

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：12701

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13379

研究課題名(和文)半導体イメージングプレート

研究課題名(英文)Semiconductor imaging plate

研究代表者

馬場 俊彦 (Baba, Toshihiko)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号：50202271

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、蛍光標識を用いずに、様々な細胞をイメージングする半導体イメージングプレートを提案、実証した。これはGaInAsP半導体を光励起したときのフォトルミネセンスがpHや表面電荷によって変化する現象を原理としている。がん細胞、正常細胞、幹細胞などが半導体イメージングプレートに吸着する状態でPL像を赤外線カメラで観察すると、細胞の状態を反映したイメージが捉えられた。またそれらが蛍光像と対応することも確認された。これは細胞の足場材料となる細胞外マトリックスが関与していることが示唆された。がん細胞と正常細胞の識別を試みたが、明瞭な差が得られず、培養液などの最適化が必要と考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we proposed and demonstrated a semiconductor imaging plate that images various cells without using fluorescent labels. This is based on the principle that the photoluminescence (PL) from GaInAsP semiconductor changes with pH and surface charge. When cancer cells, normal cells, stem cells and so on were adsorbed on the semiconductor imaging plate and the PL image was observed with an infrared camera, an image reflecting the cells was captured. It was also confirmed that they corresponded to fluorescence images, and that the extracellular matrix as the scaffolding material of the cell strongly relates with the images. We tried to distinguish between cancer cells and normal cells, but could not observe clear difference. Some optimization of culture solution and so on may be necessary to achieve this function.

研究分野：フォトニクス

キーワード：細胞イメージング GaInAsP フォトルミネセンス ラベルフリー

1. 研究開始当初の背景

本研究では、光半導体ウエハと顕微フォトルミネセンス(PL)観測系を組み合わせ、蛍光などの標識を用いずに、細胞などの生体試料や化学物質のイメージングを可能にする全く新しい手法「半導体イメージングプレート」を提案し、その実現とバイオイメージング応用を目指した。

図1は、代表者が発見した、本研究の背景となる現象である。ここでは、光通信用に幅広く使われるInGaAsP半導体発光層がInP基板上にエピタキシャル成長され、さらに最表面には厚さ数ナノメートルの保護膜(ZrO₂)が被膜された基板を用意する。これを溶液中に浸漬して発光層を光励起し、発光強度を観測する。すると溶液のpHに依存して発光強度が数倍の範囲で変化する。同様の現象は半導体表面の帯電に対しても起こり、正負に帯電した電解質の吸着や、負に帯電したDNAハイブリダイゼーション

においても発光が増減する。初期的な発光特性の調査では、発光強度が低下するとき発光寿命の短縮が同時に起きており、表面での非発光再結合が増減していることがわかった。1960~70年代に光電気化学の分野で溶液と半導体の相互作用について研究が行われ、溶液の酸化還元電位と半導体のフェルミ準位が一致するように半導体内部にショットキー障壁が形成され、これがpHの影響を受けることが議論されている。本実験結果は、このような現象を反映したものと考えられた。

2. 研究の目的

半導体イメージングプレートは簡易な機器構成で従来にない生体分子のイメージングを実現する。類似の技術にイオン感応型電界効果トランジスタイメージ素子があるが、本研究の方が圧倒的に簡単な構成で、より高い分解能を実現する。その応用は図3に示すように多岐にわたり、バイオ科学、医療などに大きなインパクトをもたらすと期待される。

そこで本研究では、具体的に以下を研究目的とした。

- (1) 原理確認と特性改善: 半導体のショットキー障壁のフラットバンド電位の測定、センシングやイメージングへの適用を容易にするためのPL特性の線形性向上
- (2) 高感度赤外カメラの導入による蛍光標識なしでの細胞や細胞外マトリックスの2次元イメージング

