

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21532

研究課題名(和文) 薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシング

研究課題名(英文) Highly sensitive Raman spectroscopic biosensing of tumor marker using an optical interference mirror slide

研究代表者

安田 充 (Yasuda, Mitsuru)

関西学院大学・理工学部・助教

研究者番号：20742307

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)：Ag基板上にAl₂O₃超薄膜を形成した薄膜干渉型ナノ構造基板では、蛍光が100倍以上増強する。蛍光増強は主にAl₂O₃層内での光学干渉により起きることが示唆されており、薄膜干渉型ナノ構造基板では光学干渉によりラマン散乱光も増強すると予想される。そこで、本研究では薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシングを目的とした。薄膜干渉型ナノ構造基板での蛍光増強は励起光と蛍光両方の光学干渉が重要であることを突き止めた。また、薄膜干渉型ナノ構造基板で腫瘍マーカーを検出したところ、60倍以上の蛍光増強を達成した。さらに、ラマン分光検出でも50倍以上の増強を達成した。

研究成果の概要(英文)：The fluorescence from a dye on an optical interference mirror (OIM) slide consisting of a Al₂O₃ thin-film on an Ag slide is enhanced by more than 100-fold, comparing to a common glass slide. It is suggested that the fluorescence enhancement occurs mainly due to the optical interference in the Al₂O₃ layer. This implies that not only the fluorescence but also the Raman scattering light is enhanced by the optical interference. In this study, a highly sensitive Raman spectroscopic biosensing of a tumor marker using the OIM slide was demonstrated. The fluorescence enhancement with the OIM slide has found that the optical interference of both the excitation light and the fluorescence is important. In addition, when a tumor marker was detected with the OIM slide, the fluorescence enhancement by more than 60-fold was achieved. Furthermore, in a Raman spectroscopic biosensing, the Raman scattering light achieved the enhancement by more than 50-fold.

研究分野：バイオ分析

キーワード：ラマン 蛍光 励起光 光学干渉 薄膜 抗原抗体反応 腫瘍マーカー バイオチップ

1. 研究開始当初の背景

近年、非侵襲・非染色で、細胞内タンパク質や核酸、脂質などの分子種を可視化できるラマン分光法が、生物医学の分野で注目を集めている。しかし、極めて微弱な細胞からのラマン散乱光を検出するには、長い露光時間を要することが大きな問題となっている。レーザーパワーを上げるとラマン散乱光の強度が増大し、増大した分だけ露光時間を短縮できるが、高レーザーパワーは細胞に損傷を与えるため、ラマン散乱光強度を増強する新たな技術開発が望まれている。

この問題を解決するため、スライドガラスなどのガラス基板上に Ag 膜、その上に透明な誘電体の超薄膜が形成された薄膜干渉型ナノ構造基板に着目した。この基板上に蛍光分子を堆積させると、ガラス基板で観察するよりも、蛍光を 100 倍以上明るく観察できる。

研究代表者は以前、誘電体として Al_2O_3 からなる薄膜干渉型ナノ構造基板を作製し、それを用いることで蛍光を 200 倍増強することに成功した。また、モデルタンパク質の検出に対して 50 倍以上、GFP 発現遺伝子組換え大腸菌の観察でも 2 桁の蛍光増強を達成した。さらに、薄膜干渉型ナノ構造基板の蛍光増強が励起光の偏光に依存する、蛍光増強の偏光依存性を発見し、それを利用した新規高感度蛍光イメージング技術を開発した。この技術により、蛍光を 100 倍以上見やすくすることに成功した。

薄膜干渉型ナノ構造基板での蛍光増強は、主に Al_2O_3 層内での励起光と蛍光両方の光学干渉によって起きる。そのため、ナノ薄膜干渉基板では蛍光のみならず、光学干渉によりラマン散乱光も増強されると予想される。また、研究代表者が開発した高感度蛍光イメージング技術をラマン分光と融合すれば、さらなるラマン散乱光の増強が見込まれ、より一層露光時間の短縮ならびに高感度なラマン分光分析が可能になると予想される。

