

平成 30 年 6 月 28 日現在

機関番号：33811

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K04701

研究課題名(和文)共焦点動的散乱法による粒子径・形状・濃度測定と細胞計測への応用

研究課題名(英文) Measurement of size, shape, and concentration of particles using confocal dynamic light scattering

研究代表者

石井 勝弘 (Ishii, Katsuhiro)

光産業創成大学院大学・光産業創成研究科・准教授

研究者番号：30311517

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：溶液中の粒子の粒子径と形状、粒子数を測定する共焦点動的散乱法の測定システムを構築した。測定システムは、倒立顕微鏡にレーザー光を導入し、試料に集光照射する。粒子からの散乱光は光ファイバーにカップルし、光電子増倍管で検出後、相関器で散乱光の時間相関関数を計算する。ポリスチレン標準粒子を用いた測定により、本測定手法により、一度の測定で粒子径と濃度の推定が可能であることを示した。さらに、2種類の粒子の混合液に対して、それぞれの粒子径と濃度の推定が可能であることも示した。また、生物試料への応用として、粒子径約10nmのウシ血清アルブミンタンパクの測定を行い、濃度と粒子径の推定に成功した。

研究成果の概要(英文)：We developed a system of the confocal dynamic light scattering for measurement size, shape, and concentration of particles suspended in water. A laser beam is introduced to an inverted microscope and is focused on a sample. Scattered light is coupled to a optical-fiber and detected by a photomultiplier tube, and then, the temporal correlation function of scattered light is calculated by a correlator. We showed the developed system can be estimate a size and concentration of particles form results of measurement of polystyrene latex beads. The developed system can be applied to the mixture of two kinds of particles. We also successfully estimated the size and concentration of Bovine serum albumin protein.

研究分野：光工学

キーワード：動的散乱 粒子径計測 粒子濃度計測 共焦点顕微鏡

1. 研究開始当初の背景

動的光散乱法は、散乱光の時間揺らぎから散乱粒子の拡散係数を推定し、粒子の粒子径分布を測定する方法である。この粒子径計測は、例えば、高分子・化学分野でのナノ粒子測定、セラミックス・色材料分野での顔料やナノ材料の測定、半導体・ディスプレイ分野でのナノ粒子測定、バイオ分野でのエマルジョンやタンパク質、ウイルスなどの測定、食品分野でのエマルジョン乳製品測定など、非常に多岐な分野で応用されている。一方、これらの材料の測定では、粒子径と同様に、粒子の濃度の情報も重要である。しかし、通常の動的光散乱では、粒子の濃度の情報を取得することはできない。また、動的光散乱法は、その原理から、多重散乱光の影響を無視できるほど透明な低濃度の溶液に適用が限られており、高濃度な溶液は希釈が必要となる。試料によっては希釈が粒子の粒子径分布や分散状態に影響を及ぼす恐れがあり、希釈なしの測定が望まれる。

2. 研究の目的

本提案は、高空間分解能な共焦点光学系で動的光散乱計測を行う共焦点動的光散乱法を提案し、そのシステムを構築する。測定される時間相関関数の特性を実験的に明らかにし、粒子径計測や粒子濃度測定が可能であることを示す。

測定領域の大きさが波長の数倍程度まで小さくなることから、光学系により多重散乱光の影響を抑えることができ、高濃度溶液への適用が可能となることが期待できる。そこで、本システムを高濃度ナノ粒子の測定に応用し、測定可能な粒子径範囲と粒子密度の範囲を明らかにする。さらに、細胞中のタンパク等の粒子計測を試みる。

3. 研究の方法

図1は、構築した焦点動的光散乱法の測定システムの概略図と写真を示す。測定システムは、オリンパス社製倒立顕微鏡 IX-70 をベースに構築している。He-Ne レーザー (8mW、635nm) または、DPSSL レーザー (20mW、532nm) からの光を顕微鏡に導入し、顕微鏡のタレットに装着されたビームスプリッタを通して、粒子が入った測定試料内に集光照射する。粒子からの後方散乱光は、ビームスプリッタを透過し、顕微鏡の左ポートに取り付けられた光ファイバーにより、光電子増倍管へと導かれ、散乱光強度が検出される。検出された散乱光強度の信号は、相関器 (ALV 5000) に送られ、散乱光の時間相関関数が計算される。光ファイバーがピンホールの役割を果たしており、測定系は共焦点光学系となっている。これにより、集光スポット外の粒子からの散乱光や多重散乱光を抑えることができ、

高濃度粒子の測定を可能にしている。同時に、測定領域を波長の数倍程度まで小さくすることで、測定領域内の粒子数が減少する。これにより、粒子数の揺らぎによる散乱光強度の揺らぎの影響が時間相関関数に表れる。したがって、時間相関関数から粒子数の推定が可能となる。

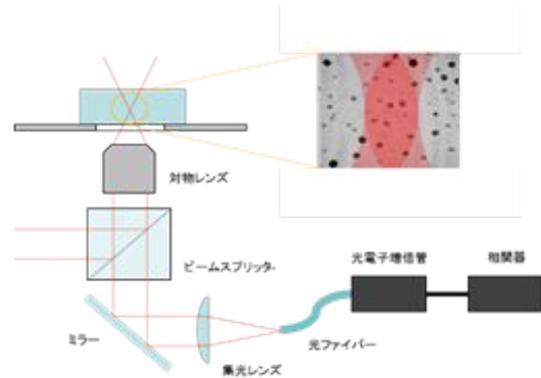


図1 共焦点動的光散乱法の測定システムの概略図

次に、共焦点動的光散乱法により計測される散乱光の時間相関関数を示す。散乱光の規格化時間相関関数は、散乱光の強度 $I(t)$ と電場 $E(t)$ から次式のように定義される。

$$\gamma(\tau) = \frac{\langle I(t)I(t+\tau) \rangle}{\langle I(t) \rangle^2} = \frac{\langle E(t)E^*(t)E(t+\tau)E^*(t+\tau) \rangle}{\langle E(t+\tau)E^*(t+\tau) \rangle^2}$$

ここで $\langle \dots \rangle$ は時間平均を表す。電場 $E(t)$ は、多数の粒子からの散乱電場の足し合わせなので、

$$E(t) = \sum_{j=1}^N E_j(t) = \sum_{j=1}^N b_j(t) E_0 E_s(\mathbf{q}) \exp[i\mathbf{q} \cdot \mathbf{r}_j(t)]$$

と表される。ここで、 $E_j(t)$ は j 番目の粒子の電場であり、 $\mathbf{r}_j(t)$ はその粒子の位置、 $b_j(t)$ はその粒子が測定領域内に存在する場合は1、それ以外は0でとなる係数である。 E_0 は入射光の電場、 \mathbf{q} は散乱ベクトル、 $E_s(\mathbf{q})$ は散乱振幅を表す。ここで、入射電場は一様で、散乱粒子はすべて同じであることを仮定している。これらの式より、時間相関関数は

$$\langle I(t)I(t+\tau) \rangle = I_s(\mathbf{q})^2 \left\{ \left\langle \sum_{j=1}^N b_j^2(t) b_j^2(t+\tau) \right\rangle + \left\langle \sum_{j=1}^N \sum_{k=1, k \neq j}^N b_j(t) b_k(t) b_j(t+\tau) b_k(t+\tau) \exp[-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j(t+\tau)] \exp[i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_k(t+\tau)] \right\rangle \right\}$$

と簡単化される。この式を測定領域内に存在する粒子の数 $N(t) \equiv \sum_{j=1}^N b_j(t)$ を用いて整理すると、時間相関関数は

$$I_s(\mathbf{q})^2 \left[\langle N(t)N(t+\tau) \rangle + \langle N(t)[N(t)-1] \left(\exp[-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j(t+\tau)] \right)^2 \right]$$

となる。一方、散乱光の時間平均強度は $\langle I(t) \rangle = I_s(\mathbf{q}) \langle N(t) \rangle$ と表される。したがって規格化時間相関関数は、

$$\gamma(\tau) = 1 + \left| \left\langle \exp[-i\mathbf{q} \cdot \Delta \mathbf{r}_j(\tau)] \right\rangle \right|^2 + \frac{\langle \delta N(t) \delta N(t+\tau) \rangle}{\langle N \rangle^2}$$

となる。時間相関関数の2項目は粒子からの散乱光同士の干渉による効果を表しており、3項目は、測定領域内の粒子数の変化の影響を表している。通常の動的光散乱の測定は、測定領域内に十分な数の粒子が入るようにして行うため、3項目の影響は無視できる。したがって、粒子数の情報は得られない。

照射する光をガウスビームと仮定し、粒子はブラウン運動しているとすると、時間相関関数は、粒子の拡散係数 D と集光位置でのビームサイズの短径 σ_1 と長径 σ_2 を用いて

$$\gamma(\tau) = 1 + \exp(-2q^2 D \tau) + \frac{1}{\langle N \rangle} \left[1 + \frac{D\tau}{\sigma_1^2} \right]^{-1} \left[1 + \frac{D\tau}{\sigma_2^2} \right]^{-1/2} \quad (1)$$

と表すことができる。したがって、時間相関関数の減衰係数から、粒子の拡散定数を推定することが可能であり、ストークス・アインシュタインの関係式から粒子径が得られる。一方、 $\tau=0$ での規格化時間相関関数の大きさは、粒子数の逆数に比例して大きくなる。共焦点光学系により測定領域を小さくし粒子数を少なくしているため、そこから測定領域内の粒子数の推定が可能となる。

4. 研究成果

図2は、測定試料として体積濃度が0.01%から0.32%の範囲の粒子径20nmのポリスチレンラテックス標準粒子を用いた場合の、構築した共焦点動的光散乱測定システムで測定された時間相関関数を示す。遅れ時間時間0.1us付近で、散乱光同士の干渉成分の揺らぎによる時間相関関数の減衰が現れている。これは(1)式の2項目に対応する。その後時間相関関数は一度一定となり、100us付近でもう一度減衰する。これは測定領域内の粒子数の揺らぎによる散乱光強度の揺らぎの効果で、(1)式の3項目に対応する。1-10usの時間相関関数がほぼ一定の領域での時間相関関数の値が、濃度に依存して変化していることがわかる。(1)式よりこの値は、粒子数に反比例しており、ここから粒子数の推定が期待できる。

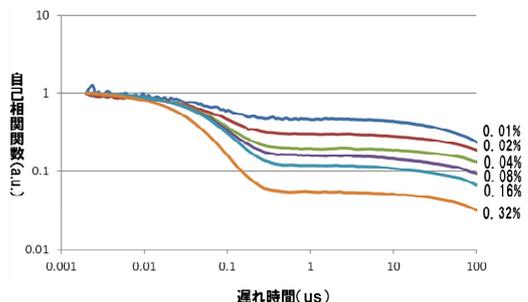


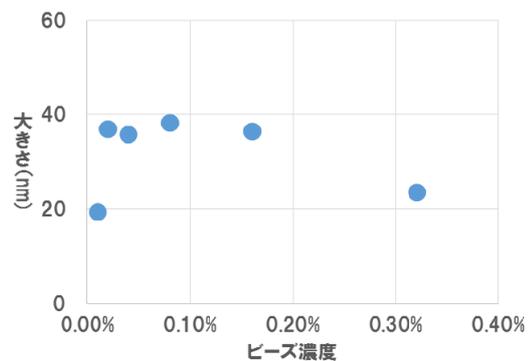
図2 粒子径20nmのポリスチレンラテックス標準粒子からの散乱光の時間相関数

フィッティングのモデル関数として

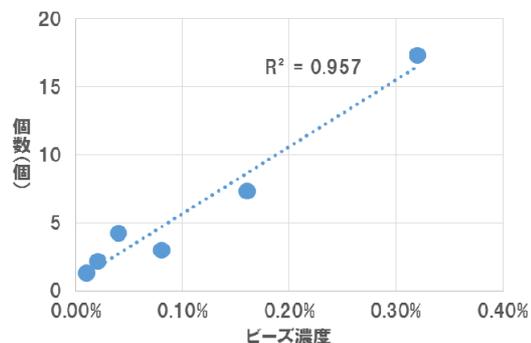
$$\gamma(\tau) = 1 + A \exp\left(-\frac{2\tau}{\tau_0}\right) + \frac{1}{\langle N \rangle} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_1} \right]^{-1} \left[1 + \left(\frac{1}{s}\right)^2 \frac{\tau}{\tau_1} \right]^{-1/2}$$

を用いて、計測された時間相関関数にフィッティングを行い、粒子径と粒子数を推定を行った結果を図3に示す。フィッティングパラメータは、 A 、 $\tau_0=1/qD^2$ 、 $\tau_1=\sigma_2/D$ 、 $\langle N \rangle$ の4つのである。 $s=\sigma_2/\sigma_1$ は構造因子と呼ばれる定数である。粒子径は、拡散係数からストークス・アインシュタインの関係式 $D=k_B/6\pi\eta a$ を用いて計算する。推定された粒子数は粒子の濃度にはほぼ比例しており、正しく推定できている。粒子径は40nm程度になっている。実際の粒子径20nmに対して大きめに推定されているのは、光を集光照射しているために、光の放射圧により粒子の拡散運動が制限されているためであると考えられる。これについては補正が必要である。

また、共焦点光学系を用いたことで、通常の動的光散乱測定が適用困難であった高濃度媒質の粒子径計測が可能であることも実験結果は示している。なお、より散乱が強い粒子径100nmのポリスチレンラテックス粒子に対して、体積濃度1%まで粒子径測定が可能であることを確認している。



(a)



(b)

図3 ポリスチレンラテックス標準粒子(a)粒子径と(b)粒子数の推定結果

次に、2種類の粒子の混合液に対して、粒子径と粒子数の推定を行う。3章で示した時間相関関数の導出を2種類の粒子の混合液に拡張すると、規格化時間相関関数が次式のよ

うに導出される。

$$\gamma(\tau) = 1 + \frac{I_1^2}{I_1^2 + I_2^2} \left\{ \exp(-2q^2 D_1 \tau) + \frac{1}{\langle N_1 \rangle} \left[1 + \frac{D_1 \tau}{\sigma_1^2} \right]^{-1} \left[1 + \frac{D_1 \tau}{\sigma_2^2} \right]^{-1/2} \right\} + \frac{I_2^2}{I_1^2 + I_2^2} \left\{ \exp(-2q^2 D_2 \tau) + \frac{1}{\langle N_2 \rangle} \left[1 + \frac{D_2 \tau}{\sigma_1^2} \right]^{-1} \left[1 + \frac{D_2 \tau}{\sigma_2^2} \right]^{-1/2} \right\}$$

この式をモデル関数として用いるにはパラメータが多いので、早い減衰の領域と遅い減衰の領域に時間相関関数を分けて、フィッティングを行う。早い減衰のモデル関数は

$$\gamma(\tau) = 1 + \frac{1}{N} + A_0 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{0A}}\right) + B_0 \exp\left(-\frac{\tau}{\tau_{0B}}\right)$$

を用いる。各パラメータは次式で与えられ、2種類の粒子の粒子径と相関関数の大きさの比が得られる。

$$A_0 = \frac{I_1^2}{I_1^2 + I_2^2} \quad B_0 = \frac{I_2^2}{I_1^2 + I_2^2}$$

$$\frac{1}{\tau_{0A}} = 2q^2 D_1 \quad \frac{1}{\tau_{0B}} = 2q^2 D_2$$

遅い減衰のモデル関数は、

$$\gamma(\tau) = 1 + A_1 \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{1A}} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{1A}(sp)^2} \right]^{-1/2} + B_1 \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{1B}} \right]^{-1} \left[1 + \frac{\tau}{\tau_{1B}(sp)^2} \right]^{-1/2}$$

を用いる。ここから相関関数の大きさの比が得られ、早い減衰での相関関数の大きさの比と合わせると、以下式を用いて各粒子の粒子数が得られる。

$$A_1 = \frac{A_0}{\langle N_1 \rangle} \Rightarrow \langle N_1 \rangle = \frac{A_0}{A_1}$$

$$B_1 = \frac{B_0}{\langle N_2 \rangle} \Rightarrow \langle N_2 \rangle = \frac{B_0}{B_1}$$

図4は、粒子径がそれぞれ80nm、100nmのポリスチレンラテックス標準粒子の混合液からの散乱光の時間相関関数を示す。粒子が大きくなるほど1つの粒子からの散乱光強度が強くなるため、それぞれの成分からの散乱光強度がほぼ等しくなるように、平均粒子径80nmの粒子は体積濃度0.08%、平均粒子径100nmの粒子は体積濃度0.04%に調整し、その水溶液の混合比を変えた複数の溶液に対して時間相関関数の測定を行っている。大きい方の粒子(100nm)の比率が増えるほど時間相関関数が遅れる傾向にあることから、混合溶液においてそれぞれの粒子の特性が測定結果に反映されていることが分かる。

図4に示す時間相関関数に対し、早い減衰の領域でフィッティングを行い、粒子径を推定した結果を図5に示す。光の放射圧の影響により実際のビーズの粒子径より大きめに推定されているが、ビーズの混合比率によらずほぼ一定である。したがって、時間相関関数から2種類の粒子を分離して、それぞれの粒子径の推定が可能であることを確認できた。早い減衰の領域でモデル関数は、通常の動的光散乱法のそれと同じものであり、CONTIN法やヒストグラム法を用いれば、粒

子径分布の推定まで行えることが期待できる。

一方、遅い減衰の領域でのフィッティングを行ったが、こちらは2つの減衰の成分を分離することはできなかった。

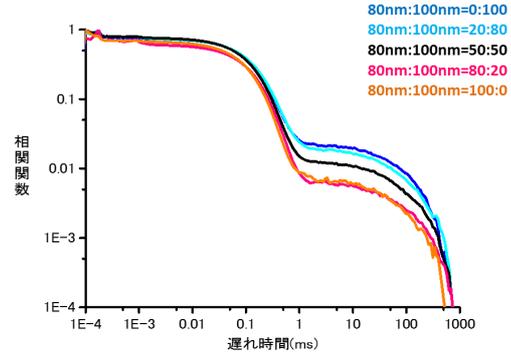
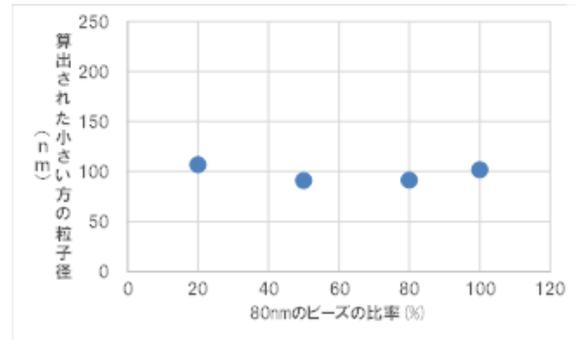
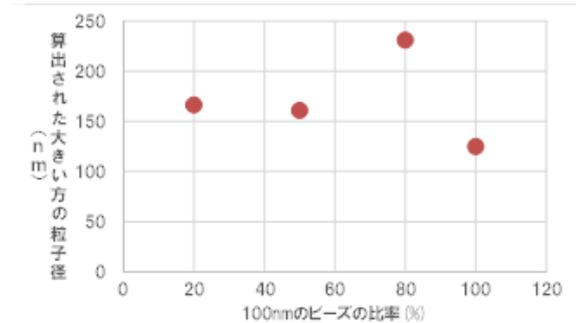


図4 2種類のポリスチレンラテックス粒子の混合液の時間相関関数



(a)



(b)

図5 2種類の粒子の粒子径の推定結果

早い減衰の領域でのフィッティングでは、粒子数の逆数も推定できており、その値は次式の通りそれぞれの粒子数に関係している。

$$\frac{1}{N} = \frac{A_0}{\langle N_1 \rangle} + \frac{B_0}{\langle N_2 \rangle} \quad (2)$$

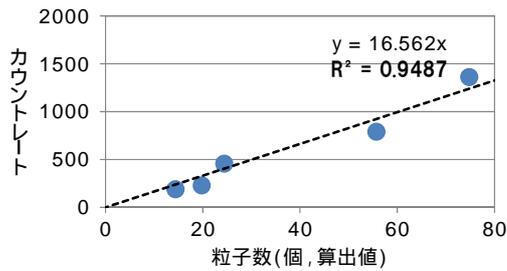
それぞれの粒子数に関する量をもう1つ測定できれば、粒子数の推定が可能となる。そこで、相関器で計測されるカウントレートを用いることで、粒子数の推定を試みる。カウントレートは、散乱光の強度と対応した量である。

図4に80nmのビーズ、100nmのビーズにおけ

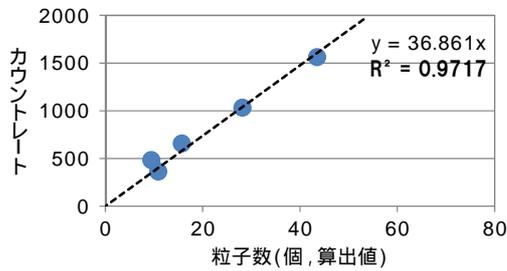
る推定された粒子数と光子カウントレートの関係を示す。この結果から、80nmのビーズは粒子1個当たり約16.6、100nmのビーズは約36.9の光子カウントである。したがって、混合液に対して測定される光子カウントレートと各粒子の粒子数には以下の関係が成り立つ。

$$PCR = 16.6 \langle N_1 \rangle + 36.9 \langle N_2 \rangle$$

この式と(2)式を用いると、各粒子の粒子数の推定が可能となる。

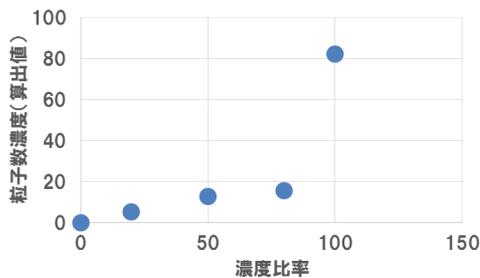


(a)

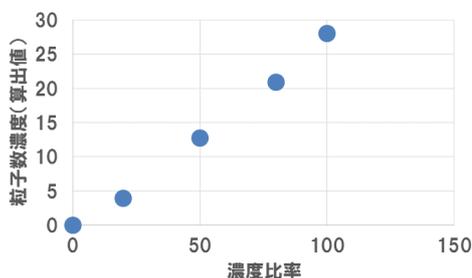


(b)

図6 (a)粒子径80nmと(b)粒子径100nmの粒子の光子カウントレート



(a)

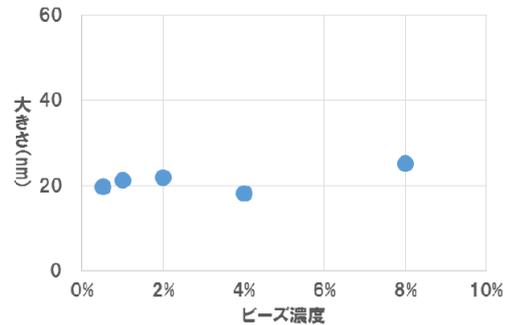


(b)

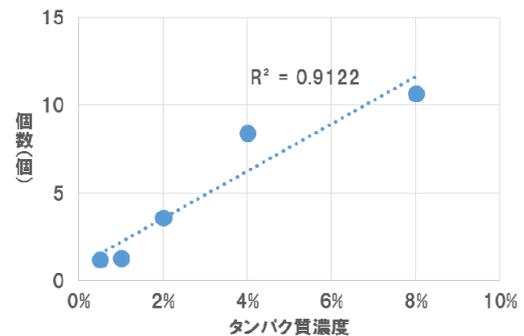
図7 (a)粒子径80nmと(b)粒子径100nmの粒子の推定された粒子数

図7は、この方法で推定された粒子径80nmと100nmの粒子の粒子数を示す。粒子径100nmに対しては、混合比の増加とともに直線的に増加しており、粒子数の推定がうまくできていることが確認できる。一方、粒子径80nmに対しては、粒子数の増加とともに粒子数が増加しているが、混合比80%と100%の間が不連続となっている。この原因は検討中である。しかし、光子カウントレートの情報を用いることで、粒子径が推定できる可能性が示された。

最後に、生物試料への応用として、ウシ血清アルブミンタンパクの粒子径と粒子数の推定を行った。ウシ血清アルブミンタンパクの粒子径は10nmである。重量濃度が1.0から8.0%の試料の測定を行った。図4は推定された粒子径と粒子数の推定結果を示す。タンパクの場合も粒子数は粒子の濃度にほぼ比例しており、正しく推定できている。粒子径がばらつきはないが、幅で濃度によって2倍程度に大きく推定されている。これは、光の放射圧の影響である。



(a)



(b)

図4 ウシ血清アルブミンタンパク(a)粒子径と(b)粒子数の推定結果

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 0件)

〔学会発表〕(計 0件)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<https://www.gpi.ac.jp/research/optical/professor-09/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石井 勝弘 (ISHII, Katsuhiro)
光産業創成大学院大学・光産業創成研究
科・教授
研究者番号：30311517

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()