〔総 合 論 文〕

光ピンセットを用いた温度応答性高分子リッチドメインの顕微分光分析

東海林 竜也*¹・坪井 泰之*¹

(受付 2017 年 12 月 25 日・審査終了 2018 年 2 月 14 日)
(早期公開 2018 年 4 月 4 日・DOI:10.1295/koron.2017-0087)

要 旨 溶液中を分散する鎖状高分子やナノ粒子のラマン分光情報を選択的に取得できれば、高分子の構造や物性をより精密に評価できるであろう。これに対し、光の電磁気学的作用である光圧を利用すると高分子を捕まえ、顕微分光学的手法により高分子構造を分析できる。筆者らは、この光ピンセット・顕微ラマン分光法を用いて、相分離により形成された温度応答性高分子リッチドメイン中の高分子濃度を見積ることに成功した。さらに、光圧により形成した高分子リッチドメイン中に、溶液中に微量に溶解する有機分子を抽出・検出する分析手法を開発した。本報では、代表的な温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) の光捕捉挙動とそのメカニズム、および高分子リッチドメインの高分子濃度決定手法を中心に述べるとともに、光捕捉した PNIPAM 分子集合体への蛍光色素分子の抽出・検出法についても述べる。

1 緒 言

温度応答性高分子である poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) は室温付近では水に可溶であるが、ある温度(曇点)以上になると不溶となり、曇点以下に冷却すると再び溶解するという可逆的な特徴を有している。1968 年に Heskins と Guillet が PNIPAM 水溶液のこの特異な温度応答性挙動を報告して以来¹⁾、温度に対して鋭敏に応答することや曇点が体温付近であることから精力的に研究が進められてきた。これまでに動的・静的光散乱測定^{2)~6)}、赤外・ラマン分光法^{6)~11)}、誘電緩和分光¹²⁾、NMR¹³⁾ などによる高分子構造解析、各種熱分析によるエントロピー/エンタルピーの評価および詳細な相図の作成^{14),15)} など数多く報告されている。筆者らは、ナノ秒レーザー温度ジャンプ法^{16),17)} や単一分子蛍光計測法¹⁸⁾ を用いて相分離ダイナミクスについてこれまで明らかにしてきた。これらの研究から、水溶液中の PNIPAM は曇点以下では水和した coil 構造をとるが、曇点以上に昇温すると脱水和した globule 構造への相転移

を経て、高分子鎖が互いに凝集することで相分離し、最終的に水溶液中には高分子リッチドメインと水リッチドメインが形成されると考えられている。この曇点は、モノマーの化学構造(分子量、立体規則性など)や塩または有機溶媒の添加などにより変化させることができる^{19),20)}。

このような PNIPAM の相転移・相分離現象を利用した応用研究も活発に進められている。たとえば、ドラッグデリバリーシステム²¹⁾ や、細胞シート²²⁾ など、医療分野を中心としたスマートマテリアルへの応用、あるいは相分離を利用した有機物の濃縮や抽出²³⁾ など、新たな高感度分析手法への応用などが期待されている。このような応用研究を発展させるには、相分離後の高分子リッチドメインの高次構造や水素結合の程度、さらに具体的に言えばドメイン中の高分子濃度など基礎的な物性情報を知ることが重要である。

これに対し、2003 年に Maeda らは、共焦点顕微ラマン分光法によって曇点前後における高濃度 PNIPAM 水溶液(10~60 wt%) の顕微ラマンスペクトル測定に成功している²⁴⁾。このような高濃度溶液中で形成される高分子リッチドメインは、数十マイクロメートルサイズの大きさをもつため、光学顕微鏡下でも十分観察可能である。

*¹ 大阪市立大学大学院理学研究科物質分子系専攻 (〒558-8585 大阪市住吉区杉本3-3-138)

Maeda らは、このドメインの顕微ラマンスペクトルからドメイン中の高分子濃度を 50~70 wt% と見積った²⁴⁾。このような高濃度溶液中では高分子鎖どうしのからまり合いが起こるため、希薄溶液中での高分子の振舞いは必ずしも同一であるとは言い難い。

希薄溶液中での高分子リッチドメイン中の高分子構造解析や濃度決定は相分離機構の解明に向けて貴重な知見を与えるが、希薄溶液を加温して形成される高分子リッチドメインはわずか数マイクロメートルの大きさであるため、光学顕微鏡下で観察するとドメインが絶えず拡散運動をしており、顕微ラマン分光法単独ではドメインのみからのシグナルを取得することは極めて困難である。そこで筆者らは、光の電磁気学的作用である光圧に注目し、顕微ラマン分光法を組合せることで、希薄溶液中の高分子リッチドメインの分光情報を選択的に取得し、そこから高分子濃度を見積る手法を開発した²⁵⁾。

本報では、PNIPAM の顕微ラマン分光分析と、その分析より得られた知見を基盤とした PNIPAM を用いた分子抽出・検出法の二つのトピックについて述べる。この二つのトピックをつなげるキーワードが「光圧」である。まず、この光圧の原理から考察を始め、光圧を利用した集光型光ピンセット法の概略と顕微ラマン分光分析を組合わせた高分子分析法について述べる。とくに、筆者らが取り組んでいる温度応答性高分子の光捕捉と顕微ラマン分光分析について述べる。最後に、新しい光ピンセット法として注目を集めるプラズモン光ピンセットにより捕捉した PNIPAM を用いた、分析化学への応用展開について述べる²⁶⁾。

1.1 光圧の歴史的背景

日常生活の中で我々は太陽や蛍光灯などさまざまな光源から光を受けているが、それらの光から圧力を感じることはまずない。しかしながら、光の圧力である「光圧(輻射圧、放射圧、輻射力などとも呼ばれる)」は、宇宙空間では無視できない力である。光圧は、Kepler の法則で知られる Johannes Kepler が彗星の尾のたなびきを説明する際に初めて登場した。Kepler の時代では実験的・理論的検証はなされなかったが、その後 1871 年に James Clerk Maxwell により体系化された Maxwell 方程式より理論的に導かれた。その後、1901 年 Lebedev および Nichols らにより実験的に実証された^{27), 28)}。太陽光が地表に与える光圧は、 $10 \mu\text{N}/\text{m}^2$ 程度の非常に弱い圧力である。この光圧を用いたマイクロメートルサイズの微小物体を操る光ピンセット装置の原型は、1986 年 Ashkin らが発表しており²⁹⁾、このときのアイデアである連続発振型のレーザーと顕微鏡の対物レンズの組合せは今でも採用されている。1986 年以後、Ashkin らはこの光捕捉をさらに発展させ、ミクロ空間で単一細胞(大腸菌やイースト菌)やガラス微粒子を近赤外レーザービームで

