Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2026-11-24

反射干渉分光を利用した抗原抗体反応のラベルフリー計測

栗原，義一

(Degree)
博士（工学）

(Date of Degree)
2013-09-25

(Date of Publication)
2015-09-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第5937号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1005937

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

博　士　論　文

（論文題目）

反射干渉分光を利用した抗原抗体反応のラベルフリー計測

平成２５年７月

神戸大学大学院工学研究科

（氏名）　栗　原　　義　一

目次

第１章　緒論 4
1-1.バイオセンサ 4
1-2.光の干渉について 7
1-3.光干渉を利用したセンサに関する研究の進展 9
1-4.本研究における反射干渉分光システム 11
1-5.本研究における計測対象物 18
1-5-1.Alpha-fetoprotein (AFP) 18
1-5-2.Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1) 19
1-6.本研究の目的と意義 21
第２章　肝細胞がんマーカーAFP 抗原抗体反応計測系の構築に向けた基板作製 23
2-1.抗体固定化基板の作製 23
2-2.試薬リスト 24
2-3.使用機器 25
2-4.実験方法 26
2-4-1.SiN 基板元素分析 26
2-4-2.SiN 基板に対するプラズマ処理の影響 26
2-4-3.カルボキシル化基板の調製 26
2-4-4.カルボキシル化基板の特性評価 28
2-4-5.抗体固定化基板の調製 29
2-5.結果と考察 29
2-5-1.SiN 基板元素分析 29
2-5-2.SiN 基板に対するプラズマ処理の影響 30
2-5-3.カルボキシル化基板の調製 36
2-5-4.カルボキシル化基板の特性評価 39
2-5-5.抗体固定化基板の調製 50
2-6.結論 51
第３章　RIfS を用いた AFP 抗原抗体反応の計測 52
3-1.AFP 抗原抗体反応の計測 52
3-2.試薬リスト 53
3-3.使用機器 54
3-4.実験方法 55
3-4-1.SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価 55
3-4-2.BSA ブロッキングした anti-AFP 固定化基板の抗原抗体反応 55
3-4-3.界面活性剤による SiN 基板への非特異吸着抑制検討 56
3-4-4.抗原抗体反応の繰り返し再現性 56

3-4-5.抗原抗体反応感度評価 56
3-4-6.抗原抗体反応の吸着特性、光学特性評価 56
3-4-7.二次抗体を利用した高感度化検討 57
3-4-8.反応条件の最適化による高感度化検討 58
3-4-8-1.ランニングバッファー組成が抗原抗体反応に与える影響 58
3-4-8-2.塩濃度が抗原抗体反応に与える影響 58
3-4-8-3.pH が抗原抗体反応に与える影響 58
3-4-8-4.反応温度が抗原抗体反応に与える影響 59
3-4-8-5.最適条件における抗原抗体反応感度評価 60
3-4-9.血中タンパク質との交差性試験 60
3-4-10.血清中 AFP の検出 60
3-5.結果と考察 62
3-5-1.SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価 62
3-5-2.BSA ブロッキングした anti-AFP 固定化基板の抗原抗体反応 62
3-5-3.界面活性剤による SiN 基板への非特異吸着抑制検討 65
3-5-4.抗原抗体反応の繰り返し再現性 66
3-5-5.抗原抗体反応感度評価 67
3-5-6.Langmuir 吸着等温線による抗原抗体反応の反応特性評価 68
3-5-7.二次抗体を利用した高感度化検討 73
3-5-8.反応条件の最適化による高感度化検討 75
3-5-8-1.バッファー組成が抗原抗体反応に与える影響 75
3-5-8-2.塩濃度が抗原抗体反応に与える影響 79
3-5-8-3.pH が抗原抗体反応に与える影響 80
3-5-8-4.反応温度が抗原抗体反応に与える影響 81
3-5-8-5.最適条件における抗原抗体反応感度評価 82
3-5-9.血中タンパク質との交差性試験 84
3-5-10.血清中 AFP の検出 85
3-6.結論 88
第４章　RIfS を用いた膜タンパク質 MRP1 に対する抗原抗体反応計測系の構築 89
4-1.ZrO_2 基板、MRP1 発現ベシクルを用いた検出系 89
4-2.試薬リスト 90
4-3.実験方法 90
4-3-1.MI-Affinity 入射光量の設定 90
4-3-2.ZrO_2 基板の特性評価 91
4-3-2-1.ZrO_2 基板の光学特性評価 91
4-3-2-2.ZrO_2 基板の接触角評価 91

4-3-3.MRP1、コントロールベシクルの吸着特性評価 91
4-3-4.膜タンパク質の固定化膜厚の算出 92
4-3-5.MRP1、コントロールベシクルと anti-MRP1 との相互作用計測 93
4-4.結果と考察 93
4-4-1. MI-Affinity 入射光量の設定 93
4-4-2.ZrO_2 基板の特性評価 96
4-4-2-1.ZrO_2 基板の光学特性評価 96
4-4-2-2.ZrO_2 基板の接触角評価 98
4-4-3.MRP1 ベシクル、コントロールベシクルの吸着特性評価 99
4-4-4.膜タンパク質の固定化膜厚の算出 101
4-4-5.MRP1 ベシクル、コントロールベシクルと anti-MRP1 との相互作用計測 103
4-5.結論 106
第５章　結言 107
参考文献 110
業績リスト 114
謝辞 115

第１章　緒論

1-1.バイオセンサ

バイオセンサとは抗体、酵素、微生物、核酸といった生体分子が有する分子認識能を利用して検出対象となる分子を計測するシステムであり、分子認識素子に加えて素子との反応によって発生するシグナルを光・熱・電気といった物理信号に変換して出力することが可能なデバイスの組み合わせから構成されている（Figure 1）[1]。

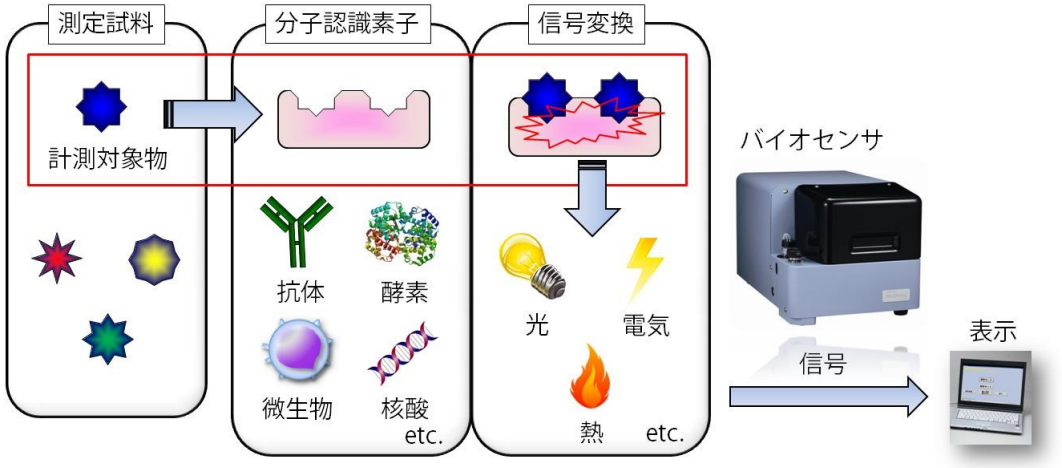


Figure 1 バイオセンサの概念図

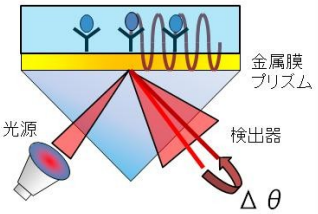
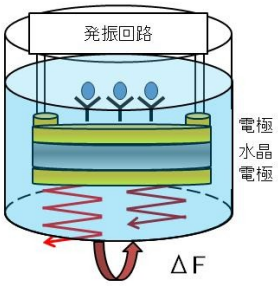
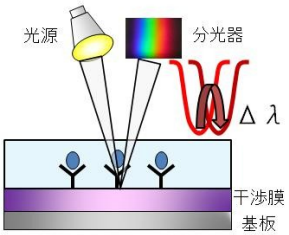
バイオセンサの最初の報告は、1962 年に Clark らによるグルコースオキシダーゼを用いたグルコースの検出である[2]。この場合、分子認識素子には酵素であるグルコースオキシダーゼを、信号変換デバイスにはグルコースとグルコースオキシダーゼとの反応によって生じた酸素を測定する酸素電極のことを指す。そして、半世紀に渡るバイオセンサに関する研究の結果、現在のバイオセンサの実用先として、河川水の汚染度の指標となる BOD（生物化学的酸素要求量）や土壌や水質の検査時に検出対象物質となる硝酸や亜硝酸、アンモニアなどの化学物質を測定する環境分野や、食品中のアルコール、グルコース、乳酸、ペプチドなどを測定する食品分野など広がりを見せつつあるが、いまだにメインの市場を形成するのは血中グルコース濃度の測定に代表される医療分野である。グルコースバイオセンサの成功例を分析すると、以下の要因が考えられる。

・それまで測れていなかった指標の計測が可能
・定量的な計測が可能
・ユーザビリティ（操作の簡便化、小型化、低コスト化の実現）

この中でも、それまで測れなかった指標を計測することが可能という点はセンサにとって最も重要な特徴であり、センサ自体の価値を決めるといっても過言ではない。

本研究では、光の干渉と呼ばれる性質を利用した測定原理、反射干渉分光（reflectometric interference spectroscopy: RIfS）に着目した。RIfS の原理については 1-3.と 1-4.に詳述するが、蛍光色素や放射性同位体、酵素などを用いることなく非標識（ラベルフリー）に分子間相互作用を計測可能な特徴を有する。ラベル化の手間がかからず、低分子などラベル化することによって構造、性質に大きく影響を与えるもの、あるいは膜タンパク質など構造自体が不安定であるものに対しては直接計測が可能であるというのは測定に有利であると言える。ラベルフリーなセンサとして代表的なものに表面プラズモン共鳴（surface plasmon resonance: SPR）、水晶発振子マイクロバランス（quartz crystal microbalance: QCM）が挙げられる。Table 1 に RIfS を含めた各センサの原理、特徴について示した。

Table 1 代表的なラベルフリーセンサの特徴比較（SPR は Kretschmann 配置、RIfS は本研究において利用した構成）

原理	SPR （表面プラズモン共鳴）	QCM （水晶発振子マイクロバランス）	RIfS （反射干渉分光）
概念図			
相互作用 測定原理	金膜表面に付着した物質が 引き起こす共鳴角シフト	電極に付着した物質が 引き起こす共振周波数シフト	干渉膜表面に付着した物質が 引き起こす反射率極小値シフト
特徴	測定値（Δ θ）から密度換算可能、金膜からの距離に応じてシグナル変化	測定値（ΔF）から換算式を用いた質量測定が可能	測定値（Δ λ）から直接物理膜厚や膜の密度の算出が可能

SPR は、ガラス表面上の金属薄膜に対して、裏面側から反射光が全反射となる入射角で光を入射することで、ガラス金属界面上にしみ出るエバネッセント波を利用する。エバネッセント波の波数と一致する入射角、すなわち共鳴角において、その入射角のエネルギーは表面プラズモン波の共鳴に使われるため、反射光強度が減少する。この共鳴角は、金膜表面の誘電体の誘電率の変化に伴い変化するため、共鳴角の変化（Δ θ）を計測することで分子間相互作用を検出出来る仕組みとなっている。SPR を利用したセンシングは 1983 年、Liedberg らのガス検出によって最初の報告がなされ[3]、現在は Biacore (GE Healthcare UK Ltd., Little Chalfont, England）なと呼ばれる Δ θ を基に密度（質量）変化を測定することが可能[4]な装置が販売されている。QCM は水晶切片の両側に取り付けた電極に対して、交流電圧をかけることで発生する圧電効果によって水晶が振動するのを利用して、共振周

波数の変化（Δf）を測定する。Δf は Sauerbrey の式によって[5]、質量変化（Δm）へと変換する事が可能となるため、分子間相互作用によって変化した質量を計測することが可能である。また、質量に加えて、振動の減衰（dissipation)を測定することで粘弾性とよばれる、ものの柔らかさを測ることが出来る QCM-D（Q-sense AB, Gothenburg, Sweden）と呼ばれる装置が販売されている。

SPR、QCM が分子間相互作用をラベルフリーに計測可能であることを説明したが、RIfS はこれらの測定原理とは異なり、Δλが光学的なものの厚み（光学膜厚）を示すため、屈折率などを適宜設定することで、原理的にものの物理的な膜厚（物理膜厚）や密度を計測することが可能である。物理膜厚や密度に関する情報は、特にタンパク質などの生体分子が基板上で取る構造が不確定なものに対して推定する際に威力を発揮する。特に、分子間相互作用と光学膜厚に関する情報を同時に取得することは、生体分子が基板上でどのように反応し、どのように変化するのかを解釈するのに役立つと言える。しかし、これまでの RIfS に関する研究において、分子間相互作用と光学膜厚の同時計測に関する報告というのは存在しない。本研究では、モデルの反応系としてバイオセンサの分子認識素子として広く用いられる抗体を用いて、タンパク質―タンパク質相互作用と光学膜厚の同時計測系の構築を試みた。本章では、RIfS の測定原理である光の干渉についての基本的な解説、干渉を利用したバイオセンサに関する研究の進展について述べた後で、抗原抗体反応計測の対象とした 2 種類のタンパク質の性質について概説する。そして、最後に本研究の意義と目的について述べる。

1-2.光の干渉について

光の干渉は我々が身近に観察することが出来る物理現象である。例えば、水面に浮いた油膜やシャボン玉が色付くのは干渉によるためである。膜の表面で反射した光と裏面で反射した光が干渉して、波長毎に光の強度が変化するため、色が付いたように見えるのである。まず、そもそも何故干渉が起こるかについて述べると、光が波の性質を持つからであり、複数のスリットを用いた Young の干渉実験によって説明することが出来る。

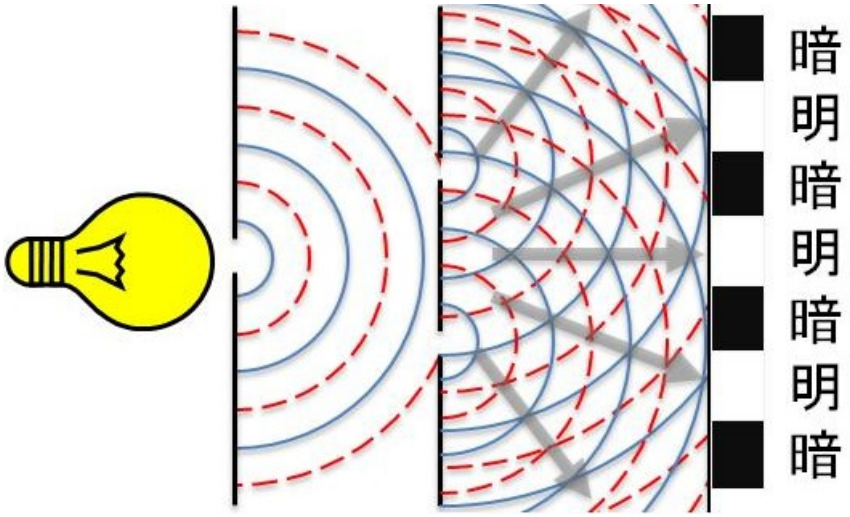


Figure 2 Young の干渉実験（青実線：波の山、赤点線：波の谷、矢印：2 つのスリットから出てくる光の位相が揃っている箇所）

Figure 2 に示した通り、スリットまでの光路差が光の波長λの整数倍になるとき波の山と山（もしくは谷と谷）が重なり合うことで干渉して強め合い、逆に波の山と谷が重なり合う中間では弱め合うことで縞模様ができる。スクリーン上で二つのスリットから等しい距離にある点で最も明るく、その両側に暗い部分、明るい部分、と交互に繰り返される。この Young の実験は、21 世紀の現在においては、光だけでなく全ての物質は「波（電磁波）」であって「粒子」であるという「粒子と波動の二重性（wave-particle duality）」の考えが一般的に広まっているが、17 世紀当時、Isaac Newton の影響により光を「粒子」と考える粒子説が優勢であった状況下においては一石を投じる結果となった。

ここでシャボン玉の色に話を戻すと、シャボン玉における光路差とはシャボン玉の組成が一定だとすると膜厚の差に由来する。シャボン玉の表面で反射する光と、シャボン玉の膜の内側で反射する光を考えてみると、シャボン玉の膜の表面（外側）で反射する光は空気の屈折率を n_a、シャボン玉の屈折率を n_f とおくと、$n_a < n_f$ であるため固定端反射となり、反射の際に位相がπだけずれる。一方、裏面（内側）で反射した光は $n_f < n_a$ のため自由端反射となり、位相は保持されたまま反射する（Figure 3）。

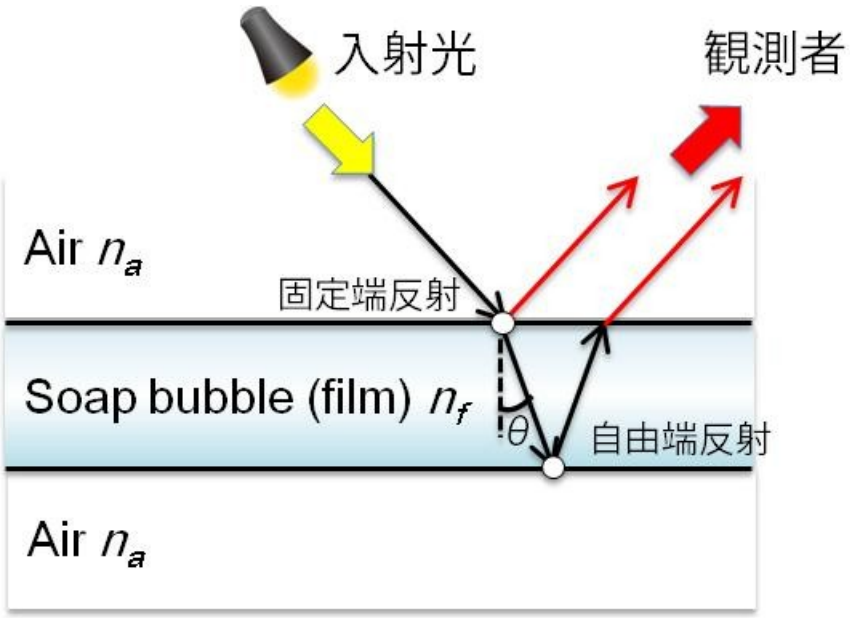


Figure 3 シャボン玉膜における干渉

従って、両者の反射する波の位相が揃う下記式(1)を満たす波長、つまり光路差 $2nd$ が半波長の奇数倍において光は強められる。

$$2n_f d\cos\theta = \left(\frac{2m+1}{2}\right)\lambda$$ (m=0,1,2…、n はシャボン玉の屈折率、d はシャボン玉の膜厚)

(1)

n、m が一定の場合、シャボン玉の膜厚 d に対して、強め合う光の波長 λ は比例関係にある。また、d が可視光の波長を大きく超える場合には、(1)を満たす λ がいくつも存在する。例えば、d = 1 mm、n = 1.45 として、380 nm から 780 nm の白色光を膜に対して垂直方向に照射した時には、(1)を満たす m が約 4000 も存在する。つまり、約 4000 もの波長の光が強め合う計算となり、4000 種類というとほぼ全ての色をカバーしているため、観測者には白色に感じられる。一方、可視光の波長に近い膜厚、例えば、d = 1 μm の場合は、(1)を満たす m は 4 種類（λ = 644, 527, 446, 387 nm)、d = 100 nm の場合は、(1)を満たす m はただ 1 種類であり（λ = 580 nm)、観測者は干渉による色を感じることが出来る。従って、この現象は白色光などの可視光領域に分布を持つ光源に対しては、おおよそ膜厚が 100 nm～1 μm オーダーの領域において成り立つと言える。

1-3.光干渉を利用したセンサに関する研究の進展

先述した通り、光の干渉とは、光が持つ波の性質がもたらす現象であり、特にシャボン玉のような薄膜に対しては、光路長の変化に応じたダイナミックな反射光の特性の変化をもたらす。光路長の変化は膜の厚み自体が変化することだけでなく、膜に対して物質が吸着、あるいは元々膜に付着していた物質が脱離することによっても引き起こされる。そのため、干渉を利用したセンシングへの応用研究が発展を遂げてきた。以下では、干渉の中でも反射干渉に範囲を絞った上で、センサに関する研究の進展について述べる。

反射干渉を利用したセンサの研究は、1930 年代頃から報告されており、Langmuir-Blodgett 膜(LB 膜)の研究としても有名な Langmuir らによるものがさきがけとして知られている[6,7]。クロムメッキをした真鍮板を基板として用いる事で、LB 膜の作製により 37～47 層のステアリン酸バリウムを基板上に展開すると偏光を高入射角で当てるだけで、0.3 nm 以下の厚みの違いによる干渉による色の変化が観測される。LB 膜によるアルブミン層吸着に伴う干渉色を観測することで、タンパク質層に対するベンゼンなどの不揮発性溶媒に対する透過性や LB 膜の表面圧の違いによるタンパク質の吸着膜厚の違いなどを評価している。その後、Adams らにより酸化タンタルをスパッタした基板[8]、Giaever、Laffin によりインジウム-金の合金を蒸着したガラス基板[9]がそれぞれ測定用の基板として利用され、干渉色の違いを利用して抗原抗体反応を肉眼で観察、評価するバイオセンサの研究へと発展を遂げた。その後、1985 年に Sandström らが、一酸化ケイ素（SiO）膜、更にその上には空気酸化により自発的に形成された 2-3 nm の二酸化ケイ素（SiO_2）膜を有したシリコンウエハを基板に用いて、ウシ血清アルブミン(BSA)と抗 BSA 抗体の抗原抗体反応に伴う干渉色の変化を測定している[10]。SiO_2 表面に対しては、dichlorodimethylsilane ($(CH_3)_2$ $SiCl_2$)により表面を疎水化している。この測定は強い干渉色が得られることを利用することで検出を可能としている。その際に、干渉色の変化に対する感度を向上させるために、誘電体膜の屈折率 n_fを、誘電体膜を設ける基板の屈折率 n_sと以下の (2)の関係を満たしていることが干渉色の変化を鋭敏に観察する上で重要であることを述べている[10]。

$$n_f = \sqrt{n_s} \tag{2}$$

つまり、n_sが 2.10 程度の SiO を選択すると大気中で自発的に形成される、n_fが $n_f \fallingdotseq \sqrt{n_s}$ となる 1.45 程度の SiO_2 がそれぞれ基板、干渉を担う膜の役割を果たしていると言える（基板のシリコンは裏面からの反射防止を目的として選択された)。この屈折率を適当に設定することで、特定の波長における反射を防止するという考えは、現在のパソコンや携帯電話などのディスプレイにおける反射防止膜における基本的な考えと同様である。

上記の報告例は全て大気中かつエンドポイント測定の評価であり、干渉色の評価は色の

濃淡などの定性的な評価が主流であって、定量的な概念は存在していなかった。そのような中、1993 年に Gauglitz グループはガラス基板の上に化学気相成長（chemical vapor deposition: CVD）による蒸着により SiO_2 膜を形成し、緩衝液を連続でフローし、rabbit IgG と goat anti-rabbit IgG との抗原抗体反応が起こる様子を報告している [11]。この研究において特徴的なのは、時間分解が可能なダイオードアレイの分光計を用いることでリアルタイム測定を可能としたこと、また、これまで干渉色の変化という定性的な測定方法に対して、反応量を厚み（thickness)の増加量として表す定量的な測定方法を確立したことである。2002 年には、干渉層の上にプラスチックの格子を貼り付け、検出器に CCD を用いることで 96 あるいは 384 個のウェルを形成したシステムによる抗原抗体反応を報告している [12]。水 10%グリセリン溶液との間のシグナル差（Δoptical thickness）を元に、各 well 間のばらつきを正規化することで、thrombin と thrombin inhibitor との間に働く特異的な結合を再現性良く評価することを可能とした。Gauglitz らの検出方式は、光学的に透明なガラス基板である事を利用して、基板の裏面から光源を当て、基板と干渉層（SiO_2）との界面における干渉光のうち裏面側への反射光成分の検出を行っている。この測定方式は、基板上面に存在するフローセル部材や測定試料の反射や散乱、吸収といった影響を受けにくいといった利点があると考えられる。一方、入射光に対する反射光の割合である反射率 R は、光が垂直入射の場合、以下の(3)に表される式で表すことが出来 [13]、その大きさは基板の屈折率 n_s と干渉層の屈折率 n_f の差に依存する。つまり、両者の屈折率差が小さいほど反射は微弱なものとなる。Gauglitz の系においては基板にガラス、干渉層として SiO_2 が用いられており、屈折率は論文中に明記されていないものの、ガラスが 1.6、SiO_2 が 1.45 と仮定すると、反射率は 0.0024 と、反射光の強度は入射光の 1%以下でしかないため、光学的ノイズによる測定への影響は受けやすいと推測される。

$$R = \frac{\left(n_s - n_f\right)^2}{\left(n_s + n_f\right)^2} \tag{3}$$

Ünlü らは、interferometric reflectance imaging sensor (IRIS)という名の、シリコンウエハ上に SiO_2 を蒸着した基板を用いて、Gauglitz らと同様、光路長の変化を測定の指標とする定量評価に加えて、CCD カメラによるイメージング機能を用いることで、面全体で起こる相互作用を特定波長における干渉による反射率の違いを評価する研究について報告している [14,15]。基板にガラス基板ではなくシリコンウエハを用いることで、干渉層との屈折率差が大きくなる。シリコンウエハ、SiO_2 の屈折率をそれぞれ 4.0、1.45 と仮定すると反射率は 0.22 となり、先程の系の約 100 倍の反射率が得られるため、光学的ノイズに対して影響を受けづらいと推測される。

このように反射干渉を用いたセンサの研究はこの数十年間の間に大きな発展を遂げてき

た。膜厚や屈折率変化に伴う光路差の変化を単に干渉色の色味の変化と捉える定性的な測定に始まり、光路長の変化として定量が行えるようになり、また、大気中だけでなく溶液中での測定も可能となることで、ラベルフリーの特徴を活かしたバイオセンサへの応用に向けた研究が発展してきているのが分かる。

1-4.本研究における反射干渉分光システム

本研究で用いた RIfS システムについて説明する。基板としては、干渉層として窒化シリコン（2-5-1.にて後述する基板の元素分析より、結晶構造を有するセラミックとして知られている Si_3N_4 ではなく、Si_xN_y となっていることから、本論文では SiN と呼ぶ。）、あるいは酸化ジルコニウム（ZrO_2）をシリコンウエハ上に蒸着した基板を用いた。本システムの特徴としては、Figure 4 に示した通り、基板上面からハロゲンランプにより入射した白色光に対して、干渉層の表面で反射した光と干渉層を透過してシリコンウエハ上で反射した光との合波が干渉しながら全反射光成分として検出器である分光器に入る。ここで、シリコンは光学特性として吸収を持ち、なおかつ厚みが 0.725 mm とハロゲンランプの出力する波長（400 nm～750 nm）に対して十分厚いため、シリコンウエハからの裏面反射に関してはほぼ無視出来るものとする。事前に測定した光学特性が既知のリファレンスとなる基板を測定することで算出された入射光に対する反射光の比、つまり反射率を波長毎に算出し、極小値を計測する仕組みとなっている。

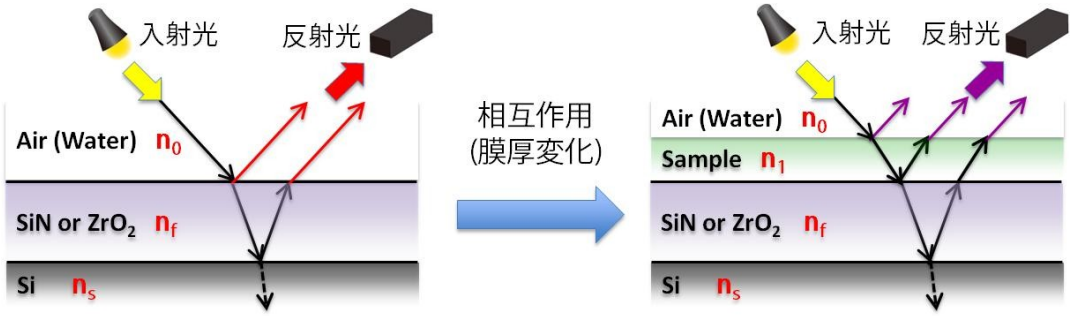


Figure 4 本研究における RIfS の測定原理（実際の光学系は基板に対して垂直入射）

例えば基板上に固定化した分子認識素子と基質との相互作用に伴い、干渉膜上の膜厚に変化が見られると、反射スペクトルにも変化が見られ、反射率極小値が長波長側にシフトする(Figure 5)。このシフト量に当たる $\Delta\lambda$ から相互作用を判定する。

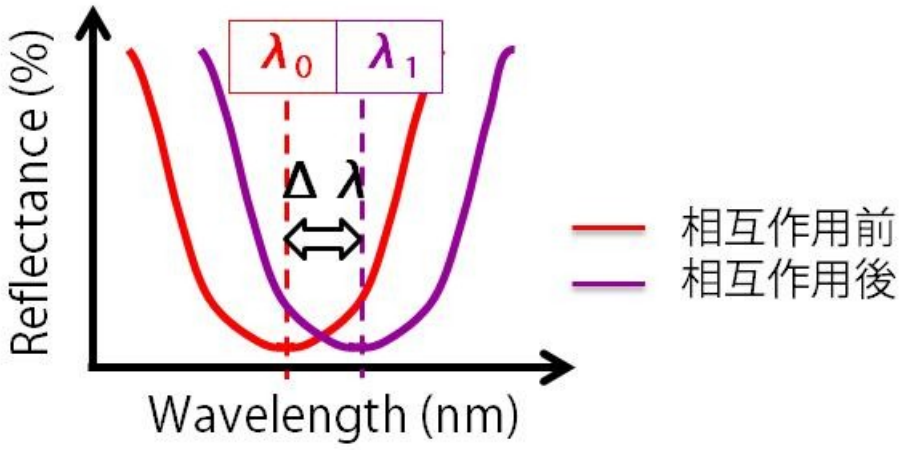


Figure 5　光学膜厚変化に伴う反射スペクトル変化（Δλ：相互作用前（λ_0）と相互作用後（λ_1）の差）

Δλと実際の膜厚の変化の関係性については、本論で述べることとして、ここでは本 RIfS システムにおいて重要な点になってくる、反射率の極小値をいかに検出しやすくするかという工夫について述べる。本測定で必要となる点は、測定波長領域内においてただ 1 つの極小値を取ること、また、反射率の極小値付近のスペクトル形状をなるべくシャープな形にすることである。

1-2.で述べたシャボン玉の例で説明した式(1)を満たすλにおいて干渉により反射が弱められる。ここで、シャボン玉の時との違いは、シャボン玉では、$n_f > n_a$と膜の屈折率が干渉するもう 1 つの界面である空気よりも高いため、自由端反射となる事で反射の際の位相が保持されるため、強め合う条件として式(1)が出てきたが、本研究における反射干渉測定基板の場合は SiN や ZrO_2 よりも高屈折率なシリコンウエハを用いているため、$n_f < n_s$となり、位相がπずれる固定端反射となる事で弱め合う条件として算出された。ここで、式(1)を変形した式(1)'から、膜の厚さ $\frac{\lambda}{4}$ の奇数倍の時、反射率は極小値になる。これは膜の厚さから得られる結論である。

$$nd = \left(\frac{2m+1}{4}\right)\lambda \qquad (m=0,1,2\cdots) \qquad (1)'$$

$m \geq 1$の薄膜においても、$\frac{\lambda}{4}$ の厚さを持つ薄膜同様に、波長λで反射率は極小値となる。しかし、$m \geq 1$のとき、波長に対する位相厚さの変化は$m = 0$の時よりも速く色分散を生じ

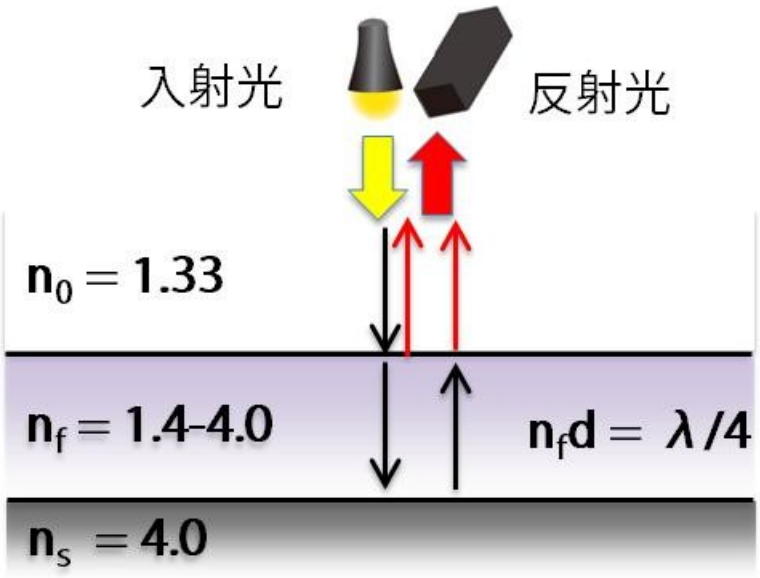
るため[13]、本 RIfS システムでは$\frac{\lambda}{4}$の膜厚を採用している。

一方、反射量という観点から、膜、基板ともに吸収がないと仮定した時に反射率を完全に 0 まで降下させる膜の屈折率条件を求めることが出来る。反射率の極値は式(4)より求められるため[13]、$n_f = \sqrt{n_0 n_s}$ の時に反射率を 0 とする事が出来る。

$$\text{反射率の極値 } R = \left(\frac{n_0 - \frac{{n_f}^2}{n_s}}{n_0 + \frac{{n_f}^2}{n_s}} \right)^2 \qquad (4)$$

ここで、シミュレーションソフトウェア Essential Macleod (Thin Film Center Inc., AZ, USA)を用いて、400～800 nm における干渉層の屈折率における干渉の効果について検証した。Figure 6 に示した通り、膜の設計としては基板にシリコン(n_s = 4.0)、媒質として水(n_0 = 1.33)、干渉膜の屈折率 n_fとしては 1.4-4.0 まで 0.1 刻みに変化させた。ただし、ここではモデルを簡略化するために、実際には吸収係数 k や波長分散は考えないものとする。ここで、反射率の極小値は$n_f d = \frac{\lambda}{4}$においてλ = 600 nm を満たすように、つまり$n_f d = 150$となるように膜厚を変更している。

(a)



(b)

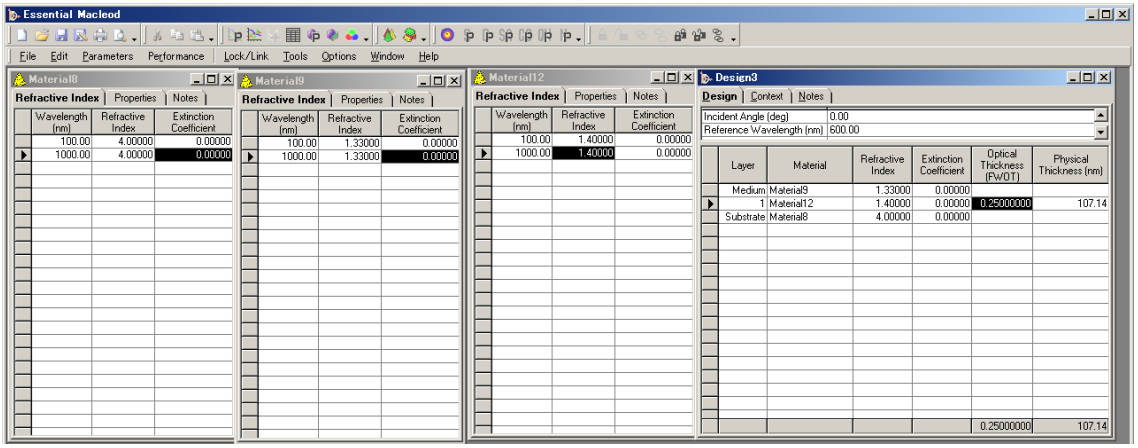
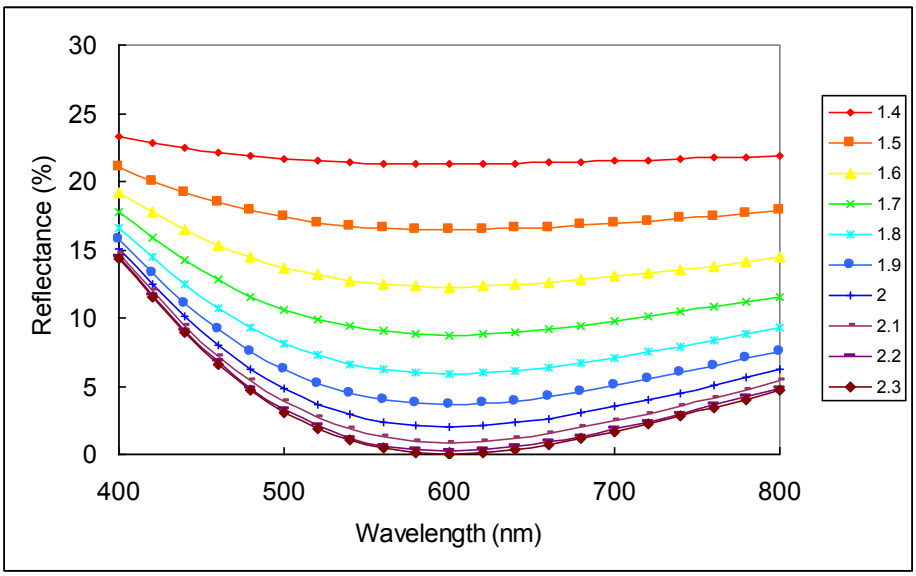


Figure 6 (a) Essential Macleod でシミュレーションを実施した膜モデル（λ=600 nm、入射角=0°、基板の屈折率をシリコン相当の 4.0, 媒質の屈折率を水相当の 1.33 として、干渉の役割を担う薄膜の屈折率を 1.4～4.0 まで 0.1 刻みで変化）(b) Essential Macleod のソフト使用画面（Material で層として使用する物質の光学定数を、Design で各層の役割を規定）

400～800 nm において 20 nm 間隔でシミュレーション結果について、n_f = 1.4-2.3 (Figure 7a)、n_f = 2.3-4.0 (Figure 7b)と場合わけして示した。Figure 7a を見ると、n_f = 1.4-2.3 において n_fが増加するに従って、600 nm における反射率が単調的に減少していくのが分かった。また、Figure 7b を見ると、n_f = 2.3-4.0 においては、n_fが増加するに従って、600 nm における反射率が単調的に増加していくのが分かった。これは、n_0 = 1.33、n_f = 4.0 の時、反射率を 0 とする条件 $n_f = \sqrt{n_0 n_s}$ ≒2.31 となることからも説明がつく。従って、本研究における反射干渉分光システムに用いるシリコンウエハ上の干渉膜の屈折率としては、2.3 程度の屈折率を有していることが望ましい。ちなみに、この反射干渉を大気中でも計測したいケースが存在するが、その場合は n_0 = 1.00、n_f = 4.0 を代入して 2.0 が得られる。反射率の極小値を計測する上では、値が 0 に近いほど、曲線が急峻になり検出がしやすくなることから、本 RIfS システムにおいては、干渉膜の屈折率 n_fが 2.0-2.5 程度の時がより計測に適しているという事が言える。

(a)



(b)

