近接場CARS顕微鏡によるDNA分子イメージング

市村 垂生¹, 井上 康志^{1,3}, 河田 聡^{2,3}

¹大阪大学大学院 生命機能研究科 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘1-3)

²大阪大学大学院 工学研究科応用物理学専攻 (〒565-0871 大阪府吹田市山田丘2-1)

³理化学研究所 (〒351-0198 埼玉県和光市広沢2-1)

Near-Field CARS Microscopy for Molecular-Imaging of DNA

Taro ICHIMURA,¹ Yasushi INOUE,^{1,3} and Satoshi KAWATA^{2,3}

¹Graduate School of Frontier Biosciences, Osaka University, 1-3 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

²Department of Applied Physics, Graduate School of Engineering, Osaka University, 2-1 Yamadaoka, Suita, Osaka 565-0871

³RIKEN, 2-1 Hirosawa, Wako, Saitama 351-0198

(Received September 28, 2005)

Tip enhanced near-field scanning optical microscopy and coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS) spectroscopy, a type of nonlinear Raman spectroscopy, have been successfully combined to image and analyze molecular distribution of nano-structures. Owing to the third order nonlinearity of the CARS process, the excitation of the CARS polarization is extremely confined to the end of the tip apex, resulting in high image contrast and high spatial resolution far beyond the diffraction limit of light. Our tip-enhanced CARS microscope visualized a deoxyribonucleic acid (DNA) network structure at a characteristic vibration-frequency (1337 cm⁻¹) in the fingerprint region with a spatial resolution of ~ 15 nm.

Key Words: Near-field scanning optical microscopy, Nonlinear optical effect, Metallic probe tip, Local field enhancement, Coherent anti-Stokes Raman scattering (CARS)

1. はじめに

近接場光学顕微鏡は、光の回折限界以下の空間分解能で物質の、文字通り光学情報を取得できる顕微鏡である¹⁾。光学情報とは、吸収、屈折、散乱、発光などの相互作用を通して計測される、試料の分子・結晶の組成や構造といった物質情報を意味する。光学情報を計測するための様々な分光計測技術を顕微鏡と組み合わせることにより、物質情報をマッピングできるのである。原子分解能で画像を提供してくれるSTMやAFMなど他のナノプローブ顕微鏡²⁾に対して、近接場光学顕微鏡の存在意義はそこにある。加えて、そもそも光は試料に対して優しいプローブであることから、生体分子などのソフトマテリアルも非破壊で分析でき、生体内の環境(液中)でも使用できる。それゆえ、生物分野では光学顕微鏡が広く使用されてきた。近接場光学顕微鏡は、このような魅力的な特長を、そのままナノの世界に持ち込む。

種々の分光計測技術の中でもとくに分子振動分光(ラマン散乱&赤外吸収)は、試料を染色などの前処理なくそのままの状態でも分子組成を分析できる。我々はこれまでに、先鋭な非開口金属プローブを用いた近接場光学顕微鏡³⁾によるナノスケールラマン分光を提案、実現してき

た^{4,5)}。金属プローブ先端(チップ)における局在プラズモン励起を利用し、チップ下のナノ領域の分子のラマン散乱を誘起するものである。チップ増強ラマン散乱(Tip enhanced Raman scattering; TERS)と呼ばれ、これは、表面増強ラマン散乱(Surface enhanced Raman scattering; SERS)^{6,7)}を金属チップ先端で実現したことにはかならない。DNAなどの生体分子⁸⁾や単層カーボンナノチューブ⁹⁾に代表される最先端ナノ材料のナノラマン分析を実現し、ラマン分光法をナノの世界に導入するに至った。最近では他の研究グループからも報告があり^{10,11)}、近接場光学顕微鏡の分野で今最もホットなトピックの1つである。

この金属チップ増強型の近接場ラマン分光顕微鏡を高空間分解能化し、より微小な構造の観察に応用したい。このためには、ラマン分極をさらに空間的に閉じ込める必要がある。本稿で紹介する研究では、自発ラマン散乱の代わりに非線形ラマン散乱を利用し、その非線形性により空間分解能の向上を図る^{12,13)}。非線形のラマン散乱としてコヒーレントアンチストークスラマン散乱(CARS)を用いて近接場CARS顕微鏡を構築し、DNA分子¹³⁾や単層カーボンナノチューブ¹²⁾のラマンイメージングを実現した。とくに、DNAのナノネットワーク構造を、DNA塩基分子に特徴的な指紋領域の振動モードにおいて、約15 nm

