

## 様式3

## 神戸大学バイオシグナル総合研究センター共同利用研究報告書

平成 29年 4月 26日

神戸大学バイオシグナル総合研究センター長 殿

所属機関・部局名 室蘭工業大学大学院・工学研究科  
職 名 准教授  
研究代表者名 加野 裕

下記のとおり平成28年度の共同利用研究成果を報告します。

## 記

(課題番号:281015)

1. 共同利用研究 課題名	疑似細胞間隙の無染色高精度高空間分解能計測による細胞接着状態評価			
2. 共同利用研究 目的	細胞膜の接着タンパク質, 受容体, リガンドなどは, 細胞間の距離に変化をもたらす要因となっており, これによって細胞の接着状態が変化する. 本研究では, 基板表面に成膜された生体模倣膜と細胞の間隙を調べる手法を確立し, これを用いて接着タンパク質, 受容体, リガンドなどが細胞接着に与える影響を評価する.			
3. 共同利用研究 期間	平成 28 年 7 月 1 日 ~ 平成 29 年 3 月 31 日			
4. 共同利用研究組織				
氏 名	所属部局等	職名等	役割分担	
(研究代表者) 加野 裕	室蘭工業大学大学院工学研究科	准教授	測定系の構築	
(分担研究者) 森垣 憲一	神戸大学バイオシグナル総合研究センター	准教授	反応系の構築	
5. センター内受入研究者	研究部門・ 分野名	シグナル分子応答研究分野	氏 名	森垣 憲一

※ 次の6, 7, 8の項目は, 枠幅を自由に変更できます。但し, 6, 7, 8の項目全体では1頁に収めて下さい。

## 6. 共同利用研究計画

本研究では、基板表面に成膜された生体模倣膜と細胞の間に形成される疑似細胞間隙の空間分布を、表面プラズモン屈折率計測法を用いて無染色で高分解能に調べるため、サブナノメートルオーダーの分解能で、間隙を測定することが可能な原理の開発を行う。その原理においては、金属表面に励起される表面プラズモンの伝搬定数が、金属表面の屈折率変化に敏感に応答する性質を利用する。さらに、申請者の独自手法を用いると、表面プラズモンを直径400nm程度の領域(半値全幅は200nm以下)に局在させることができ、高空間分解能で屈折率分布を測定することができる。表面プラズモンの伝搬定数変化は、金属表面に成膜した薄膜の膜厚差がナノメートル以下である場合にも、有意な変化を示すことが分かっているため、目的とする間隙の測定に有効であると考えられる。そこで、本研究では、この測定法をベースにして、基板表面に形成された層構造に含まれる未知の層構造パラメーター(屈折率、層厚)の一つを決定することができるように計測原理の拡張を行うことを計画した。新しい測定原理においては、非線形収束法を用い、電磁場計算によって得られる伝搬手数が、実験値と最も良く一致するように、構造パラメーターの探索を行うこととした。

具体的には、表面プラズモンを励起可能な基板の表面に、ナノメートルオーダーの層構造を作製し、これを試料として、基板の局所領域に励起される表面プラズモンの伝搬定数を測定し、層構造パラメーターを決定する。層構造の作製には、パターン化二分子膜を用い、今回は、二分子膜の屈折率を探索対象の層構造をパラメーターとする。

## 7. 共同利用研究の成果

はじめに、試料基板の作製を行った。ガラス表面に、銀、シリカをスパッタリング成膜し、シリカ表面にパターン化脂質二分子膜(DiynePCとDiynePEの混合膜)を成膜した。脂質二分子膜には直径 $4\mu\text{m}$ のピットを $8\mu\text{m}$ の間隔で形成した。銀とガラス、シリカの間には接着性を高めるために薄いクロム層を設けたが、測定ではこれを無視した。この基板の表面を超純水で覆い、ガラス側からラジアル偏光させたレーザー光(波長632.8nm)を油浸対物レンズ(開口数1.65)で集光し、対物レンズの射出瞳と光学的に共役な位置に配置したイメージセンサーにより、基板からの反射光の空間周波数スペクトルを測定した。2, 3個のピットが測定領域に含まれるように、 $15\mu\text{m}$ 平方の領域を $64\times 64$ 点で測定し、空間周波数スペクトルのセットを取得した。

この中から、まず、ピットの中央部において取得された空間周波数スペクトルを画像解析し、表面プラズモンの励起によって生じるリング状の光吸収パターンをピクセル単位で求めた。これを、ガラス、銀、シリカ、水の4層構造を仮定して計算される表面プラズモンの伝搬定数で較正し、ピクセル単位の半径を空間周波数に換算する係数を決定した。

つぎに、脂質二分子膜の領域から取得された空間周波数スペクトルを画像解析し、先の換算係数を用いて、励起された表面プラズモンの伝搬定数を求めた。ここで、非線形収束法の一つであるシンプレックス法を用い、脂質二分子膜の屈折率の探索を行った。探索対象以外のパラメーターには文献値を用い、最小反射率を与える空間周波数が実験値に漸近するように、探索対象のパラメーターを変化させた。探索のパスを6種類設定し、実験と計算の伝搬定数(真空中の光の波数で規格化したもの)が $1\times 10^{-4}$ のオーダーまで一致するように、反復停止条件を設定したところ、脂質二分子膜の屈折率は1.4085と求められた。この結果より、新しい計測原理が妥当であることを確認することができた。

さらに、疑似細胞間隙の測定へ適用性を検討した結果、励起される表面プラズモンの伝搬定数は、試作した装置のダイナミックレンジに収まっており、伝搬定数の測定分解能は、基板表面近傍に存在する疑似細胞間隙をサブナノメートルの分解能で測定するのに十分であることが分かった。

## 8. 共同利用研究成果の学会発表・研究論文発表状況

(本センターの担当教員の氏名の記載、又はこの共同利用研究に基づくとの記載のある論文等を記載して下さい。なお、論文の場合は、別刷りを1部提出してください。)

準備中

## 9. 共同利用研究に関連した受賞、博士学位論文の取得、大型研究プロジェクトや競争的資金の獲得等がありましたらご記入ください。

該当無し