

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 6 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26600117

研究課題名(和文)1分子デジタルSERS計数法の開発

研究課題名(英文)Development of digital counting method using SERS

研究代表者

安藤 潤(Ando, Jun)

大阪大学・工学研究科・特任研究員(常勤)

研究者番号：40623369

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：表面増強ラマン散乱分光法は、金属ナノ構造をプローブに用い、金属表面近傍に存在する分子からのラマン散乱光を増大させる。検体を無標識で識別し、分子の構造や周辺環境の分析を行うことができる上、ラマン分光法の課題である感度の低さを補うことができるため、様々な研究分野において、極めて重要な計測法になると期待されている。しかしながら、信号の増幅度を精密に制御することが難しく、広範な応用が困難であった。本研究では、信号強度に代えて、計数法を用いてSERSの定量を行う手法について開発を行い、SERSの課題である低濃度域での検出感度や定量性を向上できる技術を目指して研究開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Surface-enhanced Raman scattering spectroscopy uses metallic nanostructures, which amplifies Raman scattering signal from the molecule existing near the metal surface. Since it can identify molecular species of the sample at high sensitivity, and further provides information of the molecular structure and surrounding environment, it is expected to be a promising analytical method for various research fields. However, the range of its application has been limited, since the precise control of the degree of signal amplification is often challenging. In this research, digital counting was considered to use for the measure of the quantification of SERS signal, instead of the SERS signal intensity. By using it, improvement of the sensitivity of SERS measurement and quantitative analytical capability was examined.

研究分野：バイオフォトニクス

キーワード：表面増強ラマン散乱 ラマン分光法

## 1. 研究開始当初の背景

ラマン散乱分光法は、分子の振動情報を光で直接捉える振動分光法である。入射光と分子の相互作用により発生した散乱光の波長変化から、検体に含まれる分子結合情報をスペクトルとして取得することができる。得られた散乱スペクトルに見られるピーク位置、形状から、検体に含まれる分子種を同定することができる。さらに、ラマンピークの幅やシフト量、複数のラマンピークの強度比などから、検体分子の構造変化や、周辺の温度、pHや酸化・還元状態などの周辺環境の情報を取得することもできる。分子を蛍光団などの標識で修飾することなく、検体中の分子を無標識で識別し、さらに分子の構造や周辺環境情報をも取得できることから、ラマン分光法はマテリアルサイエンスの研究領域で広く用いられてきた。さらにこのラマン分光法は、ラマン散乱の励起に用いる入射光と、分子から発生する散乱光を、共に可視域の光を用いて計測する事ができる。可視光は、水に対して光吸収が少ないことから、ラマン分光法を用いれば、水中に存在する分子の振動情報を取得する事が出来る。赤外分光法も、ラマン分光法と同様に光を用いて分子種の識別・同定を行うことができるが、計測に用いる光が赤外光となるため、水の吸収の影響が大きく、水中の分子の計測が困難である。生体試料に含まれる生体分子は、その多くが水中で機能している。ラマン分光法を用いれば、水中で機能する分子を計測し、無標識で分子種を同定することができる。さらに分子の構造変化や周辺環境などの情報を取得し、分子の動きをありのままに捉えることができる。このため、ラマン分光法は、医学・生物学や薬学など、広くライフサイエンス分野に貢献する分析手法となることが期待されている。

ラマン分光法をライフサイエンス分野など、より広範囲の研究分野に応用するために大きな課題となるのが、検出感度の低さである。散乱の効率を示すラマン散乱の散乱断面積は  $10^{-30}$   $\text{cm}^2$  程度である。広く応用されている蛍光分子の吸収断面積が  $10^{-16}$   $\text{cm}^2$  程度であることと比較すると、ラマン散乱が非常に低感度な計測法であることが分かる。微弱な信号光を捉えるため、1回のスペクトルの取得にも、数秒以上の計測時間が必要となることが多い。また、高い励起光強度を用いても、その検出下限はミリメートルからサブミリメートル程度であるため、計測対象は、溶液中に高濃度の検体分子が存在する場合に限られてきた。このラマン散乱分光法の計測感度を向上させる方法として、表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman scattering, SERS) 分光法が開発されてきた。SERSは、検体分子のラマン計測に金属ナノ構造を用いる。波長より十分に小さい微細構造を有する金属ナノ構造に光が入射すると、光と金属中の自由電子の相互作用によって、金属の表面近傍に、局在化した増強電場が形成される。

