

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 25 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24656088

研究課題名(和文) 蛍光ナノプローブを用いた微量サンプルの超精密粘度計測技術の開発

研究課題名(英文) Study on ultra-precision viscosity measurement using a fluorescent probe

研究代表者

林 照剛 (Hayashi, Terutake)

大阪大学・工学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00334011

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、液中に分散するナノ粒子の回転拡散係数から微量サンプルの粘性を評価する方法として、新たに蛍光偏光法を利用した計測法を提案する。蛍光寿命が10ns以下の蛍光分子をプローブとして用いる場合、粘度計測のための蛍光偏光度解析の速度100MHz程度まで高速化することが可能となる。直径1nmの粒子では、慣性力の影響が極小化されることから、ブラウン運動の拡散モデルを用いた粘性の測定精度の向上が見込まれる。

本研究を遂行した結果、粘性計測のための回転拡散係数評価装置の構築が完了し、また同装置を用いた基礎実験の結果、微量サンプルの回転拡散係数測定から粘性の評価を行う手法の有効性が実験的に示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we suggest a novel method for evaluating the viscosity of small samples based on the rotational diffusion coefficient of the nano probe by using fluorescence polarization method. In the case of using the fluorescence probe with lifetime less than 10 ns (i.e. Fluorescein, fluorescence lifetime 4.3ns, diameter 1.1nm), it is possible to accelerate the rate of fluorescence polarization analysis for viscosity measurement to 100MHz. Furthermore, by using the probe with diameter of 1nm, the measurement accuracy of the viscosity using a diffusion model of the Brownian motion is improved due to minimizing the influence of the inertial force of probe.

As a result, we construct the fundamental system to evaluate the rotational diffusion coefficient for small sample. We verify the feasibility of proposed method for evaluating the viscosity of small sample based on the rotational diffusion coefficient.

研究分野：工学

科研費の分科・細目：機械材料・材料力学

キーワード：蛍光偏光法 ブラウン運動 回転拡散係数 回転ブラウン運動 ナノ粒子

1. 研究開始当初の背景

近年、液体の粘度測定では、回転式粘度計、毛細管式粘度計などの高負荷型粘度測定技術に加えて、低負荷で静粘度を測定できる振動式粘度測定技術が開発され、粘度測定範囲の拡大や測定精度の改善、微量サンプルの計測の実現など粘度測定における新たな課題に向けた検討が行われている。

本研究では、液中に分散するナノ粒子の回転拡散係数から微量サンプルの粘性を評価する方法として、新たに蛍光偏光法を利用した計測法を提案する。

蛍光寿命が 10ns 以下の蛍光分子 (例えば Fluorescein, 蛍光寿命 4.3ns, 直径 1.1nm) をプローブとして用いる場合、粘度計測のための蛍光偏光度解析の速度を 100MHz 程度まで高速化することが可能となり、従来の振動式粘度測定と比較して、1000 倍程度の高速化が可能となる。また、従来その実現が困難とされていた、微量サンプルにおける静粘度計測は、溶液に負荷をかけない状態で、直径 1nm の蛍光分子のブラウン粒子としての拡散を時系列でモデル化することによって実現される。直径 1nm の粒子では、慣性力の影響が極小化されることから、ブラウン運動の拡散モデルを用いた粘性の測定精度の向上が見込まれる。

2. 研究の目的

本研究では、微量サンプルの粘性を高速かつ高精度に計測する技術を新たに提案している。提案する技術では、蛍光分子 (直径 1nm) を粘性計測のプローブとし、蛍光分子の回転ブラウン運動による分子拡散時間が粘性によって変化することを利用して、液体の粘性を計測する。粘性計測は、10ns 以内で減衰する蛍光信号を偏光成分解析することによって行われることから、100MHz の帯域での繰り返し計測が可能となり、粘度の測定精度および測定速度が向上すると考えられる。また、蛍光信号は、マイクロリットル単位の微量サンプルからも取得が可能であり、粘性計測結果に影響を与えるサンプルの温度制御が容易に高速かつ安定して行える利点もある。本手法では、デバイ・ストークス・アインシュタインの式によって粘度を定義し、その値を精密計測する技術を確立することを目標とする。

3. 研究の方法

本提案の特徴として、蛍光偏光度解析に基づいて、回転拡散係数を求め、ブラウン粒子としてモデル化されるナノプローブの回転拡散係数、蛍光分子の有効体積、溶媒の温度から、粘度計測を行う点が挙げられる。蛍光分子を直線偏光照明で照明した時、蛍光寿命の値が既知である場合に、蛍光偏光度の解析結果から、蛍光分子のブラウン運動に対する回転拡散係数を計測できる。さらに、有効体積が既知の蛍光分子を粘度計測のプローブとして用いれば、蛍光分子のブラウン運動による拡散をモデル化し、デバイ・ストーク

ス・アインシュタインの式から、液体の粘度を計測することが可能であると考えられる。本提案により、金属ナノ粒子コロイド溶液、血液などの希少サンプルの超精密粘度計測が実現すれば、従来技術による代替が困難であることからその産業的意義は大きい。

4. 研究成果

蛍光偏光法を利用した粘性計測の原理を検証し、粘性計測を実現するための回転拡散係数測定装置を試作し、回転拡散係数の測定基礎実験を行った。

図 1 のように座標系をとり、原点に蛍光色素が含まれるサンプルを設置し、z 軸方向から直線偏光の励起光を照射する場合を考える。このときサンプルからは、原点を中心に全方向に蛍光が発せられる。各方向への蛍光は、進行方向に対して垂直方向の二つの成分に分けることができ、励起光の偏光方向に対して平行な蛍光成分を  $I_{\parallel}$ 、垂直な蛍光成分を  $I_{\perp}$  と定義する。この二つの成分の割合は色素の回転ブラウン運動によって変化する。

蛍光色素には吸収軸と発光軸があり、励起光として直線偏光を用いた場合、その偏光方向と同じ向きに吸収軸を持つ色素が選択的に励起される。励起後、回転ブラウン運動により発光軸の向きが変化するため、時間の経過とともに、 $I_{\parallel}$  が減少し、 $I_{\perp}$  が増加する。この蛍光信号の偏光状態の時間変化は、蛍光異方性  $r(t)$  として次の式で定義される。

$$r(t) = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{S(t)} = \frac{I_{\parallel}(t) - I_{\perp}(t)}{I_{\parallel}(t) + 2I_{\perp}(t)} \quad (1)$$

ここで  $S(t)$  は観測方向に進行する蛍光の全偏光方向成分の強度の和であり、サンプルの回転成分が一つのみであると考え、蛍光異方性は以下の単一の指数関数で表される。

$$r(t) = r_0 \exp\left(-\frac{t}{\theta}\right) \quad (2)$$

ここで、 $r_0$  は初期異方性、 $\theta$  は回転相関時間と呼ばれる。 $r_0$  は蛍光色素の吸収軸と発光軸の向きのずれ具合によって決まる値である。また色素の回転がある方向に束縛されている場合は、蛍光異方性は以下のように指数関数と定数の和で表される。

$$r(t) = (r_0 - r_{\infty}) \exp\left(-\frac{t}{\theta}\right) + r_{\infty} \quad (3)$$

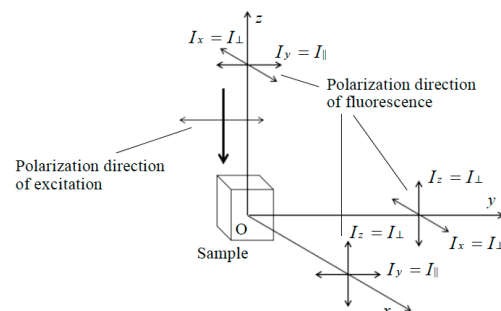


Fig.1 Standard coordinate system

ここで  $r_{\infty}$  は定常状態の蛍光異方性を表している。回転相関時間は、回転拡散係数  $D_r$  と次の関係にある。

$$\theta = \frac{1}{6D_r} \quad (4)$$

蛍光の偏光状態の測定から回転拡散係数を算出する手法としては、静的蛍光法である定常光励起法と動的蛍光法である時間領域蛍光法、周波数領域蛍光法が挙げられる。本研究では、正弦波状に強度変調した励起光を用い、高い精度で安定した測定結果が得られる周波数領域蛍光法を用いる。

周波数領域蛍光法では、励起光強度が変調されるため、蛍光も同じ周波数で変調されるが、励起状態が有限の寿命を持つために、励起光に対して位相が遅れたものとなる。このとき蛍光寿命  $\tau$  は以下の式で表される。

$$\tau = \frac{\tan \phi}{\omega} \quad (5)$$

ここで  $\phi$  は励起光と蛍光の位相差、 $\omega$  は変調角周波数である。また、このとき励起光に対して平行方向と垂直方向の蛍光成分とでは図2のように振幅と中心値、位相が異なったものとなる。二つの成分の振幅比  $Y_{AC}$  ( $A_{\parallel}/A_{\perp}$ ) と蛍光寿命  $\tau$ 、および式(3)で表される  $r_0$  と  $r_{\infty}$  から回転相関時間を計算する式は式(6)で表され、この時、色素の回転が束縛されていないとし ( $r_{\infty}=0$ )、さらに式(4)を用いて回転相関時間から回転拡散係数に直すと式(7)が導かれる。本研究では、回転拡散係数の計算にはこの式(7)を用いる。

$$\theta = \frac{Y_{AC}^2(1-r_{\infty})^2 - (1+2r_{\infty})}{\left( (1+2r_0)(1+2r_{\infty}) - Y_{AC}^2(1-r_0)(1-r_{\infty}) + \sqrt{Y_{AC}^2[9(r_0-r_{\infty})^2 + \{2+r_{\infty}(2+5r_{\infty}) + r_0[2-4r_{\infty}(4+r_{\infty})] + r_0^2[5-4r_{\infty}(1-2r_{\infty})]\} - Y_{AC}^2(1-r_0)^2(1-r_{\infty})^2(\omega\tau)^2] - (1+2r_0)^2(1+2r_{\infty})^2(\omega\tau)^2} \right)} \cdot \tau \quad (6)$$

$$D_r = \frac{1+2r_0 - Y_{AC}^2(1-r_0) + \sqrt{Y_{AC}^2[9r_0^2 + \{2+2r_0+5r_0^2 - Y_{AC}^2(1-r_0)^2\}(\omega\tau)^2] - (1+2r_0)^2(\omega\tau)^2}}{6(Y_{AC}^2-1)\tau} \quad (7)$$

周波数領域蛍光法の実験装置の構成を図3に示す。励起光として中心波長488nmのアルゴンイオンレーザーを用いる。光源を出た光は1/2波長板を通過した後、音響光学変調素子(AOM)によって、励起光強度の時間波形が正弦波状になるように強度変調される。1/2波長板は励起光の偏光方向を調節し、AOMによる変調の効率を上げる役割がある。強度変調された励起光は再び1/2波長板と偏光子を通過することによってy軸方向に偏光した直線偏光となり、サンプルに照射される。励起されたサンプルからの蛍光信号はz方向に向かい、ダイクロイックミラーと蛍光フィルターを通過する。ダイクロイックミラーと蛍光フィルターは蛍光の波長付近の光のみを透過させるため励起光の反射光がz方向に向かうの

を防ぐことができる。蛍光信号はビームディスプレーサーによって励起光の偏光方向に対して平行方向と垂直方向の二つの成分に分けられる。イメージンシファイアは信号強度の増幅に用いられ、冷却CCDカメラによって増幅された信号が検出される。イメージンシファイアによる信号増幅のタイミングはファンクションジェネレーターによりAOMによる変調の周期と同調されている。サンプルの下にはフィードバック式のサーモプレートが設置されており、サンプルの温度を一定に保つことができる。

次に測定の手順を説明する。まず、サンプルをチャンバーに封入し、サーモプレート上に設置して定常状態になるまで維持する。サンプルの温度が安定した後、蛍光信号を冷却CCDカメラにより取得し、その画像の輝度解析を行って蛍光偏光信号を取得する。取得した画像の蛍光スポットの輝度値を積算して信号強度を算出している。

正弦波状の蛍光信号の取得は、イメージンシファイアによる増幅信号の位相差を変化させて行う。AOMによる変調の周期とイメージンシファイアによる増幅の周期とは同調していることから、周期的に変調する励起光と蛍光信号が増幅されるタイミング(位相)が変化し、正弦波状に変化する蛍光信号が取得できる。

本実験では、位相を20度ずつ変化させ2周期分(0度から720度まで)の信号を取得し、これをつなぎあわせたものを一回の測定結果とした。測定結果の例を図5に示す。プロット点は取得した画像から解析される蛍光信号の強度を規格化した値を示している。また式(1)からわかるようにこの二つの成分の波形を足し合わせることで全偏光方向成分の蛍光強度の和の波形を得ることができるため、これと励起光との位相差から式(5)に基づいて蛍光寿命を計算することができる。

#### 回転拡散係数測定の基本実験

開発した回転拡散係数測定装置を用いて標準サンプルの回転拡散係数を測定した。測定時の制御パラメータは、溶媒の粘度として、その値を変化させながら回転拡散係数を測

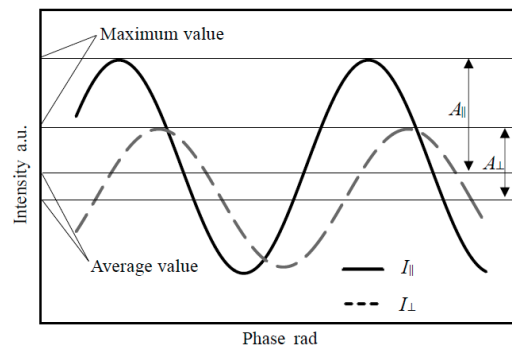
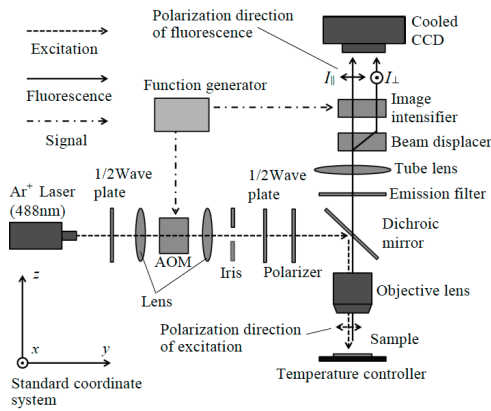


Fig.2 Modulated fluorescence signal



**Fig. 3** Schematic of experimental set-up  
 定し、理論値と比較した。

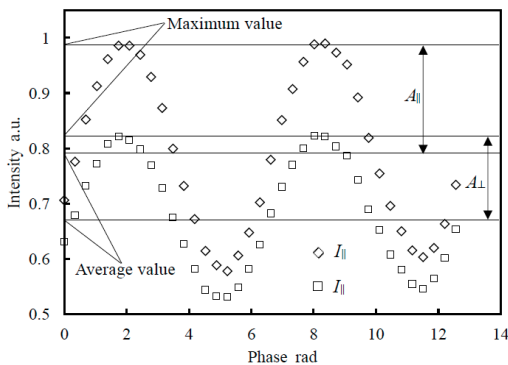
標準サンプルとして、蛍光色素 (Invitrogen 社, Alexa Fluor 488) を使用する。Alexa Fluor 488 は、フルオレセインの誘導体の一種で、広い pH 域で蛍光を発することができ、その吸収、発光スペクトルはそれぞれ 495nm, 519nm で最大となる。溶媒の粘度は、水に加えるグリセリンの量により調整する。

測定値と比較する回転拡散係数の理論値は、ブラウン運動する粒子が体積  $V$  の剛体球モデルである場合に成り立つ以下の Debye-Stokes-Einstein の式 (9) から計算する。

$$D_r = \frac{k_B T}{6V\eta} = \frac{k_B T}{\pi d^3 \eta} \quad (9)$$

ここで  $k_B$  はボルツマン定数、 $T$  と  $\eta$  は溶媒の温度と粘度、 $d$  は粒子の直径である。Alexa Fluor 488 の形状は、ほぼ球形であるため、式 (9) を適用可能と考えられる。Alexa Fluor 488 の粒径は約 1.1nm と見積もられるため、理論値の計算にはこの値を使用する。

各溶媒の粘度と測定された蛍光寿命  $\tau$ 、振幅比  $Y_{AC}$  から計算される回転拡散係数と理論値の曲線とを図 5 に示す。図中のプロット点とエラーバーは、それぞれ測定値の平均値と標準偏差を表している。測定された回転拡散係数は、理論値と同様に溶媒の粘度と反比例の関係にあり、その値も理論値との差が 10% 以内となっている。これらの結果から開発した測定装置を用いてサンプルの回転拡散係数が正確に測定されることが確認された。

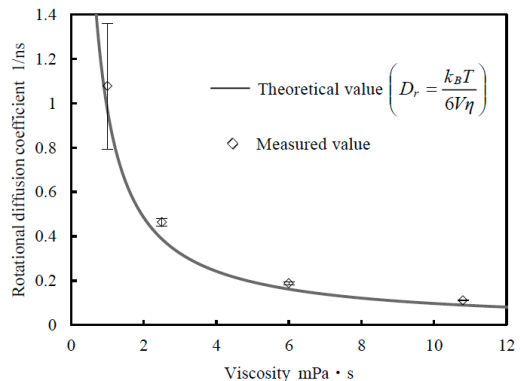


**Fig. 4** Measured fluorescence signal

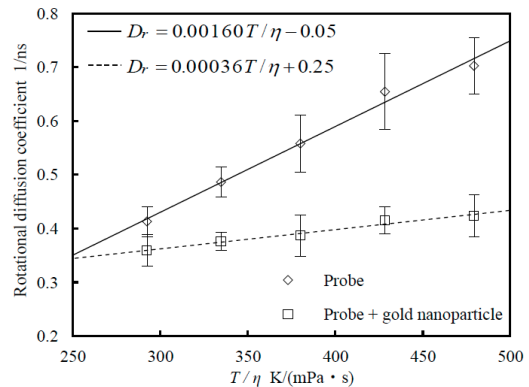
## 回転拡散係数測定基礎実験

次に、塩基数 23~40 の DNA をスペーサーとした蛍光 DNA プロブを用いて、回転拡散係数を評価する。回転拡散係数の測定値の計測基礎実験では、まずプロブ単体の回転拡散係数を溶媒の温度を変化させて測定し、回転拡散係数測定の基準値とする。次にプロブを金ナノ粒子に標識して回転拡散係数を変化させ、基準値とそれぞれ比較する。測定には、TEM により平均粒径 8.2nm と測定された金ナノ粒子 (BBI 社) を使用する。これを PBS に分散させた後、末端がチオール化した塩基数 23 の蛍光 DNA プロブを加え、その表面を標識する。測定は、溶媒の温度が 20, 25, 30, 35, 40°C の 5 通りの条件下で行った。回転拡散係数と溶媒の温度と粘度の比  $T/\eta$  の変化に対する線形近似の結果を図 6 に示す。図中のプロット点とエラーバーは、それぞれ測定値の平均値と標準偏差を表している。図からわかるようにプロブに金ナノ粒子を修飾したサンプルの回転拡散係数の測定結果は、 $T/\eta$  に対する回転拡散係数の変化の傾きが大きく変化しており、回転拡散係数の体積項が変化することによる回転拡散係数の変化が検出できていると考えられる。

本研究で得られた成果を以下にまとめる。まず、溶媒の粘度を変化させた場合の蛍光色



**Fig. 5** Rotational diffusion coefficient versus viscosity



**Fig. 6** Rotational diffusion coefficient versus number of DNA bases

素の回転拡散係数を測定し、構成した測定装

置によりサンプルの回転拡散係数を理論値との差 10%以内で測定できることを示した。次に、塩基数 23 の DNA をスパーサーとする蛍光 DNA プローブを金ナノ粒子に標識し、回転拡散係数を測定し、回転拡散係数の測定可能レンジが、低速度領域から高速度領域まで広く測定が可能であることを示し、回転拡散係数の測定から、粘性の測定評価を一定の範囲で行える可能性を示した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 2 件)

(1)石崎佑樹, 林 照剛, 道畑正岐, 高谷裕造, 蛍光偏光法を用いたナノ粒子粒径計測に関する研究 (第 1 報) - 蛍光 DNA プローブを用いた回転拡散係数測定システムの開発 -, 精密工学会誌, Vol. 80, No. 3, (2014), 214-219. 査読有り

(2)Terutake Hayashi, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, and Kok Fonog Lee, Development of nanoparticle sizing system using fluorescence polarization, ACTA IMEKO, Vol. 2, No. 2, 2013, pp. 67-72. 査読有り

[学会発表] (計 3 件)

(1)Yuki Ishizaki, Terutake Hayashi, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Development of nanoparticles sizing method based on fluorescence polarization, ISMQC2013, 11 - 13 September 2013, University, Cracow, Poland, [Best paper award], 査読有り

(2)石崎佑樹, 林 照剛, 道畑正岐, 高谷裕造, 周波数領域蛍光法を用いたナノ粒子粒径評価に関する研究 (第二報) - 粒径と蛍光 DNA プローブの回転拡散係数の関係性についての検討 -, 2014 年度精密工学会学術講演会春季大会, 東京大学 (2014)

(3)林 照剛, 石崎佑樹, 道畑正岐, 高谷裕造, 田中慎一周波数領域蛍光法を用いたナノ粒子粒径評価に関する研究 (第 3 報) - DNA を用いたナノ粒子計測プローブの開発 -, 2014 年度精密工学会学術講演会春季大会, 東京大学 (2014)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

林 照剛 (HAYASHI, Terutake)

大阪大学・大学院工学研究科・准教授

研究者番号 : 00334011

##### (2) 研究分担者

高谷裕浩 (TAKAYA, Yasuhiro)

大阪大学・大学院工学研究科・教授

研究者番号 : 70243178

道畑正岐 (MICHIHATA, Masaki)

大阪大学・大学院工学研究科・助教

研究者番号 : 70588855