

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：13201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05520

研究課題名（和文）表面プラズモンハイブリッドイメージング法の創製と細胞応答解析への応用

研究課題名（英文）Development of surface plasmon hybrid imaging method and application to cellular response analysis

研究代表者

鈴木 正康（SUZUKI, Masayasu）

富山大学・学術研究部工学系・教授

研究者番号：70226554

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：表面プラズモン共鳴（SPR）画像と、表面プラズモン増強蛍光（SPEF）画像を、同時測定し、それらを合成することで同じ近接場領域の屈折率・誘電率と蛍光を可視化できるハイブリッドイメージング法を開発した。SPRセンサ基板にフッ素樹脂Cytopの層を導入して、SPR角をシフトさせ、従来金薄膜では不可能であった500nm以下の光源を用いたSPR測定を実現すると共に、長距離伝搬表面プラズモン（LRSP）効果により、SPR、SPEFを高感度化し、SPR、SPEFの同時測定と両画像のハイブリッド化を実現した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で開発した表面プラズモンハイブリッドイメージング法はSPRイメージングの細胞応答研究ツールとしての有用性を飛躍的に向上させる。また細胞膜が関与する応答現象、シグナル伝達機構の研究や、アポトーシスやオートファジーなど細胞のダイナミックな変化の研究に有用である。また神経科学研究の有用なツールと考えられるので脳科学への貢献も大きい。社会的にも副作用の少ない分子標的薬の開発やアルツハイマー病などの脳疾患の治療薬の開発にも大きく貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Hybrid imaging method of surface plasmon resonance (SPR) and surface plasmon enhanced fluorescence (SPEF) was developed. The present method could visualize the changes of refractive index / dielectric constant and fluorescence in the same near field. SPR imaging under shorter wave length light source (<500nm) was realized by introducing fluorocarbon resin Cytop into gold SPR sensor chip. Sensitivity of SPR and SPEF was enhanced by the effect of long range surface plasmon (LRSP), and simultaneous measurement of SPR and SPEF could be realized.

研究分野：生物計測工学

キーワード：表面プラズモン共鳴 表面プラズモン増強蛍光 長距離伝搬表面プラズモン バイオセンサ 細胞分析

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

細胞膜表面の受容体へのリガンドの結合とそれにより誘起される細胞内情報伝達過程の解明は、副作用のない薬として注目される分子標的薬の開発に必要不可欠である。そこで細胞膜近傍の空間領域のみを可視化できる新たなイメージング技術の開発が要望されていた。

底面が金属薄膜で被覆されたプリズムに光を入射した時、特定の狭い角度領域で、金属膜上に表面プラズモン（電子雲の振動）（SP）が発生し入射光から光エネルギーを吸収する。このプラズモンと入射光が共鳴して反射光が大きく減少するのが表面プラズモン共鳴（SPR）現象である。この反射光が最も弱くなる入射角、SPR 角はセンサ表面近傍の屈折率・誘電率に依存する。SPR 角のシフトに伴う反射光強度の変化を画像化したのが SPR イメージングである。非標識イメージング技術の代表例であり近接場領域の屈折率・誘電率の変化を画像化できる。細胞イメージングへも応用されプロテインキナーゼ C (PKC) の活性化や神経細胞の発火が測定できたという報告がある。一方、この共鳴により金属薄膜の反対側へ移ったエネルギーにより生じた表面プラズモン共鳴で増幅されたエネルギーにより、センサ基板近傍の蛍光分子を励起して測定を行う手法が表面プラズモン増強蛍光分光法（SPEF）である。SPR と同じ空間領域の蛍光のみを見ることが出来、分子レベルでの特異性の高い詳細情報が得られる。これら SP を利用した 2 つのイメージング画像、SPR 画像と SPEF 画像を同時に取得し合成する新たなイメージング技術（本研究ではこれを表面プラズモンハイブリッドイメージング法と称する）が実現できれば極めて有益な細胞研究ツールとなると考えられる。

SPR-SPEF 同時測定の実現の最大の障壁は両者の最適光源波長が異なることである。一般的な蛍光色素の励起波長は 500nm 以下が多い。一方、SPR 測定では 700-800nm の光源が適しており金薄膜では 650nm 以下の光源では測定不可能である。

研究代表者は新規 SPR センサ基板の開発などにより研究例の少ない短波長光源による SPR 測定に取り組んできたが 550nm 以下ではどうしても不可能であった。また得られる SPEF 画像が微弱であるという問題点もあった。

