



蛍光検出型バイオセンサ応用に向けたシリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に関する研究

柳川, 博人

(Degree)

博士 (工学)

(Date of Degree)

2020-03-25

(Date of Publication)

2021-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第7765号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1007765>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士論文

蛍光検出型バイオセンサ応用に向けた
シリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に
関する研究

令和2年1月

神戸大学大学院工学研究科

柳川 博人

目次

第1章 序論.....	1
1.1 蛍光検出型バイオセンサ技術.....	1
1.2 バイオセンサの高感度化に向けたアプローチ.....	9
1.2.1 新規プラズモニック基板.....	9
1.2.2 新規蛍光体.....	14
1.3 本論文の目的・構成.....	20
第2章 プラズモニック基板の開発.....	23
2.1 はじめに.....	23
2.2 実験方法.....	25
2.2.1 試料作製方法.....	25
2.2.2 構造評価方法.....	25
2.2.3 光学特性評価方法.....	26
2.2.4 FDTD シミュレーション解析方法.....	26
2.2.5 サンドイッチイムノアッセイによる発光増強評価方法.....	27
2.3 実験結果.....	30
2.3.1 構造評価.....	32
2.3.2 光学特性評価.....	34
2.3.3 FDTD シミュレーション解析.....	39
2.3.4 サンドイッチイムノアッセイによる発光増強評価.....	45
2.4 考察.....	47
2.5 まとめ.....	49
第3章 プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光増強.....	50
3.1 はじめに.....	50
3.2 実験方法.....	52

3.2.1	試料作製方法.....	52
3.2.2	構造評価方法.....	54
3.2.3	反射スペクトル測定方法.....	55
3.2.4	発光特性評価方法.....	55
3.3	実験結果.....	58
3.3.1	B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの評価.....	58
3.3.2	構造評価.....	60
3.3.3	反射スペクトル評価.....	62
3.3.4	発光励起スペクトル評価.....	64
3.3.5	発光スペクトル評価.....	67
3.3.6	発光減衰スペクトル評価.....	72
3.4	考察.....	76
3.5	まとめ.....	78
第4章	シランカップリング分子による Si 量子ドットの表面機能化.....	79
4.1	はじめに.....	79
4.2	実験方法.....	81
4.2.1	試料作製方法.....	81
4.2.2	分散性評価方法.....	84
4.2.3	発光特性評価方法.....	84
4.3	実験結果.....	85
4.3.1	分散性評価.....	85
4.3.2	発光特性評価.....	87
4.4	考察.....	89
4.5	まとめ.....	91
第5章	抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成.....	92
5.1	はじめに.....	92
5.2	実験方法.....	93

5.2.1	試料作製方法.....	93
5.2.2	構造評価方法.....	94
5.2.3	発光特性評価方法.....	96
5.2.4	抗体結合性評価方法.....	97
5.3	実験結果.....	99
5.3.1	構造評価.....	99
5.3.2	発光特性評価.....	105
5.3.3	抗体結合性評価.....	106
5.4	考察.....	108
5.5	まとめ.....	109
第6章	本研究のまとめ.....	125
	参考文献.....	127
	謝辞.....	140
	研究業績（博士論文に関係のあるもの）.....	141

第 1 章 序論

1.1 蛍光検出型バイオセンサ技術

バイオセンサとは

生体内では複雑で多様な化学反応が、極めて精密に、正確な制御のもとで行われている。例えば、酵素というタンパク質は、生体内の多くの反応に関与しており、物質代謝、エネルギー変換をつかさどる生体触媒として、生命活動を営む上で不可欠な役割を果たしている。これは、酵素が常温、常圧という体内条件下で、特定物質を選択的に認識し、特定の反応のみを触媒する特性を有するためである。抗体というタンパク質は、異物を認識して結合する働きと、免疫を担う細胞を活性化させて異物(抗原)を排除する働きがある。抗体のこの反応は生体の防御機構であり免疫反応と呼ばれ、抗原と抗体が鍵と鍵穴の関係に例えられるように選択的に抗原-抗体複合体を形成することに起因している。このように酵素や抗体など生体分子は、夾雑物が多く存在する環境下であっても特定の物質だけに特異的に働きかけるという優れた分子認識能力を有している。このような生体分子の優れた分子認識能力を積極的に利用したセンサは「バイオセンサ」と呼ばれる^{1,2}。

図 1.1 にバイオセンサの構成図を示す。バイオセンサは、分子認識部と信号変換部から構成される^{1,2}。分子認識部は、検体に特異的に働きかける生体認識機能を有する生体分子を用いて検出対象である検体を認識する。信号変換部(トランスデューサ)は、特定の生物学的事象の発生を物理信号に変換する。生体分子としては、酵素、抗体、受容体が広く用いられており、それぞれ、基質-酵素、抗原-抗体、ホルモン-受容体の特異的結合により、基質、抗原、ホルモンの認識に用いられる。信号変換部は、電気化学、光学、圧電、質量変化、音響、熱など様々な方式が提案されている²⁻⁴。

バイオセンサの主要な応用分野は、医療・健康分野、環境分野、食品・発酵分野である。医療・健康分野はバイオセンサの応用分野として最も占める割合が大きい。特に、糖尿病患者がインスリン投与を行う際に、自己採血により血糖値をモニタするために用いる血糖値センサの市場が大きい。糖尿病患者は世界的な生活習慣病増加により大幅な増加傾向であり、患者数は日本 720 万人、世界 4 億 1500 万人と言われ、世界人口の 8.8% を占めている。国際糖尿病連合によると、今後は、急速な経済発展に伴いアジアでの糖尿病患者の急増し、2040 年には中国、インド、ASEAN で全世界の 60% を占めると予測されている。世界市場規模は 2015 年 5,800 億円であり、2020 年 6,500 億円を超えると予測されている。血糖値センサの主要メーカーは、Roche、Johnson&Johnson、PHC ホールディングス(旧、パナソニックヘルスケアホールディングス)、Abbott であり、上位 4 社で 86% を占める寡占市場となっている。

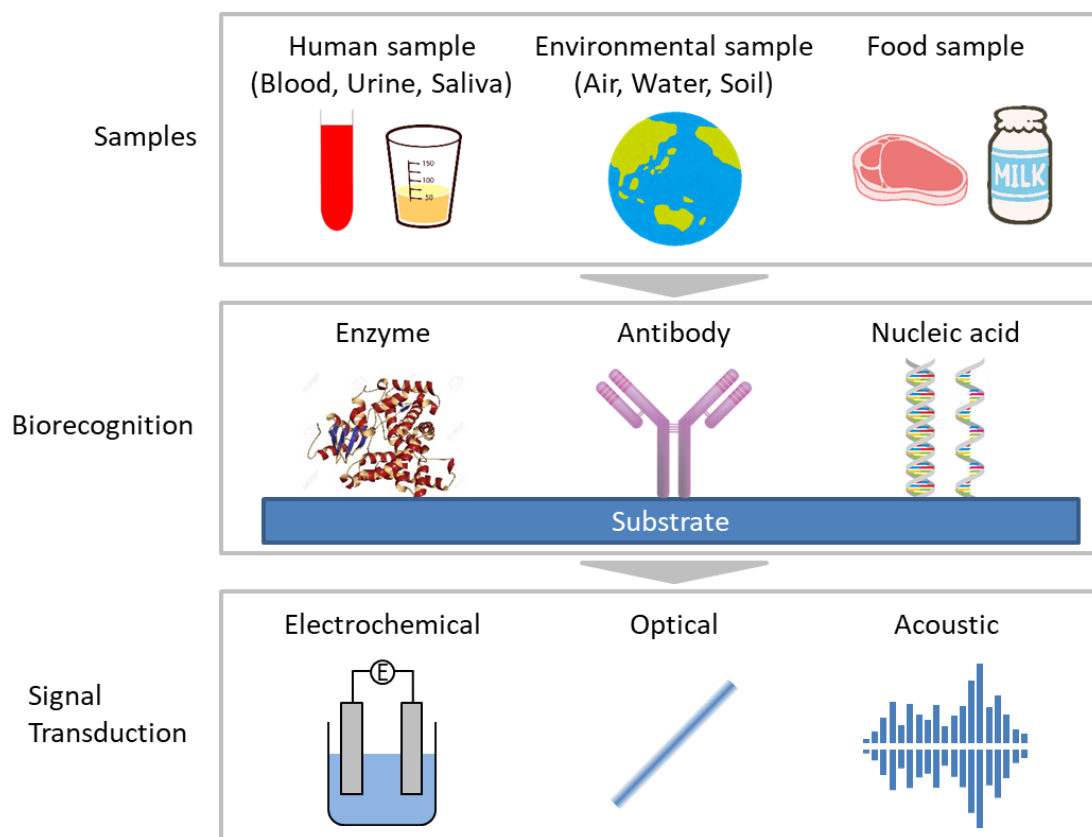


図 1.1 バイオセンサの構成模式図。

バイオセンサは、1956年のクラークらの酸素電極の報告に始まり⁵、それ以降、精力的に研究され急速な性能改善を続け1960年代初めに市販された。応用分野は前述した医療分野を中心に広範囲に渡っている^{2,6}。クラーク型酸素電極はアノード、カソード、内部電解液からなる電極系を酸素透過膜で被覆した構造であり、カソードーアノード間に電圧を印加し、カソードに到達する酸素分子の数に比例する電流が流れる。血糖値センサで用いられるグルコースセンサはクラーク型酸素電極表面に酵素であるグルコースオキシターゼが固定化された膜を形成した構造であり、酵素反応により生成／消費される電極活性物質を電気化学デバイスで電気信号に変換し、基質の濃度を間接的に測定する⁶。グルコースオキシターゼの代わりに別の酵素を用いることで基質ー酵素反応により様々な基質を測定することができる。酸素電極のようなトランスデューサはバイオセンサにおけるプラットフォームであり、検出対象に応じて分子認識部の生体分子を選択することにより様々なバイオセンサを実現でき、バイオセンサの実現に極めて重要な技術となっている。分子認識による生物学的反応を物理信号に変換するトランスデューサは、多様な方式が提案されているが、高感度かつ安価なトランスデューサ開発は依然課題である²。

バイオセンサにおけるトランスデューサ

バイオセンサの研究初期はグルコースセンサに代表される電気化学を用いる電極型がトランスデューサ開発の中心であったが、近年は発光や蛍光などを利用した光検出型バイオセンサの研究が盛んである。表 1.1 に光検出型バイオセンサの特徴を、従来から広く研究されてきた電気化学を応用した電極型バイオセンサを比較対象として示す。光検出型バイオセンサは幾つかの優れた特徴を有する。光検出型は電極型と異なり電氣的な妨害を受けにくく高感度化に有利である。また、分子認識部と光検出部が必ずしも接触している必要がなくサンプル交換が容易であるため、連続検出が可能となる。さらに光は波長や偏光など多くの情報が含まれるため、これらを区別し検出することで複数の検出対象物質の同時検出が可能となる。複数同時検出が可能になれば、特定の対象だけを検出するバイオセンサの従来用途である医療・健康分野以外にも、新たな用途への展開が期待される。新たな用途として、近年、空気や水など環境分野が注目されている。一方、光検出型は、光の遮蔽が必要であることと、小型化が困難であることがデメリットとして挙げられが、光源など光学系の急速な発展により解決されつつある。このように、光検出型バイオセンサは、高感度、連続検出、複数同時検出を武器に、バイオセンサの新たな用途開拓が期待されており、現在最も盛んに研究が行われている。

表 1.1 光検出型バイオセンサの特徴

長所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 信号が光であるため、電氣的な妨害を受けにくい ・ 分子認識部と光検出部が物理的な接触が不要で、サンプル交換が容易 ・ 波長、偏光など情報量が多く、複数の検出対象物質の同時検出が可能
短所	<ul style="list-style-type: none"> ・ 光を遮断して測定を行う必要がある ・ 測定系の小型化が難しい

光検出型のバイオセンサは、化学発光を利用するものと、蛍光や吸光を利用するものに分けられる。化学発光(chemicalluminescence ; CL)の歴史は古く^{7,8}、現在では医療・健康分野や環境分野で用いられている。代表的な化学発光であるルミノールは、アルカリ溶液中で金属イオンなどにより触媒され、 H_2O_2 存在下で酸化されることで励起状態のアミノフタル酸となり、基底状態に戻る際に青色発光する。この現象を応用することで H_2O_2 の測定が可能となる。 H_2O_2 生成を伴う酵素反応と組み合わせることで、様々な基質を測定することができる。しかし、化学発光は、ルミノールのように発光が化学反応に起因するため試薬添加が必要となり、操作が煩雑で連続検出にも不向きである。

一方、蛍光や吸光を利用する場合は、発光のための試薬添加が不要であり連続検出が期待されるが、外部からの光照射が必要で以前はセンサ小型化が課題であった。しかし、近年はレーザーや光ファイバの性能向上で小型化が可能となったため、蛍光や吸光を利用するトランスデューサが光検出型バイオセンサの研究開発の中心となっている。

蛍光検出型バイオセンサ

抗原－抗体反応の特異的な親和性(アフィニティ)を利用し、検出対象を検出する方法はイムノアッセイと呼ばれる。イムノアッセイは選択性と感度が極めて高いため、診断や生化学に広く用いられる²⁶。抗体は、生体内において特定の異物である抗原に特異的に結合して抗原－抗体複合体を形成し、その異物を生体内から除去する分子であるため、極めて高い特異的結合性を有し、夾雑物を多く含むサンプルから特定の検出対象を認識することが可能となる。イムノアッセイには、抗原－抗体複合体の形成を直接測定する非標識法と蛍光体などの標識を用いて間接的に抗原－抗体複合体の形成を検出する標識法がある。非標識法は、抗原－抗体複合体の沈殿量を肉眼で判定する方法や、沈降を観察する方法があり、いずれも簡単に測定を行えるメリットがあるが、感度、再現性に乏しく、定量化も困難である。そのためバイオセンサの高感度化に向けては、標識法によるイムノアッセイが中心に研究開発が進められてきた。

高感度バイオセンサ実現に向けて、高感度に検出対象を認識できる標識法によるイムノアッセイと、高感度、連続検出、複数同時検出が期待される光検出型トランスデューサを融合したバイオセンサが、サンドイッチイムノアッセイ法を用いた蛍光検出型バイオセンサである。図1.2にサンドイッチイムノアッセイを用いた蛍光検出型バイオセンサの模式図を示す。基板上に自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer ; SAM)などリンカー材料を介して、1次抗体として捕捉抗体を固定化する。そこに、検出対象である抗原を含んだサンプル液を投入し、抗原抗体反応を行わせ、1次抗体により抗原を捕捉する。その後、2次抗体として蛍光体を標識した検出抗体をサンプル液に添加し、抗原抗体反応を行わせ、抗原と蛍光体標識検出抗体を結合させる。この蛍光体を外部からの照射光により励起し、蛍光体からの蛍光を検出することにより、蛍光強度から検出対象である抗原量を定量する。1次抗体と2次抗体で抗原を挟む形で結合させることからサンドイッチイムノアッセイ法と呼ばれ、高い特異的結合性を有する抗原抗体反応を2度行うことにより、夾雑物を多く含むサンプルから検出対象を選択的に高感度に検出できる特徴を持つ。

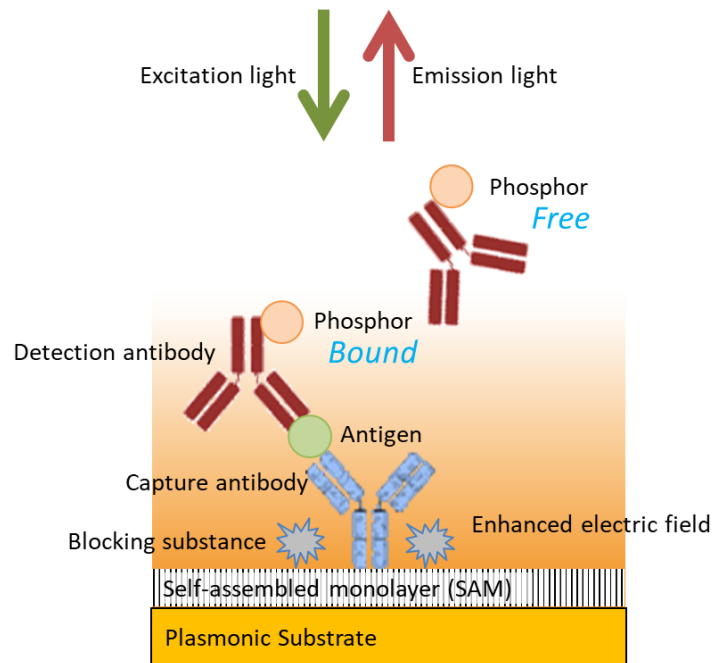


図 1.2 サンドイッチ免疫アッセイ法を用いた蛍光検出型バイオセンサの模式図。

蛍光検出型バイオセンサの主な構成要素は、抗体、蛍光体、基板である。バイオセンサの高感度化に向けては、構成要素に求められる要件を抽出し、要件を満たすべく構成要素の研究開発を進める必要がある。ここでは、構成要素に求められる要件を抽出し、次節で各構成要素の研究開発アプローチを述べる。

蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けては、大きく 2 つの取組みが必要である。1 つは、夾雑物を含むサンプルに微量に含まれる検出対象を、効率的に認識し捕捉することである。もう 1 つは、微量の検出対象と結合した検出抗体の蛍光体からの微弱な光を高感度に検出することである。前者は分子認識機能を担う抗体の性能に起因しているため、抗体を構成するアミノ酸配列の改変により高い結合能を持つ抗体の研究開発が進められている。後者の、検出対象と結合した検出抗体の蛍光体からの微弱な光を高感度に検出するためには、シグナル(S)である検出対象と結合した検出抗体の蛍光体からの光を増大させ、ノイズ(N)であるその他の光を低減する必要があり、4 つの施策が考えられる。以下に、4 つの施策について説明する。

- ① B/F 分離： 抗原を取りこぼしなく検出するため、検出抗体は抗原に比べて十分多量に添加する。そのため、抗原と結合した検出抗体(Bound ; B)と、抗原と結合していない遊離した検出抗体(Free ; F)が必ず存在する。バイオセンサでは、抗原との結合抗体からの信号と、遊離抗体からの信号を分離することが高感度化には必須であり、B/F 分離と呼ばれる。高感度化を実現するためには、シグナルである Bound された検出抗体の蛍光体からは光は強く発光させ、ノイズである

- Free の検出抗体の蛍光体からの光は発光させない必要がある。そのため、基板には、Bound された検出抗体の発光を増強し、Free の検出抗体からの発光は増強させない特性が求められる。蛍光体には、大きな吸収断面積及び高い量子収率により強く発光する蛍光体よりも、大きな発光増強が得られる蛍光体が求められる。
- ② 抗体などの生体分子は、短波長域で励起すると生体分子自身が蛍光(自家蛍光 (autofluorescence))を発生し、ノイズ光となる。自家蛍光を抑制するためには、長波長域で励起する必要がある、長波長励起に適用できる基板、及び長波長励起で励起できる蛍光体が求められる。
 - ③ 高感度に光検出するためには、励起光の散乱をできる限り除去する必要がある。検出対象が微量であるため、励起光は検出光である蛍光に比べて著しく強い。そのため、光学フィルタで励起光を除去しても、励起光と検出光の波長が近ければ励起光を完全に除去することができず、検出感度が大きく低下する。高感度化の実現には、励起光をできる限り除去するために、励起波長と蛍光波長が離れたストークスシフトの大きい蛍光体が必要となる。
 - ④ 高感度に光検出するためには、積算検出や検出時間などにより S/N を向上させる必要がある。そのためには、光検出の自由度に制約のない、蛍光劣化のない蛍光体が必要となる。

以上、微量の検出対象と結合した検出抗体の蛍光体からの微弱な光を検出するために、光検出の S/N を向上させる 4 つの施策を述べたが、いずれも基板、蛍光体の特性に強く依存している。図 1.3 に蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けて、基板及び蛍光体に求められる要件をまとめる。

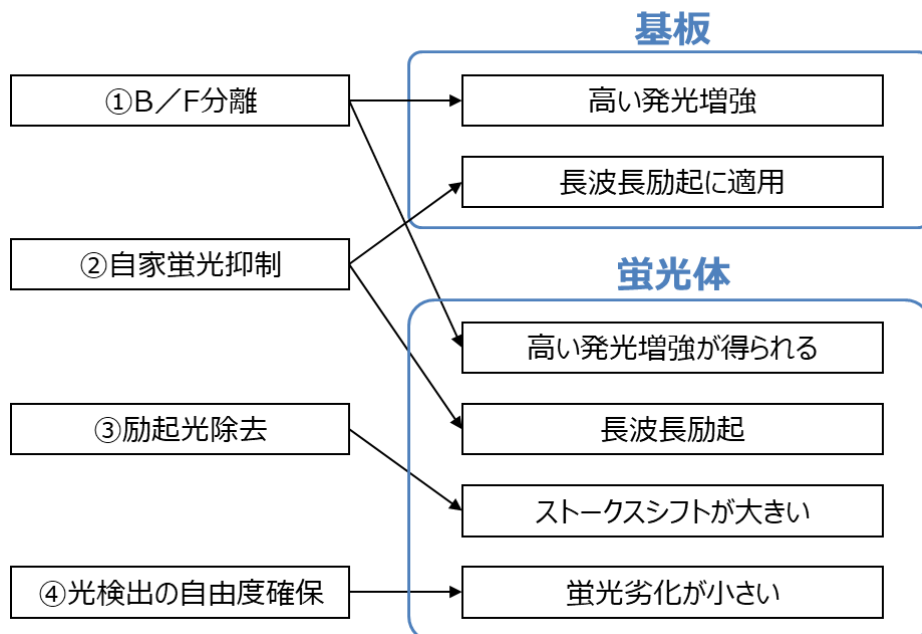


図 1.3 蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けて基板及び蛍光体に求められる要件。

蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けては、構成要素である抗体、基板、蛍光体の特性向上、及びそれらを高い次元で統合させていく必要がある。蛍光検出型バイオセンサにおいて、機能性ナノ工学に基づく各構成要素の性能向上と、それらの構成要素を統合する研究領域は、近年「ナノバイオセンシング」と呼ばれている^{9,10}。

図 1.4 に、ナノバイオセンシングの研究領域を示す¹⁰。分子認識部(Bio-recognition units)は選択的に検出対象を認識する機能を担い、抗体、アプタマー、人工結合タンパク質などの生体分子もしくは生体機能を模擬した分子が用いられる。生体分子の優れた分子認識機能をデバイスの系で発揮させるための基板への固定化には、物理吸着、親和性タグ、共有結合など表面機能化化学(Surface functionalization chemistry)が応用される。一方、サンプル液中に含まれる夾雑物が基板上に吸着するとノイズ要因となるため、基板表面には自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer; SAM)や高分子電解質多層膜など表面保護層(Surface passivation layer)が形成され、基板上への夾雑物の非特異吸着が抑制される。完全に抑制できなかつた基板上への非特異吸着物を除去するために、界面活性剤や触媒が用いられる。光検出するための蛍光体には、従来は有機蛍光色素が広く用いられてきたが、近年は量子ドット(Quantum dots)の研究が盛んに行われている。微弱な光を高感度に検出するための基板には、発光増強など蛍光体の発光特性改変のために金属ナノ構造を用いたプラズモニクス(Plasmonic)が適用される。

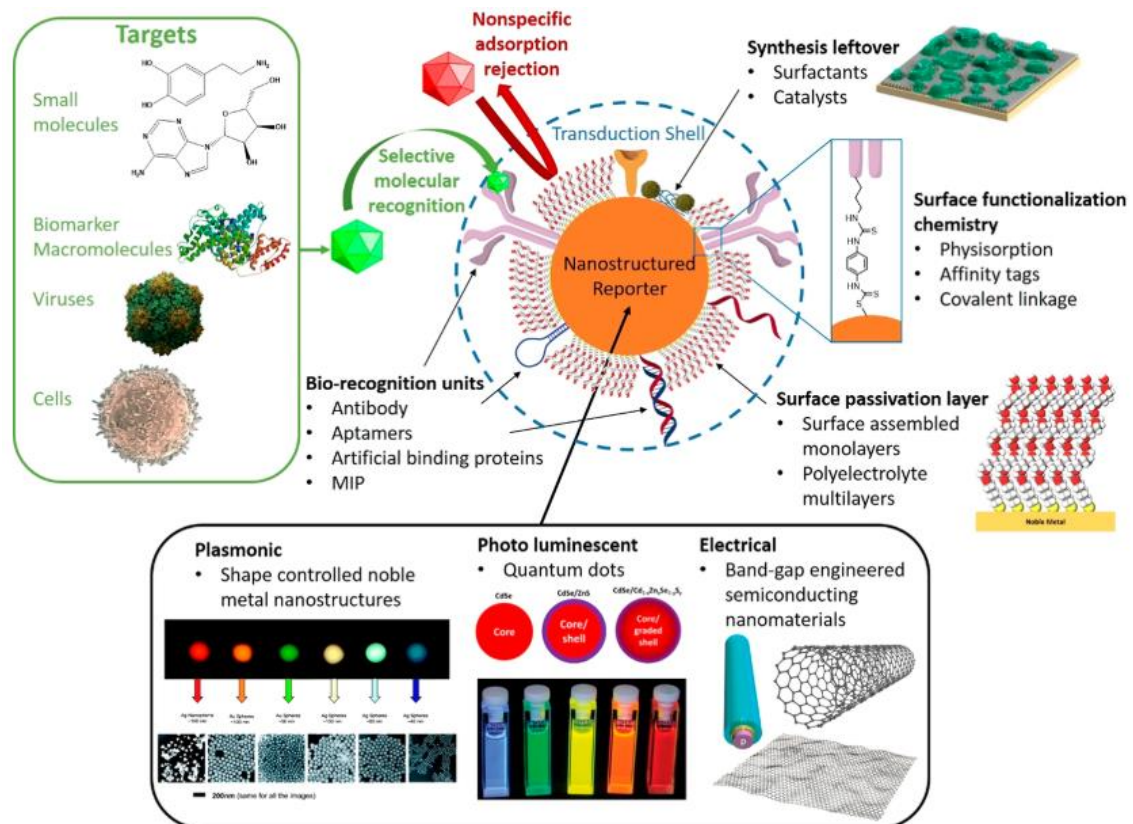


図 1.4 ナノバイオセンシングの研究領域¹⁰。

ナノバイオセンシング領域において、それぞれの構成要素の研究開発が盛んに行われているが、高感度バイオセンサの実用化に向けては課題が残されている。大きな課題の1つはプラズモン共鳴を発現する基板(プラズモニック基板)の開発であり、もう1つは蛍光体の開発である。プラズモニック基板に関しては、半導体微細加工プロセスの発展と計算機の性能向上を背景に研究開発が加速し、高い発光増強度を実現する金属ナノ構造が提案されている。半導体プロセスにより精密に制御された金属ナノ構造を持つプラズモニック基板は概念実証(Proof of Concept ; POC)には適するものの、生産スループットが低く、高コストであるため実用化には適さない。また、蛍光体に関しては、従来の有機蛍光色素の代替として量子ドットが盛んに研究されているが、市販されている量子ドットの多くにはCdなどの人体及び環境への悪影響が懸念される元素が含まれており、廃棄などの取り扱いが厳密にコントロールできる研究開発現場では用いられているものの、実用化には至っていない。

したがって、本論文では高感度蛍光検出型バイオセンサの実用化に向け、プラズモニック基板と、蛍光体に焦点を絞り、要素技術の研究開発を行う。高感度蛍光検出型バイオセンサ実用化の最大の課題であるプラズモニック基板及び蛍光体に関する要素技術を構築することにより、高感度バイオセンサの実用化は大きく前進することが期待される。次節では、バイオセンサにおけるプラズモニック基板及び蛍光体の先行研究を紹介した上で、新規プラズモニック基板と、新規蛍光体に関するアプローチを示す。

1.2 バイオセンサの高感度化に向けたアプローチ

1.2.1 新規プラズモニック基板

表面プラズモン共鳴

プラズモンとは自由電子の集団的な振動である。電磁場(光)は金属膜および金属ナノ構造の表面で表面プラズモンと結合することで強く閉じ込められる。光と自由電子が相互作用した状態は表面プラズモン共鳴と呼ばれ、金属表面近傍において電場及び光の局所状態密度が増大する¹¹⁻¹⁵。表面プラズモンには、金属ナノ構造に起因して発生する局在型表面プラズモン(localized surface plasmons ; LSP)と、金属膜に沿って伝搬する伝搬型表面プラズモン(surface plasmon polaritons ; SPP)が存在し(図 1.5(a))、表面プラズモン共鳴により閉じ込められた電磁場は、励起波長及び輻射波長において蛍光体と相互作用し、基底-励起状態間の遷移を改変する(図 1.5(b))^{2,3,11}。

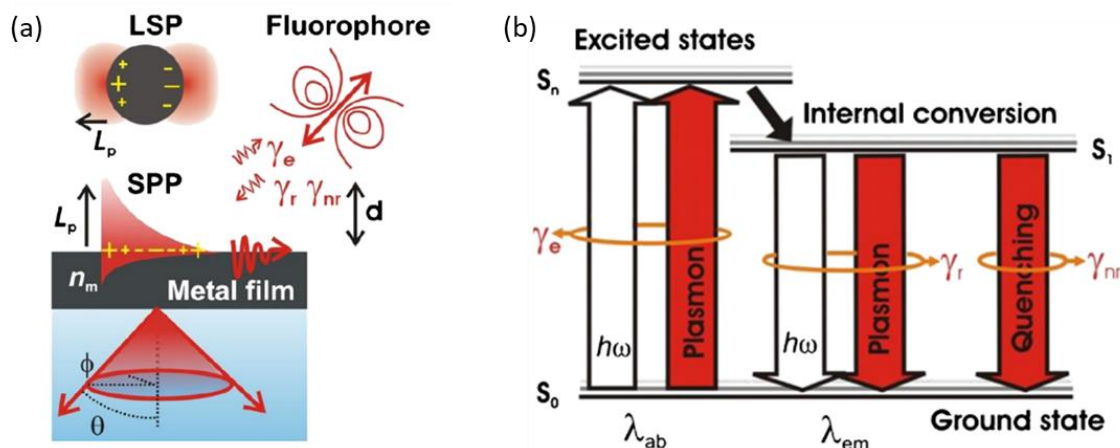


図 1.5 (a)局在型及び伝搬型表面プラズモン共鳴の模式図、(b)表面プラズモンが関与した蛍光体の基底-励起状態間遷移を示す Jablonski 図¹¹。

励起側及び輻射側の表面プラズモン共鳴に誘発される変化は、吸収 μ_{ab} 及び輻射 μ_{em} を持つ電気双極子モーメントを用いて、Maxwell 方程式によって説明できる¹⁶。

励起側の増強に関しては、吸収波長 λ_{ab} において電場 E を持つ入射光による蛍光体の励起割合 γ_e は以下の式で表される。

$$\gamma_e = |E \cdot \mu_{ab}|^2$$

輻射側の増強に関しては、蛍光体は励起光より長波長 λ_{em} (輻射遷移割合 γ_r)で光子を放射するか、光子を放射せず(非放射遷移割合 γ_{nr})に基底状態に戻る。蛍光体が本来持つ輻射遷移割合を γ_r^0 、非放射遷移割合を γ_{nr}^0 とすると、蛍光体の量子収率は $\eta^0 = \gamma_r^0 / (\gamma_r^0 + \gamma_{nr}^0)$ となる。蛍光体が金属表面近傍に配置されると、プラズモン増強電場 $|E|^2$ に伴う輻射波長 λ_{em} での光の局所状態密度(local density of optical states ; LDOS)の増大によ

り、輻射遷移割合は γ_r に、非放射遷移割合は $\gamma_{nr} = \gamma_{nr}^0 + \gamma_{abs}$ (γ_{abs} : 金属により増強された非放射遷移割合)に変化し、蛍光体の量子収率が改変される。改変された量子収率 η は以下の式で表される¹⁷。

$$\eta = \frac{\frac{\gamma_r}{\gamma_r^0}}{\frac{\gamma_r}{\gamma_r^0} + \frac{\gamma_{abs}}{\gamma_r^0} + \frac{(1 - \eta^0)}{\eta^0}}$$

蛍光体が金属表面の極近傍に配置される場合には、蛍光体－金属間の Förster エネルギー移動により強いクエンチングが発生するが、これは γ_r と競合する金属により増強された非放射遷移割合 γ_{abs} に起因しており、蛍光体の励起状態寿命 $\tau = 1/(\gamma_r + \gamma_{nr})$ は短くなり、量子収率 η は減少する。蛍光体が金属表面の極近傍から少し離れた表面プラズモンによる電場が影響する範囲内にある場合は、表面プラズモン共鳴が遠距離場と外部結合され、この相互作用により蛍光体の輻射遷移割合 γ_r が増大し、量子収率 η が増加する。

これまでのプラズモニック基板

1960年代に金属ナノ構造による蛍光増強が報告されて以来¹⁸、様々な金属ナノ構造や金属ナノ構造表面の距離依存性に関して、表面プラズモン共鳴による蛍光増強の理論的アプローチと実験結果が報告された²。表面増強蛍光(surface enhanced fluorescence; SEF)のための金属ナノ構造を有するプラズモニック基板は、当初は平面基板上に電気化学的粗面化¹⁹や熱蒸着など単純なプロセスによる金属薄膜形成により作製された。しかし、これらの方法で作製された金属ナノ構造ではあまり大きな発光増強が得られなかった。そこで、高い発光増強を達成するための厳密に制御された金属ナノ構造の作製には、半導体製造プロセスが注目されるようになった。

電子ビームリソグラフィ(electron beam lithography; EBL)や集束イオンビーム(focused ion beam; FIB)ミリングなど半導体製造プロセスを用いたトップダウンスキャンビームリソグラフィは、サブ10 nm以下の空間分解能の金属ナノ構造が形成できるため、プラズモニック基板における金属ナノ構造の作製プロセスとして最も広く用いられている^{10,20-22}。EBLを用いたプロセスでは、基板上にポリマーレジストを形成し、その後、厳密に集束された電子ビームが露光される(図1.6)。Duanらはレジストと高解像度EBLを使用したリフトオフプロセスにより、信頼性の高い10 nm以下の極小ギャップを有するAuナノ構造を形成することにより、プラズモン共鳴を正確に制御したと報告している²⁰。MalakらはレジストとEBLを用いたリフトオフプロセスにより、積層中空Auナノ構造を作製し、従来の中空でない構造と比較して、散乱ピークが変化することを報告している²¹。Kohらは、レジストをEBLによりパターニングし、Auを熱蒸着することによりナノキャビティ構造を作製した²²。また、FIBを用いたプロセスでは、集束イオ

ンビームにより、蒸着 Au 膜や単結晶 Au ナノプレートなどの金属基板上に所望のパターンを直接ミリングする^{23,24}。Ah らは塩化金酸を還元することで単結晶 Au ナノプレートを高純度で合成し、その後 FIB を用いて Au ナノプレートを様々な形状に加工することで金属ナノ構造を形成し、近赤外波長領域での強い表面プラズモン吸収を示すことを報告した²³。Huang らは自己組織化単結晶 Au フレークとスパッタ ITO 基板上に Ti を介して形成した蒸着多結晶 Au 膜に、FIB を用いて高精細な bowtie ナノアンテナを作製した²⁴。最近では、EBL と FIB の比較研究も報告されている(図 1.7)。Horak らは EBL と FIB ミリングによって作製された Au のディスク型プラズモニックアンテナの光学および構造的な特性と化学組成を調査し、EBL で作製されたアンテナの方が電場閉じ込めが良好で、プラズモニック応答が強く、その差異要因としてナノ構造の精度に加え、FIB に比べて有機及び無機汚染が少ないためと報告している²⁵。このようにプラズモン共鳴に関する研究において EBL や FIB を用いた製造プロセスは、金属ナノ構造作製の中心的役割を担ってきた。EBL や FIB を用いたプロセスはナノスケールでサイズ、形状、配置、位置といった構造が厳密に制御でき、かつ構造再現性も高いため、概念実証(proof of concept ; POC)においては最も優れた方法である。しかし、量産を見据えたプラズモニック基板の製造プロセスとしては不向きであり、その最大の問題は生産スループットである。そこで、近年 EBL と FIB の生産スループット向上に向けて、“sketch and peel” という新たな概念も提案されているが^{26,27}、あくまでも従来の EBL や FIB に比べ高い生産スループットで金属ナノ構造が作製できるというレベルであり、EBL や FIB は量産に向けた大面積プラズモニック基板の製造プロセスには依然として適さない。

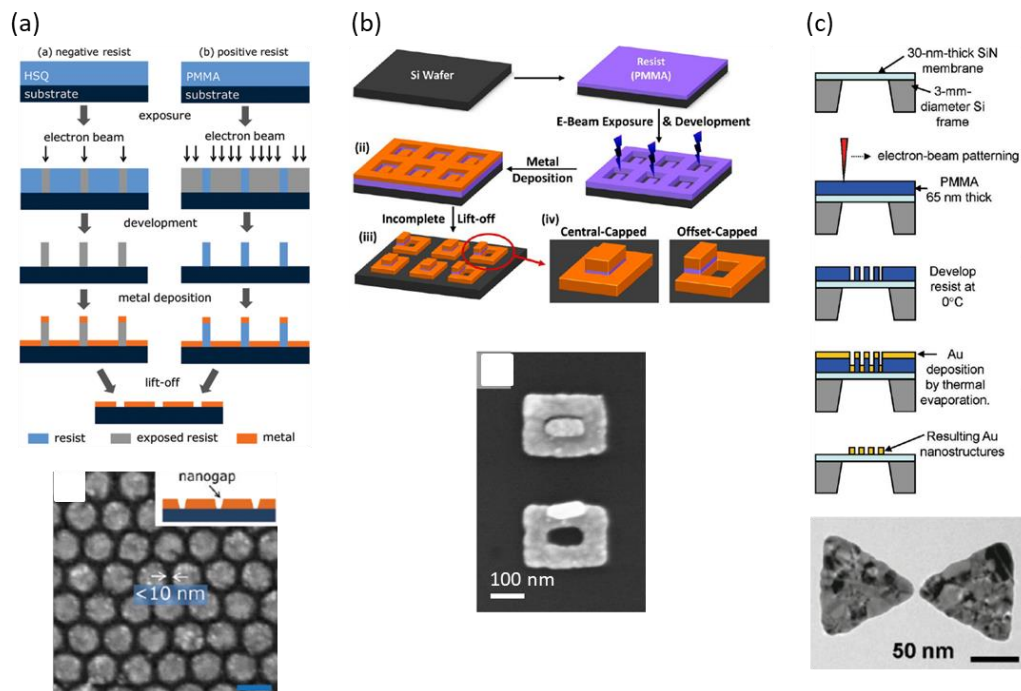


図 1.6 EBL を用いた金属ナノ構造形成プロセス、及び金属ナノ構造例²⁰⁻²²。

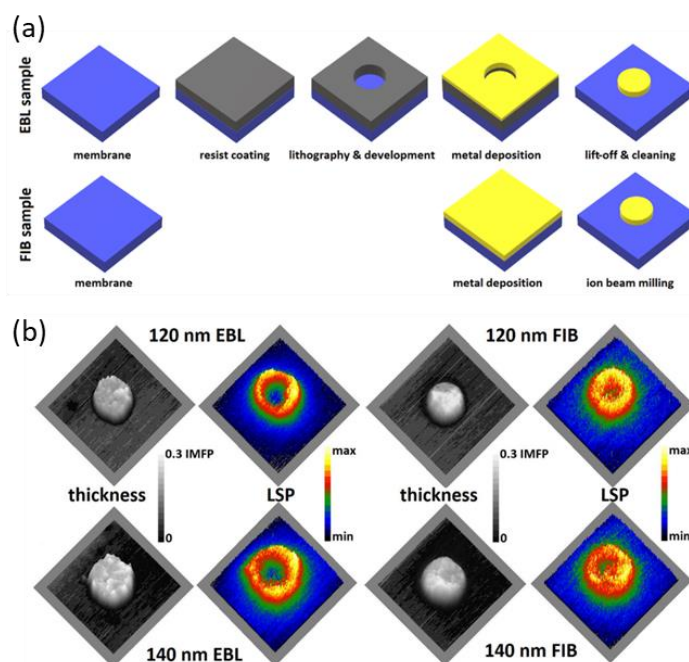


図 1.7 (a)EBL と FIB による金属ナノ構造作製プロセス、(b)EBL と FIB で作製された Au ナノアンテナ²⁵。

金属ナノ構造の作製プロセスとして、ポリスチレンやシリカのナノ粒子を自己配列させた2次元アレイを、金属ナノ構造作製のテンプレートとして用いるナノ球体リソグラフィ(nanosphere lithography ; NSL)が提案されている。NSL は高価な設備を用いることなく、高い生産スループットかつ低コストで大面積基板上に金属ナノ構造を作製できるプロセスの1つである²⁸⁻³⁶。Camden らは基板上に六角形に密集したナノ球体2次元アレイを形成し、2次元アレイをマスクとして Ag 薄膜を堆積し、その後球体を除去することで、最も典型的な NSL によるナノ構造である三角形アレイ金属ナノ構造を作製した(図 1.8(a))²⁸。また、ナノ球体2次元アレイのテンプレート上に金属薄膜を堆積し、金属ナノ構造を作製する方法も提案されており、ナノ球体上金属薄膜(film over nanosphere ; FON)と呼ばれる^{33,34,36,37}。Tang らは基板上にナノ球体2次元アレイを形成し、その上に真空蒸着により Ag 薄膜を堆積し、金属ナノ構造を作製した(図 1.8(b))³⁷。しかし、NSL や FON などナノ球体を用いた金属ナノ構造作製プロセスにはいくつかの問題がある。1つ目は、形成できる金属ナノ構造形状が限定される。ナノ構造体を自己配列により均一に密集させるために、ほとんどの場合ナノ構造体にはナノ球体がいられる。そのため、NSL では三角形アレイ、FON では連続した波状の金属膜になり、作製できる金属ナノ構造の設計自由度は小さく、プラズモニック特性の制御自由度も限定的となる。もう1つは、大面積均一性と構造再現性が低いことである。自己配列による2次元ナノ球体アレイを cm 単位の大面積基板上に均一かつ再現性良く並べることは極めて困難であ

り、概念実証を目的とした N=1 での局所的な金属ナノ構造の光学特性の評価は可能であっても、量産を見据えた大面積プラズモニック基板の作製プロセスには適していない。

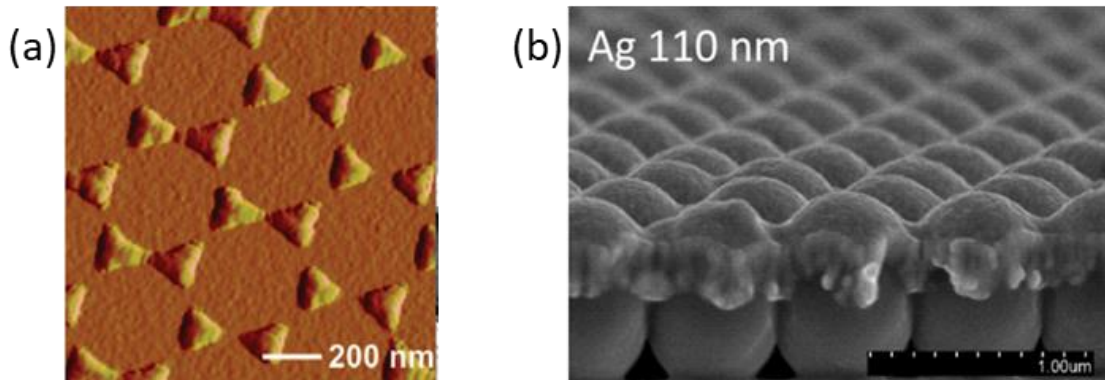


図 1.8 (a)NSL、及び(b)FON により作製された金属ナノ構造^{31,37}。

本研究では、実用化に向けた大面積プラズモニック基板の開発を目指す。EBL 及び FIB による半導体製造プロセスを応用したトップダウンプロセスでは、厳密に金属ナノ構造を制御することはできるが、生産スループットが低いため高コストである。一方、ナノ球体を用いた NSL や FON は、高価な製造設備は必要なく簡単に金属ナノ構造を形成できるものの、作製できる金属ナノ構造が限定的でプラズモニック特性の設計自由度が低く、大面積均一性及び構造再現性が低い。したがって、これらの金属ナノ構造作製プロセスはいずれも、実用化に向けた大面積プラズモニック基板には不向きである。

NIL プラズモニック基板

近年、ナノインプリントリソグラフィ(nanoimprint lithography ; NIL)で作製された 3 次元ナノ構造基板上に金属成膜したプラズモニック基板に関する数多くの報告がなされている³⁸⁻⁴⁶。NIL で作製できる 3 次元ナノ構造は、ピラー、ホール、ライン&スペース、ハニカム、スクエアなど多種類の形状が可能であり、それらのディメンジョンも含めると多種多様なナノ構造形成が可能となる。さらに、金属成膜に関しては、金属の種類に加えて、金属成膜プロセスによっても特徴が異なるため、NIL と金属成膜による金属ナノ構造の設計自由度は極めて高い。NIL はシリコンやニッケルのモールドを用いて、熱硬化や紫外線硬化により樹脂フィルムに 3 次元形状を形成する。NIL モールドは半導体プロセスにより厳密に構造制御されるため作製に時間を要するが、NIL 基板の成型はモールドを使うため高い生産性及び構造再現性で 3 次元ナノ構造を作製できる。近年は NIL モールドの大面積化が進み、12 インチサイズまで市販されている。したがって、NIL を用いた金属ナノ構造は、様々な構造が作製できるためプラズモニック特性の設計自由度が高く、かつ高い大面積均一性、構造再現性、生産性を有するため、NIL プラズモニック基板は高い発光増強度と実用性を両立できるプラズモニック基板と期待され

る。

以上より、本研究のプラズモニック基板は、高感度蛍光検出型バイオセンサの実用化を目指し、高いプラズモニック特性の設計自由度、高い大面積均一性、構造再現性、生産性の特徴を有する、NIL フィルム上に金属成膜する NIL プラズモニック基板を開発する方針とする。

1.2.2 新規蛍光体

これまでの蛍光体

蛍光検出型バイオセンサにおいて、蛍光体はプラズモニック基板と同様に極めて重要な構成要素である。蛍光体の発光特性、発光安定性、化学特性は、バイオセンサの検出感度や信頼性に大きく影響し、さらに実用化という観点では人体及び環境適合性が求められる⁴⁷。

バイオセンサの蛍光体には有機蛍光色素が幅広く用いられてきた。しかし、有機蛍光色素は励起光により早期に蛍光劣化が生じるため、蛍光検出型バイオセンサの励起光パワー及び検出積算時間など光検出の自由度が小さく、バイオセンサの高感度化の阻害要因となっている。また、ストークスシフトが小さいため、励起光を完全に光学フィルタで遮断することが困難であることも、バイオセンサの高感度化の阻害要因となっている。そこで、有機蛍光色素の代替材料として、量子ドットが注目されている。量子ドット(特に、Cd や Pb のカルコゲナイド量子ドット)は有機蛍光色素に比べて、励起光による蛍光劣化ははるかに小さく優れた発光安定性を持ち、加えて、狭い発光バンド、発光波長制御性、広い励起バンド、大きなストークスシフトと優れた発光特性を持つため、有機蛍光色素を置き換えるバイオセンサの蛍光体として有望な候補と考えられている⁴⁸⁻⁵²。図 1.9 に有機蛍光色素(フルオレセイン)と量子ドットの励起及び蛍光スペクトル、蛍光劣化の比較を示すが⁵¹、量子ドットは有機蛍光色素に比べ、ストークスシフトが大きく、蛍光劣化が小さいため、蛍光検出型のバイオセンサの蛍光体に適していることがわかる。

