

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K05535

研究課題名(和文)短波長光を活用したSPR-蛍光近接場断層イメージング法の創製

研究課題名(英文)Development of a near-field tomographic imaging technique for SPR and fluorescence by using shorter wavelength light

研究代表者

鈴木 正康 (SUZUKI, MASAYASU)

富山大学・大学院理工学研究部(工学)・教授

研究者番号：70226554

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞膜表面や細胞質全体のイメージング技術は飛躍的に進歩しているが、その一方で細胞内の膜近傍に限定した精確な位置情報も含めた局所イメージング技術はまだほとんど未踏分野と言って良い。表面プラズモン共鳴(SPR)と表面プラズモン増強蛍光(SPEF)の同時イメージングを可能にするためにこれまで不可能であった短波長光源でのSPR測定が可能な新規センサ膜を開発しSPRとSPEFの同時測定が可能な新しい近接場イメージング技術を開発した。

研究成果の概要(英文)：Significant advances are shown in imaging techniques for cell membrane surface and cellular cytoplasm, but few studies on local precise imaging techniques for juxtamembrane region have been reported. This study focused on realization for the simultaneous imaging of surface plasmon resonance (SPR) and surface plasmon enhanced fluorescence (SPEF). Novel sensor chips were developed for SPR imaging under shorter wavelength light. Simultaneous imaging of SPR and SPEF could be realized by using these sensor chips and shorter wavelength light.

研究分野：生物計測工学

キーワード：バイオセンサ 表面プラズモン共鳴センサ 近接場イメージング 計測工学 細胞イメージング

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面の受容体から、細胞内部の膜近傍における情報伝達系にいたる領域の詳細な機能解析は医療や創薬の分野において極めて重要である。細胞膜表面や細胞質全体のイメージング技術は飛躍的に進歩しているが、その一方で細胞内の膜近傍に限定した正確な位置情報も含めた局所イメージング技術はまだほとんど未踏分野と言って良い。

表面プラズモン共鳴 (SPR) 測定は金属薄膜に全反射するような角度で光を入射したとき、そのエネルギーの一部が漏れだして生じるエバネッセント波と、それによって金属中の自由電子が励起されて生じる表面プラズモン波の共鳴現象を利用している。この光エネルギーが漏れ出す距離が「浸透深さ(あるいは侵入長)」と呼ばれ、SPR測定で実際に「見ている」範囲となる。この浸透深さは光源波長の影響を受ける事が知られている。波長 505 ~ 940nm の範囲で試算したところ、銀では 53 ~ 526nm、アルミニウムでは 168 ~ 720nm となる(水測定時)。この距離はまさに上述の細胞内の膜近傍での情報伝達系などの様子を見るのに好適な範囲である。そこで研究代表者はこれを利用した2種類の近接場イメージング手法を組み合わせた新しいイメージング技術の開発を目指した。光源波長により浸透深さが異なることから、異なる波長で得られたSPR画像の互いの差分をとれば、細胞のどのあたりで(何が)起きているかを見れるはずである。これをSPR断層イメージングと名づけた。一方、上述の漏れだしたエバネッセント波によって金属膜表面の蛍光色素を励起させる表面プラズモン増強蛍光分析(SPEF)では励起される蛍光物質は浸透深さの領域にあるものに限定されるので、その蛍光が細胞のどのあたりで生じているかを知ることが出来る。さらに用いる蛍光色素により、「何が」起きているかも推定できる。本研究ではSPR断層イメージングとSPEFイメージングの同時測定を実現しようと考えた。

### 2. 研究の目的

SPRセンサの測定範囲に相当する浸み出し光の及ぶ範囲である浸透深さが光源の波長に依存することに注目して、浸透深さの異なる画像の差分をとることでSPR断層イメージングを実現する。さらに浸み出し光により励起されるSPEFを、これまでSPR測定ができないため利用できなかった490nm付近の励起波長を有する蛍光色素を利用して行う。そしてこれらSPRイメージングとSPEFイメージングを同時に取得できる測定システムを構築し、数十~数百nmという細胞内の細胞膜近傍に相当する近接場領域の「どこ」で「何が」起きているかを画像化できる、SPR-蛍光近接場断層イメージング法を創製する。

