

# 反射干渉分光法の応用領域の拡大可能性について

The Promise of Expanding Areas of Application for Reflectometric Interference Spectroscopy

栗原 義一\* 村松 新一\* 二宮 英隆\*  
Yoshikazu KURIHARA Shinichi MURAMATSU Hidetaka NINOMIYA  
泉谷 直幹\* 関矢 忠宣\* 高間 正彰\*  
Naoki IZUMIYA Tadanobu SEKIYA Masaaki TAKAMA

## 要旨

2010年4月に上市を開始したRIfS (Reflectometric Interference Spectroscopy; 反射干渉分光法) を測定原理に採用した分子間相互作用測定装置MI-Affinity®は、試行販売と並行して、実際の顧客のニーズの把握に努め、ソフトウェアや装置を用いた測定事例の開発に注力してきた。その結果、RIfSの応用領域を拡大出来る展望が見えてきた。

本レポートでは、RIfSの現行出力形式 $\Delta\lambda$ における、サイズが大きなサンプルに対する測定の妥当性の評価および新規出力形式の提案、また、光路長という概念を導入することにより、サンプルの大きさを推定する方法について述べる。次に、温調プログラムの搭載に伴う精密な温度コントロールを利用して評価することが可能になった高分子の熱応答性について、最後に、臨床検査装置としての利用に向けた抗原抗体反応の高感度化に対する取り組みについて報告する。

## Abstract

The MI-Affinity®, an intermolecular, interaction-measuring apparatus utilizing RIfS (reflectometric interference spectroscopy) went on the market in April, 2010. In these initial sales, we took the demands of customers into consideration, and we can now expand the areas of application of the RIfS by developing software for the MI-Affinity® as well as presenting increasing examples of various measurements that can be carried out using the MI-Affinity®.

In this paper, we first report evaluation validity for the samples on a micrometer scale using the present output system of RIfS ( $\Delta\lambda$ ): the result is the possibility of creating a new output system. We also report on how we can estimate the size of the samples by introducing the concept of optical path length. In addition, we report the thermal response of polymers using a new temperature control program. Last, we report on an approach to gain high sensitivity to antigen-antibody interactions.

## 1 はじめに

我々は、2010年4月にRIfSを測定原理に採用した分子間相互作用測定装置MI-Affinity®を上市した。MI-Affinity®は、タンパク質、糖、DNAなどの生体分子間相互作用をラベルフリーかつ簡易に、低コストで測定が可能で、オリジナルな測定原理を有している点を特長として、試行販売を行ってきたが、並行して実際の顧客のニーズの把握に関しても積極的に取り組んできた。

そのような取り組みを続ける中で、把握したニーズに対して、特にソフトウェアやアプリケーションに注力して開発を継続してきたことで、ハードウェアとしての機器本体はそのまま、RIfSの応用領域を拡大出来る可能性について展望が見えてきたので、本レポートにて報告する。

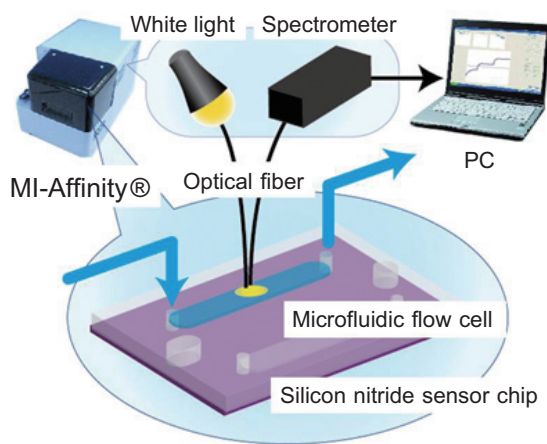


Fig. 1 Schematic of MI-Affinity® system.

## 2 測定原理とMI-Affinity®システムについて

まず最初に、RIfSの測定原理とMI-Affinity®システムの特徴について簡単に触れておく。詳細は、昨年度のテクノロジーレポートにも同様の記載があるので、参照されたい<sup>1)</sup>。

RIfSにおける相互作用を分かりやすく説明するために、光学薄膜設計ソフト「Essential Macleod」を用いて、窒化シリコン上に何も物が付いていない状態から、分子間相互作用などにより測定物質が吸着して膜厚が増加した際の分光反射率(入射光に対する反射光の強度の割合)の波長毎の変化をシミュレートした結果をFig. 2に示す。

