

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：13401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K13783

研究課題名(和文) 高分子ナノ構造・一分子解析のための超解像ラマン顕微分光システムの開発

研究課題名(英文) Develop of super resolution Raman microscope for the analyses of polymer nano structure toward single molecule

研究代表者

前田 寧 (Maeda, Yasushi)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：60242484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子構造や分子間相互作用に敏感なラマン分光法に、レーザ照射により金や銀などの金属の表面近傍のナノ空間に発生する局在プラズモン場による励起を組み合わせることで、回折限界を超える空間分解能と単一分子でのスペクトル測定も可能にする超解像ラマン顕微分光システムの開発を行った。また、ピエゾステージやガルバノミラーによる走査に比べて高速でイメージの取得が可能なニポウディスク方式共焦点レーザスキャナを用いた共焦点ラマン顕微鏡を試作した。バンドパスフィルターにより特定の波長のラマン散乱を選択透過させて冷却CCDカメラで検出することによりラマン散乱光像を直接観察した。

研究成果の概要(英文)：Super resolution Raman microscopes have been developed by combining Raman spectroscopy, which provides valuable information concerning molecular structure and interaction, with localized plasmon around the surface of Au and Ag, which enhances Raman scattering to a larger degree at the near field, to realize a high spatial resolution beyond diffraction limit and a high sensitivity toward single molecule measurements. A confocal Raman microscope with a spinning disk confocal laser scanner has also been developed, which realize a higher scanning rate than a piezo stage and a galvanometer mirror. Optical images based on Raman scattering can be directly observed with cooled CCD camera by selecting appropriate Raman bands with band pass filters.

研究分野：高分子物理化学

キーワード：高分子構造・物性 顕微分光 ナノ材料 分子分光 一分子計測

1. 研究開始当初の背景

試料の微細なイメージを得る種々の方法のなかで、光学顕微鏡法は可視光という低エネルギーの光子を用いるため試料に優しく、しかも大気中や液中でも観察が行えるという簡便さがある。しかし、光をその波長の半分程度より小さい空間にレンズを使って集めることができない(回折限界)ため、数百 nm が光学顕微鏡の解像度の限界であり、サブミクロンの構造までしか観察することができなかった。同様に顕微ラマン分光法などの分光分析の空間分解能も回折限界に制限されてきた。近年、微小な開口部を有する光ファイバーからの近接場光で蛍光を励起する方法や単一分子からの蛍光を測定する方法を用いてこの壁を破る解像度を持つ光学顕微鏡が実現された。それにやや遅れて、走査プローブ顕微鏡(SPM)の探針先端の局在プラズモンによるラマン散乱の増強を利用する探針増強ラマン分光法が開発され、ラマン散乱光を使ったナノメートルレベルのイメージングが可能になった。しかし、装置や測定法はまだ発展途上にある。ラマン分光法は、ほとんどすべての有機・無機化合物を「そのまま」の状態での測定対象にでき、分子構造や分子間相互作用などに関する豊富な情報を与えるため、非常に高い可能性を秘めていると言える。そこで、高分子化学における種々の未解決問題に答えるために探針増強法をさらに発展させる本研究を提案する。

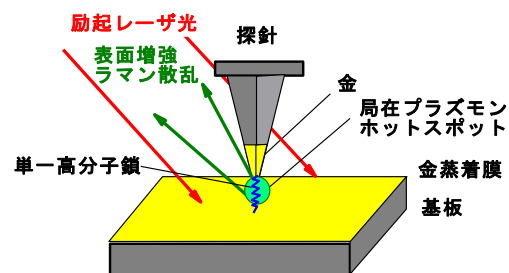
2. 研究の目的

本研究では、分子構造や分子間相互作用の変化に敏感で高速反応の解析にも適するラマン分光法に、レーザー照射により金や銀などの金属の表面近傍のナノ空間に発生する局在プラズモン、特に金属の微小なギャップに生じるホットスポットと呼ばれる強力なプラズモン場による励起を組み合わせることで、回折限界を超える空間分解能と単一分子でのスペクトル測定も可能にする散乱強度の増大を実現する。そして、①ナノ空間での組成分布の解析(イメージング)、②単一分子の反応過程における分子構造・分子間相互作用の変化の追跡、③ナノ空間での反応過程の追跡、を行うことができる超解像ラマン顕微分光システムを開発し、それを高分子ナノ構造の解析に応用する。

