

液中固体物質の高感度・選択的検出に
向けた近接場技術の開発

Development of near-field technologies for
sensitive and selective detection of
solid substances in a liquid

2018年7月

黒田 千愛

Chiaki KURODA

液中固体物質の高感度・選択的検出に
向けた近接場技術の開発

Development of near-field technologies for
sensitive and selective detection of
solid substances in a liquid

2018年7月

早稲田大学大学院 先進理工学研究科
電気・情報生命専攻 誘電体材料研究

黒田 千愛

Chiaki KURODA

液中固体物質の高感度・選択的検出に向けた近接場技術の開発

目次

第1章 序論	1
第2章 ポータブル血液検査装置を実現する近接場光センサのための 血漿測定用マイクロ流路の開発	29
第3章 紫外近接場光蛍光センサのためのセンサチップの構造最適化	48
第4章 紫外近接場光蛍光センサのための $\text{TiO}_2/\text{SiO}_2$ 導波モード共鳴励起用 チップの開発	65
第5章 細菌の選択的検出に向けた誘電泳動支援表面プラズモン共鳴蛍光 バイオセンサの開発	82
第6章 誘電泳動支援近接場光センサのための導波モード共鳴・ 表面プラズモン共鳴同時励起チップの開発	100
第7章 結論	117
謝辞	123
本論文に関する研究業績	124

第1章 序論

1.1. 研究目的

医療分野では血液中に含まれるウイルスなどの生体物質，工業分野では，たとえば，溶液法薄膜プロセスにおける出発溶液中の不純物など，液中に存在する特定の固体物質を正確かつ高感度に検出可能なセンシング技術の実現が切望されている⁽¹⁻⁴⁾。センシング手法のうち，たとえば，クロマトグラフィーは，検出感度が低くなく，高額な装置や熟練の技術を要する⁽⁵⁾。このため近年は，生物学，物理学，化学といった様々な分野から，センシング技術に対してアプローチがなされているが，簡易操作可能な，高感度・高選択検出技術が実用化された例は少ない⁽⁶⁻⁸⁾。

センシングの為の光学的手法の一つに，二つの媒質の境界面で光が全反射されることにより誘起される，近接場光を利用した技術がある⁽⁹⁾。近接場光は，その強度が固体物質の表面からの距離とともに指数関数的に減衰する非伝搬光であり，固体物質の近傍にのみ局在的に現れる。さらに金属内の自由電子と共鳴することで強い局所電界を発現可能である。このような近接場光の特殊な光学特性を応用し，検出チップの表面近傍に存在する固体物質の高感度検出を可能にする技術の開発が進んでいる。近接場センシングの原理としては，全反射（Total Internal Reflection: TIR）法，導波モード共鳴（Waveguide-mode Resonance: WMR）法，表面プラズモン共鳴（Surface Plasmon Resonance: SPR）法に大別される。さらに，検出方法は，全反射された光の強度や波長を検出する反射光検出型と，近接場光の電界増強効果を利用し，蛍光物質を強く発光させる蛍光検出型に大別される。この蛍光検出型は，検出対象の固体物質からの蛍光信号のみを選択的に検出可能であり，既にDNAやタンパク質等の検出手法として，遺伝子工学や生化学の分野で研究が進んでいる。

筆者の所属する早稲田大学電気・情報生命専攻誘電体材料研究室では，産業技術総合研究所電子光技術研究部門と共同で，WMRやSPRを基本原理として用いて，特定の物質を高感度，安定，低ノイズで検出するセンサを開発してきた。これまでに，工場廃水中の重金属の検出，めっき液の状態監視，さらに，血液型の判定などが可能なことを実証してきた。しかし，センシング技術を実用化するためには，センサの更なる高感度化と選択性向上が必須である。このため，本学位論文において筆者は，主たる研究者の立場で，液中固体物質の高感度・選択的検出に向けた以下の近接場技術を開発した。

本論文は，7章からなる。本章「序論」では，本研究の目的と概要を述べた上で，次に述べる1.2節では近接場光学の理論として，TIR，WMR，SPRの原理を説明する。1.3節では，近接場光のセンサへの応用を，先行研究を引用し述べる。第2章から第6章では，開発してきた近接場センシング技術を述べる。まず，第2章「ポータブル血液検査装置を実現する近接場光センサのための血漿測定用マイクロ流路の開発」では，一滴の血液からウイルスを検出可能なセンサを実現する，血漿測定用マイクロ流路について述べる。

つぎの第3章「紫外近接場光蛍光センサのためのセンサチップの構造最適化」では、紫外光で励起される蛍光色素で物質を標識することで、高感度検出が可能になることから提案した、紫外近接場光照明用チップの最適構造について述べる。第4章「紫外近接場光蛍光センサのためのTiO₂/SiO₂導波モード共鳴励起用チップの開発」では、第3章で述べたチップを作成し、紫外光励起蛍光色素である量子ドット懸濁液の、蛍光増強効率を評価した結果について述べる。第5章「細菌の選択的検出に向けた誘電泳動支援表面プラズモン共鳴蛍光バイオセンサの開発」では、検出における選択性の向上を期待し、SPRによる蛍光増強と誘電泳動を融合したセンサについて述べる。第6章「誘電泳動支援近接場光センサのための導波モード共鳴・表面プラズモン共鳴同時励起チップの開発」では、第5章で述べるセンサの更なる応用として、誘電泳動や電気泳動により、蛍光色素で標識された2種以上の生体物質を電極間、電極上で分離し、これを蛍光信号として同時に観察することが可能なチップについて述べる。最後に、第7章「結論」では、第6章までの研究で得られた知見をまとめた上で、近接場センシング技術の今後の展望を述べる。

1.2. 近接場光学の理論

金属表面やガラス基板と溶液の界面などで光が全反射されると、表面や界面に近接場光が誘起される⁽⁹⁻¹¹⁾。1.2.1節ではTIR、1.2.2節ではWMR、1.2.3節ではSPRの理論を述べる。

1.2.1. TIR

図1.1に、高屈折率媒質1から低屈折率媒質2に光が入射される様子を示す。媒質1に描かれている赤実線の矢印は、光の進行方向を示す。ただし本節では、光の偏光は考慮しない。ここで、入射角がある角度を超えると、入射された光がすべて反射する。この現象を全反射という^(12,13)。媒質1と媒質2の屈折率を n_1 、 n_2 ($n_1 > n_2$) とし、この境界面への入射角と屈折角を、 θ_{tir} と θ_{tir}' とおくと、全反射条件が成立する時、スネルの法則より、

$$n_1 \sin \theta_{\text{tir}} = n_2 \sin \theta_{\text{tir}}' > n_2, \quad (1.1)$$

を満たし、全反射条件の臨界角 θ_c は、

$$\theta_c = \sin^{-1} \left(\frac{n_2}{n_1} \right), \quad (1.2)$$

である。媒質2側の屈折角 θ_{tir}' は複素数であり、

$$\sin \theta_{\text{tir}}' = \frac{n_1}{n_2} \sin \theta_{\text{tir}} > 1, \quad \cos \theta_{\text{tir}}' = j \sqrt{\left(\frac{n_1}{n_2} \sin \theta_{\text{tir}} \right)^2 - 1}, \quad (1.3)$$

を満たす。よって、近接場光の電界 $E_{\text{tir}}(\mathbf{r})$ は、

$$E_{\text{tir}}(\mathbf{r}) = E \exp(-j\beta_{\text{tir}}x) \exp(-\gamma_{\text{tir}}z), \quad (1.4)$$

$$\beta_{\text{tir}} = n_1 k_0 \sin \theta_{\text{tir}}, \gamma_{\text{tir}} = -jn_2 k_0 \cos \theta_{\text{tir}} = k_0 \sqrt{(n_1 \sin \theta_{\text{tir}})^2 - n_2^2}, \quad (1.5)$$

と書ける⁽¹³⁾。ただし、 E は近接場光の電界の振幅、 k_0 は $2\pi/\lambda$ 、 β_{tir} と γ_{tir} は自然数である。

よって、近接場光の電界の振幅は、 z 軸方向に指数関数的に減衰し、この振幅が $1/e$ まで減衰する距離 $d_{\text{tir}}(\lambda)$ は、

$$d_{\text{tir}}(\lambda) = \frac{1}{\gamma_{\text{tir}}} = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{(n_1 \sin \theta_{\text{tir}})^2 - n_2^2}}, \quad (1.6)$$

と書ける。

ここで、入射光、あるいは媒質2側に生じる近接場光は、電界ベクトルが境界面に対し平行、すなわち光の入射面(紙面)に垂直な y 成分のみである、s偏光(Transverse Electric Wave Mode: TEモード)と、磁界ベクトルが境界面に対し平行な y 成分のみである、p偏光(Transverse Magnetic Wave Mode: TMモード)に分けられる。全反射条件では、境界面における光の染み出しにより x 軸方向に反射点のシフトが生じ、これをグース・ヘンシェンシフト^(12,13)と呼ぶ。入射光がs偏光の場合のグース・ヘンシェンシフト量 $x_s(\lambda)$ は、式(1.6)より、

$$x_s(\lambda) = 2d_{\text{tir}}(\lambda) \tan \theta_{\text{tir}} = \frac{\lambda \tan \theta_{\text{tir}}}{\pi \sqrt{(n_1 \sin \theta_{\text{tir}})^2 - n_2^2}}, \quad (1.7)$$

で与えられる。

1.2.2. WMR

光を閉じ込めて伝搬させることを導波または光導波と呼び、このとき光を閉じ込めるための構造を有するものを導波路または光導波路と呼ぶ^(12,14)。スラブ導波路は、高屈折率のコアを、低屈折率のクラッドで取り囲むように構成されている。入射された光が、コアとクラッドの境界面において繰り返し全反射されることで、コア中に光を閉じ込めのまま伝搬できる。

図1.2に、入射された光がコア中を伝搬する様子を示す。赤実線の矢印は、光の進行方向を示す。ただし本節では、光の偏光は考慮しない。反射角を θ_{wm} 、コアとクラッドの屈折率を n_{core} 、 n_{clad} とすると、光は、 $z = \pm a$ の境界面で全反射されながら、 x 方向には、

$$\beta_{\text{wm}} = k \sin \theta_{\text{wm}}, \quad (1.8)$$

z 方向には、

$$\gamma_{\text{wm}} = k \cos \theta_{\text{wm}}, \quad (1.9)$$

で伝搬する進行波とみなせる。 β_{wm} 及び γ_{wm} は伝搬定数と呼ばれる。従って、コア中の光の電界 E_{wm} と磁界 H_{wm} は、

$$E_{\text{wm}}, H_{\text{wm}} \propto \exp(-j\beta_{\text{wm}}x) \exp(\pm j\gamma_{\text{wm}}z), \quad (1.10)$$

と書ける。

ここで、光が伝搬するためには、コアを x 方向に往復した後の光の位相が、往復前の光の位相と同じ、すなわち x 方向に定在波が立たなければならない。この条件は、

$$2 \times 2a \cos \theta_{\text{wm}} = N \left(\frac{\lambda}{n_{\text{core}}} \right) \quad (N = 0, 1, 2, \dots), \quad (1.11)$$

となる。ここで、 N をモード番号と呼び、0または正の整数値をとる。1.2.1節で述べた、グース・ヘンシェンシフトを考慮すると、式(1.11)は位相で表す必要があり、

$$2\pi \frac{4a \cos \theta_{\text{wm}}}{\left(\frac{\lambda}{n_{\text{core}}} \right)} = 2\pi N, \quad (1.12)$$

とし、これにグース・ヘンシェンシフト 2Φ を組み込み、 $k = \frac{2\pi}{\left(\frac{\lambda}{n_{\text{core}}} \right)}$ とおけば、式(1.12)

より、

$$\begin{aligned} 4ak \cos \theta_{\text{wm}} - 2\Phi &= 2\pi N, \\ \cos \theta_{\text{wm}} &= \frac{\pi N + \Phi}{2ak}, \end{aligned} \quad (1.13)$$

となる。すなわち、式(1.13)における θ_{wm} を満たすモードで、光はコア中を伝搬する。

1.2.3. SPR

表面プラズモンは、金属薄膜中の自由電子が集団振動する現象である。この集団振動が外部から入射された光と結合した系を表面プラズモンポラリトンと呼ぶ^(13,15)。光で表面プラズモンを励起するためには、光の位相速度を金属薄膜の表面プラズモンの位相速度と一致させる必要がある。しかし、詳細は後述するが、空気等の媒質を伝搬する光を金属薄膜の表面に入射しても、光と金属薄膜の表面プラズモンの位相速度は一致しない。そこで、入射光が境界面で全反射される時に生じる近接場光を用いて、光の位相速度を表面プラズモンの位相速度に一致させ、表面プラズモン共鳴を励起する必要がある。

図1.3(a)に示す、誘電率 ϵ_m の金属薄膜が、誘電率 ϵ_d の誘電体媒質に接している場合を考える。図中の赤実線の矢印は、光の進行方向を示す。上述した通り、光と表面プラズモンの位相速度が一致しなければ、表面プラズモンは励起されない。さらに、金属中の電荷分布の疎密は表面に平行な x 方向にあるため、光の電界の表面への射影が、 x 方向成分

を持たなければ励起されない。すなわち、s偏光の電界はy成分しかもたず、表面プラズモンを励起できない。一方で、図1.3(a)中に青矢印で示す、入射面（入射光と反射光を含む面内）に電界があるp偏光は、x成分を持つため、表面プラズモンを励起出来る。すなわち、表面プラズモンの電界、磁界の成分はそれぞれ、 $\mathbf{E} = (E_x, 0, E_z)$, $\mathbf{H} = (0, H_y, 0)$ と表すことが出来る。

マクスウェルの方程式より伝導電流の密度を $\mathbf{j} = \mathbf{0}$ とすると、以下の式が成り立つ。

$$\text{rot}\mathbf{H}_n = \varepsilon_n \frac{\partial \mathbf{E}_n}{\partial t} \quad (n = d \text{ or } m), \quad (1.14)$$

ただし、下付き文字のdは誘電体層を、mは金属薄膜を示す。ここで、表面プラズモンの電界 \mathbf{E} は角周波数 ω で振動しており、時間項 $e^{j\omega t}$ を持つと仮定し、 $\frac{\partial \mathbf{E}}{\partial t} = -j\omega \mathbf{E}$ とすると、

式(1.14)は、

$$-\frac{\partial H_{ny}}{\partial z} = \varepsilon_n \frac{\partial E_{nx}}{\partial t} = -j\omega \varepsilon_n E_{nx}, \quad (1.15)$$

$$\frac{\partial H_{ny}}{\partial x} = \varepsilon_n \frac{\partial E_{nz}}{\partial t} = -j\omega \varepsilon_n E_{nz}, \quad (1.16)$$

となる。

ここで、表面プラズモンの電界と磁界は、誘電体層側では境界面からの距離に対してz方向に指数関数的に減衰し、一方、金属薄膜側では境界面からの距離に対して-z方向に指数関数的に減衰する。誘電体層および金属膜における減衰定数を k_{dz} , k_{mz} , x方向の波数を k_{dx} , k_{mx} , 磁界の振幅をA, Bとおくと、誘電体層および金属膜における磁界 H_{dy} , H_{my} はそれぞれ、

$$H_{dy} = A \exp(jk_{dx}x) \exp(-k_{dz}z), \quad (1.17)$$

$$H_{my} = B \exp(jk_{mx}x) \exp(k_{mz}z), \quad (1.18)$$

と表される。表面プラズモンは、x方向において、誘電体層側および金属薄膜側で同じ速度で伝搬するため、 $k_x = k_{dx} = k_{mx}$ である。よって、表面プラズモンの電界のx成分は式(1.15), (1.17), (1.18)より、

$$E_{dx} = \frac{1}{j\omega \varepsilon_d} A(-k_{dz}) \exp(jk_x x) \exp(-k_{dz}z), \quad (1.19)$$

$$E_{mx} = \frac{1}{j\omega \varepsilon_m} B(k_{mz}) \exp(jk_x x) \exp(k_{mz}z), \quad (1.20)$$

となる。誘電体層と金属薄膜の界面では、電界と磁界の境界面に平行な成分が連続でなければならないため、 $E_{dx} = E_{mx}$, $H_{dy} = H_{my}$ となり、式(1.17), (1.18)より、

$$A \exp(-k_{dz}z) - B \exp(k_{mz}z) = 0, \quad (1.21)$$

式(1.19), (1.20)より,

$$A \frac{k_{dz} \exp(-k_{dz}z)}{\varepsilon_d} + B \frac{k_{mz} \exp(k_{mz}z)}{\varepsilon_m} = 0, \quad (1.22)$$

が成り立つ。式(1.21), (1.22)において, 0以外の A , B の値が存在するためには,

$$\frac{k_{dz}}{\varepsilon_d} + \frac{k_{mz}}{\varepsilon_m} = 0, \quad (1.23)$$

が成り立たなければならない。従って,

$$k_{dz} = -\frac{\varepsilon_d}{\varepsilon_m} k_{mz}, \quad (1.24)$$

の関係を満たす。ただし, 誘電体層の誘電率 ε_d は正の値をもつため, 式(1.24)を満たす表面波が存在するためには, 金属薄膜の誘電率 ε_m が負であることが必要である。この誘電率 ε_m は, 金属中の自由電子が外部電界の振動, すなわち角周波数 ω に共振して振動するドルーデモデルにより,

$$\varepsilon_m = 1 - \frac{\omega_p^2}{\omega^2 + j\gamma\omega}, \quad (1.25)$$

と表すことが出来る^(13,15)。ここで, ω_p はプラズマ振動数, γ は減衰定数である。

ここで, 誘電体層側および金属薄膜側を伝搬する光の波数ベクトル \mathbf{k}_d , \mathbf{k}_m はそれぞれ,

$$|\mathbf{k}_d|^2 = (\sqrt{\varepsilon_d} k_0)^2 = k_x^2 + (jk_{dz})^2 = k_x^2 - k_{dz}^2, \quad (1.26)$$

$$|\mathbf{k}_m|^2 = (\sqrt{\varepsilon_m} k_0)^2 = k_x^2 + (-jk_{mz})^2 = k_x^2 - k_{mz}^2, \quad (1.27)$$

を満たす。式(1.24), (1.26), (1.27)より, k_x について解くと,

$$k_x = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}} = \left(\frac{\omega}{c}\right) \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m}}, \quad (1.28)$$

が得られる。これは, 表面プラズモンの波数と角周波数の分散関係である。式(1.28)を式(1.26)に代入し,

$$k_{dz} = k_0 \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} - \varepsilon_d}, \quad (1.29)$$

が得られる。よって, 近接場光の電界の振幅が, z 軸方向に $1/e$ まで指数関数的に減衰する距離 $d_{sp}(\lambda)$ は,

$$d_{sp}(\lambda) = \frac{1}{k_{dz}} = \frac{\lambda}{2\pi \sqrt{\frac{\varepsilon_d \varepsilon_m}{\varepsilon_d + \varepsilon_m} - \varepsilon_d}}, \quad (1.30)$$

と書ける。

最後に、図1.3(b)に分散関係を示す。図中の(i)は、表面プラズモンの分散関係である式(1.28)を、(ii)は誘電体中を伝搬する光の分散関係 $k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d}$ を、(iii)は近接場光の分散関係 $k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p}$ を示す。ただし、 ϵ_p は、三角プリズムの底面に金属薄膜が蒸着されているクレッチマン配置⁽¹³⁾を考えた場合の、金属薄膜の下にあるプリズムの誘電率とする。図1.3(b)において、誘電体中を伝搬する光の分散関係(ii)は、表面プラズモンの分散関係(i)より左側に位置する。ここで、誘電体層と金属薄膜界面に誘電体側からある入射角 θ_m で光が入射したとすると、光の波数ベクトルのx成分は $k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_d} \sin \theta_m$ となる。 θ_m が0 - 90°の範囲で変化すると、これに対応する(ii)は、図1.3(b)中の灰色で示した範囲内で変化する。すなわち、 θ_m がどの値であっても、(i)は(ii)よりも小さいこととなり、(i)と(ii)は交わらない。すなわち、誘電体層から単に光を入射するだけでは表面プラズモンは励起できないことが分かる。つぎに、近接場光の分散関係(iii)を考える。プリズムにある入射角 θ_m' で光が入射したとすると、プリズム内の光の波数ベクトルの成分は、 $k_x = \frac{\omega}{c} \sqrt{\epsilon_p} \sin \theta_m'$ で与えられる。 θ_m' が0 - 90°で変化すると、対応する(iii)は図1.3(b)中の赤斜線で示した範囲で変化する。すなわち、ある θ_m' で(i)と(iii)が交わる。このような条件が成り立つときに、表面プラズモンが励起されることになる。

1.3. 近接場光技術のセンシング応用

近接場光は検出チップ表面に局在していることから、チップ表面近傍に存在する固体物質の検出に適している^(16,17)。1.2節で述べた、TIR法、WMR法、SPR法の応用として、1.3.1節では反射光検出型センサの先行研究を紹介する。さらに、近接場光の電界増強効果を利用し、物質に標識された蛍光物質を強く発光させることで、高感度且つ高選択に検出することが可能になる。1.3.2節では、近接場光を利用した蛍光検出型センサについて述べる。さらに1.3.3節では、近接場光利用センサの高機能化に向けた、応用技術について述べる。

1.3.1. 反射光検出型

全反射された光の強度や波長を検出する反射光検出型センサは、検出チップの表面近傍に存在する物質を、高感度に検出可能である。本節ではまず、反射光検出型センサの例として、筆者の所属する研究室が開発してきたWMRセンサを中心に、測定原理や先行研究を述べる。次に、このWMRセンサと非常に似た測定機構を持つ、SPRセンサの測定原理とこの先行研究を述べる。

・WMRセンサ

図1.4(a)にWMRセンサ全体の光学系⁽¹⁸⁾を、(b)にこの写真を示す。WMRセンサに用いる検出チップは、石英ガラス基板上に、SiとSiO₂から成る導波路層をもつ⁽¹⁸⁻²³⁾。プリズム側から入射された、白色LED光源またはハロゲンランプ光源からの光は、石英ガラスプリズムを通して、検出チップに入射される。任意のプリズム底角に対してWMRが励起される、ある波長付近の入射光は、検出チップの各層で反射と透過を繰り返し、さらに、SiO₂層の表面とこの上に滴下された測定物質を含む媒質の境界面で全反射される。

この全反射のたびに、検出対象物質での吸収、さらには蛍光体が付着されているときには蛍光の励起が生じる。このため、検出器側へ反射される反射光強度が減少する。当然、この反射光強度の減少の大きさとそれが生じる波長は、導波路表面に吸着している物質の複素誘電率、言い換えれば、複素屈折率の実数部と虚数部に大きく依存する。また、後述するSPRと同様に、WMRを励起可能な波長は、チップの構造に依存する広がりを持っているため、導波路表面に物質の吸着等が生じると、反射スペクトルのシフトも生じる。この反射光強度の減少の大きさとそれが生じる波長のシフトを読み取ることによって、特定物質のチップ表面への吸着の有無及び、その物質の量などを検出することができる。なお、SPRはp偏光のみで励起可能であり、励起可能な金属も限られるが、WMRはs偏光とp偏光、共に励起可能である。また、導波路層には多くの透明薄膜材料が使用可能であることから、開発手法に自由度がある。

上述のように、WMRセンサのチップでは、誘電体多層膜内で光は、反射と透過を数回繰り返した後に分光器側へ反射されるのであり、通常の光導波路のように全反射を繰り返しながら長距離に亘って伝搬する訳ではない。この点のみに限れば、WMRと言う名称は若干誤解を招くおそれがあるものの、(i) 導波モード条件を満足させ、数回反射させる構造を導波路と呼ぶ事例は、他にも多い、(ii) 筆者の属する研究グループによるこのセンサの開発当初から、この名称が用いられている、(iii) 筆者の属する研究グループが、センサの開発を思いつく契機となった基礎原理を先に発表した文献(24-26)でも導波構造という表現が用いられて来た、ことを考慮し、本学位論文でもWMRと言う名称を用いることとする。

図1.4(a)に示す、Si層とSiO₂層から成る導波路をもつWMRチップは、可視域の近接場光の二乗電界強度を、チップ最表面で約100倍以上に増強可能である⁽²³⁾。図1.4(b)に示すWMRセンサは、検出器として分光器を内蔵しているが、十分に携帯可能な大きさである。これまでに、WMRのセンシング技術への応用として、検出チップ表面に、検出対象と特異的に反応する化学修飾を施し、図1.5に示すように血液型検査⁽²⁷⁾や、ウイルスの高感度検出⁽²⁸⁾を実証してきた例が報告されている。

図1.4に示すWMRセンサの他にも、各層の材料や構造を変化させることで、WMRセンサの高効率化を目指した研究が数多く報告されており⁽²⁹⁾、例えば、ナノ孔を有する構

造^(30,31)がある。さらに近年には、WMRを応用した、リング共振器センサ⁽³²⁾や光ファイバ型センサ⁽³³⁾が報告されている。

・ SPRセンサ

図1.6に示すように、SPRセンサの多くは高屈折率プリズムの一面に金属薄膜をコーティングし、この金属を測定試料と接触させる、クレッチマン配置の光学系から構成される^(13,15,34)。SPRセンサは、p偏光の光をプリズム側から金属薄膜へ入射する。上述したWMRセンサの測定原理と同様に、金属薄膜に接している媒質の誘電率に依存する、反射光強度を検出器で測定する⁽³⁴⁻³⁶⁾。SPRを励起可能な波長は、チップの構造に依存する広がりを持っているため、金属薄膜表面に物質が吸着すると、反射スペクトルの変化となって検出できる。SPRを励起する金属膜としては、AuやAg、Alなどが広く知られている^(13,15)。AuやAgは可視域や近赤外域で効率良くSPRを励起するが、紫外域でこの効率は低下する⁽³⁷⁻³⁹⁾。一方Alは、紫外域から可視域まで、幅広い波長でSPRを励起可能である⁽³⁷⁻⁴¹⁾。可視域において、具体的には、波長632.8 nmの入射光の二乗電界強度を、チップ表面で、Ag層のSPRでは289倍、Au層では44.9倍、Al層では25.7倍に増強できることが計算により示されている⁽¹³⁾。また、SPRセンサは、生体物質の高感度検出が可能であることから、Biacore (GEヘルスケア)^(42,43)や富士ドライケム (富士フィルム)⁽⁴⁴⁾をはじめとし、既に実用化されており、研究や臨床現場で広く使用されている。

上述した、平坦な金属薄膜表面で励起されるプラズモン、すなわちSPRは、伝搬型表面プラズモンとも呼ばれる。同様に、自由電子のプラズマ振動による電界は、ナノ粒子の表面にも生じ、これは局在型表面プラズモン (Localized Surface Plasmon: LSP) と呼ばれる^(13,15)。LSPは、通常の伝搬光と直接結合するため、SPRで述べたクレッチマン配置等の光学配置を使用する必要がなく、光を直接照射するだけで励起可能である。測定試料中に金属ナノ粒子を分散させ、LSPにより高感度検出を実現する試みが進められている⁽⁴⁵⁾。さらに、ナノ粒子二量体構造⁽⁴⁶⁾やより複雑なナノ構造^(47,48)等によるLSPの高効率化が研究されている。この他に、LSPを応用した例として、表面増強ラマン散乱 (Surface-enhanced Raman Scattering: SERS) による分光法⁽⁴⁹⁻⁵¹⁾を用いたセンサが既に実用化されている。また、近接場光学顕微鏡 (Near-field Scanning Optical Microscope: NSOM)^(52,53)は、金属探針先端に近接場光を発生させることで、回折限界を超えた2 - 50 nm程度の解像力を実現することができ、注目を集めている。

1.3.2. 蛍光検出型

近接場光は、検出チップ表面に局在し、且つ、電界が増強されていることから、1.3.1節で述べた反射光検出型センサの他に、蛍光色素の発光を増強させることにも広く用いられている。ここで、前述した反射光検出型センサは、検出チップ表面に物質が吸着すると反射スペクトルが変化するため、特定の物質を検出するためには、検出チップ表面

に特定の物質のみを捕捉する修飾を行う必要がある。しかし、チップ表面への修飾は、温度や湿度等の実験環境による影響を受けやすいため、安定して特定の物質を検出するには高度な技術が必要である。一方で、本節で述べる蛍光検出型センサは、蛍光色素を検出対象物質の標識として用いるため、チップ表面へ修飾を施す必要が無い。さらに、迷光や散乱光の影響なく、特定の物質を測定出来るため、選択性の高い手法である。また、量子ドット^(54,55)に代表されるように、高い量子収率を持つ蛍光色素が数多く開発されており、これらの蛍光色素を用いることで、より高いS/N比を実現することが可能となる。

近接場光を応用した蛍光検出技術として、近接場光学顕微鏡による蛍光色素の一分子検出が報告されている⁽⁵⁶⁾。また、全反射顕微鏡は既に実用化されており、液中の蛍光標識細胞のイメージング^(57,58)や蛍光標識タンパクの検出⁽⁵⁹⁾等の用途で開発が進んでいる。

さらに、SPRによる近接場光の電界増強効果を用い、蛍光色素の発光を高感度に検出する手法はこれまでに数多く報告されている⁽⁶⁰⁻⁶³⁾。また、図1.7に示すように、SPR励起TIR蛍光顕微鏡は、TIR蛍光顕微鏡よりも蛍光分子を明瞭に観察可能である⁽⁶⁴⁻⁶⁶⁾。この他にも、図1.8に示す、SPR励起層をV字型とすることで、プリズムを無くしたV溝バイオセンサ^(67,68)や、SPR励起層にグレーディングを設けた構造⁽⁶⁹⁾がある。一方、WMRによる電界増強効果を利用し、蛍光検出を行った報告はまだ少ないが、筆者の属する研究グループは、これまでに、Si層とSiO₂層から成るWMRチップにより、波長760 nmの近接場光を励起し、蛍光色素希釈液からの波長780 nm以上の蛍光を検出している⁽²³⁾。さらに、他のグループからは、金属薄膜⁽²⁴⁾やナノ孔⁽⁷⁰⁾を利用したWMR構造などが報告されている。

1.3.3. 近接場光利用センサに適用可能なその他技術

近接場光利用センサの高感度化、迅速化、小型化を目指した研究が、近年多数報告されている。本節では、近接場光利用センサに適用可能なその他技術とその応用例を述べる。

・検出チップの構造最適化

近接場光の電界増強効果を更に高めるため、上述したWMRやSPRを応用し、検出チップの構造を最適化する研究が報告されている。SPRによる電界増強効果を高める研究として、例えば、SPRを励起可能な金属膜を積層した構造⁽⁷¹⁾、金属膜の上にグラフェン層を積層した構造⁽⁷²⁾がある。この他にもSPRとWMRを融合した例として、図1.9に示すように、SPRを励起可能な金属層の上に、ある特定の膜厚で誘電体層を積層し、ファノ共鳴を励起した例^(73,74)や蛍光強度の増強を図った例⁽⁷⁵⁾がある。さらに、強磁性体とフォトリソニック結晶から構成した構造⁽⁷⁶⁾など、今後も様々な構造が報告されると考えられる。

・電界支援

SPRセンサの金属膜を電極として用いる手法が報告されている。例えば、グルコースの検出に代表されるように、電圧を印加することによる検出対象物質の変化を電気化学的に測定する方法^(77,78)が知られている。

さらに、短時間測定を目標に、誘電泳動 (Dielectrophoresis) ⁽⁷⁹⁻⁸¹⁾を利用した近接場光利用センサが報告されている。微粒子に、外部より電界を印加すると、粒子内で分極電荷が誘起される。不均一電界中では、微粒子の誘電率、導電率が、周辺溶媒の誘電率、導電率と比較し大きい場合、正の誘電泳動が作用し、微粒子は電界強度の強い方向に移動する。一方、微粒子の誘電率、導電率が、周辺溶媒の誘電率、導電率と比較し小さい場合、負の誘電泳動が作用し、微粒子は電界強度の弱い方向に移動する。

誘電泳動を利用した近接場光技術として、近接場光学顕微鏡を応用した例⁽⁸²⁾や、SPRセンサを応用した例^(83,84)がある。図1.10に示す例⁽⁸³⁾は、Auのナノ孔を有する電極に、生体物質を集め、反射光の変化を検出している。さらに近年は、蛍光標識した生体物質をナノ金属構造に集め、これを蛍光信号の増加として検出する例⁽⁸⁴⁾など幅広い応用技術が報告されている。

・小型化, 高機能化

近接場光利用センサの上にマイクロ流路を設置し、測定試料の少量化、測定時間の迅速化を図る研究が報告されている^(85,86)。今後は、ウェアラブルセンサ⁽⁸⁷⁾やスマートフォン等の小型デバイスに向けた応用開発^(88,89)など、センシング技術をより身近なものとする応用研究が幅広く行われると考える。

さらに、近接場光は測定だけにとどまらず、ナノ寸法や原子寸法の加工へ展開する可能性をもつ^(90,91)。近接場光の技術を応用することで、例えば、DNAの1塩基や細胞内のタンパク質分子を操作するなどの機能を持たせることが可能になると考える。

第1章の参考文献

1. L. D. Mello and L. T. Kubota, "Review of the use of biosensors as analytical tools in the food and drink industries," *Food chemistry* **77**(2), 237-256 (2002).
2. R. Govind, *Optical sensor systems in biotechnology*, (Springer Science & Business Media, 2009).
3. P. B. Lippa, L. J. Sokoll, and D. W. Chan, "Immunosensors - principles and applications to clinical chemistry," *Clin. Chim.* **314**(1), 1-26 (2001).
4. J. W.-F. Law, N.-S. A. Mutalib, K.-G. Chan, and L.-H. Lee, "Rapid methods for the detection of foodborne bacterial pathogens: principles, applications, advantages and limitations," *Front. Microbiol.* **5**(770), 1-19 (2015).
5. R. J. Block, E. L. Durrum, and G. Zweig, *A manual of paper chromatography and paper electrophoresis*, Second Edition, (Academic, 2016).
6. U. Kubitscheck, *Fluorescence microscopy: from principles to biological applications*, Second Edition, (Wiley-Blackwell, 2017).
7. E. Engvall and P. Perlmann, "Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) quantitative assay of immunoglobulin G," *Immunochemistry* **8**(9), 871-874 (1971).
8. S. A. Bustin, "Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays," *J. Mol. Endocrinol.* **25**(2), 169-193 (2000).
9. W. Knoll, "Optical characterization of organic thin films and interfaces with evanescent waves," *MRS Bulletin* **16**(7), 29-39 (1991).
10. M. Born and E. Wolf, *Principles of optics. Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Sixth Edition, (Cambridge University, 1997).
11. 草川徹, 光学の原理 (1) - (3), 第7版, (東海大学, 2005) [in Japanese].
12. 大木義路, 誘電体物性, (培風館, 2002) [in Japanese].
13. 川田善正, はじめての光学, (講談社, 2014) [in Japanese].
14. 国分泰雄, 光波工学 (先端光エレクトロニクスシリーズ 6), (共立出版, 1999) [in Japanese].
15. 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, (コロナ社, 2013) [in Japanese].
16. A. B. Dahlin, *Advances in biomedical spectroscopy, Plasmonic biosensors*, (IOS, 2012).
17. X. Fan, I. M. White, S. I. Shopova, H. Zhu, J. D. Suter, and Y. Sun, "Sensitive optical biosensors for unlabeled targets: A review," *Anal. Chim. Acta* **620**(1), 8-26 (2008).
18. M. Fujimaki, X. Wang, T. Kato, K. Awazu, and Y. Ohki, "Parallel-incidence-type waveguide-mode sensor with spectral-readout setup," *Opt. Express* **23**(9), 10925-10937 (2015).