\* コニカミノルタオプト(株)  
技術開発本部 LC事業推進室

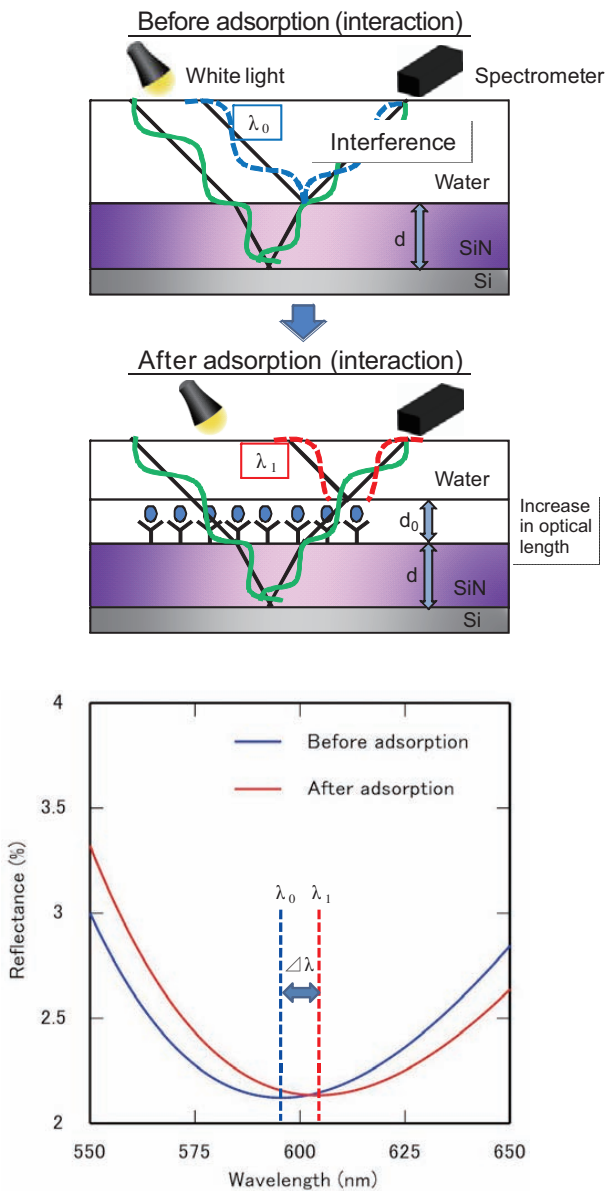


Fig. 2 Thin film simulation model.

物質が窒化シリコンに吸着（もしくは相互作用）することで、分光反射率の最小値が長波長側にシフトする様子が見られた。実際の相互作用においても同様の現象が起きることが確認されており、MI-Affinity®では、分光反射率が最小値を示す波長の変化を $\Delta\lambda$ と定義し、 $\Delta\lambda$ をリアルタイムに測定することによって、相互作用を始めとする膜厚変化をモニタリングしながら評価する仕組みとなっている。

### 3 RIFSの出力方法について

これまで、MI-Affinity®で採用している出力形式は、 $\Delta\lambda$ のみであったが、この $\Delta\lambda$ を用いて検証を続けていく中で、また、顧客の要望を集約していく中でいくつかの課題が見えてきた。

ここでは、課題に対する対策の実用化に向けた途中経過について報告する。

### 3.1 会合/解離のし易さの評価および高感度検出

現在MI-Affinity®で採用している出力 $\Delta\lambda$ を利用した会合/解離の評価は、この分光反射率が最小値を示す波長の時間に対する変化量で評価できる。この会合/解離を評価する上では、測定システムが与える出力値 $\Delta\lambda$ が基板に堆積あるいは吸着する物の量に比例していることが前提になる。Fig. 3は、基板に堆積あるいは吸着した物の量としての膜厚を横軸に、 $\Delta\lambda$ を縦軸にとり、窒化シリコン基板にポリスチレン溶液を条件違いでスピコートして作成した膜厚の異なるチップについて、エリプソメトリーで測定した膜厚に対するMI-Affinity®の実測値と、前述の薄膜シミュレーションソフトによる予想値をプロットしたものである。膜厚に応じて $\Delta\lambda$ が線形的に出力されており、シミュレーション結果ともよく一致していることが分かる。

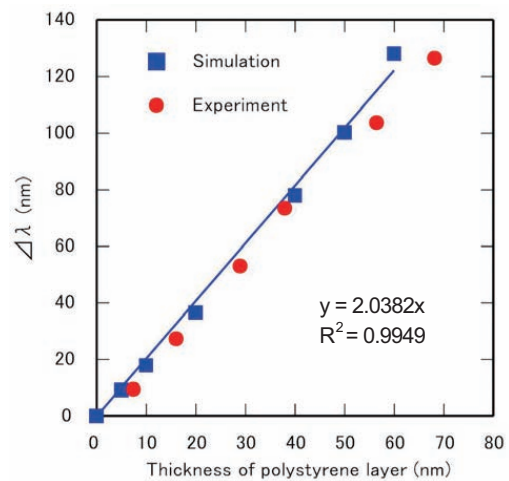


Fig. 3 Polystyrene layer thickness vs.  $\Delta\lambda$ .

