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 —

石崎佑樹** 林 照剛*** 道畑正岐*** 高谷裕浩***

Study on Measurement of Nanoparticles Size Based on Fluorescence Polarization (1st Report)
- Development of Rotational Diffusion Coefficient Measurement System Using Fluorescent DNA Probe -

Yuki ISHIZAKI, Terutake HAYASHI, Masaki MICHIHATA and Yasuhiro TAKAYA

Nanoparticles are attractive materials in the area of nanotechnology, and there is a need to measure the particle size accurately and easily. We suggest a novel particle sizing method based on fluorescence polarization. Particle size evaluation can be achieved from measuring the rotational diffusion coefficient which is sensitive to the particle size. We develop the rotational diffusion coefficient measurement system using fluorescent DNA probe. We verify the feasibility of proposed method by a fundamental experiment. We measure the rotational diffusion coefficient of gold nanoparticle whose diameter is 8.2nm. The rotational diffusion coefficient decreases by 50% compared to the reference value in the measuring range. The result indicates that nanoparticle, whose diameter is as small as 8.2nm, can be measured.

Key words: nanoparticle, particle sizing, fluorescence polarization, Brownian motion, DNA

1. 緒 言

ナノテクノロジー分野の基幹材料として注目されるナノ粒子は、その粒径に応じて特有の物理的性質を持つことが知られている¹⁾。特に金属ナノ粒子においてこの性質は顕著であり、様々なナノ構造デバイスへの応用が検討されている^{2)~4)}。ナノ粒子を素材とした製品の製造では、粒子の粒径の管理や凝集状態の確認が不可欠であり、液中に分散したナノ粒子の粒径を簡便に、かつ正確に評価する計測技術の確立が求められる。

ナノ粒子の粒径計測技術には、代表的なものとして、透過型電子顕微鏡(TEM)⁵⁾や動的光散乱法⁶⁾が挙げられる他、遠心沈降法や核磁気共鳴など様々な技術が開発されている⁷⁾。TEMは高分解能(約0.1nm)で、粒子形状の確認ができる一方、液中サンプルの直接測定は困難である。動的光散乱法は、液中で分散状態にある粒子を測定できるが、凝集していない一次粒子と凝集体が混在する場合、一次粒子からの信号検出が困難になる。

本研究では、液中に分散するナノ粒子の粒径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。提案手法では、液中の一次粒子とその凝集体から得られる信号を識別し、一次粒子の粒径を正確に評価する技術の確立することを目指す。本報では、蛍光偏光法を利用したナノ粒子粒径計測の原理についてまとめ、粒径計測を実現するために開発した高精度な回転拡散係数測定装置の構成を示す。また、開発した装置の測定性能の評価のための基礎実験の結果、および、金属ナノ粒子の粒径計測のために開発した蛍光プローブの構造について検討した結果について報告する。

2. 提案手法の特徴

蛍光偏光法とは、蛍光信号の偏光状態から、蛍光体の液中での回転ブラウン運動の拡散係数を測定する方法である。例えば、

球状の粒子について、並進ブラウン運動の速さを表す並進拡散係数は、粒径の1乗の項に対して反比例する⁸⁾のに対して、回転拡散係数は、粒径の3乗の項に反比例する⁹⁾。

提案手法では、非蛍光粒子である金などの金属ナノ粒子を計測するため、ナノ粒子に蛍光プローブを標識して、被測定粒子の回転拡散係数を計測する。この場合、微小粒子の運動では、並進拡散係数から粒径を算出する動的光散乱法⁶⁾に比べ、粒子の体積変化をより敏感に検出できると考えられる。また、検出信号の強度が粒径に依存して変化しないことから、微小な一次粒子の信号とよりサイズの大きな凝集体からの信号を同時に検出できることが期待でき、微小な一次粒子とその凝集体が混在する溶液中で、一次粒子の粒径を管理する場合の品質管理等に有効であると考えられる¹⁰⁾。

3. ナノ粒子粒径計測の原理

提案手法では、ナノ粒子に蛍光プローブを標識し、その回転拡散係数を測定する。蛍光標識されたナノ粒子の粒径が大きいほど、その回転速度は遅くなり、回転拡散係数が小さくなることから、粒径と回転拡散係数の対応関係を詳細に調べれば、回転拡散係数の測定値に基づいて粒径を評価できると考えられる。

本研究では、蛍光標識されたナノ粒子の回転拡散係数を求めるため、3.2節で述べる周波数領域蛍光法¹¹⁾において、式(7)を用いる。この時、粒径が既知である標準粒子の回転拡散係数を取得し、その粒径と回転拡散係数の関係を示す特性曲線を定めれば、被測定粒子の回転拡散係数の測定結果から、未知のナノ粒子の粒径を計測できると考えられる。