2. 研究の目的

現時点では、薄膜干渉型ナノ構造基板で蛍光が増強するメカニズムは完全には明らかになっていない。このメカニズムを知り、それを極限まで制御・活用することが、ラマン散乱光の高度な増強の獲得に重要であると考えられる。高いラマン散乱光増強は、長い露光時間、それに伴うラマン分光イメージングにおける膨大な測定時間の問題を解決する。これにより、刻一刻と変化する細胞内生化学反応を 2 次元像としてタンパク質や核酸、脂質などの分子レベル追跡できるようになるだけでなく、高度なラマン散乱光増強が高感度なラマン分光分析を可能にする。

そこで本研究では、薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシングを目的とした。そのために、本研究期間内に以下に示す 2 つの事項を明らかにする。1 つ目は、蛍光増強と基板上

で反射した励起光の関係について調べ、得られた知見を基に、ラマン散乱光強度と反射した励起光の関係を明らかにし、ラマン分光測定に最適な Al_2O_3 膜厚を決定する。2 つ目は、ラマン分光を用いた抗原抗体反応に基づく腫瘍マーカータンパク質の高感度検出を実証する。

これら 2 つの事項を明らかにすることで、将来的なラマン分光法による細胞内分子種の多項目情報の獲得、薄膜干渉型ナノ構造基板の蛍光増強特性によるラマン散乱光の増強、ラマン散乱光増強を利用した細胞の高速ラマン分光イメージング、高感度細胞ラマン分光分析を目指す。本研究はそのための基礎研究ならびに基盤技術の開発にあたる。

3. 研究の方法

スパッタリング装置を用いて、ガラス基板上に接着層として 10 nm の Cr、反射層として 500 nm の Ag、光学干渉層として 0-300 nm まで Al_2O_3 膜厚の異なる薄膜干渉型ナノ構造基板を 20 種類以上作製した。

最初に、蛍光増強と基板上で反射した励起光の関係について調べるため、薄膜干渉型ナノ構造基板上に蛍光分子 Rhodamine B をスポットした。Rhodamine B を 532 nm の励起光で励起し、バンドパスフィルタで様々な波長の蛍光を検出した。

つぎに、ラマン分光法を用いた腫瘍マーカータンパク質の高感度検出を実証するための前段階として、アミノ基を修飾した薄膜干渉型ナノ構造基板上に、肝臓癌に関連する腫瘍マーカータンパク質 α -Fetoprotein (AFP) をスポットして物理吸着させた。この AFP に Cy3 標識した AFP 抗体を結合せ、Cy3 からの蛍光を検出することで、蛍光法により AFP を検出した。

最後に AFP と未標識の AFP 抗体を混合し、あらかじめ抗原抗体反応により AFP-AFP 抗体の複合体を形成させ、それを薄膜干渉型ナノ構造基板上にスポットし、ラマン散乱光を検出した。同じ実験をガラス基板で行い、得られた結果を薄膜干渉型ナノ構造基板との結果と比較することで、薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシングを実証した。

4. 研究成果

最初に、蛍光増強と基板上で反射した励起光の関係について調べた。Rhodamine B をスポットした薄膜干渉型ナノ構造基板上に 532 nm の励起光を入射し、580, 620, 671 nm の 3 種類の波長の蛍光を検出した。検出する蛍光の波長が長くなるにつれて、最大蛍光増強をもたらす Al_2O_3 膜厚は厚くなるのがわかった。また、これらの膜厚は光学干渉理論とほぼ一致した。さらに、蛍光の波が強め合う Al_2O_3 膜厚で蛍光が増強したことから、蛍光増強には蛍光の光学干渉が関与していることが明らかとなった。

