

ナノ薄膜干渉基板を用いた マルチカラー蛍光増強イメージング技術の開発

所属：関西学院大学 理工学部

助成対象者：安田 充

概要

細胞の多色同時観察が可能なマルチカラー蛍光イメージングは、生命現象の理解を加速させる優れた技術として広く利用されている。しかし、細胞のイメージングでは暗くて蛍光を観察できない問題が頻繁に生じる。この問題を解決するため、Ag 基板の上に Al_2O_3 超薄膜を形成したナノ薄膜干渉基板に着目した。ナノ薄膜干渉基板では光学干渉により、一般的なガラス基板と比較し、蛍光物質からの蛍光を 100 倍以上増強できる。この高い蛍光増強効果を細胞のイメージングに適用すれば、これまで蛍光が見えなかった問題を解決できる。そこで本研究では、ナノ薄膜干渉基板を用いたマルチカラー蛍光増強イメージング技術の開発を目的とした。

abstract

Multicolor fluorescence imaging that allows for simultaneous multicolor observation of a cell, has been widely used as an excellent technique to accelerate the development of life science. However, the problem of the difficulty in observing the fluorescence frequently occurs due to extremely weak fluorescence in cell imaging. In order to resolve this problem, an optical interference mirror slide was focused, which consists of an Al_2O_3 thin-film on an Ag mirror. The optical interference mirror slide

can enhance the fluorescence from a fluorophore by more than 100 times by optical interference effect as compared with a common glass slide. By applying this fluorescence enhancement to cell imaging, the problem of the difficulty in observing the fluorescence can be resolved. The purpose of this study was to develop a novel multicolor enhanced-fluorescence imaging technology using the optical interference mirror slide.

研究内容

「背景・目的」

複数種の蛍光色素で標識した細胞の多色同時観察が可能なマルチカラー蛍光イメージングは、生命現象の理解を加速させる革新的な技術として広く利用されている。しかし、細胞のイメージングでは暗くて蛍光を観察できない問題が頻繁に生じる。この問題を解決するため、金属ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴をはじめとする多様な蛍光増強技術が開発されてきたが、それらの多くは異なる色の蛍光を同時に増強することが困難であった。

一方、申請者は別の蛍光増強技術として、これまで Ag 基板上的 Al₂O₃ 超薄膜からなるナノ薄膜干渉基板を用いた研究を展開してきた。ナノ薄膜干渉基板では蛍光を 100 倍以上明るく観察できる [1]。ここでの蛍光増強は主に Al₂O₃ ナノ薄膜により励起光の光学干渉と蛍光の光学干渉の二重の効果によって起きる [2]。この光学干渉を巧みに利用することで、モデルタンパク質 Avidin/Streptavidin の検出 [3]、サルモネラ菌遺伝子の DNA マイクロアレイ、肝臓癌に関連する腫瘍マーカー α -Fetoprotein のイムノアッセイ（未発表）において 50 倍以上の蛍光増強、蛍光タンパク質 GFP を発現する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、Avidin/Streptavidin の検出では標識した異なる色の蛍光を発する 3 種類の蛍光色素すべてに対して蛍光を 50 倍以上増強することに成功した。

これらの成果は、(1) 暗くて蛍光が観察できなかった問題を解決に導く、(2) 多色蛍光が同時に明るく観察できるようになる、(3) より短い露光時間での蛍光観察が可能となる、ことから、刻一刻と多様な分子が共同的に作用・変化する細胞内の生命活動を高速・高感度かつ多色蛍光で追跡できるようになり、ライフサイエンスのさらなる発展に貢献することが多いに期待される。そこで、本研究ではナノ薄膜干渉基板を用いたマルチカラー蛍光増強イメージング技術の開発を目的とした。

「実験方法」

1) 使用した蛍光物質

蛍光物質として、半導体ナノ結晶である量子ドットを使用した。量子ドットは可視域において広い光吸収帯域をもち、観察される蛍光の波長は量子ドットの粒径に依存する。これらの特性により、紫外光を照射するだけで多色の蛍光を同時に観察できることから、近年、細胞のマルチカラー蛍光イメージングに応用されている。そこで本研究では市販されている CdSeS/ZnS コア・シェル型量子ドットを 7 種類使用した。それぞれのピーク蛍光波長は 520, 540, 560, 580, 600, 630, 665 nm であった。

