

令和 6 年 6 月 1 日現在

機関番号：13301

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H01687

研究課題名（和文）エアロゾル単一粒子に含有する単一分子検出技術の基盤構築

研究課題名（英文）Establishment of the detection method of single molecules contained in single aerosol particles

研究代表者

瀬戸 章文（Seto, Takafumi）

金沢大学・フロンティア工学系・教授

研究者番号：40344155

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：環境中の極微量物質に対する一分子レベルの超高感度化学分析が実現できる手法として表面増強ラマン散乱（SERS）に着目し、粒子形状、大きさ、堆積密度を制御した銀ナノ粒子を用いたSERS基板を作製して、環境中の極微量分子に対する超高感度分析手法を開発した。粒子径、堆積量、粒子形状を厳密に制御した最適条件においては、単一分子レベルの超高感度のSERS効果が得られることが明らかとなった。これらの知見により、SERS効果に対する粒子径、粒子形状、堆積構造の影響が明らかとなり、さらに環境中に存在する様々な極微量成分の検出法への広い適用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SERSに関する研究は、バイオセンサへの応用を始めとして、環境や化学分野における超高感度分子分析法として、幅広い分野において最も注目されている物理現象のひとつである。一方で、SERSのエアロゾルの特性評価に関する応用研究はあまり進んでいない。この一因は、エアロゾルのハンドリングが困難であるためである。本提案の成果は、SERS効果に対する粒子径、密度、形状の制御性を大幅に向上するものである。また、得られる分析感度において、従来のエアロゾル計測技術の性能を大幅に凌駕するものであり、大気エアロゾルの起源の解明から室内バイオエアロゾル検出まで、多岐にわたる波及効果が期待される。

研究成果の概要（英文）：Focusing on surface-enhanced Raman scattering (SERS) as a technique that can realize ultra-sensitive chemical analysis at the single molecule level, we have developed an ultra-sensitive analytical method for ultra-trace molecules in the environment by fabricating SERS substrates with silver nanoparticles whose particle shape, size, and deposition density are controlled. It was found that under optimal conditions with strict control of particle size, deposition volume, and particle shape, ultra-sensitive SERS effect at the single molecule level could be obtained. These findings clarify the effects of particle size, particle shape, and deposition structure on the SERS effect, and are expected to be widely applied to detection methods for a variety of ultra-trace constituents in the environment.

研究分野：化学工学

キーワード：エアロゾル ナノ粒子 ラマン散乱 レーザー 分析

1. 研究開始当初の背景

我々生命体は、環境中に存在する極微量の化学物質（ガス分子、微粒子、微生物など）の影響を受けながら活動している。特に呼吸により生命を維持する人間は、空気中の様々な微粒子状物質の体内への吸入・沈着・蓄積により、呼吸器疾患や肺がんなどのリスクに晒されている。例えば、米国 6 都市研究端を発した一連の疫学的研究によれば、大気中微小粒子濃度と致死率や呼吸器疾患患者数等には正の相関があり、これらの原因が主に工場や自動車の排気等によって大気に放出される PM_{2.5}（空気力学径が 2.5 ミクロン以下の微粒子）であることが示され、大きな社会問題となった。また現在、世界が直面する新型コロナウイルス感染症は、咳・くしゃみや会話などで放出される飛沫や飛沫核など、エアロゾル状態で輸送されることが明らかになっているが、その発生・感染経路を含む動態は未だ解明されていない。

