

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 5月30日現在

機関番号：34504

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23750025

研究課題名（和文） 近接場光還元銀ナノ微粒子を用いた走査型 SERS イメージングの開発

研究課題名（英文） Development of scanning SERS imaging by using near-field photo-reduced silver nanoparticles

## 研究代表者

北濱 康孝 (KITAHAMA YASUTAKA)

関西学院大学・理工学研究科・専門技術員

研究者番号：00342775

研究成果の概要（和文）：光の回折限界より微小な領域に局在する近接場光を用いて、銀ナノ微粒子二量体を作製した。従来の光還元法では単独あるいは多数の銀ナノ微粒子しか作製できなかったが、今回、銀ナノ二量体を任意の位置に選択的に作製しながら、形状をその場測定して確認し、SERSスペクトルの違いを測定できた。また、単一分子レベルのイメージングで起きる明滅現象では、銀ナノ二量体間隙の極微小な周期的増強電磁場が影響している事を確認した。

研究成果の概要（英文）：By using near-field light, which is localized on smaller area than diffraction limit, a dimer of silver nanoparticles was fabricated. The silver nanodimer was selectively formed at a desired position and observed its topography in situ, while conventional photo-reduction forms only a single or many silver nanoparticles. Then different SERS spectrum to that from the single silver nanoparticle was measured from the silver nanodimer. Moreover, blinking SERS, which observed in the imaging at single molecule level, is affected by a nanometer-ordered periodic electromagnetic field at a junction of the silver nanodimer.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：化学

科研費の分科・細目：基礎化学・物理化学

キーワード：表面増強ラマン散乱、走査型近接場光学顕微鏡、イメージング、原子間力顕微鏡

## 1. 研究開始当初の背景

近年、表面増強ラマン散乱（SERS）イメージングの開発が進められている。SERSは銀ナノ微粒子二量体の間隙におけるプラズモン共鳴増強電磁場によって発現するので、単一分子レベルでも検出可能な感度の高さと数 nm オーダーの空間分解能が理論上は可能である。さらに、振動モードのシャープなピークから詳細な対象分子の同定ができる上に、水分子には不活性なので水を豊富に含んだ生体系の分析に適しており、生体細胞のどの部分にどんな分子が含まれているかという情報を得ることができる。既に、感度が低く空間分解能

も光の回折限界に制限されてしまうような通常のラマンイメージングでも、癌細胞表面に特定の脂質分子がマーカーとして観測されている。

SERS イメージング測定は、生体細胞表面に銀ナノ微粒子を吸着させる手法で行われている。この測定では、同じ酵母細胞上の異なる銀ナノ微粒子凝集体からのスペクトルが違うことが報告されており、細胞膜上のタンパク質分子の不均一性によるものと考えられている。しかしながら、この手法では銀ナノ微粒子を選択的に吸着させることができないという欠点がある。また、硝酸銀水溶液に細胞を

浸して化学あるいは光還元で細胞膜上に銀ナノ微粒子を生成させる手法も行われている。還元剤を使う化学還元法では細胞全体を銀ナノ微粒子が覆ってしまうことになる。一方、代表者も用いた光還元法の場合、集光位置を選択することで銀ナノ微粒子を任意の場所に生成することができるが、集光範囲に多数の銀ナノ微粒子ができてしまい、空間分解能が光の回折限界に制限されてしまう。

近年、代表者は近接場光還元で銀ナノ微粒子を作製することに成功した。極微小な開口を持つ光ファイバーを用いた走査型近接場光学顕微鏡 (SNOM) は波長限界を超えた空間分解能を有するが、その開口径の小ささのために照射光強度が弱くなり測定される信号も弱くなってしまう。一方、金属性チップを用いた散乱型ではチップ先端にプラズモンと照射光の結合による増強電磁場が生じてラマンスペクトルも測定できるほどに信号を増幅できる (チップ増強ラマン散乱: TERS) が、チップ以外を照射してしまうことによる背景信号も観測されてしまう。代表者はこれらの欠点を解消するために、SNOM 用光ファイバー先端に銀ナノ微粒子を担持させると共に、そこからの SERS スペクトルの測定にも成功した。そこで本研究では、この近接場光還元で選択的に作製した極少数の銀ナノ微粒子による走査型 SERS イメージングの開発を行う。

