

|              |   |
|--------------|---|
| Title        | 液中レーザーアブレーションによる蛍光性有機ナノ粒子の作製とその蛍光特性   |
| Author(s)    | 安國, 良平  |
| Citation     | 大阪大学, 2009, 博士論文  |
| Version Type | VoR   |
| URL          | <a href="https://hdl.handle.net/11094/23482">https://hdl.handle.net/11094/23482</a> |
| rights       |   |
| Note         |   |

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

**液中レーザーアブレーションによる  
蛍光性有機ナノ粒子の作製とその蛍光特性**

Fabrication of Fluorescent Organic Nanoparticles by Laser Ablation  
and Their Optical Properties

**安國 良平**  
Ryohei Yasukuni

**大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻**  
Department of Applied Physics, Osaka University  
March 2009

**液中レーザーアブレーションによる  
蛍光性有機ナノ粒子の作製とその蛍光特性**

Fabrication of Fluorescent Organic Nanoparticles by Laser Ablation  
and Their Optical Properties

**安國 良平**  
Ryohei Yasukuni

**大阪大学大学院工学研究科 精密科学・応用物理学専攻**  
Department of Applied Physics, Osaka University  
March 2009

## 目次

### 第1章 序論

|                 |    |
|-----------------|----|
| 1-1 緒言          | 1  |
| 1-2 種々の発光材料の特徴  | 3  |
| 1-3 本研究の目的および意義 | 10 |
| 1-4 本論文の構成      | 11 |
| 参考文献            | 12 |

### 第2章 液中レーザーアブレーションによる蛍光性有機ナノ粒子の作製

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 2-1 緒言                         | 17 |
| 2-2 有機ナノ粒子の作製手法                | 17 |
| 2-3 実験                         | 21 |
| 2-4 レーザーアブレーション法によるナノ粒子の生成     | 24 |
| 2-4-1 ペリレンジイミド化合物 (BPDI)       | 24 |
| 2-4-2 ペリレンジイミドデンドリマー化合物 (DPDI) | 28 |
| 2-4-3 添加剤効果                    | 33 |
| 2-5 まとめ                        | 34 |
| 参考文献                           | 35 |

### 第3章 ナノ粒子コロイド溶液の消失・蛍光スペクトル

|                                |    |
|--------------------------------|----|
| 3-1 緒言                         | 36 |
| 3-2 有機固体の励起状態                  | 36 |
| 3-3 ナノ粒子の吸収スペクトル               | 42 |
| 3-4 Mie 散乱理論による消失スペクトルシミュレーション | 45 |
| 3-5 蛍光強度・スペクトルの粒子サイズ依存性        | 47 |
| 3-6 レーザー光照射の蛍光スペクトルへの影響        | 53 |
| 3-7 まとめ                        | 55 |
| 参考文献                           | 56 |

### 第4章 ナノ粒子の単一粒子蛍光分光

|        |    |
|--------|----|
| 4-1 緒言 | 57 |
|--------|----|

|       |              |    |
|-------|--------------|----|
| 4-2   | 実験           | 57 |
| 4-3   | 単一ナノ粒子の発光特性  | 60 |
| 4-3-1 | 蛍光スペクトル      | 60 |
| 4-3-2 | 蛍光寿命         | 62 |
| 4-3-3 | 蛍光強度と寿命の時間変化 | 64 |
| 4-4   | まとめ          | 68 |
|       | 参考文献         | 68 |

## 第5章 ナノ構造体の蛍光消光におけるサイズ依存性

|     |                       |    |
|-----|-----------------------|----|
| 5-1 | 緒言                    | 70 |
| 5-2 | 実験                    | 70 |
| 5-3 | ナノ構造体の吸収・蛍光スペクトルと蛍光寿命 | 73 |
| 5-4 | 消光剤による消光効率のサイズ依存性     | 77 |
| 5-5 | まとめ                   | 79 |
|     | 参考文献                  | 80 |

## 第6章 蛍光性ナノ粒子を用いた細胞プローブ応用への展望

|     |                     |    |
|-----|---------------------|----|
| 6-1 | 緒言                  | 81 |
| 6-2 | 試料および実験             | 81 |
| 6-3 | 生理的緩衝液中でのナノ粒子の安定性   | 83 |
| 6-4 | ナノ粒子を用いた細胞の蛍光イメージング | 86 |
| 6-5 | 細胞プローブ応用への展望        | 87 |
|     | 参考文献                | 90 |

## 第7章 総括

|  |       |    |
|--|-------|----|
|  | 業績リスト | 97 |
|--|-------|----|

|  |    |     |
|--|----|-----|
|  | 謝辞 | 104 |
|--|----|-----|

## 第1章

### 序論

#### General introduction

---

##### 1-1 緒言

現在、物質の蛍光性を利用した技術は、各種塗料・染料、増白剤などの身近な日用品から物理、化学の研究用途にまで多岐に渡る分野で広く使用されており、とりわけライフサイエンスにおいては Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)、フローサイトメトリー、蛍光イメージングなどその需要は大きく、欠かせないものとなっている[1-3]。蛍光技術がこれほど多く利用されつづけるのは蛍光の本質的な感度の高さに加えて共焦点顕微鏡や二光子励起顕微鏡などの顕微鏡技術の登場や、アバランシェフォトダイオードなどの検出器の高感度化、紫外から可視、赤外に渡る蛍光励起用光源（レーザー）の充実といった測定装置の進歩があげられる[4]。一方、緑色蛍光タンパク質 (GFP)[5]の登場がライフサイエンスを爆発的に発展させたように、優れた蛍光材料の開発もその発展に大きく貢献してきた。数ある蛍光材料のうち一例を示すとフルオロセイン、ローダミンなどの蛍光性有機分子[6-8]、 $[\text{Ru}(\text{bpy})_3]^{2+}$ などの金属錯体[1,2]やランタノイドキレート[9]、緑色蛍光タンパク質 (GFP) などの蛍光タンパク質[5,10]、そして CdSe などの半導体ナノ粒子を筆頭に蛍光性ナノ粒子が挙げられる[11-13]。

ライフサイエンス分野に限定して言えば、理想的な蛍光材料には一般的につきのような性質が求められる。吸収断面積、蛍光量子収率が高く、化学的及び光照射に対して安定である。励起波長が生体材料の吸収帯の外にあり、且つ励起・蛍光ともにスペクトルが可視域にある。細胞培養液や緩衝液などに溶解・分散可能であること等が挙げられる。さらに使用目的によっては局所的な染色を目的とした化学修飾が可能であることや毒性が少ないことも重要である。このような要求をある程度満たす蛍光材料として、有機蛍光分子が現在最も汎用的であり、またその染色部位の局在性から生細胞のイメージングには蛍光タンパク質がよく用いられている。しかしながら有機蛍光分子・蛍光タンパク質を利用する上で課題となるのが光安定性である。顕微鏡下において市販されている蛍光色素分子は励起光によって退色してしまう[14, 15]。Fluorescence Photobleaching Recovery (FRP)法[16]のよう

に細胞膜上で蛍光退色した部分の復元過程から膜の流動性を測定する例など退色を利用した研究例もあるものの継時観測や 1 分子蛍光観測では光退色は大きな問題となる。そこで蛍光色素分子に代わる発光材料として近年特に高い関心を集めている発光材料のひとつが蛍光性ナノ粒子である。

限られた微小空間に分子・原子が閉じ込められているナノサイズの結晶や粒子は、孤立分子やバルク結晶とは電子状態が異なるため光学特性や電子・磁気物性が変化することが知られている[17, 18]。またナノ結晶では結晶表面に存在する分子・原子の割合がバルク結晶に比べて相対的に大きくなるために界面電子移動や表面反応効率が増大し、触媒作用や薬理作用の活性化が期待される[19]。他に、ナノ結晶の大きな特徴として溶媒にほとんど溶けることのない難溶性材料であってもコロイド溶液として溶媒中に分散可能であることが挙げられる。このようなナノ結晶特有のユニークな物性は分子・原子とバルク結晶間の理解の溝を埋める重要な研究対象として学術的な関心を集めているばかりではなく、光学・電子デバイス、医薬品など材料応用の観点からも高い注目を集め、基礎・応用の両面からさかんに研究が行われている[18]。対象となるナノ粒子は金・銀などの金属ナノ粒子[20, 21]、アルミナ・酸化チタンなど金属酸化物ナノ粒子[22, 23]、各種顔料・ポリマー[24, 25]など有機物ナノ粒子など無機物から有機物までその範囲は広く枚挙に暇がない。新しい発光材料として蛍光性ナノ粒子が注目される背景には、分子集合体として高い吸収係数や光安定性が期待されるのみならず、上記のようなナノ粒子特有の性質があるためである。

特に量子ドットとして知られる無機半導体ナノ粒子は、広い吸収帯と量子閉じ込め効果による紫外から赤外まで粒径に依存した鋭い発光ピーク、また蛍光色素分子と比べて高い吸収係数、光安定性を持つなど優れた発光特性を示す[26-29]。そのため量子ドットは 1990 年頃から盛んに研究がされ、1998 年に Nie、Weiss らによって生体適合性の高い表面修飾をおこなった量子ドットの細胞イメージング応用が報告されると[30, 31]、単一励起波長による多重蛍光染色[32]や、長時間継時蛍光観察[33]をはじめ赤外領域での高い発光量子収率を利用して生きたマウスの真皮下に存在する腫瘍の蛍光イメージング等が行われてきた[34]。このように優れた発光特性を有し、生体イメージングへの応用が加速する量子ドットではあるが、材料に重金属イオンを用いることから生体への高い毒性が懸念されることや[35]、さらにプリンキングと呼ばれる 1 分子レベルでの生体ダイナミクスを追跡するためには不適合な明滅現象が報告されている[36]。その他の蛍光性ナノ粒子としては、蛍光色素分子をドープしたポリマービーズ[37]やシリカ[38]、ゼオライト[39]などや発色団を多数含んだ巨大分子（ dendrimer ） [40, 41]が報告されている。一方で蛍光性分子のみからなるナノ粒

子は蛍光材料としてあまり注目されてこなかった。それは、有機分子はその固体状態において強い分子間相互作用によりエキシマーと呼ばれる二量体を形成し蛍光量子収率の極端な低下を引き起こすことが多いためである[42]。有機ナノ粒子の電子状態に関しても、電子は粒子を構成する各々の分子の中に局在していると考えられてきたためにそのサイズ効果に関する研究は非常に限られていた。またこれまでに有機ナノ粒子の基礎物性や応用に関する研究があまり成されなかった背景のひとつには、有機ナノ粒子の作製法が確立されてこなかったことがある。しかし1992年に Kasai, Nakanishi らが再沈殿法によるナノ粒子作製法を提案し、作製したペリレンナノ結晶の蛍光スペクトルのサイズ依存性を初めて報告してから[43]、他の有機色素分子や共役高分子のナノ粒子についても吸収・発光スペクトルが粒子サイズによって変化することが報告され[44-47]、近年、発光材料としての有機ナノ粒子に関心が集まりつつある。Yao らはピラゾリン系の化合物のナノ粒子において結晶内の電荷移動に起因した蛍光スペクトルのサイズ効果を報告している[48]。また Masuhara らや Barbara らのグループでは共役高分子の発光スペクトルに関しても分子内コンフォメーションの観点からそのサイズ効果を議論している[49, 50]。Katagi らはポリジアセチレンのナノ粒子の吸収スペクトルが示すサイズ依存性に関して、励起子と格子振動の結合が励起子バンドの最低エネルギー準位と光学遷移に影響を与えるというナノ結晶格子の熱的ソフト化を提案している[45, 51]。有機ナノ粒子特有の蛍光特性を利用した新規機能性蛍光材料として Li, An らはそれぞれ固体状態で蛍光が増強されるナノ粒子を利用したナノサイズの光学素子や[52]、蛍光性フォトクロミックナノ粒子を用いたメモリー素子の可能性を示している[53]。

### 1-2 種々の発光材料の特徴

ここでは主にライフサイエンスで用いられる有機蛍光分子、蛍光タンパク質、半導体ナノ粒子の発光特性とイメージング・センシング応用における特徴をそれぞれ概説し、それぞれの発光特性を生かした特徴的な応用例をいくつか紹介する。

まず有機分子の光学特性はその分子構造とそのエネルギー状態に依存する。可視域に吸収と発光のある一般的な蛍光色素では発色団全体に非局在化した $\pi$ 軌道への電子遷移が可視域の光と共鳴することで光吸収が起こり、 $\pi$ 共役長の長さによって紫外から可視へ吸収バンドの位置が変化する[2]。発光は主に励起状態の最低振動準位から基底状態の振動準位へのエネルギー放出に伴い起こる。Fig. 1-1 に分子のエネルギー状態図と発光と競合する緩



和過程を示す。蛍光は基底状態への無輻射緩和、三重項状態への項間交差、化学反応と競合するために蛍光量子収率、蛍光寿命は分子の周辺環境に強く依存する。蛍光寿命は溶液中では一般的には 1-10 ナノ秒程度で単一指数関数的に減衰するが、光化学反応などの競合過程存在下では寿命は短くなり減衰に複数の成分を有するようになる。ローダミン、フルオロセインのような一般的な共鳴吸収による電子励起が起こる色素分子では、高い吸収係数と蛍光量子収率、振動準位を反映したスペクトル構造、鏡像関係にある比較的狭い吸収・発光バンド、小さなストークスシフトのような特性が挙げられる。またクマリンのような分子間電荷移動により電子遷移を起こす色素分子では共鳴励起型の色素とは対照的に、幅の広く振動構造をもたない吸収・発光バンド、溶媒の極性に依存した大きなストークスシフトを有し、通常その吸収係数と蛍光量子収率は共鳴励起型の色素よりも低い。有機色素分子は、水への溶解度や特定物質への特異的結合、吸着性、pH 感受性までその機能全般は基本的に置換基の交換により設計される[8]。また単一分子の蛍光測定を行った場合にはブリンキングと呼ばれる明滅現象を示し、数マイクロ秒からミリ秒の非発光時間は三重項状態への緩和が原因とされるが、ミリ秒以上の非発光時間が生じる原因は未だはっきりとは解明されていない[54]。Fig. 1-2 に代表的な有機蛍光色素分子の吸収・発光スペクトルを示す[8]。有機蛍光色素分子では周辺環境やイオンなどによるスペクトル変化を利用したセンサーとしての利用が特徴的である。Minta らはローダミン、フルオロセインの誘導体の蛍光

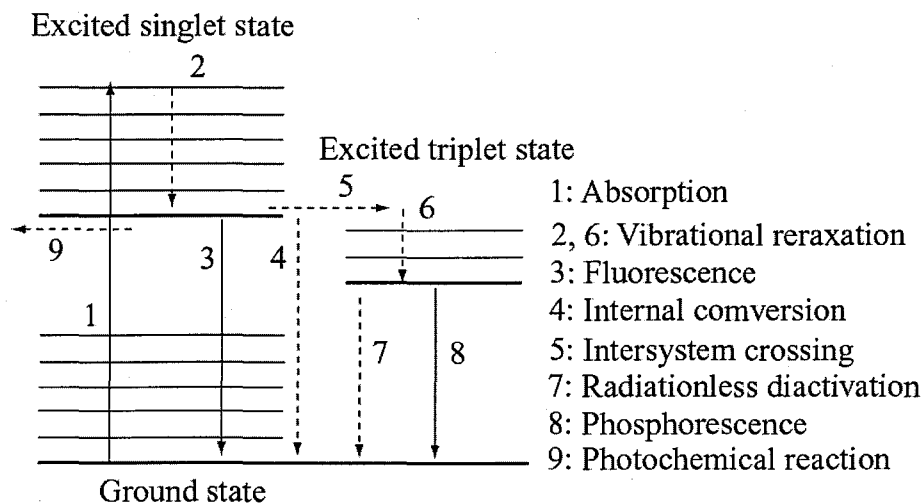


Fig. 1-1 Jablonski diagram and photochemical related process



蛍光タンパク質である GFP やその改変タンパク質はその GFP の遺伝子を目的タンパク質の遺伝子に組み込むことで理論的には任意のタンパク質をラベルすることが可能であるために特に細胞や生体組織の非侵襲的染色にとって重要な蛍光物質である[5]。GFP は 28KD の分子量を持つ樽型のタンパク質で発光原理は基本的に有機色素分子に準ずる。GFP の発色団は 238 個のアミノ酸からなるタンパク質の 65-67 番目のアミノ酸からなるトリペプチドである (Fig. 1-4)。GFP の発光効率はこの発色団形成のためのフォールディング効率に強く依存し、また蛍光特性は発色団近傍のアミノ酸残基に強く影響される。そのため発色団周辺のアミノ酸配列を変化させて発光効率の上昇や、スペクトル形状を変化させた改変 GFP が一般的にはよく利用される。現在では緑から赤までの蛍光を示す様々な改変蛍光タンパク質が市販されており、またカエデ、ドロンパなどフォトクロミズムをもつ蛍光タンパク質なども作製されている[59, 60]。多くの蛍光タンパク質は pH 感受性が高く、pH の変化により蛍光強度が顕著に変化する。これは蛍光タンパク質の種類によって pH に依存してモル吸光係数が変化する場合と量子収率が変化する場合の両方がある。蛍光タンパク質も蛍光色素分子と同様に pH 感受性などを利用した *in vivo* センサーとしての利用や蛍光寿命イメージングも行われている[61]。特に 1997 年に Miyawaki らによって設計されたカメレオンと呼ばれる蛍光タンパク質は  $\text{Ca}^{2+}$  に特異的に反応する[62]。Flors らはフォトクロミック蛍光タンパク質であるドロンパの光スイッチング機能を利用した PALM と呼ばれる回折限界を超える分解能を達成した顕微鏡技術なども報告している[63]。しかし、蛍光タンパク質においては遺伝子発現のマーカーとしての重要性が非常に大きく、その点では他の蛍光材料とは一線を画している。

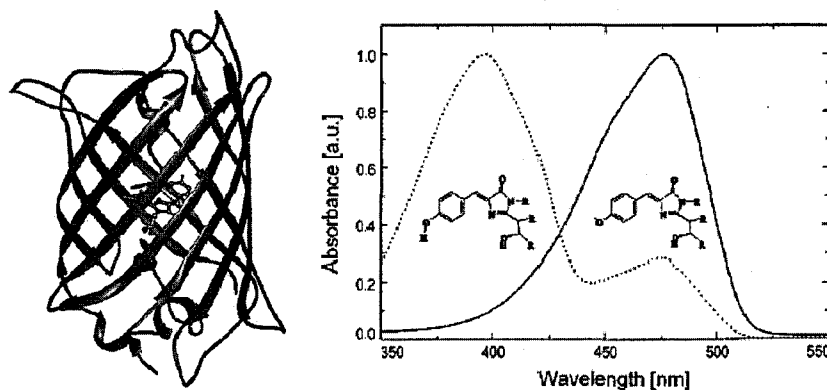


Fig. 1-4 Molecular structure of GFP, and its absorption (left) and emission (right) spectra. Chromophore of GFP is also put in the same graph as spectra.

半導体では光吸収によって生成した電子-正孔対の再結合する際に放出されるエネルギーが発光という形で放出される。バルク半導体のサイズを小さくしていくと構成原子数の減少に伴いバンドを形成している軌道の重なりが減少し、バンドが次第に離散的になる。Fig. 1-5 に半導体のサイズの減少に伴うエネルギー状態の変化を示す。半導体ナノ粒子では、そのサイズがボーア半径よりも小さくなると電子-正孔対がナノ粒子内に閉じ込められバンドギャップが大きくなる。このとき光吸収においてサイズの減少に伴う吸収バンドの短波長シフトを生じる。半導体ナノ粒子の吸収は長波長側の吸収端から短波長方向へ次第に増加し、発光はバンドギャップのエネルギーに対応した非常に幅の狭い正規分布に従ったバンドを示す(Fig. 1-6)[17]。また半導体のバンドギャップは物質によって異なり、構成原子が軽くなればなるほどバンドギャップが大きくなり吸収端は短波長へシフトする。このように半導体ナノ粒子の光学特性は、ナノ粒子を構成する元素、粒径によって大きく変化する。また半導体ナノ粒子は有機蛍光色素分子と比較して平均して 2 桁程度大きい 2 光子吸収断面積をもつ。ライフサイエンスでは吸収・発光バンドが可視域にある粒径 1-6 nm の CdSe、CdTe、InP、InGaP などがよく使われており、半導体ナノ粒子では無輻射失活は不純物またはナノ粒子表面で生じるため発光効率の低下を防ぐために通常はナノ粒子表面を ZnS で覆ったようなコアシェル構造を持つことが多い[64, 65]。また CdSe のように有機溶媒中で合成されるの水への分散やタンパク質との特異吸着性などの設計は基本的に各種抗原や反応基の表面修飾により行われ、半導体ナノ粒子においても色素分子と同様に *in vitro* から *in vivo* までのイメージングが報告されている (Fig. 1-7 a, b)。蛍光寿命は 10-100 ナノ秒程度と長く、散乱光やサンプルの自家蛍光と用意に区別可能である。しかしその粒径や表面の影響を受

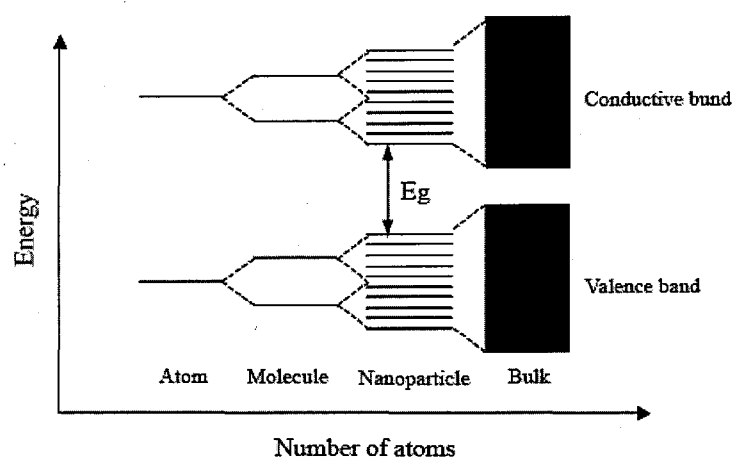


Fig. 1-5 Band structures of semiconductor depending on size.

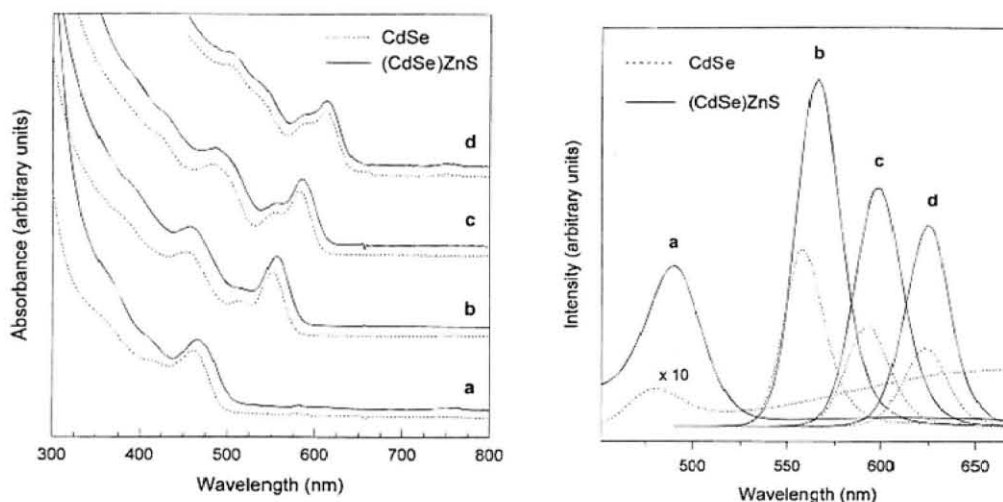


Fig. 1-6 (left) Absorption spectra for bare (dashed lines) and 1-2 monolayer ZnS overcoated (solid lines) CdSe dots with diameters measuring (a) 23, (b) 42, (c) 48, and (d) 55 Å. (right) Photoluminescence (PL) spectra for bare (dashed lines) and ZnS overcoated (solid lines) dots with the following core sizes: (a) 23, (b) 42, (c) 48, and (d) 55 Å in diameter. The PL spectra for the overcoated dots are much more intense owing to their higher quantum yields: (a) 40, (b) 50, (c) 35, and (d) 30. [64]

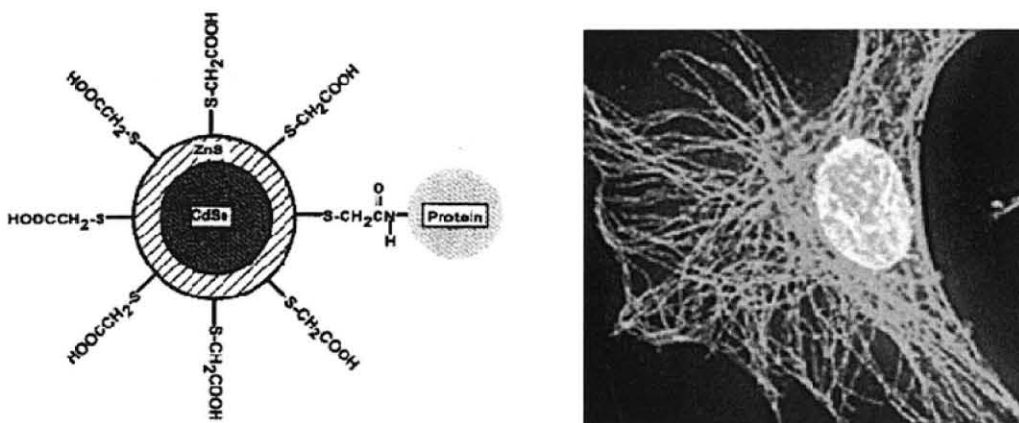


Fig. 1-7 Schematic of a ZnS-capped CdSe QD that is covalently coupled to a protein by mercaptacetic acid. [30] The nucleus of a 3T3 cell was stained with QD-streptavidin ( $\text{em}=630$ ). The microtubules were labeled with QD-streptavidin ( $\text{em}=535$ ). [32]

けやすく減衰曲線は多成分である[66, 67]。単一の半導体ナノ粒子においても単一分子と同様に明滅現象が観測され、半導体ナノ粒子の場合はナノ粒子のイオン化が原因であると考えられている[68]。半導体ナノ粒子では広い吸収スペクトルを利用した単一励起波長によるマルチカラーイメージングや、高い光安定性を活かした長時間観察が特徴的である[28, 33]。Nieらは異なるサイズの半導体ナノ粒子を含んだポリマービーズを作製し、蛍光波長のピーク比の違いを利用したエンコーディングを行い、DNAのハイブリダイゼーションをモニターしている (Fig. 1-8)[69]。また半導体ナノ粒子は高い吸光係数のために効率のいい FRET のエレクトロドナーとして働くため有機色素分子をラベルした DNA と合わせたバイオセンサーなどにも応用されている[70]。

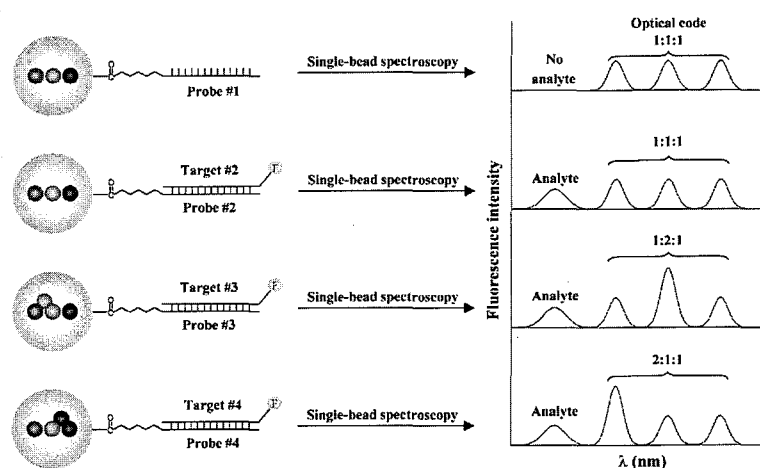


Fig. 1-8 DNA hybridization assays using QD barcode beads. When the target molecule is absent, only the QD barcode signals are detected by single beads spectroscopy or flow cytometry because hybridization does not occur. When the target molecule is present, it brings the barcode probe and reporter probe together, which results in detection of both the barcode fluorescence and the reporter signal. [69]

上述の蛍光色素分子が有する種々の機能と半導体ナノ粒子のような高い吸収係数と光安定性をもつような材料の一つとして蛍光性有機ナノ粒子が期待される。有機固体ではその発光特性は分子配列と励起子の振る舞いに強く依存する[71-73]。有機蛍光分子はナノ粒子にすることで高い吸収断面積と光化学的安定性が期待されることに加え、無機分子と異なり合成によって pH・熱・イオン感受性などの機能設計が可能であることから、センサーやプローブ応用に向けた新規蛍光性有機ナノ粒子の開発が注目される[74-76]。

最後に蛍光材料を生体応用する場合には必ず問題にされる毒性について触れる。蛍光色素分子の場合はその毒性は分子の種類によって低いものや高いものがあり一概には結論付けられない。蛍光タンパク質は一般的には生体由来のためにその毒性は低いとされる。しかし例えば細胞骨格を形成するタンパク質を GFP でラベルすると、GFP は通常ラベルされるタンパク質よりも大きな分子量を持つために、GFP 発現過剰ではタンパク質の働きを妨げ細胞の活性を低下させる原因ともなりうる。半導体ナノ粒子はもともと重金属元素を含むためにそのイオンは細胞にとって高い毒性を示す。ナノ粒子の表面処理によって金属イオンの流出などは抑制されているものの、その毒性に対する評価は、用いる半導体ナノ粒子、サイズ、表面状態、細胞の種類などによって様々である[35, 77]。また半導体ナノ粒子に限らず、ナノサイズの粒子そのものが生体に及ぼす影響は未知数であり生体応用に関してはそのリスクアセスメントが重要である[78]。

### 1-3 本研究の目的および意義

これまで述べてきたようにイメージング・センシング技術では様々な蛍光材料が用いられ、新しい蛍光材料の開発は新たな発見を促してきた。しかし現在でも完全な蛍光材料というものは存在せず、用途・目的に応じて更なる蛍光材料の開発が望まれている。有機蛍光分子のナノ粒子は高い吸収断面積と光化学的安定性や変化にとんだ有機分子の機能と共に、サイズに依存したナノ粒子特有のユニークな発光特性を持つ材料として期待される。しかしながら有機ナノ粒子の詳細なスペクトル、蛍光強度・寿命に関するサイズ効果には未解明な部分も多い。またナノ粒子を材料として利用する場合には表面や周辺環境の与える影響は重要な問題である。本研究ではイメージングやセンサーへの利用を見越した蛍光プローブの開発を視野にいれ、まず液中レーザーアブレーションによりペリレンジイミド化合物とその dendrimer の蛍光性有機ナノ粒子を作製し、作製されたナノ粒子のコロイド溶液から単一ナノ粒子レベルにおいてナノ粒子の表面や周辺媒体の寄与を考慮した詳細

な蛍光特性を明らかにすることを目的とした。

蛍光性有機ナノ粒子の蛍光特性に関する基本的な知見は、ナノ粒子内部または表面に存在する分子状態有に関する情報を与えるために、有機物質の単一分子からバルクへと変化する物性の差異を理解するための掛け橋として基礎研究の観点から重要な意味を持つ。またナノ粒子特有の蛍光特性を考慮することでナノ粒子に適した分子の設計など新規材料開発へ導線を示し、新しい産業・研究の可能性を切り開くという点で非常に意義深い。

### 1-4 本論文の構成

本論文は本章・序論を含めた7章から構成されている。以下に各章の概要を述べる。

第2章では液中レーザーアブレーションを用いて、蛍光量子収率の高い蛍光分子であるペリレンジイミド化合物 (BPDI) と、同じくペリレンジイミドを発色団に持つ dendrimer (DPDI) のナノ粒子を作製した結果を報告する。レーザー照射に伴う BPDI、DPDI 懸濁液の吸収スペクトルの変化と走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察から BPDI、DPDI ナノ粒子の生成を評価する。

第3章では平均粒径に依存した DPDI ナノ粒子コロイド溶液の消失・蛍光スペクトルの変化を議論する。動的光散乱測定により DPDI ナノ粒子コロイド溶液の平均粒径を見積もり、平均粒径に依存したコロイド溶液の消失スペクトルの変化を Mie 理論を用いたシミュレーション結果から議論する。またコロイド溶液における蛍光強度の粒径依存性を示し、ナノ粒子の蛍光消光ダイナミクスを考察する。

第4章ではポリマー薄膜中に分散させた DPDI 単一ナノ粒子の時間分解顕微蛍光分光を行い、その蛍光特性を DPDI 単一分子との比較から議論する。単一ナノ粒子の蛍光スペクトル測定からナノ粒子の点光源としての優位性を示す。また50個の単一ナノ粒子の蛍光強度と寿命の時間発展を測定した結果から、単一ナノ粒子の発光ダイナミクスを議論する。

第5章では溶媒蒸発法によりガラス基板上に作製したサイズの異なるペリレンジイミド化合物 (PDS9) のナノ構造体の消光効率のサイズ依存性を議論する。AFM 測定からディスク状ナノ構造体の直径と膜厚に比例関係があることを示し、蛍光寿命イメージングによって



ナノ構造体蛍光寿命の膜厚依存性とナノ構造体表面での消光を議論する。次に消光剤としてメチレンブルー水溶液を加え、消光効率の膜厚依存性を示し、生成した励起状態の平均移動距離を考察する。

第6章ではレーザーアブレーションにより作製したBPDIナノ粒子コロイド溶液の生理的環境下における安定性を吸収スペクトルの変化から評価する。マウス NIH3T3 細胞を培養したディッシュの培養液を、BPDIナノ粒子を分散させた生理的リン酸緩衝液に置換し、共焦点顕微鏡により蛍光イメージングを行った結果を報告し、ナノ粒子のプローブ応用へ向けた可能性を議論する。

第7章では本論文における研究の成果をまとめる。

#### 参考文献

- [1] W. T. Mason; *Fluorescent and luminescent probes for biological activity 2<sup>nd</sup> edition*. (Academic Press, London, 1999)
- [2] J. R. Lakowics; *Principles of fluorescence spectroscopy 3<sup>rd</sup> edition*. (Springer New York, 2006)
- [3] R. Kraayenhof, A. J. W. G. Visser, and H. C. Gerritsen; *Fluorescence Spectroscopy, Imaging and Probes* (Springer, Tokyo, 2002)
- [4] H. R. Petty; *Microsc. Res. Tech.* **70** (2007) 687.
- [5] M. Chalfie, S. Kain, *Green fluorescent protein* (Wiley-Liss, USA, 1998)
- [6] V. T. Oi, A. N. Glazer, L. Stryer; *J. Cell. Biol.* **93** (1982) 981.
- [7] J. Zhang, R. E. Campbell, A. Y. Ting, R. Y. Tsien; *Natl. Rev.* **3** (2002) 906.
- [8] A. Waggoner; *Curr. Opin. Chem. Biol.* **10** (2006) 62.
- [9] I. Hemmila, V. Laitala; *J. Fluoresc.* **15** (2005) 529.
- [10] N. C. Shaner, P. A. Steinbach, R. Y. Tsien; *Nat. Methods* **2** (2005) 905.
- [11] A. P. Alivisatos, W. Gu, C. Larabell; *Ann. Rev. Biomed. Eng.* **7** (2005) 55.
- [12] S-J. Yu, M-W. Kang, H-C. Chang, K-M. Chen, Y-C. Yu; *J. Am. Chem. Soc.* **127** (2005) 17640.
- [13] C. M. Cummins, M. E. Koivunen, A. Stephanian, S. J. Gee, B. D. Hammock, I. M.

