

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 6日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2012

課題番号：24655062

研究課題名（和文） 医療診断用超高感度ラマン増強基板の創製

研究課題名（英文） Development of Ultra-high-sensitivity Raman-enhancing Plates for Medical Diagnosis

研究代表者 川崎 三津夫 (KAWASAKI MITSUO)  
京都大学・工学研究科・准教授

研究者番号：50111927

研究成果の概要（和文）：銀超微粒子の表面プラズモン電場増強効果に加えて、鏡面結合型表面プラズモンを結びつけた超ラマン増強（U-SERS）素子を創製し、従来の医療診断用光技術分析法と比べて数百倍以上の感度を有し、微量成分検出が短時間で可能な超高感度メディカルセンサーとしての実用性を実証するとともに、その機構と最適基板構築のための条件を明らかにすることを目的として、1年間の計画的な研究を実施した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to construct an ultra-high sensitivity surface-enhanced Raman scattering (U-SERS) substrate, which allows a highly rapid medical sensing of trace amounts of analytes for medical diagnosis. The mechanism of U-SERS and the optimum device structures were investigated.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：バイオセンサー、表面プラズモン、銀超微粒子、表面増強ラマン散乱

## 1. 研究開始当初の背景

ラマン分光法は分子の振動状態について有用な情報を提供する一方で極めて低感度であり、70年代にラマン信号が $10^4$ 倍程度増強される現象（表面増強ラマン散乱：SERS）が発見されるまではその利用はごく限られていた。その後 SERS 現象の本質ともいえる金属ナノ構造の制御技術が飛躍的に発展する中で、局所的な増強率が $10^{14}$ 倍にも達する系も報告され、高感度センサーとしてラマン分光法が利用できるという新たな発想・期待につながっている。しかし特に医療診断現場における微量成分分析（抗ガン剤、腫瘍マーカー、損傷DNA分析など）のための簡便なプローブ技術としてラマン分光法を活用する道を開くためのハードルは高い。測定感度そのものについても、現在市販されている SERS

基板の感度は必要値を数桁以上下回り、また上記の $10^{14}$ 倍近くの増強率は基板のごく一部の例外的な場所（ホットスポット）に付随する局所的な値である。目的達成のためには、基板全体としての集団平均増強率が望ましくは $10^{12}$ 倍程度に達し、かつ基板毎の増強率に有意な差がない再現性の高い素子が必須である。

## 2. 研究の目的

当研究室で独自に開発した銀超微粒子の表面プラズモン電場増強効果に加えて、鏡面結合型表面プラズモンを結びつけた超ラマン増強（U-SERS）素子を創製し、従来の医療診断用光技術分析法と比べて数百倍以上の感度を有し、微量成分検出が短時間で可能な超高感度メディカルセンサーとしての実用

性を実証するとともに、その機構と最適基板構築のための条件を明らかにする。

具体的には SERS (表面増強ラマン散乱) 評価実験でごく一般的に利用される R-6G 色素やナフタレンチオール分子などを用いて  $10^{12}$  倍以上の集団平均 SERS 増強率を与える基板の条件を見出し、超増強過程の原理・機構を明らかにする。また本系が神経伝達物質、抗がん剤、DNA などの微量分析に適用できることを実証し、実用的な素子への展開を図る。

### 3. 研究の方法

#### (1) 蛍光・ラマン信号の比較測定法

用いた SERS 増強率の標準評価装置の概略は図 1 に示した通りで、非集光レーザー光源の標準的なパワーは 1 mW 未満である。この構成(電子冷却型ダイオードアレイ検出器を使用)では、 $10^8 \sim 10^9$  分子/cm<sup>2</sup> (1 フェムトモル/cm<sup>2</sup> 以下) の被検出分子密度で有意なラマン信号が共鳴ラマン効果の寄与なしに得られることが  $10^{12}$  倍以上の集団平均増強率の達成を意味する。