## 2. 研究の目的

原子間力顕微鏡 (AFM) で用いられるカンチレバーの先端に極微小な開口を作り、そこに光を照射して近接場を発生させる。この近接場光を銀イオンを含ませた細胞などに近づけて光還元により細胞膜中に単一銀ナノ微粒子を作製する。開口カンチレバーを走査しながら銀ナノ二量体を作製しつつ間隙からの SERS を測定してイメージングを行う。さまざまな条件で作製した銀ナノ微粒子の大きさやプラズモン共鳴スペクトルへの影響を評価するために、開口カンチレバーを取り付けた AFM や暗視野測定でその場測定あるいは同時時間分解測定し、走査型 SERS イメージングのための最適測定条件を明らかにする。この最適測定条件の下で、従来は測定できなかった出芽酵母の娘細胞の細胞膜上のタンパク質や脂質分子の分布を単一分子レベル・数 nm オーダーの高感度・高空間分解能な走査型 SERS イメージングで明らかにしたい。

## 3. 研究の方法

(1) AFM・ラマン測定装置に開口カンチレバーを取り付け、その先端での近接場光還元で

銀イオンを含ませた膜中に銀ナノ微粒子二量体を作製しながら、AFM その場測定やプラズモン共鳴スペクトル・SERS スペクトルの同時時間分解測定を行い、銀ナノ微粒子の形状と光学的性質の相関を評価する。これらの評価に基づいて最適測定条件を確定した後、開口カンチレバーを走査して銀ナノ微粒子二量体を作製しながらスペクトルを測定する走査型 SERS イメージング測定を行い、高い空間分解能と単一分子レベルの高感度さを示唆する酵母細胞上の微細な位置の違いによる生体分子からの SERS スペクトルの不連続な変化を検出する。

(2) 単一分子レベルの SERS イメージングで起きる明滅現象を調べるために、チアシアニン水溶液、NaCl 水溶液、銀ナノコロイド分散液を混合して、スライドガラスにスピコートした後、1M NaCl 水溶液を滴下して銀ナノ微粒子凝集体をガラス上に定着させ、もう一枚のスライドガラスで挟んで試料とした。これに励起レーザー光 ( $\lambda = 458, 514, 568 \text{ nm}$ ) を照射し、単一銀ナノ微粒子凝集体からの SERS 強度の時間変化を測定した。SERS が発現しない暗状態が続いた時間  $t$  ごとに発生回数をカウントし、その確率分布  $P(t)$  を算出した。その確率分布を両対数グラフにプロットし、指数関数付き冪乗則  $P(t) = At^\alpha \exp(-t/\tau)$  でフィットして冪指数  $\alpha$  と減衰時間  $\tau$  を求める。

## 4. 研究成果

(1) ①銀イオンを含ませたゲルに原子間力顕微鏡 (AFM) の開口カンチレバーを接近させて、開口部に励起光を照射することで近接場光還元を試みた。これによる銀ナノ微粒子作成を行い、その前後での原子レベルでの形状測定と表面増強ラマン散乱 (SERS) 測定も試みたが、ゲル中の水分が多いと、乾燥によるゲルの収縮によって、カンチレバーで表面を走査することができなかった。一方、ゲル中の水分が少ないと、銀イオンの拡散が起きにくくなって、光還元による銀ナノ微粒子生成が難しく SERS 測定が困難であった。このようにゲルを用いた AFM 測定と光還元銀ナノ微粒子による SERS 測定とは矛盾した条件が必要であった。