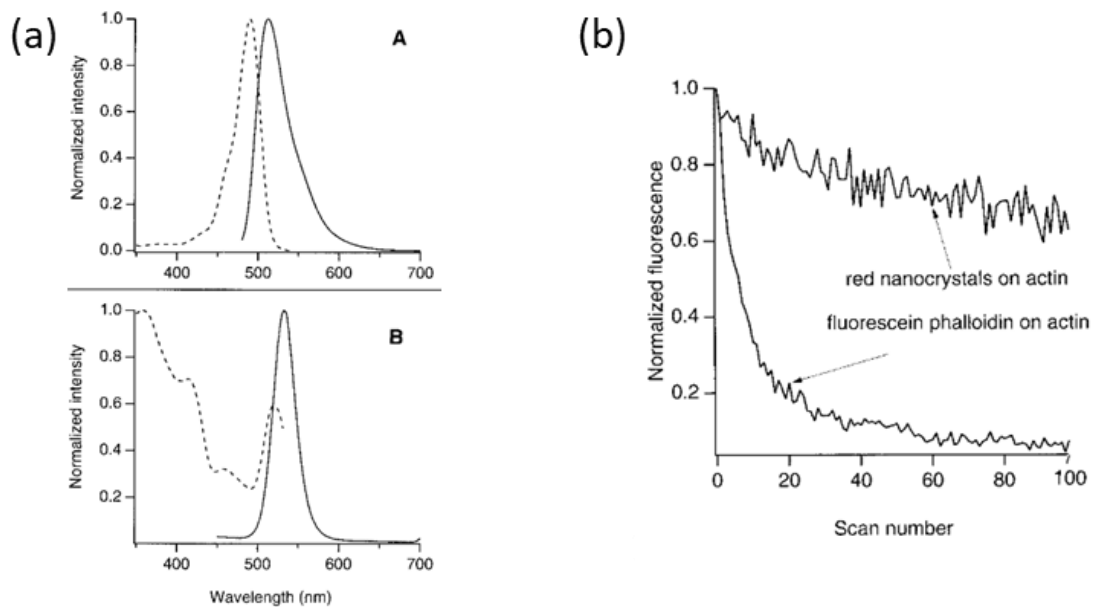


図 1.9 (a)有機蛍光色素(A)と量子ドット(B)の励起(点線)及び蛍光(実線)スペクトル、(b)有機蛍光色素と量子ドットの蛍光劣化の比較⁵¹。

半導体量子ドットは、直径が ~ 10 nm 程度のナノ結晶である。原子のド・ブローイ波長に相当する大きさである ~ 10 nm 程度のナノ構造を作製すると、電子はその領域に閉じ込められ電子の状態密度は離散化される⁵³。閉じ込め方向を1次元にしたものを量子井戸、2次元にしたものを量子細線、3次元のものを量子ドットと呼ぶ。量子ドットは、量子閉じ込め効果によりサイズでエネルギーギャップが決まるため、量子ドットのサイズを高精度に制御することにより発光波長を制御することができる(図 1.10(a))⁵⁰。図 1.10(b)に半導体量子ドットの主な材料系を示す⁵⁰。バイオセンサの高感度化に求められる赤から近赤外域に発光を持つ材料系は、CdSe、CdTe、PbS となる。これらの化合物半導体量子ドット(特に、Cd や Pb のカルコゲナイド量子ドット)は、有機蛍光色素に比べて、優れた発光特性及び発光安定性を有し有機蛍光色素を置き換える有望な候補と考えられているが⁴⁸⁻⁵²、CdS、CdTe、PbS など人体及び環境に有害な重金属を含んでいる。特に Cd に関しては、生物医学分野では発がん物質で主要な細胞死を引き起こす遊離 Cd イオンの放出が懸念されている⁵⁴⁻⁵⁶。そのため、これらの化合物半導体量子ドットは研究室での使用に限定され、蛍光検出型バイオセンサの実用化には適さない。

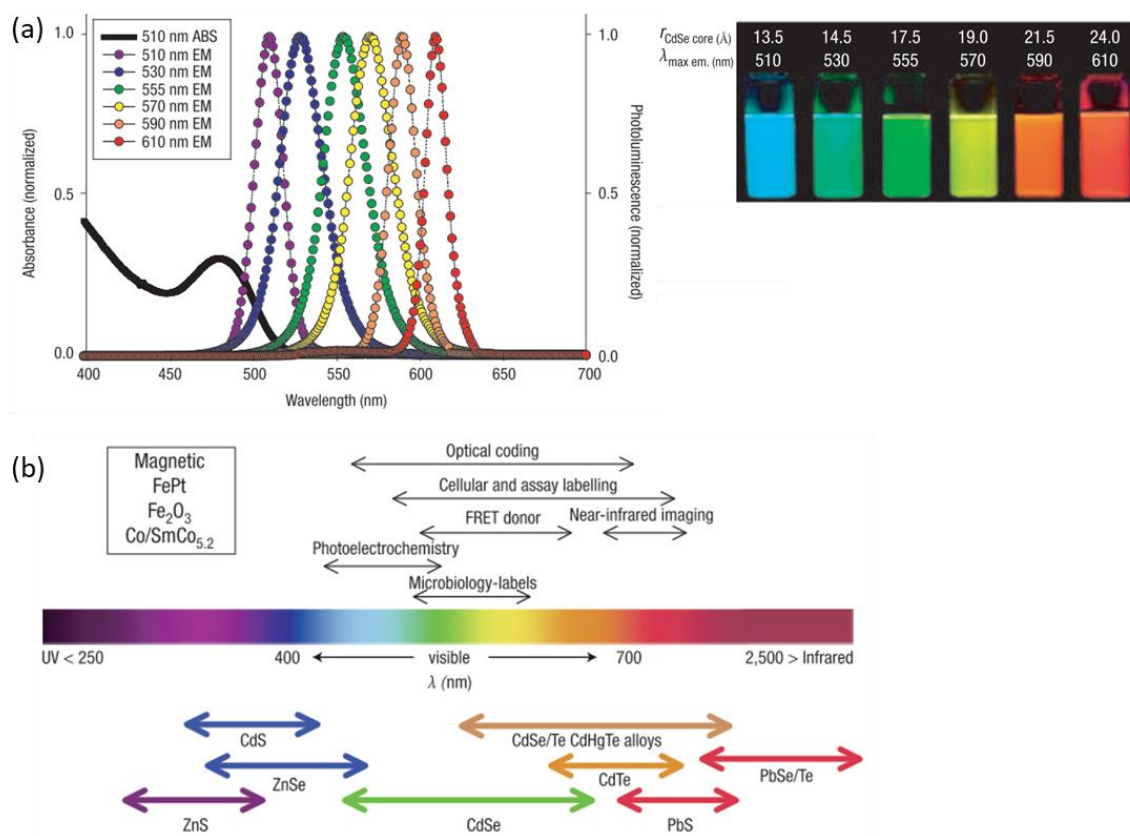


図 1.10 (a)半導体量子ドットのサイズ制御によるに発光波長⁵⁰、(b)半導体量子ドットに関する主な材料系⁵⁰。

近年、Si 量子ドットは、生物医学応用に潜在的に適した量子ドットとして大きな注目を集めている。ここ 10 年の間に、Si 量子ドットコロイド溶液を筆頭に Si 量子ドットの特性は着実に改善されており、今では Si 量子ドットの特性は化合物半導体量子ドットに急速に追いつきつつある⁵⁷⁻⁵⁹。Si はマイクロエレクトロニクス産業を支えてきた半導体材料としての実績があり、生体及び環境適合性に加えて、地球の地殻に豊富に存在するため魅力的な材料である^{57,60,61}。しかし、Si は間接遷移型半導体であり、光学遷移には運動量保存則を満たすためにフォノンの吸収及び放出が必要となるため⁶²、発光効率が 10^{-6} と極めて低く、発光素子としては期待されていなかった⁶³。そのような中、1990 年にナノ構造を有する Si において、量子閉じ込め効果により発光効率が向上することが報告された⁶⁴。Si をバルク励起子ボア半径である 4 nm 以下程度にすることで、量子閉じ込め効果により、直接バンドギャップ遷移を介した輻射再結合の確率を高め、フォノン支援の間接バンドギャップ遷移を低減することで、発光効率が向上する⁶⁵⁻⁶⁷。

しかし、Si 量子ドットに関する研究は盛んに行われ、人体及び環境適合性が高く、バイオセンサ応用が期待されているにも関わらず、未だ実用化には至っていない。その主な原因は、Si 量子ドットが発光特性が Si 量子ドットの表面状態及び周囲環境により変

化することである。Si は格子整合する半導体が存在しないため、化合物半導体 Si 量子ドットのようなコア/シェル構造を形成できない。そのため、波動関数を内部に閉じ込めることができず表面状態に発光状態が左右される。これにより、Si 量子ドットに関する研究の大部分は、発光波長が粒子サイズ依存性を示さず、青色の可視領域で発光する^{68,69}。これは Si 量子ドットの発光が表面の酸化物欠陥に起因しているためである^{57,70,71}。また、Si 量子ドットを表面機能化により官能基を形成した際には、官能基の種類によって発光特性が変化してしまう(図 1.11)⁵⁷。

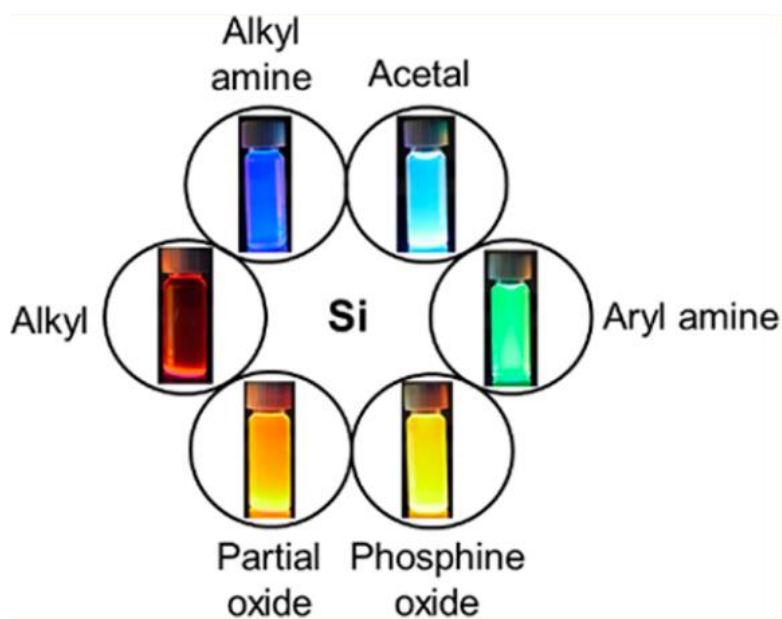


図 1.11 Si 量子ドットの表面官能基を変化させた際の発光写真⁵⁷。

Si 量子ドットの蛍光検出型バイオセンサ応用に向けては、近赤外発光及び表面状態に依存しない発光安定性が必要である。短波長励起では生体分子が自家蛍光を発するため、蛍光検出型バイオセンサの高感度化には 600nm 以上の長波長励起が必要であり、発光はさらに長波長の近赤外発光が必要となる。また、蛍光検出型バイオセンサの応用に向けては、Si 量子ドットを蛍光体として生体分子と結合させるために、Si 量子ドットの表面に所望の官能基を形成し(表面機能化)、さらに表面機能化 Si 量子ドットを生体分子と結合させる必要がある。この表面機能化及び生体分子との複合体形成後も、近赤外発光が保持できる発光安定性が求められる。

ホウ素、リン同時ドーピング Si 量子ドット

Si は格子整合する半導体が存在しないため化合物半導体量子ドットのようなコア/シェル構造を形成できず、波動関数を内部に閉じ込められないため表面状態に発光状態が左右される。そこで、我々の研究グループでは、同時スパッタリング法により不純物ドーピング Si 量子ドットを作製している^{72,73}。Si、SiO₂、ホウケイ酸塩ガラス(borosilicate glass ; BSG)、リンケイ酸塩ガラス(phosphosilicate glass ; PSG)を同時スパッタリングすることにより、ホウ素(B)とリン(P)を同時ドーピングした Si ナノ結晶をホウリンケイ酸塩ガラス(borophosphosilicate glass ; BPSG)中に成長させる。本プロセスにより、Si、O、不純物元素からなる混合薄膜を作り、ナノ結晶の成長とドーピングはその後の熱処理により行われる。

B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、CdSe コア/ZnS シェルなど化合物半導体量子ドットと同様のコア/シェル構造を持つことで、励起子をコアに閉じ込めることにより、高い発光効率及び発光安定性を有する。加えて、B,P を大量に添加したシェルは負の表面電位を有するために、量子ドット表面に有機修飾分子を用いることなく完全無機材料で水やアルコールなど極性溶媒中で良好に分散する。図 1.12 に B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの、(a)構造模式図⁷⁴、(b)メタノール分散コロイド溶液の写真⁷⁵、(c)TEM 像⁷⁶を示す。

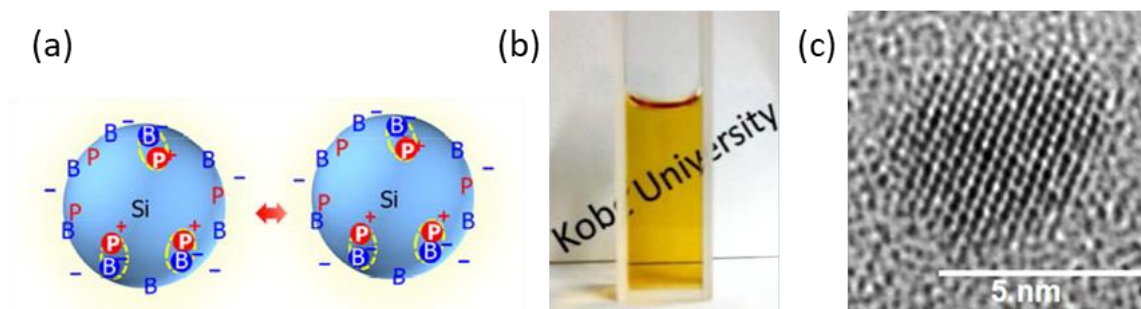


図 1.12 B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの、(a)構造模式図⁷⁴、(b)メタノール分散コロイド溶液の写真⁷⁵、(c)TEM 像⁷⁶。

このように B,P 同時ドーピング Si 量子ドットはコア/シェル構造により、従来の Si 量子ドットの課題を解決し、高感度蛍光検出型バイオセンサの蛍光体に求められる優れた特徴を有する。高感度蛍光検出型バイオセンサの蛍光体には自家蛍光抑制の観点から近赤外発光が求められる。従来の Si 量子ドットの波動関数を内部に閉じ込めることができず、多くの場合青色の可視領域で発光していたが^{68,69}、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットはコア/シェル構造により、化合物半導体 Si 量子ドット同様に発光波長のサイズ依存性が見られるため⁷⁷、Si 量子ドットサイズを制御することにより蛍光検出型バイオセンサに求められる近赤外発光が得られる(図 1.13(a))⁷⁷。加えて、高感度蛍光検出型バイオセンサの蛍光体には表面状態に依存しない安定した発光特性が求められる。従来の Si 量

量子ドットは発光が表面の酸化物欠陥に起因しているため表面状態や周囲環境により発光特性が変化していたが^{57,70,71}、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットはコア/シェル構造により、幅広い pH 範囲で発光特性が安定である(図 1.13(b))⁷⁷。さらに、Si 量子ドットをバイオセンサに応用するためには生体分子との結合のために表面機能化が必要であるが、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは有機分子修飾なしで良好な極性溶媒分散性を示すため⁷⁷、生体分子との結合のための表面機能化の自由度が極めて高い。

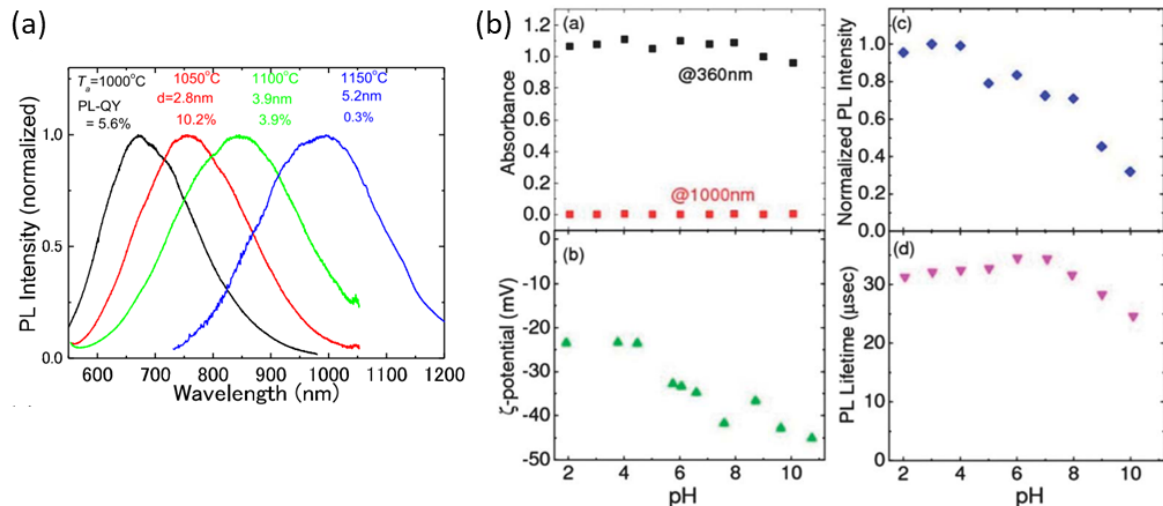


図 1.13 B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの(a)発光スペクトルの量子ドットサイズ依存性、(b)発光特性及び ζ 電位の pH 依存性⁷⁷。

以上、我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、Si 量子ドットの特徴である人体及び環境適合性に加え、近赤外発光、発光安定性、表面機能化自由度の点から、蛍光検出型バイオセンサの蛍光体に応用することで高感度化が期待される。そこで、本研究では、実用化を見据えた高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向け、蛍光体には B,P 同時ドーピング Si 量子ドットを応用する方針とする。

B,P 同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用に向けては、大きく 2 点の検討が必要である。1つ目は長波長領域での励起断面積の増大である。Si のエネルギーバンド構造に起因し直接吸収は 400 nm 付近で立ち上がるため、可視光及び近赤外領域では Si 量子ドットの吸収断面積は小さく⁷⁸、高効率励起には紫外光が必要となる。しかし、紫外光励起は、生体分子の自家蛍光によりバイオセンサの検出感度が低下する。そこで、金属ナノ構造による表面プラズモンとの結合により、長波長光子による Si 量子ドットの高効率励起を検討する。2つ目は Si 量子ドットと抗体との結合である。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの優れた水溶媒分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ、Si 量子ドット表面に所望の官能基を形成する表面機能化プロセスと、表面機能化 Si 量子ドットと抗体を結合させる複合体形成プロセスを開発する。

1.3 本論文の目的・構成

本研究の目的は、実用化を視野に入れた高感度蛍光検出型バイオセンサの要素技術を構築することである。蛍光検出型バイオセンサの主な構成要素は、抗体、蛍光体、基板である。この中で、特に高感度蛍光検出型バイオセンサの実用化に向けて、課題となっているプラズモニック基板と蛍光体に焦点を絞り研究を行う。

プラズモニック基板に関しては、広く用いられている EBL 及び FIB など半導体製造プロセスを応用したトップダウンプロセスでは、厳密に金属ナノ構造を制御できるものの、生産スループットが低いため高コストで実用化には繋がらない。一方、ナノ球体を用いた NSL や FON は、高価な製造設備は不要で簡単に金属ナノ構造を形成できるが、作製できる金属ナノ構造に制限があるため高い発光増強度が得られず、また大面積均一性及び構造再現性も低いため、実用化に向けた大面積プラズモニック基板には不向きである。そこで本研究では、高い発光増強度、大面積均一性、構造再現性、生産性を有する NIL を用いた大面積プラズモニック基板を開発する。

蛍光体に関しては、従来広く用いられてきた有機蛍光色素は蛍光劣化のため、蛍光検出型バイオセンサの光検出の自由度が小さく、またストークスシフトも小さいため励起光を完全に遮断できず、バイオセンサ高感度化の阻害要因となっている。一方、化合物半導体量子ドットは有機蛍光色素に比べて、優れた発光特性及び発光安定性を有するものの、Cd など人体及び環境に有害な元素を含むため実用化することはできない。そこで、本研究では、人体及び環境適合性に加え、優れた近赤外発光特性、発光安定性、表面機能化自由度を有する B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの蛍光検出型バイオセンサ応用に向けて、表面プラズモンとの結合による長波長光子での高効率励起の実現と、抗体との結合に向けた表面機能化プロセス、及び抗体-Si 量子ドット複合体形成プロセスを開発する。本論文の構成は以下の通りである。

第2章では、NIL プラズモニック基板の開発について述べる。NIL の多種多様な3次元ナノ構造が作製できる特徴を活かし、NIL フィルムの上に金属成膜することにより金属ナノ構造を作製する。NIL を用いた金属ナノ構造は、プラズモニック特性の設計自由度が高いことに加え、高い大面積均一性、構造再現性、生産性を有する。しかし、これまでの先行研究の NIL プラズモニック基板においては、シミュレーションと実験によるプラズモニック特性が一致しないため、電場増強メカニズム及びホットスポット位置が十分明らかになっていない。本研究では、NIL 上に Au を成膜することにより、シミュレーション予測と同等にシャープな表面プラズモン共鳴を持つ大面積プラズモニック基板を開発し、電場分布、ホットスポット位置、及びプラズモニックモードを明らかにした。さらに、開発したプラズモニック基板を用いてサンドイッチアッセイを行い、インフルエンザウイルスの核タンパク質を検出することでバイオセンサに応用できることを実証した。以上の結果により、高い発光増強度、大面積均一性、構造再現性、生

産性を有し、シミュレーションによるプラズモニック特性が予測可能である大面積プラズモニック基板を開発し、さらにバイオセンサ応用を実証したことは、高感度光検出型バイオセンサの実現に向けて、非常に重要な要素技術を構築できたと言える。

第3章では、NIL プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光増強について述べる。我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、人体及び環境適合性に加え、近赤外発光、発光特性安定性、表面機能化自由度の点から、蛍光検出型バイオセンサ応用が期待されるが、Si の直接吸収は 400 nm 付近で立ち上がるため、バイオセンサ高感度に必須である長波長励起では吸収断面積が小さい課題がある。本研究では、開発した NIL プラズモニック基板を用いて表面プラズモンとの結合により、長波光光子による Si 量子ドットの高効率励起を、Layer by Layer 法で形成したポリマースペース層を用いて Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離を厳密に制御することにより検討した。発光励起スペクトル、発光スペクトル、及び発光減衰ダイナミクスと、反射スペクトルを詳細に解析することで、複数の共鳴バンドを持つ NIL プラズモニック基板により、Si 量子ドットの課題であった励起側における吸収断面積の増大を明らかにした。加えて、輻射側において輻射遷移割合も増大されることを明らかにし、励起側及び輻射側の同時増強の両立を実証した。さらに、Si 量子ドットの発光増強度の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を明らかにすることで、蛍光検出型バイオセンサにおける最適蛍光体配置位置を示した。以上の結果より、長波長励起による Si 量子ドットの高効率励起と輻射遷移割合増大の同時増強を実証し、さらに Si 量子ドット-プラズモニック基板間距離の最適位置を明らかにしたことは、高感度光検出型バイオセンサの実現に向けた Si 量子ドットのバイオセンサ応用に非常に重要な要素技術を構築できたと言える。

第4章では、シランカップリング分子による Si 量子ドットの表面機能化について述べる。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは人体及び環境適合性に加え、近赤外発光、発光特性安定性、表面機能化自由度の点から、蛍光検出型バイオセンサ応用が期待されるが、その表面は主に水素、酸素で終端されており、そのままでは抗体と結合させることはできない。本研究では、抗体と B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの結合に向け、シランカップリング分子を用いてアミノ基、エポキシ基に表面機能化するプロセスを開発した。シランカップリング分子構造、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比を制御することにより、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットが有する水溶液分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ、Si 量子ドット表面をアミノ基及びエポキシ基にできる表面機能化プロセス条件を見出した。以上の結果より、B,P 同時ドーピング Si 量子ドット表面機能化プロセスを構築したことは、高感度光検出型バイオセンサの実現に向けた Si 量子ドットのバイオセンサ応用に非常に重要なステップとなったと言える。

第5章では、抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成について述べる。第4章

で開発したプロセスで表面機能化した Si 量子ドットを用いて抗体との複合体形成プロセスを開発した。抗体のカルボキシル基と、アミノ基で表面機能化した Si 量子ドットをペプチド結合により共有結合させ、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されていることを、電気泳動、動的光散乱(Dynamic light scattering ; DLS)、及び透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscopy ; TEM)により、詳細に解析した。その結果、表面機能化 Si 量子ドットが IgG 抗体の軽鎖及び重鎖に共有結合していることを明らかにした。さらに、複合体形成後の Si 量子ドットが近赤外発光を保持していること、及び、複合体形成後の IgG 抗体が抗原との特異的結合性を保持していることを実証した。以上の結果より、IgG 抗体の特異的結合性及び Si 量子ドットの近赤外発光特性を保持しつつ、IgG 抗体と Si 量子ドット複合体を共有結合させ、抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを開発したことは、高感度光検出型バイオセンサの実現に向けた Si 量子ドットのバイオセンサ応用に非常に重要な要素技術を構築できたと言える。

最後に第6章で、本研究のまとめを述べる。

第2章 プラズモニック基板の開発

2.1 はじめに

プラズモニック基板は、表面増強蛍光(surface-enhanced fluorescence ; SEF)及び表面増強ラマン(surface-enhanced Raman scattering ; SERS)によりバイオセンサの高感度化を実現する鍵となる構成要素である^{79,80,89,90,81-88}。従来のプラズモニック基板の精巧な金属ナノ構造は、電子ビームリソグラフィ(electron beam lithography ; EBL)^{86,91-93}や集束イオンビーム(focused ion beam ; FIB)ミリング⁹⁴などの最先端ナノ加工技術を用いて非常に高精度に作製されている。これらのナノ加工技術は高精度であるため、概念実証(Proof of concept)やチャンピオンデータとして高い発光増強を達成するには適している。しかしながら、これらのナノ加工技術は、生産スループットが低く、製造コストが高いため、実用化を目指したバイオセンサの製造方法には適していない。

金属ナノ構造の形成のテンプレートとして、ポリスチレンやシリカの球の自己配列させた2次元アレイを用いるナノ球体リソグラフィ(nanosphere lithography ; NSL)は高価な設備を用いることなく、高生産スループット及び低コストで大面積基板上に金属ナノ構造をプロセスの1つである²⁸⁻³⁶。球体2次元アレイのテンプレートはナノ球体上金属薄膜プロセス(film over nanosphere ; FON)にも用いられ、金属ナノ構造形成のための球体2次元アレイの上に金属薄膜が形成される^{33,34,36}。しかし、NSLやFONは金属ナノ構造の設計自由度が小さいため大きな発光増強が得られず、実用化に求められる大面積均一性及び構造再現性も得られない。

そこで本研究では、ナノインプリントリソグラフィ(nano-imprint lithography ; NIL)で作製された3次元ナノ構造基板上に金属薄膜を成膜し、金属ナノ構造を作製する^{95,96}。NILによる金属ナノ構造は、プラズモン共鳴波長の高い制御性、電場増強箇所であるホットスポットの高い設計自由度に加えて、実用化に必要な高い大面積均一性、構造再現性、生産性を併せ持つ。

NILで作製されたナノ構造基板上に金属成膜したプラズモニック基板に関して多くの報告がなされている³⁸⁻⁴⁶。LiらはNILで作製したシリカピラーアレイ上にAu成膜したプラズモニック基板を作製し、高いSERS増強度(1.2×10^9)と優れた大面積均一性(変動率22.4%)を達成した³⁸。Alvarez-PueblaらはNILで作製したSi格子及びピラーアレイの上にAg成膜し、表面プラズモン共鳴特性を調査した³⁹。YuらはAgミラー上の周期構造をワンステップで作製する直接ナノインプリント金属法(direct nano-imprint-in-metal method)を提案し、SERSにより 10^{-15} M(molar : mol/L)のローダミン6Gの検出に成功した⁴⁰。LeeらはSERSのためにAuマイクロビーズアレイ形成のためにNILと化学堆積を融合したハイブリッドプロセスを提案し、増強度 4.4×10^6 と 1.0×10^{-11} Mの検出

下限を達成した⁴³。Zhuらは、肺がん A549 細胞、網膜色素上皮細胞、乳がん MC-7 細胞を検出するために、ナノインプリントで作製したポリマー製のスクエアピラーとナノホールの上に Au 成膜したプラズモニック基板を作製し、 $5.0 \times 10^2 \sim 1.0 \times 10^7$ 個/mL の細胞検出を達成した⁴⁵。Barbillonらは NIL とリフトオフプロセスで作製したガラス基板上の Au ナノディスクアレイとビオチンにより、10 pM という低濃度のストレプトアビジンの検出に成功した⁴⁶。

これらの先行研究は NIL プラズモニック基板が実用化に向けて有望なプロセスであることを示唆している。しかしながら、先行研究の多くの場合、高い電場増強のメカニズム及びホットスポット位置は十分に明らかにされていない。その理由は NIL プラズモニック基板のシミュレーション結果はシャープなプラズモン共鳴を予測しているにも関わらず^{41,42}、測定されたスペクトルははるかにブロードであるため^{38,39,41,42,44-46}、シミュレーションと測定のスペクトルはほとんど一致しない^{41,42}。従って、シミュレーションでは、電場増強に寄与する電磁場モード及びホットスポット位置の特定をすることはできない。これが、更なる電場増強及びホットスポット位置チューニングの障害となっている。

そこで、本章の研究目的は、シミュレーション予測と同等にシャープな表面プラズモン共鳴を持つ NIL プラズモニック基板を開発することである。Au 表面粗さを改善することにより、表面プラズモン共鳴が著しくシャープになり、実験及びシミュレーションの両者の反射スペクトルが良好に一致することを示し、電場分布及びホットスポット位置を明らかにする。さらに、実験とシミュレーション用いた正反射及び拡散反射スペクトルの入射角度依存性評価から、ダイポールライクなブライモードと、クアドロポールライクなダークモードが Au ナノピラー間ギャップに存在することを示す。最後に、開発した NIL プラズモニック基板のバイオセンサ応用可能性を確認するため、開発したプラズモニック基板を表面増強蛍光(surface-enhanced fluorescence ; SEF)を用いたサンドイッチ免疫アッセイに適用し、インフルエンザウイルスの核タンパク質の検出を実証する。

2.2 実験方法

2.2.1 試料作製方法

NIL プラズモニック基板作製方法

本研究では、ナノインプリントフィルム上に電子ビーム(Electron Beam; EB)蒸着法とスパッタリング法により Au 成膜し NIL プラズモニック基板を作製した。図 2.1 に NIL プラズモニック基板作製プロセスの模式図を示す。

ナノインプリントフィルムは、ピラー形状を持つオレフィン製ナノインプリントフィルム(FLP230/200-120, SCIVAX)を用いた。ピラー形状は、ピラー径 230 nm、ピラーピッチ 460 nm、ピラー高さ 200 nm である。EB 蒸着法は、EB 蒸着機(Eiko)を用いて Au 膜厚を 301 nm とし、成膜レートは 1 \AA/s で成膜を行った。スパッタリング法は、スパッタリング装置(i-miller II, Shibaura)を用いて行った。Si ウエハ上にナノインプリントフィルムを固定し、Ar 流量 20 sccm、スパッタリング出力 50 W、基板回転速度 20 rpm とした。スパッタリング法では Au 膜厚はスパッタリング時間で制御し、膜厚は段差計を用いて測定した。スパッタリング時間を 875 s-2143 s で変化させることで、Au 膜厚を 208 nm-488 nm と変化させた。

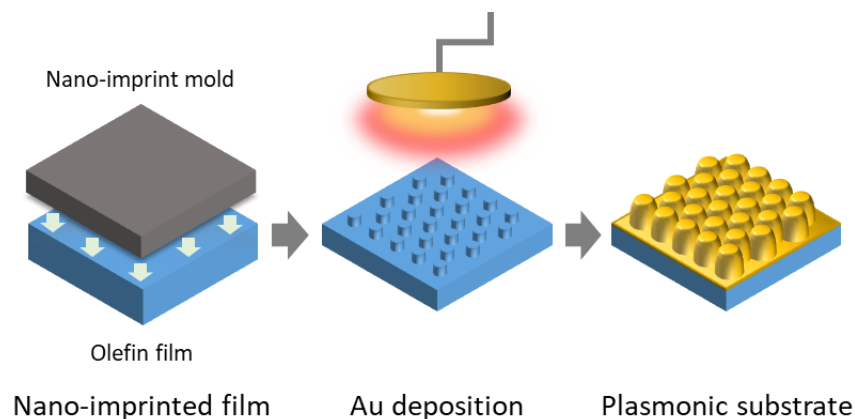


図 2.1 NIL プラズモニック基板作製プロセスの模式図。

2.2.2 構造評価方法

金属薄膜の膜厚測定

スパッタリング法を用いたプラズモニック基板の公称 Au 膜厚は、段差計(Dektak3, ULVAC)を用いて測定した。スパッタリング成膜時に、ナノインプリントフィルムに加え、膜厚測定用に一部をマスクした Si ウエハ断片を同時に成膜した。成膜後 Si ウエハ断片のマスクを剥がし、マスク有無による高低差を段差計(Dektak3, ULVAC)により測定し、公称 Au 膜厚とした。

光学顕微鏡観察

プラズモニック基板の Au ナノ構造の周期性評価を、光学顕微鏡(Keyence)を用いて行った。観察は明視野観察法(Bright Field microscopy ; BF)で行い、露光時間(Exposure time)は 1s、減光(Natural Density ; ND)フィルタは 1/16 を用いた。

走査型電子顕微鏡観察

ナノインプリントフィルム、及び NIL プラズモニック基板の構造評価を、走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope ; SEM, HELIOS NANOLAB G3 UC, FEI)を用いて行った。断面観察用サンプルは、保護層としてカーボン(C)、オスmium(Os)、白金(Pt)でサンプルをコーティングした後、集束イオンビーム(Focused ion-beam ; FIB)を用いて作製した。

2.2.3 光学特性評価方法

反射スペクトル測定

プラズモニック基板の反射スペクトルは紫外可視近赤外分光光度計(V-670, JASCO)を用いて、測定波長範囲 400 nm-1200 nm、入射角 5° で測定した。反射スペクトルの入射角度依存性は、同装置と角度可変ステージ(ARMN-735, JASCO)を用いて測定した。測定波長範囲は 350 nm-1200 nm とし、入射角は $5-75^\circ$ の範囲で 5° 刻みで設定した。プラズモニック基板の散乱及び吸収スペクトルを、正反射及び拡散反射スペクトルを測定することで求めた。正反射スペクトルは同装置を用いて、測定波長範囲 400 nm-1400 nm、入射角 8° で測定した。

拡散反射スペクトル測定

プラズモニック基板の散乱及び吸収スペクトルを、正反射及び拡散反射スペクトルを測定することで求めた。拡散反射スペクトルは、積分球と UV-VIS 紫外可視近赤外分光光度計(SolidSpec-3700, SHIMADZU)を用いて測定した。測定波長範囲は 400 nm-1400 nm、入射角は 8° の範囲で設定した。

2.2.4 FDTD シミュレーション解析方法

プラズモニック基板における電場分布及び電場増強箇所であるホットスポットを特定するため、時間領域差分法(Finite Difference Time Domain ; FDTD)法を用いて解析を行った。解析ソフトは光学用電磁波解析ソフトウェア(FDTD Solutions, Lumerical Solutions)を用いた。断面 SEM 像から得られた幾何学的パラメータを用いて、Au ナノ構造をモデリングした。詳細な解析モデル及び解析条件に関しては実験結果の中で述べる。

2.2.5 サンドイッチイムノアッセイによる発光増強評価方法

表面増強蛍光を用いたサンドイッチイムノアッセイ評価

NIL プラズモニック基板の発光増強評価、及びバイオセンサ応用可能性を実証するため、表面増強蛍光(Surface-enhanced fluorescence ; SEF) を用いたサンドイッチイムノアッセイ評価に NIL プラズモニック基板を適用し、インフルエンザ核タンパク質(Nucleoprotein ; NP)の検出を行った。図 2.2 にサンドイッチイムノアッセイ評価の模式図を示す。

表面増強蛍光を用いたサンドイッチイムノアッセイは、抗体によりサンプル中の微量な検出対象である抗原を特異的に結合させ、蛍光体の微弱な光を表面プラズモン共鳴により発光増強することにより、高感度検出が可能となる。抗原にはインフルエンザウイルスの核タンパク質(Nucleoprotein ; NP)を用い、抗体には Anti-influenza A NP IgG(Immunoglobulin G)抗体を用いた。蛍光体には 800 nm をピーク発光波長とする有機蛍光色素を用い、785 nm のレーザー光を用いて蛍光体を励起し、蛍光強度の NP 濃度依存性を評価した。

NIL プラズモニック基板上にチオール基(-SH)による化学結合で自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer ; SAM)を形成し、SAM 末端のカルボキシル基(COOH)に捕捉抗体(Capture antibody ; c-Ab)である IgG 抗体(ab66191, abcam)のアミノ基(NH₂)をペプチド結合(CONH)により固定した。捕捉抗体により抗原である NP(11675-V08B, Sino Biological)を抗原抗体反応により捕捉し、その上に有機蛍光色素(Dylight 800, Thermo Fisher)を標識した検出抗体(Detection antibody ; det-Ab)である IgG 抗体(ab110661, abcam)を抗原抗体反応により結合させた。波長 785 nm のレーザー光を照射し、波長 800 nm がピーク波長である有機蛍光色素の蛍光強度を評価した。

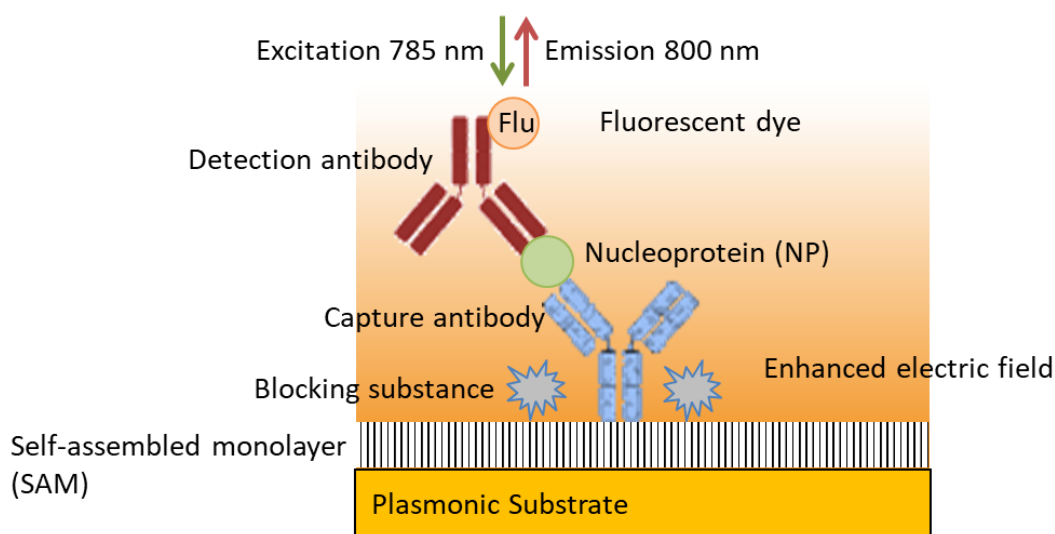


図 2.2 表面増強蛍光を用いたサンドイッチイムノアッセイ評価の模式図。

以下に、表面蛍光増強を用いたサンドイッチイムノアッセイ評価の手順を示す。

- ① NIL プラズモニック基板作製： ナノインプリントフィルム上に EB 蒸着法及びスパッタリング法により Au 成膜し、NIL プラズモニック基板を作製する。Au 成膜条件は 2.2.1 と同様とした。Au 膜厚はいずれもプラズモン共鳴波長を有機蛍光色素の 800 nm にチューニングし、EB 蒸着は Au301 nm、スパッタリングは Au403 nm とした。
- ② SAM 形成： Au 成膜後に成膜装置の真空チャンバからプラズモニック基板を取り出し、すぐにシャーレに入れた SAM 溶液に浸漬し、揮発防止のためパラフィルムでシールし、暗所、室温で一晩放置する。SAM 溶液は、5-Carboxy-1-pentanethiol(Dojindo)を無水エタノールで 1.5 mM(molar = mol/L ; M)に希釈して作製した。一晩浸漬後、SAM 形成された基板をエタノールで 2 回、純水で 1 回洗浄し、N₂ ブローで乾燥させ、24 穴プレートの各 Well に基板を 1 枚ずつ入れる。ここでの注意点は、シャーレに基板の表面が上になるように並べること、シールを忘れないこと、基板をピンセットで取り出す際プラズモニック基板表面を傷つけないようにすることである。
- ③ NHS エステル： 100 mM MES バッファ(pH4.7)で 400 mM に希釈した EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride)(Dojindo)溶液と、100 mM MES バッファ(pH4.7)で 100 mM に希釈した NHS(N-Hydroxysuccinimide)(東京化成)溶液を、直前によく混合し、基板を暗所、室温で 15 分間浸漬する。15 分経過後、各 Well の EDC-NHS 溶液をポンプ吸引する。ここでの注意点は、EDC 溶液と NHS 溶液は直前に混合すること、浸漬時間 15 分は厳密に管理すること、EDC-NHS 溶液から取り出した基板を洗浄しないことである。
- ④ Caputure-Ab： EDC-NHS 溶液をポンプ吸引した直後に、酢酸バッファ(pH5)で希釈した 10 ug/mL の IgG 抗体(ab66191, abcam)溶液に、基板を暗所、室温、シェーカ(As one), 300 rpm で揺らしながら 2 時間浸漬する。その後、c-Ab 溶液をポンプ吸引し、PBS-T(後述)溶液でシェーカ, 300 rpm で揺らしながら 5 分間、3 回洗浄する。ここでの注意点は、EDC-NHS 溶液吸引直後に、基板を c-Ab 溶液に浸漬させることである。PBS-T 溶液は、10 x PBS Buffer(NIPPON GENE)を純水で 10 倍希釈して作製した PBS(phosphate-buffered saline) バッファ (リン酸緩衝液) で、Tween 20(Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, 東京化成)を 0.05% に希釈して作製した。
- ⑤ Blocking： 検出抗体の基板上への非特異吸着抑制のため、基板表面に Blocking 処理を行う。ELISA Assay Diluent(5 x)(BioLegend)を PBS バッファで 5 倍希釈した Blocking 溶液に、基板を暗所、室温、シェーカ, 300 rpm で揺らしながら 1 時間浸漬する。その後、Blocking 溶液をポンプ吸引し、PBS-T 溶液でシェーカ 300 rpm で揺らしながら 5 分間、3 回洗浄する。

- ⑥ NP & Detection-Ab: NP 溶液と det-Ab 溶液を 1:1 で事前混合した Premix 溶液に、基板を暗所、室温、シェーカ、300 rpm で揺らしながら 1 時間浸漬する。以下に、Premix 溶液の作製手順を説明する。NP 溶液は NP(11675-V08B, Sino Biological)を Blocking 溶液で 2, 20, 200, 2000, 2000 pM に希釈して作製する。det-Ab 溶液は有機蛍光色素(Dylight 800, Thermo Fisher)を標識した det-Ab 抗体(ab110661, abcam)を Blocking 溶液で 52ug/mL に希釈して作製する。NP 溶液と det-Ab 溶液を 1:1 で混合し、遮光して、ローテータ(MTR-103, As One)を用いて回転させながら 1 時間混合する。Premix 溶液に基板を 1 時間浸漬後、Premix 溶液をポンプ吸引し、PBS-T 溶液でシェーカ 300 rpm で揺らしながら 5 分間、3 回洗浄する。その後、基板をビーカーに入れた純水にさっとくぐらせ(1 秒以下)、N₂ ブローで乾燥させ、サンプルが完成する。ここでの注意点は、純水にさっとくぐらせることであり、長時間純水に浸すと、基板上の抗原抗体複合体が剥がれてしまう恐れがある。
- ⑦ 発光測定: 図 2.3 に発光スペクトル測定系の概略図を示す。励起光源には波長 785 nm の半導体レーザー(LML-785, PD-LD)を用いた。レーザー直後にはバンドパスフィルタを配置し、対物レンズ(10 x, NA = 0.3)を用いてサンプル基板上に集光した。入射角及び検出角は 0° とし、焦点距離が 100mm のレンズを用いて分光器(iHR320, Horiba)のスリット上に集光した。スリット直前には 2 枚のロングパスフィルタを設置し、レーザーからの散乱光を除去した。検出器には液体窒素で冷却した Charge Coupled Device(CCD)(Symphony CCD, Horiba)を使用した。

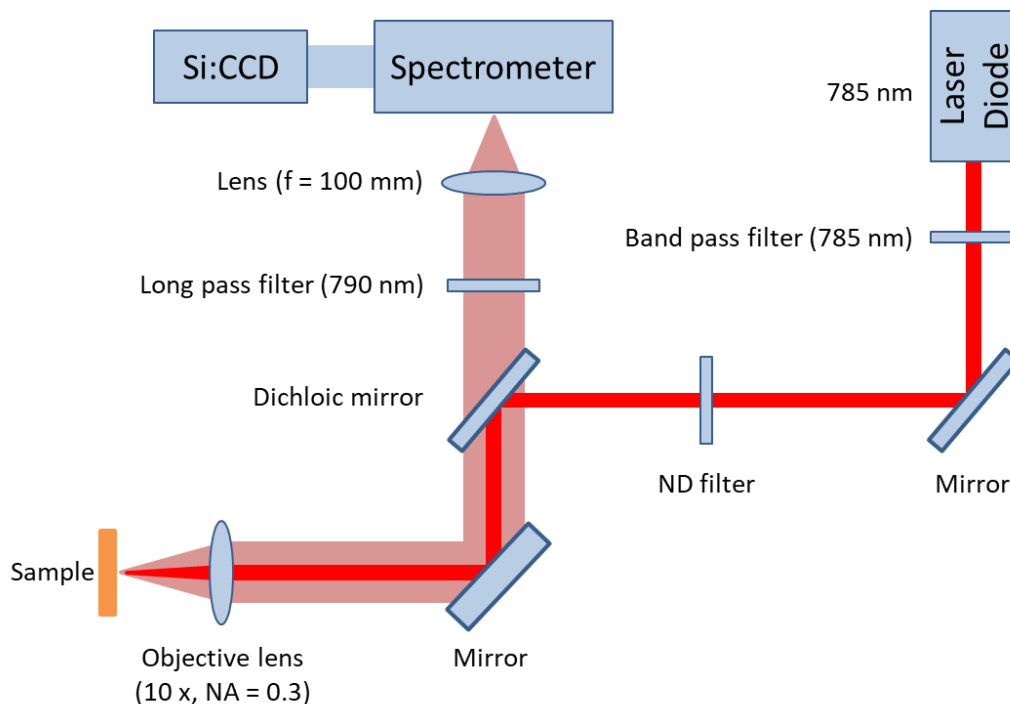


図 2.3 サンドイッチイムノアッセイの発光測定系の概略図。

2.3 実験結果

図 2.4 にオレフィン製ナノインプリントフィルム(FLP230/200-120, SCIVAX)の走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope ; SEM)像を示す。ナノインプリントフィルムのナノ構造はピラー(円柱)構造で、ピラー径 230 nm、ピラーピッチ 460 nm、ピラー高さ 200 nm である。ピラー形状の上面のエッジは若干なまっており、上面はドーム形状である。

