

## 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 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2010 年度～2012 年度

課題番号：22685009

研究課題名（和文）走査型電子増強ラマン分光顕微鏡の開発と界面化学計測への応用

研究課題名（英文）Development of Scanning Probe Electron-Enhanced Raman Scattering Microscope and its Application to Interfacial Chemistry

研究代表者

由井 宏治 (YUI HIROHARU)

東京理科大学・理学部・准教授

研究者番号：20313017

研究成果の概要（和文）：

走査型電子増強ラマン分光顕微鏡の開発を行った。金属探針先端から電子を発生させる様々な励起方法を実験的に検討した。その結果、全内部反射励起による近接場の領域に金属探針を導入する方法が、空間的に限定されている試料部の水系試料への適用に対して容易であり、金属探針を用いた電子増強ラマン（EERS）計測に適していることが分かった。さらに、走査型顕微計測に周波数変調（FM）方式を採用することで、目的計測試料の単一分子レベルでの高空間分解計測ができることが実験的に分かった。炭素材料表面や脂質・タンパク質集合体材料を用いて、ラマン増強度や AFM などによる力学応答特性などの計測を行った。

研究成果の概要（英文）：

Scanning probe electron-enhanced Raman scattering microscope has been developed. Various methods for the generation of electrons from a metal tip by laser excitation were investigated experimentally. We found that the optimal method was the introduction of the tip to the near-field area excited by total internal reflection of laser beam. This is because it is appropriate for the illumination under spatially restricted sample chamber and is easy for the application to various samples in water. In addition, the combination of the FM mode with the optimized optical arrangement allowed us high-resolution measurements at single molecular resolution level. We have applied the instrument developed here to the measurements on carbon materials, lipid or protein self-assemblies for the test of the Raman enhancement factor and of the ability to measure the mechanical responses.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	12,800,000	3,840,000	16,640,000
2011 年度	2,500,000	750,000	3,250,000
2012 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	18,400,000	5,520,000	23,920,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：複合化学・分析化学

キーワード：走査型プローブ顕微鏡・電子・ラマン散乱・増強・界面

## 1. 研究開始当初の背景

走査型トンネル顕微鏡（STM）や走査型原

子間力顕微鏡（AFM）に代表される走査型プローブ顕微鏡（SPM）の開発は、ナノテクノロジーの発展を計測の立場から強力に支援

し、今日に至っている。しかし STM は原子レベルの空間分解能が得られる一方で、測定の原理上、計測環境や使用基板が限定される。一方 AFM は、振幅変調 (AM) 技術や周波数変調 (FM) 技術方式の採用により、原子レベルでの化学種識別や水中における蛋白質の表面凹凸像の測定が可能になりつつも、その空間分解能は STM に劣る。

現在の SPM 開発における最大の目標の一つは、液体中で単一分子レベルの空間分解能を有しながら、分子振動エネルギー領域のスペクトルの取得である。その様な SPM が開発されれば、分子スケールでの表面凹凸像に加え、分子の置換基レベルでの化学結合状態の分析が可能となる。現在、このような SPM に最も近い例として、走査型トンネル顕微鏡-非弾性トンネル分光 (STM-IETS) と、チップ増強型近接場ラマン散乱分光法 (TERS) が挙げられる。しかし、前者は原理的に超高真空中の極低温環境に計測が限定され、後者は近接場光を利用するため、探針の先端径程度 (10 nm オーダー) の空間分解能が限界であり、単一分子レベルの計測は困難であった。

研究代表者は、これまでに電子増強ラマン効果 (EERS) を見出し、様々な溶液試料に応用してきた。EERS は測定したい分子に電子を外来的に近接させ、分子を構成する置換基の分極率変化を誘起し、振動子強度を飛躍的に高めることで、通常のラマン散乱に比べ信号強度を  $10^2 \sim 10^5$  倍程度増強させる新しい増強ラマン分光法である。しかしこれまで、その電子発生をレーザー光の集光によるアバランシェイオン化に頼っていたため、空間分解能は最大でも数  $10 \mu\text{m}$ 、かつ試料へのダメージが無視できない欠点があった。