### 2. 研究の目的

本研究は、それぞれ同じ近接場領域の屈折率・誘電率と蛍光を可視化できる SPR イメージング画像と、SPEF イメージング画像を、同時に測定しそれらの画像を合成したハイブリッドイメージング法を創製することを目的とする。本手法が実現できれば細胞膜研究などに極めて有力なツールとなると考えられるが、両者に用いる光源の波長が異なることや蛍光強度が弱いなどの課題があり、これまで不可能であった。本研究では SPR センサ基板に試料溶液と屈折率が近いフッ素樹脂 Cytop の層を挿入することで SPR 角をシフトさせて従来金薄膜では不可能であった 500nm 以下の光源を用いた SPR 測定を実現するとともに、長距離伝搬表面プラズモン効果により、SPR、SPEF を高感度化し、SPR、SPEF の同時測定を実現すると共に、両画像をハイブリッド化する手法を開発する。さらに本法を細胞表面受容体へのリガンドの結合とその後の情報伝達過程の同時イメージング等へ応用する。

### 3. 研究の方法

以下の 4 つの項目について研究を行った。

(1) Cytop 層挿入 SPR センサチップの作製及びその SPR 特性の評価 : Winspall によるシミュレーションでは Cytop を用いることで良好な結果が得られることが予測されているので、

フッ素樹脂の Cytop を S P R センサの基板 (SF6) 上にスピコーティングし、その上に金薄膜を蒸着した。グルコース溶液を屈折率の標準液として用いて S P R 曲線を測定し、Cytop の最適膜厚を決定した。また作製した S P R センサ基板の安定性、感度等について評価した。

(2) 金薄膜による短波長 S P R 測定の実現 : Cytop 層挿入 S P R センサチップを用いることで、これまで不可能であった金薄膜を用いた波長 490~600nm の光源を用いた S P R 測定が可能か検証した。研究代表者が所有している 405~770nm の範囲にある 8 種類の LED 光源を用いて S P R 曲線を描き、屈折率変化に対する感度の測定、S P R 画像の鮮明さの評価を行った。

(3) 表面プラズモンハイブリッドイメージングの実現 : 作製した Cytop 層挿入 S P R センサチップを用いて S P R と S P E F の同時測定及び両画像のハイブリッド化を行った。試料には基板上の蛍光色素膜及び蛍光微粒子を用いた。S P E F 測定には既設の CCD カメラでは感度が不十分なので、より高感度な電子増倍機能を持った冷却 CCD カメラを 31 年度に導入した。

(4) 表面プラズモンハイブリッドイメージングの応用 : S P R イメージングで応答測定が実際に報告されている系に、これを応用した。細胞表面受容体へのリガンドの結合及び P K C 局在化の検出を試みた。モデル肥満細胞として RBL-2H3 細胞を用いて、蛍光標識したアレルギー分子の細胞への結合を S P E F 画像で、それに伴う P K C 活性化過程による細胞 S P R 画像の変化を同時測定し、両画像を合成しようと考えた。

#### 4. 研究成果

##### (1) Cytop 層挿入 S P R センサチップの作製及び金薄膜による短波長 S P R 測定の実現

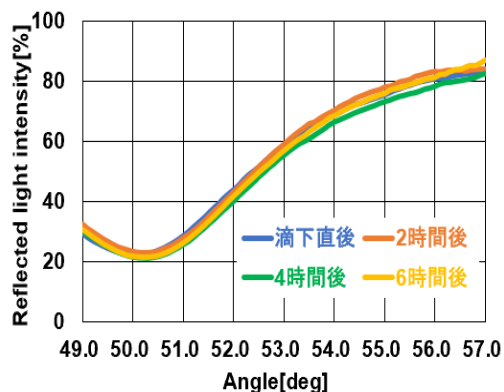
水と屈折率がほぼ等しいフッ素樹脂 Cytop®層を挿入した金薄膜 S P R センサチップを作製することで、従来金薄膜では不可能であった 500nm 以下の光源を用いた S P R 測定を実現することを目的とした。まず Cytop 層を作製するに当たり、層の形成に用いる Cytop の濃度 (原液 9%) を検討した。その結果 Cytop 濃度が高いほど、S P R 曲線が鋭くなり、より高感度に S P R 測定できることがわかった。8%以上では Cytop の粘性が高くなり膜の形成が困難だったことから 7%を最適値とした。しかし、濃度が高くなると S P R 角は低角度側にシフトし、S P R 測定が困難となることが分かった。そこで金薄膜の膜厚を最適化することで S P R 角を測定しやすい角度にした。金膜厚が厚いほど S P R 角は 高角度側にシフトすることが確認でき、Cytop 濃度 7% のとき、最適な金膜厚は 40nm であった。さらにセンサチップの安定性向上のために金薄膜と Cytop 層の間にチタン層を 2nm 挿入した。これらの条件で作製することで、これまでに例のない 490nm という短い波長の光源でシャープな S P R 曲線が得られる新しい S P R センサ チップの開発に成功した。