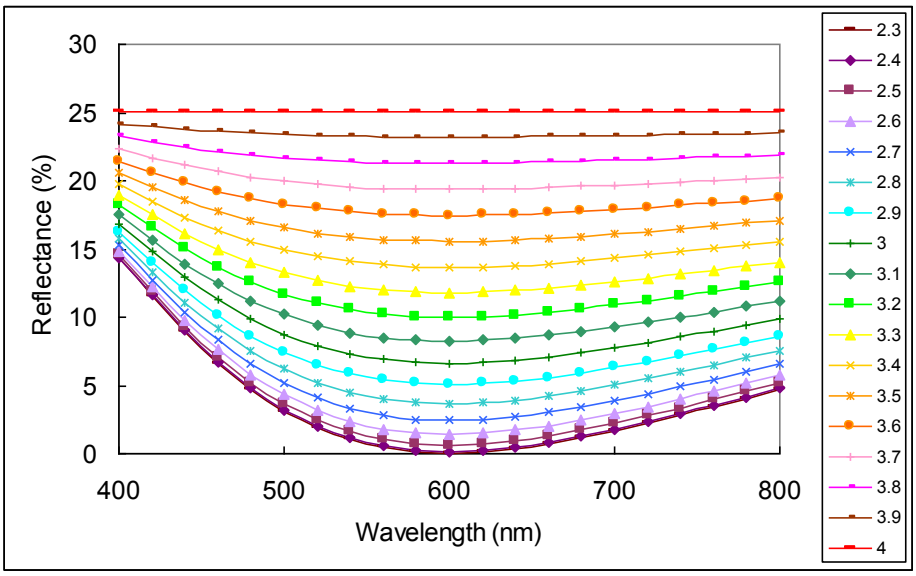


Figure 7 Figure 6a の膜モデルにおける反射率スペクトル（(a) n_f = 1.4～2.3、(b) n_f = 2.3～4.0)）

Fujimura ら[16]や Choi ら[17,18]は、この原理を採用してシリコンウエハ上に成膜した TiO_2 や SiN を基板として利用した RIfS に関するバイオセンサの研究について報告している。本研究においては、分子間相互作用と光学膜厚との関連について明らかにするための原理検証機として MI-Affinity (Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)を使用した（Figure 8)。SiN または ZrO_2 を蒸着したシリコンウエハを基板として、polydimethylsiloxane (PDMS)製のフローセルをマイクロ流路の形成に用いた。マイクロ流路の体積は 4 µL（16 mm×2.5 mm ×0.1 mm）である。送液源として Figure 8 ではシリンジポンプを載せたが、一部はオートサンプラーを用いて測定を実施した。Personal computer (PC)内のソフトウェアによりデータ取得および解析を行う。測定の対象は、前述の通り反射率の極小値であり、約 1 秒に 1 回測定を行う事で、リアルタイムな測定を可能にしている。また、基板設置箇所の下にはペルチェ素子が設置されており、10℃-40℃までの温度調節機能を備えている。また、Figure 9 に示す通り、反射率極小値の波長変化をリアルタイムに測定することにより、連続的な波長変化を捉えることを可能にしている。

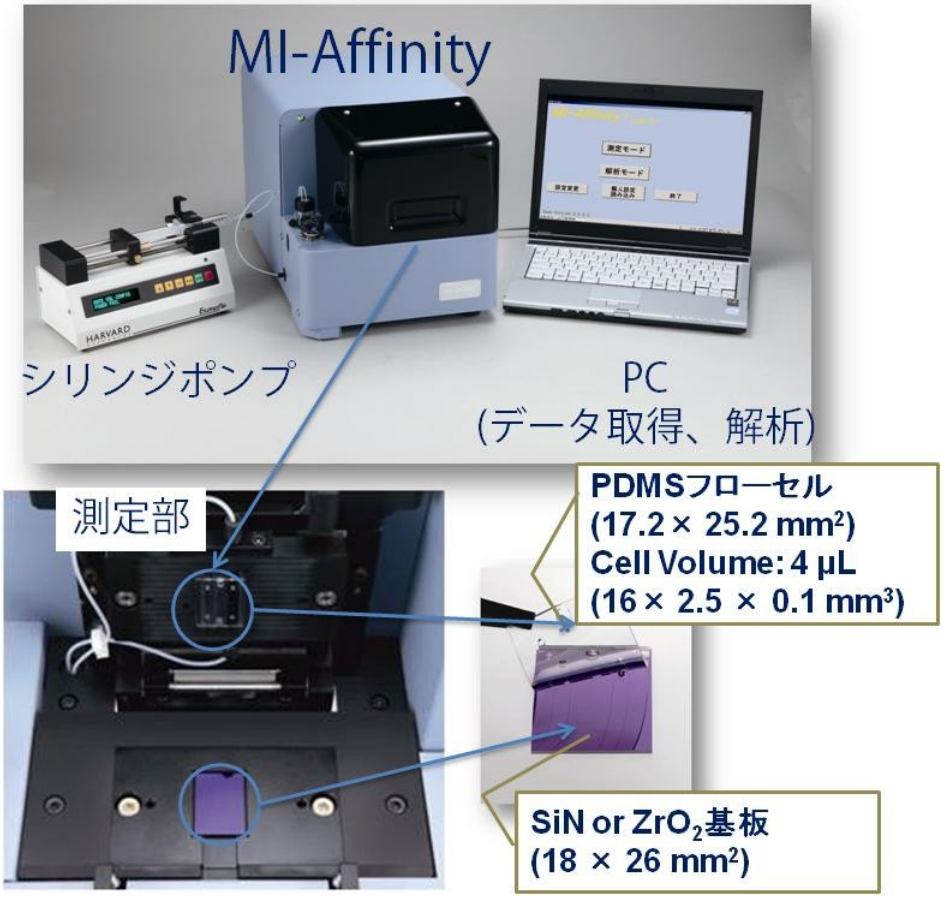


Figure 8 MI-Affinity の外観図

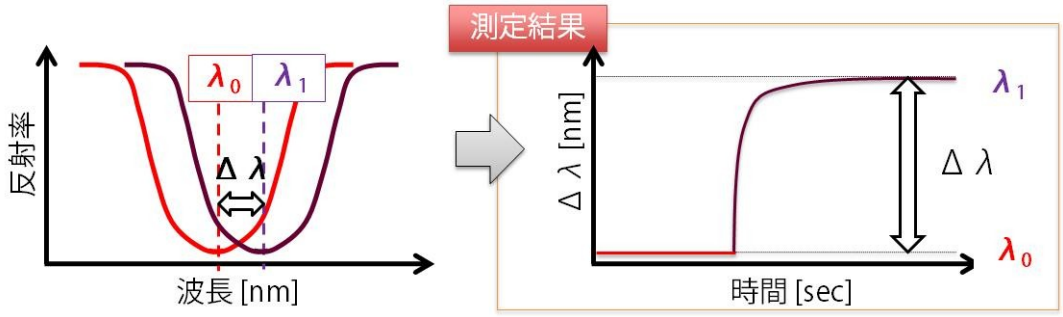


Figure 9 MI-Affinity の測定概念図（約 1 秒に 1 回測定を行う事で、分子間相互作用に伴う光学膜厚変化をリアルタイムに測定可能）

1-5.本研究における計測対象物

本研究において RIfS の計測ターゲットとした 2 種類の対象物、alpha-fetoprotein (AFP)と、multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)について概説する。いずれもヒトの体内に存在するタンパク質であるが、前者は血液中に含まれるタンパク質、後者は細胞中に存在する膜タンパク質と、存在している形態としては大きく異なるものの、ヒトの生体内において重要な意味合いを果たしており、計測の意義は大きい。

1-5-1.Alpha-fetoprotein (AFP)

AFP はバイオマーカーと呼ばれる、ある疾病の存在や進行度を濃度に反映し、血液やその他の体液中もしくは組織中に存在しているタンパク質や糖、核酸などの生体分子の一種である。バイオマーカーを測定することは、患者にとって早期治療や適切な治療に伴う効果の判定、また再発リスクの管理を行う上で重要な指標となる [19,20]。AFP は、血清中に含まれるバイオマーカーであり、肝細胞がんの判定において世界中で用いられている [21]。AFP は、1956 年に Bergstrand と Czar によってヒト臍帯血から 65-70 kDa の血清タンパク質として濾紙電気泳動法により発見された [22]。1963 年には、Abelev らにより腹水肝癌マウスの血中に胎児性タンパク質が出現することが確認され [23]、Tatarinov らによってヒト肝細胞がん患者の血清中にも AFP が増加することが示されてから [24]、AFP に関する研究は急速に進展し、肝細胞がんの診療には欠かすことの出来ないバイオマーカーであることが判明した [25,26]。AFP の発見は、科学的な根拠を持ったバイオマーカー研究の出発点としても重要な意味を持つ [27]。AFP は癌胎児性の血清糖タンパク質であり、生後間もない時点では一時的に高発現するものの、生後数カ月すると急激に発現量は減少し、正常であれば 10 ng/mL 以下になる [28]。血清中に一定量以上存在すると肝細胞癌の疑いがあるとみなされ、診断のために用いられる指標（カットオフ値）としては 20 ng/mL が一般的に用いられている [29,30]。

AFP を検出する方法としては、放射免疫測定（radioimmunoassay: RIA) [31]、酵素免疫測定（enzyme immunoassay: EIA) [32] を中心とした抗体を用いる免疫学的手法が挙げられる。今日における臨床の現場では放射性物質の取り扱いの難しさから、後者の手法がより一般

的となっている。これらの免疫学的手法には、競合法と非競合法が存在する。競合法は、予め放射性同位元素、あるいは酵素でラベルした既知量の抗原とそれに対する抗体を混ぜ、そこに標識していない目的の抗原を含む試料を加える。抗体に結合していない標識抗原の量から試料中の抗原量を見積もるというものである。また、非競合法はサンドイッチ法とも呼ばれ、抗原に対して抗体を反応させた後で、さらに放射性同位元素、あるいは酵素で標識した抗体と反応させることで高感度な検出を可能にする。この場合、最初に反応させた抗体と酵素標識した抗体は抗原が分子内に同一の抗原認識部位を複数持たない限り、異なるものを使用する必要がある。これらの測定法では抗体に対して標識が必要であり、標識自体の手間や標識におけるばらつき、標識保存安定性のなどが再現性の低下が課題として挙げられる。このような背景の中、表面プラズモン共鳴 (SPR: surface plasmon resonance) [33]や水晶発振子マイクロバランス(QCM: quartz crystal microbalance) [34,35]を利用して AFP をラベルフリーに抗原抗体反応によって検出する研究などが報告されている。

1-5-2.Multidrug resistance-associated protein 1 (MRP1)

MRP1 は膜タンパク質と呼ばれるタンパク質の一種である。膜タンパク質とは細胞や細胞小器官の外界と境界を隔てる生体膜上、または生体膜中に存在するタンパク質を指し、生体膜に見られる特異的な機能の多くは膜タンパク質が担っている。そのため、膜タンパク質の量や種類は生体膜によって大きく変わる。膜タンパク質は、細胞の内外の物質輸送・排出に重要な役割を果たし、薬剤応答、エネルギー変換、免疫反応など生理的な機能に大きな影響を与える [36]。生物におけるゲノム全体の約 20-30%は膜タンパク質をコードしていると言われており [37,38]、膜タンパク質の重要性は、タンパク質をターゲットにした全医薬品の 2/3 を占めるという事実にも反映されている [39-41]。薬剤が膜タンパク質にどのように取り込まれ、排出されるかについて、その機構を解明することは創薬開発において薬効や副作用などをスクリーニング評価していく上で非常に重要なテーマとなっている。MRP1 は多剤耐性を獲得したヒト小細胞肺がん細胞より、1992 年に Cole らのグループによりクローニングされたタンパク質である [42]。17 回の膜貫通ドメインと 2 箇所のアデノシン三リン酸（ATP）結合領域を有する分子量約 180kDa の ABC (ATP-binding casette)タンパク質であり(Figure 10)、ヒトの正常組織においては、肝臓をはじめ広範に発現していることが知られており、様々な腫瘍組織や腫瘍細胞において発現が認められている [43]。特に癌細胞においてはアントラサイクリン、エトポシド、ビンカアルカノイドなどの抗がん剤を ATP 依存的能動輸送により排出する機能を有しており [44]、抗癌剤に対する多剤耐性の原因タンパク質としても認知されているため、他の ABC トランスポーターとともに創薬開発の重要なターゲットとなっている。

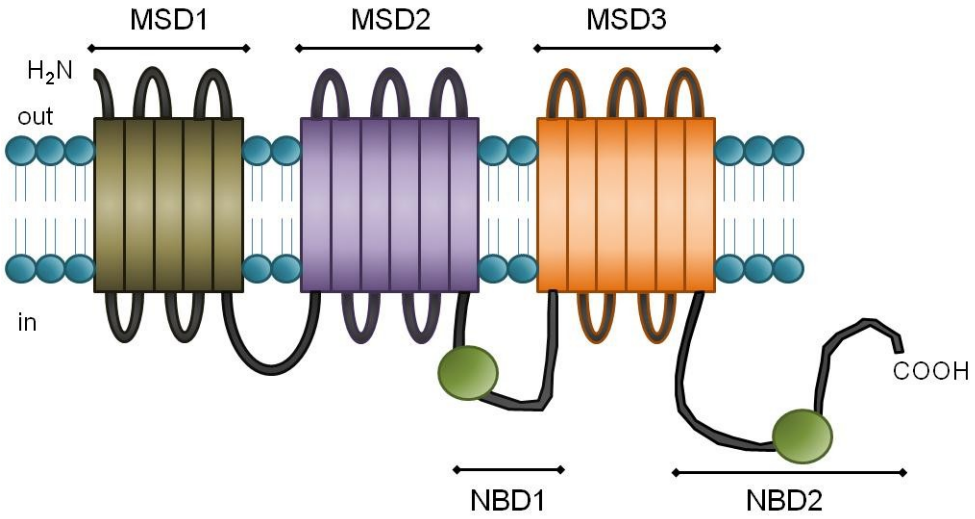


Figure 10 17 回の膜貫通ドメインと 2 箇所の ATP 結合領域を有する分子量約 180kDa の膜タンパク質 MRP1 の topology (MSD: membrane spanning domain, NBD: nucleotide binding domain)

1-6.本研究の目的と意義

本研究は、基本原理として光の干渉を利用したラベルフリー計測が可能な RIfS に着目して、これまでの研究において困難であった分子間相互作用と光学膜厚の同時計測系の構築を行うことを目的とした検討を実施した。モデルの反応系としてはバイオセンサの分子認識素子として広く用いられる抗体による抗原抗体反応をモチーフとした。

ターゲットとした最初の抗原は AFP である。AFP は 1-5-1.で述べた通り、肝細胞がんの診断には欠かすことの出来ないバイオマーカーである。肝臓部位に発生するがんは、日本国内で見ると部位別のがん死亡数として 2011 年では年間約 32,000 例となっており、これは肺（70,000 例）、胃（50,000 例）、大腸（46,000 例）に次いで第 4 位にあたる [53]。また、5 年相対生存率と呼ばれる、日本人全体の 5 年間の生存率に対し、がん患者における 5 年間の生存率の割合を指す指標によると、2003 年から 2005 年の調査では、がん全体では 58.6%であるのに対して、肝がんは 27.9%となっており、部位別の中でも膵臓（7.0%）、胆のう・胆管（21.1%）に次いで低い生存率となっており [54]、AFP を用いた肝細胞がんの診断は臨床の現場において欠かせないものとなっている。

そこで本研究では、安価な SiN を蒸着したシリコンウエハを基板に用いて、分子間相互作用の観点から AFP を抗原抗体反応によって、診断に用いられるカットオフ値: 20 ng/mL 以下で検出することが可能な計測系の確立を目的とした。それに加えて、基板上の光学特性評価が行える RIfS の特徴を活かして、AFP が抗原抗体反応によって不均一な単層を形成することを想定して、物理膜厚や屈折率を既知の値で一定と仮定した時に、溶媒を含む AFP の層全体が占める体積における AFP の体積の割合となる占有率の算出を試みた。Δλのみの評価の場合、反応中または反応後における基板上で何が起こっているのかを推定する事は不可能であるが、占有率の計算結果は、反応後の基板への結合そのものを表しているため、基板上に結合した後の状態を評価することが可能となる。このような情報は、SPR や QCM では算出することが困難なものであり、生体膜の評価など幅広い応用展開が見込める。

ターゲットとしたもう 1 つの抗原は MRP1 である。ABC トランストランスポーターの 1 つである MRP1 は細胞内にもたらされた種々の抗がん剤を ATP エネルギー依存的に細胞外に排出することによって抗がん剤耐性を示す。従って、これら薬剤耐性に関するトランスポーターの反応性を調べることは、抗がん剤耐性のメカニズムに関する研究や抗がん剤の開発にとって必要不可欠であり、安定に評価出来るシステムが求められている。膜タンパク質の評価手法の中で、生体膜により近い構造や物性を持つモデルシステムを平面基板上で作製しようという研究が近年活性化している。基板上に固定化された脂質二重層は、脂質やタンパク質の拡散、ドメイン形成やイオン輸送膜、リガンド―レセプター相互作用やシグナル伝達に代表される細胞膜のダイナミクスにおける様々な研究に有用であることが証明されている。平面基板上の膜タンパク質評価のさきがけとなった McConnell らは、細胞傷害性 T リンパ球の二次免疫応答を評価する際、ベシクルフュージョン（膜融合）による脂質二重層のガラス基板上への展開プロセスを開発した [45]。それ以後、ガラス、SiO_2 を

中心として、マイカ、シリコン、金属膜やポリマーなど、多くの表面が脂質二重層を支持する表面として広く研究されている[46-49]。基板上に直接固定する固定化平面膜は、固体に直接支持されているため、他の形態の人工モデル膜（リポソームや black lipid membrane: BLM）と比較して機械的安定性が高いほか、様々な界面分析手法（電気化学測定、SPR、QCM、原子間力顕微鏡（atomic force microscopy: AFM）を活用し膜構造や物性を超高感度に評価できるという特徴を有している。また、微細加工技術でパターン化・集積されたモデル膜を構築することが可能である[50,51]。このような特徴から固定化平面膜はデバイス化に適したモデル膜システムであり、産業応用に向けて大きなポテンシャルを秘めていると言える。しかし、生体膜は非常に複雑かつ精巧なシステムであるために、脂質二重膜の固定化方法については未だに確立されているとは言い難い。従来の方法では、例えば固体表面の疎水性物質による汚染状態などの影響により十分な親水性を発揮していないことで、リン脂質の疎水部が基板に配向するなどして二重膜がきれいに整列されない恐れがある[52]。

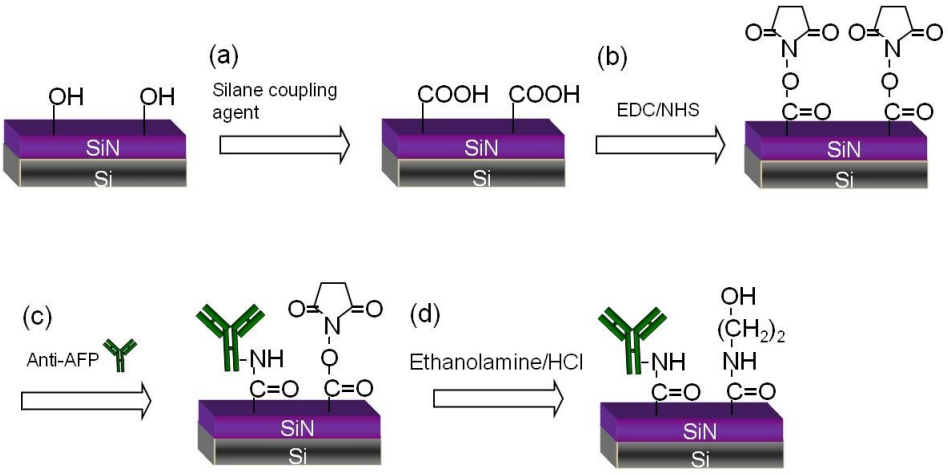
そこで本研究では、その光学特性から RIfS の干渉膜として利用することが可能な ZrO_2 基板に着目し、膜タンパク質に含まれるリン酸と基板表面のジルコニウムとの間に働く配位結合を利用した膜タンパク質の新規固定化方法の構築、更には、固定化した膜タンパク質を利用した抗原抗体反応のラベルフリー計測系を確立することを目的とした。また、基板上の光学特性が行える RIfS の特徴を活かして、固定化した膜タンパク質の物理膜厚の算出を試みた。膜タンパク質の固定化を物理膜厚という指標で計測することは、通常 SPR や QCM では困難であり、物理膜厚の把握によって基板上への展開プロセスの推定が可能になることから、特に一定の厚みを有するサンプル測定に関してその物理膜厚を推定する際に意味を持つ。そして、膜タンパク質の固定化から抗原抗体反応までのプロセス全てを基板に対するインジェクション（注入）操作のみによって達成することで、膜の光学特性評価を含めて RIfS を簡便な膜タンパク質の評価系システムへと応用することが期待出来る。

第２章　肝細胞がんマーカーAFP 抗原抗体反応計測系の構築に向けた基板作製

2-1.抗体固定化基板の作製

本章では AFP を検出するための抗 AFP 抗体(anti-AFP)固定化基板の作製について述べる。まず、SiN 成膜シリコン基板（以後、SiN 基板と呼ぶ。）の特性を把握した後に、SiN 基板に対してシランカップリング剤によりカルボキシル基の導入について検討した。カルボキシル基の修飾を各種分析手法により評価して最適な修飾方法を選択した後に、カルボキシル基を活性エステル化することで、anti-AFP との共有結合的な固定化を試みた（Scheme 1）。

Scheme 1 AFP 検出基板の作製スキーム((a)シランカップリング剤によるカルボキシル基の導入、(b)NHS/EDC によるカルボキシル基の活性エステル化、(c)アミドカップリングによる anti-AFP の固定化、(d)エタノールアミンによる未反応活性エステルのクエンチング)



2-2.試薬リスト

Reagent	Manufacturer	Catalog No.	Notes (Grade)
Acetic acid	Nacalai Tesque, Inc.	00222-55	スペクトル用特製試薬
2-Aminoethanol (Ethanolamine)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	019-12465	和光一級
Anti-AFP antibody (clone: 1D5)	Mikuri Immunology Laboratory, Inc.	-	-
Carboxysilanetriol,sodium salt, 25% in water	Gelest, Inc.	SIC2263.0	-
Ethanol (EtOH)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	051-00476	特級
1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide (EDC)	Dojindo Laboratories	348-03631	-
Hydrochloric acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	083-01095	容量分析用 (1 mol/l)
N-Hydroxysuccinimide (NHS)	Thermo Fisher Scientific Inc.	24500	-
2-(*N*-Molpholino) ethanesulfonic acid (MES)	Nacalai Tesque, Inc.	21623-26	-
2-Propanol (IPA)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	168-21675	分子生物学用
Sodium hydroxide	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	192-02175	容量分析用 (1 mol/l)
Triethoxysilylpropylmaleamic acid	Gelest, Inc.	SIT8189.8	-
N-(Trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid, trisodium salt, 45% in water	Gelest, Inc.	SIT8402.0	-

2-3.使用機器

反射干渉分光法（RIfS）

シランカップリング剤修飾前後における SiN 基板の反射率極小値波長（以後、基準波長と呼ぶ。）の測定は RIfS (MI-Affinity, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。基板を MI-Affinity にセットして、フローセルはセットせずに基板の基準波長を大気下で直接測定した。RIfS の評価方法については Figure 11 に概念図を示した。

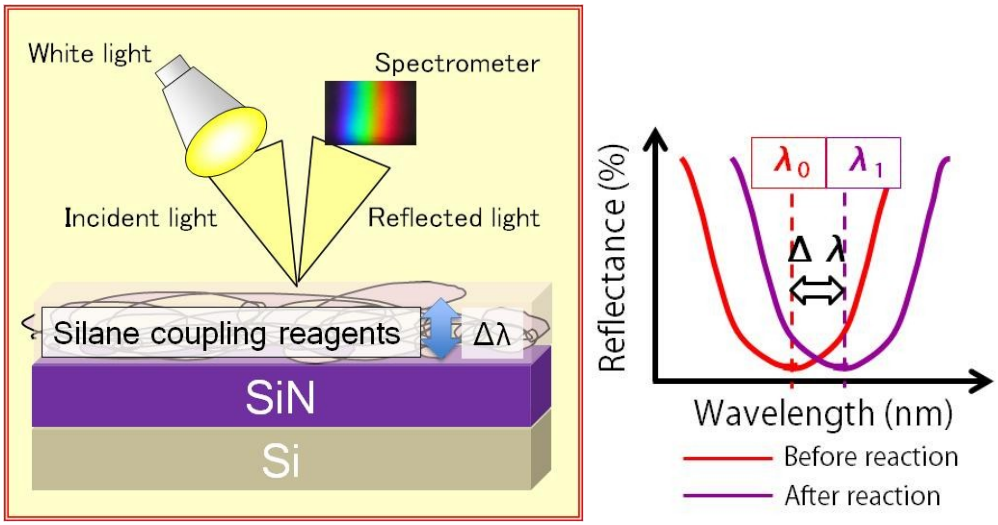


Figure 11 シランカップリング剤修飾の RIfS 評価概念図

原子間力顕微鏡（atomic force microscopy: AFM)

シランカップリング剤修飾前後の表面粗さに関する測定は、AFM（SPA-400, Seiko Instruments, Inc., Chiba, Japan)を用いて行った。測定は全てダイナミックフォースモード(DFM)によって大気中で行った。カンチレバーは、背面にアルミニウム蒸着された共振周波数 118 kHz, ばね定数 9 N/m の SI-DF 20 を用いた。

エリプソメトリー

シランカップリング剤修飾後の基板上に存在する膜厚の評価は、キセノンランプ、ハロゲンランプを備えたエリプソメータ(V-VASE, J.A.Woollam Co., Inc., NE, USA)を用いて行った。基板への入射角はシリコンウエハに対しては 70°、75°、80°、SiN 基板に対しては 65°、70°、75°とした。シリコンウエハの光学定数算出には V-VASE ソフトウェア内の Si.mat model を、SiN、シランカップリング剤の光学定数算出には同ソフトウェア内の Cauchy model を用いた。

X 線光電子分光法（X-ray photoelectron spectroscopy: XPS)

SiN 基板の表面元素分析は、XPS（Quantera SXM, ULVAC PHI, Inc., Kanagawa, Japan)を用いて行った。基板に対する射出角（試料表面と X 線検出器のなす角度）は 45°とし、X 線源には AlKα線(1486.6 eV)を使用した。測定時の真空度は 3.0×10^{-8} Torr であった。また、depth profile の際のスパッタには Ar イオンを用いた。結合エネルギーの基準には C (284.8 eV)を用いた。

但し、2-5-2.のプラズマ処理 SiN 基板を評価する際には、ESCA-850（Shimadzu Corp., Kyoto, Japan）を用いた。基板に対する射出角（試料表面と X 線検出器のなす角度）は 45°とし、X 線源には Mg（1253.6 eV）を用いた。測定時の真空度は 7.5×10^{-9}～3.8×10^{-8} Torr であった。結合エネルギーの基準には Au(84.0 eV)を用いた。

プラズマエッチング

基板の表面処理は、プラズマエッチング装置（SEDE-GE, Meiwafosis Co., Ltd., Tokyo, Japan)を用いて行った。プラズマ源としては大気を用いて、圧力を 10 Pa になるように手動でポンプによる減圧の調整をしながらエッチングを実施した。プラズマ時の電流は 3.5～6 mA であった。

2-4.実験方法

2-4-1.SiN 基板元素分析

XPS の depth profile による Bare（無修飾）の SiN 基板(膜厚:65 nm, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)の深さ方向の元素分析を行った。基板は EtOH に 20 分間浸漬させた後、milliQ 水で洗浄後、ブロアーにより基板表面の水滴を除去して、室温、overnight で乾燥させたものを用いた。シリコンが検出されるまでアルゴンイオンによるスパッタリングを行った。加速電圧は 500V とした。

2-4-2.SiN 基板に対するプラズマ処理の影響

SiN 基板に対して、プラズマエッチング装置を用いて、15 秒から 300 秒の間プラズマ処理を行った。プラズマを照射後、エリプソメトリーを用いて SiN 膜厚の測定を実施した。また、SiN に対してプラズマによる効果を比較するために 18 mm×26 mm×0.725 mm にダイシングしたシリコンウエハ（e-Prize Corp., Kanagawa, Japan）に対して、二酸化チタン(TiO_2)をイオンアシスト蒸着（Toa Optical Technologies, Ltd., Tokyo, Japan）した基板(膜厚: 75 nm)に対しても同様の処理、膜厚測定を行った。

2-4-3.カルボキシル化基板の調製

50 mL BD ファルコンチューブ内に、milliQ 水 10 mL、酢酸 100 µL、triethoxysilylpropylmaleamic acid 100 µL をこの順番に加えて、5 分間はボルテックス操作により強く撹拌後、シェーカーにより室温にて 1 時間撹拌した。シャーレにシランカッ

プリング剤溶液を移し、SiN 基板を浸漬させて、室温で 1 時間静置、またはシェーカーにより撹拌した。その後、SiN 基板を milliQ 水で洗浄後、ブロアーにより基板表面の水滴を除去した。乾熱器にて 80℃、1 時間ベークすることによりカルボキシル化基板の調製を行った。

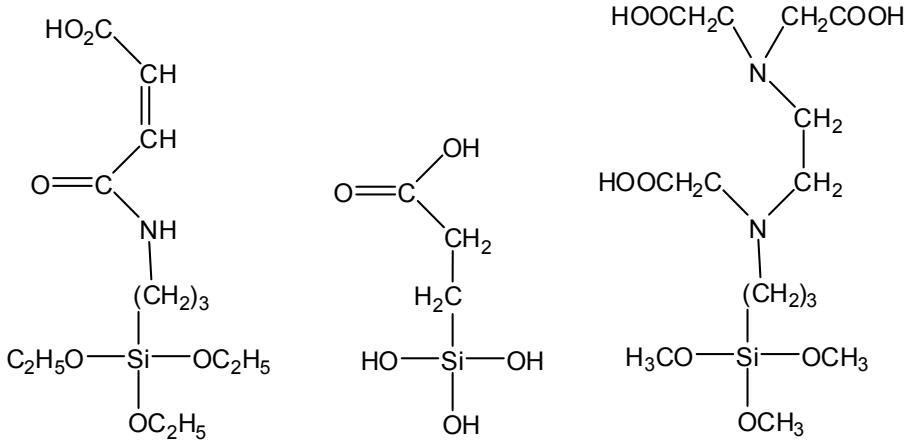
上記反応条件を基準条件として Entry 1 とし、Table 2 に示した通りシランカップリング剤の試薬の種類(Entry 2, 3)、濃度(Entry 4, 5)、反応溶媒(Entry 6, 7)、酸触媒の有無(Entry 8)、反応時間(Entry 9, 10)、ベーク条件(Entry 11, 12)を変更した条件について、条件を変更した箇所以外は同様のプロトコルにてカルボキシル化基板の作製を実施した。シランカップリング剤反応前後の SiN 基板の基準波長を RIfS により測定した。また、Entry 1～3 においては、1wt%シランカップリング剤水溶液の pH、1wt%シランカップリング剤水溶液に 1wt%酢酸を添加した溶液中の pH を pH メータ（F-52, HORIBA, Ltd., Kyoto, Japan）によって測定した。

その後、2-4-5.の条件にて anti-AFP を固定化した基板に対して、PBS buffer（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて、抗原抗体反応を評価した。ランニングバッファーと同様の PBS buffer 中に溶解した AFP 溶液（1 μg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。更に 600 秒後に、AFP 溶液(10 μg/mL)を同様の方法にて 100 μL 注入した。AFP 溶液注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴う Δλとして、カルボキシル化基板の修飾条件について検討した。

Table 2 SiN 基板に対するシランカップリング剤の反応条件

Entry	Silane coupling reagent	Solvent	Catalyst	Reaction condition	Baking condition
1	**1** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
2	**2** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
3	**3** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
4	**1** (0.2wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
5	**1** (5wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
6	**1** (1wt%)	EtOH	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
7	**1** (1wt%)	IPA	AcOH (1%)	rt, 1 h	80 °C, 1 h
8	**1** (1wt%)	H_2O	none	rt, 1 h	80 °C, 1 h
9	**1** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 10 min	80 °C, 1 h
10	**1** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 12 h	80 °C, 1 h
11	**1** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	none
12	**1** (1wt%)	H_2O	AcOH (1%)	rt, 1 h	120 °C, 1 h

尚、Table 2 に挙げた試薬は、Figure 12 に示したカルボキシル基末端のシランカップリング剤 3 種類(**1** - **3**)の事を指す。



1 **2** **3**

Figure 12 カルボキシル基末端シランカップリング剤の構造式 (**1**: Triethoxysilylpropylmaleamic acid, **2**: Carboxyethylsilanetriol, **3**: *N*-(Trimethoxysilylpropyl) ethylenediamine triacetic acid)

2-4-4.カルボキシル化基板の特性評価

2-4-3.の Entry 1 の条件で調製したカルボキシル化基板に対して、基板の表面粗さについて AFM、元素分析について XPS、シランカップリング剤の膜厚についてエリプソメトリーを用いてそれぞれ評価した。比較対照として無修飾の SiN 基板についても同様の測定を行

った。エリプソメトリーを用いてシランカップリング剤の膜厚を求めるために、2-4-2.で使用したシリコンと同じシリコンウエハに対し、V-VASE ソフトウェア内に存在する Si mat. を用いてシリコンウエハの光学定数（屈折率: n, 消衰係数: k)を算出した。更に、ここで得られたシリコンウエハの n,k を元にして、SiN の膜厚（d)、光学定数を次のように求めた。Cauchy model を用いて 700～1000 nm までの n, k, d を算出後、フィッティング(V-VASE ソフトウェア内における Pt by Pt)の範囲を 400～1000 nm まで拡大することでフィッティングは長波長側(Longest Wvl.)から値を算出した。シランカップリング剤についても同様の手法で求めた。ただし、シランカップリング剤層の屈折率は、590 nm の屈折率をメーカー（Gelest Inc.）におけるカタログに記載の $n_d = 1.472$ を用いて計算した。

2-4-5.抗体固定化基板の調製

2-4-3.において調製したカルボキシル化基板に対して以下のプロトコルにより抗体固定化基板の作製を実施した。PDMS フローセル(Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)の流路部分をカッターナイフにより繰り抜いてウェルを形成し、ウェルを形成したフローセルをカルボキシル化 SiN 基板の流路となる部分に被せた。25 mM MES buffer (pH 5.0)を用いて調製した 200 mM EDC、50 mM NHS 混合溶液 180 µL をウェルの内側に滴下し、室温にて 20 分間浸漬した。その後、milliQ 水（180 µL）で基板を 2 回洗浄した。洗浄の際にはマイクロピペット(容積: 1000 µL)を用いて液の入れ替えを行い、ピペッティングを 10～20 回実施した。続いて、10 mM acetate buffer (pH 6.0)を用いて調製した anti-AFP (20 µg/mL)溶液 180 µL をウェルの内側に滴下し、室温にて 30 分間浸漬した。milliQ 水（180 µL）で基板を 1 回洗浄後、1 M エタノールアミン塩酸塩水溶液（pH 8.5）180 µL をこれまで同様にウェルの内側に滴下し、室温にて 20 分間浸漬した。最後に、ウェル状に繰り抜いたフローセルを取り外し、洗瓶による milliQ 水で基板をすすぎ、抗体固定化基板を調製した。RIfS にて抗体固定化前と抗体固定化の基準波長の差（Δλ）を算出した。

2-5.結果と考察

2-5-1.SiN 基板元素分析

未修飾の SiN 基板の depth profile の測定結果を Figure 13 に示した。最表面では酸素原子が豊富に存在する様子が観察された。次に SiN 層となる Si と N により構成される層が続き、最終的には基板のシリコンウエハの構成成分である Si のみが検出された。Figure 13 から基板最表面には 40%程度の酸素原子が存在し、全元素の中で最も豊富であることが分かった。また、最表面の層と SiN の層が同じレートでスパッタされると仮定した場合、SiN の厚さが 65 nm である事から、120 分のスパッタリングタイム（65 nm/120 min）から、1 分あたりのスパッタリング速度は 0.54 nm/min となる。酸素原子が存在する層はスパッタ時間が 5 分以上経過した時には 10%以上に低下するため、3 nm 以下の厚さである事が推測された。また、スパッタリング時間が 10 分後から 100 分後までの SiN 層において Si が 51

～54%、N が 45～48%であることから Si の方が若干豊富である事が分かった。この理由としては、評価に用いた SiN 基板は PE-CVD (plasma enhanced-chemical vapor deposition)と呼ばれる化学気層蒸着で作られており、SiH_4やNH_3などのガスの存在比を変えることで、Si と N の比率が変えて屈折率を調整するためである。この結果から、基板表面上の酸素原子の存在は、Si の表面酸化の影響によって生じた可能性が考えられる。

以上により、SiN 基板の最表面には酸素原子が 40%存在するため、Si-O を介した反応が可能である事が示唆された。従って、シランカップリング剤は官能基を導入する試薬として有効であると判断して次の検討に移った。

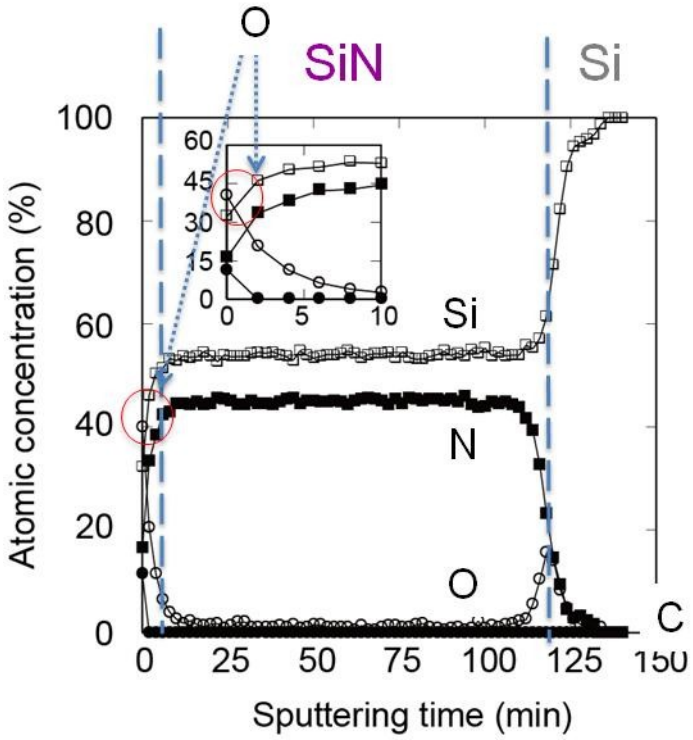


Figure 13 SiN 基板の depth profile

2-5-2.SiN 基板に対するプラズマ処理の影響

SiN 基板に対して、プラズマ照射が基板を清浄にする表面処理として有効か評価するため、プラズマエッチング装置を用いて、15 秒から 300 秒の間大気プラズマ処理を行った。プラズマ照射後、エリプソメトリーを用いて膜厚の評価を実施したところ（Figure 14)、プラズマ処理を行うことで SiN の膜厚が有意に減少することが分かった。一方、TiO_2に関しても同様の実験を行ったが、プラズマを 300 秒間照射しても膜厚の減少がほぼ見られなかった（Figure 14)。これは、例えばプラズマ時にケイ素化合物に働く求核置換反応 [55] などによって窒素原子が酸素原子に置き換わった可能性が考えられる。

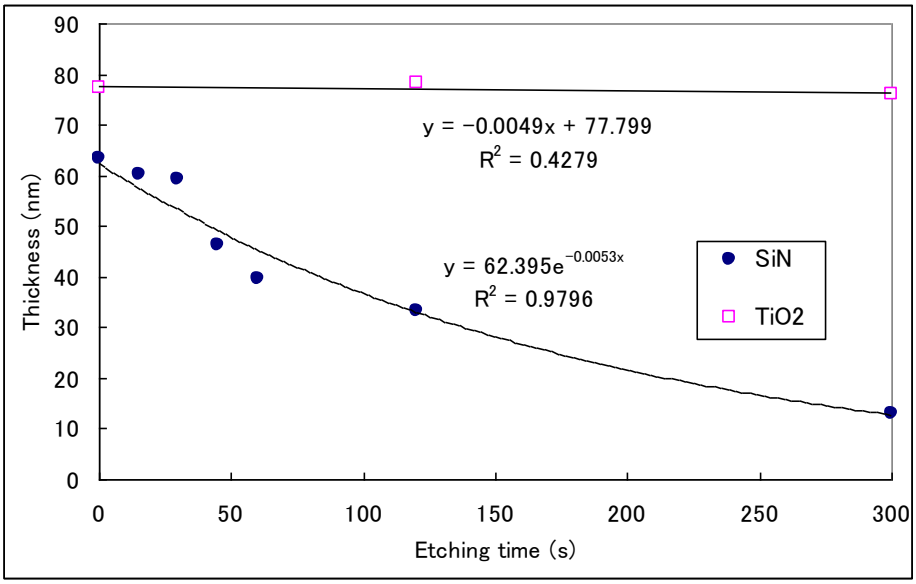


Figure 14 プラズマエッチング時間と干渉層膜厚の関係

基板の構成元素である窒素原子が影響を受けたか検証するため、プラズマ非照射の SiN 基板、30 秒、300 秒間プラズマエッチングを行った SiN 基板に対して、それぞれ XPS を用いて元素組成の割合ならびに化学シフトを算出した（Table 2）。Figure 15 に、プラズマ非照射、プラズマ 30 秒照射、プラズマ 300 秒照射 SiN 基板の写真を示した。プラズマ非照射の基板では干渉色により基板が紫～青色を帯びているのに対して、30 秒間プラズマを照射した基板は茶～赤紫色、300 秒間プラズマを照射した基板は銀色となった。300 秒間プラズマ照射した SiN 基板においては、プラズマにより SiN 層が大きく影響を受け、可視光領域における干渉が起きずにシリコン本来の色が観測されたものと推定した。

