

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25年 6月10日現在

機関番号：32682

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22760012

研究課題名（和文）色素会合体／金属微粒子複合化による生体材料標識用高効率2光子励起
蛍光材料の作製研究課題名（英文）Fabrication of high-efficient 2-photon fluorescent materials for bio-
applications using metal-particle/dye-aggregate composites

研究代表者

加藤 徳剛（KATO NORITAKA）

明治大学・理工学部・准教授

研究者番号：90329110

研究成果の概要（和文）：色素分子が配列凝集した会合体を水中で安定化させる方法を開発した。色素を会合させると、2光子励起蛍光の発光効率が溶解状態のときの10～100倍になった。微粒子上に、励起光増強効果を示す金シェルを作製する方法を開発した。金シェルを持つ微粒子上に色素会合体を形成させると、金シェルが無いときの約3倍の発光効率を得た。溶解状態の色素と比べると、色素の会合形成と金シェルの光増強効果を利用することで、最大数100倍の発光効率の向上を達成した。

研究成果の概要（英文）：The method to stabilize dye-aggregates in aqueous media was developed. The aggregates enhanced the efficiency of the 2-photon excited fluorescence by up to 100 times compared to the solubilized dyes. The method to form a gold-shell on particle was also developed. Due to the enhancement of the excitation intensity induced by the shell, the aggregates adsorbed on the shell exhibited 3 times higher efficiency than those on the particle without the shell. Thus, the combination of dye-aggregation and the gold shell achieved several 100-fold higher efficiency compared to the solubilized dyes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：応用物理学・工学基礎・応用物性・結晶工学

キーワード：局在表面プラズモン共鳴、微粒子、色素会合体、非線形光学

1. 研究開始当初の背景

2光子励起蛍光(2PF)を用いた、生体組織の高分解能3次元光計測の研究が盛んである。従来の共焦点蛍光顕微鏡と同様、蛍光分子で生体組織を染色する必要があるが、2光子励起レーザー走査型光学顕微鏡(2PF顕微鏡)は商品化されており、様々な生体組織の観察に使われ、生体機能の新規解明がなされてい

る。従来の共焦点蛍光顕微鏡と比べ、得られる像のS/Nが高いことと、2PFの励起光に生体組織の光透過性が高い近赤外光(NIR)を用いるので、試料のより深部が観察可能なことが利点である。

しかし、2PFは非線形光学過程を含むので、本質的に発光効率が非常に低い。現在、2PF材料には、従来の蛍光顕微鏡法で使われている

蛍光分子を流用しているが、より高分解能・高品質な画像を得るため、2PF 効率の高い材料の開発が求められている。

2PF 効率を向上させるためには、非線形光学過程である 2 光子で励起される過程の確率(2 光子吸収断面積： σ_{2PA})を上げる必要がある。その方法は、分子内に長い π 共役系を持たせることである。長いメチン鎖(-CH=CH-)や複数の芳香環が連結した分子が、数多く合成され、大きな σ_{2PA} を示す分子が得られている。しかし、これ以上分子量を大きくして π 共役系を伸長させることは、困難であるばかりか、本研究と関連して、水溶性・水分散性に欠けるなど生体組織の染色や生体分子の標識に不都合な問題を生じる。

一方で、 π 共役系の伸長とは別の方法として、色素分子に会合体を形成させる方法がある。会合体内での遷移双極子間の相互作用を通して、 π 電子が多数の分子にわたって非局在化し、 π 共役系が伸長したのと同等の効果が得られる。しかし、会合体の 2PF に関する報告例は非常に少ない。

また、実効的な 2PF 効率を増大させる方法に、励起光の光電場を、金属の局在表面プラズモン共鳴 (SPR) を利用して増強させる方法がある。本研究ではバイオ関連の応用を目指しているので、2PF の励起光として NIR を用いる。SPR 材料として金属ナノ粒子が有名であるが、それらは可視領域に SPR バンドを示し、NIR とは相互作用しない。NIR 領域に SPR バンドを示すものは、金ナノロッドと、誘電体コア粒子上に形成された金シェルである。しかし、これらを 2PF 効率増大に利用した報告例は、私の知る限りない。