- Kennedy; *Biosens. Bioelectron* **21** (2006) 1077.
- [14] L. Song, E. J. Hennink, I. T. Young, H. J. Tanke; *Biophys. J.* **68** (1995) 2588.
- [15] L. Song, R. P. M. van Gijlswijk, I. T. Young, H. J. Tanke; *Biophys. J.* **70** (1996) 2959.
- [16] P. WAHL; *Biophys. Chem.* **22** (1985) 317.
- [17] G. Schmid; *Nanoparticles* (Wiley-Vch, Berlin, 2004)
- [18] 微粒子工学大系、第Ⅱ巻、株式会社フジ・テクノシステムズ、(2002)
- [19] 化学総説 48、超微粒子、科学と応用。学会出版センター(1985)
- [20] U. Kreibig, M. Vollmer; *Optical Properties of Metal Clusters: Springer Series in Materials Science Vol. 25* (Springer, Berlin, 1995)
- [21] G. Raschke, S. Kowarik, T. Franzl, C. Connichsen, T. A. Klar, J. Feldmann, A. Nichtl, K. Kurzinger; *Nano Lett.* **3** (2003) 935.
- [22] M. Kumagai, G. L. Messing; *J. Am. Ceram. Soc.* **68** (1985) 500.
- [23] Y. Moro-oka, W. Ueda; *Appl. Caral. A.* **40** (1994) 233.
- [24] A. Gotoh, H. Uchida, M. Ishizaki, T. Satoh, S. Kaga, S. Okamoto, M. Ohta, M. Sakamoto, T. Kawamoto, H. Tanaka, M. Tokumoto, S. Hara, H. Shiozaki, M. Yamada, M. Miyake, M. Kurihara; *Nanotech.* **18** (2007) art. no. 345609
- [25] H. Hoppe, N. S. Sariciftci; *Adv. Poly. Sci.* **214** (2008) 1.
- [26] A.P. Alivisatos; *Science* **271** (1996) 934.
- [27] H. Weller; *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* **3** (1998) 194.
- [28] X. Michalet, F. Pinaud, T. D. Lacoste, M. Dahan, M. P. Bruchez, A. P. Alivisatos, S. Weiss; *Single. Mol.* **2** (2001) 261.
- [29] W. CW. Chan, D. J. Maxwell, X. Gao, R. E. Bailey, M. Han, S. Nie; *Curr. Opin. Biotechnol.* **13** (2002) 40.
- [30] W. C. W. Chen, S. Nie; *Science* **281** (1998) 2016.
- [31] M. Bruchez, M. Moronne, P. Gin, S. Weiss, A. P. Alivisatos; *Science* **281** (1998) 2013.
- [32] X. Wu, H. Liu, J. Liu, K. N. Haley, J. A. Treadway, J. P. Larson, N. Ge, F. Peale, M. P. Bruchez; *Nature Biotechnol.* **21** (2003) 41.
- [33] J. K. Jaiswal, H. Mattoussi, J. M. Mauro, S. M. Simon; *Nature Biotechnol.* **21** (2003) 47.
- [34] X. H. Gao, Y. Y. Cui, R. M. Levenson, L. W. K. Chung, S. M. Nie; *Nature*

- Biotechnol.* **22** (2004) 969.
- [35] R. Hardman; *Environ. Health Perspect.* **114** (2006) 165.
- [36] W. G. J. H. M. Van Sark, P. L. T. M. Frederix, A. A. Bol, H. C. Gerritsen, A. Meijerink; *ChemPhysChem* **3** (2002) 871.
- [37] D. McQuade, A. Pullen, T. Swager ; *Chem. Rev.* **100** (2000) 2537.
- [38] H. Wu, Q. Huo, S. Vamum, J. Wang, G. Liu, Z. Nie, J. Liu, Y. Lin ; *Analyst* **133** (2008) 1550.
- [39] M. Pauchard, S. Huber, R. Méallet-Renault, H. Maas, R. Pansu, G. Calzaferri ; *Angewandte Chemie* **40** (2001) 2839.
- [40] R. Métivier, T. Christ, F. Kulzer, T. Weil, K. Müllen, T. Basche ; *J. Lumin.* **110** (2004) 217.
- [41] M. Lor, L. Viaene, R. Pilot, E. Fron, S. Jordens, G. Schweitzer, T. Weil, K. Mullen, J. W. Verhoeven, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver ; *J. Phys. Chem. B* **108** (2004) 10721.
- [42] J. Gesquiere, T. Uwada, T. Asahi, H. Masuhara and P. F. Barbara; *Nano Lett.* **5** (2005) 1321.
- [43] H. Kasai, H. S. Nalwa, H. Oikawa, S. Okada, H. Matsuda, N. Minami, A. Kakuta, K. Ono, A. Mukoh, H. Nakanishi; *Jpn. J. Appl. Phys.* **31** (1992) L1132.
- [44] H. Kasai, H. Oikawa, S. Okada, H. Nakanishi; *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **71** (1998) 2597.
- [45] H. Masuhara, H. Nakanishi, K. Kasai, K. Sasaki; *Single Organic Nanoparticles* (Springer, Tokyo, 2003 )
- [46] D. Horn, J. Rieger; *Angew. Chem. Int. Ed.* **40** (2001) 4330.
- [47] Y. Komai, H. Kasai, H. Hirakoso, Y. Hakuta, H. Katagi, S. Okada, H. Oikawa, T. Adschiri, H. Inomata, K. Arai, H. Nakanishi; *Jpn. J. Appl. Phys.* **38** (1999) L81.
- [48] H. B. Fu, J. N. Yao; *J. Am. Chem. Soc.* **123** (2001) 1434.
- [49] N. Kurokawa, H. Yoshikawa, N. Hirota, K. Hyodo, H. Masuhara; *ChemPhysChem* **5** (2005) 1690.
- [50] P. G. Lagoudakis, M. M. de Souza, F. Schindler, J. M. Lupton, J. Feldmann, J. Wenus, D. G. Lidzey; *Phys. Rev. Lett.* **93** (2004) 257401.
- [51] H. Katagi, H. Oikawa, S. Okada, H. Kasai, A. Watanabe, O. Ito, Y. Nozue, H. Nakanishi; *Mol. Cryst. Liq. Cryst.* **314** (1998) 285.

- [52] S. Li, L. He, F. Xiong, Y. Li, G. Yang; *J. Phys. Chem.* **108** (2004) 10887.
- [53] B. K. An, S. K. Kwon, S. Y. Park; *Angew. Chem. Int. Ed.* **46** (2007) 1978.
- [54] J. Hofkens, M. Cotlet, T. Vosch, P. Tinnefeld, K. D. Weston, C. Ego, A. Grimsdale, K. Müllen, D. Beljonne, J. L. Bredas, S. Jordens, G. Schweitzer, M. Sauer, F. De Schryver; *PNAS* **100** (2003) 13146.
- [55] A. Minta, J. P. Kao, R. Y. Tsien; *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 8171.
- [56] D. W. Domaille, E. L. Que, C. J. Chang; *Nature Chem. Biol.* **4** (2008) 168.
- [57] J. R. Lakowicz, H. Szmajda, K. Nowaczyk, M. L. Johanson; *PNAS* **89** (1992) 1271.
- [58] H. Wallrabe, A. Periasamy; *Curr. Opin. Biotechnol.* **16** (2005) 19.
- [59] R. Ando, H. Hama, M. Yamamoto-Hino, H. Mizuno, A. Miyawaki; *PNAS* **99** (2002) 12651.
- [60] S. Habuchi, R. Ando, P. Dedecker, W. Verheijen, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens; *PNAS* **102** (2005) 9511.
- [61] C. D. Stubbs, S. W. Botchway, S. J. Slater, A. W. Parker; *BMC Cell Biol.* **6** (2005) 1471.
- [62] A. Miyawaki, O. Griesbeck, R. Heim, R. Y. Tsien; *PNAS* **96** (1999) 2135.
- [63] P. Dedecker, J. Hotta, C. Flors, M. Sliwa, H. Uji, M. B. J. Roeloffs, R. Ando, H. Mizuno, A. Miyawaki, J. Hofkens; *J. Am. Chem. Soc.* **129** (2007) 16132.
- [64] B. O. Dabbousi; J. Rodriguez-Viejo, F. V. Mikulec, J. R. Heine, H. Mattoussi, R. Ober, K. F. Jensen, M. G. Bawendi; *J. Phys. Chem. B* **101** (1997) 9463.
- [65] S. T. Selvan, T. T. Tan, J. Y. Ying; *Adv. Mater.* **17** (2005) 1620.
- [66] G. Schlegel, J. Bohanenberger, I. Potapova, A. Mews; *Phys. Rev. Lett.* **88** (2002) 137401.
- [67] K. Zhang, H. Chang, A. Fu, A. P. Alivisatos, H. Yang; *Nano Lett.* **6** (2006) 843.
- [68] F. Cichos, J. Martin, C. Von Borzyskowski; *Phys. Rev. B* **70** (2004) 115314.
- [69] M. Y. Han, X. H. Gao, J. Z. Su, S. Nie; *Nature. Biotechnol.* **19** (2001) 631.
- [70] M. Suzuki, Y. Husimi, H. Komatsu, K. Suzuki, K. T. Douglas; *J. Am. Chem. Soc.* **130** (2008) 5720.
- [71] J. D. Wright “*Molecular Exciton*” 「分子結晶」(江口太郎訳、化学同人、京都、1991)
- [72] 松井敏雄、有機結晶の励起状態、化学、**37** (1997) 9
- [73] Y. Toyozawa; *Pure. Appl. Chem.* **69** (1997) 3.

- [74] S. J. Lim, B. K. An, S. D. Jung, M. A. Chung, S. Y. Park; *Angew. Chem. Int. Ed.* **43** (2004) 6346.
- [75] A. Dreuw, J. Plotner, L. Lorenz, J. Wachtveitl, J. E. Djanhan, J. Bruning, T. Metz, M. Bolte, M. U. Schmidi; *Angew. Chem. Int. Ed.* **44** (2005) 7783.
- [76] F. Debuign, L. Jeuniau, M. Wiame, J. B. Nagy; *Langmuir* **16** (2000) 7605.
- [77] A. Hoshino, K. Fujioka, T. Oku, M. Suga, Y. F. Sasaki, T. Ohta, M. Yasuhara, K. Suzuki, K. Yamamoto; *Nano Lett.* **4** (2004) 2163.
- [78] C. Kumar; *Nanomaterials-Toxicity, Health and Environmental Issues*, (Wiley-Vch verlag Gmbh & Co. KGaA, 2006)

## 第2章

### 液中レーザーアブレーション法による 蛍光性有機ナノ粒子の作製

#### Fabrication of fluorescence organic nanoparticles by laser ablation in water

---

##### 2-1 緒言

液中レーザーアブレーション法では、これまでにフタロシアニン、キナクリドンのような各種顔料やフラーレンまた $\beta$ カロテンやフラボノイド類まで様々な有機物ナノ粒子の作製例が報告されており、貧溶媒・良溶媒の選択が必要とされる再沈殿法よりも適用物質の範囲が大きい[1,2]。また再沈殿法のように複数の溶媒が混入することなく純粋なナノ粒子コロイド溶液を作製し得るので、センサーや生細胞への応用を考える場合には細胞への毒性や不純物がセンシングしたい反応へ及ぼす影響を低減できると考えられる。しかし一般的に蛍光性分子は高強度のレーザー照射によって光退色してしまうと考えられるために、蛍光材料としての応用を見越したナノ粒子化の対象とはならなかった。本章では液中レーザーアブレーションにより、分子状態で優れた蛍光量子収率と光化学的安定性を有するペリレンジイミド化合物(BPDI)とその発色団に嵩高いデンドロン基を導入したペリレンジイミドデンドリマー(DPDI)のナノ粒子化を行った結果を述べる。

##### 2-2 有機ナノ粒子の作製手法

ナノ粒子の作製手法は大きな粒子を粉砕するトップダウン型と分子・原子を積み上げるボトムアップ型の2つに大別される。トップダウン型の典型例が機械的な粉砕処理による作製である[3]。しかしこの方法で作製される粒子の大きさはマイクロメートルサイズからせいぜい数百ナノメートルである。より小さなナノ粒子を得るために様々な試みが行われており、ボトムアップ型の作成法で特に溶液中でナノ粒子を得る方法としては溶媒中に分散させたエマルジョンのなかで結晶化を行うマイクロエマルジョン法[4]や、溶液中での化合物の加水分解・重合反応を利用したゾル-ゲル法[5]などが知られている。現在、一般的に広く利用されているのが1992年にNakanishiらが提案した再沈殿法である[6]。この方法

は様々な有機化合物のナノ粒子を簡便に取り扱いのしやすいコロイド溶液としてナノ粒子を得ることができる。Fig. 2-1 に示すように再沈殿法は有機分子の高濃度溶液（良溶媒）を別の溶解度の低い溶媒（貧溶媒）中に注入し、再析出させてナノ結晶を得る方法で、良溶媒の有機分子濃度や貧溶媒への注入速度、温度などを変えることで粒径の制御が可能である。貧溶媒中の有機分子は結晶の核を形成し、この核が成長することでナノ粒子となる。Nakanishi らはこのナノ粒子を熱処理することでナノ結晶を作製し、さらにマイクロ波を照射することで結晶形やサイズを制御することにも成功している[7]。

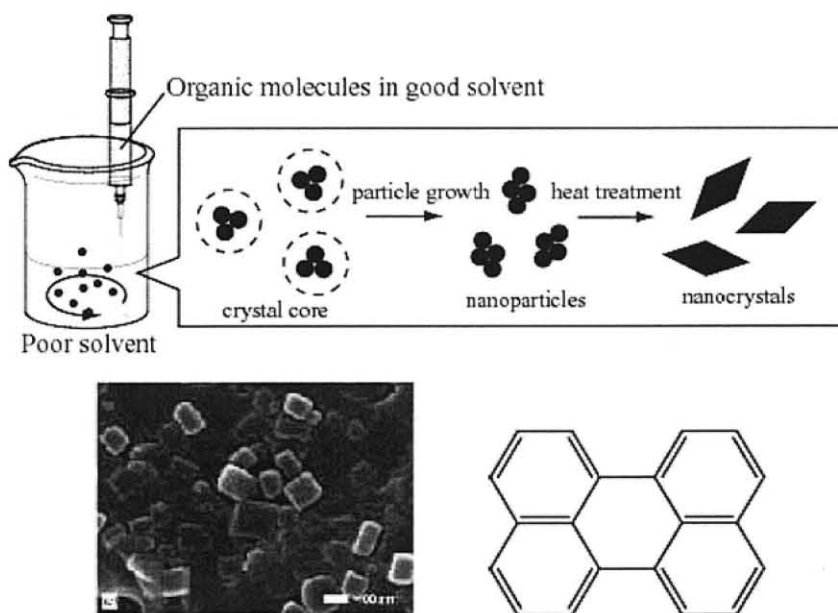


Fig. 2-1 A schematic illustration of the reprecipitation method. Organic molecules are dissolved in a water-miscible organic solvent, and then a few micro-liter of the solution is injected into vigorously stirred poor solvent such as water. Organic molecules are reprecipitated and crystallized (top). Scanning electron microscope image of Perylene nanocrystals fabricated by the reprecipitation method (bottom left) and molecular structure of Perylene (bottom right).

Asahi らは新しい有機ナノ粒子作製法として液中レーザーアブレーション法を提案しており[8]、これまでにキナクリドン、フタロシアニン、フラーレンなどの有機物のナノ粒子がレーザーアブレーション法により作製されている(Fig. 2-4)[1, 2, 9]。再沈殿法のように良溶媒と貧溶媒の組み合わせを考慮する必要がないために簡便で汎用性が高く、また単一の溶媒中に純水なコロイド溶液が作製可能である点がレーザーアブレーション法の大きな利点である。レーザーアブレーション法は従来、主に金属やシリコン、酸化物などのナノ粒子生成法として用いられてきた[10]。これら金属などの場合は、この方法は高エネルギーのレーザービームをターゲット上に集光照射することで原子・イオンのような化学種を生成させ、それらを成長させることでナノ粒子を得るボトムアップのナノ粒子作製法である。しかし有機物の場合のレーザーアブレーション法は大きな結晶をレーザー照射によってナノ粒子にまで粉砕するトップダウンの作製法である。この方法では溶媒中に分散させたマイクロからミリメートルサイズの大きな結晶に溶媒を攪拌しながら高強度のレーザー光を照射することで溶媒中にナノ粒子コロイドを得る (Fig. 2-2)。有機結晶に高強度のレーザーパルスが照射されると結晶表面に多くの励起状態が生成し、そのエネルギーは蛍光放出、無輻射失活などをへて主に熱エネルギーに緩和される。Hosokawa らは銅フタロシアニン薄膜のナノ秒レーザーアブレーションダイナミクス測定から、励起状態のエネルギーの熱への緩和時間は 10ps のオーダーであることを報告しており、レーザーのパルス幅つまり  $\sim$  ns という時間のなかでは分子の励起と熱への緩和が繰り返される[11]。結果、急激な温度上昇とそれに伴う体積増加が誘起され、内部圧力の上昇に耐えられなくなった結晶の分割や、結晶表面からのナノ粒子噴出が引き起こされる。また結晶の温度上昇と競合して周辺溶媒への熱拡散による結晶の冷却が生じる(Fig. 2-3)。Tamaki らは溶媒の熱拡散率が上昇するにつれて生成される結晶の平均粒径も大きくなることから、結晶の冷却がナノ粒子生成の律速であることを示している[12]。結晶のサイズが小さくにつれて体積あたりの表面積の割合が大きくなるため熱が溶媒へ拡散しやすくなる。結晶が細分化されレーザー照射による温度上昇よりも熱拡散による冷却作用が支配的になると、それ以上の微細化が起きなくなると考えられる。レーザーアブレーション法ではレーザー光強度、パルス幅などを変化させることでナノ粒子の粒径や相を制御可能であることが報告されている。



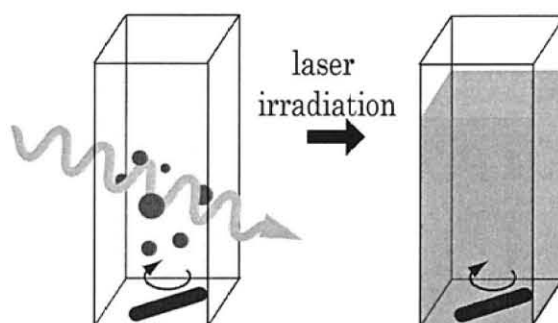


Fig. 2-2 A schematic illustration of the laser ablation method. Sample organic crystals were added to a poor solvent and stirred vigorously with a magnetic stirrer, and then exposed to laser pulses.

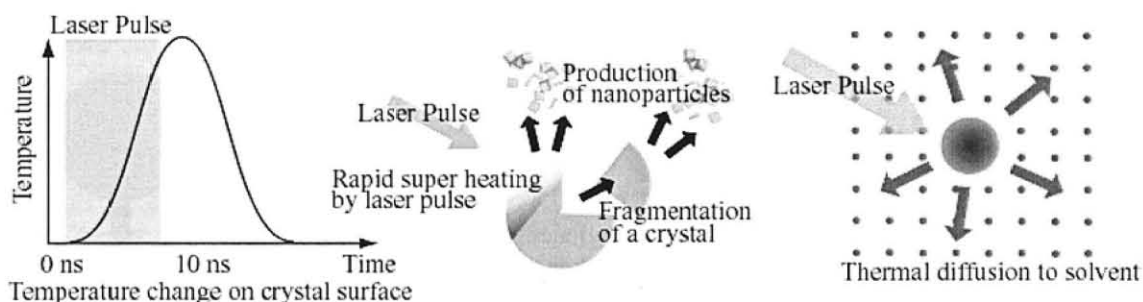


Fig. 2-3 Mechanism of nanoparticles formation. When laser pulses are irradiated to crystals, the laser energy is converted into a thermal energy rapidly. This photothermal conversion gets a crystal surface temperature increase, resulting in a fragmentation of crystals and a production of nanoparticles. At the same time, crystals were cooled by thermal diffusion from a crystal surface to a solvent. The thermal diffusion rate is increasing as crystals become smaller since smaller particles have bigger specific surface. When cooling process dominates a thermal change, the particle size doesn't decrease any more.

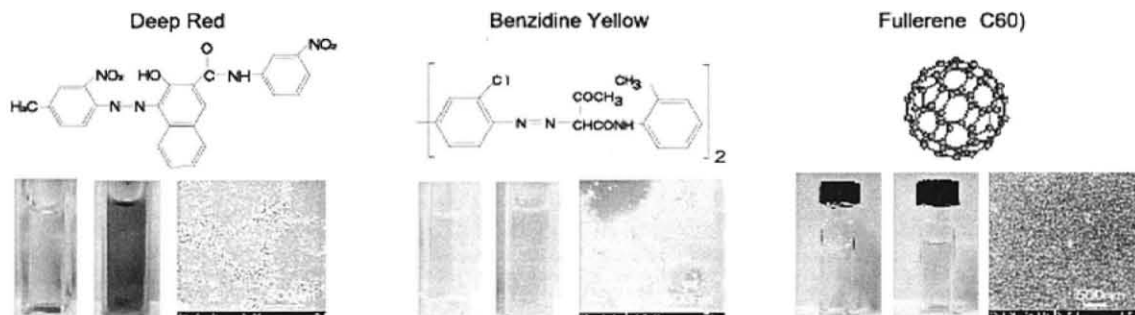


Fig. 2-4 Various kinds of organic nanoparticles. (Top) molecular structure, (bottom left) crystal dispersion, (bottom center) colloidal solution, (bottom right) Scanning electron microscope image.

### 2-3 実験

*N,N'*-bis(2,5-di-*tert*-butylphenyl)-3,4,9,10-perylenedicarboximide(BPDI)と dendroliマーペリレンジイミド(DPDI)はシグマアルドリッチから購入したものと Max Planck Institute の Prof. Müllen らが合成したものを実験に用いた[13]。それぞれの化合物の構造式を Fig. 2-5 に示す。0.38 mg の BPDI 粉末を 100 ml の純水に加え、30 分間超音波処理をしてレーザー照射前のサンプルとした。DPDI は純水中に分散せずに水面に浮いてしまうため、0.3 mg の粉末を 100 ml の 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]propanesulfonate (CHAPS, 8mM, 同人化学) 水溶液に加え、30 分間超音波処理を行ったものをサンプルとした。各サンプルの懸濁液 3 ml を 1 cm x 1 cm x 5 cm の水晶セルに入れ、攪拌子で攪拌しながら Nd<sup>3+</sup>:YAG レーザーの第二高調波または第三高調波 (Continuum, Surelight II, 532 nm or 355 nm, 10Hz, 8 ns FWHM) を照射した。レーザーのパターンとビーム径はバーンペーパーを用いて測定しピンホールを通してビーム径を 5 mm に調整した。照射レーザー光強度はパワーメーターによって測定し、グランプリズムによって調整した。Fig. 2-6 にレーザーシステムを示す。

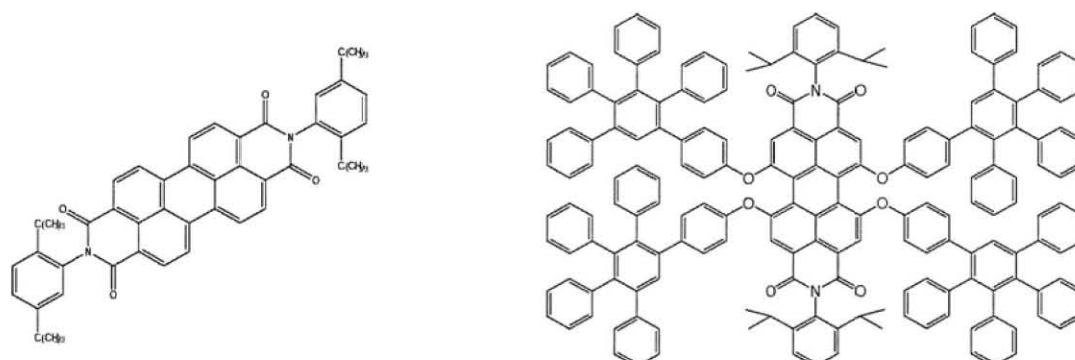


Fig. 2-5 Molecular structures of BpDI (left) and DPDI (right)

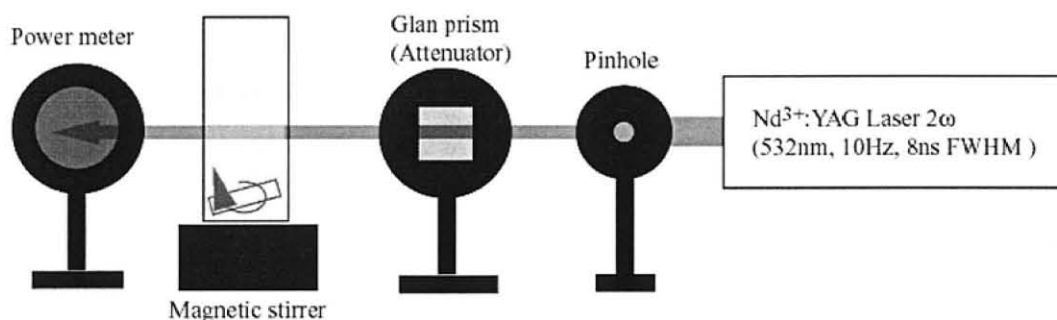


Fig. 2-6 Schematic illustration of laser system

ナノ粒子の生成は吸収スペクトル測定によって評価した。レーザー照射前後のサンプルは1時間静置したのち、その上澄みの吸収スペクトルを分光光度計（島津 UV-3100PC）を用いて測定した。また吸収スペクトルの経時変化はファイバー分光器（Ocean Optics, USB2000）により測定した。ナノ粒子の蛍光スペクトルは蛍光の再吸収の影響を避けるために吸収スペクトルのピーク吸光度が0.05になるように希釈した後、蛍光光度計（Hitachi F-4500）を用いて測定した。DPDIナノ粒子コロイド溶液の平均粒径はMalvern Instruments社のZetasizerを用い、動的光散乱(DLS)法に基づいて測定した。コロイド溶液中の粒子はブラウン運動により絶えず溶液中を移動している。動的光散乱法では粒子にレーザー光を照射し、粒子のブラウン運動にともない時間的に変動する散乱光強度の自己相関関数を解析することで粒

子径を測定する。本実験では粒子径としてキュムラント平均粒径を採用した。ブラウン運動では粒子の粒径が大きいほど拡散速度が遅くなるので、相関関数の減衰速度は粒子径に依存し、小さな粒子の場合は大きな粒子よりもはやく減衰する。散乱光の電場  $E(t)$  の自己相関関数  $g_1$  は次式で与えられる。

$$g_1(\tau) = \langle E(t)E^*(t+\tau) \rangle / \langle E(t)E^*(t) \rangle = \exp(-\tau/\tau_{diff}) = \exp(-\Gamma\tau) \quad (3-1)$$

減衰速度  $\Gamma$  は粒子の拡散係数  $D$  と散乱ベクトル  $q$  より

$$\Gamma = Dq^2 \quad (3-2)$$

散乱ベクトル  $q$  は溶媒の屈折率  $n_0$ 、レーザーの波長  $\lambda$ 、散乱角  $\theta$  を用いて

$$q = (4\pi n_0 / \lambda) \sin(\theta/2) \quad (3-3)$$

と表される。散乱光強度  $I$  は電場の二乗に比例するので散乱光強度の自己相関関数  $g_2$  は

$$g_2(\tau) = \langle I(t)I(t+\tau) \rangle / \langle I(t) \rangle^2 = 1 + |g_1(\tau)|^2 \quad (3-4)$$

となる。この指数部を  $\tau$  で二次級数展開することにより近似すると、

$$\ln(g_1(\tau)) = -K_1\tau + \frac{1}{2!}K_2\tau^2 - \dots \quad (3-5)$$

となり、

$$K_1 = \langle \Gamma \rangle = \langle D \rangle q^2 \quad (3-6)$$

から平均拡散係数  $\langle D \rangle$  が求められる。 $K_2/K_1^2$  は多分散指数(polydispersity index)と呼ばれ粒径分布の多分散度を示し、一般的にきれいな単分散の系では 0.02 程度の値をとる。最後に Stokes-Einstein の関係式

$$D = kT(6\pi\eta a) \quad (3-7)$$

より粒子のキュムラント平均粒径  $a$  が導出される。ここで  $k$ :ボルツマン定数、 $T$ :絶対温度、 $\eta$ :粘度である[14]。

## 2-4 液中レーザーアブレーション法による蛍光性有機ナノ粒子作製

### 2-4-1 ペリレンジイミド化合物 (BPDI)

レーザー照射前の BPDI 粉末は水晶セルの底に沈んだ状態で、上澄みはほとんど無色であることから BPDI は純水にはほとんど溶解しないと考えられる。波長 532 nm, 10 - 70 mJ/cm<sup>2</sup> のレーザーフルエンスで 10 分間レーザー照射後、無色であった BPDI 懸濁液の色は透明な赤紫色に変化した。Fig. 2-7 (a) に 1 時間静置した後の吸収スペクトルを示す。レーザー照射前の BPDI 懸濁液はピークのないフラットなスペクトル形状であるが、レーザー照射後は BPDI 分子が 490 nm、530 nm に持つ振動構造に対応するようなピークを持つスペクトルが観測された。波長 540 nm における吸光度の照射レーザーフルエンス依存性を Fig. 2-4 (b) に示す。レーザーフルエンス 10 mJ/cm<sup>2</sup> から 20 mJ/cm<sup>2</sup> においてピーク吸光度が立ち上がりを見せており、レーザーアブレーションによるもの粒子化は閾値を持つ現象であることがわかる。また照射光強度が高い場合にピーク吸光度の増加量が大きい。このピーク吸光度の増加は次のように説明できる。Fig. 2-8 に示すように分散している粒子のサイズが大きい場合、粒子はその表面のみで光を吸収し、それ以外の部分は吸収に寄与することができない。しかし大きい粒子が分割され粒子サイズが減少すると、吸収に寄与できる表面積が増加するため吸光度が増加すると考えられる。また粒子のサイズが光のしみ込み深さ程度まで小さくなると粒径の減少に伴う吸光度変化は小さくなり飽和する。つまり Fig. 2-7 における吸光度変化は、以前に示されたフタロシアニンやキナクリドンなどの有機分子の場合と同様に高強度のレーザー照射によって蛍光分子である BPDI 結晶も効率よくナノ粒子化されることを示唆している。Fig. 2-9 に 50 mJ/cm<sup>2</sup> で 60 分間レーザーを照射して作製したナノ粒子の SEM 像を示す。これにより粒径が 50-200 nm の球状のナノ粒子生成が直接確認された。次に BPDI 分子が強い吸収を持たない波長 355 nm で 10-70 mJ/cm<sup>2</sup> のレーザーフルエンスで 10 分間レーザー照射した場合の吸収スペクトルのフルエンス依存性を Fig. 2-10 に示す。波長 355 nm では波長 532 nm のレーザーを照射した場合より明らかに同フルエンスによるレ

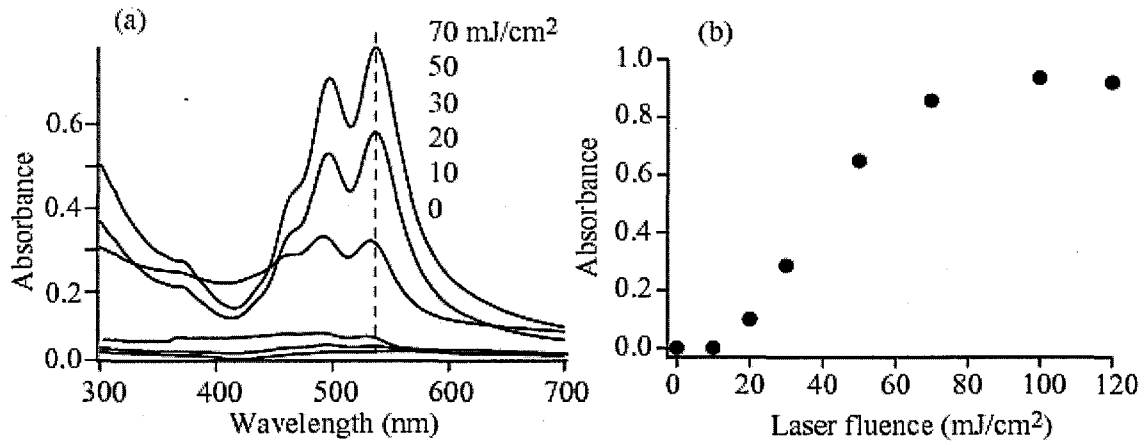


Fig. 2-7 (a) Absorbance spectra of BPDI in water before and after 532 nm nanosecond laser pulses irradiation for 10 minutes at various laser fluence (70, 50, 30, 20, 10 mJ/cm<sup>2</sup>). (b) Laser fluence dependence of the peak absorbance of the supernatant after leaving the solution to settle for 1 hour.

