

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K04916

研究課題名(和文) 集束表面プラズモンを利用した顕微複屈折測定法の開発と細胞異常診断への応用

研究課題名(英文) Measurement of microscopic birefringence by using focused surface plasmon and its application to cell diagnosis

研究代表者

加野 裕 (Kano, Hiroshi)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80322874

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)：表面プラズモンを用いてナノ領域の複屈折をワンショットで測定する手法について開発を行い、光異性化材料における複屈折の生成や消失を測定することができた。さらに、測定基板上での生体細胞培養において、銀表面をポリマー薄膜で保護する手法を開発し、膜厚15-20 nmのPMMA薄膜の成膜に成功した。PMMA薄膜により金属層は保護され、細胞を培養することには成功したが、基板と細胞間に混入した不純物によって集束表面プラズモンの空間周波数応答スペクトルの尖鋭さが失われたため、細胞培養条件の精査などが課題として残った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、極めて微小な領域に生じる複屈折を極めて高い感度で測定する手法を開発することに成功した。不
屈折は、光が媒質中を伝搬するとき、電場の振動方向によって感受する屈折率が異なる現象であり、たとえば、
細胞異常は細胞に複屈折を発生させたり、消失させたりする。開発した手法は、細胞のサイズに比べ小さな領域
の複屈折を高感度に測定する点で画期的であり、その実現には、金属表面の自由電子を光の電磁場がナノ領域で
共鳴する集束表面プラズモンを利用した。

研究成果の概要(英文)：A method for measuring birefringence in nano-region using a focused surface plasmon was developed. Birefringence induced by photo-isomerization was measured successfully. A method for protecting a silver surface with polymer ultra-thin film was also developed. In this method, the silver surface was modified by atmospheric low-temperature plasma treatment to have hydrophobic surface to enable the use of the spin coating technique. With the protective layer, cell cultivation was conducted successfully, while contaminations between the substrate surface and the cell degraded the spatial frequency response that is essential for birefringence analysis.

研究分野：光計測

キーワード：表面プラズモン 複屈折 銀表面の親水化 大気圧低温プラズマ処理 光異性化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

金属表面に光励起される表面プラズモンの伝搬定数は、金属表面の屈折率に強く依存するため、これを測定プローブに用いると極めて高感度な屈折率測定を行うことができる。広く行われている屈折率測定では、ガラスプリズム、膜厚 50nm 程度の金属薄膜、試料の 3 層で構成される光学配置に対し、プリズム側からレーザー光を入射させ、反射光強度を測定する光学系が広く用いられる。この光学系では、表面プラズモン励起に起因する光吸収が生じる入射角を測定し、表面プラズモンの伝搬定数を求める。この伝搬定数から求められる屈折率の測定感度は、金属表面で生じる分子間相互作用による屈折率変化を捉えられるほど高く、生体分子間相互作用の主要な検出方法の一つとして認知されている。

一般的な手法に対し、研究代表者は金属表面の極微小領域に表面プラズモンを局所励起する原理を考案した。この手法では、図 1 に示すように、可干渉な表面プラズモンを金属表面の 1 点に向かって集束させ、干渉によって表面プラズモンを局在させる。(以下、これを集束表面プラズモンと呼ぶ。) 屈折率測定においては、集束領域が測定領域となる。

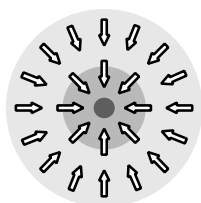


図 1 表面プラズモンの集束

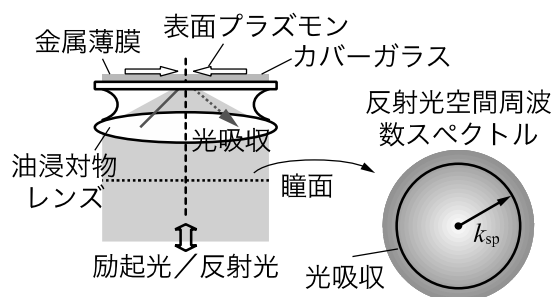


図 2 集束表面プラズモンの励起

集束表面プラズモンは、図 2 に示すように、高開口数油浸対物レンズを用い、金属薄膜を成膜したカバーガラスに励起光を集光することにより、励起できる。また、この励起原理を用いると、金属薄膜からの反射光の空間周波数スペクトル(対物レンズの射出瞳における光強度分布)に現れる光吸収パターン(図 2)から、励起された表面プラズモンの伝搬定数 (k_{sp}) を求めることができる。これにより、表面プラズモンの回折限界に相当する空間分解能で金属表面の屈折率分布を測定することができる。