しかしながら、膜厚をもっと広い範囲まで広げてみると、 $\Delta\lambda$ の値は、Fig. 3のような線形性を維持せず、周期的な挙動や、負の値を示すことがシミュレーションから予想され、実際のポリマーコート基板の測定でもその挙動が確認された。

この周期的な挙動に対しての取り組みは後述するが、ここまでの話は、何の相互作用もしていない均一な膜をRIFSで評価する場合、および、分子間相互作用というものを、非常に薄い膜が時間と共にその厚さを増していく過程と考える場合の話である。しかしながら、実際の相互作用では、会合によってその部分の「厚さ」が不均一に増加し、時間と共にそのような部分の比率が変化すると考える方がより妥当と思われる。このような考え方の場合においても、例えば、タンパク質やDNAのような数10nm以下のサイズのケースであれば、 $\Delta\lambda$ 形式の線形性に大きな問題は生じない。しかしサイズが大きくなってくると、線形性からのズレは顕著になってくる。Fig. 4は、可視光における屈折率が1.5でサイズが650nmの物質が、センサーチップ上に離散的に付いていくと仮定したときの反射率曲線の変化を表したシミュレーション結

果である。ここで、0~100とは、先程の物質がどの程度の割合で付いているかという反応の進捗度を表しており、0は何も付いていない状態を表し、100は全てその物質が付いた状態を表している。また、Fig. 5は、Fig. 4の各曲線の最小値を取る波長(黒い点線の領域内の変化)の変化量 $\Delta\lambda$ と反応の進捗度との関係を示したものである。従来の $\Delta\lambda$ を出力とする方法では、このケースの様に線形性が崩れることがあることが分かる。

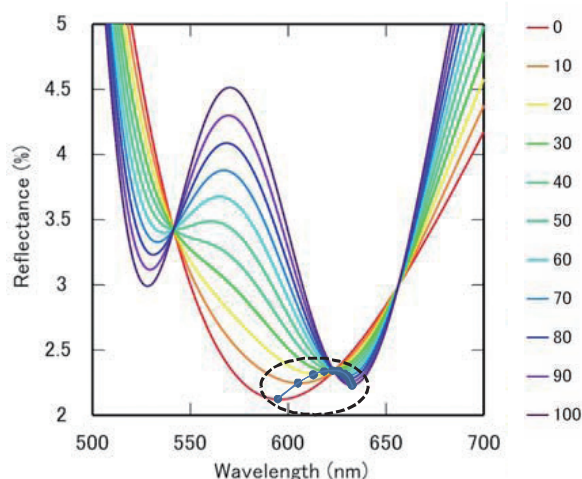


Fig. 4 Test material ( $n = 1.5$ , size = 650 nm) accumulation and spectral reflectance change.

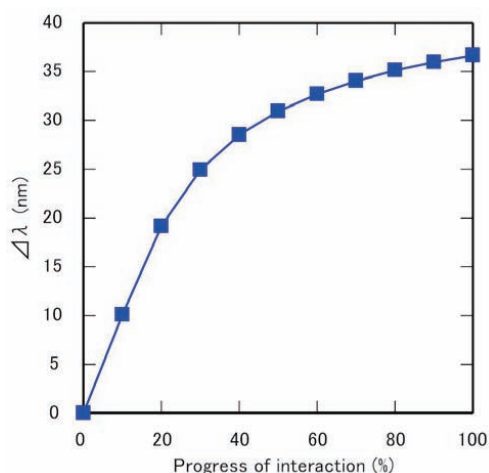


Fig. 5 Test material accumulation and  $\Delta\lambda$  (parallel with Fig. 4).