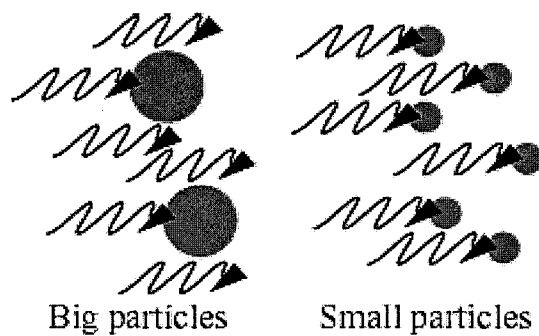


Fig. 2-8 A schematic illustration of light absorption on big and small particles that have same amount of volume.

レーザー照射後の吸光度が低く、また 355 nm、70 mJ/cm<sup>2</sup> の照射条件で作製したコロイド溶液の吸収スペクトルは 532 nm、30 mJ/cm<sup>2</sup> の照射条件で作製したコロイド溶液の吸収スペクトルによく似ている。このことからナノ粒子を構成する分子の光吸収がナノ粒子化に大きく寄与していることが明らかである。

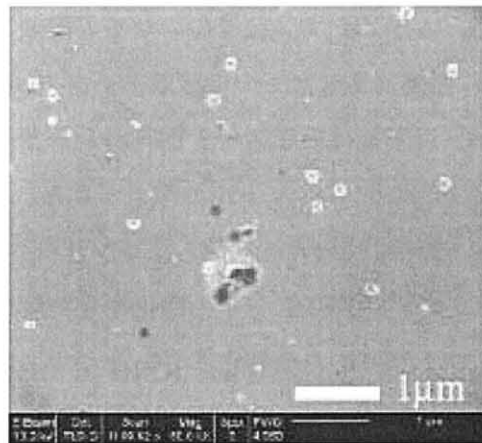


Fig. 2-9 A SEM image of prepared BPD1 nanoparticles by 532 nm laser irradiation at 50 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes. Nanoparticles having 50-200 nm diameters are observed.

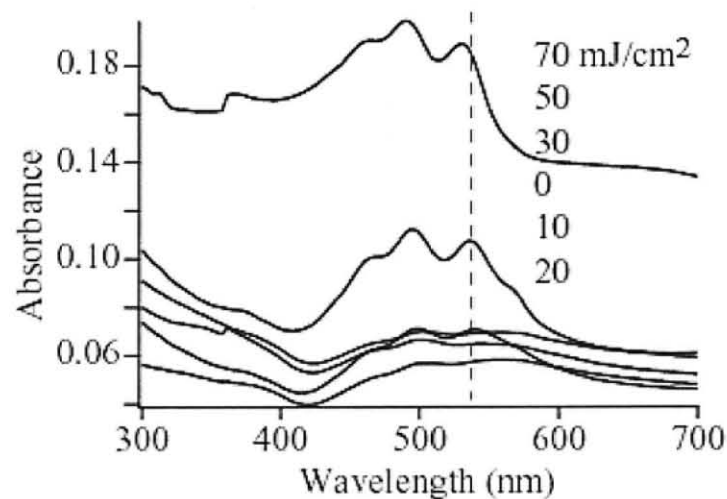


Fig. 2-10 Absorbance spectra of BPD1 in water before and after 355 nm laser irradiation for 10 minutes at various laser fluence (70, 50, 30, 0, 10, 20 mJ/cm<sup>2</sup>).

Hobley らは BPDI と同様に PDI を発色団にもつ PTCDA について波長 355 nm でレーザーアブレーションによるナノ粒子化を行いフルエンス 130  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  以上の非常に高強度のレーザーを照射した場合に効率的なナノ粒子化を観測している[15]。しかし同時に光照射により  $\text{C}_n\text{H}_2$  が生成物として生じることを報告している。波長 532 nm のレーザー照射によって BPDI 分子の光分解がおきていないことを確認するために、30 -100  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 10 分間のレーザー照射により作製した BPDI ナノ粒子のコロイド溶液をデシケーターの中で減圧乾燥させた後、エタノールに再溶解させたものの吸収スペクトルを比較した(Fig. 2-11)。レーザーフルエンス 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  以下では吸収スペクトルがレーザーを未照射のサンプルと一致したが、70  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  では紫外領域にスペクトルの浮きが見られ 100  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  ではスペクトル全体がブロードになっている。これらの結果から、レーザーフルエンスが 70  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  以上の高強度のレーザー照射によって BPDI 分子の酸化や光分解の生じている可能性が示唆されたが、50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  以下では BPDI を分解することなくナノ粒子を作製できることが示された。また生成したナノ粒子の分散安定性を確かめるために、コロイド溶液を 1 日静置し、レーザー照射 1 時間後と吸収スペクトルを比較した。Fig. 2-12 に 50  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  で 10 分間レーザー照射したサンプルの照射後 1 時間と 1 日の吸収スペクトルを示す。1 日静置したあとも吸収スペクトルにほとんど変化はなく、生成された BPDI コロイド溶液は非常に高い分散安定性を有することが明らかになった。

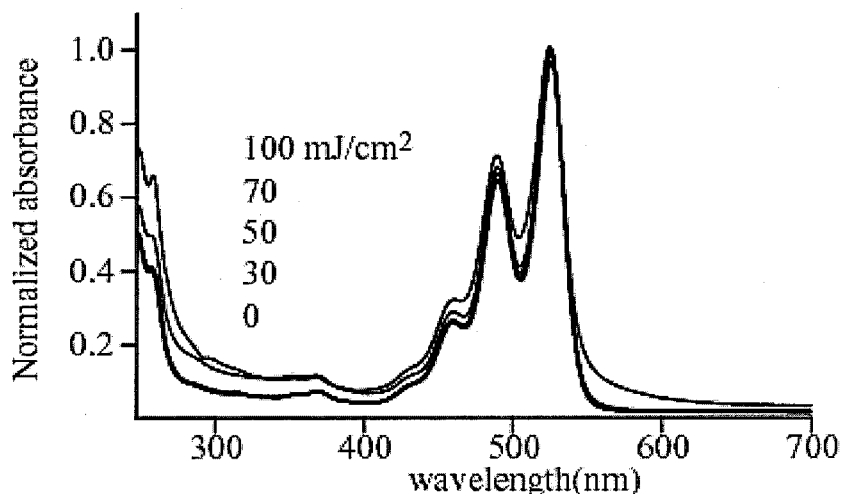


Fig. 2-11 Normalized absorption spectra of BPDI ethanol solution which were prepared by re-dissolved BPDI nanoparticles. BPDI nanoparticles were prepared 532 nm laser irradiation for 10 minutes at 100, 70, 50, 30  $\text{mJ}/\text{cm}^2$ . Fluence 0 corresponds to a no-laser irradiated sample.



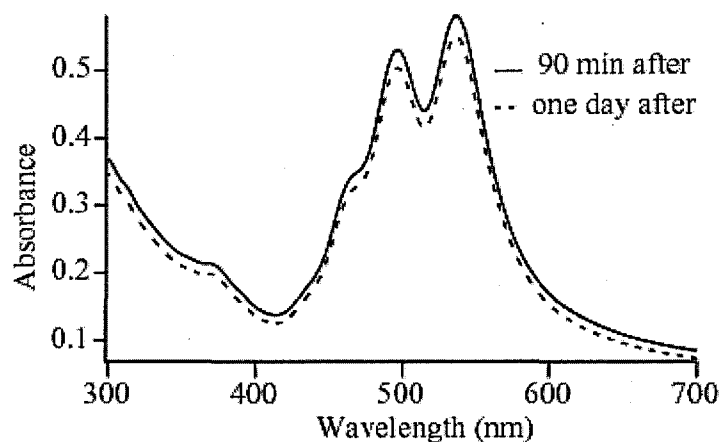


Fig. 2-12 Absorbance spectra of BPDI colloidal solution after leaving 90 minutes (*solid line*) and 1 day (*dashed line*). Colloidal solution were prepared 532 nm laser irradiation for 10 minutes at  $50 \text{ mJ/cm}^2$ .

#### 2-4-2 ペリレンジイミド dendrimer 化合物 (DPDI)

レーザー照射前の DPDI 粉末も BPDI と同様に水晶セルの底に沈んだ状態で、上澄みはほとんど無色であることから DPDI も界面活性剤を含んだ水溶液にはほとんど溶解しないと考えられる。Fig. 2-13 (a, b) に  $10 - 200 \text{ mJ/cm}^2$  のレーザーフルエンスで 10 分間照射後、1 時間静置した状態における吸収スペクトルとピーク吸光度の照射レーザーフルエンス依存性を示す。BPDI と同様に 10 分間のレーザー照射前後で DPDI 懸濁液の色が無色から赤色透明に変化し、フラットなスペクトルから分子と同じ  $570 \text{ nm}$  に振動構造をもつ吸収スペクトルが観測された。また約  $30 \text{ mJ/cm}^2$  を閾値にして、より高いレーザーフルエンスでナノ粒子の生成量が増加することが示された。そこで照射レーザー強度と作製されたナノ粒子のサイズに相関が見られるかどうかを調べた。まず DPDI 粉末の懸濁液にレーザーフルエンス  $50, 100, 150, 200 \text{ mJ/cm}^2$  で 10 分間レーザーを照射してナノ粒子コロイド溶液を作製した。次にナノ粒子化されていない大きな粉末を取り除くために  $3000 \text{ rpm}$  で 10 分間遠心分離を行い、その上澄みの DLS を測定し各レーザーフルエンスで作製されたコロイド溶液の平均粒径  $d$  を測定した。

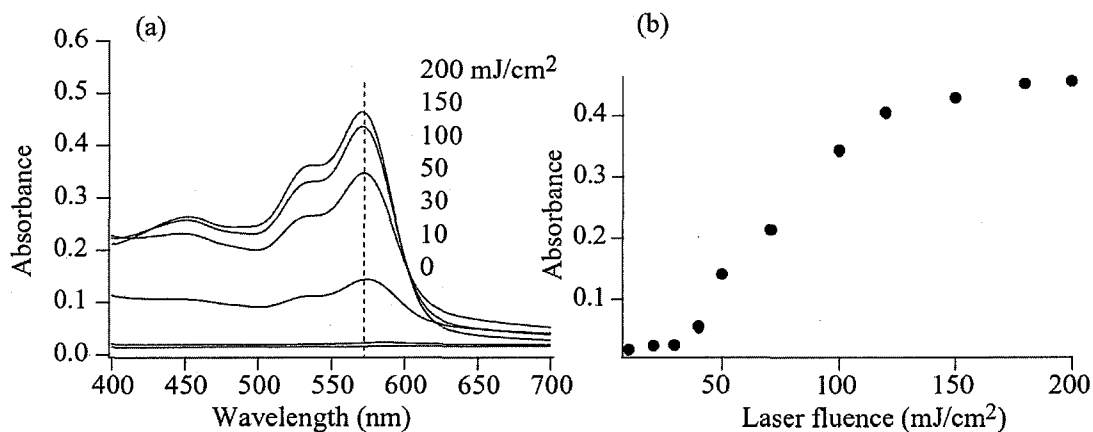


Fig. 2-13 (a) Absorbance spectra of DPDI in water containing 8mM of CHAPS before and after 532 nm laser irradiation for 10 minutes at various laser fluence (200, 150, 100, 50, 30, 10 mJ/cm<sup>2</sup> from the top) (b) Laser fluence dependence of the peak absorbance of the supernatant after leaving the solution to settle for 1 hour.

|        | Laser fluence (mJ/cm <sup>2</sup> ) |         |         |         |
|--------|-------------------------------------|---------|---------|---------|
|        | 50                                  | 100     | 150     | 200     |
| d (nm) | 436                                 | 261     | 177     | 156     |
| (pdi)  | (0.299)                             | (0.229) | (0.207) | (0.103) |

Table 2-1 Mean particles diameter of DPDI colloidal solutions measured by DLS. Colloidal solutions were prepared by 532 nm laser irradiation at fluences of 50, 100, 150, 200 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes.

その結果を Table 1 にまとめる。照射レーザーフルエンスが高くなるにつれて平均粒径と多分散度が小さくなっていることがわかる。粒子表面の急激な温度上昇がナノ粒子化を誘起するというメカニズムから、レーザーフルエンスが高いほど温度上昇も高くなり生成されるナノ粒子も小さくなると考えられる。150 mJ/cm<sup>2</sup> と 200 mJ/cm<sup>2</sup> では平均粒径は大きく変わらないが多分散度が約半分に減少している。これは粒径が 170 nm 程度まで小さくなると溶媒への熱緩和の影響が支配的になり、それ以上の粉碎は生じないが、高いレーザーフルエンスにより効率的にナノ粒子化が起こるために全ての粒子があるサイズへ漸近しているためだと考えられる。Fig. 2-14 (a, b) に 200 mJ/cm<sup>2</sup> で 10 分間レーザーを照射して作製した DPDI ナノ粒子の SEM 像を示す。DPDI のコロイド溶液は界面活性剤を含むため 15000rpm で遠心分離によってナノ粒子を沈殿させた後、上澄みを純水と交換する作業を 3 回繰り返して、界面活性剤を取り除いた。除ききれなかった界面活性剤が析出している中に最小で 50 nm 程度の球状の DPDI ナノ粒子が確認できる。(b)の SEM 像では比較的サイズの大きな長方形の粒子が観察される。このような粒子ではレーザーによって熱せられることで粒子内の分子が運動し、より結晶に近い状態に分子が配列している可能性が示唆される。

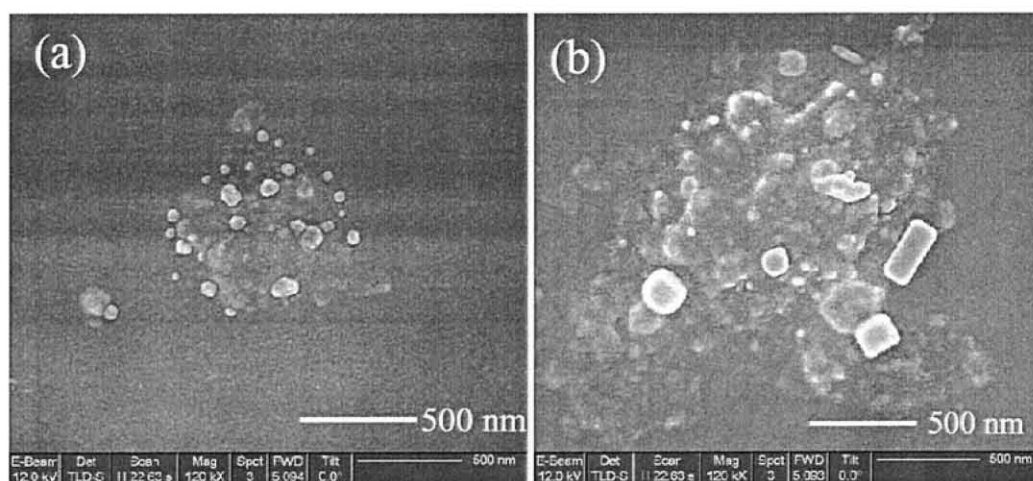


Fig. 2-14 SEM image of DPDI nanoparticles prepared by 532 nm laser irradiation at 200 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes.

DPDI 分子は BPDI 分子よりも複雑な構造をもつ上に効率の良いナノ粒子化のためにはより高いレーザーフルエンスを必要とする。レーザー照射により DPDI ナノ粒子の光分解が生じていないかどうか、70, 120, 200 mJ/cm<sup>2</sup> のレーザーフルエンスで 10 分間レーザーを照射して作製したコロイド溶液の溶媒を蒸発させ、再度エタノールに溶かしなおしたものの吸収スペクトルを比較した。Fig. 2-15 に示すように全てのフルエンスで作製したナノ粒子のエタノール溶液でその吸収バンドの位置が同じであることから可視域においてエタノールに可溶性な光分解物は生じていないと考えられる。またピーク比が異なるが異なる理由として CHAPS の影響が考えられる。CHAPS のエタノールへの溶解度が低いためその溶け残りが散乱として吸収スペクトルに影響を与えている可能性は考えられる。また光生成物がエタノール不要であり散乱に寄与している可能性も考えられるが、いずれにせよ光分解の程度はあまり大きくないと思われる。

DPDI コロイド溶液の関して分散安定性を Fig. 2-16 に示す。150 mJ/cm<sup>2</sup> で 10 分間レーザー照射した DPDI ナノ粒子のレーザー照射 1 時間後と 2 週間後の吸収スペクトルを比較したところ 2 週間後においても吸収スペクトルはほとんど変化せず DPDI コロイド溶液の分散安定性も BPDI コロイド溶液と同様に非常に高いことが明らかになった。これはレーザー照射の効果と共に、水との親和性を高めるために加えた界面活性剤が分散剤として働いている影響も多々あると考えられる。

最後に DBPI と DPDI のナノ粒子化の閾値を比較すると DPDI の閾値が高くなっている。また同じレーザーフルエンスで作製したナノ粒子のサイズは BPDI の方が DPDI よりも小さい。DPDI は DBPI よりも水に浮きやすく、分子構造からも DBPI よりも結晶の密度が小さいと考えられる。そのため温度上昇に伴う体積変化が誘起されにくくナノ粒子化に必要なレーザー強度が上昇し、また作製されるナノ粒子も大きくなったためと考えられる。また詳細は第 3 章で議論するがナノ粒子の蛍光強度を DBPI ナノ粒子と DPDI ナノ粒子で比較したところ DPDI ナノ粒子の蛍光強度のほうが高い。つまり DPDI ナノ粒子ではレーザー照射によって生じた励起状態のエネルギーが BPDI ナノ粒子と比べて効率良く発光に使われ、熱としての緩和するエネルギーが相対的に減少するために、BPDI よりも温度が上昇しにくく、結果としてナノ粒子化の閾値と平均粒径の上昇に影響を与えているのではないかと考えられる。

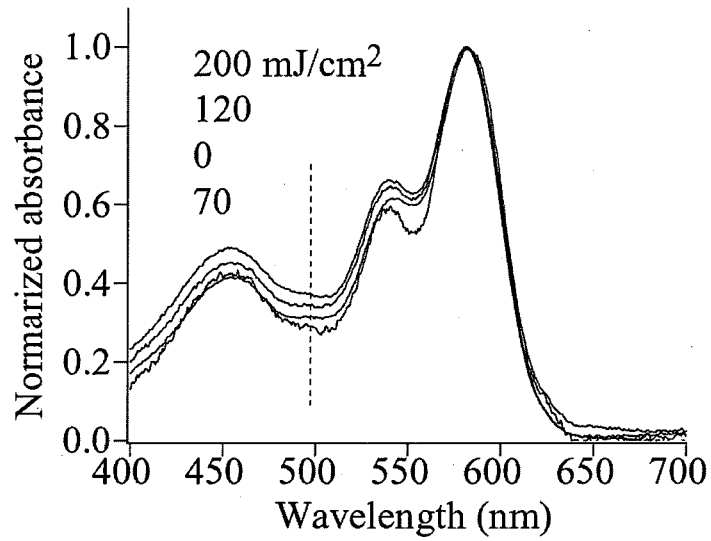


Fig. 2-15 Normalized absorption spectra of DPDI ethanol solution which were prepared by re-dissolved DPDI nanoparticles. DPDI nanoparticles were prepared 532 nm laser irradiation for 10 minutes at 200, 120, 0, 70 mJ/cm<sup>2</sup> from top.

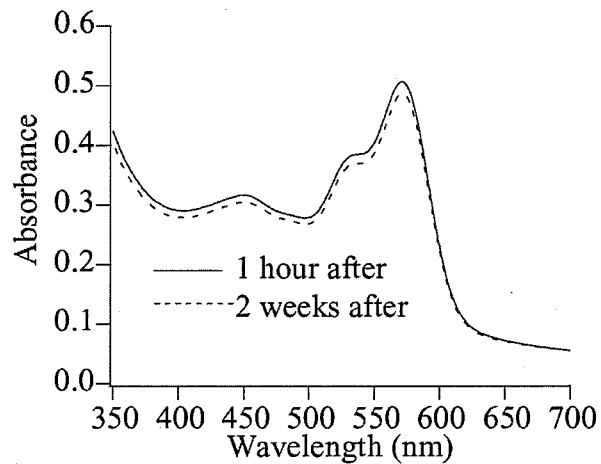


Fig. 2-16 Absorbance spectra of DPDI colloidal solution after leaving 60 minutes (*solid line*) and 2 weeks (*dashed line*). Colloidal solution was prepared 532 nm laser irradiation for 10 minutes at 150 mJ/cm<sup>2</sup>.

## 2-4-3 添加物効果

DPDI ナノ粒子を作製する時には界面活性剤を使用した。界面活性剤がナノ粒子生成に影響を与えているかどうかを調べるために二種類の界面活性剤を用いてナノ粒子化を行い、それぞれの吸収スペクトル変化を比較した。界面活性剤には非イオン性の CHAPS と陰イオン性のラウリル硫酸ナトリウム(SDS)をともに臨界ミセル濃度(8mM)の条件で実験を行った。Fig. 2-17(a)に 100 mJ/cm<sup>2</sup>で 10 分間レーザーを照射した場合の DPDI-CHAPS と DPDI-SDS の規格化した吸収スペクトルを示す。CHAPS を用いた場合は波長 570 nm あたりよりも短波長がわが SDS を用いた場合に比べてスペクトルが浮いている。これは第 3 章で詳細を述べる散乱の影響によるものと考えられ、SDS を用いた場合の方が同じレーザーフルエンスでもより小さなナノ粒子が生成することを示唆している。また Fig. 2-17(b)に示すように、ナノ粒子化の閾値を比較すると SDS を用いた場合の方がナノ粒子化の閾値が低く、効率良くナノ粒子化が起きていることが分かる。

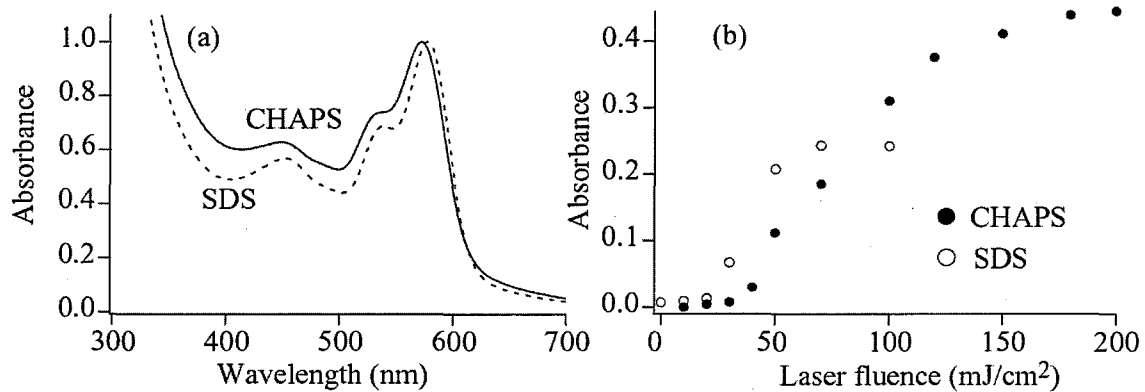


Fig. 2-17 (a) Normalized Absorbance spectra of DPDI colloidal solution with CHAPS and SDS prepared by 532 nm laser irradiation at 100 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes. (b) Laser fluence dependences of the peak absorbance of the supernatant after leaving the solution to settle for 1 hour.

Li らはバナジルフタロシアニンの液中レーザーアブレーションにおいても界面活性剤がナノ粒子化を促進することを確認し、また界面活性剤使用時に結晶を高温にした場合に見られる相転移が観測されたことから界面活性剤がナノ粒子表面からの熱拡散を抑制していると報告している[16]。本実験でも SDS がより溶媒の熱拡散を抑制した結果、高いナノ粒子生成効率が得られたのではないかと考えられる。しかしながら最終的な吸光度は CHAPS を用いた場合の方が大きくナノ粒子の生成量は CHAPS 溶液の方が多い。ピークにおける散乱の影響は双方で大きな差は無いのでナノ粒子の粒径が小さくなるほど吸収への寄与が増大し SDS を用いた場合のほうが高い吸光度を有するはずだが実験結果はこれに矛盾する。これはおそらく SDS では凝集によりナノ粒子が沈殿しているのではないかと考えられるが沈殿物の量は肉眼ではその差は確認できなかった。この界面活性剤の効果を明らかにするためにはこれから双方のサイズ、分散安定性などの詳細を比較する必要がある。

### 2-5 まとめ

本章では液中レーザーアブレーション法によりペリレンジイミドを発色団にもつ2種類の蛍光性化合物 BPDI、DPDI のナノ粒子を作製した。吸収スペクトル測定と SEM 測定から蛍光性分子また dendrimer のような複雑な分子構造をもつ化合物においてもレーザーアブレーション法によってほとんど光分解を起こすことなく、分散安定性の高いナノ粒子生成が可能であることが示され、ナノ粒子化の生成効率のレーザー波長とフルエンス依存性測定により、BPDI、DPDI 分子の光吸収がナノ粒子化に重要な役割を果たすことが明らかになった。DPDI コロイド溶液の DLS 測定結果より照射レーザーフルエンスを 50、100、150、200  $\text{mJ}/\text{cm}^2$  の時の作製されたナノ粒子の平均粒径がそれぞれ 436、261、177、156 nm であることが示され、レーザーフルエンスを変化させることによって粒径の制御が可能であることが明らかになった。更に DPDI 懸濁液に添加した分散剤、SDS と CHAPS でナノ粒子化の効率を比較したところ、分散剤の差によってナノ粒子化の効率に大きな差が生じることが明らかになった。これまでにレーザーのパルス幅をフェムト秒にすることでより粒径の小さいナノ粒子が生成することが報告されており[17]、今後ナノ粒子化の条件に関するパラメーターとしてレーザーの波長と強度以外にパルス幅や分散剤も変化させることで、より柔軟に生成するナノ粒子のサイズや結晶相を制御することが可能になると考えられる。

参考文献

- [1] Y. Tamaki, T. Asahi, H. Masuhara; *J. Phys. Chem. A* **106** (2002) 2135.
- [2] H. -G. Jeon, T. Sugiyama, H. Masuhara, T. Asahi; *J. Phys. Chem. C* **111** (2007) 14658.
- [3] H. Mollet, A. Grubenmann, *Formulierungstechnik* (Wiley-VHC, Weinheim, 1997)
- [4] M. Boutonnet, J. Kizling, P. Stenius, G. Maire; *Colloid Surfaces* **5** (1982) 209.
- [5] A. Ibanez, S. Maximov, A. Guiu, C. Chaillout, P. L. Baldeck, *Adv. Mater.* **10** (1998) 1540.
- [6] H. Kasai, H. S. Nalwa, H. Oikawa, S. Okada, H. Matsuda, N. Minami, A. Kakuta, K. Ono, A. Mukoh, H. Nakanishi; *Jpn. J. Appl. Phys.* **31** (1992) L1132.
- [7] K. Baba, H. Kasai, S. Okada, H. Oikawa, H. Nakanishi; *Jpn. J. Appl. Phys.* **39** (2000) L1256.
- [8] T. Asahi, T. Sugiyama, H. Masuhara, *Acc. Chem. Res.* In press (2008)
- [9] 朝日剛、柚山健一、杉山輝樹、増原宏、レーザー研究、**33** (2005) 41
- [10] Y. Yamada; *Jpn. J. Appl. Phys.* **35** (1996) 1361.
- [11] Y. Hosokawa, M. Yashiro, T. Asahi, H. Fukumura, H. Masuhara; *Appl. Surf. Sci.* **192** (2000) 154.
- [12] Y. Tamaki, T. Asahi, H. Masuhara; *Jpn. J. Appl. Phys.* **42** (2003) 2725.
- [13] J. Q. Qu, N. G. Pschirer, D. J. Liu, A. Stefan, F. C. De Schryver, and K. Müllen; *Chem. Eur. J.* **10** (2004) 528.
- [14] R. Pecora; *Dynamic Light Scattering* (Plenum Press, New York, 1985)
- [15] J. Hopley, T. Nakamori, S. Kajimoto, M. Kasuya, K. Hatanaka, H. Fukumura, S. Nishio; *J. Photochem. Photophys.* In press (2007).
- [16] B. Li, T. Kawakami, M. Hiramatsu; *Appl. Surf. Sci.* **210** (2003) 171.
- [17] T. Sugiyama, T. Asahi, H. Masuhara; *Chem. Lett.* **33** (2004) 724.