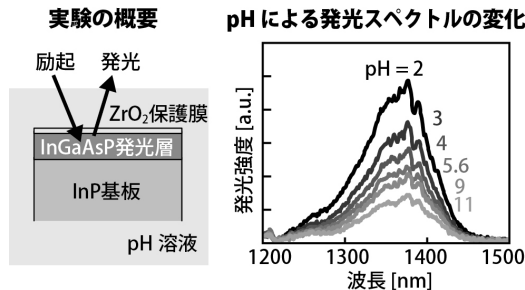


図1 本研究の背景となる実験結果。GaInAsP半導体をpH溶液に浸漬したとき、光励起に対する発光強度がpHによって変化する。

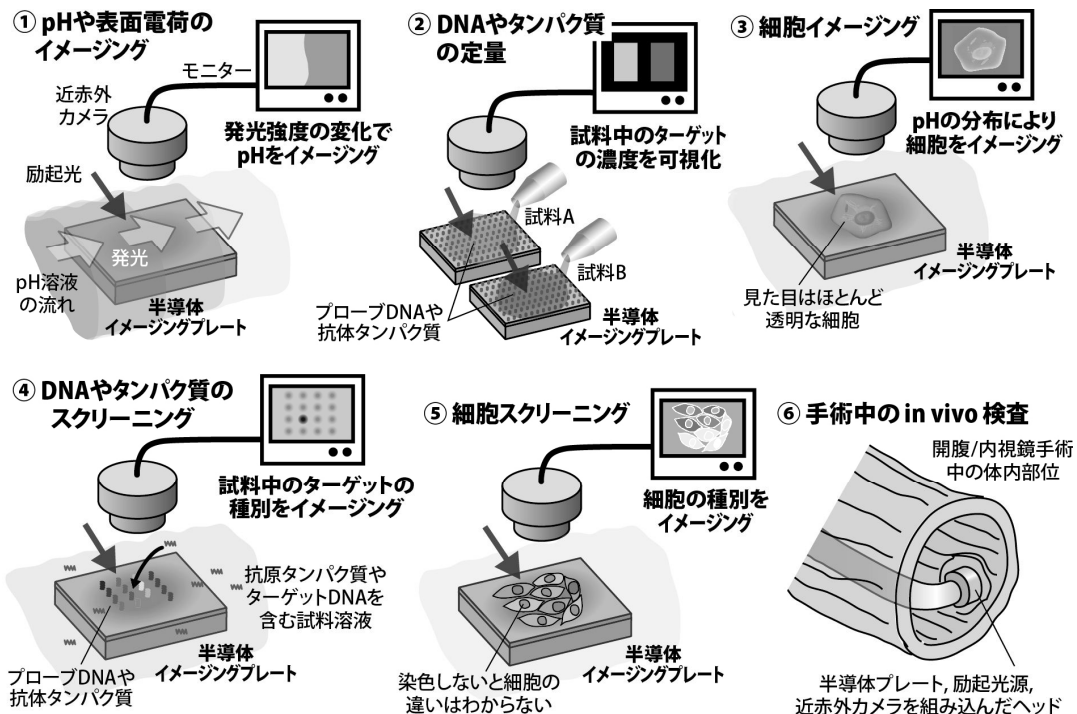


図2 本研究に期待される様々な応用。

(3) 様々な細胞のイメージング、蛍光像との対応評価、細胞の挙動の可視化、がん細胞と正常細胞の識別

3. 研究の方法

まず本研究の基盤技術となる半導体イメージングプレートにおけるPL強度のpH依存性について詳述する。この現象は、pH溶液中での酸解離平衡に伴う表面の帯電とショットキー障壁の形成、それによる表面再結合の変化をその原理とする。n型半導体に対して、pHが小さい酸側では表面が正に帯電し、表面付近のバンドは平坦に近づく。そのため、少数キャリアである正孔が表面付近に少なく、表面再結合が抑制され、PLが増大する。一方、pHが高いアルカリ側では表面が負に帯電してショットキー障壁が形成され、正孔が表面付近に集まるため、表面再結合が促進されてPLが低下する。実際、電気化学測定（モットショットキープロット）を用いて、この基板のフラットバンド電位を求めたところ、上記の考察を裏付ける変化が確認された。

さらに、様々な条件下でのPLのpH依存性を評価した。溶液に含まれる塩（KCl）濃度を変えたときの変化を調べると、図3に示すように、低塩濃度では酸側でのみ、高塩濃度ではより広い範囲でpH依存性が現れた。pH=11では塩濃度100 mMと1 mMでのPL積分強度差はないが、pH=2のときの100 mMのPL強度が1 mMの約2.2倍となった。これはイオン濃度によってデバイ長が変化し、高塩濃度ではデバイ長が短くなるため、界面付近のH⁺濃度が実効的に増大してpHが高い方にPL特性がシフトしたためと思われる。

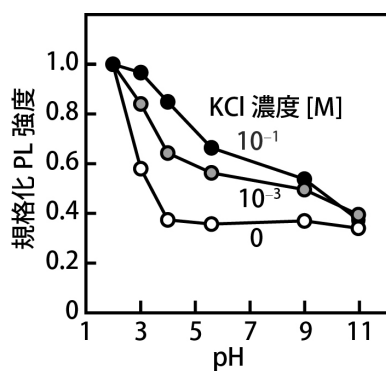


図3 溶液の塩濃度を変えたときのPL強度のpH応答の変化。塩を適度に濃くすることで、応答の線形性が向上する。

4. 研究成果

(1) 細胞のイメージング

細胞の種類によってPL強度の違いがあるかを検証するため異なる種類の細胞を基板に培養し、PL発光近視野像を-80℃冷却InGaAs近赤外カメラ(Princeton Instruments,