そこで本研究では、常温・液体中でも使用可能で、かつ分子レベルの空間分解能を有する周波数変調 AFM (FM-AFM) に着目し、AFM 探針におけるレーザー光誘起電子トンネル効果と、EERS 効果を組み合わせた新しい SPM である走査型電子増強ラマン分光顕微鏡の開発を着想した。その様な新規顕微鏡の開発にあたっては、もう一つのラマン増強法である表面増強ラマン効果 (SERS) を利用する TERS 顕微鏡をベースとし、探針先端-分子の複合系で起こる EERS の誘起を目指す。さらに、その様な顕微鏡を開発することで、探針先端で試料に力学刺激を与えながらのラマンスペクトルの取得も可能になる。そこで、分子集合体の弾性の分子起源や蛋白質の力学刺激に依る構造変化、およびそれらに対する水和水の寄与の理解を目指す。

## 2. 研究の目的

液体環境中で、単一分子レベルのラマンスペクトルを取得できる「走査型電子増強ラマ

ン分光顕微鏡」を開発し、材料化学および生命科学の分野に応用する。具体的な応用例として、触媒や生体材料として期待されるペプチド脂質分子集合体の弾性起源の置換基レベルからの理解、また力学刺激による 1 分子レベルでの蛋白質の構造変化、とくにアミロイド繊維への変化の機構の解明を目指す。

## 3. 研究の方法

- (1) パルスレーザー光を金属探針先端に集光し、電子を発生させた場合、先端近傍で電子増強効果を受ける分子数は可算個レベルになるはずである。しかし、バルク水中では、可算個レベルの分子が電子増強効果を受けているかどうかを識別することは、光の回折限界を考慮すると困難である。そこでまず、電子と相互作用する水分子のクラスターのサイズが 3 個から 5 個と提唱されている超臨界水中の EERS 計測を行い、分子可算個レベルで EERS 効果が得られるかどうかを検証した。
- (2) 次に具体的な測定試料であるペプチド脂質集合体や、アミロイド繊維を AFM 計測できるか、またそれらの力学物性が押し込みにより計測可能か検証した。
- (3) 金属探針を用いた EERS 計測へ移行するために、金属探針から電子を発生させる励

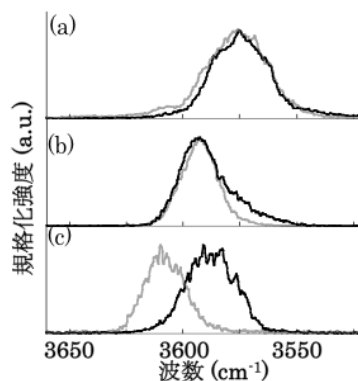


図1. 超臨界水中でのEERSスペクトル。(a) 高温・高圧水、(b) 亜臨界水、(c) 超臨界水。グレーが通常の水のスペクトル。黒が電子と相互作用している水由来の増強スペクトル。

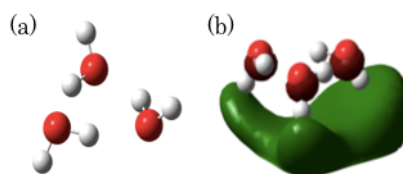


図2. (a), (b)は、それぞれ図1 (c)のグレーの線、黒の線の波数を再現するモデル図。

起方法を検討した。

(4) 励起方法を最適化した光学配置で空間分解能、表面凹凸検知能を実現するべく、目的試料の一つであるペプチド脂質集合体の水中 FM-AFM 計測を行い、分子レベルの解像度があることを確認した。

#### 4. 研究成果

(1) 分子可算個レベルで EERS 効果が得られるかの確認

電子と相互作用する水分子のクラスターのサイズが3個から5個と提唱されている超臨界水を用いて、電子と相互作用する水分子の振動スペクトル (EERS スペクトル) の取得を試みた。電子は光の入射してくる側により加速・増加していくため、いわゆる後方散乱中に電子との相互作用を反映する信号が顕著に観測される。