##### (2) Cytop 挿入 S P R センサ金薄膜センサチップの安定化

Cytop 挿入 S P R 金薄膜センサチップを作製し、それを用いることで金薄膜では例のない波長 490nm の光源で S P R 測定が可能となった。しかし作製した センサチップは水溶液中では不安定で数時間の測定で金薄膜の剥離が見られるという問題点があった。そこで細胞応答解析に応用できるように水溶液中でも長時間安定な Cytop 挿入 S P R 金薄膜センサチップの作製法を検討した。まず Cytop 層は水溶液中でも長時間安定であることが確認できた。金薄膜の膜厚を検討したところ若干の安定化は見られたものの大きな改善は見られなかった。そこでイオンスパッタリングで形成した金薄膜を除去し Cytop 表面を観察したところ平滑さが失われていることが分かった。これはイオンスパッタリング処理による発熱により Cytop 層の一部が溶解したためと考えられた。そこで発熱を伴わない真空蒸着により金薄膜を形成した。その結果、数時間水溶

液と接していても膜のはく離や、SPR特性の変化は全く見られなかった（図1）。そこでこれ以降、Cytop 挿入 SPR 金薄膜チップの金薄膜は真空蒸着で形成することにした。

図1 Cytop 挿入金薄膜チップを用いて490nm光源で得られたHBSS緩衝液のSPR曲線（緩衝液浸漬時間の影響）



### (3) 表面プラズモンハイブリッドイメージングの実現に向けたSPEF画像の高感度化

SPEF（表面プラズモン増強蛍光）画像の取得のために、本補助金経費で冷却 CCD カメラを導入し、冷却によりノイズを低減するとともに、複数画素を1画素とみなすビニング処理の採用により信号増幅を図り、従来と比べて、より高感度で鮮明な蛍光画像が取得できるようになった。

またこれまで用いてきた Cytop 挿入 SPR 金薄膜チップは、490nm の光源で SPR 測定が可能となったものの、SPR 角が装置の測定限界である 49 度に近く、全反射せずに金属薄膜のピンホールなどから透過してくる光の影響が見られ、それに隠されて SPEF 蛍光が明確に観察できないという問題が残った。そこでまず Cytop 層及び金薄膜の膜厚等を検討し、SPR 角を高角度側にシフトさせる条件を検討した。しかし SPR 角の高角度側へのシフトと十分な SPR 吸収を両立できる膜厚条件は作製可能な範囲では見いだせなかった。そこで銀薄膜層の採用が不可欠と考えられた。Cytop の上に銀薄膜を形成し、その上に水溶液中での安定性を保つため、保護膜として薄い金薄膜を形成した新たな SPR センサチップを開発した。このセンサチップについて各層の膜厚を最適化したところ、SPR 角を 50.6 度までにシフトさせることができ、これまで低角度側で見られた金属膜を透過した光の影響を完全に除去でき、さらに強い SPEF も見られた（図2）。このセンサチップにより明確な SPEF 画像が得られるようになった。

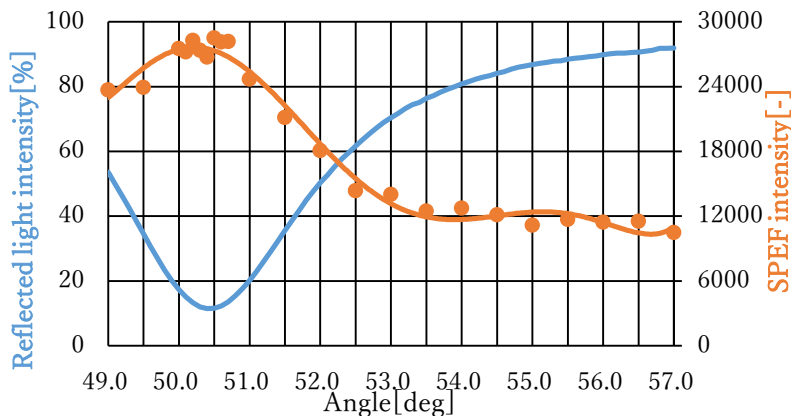
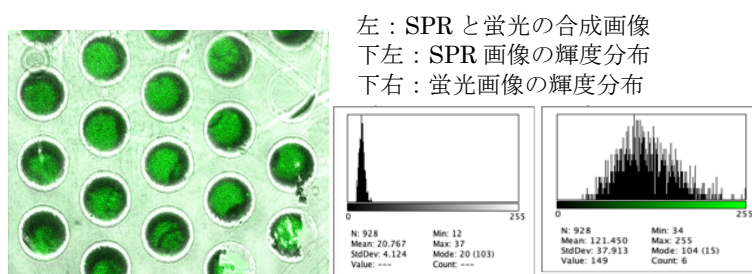


