

機関番号：10101

研究種目：特定領域研究

研究期間：2007～2010

課題番号：19049016

研究課題名（和文） 光—分子強結合反応場のための微細光学素子の創成と集積化

研究課題名（英文） Fabrication and integration of nano-structured optical devices for strong photons-molecules coupling fields

研究代表者

西井 準治 (NISHII JUNJI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：60357697

研究成果の概要（和文）：色素で標識したタンパク質の高感度検出を目的として、グレーティング結合型表面プラズモン共鳴（GC-SPR）による蛍光顕微鏡観察について研究した。ランダム偏光での GC-SPR の高効率励起のために、銀コート表面レリーフ回折格子のデザインおよび作製に成功し、スライドガラス基板に比べ 100 倍明るい蛍光イメージングに成功した。

研究成果の概要（英文）：Fluorescence microscopy using grating-coupled surface plasmon resonance (GC-SPR) was investigated for sensitive observation of proteins labeled by fluorescence dyes. Surface-relief periodic structures coated with a silver film were designed and fabricated for high-efficiency excitation of GC-SPR with unpolarized light, which gave a fluorescence image 100 times brighter than that on a slide glass.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	10,000,000	0	10,000,000
2008年度	13,600,000	0	13,600,000
2009年度	13,600,000	0	13,600,000
2010年度	10,000,000	0	10,000,000
年度			
総計	47,200,000	0	47,200,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学、無機材料・物性

キーワード：表面プラズモン共鳴、蛍光顕微鏡、増強蛍光、ナノインプリント

1. 研究開始当初の背景

表面プラズモン共鳴場やエキシトンエネルギーによって、化学反応に伴う微弱な蛍光などを高感度に検出したり、化学反応そのものを制御できる可能性がある。そのようなエネルギーの局在化には、回折格子、フォトニック結晶、極微導波路等の利用が有望である。我々はこれまでに、金薄膜の表面プラズモン共鳴場（SPR）を利用した人工生体膜（脂質膜）の高感度蛍光検出や、シリコンナノ粒子の局在エキシトンを使った希土類イオンの高効率

発光等の研究に取り組んできた。

2. 研究の目的

本研究では、これまでの研究実績をもとに、金属薄膜表面に形成されるプラズモンエネルギーと波長レベル以下の周期構造とを組み合わせ、生体反応等に用いられる蛍光色素からの微弱信号の高感度検出あるいは信号増幅のための素子化技術について検討することを目的とした。特に、回折格子上で表面プラズモン共鳴（SPR）を励起場として発生させ、表

面に固定した蛍光分子を励起する表面プラズモン励起増強蛍光分光 (SPFS) の開発と応用に関する研究を実施した。

3. 研究の方法

表面プラズモン共鳴場に適したサブ波長オーダーの周期構造をガラスおよびプラスチック基板表面に形成した。ガラス基板の表面加工については、レジストをコートした基板への He-Cd レーザー (波長 325nm) を用いた干渉露光法とドライエッチング法を用いた。また、プラスチック基板に対しては、熱ナノインプリント法および紫外線ナノインプリント法を用いた。所望の周期 (通常は 480nm あるいは 400nm)、溝深さ (10-50nm の範囲) に制御された表面レリーフ型回折格子を、蛍光イメージングに必要な 3mm^2 以上の面積に形成するためのプロセスを構築した。

得られた回折格子に、スパッタ法で銀薄膜を 50~200nm の間で制御された厚みになるようにコーティングした。銀の酸化を防ぐために、最表面にはシリカ膜を 20nm 成膜し、銀と基板およびシリカ膜との密着性を保つために各界面に 1nm 程度のクロムを成膜した。

作製した銀コート回折格子に p 偏光の He-Ne レーザー光 (633nm) を入射し、その入射角に対する反射率を計測することで、格子結合型表面プラズモンの発生を確認した。

また、周期構造基板表面をシランカップリング処理によりアミノ化し、蛍光標識蛋白質 (Cy5 標識ストレプトアビディン) を吸着させ、He-Ne レーザー光の入射角に対する 680nm での蛍光強度をフォトマルで検出した。用いた光学系を図 1 に示す。また、蛍光顕微鏡下でハロゲンランプ光 (630nm \pm 15nm のフィルター装着) での励起による蛍光イメージを EMCCD で計測した。測定光学系のイメージを図 2 に示す。