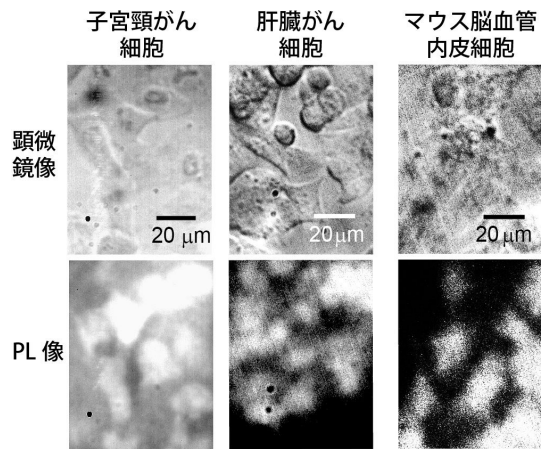


図4 がん細胞と正常細胞を半導体イメージングプレート上に培養したときの顕微鏡像とPL像の比較。

NIRvana 640)により観察した。子宮頸がん細胞や肝臓がん細胞、脳血管内皮細胞や線維芽細胞といった正常細胞、さらには間葉系幹細胞について、細胞に対応する部分のPL強度が1.5~2倍増大し、半導体イメージングプレートが細胞のイメージングに利用できることがわかった。上記の細胞の中では特にがん細胞に対してPL強度が増大する傾向が見られた。一般に正常細胞のpHは周囲の培養液のpH=7.4とほぼ同じであるが、がん細胞では細胞分泌物の影響により局所的にpHが低下しているか、イオン濃度が上昇している可能性がある。一方で同一種類の細胞でもPL強度が増大していないか、むしろ低下している部分も散見され、これは細胞と基板の接着状態、細胞の状態に関連していると考えられる。また、間葉系幹細胞が骨芽細胞に分化したときのPLを観察したところ、分化前に比べて強度が約半分に低下した。分化した細胞はアルカリホスファターゼ酵素を分泌するため、pHの上昇がPL強度に反映したものと考えられる。これにより、蛍光標識なしで、幹細胞の分化がPL強度から観察できる可能性が示された。

(2) 細胞外マトリックスのイメージング

前述のイメージング結果から、半導体イメージングプレートが示すPLイメージは細胞の外見、すなわち細胞質と必ずしも1対1対応するわけではないことが示唆された。そもそも半導体イメージングプレートは直接接している媒質と電氣的に相互作用し、PLを変化させると考えられる。したがって、細胞が分泌し、足場材料ともなる細胞外マトリックス(ECM)がPLに大きな影響を及ぼしていることが考えられた。そこでECMを構成する成分であるフェブロネクチン、コラーゲンI、ヒアルロン酸、ラミニン、マトリゲルをプレートの一部に塗布し、そのときのPL像を観測した。その結果、図5のよ