3. 研究の方法

金属探針の先端に生じる局在プラズモンによるラマン散乱の増強効果と近接場効果を利用する探針増強ラマン分光法を使ってナノメートルレベルの空間分解能での構造解析や組成分布イメージングを行う。局在プラズモンの電場をさらに強くして単位時間、

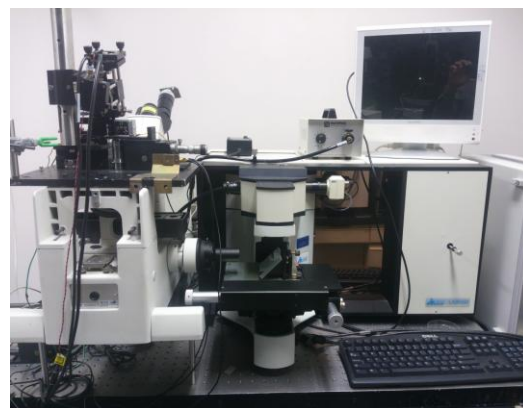
単位分子あたりの散乱強度を上げるために、金蒸着膜に試料を吸着させて探針先端の金と金蒸着膜のギャップに生じる強力な局在プラズモン場(ホットスポット)でラマン散乱を励起する。



4. 研究成果

(1) 裏面照射型超解像ラマン顕微分光システムの開発

ラマン分光光度計(堀場JY)と倒立型顕微鏡(ニコン)、原子間力顕微鏡(AFM、ソーラボ)を組み合わせ試作した。倒立型顕微鏡の試料台上にAFMを設置して、試料の光学顕微鏡像とAFM像の観察が可能である。AFM像を測定した後に、試料のねらった位置へ探針を移動させて超解像ラマンスペクトルを測定した。励起He-Neレーザー光(633 nm)は試料の下側から100倍の対物レンズを通して照射して、後方に散乱されたラマン散乱光を同じ対物レンズで集光して分光器に導いた。



(2) 正倒立型超解像ラマン顕微分光システムの開発

正立型顕微鏡(オリンパス)と倒立型顕微鏡(ライカ)を同軸で組み合わせ、試料に対して透過配置と反射配置の両方で顕微鏡像の観察とラマンスペクトルの測定が可能である。励起光としてDPSSレーザー(532nm)を用い、スペクトルは冷却CCD検出器(プリンストンインスツルメンツ)で検出した。試料の位置はピエゾステージで制御しており、ナノメートルの精度でラマンスペクトルのマッピング測定が可能である。また、バンドパスフィルターを通して特定の波長

のラマン散乱を選択的にすることで、冷却CCDカメラ（浜松ホトニクス）でラマン散乱光像を直接観察できるようにした。試料として導電性試料を用いる場合には金または銀蒸着ガラスまたはITOガラス上にのせ、探針と試料の接触を電氣的に検知した。



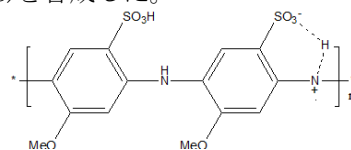
(3) ニポウディスク方式共焦点ラマン顕微鏡の開発

ピエゾステージやガルバノミラーの使用によるシングルビーム方式の共焦点顕微鏡と比べて高速でイメージの取得が可能なニポウディスク方式共焦点レーザスキャナを用いた共焦点ラマン顕微鏡を試作した。共焦点レーザスキャナを正立型顕微鏡（ライカ）のカメラポートに取り付け、光ファイバーを通して励起レーザ光（405、457、513 nm）を導入し、コリメータレンズで平行光線にしてから高速回転するピンホールアレイディスクとマイクロレンズアレイディスクを通過させることで、同時に約1000本のレーザビームを走査した。試料から散乱されたラマン光を同じ対物レンズで集光し、励起光を除去した後、バンドパスフィルターにより特定の波長のラマン散乱を選択透過させて冷却CCDカメラ（浜松ホトニクス）で検出することによりラマン散乱光像を直接観察した。対物レンズを通してレーザ光束を試料上で高速スキャンすることで、ステージを走査する方式と比較して高速なイメージングが可能である。

