BUNSEKI KAGAKU Vol. 56, No. 9, pp. 695–703 (2007) © 2007 The Japan Society for Analytical Chemistry

報 文

# ガラス基板へ固定化した金ナノ粒子の。<br /> 局在表面プラズモン共鳴散乱顕微分光測定

阿部 将之<sup>1</sup>,藤原 一彦<sup>®1</sup>,加藤 勝<sup>2</sup>,赤上 陽一<sup>2</sup>,小川 信明<sup>1</sup>

金ナノ粒子の示す局在プラズモン共鳴を利用した粒子周囲媒質の屈折率変化の検出を目的として,金ナノ 粒子を固定化したガラスチップを作製し,金ナノ粒子の局在表面プラズモン共鳴散乱分光測定装置の構築及 び粒子近傍の屈折率に対する分光応答に関して検討を行った.作製した装置は,ガラスチップを固定するフ ローセル,暗視野照明光源及び CCD 分光検出器で構成されている.フローセルへ屈折率の異なる溶媒を送 液し,スペクトルを測定したところ,屈折率変化に対して応答の大きい波長領域は主に 500~900 nm であ ることが分かった.そこでピーク波長よりも長波長側の 620~670 nm 領域の散乱光強度を時間に対してプ ロットしたところ,送液する溶媒の屈折率上昇に伴い散乱光の強度は増大し,散乱光の屈折率応答が見られ たことから,実時間で観測可能な高感度な屈折率センサーとして機能することが確認できた.また,ガラス 基板表面における粒子密度を最適化することで,粒子どうしが凝集せず均一な表面状態を持った粒子固定化 ガラス基板を作製し,屈折率応答に最も高感度な粒子密度が確認できた.本研究で示した方法は,従来の表 面プラズモン共鳴法と同程度の分解能を有し,6.67×10<sup>-6</sup>の屈折率変化を観測することが可能であること が分かった.

# 1 緒 言

金ナノ粒子は、光を照射した際に粒子内の伝導電子との 共鳴振動に起因する分光応答を示す<sup>11</sup>.この現象は局在表 面プラズモン共鳴(LSPR)と呼ばれ<sup>20</sup>,粒子の凝集状態に よって著しい色彩変化が生ずることから、デオキシリボ核 酸(DNA)ハイブリダイゼーションの検出に応用されて いる<sup>30</sup>.一方、金ナノ粒子の示す消光スペクトル(透過ス ペクトル)は、粒子表面ごく近傍の屈折率変化に対して鋭 敏に変化する<sup>40</sup>.また、粒子表面に対する分子吸着が粒子 表面近傍の屈折率を変化させることを利用して、粒子表面 へ分子プローブを導入し、タンパク質をはじめとした生体 分子を検出可能であることが報告されている<sup>5)~70</sup>.

金ナノ粒子の示す消光スペクトルは、粒子による光の吸 収成分とレーリー散乱成分に分けることができる<sup>1)8)</sup>.し たがって、消光スペクトルに基づく LSPR を利用した分子 センサーを構築する際には、理論、実験に基づいたそれぞ れの成分に対する定量的な評価が必要となる.しかしなが ら、消光スペクトルは常に吸収成分と散乱成分の和となる ため、吸収成分のみを測定することは不可能である.一 方,散乱成分は適切な暗視野光学系を用いることで測定が 可能となる.更に,金ナノ粒子の示すレーリー散乱光スペ クトルは,単一粒子レベルでも測定が可能であることがこ れまでに報告されている<sup>8)~11)</sup>.すなわち,ナノ粒子から の散乱光を利用することで,粒子の分光特性を定量的に評 価した上でセンサーを構築することが可能である.また, 単一粒子レベルでの計測が可能であることを加味すると, センサーのサイズの微小化も期待できる.したがって,被 検体量の極微量化ができるため,特にわずかしか採取でき ない生体試料に有効であることが示唆される.

また,金ナノ粒子の散乱光スペクトルは,単一粒子の状態においてもまた屈折率に対する応答を示すことが報告されている<sup>10)</sup>.したがって,基板表面上へ集団で均一に表面へ配置した金ナノ粒子のLSPR 散乱分光特性を利用することで,高感度なバイオセンサーの開発が可能であると考えられる.