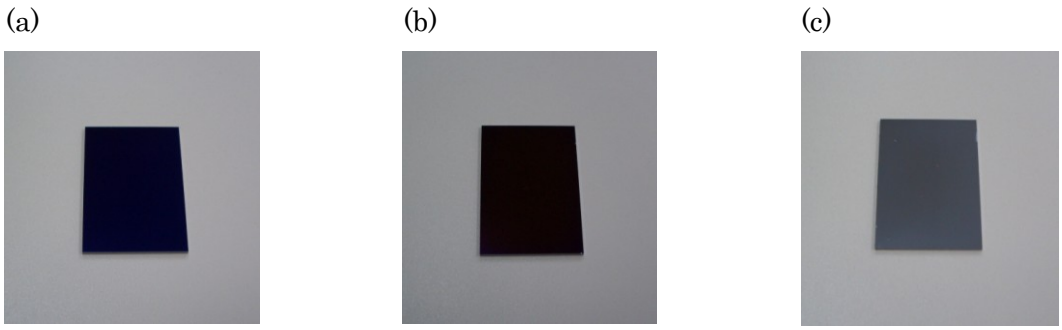


Figure 15 (a)プラズマ非照射、(b)プラズマ 30 秒照射、(c)プラズマ 300 秒照射 SiN 基板

XPS を用いて測定した Figure 15 における基板の各元素比率の測定結果を Table 3 に示した。また、それぞれの基板における wide scan、ならびに C1s, N1s, O1s, Si2p における narrow scan の測定結果を Figure 16～18 に示した。

Table 3 Figure 15 の SiN 基板における元素組成

Element	No modified	Plasma etched (30 s)	Plasma etched (300 s)
C	24.6	52.6	25.6
N	16.8	9.7	4.9
O	38.5	23.9	45.6
Si	20.2	13.8	23.8

3 種類の基板全てにおいて C, N, O, Si の元素のみが検出された。C や O が表面の汚れ由来とすると、これらの基板表面は基本的に N と Si のみで構成されていると考えることが出来る。更に元素ごとに見てみると、N については、プラズマの照射時間に応じて基板表面の元素割合の低下が観察され、プラズマ 300 秒照射した基板においては 5%以下となり（Table 3）、narrow scan においてほぼピークが消失していることを確認した(Figure 18c)。Si については、プラズマの照射によるケミカルシフトが見られた（Figure 16b, 17b, 18b）。プラズマ非照射の SiN 基板（Figure 16b）と比較してプラズマを 30 秒間照射した基板においては照射前には最も多く存在していた酸素との結合を表す Si-O（104 eV）のピークが減少し、Si-N（102 eV）と Si（100 eV）のピークが中心に観察された（Figure 17b）。プラズマ照射時間が 300 秒間になると Si-N のピークはほぼ消失し、Si と Si-O のみのピークとなっていた（Figure 18b）。

これらの実験結果と、前述の depth profile における Ar イオンエッチングで到達したシリコンの部分において酸素原子が検出されていないという事実を合わせると、基板上に存在する SiN はプラズマ照射により窒素原子が抜け、最終的にその最表面に酸化被膜が形成される可能性が示唆された。SiN は、屈折率、膜厚の変化が干渉に大きな影響を及ぼすため、RIfS の測定結果に直接影響を与える恐れがある。従って、本研究においては SiN 基板を清浄にする際にプラズマ表面処理は実施せず、EtOH による洗浄のみ行う事とした。

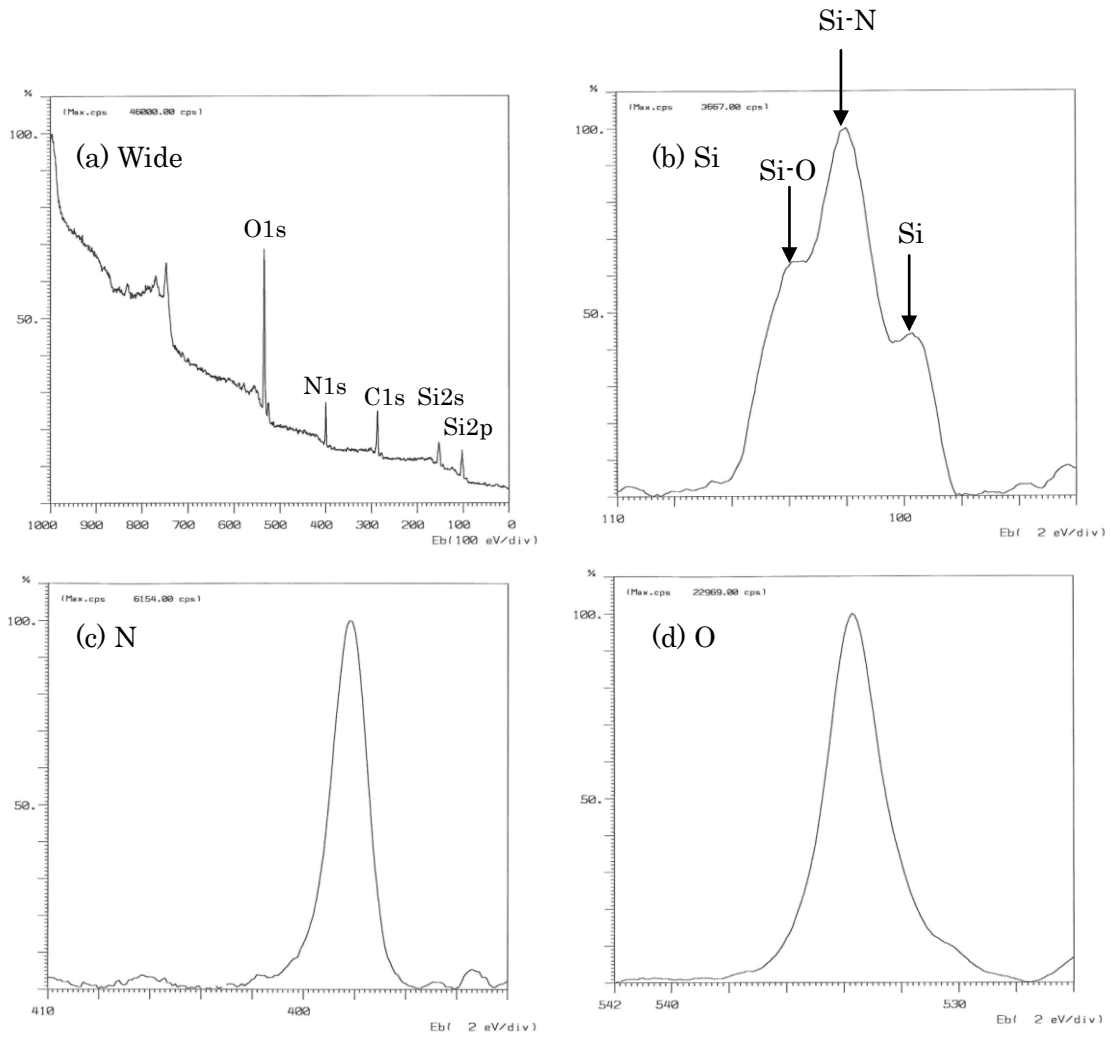


Figure 16 プラズマ非照射 SiN 基板の XPS（(a) Wide scan (0 eV～1000 eV)、(b) Si2p の narrow scan (94 eV～110 eV)、(c) N1s の narrow scan (392 eV～410 eV)、(d) O1s の narrow scan (526 eV～542 eV)）

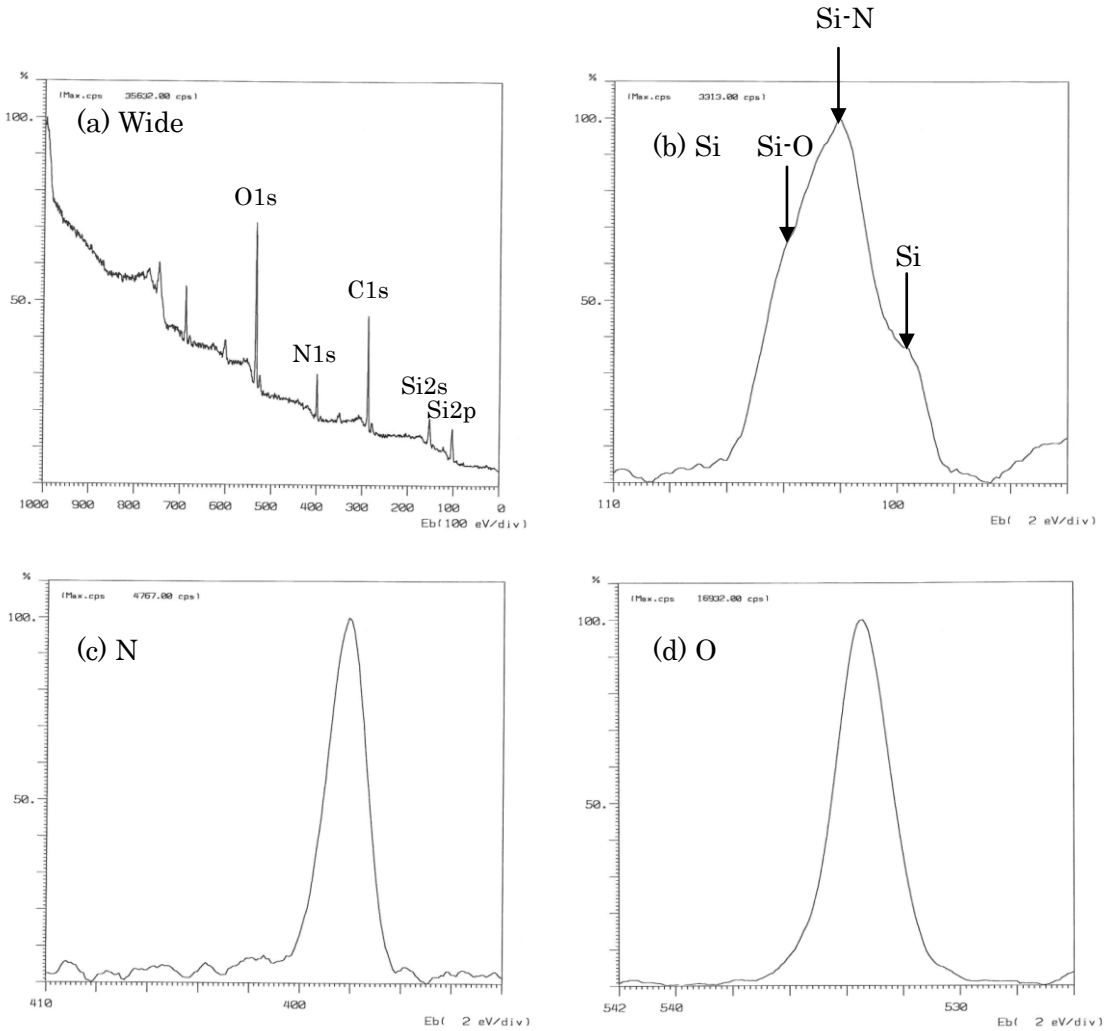


Figure 17 プラズマを 30 秒照射した SiN 基板の XPS （(a) Wide scan (0 eV～1000 eV)、(b) Si2p の narrow scan (94 eV～110 eV)、(c) N1s の narrow scan (392 eV～410 eV)、(d) O1s の narrow scan (526 eV～542 eV)）

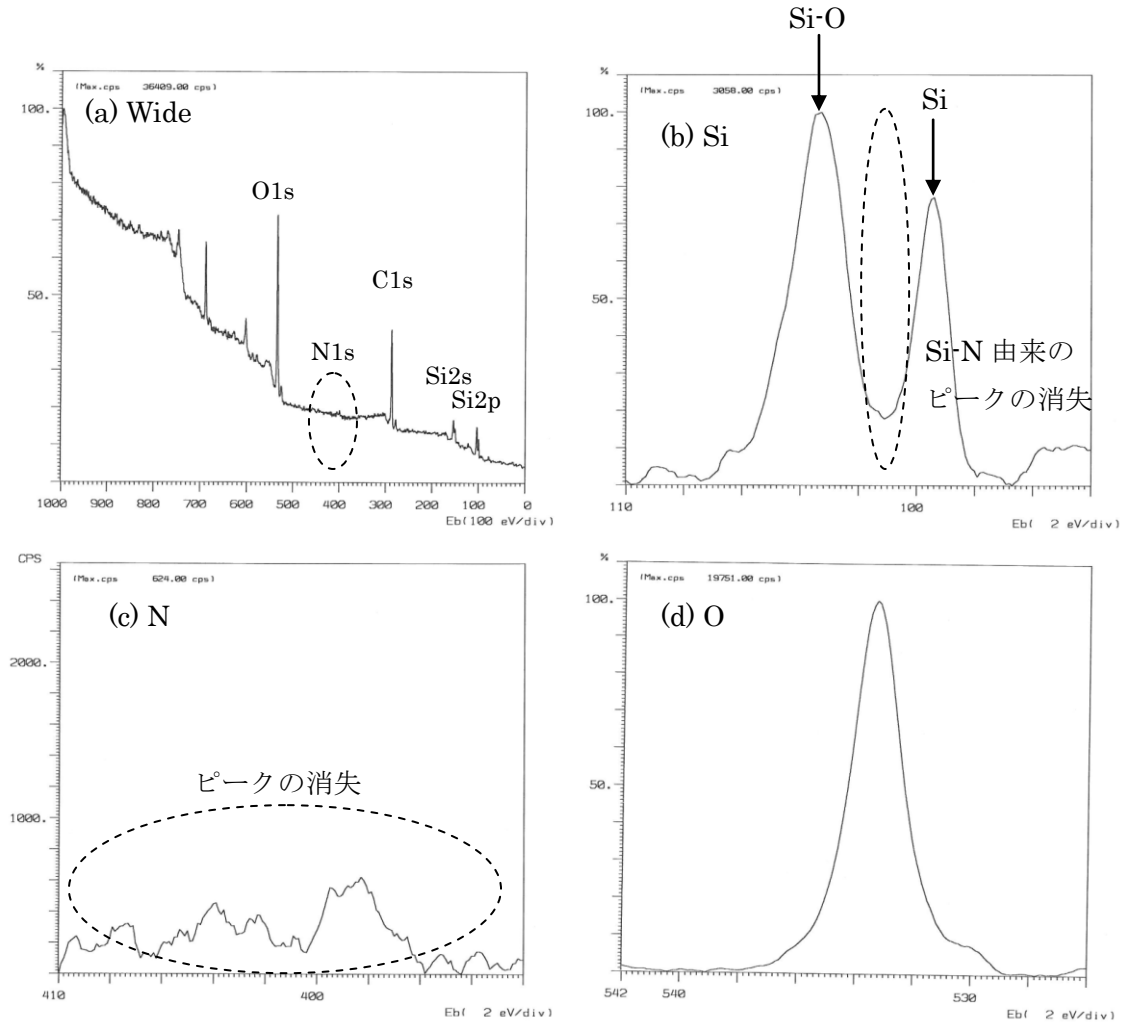


Figure 18 プラズマを 300 秒間照射した SiN 基板の XPS((a) Wide scan (0 eV～1000 eV)、(b) Si2p の narrow scan (94 eV～110 eV)、(c) N1s の narrow scan (392 eV～410 eV)、(d) O1s の narrow scan (526 eV～542 eV))

2-5-3.カルボキシル化基板の調製

Table 2 の条件で SiN 基板に対してシランカップリング剤を反応させたことに伴う RIfS の基準波長変化量（Δλ）について Table 4 に示した。

Table 4 シランカップリング剤
修飾に伴う RIfS 基準波長変化量

Entry	Δλ with silane modification (nm)
1	3.76
2	0.99
3	-0.18
4	0.93
5	5.45
6	1.06
7	5.96
8	2.67
9	3.76
10	3.23
11	3.54
12	3.31

Table 4 の Entry 1～3 を見てみると、シランカップリング剤 **1** においては最も大きいΔλが検出された(3.76 nm)。また、シランカップリング剤 **2** においては、シランカップリング剤 **1** よりは小さいものの修飾に伴うΔλが観測された(0.99 nm)。シランカップリング剤 **3** においては、基準波長が若干ではあるがマイナス側にシフトする結果となった(-0.18 nm)。シランカップリング剤 **2** に関しては、シラノール基とリンカーの長さがシランカップリング剤 **1** より短かった事ことからもシランカップリング剤同士の分子間力が弱く、反応性がシランカップリング剤 **1** よりも乏しかった可能性が考えられる。また、Table 3 からシランカップリング剤 **3** は、ほぼ基板上に修飾されなかったと考える事が出来る。原因としてシランカップリング剤 **3** の電離したカルボキシル基由来の負電荷が基板との反応に影響を与えている可能性が考えられる。この仮説を検証するため、Entry 1～3 において酢酸添加前と酢酸添加後におけるシランカップリング剤溶液の pH を測定した（Table 5）。

Table 5 Table 4 の entry 1～3 における酢酸添加前と酢酸添加後の pH

	pH		
溶液	**シランカップリング剤 1**	**シランカップリング剤 2**	**シランカップリング剤 3**
シランカップリング剤(1wt%)水溶液	2.96	12.36	11.89
シランカップリング剤(1wt%)＋酢酸(1wt%)水溶液	2.72	4.93	4.28

1wt%シランカップリング剤水溶液の pH は、シランカップリング剤 **1** のみが酸性で、シランカップリング剤 **2** とシランカップリング剤 **3** はアルカリ性を示した。これは、シランカップリング剤 **2** とシランカップリング剤 **3** がナトリウム塩であるためであると考えられる。これらの溶液に酢酸を 1wt%添加すると、シランカップリング剤 **1～3** いずれの溶液も酸性を示した。ここで、1 分子中にカルボキシル基が 3 ヶ所存在するシランカップリング剤 **3** のカルボキシル基の酸解離定数 pKa を、シランカップリング剤 **3** と同様に 1 分子中にカル

ボキシル基を 3 ヶ所持つ nitrilotriacetic acid (NTA)の酸解離定数（$pKa_1 = 1.89$, $pKa_2 = 2.49$, $pKa_3 = 9.73$）と同じであると仮定すると、反応溶液中の pH 4.28 においては、1 分子中におよそ 2 つのカルボキシル基が電離しているはずである。一方、SiN 基板表面に存在ある酸化膜は、基板表面に O^-として負電荷をもたらす可能性があるため、両者は静電反発によって接触しづらい環境が形成された可能性がある。これを防ぐ方法としては、予めカルボキシル基をエステル等で保護してから基板と反応させ、後で脱保護を行う方法が挙げられるが、簡便な one-step でのカルボキシル基導入を目指していたため、この検討は行っていない。Entry 4,5 はシランカップリング剤の濃度を変化させた実験であったが、Entry 1 と比較するとシランカップリング剤の濃度が濃いほど Δλが大きくなる、つまり基板への被覆量が増加する事が分かった。Entry 6,7 は反応溶媒を水からそれぞれエタノール（EtOH）、イソプロパノール（IPA）に変更する事でシランカップリング剤との相溶性向上による均一なシランカップリング剤による膜の形成を目的とした。溶媒を水からアルコールに変更したことで、EtOH、IPA いずれの場合においてもシランカップリング剤 **1** の溶媒に対する溶解性が向上し、ボルテックスによる撹拌操作は不要であった。Table 4 を見ると、EtOH においては、水よりも Δλが小さく、IPA においては水よりも Δλが大きい結果となった。シランカップリング剤は反応条件によって反応性や表面構造が大きく異なるため一概には言えないが、これは、溶媒に EtOH を選択した時には、EtOH がシランカップリング剤 **1** のエトキシ基の加水分解反応における分解産物と同一であり、加水分解反応が遅くなったため、シランカップリング剤の膜厚の低下につながった可能性を示唆している。IPA の場合についても同様に、反応速度の差によってシランカップリング剤の膜厚が厚くなった可能性を示唆している。Entry 8 では、触媒としての働きを持つ酢酸を加えない事による影響を見ているが、Δλが Entry 1 と比較して低下したため、酢酸が存在している方がシランカップリング剤 **1** の基板に対する被覆量が多い可能性が示唆された。Entry 10,11 はシランカップリング剤の反応時間の検討についてであるが、反応時間 10 分から 24 時間の間においてΔλは 3.23～3.76 nm と大きく変わらない結果が得られた。シランカップリング剤 **1** の基板への吸着反応は 10 分程度で終了することが分かった。最後に Entry 12,13 はベーク条件についてであるが、これはシランカップリング剤 **1** の基板への吸着反応は同一のプロトコルにて実施しているため、被覆量そのものが変化するわけではないためΔλが 3.31～3.76 nm と安定していたのは妥当な結果であると言える。

Table 2 の反応条件を用いてカルボキシル化の修飾を実施した基板を用いて、anti-AFP の固定化、抗原抗体反応を実施し、以下の事が分かった（Table 6）。

・シランカップリング剤 **1** が AFP 抗原抗体反応を検出するシランカップリング剤として最も適している（Entry 1～3）。
・シランカップリング剤 **1** の濃度は 1wt%が最適（Entry 4, 5）
・シランカップリング剤 **1** の反応溶媒としては水が最も適している（Entry 6, 7）

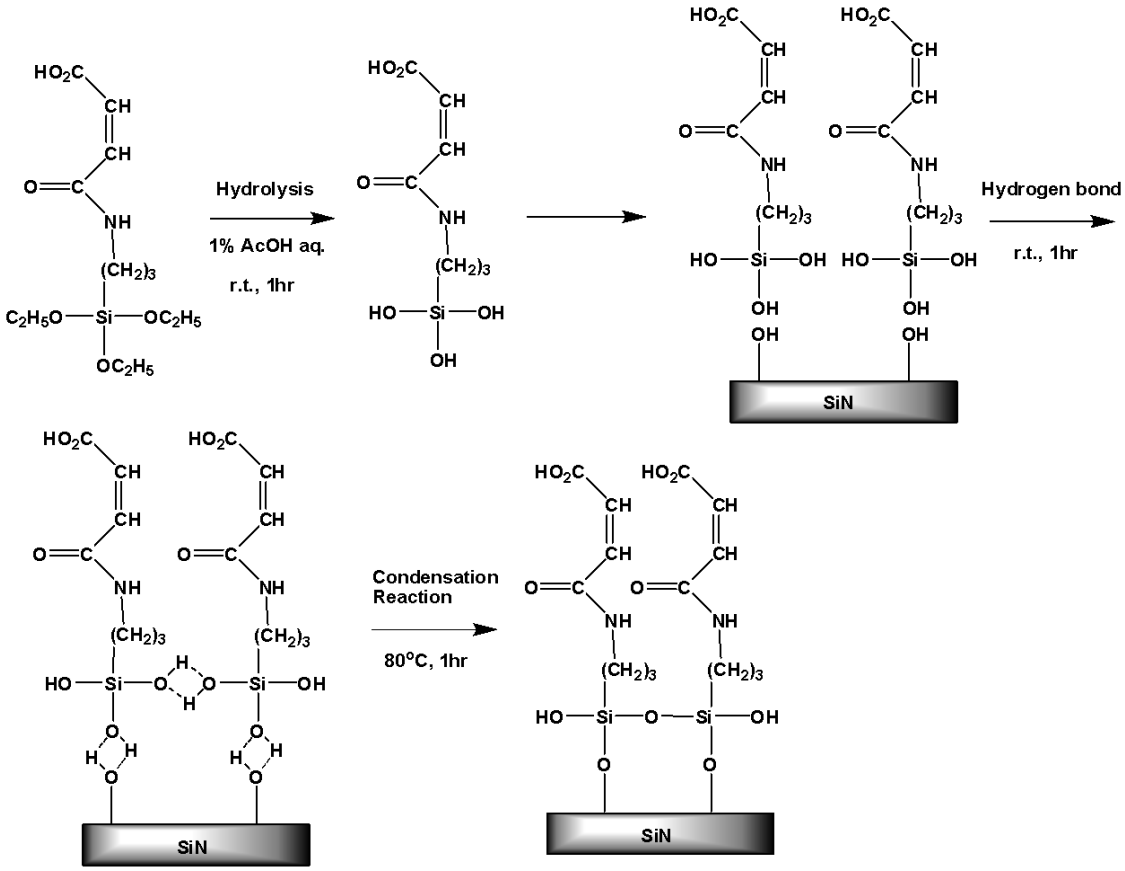
・シランカップリング剤 **1** の反応溶媒としては酢酸が添加されている方が良い（Entry 8）
・シランカップリング剤 **1** の反応時間は 10 分だと、Entry 1 ほどの抗原抗体反応に伴う Δλは見られず（Entry 9）、1 時間以上は反応させた方が良い（Entry 10）
・シランカップリング剤 **1** の反応後の加熱によるベークは必ずしも必要なく（Entry 11）、120℃でベークすると感度が低下する（Entry 12）

Table 6 RIfS による AFP の注入に伴う抗原抗体反応による Δλ

Entry	Δλ with AFP injection (nm)	
	1 μg/mL	10 μg/mL
1	0.19	0.50
2	0.10	0.19
3	0.09	0.15
4	0.18	0.45
5	0.15	0.34
6	0.11	0.30
7	0.11	0.34
8	0.13	0.34
9	0.10	0.22
10	0.25	0.48
11	0.19	0.48
12	0.11	0.26

以降は 10 μg/mL の AFP による Δλが最も大きかった Entry 1 による反応条件により SiN 基板に対するカルボキシル化の修飾を行うこととした(Scheme 2)。

Scheme 2 SiN 基板へのカルボキシル化導入反応条件(Table 2 の Entry 1)



2-5-4.カルボキシル化基板の特性評価

Table 2 の Entry 1 で調製したカルボキシル化基板の表面粗さについて AFM を用いて評価した(Figure 19)。(a)無修飾 SiN 基板、(b)カルボキシル化基板の両者を比較したところ、平均表面粗さ(R_a)や最大高低差(P-V)の数値については僅かにカルボキシル化基板の方が滑らかであると言えるが、ほとんど差が見られない事が分かった(Table 7)。カルボキシル化が、基板の平滑性に大きな影響を与えなかった事からカルボキシル化はほぼ一様に行われたと考える事が出来る。

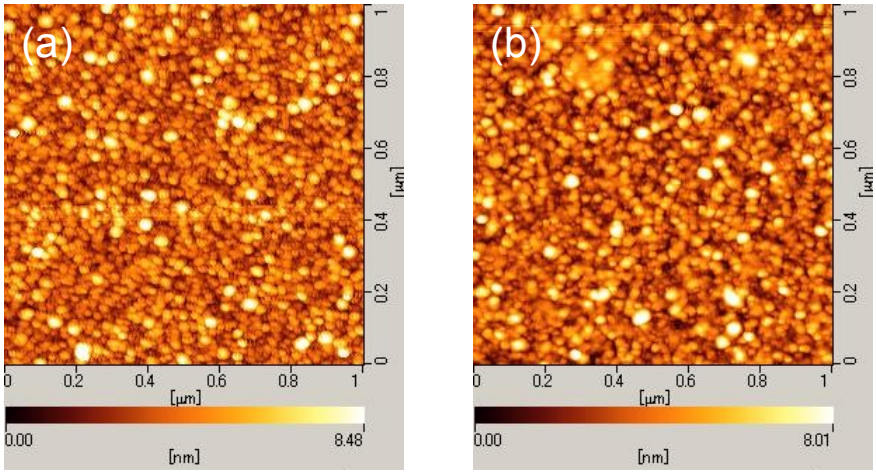


Figure 19 (a)無修飾 SiN 基板、(b)カルボキシル化 SiN 基板の AFM 画像(測定範囲は 1 μm ×1 μm)

Table 7 (a)無修飾 SiN 基板、(b)カルボキシル化 SiN 基板の AFM ラフネスパラメーター (n=3)

Sensor Chip	Roughness parameter	
	R_a (nm)	P-V (R_{max}) (nm)
(a)	0.96±0.16	9.9±2.1
(b)	0.84±0.17	9.3±1.7

カルボキシル基の導入を確認するため、カルボキシル基修飾前、修飾後の基板に対して、(a)C1s、(b) N1s、(c) O1s、(d) Si2p の 4 種類の元素について XPS の narrow scan による評価を行った(Figure 20)とこら、C1s において、カルボキシル（C(=O)-O）由来の 288.6 eV におけるピーク強度の増大が起きていることが分かった。これは、元々基板表面にカルボキシル基は一定量存在しているものの、シランカップリング剤による修飾を行うことで、存在比率が増加したと言える。また、修飾後の SiN 基板において、N1s における 400 eV 付近におけるピークの出現が見られた。これは、N-C 結合(399.9 eV)を表しており、シランカップリング剤 **1** におけるマレアミド酸に由来するものと考えられた。また、Si2p について見てみると、修飾前は Si-N (101.2 eV)、あるいは Si-O の中でも結合エネルギーが 103 eV と高エネルギーで存在していることから、ケイ酸塩、あるいはシリカと同様の結合が存在している状態であったのに対し、修飾後にピークがブロードで 102 eV 付近に存在するが、これも N1s の時と同様、シランカップリング剤の Si-O によるものと考えられた。

以上、基板表面のカルボキシル基と C-N 結合の存在を XPS により確認することが出来たため、シランカップリング剤によりカルボキシル基が導入出来ることが確認された。

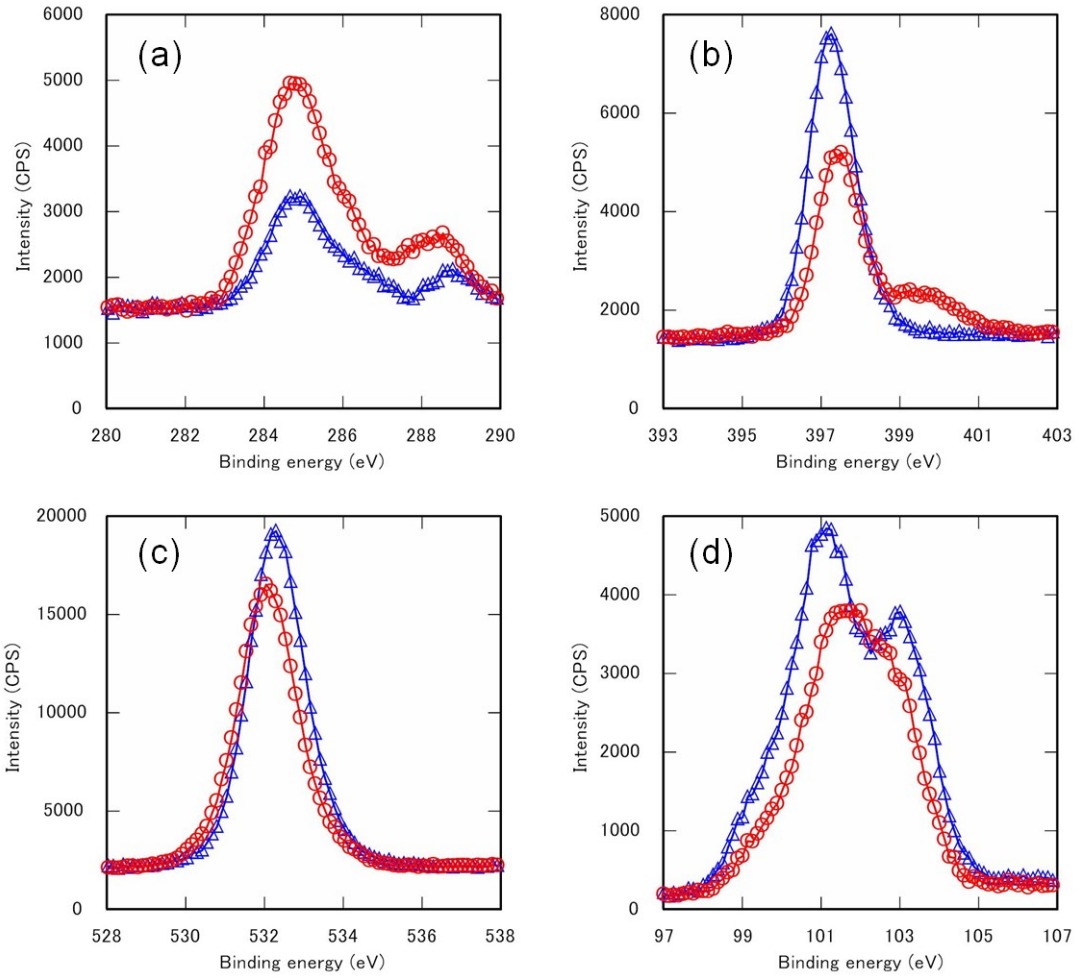


Figure 20 SiN 基板の XPS による表面元素分析（青: シランカップリング剤修飾前、赤: シランカップリング剤修飾後）(a)C1s、(b)N1s、(c)O1s、(d)Si2p

シランカップリング剤がどの程度の膜厚で被覆しているかを明らかにするため、エリプソメトリーによりシランカップリング剤修飾層の膜厚測定を行った。まずは、シリコンウエハに対して、エリプソメトリーにより、Ψ、Δを測定した(Figure 21)。得られたデータを用いてエリプソメータ付属の Si.mat model を用いて屈折率 n、吸収係数 k を求めた(Figure 22)。

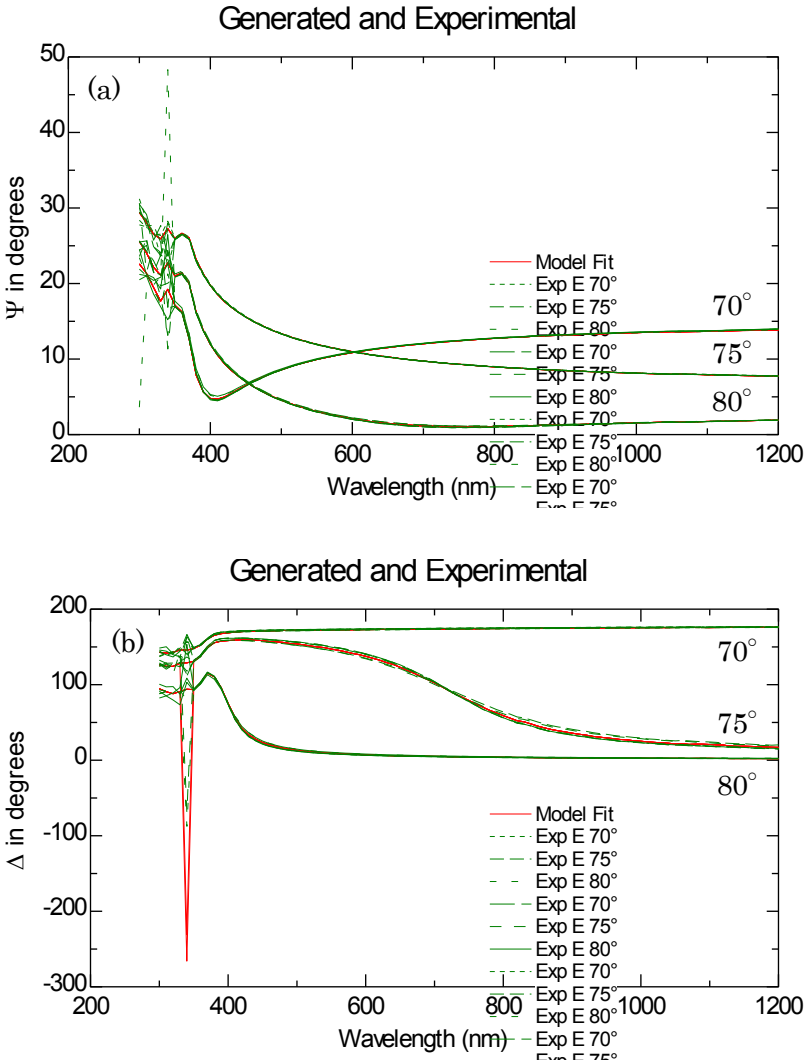
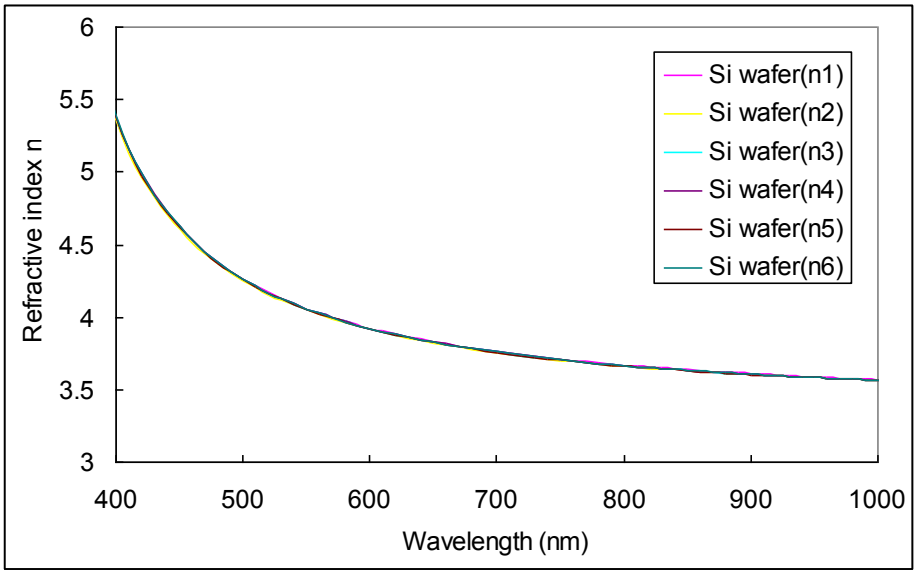


Figure 21 シリコンウエハのエリプソメトリー測定結果（(a) P 偏光と S 偏光の振幅比Ψ、(b)P 偏光と S 偏光の位相差Δ（測定条件：基板に対しての入射角；70°、75°、80°、測定波長；300～1200 nm））



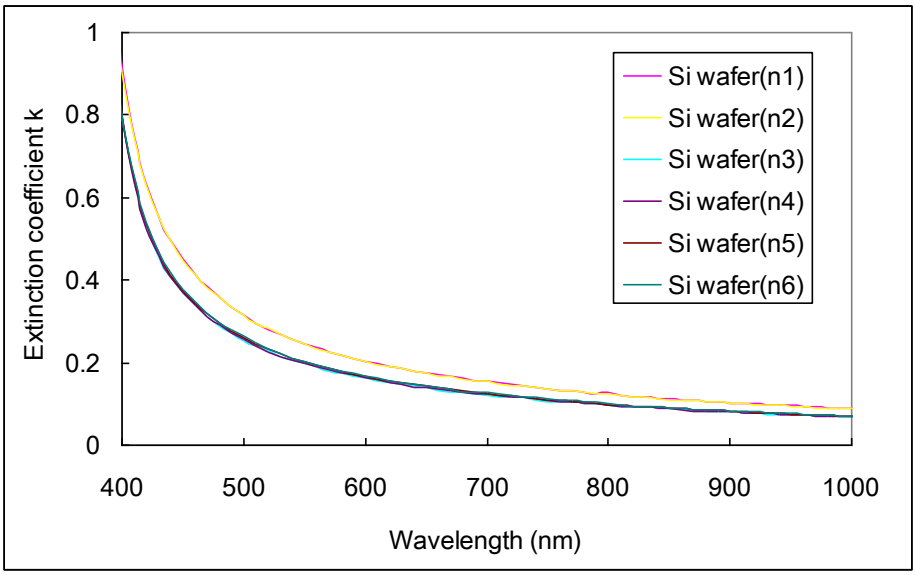


Figure 22 エリプソメータ測定により得られたシリコンウエハの光学定数（n=6, 上段: 屈折率 n、下段: 吸収係数 k）と測定波長との関係（カーブフィッティング：Figure 20 より得られた生データの Si.mat model によるフィッティング）

Figure 22 から、シリコンウエハの光学定数が再現性良く測定出来た事が分かった。これらのデータに対して V-VASE 内で最小二乗法によるフィッティングを行うことで（Figure 23）、シリコンウエハの光学定数を算出した（Table 8）。

Table 8 シリコンウエハの光学定数

波長 (nm)	屈折率 n (−)	消衰係数 k (−)
400	5.3721	0.8485
410	5.1485	0.6867
420	4.9747	0.5676
430	4.8366	0.4941
440	4.7180	0.4503
450	4.6141	0.4064
460	4.5196	0.3797
470	4.4469	0.3489
480	4.3761	0.3224
490	4.3109	0.3064
500	4.2619	0.2833
510	4.2104	0.2697
520	4.1632	0.2581
530	4.1254	0.2463
540	4.0887	0.2296
550	4.0532	0.2224
560	4.0236	0.2121
570	3.9957	0.2060
580	3.9676	0.1979
590	3.9455	0.1907
600	3.9213	0.1820
610	3.9007	0.1775
620	3.8796	0.1688
630	3.8607	0.1651
640	3.8441	0.1573
650	3.8294	0.1576
660	3.8128	0.1529
670	3.7968	0.1461
680	3.7843	0.1455
690	3.7716	0.1421
700	3.7596	0.1373
710	3.7475	0.1366
720	3.7355	0.1312
730	3.7249	0.1241
740	3.7156	0.1242
750	3.7063	0.1207
760	3.6971	0.1189
770	3.6879	0.1164
780	3.6793	0.1134
790	3.6715	0.1125
800	3.6634	0.1099
810	3.6568	0.1068
820	3.6488	0.1041
830	3.6461	0.1024
840	3.6396	0.0999
850	3.6311	0.0984
860	3.6250	0.0961
870	3.6186	0.0944
880	3.6147	0.0922
890	3.6100	0.0911
900	3.6054	0.0890
910	3.6000	0.0879
920	3.5971	0.0862
930	3.5907	0.0843
940	3.5868	0.0831
950	3.5834	0.0820
960	3.5789	0.0809
970	3.5748	0.0792
980	3.5717	0.0789
990	3.5671	0.0772
1000	3.5646	0.0763

