様式Ｃ－１９

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成２４年５月２２日現在

機関番号：１３３０１
研究種目：若手研究（Ａ）
研究期間：2009～2011
課題番号：21681018
研究課題名（和文）赤外分光法と原子間力顕微鏡の融合による液中での単一分子観察・同定技術の開発
研究課題名（英文）Single molecular imaging and recognition in liquid by combining infrared spectroscopy and atomic force microscopy
研究代表者
福間　剛士（FUKUMA TAKESHI）
金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授
研究者番号：90452094

研究成果の概要（和文）：薄型中空スキャナを用いることで，試料の下方から集光した中赤外光を照射しつつ，試料表面を観察できる周波数変調原子間力顕微鏡（FM-AFM）を開発した。赤外光照射によって生じる微小な変化を検出するために，カンチレバーを小型化して FM-AFM の感度を格段に向上させた。さらに，ポリスチレン-PMMA ブロックコポリマーの相分離膜を観察し，本装置により分子種識別イメージングが可能であることを示した。

研究成果の概要（英文）：We have developed frequency modulation atomic force microscope (FM-AFM) with a capability of irradiating a focused mid-infrared light from the bottom of the sample using a flat-type scanner with a hollow at the center. We have also achieved a significant improvement in the FM-AFM force sensitivity using a small cantilever to detect a subtle change in the surface property caused by the irradiation of an infrared light. We have demonstrated the molecular recognition capability of the developed microscope by imaging a phase-separated polystyrene-PMMA block copolymer thin film.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合　計
2009 年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2010 年度	7,200,000	2,160,000	9,360,000
2011 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総　計	19,900,000	5,970,000	25,870,000

研究分野：ナノ計測工学
科研費の分科・細目：ナノ・マイクロ科学・ナノ材料・ナノバイオサイエンス
キーワード：１分子イメージング，ナノ計測，原子間力顕微鏡

１．研究開始当初の背景

ナノスケールの構造や物性を局所的に計測できる，いわゆるナノ計測技術は，ナノテクノロジーの発展を牽引する形で急速に発展してきた。しかし，ナノ計測技術を代表する原子・分子スケールの計測技術の多くは，真空中という理想的な環境での動作を前提としてきたため，液中や大気中などの現実環境での研究に用いることは困難であった。この問題を解決するために，近年，ナノ計測技術を液中や大気中で利用可能とするための研究が盛んに行われるようになってきた。

周波数変調原子間力顕微鏡（FM-AFM）は，上記のようなナノ計測技術の代表例として挙げられる。FM-AFM は，絶縁体表面でも原子分解能で構造や物性を計測できるという他に類を見ない特長を持っている。しかしその反面，長年にわたって本手法は超高真空

中という理想環境でしか原子レベルの計測分析を実現できておらず，液中・大気中における応用はほとんどなかった。

我々は，このような状況を打開するために，長年にわたって液中 **FM-AFM** の開発を進め，**2005** 年に世界で初めて液中 **FM-AFM** による原子分解能観察に成功した。さらに，世界に先駆けて様々な生体分子の液中高分解能イメージングを実現し，本技術のバイオ応用の道を拓いた。これらの先駆的な研究成果は，液中 **FM-AFM** によって，従来技術では不可能だった様々な計測が可能になることを実証し，本技術の応用分野の拡大に貢献した。

しかしその一方で，これらの研究を通して液中 **FM-AFM** が持つ技術的な問題点も明らかになってきた。その中の一つが，化学種識別能力の欠如である。液中 **FM-AFM** では，表面の凹凸を原子レベルの分解能で観察できるが，その凹凸が何に由来しているのかを区別することは難しい。例えば，生体分子膜の表面を観察したときに，局所的に高くなっている部分があったとしても，それが周囲の分子と異なる分子が存在することを示すのか，周囲と同じ分子が異なるコンフォメーションをとっていることを示すのか，全く同じ状態の分子が違う高さの表面に吸着しているのかなどを区別することはできない。そのため，単一種の分子で構成された単純な試料表面の形状観察を行うことは可能であったが，複数の分子が入り混じった複雑な表面の分析は極めて困難であった。