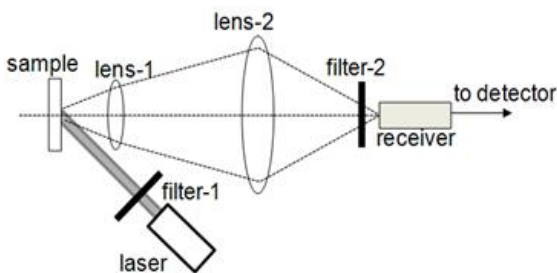


図 1 使用した簡易発光分光システム

#### (2) 超 SERS 基板の作成と最適構造パラメータの決定

U-SERS 基板の最適化にあたって調整が必要な構造パラメータの種類は図 2 に示したように数多い。この中で特に重要なものは、最上層の銀超微粒子周りの太字で記した因子である。これらについてその最適条件を詳しく調べた。

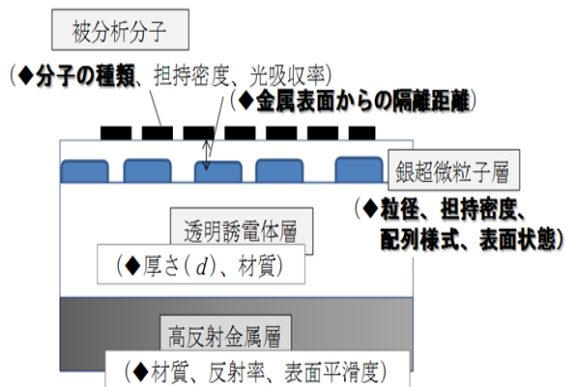


図 2 U-SERS 基板の構造因子

#### (3) 金、金銀合金、および金/銀コアシェル微粒子の増強特性

U-SERS の発現機構を明らかにする上で、金や合金超微粒子を用いた系との機能比較が役立つと考えられる。これらの超微粒子も DC スパッタ法を利用することにより比較的容易に作成できることがわかっている。できるだけ銀超微粒子に近いサイズと形態を有した試料を同方法により作成し、銀が U-SERS の発現に必須の要素となるかどうか、また合金化により正負いずれの効果が現れるか詳しく調べた。

### 4. 研究成果

#### (1) 鏡面結合型素子の最適化

当該の目的に資する銀超微粒子層の作成法として、DC スパッタ法の有用性を改めて確認した。室温で DC 成膜した試料について、種々の温度で大気中アニール処理を数分行くと、図 3 に示したような銀超微粒子膜の構造変化が生じる。これらの中で特に増強能を向上させる構造は、比較的低温 (100°C 以下) でのアニール処理により得られる、高密度銀超微粒子層であることが分かった。

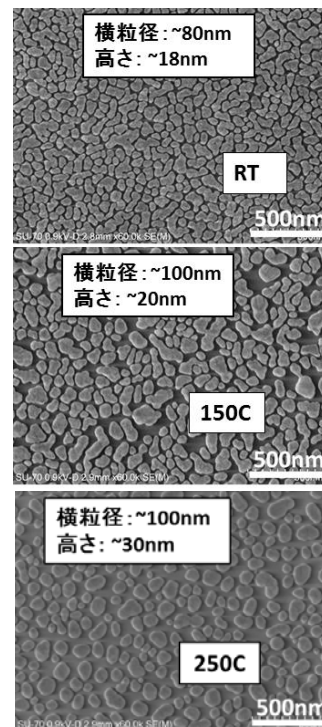


図 3 ラマン活性層を構成する銀超微粒子層の SEM 像

この層を鏡面結合型で使用した場合、 $10^{12}$  倍以上の集団平均 SERS 増強率の実現という究極の目標達成には至らなかったものの、従来 SERS 基板の平均的な増強率 ( $10^4 \sim 10^6$ ) を大きく上回る、 $10^{10}$  倍以上の増強率が実現できることがわかった。図 4 は単分子層以下の R6G