これらのエアロゾルの生体影響は微粒子を構成する粒径と化学成分により大きく異なる。図 1 に示すように PM_{2.5} の生体影響は、総質量濃度が基準として議論されており、これらの粒子径分布や、含まれる極微量の有害物質（例えば、多環芳香族炭化水素や金属など）の影響は厳密には明らかにされていない。また、エアロゾル中のウイルスや微生物を直接検出可能なセンシング技術は未だ確立されていない。エアロゾルは無機炭素、金属、酸化物、無機塩（自然現象）など、そして有機物（微生物、ウイルスを含む）からなる複合粒子である（図 2）。エアロゾルを「レプリカ」として、その粒子径と構成元素から発生源・気候・環境条件などを探索する試みは世界各国の研究者が取り組んでいる課題である。単一粒径の微粒子の化学組成を単一分子レベルの分解能で分析することは、その起源を特定するうえで最も重要な課題であるにも関わらず、現在までに開発された、いかなる分析装置、例えば、最も先端的な計測機器の一つであるエアロゾル質量分析器（AMS, Jayne et al. (2000) *Aerosol Sci. Technol.*, 33, 49）であってもその実現は極めて困難である。また、高分解能電子顕微鏡技術は、試料調整と観察に多くの時間を要し、空気中のエアロゾルの状態を直接観察することができない。すなわち、エアロゾル単一粒子の化学組成を単一分子レベルの分解能でリアルタイムで知るといふ課題が、本研究課題の核心をなす学術的な「問い」として存在する。これらの難題を解決する超高感度分子検出技術の一つに表面増強ラマン散乱（SERS）がある。SERS は、直径数十 nm の貴金属ナノ粒子への電磁波照射による表面プラズモン効果により、ラマン散乱シグナルが飛躍的に増幅される現象であるが、エアロゾルへの適用は未だ限定的である（Scopus による文献検索では、SERS に関して 35,000 件以上の研究報告があるが、そのうちエアロゾルを対象としたものは 100 件以下）。SERS の最大の特徴は数個レベルの分子からの微弱シグナルを分光学的、すなわち分子識別能をもって得られることである。一方で、上述の電子顕微鏡技術と同様、試料の前処理（精製や乾燥、基板作製等）に多大な時間とコストを要し、このことが上述した環境中の微量エアロゾル粒子の検出への適用の障壁となっていた。

2. 研究の目的

これらの背景を踏まえ、本提案の目的は「我々が有するエアロゾルテクノロジーを SERS 試料調整法として適用し、高速（リアルタイム）で、高分解能（<粒径 1nm）かつ高感度（分子レベルの検出能）で、エアロゾルの化学成分析を行う新たなツールを提供すること」にある。

SERS によってエアロゾルセンシングを行うための我々の研究戦略は、さまざまな環境中のエアロゾル（A）を 気中浮遊状態のまま静電分級法によって単一サイズかつ帯電粒子としたうえで、 対電荷を有する貴金属ナノ粒子（M）と凝集・結合させて、エアロゾル貴金属粒子複合構造体（A+M）を形成させ、 気中浮遊状態のまま、液架橋の作用によりターゲット分子を凝集体間の共鳴点（Hot Spot）に誘導し、 顕微ラマン分光法によって高速・高分解能・高感度に検出することである（図 3）。

単一分子レベルの分子認識を行う鍵は、 において、いかに制御された複合体を形成するか である。SERS 効果は、純粋な貴金属ナノ粒子の表面プラズモンに起因する増幅効果と、二個以上のナノ粒子表面電磁場の相互作用により共鳴的増幅効果が知られている。後者は Hot Spot とも呼ばれ、極めて高いシグナル増幅効果が得られることが理論的に予測され、実験的にも確かめられている（例えば Xu et al. (2000) *Phys. Rev. E*, 62, 4318）。

我々は、エアロゾルテクノロジー（合成・分級・計測・捕集など）について、長年一貫して研究開発を行っている。本課題解決の鍵のひとつである金属ナノ粒子凝集体の形態制御において