2. 研究の目的

そこで、2PF 効率を増大させるため、色素会合体による π 共役系の伸長と、SPR による励起光の光電場増強を組み合わせることを目的とした。特に、生体組織の観察に適した 2PF 材料は水中で安定でなければならない。そこで、2PF 材料を作製するにあたり、全ての工程を水環境で行うウィットプロセスに限定した。得られた試料の 2PF 特性の評価も水中で行った。

3. 研究の方法

(1)水分散型 J 会合体の作製と微粒子表面上への J 会合体の形成

2PF 材料になりうる会合体は、蛍光を示さなければならない。色素分子が凝集すると、多くの場合、蛍光消光してしまうが、J 会合体は色素分子が規則配列した凝集体で、強い蛍光を示す。また、J 会合体を形成する色素分子で有名なものが、アニオン性のシアニン色素 (CD) である。溶解度は高くはない (<1mM) が水溶性である。過飽和水溶液中で、CD は J 会

合体を形成するが、溶解度以下の濃度では、当然溶解してしまう。そこで、アニオン性 CD とカチオン性の高分子電解質 (PE) とのコンプレックを形成させ、低濃度でも会合体が解離しない、水分散型 J 会合体の作製を目指した。5 種類の CD (NK3989, NK2203, NK1976, NK1952, NK3213) を購入し、5 μ M の水溶液 (pH7 ~9) を作製した。また、2 種類のアニオン性 PE の水溶液 (1mg/mL) を作製した。CD 水溶液と PE 水溶液の体積混合比を変え、J 会合体の形成および安定性を、可視光吸収スペクトルにより評価した。

また、最終的には金ナノロッドや金シェル上に J 会合体を形成させなくてはならない。その布石として、平均粒径 400nm と 100nm のシリカ粒子上に会合体を形成させることを行った。微粒子上に PE 多層膜を形成させる交互吸着 (LbL) 法を応用した。シリカ粒子の表面電荷は負である。その上にアニオン性 PE を静電吸着させ、粒子の表面電荷を正にする。その上にさらにアニオン性の CD を静電吸着させ、J 会合体の形成を試みた。用いた溶液は、CD 水溶液 (50 or 5 μ M) と、3 種類のアニオン性 PE 水溶液 (1mg/mL, 0.5NaCl) である。

(2)微粒子表面上への金シェル形成

平均粒径 400nm と 100nm のシリカ粒子及び、平均粒径 200nm のポリスチレン (PS) 粒子をコア粒子として用い、その表面に金シェルの形成を行った。これらのコア粒子表面に、LbL 法により PE 膜を 3 層吸着させ、この PE 膜に金ナノ粒子を吸着・浸透させた。その後、塩化金酸水溶液に分散させ、コア粒子表面上の金ナノ粒子を種に、金を還元させ、析出させ、粒子表面を金の層で覆う方法をとった。

金シェル上に会合体を形成させるため、金シェル上に、さらに PE の多層膜を LbL にて作製し、表面電荷を正にしてから、アニオン性の CD を吸着させ、J 会合体吸着シリカコア/金シェル粒子を得た。なお CD として、水分散型 J 会合体形成により、2PF 効率が最も向上した NK3989 を用いた。

また、金シェルの保護と、金-会合体間の距離制御性を PE 膜より改善すべく、PS コア粒子上の金シェル上に、さらにシリカの層を形成することも行った。シリカ層の作製は、シリコンアルコキシドを用いたゾルゲル法を用い、触媒にはアンモニアを用いた。

(3)2PF 特性の評価

水分散型 J 会合体を用いて、CD が会合体を形成することで向上する 2PF 効率の評価を行った。励起光には、パルス幅 5ns の Nd³⁺YAG レーザの 3 倍波で励起した OPO を用いて得られる 620nm~1100nm のパルス光を用いた。検出には、ICCD カメラ付きのポリクロメータを用いた。2PF 効率を表す物理量である 2PF 活性断面積 (σ_{2PF}) の評価は、相対評価法を用いた。即ち、 σ_{2PF} の値が既知の蛍光分子と、試

