# 金属ナノ粒子相互作用および、

# バイオセンサーに関する調査研究

理化学研究所 岡本 隆之

### 1 局在プラズモン共鳴を利用したバイオセンサー

近年、表面プラズモン共鳴現象を用いたセンサーが実用化され、特に免疫反応の 実時間高感度測定の分野で威力を発揮している[1]。このセンサーは金属平面上の表 面プラズモン共鳴を用いている。表面プラズモンセンサーが高感度であるのは、表 面プラズモン共鳴が起きたとき、金属表面での電場が入射光の電場に比べて2桁程 度大きくなるためである。

これとは別に金属微粒子で起きる共鳴として、局在プラズモン共鳴が知られている。金コロイド懸濁液が赤色を呈するのはこのためで、入射光の振動電場と、金微 粒子内の自由電子が、波長 520 nm 近傍で、共鳴的に振動するからである。波長に 比べて十分小さい微小金属球による局在プラズモンの共鳴条件は静電近似のもとで、 次式で表される [2]。

$$\Re[\varepsilon_m(\omega)] = -2\varepsilon_0 \tag{1}$$

ここで、 $\varepsilon_m(\omega)$ は金属の誘電率で、 $\varepsilon_0$ は球の周りの媒質の誘電率である。共鳴が起きると、金属微粒子表面では入射光の電場に対して2、3桁程度大きい電場が生じることが知られている。また、可視域において強い共鳴が得られる金属としては、金や銀などが知られている。

近年、この局在プラズモン共鳴をセンサーに応用することが試みられている。Meriaudeau ら [3] はガラス基板上に金薄膜を真空蒸着しそれをアニールして得られた島 状金薄膜をセンサーとして用い、バルクの液体の屈折率を測定している。その後、 Okamoto ら [4] は金ナノ粒子を化学的な結合剤を用いてガラス基板上に固定した金 コロイド単層膜をセンサーとして用い、バルクの液体の屈折率だけではなく、バイ オセンサーとして重要になる誘電体薄膜の膜厚測定に応用した。さらに、Nathら [5] は金コロイド単層膜で実際の生体分子であるストレプトアビジンの検出を行った。 また、Cheng ら [6] は金ナノ粒子をクラッド層を除去した光ファイバー表面に固定し たセンサーを提案し、同様にストレプトアビジンの検出を行い、9.8×10<sup>-11</sup>M の検 出限界を得ている。

球形以外の金属ナノ粒子における局在プラズモン共鳴を応用したセンサーとして、 Haes ら [7] は三角形の銀ナノ粒子をガラス基板上に配列したセンサーを提案し、や はり、ストレプトアビジンの検出を行っている。三角形の銀ナノ粒子はポリスチレ ンラッテクス球をガラス基板上に規則的に最密に1層堆積し、その上から銀薄膜を 蒸着した後、ラッテクス球を除去することで作製している。Takeiら [8] はより複雑 な構造における局在プラズモン共鳴をバイオセンサーに用いている。本構造はガラ ス基板上に堆積した金薄膜の上にポリスチレンラッテクス球を1層堆積し、さらに、 その上から金薄膜を蒸着することによって作製されている。本センサーではラッテ クス上の帽子状の金微粒子における局在プラズモンとラッテクス球層がつくる共振 器とが相互作用し、感度のよいセンサーを実現している。

これらの金属ナノ粒子における局在プラズモン共鳴を利用したセンサーは、従来 の表面プラズモン共鳴センサー [1] と比較すると次のような特長を持つ。1) 全反射 光学系を用いないため、プリズムを必要としない。2) 真空蒸着では金薄膜は素子の 外側表面だけにしか堆積できないが、金コロイド単層膜はガラス管の内壁などにも 堆積することができる。3) 理論的には本センサーはたった1 個の金微粒子から構成 することができる。このことは、センサーのサイズを極端に小さくすることができ ることを意味している。これらの理由により本センサーは従来の表面プラズモン共 鳴センサーが利用できなかった領域への応用が可能であると考えられる。

ここでは Okamoto ら [4] が開発した、ガラス基板上に堆積した金コロイド単層膜 のセンサーへの応用について述べる。本センサーは基本的には金微粒子を取り巻く 試料の屈折率を測定する。局在プラズモン共鳴は粒子の近傍(粒子半径程度)のみ の屈折率に依存する。したがって、本センサーはさらに、金微粒子上に堆積した薄 膜の厚さも検知する。

