

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24550094

研究課題名(和文)短波長光を活用した次世代SPRイメージング技術の創製と単一細胞解析への応用

研究課題名(英文)Development of Novel SPR Imaging Technology Using Shorter Wavelength Light and Its Application to Single Cell Analysis

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) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：より高解像度で鮮明なSPR(表面プラズモン共鳴)画像を得られるように、誘電率の虚数成分が小さく短波長光でも使用できるSPRセンサチップを設計・作製した。銀合金薄膜、銀と酸化インジウムスズ(ITO)の積層膜の採用や接着層としてITOを用いることで500nm以下の光源でも2次元SPRイメージングセンシングを実現できた。また幅広い波長の光源が利用できるようになったことで光源波長とSPR特性の関係を明らかにすることが出来た。

研究成果の概要(英文)：Novel surface plasmon resonance (SPR) sensor chip, which can be used with shorter wavelength light source, was developed in order to obtain a clear and high resolution SPR image. By utilizing a silver, an indium tin oxide (ITO) and the silver alloy for the sensor film preparation, SPR imaging could be realized by using light source shorter than 500nm. Relationship between SPR sensor characteristics and wavelength of light source was investigated since wider wavelength light sources could be used by the development of this new sensor chip.

研究分野：生物計測工学

キーワード：バイオセンサ 免疫センサ 表面プラズモン共鳴 計測工学 生物・生体工学

1. 研究開始当初の背景

表面プラズモン共鳴 (SPR) センサは、有力なアフィニティセンサとして実用化され、最近ではこれを2次元化した2次元SPRイメージングセンサも開発され、プロテインチップの2次元配列された各スポットのSPR変化の同時測定や、細胞イメージング等様々な応用が期待されている。一方、2次元SPRイメージングセンサ研究は以下の2点が発展の大きな障害となっている。

- 1) 高い解像度で“鮮明な”SPR画像を得るという視点での研究が全く行われていない。
- 2) SPRシグナル変化が極めて微小な場合が多く画像に基づくセンシングが困難である。

研究代表者は高解像度で鮮明なSPR画像を得るには600nm以下の比較的短い波長の光源を用いた方がよいことを見いだした。ところで金属の誘電率は複素誘電率として表され、光の吸収に関係する虚数成分の割合が大きくなるとSPR吸収曲線が広がり測定感度が低下する。SPR免疫センサに一般に使われる金薄膜は700nm以下の光源では急激にこれが増大し感度が低下する。そこで短波長の光源を用いるには、複素誘電率の虚数成分が小さいもしくはその波長依存性が小さい金属を用いたSPRセンサチップが必須である。優れたSPR特性を有する銀は500nm付近まで使用可能だが塩を含む水溶液中では容易に溶解し、応用分野が限定される。またガラス基板との接着性が弱い金や銀の剥離を防ぐため接着層として用いられるクロムやチタンも虚数成分が大きい。したがって高解像度で鮮明なSPR画像が得られる短波長光でもSPR測定が可能なセンサ基盤を実現するには、銀薄膜の安定化と、誘電率の虚数成分が小さい接着層の採用が不可欠である。一方、SPR画像からSPR変化に関する情報をより高感度に得る手法として、研究代表者は細胞内カルシウムイオン濃度の測定に使われるFura-2などで使われる2波長励起により得られた蛍

光シグナルの比を利用する方法に着目した。本研究が実現できれば390~840nmの広範な波長光が利用できるようになることから例えばSPR特性の異なる500nm付近と800nm付近でそれぞれ得られたSPR画像の差もしくは比を画像演算し得られた合成画像を元にセンシングを行う方法を考案した。

2. 研究の目的

本研究は、まず誘電率の虚数成分が小さく短波長光で使用できるSPRセンサチップを設計・作製し、390~840nmと広範囲の光源が利用できる2次元SPRイメージングセンサを実現する。そしてこれを用いて、短波長光の利用により高解像度でより鮮明なSPR画像を得られるようにシングルセルイメージングを実現する。さらに、SPR特性の異なる2種類の異なる波長(例えば500nm付近と800nm付近)の入射光で得た2つのSPR画像の差分もしくは比をとった合成SPR画像を用いて高感度SPRイメージングセンサ技術を創製する。これらにより現状では発展途上の2次元SPRイメージング法を確立する。

3. 研究の方法

(1) 酸化インジウムスズを接着層として用いたSPRセンサチップの特性評価

SPRセンサチップの接着層には従来のICプロセスと同様、クロムやチタンが使われている。しかし、クロムやチタンは光の吸収に関わる誘電率の虚数成分が大きく接着層として適切ではない。本研究では虚数成分がクロムやチタンと比べて著しく小さい酸化インジウムスズ(ITO)に着目し、接着層としてITOを用いて、金薄膜や銀薄膜を形成し、作製したSPRセンサチップの特性を評価する。