本研究では、金ナノ粒子のLSPR分光特性を効率よく利 用するためチップ化することを主な目的とし、金ナノ粒子 固定化ガラス基板作製及びLSPR 散乱光測定装置の構築を 中心に検討を行った.更に、作製したガラスチップをフロ ーセルへ取り付け、屈折率の異なる溶媒を送液することで 金ナノ粒子からの散乱光強度を測定し、作製したチップの 屈折率に対する応答を評価した.また、測定感度の向上を 目的として、ガラス基板表面での金ナノ粒子の粒径と密度

<sup>&</sup>lt;sup>1</sup>秋田大学工学資源学部環境物質工学科:010-8502 秋田県秋田 市手形学園町1-1

<sup>&</sup>lt;sup>2</sup>秋田県産業技術総合研究センター工業技術センター: 010-1623 秋田県秋田市新屋町字砂奴寄 4-11



**Fig. 1** Calculated extinction (Solid line) and Scattering (broken line) spectra for 50 nm (a) and 80 nm (b)sized Au nanoparticle

に関しても検討を行った.

#### 2 理論計算

金ナノ粒子を屈折率の異なる媒質に接触させた場合のス ペクトル変化を見積もるため,Mie 散乱理論に基づき,粒 径及び溶媒の屈折率を変化させたときの消光スペクトル (可視透過スペクトルに対応)及び散乱スペクトルのシミ ュレーションを行った.計算プログラムは文献1)及び NISTより公開されている C++ クラスライブラリ (SCAT-MECH, http://physics.nist.gov/Divisions/Div844/ facilities/scatmech/html/index.htm)を基に VisualC++ (Microsoft)を用いて作成した.また,計算に用いた金の 可視領域における光学定数は既報文献<sup>12)</sup>の値を使用した.

Fig. 1には計算により得られた粒径 50 nm 及び 80 nm の金ナノ粒子の消光スペクトル及び散乱スペクトルを示し ている.計算に必要なパラメーターは粒径及び粒子を取り 囲む媒質の屈折率である.このとき計算に用いた媒質の屈 折率は1.33とした.計算より得られる消光スペクトルは 粒子が光を吸収する成分と散乱する成分(散乱スペクト ル)の総和であるため,消光スペクトルより散乱スペクト ルを差し引いたものが吸収成分である.Fig. 1の2つのス ペクトルを比較すると,粒径が増大すると消光スペクトル



Fig. 2 Plots of calculated scattering intensity at the peak wavelength as a function of refractive index Drawn symbols are distinguished by diameters for Au nanoparticles; ■: 30 nm, ●: 60 nm, ▲: 90 nm, ▼: 120 nm

の強度が大きくなるのが分かる.一方,粒径 50 nm では 透過スペクトル中の散乱成分が占める割合が1割程度で あるのに対し、粒径80 nmのでは透過スペクトル中の散 乱成分が占める割合が4割程度まで増大する.つまり, 粒径が大きくなるにつれて、共鳴波長近傍における散乱効 率が高くなると言える.また,媒質の屈折率を変化させて 散乱スペクトルを計算し、ピーク位置の強度を粒径に対し てプロットしたものを Fig. 2 に示す. このとき粒径は 30 ~120 nm まで変化させた. どの大きさの粒子においても 屈折率の増大に対して散乱強度は増加したが、粒径が増大 するのに伴い、屈折率に対する強度変化もまた大きくなっ た. したがって、粒径が大きくなるほど散乱成分の屈折率 変化に対する感度が高くなると考えられる. しかしなが ら、粒径 90 nm 以上になると屈折率に対する強度変化の 割合(屈折率に対する強度変化の傾き)がほとんど変化し なくなる.したがって、計算からは LSPR センサーとして 用いる金ナノ粒子の理想的な粒径は 90 nm 程度であると 見積もられた.