そこで、硝酸銀結晶に AFM の開口カンチレバーを接近させ、開口部に波長 488nm の励起光を照射して近接場光還元を行うことで、近接場光を照射した領域からのラマンスペクトルを増強させることができた (図 1)。1045  $\text{cm}^{-1}$  付近の鋭いピークは基板に用いた硝酸銀結晶の硝酸イオン由来のピークである。この図から通常のラマンスペクトルでは観測され

なかったチアシアニン色素のラマンスペクトルが増強されており、銀ナノ粒子が作製されてSERSスペクトルとして観測されたと考えられる。

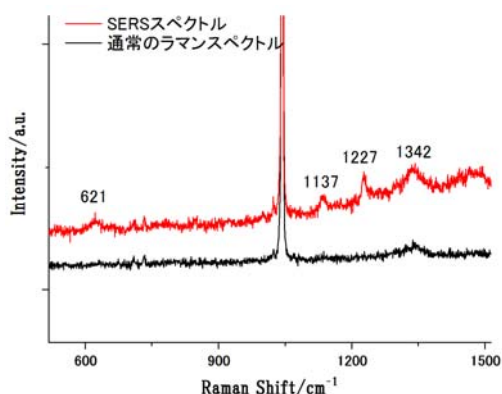


図1 近接場光還元前後でのチアシアニンのラマンスペクトル

実際に、近接場光還元前後で結晶表面のAFM その場測定を行い、カンチレバーの開口径と同じぐらいの直径の突起物、すなわち銀ナノ微粒子あるいはその二量体の生成を確認した(図2)。単独の銀ナノ微粒子を作製した結晶上に4,4'-ビピリジンのアセトン溶液を滴下して、波長514nmの励起光でラマン測定を行うと、1026 cm<sup>-1</sup>付近にビピリジン金属錯体の環呼吸振動モードのピークが観測された。一方、銀ナノ微粒子二量体の場合、1000 cm<sup>-1</sup>付近に結晶状態ビピリジン分子の環呼吸振動モードのピークが観測された(図3)。前者は、ビピリジン分子が金属に吸着してSERSが発現していると思われる。後者は、近接場光還元で作製した銀ナノ微粒子二量体の間に、ビピリジン分子が金属に吸着しない状態で存在し、そこからのSERSが発現していると考えられる。後者では銀ナノ粒子二量体の長軸に対して偏光を平行にすることで増強が起こったことから、二量体間隙からのSERSであ

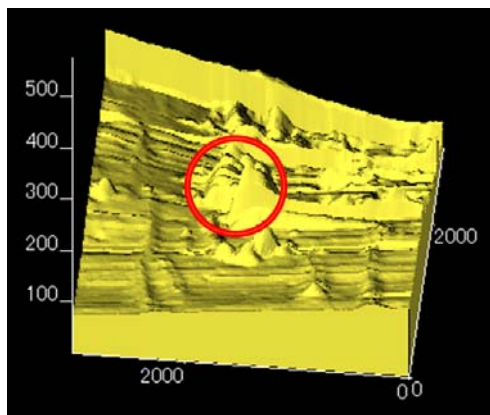


図2 近接場光還元後の硝酸銀結晶のAFM画像

ると確認できた。また、濃度を薄くすると、1000 cm<sup>-1</sup>付近の信号強度の相対比が小さくなった事、蒸発速度の遅いエタノール溶液では1000 cm<sup>-1</sup>付近の信号が観測されなかった事からも、1000 cm<sup>-1</sup>付近のピークは結晶状態ビピリジン分子由来であると言える。

このように、従来の光還元法では単独あるいは多数の銀ナノ微粒子しか作製できなかったが、今回、銀ナノ微粒子を任意の位置に選択的に作製しながら、形状をその場測定して二量体あるいは単量体を確認し、それによるSERSスペクトルの違いを測定できた。