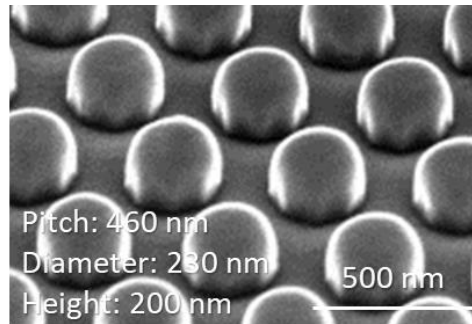


図 2.4 ポリオレフィン製ナノインプリントフィルムの SEM 像。

ピラー形状のナノ構造を有するナノインプリントフィルム上に、EB 蒸着法及びスパッタリング法により Au 薄膜を形成した。図 2.5(a)にナノインプリントフィルム上に EB 蒸着法で Au 成膜した NIL プラズモニック基板の SEM 像を、図 2.5(b)にスパッタリング法で Au 成膜したプラズモニック基板の SEM 像を示す。Au 成膜の際、膜厚測定用の Si ウエハ断片を同時に成膜し、公称 Au 膜厚(Nominal Au thickness)とした。以下、Au 膜は公称 Au 膜厚を示す。EB 蒸着は蒸着レート 1 \AA/s で膜厚 301 nm で、スパッタリングはスパッタリング電力 50 W、Au ガス流量 20 sccm で膜厚 208 nm で、それぞれ Au 成膜を行った。

図 2.5 より、2 つの異なる成膜法で作製した Au ナノ構造の形状には明らかに違いが見られる。EB 蒸着法で作製した Au ナノ構造の Au 表面は凹凸を有しており、スパッタリング法で作製した Au ナノ構造の Au 表面は平滑であることがわかる。この違いは、EB 蒸着法とスパッタリング法の成膜時における真空チャンバ中での Au 原子の飛行運動エネルギーの違いに起因する⁹⁷。

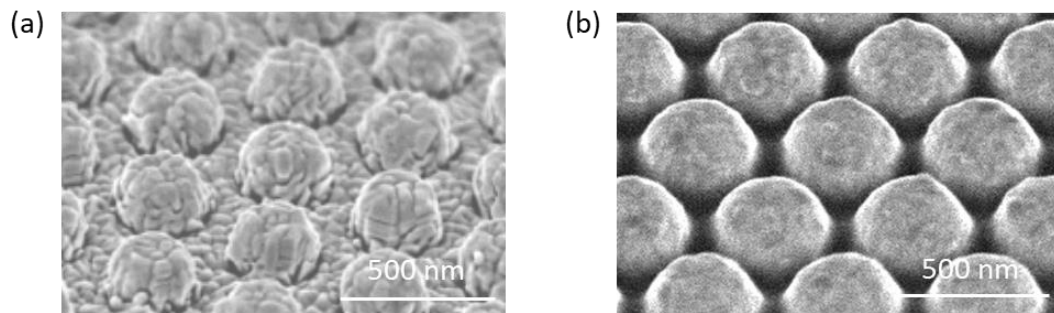


図 2.5 NIL プラズモニック基板の SEM 像。(a) EB 蒸着法で Au 成膜(Au 膜厚 301 nm)、(b)スパッタリング法で Au 成膜(Au 膜厚 208 nm)。

図 2.6 に EB 蒸着法及びスパッタリング法で Au 成膜して作製した NIL プラズモニック基板の反射スペクトルを示す。入射角は 5° に設定した。EB 蒸着法及びスパッタリング法のいずれにおいても波長 500 nm 以下で反射率が低下しているが、これは Au のバンド間遷移に起因している。EB 蒸着法で作製したプラズモニック基板とスパッタリング法で作製したプラズモニック基板の反射スペクトルは大きく異なっている。EB 蒸着法で作製したプラズモニック基板の反射スペクトルは 850 nm 付近にブロードなディップが見られる。一方、スパッタリング法で作製したプラズモニック基板の反射スペクトルは波長 550 nm 付近にシャープなディップが見られる。図 2.5(a)に示した EB 蒸着プラズモニック基板の Au ナノ構造における Au 表面の凹凸を考慮すると、EB 蒸着基板の表面プラズモン共鳴のブロードな広がりには Au 表面凹凸に起因と想定される。

本章では、Au ナノ構造における Au 表面粗さの影響を除外して、プラズモニック基板固有の特性を解析するために、ナノインプリントフィルム上にスパッタリング法で Au 成膜して作製したプラズモニック基板に関して、詳細に解析・議論する。

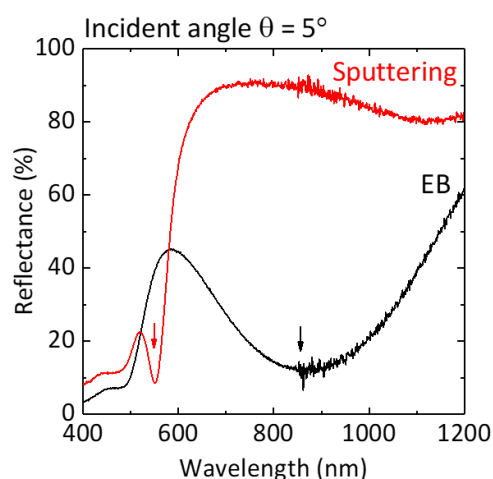


図 2.6 EB 蒸着法及びスパッタリング法で作製した NIL プラズモニック基板の反射スペクトル。入射角は 5° 。

2.3.1 構造評価

走査型電子顕微鏡観察

図 2.7 にプラズモニック基板の平面(a, c, e, g, i)及び断面(b, d, f, h, j)の SEM 像を示す。図中に Au 成膜時のスパッタリング時間、及び Au 膜厚を示す。スパッタリング時間を 857, 1285, 1714, 1928, 2143 s と変化させることで、Au 膜厚を 208, 294, 403, 450, 488 nm と変化させた。断面 SEM 像のサンプルは、保護層として C, Os, Pt でサンプルをコーティングした後、集束イオンビーム(Focused ion-beam ; FIB)を用いて作製した。

Au 成膜時間の増加に伴い、Au ナノピラーの直径と高さは増加し、隣接 Au ナノピラー間のギャップは減少している。平面 SEM 像より、成膜時間増加に伴い、Au ナノピラーの形状が円から六角形に変化し、隣接 Au ナノピラー間の最小ギャップ箇所は点から線に変化していることがわかる。隣接ナノピラー間のギャップは表面プラズモン共鳴による電場増強のホットスポットであるため、Au ナノ構造の形状は電場増強を決定する重要な因子となる^{38,98-100}。最も成膜時間が長い 2143 s においては、隣接 Au ナノピラーは一部接触している箇所が確認された。

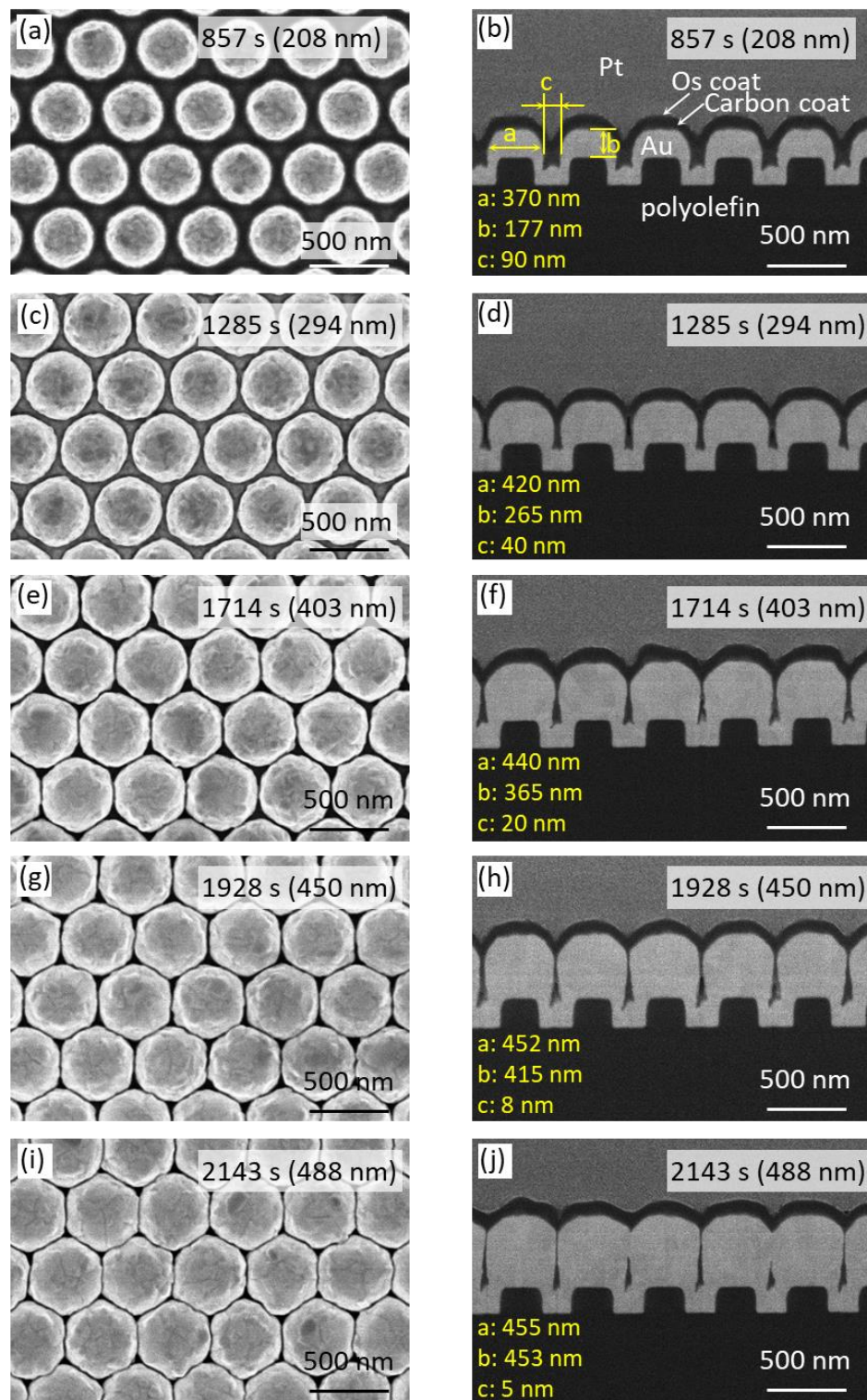


図 2.7 プラズモニック基板の平面及び断面 SEM 像。図中にスパッタリング時間及び Au 膜厚を示す。スパッタリング時間を 857, 1285, 1714, 1928, 2143 s と変化させ、Au 膜厚を 208, 294, 403, 450, 488 nm と変化させた。断面 SEM 像における C, Os, Pt をイオンミリングプロセスの保護層である。

図 2.8 に SEM 像から取得した Au ナノ構造のピラー直径、ピラー高さ、隣接ピラー間ギャップ、公称 Au 膜厚のスパッタリング時間依存性を示す。Au ナノ構造のピラー直径、ピラー高さ、隣接ピラー間ギャップは、図 2.7(b)にそれぞれ a, b, c に示すように定義した。ピラー高さとはスパッタ時間に増加に伴いほぼ線形に増加している。ピラー直径はスパッタ時間に伴い増加するが、増加量は徐々に低下し、隣接ピラー間ギャップはスパッタ時間の増加に伴い減少するが、減少量は徐々に低下している。ピラー直径及び隣接ピラー間ギャップの変化率が徐々に低下する理由は、スパッタリング時間の増加に伴い Au ナノピラーの増大することにより、ピラー間への Au 原子の堆積が阻害されるためである。

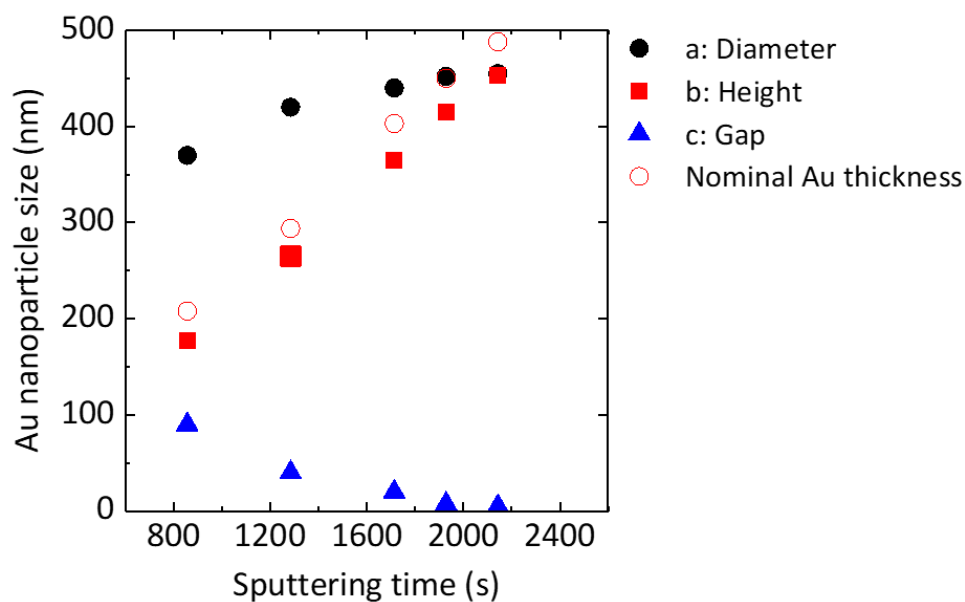


図 2.8 Au ナノピラーの直径(黒丸)、高さ(赤四角)、隣接ピラー間ギャップ(青三角)、公称 Au 膜厚(白抜き赤丸)のスパッタリング時間依存性。それぞれの定義は図 2.7(b)参照。

2.3.2 光学特性評価

反射スペクトル評価

図 2.9 にプラズモニック基板の反射スペクトルを示す。スパッタリング時間を 857, 1285, 1665, 1714, 1928, 2143 s と変化させることで、Au 膜厚を 208, 294, 386, 403, 450, 488 nm と変化させた。比較検討用に、平滑な基板にスパッタリング法により Au 成膜した平滑な Au(以下、AuFlat)のスペクトルを示す。入射角は 5° と設定した。

最も薄い Au 膜厚(膜厚 208 nm)の基板では、反射スペクトルのディップは波長 550 nm 付近に見られる。Au 膜厚の増加に伴い、スペクトルのディップは 2-3 個に分離し、長波長側のディップは大きく長波長シフトしている。これは隣接する Au ナノ構造の表面

プラズモンの結合に伴う共鳴波長変化に起因すると考えられる^{82,101,102}。最も Au 膜厚が厚い膜厚 488 nm では、表面プラズモン共鳴は他の Au 膜厚のサンプルに比べブロードである。これは、図 2.7(j)の SEM 像が示すように、隣接 Au ナノピラーが一部接触していることに起因すると考えられる。

本章の最後に行うサンドイッチイムノアッセイでは励起/検出波長は 785 nm/800 nm を用いる。またこれまでの検討により、プラズモニック基板の共鳴波長はアッセイ後 50 nm 程度長波長シフトすることがわかっている。これらのことを踏まえ、本章では 750 nm 付近に共鳴を持つ Au 膜厚 386 nm(図 2.9 より)のプラズモニック基板に焦点を当て、これ以降表面プラズモン共鳴特性を詳細に解析する。

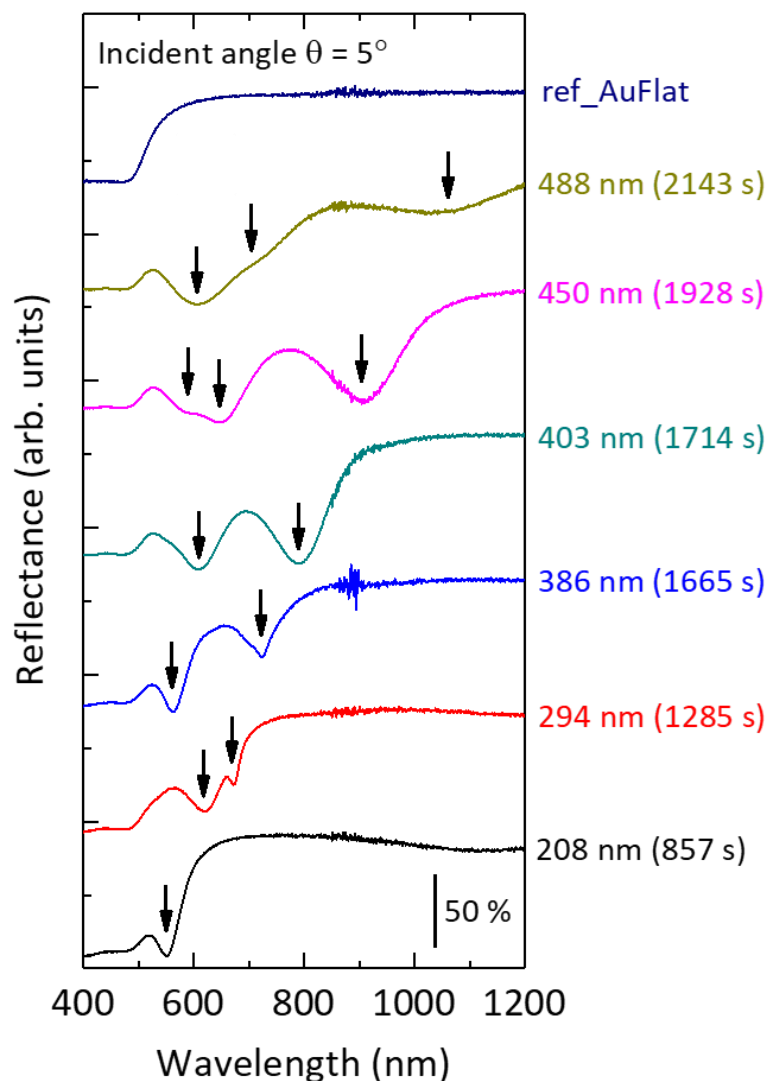


図 2.9 プラズモニック基板の反射スペクトル。スパッタリング時間を 857, 1285, 1665s, 1714, 1928, 2143 s と変化させ、Au 膜厚を 208, 294, 386, 403, 450, 488 nm と変化させた。入射角は 5°。比較として AuFlat のデータを示す。

反射スペクトルの入射角度依存性評価

プラズモニック基板の反射スペクトルにおけるディップの要因である表面プラズモン共鳴モードを明らかにするため、反射スペクトルの入射角度依存性を調査した。サンプルは Au 膜厚 386 nm、入射光は p 偏光、入射角は $5^\circ - 75^\circ$ の範囲で 5° 刻みで測定した。図 2.10(a)にプラズモニック基板の反射スペクトルの入射角度依存性、図 2.10(b)に(a)の 3D マップを示す。次項でこれらのデータを用いて、実験結果とシミュレーション結果を比較することにより、表面プラズモン共鳴の分散関係を議論する。

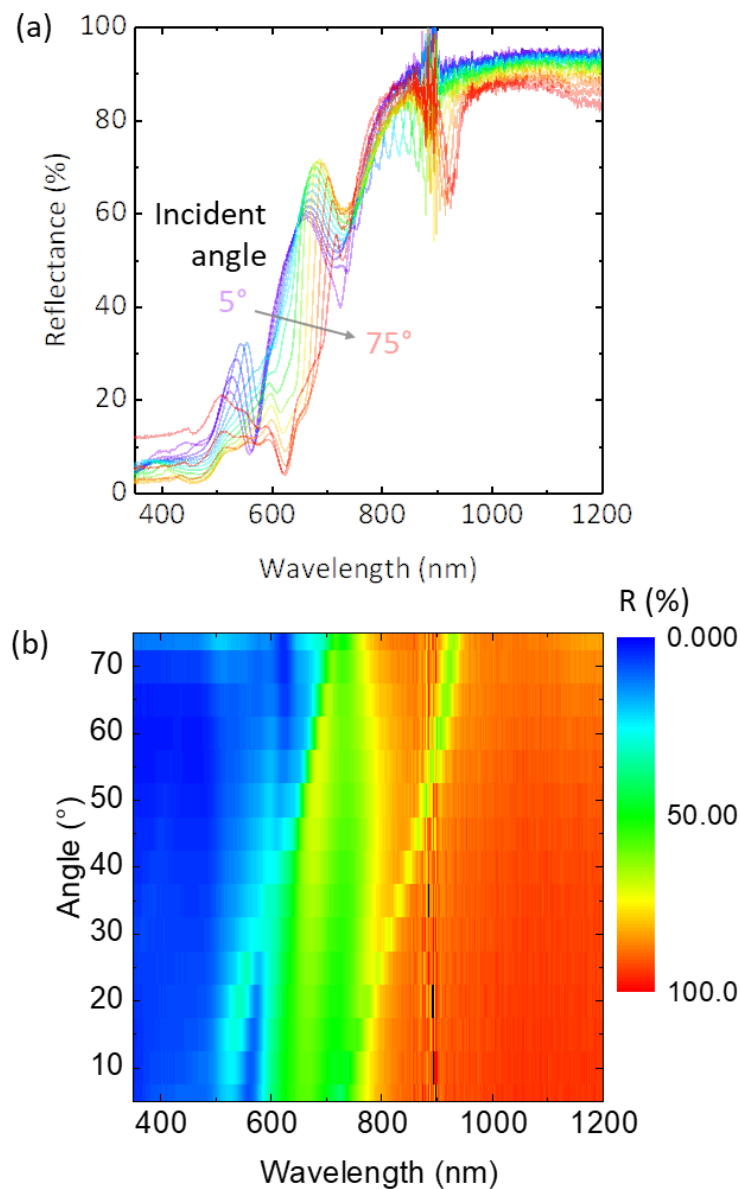


図 2.10 (a)Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の反射スペクトルの入射角度依存性。入射光は p 偏光、入射角は $5^\circ - 75^\circ$ の範囲で 5° 刻みで測定。(b)反射スペクトルの入射角度依存性の 3D マップ。

拡散反射スペクトル、散乱及び吸収スペクトル評価

図 2.9 の反射スペクトルにおいて観察されたプラズモニックモードの輻射及び非輻射特性を調査するため、プラズモニック基板の正反射スペクトル及び拡散反射スペクトルを測定することにより、反射、散乱、吸収の寄与の切り分けを行った。

図 2.11(a) に正反射スペクトル、図 2.11(b) に拡散反射スペクトル (SolidSpec-3700, Shimadzu) の測定系の模式図を示す。入射角は 8° とした。正反射スペクトルでは、入射光子に対する反射した光子の比率 (R) だけが測定される。一方、拡散反射スペクトルのジオメトリでは、積分球により散乱した光子 (S) と反射した光子 (R) を足し合わせたものが測定される。従って、拡散反射スペクトルから正反射スペクトルを差し引くことで、散乱した光子の比率 (S) が得られる。さらに、1 から拡散反射スペクトル (S+R) を差し引くことで、吸収された光子の比率 (A) が得られる。

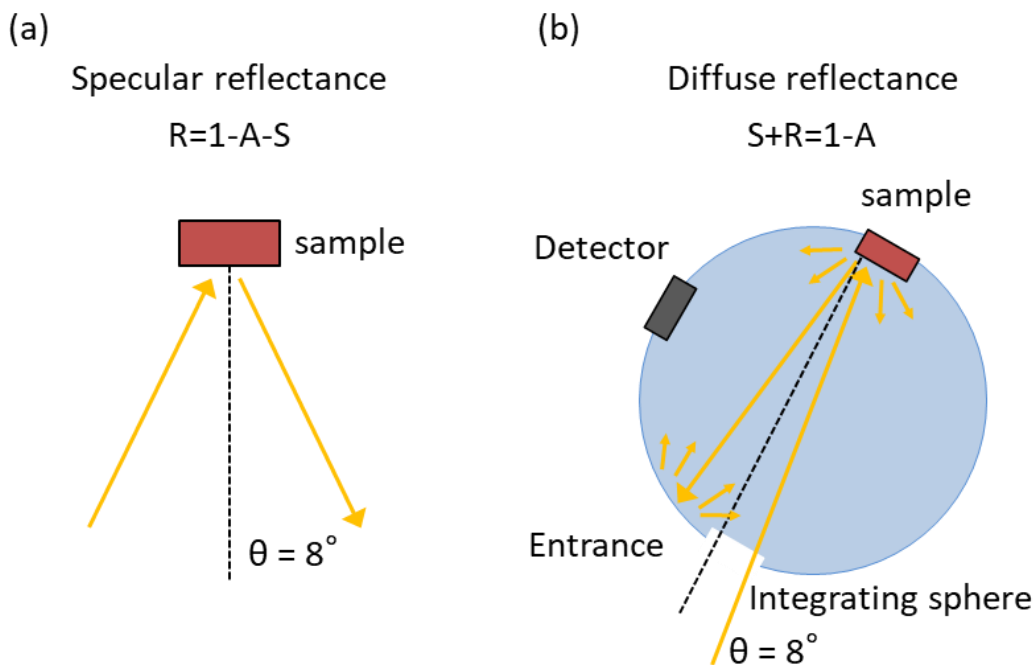


図 2.11 (a)正反射スペクトルの測定系の模式図。(b)拡散反射スペクトルの測定系の模式図。入射角はいずれも 8° とした。

図 2.12(a) に拡散反射スペクトル (黒) 及び正反射スペクトル (赤) を、図 2.12(b) に散乱スペクトル (青) 及び吸収スペクトル (緑) を示す。サンプルは Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板を用いた。波長 714 nm の共鳴の散乱強度は、波長 563 nm の共鳴の散乱強度に比べて約 2 倍大きい。一方、波長 714 nm の共鳴の吸収は、波長 563 nm の吸収に比べて約 1/2 である。これらの結果より、短波長側である波長 563 nm の表面プラズモン共鳴モードは吸収が支配的なダークモードであり、長波長側である波長 714 nm の表面プラズモン共鳴モードは散乱を有するブライトモードであることがわかる。

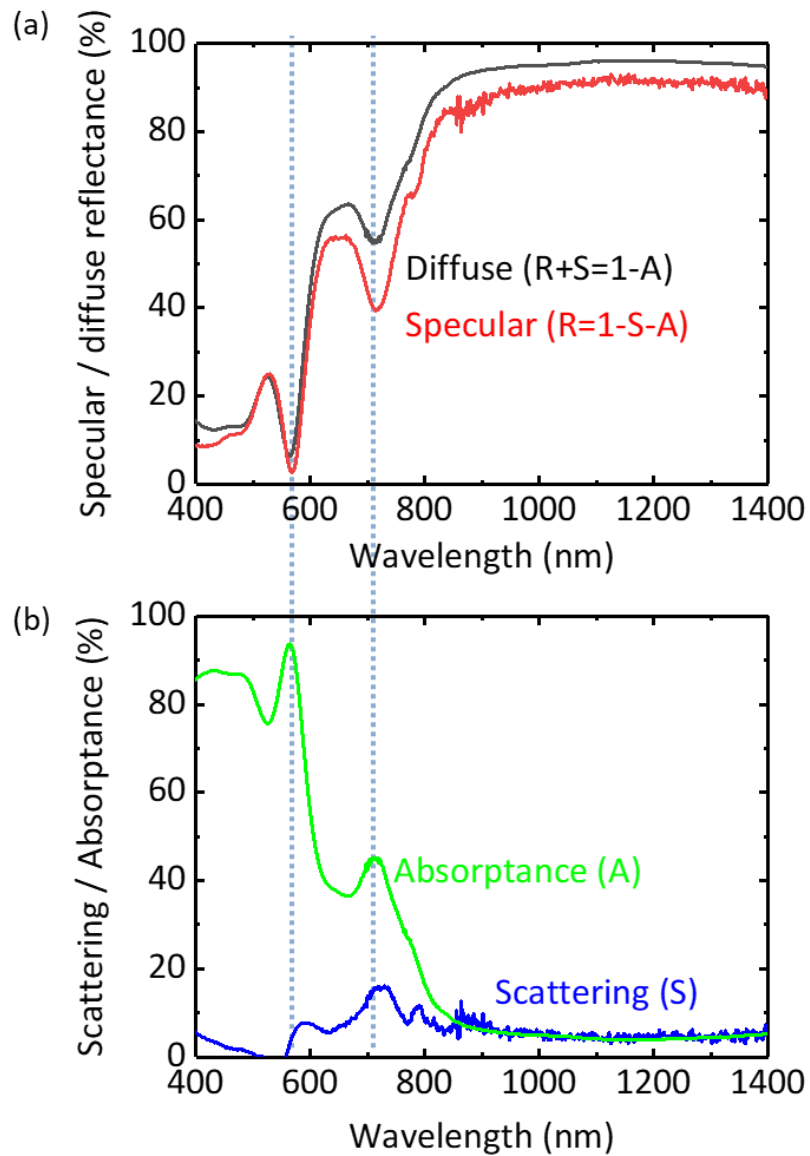


図 2.12 (a)Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の拡散反射スペクトル(黒)及び正反射スペクトル(赤)。(b)(a)より算出した散乱スペクトル(青)及び吸収スペクトル(緑)。入射角はいずれも 8° 。

2.3.3 FDTD シミュレーション解析

Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板における反射スペクトル及び電場分布を、時間領域差分法(Finite Difference Time Domain ; FDTD)法を用いて解析を行った。シミュレーションのモデリングにおいて Au ナノ構造の幾何学的パラメータは断面 SEM 像から取得した。図 2.13 に、シミュレーションの幾何学的パラメータ取得に用いた断面 SEM 像を示す。

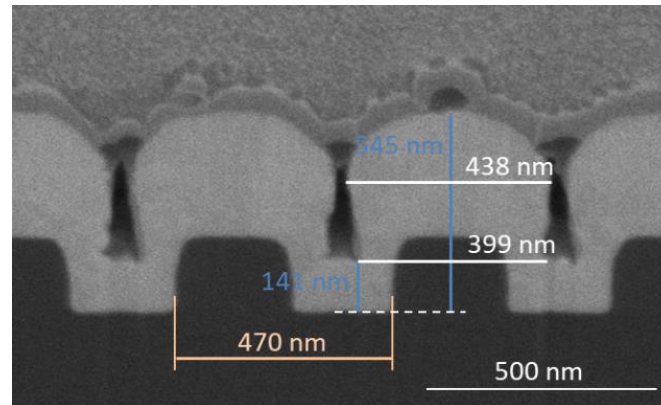


図 2.13 FDTD シミュレーションのモデリングにおいて Au ナノ構造の幾何学的パラメータ取得に用いた Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の断面 SEM 像。

図 2.14 に FDTD シミュレーションにおける Au ナノ構造モデルの模式図を示す。Au ナノピラーは Au の円柱と半球で構成し、Au ナノピラーは六角形状に配置されている。Au ナノピラーに関して直径は 438 nm、Au ナノピラー高さはオレフィン平面から 545 nm、半球高さは 200 nm、ピッチは 470 nm とし、Au 薄膜に関してはオレフィン平面から 141 nm とした。Au の誘電関数は Johnson and Christy の値を用い⁹⁹、Air 及びオレフィンの屈折率はそれぞれ 1 と 1.55 とした。シミュレーション領域は、周期的な境界(面内)及び完全に一致したレイヤー(面外)に囲まれた、1 つのピラーと 4 つの 1/4 ピラーで構成される単位セルによって定義される。光源は、直線偏光平面波光源を Au ナノピラーアレイ上に配置し、平面波光源の波数ベクトル k は Z 方向に平行で、電場ベクトル E は X 方向に平行とした。吸収エネルギーは光源と Au ナノピラーアレイの間に設けたモニターで計算し、一方、反射と散乱を含む全反射エネルギーは光源より上方に配置したモニターで計算した。そのため全反射エネルギーの計算で得られるスペクトルは、測定で得られる拡散反射スペクトルと一致する。

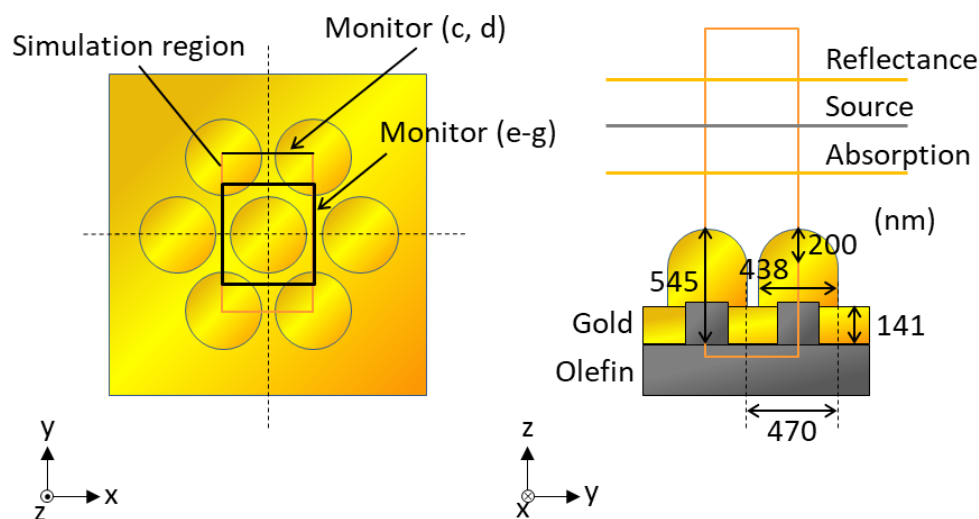


図 2.14 FDTD シミュレーションにおける Au ナノ構造モデルの模式図。

図 2.15 にシミュレーションで得られた Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の全反射エネルギースペクトル(赤)と、測定で得られた拡散反射スペクトル(黒)(図 2.12(a)で示したスペクトル(黒)と同じ)を示す。シミュレーション結果が実験で得られた拡散反射スペクトルを非常に良く再現できていることがわかる。表面プラズモン共鳴波長はほぼ完全に一致し、さらに波長 563 nm のディップの深さ及び幅も良好に一致している。波長 714 nm のディップに関しては、ディップ深さは実験とシミュレーションで若干異なっている。図 2.15 に示した本研究における実験とシミュレーションの一致は、先行研究の実験とシミュレーションの一致に比べて、はるかに優れている^{41,42,82-84}。実験とシミュレーションが良好に一致したことにより、電場分布から表面プラズモン共鳴モードの起源について議論することが可能となった。

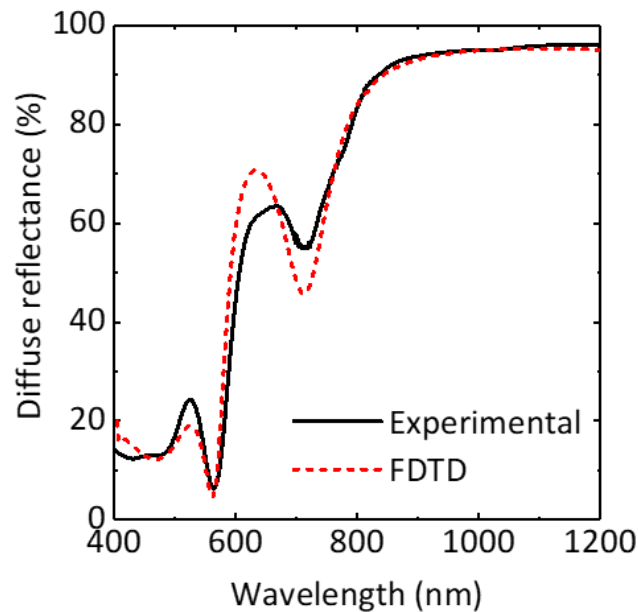


図 2.15 シミュレーションで得られた Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の全反射エネルギー(赤)と測定で得られた拡散反射スペクトル(黒)。

図 2.16(a)に波長 563 nm における XZ 断面の電場分布($|E/E_0|^2$)を、図 2.16(b)に波長 714 nm における XZ 断面の電場分布($|E/E_0|^2$)を示す。波長 563 nm では、 $Z=200$ nm と 352 nm 周辺の位置に 2 つのホットスポットが隣接 Au ナノピラー間のギャップに形成されており、その最大の電場増強度は 186 倍であった。一方、波長 714 nm では $Z=236$ nm の位置に 1 つのホットスポットが形成され、その最大の電場増強度は 414 倍であり、波長 714 nm の電場増強度は波長 563 nm の電場増強度に比べ、2.2 倍大きな値であった。これらの XZ 断面における電場分布は、波長 563 nm の共鳴はマルチポールな高次のキャビティモードであり、波長 714 nm の共鳴はダイポールライクな最も低次のキャビティモードであることを示している^{82,103}。

図 2.16(c)-(e)に各ホットスポット高さにおける XY 断面の電場分布を示す。(c)と(e)は波長 563 nm のホットスポットである $Z=352$ nm と 200 nm、(d)は波長 714 nm のホットスポットである $Z=236$ nm における XY 断面である。XY 断面の電場分布はホットスポットが隣接 Au ナノピラー間ギャップに存在するキャビティモードであることを示している。

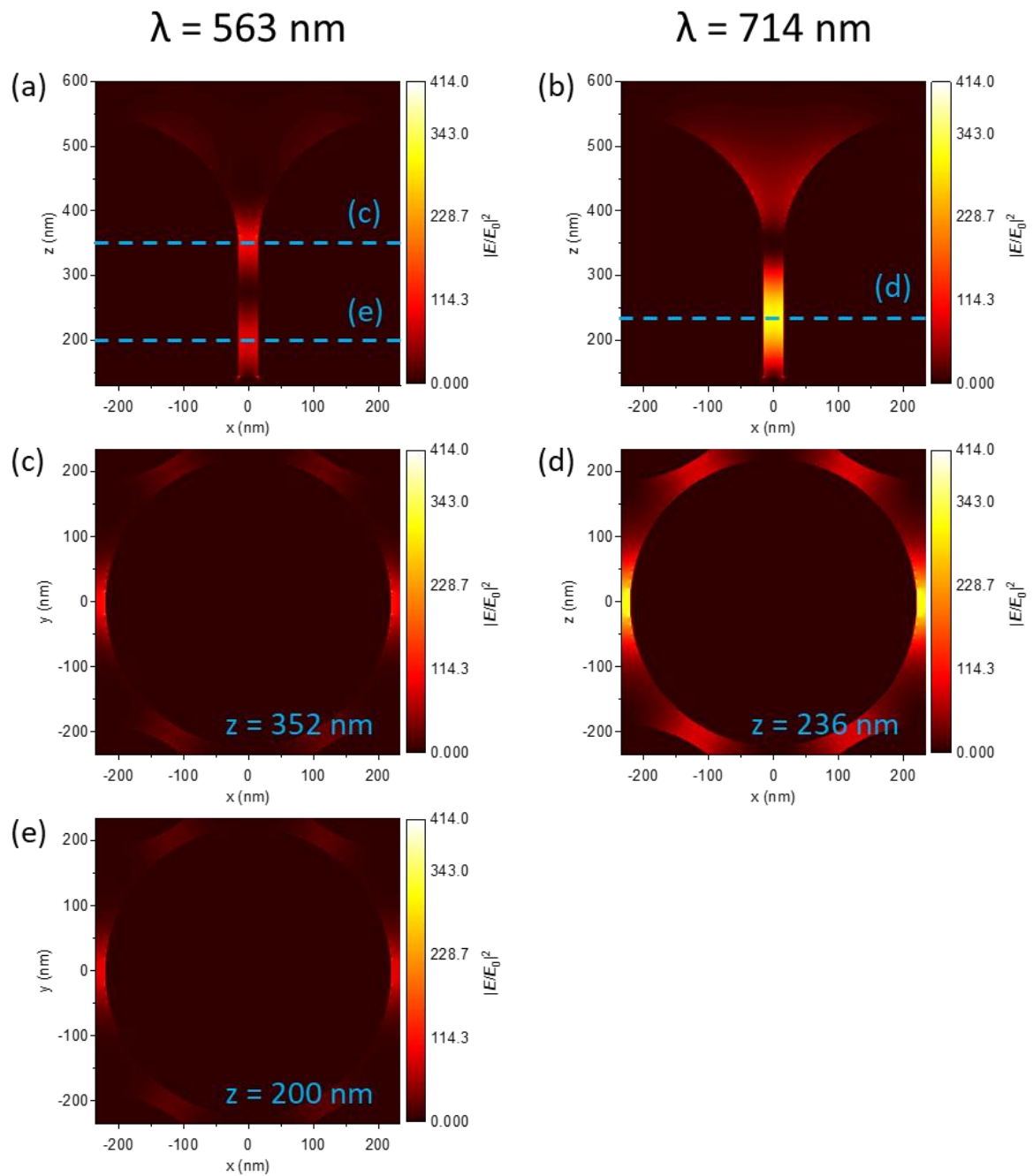


図 2.16 シミュレーションで得られた Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の電場強度 $|E/E_0|^2$ 。(a)(b)は XZ 断面、(c)-(e)は XY 断面。(a, c, e)は波長 563 nm、(b, d)は波長 714 nm。

FDTD シミュレーションにおいて、入射角を $0 - 70^\circ$ で変化させた正反射スペクトルを計算することにより(図 2.17)、分散関係を求めた。入射光は p 偏光とした。図 2.18(a) にシミュレーションによるプラズモニック基板の分散関係を、図 2.18(b) に正反射スペクトルの入射角度依存性(図 2.10(a))の実験結果から求めたプラズモニック基板の分散関係を示す。横軸は $k_{\parallel} = (\omega/c) \sin \theta$ より計算される面内波数ベクトルである。Au 膜厚はいずれも 386 nm である。

実験及びシミュレーションで得られた分散関係が非常に類似していることがわかる。この結果は、シミュレーションにおけるモデリング構造がほぼ完全に実際の Au ナノ構造を再現できていることを示している。分散関係は、低エネルギーのプラズモニックモードの分散は非常に小さく、高エネルギーのプラズモニックモードの分散は比較的大きいことを示している。従って、低エネルギーモードは隣接 Au ピラー間ギャップに強く局在しており、一方、高エネルギーモードは Au ナノピラー格子の周期性を反映した結合モードであると示唆される¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。

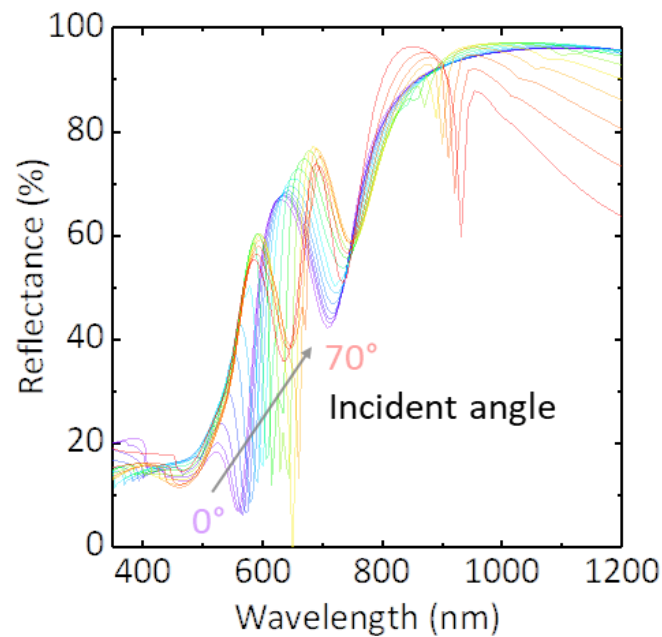


図 2.17 シミュレーションによる Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の反射スペクトルの入射角度依存性。

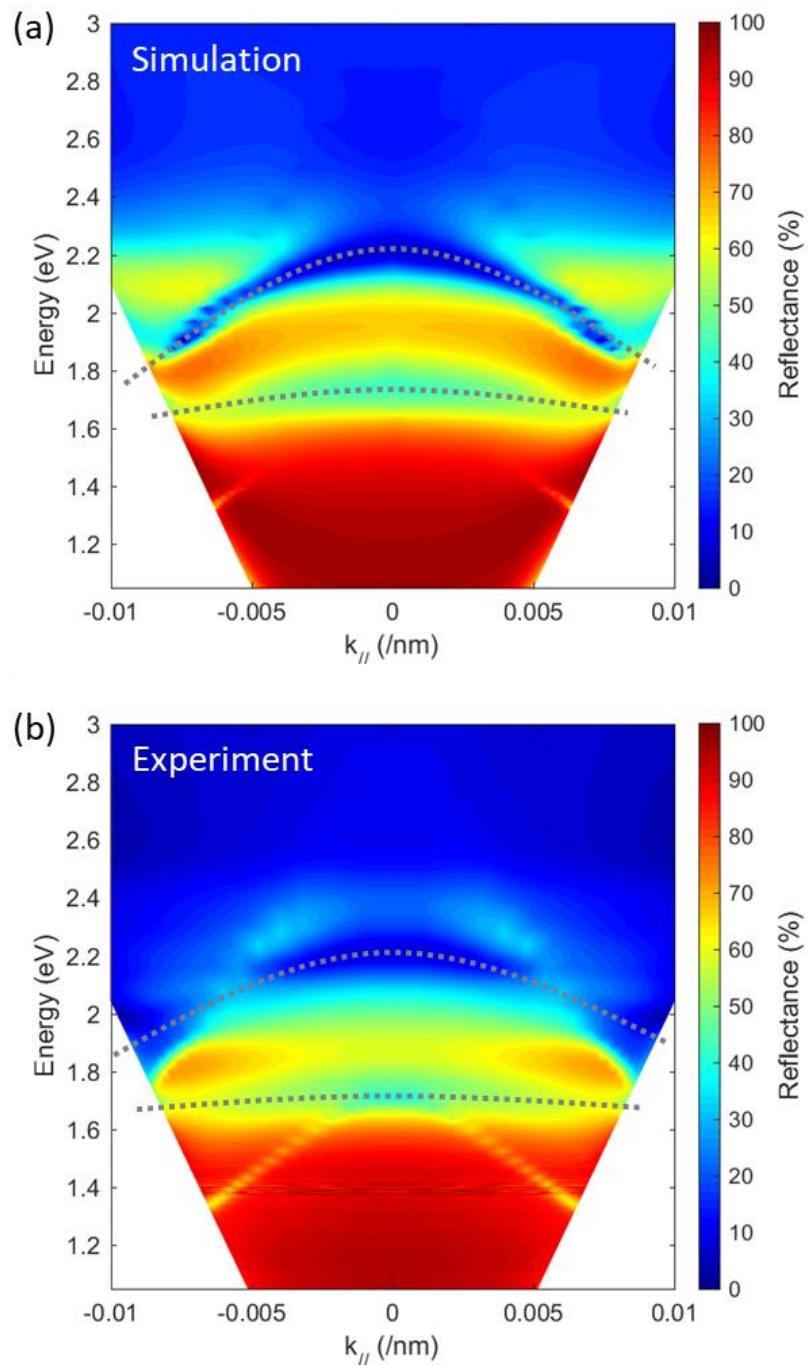


図2.18 (a)シミュレーションによる Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の分散関係、(b)実験による Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板の分散関係。横軸は $k_{||} = (\omega/c) \sin \theta$ より計算される面内波数ベクトル。