一方、入射した励起光の波長と検出した蛍光の波長の幅が大きいほど、蛍光の増強度が低下する現象が観測された。これは検出する蛍光波長が長くなるにつれて、蛍光は光学干渉により強め合うが、励起光は反対に弱め合ったことが原因であると考えられる。同様の結果がCy3などの他の蛍光分子でも観測された。以上より、薄膜干渉型ナノ構造基板での蛍光増強は蛍光の光学干渉だけでなく、励起光の光学干渉も合わせた2重の効果により起ることが明らかとなった。

上記の結果を踏まえ、細胞やタンパク質からのラマン散乱光が観測されるラマンシフト $0\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ の領域で、ラマン散乱光強度が最大となる最適な Al_2O_3 膜厚を光学干渉理論により調べたところ、約 $80\text{-}90\text{ nm}$ が最適であることがわかった。これらの Al_2O_3 膜厚では $0\text{-}1800\text{ cm}^{-1}$ 領域のラマン散乱光がほぼすべて増強されることになるため、本研究では薄膜干渉型ナノ構造基板でラマン散乱光が最も増強される最適な Al_2O_3 膜厚を 80 nm と決定した。

つぎに、ラマン分光法を用いた腫瘍マーカータンパク質の高感度検出を実証するための前段階として、抗原抗体反応を利用して、AFPを蛍光法で検出した。 80 nm の Al_2O_3 膜厚をもつ薄膜干渉型ナノ構造基板の表面と比較用ガラス基板の表面を同じにし、両基板での蛍光強度を定量的に評価するため、これらの基板表面をアミノ基で修飾した。アミノ基の修飾を、Biotin-Streptavidin 結合を利用して確認した。

その方法として、NHS 活性をもつ Biotin と NHS 活性を消失した Biotin を薄膜干渉型ナノ構造基板上にスポットし、Biotin に Cy3 標識 Streptavidin を結合させた。原理的には、NHS 活性をもつ Biotin は基板表面のアミノ基とアミド結合を介して固定化され、アミド結合を起こさない NHS 活性を消失した Biotin は基板表面に固定化されない。

Cy3 からの蛍光を蛍光顕微鏡で観察したとき、NHS 活性をもつ Biotin をスポットした基板表面からのみ強い蛍光が観測された。蛍光が観測されたということは NHS 活性をもつ Biotin をスポットした基板表面には Cy3 標識 Streptavidin が存在することを意味する。Cy3 標識 Streptavidin が存在するということは、基板表面には Biotin が存在し、Biotin が存在するということは NHS 活性をもつ Biotin が、基板表面のアミノ基とのアミド結合により固定化されたことを暗に示している。対照的に、NHS 活性を消失した Biotin をスポットした基板表面からの蛍光強度は、NHS 活性をもつ Biotin をスポットした基板表面からの蛍光強度に比較し、僅か 3% 程度であった。同様の結果がガラス基板でも得られた。以上より、基板表面へのアミノ基の修飾を確認することができた。

基板表面へのアミノ基の修飾が確認できたため、薄膜干渉型ナノ構造基板上で AFP を

蛍光法により検出した。AFP をスポットした基板表面からのみ、Cy3 標識した AFP 抗体からの強い蛍光が観測された。この蛍光が、AFP をスポットした基板表面への Cy3 標識 AFP 抗体の非特異的吸着でなく、抗原抗体反応によるものであることを実証するため、AFP をスポットした基板表面とは異なる基板表面に未標識の Streptavidin をスポットした。その結果、Cy3 からの蛍光は AFP をスポットした基板表面で観測されたが、Streptavidin をスポットした基板表面からはほとんど観測されなかった。そのときの蛍光強度は AFP をスポットした基板表面からの蛍光強度に比較し、約 6% 程度であった。

