

令和元年6月15日現在

機関番号：24402

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K13646

研究課題名(和文) ナノ光ファイバニードルによる超高感度ラマン散乱検出と一細胞機能計測

研究課題名(英文) Applications of nanofiber needles to Raman-based optical analysis in single cells

研究代表者

藤原 正澄 (Fujiwara, Masazumi)

大阪市立大学・大学院理学研究科・講師

研究者番号：30540190

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：細胞内部の情報をリアルタイムで計測可能な一細胞計測は、幹細胞のがん化や老化などを検出し、単一細胞診断につながる重要な技術である。生きた臓器内の細胞を観察する光ファイバ型細胞診断技術を目指して、ナノ光ファイバという光デバイスによる技術開発を行った。ナノ光ファイバを細胞挿入可能なようにニードル化するために、可動型酸水素バーナーシステムを構築し、ナノ光ファイバの形状自在制御、ニードル化、数値解析による設計を行った。またラマン散乱や蛍光ナノ粒子を複合化して細胞内計測を行うために、ナノ粒子のラマン散乱特性評価や幹細胞機能の評価を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、量子エレクトロニクス分野で開発してきたナノ光デバイスを、大胆にも幹細胞の一細胞計測にまで応用しようとする挑戦的な目標を掲げている。ナノ光ファイバは超高効率蛍光検出ナノデバイスとして、既に理論・実験両面でその詳細な動作特性が明らかとなっており、これをニードル化する事に成功した点で、新しいバイオ分析コンセプトを提供している。また幹細胞移植治療でのリモートセンシングを念頭に、再生因子への影響などを解明した点で、バイオ医療応用への方向性を示した点で、将来の分析ツールとして期待される。

研究成果の概要(英文)：Real-time single cell analysis is an important technological milestone that may enable diagnosing cancer or senescence of single stem cells in regenerative medicine. The project is aimed to develop such a single cell analysis in a remote-sensing style for cells in living organisms by using optical nanofibers. We fabricated needle-shape nanofibers by a newly developed hydrogen-oxygen micro torch to form arbitrary shapes of nanofibers. Nanofibers design was conducted by electromagnetic simulation. Raman characteristics and stem-cell function have been evaluated in the context of their integration into nanofiber-based single cell analysis.

研究分野：ナノ光バイオ

キーワード：ナノ光ファイバ 一細胞解析 再生医療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞内部の情報をリアルタイムで計測可能な一細胞計測は、幹細胞のがん化や老化などを検出し、単一細胞診断につながる重要な技術である。中でもラマン散乱は蛍光標識で染色せずに、細胞内部を計測できる優れた手法である。通常、ラマン散乱測定には顕微鏡が用いられるが、生体組織の表層部しか見る事ができず、生きた臓器内の細胞を観察するのは極めて困難であった。これを克服するために光ファイバ先端を先鋭化してプローブとするファイバ検出型が研究されている。しかしながら、この手法は測定感度が顕微鏡に比べて大幅に低い。そのため、近年急速に発展する表面増強ラマン散乱をファイバ先端に発生させて性能向上を目指す研究などが報告されている。ファイバ検出型の感度が低い最大の原因が、光ファイバに結合してから検出器までに存在する光損失である。従来手法では、発生したラマン信号の僅か 0.1%しか検出できていなかったため、これを解決する事が重要である。

代表者はナノ光ファイバというナノデバイスを用いて、蛍光性ナノ粒子を超高感度で検出する手法を開拓してきた。特に、導波路理論に基づいて精密にファイバ形状を制御する事で、ナノ粒子の総発光量の 20%もの信号を検出する技術を確認した(顕微鏡では 1-2%)。本研究課題では、この技術を細胞や生物個体のラマン散乱計測をはじめとする光分析技術に応用するためのファイバ作製技術や生体分析手法の基盤技術形成を目指した。

### 2. 研究の目的

本研究では、代表者らのナノ光ファイバを生体中でも利用可能なデバイスとするための作製技術の開拓を行い、細胞実験などの実使用において解決すべき課題を洗い出すこと、また、ラマン散乱検出をはじめとする種々の光分析技術の実装についても検討を行った。