本研究は 490 ~ 650nm というこれまでSP

Rセンサでは未開拓の短波長領域の光を光源として用いた研究である。これは研究代表者が開発した積層センサ膜を始めとする新しいSPRセンサチップを用いることで初めて可能となるものである。短波長光源でのSPRイメージングを実現することによりSPEFイメージングにおいても励起波長450 ~ 600nmという最も有用で多彩な蛍光プローブ色素が初めて使えるようになる。また光源波長による浸透深さの相違に着目した断層SPRイメージングというのは他に例のない計測手法であるが、短波長SPRイメージングにより幅広い波長領域でのSPRイメージングが可能になったことで初めて実現に近づいたものである。また数十μm程度に過ぎない細胞1個のレベルでのSPRイメージングに関する研究は研究代表者らの研究以外ではほとんど例のない独創的なものである。

### 3. 研究の方法

#### 光源波長と浸透深さの関係の評価

光源波長が長いほど浸透深さも長くなる。浸透深さに対応したSPR画像が得られるかを実証するためにモデル実験材料として樹脂微粒子や微小直方体を用いてそのSPR画像の大きさの変化から確認した。蒸留水中でSPRセンサ基板上に3種類の樹脂微粒子(平均粒径0.1μm、1μm、5μm)及びコントロールとして断面積が0.1μm<sup>2</sup>の四角柱体(浸透深さが変わってもSPR画像の大きさは不変)を置き、6種類の光源波長(490、505、590、660、850、940nm)でSPR画像を取得した。得られた画像の直径から浸透深さを算出した。浸透深さの理論値  $t_i$  は、 $t_i = (\lambda_0/2) \{ (n_m + n_d) / n_d^2 \}^{(1/2)}$  より求めた。ここで  $\lambda_0$  は光源波長、 $n_d$  は水の誘電率、 $n_m$  は金属の誘電率で物性データ集のデータ、または実際に作製したセンサチップを用いてエリプソメータで実測した屈折率と消光係数から算出した。

また各波長で得られた画像同士の差分画像を得るための、画像位置照合、画質補正、差分計算など必要な解析ツールの作成を行った。

#### SPRイメージと蛍光イメージが同時取得できる近接場イメージング装置の構築

SPRイメージングと同時に、その試料のSPEFに基づく蛍光画像を取得するために、2次元SPR装置のSPRセンサチップを設置するプリズム上に高感度CCDカメラ【平成27年度申請設備】を装着した。高感度CCDカメラに長WD(作動距離)顕微鏡レンズと蛍光フィルターを接続したものを、上下スライド付きのスタンド(既設)に装着してSPRセンサのセンサ基板上に来るよう位置調整をした。これに遮光カーテン等必要なものを装備した。SPEFは微弱なためカメラの感度向上のみならずバックグ

ウンドレベルの低減が必要であった。

#### SPEF画像の取得とSPR画像との関連性についての検討

短波長領域の光源でSPEFが観察できるかをまず確認した。モデル実験系としてFITCで標識したアルブミンの固定化膜やルテニウム錯体を溶解したナフィオン膜をSPRセンサ基板上に形成し、波長490nmの光源でSPR測定を行った。これによりSPR吸収とSPEFが確かに対応していることを確認した。またセンサ基板について種々の多重層薄膜基板（各層の厚さをいろいろ変えたもの）や銀薄膜と比較し、SPR吸収が大きく、かつSPEFが強く見られる基板を検討した。

#### 長距離伝搬表面プラズモン(LRSP)を活用するための新規センサチップの開発

SPRセンサチップの基板（プリズム）と金属薄膜の間に測定試料と同等の屈折率を有する物質の層を挿入することで、エバネッセント波の浸透深さや表面プラズモン波の伝搬距離が増大し高感度化が期待できるLRSPが実現できることが報告されている。本研究ではSF<sub>6</sub>基板上に屈折率が水とほぼ等しいアモルファスフッ素樹脂の1種であるCytop®(CTL-809M、旭硝子)をスピンコーティングにより塗布、硬化させ、その上に金薄膜を形成した。

#### 4. 研究成果

平成27年度は、まずSPR断層イメージングの基礎実験として光源波長と浸透深さの関係について評価した。ここでは樹脂微粒子のSPR画像の直径から浸透深さを算出した。参照試料として位置によって画像の大きさが変わらない直方体試料を用いた。その結果、光源波長が長いほど浸透深さも長くなることを実証することが出来た。

次にSPRイメージングと同時に、その試料のSPEFに基づく蛍光画像を取得するために、2次元SPR装置のセンサチップを設置するプリズム上に冷却CCDカメラを装着した。申請時に導入を予定していたRetiga 6000（日本ローバ）は視野が広く解像度が高いものの感度が不十分でSPEFによる微弱な蛍光画像の取得は困難であることがわかったので、バックグラウンドレベルが低く高感度なライカのDFC365FXを導入した。