も様々なノウハウを有しており（例えば、Ichihara, Lee, Sakamoto, Higashi, and Seto (2020) *Aerosol Sci. Technol.*, 54, 1223）これらの技術を応用し、上述の Hot Spot を有する凝集体（2, 3 量体など）を気中分散状態で調整することができる。さらに、独自の分子動力学計算（MD）モデル（Tamadate, Higashi, Seto, Hogan (2020) *J. Chem. Phys.*, 152, 094306）を複合体粒子形成における分子の移動現象解析、すなわち Hot Spot へのエアロゾルへの誘導に応用する。これらの独自に築き上げてきたエアロゾルテクノロジーを SERS と新たに組み合わせ、エアロゾルの分子レベル解析に応用・展開できれば、究極の単一エアロゾルセンシングを実現する革新的なエアロゾル技術が確立できる。本提案の目標実現の波及効果は、1) 大気エアロゾルの起源の解明、2) 化学プロセスにおける不均一反応の解析、3) エアロゾルの細胞応答の追究、そして 4) 室内の感染性バイオエアロゾルのセンシング、など極めて多岐にわたる社会的、科学的課題を解決する、最も根本的かつ強力なツールとなり得る

3. 研究の方法

図 1 に実験系を示す。直径 3.0mm の Ag ロッド（純度 99.99%、Nilaco Co.）を原料として用いた。第三高調波(355nm)のナノ秒パルス Nd:YAG レーザー（パルス幅約 5nm、0.5W、INDI-20、Spectra Physics）を、レンズにより集光し、Ag ロッドの表面に照射して蒸発させた。雰囲気として窒素ガスを大気圧で一定流量（1.5 Lmin⁻¹）で連続的に供給し、これを生成するナノ粒子のキャリアガスとして用いた。得られる粒子は表面の溶融層から直接放出される液滴と、蒸気の凝縮によって生成するナノ粒子からなる凝集体の混合物となるこれらを気中浮遊状態のまま搬送した。

つぎに、レーザーアブレーションによって生成する粒子の粒子径分布は、捕集した粒子の電子顕微鏡像と、エアロゾル状態の粒子径分布計測法を組み合わせ評価した。一次粒子径 (D_i) の分布と粒子形状については、後述するインパクトによって粒子を Cu 基板上に捕集し、走査型電子顕微鏡 (JSM-7610F, JEOL) によって解析した。一方、気中の粒子径分布は、静電分級器 (DMA) と、凝縮核計数器 (CPC) を組み合わせた走査型電気移動度分析計 (SMPS) によって in-flight で計測した。生成する粒子には凝集体が混入しているので、管型の電気炉によって流路を室温から 600°C まで加熱することで、気中アニールによって形態制御を行った。Ag ナノ粒子からなる凝集体は、融点 (960°C) よりもかなり低い温度で焼結による形態変化が生じることが知られている。気中アニールによって球形化処理を行ったときの粒子表面状態が SERS にどのような影響を与えるかを検討した。ナノメートルオーダーの一次粒子が凝集構造を形成すると、ターゲット分子が粒子間に吸着して、表面の効果が向上することが期待されるが、一方で、励起波長の 1/10 程度 (50 ~ 100nm 程度) 以下の粒径範囲では、表面プラズモンによる電場増強効果が粒径粒子ほど有利であることから、比表面積の大きな微細一次粒子と比表面積は小さいが電場増強が期待できる比較的大きな一次粒子との間に SERS の最適値が存在するものと考えられる。

分級後の粒子は気中浮遊状態のまま、インパクトに導入し、直径 1.1 mm のノズルから噴出させて、Cu 基板上に沈着させた。ノズル下流側を真空ポンプを用いて吸引し ($Q = 17 \text{ Lmin}^{-1}$)、堆積チャンバの圧力を 47.8kPa に設定すると、臨界 Stk 数 ($\sqrt{\text{Stk}} = 0.47$) を満たす粒子径は 245nm となる。よって、単段のインパクトでは、本研究で対象とした Ag 粒子 (> 40 ~ 100nm) に対して十分な捕集効率を得られない。しかしながら、実験結果で後述するように、粒子の照射によって、Cu 基板上で微細な Ag 堆積スポットが得られる。これは、よどみ点近傍で沈着した粒子が、後続の粒子の付着確率を向上させることで二次元的に「成長」するためであると考えられる。そこで、導入する粒子の個数濃度をリアルタイムで CPC で計測し、堆積時間によってこの粒子積層体の堆積量を厳密に制御した。