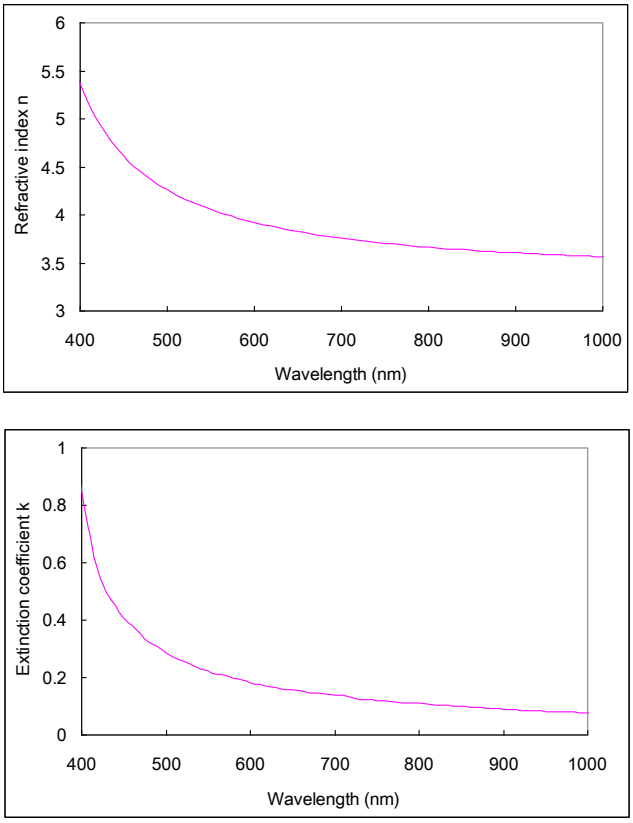


Figure 23 エリプソメータ測定によるシリコンウエハの光学定数の算出のためのカーブフィッティング（上段: 屈折率 n、下段: 吸収係数 k）

Figure 23、Table 8 で算出されたシリコンウエハの光学定数を用いて、V-VASE 付属の Cauchy model により無修飾の SiN 基板に対して屈折率 n、吸収係数 k を求めた。Cauchy model とは、媒質に吸収がないと仮定した時の、媒質の屈折率 n を波長λの関数で表した半経験式で、以下の式(5)で表わされる。

$$n = A + \frac{B}{\lambda^2} + \frac{C}{\lambda^4} + \frac{D}{\lambda^6} + \cdots \quad (5)$$

A,B,C,…は最適化パラメータである。解析には第 3 項までとれば十分とされている。この近似は膜が透明で、かつ正常分散を示す領域でのみ成立し、異常分散を示す領域では成立しない。V-VASE の解析ソフトには第 3 項（A,B,C）まで入力可能となっている。SiN に関しては、シリコンウエハと同様にΨ、Δを測定後(Figure 24)、700～1000 nm まで吸収がないと仮定して Cauchy の分散式によるフィッティングを行い、屈折率を算出してから、400～1000 nm まで範囲を拡大して Pt by Pt と呼ばれる解析ソフトのフィッティングモードにより長波長側から光学定数を算出した（Figure 25)。これら 6 つのデータに対してシリコンウエハの時と同様に解析ソフト内で最小二乗法によるフィッティングを行うことで、最終的に SiN の光学定数を決定した(Table 9, Figure 26)。この光学定数を元に算出された SiN の膜厚は 62.7 nm±0.4 nm(n=6)であった。

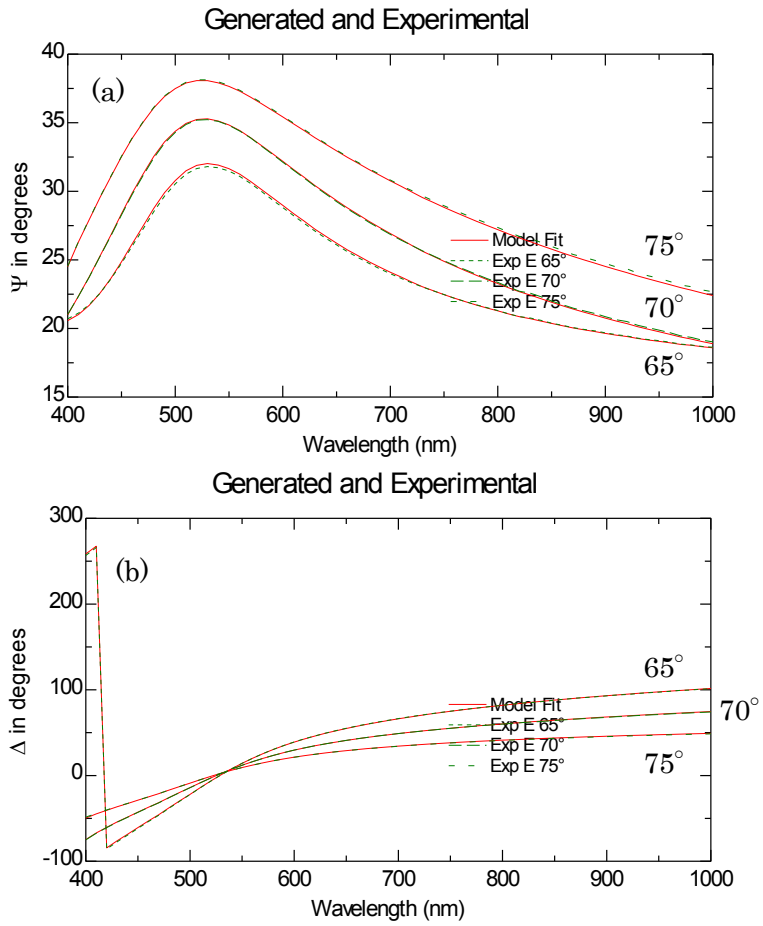
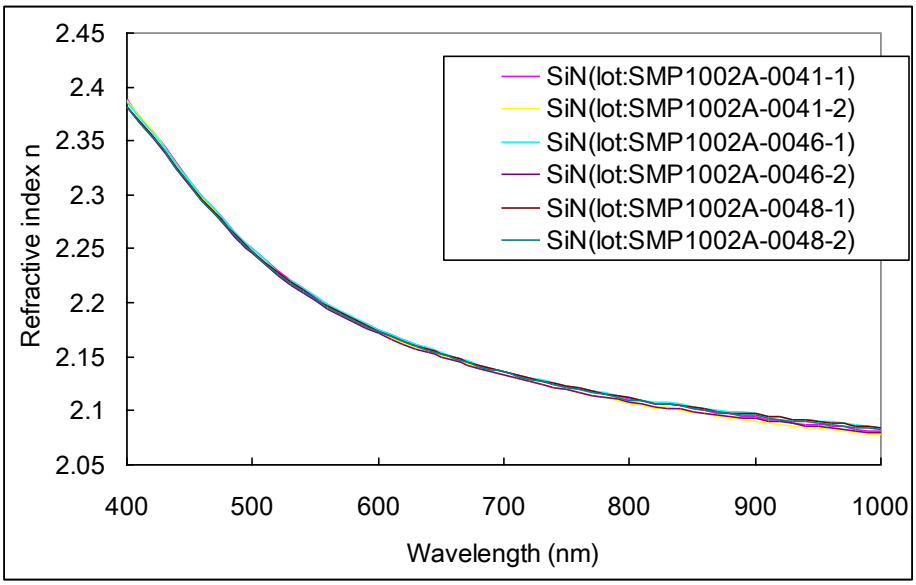


Figure 24 SiN 基板のエリプソメトリー測定結果（(a) P 偏光と S 偏光の振幅比Ψ、(b)P 偏光と S 偏光の位相差Δ （測定条件：基板に対しての入射角；65°、70°、75°、測定波長；400～1000 nm））



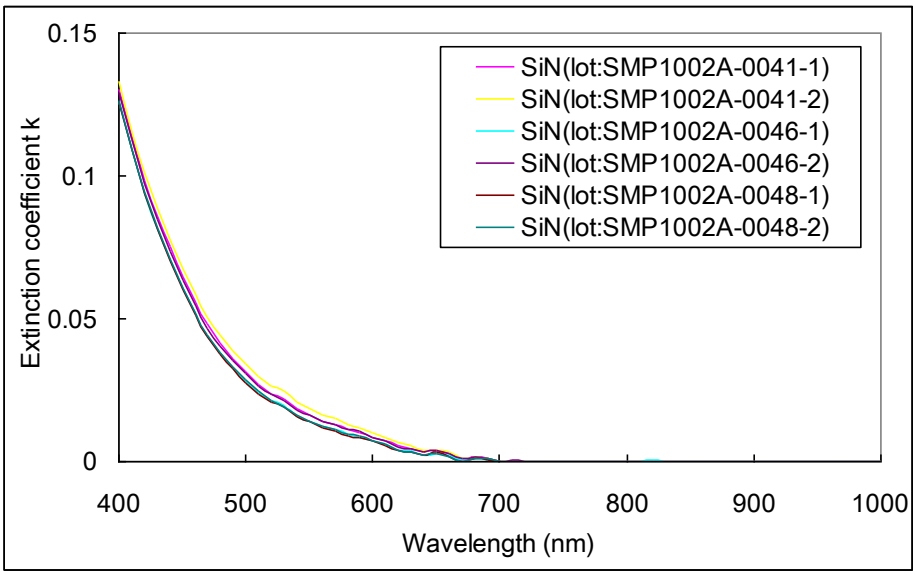


Figure 25 エリプソメータによる SiN 基板の光学定数の算出（(n=6, 上段: 屈折率 n、下段: 吸収係数 k) Figure 24 より得られた生データを Cauchy model を用いてフィッティングをかけることで算出)

Table 9 SiN の光学定数

波長 (nm)	屈折率 n (–)	消衰係数 k (–)
400	2.3837	0.1288
410	2.3689	0.1119
420	2.3550	0.0966
430	2.3392	0.0843
440	2.3253	0.0733
450	2.3097	0.0631
460	2.2950	0.0542
470	2.2820	0.0468
480	2.2693	0.0405
490	2.2563	0.0354
500	2.2466	0.0308
510	2.2362	0.0268
520	2.2257	0.0239
530	2.2173	0.0219
540	2.2100	0.0186
550	2.2020	0.0167
560	2.1956	0.0146
570	2.1892	0.0134
580	2.1830	0.0118
590	2.1782	0.0106
600	2.1728	0.0085
610	2.1683	0.0072
620	2.1639	0.0054
630	2.1598	0.0042
640	2.1553	0.0035
650	2.1514	0.0039
660	2.1475	0.0029
670	2.1448	0.0004
680	2.1410	0.0011
690	2.1375	0.0012
700	2.1350	0.0000
710	2.1315	0.0002
720	2.1285	0.0000
730	2.1263	0.0000
740	2.1234	0.0000
750	2.1212	0.0000
760	2.1188	0.0000
770	2.1166	0.0000
780	2.1142	0.0000
790	2.1120	0.0000
800	2.1096	0.0000
810	2.1080	0.0000
820	2.1054	0.0000
830	2.1048	0.0000
840	2.1035	0.0000
850	2.1004	0.0000
860	2.0997	0.0000
870	2.0978	0.0000
880	2.0960	0.0000
890	2.0950	0.0000
900	2.0943	0.0000
910	2.0922	0.0000
920	2.0916	0.0000
930	2.0892	0.0000
940	2.0881	0.0000
950	2.0873	0.0000
960	2.0859	0.0000
970	2.0849	0.0000
980	2.0833	0.0000
990	2.0821	0.0000
1000	2.0818	0.0000

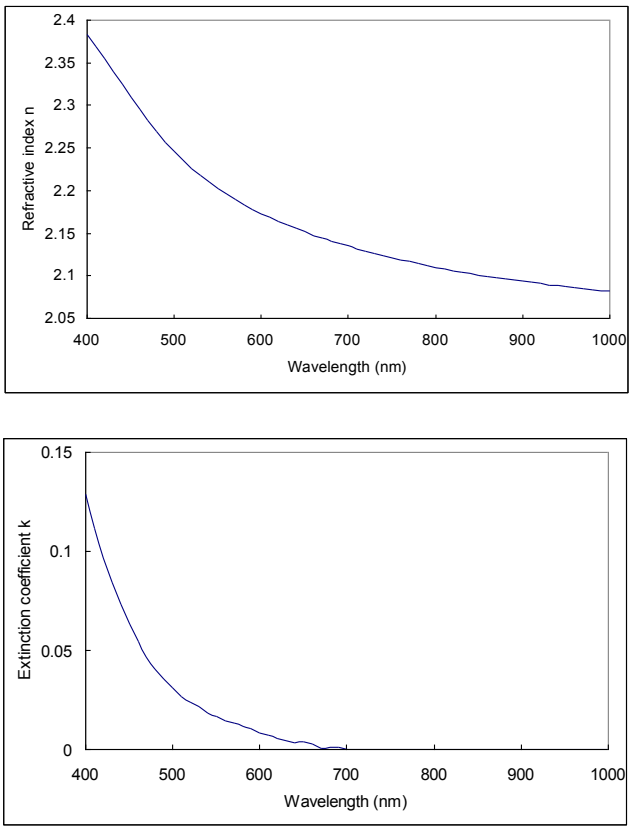


Figure 26 エリプソメータ測定による SiN の光学定数の算出のためのカーブフィッティング（上段: 屈折率 n、下段: 吸収係数 k）

シランカップリング剤の屈折率は、試薬製造元である Gelest Inc.のカタログに記載の n_d=1.472 とし、590 nm における屈折率を 1.472 になるように Cauchy model において A=1.4433, B=0.01 と設定して光学定数を算出した（Table 10）。Table 10 に設定した条件においてシランカップリング剤の膜厚を求めたところ、3.4±1.7 nm であった(n=6)。この結果から、エリプソメトリーによってもシランカップリング剤の存在が確認出来、かつシランカップリング剤の分子長が最大で 1.86 nm である事から、シランカップリング剤が 2 層程度で存在していると示唆された[56]。

Table 10 シランカップリング剤の光学定数（590 nm における屈折率を 1.472 と仮定）

波長 (nm)	屈折率 n (–)	消衰係数 k (–)	波長 (nm)	屈折率 n (–)	消衰係数 k (–)
400	1.5058	0	710	1.4631	0
410	1.5028	0	720	1.4626	0
420	1.5	0	730	1.4621	0
430	1.4974	0	740	1.4616	0
440	1.495	0	750	1.4611	0
450	1.4927	0	760	1.4606	0
460	1.4906	0	770	1.4602	0
470	1.4886	0	780	1.4597	0
480	1.4867	0	790	1.4593	0
490	1.4849	0	800	1.4589	0
500	1.4833	0	810	1.4585	0
510	1.4817	0	820	1.4582	0
520	1.4803	0	830	1.4578	0
530	1.4789	0	840	1.4575	0
540	1.4776	0	850	1.4571	0
550	1.4764	0	860	1.4568	0
560	1.4752	0	870	1.4565	0
570	1.4741	0	880	1.4562	0
580	1.473	0	890	1.4559	0
590	1.472	0	900	1.4556	0
600	1.4711	0	910	1.4554	0
610	1.4702	0	920	1.4551	0
620	1.4693	0	930	1.4549	0
630	1.4685	0	940	1.4546	0
640	1.4677	0	950	1.4544	0
650	1.467	0	960	1.4542	0
660	1.4663	0	970	1.4539	0
670	1.4656	0	980	1.4537	0
680	1.4649	0	990	1.4535	0
690	1.4643	0	1000	1.4533	0
700	1.4637	0			

2-5-5.抗体固定化基板の調製

Table 2 の Entry 1 におけるプロトコルに基づいて anti-AFP 固定化基板の作製を実施した。抗体が SiN 基板上に固定化されていることを確認するため、RIfS にて抗体固定化前（カルボキシル化基板）と抗体固定化の基準波長の差（Δλ）を算出したところ、Table 11 に示した通り 10.12±1.07 nm であった(n=6)。ここで、Table 11 に示す抗体固定化前とはカルボキシル化基板の事を指している。

Table 11 抗体固定化前後の RIfS 基準波長

基準波長 (nm)		Δλ (nm)
抗体固定化前	抗体固定化後	
564.97	575.59	10.62
568.68	578.73	10.05
572.12	581.72	9.60
568.34	580.32	11.98
570.26	579.24	8.98
578.91	588.38	9.47

RIfS の反射スペクトルについて評価を行ったところ（Figure 27)、無修飾からカルボキシル化、また、カルボキシル化から抗体固定化への表面修飾に伴い反射スペクトルに変化が観測され、全体的に長波長側へのシフトが見られた。この結果から、anti-AFP の固定化が可能であることが示されたので、この anti-AFP 固定化基板を用いて抗原抗体反応の検出に移った。

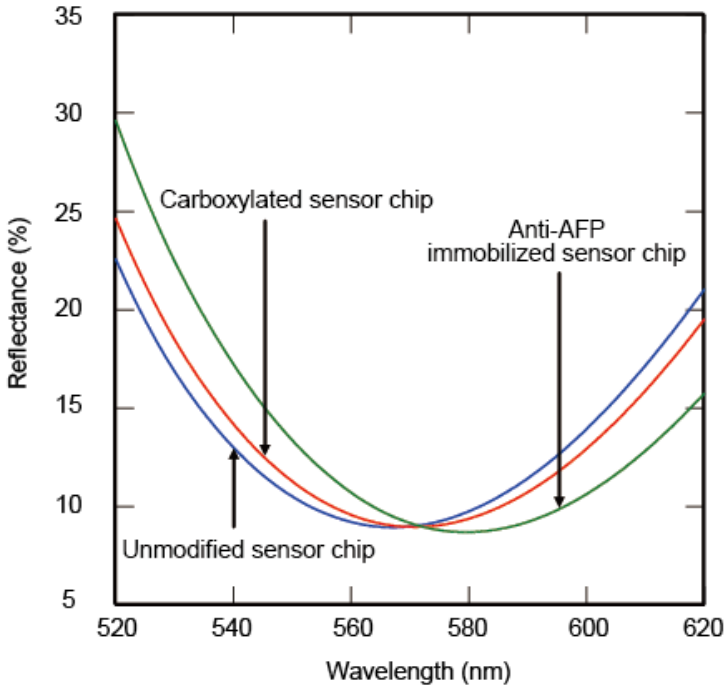


Figure 27 SiN 基板上への抗体固定化修飾に伴う RIfS における反射スペクトルの変化（青線：無修飾 SiN 基板、赤線：カルボキシル化基板、緑線：anti-AFP 固定化基板）

2-6.結論

第2章では、AFPを検出するための、anti-AFP固定化基板の作製方法について検討した。SiN 基板表面には、酸素原子が 40%存在していることを確認し、水酸基を利用したシランカップリング剤による修飾が可能であることを明らかにした。カルボキシル基修飾を行った基板に対して、活性エステルを利用して共有結合的に anti-AFP を固定化することで、anti-AFP固定化基板の作製方法を確立した。

第３章　RIfS を用いた AFP 抗原抗体反応の計測

3-1.AFP 抗原抗体反応の計測

本章では、第 2 章で作製した anti-AFP 固定化基板を用いた RIfS による抗原抗体反応の計測について述べる。以下の Figure 28 に示した検出系を基にして PDMS のフローセルを通してマイクロ流路に、シリンジポンプによる送液、インジェクターによる AFP 溶液導入を行うことにより抗原抗体反応の検出を試みた。最初に、反応条件として 9.58 mM PBS バッファー、pH 7.4、反応温度 25 ℃、BSA ブロッキングの下で RIfS による計測が可能か検討し、目標とする抗原抗体反応のカットオフ値である 20 ng/mL 以下の検出を可能にするための反応条件の最適化を行った。最後に、本検出系の体外診断装置としての実用性を見積もるため、血中タンパク質との交差性反応試験、ならびにヒト正常プール血清を利用した血清中の AFP 検出を試みた。

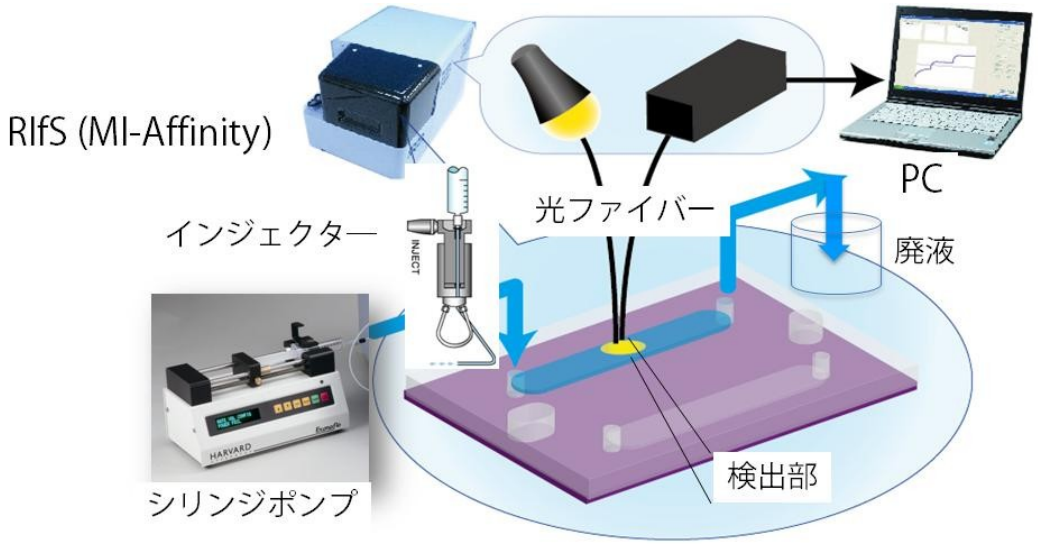


Figure 28 AFP 抗原抗体反応の検出系概略図

3-2.試薬リスト

Reagent	Manufacturer	Catalog No.	Notes (Grade)
Acetic acid	Nacalai Tesque, Inc.	00222-55	スペクトル用特製試薬
Albumin, Bovine Serum (BSA)	Merck KGaA	126575	-
Albumin, from human serum (HSA)	Sigma-Aldrich Inc.	A9511-1G	≧97%
2-Aminoethanol (Ethanolamine)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	019-12465	和光一級
Anti-AFP antibody (clone: 6D2)	Mikuri immunology Laboratory, Inc.	-	-
Fibrinogen, from human plasma	Sigma-Aldrich Inc.	F3879-100MG	-
Glycine	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	070-05281	分子生物学用
Guanidine	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	078-01821	生化学用
HEPES (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine Ethane sulfonic acid)	DOJINDO LABORATORIES	340-08233	分子生物学用
Human serum (pooled)	Kohjin Bio Co., Ltd.	12181201	ヒト正常血清
Hydrochloric acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	083-01095	容量分析用 (1 mol/l)
IgG from human serum	Sigma-Aldrich Inc.	I4506-100MG	-
3-Morpholinopropanesulfonic acid (MOPS)	DOJINDO LABORATORIES	345-01804	試験研究用
Neutravidin	Thermo Fisher Scientific Inc.	31000	-
10×PBS buffer (pH 7.4)	NIPPON GENE CO., LTD.	314-90185	-
Potassium chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	163-03545	特級
Sodium chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	31320-05	特級

Sodium hydroxide	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	192-02175	容量分析用 (1 mol/l)
Sodium dihydrogenphosphate dihydrate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	198-02812	特級
Transferrin, Human Plasma	Atehens Research & Technology, Inc.	16-16-032001	-
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	204-07885	生化学用
Tween20	GE Healthcare Bio-Sciences AB	17-1316-01	-

3-3.使用機器

反射干渉分光法（RIfS）

抗原抗体反応、あるいは交差性試験の際のタンパク質吸着の計測は RIfS（MI-Affinity, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)を用いて行った。Figure 29 に抗原抗体反応の測定概念図を示した。抗原添加に伴うΔλのリアルタイムな変化を計測し、再生溶液により抗原を解離することで再実験を可能とした。

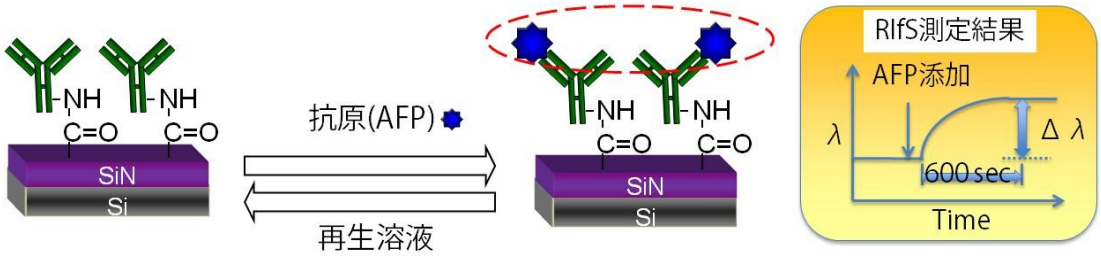


Figure 29 RIfS による抗原抗体反応の測定概念図

RIfS 測定条件としては、特に記載がない限りは以下の条件を採用した。基板を MI-Affinity にセット後、基板上に PDMS フローセルを装着して体積 4 μL (16 mm×2.5 mm ×0.1 mm)の流路を形成した。シリンジポンプ（Econoflow Syringe Pump 70-2205, Harvard Apparatus, MA, USA)を用いて基板への送液を行った。流量は 20 μL/min に設定した。測定部温度を 25℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。

分光光度計

Anti-AFP への蛍光標識の確認は NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc., MA , USA)を用いて行った。

3-4.実験方法

3-4-1.SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価

milliQ 水をランニングバッファーとして用いて無修飾 SiN 基板に対する酸、塩基耐性を評価するために、Table 12 に示した溶液を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 µL 注入した。測定開始時の基準波長に対して、サンプル注入 1200 秒後から 1500 秒後までの平均基準波長を溶液に伴うΔλとして評価した。

Table 12 SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価に用いた溶液

Solution	pH
100 mM HCl aq.	1.0
10 mM Glycine−HCl buffer	2.0
10 mM Glycine−HCl buffer	3.0
10 mM Sodium acetate buffer	4.0
10 mM PBS buffer	7.4
1 M Tris−HCl buffer	9.0
20 mM Ethanolamine−acetic acid buffer	10.0
50 mM Sodium carbonate buffer	10.2
1 mM NaOH aq.	11.0
1 mM KOH aq.	11.1
10 mM NaOH aq.	12.0
10 mM KOH aq.	12.2
100 mM NaOH aq.	13.0
100 mM KOH aq.	13.1
1 M NaOH aq.	14.0
1 M KOH aq.	14.2

3-4-2.BSA ブロッキングした anti-AFP 固定化基板の抗原抗体反応

第 2 章で作製した anti-AFP 固定化基板に対して、PBS buffer（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7.4）で溶解した 1% BSA 溶液を室温で 30 分間浸漬することで、BSA でブロッキングした anti-AFP 固定化基板に対して同様の PBS buffer をランニングバッファーとして用いて抗原抗体反応を実施した。PBS buffer 中に溶解した AFP(1 µg/mL または 10 µg/mL)は MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 µL 注入した。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。測定試料注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴うΔλとして評価した。BSA ブロッキングをした基板と対照実験として、BSA ブロッキングをしない基板とのΔλを比較した。

3-4-3.界面活性剤による SiN 基板への非特異吸着抑制検討

無修飾の SiN 基板と、PBS buffer（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, pH 7.4）、0.001% PBST(前記 PBS buffer に Tween20 を 0.001%添加したもの)をランニングバッファーとして用いて、界面活性剤による SiN 基板へのタンパク質の非特異吸着抑制検討を実施した。ランニングバッファーに溶解した neutravidin (100 µg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 µL 注入した。測定試料注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を neutravidin の非特異吸着に伴う Δλとして、ランニングバッファーに対して界面活性剤の添加に伴う、SiN 基板への非特異吸着の変化を評価した。

3-4-4.抗原抗体反応の繰り返し再現性

第 2 章で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて、抗原抗体反応の繰り返し再現性を評価した。0.001% PBST 中に溶解した AFP (1 µg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクター、あるいはオートサンプラー（SIL-20AC, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan）を通じて 100 µL 注入した。AFP を導入して 600 秒後に、10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を同様の方法にて 100 µL 導入した。この AFP, Glycine-HCl の注入を 1 サイクルとして、シリンジポンプで 20 サイクル、オートサンプラーで 100 サイクルの AFP 繰り返し検出を実施した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴う Δλとして、anti-AFP 固定化基板の繰り返し再現性を評価した。

3-4-5.抗原抗体反応感度評価

第 2 章で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて RIfS による抗原抗体反応の感度評価を実施した。0.001% PBST 中に溶解した AFP (0.1, 0.3 1, 3, 10, 30 または 100 µg/mL)溶液を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 µL 注入した。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴う Δλとして評価した。

3-4-6.抗原抗体反応の吸着特性、光学特性評価

3-4-5.で得られた結果を Langmuir 吸着等温式に当てはめることで、抗原抗体反応の吸着形式について評価した。Langmuir 吸着等温線から求めた平衡状態における会合定数に対し、RIfS による抗原抗体反応のリアルタイム測定データを用いて、MI-Affinity による解析モードを利用した会合速度定数 *ka*, 解離速度定数 *kd*, 会合定数 *Ka*, 解離定数 *Kd*の算出を行い、

両者を比較した。解析モードには会合領域（会合開始時間、会合終了時間）および解離領域（解離開始時間、解離終了時間）を設定することが出来るが、以下の 3 種類にの条件における反応速度定数をそれぞれ算出した。

1)会合時間 5 分（試料注入開始 50 秒後～350 秒後）、解離時間 5 分（試料注入開始 350 秒後～650 秒後）

2)会合時間 7 分（試料注入開始 50 秒後～470 秒後）、解離時間 3 分（試料注入開始 470 秒後～650 秒後）

3)会合時間 8 分（試料注入開始 50 秒後～530 秒後）、解離時間 2 分 （試料注入開始 530 秒後～650 秒後）

尚、試料注入開始 50 秒後というのは、試料を注入してから測定部に到達するまでの時間を考慮したものである。

3-4-7.二次抗体を利用した高感度化検討

第 2 章で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて、二次抗体を利用した高感度化検討を実施した。0.001% PBST 中に溶解した AFP (0.1, 0.3 1, 3, 10, 30 または 100 μg/mL)溶液を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。AFP 注入後、続いて anti-AFP(clone: 6D2, 10 μg/mL)を同様にインジェクターを通じて 100 μL 注入した。また、anti-AFP を APEX Antibody Labeling Kits（Life Technologies Corporation, CA, USA）を利用して、蛍光色素標識（Alexa 488、Alexa555、Alexa594、Alexa647）を行った(Figure 30)。

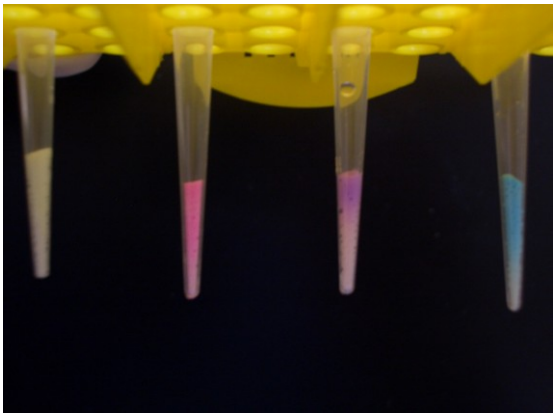


Figure 30 APEX Antibody Labeling Kits（左から Alexa 488、Alexa555、Alexa594、Alexa647）

抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。AFP、あるいは anti-AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗

体反応に伴うΔλとして評価した。

3-4-8.反応条件の最適化による高感度化検討

3-4-8-1.ランニングバッファー組成が抗原抗体反応に与える影響

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、9.58 mM phosphate buffer、10 mM Tris-HCl buffer、10 mM MOPS buffer、あるいは 10 mM HEPES buffer（pH は全て 7.4 に統一し、それぞれのバッファーに対して塩として 138 mM の NaCl を加えるもの、加えないもの 2 種類）の調製を行った。つまり(緩衝液の種類: 4 種類)×(塩の有無: 2 種類)の計 8 種類のバッファーをランニングバッファーとして用いて、バッファー組成が抗原抗体反応に与える影響を評価した。それぞれのバッファーを用いて調製した AFP 溶液(1 μg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。その後、続けてより高濃度の AFP 溶液(10 μg/mL)を注入した後、再生溶液として 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を 100 μL 注入した。この 3 種類の溶液の注入を 1 サイクルとし、この順番で 2 サイクル評価を行った。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴うΔλとして評価した。

3-4-8-2.塩濃度が抗原抗体反応に与える影響

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)をランニングバッファーとして用いて、塩濃度が抗原抗体反応に与える影響を評価した。塩としては、75 mM、300 mM、500 mM、1 M の NaCl を加えたもの、計 4 種類の調製を行った。AFP (1 μg/mL)は MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 導入された。その後、続けてより高濃度の AFP (10 μg/mL)が導入された。その後、再生溶液として 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)が導入された。この 3 種類の溶液の注入を 1 サイクルとし、この順番で 2 サイクル評価を行った。3-4-8-1.と同様に AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴うΔλとして評価し、バッファー組成の検討を行った時に用いた Tris-HCl buffer の塩濃度 0 mM、138 mM のものと併せて評価を行った。

3-4-8-3.pH が抗原抗体反応に与える影響

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST (9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて pH が抗原抗体反応に与える影響を評価した。Table 13 に示した通り、10 mM の各バッファーの pH を 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.4, 9.0 及び 10.0 に調製し、これらのバッファーにそれぞれ AFP を溶解した（1 μg/mL)。調製した各 AFP 溶液を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準

波長を抗原抗体反応に伴うΔλとして評価した。

Table 13 AFP の溶解に用いた緩衝液（濃度は全て 10 mM）

Solution	pH
Glycine-HCl buffer	3.0
Sodium acetate buffer	4.0
Sodium acetate buffer	5.0
Sodium acetate buffer	6.0
Sodium phosphate buffer	7.4
Sodium carbonate buffer	9.0
Sodium carbonate buffer	10.0

3-4-8-4.反応温度が抗原抗体反応に与える影響

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST（9.58 mM phosphate, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて反応温度が抗原抗体反応に与える影響を評価した。測定部温度を 10℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。0.001% PBST を用いて調製した AFP 溶液(1 μg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。再生溶液が導入されて 600 秒後、MI-Affinity 内の操作により、5℃/min の勾配で温度を 15℃に昇温した。15℃においても、同様に AFP、再生溶液の注入を行った。この操作を 20℃、25℃、30℃、35℃、40℃においても実施した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴うΔλとして評価した。

また、抗原抗体反応測定時において測定部温度の温度変更に伴う RIfS のベースラインの変化が観察されたことを受けて、次の実験を行った。無修飾の SiN 基板を MI-Affinity にセットした。基板上に PDMS フローセルを装着し、体積 4 μL（16 mm×2.5 mm×0.1 mm）の流路を形成した。ランニング溶液には、milliQ 水を用いた。測定部温度を 25℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。測定開始 300 秒後に MI-Affinity ソフトウェア内の温度変更ファイルにより設定した温度スケジュールを実行した。SiN 基板に対して Table 14 に示したような温度変化を実行した時のベースラインを計測した。

Table 14 MI-Affinity による温度スケジュール

No.	Temperature (℃)	Time (s)	Rate of change (℃/s)
0	25 (constant)	0	0
1 (start)	25→10	300	-0.0333
2	10→40	750	0.0333
3	40→10	1650	-0.0333
4	10→40	2550	0.0333
5	40→10	3450	-0.0333
6	10→40	4350	0.0333
7 (end)	40→25	5250	-0.0333
8	25 (constant)	5700	0

3-4-8-5.最適条件における抗原抗体反応感度評価

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、Tris-HCl buffer（10 mM Tris, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 5.0）をランニングバッファーとして用い、3-4-7-1～3-4-7-4 それぞれの検討で選択した最適条件における抗原抗体反応の感度評価を実施した。測定部温度を 30℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。ランニングバッファーに溶解した AFP (0.01, 0.1, 0.3 1, 3, 10, 30 または 100 μg/mL) 溶液は MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 導入された。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴う Δλとして、3-4-5.の初期条件下における抗原抗体反応の感度との比較を実施した。また、Langmuir の吸着等温線から反応形式や AFP の占有率についても同様に算出した。

3-4-9.血中タンパク質との交差性試験

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、Tris-HCl buffer（10 mM Tris-HCl, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 5.0）をランニングバッファーとして用いて、血中タンパク質との交差性試験を実施した。測定部温度を 30℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。ランニングバッファーに溶解した human fibrinogen、human IgG、HSA、human transferrin (各 100 μg/mL)を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 注入した。血中タンパク質注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を SiN 基板への非特異吸着に伴う Δλとして、3-4-7.において 100 μg/mL の AFP を注入したときの Δλと比較した。

3-4-10.血清中 AFP の検出

2-4-5.で作製した anti-AFP 固定化基板と、0.001% PBST (9.58 mM phosphate, 2.68 mM

KCl, 138 mM NaCl, 0.001%Tween20, pH 7.4）をランニングバッファーとして用いて血清中 AFP の検出を行った。測定部温度を 25℃に設定して、RIfS のベースラインが安定したのを確認後、測定を開始した。ランニングバッファーと同じ組成の PBST、あるいはヒト正常血清（原液、あるいはランニングバッファーと同じ組成の PBST で 10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈した溶液）に添加した AFP (0.1, 1 または 10 μg/mL)溶液を MI-Affinity に備えられているインジェクターを通じて 100 μL 導入した。抗原抗体反応の再生溶液としては 10 mM Glycine-HCl 溶液(pH 1.5)を選択した。AFP 注入 600 秒後の測定点に前後 15 点を加えた計 31 点の基準波長を抗原抗体反応に伴う Δ λ として評価した。

