

## 金属ナノホールにおける表面プラズモン

石田 昭人・藤井亜矢子

### Analytical Applications of Surface Plasmon Field Launched into Nanoholes in a Gold Film

Akito ISHIDA and Ayako FUJII

Fluorescence-based detection of antigen-antibody binding and DNA hybridization in wavelength-seized gold nanoholes has been achieved by surface plasmon excitation. The nanoholes effectively scattered propagating surface plasmon resulting in localization of the electromagnetic field in them, and the localized field was successively converted to far-field light. When the bottom surface was covered with the fluorescent dye molecules such as Texas Red, the localized field effectively excited them giving intense fluorescence. DNA hybridization experiment and immunoassay in the nanoholes have been successfully carried out by the surface plasmon excitation. The present results demonstrate that the localized surface plasmon field in nanoholes is useful for development of ultra-high density bioassay systems.

**Key words:** scattering of surface plasmon by gold nanoholes, surface plasmon enhanced excitation of Texas Red, detection of DNA hybridization, fluorescence immunoassay

表面プラズモン共鳴（SPR）を利用したセンサーは、免疫反応などの分子間相互作用を高感度でリアルタイム検出可能なため、生化学研究に不可欠なツールとなっている<sup>1)</sup>。しかし、SPR センサーは、分子間相互作用にともなう金薄膜表面の屈折率変化を観測しているに過ぎず、入射光のエネルギーは熱として失われてしまう。表面プラズモン電場は金薄膜表面を長距離伝播し、しかも入射光に比べて可視領域でも数十倍に増強されるので、表面に修飾された光応答性分子薄膜の励起起源としてきわめて魅力的である。そこで、筆者らは、チオール基を末端にもつ分子の溶液に金表面を浸漬させるだけで強固な単分子膜を形成できる自己組織化単分子膜法により形成したポルフィリン単分子膜の蛍光測定<sup>2)</sup>と湿式太陽電池への応用<sup>3,4)</sup>、表面プラズモンの p 偏光性を利用して蛍光偏光消測定による単分子膜中の分子交換反応の観測<sup>5,6)</sup>などについて検討し、表面プラズモン励起の有効性を明らかにしてきた。しかし、避けては通れない課題も明らかになった。それは、金へのエネルギー移動による励起分子の消光である。プラズモン電場を十分に受け、なおかつ消光を防ぐためには、光応答性部位（クロモフォア）を金表面から 3~10 nm 程度の距離に固定することが望ましい。しかし、合成上の制約から、クロモフォアと金表面へのアンカーとなるチオール基を連結するメチレン鎖部分は 1.5 nm 程度が最長である。実際、筆者らが用いたポルフィリン誘導体（連結部の鎖長約 1.3 nm）単分子膜の蛍光量子収率は 0.0003 に過ぎず<sup>7)</sup>、溶液中（~0.1）と比べて著しく低い。したがって、表面プラズモン励起を活用するための新たな方策の開拓が望まれる。

一方、最近、銀や金などの金属薄膜に光波長以下のサイズの微小開口（ナノホール）をあけると、異常な光透過がみられるなど、表面プラズモン電場がナノホール内部に局在することに起因する興味深い現象が報告されている<sup>8~11)</sup>。ナノホールにおけるプラズモン電場の局在は分光学だけでなく、励起起源としての応用の点からもきわめて興味深い。なぜなら、ガラスなどの透明基板上に形成したナノホールは光化学反応や蛍光分析の容器として利用できるうえ、光応答性分子を金表面ではなく底面基板上に修飾あるいは開口内部に充填することで金との距離を確保し、効果的に励起しつつ消光を防げるからである。そこで、本研

究では、ガラス基板上に形成した金ナノホールの光散乱特性を観測するとともに、底面に蛍光性分子を修飾して蛍光特性を観測し、免疫分析と遺伝子分析への応用を試みた。

## 1. 実験

ナノホールはプロジェクション法で形成した<sup>12)</sup>。金との接着層および分子修飾サイトとして、アミノプロピルトリエトキシシランで表面をアミノ化したカバーガラス上に直径 500 または 600 nm のポリスチレンラテックスを分散し、その上から金を 50 nm 高真空で蒸着した後に、超純水中で超音波照射してラテックスを除去した。原子間力顕微鏡で観測すると、金薄膜にラテックスの直径と一致した口径の矩形断面をもち、底面にガラスが露出したナノホールが約 10<sup>4</sup> 個/mm<sup>2</sup> の密度で多数形成されていた（図 1 插入図）。

ナノホールの蛍光修飾および蛍光分析用の蛍光色素として、600 nm 付近に吸収・発光極大をもち、退色しにくいテキサスレッド（TR）を選択した。ナノホールの蛍光修飾は、アミノ基と結合するスクシンイミジル基をもつ TR の誘導体を用いて、底面ガラス表面上のアミノ基に TR を共有結合で固定化した。

散乱特性と蛍光特性は、ナノホールを形成したカバーガラスを BK-7 直角プリズムにマッチングオイルで貼り付けて Kretschmann 配置とし、蛍光スペクトロメーターを用いて入射角 55° で p 偏光 ATR (attenuated total reflection) 励起により観測した。

