

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 8 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2009～2011

課題番号：21686015

研究課題名（和文）

マルチスポット蛍光偏光法を用いたナノ粒子構造のアクティブ制御

研究課題名（英文）

Dynamic control for nanoparticle by using multispot fluorescence polarization

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

研究成果の概要（和文）：本研究は、ナノ粒子の構造化過程における可視化計測を実現し、さらに、計測したナノ粒子から、所望のナノ構造を組み立てるアクティブナノ粒子構造制御を実現するための基盤技術を開発することを目的としている。本研究では、金属ナノ粒子の粒径を計測するための計測システムを構築し、蛍光偏光法を用いたナノ粒子粒径の in-situ 計測技術を開発した。その結果、ナノ粒子粒径の計測に関する基本特性を評価し、直径 10nm 以下の粒子粒径の相対変化を、測定できることを実験的に確認することに成功した。

研究成果の概要（英文）：For the quality assurance of nanoparticles, nanoparticles size evaluation tool is required. In this study, nanoparticles size evaluation method based on fluorescence polarization is proposed. We also developed the method to control the nanoparticle aggregation by using developed nanoparticle sizing system. Fundamental investigation using the nano particle sizing system is performed for 10 nm gold nanoparticle. Gold nanoparticle and standard particle is measured with varying viscosity and temperature, and the measurement results are relatively agree with the change of the nanoparticle sizes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	11,800,000	3,540,000	15,340,000
2010 年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2011 年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	19,600,000	5,880,000	25,480,000

研究分野：マイクロ加工，光応用計測

科研費の分科・細目：機械工学・生産工学・加工学

キーワード：蛍光偏光法，ナノ粒子，粒径計測，in-situ 計測，ブラウン運動，回転拡散係数

1. 研究開始当初の背景

近年、1nm~100nm の粒径を有するナノ粒子の応用開発が盛んに行われており、その機能は、光導波路、生物センサー、触媒など様々な分野に応用されている。また、粒径が 4nm 未満の金属ナノ粒子が触媒活性を向上する

効果が確認されるなど、1-10nm の粒径に属するナノ粒子の応用も拡大してきている。これらの応用開発で、ナノ粒子の品質管理を行うにはナノ粒子の粒径を正確に評価する技術を確立することが重要となる。本研究では、蛍光偏光法を用いたナノ粒子粒径評価シス

テムを提案し、溶媒中のナノ粒子の平均粒径や粒度分布を評価する技術を確認することを目的としている。

2. 研究の目的

ナノ粒子構造のアクティブ制御技術を確認するために、ナノ粒子の粒径を評価する技術によってナノ粒子構造体の加工単位となるナノ粒子を選別する技術を確認し、構築した粒径評価システムに、ナノ粒子の凝集制御システムを組み込みナノ粒子のアクティブ制御を行う技術を確認することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 蛍光偏光法

Fig.1 に示すように溶液中に分散している蛍光粒子に直線偏光の励起光を照射するとき、励起光と平行な偏光成分を持つ蛍光粒子が励起されて、この時間内に、ブラウン運動のために、蛍光の偏角解消が生じる。この偏角解消の程度は、蛍光異方性 $r(t)$ で定義できる。

$$r(t) = r_0 e^{-t/\theta} \quad (1)$$

θ は回転相関時間であり、ナノ粒子のサイズ、形状、周囲状態によって変化するパラメータである。蛍光異方性の信号取得では、観察した蛍光を、励起光の偏光方向と平行な成分 $I_{||}$ と垂直な成分 I_{\perp} に分けて、以下の式から求められる。

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

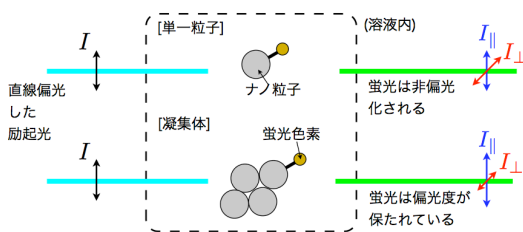


Fig.1 蛍光偏光法による偏角解消計測原理

(2) 周波数領域蛍光法

本研究では、上述の蛍光偏光度の測定に、周波数領域蛍光法を用いる。ある周波数で変調した励起光を蛍光粒子に照射し、励起された蛍光を、励起光の偏光方向に対して垂直な成分と平行な成分に分けてみると、その2つの信号は位相と強度の差が発生する。この位相と強度の差から上述の回転相関時間 θ を

