論定数

ステンレス鋼	$\Gamma_0$	$\Gamma_0^f$	$\Gamma_0^s$	$k^f$	$k^s$
	(mg/m <sup>2</sup> )			(min <sup>-1</sup> )	
未処理	3.73	2.92	0.81	0.092	0.0059
疑似鋭敏化処理	3.96	1.71	2.25	0.046	0.00018
溶体化処理	3.85	3.27	0.65	0.099	0.0039

最小二乗法を用いて解析した結果であり、脱着データと良好な適合性を示した。表 2 に、解析の結果得られた速度論定数を示す。疑似鋭敏化処理粒子に対して得られた  $k^f$  と  $k^s$  は、未処理粒子と比較すると、各々 2 倍および 33 倍も小さいと算出された。また、溶体化処理粒子に対して得られた  $k^f$  と  $k^s$  は、未処理粒子とほぼ同等であった。以上の結果から、アルカリ洗浄によるステンレス鋼表面からの BSA の除去は、疑似鋭敏化によって平衡論および速度論の両面において著しく低下することがわかった。

#### 4 まとめ

316L ステンレス鋼粒子を疑似鋭敏化の状態にした結果、表面に Cr 析出物が形成された。疑似鋭敏化処理粒子の  $\sigma_{app}$  は、未処理の粒子と比較して、より塩基性の性質を示した。BSA の吸着量は、未処理粒子および疑似鋭敏化処理粒子の間に有意差はなかったが、0.1M NaOH を用いた回分洗浄および連続洗浄において、疑似鋭敏化粒子からの BSA の除去率は著しく低下した。この極度に低下した洗浄性は、鋭敏化処理による  $\sigma_{app}$  の著しい増加に起因することが示された。疑似鋭敏化粒子を溶体化処理した結果、Cr 析出物は再び固溶され、表面化学組成と  $\sigma_{app}$  は元の粒子の状態に戻った。その結果、溶体化処理粒子は、未処理粒子と同等の洗浄性に改善されることがわかった。

#### 参考文献

- 1) Davis, J. R.: *In Corrosion of weldments*, (Davis, J. R., ed.), pp. 1-12, ASM International, Materials Park, OH (2006)
- 2) Osozawa, K.: 防食技術, **22**, 268-273(1973)
- 3) European Hygienic Equipment Design Group: Trends Food Sci. Technol., **4**, 306-310 (1993)
- 4) Videla, H. A. and Characklis, W. G.: Intl. Biodeter. Biodegrad., **29**, 195-212 (1992).
- 5) Walsh, D., Seago, J., and Williams, L.: *In Corrosion/92*, Paper No. 155. NACE International, Houston, Texas (1992).
- 6) Walsh, D., Willis, E., and VanDiepen, E.: *In Corrosion/94*, Paper No. 612. NACE International, Houston, Texas (1994)
- 7) Lowry, O. H., Rosenbrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J.: J. Biol. Chem., **193**, 265-275 (1951)
- 8) Fukuzaki, S., Urano, H., Hiramatsu, M., and Takehara, A.: Biocontrol Sci., **6**, 87-94 (2001)
- 9) Fukuzaki, S., Takehara, A., Takahashi, K., Hiramatsu, M., and Koike, K.: 表面技術, **54**, 1034-1042 (2003)
- 10) Fukuzaki, S., Urano, H., Hiramatsu, M., and Takehara, A.: Biocontrol Sci., **6**, 95-101 (2001)
- 11) Takahashi, K. and Fukuzaki, S.: 表面技術, **57**, 290-295 (2006)
- 12) Fukuzaki, S., Urano, H., and Hiramatsu, M.: 表面技術, **49**, 915-916 (1998)
- 13) 福崎智司: 防菌防黴, **32**, 203-213 (2004)
- 14) 福崎智司, 平松 実, 生貝 初, 高橋和宏, 山田貞子: 表面技術, **57**, 220-225 (2006)
- 15) Urano, H. and Fukuzaki, S.: J. Colloid Interface Sci., **252**, 284-289 (2002)