(2) 銀合金薄膜を金属薄膜に用いたSPRセンサチップの特性評価

銀薄膜はSPRセンサ基板として優れた特性を示すが塩を含む水溶液中では極めて不安

定であることから溶液中のSPRセンサでは使用が困難であった。最近、ハロゲンに対して安定性の高い銀合金薄膜が開発された。ここでは銀にモル比で1%のビスマスを含む銀合金について、生理食塩水での安定性やSPR特性について評価を行う。

(3) 銀薄膜層を含む多重積層薄膜を用いたSPRセンサチップの特性評価

研究代表者はシミュレーションにより銀と金の間にITO層を形成したSPRセンサチップは銀とほぼ同様の鋭いSPR曲線が得られる事を見いだした。本研究ではガラス基板上に、ITO(接着層)、銀、ITO(中間層)、金を順に積層したSPRセンサチップを形成し、評価する。

(4) 光源波長の差異が2次元SPRイメージに与える影響についての検討

390~840nmの広い範囲で光源の波長を変えてSPR画像を取得し、その特徴を明らかにする。

(5) 2波長合成画像法による高感度2次元SPRイメージング

微小なSPRシグナル(反射光強度)変化の増大を図るためにSPR特性が異なる2種類の波長で得られた2つのSPR画像の差や比を画像演算で算出して新たな合成画像を作成しこれを元に測定の高感度化を図る。

4. 研究成果

(1) 酸化インジウムスズを接着層として用いたSPRセンサチップの特性評価

600nm以下の短波長光源でのSPRイメージングを実現するために、まず誘電率の虚数成分が小さく短波長光で使用できるSPRセンサチップを設計・作製した。

まず基板の接着層について、虚数成分がクロムやチタンと比べて著しく小さい酸化インジウムスズ(ITO)に着目した。ITOを接着層として用いた金薄膜の接着性を評価

したところ、クロムやチタンに比べ高い接着性が見られ、またヨウ素溶液による金薄膜除去後も高い残存性が得られた。またITOを接着層とした金薄膜、銀薄膜を用いたSPR測定の感度を比較したところ、チタンを用いた場合と同等の感度が得られた(図1)。

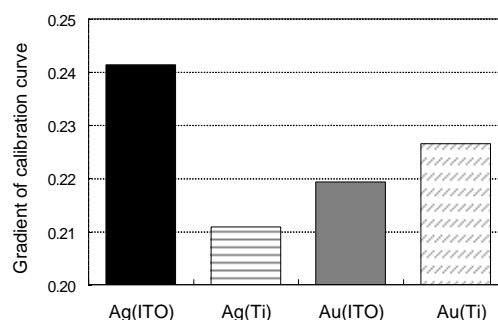


図1 接着層の相違による測定感度の比較

(2) 銀合金薄膜を金属薄膜に用いたSPRセンサチップの特性評価

一方、誘電率の虚数成分が小さく短波長光でのSPR測定に適した銀薄膜は緩衝液中では不安定で使用できない。銀の特性を維持しながら安定性を得るために銀-ビスマス合金のSPRセンサ膜としての特性を調べた。蒸留水中でのSPR曲線を測定したところシャープな吸収が見られた。また8.5ミクロン径のマイクロウェルアレイ中でグルコース水溶液を用いて感度を測定したところ、金、銀と同等もしくはそれ以上の感度が得られた。8.5ミクロン径のマイクロウェルアレイでは金薄膜ではSPR画像が不鮮明になるが銀-ビスマス合金薄膜では銀薄膜と同様にいずれのウェルも鮮明に見えた(図2)。銀-ビスマス合金薄膜は生理食塩水中に2時間浸漬してもSPRシグナルの変化は見られなかった。また金や銀と同様にチオール分子を用いることで銀-ビスマス合金薄膜上に抗体などのタンパク質を固定化することも可能であることがわかった。