## 第3章

### ナノ粒子コロイド溶液における消光・蛍光スペクトル

#### Size dependent optical properties of nanoparticle colloidal solutions

---

##### 3-1 緒言

有機ナノ粒子の吸収・蛍光スペクトルのサイズ依存性がこれまでにいくつか報告されており、サイズ効果の原因として、バルクとナノ粒子では分子間の電子相互作用が異なることが議論されてきた[1]。しかし、ナノ粒子のコロイド溶液では光の散乱の影響があるために、一般的な吸収スペクトル測定によって得られるのは吸収スペクトルではなく吸収と散乱の寄与を合わせた消失スペクトルである[2]。またナノ粒子では分子やバルク固体とは異なり表面の寄与が大きいため、表面の効果を考慮する必要がある。このような、ナノ粒子の散乱、表面、また作製法の及ぼす影響まで考慮した詳細な光学特性の解明は、蛍光性ナノ粒子を実際に材料として応用する場合に必要不可欠である。本章ではレーザーアブレーションによって作製した、分子構造は異なるが同じ発色団をもつ BPDI と DPDI ナノ粒子コロイド溶液に関してナノ粒子の吸収・蛍光スペクトルをそれらの分子の吸収・蛍光スペクトルと比較することで、分子構造の差が生み出す分子間相互作用の観点からナノ粒子の光学特性を議論する。また DPDI コロイド溶液に関して、平均粒径に依存した散乱の寄与を考慮し、DPDI ナノ粒子の消光・蛍光スペクトルの変化を、Mie 理論を用いたシミュレーション結果を用いて説明する。次にナノ粒子の表面の効果に着目し、表面における周辺環境との相互作用とサイズの減少に伴う蛍光強度の相関を述べ、ナノ粒子での励起エネルギー移動と蛍光消光を議論する。最後にナノ粒子作製時に照射する高強度レーザーパルスがナノ粒子の蛍光特性に与える影響を考察する。

##### 3-2 有機固体の励起状態

ペリレンジイミド(PDI)は光安定と蛍光量子収率が高く、有機発光ダイオードや単一分子分光などにも用いられる蛍光分子である。しかし固体状態ではエキシマーと呼ばれる励起状態における二量体を形成し蛍光量子収率の低下を引き起こす。ここではナノ粒子の発光

挙動を理解するために、有機結晶固体における吸収・発光スペクトルの一般的な特性を概説する[1,2]。

結晶中のある格子点 A の分子が励起されたとき、励起状態が非局在化しエネルギーの損失なしに結晶中を自由に動き回れる状態を励起子（エキシトン）と呼ぶ。同種分子の二量体の励起状態を考え、2 つの分子の基底状態の波動関数をそれぞれ $\Psi_1$ 、 $\Psi_2$ 、電子励起状態の波動関数を $\Psi_1^*$ 、 $\Psi_2^*$ とする。このとき二量体の基底状態の波動関数 $\Psi_g$ は近似的に

$$\Psi_g = \Psi_1 \Psi_2 \quad (3-1)$$

となる。2分子のうちどちらか片方の分子が電子励起されたとすると、分子間相互作用が大きいときには励起状態は分子振動や分子間振動に乱されることなく波動関数のコヒーレンスを保ったまま 2 分子間を移動する。このような励起状態がコヒーレンスを保ったまま 2 分子間を移動する波動関数は

$$\Psi_{\pm} = (1/\sqrt{2})(\Psi_1 \Psi_2^* \pm \Psi_1^* \Psi_2) \quad (3-2)$$

とあらわされる。これが励起子である。ここで、2分子間の相互作用エネルギー演算子を  $V$  とおくと、2つの波動関数 $\Psi_{\pm}$ のエネルギーはそれぞれ、

$$E_{\pm} = E_0 \pm \beta \quad (3-3)$$

$$\beta = \langle \Psi_1 \Psi_2^* | V_{12} | \Psi_1^* \Psi_2 \rangle \quad (3-4)$$

となる。ここで $\beta$ は共鳴エネルギーと呼ばれ分子間相互作用の大きさを表し、二量体の励起状態は異なる2つのエネルギー準位に分裂する。この時の分子間相互作用は共鳴励起移動（交換）によるものであり共鳴エネルギー $\beta$ の大きさは対応する遷移振動子強度  $f$  と分子間の距離  $r$  および 2 分子の遷移双極子の幾何学的配置 $\theta$ に依存する。Davydov は共鳴励起移動速度を 2 つの遷移双極子-双極子相互作用から導出し、共鳴エネルギーに次式を用いて分子励起の理論を展開した。

$$\beta \propto f \cdot \cos(\theta) \cdot r^{-3} \quad (3-5)$$

この二量体モデルを用いて、分子間相互作用が吸収バンドのシフトとピークの分裂を起こすことが説明できる。2つの分裂した励起準位への光励起が許容遷移になるか禁制遷移になるかは2分子の配向によってFig2-1に示す3通りが考えられる。2つの遷移双極子が直列配向のときには高エネルギー準位への遷移は互いの双極子が打ち消しあうために禁制となり、低エネルギーへの遷移のみが観測される。すなわち二量体の吸収バンドは孤立分子に比べ長波長側にシフトする。逆に平行配置のときには、高エネルギー準位への遷移が許容となり、吸収バンドは短波長側へシフトする。2つの双極子がななめに配向する場合は両方の準位への遷移が許容となる。孤立分子の吸収バンドが2つに分裂するこの現象は Davydov 分裂と呼ばれる。この二量体モデルを3次元の結晶に拡張すると励起子のエネルギー準位は

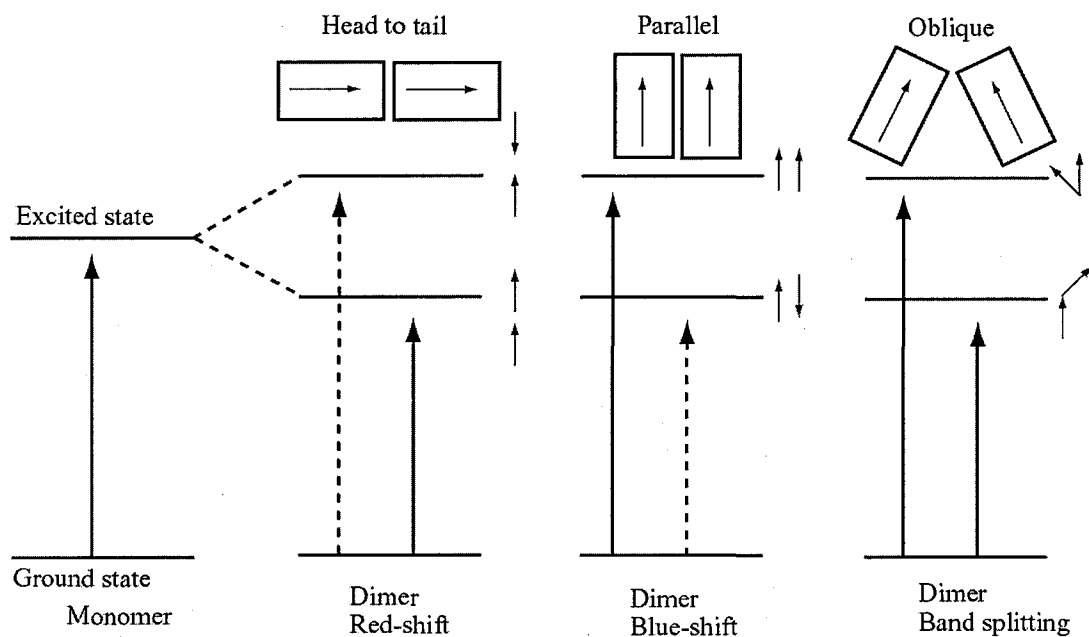


Fig. 3-1 Diagrams for exciton band structure in molecular dimers with various geometrical arrangements of transition. Transitions shown by dashed line mean forbidden transitions.

孤立分子の遷移エネルギー $E_0$ を中心とした $\pm B(=2\beta)$ の幅の中に連続した励起子帯と呼ばれるバンドを形成する。また励起子帯のバンド幅の大きさは共鳴エネルギー移動の大きさ、つまり隣接2分子間の共鳴励起移動速度 $K$ に依存し次式が成り立つ。

$$K = 2|\beta|/\hbar \quad (3-6)$$

この式(6)で表されるように共鳴励起移動の速さは共鳴エネルギーの大きさ、すなわち遷移双極子の大きさ、分子間の距離と配向に強く依存する。

ここまで孤立分子の波動関数として分子間振動の影響は考慮していない電子波動関数を用いて説明したが、実際は分子の電子励起スペクトルには振動準位に対応した振動構造が観測されるため、より厳密な取り扱いでは分子間振動を考慮した振電波動関数を使う必要がある。上で述べたように励起子帯の幅は共鳴励起移動の速さで決まるため励起移動速度と分子振動の速さの関係によって励起子の吸収スペクトル形状が大きく変わる。ここでは振電相互作用を考慮した場合、励起子相互作用の大きさと吸収スペクトルの関係を、励起子帯の幅( $2B$ )と分子内振動エネルギー( $\hbar\omega$ )の大小関係によって次の4つに分類し整理する。

強結合(strong-coupling): $2B \gg \hbar\omega$

励起移動は分子振動よりずっと速く起こる場合、励起子は多数の分子間を迅速に動き回り、この電子励起状態の波動関数に従って、各分子内の核配置がもとの孤立分子とは異なる平衡位置を取る。つまり振電波動関数が増変し吸収スペクトルの振動構造が孤立分子から大きく変化する。結晶や多数分子の会合体では光吸収の選択則の関係から非常に鋭い一本の吸収バンドのみが観測されることになる。このような強結合状態は分子のモル吸光係数が $10^5 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ のような非常に強い吸収帯のときに起こる。

弱結合(weak-coupling): $2B \ll \hbar\omega$

励起移動が分子振動よりずっと遅く起こる場合は孤立分子の振電波動関数がよい近似となり、各分子の同じ振動準位間で電子励起移動が起こる。従って励起子の吸収スペクトルはもとの孤立分子に非常に近くその吸収バンドがわずかにシフトする。分子のモル吸光係数が $10^3 \text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$ 以下の弱い吸収帯に相当する。

#### 中間結合(intermediate-coupling)

強結合と弱結合の中間で異なる振動準位間でもエネルギーが近ければ共鳴励起移動が起こる。その結果、励起子の吸収スペクトルは孤立分子のスペクトルとは形状が変化するが、強結合のように1つの吸収バンドにはならず、複雑な振動構造が観測される。

#### 非常に弱い結合(very weak-coupling)

Forester の励起エネルギー移動と呼ばれ、分子間の相互作用は弱く、吸収スペクトルは孤立分子と一致する。この場合の励起移動の機構は遷移双極子とそれによる誘起双極子との相互作用によるもので励起移動速度が分子間の距離の6乗に反比例する。

励起子の運動を考えると上記の説明から励起子が多数の分子の間を自由に動き回っているかのような印象を与えるが、実際は励起子は格子振動（フォノン）や格子欠陥と衝突しエネルギーをやりとりするため励起子の運動は格子の運動と密接に関係する。励起子は励起バンド幅  $2B$  と格子振動のエネルギー  $\varepsilon$  との大小関係、あるいはこれと等価な分子間の共鳴励起エネルギー速度  $K$  と格子振動数  $\omega$  との関係によって、自由励起子と局在励起子に大別できる。これに加えて、格子構造・運動と励起子との関係から励起子の状態は次の4種に分類できる。

#### 自由励起子: $B \gg \varepsilon, K \gg \omega$

格子振動の時間よりずっと速く励起子が移動する場合で励起子が多数の分子に非局在化している。このような場合でも格子振動や、格子欠陥との衝突のため励起子の波動関数がコヒーレンスを保っている時間は極めて短く分子性結晶では一般に  $10^{-4}$  秒より短い。つまり有機結晶では励起子が非局在化している範囲は大きくてもせいぜい10分子程度である。このような励起子は孤立分子での光吸収が許容遷移である励起一重項状態の場合に相当する。

#### 局在励起子: $B \ll \varepsilon, K \ll \omega$

励起移動速度が格子振動によって律速される。つまり、自由励起子とは対照的に励起子は1分子に局在し励起子の運動は完全に非コヒーレントである。禁制遷移である三重項励起子が典型的な例である。

#### 自己束縛励起子

励起子がある格子点の周りの結晶格子を局所的に歪ませ、その周りで格子の平行位置が変化する場合がある。その歪みの結果励起状態のエネルギーが安定化されると励起子はその格子点に捉えられる。このような励起子を自己束縛励起子とよび、有機結晶ではピレン、ペリレン結晶で観測されるエキシマー状態が有名である。

#### 格子欠陥、不純物での束縛励起子

完全な結晶というのは現実には存在せず、不純物や欠陥が混入する。その周辺では分子の距離や配向が乱れるので分子間の励起移動速度が大きく変わることが予測され、多くの場合欠陥では励起移動速度が遅くなり、励起子がそこに補足される。また不純物として励起状態のエネルギーが低い分子が存在するとその分子が励起子を補足し励起子の移動はとまってしまう。

自由励起子と局在励起子・束縛励起子の大きな違いは拡散係数の温度依存性として観測される。自由励起子ではコヒーレントな励起子の運動がフォノンとの衝突で妨げられるため、低温であるほど格子振動の影響が小さくなり励起子は結晶中を速く伝わる。一方局在励起子や束縛励起子ではその運動はあるサイトからの別のサイトへのホッピングになる。ひとつのサイトから別のサイトに移るには活性化エネルギーが必要なため、励起子の移動速度は低温ほど遅くなる。

結晶からの蛍光スペクトルは吸収スペクトルと鏡像関係の蛍光スペクトルが期待される。しかしほとんどの場合で、結晶状態ではほとんど蛍光をださないか、もしくは大きなストークスシフトを持ったブロードな蛍光を発する。このブロードな蛍光はエキシマー発光と呼ばれ上記の自己束縛励起子からの発光である。電子励起された後、ある一对の分子間距離が近接しエキシマーを形成すると、励起状態のエネルギーが自由励起子帯の底の準位よりも低くなり励起子がそこに捕らえられ安定化する。2分子間の距離の近接と格子の歪みは一般に格子エネルギーの不安定化を引き起こすと考えられるが、それ以上にエキシマー形成による電子状態の安定化のほうが勝るため全体としてエキシマーのエネルギー準位が自由励起子よりも低くなる。Fig 2-2 にこの様子をポテンシャルエネルギー図で表す。エキシマーの周辺ではその格子も歪みエキシマー状態の安定な格子位置は基底状態のそれとはずれた位置になる。孤立分子の励起状態準位に対するエキシマー生成に伴う安定化エネルギーを格子緩和エネルギーとよび、これが励起子帯のバンド幅の半分より大きいとき自己束縛励起子が生成する。エキシマーを形成する2分子のみに着目すればこの状態は強結合励起子と言え、元の分子とは大きく異なる蛍光スペクトルとなる。またエキシマー形成時にこの二量体の双極子が並列配置にある場合は励起子バンドの底は励起一重項状態の準安定状態に対応し、この状態から基底状態への遷移は禁制であるためにエキシマーからの発光効率は通常非常に低いものとなる。

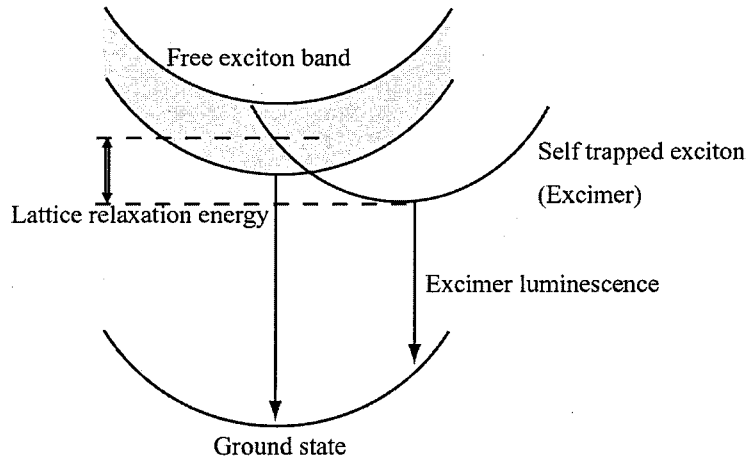


Fig. 3-2 Schematic adiabatic potential diagrams.

### 3-3 ナノ粒子の吸収スペクトル

サンプルとして BPDI、DPDI 用いそれぞれ純水中、8mM-CHAPS 水溶液中でレーザーアブレーション法により蛍光性ナノ粒子を作製した(第2章参照)。Fig. 3-3 (a, b)に BPDI、DPDI コロイド溶液とそれぞれ  $2\mu\text{M}$  のエタノール、アセトン溶液の吸収スペクトルを示す。コロイド溶液は BPDI では  $532\text{ nm}$ 、 $100\text{ mJ/cm}^2$  で 10 分間、DPDI は  $532\text{ nm}$ 、 $200\text{ mJ/cm}^2$  で 10 分間レーザーを照射して作製した。BPDI のコロイド溶液はエタノール溶液と比較してピークバンドが長波長方向に  $10\text{ nm}$  程度シフトしており、また第1ピークと第2ピークのピークが大きく変化している。DPDI コロイド溶液ではアセトン溶液と比較して  $1\text{ nm}$  程度短波長側にシフトしておりピークも変化しているが BPDI と比べるとその変化は小さい。双方のコロイド溶液共に特徴的であるのが吸収スペクトルの幅が横に広がり、溶液では吸収のないピークバンドよりも長波長側にかけて吸収の裾が広がっていることである。

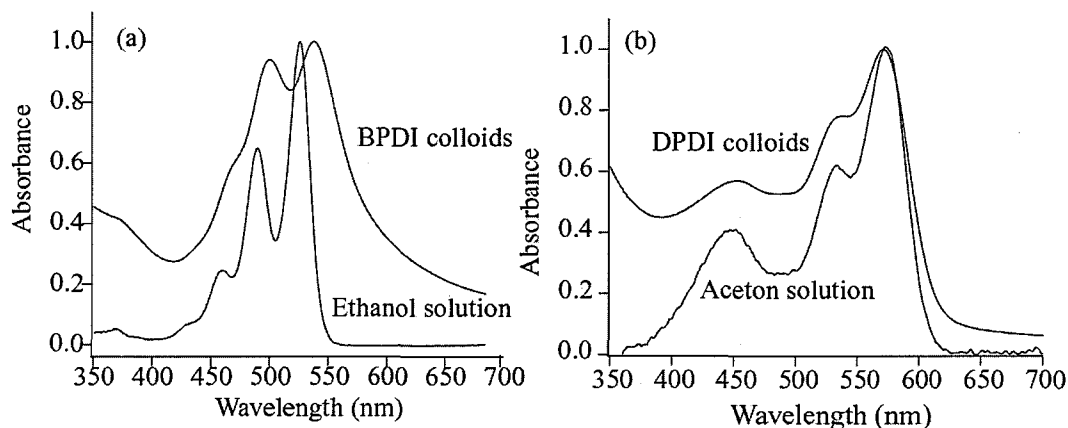


Fig. 3-3 (a) Absorbance spectra of the BPD colloidal solution prepared by 532 nm laser irradiation at  $100 \text{ mJ/cm}^2$  for 10 minutes and that of the  $2\mu\text{M}$  ethanol solution. (b) Absorbance spectra of the DPDI colloidal solution prepared by 532 nm laser irradiation at  $200 \text{ mJ/cm}^2$  for 10 minutes and that of the  $2\mu\text{M}$  acetone solution.

Fig. 3-4 に 50, 100, 150, 200  $\text{mJ/cm}^2$  のレーザーフルエンスで 10 分間レーザーを照射して作製した DPDI コロイド溶液のピーク吸光度で規格化したスペクトルを示す。コロイド溶液に含まれるナノ粒子の平均粒径はそれぞれ 436 nm、261 nm、177 nm、156 nm である。どのフルエンスで作製した試料においても波長約 620 nm 以上の DPDI 分子が吸収をもたない領域に吸収が観測されている。また平均粒径が大きいほどこの波長域での吸光度が相対的に大きい。一方、照射レーザー光強度が高い、即ちコロイドの平均粒径が小さいほど吸収ピークの波長が短波長にシフトしていることがわかる。ここで気をつけなければいけないことは、通常の吸光度計を用いて測定されたコロイド溶液の吸光度が、ナノ粒子の吸収と散乱の和であるということである。つまりコロイド溶液の吸収係数  $\alpha_{ext}$  は吸収係数  $\sigma_{abs}$  と散乱係数  $\sigma_{sca}$ 、粒子数  $N$  を用いて次式で表される。

$$\alpha_{ext} = N(\sigma_{abs} + \sigma_{sca}) = N\sigma_{ext} \quad (3-7)$$

ここで  $\sigma_{ext}$  とは消失係数であり  $\sigma_{abs}$  と  $\sigma_{sca}$  の和となり吸収係数と散乱係数の 2 因子の相対的な寄与によってコロイド溶液の吸光度が変化する。粒子径が大きくなるほど散乱の相対的な寄与が大きくなることが知られており、レーザーフルエンスを変化させて作製したコロ



イド溶液のスペクトル変化はナノ粒子の平均粒径の違いによる光散乱の寄与の変化のためであると考えられる。すなわち BPDI、DPDI コロイド溶液に見られるスペクトルの幅の広がりや長波長領域の吸収の裾はナノ粒子の散乱の影響によるものだと考えられる。次節でこの点について詳細に議論する。

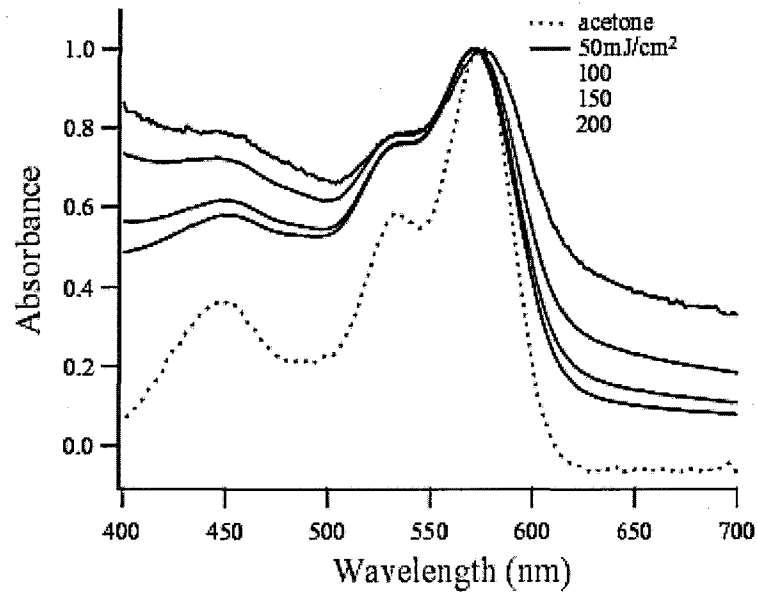


Fig. 3-4 Normalized absorption spectra of DPDI colloids prepared by 532 nm laser irradiation at 50-200 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes (solid line: 50, 100, 150, 200 mJ/cm<sup>2</sup> from above) and 2 μM acetone solution (dashed line).

## 3-4 Mie 散乱理論による消失スペクトルシミュレーション

コロイド溶液の平均粒径の変化に伴う光消失、散乱、吸収スペクトルの詳細を議論するために Mie 理論に基づいたスペクトルのシミュレーションを行った[3]。シミュレーションのために必要なパラメータである DPDI ナノ粒子の複素屈折率は次のようにして求めた。まず DPDI のアセトン溶液の吸収スペクトルを測定し、式(3-8)を用いて複素屈折率の虚数部分の値  $\kappa$  を求めた。

$$\kappa = \frac{\lambda}{4\pi} \varepsilon c \quad (3-8)$$

ここで  $\varepsilon$  と  $c$  はそれぞれ溶液の吸収係数とナノ粒子における DPDI 分子の濃度である。ここで DPDI ナノ粒子では、嵩高いデンドロンによって発色団同士に物理的な隔りがあるために電子的な相互作用が抑制されており、溶液とナノ粒子の吸収係数はほとんど変化しないと仮定する。またナノ粒子における DPDI 分子の濃度は比重を 1.5 と仮定し  $0.58 \text{ mol/dm}^3$  とおいた。次に求められた  $\kappa$  の値を用いて

$$n(\lambda) = \int_0^{\infty} \frac{\kappa(\lambda')}{\lambda(1 - (\lambda/\lambda')^2)} d\lambda' + n_0 \quad (3-9)$$

で与えられる Kramers-Kronig の関係式より複素屈折率の実部  $n$  を導出した。ここで  $n_0$  は無限遠の波長領域における屈折率でここでは 1.6 とおいた。ナノ粒子の形状を球形とし、Bohren、Huffman らのアルゴリズムを用いて  $\sigma_{\varepsilon\tau}$ 、 $\sigma_{abs}$ 、 $\sigma_{sca}$  を計算した。

DPDI についての計算から求められた複素屈折率と粒径 500 nm から 50 nm の光消失、散乱、吸収スペクトルの粒径依存性を Fig. 3-5 (a-d) に示す。測定されたおよそ 400 nm から 150 nm の平均粒径を持つコロイド溶液の消失スペクトルは平均粒径が大きくなるほど顕著に長波長領域に吸収の裾を示し、粒径の減少に伴い吸収の裾がなくなりピークが 10 nm 程度短波長にシフトしている。一方 Mie 理論によって計算した消失スペクトルも同様に粒径が大きくなるほど顕著に長波長領域に吸収の裾を示し、粒径の減少に伴い吸収の裾がなくなりピークが短波長にシフトしている。散乱と吸収効率のシミュレーション結果を見ると散乱効率は粒径が大きくなるにつれて長波長領域の寄与が増大し、スペクトル形状も変化しているが吸収効率は全体的な寄与が低下するのみでスペクトル形状は変化していない。この結果より消失スペクトルの粒径依存性を与えているのは主に散乱の寄与の変化であり、DPDI ナノ粒子の真の吸収スペクトルは粒径によって変化せず溶液の吸収スペクトルと大きく異ならないと結論づけられる。

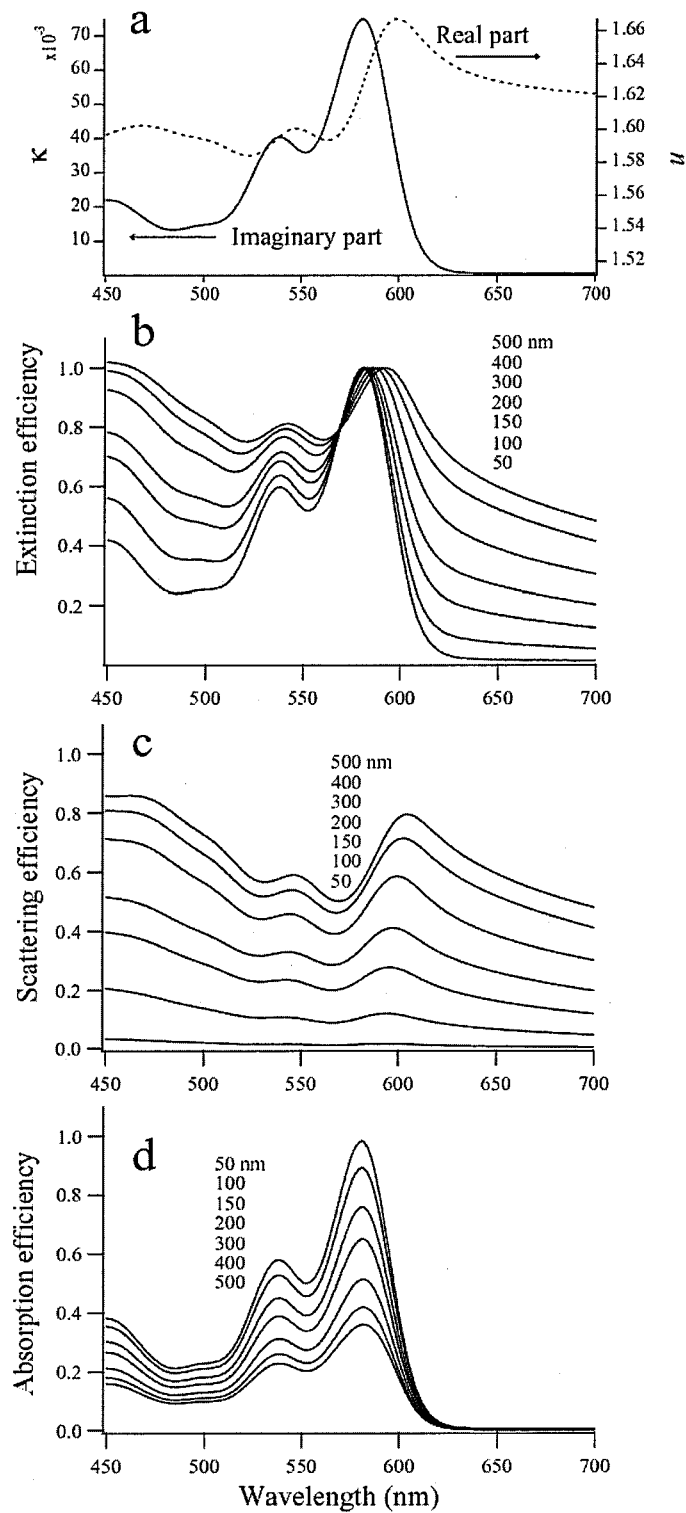


Fig. 3-5 Mie theory simulation for various sized DPDI spherical nanoparticles. (a) Complex refractive index ( $n + ik$ ) of DPDI in the solid state. (b) extinction, (c) scattering, and (d) absorption efficiency. Particle sizes are given in the figure.

BPDI に関しても BPDI の厚さ 10 nm の蒸着膜から得られた吸収スペクトルを用いて DPDI と同様の手順により複素屈折率を計算し  $\sigma_{ext}$ 、 $\sigma_{abs}$ 、 $\sigma_{sca}$  を計算した。Fig. 3-6 に計算によって得られた粒径 50 nm から 250 nm での消失スペクトルを示す。粒径が小さい場合には計算で得られた消失スペクトルは実験によって得られた消失スペクトルとよく似ている。(第 2 章 Fig. 2-7 参照) しかし実験では粒径の現象に伴い長波長側のピークがより長波長へシフトする傾向があるのに対して計算結果では逆に短波長側にシフトしている。この実験結果と計算結果のスペクトルの差異は BPDI の消失スペクトルは粒径の変化に伴う散乱の寄与の変化では説明できないことを示唆している。BPDI の溶液とナノ粒子のスペクトルが異なることから BPDI ナノ粒子では発色団間の電子相互作用が存在すると考えられ、ナノ粒子のサイズの変化による電子相互作用の変化が、吸収係数も変化させたのではないかと考えられる。

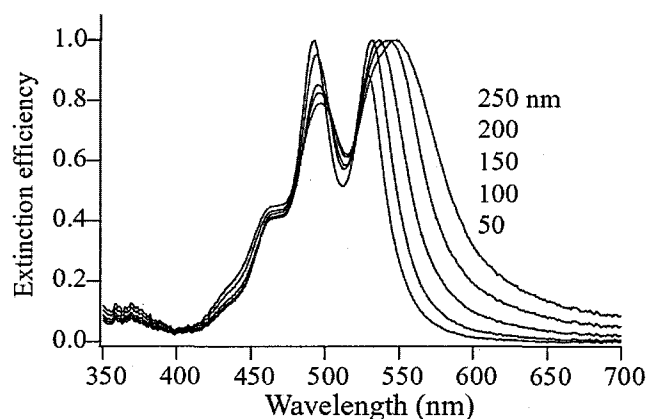


Fig. 3-6 Extinction efficiency of various sized BPDI spherical nanoparticles simulated by Mie theory.

### 3-5 蛍光強度・スペクトルの粒子サイズ依存性

BPDI のコロイド溶液とエタノール溶液、DPDI のコロイド溶液とアセトン溶液の蛍光スペクトルを Fig. 3-7 (a, b) に示す。BPDI コロイド溶液の蛍光スペクトルはエタノール溶液と比較して 70 nm 程度長波長にシフトしており、スペクトルの振動構造も失われている。これは BPDI 薄膜においても観察される典型的な固体状態のエキシマー発光であり、ナノ粒子内部において励起状態の BPDI 分子が強く相互作用していると考えられる。またエキシマー

の形成に伴い蛍光強度もエタノール溶液と比べて 100 分の 1 以下にまで低下した。DPDI コロイド溶液ではアセトン溶液と同様の蛍光スペクトルを示し、エキシマー発光は観測されなかった。このことから DPDI ナノ粒子においては嵩高いデンドロン基によって発色団間の電子相互作用が抑制されていることがわかる。しかし、溶液と比較して蛍光ピークが 10 nm 程度長波長シフトしていることから非常に弱い電子相互作用により、蛍光ピークがシフトしたと考えられる。

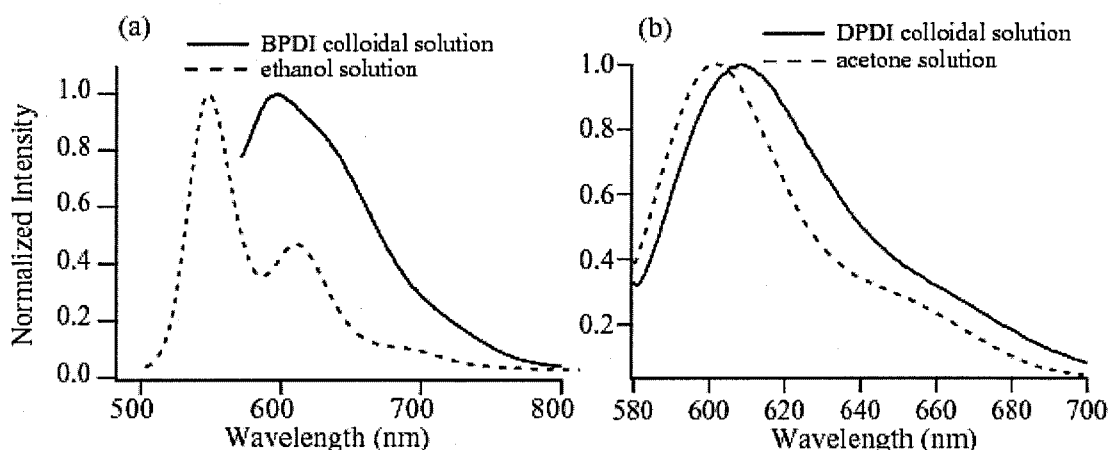


Fig. 3-7 Fluorescent spectra of (a) BPDI colloidal solution prepared by 532 nm laser irradiation at 100 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes and 2 $\mu$ M ethanol solution, and (b) DPDI colloidal solution prepared by 532 nm laser irradiation at 200 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 minutes and 2 $\mu$ M acetone solution. The excitation wavelength for emission measurements was 570 nm.