最後に短波長領域の光源でSPEFが観察できるかを確認した。アルミニウム薄膜（膜厚15nm）基板上にルテニウム錯体をPDMSで固定化したものについて光源波長505nmでSPRイメージング画像とSPEFイメージング画像を計測したところ、SPR吸収が最大となった入射角54°付近で蛍光も最大となった。同様に蛍光微粒子を用いた実験でもSPR角で蛍光強度は最大となり、SPEFが観察できていることがわかった。

このように平成27年度に予定していた研究についてはほぼ計画通り遂行できた。

平成27年度の研究によりSPR吸収とSPEFの同時測定が可能となり、SPR吸収が最大となった入射角付近で蛍光も最大となるという結果が得られた。しかしSPEFによる蛍光は極めて微弱であり、SPEFではなく単に励起光を観測していた可能性も否定できなかった。そこで平成28年度は短波長光源でも感度の高いアルミ基板を用いてSPEF測定の検証を行った。直径6μmの蛍光微粒子(ex.512nm em.554nm)を用いてSPEF測定を行ったところ、505nmの光源ではSPR角付近で蛍光ピークが見られたが、660nmの光源ではSPR角付近でも蛍光はほとんど見られなかった。銀基板では505nmの光源ではSPR角が測定範囲外となったが、この時505nmの光源でも蛍光は見られなかった。以上のことから確かにSPRのエネルギーで蛍光が励起されていることが示された。このように浸透深さが大で、短波長光源でもSPR測定ができるアルミ基板を用いてSPEFが測定できた。しかしアルミ薄膜は不安定で緩衝液のように塩濃度の高い溶液中ではすぐに溶解してしてしまう。

そこで塩を含む溶液中でも使用できるようにアルミ基板上にアルミナ膜を形成したセンサチップを開発した。449nmに励起ピークを有し、500nm程度でも励起されるルテニウム錯体を含むナフィオン膜をセンサ基板上に形成し、505nmの光源を用いてSPR-SPEF同時測定を行った。結果を図1に示す。

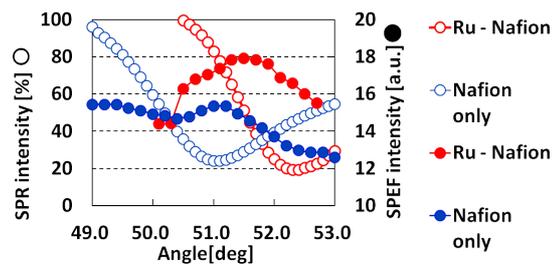


図1 アルミ-アルミナ積層膜を用いたSPR-SPEF同時測定

ルテニウム錯体を含まないナフィオン膜ではSPR、SPEF共、入射角51.0°でピークとなったが、ルテニウム錯体を含むナフィオン膜ではSPR角は52.4°、SPEFの最大値は51.5°で得られ、ルテニウム錯体の有無によるSPEFの増大も見られた。このようにアルミ-アルミナ基板でもSPR-SPEF同時計測に成功した。

このように平成28年度の研究によりアルミ-アルミナ積層膜をSPRイメージングのセンサ基板として新たに用いることでSPR-SPEF同時測定に成功した。しかしSPEFの感度は依然充分とは言えずアルミナ薄膜はSPRセンサに一般的に用いられる金薄膜と比べ化学的修飾が難しく安定性も充分とは言えなかった。そこで平成29年度はSP

EFの感度の一層の向上を図り、金薄膜を用いたセンサ基板を利用できるようにするため長距離伝搬表面プラズモン(LRSP)技術を導入した新しいセンサ基板を開発した。プリズムと金薄膜との間に水と屈折率の値に近いアモルファスフッ素樹脂であるCytopの層を挿入した。まずシミュレーション結果を参考にCytop層と金薄膜の最適膜厚を、光源波長が505nm、590nm、660nm、850nmの各場合について求めた。そしてSPRセンサ膜としての特性を検討したところ、いずれの光源波長においてもCytop層の挿入によりSPR曲線は非常にシャープになり、これにより輝度変化を指標としたSPR測定の感度は2.5~15倍向上した(図2)。