3-5.結果と考察

3-5-1.SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価

無修飾の SiN 基板に対して、pH 1.0～14.2 までの各溶液 100 μL を注入した時の結果を Figure 31 に示した。pH 9 の Tris-HCl buffer において基準波長（λ）に対して影響が見られ始め、それ以上になると pH が大きくなる毎にΔλが負方向に大きくなる事が分かった。SiN 基板に特に修飾を施していない事から、この結果は SiN 自体が浸食されている事に起因すると考えられる。また、基板のシリコン自体が下記式(8)で示される水酸化物イオンによる Si の溶解反応と、式(9)で示される水の分解反応による水酸化物イオンの生成反応によりアルカリでエッチングされることから[57]、抗原抗体反応の再生条件にはアルカリ性条件よりも酸性条件の選択を行うのが好ましいと言える。

$$Si + 4OH^- \rightarrow Si(OH)_4 + 4e^- \quad (6)$$

$$4H_2O + 4e^- \rightarrow 4OH^- + 2H_2 \quad (7)$$

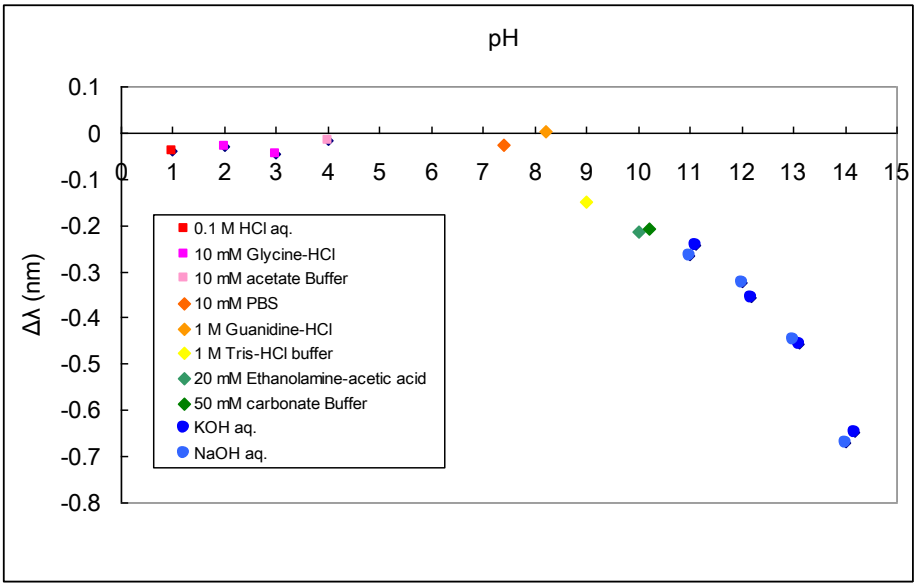


Figure 31 SiN 基板に対する酸、塩基耐性評価

3-5-2.BSA ブロッキングした anti-AFP 固定化基板の抗原抗体反応

BSA でブロッキングした anti-AFP 固定化基板に対する抗原抗体反応の RIfS 測定結果を Figure 32 に示した。

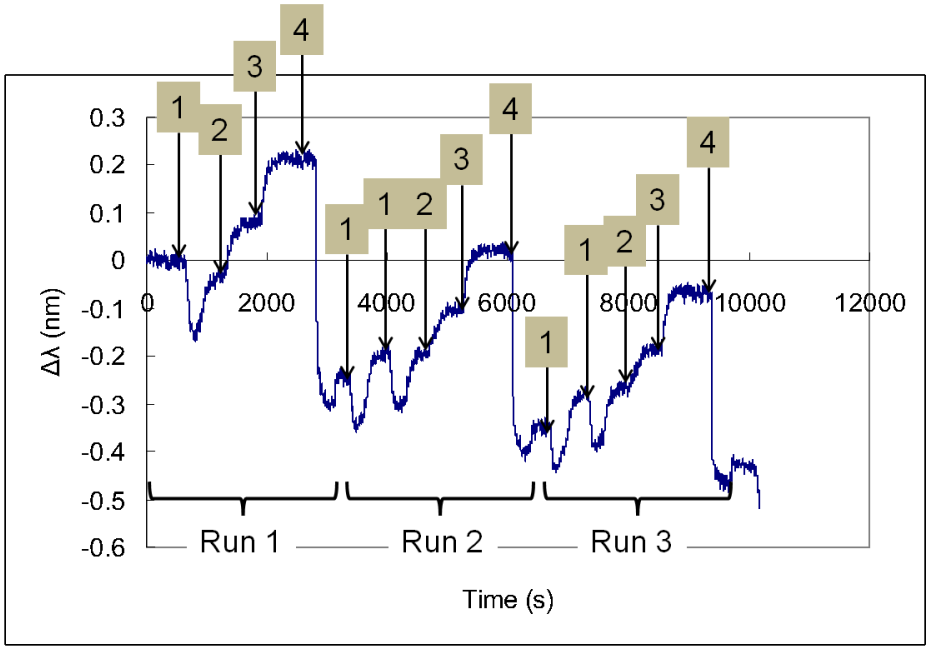


Figure 32 BSA ブロッキング基板を用いた抗原抗体反応(1: 1% BSA, 2: AFP (1 μg/mL), 3: AFP (10 μg/mL), 4; 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5))

抗原抗体反応の繰り返し再現性に関して、Run 1 における AFP の反応量（Δλ）を 100%として Run 2、Run 3 と比較すると、AFP が 1 μg/mL の時は Run 2, Run 3 ともに 25%～30%、AFP が 10 μg/mL の時は Run 2, Run 3 ともに 15%～20%低下した（Figure 33）。この結果から、10 mM Glycine-HCl (pH 1.5)による再生で、抗原は抗体から解離し、再び接触した抗原との抗原抗体反応は起こるものの、反応性の低下が認められた。また、再生溶液添加に伴いベースラインの低下が見られた。これは、酸性の再生溶液が先程の基板に対する耐性評価の結果から SiN 基板に直接影響を与えていないとすると、再生溶液は AFP だけではなく、BSA も基板から解離している現象も見ている可能性が考えられる。この事は、再生溶液が繰り返し接触することで BSA ブロッキングの効果が不安定になる恐れがある事を示している。また、BSA 自体により抗原抗体反応の反応効率自体が低下する可能性もある。そこで、BSA による基板へのブロッキングではなく、界面活性剤の添加により SiN 基板への非特異吸着を抑制することを試みた。

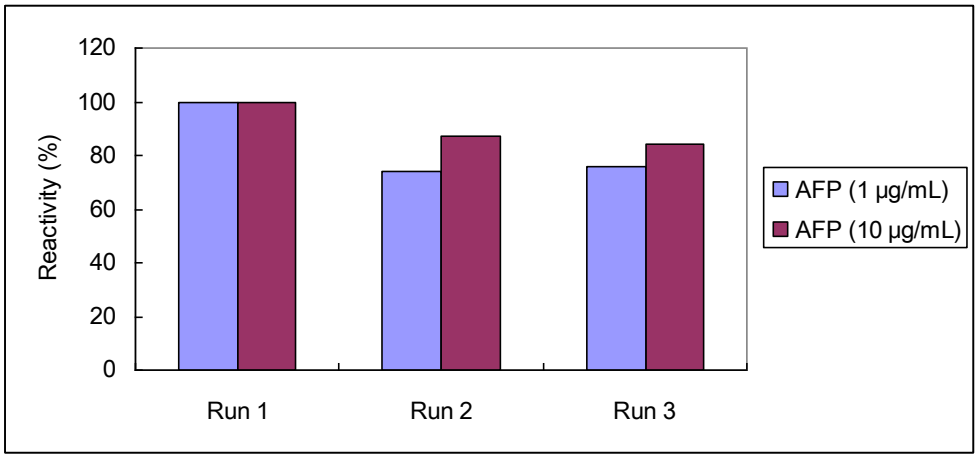


Figure 33 BSA ブロッキング基板による抗原抗体反応の繰り返し再現性

3-5-3.界面活性剤による SiN 基板への非特異吸着抑制検討

無修飾の SiN 基板に対して、ランニングバッファーを、PBS とした時の neutravidin (100 μg/mL)に対するΔλを評価した(Figure 34a)。

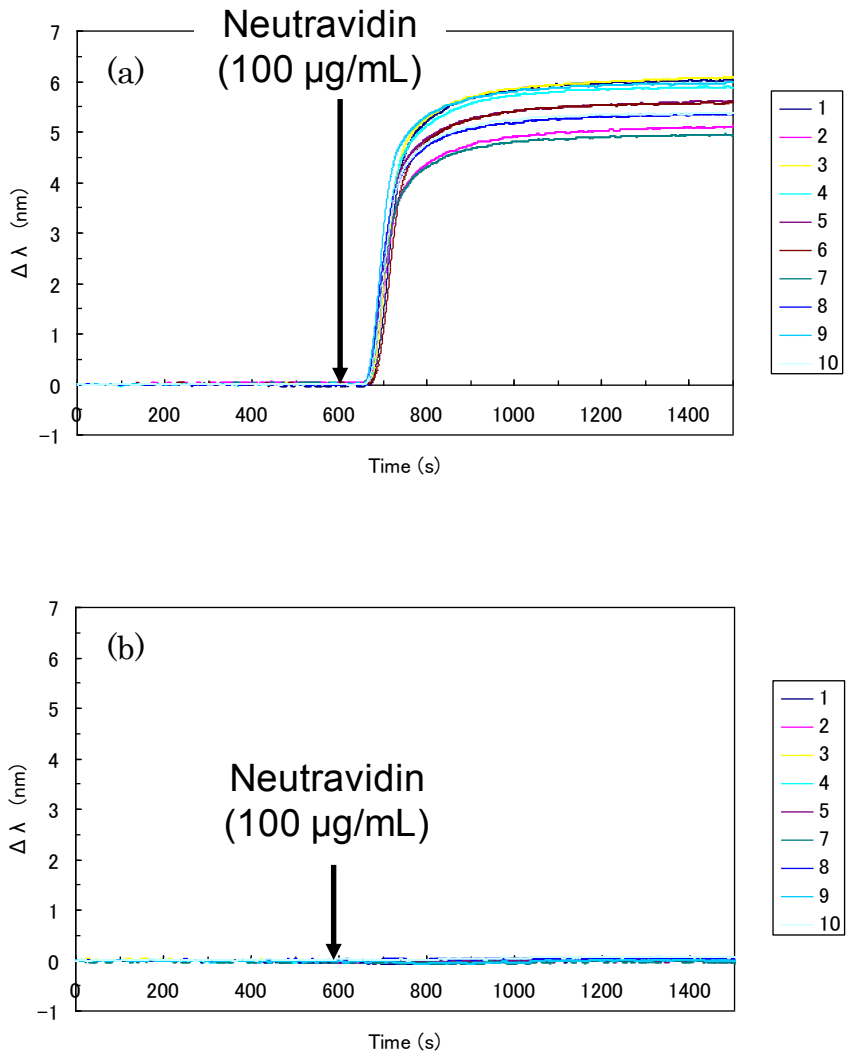


Figure 34 SiN 基板に対する neutravidin の非特異吸着評価(ランニングバッファー: (a)PBS、(b) 0.001%PBST)

Figure 34(a)と(b)を比較すると、ランニングバッファーに Tween20 を添加することで、neutravidin 添加後のΔλ値の増加が抑制されていた。このことは、Tween20 存在下において neutravidin の SiN 基板に対する非特異吸着が顕著に抑制されることを示唆している。添加後 10 分後のΔλ値は、Tween20 存在下では 1/100 となった（Figure 35)。

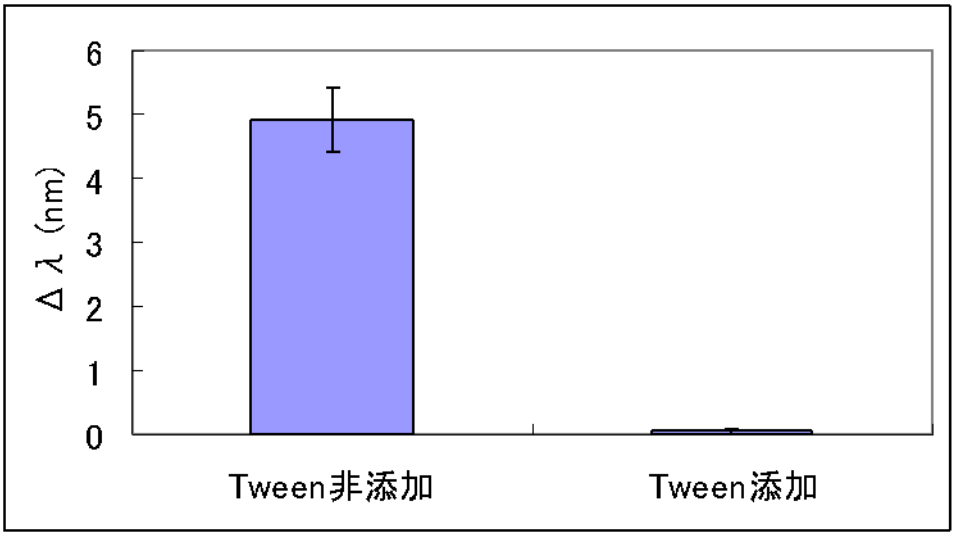


Figure 35 ランニングバッファーの違いによる SiN 基板に対する neutravidin の非特異吸着評価の差(n=10)。

これは、タンパク質の疎水性領域が界面活性剤と相互作用することで親水化され、基板への非特異吸着を防ぐ事が一因として考えられる。ただし、0.001%PBST をランニングバッファーに用いた時には、ベースラインを安定化させる際に PBS よりも顕著なドリフト傾向が認められる傾向があった事から (data not shown)、基板表面の疎水部分に対して Tween20 が吸着することで、基板の親水性が向上し、neutravidin の非特異吸着が抑制出来た可能性も否定出来ない。

3-5-4.抗原抗体反応の繰り返し再現性

anti-AFP 固定化基板を用いて、AFP の抗原抗体反応を 100 サイクル繰り返した際の RIfS 測定結果について Figure 36 に示した。再生溶液には BSA ブロッキング基板の時と同様に 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5)を用いた。100 サイクルに伴う Δ λ のばらつきは CV=5.4%と小さかったことから、抗体が失活することなく、35 時間にわたって安定な測定が可能であることが示された。また、BSA ブロッキング基板の抗原抗体反応評価時に見られたような再生溶液の導入に伴う、ベースラインのマイナスドリフトも見られなかった。

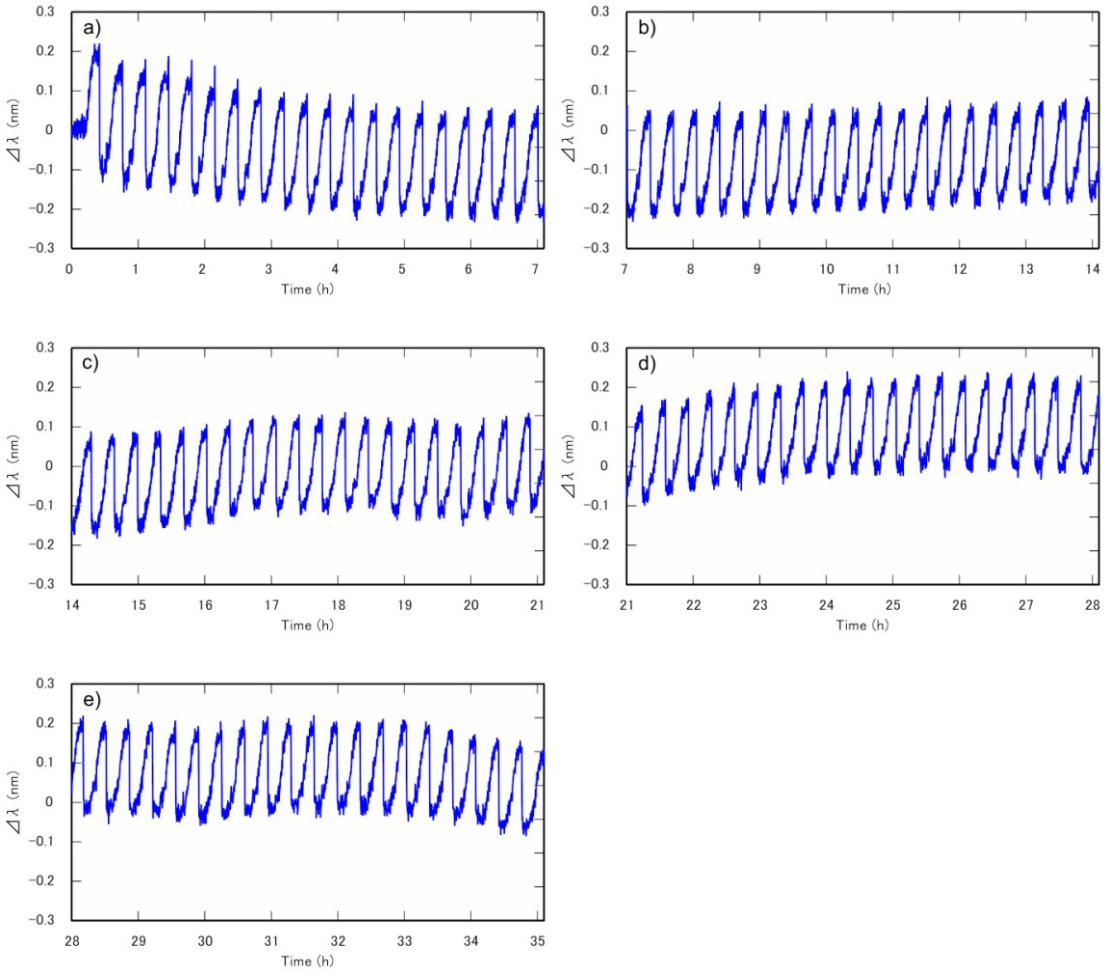


Figure 36 AFP 抗原抗体反応繰り返し再現性評価 (n=100) (a) 1-20, (b) 21-40, (c) 41-60, (d) 61-80, (e) 81-100 サイクル)

3-5-5.抗原抗体反応感度評価

anti-AFP 固定化基板を用いて、AFP の抗原抗体反応の濃度を 0.1～100 μg/mL まで変化させた時の RIfS 測定結果を Figure 37 に示した。

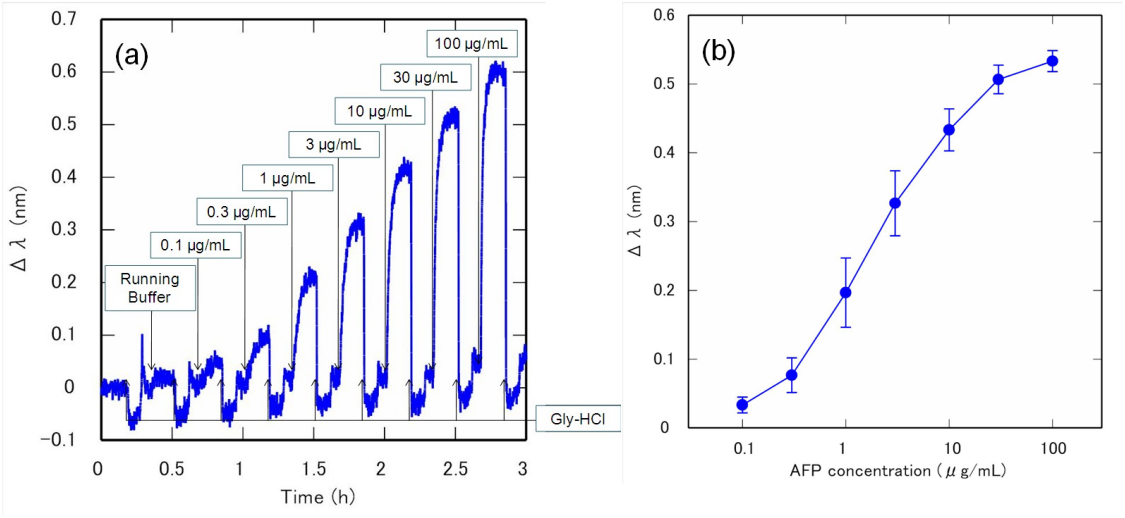


Figure 37 AFP 抗原抗体反応感度評価 (a)RIfS 測定生データ、(b) Δ λ の AFP 濃度依存性 (n=3)

Figure 37b は n=3 としてエラーバーは標準偏差（standard deviation: SD）を表している。本 RIfS システムにおいては、AFP を 0.1～100 μg/mL まで検出可能であり、AFP の検出限界（limit of detection: LOD）は 0.1 μg/mL である事が分かった。0.1 μg/mL という値は、癌手術後の肝内累積再発の指標として用いられているため[58]、本 RIfS システムは術後の肝臓疾患、特に肝細胞癌のモニタリングに対して十分な感度を有していることが示された。また、RIfS には少なくとも今回示したような 3 桁以上の検出範囲を有しており、SPR や QCM などの他のラベルフリー検出システムと比較しても同等以上の検出範囲であった 2～50 ng/mL）[31-33]。

3-5-6.Langmuir 吸着等温線による抗原抗体反応の反応特性評価

本抗原抗体反応における吸着形式について Langmuir の吸着等温式を用いて評価を行った。Langmuir の吸着等温式は Masson らの式を参考にして、以下の式(8)によって導かれる[59]。

$$\frac{\Delta \lambda}{\Delta \lambda_{\max}} = \frac{K_a C}{1 + K_a C} \tag{8}$$

更に式(8)を変形すると、式(9)が導かれる。

$$\frac{C}{\Delta \lambda} = \frac{C}{\Delta \lambda_{\max}} + \frac{1}{K_a \Delta \lambda_{\max}} \tag{9}$$

ここで、Δλは RIfS による波長変化量、$\Delta\lambda_{max}$ は理論最大波長変化量、C は平衡濃度、K_a は抗原抗体反応における会合定数を示す。C については、基板に吸着した AFP に対して連続的に供給される AFP が圧倒的に多いことを想定して、注入時の AFP 濃度を当てはめた。

C を横軸、$C/\Delta\lambda$ を縦軸とした時に、各濃度のプロットの間で相関性が高く近似直線が引けることを、Langmuir の吸着等温式に従うか否かの判断指標とした。Figure 38 より、直線近似によって決定係数 $R^2 = 0.9998$ が得られた事から相関性が高く、Langmuir 型の吸着挙動を示していることが分かった。また、この吸着等温線の近似直線式より $\Delta\lambda_{max} = 0.60$ nm, $K_a = 3.74\times10^7\ M^{-1}$ と求められた。Langmuir 型の吸着は、吸着表面にのみ吸着サイトを有し、タンパク質と抗体が 1:1 で相互作用することを前提としていることから、AFP が基板表面に対して anti-AFP によってのみ認識される 1:1 の抗原抗体反応によって基板への吸着反応が進行している可能性を示唆している。

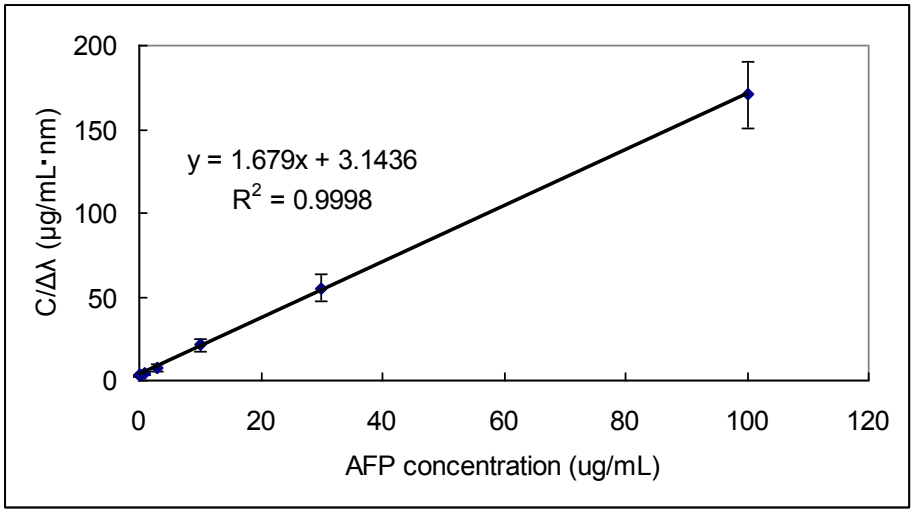


Figure 38 AFP 抗原抗体反応の Langmuir 吸着等温線（横軸 : AFP の濃度 C、縦軸 :（AFP の濃度 C）/（波長変化量Δλ））

RIfS による本抗原抗体反応の測定はリアルタイム計測であるため、速度論的な解析も可能である。そこで、測定生データの結果を元に、MI-Affinity の解析モードを利用して、会合速度定数 *ka*, 解離速度定数 *kd*, 会合定数 *Ka*, 解離定数 *Kd* を算出したものを Table 15 に示した。

Table 15 RIfS リアルタイム測定データによって算出された AFP 抗原抗体反応の反応速度定数

1)会合5 min+解離5 min

AFP濃度		会合開始時間	会合終了時間	解離開始時間	解離終了時間	会合速度定数: ka	解離速度定数: kd	結合定数: Ka
(μg/mL)	(M)	(s)	(s)	(s)	(s)	($M \cdot s^{-1}$)	(s^{-1})	(M^{-1})
0.1	1.43E-09	2450	2750	2750	3050	2.65E+06	-9.46E-04	-2.80E+09
0.3	4.29E-09	3650	3950	3950	4250	1.11E+06	-9.96E-04	-1.11E+09
1	1.43E-08	4850	5150	5150	5450	4.35E+05	-3.23E-04	-1.35E+09
3	4.29E-08	6050	6350	6350	6650	1.75E+05	-1.82E-04	-9.63E+08
10	1.43E-07	7250	7550	7550	7850	5.45E+04	-1.07E-04	-5.07E+08
30	4.29E-07	8450	8750	8750	9050	2.06E+04	-5.63E-05	-3.66E+08
100	1.43E-06	9650	9950	9950	10250	7.01E+03	5.59E-05	1.25E+08

2)会合7 min+解離3 min

AFP濃度		会合開始時間	会合終了時間	解離開始時間	解離終了時間	会合速度定数: ka	解離速度定数: kd	結合定数: Ka
(μg/mL)	(M)	(s)	(s)	(s)	(s)	($M \cdot s^{-1}$)	(s^{-1})	(M^{-1})
0.1	1.43E-09	2450	2870	2870	3050	1.36E+06	6.90E-04	1.97E+09
0.3	4.29E-09	3650	4070	4070	4250	1.12E+06	-9.20E-04	-1.22E+09
1	1.43E-08	4850	5270	5270	5450	3.88E+05	-7.81E-05	-4.97E+09
3	4.29E-08	6050	6470	6470	6650	1.57E+05	-2.37E-04	-6.60E+08
10	1.43E-07	7250	7670	7670	7850	4.26E+04	9.96E-05	4.28E+08
30	4.29E-07	8450	8870	8870	9050	1.62E+04	9.13E-05	1.78E+08
100	1.43E-06	9650	10070	10070	10250	5.59E+03	1.80E-04	3.10E+07

3)会合8 min+解離2 min

AFP濃度		会合開始時間	会合終了時間	解離開始時間	解離終了時間	会合速度定数: ka	解離速度定数: kd	結合定数: Ka
(μg/mL)	(M)	(s)	(s)	(s)	(s)	($M \cdot s^{-1}$)	(s^{-1})	(M^{-1})
0.1	1.43E-09	2450	2930	2930	3050	1.82E+06	2.30E-04	7.89E+09
0.3	4.29E-09	3650	4130	4130	4250	1.07E+06	-9.81E-04	-1.09E+09
1	1.43E-08	4850	5330	5330	5450	3.91E+05	2.85E-05	1.37E+10
3	4.29E-08	6050	6530	6530	6650	1.22E+05	4.17E-04	2.92E+08
10	1.43E-07	7250	7730	7730	7850	4.13E+04	3.00E-05	1.38E+09
30	4.29E-07	8450	8930	8930	9050	1.55E+04	8.52E-05	1.82E+08
100	1.43E-06	9650	10130	10130	10250	5.48E+03	3.28E-04	1.67E+07

1)では、7 種類の濃度のうち最も濃い 100 μg/mL を除く 6 種類で *kd* が負の値を示した。*kd* が負の値を示すということは、解離領域においても Δλ が上昇しているということと同義であるが、これは、解離領域において、正方向へのドリフトが生じたなどの RIfS の測定環境の問題、あるいは、基板に接触するまでに AFP 溶液の拡散が生じたため、5 分間送液した後も AFP が液体中に含まれていることを示唆する。特に後者の影響を回避するため、2)や 3)では、解離開始時間を AFP 注入後 7 分後、8 分後とした。2)においては、3 種類の濃度において kd が負の値を示したが、3)においては 1 種類のみであった。これらの結果から、3)の条件が反応速度定数算出において信頼性が最も高いと考えた。*Ka* については、$1.67 \times 10^7 \sim 1.37 \times 10^{10}$ M^{-1}（ただし、負の値を除く。）と最小値と最大値で 1000 倍程度異なっていた。このばらつきについて、*ka*、*kd* それぞれの値について着目すると kd が 10^{-4} あるいは 10^{-5} オーダーと 10 倍程度のばらつきであるのに対して、*ka* は 10^3 から 10^6 と 1000 倍程度異なっていた事から、*ka* の値のばらつきが原因となっている事が示唆された。今回算出した *Ka* の範囲の中に Langmuir 吸着等温線で得られた 3.74×10^7 M^{-1} という値は MI-Affinity 解析モードによって得られた値（$1.67 \times 10^7 \sim 1.37 \times 10^{10}$ M^{-1}）の中に入ってはいるものの、どの程度相関があるのかについては *ka*、*kd* を算出するソフトウェアの信頼性も含めて今後の検討課題である。

また、Essential Macleod を用いて以下の Figure 39 に示すような膜モデル系を用いることで、AFP が anti-AFP 固定化 SiN 基板上に不均一な単層を形成すると仮定した時の占有率について考察した。Si と SiN の光学特性（屈折率、吸収係数）はそれぞれ Table 6, 7 に記載の値を用いた。

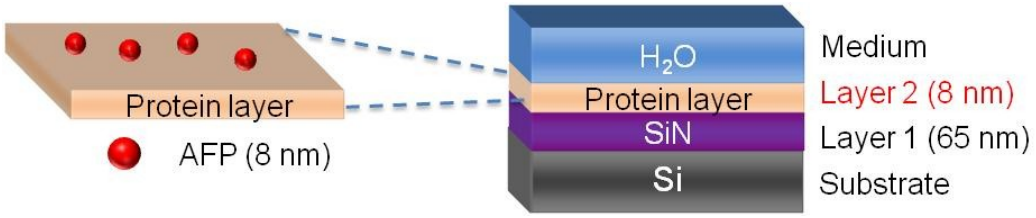


Figure 39 Essential Macleod で使用した膜モデル

AFP が吸着している層（protein layer）は、水と AFP との 2 成分系となるため、式(10)に示される Bruggeman による有効媒質近似 [60] を用いて、タンパク質の大きさが protein layer の膜厚と仮定した際の仮想的な水含有 protein layer の屈折率を算出した。

$$f_a \frac{\varepsilon_a - \varepsilon}{\varepsilon_a + 2\varepsilon} + (1 - f_a) \frac{\varepsilon_b - \varepsilon}{\varepsilon_b + 2\varepsilon} = 0 \qquad (10)$$

ε_a、ε_b はそれぞれ成分 AFP、b 水の誘電率、f_a は AFP の占有率である。また、屈折率 n と誘電率 ε には以下の式(11)の関係が成り立つ。

$$n = \varepsilon^2 \qquad (11)$$

AFP の大きさは 8 nm とし [61]、AFP の屈折率を 1.45、水の屈折率を 1.33 で一定とした時の AFP の占有率に対する protein layer の屈折率を Figure 40 に示した。AFP が存在しない部分には水が存在すると仮定した。

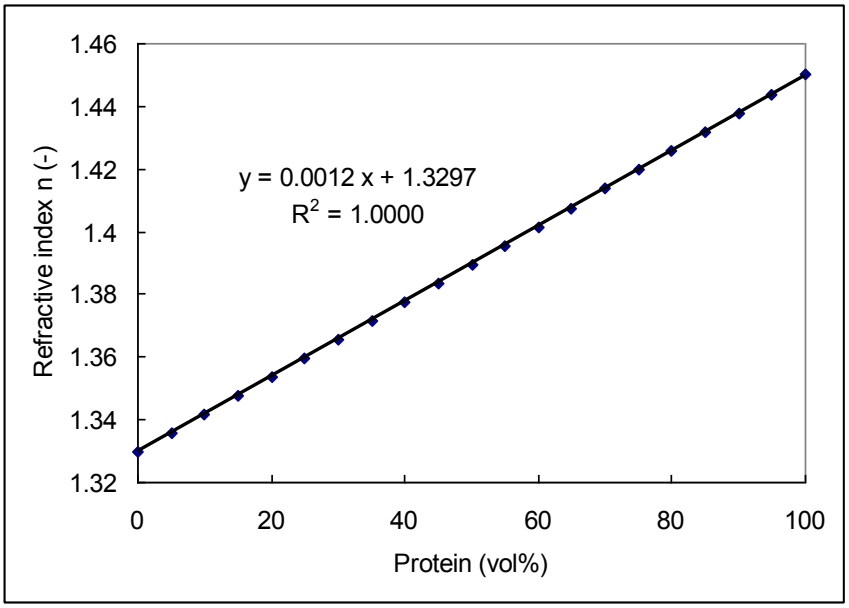


Figure 40 Essential Macleod で仮定した AFP が存在する protein layer の占有率に対する有効媒質近似による屈折率の算出

Figure 40 の結果より、タンパク質の存在割合に応じて一次関数的に屈折率が増加することが分かった。ここで得られた屈折率を Essential Macleod に代入することで、AFP の占有率に応じた反射率の極小値波長 λ を取得したところ（Figure 41）、こちらもタンパク質の存在割合に応じて一次関数的に λ が増加していくことが分かった。ここで、λ_{max} = 0.60 nm であるため、最大で 9%の AFP の吸着が見込める反応系であることが分かった。この反応条件では、目標とする 20 ng/mL の AFP を検出することが出来ないため、高感度化の検討に移った。

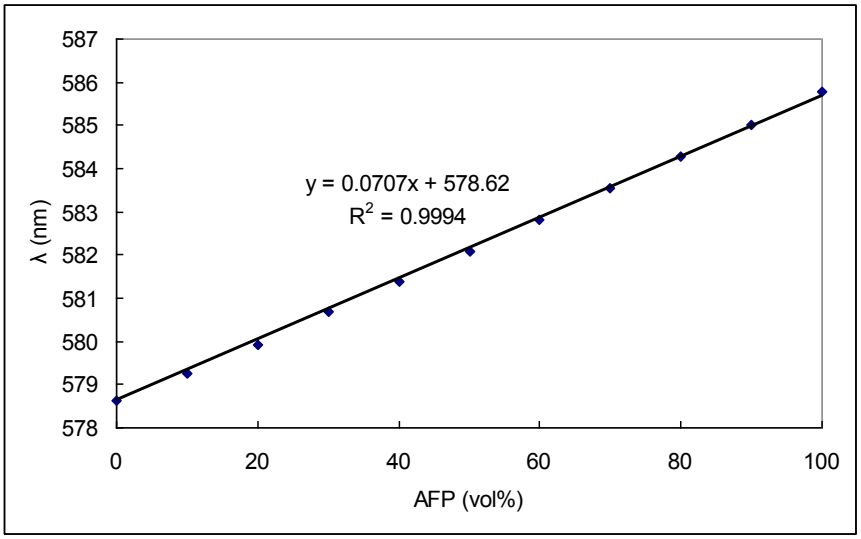


Figure 41 Essential Macleod を利用した AFP の占有率に応じた反射率極小値波長 λ

3-5-7.二次抗体を利用した高感度化検討

ここまでは、anti-AFP 固定化基板に対して、抗原抗体反応量を AFP 注入に伴うΔλとして直接評価してきたが、更なる高感度化を目指すため、AFP を導入後、基板に固定化した anti-AFP (clone: 1D5)とは異なるエピトープを有する anti-AFP (clone: 6D2)を二次抗体として導入することによる光学膜厚増加に伴う高感度化を検討した。また、二次抗体に対して蛍光色素標識（AlexaFluor488、AlexaFluor555、AlexaFluor594、AlexaFluor647）を行い、蛍光色素標識に伴う感度に与える影響について評価した。

APEX Antibody Labeling Kits を利用して、蛍光色素標識を行った二次抗体の吸収スペクトルについて Figure 42 に示した。

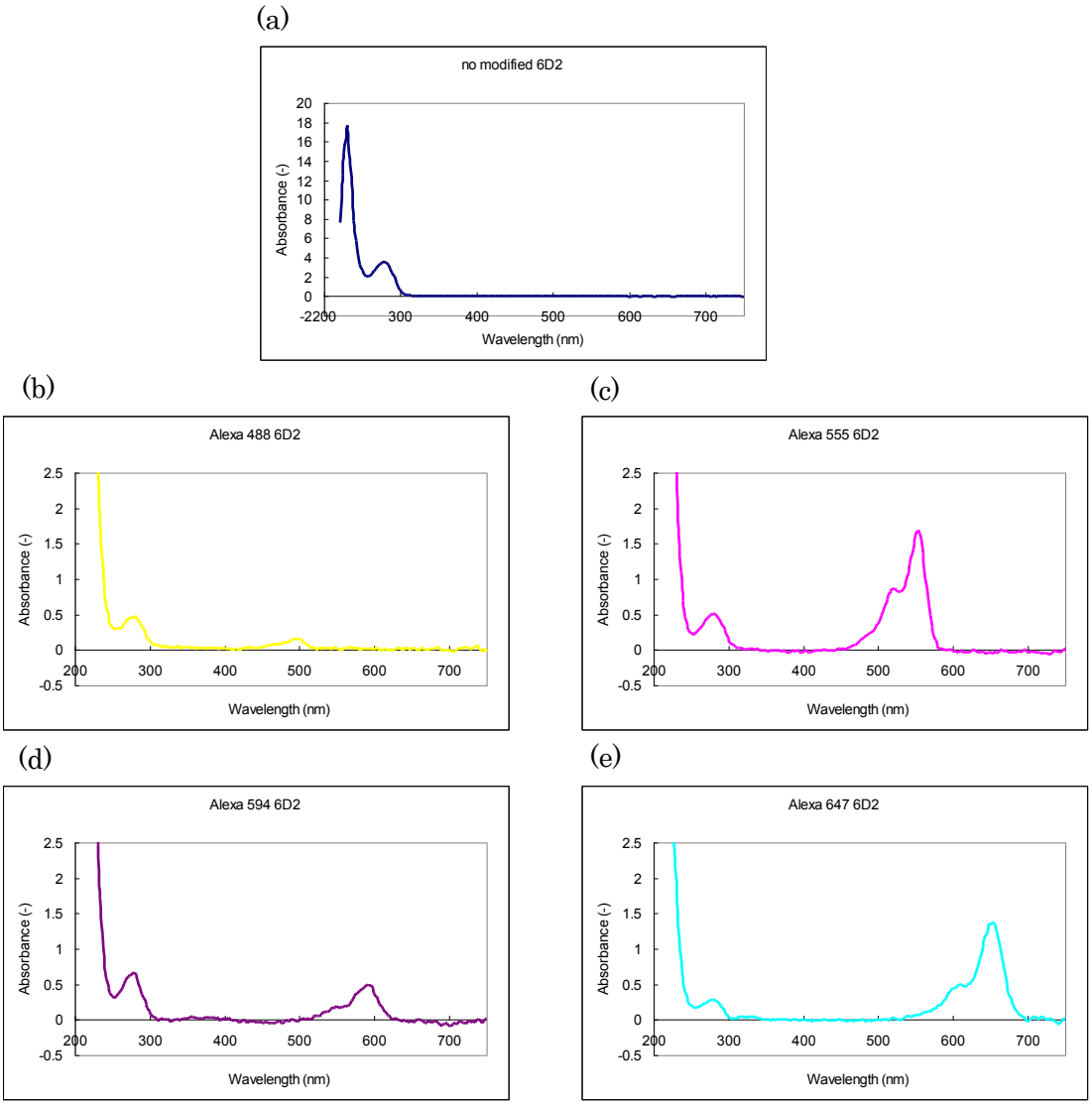


Figure 42 二次抗体(clone: 6D2)の吸収スペクトル((a) 標識なし、(b)Alexa 488 標識、(c)Alexa 555 標識、(d) Alexa 594 標識、(e) Alexa 647 標識)

タンパク質由来の 280nm 付近に吸収極大値が確認され、濃度はそれぞれ、(a) 2.54 mg/mL. (b) 0.30 mg/mL, (c) 0.35 mg/mL, (d) 0.47 mg/mL, (e) 0.17 mg/mL であった。また、蛍光標識抗体に関しては各蛍光色素の蛍光波長付近にピークが確認されたことから、抗体への二次抗体は上手くいっているものと判断した。このようにして調製した蛍光標識二次抗体を用いて、抗原抗体反応の検証を行った。AFP 溶液(10 µg/mL)注入後に、無標識あるいは蛍光標識二次抗体(10 µg/mL)を注入した。測定結果を Figure 43 に示した。蛍光標識に伴い、特に Alexa555 や Alexa594 は、RIfS の基準波長の算出に使われる反射率極小値(約 560nm)付近に吸収や蛍光を持つために、出力値に大きな影響があるかと思われたが、RIfS の Δλ

には大きな差は確認されなかったことから、蛍光標識に伴う感度の変化はないものと判断した。これは二次抗体が基板表面に付着する程度の蛍光や吸収では RIfS の測定値に影響を与えないということが言える。しかし、無標識であっても、レスポンスの上昇に寄与することは間違いないことが確認されたので、先程報告した感度算出試験における AFP の LOD（100 ng/mL）に対して二次抗体を添加した系を実施することで一定の感度向上が期待される。あるいは、ビーズのようなサイズが大きいものを用いて更に高感度に検出することが可能である事が示唆された。