同じピーク吸光度の値で DPDI コロイド溶液と DBPI コロイド溶液の蛍光強度を比較すると DPDI コロイド溶液の蛍光強度が高く、デンドリマーを用いることで輝度の高いナノ粒子を作製し得るといえる。しかし DPDI コロイド溶液においても蛍光強度はアセトン溶液と比較すると 10 分の 1 程度で、エキシマーは形成されていないにもかかわらず、蛍光消光が起きている。先ほど説明したように DPDI コロイドではサイズの変化に伴う分子間相互作用の変化は無視できるほど小さいと考えられ、DPDI コロイド溶液の消光は主にナノ粒子表面やレーザー照射による光生成物などの影響であると考えられる。フルエンス 50–200 mJ/cm<sup>2</sup> で 10 分間レーザーを照射して作製した平均粒径 400–150 nm の DPDI コロイド溶液とアセトン溶

### 3. ナノ粒子コロイド溶液中における消光・蛍光スペクトル

液の蛍光スペクトルを Fig.3-8 (a)に示す。蛍光スペクトル測定において蛍光の再吸収を防ぐために吸収ピークでの吸光度が 0.05 以下の希薄コロイド溶液を用いた。DPDI コロイド溶液の蛍光スペクトルは溶液の蛍光スペクトルとほぼ同じであり、平均粒径の差による変化もほとんど見られないのに対して蛍光強度は平均粒径に強く依存し、すべてアセトン溶液よりも低い値を示した。また前節で述べたように、吸光光度計で測定したコロイド溶液の吸収スペクトルは実際の光学吸収を与えてはいない。

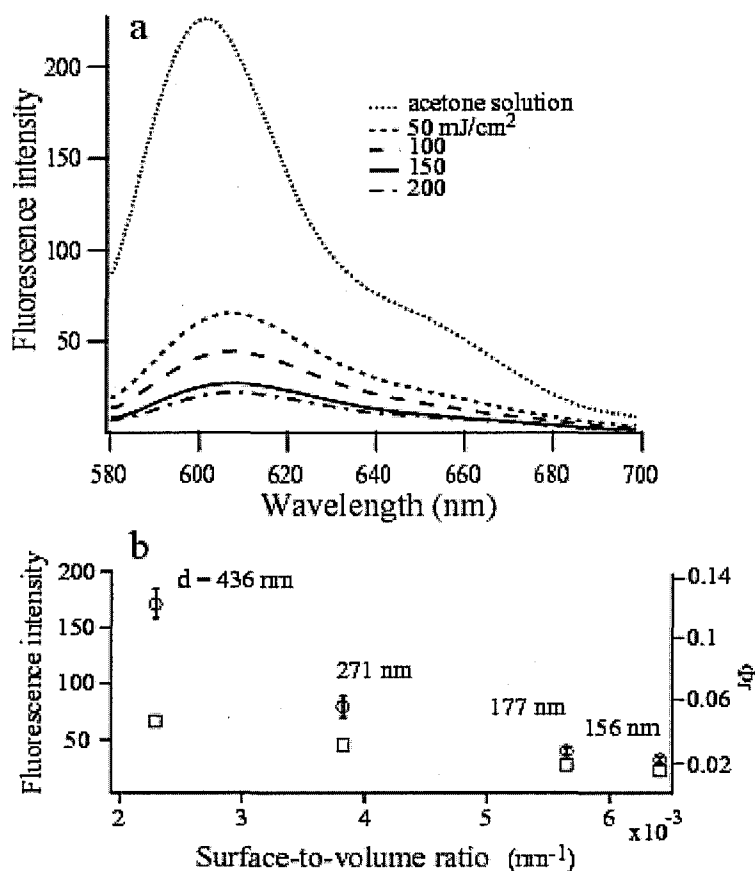


Fig. 3-8 (a) The emission spectra of DPDI nanoparticle colloids prepared by 532 nm nanosecond laser irradiation at the fluences of 50, 100, 150 and 200 mJ/cm<sup>2</sup> for 10 min, and the fluorescence spectrum of a 2 μM acetone solution. The excitation wavelength for emission measurements was 570 nm. (b) Emission intensities of different-sized DPDI nanoparticle colloids as a function of the surface-to-volume ratio (○), and the fluorescence quantum yield estimated by taking into accounts of the scattering loss of the excitation light (□) Mean particles size is given in the figure.

そこで前節のシミュレーションから各平均粒径のコロイド溶液の吸光度に含まれる散乱の寄与を見積もり、吸光度から散乱の寄与を除いたコロイド溶液の実際の吸収に基づいて蛍光強度を校正し、蛍光量子収率のサイズ依存性を求めた。その結果をアセトン、トルエン溶液中での蛍光量子収率と合わせて Table 3-1 にまとめる。ここで DPDI トルエン溶液の蛍光量子収率を 0.92 とし、トルエン溶液との蛍光強度の比較によりコロイド溶液の蛍光量子収率を求めた[4]。各平均粒径での蛍光量子収率をみるとやはり平均粒径の減少に伴い蛍光量子収率が極端に低下していることから DPDI ナノ粒子において励起状態の無輻射緩和を促す経路、例えばナノ粒子表面やレーザー照射による光生成物などが存在することが示唆される。Fig. 3-8 (b)にコロイド溶液の蛍光量子収率を平均粒径から求めた比表面積の関数としてプロットすると、コロイド溶液の蛍光量子収率は比表面積と線形に近い相関がみられることから、励起状態の無輻射経路はナノ粒子表面との関連が強いと考えられる。また溶液であるアセトン溶液とトルエン溶液においても蛍光量子収率に大きな差が見られる。Quらは DPDI 溶液の蛍光量子収率は溶媒の極性に強く依存し、極性溶媒中では蛍光量子収率が低下することを報告している。メチルシクロヘキサン( $\epsilon=2.02$ )では 0.96、トルエン( $\epsilon=2.38$ )では 0.92 と高い蛍光量子収率を示すが、THF( $\epsilon=7.58$ )では 0.77 と収率が低下している。アセトンは誘電率が 21 と非常に極性が強く、アセトン溶液中での蛍光量子収率の低下も溶媒の強い極性が原因だと考えられる。これまでにペリレンジイミドに付加した電子供与体が、極性溶媒中では無輻射緩和を促進するという報告がされており DPDI ではデンドロン基が電子供与体として働き、次式で表されるようなデンドロン基(D)から励起状態の発色団(PDI\*)への電子移動反応が蛍光量子収率の低下を引き起こすと考えられる。



DPDI ナノ粒子の場合も同様に、その表面にある分子は水の極めて高い極性 ( $\epsilon=80.4$ )の影響によって分子内での電荷分離状態が安定化され、デンドロン基から励起した発色団への電子移動によって励起状態が緩和し消光が起きると考えられる。

しかし粒径 100 nm のナノ粒子の場合、その表面に存在する分子の割合は全体の 3%程度でありナノ粒子表面で生成した励起状態のみの無輻射緩和を考えると Table 3-1 に示したようなトルエン溶液等の蛍光収率と比較して 100 分の 1 もの蛍光収率の低下は起きない。ナノ粒子が全く消光を受けない場合の蛍光量子収率を 1 とし、粒径 156 nm での蛍光量子収率が 0.018 であることを考えると、ナノ粒子の 90.2%が消光されていることになり、体積に換算すると直径 156 nm の球状ナノ粒子の表面から 70 nm 程度の領域が消光されていることになる。Michel らは複数のペリレンモノイミド発色団を持つデンドリマーを用いて、そのデンドリマー1分子からの蛍光の偏光が時間とともに変化することから、発色団間でのエネ

ルギー移動を観測している[5]。DPDI ナノ粒子の場合も吸収と蛍光スペクトルに大きな重なりがあるため効率良くエネルギーのホッピングが起き、エネルギー移動により粒子内を移動するうちに表面において上記の電子移動消光をうけると考えられる(Fig. 3-9)。そのためナノ粒子の粒径が小さくなるにつれて励起されたエネルギーが表面まで到達する可能性が高くなり、より消光の影響を受けやすくなると考えられる[6]。また励起子の拡散距離  $l$  は

$$l = \sqrt{6D\tau} \quad (3-11)$$

で表され  $6$  は励起子の自由度を示し、 $D$  は拡散係数、 $\tau$  は励起子の寿命である。この式に実験値から得られた  $l = 70 \text{ nm}$ 、 $\tau = 6 \text{ ns}$  を代入すると拡散係数  $D$  は  $1.36 \times 10^{-3} \text{ cm}^2/\text{s}$  となる。一方、ペリレンモノイミドデンドリマーについてフェルスター半径  $R_0$  が  $5 \text{ nm}$  と見積もられている。ペリレンモノイミドデンドリマーと DPDI の吸収、蛍光スペクトルが類似していることから DPDI についてもこのフェルスター半径を適用し、共鳴励起エネルギー移動の時定数を次式より見積もった。

$$k_{RET} = \frac{1}{\tau} \left( \frac{R_0}{r} \right)^6 \quad (3-12)$$

励起子の寿命  $\tau = 6 \text{ ns}$ 、分子間の距離  $r = 1 \text{ nm}$  を代入して  $k_{RET} = 2.7 \times 10^{12}/\text{s}$  となり、これから拡散係数  $D$  は

$$D = r^2 k_{RET} / 2$$

となり  $D = 1.35 \times 10^{-2} \text{ cm}^2/\text{s}$  となる。この共鳴励起エネルギー移動の時定数から得られた拡散係数の理論値と実験結果から見積もられた値を比較すると、理論値が一桁程度大きい。理論値からは約  $700 \text{ nm}$  の拡散長が得られるが、理論では励起子の拡散を妨げる格子欠陥やフォノンとの衝突等が考慮されていない。DPDI ナノ粒子は結晶ではないので多くの格子欠陥や不純物を含むと考えられる。それらが励起子の拡散律速となり、結果  $70 \text{ nm}$  程度の距離を移動すると考えられる。



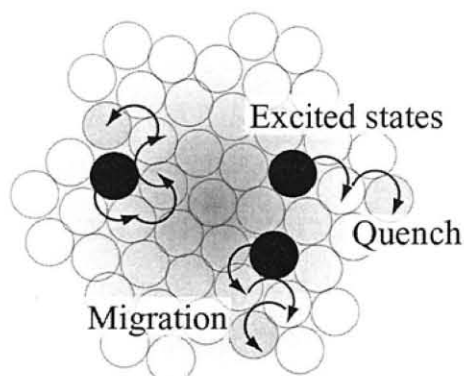


Fig. 3-9 A possible mechanism of surface quenching on DPDI nanoparticles. Excited state migrates in a nanoparticle. If it reaches to a surface, it will be quenched.

Table 3-1 Mean particles size ( $d$ ), absorption maximum wavelength ( $\lambda_{\max}$ ), and fluorescence quantum yield ( $\Phi_f$ ) of DPDI nanoparticle colloidal solutions and those of DPDI acetone and toluene solutions.

\* Relative fluorescence intensities of the colloidal and molecular solutions regarding the toluene solution as 1, Optical densities of each samples are 0.05 at the excitation wavelength (570 nm)

\*\*Fluorescence quantum yields by using DPDI toluene solution as the reference. ( $\Phi_f = 0.92$ ).

| Laser fluence<br>(mJ/cm <sup>2</sup> ) | $d$ (nm) / (pdi) | $\lambda_{\max}$ (nm) | Relative fluorescence<br>intensity* | $\Phi_f^{**}$ |
|--|------------------|-----------------------|-------------------------------------|---------------|
| 50                                     | 436 / (0.299)    | 577                   | 0.055                               | 0.13          |
| 100                                    | 261 / (0.229)    | 573                   | 0.038                               | 0.055         |
| 150                                    | 177 / (0.207)    | 571                   | 0.023                               | 0.027         |
| 200                                    | 156 / (0.103)    | 571                   | 0.019                               | 0.018         |
| Acetone                                | —                | 573                   | 0.19                                | 0.17          |
| Toluene                                | —                | 581                   | 1                                   | 0.92          |

#### 3-6 レーザー光照射の蛍光スペクトルへの影響

前節ではレーザーフルエンスを変化させることでナノ粒子の粒径を制御し、蛍光強度のサイズ依存性を議論した。しかしより粒径の小さなナノ粒子を作製するためには、より高強度のレーザーフルエンスを必要とするため、レーザー照射それ自身によって、ナノ粒子の退色や、光生成物による消光が生じている可能性がある。レーザー照射が蛍光強度に及ぼす影響を調べるために、レーザーフルエンスは  $50 \text{ mJ/cm}^2$  でナノ粒子作製を行い、平均粒径、蛍光強度、ゼータ電位のレーザー照射時間依存性を測定した。ゼータ電位は Malvern Instruments 社の Zetasizer によってレーザードップラー法に基づいて測定した。Fig. 3-10 に示すようにレーザー照射開始から 30 分間は平均粒径、蛍光強度ともに減少し前節の結果を再現している。更にレーザーを照射すると、平均粒径は変化しないのに対し、蛍光強度は減少した。またゼータ電位の絶対値がレーザー照射とともに増加した。ゼータ電位の絶対値の増加はナノ粒子表面の電荷の変化を意味しておりレーザー照射によって表面に酸化物などなんらかの電荷をもった生成物が生じ、その生成物が表面での消光に部分的に寄与しているのではないかと考えられる。

さらに平均粒径が変化しない条件で照射レーザーフルエンスの影響を考慮するために、まず  $200 \text{ mJ/cm}^2$  で 10 分間レーザーを照射してナノ粒子を作製し、その上で異なるフルエンスで同じエネルギー量 ( $50 \text{ mJ/cm}^2$  120 分、 $100 \text{ mJ/cm}^2$  60 分、 $150 \text{ mJ/cm}^2$  40 分) のレーザーをさらに照射し蛍光強度を比較した。Fig. 3-11 に示すようにフルエンス  $200 \text{ mJ/cm}^2$  のレーザーを照射後ナノ粒子は平均粒径が  $150\text{-}160 \text{ nm}$  でその後のレーザー照射によって平均粒径はほとんど変化していない。しかし高いフルエンスでレーザーを照射したサンプルほど蛍光強度の低下が顕著にあらわれている。蛍光強度の低下の原因が 1 光子励起による光退色ならば、同じ光子数を照射した全てのサンプルで蛍光強度の低下は同程度となるはずである。蛍光強度の低下量がレーザー強度に依存しているということは多光子励起による DPDI 分子の光分解を強く示唆している。2 光子吸収確率はフルエンス  $150 \text{ mJ/cm}^2$  では  $100 \text{ mJ/cm}^2$  と比べて 2.25 倍となる。蛍光強度の低下量を比較するとフルエンス  $150 \text{ mJ/cm}^2$  では  $100 \text{ mJ/cm}^2$  の 2.44 倍となり 2 光子吸収確率の差異と近い値をとり、多光子吸収による光分解を支持する。また Fig. 3-10 で示した実験では  $50 \text{ mJ/cm}^2$  のレーザー照射により蛍光強度が時間とともに減少したのに対し、この実験では蛍光強度の減少がみられないことは、 $200 \text{ mJ/cm}^2$  のレーザー照射によって表面の改質がすでに生じており、 $50 \text{ mJ/cm}^2$  のレーザー照射によってそれ以上の表面の変化が誘起されないためであると考えられる。

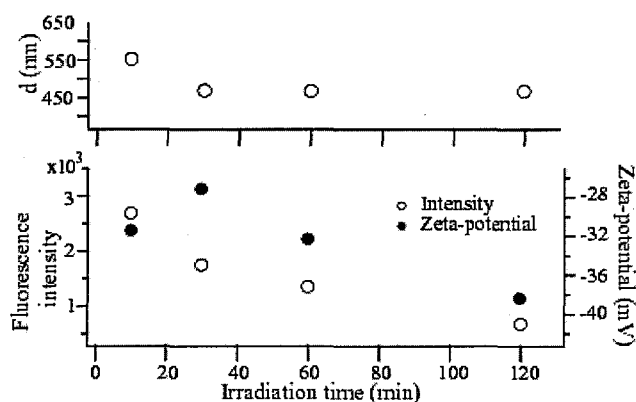


Fig. 3-10 Mean particle size (d, top), fluorescence intensity (○), and zeta potential (●) (bottom) of DPDI nanoparticle colloidal solution after laser irradiation at 50 mJ/cm<sup>2</sup> as a function of laser irradiation time.

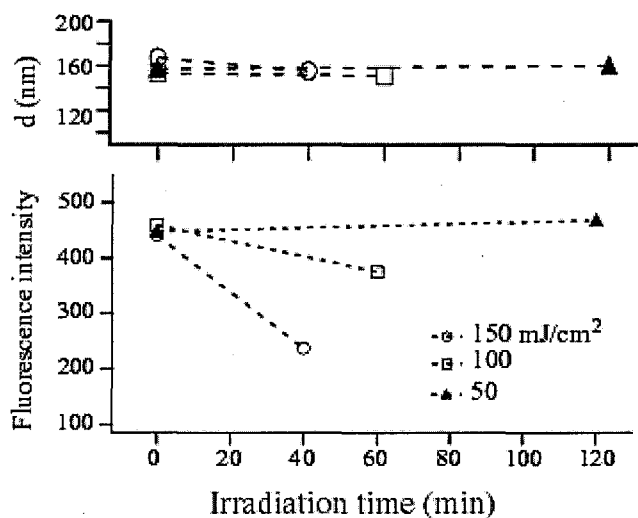


Fig. 3-11 The laser fluence dependence of mean particle size (d, top) and fluorescence intensity (bottom) on the sequence laser irradiation to the DPDI nanoparticle colloidal solution prepared at 200 mJ/cm<sup>2</sup>. Irradiated laser fluences are 150 (○), 100 (□) and 50 (▲) mJ/cm<sup>2</sup>.

#### 3-7 まとめ

本章では液中レーザーアブレーション法を用いて作製した BPDI、DPDI のナノ粒子の光学特性を議論した。Mie 理論によりコロイド溶液の散乱スペクトルのシミュレーションを行い、コロイド溶液の消失スペクトルにおける散乱の寄与を考慮したナノ粒子の真の吸収スペクトルを見積もった。その結果、DPDI コロイド溶液の平均粒径の変化に伴う消失スペクトルの変化は主に散乱効率の変化に起因し、吸収スペクトルはサイズに依存しないが DBPI では粒径の変化に伴い散乱とともに吸収スペクトルも消失スペクトルに影響を与えている可能性が示された。蛍光スペクトルからは DPDI はコロイド溶液と溶液中の分子で同様のスペクトルを示すのに対し、BPDI ではエキシマー発光が観測された。これら、吸収・蛍光スペクトル測定の結果から BPDI は基底状態と励起状態ともに強い発色団間の電子相互作用が存在するが DPDI は嵩高いデンドロン基によって発色団間の電子相互作用が抑制されていることが明らかになった。DPDI コロイド溶液を用いてナノ粒子の蛍光量子収率の粒子サイズ依存性をナノ粒子の実際の吸収に基づいて調べた結果、サイズの減少に伴って蛍光量子収率の顕著な低下が観測され、平均粒径 150 nm のコロイド溶液では  $\Phi=0.018$  と 400 nm の  $\Phi=0.13$  と比較して 10%以下に低下した。この蛍光量子収率の原因として水の高い極性による表面励起状態の電子移動消光と、エネルギー移動によるナノ粒子内部の励起状態の表面への拡散を提示し、励起状態の拡散長をおよそ 70 nm と見積もった。粒径を一定に保ったまま、レーザー照射条件を変化させて蛍光量子収率を比較し、高強度のレーザー照射によって生じる表面状態の改質や光生成物もナノ粒子の消光を促進することが示唆された。

デンドロンのような嵩高い置換基の導入によって確かに発色団間電子相互作用が抑制されることは、DPDI に限らず蛍光性ナノ粒子を作製する上でその分子設計に重要な指針を与える結果である。また本実験においては表面での励起状態は電子移動消光という形で無輻射失活したものの、粒子内部の励起状態が表面での反応に寄与し得るという結果は、例えば表面で蛍光増強が起こるような分子設計を行った場合、一つの励起パルスによって生成した多くの励起状態が発光に寄与することが可能となる。半導体ナノ粒子の場合は一つの励起パルスに対して一つのフォトンしか放出することができないため、上記のような有機ナノ粒子の性質を利用して、より明るい、また錯体形成による蛍光収率の増加のような機能性を付加した蛍光性ナノ粒子の開発が期待される。

参考文献

- [1] J. D. Wright “*Molecular Exciton*” 「分子結晶」(江口太郎訳、化学同人、京都、1991)
- [2] 松井敏雄、有機結晶の励起状態、化学、**37** (1997) 9
- [3] C. F. Bohren, and D. R. Huffman: *Absorption and Scattering of Light by Small Particles* (Wiley, New York, 1983)
- [4] J. Q. Qu, N. G. Pschirer, D. J. Liu, A. Stefan, F. C. De Schryver, and K. Müllen: Chem. Eur. J. **10** (2004) 528.
- [5] C. Flors, I. Oesterling, T. Schnitzler, E. Fron, G. Schweitzer, M. Sliwa, A. Herrmann, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver, K. Müllen, and J. Hokens: J. Phys. Chem. C **111** (2007) 4861.
- [6] E. Botzung-Appert, V. Monnier, T. Ha Duong, R. Pansu, and A. Ibanez: Chem. Mater. **16** (2004) 1609.

## 第4章

### ナノ粒子の単一粒子蛍光分光

#### Single nanoparticles spectroscopy of DPDI nanoparticles

---

##### 4-1 緒言

前章ではレーザーアブレーションにより DPDI のナノ粒子コロイド溶液を作製し、バルクコロイド溶液で蛍光特性のサイズ依存性を議論した。しかしコロイド溶液を用いたナノ粒子の集団測定から得られる結果はサイズ、形状に一定の分布をもつナノ粒子の平均値である。このような平均値は一般的なナノ粒子の性質を評価する際には有用である。しかしながら、これまでに均質に見える分子においても単一分子で分光測定を行うことにより、分子ごとに異なるスペクトルの分散や、溶液では観測されない明滅現象などが観測されている。ナノ粒子に関しても、半導体ナノ粒子の明滅現象や金属ナノ粒子の形状に依存したスペクトル変化など平均値測定からは得ることのできない、単一粒子測定によってのみ観測される光学特性が報告されている。第2章で示されたようにレーザーアブレーションによって作製された DPDI ナノ粒子に関しても、そのサイズは一樣ではなく、形状なども個々に異なる粒子の集団である。このような系に関してバルクコロイド溶液測定による平均化された光学特性のみを取り扱ってはいは一粒の粒子のもつ振る舞いや形状などの影響を含んだ詳細な蛍光特性はみえてこない。そこで本章では単一分子蛍光分光測定と同様の装置を用いてレーザーアブレーションで作製した DPDI ナノ粒子と DPDI 分子一粒ずつの蛍光スペクトル、蛍光寿命、蛍光強度を測定した結果を報告し、DPDI 単一分子との比較から DPDI ナノ粒子の詳細な蛍光特性を議論する。またコインシデンス測定の結果と合わせてナノ粒子内部からの発光のメカニズムについて考察した。

##### 4-2 実験

DPDI のナノ粒子は第2章と同様の実験系を用いてフルエンス  $60 \text{ mJ/cm}^2$  で50分間レーザーを照射することで作製した[1]。界面活性剤は SDS (Wako)を用い、同条件で作製した DPDI ナノ粒子の平均粒径は動的光散乱測定(Ohtsuka-denshi, DLS-70H)より 300 nm と見積もられ

た。DPDI ナノ粒子と DPDI 分子はそれぞれポリビニルアルコール水溶液(PVA: 10 wt%,  $M_w = 88000$ , Wako)とポリメチルメタクリレートクロロホルム溶液(PMMA,  $10^{-9}$  M)との混合し、スピコートによってガラス基板上にナノ粒子、分子を包括したポリマー薄膜を形成した。これによりナノ粒子・分子はポリマー中に固定され、空気・ガラス基板との相互作用を避けることが可能である。ここでナノ粒子と分子の濃度は顕微鏡の回折限界で限定される空間に 1 粒存在する程度に調節した。

Fig. 4-1 に実験装置を示す。サンプルは倒立型共焦点蛍光顕微鏡に設置し、時間相関単一光子計数法(TCSPC)により単一粒子・分子の時間分解蛍光測定を行った。励起パルス(543 nm, 8.18 MHz, 1.2 ps FWHM)はチタンサファイアレーザー(Tsunami, Spectra Physics)から発振したレーザーパルスをポンプ光として、光パラメトリック発振器(GWU)によって得られた第 2 高調波を用いた。ベレーク補償板(New focus)を用いて円偏光にした励起パルスは走査ステージ(Physics Instruments)を備えた倒立顕微鏡(Olympus IX 70)に導入され、油浸対物レンズ(1.3 NA, x100, Olympus)を通してサンプルに集光した。励起高強度は顕微鏡の導入口に設置した回転式減光フィルターを用いて調整した。サンプルからの蛍光は対物レンズを通ったあと無偏光ビームスプリッターによって 50:50 に分けられ、一方はイメージを得るためにアバランシェフォトダイオード(APD, SPCM 15, EG&G)に導入され、もう片方はスペクトルを得るために液体窒素冷却 CCD とカップルさせたポリクロメーターへ導入した。時間分解データは TCSPC カードの first-in-first-out モードにより処理した[2]。

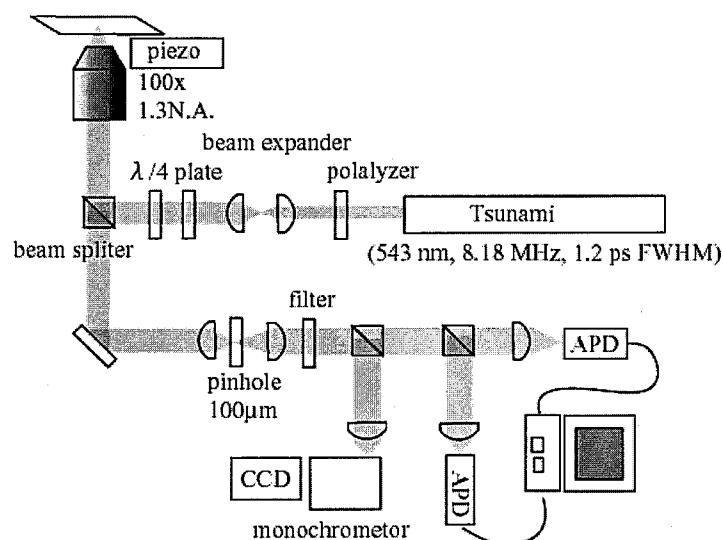
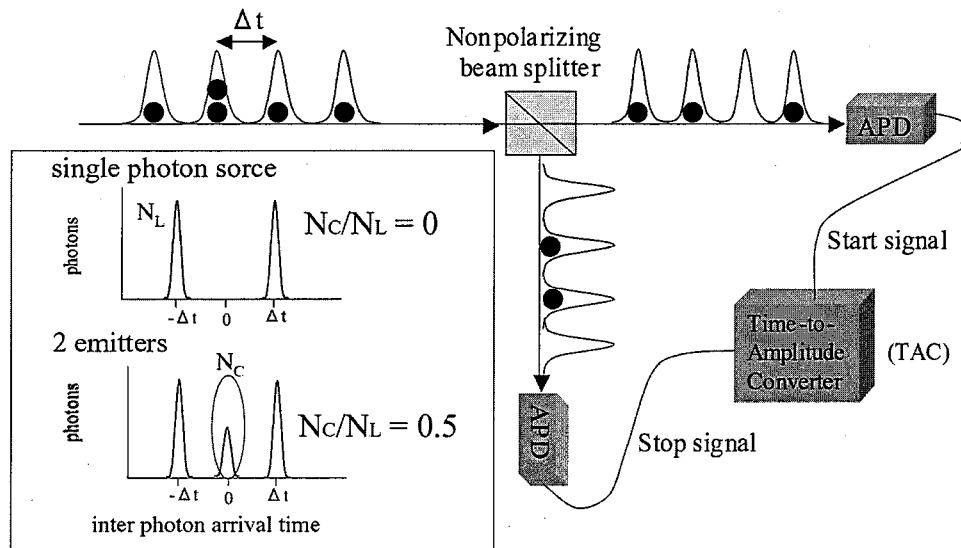


Fig. 4-1 Schematic illustration of the single particle spectroscopy set-up.

コインシデンス測定には Hanbury-Brown and Twiss アンチバンチング装置を用いた[3]。アンチバンチングとは時刻  $t$  に光子が来た時に時刻  $t+\delta t$  ( $\delta t \rightarrow 0$ ) に光子が来る確率が小さいことを意味する。コインシデンス測定では上記の共焦点顕微鏡システムを用い、サンプルからの蛍光を無偏光ビームスプリッターで 50:50 に分けそれぞれを 2 つの APD で検出し、TCSPC カードを用いてある時刻  $t$  と  $t+\delta t$  における信号の有無の相関を取った。Fig. 4-2 に示すように、例えば単一蛍光分子からの蛍光を観測する場合、励起レーザーパルス幅が分子の蛍光寿命よりも十分短かければ一つのパルスによって分子は 1 つの光子を発生し、同時に 2 つ以上の光子を発生することはない。この時  $\tau$  を横軸にとり 2 つの APD で同時に光子を検出する回数 のヒストグラムをとると、 $\delta t=0$  での値は 0 となりアンチバンチド状態となる。単一分子からの発光ではない場合は  $\delta t=0$  での値は 0 とならないが  $\delta t=0$  の値はレーザーにより励起されている領域に含まれる分子数に依存する。TCSPC カードには 125 ns の不感時間が存在するので APD のシグナルのうち一方には 1.3  $\mu\text{s}$  の電氣的遅延を設けた。これにより一つのレーザーパルスによる複数の蛍光シグナルを検出することが可能となる。TCSPC カードはデータ取得開始後、分解能 50 ns で 2 つの APD のシグナル到達時間(macro-time)と蛍光シグナルによる開始パルスとレーザーからの終了パルスの間の遅延時間(micro-time)を記録する。



Histogram of interphoton arrival time

Fig. 4-2 Schematic illustration of Hanbury-Brown and Twiss antibunching set-up. An example of histogram of inter photon arrival time is incorporated in the figure.



## 4-3 単一ナノ粒子の発光特性

## 4-3-1 蛍光スペクトル

Fig. 4-3(a) に PVA 薄膜中に分散させた DPDI ナノ粒子の蛍光像を示す。ナノ粒子の蛍光イメージは 2D ガウシアンでフィッティングし x 軸、y 軸それぞれの半値幅の平均値をナノ粒子の直径とおいた。Fig. 4-3(b) に 50 個のナノ粒子を測定した結果の粒径分布を示す。得られたナノ粒子の平均粒径は 243 nm で DLS によって見積もられた 300 nm と整合性のよい値が得られた。また本実験で用いた蛍光顕微鏡システムの空間分解能は回折限界である 200 nm 程度である。蛍光測定により求めたナノ粒子の粒径は空間分解能よりも大きな値を示しているため、観察している対象は PVA 薄膜中に溶けた DPDI 分子ではなくナノ粒子であると考えられる。Fig. 4-2 に代表的な PVA 薄膜中の DPDI 単一ナノ粒子、PMMA 薄膜中 DPDI 単一分子、空気中の DPDI 結晶粉末 (1 $\mu\text{m}$ ~) の蛍光スペクトルを示す。単一ナノ粒子と単一分子の蛍光スペクトルは、それぞれコロイド溶液とトルエン溶液と同様の形状をした蛍光スペクトルを示すが、結晶粉末ではナノ粒子、分子に比べてブロードな発光を示し 650 nm 付近における肩の成分の寄与が大きくなっている。前章までに DPDI ナノ粒子では嵩高いデンドロン基によって分子間相互作用が抑制され分子とよく似た吸収・蛍光スペクトルを示すことを報告してきた[1]。

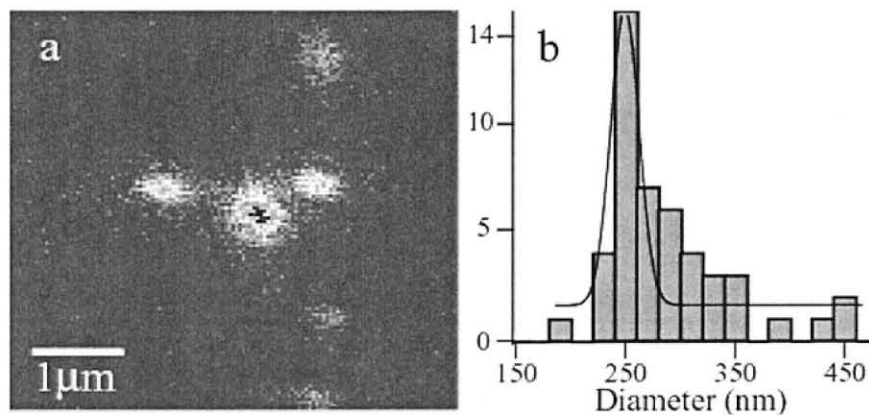


Fig. 4-3 (a) Fluorescence image of DPDI single nanoparticles dispersed in PVA film. (b) The histogram of particles size.