たとえば、NA1.65 の対物レンズを用いて波長 632.8 nm の光を、水に接する金薄膜に集光すると、集束表面プラズモンの生成する電場は半径 180nm、金属表面から 180nm の領域に局在する。表面プラズモンが生成する電場はエバネッセント場であるため、金属表面の近接場に局在し、金属表面での電場の広がりや金属表面の媒質中に形成される光の回折限界スポットよりも小さい。

これまで、この手法によって実現される高い空間分解能を活かして、生体模倣膜(脂質二分子膜)の膜構造や細胞と基板の間隙に形成される接着斑の計測などを実現したが、試料は等方的であると見なせる試料を測定の対象としていた。本研究では、光学的異方性を有する試料も対象にするべく、複屈折を示す試料の計測についての知見を深め、その応用を企図した。

2. 研究の目的

本研究では、集束表面プラズモンを測定プローブとして局所的な複屈折を高感度に測定する手法の確立を研究目的とした。複屈折を測定する手法は一般に透過光に生じる位相変化の偏光依存を調べる手法が広く利用されている。この原理に基づく測定手法では、十分な位相変化を得るのに、比較的長い光路長が必要となるため、ナノ領域の複屈折測定には測定感度の問題が付随する。本研究で開発する手法により、局所領域の微小な複屈折の測定が実現すると、試料における形態的な制限が緩和されるメリットをもたらす。

さらに、開発する手法の応用として、細胞内に形成される複屈折を測定することを研究目的とした。本研究の測定法は、高い空間分解能を有するため、細胞のどの部位がどの程度の複屈折を示しているのかを表す像の取得が実現できれば、個別の細胞の状態を評価することに貢献できる。そこで、正常細胞に比べ、癌化した細胞は強い複屈折を示すことが知られているため、その診断を行うことが可能か、検討を行うこととした。細胞の癌化では、ステージ I で 10^{-3} オーダーの変化が生じるとされるが、細胞の全体が均一な複屈折を示すわけではなく、相対的に核は大きな変化を示すと考えられている。そのため、ステージ I への変化をより早期に診断できる可能性がある。

以上の研究目的に照らし、本研究では、200 nm 以下の空間分解能と、常光線と異常光線の間で 10^{-3} オーダーの屈折率差があることを検出可能な測定感度の実現を開発の目標とした。

3. 研究の方法

本研究では、はじめに集束表面プラズモンを用いて複屈折測定を行う装置の試作を行った。図3に示す試作装置では、ラジアル偏光させた平行光を、高開口数の油浸対物レンズでクレッチマン配置(高屈折率ガラス/銀/シリカ/試料)基板に集光し、反射光を、対物レンズの射出瞳と光学的に共役な位置に配置したイメージセンサーで強度測定する光学系を構築した。これにより、基板からの反射光の空間周波数スペクトルを取得し、画像解析によって、表面プラズモンの伝搬方向ごとの伝搬定数を測定することができる。伝搬定数の決定においては、楕円状の光吸収パターンの長軸、短軸の方位、長軸方向の伝搬定数、楕円率を決定する非線形収束法(シンプレックス法)に基づく画像処理プログラムを作成した。測定システムの動作検証のため、試料として、一方向に張力を加えたパラフィン膜を用い、光学軸の方位や常光線、異常光線に対する屈折率を求めた。その結果から、測定システムが適切に構築できたと判断した。