この金属表面に検体分子が存在すると、電場増強効果によって、分子から発生するラマン散乱光が増大する。さらに、分子から発生したラマン散乱光が金属ナノ構造によって再び増幅される事によって、信号光のさらなる増幅効果を得る事ができる。電場の増強効果に加えて、検体分子と金属の化学的な相互作用による増幅メカニズムも存在する。特に、金属と化学結合を形成する分子構造や、金属表面に吸着する構造を有する分子で顕著にその効果を得ることができる。その極めて高い増強効果によって、計測感度が大幅に向上され、1分子検出が実現された事例も報告されている (S. Nie *et al.*, Science Vol. 275, pp.1102, 1997, K. Kneipp *et al.*, Phys. Rev. Lett., Vol. 78, pp. 1667, 1997)。計測対象も、色素等の金属表面への吸着効果が高い分子に加えて、ヘモグロビンやアデニンなど生体分子の計測も報告されており、そのライフサイエンス分野への応用が期待されてきた。

## 2. 研究の目的

金属ナノ構造を用いた SERS 計測法は、ラマン分光法の計測感度の低さを補うことのできる極めて有望な検出手法である。数桁から十数桁の増幅効果が報告されており、信号増幅による検出下限の低減に加えて、感度向上に伴う計測時間の短縮、用いる励起光強度の低減による試料分子に対する光損傷の可能性の低減など、様々な利点を有する。こうした大きな利点を有しながら、これまで SERS を用いたラマン分光法の応用、中でもライフサイエンス分野における応用範囲は限定的であった。SERS の広範な応用を妨げる要因となるのが、信号増幅効果の安定性と再現性を高く保つことが難しい点にある。SERS の信号増幅効率は、金属ナノ構造の微細な形状の違いによっても大きく変化する。複数の金属ナノ構造が近接したナノスケールの間隙や、金属がナノスケールで先鋭化した先端部など、金属ナノ構造全体で均一ではなく、ホットスポットと呼ばれる限られた領域で高い増幅度を示すことが知られている。さらにその増幅度は、金属ナノ構造のナノメートルオーダーでの近接距離に依存して、鋭敏に変化することも報告されている。SERS による増幅度を安定して取得するには、上記の金属ナノ構造体を広範囲に渡って高い精度で再現性高く均一に作成することが重要である。しかしながら、金属のナノ構造体をナノスケールの精度で広範に形成することは容易ではない。さらに、分子と金属ナノ構造の相互作用が増幅度に大きく影響するため、分子の吸着状態が信号の増幅度に寄与する可能性もある。こうした状況のため、SERS で得られる信号光強度を頼りに、計測の安定性と再現性を保ち、高感度化を図ることは容易ではなかった。上記の状況を鑑み、申請者は、SERS を安定に、かつ高感度に計測する手法の開発を

目的に研究を行った。

### 3. 研究の方法

SERS 計測において散乱強度による評価法に代えて、数を計量する計数法を用いて、SERS の感度を向上する手法の開発を目指して研究を行った。従来の SERS 計測では、ラマン分光計測装置やラマン顕微鏡を用いて、試料から発生するラマン散乱スペクトルを取得する。得られたスペクトルの内、特定の分子振動モードに帰属されるピークの高さから、溶液に含まれる検体分子を定量する。本研究では、標準試料と金属ナノ構造を含む試料に対して、散乱分光イメージングを行った。さらに、得られた画像における、特定の分子振動モードの散乱強度を元に画像を構築する。構築した画像を解析し、検体の濃度を変えながら各濃度で取得した画像のうち、得られたホットスポットの数を計上する。従来、画像全体の強度の平均値など、散乱強度で評価していた縦軸を、ホットスポットの数に置き換えて計測を行う。レーザーのスポット内に存在する分子数が極めて少ない、低濃度の条件下でラマン計測を行い、散乱強度を元にした従来法と計数法において、検出感度に差があるかを検証する。