DNA と抗体の修飾は、末端にアミノ基をもつ抗ヒト IgG 抗体または 15 塩基対のプローブ DNA を、口径 600 nm のナノホール底面のアミノ基にグルタルアルデヒドを用いてそれぞれ結合させ固定化した。

表面プラズモン励起による顕微蛍光測定は、導波路を用いて 532 nm, 1 μJ, 600 ps の p 偏光レーザー光を金薄膜の裏面から全反射照明して行い、倒立蛍光顕微鏡と ×60 対物レンズ、蛍光キューブ、ピンホールを用いて、約 20 個のナノホールからの蛍光をフォトンカウンティングモジュールに導いて検出した。

## 2. 結果と考察

### 2.1 ナノホールによる表面プラズモンの散乱

平滑金膜、口径 500 および 600 nm のナノホールを表面プラズモン励起して得られる散乱光の波長依存性を観測した（図 1）。平滑金膜では全波長にわたってごく弱い散乱光がみられたのに対し、ナノホールをもつ金膜では散乱光強度が増大し、しかも、それぞれの口径に対応する波長より数十 nm 長波長の領域で散乱光が著しく増強されている。このことから、ナノホールによって散乱光が増強される波

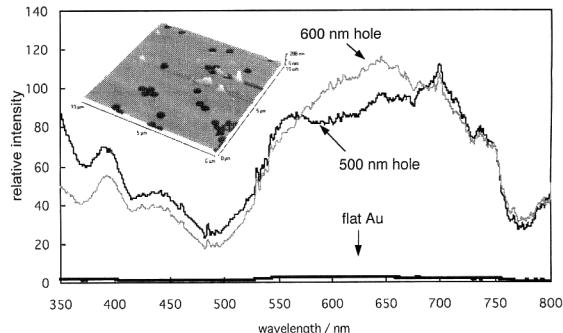


図 1 ナノホールをもつ厚さ 50 nm の金薄膜の表面プラズモン励起による散乱光のスペクトル。BK-7 直角プリズムを通して入射角 55° で p 偏光を照射。黒色太線、平滑金薄膜；黒色細線、500 nm ナノホール；灰色線、600 nm ナノホール。写真は 500 nm ナノホールのコンタクトモード AFM 像。

長領域に吸収極大をもつ TR のような色素をナノホール内部に修飾すれば、効率よく励起できると期待される。

### 2.2 蛍光修飾ナノホールの蛍光特性

TR で修飾したナノホールからは、金表面に直接修飾した場合と比較して、数十倍にも達する強い蛍光が観測された。蛍光スペクトルの形状は溶液中の TR の蛍光スペクトルと同様であったが、励起スペクトルには表面プラズモン励起に特有の長波長部の増強がみられ、口径と対応した 600 nm 以上の領域が特に強く増強されていた。このことから、期待通り、ナノホールの口径と励起光の波長が一致する領域では表面プラズモン電場がナノホールによって強く散乱され、底面に修飾された TR を効率よく励起することができる、また色素分子を金表面に直接修飾した場合とは異なり、金による消光を受けにくいうことが明らかになった。

表面プラズモンの電場は p 偏光性をもつので、薄膜中のように分子運動が抑制されている場合には、その電場で誘起された蛍光も p 偏光性を保っている<sup>4)</sup>。実際、平滑金表面上に修飾した TR の表面プラズモン励起蛍光は p 偏光性を強く残しており、これは TR が表面プラズモン電場で直接励起されたことを示唆している。これに対して、ナノホール底面に修飾された TR の表面プラズモン励起蛍光は偏光度が大きく低下していた。励起機構の詳細についてはさらに検討を要するが、TR がナノホール内に局在した表面プラズモン電場で直接励起されるほかに、表面プラズモンがナノホールによって散乱されてファーフィールド光に変換され、これを TR が吸収・励起される過程も寄与していると思われる。

### 2.3 ナノホール内部における蛍光免疫分析

しばしば鍵穴と鍵にたとえられるように、抗体は特定の抗原タンパクのみを認識して強く結合する。免疫分析では

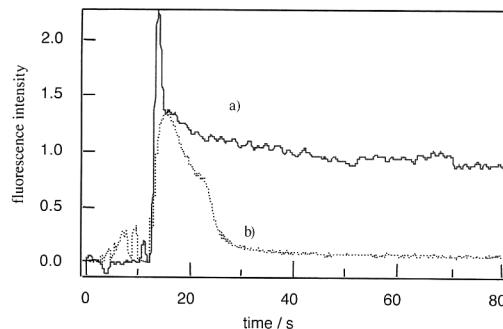


図2 600 nm ナノホール中における蛍光免疫分析。抗ヒト IgG を底面に修飾したナノホールにテキサスレッドを修飾したヒト IgG の 0.27 mg/ml 溶液を滴下、実線 a)；対照系として同濃度のテキサスレッド修飾 BSA 溶液を滴下、点線 b)。