#### 3 実験と装置

#### 3・1 金ナノ粒子の合成

金ナノ粒子の合成は既報文献<sup>5)~7)</sup>を参考に行った.0.8 mM テトラクロロ金(III)四水和物(関東化学製特級)水 溶液 125 mL を加熱かくはんし,激しく沸騰し始めた後, 10 mM クエン酸ナトリウム(和光純薬製特級)10 mL を 加え 10 分間加熱かくはんした.その後,室温まで冷却し た金ナノ粒子分散液を孔径 0.20  $\mu$ m のシリンジフィルタ - (ADVANTEC DISMIC25CS)で沪過した.合成した粒 子の分散液は使用するまで冷蔵庫で保存した. 報 文

阿部,藤原,加藤,赤上,小川:ガラス基板へ固定化した金ナノ粒子のLSPR 散乱分光測定



Fig. 3 Schematic drawing of Au nanoparticle immobilized on the glass substrate

# 3・2 金ナノ粒子固定化ガラス基板作製

金ナノ粒子を固定化するガラス基板(MATSUNAMI 18 mm×18 mm)は王水で表面を十分に洗浄した後,アルカ リ性洗剤,超純水で洗浄したものを使用した.まず,ガラ ス基板表面に,5% (v/v) 3-アミノプロピルトリメトキシ シラン (APTMS,東京化成工業製)溶液 {トルエン(関 東化学製特級)}を滴下し5分間静置した.その後,エタ ノールで5分間,6回,超純水で5分間・3回超音波洗 浄を行い,ガラス表面の過剰なシランを取り除いた.3・1 で合成した金ナノ粒子分散液を希釈し粒子濃度を0.24 nM としてガラス基板表面へ20 µL滴下し2時間静置した. この操作により,金ナノ粒子はガラス表面の陽電荷を持っ たアミンと粒子表面のクエン酸による負電荷により,静電 相互作用を介して粒子はガラス基板上へ固定化される<sup>13)</sup>. Fig. 3に金ナノ粒子固定化状態の模式図を示した.

## 3・3 原子間力顕微鏡画像測定及び粒径解析

金ナノ粒子固定化ガラス基板の表面状態観察には,原子 間力顕微鏡(AFM, Seiko SPI-3700/SPA-300)を用いた. AFM 画像より粒子固定化状態を観察し,測定した AFM 画 像をグレースケールに変換した後,画像処理ソフトウェア ImageJ(NIH)を用いてガラス基板上に固定化されている 金ナノ粒子の平均粒径を解析した.

#### 3・4 固定化した金ナノ粒子の粒径制御

Mie 散乱理論を元に計算した結果から,散乱効率と屈折 率変化に対する感度の増加には粒径増大が必要不可欠であ る.均一な粒径 90 nm 付近の粒子を直接合成することは 非常に困難であるため,既報文献<sup>14)15)</sup>の手順を参考に,ガ ラス基板上で金ナノ粒子の粒径を制御した.3・2の手順で 作製した金ナノ粒子固定化ガラス基板を,0.3 mM テトラ クロロ金(III)四水和物水溶液と0.4 mM 塩酸ヒドロキシル アミンの体積比 10:1 の混合液(以下成長液)に10 分間 浸漬させ,ガラス表面を超純水で洗浄後,更に新しく調製 した成長液に浸漬させた.この操作を3回繰り返すこと で,初めに固定化されていた粒子の周りに金を析出させ, 粒子の粒径を増大させた.粒径制御操作を行った後に金ナ



**Fig. 4** Schematic drawing for (a) the LSPR scattering light measurement system and (b) flowcell

ノ粒子固定化ガラス基板の透過スペクトル測定を行った. また,AFM 画像から平均粒径を求めた.