図2 金/銀/Cytop 積層センサチップで得られた FITC 標識アルブミン膜の SPR 曲線と SPEF 強度の関係（光源波長：490nm）

#### (4) SPR 画像と SPEF 画像のハイブリッド化のためのプログラムの作成

2次元 SPR 画像は斜め下方向から撮影するため得られる画像は上下方向に圧縮されている上に、焦点距離から少しずれている、画像上方と下方ではぼやけて見えるので被写体の大きさも不正確であった。真上方向から撮影し、このような変形が見られない SPEF 画像と重ねてハイブリッドイメージング化するには SPR 画像の補正が必須である。画像処理ソフト Image J に、マクロによるプログラムも加えて、SPR 画像の補正処理、さらには SPEF 画像との重ね合わせのための処理プログラムを作成した。その結果、形状や画像サイズの異なる 2 つの画像の重ね合わせを実現し、SPR 画像を SPEF 画像に合わせる場合、SPEF 画像を SPR 画像に合わせる場合のいずれも自動的に行えるようにした。また両画像において同じ位置の輝度分布を求めることも可能となり本研究の目的である SPR 画像と SPEF 画像のハイブリッド化を実現することができた (図 3)。

図 3 SPR 画像と蛍光画像のハイブリッド化と輝度分布の算出例



#### (5) 表面プラズモンハイブリッドイメージングの応用

開発したハイブリッドイメージング法を、SPR イメージングで応答測定が実際に報告されている細胞表面受容体へのリガンドの結合及び PKC 局在化の検出に適用しようと考えた。モデル肥満細胞として、すでに研究代表者が取り扱い経験のある実験系である RBL-2H3 細胞を用いて、蛍光標識したアレルゲン分子の細胞への結合を SPEF 画像で測定し、それに伴う PKC 活性化過程による細胞 SPR 画像の変化を同時に測定し、両画像を合成しようと考えた。

まず開発した SPR センサチップ上で RBL-2H3 細胞を培養し、生細胞のみが染色される CalceinAM を用いて染色したのち、SPEF 画像で観察した。

しかし金薄膜上への細胞の付着が見られなかった。アルブミンやポリ L-リジン等の金薄膜への吸着処理を行ったが効果は見られなかった。そこで Dithiobis(succinimidyl hexanonate) を金薄膜に結合させ、それにポリ L-リジンのアミノ基を結合させた。その結果、専用培養フラスコには及ばないものの細胞の付着が見られるようになった。

そこで Calcein AM で蛍光染色した RBL-2H3 細胞の SPEF 画像を観察した。しかしビニング 16 × 16 で行っても明確な蛍光画像は観察できなかった。LED 光源で励起した場合は明瞭な蛍光画像が見られたので SPEF 観察条件の最適化が必要と考えられた。

このように培養細胞を用いた SPR、SPEF ハイブリッドイメージングについては、本助成事業の研究期間中に充分実施できなかったため、今後も引き続き行っていく予定である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Md.Abul Kashem, Kazuki Kimoto, Yasunori Iribe and Masayasu Suzuki	4. 巻 9
2. 論文標題 Development of Microalgae Biosensor Chip by Incorporating Microarray Oxygen Sensor for Pesticides Sensing	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Biosensors	6. 最初と最後の頁 133(1-11)
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/bios9040133	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yasunori Iribe, Atsuya Yamamoto, Masayasu Suzuki
2. 発表標題 SPR Imaging at Shorter Wavelengths by Using Cytop Inserted Sensor Chips
3. 学会等名 17th International Meeting on Chemical Sensors (Vienna) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masayasu Suzuki, Daisuke Shimizu, Yuto Horiuchi, Yasunori Iribe
2. 発表標題 Smartphone-based Oxygen Imaging Sensor and Application to BOD sensor
3. 学会等名 17th International Meeting on Chemical Sensors (Vienna) (国際学会)
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 鈴木正康（分担執筆）（三林浩二・監修）	4. 発行年 2020年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 304(うち8)
3. 書名 酵素トランスデューサーと酵素技術展開	

1. 著者名 鈴木正康（分担執筆）（富永昌人・監修）	4. 発行年 2022年
2. 出版社 シーエムシー出版	5. 総ページ数 412(うち8)
3. 書名 近未来のデジタルヘルスを支える酵素バイオ技術	

〔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
---------	---------