2.3.4 サンドイッチイムノアッセイによる発光増強評価

開発した NIL プラズモニック基板の発光増強特性評価、及びバイオセンサ応用の可能性を実証するため、NIL プラズモニック基板を用いて、表面増強蛍光(Surface-enhanced fluorescence; SEF)によるサンドイッチイムノアッセイ評価を行った。検出対象をインフルエンザの核タンパク質(Nucleoprotein; NP)とし、プラズモニック基板の Au 膜厚を 208 nm-488 nm の範囲で変化させることにより、図 2.9 に示したように表面プラズモン共鳴波長は 550 nm-1030 nm に変化させた。サンドイッチイムノアッセイ評価では、蛍光体には有機蛍光色素(Dylight 800, Thermo Fisher)を用い、励起光には波長 785 nm のレーザー光を、検出光は波長 800 nm とした。

図 2.19 にサンドイッチイムノアッセイにおける発光強度を示す。横軸はプラズモニック基板の Au 膜厚で制御したプラズモン共鳴波長である。発光強度はプラズモニック基板の共鳴波長が励起(785 nm)及び発光波長(800 nm)に近づくにつれて増加し、Au 膜厚 403 nm で最も大きくなり、その後 Au 膜厚増加に伴い共鳴波長が 800 nm から離れるに伴い発光強度は低下した。

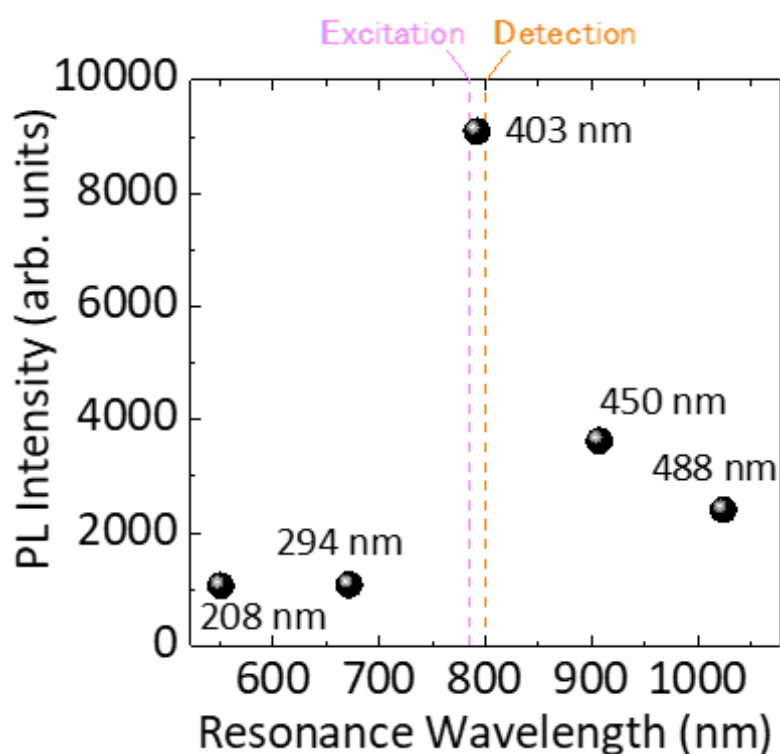


図 2.19 スパッタリング法で Au 成膜したプラズモニック基板を用いたサンドイッチイムノアッセイの発光強度。横軸はプラズモニック基板の Au 膜厚を変化させることで制御した表面プラズモン共鳴波長。励起波長と検出波長はそれぞれ 785 nm と 800 nm。

次に、EB 蒸着法及びスパッタリング法で Au 成膜した NIL プラズモニック基板を用いたサンドイッチイムノアッセイ評価により、発光増強度の比較を行った。図 2.5 に示したように、EB 蒸着法で作製したプラズモニック基板の Au ナノ構造の Au 表面は凹凸を有しており、一方スパッタリング法で作製したプラズモニック基板の Au ナノ構造の Au 表面は平滑である。図 2.20 にサンドイッチイムノアッセイの発光強度の NP 濃度依存性を示す。プラズモニック基板の Au 膜厚は、図 2.6(黒)と図 2.9(緑)に示した反射スペクトルより、プラズモニック基板の共鳴波長が 800 nm 付近を示す Au 膜厚を選定し、EB 蒸着法は Au 膜厚 301 nm、スパッタリング法は Au 膜厚 403 nm とした。図 2.20 において、EB 蒸着法とスパッタリング法で作製したプラズモニック基板はほぼ同じ 800 nm の共鳴波長を持つにも関わらず、スパッタリング法で作製したプラズモニック基板を用いたサンドイッチイムノアッセイの発光強度は、EB 蒸着法で作製したプラズモニック基板を用いた場合に比べて、約 4 倍大きい。これは、スパッタリング法で作製した Au ナノ構造の共鳴波長における電場増強が、EB 蒸着法で作製した Au ナノ構造に比べて大きいことを示しており、スパッタリング法で作製した Au ナノ構造における Au 表面平滑性に起因していると考えられる。また、EB 蒸着法及びスパッタリング法のいずれのプラズモニック基板においても、発光強度の NP 濃度依存性が見られ、NIL プラズモニック基板がバイオセンサに応用できることを実証できた。

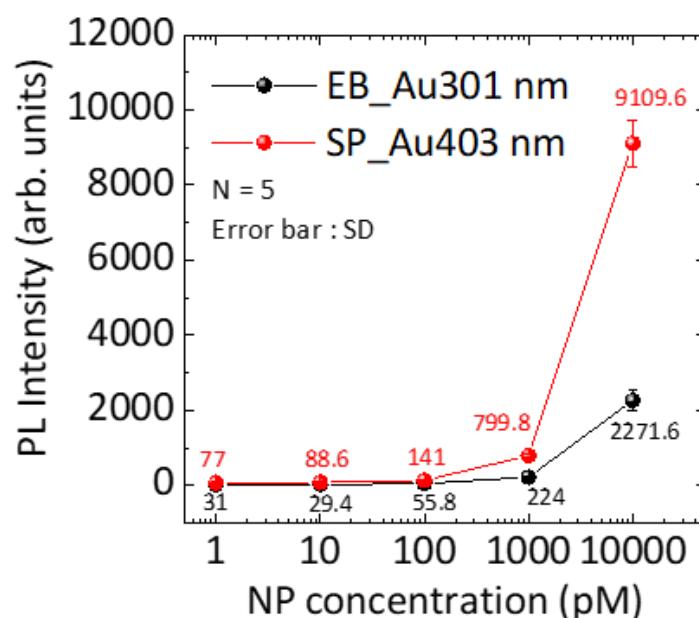


図 2.20 EB 蒸着法及びスパッタリング法で作製したプラズモニック基板を用いたサンドイッチイムノアッセイの発光強度の NP 濃度依存性。共鳴波長が 800 nm 付近になるように、EB 蒸着法及びスパッタリング法の Au 膜厚はそれぞれ 301 nm と 403 nm とした。励起波長と検出波長はそれぞれ 785 nm と 800 nm。

2.4 考察

本章では、ナノインプリント上にスパッタリング法により Au 成膜することにより、プラズモニック基板を作製した。開発した NIL プラズモニック基板は Au ナノ構造における Au 表面が平滑であるため、FDTD シミュレーションにおいて Au ナノ構造を厳密にモデル化することが可能となり、シミュレーションにより実験結果を良好に再現できることを示した。プラズモニック基板のプラズモニックモードを明らかにするため、2つの表面プラズモン共鳴を持つ Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板を用いて、正反射及び拡散反射スペクトル測定による散乱及び吸収スペクトル評価、正反射スペクトルの入射角度依存性評価、シミュレーションによるホットスポット位置及び電場分布の特定を行った。ここでは、2つの共鳴についてプラズモニックモードを考察する。

表 2.1 に各評価における短波長側及び長波長側の表面プラズモン共鳴の評価結果をまとめる。散乱及び吸収スペクトル評価において、散乱強度は長波長側の共鳴は短波長側に比べて約 2 倍大きく、吸収は長波長側の共鳴は短波長側の約 1/2 であり、短波長側の共鳴はダークモード、長波長側の共鳴はブライモードである。シミュレーションによる Au ナノ構造近傍の断面電場分布より、隣接 Au ナノピラー間ギャップにおいて、短波長側の共鳴は2つのホットスポット、長波長側の共鳴は1つのホットスポットを持っており、短波長側の共鳴はマルチポールな高次のキャビティモード、長波長側の共鳴はダイポールライクな最も低次のキャビティモードであることを確認した^{82,103}。一般的に、ダイポールライクな低次モードは遠隔場(far-field)と結合できるブライモードであり、高次モードは遠隔場輻射(far-field radiation)がほとんどないダークモードである¹⁰⁴。散乱及び吸収スペクトル評価と、Au ナノ構造近傍の電場分布はコンシステントな結果であり、短波長側の共鳴はマルチポールライクな高次モードでダークモード、長波長側の共鳴はダイポールライクな低次モードでブライモードであることが確認できた。

表 2.1 Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板における表面プラズモン共鳴評価結果。

	短波長側の 表面プラズモン共鳴 (共鳴波長 563 nm)	長波長側の 表面プラズモン共鳴 (共鳴波長 714 nm)
散乱及び吸収スペクトル	吸収が支配的	散乱も含む
隣接 Au ナノピラー間 ギャップのホットスポット数	2つ	1つ
分散関係	非常に小さい	比較的大きい

次に、実験及びシミュレーションの正反射スペクトルの入射角度依存性評価から、短波長側の共鳴モードは比較的大きな分散であるのに対し、長波長側の共鳴モードは非常に小さい分散であることを確認した。開発した NIL プラズモニック基板は隣接 Au ナノピラーが相互作用する程度に近接しており、規則正しい周期性を持つ(図 2.21)。そのため、隣接間ギャップに局在する共鳴モードに加えて、周期構造の回折次数を反映した共鳴モードを併せ持つ¹⁰⁸⁻¹¹¹。分散関係より、短波長側は比較的大きな分散であるため Au ナノピラー格子の周期性を反映した結合モード、長波長側の分散は非常に小さいため隣接 Au ナノピラー間ギャップに局在したプラズモニックモードであると示唆される¹⁰⁴⁻¹⁰⁷。

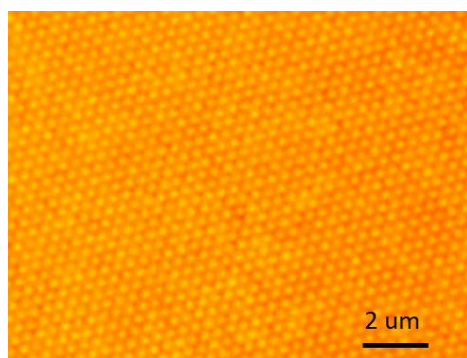


図 2.21 Au 膜厚 386 nm のプラズモニック基板における光学顕微鏡の明視野像。露光時間 1 秒、ND フィルタ 1/16。

以上より、NIL プラズモニック基板のプラズモニックモードは、短波長側の共鳴は Au ナノピラー周期構造を反映したマルチポールライクな高次のダークモード、長波長側の共鳴は隣接 Au ナノピラー間ギャップに局在するダイポールライクな低次のブライドモードであることが明らかとなった。

最後に NIL プラズモニック基板の蛍光検出側バイオセンサへの適用性を考察する。高感度蛍光検出型バイオセンサでは、励起光をできる限り除去するため、ストークスシフトの大きい蛍光体が求められる。プラズモンとの結合により高い発光増強を得るには励起側及び輻射側の発光増強を両立する必要がある、ストークスシフトの大きい蛍光体に適用するためには励起波長及び蛍光波長にプラズモン共鳴波長を持つプラズモニック基板が有効である。加えて、輻射側は検出光として伝搬光を取り出すため、遠隔場(far-field)と結合できるブライドモードである必要がある。今回開発した NIL プラズモニック基板は短波長側がダークモード、長波長側がブライドモードであり、ストークスシフトの大きい蛍光体の励起側及び輻射側の同時増強に必要な「ダブルレゾナンス」及び「長波長側がブライドモード」の特性を満たしていることが確認でき、蛍光検出型バイオセンサの高感度化に大きく貢献できると期待される。

2.5 まとめ

本章では、シャープなプラズモン共鳴を有する NIL プラズモニック基板を開発した。NIL プラズモニック基板は、ナノインプリントフィルム上に Au 成膜することで作製され、Au ナノ構造の設計自由度に加えて、高い大面積均一性、構造再現性、生産性を有している。開発した NIL プラズモニック基板は、Au 表面平滑性を改善することによりプラズモニック特性はシミュレーションにより良好に再現でき、Au ナノ構造近傍の電場分布及び電場集中箇所であるホットスポット位置の特定が可能となった。実験とシミュレーションを組み合わせた、正反射及び拡散反射スペクトル評価、反射スペクトルの角度依存性評価により、短波長側の共鳴は Au ナノピラー周期構造を反映したマルチポールライクな高次のダークモード、長波長側の共鳴は隣接 Au ナノピラー間ギャップに局在するダイポールライクな低次のブライドモードであることが判明した。バイオセンサ応用の可能性を実証するため、SEF を用いたサンドイッチイムノアッセイに NIL プラズモニック基板を適用した。その結果、Au 表面平滑性の改善によるシャープなプラズモン共鳴を持つ NIL プラズモニック基板は発光増強が増大すること、及びインフルフルエンザの核タンパク質を検出できることを確認し、開発した NIL プラズモニック基板が蛍光検出型バイオセンサに適用できることを実証した。NIL プラズモニック基板の Au 表面平滑性を改善することにより、高い発光増強度と、高い大面積均一性、構造再現性、生産性を有するシミュレーションで予測可能な NIL プラズモニック基板の開発に成功し、表面増強蛍光を用いたサンドイッチイムノアッセイに適用できることを実証したことは、実用化を見据えた高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に大きな貢献である。

第3章 プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光増強

3.1 はじめに

量子ドットは、蛍光検出型バイオセンサの蛍光体に一般的に用いられてきた有機蛍光色素に比べて優れた特性を有している⁴⁷。有機蛍光色素は励起光により早期に蛍光劣化が生じるため、蛍光検出型バイオセンサの励起光パワー及び検出積算時間など光検出自由度が小さくデバイスの検出感度向上の大きな阻害要因となっている。量子ドット(特に、Cd や Pb のカルコゲナイド量子ドット)は有機蛍光色素に比べて、はるかに安定した発光特性を有し、加えて、狭い発光バンド、発光波長制御性、広い励起バンドの特徴を持つため有機蛍光色素を置き換える有望な候補と考えられている⁴⁸⁻⁵²。しかしながら、これらの化合物半導体量子ドットの重金属は常に生物医学用途の懸念事項である⁵⁴。そこで、近年、Si 量子ドットは、生物医学応用に潜在的に適した量子ドットとして大きな注目を集めている。ここ10年の間に、Si 量子ドットコロイド溶液を筆頭に Si 量子ドットの特性は着実に改善されており、今では Si 量子ドットの特性は化合物半導体量子ドットに急速に追い付きつつある⁵⁷⁻⁵⁹。

Si 量子ドットのバイオセンサ応用に向けた課題の1つが、エネルギーバンド構造に起因する可視光及び近赤外領域での Si 量子ドットの小さい吸収断面積である⁷⁸。Si 量子ドットの直接吸収は400 nm付近で立ち上がるため、高効率な励起には紫外光が必要となるが、紫外光励起は、バイオセンサの生体分子の劣化及び生体分子の自家蛍光による検出感度低下を引き起こす。この問題の克服するため、金属ナノ構造による表面プラズモンとのカップリングにより、長波長光子による Si 量子ドットの高効率励起が提案されている^{32,92,112}。我々の研究グループでも、プラズモニック基板上に Si 量子ドットを配置することにより Si 量子ドットの励起断面積が著しく増大されることが実証され³⁶、加えて、表面プラズモン共鳴波長を Si 量子ドットの発光波長にチューニングすることにより、パーセル効果による輻射遷移割合の増大も報告されている^{35,113-115}。

これまでの表面プラズモンによる量子ドットの発光増強に関する研究では、金属ナノ構造は幾つかの異なる方法で作製されている^{94,116-119}。最も幅広く用いられているプロセスは電子ビームリソグラフィ(Electron beam lithography; EBL)である^{92,93,112}。EBLは高精度にナノ構造を作製できるプロセスであるため概念実証には適しているが、高コストであるため実用化には適さない。金属ナノ構造の形成のテンプレートとしてナノ粒子の2次元アレイを用いるナノ球体リソグラフィ(Nanosphere lithography; NSL)もしばしば用いられる金属ナノ構造作製プロセスであり^{32,35,36}、高価な設備を必要としないプロセス

であるが、金属ナノ構造の設計自由度が低いこと、プラズモニック特性の制御性が制限され、大面積均一性及び構造再現性が低いこと、実用化には適さない。ナノ球体 2 次元アレイ上に金属を成膜して作製するプラズモニック基板(Film over nanosphere ; FON)も同様に、大面積均一性及び構造再現性に問題がある。

本章では、金属ナノ構造の高い設計自由度に加え、高い大面積均一性、構造再現性及び生産性を有する第 2 章で開発した NIL プラズモニック基板を用いて B,P 同時ドープ Si 量子ドットの発光増強を検討する。本章の研究目的は、NIL プラズモニック基板上に Si 量子ドット単層膜を形成することにより、バイオセンサ応用に必要な長波長光子による励起において、Si 量子ドットの励起断面積と輻射遷移割合の同時増強を実現することである。Layer by Layer(LbL)法により形成した有機ポリマーをスペーサ層として用いることで、Si 量子ドット-Au ナノ構造間の距離を非常に正確に制御する。まず、反射分光法により基板の表面プラズモン共鳴特性を評価し、次に、励起断面積の増大と輻射遷移割合の増大の相対な寄与を分析するため、発光(Photoluminescence ; PL)、発光励起(Photoluminescence excitation ; PLE)、及び発光減衰(Photoluminescence decay ; PL decay)ダイナミクスを調査する。これにより、励起断面積及び輻射遷移割合の同時増強により、Si 量子ドット単層膜の発光が 600 nm 以上の長波長励起下で強く増強されることを実証する。さらに Si 量子ドットの発光増強度の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を明らかにすることにより、Si 量子ドットの最適配置位置を示す。

3.2 実験方法

3.2.1 試料作製方法

近赤外発光 Si 量子ドット単層膜を金属ナノ構造上に、スペーサにより Si 量子ドット - Au ナノ構造間距離を厳密に制御して配置し、Si 量子ドットの発光特性を評価する。作製した試料の構造を図 3.1 に示す。金属ナノ構造は、ナノインプリント(NIL)フィルム上に EB 蒸着により Au 成膜して作製した NIL プラズモニック基板を用いた。スペーサは、Layer by Layer (LbL)法により作製したポリマー層を積層した。Si 量子ドット単層膜は、ホウ素(B)、リン(P)同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液をスピコートにより形成した膜を用いる。各々の作製方法を以下に示す。

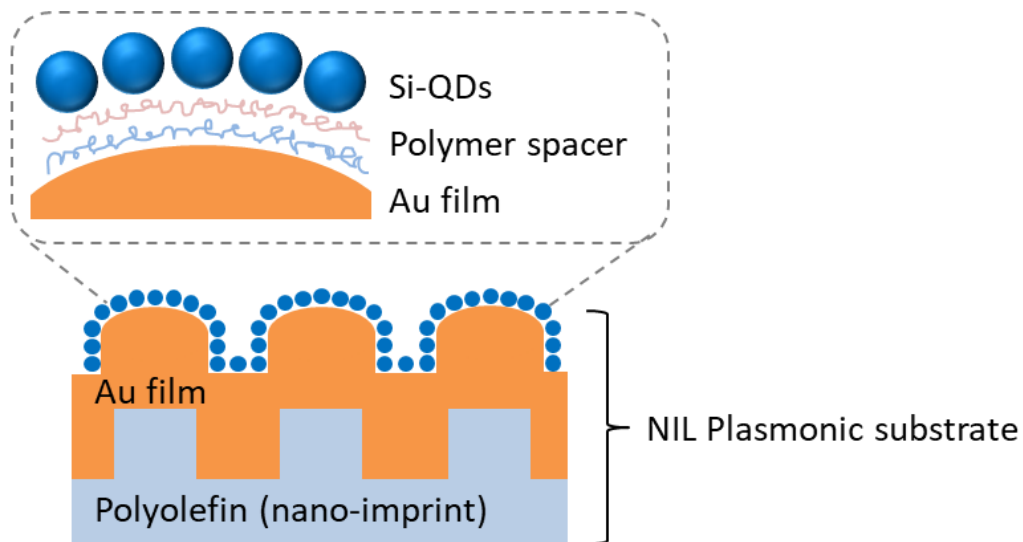


図 3.1 NIL プラズモニック基板上の Au ナノ構造上に、ポリマースペーサ層を介して配置した Si 量子ドット単層膜。Si 量子ドット - Au ナノ構造間の距離はポリマーの膜厚により厳密に制御した。

ホウ素(B)とリン(P)同時ドーピング Si 量子ドット作製方法

B,P 同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液は同時スパッタリング法により作製した。詳細な作製方法は先行研究に詳細に述べられている^{73,76,77,120}。簡単に説明すると、シリコン(Si)、二酸化ケイ素(SiO_2)、酸化ホウ素(B_2O_3)、五酸化二リン(P_2O_5)を同時にスパッタすることで、Si 量子ドットを含む borophosphosilicate glass(BPSG)薄膜がステンレスプレート上に堆積される。BSPG 薄膜をステンレスプレートから剥離し、 1100°C の N_2 ガス雰囲気中で 30 分間アニールすることで、BPSG マトリクス中に同時ドーピング Si 量子ドットを成長させる。次にフッ酸(HF)エッチングにより BPSG マトリクスから Si 量子ドットを抽出し、フッ酸をメタノールで置換しメタノール分散 Si 量子ドットを作製した⁷⁷。

NIL プラズモニック基板作製方法

高い設計自由度、大面積均一性、構造再現性、生産性を有するプラズモニック基板として、第2章で開発したNILプラズモニック基板を用いた。3次元ナノピラー形状を持つオレフィン製ナノインプリントフィルム(FLP230/200-120, SCIVAX)上にEB蒸着機(Eiko)を用いてAuを301 nm成膜した。ナノインプリントフィルムのピラー形状は、ピラー径230 nm、ピラーピッチ460 nm、ピラー高さ200 nmである。EB蒸着における成膜レートは1 Å/sとした。

Layer by Layer 法によるポリマースペーサ層形成方法

Si量子ドット単層膜-Auナノ構造間の距離を、Layer by Layer法により作製したポリマースペーサ層により厳密に制御した。Layer by Layer法(交互積層法)は、簡易な設備、常温常圧下で高精度に膜厚が制御できるポリマー層が作製できる手法として、広く用いられており^{36,121-123}、正または負に帯電したポリマーを交互に積層していき、積層数により膜厚が決定される。以下に詳細な手順を示す。

- ① 自己組織化単分子膜(SAM; Self-Assembled Monolayer)形成: プラズモニック基板の親水性向上と基板表面を正に帯電させるため、プラズモニック基板上にSAM膜を形成する。まず、プラズモニック基板を10 mm²に切断し、基板表面洗浄のためにUVオゾンクリーナー(UV-1, SAMCO)を用いて、基板加熱なしで20分間UVオゾン処理を行う。6-Amino-1-hexanethiol, hydrochloride(6-AHT, Dojindo Laboratories)をエタノールで1 mMに希釈したSAM溶液に、プラズモニック基板を暗所で一晩浸漬させる。その後、基板を取り出しエタノールと純水で洗浄し、N₂ブローで乾燥させる。
- ② ポリマー溶液調整: 負に帯電したポリマーとしてPSS; Poly(sodium 4-styrenesulfonate)(Sigma Aldrich)、正に帯電したポリマーとしてPDDA; Poly(diallyldimethylammoniumchloride)(Sigma Aldrich)を用いた^{36,124-126}。PSS200 mgまたはPDDA1000 μLに塩化ナトリウム5.84gを加え、水200 mLに溶解させ、超音波分散器を用いて十分に攪拌する。
- ③ ポリマー層形成: 6-AHTによるSAM膜を形成したプラズモニック基板表面は正に帯電しているため、まず負に帯電したPSS膜を形成する。SAM膜を形成したプラズモニック基板をポリマー溶液に20分間浸漬する。その後、大量の水(1L)を入れたビーカーを用いて基板洗浄し、N₂ブローで乾燥させる。その後、同様のプロセスでPDDA膜を形成し、十分に水洗し、乾燥させる。
- ④ ③のプロセスを必要なだけ繰り返し、負と正に帯電したポリマー層を交互に堆積させる。Si量子ドットは負に帯電しているため、最後は必ず正に帯電したPDDA膜で終了する。

Si 量子ドット単層膜の作製方法

Si 量子ドット単層膜は、プラズモニック基板上に B,P 同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液をスピコートすることにより作製した。SAM 膜を形成した 10 mm²のプラズモニック基板(L(0))上、ポリマースペーサ層を 2 層、4 層、6 層、8 層、10 層、12 層、14 層形成したプラズモニック基板(L(2)~L(14))、及び比較対象として Silica 基板上に、0.2 mg/mL にエタノール希釈した Si 量子ドットコロイド溶液を 10 μ L 滴下し、スピコートを行った。スピコートは 2 段階で行い、1st ステップは 500rpm で 5 秒、2nd ステップは 1500rpm で 30 秒とした。また、Silica 基板は Si 量子ドット単層膜作製の前処理として、アセトンで 5 分間超音波洗浄した後、イソプロピルアルコール(IPA)で洗浄し、UV オゾンクリーナー(UV-1, SAMCO)を用いて基板温度 110 $^{\circ}$ C で 20 分間基板洗浄を行った。

3.2.2 構造評価方法

透過型電子顕微鏡観察

Si 量子ドットの構造評価を、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope ; TEM, JEM-2100F, JEOL)を用いて行った。より詳細な構造評価のため、高分解 TEM(High Resolution TEM ; HR-TEM)像を用いて評価した。観察サンプルは、カーボンコーティングした Cu メッシュに希釈した Si 量子ドットコロイド溶液を滴下することで作製した。

走査型電子顕微鏡観察

ナノインプリントフィルム、及びナノインプリントフィルム上に EB 蒸着により Au 成膜し作製したプラズモニック基板の構造評価を、走査型電子顕微鏡(Scanning Electron Microscope ; SEM)(HELIOS NANOLAB G3 UC, FEI)を用いて行った。

可視分光エリプソメトリー

プラズモニック基板上に形成したポリマースペーサ層、及び Si 量子ドット単層膜の膜厚を可視分光エリプソメーター(Auto SE, HORIBA)を用いて評価した。光源には、入射角が 70 $^{\circ}$ で固定のハロゲンランプを用いた。測定波長範囲は 450 nm-1000 nm、スポットサイズは 250 \times 250 μ m²とした。

薄膜の膜厚の見積もりの際に必要となるモデルを図 3.2 に示す。誘電率は、PDDA は 1.41、PSS は 1.50 とし¹²⁷、ポリマー中での PDDA と PSS の体積比が 1:1 であると仮定することで、ポリマー層の誘電率は 1.455 に設定した。

Si 量子ドットの誘電率には、以下に示す Bruggeman の有効媒質近似を用いた¹²⁸。

$$f_{Si} \frac{\epsilon_{Si} - \epsilon_{eff}}{\epsilon_{Si} + 2\epsilon_{eff}} + (1 - f_{Si}) \frac{\epsilon_{air} - \epsilon_{eff}}{\epsilon_{air} + 2\epsilon_{eff}} = 0$$

ここで ϵ_{Si} はバルク Si の誘電率、 f_{Si} は Si 量子ドットの充填率、 ϵ_{air} は空気の誘電率(=1)であり、上記の式より Si 量子ドット層の有効な誘電率 ϵ_{eff} を求める。そのためには Si 量子ドットの充填率である f_{Si} が必要となり、 f_{Si} には過去の実験から予想されている 25%と 30%の 2つの値を用い、Si 量子ドットの有効な誘電率を求めた¹²⁹⁾。

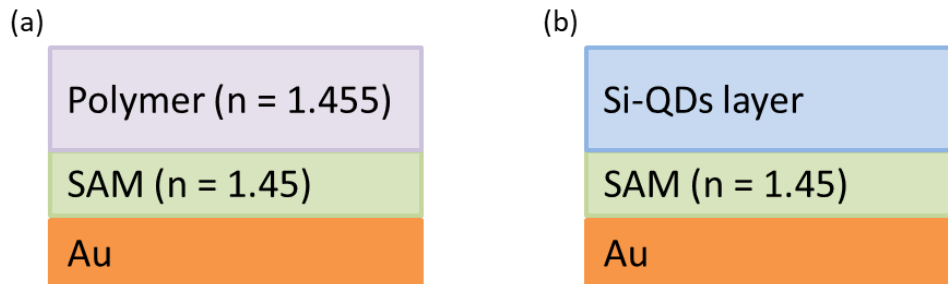


図 3.2 エリプソメトリーにおける解析モデル。(a)ポリマースペーサ層、(b)Si 量子ドット層。

3.2.3 反射スペクトル測定方法

プラズモニック基板上のポリマースペーサ層を 0 層から 14 層まで変化させ、その上に Si 量子ドット単層膜を配置したサンプルの反射スペクトルを紫外可視近赤外分光光度計(SolidSpec-3700, SHIMADZU)を用いて測定した。入射角は 45° と 60° とし、測定波長範囲は 180 nm-1600 nm とした。

3.2.4 発光特性評価方法

発光励起スペクトル測定

Si 量子ドットの発光励起スペクトル(Photoluminescence Excitation Spectrum ; PLE)測定には、モジュール型蛍光分光測定装置(Fluorolog-3, HORIBA)を用いた。励起光源はダブルモノクロメーターで分光された 450 W の Xe ランプからの光を用いた。励起光の波長範囲は 300 nm-700 nm とし、シングルモノクロメーターで分光された発光は光電子増倍管(Photomultiplier: PMT)(500-850 nm)で検出される。ロングパスフィルタ(LP425, HOYA)を検出側分光器のスリット直前に配置することで、励起光の散乱光を除去した。サンプルは Silica 上に形成した Si 量子ドット単層膜を用いた。図 3.3 に発光励起スペクトル測定ジオメトリを示す。入射角は 60° とし、検出光は入射光と 90° をなす方向の光とした。

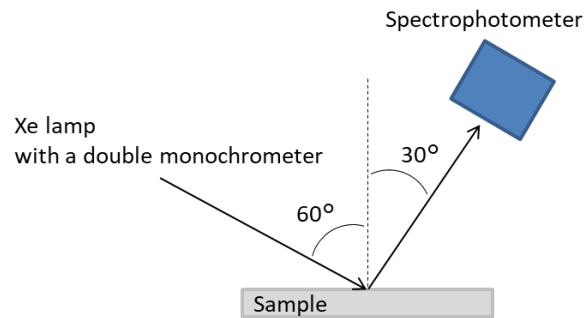


図 3.3 発光励起スペクトル測定ジオメトリ。

発光スペクトル測定

図 3.4 に発光スペクトル測定概略図を示す。励起光源には波長 405 nm 及び 641 nm の半導体レーザー(CUBE, COHERENT)を用いた。レーザー直後にはそれぞれ 405 nm 及び 641 nm のバンドパスフィルタ(TECHSPEC Bandpass Filter, Edmund)を配置し、アパーチャと焦点距離 100 mm のレンズを用いてサンプル基板に集光した。入射角は 45° とし、検出光は励起光と 45° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には手前から順番にロングパスフィルタ(575 nm、675 nm)とダイクロイックフィルタ(J52529, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。分光器の中心波長は 800 nm に設定した。検出器には液体窒素で冷却した Charge Coupled Device(Roper Scientific)を使用した。

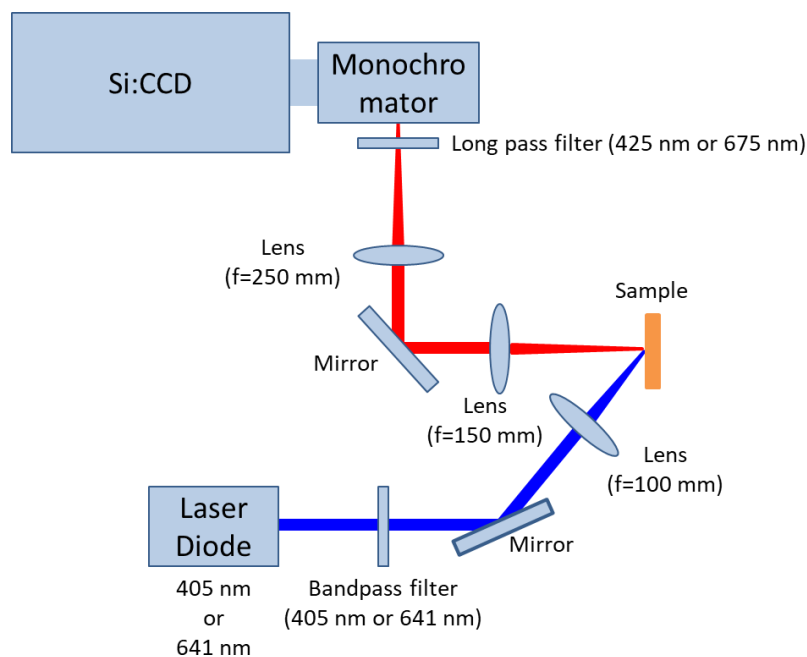


図 3.4 発光スペクトル測定系の概略図。

発光減衰スペクトル測定

図 3.5 に発光減衰スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。このレーザー光をパルスジェネレーター(PG-230, IWATSU)により、パルス幅 0.6 ms のパルス光にした。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルタ(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いてサンプル基板の上に集光した。入射角は 45° に、検出光は入射光と 45° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には、425 nm のロングパスフィルタ(High Performance OD5 Longpass Filters 425 nm, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。分光器の中心波長は 700 nm に設定した。検出器には gated image intensified CCD (iCCD) (PI-Max, Princeton Instrument)を用いた。時間分解能は 1 μ s とした。

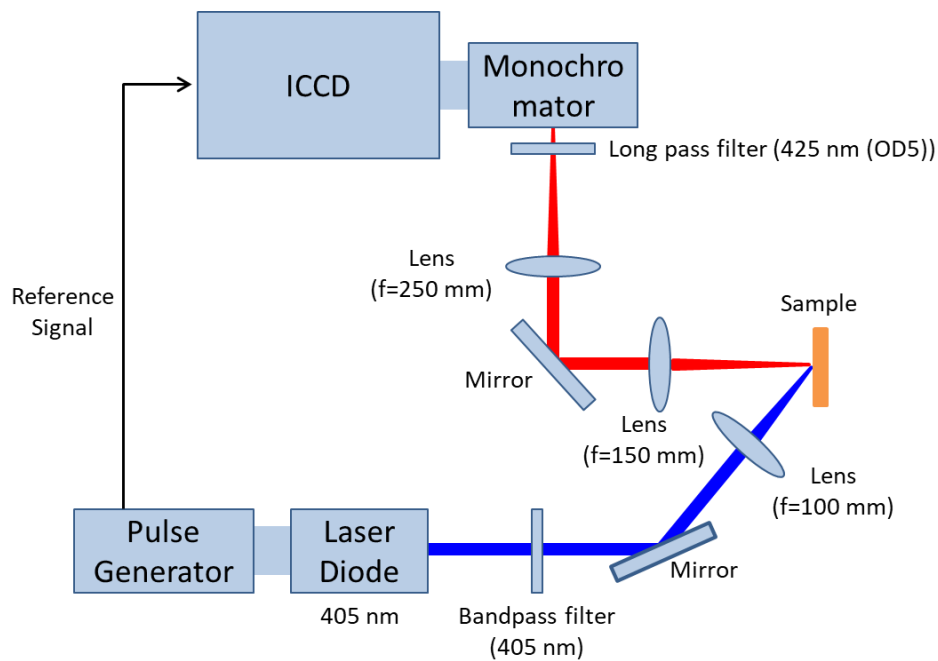


図 3.5 発光減衰スペクトル測定系の概略図

3.3 実験結果

3.3.1 B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの評価

Si 量子ドット単層膜形成に用いた B,P 同時ドーピング Si 量子ドットについて、目視及び TEM 観察による構造評価、発光励起スペクトル及び発光スペクトル測定による発光特性評価を行う。

構造評価

Si 量子ドット単層膜形成に B,P 同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液を用いた^{72,76,77,120}。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、B と P が高濃度にドーピングされた表面層を有し^{130,131}、これにより表面に負の表面電位を持つため、静電斥力により極性溶媒中で凝集を抑制している。そのため、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは有機分子なしで良好な水溶液分散性を有する^{76,77}。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、粒径により発光波長を可視域～近赤外域で制御でき、水溶液中の幅広い pH 範囲で安定した発光特性を有する^{77,120}。そのため、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは蛍光検出型バイオセンサを始めとしたバイオ応用に非常に適している。

図 3.6 にメタノール中の B,P 同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液の写真を示す。Si 量子ドットは完全に分散しているので、溶液は非常に透明で 1 cm² 石英セルの背後にある文字も鮮明に読むことができる。



図 3.6 メタノール中の B,P 同時ドーピング Si 量子ドットコロイド溶液の写真。

図 3.7(a) にカーボンコーティングした Cu メッシュに Si 量子ドットコロイド溶液を滴下して作製した B,P 同時ドーピング Si 量子ドット単層膜の透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope ; TEM)像を示す。Si 量子ドットが高密度に集まった単層膜が形成できており、3次元凝集体は観察されない。図 3.7(b) に Si 量子ドット高分解 TEM 像を示す。高分解 TEM 像の格子縞は、Si 結晶の {111} 面と一致しており、Si 量子ドットが Si ナノ結晶であることがわかる。TEM 像から Si 量子ドットの粒径を見積もると、平均直径 3.9 nm、標準偏差 0.8 nm である⁷⁷。

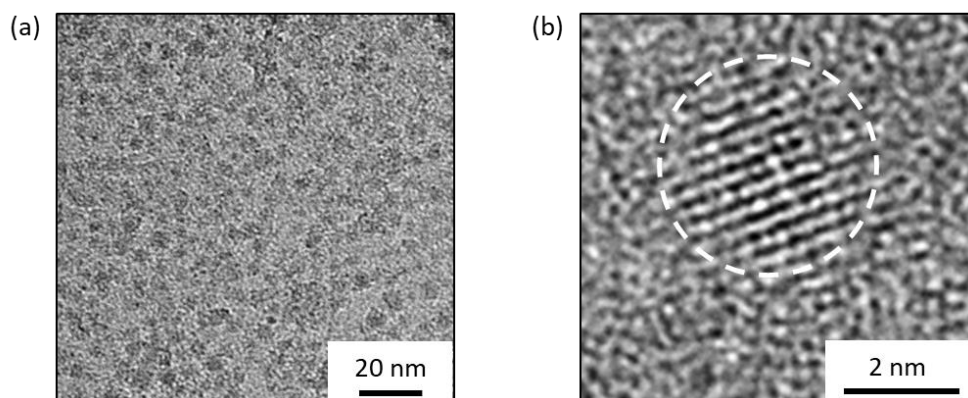


図 3.7 (a)カーボンコーティング Cu メッシュ上に形成した Si 量子ドット単層膜の TEM 像、(b)Si 量子ドットの高分解 TEM 像。

発光特性評価

図 3.8 に B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの発光スペクトル(Photoluminescence Spectrum; PL)、発光励起スペクトル(Photoluminescence Excitation Spectrum; PLE)を示す。発光スペクトルの励起波長は 405 nm、発光励起スペクトルの検出波長は 850 nm とした。サンプルは Silica 基板上に形成した Si 量子ドット単層膜を用いた。

発光スペクトルは、800 nm 付近をピークに持ち、ブロードなスペクトルである。Si 量子ドットの量子収率は約 3.9% である⁷⁾。発光励起スペクトルは 600 nm 以下の波長で立ち上がっており、可視光領域での励起効率は非常に小さいことがわかる。そのため、Si 量子ドットの励起には紫外光が必要であるが、蛍光検出型バイオセンサでは生体分子が自家蛍光を発するため課題となっている。そこで、本章ではプラズモンとの結合により長波長光子における Si 量子ドットの高効率励起を検討する。

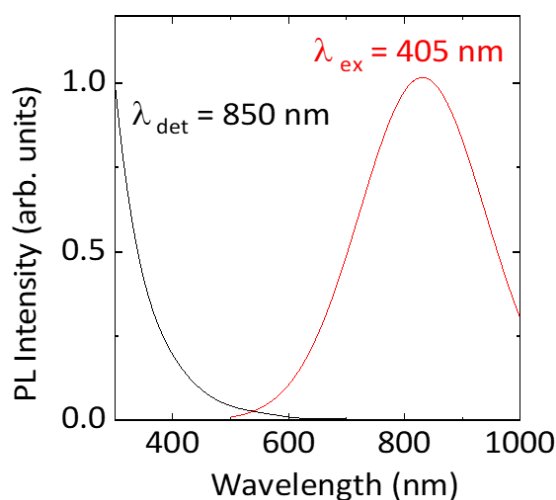


図 3.8 Si 量子ドット単層膜の発光励起スペクトル(黒線)と発光スペクトル(赤線)。発光励起スペクトルの検出波長は 850 nm、発光スペクトルの励起波長は 405 nm。

3.3.2 構造評価

走査型電子顕微鏡観察

図 3.9(a)に本研究で用いたポリオレフィン製ナノインプリント (Nano-Imprint Lithography ; NIL) フィルム (FLP230/200-120, SCIVAX)の走査型電子顕微鏡 (Scanning Electron Microscope ; SEM)像を示す。ナノインプリントフィルムのナノ構造は、ピラー (円柱)形状であり、ピラー径 230 nm、ピラーピッチ 460 nm、ピラー高さ 200 nm である。図 3.9(b)にナノインプリントフィルム上に EB 蒸着法により Au301 nm を成膜し、作製した NIL プラズモニック基板を示す。Au ナノ構造における Au 表面は Au のアイランド成長のため凹凸が見られる。

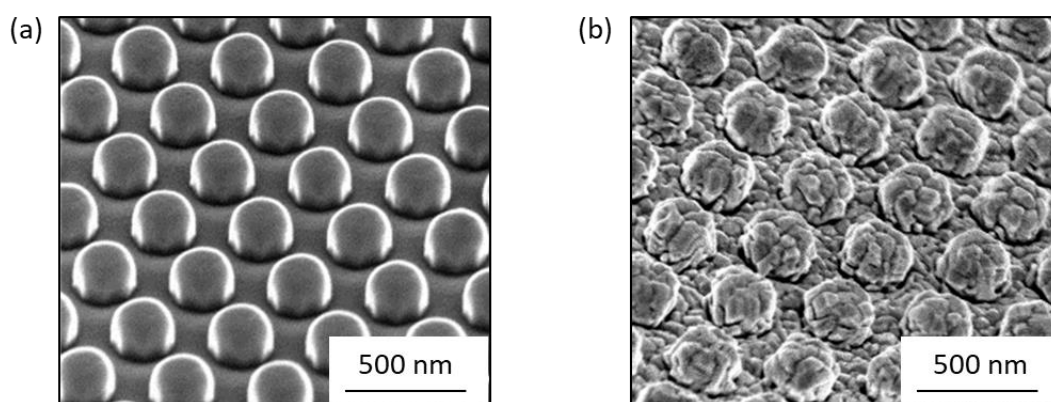


図 3.9 (a)ポリオレフィン製ナノインプリントフィルムの SEM 像、(b)ナノインプリントフィルム上に EB 蒸着により Au301 nm を成膜して作製した NIL プラズモニック基板の SEM 像。

可視分光エリプソメトリー測定

本章では、図 3.1 に示したように、NIL プラズモニック基板の上に、Layer by Layer 法により厳密に膜厚を制御したポリマースペーサ層を形成し、その上にスピコートにより Si 量子ドット単層膜を形成し、サンプルを作製した。Si 量子ドット発光特性の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を評価するためには、Layer by Layer 法によるポリマースペーサ層の膜厚と、Si 量子ドットの単層膜がナノレベルで制御でき形成されていることが極めて重要である。そこで、ポリマースペーサ層と Si 量子ドット層の膜厚を、エリプソメトリーにより測定した。なお、ナノ構造を持たない平滑な Au 表面上に形成したポリマースペーサ層を用いて測定した。

図 3.10 にポリマースペーサ層膜厚のポリマー層数依存性を示す。今回の実験では負に帯電した Si 量子ドット単層膜をポリマースペーサ層の上に形成するため、ポリマースペーサ層は正に帯電した PDPA ポリマー層で終了させる必要がある。そのため、ポリマースペーサ層数は全て偶数で終了している。ポリマー層数の増加に伴いポリマース

ペーサ層膜厚は増加し、0 層から 14 層まで変化させることでポリマースペーサ層は 1 nm から 84 nm まで変化していた。これより、Layer by Layer 法によりポリマースペーサ層を形成することで、層数によりポリマースペーサ層の膜厚をナノレベルで制御できていることを確認できた。なお、ポリマースペーサ層の膜厚増大が線形ではなく、非線形的に増大するのは、ポリマー層数増加に伴いポリマー層表面のラフネスが増加したため 1 度のポリマー層形成で吸着するポリマー量が増加したことが原因と考えられる。

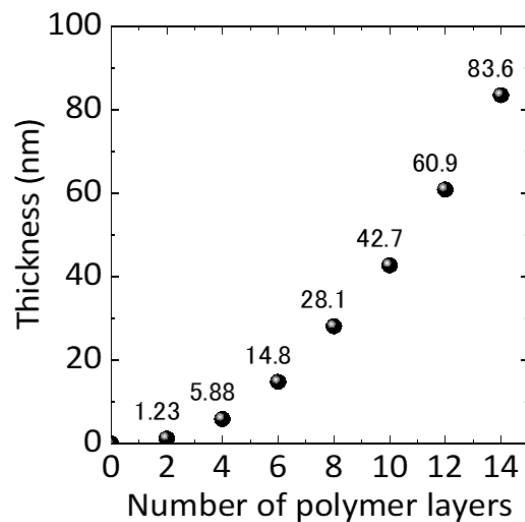


図 3.10 Layer by Layer 法で形成したポリマースペーサ層膜厚のポリマー層数依存性。

図 3.11 に Si 量子ドット層膜厚のスピコート回数依存性を示す。なお、Si 量子ドット単層膜の発光増強に用いるサンプルはスピコート回数が 1 回であるが、今回は Si 量子ドット層膜厚測定のためにスピコート回数を 1 回～4 回と変化させ、Si 量子ドット層膜厚を測定した。ナノ構造を持たない平滑な Au 表面上に形成した Si 量子ドット層を測定し、解析は Si 量子ドット層の充填率を 0.25 と 0.3 の 2 つの値を用いて Si 量子ドット層膜厚を計算した。Si 量子ドット層の膜厚は、充填率 0.25 では傾き 4.7 nm/回で、充填率 0.3 では傾き 3.8 nm/回で、スピコート回数に対しほぼ線形に増加していた。このエリプソメトリーで得られた傾きの値は、図 3.7 に示した TEM 像からの見積もった Si 量子ドットの平均直径は 3.9 nm、標準偏差 0.8 nm と非常に近い値である。以上より、スピコートにより Si 量子ドット層をナノレベルで制御できており、スピコート 1 回により Si 量子ドット単層膜が形成できていることを確認できた。