SPR (Surface Plasmon Resonance; 表面プラズモン共鳴) 原理と比較した場合、RIFSの特長のひとつとして、数100nm超の大きな分子でも測定できるということが分かるが、その意味でこの線形性の崩れは、会合/解離のし易さの定量的評価の阻害要因となり得るため、対応が必要な課題である。

また、従来の出力方法では、反射率の極小値を与える波長を常時生データの関数フィッティングで追い求めて出力しているため、ノイズの大きさは、極値付近の反射率形状に大きく依存する。本来、RIFSの特長として、反射干渉効果の変化はどの波長においても測定され得ると

いう点があり、相互作用による反射率曲線の変化を、局部的ではなく検出波長範囲全域で捉えることで、特定波長でのノイズの影響を除外でき、相互作用の有無を高感度に捉えられる可能性があると考えられる。

以上の観点から、現在我々は、相互作用による変化量と測定出力との間において、比較的大きな分子を扱う場合でも線形性が成り立ち、かつS/N比向上が期待できる出力形式の候補として、各波長での反射率の変化( $\Delta R$ と表わす)に着目し、鋭意検討を進めている。

### 3.2 試料の物理的情報の提供

前項でも触れたように、RIFSの根幹である反射干渉効果は、試料の光路長(膜厚×屈折率)の変化に対して周期的な挙動を示す。この現象は、従来は条件次第ではRIFSの短所として扱われていた。

我々は、その周期性が理論式で厳密に計算できるものであることに着目し、それをRIFSにおける長所として活用することを検討した。

まず、分光反射率の挙動を実測とシミュレーションで比較する上で、障害となる差異を埋める必要がある。現システムの分光反射率とは、光源からの光を一旦標準白色板にあて、そこでの反射光強度を光源の分光強度とし、これを基準に反射率に換算する相対的な分光反射率であったのに対して、干渉層の膜厚や屈折率が既知のセンサーチップを用い、シミュレーションから得られる理論的分光反射率になる光源の分光強度を逆算し、これを新たな光源の分光強度とおいた。そのようにして得られた実測の反射率曲線とそのシミュレーション結果とを照合することにより、試料の光路長を推定できる。

具体的には、光路長の変化に対する反射率曲線の(複数の)極値位置の波長シフトの関係を予めシミュレーションし、それを数学的に処理してテンプレートを作成しておく。

そして、実測された反射率曲線の極値位置の波長をそのテンプレートに照らすと、近似的に、試料の光路長が得られる。そして、試料の屈折率が大体わかっている場合、得られた光路長をその屈折率で割ることで、試料の膜厚が計算できる。そして、この膜厚は光の進行方向における試料の大きさと考えることができる。つまり、このような方法を取ることで、試料の大きさを推定することができる。

あるいは、一度会合した試料が、環境温度変化などによって伸縮した場合、その量も推定できる。このような情報は、他の競合技術には無い、RIFSだけの特長である。

そして、この光路長の情報は、相互作用がある程度進んで、ノイズレベルを越すと得られるはずであるので、試料の光路長がわかっている場合、会合の有無を、非常に微量な試料によって推定することができる。

つまり、その試料の光路長を一種の標識として用いることで、特定試料の存在の検出を高感度で行なうことが期待できる。

### 3.3 今後の課題と可能性

測定機としては、ここで述べた新しい考え方も、従来と同じ分光反射率データのデータ処理方法を変えるだけで実現できる。この点も他の競合技術にはない重要な特長である。我々は、想定される各種のニーズのそれぞれに最適なツールを提供すべく、システムノイズや各種の変動要因などを勘案しながら、具体的な手法の洗練を進めている。

これらの結果として、今まで測定が困難であった現象の解析に対しても適用できるものと確信している。

## 4 測定可能なターゲットの拡大について

### 4.1 薄膜の熱応答測定

近年、医療分野(細胞シート、人工皮膚、透析膜)やエネルギー分野(有機EL、液晶フィルム、太陽電池)に対して機能性高分子を利用したフィルムの用途が広がっている。これら高分子フィルムは担体の上に一般的にナノメートルからマイクロメートルのオーダーで固定されている。これまでの高分子の評価方法としては、膜厚評価では各種顕微鏡やエリプソメトリーが使われ、あるいは熱耐性などの環境試験では、DSC (Differential Scanning Calorimeter; 示差走査熱量測定) やTG (Thermo Gravimetry; 熱重量分析), TMA (Thermomechanical Analysis; 熱機械分析) などが使われてきた。しかし、これらの熱応答試験では、微細構造中にポリマーを使う有機EL素子や太陽電池のモジュールあるいはナノメートルオーダーの薄膜を直接測定することが難しく、厚膜のストリップやポリマー粉末を作成することで代替していた。薄膜は物質全体に占める界面の割合が大きいため、熱応答はバルクとは必ずしも同じではなく、薄膜の熱応答を直接測定する方法が求められている。