抗原タンパクとの相互作用のみを検出できることが望ましいが、特に固体表面で分析を行う場合には、妨害タンパクが抗体の周囲表面と非特異的に結合してバックグラウンド信号を与えててしまうこともある。そこで、代表的な免疫系であるヒト免疫グロブリン G(IgG)-抗 IgG の組み合わせと、対照系として相互作用をもたないウシ血清アルブミン( BSA )-抗 IgG の組み合わせを比較検討した。抗 IgG を底面に修飾したナノホールを室温でリン酸緩衝溶液に浸漬し、532 nm で表面プラズモン励起しながら、あらかじめ TR で蛍光修飾しておいた標的である IgG と偽標的である BSA の溶液を、それぞれナノホール上に滴下して蛍光強度変化を比較した(図2)。どちらも滴下直後に TR の強い蛍光が観測されたが、IgG では数秒で急激に低下した後、ほぼ一定の蛍光強度を示し続けたのに対し、BSA では蛍光強度が数十秒で低下してベースラインにほぼ収束した。蛍光プロファイルの大きな差は、底面に修飾された抗 IgG と溶液中の IgG および BSA の結合性相互作用の強さを反映していると考えられる。顕微分光系で定量的測定を行うには条件の最適化を要するが、蛍光分光光度計によるマクロ測定では IgG 濃度と蛍光強度の間に良好な直線関係がみられたことから、ナノホール中における蛍光免疫分析は十分な実用性をもつと思われる。

#### 2.4 ナノホール内部における蛍光遺伝子分析

プローブ DNA を修飾したナノホールを室温で緩衝溶液に浸漬し、532 nm で表面プラズモン励起を行いながら、TR で標識した標的 DNA と対照 DNA の緩衝溶液をそれぞれ滴下し、蛍光強度変化を比較した(図3)。プローブ DNA とシーケンスが合致する標的 DNA では時間とともに蛍光強度が増大したが、塩基配列をスクランブルして相補性を失わせた対照 DNA では、蛍光強度の増大がまったくみられなかった。標的 DNA の場合は、ナノホール底面に

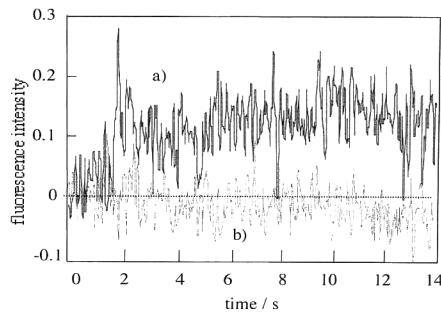


図3 600 nm ナノホール中における蛍光遺伝子分析。15 塩基対のオリゴヌクレオチド(5'-NH<sub>2</sub>-CGTCCTCTTCAAGAA-3')を底面に修飾したナノホールにテキサスレッドを修飾した標的オリゴヌクレオチド(5'-TR-TTCCTGAAGAGGAC-G-3')溶液を滴下、実線 a)；対照系として配列をスクランブルしてテキサスレッドを修飾した同濃度のオリゴヌクレオチド(5'-TR-ATGTACGTGTAGCAG-3')溶液を滴下、点線 b)。

修飾されたプローブ DNA とのハイブリダイゼーション(二重鎖形成)が起こり、標的 DNA に修飾された TR が底面に固定されて定常的な蛍光を示したと考えられる。

以上のように、金薄膜表面に形成したナノホールへのプラズモン電場の局在と蛍光分析への応用の可能性を明らかにした。ナノホールの形状と配列の最適化は、感度向上やアドレッシングが期待されるので最も興味深い課題である。理論系の研究者と緊密な連携をとりながら、今後研究を展開していきたい。

本研究は科学技術振興機構(PRESTO)、中谷電子計測技術研究振興財団、および文部科学省科学研究費補助金による研究助成を受け実施された。

#### 文 献

- 1) L. G. Fägerstam, et al.: J. Mol. Recognit., **3** (1990) 208-214.
- 2) A. Ishida, et al.: Chem. Commun., No. 1 (1998) 57-58.
- 3) A. Ishida, et al.: Chem. Lett., No. 3 (1998) 267-268.
- 4) A. Ishida and T. Majima: Chem. Phys. Lett., **322** (2000) 242-246.
- 5) A. Ishida and T. Majima: Chem. Commun., No. 14 (1999) 1299-1300.
- 6) A. Ishida and T. Majima: Nanotechnology, **10** (1999) 308-314.
- 7) A. Ishida and T. Majima: Analyst, **125** (2000) 535-540.
- 8) T. W. Ebessen, et al.: Nature, **391** (1998) 667-669.
- 9) C. Shönnichsen, et al.: Appl. Phys. Lett., **76** (2000) 140-142.
- 10) A. Bouhelier, et al.: Phys. Rev. B, **63** (2001) 155404-155413.
- 11) B. Dragnea, et al.: Nano Lett., **3** (2003) 3-7.
- 12) 石田昭人: レーザー研究, **29** (2001) 739-743.

(2003年10月15日受理)