上記に加え、より高精度で計数法を行う基盤技術の開発のため、マイクロスケールの微小なチャンバーアレイの作成方法を検討した。作成方法として、電子線描画装置を用いたマイクロパターニング法を選定した。この方法を用い、ガラス基板上に作成したレジストにマイクロスケールのパターンを形成し、これをアレイ状に配列することでチャンバーアレイを作成する。ホットスポットの得られる場所を予め限定し、画面内におけるホットスポットの数を毎回一定にする。さらに、チャンバーのサイズを微小化することにより、一度のイメージングで取得出来るホットスポットの数を増加させる。

SERS イメージングを行うため、スリット走査型のラマン顕微鏡を用いた (A. Palonpon *et al.*, Nat. Protoc. Vol. 8, pp. 677, 2013, J. Ando *et al.*, Curr. Opin. Chem. Biol., Vol. 33, pp. 16, 2016)。レーザー光をシリンドリカルレンズによってライン状に成形し、対物レンズを用いて試料上にライン状に集光する。発生したラマン散乱を同一の対物レンズで集め、イメージング分光器のスリット上に結像する。発生したラマン散乱光を冷却 CCD カメラで、数百個のスペクトルを平行に検出する。ライン状の照明光を、ガルバノメータミラーを用いて走査する事により、2次元的なラマン像を取得する。SERS 計測を行う金属ナノ構造には、金、及び銀のナノ粒子を用いた。

### 4. 研究成果

SERS において、計数法を用いた計測を行うため、銀ナノ粒子を用いて生体分子の SERS 測

定を行った。標準試料として、アルキン標識したペプチドを用いた。アルキンは、炭素-炭素三重結合を有し、ラマンピークが、生体試料が通常ラマン散乱光を示さない  $1800\text{-}2600\text{cm}^{-1}$  付近のサイレント領域と呼ばれる波数域に現れる (Yamakoshi *et al.*, J. Am. Chem. Soc., Vol. 133, pp. 6102, 2011)。このため、背景光を抑えて選択的に目的の分子を検出する事が出来る。10 アミノ酸の連結したペプチドの1つに、末端アルキンを有する非天然のプロパルギルグリシンを導入した。上記の試料を、直径 40nm の銀ナノ粒子と混合してラマン計測を行った。様々な条件検討を行ったところ、トリフルオロ酢酸 (TFA) を混合する事で、銀ナノ粒子が安定してガラス基板上に凝集体を形成することを見いだした。凝集体からは、ペプチドに含まれるアルキン標識由来の増幅されたラマン散乱光を得ることができる。TFA を添加し、ガラス基板上に安定して凝集体を形成させたのち、励起光 532nm のレーザー光を照明光として、ラマン計測を行った。1 ラインあたり 1 秒露光し、25 回走査してイメージングを行った。ライン方向のピクセル数は 240 とした。倍率 40 倍、開口数 0.75 の対物レンズを用い、対物レンズ後のレーザー光強度を 240mW として測定を行った。アルキン標識ペプチドの濃度を、30 ピコモラーから 300 ナノモラーまで変化させて、各濃度でイメージングを行った。計測後、アルキンに由来する  $1957\text{ cm}^{-1}$  の SERS ピークの強度とピークボトムの強度の差をとり、SERS ピークの強度を元に画像を構築した。300 ナノモラーの高濃度域では、基板上に存在するほぼ全ての凝集体から高い SERS 光強度が得られていることが確認できた。取得した画像を元に、平均の SERS 光強度をプロットした場合、その検出下限は約 3 ナノモラー程度であった。一方、各画像に見られるホットスポットの数を計量した場合、0.3 ナノモラー程度まで、濃度に応じてホットスポットの数が変化している様子が観察された。上記の検討結果から、計数法によって、SERS の検出下限を低減できる可能性が示唆された。