2) ナノ薄膜干渉基板の作製

スパッタリング装置を用いてガラス基板上に Cr (10 nm), Ag (500 nm), Al₂O₃ (0-420 nm) を成膜することで Al₂O₃ 膜厚の異なる 20 種類以上のナノ薄膜干渉基板を作製した。Cr はガラスと Ag の接着層である。Cr と Ag の膜厚を触針型表面形状解析装置で、Al₂O₃ の膜厚をエリプソメータで決定した。

3) 反射した励起光の検出

ナノ薄膜干渉基板での蛍光増強メカニズムを、基板上で反射した励起光の観点から調べるため、モノクロ CCD カメラおよび 2x 対物レンズを搭載した正立型蛍光顕微鏡から蛍光フィルタを取り外した。この光学系を用いてナノ薄膜干渉基板に紫外から可視域まで（藍、青、緑、赤色）の 4 種類の波長の励起光を、それぞれダイクロイックミラーを介して基板の真上から入射し、基板表面で反射した励起光を基板の真上で検出した。励起光の中心波長は藍色が 432 nm, 青色が 475 nm, 緑色が 535 nm, 赤色が 628 nm であった。得られたデータおよび光学干渉理論の結果から蛍光増強メカニズムについて考察した。

4) 蛍光の検出

量子ドットを純水で 10 μg/mL に希釈し、ナノ薄膜干渉基板上に 1 μL スポットして乾燥させた。量子ドットからの蛍光を、蛍光フィルタとモノクロ CCD カメラを取り付けた蛍光顕微鏡で検出した。対物レンズは 2x, 励起光は藍色であった。同じ実験を比較用ガラス基板で行った。つぎに、モノクロ CCD カメラをカラー CCD カメラと取り替え、量子ドットの 7 色同時蛍光観察を行うことで、マルチカラー蛍光増強イメージングを実証した。

「結果・考察」

1) ナノ薄膜干渉基板の蛍光増強メカニズム

最初に、ナノ薄膜干渉基板の蛍光増強メカニズムについて調べた。ナノ薄膜干渉基板に赤色の励起光を入射したとき、 Al_2O_3 膜厚の増加に伴って励起光の反射光強度が周期的に変化した。この周期的な変化は赤から緑、青、藍と波長が短くなるにつれ、その周期が短くなった。同様の傾向が光学干渉理論、具体的にはフレネルの公式を用いた反射率の理論シミュレーションにおいて観測された。

これらの結果は、ナノ薄膜干渉基板に励起光を斜入射し、散乱した励起光を基板の真上で検出する以前の報告と大きく異なる [2]。今回は入射角と検出角が同じで、励起光の反射光を検出しているが、以前の報告は入射角と検出角が異なり、散乱光を検出している。散乱光は蛍光が増強する Al_2O_3 膜厚付近で高い強度を示したが、一方で反射光は蛍光が増強する Al_2O_3 膜厚付近で強度が減少した。

エネルギー保存則に基づくと、反射光強度が減少しても全体としてのエネルギーは保存されるため、減少した分のエネルギーは散乱光などへ移動したと考えられる。したがって、蛍光が増強する Al_2O_3 膜厚付近では反射光強度が減少した結果、他の光、例えば散乱光などの強度が増大したことで、蛍光が増強することが示唆された。現時点ではまだ完全に理解できていないため、蛍光増強メカニズムに対してはさらなる調査を必要とする。

2) 蛍光増強イメージング

申請者の過去の成果から、最大蛍光増強をもたらす Al_2O_3 膜厚は単純な光学干渉理論により見積もることができる [2]。今回使用する量子ドットの蛍光波長は 520-665 nm であり、この範囲内で蛍光が増強する Al_2O_3 膜厚は 80-103 nm であるため、 Al_2O_3 膜厚が 80, 90, 100 nm のナノ薄膜干渉基板を使用した。

基板上にスポットした量子ドットからの蛍光を検出したところ、ナノ薄膜干渉基板ではガラス基板と比較し、はっきりと明るい増強した蛍光が観測された。そこで、この蛍光の増強を定量的に評価しようと試みた。しかし、ナノ薄膜干渉基板とガラス基板上にそれぞれスポットして乾燥させたスポットの蛍光パターンが大きく異なり、蛍光強度ならびに蛍光増強を定量的に評価することが困難な問題に直面した。