実験の結果、超臨界水では、前方散乱のピーク位置は通常の超臨界水のラマンシフトと一致しているのに対して、後方散乱では  $50\text{ cm}^{-1}$  の低波数シフトが観測された (図 1)。そのスペクトルの結果から、超臨界状態では水分子同士の水素結合ネットワークが切断され、発生した電子が双極子をもつ水分子を捉えている構造が発達したと考えられる。さらに、得られたスペクトルの波数と理論計算との比較から、超臨界水中では、発生した電子に平均3個の水分子が相互作用したクラスターが多く存在しているものと見積もられた (図 2)。

以上より、超臨界水を用いて可算個レベルの水分子の EERS スペクトルの検出に成功し、分子可算個レベルでも顕著な EERS 効果が得られることが確認できた。

(2) 金属探針の押し込みによりペプチド脂質集合体、アミロイド繊維の力学物性が計測可能か、AFM 計測により確認

##### ① ペプチド脂質自己集合体

ペプチド脂質の一つである 2-(2-tetradecanacetamido) acetic acid (産業技術総合研究所清水敏美博士らからの提供) は、親水基末端としてカルボキシレートイオン部位、疎水部位としてのアルキル鎖、その間に2つのグリシルグリシン基から構成される。親水部末端のカルボキシレートイオンは、遷移金属カチオンと配位結合を形成し、金属カチオンの種類を変えることによって、取りうる自己集合形態がチューブやプレート構造など異なることが報告されている。そのような金属を配位した脂質自己集合体は、新たな有機-無機ハイブリッド材料や生体適合性材料としての応用が期待されている。しかし、表面の親水性・疎水性を決定する化学状

態の分析や、金属がどのように脂質に配位しているかなどの、化学結合状態などを、表面選択的に計測する手法がなく、このような化学分析が望まれている。さらに、生体材料としての応用を考えた際には、これらの化学環境や構造と、弾性・粘性などの力学物性との相関を明らかにすることが材料設計の観点から望まれている。

ここでは上記ペプチド脂質を水中に分散させ、そのとき  $\text{Zn}^{2+}$  を共存させることで、 $\text{Zn}^{2+}$  配位型ペプチド脂質プレートを形成した。まず全く同じ脂質分子にも関わらず、同じ平面上の自己集合形態で、多方面に成長する sheet (図 3 (左)) と一方向に成長する tape (図 3 (右)) と、少なくとも2種類のプレート状の自己集合体を形成することを SEM 観察から明らかにした。