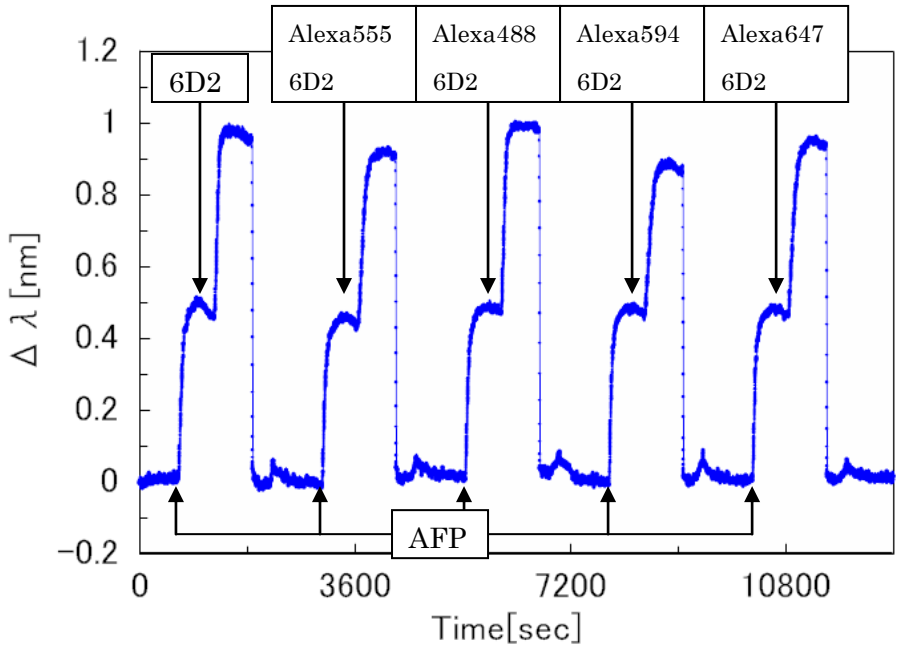


Figure 43 二次抗体を利用した AFP 抗原抗体反応（AFP、anti-AFP (clone: 6D2)ともに 10 μg/mL）

3-5-8.反応条件の最適化による高感度化検討

3-5-8-1.バッファー組成が抗原抗体反応に与える影響

カルボキシル化基板における、抗原抗体反応時のバッファーのイオン種について検討を行った。抗原抗体反応は、タンパク質-タンパク質相互作用（protein-protein interaction: PPI)の代表的な存在であり、静電引力や疎水性相互作用やなどの非共有結合によるアフィニティーに依り結合するため、その反応場の環境条件と用いるバッファーのイオン種は抗原抗体反応の効率に影響を与える。ここでは、0.001%Tween20 存在下、pH 7.4 において、リン酸（phosphate）, HEPES, Tris, MOPS について検討した(Figure 44)。また、塩（NaCl）の影響について同様に検討を行った(Figure 45, 46)。

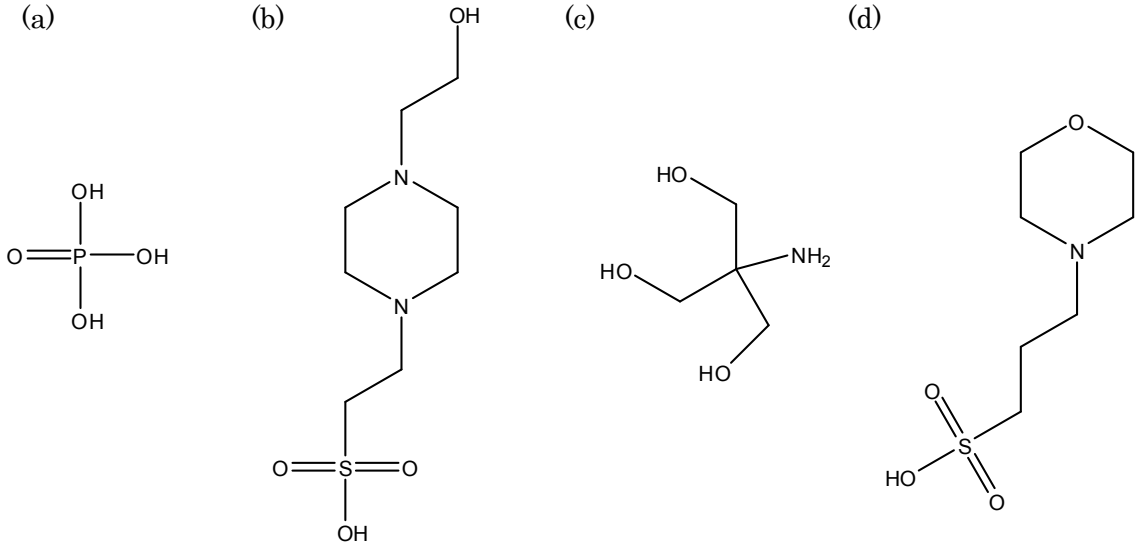


Figure 44 抗原抗体反応の条件検討に用いたバッファーの種類 ((a) リン酸, (b) HEPES, (c) Tris, (d) MOPS)

その結果、Tris、リン酸バッファーは HEPES, MOPS と比較して抗原抗体反応に伴う Δλが高い事が分かった（Figure 45）。これは、詳細については不明であるが、Good's buffer である HEPES, MOPS の構造中のスルホン酸が強酸として存在する事が、弱塩基（Tris）や弱酸（リン酸）のイオン種と比較して、タンパク質の電荷や構造に影響したことなどが原因として考えられる。また、塩の影響については、Figure 45 の左の列と右の列を比較すると分かるように、どのイオン種においても塩が存在する方が抗原抗体反応に伴う Δλが高くなる結果となった。これは、塩が存在しない時には、タンパク質中のアミノ酸が電荷を帯びやすい状態となる結果、疎水性相互作用が働きづらくなるために感度が低下した可能性が一因として考えられる。以上より、塩の有無が抗原抗体反応において重要であることが分かった。また、ここでは AFP 1 μg/mL において最も高感度であった Tris を最適なバッファー種として選定した。

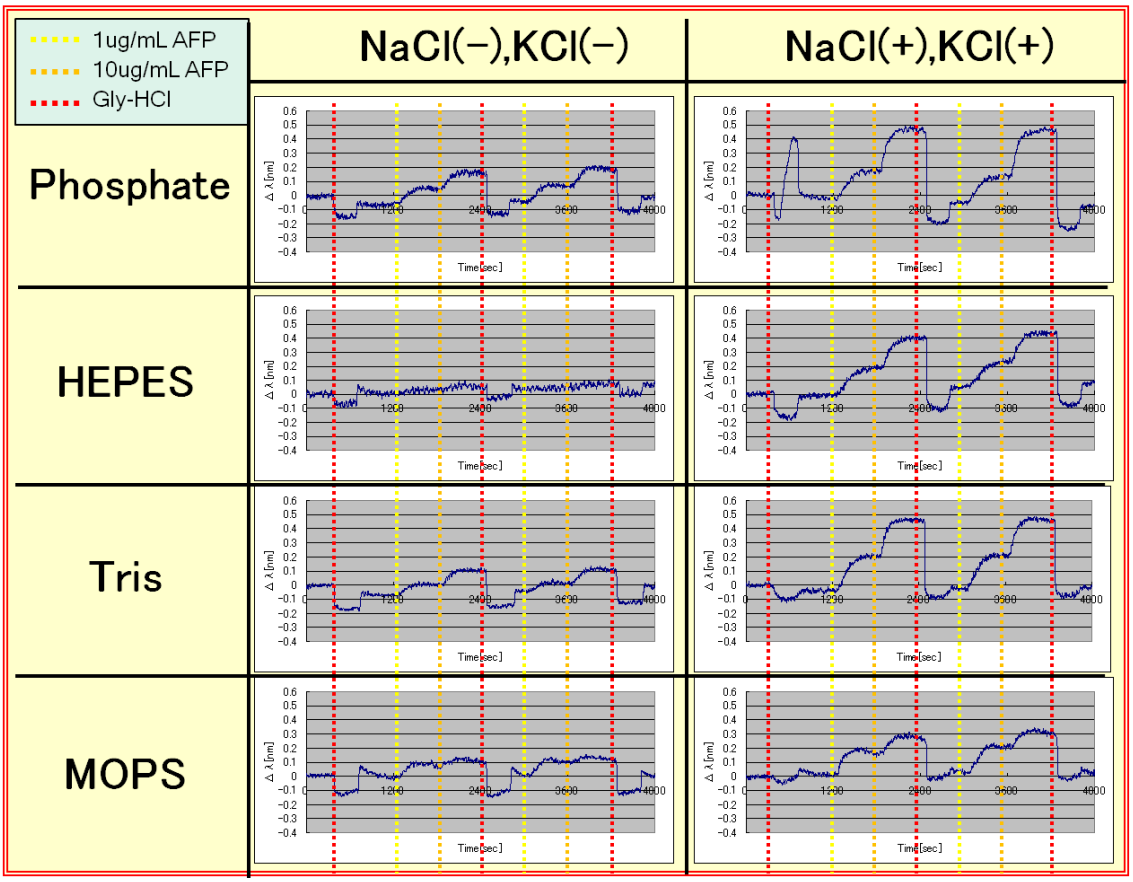


Figure 45 各バッファーにおける抗原抗体反応生データ

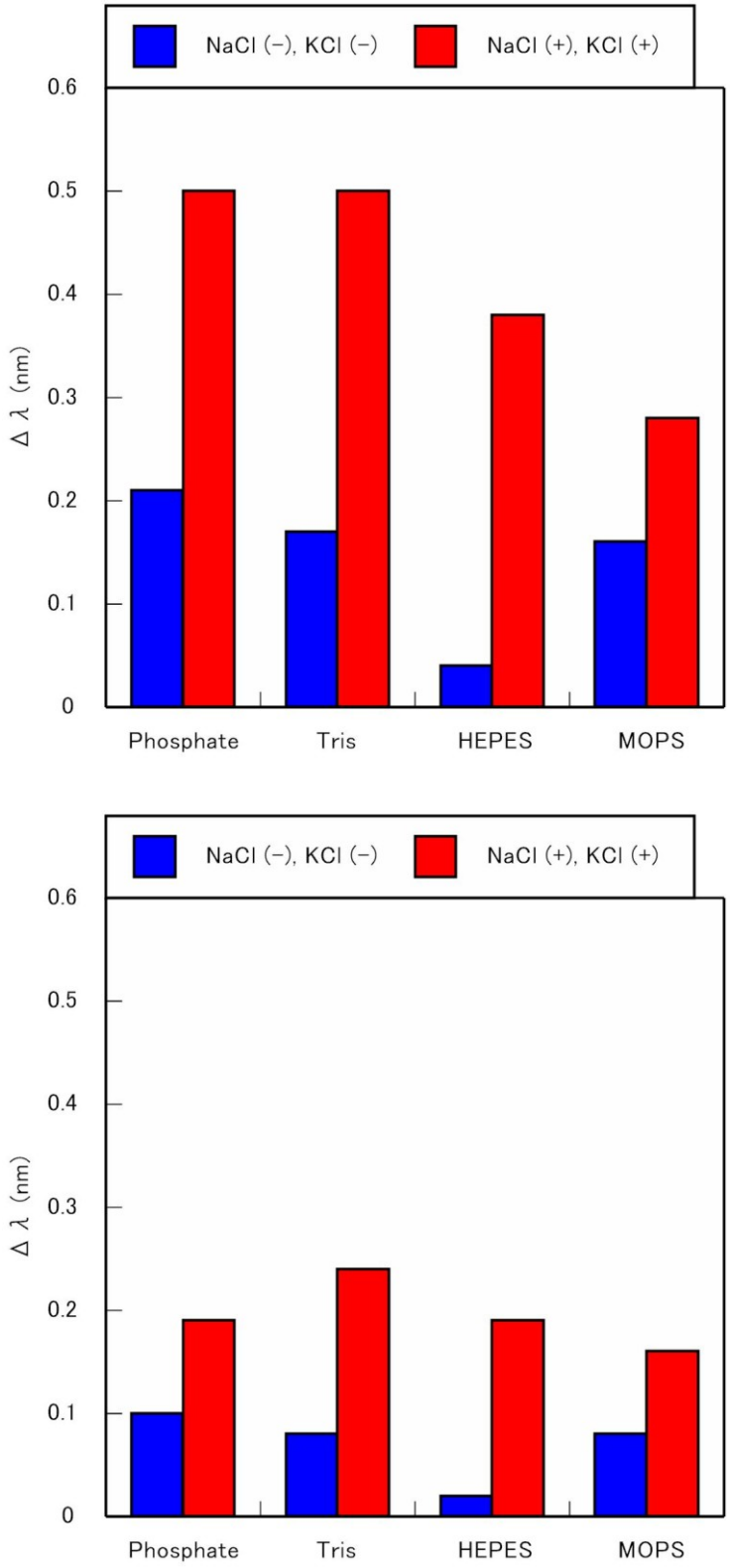


Figure 46 各バッファーにおける AFP 抗原抗体反応による Δ λ（上段: 10 μg/mL、下段: 1 μg/mL）

3-5-8-2.塩濃度が抗原抗体反応に与える影響

最も高感度で AFP を検出可能であった Tris buffer について、塩濃度の最適化を実施したところ(Figure 47)、138 mM の時に抗原抗体反応が最も検出しやすくなることが分かった(Figure 48)。これは、生体内の環境とほぼ同様の塩濃度であり、生体分子間反応、特に抗原抗体反応においては、生体内の環境を模倣することが反応の促進につながることが示唆された。

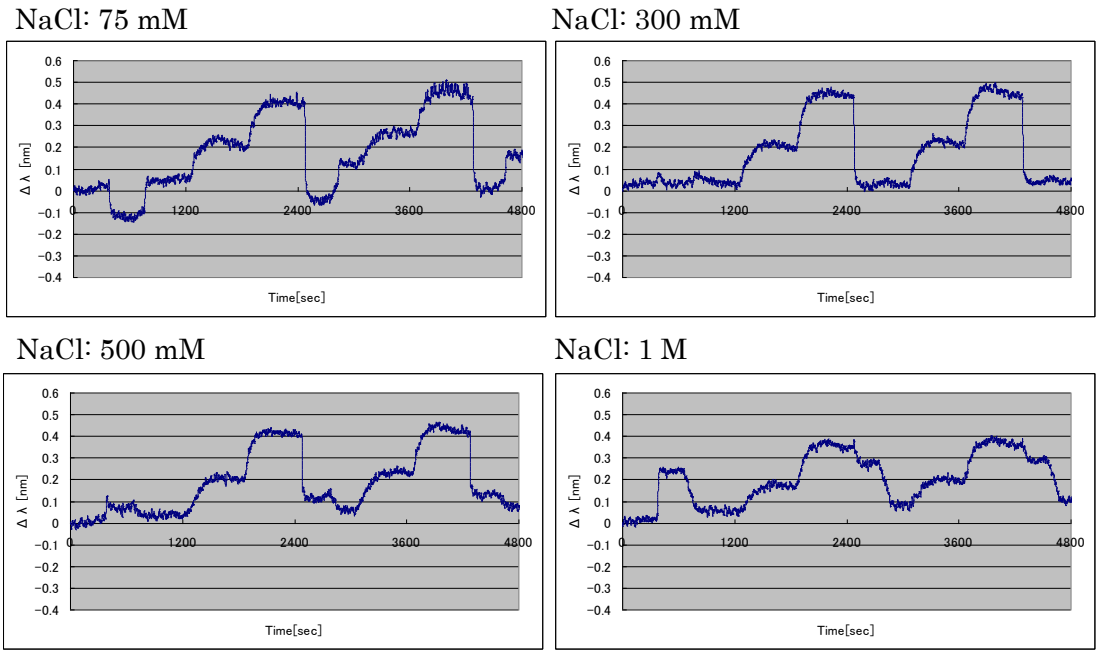


Figure 47 AFP 抗原抗体反応塩濃度検討（ランニングバッファー：Tris、NaCl の濃度は左上段: 75 mM、右上段: 300 mM、左下段: 500 mM、右下段: 1 M）

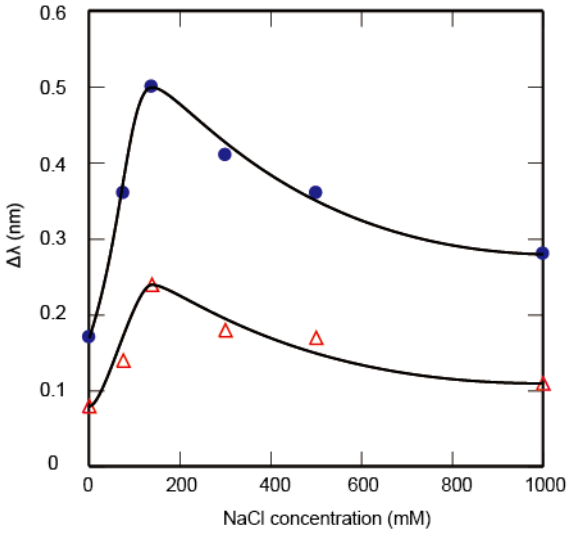


Figure 48 塩濃度が抗原抗体反応に及ぼす影響（青: AFP (10 μg/mL), 赤: AFP (1 μg/mL)）

3-5-8-3.pH が抗原抗体反応に与える影響

pH が抗原抗体反応に与える影響について pH 3.0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.4, 9.0, 10.0 の各緩衝液中に溶解した AFP (1 μg/mL)に対するレスポンスにより評価した（Figure 49)。

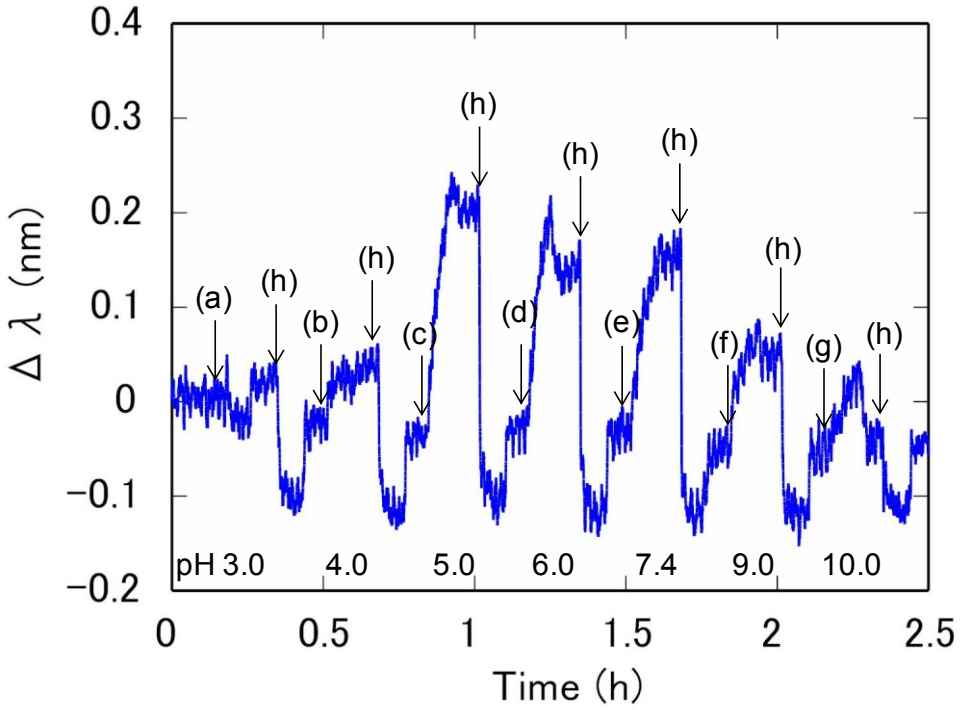


Figure 49 pH が抗原抗体反応に与える影響（AFP (1 μg/mL)を(a) Glycine-HCl buffer (pH 3.0)、(b) Sodium acetate buffer（pH 4.0)、(c) Sodium acetate buffer (pH5.0)、(d) Sodium acetate buffer (pH 6.0)、(e) Sodium phosphate buffer (pH 7.4)、(f) Sodium carbonate buffer (pH 9.0)、(g) Sodium carbonate buffer (pH10.0)

Figure 49 の結果、弱酸性～中性（pH 5.0～7.4）領域においてΔλの上昇が大きく、中でも pH 5.0 の時が最もΔλが大きかった。抗原抗体反応の再生溶液に pH 1.5 を用いている事からも、酸性側では抗原抗体反応が起きにくい事が予想され、また、アルカリ性では SiN 基板それ自体が浸食されることで抗原抗体反応に悪影響を与えている事からも想定される結果である。また、AFP の等電点は、脂肪酸を含む主構成物としては 4.7、脂肪酸フリーの構成物としては 5.3 である事が Paemelee らにより報告されており [62]、今回の結果は等電点付近において最も抗原抗体反応が高感度に検出出来ると言える。すなわち、AFP あるいは抗体における高い電荷密度は抗原抗体反応を弱めることが示唆された。最適条件下における AFP の感度評価には pH 5.0 を採用することとした。

3-5-8-4.反応温度が抗原抗体反応に与える影響

反応温度が抗原抗体反応に与える影響について、10℃～40℃まで 5℃刻みで AFP (1 μg/mL)の抗原抗体反応のレスポンスにより評価した (Figure 50)。

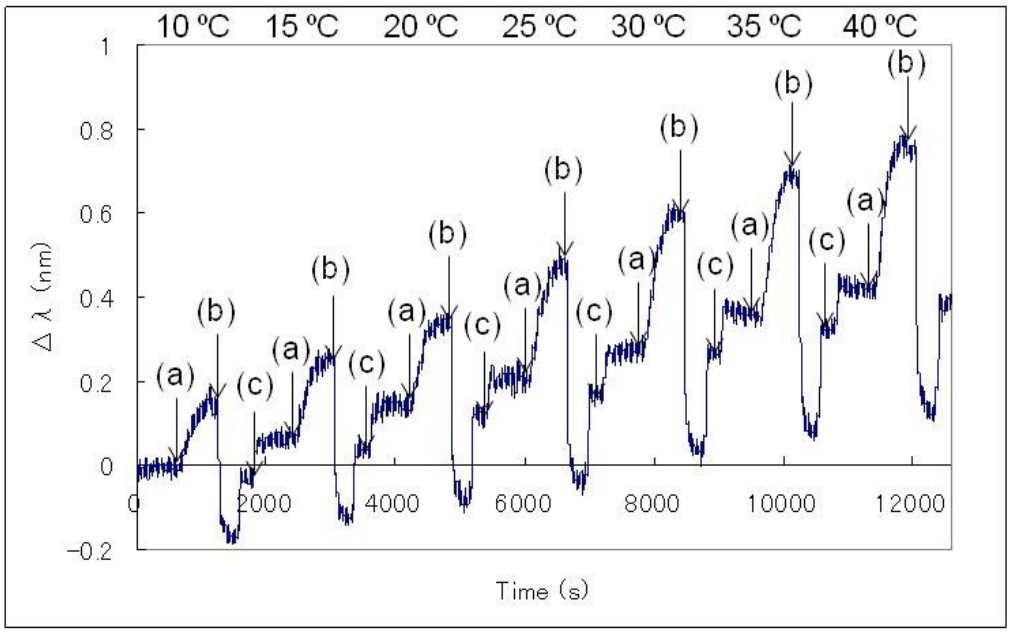


Figure 50 反応温度が抗原抗体反応に与える影響((a) AFP (1 μg/mL)、(b) 10 mM Glycine-HCl (pH 1.5)、(c) 昇温(5℃/min)

反応温度を 10℃から 30℃に変更することで、抗原抗体反応に伴う Δ λ が 0.15 nm から 0.33 nm へと約 2.2 倍となった。また、30℃に対して 35℃、40℃においては、ほぼ同程度の値である事が分かったため、最適条件下における AFP の感度評価には 30℃を採用することとした。また、温度変更に伴い RIfS のベースラインの上昇が認められた (Figure 50c)。これは、基板に固定化したシランカップリング剤や抗体の影響ではなく、RIfS の測定原理上の要因が影響している可能性がある。そこで、無修飾の SiN 基板に対して、測定部の温度変化を加えた時のベースラインの変化について計測を行ったところ(Figure 51)、温度と共にベースラインも上下している様子が確認された。すなわち、温度の変化に伴い、水やフローセルの構成材料である PDMS の屈折率がわずかに変化することによりベースラインの変動が生じたものであると考察することが出来る。

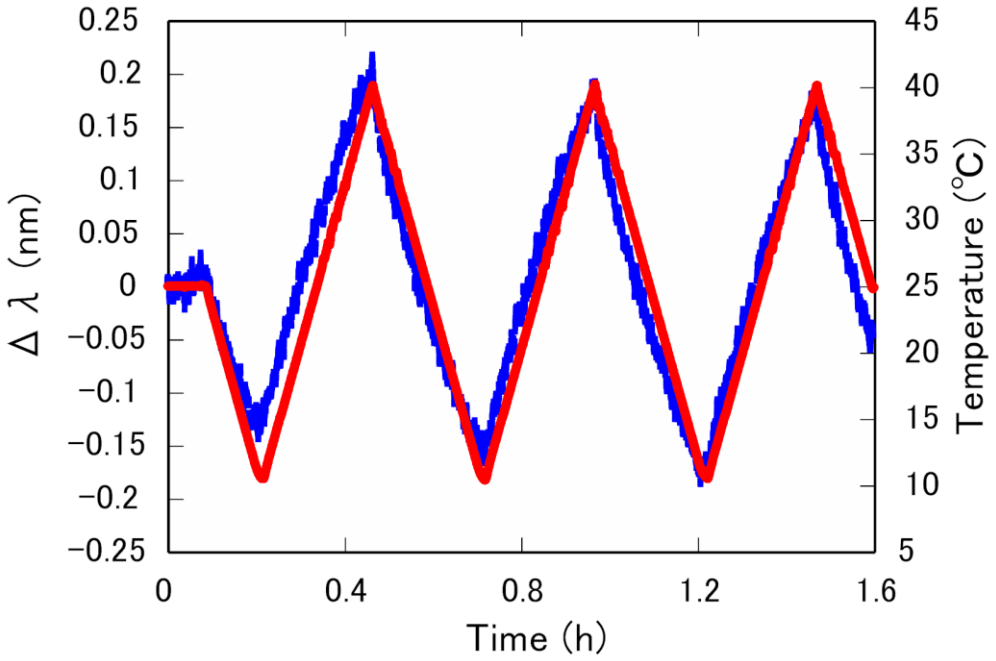


Figure 51 温度変更に伴う RIfS ベースライン変化(青: RIfS 測定結果、赤:RIfS 測定部温度)

3-5-8-5.最適条件における抗原抗体反応感度評価

3-5-8-3.および 3-5-8-4.において得られた最適化条件（30℃、pH 5.0）において抗原抗体反応の感度評価を実施した。3-4-5.で検討した最初の条件(25℃、pH 7.4)と比較した結果について Figure 52 に示した。

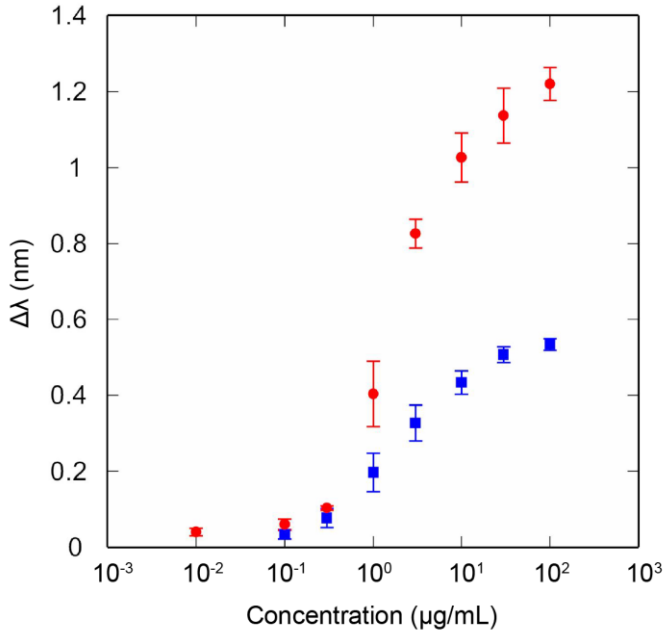
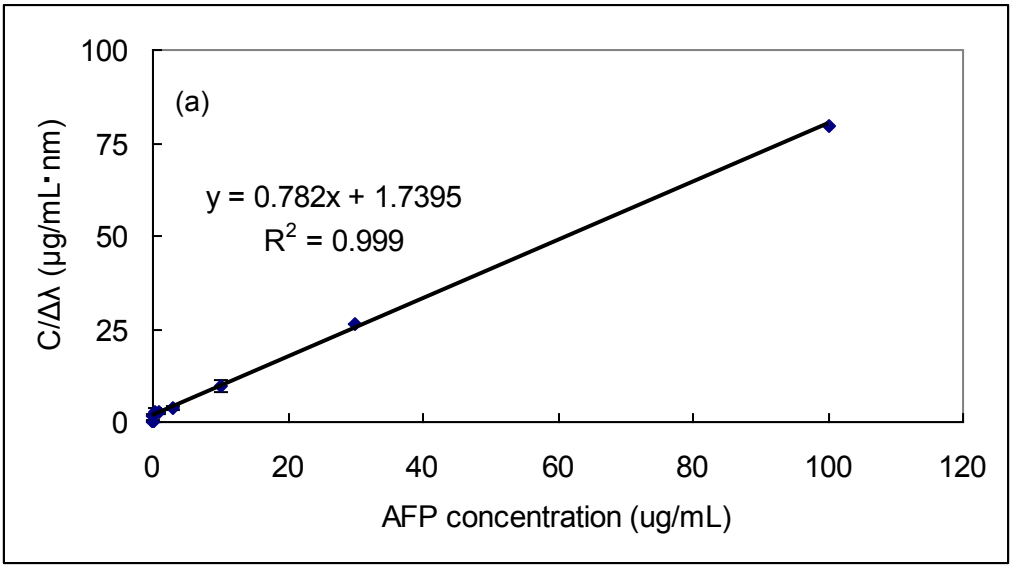


Figure 52 抗原抗体反応の感度比較（赤: 30℃, pH 5.0、青: 25℃, pH 7.4）

Figure 52 から、初期条件よりも最適条件において全ての濃度領域でΔλの上昇が見られ、最適化条件においては、AFP を 10 ng/mL の濃度で検出することが出来た。また、検出範囲は 10 ng/mL～100 μg/mL であった。これは一般的に用いられている肝細胞癌マーカーのカットオフ値（20 ng/mL[29,30]）よりも低濃度であり、既に報告されている SPR や QCM など他のラベルフリーによる AFP 検出系と比較しても同程度であった[33-35]。従って、今回の RIfS システムは、タンパク質-タンパク質間の最適な反応条件を簡便に探索可能であること、かつ、診断機器としての応用の可能性の両方を秘めている事が示された。

次に最適化条件下における Langmuir 吸着等温式を Figure 55 に示した。最適条件における抗原抗体反応は初期条件における抗原抗体反応と同様に、Langmuir 吸着等温式の形式によく従うことが分かった（Figure 53a）。また、検出限界となる 10 ng/mL においては、吸着等温線の近似直線から外れており（Figure 53b）、この近似直線が成り立つ範囲については、初期条件の時と同様 100 ng/mL～100 μg/mL であることが分かった。また、Figure 55a の近似直線式より $\Delta\lambda_{max} = 1.28$ nm, $K_a = 3.15\times10^7$ M^{-1} と求められた。$\Delta\lambda_{max}$ について見てみると、初期条件で $\Delta\lambda_{max}$ が 0.60 nm であったのに対して、約 2 倍の値となっている。AFP 膜の観点から見ると、Figure 41 で得られた式より理論最大吸着量は 18%程度となり、反応効率が改善した事が分かった。一方で、会合定数については初期条件における $K_a = 3.74\times10^7$ M^{-1} と比較して、わずかに小さくなる事が分かった。この事から、反応条件の最適化による感度向上は、抗原－抗体間のアフィニティーが向上したからではなく、最適条件では pH が AFP の等電点付近になっており、静電的な影響によって抗原が基板上の抗体と接触しやすくなる濃縮効果に伴い、反応確率が向上していることなどが考えることが出来る。



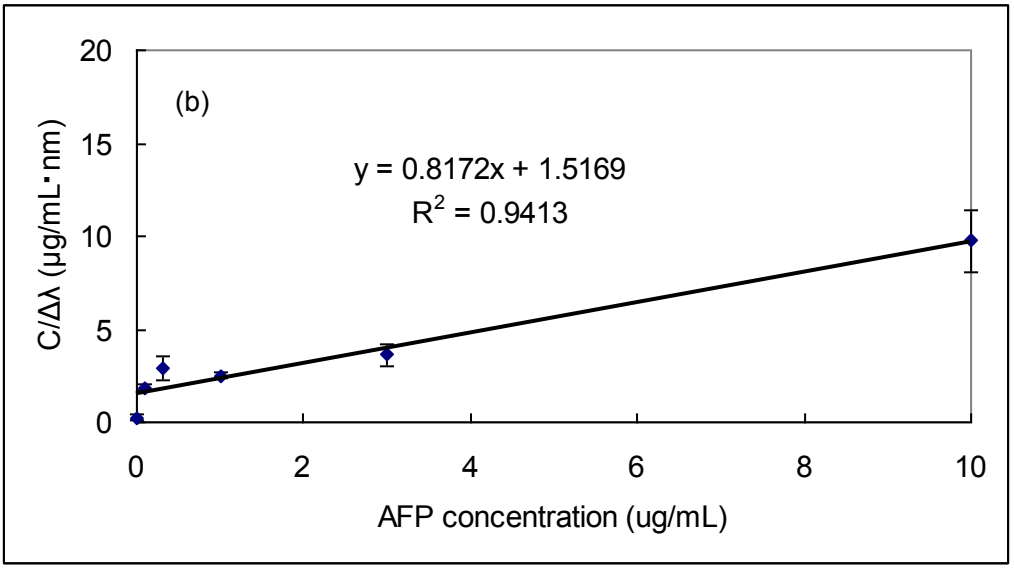
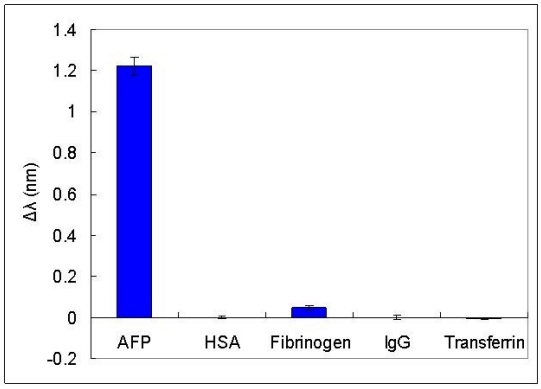


Figure 53 最適条件(30℃, pH 5.0)における抗原抗体反応の Langmuir 吸着等温線((a)0.01 μg/mL～100 μg/mL, (b) 0.01 μg/mL～10 μg/mL)

3-5-9.血中タンパク質との交差性試験

本検出系の有用性を確認するため、血中タンパク質との交差性反応試験を実施した。ヒトの血液には様々なタンパク質が含まれているが、その中でも特に豊富に含まれている human serum albumin (HSA)[63], fibrinogen[64], IgG[65], transferrin[66,67] について AFP との選択性の差を評価した(Figure 54)。



Protein	Molecular Weight (kDa)	pI
AFP	65-70	4.8-5.3
HSA	69	4.8
Fibrinogen	340	5.5
IgG	150	5.5-9.0
Transferrin	80	5.9

Figure 54 anti-AFP 固定化基板に対する血中タンパク質との交差性試験

anti-AFP 固定化基板は、同濃度の血中タンパク質に対してレスポンスせず、AFP に対して高い選択性を示した。今回比較対照として用いたタンパク質の中でも、アルブミンは分子量、等電点ともに AFP と近いにも関わらず、本結果が得られたことから、SiN 基板上に固定化した anti-AFP が抗原である AFP を特異的に認識していることが証明された。

3-5-10.血清中 AFP の検出

3-5-9.にて、anti-AFP 基板が AFP に対して高い選択性がある事が示されたため、実際のヒト正常血清中の AFP を検出することを試みた。ヒト正常血清（原液、10 倍希釈、100 倍希釈、1000 倍希釈）に AFP を 0.1、1、10 μg/mL の終濃度となるように添加したサンプルを anti-AFP 基板に導入した（Figure 55～57）。

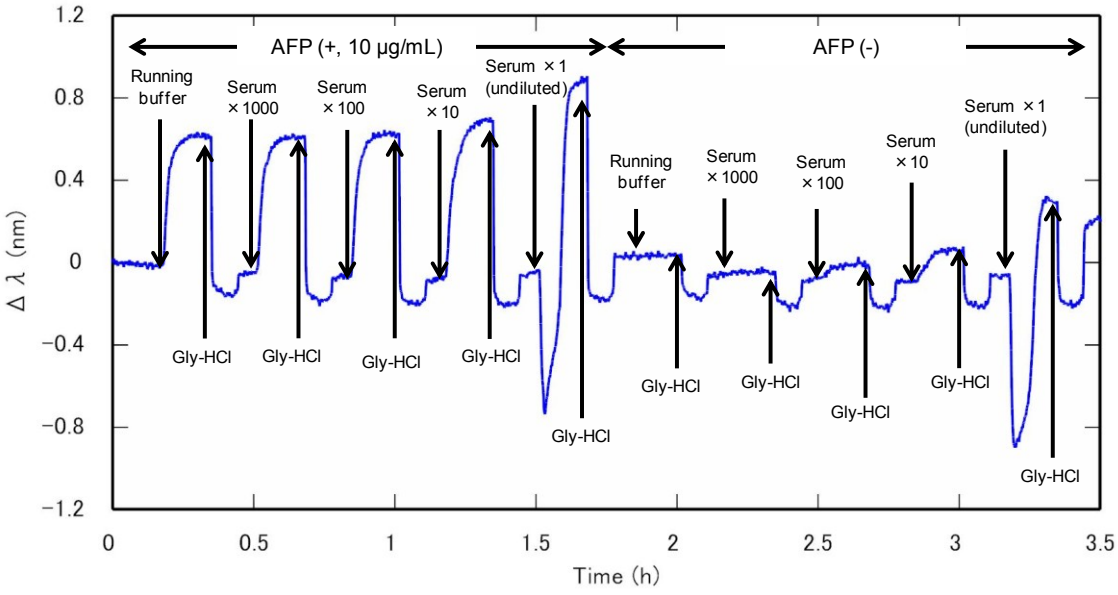


Figure 55 RIfS による血清中 AFP の検出(AFP: 10 μg/mL)

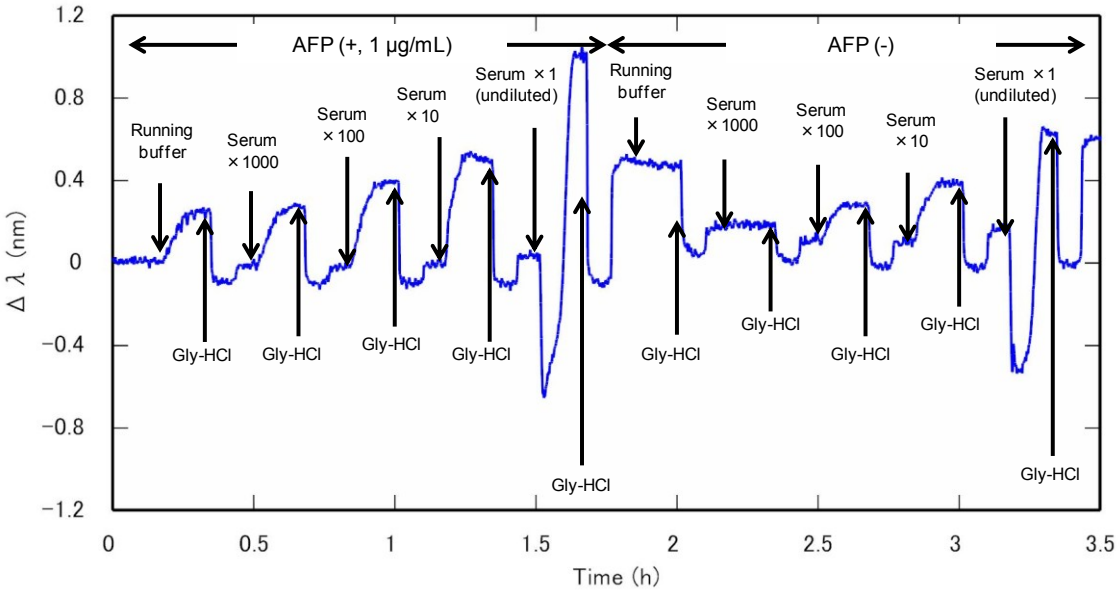


Figure 56 RIfS による血清中 AFP の検出(AFP: 1 μg/mL)

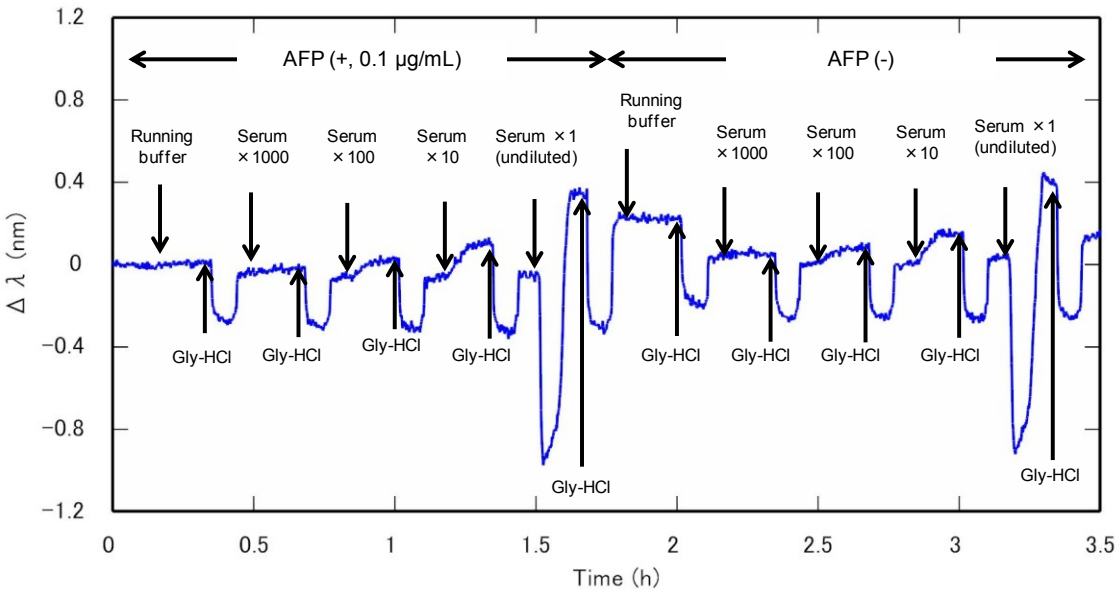


Figure 57 RIfS による血清中 AFP の検出(AFP: 0.1 μg/mL)