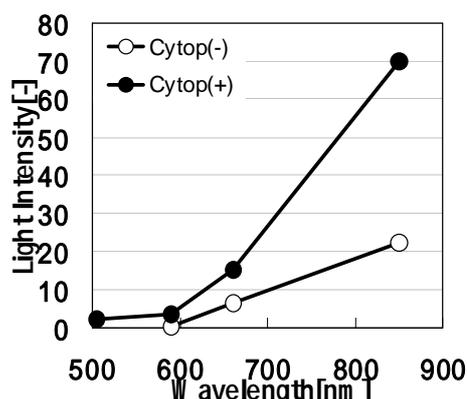


図2 Cytop挿入基板のSPR感度

また従来、金薄膜では測定が不可能であった波長505nmの光源でもSPR測定が可能となった。また入射光が金属薄膜から滲み出て表面プラズモン現象を引き起こす範囲を示す浸透深さはSPEFの高感度化に直接関係する指標であるが、Cytop層の挿入により約1.6倍増大した。

なおSPEF測定の高感度実現のため新規のSPRセンサ基板の開発に注力したため、交付申請時に平成29年度に実施を予定していた接着性培養細胞SPR-蛍光同時計測近接場イメージングについては十分時間を割くことができず特筆すべき成果は得られなかった。研究期間終了後も引き続き取り組んでいく予定である。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 2件)

Suzuki M, Nomura A, Yamamoto M, Minakuchi K, Iribe Y, Microscale chemical and enzyme sensor array prepared by microcontact printing, Sensors and Materials, 査読有, Vol.27, 2015, pp.881-889, DOI なし

鈴木正康, 単一細胞解析のためのバイオセンシング技術、化学工業、査読無、Vol.68, 2017, pp.96-100, DOI なし

[学会発表](計 11件)

入部康敬、鈴木正康、短波長光源を利用した2D-SPRイメージングの実現とその応用、化学とマイクロ・ナノシステム学会第32回研究会、2015年11月26~27日、北九州国際会議場(北九州市)

Suzuki M, Kobayashi Y, Murai I, Iribe Y, Enzyme switches on SPR imaging sensor chip, 26th Anniversary World Congress on Biosensors (国際会議), 2016年5月24~27日, Goteborg (スウェーデン)

Kashem MA, Kimoto K, Iribe Y, Suzuki M, Low-cost biosensor chips for BOD and pesticides monitoring, 26th Anniversary World Congress on Biosensors (国際会議), 2016年5月24~27日, Goteborg (スウェーデン)

堂浜光司、入部康敬、鈴木正康、SPR-SPEF同時計測のためのSPRセンサ膜の検討、2016年電気化学会北陸支部秋季大会、2016年9月15日、富山大学(富山市)

Kashem KA, Tharmizi ABA, 入部康敬、鈴木正康、酸素計測蛍光膜を用いた簡易なBODセンサチップの開発、2016年電気化学会北陸支部秋季大会、2016年9月15日、富山大学(富山市)

堂浜光司、入部康敬、鈴木正康、Al-Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>薄膜を用いたSPR-SPEF同時計測、2017年電気化学会北陸支部秋季大会、2017年11月2日、金沢大学(金沢市)

磯野幸平、小林大和、東野志保、入部康敬、鈴木正康、酵素-ポリアニリン複合体の微小化とSPRによる測定、2017年電気化学会北陸支部秋季大会、2017年11月2日、金沢大学(金沢市)

清水大輔、堀内雄斗、入部康敬、鈴木正康、蛍光酸素センサのスマートフォンによる測定、日本化学会近畿支部平成29年度北陸地区研究発表会、2017年12月1日、石川県ハイテク交流センター(能美市)

西村真彦、濱野優花、Irfirudin M、入部康敬、鈴木正康、PDMSを用いた酸素計測イメージングシートの開発、日本化学会近畿支部平成29年度北陸地区研究発表会、2017年12月1日、石川県ハイテク交流センター(能美市)

Iribe Y, Yamamoto A, Suzuki M, SPR imaging at shorter wavelengths by using cytop inserted sensor chip, 17th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2018) (国際会議), 2018年7月15~19日, Vienna (オーストリア)

Suzuki M, Shimizu D, Horiuchi Y, Iribe Y, Smartphone-based oxygen imaging sensor and application to BOD sensor, 17th International Meeting on Chemical Sensors (IMCS2018) (国際会議), 2018年7月15~19日, Vienna (オーストリア)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 正康 (SUZUKI Masayasu)

富山大学・大学院理工学研究部 (工学)・  
教授

研究者番号: 70226554