## 3.5 局在表面プラズモン共鳴散乱顕微分光装置の構築

本研究において作製した装置の概略図を Fig. 4(a) に 示す. 光源にはタングステン-ハロゲンランプを使用し, 光源からの光束を対物レンズ(40×, N.A.0.65 Olympus) で集光した後, 直径 100 µm のピンホールを通し, アクロ マティックレンズ (Edmund Optics, f=60mm) を通し て光束をレンズ瞳径と同じ直径を持つ平行光とした. その 後、暗視野照明用リングにより、光束をリング状にしてビ ームスプリッター, 対物レンズ (10×, N.A.0.28 Olympus) を通し、フローセル内に取り付けた金ナノ粒子固定化ガラ ス基板に集光照射した. このときの焦点位置のスポット は, 直径 115 µm の円形であり, 面積にして 1.40 × 10<sup>4</sup> μm<sup>2</sup>であった. 焦点内の粒子数は, 例えば粒子密度が 50 個/μm<sup>2</sup>である場合には観測領域の粒子数は 5.14×10<sup>5</sup> 個 と計算できる. 散乱光はビームスプリッターを介して反対 側に設置した光ファイバーへ対物レンズを用いて集光し, 光ファイバーを通じてマルチチャンネル分光器 (Stellarnet, EPP2000) へ導入した. また, サンプルから の反射光等を遮るため、光ファイバー側には虹彩絞りを設 置した.分光器により検出した散乱スペクトルは PC へ取 り込み、解析を行った、また、フローセルの模式図を

BUNSEKI KAGAKU



Fig. 5 Scattering spectra for Au nanoparticle immobilized on the glass substrate

Spectra drawn with solid line and broken line were obtained by the injection of water and 1,4-dioxane to the flowcell, respectively. The region between two lines in which are vertical to the wavelength axis represents the wavelength region  $(620 \sim 670 \text{ nm})$  employed in time course measurements indicated in Fig. 6 and Fig. 8.



Fig. 6 Time course of the scattering intensity at 620  $\sim 670~{\rm nm}$  region

Au nanoparticle with 33.5 nm diameter was immobilized on the glass substrate in which attached to the flowcell. Dataset were obtained by the replicate injection of water and different fluids. Numbers in the drawing depicts the injection point of the fluids, injected fluids were 1: ethanol, 2: 1,4-dioxane, 3: DMSO.



**Fig. 7** A: AFM image for Au nanoparticle immobilized on glass substrate before a seeding growth procedure. Particle size was analyzed as  $35.2 \pm 6.0$  nm; B: Extinction spectra for Au nanoparticle immobilized glass substrate. Absorbance was increased with repetition of a seeding growth procedure; C: AFM image for Au nanoparticle immobilized on glass substrate after 3-time seeding growth procedure. Particle size was analyzed as  $103.4 \pm 13.4$  nm.

報文



Fig. 8 (a) Time course of the scattering intensity at  $620 \sim 670$  nm region

Au nanoparticle with 103.4 nm diameter was deposited by a seeding growth procedure on the glass substrate in which attached to the flowcell. Dataset were obtained by the replicate injection of water and different fluids. Numbers in the drawing depicts the injection point of the fluids, injected fluids were 1: ethanol, 2: 1,4-dioxane, 3: DMSO. Lower drawing depicts the dataset in which indicated in Fig. 6 for comparison. Scattering intensity difference in which indicated in (a) as a function of refractive index. Deposited particle diameters were 103.4 nm (filled circle) and  $33.4 \pm 7.8$  nm (filled square), respectively. Solid lines were obtained by linear least squares curve fitting.

Fig. 4 (b) に示している. フローセルは, Oリングを介 してガラスチップを挟み込み, ガラスチップ上を溶媒が通 過するよう, ポリテトラフルオロエチレン (PTFE) によ り作製したものを用いた. フローセルにはポンプを取り付 け, 試料を送液した. 得られた散乱スペクトルの特定の波 長領域における強度の合計値を時間に対して 0.5~1.0 秒 ごとにプロットするようプログラムを作成し, 試料送液に よる散乱光強度変化を観測した. 測定プログラムは Labview7.1 (National Instruments) を用いて作成した.

# 3・6 散乱光の屈折率応答

金ナノ粒子固定化ガラス基板をフローセル内にセット

し,異なる濃度のスクロース溶液(和光純薬製特級)及び エタノール(ナカライテスク製特級,屈折率1.362),1,4-ジオキサン(東京化成工業製特級,屈折率1.422),ジメ チルサルホキシド(DMSO,和光純薬製特級,屈折率 1.477)を流量0.1 mL/minで送液した.散乱光強度が一 定になるのを確認し,送液試料を変えるときは,完全にフ ローセル内を超純水で満たしてから次の試料を送液した.

