

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21165

研究課題名(和文) プラズモン導波路を用いたリモート励起探針増強蛍光の開発

研究課題名(英文) Plasmonic waveguiding remote surface enhanced fluorescence microscopy

研究代表者

雲林院 宏(Hiroshi, Uji-i)

北海道大学・電子科学研究所・教授

研究者番号：40519352

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、プラズモン導波路として機能する化学合成で作成した直径100nm、長さ数十マイクロメートルの銀ナノワイヤー(AgNW)をAFMカンチレバー先端に導入することで、10nm以下の高い空間分解能を有する新たな「リモート励起探針増強蛍光(RE-TEF)顕微鏡」の開発を目指した。本研究では、ガルバニック置換反応、光誘起金ナノ粒子局所析出法、2本のAgNWを並べる方法を比較開発し、これらを用いたRE-TEFでは、30 nm程度の空間分解能でスペクトルマッピングが可能であり、新規光DNAマッピング解析、2次元半導体材料解析、細胞内増強ラマン測定に応用できることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

蛍光遺伝子マッピングは染色体に存在する特定の遺伝子配列部位の相対位置を蛍光測定で特定することであり、ゲノム配列決定、医療診断、病原同定などに用いられる臨床でも重要な技術である。シーケンスでは数週間かかる判断が、蛍光マッピングでは数日に行えるため、迅速な治療判断が必要な場合にその威力を発揮する。本研究で開発したリモート励起TEFは高い空間分解能を有するため、新たなDNAマッピング技術などに応用することで医療分野への高い貢献度が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop a new "remote-excitation probe-enhanced fluorescence (RE-TEF) microscope" with high spatial resolution of less than 10 nm by introducing silver nanowires (AgNWs) of 100 nm in diameter and several tens of um in length, chemically synthesized to function as a plasmon waveguide, on an AFM cantilever. In this study, we comparatively developed a method of galvanic substitution reaction, photo-induced local deposition of gold nanoparticles, and alignment of two AgNWs to couple far-field light in propagating plasmons. These probes enable spectral mapping with a spatial resolution of about 50-100 nm, which is useful for novel optical DNA mapping analysis.

研究分野：顕微分光

キーワード：近接場顕微鏡 DNAマッピング プラズモニクス 銀ナノワイヤー

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

高い空間分解能を有する光学顕微鏡として、2014年にノーベル化学賞を得た超解像蛍光顕微鏡がある。これらの空間分解能は数十 nm から 100 nm 程度であり、回折限界 (200~300 nm) よりも遥かに高い分解能が得られる。この超解像蛍光顕微鏡の興味深い応用として、遺伝子解析の一つである光 DNA マッピングに適用した報告が挙げられる (Nucl. Acids Res. 2014, 42, e50 など)。従来の光 DNA マッピングより精度の高いマッピングが可能であり、医療診断への貢献が期待される例である。しかしながら、試料作製時に DNA を引き伸ばす必要があるが、その引き伸ばし具合にばらつきが出てしまうため、統計解析に時間がかかってしまうこと、また空間分解能は 100 塩基対程度にとどまることが課題として残されている。DNA マッピングのように表面で解析を行う応用に適した他の方法として、探針増強蛍光顕微鏡 (TEF) が挙げられる (図 1 左)。この方法では、先鋭化した貴金属プローブ先端で励起される局在表面プラズモンを利用して、試料の蛍光ラベルを局所的に増強励起しながら計測する。そのため、試料の形状とともに蛍光像も高い空間分解能で得られるため、DNA の引き伸ばされ具合を形状から直接解析でき、DNA マッピングなどには適した方法である。しかしながら、TEF の空間分解能は、いまだ数十 nm から百 nm 程度にとどまっている。その理由として、(1) プローブ先端付近に存在する他の蛍光分子が遠視野励起光で同時に励起されてしまい、それが雑音となってしまい空間分解能が上がらない、(2) プローブ先端が到達する前に遠視野励起光で周辺の蛍光分子が消光されてしまうことが挙げられる (図 1 左)。そのため、TEF を光 DNA マッピングに応用した際には、マッピング欠損を引き起こしてしまうことが最も大きな課題となる。そのため、雑音や欠損を引き起こさない新たな TEF 励起法の開発が望まれる。

2. 研究の目的

本研究では、蛍光消光によるマッピング欠損を引き起こさず、真に高い空間分解能を発揮する探針増強顕微鏡法を実現するため、当該研究者が開発してきたプラズモン導波路を利用した新たな「リモート励起蛍光・ラマン散乱」を利用した新たな TEF プローブを開発することを目的とした。これにより、世界最高空間分解能を有する新たな光 DNA マッピングの基礎技術を創出する (図 1 右)。

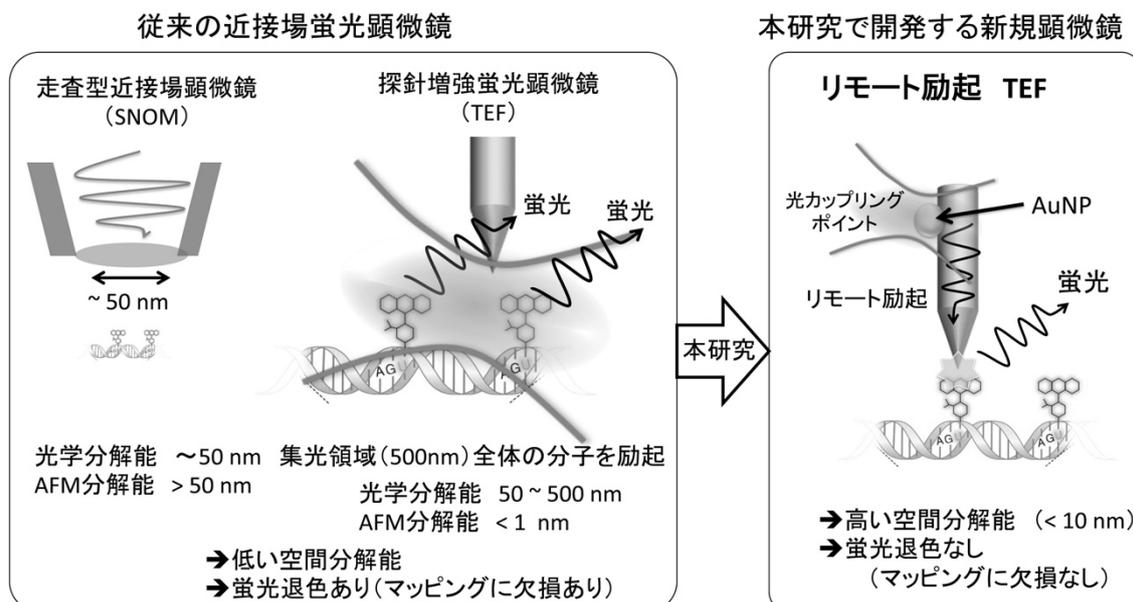


図 1 研究背景と研究目的

3. 研究の方法

本研究では、当該研究者が開発した銀ナノワイヤー (AgNW) プローブ探針増強ラマン (TERS)・蛍光顕微鏡 (TEF) と、プラズモン導波路を利用したリモート励起を組み合わせ、リモート励起 TEF を実現する。AgNW をプラズモン導波路として利用した「リモート励起」は、当該研究者が 2009 年に初めて提案した (Uji-i *et al.* Nano Lett 2019, 9, 995.)。しかし、TERS や TEF で、リモート励起するためには、光のカップリングポイントを AgNW 上の任意位置に作成する必要があるが、望んだ箇所にポイントを作成する手法が存在しなかった。本プロジェクトでは、光カップリングを可能とする AgNW プローブを、ガルバニック置換反応や光金ナノ粒子デポジット法などを利用して開発し、その評価を行った。

4. 研究成果

光カップリングポイント性能評価のため、まずガルバニック法と光デポジット法を比較した。

(1) **ガルバニック法**: 銀ナノワイヤーを塩化金酸水溶液に浸漬させると、ガルバニック置換反応が起こり、銀ナノワイヤー表面に金銀合金がランダムに形成される (図 2a)。同時にナノワイヤー表面にナノメートルスケールの凹凸ができるため、光カップリングポイントが多数作成される。このガルバニック反応をさせた銀ナノワイヤー (Au-etched AgNW) では、中空構造が作成されることがあり、(図 2c) ワイヤーの機械的強度が低くなってしまい、TEF による表面走査には不適切であることが明らかとなった。

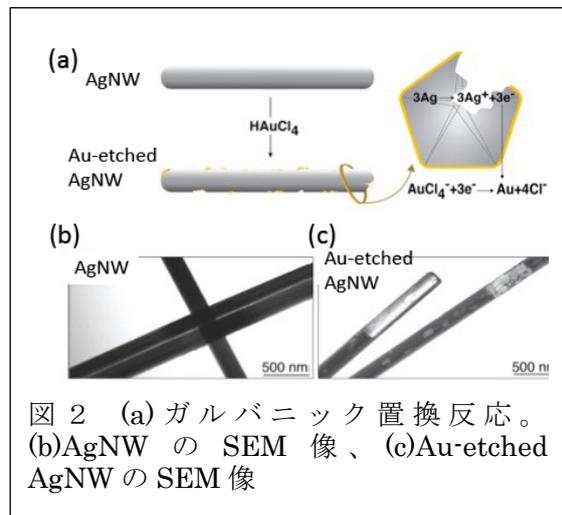


図 2 (a)ガルバニック置換反応。(b)AgNW の SEM 像、(c)Au-etched AgNW の SEM 像

しかし、表面走査する必要がない場合には利用可能であり、本プロジェクトでは細胞内増強ラマン分光用のリモート励起プローブとしての性能を評価した。本成果は、American Chemical Society(ACS)の Chemical Analysis 93, 5037 – 5045 (2021)に国際共著論文として発表した。

(2) **光金デポジット法**: ガルバニック反応のように AgNW の強度を失うことなく、金ナノ粒子 (Au NP) を AgNW の任意位置に配置するために、当該研究者が開発した光誘起金ナノ粒子デポジット法をリモート励起プローブ作製に適用した。ガルバニック反応を抑制するために、反応溶液の pH を高く (pH > 10) 設定した。TEF のプローブとして利用するため、まず AgNW をカンチ

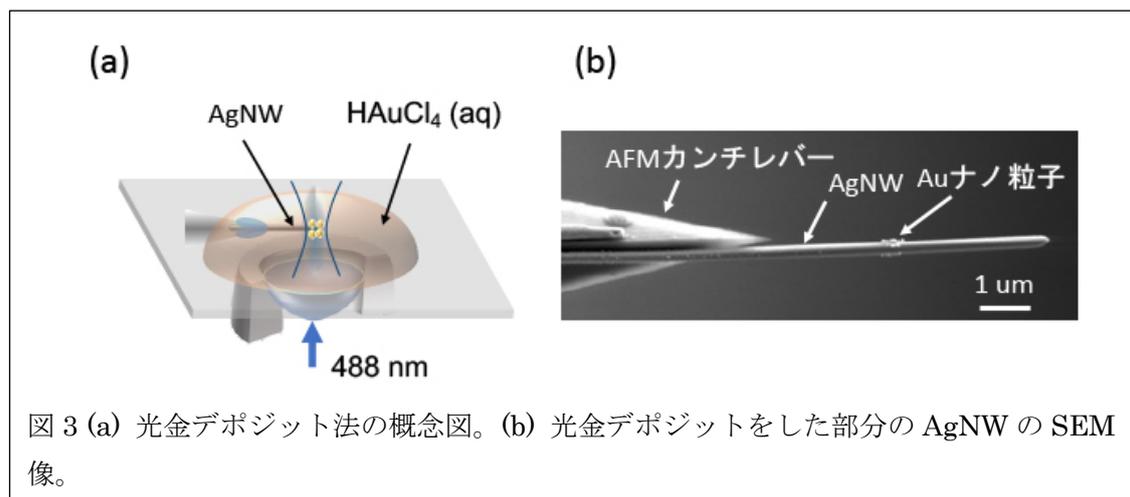


図 3 (a) 光金デポジット法の概念図。(b) 光金デポジットをした部分の AgNW の SEM 像。

レバー先端に導入した後に光デポジットをする必要がある。図 3a に示すように、プローブ先端に導入した AgNW 部を塩化金酸水溶液に浸水させ、任意位置に可視レーザー光を集光することで (図 3a)、AgNW 表面に複数の Au NPs を析出させることに成功した (図 3b)。このプローブを用いることで、リモート励起が可能であることは確認した。上記同様、まず表面走査を必要としない細胞内増強ラマン分光で、プローブとしての性能を評価した。その成果は American Chemical Society (ACS) ACS Appl. Nano Mater. 4, 9886–9894 (2021) に国際共著論文として発表した。このプローブは表面走査に耐える強度を有しており、リモート励起 TEF 用のプローブとして利用することは可能であるが、その性能は光 DNA マッピングなど微弱光検出を必要とする応用には十分ではないことが明らかとなった。これは、金ナノ粒子からの発光がバックグラウンドノイズとして乗ってしまうこと、光カップリング効率が低いこと、AuNP 部分でプラズモンが発光または熱に変換されてしまうことなどが理由であると考えられる。

(3) 金コート法

探針増強顕微鏡では、蛍光のみならずラマン散乱を増強して検出することも可能である (探針増強ラマン散乱: TERS と呼ばれる)。光金デポジット AgNW を作成する際に、AgNW を pH 調整した塩化金酸水溶液に浸すが、光を照射しなくとも AgNW 表面は金薄膜でコートされる (図 4)。この金コート AgNW (Ag@Au NW) が TERS プローブとして高い性能を示すことを本プロジェクトで見出した。図 4a は、カーボンナノチューブの TERS 像である。Ag@Au NW を用いる事により、5 nm 程度の空間分解能が得られた。また、TERS 像の各点でラマンスペクトルを得ることができており、図 4b に示すように高い信号ノイズ比でスペクトル測定も可能であることを示した。本プロジェクトで当初目的としていた「リモート励起探針増強蛍光」とは異なり、ここではラマン散乱を利用しているが、光 DNA マッピングを増強ラマン散乱で行うことも可能であるため、最終目標は同一である。本結果は、The Royal Society of Chemistry (RSC) の Nanoscale, 14, 5439–5446 (2022) に国際共著論文として発表した

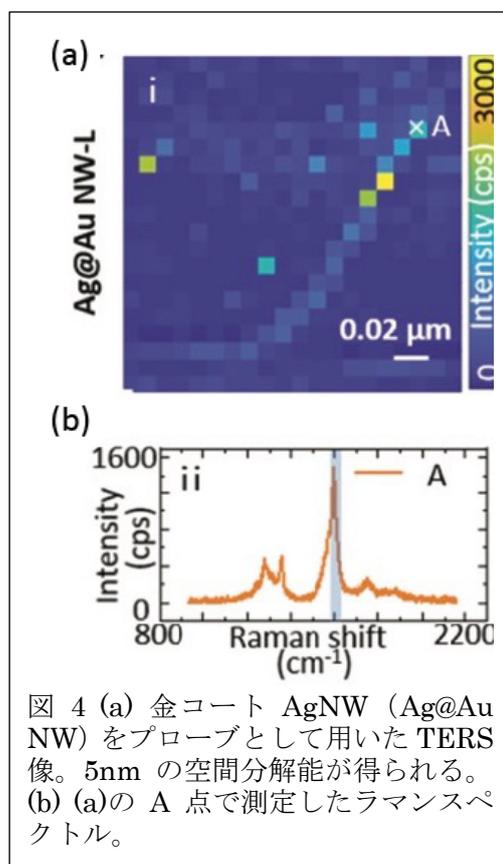


図 4 (a) 金コート AgNW (Ag@Au NW) をプローブとして用いた TERS 像。5nm の空間分解能が得られる。(b) (a) の A 点で測定したラマンスペクトル。

(4) Two Wire 法

金ナノ粒子を銀ナノワイヤー上に析出させることで、光カップリングポイントを導入するという当初の目的は達成し、リモート励起探針増強蛍光顕微鏡用の新規プローブの作製には成功した。しかしながら、光 DNA マッピングのような微弱光検出を必要とする応用には、その性能は満足行くものではなかった。これは前述したとおり、金ナノ

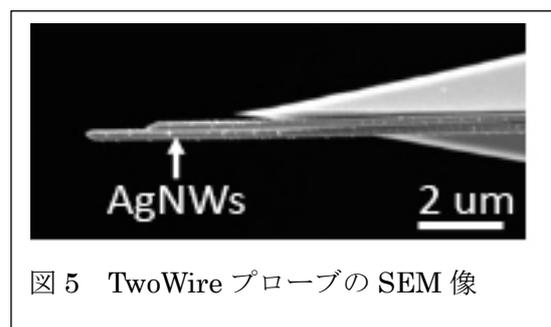


図 5 TwoWire プローブの SEM 像

粒子によってプラズモンが減衰してしまっていることに起因していると考えられている。これを避けるためには、金ではなく銀をカップリングポイントの材料とすることが望ましい。しかし、銀ナノ粒子を上記の光デポジット法で析出させることは困難であった。そのため、ナノ粒子ではなく、銀ナノワイヤーそのものをカップリングポイントに利用することを考察した。具体的には、図5に示すように2本のナノワイヤーを平行に並べてAFMカンチレバー上に導入したTwoWireプローブを新たに開発した。AgNWが2本並んでいる部分に励起光を集光すると、伝搬プラズモンが励起され、図5でAgNWが1本になっている左側先端にまでプラズモンが伝搬し、先端で局在化する。この局在化したプラズモンで蛍光を励起することが可能であり、現在30nm程度の空間分解能まで達成している。また1～3で観測された金ナノ粒子からの発光によるノイズの問題も解決され、高い信号ノイズ比でのTEF測定が可能であることを確認した。このプローブの性能評価などは国際共著論文として投稿予定であるが、次世代リモート励起探針増強蛍光・ラマン顕微鏡用のプローブとして有力な候補であり、今後さらなる開発を継続する予定である。

以上、本プロジェクトでは、リモート励起を可能とするプラズモン導波路プローブを3種類開発下。これらにより、探針増強ラマン顕微鏡では5nm、探針増強蛍光顕微鏡では30nmの空間分解能を実現することに成功した。これら空間分解能は世界トップレベルである。今後、DNAマッピングやタンパク質解析など医療診断への応用に展開していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Wolf Mathias, Hirai Kenji, Toyouchi Shuichi, Fron Eduard, Peeters Wannes, De Feyter Steven, Uji-i Hiroshi	4. 巻 56
2. 論文標題 Label-free visualization of heterogeneities and defects in metal organic frameworks using nonlinear optics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Communications	6. 最初と最後の頁 13331 ~ 13334
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/d0cc05470d	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
1. 著者名 Yamaguchi Kazushi, Otomo Kohei, Kozawa Yuichi, Tsutsumi Motosuke, Inose Tomoko, Hirai Kenji, Sato Shunichi, Nemoto Tomomi, Uji-i Hiroshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Adaptive Optical Two-Photon Microscopy for Surface-Profiled Living Biological Specimens	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 ACS Omega	6. 最初と最後の頁 438 ~ 447
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsomega.0c04888	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する
1. 著者名 Ricci Monica, Fortuni Beatrice, Vitale Raffaele, Zhang Qiang, Fujita Yasuhiko, Toyouchi Shuichi, Lu Gang, Rocha Susana, Inose Tomoko, Uji-i Hiroshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Gold-Etched Silver Nanowire Endoscopy: Toward a Widely Accessible Platform for Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Analysis in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5037 ~ 5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c04120	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
1. 著者名 Ricci Monica, Fortuni Beatrice, Vitale Raffaele, Zhang Qiang, Fujita Yasuhiko, Toyouchi Shuichi, Lu Gang, Rocha Susana, Inose Tomoko, Uji-i Hiroshi	4. 巻 93
2. 論文標題 Gold-Etched Silver Nanowire Endoscopy: Toward a Widely Accessible Platform for Surface-Enhanced Raman Scattering-Based Analysis in Living Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Analytical Chemistry	6. 最初と最後の頁 5037 ~ 5045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.analchem.0c04120	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

1. 著者名 Zhang Qiang, Inose Tomoko, Ricci Monica, Li Jiangtao, Tian Ya, Wen Han, Toyouchi Shuichi, Fron Eduard, Ngoc Dao Anh Thi, Kasai Hitoshi, Rocha Susana, Hirai Kenji, Fortuni Beatrice, Uji-i Hiroshi	4. 巻 4
2. 論文標題 Gold-Photodeposited Silver Nanowire Endoscopy for Cytosolic and Nuclear pH Sensing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACS Applied Nano Materials	6. 最初と最後の頁 9886 ~ 9894
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnm.1c02363	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

1. 著者名 Wen Han, Inose Tomoko, Hirai Kenji, Akashi Taiki, Sugioka Shoji, Li Jiangtao, Peeters Wannes, Fron Eduard, Fortuni Beatrice, Nakata Yoshihiko, Rocha Susana, Toyouchi Shuichi, Fujita Yasuhiko, Uji-i Hiroshi	4. 巻 14
2. 論文標題 Gold-coated silver nanowires for long lifetime AFM-TERS probes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nanoscale	6. 最初と最後の頁 5439 ~ 5446
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1NR07833J	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

1. 著者名 Wolf Mathias, Toyouchi Shuichi, Walke Peter, Umemoto Kazuki, Masuhara Akito, Fukumura Hiroshi, Takano Yuta, Yamada Michio, Hirai Kenji, Fron Eduard, Uji-i Hiroshi	4. 巻 12
2. 論文標題 Li@C60 thin films: characterization and nonlinear optical properties	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 RSC Advances	6. 最初と最後の頁 389 ~ 394
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D1RA08051B	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8件 (うち招待講演 4件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 中尾 佑輔 豊内 修一, 平井 健二, 猪瀬 朋子, 雲林院宏
2. 発表標題 銀ナノワイヤへの金ナノ粒子析出とナノ熱源としての利用
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 杉岡 祥治、豊内 秀一、原 慎之介、猪瀬 朋子、平井 健二、藤田 康彦、田中 啓文、雲林院 宏
2. 発表標題 探針増強ラマン分光法によるグラフェンナノリボンの評価
3. 学会等名 第81回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Hiroya Saito, Han Wen, Tomoko Inose, Kenji Hirai, Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Length controlled AFM-AgNW probes for TERS
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Han Wen, Syoji Sugioka, Naoyuki Kanda, Jiangtao Li, Tomoko Inose, Yasumitsu Miyata, Yusuke Nakanishi, Kenji Hirai, Yasuhiko Fujita, Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Nanoscale characterisation of carbon nanomaterials using tip-enhanced Raman spectroscopy
3. 学会等名 第69回応用物理学会春季学術講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Nanowire Single-cell endoscopy
3. 学会等名 Nanomeet2021 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Single cell Endoscopy - Enhanced Raman spectroscopy inside a live cell -
3. 学会等名 レーザー学会学術講演会第42回年次大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 文 暎, Beatrice Fortuni, 豊内 秀一, 猪瀬 朋子, 平井 健二, 藤田 康彦, 雲林院 宏
2. 発表標題 "Au-coating Silver Nanowire based TERS probe How high EF and long lifetime can we get?"
3. 学会等名 2022年第69回応用物理学会春季学術講演会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Hiroshi Uji-i
2. 発表標題 Nanowire-based nanoscopy
3. 学会等名 Pacifichem 2020 Congress（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2021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
研究分担者	猪瀬 朋子 (INOSE Tomoko) (10772296)	京都大学・高等研究院・特定助教 (14301)	

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			
ベルギー	ルーヴァン大学			
オーストラリア	メルボルン大学			