19. M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, Y. Koganezawa, Y. Ohki, and T. Komatsubara, "Silica-based monolithic sensing plates for waveguide-mode sensors," *Opt. Express* **16**(9), 6408-6416 (2008).
20. K. Awazu, C. Rockstuhl, M. Fujimaki, N. Fukuda, J. Tominaga, T. Komatsubara, T. Ikeda, and Y. Ohki, "High sensitivity sensors made of perforated waveguides," *Opt. Express* **15**(5), 2592-2597 (2007).
21. M. Fujimaki, K. Nomura, K. Sato, T. Kato, S. C. B. Gopinath, X. Wang, K. Awazu, and Y. Ohki, "Detection of colored nanomaterials using evanescent field-based waveguide sensors," *Opt. Express* **18**(15), 15732-15740 (2010).
22. X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu, and Y. Ohki, "Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure," *Opt. Express* **19**(21), 20205-20213 (2011).
23. K. Nomura, T. LakshmiPriya, N. Fukuda, X. Wang, and M. Fujimaki, "Fluorescence enhancement by a SiO₂-based monolithic waveguide structure for biomolecular detection," *J. Appl. Phys.* **113**, 143103 (2013).
24. W. R. Holland and D. G. Hall, "Waveguide mode enhancement of molecular fluorescence," *Opt. Lett.* **10**(8), 414-416 (1985).
25. K. H. A. Lau, L.-S. Tan, K. Tamada, M. S. Sander, and W. Knoll, "Highly sensitive detection of processes occurring inside nanoporous anodic alumina templates: A waveguide optical study," *J. Phys. Chem. B* **108**(30), 10812-10818 (2004).
26. N. Skivesen, R. Horvath, and H. C. Pedersen, "Optimization of metal-clad waveguide sensors," *Sens. Actuators B* **106**(2), 668-676 (2005).
27. H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, M. Fu, Y. Ohki, T. Tanaka, and M. Makishima, "Hemagglutination detection for blood typing based on waveguide-mode sensors," *Sens. Bio-Sens. Res.* **3**, 59-64 (2015).
28. S. C. B. Gopinath, K. Awazu, M. Fujimaki, K. Shimizu, and T. Shima, "Observations of immuno-gold conjugates on influenza viruses using waveguide-mode sensors," *PLoS One* **8**(7), e69121 (2013).
29. P. Kozma, F. Kehl, E. Ehrentreich-Förster, C. Stamm, and F. F. Bier, "Integrated planar optical waveguide interferometer biosensors: A comparative review," *Biosens. Bioelectron.* **58**(15), 287-307 (2014).
30. K. Hotta, A. Yamaguchi, and N. Teramae, "Nanoporous waveguide sensor with optimized nanoarchitectures for highly sensitive label-free biosensing," *ACS Nano* **6**(2), 1541-1547 (2012).

31. K. Nomura, M. Fujimaki, and K. Awazu, "Size control of nanopores formed on SiO₂ glass by swift-heavy-ion irradiation and its application to highly sensitive biomolecular detection," *J. Vac. Sci. Technol. A* **29**(5), 051402 (2011).
32. J. Flueckiger, S. Schmidt, V. Donzella, A. Sherwali, D. M. Ratner, L. Chrostowski, and K. C. Cheung, "Sub-wavelength grating for enhanced ring resonator biosensor," *Opt. Express* **24**(14), 15672-15686 (2016).
33. X.-D. Wang and O. S. Wolfbeis, "Fiber-optic chemical sensors and biosensors (2013-2015)," *Anal. Chem.* **88**(1), 203-227 (2015).
34. X. D. Hoa, A. G. Kirk, and M. Tabrizian, "Towards integrated and sensitive surface plasmon resonance biosensors: A review of recent progress," *Biosens. Bioelectron.* **23**(2), 151-160 (2007).
35. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors," *Sens. Actuators B* **54**(1), 3-15 (1999).
36. D. R. Shankaran, K. V. Gobi, and N. Miura, "Recent advancements in surface plasmon resonance immunosensors for detection of small molecules of biomedical, food and environmental interest," *Sens. Actuators B* **121**(1), 158-177 (2007).
37. M. W. Knight, N. S. King, L. Liu, H. O. Everitt, P. Nordlander, and N. J. Halas, "Aluminum for plasmonics," *ACS Nano* **8**(1), 834-840 (2013).
38. K. Diest, V. Liberman, D. M. Lennon, P. B. Welander, and M. Rothschild, "Aluminum plasmonics: optimization of plasmonic properties using liquid-prism-coupled ellipsometry," *Opt. Express* **21**(23), 28638-28650 (2013).
39. D. V. Nesterenko and Z. Sekkat, "Resolution estimation of the Au, Ag, Cu, and Al single-and double-layer surface plasmon sensors in the ultraviolet, visible, and infrared regions," *Plasmonics* **8**(4), 1585-1595 (2013).
40. I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, and J. R. Lakowicz, "Ultraviolet surface plasmon-coupled emission using thin aluminum films," *Anal. Chem.* **76**(14), 4076-4081 (2004).
41. A. Ono, M. Kikawada, R. Akimoto, W. Inami, and Y. Kawata, "Fluorescence enhancement with deep-ultraviolet surface plasmon excitation," *Opt. Express* **21**(15), 17447-17453 (2013).
42. L. Nieba, S. E. Nieba-Axmann, A. Persson, M. Hamalainen, F. Edebratt, A. Hansson, J. Lidholm, K. Magnusson, A. F. Karlsson, and A. Pluckthun, "BIACORE analysis of histidine-tagged proteins using a chelating NTA sensor chip," *Anal. Biochem.* **252**(2), 217-228 (1997).
43. M. A. Wear, M. W. Nowicki, and E. A. Blackburn, "Thermo-kinetic analysis space expansion for cyclophilin-ligand interactions - identification of a new nonpeptide inhibitor using Biacore™ T200," *FEBS Open Bio* **7**(4), 533-549 (2017).

44. 富士フィルムHP,
<http://fujifilm.jp/business/healthcare/chemical/immuno/ag1/techdata.html>, (Retrieved on Jan. 13, 2018) [in Japanese].
45. S. Zhang, R. Geryak, J. Geldmeier, S. Kim, and V. V. Tsukruk, "Synthesis, assembly, and applications of hybrid nanostructures for biosensing," *Chem. Rev.* **117**(20), 12942-13038 (2017).
46. W. Li, P. H. C. Camargo, X. Lu, and Y. Xia, "Dimers of silver nanospheres: facile synthesis and their use as hot spots for surface-enhanced Raman scattering," *Nano Lett.* **9**(1), 485-490 (2008).
47. X. Ye, L. Jin, H. Caglayan, J. Chen, G. Xing, C. Zheng, V. Doan-Nguyen, Y. Kang, N. Engheta, C. R. Kagan, and C. B. Murray, "Improved size-tunable synthesis of monodisperse gold nanorods through the use of aromatic additives," *ACS Nano* **6**(3), 2804-2817 (2012).
48. L. Scarabelli, M. Coronado-Puchau, J. J. Giner-Casares, J. Langer, and L. M. Liz-Marzán, "Monodisperse gold nanotriangles: size control, large-scale self-assembly, and performance in surface-enhanced Raman scattering," *ACS Nano* **8**(6), 5833-5842 (2014).
49. M. Moskovits, "Surface-enhanced spectroscopy," *Rev. Mod. Phys.* **57**(3), 783-826 (1985).
50. J.-Y. Lim, J.-S. Nam, S.-E. Yang, H. Shin, Y.-H. Jang, G.-U. Bae, T. Kang, K.-I. Lim, and Y. Choi, "Identification of newly emerging influenza viruses by surface-enhanced Raman spectroscopy," *Anal. Chem.* **87**(23), 11652-11659 (2015).
51. K. Kong, C. Kendall, N. Stone, and I. Notingher, "Raman spectroscopy for medical diagnostics—From in-vitro biofluid assays to in-vivo cancer detection," *Adv. Drug Deliv. Rev.* **89**, 121-134 (2015).
52. E. Betzig, J. K. Trautman, T. D. Harris, J. S. Weiner, and R. L. Kostelak, "Breaking the diffraction barrier: optical microscopy on a nanometric scale," *Science* **251**(5000), 1468-1470 (1991).
53. F. Zenhausern, M. P. O'Boyle, and H. K. Wickramasinghe, "Apertureless near - field optical microscope," *Appl. Phys. Lett.* **65**(13), 1623-1625 (1994).
54. M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, and A. P. Alivisatos, "Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels," *Science* **281**(5385), 2013-2016 (1998).
55. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," *Nat. Mater.* **4**(6), 435-446 (2005).
56. E. Betzig and R. J. Chichester, "Single molecules observed by near-field scanning optical microscopy," *Science* **262**, 1422-1425 (1993).
57. D. Axelrod, "Total internal reflection fluorescence microscopy," *Methods in cell biology* **89**, 169-221 (2008).

58. A. L. Mattheyses, S. M. Simon, and J. Z. Rappoport, "Imaging with total internal reflection fluorescence microscopy for the cell biologist," *J. Cell Sci.* **123**(21), 3621-3628 (2010).
59. M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, and T. Yanagida, "Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**(1), 47-53 (1997).
60. T. Liebermann and K. Wolfgang, "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy," *Colloid. Surf. A* **171**(1), 115-130 (2000).
61. K. Tawa and K. Morigaki, "Substrate-supported phospholipid membranes studied by surface plasmon resonance and surface plasmon fluorescence spectroscopy," *Biophys. J.* **89**(4), 2750-2758 (2005).
62. J. Dostálek and W. Knoll, "Biosensors based on surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy," *Biointerphases* **3**(3), FD12-22 (2008).
63. M. Bauch, K. Toma, M. Toma, Q. Zhang, and J. Dostalek, "Plasmon-enhanced fluorescence biosensors: A review," *Plasmonics* **9**(4), 781-799 (2014).
64. R.-Y. He, G.-L. Chang, H.-L. Wu, C.-H. Lin, K.-C. Chiu, Y.-D. Su, and S.-J. Chen, "Enhanced live cell membrane imaging using surface plasmon-enhanced total internal reflection fluorescence microscopy," *Opt. Express* **14**(20), 9307-9316 (2006).
65. K. Tawa, C. Yasui, C. Hosokawa, H. Aota, and J. Nishii, "In situ sensitive fluorescence imaging of neurons cultured on a plasmonic dish using fluorescence microscopy," *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**(22), 20010-20015 (2014).
66. R.-Y. He, C.-Y. Lin, Y.-D. Su, K.-C. Chiu, N.-S. Chang, H.-L. Wu, and S.-J. Chen, "Imaging live cell membranes via surface plasmon-enhanced fluorescence and phase microscopy," *Opt. Express* **18**(4), 3649-3659 (2010).
67. K. Nomura, S. C. B. Gopinath, T. LakshmiPriya, N. Fukuda, X. Wang, and M. Fujimaki, "An angular fluidic channel for prism-free surface-plasmon-assisted fluorescence capturing," *Nat. Commun.* **4**, 2855 (2013).
68. H. Ashiba, M. Fujimaki, X. Wang, K. Awazu, T. Tamura, and Y. Shimizu, "Sensor chip design for increasing surface-plasmon-assisted fluorescence enhancement of the V-trench biosensor," *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**(6), 067001 (2016).
69. K. Kim, D. J. Kim, E.-J. Cho, J.-S. Suh, Y.-M. Huh, and D. Kim, "Nanograting-based plasmon enhancement for total internal reflection fluorescence microscopy of live cells," *Nanotechnology* **20**(1), 015202 (2008).
70. Y. Fan, K. Hotta, A. Yamaguchi, and N. Teramae, "Enhanced fluorescence in a nanoporous waveguide and its quantitative analysis," *Opt. Express* **20**(12), 12850-12859 (2012).

71. M. Lu, Y. Liang, S. Qian, L. Li, Z. Jing, J.-F. Masson, and W. Peng, "Optimization of surface plasmon resonance biosensor with Ag/Au multilayer structure and fiber-optic miniaturization," *Plasmonics* **12**(3), 663-673 (2017).
72. L. Wu, Z. Ling, L. Jiang, J. Guo, X. Dai, Y. Xiang, and D. Fan, "Long-range surface plasmon with graphene for enhancing the sensitivity and detection accuracy of biosensor," *IEEE Photon. J.* **8**(2), 1-9 (2016).
73. S. Hayashi, D. V. Nesterenko, and Z. Sekkat, "Fano resonance and plasmon-induced transparency in waveguide-coupled surface plasmon resonance sensors," *Appl. Phys. Express* **8**(2), 022201 (2015).
74. S. Hayashi, D. V. Nesterenko, and Z. Sekkat, "Waveguide-coupled surface plasmon resonance sensor structures: Fano lineshape engineering for ultrahigh-resolution sensing," *J. Phys. D: Appl. Phys.* **48**(32), 325303 (2015).
75. C. J. Huang, J. Dostalek, and W. Knoll, "Long range surface plasmon and hydrogel optical waveguide field-enhanced fluorescence biosensor with 3D hydrogel binding matrix: On the role of diffusion mass transfer," *Biosens. Bioelectron.* **26**(4), 1425-1431 (2010).
76. D. O. Ignatyeva, G. A. Knyazev, P. O. Kapralov, G. Dietler, S. K. Sekatskii, and V. I. Belotelov, "Magneto-optical plasmonic heterostructure with ultranarrow resonance for sensing applications," *Sci. Rep.* **6**, 28077 (2016).
77. X. Kang, G. Cheng, and S. Dong, "A novel electrochemical SPR biosensor," *Electrochem. Commun.* **3**(9), 489-493 (2001).
78. Y. Iwasaki, T. Tobita, K. Kurihara, T. Horiuchi, K. Suzuki, and O. Niwa, "Imaging of electrochemical enzyme sensor on gold electrode using surface plasmon resonance," *Biosens. Bioelectron.* **17**(9), 783-788 (2002).
79. T. B. Jones, *Electromechanics of Particles*, (Cambridge, 1995).
80. K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, "Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems," *Biosens. Bioelectron.* **26**(5), 1800-1814 (2011).
81. S. Park, Y. Zhang, T.-H. Wang, and S. Yang, "Continuous dielectrophoretic bacterial separation and concentration from physiological media of high conductivity," *Lab Chip* **11**(17), 2893-2900 (2011).
82. K. J. Freedman, C. R. Crick, P. Albella, A. Barik, A. P. Ivanov, S. A. Maier, S.-H. Oh, and J. B. Edel, "On-demand surface- and tip-enhanced raman spectroscopy using dielectrophoretic trapping and nanopore sensing," *ACS Photonics* **3**(6), 1036-1044 (2016).
83. A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, and S.-H. Oh, "Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays," *Nano Lett.* **14**(4), 2006-2012 (2014).

84. A. Barik, S. Cherukulappurath, N. J. Wittenberg, T. W. Johnson, and S.-H. Oh, "Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays," *Anal. Chem.* **88**(3), 1704-1710 (2016).
85. C. Huang, K. Bonroy, G. Reekmans, W. Laureyn, K. Verhaegen, I. D. Vlamincx, L. Lagae, and G. Borghs, "Localized surface plasmon resonance biosensor integrated with microfluidic chip," *Biomed. Microdevices* **11**(4), 893-901 (2009).
86. O. Tokel, F. Inci, and U. Demirci, "Advances in plasmonic technologies for point of care applications," *Chem. Rev.* **114**(11), 5728-5752 (2014).
87. A. J. Bandodkar, I. Jeerapan, and J. Wang, "Wearable chemical sensors: Present challenges and future prospects," *ACS Sens.* **1**(5), 464-482 (2016).
88. Q. Wei, H. Qi, W. Luo, D. Tseng, S. J. Ki, Z. Wan, Z. Gorocs, L. A. Bentolila, T.-T. Wu, R. Sun, and A. Ozcan, "Fluorescent imaging of single nanoparticles and viruses on a smart phone," *ACS Nano* **7**(10), 9147-9155 (2013).
89. Y. Liu, Q. Liu, S. Chen, F. Cheng, H. Wang, and W. Peng, "Surface plasmon resonance biosensor based on smart phone platforms," *Sci. Rep.* **5**, 12864 (2015).
90. 大津元一, "近接場光技術とその展開," *精密工学会誌* **66**(5), 661-666 (2000) [in Japanese].
91. R. Ranjan, E. N. Esimbekova, M. A. Kirillova, and V. A. Kratasyuk, "Metal-enhanced luminescence: Current trend and future perspectives - A review," *Anal. Chim. Acta* **971**(8), 1-13 (2017).

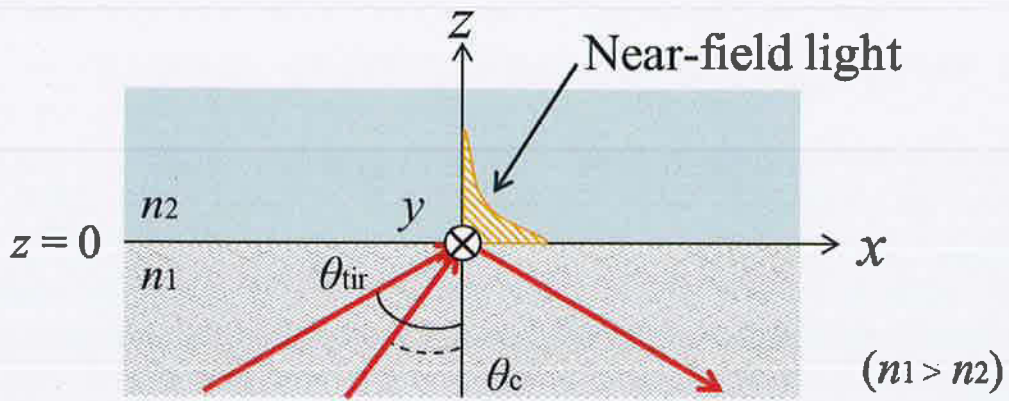


Fig. 1.1. Schematic drawing showing a near-field light induced by the total internal reflection of an incident light.

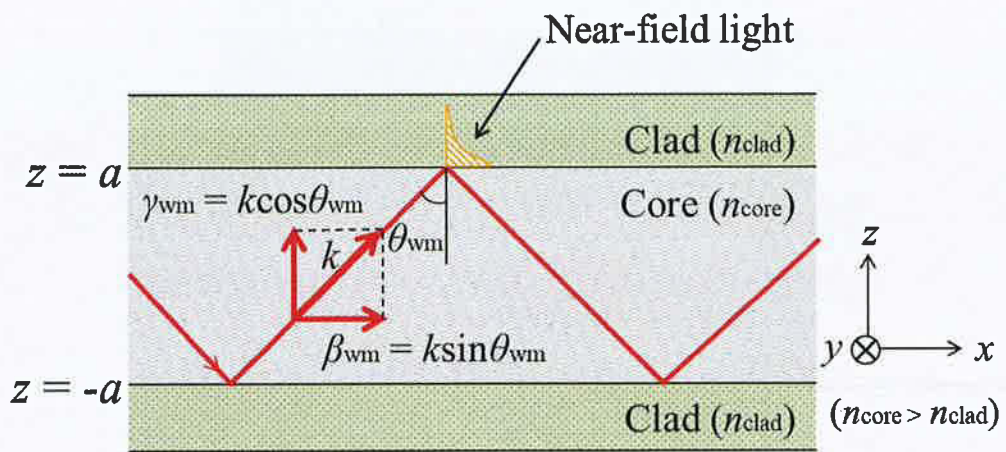


Fig. 1.2. Schematic drawing of the light propagating in a three-layer waveguide composed of a core layer and two clad layers.

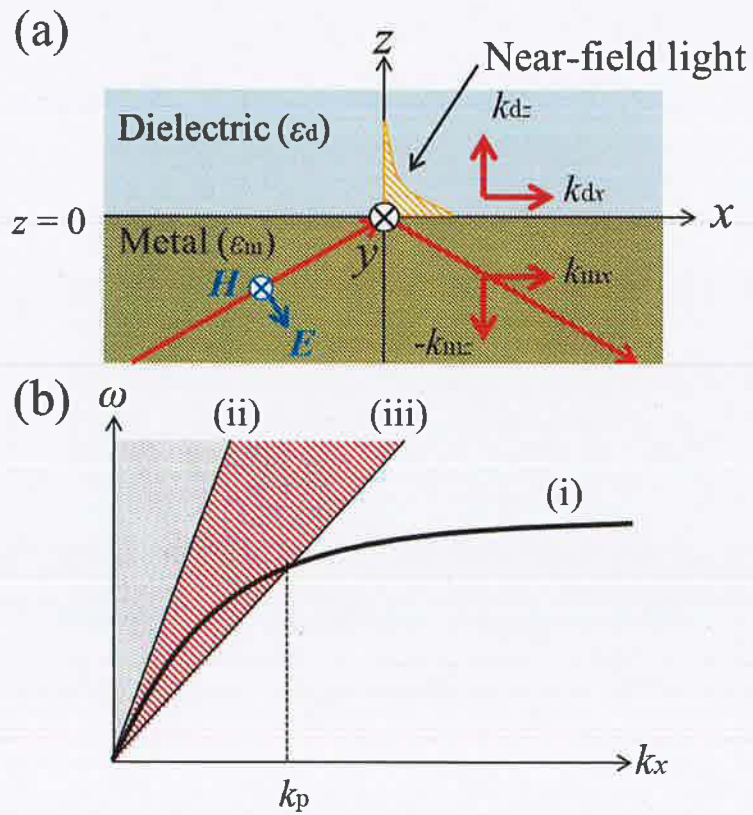


Fig. 1.3. (a) Schematic drawing of a metal thin layer and a dielectric layer to induce SPR by p-polarized light. (b) Dispersion relation of SPR. The wavenumber in the x -axis direction is denoted as k_x and the wave number, which excites SPR, is denoted as k_p .

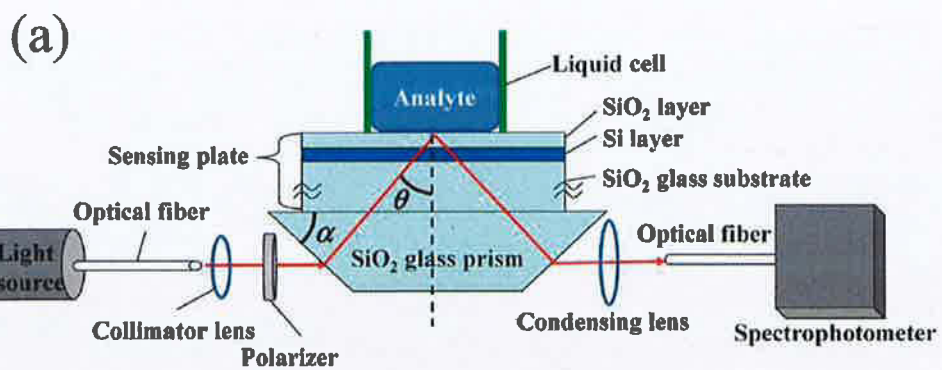


Fig. 1.4. (a) Optical arrangement of the whole WMR sensor using the Kretschmann configuration (After Ref. 18). (b) Photo showing a WMR sensor with four channels.

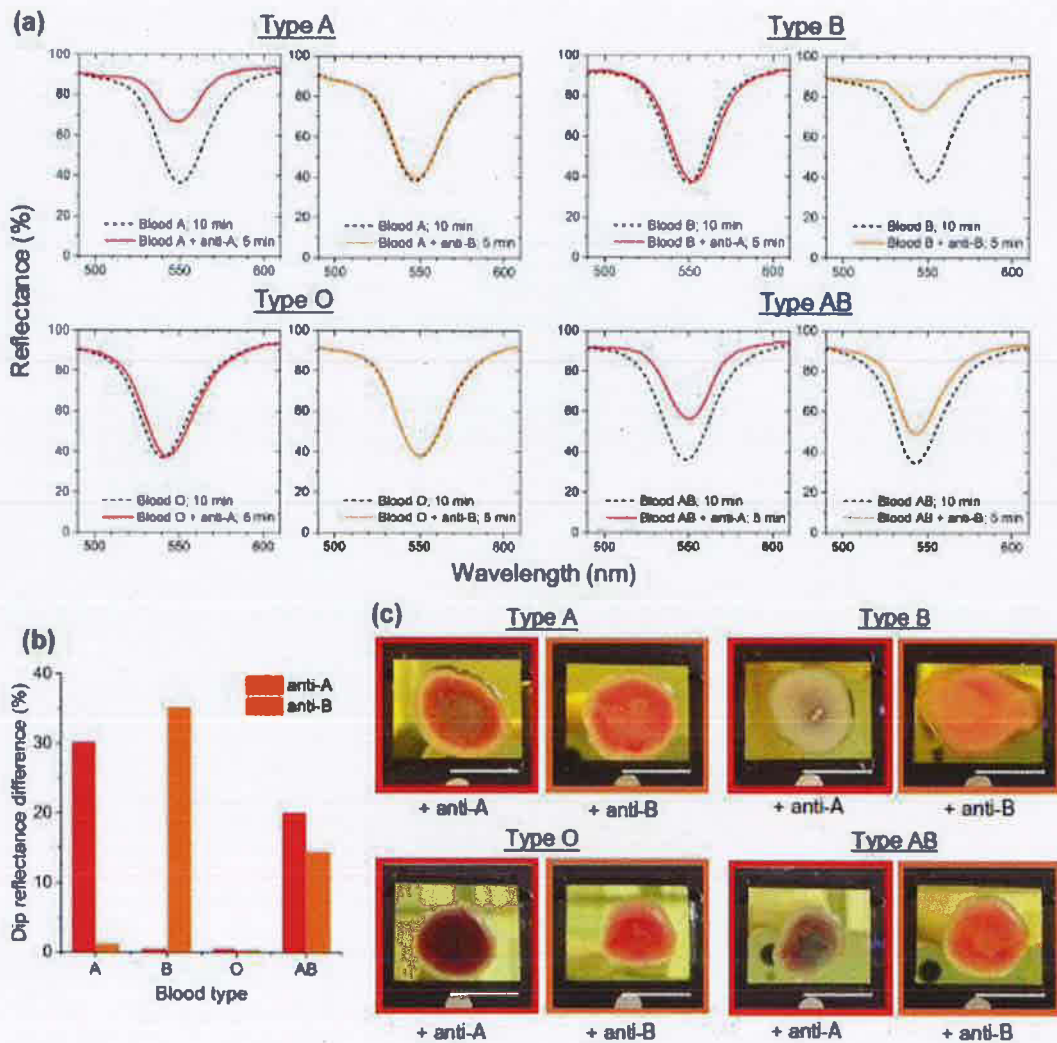


Fig. 1.5. (a) ABO blood typing using a WMR sensor. (b) Dip reflectance difference between blood with and without antibody. (c) Photographs of sensing chips analyzing the blood-antibody mixture. Each photograph corresponds to the spectra shown in (a). Scale bars in the figure indicate 10 mm (After Ref. 27).

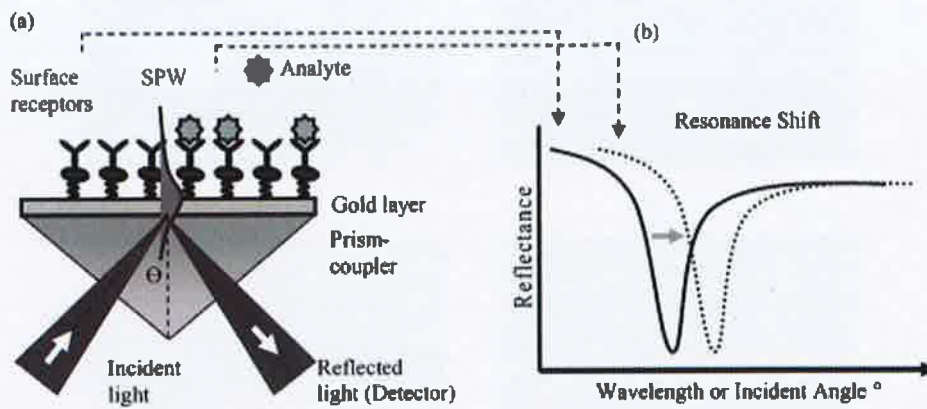


Fig. 1.6. Tracking surface absorption by SPR, (a) prism-coupled configuration and (b) resonance shift in the reflected light spectrum (After Ref. 34).

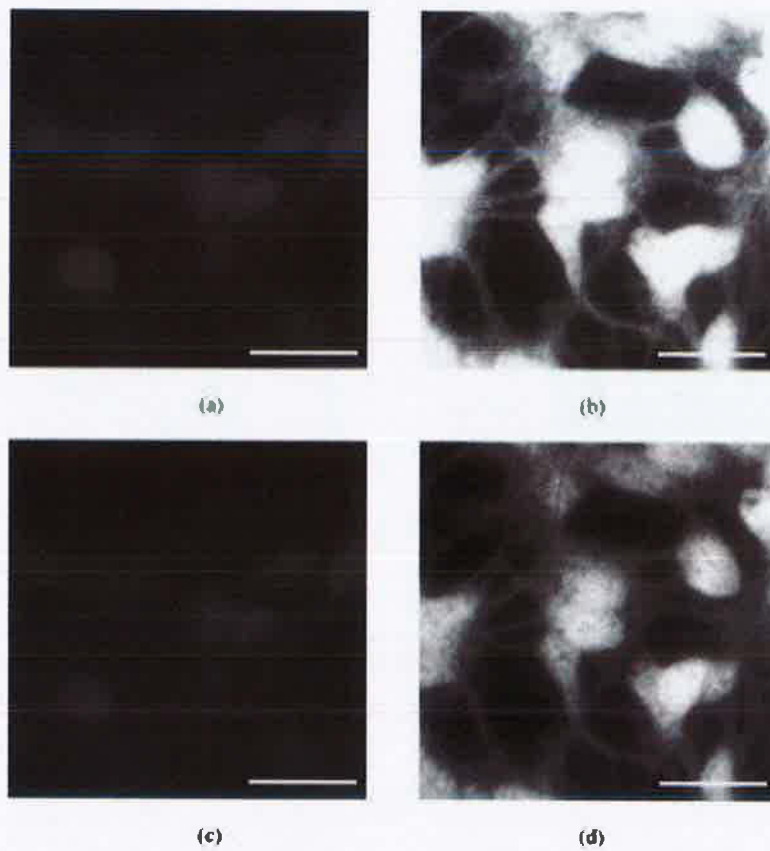


Fig. 1.7. Fluorescence images of neuronal cells cultured on a glass bottomed dish ((a) and (c)), and on a plasmonic dish ((b) and (d)) (After Ref. 65).

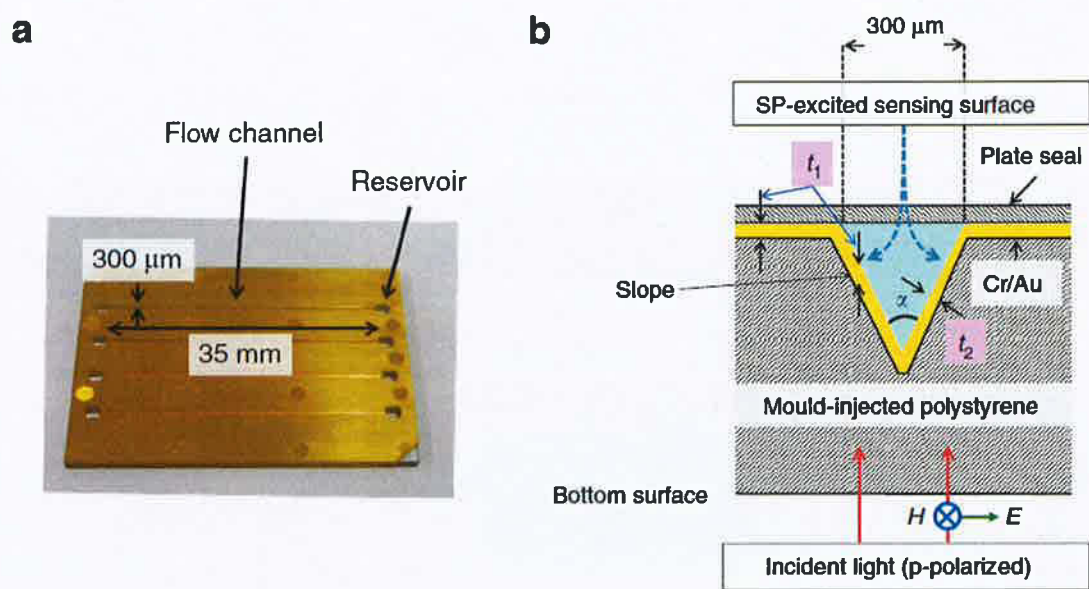


Fig. 1.8. Configuration of the sensing system. (a) Top view of the chip containing the fluidic channel. (b) Cross-sectional image of the V-shaped channel (After Ref. 67).

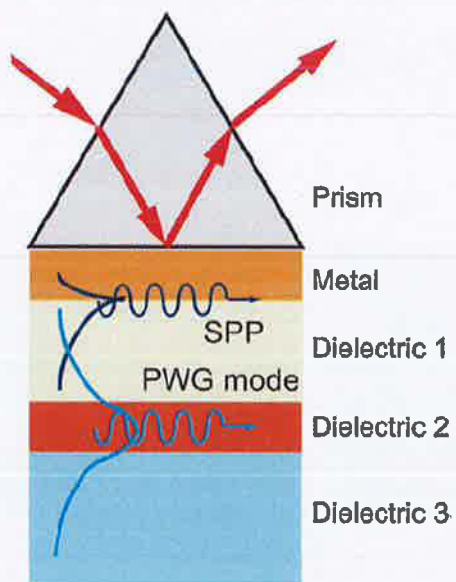


Fig. 1.9. Multilayer electromagnetic system (After Ref. 74).

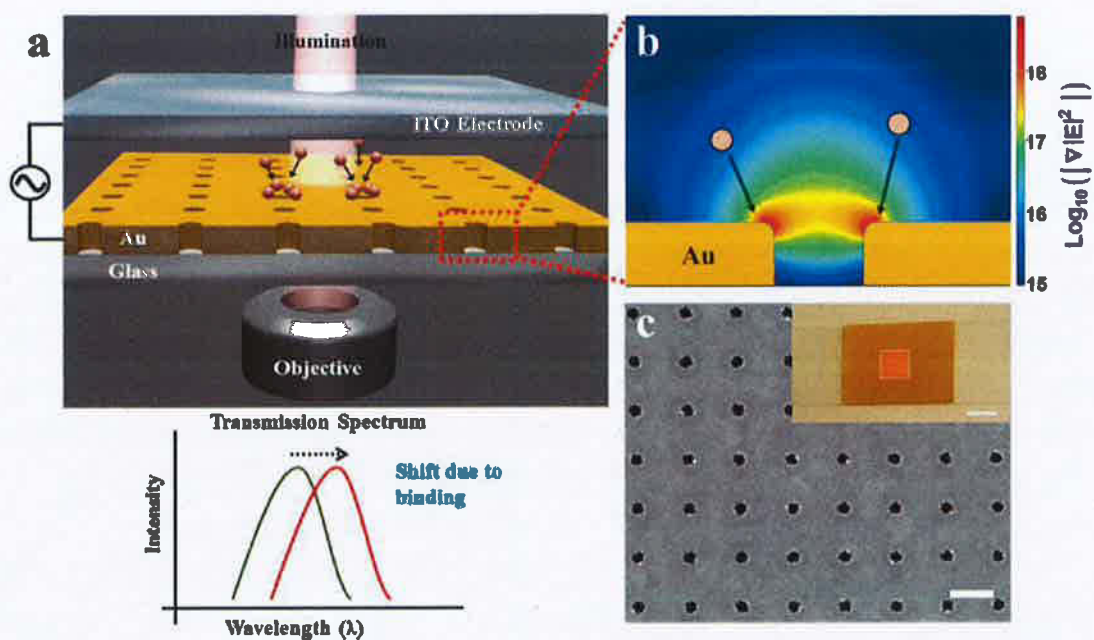


Fig. 1.10. Schematic of the experimental setup for dielectrophoretic concentration of analyte molecules. (b) Dielectrophoretic forces attract analyte molecules toward the edge of each hole as the electric field intensity gradient is strongest (red color) along the rim of the holes. (c) SEM of the nanohole array showing a hole diameter of 140 nm and periodicity of 600 nm. Scale bar is 500 nm. Inset: photograph of the template-stripped gold nanohole array. Scale bar is 1 cm (After Ref. 83).