求める。 $\Delta\Phi$ は位相差、 $Y_{AC}(AC_{||}/AC_{\perp})$ は振幅比、 $Y_{DC}(DC_{||}/DC_{\perp})$ は平均値の比、 ω は励起周波数、 τ は蛍光寿命である。

$$\theta = \left[\frac{Y_{AC}(Y_{AC}^2 - 2Y_{DC}Y_{DC} + 2)\sqrt{1 + \tan^2 \Delta\Phi^2} + Y_{AC}(Y_{DC} - 4)\tan \Delta\Phi \cdot \omega\tau}{(Y_{AC}^2 - 4)(Y_{AC}^2 - Y_{DC}^2) + (Y_{AC}^2 - 2Y_{DC})^2 \tan^2 \Delta\Phi^2} - 1 \right]^{-1} \cdot \tau \quad (3)$$

回転相関時間 θ の値から、蛍光異方性を評価すれば、蛍光異方性 $r(t)$ とナノ粒子の関係に基づいて、測定する粒子の粒径を求めることができる。

(3) 実験装置構成

本研究で用いた光学系を Fig.2 に示す。光源は波長 488 nm の Ar+ レーザを用い、偏光子で励起光の直線偏光度を高めた状態でサンプルに照射する。サンプルからの蛍光は対物レンズ・結像レンズ・冷却 CCD からなる顕微鏡光学系で観測している。光学系内にダイクロイックミラーやロングパスフィルターを挿入する事により、励起光の反射光や粒子による散乱光、迷光を防いでいる。また、冷却 CCD の直前にビームディスペーサを配置する事によって、蛍光を互いに垂直な偏光方向を持つ二つの光に分離でき、蛍光偏光度を 1 回の照射で測定できる。サンプルは、約 20 μ l の溶液を一回に測定可能でありサーモプレートを置く事によって、溶液の温度を制御している。測定システムである蛍光偏光法は、蛍光顕微鏡光学系と一体化されている。また、ビームディスペーサによって、蛍光偏光度の in-situ 測定が可能となっている。

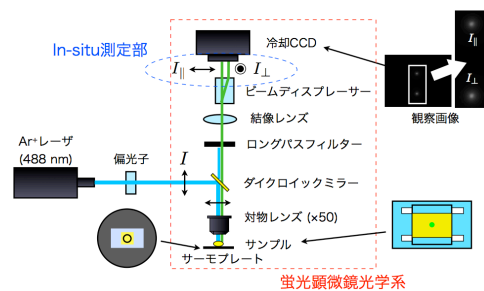


Fig.2 実験装置基本構成

4. 研究成果

(1) 蛍光粒子の粒径評価

この研究で測定対象となる金属ナノ粒子の粒径評価を行う場合、蛍光標識付き金属ナノ粒子について、回転相関時間の評価と粒径の計測を行う必要がある。本研究では、ナノ粒子粒径計測を実現するため、顕微鏡システ

ムに組み込み可能な回転相関時間の計測システムを開発し、粒径が約 1nm の蛍光粒子の回転相関時間を計測し、その測定データが Debye-Stokes-Einstein (DSE) の関係式に従うことをした。粘度 η 、温度 T に反比例する。 V_H は流体力学的体積、粒子のサイズ・形状と境界条件に依存する。 l は球面調和関数、 k_B はボルツマン係数である。

$$\theta = \frac{V_H \eta}{l(l+1)k_B T} \quad (4)$$

蛍光粒子を標準粒子として、構築した装置の計測特性を評価した。温度を 20.4°C に一定に保ち、粒子の境界条件が変化しないように、蛍光粒子よりサイズが小さい溶媒分子を持つ glycerin 水溶液を使って、すべり現象が発生しないように、回転相関時間の評価を行った。その結果、構築した実験装置において、回転相関時間は粘度に比例し、DSE の関係式に従い、 $\theta = (1.65 \cdot 10^{-10}) \eta$ となる関係が得られた。これは V_H を剛体球として与えた場合、粒子の粒径 $d=1.1$ nm となることを意味し、動的散乱法等で評価された蛍光粒子の粒径とよく一致する。