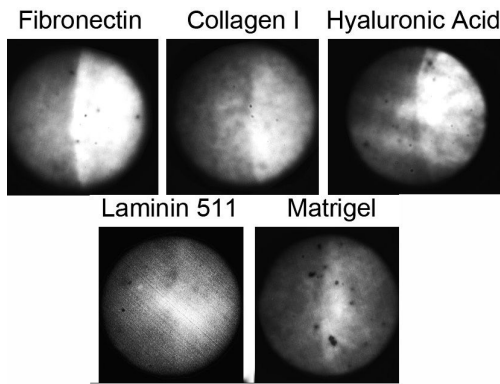


図5 半導体イメージングプレート上に滴下したECM成分のPL像．各イメージの右側にECMがある．

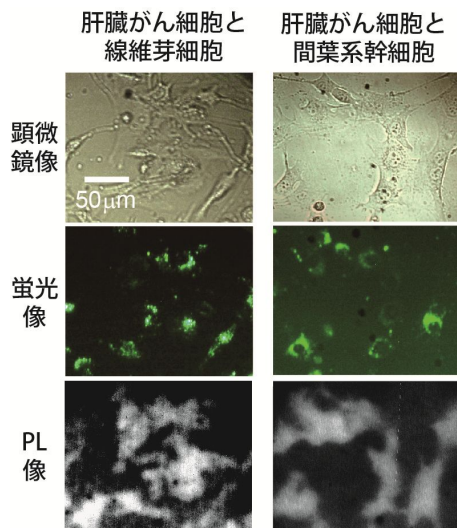


図6 混合播種した2種類の細胞に対する3種類の像．蛍光剤はがん細胞のみに導入されている．

うに，全てのECMで塗布した箇所のPLが増大し，塗布していない箇所との境界が明確に表れた．フィブロネクチンやラミニンは等電点pIが6程度である．この観測はリン酸緩衝液 (pH 7.4) 中で行ったので，表面は負に帯電していたはずであり，3の原理を考慮すれば，PL強度が低下するはずであるが，上記の結果とこれと反する．ECMが負に帯電するとしても，これが半導体表面に対してカウンターイオンとして作用するような機構があることも考えられる．

(3) 蛍光像との対応，がん細胞の識別

現在の細胞イメージングには蛍光分子が用いられるのが一般的であり，これとの対応を確認することは，現行技術との一致/不一致を知る重要な調査となる．細胞膜を蛍光染色した肝臓がん細胞と緑色蛍光タンパク質を導入したマウス脳血管内皮細胞をそれぞれ培養し，波長442 nmで光励起したときの蛍光イメージと，半導体イメージングプレートのPLイメージを比較した．肝臓

がん細胞では，一部のPLが最大で1.6倍程度増大し，細胞膜の蛍光とPL増大部分がよく一致した．また，細胞の微細な挙動に対応したPLイメージの変化が観測された．マウス脳血管内皮細胞では，一部の細胞の蛍光像とPL増大部分が一致したが，がん細胞ほど顕著な一致ではなく，一致しない部分も見られた．

蛍光染色した肝臓がん細胞と無標識の線維芽細胞を混合して播種したプレートでは，図6のように，蛍光像と対応する部分のPLが増大したが，対応しない部分，すなわち線維芽細胞が吸着した部分でもPLが増大した．全体として両者のPLに明確な差異は見られず，この場合，がん細胞と正常細胞は識別できなかった．適切な培養液を選択し，両者のPLの強度差を与えるしきい値特性が設定できれば，両者の識別が可能になると期待される．

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

M. Sakemoto, Y. Kishi, K. Watanabe, H. Abe, S. Ota, Y. Takemura and T. Baba, "Cell imaging using GaInAsP semiconductor photoluminescence", *Optics Express*, 査読有, vol. 24, no. 10, 2016, pp. 11232-11238, DOI: 10.1364/OE.24.011232

馬場俊彦, 羽中田庄司, 渡邊敬介, 渡部工, 阿部紘土, 高橋大地, 岸洋次, 酒本真衣, "GaInAsP 半導体ナノレーザのバイオセンシング応用", *電子情報通信学会論文誌*, 査読有, vol. J100-C, no. 2, pp. 61-71

〔学会発表〕(計5件)

酒本真衣, 大多哲史, 竹村泰司, 馬場俊彦, "GaInAsP 半導体イメージングプレートによる細胞イメージング特性評価", 応用物理学会秋季講演会, 2015年9月15日, 「名古屋国際会議場」(名古屋市)

酒本真衣, 景山達斗, 福田淳二, 馬場俊彦, "GaInAsP 半導体イメージングプレートによる様々な細胞イメージング", 応用物理学会春季講演会, 2016年3月20日, 「東京工業大学」(東京都)

M. Sakemoto, Y. Kishi, K. Watanabe, S. Ota, Y. Takemura, T. Baba, "Label-free living-cell imaging using photoluminescence from GaInAsP semiconductor plate", *Biosensors*, 2016年5月27日, 「Gothenburg」(Sweden)

酒本真衣, 景山達斗, 福田淳二, 馬場俊彦, "GaInAsP 半導体イメージングプレートによる細胞イメージング-ラベルによる蛍光像との対応と細胞外マトリックスに対する反応", 2016年9月14

日,「朱鷺メッセ」(新潟市)
酒本真衣,阿部紘土,景山達斗,福田淳
二,馬場俊彦,“GaInAsP 半導体イメー
ジングプレートによる混合細胞イメー
ジング”,応用物理学会春季講演会,
2017年3月16日,「パシフィコ横浜」
(横浜市)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.baba-lab.ynu.ac.jp/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

馬場 俊彦 (BABA, Toshihiko)

横浜国立大学・大学院工学研究院・教授

研究者番号: 50202271

(2)研究分担者

(3)連携研究者

(4)研究協力者