第2章 ポータブル血液検査装置を実現する近接場光センサのための 血漿測定用マイクロ流路の開発

2.1. はじめに

患者の負担を軽減するため、1滴の血液から多項目を同時に検査可能なセンシング手法の実現が切望されている。ここで、血液は、赤血球、白血球、血漿、血小板から構成され、中でも血漿には、タンパク質や代謝産物、ウイルス等の多くの分析物が含まれている。よって、血液中のウイルスを迅速に検出するためには、予め全血から血球を除去し、血漿を分離する必要がある。しかし、広く用いられている遠心分離法は、1 mL以上の血液を要する⁽¹⁾。

微量血液を用いた血漿分離手法として、マイクロ流路が近年注目を集めている⁽¹⁻³⁾。これまでに、例えば、血球と血漿の流速の差を用いる方法⁽⁴⁻⁶⁾、血球の大きさに適したフィルタを併用する方法⁽⁷⁻⁹⁾、血球を重力沈降させる方法⁽¹⁰⁻¹²⁾が報告されている。さらに、マイクロ流路に磁界⁽¹³⁾や電界^(14,15)を作用させ、除去効率を向上させる試みが報告されている。

筆者は、これまでに開発してきた導波モード共鳴 (WMR) センサ⁽¹⁶⁻²¹⁾を用いて、血漿中に存在するウイルス抗体の検出を行うため、図2.1に示すような、垂直円筒形の沈降孔内部で血球を重力沈降させ、血漿を分離するマイクロ流路を開発してきた^(22,23)。重力沈降法は、他の方法と比較し、5倍程度の低希釈の血液から血漿を分離できる⁽¹⁾。しかし、血漿が分離されるまでに10分以上の時間がかかるという問題を有す。

ここで、1920年にボイコットは、垂直な試験管よりも、傾けた試験管で血球がより速く沈降することを見出した⁽²⁴⁾。傾けた試験管内では、血球は、分離した血漿と残りの全血の界面から垂直に沈降するだけでなく、傾けた壁面からも沈降する。この壁面から分離された血漿層は、直ちに、既に分離されている血漿層と合流する^(25,26)。

これらの観点から本研究では、血球除去に要する時間を短縮するために、このボイコット効果に注目し、血球沈降孔の形状を最適化する。さらに、円錐台形血球沈降孔を備えたWMRセンサを用いて、血液から血漿を分離し、分離血漿中の抗B型肝炎表面抗原抗体 (HBs抗体) を検出する。

2.2. 血球沈降孔の最適化

沈降孔の上部から血漿を取得する場合、沈降孔内の血漿高さ h が高いほど、血球汚染が少ない。よって、血漿高さの観点から、沈降孔の形状を最適化する。まず、前述したボイコット効果とは無関係に、図2.2(a)に示す、半径 a の垂直断面を有する円筒形沈降孔 (i) を考える。全ての血球は同じ速度 v で垂直に沈降すると仮定すると、孔内で血液を微小時間 dt の間静置する場合、分離される血漿高さの増加分 dh は、

$$dh = vdt, \quad (2.1)$$

と表される。すなわち、分離される血漿量 dV は、

$$dV = a^2 \pi dh = a^2 \pi v dt, \quad (2.2)$$

と表される。

次に、ボイコット効果が生じる代表的なモデルとして、図2.2(b)に示す円錐台形沈降孔(ii)を考える。ボイコット効果により、血球は既に分離された血漿（黄色）と残りの全血（赤色）との間の境界面と、下向きの壁から分離される。ここで、 H は沈降孔の高さを、 h は時間 t の間に分離された血漿の高さを示す。さらに、 a は孔の底部の半径、 θ は下向きの壁の傾斜角を示す。簡単のため、血球の沈降速度 v は、血漿/全血界面と傾斜壁において同じであると仮定する。黄色で網掛けされた体積 dV は、微小時間 dt の間に分離される血漿である。この容積は、既存の血漿と合わさった後の台形ABCDの容積 dV' に等しいと考えられる⁽²⁵⁾。

図2.2に示す形状は、以下の条件、

$$a - H \tan \theta > 0 \text{ and } 0 \leq \theta < \frac{\pi}{2}, \quad (2.3)$$

を満たす。黄色で網掛けされた台形AEFGの面積は、 $v dt$ が非常に小さいときの平行四辺形AEF'Gの面積にほぼ等しく、AEF'Gの面積は矩形AEJIの面積と等しいため、黄色で網掛けされた領域全体は $2av dt$ として近似することができる。従って、黄色で網掛けされた全領域の断面に対応する体積 dV は、

$$dV = a^2 \pi v dt, \quad (2.4)$$

と求められる。

式(2.2)と式(2.4)より、 dV は沈降孔の底面積 $a^2 \pi$ と $v dt$ の積に等しいことが分かる。すなわち、血漿/全血界面と下向き傾斜面の底面に対する投影の合計が、円筒形(i)と円錐台形(ii)で等しい場合、微小時間 dt の間に新たに分離される血漿の体積 dV は、孔の形状とは無関係に決まることが分かる。

つぎに、円錐台形沈降孔の高さ dh を推定する。図2.2(b)に示す台形ABCDの断面積 dV' を考える。長さABとCDはそれぞれ、 $2[a - (H - h) \tan \theta]$ と $2[a - (H - h - dh) \tan \theta]$ である。したがって、台形ABCDの面積は、 $(dh)^2$ を無視すると、 $2[a - (H - h) \tan \theta] dh$ と表すことができる。したがって、台形ABCDに対応する回転台形の体積は、 $dV' = [a - (H - h) \tan \theta]^2 \pi dh$ で表される。ここで、 dV' は式(2.4)の dV と等しいため、

$$dh = \frac{a^2}{\{a - (H - h) \tan \theta\}^2} v dt, \quad (2.5)$$

が成り立つ。

さらに、2.3節で後述する、実際に作成した沈降孔の容積を考慮に入れ、容積を40.0 μL で一定とした沈降孔の、分離血漿高さ h を計算した。ここで、血球沈降速度 v は、ヘマトクリット値が10%のときの文献値である、0.053 mm/minとする⁽²⁷⁾。まず、 $\theta = 0^\circ$ に設定した円筒形沈降孔を仮定する。さらに、 $\theta = 5, 15, 20^\circ$ に設定した円錐台形沈降孔を仮定する。ただし、孔の体積を一定とし、さらに、孔の高さ H 、または底面の半径 a の2つのパラメータのうちの1つを一定とすると、傾斜角 θ が増加するにつれて、もう1つのパラメータが増加する。図2.3に、 $a = 2.5$ mmで一定(a)、または $H = 5$ mmで一定(b)とした場合の、分離血漿高さ h を θ の関数として示す。図2.3(a), (b)の両方の場合において、 θ が増加すると、 h も増加することが分かる。 h が大きいほど、血球汚染の少ない血漿が得られることから、図2.3より、 θ が大きい場合、高純度の血漿が得られると考えられる。

2.3. 試料と実験方法

2.3.1. 血球沈降孔を有するマイクロ流路の作製

図2.4に示すように、円筒形(i)または円錐台形(ii)の沈降孔を有する2つのマイクロ流路を用意し、血球除去効率を評価した。まず、マスクレス露光装置 (NanoSystem Solutions, DL-1000) とイオンエッチング装置 (Samco, RIE-101iPH) を用いて、フォトリソグラフィ法により、シリコン単結晶ウエハ上に、流路のための鋳型を作成した。さらに、沈降孔の形状に切断されたポリメチルメタクリレートを用いて、この鋳型に接着した。つぎに、ポリジメチルシロキサン(PDMS)のプレポリマー (以下、PDMS; Dow Corning Toray, Silpot 184) 及びこの硬化剤を鋳型に注いだ。80 $^\circ\text{C}$ に加熱したアルミニウム板上に、鋳型を約60分間置き、PDMSを硬化させ、鋳型から剥がした。その後、このPDMSチップに2つの孔をあけて入口と出口を形成した。PDMSチップの表面を酸素プラズマクリーナー (Harrick Plasma, PDC-32G) を用いて洗浄した後、PDMSチップを石英ガラス基板に貼り合わせて流路を形成した。最後にシリンジポンプを、シリコーンゴムチューブを介して流路の入口に接続した。

2.3.2. 血球分離効率の評価

表2.1に、実施した2つの実験のための血液試料の詳細を示す。抗凝固エチレンジアミン四酢酸二カリウム塩 (EDTA 2K) を含有するヒト全血の試料は、Tennessee血液サービスから購入した。表2.1の中列に記載されているように、血球分離効率を評価するために、まず、遠心分離により予め血球のみを採取した。つぎに、採取した血球懸濁液約10 μL を、約90 μL のリン酸緩衝生理食塩水 (以下、PBS; 和光純薬工業) で希釈し血液試料とした。ただし、この血液試料はヒト血液由来の血漿を含まないが、同様の試料はヒト血液モデルとして広く使用されている⁽²⁸⁻³⁰⁾。さらに、ヒト全血のヘマトクリット値は通常約40%であり、血液1滴の体積は約50 μL である。したがって一滴の血液には、平均し

て約20 μL の血球が含まれる。一方、本研究で用いた、上記血液試料100 μL には、約10 μL の血球が含まれている。

図2.4に示すように、シリンジポンプ (New Era Pump Systems, NE-1000) を用いて、流速約20.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で、血液試料をマイクロ流路へ導入した。沈降孔の約80%に、約30 μL の血液が充填された時点で、血液試料の導入を停止した。孔を血液試料で充填するのに必要な導入時間は、流路の形状に依存して30秒 - 1分であった。導入を停止した後、血液試料を0 - 6分間静置させた。この間に血球は沈降し、溶媒は上澄み液として残った。つぎに、流速5.0 $\mu\text{L}/\text{min}$ で血液試料の導入を再開し、上澄み液を上部流路へ導入した。これらの間、流路の横、及び上に設置したデジタル顕微鏡 (Dino Capture, Dino-Lite Premier2 S Polarizer) 及びデジタル光学顕微鏡 (Olympus, BX51) により、観察を行った。

分離した上澄み液の高さを、取得した顕微鏡写真から推定し、上澄み液の純度を以下の式(2.6)より評価した。

$$\text{上澄み液の純度} = (1 - n_A/n_B) \times 100 (\%), \quad (2.6)$$

ただし、 n_B 及び n_A はそれぞれ、マイクロ流路を通過する前後の、約1 μL の血液試料に含まれる血球の数である。本研究では、血液試料をPBSで20倍に希釈した後、血球計算盤 (NanoEntek, C-Chip DHC-N01) を用いて n_B および n_A を計数した。

2.3.3. 血液試料中のウイルス抗原抗体検出

図2.1に示すように、作成したマイクロ流路をWMRセンサに設置し、ウイルス検出のための流路として使用可能か検証を行った。本研究で使用したWMRセンサの検出板は、石英ガラス基板上に、膜厚45 nmの下部Si単結晶層と、この熱酸化により形成された膜厚355 nmの上部 SiO_2 層を有する⁽¹⁷⁾。

本研究では、検出対象物質としてモノクローナルマウス抗B型肝炎ウイルス表面抗原抗体 (以下、HBs抗体; Hytest, Hs33) を用いた。このHBs抗体を検出するために、WMRセンサ検出板を、以下に述べる2種のトリエトキシシラン誘導体が同じモル比で混合された溶液に、約15時間浸漬した⁽³¹⁾。一つ目は、HBs抗体に対する抗原タンパク質と結合する、スクシンイミドエステルである。二つ目は、血漿中の汚染物質が検出板へ非特異的に吸着することを防止する、オリゴエチレングリコールである。この表面修飾後、約20 μL の、濃度50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のB型肝炎表面抗原 (Beacle, HBsAg-XT) の溶液を検出板上に滴下し、HBs抗原が検出板に固定されるよう24時間静置した。つぎに、酸素プラズマ処理により、沈降孔を有するマイクロ流路と、検出板を接着した。ただし、この時、HBs抗原が固定されている場所へ酸素プラズマが当たらないように、PDMS製マスクを被せた。その後、底角38°の石英ガラス台形プリズム上に、検出板を設置した。

表2.1の右列に記載する通り、ヘマトクリットを約10%に調整した血液試料を用意した。この血液試料は、血球分離効率の評価に用いた血液試料とは異なり、ヒト血液由来

の血漿を含む。濃度75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のHBs抗体を含むこの血液試料約100 μL を、シリンジポンプを用いて流速50 $\mu\text{L}/\text{min}$ でマイクロ流路に導入した。沈降孔の約80%に約30 μL の血液試料が充填された時点で、導入を停止し、血球を沈降させた。ここで、分離された上澄み液は主に血漿から成る。つぎに、約1 μL の分離血漿を、シリンジポンプを用いて検出部へ導入した。さらに、既に検出板に固定されたHBs抗原と分離血漿中のHBs抗体が、検出部で抗原抗体反応を起こせるよう、検出部内で血液試料を30分間静置した。分離血漿中にHBs抗体が存在する場合、このHBs抗体は検出板上のHBs抗原に結合し、WMRセンサの反射スペクトルの変化として測定される。

2.4. 結果と考察

2.4.1. 血球分離効率の評価

図2.5(a)に示すように、 $a = 1.5 \text{ mm}$ 、 $H = 4.0 \text{ mm}$ の円筒形沈降孔(i)と、 $a = 2.5 \text{ mm}$ 、 $\theta = 22.5^\circ$ の円錐台形沈降孔(ii)を有するマイクロ流路を作成した。図2.5(b)は、沈降孔の拡大図である。図2.5(b)に示すように、孔内で分離された上澄み液は、その表面に凹メニスカスを形成する。簡単の為、本研究では、上澄み液の高さ h を、分離されていない血液の頂部からメニスカスの底部までの距離として定義する。

分離高さ h を、血液の静置時間 t の関数として、図2.6に示す。ただし、図中の円および三角形は、円筒形(i)および円錐台形(ii)沈降孔において取得した画像内の、3つの点で測定した平均高さを示し、エラーバーはこの最大値及び最小値を示す。どの静置時間 t においても、円錐台形沈降孔(ii)の h は、円筒形沈降孔(i)よりも大きい。例えば、5分における(ii)の h は、(i)の1.5倍である。式(2.1)と式(2.5)を用いて計算した h の理論値を、緑点線および赤実線で、図2.6に合わせて示す。この理論値は、実験値と良く一致することが分かる。

図2.7に、式(2.6)を用いて計算した、各静置時間ごとの上澄み液の純度を示す。純度99%以上を有する上澄み液を得るために必要な静置時間は、円錐台形沈降孔(ii)では2分、円筒形沈降孔(i)では5分である。すなわち円錐台形沈降孔は、孔が高く、高純度の血漿を得るために好都合なことが分かる。

2.4.2. 血液試料中のウイルス抗原抗体検出

2.4.1節で示した結果より、高純度の血漿を得るための血球沈降孔として、円錐台形が最適な形状であることが分かった。このため本研究では、図2.1に示すように、円錐台形沈降孔(ii)と検出部がつながったマイクロ流路をWMRセンサ上に設置した。検出部の長さ、幅、高さはそれぞれ10.0、2.0、0.05 mmであり、この容積を満たすために必要な分離血漿量は1 μL 以上である。

2.3.3節に示したように、HBs抗体を含む血液試料を調整した。シリンジポンプを用いて、この血液試料を沈降孔へ導入した後、20分間静置して血球を除去し、分離された血

漿を検出部へ導入した。反射スペクトルは、検出部へ血漿を導入した直後と、抗原抗体反応を誘導するために、検出部で30分間静置した後に測定した。

ここで、ヘマトクリット値10%の血液のレイノルズ数は、直径3 mmの円筒状の沈降孔を仮定した場合、約0.06と計算される。このレイノルズ数は、沈降孔の形状が円錐であれば異なる値をとるが、沈降孔内の乱流の発生は無視できるほど小さいといえる。すなわち、分離された血漿は、血球の再混合無く、層流で沈降孔内を上昇する。さらに、沈降孔の出口と検出部とは、チューブで直接結合されている。従って、検出部内の血液試料には、非常に限られた数の血球しか含まれていないことが仮定できる。

図2.8に、2つの血液試料の反射スペクトルを示す。図2.8(a)に示すように、HBs抗体を含まない血液試料の場合、30分間の静置時間の前後で、反射スペクトルの最低反射率をとる波長は、約570 nmのままで殆ど変化しない。一方、図2.8(b)に示すように、血液試料にHBs抗体が含まれている場合には、最低反射率をとる波長は、長波長側に約4.1 nmだけシフトする。前述した通り、血液試料にHBs抗体が存在する場合は、HBs抗体は検出板上に固定されたHBs抗原と抗原抗体反応を起こし、最低反射率をとる波長が長波長にシフトすることが分かる。

HBs抗体を含む血液試料を用いて、円錐台形沈降孔内における血液試料の静置時間を5分間に短縮して同様の実験を行った。図2.9に結果を示す。検出部で30分間血液試料の導入を停止した場合、最低反射率をとる波長は僅かに長波長側へシフトするが、反射率は約6.1%減少する。これは、血液試料が沈降孔内に静置される時間が短く、分離血漿中に血球が混入しているためと考えられる。この混入した血球は、検出部へ沈降し、抗原抗体反応を妨げる^(32,33)。すなわち、5分間の静置時間では、血漿と血球を分離するのに十分でないことが分かる。今後、沈降孔と検出部の位置を改良し、静置時間の短縮を試みる予定である。

2.5. 結論

ボイコット効果を考慮した計算と実験により、円錐台形が、血液から血球を除去するための沈降孔として最適なことを示した。さらに、円錐台形血球沈降孔を有するマイクロ流路を開発し、この流路を備えた導波モード共鳴センサを用いて、血液中の抗B型肝炎表面抗原抗体を検出可能なことを実証した。

第2章の参考文献

1. M. Kersaudy-Kerhoas and E. Sollier, "Micro-scale blood plasma separation: from acoustophoresis to egg-beaters," *Lab Chip* **13**(17), 3323-3346 (2013).
2. D. R. Gossett, W. M. Weaver, A. J. Mach, S. C. Hur, H. T. K. Tse, W. Lee, H. Amini, and D. D. Carlo, "Label-free cell separation and sorting in microfluidic systems," *Anal. Bioanal. Chem.* **397**(8), 3249-3267 (2010).
3. G. Comina, A. Suska, and D. Filippini, "Towards autonomous lab-on-a-chip devices for cell phone biosensing," *Biosens. Bioelectron.* **77**, 1153-1167 (2016).
4. S. Yang, A. Undar, and J. D. Zahn, "A microfluidic device for continuous, real time blood plasma separation," *Lab Chip* **6**(7), 871-880 (2006).
5. E. Sollier, M. Cubizolles, Y. Fouillet, and J.-L. Achard, "Fast and continuous plasma extraction from whole human blood based on expanding cell-free layer devices," *Biomed. Microdevices* **12**(3), 485-497 (2010).
6. T. Kobayashi, T. Funamoto, M. Hosaka, and S. Konishi, "Centrifugal separation device based on two-layer laminar flow in microchannels for high-throughput and continuous blood cell/plasma separation," *Jpn. J. Appl. Phys.* **49**(7R), 077001 (2010).
7. K. Aran, A. Fok, L. A. Sasso, N. Kamdar, Y. Guan, Q. Sun, A. Undar, and J. D. Zahn, "Microfiltration platform for continuous blood plasma protein extraction from whole blood during cardiac surgery," *Lab Chip* **11**(7), 2858-2868 (2011).
8. G.-J. Zhang, Z. H. H. Luo, M. J. Huang, J. J. Ang, T. G. Kang, and H. Ji, "An integrated chip for rapid, sensitive, and multiplexed detection of cardiac biomarkers from fingerprick blood," *Biosens. Bioelectron.* **28**(1), 459-463 (2011).
9. J. S. Shim and C. H. Ahn, "An on-chip whole blood/plasma separator using hetero-packed beads at the inlet of a microchannel," *Lab Chip* **12**(5), 863-866 (2012).
10. T. Tachi, N. Kaji, M. Tokeshi, and Y. Baba, "Simultaneous separation, metering, and dilution of plasma from human whole blood in a microfluidic system," *Anal. Chem.* **81**(8), 3194-3198 (2009).
11. I. K. Dimov, L. Basabe-Desmonts, J. L. Garcia-Cordero, B. M. Ross, A. J. Ricco, and L. P. Lee, "Stand-alone self-powered integrated microfluidic blood analysis system (SIMBAS)," *Lab Chip* **11**(5), 845-850 (2011).
12. X.-B. Zhang, Z.-Q. Wu, K. Wang, J. Zhu, J.-J. Xu, X.-H. Xia, and H.-Y. Chen, "Gravitational sedimentation induced blood delamination for continuous plasma separation on a microfluidics chip," *Anal. Chem.* **84**(8), 3780-3786 (2012).

13. K. H. Chung, Y. H. Choi, J.-H. Yang, C. W. Park, W.-J. Kim, C. S. Ah, and G. Y. Sung, "Magnetically-actuated blood filter unit attachable to pre-made biochips," *Lab Chip* **12**(18), 3272-3276 (2012).
14. Y. Li, C. Dalton, H. J. Crabtree, G. Nilsson, and K. V. I. S. Kaler, "Continuous dielectrophoretic cell separation microfluidic device," *Lab Chip* **7**(2), 239-248 (2007).
15. H. Jiang, X. Weng, C. H. Chon, X. Wu, and D. Li, "A microfluidic chip for blood plasma separation using electro-osmotic flow control," *J. Micromech. Microeng.* **21**(8), 085019 (2011).
16. K. Awazu, C. Rockstuhl, M. Fujimaki, N. Fukuda, J. Tominaga, T. Komatsubara, T. Ikeda, and Y. Ohki, "High sensitivity sensors made of perforated waveguides," *Opt. Express* **15**(5), 2592-2597 (2007).
17. M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, Y. Koganezawa, Y. Ohki, and T. Komatsubara, "Silica-based monolithic sensing plates for waveguide-mode sensors," *Opt. Express* **16**(9), 6408-6416 (2008).
18. M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, N. Fukuda, Y. Koganezawa, and Y. Ohki, "The design of evanescent-field-coupled waveguide-mode sensors," *Nanotechnology* **19**(9), 095503 (2008).
19. M. Fujimaki, K. Nomura, K. Sato, T. Kato, S. C. B. Gopinath, X. Wang, K. Awazu, and Y. Ohki, "Detection of colored nanomaterials using evanescent field-based waveguide sensors," *Opt. Express* **18**(15), 15732-15740 (2010).
20. X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu, and Y. Ohki, "Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure," *Opt. Express* **19**(21), 20205-20213 (2011).
21. M. Fujimaki, X. Wang, T. Kato, K. Awazu, and Y. Ohki, "Parallel-incidence-type waveguide-mode sensor with spectral-readout setup," *Opt. Express* **23**(9), 10925-10937 (2015).
22. C. Kuroda, Y. Ohki, H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, T. Tanaka, and M. Makishima, "Microfluidic sedimentation system for separation of plasma from whole blood," *IEEE Sensors*, 1854-1857 (2014).
23. C. Kuroda, Y. Ohki, H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, T. Tanaka, and M. Makishima, "ポータブル血液検査装置のための血漿分離システムの開発," *Denki Gakkai Ronbunshi E* **135**(5), 152-157 (2015) [in Japanese].
24. E. Boycott, "Sedimentation of blood corpuscles," *Nature* **104**(2621), 532 (1920).
25. K. Kinoshita, "Sedimentation in tilted vessels (1)," *J. Colloid Sci.* **4**(5), 525-536 (1949).
26. M. Okazaki, A. Seiyama, K. Kon, N. Maeda, and T. Shiga, "Boycott effect with vertical cylinder for paramagnetic red blood cells under the inhomogeneous magnetic field," *J. Colloid Interface Sci.* **146**(2), 590-593 (1991).

27. T. Dobashi and A. Sakanishi, “赤血球沈降現象における基礎的諸問題,” *Nihon Biorheology Gakkaishi* **4**(3), 10-18 (1990) [in Japanese].
28. A. R. Minerick, R. Zhou, P. Takhistov, and H.-C. Chang, “Manipulation and characterization of red blood cells with alternating current fields in microdevices,” *Electrophoresis* **24**(21), 3703-3717 (2003).
29. L. Liu, J. Yang, J. Xie, Z. Luo, J. Jiang, Y. Y. Yang, and S. Liu, “The potent antimicrobial properties of cell penetrating peptide-conjugated silver nanoparticles with excellent selectivity for Gram-positive bacteria over erythrocytes,” *Nanoscale* **5**(9), 3834-3840 (2013).
30. D. C. Giagkas, T. Choli-Papadopoulou, and A. A. Pantazaki, “Development of an antibody for detection of rhamnolipids characterized as a major bacterial virulence factor,” *Antibodies* **2**(3), 501-516 (2013).
31. M. Tanaka, K. Yoshioka, Y. Hirata, M. Fujimaki, M. Kuwahara, and O. Niwa, “Design and fabrication of biosensing interface for waveguide-mode sensor,” *Langmuir* **29**(42), 13111-13120 (2013).
32. H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, M. Fu, Y. Ohki, T. Tanaka, and M. Makishima, “Hemagglutination detection for blood typing based on waveguide-mode sensors,” *Sens. Bio-Sens. Res.* **3**, 59-64 (2015).
33. H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, M. Fu, Y. Ohki, T. Tanaka, and M. Makishima, “Rapid detection of hemagglutination using restrictive microfluidic channels equipped with waveguide-mode sensors,” *Jpn. J. Appl. Phys.* **55**(2), 027002 (2016).

Table 2.1. Details of prepared blood samples.

	Evaluation of removal efficiency of blood cells	Detection of analytes in blood
Preparation method	Human whole blood diluted with PBS was centrifuged to collect blood cells.	HBsAb was added at a concentration of 75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ to human whole blood diluted with PBS.
Hematocrit (%)	10	10
Plasma	Absent	Present
Total volume (μL)	100	100

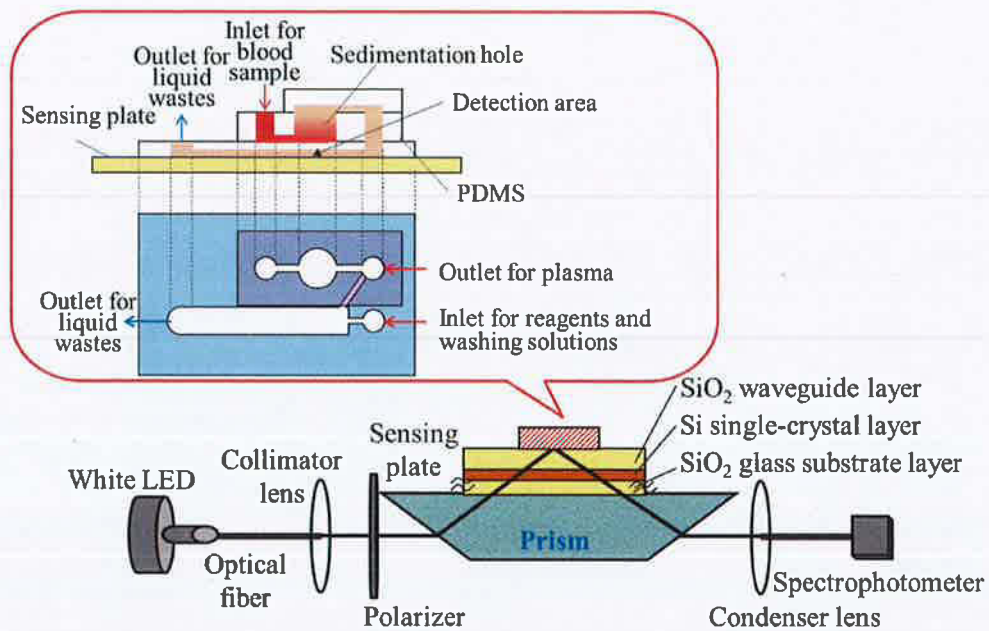


Fig. 2.1. Structural and optical arrangements of the whole waveguide-mode sensing system. The sensing plate consists of a waveguide-mode sensor composed of a SiO₂ glass substrate layer, a Si single-crystal layer, and a SiO₂ waveguide layer. It is sandwiched between a microfluidic channel and a SiO₂ glass trapezoid prism. When blood ascends the sedimentation hole in the channel, blood cells settle down to the bottom of the hole, leaving plasma at the top, which then flows into a detection area in the channel.

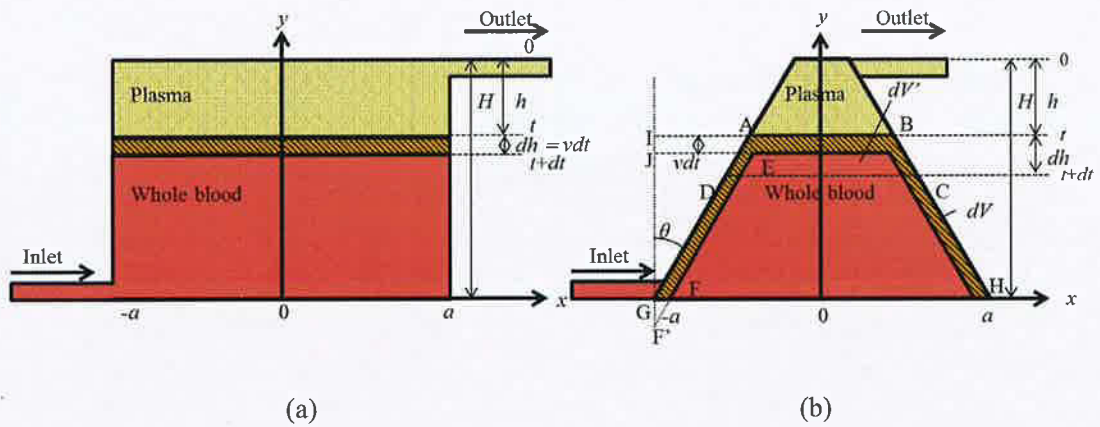


Fig. 2.2. Schematic cross-sectional views of two sedimentation holes: cylindrical (a) and truncated conical (b). Red, unseparated whole blood; shaded in yellow, plasma to be separated for short duration dt ; yellow, plasma already separated at t . a , radius of the base; H , height of the hole; θ , inclination angle of the downward-facing wall; v , sedimentation speed of blood cells; $h + dh$, height of plasma at $t + dt$.

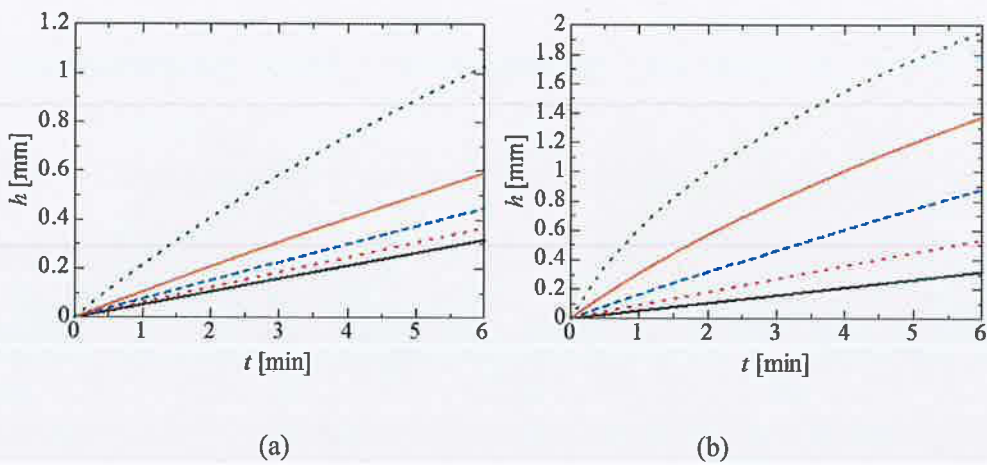


Fig. 2.3. Heights of separated plasma h as a function of the retention time t of blood in truncated conical sedimentation holes with different inclination angles θ . A constant volume of the hole, $40 \mu\text{L}$, is filled with blood with a hematocrit of 10%. (a) a is constant at 2.5 mm and H varies. (b) H is constant at 5 mm and a varies. Solid black line, $\theta = 0^\circ$; dotted red line, 5° ; broken blue line, 10° ; solid orange line, 15° ; dotted green line, 20° .

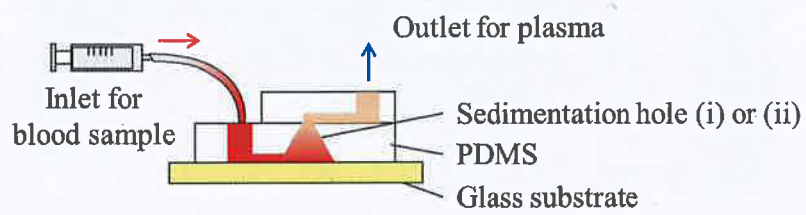


Fig. 2.4. Schematic diagram of the microfluidic channel with cylindrical (i) or truncated conical (ii) sedimentation hole.

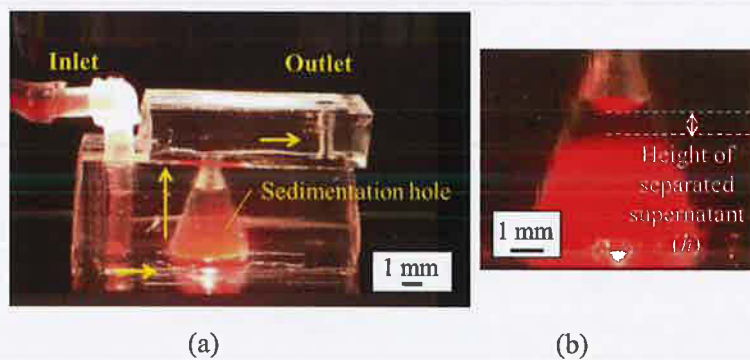


Fig. 2.5. (a) Whole view of the microfluidic channel with the truncated conical sedimentation hole (ii) used to examine the height and purity of the separated supernatant. (b) Enlarged view of the hole.

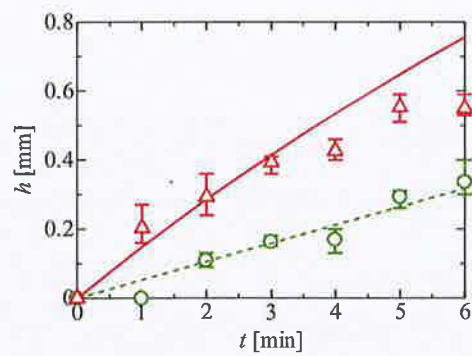


Fig. 2.6. Height of the separated supernatant as a function of retention time t of blood. Circles and triangles: averages in the cylindrical sedimentation hole (i) and the truncated conical sedimentation hole (ii), respectively. Error bars show maxima and minima measured at three points in the same image, while dotted and solid curves show theoretical values for (i) and (ii), respectively.

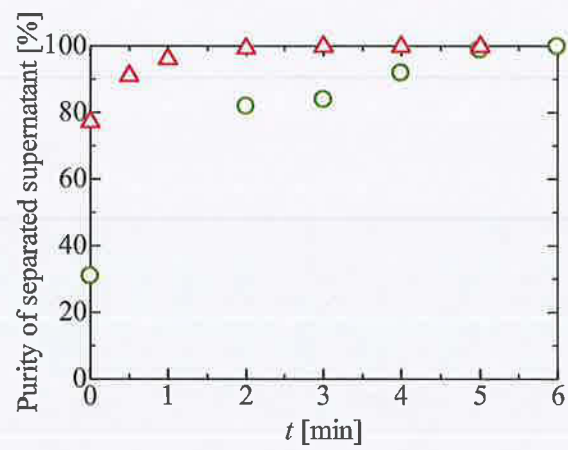


Fig. 2.7. Purity of the separated supernatant as a function of retention time t of blood measured for the cylindrical sedimentation hole (i, circles) and the truncated conical sedimentation hole (ii, triangles).

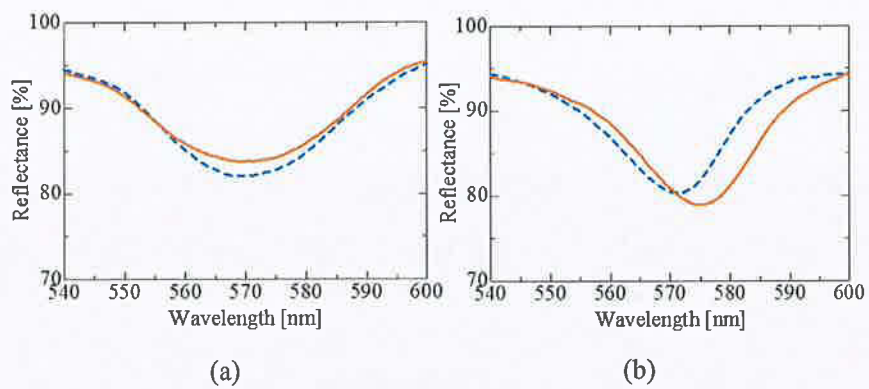


Fig. 2.8. Reflectance spectra of the blood samples measured using the waveguide-mode sensor before (broken curves) and after (solid curves) the sample injection was suspended at the detection area for 30 min to induce the antigen-antibody reaction. In both cases, the blood samples were retained in the conical sedimentation hole for 20 min before the measurements. (a) Blood without HBsAb. (b) Blood with HBsAb at a concentration of 75 $\mu\text{g/mL}$.

