

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32606

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H02725

研究課題名(和文) ゆらぎを利用した近接場ラマン顕微鏡の開発

研究課題名(英文) Development of near-field Raman microscope utilizing fluctuation

研究代表者

齊藤 結花 (Saito, Yuika)

学習院大学・理学部・教授

研究者番号：90373307

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：分光信号のゆらぎを考慮した測定によって、ノイズに埋没し観測が困難であった微弱なラマン信号光の検出を可能にする新しい実験およびデータ解析手法を確立した。表面増強ラマン散乱のゆらぎの時間スケールは、常温液体のブラウン運動の時間スケールから、ナノ秒オーダーと見積られる。そこで、パルス幅ナノ秒レーザーのシングルパルスを露光時間とし多数回測定を行い、高SN信号のみを選択的に取り出して積算し、残りを棄却することによって、バックグラウンドを排除したラマンスペクトルの測定を行った。データは、密度に基づくノイズあり空間クラスタリングDBSCAN法によってノイズと信号の分別を行ない、高いSNでスペクトルを再構成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非侵襲で分子固有の信号を与えるラマン分光を、安定して単分子レベルで行うことは、近年の分光学の究極の目標の一つである。本研究では、従来の高感度ラマン分光で問題であった信号ゆらぎを測定に組み込み、大容量データ取得とデータ選別法を組み合わせた超高感度分析手法を開発した。ここで開発したデータ解析手法は、生物試料等の複雑系、食品や医薬品分析に幅広く適用可能である。本手法は、計算機のCPU速度およびメモリの容量を増大させることで精度を高めることができるため、コンピュータの進歩とともに今後ますます発展することが予想される。

研究成果の概要(英文)：We established a method to detect weak Raman scattering signals by taking into signal fluctuation into the measurement scheme. The fluctuation time scale of surface enhanced Raman scattering is approximately nano second which is influenced by Brownian motion of a molecule in liquid under room temperature. We measured thousands of Raman spectra with exposure time of a single nano-second pulse duration time, followed by data selection procedure. Density-Based Spatial Clustering Analysis with Noise (DBSCAN) was employed for data analysis. We successfully reconstructed Raman spectra with high SN ratio.

研究分野：分光学

キーワード：ラマン分光 表面増強ラマン散乱 ゆらぎ クラスタ分析 近接場光学 微弱光測光

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

単一分子レベルの超高感度で、試料の化学分析をすることは、近年の分光が目指す究極の目標の一つである。特にラマン散乱をはじめとする振動分光は、スペクトルのパターンから分子種を直接特定することができる強力な手法であるため、高感度ラマン分光法には大きな期待がよせられている。ラマン分光と顕微鏡と組み合わせて空間マッピングをする顕微ラマン分光や、微小なプローブを用いてナノスケールの空間分解能を実現する近接場ラマン顕微鏡測定も、高感度分光分析の技術に依拠している。ラマン分光の欠点は、信号強度が蛍光の10億分の一程度と微弱であるため、長時間の露光や検出限界の問題を抱えていた。ラマン分光の感度を改善する手法として、80年代から表面増強ラマン散乱 Surface Enhanced Raman Spectroscopy (SERS) が注目され、多くの研究者によって研究されてきた。SERSでは、自由電子金属(通常ではAuやAg)の近傍にある分子からのラマン散乱光が、局在表面プラズモン増強効果によって大きく増強される効果である。プラズモンによる信号増強効果は $10^3$ - $10^{20}$ 倍にも達するため、単一分子からの、本来極微弱なラマン散乱信号を観測することが可能である[1]。従って一分子イメージングの可能性を十分に有している。一方、単一分子分光が可能な強い信号は、点滅をくりかえし安定的に継続しないことも知られている[2]。金属表面は複雑な形状をしており、一分子検出が可能なラマン信号光は、ホットスポットと呼ばれる原子レベルでの微細構造に起因すると言われている。原子レベルでこのような金属微細構造を設計することは現状のナノテクノロジーでは不可能であると同時に、常温常圧下で測定系は、一定の熱ゆらぎを有している。従ってSERSの金属プローブと測定試料間の相互作用は時間的に変動し、不可避的に分光測定強度にもゆらぎが生じる。もし信号光を長時間積算するならば、無駄な積算している可能性がある。ここで、ゆらぎの時間スケールに合わせた露光時間を設定し、取得した測定ラマンスペクトルを選別することによって、飛躍的にラマン分光のSNを改善することが本研究の提案である。