捕捉し、空間的に操る光操作法を報告した³⁰⁾。これを契機に、光ピンセットは急速にその活躍の場を、生物学、化学、物理学など分野の垣根を越え、広げていった。

1.2 光圧の原理

光を粒子として考えたとき、1 個の光子は h/λ (h : プランク定数, λ : 波長) で与えられる運動量 p をもっている。この光子が二つの媒質の境界面で反射または屈折することにより、光子の運動量変化分の力 F が物質に受け渡される。この力が光圧である。たとえば、1 mW のレーザー光が垂直に鏡に入射したとき、鏡に及ぼす光圧は $\sim 7 \times 10^{-12} \text{ N}$ と非常に小さな力であるが、半径 $1 \mu\text{m}$ の水滴に働く重力が $\sim 5 \times 10^{-15} \text{ N}$ であるため、光圧は μm サイズの微小な空間では無視できない力である。このような微小空間での光圧の理論的な取り扱い、厳密には Mie 散乱の理論を用いる必要がある。しかしながら、微粒子の大きさが光の波長よりも十分に大きい場合では幾何光学の理論を、光の波長よりも十分に小さい場合では Rayleigh 散乱の理論をそれぞれ近似的に適用することができる。次に、半径 r の微粒子が光の波長よりも大きい場合 ($2r \gg \lambda$) と小さい場合 ($2r \ll \lambda$) の光圧をそれぞれ考察する。

1.2.1 光圧の原理 1: マイクロ粒子操作

まず捕捉対象物が光の波長よりも十分大きいとき、捕捉の原理は Figure 1 に示すように直感的に理解できる。空気(屈折率 $n: 1.00$) や水 ($n: 1.33$) のような媒質よりも高い屈折率を有する μm サイズの透明な微粒子に光が照射されると、微粒子と媒質の界面で光の反射と屈折が起こる。入射したすべての光は、最終的には界面で屈折しながら媒質中へと出射される。このような反射と屈折において、光子の運動量は保存される。媒質の屈折率よりも粒子の屈折率が高いとき、運動量の保存の法則に従い、微粒子の各界面では光圧が作用する。すべての光圧の合力を計算すると、光圧は光の焦点の方向を向く力となる。結果として微粒子は焦点位置に引き寄せられ、捕捉される。

Figure 1. Illustration of optical trapping of a microsphere.

Figure 2. Illustration of optical trapping of nanoparticles.

1.2.2 光圧の原理 2：ナノ粒子操作

Rayleigh 散乱の理論に基づく、光の波長よりも小さな微粒子は、1 個の電気双極子として近似することができる (長波長近似)。この微粒子が受ける光圧 (ローレンツ力) F は、以下の式で表される。

$$F = \frac{1}{2} \alpha \nabla E^2 + \alpha \frac{\partial}{\partial t} (E \times B) \quad (1)$$

$$\alpha = 4\pi\epsilon_2 a^3 \frac{(n_1/n_2)^2 - 1}{(n_1/n_2)^2 + 2} \quad (2)$$

ここで、 E ：レーザー光の電場 [$V \cdot m^{-1}$]、 B ：磁束密度 [$V \cdot s \cdot m^{-2}$]、 ϵ_2 ：微粒子の誘電率 [$F \cdot m^{-1}$]、 a ：微粒子の半径 [m]、 n_1 ：微粒子の屈折率、 n_2 ：媒質の屈折率である。式 (1) の右辺第一項は、双極子が不均一な空間分布をした電場の中に置かれたときに発生する静電応力であり、勾配力と呼ばれる。微粒子の屈折率が、媒質の屈折率よりも大きい場合 ($n_1 > n_2$)、勾配力は電場の強い方向に働くため、微粒子を集光位置に引き寄せる力となる。第二項は、光のエネルギーの進行方向 (ポインティングベクトル；Poynting vector) が時間によって変化することにより生じる力 (散乱力) であり、微粒子を集光位置から遠ざける力となる。ナノ粒子が光圧により捕捉されるためには、ナノ粒子がもつ熱ゆらぎのエネルギー ($k_B T$) よりも光圧のポテンシャルエネルギーが高い必要がある。透明な誘電体微粒子に作用する散乱力は、一般に勾配力に比べ無視できるほど小さいため、光圧のポテンシャル U は、

$$U = - \int F dr = - \frac{1}{2} \alpha E^2 \quad (3)$$

で近似的に求められる。この光圧ポテンシャルの形状は、入射するレーザーの空間的な光強度分布に従う。たとえば、強度分布がガウス型に従う一般的なレーザーを用いた場合、光圧ポテンシャルが熱ゆらぎのエネルギーを上回ると ($|U| > k_B T$)、微粒子は最も光強度の

強い焦点位置に引き寄せられ捕捉されることとなる (Figure 2)。式 (3) を用いて、光捕捉用レーザー光 (波長 1064 nm、出力 50 mW) を対物レンズで水中に集光した場合、水中に分散する微粒子の屈折率を 1.59 とすると、室温付近で捕捉できる微粒子の半径は、約 20 nm となる。したがって、光圧とブラウン運動が同程度となるのは半径が十数ナノメートル程度であるということが予想される。

2 光ピンセット・顕微ラマン分光分析のあらましと光捕捉した高分子ナノ粒子の顕微ラマン分光分析の実例

先に述べた原理のもと、光ピンセットを用いることで溶液中に分散する高分子微粒子や、溶解している直鎖状高分子を非破壊・非接触でレーザー集光位置にて捕捉し、その構造を分光学的手法により分析できる。本章では、実際の光ピンセット・顕微ラマン分光装置の概略について述べる。その後、代表的な高分子の光捕捉の実例を紹介する。