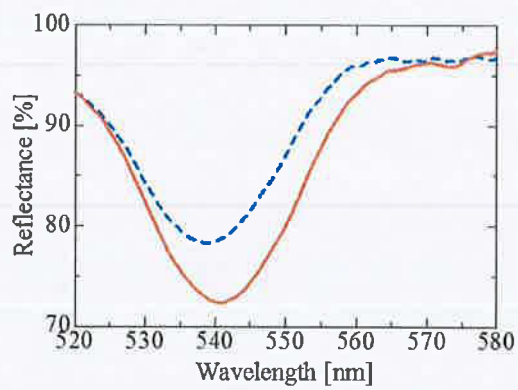


Fig. 2.9. Blood with HBsAb at a concentration of 75 $\mu\text{g/mL}$, which was retained in the sedimentation hole only for 5 min. Broken curve: measured immediately after the injection of the sample to the detection area. Solid curve: measured after the suspension of sample injection at the detection area for 30 min.

第3章 紫外近接場光蛍光センサのためのセンサチップの構造最適化

3.1. はじめに

ガラス基板と溶液の界面などで光が全反射されると、表面や界面に近接場光が誘起される。これを利用した全反射顕微鏡は、液中の蛍光標識細胞のイメージング^(1,2)や蛍光標識タンパクの検出⁽³⁾のために広く用いられている。さらに、表面プラズモン共鳴 (SPR) により、近接場光の電界を非常に強く増強することができる^(4,7)。よって表面プラズモン励起全反射顕微鏡は、通常的全反射顕微鏡よりも蛍光標識された物質を高感度に検出可能である⁽⁸⁻¹⁰⁾。

紫外光励起蛍光色素である量子ドットは、ストークスシフトが大きい、発色が鮮明、褪色しにくい等の利点を有し注目を集めている⁽¹¹⁾。これら蛍光色素を効率的に励起するため、Al薄膜のSPRによる紫外近接場光の電界増強法が報告されているが、AuやAgによる可視域のSPRに比べて増強度が低い⁽¹²⁻¹⁵⁾。また、Al層は空気中で酸化されやすい。生じた酸化膜は、蛍光の励起エネルギーが金属薄膜へ移動することで起こる消光現象を妨げるという利点をもたらすが、一方で、Al層のSPRによる電界の増強を弱めるという問題がある⁽¹⁵⁾。

ここで、図3.1に示すようなクレッチマン配置の光学系において、Si層（一層目）を、石英ガラス基板とSiO₂層（二層目）で挟むように構成した検出板を有する導波モード共鳴 (WMR) センサ⁽¹⁶⁻²¹⁾が開発されている。本研究においては、紫外近接場光蛍光センサを実現するために、基板上に成膜された二層の誘電体層の、最適な屈折率と膜厚の関係を理論的に考察する。さらに、転送行列法^(22,23)を用いてWMRチップの最表面の二乗電界強度を計算し、誘電体層として最適な材料を選定する。

3.2. 理論

WMRチップとその上に滴下される分析物を含む溶液の界面を $z = 0$ の xy 平面とし、図3.1に示すように z 方向を定義する。光はWMRチップの下に設置したプリズムからWMRチップへ入射される。光の照射面積が無限大と仮定すると、WMRチップの表面付近の電界が z のみの関数として一次元近似できる⁽²³⁾。このとき、プリズムへ入射する前の入射光の電界を E_0 、WMRチップ/溶液界面に垂直な光の入射面上の点 z における電界を $E(z)$ として、正規化二乗電界強度 (Normalized Electric Field Strength Squared : 以下、二乗電界強度) $N(z)$ を以下の式で定義する⁽²³⁾。

$$N(z) = \left| \frac{E(z)}{E_0} \right|^2. \quad (3.1)$$

誘電体層を二層堆積させたWMRチップと、この上に滴下された溶液中の、光の反射の模式図を図3.2(a)に示す。WMRチップの基板、誘電体層、溶液の複素屈折率 n' に応じ

て、光は反射、透過される。複素屈折率 n' は、屈折率の実部 n と光吸収の割合を表す消衰係数 k を用いて、 $n' = n - ik$ と表される。消衰係数 k が大きいほど光が吸収され、WMRチップ内で反射される光の強度は弱くなることから、本研究では、 $k=0$ の場合のみを考える。また、基板とプリズムの材料は同一とする。このとき、プリズムを経た光の、WMRチップの基板への入射角と、WMRチップ上の誘電体層への入射角は同じになる。

プリズムへ入射された光は、WMRチップの基板/一層目界面、一層目/二層目界面では反射と透過を繰り返す、二層目/溶液界面付近では全反射され、再びプリズム内へ戻る。WMRチップ最表面における二乗電界強度 $N(0)$ の値が大きいほど、分析物に標識された蛍光色素を効率よく励起できる⁽⁸⁾。そこで、最大の $N(0)$ を得るためのWMRチップ構造について考察する。

図3.2(a)に示すWMRチップにs偏光が入射されたとき、基板、一層目、二層目、溶液層における屈折率を n_s, n_1, n_2, n_b 、基板ならびに一層目への入射角を θ_m 、二層目への入射角を θ_1 、溶液層への入射角を θ_2 とおくと、基板/一層目、一層目/二層目の境界では、スネルの法則により、

$$n_s \sin \theta_m = n_1 \sin \theta_1 = n_2 \sin \theta_2, \quad (3.2)$$

を満たす。二層目の誘電体層と溶液の界面付近においては、 θ_c を全反射条件の臨界角とすると、

$$\theta_2 \geq \sin^{-1} \left(\frac{n_b}{n_2} \right) = \theta_c, \quad (3.3)$$

を満たす。ただし図3.2(a)に示すように、二層目と溶液の界面では、光の染み出し、すなわち近接場光が生じているため、光の反射位置は、僅かに溶液側にずれる。このとき、近接場光のエネルギー反射率 R は、

$$R = \left(\frac{\sin(\theta_2 - \theta_b)}{\sin(\theta_2 + \theta_b)} \right)^2 = \exp(j2\Phi), \quad \text{かつ} \quad (3.4)$$

$$\Phi = 2 \tan^{-1} \left[\frac{\sqrt{(n_2 \sin \theta_2)^2 - n_b^2}}{n_2 \cos \theta_2} \right], \quad (3.5)$$

と導かれる⁽²⁴⁾。この Φ は、二層目の誘電体層から溶液側への電磁界の染み出しによる位相シフトを表し、グース・ヘンシエン (Goos-Hänchen) シフトと呼ばれる。このとき、WMRチップ最表面の誘電体層から、光の全反射が起こると仮想した反射面までの z 方向の距離 δ は、

$$\delta = \frac{\lambda(\pi - \Phi)}{4\pi n_2 \cos \theta_2}, \quad (3.6)$$

と表される⁽²⁴⁾。

入射角 θ_{in} が臨界角 θ_c であるとき、式(3.5)より $\Phi = 0$ であるから、式(3.6)より、WMRチップ最表面から全反射位置までの距離 δ は、 $\delta = \lambda / (4\pi n_2 \cos\theta_2)$ と計算される。このとき、図3.2(b)に示すように、光電界の最大値は二層目/溶液界面にある。よって、位置 z における光電界 $E(z)$ とプリズムへの入射光 E_0 との大きさの比 $|E(z)/E_0|$ は、二層目/溶液界面での値 $|E(0)/E_0|$ が最大となる。一方で、 θ_{in} が臨界角 θ_c より大きくなるにつれて、 Φ は増加し、 δ は減少する。すなわち、図3.2(c)に示すように、光電界の最大値、すなわち、 $|E(z)/E_0|$ の最大値は誘電体層内へ移動し、二層目/溶液界面における $|E(0)/E_0|$ の値は減少する。よって、式(3.1)より $|E(0)/E_0|$ の二乗である $N(0)$ は、 θ_{in} が臨界角 θ_c に近づくほど大きくなる。ゆえに、 θ_{in} は θ_c と等しいか僅かに大きい角度とすることが望ましい。

つぎに、誘電体層の膜厚を考える。 $N(0)$ を増大させるためには、光が誘電体層の表面から距離 δ だけ離れた位置で効率よく全反射される必要がある。すなわち、基板/一層目界面、一層目/二層目界面、全反射位置で反射される光の位相が揃うような、一層目、二層目の膜厚が最適である。ここで、光が低屈折率媒質から高屈折率媒質へ入射されると、反射光は、入射光と比べ位相が反転、すなわち π だけずれる。一方で、高屈折率媒質から低屈折率媒質へ入射される光の反射光は、入射光と比べ位相が変わらない。例えば、 $n_s < n_1$ 、 $n_1 > n_2$ を仮定すると、基板/一層目界面で反射される光の位相は入射光の位相と比べ反転し π だけずれ、一層目/二層目界面で反射される光の位相は変わらない。さらに、WMRチップ最表面から距離 δ だけ離れた位置で全反射される光の位相は変わらない。

よって、一層目の膜厚 d_1 は、基板/一層目界面で反射される光と、一層目/二層目界面で反射される光の光路差 $2d_1 \cos\theta_1$ が波長 (λ/n_1) の整数倍から半波長分ずれるときに最適値をとる。すなわち、 m_1 を0以上の整数とすると、一層目の誘電体層の膜厚 d_1 は、

$$d_1 = \frac{\left(m_1 + \frac{1}{2}\right)\lambda}{2n_1 \cos\theta_1}, \quad (3.7)$$

を満たす必要がある。つぎに、二層目の膜厚を d_2 とおき、誘電体層から全反射が起こると仮想した反射面までの距離 δ を足し合わせた仮想膜厚 D を、

$$D = d_2 + \delta, \quad (3.8)$$

とするとき、一層目/二層目で反射された光と、全反射位置で反射された光の光路差 $2D \cos\theta_2$ は、波長 (λ/n_2) の整数倍となるように設定する必要がある。すなわち、 m を0以上の整数とすると、仮想膜厚 D は、

$$D = \frac{m_2 \lambda}{2n_2 \cos\theta_2}, \quad (3.9)$$

を満たす。二層目の膜厚 d_2 は、式(3.8)、(3.9)より求められる。

式(3.7)において $m_1 = 0$ 、式(3.9)において $m_2 = 1$ としたとき、

$$d_1 = \frac{\left(m_1 + \frac{1}{2}\right)\lambda}{2n_1 \cos \theta_1}, \quad (3.10a)$$

$$D = \frac{\lambda}{2n_2 \cos \theta_2}, \quad (3.10b)$$

が得られる。図3.3に、プリズムへ入射前の入射光に対する、位置 z における光の電界の大きさの比 $|E(z)/E_0|$ を示す。

3.3. WMRチップの構造最適化

BornとWolfは、転送行列法によりマクスウェル方程式を解くことで、多層膜内の反射率と透過率を計算した⁽²²⁾。本研究では、転送行列法に基づき、式(3.1)で示される二乗電界強度 $N(z)$ の計算を行った。さらに、反射光の位相は、それぞれの層の複素屈折率を代入することで計算した⁽²³⁾。

3.1節で述べたように、WMRセンサの感度が高いs偏光を入射光とし、この波長は375 nmとする。プリズムとWMRチップの基板は、既に報告されているWMRセンサ⁽¹⁶⁻²¹⁾と同様に石英ガラスを想定する。簡単化のため、WMRチップ上に滴下される溶液は分析物を含まない水 ($n_w = 1.354$, $k_w = 0.000$ ⁽²⁵⁾) として、 $N(z)$ の計算を行う。さらに、図3.2に示すWMRチップにおいて、式(3.3)で表される全反射角条件の臨界角 θ_c は、基板を石英ガラスとしたとき、 $n_s = 1.473$, $n_w = 1.354$ より、 $\theta_c = 66.8^\circ$ と計算される。よって、本研究では、 $\theta_{in} = 67.0^\circ$ と設定する。

まず、一層目に最適な材料を選定するため、上記条件のもと、一層目の屈折率 n_1 , k_1 を変化させ、WMRチップ/水界面における二乗電界強度 $N(0)$ の値を計算する。ただし、二層目はSiO₂とする。一層目と二層目の膜厚は、一層目の屈折率ごとに $N(0)$ が最大となるよう設定する。一層目の n_1 を2.00 - 7.00の範囲で、 k_1 を0.00 - 1.60の範囲で変化させたときの $N(0)$ の最大値 $N_M(0)$ を図3.4(a)に色分けして示す。赤色に近づくにつれ、 $N_M(0)$ の値は大きくなる。図3.4(a)より、一層目には n_1 が大きく、 k_1 が小さい材料が適していることが分かる。さらに、波長375 nmにおける、ITO (i), diamond (ii), SiC (iii), TiO₂ (iv), ZnO (v), Si (vi)の n と k ⁽²⁵⁻²⁸⁾を、図3.4(a)にプロットして示す。さらに、図3.4(b)に、各材料の $N_M(0)$ とこの時の一層目の膜厚 d_1 を括弧内に示す。図3.4(b)において、 d_1 は式(3.10a)から計算された値と一致する。さらに、(i) - (vi)の全ての場合において、二層目のSiO₂層の膜厚は176 nmであり、式(3.10b)から計算された値と一致する。TiO₂ (iv)を用いた場合、WMRセンサ⁽¹⁶⁻²¹⁾に使用していたSi (vi)の場合の $N_M(0) = 20.3$ と比べて、約6.8倍高い値の $N_M(0) = 138$ を得られることが分かる。

つぎに、上述の検討を踏まえ、一層目をTiO₂とした上で、二層目に最適な材料を選定するため、二層目の屈折率 n_2 , k_2 を変化させ、二層目/水界面における二乗電界強度 $N(0)$ の値を計算する。一層目と二層目の膜厚は、二層目の屈折率ごとに $N(0)$ が最大となるよ

う設定する。二層目の屈折率 n_2 を1.35 - 1.50の範囲で、 k_2 を0.000 - 0.001の範囲で変化させたときの $N_M(0)$ を図3.5(a)に色分けして示す。 n_2 が1.356以下のとき $N_M(0)$ の値がほぼ0に減少しているのは、一層目/二層目界面で光が全反射され、二層目/水界面に光が到達しないためである。二層目/水界面で光が全反射される条件を満たす屈折率 n_2 の範囲で、二層目には n_2 が小さく、 k_2 が小さい材料が適していることが分かる。さらに、波長375 nmにおける、 MgF_2 (vii), CaF (viii), SiO_2 (ix), $PMMA$ (x), $BK7$ (xi)の屈折率^(25,29,30)を、図3.5(a)にプロットして示す。さらに、図3.5(b)に、各材料の $N_M(0)$ とこの時の二層目の膜厚 d_2 を括弧内に示す。図3.5(b)において、 d_2 は式(3.10b)から計算された値と一致する。さらに、一層目とした TiO_2 層の膜厚は28 nmであり、式(3.10a)から計算された値と一致する。 MgF_2 (vii)を用いた場合、(vii) - (xi)の中で最も高い値の $N_M(0) = 387$ が得られる。

さらに、 TiO_2 層の膜厚が28 nm、 MgF_2 層の膜厚が315 nmのときの、二乗電界強度 $N(z)$ を、図3.6に示す。 $z = 0$ の位置は二層目/水界面であり、 $z < -342.5$ (青破線)に石英ガラス基板が、 $-342.5 < z < -315$ (橙点線)に TiO_2 層が、 $-315 < z < 0$ (黒実線)に MgF_2 層が、 $0 < z$ に水層がある。さらに、光の全反射が起こると仮想した反射面を黒破線で示す。二層目/水界面 ($z = 0$) からこの黒破線までの距離は、式(3.6)で計算される $\delta = 239$ nmである。

さらに、電界増強に最適な膜厚の範囲を評価するため、一層目を膜厚0 - 60 nmの TiO_2 、二層目を膜厚200 - 400 nmの MgF_2 としたWMRチップの、二層目/水界面における二乗電界強度 $N(0)$ の値を図3.7に示す。 $N(0)$ は、膜厚が数nmの誤差で変化しても、同様に増強されることが分かる。

3.4. 比較の為のAl SPRチップ

3.1節で構造を最適化したWMRチップの二乗電界強度と、近接場光増強法として広く用いられているSPRチップの二乗電界強度を比較する。SPRを励起するためには、光はp偏光である必要がある。先行研究により、紫外光はAlのSPRにより増強されることが確認されている⁽¹⁵⁾。AlのSPRチップに、波長375 nmのp偏光を入射した際の、Al薄膜/水界面 ($z = 0$) における二乗電界強度 $N_{spM}(0)$ の値を計算する。プリズムとガラス基板は、3.1節で述べたWMRチップと同様に石英ガラスを想定する。屈折率は、分光エリプソメーター (J. A. Woollam, VASE) を用いて測定した値の $n_{Al} = 0.347$, $k_{Al} = 4.535$ とする。

ここで、Al薄膜の膜厚 d_{Al} を5 - 50 nmの範囲で変化させる。 d_{Al} の変化に応じて、SPRが励起される入射角 θ_{sp} が変化するため、各 d_{Al} ごとに $N(0)$ が最大となるよう θ_{sp} を65°から75°の範囲で設定する。転送行列法で得た、 d_{Al} と $N_{spM}(0)$ の関係を図3.8に示す。横軸には d_{Al} 、左軸には $N_{spM}(0)$ (赤実線) を、右軸にはその $N_{spM}(0)$ を与える θ_{sp} の値 (青破線) を示す。Al薄膜の膜厚 d_{Al} が約20 nmのとき、入射角 $\theta_{sp} = 73.5^\circ$ で、 $N_{spM}(0)$ は最大値15.5と求められる。この値は、3.1節で構造最適化したWMRチップの $N_M(0) = 387.2$ の約1/25である。

Alナノ粒子^(31,32)や、Alナノ構造⁽³³⁾を用いることで、増強度を高める報告がされているが、作成には高度な技術が必要であることや、検出板表面にナノ構造による凹凸が生じることから近接場照明としての利用には不向きという問題がある。

本研究で構造最適化した、一層目にTiO₂層、二層目にMgF₂層としたWMRチップは、電界強度が387倍と大きな近接場光が得られる。さらに、このWMRチップは、誘電体層のみで構成され、金属を用いる必要のあるSPRよりも腐食せず、安定して保存可能と考えられる。また、金属膜上で起こる蛍光色素の消光現象は、誘電体層上では起こらない。よって、本研究で最適化したWMRチップを用いることで、はるかに高効率な紫外近接場光蛍光センサが実現できると考えられる。

3.5. 結論

紫外光励起蛍光色素で標識された物質を高感度に検出するために、検出板の構造最適化を行った。この結果、ガラス基板に、高屈折率かつ紫外光吸収が少ない誘電体層と、低屈折率かつ紫外光吸収が少ない誘電体層を、各層の境界面で反射される光の位相が揃う膜厚となるよう成膜することで、紫外近接場光の電界強度を高められることが分かった。さらに、転送行列法に基づく計算により導波モード共鳴センサの検出板（WMRチップ）の最表面の二乗電界強度を求めたところ、石英ガラス基板にTiO₂層とMgF₂層を成膜したWMRチップにより、波長375 nmの紫外光の二乗電界強度を、Al薄膜の表面プラズモン共鳴チップに比べ約25倍強い、約387倍に増強できることが分かった。よって、本手法は、蛍光色素で標識された物質の高感度検出を実現するための極めて有効な手段である。

第3章の参考文献

1. D. Axelrod, "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology," *Traffic* **2**(11), 764-774 (2001).
2. D. Axelrod, "Cell-substrate contacts illuminated by total internal reflection fluorescence," *J. Cell Biol.* **89**(1), 141-145 (1981).
3. M. Tokunaga, K. Kitamura, K. Saito, A. H. Iwane, and T. Yanagida, "Single molecule imaging of fluorophores and enzymatic reactions achieved by objective-type total internal reflection fluorescence microscopy," *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **235**(1), 47-53 (1997).
4. T. Liebermann and W. Knoll, "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy," *Phys. Chem. Eng. Asp.* **171**, 115-130 (2000).
5. K. Tawa and K. Morigaki, "Substrate-supported phospholipid membranes studied by surface plasmon resonance and surface plasmon fluorescence spectroscopy," *Biophys. J.* **89**(4), 2750-2758 (2005).
6. J. Dostálek and W. Knoll, "Biosensors based on surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy," *Biointerphases* **3**(3), FD12-FD22 (2008).
7. C. J. Huang, J. Dostalek, and W. Knoll, "Long range surface plasmon and hydrogel optical waveguide fieldenhanced fluorescence biosensor with 3D hydrogel binding matrix: on the role of diffusion mass transfer," *Biosens. Bioelectron.* **26**(4), 1425-1431 (2010).
8. R.-Y. He, G.-L. Chang, H.-L. Wu, C.-H. Lin, K.-C. Chiu, Y.-D. Su, and S.-J. Chen, "Enhanced live cell membrane imaging using surface plasmon-enhanced total internal reflection fluorescence microscopy," *Opt. Express* **14**(20), 9307-9316 (2006).
9. R.-Y. He, C.-Y. Lin, Y.-D. Su, K.-C. Chiu, N.-S. Chang, H.-L. Wu, and S.-J. Chen, "Imaging live cell membranes via surface plasmon-enhanced fluorescence and phase microscopy," *Opt. Express* **18**(4), 3649-3659 (2010).
10. V. Chabot, Y. Miron, P. G. Charette, and M. Grandbois, "Identification of the molecular mechanisms in cellular processes that elicit a surface plasmon resonance (SPR) response using simultaneous surface plasmon-enhanced fluorescence (SPEF) microscopy," *Biosens. Bioelectron.* **50**(15), 125-131 (2013).
11. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," *Nat. Methods* **5**(9), 763-775 (2008).
12. S. Ekgasit, C. Thammacharoen, F. Yu, and W. Knoll, "Evanescent field in surface plasmon resonance and surface plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopies," *Anal. Chem.* **76**(8), 2210-2219 (2004).

13. E. L. Moal, E. Fort, S. Lévêque-Fort, F. P. Cordelières, M.-P. Fontaine-Aupart, and C. Ricolleau, "Enhanced fluorescence cell imaging with metal-coated slides," *Biophys. J.* **92**(6), 2150-2161 (2007).
14. I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, and J. R. Lakowicz, "Ultraviolet surface plasmon-coupled emission using thin aluminum films," *Anal. Chem.* **76**(14), 4076-4081 (2004).
15. A. Ono, M. Kikawada, R. Akimoto, W. Inami, and Y. Kawata, "Fluorescence enhancement with deep-ultraviolet surface plasmon excitation," *Opt. Express* **21**(15), 17447-17453 (2013).
16. M. Fujimaki, C. Rockstuhl, X. Wang, K. Awazu, J. Tominaga, Y. Koganezawa, Y. Ohki, and T. Komatsubara, "Silica-based monolithic sensing plates for waveguide-mode sensors," *Opt. Express* **16**(9), 6408-6416 (2008).
17. K. Nomura, T. Lakshmi Priya, N. Fukuda, X. Wang, and M. Fujimaki, "Fluorescence enhancement by a SiO₂-based monolithic waveguide structure for biomolecular detection," *J. Appl. Phys.* **113**(14), 143103 (2013).
18. X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu, and Y. Ohki, "Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure," *Opt. Express* **19**(21), 20205-20213 (2011).
19. M. Fujimaki, X. Wang, T. Kato, K. Awazu, and Y. Ohki, "Parallel-incidence-type waveguide-mode sensor with spectral-readout setup," *Opt. Express* **23**(9), 10925-10937 (2015).
20. M. Yasuura and M. Fujimaki, "Detection of extremely low concentrations of biological substances using nearfield illumination," *Sci. Rep.* **6**, 39241 (2016).
21. C. Kuroda, Y. Ohki, H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, and M. Makishima, "Design of a sedimentation hole in a microfluidic channel to remove blood cells from diluted whole blood," *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**, 037201 (2017).
22. M. Born and E. Wolf, *Principles of optics. Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Sixth Edition, (Cambridge University, 1997).
23. O. Arnon and P. Baumeister, "Electric field distribution and the reduction of laser damage in multilayers," *Appl. Opt.* **19**(11), 1853-1855 (1980).
24. Y. Kokubun, *Optical-wave engineering*, (Kyoritsu, 1999) [in Japanese].
25. E. Palik, G. Ghosh, and T. M. Cotter, *Handbook of optical constants of solids*, (Academic, 1998).
26. M. Losurdo, M. Giangregorio, P. Capezzuto, G. Bruno, R. D. Rosa, F. Roca, C. Summonte, J. Plá, and R. Rizzoli, "Parametrization of optical properties of indium-tin-oxide thin films by spectroscopic ellipsometry: Substrate interfacial reactivity," *J. Vac. Sci. Technol.* **20**(1), 37-42 (2002).

27. X. W. Sun and H. S. Kwok, "Optical properties of epitaxially grown zinc oxide films on sapphire by pulsed laser deposition," *J. Appl. Phys.* **86**(1), 408 (1999).
28. G. E. Jellison, Jr., "Optical functions of silicon determined by two-channel polarization modulation ellipsometry," *Opt. Mater.* **1**(1), 41-47 (1992).
29. AGC Asahi Glass, "Optical properties of amorphous fluoro-resin," [in Japanese], <http://www.agc.com/kagaku/shinsei/cytop/optical.html>.
30. Schott, "Datasheet of N-BK 7," http://www.schott.com/advanced_optics/japanese/abbe_datasheets/schottdatasheet-n-bk7.pdf.
31. M. H. Chowdhury, K. Ray, S. K. Gray, J. Pond, and J. R. Lakowicz, "Aluminum nanoparticles as substrates for metal-enhanced fluorescence in the ultraviolet for the label-free detection of biomolecules," *Anal. Chem.* **81**(4), 1397-1403 (2009).
32. Y. Kumamoto, A. Taguchi, M. Honda, K. Watanabe, Y. Saito, and S. Kawata, "Indium for deep-ultraviolet surface-enhanced resonance raman scattering," *ACS Photonics* **1**(7), 598-603 (2014).
33. K. Ray, M. H. Chowdhury, and J. R. Lakowicz, "Aluminum nanostructured films as substrates for enhanced fluorescence in the ultraviolet-blue spectral region," *Anal. Chem.* **79**(17), 6480-6487 (2007).

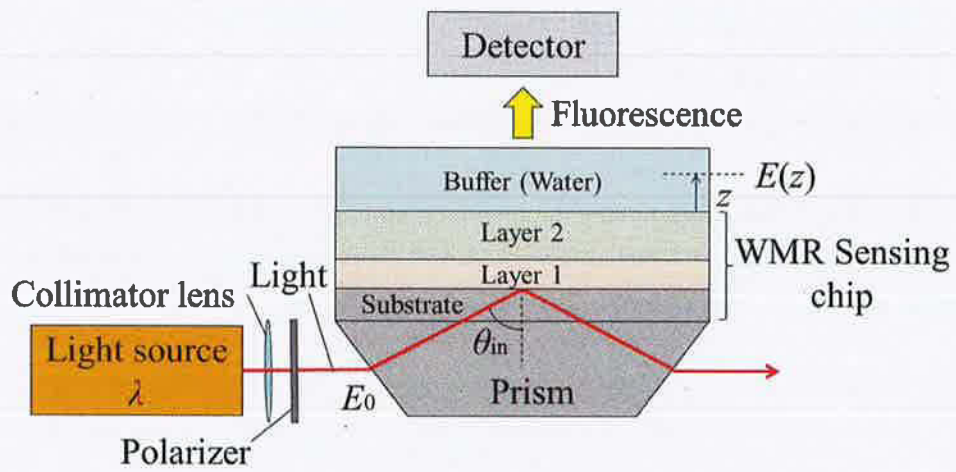


Fig. 3.1. Optical arrangement of a WMR sensor in the Kretschmann configuration (not to scale).

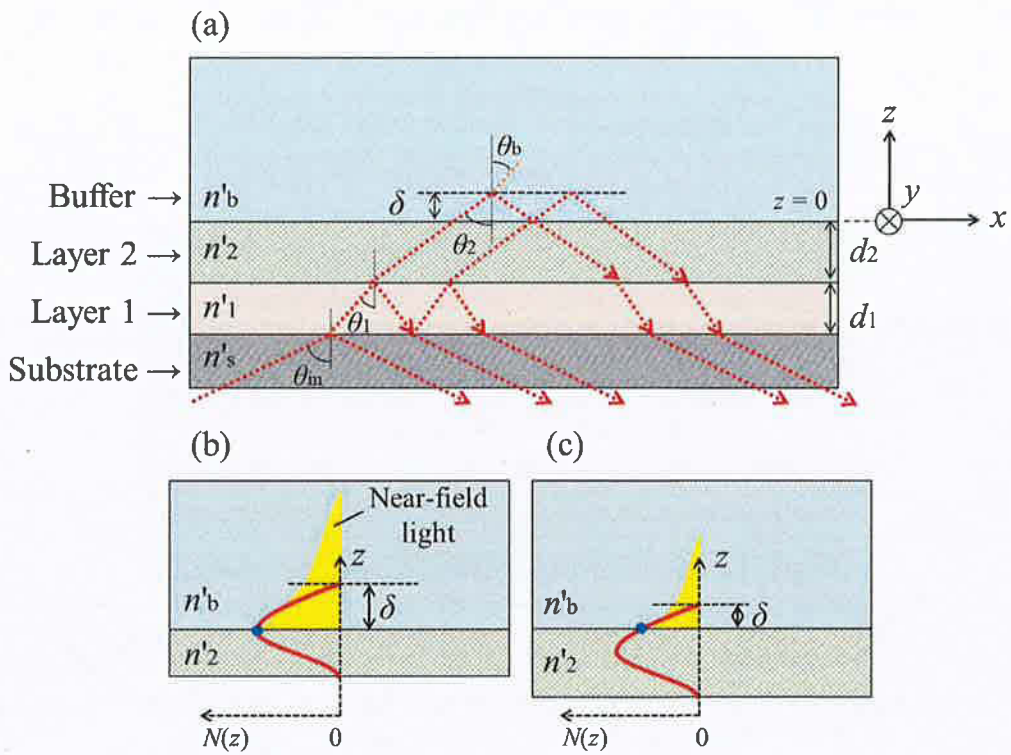


Fig. 3.2. Schematic views of the cross-sectional structure of the WMR sensing chip. The directions of the light reflection and transmission (a) and the change in value of $N(z)$ in the chip when $\theta = \theta_c$ (b) or $\theta > \theta_c$ (c), θ_c : critical angle of total reflection (not to scale). n'_s , n'_1 , n'_2 , and n'_b denote the complex refractive indices of the substrate, the layer 1, the layer 2, and the buffer, respectively. Yellow areas in (b) and (c) are conceptual images of near-field light.

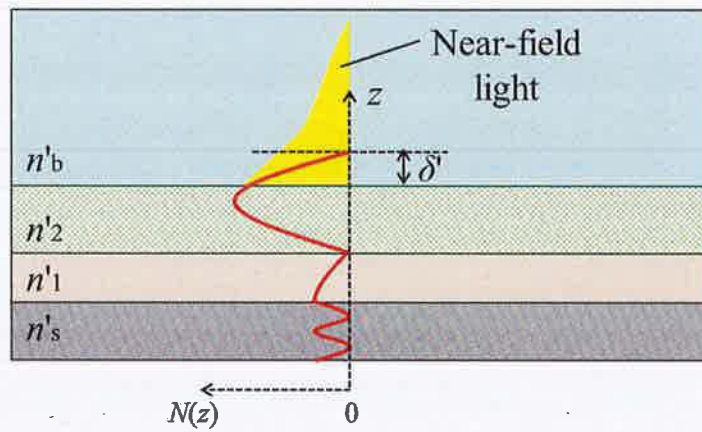


Fig. 3.3. Change in value of $N(z)$ in the WMR sensing chip when the real part of n'_1 is higher than those of n'_s and n'_2 . Yellow area is a conceptual image of near-field light.

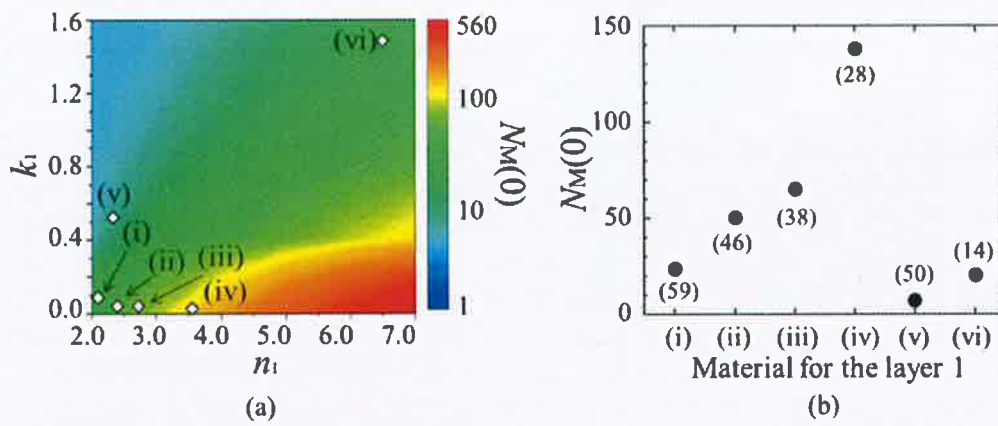


Fig. 3.4. (a) Calculation results of $N_M(0)$ as a function of n_1 and k_1 . White squares stand for the values of ITO (i), diamond (ii), SiC (iii), TiO_2 (iv), ZnO (v), and Si (vi). The layer 2 is assumed to be SiO_2 . (b) Values of $N_M(0)$ for the candidates (i) - (vi). Numerals in parentheses are the optimized thicknesses d_1 [nm] that yield these values of $N_M(0)$.

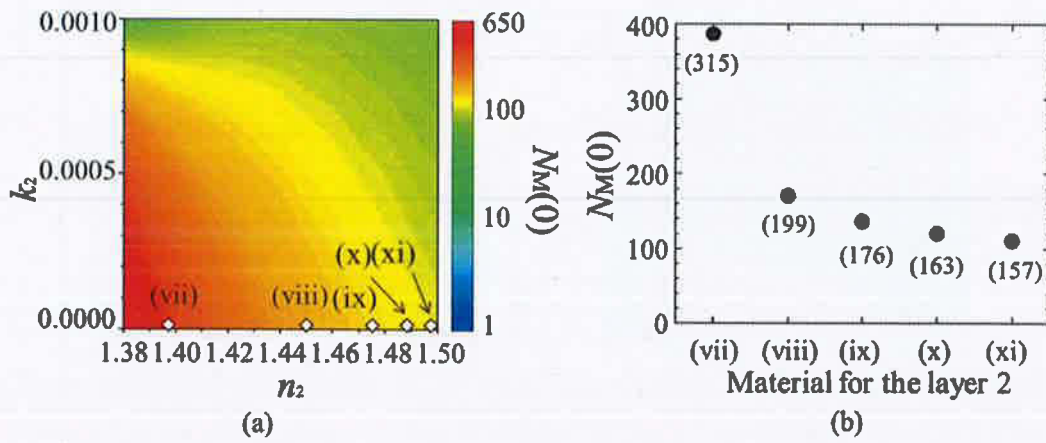


Fig. 3.5. (a) Calculation results of $N_M(0)$ as a function of n_2 and k_2 and for MgF_2 (vii), CaF (viii), SiO_2 (ix), PMMA (x), and BK7 (xi). The layer 1 is assumed to be TiO_2 . (b) Values of $N_M(0)$ and the corresponding optimized values of d_2 [nm] in parentheses.