２．研究の目的

本研究では，液中で原子分解能観察が可能な **FM-AFM** 技術と，化学種の識別・同定が可能な赤外分光法とを融合させることにより，単一分子レベルの化学種識別・同定技術の実現を目指した。これにより，現在の液中 **FM-AFM** の，化学種識別能力の欠如という問題を解決し，従来よりも複雑な生体分子システムの分子レベル研究を実現することを目標とした。

３．研究の方法

(1)　赤外 FM-AFM の原理

液中 FM-AFM では，鋭く尖った探針を先端に有する片持ち梁（カンチレバー）を力検出器として用いる。カンチレバーをその共振周波数で機械的に振動させ，試料表面に近づけると，探針―試料間に相互作用力が働き，カンチレバーの共振周波数が変化する。この周波数変化量を検出し，それを一定に保つように探針―試料間距離を制御する。この状態で探針を試料に対して水平方向に走査すれば，探針は試料の凹凸をなぞるように上下するため，この際の探針の軌跡から表面の凹凸を知ることができる。

液中 FM-AFM 観察時に，試料の下方から特定波長の赤外光を照射すると，一部の分子内結合が励起され，その分子の熱揺動が増大する。熱揺動の増大を AFM により局所的に検出することができれば，分子識別が可能となるはずである。また，一つの場所で，照射する波長を連続的にスイープしながら分子の熱揺動を測定すれば，個々の分子に特有のスペクトルが観察され，分子同定も可能となるはずである。

カンチレバーの振動エネルギーは，探針―試料間に働く散逸力によって変化することが知られている。さらに，散逸力は，分子の揺動により増大する可能性が示唆されている。これらのことから，試料に赤外光を照射しながら，散逸エネルギー分布をナノスケールで計測すれば，分子識別および同定が可能になるものと期待される。

(2)　赤外 FM-AFM の開発

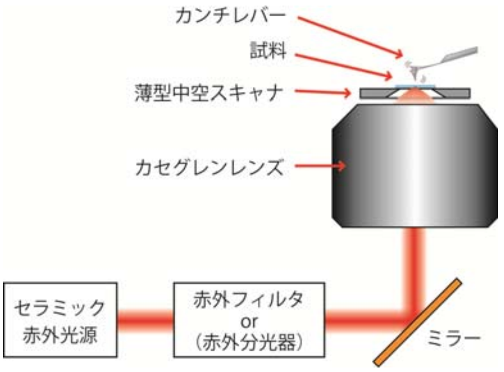

図 1.　赤外 FM-AFM の構成の概略図.

図 1 に開発した赤外 FM-AFM の構成図を示す。まず，幅広い波長成分を含む赤外光をセラミック光源により生成する。次に，その赤外光を赤外フィルタ（もしくは分光器）により赤外光を単色化する。その光をカセグレンレンズにより集光して下方から試料に照射する。

装置全体を空気ばね式除振台の上に設置することで床振動の影響を抑制した。さらに，AFM 部全体を防音フードで囲むことで，音響振動の影響を抑制した。

(3)　分子識別観察用のモデル試料

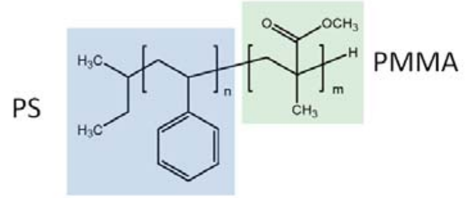

図 2.　ポリスチレン（PS）– PMMA ブロックコポリマーの分子構造.

モデル試料には，明確に異なる吸収波長を持つ２つの分子種が，AFM の走査範囲内に共存していることが望まれる。そこで，本研究では，ポリスチレン／PMMA ブロックコポリマーの相分離薄膜を用いた。

PMMA 分子は 1800 cm^{-1} 付近に C=O 伸縮振動の吸収ピークを持つため，1818-1666 cm^{-1} の波数を持つ光を透過する C=O 励起用フィルタで単色化した光を照射すれば，その振動が励起されるはずである。一方，ポリスチレンにはその波数域に吸収はほとんどない。

ポリスチレンは分子内にベンゼン環を有し，3050 cm^{-1} 付近に Ar-H 伸縮振動の吸収ピークを持つ。したがって，3690-3048 cm^{-1} の波数域の光を透過する OH-NH 励起用フィルタを用いて，振動を励起することが可能である。一方，PMMA は 3000 cm^{-1} 付近に大きな C-H 伸縮振動の吸収ピークがあるものの，3050 cm^{-1} 以上の波数ではでは大きな吸収を持たない。