2.1 集光レーザー型光ピンセット・共焦点顕微ラマン分光装置

代表的な光ピンセットは、連続発振型 (cw) のレーザー (波長 1064 nm に代表される近赤外光が多い)、光学顕微鏡、レーザーを顕微鏡に導入するための光学部品、観察用のモニター (CCD カメラとコンピュータ) で構成される。さらに、捕捉した試料の分光情報を得る際には、分光用の光源、光学部品、検出器、制御用コンピュータを組合せる。Figure 3 に、光ピンセット・共焦点顕微分光システムの光学系を示す。

光ピンセット用のレーザー光源は、高出力かつ集光特性の高い近赤外レーザーが可視レーザーよりも至適であるとされている。利点としては、近赤外域のため捕捉挙動を観察しやすいことや、捕捉試料の光化学的損傷を抑えられるなどが挙げられる。筆者らの実験装置は、cw 近赤外レーザー ($\lambda = 1064 \text{ nm}$) (SDL-1064-3000T、

Figure 3. Optical setup of optical tweezers combined with confocal microscopy.

Figure 4. Confocal optical setup; optical paths to a detector from the focal point (a) and defocus points (b).

Shanghai Dream Lasers Tech. Co., Ltd.) を用いている。このレーザーを対物レンズで最も効率よく集光できるように、ビームエキスパンダーおよびミラーなどの光学部品で光軸を調整し、顕微鏡にレーザー光を導入する。光捕捉した微粒子からの分光情報を取得するため、近赤外レーザーと同軸で cw 可視レーザーを顕微鏡に導入した。捕捉試料の光物性(蛍光またはラマンなど)に応じてレーザー光源を選択する以外は、顕微鏡へのレーザー導入部の光学系は、光ピンセット装置と同様である。試料からのシグナルは、ピンホールを通過した後に検出している。このピンホールは後述するように共焦点光学系としての役割があり、集光点近傍のシグナルを選択的に得ることを可能にしている。

測定試料にレーザー光を集光すると、照射領域内の溶媒・溶質からシグナル光(蛍光、レイリー散乱光、ラマン散乱光など)が放出されビームスプリッターにより分離されて検出器へと到達する。これらシグナル光から、

レーザー集光点近傍のシグナル光を選択的に検出する手法が、共焦点光学系である (Figure 4)。共焦点光学系は、検出器側の焦点位置にピンホールを設置する。これにより、レーザー集光点からのシグナル光はピンホールを通過し検出器へと到達するが (Figure 4(a))、集光点前後のシグナル光はピンホール位置で集光されず検出器に到達しない (Figure 4(b))。結果として、試料中の焦点以外のシグナルを排除するため、高い空間分解能を有した分光が可能となる。

共焦点光学系で使用するピンホール径は、レーザーのスポットサイズよりも小さく設定することが適切とされる。しかしながら、ピンホール径を小さくするにつれて高い空間分解能が得られるが、シグナル強度が弱くなる。つまり、シグナル強度と空間分解能はトレードオフの関係にあり、分析対象物に応じて最適なピンホールを選択しなければならない。

Figure 5. (a) Optical micrographs of optical trapping of PLGA nanoparticles, and (b) Raman spectra of PLGA nanoparticles trapped by optical tweezers: H1 (PLGA only), H2 (PLGA + bicyclol), H3 (PLGA + Br-NBP). The spectra are baseline-corrected. Reprinted with permission from The Royal Society of Chemistry.

2.2 光捕捉した生分解性高分子ナノ粒子の顕微ラマン分光分析

このような光学系を独自に構築することで、捕捉対象物の構造変化を高い空間分解能で分光分析できる。一例として、Figure 5(a)に光ピンセットにより捕捉した生分解性高分子である poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) ナノ粒子の明視野顕微鏡像を示す。捕捉した PLGA ナノ粒子の粒径はおおよそ 300 nm 前後であり、約十数個のナノ粒子を一度に捕集すると明視野顕微鏡像としては一つの微粒子のように見える。レーザー照射を停止すると、捕捉していたナノ粒子が水溶液中に再び分散していく過程を観察することができた。

PLGA ナノ粒子は、ドラッグデリバリーシステム製剤として研究が進められており、この PLGA ナノ粒子ひとつひとつに内包される薬剤の同定や担持量を正確に見積もる手法が求められている。そこで筆者らは光ピンセット・顕微ラマン分光装置を用いて、捕捉した PLGA ナノ粒子および内包した薬剤 [5% bicyclol または 3% 3-n-butyl-6-bromophthalid (Br-NBP)] のラマン分光分析を行った³¹⁾。その結果を Figure 5(b) に示す。薬剤を担持していない PLGA のラマンスペクトル (Figure 5(b) 中 H1) に現れる 2930 および 2960 cm^{-1} のラマンピークは、lactic acid の CH_3 伸縮振動モードに対応し、2884 cm^{-1} は CH 伸縮振動モードに対応する。さらに 2850 cm^{-1} に glycolic acid の CH_2 伸縮振動モードに対応し、そのほか低波数領域 (1000–1650 cm^{-1}) の各ピークも PLGA 由来の振動モードとして同定することができた。薬剤を担持し

た PLGA のラマンスペクトルには、PLGA 単独では出現しないピークを得ることができた (Figure 5(b) 中 H2 および H3)。それぞれのピークを bicyclol および Br-NBP と同定することに成功した。このように本手法を用いることで、溶液中に分散するナノ粒子を個々に捕まえ、粒子や粒子内部に導入した薬剤の同定を行うことができる。このように高分子微粒子や、ガラス球、金属ナノ粒子などの剛体球も捕捉できる。それでは、水溶液中に溶解する鎖状高分子も捕捉できるだろうか。次章より、鎖状高分子の光捕捉と顕微分光分析について述べる。