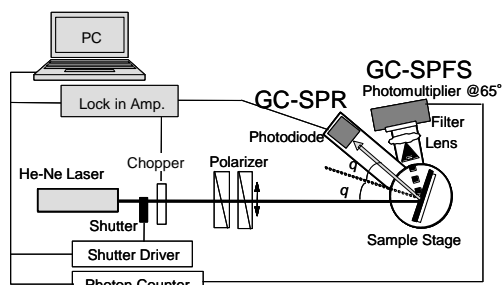


図 1 GC-SPR および蛍光検出のための光学系

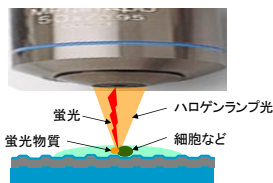


図 2 顕微鏡を用いた蛍光イメージングの模式図

4. 研究成果

(1) 格子形状の最適化

平坦な基板上に周期 Λ の回折格子を形成した。格子の溝深さ (凹凸) が十分に浅い場合、角度 θ_1 で入射した光 (波長 λ) の一次回折光がその格子表面に結合する条件は、 $n_s \sin \theta_1 = N - \lambda/\Lambda$ (n_s は空気の屈折率、 N は金属とシリカからなる導波層の実効屈折率) となる。図 3 は θ_1 と λ/Λ との関係性を空気中と水中で求めた結果である。ここで、 $N=1.4$ (水の場合)、 1.0 (空気の場合) とした。本研究では、水溶液中に存在する色素などでラベルされた細胞などの蛍光イメージを光学顕微鏡下で観察することを目的としている。したがって、対物レンズから正規分布に近いパワー密度の励起光が出射する場合には、 θ_1 をできるだけ小さくした方が励起効率が向上すると予想される。図 3 より、本研究で用いる励起光源 (He-Ne レーザー: 波長 633nm) の場合には、周期 400nm 付近がその条件に近いことがわかる。同様な結果は FDTD シミュレーションでも得られる。図 4 は、水中に置かれた一次元格子に入射角度 2.6° で 633nm の光を入射した場合の SPR による表面電場強度分布である。格子のエッジの部分に強い電場が局在していることがわかる。

本研究で作製した代表的な一次元格子の AFM 像を図 5 に示す。蛍光 (Cy5) 標識蛋白質を固定化した一次元格子基板にレーザー光 (p-偏光) を入射し、入射角を変化させながら

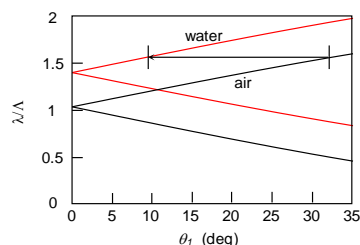


図 3 空気中および水中での光の入射角度と λ/Λ (λ : 波長, Λ : 格子定数) の関係

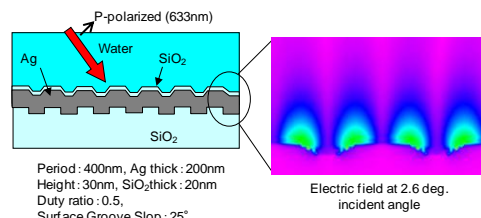


図 4 FDTD で計算した格子表面での電界強度分布

図 6 は格子深さが 20nm、デューティー比 0.43 (Λ に対する格子幅の比) の場合の測定結果である。空気中では入射角度 31 度付近、水中では 8 度付近で SPR の励起によって反射光が弱

くなり、図3あるいは図4の計算結果とほぼ一致した。次に、一次元格子において、格子深さとSPRの関係性を調べた結果を図7に示す。強いSPRを励起するには、格子深さ20nm付近が好ましい。また、デューティ比依存性についても調べた結果、0.4~0.5が好ましいことがわかった。

