

研究終了報告書

「生命ナノ動態をありのままに観察するラベルフリー超解像顕微鏡」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：馬越 貴之

1. 研究のねらい

本研究のねらいは、自由電子集団が量子化して励起されるプラズモンを用いて、バイオイメージング用のラベルフリー超解像顕微鏡を開発することである。

金属探針に光を照射することによって、フォトンとプラズモンの結合により、探針先端にナノサイズの光場が生成される。このナノ光場を試料上で二次元走査すれば、超解像光学イメージングが可能である。加えて、物理的に小さい光で超解像を達成するため、試料由来の様々な光信号をラベルフリー測定できる。近接場光学顕微鏡として知られる超解像顕微技術である。しかしながら、探針もしくは試料を二次元走査して画像を取得するため、撮像速度が遅い。画像1枚を取得するのに通常30分程度、速くとも数分を要していた。そのため、生きた動く生体試料を観察するための顕微鏡とは、これまで見なされてこなかった。

本研究では、高速原子間力顕微鏡(高速AFM)の高速走査技術を、プラズモンを用いた超解像顕微鏡に融合することによって、近接場光学顕微鏡の超高速化を目指した。高速AFMは、カンチレバー探針を高速走査することによって試料の形状・構造変化を動画観察する技術である。近接場光学顕微鏡も、カンチレバー探針を用いるため、高速AFM技術を取り入れる上で非常に親和性が高い。高速AFMは試料の構造を観察するが、近接場光学顕微鏡に高速AFMの高速走査技術を組み込むことによって、光学情報を高速かつ超解像で測定できるようになる。超解像バイオイメージングとえば、現状はSTEDやSTORM、PALMなどの超解像蛍光顕微鏡が主流であるが、超高速・近接場光学顕微鏡をそれらに並ぶような新しい超解像バイオイメージング技術まで発展させることも将来的な目標である。

2. 研究成果

(1) 概要

上述のねらいを達成するため、本研究では、高速近接場光学顕微鏡を開発し、実際に高速近接場イメージングを実現することに成功した。

これまでも近接場光学顕微鏡の高速化を目指して、プロトタイプの開発などに取り組んできたが、所望のイメージング速度は実現できていなかった。そこで、まずは根本的な改良を施すため、一から高速近接場光学顕微鏡を再構築した。近接場光学計測用の光学系や高速AFM本体ヘッド、制御プログラムなど、様々に装置開発を行った。特に、新しい走査方式を提案・開発し、高速化を実現することに成功した。装置構成や制御系は複雑化するが、近接場光学顕微鏡の高速化に不可欠な新しい走査方法を開発できた。新規走査方式のための制御プログラムも構築し、高速走査制御できることを確認した。実際に開発した高速近接場光学顕微鏡を用いて、高速近接場イメージングに挑戦した。テスト試料としてカーボンナノチューブを用いて、高速に近接場光学動画観察できることを実証した。

近接場光学顕微鏡の高速化だけでなく、近接場光学顕微鏡の高安定化や、カンチレバー探針のタッピング振幅制御に関する研究など、関連する研究成果も挙げることができた。

(2) 詳細

高速 AFM や近接場光学計測系などの構築:

上記概要の通り、まずは高速 AFM や近接場光学計測系などの構築から取り組んだ。図 1 が開発した(a)高速 AFM と(b)高速近接場光学顕微鏡の全体像である。試料ステージのみを動かすことのできるマイクロアクチュエーターの導入や、安定した高速 AFM 観察のためのピエゾミラーの開発・導入など、複雑化する装置をできるだけ使いやすくなるよう、従来版から様々に改良を施した。また、技術的な部分で重要だったのが、新規走査方式の構築である。自作スキャナーや制御プログラムなどを構築し、様々な試行錯誤ののち高速化を実現することができた。

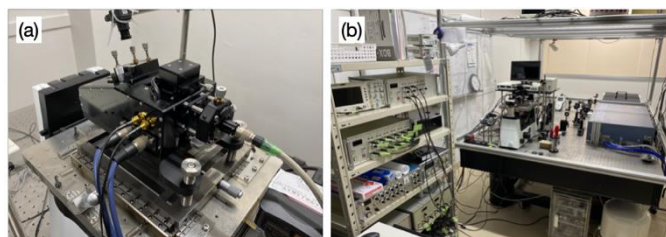


図 1. 構築した(a)高速 AFM と(b)高速近接場光学顕微鏡

開発した高速近接場光学顕微鏡による高速イメージングの実証:

新規・高速近接場光学顕微鏡を構築できたため、高速イメージングが可能か検証した。テスト試料として、カーボンナノチューブを用いた。溶液環境下でイメージングを行い、高速近接場動画観察することに成功した。従来の近接場光学顕微鏡から、3 桁近く高速化できた。約 10 nm の高い空間分解能が得られていることも確認した。独創的かつ強力な超解像顕微鏡の開発に成功したと考えている。

その他の関連成果:

高速近接場光学顕微鏡を開発する過程で、付加的な成果もいくつか得られたため、その内の 2 つを簡単に報告する。

1 つは、近接場光学顕微鏡の安定化である。探針や入射レーザーの位置は、機械的なドリフトにより時々刻々と位置ずれを起こす。このドリフトは xyz 全方向に 3 次的に起こる。そこで、ドリフトを 3 次的に補正する自動フィードバック機構を開発した。これにより、入射レーザーの集光スポット中心に探針を長時間保持できる機構を実現できた。実際に、7 時間もの長時間にわたって近接場光学イメージングできることを示した(図 2(a))。高速近接場光学顕微鏡にも非常に有効な技術である。

もう一つは、カンチレバー探針のタッピング振幅制御に関する研究である。高速 AFM 及び高速近接場光学顕微鏡では、カンチレバー探針がタッピング振動しているため、試料に近接したり離れたりする。近接している場合は、強い近接場光学シグナルが得られるが、離れている場合は近接場光学シグナルが得られない。近接場光学シグナル強度とタッピング振幅の関

係性を、理論と実験の両面から検証し、実際に振幅 2 nm 程度にすれば十分な近接場光学シグナルが得られることを見出した(図 2(b))。高速近接場光学顕微鏡においても、タッピング振幅は制御可能であり、実際に振幅 2 nm 程度で測定を行なっている。

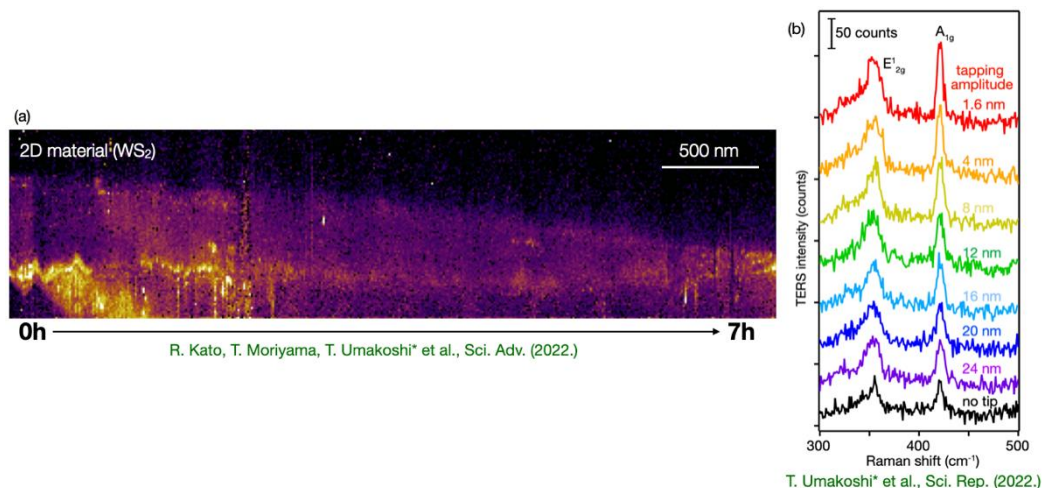


図 2. (a)高安定化した近接場光学顕微鏡で撮像した二次元材料
(b) タッピング振幅と近接場シグナル強度の評価

3. 今後の展開

バイオイメージングに有用な高速近接場光学顕微鏡を、実験実証することはできた。今後は、プラズモンという量子技術を用いたこの超解像顕微鏡を、実際に生命科学に応用していきたい。近接場光学顕微鏡の利点の一つは、どんな光計測も超解像化できることである。これは、物理的に小さい光を作り出して超解像を実現する、近接場光学顕微鏡ならではの長所である。様々な光計測法を超解像化し、生命科学ナノダイナミクスの解明へつなげたい。

プラズモンを用いる近接場光学顕微鏡自体は、発明されて四半世紀以上経つが、生きた生体試料を観察できる顕微法とは思われてこなかった。高速近接場光学顕微鏡の実現によって、その扉がいよいよ開かれようとしている。先 5 年以内には、新しい基盤的バイオイメージング技術として生命科学の分野で広く認知されるよう、装置開発を引き続き精力的に推し進める所存である。

4. 自己評価

重要な目標の一つである近接場光学顕微鏡の高速化には成功したため、一定の成果を上げることができたと自己評価する。加えて、バイオ応用を目指しているため、もちろんこれを溶液環境中で達成できている。近接場光学顕微鏡は、液中環境での測定も報告がほとんどなく、その点でも当該分野にインパクトを与えられると考える。

高速近接場光学顕微鏡は、高速 AFM と近接場光学顕微鏡の双方を開発できる私独自の極めてユニークな計測装置である。超解像蛍光顕微鏡などと並ぶような、新しい基盤的バイオイメージング技術になれる可能性を有しており、その技術シーズを本研究で創出することができた。新しい観察法は、いつも生命科学に変革をもたらしてきた。高速近接場光学顕微鏡も、生命科学に不可

欠な基盤的計測技術になるポテンシャルを持っており、そのポテンシャルを開花させるために私独自の技術として今後も改良・発展に努める所存である。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:2件

1. R. Kato, T. Moriyama, T. Umakoshi*(責任著者), T. Yano, and P. Verma*, “Ultrastalble tip-enhanced hyperspectral optical nanoimaging for defect analysis of large-sized WS₂ layers”, *Science Advances*, (2022), **8**, eabo4021.

概要:近接場光学顕微鏡の高安定化技術の開発に関する研究である。ナノレベルの精度で金属探針を集光スポット中心に原理上半永久的に保持できる機構を開発した。実際に、7 時間にも及ぶ長時間にわたって大面積に近接場光学イメージングできることを実験的に示した。信号強度の弱い生体試料にも有効な技術である。

2. T. Umakoshi* (筆頭責任著者), K. Kawashima, T. Moriyama, R. Kato, and P. Verma, “Tip-enhanced Raman spectroscopy with amplitude-controlled tapping-mode AFM” *Scientific Reports*, (2022), **12**, 12776.

概要:近接場光学顕微鏡におけるカンチレバー探針のタッピング振幅の影響及びその制御に関する研究である。近接場光学顕微鏡計測では、探針が上下にタッピング動作しており、その振幅に応じて近接場光シグナル強度が変化する。本研究では、シグナル強度のタッピング振幅依存性を理論的・実験的に検証し、実際に振幅を 2 nm 程度以下に抑えることで高強度の近接場光シグナルが得られることを報告した。

3. T. Umakoshi* (筆頭責任著者), Near-field optical microscopy toward its applications for biological studies”, *Biophysics and Physicobiology*, **20** e200011 (2023).

概要:生体応用を指向した近接場光学顕微鏡の研究開発に関するレビュー論文である。自身の成果を中心に近年の研究動向をまとめ、今後の展望や可能性について言及した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のものも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 馬越貴之、“近接場光を用いた先端ナノフォトニクス計測”、第24回“光”機到来Qコロキウム、オンライン開催、2022年1月28日(招待講演)
2. 馬越貴之、“近接場光学顕微鏡の高速化 -生命ナノ動態をありのままに観察する光学顕微鏡を目指して-”、SY09-3、日本放射線影響学会第63回大会、オンライン開催、2020年10月(招待講演)
3. 馬越 貴之、“生体計測応用を指向した近接場光学顕微鏡の新技术”、*生物物理*, **62(2)**, 128-130 (2022). (著作物)

4. 馬越 貴之, “先端増強ラマン散乱顕微鏡の空間分解能”, *分光研究*, **70(1)**, 23-24 (2021). (著作物)
5. Takayuki Umakoshi, and Prabhat Verma “Tip-enhanced Raman spectroscopy”, *Modern Techniques of Spectroscopy, Springer Nature*, **13**, 209-234 (2021). (著作物)
6. 「長時間・大面積の超解像ラマンイメージングを実現 ~電子デバイス材料の評価や生体分子観察への応用に期待~」(2022年7月16日)(JST プレスリリース) <https://www.jst.go.jp/pr/announce/20220716/index.html>