今回使用した AFP 抗体は AFP と特異的に結合する抗体であり、Streptavidin とは結合しない。そのため、AFP をスポットした基板表面からのみ強い蛍光が観測されたということは、AFP をスポットした基板表面への AFP 抗体の非特異的吸着によるものではなく、AFP と AFP 抗体が抗原抗体反応により特異的結合したことを意味する。したがって、本研究では抗原抗体反応により腫瘍マーカータンパク質 AFP を検出することができた。同様の結果がガラス基板でも得られた。

そこで、AFP 検出における薄膜干渉型ナノ構造基板とガラス基板での蛍光強度を比較したところ、薄膜干渉型ナノ構造基板ではガラス基板に比べ、蛍光が 60 倍以上の増強に達した。この結果は、モデルタンパク質を検出した研究代表者の以前の成果とほぼ一致したため、本研究成果で得られた蛍光増強度は妥当である。

今回採用した AFP の検出方法は、基板表面に標的タンパク質を吸着させる直接吸着法と呼ばれるものであり、この方法はあまり一般的でない。より一般的な検出方法としては、標的タンパク質を2種類の異なる抗体で挟むサンドイッチ法が用いられる。そこで、薄膜干渉型ナノ構造基板上にスポットして固定化した AFP 抗体に AFP を結合させ、さらにこの AFP の別のエピトープに Cy3 標識 AFP 抗体を結合させるサンドイッチ法を用いたイムノアッセイを行ったところ、AFP の高感度検出に成功した。本研究成果は薄膜干渉型ナノ構造基板を、医療診断用ナノバイオチップとして実用化することが可能であることを示唆する。今後は、ラマン分光への応用とともに、薄膜干渉型ナノ構造基板の実用化を念頭においた研究も展開していく予定である。

最後に、抗原抗体反応により AFP-AFP 抗体の複合体を形成させ、それを薄膜干渉型ナノ構造基板上にスポットし、ラマン散乱光を検出した。 80 nm の Al_2O_3 膜厚をもつ薄膜干渉型ナノ構造基板上に、モデルタンパク質として Bovine Serum Albumin (BSA) をスポットし、ラマンスペクトルを測定した。 1000 cm^{-1} 付近における BSA のラマン散乱強度は石英ガラスに比べ、 2 桁増強した。さらに、基板上に AFP をスポットした場合もラマン散乱光強度が 2

桁増強し、AFP-AFP 抗体の複合体をスポットしたときは、ラマン散乱光が 50 倍以上の増強に達した。

以上より、本研究では、薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカーの高感度ラマン分光バイオセンシングを実証することに成功した。さらに次の展開を見据え、薄膜干渉型ナノ構造基板上にスポットした AFP のラマン分光イメージングに挑戦したところ、AFP の高速ラマン分光イメージングにも成功した。したがって、本研究では、腫瘍マーカーの高感度なラマン分光バイオセンシングのみならず、薄膜干渉型ナノ構造基板を用いた腫瘍マーカータンパク質の高速ラマン分光イメージングを実証することができた。

今後は、薄膜干渉型ナノ構造基板を細胞生物学へ応用し、ラマン分光法による細胞内分子種の多項目情報の獲得、薄膜干渉型ナノ構造基板の蛍光増強特性によるラマン散乱光増強、ラマン散乱光の増強を利用した細胞の高速ラマン分光イメージング、高感度細胞ラマン分光分析を実証し、生命科学の発展に貢献していく。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計3件)

1. M. Yasuda and T. Akimoto, "Enhanced fluorescent DNA microarray using an optical interference mirror slide," *Sensor. Mater.* (accepted). 査読有
2. M. Z. Brela, M. J. Wójcik, M. Boczar, L. Witek, M. Yasuda, and Y. Ozaki, "Car-Parrinello molecular dynamics simulations of infrared spectra of crystalline vitamin C with analysis of double minimum proton potentials for medium-strong hydrogen bonds," *J. Phys. Chem. B* 119 (25), pp7922-7930 (2015). 査読有
DOI: 10.1021/acs.jpcc.5b02777
3. 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", *J. Jpn. Soc. Colour Mater.* 88 (6), pp181-186 (2015). 査読有 . DOI: <http://doi.org/10.4011/shikizai.88.181>.