#### 4 結果と考察

# 4・1 散乱スペクトル測定

作製した装置を用いて測定した金ナノ粒子の散乱スペク トルを Fig. 5 に示す.このときガラスチップへ固定化し た金ナノ粒子の粒径は 65.7 ± 13.4 nm であり,固定化時 の濃度は 0.24 nM とした.また,Fig. 5 の実線で示してい るスペクトルは超純水をフローセルへ送液した場合のスペ クトルである.ピーク波長は 580 nm 付近に現れ,これは 同じ粒径の金ナノ粒子について計算した散乱スペクトルの ピーク位置 570 nm とほぼ一致していた.一方,破線で示 しているスペクトルは 1,4ジオキサンを送液した場合のス ペクトルである.送液する溶媒の屈折率増加に伴いピーク 位置は長波長側にシフトし,波長領域 500~900 nm の強 度が増大した.したがって,この波長領域の散乱光強度を 時間に対して測定することで,実時間で測定可能な LSPR センシングが可能であることが予想された.

#### 4・2 屈折率変化に対する散乱光強度の実時間測定

前項の結果に基づき、屈折率変化に対する散乱光強度の 実時間測定を試行した.理論計算の項においてはスペクト ルのピーク位置の強度を屈折率に対してプロットしたが, 実時間測定においては散乱スペクトルに対してその都度ピ ーク位置を検索し、プロットするのは処理を行うプログラ ムに負担がかかってしまう.また,スペクトルのノイズに より誤差が大きくなる恐れがある. そこで,変化の大きい 波長領域の散乱光強度を時間に対してプロットすることで 実時間測定を試行した. これまでの検討により試料送液に 伴う屈折率変化によって散乱スペクトルは強度が上昇する とともに、ピーク位置がレッドシフトすることが実験及び 理論計算より分かったが、ピーク波長付近を測定領域とし て選択した場合、スペクトルが大きくレッドシフトする と,初めのピーク付近の散乱光強度は逆に減少する可能性 がある.そのため、ピーク位置より長波長側で、確実に強 度変化の観測できる 620~670 nm (Fig. 5 において波長 軸に垂直な直線で囲まれた領域)を測定領域とした.

試料を送液したときの散乱光強度の経時変化を Fig. 6 に示す.まずフローセル内に超純水を 10 分間送液し,続 いてエタノールを送液した.送液後,セル内がエタノール で完全に満たされるまでに数分かかり,散乱光強度が徐々

#### BUNSEKI KAGAKU



Fig. 9 AFM images for Au nanoparticle deposited glass surface, before (A, C) and after (B, D) a seeding growth procedure

Initial Au nanoparticle densities on glass surfaces were 111.6 particle/ $\mu$ m<sup>2</sup> and 30.1 particle/ $\mu$ m<sup>2</sup>, respectively.

に増加していくのが確認できた.更に1,4-ジオキサン, DMSOを用いて同様に測定を行った結果,エタノール, 1,4ジオキサン,DMSOの順に散乱光強度は増大した.つ まり,送液する試料の屈折率が増加するのに従って,散乱 光強度が増大したことを示している.この試行により,散 乱スペクトル測定において変化を確認した特定の波長領域 のみを測定することで,効率よく金ナノ粒子を取り囲む媒 質の屈折率を実時間で測定できることが示された.