の空間分解能で可視化できた。本稿では、近接場CARS顕微鏡の原理、装置について述べ、このDNA分子イメージングの実験について概説する。

2. 近接場CARS顕微鏡の原理

波長以下の大きさの先鋭な金属プローブ先端に光を照射すると、先端のチップ近傍の微小領域に強い光場が生成される^{3,14}。チップの金属中の電子が入射光によって励振されることによって起こる¹⁵。これを局在表面プラズモンといい、SERSにおける電磁気学的増強と同じ原理に基づく⁶。この局所増強場で分子のラマン散乱を誘起することで、チップサイズ程度の微小領域のラマンスペクトルが得られる(Fig. 1)。試料またはプローブを走査すれば、先端サイズ程度の空間分解能でのラマンイメージングが可能となる^{8,16,17}。

本研究で提案する近接場CARS顕微鏡では、金属チップの局所増強場でCARSを誘起する。CARSは三次の非線形コヒーレントラマン散乱の一つで、二色の励起光の振動数差($\omega_1 - \omega_2$)を試料分子に特徴的なラマン活性振動準位の振動数(Ω_{Raman})に一致させ、振動数が $\omega_3 = (\omega_1 - \omega_2) + \omega_1 = 2\omega_1 - \omega_2$ のCARS分極(式(1))を共鳴的に誘起する(Fig. 2(a))¹⁸。

$$P_{\text{CARS}}^{(3)}(\omega_3 = 2\omega_1 - \omega_2) = \chi^{(3)} E_1(\omega_1) E_2^*(\omega_2) E_1(\omega_1) \quad (1)$$

ここで、 $\chi^{(3)}$ は非線形感受率、 $E_1(\omega_1)$ や $E_2(\omega_2)$ はそれぞれ励起場の ω_1 と ω_2 の振動数成分を表し、 $E_2^*(\omega_2)$ は $E_2(\omega_2)$ の複素共役を表す。本来はベクトル式であるがここでは簡単のためスカラー式で表現した。非線形感受率 $\chi^{(3)}$ は、一般的に振動準位に関係する共鳴項($\chi_R^{(3)}$)と関係しない非共鳴項($\chi_{\text{NR}}^{(3)}$)の和(式(2))で表される。

$$\chi^{(3)} = \chi_R^{(3)} + \chi_{\text{NR}}^{(3)} = \frac{A}{\Omega_{\text{Raman}} - (\omega_1 - \omega_2) - i\Gamma} + \chi_{\text{NR}}^{(3)} \quad (2)$$

A は振動強度を表す定数、 Γ はバンド幅に相当する。 $\chi_{\text{NR}}^{(3)}$ は振動共鳴準位を経由しない過程からの寄与である。とくに、 $2\omega_1$ のエネルギー準位を経由する過程は、往々にし

Fig. 1 Schematic illustration of local enhancement by a metallic probe tip.

Fig. 2 (a) Energy diagram of the CARS process. (b) Spatial confinement of the excitation efficiency of high-order nonlinear effects.

て電子準位共鳴もしくは前期共鳴過程となるため¹⁸、最も大きな寄与を与える。この分極による放射光がCARS光であり、 ω_2 を掃引しながら $\omega_1 - \omega_2$ に対してCARS光強度をプロットすれば、自発ラマンスペクトルと類似のCARSスペクトルが得られる。自発ラマン分光法同様、分子種や分子組成といった化学情報を取得できる。もちろん、染色などの前処理は必要ない。通常のCARS分光法においては、励起レーザー光を試料中で位相整合条件を満たすような角度で交差させ、CARSを誘起する。これに対し、金属チップ先端などの局所領域でCARSを誘起する場合、位相整合条件は緩和される¹⁹。CARS光の波長よりもはるかに小さい領域でCARS分極が同位相で誘起されるため、励起光の波数ベクトルの向きに依存なくなり、CARS光の散乱パターンは孤立振動双極子のそのように等方的になる。このような考え方は、近年報告された(ファーフィールドの)レーザー走査CARS顕微鏡^{20,21})にも共通する。ファーフィールドの系の場合、高NAの対物レンズを用いて励起光を広い立体角で強く集光することにより、相互作用領域を波長サイズ以下に閉じ込めるものであった^{22,23}。金属ナノチップによる局所増強はその極限形と言える。以上のように、位相整合条件は、相互作用領域が波長以下となる近接場CARS顕微鏡においては、考慮する必要がなくなる。

金属チップでCARS分極を誘起するとき、CARSの三次の非線形性により、CARS分極の誘起効率がチップ先端のさらに微小な領域に閉じ込められる。この効果は、通常のレーザー走査顕微鏡においては、超分解を実現する1つの方法として既に認知されている^{24,25}。このことは、CARS誘起効率の空間分布($P_{\text{CARS}}^{(3)}(r, \omega_3)$, (式(1)に空間座標を加えた))が、2色の励起場の空間分布の3次の積($E_1^2(r, \omega_1) E_2^*(r, \omega_2)$)で与えられることで説明される。レーザー走査顕微鏡においては、 $E_1(r, \omega_1)$ や $E_2(r, \omega_2)$ は集光された励起場の分布を表すが、このとき、 $P_{\text{CARS}}^{(3)}(r, \omega_3)$ は2色の励起場に比べ狭い領域に閉じ込められるわけである(Fig. 2(b))。近接場CARSにおいても同様で、この場合 $E_1(r, \omega_1)$ や $E_2(r, \omega_2)$ はチップ近傍の電場分布を表す。たとえば金属微小球と単一分子の系について考えてみる。それぞれ波長に対して十分小さいと仮定した場合、誘起される分極を振動双極子で置き換えて表される²⁶。外部からの光照射によって金属微粒子周りにできる近接場の強さは、金属位置からの距離 R の3乗分の1、すなわち $1/R^3$ に比例する。この近接場により励起されるCARS

分極はその3乗, すなわち, $(1/R^3)^3 = 1/R^9$ に比例し, $1/R^3$ に依存する通常のラマン(=自発ラマン)より, 狭い領域で励起されることになる. 実際に遠方で検出される信号は, 分子そのものからの直接の信号ではなく, むしろ金属チップに再散乱された光であり, このCARS光に対しても距離に依存した因子がかけられる. そのため結局, CARSと自発ラマンはそれぞれ4乗と2乗に比例することになるが, いずれにしてもCARSはラマンに比較して狭い領域で誘起されることになる.

近接場CARSにおける増強効果はどうなるだろうか. ここにも, 非線形効果の効果がプラスに働く. 励起場の各成分はチップの金属によって, 局所的に増強される. 式(1)の右辺の励起場全てに増強度がかかるため, 増強度は電場のそれに比べて強くなる. ここでもやはり, 散乱場の増強効果があるため, 結局増強効果を加えた近接場CARSの分極は式(3)のように表される.

$$P_{\text{CARS}}^{(3)}(\omega_3) = L(\omega_3) \times \left\{ \chi^{(3)} [L(\omega_1)E_1(\omega_1)] [L(\omega_2)E_2(\omega_2)]^* [L(\omega_1)E_1(\omega_1)] \right\} \\ = L(\omega_3)L(\omega_1)L^*(\omega_2)L(\omega_1) \times [\chi^{(3)}E_1(\omega_1)E_2^*(\omega_2)E_1(\omega_1)] \quad (3)$$

ここで, $L(\omega_i)$ ($i=1, 2, 3$)は局所場因子と呼ばれるもので, ここではたとえばチップ先端でのそれぞれの波長での増強度を表す. これに対して, 自発ラマンの場合は, そのラマン分極は以下の式(4)で表される.

$$P_{\text{RS}}^{(1)}(\omega_2) = L(\omega_2) [\chi^{(1)}L(\omega_1)E_1(\omega_1)] \\ = L(\omega_2)L(\omega_1) \times \chi^{(1)}E_1(\omega_1) \quad (4)$$

ここで, $\chi^{(1)}$ はラマン散乱過程の線形感受率である. 結局, 増強度も自発ラマンに比べて高次となる. このことは, 単純にCARS光の増強度が大きくなることに加え, ファーフィールドバックグラウンドの軽減にもつながる. ファーフィールドバックグラウンドとは, レーザー光を照射した領域のうちチップから離れた場所で誘起されるCARS/ラマン光のことで, 自発ラマンの実験においてたびたび問題になってきた²⁷⁾. CARSにおいては, チップ周辺で増強された近接場CARS光がファーフィールドバックグラウンドに比べて高コントラストで得られるので, 得られる像が解釈しやすくなる.

以上のように, 非線形効果であるCARSを用いることによって, 自発ラマンと比較して, 空間分解能, 信号の増強度, ファーフィールドバックグラウンドに対するコントラストという3つの点において向上を期待できる.

3. 近接場CARS顕微鏡のシステム

近接場CARS顕微鏡システムを試作した(Fig. 3). 励起光源として, 2台のピコ秒モードロックチタンサファイアレーザー(繰り返し周波数~80 MHz)を用いた. パルス幅は約5 psであり, これは約4 cm^{-1} 程度のスペクトル幅に相当する. このスペクトル幅は, 指紋領域における生体分子の振動モードのバンド幅と同程度である. もし, フェムト秒レーザーのようなより短いパルスを用いれば, 一

Fig. 3 An experimental system of tip-enhanced CARS microscopy. See the text for detail.

般的に非線形効果の誘起効率が向上するが, スペクトル分解能は得られない. 一方, ナノ秒レーザーを用いれば高スペクトル分解能を達成できるが, 信号強度が稼げない. 高効率な振動分光イメージングを実現するためには, 今回用いた数ピコ秒程度のピコ秒レーザーが最適な選択である. これら2本のピコ秒レーザーパルス列を時間的および空間的に重ね, 原子間力顕微鏡(AFM)を搭載した倒立顕微鏡に導入し, 対物レンズ(NA=1.4, 油浸)により試料表面に集光した. プローブとして, AFM用のシリコンカンチレバーに銀を20 nm真空蒸着したものを用いた. フォーカス内にプローブ先端を接触させ局所領域のCARS分極を誘起し, この散乱光を入射に使用した高NA対物レンズで高い効率で集めた. CARS光は, 励起光除去フィルターとモノクロメーターを通して, アバランシェフォトダイオード(APD)により光子計数した. また, パルスピッカーを顕微鏡の手前に配置し, パルスの繰り返し周波数を800 kHzに下げた. これにより, 非線形効果の効率を維持しながら試料やプローブに対する熱ダメージを抑えた. また, APDのフォトンカウンターにパルスピッカーに同期した時間ゲートをかけることにより, APDの熱雑音を大幅に軽減した.

4. DNA分子の近接場CARSイメージング

試作したシステムにより, DNA分子の近接場CARSイメージングを行った. アデニン(A)とチミン(T)のみを含むDNA分子(poly(dA-dT))をガラス基板上で数十ナノメートルの大きさに凝集させた¹³⁾. 2色の励起光の振動数をそれぞれ, $\omega_1 = 12710 \text{ cm}^{-1}$ (波長 = 786.77 nm)と $\omega_2 = 11373 \text{ cm}^{-1}$ (879.25 nm)に合わせ, その振動数差($\omega_1 - \omega_2$)を1337 cm^{-1} に固定した. これは, アデニンに特徴的なラマン活性分子振動(五員環伸縮)の固有振動数に一致する⁸⁾. この振動共鳴条件下でイメージングした後, ω_2 を変化させ, 振動数差をどの分子振動にも共鳴しない1278 cm^{-1} に合わせて, 再び同様のイメージングを行った. このDNA試料の自発ラマン散乱スペクトルをFig. 4に示す.

Fig. 5 (a), 5 (b)に, 共鳴条件下($\omega_1 - \omega_2 = 1337 \text{ cm}^{-1}$)で取得した近接場CARS像と, 同時取得したAFM像をそれぞれ示す. Fig. 5 (a)では, 100 nm程度の大きさのDNAクラスターが, CARS光で可視化できた. また, 中央に160 nm程度離れて分布する二つのクラスターが, CARS像上で空

Fig. 4 A tip-enhanced spontaneous Raman spectrum of the DNA of poly(dA-dT).poly(dA-dT). The two frequencies adopted for our CARS imaging are indicated by the downward arrows. The Raman band at 1337 cm^{-1} can be assigned to the ring-stretching mode of adenine in the DNA.

間的に分離されている。これは、従来のCARS顕微鏡の二点分解能(回折限界で制限される)を超えており、銀チップを用いたことで超解像を実現できたことを示している。また、この像においてファーフールドバックグラウンドは全く見られなかったことから、CARSの非線形性により高コントラストなイメージングを実現したといえる。Fig. 5 (c)-(d)は、非共鳴条件($\omega_1 - \omega_2 = 1278 \text{ cm}^{-1}$)において得られた光学像を異なるグレースケールで示したものである。Fig. 5 (a)と比較して、CARS光強度は劇的に弱くなった。このことから、Fig. 5 (a)で得られた像が、励起光の振動数差に依存する像、すなわち分子振動に共鳴した像であることを確認した。銀チップによるCARSの増強度は、別の実験で見積もったDNAのCARS効率との比較から、単位体積あたりで 10^6 のオーダーと見積もられた。この増強度は、われわれや他のグループで報告されている自発ラマンのチップ増強によるラマン増強度^{8,28,29)}と比較

Fig. 5 CARS images of the DNA clusters. (a) Tip-enhanced CARS image at on-resonant frequency (1337 cm^{-1}), and (b) the simultaneously obtained topographic image. (c) Tip-enhanced CARS image at the off-resonant frequency (1278 cm^{-1}). (d) The same image as (c) shown with a different gray scale. (e) CARS image of the corresponding area obtained without the silver tip. The scanned area is 500 nm by 300 nm. The number of photons counted in 100 ms was recorded for one pixel. The acquisition time was ~ 3 minutes for the image. The average powers of the ω_1 and ω_2 beams were 30 μW and 15 μW at the 800 kHz repetition rate.

して、1桁～3桁大きい。2章で予想した、非線形性による増強度の増大効果が示されたと言える。

非共鳴条件で得られた像(Fig. 5 (d))では、構造に一致する信号がわずかに見られるが背景光にほぼ埋もれている。非共鳴条件下において構造に一致する信号が得られる理由は、次の2つが考えられる。1つ目は、式(2)の非共鳴項に起因する非共鳴バックグラウンドである。もちろん、振動共鳴とは無関係なので、非共鳴条件下でも観察される。2つ目は、近接場光学顕微鏡においてたびたび問題となる構造アーチファクトである³⁰⁾。一方、Fig. 5 (d)の背景光は、Fig. 5 (a)でも同程度の強度で観察されたが、銀プローブを基板から遠ざけ、同様のイメージングを行ったところ、信号強度はほぼゼロであった(Fig. 5 (e))。これらのことから、この背景光はプローブの銀または基板のガラスからの非線形発光によるものであると言える。

さらに、本システムの空間分解能と検出限界を評価するために、より微細な構造を観察した。試料としては、DNAのネットワーク構造を用いた。やはりアデニンとチミンのみを含んだDNA二重螺旋構造が十数本程度束になって、網目状に自己組織化したものである³¹⁾。構造の高さは約2.5 nm程度であり、これは一本のDNA二重螺旋構造と同程度かやや大きい。この試料を、さきほどと同様に共鳴および非共鳴の振動数条件でイメージングした(Fig. 6 (a)-(b))。DNAネットワークの微細構造がCARS光でイメージングできた。これらの像の矢印で示した一行のラインプロファイルを、Fig. 6 (c)に示す。チップを基板から遠ざけて取得したラインプロファイルも併せて示す。ここから明らかなように、非共鳴の条件下では構造からの信号がほとんど得られず、チップを遠ざけると背景光ともども信号強度はゼロになる。また、このラインプロファイルの右のピークの半値幅は15 nm程度であった。これは、これまでに我々がチップ増強の自発ラマン

Fig. 6 CARS images of the DNA network. (a) Tip-enhanced CARS image at on-resonant frequency (1337 cm^{-1}). (b) Tip-enhanced CARS image at the off-resonant frequency (1278 cm^{-1}). (c) One dimensional line profiles of the row indicated by the solid arrows. The scanned area is 1000 nm by 800 nm. The number of photons counted in 100 ms was recorded for one pixel. The acquisition time was ~ 12 minutes for the image. The average powers of the ω_1 and ω_2 beams were 45 μW and 23 μW at the 800 kHz repetition rate.

散乱で達成した空間分解能($\sim 30\text{ nm}$)⁸⁾に比べて優れている。さらに、得られた空間分解能 15 nm と、構造の高さ 2.5 nm から、信号に寄与するDNAの体積をzeptolitter($= 1000\text{ nm}^3$)のオーダーと見積もることができる。つまり、現在の測定条件下でサブzeptolitterの大きさのDNAを検出できることが明らかになった。

5. おわりに

金属チップによる局所電場増強効果を利用した近接場CARS顕微鏡を提案し、DNA分子のCARSイメージングを実現した。とくに、DNAネットワークのナノ構造をアデニンの分子振動(1337 cm^{-1})で可視化し、およそ 15 nm の空間分解能の空間分解能を達成した。近接場CARS顕微鏡の今後の課題としては、空間分解能や検出感度のさらなる向上が挙げられる。より微細な構造、あるいはより少ない分子数を観察するために必要となる。ただし、CARS強度は分子数の2乗に比例するため、分子数を少なくしていくと強度が急激に弱くなる。強度が分子数に比例する自発ラマンに比べて信号が弱くなると考えられる。実際、表面増強ラマン散乱(SERS)について言えば、幾つかのグループはSERSによる単分子検出にも成功している³²⁻³⁴⁾。しかし、ごく最近には表面増強CARS(SECARS)による単分子検出という報告もあり³⁵⁾、どちらが有利かについてはまだ議論の余地がある。このため、近接場CARS顕微鏡と近接場自発ラマン顕微鏡の検出感度の定量的な比較も今後の重要な課題の1つである。

いずれにしても、近接場CARS顕微鏡が強力なナノ分析ツールであることには変わりはない。染色されていない無色のDNA分子を、その分子振動だけで可視化できるのだから、この方法は、種々の核酸関連分子はもちろん、あらゆる種類の分子のイメージングに有効となる。単層カーボンナノチューブなどのナノカーボン材料についてはとくに、ラマン分光法がその分析ツールとして広く利用されており^{36,37)}、これにナノ分解能を付加できればその応用範囲は飛躍的に広がる^{12,38,39)}。実際に我々のグループには分析依頼の引き合いが多く来ている。ナノテクノロジーやナノサイエンスに従事する企業や大学の研究者たちが、既存の方法では観察できなかったものを観察したり分析したりする方法として、近接場CARS顕微鏡あるいは近接場(自発)ラマン顕微鏡に期待を寄せている。より高感度、高空間分解能で且つ実用的なものにすべく、引き続き検討と改良を重ねていきたい。

参考文献

- 1) S. Kawata (Ed.): *Near-Field Optics and Surface Plasmon Polaritons* (Springer, Berlin, 2001).
- 2) 森田 清三編著: 原子・分子のナノ力学(丸善2003).
- 3) Y. Inouye and S. Kawata: *Opt. Lett.* **19** (1994) 159.
- 4) Y. Inouye, N. Hayazawa, K. Hayashi, Z. Sekkat, and S. Kawata: *Proc. SPIE* **3791** (1999) 40.
- 5) N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata: *Opt. Commun.* **183** (2000) 333.
- 6) R. K. Chang and T. E. Furtak (Ed.): *Surface Enhanced Raman Scattering* (Plenum Press, New York, 1981).
- 7) M. Moskovits: *Rev. Mod. Phys.* **57** (1985) 783.
- 8) H. Watanabe, Y. Ishida, N. Hayazawa, Y. Inouye, and S. Kawata: *Phys. Rev. B* **69** (2004) 155418.
- 9) N. Hayazawa, T. Yano, H. Watanabe, Y. Inouye, and S. Kawata: *Chem. Phys. Lett.* **376** (2003) 174.
- 10) A. Hartschuh, E. J. Sanchez, X. S. Xie, and L. Novotny: *Phys. Rev. Lett.* **90** (2003) 95503.
- 11) B. Pettinger, B. Ren, G. Picardi, R. Schuster, and G. Ertl: *Phys. Rev. Lett.* **92** (2004) 096101.
- 12) N. Hayazawa, T. Ichimura, M. Hashimoto, Y. Inouye, and S. Kawata: *J. Appl. Phys.* **95** (2004) 2676.
- 13) T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, and S. Kawata: *Phys. Rev. Lett.* **92** (2004) 220801.
- 14) H. Furukawa and S. Kawata: *Opt. Commun.* **148** (1998) 221.
- 15) T. Okamoto: in Ref. 1, p. 97.
- 16) N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata: *J. Chem. Phys.* **117** (2002) 1296.
- 17) A. Hartschuh, E. J. Sanchez, X. S. Xie, and L. Novotny: *Phys. Rev. Lett.* **90** (2003) 95503.
- 18) M. D. Levenson and S. S. Kano: *Introduction to Nonlinear Optical Spectroscopy* (Academic Press, Orlando, 1988).
- 19) T. Ichimura, N. Hayazawa, M. Hashimoto, Y. Inouye, and S. Kawata: *J. Raman Spectrosc.* **34** (2003) 651.
- 20) A. Zumbusch, G. R. Holtom, and X. S. Xie: *Phys. Rev. Lett.* **82** (1999) 4142.
- 21) M. Hashimoto, T. Araki, and S. Kawata: *Opt. Lett.* **25** (2000) 1768.
- 22) M. Hashimoto and T. Araki: *J. Opt. Soc. Am. A* **18** (2001) 771.
- 23) J.-X. Cheng, A. Volkmer, and X. S. Xie: *J. Opt. Soc. Am. B* **19** (2002) 1363.
- 24) 河田 聡: 超解像の光学(日本分光学会測定法シリーズ38, 学会出版センター, 1999).
- 25) 河田 聡, 井上 康志: *応用物理* **71** (2002) 653.
- 26) M. Kerker and C. G. Blatchford: *Phys. Rev. B* **26** (1982) 4052.
- 27) N. Hayazawa, Y. Inouye, Z. Sekkat, and S. Kawata: *Chem. Phys. Lett.* **335** (2001) 369.
- 28) A. P. Sokolov, D. Mehtani, N. Lee, R. D. Hartschuh, A. Kisliuk, and M. D. Foster: *J. Raman Spectrosc.* (to be published).
- 29) B. Pettinger, B. Ren, G. Picardi, R. Schuster, and G. Ertl: *Phys. Rev. Lett.* **92** (2004) 096101.
- 30) B. Hecht, H. Bielefeldt, Y. Inouye, D.W. Pohl, and L. Novotny: *J. Appl. Phys.* **81** (1997) 2492.
- 31) S. Tanaka, L. T. Cai, H. Tabata, and T. Kawai: *Jpn. J. Appl. Phys.* **40** (2001) L407.
- 32) S. Nie and S. R. Emory: *Science* **275** (1997) 1102.
- 33) K. Kneipp, Y. Wang, H. Kneipp, L. T. Perelman, I. Itzkan, R. R. Dasari, and M. S. Feld: *Phys. Rev. Lett.* **78** (1997) 1667.
- 34) M. Ishikawa, Y. Maruyama, J. Y. Ye, and M. Futamata: *J. Luminescence* **98** (2002) 81.
- 35) T.-W. Koo, S. Chan, and A. A. Berlin: *Opt. Lett.* **30** (2005) 1024.
- 36) R. Saito, A. Jorio, J. H. Hafner, C. M. Lieber, M. Hunter, G. Dresselhaus, and M. S. Dresselhaus: *Phys. Rev. B* **64** (2001) 5312.
- 37) S. D. M. Brown, A. Jorio, M. S. Dresselhaus, and G. Dresselhaus: *Phys. Rev. B* **64** (2001) 3403.
- 38) P. Verma, K. Yamada, H. Watanabe, Y. Inouye, and S. Kawata: *Phys. Rev. B* **73** (2006) 045416.
- 39) T. Yano, P. Verma, Y. Inouye, and S. Kawata: *Appl. Phys. Lett.* in press.