



表面プラズモン顕微鏡

岡本 隆之・山口 一郎

理化学研究所光工学研究室 〒351-01 和光市広沢 2-1

(1990年4月17日受付, 1990年7月9日受理)

Surface Plasmon Microscope

Takayuki OKAMOTO and Ichirou YAMAGUCHI

Optical Engineering Laboratory, The Institute of Physical and Chemical Research,
2-1, Hirosawa, Wako 351-01

(Received April 17, 1990; Accepted July 9, 1990)

A microscope using surface plasmon resonance is described, which images 2-D distributions of refractive indices and/or surface profiles of samples. By using an attenuated total reflection (ATR) method called the Kretschmann configuration, surface plasmon at a metal-dielectric interface can be excited by p -polarized light. At an incident angle, surface plasmon resonance occurs, and the energy of the incident light is transferred to the surface plasmon to decrease the reflectance remarkably. The resonance angle is very sensitive to the refractive index of the dielectric medium. In this microscope, the reflected light at a fixed incident angle near the resonance angle is magnified through a microscopic objective and its distribution is mapped as images. This microscope gives the 2-D distribution of the refractive index with high sensitivity, if the sample is in contact with the silver film. If there is a gap between the sample and the silver film, the reflectance also depends on the gap thickness. In experiments, bubbles in water and biological tissues have been imaged.

1. はじめに

透明な生物試料は染色を行わない限りその透過率がほとんど1であるため、通常の透過型の顕微鏡では一般に観察が困難である。ただ、屈折率が急激に変化する部分がある場合、そこでの光の回折により、透過光の強度分布にわずかに明暗を生じる。これにより試料の屈折率分布がかるうじて観察される。この屈折率分布は通常位相差顕微鏡や干渉顕微鏡で観察される。これらの顕微鏡で観測されるのは試料を透過してきた光束の波面形状である。すなわち、試料の屈折率の光路に関する線積分量で与えられる光路長であり、試料の屈折率分布そのものではない。

一方、試料の表面だけの情報を得る方法として反射型の測定が存在する。しかし生物試料などの透明試料においては、表面での反射率が低いため反射光がある一つの面からか、あるいはいくつかの反射面からの反射光の和

かを判断するのは一般に困難である。反射型測定の一変形として ATR (Attenuated Total Reflection) 法がある¹⁾。これはプリズム内面で光が全反射するときに生じるエヴァネッセント光を用いる測定法である。このエヴァネッセント光が存在する領域はプリズムの外側その深さは光の波長オーダーとなる。したがってプリズム表面のごく近傍の情報だけが得られることになる。

本論文では生物試料の表面近傍の情報のみを観測する目的で、ATR 法の一つである表面プラズモン共鳴を用いた顕微鏡の開発について報告する。表面プラズモンとは誘電体と複素誘電率の実部が負である導電体との界面に生じる電子密度分布の波で、界面にそって伝播する²⁾。この表面プラズモンはエヴァネッセント光によって励起可能であり、その励起条件は媒質の誘電率に対して非常に敏感に変化する。光と表面プラズモンが結合した状態を表面プラズモン共鳴という。近年、表面プラズモン共鳴を用いた各種のセンサーが考案されている³⁻⁷⁾。いず

れも最終的には試料の屈折率を測定するものである。

Yeatman と Ash^{8,9)} は表面プラズモン共鳴を用いて銀薄膜に格子状に蒸着した WO₃ 薄膜の膜厚分布を数 Å の感度で観測している。これに対して本論文では、より一般的な対象として生物試料などの表面近傍情報 (たとえば屈折率分布や表面形状分布など) を得る目的で、表面プラズモン共鳴を用いた顕微鏡を提案し、基礎的な検証を行った。

2. 表面プラズモン共鳴

プラズマ振動とは金属中の自由電子密度の縦波であり、プラズモンとはこの振動を量子化したものである。とくに導電体と誘電体との界面を伝播するプラズモンを表面プラズモンという。以後、本論文ではプラズモンといえば、表面プラズモンをさすこととする。