## 2. 研究の目的

本研究では、大容量データ取得とデータ選別法を組み合わせ、微弱な分子分光スペクトルを超高感度に測定する手法を開発する。ラマン分光をはじめとする分子振動分光は、非侵襲で分子種を特定することのできる優れた分析手法である。しかしラマン信号光は微弱で、観測視野に微量にしか存在しない分子を測定することは困難である。室温下の溶液測定では分子はブラウン運動しており、少数分子からの光の吸収と放出は時間的に変動するので、ラマン信号光にも常にゆらぎがある。そこで本研究では、レーザーの1パルス露光時間内に1つのスペクトルを測定し、結果を積算せずすべて回収し、標的とする信号成分が含まれているデータのみクラスター分析によって抽出し、隠れた微弱な信号光高いSNで再構築する。このプロセスは、感度の問題を頻度の分析に置き換えた測定を実施することに相当し、計算機のCPU速度およびメモリの容量を増大させることで精度を高めることができる、これまでにない分析手法である。

## 3. 研究の方法

(1)実験方法: ゆらぎの時間スケールは、下記の考察より、数ナノ秒程度と見積もることができる。まず、常温液体中の分子のブラウン運動による移動速度を1nm/nsecとすると、分子一個が金属ナノ粒子の近傍に存在する時間は数ナノ秒程度と見積もることができる。また、空気中に置かれた試料には、多くの場合水和層が存在している可能性が高いため、分子-ナノ構造体間のゆらぎの時間スケールとして、類似の値を仮定することは妥当な近似であると考えられる。これはナノ秒パルスレーザーのシングルパルス時間を露光時間として、ラマン分光測定を行うことに相当する。そこで本研究では、パルス幅ナノ秒レーザーのシングルパルスを露光時間とし、試料の一点につき多数(~1000回以上)のSERS測定を行い、高SN信号のみを選択的に取り出して積算し、残りを棄却するという方法を用いることによって、信号光が発生していない時間に由来するバックグラウンドを極限まで排除した近接場ラマンスペクトルの測定を行う。以上、ゆらぎ

を組み込んだ新しいアプローチ、「シングルパルス SERS」によって、ノイズに埋没し観測が困難であった微弱なラマン信号光の検出を可能にする。

(2) データ解析: 得られたスペクトルに Density-Based Spatial Clustering Analysis with Noise (DBSCAN) [3]と呼ばれるクラスタリング分類手法(密度に基づくノイズあり空間クラスタリング)を適用し、信号が強く出ているスペクトルを選別することで、より高精度なスペクトルを取得することを目的とする。

#### 4. 研究成果

##### (1) シングルパルス SERS 実験

銀薄膜を 10 [nm]真空蒸着したガラスボトムディッシュに  $10^{-5}$  mol/L のナイルブルー水溶液を約 5 ml 滴下し、波長 532 nm、7 ns 幅パルスレーザーを照射し、10000 個の SERS スペクトルを取得した。

##### (2) DBSCAN

DBSCAN をデータに適用する。各スペクトルから強度が最大となるデータ点を取り出し、eps(半径)と min-samples(クラスター形成に必要な最小データ点数)の条件をそれぞれ変化させ、高密度領域を検索した。高密度領域から高精度な SERS スペクトルを再構成した。DBSCAN を微弱光検出目的のスペクトル解析に用いたのは、本研究が最初である。

(3) 結果の一例を図 1 に示す。Intensity 軸は、スペクトル軸と密度の比較を可能にするために、標準偏差 5pix にスケールしている。これ平均的なラマンスペクトルの線幅を元に決められている。図 1 は、eps=3.8,min-samples=110 の条件で DBSCAN を行い、クラスターを作成したものである。図 2 にそれぞれのスペクトルを示す。再構成したスペクトルは全積算スペクトルと比較して、全体的に細かな構造を再現している。四角で囲った範囲において、構成前ではピークが小さく見えにくかったが、再構成スペクトルでは、大きく見ることができるように変化している。この