本研究で用いたガラス基板上に作製した金コロイド単層膜の走査型電子顕微鏡像の例を図1に示す。本例で用いた金微粒子の平均径は20nmで、金微粒子は均一に分布しており、それぞれの粒子は孤立していることがわかる。図1より測定した金 微粒子の密度は1µm<sup>2</sup> あたり、約370 個である。これは被覆率に換算すると0.17 に相当する。金コロイド粒子は3-aminopropyltrimethoxysilane (APTMS)を用いて化学的にガラス基板上に固定されている。金微粒子はアミノ基との結合により、ガラス基板上に強固に固定される。



図 1: ガラス基板上に固定された直径 20nm の金ナノ粒子の走査型電子顕微鏡像。

金コロイド単層膜(平均径 20nm)を用いて作製した液体セルにメタノール、エ タノール、水、グリセリン、ジヨードメタンを満たしたときの吸収スペクトルを図



図 2: 平均径 20nm の金ナノ粒子を堆積したがらす基板を種々の屈折率を持つ液体に 浸けたときの吸収スペクトル。

によるものである。液体試料の屈折率が上がるにしたがって、ピーク吸光度が高く なっていることがわかる。得られたこれらのスペクトルは Mie 散乱の公式を用いて 計算した、均一媒質中の孤立した金球の消光効率のスペクトルと極めてよく似てい る。また、ピーク吸光度および共鳴波長の試料屈折率依存性も Mie の理論から得ら れる結果と類似している。

バイオセンサー、特にアフィニティーセンサーを考える場合、センサー表面の薄膜 試料の屈折率変化や、膜厚変化が感度よく検出できなければならない。金コロイド単 層膜においてこのことを検証するため、いくつかの厚さのPoly(methyl methacrylate acid) (PMMA) 膜を金コロイド単層膜上にスピンコートした。PMMA の屈折率は波 長 520 nm で 1.496 である。いくつかの膜厚の PMMA 薄膜に対する平均径 13.9 nm の金コロイド単層膜の吸収スペクトルから、共鳴波長、ピーク吸光度を求め、プロッ トしたものを図3に示す。ピーク吸光度は PMMA 薄膜を堆積していないものに対す るピーク吸光度で規格化した。両者は共に、膜厚の増加とともに増大している。図 にはフィッティングした指数関数も示している。 試料膜厚が約 10 nm 以下の領域で は、ピーク吸光度と共鳴波長が試料膜厚に対して感度よく変化している。それに対 して、より膜厚が厚い領域では、両者は飽和傾向を示している。ピーク吸光度に対 する減衰膜厚は、すなわち、感度が 1/e になる膜厚は 6.0 nm である。これらの値は 抗体や抗原などのタンパク質の大きさと同程度である。したがって、この金コロイ ド単層膜はバイオセンサーやアフィニティーセンサーに非常に適していると考えら れる。



図 3: 平均径 13.9nm の金ナノ粒子表面に種々の厚さの PMMA 薄膜を堆積したとき の吸収ピークの値とその時の波長の膜厚依存性。曲線は単一指数関数でフィッティ ングした結果を示す。

# 2 局在プラズモン共鳴による蛍光増強

#### 2.1 孤立金属微粒子による蛍光増強

金属基板表面近傍に置かれた蛍光分子は金属へのエネルギー移動により消光を起 こす。エネルギー移動の割合は金属が半無限の厚さを持つ平面なら距離の3乗に反 比例して、金属が無限に薄い平板なら距離の4乗に反比例して、また、金属が微粒 子なら距離の6乗に反比例して小さくなる。一方、金属表面で表面プラズモン共鳴 が起きる条件の場合、励起光および蛍光はそれにより増強を受ける。その結果、図 4に示すように、金属表面からある距離離れた位置で、分子からの蛍光強度は最大 となる。



図 4: 金属表面近傍に置かれた分子の蛍光強度の距離依存性。

さらに、金属微粒子が分子の近くにあることで、もう一つの効果が考えられる。 それは、金属が存在することによる特有の発光である [10]。図5 にその様子をまと める。金属がない場合と比較して、金属が近くにあると、まず、吸収過程において、 金属の存在によるプラズモン共鳴による電場増強効果による遷移  $E_m$ が加わる。発 光過程においては、金属による消光  $k_m$  と金属による発光  $\Gamma_m$ が加わる。図6 はこれ らの効果を考慮したときの分子の蛍光量子収量が  $\Gamma_m/\Gamma$ の値に対してどのように変 化するかを、金属がない場合の分子の蛍光量子収量をパラメータとしてプロットし たものである。ただし、 $k_m = 0$  と仮定した。図から分かるように、もとの蛍光量子 収量が1の場合には当然ながら、金属による蛍光量子収量の増加はないが、もとの 量子収量が小さいほど金属の存在により、量子収量が大きくなることが分かる。す なわち、もともと光らない分子ほど、金属の存在によって光るようになることが分 かる。





図 5: 金属表面近傍の蛍光分子の遷移。



図 6: 金属表面近傍の分子の蛍光量子収量。

図7は、ガラス基板上に金薄膜を真空蒸着により堆積し、それを350°Cで3時間ア ニールして得られた金ナノ粒子薄膜上にコートした、蛍光分子であるローダミン6G をドープした PMMA 薄膜の蛍光スペクトルを測定した結果を示す。金ナノの粒子 が無い場合と比較して、蛍光強度が低下していることが分かる。金ナノ粒子と色素 薄膜との間にスペーサー層を挿入すると蛍光強度がその層数が増えるにしたがい回 復していることが分かる。スペーサー層としてカチオン性、アニオン性のポリマー である、poly(ethyleneimine) (PEI) と、poly(vinylsulfate) (PVS) の膜を交互吸着法 で堆積したものを用いた。PEI と PVS を 1 組として 1 層と数えている。



図 7: 金ナノ粒子上に堆積したローダミン6Gの蛍光スペクトル。

これに対して図8は蛍光をほとんど発しない色素であるメチルレッドをドープした PMMA を同じ金ナノ粒子薄膜上に堆積したものの蛍光スペクトルを測定した結果を示す。ローダミン6Gの場合と異なり、金ナノ粒子が存在している方が蛍光強度が強くなっていることが確認できる。これらの2種類の色素分子の蛍光増強度の違いは図6の計算結果と一致している。ただし、なぜ、メチルレッドの場合にスペーサーを1層挿入したときにが蛍光が最も強くなるのかは不明である。



図 8:金ナノ粒子上に堆積したメチルレッドドープ PMMA の蛍光スペクトル。

さて、金属の存在による発光の物理的なメカニズムであるが、次のように考えら れる。励起された分子が金属の存在により、発光により基底準位に落ちるよりも早 く金属ヘエネルギー移動を起こす。金属へ移動したエネルギーのほとんどは熱となっ て消費されるが、その一部は金属ナノ粒子中に双極子を励起する。その双極子放射 が発光として観察されていると考えられる。ただし、発光に寄与する割合は小さい。 したがって、もともと蛍光量子収量が高い分子は励起されたエネルギーの大部分が 金属へ移動し熱となって消費されてしまうため、量子効率が下がる。それに対して、 もともと量子収量の小さい分子は分子内でのエネルギー移動より早く金属へのエネ ルギー移動が生じ、そのエネルギーの一部が発光に寄与するため見かけの量子収量 は大きくなる。

#### 2.2 微粒子-微粒子相互作用による蛍光増強

金属微粒子へ移動したエネルギーの中で発光に寄与する割合は、結局、双極子の 励起効率、すなわち、分極率によって決まる。別の言い方をすると、局在プラズモ ン共鳴の大きさによって決まる。これまで、孤立した微粒子における局在プラズモ ン共鳴についてだけ述べてきたが、複数の微粒子が近接して存在する場合には、双 極子-双極子相互作用により、双極子以外の多重極子が励起される。また、その結 果、共鳴周波数は低エネルギー側にシフトする。さらに、このとき微粒子と微粒子 との間において電場強度は非常に強くなる。直径 20 nm の 2 個の金ナノ粒子が 1 nm 離れて空気中におかれているときの電場強度分布をWind らの方法 [9] で計算した結 果を図 9 に示す。ただし、入射電場の方向は 2 つの粒子を結ぶ軸に平行で、入射波 長は 546nm である。図 10 は 2 粒子の中点での電場強度スペクトルを粒子間距離を パラメータとして計算したものである。粒子間距離が小さくなるにつれて、電場強 度が大きくなり、しかも長波長まで増強範囲が広がることが分かる。理論的には微 粒子間距離が無限小になれば電場は無限大になる。



図 9: 直径 20 nm の 2 個の金ナノ粒子が 1 nm 離れて空気中におかれているときの電 場強度分布の計算結果。

この微粒子-微粒子相互作用の系において蛍光がどのように増強されるかを測定 した。まず、スライドガラス上に金薄膜を真空蒸着したものを350°Cで3時間アニー



図 10: 種々の粒子間距離を持つ、直径 20 nm の 2 個の金ナノ粒子の中点での電場強度スペクトルの計算結果。

ルした。得られた島状金薄膜表面に aminoethanethiol の単分子膜を自己組織化によ り堆積したものを金コロイド懸濁液に浸けて金ナノ粒子が凝集した基板を作製した。 その走査型電子顕微鏡像を図 11 に示す。島状金ナノ粒子上に別の金ナノ粒子が堆積 していることが分かる。この基板上にメチルレッドをドープした PMMA 薄膜をス ピンコートし、その蛍光スペクトルを測定した結果を図 12 に示す。島状金ナノ粒子 上の金ナノ粒子は直径 41 nm と 72 nm のものを用いた。いずれも金属微粒子が無い ときと比較して、蛍光強度が大きく増強されていることが分かる。また、72 nm の 粒子を用いた基板の方が、増強度は大きくなっている。これは、粒子間距離が同じ ならば、粒子径が大きい方が、ギャップにおける電場強度が大きくなるためである と考えられる。



図 11: ガラス基板上の島上金薄膜上に固定された金ナノ粒子の走査型電子顕微鏡像。



図 12: 金ナノ粒子上に堆積したメチルレッドドープ PMMA の蛍光スペクトル。

## 3 おわりに

金属ナノ粒子の局在プラズモン共鳴を用いた、バイオセンサーについて述べた。 この研究は実質的には2000年に始まったばかりであり、いまだ報告例が少ない。し かしながら、本センサーは上に述べたように、従来の表面プラズモン共鳴センサー が持っていないいくつかの特長を持っている。そのため、従来の表面プラズモンセ ンサーが未だ実現していないDNAチップや、蛋白チップなどを実現する可能性を 持っていると考えられる。また、後半では、金属ナノ粒子による蛍光の増大効果に ついて述べた。本効果は、本来、分子内部でのエネルギー移動により蛍光が観測で きないような分子に対して、蛍光を放射させるものである。これにより、従来は蛍 光色素で修飾しなければ観察できないような生体分子を無標識で観測する道が開か れ、新たなセンサーが期待できる。

# 参考文献

- special issue on Surface Plasmmon Resonance (SPR) Optical Sensors, Current Technology and Applications, Sensors and Actuators B54, Nos. 1-2 (1999).
- [2] H. Raether, Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings, (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- [3] F. Meriaudeau, T. R. Downey, A. Passian, A. Wig, and T. L. Ferrell, "Environment effects on surface-plasmon spectra in gold-island films potential for sensing applications," Appl. Opt. 37 8030-8037 (1998).
- [4] T. Okamoto, I. Yamaguchi, T. Kobayashi, "Local plasmon sensor with gold colloid monolayers deposited upon glass substrates," Opt. Lett. 25, 372–374 (2000).

- [5] N. Nath and A. Chilkoti, "A colorimetric gold nanoparticle sensor to interrogate biomolecular interactions in real time on a surface," Anal. Chem. 74 504-509 (2002).
- [6] S.-F. Cheng and L.-K. Chau, "Colloidal gold-modified optical fiber for chemical and biochemical sensing," Anal. Chem. 75 16-21 (2003).
- [7] A. J. Haes and R. P. Van Duyne, "A nanoscale optical biosensor: Sensitivity and selectivity of an approach based on the localized surface plasmon resonance spectroscopy of triangular silver nanoparticles," J. Am. Chem. Soc. 124, 10596-10604 (2002).
- [8] H. Takei, M. Himmelhaus, and T. Okamoto, "Absorption spectrum of surfacebound cap-shaped gold particles," Opt. Lett. 27, 342-344 (2002).
- [9] M. M.Wind, J. Vlieger, and D. Bedeaux, "The polarizability of a truncated sphere on a substrate I" Physica 141A, 33–57 (1987).
- [10] J. R. Lakowicz, "Radiative decay engineering: Biophysical and biomedical applications," Anal. Biochem. 298 1-24 (2001).