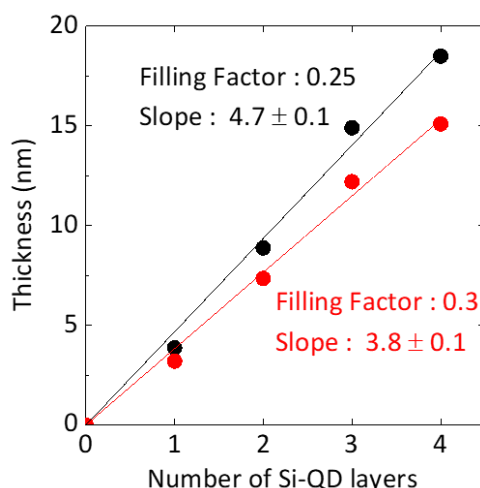


図 3.11 Si 量子ドット層膜厚のスピンコート回数依存性。

3.3.3 反射スペクトル評価

プラズモニック基板上にポリマースペーサ層を介し Si 量子ドット単層膜を形成したサンプル(以下、Si 量子ドット単層膜/ポリマースペーサ層/プラズモニック基板と記す)の特性評価を反射スペクトル測定により行った。反射スペクトル測定は、紫外可視近赤外分光光度計(SolidSpec-3700, SHIMADZU)を用いて、入射角 45° と 60° に設定し、波長範囲 180 nm-1600 nm で行った。図 3.12(a)に入射角 45° 、(b)に入射角 60° の反射スペクトルを示す。ポリマースペーサ層は 0 層(L(0))から 14 層(L(14))まで変化させた。

ポリマースペーサ層なしでプラズモニック基板上に直接 Si 量子ドット単層膜を形成したサンプル(L(0))の反射スペクトルでは、3つのディップが見られる。波長 500 nm 以下の反射率ロスは Au のバンド間遷移に起因するため、Si 量子ドットの発光増強には寄与しない。650 nm 付近のシャープなディップと、800 nm 付近のブロードなディップは、表面プラズモンの励起に起因する。800 nm 付近のディップは、図 3.8 に示した Si 量子ドットの発光スペクトルと重なるため、このプラズモニックモードと結合することにより強い輻射増強が期待できる。一方、650 nm 付近のディップは、Si 量子ドットの励起光をこの波長と近いものを選択する場合には、Si 量子ドットの励起断面積の増大が期待できる。反射スペクトルはポリマースペーサ層の層数に大きく依存している。650 nm 付近のディップはポリマースペーサ層の膜厚増加に伴い、わずかに長波長シフトしている。一方、800 nm 付近のブロードなディップはポリマースペーサ層の膜厚増加に伴い、大きく長波長シフトしており、ポリマースペーサ層 14 層(L(14))では 1300 nm 付近にまで達している。長波長シフトは Au ナノ構造付近の誘電率増加によって説明できる。800 nm 付近の長波長側のディップは周囲の誘電率変化に敏感であることより、このモードはダイポールライクな低次モードと考えられる。一方、650 nm 付近のマルチポールライクな高次モードと考えられる。

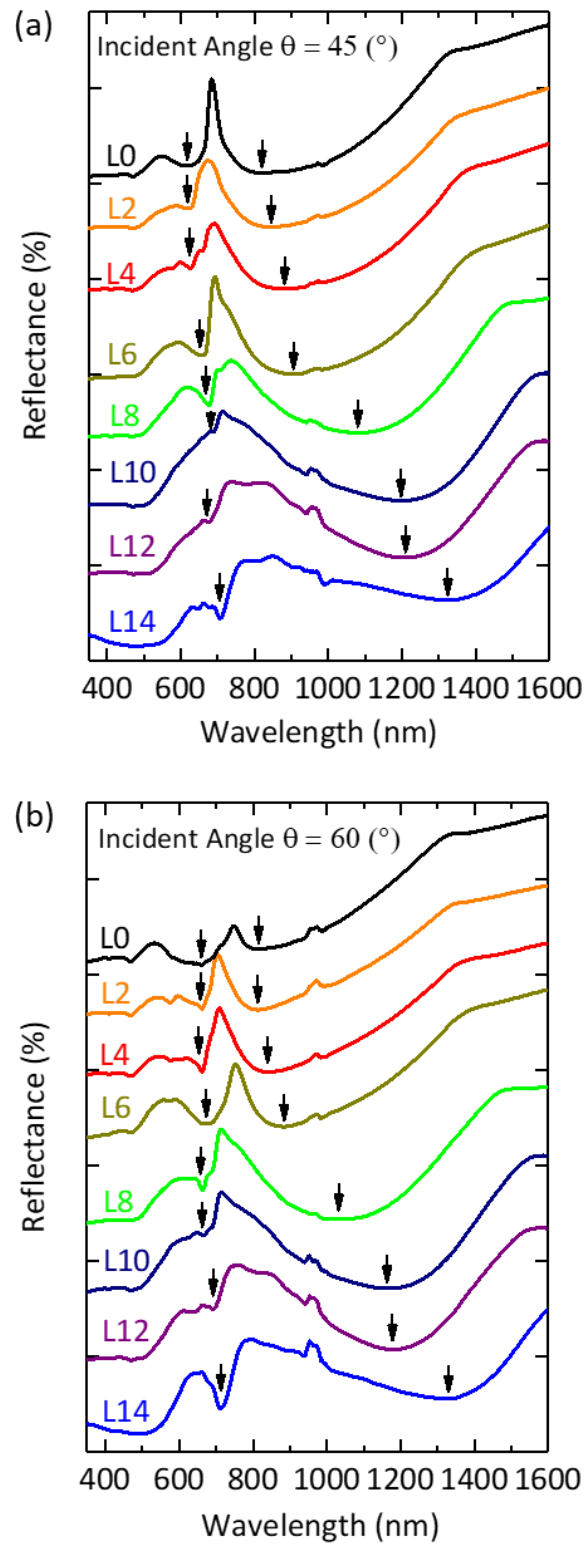


図 3.12 (a)入射角 45° 、(b)入射角 60° における Si 量子ドット単層膜／ポリマースペーサ層／プラズモニック基板の反射スペクトル。ポリマースペーサ層は 0 層から 14 層まで変化させた。

3.3.4 発光励起スペクトル評価

プラズモニック基板による Si 量子ドットの励起断面積の増大による励起側発光増強の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を明らかにするため、異なるポリマースペーサ層数(n)を有する、Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板の発光励起スペクトルを測定した。ポリマースペーサ層数は0(L(0))~14層(L(14))とし、検出波長は 850 nm、励起光の入射角は 60° と設定した。比較検討のため、プラズモニック基板の代わりに、ナノ構造を有さない平滑なオレフィン製フィルムの上に EB 蒸着により Au301 nm を成膜した平滑な Au 基板(AuFlat)と、Silica 基板(Silica)の Si 量子ドット単層膜の発光励起スペクトルも測定した。また、プラズモニック基板上及び AuFlat 基板上の Si 量子ドットの発光強度を、Silica 基板上の Si 量子ドットの発光強度で割ることにより(PL/PL_{silica})、発光増強度(Enhancement Factor)スペクトルを求めた。

図 3.13 に Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板、Si 量子ドット/AuFlat 基板、Si 量子ドット/Silica 基板の発光励起スペクトルを示す。なお、縦軸は Log スケールである。図 3.14 に Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板、Si 量子ドット/AuFlat 基板の発光増強度スペクトルと、入射角 60° で測定した反射スペクトル(線)を示す。図 3.15 に発光励起スペクトル及び発光増強度スペクトルを比較するため、Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n = 0, 4, 8, 14)/プラズモニック基板、Si 量子ドット/AuFlat 基板、Si 量子ドット/Silica 基板のデータを同一グラフにプロットしたものを示す。

発光励起スペクトルに関して、Si 量子ドット/Silica 基板では、励起波長が長波長になるに伴い発光強度は単調減少し、励起波長 500 nm 以上ではデータはかなりばらついている。Si 量子ドット/AuFlat 基板では、発光強度は Silica 基板上に比べ著しく小さくなり、励起波長 500 nm 以上では信頼できるデータは取得できていない。Si 量子ドット/ポリマースペーサ層/プラズモニック基板では、発光励起スペクトルの形状は強く改変されている。

発光増強度スペクトルを用いてプラズモニック基板上の Si 量子ドットの発光励起スペクトル改変を分析すると、プラズモニック基板上の Si 量子ドットの発光強度は Silica 基板上に比べ大きく増大しており、特に励起波長 500 nm 以上での増大が著しい。発光増強度スペクトルと反射スペクトルを、L(0)を例に比較すると、励起波長 650 nm 付近の強い増強は、反射スペクトルのディップ(矢印)と良好に一致している。これは、Si 量子ドットの励起側の発光増強は、Au ナノ構造に由来する表面プラズモン共鳴により電場が増強され、それに伴い Si 量子ドットの励起断面積が増強されたことを示唆している。L(0)以外でも、発光増強度スペクトルのピークと反射スペクトルのディップの波長は概ね一致している。

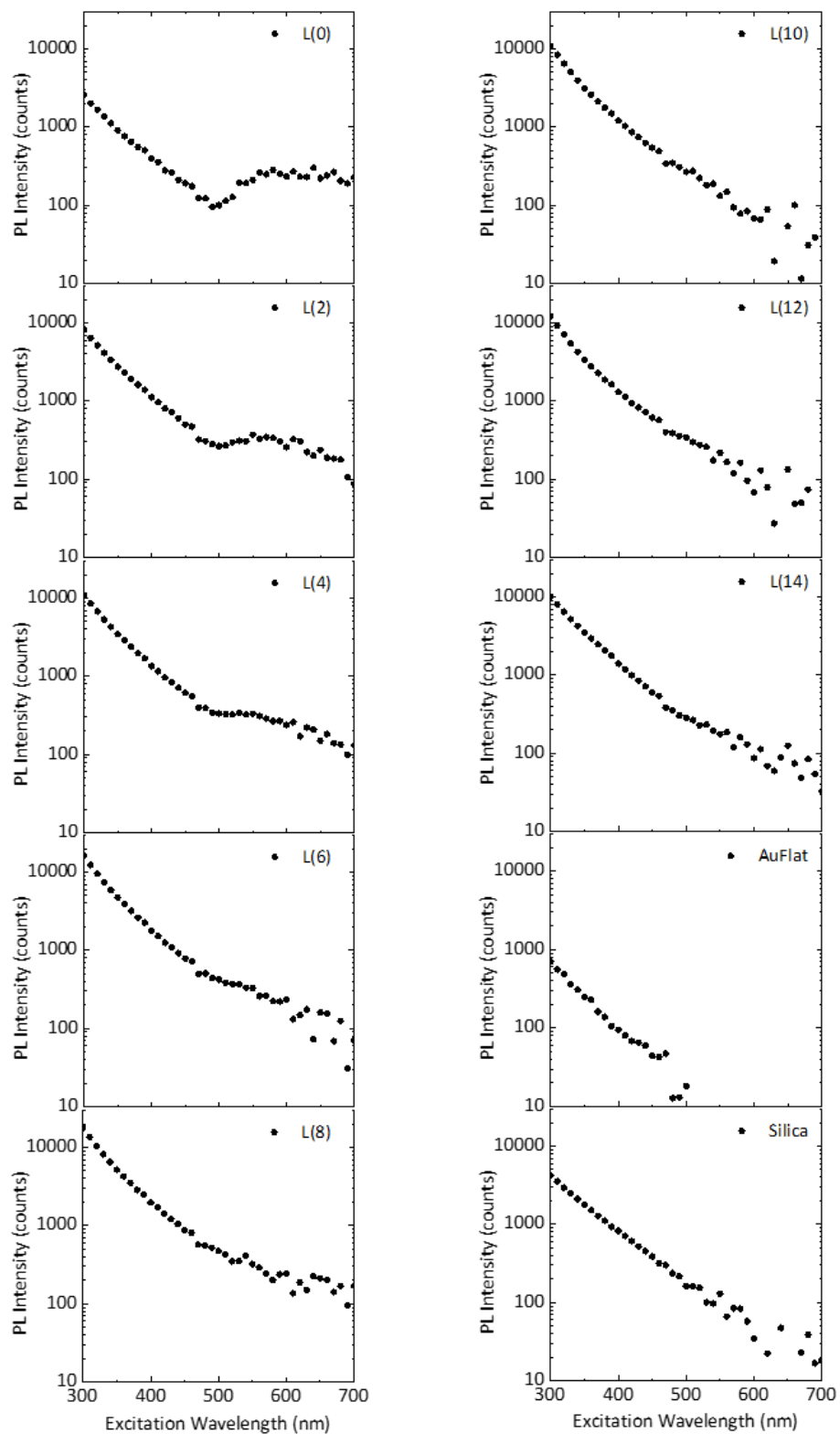


図 3.13 Si 量子ドット／ポリマースペーサ層 L(n)／プラズモニック基板の発光励起スペクトル。入射角 60° 、検出波長 850 nm。比較として Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータも示す。

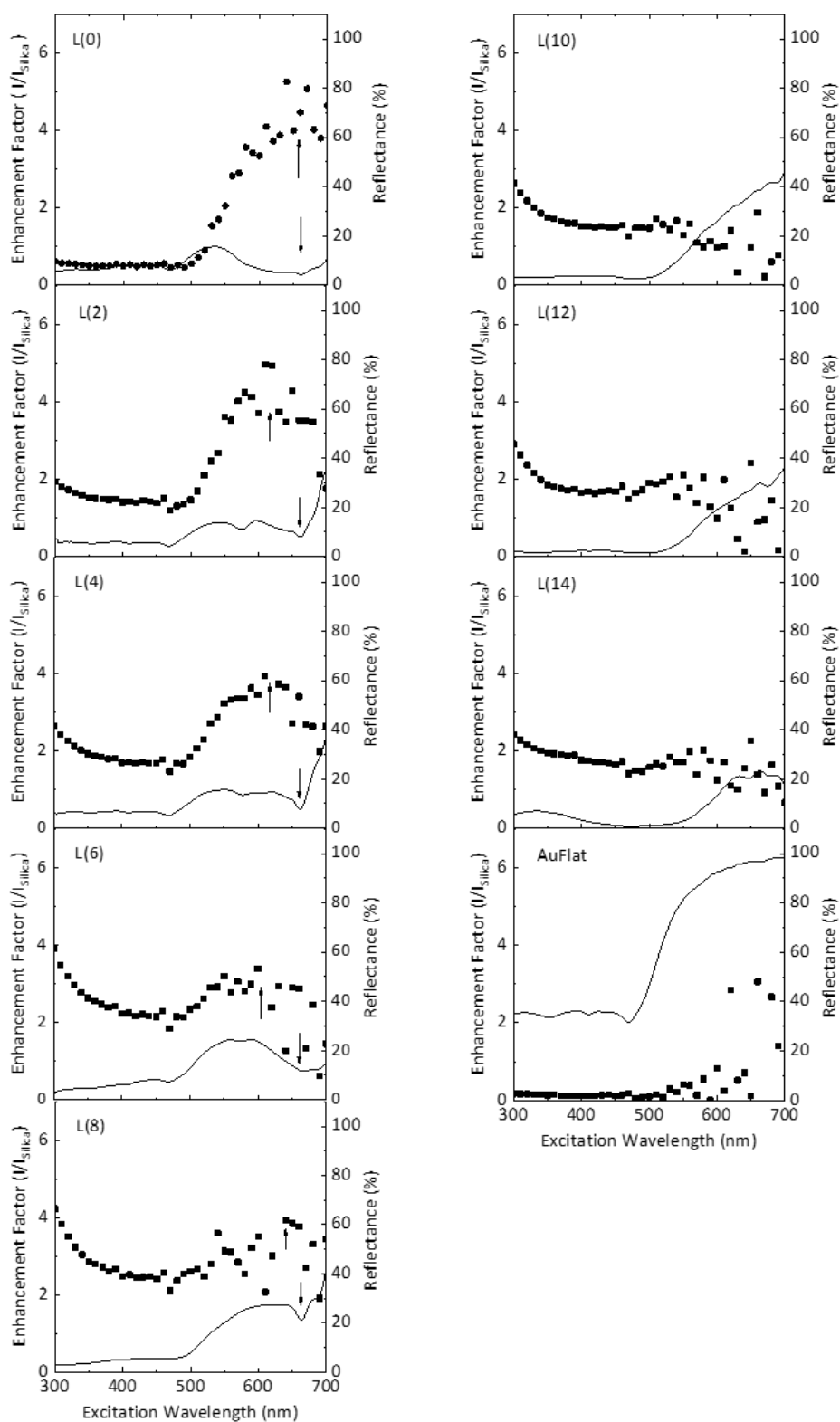


図 3.14 Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板の発光増強度スペクトル(点)と反射スペクトル(線)。入射角 60° 、検出波長 850 nm。比較として Si 量子ドット/AuFlat 基板、Si 量子ドット/Silica 基板のデータも示す。

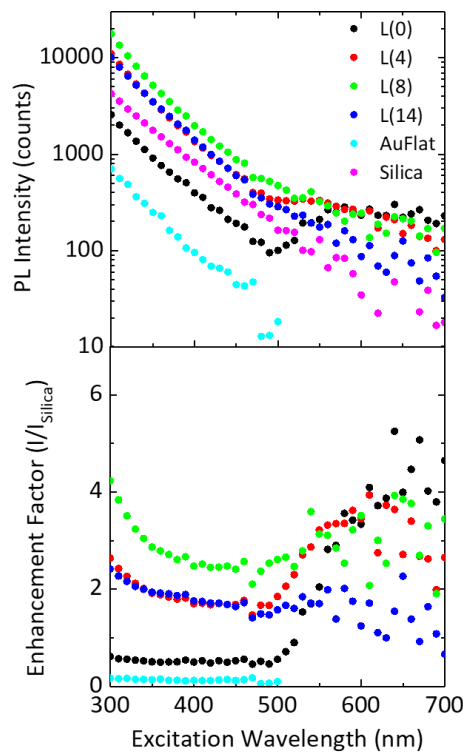


図 3.15 Si 量子ドット／ポリマースペース層 $L(n=0, 4, 8, 14)$ ／プラズモニック基板の (a)発光励起スペクトル、(b)発光増強度スペクトル。入射角 60° 、検出波長 850 nm 。比較として、Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータを示す。

3.3.5 発光スペクトル評価

プラズモニック基板による Si 量子ドットの輻射遷移割合の増大による輻射側の発光増強の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性、及び、励起波長依存性を明らかにするため、異なるポリマースペース層数(n)を有する、Si 量子ドット／ポリマースペース層 $L(n)$ ／プラズモニック基板の発光スペクトルを、2つの励起波長 405 nm と 641 nm を用いて測定した。ポリマースペース層数は $0(L(0))\sim 14$ 層($L(14)$)とし、励起光の入射角は 45° と設定した。比較検討のため、平滑な Au 基板(AuFlat)と、Silica 基板(Silica)の Si 量子ドット単層膜の発光スペクトルも測定した。また、プラズモニック基板上及び AuFlat 基板上の Si 量子ドットの発光強度を、Silica 基板上の Si 量子ドットの発光強度で割ることにより(PL/PL_{silica})、発光増強度(Enhancement Factor)スペクトルを求めた。

図 3.16 に Si 量子ドット／ポリマースペース層 $L(n)$ ／プラズモニック基板における発光スペクトルと、発光増強度スペクトルを示す。なお、発光スペクトルは Silica 基板上の Si 量子ドットのピーク発光強度で規格化している。(a)は励起波長 405 nm 、(b)は励起波長 641 nm であり、入射角はいずれも 45° である。図 3.17 に励起波長 405 nm における発光増強度スペクトルと反射スペクトルを、図 3.18 に励起波長 641 nm における発

光増強度スペクトルと反射スペクトルを示す。入射角は全て 45° である。

図 3.12(a)に示した入射角 45° における反射スペクトルより、650 nm 付近のシャープなディップと、800 nm 付近のブロードなディップが見られ、いずれもプラズモン共鳴に起因している。発光スペクトル測定では励起光として 405 nm と 641 nm の 2 波長を用いたが、励起波長 641 nm の場合は、反射スペクトルの 650 nm 付近のシャープなディップと波長がほぼ一致しているため吸収断面積増大による励起側発光増強と、Si 量子ドット発光波長 800 nm と反射スペクトルの 800 nm 付近のブロードなディップの波長一致するため輻射遷移割合増大による輻射側発光増強の影響を受ける。一方、励起波長 405 nm の場合は、励起側発光増強はなく、輻射側発光増強の影響のみを受ける。そのため、ここでは輻射側発光増強の影響のみを分析するため、励起波長 405 nm のデータについて以下に議論する。

図 3.16(a)の励起波長 405 nm の発光スペクトルより、プラズモニック基板上の Si 量子ドットの発光強度は、Silica 基板上の発光強度と比べて大きく増強されている。その最大発光増強はポリマースペース層を 8 層(L(8))であり、Silica 基板上の約 9 倍に増強されている。加えて、発光スペクトル形状は大きく改変されており、特にポリマースペース層 14 層(L(14))で顕著である。一方、平滑な Au 基板上の Si 量子ドット(AuFlat)の発光強度は、Silica 基板以上に比べて大きく減少している。図 3.16(b)より、励起波長 405 nm における Si 量子ドット/ポリマースペース層 L(n = 0, 4, 8, 14)/プラズモニック基板、及び Si 量子ドット/AuFlat 基板の発光スペクトルを、Si 量子ドット/Silica 基板で割った発光増強度スペクトルは、ポリマースペース層の層数に強く依存している。

図 3.17 の励起波長 405 nm における発光増強度スペクトルと反射スペクトルの比較より、発光増強度スペクトルのピークは反射スペクトルのディップの波長はかなり良好に一致している。これより、発光スペクトル形状の著しい改変は、プラズモニック基板の表面プラズモンとのカップリングによる Si 量子ドットの輻射遷移割合の改変に起因している¹³²。

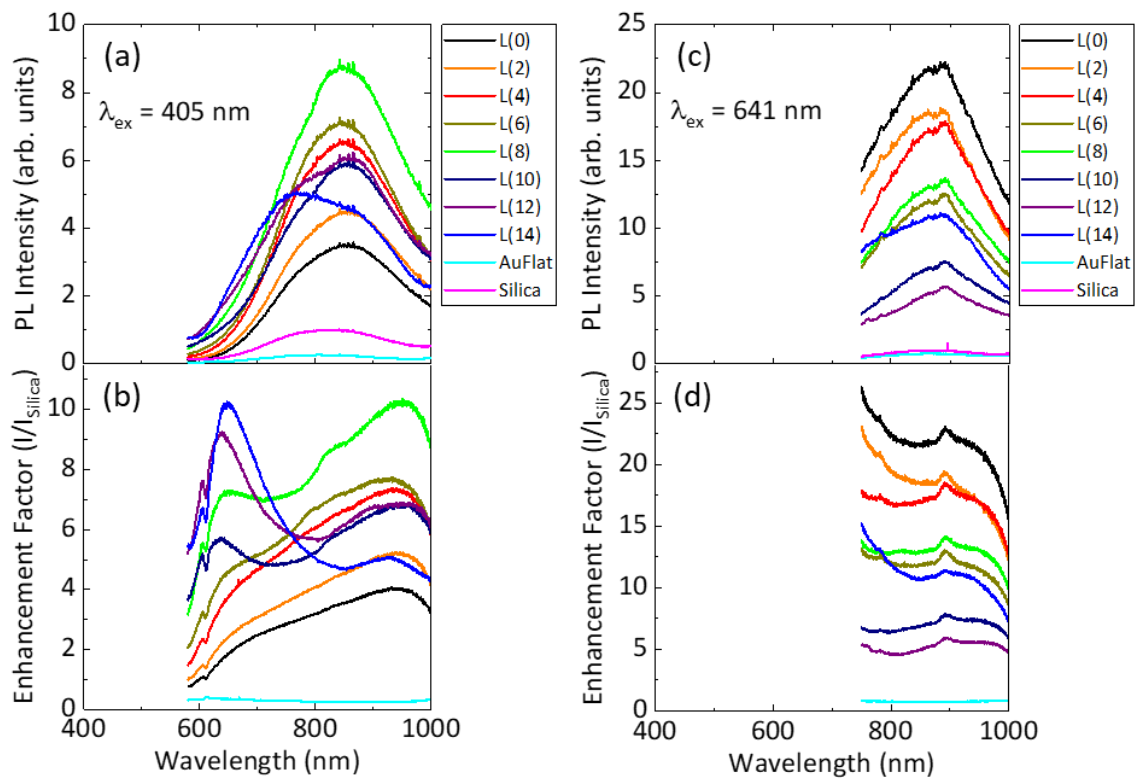


図 3.16 Si 量子ドット／ポリマースペーサ層 $L(n)$ ／プラズモニック基板における、(a) 発光スペクトル(励起波長 405 nm)、(b)発光増強度スペクトル(励起波長 405 nm)、(c)発光スペクトル(励起波長 641 nm)、(d)発光増強度スペクトル(励起波長 641 nm)。入射角 45° 。比較として Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータも示す。

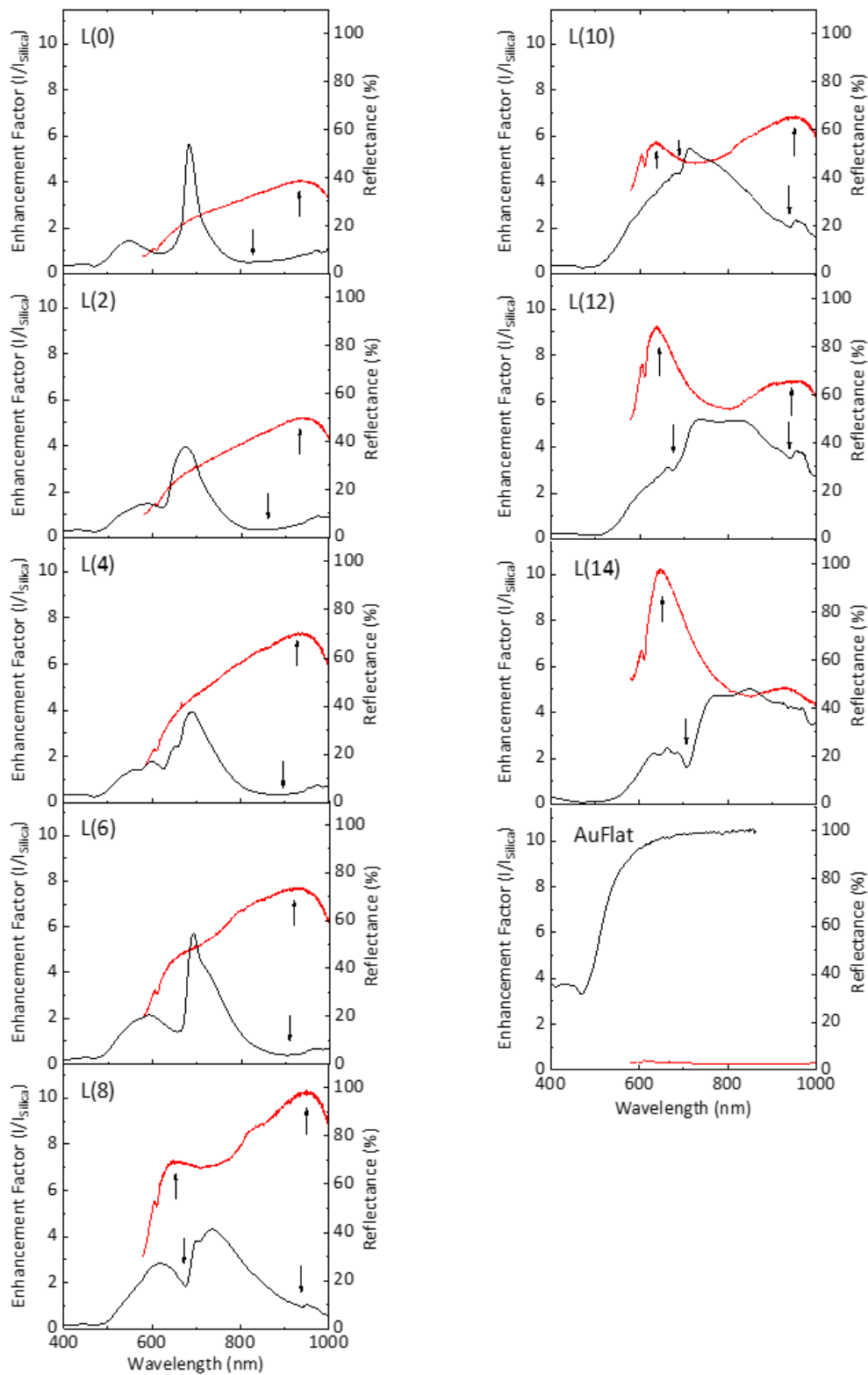


図 3.17 Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板の発光増強度スペクトル(点)と反射スペクトル(線)。励起波長 405 nm、入射角 45°。比較として Si 量子ドット/AuFlat 基板、Si 量子ドット/Silica 基板のデータも示す。

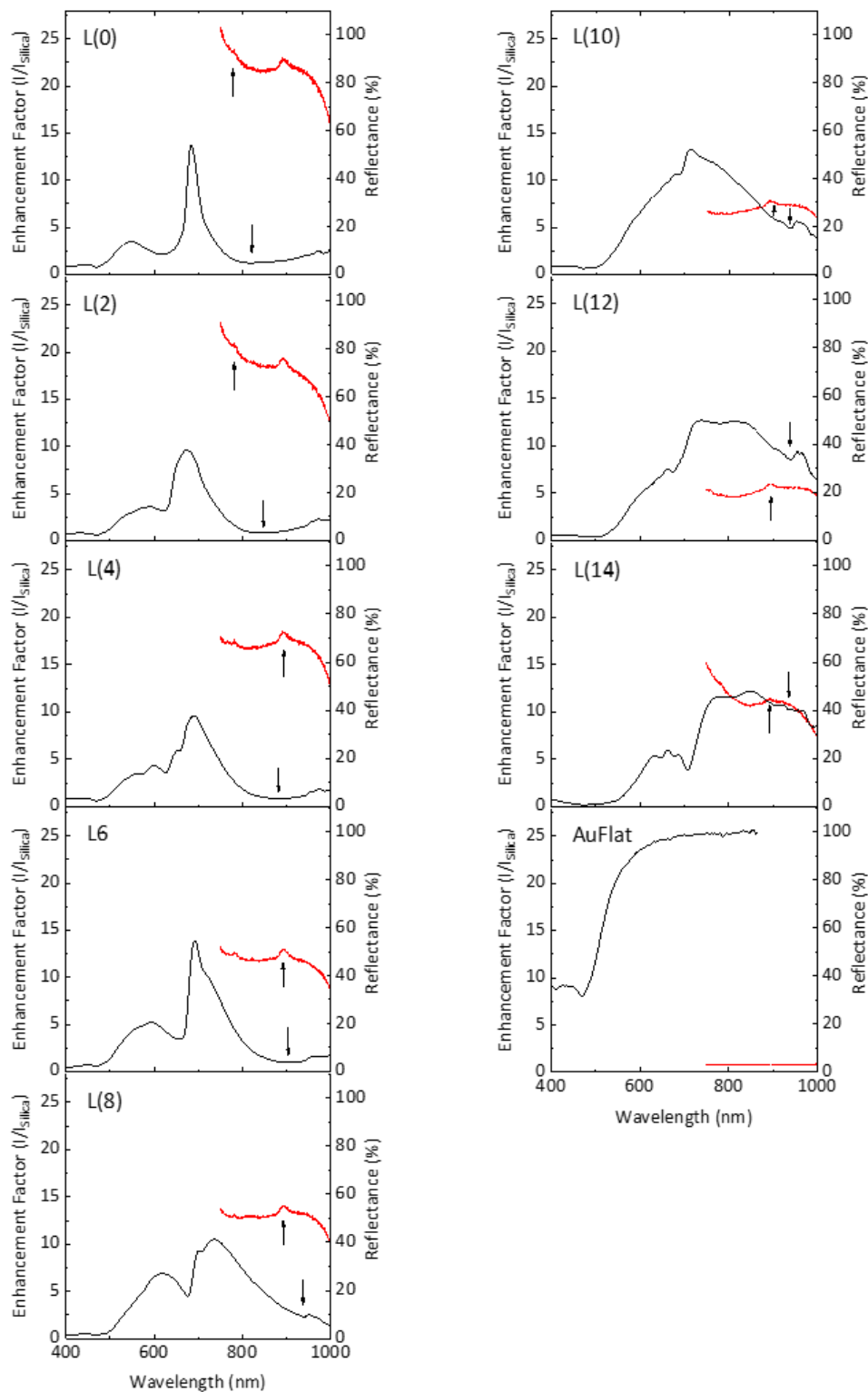


図 3.18 Si 量子ドット／ポリマースペーサ層 L(n)／プラズモニック基板の発光増強度スペクトル(点)と反射スペクトル(線)。励起波長 641 nm、入射角 45°。比較として Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータも示す。

3.3.6 発光減衰スペクトル評価

プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光減衰レートの Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性、及び、検出波長依存性を明らかにするため、異なるポリマースペーサ層数(n)を有する、Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板の発光減衰スペクトル測定を行った。ポリマースペーサ層数は L(n=0, 4, 8, 12)とし、励起波長は 405 nm、励起光の入射角は 45° と設定した。比較検討のため、平滑な Au 基板(AuFlat)と、Silica 基板(Silica)の Si 量子ドット単層膜の発光減衰スペクトルも測定した。

図 3.19 に励起波長 405 nm、入射角 45°、検出波長を 600 nm-650 nm、650 nm-700 nm、700 nm-750 nm、750 nm-800 nm、800 nm-850 nm、850 nm-900 nm における、Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板の発光減衰曲線を示す。比較検討のため、Si 量子ドット/AuFlat 基板、Si 量子ドット/Silica 基板のデータも示す。一般的に観測されているように、Si 量子ドットの発光減衰曲線は非指数関数的である。

図 3.20(a)に発光減衰レートの検出波長依存性を示す。発光減衰レート(Γ)は、 $\Gamma = 1/\tau_{ave}$ (τ_{ave} : 平均発光寿命)により算出した。平均発光寿命 (τ_{ave}) は $\tau_{ave} = \tau\beta^{-1}\Gamma_E(\beta^{-1})$ (Γ_E : オイラーガンマ関数)で定義され、 τ 及び β を求めるため発光減衰曲線を拡張指数関数 $I = I_0 \exp\{-t/\tau\}^\beta$ (τ : 減衰係数、 β : 拡張パラメータ)を用いてフィッティングを行った。Silica 基板上の Si 量子ドットの減衰レートは、今回の検出波長域において 0.1~0.4 μs^{-1} である。検出波長が短くなることにより減衰レートが増加するのは、小粒径の量子ドットの運動量空間において電子と正孔の波動関数が良好に重なるためである。プラズモニック基板上、及び AuFlat 基板上の Si 量子ドットの発光減衰レートは、Silica 基板上に比べて増大している¹⁰⁶。プラズモニック基板上の Si 量子ドットの中では、ポリマースペーサ層のない L(0)の発光減衰レートが最も大きく、ポリマースペーサ層数が増加による Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離が増加に伴い、発光減衰レートは減少している。

図 3.20(b)に発光減衰レート増強度の検出波長依存性を示す。発光減衰レート増強度は、Si 量子ドット/ポリマースペーサ層 L(n)/プラズモニック基板、及び Si 量子ドット/AuFlat 基板の発光減衰レートを、Si 量子ドット/Silica 基板の発光減衰レートで割ることで求めた。ポリマースペーサ層数の減少による Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離の減少に伴い、発光減衰レートが増加している。

発光減衰レートの増加は2つの要因から生じる。1つ目は輻射遷移割合であるパーセルフアクターの増大であり、量子効率増大に貢献する。2つ目は、損失モード(lossy mode)へのエネルギー散逸である¹⁰⁵。そこで、発光減衰レートの増加から、パーセルフアクターの増大を抽出した。パーセル増強ファクター(P/P_{Silica})(ここで、 P : プラズモニック基板上、及び AuFlat 基板上の Si 量子ドットのパーセルフアクター、 P_{Silica} : Silica 基板上

の Si 量子ドットのパーセルフアクター)は、発光減衰レートの増強度(Γ/Γ_{Silica})と、発光強度の増強度(I/I_{Silica})により以下に示す手順により求まる。発光増強度は

$$I/I_{Silica} = Q/Q_{Silica} \cdot \sigma/\sigma_{Silica} \cdot \eta/\eta_{Silica}$$

と表すことができる。ここで、 Q は量子収率、 σ は励起断面積、 η は集光効率である。量子収率増強度(Q/Q_{Silica})は、

$$Q/Q_{Silica} = P/P_{Silica} \cdot \Gamma_{Silica}/\Gamma$$

である。これらのパラメータの内、励起断面積増強度(σ/σ_{Silica})は、励起波長 405 nm では一定と近似できる。一方、集光効率に関しては、かなりの量の光子が基板側に放射され、Silica 基板上の Si 量子ドットにおいては集光できないため、集光効率は大きく異なる。誘電率 1.45 の Silica 基板上に双極子放射体を配置すると、約 24%の光子が上方に放射され、残りは基板側に放射される。そのため、発光増強度(I/I_{Silica})は、

$$I/I_{Silica} = P/P_{Silica} \cdot \Gamma_{Silica}/\Gamma \cdot 1/0.24$$

と近似できる。

図 3.20(c)にパーセルフアクター増強度の検出波長依存性を示す。想定していた通り、AuFlat 基板上ではパーセルフアクターの増強はなく、プラズモニク基板上ではパーセルフアクターは大きく増大している。L(0)と L(4)のパーセルフアクター増強度の検出波長依存性は似た傾向を示しており、長波長側でパーセルフアクターは増加している。この結果は、パーセルフアクターの増大が図 3.12(a)で示した長波長側のプラズモニクモードとのカップリングに起因していることを示唆している。L(8)ではパーセルフアクター増強度の検出波長依存性が小さく、L(14)では依存性は逆転し長波長側でパーセルフアクターは減少している。これは、L(14)のプラズモニク基板では、図 3.12(a)で示した長波長側のプラズモニクモードが、800 nm をピークの Si 量子ドットの発光波長を超えて長波長シフトしたことにより、パーセルフアクターの増強は主に短波長側の表面プラズモニクモードとのカップリングに起因しているためである。

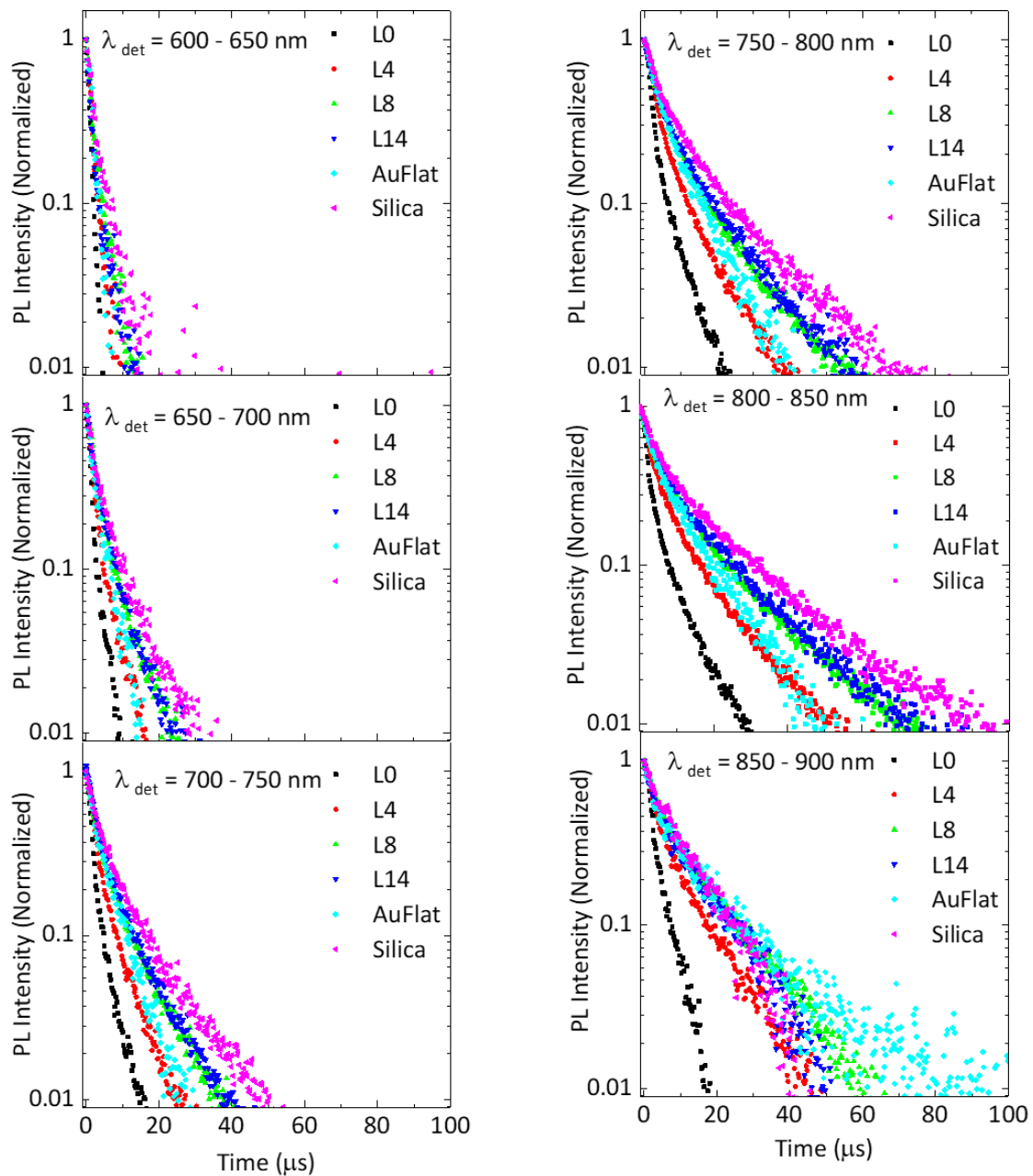


図 3.19 Si 量子ドット／ポリマースペーサ層 L(n)／プラズモニック基板の発光減衰曲線。励起波長 405 nm、入射角 45°。検出波長を 600–650 nm、650–700 nm、700–750 nm、750–800 nm、800–850 nm、850–900 nm と変化させた。比較として Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータも示す。

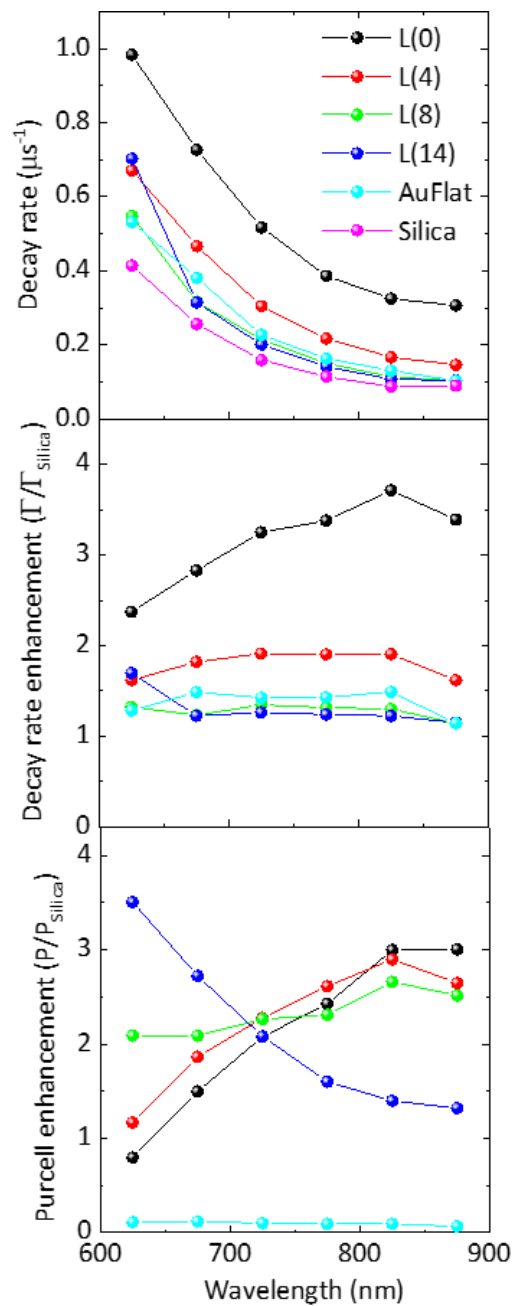


図 3.20 (a) Si 量子ドット／ポリマースペーサ層 L(n)／プラズモニック基板の発光減衰レートの検出波長依存性。比較として Si 量子ドット／AuFlat 基板、Si 量子ドット／Silica 基板のデータも示す。(b)発光減衰レート増強度の検出波長依存性。各発光減衰レートを Si 量子ドット／Silica 基板の発光減衰レートで割ることで求めた。(c)パーセルファクター増強度の検出波長依存性。

3.4 考察

NIL プラズモニク基板を作製し、Layer by Layer 法によりナノレベルで膜厚制御したポリマースペース層を形成し、その上に Si 量子ドット単層膜を形成することにより、Si 量子ドットの発光特性が表面プラズモンとの結合によりどのように改変されるかを詳細に調査した。反射スペクトル評価によりプラズモニク基板が Si 量子ドットの励起および輻射に適用できる 2 つの表面プラズモンバンドを持つことを明らかにし、反射スペクトル評価と、発光励起スペクトル評価、発光スペクトル評価、及び発光減衰評価により、Si 量子ドットの励起及び輻射プロセスの両方がプラズモニク基板により強く改変されていることが明らかとなった。ここでは、2 つの励起波長(405 nm と 641 nm)において、Layer by Layer 法によるポリマースペース層により得られた Si 量子ドットの発光増強度の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性から、発光増強メカニズムに関して考察する。

図 3.21 に励起波長 405 nm(黒)と 641 nm(赤)での発光波長 850 nm における Si 量子ドットの発光増強度のポリマースペース層数依存性を示す。励起波長 405 nm の場合は、ポリマースペース層数の増加に伴い Si 量子ドットの発光増強度は増加し、スペース層 8 層(L(8))で最大となり発光増強度 9 倍に達し、その後層数増加に伴い発光増強度は低下している。一方、励起波長 641 nm の場合は、ポリマースペース層なし(L(0))で発光増強度は最大で発光増強度は 22 倍であり、層数増加に伴い発光増強度は単調減少した。2 つの励起波長における発光増強度の層数依存性の違いは、Si 量子ドットの発光増強メカニズムが異なることを示唆している。

励起波長 405 nm の場合は、Au の誘電関数の大きな虚数部により、Si 量子ドットの励起側の増強は期待できない。従って、Si 量子ドットの発光増強は、アンテナ効率の増大に起因する Si 量子ドットの量子収率の増大のみである。輻射遷移割合の増大と、損失モードへのエネルギー散逸の競合により、アンテナ効率に最適な距離があることは知られている¹³³。本実験における最適距離は、ポリマースペース層 8 層であり、図 3.10 のポリマースペース層膜厚の層数依存性より Si 量子ドット-Au ナノ構造間の最適距離は約 30 nm である。

一方、励起波長 641 nm の場合は、Si 量子ドットの量子収率の増大に加えて、励起効率の増大が重要な役割を担っている。入射光電場の増強に起因する励起効率の増大は、金属ナノ構造表面で最大である。図 3.21 に示したポリマースペース層膜厚の増加に伴う発光増強度の単調減少は、励起波長 641 nm においては励起効率の増大が支配的であることを示唆している。