ラマン散乱の検出分子として、ローダミン B ($\text{C}_{28}\text{H}_{31}\text{ClN}_2\text{O}_3$) を用いた。モル濃度が 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} M となるよう超純水で希釈し、この溶液 100 μL を SERS 基板に滴下した。滴下した面積はおよそ 8 mm であり、水分が蒸発して均一に分子が表面上に分散して析出したとすれば、表面上の分子密度は、 $1.2 \times 10^{10} \sim 10^{12} \text{ 個 m}^{-2}$ となる。Ag 粒子のスポットは滴下面積よりも十分に小さく ($\phi 0.4 \text{ mm}$ 程度) さらにレーザー照射エリアはさらに小さい ($\phi 1 \mu\text{m}$ 程度) さらに、実際には

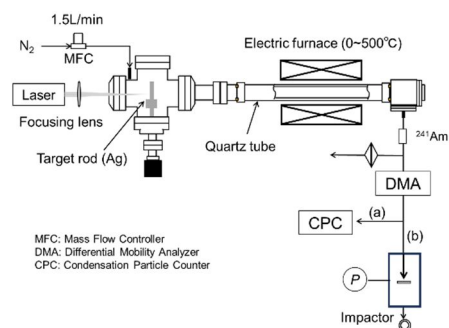


図 1 レーザーアブレーションによる単分散 Ag 粒子の合成

スポットよりも外側に濃縮された分子からなるコーヒーリングが形成されるために、ラマン散乱を行うスポットに存在する分子数は、計算上の 1000 ~ 100,000 個あるいは、それよりも低い濃度であると考えられる。ラマン散乱分光分析には、励起レーザー532nm を用い、光学顕微鏡 BX53, Olympus) と、分光器 (iHR320, Horiba Ltd.) を組み合わせた顕微ラマン散乱分光装置 (Horiba) を用いて行った。計測条件としては、露光時間 1s で、分光器の分解能は 0.06 nm とした。レーザーのスポット径は約 1 μ m であり、Ag 粒子が堆積しているスポットの少なくとも 10 箇所程度を計測し、その最大値を用いた。計測箇所におけるピーク強度のばらつきは 10-15% 程度であった。

4 . 研究成果

まず気中加熱を行っていない常温の粒子は、球形の粒子もいくつかみられるものの、80nm より明らかに小さな一次粒子によって構成される凝集体が多く存在していた。球形の粒子は、レーザー照射によって形成されるターゲット表面の溶融層から脱離した液滴であると考えられる。一方、凝集体は、レーザーアブレーションによって生成した過飽和 Ag 蒸気が核生成によって数 nm の粒子を形成し、それらが凝集したものであると考えられる。そこで、得られる粒子をエアロゾル状態で気中加熱したところ、500 で加熱することにより、ほぼ球形で粒子径のそろった粒子が得られていることが分かった。これは、球形化することによって、粒子が単一粒子となり、一次粒子径と電気移動度径が一致するためである。このような粒子径変化は SMPS によるエアロゾルの粒子径分布からも確認された。

500°Cに気中加熱して分級後の単分散粒子の SEM 像を図 2 に示す。図に示すように、分級粒径を変えることで、いずれも球形の単分散粒子が得られていることが分かる。このような単分散粒子は、SERS に与える粒子径の影響を厳密に評価できることが期待される。

