

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32692

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26350518

研究課題名(和文) 薄膜干渉基板の蛍光増強効果を利用した高コントラスト蛍光顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of high contrast fluorescence microscopy using enhanced fluorescence of an optical interference mirror slide

研究代表者

秋元 卓央 (Akimoto, Takuo)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号：90367194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：金属と誘電体を積層させた薄膜干渉基板を利用すると蛍光を増強して観察することができる。しかし、薄膜干渉基板の蛍光増強現象が偏光依存性をもつことが原因で、通常の蛍光顕微鏡では、蛍光増強の効果は十分に得られない。そこで、薄膜干渉基板の蛍光増強効果を十分に得るために、特殊な偏光板を利用することで励起光を同心円状に偏光させ、これを利用した蛍光顕微鏡の開発を行った。この結果、蛍光は通常の方法に比較し4.2倍明るくなった。

研究成果の概要(英文)：An enhanced fluorescence can be observed with an optical interference mirror slide consisting of a metal and a dielectric layer. However, a general fluorescence microscopy does not provide the enhanced fluorescence because of the polarization dependence of the enhanced fluorescence. To obtain the enhanced fluorescence, we developed a fluorescence microscope equipped with a concentric circular polarized excitation. As a result, 4.2-fold enhanced fluorescence was achieved by the microscope with the concentric circular polarized excitation.

研究分野：バイオセンサー

キーワード：バイオセンサー 蛍光増強 蛍光顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

金属と誘電体を積層した薄膜干渉基板を用いると蛍光を 100 倍程度強く観察することができる。しかし、細胞の蛍光イメージングに薄膜干渉基板と通常の蛍光顕微鏡を用いると蛍光はあまり増強しない。これは、薄膜干渉基板での蛍光増強は励起光の偏光に強く依存する事が原因である。蛍光を強く増強するためには励起光を同心円状に偏光させなければならない。そこで本研究では、同心円状に偏光するレーザー光を利用した蛍光顕微鏡を開発し、薄膜干渉基板上で培養した細胞の高コントラスト蛍光イメージングを行うことを考えた。

2. 研究の目的

薄膜干渉基板での蛍光増強は励起光の偏光に依存し、TE 偏光の励起光で蛍光は増強し、TM 偏光では蛍光は増強しない。このため、蛍光で染色した細胞の観察においても TE 偏光した励起光を用いることで強い蛍光を観察することができる。しかし、通常の蛍光顕微鏡に直線偏光の偏光板を適用しただけでは励起光を完全に TE 偏光にすることはできない。完全に TE 偏光した励起光とするためには、光を同心円状に偏光される偏光板が必要である。

そこで本研究では、励起光を同心円状の偏光とするために、光源をレーザー光とし、レーザー光を同心円状の偏光にできる Z 軸ポラライザーを用いる蛍光顕微鏡を開発することを目的とした。そして、開発した蛍光顕微鏡を利用して蛍光染色した細胞の観察を行うこととした。

3. 研究の方法

市販の蛍光顕微鏡を改造することで、同心円状に偏光したレーザー光を励起光源とする蛍光顕微鏡の開発を行った。具体的には、励起光源を水銀ランプからレーザー光源へ変更した。レーザーは $\lambda/2$ 板を通過させた後、同心円状の偏光を作るための Z 軸ポラライザーを通過させた。Z 軸ポラライザーは、近年、少数のメーカーが発売を開始している、軸方位の異なる $\lambda/2$ 板を組み合わせた特殊な波長板である。この Z 軸ポラライザーに一定方向の直線偏光した光を入射すると、出射した光は同心円状の偏光を持つ光となる。同心円状の偏光を持つ光は、その後、100 倍の対物レンズにより集光させた。光が同心円状の偏光を持っているかどうかは、一般的な偏光板を用いて確認した。

薄膜干渉基板状で蛍光染色した細胞を観察するために、細胞観察に適する干渉膜の材質を検討した。具体的には、プラズマ重合膜と Al_2O_3 を検討した。蛍光物質については、細胞に取り込ませる方法と、基板に固定化する方法について検討した。