本章ではこの計測原理について順を追って説明する。まず、3.1節では蛍光信号の偏光状態と回転ブラウン運動との関係について述べ、次に3.2節で周波数領域蛍光法により、蛍光信号の偏光状態から回転拡散係数を算出する方法について説明する。そして、3.3節では、ナノ粒子に標識する蛍光プローブの基本構造について述べる。なお以下の議論は全てサンプルとなるナノ粒子が単分散状態にあることを仮定する。

* 原稿受付 平成25年1月15日

** 学生会員 大阪大学大学院 (吹田市山田丘2-1)

*** 正会員 大阪大学大学院

3.1 蛍光信号の偏光状態と回転ブラウン運動の関係

今、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（図中では I_y ）を $I_{\parallel}$ 、垂直な蛍光成分（図中では I_x, I_z ）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。

図2にz軸を観測方向とした場合の色素の回転運動および色素から発せられる蛍光信号の偏光方向の時間変化を示す。なお簡単のため、観測方向であるz軸に対して垂直なxy平面での回転運動のみを考えるものとする。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。図中ではこの二軸を一致させている。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る。簡単のため、サンプルの回転成分が一つのみであると考えると、蛍光異方性は以下の単一の指数関数で表される。

Fig.1 Standard coordinate system

Fig.2 Relationship between rotational Brownian motion of fluorophore and polarization direction of fluorescence ($0 < t_1 < t_2$)

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

ここで、 r_0 は初期異方性、 θ 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¹²⁾。

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

ここで r_{∞} は $t \rightarrow \infty$ 時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。

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

3.2 周波数領域蛍光法

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¹³⁾と動的蛍光法である時間領域蛍光法¹⁴⁾、周波数領域蛍光法が挙げられる。定常光励起法は、高い蛍光強度で安定した測定が行えるが、複数の粒径の粒子が混在した多分散系のサンプルの解析を行うことは困難である。そのため、多分散系のサンプルの解析への応用を可能にするため、本研究では周波数領域蛍光法を用いる。

周波数領域蛍光法では、正弦波状に強度変調した励起光を用いる。これにより励起された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 τ は以下の式で表される¹⁵⁾。

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

ここで ϕ は励起光と蛍光の位相差、 ω 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3のように振幅と中心値、位相が異なったものとなる。Claytonらは、二つの成分の振幅比 $Y_{AC} (= A_{\parallel} / A_{\perp})$ と蛍光寿命 τ 、および式(3)で表される r_0 と r_{∞} から回転相関時間を計算する式を式(6)で示した¹¹⁾。その計算式において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)のようになる。以後の回転拡散係数の計算にはこの式(7)を用いる。なお初期異方性の値は色素の吸収軸と発光軸の向きが一致しているときの値($r_0 = 0.4$)に固定する。

3.3 蛍光プローブの設計

蛍光プローブは、ナノ粒子の回転拡散係数の測定に必要不可欠である。しかし、蛍光色素単体を金属ナノ粒子に標識し、蛍光プローブとして使用することはできない。近接する蛍光色素と金属ナノ粒子間には表面エネルギー移動(SET)と呼ばれる現象が起こるため、色素のエネルギーが金属ナノ粒子に移動し消

Fig.3 Modulated fluorescence signal

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

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

光する。このエネルギー移動の割合は以下の式で示される¹⁶⁾。

$$\Phi_{EnT} = \frac{1}{1+(l/l_0)^4} \quad (8)$$

ここで l は粒子-色素間の距離であり、 l_0 はエネルギー移動の割合が 50% となる距離で、フェルスター距離と呼ばれる。式(8)から、粒子と色素の距離が近すぎる場合、エネルギー移動の割合が高くなり消光も大きくなるため、蛍光信号の取得は困難になると考えられる。

そこで、本研究では、蛍光色素とスパーサーを組み合わせたものを蛍光プローブとして使用する。スパーサーは、蛍光色素と金属ナノ粒子の間に位置し、この二つの距離を一定に保つことで消光を抑える役割がある。スパーサーに要求される条件としては、長さが容易に調節できること、粒子とプローブが一体となって回転できるだけの剛性があることが挙げられる。

これらの要件を満たすスパーサーとして、本実験では DNA を使用する。一本鎖の DNA は、相補鎖とハイブリダイゼーションし二本鎖となることで、直径約 2nm の二重らせん構造となり、50nm 以下の長さで高い剛性を示すことが知られている¹⁷⁾。また構成する塩基数を変えることで 0.34nm 単位で長さを調節することができるため、スパーサーに適すると考えられる。DNA は末端をチオール化することにより金属ナノ粒子に容易に結合することから、片方の末端に蛍光色素が修飾、もう片方の末端がチオール化した二本鎖 DNA を金属ナノ粒子と反応させると、図 4 のように DNA が粒子表面に固定される。

測定に十分な蛍光強度を確保するためには、消光を 50% 以下に抑えることが望ましいため、粒子-色素間はフェルスター距離 l_0 以上離す必要がある。Yun らの実験によれば、有機系の蛍光色素と金ナノ粒子間のエネルギー移動の場合、 l_0 は約 9nm という結果が得られている¹⁶⁾。そこで、DNA の塩基数は 23 以上とする。このとき、粒子-チオール間と DNA-色素間のリンカーの長さ (約 1.8nm)¹⁸⁾ を考慮すると粒子-色素間の距離は約 9.6nm 以上となり、消光は 50% 以下になると考えられる。また塩基数の上限は、DNA の剛性の高さが保たれる長さで合成可能な長さを考慮して 100 とする。このとき、粒子-色素間の距離は約 36nm となり 50nm 以下となるため剛性は十分高く保たれる。本研究では、以後、この蛍光色素と DNA スパーサーにより構成される蛍光プローブを蛍光 DNA プローブと呼ぶ。

Fig.4 Schematic of fluorescent DNA probe

4. 実験装置・手順

4.1 実験装置の構成

周波数領域蛍光法¹¹⁾の実験装置の構成を図 5 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スャ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。イメージインテ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。イメージインテ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。

4.2 測定手順

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、イメージインテンシファイア

Fig.5 Schematic of experimental set-up

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インテ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。強度変調の周波数を複数の値に変化させて測定することで、多分散状態のサンプルの解析を行うことができるが、本報では、単分散状態の粒子を仮定しているため、強度変調の周波数は一つの値に固定する。

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6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。この場合、 $A_{\parallel} = 0.1991$ 、 $A_{\perp} = 0.1407$ であるため、振幅比は $Y_{AC} = 1.413$ と算出され、式(7)から回転拡散係数を求めることができる。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。

5. 実験結果

5.1 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 η 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。粒径には、動的光散乱粒径計測装置Zetasizer Nano ZS(Malvern Instruments)による測定値を用いる。これによる粒径の測定結果を図7に示す。これより

Fig.6 Measured fluorescence signal

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 τ 、振幅比 Y_{AC} を表1に示す。なお測定において、励起光の強度変調周波数は60MHz、溶媒の温度は20℃とし、表には測定の平均値を示している。そして、表の値から計算される回転拡散係数と理論値の曲線とを併せて図8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。

5.2 蛍光DNAプローブの適切な長さの検証

次に、本手法で使用する蛍光DNAプローブのスペーサー長さについて検討した。蛍光偏光法では、蛍光色素が蛍光寿命の間に発する蛍光信号を測定するため、蛍光寿命に対して色素の回転拡散が速すぎる、または遅すぎる場合には、蛍光の偏光状態の測定感が悪くなるという問題がある。そのため、ナノ粒子の粒径を測定する場合、粒子が結合することによる回転拡散係数の減少を敏感に検出できるような長さのプローブを使用することが望ましい。そこで、構成するDNAの塩基数を増加させた

Fig.7 Size distribution of Alexa Fluor 488

Table 1 Viscosity of solvents and measured lifetime and amplitude ratio

Solvent	Viscosity mPa · s	τ ns	Y_{AC}
Water	1.002	4.1	1.053
Glycerin30% wt%	2.50	3.8	1.128
Glycerin50% wt%	6.00	3.6	1.343
Glycerin60% wt%	10.8	3.1	1.600

Fig.8 Rotational diffusion coefficient versus viscosity of solvent

場合のプロープの回転拡散係数を測定し、粒径計測に適切なスペーサー長さを調べる。

DNA は、塩基数 23, 40, 60, 80, 100 のものを使用する。それぞれ末端には Alexa Fluor 488 が修飾されている。各塩基長の DNA は PBS に溶解させた後、相補鎖を加え、温度 50℃ で 12 時間放置しハイブリダイゼーションさせ、二本鎖とした。

蛍光寿命 τ と振幅比 Y_{AC} の測定結果を表 2 に示す。なお測定において、励起光の強度変調周波数は 60MHz、溶媒の温度は 20℃ とし、表には測定の平均値を示している。そして、表の値から計算される回転拡散係数と塩基数の関係を図 9 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。

これを見ると塩基数 40~80 の範囲で大きな変化が見られるが、80 以上では変化が見られない。そのため、図中に示す線が今回の測定条件下での回転拡散係数の測定レンジの上限と下限に相当すると考えられる。この範囲を最大ととして、回転拡散係数の変化を測定するためには、塩基数 23~40 の DNA をスペーサーに使用することが望ましいとわかる。

5.3 金ナノ粒子の回転拡散係数測定実験

次に、この塩基数 23~40 の DNA をスペーサーとした蛍光 DNA プロープを用いて、ナノ粒子の回転拡散係数を評価する。回転拡散係数の測定値の妥当性を検証するため、まずプロープが単体の場合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。次にプロープを標識した金ナノ粒子を同様の条件で測定し、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 プロープを加え、その表面を標識する。測定は、溶媒の温度が 20, 25, 30, 35, 40℃ の 5 通りの条件下で行った。

各溶媒温度における溶媒の粘度、および蛍光寿命 τ と振幅比 Y_{AC} の測定結果を表 3 に示す。なお、粘度は水と同じ値とし、励起光の強度変調周波数は、60MHz とした。表には測定の平均値

を示しており、蛍光寿命は溶媒温度により変化しないと考え、20℃での測定値を代表値として示している。それらの値から計算される回転拡散係数と溶媒の温度と粘度の比 T/η の変化に対する線形近似の結果を図 10 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。

プロープを標識した金ナノ粒子の回転拡散係数は、どの T/η においてもプロープ単体の場合の基準値と比べて減少していることがわかる。5.2 節の測定と同じ条件下である溶媒温度 20℃ ($T/\eta = 292[\text{K}/(\text{mPa} \cdot \text{s})]$) の場合に注目すると、基準値から図 9 より見積もられた測定レンジの 50%に相当する大きな減少が見られる。これは、開発した測定装置とプロープにより、プロープ単体と粒径 8.2nm の金ナノ粒子の回転運動の差を回転拡散係数の変化として敏感に検知できることを示している。この結果は、粒径 8.2nm 付近の微小粒子の粒径を評価できる可能性を示唆している。

また、ここで回転拡散係数と T/η との関係について注目する。式(9)で表される剛体球モデルの場合、回転拡散係数は T/η に比例し、その変化勾配は粒子の体積 V に反比例する。図中に示す近似式を見ると、測定された回転拡散係数は、切片が 0 でないものの T/η と線形な関係にあることから、その変化勾配は、被測定物の体積と関係している可能性が高い。実際に、金ナノ粒子の回転拡散係数の変化勾配は、基準値であるプロープ単体の場合の変化勾配よりも小さくなっており、これは、金ナノ粒子が結合することによる体積増加に起因したものと考えられる。そのため、変化勾配の大きさは、溶媒の温度と粘度の影響を受けず、被測定物の体積によって定まると考えられる。この結果は、回転拡散係数の T/η に対する変化勾配の大きさから粒子の粒径を評価できる可能性を示している。

以上の結果を踏まえると、ある特定の T/η における回転拡散係数の基準値との変化量から粒径を評価することも可能と考えられるが、この場合、サンプルの T/η を基準となるサンプルと厳密に一致させる必要があり、非常に困難となる。しかし、前

Table 2 Number of DNA bases and measured lifetime and amplitude ratio

Number of DNA bases	τ ns	Y_{AC}
23	2.0	1.235
40	1.9	1.255
60	1.8	1.318
80	2.0	1.342
100	1.8	1.362

Fig.9 Rotational diffusion coefficient versus number of DNA bases

Table 3 Temperature and viscosity of solvent and measured lifetime and amplitude ratio

Temperature K	Viscosity mPa · s	Probe		Probe + gold nanoparticle	
		τ ns	Y_{AC}	τ ns	Y_{AC}
293	1.002		1.235		1.454
298	0.890		1.201		1.436
303	0.797	2.0	1.177	1.0	1.429
308	0.719		1.152		1.403
313	0.653		1.141		1.397

Fig.10 Rotational diffusion coefficient versus T/η of solvent

述のように T/η に対する変化勾配の大きさが被測定物の体積に対応して変化すると考えられ、その値から粒径を評価できると考えられる。この場合、 T/η が既知でさえあれば、変化勾配を求めることができ、 T/η を固定しなくても、粒径の比較が可能と考えられる。

6. 結 言

蛍光偏光法を利用したナノ粒子の粒径計測法を提案し、その基礎研究を行った結果、以下の知見が得られた。

- (1) 構成した回転拡散係数測定装置の性能を検証するため、溶媒の粘度を変化させた場合の蛍光色素の回転拡散係数を測定した。その結果、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。
- (2) 蛍光 DNA プローブの構造を決定するため、スペーサーとなる DNA の塩基数を変化させてプローブの回転拡散係数を測定し、その値を敏感に測定可能な領域を実験的に調査した。その結果、塩基数 23~40 の DNA が粒径計測に用いるプローブのスペーサーに適していることが確認された。
- (3) 塩基数 23 の DNA をスペーサーとする蛍光 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た。その結果、粒径 8.2nm 近傍という微小領域における金ナノ粒子の粒径を評価できる可能性を示した。

また溶媒の温度と粘度の比 T/η と回転拡散係数の関係が線形であり、その変化勾配は粒子の体積に依存して変化すると考えられる。そのため、 T/η と回転拡散係数の測定値に基づいて粒径を評価することができると考えられる。

今後は、蛍光 DNA プローブを標識する金ナノ粒子の粒径を変化させて回転拡散係数を測定する。粒子の粒径と測定される回転拡散係数との関係を調べることで、提案手法の計測特性の詳細を検証する。

謝 辞

本研究を遂行するにあたり、蛍光 DNA プローブの標識に御助言頂いた大阪大学大学院生命機能研究科の井上康志先生、大阪大学フォトンクスセンターの田中慎一先生、TEM による金ナノ粒子の粒径計測に御協力頂いた大阪大学超高压電子顕微鏡セン

ターの保田英洋先生、坂田孝夫様に心から感謝申し上げます。

また本研究の一部は、平成 21~23 年度、科研費補助金課題番号 21686015 の助成をうけて行われたことを記し、ここに謝意を表明します。

参 考 文 献

- 1) 林田美咲: ナノ粒子分散薄膜標準物質に関する調査研究, 産総研計量標準報告, **8**, 1 (2010) 155.
- 2) T. Ichiro et al.: Optical nonlinearities of Au/SiO₂ composite thin films prepared by a sputtering method, *J. Appl. Phys.*, **79**, 3 (1996) 1244.
- 3) R. G. Freeman et al.: Self-assembled metal colloid monolayers: An approach to SERS substrates, *Science*, **267**, 5204 (1995) 1629.
- 4) S. Sun et al.: Monodisperse FePt nanoparticles and ferromagnetic FePt nanocrystal superlattices, *Science*, **287**, 5460 (2000) 1989.
- 5) L. C. Gontard et al.: A simple algorithm for measuring particle size distributions on an uneven background from TEM images, *Ultramicroscopy*, **111**, 2 (2011) 101.
- 6) R. Pecora: Dynamic light scattering measurement of nanometer particles in liquids, *J. Nanopart. Res.*, **2**, (2000) 123.
- 7) 加藤晴久: ナノ粒子粒径分布標準物質に関する調査研究, 産総研計量標準報告, **6**, 4, (2007) 185.
- 8) A. Einstein: Investigations on the theory of Brownian motion, Dover, New York, (1956).
- 9) P. Debye: Polar Molecules, Dover, New York, (1929).
- 10) T. Hayashi et al.: Development of nanoparticle sizing system integrated with optical microscopy using fluorescence polarisation, *Int. J. Nanomanufacturing*, **8**, 1/2 (2012) 54.
- 11) A. H. A. Clayton et al.: Dynamic fluorescence anisotropy imaging microscopy in the frequency domain (rFLIM), *Biophysical Journal*, **83**, 3, (2002) 1631.
- 12) K. Kinoshita et al.: A theory of fluorescence polarization decay in membranes, *Biophys J.*, **20**, 3 (1977) 289.
- 13) B. S. Fujimoto et al.: An analysis of steady-state fluorescence polarization anisotropy measurements on dyes intercalated in DNA, *J. Phys. Chem.*, **91**, 7 (1987) 1947.
- 14) T. P. Burghardt: Time-resolved fluorescence polarization from ordered biological assemblies, *Biophys. J.*, **48**, 4 (1985) 623.
- 15) R. D. Spencer, G. Weber: Measurements of subnanosecond fluorescence lifetimes with a cross-correlation phase fluorometer, *Annals of the New York Academy of Science*, **158**, 1 (1969) 361.
- 16) C. S. Yun et al.: Nanometal surface energy transfer in optical rulers, breaking the FRET barrier, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 9 (2005) 3115.
- 17) G. S. Manning: The persistence length of DNA is reached from the persistence length of its null isomer through an internal electrostatic stretching force, *Biophys J.*, **91**, 10 (2006) 3607.
- 18) J. Seelig et al.: Nanoparticle-induced fluorescence lifetime modification as nanoscopic ruler: Demonstration at the single molecule level, *Nano. Lett.*, **7**, 3 (2007) 685.