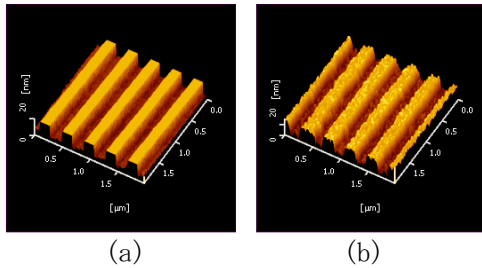


図5 本研究で作製した一次元回折格子のAFM像：(a)銀コート前、(b)銀コート後

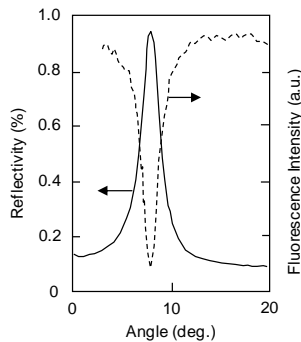


図6 リン酸緩衝液中でのHe-Neレーザー光の反射率とCy5の蛍光強度

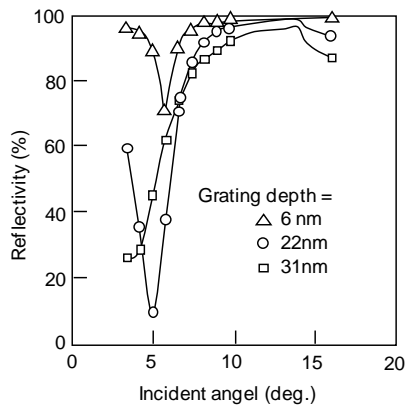


図7 格子の溝深さと反射率の関係

(2) 一次元格子を用いた蛍光イメージング

図8は、光学顕微鏡で観測されたCy5標識細胞の明視野像(a)と蛍光像(b)である。回折格子基板上で極めて鮮明な蛍光像が観測され、その明るさは、スライドガラス上での蛍光強度の約24倍、平坦な銀薄膜上の12倍で

あった。励起光はハロゲンランプからのランダム偏光であるが、主にそのp偏光成分が格子と結合し、SPRによる強い電場が発生したと推察される。

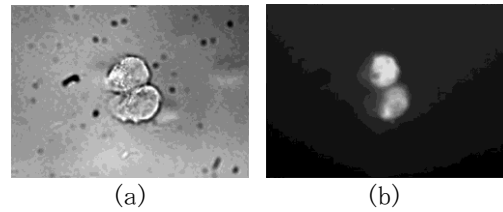


図8 光学顕微鏡で観測されたCy5標識細胞の明視野像(a)と蛍光像(b)
(細胞の大きさは約10μm程度)

(3) 二次元格子を用いた蛍光イメージング

さらに鮮明な蛍光イメージングを実現することを目的として、格子を二次元化することを試みた。格子の作製方法は一次元の場合とほぼ同じであるが、二光束干渉露光によるパターンニングの際に、一次元の場合の1/2の露光時間で基板を90度回転して残り1/2の露光を行った。代表的な二次元光格子のAFM像を図9に示す。

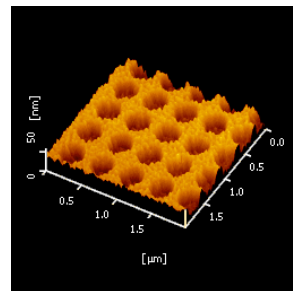


図9 本研究で作製した二次元回折格子のAFM像(銀コート後)

周期400nm、格子深さ20nmの二次元格子を用いて、蛍光標識蛋白質の蛍光イメージを観察した結果を図10に示す。参考のため、一次元格子の観察結果も示す。図から明らかなように、二次元格子の方が明るい蛍光イメージを得ることができた。CCDカメラのカウント数から見積もられるその明るさは一次元格子の約3倍(スライドガラスの約100倍)であった。

二次元格子での優れた蛍光増強の要因について考察するために、RCWA法でシミュレーションを行った。その結果、図11に示す様に、x-y面の回転軸(ϕ)に対して入射光が結合する条件が広く分布するためであると推察された。