#### 4. ナノ粒子の単一粒子蛍光分光

本実験においても粒径が 500 nm 程度のナノ粒子に関しては同様の結論が導かれるが、粒径が非常に大きい場合は DPDI 分子でさえも分子間相互作用があらわれてくる可能性を示唆している。これは大きな粒子の内部で分子密度が高くなり分子間距離が小さくなる結果、発色団同士の電子相互作用が大きくなるのではないかと考えられるが詳細は明らかでない。Fig. 4-4 (a, b) に単一ナノ粒子と単一分子の S0-S0 振動ピークに対応する蛍光ピーク位置のヒストグラムを示す。蛍光ピークは分子に関して 600 nm を中心に約 30 nm の分散を持つに対して、ナノ粒子では 608 nm を中心に約 10 nm の分散を持ち長波長側へのシフト傾向が見られる。この長波長シフトの原因としてナノ粒子では蛍光の再吸収の寄与も存在すると思われるが、結晶粉末の発光スペクトルのピークが大きく長波長側へシフトしていることを考慮すると、ナノ粒子でも分子に比べると励起状態のエネルギーが安定化されていると考えられる。

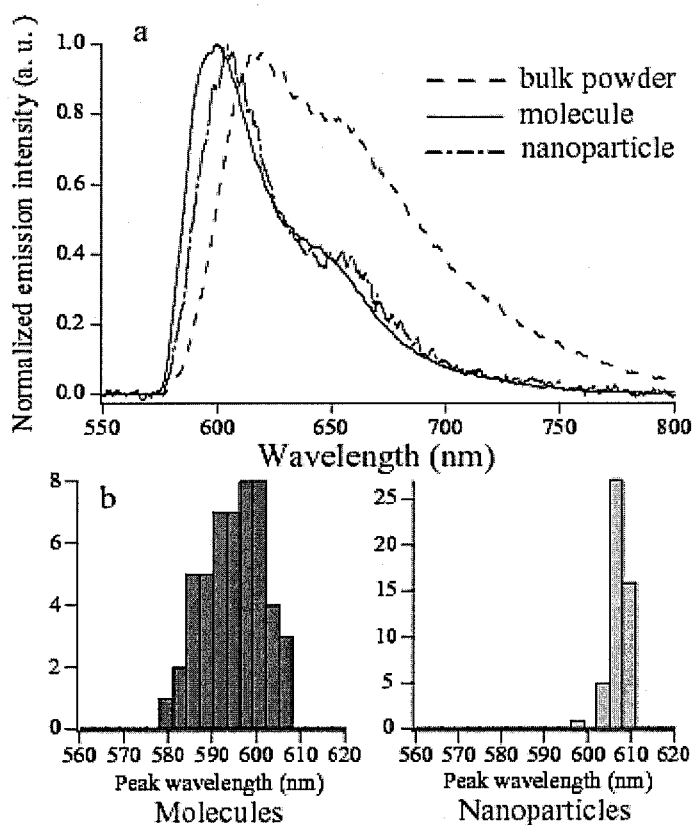


Figure 4-4 (a) Representative normalized emission spectra of a G1PDI single nanoparticle in PVA film and a single molecule in PMMA and bulk powder. (b) Histograms of emission peak positions of single nanoparticles and molecules.

しかしナノ粒子の蛍光ピーク位置と粒径の相関を見ると Fig. 4-5 に示すようにに粒径 200 nm から 500 nm の間ではサイズによる顕著な相関は見られなかった。蛍光ピークの分散に関しては、単一分子ではガラスやポリマーなどの周辺媒質との相互作用が原因で大きな分散を示すことが知られている[5]。さらに単一分子の場合はポリマー中に固定された状態においても分子構造の揺らぎによって立体構造が少しずつ変化し、それにともない継時的に蛍光ピークが揺らぐことが報告されている。しかし単一ナノ粒子に関しては単一分子と比べて分散が小さく、またスペクトルの継時変化も観察されず、異なるナノ粒子間でのみスペクトルの差異が観察された。ナノ粒子の分散している PVA は極性ポリマーで電子受容体として働くことが知られている。そのため第3章で示したようにナノ粒子の表面では DPDI の消光が起き、表面からの発光はあまり生じないと考えられる。このナノ粒子の消光は次節で示すように、ナノ粒子の蛍光寿命が分子よりも短いことから確認される。このことから DPDI ナノ粒子では発光は粒子内部から生じ、粒子内部では分子の運動が抑制されて立体構造の変化が小さいために蛍光ピークの揺らぎが観測されないと考えられる。またナノ粒子内部の分子がとる立体構造は、エネルギー的に安定な構造を有することが蛍光ピーク波長を長波長シフトさせていると思われる。

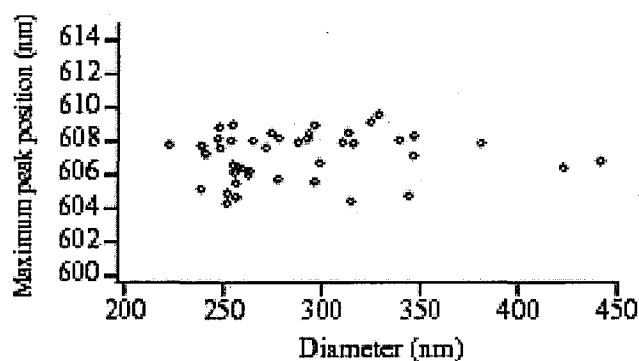


Fig. 4-5 Maximum peak positions of single DPDI nanoparticles as a function of its diameter.

#### 4-3-2 蛍光寿命

Fig. 4-6 (a-d) に単一分子と単一ナノ粒子の蛍光寿命減衰曲線を示す。これまでに DPDI 単一分子の蛍光は 5-6 ns の単一指数関数的減衰を示し、これは PDI 溶液中と同様の性質であ

#### 4. ナノ粒子の単一粒子蛍光分光

ることが知られている。また、単一分子の蛍光寿命も蛍光ピークと同様に分布をもつが、この分散は正規分布である[6]。Fig. 4-6 (a) に示した DPDI 単一分子の蛍光も単一指数関数的に減衰し、その寿命も 5.14 ns とこれまでの結果を再現している。しかしナノ粒子の蛍光は粒子ごとに異なる多成分減衰曲線を示しその寿命もばらばらである。また減衰曲線は時刻とともに変化する。ナノ粒子の蛍光寿命を求めるために蛍光ナノ粒子の蛍光寿命減衰曲線を 2 成分指数関数でフィッティングし寿命成分の  $\tau_1$ 、 $\tau_2$  を求めた。ここで装置関数を考慮すると 2 成分でのフィッティングが困難であったため装置関数は考慮せず減衰曲線の立ち上がり後の減衰部分に関してのみのフィッティングを行った。50 個のナノ粒子について求めた  $\tau_1$  はおよそ 0.5-1.5 ns の範囲にあり  $\tau_2$  は 3-8 ns という応範囲に広がった分布を見せた。粒子ごとの平均蛍光寿命を比較するために次式(4-1)で平均蛍光寿命を求めた。

$$\langle \tau \rangle = \frac{\alpha\tau_1 + \beta\tau_2}{\alpha + \beta} \quad (4-1)$$

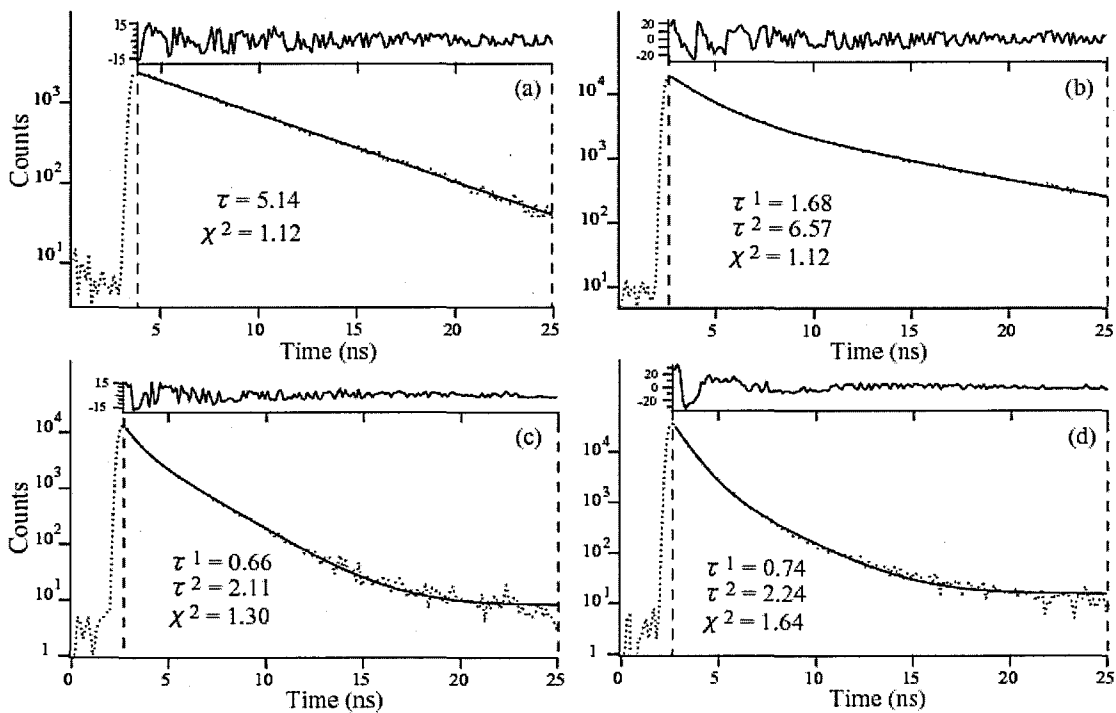


Fig. 4-6 Representative fluorescent decay curves of (a) a single molecule in PMMA and (b-d) three different nanoparticles in PVA. Residuals, fitting curves, lifetimes  $\tau$ , and  $\chi^2$  are also given in the figure.

$\alpha$ 、 $\beta$ は各寿命成分の寄与を表す係数である。平均蛍光寿命 $\langle\tau\rangle$ のヒストグラムを Fig. 4-7 に示す。ナノ粒子の平均蛍光寿命はほとんどが 1 ns 程度を示し、中には非常に長く単一分子的な 5-7 ns を示すナノ粒子も存在した。多成分指数関数による蛍光減衰からはナノ粒子で消光が起きていることが示される。この結果は前章までで示したナノ粒子での蛍光量子収率の低下を説明する。また粒子ごとに減衰曲線が異なることから消光の寄与は粒子ごとに一樣ではないことを示唆し、ナノ粒子からの発光状態を大きく分類すると平均蛍光寿命が 1 ns 程度を示す消光を受けた状態と、平均蛍光寿命が 5-7 ns の消光を受けていない状態に大きく 2 分することができる。加えて蛍光寿命に関しても粒子サイズとの相関をとった結果、蛍光ピークと同様に 200 ns から 500 ns のサイズの範囲では特別な相関は見られなかった。

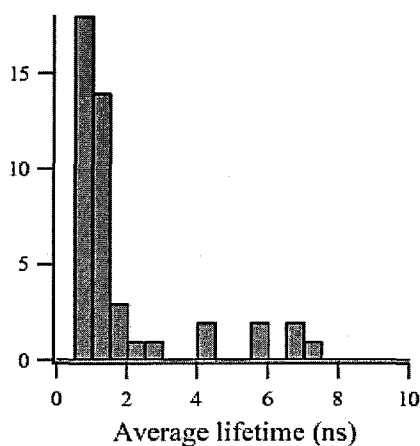


Fig. 4-7 A histogram of average lifetimes on nanoparticles in PVA film.

#### 4-3-3 蛍光強度と寿命の時間変化

Fig. 4-8 (a-d) に Fig. 4-6 (a-d)の寿命減衰曲線をもつ各分子とナノ粒子に対応した蛍光寿命と蛍光強度の時間変化を示す。単一分子の場合は 5 ms あたり 100 光子カウントの蛍光強度を得るために数 kW/cm<sup>2</sup> の励起光強度を必要とするのに対し、ナノ粒子では 1000 分の 1 以下の数 W/cm<sup>2</sup> しか必要としない。直径 300 nm の球形ナノ粒子を仮定した場合、ナノ粒子は数百万の分子を含有しているために、ナノ粒子を一つの発光体とみなすとナノ粒子の消光を考慮しても分子よりも 1000 倍以上の吸収断面積を有しているといえる。これは点光源として DPDI ナノ粒子を捉えると非常に優れた性質である。DPD 単一粒子の蛍光強度の時間変化を見ると、DPDI は分子としては非常に高い光安定性を持つ分子ではあるが、それでも蛍光のオフ時間が観測される。この単一分子からの蛍光に見られる蛍光の明滅現象は、蛍

光収率を減少させる要因として常に問題になる。マイクロ秒からミリ秒のオフ時間はトリプレットへの項間交差が原因であるとされる[7]。実際、窒素雰囲気下では単一分子からの蛍光収率は改善される。ミリ秒以上に及ぶオフ時間はポリマーとの相互作用やアニオンラジカルの形成がその理由として提案されているが完全には明らかになっていない。単一ナノ粒子からの発光においては単一分子に見られるような明滅現象はみられないが、ナノ粒子によって、蛍光強度の階段的变化、揺らぎをもつ場合、一定の3種類の振る舞いを示した。ナノ粒子の場合は空気雰囲気下でも窒素雰囲気下でも蛍光発光の振る舞いは変化しなかった。これは蛍光ピーク位置が変化しないのと同様にナノ粒子の内部では周辺環境の影響を受けないからだと考えられる。さらにナノ粒子の蛍光強度は揺らいでいるが分子と違い、蛍光強度0のオフ状態にはならない。これは高い吸収断面積と合わせて点光源としてのナノ粒子を利用する場合の優位な点である。

Fig. 4-8のb、c、dのナノ粒子の励起光強度を見るとb、cの蛍光強度に揺らぎが観測されるナノ粒子では蛍光強度が一定であるdに比べて必要な励起光強度は高い。また多数の分子からの蛍光が同期することは考えにくく、蛍光強度の振る舞いの差はナノ粒子内で蛍光を発している分子の数によって生まれているのではないかと考えられる。すなわちナノ粒子b、cではナノ粒子の中で少数の分子のみが蛍光を発しているため、各分子からの蛍光の強度への寄与が大きく、そのうち一つが消光を受けるなどして蛍光を発しなくなると蛍光強度が大きく揺らぐと考えられる。ナノ粒子の蛍光強度が階段状に変化する場合は発光分子数が極端に少なく1個から数個しかないと思われる。これに対し、ナノ粒子cの場合は多数の発光分子がナノ粒内に存在するため、弱い励起光でも十分な蛍光強度が得られ、また1分子の蛍光強度への寄与は小さいため、各分子の振る舞いは平均化され一定の強度を示していると考えられる。この仮説を検証するためにコインシデンス測定を行いナノ粒子からある時刻に放出されるフォトン数を測定した。その結果Fig. 4-6のナノ粒子bのようにナノ粒子の蛍光強度が単一指関数に近い形で減衰する場合にのみ蛍光のアンチバンチングが観測された(Fig. 4-9)。この時 $N_c/N_L$ は0.5以下となり、ナノ粒子は平均的に2個以下の光子を発していることが明らかになった。これは上記の仮説を裏付ける結果である。さらにそのようなナノ粒子では蛍光強度と寿命が同調して変化している。Fig. 4-7で示した蛍光寿命のヒストグラムの測定結果でも述べたようにナノ粒子の蛍光はほとんど消光を受けているので、ナノ粒子内でランダムに起こった発光がこのような同調を示すとは考えにくく、Fig. 4-8、bの発光はナノ粒内のある一つの分子からの発光を観測していると考えられる。

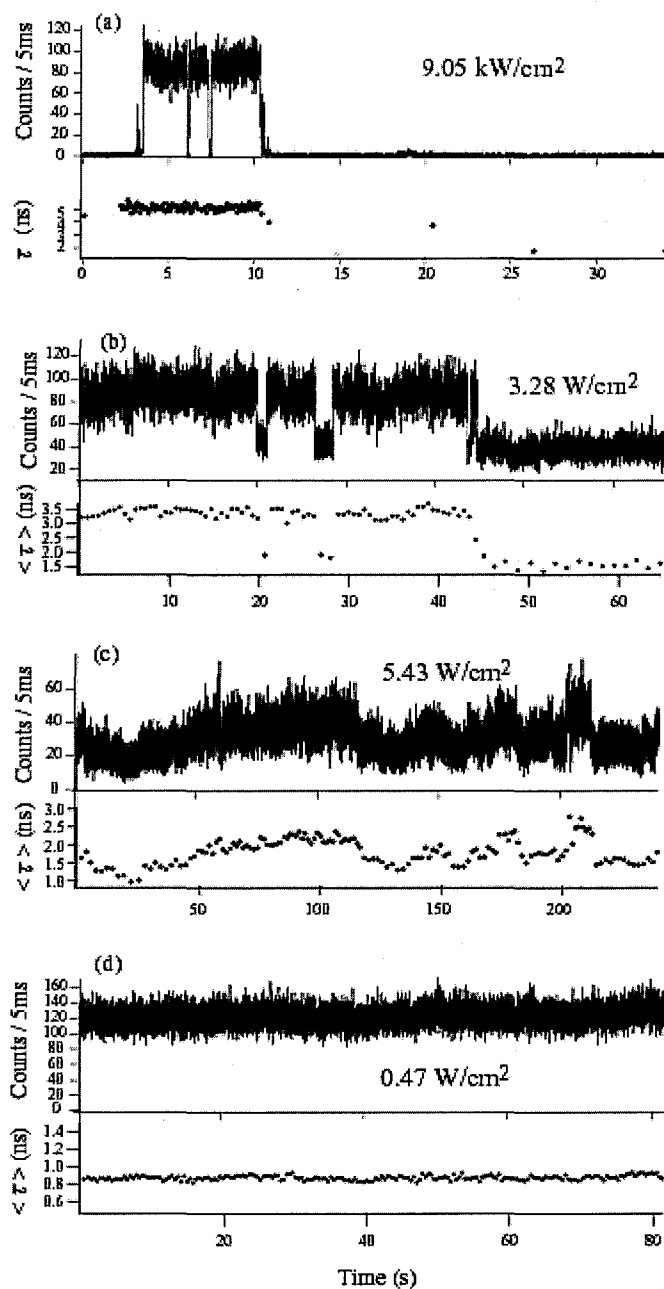


Fig. 4-8 Fluorescent intensity and lifetime trajectories of (a) a single molecule in PMMA and (b-d) three different nanoparticles in PVA. Transient intensity and lifetime recorded with 5-ms binning time and every 1000 photons respectively. Each trajectories of (a-d) corresponds to the decays in Fig. 4-6 (a-d). Excitation laser power was given in the figure.

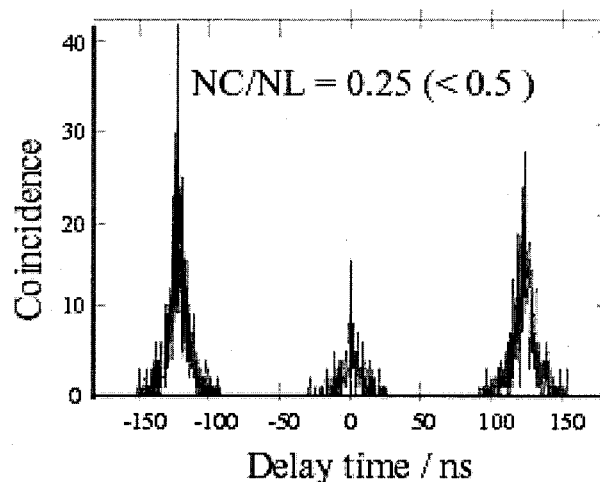


Fig. 4-9 A histogram of inter photon arrival time on single DPDI nanoparticle that has a monoexponential decay curve.

以上のすべての結果から次のようなナノ粒子の発光ダイナミクスが推測される(Fig. 4-10)。まずナノ粒子に励起レーザーパルスが照射されるとナノ粒子内で多数の励起子が生成される。生成した励起子は第 3 章でも示したようにエネルギー移動によってナノ粒子内を移動しその多くはナノ粒子表面または光生成物などによって消光される。この時、分子内でエネルギー的に安定な立体構造をとる分子に励起子が移動すると、エネルギー移動速度が低下し、励起子がこのような分子上で束縛を受けられると思われる。ナノ粒子からの発光は主にそのようなエネルギー的に安定化された分子から起きると考えられるが、そのような分子においても、常に安定して存在するわけではなく時間的に安定な状態と不安定な状態を繰り返し、平均的には不安定な状態の方が支配的であるために、ナノ粒子の発光としては蛍光寿命の短いものが多数であると考えられる。

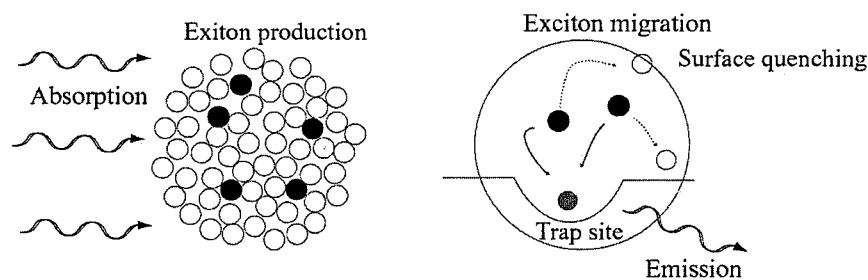


Fig. 4-10 Possible mechanism of the emission from DPDI nanoparticles.



##### 4-4 まとめ

ポリマー薄膜中に分散させた DPDI ナノ粒子と分子に関して顕微鏡下で単一粒子・分子の蛍光スペクトル、蛍光寿命、蛍光強度測定を行い、分子の蛍光特性との比較からナノ粒子の蛍光特性を議論した。50 個の粒子と分子をそれぞれ測定した結果、DPDI ナノ粒子では分子に比べて蛍光スペクトルのピークバンドが長波長側にシフトしており、蛍光ピークの位置はバルクコロイド溶液の結果と一致する。これは発光の生じるナノ粒子内部の分子は安定な立体構造をとることに由来すると考えられまた、ナノ粒子の方が分子よりも粒子ごとの分散が小さく、ポリマーなどのナノ粒子周辺環境の影響を受けにくいと考えられる。蛍光寿命測定の結果から、DPDI 分子は 5-7 ナノ秒程度の蛍光寿命を持ち単一指数関数で減衰するのに対し、ナノ粒子では粒子ごとに異なる寿命と多成分の減衰曲線をもち、その多くは 1-2 ナノ秒の非常に短い寿命を持つことが示され、これは前章で示したように結晶内部の不純物や表面での消光による影響であると考えられる。蛍光強度・寿命の時間発展を測定すると単一分子と単一ナノ粒子で同等の蛍光強度を得るために必要な励起光強度はナノ粒子では分子と比較して 1000 分の 1 以下であり、双方を一つの点光源として捉えた場合ナノ粒子は高い吸収係数を有することが示された。またナノ粒子では分子のような明滅現象は観測されず定常的に蛍光を発することから安定な光源であることも示された。しかしナノ粒子の中には、蛍光寿命が 6 ナノ秒程度で単一指数関数減衰し、蛍光強度が階段的揺らぐ分子的な蛍光挙動を有する粒子が観測され、コインシデンス測定の結果からこのようなナノ粒子では一つのレーザーパルスに対して平均的に一つのフォトンを放出する単一光子発生源としての可能性も示唆された。最後に全ての単一粒子分光測定の結果から、ナノ粒子内部で生成した励起状態はエネルギー移動により粒子内部を拡散する過程で主に表面などで消光され、エネルギー的な安定な発光サイトが一時的に生じた場合にはナノ粒子は発光サイトに補足され寿命の長い分子的な振る舞いをするというナノ粒子の発光ダイナミクスを提案した。

##### 参考文献

- [1] R. Yasukuni, T. Asahi, T. Sugiyama, H. Masuhara, M. Sliwa, J. Hofkens, F. C. De Schryver, M. Van der Auweraer, A. Herrmann, K Müllen: *Appl. Phys. A* **93** (2008)

5.

- [2] R. Hanbury-Brown, R. Twiss: *Nature* **177** (1956) 27.
- [3] J. Hofkens, M. Maus, T. Gensch, T. Vosch, M. Cotlet, F. Köhn, A. Herrmann, K. Müllen, F. C. De Schryver: *J. Am. Chem. Soc.* **122** (2000) 9278.
- [4] T. Vosch, M. Cotlet, K. Van Der Biest, M. Lor, K. Weston, P. Tinnefeld, M. Sauer, L. Latterini, K. Müllen, F. C. De Schryver: *J. Phys. Chem. A* **107** (2003) 6920.
- [5] J. Hofkens, M. Cotlet, T. Vosch, P. Tinnefeld, K. D. Weston, C. Ego, A. Grimsdale, K. Müllen, D. Beljonne, J. L. Bredas, S. Jordens, G. Schweitzer, M. Sauer, F. De Schryver: *PNAS* **100** (2003) 13146.
- [6] K. D. Weston, M. Dyck, P. Tinnefeld, C. Muller, D. P. Herten, M. Sauer: *Anal. Chem.* **74** (2002) 5342.
- [7] C. Flors, I. Oesterling, T. Schnitzler, E. Fron, G. Schweitzer, M. Sliwa, A. Herrmann, M. Van der Auweraer, F. C. De Schryver, K. Müllen, J. Hofkens *J. Phys. Chem. C* **111** (2007) 4861.

## 第5章

### ナノ構造体の蛍光消光におけるサイズ依存性

#### Size dependent quenching efficiency of nano structures

---

##### 5-1 緒言

第3、4章ではレーザーアブレーション法で作製した dendritic ナノ粒子に関して、コロイド溶液のバルク測定と単一粒子分光測定により、詳細な光学特性を議論した。その中でナノ粒子では粒径が励起状態の拡散移動距離と同程度になるために、粒子内部の励起状態であっても表面での反応に寄与する可能性を示した。この表面での反応を確認する方法として有効なのが消光剤の添加である。消光剤の添加によりナノ粒子表面での励起エネルギーが消光剤へ移動するために、表面での発光が生じなくなると考えられる。この消光剤による表面での励起エネルギーの失活に関してサイズ依存性を測定することで、粒子内部の励起エネルギーが表面へ移動するかを確認することが可能だと考えられる。

本章では溶媒蒸発法によりガラス基板上に作製したナノ構造体に関して、蛍光消光効率のサイズ依存性を測定した結果を示す。まずペリレンジイミド化合物(PDS9)の溶液とバルク結晶での吸収・蛍光スペクトル、蛍光寿命を示し、キャスト法とディウエット法を用いて作製したサイズの異なる PDS9 のナノ構造体の蛍光スペクトル、蛍光寿命と比較した結果を示す。次に AFM 測定から作製したディスク状ナノ構造体の直径と膜厚の相関を示し、蛍光寿命イメージング (FLIM) によってナノ構造体の蛍光寿命の膜厚依存性を測定した結果を報告する。さらに消光剤としてメチレンブルー水溶液を加え、消光効率の膜厚依存性を測定した結果を報告し、最後に PDS9 ナノ構造体に関して生成した励起状態の表面での消光と平均移動距離に関して議論する。

##### 5-2 実験

本実験でサンプルとして用いたペリレンジイミド S9 (PDS9) はドイツ LMU-Universität の Langhals 教授らのグループが合成したものを使用した[1]。PDS9 の構造式を Fig. 5-1 に示す。通常ペリレンジイミドは $\alpha$ 、 $\beta$ の結晶多形をもつが PDS9 は結晶多形をもたないためナ

ノ構造体の蛍光特性を比較する際に結晶多形による差異を考慮する必要がない。測定対象として2種類のPDS9ディスク状ナノ構造体をガラス基板上に作製した。この2種類の差はその作製手法とサイズである。数百nmから数 $\mu\text{m}$ の幅を持つ構造体は10 $\mu\text{L}$ のPDS9ジクロロメタン溶液(7.55 x 10<sup>-2</sup> wt%)をプラズマ処理したガラス基板上にキャストした後、溶媒を蒸発させて作製した。ガラス基板上に作製された構造体は、キャストされた液滴の位置によってその形状を変化させる。例えば液滴の中心には薄く広がった膜状の構造を造り、液滴の縁には小さな丸い構造体が点々と生じる。この液滴の縁に作製される構造体をキャスト構造体(c-spot)と称した。数百nm以下の幅をもつ構造体はガラス基板上に上記と同じPDS9ジクロロホルム溶液を薄く塗布することで作製した。ガラス基板上に液滴をキャストしたあと、スライドガラスのエッジで、液滴をキャストしたガラス基板の上を一定の速度でなぞることでガラス基板上に溶液を一様に薄く塗布し、その後溶媒を蒸発させて基板上にディスク状のディウェッティング構造体(d-spot)を作製した[2]。PDS9の蛍光消光剤として1mMのメチレンブルー水溶液を用いた(Fig. 5-1)。c-spotとd-spotの厚さは原子間力顕微鏡(AFM; THERMO MICROSCOPE, EXPLORER)のノンコンタクトモードを用いて測定した。

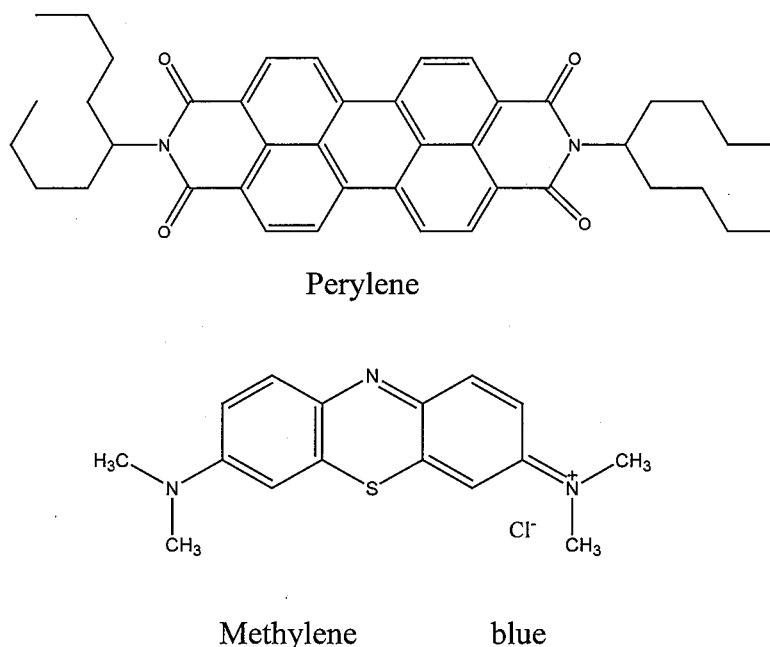


Fig. 5-1 Molecular structures of Perylene S9 and Methylene blue as quencher

PDS9 ジクロロメタン溶液の吸収・蛍光スペクトルはそれぞれ分光光度計(CARY 500) と 蛍光光度計(SPEX Jobin-Yvon)を用いて測定した。蛍光寿命イメージングはマルチチャンネルプレート光電子増倍管(Hamamatsu)の単一光子計数モードにより行った。蛍光寿命イメージングシステムを Fig. 5-2 に示す。励起光にフェムト秒レーザー(t-Pulse 200 Amplitude,  $\lambda = 1030\text{nm}$ , 10 MHz, 400 fs FWHM)の第二高調波を用いた。励起レーザーパルスは倒立 wide-field 顕微鏡(Olympus)に導入され 60 倍対物レンズ(Nikon, N.A. = 0.95)によってサンプルに照射された。励起レーザーパルス強度は減光フィルターによって、サンプル照射時に数  $\text{nW}/\text{cm}^2$  から数百  $\text{nW}/\text{cm}^2$  の範囲で調節した。サンプルからの蛍光は同じ対物レンズを通過したあと、視野観察用の CCD カメラと吸収・蛍光スペクトル測定のためのファイバー分光器(Ocean Optics, Inc.)に分けられ、最後にマルチチャンネルプレート光電子増倍管へ導入した。生成した光電子は 5 つの陰極に広がり、それぞれの陰極における電荷量から入射した光子の陽極上での位置を計算する。この処理と光子の到着時間に基づいて  $256 \times 256$  ピクセルの蛍光寿命イメージを作製した[3]。

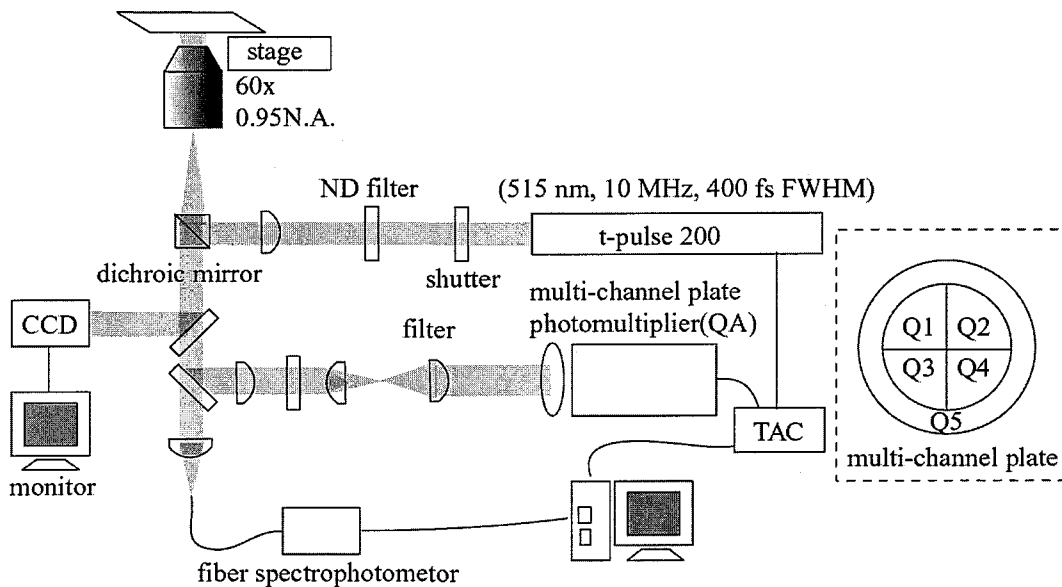


Fig. 5-2 Schematic illustration of fluorescence lifetime imaging set up.

