

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：10103

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K04966

研究課題名(和文)点検出を用いる表面プラズモン顕微鏡による高空間分解能高感度屈折率分布計測

研究課題名(英文)High sensitive and high spatial resolution surface plasmon microscopy employing a point detector in the detection system

研究代表者

加野 裕 (Kano, Hiroshi)

室蘭工業大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号：80322874

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：集束表面プラズモンを測定プローブに用いて金属表面の光近接場における局所的な有効屈折率を高感度に測定する手法において、環状瞳照明系と共焦点検出系を導入することによって、面内空間分解能がおおよそ30%程度向上することを計算によって示し、これを実現する光学系の提案と試作を行い、試作装置による透明微小球観察を行った。さらに、表面プラズモンの伝搬定数測定を行うことで、認知症原因物質の一つとされるアミロイド タンパク質の凝集特性評価を試みた。その結果、アミロイド タンパク質凝集体の100ナノメートル程度堆積するまでの過程を定量的に追跡できることを確認し、凝集測定評価における有用性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、基板表面の光近接場における屈折率を、光の回折限界を超える空間分解能で高感度に測定する手法を開発した。これによって、さまざまな生体関連分子の相互作用を無標識で捉えることが可能になるため、たとえば、蛍光標識が相互作用における本来特性を変えてしまう懸念を取り除くことができる。本研究の成果を用いることで、認知症の予防や症状の進行抑制に有効な物質の探索が加速されると期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, efficacy of ring pupil illumination system and confocal detection system was confirmed in terms of spatial resolution improvement in microscopic measurement of refractive index distribution in the optical near field of a metal surface using focused surface plasmon as a measurement probe. The theoretical calculation shows the improvement of the full width at half maximum of the point spread function, and the optical system for this measurement was proposed. The nano-meter sized particles were successfully observed by the developed system. We also tried to apply the focused surface plasmon to evaluate the aggregation property of amyloid beta protein. It was successfully confirmed that the increase of aggregates sediment was quantitatively traceable within the thickness range of ~100nm.

研究分野：顕微光計測工学

キーワード：表面プラズモン 屈折率計測 顕微計測 生体分子計測

## 1. 研究開始当初の背景

表面プラズモンを利用する屈折率測定法では、ガラスプリズム、膜厚50nm程度の金属薄膜、試料の3層で構成される光学配置（クレッチマン配置）に対し、プリズム側からレーザー光を入射させ、反射光強度を測定する光学系が用い、表面プラズモン励起に起因する光吸収が生じる入射角から表面プラズモンの伝搬定数を求める。この伝搬定数を換算して求められる屈折率の測定感度は、金属表面で生じる分子間相互作用による屈折率変化を捉えるのに十分高く、生体分子間相互作用の最も主要な検出方法の一つとして認知されている（O. S. Wolfbeis and J. Homola, {mit Surface Plasmon Resonance Based Sensors, Springer, 2006.）

この測定法を発展させるものとして、研究代表者は金属表面の極微小領域に表面プラズモンを局所励起する手法を考案した。その方法では、可干渉な表面プラズモンを金属表面の1点に向かって集束させ、干渉によって表面プラズモンの局在を作り出す。（以下、これを集束表面プラズモンと呼ぶ。）この場合、表面プラズモンの集束領域が、屈折率測定を行う場合の測定領域となる。

集束表面プラズモンは、高い開口数を有する油浸対物レンズを用い、金属薄膜を成膜したカバーガラスに励起光を集束することにより、励起できる。また、この励起原理を用いると、金属薄膜からの反射光の空間周波数スペクトル（対物レンズの射出瞳における光強度分布）に現れる光吸収パターンから、励起された表面プラズモンの伝搬定数を求めることができる。これにより、表面プラズモンの回折限界に相当する空間分解能で金属表面の屈折率分布を測定することができる。たとえば、NA1.65の対物レンズを用いて波長632.8nmの光を、水に接する金薄膜に集光すると、集束表面プラズモンの生成する電場は半径180nm、金属表面から180nmの領域に局在することが明らかになっていた。

以上のように、表面プラズモンの励起光学系を工夫することによって、金属表面の局所的な屈折率測定が実現したが、この原理では、検出光学系は反射光空間周波数の分解を担うため、屈折率分布像形成における空間分解には寄与していなかった。そのため、検出光学系においても空間分解を行うことで、測定系全体の空間分解能を向上させる余地があると考えた。

一方、ナノ領域の屈折率を高感度に測定する手法の開発に関し、生体分子間相互作用の評価を行う場面をはじめ、多くの方面からの期待が聞こえていた。その一つが、認知症原因物質とされるアミロイド（A $\beta$ ）の凝集特性評価であった。認知症の予防や進行の抑制のために、A $\beta$ の凝集速度を低下させる物質の探索が盛んであるが、A $\beta$ の凝集速度を定量的に評価するために利用される手法については、A $\beta$ を蛍光標識するものが主流であり、蛍光標識が凝集特性を変化させてしまうことに対する懸念があった。特に、オリゴマーの段階では、その懸念が大きく、無標識で凝集特性を評価する手法の確立が期待されていた。

## 2. 研究の目的

本研究では、基板表面の屈折率分布測定において、高い屈折率測定感度を保ったまま空間分解能を向上させるための技術開発を行った。研究代表者が見出した集束表面プラズモンは、光と集団的電子振動との共鳴による高感度化効果、およびエバネッセント場の集束によるスポット微小化効果によって、既存の原理を大きく上回る屈折率測定感度、空間分解能を実現している。この独自の原理をベースに、さらに、検出光学系で空間分解を可能にする測定原理を導入し、他の屈折率測定法に比べ圧倒的に高い空間分解能を実現することを目的とした。

また、測定原理の特長を活かし、生体関連分子が相互作用する過程を無染色で計測する応用研究を行った。本研究では、基板表面に、認知症原因物質とされるアミロイド分子を固定し、これを核として、基板表面に滴下した溶液に含まれるアミロイドが形成する凝集体のサイズや凝集速度を、屈折率分布測定によって求める手法の有効性の検証を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、初めに、装置試作と性能検証を行う。空間分解能の向上にむけて、点検出器を用いて共焦点検出系を構成する方針を立てた。これには、点検出器に入射する光の強度が測定領域の屈折率によって変化することが条件となった。そこで、本研究では、環状瞳照明系（輪帯幅が極めて狭い瞳を用いる照明系）を用いて、集束表面プラズモンを励起することとした。図1に示すように、入射瞳において環状分布を

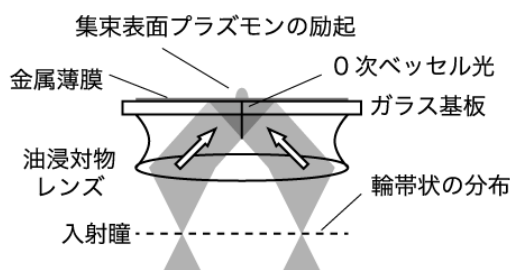


図1 環状瞳照明による表面プラズモン励起

て、集束表面プラズモンを励起することとした。図1に示すように、入射瞳において環状分布を

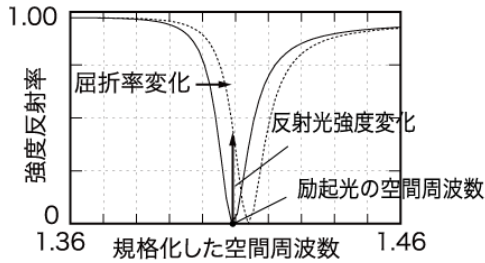


図2 屈折率変化による反射光強度変化

局在を最適化するには、励起にラジアル偏光を用いる必要があるため、輪帯分布を生成した後、対物レンズの入射瞳と共役な位置にラジアル偏光コンバーターを配置することとした。

検出光学系においては、対物レンズの射出瞳と光学的に共役な位置でラジアル偏光を直線偏光に戻し、これをフーリエ変換して点検出器に反射光を導くこととした。これによって、共焦点光学系を構成した。

この光学系による点像分布関数は、環状瞳照明によって金属表面に生成されるベクトル電場と点検出器からの逆伝搬光が金属表面に生成する像のベクトル電場の積によって得られる。そこで点像分布関数を計算するプログラムを作製し、理論的な空間分解能を明らかにする計算を行った。

さらに、この光学系を構築し、さらにステージ走査と同期して点検出器に入射する光の強度を測定するための制御プログラムを作製し、透明微小球の観察を行って、試作装置の空間分解能、屈折率測定感度を評価した。

続いて、モノマーAの金属表面への固定に関し、金属表面にシリカ層を20nm程度成膜し、APTS (3-aminopropyltriethoxysilane)をシラン結合させ、その末端のアミン基にクロスリンカーを用いてAを固定するプロセスの実行性を検証した。

#### 4. 研究成果

波長 632.8nm の光源 NA=1.65 の対物レンズ、最適膜厚の金薄膜でコートした屈折率 1.78 のガラス基板を仮定し、点検出器を用いる光学系における点像分布関数を計算した結果、図3を得た。センターピークの半値全幅を、従来からの、点検出器を用いない場合の光学系と比較すると、30%程度の縮小を確認することができた。さらに、装置試作を行い、直径 200nm のポリスチレン透明微小球を試料として、屈折率分布像を測定した結果、点検出器を用いると、微小球の像の半値全幅が 10%程度縮小すること、および、コントラストが顕著に向上することを確認できた。

Aの凝集速度評価については、当初計画の通り、モノマーAを固定し、これを核に形成される凝集体がもたらした有効屈折率変化を測定することは可能であったが、コントロールとして測定した、モノマーAが未固定の基板においても、有効屈折率変化が測定された。これは、Aが基板へ吸着するプロセスを経た凝集と考えられ、吸着したAの除去を試みた。基板表面をリンスする条件や添加剤を変えて、物理吸着したアミロイドの除去を試みたものの、その効果は十分ではなかった。そこで、当初の計画を変更し、倒立型の光学系を用い、液中でA凝集体が基板表面に沈下することで形成される堆積物のもたらす表面プラズモンの伝搬定数増大を測定することとした。すなわち、モノマーアミロイドを含む溶液を、測定基板上に滴下し、励起される表面プラズモンの伝搬定数の時間変化を求めた。この実験から、基板表面の屈折率の時間変化は、アミロイド凝集体の沈下、堆積を反映していると考えられる結果であったが、

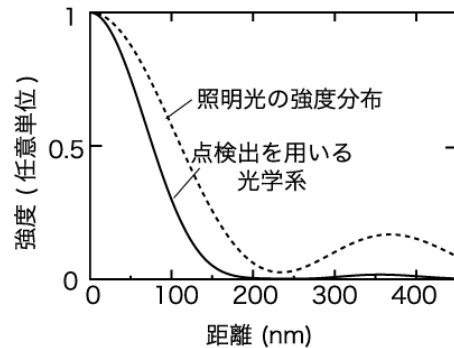


図3 点検出器による高空間分解能化

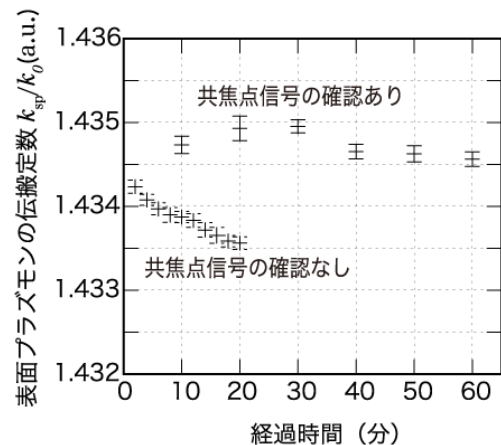


図4 測定値の安定性向上

与え、基板表面を照明する光の空間周波数を制限すると、図2に示すように、空間周波数対反射率曲線は、金属表面の屈折率に依存して変化（屈折率増大によって高空間周波数側に光吸収ディップがシフト）するため、照明光の空間周波数を適切に選択すると、その空間周波数における反射光強度は屈折率変化が反映されるようになる。そこで、本研究では、環状分布の生成に空間位相変調器を用い、環状分布を対物レンズの入射瞳に結像するように励起光学系を形成することとした。なお、集束表面プラズモンの

屈折率変化速度の再現性が低いことが分かった。その主たる原因は、超高開口数油浸対物レンズのイマージョンオイルの変性だと思われる。そこで、超高開口数油浸対物レンズのイマージョンオイル(屈折率1.78)の特性変化や、基板を保持する走査ステージの粗動メカで生じるドリフトに起因するフォーカス外れがもたらす測定値の変動を取り除くため、基板を光軸方向に走査して、反射光の共焦点検出を行い、これによって得られるプロファイルが、イマージョンオイルの劣化(屈折率不整合)による影響を受けずに初期状態を保っていること、基板が最大強度を与える位置に保持されていることを確認するプロトコルを追加した。その結果図4に示すように、共焦点検出を行わない場合に比べ、共焦点検出を行う場合の伝搬定数は、変動が顕著に抑制されることを確認できた。また、A の凝集には環境温度の影響が大きいため、試料を配置する空間をヒーターで加熱し、36度に環境温度を保つことができるように装置改良を行った。以上の改善を行い、10 $\mu$ MのモノマーA 溶液を用いた実験を行った結果、図5に示すように、A 凝集体の沈下に伴って、表面プラズモンの伝搬定数が約0.4%の増大を示した後、一定となることを確認した。特に、伝搬定数が増大する過程において、測定値の揺らぎは十分に抑制されており、凝集及び沈下の特性を定量的に評価できることを確認した。

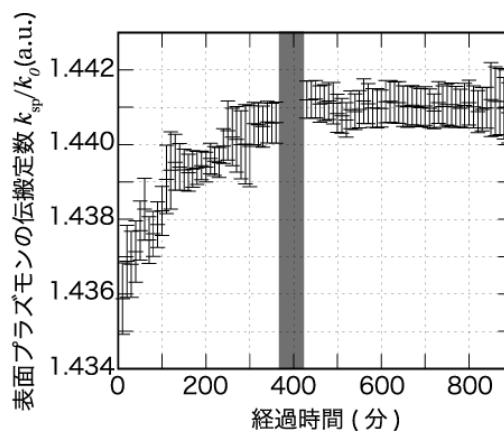


図5 A $\beta$ 堆積層の形成による伝搬定数増大

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Jun Ning, Hiroki Sato, Amintanggesi Hereid, Hiroshi Kano	4. 巻 427
2. 論文標題 Microscopic absorption measurement with enhanced sensitivity by using focused surface plasmons	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Opt. Commun.	6. 最初と最後の頁 405-408
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.optcom.2018.06.063	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 2件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Focused surface plasmon sensing of anisotropic sample towards cell characterization
3. 学会等名 第80回応用物理学会学術講演会 JSAP-OSA Joint Symposia 2019
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Spatial frequency response of focused surface plasmon facing an anisotropic sample
3. 学会等名 International Conference on Optics and Electro-optics (ICOL) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ipsita Chakraborty and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Spatial frequency response of focused surface plasmon facing an anisotropic medium and solving the inverse problem under speckle noise towards cell characterization
3. 学会等名 International Symposium on Opto-mechatronic technologies (ISOT) 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Aomintanggesi Hereid and Hiroshi Kano
2. 発表標題 Surface plasmon microscopy of refractive index distribution using a confocal optical system
3. 学会等名 The 15th International Conference on Near-field Optics, Nanophotonics & Related Techniques (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加野 裕
2. 発表標題 集束表面プラズモンを利用した顕微屈折率センシング・イメージング
3. 学会等名 2018年度精密工学会秋季大会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hiroshi Kano
2. 発表標題 Surface plasmon focusing and its application to refractive index imaging
3. 学会等名 第79回応用物理学会学術講演会 JSAP-OSA Joint Symposia 2018 (招待講演)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------