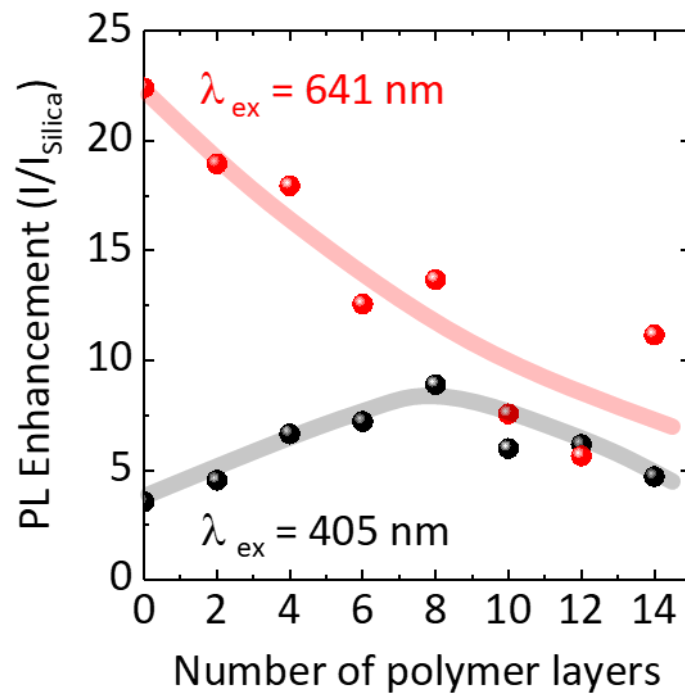


図 3.21 励起波長 405 nm(黒)と 641 nm(赤)における発光波長 850 nm での Si 量子ドットの発光増強度のポリマースペース層数依存性。

Si 量子ドットの発光増強度の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性は、蛍光検出型バイオセンサデバイスを設計する際に重要な指針となる。最適な発光体位置に関して以下に考察する。

図 1.2 に示したサンドイッチイムノアッセイにおいて、抗体を最も一般的である IgG(immunoglobulin G)抗体、Si 量子ドットは IgG 抗体の Fc(Fragment crystallization)領域の末端に標識され、抗原は核タンパク質(NP; Nucleoprotein)と想定すると、IgG 抗体の長辺の長さは約 15 nm、NP は直径約 5 nm であるため、サンドイッチイムノアッセイした際の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離は 35nm となる。IgG 抗体-NP-IgG 抗体の抗原抗体複合体はプラズモニック基板に対して垂直に直立している訳ではなく、Au 表面に倒立しているものも存在するため、Au 表面に対し倒立(0°)から直立(90°)まで均一に存在していると仮定すると、Si 量子ドット-Au ナノ構造間の平均距離は 35 nm に $\sin 45^\circ$ をかけて 25 nm 程度となる。発光増強度の距離依存性より、励起波長 405 nm での最大の発光増強はポリマースペース層 8 層でありその距離は 28.1 nm であり両者はほぼ一致するため、IgG 抗体を用いたサンドイッチイムノアッセイでは Si 量子ドットは最適なプラズモニック基板からの距離に配置できる。一方、励起波長 641 nm を用いた場合には、Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離が小さくなるに伴い発光増強度が増加するため、サンドイッチイムノアッセイにおいて Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離が短

くなるように設計することが望ましい。Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離を短縮するための有効な手段は、抗原サイズは変えられないため、小型抗体への置換である。IgG 抗体は軽鎖と重鎖を持ち複数のドメインから構成されるが、ラクダ科動物(アルパカ、ラマなど)は重鎖のみで構成される単ドメイン抗体を有し、VHH 抗体(Variable domain of Heavy chain of Heavy chain antibody)と呼ばれ、IgG 抗体の分子量は 150 kDa に対し、VHH 抗体の分子量は 15 kDa と約 1/10、サイズは約 5 nm である^{134,135}。VHH 抗体をサンドイッチイムノアッセイに適用すると、Si 量子ドット-Au ナノ構造間の平均距離は 15 nm に $\sin 45^\circ$ をかけて 11 nm 程度となり、励起波長 641 nm では発光増強度は約 1.3 倍増大することが期待される。

3.5 まとめ

本章では、蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けて、長波長励起下での NIL プラズモニク基板による Si 量子ドット単層膜の発光増強と、Layer by Layer 法で形成したポリマースペーサ層を用いて Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離を厳密に制御することにより発光増強度の距離依存性を検討した。複数の共鳴バンドを持つ NIL プラズモニク基板により、長波長光子による Si 量子ドットの近赤外発光は大きく増強されることを実証した。発光励起スペクトル、発光スペクトル、及び発光減衰ダイナミクスと、反射スペクトルを詳細に解析することで、複数の共鳴バンドを持つ NIL プラズモニク基板により、Si 量子ドットの長波長光子の吸収断面積の増大と輻射遷移割合の増大の同時増強を明らかにした。また、励起側発光増強と輻射側発光増強の相対的寄与度が励起波長に強く依存していることを示し、励起断面積の増大が期待されない励起波長 405 nm では、Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離が 28.1 nm で最大の発光増強が得られた。一方、強い励起断面積の増大が期待される励起波長 641 nm では、Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離が最小の約 1 nm で最大の発光増強度が得られた。NIL プラズモニク基板により、Si 量子ドットにおける長波長光子の吸収断面積増大による励起側、及び輻射遷移割合増大による輻射側の同時増強を実証し、Si 量子ドットの最適配置位置を明らかにしたことは、実用化を見据えた高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に大きな貢献である。

第4章 シランカップリング分子による Si 量子ドットの表面機能化

4.1 はじめに

有機蛍光色素はバイオセンシングの蛍光体に幅広く用いられている。有機蛍光色素はサイズが小さいため、生体分子の生物学的相互作用を妨害する可能性は低く、特に、近赤外発光の有機蛍光色素は生体分子の自家蛍光を回避できるため優先的に使用される¹³⁶。しかしながら、有機蛍光色素は照射光により蛍光劣化するため、積算検出や励起光強度など光検出の自由度が小さく、蛍光検出型バイオセンサの高感度化の障害となっている¹³⁷。加えて、有機蛍光色素はストークスシフトが小さいため、励起光を完全に光学フィルタで除去することが困難であり、センサの検出感度の低下をまねく⁴⁷。量子ドットは、発光波長のサイズ制御性、狭い発光バンド、高い量子収率、高い光安定性など幾つかの優れた物理的及び光学的特性のため、近赤外発光有機蛍光色素に代わる有望な候補と考えられている^{47-50,52,137-139}。しかしながら、CdS、CdTe、CdSe、ZnS でカップされた CdSe など市販され入手可能な Cd カルコゲナイド量子ドットの使用においては、生物医学分野では発がん物質で主要な肝細胞死を引き起こす遊離 Cd イオンの放出が常に懸念されている⁵⁴⁻⁵⁶。

Si 量子ドットは、生体及び環境適合性から、バイオセンシング応用に潜在的に適した量子ドットである¹⁴⁰⁻¹⁴⁵。近年、幾つかの研究グループが生物学的応用に向けて、Si 量子ドットと抗体や DNA などバイオ材料との結合に関して報告している。Wang らは、2つの光誘導反応とそれに続く DNA 標識ステップにより、青色発光(400 nm と 450 nm)を持つ直径 1 nm-2 nm の Si ナノ粒子を 5-アミノ修飾オリゴヌクレオチドに結合させた¹⁴⁶。He らは、直径約 35 nm の Si 量子ドットを閉じ込めた抗体結合 Si ナノ粒子により、500 nm 程度の波長域で免疫蛍光細胞イメージングを報告した¹⁴⁷。Tu らは、抗体を結合した直径 100 nm-150 nm のポーラス Si により、免疫染色された生きたガン細胞の赤色波長範囲での時間ゲート共焦点蛍光イメージングを実証した¹⁴⁸。最近、Robidillo らは、光化学的チオールエン反応により 630 nm 付近の発光バンドを持つ Si 量子ドットと酵素の結合に成功した¹⁴⁹。しかしながら、実用化に向けてはまだいくつかの課題が残っている。先行研究の多くは、有機または無機の厚いシェルにカプセル化された Si 量子ドットやその凝集体が用いられており、それらのサイズは未修飾の Si 量子ドットのサイズに比べはるかに大きいため、バイオセンサの生体分子の生物学的相互作用を妨害するため適さない。さらに、これらの Si 量子ドットはコア/シェル構造を有していないため、発光が Si 量子ドット表面状態に依存するため青色～赤色発光であり、さらに表面状態に

より発光特性が変化することが報告されており、高感度蛍光検出型バイオセンサに求められる安定的な近赤外発光を有する Si 量子ドットは実現できていない。

本章では、Si 量子ドットには我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットを用いて^{72,150}、抗体との結合に向け、シランカップリング分子を用いた Si 量子ドットの表面機能化プロセスを開発する。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、結晶性 Si コアの表面に高濃度に B,P がドーピングされたアモルファス Si シェルを有する¹⁵¹。シェルは Si 量子ドットの表面に負の電位(電位: -35 mV)を誘導し⁷⁷、静電反発によりアルコールや水などの極性溶媒中で凝集を防ぐ⁷⁶。従って、水分散性を発現・維持するための厚い有機や無機のシェルは不要である。Si 量子ドットはドナー-アクセプター遷移により、近赤外範囲でサイズによる発光波長調整が可能である^{120,152}。さらに、励起子は結晶性 Si コアに閉じ込められるので、Si 量子ドットの発光は幅広い pH 範囲(pH 1 -10)の水溶液中で安定である⁷⁷。これらの優れた特性から、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットをバイオセンサに応用することで、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現が期待される。本章の研究目的は、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットが有する優れた水溶媒分散性と近赤外発光特性を保持しつつ、抗体との結合に向けて Si 量子ドットをシランカップリング分子で表面機能化することである。

4.2 実験方法

4.2.1 試料作製方法

Si 量子ドットの表面機能化方法

Si 量子ドットと抗体を結合させるためには、抗体表面の官能基と共有結合できる官能基を Si 量子ドット表面に修飾する必要がある。Si 量子ドットの表面機能化方法にはヒドロシリル化反応とシランカップリング反応が研究されているが^{153,154}、本研究では Si 量子ドット表面の水酸基(-OH)を利用しシランカップリング反応による表面機能化を行う^{129,155}。

図 4.1 にシランカップリング反応による Si 量子ドットの表面機能化プロセスの模式図を示す。シランカップリング分子は水相で加水分解反応によりメトキシ基((Si)-OCH₃)がシラノール基(Si-OH)に変化し、生じたシラノール基が Si 量子ドット表面の水酸基(-OH)に吸着する。その後、脱水縮合反応によりシロキサン結合(Si-O-Si)が形成され、Si 量子ドットの表面が所望の官能基に機能化される¹⁵⁶⁻¹⁶⁰。

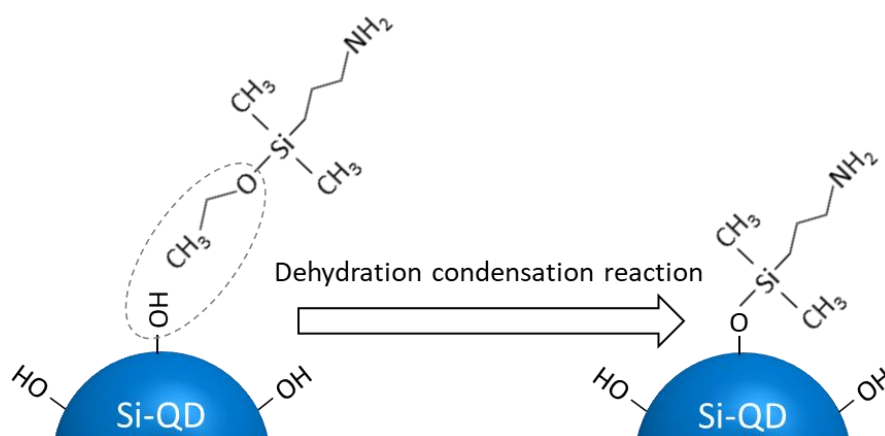


図 4.1 Si ナノ結晶のシランカップリング反応を用いた表面修飾プロセス。

次にシランカップリング分子の選定について説明する。シランカップリング分子の官能基の種類、及びシラノール基(Si-OH)の数が表面機能化に大きな影響を及ぼすことが報告されている¹⁵⁴。官能基の種類に関しては、抗体の官能基を考慮する必要がある。図 2.4 にアミノ酸、タンパク質、IgG 抗体の模式図を示す。抗体はタンパク質であり、アミノ酸がペプチド結合により多数連結してできた高分子である。アミノ酸はアミノ基(-NH₂)とカルボキシル基(-COOH)の両方の官能基を持つ有機物である。そのため、抗体のアミノ基またはカルボキシル基と共有結合させるために、Si 量子ドット表面はカルボキシル基またはアミノ基で表面機能化し、抗体と Si 量子ドットをペプチド結合させることが考えられる。また別の官能基として、エポキシ基は活性アミン水素を介して開環重合によりアミノ基と結合することも報告されている¹⁵³。シラノール基の数に関しては、

シランカップリング分子あたりのシラノール基の数が多いほど、Si 量子ドットに固定化されるシランカップリング分子数が増加するため、抗体との反応性の高い機能化 Si 量子ドットが得られる。一方、シラノール基間での脱水縮合反応による架橋が起こることにより、Si 量子ドット-Si 量子ドット間の架橋による凝集も生じる懸念がある。以上より、シランカップリング分子の官能基は、カルボキシル基、アミノ基、エポキシ基を持つシランカップリング剤が候補だが、本研究では入手性からアミノ基とエポキシ基を選定した。シラノール基の数はメリット/デメリットがあるため、単数と複数のシラノール基を持つシランカップリング分子を選定した。これらの、異なる分子構造を持つシランカップリング分子を用いて、抗体との結合に向け B,P 同時ドーブ Si 量子ドットの表面機能化プロセスを検討した。

使用したシランカップリング剤の分子構造を図 4.3 に示す。アミノ基修飾には、(3-Aminopropyl) dimethylethoxysilane : APDMES (Sigma Aldrich)、(3-Aminopropyl) trimethoxysilane : APTMS (Sigma Aldrich)を、エポキシ基修飾には、(3-Glycidyloxypropyl) trimethoxysilane : GOPTS (Sigma Aldrich)を用いた。

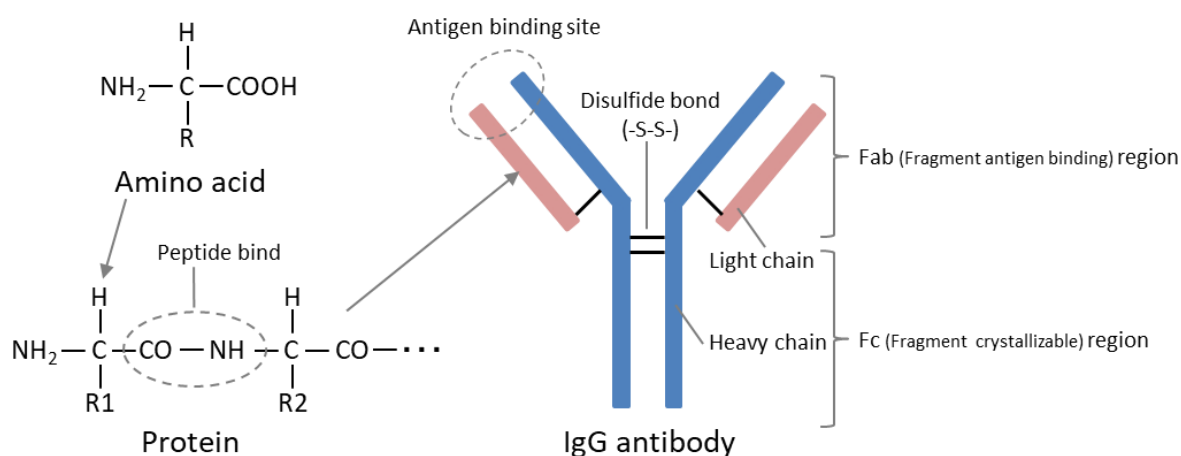


図 4.2 アミノ酸、タンパク質、IgG 抗体の構造模式図。

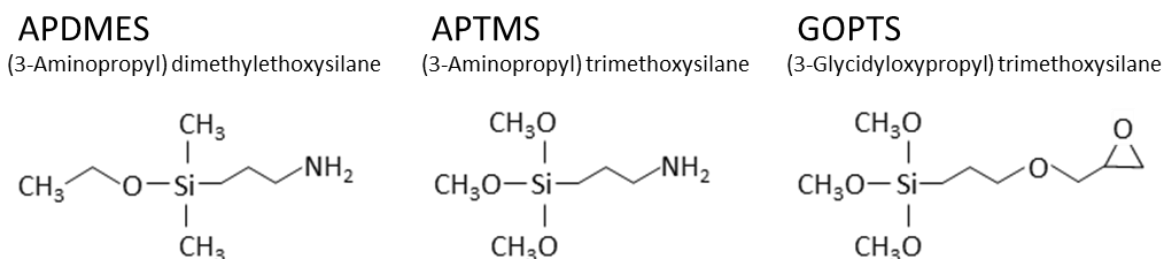


図 4.3 Si 量子ドットの表面機能化に用いたシランカップリング剤の分子構造。

図 4.4 に Si 量子ドットの表面機能化プロセスを、表 4.1 に本実験で作製したサンプルリストを示す。以下に表面機能化手順を示す。

- ① 希釈： メタノール分散 Si 量子ドット溶液(1.0 mg/mL)を純水で 10 倍希釈し、0.1mg/mL の Si 量子ドット水溶液を作製する。純粋で希釈する理由は、後のプロセスで用いる透析膜のメタノール耐性のためである。
- ② 混合： メタノールと純粋を 1：9 で混合した溶液に分散した Si 量子ドット溶液 (0.1 mg/mL), 400 μ L に、メタノールで濃度調整を行ったシランカップリング剤 20 μ L を混合し、純水 20 μ L を加えることで、溶液中で加水分解反応を起こす。
- ③ 攪拌： ボルテックスミキサーで②の溶液を混合し、その後、超音波洗浄機に 15 分間かけることで、十分に攪拌する。
- ④ 透析： 透析膜フィルタ(Slide-A-Lyzer G2 Dialysis Cassettes, 7000MWCO, Thermo Fisher)を用いて、未反応のシランカップリング剤を取り除く。透析は、純水 1L を入れたビーカーに透析膜フィルタをフロートさせ、4°Cの冷蔵庫の中でマグネッタスターラーを用いて攪拌させ、1 時間、1 時間、1 晩と 3 回行った¹⁶¹⁻¹⁶³。
- ⑤ 反応： 溶液を 95°Cに熱したホットプレートで 10 分間加熱し、脱水縮合反応を促進させる^{154,158,160}。

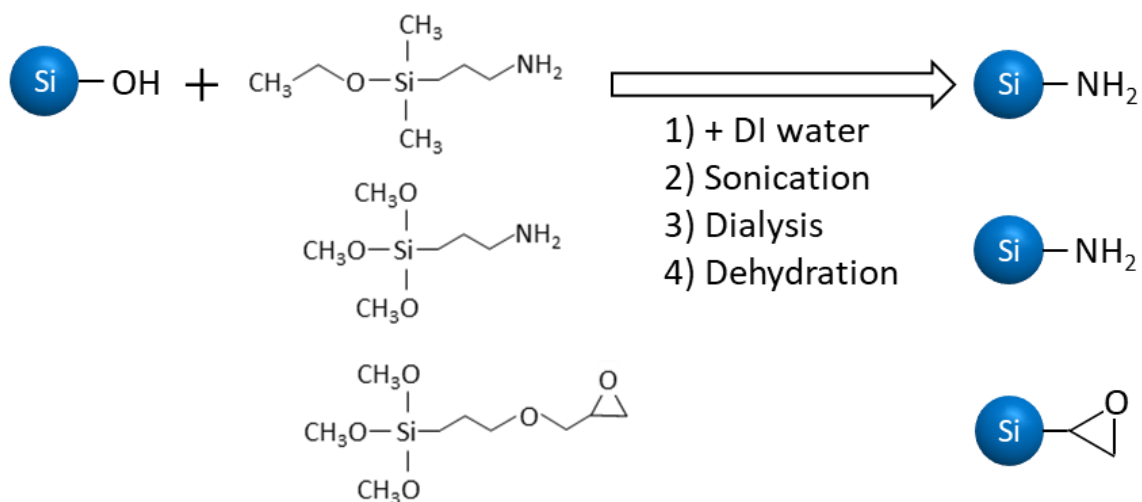


図 4.4 Si 量子ドットの表面機能化プロセス。

表 4.1 サンプルリスト

No.	Si-QDs (a)	Silane coupling agent (b)	Mixed molecule ratio (a) : (b)
S1	Si-QDs	APDMES	1:125
S2	Si-QDs	APDMES	1:250
S3	Si-QDs	APDMES	1:1250
S4	Si-QDs	APTMS	1:125
S5	Si-QDs	APTMS	1:250
S6	Si-QDs	APTMS	1:1250
S7	Si-QDs	GOPTS	1:125
S8	Si-QDs	GOPTS	1:250
S9	Si-QDs	GOPTS	1:1250
R1	Si-QDs	—	—

4.2.2 分散性評価方法

透過スペクトル測定

Si 量子ドットコロイド溶液の可視～近赤外領域における透過率スペクトルの測定には、紫外可視分光光度計(UV-310PC, Shimadzu)を用いた。測定範囲は 300 nm-1000 nm とし、スリット幅は 3 nm、サンプリングピッチは 1 nm、スキャンニングスピードは中速(200 nm/min)に設定した。測定の際は、微小容量溶液用の石英セル(容量 100 μ L)を使用した。リファレンスには水を用いた。

4.2.3 発光特性評価方法

発光スペクトル測定

可視～近赤外領域(500 nm-1300 nm)の検出波長領域における Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトル測定には、モジュール型蛍光分光測定装置(SPEX Fluorolog-3, HORIBA)を用いた。励起光源として、ダブルモノクロメーターで 405 nm に分光された 450 W の Xe ランプからの光を用い、シングルモノクロメーターで分光された発光は光電子増倍管(Photomultiplier: PMT)(500 nm-850 nm)、あるいは液体窒素で冷却された InGaAs 近赤外フォトダイオード(800 nm-1400 nm)で検出される。光電子増倍管を検出器として用いる際は、ロングパスフィルタ(Y44, HOYA)を、InGaAs 近赤外フォトダイオードを用いる際は、ロングパスフィルタ(IR75, HOYA)を検出側分光器のスリット直前に配置することで、励起光の散乱光を除去した。励起、及び検出スリット幅は 5 nm とし、Increment は 5 nm に設定した。サンプルは微小容量溶液用の石英セルに溶液を入れたものを使用した。

4.3 実験結果

4.3.1 分散性評価

Si 量子ドットの表面修飾が、水溶媒分散性に与える影響に関して、透過率スペクトルを測定することにより議論する。図 4.5 に 3 種類のシランカップリング分子(図 4.3)を用い、Si 量子ドットとシランカップリング分子の混合比率 (Si-QDs : シランカップリング分子 = 1 : 125、1 : 250、1 : 1250) を変化させて、Si 量子ドットを表面機能化した溶液の透過率スペクトルを示す。比較検討用として、シランカップリング分子を加えず、同様の表面機能化プロセスを行った Si 量子ドットコロイド溶液の透過率を黒線で示す。Ref. のデータより、Si 量子ドットの吸収がない 700nm 以上の波長域において、透過率がほぼ 100% であることより、溶液中に巨視的な散乱体、つまり凝集物が存在せず、我々の研究室の B,P 同時ドーピング Si 量子ドットが、表面修飾なしで非常に高い水溶媒分散性を有することがわかる。

図 4.5(a) に APDMES : (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane を用いてアミノ基に表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の透過率スペクトルを示す。全ての混合比のサンプルの透過率において、Ref. である未修飾 Si 量子ドットからの変化は見られなかった。これより、APDMES 表面機能化 Si 量子ドットはいずれの混合比においても良好な水溶性溶媒分散性を保持できることがわかった。

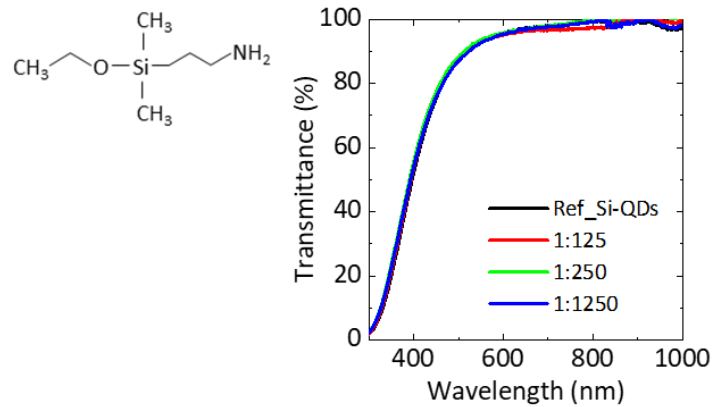
図 4.5(b) に、APTMS : (3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いてアミノ基に表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の透過率スペクトルを示す。APDMES の場合とは異なり、全ての混合比のサンプルの透過率において、Ref. である未修飾 Si 量子ドットに比べて透過率が低下した。特に Si 量子ドットの吸収がない 700nm 以上の波長域で透過率においても透過率が低下しており、これは溶液中に巨視的な散乱体、つまり凝集物が形成したことを示している。これより、APTMS 表面機能化 Si 量子ドットは凝集体を形成し良好な水溶性溶媒分散性を保持できないことがわかった。

図 4.5(c) に、GOPTS : (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane を用いてエポキシ基で表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の透過率スペクトルを示す。Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比が 1 : 125、1 : 250 のサンプルの透過率は、Ref. である未修飾 Si 量子ドットからの変化は見られなかった。一方、最もシランカップリング分子の混合比が高い 1 : 1250 のサンプルの透過率は、Ref. である未修飾 Si 量子ドットに比べ低下した。特に Si 量子ドットの吸収がない 700nm 以上の波長域で透過率においても透過率が低下しており、これは溶液中に巨視的な散乱体、つまり凝集物が形成したことを示している。これより、GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットは、Si 量子ドットに対するシランカップリング分子の分子数混合比が 1 : 250 以下であることが分散性の観点から望ましいことがわかった。

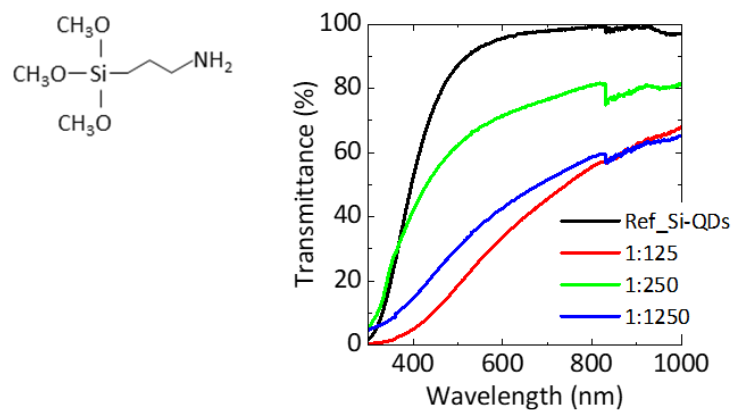
以上の結果より、シランカップリング剤を用いた Si 量子ドットの表面機能化におい

て、Si 量子ドットの水溶媒分散性の観点から、シランカップリング分子の構造、及び分子数混合比が重要であることが分かった。

(a) APDMES (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane



(b) APTMS (3-Aminopropyl)trimethoxysilane



(c) GOPTS (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane

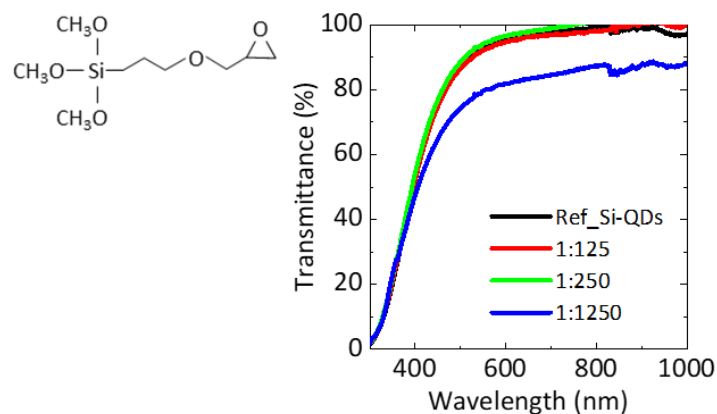


図 4.5 シランカップリング分子の種類、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の混合比を変化させて Si 量子ドットを表面機能化した場合の透過率スペクトル。

4.3.2 発光特性評価

図 4.6 に 3 種類のシランカップリング分子(図 4.3)を用い、Si 量子ドットとシランカップリング分子の混合比率 (Si-QDs:シランカップリング分子=1:125、1:250、1:1250)を変化させて Si 量子ドットを表面機能化した場合の、Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトルを示す。比較検討用として、シランカップリング分子を加えず、同様の表面機能化プロセスを行った Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトルを黒線で示す。縦軸の発光強度は、未修飾 Si 量子ドットのコロイド溶液の発光強度で正規化している。全サンプルにおいて、発光スペクトル形状に関しては未修飾 Si 量子ドットと比較して表面機能化による変化は見られなかったが、発光強度に関してはシランカップリング分子の構造及び分子混合比率に依存して変化が見られた。表面機能化を行っても Si 量子ドットの発光スペクトル形状が変化しない今回の結果は、他グループの先行研究で報告されている Si 量子ドット表面機能化による発光特性変化と大きく異なっている (57,67,68,146,148,164-167)。

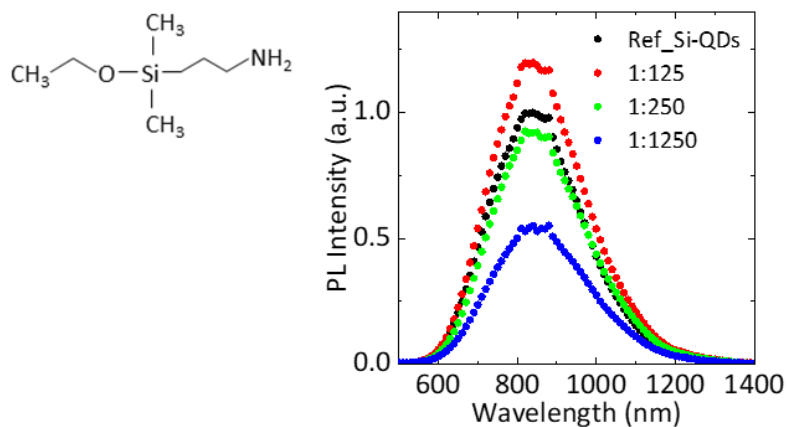
図 4.6(a)に APDMES : (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane を用いてアミノ基で表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトルを示す。全混合比で発光スペクトル形状変化は見られなかった。発光強度に関しては、1:125、1:250 では未修飾 Si 量子ドットと比べ発光強度低下は見られなかったが、1:1250 では 1/2 に発光強度が低下し、発光強度の混合比依存性が見られた。

図 4.6(b)に APTMS:(3-Aminopropyl)trimethoxysilane を用いてアミノ基で表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトルを示す。全混合比で発光スペクトル形状変化は見られなかった。発光強度に関しては、図 4.6(a)で示した APDMES とは異なり、全混合比で発光強度が大きく低下し、1:125、1:250 の発光強度は未修飾に比べ約 2 割程度に減少、1:1250 ではほとんど発光が検出できず、発光強度の混合比依存性が見られた。

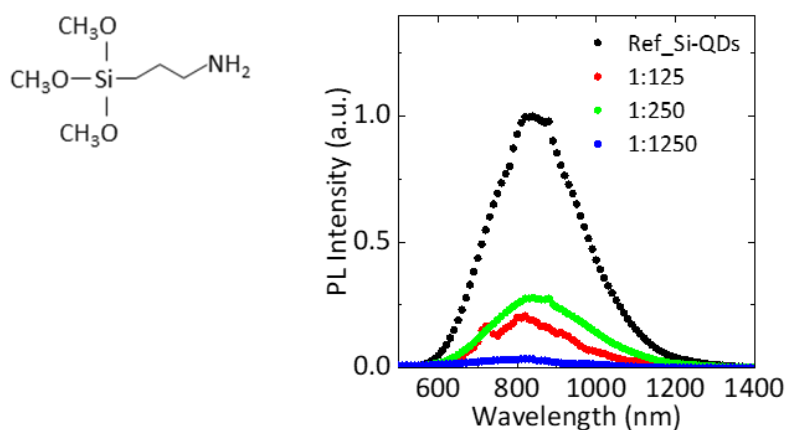
図 4.6(c)に、GOPTS : (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane を用いてエポキシ基で表面機能化した Si 量子ドットコロイド溶液の発光スペクトルを示す。全混合比で発光形状変化は見られなかった。発光強度に関しても、全混合比で発光強度低下は見られなかった。

以上の結果より、シランカップリング剤を用いた Si 量子ドットの表面機能化において、Si 量子ドットの発光特性の観点から、シランカップリング分子の構造、及び分子数混合比が重要であることが分かった。

(a) APDMES (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane



(b) APTMS (3-Aminopropyl)trimethoxysilane



(c) GOPTS (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane

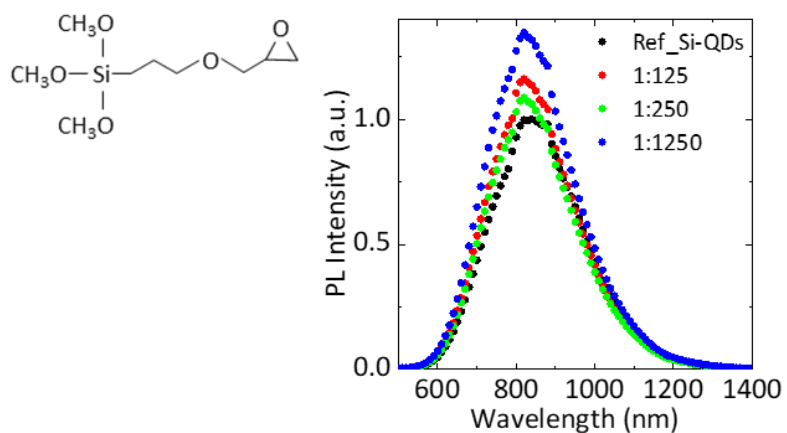


図 4.6 シランカップリング分子の種類、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の混合比を変化させて Si 量子ドットを表面機能化した場合の発光スペクトル。

4.4 考察

シランカップリング分子を用いた B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの機能化では、シランカップリング分子構造及び分子数混合比に依存した水溶媒分散性及び発光特性を示すことが明らかになった。これは、目的とする官能基で表面機能化を行う際、分子構造の選択、及び混合比を制御することにより、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの優れた水溶性溶媒分散性、及び発光特性を保持できることを示している。

水溶媒分散性に関しては、アミノ基を持つ 2 種類のシランカップリング分子において、APDMES で表面機能化した Si 量子ドットは全混合比で良好な分散性を示したが、APTMS では全混合比で凝集体が形成した。エポキシ基を持つシランカップリング分子 GOPTS を用いた場合は、一定の混合比までは良好な分散性を示したが、シランカップリング分子が高濃度になると凝集体が形成した。この結果は、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの水溶性溶媒(極性溶媒)中での分散起源が強く関与していると考えられる。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、B,P 同時ドーピングにより負の表面電位を有しており、pH7 付近で -35 mV 程度である⁷⁷。この負の表面電位により、水溶性溶媒やアルコールなど極性溶媒中で、Si 量子ドット粒子間に静電斥力が働くことで、凝集を防ぎ良好な分散性を示す⁷⁶。

水溶液中で正の電荷を持つアミノ基で表面機能化することにより、Si 量子ドットの負の表面電位は低下し、凝集体を形成すると考えられる。今回のアミノ基を有するシランカップリング分子において、Si 量子ドットと結合するシラノール基となるメトキシ基(-OCH₃)の数が APDMES と APTMS で異なることにより、分散性に大きな違いが見られた。APDMES はメトキシ基が 1 箇所であり Si 量子ドット表面に修飾されるシランカップリング分子の数が限定的であったため、Si 量子ドットの負の表面電位は完全には緩和されることはなく、APDMES 表面機能化 Si 量子ドットは良好な分散性を保持した。一方、APTMS はメトキシ基が 3 箇所あるため、Si 量子ドット表面に過剰にシランカップリング分子が修飾されたことで、Si 量子ドットの負の表面電位が著しく低下したことで分散性が低下し、凝集体を形成したと考えられる。さらに、メトキシ基が 3 箇所あるため、シランカップリング分子間の架橋により複数の Si 量子ドットが共有結合し、凝集体が形成されたことも考えられる。

一方、水溶液中でエポキシ基はアミノ基ほど正の電荷を持たないため、GOPTS はメトキシ基が 3 箇所存在し、Si 量子ドット表面に十分に修飾されても、シランカップリング分子が低濃度である分子数混合比が 1 : 125、1 : 250 の場合は Si 量子ドットの負の表面電位は完全には緩和されず、Si 量子ドットは良好な分散性を示したと考えられる。しかし、シランカップリング分子が高濃度である 1 : 1250 では、Si 量子ドット表面に過剰にシランカップリング分子が修飾され、Si 量子ドットの負の表面電位の緩和による静電斥力低下による分散性低下、及びメトキシ基が複数存在することによるシ

ランカップリング分子間の架橋により複数の Si 量子ドットが共有結合し、凝集体が形成したと考えられる。

次に表面機能化 Si 量子ドットの発光特性に関して考察する。APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの発光強度は、シランカップリング分子が低濃度である 1 : 125、1 : 250 では発光強度低下は見られなかったが、シランカップリング分子が高濃度の 1 : 1250 では発光強度が半減した。一方、APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの分散性は全分子数混合比のサンプルで良好であった。これより、分子数混合比 1 : 1250 で見られた発光強度低下は、表面機能化により非輻射遷移割合が増加したことが発光強度低下の原因と考えられる。今回の結果は、先行研究で報告されている APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの結果と良好に一致しており¹⁵⁴、先行研究では APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの発光寿命は分子数混合比に依存して減少することが報告されており¹⁵⁴、アミノ基を持つ修飾分子へのエネルギー移動による非輻射遷移割合の増大が APDMES 表面機能化 Si 量子ドット (1 : 1250) の発光強度低下の支配的要因であると考えられる。

APTMS 表面機能化 Si 量子ドットは、発光強度は、全混合比で発光強度が大きく低下し、1 : 125、1 : 250 の発光強度は未修飾に比べ約 2 割程度に減少、1 : 1250 ではほとんど発光が検出できず、発光強度の混合比依存性が見られた。一方、分散性は全分子数混合比で低下していた。APTMS 表面機能化 Si 量子ドットの発光強度低下の原因は、非輻射遷移割合増加に加えて、凝集体が計測用石英セル下部に沈殿したことによりコロイド溶液中の Si 量子ドットの分散量が低下したためと考えられる。非輻射遷移割合増加に関しては、先行研究において APTMS 表面機能化 Si 量子ドットの発光寿命は、APDMES 表面機能化 Si 量子ドットよりも顕著に減少することが報告されており¹⁵⁴、メトキシ基の増加により Si 量子ドット表面に修飾されたシランカップリング分子が増加したことによるアミノ基を持つ修飾分子へのエネルギー移動の増大に伴い、非輻射遷移割合も増大したと考えられる。

GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットは、全混合比において発光強度が低下せず、メトキシ基が 3 箇所あることを考慮すると、エポキシ基を持つ修飾分子へのエネルギー移動は、アミノ基を持つ修飾分子へのエネルギー移動に比べ小さく、そのため非輻射遷移割合が増加しなかったと考えられる。

本章の目的は、Si 量子ドットと抗体の結合に向け、B,P 同時ドーブ Si 量子ドットの優れた水溶媒分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ表面機能化できるプロセスを開発することである。3 種類のシランカップリング分子を用い、Si 量子ドットとの分子数混合比を 3 水準変化させた結果、水溶液中で正に帯電するアミノ基を持ち、かつメトキシ基を 3 箇所持つ APTMS は全分子数混合比で透過率低下が見られ分散性が低下したことから、Si 量子ドットの表面機能化には不適であると判断した。アミノ基を持ちメトキシ基が 1 箇所の APDMES では分子数混合比 1 : 125、1 : 250 では分散性と発

光特性のいずれも良好であったが、シランカップリング分子が高濃度の 1 : 1250 では分散性は良好であったが発光強度が半減した。エポキシ基を持ちメトキシ基が 3 箇所 GOPTS では、分子数混合比 1 : 125、1 : 250 では分散性と発光特性のいずれも良好であったが、シランカップリング分子が高濃度の 1 : 1250 では透過率低下が見られ分散性が低下した。以上の結果より、Si 量子ドットの水溶媒分散性及び発光特性を保持しつつ表面機能化するためには、シランカップリング分子は APDMES と GOPTS、分子数混合比は Si 量子ドット : シランカップリング分子 = 1 : 250 が最適であると判断した。次章ではシランカップリング分子は APDMES 及び GOPTS、分子数混合比は Si 量子ドット : シランカップリング分子 = 1 : 250 で表面機能化した Si 量子ドットを用いて、抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを検討する。

4.5 まとめ

本章では、抗体との結合に向け、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの表面機能化プロセスを開発し、優れた水溶媒分散性と近赤外発光を保持しつつ、アミノ基とエポキシ基に表面機能化した Si 量子ドットの作製に成功した。表面機能化プロセスでは、シランカップリング分子の構造と、Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比が、Si 量子ドットの水溶媒分散性と近赤外発光特性に大きな影響を与えることが明らかとなった。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの水溶媒分散性と近赤外発光の保持可能な Si 量子ドット表面機能化プロセスを構築したことは、Si 量子ドットの蛍光検出型バイオセンサ応用に極めて重要であり、抗体-Si 量子ドットの複合体形成に大きく貢献できると期待される。

第5章 抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成

5.1 はじめに

第4章では、バイオセンサの蛍光体として幅広く用いられている有機蛍光色素の代替を目指し、光退色性のない安定した近赤外発光、大きなストークスシフト、生体及び環境適合性、表面機能化自由度と優れた特性を有する我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの表面機能化プロセスを開発した。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、コア/シェル構造により、Si 量子ドット本来の小さいサイズで良好な水溶媒分散性と安定した近赤外発光特性を有している。シランカップリング分子を用いてアミノ基及びエポキシ基で表面機能化し、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの優れた水溶媒分散性と近赤外発光を保持していることを示した。表面機能化プロセスにおいて、シランカップリング分子の構造、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比が、Si 量子ドットの水溶媒分散性と近赤外発光の維持に大きな影響を与えることを明らかにした。

本章では、前章で開発した表面機能化 Si 量子ドットを用いて、抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを開発する。表面機能化 Si 量子ドットは、良好な水溶媒分散性と近赤外発光特性を示したシランカップリング分子種及び分子数混合比である、アミノ基を持つ APDMES((3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane)、及びエポキシ基を持つ GOPTS((3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane)の、Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比は 1 : 250 を用いる。抗体はバイオ分野で広く用いられる免疫グロブリン G(Immunoglobulin G ; IgG)抗体を用い、インフルエンザの核タンパク質と結合する IgG 抗体(Anti-Influenza A Virus Nucleoprotein IgG antibody)を選定した。

本章の研究目的は、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットの優れた近赤外発光特性と IgG 抗体の抗原との特異的結合性を保持できる、IgG 抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを開発することである。IgG 抗体-Si 量子ドット複合体は、電気泳動、動的光散乱(Dynamic light scattering ; DLS)、及び透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscopy ; TEM)により、多方面から詳細に解析し、IgG 抗体と表面機能化 Si 量子ドットが結合し、複合体形成に成功していることを証明する。加えて、複合体形成後の Si 量子ドットが近赤外発光を保持していることを発光特性評価により明らかにし、複合体形成後の IgG 抗体が抗原との特異的結合性を維持していることをインフルエンザの核タンパク質を抗原とした蛍光免疫アッセイ評価により明らかにする。

5.2 実験方法

5.2.1 試料作製方法

抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセス

抗体とシランカップリング分子で表面機能化した Si 量子ドットを結合させる。表面機能化 Si 量子ドットは、第4章で得られた Si 量子ドットの分散性と発光特性を保持できる最適表面機能化条件である APDMES : (3-Aminopropyl)dimethylethoxysilane と GOPTS : (3-Glycidyloxypropyl)trimethoxysilane の分子数混合比 Si 量子ドット : シランカップリング分子 = 1 : 250 を、比較検討用として未修飾 Si 量子ドットを用いた。抗体は、インフルエンザの核タンパク質と結合する IgG 抗体(Anti-Influenza A Virus Nucleoprotein IgG antibody, ab66191, abcam)を用いた。

図 5.1 に IgG 抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを、表 5.1 に本実験で作製したサンプルリストを示す。S1~S3 は IgG 抗体と Si 量子ドットを含むサンプルであり、R1~R4 は IgG 抗体、Si 量子ドットのいずれかしか含まない比較検討用サンプルである。以下に IgG 抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成の実験手順を示す。

- ① IgG 抗体希釈： IgG 抗体(6.7 mg/mL)を PBS バッファ(Phosphate Buffered Saline; リン酸緩衝食塩水), pH7.4 で 0.4 mg/mL に希釈する。
- ② DMT-MM 水溶液作製： アミノ基とカルボキシル基のペプチド結合の縮合剤に用いるため、4-(4,6-dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholium chloride (DMT-MM)を 17.8 mg/mL になるように純水に溶かす^{154,168}。
- ③ 混合(IgG 抗体と Si 量子ドット)： IgG 抗体(0.4 mg/mL) in PBS と表面機能化 Si 量子ドット(0.1 mg/mL) in 純水を分子数比 1:2 で混合し、PBS(1 x)溶液となるように PBS(10 x)溶液を混合する(S1、S2、S3)。IgG 抗体を用いない比較用のサンプル(R1、R2、R3)は IgG 抗体溶液と同量の PBS バッファを、Si 量子ドットを用いない比較用のサンプル(R4)は Si 量子ドット溶液と同量の PBS バッファを混合する。
- ④ 結合(DMT-MM 添加)： APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを用いるサンプル(S1、R1)は、③で作製した水溶液量の 1/10 体積の DMT-MM 水溶液(17.8 mg/mL)を添加する。それ以外のサンプルは、DMT-MM 水溶液は不要であるため、③で作製した水溶液量の 1/10 体積の純水を添加する(S2、S3、R2、R3、R4)。
- ⑤ 反応： 室温、暗所で 4 時間インキュベートする^{153,154,169}。

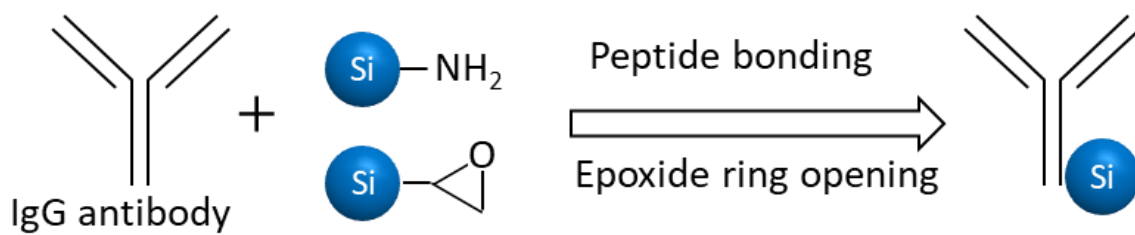


図 5.1 IgG 抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセス。

表 5.1 サンプルリスト

No.	IgG	Si-QD	Mixed molecule ratio IgG : Si-QD
S1	IgG	Si-QDs/APDMES (1:250)	1:2
S2	IgG	Si-QDs/GOPTS (1:250)	1:2
S3	IgG	Si-QDs	1:2
R1	—	Si-QDs/APDMES (1:250)	—
R2	—	Si-QDs/GOPTS (1:250)	—
R3	—	Si-QDs	—
R4	IgG	—	—