DBSCAN を用いることで、高精度なスペクトルを再構成することができた。

##### (4) クラスタ形成条件の最適化

得られたスペクトルから DBSCAN によりクラスターを生成するためには、eps と min-samples の 2 つのパラメータを指定する必要があるが、この条件を k-dist 法によって予想することを試みた。k-dist の曲率が急激に変化する周辺の条件について、クラスター数を自動的に探索するプログラムを作成した。

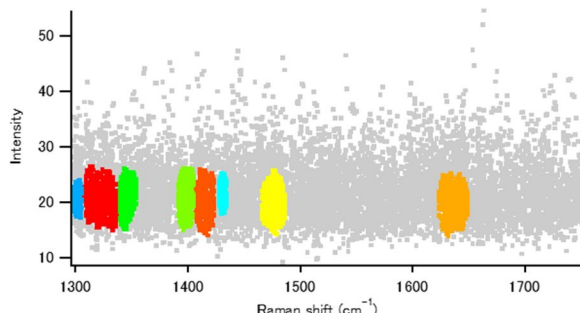


図 1 DBSCAN によるクラスター形成、色のついた領域がスペクトルでグレーの領域がノイズに分類される

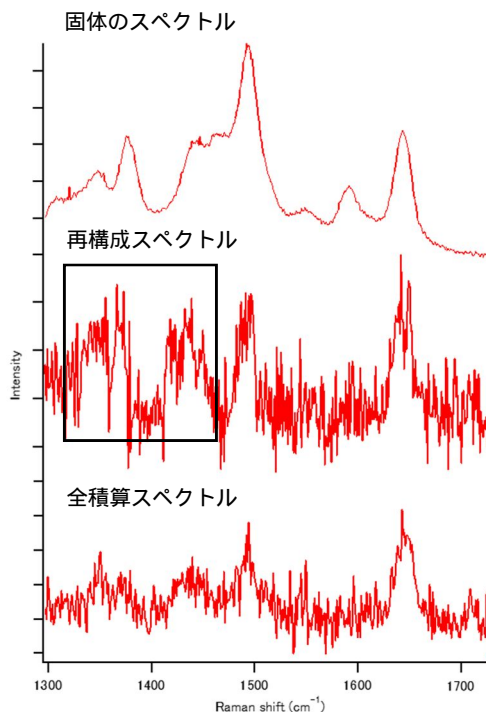


図 2 DBSCAN によるデータ選別の効果,上から固体のナイルブルー, 再構成スペクトル, 構成前のスペクトル.四角で囲った領域とくに信号が顕著に現れている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Saito Y, Kondo T, Ito H, Okada M, Shimizu T, Kubo T, Kitaura R	4. 巻 59
2. 論文標題 Low frequency Raman study of interlayer couplings in WS <sub>2</sub> MoS <sub>2</sub> van der Waals heterostructures	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 062004 -1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ab9400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Saito Y, Tokiwa K, Kondo T, Bao J, Terasawa T, Norimatsu W, Kusunoki M	4. 巻 9
2. 論文標題 Longitudinal strain of epitaxial graphene monolayers on SiC substrates evaluated by z-polarization Raman microscopy,	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 AIP Advances	6. 最初と最後の頁 065314-1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5099430	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kondo T, Tomida A, Morishita N, Saito Y	4. 巻 127
2. 論文標題 Vapor-deposited Au thin films modified by plasma etching for surface-enhanced Raman scattering active substrates	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 093105-1-9
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1063/1.5139586	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Honda M, Hizumi K, Devi I. Tiwari N, Saito Y, Ichikawa Y	4. 巻 59
2. 論文標題 Near-UV plasmon resonances for enhanced TiO <sub>2</sub> photocatalysis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Applied Physics	6. 最初と最後の頁 045001-4
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.35848/1347-4065/ab809b	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi Y, Ranjan B, Saito Y, Umakoshi T, Verma P	4. 巻 9
2. 論文標題 Tapered arrangement of metallic nanorod chains for magnified plasmonic nanoimaging	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2656-2663
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-39624-1 2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ohashi Y, Ranjan B, Saito Y, Umakoshi T, Verma P	4. 巻 11
2. 論文標題 Plasmonic transfer of near-field light from subwavelength objects through a gold-nanorod chain	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Applied Physics Express	6. 最初と最後の頁 102001-102005
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7567/APEX.11.102001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Mori M, Abe S, Kondo T, Saito Y	4. 巻 10490
2. 論文標題 Raman imaging of lipid bilayer membrane by surface enhanced Raman scattering	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Proc. SPIE	6. 最初と最後の頁 104900z1-9
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1117/12.2286839	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okada M, Kutana A, Kureishi Y, Kobayashi Y, Saito Y, Saito T, Watanabe K, Taniguchi T, Gupta S, Miyata Y, Yakobson BI, Shinohara H, Kitaura R	4. 巻 12
2. 論文標題 Direct and Indirect Interlayer Excitons in a van der Waals Heterostructure of hBN/WS2/MoS2/hBN	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 ACSNano	6. 最初と最後の頁 2498-2505
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acsnano.7b08253	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 4件）