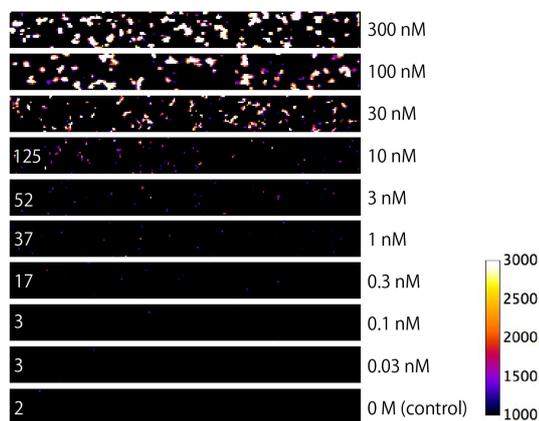


図 1 濃度を変化させながら測定した標識ペプチドの SERS 像。左側の数字は、画像内でホットスポットの見られたピクセル数の

計数値を示す。

計数法によってより高精度に SERS 計測の定量性と感度を向上するには、金属ナノ構造を精密に配列したチャンバーアレイの作成が重要となる。そこで、電子線描画装置を用いてガラス基板上にマイクロスケールの微小チャンバーアレイの作成を試みた。ガラス基板上に電子線レジストとして ZEP520A を塗布した。成膜にはスピコートを用い、カバーガラス上面に膜を形成した。スピコートの回転数を 6000rpm、回転時間を 2 分とした。180° でベークを行った後、試料のチャージアップ防止剤をスピコーターで塗布し、110° でベークを行った。得られた基板を電子線描画装置のカセットに設置し、電子線描画を行った。電子線の露光パターンは、1 つの区画を 2.5×2.5 μm、及び 0.5×0.5 μm の正方形とした。区画間のピッチを 10.0 μm、及び 12.5 μm とし、500×500 μm の区画に 40×40 個の計 1600 個のマイクロパターンをアレイ上に形成するデザインとした。電子線露光後に現像液の ZED-N50、リンス液の ZMD-D を用いて現像を行った。現像後、暗視野顕微鏡で観察した結果を図 2 に示す。ガラス基板上に、アレイ状に、均一なマイクロパターンが 2 次的に配列されていることが確認できる。

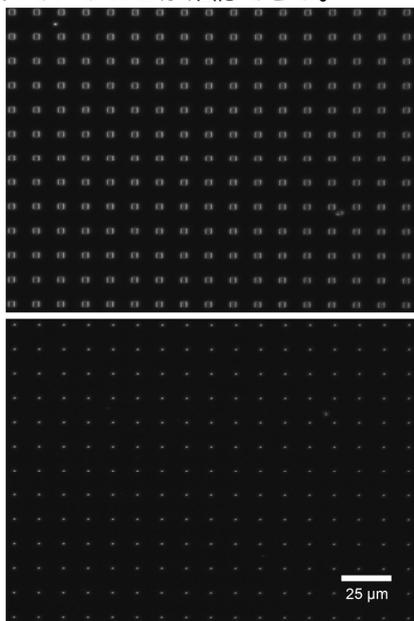


図 2 電子線描画装置で形成したマイクロチャンバーアレイの暗視野像 (上: 2.5×2.5 μm, 下: 0.5×0.5 μm)

次に、マイクロパターンを形成した基板の上に、SERS 計測に用いる金属ナノ粒子を配列・制御する手法を検討した。種々検討した結果、現像後に露出するガラス基板表面に効率よく金属ナノ粒子を結合させるため、表面をアミノシランでコーティングした表面修飾ガラス基板の利用を試みた。アミノシランでコーティングしたガラス基板は、正に帯電したアミノ基の性質により、負に帯電した金属コ