ここで、RiFSの大きな特長の一つに、光学膜厚をサブオングストロームレベルで測定可能という点がある。そこで、我々はMI-Affinity®の温調プログラム機能を効果的に利用することで、基板表面に塗膜したポリマーの加熱・冷却に対する膜厚変動を測定できるのではないかと考えた。

また、MI-Affinity®は測定環境として、大気中のdry状態とフローセル中に水を満たしたwet状態、双方を選択することが可能であるため、より実使用環境に近い形での熱応答測定を行えることを期待した。

### 4.2 RiFSの温調プログラム

開発初期のソフトウェアでは温度調整は手動操作であり、温度変化の速度や繰り返し等、細かい制御が出来るものではなかったため、ソフトウェアで温度変化のプログラムを組めるようにした。これにより、予め指定した速度で温度変化を行うことが可能となった。Fig. 6では、窒化シリコン基板に対して、25°C→40°C→10°C→25°Cの順番で、設定温度を変化させた際の、実際の基板の温

度の追従性能を示した。温度変化速度は15°C/300秒、また、15°C変化毎に60秒保持している。

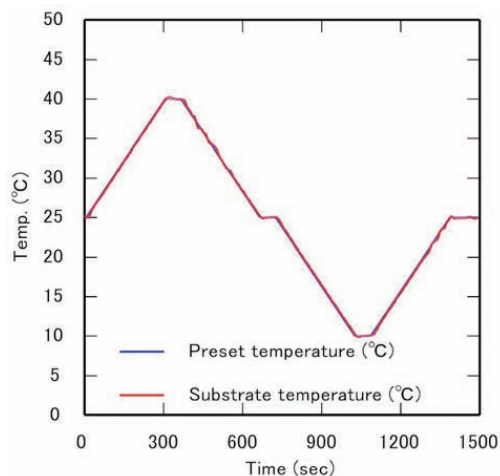


Fig. 6 Performance of temperature control program.

Fig. 6の結果から、基板温度の設定温度に対する追従性が非常に良いことを確認出来た。一般的な分子間相互作用測定装置では測定しながら設定温度を変更することが出来なかつたり、あるいは出来たとしても追従性が良くなかつたりするため、このようなプログラムを組んでリアルタイムな温度変化に対する測定を行なうことが出来なかつた。そこで、本プログラムをRiFSと組み合わせることで、MI-Affinity®ならではの測定事例の創出につながれると考えた。

### 4.3 RiFSを用いた熱応答性測定

熱応答測定のための試料としてポリスチレンと水和性高分子を用い、スピコーターを使用して基板上への高分子の塗布を行った。塗布後、薄膜の膜厚をエリプソメーターで測定したところ、それぞれ151.8nm (ポリスチレン)、29.7nm (水和性高分子)であった。

先述のソフトウェアを用いてRiFS基板上に塗布した薄膜の熱応答測定を試みた。温調プログラムは25°C→15°C→40°C→25°Cの順番に設定した(温度変化速度は5°C/100秒、5°C変化毎に60秒保持)。結果をFig. 7, 8に示す。

dry, wetいずれもポリスチレンと水和性高分子は温度に対して逆の挙動を示した。これは水和性高分子が内部に水分子を取り込んでおり、熱に反応してそれらを脱吸していることを反映しているものと推察している。すなわち、ポリスチレンのような疎水的な構造を持つポリマーは温度の増減に対して膨張・収縮という一般的な応答を示すのに対し、水和性高分子は水分子を含む形での構造変化を起こし、それが光学膜厚(光路長)に反映していると考えている。

また、別章で述べたとおりMI-Affinity®では $\Delta\lambda$ から絶対膜厚を算出することが可能であり、今回の測定結果からポリスチレン・水和性高分子の屈折率を入力すること

で、実際にどの程度の膜厚変化が起きているのかを求めることができる。具体的には、ポリスチレンは15°Cから40°Cの温度変化に対して膜厚が、dry環境で0.15nm, wet環境で0.13nm増加していた。一方水和性高分子は、15°Cから40°Cの温度変化に対して膜厚が、dry環境で0.53nm, wet環境で1.58nm減少していた。特に水和性高分子では高温条件に晒した後に室温に戻しても元の状態に戻っておらず、水分子の脱離などによるポリマー収縮が起こっていることが推測できる。この推測を裏付ける結果として、前記熱応答測定を繰り返すと水和性ポリマーではグラフがマイナス方向にシフトするという知見も得ている。