4. 研究成果

(1) 同心円状に偏光したレーザー光を励

起光源とする蛍光顕微鏡の作製を行った。図 1 に示す光学配置により同心円状の偏光のレーザー光線を励起光源とした蛍光顕微鏡を作製した。レーザー光源の波長は 635 nm、対物レンズの倍率は 100 倍 (開口数 1.3) であった。この装置では、 $\lambda/2$ 板を回転させることにより、光を同心円状と放射状の偏光とすることができる。レーザー光の偏光は、直線偏光の偏光板を用いて調べた。薄膜干渉基板は Ag と厚さ 90 nm の Al_2O_3 を積層させ作製した。この基板上に蛍光物質の Cy5 を滴下し、作製した顕微鏡を用いて蛍光の観察を行った。

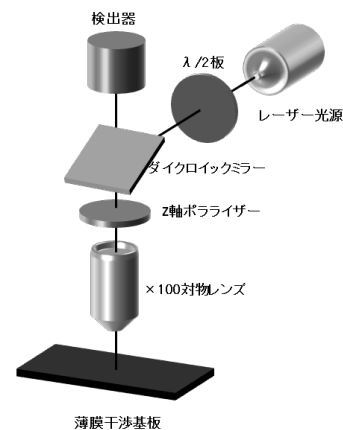


図 1 作製した蛍光顕微鏡

図 2 はレーザーの偏光を同心円状と放射状にした場合の蛍光強度である。この結果より、レーザー光を同心円状にした場合の方が放射状に偏光させた場合よりも蛍光強度が 1.5 倍高いことが示された。しかし、予測していたよりも同心円状と放射状の偏光での差は小さかった。これは、使用した対物レンズの NA が 1.3 であることが原因と考えられる。レーザー光の入射角度が大きいほど偏光による蛍光強度変化の差は大きくなるが、NA が 1.3 の場合、基板への最大の入射角度が 60 度に限定されてしまう。さらに、入射角度が 0 度付近の、同心円状と放射状の偏光による蛍光の変化が生じない光の成分が大きいことも原因であると考えられる。

図 3 は、同心円状に偏光するレーザー光を励起光とした蛍光顕微鏡を用いて、ガラス基板と薄膜干渉基板での蛍光を比較した結果である。この結果より、薄膜干渉基板では、ガラス基板に比較して蛍光が 42 倍程度増強したことがわかった。研究計画の当初は 100 倍の蛍光増強を目標としていたが、その半分程度の増強であった。この原因は、2 つあると考えている。1 つは薄膜干渉基板に用いた誘電体の厚さである。薄膜干渉基板での蛍光増強は使用する誘電体の膜厚と材質に強く依存する。実験では Cy5 の励起・蛍光波長に合わせて約 90 nm の膜厚の Al_2O_3 を作製したが、基板により数 nm の膜厚の変化が生じる

のは避けられない。しかし、数 nm の膜厚の変化が蛍光の増強度に大きく影響する。このため、今回の実験での蛍光増強度は 42 倍にとどまったと考えられる。2 つめは蛍光の退色である。同心円状に偏光させたレーザーを励起光源とした場合、通常の水銀ランプを光源とする場合に比較し、光の焦点が小さいためエネルギーが狭い範囲に集中する。このため、蛍光物質の退色が早く、蛍光画像を取得する間に蛍光の退色が始まる。特に薄膜干渉基板では、原理的に励起光が干渉により強まっているので退色が早い。今回の実験では、蛍光の退色を考慮した実験が十分でできなかった。このため、蛍光増強度が予想よりも小さくなったと考えられる。