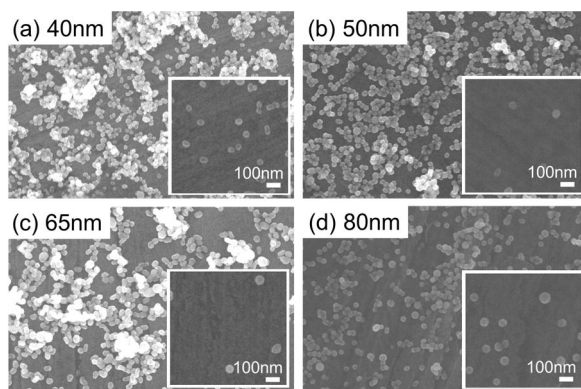


図 2 分級粒径を変えて得られた単分散 Ag ナノ粒子の SEM 像

図 3 に SERS に与える Ag 粒子径の影響を示す。1650 cm^{-1} に着目すると、最小粒子径である 40nm よりも、青の 50nm のほうが若干ピークは高く、そこから、65, 80nm と粒子径を増加させると、ピーク値は低くなっていることがわかる。また、100nm まで粒子径を増加させると、ピークはかなり低い値となった。そこで、この 1650 cm^{-1} のピークに着目し、このピーク強度を粒子径に対してプロットすると図 9 の結果となった。プロットは場所を変えてランダムに測定したスペクトルの中から強度の高かった 5 点を平均した値を用いている。上述したように、50nm が最も高く、それより小さくても大きくてもピーク強度は低くなることが分かる。ここで SERS 効果と密接にかかわる表面プラズモン共鳴の原理を考察する。波長の 1/10 程度以下のサイズを有する金属ナノ粒子または金属ナノ構造体に光が照射された時、光の電場によりナノ構造体内の自由電子の分布に偏りが生じ電気双極子が誘起される。金属ナノ粒子または金属ナノ構造に入射光を照射し透過スペクトルを計測すると、自由電子の集団運動と共鳴する特定波長で強い吸収が見られ、この共鳴現象が表面プラズモン共鳴と呼ばれる。この表面プラズモン共鳴により金属粒子表面に誘起され電気双極子モーメントは、金属粒子の粒子径に大きく依存し粒径の 3 乗に比例することが知られている。(Wakaki and Yokoyama (2012) *Optical Properties of Oxides Films Dispersed with Nanometal Particles* ” In “UV-VIS and Photoluminescence Spectroscopy for Nanomaterials Characterization, ed., Springer-Verlag GmbH, 325) さらに粒子の複合構造による影響を考慮すると、粒子と粒子の間隙部分に著しい電場増強効果が現れるホットスポットと呼ばれる部分が存在し、SERS による高感度検出に重要な役割を果たしている。(Futamata et al., *J. Phys. Chem. B*, 108 (2004)

13119-13127) 基板上に粒径の揃った粒子を 2 次元に分散させた際のホットスポット数は、配列が相似であるという仮定の下で、粒子の基板への投影断面積、即ち粒径の 2 乗に反比例する。従ってホットスポットによる SERS 増強効果に関しては、3 乗掛ける-2 乗で、粒径に対してほぼリニアな依存性を示すものと期待される。図 3 で Ag 微粒子粒径 40 nm から 50 nm で確認される SERS 増強効果は以上の機構によるものと考えられる。

一方、更に粒径が大きく、粒子のサイズが励起光波長に対して無視できない領域では、粒子が感じる電場が一様とはみなせず内部に位相差が発生することから、粒子内電子の集団振動が理想的な状態から外れ、誘起される双極子モーメントが低下する。図 3 で粒径 50 nm より大きな領域で観察された SERS 増幅の低下はこれらに起因するものと考えられる。

本研究では、熱処理と分級操作によって、サイズの揃った球形粒子が得られるため、このような SERS 増強効果のサイズ依存性を明確に示すことができたといえる。その結果、励起波長である 532nm のちょうど 1/10 である、50nm が最も強い増強効果が得られることを明らかにすることができた。