5.2.2 構造評価方法

電気泳動法

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の分子量評価は、電気泳動法を用いて行った。電気泳動法は、アガロースゲルを用いる方法、ポリアクリルアミドゲルを用いる方法などいくつかの方法があるが、今回は疎水性相互作用など物理的な非特異吸着による影響を最小限にし共有結合など化学的結合のみ評価するとともに、タンパク質の高次構造を変性させ分子量把握するために、SDS-PAGE(Sodium dodecyl Sulfate- Polyacrylamide gel electrophoresis)電気泳動法を用いた。また、表面機能化 Si 量子ドットが IgG 抗体の重鎖、軽鎖のいずれに結合しているのかを明確化する目的で、IgG 抗体のジスルフィド結合(S-S 結合)を切断するために還元剤を用いた。以下に電気泳動の実験手順を示す。

- ① サンプルバッファ調整(2 x)： サンプルバッファ(NuPAGE LDS Sample Buffer 4 x, Thermo Fisher)250 μ L と還元剤(NuPAGE Sample Reduction Agent 10 x, Thermo Fisher)100 μ L を混合し、純水を 150 μ L 添加し、ボルテックスミキサーで混合する。
- ② サンプル調整： サンプル(S1~S3、R1~R4)各々15 uL と、①で調整したサンプルバッファ 15 uL をボルテックスミキサーで混合し、ホットプレートで 95°C、5 分加熱する。
- ③ ランニングバッファ調整： ランニングバッファ(Tris/Glycine/SDS buffer 10 x, Bio-

Rad)50mL に純水 450mL を加え 10 倍希釈する。

- ④ サンプルローディング： プレキャストポリアクリルアミドゲル(Any kD Mini-PROTEAN TGX precast gel 10well 30 μ L, Bio-Rad)にピペットで②で作製したサンプルを各々20 μ L ロードする。また、分子量を定量的に評価するため、分子量マーカー(PageRuler Unstained Protein Ladder, Thermo Fisher)を 15 μ L ロードする。
- ⑤ 泳動： 垂直型電気泳動セル(Mini-PROTEAN, Bio-Rad)を用い、ゲルはプレキャストポリアクリルアミドゲル(Any kD Mini-PROTEAN TGX precast gel, Bio-Rad)を用い、印加電圧 200V で 30 分間泳動する。
- ⑥ Si 量子ドット発光バンド評価： ゲル中の Si 量子ドットのバンドを評価するため、ゲル中の Si 量子ドットの PL を Chemiluminescence イメージングシステム(FUSION FX, Vilber-Lourmat)で撮影した。励起光には 312 nm、近赤外バンドパスフィルタ(800 nm-840 nm)を用いた。
- ⑦ 染色： 電気泳動後のゲルを、クマシーブリリアントブルー(Coomassie Brilliant Blue : CBB)染色液(EzStain AQUA, ATTO)に 1 時間浸漬する。
- ⑧ 脱色： 染色後のゲルを純水に浸漬し、室温で 1 晩保管する。この際、キムワイプをゲルと同じ容器に入れておくと、きれいに脱色される。

動的光散乱法

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成による粒径評価は、動的光散乱法(dynamic light scattering: DLS)を用いて行った。DLS 測定装置(Zetasizer Ultra, Malvern Panalytical)に、微小容量用ディスポセルをセットし測定を行う。この際ディスポセル中には、十分な量(50 μ L 程度)の溶液を入れる。測定温度は 25°C に設定し、ディスポセルのセット後から測定開始まで 2 分間温度を一定に保ってから測定を行った。測定終了後、散乱強度分布、体積分布、個数分布のデータを取得した。なお、動的光散乱法により測定される粒子径は、粒子の実際の直径ではなく、アインシュタイン-ストークスの式を用いて計算される流体力学的直径(hydrodynamic diameter)であることに注意する。

透過型電子顕微鏡観察

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の構造評価は、透過型電子顕微鏡(Transmission Electron Microscope:TEM)を用いて行った。本実験では、より詳細な構造評価のため、高分解 TEM(High Resolution TEM: HR-TEM)像、及び FFT 像(Fast Fourier Transform image)を、透過型電子顕微鏡(JEM-2100F, JEOL)を用いて観察した。加速電圧は 200 kV とする。観察対象となるナノ粒子の試料は、マイクログリッドに酸化グラフェン支持膜を担持した TEM 観察用支持膜上にサンプル溶液を 1 滴滴下することで作製した。

5.2.3 発光特性評価方法

発光スペクトル測定

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後の Si 量子ドットの発光スペクトルを評価するために、電気泳動後のポリアクリルアミドゲル中の Si 量子ドット発光バンドの発光スペクトルを評価した。具体的には、電気泳動後の CBB 染色していないポリアクリルアミドゲルを Chemiluminescence イメージングシステム(FUSION FX, Vilber-Lourmat)を用いて、ゲル中の Si 量子ドットの発光バンド位置を確認し、Si 量子ドットの発光バンドが含まれるようにゲルを適当なサイズ(7 mm²程度)に割断した。その後、割断したゲルを石英セルの内壁に密着固定し、発光スペクトルを評価した。

図 5.2 に発光スペクトル測定の概略図を示す。励起光源には波長 405 nm の半導体レーザー(CUBE 1073840, COHERENT)を用いた。レーザー直後には 405 nm のバンドパスフィルタ(TECHSPEC Bandpass Filter 65133, Edmund)を配置し、アパーチャーと焦点距離 150 mm のレンズを用いてサンプル上に集光した。検出光は励起光と 90° をなす方向の光とし、焦点距離が 150 mm と 250 mm の 2 枚のレンズを用いて、分光器(SpectraPro-300i, Acton Research Corp.)のスリット上に集光した。スリット直前には手前から順番にロングパスフィルタ(575 nm)とダイクロイックフィルタ(J52529, Edmund)を設置し、レーザーからの散乱光を除去した。分光器の中心波長は 800 nm に設定した。検出器には液体窒素で冷却した InGaAs フォトダイオードアレイ(OMA-V-SE, Roper Scientific)を使用した。

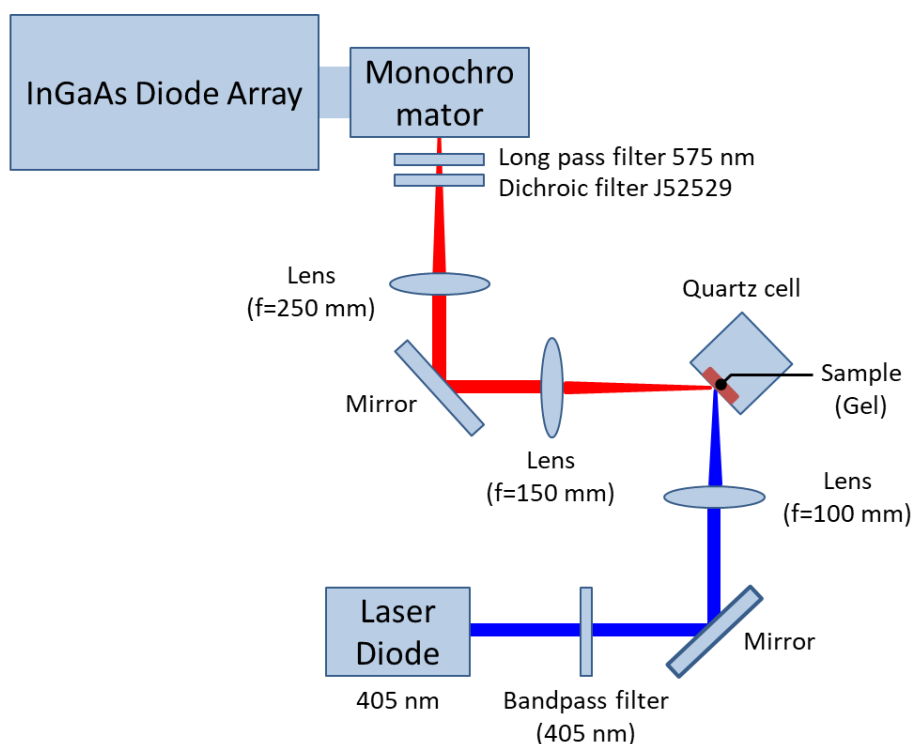


図 5.2 発光スペクトル測定系の概略図。

5.2.4 抗体結合性評価方法

蛍光イムノアッセイ評価

本研究の目的は、IgG 抗体の抗原抗体結合性と Si 量子ドットの近赤外発光を保持しつつ、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体を形成することである。そこで、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後の IgG 抗体が抗原との特異的結合性を評価するため蛍光イムノアッセイ評価を行った。図 5.3 に蛍光イムノアッセイ評価の模式図を示す。

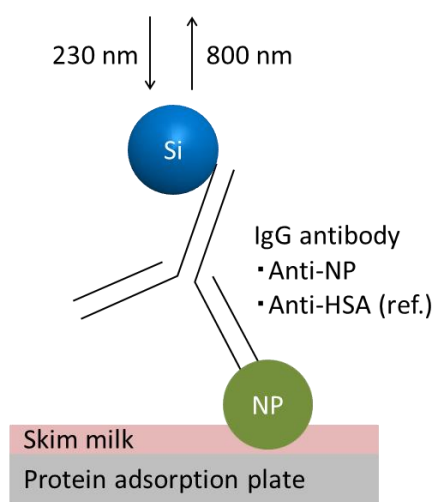


図 5.3 蛍光イムノアッセイ評価の模式図。

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成に用いた IgG 抗体(Anti-Influenza A Virus Nucleoprotein, ab66191, abcam)は、インフルエンザの核タンパク質に結合する抗体であるため、蛍光イムノアッセイにおける抗原はインフルエンザの核タンパク質(NP ; Nucleoprotein)を用いた。また、Anti-NP IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が NP と非特異吸着ではなく、抗原抗体反応により結合していることを明らかにするため、比較検討用として NP とは抗原抗体反応せずヒト血清アルブミン(HSA ; Human serum albumin)と抗原抗体反応する 2 種類の異なる Anti-HSA IgG 抗体を用いた。Anti-NP IgG 抗体と同様のプロセスで、Anti-HSA IgG 抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体を作製し、比較検討のために蛍光イムノアッセイ評価を行った。以下に蛍光イムノアッセイ評価の実験手順を示す。図 5.4 に蛍光イムノアッセイの Well 配置を示す。各条件 N=3 で行った。

- ① NP 希釈： NP(Recombinant Influenza H1N1 NP, Sino Biological)を PBS バッファで 10nM(M ; Molar = mol/L)に希釈する。
- ② NP 固定化： タンパク質吸着 ELISA(Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay)用プレート(F Maxi Sorp, Thermo Fisher)の各 Well に NP 0 (=PBS バッファ)と、①で作製した NP10 nM を 50 μ L ずつ入れ、フィルムでシールし、4°C 冷蔵庫に 1 晩保管し、NP をプレートに固定化する。

- ③ **Blocking 溶液作製**： PBS バッファに界面活性剤の Tween 20(=Polyoxyethylene Sorbitan Monolaurate, 東京化成)を 0.05 %混合し、PBS-T 溶液(Tween 0.05 %)を作製する。PBS-T 溶液にスキムミルク粉末を溶解させ、5%スキムミルク in PBS-T(Tween 0.05 %)を作製する。
- ④ **Blocking**： 1 晩保管し NP を固定化したプレートから NP 溶液を取り除く。この際、イスなどクッションの上に複数枚キムタオルを重ね、その上にプレートをたたきつけることで、Well の NP0(PBS バッファ)溶液と NP10 nM 溶液を混合させずに取り除くことができる。その後、Well の Wash は行わずに、③で作製した Blocking 溶液を各 Well に 300 μ L ずつ入れ、フィルムでシールし、室温で 1 時間保管する。1 時間経過後、Well の Blocking 溶液を前述した様にキムタオルにたたきつけ取り除き、プレートウォッシャー(HydroFlex, TECAN)を用いて、PBS-T 溶液(Tween 0.05 %) で Well を 3 回 Wash する。
- ⑤ **抗原抗体反応**： 第 4 章で述べた Si 量子ドット表面機能化プロセス、及び第 5 章で述べた IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成プロセスで作製した Anti-NP IgG 抗体 (Anti-Influenza A Virus Nucleoprotein, ab66191, abcam)-表面機能化 Si 量子ドットの複合体サンプル溶液を、各 Well に 50 μ L 入れる。比較検討用として、NP と抗原抗体反応しない 2 種類の Anti-HSA IgG 抗体(Anti-HSA, 15C7, HyTest), (Anti-HSA, 1A9, HyTest)をそれぞれ同様のプロセスで表面機能化 Si 量子ドットと複合体形成したサンプル溶液を各 Well に 50 μ L ずつ入れ、フィルムでシールし、室温で 3 時間保管する。3 時間経過後、Well の Blocking 溶液を前述した様にキムタオルにたたきつけ取り除き、プレートウォッシャー(HydroFlex, TECAN)を用いて、PBS-T 溶液(Tween 0.05 %)で Well を 3 回 Wash する。
- ⑥ **Si 量子ドット発光測定**： プレートリーダー(Infinite M1000 PRO, TECAN)を用い、励起波長 230 nm、検出波長 800 nm で各 Well の Si 量子ドットの発光強度を測定する。

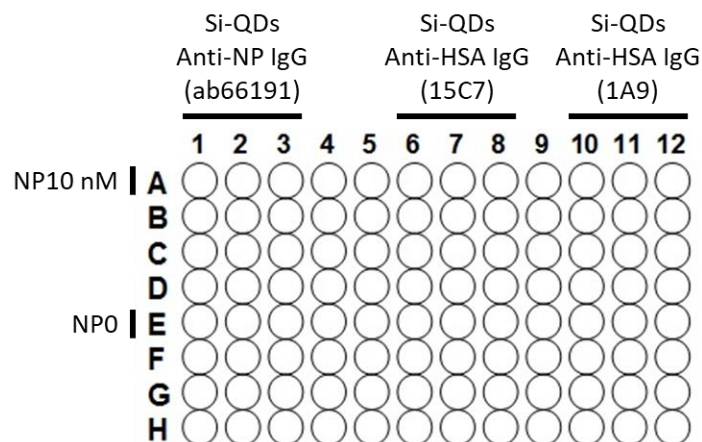


図 5.4 蛍光免疫アッセイの Well 配置。

5.3 実験結果

5.3.1 構造評価

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の形成を明らかにするために、IgG 抗体-APDMES 表面機能化 Si 量子ドット(S1)、IgG 抗体-GOPTS 表面機能化 Si 量子ドット(S2)、IgG 抗体-未修飾 Si 量子ドット(S3)に関して、APDMES 表面機能化 Si 量子ドット(R1)、GOPTS 表面機能化 Si 量子ドット(R2)、未修飾 Si 量子ドット(R3)、IgG 抗体(R4)を比較対象に、電気泳動による分子量評価、動的光散乱による粒径評価、TEM による直接観察評価を行った。

電気泳動評価

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の形成を分子量変化から評価するため、SDS-PAGE による電気泳動を行った。電気泳動ゲル中の IgG 抗体バンドは CBB 染色により目視で、Si 量子ドットバンドは CBB 染色前に Chemiluminescence イメージングシステムを用い Si 量子ドットの近赤外発光を撮影することにより評価した。図 5.5(a)に CBB 染色後の電気泳動ゲル写真を、図 5.5(b)に CBB 染色前の Chemiluminescence イメージングシステム(FUSION FX、Vilber-Lourmat)を用いて励起波長 312 nm、近赤外バンドフィルタ(800 nm-840 nm)で撮影した電気泳動ゲルの蛍光写真を示す。

図 5.5(a)において、IgG 抗体を含まない比較対象の R1、R2、R3 では染色バンドは見られず、染色バンドは IgG 抗体由来であることは明らかである。R4 より IgG 抗体は 25 kDa と 50 kDa に 2 つのバンドを示し、IgG 抗体の軽鎖と重鎖と良好に一致していた¹⁷⁰⁻¹⁷²。これは、還元剤により IgG 抗体のジスルフィド結合が切断されたためである。IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S1 では、25 kDa と 50 kDa の IgG 抗体の軽鎖と重鎖のバンドは完全に消滅しており、200 kDa 付近に薄っすらとブロードなバンドが確認できた。これは、IgG 抗体の軽鎖と重鎖に Si 量子ドットが共有結合したことを示している。一方、IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S2 と、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドットを混合した S3 は、R4 の IgG 抗体と同じ 25 kDa と 50 kDa の位置にバンドが確認できた。ただ、S2、S3 いずれにおいても、50 kDa の重鎖のバンドはいずれも薄っすらと分子量の大きい側に広がっているのが確認できる。これより、S2 と S3 においては、IgG 抗体の軽鎖と重鎖は Si 量子ドットと共有結合せずにそのまま残っているが、極一部の IgG 抗体の重鎖が Si 量子ドットと結合していると考えられる。

図 5.5(b)において、Si 量子ドットを含まない比較対象の R4 ではバンドは見られず、Si 量子ドットの発光バンド由来であることは明らかである。IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S1 では 200 kDa 付近にブロードな Si 量子ドットの発光バンドが確認でき、この発光バンドは 200 kDa 付近の IgG 抗体の染色バンドと完全に

一致した。一方、IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S2 と、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドットを混合した S3 では 50 kDa-60 kDa と 150 kDa 付近に薄っすらと発光バンドが見られ、50 kDa-60 kDa 付近の薄っすらとしたブロード発光バンドは図 5.5(a)の S2 と S3 における IgG 抗体染色バンドと一致し、IgG 抗体-Si 量子ドットの結合を示唆するが、その量は S1 に比べると極微量である。

以上より、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S1 では、IgG 抗体染色バンドと Si 量子ドット発光バンドが 200 kDa 付近で完全に一致し、IgG 抗体の軽鎖と重鎖に対応する 25 kDa と 50 kDa の染色バンドは完全に消滅していたことより、S1 においてはほぼ全ての IgG 抗体の重鎖と軽鎖が Si 量子ドットと共有結合していることを確認できた。複合体形成後の分子量が 200 kDa 程度であることから、IgG 抗体に複数の Si 量子ドットが共有結合していると考えられる。また複数の IgG 抗体が Si 量子ドットを介して共有結合している可能性もある。複合体の構造の議論は、動的光散乱評価と、TEM 構造解析の結果を踏まえ、後で議論する。一方、IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S2 と、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドットを混合した S3 では、IgG 抗体染色バンド及び Si 量子ドット発光バンドより僅かに分子量が増加していることが確認できたものの、IgG 抗体の軽鎖と重鎖に対応する 25 kDa と 50 kDa の染色バンドは比較対象である IgG 抗体(R4)と同じ位置にはっきりと確認でき、大半の IgG 抗体が Si 量子ドットと未結合であることが確認できた。

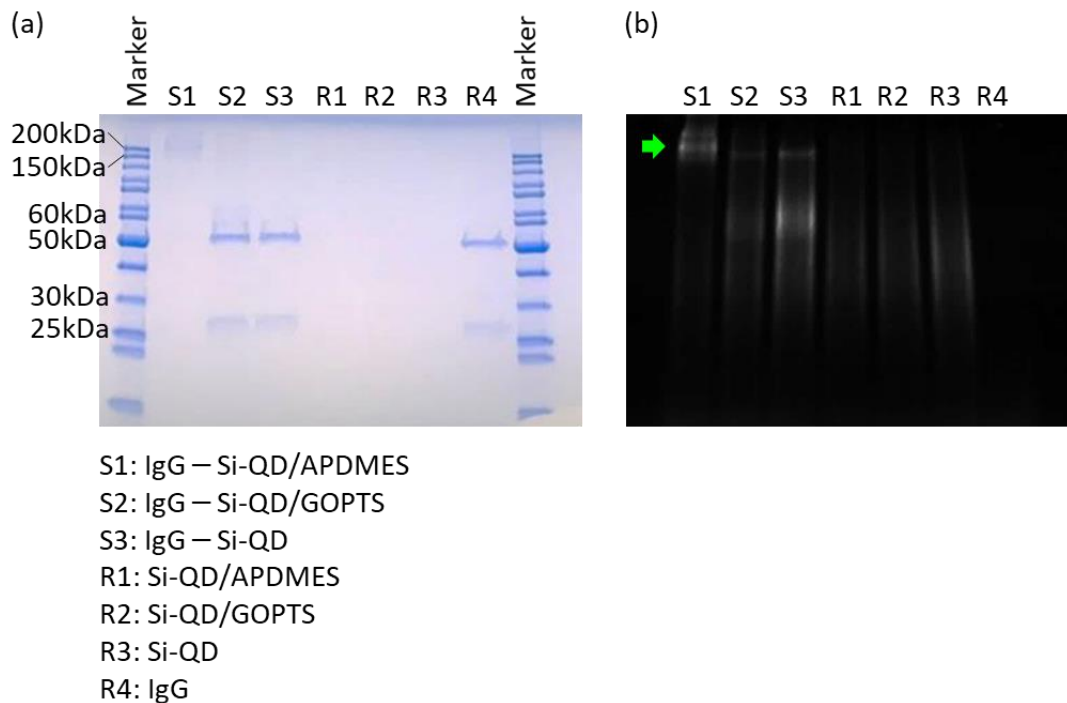


図 5.5 (a)CBB 染色後の電気泳動ゲル写真、(b)CBB 染色前に Chemiluminescence イメージングシステムを用いて励起波長 312 nm、近赤外バンドパスフィルタ(800 nm -840 nm)を用いて撮影した電気泳動ゲルの蛍光写真。

動的光散乱評価

IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の形成を粒径変化から評価するため、動的光散乱法を用いて流体力学的直径を測定した。図 5.6 に IgG 抗体-APDMES 表面機能化 Si 量子ドット(S1)、IgG 抗体-GOPTS 表面機能化 Si 量子ドット(S2)、IgG 抗体-未修飾 Si 量子ドット(S3)、Si 量子ドット(R3)、IgG 抗体(R4)における動的光散乱法で測定した流体力学的直径の強度分布、体積分布、個数分布のピークをまとめ、図 5.7 に動的光散乱法で測定した流体力学的直径の個数分布を示す。

図 5.6 より、全てのサンプルにおいて、流体力学的直径の強度分布、体積分布、個数分布のピークの違いはほとんど見られない。これは、測定範囲である直径 1 nm-100 nm の範囲外に、巨大な凝集体が形成されていないことを示唆している。

図 5.7 に示した流体力学的直径の個数分布を用いて、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体のサイズを議論する。Si 量子ドット(R3)の平均流体力学的直径は 7.4 nm であった。この値は TEM による Si 量子ドットの直接観察による、平均直径 3.9 nm、標準偏差 0.8 nm と比較して大きい⁷⁷。水溶液に分散した Si 量子ドットにおける動的光散乱法による流体力学的直径と TEM 観察による直径の不一致は先行研究でも報告されており、動的光散乱法と TEM の評価条件下における Si 量子ドットの表面状態に起因する¹⁷³⁻¹⁷⁶。IgG 抗体の平均流体力学的直径は 7.7 nm であった。

IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S2 と、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドットを混合した S3 における平均流体力学的直径はそれぞれ、7.5 nm と 7.7 nm であり、この値はシリコン量子ドット(R3)7.4 nm と IgG 抗体(R4)7.7 nm と近い値であった。これは S2 と S3 では、IgG 抗体と Si 量子ドットの大部分が複合体を形成せず、独立した状態で存在することを示している。この結果は、図 5.5 で示した電気泳動において、S2 と S3 では複合体のバンドはかなり薄く、IgG 抗体の軽鎖、重鎖のバンドが明確に表れた結果と良好に一致する。

一方、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを混合した S1 の平均流体力学的直径は 33.0 nm と、S2、S3、R3、R4 に比べてかなり大きな値であった。S1 のサイズ増大は、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットが結合し、複合体を形成したためと考えられる。この結果は、図 5.5 で示した電気泳動において S1 では IgG の軽鎖と重鎖に対応するバンドは見られず、150 kDa-200 kDa 付近に新たにバンドが見られ複合体が形成できているという結果と良好に一致する。さらに S1 において、流体力学的直径の個数分布データにおいて 10 nm 以下の粒子は見られず、これはほぼ全ての IgG 抗体と Si 量子ドットが複合体形成に消費されたことを支持している。

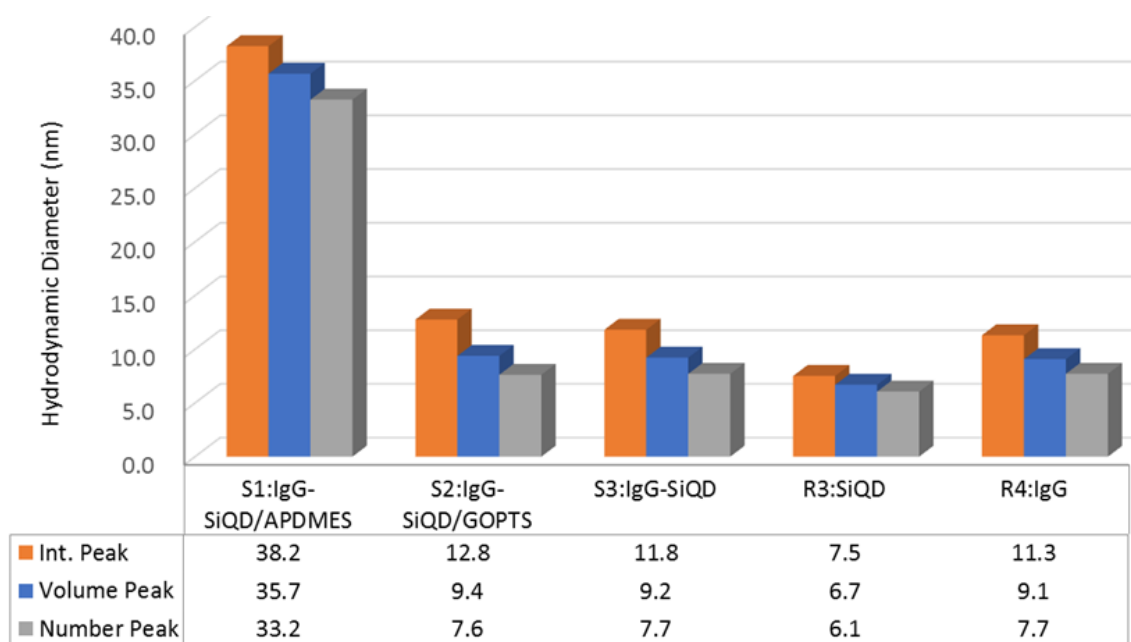


図 5.6 IgG 抗体-Si 量子ドット混合溶液、Si 量子ドット、IgG 抗体における動的光散乱法で測定した流体力学直径の強度分布、体積分布、個数分布のピーク。

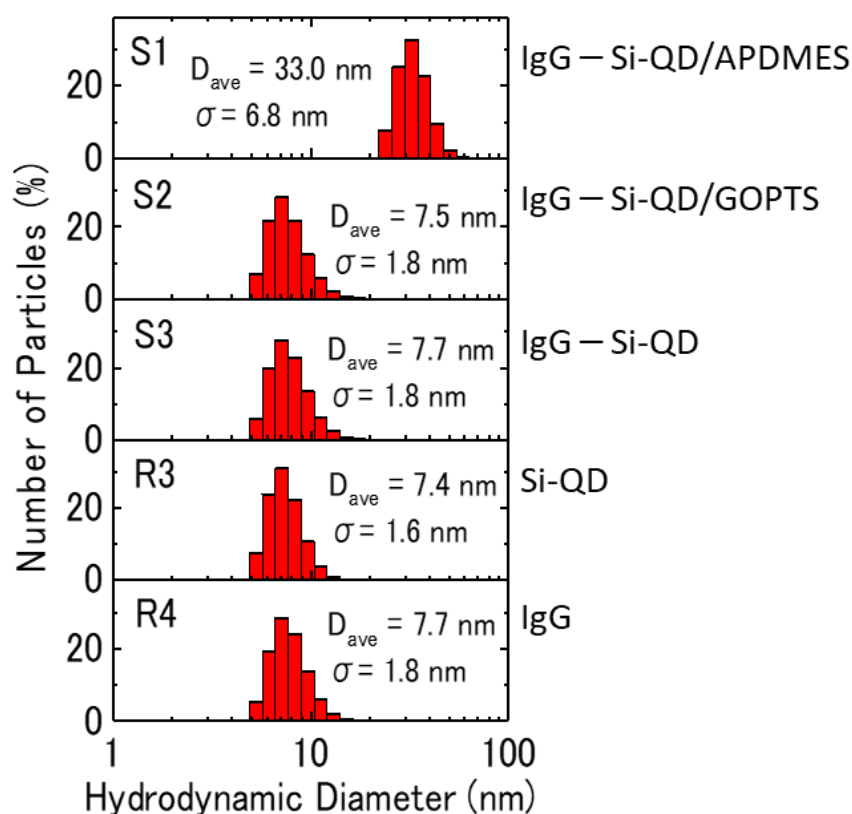


図 5.7 IgG 抗体-Si 量子ドット混合溶液、Si 量子ドット、IgG 抗体における動的光散乱法で測定した流体力学直径の個数分布。

透過型電子顕微鏡観察

図 5.5 で示した電気泳動法による分子量評価と、図 5.6 と図 5.7 で示した動的光散乱法による粒径評価の結果より、分子量と粒径の増加が確認され複合体を形成が示唆される IgG 抗体-APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)において、複合体形成を直接的に確認するため透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて観察した。図 5.8(a)に S1 の TEM 像を、図 5.8(b)に拡大した TEM 像を示す。アモルファスカーボン支持膜のバックグラウンドノイズを低減し、有機物を鮮明に観察するために、酸化グラフェン支持膜を用いた¹⁵⁾。

図 5.8(a)の TEM 像より、20 nm-30 nm 程度のアモルファスの物体が確認でき、これらは IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの複合体であると考えられる。図 5.8(b)の拡大 TEM 像より、黄色の四角で囲んだ複合体と想定される有機物を拡大すると、アモルファスの物体の中に直径 4.2 nm 程度の結晶性粒子を確認することができた。以上より、アモルファスの物体は有機物である IgG 抗体、結晶性粒子は Si ナノ結晶である Si 量子ドットと想定される。

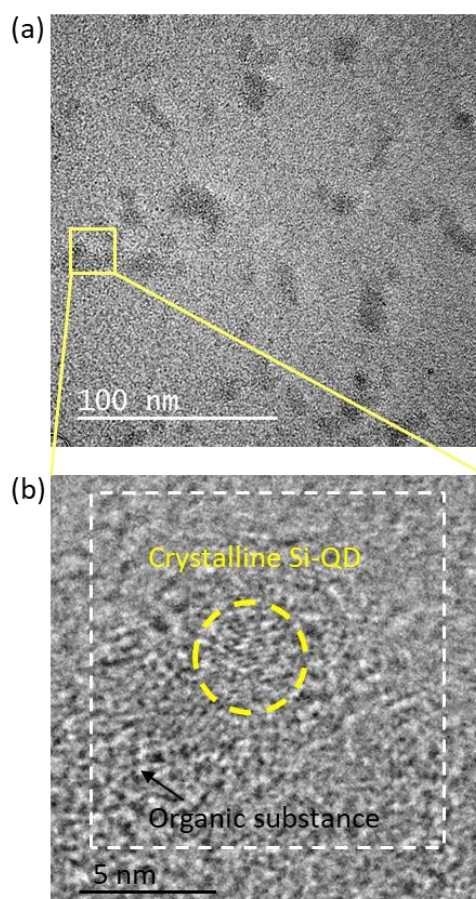


図 5.8 (a)IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)の TEM 像。
(b)(a)において黄色で囲んだ領域を拡大した TEM 像。

次に図 5.8(b)で見られた結晶性粒子が Si 量子ドットであることを確認するために、図 5.8(b)で白い点線で囲んだ領域の高速フーリエ変換(FFT; Fast Fourier Transform)像を取得した。図 5.9 に FFT 像を示す。

アモルファス物体からのハローリングパターンにおいて、いくつかのスポットが確認され、これらのスポットは結晶 Si(JCPDS No. 27-1402)の $\{111\}$ と $\{220\}$ と良好に一致した⁷⁶。これにより、図 5.8(b)で見られた結晶性粒子が Si 量子ドットであることが確認された。アモルファス物体の中に Si 量子ドットが確認されたことより、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)では、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されたことを確認できた。

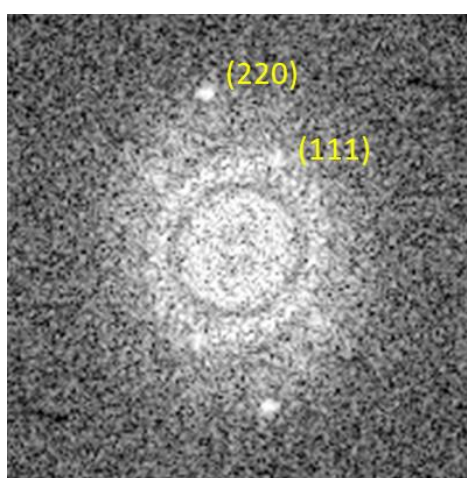


図 5.9 図 5.8(b)において白点線で囲んだ領域で FFT 像。

以上の結果より、電気泳動法による分子量評価と、動的光散乱法による粒径評価の結果は良好に一致しており、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットを混合したサンプル(S1)に関しては、分子量増加と粒径増加が確認され、単体の IgG 抗体と Si 量子ドットは確認されなかった。さらに、S1 における TEM 観察による構造解析と FFT 像より、IgG 抗体の中に Si 量子ドットが存在することが確認できた。これらの結果より、IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)は、Si 量子ドットが IgG 抗体の軽鎖及び重鎖に共有結合し、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されたことを確認できた。また、IgG 抗体と Si 量子ドットは複合体形成に消費され、単体の IgG 抗体と Si 量子ドットは枯渇していた。

一方、IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S2)と、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドットの混合サンプル(S3)に関しては、分子量増加と粒径増加は確認されず、単体の IgG 抗体と Si 量子ドットが存在することが確認でき、複合体を形成していないことを確認した。

5.3.2 発光特性評価

発光スペクトル測定

本研究の目的は、IgG 抗体の抗原との特異的結合性と、Si 量子ドットの近赤外発光特性を保持しつつ、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体を形成することである。他の研究グループの Si 量子ドットでは、Si 量子ドットの表面機能化、及び生体分子との複合体形成後に、Si 量子ドットと発光特性が変化することが報告されている¹⁴⁶⁻¹⁴⁹。一方、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは発光特性が表面状態に依存せず安定である特徴を有し、シランカップリング分子による表面機能化も発光スペクトルが変化しないことを示したが¹⁵⁴、抗体との共有結合による発光特性への影響は未確認である。そこで、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後の Si 量子ドットの発光スペクトルを評価する。

5.3.1 で IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)で、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されていることを確認した。そこで、S1 における IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の Si 量子ドットの発光スペクトル評価を行うために、図 5.5(b)で示した CBB 染色前のポリアクリルアミド電気泳動ゲルを Chemiluminescence イメージングシステム(FUSION FX、Vilber-Lourmat)で Si 量子ドットの発光バンドを評価しバンド位置を確認した後、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体である S1 の 200kDa 付近のゲル(図 5.5(b)の緑矢印)を割断し、PL スペクトル評価を行った。

図 5.9 に電気泳動ゲル中の S1 の IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の Si 量子ドットの発光スペクトルを緑線で示す。また比較対象として、未修飾 Si 量子ドット(黒ドット)、APDMES 表面機能化 Si 量子ドット(赤ドット)の発光スペクトルを示す。3 つの発光スペクトルはほぼ完全に一致しており、Si 量子ドットは IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後も、未修飾および APDMES 表面機能化 Si 量子ドットと同様に近赤外発光を保持していることを確認できた。同時に電気泳動評価(図 5.5(b))の発光バンドが Si 量子ドットの発光であることを証明できた。

以上より、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後も Si 量子ドットの発光スペクトル形状に変化はなく、近赤外発光を保持していることを確認した。B,P 同時ドーピング Si 量子ドットは、シランカップリング分子による表面機能化後、及び抗体との共有結合後も近赤外発光特性を維持しており、表面状態変化に極めて鈍感で、安定した近赤外発光特性を有することを確認できた。

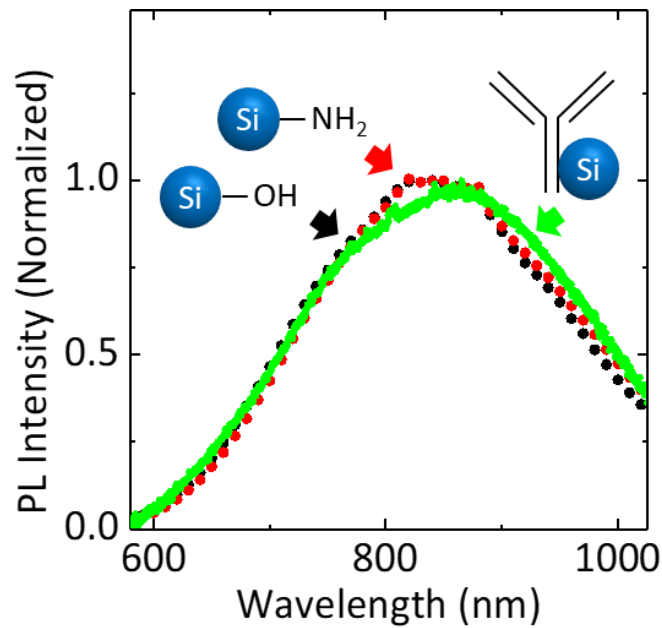


図 5.9 電気泳動ゲルにおける S1 の 200 kDa 付近の IgG 抗体-APDMES 表面機能化 Si 量子ドット複合体の Si 量子ドットの発光スペクトル(図 5.5(b)緑矢印)。励起光は 415 nm。

5.3.3 抗体結合性評価

蛍光イムノアッセイ評価

本研究の目的は、IgG 抗体の抗原結合性と、Si 量子ドットの近赤外発光特性を保持しつつ、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体を形成することである。IgG 抗体における抗原結合部位は、図 4.2 で示した Fab(ab; antigen binding の略)と呼ばれる IgG 抗体の Y 字の上端 2 箇所である。そのため、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成により、Si 量子ドットが IgG 抗体の抗原結合部位の周辺に共有結合した場合には、複合体の IgG 抗体は抗原との結合性を消失している可能性がある。そこで、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の IgG 抗体における抗原との特異的結合性を評価する。

5.3.1 で IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)で、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されていることを確認した。そこで S1 における IgG 抗体-Si 量子ドット複合体サンプルの蛍光イムノアッセイ評価を行った。IgG 抗体が Anti-NP IgG 抗体であるため、タンパク質吸着プレートに抗原としてインフルエンザウイルスの核タンパク質(NP; Nucleoprotein)を固定化し、その後、IgG 抗体-Si 量子ドットの非特異吸着を低減するため、ブロッキング剤としてスキムミルクを用いた。次に、S1 の IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の IgG 抗体をプレートに固定化した NP と抗原抗体反応させ、未反応の IgG 抗体-Si 量子ドット複合体を洗浄により取り除いた。さらに、複合体における IgG 抗体と NP との結合が、非特異吸着ではなく抗原抗体反応に起因することを明らかにするため、NP と結合せずヒト血清アルブミン(HSA;

Human Serum Albumin)と抗原抗体反応する2種類のIgG抗体(Anti-HSA IgG)を、それぞれAPDMES表面機能化Si量子ドットと、S1と同様のプロセスで結合させ、Anti-HSA IgG抗体-APDMES表面機能化Si量子ドット複合体を作製し、比較対象として蛍光免疫アッセイを行った。

図5.10にタンパク質吸着プレート上のSi量子ドットのPL強度を示す。赤の棒グラフは吸着プレート上にNP固定なし、緑の棒グラフは吸着プレート上にNP10 nMを固定したPL強度で、棒グラフはN=3の平均値、エラーバーは標準偏差を示している。励起波長は230 nm、検出波長は800 nmとした。

Anti-NP IgG抗体とAPDMES表面機能化Si量子ドットを混合したサンプルS1では、NPなしに対して、NP10 nMではPL強度が増加した。一方、比較対象としてAnti-HSA IgG抗体とAPDMES表面機能化Si量子ドットを混合した2種類のサンプルではいずれも、NPによるPL強度の増加は見られない。この結果は、Anti-NP IgG抗体を用いたS1のNPによるPL増加は、NPへのIgG抗体-Si量子ドット複合体の非特異吸着ではなく、抗原抗体反応に起因していることを示している。

以上より、S1においてIgG抗体-APDMES表面機能化複合体におけるIgG抗体がNPとの抗原抗体結合性を保持していることが明らかとなった。しかし、抗原抗体反応によるPL増加は、S1のNPなしで見られた非特異吸着のPL強度に比べ小さく、蛍光検出型バイオセンサにIgG抗体-APDMES表面機能化Si量子ドットを応用する際には、バイオセンサの高感度化に向け、IgG抗体-APDMES表面機能化Si量子ドットの非特異吸着を抑制するプロセス開発が必要不可欠であることも明らかとなった。

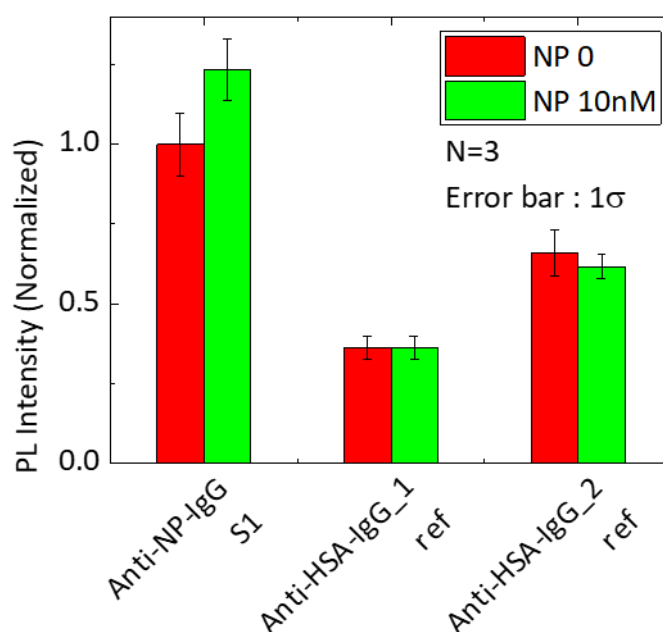


図5.10 蛍光免疫アッセイにおけるS1のPL強度。Anti-HSA IgG抗体は比較対象。励起波長230 nm、検出波長800 nm。N=3の平均値、エラーバーは標準偏差。

5.4 考察

IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)、IgG 抗体と GOPTS 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S2)、IgG 抗体と未修飾 Si 量子ドット(S3)の混合サンプル(S3)に関して、APDMES 表面機能化 Si 量子ドット(R1)、GOPTS 表面機能化 Si 量子ドット(R2)、未修飾 Si 量子ドット(R3)、IgG 抗体(R4)を比較対象に、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成の構造評価と、複合体形成後の Si 量子ドットの発光特性評価、複合体形成後の IgG 抗体の特異的結合性評価を行った。IgG 抗体と APDMES 表面機能化 Si 量子ドットの混合サンプル(S1)において、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成を証明し、複合体形成後も、Si 量子ドットは近赤外発光を、IgG 抗体は抗原抗体結合性を保持していることを示した。ここでは、S1 における IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の構造について考察する。

S1 において、電気泳動法で 200 kDa に IgG 抗体の染色バンドと Si 量子ドットの発光バンドが見られたこと、動的光散乱法で流体力学的直径が平均 33 nm であったことより、IgG 抗体と Si 量子ドットが 1:1 で結合し複合体を形成しているのではなく、IgG 抗体に複数の Si 量子ドットが結合、または、Si 量子ドットに複数の IgG 抗体が結合していると考えられる。IgG 抗体と Si 量子ドットの分子数混合比が 1:2 であることを考慮し、S1 において想定される IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の構造の 1 つのモデルを図 5.11 に示す。

このモデルの左図において、IgG 抗体の長さが約 15 nm、Si 量子ドットの平均直径が 3.9 nm であり、IgG 抗体と Si 量子ドットは 3 次的に複合体を形成することを考慮すると^{177,178}、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体のサイズは 30 nm 程度と想定され、動的光散乱法で得られた流体力学直径 33.0 nm と近い値である。この IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の分子量は、IgG 抗体の軽鎖と重鎖がそれぞれ 25 kDa と 50 kDa で、Si 量子ドット 1 個の分子量は 40 kDa であるため、690 kDa となる。

SDS-PAGE では還元剤により IgG 抗体のジスルフィド結合が切断されるため、図 5.11 の右図の構造となる。このモデルにおいて分子量は 205 kDa となり、SDS-PAGE 電気泳動において S1 で見られた IgG 抗体の染色バンドと Si 量子ドットの発光バンドの位置と同程度の値になる。

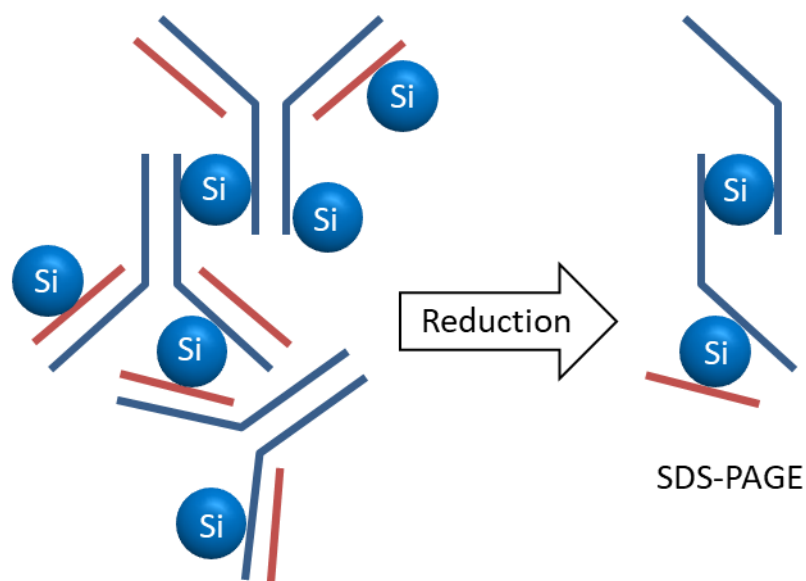


図 5.11 Si において想定される IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の 1 つのモデル。左は溶液中、右は SDS-PAGE でジスルフィド結合が切断された状態。

5.5 まとめ

本章では、IgG 抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成プロセスを開発し、アミノ基である APDMES で表面機能化した Si 量子ドットにより、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成に成功した。IgG 抗体-Si 量子ドット複合体の形成を証明するために、SDS-PAGE 電気泳動法、動的光散乱法、TEM 観察により詳細に解析した。SDS-PAGE 電気泳動により、Si 量子ドットが IgG 抗体の軽鎖と重鎖の両方に共有結合していることが明らかとなった。また、電気泳動ゲルにおける複合体を示すバンドの発光スペクトル評価により、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後も Si 量子ドットの発光スペクトル形状に変化がなく近赤外発光を保持しており、B,P 同時ドープ Si 量子ドットの近赤外発光が表面状態に依存せず極めて安定であることが明らかとなった。さらに、蛍光免疫アッセイ評価により、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成後も IgG 抗体は抗原抗体結合性を保持していることが明らかになった。Si 量子ドットの近赤外発光と IgG 抗体の抗原抗体結合性を保持しつつ、共有結合により IgG 抗体-Si 量子ドット複合体形成に成功したことは、実用化を見据えた高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けて、極めて大きな前進である。