吸着層に対して測定されたラマンスペクトルの一例である。

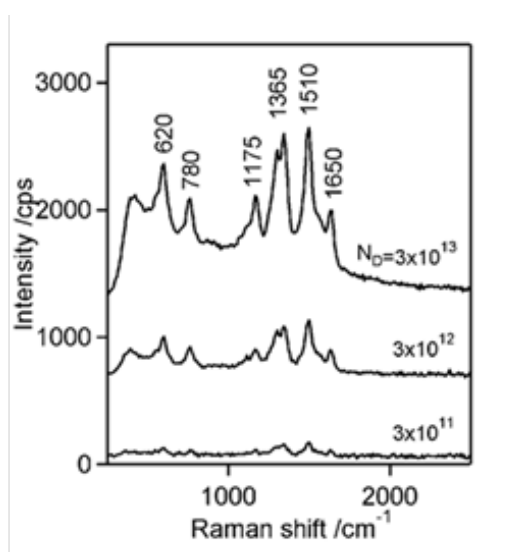


図4 実際に測定された R6G 吸着層のラマンスペクトルの一例

### (2) 金、金銀合金、および金/銀コアシェル微粒子の増強特性

表面プラズモン励起を介したラマンや発光増強に関して、銀は最も強い増強作用を示す一方で、化学的には比較的不安定という欠点もある。そこで、金超微粒子、金銀超微粒子、さらには薄い金シェルで覆われたコアシェル型微粒子層を有した同様な素子を作成し、それらの性能比較を行った。その結果、金や金銀合金微粒子層の増強作用は極めて小さく、実用にはならないと結論した。一方、図3の銀微粒子が薄い金シェルで覆われたコアシェル型の超微粒子層を用いると、発光増強作用は有意に低下してしまうものの、表面増強ラマン散乱については、銀超微粒子層を用いた素子に匹敵する性能を示すことが明らかになった。限定的ではあるが、銀超微粒子の化学的不安定性を補うための有効策として利用が可能である。

### (3) 実用素子としての新たな課題の抽出とその解決法

以上の成果にも関わらず、その一方で、メディカルセンサーとしての利用を図る上で、当該素子が極めて深刻な課題を抱えることもその後明らかになった。すなわち、医学・生物化学分析で常用される生理食塩水(0.1M以上の高濃度)という環境に銀超微粒子が直接接触すると、ハロゲン化物イオンとの反応により銀超微粒子が即座に侵されて増強機能を失うという問題である。しかも、この環境に試料が曝される時間は場合により数日におよび、その温度も38℃という比較的高い

条件である。さすがにこの条件では、上記のコアシェル型粒子も十二分な耐性を示さない。さらに、裸の銀微粒子層の物理的な強度は著しく小さく、この点でも実用素子としての条件を十分には満たさない。

この難問の解決法として、表面プラズモン増強電場を全く減衰させずに、その最表面に担持された検体分子のラマン信号を大きく増強する革新的な保護膜の開発に成功した。これにより銀超微粒子層の化学的・物理的な耐久性を十分確保した上で、ラマン増強率が最大で $10^8$ 倍を超える実用素子を構築する道が開かれた。その素子の構造は、図5に示したようなもので、上記銀超微粒子層が厚さ100nm以上の構造異方性シリカ膜で覆われている。

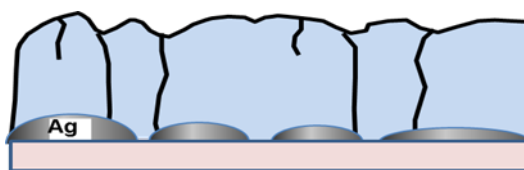


図5 異方構造型保護膜で覆われた堅牢な素子の断面模式図

100nm以上の厚さを有した保護膜を介して、銀超微粒子の表面プラズモン誘起増強場が最表面に置かれた検体分子に作用することはこれまでの常識を覆す現象であり、その解釈・説明は今後の課題であるが、特に強調すべき点は、このような保護膜を介した増強ラマン信号の方が、銀微粒子表面に直接吸着した分子の増強ラマン信号の大きさを上回ることであり、また同保護膜を有した素子を無機塩水溶液に浸漬すると、さらに一桁以上大きなラマン増強信号が得られることも明らかになった。図6はその比較を行ったラマンスペクトルの一例である。