## 5-3 ナノ構造体の吸収・蛍光スペクトルと蛍光寿命

まず AFM 測定により、基板上に作製した PDS9 ナノ構造体 c-spot と d-spot の膜厚を見積もった。構造体の AFM トポグラフィー像を Fig5-3 (a, b) に示す。c-spot では直径が 1 から数  $\mu\text{m}$  のディスク状の構造体が基板上に島状に存在し、d-spot では直径 200 nm 程度のディスク状構造体が基板上に無数に点在した。Fig. 5-4 にディスク状構造体の膜厚をサイズに関してプロットした結果を示す。d-spot の膜厚は 20 nm から 100 nm かけて分布し、サイズが大きくなるにつれて分散が大きくなるものの、直径の増加に比例した膜厚の増加が観測された。c-spot の膜厚に関しては 50 個の構造体の平均値をとり、平均膜厚は  $9.0 \pm 4 \text{ nm}$  であった。

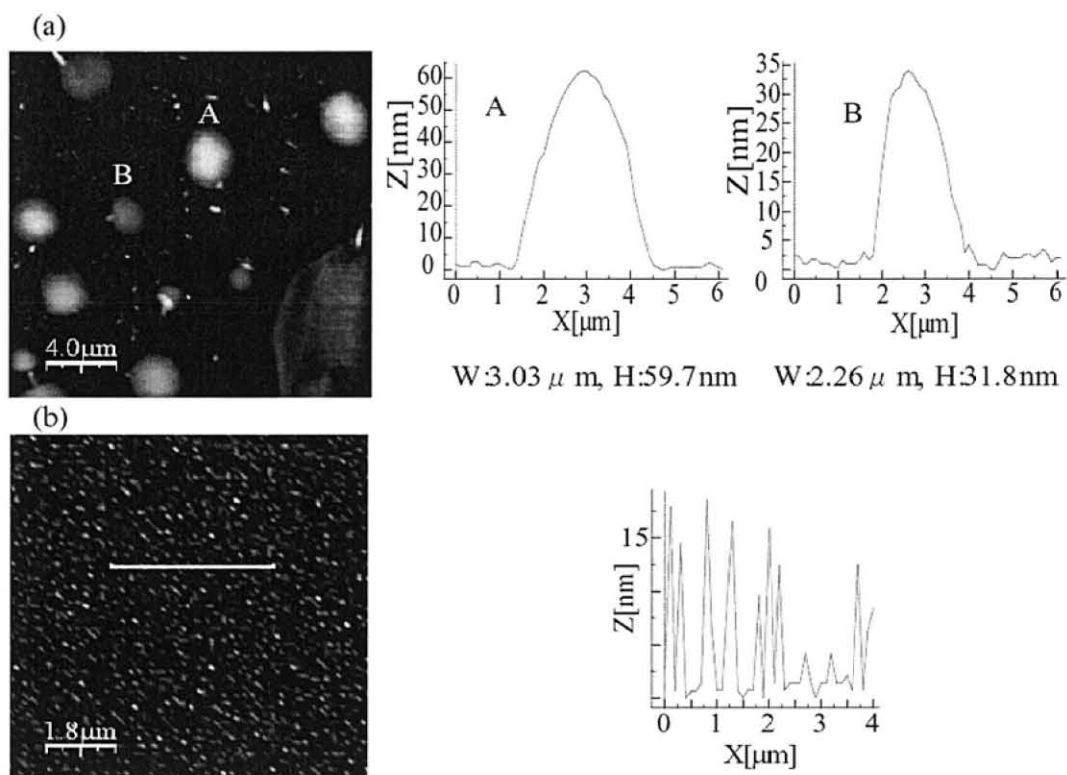


Fig. 5-3 AFM topography of c-spot (a) and d-spot (b).

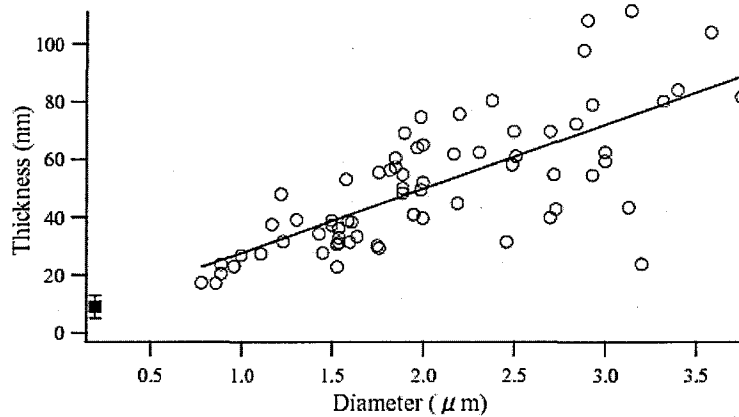


Fig 5-4 Thickness of c-spots as a function of its diameter (open circle) and average thickness of 50 d-spots (close square).

Fig. 5-5 に PDS9 のジクロロメタン溶液と固体薄膜の吸収スペクトル、ジクロロメタン溶液、c, d-spot、結晶粉末 (数 $\mu\text{m}$ ) の蛍光スペクトルと溶液以外の蛍光像を示す。固体状態の吸収スペクトルは c-spot を作製する際に液滴中央に形成される薄膜を用いて測定し、光源には顕微鏡に設置されたハロゲンランプを使用した。PDS9 固体の吸収スペクトルは分子と同様の振動バンドを有し、ジクロロメタン溶液と比較すると各ピークが長波長にシフトしている。吸収バンドのピーク比が変化していることから、PDS9 固体での基底状態での強い分子間相互作用が明らかになった。また蛍光スペクトルを見ると、鏡像関係を保っている溶液の蛍光スペクトルに対して固体では 529 nm から 593 nm への非常に大きなストークスシフト、幅が広く振動構造のないスペクトルを示すことから、励起状態での強い分子間相互作用によるエキシマー形成が確認された。次に同じ固体状態である、c-spot、d-spot、結晶粉末の蛍光スペクトルを比較すると c-spot、d-spot、では蛍光ピーク波長の 620 nm 以降に結晶粉末には見られない肩を示し、c-spot では蛍光ピーク波長の短波長側にも肩が存在する。

c-spot、d-spot は、急激な溶媒蒸発過程によって作製されることや、そのディスク形状を考慮すると、単結晶であるとは考えにくい。そこでスペクトルに見られる肩の部分は c-spot、d-spot が完全な結晶ではなくアモルファスであるために、本来 PDS9 結晶では存在しない $\beta$ 型の分子配置をとる分子が存在し、それらが振動構造をもつ蛍光を発していると考えられる。d-spot において蛍光ピーク波長より短波長側の肩が見られないのは、AFM 測定から示したようにその膜厚が c-spot よりも厚いために蛍光の再吸収が起きているためだと考えられる。

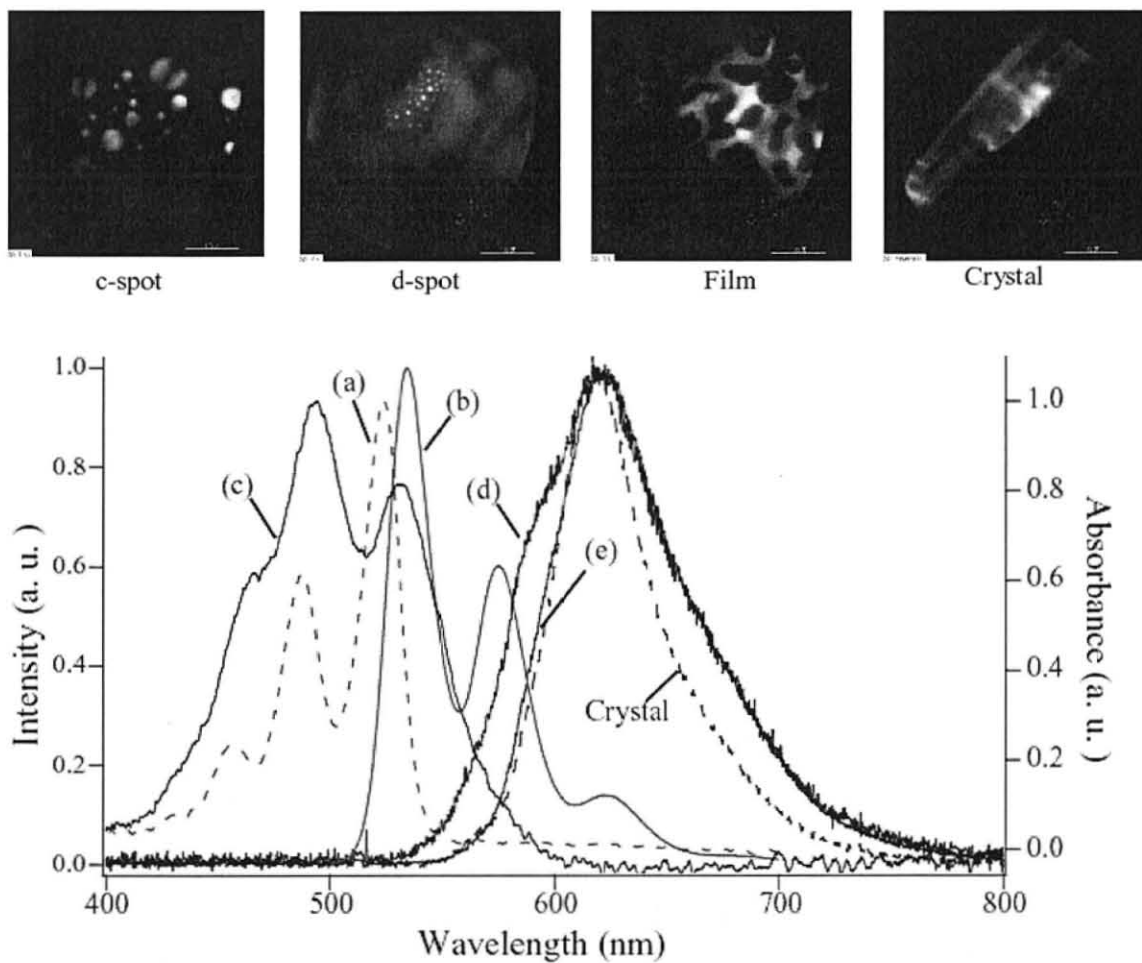


Fig. 5-5 Absorption spectra and fluorescence images of PDS9 a) in dichloromethane solution, c) thin film and emission spectra of b) dichloromethane solution, d) d-spots, c) c-spots and a crystal. Absorption peak position of a) dichloromethane solution and c) thin film are almost same but emission peaks of d) d-spots, c) c-spots and crystal is red shifted due to an excimer forming.

次に c-spot、d-spot、粉末結晶の蛍光寿命を Fig. 5-6 に比較する。粉末結晶は単一成分で 22 ナノ秒という長寿命の蛍光減衰を示し、これはエキシマー状態の発光に典型的な減衰曲線である。それに対して c-spot と d-spot では結晶よりも寿命が短く、多成分の減衰曲線を示し、ナノ構造体のサイズが小さい d-spot において寿命の減少が顕著に表れている。



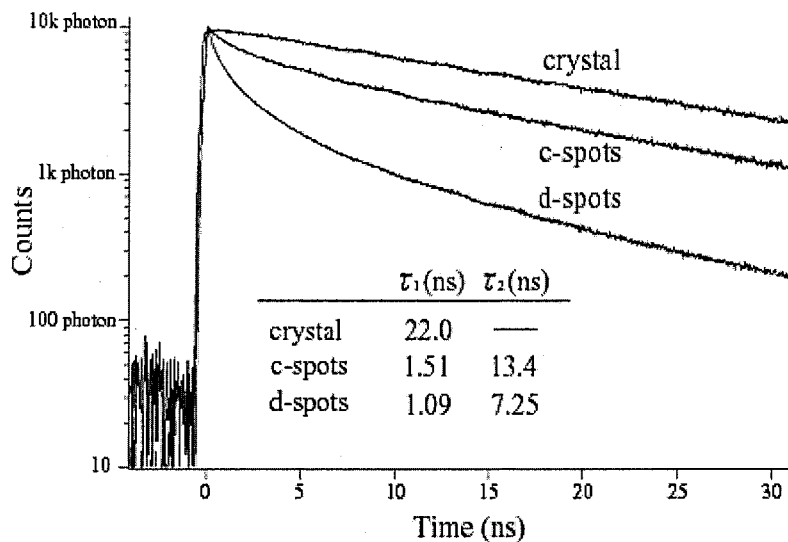


Fig. 5-6 Fluorescent decay curves of PDS9 crystal, c-spots, and d-spots. Two components of fluorescence lifetime are shown in the figure.

前章までは周辺環境やナノ粒子表面の改質などが蛍光消光の一因であることを示してきた。本実験では周辺環境は空気であり特別に表面の改質を与える要因がないにもかかわらずサイズに依存した蛍光消光が生じている。先ほど述べたように今回作製したナノ構造体はアモルファスであると考えられるため、ペリレンナノ粒子で報告されたようにフォノンの状態がサイズに依存して変化したとは考えにくい。Kwon らは 9, 10-bis (4-(N-carbazolyl) anthracene nanoparticles のナノ粒子に関して、そのナノ粒子の表面粗さを変えると蛍光寿命が荒さの程度によって変化することを報告しており[4]、PDS9 の場合も表面の欠陥が蛍光消光を引き起こしている可能性が挙げられる。そのためサイズが減少するにつれて欠陥を有した表面の寄与が増大し、より大きな消光を与えたと考えられる。

c-spot における蛍光寿命イメージを Fig. 5-7 に示す。破線で囲った直径  $3\mu\text{m}$  程度の構造体は 18-20 ナノ秒の長い寿命を持つのに対し、実線で囲んだ直径  $1.5\mu\text{m}$  程度の構造体では 16 ナノ秒程度と大きな構造体に比べて寿命が短くなっている。これらの構造体では Fig. 5-4 から膜厚が半分程度になっていると思われ、サイズの減少にともない表面の効果が表れていると思われる。また大きい方の構造体に関してエッジの部分が中央に比べて寿命が短くなっており、このことも表面における蛍光消光を示唆している。

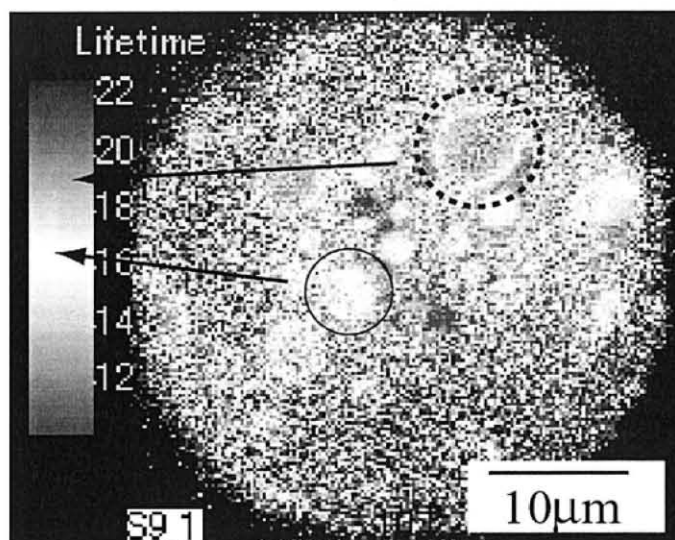


Fig. 5-7 Fluorescent lifetime image of c-spot. Bigger spot having 18-20 ns lifetime is surrounded by dashed line and smaller spot having around 16 ns lifetime is surrounded by solid line.

#### 5-4 消光剤による消光効率のサイズ依存性

ナノ構造体 c-spot と d-spot に蛍光の消光剤を加えてその影響がサイズに依存してどのように変化するかを調べた。蛍光消光剤としてメチレンブルー水溶液を用いた。一般的に空気中での蛍光サンプルを水で被うと周辺屈折率の変化により蛍光体上部で反射されて対物レンズへ導入されていた成分がなくなり、観測される蛍光強度が小さくなる。また今回用いた PDS9 は水の極性により表面での消光を受ける可能性があるためまず、メチレンブルーが実際に消光剤として機能するかどうかを調べた。Fig. 5-8 にフィルム状構造体にメチレンブルー水溶液を添加したときの蛍光寿命の変化を示す。このとき水溶液はチャンバー内に封入し、溶媒の蒸発と消光剤濃度の増加はない。消光剤を添加してから 90 分間程度の間だんだんと蛍光寿命が短くなっていく。励起光強度は蛍光退色が生じない程度に調整しており不純物の効果も無視できるので、この寿命の減少はメチレンブルーによる消光だと言える。また時間とともに消光効率が増加していることからこれは親水的なメチレンブルーが疎水的な PDS9 フィルム構造体へメチレンブルーが吸着していくことによる静的消光がおきているためと考えられる。

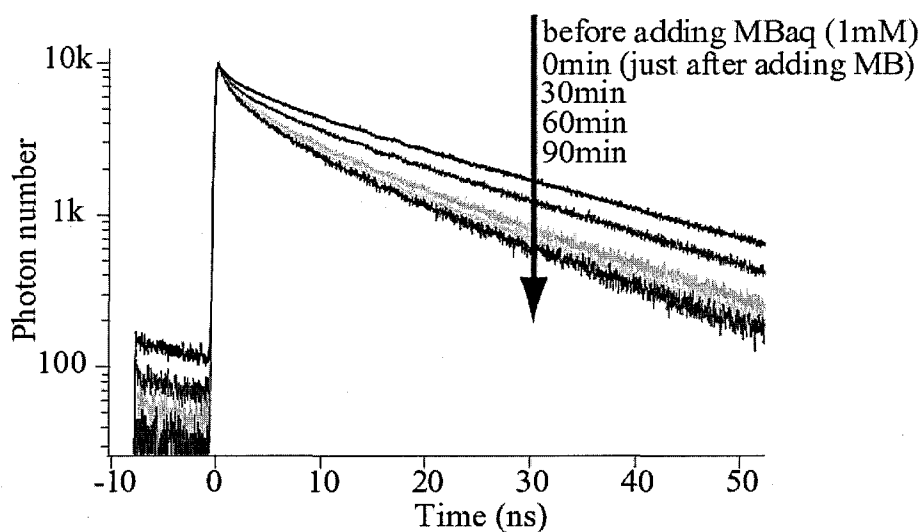


Fig. 5-8 Time change of fluorescent decay curves of PDS9 film before and after adding quencher.

次に c-spot、d-spot に対して消光剤を加えた時の蛍光強度の変化を Fig. 5-9 に示す。ここで消光剤を c-spot、d-spot に加えた場合蛍光強度の減衰が激しく蛍光寿命の測定が困難であったため強度の変化を指標とした。Fig. 5-9 から明らかなように c-spot つまり膜厚が小さいほど消光剤の影響を強く受けている。これは膜状構造体の時と同様に消光剤がナノ構造体の表面に吸着することによって蛍光消光が引き起こされていると考えられる。c-spot、d-spot は消光剤の添加前から表面での消光が確認されていたが、消光剤の添加により消光効率が増加したことから、表面の欠陥によって 100%の消光はされていなかったことがわかる。また平均の膜厚が 10 nm 程度である d-spot において表面に存在する分子は多く見積もっても全体の 1/10 であるが消光効率は 1/10 よりも大きい。このことから PDS9 のナノ構造体についても第 3、4 章で議論したように励起状態のエネルギー移動によって内部の励起状態が表面まで移動しそこで消光剤によって消光を受けたために、効率よく蛍光消光が起きたと考えられる。平均膜厚 60 nm 程度の c-spot1.2.3 の平均消光効率は 22%なので表面から約 12 nm が消光されていると考えると d-spot ではほとんど完全に消光されている結果と比較して妥当である。この値は第 3 章で述べた dendrimer ナノ粒子の場合の拡散長 70 nm と比較すると移動距離が短い。これは DPDI では発色団同士の電子相互作用が非常に弱いのに対し、

|          | Without quencher | With quencher |
|----------|------------------|---------------|
| c-spot 1 | 28000            | 9300 (0.33)   |
| c-spot 2 | 34500            | 5700 (0.17)   |
| c-spot 3 | 21400            | 3400 (0.16)   |
| d-spot 1 | 17000            | 500 (0.03)    |
| d-spot 2 | 24700            | 1100 (0.04)   |
| d-spot 3 | 17200            | 300 (0.02)    |

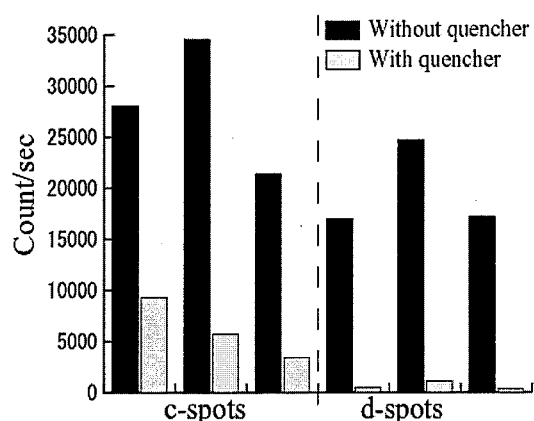


Fig. 5-9. Fluorescent intensity of c-spots and d-spots on three different parts before and after adding MB.

PDS9ではエキシマーを形成し、励起子がある分子に局在している影響のためと考えられる。しかし従来はエキシマー状態では分子のエネルギー移動距離は分子数個程度と考えられていたが、本実験は分子数で一桁以上大きい移動距離を有する可能性を示している。

#### 5-5 まとめ

キャスト法とディウェッティング法の2種類の溶媒蒸発法によりガラス基板上にサイズの異なるペリレンジイミド化合物(PDS9)のナノ構造体を作製し、AFM測定からディスク状ナノ構造体の直径と膜厚に比例関係があることを見出した。蛍光寿命イメージング(FILIM)によってナノ構造体蛍光寿命の膜厚依存性を測定し、空气中で膜厚の減少に伴い、また構造体のエッジの部分で蛍光寿命が特に短くなることからナノ粒子表面での周辺環境との相互作用やナノ粒子内部の不純物など以外にもナノ構造体表面の構造的な欠陥で蛍光消光が生じる可能性を示した。次に消光剤としてメチレンブルー水溶液を加え、フィルム状構造体の蛍光寿命が継時的に短くなることから、メチレンブルーによる蛍光消光がフィルム状構造体表面に吸着することによる静的消光であることを示し、ナノ粒子表面での欠陥構造による蛍光消光は部分的であることを示した。また消光剤を加えた場合の消光効率の膜厚依存性測定から、励起状態が強く束縛されるエキシマー状態においてもエネルギー移動

によって内部の励起状態が表面での効率的な反応に寄与し、その平均移動距離が 12 nm 程度であることを見積もった。

これらの結果はナノ粒子をセンサーなどに応用する場合に、粒径が小さくなるほど表面でのエネルギー移動効率が上がり FRET などのセンサー応用の場合は高い SN 比を得られることなど応用に向けて重要な知見である。

#### 参考文献

- [1] H. Langhals, R. Ismael, O. Yürük : *Tetrahedron* **56** (2000) 5435.
- [2] H. Luo, D. Gersappe : *Macromolecules* **37** (2004) 5792.
- [3] J. A. Spitz, R. Yasukuni, N. Sandeau, M. Takano, J. J. Vachon, R. Méallet-Renault, R. B. Pansu, *J. Microsc* : **229** (2008) 104.
- [4] E. Kwon, H.R. Chung, Y. Araki, H. Kasai, H. Oikawa, O. Ito, H. Nakanishi, *Chem. Phys. Lett.* **441** (2007) 106.

## 第6章

### 蛍光性ナノ粒子を用いた細胞プローブ応用への展望

#### Perspective for applying fluorescent nanoparticles to bio-probe

---

##### 6-1 緒言

ライフサイエンスにおいて蛍光材料を用いた細胞染色やタンパク質の可視化、タンパク相互作用のダイナミクス測定などは必要不可欠なキーテクノロジーである。第1章において従来用いられていた有機色素分子、蛍光タンパク質、半導体ナノ粒子に加えて近年では有機蛍光性ナノ粒子が新しい発光材料として注目されている背景を述べ、従来の色素分子や蛍光タンパク質では光安定性が低く、観察中の光退色により1分子トレースや長時間の継時観測を困難にさせていることや、半導体ナノ粒子での明滅現象、毒性の問題に触れた。そして前章までに示した有機ナノ粒子の蛍光特性より、始めに期待されたように、有機ナノ粒子では高い吸収係数を持つ、安定した光源となり得ることが示され、蛍光プローブとして応用が期待される。しかし生体応用特に *in vivo* での応用を考える場合には生理的環境下における有機蛍光性ナノ粒子の安定性や細胞との相互作用の解明が重要である。半導体ナノ粒子や蛍光分子をドーピングしたポリマーナノ粒子では表面修飾により生理的環境下での分散安定性を確保し、また細胞へのナノ粒子の導入や特異的な染色などが報告されているが有機ナノ粒子では、生理的環境下での細胞との相互作用はほとんど報告されていない[1]。

本章ではまず生理的環境下においてナノ粒子作製を行った結果を報告する。レーザーアブレーションにより BPDI ナノ粒子を作製し、吸収スペクトル測定から生理的リン酸緩衝液中でのナノ粒子の生成効率と分散安定性を評価した。次に培養したマウス NIH3T3 細胞の培養液を、BPDI ナノ粒子を分散させた生理的リン酸緩衝液に置換し、ナノ粒子と細胞の相互作用を、共焦点顕微鏡蛍光イメージングにより観測した結果を示す。最後にナノ粒子のプローブ応用へ向けた可能性を議論した。

##### 6-2 試料および実験

蛍光性ナノ粒子は BPDI を用いてレーザーアブレーション法により作製した。化合物、作製法の詳細は第2章に示す。BPDI ナノ粒子を細胞へ応用する際に使用した生理的緩衝溶液

として PBS (NaCl 1.37M, KCl 27mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 100mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 18mM)、TBS (NaCl 137mM, KCl 2.7mM, Tris-base 25mM)を用いた。細胞はマウス由来の NIH3T3 マウス線維芽細胞 (NIH3T3 fibroblastscell) を用いた(Fig. 6-1)。NIH3T3 細胞はマウスの腫瘍から得られた繊維芽細胞であり、増殖能の高い細胞である。細胞は液体窒素で凍結保存したものを解凍し、1日おきに培養液交換、3日おきに

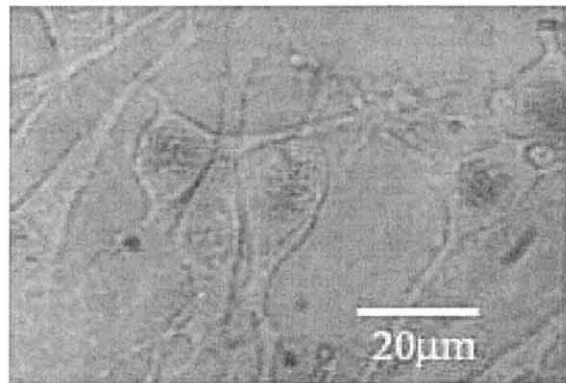


Fig. 6-1 Transmission image of mouse NIH 3T3 fibroblast cell.

継代を繰り返して使用した。継代には組織培養用ベントキャップフラスコ (IWAKI 3123-075X) を用い、実験の際はフィブロネクチン(CALBIOCHEM 341635)をコートしたガラスボトムディッシュ (秋田住友ベーク株式会社) に培養したものをを用いた。蛍光観察は共焦点蛍光顕微鏡 (Olympus, FLUOVIEW FV300) を使用した。励起光に連続発振の半導体レーザー (Shanghai laser, DPSS, 473 nm)を用い、100 倍の油浸対物レンズ(Olympus, N. A. 1.25) で観察した。以下に細胞培養液の調整方法、冷凍保存された細胞の解凍と培養方法を示す。

#### 細胞培養液の調整

- ① L-グルタミン(Wako)292 mg を、少量の液体培地 (DMEM Sigma D5796)に溶かし、フィルター滅菌する。
- ② DMEM 450 ml に①の L-グルタミン溶液、ペニシリン-ストレプトマイシンの混合液 5 ml (GIBCO Cat.No.15140-148) 、57°Cで補体因子を不活性化させた血清 50ml (GIBCO Cat. No. 26140-079) を加え懸濁する。

#### 細胞の解凍

- ① 液体窒素凍結保存容器から冷凍保存チューブを取り出し、37°Cの湯浴で温める。
- ② 冷凍保存チューブを遠心分離(1000 rpm, 5 min)にかけ上澄みを吸い出し、12 ml の細胞培養液を加えて懸濁した後、培養フラスコにまく。

#### 細胞の培養

- ① 胞培養液とリン酸緩衝液(PBS Sigma D4031)を湯浴で 37°Cに温める。
- ② 培養フラスコの培養液を除き、PBS ですすいだあと PBS を除き、トリプシン/EDTA (GIBCO 25300-54)を加えて 37°Cのインキュベーターに 30 秒入れ、顕微鏡で細胞が剥がれたのを確認したあと、培養液を入れトリプシンの活性を止める。
- ③ 1x10<sup>4</sup> 個/ml に②の細胞懸濁液を希釈して新しい培養フラスコに移し、CO<sub>2</sub> インキュベーター

ターで37°C、CO<sub>2</sub>濃度5%のもと培養する。

- ④ ガラスボトムディッシュに培養する際は37°Cに温めたDMEMに5 μg/mlになるようにフィブロネクチン溶液を加えて45分室温に置いたあとPBSで洗浄したものに細胞懸濁液を加え③の条件で培養した。

### 6-3 生理的緩衝液中でのナノ粒子の安定性

Fig 6-2 に BPGDI の PBS 懸濁液にフルエンス 50mJ/cm<sup>2</sup> でレーザーを照射した場合の吸収スペクトルを示す。PBS 中でもレーザーの照射時間の増加に伴い分子的な吸収バンドが表れナノ粒子が生成していることがわかる。しかし BPGDI 水懸濁液と PBS 懸濁液の結果と比較すると、フルエンス 50 mJ/cm<sup>2</sup> で 10 分間レーザーを照射した場合、PBS 懸濁液のピーク吸光度は水懸濁液の 6 割程度しかなくナノ粒子の生成効率が悪い。また PBS 懸濁液での吸収スペクトルではピーク位置の長波長シフトと 600 nm 以降により大きな吸収の裾が見られる。第 3 章で議論したようにピーク位置の変化と吸収の裾の主な原因は生成したナノ粒子の散乱であり、PBS 懸濁液ではより大きな散乱の寄与が認められることから、生成したナノ粒子の粒径は水懸濁液中で生成したナノ粒子の粒径よりも大きいと考えられる。

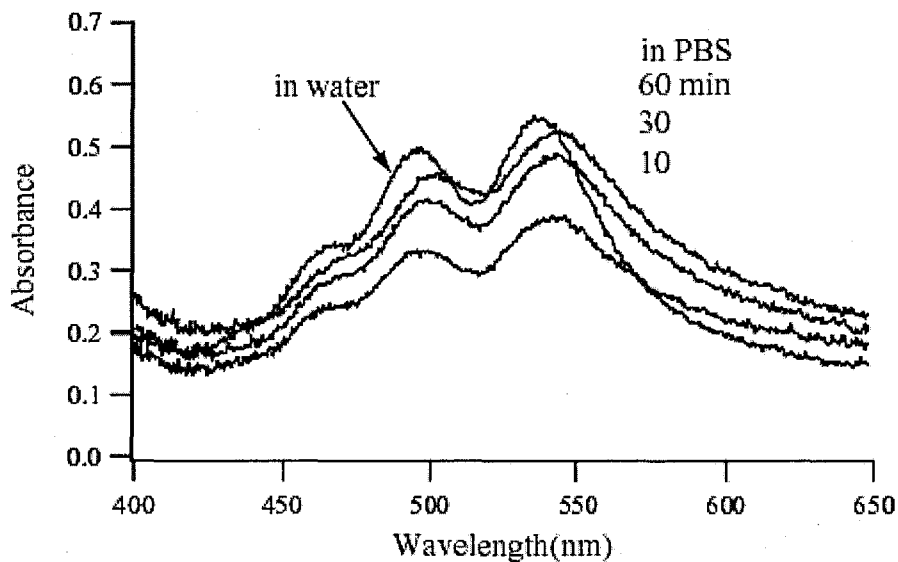


Fig. 6-2 Absorption spectra of BPGDI in PBS after 10, 30, 60 minutes laser irradiation at 532 nm at 50 mJ/cm<sup>2</sup> from the top and in water after 10 minutes laser irradiation at 532 nm at 50mJ/cm<sup>2</sup>.