ヒト血清あるいはヒト血清の希釈液のみを基板に導入した場合、1000 倍希釈の血清ではほとんど非特異吸着に伴うΔλの上昇は見られなかったものの、100 倍希釈、あるいは 10 倍希釈、原液のヒト血清についてはΔλの上昇が見られ、それは濃度依存的で起こることが分かった。ヒトの血中に含まれるタンパク質濃度は 70 mg/mL 程度であると言われており[68]、1000 倍希釈ではタンパク質濃度が 70 μg/mL となり先述の交差性反応試験 100 μg/mL でヒト血清タンパク質が基板に非特異吸着が起きなかった事とも矛盾していない。従って、

1000 倍希釈よりも濃い濃度の血清に関しては、非特異吸着由来のΔλが起きてしまうが、興味深い事実として Figure 55～57 をそれぞれ見てみると、AFP を添加した前半部分（AFP(＋)）の方が、Δλが大きくなっている事が分かる。これを Specific signal（(血清中の AFP に対するΔλ）―（血清に対するΔλ)）として濃度別、希釈度別に表したものを見てみると（Figure 58)、バッファー中におけるΔλとほぼ同様の挙動を示すことが分かった。これは、血清原液中に添加した AFP についてもバッファー中と同様の抗原抗体反応が起きていることを示唆している。

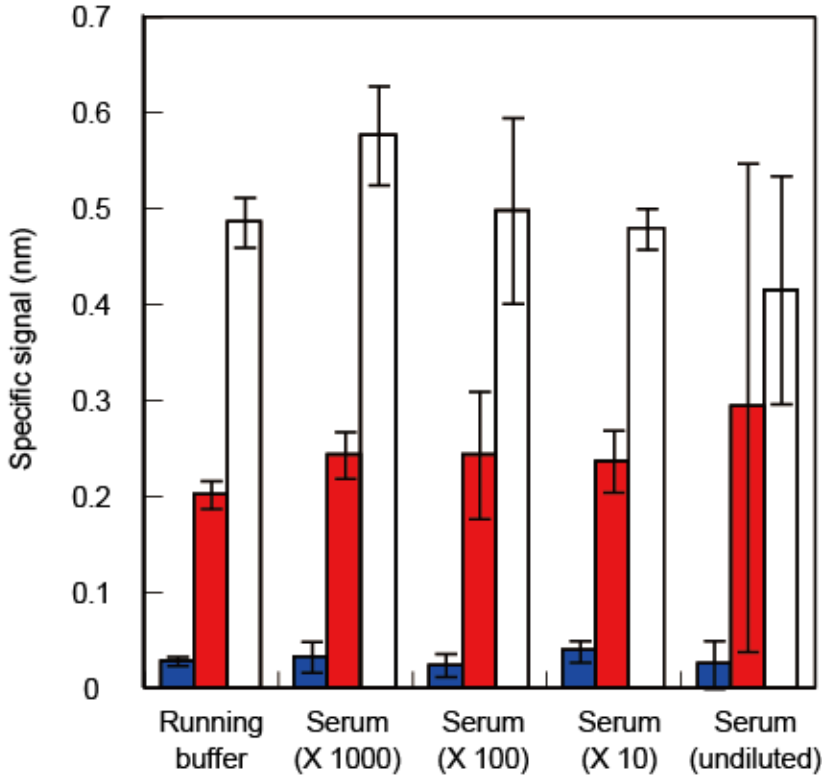


Figure 58 ヒト血清中への AFP 添加試験(Specific signal: （血清中の AFP に対するΔλ）―（血清に対するΔλ)、青 : AFP (0.1 μg/mL)、赤 : AFP (1 μg/mL)、白 : AFP (10 μg/mL))

3-6.結論

第 3 章では、第 2 章で調製した anti-AFP 固定化基板を用いた RIfS による抗原抗体反応の計測系の確立について検討した。適切な反応条件を選択することで、肝細胞がんの体外診断に用いられている AFP のカットオフ値（20 ng/mL)以下となる 10 ng/mL の検出を達成することが出来た。ヒト正常プール血清に対して AFP を添加したものを試料として用いた結果、血清由来の成分に対して抗原抗体反応を阻害されることなく、AFP 由来のシグナルを検出することが出来たが、血清由来成分の非特異吸着を完全に防ぐことは出来なかったため、直接 AFP のレスポンスを評価することは困難であることが分かった。

また、抗原抗体反応が Langmuir の吸着等温式に対して相関性が高く（R^2=0.9998）従ったことから、基板に対して単層で吸着していると仮定して、Essential Macleod を用いて、AFP の占有率を算出した。AFP の膜厚（8 nm）と屈折率（1.45）を仮定することで、初期反応条件において理論最大吸着時に 9%､反応条件最適化後においては 18%とそれぞれ AFP の占有率を算出することが可能であった。

第４章　RIfS を用いた膜タンパク質 MRP1 に対する抗原抗体反応計測系の構築

4-1.ZrO_2 基板、MRP1 発現ベシクルを用いた検出系

本章では、ZrO_2 成膜シリコン基板（以後、ZrO_2 基板と呼ぶ。）を用いた膜タンパク質の基板上への固定化、ならびに膜タンパク質と抗体の相互作用の検出方法について述べる。

ZrO_2 基板を検討に用いた理由としては 2 つある。1 つは ZrO_2 が一般的に屈折率 n_d=2.0 程度と SiN と同程度であることから、SiN と同様にシリコンウエハ上に対して成膜するだけで、RIfS 測定を可能にするための干渉膜として機能する。もう 1 つは、基板上のジルコニウムと膜タンパク質の構成成分であるリン脂質中に含まれるリン酸との間に配位結合が働く点である [69]。リン酸に含まれる酸素原子の不対電子が Lewis 塩基として、ジルコニウム原子の空の d 軌道が、Lewis 酸として働くため、配位結合が可能となる（Figure 59)。この配位結合を利用した研究として、メソポーラスな ZrO_2 を利用したリン酸カリウムの選択的な除去や [70]、ZrO_2 をコートしたシリカゲルビーズ（Supelco 社の HybridSPE™）を利用した、サリンなどの有機リン系神経作用薬の分解産物の選択的な抽出に関する研究が行われている [71]。

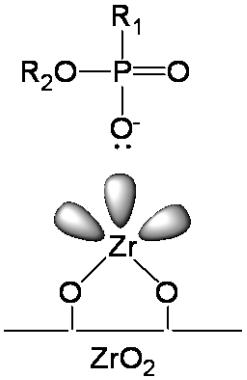
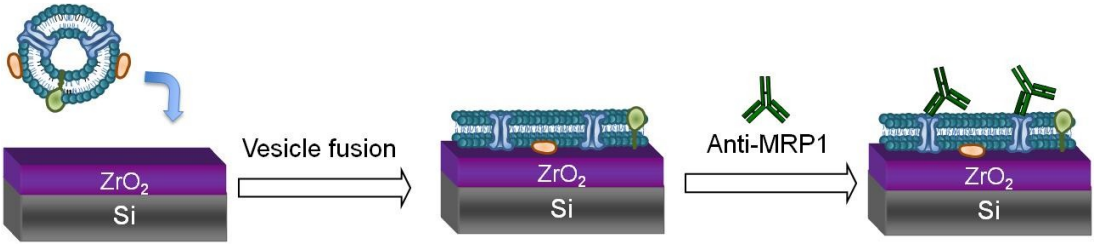


Figure 59 ZrO_2 基板とリン酸との間に働く配位結合

そこで、RIfS を用いて膜タンパク質を含むベシクルを ZrO_2 基板上のマイクロ流路に注入することで、リン酸の配位結合を介したベシクルフュージョンによる固定化を試みた。続いて、ベシクルの特定領域に対する抗体を注入することで、膜タンパク質と抗体の特異的な相互作用計測を試みた(Scheme 3)。ベシクルは BD Biosciences より購入した、バキュロウイルス発現系により MRP1 を発現させた Sf9 細胞由来の膜画分から調製された膜小胞の MRP1 ベシクルと、MRP1 ベシクルの対照試料として、Sf9 細胞由来の膜画分由来で MRP1 が発現していないコントロールベシクルの 2 種類を用いた。

Scheme 3 MRP1 と抗体との特異的相互作用検出



4-2.試薬リスト

Reagent	Manufacturer	Catalog No.	Notes (Grade)
Anti-MRP1 antibody (clone: IU2H10)	Novus Biologicals, Ltd.	NB400-156	–
Anti-MRP1 antibody (clone: MRPm5)	Novus Biologicals, Ltd.	NBP1-42341	–
Anti-human IgG antibody (polyclone)	Acris Antibodies, Inc.	DP023	–
Calcium chloride dihydrate	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	031-00435	特級
Control vesicles	BD Biosciences	453500	–
Dipalmitoylphosphatidylcholine (DPPC)	NOF CORPORATION	ME6060	COATSOME®
Human MRP1 vesicles	BD Biosciences	453455	–
Hydrochloric acid	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	083-01095	容量分析用 (1 mol/l)
Sodium chloride	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	31320-05	特級
Tris (hydroxymethyl) aminomethane (Tris)	Wako Pure Chemical Industries, Ltd.	204-07885	生化学用

4-3.実験方法

4-3-1.MI-Affinity 入射光量の設定

MI-Affinity で分光反射率を算出するため、光学ガラス BK7 のみで構成された基板（18 mm×26 mm×0.725 mm, Shibuya Optical Co., Ltd., Saitama, Japan）を用いて入射光量の設定を行った。BK7 基板の裏面には反射を防止するためにレンズ黒塗りキット（Edmund

Optics Inc., NJ, USA）による反射防止処理を施した。Essential Macleod（Thin Film Center Inc., AZ, USA）を用いて、400 nm～750 nm まで 0.5 nm 刻みで算出した BK7 基板のシミュレーションによる反射率スペクトルと、MI-Affinity を用いて測定した BK7 基板の反射光スペクトルから、校正した入射光スペクトル（以下、理想光源とする）を算出した。但し、反射率スペクトルは分光器に予め設定されている波長であり、値が小数点以下第 4 位までの端数となるため反射率スペクトルを Microsoft Excel 2003 の 6 次近似を用いて算出した近似式（$y=-3.72280E-16x^6 + 1.36134E-12x^5 - 2.04882E-09x^4 + 1.62020E-06x^3 - 7.06603E-04x^2 + 1.59330E-01x - 9.93398$; $R^2 = 0.9999$）を用いることで、分光器の波長に対応させた。ここで得られた理想光源を用いて ZrO_2 基板の反射光スペクトルの測定を行った。

4-3-2.ZrO_2 基板の特性評価

4-3-2-1.ZrO_2 基板の光学特性評価

イオンアシスト蒸着により、70 nm を想定してシリコンウエハ上に成膜された ZrO_2 基板（Toa Optical Technologies, Ltd., Tokyo, Japan）の屈折率をエリプソメータ（V-VASE, J.A.Woollam Co., Inc., NE, USA)を用いて測定した。ZrO_2 基板に対しての入射角は 65°、70°、75°とした。ZrO_2 の光学定数算出には測定範囲の 400 nm～1000 nm に渡って吸収がないものとして、V-VASE ソフトウェア内の Cauchy model を用いた。

4-3-2-2.ZrO_2 基板の接触角評価

ZrO_2 基板に対してプラズマエッチング装置(SEDE-GE, Meiwafosis Co., Ltd., Tokyo, Japan)による表面処理を行った。プラズマ源としては通常の大気を用い、圧力が 5 Pa になるように手動で調整しながらエッチングを 30 秒間実施した。プラズマ時の電流は 1～2 mA 程度であった。基板の表面処理の効果を、接触角測定ソフトウェア FTA32 (First Ten Angstroms, Inc., VA, USA)を用いて水に対する基板の接触角を測定した。水の液滴は約 1 μL、液滴と基板との距離は約 4 mm に設定した。また、経時による接触角の変化を測定した。プラズマ処理後直後（0 時間）、または大気下で 1、2、3、6、12、24、72、144 時間静置後における水に対する接触角測定を行った。各測定条件において基板を 2 枚用いて、1 枚あたりの測定を 1 箇所ないし 2 箇所として、最低 3 回測定を行い、平均値を接触角とした。

4-3-3.MRP1、コントロールベシクルの吸着特性評価

プラズマ表面処理した ZrO_2 基板に PDMS フローセル（volume: 4 μL (2.5 mm×16 mm ×0.05 mm)を被せてマイクロ流路を形成した。シリンジポンプを用いて 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4)を 20 μL/min の流量で送液し、RIfS(MI-Affinity, Konica Minolta, Inc., Tokyo, Japan)のベースラインが安定化するのを待ってから測定を開始した（通常 30 分以

上)。全ての測定は 25℃において実施した。測定開始 10 分後、MRP1 ベシクルまたはコントロールベシクル（5, 10, 50, 100, 250, 500 μg/mL）を注入し、その後最低 10 分間測定を行った。ベシクル溶液は、ランニングバッファーと同様の Tris-HCl buffer を希釈溶媒として用いた。ベシクル溶液は、注入直前に 37℃、5 分の条件で恒温器(IN602, Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan）によるインキュベーションを行った。測定は 1 測定ごとに ZrO_2 基板を変更して、それぞれの濃度において計 3 回行った。注入直後（測定開始 10 分後）のボトム波長とその前後の測定値 15 点（計 31 点）のボトム波長の平均値と注入 10 分後（測定開始 20 分後）のボトム波長とその前後の測定値 15 点（計 31 点）のボトム波長の平均値との差を吸着量Δλとして評価した。

4-3-4.膜タンパク質の固定化膜厚の算出

Essential Macleod を用いて ZrO_2 基板上に吸着したベシクルのΔλからΔd への換算式の算出を行った。シリコンウエハの光学定数は 2-5-4.の Table 8 にて求めたものを、水の屈折率は Hale らの文献値を使用した[72]。また、リン脂質層の屈折率は波長分散などを考慮せず、1.49 と置いた[73,74]。リン脂質層の厚み（Δd）を 0～50 nm まで変化させた時のΔλからΔd を算出した。また、Δλからの変換式の妥当性を検証するため、Figure 60 に示した LB 膜作製装置(HBM 700 LB, Kyowa Interface Science Co., Ltd., Saitama, Japan)を用いて DPPC 単層膜展開基板の作製を行った。LB 膜の作製を行う時は室温を 20℃に設定にした。また、トラフに付いている温調も同様に 20℃に設定して実験を行った。トラフには milliQ 水に 3 mM の $CaCl_2$ を加えた溶液を使用した。DPPC を LB 膜により単層積層した時の RIfS のΔλから変換したΔd と分子長との比較を行った。



Figure 60 LB 膜作製装置（HBM 700 LB）

4-3-5.MRP1、コントロールベシクルと anti-MRP1 との相互作用計測

前述の 4-3-2.と同様の測定条件で RIfS 測定開始 10 分後、10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.4) を用いて希釈調製を行った MRP1 ベシクル（50 μg/mL）または MRP1 を含まないコントロールベシクル（500 μg/mL）を注入した。ベシクルは注入直前に 37℃、5 分の条件で恒温器（IN602, Yamato Scientific Co., Ltd., Tokyo, Japan）によるインキュベーションを行った。ベシクルを注入してから 20 分後（測定開始 30 分後）、MRP1 の N 末端にエピトープ（amino acids 8-17）を有する anti-MRP1（1, 10, 20, 50 または 100 μg/mL, clone: IU2H10）、細胞内部に存在する領域にエピトープを有する anti-MRP1（1, 10, 20 または 50 μg/mL, clone: MRPm5）、ヒト IgG に対するポリクローナル抗体（10 μg/mL,anti-human IgG antibody, 以後 anti-human IgG と呼ぶ）を注入した。抗体注入に伴う相互作用の評価を次のように行った。抗体注入時点におけるボトム波長測定値を 1 点、またその前後の測定値を 50 点ずつ、合計 101 点のボトム波長の平均値を算出し、さらに抗体注入 20 分後のボトム波長測定値 1 点とその前後の測定値 50 点ずつ、合計 101 点の平均値を算出した。これら 2 つの平均ボトム波長測定値の差を抗体の吸着量Δλとして評価した。

4-4.結果と考察

4-4-1. MI-Affinity 入射光量の設定

基板上に固定化する脂質二分子膜の物理膜厚を正確に算出するために光学ガラス BK7 基板を用いて MI-Affinity におけるハロゲンランプの正確な入射光量の見積もりを行うため、BK7 基板の裏面には反射を防止するためにレンズ黒塗りキットを用いて裏面反射防止処理を施した（Figure 61）。

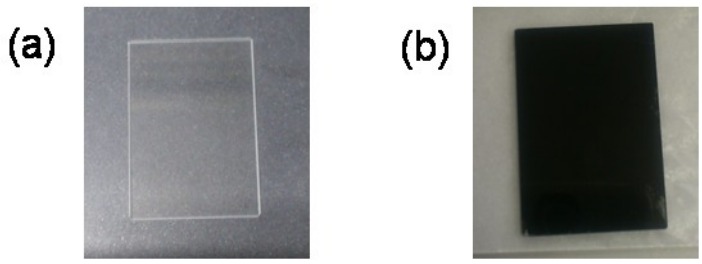


Figure 61 BK7 基板（(a): レンズ黒塗り未実施、(b): レンズ黒塗り実施）

BK7 を大気下で直接測定した時の条件を膜モデルとして設定し、Essential Macleod を用いて BK7 基板の理想的な反射スペクトルを算出した（Figure 62）。BK7 を大気下で直接測定した時の条件を膜モデルとして設定した。ここで、大気中（air）の屈折率を波長によらず 1.0 とし、BK7 の屈折率は Schott 社のカタログに記載の値を用いた（Table 16）。尚、両者とも吸収係数は 0 とした。

Table 16 BK7 の屈折率(Schott 社のカタログより引用)

波長 (nm)	BK7
334.1	1.54272
365.1	1.53627
404.7	1.53024
480.0	1.52283
546.1	1.51872
587.6	1.5168
632.8	1.51509
706.5	1.51289
852.1	1.5098
1060.0	1.50669
1529.6	1.50091
1970.1	1.49495
2325.4	1.48921

(a)



(b)

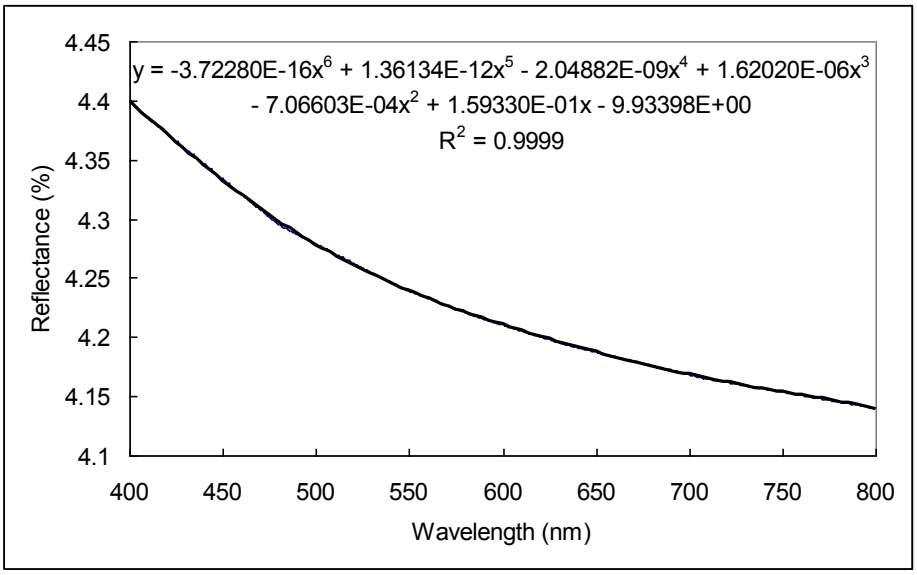


Figure 62 (a)Essential Macleod に用いたシミュレーションモデル、(b)Essential Macleod による BK7 基板の反射率スペクトル

BK7 基板の分光反射率をシミュレーションにより見積もったところ、Figure 64b より、400 nm～800 nm において 4.15%～4.40%であった。次に、BK7 基板の分光強度を MI-Affinity により実測定した(Figure 63)。

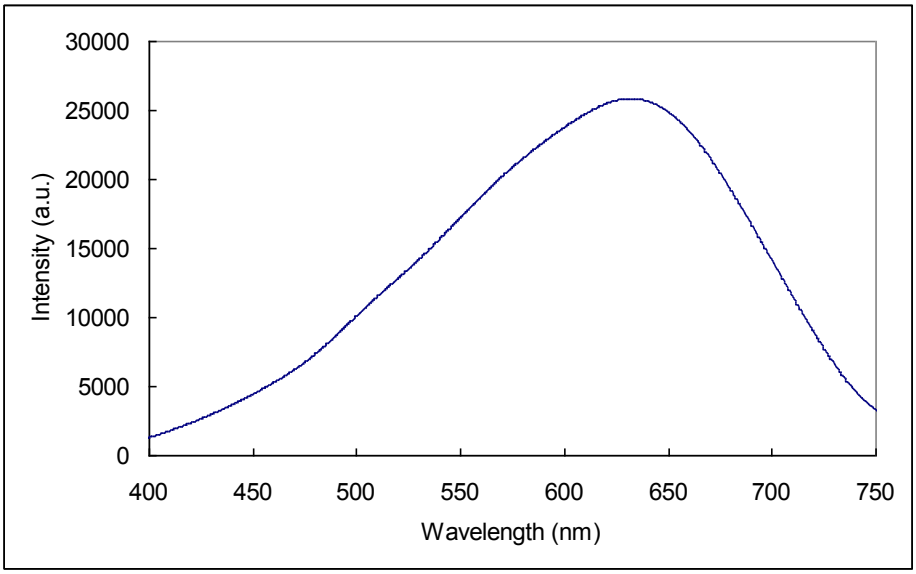


Figure 63 MI-Affinity を用いて測定した BK7 基板の反射光スペクトル

Figure 63 の結果と、Figure 62b で算出した反射率スペクトルの 6 次近似式（$y=-3.72280E-16x^6 + 1.36134E-12x^5 - 2.04882E-09x^4 + 1.62020E-06x^3 - 7.06603E-04x^2 + 1.59330E-01x - 9.93398$; $R^2 = 0.9999$）を用いて、以下の式(12)によりハロゲンランプの入射光量を見積もった。

（入射光量）＝（MI-Affinity により測定した BK7 基板の反射光強度）÷（Essential Macleod により見積もられた BK7 基板の反射率）

(12)

各波長における入射光量が明らかになったことから、本章の RIfS 測定においては、Figure 64 の入射光スペクトルを元にλの算出を行った。

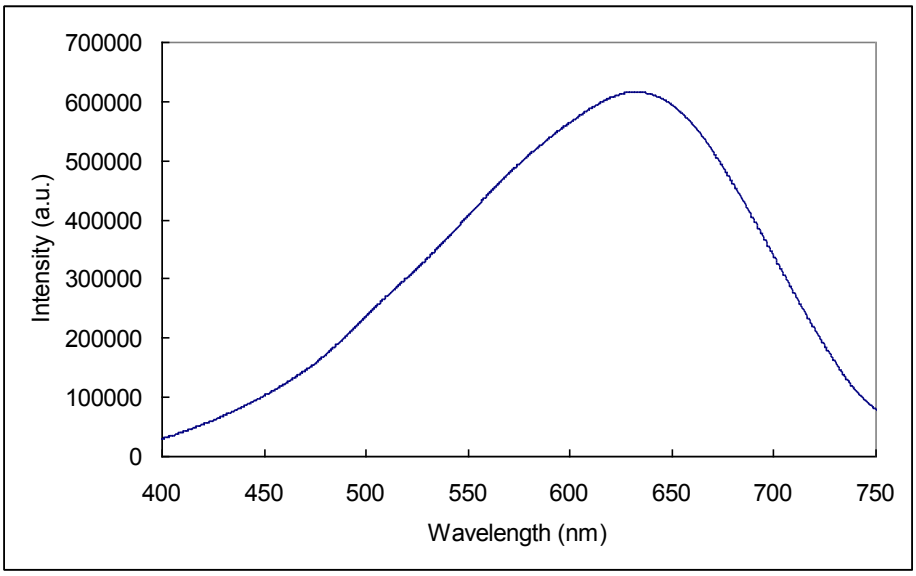


Figure 64 （BK7 基板の MI-Affinity により測定した反射光強度）÷（Essential Macleod により見積もられた BK7 基板の反射率）により見積もられたハロゲンランプの入射光量

4-4-2.ZrO_2 基板の特性評価

4-4-2-1.ZrO_2 基板の光学特性評価

基板上に吸着した脂質層がどの程度の物理膜厚で存在しているのかを評価するために、RIfS の測定値Δλから物理膜厚変化量Δd へと変換する式を立てるべく、ZrO_2 の光学定数をエリプソメータにより測定した（Figure 65）。ZrO_2 は、測定範囲の 400 nm～1000 nm に渡って吸収がないものとして、Cauchy model（2-5-4.参照）により算出した。その結果、ZrO_2 の基板の厚さは約 70.0 nm、590 nm の波長における屈折率は約 2.00 であった(Table 17)。これは、本章の冒頭で述べた n_d と同程度の値であり、屈折率の観点からは想定通りの膜が出来たと言える。

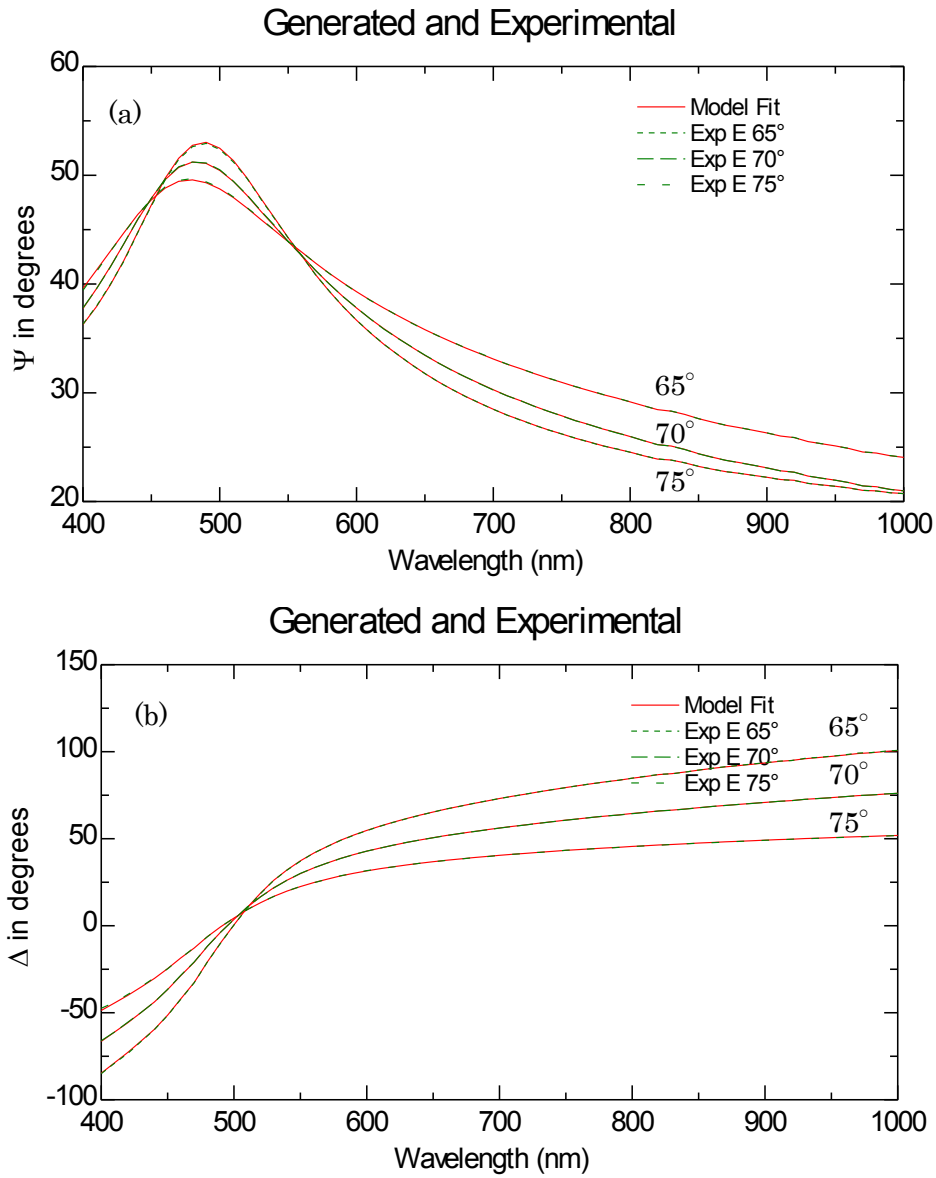


Figure 65 ZrO_2基板のエリプソメトリー測定結果（(a) P 偏光と S 偏光の振幅比Ψ、(b)P 偏光と S 偏光の位相差Δ （測定条件：基板に対しての入射角；65°、70°、75°、測定波長；400～1000 nm））

Table 17 エリプソメータの Cauchy model により求めた 400 nm～1000 nm における ZrO_2 の光学定数

波長 (nm)	屈折率n (−)	波長 (nm)	屈折率n (−)	波長 (nm)	屈折率n (−)
400	2.0348	610	1.9992	810	1.9876
410	2.0318	620	1.9984	820	1.9873
420	2.029	630	1.9976	830	1.9869
430	2.0264	640	1.9968	840	1.9866
440	2.024	650	1.996	850	1.9862
450	2.0217	660	1.9953	860	1.9859
460	2.0196	670	1.9946	870	1.9856
470	2.0176	680	1.994	880	1.9853
480	2.0157	690	1.9934	890	1.985
490	2.014	700	1.9928	900	1.9847
500	2.0123	710	1.9922	910	1.9845
510	2.0108	720	1.9917	920	1.9842
520	2.0093	730	1.9911	930	1.9839
530	2.0079	740	1.9906	940	1.9837
540	2.0066	750	1.9902	950	1.9835
550	2.0054	760	1.9897	960	1.9832
560	2.0042	770	1.9892	970	1.983
570	2.0031	780	1.9888	980	1.9828
580	2.0021	790	1.9884	990	1.9826
590	2.0011	800	1.988	1000	1.9824
600	2.0001				

4-4-2-2.ZrO_2 基板の接触角評価

膜タンパク質中に含まれるリン脂質をベシクルフュージョンにより二重膜の状態で固定化するにはリン脂質の親水基の部分が基板と相互作用する必要があるため、基板表面を親水性にする必要がある。そこで、ZrO_2 基板に対する大気プラズマ処理が接触角に与える影響について評価を行った。プラズマ処理前は、水に対する接触角が 56.8±0.8°(n=3)であったのに対して（Figure 66a)、プラズマ処理直後は 4.4±0.3°(n=4)とプラズマ処理により超親水性が発揮されることが分かった（Figure 66b)。また、プラズマ処理から 144 時間後の接触角は 33.1±0.7°(n=3)となり（Figure 66c)、6 日後でもプラズマ処理前の接触角よりも低かった。これは、プラズマ処理前の基板が汚染されていたことなどが理由として考えられる。この結果からプラズマ処理は ZrO_2 の配位結合の効果を期待する上で必要な処理であると言える。



Figure 66 ZrO_2 基板に対する水の接触角（(a)プラズマ処理前、(b)プラズマ処理直後(0 時間後)、(c)プラズマ処理 144 時間後）

プラズマ処理の効果は経時によって変化することが既に知られているため、ZrO_2 基板のプラズマ処理の経時変化を、水に対する接触角測定により評価した。Figure 67 に示した通り、プラズマ処理後 6 時間後まで接触角は 7° 以下に保たれており、超親水性が発揮されていることが分かった。RIfS による測定は 1 測定あたり 1 時間以内で終了するため、親水化条件を保持した状態で実験を行っていることが確認された。

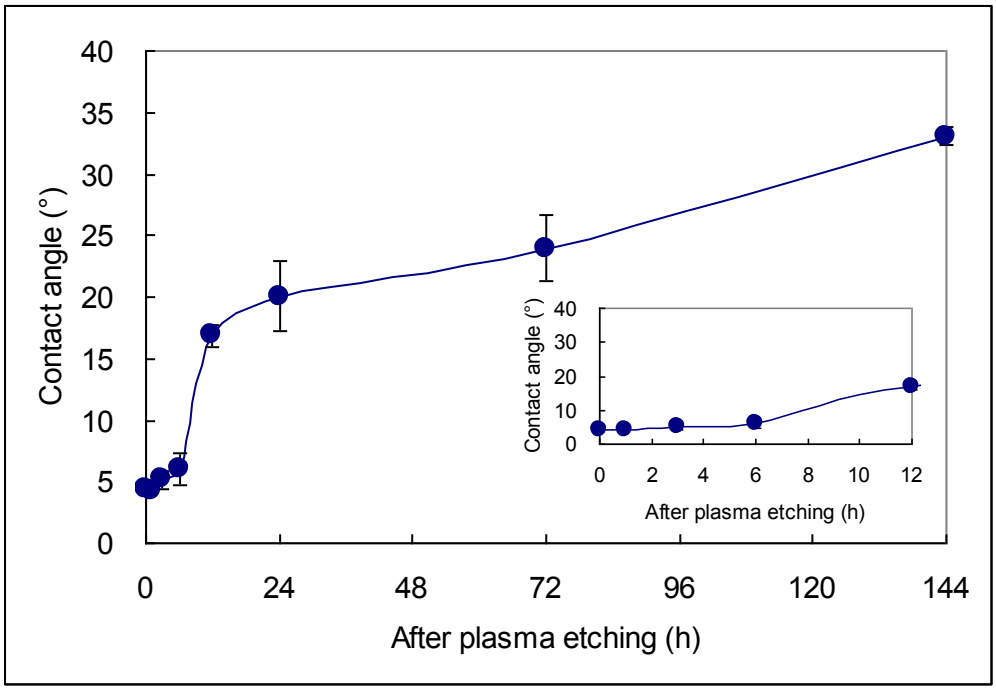


Figure 67 プラズマ処理後の ZrO_2 基板の水に対する接触角

4-4-3.MRP1 ベシクル、コントロールベシクルの吸着特性評価

MI-Affinity を用いて ZrO_2 基板に対して MRP1 ベシクル、またはコントロールベシクルを 100 μL 注入した時の Δ λ を評価した（Figure 68）。

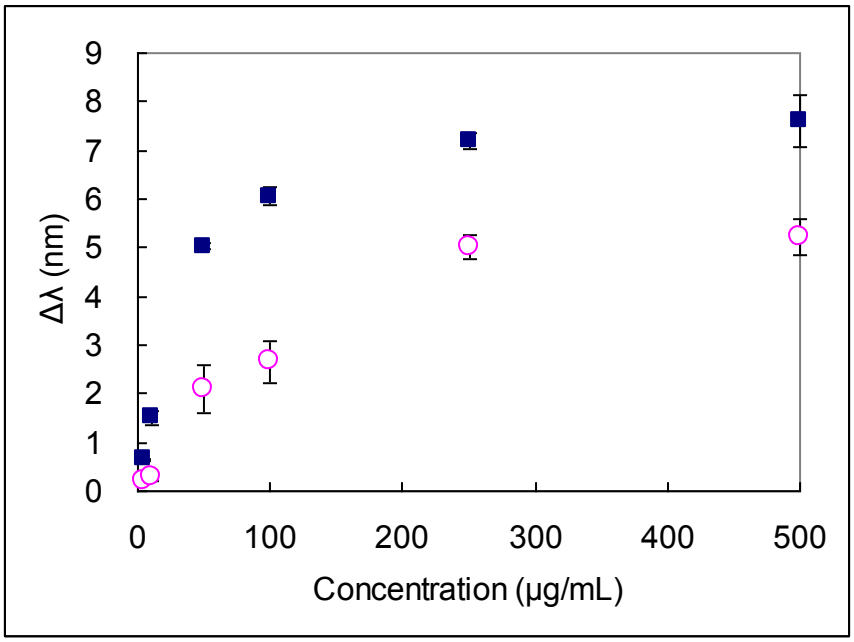


Figure 68 MRP1、コントロールベシクルの ZrO_2 基板に対する吸着特性評価（solid square: MRP1 ベシクル, open circle: コントロールベシクル）

Figure 68 から MRP1、コントロールベシクルともに濃度が上昇するに従って Δλは大きくなり、250 μg/mL の濃度において飽和する挙動を示すことが分かった。続いて、このベシクルの吸着特性について、3-5-6.の AFP 抗原抗体反応の時と同様に式(9)に示した Langmuir の吸着等温式を用いて評価を行った。

$$\frac{C}{\Delta\lambda} = \frac{C}{\Delta\lambda_{max}} + \frac{1}{K_a \Delta\lambda_{max}} \tag{9}$$

Δλは RIfS による波長変化量、$\Delta\lambda_{max}$ は理論最大波長変化量、K_a は ZrO_2 基板とベシクルの間に働く会合定数を示す。C については、基板に吸着したベシクルに対して連続的に供給されるベシクルの量が圧倒的に多いことを想定して、注入時のベシクル濃度を当てはめた。各濃度間で相関性良く近似直線が引けることを、Langmuir の吸着等温線に従うか判断する指標とした。Figure 69 に式(9)に基づいて作製したグラフを示した。MRP1 ベシクル、コントロールベシクルともに R^2>0.9 と相関性は高く、Langmuir 型の吸着挙動を示していることが分かった。Langmuir 型の吸着には、吸着表面にのみ吸着サイトを有し、吸着分子と結合するという仮定をふまえていることから、ベシクルが ZrO_2 基板表面に対して多層吸着することなく固定化され、supported lipid layer が形成されている可能性を示唆している。また、それぞれのベシクルについて $\Delta\lambda_{max}$ を求めたところ、MRP1 ベシクルは $\Delta\lambda_{max}$ = 8.33 nm、コントロールベシクルは $\Delta\lambda_{max}$ = 7.55 nm であった。

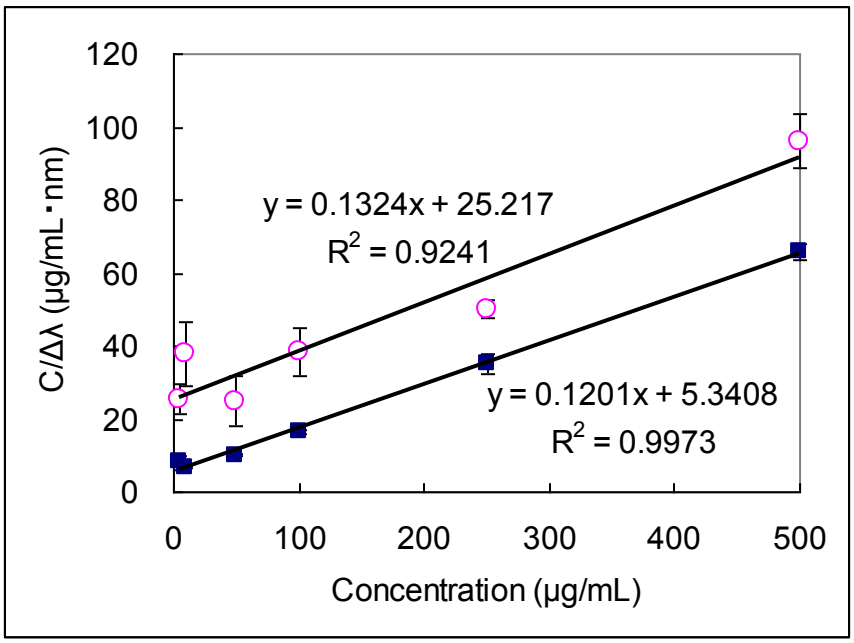


Figure 69 MRP1 ベシクル、コントロールベシクルの Langmuir 吸着等温線（solid square: MRP1 ベシクル、 open circle: コントロール、横軸：AFP の濃度 *C*、縦軸：（AFP の濃度 *C*）/（波長変化量Δλ））