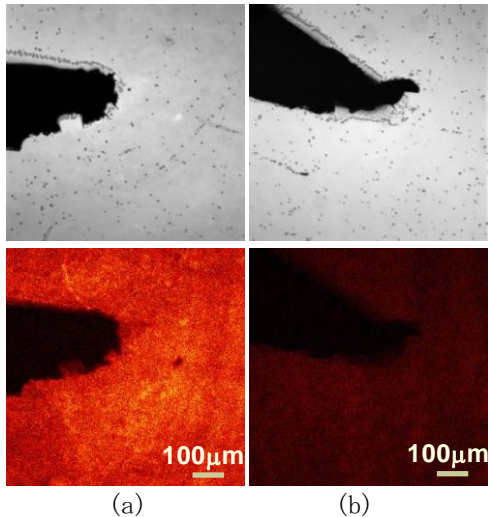


図 10 一次元および二次元格子に固定した蛍光標識蛋白質の明視野像(上段)と蛍光イメージ(下段) : (a) 二次元格子、(b) 一次元格子

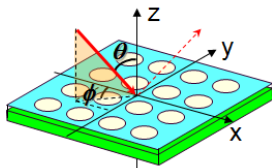
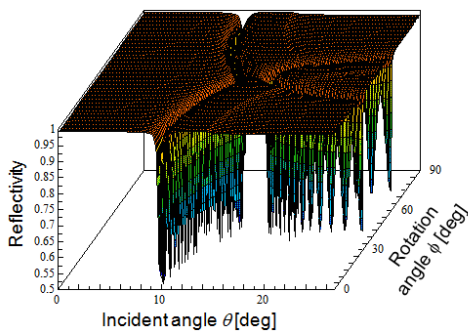


図 11 RCWA 法で計算した二次元格子における入射光の結合条件と計算に用いたモデル

(4) 蛍光消光に関する考察

銀格子表面での蛍光の消光を抑制するために成膜したシリカ膜の膜厚と消光傾向との相関を定量的に求めることを試みた。一般に、格子表面での蛍光は、銀に再結合することで消光されやすく、その程度は表面からの距離に依存する。そこで、銀と蛍光分子との距離を制御するために種々の厚みのシリカを周期 400nm の銀回折格子の表面に成膜し、蛍光強度とシリカ膜厚の関係を調べた。結果

を図 12 に示す。実験開始当初は、最適構造のガラス回折格子をナノレベルの精度で複数枚作製することが極めて困難であったため、紫外線インプリント法で樹脂レプリカを作製し、その表面に銀およびシリカを成膜した。その結果、シリカ膜厚 20nm 付近で蛍光強度が最大になることが実験的に確かめられた。その後、ガラス基板の微細加工精度を高めた結果、樹脂と同様な高精度な周期構造を複数枚作製することに成功し、同様な結果を得た。一方、金属表面での蛍光消光の理論的予測に使われる CPS モデルと、時間領域差分法で求まる表面プラズモン電場強度分布の両者の積が最大となる距離を計算したところ、金属表面から 20nm 付近であることが明らかとなり、実験結果と一致した。

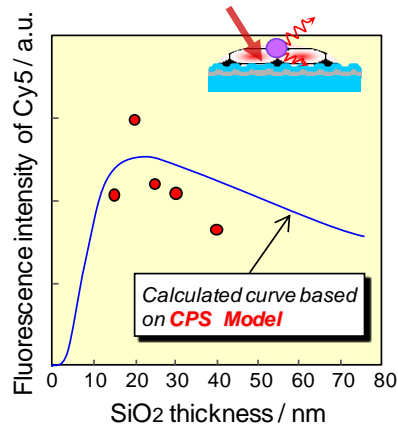


図 12 一次元銀格子において、計測条件をすべて同一にして、銀表面のシリカ膜厚のみ変化させた場合の Cy5 の蛍光強度の変化

(5) まとめ

一次元および二次元の銀コート回折格子を作製し、その表面に固定した蛍光色素で標識された細胞あるいはタンパク質の鮮明な蛍光イメージングに成功した。特に二次元格子表面での蛍光強度は、銀コートしていない平坦なスライドガラス上に比べて約 100 倍明るいイメージが得られた。本結果は、当初の期待以上であり、インパクトファクターの高い雑誌に複数本の論文が採択された。また、米国光学学会 (OSA) の年会で Post Deadline Paper に選ばれた。

本回折格子はリソチウムの高効率光誘起結晶化等の化学反応場への応用も可能であり、その他にも幅広い応用が期待される。

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 41 件)