料の蛍光強度を比較することで、水分散型 J 会合体及び、溶液状態（モノマー状態）での σ_{2PF} を求めた。なお、後者の試料として、CD のメタノール溶液 (100 μ M) を用いた。

J 会合体吸着シリカコア/金シェル粒子を用いて、金シェルが示す励起光増強効果による 2PF 効率の向上を評価した。なお、平均粒径が 400nm のシリカコア粒子の試料を用いた。粒子が光を強く散乱するため、上記の分光法では評価できず、2PF 顕微鏡を用いて 1 粒子ごとに 2PF 強度を評価した。励起光は、パルス幅 100fs で波長 800nm である。

4. 研究成果

(1) 水分散型 J 会合体の作製と微粒子表面上への J 会合体の形成

NK3989 と NK2203 と NK1976 の場合、各水溶液に PE 水溶液を添加していく毎に、溶解状態の吸収ピークよりも長波長側に、先鋭な J バンドという J 会合体形成を示す吸収バンドが成長していき、溶解状態の吸収ピークが消滅していった。J バンドが成長しきる最低の混合比で得られた水分散型 J 会合体と、一部ダイマーを含む水溶液の可視光吸収スペクトルを図 1 に示す。PE 水溶液を添加する前の水溶液の吸収ピークよりも、長波長側にシフトした、鋭いピークを示すことから J 会合体が形成されことを示す。これらの分散液の粒径の測定を試みたが、測定できないほど光を散乱しない、光学的に均質な(濁りの無い)水分散型 J 会合体を得ることに成功した。得られた水分散型 J 会合体は、30 倍まで希釈しても J 会合体は解離せず、pH5~9 の間で安定していた。

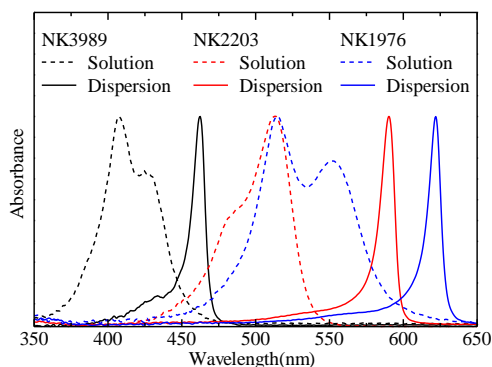


図 1 J 会合体分散液および溶解状態の規格化した可視光吸収スペクトル

一方、NK1952 と NK3213 の場合、PE 水溶液を添加していくと、目視でも分かる大きな凝集体が水面上に浮遊した。本研究で提案したコンプレックス形成による水分散型 J 会合体の作製方法は、用意した全ての CD には適応できなかったものの、3 種類の CD については成功を収めた。

微粒子表面上への吸着には、4 種類の CD

(NK3989, NK2203, NK1976, NK1952) を用いた。どの CD も粒子上に静電吸着させると、J 会合体になった。粒径 400nm のシリカコアを用いた場合、J 会合体吸着後も良好な分散性を示したが、粒径 100nm の場合、粒子間の凝集が起り、コロイド安定性が得られなかった。図 2 に粒径 400nm のシリカコアを用いた場合で、最もコロイド安定性が良かった PE との組み合わせで得られた J 会合体吸着微粒子 (最大で粒径 475nm) の消衰スペクトルと蛍光スペクトルを示す。これにより種々の発光波長を示す蛍光微粒子を得ることに成功した。