4-4-4.膜タンパク質の固定化膜厚の算出

4-4-2-1 で求めた ZrO_2 の光学定数と第 2 章で求めたシリコンウエハの光学定数、Hale らの報告による H_2O の光学定数 [71] を元に、Essential Macleod で Figure 70 に示したシミュレーションモデルを組んだ。光学定数が既知のシリコン、ZrO_2、H_2O に対して屈折率を 1.49 と仮定した脂質層 [72,73] を 0～50 nm ZrO_2 上に積層した時のΔλを求めた（Figure 71）。その結果、屈折率が 1.49 の時、水中におけるΔλの 1 nm はΔd（厚さ）約 0.6 nm に変換出来ることが分かった。このモデルの妥当性を確かめるために、分子長が 2.5 nm と既知であるリン脂質 DPPC の基板上への LB 膜作製を行い、Δλから Δd へと算出することで Figure 66 で求めた式の妥当性について検証した(Table 16)。Table 16 より得られた DPPC 1 層積層によって生じたΔd=2.73±0.10 nm という値は、既に報告されている DPPC の分子長(2.5 nm[75])と比較しても矛盾しない事から、この変換式は妥当な値であると考えることが出来る。

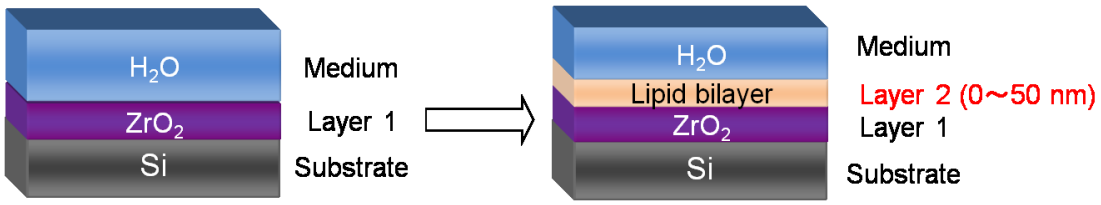


Figure 70 Essential Macleod で設計したシミュレーションモデル

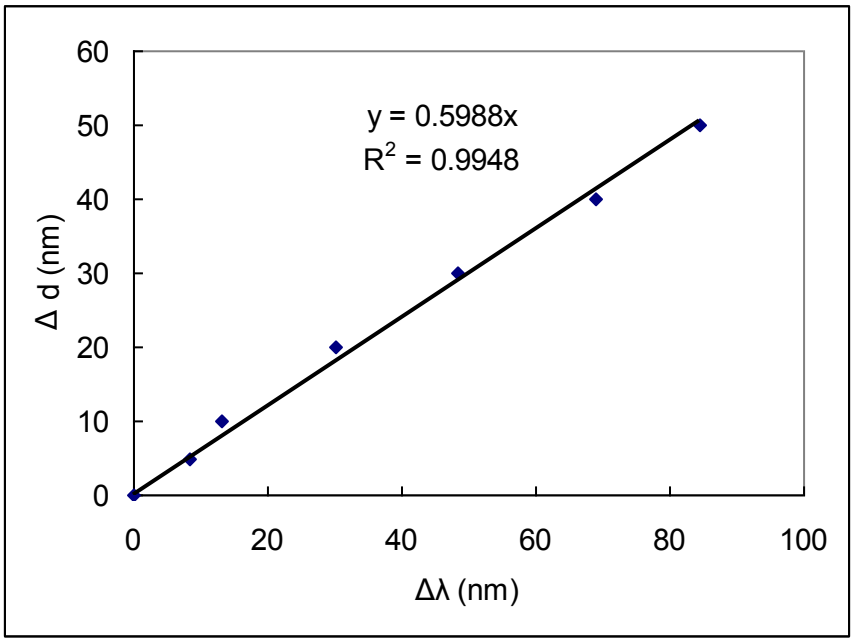


Figure 71 Essential Macleod による Δ λ から Δ d への変換式

Table 16 DPPC の LB 膜形成前後の基準波長ならびに Δ λ および Figure 66 で求めた変換式（Δ d = 0.5988× Δ λ）より変換された Δ d

基板 Lot	DPPC 0 層 (nm)	DPPC 1 層 (nm)	Δ λ (nm)	Δ d (nm)
130424-1-5-1	547.04	551.69	4.65	2.78
130424-1-5-2	548.80	553.51	4.71	2.82
130424-1-6-1	549.45	553.79	4.35	2.60
130424-1-6-2	550.22	554.72	4.50	2.70

Δλから Δd への変換式（Δd = 0.5988×Δλ）と、Figure 64 の傾きが $1/\lambda_{max}$ である事から MRP1 ベシクル、コントロールベシクルそれぞれの $\Delta\lambda_{max}$ である 8.33 nm, 7.55 nm は最大物理膜厚変化量 Δd_{max} として 4.99 nm, 4.52 nm と見積もられる。MRP1 ベシクルの方がコントロールベシクルよりも物理膜厚が大きく算出された理由としては、リン脂質以外の構成成分の発現量の差が膜厚に差を与えている可能性が考えられる。また、ここで得られた Δd_{max} の値は既に 4.2～5.1 nm と報告されている脂質二重層としての厚みと一致しており [76-79]、また、Langmuir 吸着等温線が直線を示していることも考えあわせると、MRP1 ベシクル、コントロールベシクルともにベシクルフュージョンによって二重層の形式で吸着していることが明らかとなった。

4-4-5.MRP1 ベシクル、コントロールベシクルと anti-MRP1 との相互作用計測

基板上に固定化したベシクルに対して MRP1 の N 末端にエピトープ（amino acids 8-17）を有する MRP1 特異的な抗体 anti-MRP1（clone: IU2H10）との反応を RIfS によって評価した。基板へのベシクルの固定化量を約 5 nm の Δλ に統一するため、ベシクルフュージョンの際の MRP1 ベシクルとコントロールベシクルの濃度を 50 μg/mL、500 μg/mL とした（Figure 68 参照）。ベシクルを固定化した基板に対して、anti-MRP1 の注入による Δλ について見てみると、コントロールベシクルではほとんど Δλ の上昇がほとんど見られなかったのに対して、MRP1 ベシクルでは濃度依存的な Δλ の上昇が見られた(Figure 72)。MRP1 とコントロールベシクルの違いが、MRP1 の発現の有無によるものであるとすると、anti-MRP1 が MRP1 と特異的に相互作用していることが分かった。

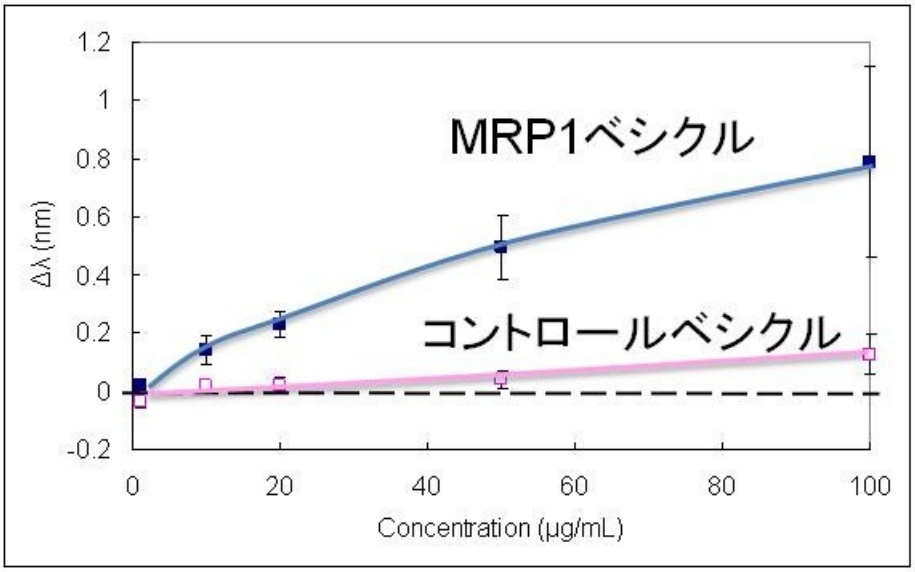


Figure 72 RIfS による MRP1 ベシクル、コントロールベシクルと N 末端にエピトープを有する anti-MRP1（clone: IU2H10）との反応（solid square: MRP1 ベシクル, open circle: コントロールベシクル）

Figure 73に示したように、細胞の外側にエピトープを有するclone: IU2H10とは異なり、細胞の内側に存在する膜貫通領域（membrane spanning domain 3: MSD3）にエピトープを有するanti-MRP1 (clone: MRPm5)に対して[80]、同様の評価を実施した（Figure 74）。

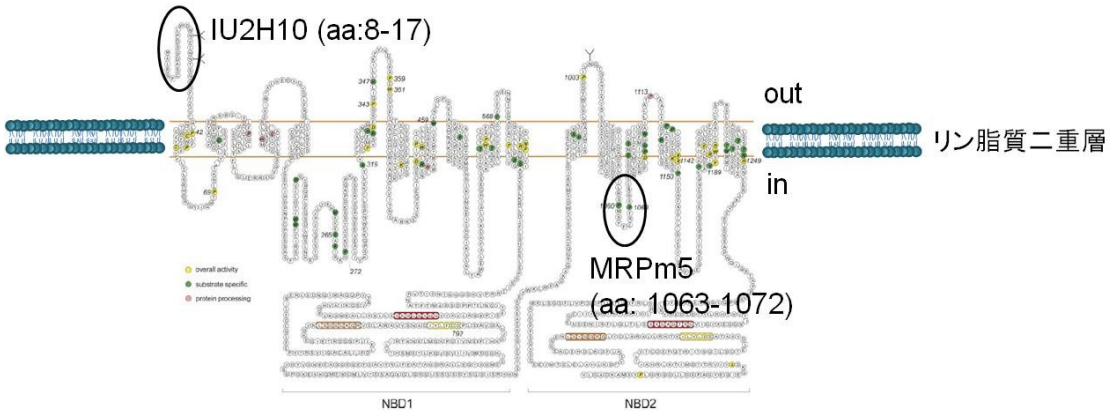


Figure 73 anti-MRP1の抗原認識部位（Deeleyらの文献より引用[81]）

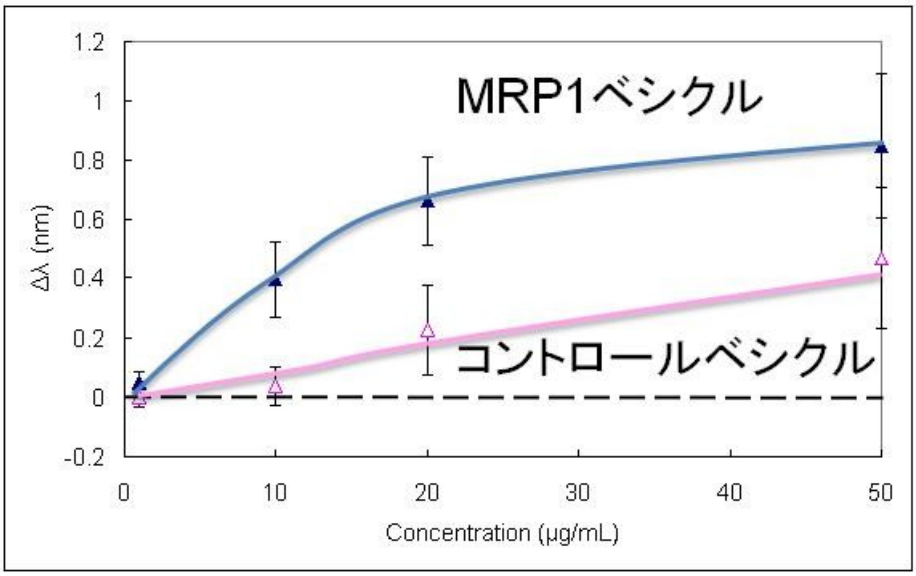


Figure 74 RIfSによるMRP1ベシクル、コントロールベシクルと細胞内部にエピトープを有する anti-MRP1（clone: MRPm5）との反応（solid triangle: MRP1 ベシクル, open triangle: コントロールベシクル）

Clone: MRPm5においてもclone: IU2H10の時と同様、測定濃度領域においてMRP1ベシクルの方がコントロールベシクルよりもΔλが大きく、MRP1 ベシクルを固定化した基板上にはMRPm5によって認識される膜タンパク質が存在することが示唆された。

ベシクルフュージョンにより膜タンパク質が固定される時に、基板と最初に接触するのはベシクルの外側であるため、基板上で抗体と接触出来るのは内側の成分だけになるはずだが、測定結果からは、細胞の外側、内側にエピトープを有する抗体ともに MRP1 ベシクル選択的に認識されたと言える。これは、生体細胞からベシクルを形成する機構が、一度細胞膜を開いてから再び閉じる際に[82]、ベシクルによって膜タンパク質の配向が異なるからであると考えることが出来る。また、Anti-MRP1 の濃度が上昇するのに伴い、コントロールベシクルにおいてもΔλの上昇が見られたが、これは抗体の MRP1 に対する特異性が高くないため、あるいは非特異的な anti-MRP1 の吸着によるためであると考えられる。

先程の結果は、抗体（IgG）自体の MRP1 ベシクルに対する非特異吸着による結果である可能性も考えられたため、MRP1 に結合しないと考えられる抗ヒト IgG 抗体（anti-hIgG）を用いて、間接的に anti-MRP1 と MRP 1 ベシクルが特異的相互作用によってレスポンスをしているか検証した。

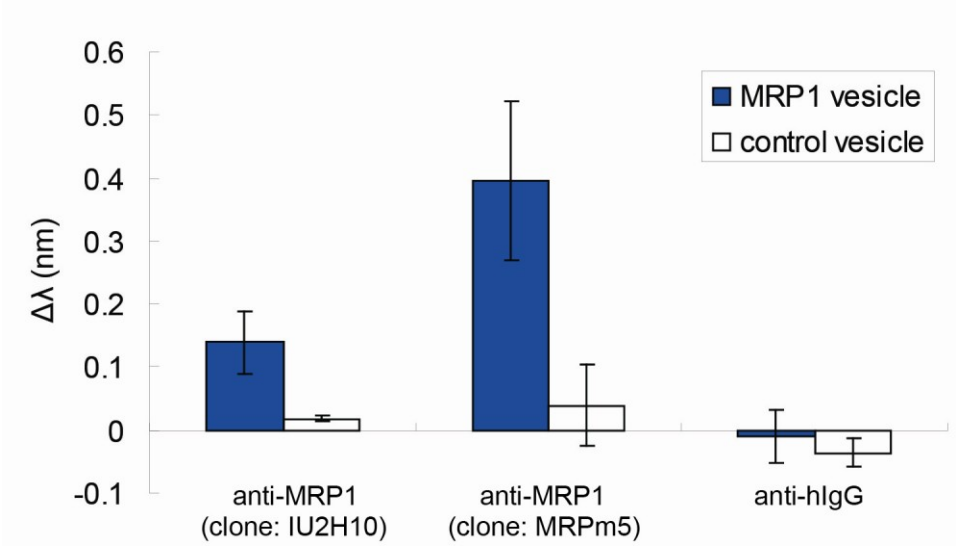


Figure 75 MRP1 ベシクル、コントロールベシクルと 2 種類の anti-MRP1(clone: IU2H10, MRPm5)、anti-hIgG との反応（抗体濃度: 10 μg/mL）

Anti-hIgG は、MRP1 ベシクルに相互作用しないことが確認されたことから（Figure 75）、anti-MRP1 と MRP1 ベシクルの反応は anti-MRP1 の抗原認識部位によっておこる特異的な反応である可能性が示唆された。以上より、ZrO_2 基板に固定化した膜タンパク質に対する抗体を用いて、膜タンパク質の存在領域に関係なく膜タンパク質と抗体の相互作用が特異的に検出可能であることが分かった。

4-5.結論

第 4 章では、MRP1 が発現した脂質二重膜により構成されたベシクルを用いた膜タンパク質 MRP1 の基板上への固定化、ならびに固定化した MRP1 と anti-MRP1 と間の抗原抗体反応の計測系の確立について検討した。両ベシクルともに Langmuir 型の吸着挙動を示したことから、膜タンパク質と ZrO_2 との間に働く相互作用により、単層吸着している事が予想された。分子量既知の DPPC の LB 膜によって実証した Essential Macleod を用いた Δλから膜厚変化量 Δd への変換式によって、膜タンパク質固定化における理論最大膜厚 Δd_{max} を求めたところ、MRP1 ベシクルが 4.99 nm、コントロールベシクルが 4.52 nm となり、両ベシクルともに既に報告されているリン脂質二重層（4.2 nm-5.1 nm）と同程度の厚さであり、膜タンパク質は基板上でベシクルフュージョンによって平面二重層を形成していることが示唆された。続いて、膜タンパク質を固定化した ZrO_2 基板に対して、続けて anti-MRP1 溶液を導入することによる抗原抗体反応の計測を試みた。本来細胞の外部、内部にエピトープを持つ抗体ともに、コントロールベシクルよりも、MRP1 ベシクルとの反応量が大きかったことから、anti-MRP1 は ZrO_2 基板上、あるいはリン脂質に対して非特異的に結合しているのではなく、MRP1 リガンドを選択的に認識している可能性が示唆された。この可能性は、anti-MRP1 とは異なる抗体（anti-hIgG）が基板上に非特異吸着しないことからも支持された。

第５章　結言

本研究は、基本原理としてラベルフリーかつ簡易な光学系で相互作用を計測することが可能な RIfS に着目して、これまでの研究において困難であった分子間相互作用と光学膜厚の同時計測系の構築を目的とした検討を実施した。モデルの反応系としてはバイオセンサの分子認識素子として広く用いられる抗体による抗原抗体反応をモチーフとした。

第 2 章では、AFP を検出するための、anti-AFP 固定化基板の作製方法の確立に向けた検討を実施した。XPS により SiN 基板表面には、酸素原子が 40%存在していることを確認して、水酸基を介したシランカップリング剤による修飾が可能であることを明らかにした。シランカップリング剤の修飾条件を検討し、抗原抗体反応を計測するのに最適な修飾条件を見出した。修飾したカルボキシル化基板を XPS により評価し、カルボキシル基由来と思われる C(=O)-O ピーク強度の増大、あるいはシランカップリング剤中に含まれるマレアミド酸由来の N-C ピークの出現から、基板表面に対してシランカップリング剤が修飾されていることを確認した。シランカップリング剤修飾前後の基板表面を AFM により観察したところ、イメージ、表面粗さにほぼ変化が見られなかった事から、カルボキシル化はほぼ一様に行われたと考えられた。そして、カルボキシル基修飾を行った基板に対して、アミドカップリングにより共有結合的に anti-AFP を固定化した anti-AFP 固定化基板の作製を行った。RIfS を用いて基板の基準波長を測定したところ、抗体固定化プロセスに伴う Δλが計測されたことから、anti-AFP が有意に固定化されていることを確認した。以上の検討により、SiN 基板に対するシランカップリング剤を経由した anti-AFP 固定化基板の作製方法を確立した。

第 3 章では、第 2 章で調製した anti-AFP 固定化基板を用いた RIfS による抗原抗体反応の計測系の確立に向けた検討を実施した。RIfS にセットした anti-AFP 固定化基板上に PDMS フローセルを装着してマイクロ流路を形成し、流路内に AFP 溶液を導入することで抗原抗体反応の計測を行った。検出感度を向上させるために、running buffer、塩濃度、pH、温度について反応条件の探索を行い、pH 5.0 の Tris-HCl buffer（10 mM Tris, 2.68 mM KCl, 138 mM NaCl）、測定温度 30℃の反応条件を選択することで、肝細胞がんの体外診断に用いられている AFP のカットオフ値（20 ng/mL)以下となる 10 ng/mL の検出を達成することが出来た。この反応条件を用いて BSA ならびにヒト血清に含まれるタンパク質対する交差性試験を行った結果、anti-AFP 固定化基板に対する反応が AFP 特異的であることを確認した。ヒト正常プール血清中の AFP を試料として用いて抗原抗体反応の計測を行った結果、血清由来の成分に対して抗原抗体反応が阻害されることなく、AFP 由来のシグナルを検出することが出来た。しかし、血清由来成分の非特異吸着を完全に防ぐことは出来なかったため、RIfS を体外診断装置に応用するには夾雑物の基板への非特異吸着抑制に関しては、

界面活性剤の添加以外にさらなる検討が必要である。

また、抗原抗体反応が Langmuir の吸着等温式に対して相関性が高く（R^2=0.9998）従ったことから、基板に対して単層で吸着していると仮定して、Essential Macleod を用いて、膜モデルを組み立て反射率のシミュレーションから抗原抗体反応における AFP の占有率を算出した。AFP の膜厚（8 nm）と屈折率（1.45）を仮定することで、初期反応条件において理論最大吸着（$\Delta\lambda_{max}$）の時に 9%、反応条件を最適化した後においては 18%とそれぞれ AFP の占有率を算出することが可能であった。AFP を不均一な膜として捉えることで、その占有率を算出可能であったことから、$\Delta\lambda$ で分子間相互作用を捉えるだけでなく、反応後の解析によって AFP の基板上の状態を占有率として推定することが出来た。

第 4 章では、MRP1 が発現した脂質二重膜により構成されたベシクルを用いた膜タンパク質 MRP1 の基板上への固定化、ならびに固定化した MRP1 と anti-MRP1 と間の抗原抗体反応の計測系の確立について検討した。膜タンパク質を平面基板上に固定化するために、膜タンパク質中のリン脂質に含まれるリン酸との配位結合が可能、かつ RIfS の干渉膜として機能する ZrO_2 を基板材料として選択した。MRP1 ベシクル、コントロールベシクルを含む溶液を PDMS フローセルが装着された ZrO_2 基板上のマイクロ流路内に導入することによる固定化を試みた。RIfS 評価を実施したところ、両ベシクルともに Langmuir 型の吸着挙動を示したことから、膜タンパク質と ZrO_2 との間に働く相互作用により、単層吸着している事が予想された。分子量既知の DPPC の LB 膜によって実証した Essential Macleod を用いた $\Delta\lambda$ から膜厚変化量 Δd への変換式によって、膜タンパク質固定化における理論最大膜厚 Δd_{max} を求めたところ、MRP1 ベシクルが 4.99 nm、コントロールベシクルが 4.52 nm となり、両ベシクルともに既に報告されているリン脂質二重層（4.2 nm-5.1 nm）と同程度の厚さであり、膜タンパク質は基板上でベシクルフュージョンによって平面二重層を形成していることが示唆された。続いて、膜タンパク質を固定化した ZrO_2 基板に対して、続けて anti-MRP1 溶液を導入することによる抗原抗体反応の計測を試みた。本来細胞の外部、内部にエピトープを持つ抗体ともに、コントロールベシクルよりも、MRP1 ベシクルとの反応量が大きかったことから、anti-MRP1 は ZrO_2 基板上、あるいはリン脂質に対して非特異的に結合しているのではなく、MRP1 リガンドを選択的に認識している可能性が示唆された。この可能性は、anti-MRP1 とは異なる抗体（anti-hIgG）が基板上に非特異吸着しないことからも支持された。ZrO_2 基板を利用したベシクルの固定化、ならびに MRP1 の抗原抗体反応を計測することで、MRP1 と anti-MRP1 の抗原抗体反応が特異的に起きることをントロールベシクルとの比較や anti-hIgG との比較により明示することが出来たことから、基板上に固定化した膜タンパク質の反応性を評価することが出来る装置としての可能性を証明することが出来た。また、光学膜厚の観点からは、脂質膜の屈折率を仮定することで ZrO_2 基板上に付着した脂質膜の物理膜厚を計測することが可能であった。

以上を総括すると、本研究における検討によって肝細胞がんのバイオマーカーとしてAFP を診断に用いられるカットオフ値以下の検出限界を達成することが出来た。従って、血清由来の非特異吸着の影響を回避することが出来れば、体外診断機器として応用出来る可能性がある。また、MRP1 はがんに対する化学療法に対して問題となる薬剤の耐性に関連するため、膜タンパク質上の特異的なリガンドを検出出来るシステムは創薬に貢献出来る可能性を秘めている。更に、本研究において初めて RIfS が光学膜厚を測定可能であるという点に着目し、AFP の抗原抗体反応においてはその占有率を、MRP1 に関しては物理膜厚を算出することが可能であることを見出した。この占有率や物理膜厚は、現在は屈折率を波長分散がなく一定である、などの仮定によって成り立っているが、今回の DPPC の LB 膜測定によって明らかになったたように、屈折率や物理膜厚が既知のサンプルを用いる事で、確度を向上させることが可能である。また、本研究では RIfS の測定値を反射率極小値波長のシフトとしたが、反射スペクトル全体を解析することで屈折率や物理膜厚に関しても情報を得ることが出来るようになると予想される。占有率は、反応における効率を表す指標、物理膜厚は、構造の厚みを表す指標となり、このような情報は、SPR や QCM などのラベルフリーセンサでは算出することが困難なものであるため、薄膜表面・界面で生じた構造に関する評価、生体膜や高分子、ゲルなどの高分子材料に対する評価など幅広い応用展開が見込める。そして、評価は基本的に基板に対するインジェクション（注入）操作のみによって達成出来たことは、膜の光学特性評価を含めて RIfS が簡便な評価システムへと応用可能なことを示している。

本研究の成果によって、RIfS が分子間相互作用にとどまらず、光学特性という新たな指標をも同時に計測することが可能な有用なセンサとなり得ることを実証した。最後に本研究が、今後 RIfS センシングシステムの医学・薬学・理工学におけるさまざまな分野での応用が展開される際の基礎的知見に位置づけられることを期待したい。

参考文献

(1) Barredo, J. L. *Methods in Biotechnology* **2005**, *17*, 29-60.

(2) Clark, L. C. Jr.; Lyons, C. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1962**, *102*, 29-45.

(3) Liedberg, B.; Nylander, C.; Lundstrom, I. *Sens. Actuators.* **1983**, *4*, 299-304.

(4) Jönsson, U.; Malmqvist, M. *Adv. Biosens.* **1992**, *2*, 291-336.

(5) Sauerbrey, G. *Z. Phys.* **1959**, *155*, 206-210.

(6) Langmuir, I.; Schaefer, V. J.; Wrinch, D. M. *Science* **1937**, *85*, 76-80.

(7) Blodgett, K. B.; Langmuir, I. *Phys. Rev.* **1937**, *51*, 964-982.

(8) Adams, A. L.; Klings, M.; Fischer, G. C.; Vroman, L. *J. Immunol. Methods* **1973**, *3*, 227-232.

(9) Giaever, I.; Laffin, R. J. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **1974**, *71*, 4533-4535.

(10) Sandström, T.; Stenberg, M.; Nygren, H *Appl. Opt.* **1985**, *24*, 472-479.

(11) Brecht, A.; Gauglitz, G *Biosens. Bioelectron.* **1993**, *8*, 387-392.

(12) Birkert, O.; Gauglitz, G *Anal. Bioanal. Chem.* **2002**, *372*, 141-147.

(13) 李　正中, 光学薄膜と成膜技術, アグネ技術センター, **2002**, pp.41-44.

(14) Özkumur, E.; Needham, J. W.; Bergstein, D. A.; Gonzalez, R.; Cabodi, M.; Gershoni, J. M.; Goldberg, B. B.; Ünlü M. S. *Proc. Nat. Acad. Sci USA* **2008**, *105*, 7988-7992.

(15) Daaboul, G. G.; Vedula, R. S.; Ahn, S.; Lopez, C. A.; Reddington, A.; Ozkumur E.; Ünlü, M. S. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 2221-2227.

(16) Fujimura, T.; Takenaka, K.; Goto, Y. *Jpn. J. Appl. Phys.* **2005**, *44*, 2849-2853.

(17) Choi, H. W.; Takahashi, H.; Ooya, T.; Takeuchi, T. *Anal. Methods* **2011**, *3*, 1366-1370.

(18) Choi, H. W.; Sakata, Y.; Kurihara, Y.; Ooya, T.; Takeuchi, T. *Anal. Chim. Acta* **2012**, *728*, 64-68.

(19) Srinivas, P. R.; Kramer, B. S.; Srivastava, S. *Lancet Oncol.* **2001**, *2*, 698-704.

(20) Hanash, S. M.; Pitteri, S. J.; Faca, V. M. *Nature* **2008**, *452*, 571-579.

(21) Sturgeon, C. *Clin.Chem.* **2002**, *48*, 1151-1159.

(22) Bergstrand, C. G.; Czar, B. *Scand. J. Clin. Lab. Invest.* **1956**, *8*, 174-179.

(23) Abelev, G. I.; Perova, S.; Khramkova, N. I.; Postnikova, Z. A.; Irlin, I. *Transplant Bull.* **1963**, *1*, 174-180.

(24) Tatarinov, Y. S. *Vop. Med. Khim.* **1964**, *10*, 90-91.

(25) Bruix, J.; Sherman, M. *Hepatology* **2005**, *42*, 1208-1236.

(26) Trevisani, F.; D'Intino, P. E.; Morselli-Labate, A. M.; Mazzella, G.; Accogli, E.; Caraceni, P.; Domenicali, M.; De Notariis, S.; Roda, E.; Bernardi, M. *J.Hepatol.* **2001**, *34*, 570-575.

(27) 岡崎　伸生, 長谷川　博, 新しい臨床検査マーカーの開発と展望, シーエムシー, **1993**, pp.10-18.
(28) Ball, D.; Rose, E.; Alpert, E. *Am. J. Med. Sci.* **1992**, *303*, 157-159.
(29) Gupta, S.; Bent, S.; Kohlwes, *J. Ann. Intern. Med.* **2003**, *139*, 46-51.
(30) Nguyen, M.; Garcia, R.; Simpson, P.; Wright, T.; Keeffe, E. *Hepatology* **2002**, *36*, 410-417.
(31) Waldmann, T. A.; McIntire, K. R. *Cancer* **1974**, *34*, 1510-1515.
(32) Belanger, L.; Sylvestre, C.; Dufour, D. *Clin. Chim. Acta* **1973**, *48*, 15-19.
(33) Teramura, Y.; Iwata, H. *Anal. Biochem.* **2007**, *365*, 201-207.
(34) Chou, S. F.; Hsu, W. L.; Hwang, J. M.; Chen, C. Y. *Clin. Chem.* **2002**, *48*, 913-918.
(35) Tsai, W. C.; Lin, I. C. *Sens. Actuators, B* **2005**, *106*, 455-460.
(36) Alberts, B.; Johnson, A.; Lewis, J.; Raff, M,; Roberts, K.; Walter, K. THE CELL 細胞の分子生物学 第 4 版, Newton Press Inc., **2004**, pp.593-613.
(37) Gerstein, M.; Hegyi, H. *FEMS Microbiol. Rev.* **1998**, *22*, 277-304.
(38) Muller, D. J. *Biophys. J.* **2006**, *91*, 3133-3134.
(39) Scheffer, G. L.; Maliepaard, M.; Pijnenborg, A. C. L. M.; van Gastelen, M. A.; de Jong, M. C.; Schroeijers, A. B.; van der Kolk, D. M.; Allen, J. D.; Ross, D. D.; van der Valk, P.; Dalton, W. S.; Schellens, J. H. M.; Scheper R. J. *Cancer Res.* **2000**, *60*, 2589-2593.
(40) Bramhill, D. *Annu. Rev. Cell Rev. Biol.* **1997**, *13*, 395-424.
(41) Hopkins, A. L.; Groom, C. R. *Nature Rev.* **2002**, *1*, 727-730.
(42) Cole, S. P.; Bhardwaj, G.; Gerlach, J. H.; Mackie, J. E.; Grant, C. E.; Almquist, K. C.; Stewart, A. J.; Kurz, E. U.; Duncan, A. M.; Deeley, R. G. *Science* **1992**, *258*, 1650-1654.
(43) Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P. C. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 849-899.
(44) 稲垣　暢也, 植田　和光, 鈴木　洋史, ABC トランスポーター, 診断と治療社, **2002**, pp.46-59.
(45) Brian, A. A.; McConnell, H. M. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1984**, *81*, 6159-6163.
(46) Sackmann, E. *Science* **1996**, *271*, 43-48.
(47) Goennenwein, S.; Tanaka, M.; Hu, B.; Moroder, L.; Sackmann, E. *Biophys. J.* **2003**, *85*, 646-655.
(48) Srinivasan, M. P.; Ratto, T. V.; Stroeve, P.; Longo, M. L.; *Langmuir* **2001**, *17*, 7951-7954.
(49) Keller, C. A.; Kasemo, B. *Biophys. J.* **1998**, *75*, 1397-1402.
(50) Gloves, J. T.; Ulman, N.; Boxer, S. G. *Science* **1997**, *275*, 651-653.
(51) Gloves, J. T.; Boxer, S. G. *Acc. Chem. Res.* **2002**, *35*, 149-157.

(52) 馬越　大, 森田　誠一, 久保井　亮一,リポソーム応用の新展開, NTS, **2005**, pp.415-424.
(53) 人口動態統計（厚生労働省大臣官房統計情報部）, 国立がん研究センターがん対策情報センター, **2011**. (http://ganjoho.jp/professional/statistics/statistics.html)
(54) Matsuda, T.; Ajiki, W.; Marugame, T.; Ioka, A.; Tsukuma, H.; Sobue, T. *Jpn. J. Clin. Oncol.* **2011**, *41*, 40-51.
(55) Laarz, E.; Zhmud, B. V.; Bergstrom, L. *J. Am. Ceram. Soc.* **2000**, *83*, 2394-2400.
(56) Arkles, B. *Chemtech* **1977**, *7*, 766-778.
(57) Seidel, H.; Csepregi, L.; Heuberger, A.; Baumgartel, H. *J. Elecrochem. Soc.* **1990**, *137*, 3621.
(58) Belghiti, J. J.; Panis, Y.; Farges, O.; Benhamou, J. P.; Fekete, F. *Ann. Surg.* **1991**, *214*, 114-117.
(59) Masson, J. F.; Obando, L.; Beaudoin, S.; Booksh, K. *Talanta* **2004**, *62*, 865-870.
(60) Aspnes, D. E. *Thin Solid Films* **1982**, *89*, 249-262.
(61) Luft, A. J.; Lorscheider, F. L. *Biochemistry* **1983**, *22*, 5978-5981.
(62) Paemelee, D.; Evenson, M.; Deutsch, H. *J. Biol. Chem.* **1978**, *253*, 2114-2119.
(63) Hua, Z.; Chen, Z.; Li, Y.; Zhao, M. *Langmuir* **2008**, *24*, 5773-5780.
(64) Vink, H.; Duling, B. R. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* **2000**, *278*, 285-289.
(65) Huang, Y. C.; Ge, B.; Sen, D.; Yu, H. Z. *J. Am. Chem. Soc.* **2008**, *130*, 8023-8029.
(66) Iglesias-González, T.; Sánchez-González, C.; Montes-Báyon, M.; Llopis-González, J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 277-285.
(67) Cheng, P. W. *Human Gene Therapy* **1996**, *7*, 275-282.
(68) Reznick, A. Z.; Cross, C. E.; Hu, M. L.; Suzuki, Y. J.; Khwaja, S.; Safadi, A.; Motchnik, P. A.; Packer, L.; Halliwell, B. *Biochem. J.* **1992**, *286*, 607-611.
(69) Fabre, R. M.; Okeyo, G. O.; Talham, D. R. *Langmuir* **2012**, *28*, 2835-2841.
(70) Liu, H.; Sun, X.; Yin, C.; Hu, C. *J. Hazard. Mater.* **2008**, *151*, 616-622.
(71) Kanaujia, P. K.; Pardasani, D.; Tak, V.; Purohit, A. K.; Dubey, D. K. *J. Chromatogr. A.* **2012**, *1218*, 6612-6620.
(72) Hale, G. M.; Querry, M. R. *Appl. Opt.* **1973**, *12*, 555-563.
(73) Gagoś, M.; Koper, R.; Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2001**, *1511*, 90-98.
(74) Sujak, A.; Gabrielska, J.; Milanowska, J.; Mazurek, P.; Strzałka, K.; Gruszecki, W. I. *Biochim. Biophys. Acta* **2005**, *1712*, 17-28.
(75) Takizawa, M.; Kim, Y. H.; Urisu, T. *Chem. Phys. Lett.* **2004**, *385*, 220-224.
(76) Cremer, P. S.; Boxer, S. G. *J. Phys. Chem. B* **1999**, *103*, 2554-2559.
(77) Simon, S. A.; McIntosh, T. J. *Biochim. Biophys. Acta* **1984**, *773*, 169-172.
(78) Nagle, J. F.; Wiener, M. C. *Biochim. Biophys. Acta* **1988**, *942*, 1-10.

(79) Fabre, R. M.; Talham, D. R. *Langmuir* **2009**, *25*, 12644-12652.
(80) Koike, K.; Deeley, R. G.; Cole, S. P. C. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* **2004**, *315*, 719-725.
(81) Deeley, R. G.; Westlake, C.; Cole, S. P. C. *Physiol. Rev.* **2006**, *86*, 849-899.
(82) Lew, V. L.; Hockaday, A.; Freeman, C. J.; Bookchin, R. M. *J. Cell. Biol.* **1988**, *106*, 1893-1901.

業績リスト

【本研究に関する論文】

1. “Fabrication of Carboxylated Silicon Nitride Sensor Chips for Detection of Antigen–Antibody Reaction Using Microfluidic Reflectometric Interference Spectroscopy”
Yoshikazu Kurihara, Masaaki Takama, Tadanobu Sekiya, Yuka Yoshihara, Tooru Ooya, Toshifumi Takeuchi
Langmuir **2012**, *28*, 13609-13615

2. “Microfluidic Reflectometric Interference Spectroscopy-based Sensing for Exploration of Protein-Protein Interaction Conditions”
Yoshikazu Kurihara, Masaaki Takama, Manami Masubuchi, Tooru Ooya, Toshifumi Takeuchi
Biosensors and Bioelectronics **2013**, *40*, 247-251

3. “Measurements of Interaction between Membrane Proteins and Antibody on a Zirconium Oxide Surface using Refletcometric Interference Spectroscopy”
Yoshikazu Kurihara, Fuminori Okada, Manami Masubuchi, Tsuneo Sawazumi, Tooru Ooya, and Toshifumi Takeuchi
In preparation

謝辞

本研究を行うにあたり、終始御指導と御鞭撻を賜り、また、本論文をまとめるに際して多大なる御助言を授けてくださいました神戸大学大学院工学研究科教授　竹内　俊文先生に心より感謝を申し上げます。社会人大学院生という立場上、学生として過ごす時間は限られておりましたが、私が大学不在時においてもメール、あるいは電話と密にご指導を仰ぐ機会を設けていただきました。そのおかげで、研究のデザインや集約といった大局観的なものの見方が非常に不得手であった私の苦手意識を改善して、今後の研究者としての礎を築いていく上で非常に有意義な 3 年間となりました。さらに、本研究の遂行におきまして、多くの御教示、御激励をいただきました神戸大学大学院工学研究科准教授　大谷　亨先生、助教授　北山　雄己哉先生に深謝致します。両先生ともお忙しい中、常に声をかけて下さり、相談に乗っていただいたことで、本論文の質を向上させることが出来ました。また、神戸大学大学院工学研究科研究員　高野　恵里氏、砂山　博文氏に感謝致します。竹内研究室にて後期博士課程を卒業されたお二人の実体験に基づく御助言をいただけたおかげで、本論文の執筆を円滑に進めることが出来ました。

社会人大学院生として神戸大学に入学する機会を作っていただいた 2010 年 10 月当時の部署、コニカミノルタオプト株式会社 LC 事業推進室の上司であった鈴木　明氏、奈良　環氏、高間　正彰氏に感謝を申し上げます。ここまで研究と仕事が両立出来たのは、未熟であった私に大きな裁量を与えていただいたおかげだと思っております。在学中における部署異動に際して、継続して研究に励む機会を与えて下さった私の現在（2013 年 5 月）の部署、コニカミノルタ株式会社第 1 技術開発センターの上司である須田　美彦氏、澤住　庸生氏に感謝を申し上げます。卒業が近づき、特に本論文の執筆中においては仕事で満足いくパフォーマンスが出せずに御迷惑をおかけしましたが、学業に集中出来るよう配慮して下さった事は、本論文を完成させるのにあたって非常に大きな助けとなりました。私が竹内研究室に通わせていただいた 3 年の間に MI-Affinity の開発に携わった、コニカミノルタ株式会社の関矢　忠宣氏、泉谷　直幹氏、二宮　英隆氏、村山　貴紀氏、吉原　由佳氏、岡田　文徳氏、増渕　茉奈美氏、平山　博士氏、村松　新一氏に感謝致します。皆様のおかげでコミュニケーションを取りながら仕事を円滑に進められ、研究に集中して取り組むことが出来たと思っております。

最後に研究、仕事以外の面で色々と支えになってくれた私の家族や友人に感謝致します。

神戸大学博士論文「反射干渉分光を利用した抗原抗体反応のラベルフリー計測」全 116 項
提 出 日　２０１３年７月１２日
本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当ページ上に掲載されます。

© 栗 原 義 一
本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。