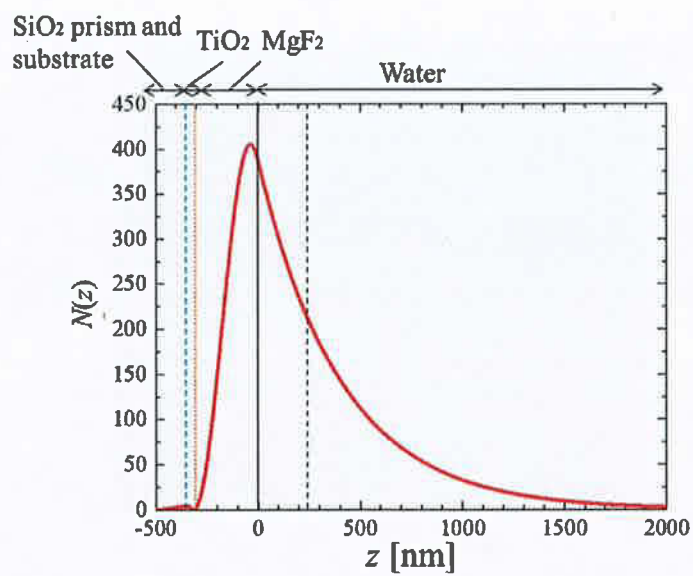


Fig. 3.6. Normalized electric field strength squared $N(z)$ in the WMR sensing chip composed of the 28-nm TiO₂ layer and the 315-nm MgF₂ layer as a function of distance z from the interface between the MgF₂ layer and the water. The interfaces between the substrate and the TiO₂ layer, the TiO₂ layer and the MgF₂ layer, and the MgF₂ layer and the water are indicated by the broken blue line, the dotted orange line, and the solid black line, respectively. The position where the light is totally reflected is shown by the broken black line.

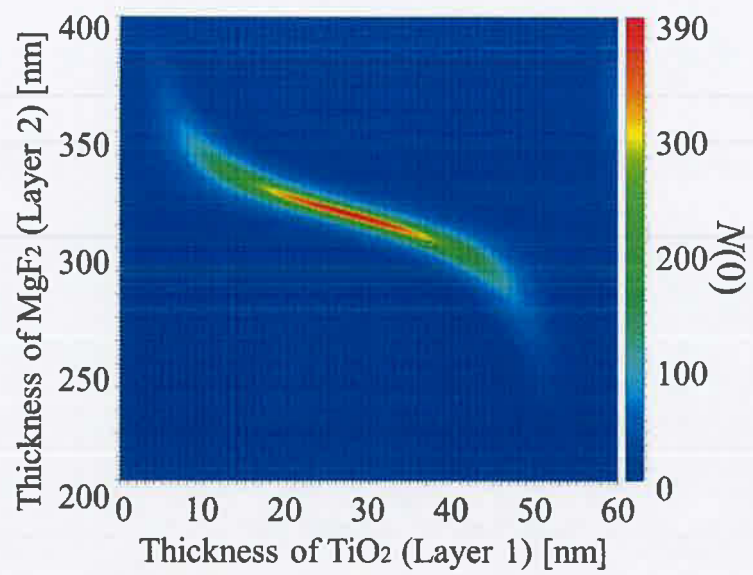


Fig. 3.7. $N(0)$, calculated as a function of thicknesses of the TiO₂ layer and the MgF₂ layer.

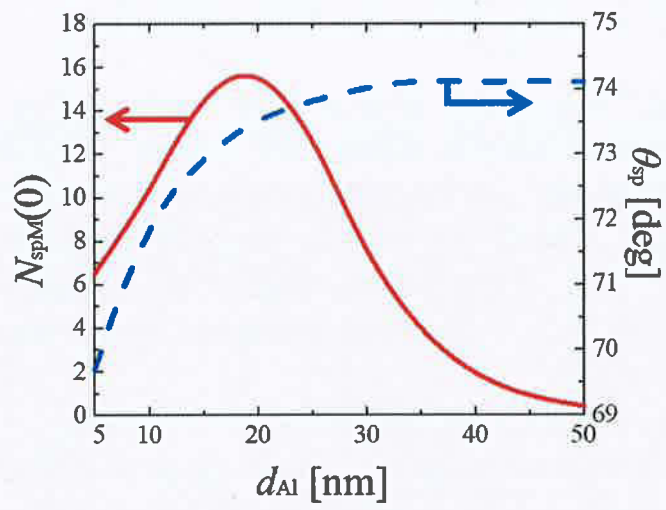


Fig. 3.8. Calculation results of $N_{spM}(0)$ (solid red) obtainable for the Al SPR sensing chip and the incident angle to the Al layer θ_{sp} (broken blue) as a function of d_{Al} .

第4章 紫外近接場光蛍光センサのためのTiO₂/SiO₂導波モード共鳴励起用チップの開発

4.1. はじめに

近接場光照明を利用した全反射顕微鏡は、蛍光標識細胞のイメージング^(1,2)や蛍光標識タンパクの検出⁽³⁾に広く用いられている。さらに、全反射顕微鏡で表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用することにより、検出板表面の蛍光体の発光を極めて効率良く励起可能である^(4,5)。

生体物質の標識のための蛍光体として、直径数nmの半導体結晶である量子ドットの研究が進んでいる^(6,7)。量子ドットの光吸収係数は短波長に向かって増大するため、可視光よりも紫外光によって、量子ドットを高効率に励起できる。さらに、励起光と発光のエネルギー差、すなわち、ストークスシフトが大きいことから、発光を励起光から分離しやすい。さらに量子ドットは、発色が鮮明、褪色しにくい等の利点を有す。量子ドットを高効率に発光させるためには、紫外近接場光の電界を増強する必要がある。この為の手法として、Au, Ag, Al等の金属薄膜を用いるSPRがある。ここで、第1章でも述べたが、AuとAgは、可視域と近赤外域では、SPRを効率良く励起出来るが、紫外域では効率が悪い⁽⁸⁻¹⁰⁾。一方、Alは紫外域から可視域までの広い波長範囲において、SPRを励起可能である⁽⁸⁻¹²⁾。よって、Al薄膜を用いたSPR検出技術は、紫外光励起蛍光色素のために用いられている^(13,14)。

また、図4.1に示す、導波モード共鳴励起用チップ (以下、WMRチップ) を用いたセンサは、近接場光の電界を増強可能な手法の一つである⁽¹⁵⁻¹⁸⁾。筆者は、第3章で述べたように、転送行列法^(19,20)による電界計算を行い、紫外近接場光を高効率に増強可能な導波路層構造を設計してきた⁽²¹⁾。この結果、例えば、導波路層の一層目を膜厚28 nmのTiO₂、二層目を膜厚315 nmのMgF₂としたWMRチップにより、計算上、波長375 nmの紫外近接場光の二乗電界強度を約387倍に増強できることが分かった。これは、SPRチップについて同様に計算した結果よりも非常に高い値である⁽²¹⁾。しかし、TiO₂/MgF₂ WMRチップを実際に作成してみると、MgF₂の密着性や平滑性に問題があることが分かった。

このため本研究では、文献(21)に記載した条件を満たす材料として、一層目にTiO₂、二層目に、一層目のTiO₂との密着性が良く安定して成膜可能なSiO₂を採用した、TiO₂/SiO₂ WMRチップを作成する。さらに、比較の為、AlのSPR励起用チップ (以下、SPRチップ) を作成する。WMRチップとSPRチップを用いて、量子ドットが懸濁された水 (以下、量子ドット懸濁液と呼ぶ) の蛍光強度を測定する。最後に、測定結果と電界計算から予測した値を比較し、WMRチップを用いることで、量子ドット懸濁液を強く発光させることが可能か検討を行う。

4.2. 理論

図4.1に示すように、WMRとSPRを励起する光学系は、クレッチマン配置をとる。波長 λ における、近接場光の正規化二乗電界強度（以下、二乗電界強度） $N(\lambda, z)$ は、プリズムへ入射前の入射光の電界を $E_0(\lambda)$ 、チップと溶液の界面に垂直な、光の入射面上の点 z における電界を $E(\lambda, z)$ とおくと、

$$N(\lambda, z) = \left| \frac{E(\lambda, z)}{E_0(\lambda)} \right|^2, \quad (4.1)$$

と定義される⁽²¹⁾。 $z=0$ はチップ/溶液界面とする。ただし本研究において、wmとspの下付き文字は、それぞれWMRとSPRを示す。

これまでに、屈折率の実部が n_1 の一層目と、屈折率の実部が n_2 の二層目を有するWMR励起層を、 $n_1 > n_2$ の条件の下、反射される光の位相が揃う膜厚で堆積することで、 $N(\lambda, z)$ を増強可能なことを報告してきた⁽²¹⁾。本研究では、一層目を TiO_2 、二層目を SiO_2 とし、入射光の波長 λ が375 nmのときの $N_{\text{wm}}(375, 0)$ の値が高くなるような、入射角 θ_{wm} 、 TiO_2 層と SiO_2 層の膜厚を決定する。

まず、図4.1に示す入射角 θ_{wm} を決定する。WMRセンサ⁽¹⁵⁻¹⁸⁾と同様に、台形プリズムとWMRチップの基板の材料を石英ガラスとし、この屈折率には文献値 ($n_p = 1.473$, $k_p = 0.000$ ⁽²²⁾) を使用する。簡単のため、WMRチップに滴下される溶液は水とし、この屈折率には文献値 ($n_w = 1.354$, $k_w = 0.000$ ⁽²²⁾) を使用する。図4.1に示すように、光源からの光を導くファイバは、台形プリズムの底面に対して平行な方向で、プリズムの側面に接続する。このとき、基板/一層目界面への光の入射角 θ と台形プリズムの底角 ϕ 、台形プリズムの屈折率 n_p の間には、

$$\theta = \phi + \sin^{-1} \left(\frac{\cos \phi}{n_p} \right), \quad (4.2)$$

の関係が成り立つ⁽¹⁶⁾。ただし、プリズムと基板の材料は同じため、 θ はプリズム/基板界面への光の入射角とも等しい。

上記の屈折率の条件では、WMRチップ/水界面で光が全反射される場合の臨界角は、 66.8° と計算される⁽²¹⁾。実際に測定する溶液の屈折率は、水の屈折率よりも僅かに高くなることを想定し、 θ は臨界角より僅かに大きく設定する必要がある。よって本研究のWMRチップには、式(4.2)より $\theta = 67.1^\circ$ と計算される、 $\phi = 32^\circ$ の台形プリズムを使用することとする。

つぎに、 TiO_2 層と SiO_2 層の膜厚を決定する為に、両者の屈折率を調べる。高周波 (RF) マグネトロンサイドスパッタリング装置 (芝浦メカトロニクス, CFS-4EP-L) を用いて、 TiO_2 と SiO_2 をそれぞれ別のSiウエハ上に成膜した。この複素屈折率を、分光エリプソメーター (J.A. Woollam, VASE) を用いて測定した。この結果、真空中での波長 $\lambda = 375$ nm

の光では、 TiO_2 は、 $n_{\text{TiO}_2} = 2.757$, $k_{\text{TiO}_2} = 0.029$, SiO_2 は $n_{\text{SiO}_2} = 1.503$, $k_{\text{SiO}_2} = 0.000$ であった。

転送行列法に基づき、 TiO_2 層と SiO_2 層の最適膜厚を決定する。導波モードは、s偏光、p偏光のどちらによっても励起されるがs偏光の方が効率よく電界を増強できる⁽²¹⁾。よって、一層目として膜厚0 - 80 nmの TiO_2 と、二層目として膜厚0 - 300 nmの SiO_2 が成膜されたWMRチップに、プリズムを通して $\lambda = 375$ nmのs偏光が入射された際の、 $N_{\text{wm}}(375, 0)$ の値を計算した。その結果として得られた、 TiO_2 と SiO_2 の両膜厚の関数としての $N_{\text{wm}}(375, 0)$ を図4.2(a)中に色で示す。さらに、図4.2(b)に、図4.2(a)の白枠で囲まれた部分の拡大図を示す。色は、冷色から暖色に、 $N_{\text{wm}}(375, 0)$ の値と相関するように選んでいる。図4.2(b)の白四角で示すように、 TiO_2 層の膜厚が約38 nm、 SiO_2 層の膜厚が約160 nmのとき、 $N_{\text{wm}}(375, 0)$ は最大値45.3をとることが分かる。図4.2(b)の丸印については後述する。

WMRチップと比較する為、Al SPRチップの最適構造を調べる。ただしAl層の表面には、自然酸化膜である膜厚5 nmの Al_2O_3 層が形成されていることを仮定する⁽¹³⁾。また、プリズム、基板、及びチップ上に滴下された水の屈折率は、WMRチップについて仮定したものと同じとする。文献(13)より、Alと Al_2O_3 の複素屈折率を、 $n_{\text{Al}} = 3.467 \times 10^{-1}$, $k_{\text{Al}} = 4.535$, $n_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 1.790$, $k_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 0.000$ と仮定する。また、SPRを励起するため、入射光はp偏光とする。図4.3の白四角で示すように、Al層の膜厚が約18 nm、 ϕ が約 52° のとき、 $N_{\text{sp}}(375, 0)$ は最大値12.6をとる。図4.3の丸印は、4.3.1節で後述する。

4.3. 実験方法

4.3.1. WMRチップとSPRチップの作成

上述のWMRチップの電界増強効果を実証するため、長さ18 mm、幅14 mm、厚さ1 mmの石英ガラス基板上に、まず一層目として TiO_2 を成膜し、つぎに二層目として SiO_2 を成膜した。

TiO_2 のスパッタリングレートは、0.5 PaのAr雰囲気、RF (13.56 MHz) 電力200 Wの条件で、約0.063 nm/sである。よって、スパッタリング時間を9分35秒とし、膜厚36.2 nmの TiO_2 膜を成膜した。ただし、本節及び後述する4.4節において、膜厚と量子ドット懸濁液の蛍光強度を、3桁または4桁の有効数字で議論するため、膜厚を0.1 nmの精度で記載している。

WMRチップの電界増強効果の膜厚依存性を分析するため、 SiO_2 のスパッタリング時間を変化させた3種のWMRチップ(i), (ii), (iii)を作成した。0.5 PaのAr雰囲気、RF電力400 Wの条件で、 SiO_2 のスパッタリングレートは約0.223 nm/sである。よって、スパッタリング時間とその結果の SiO_2 膜厚を、WMRチップ(i)では12分35秒と168.4 nm、(ii)では12分50秒と171.7 nm、(iii)では13分5秒と175.0 nmとした。このWMRチップ(i), (ii), (iii)の TiO_2 及び SiO_2 の膜厚は、図4.2(b)に赤丸、青丸、黒丸で示されている。

さらに、比較のためのSPRチップを作成するため、WMRチップと同様の石英ガラス基板上にAlを成膜した。0.5 PaのAr雰囲気、RF電力200 Wの条件で、Alのスパッタリングレートは約0.246 nm/sであり、成膜したAlの膜厚は18.2 nmであった。Al層上に形成される自然酸化膜 Al_2O_3 の膜厚を5.0 nmとすると、Al層の厚さは13.2 nmと見積もられる。SPRチップを置くプリズムの底角 ϕ を 42° とすると、図4.3の緑丸で示されるように、 $N_{\text{sp}}(375, 0)$ は7.8と計算される。

4.3.2. 蛍光測定のための試料と実験方法

作成したWMRチップとSPRチップを用いて、量子ドット懸濁液の蛍光強度を測定した。図4.1において、LED光源（Thorlabs, M375F2）からの光は、光ファイバ、コリメートレンズ、偏光板（Sigmakoki, SPF-30C-32）を通りプリズムへ入射される。入射光はWMRチップではs偏光、SPRチップではp偏光とする。WMRまたはSPRが誘起されると、チップ表面に電界が増強された近接場光が発生する。

WMRチップまたはSPRチップをプリズムの上に置いた。つぎに、直径約10 mmの貫通孔を有する厚さ約1.0 mmのシリコンゴムシートをチップ上に設置し、約100 μL の純水を、シリコンゴムシートの孔内に滴下した。ここで、CCDイメージセンサ（Bitran, BU-59LIR）を用いて、対物レンズ（Mitsutoyo, M Plan Apo）と光学フィルタ（Thorlabs, FELH0700）を通った光の蛍光像を、露光時間1分で検出した。この光学フィルタは、波長約700 nmよりも長波長の光のみを通すため、入射光が直接イメージセンサに到達することを防ぐ。この後、Qdot 705ストレプトアビジンコンジュゲート（Thermo Fisher Scientific, Q10163MP）⁽²³⁾を純水で希釈し、濃度1.0 nM（ $M = \text{mol/L}$ ）の量子ドット懸濁液を調整し、純水の場合と同様に蛍光像を取得した。この量子ドットは、紫外光により励起され、波長705 nmの光を中心に明るい蛍光を発する。

4.4. 実験結果

まず、偏光板を通過しプリズムへ入射される前の、LED光源からの光の発光強度を、分光器（Ocean Optics, USB4000）を用いて測定した。図4.4に、s偏光とした入射光強度 $I_s(\lambda)$ を赤破線で、p偏光とした入射光強度 $I_p(\lambda)$ を青実線で示す。使用したLED光源の強度は、s偏光とp偏光で同一なことがわかる。

WMRチップ(i) - (iii)とSPRチップについて、4.3.2節に記載した方法で取得した、純水と量子ドット懸濁液の蛍光強度を図4.5に示す。ただし、本研究に使用したイメージセンサでは、蛍光強度は16 bitの階調で相対的に記録される。取得した長さ2.5 mm \times 幅 2.0 mmの蛍光像について、蛍光強度の平均値を計算した。純水を滴下し取得した、蛍光像全体の蛍光強度の平均値 μ_w を、各WMRチップについて、(i)：白抜きの赤丸、(ii)：白抜きの青丸、(iii)：白抜きの黒丸で示し、SPRチップについて、白抜きの緑丸で示す。ただし、 μ_w の標準偏差 σ_w は、それぞれの丸印よりも小さいため図示されていない。また図

4.5に、量子ドット懸濁液を滴下し取得した、蛍光像全体の蛍光強度の平均値 μ_q を、各WMRチップについて、(i)：赤三角、(ii)：青三角、(iii)：黒三角で示し、SPRチップについて緑三角で示す。エラーバーは、 μ_q の標準偏差 σ_q である。

イメージセンサによる熱ノイズやチップの自家蛍光は、蛍光測定中に水のバックグラウンド蛍光 μ_w として現れるため、 μ_q/μ_w の比は、チップの性能を評価する指標の一つとなる。それぞれのチップについて μ_q/μ_w を計算すると、WMRチップ(i)は4.5、(ii)は3.3、(iii)は2.9であるが、SPRチップは1.6にすぎないことが分かる。さらに、純水の蛍光の影響が除去された有意な実効的実測蛍光強度は、 $\mu_q - \mu_w$ から計算でき、この標準偏差は誤差の伝搬則⁽²⁴⁾により $\sqrt{\sigma_w^2 + \sigma_q^2}$ から計算できる。図4.5より、各チップの量子ドット懸濁液の実効的実測蛍光強度は、チップ(i)では約 3820 ± 420 、(ii)では約 2520 ± 290 、(iii)では約 2070 ± 330 、SPRチップでは約 590 ± 150 と求められる。よって、WMRチップ(i)における実効的実測蛍光強度は、SPRチップの値の約6.5倍であることが分かる。

4.5. 考察

上述の実効的実測蛍光強度と比較するために、電界計算をもとに、各チップの量子ドット懸濁液の相対蛍光強度を予測する。まず、波長 $\lambda = 360 - 400$ nmの光におけるWMRチップ(i) - (iii)とSPRチップの二乗電界強度 $N(\lambda, 0)$ を、転送行列法を用いて計算した。各チップの $N(\lambda, 0)$ を、 λ の関数として図4.6に示す。チップ(i)：赤実線、(ii)：青一点鎖線、(iii)：黒二点鎖線、SPRチップ：緑破線である。ただし、計算に使用した各層の膜厚は、4.3.1節で述べた値とした。 $N_{wm}(\lambda, 0)$ のピークは、最も効率良くWMRが誘起される波長に起因して生じる。

s偏光及びp偏光の入射光強度 $I_s(\lambda)$ 、 $I_p(\lambda)$ は、図4.4に示すように λ の関数である。さらに量子ドット懸濁液の発光の効率、すなわち1つの光子が量子ドット懸濁液へ照射されたときのnm単位幅あたりの相対蛍光強度も、励起光の波長 $\lambda = 360 - 400$ nmで異なる⁽²³⁾。よって、量子ドット懸濁液の相対蛍光強度 F を以下に定義する式で計算することとした。

$$\begin{aligned}
 F &= c \times \int_0^{\infty} \int_{360}^{400} \left(N(\lambda, 0) e^{-\frac{2}{d(\lambda)}z} I(\lambda) \eta(\lambda) \right) d\lambda dz \\
 &= \frac{c}{2} \times \int_{360}^{400} \left(d(\lambda) N(\lambda, 0) I(\lambda) \eta(\lambda) \right) d\lambda.
 \end{aligned} \tag{4.3a}$$

ただし、 c は定数で、 $d(\lambda)$ は、近接場光の電界強度が $1/e$ に減少するまでの染み出し長を示す。なお、式(4.3a)において用いたように、二乗電界強度 N は z 方向に対し、

$$N(\lambda, z) = N(\lambda, 0) e^{-\frac{2}{d(\lambda)}z}, \tag{4.3b}$$

で示される変化をすると仮定できる。したがって、 $N(\lambda, z)$ を用いずに、式(4.3a)の中央辺

に示すように、 $e^{-\frac{2}{d(\lambda)z}}$ をz方向に積分し、式(4.3a)の最左辺とすることができる。WMRチップ、SPRチップの $d(\lambda)$ はそれぞれ、

$$d_{\text{wm}}(\lambda) = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{(n_p \sin \theta)^2 - n_w^2}}, \quad (4.4a)$$

$$d_{\text{sp}}(\lambda) = \frac{\lambda}{2\pi\sqrt{\frac{\epsilon_{\text{Al}}\epsilon_w}{\epsilon_{\text{Al}} + \epsilon_w} - \epsilon_w}}, \quad (4.4b)$$

から計算される⁽²⁵⁾。 ϵ_{Al} 、 ϵ_w は、Alと水の比誘電率である。なお、量子ドット懸濁液による光吸収係数は、 $d(\lambda)$ と比較し無視できるほど小さい⁽²⁶⁾。また、式(4.4a)にWMRチップの二層目の屈折率が記載されていないが、これは、WMRチップの各層と基板が平行なためである。

式(4.3a)の右辺の被積分関数を計算するために、 $I(\lambda)$ を最大値 I_p (374)で正規化し、文献(23)に記載されている $\eta(\lambda)$ を、最大値をとる $\lambda = 360$ nmで正規化した。図4.7に、式(4.3a)の右辺の被積分関数を λ の関数として示す。この値を $\lambda = 360 - 400$ nmの範囲で、波長間隔を1 nmとして数値積分し、各チップにおける F の計算値を求めた。ただし、 λ は無次元、 c は簡単のため1とした。この結果、 F は、(i)では 9.47×10^4 、(ii)では 6.93×10^4 、(iii)では 5.17×10^4 、SPRチップでは 7.63×10^3 と計算された。この F の値を横軸とし、図4.5より求めた蛍光強度の実効的測定値 $\mu_q - \mu_w$ を縦軸として、両者の関係を図4.8に示す。チップ(i)：赤丸、(ii)：青丸、(iii)：黒丸、SPRチップ：緑丸である。また、各エラーバーは、前述の蛍光強度

の実効的実測蛍光強度の標準偏差 $\sqrt{\sigma_w^2 + \sigma_q^2}$ である。図4.8中の赤四角と青四角について

は後述する。ここで、チップ表面に近接場光が生じていないとき、 $\mu_q - \mu_w$ と F はどちらもゼロである。よって、図4.8に、原点を通過するよう最小二乗法から求めた、WMRチップ(i) - (iii)の近似直線を赤点線で示す。赤点線より、 $\mu_q - \mu_w$ は、 F にほぼ完全に比例することが分かる。青点線は、SPRチップについて $\mu_q - \mu_w$ と F の比例関係を仮定した場合の、近似直線である。

つぎに、最適構造を有するWMRチップ及びSPRチップについて、上述の近似直線を考慮に入れ、 $\mu_q - \mu_w$ を推定した。図4.2(b)に示すように、WMRチップの最適構造は、膜厚38 nmのTiO₂層と膜厚160 nmのSiO₂層で構成される。この場合、式(4.3a)及び式(4.4a)より、 F は、 13.3×10^4 と計算される。したがって、最適構造を有するWMRチップの $\mu_q - \mu_w$ は、図4.8中の白抜き赤四角で示すように、5090と推定される。

SPRチップでは、図4.3に示すように、Al層の膜厚が18 nm、 ϕ が52°のとき最適構造をとる。したがって、SPRチップの最適構造では、式(4.3a)及び式(4.4b)より $F = 1.20 \times 10^4$ と計算される。この時の $\mu_q - \mu_w$ は、図4.8中の白抜きの青四角で示すように、920である。よって、WMRチップの紫外近接場光の電界増強効果は、SPRチップと比較し、約5.5 (=

5090/920) 倍である。ただし、WMRチップの近似直線(赤点線)の傾きはSPRチップの近似直線(青点線)の傾きよりも小さい。すなわち、WMRチップは F が大きいにも関わらず、効率良く蛍光を増強出来ていないといえる。これは、SPRチップに比べて膜厚の厚い2つの層を必要とするWMRチップの各層の表面が、完全に平滑ではないことに起因すると考えられる。

また、実験では、WMRチップには $\phi = 32^\circ$ 、SPRチップには $\phi = 42^\circ$ の石英ガラスプリズムを用いた。この ϕ の違いは、チップ表面への入射光の射影における、単位面積当たりの光強度を10%変化させる。しかしながら、上記の蛍光強度の比、5.5倍よりもこの効果は遥かに小さく、無視できる。さらに、プリズムや基板に用いられる材料の屈折率は、電界増強効果に影響を与える。例えば、SPRセンサに良く用いられている、BK7(波長375 nmにおいて $n = 1.534$, $k = 0.000$ ⁽²⁷⁾)をプリズム及び基板として使用した場合を考える。本研究の石英ガラスを用いた場合の正規化二乗電界強度 N の最大値は、転送行列法により、 $N_{\text{wm}}(375, 0) = 45.3$, $N_{\text{sp}}(375, 0) = 12.6$ と計算される一方、BK7を用いた場合は、 $N_{\text{wm}}(375, 0) = 46.8$, $N_{\text{sp}}(375, 0) = 17.7$ と計算される。

さらに、本研究で使用した転送行列法は、SPRの発生条件を直接考慮していない。このことに関して、Al SPRチップの反射率が最小となる角度を転送行列法により計算した結果、 $\omega - k$ の分散関係⁽²⁵⁾から計算される角度と良く一致した。したがって、本研究の転送行列法に、SPRの影響が実質的に組み込まれていると考えられる。

以上の結果をまとめる。WMRチップがSPRチップと比較し高い蛍光強度を得た主な理由は、図4.2(b)と図4.3に示されるように、WMRチップの高い電界増強効果である。さらに、式(4.4a)、式(4.4b)より、各チップの染み出し長は、 $d_{\text{wm}}(\lambda) = 520 - 695$ nm, $d_{\text{sp}}(\lambda) = 128 - 162$ nmと計算される。すなわち、WMRチップの染み出し長はSPRチップよりも長く、WMRチップは多くの量子ドットを励起可能である。これらの理由から、TiO₂/SiO₂ WMRチップが紫外近接場光の電界を効率良く増強可能であることを実証した。

4.6. 結論

紫外近接場光蛍光センサのためのTiO₂/SiO₂導波モード共鳴励起用(WMR)チップと、比較の為にAl表面プラズモン共鳴励起用(SPR)チップを作成した。チップ上に滴下された量子ドット懸濁液からの蛍光強度を測定した結果、WMRチップを用いた場合、SPRチップよりも約6.5倍高い蛍光強度が得られた。この実験結果から、最適構造を有するWMRチップは、最適構造を有するSPRチップより、約5.5倍高く、量子ドット懸濁液からの蛍光強度を得られることが推定された。すなわちこれらの結果は、WMRチップがSPRチップよりも優れていることを示す。

第4章の参考文献

1. D. Axelrod, "Total internal reflection fluorescence microscopy in cell biology," *Traffic*. **2**(11), 764-774 (2001).
2. L. Liang, J. Li, Q. Li, Q. Huang, J. Shi, H. Yan, and C. Fan, "Single-particle tracking and modulation of cell entry pathways of a tetrahedral DNA nanostructure in live cells," *Angew. Chem. Int. Ed.* **53**(30), 7745-7750 (2014).
3. H. Yamamura, Y. Suzuki, and Y. Imaizumi, "New light on ion channel imaging by total internal reflection fluorescence (TIRF) microscopy," *J. Pharmacol. Sci.* **128**(1), 1-7 (2015).
4. R.-Y. He, C.-Y. Lin, Y.-D. Su, K.-C. Chiu, N.-S. Chang, H.-L. Wu, and S.-J. Chen, "Imaging live cell membranes via surface plasmon-enhanced fluorescence and phase microscopy," *Opt. Express* **18**(4), 3649-3659 (2010).
5. E. Chung, Y.-H. Kim, W. T. Tang, C. J. R. Sheppard, and P. T. C. So, "Wide-field extended-resolution fluorescence microscopy with standing surface-plasmon-resonance waves," *Opt. Lett.* **34**(15), 2366-2368 (2009).
6. I. L. Medintz, H. T. Uyeda, E. R. Goldman, and H. Mattoussi, "Quantum dot bioconjugates for imaging, labelling and sensing," *Nat. Materials* **4**(6), 435-446 (2005).
7. U. Resch-Genger, M. Grabolle, S. Cavaliere-Jaricot, R. Nitschke, and T. Nann, "Quantum dots versus organic dyes as fluorescent labels," *Nat. Methods* **5**(9), 763-775 (2008).
8. M. W. Knight, N. S. King, L. Liu, H. O. Everitt, P. Nordlander, and N. J. Halas, "Aluminum for plasmonics," *ACS Nano* **8**(1), 834-840 (2013).
9. K. Diest, V. Liberman, D. M. Lennon, P. B. Welander, and M. Rothschild, "Aluminum plasmonics: optimization of plasmonic properties using liquid-prism-coupled ellipsometry," *Opt. Express* **21**(23), 28638-28650 (2013).
10. D. V. Nesterenko and Z. Sekkat, "Resolution estimation of the Au, Ag, Cu, and Al single- and double-layer surface plasmon sensors in the ultraviolet, visible, and infrared regions," *Plasmonics* **8**(4), 1585-1595 (2013).
11. I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, and J. R. Lakowicz, "Ultraviolet surface plasmon-coupled emission using thin aluminum films," *Anal. Chem.* **76**(14), 4076-4081 (2004).
12. A. Ono, M. Kikawada, R. Akimoto, W. Inami, and Y. Kawata, "Fluorescence enhancement with deep-ultraviolet surface plasmon excitation," *Opt. Express* **21**(15), 17447-17453 (2013).
13. H. Ashiba, Y. Sugiyama, X. Wang, H. Shirato, K. Higo-Moriguchi, K. Taniguchi, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance-assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels," *Biosens. Bioelectron.* **93**, 260-266 (2017).

14. C. Kuroda, R. Iizuka, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Development of a dielectrophoresis-assisted surface plasmon resonance fluorescence biosensor for detection of bacteria," *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**(5), 057001 1-5 (2018).
15. X. Wang, M. Fujimaki, T. Kato, K. Nomura, K. Awazu, and Y. Ohki, "Optimal design of a spectral readout type planar waveguide-mode sensor with a monolithic structure," *Opt. Express* **19**(21), 20205-20213 (2011).
16. M. Fujimaki, X. Wang, T. Kato, K. Awazu, and Y. Ohki, "Parallel-incidence-type waveguide-mode sensor with spectral-readout setup," *Opt. Express* **23**(9), 10925-10937 (2015).
17. K. Nomura, T. LakshmiPriya, N. Fukuda, X. Wang, and M. Fujimaki, "Fluorescence enhancement by a SiO₂-based monolithic waveguide structure for biomolecular detection," *J. Appl. Phys.* **113**(14), 143103 (2013).
18. C. Kuroda, Y. Ohki, H. Ashiba, M. Fujimaki, K. Awazu, and M. Makishima, "Design of a sedimentation hole in a microfluidic channel to remove blood cells from diluted whole blood," *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**(3), 037201 (2017).
19. O. Arnon and P. Baumeister, "Electric field distribution and the reduction of laser damage in multilayers," *Appl. Opt.* **19**(11), 1853-1855 (1980).
20. M. Born and E. Wolf, *Principles of optics. Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Sixth Edition, (Cambridge University, 1997).
21. C. Kuroda, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Optimization of a waveguide-mode sensing chip for an ultraviolet near-field illumination biosensor," *Opt. Express* **25**(21), 26011-26019 (2017).
22. E. D. Palik, G. Ghosh, and T. M. Cotter, *Handbook of optical constants of solids*, (Academic, 1998).
23. Thermo Fisher Scientific HP,
<http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/Q10163MP>, (Retrieved on Nov. 8, 2017).
24. J. E. Turner, D. J. Downing, and J. S. Bogard, *Propagation of error*, (Statistical Methods in Radiation Physics, 2012), pp. 199-214.
25. A. B. Dahlin, *Advances in biomedical spectroscopy, Plasmonic biosensors*, (IOS, 2012).
26. Thermo Fisher Scientific HP,
<http://www.thermofisher.com/jp/ja/home/references/molecular-probes-the-handbook/tables/extinction-coefficients-of-qdot-streptavidin-conjugates-at-common-wavelengths.html>, (Retrieved on Dec. 16, 2017).
27. Schott HP,
http://www.schott.com/advanced_optics/japanese/abbe_datasheets/schott-datasheet-n-bk7.pdf, (Retrieved on Feb. 21, 2018).

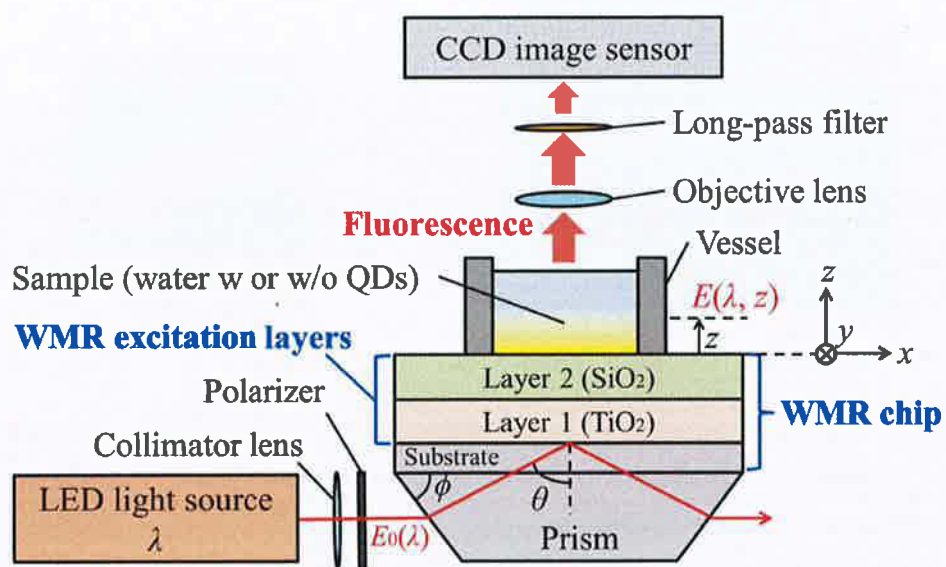


Fig. 4.1. Schematic optical arrangement of the UV near-field fluorescence biosensor with the two-layer WMR chip (not to scale).