プラズモンの伝播に付随する電場は電磁波と見なすことができ、その偏波状態は常に TM である。二つの半無限媒質 (媒質 1, 2) の界面を接線方向に伝播するプラズモンの分散関係は Maxwell の方程式を解くことによって与えられ、次式で表される²⁾。

$$k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\frac{\epsilon_1 \epsilon_2}{\epsilon_1 + \epsilon_2}} \quad (1)$$

ここで、 ϵ_1, ϵ_2 はそれぞれ媒質 1, 2 の誘電率、 ω はプラズモンの角周波数、 k_x はプラズモンの伝播定数である。プラズモンが界面に局住するためには次の条件を満たさなければならない²⁾。

$$\epsilon_1 + \epsilon_2 < 0 \quad (2)$$

すなわち、二つの媒質のどちらか一方の誘電率は負でなければならない。一方が金属であれば、一般にこの条件を満たす。

次に表面プラズモンと光との結合を考える。プラズモンは TM 偏波であるため、p 偏光としか結合しない。さらに、表面プラズモンの伝播定数 k_x は誘電体中の光の波数よりも常に大きいため、単純には誘電体側からの光と結合することはできない。これを解決する方法として、ATR 法の一変形としてプリズム結合器を用いる方法が Otto¹⁰⁾ と Kretschmann¹¹⁾ によって考案された。Otto 配置はバルク金属を用いるため表面観測には適さない。Fig. 1 に Kretschmann 配置を示す。金属は薄膜としてプリズムに直接蒸着され、光がプリズム内面で全反射するとき生じるエヴァネッセント波が金属と誘電体との界面におけるプラズモンと結合する。すなわち、エヴァネッセント波の波数ベクトルの接線成分がプラズモンの伝播定数と等しいとき、

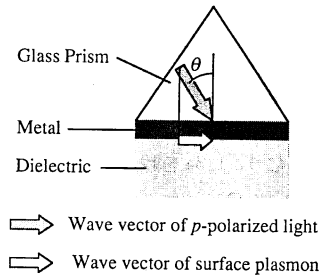


Fig. 1 Kretschmann configuration.

$$k_x = n_p k_0 \sin \theta \quad (3)$$

が成り立つときに結合する。ここで、 n_p はプリズムの屈折率、 k_0 は真空中での光の波数である。

Kretschmann 配置では、金属は有限の厚さ d となる。このときの伝播定数 k_x は k_x からわずかにずれる²⁾。プリズム結合器により入射光はプラズモンの波長に対応した入射角で結合し、プラズモンによる吸収により反射光強度は減衰し、反射率分布はこの共鳴により鋭い谷を示す。

金属薄膜として銀を用い、入射光を波長 633 nm の He-Ne レーザーを用いた場合、反射率の谷が最も深くなる銀の膜厚は 56.5 nm でそのときの反射率は 0.20% となる。ただし銀の複素屈折率としては $0.050 + 4.27i$ を用いた¹²⁾。この複素屈折率は複素誘電率の平方根に等しい。

3. 表面観察の原理

表面プラズモン共鳴によって生じる反射率曲線における谷の位置は上にも述べたように k_x で決まる。ここで誘電体の屈折率が変化した場合、表面プラズモンの波数ベクトルが変化し、それに伴って反射率曲線の谷の位置が変化する。Kretschmann 配置を用いたときの様子を Fig. 2 に示す。プリズムは屈折率 1.515 の BK7 で金属薄膜は厚さ 55 nm の銀である。反射率曲線は三層膜の計算によって求めた¹³⁾。このように谷の位置は誘電体の屈折率に非常に依存することがわかる。また、谷の位置は屈折率が小さくなるにしたがって、角度の小さいほうへと移動する。したがって、谷の位置を測定することにより、誘電体の屈折率を高感度で知ることができる。しかし、実験においてこの角度を知るためには、入射光を角度走査しなければならない、装置が複雑になり、測定にも時間がかかる。反射率分布を角度走査なしで得る方法も提案されているが^{5,6)}、本論文では、入射角を一定にして、そのときの反射光強度を測定することに

した. Fig. 2 と同じ光学配置で, 入射角度を 67.5° に固定したときの反射率の屈折率依存性を Fig. 3 に示す.