第6章 本研究のまとめ

本研究では、実用化を視野に入れた蛍光検出型バイオセンサの高感度化に向けた要素技術の構築を目指し、新規プラズモニック基板の開発と、新規蛍光体のバイオセンサ応用技術を開発した。新規プラズモニック基板は、優れた設計自由度、大面積均一性、構造再現性、生産性と優れた特徴を持つ NIL プラズモニック基板の開発を行った。その結果、Au ナノ構造の表面平滑性を改善することで、シミュレーションにより予測可能なシャープな 2 つのプラズモン共鳴を持つ NIL プラズモニック基板の開発に成功した。新規蛍光体のバイオセンサ応用技術としては、近赤外発光、発光安定性、大きなストークスシフト、表面機能化自由度、人体及び環境適合性を有する我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットを用いて、バイオセンサ応用に向け、長波長光子による発光増強、Si 量子ドット表面機能化プロセス、及び抗体-表面機能化 Si 量子ドット複合体形成プロセスを開発した。その結果、NIL プラズモニック基板によるプラズモンとの結合により長波長光子での Si 量子ドットの吸収断面積及び輻射遷移割合の同時増強を実現した。また、シランカップリング分子を用いて Si 量子ドットの優れた水溶性分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ表面機能化することに成功し、Si 量子ドットの近赤外発光特性及び抗体の特異的結合性を保持しつつ IgG 抗体-表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成に成功した。これらの結果は、実用化を見据えた高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けた要素技術として、非常に重要な意味を持つ。以下に、本研究で得られた成果と今後の展望をまとめる。

第2章では、NIL プラズモニック基板の開発について述べた。本研究では、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向け、優れた設計自由度、大面積均一性、構造再現性、生産性を有している NIL プラズモニックを開発した。先行研究で報告されている従来の NIL プラズモニック基板はプラズモン共鳴がブロードであった。そのため、高い発光増強度が得られないことに加え、シミュレーションで電場分布及びホットスポット位置を予測できず、プラズモニック基板の特性改善には試行錯誤に頼らざるを得なかった。本研究では、Au ナノ構造における Au 表面平滑性を改善することによりシミュレーション予測と同等にシャープなプラズモン共鳴を実現したことで、電場分布、ホットスポット位置、及びプラズモニックモードを明らかにし、シミュレーションで予測可能なプラズモニック基板を開発した。さらに、開発した NIL プラズモニック基板のバイオセンサ応用可能性を、インフルエンザウイルスの核タンパク質検出により実証した。これらの結果は、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けた大面積プラズモニック基板の開発において、非常に大きな一歩である。

第3章では、NIL プラズモニック基板による Si 量子ドットの発光増強について述べ

た。本研究では、優れた発光特性及び発光安定性を有する我々の研究グループで開発した B,P 同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用に向けて、Si 量子ドットの課題である長波長光子での小さい吸収断面積を、NIL プラズモニック基板によるプラズモンとの結合により解決した。NIL プラズモニック基板上に Layer by Layer 法で形成したポリマースペース層を用いて Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離を厳密に制御し、発光励起スペクトル、発光スペクトル、及び発光減衰ダイナミクスと、反射スペクトルを詳細に解析することで、プラズモンとの結合により長波長光子での Si 量子ドットの吸収断面積増大及び輻射割合増大による同時増強を明らかにした。また、発光増強の Si 量子ドット-Au ナノ構造間距離依存性を明らかにすることで、バイオセンサの高感度化に向けた蛍光体配置位置を示した。これらの結果は、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けた、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用において、非常に大きな一歩である。

第4章では、シランカップリング分子による Si 量子ドットの表面機能化について述べた。本研究では、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットを抗体と結合させるために、シランカップリング分子を用いてアミノ基、エポキシ基に表面機能化するプロセスを開発した。シランカップリング分子構造、及び Si 量子ドットとシランカップリング分子の分子数混合比を制御することにより、B,P 同時ドーピング Si 量子ドットが有する水溶液分散性及び近赤外発光特性を保持しつつ、Si 量子ドット表面をアミノ基及びエポキシ基に修飾できる表面機能化プロセス条件を見出した。これらの結果は、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けた B,P 同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用において、非常に重要なステップとなったと言える。

第5章では、抗体と表面機能化 Si 量子ドットの複合体形成について述べた。本研究では、第4章で開発したプロセスで表面機能化した Si 量子ドットを用いて、抗体との複合体形成プロセスを開発した。アミノ基で機能化した Si 量子ドットと抗体のカルボキシル基をペプチド結合させることで、IgG 抗体-Si 量子ドット複合体が形成されていることを、電気泳動、動的な光散乱(Dynamic light scattering ; DLS)、及び透過型電子顕微鏡(Transmission electron microscopy ; TEM)により詳細に解析し、表面機能化 Si 量子ドットが IgG 抗体の軽鎖及び重鎖に共有結合していることを明らかにした。さらに、複合体形成後に、Si 量子ドットが近赤外発光を保持していること、IgG 抗体が抗原との特異的結合性を保持していることを明らかにした。これらの結果は、高感度蛍光検出型バイオセンサの実現に向けた B,P 同時ドーピング Si 量子ドットのバイオセンサ応用において、非常に大きな一歩である。

参考文献

1. Grieshaber, D., MacKenzie, R., Vörös, J. & Reimhult, E. Electrochemical Biosensors - Sensor Principles and Architectures. *Sensors* **8**, 1400–1458 (2008).
2. Jeong, Y., Kook, Y. M., Lee, K. & Koh, W. G. Metal enhanced fluorescence (MEF) for biosensors: General approaches and a review of recent developments. *Biosens. Bioelectron.* **111**, 102–116 (2018).
3. Hoa, X. D., Kirk, A. G. & Tabrizian, M. Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress. *Biosens. Bioelectron.* **23**, 151–160 (2007).
4. Rajesh, Ahuja, T. & Kumar, D. Recent progress in the development of nano-structured conducting polymers/nanocomposites for sensor applications. *Sensors Actuators, B Chem.* **136**, 275–286 (2009).
5. L. C. Clark. Monitor_and_Control_of_Blood_and_Tissue_Oxygen. *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **2**, 41–48 (1956).
6. 堀池靖浩 & 宮原裕二. バイオチップとバイオセンサー. (共立出版, 2006).
7. Glick, D. Microchemical analytical techniques of potential clinical interest. *Clin. Chem.* **23**, 1465–71 (1977).
8. Whitehead, T. P., Kricka, L. J., Carter, T. J. & Thorpe, G. H. Analytical luminescence: its potential in the clinical laboratory. *Clin. Chem.* **25**, 1531–46 (1979).
9. Ju, H., Zhang, X. & Wang, J. *NanoBiosensing: Principles, Development and Application*. (Springer, 2011).
10. Zhang, S., Geryak, R., Geldmeier, J., Kim, S. & Tsukruk, V. V. Synthesis, Assembly, and Applications of Hybrid Nanostructures for Biosensing. *Chem. Rev.* **117**, 12942–13038 (2017).
11. Bauch, M., Toma, K., Toma, M., Zhang, Q. & Dostalek, J. Plasmon-Enhanced Fluorescence Biosensors: A Review. *Plasmonics* **9**, 781–799 (2014).
12. Kelly, K. L., Coronado, E., Zhao, L. L. & Schatz, G. C. The Optical Properties of Metal Nanoparticles: The Influence of Size, Shape, and Dielectric Environment. *J. Phys. Chem. B* **107**, 668–677 (2003).
13. 梶川浩太郎, 岡本隆之, 高原淳一 & 岡本晃一. アクティブ・プラズモニクス. (Koronasha, 2013).
14. 岡本隆之 & 梶川浩太郎. プラズモニクス: 基礎と応用. (講談社, 2010).

15. プラズモンナノ材料の開発と応用. (シーエムシー出版, 2011).
16. Ford, G. W. & Weber, W. H. Electromagnetic interactions of molecules with metal surfaces. *Phys. Rep.* **113**, 195–287 (1984).
17. Bharadwaj, P. & Novotny, L. Spectral dependence of single molecule fluorescence enhancement. *Opt. Express* **15**, 14266 (2007).
18. Drexhage, K. H. Influence of a dielectric interface on fluorescence decay time. *J. Lumin.* **1–2**, 693–701 (1970).
19. Geddes, C. D. *et al.* Roughened silver electrodes for use in metal-enhanced fluorescence. *Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **60**, 1977–1983 (2004).
20. Duan, H., Hu, H., Kumar, K., Shen, Z. & Yang, J. K. W. Direct and reliable patterning of plasmonic nanostructures with sub-10-nm gaps. *ACS Nano* **5**, 7593–7600 (2011).
21. Malak, S. T. *et al.* Stacked gold nanorectangles with higher order plasmonic modes and top-down plasmonic coupling. *J. Phys. Chem. C* **118**, 5453–5462 (2014).
22. Koh, A. L., Fernández-Domínguez, A. I., McComb, D. W., Maier, S. A. & Yang, J. K. W. High-resolution mapping of electron-beam-excited plasmon modes in lithographically defined gold nanostructures. *Nano Lett.* **11**, 1323–1330 (2011).
23. Ah, C. S. *et al.* Size-controlled synthesis of machinable single crystalline gold nanoplates. *Chem. Mater.* **17**, 5558–5561 (2005).
24. Huang, J. S. *et al.* Atomically flat single-crystalline gold nanostructures for plasmonic nanocircuitry. *Nat. Commun.* **1**, (2010).
25. Horák, M. *et al.* Comparative study of plasmonic antennas fabricated by electron beam and focused ion beam lithography. *Sci. Rep.* **8**, 1–8 (2018).
26. Chen, Y. *et al.* ‘sketch and Peel’ Lithography for High-Resolution Multiscale Patterning. *Nano Lett.* **16**, 3253–3259 (2016).
27. Chen, Y. *et al.* Rapid Focused Ion Beam Milling Based Fabrication of Plasmonic Nanoparticles and Assemblies via ‘sketch and Peel’ Strategy. *ACS Nano* **10**, 11228–11236 (2016).
28. Jensen, T. R., Malinsky, M. D., Haynes, C. L. & Van Duyne, R. P. Nanosphere Lithography: Tunable Localized Surface Plasmon Resonance Spectra of Silver Nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **104**, 10549–10556 (2000).
29. Hicks, E. M. *et al.* Plasmonic properties of film over nanowell surfaces fabricated by nanosphere lithography. *J. Phys. Chem. B* **109**, 22351–22358 (2005).
30. Shioi, M., Lodewijks, K., Lagae, L., Kawamura, T. & Van Dorpe, P. Tuning plasmonic interaction between gold nanorings and a gold film for surface

- enhanced Raman scattering. *Appl. Phys. Lett.* **97**, 163106 (2010).
31. Camden, J. P., Dieringer, J. A., Zhao, J. & Van Duyne, R. P. Controlled plasmonic nanostructures for surface-enhanced spectroscopy and sensing. *Acc. Chem. Res.* **41**, 1653–1661 (2008).
 32. Mochizuki, Y., Fujii, M., Hayashi, S., Tsuruoka, T. & Akamatsu, K. Enhancement of photoluminescence from silicon nanocrystals by metal nanostructures made by nanosphere lithography. *J. Appl. Phys.* **106**, 013517 (2009).
 33. Lin, W. C. *et al.* Size Dependence of Nanoparticle-SERS Enhancement from Silver Film over Nanosphere (AgFON) Substrate. *Plasmonics* **6**, 201–206 (2011).
 34. Farcău, C. & Aștilean, S. Silver half-shell arrays with controlled plasmonic response for fluorescence enhancement optimization. *Appl. Phys. Lett.* **95**, 1–4 (2009).
 35. Sugimoto, H., Yashima, S., Furuta, K., Inoue, A. & Fujii, M. Probing Purcell enhancement in plasmonic nanoantennas by broadband luminescent Si quantum dots. *Appl. Phys. Lett.* **108**, 241103 (2016).
 36. Inoue, A., Sugimoto, H. & Fujii, M. Photoluminescence Enhancement of Silicon Quantum Dot Monolayer by Double Resonance Plasmonic Substrate. *J. Phys. Chem. C* **121**, 11609–11615 (2017).
 37. Thang, P. N. *et al.* Surface-enhanced Raman scattering from semiconductor and graphene quantum dots coupled to metallic-film-on-nanosphere substrates. *Appl. Phys. A Mater. Sci. Process.* **125**, 1–10 (2019).
 38. Li, W.-D., Ding, F., Hu, J. & Chou, S. Y. Three-dimensional cavity nanoantenna coupled plasmonic nanodots for ultrahigh and uniform surface-enhanced Raman scattering over large area. *Opt. Express* **19**, 3925 (2011).
 39. Alvarez-Puebla, R., Cui, B., Bravo-Vasquez, J. P., Veres, T. & Fenniri, H. Nanoimprinted SERS-active substrates with tunable surface plasmon resonances. *J. Phys. Chem. C* **111**, 6720–6723 (2007).
 40. Yu, C. C. *et al.* Incident angle-tuned, broadband, ultrahigh-sensitivity plasmonic antennas prepared from nanoparticles on imprinted mirrors. *Nanoscale* **7**, 3985–3996 (2015).
 41. Lopatynskiy, A. M. *et al.* Au nanostructure arrays for plasmonic applications: annealed island films versus nanoimprint lithography. *Nanoscale Res. Lett.* **10**, 1–9 (2015).
 42. Nagel, R. D. *et al.* Nanoimprint methods for the fabrication of macroscopic plasmonically active metal nanostructures. *J. Appl. Phys.* **121**, 084305 (2017).
 43. Lee, T. *et al.* Formation of Interstitial Hot-Spots Using the Reduced Gap-Size between Plasmonic Microbeads Pattern for Surface-Enhanced Raman Scattering Analysis. *Sensors* **19**, 1046 (2019).

44. Matsushita, T. *et al.* Localized surface plasmon resonance sensor based on fabricating nano-period structure for high throughput by polymer. *Jpn. J. Appl. Phys.* **47**, 7420–7427 (2008).
45. Zhu, S., Li, H., Yang, M. & Pang, S. W. High sensitivity plasmonic biosensor based on nanoimprinted quasi 3D nanosquares for cell detection. *Nanotechnology* **27**, 295101 (2016).
46. Barbillon, G. Plasmonic nanostructures prepared by soft UV nanoimprint lithography and their application in biological sensing. *Micromachines* **3**, 21–27 (2012).
47. Resch-Genger, U., Grabolle, M., Cavaliere-Jaricot, S., Nitschke, R. & Nann, T. Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels. *Nat. Methods* **5**, 763–775 (2008).
48. Chan, W. C. & Nie, S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science (80-.)*. **281**, 2016–8 (1998).
49. Michalet, X. *et al.* Quantum dots for live cells, in vivo imaging, and diagnostics. *Science (80-.)*. **307**, 538–44 (2005).
50. Medintz, I. L., Uyeda, H. T., Goldman, E. R. & Mattoussi, H. Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing. *Nat. Mater.* **4**, 435–446 (2005).
51. Bruchez, M., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S. & Alivisatos, A. P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science (80-.)*. **281**, 2013–6 (1998).
52. Chan, W. C. *et al.* Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 40–46 (2002).
53. Schmid, G. & others. *Nanoparticles*. (Wiley VCH, 2005).
54. Tsoi, K. M., Dai, Q., Alman, B. A. & Chan, W. C. W. Are Quantum Dots Toxic? Exploring the Discrepancy Between Cell Culture and Animal Studies. *Acc. Chem. Res.* **46**, 662–671 (2013).
55. Derfus, A. M., Chan, W. C. W. & Bhatia, S. N. Probing the Cytotoxicity of Semiconductor Quantum Dots. *Nano Lett.* **4**, 11–18 (2004).
56. Godt, J. *et al.* The toxicity of cadmium and resulting hazards for human health. *J. Occup. Med. Toxicol.* **1**, 1–6 (2006).
57. Dasog, M., De los Reyes, G. B., Titova, L. V., Hegmann, F. A. & Veinot, J. G. C. Size vs Surface: Tuning the Photoluminescence of Freestanding Silicon Nanocrystals Across the Visible Spectrum via Surface Groups. *ACS Nano* **8**, 9636–9648 (2014).
58. Mastronardi, M. L. *et al.* Size-Dependent Absolute Quantum Yields for Size-Separated Colloidally-Stable Silicon Nanocrystals. *Nano Lett.* **12**, 337–342 (2012).

-
59. Sanghaleh, F., Sychugov, I., Yang, Z., Veinot, J. G. C. & Linnros, J. Near-Unity Internal Quantum Efficiency of Luminescent Silicon Nanocrystals with Ligand Passivation. *ACS Nano* **9**, 7097–7104 (2015).
 60. Ball, P. Silicon still supreme. *Nat. Mater.* **4**, 119–119 (2005).
 61. Cava, R. J. Super silicon. *Nature* **444**, 427–428 (2006).
 62. Kittel, C., McEuen, P. & McEuen, P. *Introduction to Solid State Physics*. (Wiley, 1996).
 63. Kovalev, D., Heckler, H., Polisski, G. & Koch, F. Optical Properties of Si Nanocrystals. *Phys. Status Solidi* **215**, 871–932 (1999).
 64. Canham, L. T. Silicon quantum wire array fabrication by electrochemical and chemical dissolution of wafers. *Appl. Phys. Lett.* **57**, 1046–1048 (1990).
 65. Holmes, J. D. *et al.* Highly luminescent silicon nanocrystals with discrete optical transitions. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 3743–3748 (2001).
 66. Baldwin, R. K., Pettigrew, K. A., Ratai, E., Augustine, M. P. & Kauzlarich, S. M. Solution reduction synthesis of surface stabilized silicon nanoparticles. *Chem. Commun.* 1822–1823 (2002). doi:10.1039/b205301b
 67. Warner, J. H., Rubinsztein-Dunlop, H. & Tilley, R. D. Surface morphology dependent photoluminescence from colloidal silicon nanocrystals. *J. Phys. Chem. B* **109**, 19064–19067 (2005).
 68. Shiohara, A. *et al.* Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **132**, 248–253 (2010).
 69. Zou, J., Baldwin, R. K., Pettigrew, K. A. & Kauzlarich, S. M. Solution synthesis of ultrastable luminescent siloxane-coated silicon nanoparticles. *Nano Lett.* **4**, 1181–1186 (2004).
 70. Dohnalová, K. *et al.* Optical gain at the F-band of oxidized silicon nanocrystals. *J. Phys. D: Appl. Phys.* **42**, (2009).
 71. Lioudakis, E., Othonos, A. & Nassiopoulou, A. G. Ultrafast transient photoinduced absorption in silicon nanocrystals: Coupling of oxygen-related states to quantized sublevels. *Appl. Phys. Lett.* **90**, 88–91 (2007).
 72. Fujii, M., Sugimoto, H. & Imakita, K. All-inorganic colloidal silicon nanocrystals—surface modification by boron and phosphorus co-doping. *Nanotechnology* **27**, 262001 (2016).
 73. Fukuda, M., Fujii, M., Sugimoto, H., Imakita, K. & Hayashi, S. Surfactant-free solution-dispersible Si nanocrystals surface modification by impurity control. *Opt. Lett.* **36**, 4026–8 (2011).
 74. Fujii, M. 不純物ドーピングによるシリコンナノ結晶の物性制御. in 2013年

度精密工学会秋季大会学術講演会講演論文集 339–340 (2013).

75. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. Phosphorus and Boron Codoped Colloidal Silicon Nanocrystals with Inorganic Atomic Ligands. *J. Phys. Chem. C* **117**, 6807–6813 (2013).
76. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. All-inorganic near-infrared luminescent colloidal silicon nanocrystals: High dispersibility in polar liquid by phosphorus and boron codoping. *J. Phys. Chem. C* **116**, 17969–17974 (2012).
77. Sugimoto, H., Fujii, M., Fukuda, Y., Imakita, K. & Akamatsu, K. All-inorganic water-dispersible silicon quantum dots: highly efficient near-infrared luminescence in a wide pH range. *Nanoscale* **6**, 122–126 (2014).
78. Wilson, W. L., Szajowski, P. F. & Brus, L. E. Quantum Confinement in Size-Selected, Surface-Oxidized Silicon Nanocrystals. *Science* (80-.). **262**, 1242–1244 (1993).
79. LAL, S., LINK, S. & HALAS, N. J. Nano-optics from sensing to waveguiding. in *Nanoscience and Technology* **10**, 213–220 (2009).
80. Li, M., Cushing, S. K. & Wu, N. Plasmon-enhanced optical sensors: a review. *Analyst* **140**, 386–406 (2015).
81. Haynes, C. L. & Van Duyne, R. P. Plasmon-Sampled Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy †. *J. Phys. Chem. B* **107**, 7426–7433 (2003).
82. Huang, Y., Zhang, X., Li, J., Ma, L. & Zhang, Z. Analytical plasmon dispersion in subwavelength closely spaced Au nanorod arrays from planar metal-insulator-metal waveguides. *J. Mater. Chem. C* **5**, 6079–6085 (2017).
83. Huang, Y. *et al.* Detailed correlations between SERS enhancement and plasmon resonances in subwavelength closely spaced Au nanorod arrays. *Nanoscale* **10**, 4267–4275 (2018).
84. Huang, Y. *et al.* Tunable Lattice Coupling of Multipole Plasmon Modes and Near-Field Enhancement in Closely Spaced Gold Nanorod Arrays. *Sci. Rep.* **6**, 1–10 (2016).
85. Siegfried, T., Ekinci, Y., Martin, O. J. F. & Sigg, H. Gap plasmons and near-field enhancement in closely packed sub-10 nm gap resonators. *Nano Lett.* **13**, 5449–5453 (2013).
86. Kinkhabwala, A. *et al.* Large single-molecule fluorescence enhancements produced by a bowtie nanoantenna. *Nat. Photonics* **3**, 654–657 (2009).
87. Bakker, R. M. *et al.* Enhanced localized fluorescence in plasmonic nanoantennae. *Appl. Phys. Lett.* **92**, (2008).
88. Yang, Z.-J. *et al.* Fano resonances in dipole-quadrupole plasmon coupling nanorod dimers. *Opt. Lett.* **36**, 1542 (2011).

-
89. Kawasaki, M. & Mine, S. Enhanced molecular fluorescence near thick Ag Island film of large pseudotubular nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **109**, 17254–17261 (2005).
 90. Lakowicz, J. R. Radiative Decay Engineering: Biophysical and Biomedical Applications. *Anal. Biochem.* **298**, 1–24 (2001).
 91. Shioi, M. *et al.* Tuning the interaction between propagating and localized surface plasmons for surface enhanced Raman scattering in water for biomedical and environmental applications. *Appl. Phys. Lett.* **104**, (2014).
 92. Biteen, J. S., Lewis, N. S., Atwater, H. A., Mertens, H. & Polman, A. Spectral tuning of plasmon-enhanced silicon quantum dot luminescence. *Appl. Phys. Lett.* **88**, 131109 (2006).
 93. Pompa, P. P. *et al.* Metal-enhanced fluorescence of colloidal nanocrystals with nanoscale control. *Nat. Nanotechnol.* **1**, 126–130 (2006).
 94. Brolo, A. G. *et al.* Surface plasmon-quantum dot coupling from arrays of nanoholes. *J. Phys. Chem. B* **110**, 8307–8313 (2006).
 95. Chou, S. Y. Nanoimprint lithography. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectron. Nanom. Struct.* **14**, 4129 (1996).
 96. Guo, L. J. Nanoimprint lithography: Methods and material requirements. *Adv. Mater.* **19**, 495–513 (2007).
 97. Lackner, J. M. *et al.* Mechanisms for self-assembling topography formation in low-temperature vacuum deposition of inorganic coatings on polymer surfaces. *Bull. Polish Acad. Sci. Tech. Sci.* **58**, 281–294 (2010).
 98. Kleinman, S. L. *et al.* Structure enhancement factor relationships in single gold nanoantennas by surface-enhanced raman excitation spectroscopy. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 301–308 (2013).
 99. Kurouski, D. *et al.* Unraveling the Near- and Far-Field Relationship of 2D Surface-Enhanced Raman Spectroscopy Substrates Using Wavelength-Scan Surface-Enhanced Raman Excitation Spectroscopy. *J. Phys. Chem. C* **121**, 14737–14744 (2017).
 100. Litz, J. P., Camden, J. P. & Masiello, D. J. Spatial, spectral, and coherence mapping of single-molecule SERS active hot spots via the discrete-dipole approximation. *J. Phys. Chem. Lett.* **2**, 1695–1700 (2011).
 101. Doherty, M. D., Murphy, A., Pollard, R. J. & Dawson, P. Surface-enhanced Raman scattering from metallic nanostructures: Bridging the gap between the near-field and far-field responses. *Phys. Rev. X* **3**, 1–12 (2013).
 102. Lyvers, D. P., Moon, J. M., Kildishev, A. V., Shalaev, V. M. & Wei, A. Gold nanorod arrays as plasmonic cavity resonators. *ACS Nano* **2**, 2569–2576 (2008).
 103. Bastús, N. G., Piella, J. & Puntès, V. Quantifying the Sensitivity of Multipolar

- (Dipolar, Quadrupolar, and Octapolar) Surface Plasmon Resonances in Silver Nanoparticles: The Effect of Size, Composition, and Surface Coating. *Langmuir* **32**, 290–300 (2016).
104. Hakala, T. K. *et al.* Lasing in dark and bright modes of a finite-sized plasmonic lattice. *Nat. Commun.* **8**, 1–7 (2017).
 105. Lozano, G. *et al.* Plasmonics for solid-state lighting: enhanced excitation and directional emission of highly efficient light sources. *Light Sci. Appl.* **2**, e66 (2013).
 106. Guo, R. *et al.* Controlling quantum dot emission by plasmonic nanoarrays. *Opt. Express* **23**, 28206–28215 (2015).
 107. Rodriguez, S. R. K. *et al.* Coupling Bright and Dark Plasmonic Lattice Resonances. *Phys. Rev. X* **1**, 1–7 (2011).
 108. Zou, S., Janel, N. & Schatz, G. C. Silver nanoparticle array structures that produce remarkably narrow plasmon lineshapes. *J. Chem. Phys.* **120**, 10871–10875 (2004).
 109. De Abajo, F. J. G. Colloquium: Light scattering by particle and hole arrays. *Rev. Mod. Phys.* **79**, 1267–1290 (2007).
 110. Kravets, V. G., Schedin, F. & Grigorenko, A. N. Extremely narrow plasmon resonances based on diffraction coupling of localized plasmons in arrays of metallic nanoparticles. *Phys. Rev. Lett.* **101**, 1–4 (2008).
 111. Auguié, B. & Barnes, W. L. Collective resonances in gold nanoparticle arrays. *Phys. Rev. Lett.* **101**, 1–4 (2008).
 112. Biteen, J. S., Pacifici, D., Lewis, N. S. & Atwater, H. A. Enhanced Radiative Emission Rate and Quantum Efficiency in Coupled Silicon Nanocrystal-Nanostructured Gold Emitters. *Nano Lett.* **5**, 1768–1773 (2005).
 113. Takeda, E., Fujii, M., Nakamura, T., Mochizuki, Y. & Hayashi, S. Enhancement of photoluminescence from excitons in silicon nanocrystals via coupling to surface plasmon polaritons. *J. Appl. Phys.* **102**, 023506 (2007).
 114. Imakita, K. *et al.* Enhancement of Radiative Recombination Rate of Excitons in Si Nanocrystals on Au Film. *Jpn. J. Appl. Phys.* **45**, 6132–6136 (2006).
 115. Biteen, J. S. *et al.* Plasmon-Enhanced Photoluminescence of Silicon Quantum Dots : Simulation and Experiment Plasmon-Enhanced Photoluminescence of Silicon Quantum Dots : Simulation and Experiment. *J. Phys. Chem. C* 13372–13377 (2007). doi:10.1021/jp074160
 116. Song, J., Atay, T., Shi, S., Urabe, H. & Nurmikko, A. V. Large Enhancement of Fluorescence Efficiency from CdSe/ZnS Quantum Dots Induced by Resonant Coupling to Spatially Controlled Surface Plasmons. *Nano Lett.* **5**, 1557–1561 (2005).

-
117. Shimizu, K. T., Woo, W. K., Fisher, B. R., Eisler, H. J. & Bawendi, M. G. Surface-Enhanced Emission from Single Semiconductor Nanocrystals. *Phys. Rev. Lett.* **89**, 117401 (2002).
 118. Zhang, J., Ye, Y. H., Wang, X., Rochon, P. & Xiao, M. Coupling between semiconductor quantum dots and two-dimensional surface plasmons. *Phys. Rev. B - Condens. Matter Mater. Phys.* **72**, 2–5 (2005).
 119. Park, S.-J. *et al.* Nanosilver Colloids-Filled Photonic Crystal Arrays for Photoluminescence Enhancement. *Nanoscale Res. Lett.* **5**, 1590–1595 (2010).
 120. Sugimoto, H., Fujii, M., Imakita, K., Hayashi, S. & Akamatsu, K. Codoping n- and p-type impurities in colloidal silicon nanocrystals: Controlling luminescence energy from below bulk band gap to visible range. *J. Phys. Chem. C* **117**, 11850–11857 (2013).
 121. Gittins, D. I. & Caruso, F. Tailoring the polyelectrolyte coating of metal nanoparticles. *J. Phys. Chem. B* **105**, 6846–6852 (2001).
 122. Schneider, G. & Decher, G. From functional core/shell nanoparticles prepared via layer-by-layer deposition to empty nanospheres. *Nano Lett.* **4**, 1833–1839 (2004).
 123. Yoshida, K. Development of Functional Thin Polymer Films Using a Layer-by-Layer Deposition Technique. *Yakugaku Zasshi* **137**, 1215–1221 (2017).
 124. Kulakovich, O. *et al.* Enhanced Luminescence of CdSe Quantum Dots on Gold Colloids. *Nano Lett.* **2**, 1449–1452 (2002).
 125. Chan, Y. H. *et al.* Using patterned arrays of metal nanoparticles to probe plasmon enhanced luminescence of CdSe quantum dots. *ACS Nano* **3**, 1735–1744 (2009).
 126. Cui, Q., He, F., Li, L. & Möhwald, H. Controllable metal-enhanced fluorescence in organized films and colloidal system. *Adv. Colloid Interface Sci.* **207**, 164–177 (2014).
 127. Ma, C. *et al.* Supported lipid bilayers lifted from the substrate by layer-by-layer polyion cushions on self-assembled monolayers. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **28**, 319–329 (2003).
 128. Bruggeman, D. A. G. The calculation of various physical constants of heterogeneous substances. I. The dielectric constants and conductivities of mixtures composed of isotropic substances. *Ann. Phys. (N. Y.)* **416**, 636–791 (1935).
 129. 古田 健太. 修士論文 シリコンナノ結晶間の共鳴エネルギー移動に関する研究. (2015).
 130. Fujii, M., Sugimoto, H., Hasegawa, M. & Imakita, K. Silicon nanocrystals with high boron and phosphorus concentration hydrophilic shell—Raman scattering and X-ray photoelectron spectroscopic studies. *J. Appl. Phys.* **115**, 084301 (2014).

131. Nomoto, K. *et al.* Atom Probe Tomography Analysis of Boron and/or Phosphorus Distribution in Doped Silicon Nanocrystals. *J. Phys. Chem. C* **120**, 17845–17852 (2016).
132. Ramezani, M., Lozano, G., Verschuuren, M. A. & Gómez-Rivas, J. Modified emission of extended light emitting layers by selective coupling to collective lattice resonances. *Phys. Rev. B* **94**, 1–7 (2016).
133. Anger, P., Bharadwaj, P. & Novotny, L. Enhancement and quenching of single-molecule fluorescence. *Phys. Rev. Lett.* **96**, 3–6 (2006).
134. Cortez-Retamozo, V. *et al.* Efficient tumor targeting by single-domain antibody fragments of camels. *Int. J. Cancer* **98**, 456–462 (2002).
135. De Vlieger, D., Ballegeer, M., Rossey, I., Schepens, B. & Saelens, X. Single-Domain Antibodies and Their Formatting to Combat Viral Infections. *Antibodies* **8**, 1 (2018).
136. Tynan, C. J. *et al.* Multicolour Single Molecule Imaging in Cells with Near Infra-Red Dyes. *PLoS One* **7**, e36265.1-e36265.7 (2012).
137. Gao, X. *et al.* In vivo molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* **16**, 63–72 (2005).
138. Larson, D. R. *et al.* Water-soluble quantum dots for multiphoton fluorescence imaging in vivo. *Science (80-.)*. **300**, 1434–6 (2003).
139. Jaiswal, J. K., Goldman, E. R., Mattoussi, H. & Simon, S. M. Use of quantum dots for live cell imaging. *Nat. Methods* **1**, 73–78 (2004).
140. Liu, J. *et al.* Assessing Clinical Prospects of Silicon Quantum Dots: Studies in Mice and Monkeys. *ACS Nano* **7**, 7303–7310 (2013).
141. Bhattacharjee, S. *et al.* Cytotoxicity of surface-functionalized silicon and germanium nanoparticles: the dominant role of surface charges. *Nanoscale* **5**, 4870 (2013).
142. Michl, J. Introduction: Silicon Chemistry. *Chem. Rev.* **95**, 1135 (1995).
143. McVey, B. F. P. & Tilley, R. D. Solution synthesis, optical properties, and Bioimaging applications of silicon nanocrystals. *Acc. Chem. Res.* **47**, 3045–3051 (2014).
144. Chinnathambi, S., Chen, S., Ganesan, S. & Hanagata, N. Silicon quantum dots for biological applications. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 10–29 (2014).
145. Peng, F. *et al.* Silicon nanomaterials platform for bioimaging, biosensing, and cancer therapy. *Acc. Chem. Res.* **47**, 612–623 (2014).
146. Wang, L., Reipa, V. & Blasic, J. Silicon Nanoparticles as a Luminescent Label to DNA. *Bioconjug. Chem.* **15**, 409–412 (2004).
147. He, Y. *et al.* Photo and pH Stable, Highly-Luminescent Silicon Nanospheres and

- Their Bioconjugates for Immunofluorescent Cell Imaging. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 4434–4438 (2009).
148. Tu, C.-C. *et al.* Time-Gated Imaging on Live Cancer Cells Using Silicon Quantum Dot Nanoparticles with Long-Lived Fluorescence. *ACS Photonics* **4**, 1306–1315 (2017).
 149. Robidillo, C. J. T., Aghajamali, M., Faramus, A., Sinelnikov, R. & Veinot, J. G. C. Interfacing enzymes with silicon nanocrystals through the thiol-ene reaction. *Nanoscale* **10**, 18706–18719 (2018).
 150. Fujii, M., Sugimoto, H. & Kano, S. Silicon Quantum Dot with heavily Boron and Phosphorus Codoped Shell. *Chem. Commun.* **54**, 4375–4389 (2018).
 151. Sugimoto, H., Yamamura, M., Sakiyama, M. & Fujii, M. Visualizing a core-shell structure of heavily doped silicon quantum dots by electron microscopy using an atomically thin support film. *Nanoscale* **10**, 7357–7362 (2018).
 152. Sugimoto, H., Yamamura, M., Fujii, R. & Fujii, M. Donor–Acceptor Pair Recombination in Size-Purified Silicon Quantum Dots. *Nano Lett.* **18**, 7282–7288 (2018).
 153. Kanno, T., Kano, S., Sugimoto, H., Tada, Y. & Fujii, M. Water-dispersible near-infrared luminescent silicon nanocrystals –immobilization on substrate. *MRS Commun.* **6**, 429–436 (2016).
 154. Inoue, A., Sugimoto, H., Yaku, H. & Fujii, M. DNA assembly of silicon quantum dots/gold nanoparticle nanocomposites. *RSC Adv.* **6**, 63933–63939 (2016).
 155. Sugimoto, H., Fujii, M. & Imakita, K. Silicon nanocrystal-noble metal hybrid nanoparticles. *Nanoscale* **8**, 10956–10962 (2016).
 156. Naiki, H. *et al.* Modulated exciton-plasmon interactions in Au-SiO₂-CdTe composite nanoparticles. *J. Phys. Chem. C* **117**, 2455–2459 (2013).
 157. Liu, N., Prall, B. S. & Klimov, V. I. Hybrid gold/silica/nanocrystal-quantum-dot superstructures: synthesis and analysis of semiconductor-metal interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **128**, 15362–3 (2006).
 158. Park, S., Park, M., Han, P. & Lee, S. The Effect of pH-adjusted Gold Colloids on the Formation of Gold Clusters over APTMS-coated Silica Cores. *Bull. Korean Chem. Soc.* **27**, 1341–1345 (2006).
 159. Viet, D., Kil, J., Sarawade, P. B., Huu, D. & Taik, H. Journal of Industrial and Engineering Chemistry Preparation of amino-functionalized silica for copper removal from an aqueous solution. *J. Ind. Eng. Chem.* **18**, 83–87 (2012).
 160. Kulkarni, S. A., Ogale, S. B. & Vijayamohanani, K. P. Tuning the hydrophobic properties of silica particles by surface silanization using mixed self-assembled monolayers. *J. Colloid Interface Sci.* **318**, 372–379 (2008).
 161. Li, H., Shih, W. Y. & Shih, W.-H. Highly Photoluminescent and Stable Aqueous

- ZnS Quantum Dots. *Ind. Eng. Chem. Res.* **49**, 579–582 (2010).
162. Zhu, M., Chang, E., Sun, J. & Drezek, R. A. Surface modification and functionalization of semiconductor quantum dots through reactive coating of silanes in toluene. *J. Mater. Chem.* **17**, 800–805 (2007).
 163. Chen, J. *et al.* Synthesis of silica-based carbon dot/nanocrystal hybrids toward white LEDs. *J. Mater. Sci.* **49**, 7391–7398 (2014).
 164. Dasog, M. *et al.* Chemical insight into the origin of red and blue photoluminescence arising from freestanding silicon nanocrystals. *ACS Nano* **7**, 2676–2685 (2013).
 165. Cheng, X., Gondosiswanto, R., Ciampi, S., Reece, P. J. & Gooding, J. J. One-pot synthesis of colloidal silicon quantum dots and surface functionalization via thiol-ene click chemistry. *Chem. Commun.* **48**, 11874–11876 (2012).
 166. Oliinyk, B. V., Lysenko, V. & Alekseev, S. Determining the impact of hydrofluoric acid on surface states of as-prepared and chemically modified Si nanocrystals. *RSC Adv.* **6**, 3723–3728 (2016).
 167. Cheng, X., Lowe, S. B., Reece, P. J. & Gooding, J. J. Colloidal silicon quantum dots: from preparation to the modification of self-assembled monolayers (SAMs) for bio-applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 2680 (2014).
 168. Kunishima, M., Kawachi, C., Hioki, K., Terao, K. & Tani, S. Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and ... Formation of carboxamides by direct condensation of carboxylic acids and amines in alcohols using a new alcohol- and water- soluble co. *Tetrahedron* **57**, 1551–1558 (2015).
 169. Kamra, T. *et al.* Covalent immobilization of molecularly imprinted polymer nanoparticles using an epoxy silane. *J. Colloid Interface Sci.* **445**, 277–284 (2015).
 170. Pathak, S., Davidson, M. C. & Silva, G. A. Characterization of the functional binding properties of antibody conjugated quantum dots. *Nano Lett.* **7**, 1839–1845 (2007).
 171. Sapparapu, G. *et al.* Constant Domain-regulated Antibody Catalysis. *J. Biol. Chem.* **287**, 36096–36104 (2012).
 172. Rižner, T. L. Teaching the structure of immunoglobulins by molecular visualization and SDS-PAGE analysis. *Biochem. Mol. Biol. Educ.* **42**, 152–159 (2014).
 173. He, Y. *et al.* One-pot microwave synthesis of water-dispersible, ultraphoto- and pH-stable, and highly fluorescent silicon quantum dots. *J. Am. Chem. Soc.* **133**, 14192–14195 (2011).
 174. Banerjee, S. S. & Chen, D. H. Magnetic nanoparticles grafted with cyclodextrin for hydrophobic drug delivery. *Chem. Mater.* **19**, 6345–6349 (2007).

175. Su, Y. *et al.* In vivo distribution, pharmacokinetics, and toxicity of aqueous synthesized cadmium-containing quantum dots. *Biomaterials* **32**, 5855–5862 (2011).
176. Soo Choi, H. *et al.* Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* **25**, 1165–1170 (2007).
177. Du, C. Supramolecular Assembly of Amelogenin Nanospheres into Birefringent Microribbons. *Science (80-.)*. **307**, 1450–1454 (2005).
178. Nobbmann, U. *et al.* Dynamic light scattering as a relative tool for assessing the molecular integrity and stability of monoclonal antibodies. *Biotechnol. Genet. Eng. Rev.* **24**, 117–128 (2007).

謝辞

本研究の指導教官として、私が社会人であり色々ご不便ご迷惑をおかけする中、入学前のご相談から現在に至るまでの約4年に渡り、研究に関する考え方や進め方、論文の書き方と多岐にわたりご指導くださいました、藤井稔教授に厚く御礼申し上げます。

本研究において、実験の進め方、実験方法、データ解釈と、細部に渡り丁寧にご指導をくださいました、杉本泰助教に厚く御礼申し上げます。

本研究において、上司として大学で学ぶ機会を下さり、同じ研究室の先輩としてご助言をくださいました、塩井正彦様に深く感謝致します。

本研究を進めるにあたり、研究室の先輩として実験に関して、ご助言、ご協力をくださった、管野天様に深く感謝致します。

同じ研究室での博士課程の学生として、実験及びデータ解釈に関してご助言、ご協力をくださり、その都度議論をしてくださった、井上飛鳥様(現、日本電信電話株式会社)と雛本樹生様に深く感謝致します。

研究活動を進めるにあたりご協力くださり、研究室に伺った際にはいつも暖かく迎えてくださった藤井研究室の方々には深く感謝致します。

最後に、これまでの学生生活を温かく見守ってくれた家族に深く感謝致します。

研究業績（博士論文に関係のあるもの）

PUBLICATION

1. **H. Yanagawa**, A. Inoue, H. Sugimoto, M. Shioi, and M. Fujii, “Photoluminescence enhancement of silicon quantum dot monolayer by plasmonic substrate fabricated by nano-imprint lithography”, *Journal of Applied Physics*, America Institute of Physics Publishing, Vol.122, No.22, 223101, 2017
2. **H. Yanagawa**, A. Inoue, H. Sugimoto, M. Shioi, and M. Fujii, “Antibody-Conjugated Near-Infrared Luminescent Silicon Quantum Dots for Biosensing”, *MRS Communications*, Cambridge University Press, Vol.9, No.3, pp.1079-1086, 2019
3. **H. Yanagawa**, T. Hinamoto, T. Kanno, H. Sugimoto, M. Shioi and M. Fujii, “Gold nanopillar array with sharp surface plasmon resonances and the application in immunoassay”, *Journal of Applied Physics*, America Institute of Physics Publishing, Vol.126, No.22, 223104, 2019

INTERNATIONAL CONFERENCE

1. (poster) **H. Yanagawa**, K. Nishio, N. Shimba, E. Ikeuchi, T. Kawamura, K. Tsumoto, and M. Shioi, “Highly Sensitive Detection of Viral Nucleoprotein using VHH Antibody and Surface Plasmon Resonance”, 63rd Annual Meeting of the Biophysical Society, Baltimore, USA (February 2019) / *Biophysical Journal*, Cell Press, Vol.116, No.3, P.443a, 2019

DOMESTIC CONFERENCE

1. (口頭) **柳川 博人**、西尾 和晃、榛葉 教子、池内 江美奈、河村 達朗、塩井 正彦、津本 浩平、「VHH抗体と表面プラズモンを用いたウイルス核タンパク質の高感度検出」、第66回応用物理学会春季学術講演会 10p-S421-7、東京、2019年3月
2. (口頭) **柳川 博人**、河村 達朗、佐々木 良樹、管野 天、安浦 雅人、藤巻 真、「外力支援近接場照明バイオセンサによるインフルエンザウイルスの検出」、第66回応用物理学会春季学術講演会 10a-S421-1、東京、2019年3月
3. (口頭) 管野 天、郡 俊輔、**柳川 博人**、榛葉 教子、池内 江美奈、河村 達朗、塩井 正彦、津本 浩平、「流路構造を有する格子結合型プラズモン共鳴バイオセンサでのウイルス核タンパク検出」、第66回応用物理学会春季学術講演会 10p-S421-

8、東京、2019年3月

4. (口頭) 脇田 尚英、榛葉 教子、管野 天、柳川 博人、池内 江美奈、河村 達朗、塩井 正彦、津本 浩平、「超解像顕微鏡による格子結合型プラズモン共鳴バイオセンサのナノ発光分布解析」、第66回応用物理学会春季学術講演会 10p-S421-9、東京、2019年3月

PATENT

1. 柳川 博人、塩井 正彦、西尾 和晃、池内 江美奈、「検出装置及び検出方法」、特願 2017-181836
2. 柳川 博人、「センサ基板、検出装置及びセンサ基板の製造方法」、特願 2017-194171
3. 佐々木 良樹、河村 達朗、柳川 博人、「病原体検出装置および病原体検出方法」、特願 2018-063330
4. 管野 天、柳川 博人、「センサ基板の製造方法」、特願 2018-101010
5. 柳川 博人、「センサ基板およびその製造方法」、特願 2018-159744
6. 管野 天、柳川 博人、「金属微細構造体および検出装置」、特願 2018-157377
7. 柳川 博人、「複合体及び検出装置」、特願 2018-224875
8. 柳川 博人、「複合体及び検出装置」、特願 2018-225053
9. 柳川 博人、「複合体及び検出装置」、特願 2018-225339
10. H. Yanagawa, M. Shioi, K. Nishio, E. Ikeuchi, “DETECTION DEVICE AND DETECTION METHOD”, PCT/JP2018/034425
11. H. Yanagawa, “SENSOR SUBSTRATE, DETECTION DEVICE, AND METHOD FOR MANUFACTURING SENSOR SUBSTRATE”, PCT/JP2018/035059
12. Y. Sasaki, T. Kawamura, H. Yanagawa, “PATHOGEN DETECTION DEVICE AND PATHOGEN DETECTION METHOD”, PCT/JP2019/007431
13. T. Kanno, H. Yanagawa, “METAL MICROSTRUCTURE AND DETECTION DEVICE”, PCT/JP2019/025629

14. **H. Yanagawa**, “SENSOR SUBSTRATE AND MANUFACTURING METHOD”, PCT/JP2019/025628
15. **H. Yanagawa**, “COMPOSITE AND DETECTION DEVICE”, PCT/JP2019/***(現段階では出願番号未付与)

神戸大学博士論文「蛍光検出型バイオセンサ応用に向けたシリコン量子ドットの発光増強および抗体修飾に関する研究」全 143 頁

提出日 2020 年 1 月 21 日

本博士論文が神戸大学機関リポジトリ Kernel にて掲載される場合、掲載登録日（公開日）はリポジトリの該当 ページ上に掲載されます。

© 柳川 博人

本論文の内容の一部あるいは全部を無断で複製・転載・翻訳することを禁じます。