

# 研究報告書

## 「リモート励起ラマン分光を用いたナノ計測法の開発とその展開」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 21 年 10 月～平成 25 年 3 月

研究者: 雲林院 宏

### 1. 研究のねらい

生体の様々な巨視的性質を理解するためには、ミクロな世界での化学現象を解明する必要がある。なぜなら細胞全体の機能は個々のタンパク質や各構成組織内及び組織間で起こる化学反応の協同的現象として現れるからである。顕微鏡はミクロな世界での生命現象を可視化する有効な手段であるが、その分解能は「回折限界」により数百ナノメートル(1ナノメートルは10億分の1メートル)に限られる。対照的に、先鋭化したピペットや光ファイバー(導波路)などを細胞内に差し込む「単一細胞内視鏡法」は、細胞に直接接触して調べる(分光する)方法として有力な方法である。この方法は遺伝子導入や薬物輸送の手段としても用いられている。その空間分解能は光学的に露出した先端部のみに依存し、50～100ナノメートル程度が達成される。ところが、ガラスなどを材料に用いた場合、導波路部の径はマイクロメートル(1マイクロメートルは1000分の1ミリ)程度必要であり、プローブの挿入に伴う顕著な細胞損傷が問題となる。近年、半導体ナノワイヤーやカーボンナノチューブを用いた径100～200ナノメートルのプローブが報告され、蛍光分析や生理電気学測定が単一細胞レベルで行われている。これは単一細胞研究の重要性が見直されて来ていることと、ナノスケールの細いプローブを作製する技術が確立してきた結果に他ならない。しかしながら、特に分光に関しては、未だ回折限界に縛られており、分光感度も非常に低い。

本さきがけ研究では、細胞の損傷を最小限に抑え、かつ回折限界を超える超高感度な「単一細胞内視鏡法」を、本研究者が2009年に提案したプラズモン導波路を用いたリモート励起表面増強ラマン(RE-SERS)を応用して実現することを目的とした。本手法では、径50ナノメートル程度の銀ナノワイヤーをプラズモン導波路として用いる。表面プラズモンを利用した光導波路は原理的には回折限界に縛られることなく、容易にナノメートルスケールでの光伝搬および集光を可能にする。またプラズモンによる光増強効果により、最大で単一分子を検出する高感度ラマン分光が可能になり、通常のラマン分光では検出できない量の化学物質を細胞内で同定するポテンシャルを有する。そのようなプラズモン光導波路を用いて、単一細胞内での3次元リモートラマン分光を可能にするプラズモン導波路型内視鏡法を開発することを目的として研究を進めた。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

「単一細胞プラズモン導波路型内視鏡法」の確立を目指し、本研究ではまず、化学合成を用いて質の高いプラズモン導波路の作製を行い、その導波路への光カップリング方法及び効率を評価した。また、作製した導波路を内視鏡プローブに導入する方法を開発した。そのプラズモン導波路プローブを用いたリモートラマン分光顕微鏡を作製し、単一細胞内でのリモートラ

マン分光を実現した。また、本手法をラマン分光のみならず単一分子蛍光分光へも展開した。

## (2) 詳細

### 研究テーマ A 「プラズモン導波路の作製」

本研究では、化学合成で作製した直径50~100ナノメートル、長さ10~20マイクロメートルの銀ナノワイヤーをプラズモン導波路として用いた。化学合成を用いることで、表面が原子レベルで滑らかでかつ格子欠陥の少ないナノワイヤーを作製でき、故に伝搬効率の高い導波路が容易に得られる。本さきがけ研究では、反応の初期段階で反応溶液に可視光を照射することで、ワイヤーへと成長する核形成の収率を高めることに成功した(論文1)。可視光は銀イオンの還元反応には寄与せずに核形成に影響する。また、金属粒子の形状制御のみならずその成長方向をも光をうまく利用することにより制御可能であることも示した(論文2)。これらの結果は光反応の有用性を示す良い例である。

### 研究テーマ B 「プラズモン導波路の基礎研究」

プラズモン導波路を用いたリモート励起表面増強ラマンは、本研究者が2009年に提案した新たなリモートラマンの方法である(Uji-i et. al. Nano Lett. 2009, 9, 995-1001.)。光共鳴励起による貴金属表面での自由電子の集団電子振動を表面プラズモンという。即ち光エネルギーは電子振動として金属表面に閉じ込められる。表面プラズモンは金属表面を伝搬する性質を有するため、貴金属ナノ構造を光導波路として利用することが可能である。ガラスなどの誘電体物質で作られた導波路とは異なり、金属導波路は光の回折限界に縛られることがないため、その径を波長の10分の1以下(数十ナノメートル)まで減らすことが可能である。また、金属導波路に微細構造を施すと伝搬プラズモンはその構造に局在して、そこでの光強度は劇的に増強される(局在プラズモン)。リモート励起表面増強ラマンは、これらの性質をうまく利用したプラズモン導波路型ラマン分光である。(図1)。