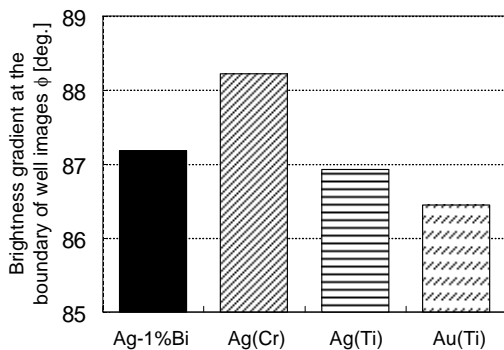


図2 銀合金SPRセンサ膜の画像の鮮明さの評価

(3) 銀薄膜層を含む多重積層薄膜を用いたSPRセンサチップの特性評価

SPR曲線のシミュレーションソフトウェアである“Winnspace”を用いて検討したところ、ITOを接着層として形成した銀薄膜の上に直接金薄膜を形成した場合は金薄膜とほぼ同様のSPR曲線となるが、銀と金の間にITO層を形成した場合は銀とほぼ同様の鋭いSPR曲線が得られる事を見いだした。そこでガラス基板上に、ITO（接着層）、銀、ITO（中間層）、金を順に積層したSPRセンサチップを作製しSPR特性を評価した。実試料測定の結果とシミュレーション結果に差異が見られたが、物性定数をデータベースの値からエリプソメータによる実測値に替えてシミュレーションしなおしたところ適合性が向上した。膜の熱処理の影響なども検討した。

(4) 光源波長の差異が2次元SPRイメージに与える影響についての検討

光源波長の差異が2次元SPR画像に与える影響について検討した。SPRセンサ膜の金属の種類によって、光源波長依存性がどのように異なるかを505～940nmの6種の高輝度LED光源で詳細に調べた。金、銀、アルミニウムで比較したところ、金は505nmではSPR測定が出来ず、長波長ではアルミ

ニウムが最も高い感度を示した。一方、解像度（SPR画像の鮮明さ）は波長660nmの光源で最大となり高い方から銀、アルミニウム、金の順であった。浸透深さについては短波長の光源ではアルミニウムの浸透深さが他の金属薄膜より長かった。しかし長波長では逆に金、銀の方が長くなった。

(5) 2波長合成画像法による高感度2次元SPRイメージング

得られた2次元SPR画像の光源波長依存性の成果をもとに、SPR特性が異なる2種類の波長で得られた2つのSPR画像の差や比を画像演算で算出して新たな合成画像を作成し、それをもとに測定を行う2波長合成画像法について検討した。その結果、以下の問題点が明らかとなった。光源波長が異なると共鳴吸収が最大となるSPR角も変化する。そのためSPR画像取得時の、センサ基板と冷却CCDカメラとのなす角も異なることとなる。そのため得られるSPR画像の歪み具合が大きく異なる結果となった。したがって異なる光源波長のSPR画像の画像演算を行うには両画像の歪みの程度を補正して画像をあわせる必要があることがわかった。また画像の明るさや鮮明さも光源波長により大きく異なることから、それについても補正が必要である事が明らかとなった。今後、2波長合成画像法の実現に向けて、より高精度な画像補正技術の開発を遂行していく。

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, Murata A, Iribe Y, Detection and collection system of target single cell based on respiration activity, Journal of Micro-Nano Mechatronics, 査読有, Vol.7, 2012, pp.79-86

DOI 10.1007/s12213-012-0046-0

鈴木正康、高解像度2次元SPR免疫・細

胞イメージング、Electrochemistry、査読有、
Vol.82、2014、pp.282-287
<http://dx.doi.org/10.5796/electrochemistry.82.282>

〔学会発表〕(計14件)

Suzuki M, Kawauchi Y, Iribe Y,
Microarrayed 2D-SPR immunosensor for
interleukin-2, The 14th International
Meeting on Chemical Sensors, 2012年5月
20~23日, Nuremberg (ドイツ)

鈴木正康、PDMS 微小構造体を活用した化学・バイオセンサアレイの開発(招待講演)、
電子情報通信学会2012年ソサイエティ大会、
2012年9月11日、富山大学(富山市)

Suzuki M, Iribe Y, Microwell-arrayed
biosensors for single-cell assays,
Symposium on New Technology for Cell-based
Drug Assay, 2012年12月10日, 東京大学(東京都)

Suzuki M, Okada T, Iribe Y,
Visualization of planar and temporal
distribution of glucose in micro flow
channel, 24th Anniversary World Congress
on Biosensors, 2014年5月27~30日,
Melbourne(オーストラリア)

稲塚翔、堂浜光司、入部康敬、鈴木正康、
光源波長による浸透深さの変化に着目した
SPR測定の基礎的研究、2014年電気化学会
北陸支部秋季大会、2014年10月16日、福井
県産業会館(福井市)

〔図書〕(計2件)

鈴木正康、篠原寛明、電気化学便覧第6
版、2013、pp.706-707

鈴木正康、情報技術協会、バイオセンサの
先端科学技術と新製品への応用開発、2014、
pp.79-82

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