以上から，C=O および OH-NH 励起用フィルタを用いれば，２種類の分子種のうち片方のみの振動を励起することが可能であると予想される。

４．研究成果

(1) 薄型中空スキャナの開発

図１に示したように，試料の下方から赤外光を照射するためには，試料を走査するスキャナの中央には，赤外光が透過する光学窓か中空構造を持つ必要がある。また，できるだけ探針直下の試料表面に照射される光のパワー密度を高くするためには，赤外光を集光することが望ましい。しかし，高い開口数（NA）を持つレンズで光を集光した場合，作動距離が短くなるため，スキャナの厚さを極めて薄くする必要がある。このため，本研究では薄型中空スキャナを開発した。

図３(a)に，開発した薄型中空スキャナの構成を示す。中央の試料ステージは，4 方から，それぞれ 3 本ずつの細いビームにより支えられている。XY 方向には対称的な構造となっているため，図 3(a)には断面図を示してある。各軸を駆動するために，2 つの圧電アクチュエータを用いる。この 2 つのアクチュエータは，互いに反対方向に同じ量だけ動く。このような，並列型のフレクシャー構造を採用することにより，極めて薄型（4 mm）の構成でありながら，2 μm 以上の十分な走査範囲を実現した。

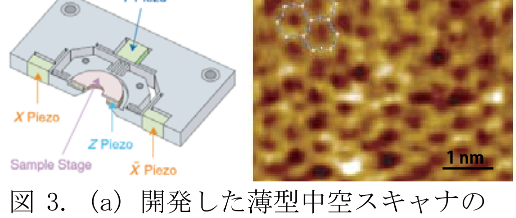

図 3. (a) 開発した薄型中空スキャナの構成. (b) 本スキャナを用いて取得したマイカ表面の液中原子分解能像.

一方，Z 軸を駆動するための圧電アクチュエータは，中央の試料ステージ上に設置されている。このアクチュエータは，非常に高さの低い円筒形をしている。また，試料ステージ自体には下方に広がっていくテーパー構造と中空構造が設けられている。したがって，試料中央部に，スキャナの下方から集光した赤外光を照射することが可能である。

図 3(b)に本スキャナを用いて取得したマイカ表面の液中原子分解能像を示す。マイカ表面に特徴的なハニカム状の構造が明瞭に観察されている。このことから，薄型中空構造をとりながら，原子レベルの観察に必要な安定性と分解能を有するスキャナを開発することができたことが分かる。

(2) 液中 FM-AFM の高感度化

赤外光照射機能を備えた液中 FM-AFM を開発した後，赤外光に対する応答の検出を試みたが，AFM の感度が十分ではなく，赤外光の照射が試料に与える影響を十分に検出することができなかった。そこで，本研究では，AFM を高感度化するために以下の技術開発を行った。

FM-AFM で得られる感度の原理限界は，カンチレバーのばね定数 k，共振の Q 値，共振周波数 f_0 などの特性によって決まる。我々の AFM は，既に従来のカンチレバーで得られる原理限界の性能を達成していたため，AFM を構成する他の部分の性能を改善しても，感度を改善することはできない。そこで，我々は，カンチレバーの改良に取り組んだ。

k は，小さいほど感度が高くなるが，小さすぎると熱振動が大きくなる点や，表面への探針の吸着が防げない点などが問題となる。そのため，少なくとも高分解能観察を目的とする限りは，10 N/m 以上に保つ必要があり，力感度の改善のために下げることは難しい。

一方，Q は大きいほど感度が改善するが，その方針でカンチレバーをデザインすると，k が大きくなってしまう傾向があり，結局大きな力感度の改善は得られない。

以上のことから，k や Q を従来どおりの値に保ったまま，f_0 を向上させることが力感度改善のための主な方針となる。それを実現する方法の一つがカンチレバーを小型化させることである。

図４に，従来から用いてきたカンチレバーと，本研究で用いた小型カンチレバーを示す。従来型のカンチレバーが 130 μm 程度の長さを有するのに対し，小型カンチレバーの長さは，10 μm 程度であり，大幅に小型化されていることが分かる。その結果，液中における共振周波数は，従来の 130 kHz から 3 MHz へと 20 倍以上も向上した。