# 4・3 屈折率応答に対する粒径の効果

次に,ガラス基板表面に固定化した金ナノ粒子の屈折率 応答に対する粒径の効果を検討した.金ナノ粒子固定化ガ ラス基板のAFM 画像 {Fig. 7 (a)} から平均粒径を求め た結果,合成により得られた金ナノ粒子の粒径は 35.2 ± 6.0 nm であった.計算より得られた結果では,散乱光を 測定することで効率よく LSPR センシングを行うには 90 nm 程度の粒径が必要である.しかしながら,通常の液相 還元法で再現性よく合成できる金ナノ粒子の粒径は 50 nm 程度が限界である<sup>6)</sup>. 一方, ヒドロキシルアミンを用いて あらかじめ合成した金ナノ粒子を種として粒径を増大させ ることが可能である<sup>16)</sup>が,容易に凝集してしまうため分散 液の濃度をあまり高くできない.そこで、APTMS を介し てガラス表面に金ナノ粒子を固定化した後に塩化金酸及び ヒドロキシルアミンを用いて粒径増大操作を行った. Fig. 7(b) に粒径制御操作後の金ナノ粒子固定化ガラス 基板の透過スペクトルを示した. ヒドロキシルアミン/塩 化金酸混合液への浸漬を繰り返すごとにスペクトルを測定 したところ、粒径の増大に伴う吸光度の増加とピーク位置 のレッドシフト<sup>16)17)</sup>が観測された.浸漬を3回繰り返した 後の AFM 画像を Fig. 7 (c) に示す. この画像から求めた 平均粒径は 103.4 ± 13.4 nm であった.次に、粒径制御操 作により粒径を 33.5~103.4 nm まで増大させた金ナノ粒 子固定化ガラス基板をフローセル内に取り付け、同様に屈 折率の異なる試料を送液し、散乱光強度測定を行った.

報 文



Fig. 10 (a) Scattering intensity difference as a function of refractive index. Deposited particle densities were 32.0 particle/ $\mu$ m<sup>2</sup> (filled square), 40.7 particle/ $\mu$ m<sup>2</sup> (filled circle) and 60.8 particle/ $\mu$ m<sup>2</sup> (filled triangle), respectively; (b) Plots for sum of calculated scattering intensity at 620 ~ 670 nm region as a function of refractive index; (c) Plots of slope for solid line in (a) as a function of Au nanoparticle density on a substrate surface.

33.5 及び 103.4 nm それぞれの粒径の金ナノ粒子が固定化 されたガラスチップを用いた場合の、4・2と同様の実験の 結果を Fig. 8(a) に示す. 粒径の増大に伴い屈折率変化 に対する散乱光強度変化は増大した.したがって、計算に よる予測と同様に、粒径を増大させることにより、屈折率 に対する感度も増大することが分かった.また、試料送液 後に強度が一定になった位置の平均値を求め、超純水を送 液したときの強度に対する強度変化を屈折率に対してプロ ットしたものが Fig. 8 (b) である. 測定した領域(屈折 率 1.36~1.47) において, 強度変化は良好な直線となっ た. その傾きを測定感度の指標として比較を行ったとこ ろ、粒径増大後には感度が4倍上昇したことが分かった. また、検出器の応答最小単位に対する屈折率応答の分解能 をこの傾きより逆算したところ、粒径を 103.4 ± 13.4 nm とした場合には 6.67×10<sup>-6</sup> RIU と得られた. 表面プラズ モン共鳴 (SPR) 法の持つ分解能は 5.0×10<sup>-5</sup> から 1.7× 10<sup>-7</sup> RIU であり<sup>18)19)</sup>,ほぼ本研究で検討した手法は SPR 法とほぼ同等の屈折率変化に対する感度を有することが分 かった.

# 4・4 ガラス表面の粒子密度制御

粒子濃度を 0.52 nM としたときの金ナノ粒子固定化ガ ラス表面の AFM 画像を Fig. 9-A に示す. このように粒子 固定化時の粒子密度が 111.6 particle/µm<sup>2</sup>と高い状態で は, 粒径増大操作を行うと, 粒子どうしの間隔が狭すぎる ために Fig. 9-B のように会合してしまい粒子が島状に成 長してしまうことが分かった. このような状態においては 表面状態が不均一となることで,測定箇所によって強度変 化にばらつきが生じ、センシング効率の低下につながるこ とが確認できた.そこで,金ナノ粒子分散液濃度を 0.13 nMとし、粒子固定化後のガラス表面の粒子密度を 39.2 particle/µm<sup>2</sup>と下げることで、Fig. 9-Cに示すように、粒 子間距離を十分に持った状態で固定化させた、この後に増 大操作を行った場合の AFM 画像が Fig. 9-D である. 図よ り、粒子成長操作を行っても島状に成長することなく、均 ーに粒子の粒径が増大することが確認できた.また、散乱 スペクトル測定を試行したところ、ガラス表面は、測定箇 所による強度変化のばらつきがほとんどない均一な状態と なったこともまた確認できた.