- ① Keiko Tawa, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Kenichi Morigaki, Sensitive bioimaging in microfluidic channels on the plasmonic substrate: Application of an enhanced fluorescence based on the reverse coupling mode, *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 査読あり, accepted (2011).
- ② Keiko Tawa, Yoshiki Yokota, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Takahiko Nakaoki, An application of a plasmonic chip with enhanced fluorescence to a simple biosensor with extended dynamic range, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読あり, accepted (2011).
- ③ Hironobu Hori, Keiko Tawa, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Yoshiro Tatsu, Surface profile dependence of the photon coupling efficiency and enhanced fluorescence in the grating-coupled surface plasmon resonance, *J. Appl. Phys.*, 査読あり, 107 巻, 2010, 114702-1-114702-6.
- ④ Xiaoqiang Cui, Keiko Tawa, Hironobu Hori, Junji Nishii, Tailored plasmonic gratings for enhanced fluorescence detection and microscopic imaging, *Adv. Func. Mat.*, 査読あり, 20 巻, 2010, 546-553.
- ⑤ Xiaoqiang Cui, Keiko Tawa, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Enhanced fluorescence microscopic imaging by plasmonic nanostructures: from a 1D grating to a 2D nanohole array, *Adv. Func. Mat.*, 査読あり, 20 巻, 2010, 945-950.
- ⑥ X. Cui, K. Tawa, H. Hori, J. Nishii, Duty ratio-dependent fluorescence enhancement through surface Plasmon resonance in Ag-coated gratings, *Appl. Phys. Lett.*, 査読あり, 95 巻, 2009, 133117/1-133117/3.
- ⑦ K. Tawa, N. Kuboyama, Saleh A. Ahmed, M. Tanaka and T. Nakaoki, Sensitive detection of a pseudo-polyrotaxane ultrathin film by SPR and QCM-D methods, *Sensors and Actuators B: Chemical*, 査読あり, 138 巻, 2009, 126-133.
- ⑧ Naoko Akashi, Keiko Tawa, Yoshiro Tatsu, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Application of Grating Substrate Fabricated by Nanoimprint Lithography to Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Microscopy and Study of Its Optimum Structure, *Jpn. J. Appl. Phys.*, 査読あり, 48 巻, 2009, 062002-1/6.
- ⑨ Yukie Yokota, Kosei Ueno, Saulius Juodkazis, Vygantas Mizeikis, Naoki Murazawa, Hiroaki Misawa, Haruya Kasa, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Nano-textured metallic surfaces for optical sensing and detection applications, *J. Photochem. Photobiol. A: Chem.*, 査読あり, 207 巻, 2009, 126-134.
- ⑩ Hironobu Hori, Keiko Tawa, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Yoshiro Tatsu, Influence of Groove depth and Surface Profile on Fluorescence Enhancement by Grating Coupled Surface Plasmon Resonance, *Optical Review*, 査読あり, 16 巻, 2009, 216-221.
- ⑪ K. Tawa, H. Hori, K. Kintaka, K. Kiyosue, Y. Tatsu and J. Nishii, Optical microscopic observation of fluorescence enhanced by grating-coupled surface plasmon resonance, *Opt. Express*, 査読あり, 16-13 巻, 2008, 9781-9790.

[学会発表] (計 92 件)

- ① 田和 圭子、横田 佳樹、東洋輔, 高感度バイオセンシングを目指したプラズモニクチップの作製, デザインバイオニクス講演会, 2011年03月29日, 阪大中之島センター (大阪府).
- ② Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, Sensitive and rapid detection of antigens on the plasmonic substrate with bispecific antibodies against antigen and ZnO surface, Oral (invited), 20th MRS-Japan Academic Symposium, 2010年12月22日, 横浜市(神奈川県).
- ③ Keiko Tawa, Mitsuo Umetsu, Takamitsu Hattori, Izumi Kumagai, 10pM-antigens detection on the plasmonic substrate with bispecific antibodies against antigen and ZnO surface, (invited), Pacificchem 2010, 2010年12月16日, Honolulu (Hawaii, USA).
- ④ Keiko Tawa, Xiaoqiang Cui, Kenji Kintaka, Junji Nishii, Sensitive Fluorescence Microscopic Imaging with Plasmonic Substrate, Poster, The international conference on nanophotonics 2010, 2010年6月1日, つくば(茨城県).
- ⑤ Keiko Tawa, Junji Nishii, 100 Times-Enhanced Fluorescence Detected on a Metal-coated Grating Biochip, Oral, 7th International Conference on Optics-Photonics Design & Fabrication (ODF' 10), 2010年4月20日, 横浜(神奈川県).
- ⑥ Kenji Kintaka, Xiaoqiang Cui, Keiko Tawa,