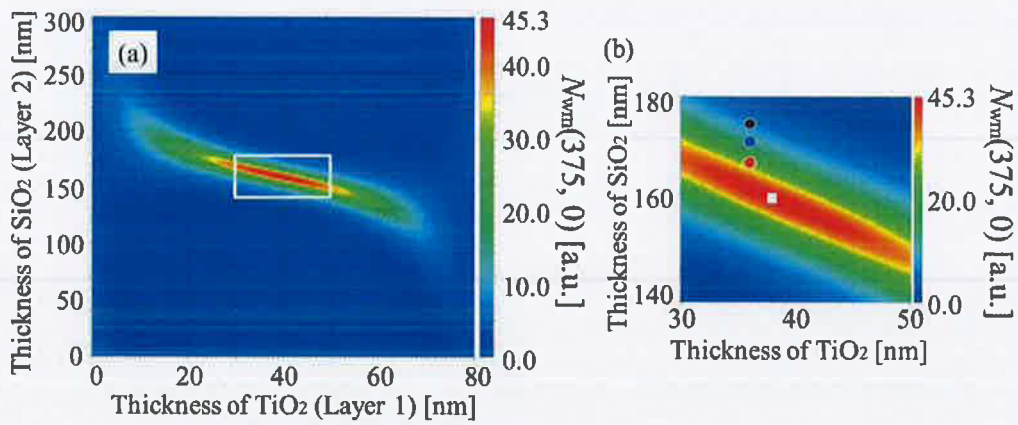


Fig. 4.2. (a) Normalized electric field strength squared, $N_{\text{wm}}(375, 0)$, calculated for the WMR chip as a function of thicknesses of the TiO₂ layer 1 and the SiO₂ layer 2. The base angle ϕ of the prism is set to 32°. Water is put on the layer 2. The color bar is linearly divided from cold to warm, depending on the value of $N_{\text{wm}}(375, 0)$. (b) Enlarged view of the area surrounded by the white frame in Fig. 4.2(a). The solid red, blue, and black circles denote experimental conditions for the WMR chips (i), (ii), and (iii), respectively, while the white square denotes the ideally optimized condition for WMR excitation.

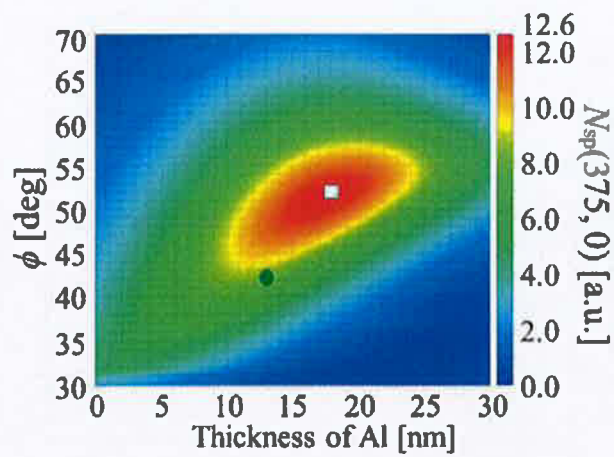


Fig. 4.3. $N_{sp}(375, 0)$, calculated for the SPR chip, as a function of thickness of the Al layer and base angle ϕ of the prism. Water is on a 5-nm Al_2O_3 layer put on the Al layer. The solid green circle denotes the experimental condition for the SPR chip, while the white square denotes the ideally optimized condition for SPR excitation.

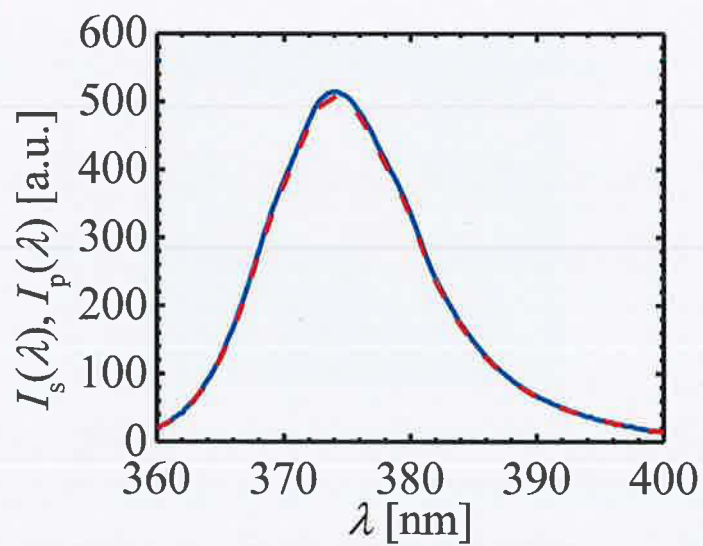


Fig. 4.4. Light intensity of the LED, measured as a function of λ . Broken red: $I_s(\lambda)$ for s-polarized light, solid blue: $I_p(\lambda)$ for p-polarized light. Note that the two curves overlap each other.

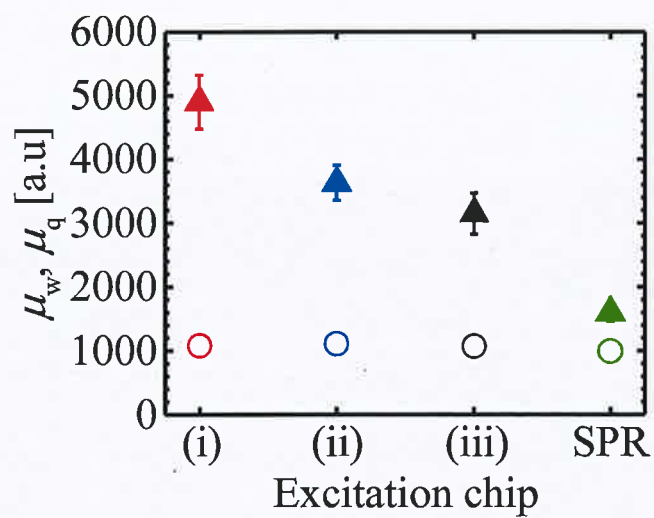


Fig. 4.5. Fluorescence intensities measured using the WMR chips (i) - (iii) and the SPR chip. The solid triangles represent the average of fluorescence intensities from QD solutions μ_q , while the open circles represent the average from water μ_w . The standard deviations of fluorescence intensities, represented by vertical bars, are larger for the QD solution than for the water.

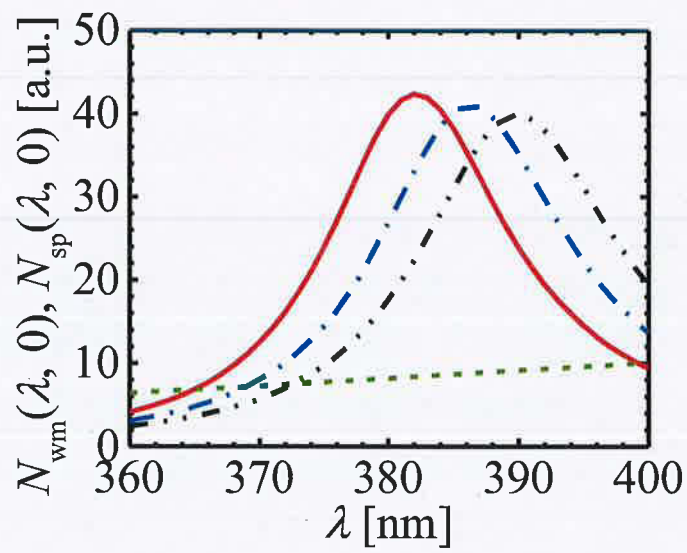


Fig. 4.6. $N_{wm}(\lambda, 0)$ and $N_{sp}(\lambda, 0)$ calculated as a function of λ . Solid red: WMR chip (i), dashed dotted blue: WMR chip (ii), dashed double-dotted black: WMR chip (iii), broken green: SPR chip.

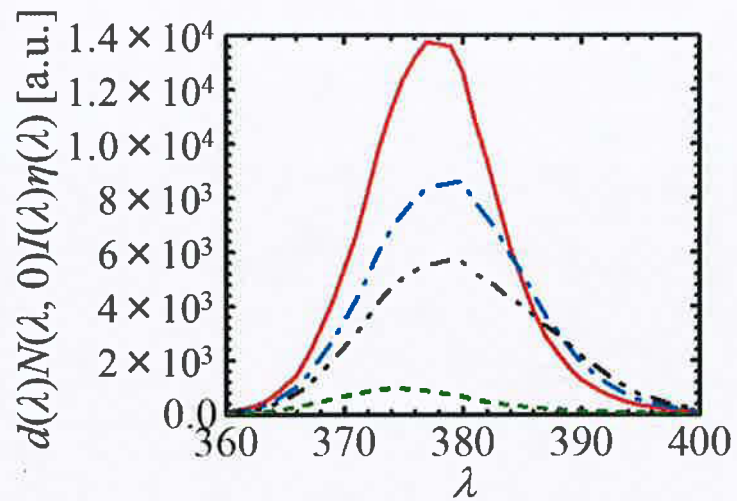


Fig. 4.7. Integrand in the right side of Eq. (4.3a), $d(\lambda)N(\lambda, 0)I(\lambda)\eta(\lambda)$, as a function of λ . To calculate the relative total fluorescence intensity F , each curve is integrated with respect to λ . Solid red: WMR chip (i), dashed dotted blue: WMR chip (ii), dashed double-dotted black: WMR chip (iii), broken green: SPR chip. Only in this figure, λ is treated as dimensionless.

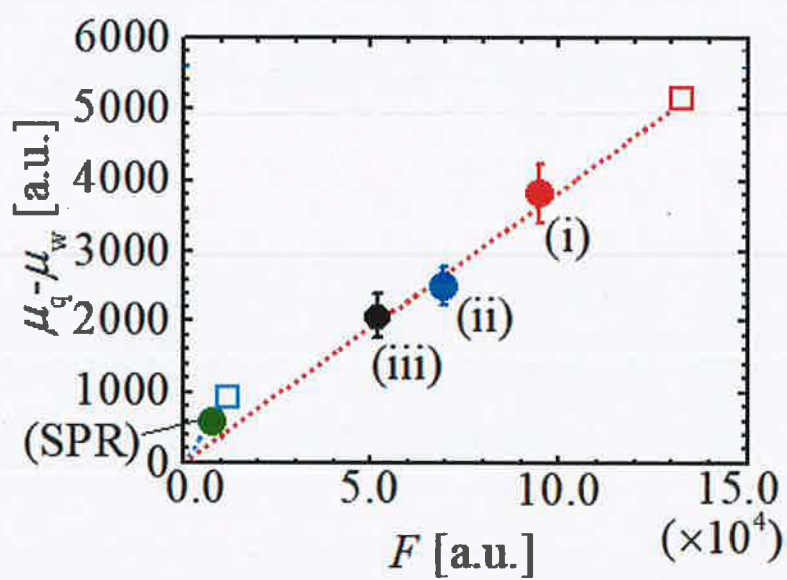


Fig. 4.8: Effective fluorescence intensity, $\mu_q - \mu_w$, for the WMR chips (i) - (iii) and the SPR chip as a function of F . Vertical bars show the standard deviations. Solid circles: measured, open squares: estimated for the ideally optimized chips.

第5章 細菌の選択的検出に向けた誘電泳動支援表面プラズモン共鳴 蛍光バイオセンサの開発

5.1. はじめに

ヒト血液や環境水等の多くの夾雑物が存在する液体試料から、特定の生体物質を正確に検出するバイオセンサは、ヒトの健康や環境汚染管理など、幅広い分野で切望されている。このためのバイオセンサとして、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサが広く報告されている⁽¹⁻⁵⁾。しかし、特定の生体物質のみを高選択に検出するためには、夾雑物を反応工程ごとに洗浄する必要がある、熟練の技術が必要、時間がかかるといった問題がある。

短時間測定を目標に、SPRセンサの金属膜を電極として用い、誘電泳動により検出対象生体物質を金属膜へ吸着させる、誘電泳動支援SPRセンサが開発されている⁽⁶⁻⁸⁾。ここで、微粒子に外部より電界を印加すると、微粒子内で分極電荷が誘起される。不均一電界中では、印加周波数、印加電圧、周辺溶媒や微粒子の導電率、誘電率、微粒子の粒径に依存し、誘電泳動が生じる^(9,10)。一般に、微粒子の誘電率と導電率が、周辺溶媒よりも大きい場合、正の誘電泳動 (Positive DEP) が作用し、微粒子は電界強度の強い方向に移動する。一方、微粒子の誘電率と導電率が、周辺溶媒よりも小さい場合、負の誘電泳動 (Negative DEP) が作用し、微粒子は電界強度の弱い方向に移動する。

上述の文献(6-8)で報告されている誘電泳動支援SPRセンサは、SPRを励起可能な電極に、生体物質を集めることができる。しかし、実際にセンサを使用する場面では、試料中に存在する夾雑物も誘電泳動によって電極上に集められる可能性がある。ここで、検出対象の生体物質を夾雑物から区別するために、生体物質を色素で染色し、SPRにより色素の蛍光を励起するセンサが報告されている^(11,12)。文献(11,12)では、蛍光色素で標識された生体物質を、誘電泳動により金属のナノ構造上へ集めている。このナノ構造ではSPRが誘起されるため、ナノ構造上の蛍光強度の変化を測定することにより、生体物質を検出している。これらの検出手法は、蛍光色素で標識された物質からの信号のみを検出可能であり、高い選択性を有す。しかし、複雑な金属ナノ構造を作成することは難しい。よって、本研究では、蛍光色素で標識された生体物質を、誘電泳動によりSPRが誘起される平面電極上に集める誘電泳動支援表面プラズモン共鳴蛍光 (SPRF) バイオセンサを開発する。

本研究では、検出対象の生体物質として大腸菌 (*E. coli*) を用いた。まず、検出チップの表面近傍に存在する、大腸菌から散乱された光を観察することにより、誘電泳動により大腸菌を電極上へ集めるための、最適な印加電界の周波数を調べた。つぎに、SPRを電極上で励起させるため、検出チップの構造を最適化した。さらに、大腸菌を4', 6-ジアミジノ-2-フェニルインドール (DAPI) で染色し、SPRで励起されたDAPIの蛍光強度を測定した。

5.2. 試料と実験方法

5.2.1. 試料

大腸菌 (Takara Bio, JM109) は、寒天培地で培養し、3 mLのルリア・ベルターニ (LB) 溶液へ移し、37 °Cの環境で4時間、振盪させた。その後、遠心分離器を使用し、LB溶液を除去後、残った大腸菌を純水 (Millipore, Milli-Q) で希釈した。この工程を3回から4回繰り返して、LB溶液を完全に純水で置換した。最終的には、大腸菌の細胞一つ一つを区別しやすいよう、大腸菌を含む約10 μL の溶液を純水約2 mLで希釈し、濃度 2×10^5 cfu/mL (cfu : コロニー形成単位) の大腸菌懸濁液を得た。

さらに、大腸菌を非生物の夾雑物と区別して検出するため、青紫光で励起され、波長461 nmを極大とする蛍光を発する濃度1 $\mu\text{g/mL}$ の核酸染色剤DAPI (ThermoFisher scientific, P1306) で染色した。ここで、DAPIは、青紫色光で励起され、波長461 nm付近の光を最も効率良く発光する。DAPIの濃度は1 $\mu\text{g/mL}$ とし、DAPIで染色された大腸菌懸濁液の濃度は約 4×10^4 cfu/mLであった。

大腸菌懸濁液中の大腸菌細胞の体積は、周辺溶媒と比較し非常に少ない。よって本研究では、大腸菌細胞が大腸菌懸濁液へ与える電気的性質を考慮せずに、大腸菌懸濁液の誘電率を水の誘電率と仮定する^(13,14)。大腸菌懸濁液を調整するために使用した水の導電率は、導電率計 (Eutech Instruments, PC450) を用いて測定した結果、約 2.2×10^{-4} S/mであった。

5.2.2. ITO電極を用いた大腸菌の散乱光検出

本研究で開発したセンサの概要図を図5.1に示す。ただし、以下に述べる大腸菌の散乱光検出と蛍光検出の2つの実験のためには、異なる試料、光源、および電極を用いた。この詳細を表5.1に示す。

大腸菌からの散乱光を検出するために、上述した手順で調製した大腸菌懸濁液を使用した。大腸菌懸濁液からの散乱光を明瞭に観察するため、電極には、透明導電膜として一般的な酸化インジウムスズ (ITO) を採用した。交流電圧印加による誘電泳動力を増大させるため、電極配置は四極状を採用した。高周波 (RF) マグネトロンスパッタリング装置 (芝浦メカトロニクス, CFS-4EP-L) を用いて、大きさ14 mm \times 18 mmの石英ガラス基板に、大きさ6 mm \times 8 mm、膜厚30 nm のITO膜を四極状に、電極間の距離が約500 μm となるよう成膜し、検出チップとした。この検出チップを底角32°の台形プリズム上に設置した。

作成した検出チップ上に設置された、厚さ約1 mmのシリコーンゴムシートに貫通するよう開けた直径約1 cmの孔の中に、大腸菌懸濁液を約60 μL 滴下した。この状態で、Xeランプ (分光計器, SM-10YN) の光をプリズムに入射すると、検出チップと大腸菌懸濁液界面で光が全反射される。大腸菌懸濁液から生じる散乱光を、5倍の対物レンズ (ミ

ットヨ, M PLAN APO) を通して, CCDイメージセンサ (Bitran, BU-59LIR) により, 露光時間0.5秒で検出した。

つぎに, 図5.2に示すように, 180° 位相のずれた, 実効値が $(10/\sqrt{2})$ V, すなわち, 正の最大値と負の最大値の電圧差が20 V, 周波数100 Hzの2つ交流電圧が, 向かい合った電極にそれぞれ印加されるようマルチファンクションジェネレータ (Wave factory, WF 1974) を検出チップに接続した。

交流電圧を約1分間印加し, 大腸菌懸濁液からの散乱光を露光時間0.5秒で, 再び検出した。この後, 交流電圧印加前と約1分間印加した後の, 散乱光像を比較した。印加交流電圧の正の最大値と負の最大値の電圧差は20 Vのまま, 周波数を1 MHzに変え, 同様に散乱光像を観察した。画像編集ソフト (Image J) を用いて, 取得した散乱光像の解析を行った。

5.2.3. Al SPR電極を用いた大腸菌の蛍光検出

DAPI染色された大腸菌からの蛍光を検出する際にも, 図5.1に概略図を示すセンサ構造を用いた。表5.1の右欄に記載されているように, 電極上で波長405 nmの光のSPRが励起されるよう, Al膜を電極材料として用いた⁽¹⁵⁻¹⁸⁾。Alを成膜した石英ガラス基板を石英ガラス台形プリズム上に設置し, 波長405 nmのp偏光を入射した際の, プリズムへ入射前の入射光の電界 E_0 とAl成膜基板/大腸菌懸濁液界面 ($z=0$) の電界 $E(0)$ の大きさの比の2乗である正規化二乗電界強度 $|E(0)/E_0|^2$ の値を計算した。ただし, 簡単化のため, 大腸菌懸濁液の屈折率の実部 n と消衰係数 k を水と同じと仮定し, 石英ガラスの屈折率 $n_{\text{SiO}_2} = 1.47, k_{\text{SiO}_2} = 0.000$ ⁽¹⁹⁾, 水の屈折率 $n_{\text{water}} = 1.35, k_{\text{water}} = 1.58 \times 10^{-9}$ ⁽¹⁹⁾を使用した。Alの屈折率は, 分光エリプソメーター (J.A. Woollam, VASE) を用いて測定した値の $n_{\text{Al}} = 0.347, k_{\text{Al}} = 4.54$ とした。Alの膜厚を0 - 50 nm, 台形プリズムの底角を30 - 50°の範囲で変化させた際の, 転送行列法^(20,21)を用いて計算した, $|E(0)/E_0|^2$ の値のカラーチャートを図5.3に示す。台形プリズムの底角が 41.4° でAlの膜厚が約18.7 nmのときに, $|E(0)/E_0|^2$ は最大値16.0をとる。この結果をもとに, 四極電極及びSPR励起層として, 図5.3中に黒破線で示すように膜厚20 nmのAl膜を石英ガラス基板に成膜した。この検出チップを, 底角 42° の石英ガラス台形プリズム上に設置した。

つぎに, 偏光板 (シグマ光機, SPF-30C-32) を通してp偏光とした波長405 nmのレーザー光 (Thorlabs, CPS405) を台形プリズムに入射した。対物レンズ上に波長447 nmのバンドパスフィルタ (Edmund Optics, 84095) を設置した。検出チップ上に, 濃度 4×10^4 cfu/mLのDAPI染色大腸菌懸濁液を約60 μ L滴下した。このとき生じるDAPI染色大腸菌からの蛍光を, 露光時間1分で検出した。なお, 通常, 殺菌には波長260 - 280 nm付近の深紫外光が使用される^(22,23)。波長400 nmでは, 殺菌効果が最大値の約0.01%となることも報告されており⁽²³⁾, 実験に使用した波長405 nmの入射光は, 大腸菌の生死状態に影響を及ぼさないと考えられる。

5.2.2節と同様に、検出チップに、最大と最小の電圧差が20 V、周波数100 Hzの交流電圧を印加した。電圧を約1分間印加し、電圧印加を停止した後に、DAPI染色大腸菌懸濁液の蛍光を露光時間1分で再び検出した。上述の画像編集ソフトを用いて、電圧印加前後に取得した蛍光像の解析を行った。さらに、印加交流電圧の最大と最小の電圧差は20 Vのまま、周波数を1 kHz、1 MHzと変え、同様に蛍光を検出した。

5.3. 実験結果

5.3.1. 大腸菌の散乱光検出

5.2.2節に記載した方法で、四極状のITO電極を有する検出チップにXeランプからの光を入射し、大腸菌懸濁液からの散乱光を観察した。正の最大値と負の最大値の電圧差が20 V、周波数が100 Hzの交流電圧を1分間検出チップに印加した。画像編集ソフトを用いて、電圧印加後に取得した散乱光像を、電圧印加前に取得した散乱光像に重ね合わせた結果を図5.4(a)に示す。図5.4(a)中の赤点は、電圧印加前と比較し、印加後に増加した散乱光強度が約2000 [arb. unit]以上の光点を示す。図5.4(a)より、周波数100 Hzの交流電圧を電極に1分間印加することで、大腸菌がITO電極上へ集まっている。さらに電圧を印加し続けると、電極上へ集まった大腸菌は、図5.4(a)の右上の視野外へ移動していった。

この後、周波数1 MHzの交流電圧を1分間検出チップに印加した。取得した散乱光像を、電圧印加前に取得した散乱光像に重ね合わせた結果を図5.4(b)に示す。図5.4(b)中の赤点も同様に、電圧印加後に増加した光点を示す。周波数1 MHzの交流電圧を印加した場合は、大腸菌は電極の端に集まる。

5.3.2. 大腸菌の蛍光検出

5.2.3節に記載した方法で、四極状のAl電極を有する検出チップに波長405 nmのレーザー光を入射し、DAPI染色大腸菌懸濁液からの蛍光を観察した。図5.5(a)に、電圧印加前に取得した、Al電極(ii)およびその近傍の蛍光像を示す。DAPI染色された大腸菌は、ほぼ均一な分布で存在すると仮定できるが、図5.5(a)では、電極上のみで強い蛍光信号が観察される。これは、SPRにより、DAPI染色された大腸菌からの蛍光が効率良く励起されるためである。

図5.5(b) - (d)に、正の最大値と負の最大値の電圧差が20 Vの電圧印加後に取得した蛍光像を示す。印加周波数はそれぞれ、100 Hz (b)、1 kHz (c)、1 MHz (d)である。図5.5(b)および図5.5(c)では、電極上に強い蛍光信号が観察される。これは、上述したSPRによるものと考えられる。一方、図5.5(d)では、電極上の蛍光信号を明瞭に観察出来ない。ここで図5.4(b)に関連して述べたように、周波数1 MHzを印加すると、大腸菌は電極の端に集められる筈である。しかし、電極の端は、検出チップの基板の表面に垂直であり、

SPRを励起出来ない。よって、電極の端に集められたDAPI染色された大腸菌からの蛍光信号は、明瞭に観察出来ないと考えられる。

ここで、図5.5のすべての蛍光像のAl電極上で、夾雑物や電極表面の凹凸に因ると考えられる蛍光信号が多く観察されている。すなわち、DAPI染色大腸菌からの蛍光を明瞭に観察出来ない。これら検出チップの汚れやカメラノイズを除くため、Al電極上の領域で1400 [arb. unit]以上の蛍光強度を有する部分のみ、色付けすることとした。電圧印加前を緑で、周波数100 Hzの交流電圧印加後を赤で色付けし、重ね合わせた像の一部を、図5.6(a)に示す。ただし、図中の白い部分は、緑と赤が重なった領域であり、電圧印加により蛍光信号が変化しなかったことを示す。緑または赤で色付けされなかった部分は、背景として黒で色付けした。図5.6(a)より、赤点が緑点より有意に多く確認される。赤点は、電圧印加前と比較し印加後に増加した光点、緑点は、逆に印加後に減少した光点を示す。よって、周波数100 Hzの交流電圧印加により、Al電極上で、DAPI染色大腸菌からの蛍光信号が増加したことが分かる。

つぎに、正の最大値と負の最大値の電圧差は20 V、周波数1 kHzの交流電圧を1分間印加し、取得した蛍光像を、電圧印加前と重ね合わせた結果を図5.6(b)に示す。図5.6(a)と同様の画像加工を行い、電圧印加前を緑に、電圧印加後を赤で色付けしている。図5.6(a)よりもはるかに多くの赤点が確認されることから、周波数1 kHzの交流電圧印加により、Al電極上に、多くの大腸菌が集まる事が分かる。

最後に、図5.6に示す蛍光信号の増加は、電圧印加により生じたことを確認するため、別のDAPI染色大腸菌懸濁液を検出チップに約60 μ L滴下した。つぎに、電圧を印加せずに試料を10分間静置させ、この前後で蛍光像を取得した。静置前を緑、静置後を赤で色付けし、重ね合わせた像の一部を、図5.7に示す。赤点はほぼ無く、この静置時間内では、重力沈降により大腸菌が検出チップ上へ落ちないことが確認できる。すなわち、図5.6(a), (b)で見られた赤点の増加は、誘電泳動により生じたことが分かる。

5.4. 考察

図5.2に示すように、本研究では、対向する2つの電極に、位相差を180°に設定した交流電圧を印加している。電極を四極状に設計した理由は、電界強度の空間的分布を大きく変化させ、誘電泳動による効果を明瞭に観察するためである。すなわち、隣り合う2つの電極間では最大10 V、電極(ii)と電極(iii)の間では最大20 Vの電位差を作ることができる。電気力線が集中している、厚さ20 nmまたは30 nmの電極の端部では、電界強度は更に高い。一方で、4つの電極上では、常に電界強度はほぼ零である。もし対向する2つの電極に同じ位相を持つ交流電圧を印加したとすると、電極(ii)の電位は常に電極(iii)の電位と、電極(i)の電位は常に電極(iv)の電位と等しくなる。これは、電極上だけでなく、電極以外の場所で電界強度が常に零になることを意味し、負と正の誘電泳動を区別することが困難になる。

本研究で使用した大腸菌は、大腸菌の細胞質 (Cytoplasm) を内側細胞膜 (Inner membrane), 細胞壁 (Periplasm), 外側細胞膜 (Outer membrane) が取り囲む構造をしており、各部分の比誘電率や導電率は、表5.2に示すように大きく異なる⁽²⁴⁾。さらに、大腸菌全体としての誘電率、導電率は強い周波数依存性を持つことが知られている。例えば、低周波の交流電圧を印加すると、外側細胞膜に電荷が溜まる界面分極が起こる⁽²⁴⁻²⁷⁾。このため、外側細胞膜の内側にある、細胞壁などには電界が殆ど掛からない。印加周波数を上げると、上記の界面分極が十分に起こらなくなるため、細胞質に電界が掛かるようになる⁽²⁷⁻²⁹⁾。

図5.4, 図5.6に示す通り、印加周波数により大腸菌が集まる場所は変化し、100 Hzと1 kHzでは電極上に、1 MHzでは電極の端に集まる。印加周波数が100 Hz, 1 kHzでは、上述のように、大腸菌の内側の細胞質などには電界は掛からず、外側細胞膜のみが誘電分極を示すと考えている。表5.2に示すように、外側細胞膜の誘電率および導電率は、水の誘電率および導電率よりも小さい。すなわち、周波数100 Hzや1 kHzでは、負の誘電泳動により、電界強度が最も低い電極上に大腸菌が集められたと考えられる^(28,29)。一方、周波数1 MHzでは、大腸菌の容積の大部分を占める細胞質に電界の影響が及ぶと仮定できる。表5.2に示すように、細胞質の誘電率および導電率は、水の誘電率および導電率より高い。したがって、図5.4(b)に示すように、正の誘電泳動により、大腸菌は電界強度の高い電極の端へ集められたと考えられる⁽²⁸⁾。

現在使われている細菌検出技術は、培養を必要とするため数日を要す⁽³⁰⁾。一方、本研究で開発したセンサは、蛍光で標識された細菌を、検出チップ上に迅速に収集し、これを選択的に検出可能である。感度やその他の性能を更に向上させることで、誘電泳動を利用した、正確で迅速なバイオセンサが実現すると考える。

5.5. 結論

生体物質を正確かつ迅速に測定することを目標に、誘電泳動支援表面プラズモン共鳴 (SPR) 蛍光バイオセンサを開発した。本研究では、まず、誘電泳動力により電極上へ大腸菌が集まる印加周波数を、ITO電極を用いて検証した。この結果をもとに、Al電極上で波長405 nmの光のSPRが励起されるようセンサ構造を最適化し、周波数100 Hzや1 kHzの交流電圧を印加した結果、DAPI染色大腸菌が、負の誘電泳動によりAl電極上に集まることを確認した。すなわち本センサは、検出対象となる生体物質を検出チップに引き寄せて検出することが可能である。さらに、周波数1 MHzの交流電圧を印加すると、電極の端に大腸菌が集められることを確認した。大腸菌のこの周波数依存特性は、誘電泳動により、大腸菌が移動することを示している。本手法を更に発展させることで、生体物質の簡易・選択的検出技術の実現に繋がることが期待される。

第5章の参考文献

1. W. Knoll, "Optical characterization of organic thin films and interfaces with evanescent waves," *MRS Bulletin* **16**(7), 29-39 (1991).
2. J. Homola, S. S. Yee, and G. Gauglitz, "Surface plasmon resonance sensors," *Sens. Actuators B* **54**(1-2), 3-15 (1999).
3. T. Liebermann and W. Knoll, "Surface-plasmon field-enhanced fluorescence spectroscopy," *Colloids Surf. A* **171**(1-3), 115-130 (2000).
4. J. Dostálek and W. Knoll, "Biosensors based on surface plasmon-enhanced fluorescence spectroscopy," *Biointerphases* **3**(3), FD12-22 (2008).
5. A. Abbas, M. J. Linman, and Q. Cheng, "New trends in instrumental design for surface plasmon resonance-based biosensors," *Biosens. Bioelectron.* **26**(5), 1815-1824 (2011).
6. A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, and S.-H. Oh, "Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays," *Nano Lett.* **14**(4), 2006-2012 (2014).
7. S. Cherukulappurath, S. H. Lee, A. Campos, C. L. Haynes, and S.-H. Oh, "Rapid and sensitive in situ SERS detection using dielectrophoresis," *Chem. Mater.* **26**(7), 2445-2452 (2014).
8. M. Suzuki, R. Nakano, and Y. Iribe, "High efficient cell leading into microwell array by using positive dielectrophoresis," *Electrochemistry* **84**(5), 319-323 (2016).
9. P. R. C. Gascoyne and J. Vykoukal, "Particle separation by dielectrophoresis," *Electrophoresis* **23**(13), 1973 (2002).
10. K. Khoshmanesh, S. Nahavandi, S. Baratchi, A. Mitchell, and K. Kalantar-zadeh, "Dielectrophoretic platforms for bio-microfluidic systems," *Biosens. Bioelectron.* **26**(5), 1800-1814 (2011).
11. A. Barik, S. Cherukulappurath, N. J. Wittenberg, T. W. Johnson, and S.-H. Oh, "Dielectrophoresis-assisted raman spectroscopy of intravesicular analytes on metallic pyramids," *Anal. Chem.* **88**(3), 1704-1710 (2016).
12. Y.-H. Tai, D.-M. Chang, M.-Y. Pan, D.-W. Huang, and P.-K. Wei, "Sensitive detection of small particles in fluids using optical fiber tip with dielectrophoresis," *Sensors* **16**(3), 303 (2016).
13. V. G. Artemov and A. A. Volkov, "Water and ice dielectric spectra scaling at 0 °C," *Ferroelectrics* **466**(1), 158-165 (2014).
14. GE Water, White Paper, 300 00322 EN Rev. B, <http://www.gewater.com/>, (Retrieved on Mar. 3, 2018).

15. I. Gryczynski, J. Malicka, Z. Gryczynski, K. Nowaczyk, and J. R. Lakowicz, "Ultraviolet surface plasmon-coupled emission using thin aluminum films," *Anal. Chem.* **76**(14), 4076-4081 (2004).
16. A. Ono, M. Kikawada, R. Akimoto, W. Inami, and Y. Kawata, "Fluorescence enhancement with deep-ultraviolet surface plasmon excitation," *Opt. Express* **21**(25), 17447-17453 (2013).
17. M. Kikawada, A. Ono, W. Inami, and Y. Kawata, "Enhanced multicolor fluorescence in bioimaging using deep-ultraviolet surface plasmon resonance," *Appl. Phys. Lett.* **104**(22), 223703 (2014).
18. M. Kikawada, A. Ono, W. Inami, and Y. Kawata, "Surface plasmon-enhanced fluorescence cell imaging in deep-UV region," *Appl. Phys. Express* **8**(7), 072401 (2015).
19. E. Palik, G. Ghosh, and T. M. Cotter, *Handbook of optical constants of solids*, (Academic, 1998).
20. O. Arnon and P. Baumeister, "Electric field distribution and the reduction of laser damage in multilayers," *Appl. Opt.* **19**(11), 1853-1855 (1980).
21. M. Born and E. Wolf, *Principles of optics. Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Sixth Edition, (Cambridge University, 1997).
22. H. Kuwahara, E. Kumazawa, R. Ohyama, and A. Itou, "Disinfection of *Escherichia coli* using atmospheric-pressure argon plasma jet," *J. Surf. Sci. Soc. Jpn.* **31**(12), 667-672 (2010) [in Japanese].
23. パナソニック株式会社HP,
<http://www.panasonic.biz/es/lighting/plam/knowledge/pdf/0320.pdf>, (Retrieved on Mar. 23, 2018) [in Japanese].
24. W. Bai, K. S. Zhao, and K. Asami, "Dielectric properties of *E. coli* cell as simulated by the three-shell spheroidal model," *Biophys. Chem.* **122**(2), 136-142 (2006).
25. K. Asami, "Low-frequency dielectric dispersion of bacterial cell suspensions," *Colloids Surf. B* **119**, 1-5 (2014).
26. K. Asami, "Dielectric properties of membranes," *Maku* **29**(6), 350-352 (2004) [in Japanese].
27. K. Cheung, S. Gawad, and P. Renaud, "Impedance spectroscopy flow cytometry: On-chip label-free cell differentiation," *Cytometry Part A* **65**(2), 124-132 (2005).
28. H. Li and R. Bashir, "Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes," *Sens. Actuators B* **86**(2-3), 215-221 (2002).
29. B. H. Lapizco-Encinas, B. A. Simmons, E. B. Cummings, and Y. Fintschenko, "Dielectrophoretic concentration and separation of live and dead bacteria in an array of insulators," *Anal. Chem.* **76**(6), 1571-1579 (2004).

30. P. K. Mandal, A. K. Biswas, K. Choi, and U. K. Pal, "Methods for rapid detection of foodborne pathogens: an overview," *Am. J. Food Technol.* **6**(2), 87-102 (2011).

Table 5.1. Samples, light sources, and electrodes used for the detection of unstained and stained *E. coli* cells.

	Detection of scattered light from <i>E. coli</i>	Detection of fluorescence from <i>E. coli</i> stained with DAPI
Sample	Suspension of <i>E. coli</i> cells with a concentration of 2×10^5 cfu/mL	Suspension of DAPI-stained <i>E. coli</i> cells with a concentration of 4×10^4 cfu/mL
Light source	White light from a Xe lamp	Laser light at 405 nm
Electrodes	30-nm-thick ITO	20-nm-thick Al

Table 5.2. Relative permittivity and conductivity of water and constituents of *E. coli*, together with the latter's thicknesses.

		Relative permittivity	Conductivity (S/m)	Thickness (nm)
Water		83 ⁽¹³⁾	2.2×10^{-4}	-
<i>E. coli</i> ⁽²⁴⁾	Outer membrane	10 - 12	$0 - 10^{-4}$	5 - 10
	Periplasm	60	3.2	10
	Inner membrane	5.5	0	5 - 10
	Cytoplasm	108	0.22	1000 - 5000 (Size)

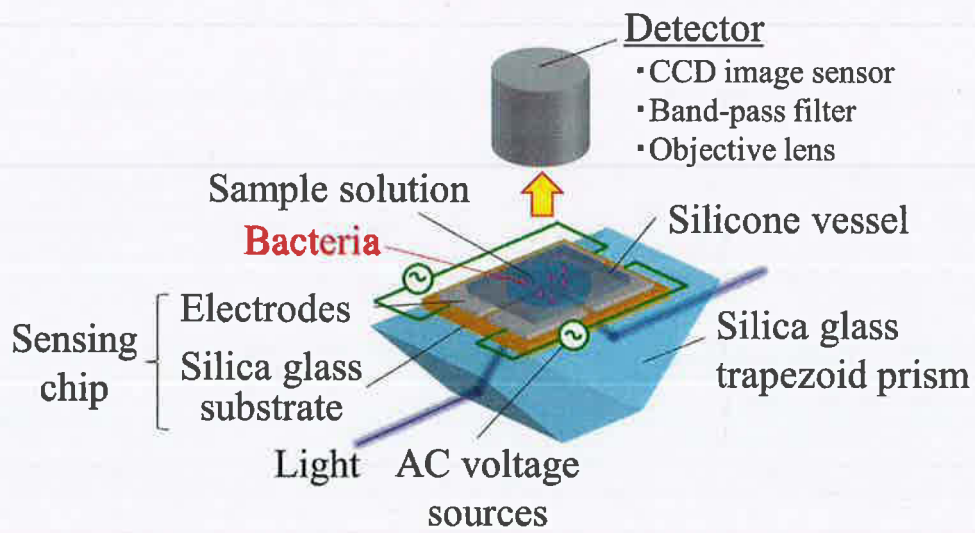


Fig. 5.1. Whole view of the DEP-assisted SPRF biosensor (not to scale).

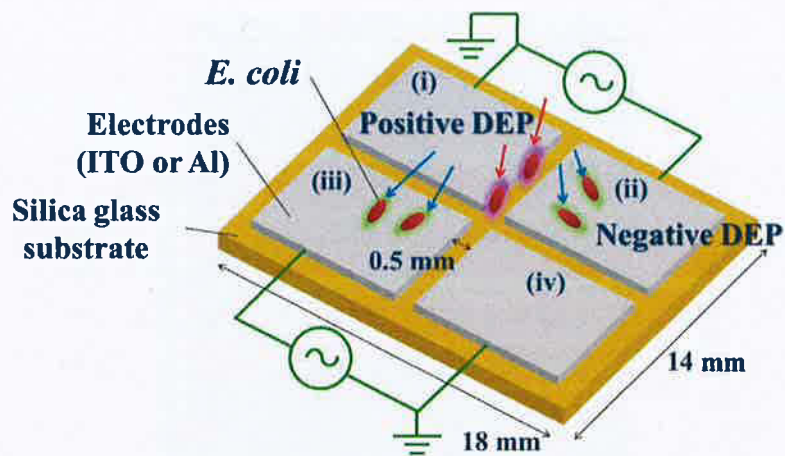


Fig. 5.2. Schematic top view of the sensing chip. To detect scattered light or fluorescence from a suspension of *E. coli* cells, two ac voltages with the peak-to-peak voltage of 20 V and the mutual phase difference of 180° were applied to two pairs of the ITO or Al electrodes so that the potential became positive maximum at electrode (ii) when it was negative maximum at electrode (iii). The red and blue arrows show the directions of forces due to positive DEP and negative DEP, respectively.

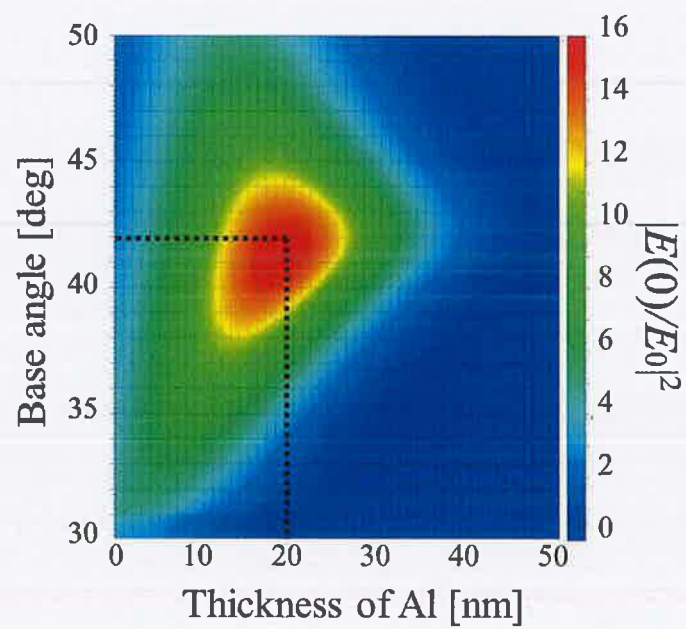


Fig. 5.3. Color diagram showing the value of $|E(0)/E_0|^2$ as a function of thickness of the Al layer and base angle of the trapezoid prism, calculated numerically. The intersection of the two broken black lines indicates the condition actually used for fabricating the biosensor.

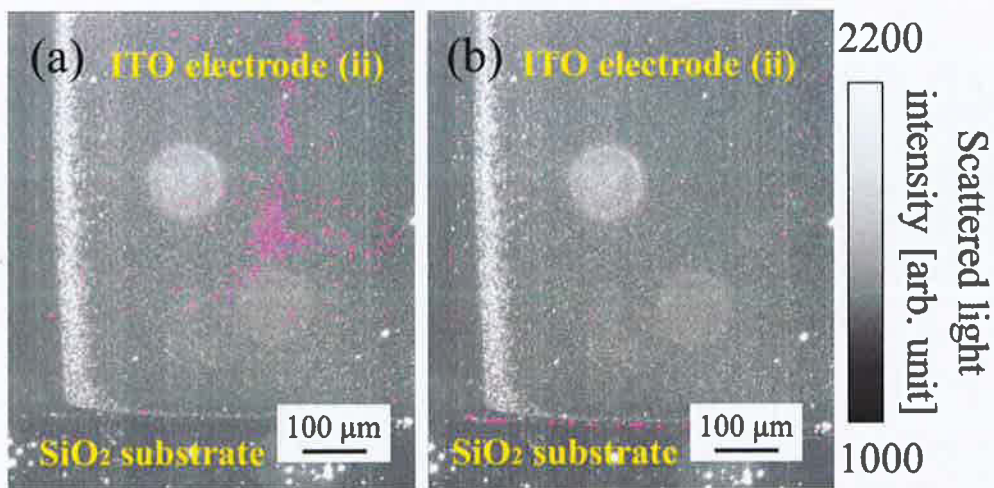


Fig. 5.4. Images of scattered light from an *E. coli* suspension. In both figures, two images taken before and after the application of ac voltages with a peak-to-peak voltage of 20 V to the ITO electrodes for 1 min were overlapped. The frequency of the voltage was 100 Hz (a) or 1 MHz (b). The exposure time to take the image was 0.5 s for (a) and (b).

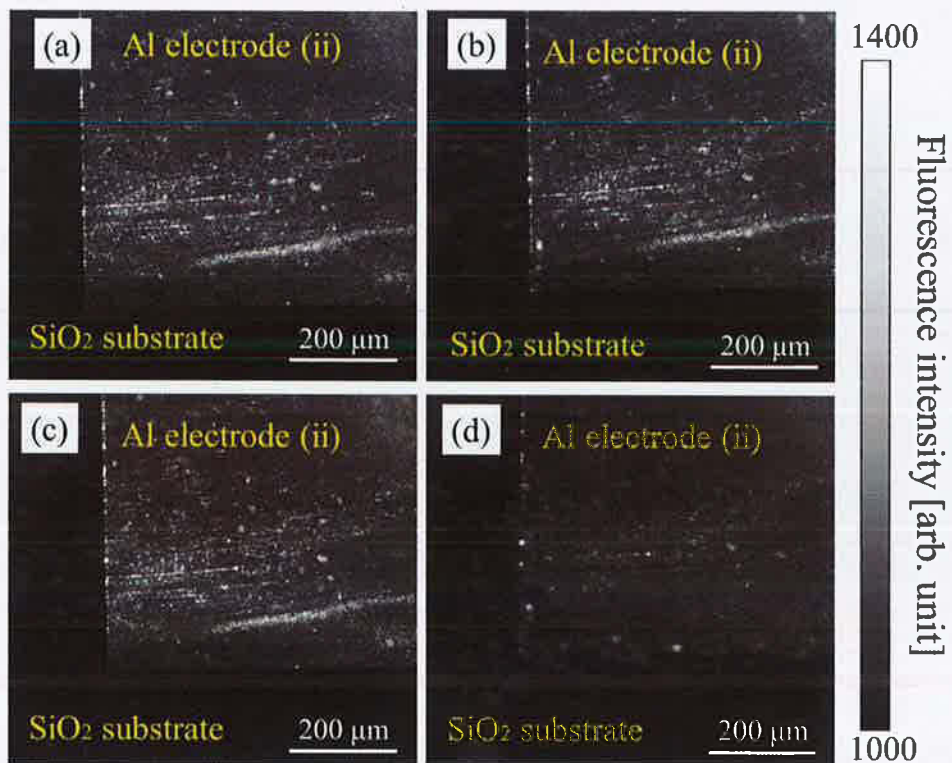


Fig. 5.5. Images of fluorescence from a DAPI-stained *E. coli* suspension, taken with an exposure time of 1 min. In (a), the image was taken before the voltage application. In (b), (c), and (d), images were taken after the application of ac voltages with a peak-to-peak voltage of 20 V to the Al electrodes for 1 min. The frequency of the voltage was 100 Hz (b), 1 kHz (c), or 1 MHz (d).

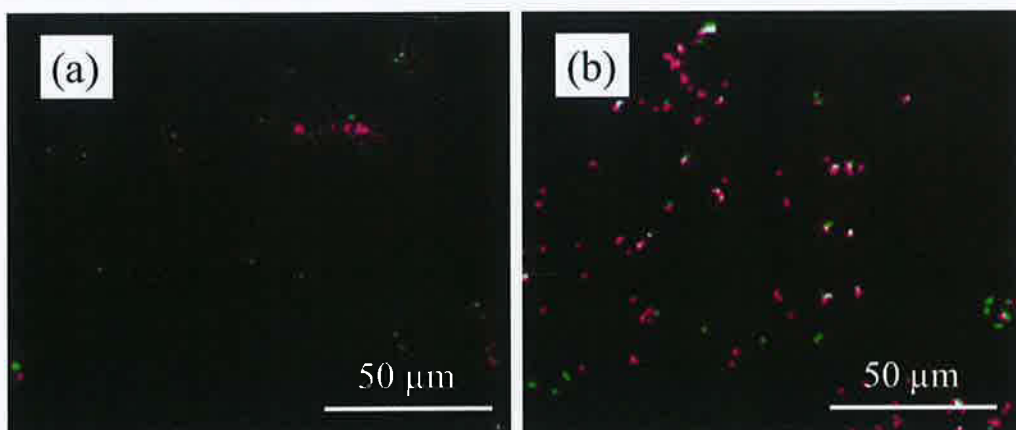


Fig. 5.6. Images of fluorescence observed on a part of the electrode surface, made by overlapping two images taken before and after the 1 min application of ac voltages with a peak-to-peak voltage of 20 V. The frequency of the voltage was 100 Hz (a) or 1 kHz (b). The magenta dots indicate that *E. coli* cells were collected by DEP. When two dots in magenta and green overlap with each other, they look white.

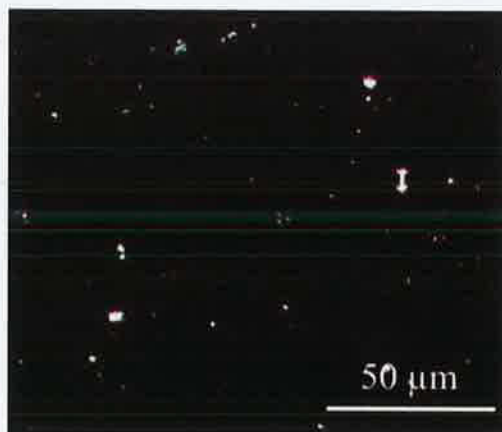


Fig. 5.7. Image of fluorescence observed on a similar part of the electrode as that observed in Fig. 5.6, made by overlapping two images taken before and after the 10 min retention without the voltage application. The white dot indicates that two dots in magenta and green overlap with each other.

第6章 誘電泳動支援近接場光センサのための導波モード共鳴・表面プラズモン共鳴同時励起チップの開発

6.1. はじめに

バイオセンサのためのセンシング技術として、表面プラズモン共鳴 (SPR) が広く報告されている⁽¹⁻³⁾。しかし、特定の生体物質のみを選択的に検出するためには、夾雑物を反応工程ごとに洗浄する必要があり、時間を要す。

短時間測定を目標に、SPRセンサの金属膜を電極として用い、誘電泳動により検出対象の生体物質を金属膜へ吸着させる、電界支援SPRセンサが開発されている^(4,5)。しかし、誘電泳動の方向は、物質と周辺溶媒の誘電率や導電率の大小関係で決まるため、特定の生体物質を選択的に検出することは難しい。そこで筆者は、第5章で述べたように、検出対象の生体物質を蛍光色素で標識することで、検出における選択性が向上できると期待し、SPRによる蛍光増強と誘電泳動を融合した、「電界支援SPR蛍光バイオセンサ」を開発した⁽⁶⁾。このセンサは、蛍光色素で標識された検出対象の生体物質を、誘電泳動によりSPR励起電極の上へ集め、これを蛍光信号の増加として観察する。しかし、SPRが励起されない電極外では、近接場光の電界は増強されないため、蛍光色素で標識された生体物質を明瞭に観察出来なかった。

検出対象物を電極上に集めたとしても、全てが集まるとは限らない。さらに、誘電泳動や電気泳動により物質の集まる場所は、電界の周波数の関数である物質の誘電率や導電率によって変わるので、周波数を変化させることで、異種の物質の選別や特定を行える可能性がある⁽⁶⁾。このため本研究では、電極上だけでなく、電極外の絶縁体上においても、効率良く近接場光の電界を増強させ、検出対象物からの蛍光信号を観察できる同時励起近接場照明チップを提案し、その構造を、転送行列法^(7,8)を用いた電界計算により最適化したうえで、実験によりチップの蛍光増強効果を実証する。

6.2. 同時励起近接場照明チップの提案と作成

6.2.1. 提案

第5章までに述べて来たように、導波モード共鳴 (WMR)⁽⁹⁻¹¹⁾とSPRは、それぞれ、透明誘電体と金属層よりなるチップの最表面と溶液など測定物質との界面に、電界が増強された近接場光を誘起可能である。特に、第4章で筆者は、石英ガラス基板上に、まず1層目としてTiO₂を、更にこの上に2層目としてSiO₂を成膜したWMRチップを作成し、紫外近接場光の電界を効率良く増強可能なことを実証してきた⁽¹²⁾。さらに、第1章と第4章で述べて来たように、SPRにおいては、Al層を用いることで、紫外近接場光の電界を効率良く増強可能なことが知られている。よって本稿では、石英ガラス基板にTiO₂層とSiO₂層を成膜し、SiO₂層の一部にAl層をさらに成膜することで、SiO₂層上でWMRが、Al層上でSPRが励起されるチップを提案する。

6.2.2. 構造最適化

電界支援近接場蛍光バイオセンサ全体の光学配置を図6.1に示す。この構造は、これまでに報告したWMR構造⁽¹²⁾と同様に、台形プリズムと石英ガラス基板を用いている。これらの屈折率は文献より、 $n_p = 1.473$, $k_p = 0.000$ ⁽¹³⁾である。また、簡単のため、チップに滴下される溶液は水とし、この屈折率は文献より、 $n_w = 1.354$, $k_w = 0.000$ ⁽¹³⁾である。WMR部のTiO₂とSiO₂、SPR部のAlとこの上に形成される自然酸化膜であるAl₂O₃の屈折率は、分光エリプソメーター (J. A. Woollam, VASE) を用いた測定で、 $n_{\text{TiO}_2} = 2.757$, $k_{\text{TiO}_2} = 0.029$, $n_{\text{SiO}_2} = 1.503$, $k_{\text{SiO}_2} = 0.000$, $n_{\text{Al}} = 3.467 \times 10^{-1}$, $k_{\text{Al}} = 4.535$, $n_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 1.790$, $k_{\text{Al}_2\text{O}_3} = 0.000$ と求まっている^(11,12)。

上記の屈折率の値を使い、WMR部の、1層目のTiO₂層と2層目のSiO₂層の膜厚を最適化する。WMRが効率良く励起されるよう、入射光はs偏光を仮定する^(9,12)。また、台形プリズムの底角 ϕ 、すなわち図6.1に示す左上の角の大きさの最適値は、WMRとSPRで異なり、WMRでは32°、SPRでは52°である⁽¹²⁾。本研究では、WMRとSPRを同時に励起するために、以下に述べる計算と実験において、 $\phi = 42^\circ$ とする。

ここで、SiO₂層と水の界面における電界を $E(\lambda)$ とする。このとき、プリズムへ入射前の入射光の電界 $E_0(\lambda)$ と、電界 $E(\lambda)$ の大きさの比である正規化二乗電界強度 $N_{\text{wm}}(\lambda) = |E(\lambda)/E_0(\lambda)|^2$ を考える⁽¹²⁾。ただし、wmとspの下付き文字は、それぞれWMRとSPRを表す。転送行列法^(7,8)を用いて、TiO₂層とSiO₂層を成膜した石英ガラス基板を $\phi = 42^\circ$ の石英ガラス台形プリズムに設置し、波長375 nmのs偏光を入射した際の、 $N_{\text{wm}}(375)$ を計算した。TiO₂層の膜厚を0 - 80 nmの範囲、SiO₂層の膜厚を100 - 350 nmの範囲で変化させた際の、 $N_{\text{wm}}(375)$ のカラーチャートを図6.2(a)に示す。TiO₂層の膜厚が約40 nm、SiO₂層の膜厚が約241 nmのときに、 $N_{\text{wm}}(375)$ は最大値42.2をとる。

つぎに、図6.2(a)より、TiO₂層の膜厚を40 nm、SiO₂層の膜厚を241 nmとしたWMR部の上に成膜する、SPR部のAl層の膜厚を最適化する。SPRを励起するため、入射光は波長375 nmのp偏光と仮定する。Al₂O₃の膜厚は、分光エリプソメーターの測定値である5 nmとする⁽¹¹⁾。上記の条件の下で、WMR部の上に形成されるSPR部の、Al₂O₃層/水界面における正規化二乗電界強度 $N_{\text{sp}}(\lambda)$ を、Al層の膜厚の関数として、転送行列法により計算した。Al層の膜厚を0 - 30 nmの範囲で変化させた際の、 $N_{\text{sp}}(375)$ を図6.2(b)に示す。Alの膜厚が約7 nmのときに、チップ最表面における $N_{\text{sp}}(375)$ は、最大値8.8をとる。

6.2.3. 作成

図6.2の計算結果に基づき、同時励起近接場照明チップを作成した。横18 mm、縦14 mm、厚さ1 mmの石英ガラス基板に、高周波 (RF) マグネトロンサイドスパッタリング装置 (芝浦メカトロニクス, CFS-4EP-L) を用いて、WMR部としてのTiO₂とSiO₂を順に成膜した。更にこの一部に、SPR部としてのAlを成膜した。

作成したチップの各層の膜厚は、以下の方法により、反射スペクトルから推測した。同時励起近接場照明チップを $\phi = 42^\circ$ の石英ガラス台形プリズム上に設置し、この上に約10 μL の純水を滴下した。つぎに、光ファイバ、コリメートレンズ、偏光板 (Sigmakoki, NSPFU-30C) を介してXeランプ (分光計器, SM-10YN) の光をプリズムに照射した。ここで、チップの基板と接触しているプリズムの底面の中央部には、入射光の射影、すなわち近接場光照明部が形成されている。まず、この近接場光照明がチップのWMR部だけに当たるよう、プリズム上でチップの位置を調節した。プリズムへ入射される光をs偏光とし、図6.1において右下の括弧内に図示した分光器 (Ocean Optics, USB4000) により、光の反射率を測定した。つぎに、近接場光照明がチップのSPR部だけに当たるようチップの位置を調整し、入射光をp偏光として同様に反射率を測定した。

反射率スペクトルの測定結果を、s偏光の近接場照明をWMR部に当てた場合を赤実線、p偏光をSPR部に当てた場合を青実線として図6.3に示す。反射率の極小値をとる波長が、WMR部、SPR部ごとに、実線で示す実測値と一致するよう、各層の膜厚を選んだ。すなわち、入射光を、WMR部ではs偏光、SPR部ではp偏光と想定し、WMR部、SPR部の反射率を、転送行列法によりそれぞれ計算した。この結果、WMR部の TiO_2 層の膜厚が31 nm、 SiO_2 層の膜厚が240 nmのとき、図6.3に赤破線で示す反射率スペクトルが得られた。また、更にこの上に、SPR部のAl層の膜厚が11 nm、 Al_2O_3 層の膜厚が5 nm堆積したと仮定したとき、青破線で示す反射率スペクトルが得られた。よって、作成した同時励起近接場照明チップの各層の膜厚は、 TiO_2 層は31 nm、 SiO_2 層は240 nm、Al層は11 nm、 Al_2O_3 層は5 nmと推測される。

上記膜厚を用いて、チップ最表面、すなわち、WMR部では SiO_2 /水界面、SPR部では Al_2O_3 /水界面における二乗電界強度 $N_{\text{wm}}(\lambda)$ 、 $N_{\text{sp}}(\lambda)$ を計算した結果を、波長 λ の関数として図6.4に示す。赤線は $N_{\text{wm}}(\lambda)$ 、青線は $N_{\text{sp}}(\lambda)$ 、実線は入射光がs偏光、破線はp偏光であることを示す。WMRは、s偏光、p偏光どちらによっても励起可能であるが、s偏光の方が効率が良い⁽⁹⁾。一方、SPRは、前述のように、p偏光のみで励起可能である。

6.3. 同時励起近接場照明チップでの蛍光強度測定

つぎに蛍光ビーズ (Polyscience, Fluoresbrite BB carboxylate microspheres) を純水で希釈した濃度 4×10^8 個/mLの蛍光ビーズ懸濁液を用いて、このチップの蛍光増強効率を評価する。このビーズは、粒径が約500 nmのポリスチレン内に蛍光色素が包含されており、紫外光により励起されると、波長約407 nmを中心とした光を発する⁽¹⁴⁾。

作成した同時励起近接場照明チップを、 $\phi = 42^\circ$ のプリズム上に設置し、蛍光ビーズ懸濁液を約5 μL 滴下し、その上にカバーガラスを被せた。蛍光測定の際は、図6.1に示すLED (Thorlabs, M375F2) の光により、WMRまたはSPRが励起され、チップ表面に電界が増強された近接場光が生じる。この近接場光により、チップ上に滴下された蛍光ビーズ懸濁液中に蛍光が励起され、チップ上に設置された、5倍の対物レンズ (ミットヨ, M

PLAN APO) と、中心波長が447 nmのバンドパスフィルタ (Edmund Optics, 84095) を経て、CCDイメージセンサ (Bitran, BU-59LIR) に到達する。図6.4に関連して述べた通り、WMRとSPRの励起効率が入射光の偏光によって異なる。よって、LEDからの光をs偏光、p偏光とした場合、さらに光学系から偏光板を除き無偏光とした場合、の3つの場合について、露光時間1分で蛍光像を取得した。

蛍光強度の測定結果を評価するためには、分光器によるLED光源の光強度 $I(\lambda)$ を知る必要がある。その測定結果を図6.5に示す。赤破線のs偏光と青一点鎖線のp偏光の強度は、黒実線で示す偏光板を除いた無偏光と比べて小さいが、全ての波長において同一である。

上述の方法で同時励起近接場照明チップにより取得した蛍光画像を図6.6に示す。(a)はs偏光、(b)はp偏光の結果である。蛍光像の上半分はSPR部、下半分はWMR部であり、光点は蛍光ビーズによるものである。本測定に使用したCCDイメージセンサでは、蛍光強度は16 bit (= 65,536)の階調で無次元量として相対的に記録される。ただし、図6.6では、ビーズによる光点が明瞭に見えるよう、蛍光強度を示す縦軸を800 - 8000に設定している。当然であるが、s偏光ではSPRは励起されない。一方、WMRは両偏光で励起されている。さらに、偏光板を取り除き取得した蛍光画像を図6.6(c)に示す。図6.6(a), (b)に示した、偏光板を挿入した場合の蛍光画像と比較し、図6.6(c)では、WMR部、SPR部の両方で、蛍光ビーズによる光点が明瞭に観察可能である。上記の結果より、作成したチップを用いてWMRとSPRを同時に励起可能なことを確認した。

6.4. 同時励起近接場照明チップの評価

画像編集ソフト (Image J) を用いて、蛍光画像中のビーズの蛍光強度の平均値を算出した。まず、各画像のWMR部、SPR部から切り取ったそれぞれ約 $220 \times 220 \mu\text{m}^2$ の領域に存在する蛍光ビーズのうち、蛍光強度が高い上位100個のビーズの蛍光強度の平均値 μ_b とこの標準偏差 σ_b を求めた。また、実際の生体物質からの蛍光を測定する際には、イメージセンサの熱ノイズやチップの自家蛍光によるバックグラウンドノイズが生じるため、溶媒である純水のみが存在する部分の蛍光強度の平均値 μ_w とこの標準偏差 σ_w を求めた。 $\mu_b - \mu_w$ を、バックグラウンドノイズが除去された、蛍光ビーズの実効的蛍光強度とし、その標準偏差を、誤差の伝搬則⁽¹⁵⁾により $\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ から求めた。

上述の手順により図6.6の蛍光画像を解析して得た結果を図6.7に示す。赤丸、赤四角、赤三角はWMR部、青丸、青四角、青三角はSPR部の $\mu_b - \mu_w$ であり、各エラーバーは標準偏差 $\sqrt{\sigma_b^2 + \sigma_w^2}$ である。偏光板を設置した場合と比較し、偏光板を取り除いた場合は、WMR部、SPR部の両方で、高い蛍光強度が得られている。これは、図6.5に示すように、偏光板を挿入しない場合、入射光のパワーが高いためである。

つぎに、偏光板を設置し、入射光をs偏光またはp偏光とした場合の結果を考える。s偏光が入射されているときの、本来s偏光では励起できないSPR部での蛍光強度 $\mu_b - \mu_w$ は、

約 1300 ± 200 である。これは、 μ_w の減算だけでは除去できなかった蛍光ビーズからの散乱光によるバックグラウンドノイズと考えられる。

これらの値の妥当性を電界計算により評価する。ここで、チップ最表面の蛍光ビーズの相対蛍光強度 F を以下の式(6.1)で定義する⁽¹²⁾。

$$F = c \int_{360}^{400} (N(\lambda)I(\lambda)\eta(\lambda))d\lambda, \quad (6.1)$$

ただし、 c は定数である。また、 $N(\lambda)$ は、図6.4に示すWMR部またはSPR部のチップ最表面における二乗電界強度である。 $I(\lambda)$ は、図6.5に示すs偏光またはp偏光の光強度を示し、本研究の計算においては、最大値をとる波長375 nmにおける無偏光の発光強度を1として正規化した値を使用した。また、使用した蛍光ビーズが発光する効率、励起光の波長 $\lambda = 360 - 400$ nmで異なる⁽¹⁴⁾。 $\eta(\lambda)$ は、蛍光ビーズ懸濁液に、光子が一個入射した時に生じる発光の、 λ における単位波長幅、つまり1 nmあたりの発光強度と定義する。本研究の計算においては、最大値での発光強度を1として正規化した、文献(14)の値を使用した。なお、WMR部とSPR部では、近接場光の染み出し長が異なる⁽¹²⁾が、本研究では、チップ最表面に存在する蛍光ビーズの蛍光強度のみを評価しているため、式(6.1)では染み出し長の影響を考慮していない。

式(6.1)の右辺の被積分関数を計算し、図6.8に λ を横軸として示す。赤線はWMR部、青線はSPR部、実線はs偏光、破線はp偏光を表す。波長間隔を1 nmとしたときの、この被積分関数の $\lambda = 360 - 400$ nmの範囲での、積分値である F を、任意単位の相対値として、図6.9の横軸に目盛る。さらに、その F の関数の形で、蛍光強度 $\mu_b - \mu_w$ を図6.9の縦軸に示す。ただし、赤丸はWMR部にs偏光を、赤四角はWMR部にp偏光を、青丸はSPR部にs偏光を、青四角はSPR部にp偏光を入射したときの値である。各エラーバーは、前述の標準偏差 $\sqrt{\sigma_s^2 + \sigma_w^2}$ である。さらに、最小二乗法により近似曲線を求め、図6.9に黒点線で示す。 $\mu_b - \mu_w$ は、 F にほぼ比例している。このことは、作成したチップのWMR部、SPR部がほぼ計算の予測通りに近接場光の電界を増強可能であることを示している。

一般に、SPRでは、励起光のエネルギーが金属膜へ移動することによる消光が生じ、蛍光強度が低下する⁽¹⁰⁾。しかし、今回使用した蛍光ビーズでは、ポリスチレン内に蛍光色素が包含されているため、消光が生じにくく、 F にほぼ比例した蛍光強度を得られたと考えられる。

以上、述べて来たように、WMR部、SPR部の両方で蛍光を同時に励起可能な同時励起近接場照明チップを開発した。今後、SPR部を電極として用い、電圧を印加し、誘電泳動により蛍光色素で標識された2種以上の生体物質を電極上と電極外に分離し、これらの同時検出を行う予定である。

6.5. 結論

誘電泳動や電気泳動により、蛍光色素で標識された2種以上の生体物質を電極間、電極上で分離し、これを蛍光信号として同時に観察することが可能な電界支援近接場蛍光バイオセンサの実現を目指し、導波モード共鳴（WMR）部と、さらにこの上に成膜された表面プラズモン共鳴（SPR）電極部から成る同時励起近接場照明チップを提案した。電界計算に基づき、チップの設計、作成を行い、蛍光ビーズ懸濁液からの蛍光強度を測定した結果、TiO₂層とSiO₂層から成るWMR部と、この上のAl層から成るSPR部において、ほぼ電界計算の予測通りの蛍光を得られることが確認された。WMR部を電極外の絶縁部、SPR部を電極として用いることで、泳動により電極上と電極間に分離して集められた、蛍光色素で染色された異種の生体物質を同時に検出することが可能になると考える。

第6章の参考文献

1. W. Knoll, "Optical characterization of organic thin films and interfaces with evanescent waves," MRS Bulletin **16**(7), 29-39 (1991).
2. J. Homola, H. B. Lu, G. G. Nenninger, J. Dostalek, and S. S. Yee, "Optical characterization of organic thin films and interfaces with evanescent waves," Sens. Actuators B **76**(1), 403-410 (2001).
3. A. Abbas, M. J. Linman, and Q. Cheng, "Patterned resonance plasmonic microarrays for high-performance SPR imaging," Anal. Chem. **83**(8), 3147-3152 (2011).
4. A. Barik, L. M. Otto, D. Yoo, J. Jose, T. W. Johnson, and S.-H. Oh, "Dielectrophoresis-enhanced plasmonic sensing with gold nanohole arrays," Nano Lett. **14**(4), 2006-2012 (2014).
5. S. Cherukulappurath, S. H. Lee, A. Campos, C. L. Haynes, and S.-H. Oh, "Rapid and sensitive in situ SERS detection using dielectrophoresis," Chem. Mater. **26**(7), 2445-2452 (2014).
6. C. Kuroda, R. Iizuka, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Development of a dielectrophoresis-assisted surface plasmon resonance fluorescence biosensor for detection of bacteria," Jpn. J. Appl. Phys. **57**(5), 057001 1-5 (2018).
7. O. Arnon and P. Baumeister, "Electric field distribution and the reduction of laser damage in multilayers," Appl. Opt. **19**(11), 1853-1855 (1980).
8. M. Born and E. Wolf, *Principles of optics. Electromagnetic theory of propagation, interference and diffraction of light*, Sixth Edition, (Cambridge University, 1997).
9. C. Kuroda, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Optimization of a waveguide-mode sensing chip for an ultraviolet near-field illumination biosensor," Opt. Express **25**(21), 26011-26019 (2017).
10. A. Ono, M. Kikawada, R. Akimoto, W. Inami, and Y. Kawata, "Fluorescence enhancement with deep-ultraviolet surface plasmon excitation," Opt. Express **21**(15), 17447-17453 (2013).
11. H. Ashiba, Y. Sugiyama, X. Wang, H. Shirato, K. H.-Moriguchi, K. Taniguchi, Y. Ohki, and M. Fujimaki, "Detection of norovirus virus-like particles using a surface plasmon resonance-assisted fluoroimmunosensor optimized for quantum dot fluorescent labels," Biosens. Bioelectron. **93**, 260-266 (2017).
12. C. Kuroda, M. Nakai, M. Fujimaki, and Y. Ohki, "Development of a TiO₂/SiO₂ waveguide-mode chip for an ultraviolet near-field fluorescence sensor," Opt. Express **26**(6), 6796-6805 (2018).
13. E. D. Palik, G. Ghosh, and T. M. Cotter, *Handbook of optical constants of solids*, (Academic, 1998).
14. Polysciences HP,

<http://www.polysciences.com/default/catalog-products/microspheres-particles/fluorescent-microspheres/carboxyl/fluoresbrite-bb-carboxylate-microspheres-050m/>, (Retrieved on Nov. 22, 2017)

15. J. E. Turner, D. J. Downing, and J. S. Bogard, *Propagation of error*, (Statistical Methods in Radiation Physics, 2012), pp. 199-214.

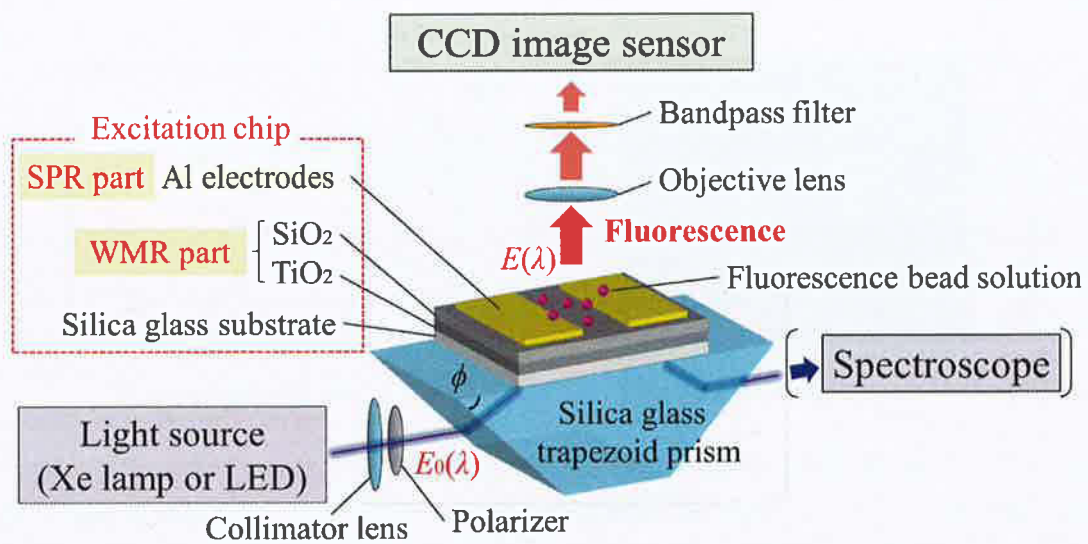


Fig. 6.1. Schematic optical arrangement of a fluorescence sensor with a chip for simultaneous excitation of WMR and SPR (not to scale). A Xe lamp and a spectroscopy are used for checking the proper thickness of each layer, while an LED and a CCD image sensor are used for observing fluorescence.

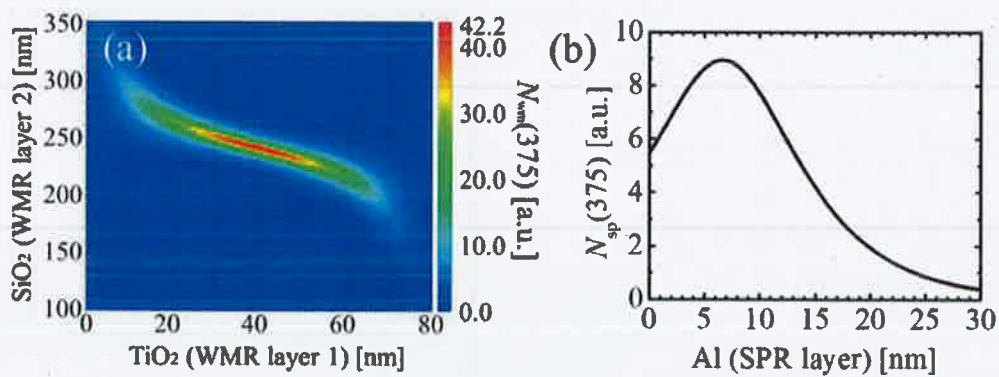


Fig. 6.2. Calculation results of normalized electric field strength squared. The base angle ϕ of the prism is set to 42° . (a) $N_{wm}(375)$, calculated for s-polarized light at the WMR part as a function of thicknesses of the lower TiO_2 layer and the upper SiO_2 layer. (b) $N_{sp}(375)$, calculated for p-polarized light at the SPR part as a function of thickness of the Al layer. The thicknesses of the TiO_2 , SiO_2 , and Al_2O_3 layers are set to be 40, 241, and 5 nm, respectively.

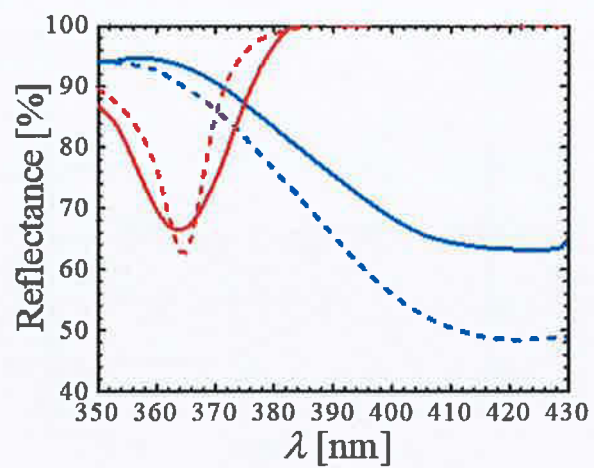


Fig. 6.3. Comparison of the reflectance spectra. Red: WMR, blue: SPR; solid: measured, broken: calculated by assuming 240-nm SiO_2 on 31-nm TiO_2 for WMR and 5-nm Al_2O_3 on 11-nm Al for SPR.

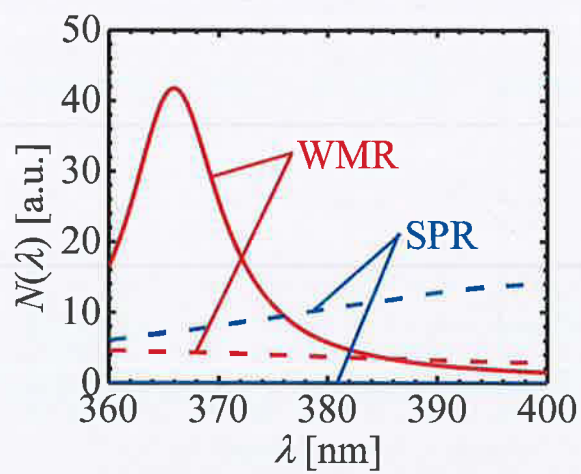


Fig. 6.4. $N_{wm}(\lambda)$ and $N_{sp}(\lambda)$ of the fabricated chip, calculated as a function of λ . Red: the WMR part, blue: the SPR part; solid: s-polarized, broken: p-polarized.

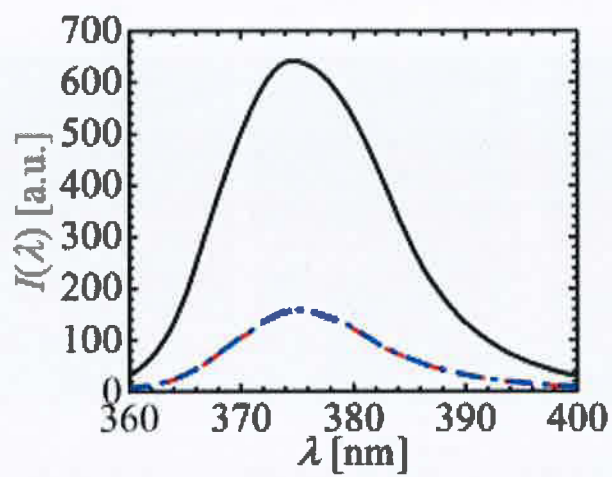


Fig. 6.5. Light intensity of the LED, measured as a function of λ . Broken red: s-polarized, dashed dotted blue: p-polarized, and solid black: non-polarized. Note that broken red and dashed dotted blue curves overlap each other.

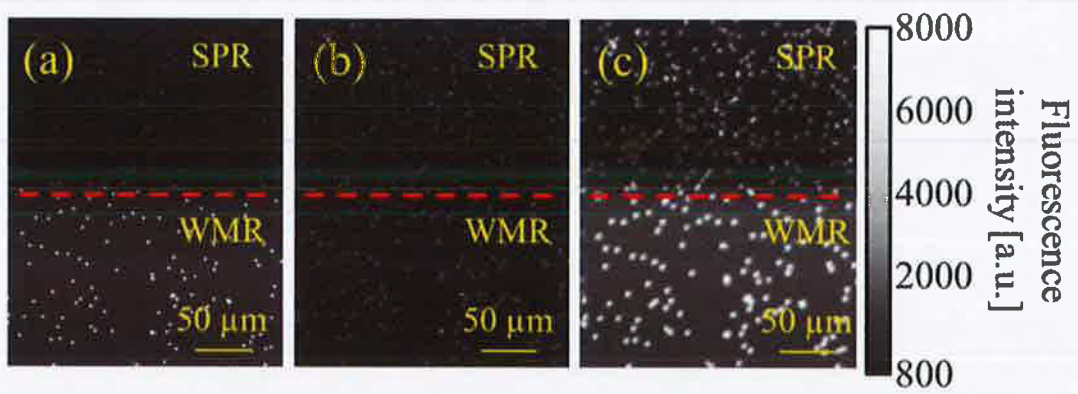


Fig. 6.6. Fluorescence images of the solution of fluorescence beads excited by s-polarized light (a), p-polarized light (b), and non-polarized light (c). The range of the ordinate, showing the fluorescence intensity, is set to make the fluorescence clear.

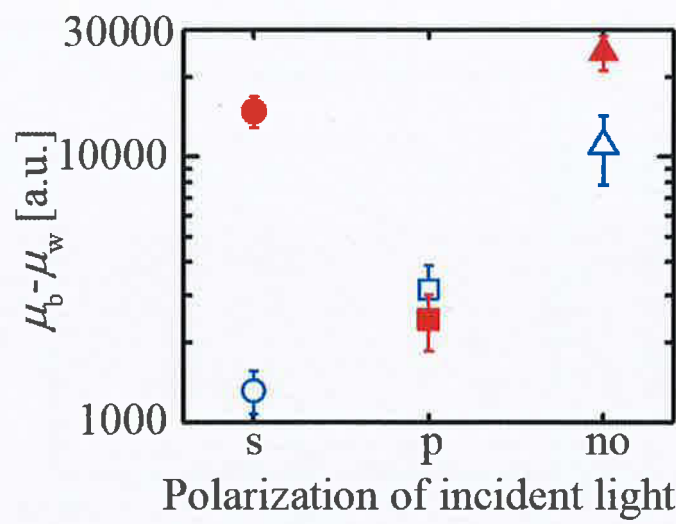


Fig. 6.7. Effective fluorescence intensities $\mu_b - \mu_w$. Red and blue symbols show the intensities in the WMR part and in the SPR part, respectively. Vertical bars show the standard deviations.

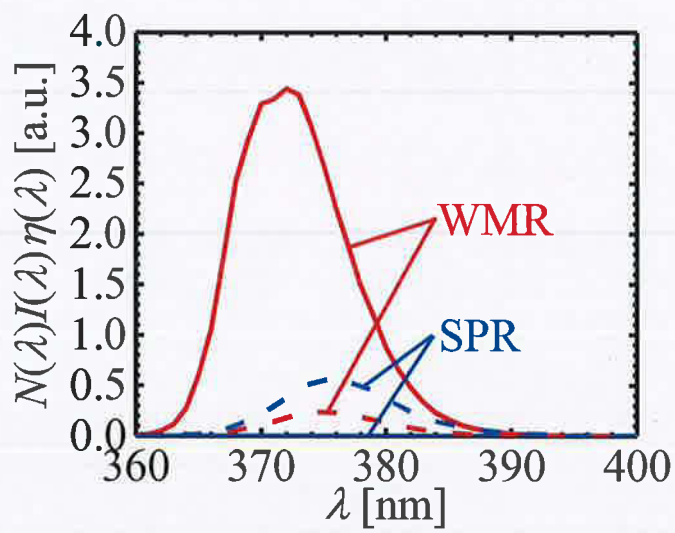


Fig. 6.8. Product $N(\lambda)I(\lambda)\eta(\lambda)$, representing the relative fluorescence intensity of the fluorescence beads, as a function of λ . Red: the WMR part, blue: the SPR part; solid: s-polarized, broken: p-polarized.

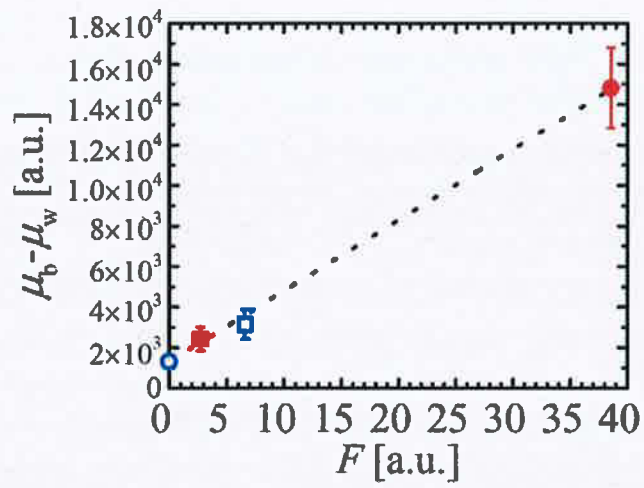


Fig. 6.9. Fluorescence intensities $\mu_b - \mu_w$ as a function of F . Red: the WMR part, blue: the SPR part; circle: s-polarized, square: p-polarized. Vertical bars show the standard deviations.

第7章 結論

学位論文の最後に、第2章 - 第6章の各章で得られた重要な知見を述べる。さらに、本研究や近接場光学の将来の展望についても述べる。

7.1. 各章で得られた知見

7.1.1. 第2章

患者の負担を軽減するため、1滴の血液から多項目を同時に検査可能な近接場光センサの実現を目指し、血球沈降孔を有したマイクロ流路を開発した。本研究では、まず、傾けた試験管内で血球の沈降が促進される現象であるボイコット効果に注目し、血液物性を考慮に入れ、ストークスの式を応用した血球沈降現象の数理モデルを構築した。このモデルに基づき、沈降孔の形状と血球沈降速度の関係を解明し、一滴の血液から迅速に血球を除去可能な、血球沈降孔の形状を理論的に計算した結果、円錐台形が最適であることを解明した。さらに、実際に血球沈降孔を作成し、血球の除去効率を評価した結果、血液約30 μL を円錐台形血球沈降孔内に2分間静置させるだけで、純度99%以上の血漿を取得可能であることを実証した。

また、円錐台形沈降孔を近接場光センサへ組み込むための血漿測定用マイクロ流路を開発し、この流路を導波モード共鳴 (WMR) センサに設置した。WMRセンサ上で、血液から血漿を分離し、分離血漿中の抗B型肝炎表面抗原抗体 (HBs抗体) を検出した。すなわち、本研究で開発した円錐台形沈降孔を有する血漿測定用マイクロ流路を用いることで、血球除去から分離血漿中HBs抗体検出までの、一連の血液検査工程を遂行可能であることが示された。

7.1.2. 第3章

紫外光励起蛍光色素である量子ドットは、ストークスシフトが大きい、発色が鮮明、褪色しにくい等の利点を有し注目を集めている。これら蛍光色素を効率的に励起する紫外近接場光蛍光センサを実現するために、WMRチップを構成する二層の誘電体層の、最適な屈折率と膜厚の関係を理論的に考察した。この結果、誘電体層の各層の境界面で反射される光の位相が揃う膜厚となるよう成膜することで、紫外近接場光の強度を高められることを予測した。

さらに、この理論的予測を、マクスウェル方程式と転送行列法を用いた電界計算により確認した。また、WMRチップの誘電体層の最表面の二乗電界強度を計算し、誘電体層として最適な材料を選定した。この結果、高屈折率かつ紫外光吸収が少ない誘電体層と、低屈折率かつ紫外光吸収が少ない誘電体層を、各層の境界面で反射される光の位相が揃う膜厚で成膜することで紫外近接場光の強度を高められることを確認した。また、石英ガラス基板に膜厚28 nmの TiO_2 層と膜厚315 nmの MgF_2 層を成膜したWMRチップに

より、波長375 nmの紫外光において、チップ最表面の光の二乗電界強度を、プリズムに入射される前の光の約387倍に増強できることを示した。この387倍という値は、既に報告されているAl薄膜の表面プラズモン共鳴（SPR）チップにおける増強効果（15.5倍）と比較し約25倍高い値である。よって本研究で最適化したWMRチップを用いることで、はるかに高効率な紫外近接場光蛍光センサを実現できることが示された。

7.1.3. 第4章

本研究では、第3章で述べた、電界計算により構造最適化を行ったWMRチップを実際に作成し、この蛍光増強効果を実証した。すなわち、石英ガラス基板の上に、TiO₂層の膜厚を一定として、SiO₂層の膜厚を変化させ堆積した、三種のWMRチップを作成した。さらに、比較の為に、Al薄膜を堆積したSPRチップを作成した。これらチップの上に、濃度1.0 nMの量子ドット添加液を約100 μ L滴下し、石英ガラスプリズムを介して、LED光源から波長360 - 400 nmの光を入射した。量子ドット添加液からの実効的実測蛍光強度を、イメージセンサを用いて測定した結果、作成したWMRチップを用いた場合、SPRチップよりも約6.5倍高い値が得られた。

この実効的実測蛍光強度と比較するために、電界計算をもとに、各チップの量子ドット懸濁液の相対蛍光強度を予測した。すなわち、各チップの近接場光の染み出し長、二乗電界強度、入射光強度、量子ドット懸濁液の発光の効率を考慮した理論式より、量子ドット懸濁液の相対蛍光強度を計算した。この結果、最適構造を有するWMRチップは、最適構造を有するSPRチップより、約5.5倍高く、量子ドット懸濁液からの蛍光強度を得られることが推定された。これらの結果により、WMRチップがSPRチップよりも、高効率に紫外近接場光の電界を増強し、量子ドットを励起可能であることを実証した。

7.1.4. 第5章

生体物質を正確かつ迅速に測定することを目標に、誘電泳動支援SPR蛍光バイオセンサを開発した。本研究で開発した検出チップでは、石英ガラス基板の上に電極が四極状に配置されている。まず、誘電泳動により電極上へ大腸菌が集まる印加周波数条件を、ITO電極を用いて検証した。すなわち、作成した検出チップ上に、大腸菌懸濁液を滴下し、180°位相のずれた、正の最大値と負の最大値の電圧差が20 Vの2つ交流電圧を、向かい合った電極にそれぞれ印加した。大腸菌からの散乱光を、イメージセンサを用いて検出した結果、周波数100 Hzの交流電圧を電極に1分間印加することで、大腸菌がITO電極上へ集まる様子が観察された。一方、周波数1 MHzの交流電圧を1分間印加することで、大腸菌が電極の端に集まる様子が観察された。

つぎに、大腸菌を非生物の夾雑物と区別して検出するため、大腸菌を青紫光で励起される蛍光色素で染色した。さらに、Al電極上で波長405 nmの光のSPRが励起されるようセンサ構造を最適化した。作成したセンサに、蛍光色素で染色された大腸菌懸濁液を滴

下し、周波数100 Hzや1 kHzの交流電圧を印加した結果、DAPI染色大腸菌が、負の誘電泳動によりAl電極上に集まることが確認された。

大腸菌懸濁液に周波数100 Hzや1 kHzといった低周波の交流電圧を印加すると、負の誘電泳動により、大腸菌は電界強度が最も低い電極上に集められると考えられる。一方、大腸菌懸濁液に周波数1 MHzといった高周波の交流電圧を印加すると、正の誘電泳動により、大腸菌は電界強度が最も高い電極の端に集められると考えられる。すなわち本センサにより、検出対象となる生体物質を、誘電泳動力により検出チップに引き寄せて検出可能なことを示した。本手法を更に発展させることで、生体物質の簡易・選択的検出技術の実現に繋がることが期待される。

7.1.5. 第6章

第5章で述べた、誘電泳動支援SPR蛍光バイオセンサの更なる発展として、誘電泳動や電気泳動により、蛍光色素で標識された2種以上の生体物質を電極間、電極上で分離し、これを蛍光信号として同時に観察することが可能な近接場照明チップを開発した。まず本研究では、電極上ではSPRを、電極外の絶縁体上ではWMRを励起することにより、異種の生体物質を電極上と電極外に分離した上で、両者からの蛍光信号を同時に観察できることを提案した。つぎに、TiO₂層とSiO₂層から成るWMR部と、この上のAl層から成るSPR部を有する同時励起近接場照明チップの各層の膜厚を電界計算により最適化した。実際にチップを作成し、チップ上に滴下された、紫外光で励起される蛍光ビーズ懸濁液の蛍光強度を評価した。この結果、ほぼ電界計算の予測通りの蛍光信号を得られることが確認された。WMR部を電極外の絶縁部、SPR部を電極として用いることで、泳動により電極上と電極間に分離して集められた、蛍光色素で染色された異種の生体物質を同時に検出することが可能になると考える。

7.2. 今後の展望

近接場光は、検出チップ表面に局在し高い電界強度を有することから、これまで述べて来たように、生体物質等の液中固体物質を高感度かつ高選択に検出出来る。この応用例としては、本学位論文で対象とした、HBs抗体や大腸菌検出以外に、遺伝子検査のためのDNA検出やサイトカイン等の極微量バイオマーカーの検出がある。既に、金属薄膜や金属ナノ粒子への蛍光色素のクエンチングを利用し、ヌクレオシドを検出した例や、金属ナノ粒子を用いてアデノシン三リン酸（ATP）を検出した例が報告されている⁽¹⁾。この他には、マイクロファイバ内で光の電界を増強させ、固体ナノ物質の屈折率や濃度を検出する技術が報告されている⁽²⁾。同様の原理を用いて、工場廃液中の重金属や気体等も検出可能である。

さらに、特定の物質を検出するだけでなく、多種類の物質を判別するためのセンシング技術が切望されている。第6章に述べた通り、筆者は、電極上ではSPRを、電極外の

絶縁体上ではWMRを励起することにより、電極上と電極外において蛍光信号を同時に観察できる、同時励起近接場照明チップを開発してきた。今後、2種以上の測定対象物質に蛍光色素を標識した後、本同時励起近接場照明チップに電圧を印加することで、泳動により電極上と電極間で2種の物質を分離した上で、これを同時に検出出来る可能性がある。

このセンシング技術の応用先として、例えば、生菌と死菌の判別が挙げられる。温泉の水質管理においては、レジオネラ菌の増殖を防ぐため消毒剤を使用しているが、全ての泉質に有効な消毒剤は、筆者の知る限り未だ無い。このため、測定試料中の生菌と死菌を判別し、生菌数が基準値以下であること保障する必要がある⁽³⁾。しかし現状では、試料中の菌を培養する必要があるため、2日以上検査時間を要する。環境衛生を迅速に評価するためには、生菌、死菌を迅速に判定する技術が必要である。ここで、生菌は死菌よりも細胞膜抵抗が高く、導電率は低いことが既に報告されている⁽⁴⁾。すなわち、誘電泳動により、生菌を電界の低い電極上、死菌を電界の高い電極間に集められる可能性がある。

さらに、第5章で述べたように、筆者が開発してきた誘電泳動支援SPR蛍光バイオセンサに必要な検出時間は、電圧印加の為の約1分間と、電圧印加前後に蛍光像を取得する為の約2分間の、計3分間のみである。すなわち、培養を必要としていた従来の検出技術よりも非常に短時間のうちに、細菌の生死判定を行うことが出来ると考える。このように、近接場光技術を応用することで、測定試料中の多種類の物質を特定可能なセンシング技術を実現できる可能性がある。

ただし、現段階において、WMRチップを用いた大腸菌の検出は実現出来ていない。これは、大腸菌のサイズが約1 μm と大きく、大腸菌自体が導波路と同等な作用を示し、共鳴条件が大きく変わるためと考えている。これを踏まえると、今後、WMR・SPR同時励起近接場照明チップを用いて生菌と死菌の判別を実現するためには、細菌自体の屈折率も考慮に入れて、検出チップ各層の材料や膜厚を設計する必要があると考える。

さらに、多種類の物質判別のための近接場光センサを実現するためには、検出技術だけでなく、微量流体を装置へ導入し廃液する、送液技術も必須である。第2章に述べた通り、筆者はマイクロ流路の開発にも従事してきた。今後は、微量液体試料を近接場照明チップへ導入し、測定を行った後、試料を装置外へ廃液する、といった一連の検査工程を遂行する必要があると考える。

最後に、近接場光はセンシング技術以外にも、幅広い分野へ応用可能である。例えば、近接場光の電界増強効果を応用した太陽電池が報告されている⁽⁵⁾。有機太陽電池においてSPRを励起させると、SPR励起層内で電界が増強され、光電変換の効率が大幅に向上することが知られている。さらに、近接場光はホログラムの読み出しにも応用可能である⁽⁶⁾。SPRを用いると、この電界増強効果により、ホログラムの微小な屈折率差を増強

し、明るい再生像を得られる。また、近接場光を応用した光触媒⁽⁷⁾等の応用例も報告されている。

近接場光を利用したこれら技術の多くは、まだ基礎研究段階にあるが、近い将来、実用化される可能性がある。近接場光に関する研究がより一層進展することで、社会の問題解決に繋がる技術が発明されると確信する。

第7章の参考文献

1. M. Li, S. K. Cushing, and N. Wu, "Plasmon-enhanced optical sensors: a review," *Analyst* **140**(2), 386-406 (2015).
2. H. Li and R. Bashir, "Dielectrophoretic separation and manipulation of live and heat-treated cells of *Listeria* on microfabricated devices with interdigitated electrodes," *Sens. Actuators B* **86**(2-3), 215-221 (2002).
3. 黒川忠, "仙台市及びその近郊の温泉水のレジオネラ菌汚染状況調査," *東北大医短部紀要* **7**(1), 11-20 (1998) [in Japanese].
4. J. Lou, Y. Wang, and L. Tong, "Microfiber optical sensors: A review," *Sensors* **14**(4), 5823-5844 (2014).
5. 立間徹, "金属ナノ粒子のプラズモン共鳴に基づく光電気化学反応," *Electrochemistry* **79**(2), 98-103 (2011) [in Japanese].
6. 河田聡, "表面プラズモン共鳴現象を用いた光センサ," *計測と制御* **36**(4), 275-281 (1997) [in Japanese].
7. J. Zhang, X. Jin, P. I. Morales-Guzman, X. Yu, H. Liu, H. Zhang, L. Razzari, and J. P. Claverie, "Engineering the absorption and field enhancement properties of Au-TiO₂ nanohybrids via whispering gallery mode resonances for photocatalytic water splitting," *ACS nano* **10**(4), 4496-4503 (2016).

謝辞

本論文は、筆者が早稲田大学大学院先進理工学研究科電気・情報生命専攻博士後期課程に在籍中の研究成果をまとめたものです。

まず、大木義路教授に、学位論文を作成するにあたって沢山のご指導を頂きましたことを、心から感謝致します。大木教授には、産総研へ通うための交通費や研究費等を支援していただき、恵まれた環境で研究できたことも厚く御礼申し上げます。この学位論文に対して貴重なご意見をくださった、大木研究室の平井直志博士にも感謝致します。さらに、本学位論文の副査である、早稲田大学の武田京三郎教授、宗田孝之教授、牧本俊樹教授、小林正和教授、柳谷隆彦准教授にも、貴重なご意見を頂きましたことを、心より感謝致します。

また、近接場光学やバイオセンサ技術をご指導くださった、特定国立研究開発法人産業技術総合研究所の藤巻真博士に深く御礼申し上げます。度々のディスカッションや、実験指導のお時間を頂き、研究に関する深い知識を得ることが出来ました。また、産総研の粟津浩一博士、芦葉裕樹博士、日本大学医学部の槇島誠博士、産総研の技術スタッフの方々にも、貴重なアドバイスと討論を頂きましたことを、御礼申し上げます。

さらに、私と一緒に研究に取り組んでくれた研究室の先輩や後輩に感謝します。杉山勇樹、白水秀幸、飯塚亮太、中井翠らが本論文に記載した実験を支援してくれました。最後に、いつも支えてくださる両親や友人に深く感謝致します。

本論文に関する研究業績

【論文】

- 1. Chiaki Kuroda, Ryota Iizuka, Yoshimichi Ohki, and Makoto Fujimaki, "Development of a dielectrophoresis-assisted surface plasmon resonance fluorescence biosensor for detection of bacteria," *Jpn. J. Appl. Phys.* **57**(5), pp. 057001 1-5, 2018.3.27.
- 2. Chiaki Kuroda, Midori Nakai, Makoto Fujimaki, and Yoshimichi Ohki, "Development of a TiO₂/SiO₂ waveguide-mode chip for an ultraviolet near-field fluorescence sensor," *Opt. Express* **26**(6), pp. 6796-6805, 2018.3.6.
- 3. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, and Makoto Fujimaki, "Optimization of a waveguide-mode sensing chip for an ultraviolet near-field illumination biosensor," *Opt. Express* **25**(21), pp. 26011-26019, 2017.10.11.
- 4. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, Hiroki Ashiba, Makoto Fujimaki, Koichi Awazu, and Makoto Makishima, "Design of a sedimentation hole in a microfluidic channel to remove blood cells from diluted whole blood," *Jpn. J. Appl. Phys.* **56**(3), pp. 037201 1-6, 2017.2.13.
5. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 田中寅彦, 槇島誠, "ポータブル血液検査装置のための血漿分離システムの開発," *電気学会論文誌E* **135**(5), pp. 152-157, 2015.5.1.

【総説】

1. 大谷昭仁, 仲嶋一, 佐伯勝敏, 飴谷充隆, 黒田千愛, "計測技術における研究開発の動向と最前線," *電気学会論文誌A* **138**(1), pp. 16-21, 2018.1.1.

【講演】

国際会議

1. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, and Makoto Fujimaki, "Dielectrophoresis-assisted SPR illumination biosensor for selective detection of biological substances," 2017 IEEE CEIDP, 4A-3 034, pp. 253-256, Fort Worth TX, US, 2017.10.23.
2. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, and Makoto Fujimaki, "Development of an electro-assisted near-field illumination sensor for quick and selective detection of bacteria," 5th International Conference on Bio-Sensing Technology, P114, Riva del Garda, Italy, 2017.5.9.
3. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, Hiroki Ashiba, Makoto Fujimaki, Koichi Awazu, Takenori Shimizu, Torahiko Tanaka, and Makoto Makishima, "Development of a microfluidic sedimentation system for separation of plasma utilizing the Boycott effect," Biosensors 2016, O52, Gothenburg, Sweden, 2016.5.26.
4. Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, Hiroki Ashiba, Makoto Fujimaki, Koichi Awazu, Torahiko Tanaka, and Makoto Makishima, "Microfluidic sedimentation system for separation of plasma from whole blood," IEEE Sensors 2014, C3P-J 1077, pp. 1854-1857, Valencia, Spain, 2014.11.5.

国内会議

1. 黒田千愛, 飯塚亮太, 中井翠, 大木義路, 藤巻真, "導波モード共鳴・表面プラズモン共鳴同時励起検出板における蛍光強度の評価," 第65回応用物理学会春季学術講演会, 18a-A402-5, 東京都, 早稲田大学西早稲田キャンパス, 2018.3.18.

2. 黒田千愛, 飯塚亮太, 中井翠, 大木義路, 藤巻真, “導波モード共鳴・表面プラズモン共鳴同時励起可能な近接場照明チップの開発,” 電気学会計測光応用・視覚合同研究会, LAV-18-001, IM-18-001, 沖縄県, 青年会館, 2018.2.22.
3. 飯塚亮太, 黒田千愛, 大木義路, 藤巻真, “電界支援SPR照明バイオセンサのための大腸菌の誘電泳動に及ぼす電圧周波数の影響,” 2017年度放電学会年次大会, C-3-4, 沖縄県, 琉球大学, 2017.11.25.
4. 中井翠, 黒田千愛, 大木義路, 藤巻真, “紫外近接場光照明利用センサのためのスパッタリング法によるTiO₂/SiO₂導波モード励起用チップの作製,” 平成29年電気学会基礎・材料・共通部門大会, 20-C-a1-2, 北海道, 室蘭工業大学, 2017.9.20.
5. 黒田千愛, 中井翠, 飯塚亮太, 大木義路, 藤巻真, “紫外近接場光照明センサのための誘電体層センサチップの構造最適化,” 平成29年電気学会基礎・材料・共通部門大会, 20-C-a1-1, 北海道, 室蘭工業大学, 2017.9.20.
6. 黒田千愛, 飯塚亮太, 中井翠, 大木義路, 藤巻真, “電界支援近接場照明バイオセンサのための導波モード・SPR同時励起検出板の開発,” 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 6p-A502-6, 福岡県, 福岡国際会議場, 2017.9.6.
7. 黒田千愛, 大木義路, 藤巻真, “高感度紫外近接場光照明利用センサのためのTiO₂/SiO₂導波モード検出板の開発,” 電気学会計測光応用・視覚合同研究会, IM-17-003, LAV-17-003, pp. 13-19, 兵庫県, 瑞宝園, 2017.2.16.
8. 黒田千愛, 大木義路, 藤巻真, “蛍光標識物質検出用紫外近接場光照明導波モード基板の構造最適化,” 2016年度放電学会年次大会, 4-4, pp. 43-47, 神奈川県, 東京都市大横浜キャンパス, 2016.11.26.
9. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 田中寅彦, 槇島誠, “血漿分離のための血球沈降孔の形状最適化,” 第63回応用物理学会春季学術講演会, 20p-P12-19, 東京都, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2016.3.20.
10. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 清水武則, 田中寅彦, 槇島誠, “ポータブル血液検査装置を実現する導波モードセンサのためのマイクロ流路の開発,” 電気学会計測光応用・視覚合同研究会, IM-16-002, LAV-16-002, pp. 5-10, 島根県, 松江テルサ, 2016.2.18.
11. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 田中寅彦, 槇島誠, “ポータブル血液検査装置のためのマイクロ流路を用いた血漿分離・導入システムの開発,” 日本分析化学会第64年会, I2007, 福岡県, 九州大学伊都キャンパス, 2015.9.10.
12. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 田中寅彦, 槇島誠, “水平円筒流路を用いた血漿分離システムの開発,” 第62回応用物理学会春季学術講演会, 13p-D5-3, 神奈川県, 東海大学湘南キャンパス, 2015.3.13.
13. 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 藤巻真, 栗津浩一, 田中寅彦, 槇島誠, “ポータブル血液検査装置のための血漿分離システムの開発,” 電気学会センサ・マイクロマシン総合研究会, BMS-14-25, pp. 79-84, 東京都, 東京大学生産技術研究所, 2014.5.28.

【その他】

特許

1. 黒田千愛, 藤巻真, 中井翠, 飯塚亮太, 特願2017-001403「目的物質検出チップ、目的物質検出装置及び目的物質検出方法」, 2017.8.17.
2. 芦葉裕樹, 栗津浩一, 藤巻真, 黒田千愛, 槇島誠, 特願2015-237443「血漿分離装置及び血漿分離方法」, 2015.12.4.

論文

1. Takayuki Shima, Hideyuki Shiramizu, Makoto Fujimaki, Chiaki Kuroda, and Yoshimichi Ohki, "Fluorescence imaging of *Escherichia coli* on a rotating optical disk," Jpn. J. Appl. Phys. (to be published).
2. Hideyuki Shiramizu, Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, Takayuki Shima, Xiaomin Wang, and Makoto Fujimaki, "Selective detection of *Escherichia coli* by imaging of the light intensity transmitted through an optical disk," Appl. Phys. Express **11**, 037001 1-4, 2018.1.29.

講演

国際会議

1. Hideyuki Shiramizu, Chiaki Kuroda, Yoshimichi Ohki, Takayuki Shima, Xiaomin Wang, and Makoto Fujimaki, "Selective detection of *Escherichia coli* by imaging light intensity transmitted through an optical disk," International Symposium on Imaging, Sensing, and Optical Memory 2017, Tu-J-40, Kunibiki Messe, Matsue, Shimane, 2017.10.24.
2. Koichi Awazu, Makoto Fujimaki, Hiroki Ashiba, Chiaki Kuroda, Mengying Fu, Yoshimichi Ohki, Torahiko Tanaka, and Makoto Makishima, "Microsystem of blood plasma separation for blood typing test," 2014 MRS, Spring Meeting, V1-03, San Francisco, America, 2014.4.22.

国内会議

1. 白水秀幸, 黒田千愛, 大木義路, 島隆之, 王晓民, 藤巻真, "蛍光検出器を備えた光ディスク装置による大腸菌の検出," 第78回応用物理学会秋季学術講演会, 5p-A401-8, 福岡県, 福岡国際会議場, 2017.9.5.
2. 白水秀幸, 黒田千愛, 大木義路, 島隆之, 王晓民, 藤巻真, "透過光像取得型光ディスク装置を用いた大腸菌の選択検出," 電気学会計測光応用・視覚合同研究会, IM-17-005, LAV-17-005, pp. 27-31, 兵庫県, 瑞宝園, 2017.2.16.
3. 白水秀幸, 黒田千愛, 大木義路, 島隆之, 王晓民, 藤巻真, "透過光検出器を備えた光ディスク装置による大腸菌の検出," 第77回応用物理学会秋季学術講演会, 14a-D63-9, 新潟県, 朱鷺メッセ, 2016.9.14.
4. 大木義路, 黒田千愛, 藤巻真, 栗津浩一, "産総研・早大大木研究室における導波モードセンサの開発," 電気学会計測光応用・視覚合同研究会, IM-16-011, LAV-16-011, pp. 57-62, 島根県, 松江テルサ, 2016.2.19.
5. 杉山勇輝, 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 王晓民, 藤巻真, "ノロウイルスのウイルス様粒子のV溝バイオセンサーによる検出," 2015年度放電学会年次大会, C-1-3, 神奈川県, 防衛大学校, 2015.12.5.
6. 杉山勇輝, 黒田千愛, 大木義路, 芦葉裕樹, 王晓民, 藤巻真, "V溝バイオセンサーを用いたノロウイルス様粒子の検出," 第76回応用物理学会秋季学術講演会, 15p-2B-10, 愛知県, 名古屋国際会議場, 2014.9.15.

表彰

1. 2017 IEEE DEIS Japan Chapter Student Best Paper Presentation Award (2018年3月15日)
2. 平成28年 電気学会 基礎・材料・共通部門表彰 優秀論文発表 (2017年9月19日)
3. 2016年度 放電学会年次大会優秀論文発表賞 (2016年11月26日)
4. 平成25年度 電気学会 電気学術女性活動奨励賞 (2014年3月31日)