本研究テーマでは、プラズモン導波路への光カップリング効率の向上をはかった。銀ワイヤーの表面プラズモンの光励起は通常ワイヤー先端に励起光を集光することで行われる。本研究で作製したプラズモン導波路プローブでは、銀ワイヤーの一端はタングステン線または他の銀ワイヤーと接触しており、他方の先端はラマン励起に使用されるため、ワイヤー先端からの光励起は不可能である(研究テーマD参照)。また、ワイヤーの中心部では分散関係を満たさないため伝搬プラズモンは励起されない。しかしながら、ワイヤーの中心部に新たに吸着させた銀粒子に励起光を集光することで伝搬プラズモンの励起、即ちプラズモン導波路への光カップリングが可能になる。本研究では、光カップリング効率を間接的に測定する実験手法を開発し、吸着銀粒子の影響を調べた。また、カップリング効率は粒径に依存することも理論的に示した。(論文3)

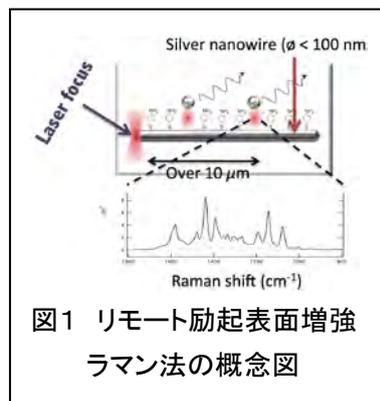


図1 リモート励起表面増強ラマン法の概念図

### 研究テーマ C 「単一分子蛍光分光への展開」

抗体や受容タンパク質などをプローブ表面に導入することで、細胞内の特定の物質を捉える「選択性を有するプローブ」の作製が可能である。しかし、表面増強ラマン散乱では金属表面近傍1ナノメートル程度に存在する分子のみが検出されるため、抗体や受容体の使用はラマン分光では現実的でない。対して、表面増強蛍光では金属表面から10ナノメートル以上離れた蛍光分子からの蛍光が強く観測される。即ち、対象タンパク質を蛍光ラベルしておき、その上で「選択性を有するプローブ」を細胞内に挿入し、プラズモン導波路により蛍光励起を行うことで、高空間分解度かつ高感度蛍光検出が可能であると考えられる。

本研究では、「選択性を有するプローブ」を用いた「単一分子蛍光検出」の可能性を探るための検証実験を行った。銀ナノワイヤー表面を抗体で修飾し、蛍光タンパク質をナノワイヤー表面に捉えた。蛍光タンパクと金属表面の距離は抗体が間に入ることにより10ナノメートルほど離れている。その上でワイヤー全体を光励起する広視野蛍光顕微鏡法で蛍光検出を行った(図2)。この実験により、抗体で修飾した銀ナノワイヤー表面において、単一分子の蛍光検出が可能であることを実証した。また、金属表面による単分子蛍光の散乱空間分布への影響を理論計算と組み合わせることにより議論した。(論文4)

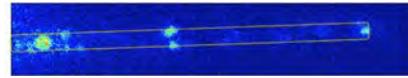


図2 銀ナノワイヤー上での蛍光タンパクの単一蛍光像

### 研究テーマ D 「プラズモン導波路型内視鏡の作製」

電気泳動法を用いることで、先鋭化した金属探針(例えばタングステン線)の先端に銀ナノワイヤーを捉えることが可能であることは知られているが、この手法ではナノワイヤーの付着力が弱く実用に堪えない。本研究ではワイヤーの付着強度を高める方法を開発し、バッファー溶液中でも銀ナノワイヤーを長時間保持でき、かつ光導波路の機能も完全に保持したプラズモン導波路プローブの作製に成功した。(図3a)

3次元リモートラマン顕微鏡法は、遺伝子操作などに使われるマイクロインジェクション用4軸マイクロマニピュレーターと倒立型共焦点ラマン顕微鏡を組み合わせで作製した(図3b)。リモートラマン分光では、導波路への光カップリングを行うレーザー焦点位置と、ラマン散乱を観測する位置は異なる。銀ナノワイヤープローブを操作する4軸マニピュレーター( $X'Y'Z'$ 軸+I軸)とサンプル位置を調整するピエゾ素子駆動3軸ステージ( $XYZ$ 軸)を用いて、ワイヤー先端の観測点に対する位置とガラ