ロイドを効率的にガラス基板上に吸着させることができる。上記と同様の手順で、表面修飾されたガラス基板上に電子線レジストを成膜し、電子線描画装置による露光、及び現像を行った。現像後、レジストが剥離されたパターン上のみ、アミノ基を有するガラス表面が露出することになる。実際に、作成した機能化表面を有する 2.5×2.5 μm 区画のパターニングを行ったガラス基板上に、SERS 計測に用いる金ナノ粒子の溶液を滴下した。ナノ粒子を含む溶液に浸漬させた後、超純水で洗浄し、余剰な金ナノ粒子を排除した。パターニングした基板の任意の位置に金属ナノ粒子が配列できているかを確認するため、洗浄後に乾燥させた基板に対して、スリット走査分光顕微鏡を用いたフォトルミネッセンスイメージングを行った。金ナノ粒子は、530nm 付近の励起光を照射すると、特徴的なフォトルミネッセンスが得られる。波長 532nm のライン状に成形したレーザ光を 1 次的に走査し、各ライン毎に分光スペクトルを取得した。得られた分光スペクトルの 550-600nm の発光強度の平均値を元に、2 次元画像を構築したところ、マイクロパターンに沿って、2 次的に配列された発光パターンを確認できた。金属ナノ構造を配列制御した基板を用いて、表面増強ラマン散乱計測を行った。励起波長 683nm の近赤外レーザー光を励起光に用い、スリット走査型のラマン散乱顕微鏡を用いて計測を行った。SERS 計測の標準試料として、ローダミン 6G を用いた。ローダミン 6G 溶液を基板の上に滴下し、露光時間 50 ms、120 回の走査数で計測を行った。ローダミン 6G に特徴的に見られる 1511cm<sup>-1</sup> のラマンピークの強度で画像を構築し、ラマンピークの見られない 1849cm<sup>-1</sup> のラマン強度の強度分布との差分をとった画像を図 3 に示す。基板上に形成したマイクロチャンバーに沿って、目的分子由来の SERS 信号を空間的に制御して取得出来ることが確認できた。

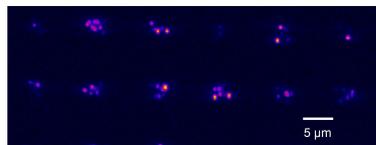


図 3 マイクロチャンバーアレイに配列した金ナノ粒子を用いたローダミン 6G 溶液の SERS 像

#### 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 5 件)

Jun Ando, Miwako Asanuma, Kosuke Dodo, Hiroyuki Yamakoshi, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Mikiko Sodeoka, Alkyne-tag SERS screening and

identification of small-molecule-binding sites in protein, Journal of the American Chemical Society, Vol. 138, pp. 13901-13910, 2016.

DOI: 10.1021/jacs.6b06003

Jun Ando, Takumasa Sekiya, Hiroyuki Yamakoshi, Den Ka, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles, Proc. of SPIE, Vol. 10046, p. 10046-1, 2017.

DOI: 10.1117/12.2256126

Jun Ando, Almar F Palonpon, Mikiko Sodeoka, Katsumasa Fujita, High-speed Raman imaging of cellular processes, Current Opinion in Chemical Biology, Vol. 33, pp. 16-24, 2016.

DOI: 10.1016/j.cbpa.2016.04.005

Jun Ando, Almar F. Palonpon, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Satoshi Kawata, Mikiko Sodeoka, Katsumasa Fujita, Alkyne-tag Raman imaging of bio-active small molecules in live cells, Proc. SPIE Biophotonics Japan 2015, Vol. 9792, p. 979207, 2015.

DOI: 10.1117/12.2207554

Jun Ando, Almar F. Palonpon, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Raman spectroscopic detection of bio-active small molecules using alkyne tag, CPMT Symposium Japan 2015 IEEE, 2015.

DOI: 10.1109/ICSJ.2015.7357369

〔学会発表〕(計 17 件)

安藤潤, 藤田克昌、ラマン散乱を利用した細胞分子イメージング、第 24 回分子複合医薬研究会(招待講演)

2016 年 07 月 29 日~2016 年 07 月 29 日、産業技術総合研究所, 大阪

安藤潤、ラマン散乱を用いた細胞分析イメージング、京都バイオ計測センターシンポジウム、食・ヘルスケアから未病診断への新しいバイオ計測(招待講演)、2016 年 08 月 02 日~ 2016 年 08 月 02 日、京都バイオ計測センター, 京都

J. Ando, K. Bando, K. Mochizuki, K. Dodo, H. Yamakoshi, K. Fujita, M. Sodeoka, S. Kawata, Rapid SERS imaging of biomolecules using slit-scanning Raman microscopy, NFO-14: The 14th International Conference of Near-Field Optics,