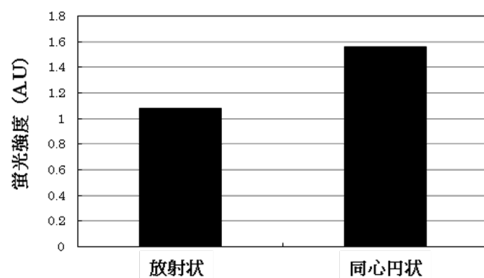


図 2 放射状と同心円状の偏光による蛍光強度の違い

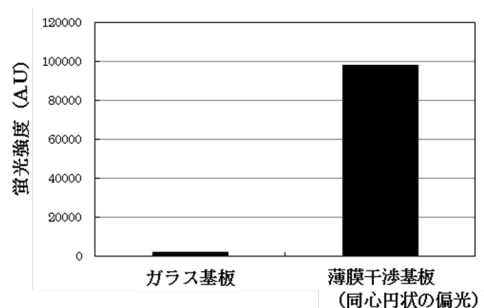


図 3 ガラス基板と薄膜干渉基板での蛍光強度の違い

(2) 薄膜干渉基板上で細胞を培養し、蛍光染色する方法について検討した。薄膜干渉基板の干渉膜に用いる Al_2O_3 は比較的もろいため、より堅い素材であるプラズマ重合膜を検討した。

プラズマ重合膜のモノマーとしてアセトニトリル、ヘキサメチルジシロキサン、エチレンジアミンの 3 種類を検討した。これらのモノマーを素材としたプラズマ重合膜を製作し、これらの膜上に Calcein で染色した HepG2 細胞を播種し蛍光強度を測定した。Calcein は細胞中の Ca^{2+} に反応し蛍光を発する物質である。この実験により、膜が堅く、また、細胞が固着する性質を有するプラズマ重合膜を選択することとした。

結果を図 4 に示す。この結果より、すべてのプラズマ重合膜で細胞が培養できること

がわかったが、エチレンジアミンの膜で最も蛍光強度が高いことがわかった。これは、エチレンジアミンの膜で最も多くの細胞が培養できたことを示している。

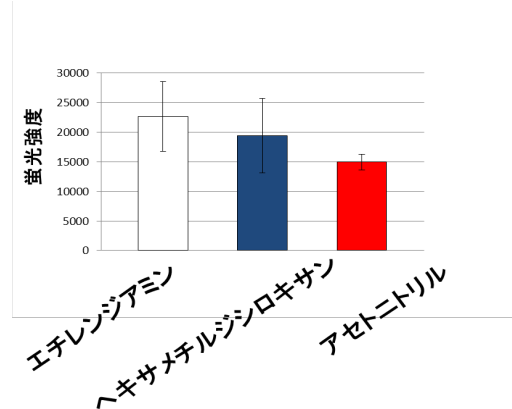


図 4 プラズマ重合膜を用いた場合の蛍光強度

この結果より、エチレンジアミンのプラズマ重合膜を用いて、蛍光増強に最適な膜厚を検討した。この結果を図 5 に示す。この結果、膜厚が 60 nm のとき最も蛍光強度が高いことがわかった。しかし、ガラス基板と比較したときの蛍光増強度は約 2.4 倍であり、予想よりも小さい値であった。これは、プラズマ重合膜がガラスほど透明ではないために、蛍光増強の効果が小さくなったことと、蛍光物質が細胞に取り込まれたため、蛍光物質とプラズマ重合膜の距離が遠くなってしまったことが原因と考えられる。

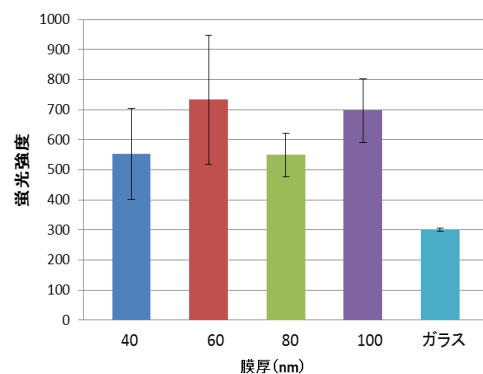


図 5 プラズマ重合膜の膜厚と蛍光強度の関係

これらの結果より、プラズマ重合膜は薄膜干渉基板の干渉膜としては不適と考えた。また、細胞に蛍光物質を取り込ませると、蛍光物質を干渉膜との距離が大きくなり蛍光増強度が小さくなることが予想できた。そこで、干渉膜としては従来の Al_2O_3 を使い、 Al_2O_3 上に直接蛍光物質を固定化し、そこに細胞を培養することを考えた。