### 3. 研究の方法

本研究では大きく分けて次の 3 項目に関する研究を実施した。

#### (1) ナノ光ファイバの片端ニードル形状化

代表者がこれまで開発してきたナノ光ファイバ作製法は、電気加熱セラミックヒータを利用して、光ファイバ延伸中に加熱領域の幅や温度を迅速に制御する事が困難であり、所望のニードル形状を実現する事が不可能であった。これを克服するために、可動型酸水素マイクロバーナーシステムを開発し、ナノ光ファイバの作製を行う事とした。また、片端化にはナノ光ファイバ作製後、急激に延伸する手法を採用した。

#### (2) ナノダイヤモンド粒子を複合化した際に問題となる粒子のラマン散乱特性評価

ナノ光ファイバニードルデバイスの応用利用を考えた場合、単純な生体内のラマン散乱だけでなく、金ナノ粒子や蛍光ダイヤモンドナノ粒子のような光ナノ材料と複合させて利用する事が想定される。そのため、特に量子センシングなどの超高感度計測が可能な蛍光ダイヤモンドナノ粒子との複合化を想定して、蛍光ダイヤモンドナノ粒子のラマン散乱特性と量子センシング性能の関連性に関して研究を行った。

#### (3) リモート生体計測応用に向けた細胞や生体機能の光計測の研究

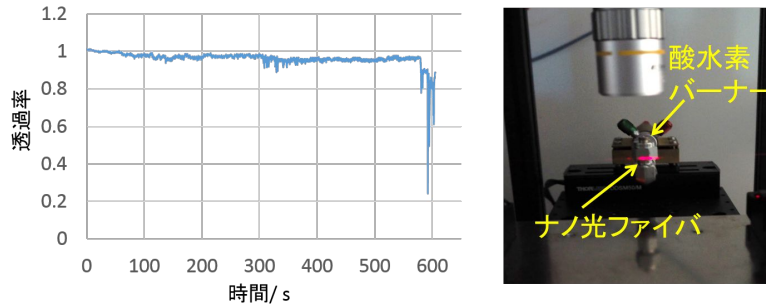
本研究で開発するナノ光デバイスを実際に細胞や生体に適用して、有用な機能情報を得るためには、ラマン散乱や蛍光を測定するという光技術サイドからの知見だけではなく、それらがどのような生体機能と関係しているかを解明する事が必要である。具体的には、体内リモート計測する用途として、研究分担者の湯川が研究を行う移植幹細胞の肝臓生着状況モニタリングがある。この中で、ファイバ挿入やナノ粒子導入による刺激で移植幹細胞の再生機能が変化してはいけない。特にナノ粒子導入による刺激を評価した。細胞挿入刺激に関しても研究を進めた。

### 4. 研究成果

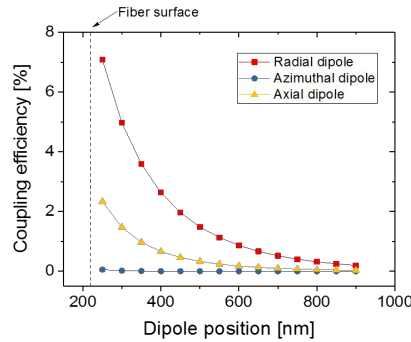
#### (1) ナノ光ファイバの片端ニードル形状化 (図 1)

代表者がこれまで開発してきたナノ光ファイバ作製法は、電気加熱セラミックヒータを利用して、光ファイバ延伸中に加熱領域の幅や温度を迅速に制御する事が困難であり、所望のニードル形状を実現する事が不可能であった。これを克服するために、可動型酸水素マイクロバーナーシステムを開発した。これを用いてナノ光ファイバの作製を行い、直径 700 nm 程度のナノ光ファイバの作製に成功した。酸水素バーナーシステムを用いて実現した事で、高い剛性を有して生体内への挿入が可能な片端ナノ光ファイバを作製する基盤技術が確立した。片端化にはナノ光ファイバ作製後、急激に延伸する手法を採用する事で片端化ファイバの試作を行った。生体内や水中でのラマン散乱集光効率を数値計算によって詳細に解析する事に成功した。現在、細胞挿入に必要な剛性確保を目指して、ニードル形状の最適化を行っている。