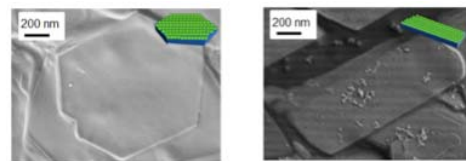


図3.  $\text{Zn}^{2+}$  配位型ペプチド脂質プレートのSEM像 (左: sheet、右: tape)。

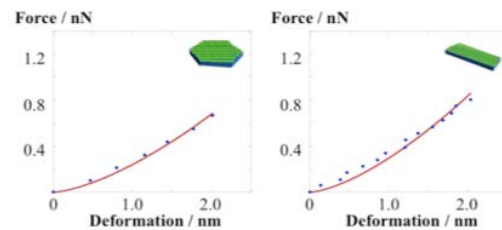


図4.  $\text{Zn}^{2+}$  配位型ペプチド脂質プレートのフォースカーブ (左: sheet、右: tape)。

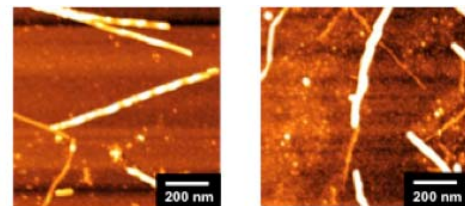


図5. (左)自然乾燥、(右)真空乾燥したリゾチーム繊維のAFM像

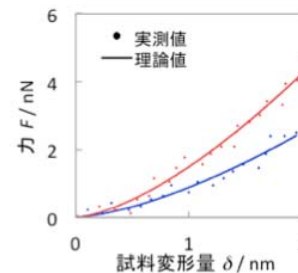


図6. 自然乾燥 (赤) /真空乾燥 (青) のアミロイド線維のフォースカーブ

次にそれぞれの自己集合体 1 個の AFM フォースカーブ (図 4) を計測し、ヤング率を Hertz の接触理論に従って定量評価した。その結果、sheet タイプのプレート構造のヤング率は 40 MPa、tape タイプのプレート構造は 52 MPa と見積もられた。この差異は、tape タイプの方が水素結合ネットワークがより強く発達していることと、さらに配位結合を介して脂質分子を繋いだことによって、縦方向の外力から変形を誘起しにくくなったことに依るものと考察した。このような結果から、分子 1 個 1 個が集まってできており、かつ力学的特性との相関が議論できるという観点から、本試料は一つの良いテストサンプルになることが分かった。

## ② アミロイド繊維

もうひとつの試料として、卵由来のリゾチームからアミロイド繊維を作成した。タンパク質は水和層の有無で天然状態から変性状態に変化するが、水和のタンパク質に及ぼす構造や機能というのは実験レベルでは直接計測が難しく、もっぱら理論計算による検討がなされているのが現状である。

ここではアミロイド繊維の懸濁液をマイカ基板に滴下し、AFM フォースカーブ計測を行い、そのヤング率を評価した。ここで、マイカ基板に滴下した懸濁液を自然乾燥または真空乾燥させることで、水分保持の有無がアミロイド繊維のヤング率にどのような影響を与えるか調べた。

自然乾燥および真空乾燥させたリゾチーム繊維の AFM 像を図 5 に示す。リゾチームから繊維が形成されたことが確認できた。それぞれの条件で作成した繊維 1 本のフォースカーブ (図 6) を計測し、ヤング率を Hertz の接触理論に従って定量評価した。自然乾燥の場合、340 MPa、一方真空乾燥では 200 MPa と見積もられた。このように、水和水の存在の程度により実際の力学的物性が変化する試料を見出したことで、当該の目的である、水和層とタンパク質の構造物性との観点を議論できる良いサンプルを得ることができた。

以上、測定対象であるペプチド脂質自己集合体とアミロイド繊維の力学特性 (ヤング率) を、金属探針の押し込みによる AFM 計測によって定量評価できることが確認できたことで、力学的に変形を加えながらの AFM 探針下での増強ラマン分光計測にとって有意義な試料を見出すことができた。

## (3) 金属探針から電子を発生させる励起方法の検討

次に金属探針を用いた EERS 計測に移行するために、金属探針から電子を発生させる励起方法として、まず side-illumination 型を

検討した。これは、長作動距離の対物レンズを用いて探針先端に励起光を探針側面から

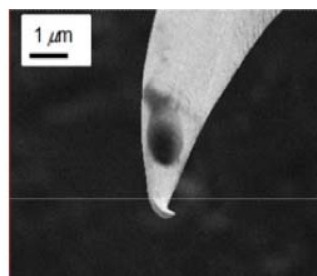


図7. 自作した金の探針のSEM像



図8. 金の探針の取り付け

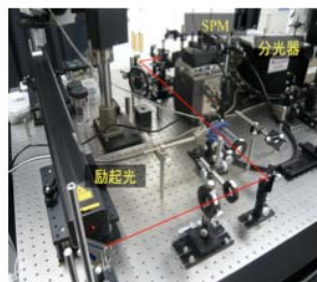


図9. 走査型電子増強ラマン分光顕微鏡の光学系

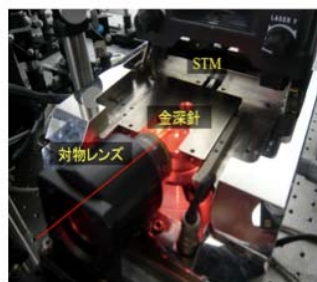


図10. 金探針への励起光の集光

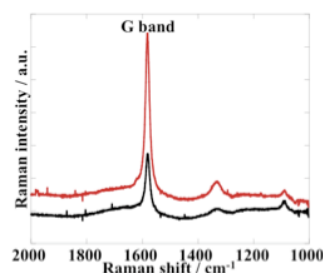


図11. HOPGのラマンスペクトル (赤) 探針あり (黒) 探針なし

集光照射している。この光学系配置では、探針に対してある角度で入射させることによって、水平方向で入射させるよりも、探針で発生する近接場強度が高くなり、ラマン散乱光の増強率が上がるのがこれまで見出されている (O. J. F. Martin and C. Girard, *Appl. Phys. Lett.*, 1997, 70, 705)。今回用いた AFM 装置は、試料室側面が空間的にあいているので、まず side-illumination 型の配置をとった。