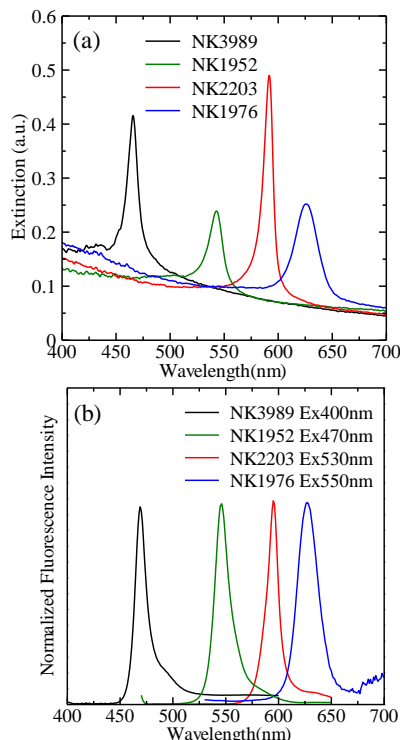


図 2 粒径 400nm のシリカコアを用いて作製した J 会合体吸着微粒子の消衰スペクトル (a) と蛍光スペクトル (b)

(2) 微粒子表面上への金シェル形成

粒径 400nm と 100nm のシリカコアを用いて、LbL 膜によるコート、金ナノ粒子の吸着・浸透、そして金の析出還元による金シェル構造の形成を行った。粒径 100nm のシリカコアの場合、如何なる条件でも金の析出還元時に、大きな凝集体となり、金シェル構造を有する微粒子作製には至らなかった。図 3 に、粒径 400nm のシリカコア上に最適な条件で作製した金シェル構造の消衰スペクトルと透過電子顕微鏡 (TEM) 像を示す。典型的な SPR バンドを 520nm に示す金ナノ粒子を、PE 膜被覆粒子表面に吸着・浸透させると、金ナノ粒子の凝集により SPR バンドが 610nm にシフトし、金を析出還元させ、金シェルを形成させる、804nm の NIR 領域に SPR バンドが出現した。TEM 像を見ると、未被覆のシリカコアよりも、

金で被覆された粒子表面は黒く見える。提案した方法が、NIR に SPR バンドを形成するのに有効であることが示された。

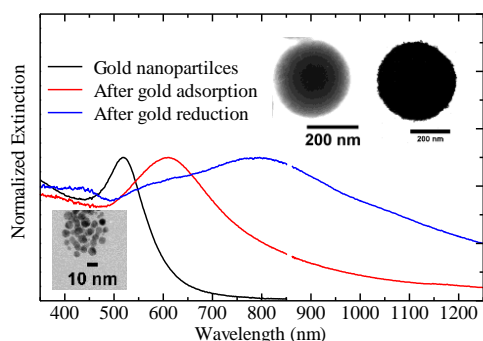


図3 金ナノ粒子分散液、金ナノ粒子吸着シリカコア分散液及び、シリカコア/金シェル分散液の消衰スペクトル(シリカコアの粒径は400nm)左から1番目のTEM像は金ナノ粒子、2番目は未被覆のシリカコア、3番目はシリカコア/金シェル

金シェルの保護及び、金表面とJ会合体間の距離の制御性を向上させるため、金シェル上にさらにシリカ層で被覆した。光散乱の効果なるべく低下させるため、この実験では平均粒径 200nm の PS コアを用いた。平均粒径が小さいため、金シェル形成時にコロイド安定性を保持するのが、困難であったが、金の析出を多段で行うなど工夫した。また、シリカ層形成時のゾルゲル反応条件も最適化を行い、図4に示すような708nmにSPRバンドを示すシリカ被覆 SP コア/金シェルの作製に成功した。TEM像を見ると、黒いPSコア/金シェルの上にある灰色の層がシリカ層である。

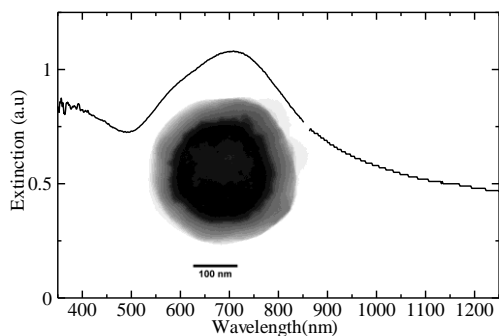


図4 シリカ層で被覆されたPSコア/金シェル分散液の消衰スペクトルとTEM像(PSコアの粒径は200nm)