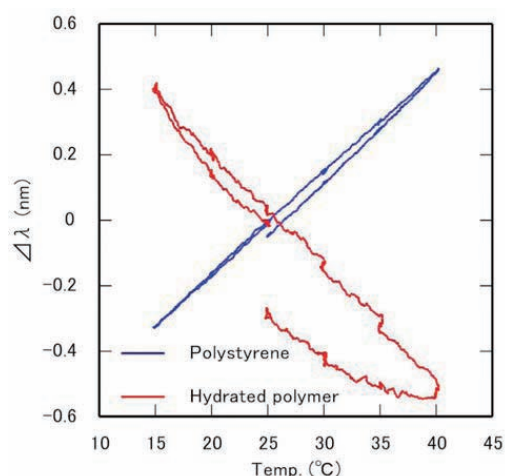


Fig. 7 Thermal response measurement of polymer-coated chip under dry condition.

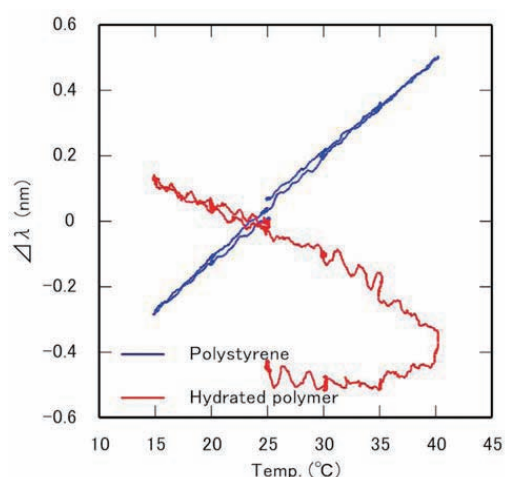


Fig. 8 Thermal response measurement of polymer-coated chip under wet condition.

#### 4.4 今後の課題と可能性

RIfS測定で得られる $\Delta\lambda$ は基本的に光学膜厚を反映したものであるが、今回測定した範囲の温度変化では温度に対する屈折率変化は微小(本測定範囲では0.004程度)であるため、 $\Delta\lambda$ への影響は少なく、ほぼ物理的な膜厚

変化に由来するものと考えているが、その点を様々な高分子を用いて追究していくことが課題であると言える。

本測定ではMI-Affinity®が非常に低膜厚の薄膜の熱応答測定のみならず、環境中の水分子とのやり取り、つまり高分子の水和構造変化をも測定できる可能性を見出し、現在は詳細な解析を進めている段階である。

## 5 抗原抗体反応の高感度化について

ここでは、開発当初から検討を行ってきた、分子間相互作用の代表例でもある抗原抗体反応の高感度化に向けた取り組みについて説明する。出力形式から高感度化する取り組みはもちろん重要であるが、測定対象物に見合ったカスタマイズを行うという観点からも本取り組みは重要であると考えている。

### 5.1 RIfSにおける高感度化検出への取り組み

高感度化に向けた取り組みとしては、モデル抗原として肝細胞癌マーカーとしても利用されている、AFP (Alphafetoprotein)を利用した抗原抗体反応について検討を行ってきた。その中でも感度向上に対して効果が認められた部分について2点述べる。

まず、1点目としては窒化シリコン基板に対する官能基修飾プロトコルを見直した。具体的には、カルボキシル基を末端に有するシランカップリング剤の選択、更には反応条件について、溶媒、pH、温度や反応時間などの最適化を行うことで、抗体の固相化量や抗原との反応性を高めることが出来た。2点目としては、検討当初、抗体固相化基板に対してBSA (Bovine Serum Albumin)によるブロッキングを行い、送液するランニングバッファーとして、PBS (Phosphate Buffer Saline)を用いた抗原抗体反応の検証を行っていたが、界面活性剤Tween 20を含む0.001% PBSTを選択することで、BSAブロッキングを行わなくとも、非特異吸着や交差反応性を抑えられることが分かり、また、BSAを使用しないことで、抗原抗体反応の効率が向上することが分かった。これらの検討結果を踏まえて、抗原抗体反応のLOD (Limit of Detection; 検出限界)や、定量範囲の算出を試みた。

### 5.2 抗原抗体反応検出

Fig. 9に抗原抗体反応の検出スキームについて示した。カルボキシル基を末端に有するシランカップリング剤として、Triethoxysilylpropylmaleamic acidを用いてカルボキシル化修飾基板の調製を行った。その後、カルボキシル化基板に対して、2種の縮合剤NHS (*N*-hydroxysuccinimide)、水溶性カルボジイミドEDC (1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide)によるカルボキシル基の活性エステル化を行い、抗体をアミド結合により共有結合的に固定化した。最後に、エタノールアミンによる不要な活性エステルのクエンチングを行い抗体固相化基板の調製を行った。