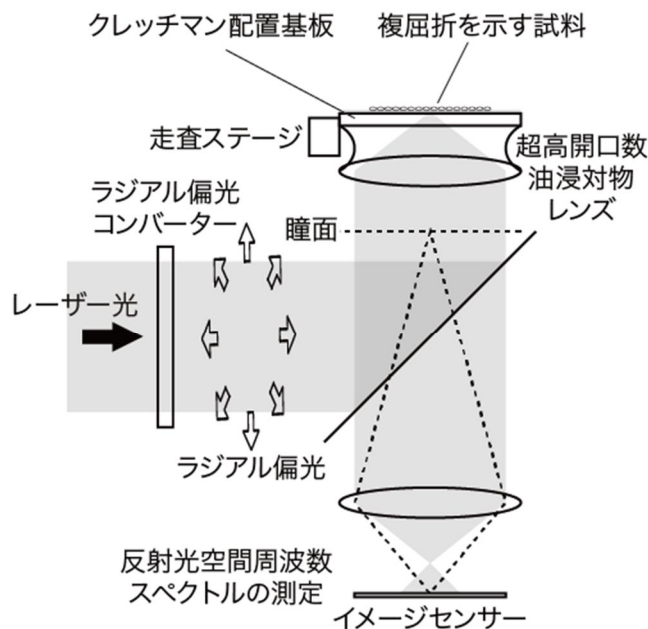


図3 光学系

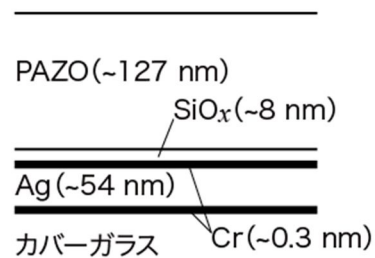


図4 基板構造と試料

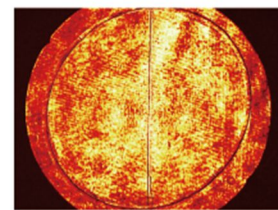


図5 反射光空間周波数スペクトル

続いて、この試作装置が高い測定感度を有することを示すため、膜厚 100nm 程度の薄膜における複屈折分布の測定を行った。この実験では、図4に示すように、基板表面に光異性化によって複屈折を示す材料 (PAZO: poly[1-[4-(3-carboxy-4-hydroxyphenylazo)benzenesulfonamide]-1,2-ethanediyl sodium salt]) をスピコートし、波長 473 nm の光照射によって、PAZO が異性化し、これによる複屈折の発現により、図5のように、空間周波数スペクトルに現れる光吸収パターンが楕円化することを確認した、また、光吸収パターン楕円率から、光異性化に伴う複屈折により光学軸とこれを直交する方位では屈折率が 0.01 程度異なることを確認した。

さらに、空間周波数スペクトルを記録するイメージセンサーの画素数を増大させ、より精密に複屈折を測定できるよう、装置の改良を行った。この改良においては、イメージセンサーの信号伝送をアナログからデジタル方式に変更したため、システムの制御ソフトウェアに大幅な変更を行った。この改良により、データ取得速度の向上も実現した。

試作装置の動作確認を終えた後、集束表面プラズモンを測定プローブに用いた生体細胞の複屈折分布の可視化に向け、集束表面プラズモンを励起することができる基板上での生体細胞の培養を試みた。集束表面プラズモンを可視域で励起するとき、銀を用いると、金などを用いる場合と比べ、伝搬定数のピークが先鋭化させることができるが、銀は化学的に安定でないため、これまで、シリカのスパッタ薄膜で表面保護を行っていた。この基板を用いて細胞培養を試みたところ、シリカスパッタ膜の崩壊が確認された。そこで、表面プラズモンセンシング基板の表面の保護にポリマー薄膜を用いる検討を行った。表面プラズモンセンシングでは、表面プラズモンが形成する電場はエバネッセント波となって局在し、金属表面から離れると指数関数的に減衰するため、保護膜の膜厚は測定感度に大きな影響を与える。これを考慮して、ポリマー薄膜の膜厚の目標値を 10~20nm に定め、材料と成膜法の選定を行い、ポリメチルメタクリレート (PMMA) をトルエンに溶解させ、スピコーティング法で成膜することとした。その試行段階では、目標とする膜厚での成膜においては、膜厚が不均一になることが確認された。この成膜過程において

は、銀表面に滴下した PMMA トルエン溶液の濡れ性が低いことが視認できたため、銀表面の親水化が必要であると判断した。いくつかの手法を検討した結果、銀表面に大気圧低温プラズマを照射する手法を試行することとなった。プラズマバレットの形状、ガスの種類、基板とプラズマバレットの距離、照射時間、ガスへの水の添加などの条件を変化させて、銀表面に滴下した水滴の接触角を測定した。その結果、図6に示すように、アルゴンガスを用いて発生させたプラズマを 30mm の距離から 180 秒照射すると、図7に示すように、銀に滴下した超純水の接触角が 94° から 54° まで減少することを確認できた。また、プラズマ照射の前後で表面プラズモンの空間周波数応答を測定したところ、図8のように、光吸収ディップにわずかな変化は生じるものの、半値全幅も含め大きな変化は生じないことを確認できた。