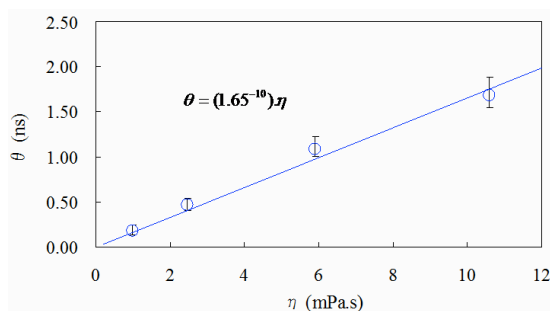


Fig.3 粘度と回転相関時間の関係

以上の結果から、開発した装置において、ナノ粒子の粒径評価に必要な、回転ブラウン運動の回転相関時間を正しく評価できることを確認した。

(2) 粒径変化検出特性の評価

計測したシステムにおいて、数 nm オーダーの粒径変化の検出が可能であるかどうかを確認するため、蛍光粒子に DNA 修飾を施し、DNA の相補的結合反応を利用して、サンプルの粒径を変化させた場合について、蛍光偏光度の変化を調べた。

相補的な塩基配列を持った DNA 同士では、塩基部に水素結合が働いたため、ハイブリダイゼーションという結合が起こり、その際、粒

径が増加する。そこで、30 塩基長の DNA と 90 塩基長の DNA を用意し、両者を結合させた場合の粒径変化による蛍光偏光度の変化を、開発したシステムを用いて観測できるか調べた。この時、測定する蛍光粒子 Alexa Fluor 488 には、30 塩基長の DNA が修飾されており、90 塩基長の DNA の一部が蛍光色素に修飾された 30 塩基長の DNA と相補的な配列になっていることから、両者を混合すると DNA 修飾された蛍光色素に 90 塩基長の DNA が結合され粒径が増加する。実験では、色素濃度を一定にするために、30 塩基長の DNA で修飾された蛍光粒子の濃度を 100 nM で一定にし、90 塩基長の DNA の濃度を 1 nM から 1 μ M まで変化させた。測定温度は、DNA の失活が起こらないように、31°C で一定にした。

実験結果を Fig.4 に示す。横軸が 90 塩基長の DNA の濃度、縦軸が蛍光偏光度を示している。90 塩基長の DNA の濃度が薄い所では、ほとんどハイブリダイゼーションが起こらずに、30 塩基長の DNA に修飾されたナノ粒子だけが運動している状態なので、蛍光偏光度は低い値を示している。一方で、30 塩基長の DNA で修飾された蛍光粒子と 90 塩基長の DNA が等しい濃度になるにつれて、ハイブリダイゼーションが起こり、90 塩基長の DNA の濃度が高い所では、全ての蛍光粒子に 90 mer DNA が結合して大きな粒子に変化したため、蛍光偏光度が増加した。この蛍光偏光度の増加量は 12 [mP] と小さいが、変化が急峻である事から、直径が 1nm 前後の蛍光ナノ粒子について、その粒径変化が観察可能であることがわかる。この実験の結果から、開発したシステムでは、ナノ粒子の粒径の変化に伴う蛍光偏光度の変化を連続的に観察可能であることを確認した。さらに、蛍光偏光度からナノ粒子の粒径の関係を詳細に調べ、実験式を確立することにより、ナノ粒子の凝集等による粒径の変化を計測評価することが可能になると考えられる。

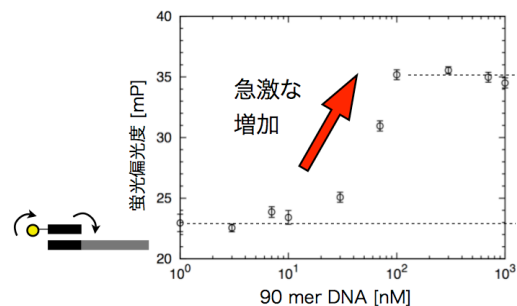


Fig.4 粒径変化に伴う蛍光偏光度変化の検出

次に、蛍光粒子をプローブとし、プローブとなる蛍光粒子に粒径の異なる金属ナノ粒子を結合させた際に、蛍光粒子の回転相関時間の変化から、金属ナノ粒子の粒径が測定できるかどうかを検証する。まず、粒径が異なる金属ナノ粒子を結合した蛍光微粒子について、回転相関時間の変化を調べる。回転相関時間の変化を調べるため、サンプルとして、直径 1nm の蛍光粒子 (AlexaFluor488) , AlexaFluor488 に、それぞれ平均粒径が 1.86nm, 5.68nm, 8.54nm の金ナノ粒子を結合し、サンプルの温度を 20.4°C に保った上で、回転相関時間を計測する実験を行った。実験結果を Fig.5 に示す。Fig.5 の x 軸を、結合した金ナノ粒子の粒径、縦軸を各測定サンプルを計測した際の回転相関時間としている。尚、金ナノ粒子の粒径が 0nm の点にプロットされている実験値は、蛍光粒子単体の回転相関時間としている。