Nanophotonics and Related Techniques (国際学会)、2016 年 09 月 06 日~2016 年 09 月 06 日、Shizuoka, Japan

安藤潤, 藤田克昌、ラマン散乱を用いた生体イメージング、2016 年 電子情報通信学会ソサイエティ大会(招待講演)、2016 年 09 月 21 日~2016 年 09 月 21 日、北海道大学, 札幌市

Jun Ando, Takumasa Sekiya, Den Ka, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, SERS imaging of alkyne-tagged small molecule in cells with gold nanoparticles, Optics & Photonics Japan 2016、2016 年 10 月 30 日~2016 年 10 月 31 日、筑波大学, 東京

安藤潤, 藤田克昌、ラマン散乱による細胞分析イメージング、第 36 回ポリマー光部品(POC)研究会(招待講演)、2016 年 11 月 30 日~2016 年 11 月 30 日、産業技術総合研究所, 大阪

Jun Ando, Takumasa Sekiya, Hiroyuki Yamakoshi, Den Ka, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Surface-enhanced Raman scattering (SERS) imaging of alkyne-tagged small molecule drug in live cells with endocytosed gold nanoparticles, SPIE Photonics west BIOS 2017(国際学会)、2017 年 01 月 28 日~2017 年 02 月 02 日、San Francisco, USA

安藤潤, 関谷 拓正, Ka Den, 山越 博幸, どの孝介, 袖岡 幹子, 河田 聡, 藤田克昌、生細胞に投与した薬剤のアルキン標識・増強ラマンイメージング、第 64 回応用物理学会春季学術講演会、2017 年 03 月 17 日~2017 年 03 月 17 日、パシフィコ横浜, 神奈川

安藤潤、アルキン標識を用いた小分子のバイオラマンイメージング、第 53 回日本生物物理学会年会(招待講演)、2015 年 09 月 13 日~2015 年 09 月 15 日、金沢大学, 石川

Jun Ando, Almar F. Palonpon, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Satoshi Kawata, Mikiko Sodeoka, Katsumasa Fujita, Alkyne-tag Raman imaging of bio-active small molecules in live cells, SPIE/ OSJ Biophotonics Japan(国際学会)、2015 年 10 月 27 日~2015 年 10 月 28 日、Tokyo, Japan

Jun Ando, Kazuki Bando, Kentaro Mochizuki, Nicholas I. Smith, Katsumasa Fujita, Satoshi Kawata, 3D SERS imaging of intracellular pathways with endocytosed

gold nanoparticles、5th International Conference on Tip-enhanced Raman Spectroscopy (国際学会)、2015年10月29日～2015年10月30日、Osaka, Japan

Jun Ando, Almar F. Palonpon, Satoshi Kawata, Katsumasa Fujita, Hiroyuki Yamakoshi, Kosuke Dodo, Mikiko Sodeoka  
Raman spectroscopic detection of bioactive small molecules using alkyne-tag  
IEEE CPMT Symposium Japan 2015(国際学会)  
2015年11月09日～2015年11月11日  
Kyoto, Japan

他 5 件

〔図書〕(計 3 件)

安藤潤, どの孝介, 藤田克昌, 袖岡幹子,  
バイオインダストリー協会 (バイオサイエ  
ンスとインダストリー Vol. 73)、アルキン標  
識ラマンイメージング: 生体内の低分子化  
合物を見る、Vol. 9, no.2, pp. 3-11, 2015  
年

安藤潤, 袖岡幹子, 藤田克昌、日本分子  
イメージング学会 機関誌、Vol.9, No.2, pp.  
3-11、ラマン散乱を利用した細胞分子イメ  
ージング、2016年

安藤潤, 藤田克昌、日本工業出版(株)、  
光アライアンス 2017年6月号, pp. 52-57,  
ラマン分光顕微鏡とライフサイエンス応用、  
2017年

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/junando1ja/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安藤 潤(ANDO, Jun)

大阪大学・大学院工学研究科・特任研究員

研究者番号: 40623369