Junji Nishii, 100-Fold Enhancement of Fluorescence Imaging by Two-Dimensional-Grating-Coupled Surface Plasmon Resonance, Advances in Optical Materials (AIOM) part of the Fall OSA Optics & Photonics Congress, 2009年10月15日, サンノゼ(アメリカ).

⑦ K. Tawa, J. Nishii, X.Q. Cui, and K. Kintaka, Development of enhanced fluorescence imaging microscopy with a metal coated grating for biological applications, International symposium on advances in nanostructure-enhanced photochemical reactions and photoenergy conversion, 2009年7月16日, Leuven(ベルギー).

⑧ 田和圭子, 堀博伸, 金高健二, 達吉郎, 西井準治, 格子カップリング表面プラズモン共鳴場を用いたタンパク質の増強蛍光検出, 応用物理学関係連合講演会, 2009年3月30日, 筑波大学(茨城県).

⑨ Yuji Nishizawa, Keiko Tawa, Takahisa Taguchi, Kazuyuki Kiyosu, Takahiko Nakaoki, The Detection of Antigen-Antibody Recognition on an Array Chip by Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Imaging (SPFI), IUMRS, 2008年12月10日, 名古屋(愛知県).

⑩ Junji Nishii, Kenji Kinatka, Naoko Akashi, Hironobu Hori, Keiko Tawa, Fluorescence Microscopy using Subwavelength Grating Coupled Surface Plasmon Resonance, The 2nd Japan-Taiwan Joint Symposium on Organized nanomaterials and Nanostructures Related to Photoscience, 2008年11月5日, 京都大学(京都府).

⑪ Y. Nishizawa, K. Tawa, K. Kiyosue, T. Taguchi, T. Nakaoki, Antigen-Antibody Interaction on a Chip Observed by Surface Plasmon Field-Enhanced Fluorescence Microscopy (SPFM), The 10th Pacific Polymer Conference (PPC10), 2007年12月5日, 神戸市(兵庫県).

[図書] (計1件)

① 田和圭子, 西井準治, シーエムシー出版, プラズモンナノ材料の新技术, 2009年9月, 228-236.

[産業財産権]

○出願状況 (計5件)

①名称: 周期構造を有するマイクロプレートおよびそれを用いた表面プラズモン励起増強蛍光顕微鏡または蛍光マイクロプレートリーダー

発明者: 田和圭子, 西井準治, 金高健二, 堀博伸, 達吉郎

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 特願 2008-268112

出願年月日: 2008年10月17日

国内外の別: 国内

②名称: 微小発光素子

発明者: 宮下徳治, 三ツ石方也, 森田晋平, 田和圭子, 西井準治

権利者: 東北大学

種類: 特許

番号: 特願 2010-180209

出願年月日: 2010年08月11日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計1件)

①名称: プラズモン共鳴蛍光を用いた生体分子相互作用検出装置及び検出方法

発明者: 田和圭子, 田口隆久

権利者: 産業技術総合研究所

種類: 特許

番号: 第 4370383

取得年月日: 2009年9月11日

国内外の別: 国内

[その他]

ホームページ:

<http://www.es.hokudai.ac.jp/labo/photocontrol/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西井準治 (NISHII JUNJI)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号: 60357697

(2) 研究分担者

田和圭子 (TAWA KEIKO)

産業技術総合研究所・健康工学研究部門・主任研究員

研究者番号: 80344109

金高健二 (KINTAKA KENJI)

産業技術総合研究所・ユビキタスエネルギー研究部門・主任研究員

研究者番号: 50356911