得られた実験結果では、直径 10nm 以下の金ナノ粒子を蛍光色素に接続した場合でも、ナノ粒子の粒径変化に伴って、回転相関時間が変化している。

Fig.5 を用いて、回転相関時間 θ と d の関係を d の 3 次式で近似した結果は、

$$d = 5.7 \times 10^{15} d^3 - 3.2 \times 10^7 d^2 + 0.2d + 2.05 \times 10^{-9} \quad (5)$$

となる。この結果、粒径は回転相関時間の 3 乗の項に最も大きな影響を受けると考えられ、ナノ粒子の粒径を、蛍光微粒子の回転相関から計測できる可能性を示唆している。

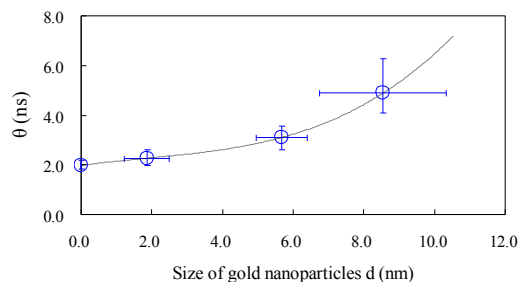


Fig.5 蛍光偏光法による金属ナノ粒子の回転相関時間評価

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Terutake Hayashi, Yasuhiro Takaya and Masaki Michihata, Development of nanoparticle sizing system integrated with optical microscopy using fluorescence polarisation, Int. J. Nanomanufacturing, Vol. 8, Nos. 1/2, 2012,

[学会発表] (計 7 件)

[国際会議]

- (1) Terutake Hayashi, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, and Kok Foong Lee, Development of Nano Particle Sizing System Using Fluorescence Polarization, XX IMEKO World Congress Busan Korea, 2012, 13th Sep. To be published.
- (2) Kok Foong Lee, Terutake Hayashi, Yasuhiro Takaya, Structural of Metal Nanoparticles by Photoinduced Aggregation, Proc. 10th International Symposium on Measurement and Quality Control (ISMQC), 9th September 2010, Osaka, Japan, pp.B4-135-1.
- (3) Kok Foong Lee, Terutake Hayashi, Masaki Michihata, Yasuhiro Takaya, Development of in-situ evaluation system for monitoring the size of nanoparticles based on fluorescence polarization, Proc. The 10th International Symposium of Measurement Technology and Intelligent Instruments (ISMTII), 29th June 2011, Daejeon, Korea, pp.C5-4.
- (4) Satoshi Ota, Terutake hayashi, Yasuhiro Takaya, In-situ measurement system for the particle growth in self-assembly process based on fluorescence polarization, Asian Symposium for Precision Engineering and Nanotechnology, Japan, 11th Nov. (2009), Included in Digital Media

[国内発表]

- (5) Lee Kok Foong, 林 照剛, 道畑正岐, 高谷裕浩, 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(第一報) ブラウン粒子の回転相関時間計測システムの開, 2012 年度精密工学会春季大会学術講演会(2012), p.461-p.462, 首都大学東京, 3月15日
- (6) 大田悟嗣, 林 照剛, 高谷裕浩, 蛍光偏光法を用いた自己組織化過程における in-situ ナノ粒子径評価(第2報), 2010年

- 度精密工学会春季大会学術講演会(2010),
p.389-p.390 , 埼玉大学, 3月18日
- (7) 大田悟嗣, 林 照剛, 高谷裕浩, 蛍光偏光
法を用いた自己組織化過程における
in-situ ナノ粒子径, 2009年度精密工学
会秋季大会学術講演会(2009),
p.677-p.678, 神戸大学, 9月10日

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況(計0件)

○取得状況(計0件)

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