Al_2O_3 に固定化する蛍光物質としてまず、pH によって蛍光強度が変化する物質である 5-carboxyfluorescein (BCECF) を用いた。

BCECF を Al_2O_3 に固定化するため、 Al_2O_3 を 1% の (3-Aminopropyl)trimethoxy-silane を用いてアミノ化した。その後、アミド結合によって BCECF を固定化した。この方法によって薄膜干渉基板に固定化した BCECF の蛍光をガラス基板と比較したところ、蛍光増強度は約 4.5 倍であり、期待したよりも小さな値となった。このため、BCECF は今回の実験には適さないと判断した。

次に、 Al_2O_3 に固定化する蛍光物質として pH によって蛍光強度が変化する

5(6)-Carboxynaphthofluorescein (CNF) を用いた。CNF の Al_2O_3 への固定化方法は BCECF の場合と同じである。固定化した CNF の蛍光強度を測定した結果を図 6 に示す。このときの Al_2O_3 の膜厚は 100 nm であり、ガラス基板に比較した蛍光増強度は約 16 倍であった。この結果より、CNF は BCECF に比べ蛍光増強度が高い事いため、基板に固定化する蛍光物質は CNF を使用することとした。

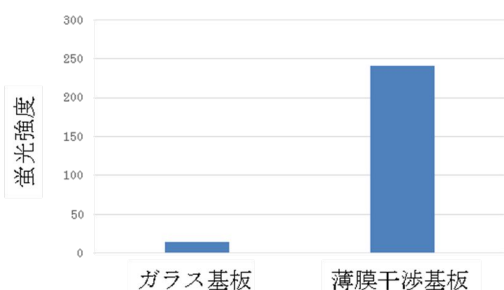


図 6 CNF を固定した薄膜干渉基板とガラス基板の蛍光強度の比較

最後に、CNF を固定化した薄膜干渉基板に HepG2 細胞を播種し、得られる蛍光を顕微鏡で観察することを試みた。しかし、CNF を固定した薄膜干渉基板上で細胞が十分に培養できず、蛍光像を得ることはできなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Yasuda Mitsuru and Takuo Akimoto, Enhanced Fluorescent DNA Microarray Using an Optical Interference Mirror Slide, Sensors and Materials, 査読有り, 印刷中

Yasuda Mitsuru and Takuo Akimoto, High-Contrast Fluorescence Imaging Based on the Polarization Dependence of the Fluorescence Enhancement Using an Optical Interference Mirror Slide, analytical science, 査読有り, 31, 2015, 139-143

秋元卓央、安田充, 蛍光増強効果をもつ薄膜干渉基板のバイオセンサーへの応用, Journal of the Japan Society of colour

Material, 査読有り, 6, 2015, 21-26

Kazuyoshi Yano, Kazuyuki Yamano, Akira Iwasaki, Takuo Akimoto, Hiroataka Miyachi and Atsunori Hiratsuka, Fluorescence Enhancement of Immunoassay Using Multilayered Glass Substrates Modified with Plasma-Polymerized Films, Sensors and Materials, 査読有り, 27, 2015, 859-869

〔学会発表〕(計 3 件)

Mitsuru Yasuda and Takuo Akimoto, Pchifichem2015, Development of a high-contrast fluorescence microscopy based on polarization techniques using an optical interference mirror slide, 2015 年 12 月 16, Honolulu(U.S.A.)

安田充、秋元卓央, 薄膜干渉基板を用いた高コントラスト蛍光増強イメージング, 日本分析化学会第 63 年会, 2015 年 9 月 18 日, 広島大学(広島県、広島市)

安田充、秋元卓央, 薄膜干渉基板を用いた偏光技術に基づく高コントラスト蛍光顕微鏡の開発とタンパク質分析への応用, 第 62 回 応用物理学会春季学術講演会, 2015 年 3 月 11 日, 東海大学(神奈川県、平塚市)

〔図書〕(計 1 件)

秋元卓央 他, シーエムシー出版, ヘルスクエアを支えるバイオ計測, 2016, 95-103

6. 研究組織

(1) 研究代表者

秋元卓央 (AKIMOTO, Takuo)

東京工科大学・応用生物学部・教授

研究者番号: 90367194