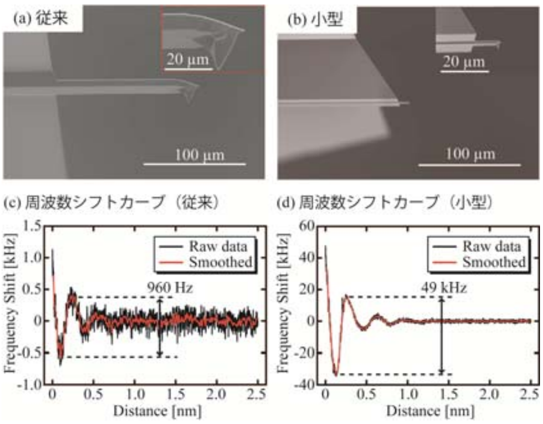

図 4. 従来型及び小型カンチレバーの SEM 像と，それらを用いてマイカ／水界面において取得した周波数シフトカーブ.

原理的には，この小型カンチレバーにより感度が大幅に改善するはずであるが，これを液中で安定に用いるためには，その振動を検出するための変位検出器と，振動を励起するための励振システムに改良が必要となることが，本研究の中で明らかとなった。変位検出器に関しては，従来から小型カンチレバーの利用を視野に入れて開発してきたため，十分なノイズ性能と帯域で変位検出をすることが可能であった。一方，励振に関しては，従来のピエゾ励振法の代わりに光熱励振法を用いることが必要であった。さらに，光熱励振法により小型カンチレバーを安定に励振するためには，励振用のレーザ光に対して極めて高い安定度が要求される。これを解決するために，我々は励振用のレーザを温調ユニットの中に設置し，さらに偏波面保存ファイバを用いることにより，理想的なビームプロファイルを持った光を，高い安定性を持って伝送できるようにした。これらの改良により，初めて小型カンチレバーを液中で安定に励振することに成功した。

図 4(c)および(d)に，従来型および小型カンチレバーにより，マイカ／水界面で取得した周波数シフト－距離曲線を示す。両者ともに，界面に形成された水和層の影響を反映した振動的なプロファイルを示している。しかし，小型カンチレバーを用いた場合には，従来のカンチレバーを用いた場合に比べて，はるかに高い信号対雑音比で水和力が検出できていることが分かる。振動的なプロファイルの最大値と最小値の差を，それぞれの場合で比較してみると，従来のカンチレバーを用いた場合には 1 kHz 程度であるのに対し，小型カンチレバーを用いた場合には，約 50 kHz となっており，50 倍程度の感度向上が達成されたことが分かる。

(3) 赤外 FM-AFM による分子識別観察

図 5 に，フィルタで単色化した赤外光を照射中に測定した，ポリスチレン-PMMA ブロックコポリマーの相分離膜の FM-AFM 像を示す。この薄膜には周期的な凹凸構造が見られるが，凸部がポリスチレン，凹部が PMMA に相当する。

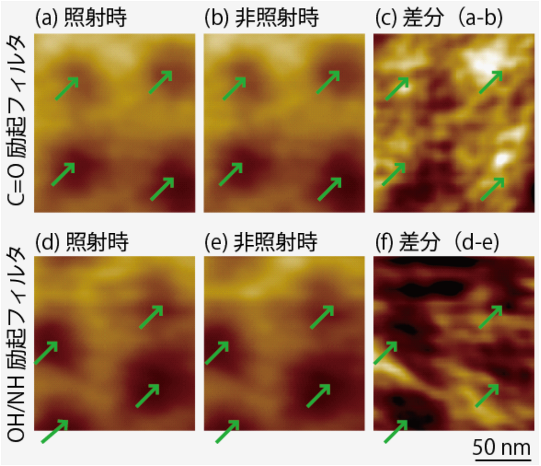

図 5. 赤外光照射中に測定したポリスチレン-PMMA ブロックコポリマー相分離膜の FM-AFM 像.