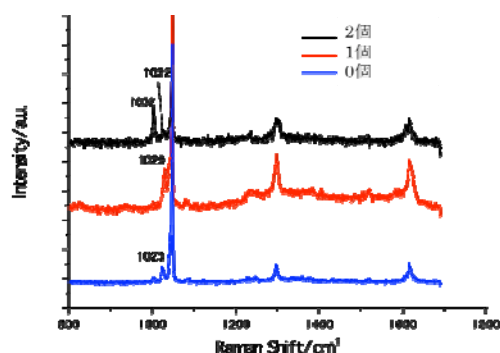


図3 近接場光還元銀ナノ微粒子上の4,4'-ビピリジンのSERSスペクトル

② SERSは金属ナノ構造体の局在表面プラズモン共鳴による増強電磁場で、吸着分子のラマン散乱効率が著しく増大する現象である。この増強電磁場は金属表面あるいは金属ナノ構造体の接点に局在しているために、表面・接点に近い分子の置換基のみの振動モードが増幅され得る、すなわち、SERSスペクトルが吸着分子の配向によって変化する事がある。今回、近接場光還元によってSERS測定用の金属ナノ構造体を選択的に作製し、表面あるいは接点からのSERSスペクトルの測定に成功した。そこで、有機溶媒中に存在する分子をこの金属ナノ構造体の表面あるいは接点に吸着させ、洗浄前後のスペクトル変化を測定するなどして分子配向の違いを考察することにした。

洗浄前のSERSスペクトル(図3)では、1045 cm<sup>-1</sup>に硝酸イオンのラマンピークが現れ、1002, ~1026, 1294, 1616 cm<sup>-1</sup>には4,4'-ビピリジンの結晶性分子Ring breathing、金属錯体Ring breathing, Inter-ring stretch, Ring stretch modeがそれぞれ観測され、洗浄後も同じ位置にピークが現れたが、その相対比が変化した。

エタノール洗浄では、金属錯体Ring breathing modeの強度が相対的に増大した。これは、溶解したビピリジンが銀ナノ構造体間

隙に吸着したと考えられる。一方、アセトン洗浄では、Inter-ring stretch mode の強度が相対的に増大した。溶解したピペリジンが銀ナノ構造体間隙で垂直配向したものと思われる。

これは、金ナノ微粒子上で作製した SERS 基板に 4,4'-ピペリジンのエタノール溶液を滴下して洗浄前後のスペクトルを測定したところ、Inter-ring stretch mode が相対的に減少したという報告とは異なる結果であった。

(2) 単一分子レベルの SERS イメージングで起きる明滅現象についても調べた。アニオン性色素を吸着させた銀ナノコロイド微粒子上からの SERS 明滅現象を、色素濃度や励起波長を変化させて観測し、図 4 のように明滅状

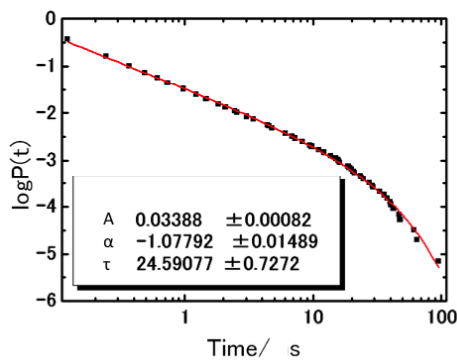


図 4 SERS 非発現状態保持時間の確率分布

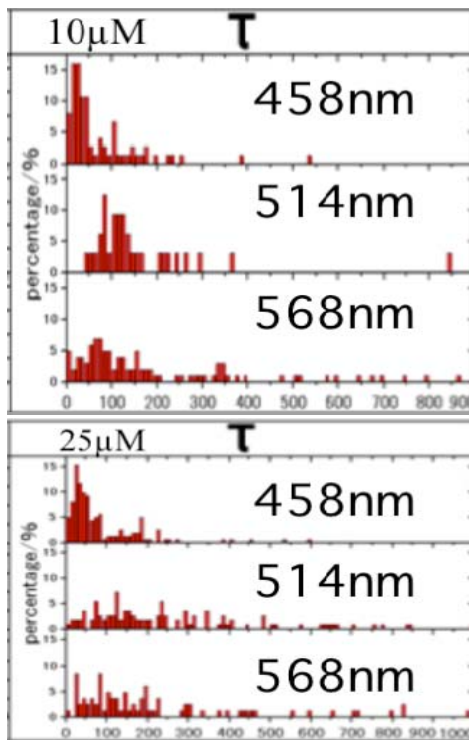


図 5 減衰時間のヒストグラム

態保持時間の確率分布を指数関数付き冪乗則  $P(t) = At^\alpha \exp(-t/\tau)$  で解析し、冪指数  $\alpha$  と減衰時間  $\tau$  を求めると、高濃度では  $\tau$  が長くなる事が分かった。単一量子ドットの明滅現象と同様に、冪乗則からのずれは吸着分子が明暗状態間のエネルギー障壁を速い拡散によって乗り越えることに起因し、減衰時間  $\tau$  はその拡散時間をエネルギー障壁の高さで割った値に比例すると考えられる。励起光強度依存性の場合とは異なり、濃度が違ってもプラズモン増強電磁場の干渉によるエネルギー障壁の高さは同じはずなので、吸着分子の濃度が拡散時間に影響して  $\tau$  の変化が観測されたと考えている。

一方、長波長の光で励起した場合は  $\tau$  が長くなる事が分かった (図 5)。励起光強度依存性の場合のチアカルボシアニン分子とは異なり、今回のチアシアニン分子は 458nm より長い波長の光をほとんど吸収しないため光誘起による脱離は起きないと考えられるので、明暗状態間のエネルギー障壁が励起光波長の違いに影響されたと思われる。このエネルギー障壁は、周期的な増強電磁場による光学トラップポテンシャルの底と準安定な極小位置という SERS 明暗状態の間に存在すると考えられる。最近、探針を用いた走査型近接場光学顕微鏡により、金ナノブロックの間隙に周期的な構造を持つ電磁場が観測された。これは、表面プラズモンの多重極子共鳴が結合したものと考えられている。多重極子の共鳴は長波長の光励起では起きにくく、図 6 の FDTD (finite-difference time-domain) 法での計算が示すように、周期的な増強電磁場も生まれにくい。これは、長波長の光励起では SERS 暗状態での確率分布の冪乗則からのずれが起きにくい、すなわち  $\tau$  が長くなるとい

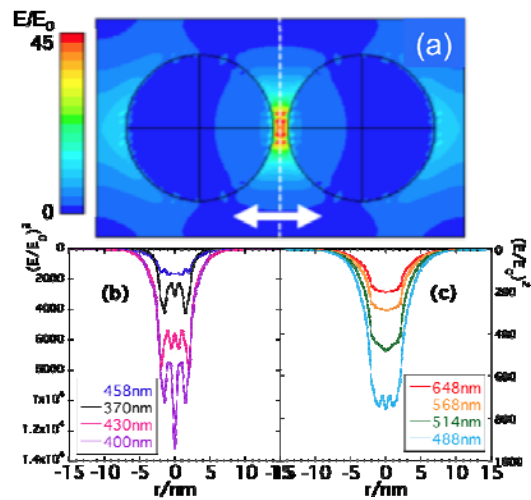


図 6 表面プラズモン増強電磁場の強度分布計算

う実験結果と一致する。

このように、励起波長が短いと銀ナノ微粒子二量体の間隙に周期的な増強電磁場が発生し、それが SERS 明滅現象に影響している事を確認した。今回の研究結果は、走査型近接場光学顕微鏡による金ナノ二量体間隙の周期的な増強電磁場の観測報告での挙動と一致している事も明らかになった。