#### 4・5 屈折率応答に対するガラス表面粒子密度の効果

ガラス表面における金ナノ粒子密度を変化させた場合 の,各溶媒の送液に対する散乱光測定を行った結果を Fig. 10 (a) に示す.粒子密度はガラスへ固定化するとき の金ナノ粒子分散液濃度を 0.13,0.15 及び 0.20 nM と変 えることで変化させた.それぞれの濃度で固定化したガラ ス基板の表面状態を AFM で観察し粒子密度を求めたとこ ろ,32.0,40.7 及び 60.8 particle/µm<sup>2</sup> であった.得られ たデータは下に凸な緩やかな曲線を示している.理論計算 により得られた 620~670 nm の領域の散乱断面積の和を 屈折率に対してプロットしたところ {Fig. 10 (b)},実験 データと同様の形状を示すことが分かった.

一方,いずれの粒子密度においても,屈折率変化に対し て散乱光強度の増加が確認できた.また,密度の上昇に伴 い散乱光強度変化も増加し,屈折率に対する応答は粒子密 度に依存していることが分かった.粒子密度が高くなるこ とで,測定領域における粒子数が増加するため,粒子数の 増大に対応して散乱光の屈折率応答は高くなると考えられ る.このことを確認するため Fig. 10 (a)のデータに対し て最小二乗によるカーブフィッティングを行い,直線の傾 きを粒子密度に対してプロットしたものが Fig. 10 (c)で ある.ゼロを通過する直線により最小二乗近似を行ったと ころ,直線の傾きは粒子密度の増大に対して比例して増加 することが分かった.したがって,粒子密度が高いほど感 度の増大が見込まれることが予想される.

他方,前項に示したとおり,粒径を増大する操作に伴っ て粒子どうしが凝集してしまい,測定箇所における表面状 態にばらつきがでてしまう.以上のことから,屈折率変化 に対して感度よく測定を行うことができ,同時に粒子間の 凝集を防ぐことのできるガラス表面上の粒子密度のしきい 値は 60 particle/μm<sup>2</sup> 程度であると判断した.

#### 5 結 論

本研究では、Mie 散乱理論に基づいた金ナノ粒子の LSPR 散乱スペクトルのシミュレーションを行うことで、 散乱光計測による LSPR センサーに最適な粒径を予測し た.また、予測を基に、金ナノ粒子固定化ガラス基板を作 製し、ガラス表面へ固定化する金ナノ粒子の粒径を制御す ることで、屈折率に対する感度を増大させることができ た.更に、屈折率変化に対してスペクトル変化の大きい領 域を選択することで、送液する試料の屈折率変化を散乱光 強度変化としてリアルタイムに検出可能であり、表面プラ ズモンセンサーとほぼ同等の感度を有することが分かっ た.また、表面粒子密度の最適化によりセンシング効率が 上昇することが確認できた.今後,本研究により構築した 散乱光検出をベースにした LSPR センサーは,固定化した 金ナノ粒子を化学修飾することにより,粒子表面近傍にお ける DNA 及びタンパク質相互作用解析へと応用されるこ とが期待できる.

本研究の一部は(財)実吉奨学会の助成を受けて行われた.