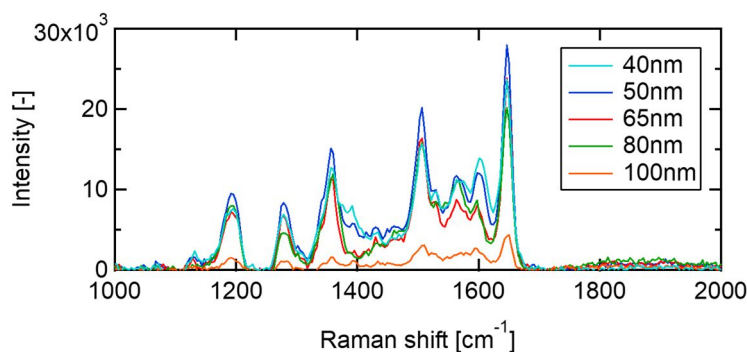


図 3 サイズを変えた Ag ナノ粒子による SERS 効果

このような SERS 効果は、サイズだけでなく、金属粒子間の相互作用によっても変化する。粒子径 50nm の Ag 粒子の導入量を 0.5 から 6 μ g まで変えた時の、堆積状態を SEM で観察した結果からは、0.5 μ g では、表面上にまばらに粒子が堆積しているのに比べ、2 μ g では粒子の堆積量が急激に増え、Cu 基板のほとんどの領域をカバーできていることが分かった。これは、一旦堆積した粒子によって、後から導入される粒子の沈着効率が向上したためであると考えられる。この 2 μ g のときに、粒子同士の重なりが少なく、ほぼ一層の粒子堆積が実現できていると考える。一方、さらに、4, 6 μ g と粒子導入量を増加させると、粒子どうしが重なって、さらに多層に積層していることが確認された。

これらの Ag 粒子導入量を変えたときのラマン散乱を先ほどと同じ条件で行ってみると、図 4 の結果となる。ほぼ一層の堆積状態が確認された 2 μ g まではピークが増加しているが、4 μ g 以上に導入量を増やすと、緑と赤で示すように逆にピークの高さが低くなっていることが分かる。これは、滴下した RhB が多層に積層した粒子層の内部まで浸透したことで、ラマン散乱分析の効率が低下したためであると考えられる。

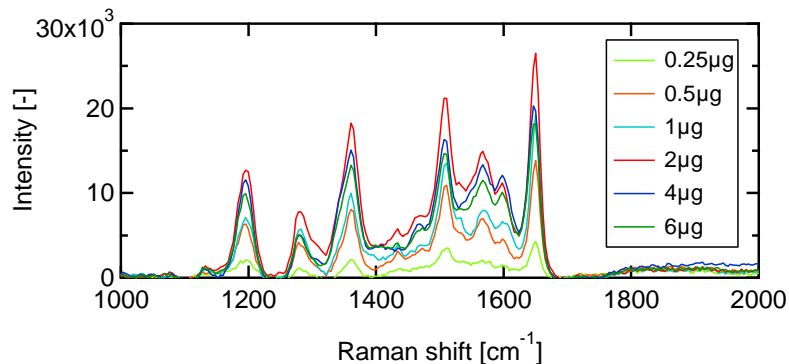


図 1 1 Ag ナノ粒子 (80nm) の堆積量を変化させたときの SERS 効果の変化

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Matsumoto Chigusa, Gen Masao, Matsuki Atsushi, Seto Takafumi	4. 巻 12
2. 論文標題 Development of spray-drying-based surface-enhanced Raman spectroscopy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 4511
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-022-08598-y	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 Ito, E., Tamadate, T., Inomata, Y., Seto, T.	4. 巻 55
2. 論文標題 Water-based particle size magnifier for wet sampling of aerosol particles	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Aerosol Science and Technology	6. 最初と最後の頁 1239 - 1248
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/02786826.2021.1940828	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Soma Kemmotsu, Chigusa Matsumoto, Masao Gen, Atsushi Matsuki, Makoto Hirasawa, Takafumi Seto
2. 発表標題 Detection of single molecules by spray-drying-based surface-enhanced Raman spectroscopy
3. 学会等名 11th International Aerosol Conference（国際学会）
4. 発表年 2022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	平澤 誠一 (Hirasawa Makoto) (30321805)	国立研究開発法人産業技術総合研究所・エレクトロニクス・製造領域・主任研究員 (82626)	

6. 研究組織（つづき）

	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	猪股 弥生 (Inotama Yayoi) (90469792)	金沢大学・環日本海域環境研究センター・准教授 (13301)	

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