(3) 2PF 特性の評価

水分散型J会合体を用いて、色素分子が会合体を形成したことによる2PF効率の違いを評価した。4(1)節で水分散型J会合体が得られた3種類のCDについて、溶解状態(モノマー状態)のときと会合状態のときの σ_{2PF} を

各励起光波長で評価し、図5にまとめた。なお、 σ_{2PF} は1分子当たりの値で計算した。観測した発光が、試料からの2PFであることを確認するため、各励起波長において、励起強度の2乗に発光強度が比例することを確かめた。水分散型J会合体では、励起波長を短くしていくと、 σ_{2PF} が上昇し、測定範囲において最大で120~160GMの σ_{2PF} を示した。1分子当たりの σ_{2PF} 値からするとJ会合体自体は、効率のよい2PF材料とは言えない。ところが、会合体は、複数の色素分子が凝集している。従って、分散している会合体1個当たりの σ_{2PF} 値が見積もられば、非常に効率の良い2PF材料であることが示せるが、会合体当たりの分子数(恐らく100以上)を見積もる手だてがないのが現状である。

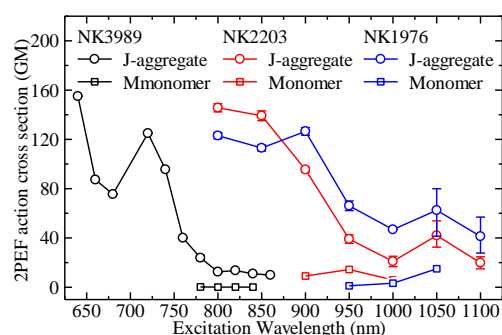


図5 水分散型J会合体及びモノマー状態での σ_{2PF} スペクトル

一方、モノマー状態の2PF効率は非常に低く、種々の励起長で σ_{2PF} を評価できなかつた。測定できた励起波長で会合状態と比較すると、NK3989の場合約113倍、NK2203の場合約11倍、NK1976の場合約60倍、会合体を形成することで、 σ_{2PF} が増大した。残念ながら会合状態で σ_{2PF} の高い励起波長で、モノマー状態での σ_{2PF} の評価ができず、大幅な σ_{2PF} の増大を数値として示すことができなかったが、J会合体を形成することで、大幅に2PF効率が向上することを実験的に示すことができた。

金シェルの励起光増強効果を評価するため、シリカコア/金シェル粒子上にPE多層膜をLbL法にて形成し、表面電荷を正にしているから、NK3989を最表面に吸着させ、J会合体吸着シリカコア/金シェル粒子を作製した。シリカコア/金シェル粒子の作製方法は、4(2)で示した方法を踏襲し、平均粒径400nmのシリカコアを用いた。また、J会合体の吸着に関しては、4(1)で示したJ会合体吸着微粒子の作製方法を踏襲した。図6に作製した粒子の消衰スペクトルとTEM像を示す。NK3989のJバンドが467nmに、SPRバンドが839nmに確認できる。金シェルを3層のPE膜で被覆してから、NK3989を吸着させたが、TEM像にはその層が観察されなかつた。

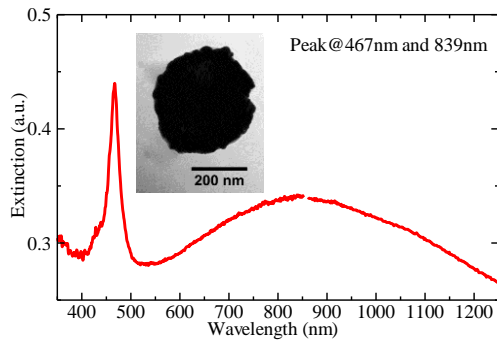


図6 NK3989を用いたJ会合体吸着シリカコア/金シェル粒子の消衰スペクトルとTEM像(金シェル上に3層PE膜で被覆してからNK3989を吸着)