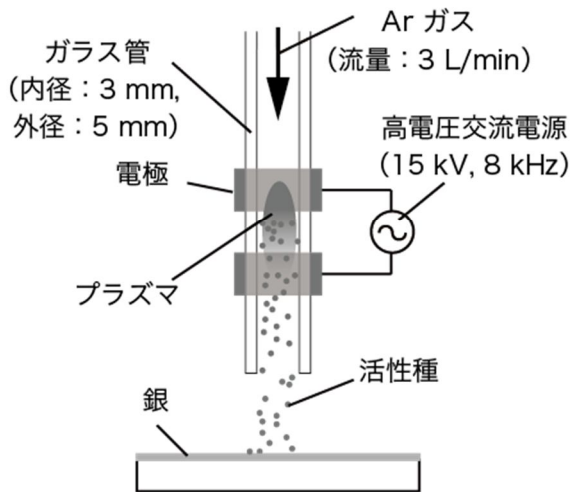


図6 プラズマ処理による銀表面の親水化

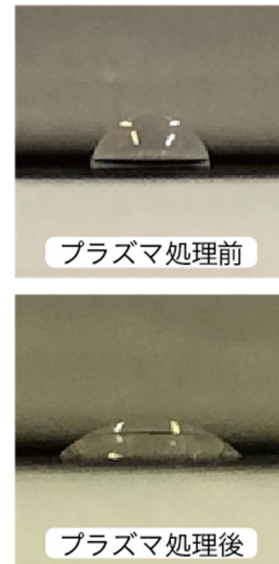


図7 親水化による接触角の減少

続いて、PMMA の成膜を行い、集束表面プラズモン顕微鏡で評価した。測定領域を 15 μm 平方とし、64 \times 64 点で、反射光空間周波数スペクトルを取得し、それぞれのスペクトル画像を解析してプラズモンの伝搬定数を求めた。図9は、4枚の基板につき、およそ1mm 間隔で3領域を測定した結果であり、各領域内 (b_1 から e_3) の伝搬定数の標準偏差が 10^{-4} オーダーであることから、各領域において集束表面プラズモンの伝搬定数のばらつきは十分に小さいこと、また、領域間の伝搬定数の平均値の差が 0.001 であったことから、基板が十分に均一であることを確認できた。なお、伝搬定数を PMMA の膜厚に換算するとおよそ 17 nm であった。以上より、目標とする膜厚で、均一性の高い薄膜の成膜に成功し、再現性も確認できた。

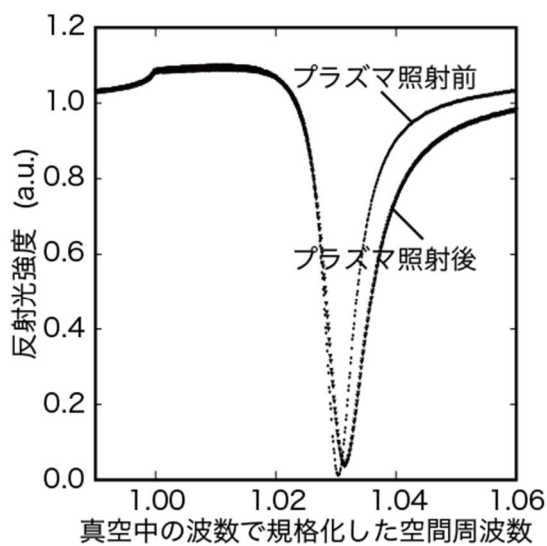


図8 表面プラズモン空間周波数応答

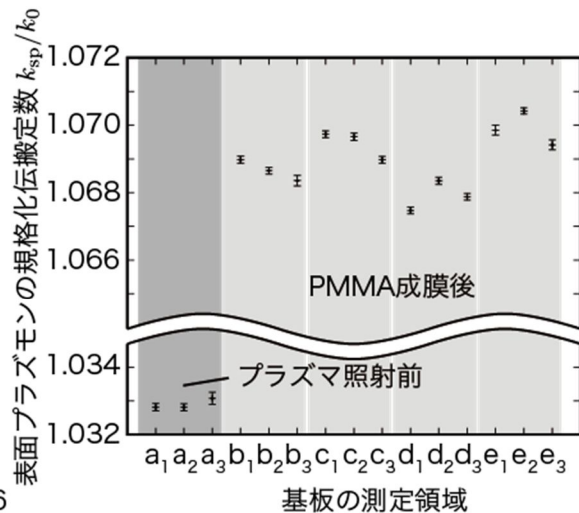


図9 表面プラズモンの伝搬定数分布

次に、PMMA で保護した銀を用いる表面プラズモンセンシング基板に、ラットの神経細胞

(後根神経節)を培養し、その基板の顕微領域からの反射光空間周波数スペクトル測定を行った。その結果、基板の銀を劣化させずに培養は行えたものの、基板表面で生じる多重散乱によって周波数スペクトルの光吸収パターンが尖鋭さが失われ、周波数スペクトルの背景雑音が増大したため、集束表面プラズモンの伝搬定数を決定することができなかった。ポリマー保護膜と培養細胞の間に析出物が混入したことが、周波数応答の尖鋭さを低下させ、背景雑音を増大させた原因と考えられる。