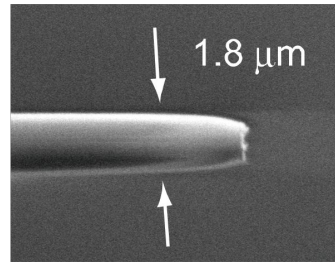
図1: 可動型酸水素バーナーシステムによるナノ光ファイバの作製



液体内の検出効率数値解析

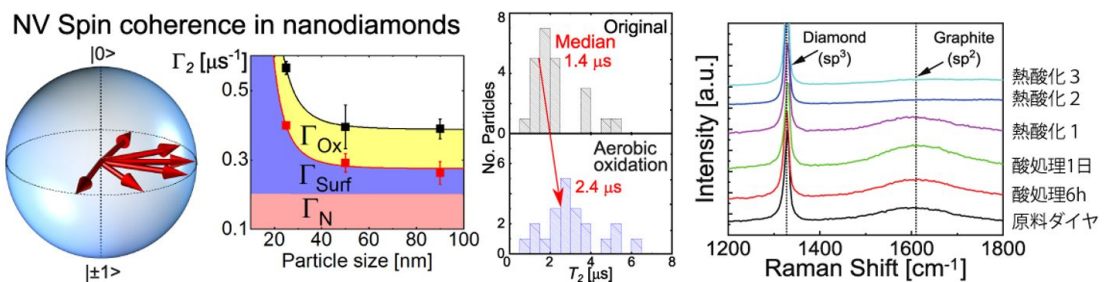


ニードル形状の試作



(2) ナノダイヤモンド粒子を複合化した際に問題となる粒子のラマン散乱特性評価(図2) ナノ光ファイバニードルデバイスの応用利用を考えた場合、単純な生体内のラマン散乱だけでなく、金ナノ粒子や蛍光ダイヤモンドナノ粒子のような光ナノ材料と複合させて利用する事が想定される。そのため、特に量子センシングなどの超高感度計測が可能な蛍光ダイヤモンドナノ粒子との複合化を想定して、蛍光ダイヤモンドナノ粒子のラマン散乱特性と量子センシング性能の関連性に関して研究を行った。高い量子センシング特性を有するナノダイヤモンドではラマン散乱がダイヤモンドラマン線(1333 cm<sup>-1</sup>)のみになる事を示した。(Tsukahara, Fujiwara et al., ACS Appl. Nano Mat. (2019), in press.)

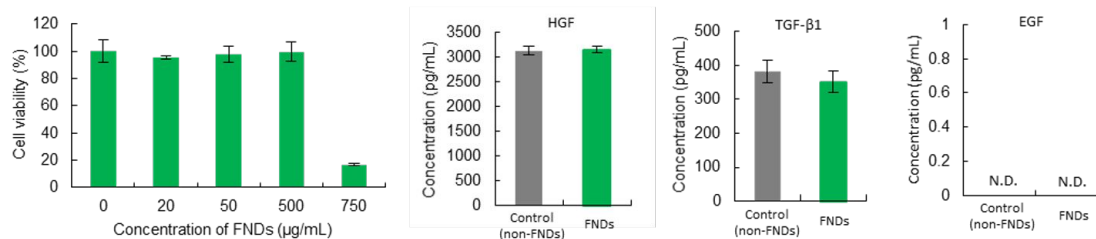
図2: 蛍光ナノダイヤモンド表面処理によるスピニコヒーレンス時間とラマン散乱特性



(3) リモート生体計測応用に向けた細胞や生体機能の光計測の研究

本研究で開発するナノ光デバイスを実際に細胞や生体に適用して、有用な機能情報を得るためには、ラマン散乱や蛍光を測定するという光技術サイドからの知見だけではなく、それらがどのような生体機能と関係しているかを解明する事が必要である。体内リモート計測する用途の例として、研究分担者の湯川が行う移植幹細胞の肝臓生着状況モニタリングがある。この中で、ファイバ挿入や粒子導入による刺激で移植幹細胞の再生機能が変化してはいけない。ナノ粒子導入による刺激の影響を評価し、その無影響性を確認した(Yukawa, Fujiwara et al., submitted (2018).)。また、マウスへのファイバ挿入に関しても、in vivo イメージング装置との複合的測定を検討し、現在、装置改造を行っており、研究期間終了後ではあるが、引き続き生体モニタリングへのナノ光ファイバ応用を模索する予定である。