金シェルが示すSPRバンドに、共鳴する波長の励起光が増強される。この効果を評価するため、金シェルを持たないシリカ粒子上にJ会合体を吸着させた微粒子も用意し、J会合体吸着シリカコア/金シェル粒子とで、2PF強度を2PF顕微鏡により比較した。図7にその2PF像を示す。両試料ともに、透過像で確認できた粒子の全てから、2PFを確認することができ、均一にJ会合体が粒子表面に吸着していることが確認できた。それぞれの像から1粒子当たりの2PF強度を算出し、粒子当たりのJバンドの吸光度当たりの2PF強度を比較したところ、J会合体吸着シリカコア/金シェル粒子の方が、約3倍2PF強度が強かった。

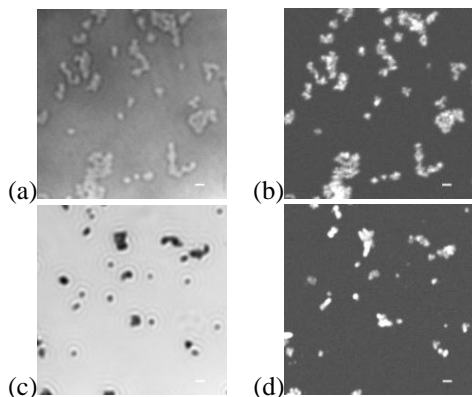


図7 J会合体吸着シリカ微粒子の透過像(a)と2PF像(b)及びJ会合体吸着シリカコア/金シェル粒子の透過像(c)と2PF像(d)(シリカコアの平均粒径:400nm, 励起波長:800nm, Scale bar:1μm)

当初は、数桁強い2PF強度が得られることを期待していたが、3倍程度の増大に留まった。その原因は、図6に示したように金シェルのSPRバンドがブロードであること、金シェルの表面が平滑でないこと、そして金シェル上のPE膜が薄いことが挙げられる。金シェルの形状均質化及び表面の平滑化がなさ

れば、SPRバンドが狭くなり、共鳴効果を十分に引き出せると考える。また、金シェルと会合体が接近しすぎると、会合体から無輻射で、金に励起エネルギーが移動してしまい、蛍光消光を起こす。図4に示したようにシリカ層を金シェル上に形成させ、会合体を金シェルから15nm程度離せば、より大きな2PFの増大が得られると考える。

NK3989の場合、会合体形成することで励起波長800nmの2PF効率が約100倍の増大した(図5)。そして、金シェルのSPRバンドによる励起光増強効果より約3倍2PF効率が増大した(図7)。従って、会合体形成とSPRによる励起光増強を組み合わせることにより、正味300倍2PF効率を向上できることを実験的に示した。

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)

[学会発表] (計17件)

- ① 内藤峻之, 志野木駿伍, 加藤徳剛「近赤外領域に表面プラズモン共鳴帯をもつポリスチレン@Au型コア/シェル粒子の作製(28p-PA6-2)」第60回応用物理学会春季学術講演会, 2013年3月28日, 神奈川県(神奈川工科大)
- ② 内藤峻之, 志野木駿伍, 加藤徳剛, 飯村兼一「シリカコア-金シェル型粒子上のJ会合体の2光子励起蛍光特性(13p-H2-9)」第73回応用物理学会学術講演会秋季, 2012年9月13日, 愛媛県(愛媛大・松山大)
- ③ 加藤徳剛, 内藤峻之, 宇佐美仁彦「Two-Photon Excited Fluorescence of J-aggregates Using Surface Plasmon Resonance Excitation (2P-099)」6th International Conference on Gold Science, Technology and Its Applications, 2012年9月7日, 東京都(Keio Plaza Hotel)
- ④ 加藤徳剛, 宇佐美仁彦, 内藤峻之, 飯村兼一「Two-photon excited fluorescence properties of J-aggregate-adsorbed nanoparticles (PA-039)」14th International Conference on Organized Molecular Films, 2012年7月11日, Universite Paris Descartes, France
- ⑤ 仙波晴之, 加藤徳剛, 飯村兼一「J会合体と単量体の2光子励起蛍光効率の比較(18a-F9-11)」第59回応用物理学関係連合講演会春季, 2012年3月18日, 東京都(早大)
- ⑥ 宇佐美仁彦, 加藤徳剛「表面プラズモン共鳴励起を用いたJ会合体の2光子励起蛍光(18a-F9-10)」第59回応用物理学関