初めに、金の探針を電解研磨で自作した。このとき先端曲率半径はまず 50 nm 程度を目標とした。自作した金の探針の SEM 像を図 7 に示す。自作した金探針を試料に近接させるために、金探針をホルダーに取り付けた (図 8)。また、図 9, 10 はそれぞれ自作した電子増強走査型ラマン顕微鏡の概観、対物レンズを用いて金探針にレーザー光を集光照射している様子である。ラマン散乱の増強信号を評価するために、測定試料として HOPG グラファイト基板を用いた。その理由として、G バンドのラマン散乱強度が高い事のみならず、試料が導電性であるため、トンネル電子を流しながら STM モードでチップを近接させフィードバックをかけることが出来るからである。こうすることで、電子は常に測定点に流れ続けるため、電子増強の第一歩となる。励起光源には He-Ne レーザー (波長: 632.8 nm、出力: 32 mW) を用い、測定モードは STM モードでフィードバックをかけた。

金探針を HOPG に STM モードでアプローチさせ、その時に探針にレーザー光を集光照射し、試料からのラマン散乱光の増強度を見積もった。探針を近接させたときとそうでない時のラマンスペクトルの比較を図 11 に示す。探針を近接させ、探針にレーザー光を集光照射した場合、探針がない状態における自発ラマン散乱の強度に比べて、約 3 倍の信号強度のラマン散乱が観測された。探針を用いた時の近接場の励起領域のサイズは、用いない場合に比べて、 $10^3$ 分の 1 程度と見積られる。そのことから、探針に直接光を入射させることで、 $10^3$ オーダーのラマン増強が得られた。

以上、金属探針にレーザー光を直接集光することで、ラマン増強が観測された。しかしこの方法をそのまま溶液中計測に持ち込もうとすると、溶液セルの空間的制限などの問題で、探針にレーザー光を直接導入することは困難であった。そこでより普遍的な励起を可能にすべく、直接探針へのレーザー光照射ではなく、以下に記すような近接場光内に探針を導入する励起方法へ装置を改良した。

近接場光内に金属探針を接近させ、電子励起させるシステムを構築するために、石英製の全反射プリズムに透明導電膜である ITO ガラスを塗布した。このとき全反射プリズム

側から光を導入、全内部反射励起で照射する方法で、ラマン分光計測が可能かどうか確認した。

図 12 に、半球プリズムに入射したレーザー光が全反射している概観を示す。励起光源には He-Ne レーザー (波長: 632.8 nm、出力: 32 mW) を用いた。測定試料として、アミロイド繊維の濃厚水溶液から、水和フィルムを作成し、計測に用いた。アミロイド繊維の水和フィルムを半球プリズムと石英基板で挟み込み、図 13 に示すようにレーザー光を全反射させ、その近接場によって励起されたラマン散乱光を対物レンズで拾い、全反射ラマンスペクトルを取得した (図 13)。その結果、蛋白質に特徴的なアミド I バンド ( $1660 \text{ cm}^{-1}$ )、アミド III バンド ( $1230 \text{ cm}^{-1}$ )、フェニルアラニン ( $1000 \text{ cm}^{-1}$ ) が観測され、蛋白質の全反射ラマンスペクトルの計測が可能であることを確認した。将来的には ITO プリズム上面から STM 探針を下して、同様の計測を行うことで、より普遍的なサンプルにも対応可能としていく予定である。

以上、金属探針を用いた EERS 計測に向けて、探針先端での電子の励起方法を検討した。最初に検討した横からレーザー光を集光照射させる光学配置よりも、全内部反射励起による近接場の領域に金属探針を導入する方法の方が、水系試料への適用が容易であり、金属探針を用いた EERS 計測に適していることが分かった。