1. 発表者名 Takahiro Kondo, Kenta Hirose, Mahiro Hanazawa, Ryosuke Kojima, Takeru Yumoto, Yuika Saito
2. 発表標題 単一半導体ナノ粒子の散乱分光
3. 学会等名 第80回応用物理学会秋季学術講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuika Saito, Takahiro Kondo, Kenta Hirose, Mahiro Hanazawa
2. 発表標題 Spectroscopic analysis of wide-gap semiconductor nanoparticle
3. 学会等名 SPIE Optics Photonics 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y. Saito, T. Kondo, K. Hirose, M. Hanazawa
2. 発表標題 Individual semiconductor nano-particles evaluated by UV spectroscopy
3. 学会等名 日本分光学会紫外フロンティア分光部会 (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Y.Saito, T. Kondo, K. Hirose, M. Hanazawa, R. Kojima
2. 発表標題 UV Rayleigh Scattering Spectroscopy of Semiconductor Nano-particles
3. 学会等名 SciX2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森基彰, 石渡瑞枝, 近藤崇博, 齊藤結花
2. 発表標題 ラマンイメージングによるP3HT/PCBMバルクヘテロ型有機混合薄膜の固体構造の評価
3. 学会等名 応用物理学会 第79回秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤崇博, 富田輝, 齊藤結花
2. 発表標題 蒸着金薄膜の微細化による表面増強ラマン散乱活性基板 の開発
3. 学会等名 応用物理学会第79回秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広瀬健太, 花澤真優, 近藤崇博, 齊藤結花
2. 発表標題 三酸化タングステン単一ナノ粒子のバンドギャップ観測
3. 学会等名 応用物理学会第79回秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 森基彰, 安倍駿輔, 近藤崇博, 齊藤結花
2. 発表標題 表面増強ラマン散乱を用いた脂質二重膜のラマンイメージング
3. 学会等名 応用物理学会 第78回秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 広瀬健太, 近藤崇博, 齊藤結花
2. 発表標題 紫外共鳴レーザ散乱による半導体単一ナノ粒子測定
3. 学会等名 応用物理学会 第78回秋季学術講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoaki Mori, Shunsuke Abe, Takahiro Kondo, Yuika Saito
2. 発表標題 Raman imaging of lipid bilayer membrane by surface enhanced Raman scattering
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takahiro Kondo, Sergei A. Kulinich, Yuika Saito and Satoru Iwamori
2. 発表標題 Laser ablation in water for Sn-based nanomaterials synthesis by millisecond-pulsed laser
3. 学会等名 SPIE Photonics West 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 近藤崇博, 香取蘭美亜, 西澤みらい, 仲村彩, 齊藤結花
2. 発表標題 Density-based clustering analysis for surface-enhanced Raman spectroscopy
3. 学会等名 日本材料科学会学術講演大会
4. 発表年 2021年



〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	佐甲 徳栄  (Sako Tokuei)  (60361565)	日本大学・理工学部・准教授    (32665)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------