- 係連合講演会春季, 2012年3月18日, 東京都(早大)
- ⑦ 宇佐美仁彦, 内藤峻之, 加藤徳剛, 飯村兼一 「Fabrication of J-aggregate-adsorbed microparticles: Toward two-photon fluorescent staining or labeling of biological samples(14PN-47)」6th International Symposium on Surface Science, 2011年12月14日, 東京都(タワーホール船堀)
- ⑧ 加藤徳剛, 宇佐美仁彦, 内藤峻之, 仙波晴之, 飯村兼一 「J会合体吸着微粒子の作製と2光子励起蛍光特性(3F04)」第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9月9日, 京都府(京大)
- ⑨ 山本葵果, 古澤毅, 飯村兼一, 仙波晴之, 加藤徳剛 「有機色素分子を複合化させた金属ナノ粒子の作製と光学特性(1E05)」第63回コロイドおよび界面化学討論会, 2011年9月7日, 京都府(京大)
- ⑩ 宇佐美仁彦, 内藤峻之, 加藤徳剛 「J-会合体吸着微粒子の作製と二光子励起蛍光観察(30a-S-14)」第72回応用物理学会学術講演会秋季, 2011年8月30日, 山形県(山形大)
- ⑪ 仙波晴之, 加藤徳剛, 飯村兼一 「J会合体分散液の2光子励起蛍光特性(30a-S-13)」第72回応用物理学会学術講演会秋季, 2011年8月30日, 山形県(山形大)
- ⑫ 加藤徳剛, 宇佐美仁彦, 仙波晴之, 内藤峻之, 飯村兼一 「J-Aggregate-Adsorbed Nanoparticles for RGB Fluorescent Imaging Using Confocal and Two-Photon Microscopy (028)」12th European Conference on Organized Films, 2011年7月19日, Sheffield, UK
- ⑬ 山本葵果, 飯村兼一, 古澤毅, 仙波晴之, 加藤徳剛 「有機色素会合体/金属ナノ粒子複合体の構造と光学的特性(2PC-092)」日本化学会第91春季年会(震災で講演中止), 2011年3月27日, 神奈川県(神奈川大横浜キャンパス)
- ⑭ 宇佐美仁彦, 加藤徳剛 「微粒子表面上での色素会合体の作製(25a-CD-8)」第58回応用物理学関係連合講演会春季(震災で講演中止), 2011年3月25日, 神奈川県(神奈川工科大)
- ⑮ 山本葵果, 飯村兼一, 加藤徳剛, 仙波晴之 「Fabrication of dye aggregate/metal nanoparticle complexes toward enhancement of two-photon-excited fluorescence generation (ID#1076)」2010 International Chemical Congress of Pacific Basin Societies, 2010年12月18日, Honolulu, Hawaii, USA
- ⑯ 山本葵果, 飯村兼一, 加藤徳剛, 仙波晴

- 之 「Synthesis of metal nanoparticle-organic dye aggregate complex for enhancement of two-photon-excited fluorescence generation (1PB31)」International Conference on Nanoscopic Colloid and Surface Science, 2010年9月20日, 千葉県(幕張メッセ)
- ⑰ 仙波晴之, 高田昌和, 加藤徳剛, 飯村兼一 「ポリイオンコンプレックスを用いた水分散型J会合体の作製(17a-K-10)」第71回応用物理学会学術講演会秋季, 2010年9月17日, 長崎県(長崎大)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

加藤 徳剛 (KATO NORITAKA)
明治大学・理工学部・准教授
研究者番号: 90329110