赤外光の照射時と非照射時に取得した FM-AFM 像を比較すると，大きな差は見られない。しかし，それらの画像の差分をとると，C=O 励起用フィルタを通して光を照射した場合には，PMMA に相当する凹部が相対的に高く，OH/NH 励起用フィルタを通した場合は，相対的に暗く変化していることが分かる。

C=O 励起光の照射時には，PMMA の光吸収の方が大きく，熱膨張するため，凸部にくらべて凹部の高さがわずかに高くなったものと考えられる。一方，OH-NH 励起光の照射時には，ポリスチレンの光吸収の方が大きいため，今度は凸部の高さが増大したものと考えられる。したがって，本実験で得られた結果は，ポリスチレンおよび PMMA の吸収波長から考えて妥当である。以上から，本研究で開発した赤外 FM-AFM により分子種の識別イメージングに成功したと言える。

(4) まとめ

本研究では，液中で原子分解能観察が可能な FM-AFM と，分子種の識別同定が可能な赤外分光法を組み合わせて，単一分子スケールの分子種識別顕微鏡の開発を試みた。

薄型中空スキャナを開発し，観察中に試料の下方から赤外光を集光して照射できる FM-AFM を開発した。さらに，赤外光の照射によって生じる微小な変化を検出するために，カンチレバーを小型化することで，力感度の大幅な向上を達成した。また，ポリスチレン-PMMA ブロックコポリマーの相分離膜をモデル試料として用い，FM-AFM による分子種識別イメージングを達成した。

今後は，本手法の液中での動作を確認し，

生体分子の分子種識別イメージングへと応用を広げていきたい。また，本研究で開発した装置では，赤外フィルタだけでなく，赤外分光器を用いて連続的に波長を変化させられる。したがって，今後は探針位置を固定した状態で波長をスイープして，赤外吸収スペクトルを測定し，分子種の同定にも挑戦したい。

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１件）

① Fukuma, T., Onishi, K., Kobayashi, N., Matsuki, A., Asakawa, H., Atomic-resolution imaging in liquid by frequency modulation atomic force microscopy using small cantilevers with megahertz-order resonance frequencies, 査読有, 23, 2012, 135706. doi:10.1088/0957-4484/23/13/135706

〔学会発表〕（計８件）

① 福間剛士，液中周波数変調 AFM の性能改善と多機能化，日本顕微鏡学会 第 68 回学術講演会，2012 年 5 月 16 日，つくば国際会議場（茨城県）

② 福間剛士，液中周波数変調 AFM の開発と固液界面計測への応用，第 5 回 SFG 研究会，2012 年 3 月 11 日，東北大学（宮城県）

③ Onishi, K., Asakawa, H., Fukuma, T., Atomic-resolution imaging in liquid by frequency modulation atomic force microscopy using small cantilevers, 19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM19), 2011 年 12 月 19 日，洞爺湖万世閣（北海道）

④ Miyata, K., Furuya, S., Asakawa, H., Fukuma, T., Improvement in the Usability of Sample and Cantilever Holding Mechanisms for Separate-type High-Speed AFM Scanner, 19th International Colloquium on Scanning Probe Microscopy (ICSPM19), 2011 年 12 月 19 日，洞爺湖万世閣（北海道）

⑤ 福間剛士，周波数変調原子間力顕微鏡の固液界面計測への応用，第一回走査プローブ顕微鏡シミュレータの開発セミナー，2011 年 3 月 8 日，国立オリンピック記念青少年総合センター（東京都）

⑥ 福間剛士，周波数変調ＡＦＭによる固液界面計測技術の発展と将来展望，日本顕微鏡学会シンポジウム，2010 年 11 月 12 日，金沢市文化ホール（石川県）

⑦ 福間剛士，原子間力顕微鏡を用いた固液界面の原子分解能イメージング，分子研研究会「グリーンイノベーションのための表面・界面化学」，2010 年 10 月 6 日，分子科学研究所（愛知県）

⑧ 福間剛士，液中周波数変調 AFM による生体試料の分子スケール観察，第 57 回応用物理学関係連合講演会，2010 年 3 月 19 日，東海大学（平塚市）

〔その他〕
ホームページ等
http://fukuma.w3.kanazawa-u.ac.jp

６．研究組織
(1)研究代表者

福間　剛士（FUKUMA TAKESHI）
金沢大学・フロンティアサイエンス機構・特任准教授
研究者番号：90452094

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし