

令和元年6月14日現在

機関番号：13401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04202

研究課題名(和文) アンチストークス光の超高速3次元顕微分光測定による高分子ダイナミクスの解析

研究課題名(英文) Polymer chains dynamics as observed by high speed 3D scanning coherent anti-Stokes Raman microscopy

研究代表者

前田 寧 (Maeda, Yasushi)

福井大学・学術研究院工学系部門・教授

研究者番号：60242484

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：コヒーレントアンチストークスラマン散乱光を検出することで、分子構造や分子間相互作用に関して豊富な情報をもたらす、高速・高空間分解能で分子イメージングが可能な顕微分光システムを試作し、高分子材料の動的な構造・組成解析に応用した。具体的には、温度に応答して水中で会合して微細構造を形成する高分子の構造転移ダイナミクスや、ポリエチレングリコールなどの高分子とチオシアン酸塩が作る錯体結晶の結晶化過程を解析した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高分子材料が医療からエレクトロニクスまで多方面で利用されている今日、その微細構造を可視化すると同時に組成分布や異種素材などとの相互作用を解析する技術の高度化が求められている。ラマン散乱光を用いる方法は試料に優しく、細胞を生きたまま測定することもでき、しかもそのスペクトルは分子構造に関する豊富な情報をもたらす。通常のラマン散乱は強度が低いために長時間の測定を要するという欠点を克服した本方法は、高い汎用性と拡張性を持ち、波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We have developed a scanning coherent anti-Stokes Raman spectroscopic microscope, which allows us to obtain abundant information about structure and interaction of molecules and images of the distribution of chemical species with high speed and spatial resolution, and applied to investigate dynamics of polymer chains. Self-association of temperature-responsive polymers in water and formation of crystalline complexes between polymers such as poly(ethylene glycol) and metallic salts were investigated.

研究分野：高分子物理化学

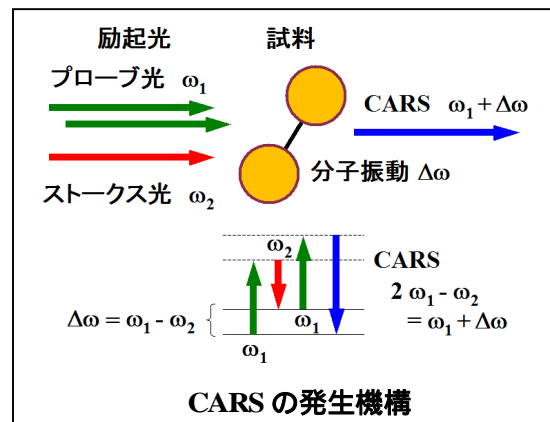
キーワード：高分子構造・物性 ラマン分光法 コヒーレントアンチストークスラマン ナノ構造

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

高分子材料が医療、エレクトロニクス分野など多方面で利用され、精密な構造制御と高い機能の発現を求められている今日、高分子やその複合材料の微細構造を可視化すると同時に組成分布や異種素材や細胞などの相互作用を解析する技術の高度化が求められている。種々の方法のなかで、光を用いる方法は低エネルギーの光子を用いるため試料に優しく、しかも常温常圧で大気中や液中でも観測できるという簡便さがある。細胞や生体試料を扱う場合には、損傷を与えることなく生きたままで生命活動を捉えることもできる。また、透過光や散乱光を分光して得られるスペクトルは分子構造や組成に関する情報をもたらす。特に、赤外吸収やラマン散乱のスペクトルには、試料を構成している分子の情報が直接的に得られ、官能基ごとのコンフォメーションや相互作用についても知ることができるといった優れた特徴がある。しかし、赤外分光には、空間分解能が劣る、試料の深さ方向の分析や水系での測定が困難、という弱点がある。同じ振動分光法であるラマン分光法を用いれば、そのような弱点は克服されるが、通常のラマン散乱は強度が低いために長時間の測定を要するという欠点が残る。この欠点を克服するために種々のラマン散乱の増強効果が利用されているが、その一つにコヒーレントアンチストークスラマン散乱 (CARS: coherent anti-Stokes Raman scattering) と呼ばれる現象がある。通常、ラマン分光では振動数 $\omega_1$ の光を試料に照射したときの散乱光のうち、分子振動(振動数:  $\Delta\omega$ )にエネルギーを与えて振動数が低下したストークス光 ( $\omega_1 - \Delta\omega$ ) を測定している。これは、分子振動からエネルギーを受け取るアンチストークス光 ( $\omega_1 + \Delta\omega$ ) が、ストークス光より弱いためである。しかし、振動数 $\omega_1$ のプロープ光に加えてストークス光に相当する光 ( $\omega_2 = \omega_1 - \Delta\omega$ ) を試料に照射すると、アンチストークス光が著しく増強される。この現象がCARSであり、通常のラマン散乱よりはるかに高強度であるため、高速でのスペクトル測定や、特定の波長の散乱光でイメージを得るCARS顕微鏡に应用されてきた。CARSは3次の非線形光学現象であり、その誘起には高強度の光を必要とするため、以前は2台のパルスレーザを利用し、一方を波長掃引してスペクトルを得ていた。操作が複雑で長時間の測定が必要であった上、装置が非常に高額であったために、その利用はあまり広がらなかった。最近、フォトニック結晶ファイバーにより発生させる高強度で波長帯域が広いスーパーコンティニウム光 (SC: supercontinuum) をストークス光として用いることで、試料の複数の振動準位を同時に励振させ、マルチチャンネル分光器で一度に全スペクトル領域を測定するマルチプレックスCARSが提案され、装置開発に新たなブレークスル がもたらされた。

我々はこれまで、赤外およびラマン分光法により種々の高分子の構造解析を行ってきており、最近では、原子間力顕微鏡の探針先端の表面プラズモンを利用する探針増強ラマン装置を開発して高分子ナノ構造の解析に应用している。このような成果と経験を踏まえ、装置自体が発展途上にあるCARS分光・イメージングシステムを高分子材料の解析に適した形で試作し、その可能性を探る本研究課題を提案するに至った。



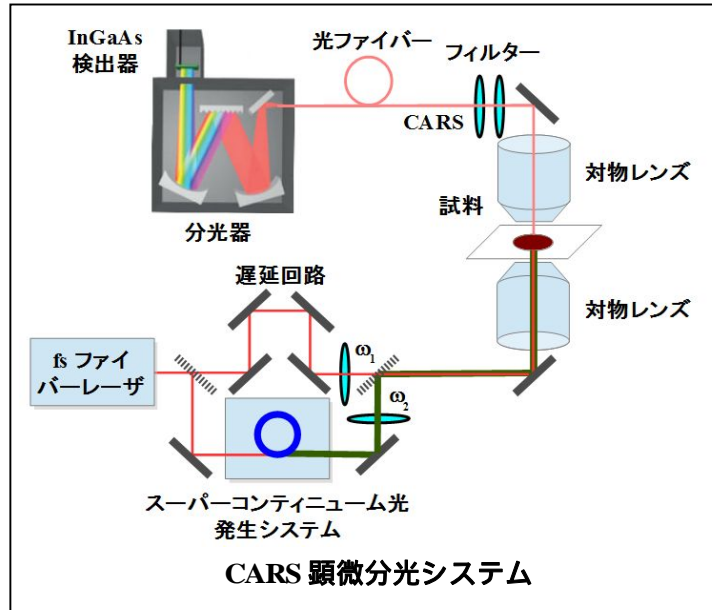
### 2. 研究の目的

本研究では、コヒーレントアンチストークスラマン散乱光 (CARS) を検出する高速で高空間分解能な顕微ラマン分光・イメージングシステムを開発し、高分子材料の静的・動的な構造・組成解析に应用する。具体的には、装置開発に関して  $1 \mu\text{m}$ 以下の空間分解能での三次元組成分布解析、高フレームレートでの二次元平面・断層の動画撮影、光コヒーレントトモグラフィ (OCT) の機能を付加してCARSより高深度領域の高速3次元イメージングを実現する。高分子とその複合体の微細構造解析に関して、温度応答性高分子やマイクロゲルの水中での相転移過程のダイナミクスの解析、水中でのブロック共重合体の構造転移の解析、高分子への細胞吸着過程の解析、を行う。

### 3. 研究の方法

コヒーレント反ストークスラマン散乱 (CARS) 顕微分光システムの試作

CARS を発生させるためには、短パルスのポンプ光 ( $\omega_1$ ) および試料の分子振動に一致する Stokes 光 ( $\omega_2$ ) を同時に照射することが必要である。可視域で励起と測定を行うシステムおよび近赤外域で行うシステムの 2 系統の CARS 顕微分光システムの試作を行った。可視域のシステムでは、Q スイッチパルス Nd/YAG レーザの高調波 (532 nm) をビームスプリッターで二つに分け、一方をポンプ光として用い、他方でローダミン 6G 溶液による色素レーザーを励起して 650 nm 付近の Stokes 光を発生させた。近赤外域のシステムでは、モード同期 Yb ファイバーレーザーの出力を二つに分け、一方をフォトニック結晶ファイバーによるスーパーコンティニウム (SC) 光発生システムに導入して SC 光を発生させた。SC 光の波長成分のうち、近赤外成分をフィルターで分離して広帯域 Stokes 光 ( $\omega_2 = 1250 \pm 250$  nm) として用い、ファイバーレーザーの残りの基本波をバンドパスフィルターにより狭帯域化してポンプ光 ( $\omega_1 = 1040$  nm) とした。どちらの系統とも、ロングパスフィルターを用いてポンプ光と Stokes 光を混合して同軸で顕微鏡へ導入し、対物レンズにより試料に集光した。試料から発生した CARS 光は、対向させた対物レンズで集め、各種フィルターを経由させてポンプ光と Stokes 光を除いた後に、分光器で分け電子増幅冷却 CCD 検出器で測定した。



CARS 顕微分光システム

#### OCT イメージング、3 次元スキニング機構の追加

平成 29 年度に試作した CARS 顕微分光システムに光コヒーレンストモグラフィ (OCT) による解析機能を追加した。近赤外の高速波長掃引レーザーを光源とする Swept Source OCT (SS-OCT) を構築した。試料中の屈折率に差がある領域間の界面で反射された光が再び参照光と混合されるときに、光路差のために干渉が生じる。高速波長掃引レーザーを用いる場合、波長により干渉状態が異なるため、波長変化に同期して反射光の強度が変化し、それをフーリエ変換すると深さ方向の反射光強度分布が得られる (A スキャン)。試料を光軸方向に移動させることなく 1 次元の断面像を得られるため高速な観察が可能になる。さらに、ピエゾステージとガルバノミラーを追加して、CARS および OCT 測定で 2 次元、3 次元スキニングを可能にした。

#### 共焦点レーザー स्क्यान ラマン イメージング 機構の追加

新たに DPSS レーザー (458 nm、100 mW) と共焦点レーザー स्क्यान を追加してラマン散乱光を検出する共焦点レーザー स्क्यान 顕微鏡として使用できるようにした。スパッタリングにより銀コートを施したポリスチレンやシリカの微粒子を 4-アミノベンゼンチオール の単分子膜で修飾して、その表面増強ラマン散乱光 (SERS) をバンドパスフィルターにより分離して検出し、イメージングおよびスペクトル測定を行った。分散液中やコロイド結晶中での単一の微粒子の運動を解析した。

## 4. 研究成果

### 温度応答性高分子の水中での相分離過程のダイナミクスの解析

温度応答性高分子の水溶液の相分離過程を 2 次元観察 (C-H 伸縮バンドの強度で画像化) および各点のフルスペクトルの測定を行った。相分離により生じる微粒子状の高分子濃厚相の成長過程と濃度変化をリアルタイムで追跡した。N-isopropylacrylamide (NiPAm) と N,N-diethylacrylamide (dEA) などの monoalkylacrylamide と dialkylacrylamide のランダム共重合体において、モル比が 1:1 のときに相転移温度が極小になり、dialkylacrylamide の分率が高くなるほど濃厚相の濃度変化の温度勾配が小さくなることが分かった。アミド I、II バンドの解析により異種モノマー間の水素結合の形成が転移温度が極小を示すことや、転移の協同性が変化することに係っていることが示唆された。また、同様な解析を温度応答性マイクロゲルでも行い、イメージングにより体積相転移の過程を、スペクトルにより水和状態の変化を追跡した。

### 液中での共重合体の構造転移のダイナミクスの解析

温度応答性ブロック共重合の温度に依存した会合と水和状態の変化を解析した。親水性 -

LCST ブロック共重合体のユニマー ミセル転移や LCST - UCST ブロック共重合体のミセル逆ミセル転移を対象として、イメージングによりモルフォロジー変化を、スペクトル測定により水和の変化を追跡した。さらに、親水性ブロックを安定化剤とする疎水性ブロックの RAFT 重合において、疎水部の体積分率の増加に伴ってブロック共重合体が会合体の形態を変化させる過程を解析した。

#### ポリエチレングリコール (PEG) とチオシアン酸塩の錯体結晶の解析

PEG とチオシアン酸ナトリウムはモル比 3:1 で錯体結晶を形成する。メタノール溶液から溶媒を蒸発させるとアモルファス状態を経て球晶が生成するが、その過程でチオシアン酸イオンの振動バンドが  $2062\text{ cm}^{-1}$  から  $2031\text{ cm}^{-1}$  にシフトする。球晶成長とスペクトルの変化を解析して高分子-イオン間の相互作用が生じて錯体の球晶が成長する過程を追跡した。

### 5. 主な発表論文等

#### [雑誌論文](計 5 件)

1. “Synthesis and Nano-object Assembly of Biomimetic Block Copolymers for Catalytic Silver Nanoparticles”, Shinji Sugihara, Masahiro Sudo, Yasushi Maeda, *Langmuir*, **35**, 1346-1356 (2019) 査読あり, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b01558
2. “Synthesis of Various Poly(2-Hydroxyethyl Vinyl Ether)-Stabilized Latex Particles via Surfactant-Free Emulsion Polymerization in Water”, Shinji Sugihara, Masahiro Sudo, Kazumasa Hirogaki, Satoshi Irie, Yasushi Maeda, *Macromolecules*, **51**, 1260-1271 (2018) 査読あり, doi: 10.1021/acs.macromol.7b02417
3. “Design of Hydroxy-Functionalized Thermoresponsive Copolymers: Improved Direct Radical Polymerization of Hydroxy-Functional Vinyl Ethers”, Sugihara Shinji, Yoshida Ayano, Fujita Satoshi, Maeda Yasushi, *Macromolecules*, **50**, 8346-8356 (2017) 査読あり, doi: 10.1021/acs.macromol.7b02084
4. “Metal-Free RAFT Cationic Polymerization of p-Methoxystyrene with HCl/Et<sub>2</sub>O Using a Xanthate-Type RAFT Cationogen”, Shinji Sugihara, Seiya Okubo, Yasushi Maeda, *Polym. Chem.*, **7**, 6854-6863, (2016) 査読あり, doi: 10.1039/C6PY01684G
5. “振動分光法で見る高分子の構造”, 前田 寧, *繊維学会誌*, **72**, 213 (2016) 査読なし, doi: 10.2115/fiber.72.P-213

#### [学会発表](計 10 件)

1. “温度応答性共重合体の水和と相分離挙動の解析”, 前田 寧, 西本 剛大, 杉原 伸治, 第 67 回高分子討論会 (2018)
2. “増強効果を利用する顕微ラマン分光装置の開発と高分子”, 小林 祐貴, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 67 回高分子討論会 (2018)
3. “レドックス活性高分子微粒子の電気化学特性の解析と二次電池への応用”, 渡邊 保, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 67 回高分子討論会 (2018)
4. “増強効果を利用する顕微ラマン分光装置の開発と高分子構造解析への応用”, 小林 祐貴, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 67 回高分子学会北陸支部研究発表会 (2018)
5. “水酸基を有するポリアクリル酸誘導体温度応答性高分子の機能解析”, 西本 剛大, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 67 回高分子学会北陸支部研究発表会 (2018)
6. “レドックス活性高分子微粒子の合成と二次電池への応用に向けた特性解析”, 渡邊 保, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 67 回高分子学会北陸支部研究発表会 (2018)
7. “赤外・ラマン分光法による高分子構造・物性解析”, 前田 寧, 高分子分析研究懇談会第 389 回例会 (招待講演) (2017)
8. “温度応答性高分子の水和と相分離挙動について”, 前田 寧, 膜工学サロン (招待講演), (2017)
9. “赤外・ラマン分光法による高分子構造・物性解析”, 前田 寧, 第 66 回高分子討論会 (招待講演), (2017)
9. AFM-Raman 複合装置を用いた高分子の構造解析, 小林 祐貴, 前田 寧, 杉原 伸治, 第 66 回高分子学会北陸支部研究発表会, (2017)
10. 振動分光法による温度応答性高分子の水和の解析, 前田 寧, 10th Mini-Symposium on Liquids, (2016)

#### [図書](計 1 件)

1. Chapter 8: Infrared and Raman spectroscopy”, Yasushi Maeda, in “Temperature-responsive polymers: Chemistry, Properties and Applications”, Vitaliy V. Khutoryanskiy, Theoni K. Georgiou (Editor) 197-222 (2018), John Wiley & Sons, ISBN: 978-1-119-15778-6

〔その他〕

ホームページ等: <http://acbio2.acbio.u-fukui.ac.jp/koubun/maeda/indexJP.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：杉原 伸治

ローマ字氏名：(SUGIHARA, Shinji)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。