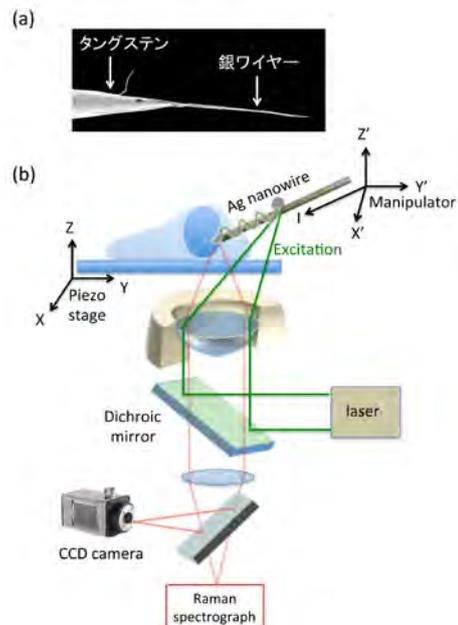


図3 (a) プラズモン導波路型内視鏡プローブ (b) 3次元リモートラマン顕微鏡の概要

基板表面からの高さを調整する。その上で、銀ナノワイヤー上の導波路光カップリング位置にレーザー焦点をあわせる。この時点での全軸の位置は記録する。X' Y' Z' 及び Z 軸を保持したまま、ワイヤーをI軸に沿ってガラス表面から遠ざけたうえで、観測したい細胞を観測点まで移動し、ナノワイヤープローブをI軸に沿って記録位置まで戻すことでワイヤーを単一細胞内に挿入する。このような挿入方法により細胞への損傷は最小限に抑えられ、かつワイヤー先端の細胞に対する位置の制御も正確に行われる。径50ナノメートル程度の銀ワイヤーを用いた場合、挿脱入を繰り返しても、細胞膜の泡状化や細胞の縮小、形状変化、他細胞からの剥離などの顕著な細胞死の兆候は観測されなかった。また、挿入した状態で数時間放置した場合にも細胞死は観測されなかった。このことから細胞膜の損傷は最小限に抑えられており、細胞からのタンパク質や細胞構成組織の漏れも最小であると考えられる。反して径100～150ナノメートル以上の銀ワイヤーを用いた際には、細胞膜貫通が困難な場合が多く、挿入後1時間以内に細胞壊死が観測される場合もある。

#### 研究テーマ E 「単一細胞におけるリモートラマン分光」

本研究で作製した銀ナノワイヤープラズモン導波路プローブを用いて、生きた He-La 細胞内でのリモートラマンを試みた。図4a は、He-La 細胞の核内に銀ナノワイヤーを挿入した状態の透過光像である。銀ナノワイヤーは、透過光像では黒い陰として現れている。ワイヤーが円錐状に見えるのは、ワイヤーはガラス表面に対して30度から40度程度の傾きをもって細胞に挿入されているためである。実際のナノワイヤー径は全領域にわたって100ナノメートル以下である。図4b は同領域のラマン像である。

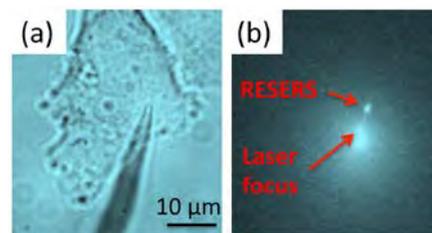


図4 He-La 細胞内におけるリモートラマン分光の透過光像(a)とラマン像

図に矢印で示した通り、銀ワイヤーへの光カップリングは、細胞の外側のワイヤー中心部にレーザー光を集光することで実現した。ワイヤーの先端部からのラマン散乱を観測した結果、細胞核内に存在するプロテインなどからと考えられるラマン散乱が観測された(論文発表予定)。細胞内で表面増強ラマンを行う際には、金属粒子のプラズモン由来の発熱の細胞への影響が最も懸念される。レーザー光を銀ワイヤー先端に集光してラマン散乱を同箇所から観測する直接励起ラマン(通常の方法)を細胞内で行うと、測定直後から直ちに細胞死の兆候がしばしば観測される。反して、リモートラマンを用いた場合には、細胞死が引き起こされる率は格段に低くなる。本研究での測定では多くの場合、細胞死は観測されなかった。

### 3. 今後の展開

本研究では、径100ナノメートル以下の金属ナノワイヤーを内視鏡プローブに導入する方法を最適化し、3次元リモートラマン計測法を確立した上で、生きた細胞内でのリモート励起ラマン分光を初めて実現した。今後は、リモートラマン計測法の応用展開として、ドラッグデリバリーシステムの基礎研究を行う。ドラッグデリバリーを内視鏡プローブで行うことで、ドラッグによる効果を導入量や導入箇所などの情報をもとにリモートラマンを用いながら評価することが可能となる。また、リモートラマンにとどまらず、「選択性を有するプローブ」を用いた細胞内での「リモート単一

(生体)分子蛍光検出」の実現や、リモート励起を用いた局所プラズモン発熱などへ研究を進展させる。

#### 4. 自己評価

近年、単一細胞レベルでの研究の重要性が見直され、かつそれを可能にする技術が確立してきた。本研究者は、貴金属ナノワイヤーを光導波路として利用したリモート励起表面増強ラマン分光法を2009年に提案し、その後さきがけ研究においてプラズモンリモートラマンの単一細胞ラマン分光法の確立およびその応用展開を目標に掲げた。その結果、世界で最も細い導波路プローブを用いた非常に感度の高いリモートラマン内視鏡法を確立した。本研究で開発したプラズモンリモートラマン計測法は化学物質に関する情報を直接得ることが可能性であるため、これまで報告された手法以上のポテンシャルを有している。ラマン分光や蛍光分光などを組み合わせることで、本さきがけ研究は単一細胞研究に新たな展開をもたらす可能性があると考えられる。

#### 5. 研究総括の見解

化学合成により銀ナノワイヤー作製し、それをプラズモン導波路として機能させるための光カップリング効率を検討し、自ら提案したリモート励起表面増強ラマン法を実証した。径100ナノメートル以下の銀ナノワイヤープローブを4軸マニピュレーターに装着し、生きた He-La 細胞内に挿入し、細胞外部の銀ナノワイヤー中心部にある光カップリング部にレーザー光を照射して、細胞内に存在するプロテインなどからのラマン散乱を観測することに成功した。光技術の粋を集めたこの計測法が実際に生命機能の研究分野で使われていくものと期待する。

#### 6. 主な研究成果リスト

##### (1) 論文(原著論文)発表

1. Lin, H., Ohta, T., Paul, A., Hutchison, J., Demid, K., Lebedev, O., Van Tendeloo, G., Hofkens, J., Uji-i, H. Light-assisted nucleation of silver nanowires during polyol synthesis. *Journal of Photochemistry and Photobiology A, Chemistry*, 2011, 221(2-3), 220-223.
2. Paul, A., Kenens, B., Hofkens, J., Uji-i, H. Excitation Polarization Sensitivity of Plasmon-Mediated Silver Nanotriangle Growth on a Surface. *Langmuir*, 2012, 28(24), 8920-8925.
3. Kenens, B., Rybachuk, M., Hofkens, J., Uji-i, H. Silver Nanowires Terminated by Metallic Nanoparticles as Effective Plasmonic Antennas. *Journal of Physical Chemistry C*, 2013, 117(6), 2547-2553.
4. Lin, H., Centeno, S., Su, L., Kenens, B., Rocha, S., Sliwa, M., Hofkens, J., Uji-i, H. Mapping of Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Nanoparticles using Super-Resolution Photoactivation Localization Microscopy. *ChemPhysChem*, 2012, 13(4), 973-981.

##### (2) 特許出願

研究期間累積件数:0件

##### (3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)



## 招待講演

- (i) Energy Materials Nanotechnology (EMN) 2012 meeting (USA)  
“ Mapping of Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Nanoparticles using Super-Resolution Photoactivation Localization Microscopy (SEF-PALM)”
- (ii) European Materials Research Society 2012 fall meeting (Poland)  
“Visualization of point spread function of single molecule fluorescence in the vicinity of metal nano-structure“
- (iii) BIT' s 3rd Annual World Congress of Nanomedicine-2012 (China)  
“Light controlled silver nanoparticle growth and super-resolution fluorescence imaging in vicinity of metal surface”

## 口頭発表

- (i) 3rd EuChemMS Chemistry Congress 2010 (Germany)  
“Sub-diffraction limited remote excitation surface enhanced Raman scattering (RE-SERS)”
- (ii) European Materials Research Society 2012 spring meeting (France)  
“Excitation light coupling on metal nanowires via surface plasmons”  
“Mapping of Surface Enhanced Fluorescence on Metal Nano-particles using Super-resolution Photo-activation Localization Microscopy”  
“light-controlled silver nanoparticle growth direction”
- (iii) European Materials Research Society 2012 fall meeting (Poland)  
“Optical Characterization of Silver Nanoparticle-Nanowire Hybrid Structure as a Plasmon Antenna”  
“Visualization of point spread function of single molecule fluorescence in the vicinity of metal nano-structure“
  
- (iv) IUPAC photochemistry 2012 (Portugal)  
“Measuring Surface-Enhanced Fluorescence on Metal Surface by means of Sub-diffraction fluorescence Microscopy”