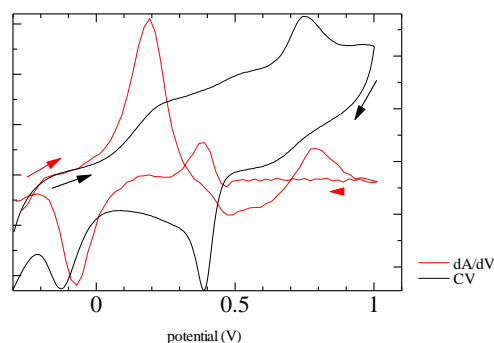


(4) poly(2-methoxyaniline-5-sulfonic acid)の解析

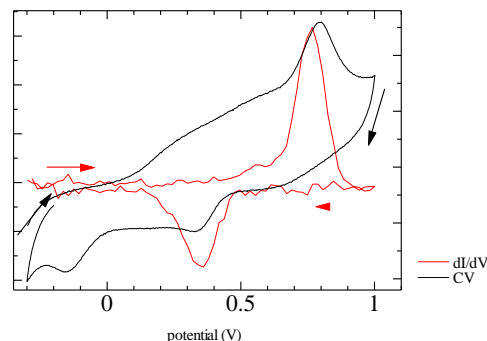
水溶性で導電性があり酸化還元も起こす poly(2-methoxyaniline-5-sulfonic acid) (PMAS) を合成した。



分光電気化学測定で電極電位を掃引して紫外可視吸収スペクトルおよびラマンスペクトルを測定し、ロイコエメラルジン(LE)からエメラルジン(ES)、ペルニグラニン(PE)へ酸化されることを確認した。

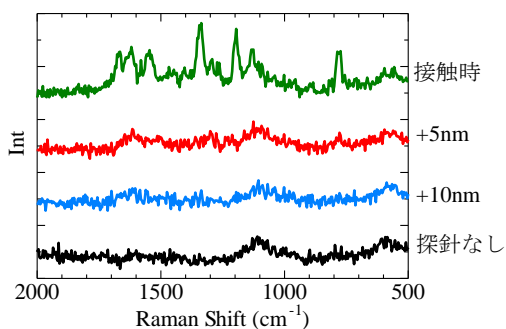


Voltammogram for current (black) and absorption at 475 nm (red).



Voltammogram for current (black) and intensity of Raman scattering at 1517cm⁻¹ (red).

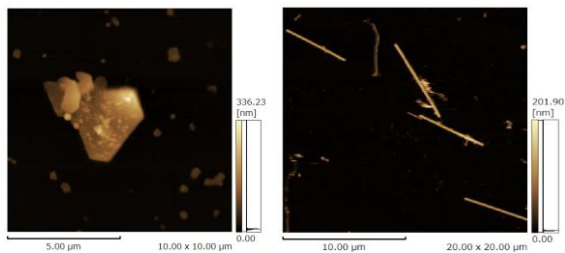
ITOガラス上に作成したPMAS薄膜のTERS測定を正倒立型超解像ラマン顕微分光システムと電解研磨で作成した銀探針で用いて行った。探針がない状態では、PMASのスペクトルを確認することができないが、探針接触時には良好なスペクトルが観測され、5 nmの退避でほとんど強度が急激に下がっており垂直方向での高い空間分解能が確認された。



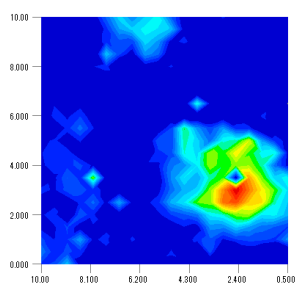
TERS spectra of PMAS film measured with Ag probe.

(5) 金・銀ナノ構造上のチオール単分子膜の解析

金や銀のマイクロプレートやナノワイヤを合成して、その上に 1-octadecanethiol やベンゼンチオールの自己組織化単分子膜 (SAM) を形成させてラマンスペクトルのマッピング測定を行い、C-H 伸縮ラマンバンドでケミカルイメージングを行った。



AFM image of Ag microplate (left) and nanowire (right).



Raman chemical mapping image of octadecanethiol SAM on Ag microplate.