# 文 献

- 1) C. F. Bohren, D. R. Huffman: "Absorption and Scattering of Light by Small Particles", (1983), (Wiley-VCH, Weinheim).
- 2) E. Hutter, J. H. Fendlar: Adv. Mater., 16, 1685 (2004).
- 3) J. J. Storhoff, R. Elghanian, R. C. Mucic, C. A. Mirkin, R. L. Letsinger: *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 1959 (1998).
- 4) T. Okamoto, I. Yamaguchi, T. Kobayashi: Opt. Lett., 25, 372 (2000).
- 5) N. Nath, A. Chilkoti: Anal. Chem., 74, 504 (2002).
- 6) N. Nath, A. Chilkoti: Anal. Chem., 76, 5370 (2004).
- K. Fujiwara, H. Watarai, H. Itoh, E. Nakahama, N. Ogawa: Anal. Bioanal. Chem., 386, 639 (2006).
- 8) 朝日 剛: 化学, 60, 12 (2005).
- 9) S. K. Eah, H. M. Jaeger, N. F. Scherer, G. P. Wiederrecht, X-M. Lin: *Appl. Phys. Lett.*, 86, 031902 (2005).
- 10) T. Itoh, T. Asahi, H. Masuhara: Appl. Phys. Lett., 79, 1667 (2001).
- 11) T. Kalkbrenner, U. Håkanson, V. Sandoghdar: Nano Lett., 4, 2309 (2004).
- 12) P. B. Johnson, R. W. Christy: Phys. Rev. B, 6, 4370 (1972).
- 13) K. C. Grabar, R. G. Freeman, M. B. Hommer, M. J. Natan: Anal. Chem., 67, 735 (1995).
- 14) N. R. Jana, L. Gearheart, C. J. Murphy: Langmuir, 17, 6782 (2001).
- 15) K. R. Brown, M. J. Natan: Langmuir, 14, 726 (1998).
- 16) J. Turkevich, P. C. Stevenson, J. Hillier: Disscuss. Faraday Soc., 8, 348 (1950).
- 17) S. Link, M. A. El-Sayed: J. Phys. Chem. B, 103, 4212 (1999).
- 18) J. Melendez, R. Carr, D. U. Bartholomew, K. Kukanskis, J. Elkind, S. Yee, C. Furlong, R. Woodbury: Sens. Actuators, B, 35, 1 (1996).
- 19) T. M. Chinowsky, J. G. Quinn, D. U. Bartholomew, R. Kaiser, J. L. Elkind: Sens. Actuators, B, 91, 266 (2003).

報文

# Localized Surface Plasmon Resonance Light Scattering Spectroscopy of Au Nanoparticle Immobilized on a Glass Substrate

Masayuki ABE<sup>1</sup>, Kazuhiko Fujiwara<sup>1</sup>, Masaru Kato<sup>2</sup>, Yoichi Akagami<sup>2</sup> and Nobuaki Ogawa<sup>1</sup>

 <sup>1</sup> Department of Materials-process Engineering & Applied Chemistry for Environments, Faculty of Engineering and Science, Akita University, 1 - 1, Tegatagakuencho, Akita-shi, Akita 010 - 8502
 <sup>2</sup> Akita Prefectural R&D Center, 4 - 11, Arayamachi, Aza, Sanuki, Akita-shi, Akita 010 - 1623

(Received 13 April 2007, Accepted 5 July 2007)

Localized surface plasmon resonance (LSPR) scattering spectroscopy for Au nanoparticle immobilized on a glass substrate was studied. An apparatus for LSPR scattering spectroscopy, which consists of a flowcell, dark-field illumination light source and CCD spectrophotometer, was constructed in this study. A flowcell was designed to fix an Au nanoparticle deposited glass chip, so that injected fluids contact with a Au nanoparticle deposited surface inside the flowcell. The spectroscopic response of a Au nanoparticle for dielectric environments around the particle was examined by the injection of water and several organic solvents. LSPR scattering spectra revealed a red-shift of the scattering maxima and an increment of the scattering intensity at the  $500 \sim 900$  nm region by increasing the refractive index of the injected solvent. Then, the time course of the scattering intensity at  $620 \sim 670$  nm region was observed by the replicate injection of water and organic solvents. The scattering intensity was increased with increasing refractive index of the injected solvent. Therefore, it was confirmed that the fabricated glass chip worked as a sensitive refractive index sensor by combining with LSPR scattering spectroscopy. The LSPR scattering responses in different surface density and size of a Au nanoparticle on a glass surface were also examined. We confirmed the optimum Au nanoparticle density with uniform particle spacing and without particle aggregation for refractive index sensing.

Keywords : localized surface plasmon resonance (LSPR); Au nanoparticle; light scattering.