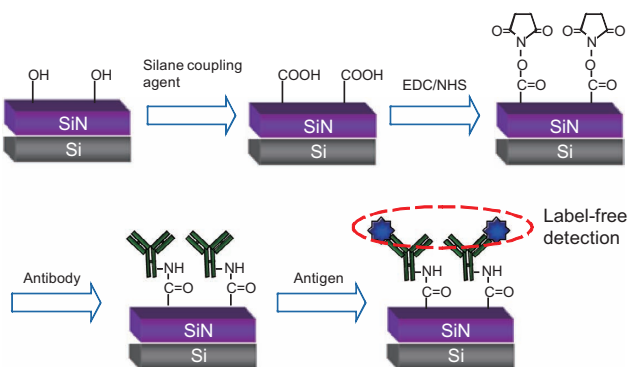


Fig. 9 Schematic of label-free detection of antigen-antibody reaction by RfS system.

MI-Affinity® に対するランニングバッファーとしては、0.001% PBST を流量  $20 \mu\text{L}/\text{min}$  で送液し、抗原抗体反応後、抗原を抗体から剥離する再生溶液に Glycine-HCl (pH1.5) を使い、毎回、剥離再生しながら、AFP を  $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  まで段階的に振って検証を行った。

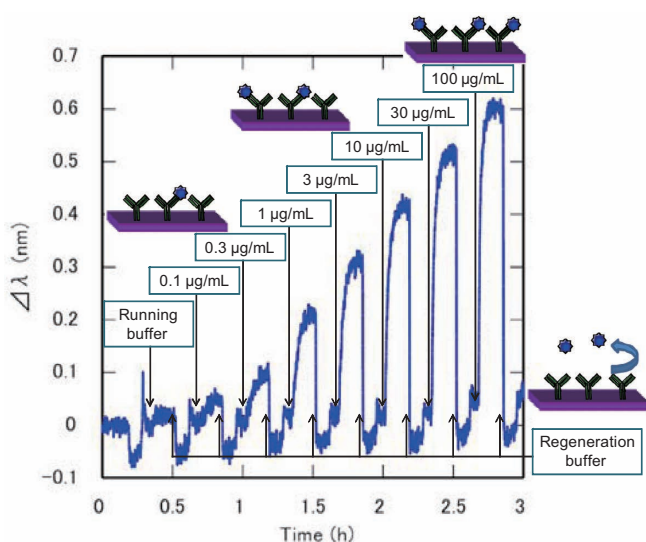


Fig. 10 LOD (limit of detection) and measurement range of sensor chip upon which anti-AFP antibody is immobilized.

Fig. 10 の結果から、AFP をモデル抗原にした MI-Affinity® システムにおける抗原抗体反応の LOD は  $0.1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 、定量範囲は  $0.1 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$  であることが分かった。この値は、サンプル量 ( $100 \mu\text{L}$ ) を考慮に入れても、RfS と同様にラベルフリーの相互作用測定が可能な SPR や QCM と大きく変わらない良いレベルであると言える。

続いて、抗体固相化基板の再現性について  $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  AFP の 20 回連続インジェクト評価を行った。ランニングバッファーとしては、 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$  程度の濃度領域において、先程の実験条件より  $\Delta\lambda$  が大きいことを確認している Tris-HCl (pH6.0) を、また、再生溶液としては先述の感度評価と同様のものを用いた。

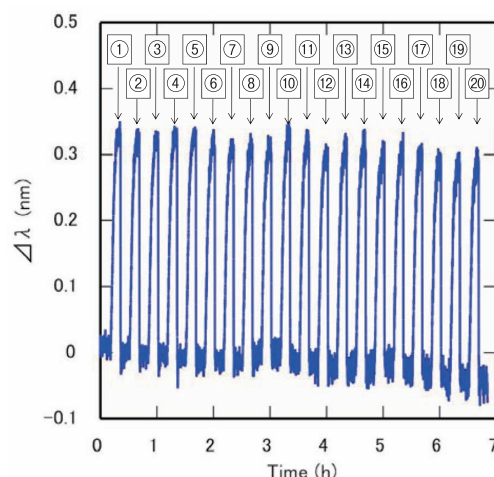


Fig. 11 Reproducibility of sensor chip upon which anti-AFP antibody is immobilized.