[学会発表](計13件)

1. M. Yasuda, Bio-Raman/fluorescence enhancement using a nano-biochip: highly-sensitive biosensing and bioimaging, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市), December 4-7 (2016). 招待講演
2. T. Hiramatsu, S. Ha, Y. Masuda, M. Yasuda, M. Ishigaki, Y. Ozaki, and E. Chatani, Investigating amyloid

polymorphism by using iodine staining, Japan-Taiwan Medical Spectroscopy International Symposium, 淡路夢舞台国際会議場 (兵庫県淡路市), December 4-7 (2016).

3. 安田 充, 超高感度がん診断ナノバイオチップの開発, 田中貴金属グループ 技術交流イベント, 日本工業倶楽部 (東京都千代田区), 9月1日 (2016). 招待講演
4. 安田 充, ナノバイオチップを用いた高感度バイオセンシング・バイオイメージング, 最先端光計測とライフサイエンスの近未来~Bio, Phys, Chem, 三重点の探索~, 東北大学 (宮城県仙台市), 6月18日 (2016). 招待講演
5. 安田 充, 秋元 卓央, 尾崎 幸洋, 薄膜干渉基板を用いた腫瘍マーカータンパク質のラマン分光分析, 第76回 分析化学討論会, 岐阜薬科大学・岐阜大学 (岐阜県岐阜市), 5月28日-5月29日 (2016).
6. 平松 貴人, Seongmin Ha, 増田 裕輝, 安田 充, 尾崎 幸洋, 茶谷 絵理, 新規アミロイド構造プローブとしてのヨウ素染色の有用性評価及び染色メカニズムの解析, 第63回 日本生化学会 近畿支部例会, 神戸薬科大学 (兵庫県神戸市), 5月21日 (2016).
7. 安田 充, 秋元 卓央, 尾崎 幸洋, 薄膜干渉基板を用いた高感度ラマン分光イメージング, 第63回 応用物理学会春季学術講演会, 東京工業大学 大岡山キャンパス (東京都目黒区), 3月19日-3月22日 (2016).
8. M. Yasuda, T. Akimoto, and Y. Ozaki, Enhanced Raman Spectroscopic immunoassay using an optical interference mirror slide, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20 (2015).
9. M. Yasuda and T. Akimoto, Development of a high-contrast fluorescence microscopy based on polarization techniques using an optical interference mirror slide, 2015 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, Honolulu, Hawaii, USA, December 15-20 (2015).
10. 安田 充, 秋元 卓央, 薄膜干渉基板を用いた蛍光増強 DNA マイクロアレイ, 第76回 応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市), 9月13

日-9月16日(2015).

11. 安田 充, 秋元 卓央, 尾崎 幸洋, 薄膜干渉基板を用いたラマン分光法に基づくタンパク質検出感度の評価, 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市), 9月13日-9月16日(2015).
12. 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64年会, 九州大学 伊都キャンパス(福岡県福岡市), 9月9日-9月11日(2015).
13. 安田 充, 秋元 卓央, 尾崎 幸洋, 薄膜干渉基板を用いたタンパク質の高感度ラマン分光分析, 日本分析化学会 第64年会, 九州大学 伊都キャンパス(福岡県福岡市), 9月9日-9月11日(2015).

〔図書〕(計1件)

1. 秋元 卓央, 安田 充, “ヘルスケアを支えるバイオ計測~バイオテクノロジーシリーズ~『第4章 技術開発: 蛍光増強効果をもつナノ構造基板を用いたタンパク質の高感度検出』”, シーエムシー出版, pp95-103 (2016年3月28日).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安田 充 (YASUDA, Mitsuru)
関西学院大学・理工学部・研究特別任期
制助教
研究者番号: 20742307