図3: ナノダイヤモンド粒子導入による細胞の生存率と再生因子量



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件)

- (1) Ryuta Tsukahara, Masazumi Fujiwara, Yoshihiko Sera, Yushi Nishimura, Yuko Sugai, Christian Jentgens, Yoshio Teki, Hideki Hashimoto, Shinichi Shikata, “Removing Non-Size-Dependent Electron Spin Decoherence of Nanodiamond Quantum Sensors by Aerobic Oxidation”, ACS Appl. Nano Mat. accepted.
- (2) Masazumi Fujiwara, Ryuta Tsukahara, Yoshihiko Sera, Hiroshi Yukawa, Yoshinobu Baba, Shinichi Shikata, and Hideki Hashimoto, “Monitoring spin coherence of single nitrogen-vacancy centers in nanodiamonds during pH changes in aqueous buffer solutions”, RSC Adv. **9**, 12606-12614 (2019).
- (3) Masazumi Fujiwara, Oliver Neitzke, Tim Schröder, Andreas W. Schell, Janik Wolters, Jiabao Zheng, Sara Mouradian, Mohamed Almkhtar, Shigeki Takeuchi, Dirk Englund, and Oliver Benson, “Fiber-Coupled Diamond Micro-Waveguides toward an Efficient Quantum Interface for Spin Defect Centers”, ACS Omega **2**, 7194-7202(2017)
- (4) Masazumi Fujiwara, Kazuma Yoshida, Tetsuya Noda, Hideaki Takashima, Andreas W. Schell, Norikazu Mizuochi, and Shigeki Takeuchi, “Manipulation of single nanodiamonds to ultrathin fiber-taper nanofibers and control of NV-spin states toward fiber-integrated  $\lambda$ -systems”, Nanotechnology **27**, 455202 (2016).

〔学会発表〕(計11件)

- (1) Masazumi Fujiwara, Hiroshi Yukawa, Kaori Kobayashi, Yumi Umehara, Yoshinobu Baba, “Fluorescent-nanodiamond quantum thermometers probing adipose tissue-derived stem cells taken from mice”, SPIE Photonics West2019 (San Francisco, California, USA, Feb. 2-7, 2019).
- (2) Masazumi Fujiwara, Ryuta Tsukahara, Yoshihiko Sera, Shinichi Shikata and Hideki Hashimoto, “Nanodiamond nitrogen vacancy centres for quantum sensing applications”, 28th International Conference on Diamond and Carbon Materials (Göthenburg, Sweden, Sept. 3-7 (2017)).
- (3) M. Fujiwara, O. Neitzke, T. Schröder, S. Takeuchi, D. Englund, and O. Benson, “Spin defect centers in nanostructured diamonds for applications in quantum optics and quantum sensing”, Spin TECH IX International school and conference 2017 (Poster, B182, Jun. 4-8, 2017).
- (4) Masazumi Fujiwara, Hong-Quan Zhao, Tetsuya Noda, Kazuhiro Ikeda, Hitoshi Sumiya, and Shigeki Takeuchi, “Ultrathin fiber-taper coupling with nitrogen vacancy centers in nanodiamonds at cryogenic temperatures”, No. 9762-32, Photonics West 2016 (San Francisco, Feb. 13-18, 2016).

〔図書〕(計0件)

該当なし

〔産業財産権〕

出願状況 (計3件)

名称：容器、及び光学顕微鏡の温度調整装置

発明者：藤原正澄，湯川博，馬場嘉信

権利者：大阪市立大学・名古屋大学

番号：2018-085225

出願年：2018年4月26日

国内外の別：国内

〔その他〕

研究室ホームページ

<http://www.sci.osaka-cu.ac.jp/chem/RKINOU/>

個人ホームページ

<https://www.masazumifujiwara.net/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：湯川 博

ローマ字氏名：YUKAWA HIROSHI

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：大学院工学研究科

職名：特任准教授

研究者番号（8桁）：30634646

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。