3 光捕捉した温度応答性高分子の顕微分光分析

3.1 鎖状高分子の光捕捉の研究動向

光ピンセットはマイクロメートルサイズの微粒子や、ナノメートルサイズの剛体球がおもな捕捉対象であるが、1990 年代より溶液中に溶解している鎖状高分子をも光ピンセットにより捕捉できることが報告されはじめた³²⁾。Table 1 に光捕捉が報告されている代表的な鎖状高分子を示す。レーザーを対物レンズにより高分子溶液に集光すると、光電場で分極した高分子鎖には光圧が作用し、レーザー光強度が最も強くなる焦点位置に引き寄せられる。最終的には、高分子鎖が次々と捕捉されることで、集光位置では高分子濃度が増加し、分子集合体が形成される。また、非水溶性高分子の poly(*N*-vinylcarbazole) やその誘導体などの鎖状高分子も有機溶媒中で光圧により捕集し、集合体形成が可能であることが報告されている^{33), 34)}。

このような高分子の分子集合体を形成するためには、式(2)より分極率は粒径の3乗に応じるため、粒径すなわち分子量が小さくなるにつれ、高出力のレーザーが要求される。H. Rubinsztein-Dunlop らは、水溶性高分子 poly(ethylene oxide) (PEO) の光捕捉を実証している³⁵⁾。彼らは、分子量 (M_v) 100,000 (慣性半径 17.6 nm), 300,000 (33.5 nm), そして 900,000 (63.6 nm) の PEO 水溶液に 1064 nm のレーザー光を集光し、PEO が捕捉される強度のしきい値を見積もった。その結果、 $M_v=900,000$ ではレーザー出力 0.29 W, $M_v=300,000$ では 0.53 W で捕捉することができるが、 $M_v=100,000$ では 0.7 W を集光しても捕捉することができなかった。この結果は光圧の理論計算結果とも良い一致を示した。

高分子集合体中の分子構造解析には、顕微ラマン分光法だけでなく顕微蛍光法も有力なツールである。Masuhara らは高分子側鎖に pyrene を結合させた PNIPAM を光捕捉し³⁹⁾、モノマー蛍光に対するエキシマー蛍光の割合増加から、光圧により形成した PNIPAM 分子集合体はより密な内部構造を有することを示した。このよ

うな PNIPAM 分子集合体のより詳細な分子構造解明を目指し、筆者らは顕微ラマン分光法を取り入れ実験を行った。

3.2 PNIPAM の光捕捉挙動と顕微ラマン分光分析

Figure 6(a) に PNIPAM 水溶液 (2.5 mmol/L, M_w 150,000) に 1064 nm の連続発振型近赤外レーザー (190 mW) を集光したときの明視野顕微鏡像を示す。近赤外レーザー照射開始とともに、集光位置にマイクロメートルサイズの微粒子が形成した。照射時間とともに、微粒子は徐々に成長し、照射開始から 10 分程度で直径 10 μm 程度まで成長した。照射をやめると、微粒子は直ちに溶解した。このような捕捉挙動は、あるレーザー出力以上を集光しなければひき起こされず、この場合では 120 mW 以下では微粒子は形成されなかった。また、190 mW 以上を集光すると微粒子のサイズが大きくなることも観測している。

このように形成した PNIPAM 分子集合体の高波数領域 (2800–3800 cm^{-1}) の顕微ラマンスペクトルを Figure 6(b) に示す。2800–3050 cm^{-1} 領域に PNIPAM 主鎖由来の CH 伸縮振動モードが、3100–3800 cm^{-1} 領域に水由来の OH 伸縮振動モードが現れる。Figure 6(b) は水のラマンバンドで規格化しており、近赤外レーザー強度の増加とともに CH 伸縮振動モード由来のラマンバンドが著しく増加した。より詳細に検討するため、2850–3050 cm^{-1} 領域を拡大したスペクトルを Figure 6(c) に示す。2925 および 2944 cm^{-1} のラマンバンドはメチレン基の非対称 CH 伸縮振動モードに対応するが、これらラマンバンドの強度

Table 1. List of optically trapped polymer chains with optical tweezers

Polymer chains	Ref.
poly(<i>N</i> -vinylcarbazole) and its derivatives	33–34
poly(ethylene oxide)	35
poly(<i>N</i> -isopropylacrylamide) and its derivatives	25, 36–40
poly(vinyl methyl ether)	41
polyfluorene	42–43

Figure 6. (a) Optical micrographs of a single polymer-rich domain formed by optical tweezers, (b) Raman spectra of polymer rich-domain formed by optical tweezers (2.5 mmol/L in H_2O): Near-infrared laser power 0.12 W, 0.19 W, and 0.25 W. Reference Raman spectrum of 2.5 mM PNIPAM solution is also shown. (c) Expanded spectra of (b) for a 2850–3050 cm^{-1} region. Reprinted with permission from Elsevier.

比は、主鎖周りの疎水性環境を反映している⁴⁰⁾。すなわち、水和した coil 状態の PNIPAM に比べ、脱水和した globule 状態の PNIPAM では、 2944 cm^{-1} に対する 2925 cm^{-1} のラマンバンド強度が増加する。このような背景をもとに、光圧により形成した PNIPAM 分子集合体のラマンスペクトルに注目すると、近赤外レーザー強度の増加に伴い、 2944 cm^{-1} に対する 2925 cm^{-1} の強度比が増加した。このことから、形成された PNIPAM 分子集合体は、脱水和した globule 状態の PNIPAM リッチドメインであると同定した²⁵⁾。なお筆者らは 1600 cm^{-1} 以下の指紋領域でも同様の実験を行っており、光圧により形成した分子集合体が globule 状態であることを明らかにしている⁴⁰⁾。それでは、なぜ近赤外レーザーを集光すると globule 状態の PNIPAM リッチドメインが形成されるのか、そのメカニズムについて考察する。

3.3 PNIPAM リッチドメイン形成メカニズム

筆者らは、PNIPAM の捕捉光源として、連続発振型の発振波長 1064 nm の近赤外レーザーを使用している。この近赤外レーザーを PNIPAM 水溶液に強く集光すると、PNIPAM に光圧が作用するだけではなく、水の光吸収に伴う熱発生も同時に起こる。水分子は 1200 nm 領域に OH 伸縮振動モードの倍音に対応する吸収帯を有している。そのため、 1064 nm のレーザー光を集光すると、焦点近傍で光熱効果により温度上昇が引き起こされる。このときの温度上昇の定量的評価は現在も、実験的な取り組みが積極的に行われている⁴⁴⁾。たとえば、Ito らは顕微蛍光相関分光法を駆使し、近赤外レーザー照射に伴う蛍光分子の拡散定数から焦点近傍の温度上昇度を精緻に見積もっている⁴⁵⁾。Ito らによると、およそ 1 W の 1064 nm のレーザー光を対物レンズにより水に集光すると、 $23 \pm 1\text{ K}$ の温度上昇が引き起こされると見積もられる。

このような光熱効果と光圧により PNIPAM リッチドメインが形成されたと考えられる。すなわち、近赤外レーザーの集光に伴う光熱効果により焦点近傍で PNIPAM が相分離する。相分離した PNIPAM に光圧が作用し、次々と捕捉されることでマイクロメートルサイズの PNIPAM リッチドメインが形成されたと考えられる。この手法を用いると、これまでアクセスしづらかった相分離により形成される高分子リッチドメインの分光情報のみを選択的に取得することができる。次章では本手法を用いた温度応答性高分子リッチドメインの分光分析について述べる。

4 温度応答性高分子リッチドメイン中の高分子濃度の分析

前章において PNIPAM の高分子リッチドメインの形成と顕微ラマン分光分析の結果について述べているので、ここでは濃度決定法と結果について述べる²⁵⁾。筆者ら

は、濃度既知の高分子水溶液を用意し、その高分子水溶液の高波数領域 ($2800\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$) のラマンスペクトルを得た。ここから水溶液の高分子濃度に対する水由来の OH 伸縮振動ラマンバンド ($3100\text{--}3800\text{ cm}^{-1}$) と PNIPAM 由来の CH 伸縮振動ラマンバンド ($2800\text{--}3050\text{ cm}^{-1}$) の強度比の検量線を作成した。この検量線を用いることで高分子リッチドメインの高分子濃度を見積もることができる。

Figure 7 に、形成した PNIPAM リッチドメインの高分子濃度のレーザー強度依存性を示す。 120 mW は高分子リッチドメインが形成される光強度の最低値であり、これ以下では光熱効果の温度上昇および光圧が弱すぎるため高分子リッチドメインが形成されなかった。レーザー強度の増加とともに、ドメイン中の高分子濃度は増加し、最大で $60\text{--}70\text{ wt\%}$ に到達することがわかった。これは光圧の効果と光熱効果の二つがかかっていると考えられる。この効果のどちらが支配的に作用しているか明らかにするためには、重水で同様の実験を行うことが有効である。重水は 1064 nm の光を吸収しないため、純粋な光圧の効果のみで高分子リッチドメインを形成することができることを筆者らは見いだしている⁴⁰⁾。現在、重水実験も含め、高分子の分子量や化学構造、立体構造がリッチドメインの高分子濃度に与える影響を調べている。本手法はまだ萌芽的ながらも他の手法では困難であった温度応答性高分子の高分子リッチドメインの分光情報を選択的に取得することが可能であり、本章で述べたような高分子濃度を決定する手法として力強いツールになると期待できる。

光ピンセットを駆使することで温度応答性高分子リッチドメインの高分子濃度を見積もることができた。

Figure 7. PNIPAM concentration in polymer-rich domain as a function of near-infrared laser power and solution concentration: 2.5 (square), 5.4 (circle), and 15 (triangle) mM solutions. Reprinted with permission from Elsevier.

さらに筆者らは、光ピンセットと温度応答性高分子を組合せることで新しい分析化学手法を開発している。本報の最終章では、光ピンセット研究の中で注目を集めるプラズモン光ピンセットによる温度応答性高分子の光捕捉と、それを用いた微量有機分子の抽出・分光検出について述べる。

5 温度応答性高分子リッチドメインを用いた微量有機分子の抽出・検出法

5.1 プラズモン光ピンセット

光圧を表す式 (3) より、光圧を増大させる方策の一つとして光電場 E を増大させることである。この光電場の増大に利用するのがプラズモンの電場増強効果である。金や銀などの貴金属中の自由電子の集団振動をプラズモンと呼び、共鳴光を貴金属ナノ構造に照射すると、プラズモンを励起することで入射光が貴金属表面に局在することで、増強電場が形成される。とくにナノ構造をナノメートルサイズで空隙(ナノギャップ)を形成するように配置すると、ナノギャップ間に著しく増強された電場が局在する。これをギャップモード局在表面プラズモンという。ナノギャップでは入射共鳴光に比べその電場増強度 E^2 は数千倍以上にまで増強される。また、増強電場はナノ空間に局在するので電場勾配 ∇E^2 は急峻で大きな値となる。したがって、ナノギャップ近傍にナノ粒子が接近すれば、ナノ粒子には強い光圧が作用し捕捉される。これをプラズモン光ピンセットと呼ばれる。近年光ピンセット研究で注目を集める新しいナノ粒子捕捉法である^{46),47)}。

このプラズモン光ピンセットは、従来の集光型光ピンセットに比べ以下に挙げる特長を有している。

(1) 捕捉力が強い： $10^3 \sim 10^5$ 倍の電場増強能を示すプラズモンナノ構造体を利用すると、強い光圧がナノ粒子に作用する。そのため、ナノ粒子を捕捉するために数百 mW の高出力レーザーを必要とせず、レーザーポインターのような数 mW 程度のレーザー出力で実現できる。

(2) 捕捉の空間分解能が高い：増強電場は貴金属ナノ構造近傍に制限されるため、微粒子はこのナノ空間に

のみ捕捉される。

(3) プラズモン増強分光法と組合せが可能：プラズモン増強電場を利用した高感度分析法として表面増強ラマン散乱法や表面増強蛍光法が挙げられる。これら分析手法とプラズモン光ピンセットで用いる光学系は、組合せて利用できる。したがって、たとえば捕捉した分子やナノ粒子をプラズモン増強分光法と組合せて高感度な分光分析法として昇華することが期待できる。

筆者らは、2010 年よりプラズモン光ピンセットに取り組んでおり、これまでに分子系ナノ物質(色素会合体⁴⁸⁾、DNA⁴⁹⁾、量子ドット⁵⁰⁾、ポリスチレンナノ粒子⁵¹⁾などを対象に、その捕捉挙動、メカニズムの解明に注力してきた。本報では温度応答性高分子のプラズモン光ピンセットに注目し、その捕捉挙動を述べる。その後、プラズモン光ピンセットにより捕捉した温度応答性高分子を用いた微量有機分子の抽出・検出法について述べる。

5.2 プラズモン光ピンセットを用いた温度応答性高分子の光捕捉

プラズモンナノ構造体として、筆者らは金のナノピラミッドがガラス基板上に規則配列した金ナノピラミッドダイマアレイを用いている。この金ナノ構造体は Angular-Resolved Nanosphere Lithography 法で作製でき、センチメートルオーダーの面積でナノギャップを高密度に作製できる。共鳴波長は 700~1000 nm の近赤外域に示し、近赤外光を照射するとピラミッドの底部とナノギャップ間で最大で 10^4 倍程度の増強電場が局在する。この基板をセル底部に使用し、PNIPAM 水溶液に接触させる。光学系は Figure 3 とほぼ同一であるが、光源として捕捉光源として発振波長 808 nm の近赤外半導体レーザーを用いている。

プラズモン光ピンセットにより捕捉した PNIPAM の顕微鏡像を Figure 8 に示す⁵²⁾。プラズモン励起後 1 秒以内に、モザイク状の PNIPAM の分子集合体が形成された。さらにプラズモン励起を続けると、表面が均一な膜状の集合体に成長した。このように形成した分子集合体は光励起をやめると即座に溶液中へと溶解した。このように

Figure 8. Optical micrographs during plasmon excitation at 3.0 kW/cm^2 . The circles denoted by dotted lines correspond to the plasmon excitation area. Reprinted with permission from American Chemical Society.

Figure 9. (a) Fluorescence spectrum of Rhodamine B with (over 100 s of plasmon excitation time) and without plasmon excitation. The concentration of Rhodamine B was 1.0×10^{-5} mol/L in solution. Plasmon excitation intensity was 4.0 kW/cm^2 . (b) Representative temporal profile of the fluorescence intensity as the plasmon excitation was repetitively turned on and off. Reprinted with permission from American Chemical Society.

PNIPAM分子集合体の形成と溶解は、プラズモン励起に鋭敏に応答した。

この現象を詳細に調べるために、PNIPAMに蛍光分子をラベル化し、共焦点顕微蛍光分光法により捕捉挙動を追跡した。ラベル化した蛍光分子は、周囲の極性環境に鋭敏に反応し、疎水環境の下では蛍光極大波長が短波長シフトする。このような蛍光分子をラベル化したPNIPAMを光捕捉すると、蛍光強度の増加とともに短波長シフトが観測された。蛍光強度の増加から、PNIPAMの高分子濃度の増加が、短波長シフトから捕捉されたPNIPAMが相分離した脱水構造をとることが示された。

このようにプラズモン光ピンセットにより捕捉したPNIPAMも集光型光ピンセットと同様に、相分離した状態で光捕捉されることが明らかとなった。筆者らは、この特異的な捕捉挙動を示すPNIPAMのプラズモン光ピンセットを用いることにより、水溶液中に微量に溶解した有機分子を高分子集合体中に抽出し、顕微分光学的手法と組合せて検出する新たな分析手法を開発した。

5.3 有機分子の抽出・検出

3.5 wt%のPNIPAM水溶液に溶解させたrhodamine B (1.0×10^{-5} mol/L)の蛍光検出の結果をFigure 9に示す²⁶⁾。横軸に測定時間を、縦軸にプラズモン励起していないときの蛍光強度を1としたときの相対蛍光強度をプロットしている。プラズモン励起時間に伴い、相対蛍光強度は速やかに増加した。蛍光強度が10倍に至るまでに約3秒程度要した。しばらくすると蛍光強度は一定となり、プラズモン光ピンセットにより形成したPNIPAM

分子集合体中に抽出されたrhodamine Bの濃度が平衡に到達したと示唆される。プラズモン励起を停止によりPNIPAM分子集合体が溶解すると同時に、蛍光強度も元の強度まで減少した。このような蛍光挙動は、PNIPAM分子集合体の有無に鋭敏に反応し、高い再現性を有している。

$1.0 \times 10^{-6} \sim 1.0 \times 10^{-8}$ mol/Lのrhodamine B溶液でも同様にPNIPAM中に抽出・検出することに成功した。得られた実験結果より、rhodamine Bはおおよそ10倍程度濃縮されたと見積もられる。最終的には、 1.0×10^{-9} mol/Lという極低濃度でのrhodamine Bの蛍光検出にも成功した。単分子検出が報告されている蛍光増強分光法に比べると、検出限界濃度は優れているとはいえないが、改善策として、(1) 蛍光増強分光法を組合せた高感度化、または(2) 光捕捉する温度応答性高分子の検討、が考えられる。(1)については、現在も実験的に検討中であるが、(2)については興味深い結果が得られているので報告する。

本手法では、脱水した高分子集合体へ有機分子を抽出し分光検出する。この概念に従えば、より脱水しやすい温度応答性高分子を用いることで、より高効率に有機分子を濃縮することができると期待される。このような考えのもと、分子量の小さなPNIPAM ($M_w = 4.7 \times 10^4$)を用いて先程と同様にrhodamine Bの蛍光検出を行った。その結果、 $M_w 15.7 \times 10^4$ のPNIPAMを用いたときよりもrhodamine Bがより高濃度に濃縮されることがわかった。このような結果は、相分離した温度応答性高分子の脱水和度に依存していると考えられる。

本手法の汎用性を検討するため、acid red 88, crystalviolet, pyrene でも同様の実験を行い、抽出・検出に成功している。とくに、pyrene は水溶液中では 2.0×10^{-6} mol/L の濃度ではモノマー由来の発光しか測定されないが、PNIPAM 分子集合体中に抽出されると、エキシマー発光を発することが明らかとなった。縮合芳香族炭化水素の PNIPAM と水の分配係数では $10^3 \sim 10^4$ 程度であり、極微量に溶解した pyrene が PNIPAM 分子集合体に抽出されることでエキシマー発光を発したと考えられる。本手法は顕微蛍光分光法だけでなく、ラマン顕微分光法と組合せることで σ -または p -chlorophenol などの非蛍光性有機分子の検出にも成功した。今後、より低波数領域のラマンスペクトルから抽出した有機分子の構造変化を追跡するだけでなく、表面増強ラマン散乱と組合せることでより高感度な分析手法になると考えられる。

6 ま と め

以上、集光型光ピンセットにより捕捉した温度応答性高分子 PNIPAM の顕微ラマン分光分析と、ブラズモン光ピンセットにより捕捉した PNIPAM 分子集合体を用いた分析化学への展開について述べた。近赤外レーザーを PNIPAM 水溶液に集光すると、光圧と光熱効果により PNIPAM が捕捉され、高分子リッチドメインを形成する。形成されたドメインの顕微ラマン分光分析し、ドメイン中の高分子濃度を見積もることに成功した。光圧により形成される高分子リッチドメインは水溶液中に局所的な疎水環境を提供できるため、水溶液中に微量に溶解した有機分子を高分子リッチドメイン中に抽出し、分光学的に検出する新しい分析化学手法としての応用展開を示した。

Ashkin らが現在の集光型光ピンセットを報告してから 30 年余り、ブラズモン光ピンセットの登場から 10 年という年月を経ながらも、いまだ新しい捕捉現象が相次いで報告されている。その一方で、この領域は物理学が主領域であり、高分子化学での光ピンセットの報告例は決して多くはない。しかしながら、これからの光ピンセット研究は応用分野の探索と技術の発展に徐々にシフトしていくと予想され、高分子化学がそのフィールドとしてとても魅力的な分野であると筆者らは推測している。本手法は、温度応答性高分子以外の多くの高分子にも適用できる可能性を秘めており、本手法が今後、高分子分析の一助となることを期待する。

謝 辞 本研究は大阪市立大学大学院理学研究科の大学院生、北海道大学大学院理学研究科の喜多村 昇教授グループ、村越 敬教授グループ、大阪大学大学院工学研究科の麻生 隆彬准教授との共同研究の成果です。ここに深謝申し上げます。本研究の一部は科研費・新学術領域「光圧によるナノ物質

操作と秩序の創生」(JP16H06506/JP16H06507)、若手研究 (B) (JP16K17922) および (公財) 日揮・実吉奨学会の支援を受け推進されました。

文 献

- 1) M. Heskins and J. E. Guillet, *J. Macromol. Sci., Part A: Pure Appl. Chem.*, **2**, 1441 (1968).
- 2) S. Fujishige, K. Kubota, and I. Ando, *J. Phys. Chem.*, **93**, 3311 (1989).
- 3) C. Wu and S. Zhou, *Macromolecules*, **28**, 5388 (1995).
- 4) X. Wang, X. Qiu, and C. Wu, *Macromolecules*, **31**, 2972 (1998).
- 5) C. Wu and X. Wang, *Phys. Rev. Lett.*, **80**, 4092 (1998).
- 6) H. Cheng, L. Shen, and C. Wu, *Macromolecules*, **39**, 2325 (2006).
- 7) Y. Maeda, T. Higuchi, and I. Ikeda, *Langmuir*, **16**, 7503 (2000).
- 8) Y. Maeda, *Macromol. Symp.*, **303**, 63 (2011).
- 9) F. A. Plamper, A. A. Steinschulte, C. H. Hofmann, N. Drude, O. Mergel, C. Herbert, M. Erberich, B. Schulte, R. Winter, and W. Richtering, *Macromolecules*, **45**, 8021 (2012).
- 10) C. Hashimoto, A. Nagamoto, T. Maruyama, N. Kariyama, Y. Iriya, A. Ikehata, and Y. Ozaki, *Macromolecules*, **46**, 1041 (2013).
- 11) Y. Maeda, T. Nakamura, and I. Ikeda, *Macromolecules*, **34**, 8246 (2001).
- 12) Y. Ono and T. Shikata, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 1511 (2007).
- 13) L. Starovoytova and J. Spěváček, *Polymer*, **47**, 7329 (2006).
- 14) D. G. Lessard, M. Ousaleh, and X. X. Zhu, *Can. J. Chem.*, **79**, 1870 (2001).
- 15) X. Zhou, J. Li, C. Wu, and B. Zheng, *Macromol. Rapid Commun.*, **29**, 1363 (2008).
- 16) Y. Tsuboi, Y. Yoshida, K. Okada, and N. Kitamura, *J. Phys. Chem. B*, **112**, 2562 (2008).
- 17) Y. Tsuboi, T. Tada, T. Shoji, and N. Kitamura, *Macromol. Chem. Phys.*, **213**, 1879 (2012).
- 18) T. Tada, Y. Katsumoto, K. Goossens, H. Uji-i, J. Hofkens, T. Shoji, N. Kitamura, and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C*, **117**, 10818 (2013).
- 19) T. Baltes, F. Garret-Flaudy, and R. Freitag, *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.*, **37**, 2977 (1999).
- 20) Y. Zhang, S. Furry, D. E. Bergbreiter, and P. S. Cremer, *J. Am. Chem. Soc.*, **127**, 14505 (2005).
- 21) Y. Hiruta, M. Shimamura, M. Matsuura, Y. Maekawa, T. Funatsu, Y. Suzuki, E. Ayano, T. Okano, and H. Kanazawa, *ACS Macro Lett.*, **3**, 281 (2014).
- 22) M. Nakayama, N. Yamada, Y. Kumashiro, H. Kanazawa, M. Yamato, and T. Okano, *Macromol. Biosci.*, **12**, 751 (2012).
- 23) H. Inoue, T. Yamamoto, S. Kuwahara, and K. Katayama, *Chem. -Asian J.*, **8**, 108 (2013).
- 24) Y. Maeda, H. Yamamoto, and I. Ikeda, *Macromolecules*, **36**, 5055 (2003).
- 25) T. Shoji, R. Nohara, N. Kitamura, and Y. Tsuboi, *Anal. Chim. Acta*, **854**, 118 (2015).
- 26) T. Shoji, D. Sugo, F. Nagasawa, K. Murakoshi, N. Kitamura, and Y. Tsuboi, *Anal. Chem.*, **89**, 532 (2017).
- 27) P. Lebedew, *Ann. Phys.*, **311**, 433 (1901).

- 28) E. F. Nichols and G. F. Hull, *Phys. Rev. (Series I)*, **13**, 307 (1901).
- 29) A. Ashkin, J. M. Dziedzic, J. E. Bjorkholm, and S. Chu, *Opt. Lett.*, **11**, 288 (1986).
- 30) A. Ashkin, *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.*, **6**, 841 (2000).
- 31) H. Yan, Y.-F. Hou, P.-F. Niu, K. Zhang, T. Shoji, Y. Tsuboi, F.-Y. Yao, L.-M. Zhao, and J.-B. Chang, *J. Mater. Chem. B*, **3**, 3677 (2015).
- 32) T. Sugiyama, K. Yuyama, and H. Masuhara, *Acc. Chem. Res.*, **45**, 1946 (2012).
- 33) P. Borowicz, J. Hotta, K. Sasaki, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem. B*, **101**, 5900 (1997).
- 34) P. Borowicz, J. Hotta, K. Sasaki, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem. B*, **102**, 1896 (1998).
- 35) W. Singer, T. Nieminen, N. Heckenberg, and H. Rubinsztein-Dunlop, *Phys. Rev. E*, **75**, 011916 (2007).
- 36) M. Ishikawa, H. Misawa, N. Kitamura, and H. Masuhara, *Chem. Lett.*, **22**, 481 (1993).
- 37) M. Ishikawa, H. Misawa, N. Kitamura, R. Fujisawa, and H. Masuhara, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **69**, 59 (1996).
- 38) J. Hofkens, J. Hotta, K. Sasaki, H. Masuhara, and K. Iwai, *Langmuir*, **13**, 414 (1997).
- 39) J. Hofkens, J. Hotta, K. Sasaki, H. Masuhara, T. Taniguchi, and T. Miyashita, *J. Am. Chem. Soc.*, **119**, 2741 (1997).
- 40) Y. Tsuboi, M. Nishino, T. Sasaki, and N. Kitamura, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 7033 (2005).
- 41) Y. Tsuboi, M. Nishino, Y. Matsuo, K. Ijio, and N. Kitamura, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, **80**, 1926 (2007).
- 42) S. Masuo, H. Yoshikawa, H.-G. Nothofer, A. C. Grimsdale, U. Scherf, K. Müllen, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 6917 (2005).
- 43) Y. Nabetani, H. Yoshikawa, and H. Masuhara, *J. Phys. Chem. B*, **110**, 21399 (2006).
- 44) F. Català, F. Marsà, M. Montes-Usategui, A. Farré, and E. Martín-Badosa, *Sci. Rep.*, **7**, 1 (2017).
- 45) S. Ito, T. Sugiyama, N. Toitani, G. Katayama, and H. Miyasaka, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 2365 (2007).
- 46) T. Shoji and Y. Tsuboi, *Opt. Rev.*, **22**, 137 (2015).
- 47) T. Shoji and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. Lett.*, **5**, 2957 (2014).
- 48) A. Mototsuji, T. Shoji, Y. Wakisaka, K. Murakoshi, H. Yao, and Y. Tsuboi, *Opt. Express*, **25**, 13617 (2017).
- 49) T. Shoji, J. Saitoh, N. Kitamura, F. Nagasawa, K. Murakoshi, H. Yamauchi, S. Ito, H. Miyasaka, H. Ishihara, and Y. Tsuboi, *J. Am. Chem. Soc.*, **135**, 6643 (2013).
- 50) Y. Tsuboi, T. Shoji, N. Kitamura, M. Takase, K. Murakoshi, Y. Mizumoto, and H. Ishihara, *J. Phys. Chem. Lett.*, **1**, 2327 (2010).
- 51) T. Shoji, M. Shibata, N. Kitamura, F. Nagasawa, M. Takase, K. Murakoshi, A. Nobuhiro, Y. Mizumoto, H. Ishihara, and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C*, **117**, 2500 (2013).
- 52) M. Toshimitsu, Y. Matsumura, T. Shoji, N. Kitamura, M. Takase, K. Murakoshi, H. Yamauchi, S. Ito, H. Miyasaka, A. Nobuhiro, Y. Mizumoto, H. Ishihara, and Y. Tsuboi, *J. Phys. Chem. C*, **116**, 14610 (2012).

[Comprehensive Papers]

Raman Microspectroscopic Studies on Thermo-Responsive Polymer Rich Domains Formed by Optical Tweezers

Tatsuya SHOJI*¹ and Yasuyuki Tsuboi*¹

*¹Graduate School of Science., Osaka city University (3-3-138 Sugimoto, Sumiyoshi-ku, Osaka 558-8585, Japan)

Poly(*N*-isopropylacrylamide) (PNIPAM) as a representative water-soluble thermo-responsive polymer exhibits a coil-to-globule phase transition followed by phase separation upon temperature increase, leading to the formation of polymer-rich domains in solution. Quantitative analysis of polymer concentration in polymer-rich domains is a challenging task for deeper understanding of the phenomena. Recently, we developed an analytical technique that combined optical tweezers with confocal Raman microspectroscopy to determine the concentration in the domain. Furthermore, optical tweezers enhanced by localized surface plasmon formed a micro-assembly of PNIPAM on plasmonic nanostructures, providing the platform for a highly sensitive detection technique for fluorescent and nonfluorescent organic molecules dissolved in an aqueous solution. These trapping method combined with microspectroscopies are applicable for a variety of other thermos-responsive polymers.

KEY WORDS Thermo-Responsive Polymer / Poly(*N*-isopropylacrylamide) / Optical Force / Optical Tweezers / Confocal Raman Microspectroscopy / Localized Surface Plasmon /

(Received December 25, 2017; Accepted February 14, 2018; Advance Publication April 4, 2018) [*Kobunshi Ronbunshu*, **75**, 243—253 (2018)]

©2018, The Society of Polymer Science, Japan