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

① 振動分光法で見る高分子の構造”, 前田 寧, 繊維学会誌, 72, P-213 (2016). 査読無, doi: 10.2115/fiber.72.P-213

② Metal-Free RAFT Cationic Polymerization of *p*-Methoxystyrene with HCl·Et₂O Using a Xanthate-Type RAFT Cationogen, Shinji

Sugihara, Seiya Okubo, Yasushi Maeda, *Polym. Chem.*, 7, 6854-6863 (2016). 査読有
doi: 10.1039/C6PY01684G

③ Direct Radical Polymerization of Vinyl Ethers: Reversible Addition–Fragmentation Chain Transfer Polymerization of Hydroxy-Functional Vinyl Ethers, Shinji Sugihara, Yuki Kawamoto, Yasushi Maeda *Macromolecules*, 2016, 49 (5), 1563–1574, 査読有
DOI: 10.1021/acs.macromol.6b00145

④ In situ nano-objects via RAFT aqueous dispersion polymerization of 2-methoxyethyl acrylate using poly(ethylene oxide) macromolecular chain transfer agent as steric stabilizer, Sugihara, Shinji; Ma'Radzi, Akmal Hadi; Ida, Shota; Irie, Satoshi; Kikukawa, Takamaru; Maeda, Yasushi *Polymer*, 2015, 76, 17-24, 査読有
DOI:10.1016/j.polymer.2015.08.051

⑤ HCl·Et₂O-Catalyzed Metal-Free RAFT Cationic Polymerization: One-Pot Transformation from Metal-Free Living Cationic Polymerization to RAFT Radical Polymerization, Sugihara, Shinji; Konegawa, Naoto; Maeda, Yasushi *Macromolecules*, 2015, 48 (15), 5120-5131, 査読有, DOI:10.1021/acs.macromol.5b01071

[学会発表] (計 12 件)

① 振動分光法による温度応答性高分子の水和の解析, 前田 寧, 10th Mini-Symposium on Liquids, 2016.10.15, 岡山大学 津島キャンパス (岡山・岡山)

② 振動分光法で見る高分子の構造, 前田 寧・、第 46 回繊維学会夏季セミナー, 2016.7.20, 福井市交流プラザ (福井・福井)

③ ラマン散乱の増強効果を利用する高分子構造の分光学的解析, 前田 寧・藤村 和久・小林 祐貴・杉原 伸治, 第 65 回高分子討論会, 2016.9.15, 神奈川大学 横浜キャンパス (神奈川・横浜)

④ 振動分光法による温度応答性高分子の水和の解析, 前田 寧・片川 成美・杉原 伸治, 第 65 回高分子討論会, 2016.9.15, 神奈川大学 横浜キャンパス (神奈川・横浜)

⑤ *N*-置換アクリルアミドと *N,N*-二置換アクリルアミドの共重合体溶液の相分離に対する温度・圧力効果, 片川 成美・前田 寧・杉原 伸治, 第 65 回高分子学会北陸支部研究発表会, 2016.11.12, 福井大学 文京キャンパス (福井・福井)

⑥ 顕微ラマン分光法による高分子微細構造の解析, 前田 寧・松木 一真・藤村 和久・杉

原 伸治、第 46 回高分子討論会、2015.9.17、
東北大学（宮城・仙台）

⑦ *N*-置換アクリルアミド-*N,N*-二置換アクリルアミド共重合体溶液の温度・圧力応答性の解析、片川 成美・前田 寧・杉原 伸治、第46回高分子討論会、2015.9.17、東北大学（宮城・仙台）

⑧ 水酸基含有ビニルエーテル類のRAFT重合、杉原 伸治・川本 裕紀・前田 寧、第46回高分子討論会、2015.9.16、東北大学（宮城・仙台）

⑨ *N*-置換アクリルアミドと *N,N*-二置換アクリルアミドの各種共重合体の水溶液中での温度・圧力応答性、片川 成美・前田 寧・杉原 伸治、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑩ 金属探針による表面プラズモン効果を利用したラマン分析装置の開発、松木 一真・前田 寧・杉原 伸治・藤村 和久・矢田 直人、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑪ 原子間力顕微鏡と組み合わせた高空間分解能ラマン分光システムの開発、藤村 和久・松木 一真・矢田 直人・前田 寧・杉原 伸治、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

⑫ 重合誘起自己組織化による有機溶媒分散ナノ組織の合成、菊川 雄丸・杉原 伸治・前田 寧、第 46 回高分子学会北陸支部研究発表会、2015.11.15、石川ハイテク交流センター（石川・能美）

〔その他〕

ホームページ：

<http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/koubun/maeda/indexJP.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 寧 (Maeda Yasushi)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：60242484