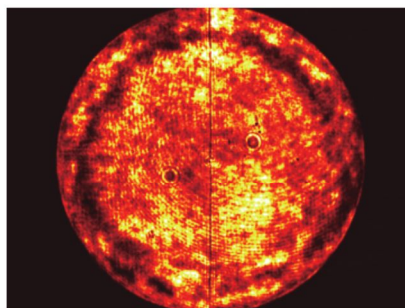


図10 培養細胞直下に励起した集束表面プラズモンの空間周波数応答

その他、複屈折を示す媒質と相互作用した集束表面プラズモンが示す空間周波数応答から、複屈折媒質の光学軸方位、常光線、異常光線に対する屈折率を求めるプログラムについても追加の改良を行った。空間周波数スペクトル画像において、楕円化した周波数スペクトルパターンの中心、長軸の長さ、楕円率、長軸の方位の5種のパラメータ推定をシンプレックス法によって行うが、シンプレックス法の収束過程において、より高い評価値を与えるパラメータセットを探索する不能になる問題の解消を行った。具体的には、候補となるパラメータセットの選択肢を増大させるとともに、その序列を調整した。これにより、複屈折を生じさせる光学軸の方位推定の精度が向上した。

4. 研究成果

ナノ領域の複屈折をワンショットで測定する手法について開発を行い、光異性化材料における複屈折の生成と消失を測定することによって、これを検証することができた。さらに細胞の複屈折を測定するために、基板表面に細胞培養を試みたが、銀の保護層となっているシリカ層が崩壊したため、表面プラズモンセンシングを行う銀表面を膜厚 15~20 nm でポリマーコーティングする手法を開発した。この過程では、銀表面でポリマーのスピンコーティングが実行できるように、銀表面を親水化する必要があり、大気圧低温プラズマ照射がこれに有効であることを明らかにした。PMMA 保護層を有する基板を用いて細胞培養を行ったところ、金属層は保護され、細胞が培養できることを確認できたものの、集束表面プラズモンの空間周波数応答スペクトルの尖鋭さが失われたため、細胞培養条件の精査などが課題として残った。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akinari Abe, Ipsita Chakraborty, Daiki Matsubayashi, Tsuyoshi Noguchi, Akitoshi Okino and Hiroshi Kano	4. 巻 63
2. 論文標題 Deposition of a polymer thin film on a silver surface for surface plasmon sensing	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ad523f	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Chakraborty Ipsita, Kano Hiroshi	4. 巻 147
2. 論文標題 Microscopic-characterization of photo-induced birefringence of azo-polymer thin film by focused surface plasmon	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Optics & Laser Technology	6. 最初と最後の頁 107673 - 107673
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.optlastec.2021.107673	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 D. Matsubayashi, H. Kano
2. 発表標題 Experimental Imaging Property of a Scanning Confocal Surface Plasmon Microscope
3. 学会等名 Focus on Microscopy (FOM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 I. Chakraborty, H. Kano
2. 発表標題 Label free super-resolved surface plasmon microscopy on thin metal film
3. 学会等名 Focus on Microscopy (FOM2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty, Daiki Matsubayashi, Tomoki Omachi, Yasushi Hasegawa and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Optimization of substrate to culture and image live cells for surface plasmon microscopy
3. 学会等名 SPIE Optics and Photonics 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Akinari Abe, Noguchi Tsuyoshi, Yuma Suenaga, Kenichi Yamazaki, Akitoshi Okino and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Polymer thin film coating with a thickness in 10-20 nm range on a silver surface of surface plasmon bio-sensor
3. 学会等名 The 7th International Symposium on Biomedical Engineering (ISBE2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Dynamic range of refractive index measurement by focused surface plasmon
3. 学会等名 JSAP-QSA Joint Symposia 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Single shot birefringence analysis of natural fibers
3. 学会等名 Frontiers in Optics + Laser Science 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------