ナノ薄膜干渉基板でのスポットの蛍光パターンは円形だが、縁だけが極端に明るいドーナツ形状をしていた。一方、ガラス基板はスポットごとに形状が異なった。さらに、乾燥

する前の溶液状態のスポットの蛍光パターンはガラス基板ではほぼ均一であったが、ナノ薄膜干渉基板ではやはりドーナツ形状となっていた。そのため、両基板を比較することが非常に困難であった。

しかし、ナノ薄膜干渉基板での蛍光はガラス基板とは比較にならないほど明るかったため、この明るさをわかり易く表現するため、以下の方法で蛍光を観察した。蛍光顕微鏡を用いず、手で持ったナノ薄膜干渉基板に青色 LED の光を直接当て、フィルタを介して目視で量子ドットからの蛍光を観察したところ、スポットが見えただけでなく、各スポットの色までも容易に識別できるほど、明るい多色の蛍光が観察された。ガラス基板ではスポットが全く見えなかったことを考慮すると、本研究では蛍光増強の定量的な評価はできていないが、量子ドットのマルチカラー蛍光増強イメージングには成功したと言える。

将来的には、水銀ランプのような高価な光源や冷却 CCD カメラなどの高価な検出器を用いなくとも、細胞からの極微弱な蛍光を容易かつ低コスト、さらに多色で観察できる、そのような可能性を期待させる成果が本研究で得られた。

「今後」

今後はナノ薄膜干渉基板を用いたマルチカラー蛍光増強イメージング技術の実用性の評価、およびさらなる蛍光増強メカニズムの理解を達成するため、量子ドットからの蛍光強度ならびに蛍光増強を定量的に評価できるように試行錯誤する。これを達成した後、つぎに量子ドットを用いた蛍光増強メカニズムのさらなる調査へと移行する。

これまでの成果では励起光が干渉により強め合う Al_2O_3 膜厚と蛍光が干渉により強め合う Al_2O_3 膜厚は非常に近かったため、励起光の光学干渉と蛍光の光学干渉の二重の効果で蛍光が増強すると考えていた [2]。一方、量子ドットのようなストークスシフト幅が大きい蛍光物質では、励起光と蛍光それぞれが干渉により強め合う Al_2O_3 膜厚が大きく異なる、すなわち光学干渉が大きく寄与していた場合、ストークスシフトが小さい蛍光物質では蛍光が増強し、大きい蛍光物質では蛍光が増強しないパターンになると予想される。そのため、量子ドットの使用がさらなる蛍光増強の理解につながると期待される。

蛍光増強メカニズムの調査で得られた新たな知見を基に、つぎにマルチカラー蛍光増強イメージングに最適な条件等について考察し、その条件でマルチカラー蛍光増強イメージングを行う。その後は細胞のマルチカラー蛍光増強イメージングへと移行し、生物医学分野における本研究の実用性について評価する。

「引用文献」

- [1] T. Akimoto, M. Yasuda, and I. Karube, “Effect of the polarization and incident angle of excitation light on the fluorescence enhancement observed with a multilayered substrate fabricated by Ag and Al₂O₃,” *Appl. Opt.* 47 (21), pp3789-3794 (2008).
- [2] T. Akimoto and M. Yasuda, “Fluorescence enhancement and reflection of the excitation light observed with a multilayered substrate,” *Appl. Opt.* 49 (1), pp80-85 (2009).
- [3] M. Yasuda and T. Akimoto, “Highly sensitive fluorescence detection of avidin/streptavidin with an optical interference mirror slide,” *Anal. Sci.* 28 (10), pp947-952 (2012).
- [4] M. Yasuda and T. Akimoto, “Enhanced fluorescent DNA microarray using an optical interference mirror slide,” *Sens. Mater.* 30 (1), pp59-66 (2018).
- [5] H. Etoh, M. Yasuda, and T. Akimoto, “Signal enhancement by a multi-layered substrate for mutagen detection using an SOS response-induced green fluorescent protein in genetically modified *Escherichia coli*,” *Anal. Sci.* 27 (12), pp1179-1183 (2011).

「本助成に関わる成果物」

なし