Fig. 11 の結果から、 $\text{CV} = 1.8\%$  ( $\Delta\lambda$  (average) =  $0.32 \text{ nm}$ ,  $n = 20$ ) という高い再現性を示した。この結果は、MI-Affinity® システム自体が非常に高い再現性を有していることを証明しており、他の検証においても実験条件を最適化することで、同様の測定が可能になると考えられる。

最後に、抗体固相化窒化シリコン基板に対する、血中に多く存在するヒト由来のタンパク質 4 種 (Fibrinogen, Human IgG (Immunoglobulin G), HSA (Human Serum Albumin), Transferrin) の交差反応性試験測定結果を Fig. 12 に示す。尚、ランニングバッファーや再生溶液としては先述の感度評価と同様のものを用いた。

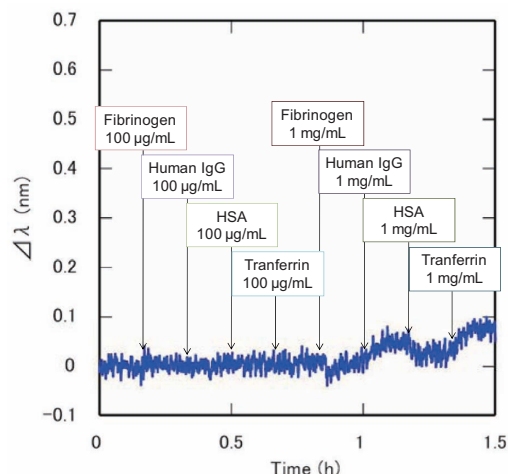


Fig. 12 Cross-reactivity of sensor chip upon which anti-AFP antibody is immobilized.

Fig. 12 の結果から、 $1 \text{ mg}/\text{mL}$  においては、Human IgG や Transferrin などのタンパク質において交差反応性や非特異吸着由来と考えられる  $\Delta\lambda$  の上昇がわずかながら認められるものの、 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$  においては変化がなく、この濃度は先述した AFP の検出限界 ( $100 \text{ ng}/\text{mL}$ ) の 1000 倍の濃度に相当するため、公差反応性は非常に少な

いと言える。本結果は窒化シリコン基板表面そのものが界面活性剤との組み合わせにより、非常にタンパク質を吸着しにくい表面である可能性を示しているデータでもあり、現在は窒化シリコン以外の基板表面との比較を検討している。

### 5.3 今後の課題と可能性

本レポートでは、抗原抗体反応における窒化シリコン基板表面に対する官能基の修飾方法として、シランカップリング剤による方法を報告した。今後は、非特異吸着防止を意識した基板表面を構築していくことによって、MI-Affinity®は、ラベルフリー測定にとって最も測定しづらい、夾雑物が多く含まれるサンプルを用いた目的物の相互作用測定を可能にすることで、臨床検査装置を始めとする測定機器として応用領域を拡大出来る可能性を示したい。

## 6 まとめ

実際の顧客のニーズから RIFS 原理の特長を見つめ直し、検証を重ねながら継続して開発を続けてきたことで、分子間相互作用測定装置としてスタートした MI-Affinity®は菌やウイルス、膜タンパク質といったサイズの大きなサンプルを測定することが出来る装置、あるいはポリマーや機能性材料の熱応答性などの特性を評価する装置、あるいはバイオマーカーを測定する体外診断装置として、顧客ターゲットを当初の研究機関のみならず、素材メーカー、製薬メーカー、臨床検査機器メーカーなど産業界へ拡大出来る可能性を本報告で示すことができたと考えている。

本レポートでは、実際に応用領域を拡大していくための取り組みとして、出力形式の見直しや薄膜高分子の熱応答性測定、抗原抗体反応の高感度化について例示することが出来た。今後も、様々な領域で測定したい現象を測定出来るツールとして、顧客のご要望に応えられるように開発を続けていきたい。

## 7 謝辞

本レポートにおける抗原抗体反応の検証に関して、神戸大学大学院工学研究科教授竹内俊文先生、准教授大谷亨先生より多くの有益なご助言をいただいた。また、本研究の一部は、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO) より受託した平成22年度イノベーション実用化開発に関する助成を受けて行われた。ここに深謝の意を表す。

### ●参考文献

- 1) 栗原義一, 泉谷直幹, 柏崎治, 山崎茂: 反射干渉分光法を利用した分子間相互作用測定装置, KONICA MINOLTA TECHNOLOGY REPORT VOL.8, (2011)