#### (4) FM-AFM 計測による分解能の検討

上記の AFM, STM 測定は、全て AM モードで行った。一方、FM モードでは、より高い空間分解能を期待できる。ここでは金沢大学・福間剛士教授らの協力を受け、試験的に、水中 FM-AFM 計測で、先に計測したペプチド脂質集合体を用い空間分解能向上に向けた試験測定を行った。

その結果、 $\text{Zn}^{2+}$ 配位型ペプチド脂質プレートについて分子 1 つ 1 つのレベルの空間分解能をもつ表面凹凸像のイメージングに成功した (図 14)。このことから、上述した走査型レーザーラマン計測装置を FM モードに改良し、全反射光学配置をすることにより、分子レベルでの高空間分解増強ラマン計測ができることが分かった。本研究期間中ではほとんどの時間を装置開発と測定用試料の SPM 計測に費やしたが、増強ラマン信号と分子レベルの高分解計測が可能なが分かった。

今後は、AFM モードにおける光誘起電子放出の方法、ならびに、測定対象の普遍性を向上させるため、ペプチド脂質集合体やアミロイド繊維を具体的な対象物質として、走査型電子増強ラマン顕微鏡を STM ベースだけでなく FM 方式による AFM ベースにも拡張

する予定である。

#### 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4件)

① H. Yui, Y. Someya, Y. Kusama, K. Kanno and H. Takakuwa, "Microscopic Optical Discharge Cell for Micro-Spectroscopic Measurements of Plasma in Solutions and Its Chemical-contrasted Imaging" *Bunsekikagaku*, 査読有, vol. **62**, 2013, pp19-24.

② H. Yui, T. Tomai, M. Sawada, and K. Terashima, "Generation of laser-induced plasma in supercritical water and vibrational spectroscopic study of accompanying stimulated Raman scattering" *Appl. Phys. Lett.* 査読有, vol. **99**, 2011, 091504.

③ H. Yui, "Electron-enhanced Raman scattering: a history of its discovery and spectroscopic applications to solution chemistry and interfacial chemistry" *Anal. Bioanal. Chem.* 査読有, vol. **397**, 2010, pp1181-1190.

④ Y. Someya and H. Yui, "Fluorescence lifetime probe for solvent microviscosity utilizing anilinonaphthalene sulfonate" *Anal. Chem.* 査読有, vol. **82**, 2010, pp 5470-5476.

[学会発表] (計5件)

① H. Yui, Y. Someya, Y. Kusama, K. Kanno, H. Takakuwa, [Invited Lecture] Transient Formation of Plasma/Solution Interfaces - Its Micro-Spectroscopic Imaging and Applications toward New Reaction Fields-, 12<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing, Nagoya University, Nagoya, Japan, 2012, January 25.

② H. Yui, [Invited Lecture] "New Spectroscopic Approaches to Plasma / Solution Interfaces" IUPAC International Congress on Analytical Sciences (ICAS2011), (Kyoto, Japan, 2011年5月).

③ 由井宏治, [招待講演] 「プラズマと溶液の界面を利用した新しい計測技術を目指して」硫酸協会第50回分析分科会(東京、2011年3月) .

④ H. Yui, [Invited Lecture] "Spectroscopic Studies on Peptide Lipid Self-Assemblies" 11<sup>th</sup> International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-11), (Nagoya, Japan, 2011年1月).

⑤ 由井宏治, [招待講演] 「プラズマ/溶液界面の分光計測・分析化学の新展開」日本

分析化学会第59年会(東北大学、2010年9月15日) .

[図書] (計2件)

① 由井宏治, 「プラズマと溶液の界面が創り出す新しい化学反応場とその分光計測」日本化学会誌「化学と教育」2011年11月「レーダー」Vol. 59 No. 11 pp558-559

② 由井宏治, (特集記事) イノベーションに資する計測技術の最前線「プラズマと溶液の界面を利用した新しい計測技術を目指して」日本化学会誌「化学と工業」2010年10月号 pp798-799.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

由井 宏治 (YUI HIROHARU)

東京理科大学・理学部第一部化学科・教授

研究者番号：20313017

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし