トピックス

近接場ラマン顕微鏡によるナノメートル観察

市村垂生¹, 河田 聡^{1,2}¹大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻²理化学研究所

1. はじめに

近接場光学顕微鏡は「光で」「ナノで」「大気中／液中で」試料を観察できる。これらの特徴は、生物学研究において大いに有用であり、これまで多くの方々から興味をもっていただいた。筆者らは、近接場光学顕微鏡、特に先端増強型のその開発に取り組み、分解能、感度を向上させると同時に、いつでも誰でも使える実用的な装置としての技術確立をめざしている。本稿では、**先端増強型近接場光学顕微鏡**の最新の研究動向を、筆者らのグループの研究成果を中心に紹介し、広く応用されるための今後の課題について述べる。

2. 先端増強型近接場ラマン顕微鏡

先端増強型の近接場光学顕微鏡では、先鋭な金属ナノ探針を用いる (図 1a)。探針先端に光照射すると、金属内の自由電子が強く揺らされ、光強度が先端近傍で増強され、局在する (図 1b)¹⁾。この局在光を近接場光という。探針を、観察したい試料に近づけると、近接場光の中にある試料分子のみを光励起することができる。近接場光の空間的広がり、探針先端径程度 (数 10 nm) であり、これが顕微鏡としての空間分解能を決める。試料 (または探針) を走査することにより、光の回折限界をはるかに超えた光学イメージングが可能となる。探針としては通常、金属化した原子間力顕微鏡 (AFM) 探針や走査トンネル顕微鏡 (STM) 探針を用いる。近接場光学顕微鏡には、先鋭化された光ファイバプローブを用いる方式 (いわゆる開口型) もあり、現時点ではこちらの方が広く市販されているが、分解能・感度とも先端増強型の方が優れている。

金属探針先端の近接場光により、蛍光、レーリー散乱、ラマン散乱、非線形散乱などさまざまな光-物質相互作用を励起できる。なかでも、ラマン散乱を増強させる、先端増強ラマン散乱 (tip-enhanced Raman

scattering: TERS) 顕微鏡では、染色などの前処理なしで試料の分子組成やその分布を直接観察できる²⁾。

図 1c に、筆者らのグループで試作した TERS 顕微鏡の構成を示す。倒立顕微鏡、AFM、励起用レーザー、ラマン分光検出器で構成される。探針として、AFM 用のカンチレバーに銀コートしたものを用い、接触モード AFM により高さ制御している。レーザー光を対物レンズにより試料表面に集光し、集光スポット内で探針先端を AFM 制御する。先端で増強されたラマン散乱光を、窒素冷却 CCD や EMCCD を備えた分光器によりスペクトル検出する。

図 1d に、この装置により観察されたナノ微結晶のアデニン分子の TERS スペクトルの 1 例を示す。金属探針先端が試料から離れているときはピークは観察できないが、接触させると多くのピークが観察される。これらのピークはアデニン分子固有のピークであり、分子のラマン散乱を金属探針により増強できることを示している。また、図 1e は 2 重鎖 DNA の自己組織化ネットワーク構造を、アデニンの分子振動モードで大気中観察した像である。15 nm の空間分解能を実現している³⁾。世界の他のグループでも、同じ原理に基づいて、やはり 10 nm に迫る分解能が得られている^{4), 5)}。

図 1 (a) ナノ探針の SEM 像。 (b) 先端での近接場光の発生 (数値計算)。 (c) TERS 顕微鏡の構成。 (d) TERS スペクトル (アデニン)。 (e) DNA のラマン像。

Near-Field Raman Microscopy for Nanometric Observation

Taro ICHIMURA¹ and Satoshi KAWATA^{1,2}¹Department of Applied Physics, Osaka University²RIKEN

3. ナノメートル分解能へ

最近筆者らは、TERS 顕微鏡の空間分解能を数ナノメートルのレベルまで向上する方法を提案し、実証した⁶⁾。この方法では、金属探針と試料の相互作用を利用する。探針先端と試料が物理的に接触すると、金属からの圧力印加により試料分子の構造が変形し（力学的相互作用）、同時に、分子軌道が金属の電子雲と重なり変化する（化学的相互作用）^{7), 8)}。これらはいずれも分子振動スペクトルに変化を与える。このスペクトル変化は、探針先端と直接接触している分子のみに現れる。変化部分（強度変化またはピークシフト）を抽出してやれば、接触している分子の分光情報が選択的に得られる。近接場光の大きさが探針先端サイズ程度なのに比べて、はるかに小さい領域の分子のみを観察できることになる（図 2a）。これが空間分解能向上の原理である。

図 2b はアデニン分子の ring breathing mode とよばれる振動のスペクトル変化を観察したものである⁹⁾。探針が試料（ナノ微結晶）から離れているときのスペクトル（A）と比較すると、接触すると化学的相互作用により高振動数側に新しいピークが出現し（B）、さらに強い力を印加すると強度と振動数ともに大きく変化している（C）。スペクトル変化の振る舞いは、量子化学計算により予測・解析でき、分子配向やその変化までをも知る事ができる¹⁰⁾。

上記と同じアデニンナノ微結晶を試料として用い、空間分解能を検証した。探針先端を微結晶のエッジを横切るように 1 次元走査し（図 2c 上）、ピークの振動数変化を位置に対してプロットした（図 2c 下）。微結晶のエッジが約 4 nm の空間応答を以て観察された。エッジ応答の幅は点物体の空間応答の幅に一致する。

図 2 (a) 高分解能の原理。 (b) 探針-試料間相互作用によるスペクトル変化。 (c) アデニン微結晶の 1 次元走査像。 ガラス基板上に固定した微結晶を用い、大気中で測定した。

したがって、この結果から 4 nm の空間分解能が実現したといえる。現時点で、この分解能は TERS 顕微鏡において世界最高である。前述したように、本手法では探針先端と接触する分子の情報を取得できるため、原理的には AFM の分解能（1 nm 以下）での分光イメージングが可能であると考えている。さらに分解能を向上するために、探針の設計、力の最適設定を進めたい。

4. 今後の課題

このように先端増強型の近接場光学顕微鏡は、ナノメートル分解能での分子イメージングを実現している。今後、生物学の応用を見据えた研究が必要であろう。現状としては使える装置として認知されていると言いはし難い。実際、生物物理学学会年会において、関連の発表は筆者らを除くとこれまで 1 件もない。最大の課題は、探針の加工精度と歩留まりの向上である。分解能・感度は探針に大きく依存するが、その探針がすべて同じに加工できない。ゆえに、同じ性能が毎回得られるとは限らないのである。時間分解能も応用上重要な要素であるが、それも探針の出来如何にかかっている。この重要な課題に尽力し、「使える装置」としての技術確立を成し遂げたい。

文 献

- 1) Kawata, S. *et al.* eds. (2007) Tip Enhancement, Elsevier.
- 2) Hayazawa, N. *et al.* (2000) Opt. Commun. **183**, 333-336.
- 3) Ichimura, T. *et al.* (2004) Phys. Rev. Lett. **92**, 220801.
- 4) Anderson, N. *et al.* (2005) J. Am. Chem. Soc. **127**, 2533-2537.
- 5) Steidtner, J. *et al.* (2008) Phys. Rev. Lett. **100**, 236101.
- 6) Yano, T. *et al.* (2009) Nature Photonics **3**, 473.
- 7) Watanabe, H. *et al.* (2004) Phys. Rev. B **69**, 155418.
- 8) Yano, T. *et al.* (2006) Nano Lett. **6**, 1269-1273.
- 9) Ichimura, T. *et al.* (2009) Phys. Rev. Lett. **102**, 186101.
- 10) Hayazawa, N. *et al.* (2006) J. Chem. Phys. **125**, 244706.

市村垂生

市村垂生 (いちむら たろう)

大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻特任研究員

2004 年大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻博士後期課程修了。博士（工学）。04-07 年大阪大学大学院生命機能研究科にて日本学術振興会特別研究員。07 年から現職。

研究内容: 近接場ラマン顕微鏡によるナノ分子イメージング

連絡先: 〒565-0871 大阪府吹田市山田丘 2-1

E-mail: ichimura@ap.eng.osaka-u.ac.jp

URL: <http://lasie.ap.eng.osaka-u.ac.jp/ap1g1tar/>

河田 聡 (かわた さとし)

大阪大学大学院工学研究科応用物理学専攻教授／理化学研究所主任研究員