さらに図7は、上記保護膜の厚さと増強ラマン信号との関係を示したものであり、厚さが数百nm以上になっても尚銀表面に直接吸着した検体分子よりも大きな増強信号が得られるという、本増強素子の特異性を端的に表している。

以上の結果は、R6Gという比較的単純な色素分子を用いて得られたものであるが、測定可能な分子、化学種はもちろこれに限定されず、ラマン活性を有するほとんど全ての化学種の分析に利用可能である。さらに、生体組織や細胞膜など、生医科学、医療診断分野での分析対象となるより複雑な系に対しても、増強ラマン信号の検出にすでに成功しており、今後の発展が大いに期待される。

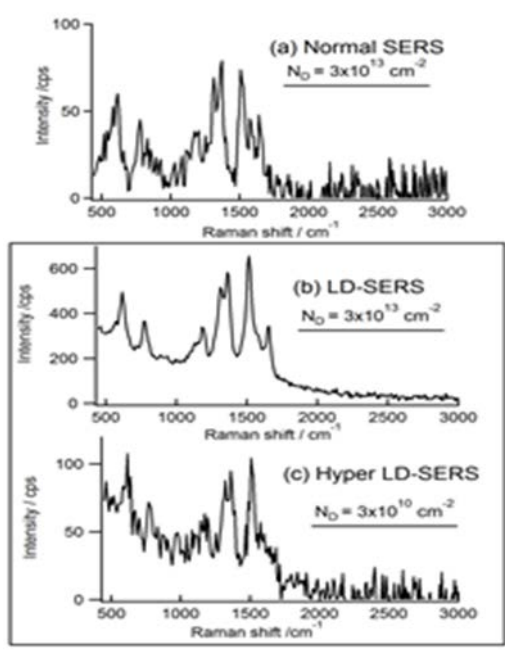


図6 銀超微粒子に直接吸着したR6G色素のラマンスペクトル(上)、異方構造的保護膜を有した素子で得られたスペクトル(中)、および二桁以上低い分子密度で測定された超SERS信号(下)の比較

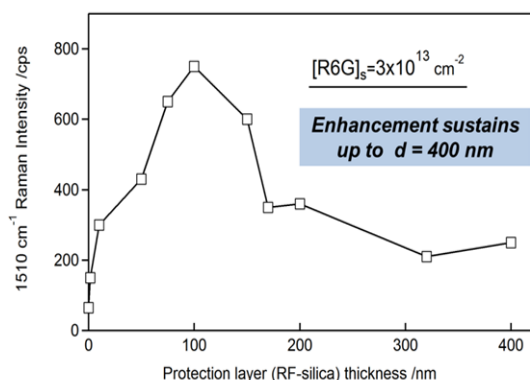


図7 増強ラマン信号の強度と保護膜の厚さの関係

## 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)

[学会発表] (計4件)

(1) 川崎三津夫、異方性シリカ保護層を有する銀ナノアイランド膜による長距離増強発光・増強ラマン散乱、日本化学会 第93春季年会、平成25年3月24日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス

(2) 川崎三津夫、銀微粒子表面プラズモン素子による長距離型増強発光と増強ラマン散乱、2012年度 日本写真学会秋季研究発表会、平成24年11月30日、京都工芸繊維大学

(3) 川崎三津夫、Long-distance Enhancement in SERS Using a Corrosion-Proof Silver Plasmonic Substrate、International symposium of “Applications of Spectroscopy to analyzing biological events and catalytic reaction、平成24年11月28日、東京工業大学

(4) 川崎三津夫、保護膜で安定化された銀微粒子表面プラズモン基板による長距離型増強発光・増強ラマン散乱、第31回 固体・表面光化学討論会、平成24年11月22日、大阪大学 吹田キャンパス

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

川崎 三津夫 (KAWASAKI MITSUO)  
 京都大学・工学研究科・准教授  
 研究者番号：50111927