## 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 2 件)

- ① Yasutaka Kitahama, Ai Enogaki, Yuhei Tanaka, Tamitake Itoh, Yukihiro Ozaki, “Truncated power law analysis of blinking SERS of thiocyanine molecules adsorbed on single silver nanoaggregates by excitation at various wavelengths”, *J. Phys. Chem. C*, 査読有、Vol. 117, Issue 18, 2013, pp. 9397–9403, DOI: 10.1021/jp312530j
- ② Xinlei Yan, Tamitake Itoh, Yasutaka Kitahama, Toshiaki Suzuki, Harumi Sato, Takeshi Miyake, Yukihiro Ozaki, “A Raman spectroscopy study on single wall carbon nanotube/polystyrene nanocomposites: mechanical compression transferred from the polymer to single-wall carbon nanotubes”, *J. Phys. Chem. C*, 査読有、Vol. 116, Issue 33, 2012, pp. 17897–17903, DOI: 10.1021/jp303509g

[学会発表] (計 9 件)

- ① 北濱康孝、池町卓哉、鈴木利明、尾崎幸洋、「近接場光還元基板の洗浄前後での表面増強ラマン散乱スペクトル変化」、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀)
- ② 池町卓哉、北濱康孝、鈴木利明、尾崎幸洋、「近接場光還元基板による 4,4'-ビピリジンの表面増強ラマン散乱測定」、日本化学会第 93 春季年会、2013 年 3 月 23 日、立命館大学びわこ・くさつキャンパス (滋賀)
- ③ 北濱康孝、榎垣愛、伊藤民武、尾崎幸洋、「SERS 明滅現象の励起波長依存性」、分子科学討論会 2012、2012 年 9 月 21 日、東京大学本郷キャンパス (東京)
- ④ 池町卓哉、北濱康孝、鈴木利明、尾崎幸洋、「近接場光還元を用いた表面増強ラマン散乱測定」、分子科学討論会 2012、2012 年 9 月 18 日、東京大学本郷キャンパス (東京)
- ⑤ 北濱康孝、榎垣愛、伊藤民武、尾崎幸洋、「Blinking SERS from single Ag nanoaggregate with adsorbed dye at different

concentration excited at various wavelengths」、第 23 回国際ラマン会議、2012 年 8 月 14 日、インド理科大学院 (インド、バンガロール)

- ⑥ 池町卓哉、北濱康孝、鈴木利明、尾崎幸洋、「Surface-enhanced Raman scattering measurement by using near-field photo reduction」、第 23 回国際ラマン会議、2012 年 8 月 13 日、インド理科大学院 (インド、バンガロール)
- ⑦ 北濱康孝、榎垣愛、伊藤民武、尾崎幸洋、「表面増強ラマン散乱明滅現象の濃度依存性」、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 27 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川)
- ⑧ 池町卓哉、北濱康孝、鈴木利明、尾崎幸洋、「近接場光還元銀ナノ微粒子を用いた表面増強ラマン散乱測定」、日本化学会第 92 春季年会、2012 年 3 月 27 日、慶應義塾大学日吉キャンパス (神奈川)
- ⑨ 北濱康孝、鈴木利明、尾崎幸洋、「原子間力顕微鏡を用いた近接場光還元銀ナノ微粒子による表面増強ラマン散乱」、分子科学討論会 2011、2011 年 9 月 20 日、札幌コンベンションセンター (北海道)

[図書] (計 1 件)

- ① Yasutaka Kitahama, Tamitake Itoh, Prompong Pienpinijtham, Sanong Ekgasit, Xiaoxia Han, Yukihiro Ozaki, American Chemical Society, “Chapter 9 Biological applications of SERS using functional nanoparticles” in *Functional Nanoparticles for Bioanalysis, Nanomedicine and Bioelectronic Devices Volume 2 (ACS Symposium series Vol. 1113)*, 2013, pp. 181–234

[その他]

ホームページ等

<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ozaki/>  
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ozaki/StrategicResFoundSERS.html>  
<http://sci-tech.ksc.kwansei.ac.jp/~ozaki/SERS.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

北濱 康孝 (KITAHAMA YASUTAKA)  
関西学院大学・理工学研究科・専門技術員  
研究者番号: 00342775