この例では誘電体の屈折率が 1.33 のとき反射率は極小値をとる. 屈折率が 1.33 から離れるにしたがって, 反射率は大きくなり, 1.34 を越えると反射率の変化は非常に小さくなる. この方法はダイナミックレンジは制約されるが, 簡便である.

ここまでの議論では誘電体は均一な半無限の媒質であるとの仮定であったが, 液体や気体以外の実際の測定, たとえば生物試料などの測定においては金属薄膜と試料を完全に密着させることは一般に困難である. そこで, 誘電体試料と金属薄膜の間にもう一層の薄い誘電体媒質を考慮にいれなければならない. この付加された層により, 共鳴に関与する試料の見かけ上の屈折率が変わる. この変化の割合は付加層の屈折率および厚さに依存

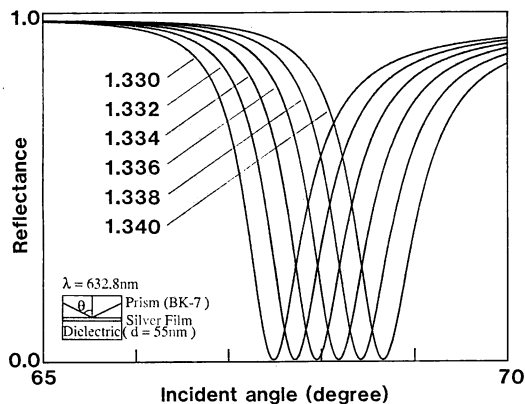


Fig. 2 Reflectance curves for several refractive indices of dielectric in the system consisting of a prism, a thin silver film, and a dielectric.

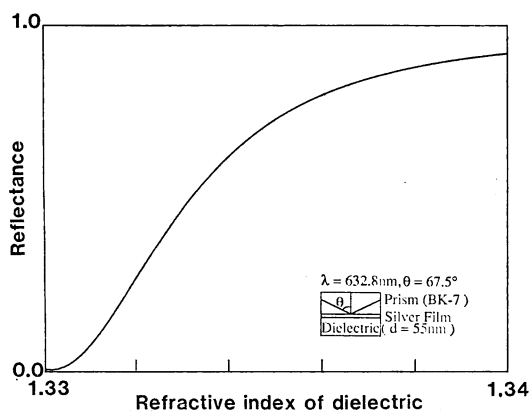


Fig. 3 Reflectance versus refractive index of the dielectric at the incident angle of 67.5° degrees for the system shown in Fig. 2.

する. その結果, 反射率曲線における谷の位置が変化する. Fig. 4 に付加層が水のときの理論反射率曲線を示す. パラメーターは水の層の厚さである. 試料としての誘電体の屈折率は 1.34 としている. 図からわかるように付加層の厚さに対して指数関数的に谷の位置が変化する. これはエヴァネッセント波の振幅が深さに対して指数関数的に減衰するためである. そのため付加層が波長程度以上であればエヴァネッセント波が侵入せず谷の位置の変化はなくなる. 付加層としての水の厚さと, 試料としての誘電体の屈折率を変化させたときの共鳴角を等高線で表したものを Fig. 5 に示す. 同じ共鳴角を与え

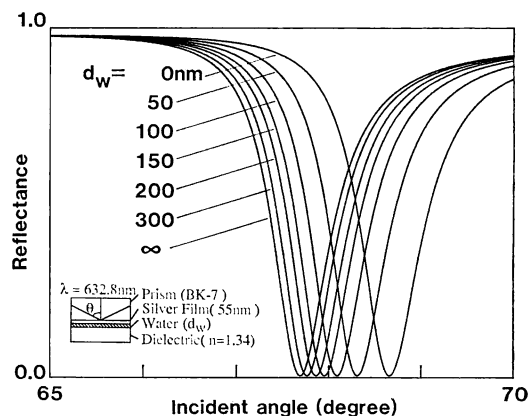


Fig. 4 Reflectance curves for several thickness values of water layer in the four layer system which consists of a glass prism, a thin silver film, a water layer, and a dielectric.

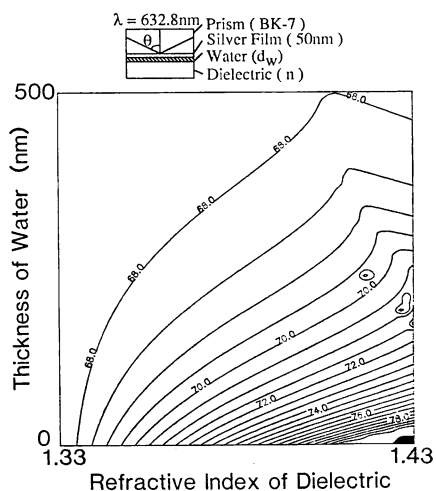


Fig. 5 Contour lines of resonant angle as functions of the thickness of the water layer and the refractive index of the dielectric in the system shown in Fig. 4.

る付加層の厚さと誘電体の屈折率の組合せが無制限個存在することがわかる。

4. 装 置

Fig. 6 に装置の概略を示す。He-Ne レーザーからの p 偏光は結合プリズムを通して試料に照射される。反射光はレンズによって拡大された後、その一部がピンホールを通して検出器に入射する。レンズは試料表面をピンホール上に結像するように配置した。試料は通常の顕微鏡下での生物試料と同様、スライドガラス上に置かれることが望ましい。そこで、Fig. 7 に示すように試料を保持した。スライドガラス上の試料は試料側を厚さ 55 nm の銀薄膜で蒸着したカバーガラスで被われ、通常のプレパラートと同様に扱われる。結合プリズムは屈折率整合液を介してカバーガラス上におかれる。結合プリズムは BK7 製の 60 度プリズムを用いた。試料は XY ステージ上に置かれパルスモーター (最小移動量: 1 μm) によって 2 次元走査される。パルスモーターはパーソナルコンピューターによって制御される。検出器からの信号は AD 変換の後パーソナルコンピューターに取り込まれ CRT 上にマッピングされ濃淡像や疑似カラー像として表示される。

走査は試料とプリズムを一体化して行う。その結果試

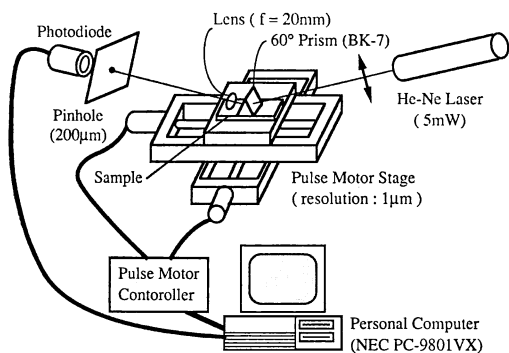


Fig. 6 Schematic diagram of the surface plasmon microscope.

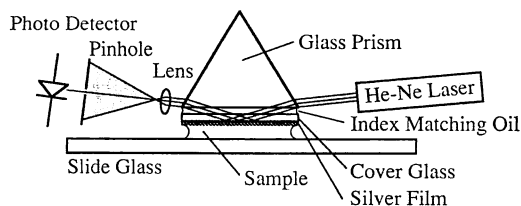


Fig. 7 Optical setup of the surface plasmon microscope.

料の走査に伴ってレンズから試料までの光路長が変化し焦点位置がずれる。理想的にはプリズムの位置を固定し屈折率整合液より下のプレパラートの部分のみを動かすことが望ましいが、屈折率整合液の粘性が高いためカバーガラスがずれてしまい困難であった。

5. 実験結果

まず、試料として気泡を含む水を測定した、Fig. 8 にその結果を示す。使用したレンズは焦点距離 20 mm で試料面のピンホール上への結像倍率は 20 倍であった。使用したピンホールの直径は 200 μm である。その結果、本顕微鏡の分解能は 10 μm となる。試料の走査は XY ともに 5 μm ステップで行い、サンプル点数は 200 点とした。走査範囲は $1 \times 1 \text{mm}^2$ である。この程度の倍率と観測領域であれば焦点位置の変動は無視できる。入射角は水の屈折率において反射率が最低になるように 67.5° に設定した。図において反射光強度の低い部分は水であり、円形の反射光強度の高い部分が気泡 (空気) である。気泡中に数カ所反射光強度の低い部分があるが、これは周りの水が一度気化した後、再びカバーガラス表面に結露したものであると思われる。屈折率の差による反射光強度の差が明瞭に確認できる。

Fig. 8 の測定例では非常に屈折率差が大きい試料の観測であった。次により屈折率差の小さい実際の生物試料の観測例を示す。Fig. 9 (a) は玉葱の表皮細胞を本顕微鏡で観測したものである。Fig. 9 (b) に比較のため通常の光学顕微鏡で観測した結果を示す (ただし、試料は異なる)。測定条件は Fig. 8 の場合とおなじである。玉葱の表皮細胞をカバーガラスの銀薄膜に完全に密着させることは困難であるため、銀薄膜と細胞の間の空隙には水を満たした。細胞壁とその他の部分で反射光強度が異なっていることが確認できる。反射光強度の最大値と最

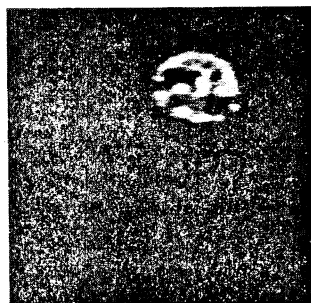


Fig. 8 Air bubbles in water observed by the surface plasmon microscope. The observation region is $1 \times 1 \text{mm}^2$.

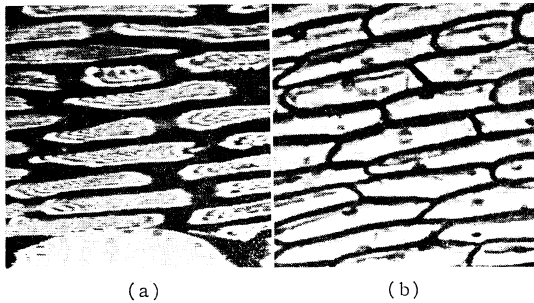


Fig. 9 (a) Skin cells of an onion observed by the surface plasmon microscope. The bright region in the bottom shows an air bubble. The observation region is $1 \times 1 \text{ mm}^2$. (b) Skin cells of an onion observed by a conventional microscope. The observation region is $0.6 \times 0.6 \text{ mm}^2$.

小値との比は107であった。反射光強度から直接求まる見かけの屈折率は図3から得られる。細胞壁の部分の見かけの屈折率は水と同じであり、細胞質の部分は測定ダイナミックレンジを越えており1.34以上であると考えられる。

図9(a)の下部の大きい白い部分は気泡である。水を満たした部分も気泡の部分も銀薄膜から試料までの平均距離は等しいと思われるが、空隙が空気の場合プリズムの屈折率との差が大きいためエヴァネッセント波が試料まで届かず、反射光強度は試料(表皮細胞)の影響を受けていないと考えられる。プラズモン顕微鏡で観測した細胞には従来の光学顕微鏡では見られない微細構造が現われているが、何によるものなのかは現在不明である。

本表面プラズモン顕微鏡においては、このように試料と銀薄膜が完全に密着していない場合、反射光強度は試料の屈折率分布を表しているのか試料の表面形状を表しているのかあるいはその両方の情報を含むのかわからない。今後の課題としては、この二つの変数、屈折率と表面形状をなんらかの方法で分離する必要がある。現在考えられる方法としては、カバーガラスに適当に圧力をかけて試料との空隙を変化させて何枚かの像を取り込みそれらの反射率の変化から屈折率と表面形状を分離することである。

6. おわりに

微小透明試料の表面近傍の情報を得る手法として表面プラズモン顕微鏡を提案し、基礎的検証を行った。本顕微鏡では試料表面の屈折率分布測定や表面形状測定が高感度で行える。しかしながら、現在のままでは銀薄膜に完全に密着していない試料の場合、試料の屈折率と表面形状の分離は困難である。これを分離するのが今後の課

題である。

本プラズモン顕微鏡の空間分解能はレンズの結像倍率とピンホールの大きさで決まる。分解能をより大きくするためにはより短焦点のレンズを使って結像倍率を上げる必要があるが、本装置では、レンズの焦点距離は結合プリズムによって制限されていた。この制約を免れるためには、結合器として回折格子を用いることが考えられる。これによって短焦点距離のレンズの使用が可能になる。

本論文では実際に入手の関係上60度プリズムを用いたが、反射光のプリズムに対する出射角が0になる角度をもつプリズムを使用することにより非点収差を除くことができる。また、回折格子結合器を用いることによって、結合素子の厚さを無視することができ、焦点位置の変動や非点収差などの3角プリズムを使用したことに起因する問題も解決され、より高い分解能が得られるであろう。

実験を手伝って下さった学習院大学理学部4年生の大河内文隆君に感謝する。

文 献

- 1) たとえば, D. Axelrod, T. P. Burghardt and N. L. Thompson: "Total internal reflection fluorescence," *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.*, **13** (1984) 247-268.
- 2) H. Raether: *Surface Plasmons on Smooth and Rough Surfaces and on Gratings* (Springer-Verlag, Berlin, 1988).
- 3) B. Liedberg, C. Nylander and I. Lundstrom: "Surface plasmon resonance for gas detection and bio-sensing," *Sensors Actuators*, **4** (1983) 299-304.
- 4) C. Nylander, B. Liedberg and T. Lind: "Gas detection by means of surface plasmon resonance," *Sensors Actuators*, **3** (1982/1983) 79-88.
- 5) K. Matsubara, S. Kawata and S. Minami: "Optical chemical sensor based on surface plasmon measurement," *Appl. Opt.*, **27** (1988) 1160-1163.
- 6) K. Matsubara, S. Kawata and S. Minami: "A Compact surface plasmon resonance sensor for measurement of water in process," *Appl. Spectrosc.*, **42** (1988) 1375-1379.
- 7) 河田 聡, 南 茂夫: "光励起表面プラズマ振動を利用した化学センサー", *光学*, **16** (1987) 438-439.
- 8) E. M. Yeatman and E. A. Ash: "Surface plasmon microscopy," *Electron. Lett.*, **23** (1987) 1091-1092.
- 9) E. M. Yeatman and E. A. Ash: "Surface plasmon scanning microscopy," *Proc. SPIE*, **897** (1988) 100-107.
- 10) A. Otto: "Excitation of nonradiative surface plasma waves in silver by the method of frustrated total reflection," *Z. Phys.*, **216** (1968) 398-410.
- 11) E. Kreschmann: "Die Bestimmung optischer Konstanten von Metallen durch Anregung von Oberflächenplasmaschwingungen," *Z. Phys.*, **241** (1971) 313-324.
- 12) P. B. Johnson and R. W. Christy: "Optical constants of the noble metals," *Phys. Rev. B*, **6** (1972) 4370-4379.
- 13) E. Delano and R. J. Pegis: "Methods of synthesis for dielectric multilayer filters," *Progress in Optics*, Vol. 7, ed. E. Wolf (North-Holland, Amsterdam, 1969) pp. 67-137.