

# SPR-SPEF 技術を利用した近接場蛍光イメージングによる細胞観察および溶存酸素モニタリングに関する基礎研究

○入部 康敬<sup>A)</sup>、山形 桜太<sup>B)</sup>、鈴木 正康<sup>B)</sup>  
富山大学理工系事務部<sup>A)</sup>、富山大学大学院<sup>B)</sup>

## 1. はじめに

表面プラズモン共鳴(Surface Plasmon Resonance, SPR)センサは屈折率変化を指標とするセンサで、抗原抗体反応を用いた免疫センサ等で広く利用されている。この SPR センサの原理を応用した表面プラズモン励起増強蛍光(Surface Plasmon Enhanced Fluorescence, SPEF)法はセンサチップ表面の近接場領域での蛍光観察が可能で、細胞への光毒性や蛍光色素の褪色の抑制が期待できる手法である<sup>[1]</sup>。本報では図 1 に示すようにセンサチップ表面に酸素応答性蛍光色素 Ru(phen)<sub>3</sub>を含む Nafion 膜および酵素固定化膜を形成し近接場領域での酵素反応に伴う溶存酸素濃度変化の SPR-SPEF イメージングを行った。

## 2. 実験方法

一般的に広く利用されている FITC のような蛍光色素の多くは、波長約 500nm 以下の短波長光源により励起されるものが多い。そのため本研究では短波長光源の利用が可能で、かつ近接場領域である金属薄膜表面からの浸透深さがより深い MgF<sub>2</sub> 薄膜、Ti 接着層および Ag 薄膜とその保護膜に Au 薄膜を用いた長距離伝搬(Long range, LR) SPR センサチップを使用した。MgF<sub>2</sub> 薄膜、Ti 接着層は抵抗加熱蒸着法により膜厚 150、3nm、Ag、Au 薄膜はスパッタ法により膜厚 8、6nm で成膜した。

そして LRSR センサチップ表面にレジストパターンを形成するために、ポジ型レジスト(OFPR800、東京応化工業)を 2500rpm、30sec でスピコーティングし直径 100μm、ピッチ 200μm のマスクパターンを使用して露光(60sec)、現像、ハードベーク(180°C、10min)を行った。

さらに周囲の酸素濃度の増減に応じて蛍光強度が減増する酸素応答性蛍光色素 Ru(phen)<sub>3</sub>を含む Nafion 膜をコーティングした。2.5g/l Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 1.25%Nafion 溶液をセンサチップ表面に滴下し、低速回転 500rpm、5sec→加速度回転+100rpm/sec、35sec→高速回転 4000rpm、20sec の条件でスピコーティング

して、常温、遮光状態で 1 晩乾燥して形成した<sup>[2]</sup>。

そして酵素固定化膜は、pH6.8、0.01M リン酸ナトリウム緩衝液で調製したグルコースオキシダーゼ(GOD)・ウシ血清アルブミン(BSA)混合溶液(GOD 2000U/ml, BSA 1.1mg/ml) またはカタラーゼ(CAT)・BSA 混合溶液(CAT 4000U/ml, BSA 1.1mg/ml)をセンサチップ表面に滴下してスピコーティング(1000rpm, 30sec)した後、glutaraldehyde 雰囲気下で架橋反応(4°C、12h)により形成した。

次に 2D-SPR センサのプリズムに酵素固定化 Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜コーティング LRSR センサチップおよびアクリルチャンバを設置して、pH6.8、0.01M リン酸ナトリウム緩衝液を満たした。光源波長 490nm の LED 光源および等倍・7 倍レンズを使用して角度走査 SPR 測定を行い、反射光強度が最も低下する入射角度(SPR 角)を求めた。次に波長 488nm のレーザーダイオード(LD)に付け替え、対物レンズ(10×)を取り付けた SPEF 光学システムおよびレーザースペックル抑制用

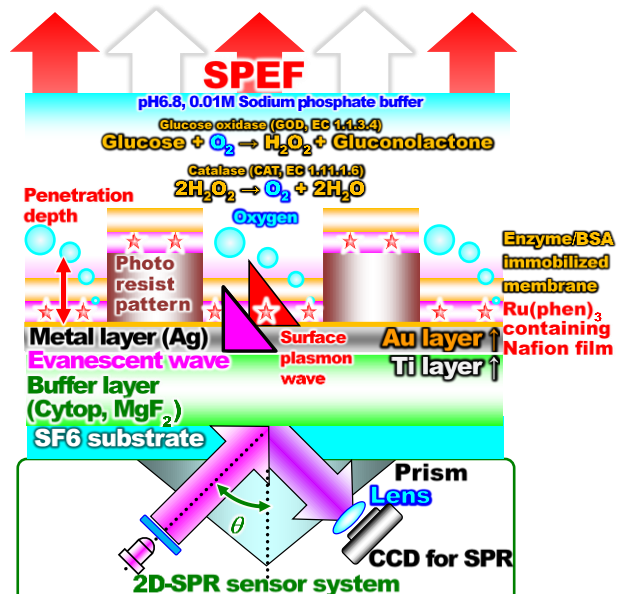


図 1 酵素固定化 Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜コーティング LRSR センサチップの概略図

光ファイバ屈曲システム<sup>[3]</sup>を稼働させて角度走査 SPR-SPEF 測定 (ピニング 8×8、露光時間 60sec) を行った。その後、最大 SPEF 強度が得られた入射角度に固定し経時変化 SPR-SPEF 測定を行った。

### 3. 結果および考察

GOD/BSA 固定化膜および Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜を形成した LRSRPR センサチップ表面の SPEF 画像を図 2 に示す。レジストパターン内のウェル内での SPEF 強度がレジスト部分よりも高いことが確認できた。そして図 3 のように入射角度に対して対称的な SPEF 強度、SPR 反射光強度変化が得られた。レジストの屈折率はウェル内の屈折率より高いため、レジスト部分の SPR 角はウェル内の SPR 角よりも高角度側で生じる、と考えていたが異なる結果が得られた。そのためレジストの膜厚よりも浸透深さの大きい表面プラズモン波によりレジスト表面の Ru(phen)<sub>3</sub> が励起されて SPEF が生じた、と考えられた。

さらにウェル内で最も高い SPEF 強度が得られた入射角度に設定し、SPR-SPEF の経時変化を測定した。GOD/BSA または CAT/BSA 固定化センサチップでの結果を図 4 に示す。GOD/BSA 固定化センサチップではグルコース溶液への置換に伴う GOD による緩衝液中の溶存酸素濃度の減少により Ru(phen)<sub>3</sub> の SPEF 強度の増大を、CAT/BSA 固定化センサチップでは H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液への置換に伴う CAT による溶存酸素濃度の増大により Ru(phen)<sub>3</sub> の SPEF 強度の減少を確認できた。しかし、レジスト部分でも Ru(phen)<sub>3</sub> の SPEF 強度変化が生じた。そのためレジスト部分で SPEF が生じないように、レジスト表面の Ru(phen)<sub>3</sub> の励起抑制方法を現在検討中である。尚、ポスターセッションでは上記の詳細の他、細胞モデル実験として FITC-BSA 固定化膜<sup>[4]</sup>や蛍光染色した RBL-2H3 生細胞の SPR-SPEF イメージングについても報告する。

#### 参考文献

- [1] M. Toma et al., ACS Applied Materials & Interfaces, 8, 22032–22038 (2016)
- [2] V. Huntosova et al., Journal of Biomedical Optics, 19, 077004 (2014)
- [3] W. Ha et al., OPTICS EXPRESS, 17, 17536–17546 (2009)
- [4] S. F. Shimobayashi et al., Scientific Reports, 8, 17769 (2018)

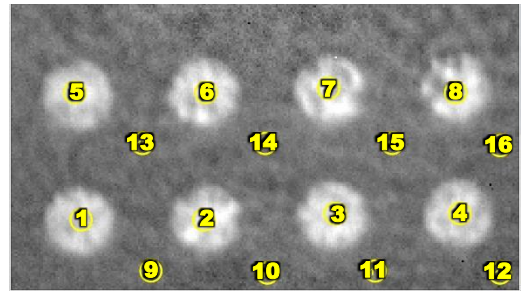


図 2 GOD/BSA 固定化 Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜コーティング LRSRPR センサチップでの SPEF 画像 (入射角度 52.8deg)

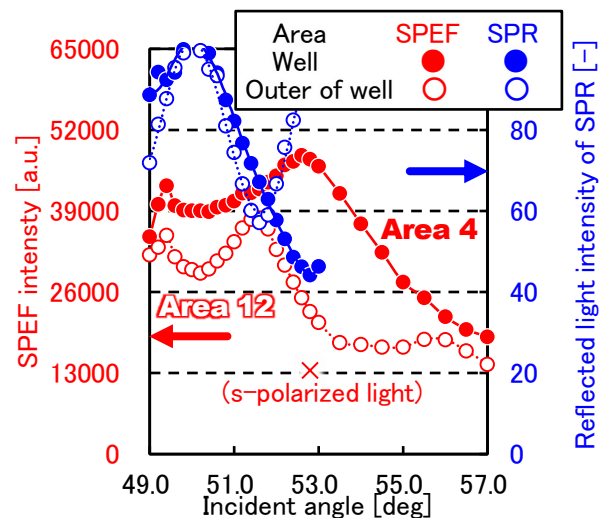


図 3 GOD/BSA 固定化 Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜コーティング LRSRPR センサチップでの角度走査による SPR-SPEF 強度変化測定結果

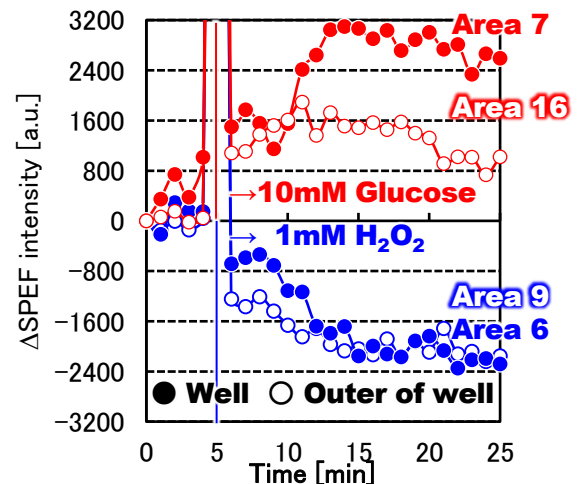


図 4 GOD/BSA または CAT/BSA 固定化 Ru(phen)<sub>3</sub> 含有 Nafion 膜コーティング LRSRPR センサチップでの各試料液添加時の SPEF 強度の経時変化