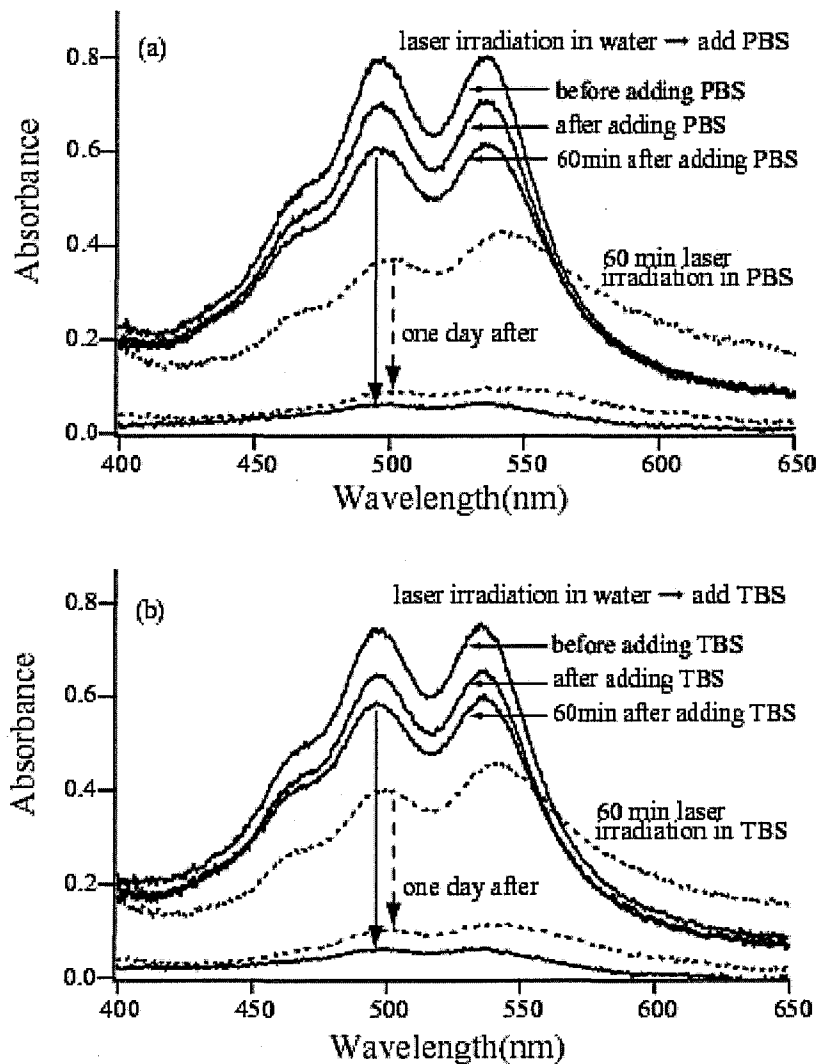


Fig. 6-3 (a) Time change of absorption spectra of BPDI before, just after, 60 min after and one day adding in PBS. (b) Time change of absorption spectra of BPDI before, just after, 60 min after and one day adding in TBS. PBS and TBS were added after 60 minutes laser irradiation at 532 nm at 50 mJ/cm<sup>2</sup>.

次に水中で生成したナノ粒子に緩衝溶液を添加した場合の吸収スペクトルの変化を観察した。第2章で示したようにレーザーアブレーションで作製したBPDIナノ粒子は水中では極めて高い分散安定性を有する。Fig.6-3 (a) にフルエンス  $50 \text{ mJ/cm}^2$  で吸光度が飽和するまで60分間レーザーを照射後にPBSを加えた場合の吸収スペクトルを示す。この時、PBSは通常使用する10倍の濃度に調整し、ナノ粒子コロイド溶液とPBSを9:1の割合で混合した。PBS添加後、ピーク吸収度は添加前よりも低下し、添加後1時間でさらに低下を続けた。しかしPBS添加後1時間経過後でもPBS中でフルエンス  $50 \text{ mJ/cm}^2$  で60分間レーザーを照射した場合の吸収スペクトルよりは高いピーク吸光度を維持している。単純なDLVO理論によりナノ粒子の分散安定性を考えると[2]、バッファーのような高濃度の電解質溶液の中では電気二重層斥力が弱くなりナノ粒子は凝集しやすくなる。第3章ではレーザー照射に伴う表面の酸化などなんらかの表面状態変化によるDPDIナノ粒子のゼータ電位の変化を報告した。BPDIナノ粒子においてもDPDIナノ粒子と同様に表面電位の変化が起きていると考えられ、電解質溶液においてもナノ粒子の分散安定性を高めているのではないかと考えられる。しかしながらBPDIコロイド溶液を一日静置したところ、後からPBSを加えた場合、PBS中でナノ粒子化を行った場合のどちらでも吸光度が1/5程度にまで減少した。光学セルの底には沈殿物が確認されナノ粒子はほとんど凝集したと考えられる。また上記と同様の実験をTBS中で行った結果をFig. 6-3 (b) に示す。TBSでの結果はPBSと同様の傾向を示し、ナノ粒子の生成効率もほとんどPBSの場合と変化がなかった。このことから電解質の組成の違いはナノ粒子の生成にあまり影響を与えていないと考えられる。

最後にPBS中でBPDIナノ粒子を作製した場合の蛍光スペクトルをFig. 6-4に示す。培養液DMEMにナノ粒子を加えた場合、蛍光スペクトルはエキシマー発光ではなくモノマー発光を示し、DPDIは水性溶媒であるDMEMには可溶であることを示している。しかしPBS中での大きなストークスシフトと幅の広いスペクトルの特徴はエキシマー由来のものであり、PBS中でもBPDIが分子として溶け出さず、ナノ粒子として存在していることがわかる。また蛍光スペクトルのピーク波長が水中で作製したBPDIコロイド溶液のスペクトルよりも長波長にシフトしており形状も完全に相似ではないことからPBS中でアブレーションを行った場合、塩化物などPBS中のイオンとなんらかの化合物を形成している可能性も考えられる。

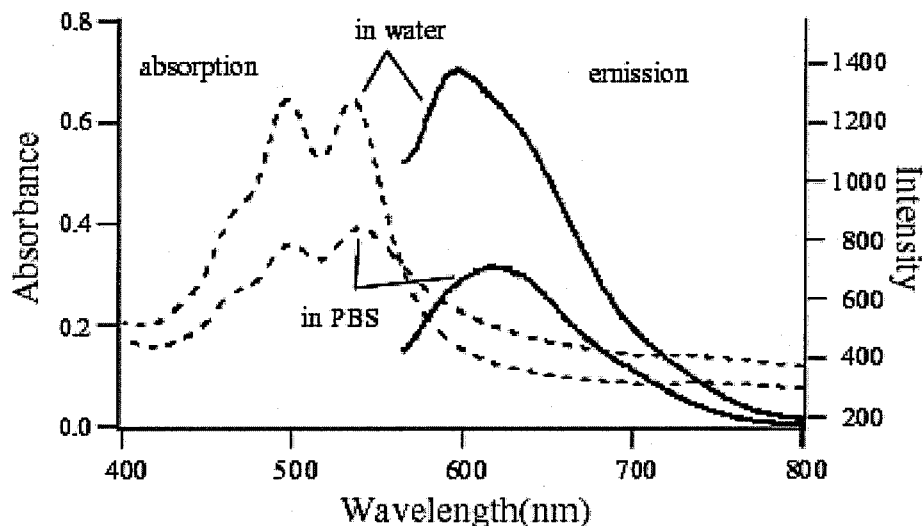


Fig. 6-4 Absorption and fluorescence spectra of BPD1 colloidal solution in water and PBS. Colloidal solution was prepared 532 nm laser irradiation at 50 mJ/cm<sup>2</sup> for 50 minutes. PBS was added after laser irradiation.

#### 6-4 ナノ粒子を用いた細胞の蛍光イメージング

前節でレーザーアブレーションにより作製したナノ粒子コロイド溶液に生理的緩衝溶液を添加した場合、1 時間程度であればナノ粒子として緩衝溶液中に存在することを示した。そこで実際に培養細胞に蛍光性ナノ粒子を添加した場合の細胞とナノ粒子の相互作用を共焦点顕微鏡により観察した。ガラスボトムディッシュに培養したマウス NIH3T3 細胞の培養液とナノ粒子を分散させた生理的緩衝溶液を置換した。12 時間 37°C、5% CO<sub>2</sub> の条件下でインキュベートした NIH3T3 細胞の散乱像と蛍光像を Fig. 6-5 に示す。細胞の外ではナノ粒子の凝集体が多数確認されるが、細胞もナノ粒子で染色されている。共焦点顕微鏡による 3 次元測定によりこのナノ粒子は細胞表面ではなく細胞質に存在することが確認され、また核内にはナノ粒子は見られず小胞体やゴルジ体のような細胞器官の存在する辺りにナノ粒子が局在していることが明らかになった[3]。ナノ粒子が細胞に取り込まれた機構としていくつかの理由が考えられる。まずひとつは細胞の飲食作用であるエンドサイトーシス・エキサイトーシスを介した取り込みである[3]。しかし一般的にはエン

ドサイトーシスでは 100 nm、エキサイトーシスではそれ以下の粒径の粒子が細胞に取り込まれると考えられている。ナノ粒子が凝集せずに分散している場合はそのそれらの機構による取り込みの可能性も考えられるが 2 つ以上ナノ粒子が凝集すればおそらく飲食作用による取り込みの上限を超える粒径に達していると考えられる。他にはナノ粒子が細胞膜を透過した可能性がある。細胞染色用の色素の場合、疎水性分子は細胞膜を通過して細胞内部へ入ることができる。実際に水中で作製したナノ粒子を培養液へ直接添加した場合の蛍光イメージを Fig. 6-6 に示す。前節で述べたように BPDI ナノ粒子は培養液である DMEM に可溶であるため、培養液中では BPDI は分子として存在する。このとき Fig. 6-6 から明らかのように BPDI は細胞内部に存在し、細胞膜を通過もしくは細胞に取り込まれていることがわかる。またこの時の時間スケールはナノ粒子添加後、数時間である。このように BPDI 分子は疎水的であるために細胞膜を通過することが可能であると考えられ、同様に BPDI ナノ粒子も細胞膜を通過した可能性が考えられる。しかし緩衝溶液中でのナノ粒子の凝集を考えるとナノ粒子のサイズは 100 nm、もしくはそれ以上になっていると思われ、疎水的とはいえ簡単に細胞膜を通過し得るとも考えにくい。本実験条件では緩衝溶液中で細胞を 12 時間培養しており、これにより細胞活性が通常より低下していると思われる。細胞活性の低下により細胞膜の流動性が高くなることが知られており[4]、このことも 100 nm という大きな粒子が細胞膜を通過したことに影響しているのではないかと考えられる。また細胞内に導入されたナノ粒子が細胞内にとどまっていることは注目すべき点である。細胞膜を通過可能な疎水性分子の場合は、細胞内に導入された分子が再び細胞外に放出されるのを防ぐために、細胞内で加水分解を起こさせて親水化し細胞膜の外にでるのを防ぐなど複雑なプロセスを必要とする。ナノ粒子の場合は特別な表面修飾などもされておらず、細胞質内に存在する細胞器官への物理吸着によって細胞質内にとどまっているのではないかとと思われる。

### 6-5 細胞プローブ応用への展望

前章までに有機ナノ粒子は高い吸収係数を持つ、安定した光源となり得ることが示され、また内部の励起状態の表面へのエネルギー移動により、高い感度でナノ粒子周辺環境をモニターする蛍光プローブとなり得ることが示された。そして本章のナノ粒子が細胞に取り込まれたという結果から、ナノ粒子の細胞プローブへの応用が期待される。最も期待される応用は単一ナノ粒子による局所環境プローブである。本論文では DPDI のナノ粒子を用い

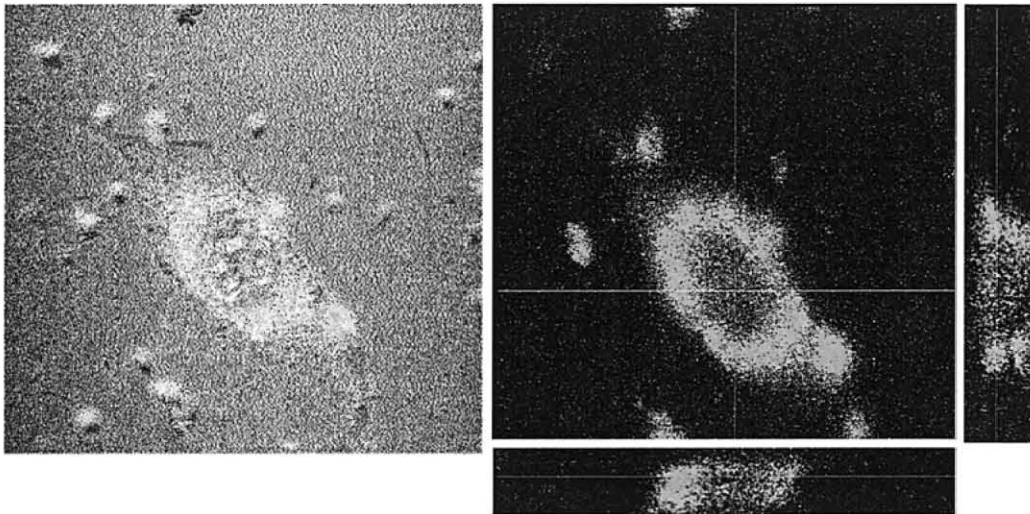


Fig. 6-5 Transmission image (left) and fluorescence image (right) of NIH3T3 cell stained with BPDl nanoparticles. Cross-section of fluorescence images is also put in the figure.

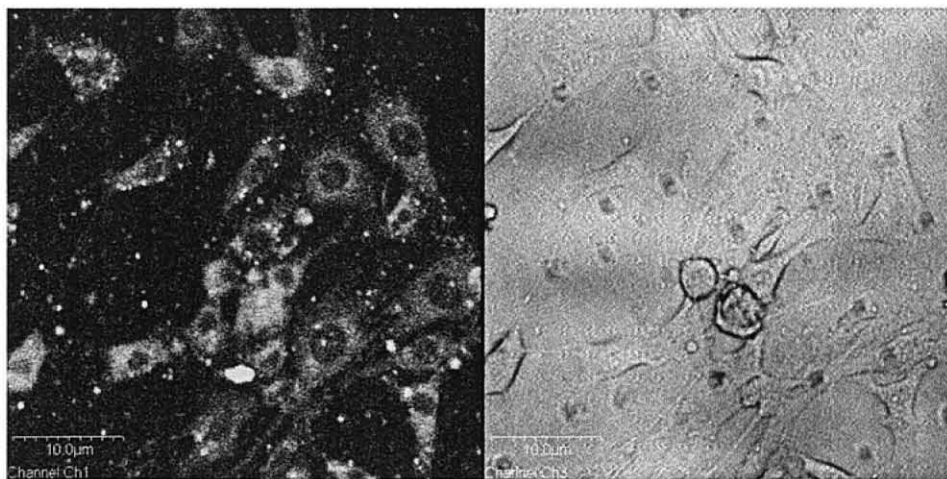


Fig. 6-6 Transmission image (right) and fluorescence image (left) of NIH3T3 cell stained with BPDl molecules.

たために表面での反応が電子移動消光という形で現れたが、ナノ粒子に用いる分子に金属イオン感受性などを付加することでナノ粒子表面において高い感度で金属イオンを検出可能なプローブが作製可能だと考えられる。そしてナノ粒子の安定光源としての性質を利用し、色素分子や半導体ナノ粒子では退色や明滅現象のために不可能であったミリ秒単位の環境変化のダイナミクスも測定可能となることが期待される。

今後このような蛍光性有機ナノ粒子を細胞プローブとして応用することを考えた場合、まず有機ナノ粒子と細胞がどのような相互作用を持つか、例えばまずナノ粒子が細胞内へ取り込まれるメカニズムなどを明らかにすることが重要である。一般的に半導体ナノ粒子などを用いて細胞を染色する際にはナノ粒子を培養液中で分散させるための表面修飾と、細胞への特異的吸着や導入を行う場合には更なる粒子表面の煩雑な修飾を必要とする。しかし、今回用いた BPDI ナノ粒子では特別な表面修飾は行っていないにもかかわらず、ナノ粒子は細胞内に蓄積した。飲食作用を介した取り込みであれば、その速度は 1 時間あたりに細胞体積の数%であるため、蛍光性ナノ粒子の高い光安定性を利用した継時観察によってそのダイナミクスが観察可能であると思われる。また細胞膜を通過する可能性を評価するためには細胞の活性を評価しなければならない。これはすでに市販されている、細胞の酵素活性や膜流動性を評価する試薬と同時染色を行うことで実現可能だと考えられる。さらには細胞へ取り込まれるナノ粒子のサイズによる効果や、表面が疎水性か親水性であるかのような表面状態が細胞への取り込みにどのような影響を与えるかも重要である。

また近年レーザーを用いたマイクロマニピュレーション技術が注目を浴びており、有機ナノ粒子に限らず単一のナノ粒子や細胞の操作・加工に関する研究が報告されている[5, 6]。例えばレーザートラッピング技術を用いればナノ粒子を細胞の任意の場所に誘導しその局所環境変化を蛍光スペクトルからモニターすることも可能かと思われる。Hosokawa らはフェムト秒レーザー照射によって細胞膜に穴をあけることで通常では細胞に導入されない分子を細胞へ導入したり[7]、フェムト秒レーザーの誘起する衝撃波を利用したナノ粒子の細胞への導入などを報告している[8]。

本実験で得られたナノ粒子の蛍光特性に基づく分子設計とナノ粒子と細胞間の相互作用の評価、ナノ粒子のマニピュレーション技術によって、新規有機ナノ粒子プローブの開発にとどまらず有機ナノ粒子の毒性や、さらにナノ粒子を用いたドラッグデリバリーの可能性など、有機ナノ粒子の細胞応用研究全般へ大きく貢献することが可能であると考えられる。

参考文献

- [1] C. W. C. Chen, S. M. Nie: *Science* **281** (1998) 5385.
- [2] J. N. Israelachvili: *Intermolecular and Surface Forces* (Academic Press Ltd. London 1985)
- [3] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J. D. Watson: *The Cell* (Newton Press, New York, 1995 )
- [4] S. Lee, A. G. Doukas: *IEEE. J. Selected Topics Quant. Elect.* **5** (1999) 997.
- [5] R. Yasukuni, J.-A. Spitz, R. Meallet-Renault, T. Negishi, T. Tada, Y. Hosokawa, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki, H. Masuhara: *Applied Surface Science* **253** (2007) 6416.
- [6] C. Hosokawa, H. Yoshikawa, H. Masuhara: *Phys. Rev. E* **70** (2004) 061410.
- [7] A. Yamaguchi, Y. Hosokawa, G. Louit, T. Asahi, C. Shukunami, Y. Hiraki, H. Masuhara: *Appl. Phys. A*, **93** (2008) 39.
- [8] Y. Hosokawa, S. Iguchi, R. Yasukuni, Y. Hiraki, C. Shukunami, H. Masuhara: *Appl. Surf. Sci.* Accepted.

---

## 第7章

### 総括

#### Summary

---

蛍光材料は生物学・化学など多岐に渡る分野で、イメージングやセンシングのために広く使用されており、機能性蛍光分子を利用して蛍光顕微鏡の回折限界を超える分解能が実現されるなどその応用はさらなる拡大をみせている。蛍光性ナノ粒子は近年注目を集める蛍光材料であり、半導体ナノ粒子ではサイズに依存したユニークな発光特性を有することから、マルチカラーイメージングやコーディングなどへの応用例が報告されている。一方で有機分子の蛍光性ナノ粒子は、分子集合体として高い吸収係数、光安定性に加え、温度や pH 感受性のような分子由来の機能性を有する蛍光材料としての可能性が期待されている。しかし有機ナノ粒子はその作製とサイズ制御の困難さから、サイズ依存性のような一般的な発光特性に関する研究が限られていた。本論文は蛍光性有機ナノ粒子の新規作製手法として液中レーザーアブレーション法を提案し、作製したナノ粒子の詳細な蛍光特性をまとめたものである。以下に本論文における成果を総括する。

第2章では液中レーザーアブレーションを用いて、蛍光量子収率の高い蛍光分子であるペリレンジイミド化合物 (BPDI) と、同じくペリレンジイミドを発色団に持つ dendrimer (DPDI) のナノ粒子を作製した結果をまとめた。レーザー照射条件の変化に伴う BPDI、DPDI 懸濁液の吸収スペクトルの変化と走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察から BPDI、DPDI ナノ粒子においても高強度のレーザー照射によって効率よくナノ粒子が生成することを示し、レーザー照射条件を調整することで光分解を起こすことなく、分散安定性の高いナノ粒子が生成すること可能であり、また粒径の制御が可能であることが示された。また DPDI 懸濁液に分散剤として SDS または CHAPS を添加したところ、分散剤の種類によってナノ粒子化の効率に大きな差が生じることが明らかになった。

第3章ではコロイド溶液の平均粒径に依存した dendrimer ナノ粒子 (DPDI ナノ粒子) の消失・蛍光スペクトルの変化を議論した。コロイド溶液の平均粒径に依存した消失スペクトルの変化を示し、Mie 理論を用いたシミュレーション結果から、粒径の変化に伴う消失ス



ペクトルの変化は、主に粒子の散乱に起因し、コロイドの吸収スペクトルは粒径に依存して変化しないことを明らかにした。またそれぞれの溶液のスペクトルとの比較から BPD1 ナノ粒子は典型的な有機固体からの発光であるエキシマー発光を示し顕著な蛍光強度の低下を示すのに対し、DPDI はデンドロン基により発色団同士の電子相互作用が抑制され、溶液と固体で良く似た吸収・発光スペクトルを示し、高い輝度を有することを明らかにした。DPDI コロイド溶液の蛍光量子収率の粒径依存性を測定し、サイズの減少に伴って蛍光量子収率の顕著な低下を観測した。DPDI 分子の蛍光収率がアセトンのような極性の高い溶媒中で顕著に低下する事実から、サイズ減少に伴う蛍光量子収率低下の原因として水の高い極性による表面励起状態の電子移動消光と、ナノ粒子内部の励起状態がエネルギー移動により表面へ拡散するという機構を示し、励起状態の拡散長をおよそ 70 nm と見積もった。また粒径を一定に保ったまま、レーザー照射条件を変化させて蛍光量子収率を比較し、高強度のレーザー照射によって生じる表面状態の改質や光生成物もナノ粒子の消光を促進することが示唆された。

第4章ではポリマー薄膜中に分散させた DPDI 単一ナノ粒子の時間分解顕微蛍光分光を行い、その蛍光特性を DPDI 単一分子との比較からまとめた。ナノ粒子では分子の 1000 分の 1 以下の励起光強度で分子と同等の蛍光強度を得ることができ、また単一分子に特有のスペクトル分散と明滅減少もみられないことから DPDI ナノ粒子は輝度の高い安定な点光源であることが示された。また単一ナノ粒子の蛍光強度と寿命の時間発展を測定した結果、ナノ粒子はそれぞれに異なる寿命の減衰を示し、ステップ状の蛍光強度変化と蛍光寿命の変化を示すものが存在することから、ナノ粒子の発光のダイナミクスとして、ナノ粒子内部で生成した励起状態がエネルギー移動により粒子内部を拡散する過程で主に表面などで消光され、エネルギー的な安定な発光サイトが一時的に生じた場合にはナノ粒子は発光サイトに補足され寿命の長い分子的な振る舞いをするという機構を提案した。

第5章では、溶媒蒸発法により作製したペリレンジイミド化合物ナノ構造体の蛍光寿命イメージングの結果をまとめた。ガラス基板上に作製したサイズの異なるペリレンジイミド化合物 (PDS 9) のナノ構造体の AFM 測定からディスク状ナノ構造体の直径と膜厚に比例関係があることを見出した。ナノ構造体の厚さの減少に伴い、蛍光寿命が短くなることを示し、表面で蛍光消光が生じていることを明らかにした。蛍光消光剤としてメチレンブルーを添加した水溶液中における消光効率の膜厚依存性から構造体内部での励起子の

平均移動距離を考察した。

第6章ではレーザーアブレーションにより作製したBPDIナノ粒子コロイド溶液の生理的環境下における安定性を吸収スペクトルの変化から評価し、緩衝溶液中でもナノ粒子は数時間分散可能であることを示した。緩衝溶液に分散させたBPDIナノ粒子を添加したマウスNIH3T3細胞の共焦点顕微蛍光イメージングによりナノ粒子が細胞膜を通過し細胞内に取り込まれることを明らかにし、蛍光性ナノ粒子の生細胞プローブとしての展望を示した。

本研究により液中レーザーアブレーション法を用いて蛍光性有機分子であるペリレンジイミド化合物とその dendrimer のナノ粒子が作製可能であることが示され、作製されたナノ粒子のサイズに依存した蛍光特性と表面や周辺環境を考慮した蛍光ダイナミクスに関する知見を与えることができた。しかし、今回取り扱ったナノ粒子は粒径が数十ナノから数百ナノメートルの比較的大きなナノ粒子であり、プローブとしての応用を考えるとより粒径の小さなナノ粒子を作製し、その蛍光特性も明らかになることが望ましい。また作製されたコロイド溶液は粒径分布が大きく、単一ナノ粒子測定においてもその正確な粒径や形状は明らかになっていない。これらを踏まえ、今後、レーザー照射条件の最適化による粒径の減少と均一化や、蛍光顕微鏡と原子間力顕微鏡などを組み合わせたスペクトル情報と粒径・形状の同時測定を行うことで、より詳細なナノ粒子の蛍光特性の解明とそれに基づいた新規材料開発への展開が期待される。

## Summary

---

Fluorescence imaging and spectroscopy have been widely used in the field of life science, and organic fluorescent nanoparticles have attracted increasing interest as one of the promising materials as functional fluorescent probes for cell-imaging and sensing of biomaterials. However, there is limited research of the optical properties depending on the size, surface nature, and surrounding environments and so on. In the thesis I present the new fabrication method of fluorescent organic nanoparticles and consider their optical properties in prospect of biological applications. Highly fluorescent nanoparticle was successfully fabricated using a perylenediimide derivative having bulky dendron group by laser ablation in water. The size-dependent optical properties in a single nanoparticles level and of bulk colloidal solution were investigated. Main results in each chapter are summarized as follow.

In chapter 2, fabrication of fluorescent organic nanoparticles of BPDI (commercially available perylenediimide) and DPDI (dendronized perylenediimide) by laser ablation in water was demonstrated. Microcrystals of fluorescent molecules having complex structures converted into nanoparticle colloids by laser ablation without remarkable photo-degradation by adjusting laser conditions and obtained colloidal solutions were quite stable for more than a week. Dynamic light scattering measurements demonstrated that DPDI nanoparticles with a mean size ranging from 150 to 400 nm were successfully fabricated by varying the laser fluence.

In chapter 3, the size-dependence of extinction and fluorescent properties of BPDI and DPDI colloids were investigated. It was confirmed that the size dependent extinction spectra of DPDI colloids could be attributed to the contribution of light scattering loss and absorption spectra doesn't change depending on the size. Both the absorption and the emission spectra of DPDI nanoparticles were similar to those of

molecules in solution, which indicated the weak electronic interactions of DPDI nanoparticles due to the bulky dendron groups situated in the bay positions of the PDI core. On the other hand, BPDI nanoparticles showed a different absorption spectrum from that of molecules solution and exhibited a broad excimer fluorescence band. It was found that fluorescence quantum yields of DPDI nanoparticles are smaller than that of DPDI molecules in non-polar solvent and the yields decreased drastically with particle size decreasing. It was suggested that the surface quenching due to polar environment in water, and an excited state migration in the nanoparticle by energy hopping. The laser irradiation effect on the fluorescence intensity suggests that ionization or oxidized species are generated at the particle surface under the intense laser excitation.

In chapter 4, fluorescent properties of DPDI single nanoparticles were examined under time-resolved confocal fluorescence microscope and compared with those of single molecule. Spectrum measurements of 50 individual nanoparticles demonstrates that their emission peak position is almost same to each other while single molecules showed a large scatter on their emission peak. The result is a sign of a more rigid system and a fluorescence protected from its environment like bulk system. Time-traces fluorescent intensity measurement revealed almost no blinking and a higher photo-stability compare to single molecules, which confirms the non-affection from the surrounding environment. A stepwise change on fluorescent intensity and lifetime suggested the exciton energy migrates in a nanoparticle and will be deactivated at quenching site.

In chapter 5, the size dependent quenching efficiency of PDS9 nano structures prepared on a glass substrate by cast and dewetting methods was investigated. Wide fields fluorescence lifetime measurement on different sized nano structures under air atmosphere revealed that thinner structures had shorter fluorescence lifetime than thicker structures probably due to exciton trap sites such as defects or photoproducts at the surface. The size quenching efficiency of PDS9 nano structures measured by covering with methylene blue water solution was examined. Exciton migration length in PDS9 nano structures was estimated from the size dependent quenching efficiency to

around 12 nm.

In chapter 6, fluorescent imaging of live-cell using BPDI nanoparticles were demonstrated. It was confirmed that BPDI nanoparticles dispersed in a buffer solution for a few hours. BPDI nanoparticles in buffer solution was added to cell culture medium of NIH 3T3 cells and fluorescent images of the cells were observed with a confocal microscope. It was confirmed that BPDI nanoparticles could go through cell membrane. Finally a future perspective of potential application of fluorescent organic nanoparticles to bio-sensing or bio-imaging was discussed.

## 業績リスト

### 本学位論文に関する原著論文

1. “Fabrication of fluorescent nanoparticles of dendronized perylenediimide by laser ablation in water ”  
**Ryohei Yasukuni**, Tsuyoshi Asahi, Hiroshi Masuhara, Michel Sliwa, Johan Hofkens, Frans. C. De Schryver, Mark Van der Auweraer, Andreas Herrmann, Klaus Müllen  
*Applied Physics A* **93**, 5-9, (2008)
3. “Size dependent absorption and fluorescence of dendronized perylenediimide nanoparticle prepared by laser ablation in water”  
**Ryohei Yasukuni**, Michel Sliwa, Johan Hofkens, Frans. C. De Schryver, Andreas Herrmann, Klaus Müllen, Tsuyoshi Asahi  
*Japanese Journal of Applied Physisc* (submitted)
4. “Single particles level characterization of fluorescent organic nanoparticles based on dendronized perylenediimide”  
**Ryohei Yasukuni**, Michel Sliwa, Junichi Hotta, Johan Hofkens, Frans. C. De Schryver, Andreas Herrmann, Klaus Müllen, Tsuyoshi Asahi  
*The Journal of Physical Chemistry C* (in preparation)
5. “Size Dependent Fluorescence Quenching on Perylenediimide nanostructures”  
**Ryohei Yasukuni**, Tsuyoshi Asahi, Arnord Brosseau, Rachel Méallet-Renault, Heinz Langhals, Robert B. Pansu  
*Journal of Photochemistry and Photobiology A*. (in preparation)

### 関連原著論文

1. “Scanning-less wide-field single-photon counting device for fluorescence intensity, lifetime and time-resolved anisotropy imaging microscopy ”  
Jean-Alexis Spitz, **Ryohei Yasukuni**, Nicolas Sandeau, Minako Takano, Jean-Jacques Vachon, Rachel Meallet-Renault, Robert B Pansu  
*Journal of Microscopy* **229**, 104-114, (2008)

## その他の原著論文

1. “Realignment process of actin stress fibers in single living cells studied by focused femtosecond laser irradiation ”  
**Ryohei Yasukuni**, Jean-Alexis Spitz, Rachel Meallet-Renault, Takayuki Negishi, Takuji Tada, Yoichiroh Hosokawa, Tsuyoshi Asahi, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
*Applied Surface Science* **253**, 6416-6419, (2007)
2. “Gene delivery process in single animal cell after femtosecond laser microinjection”  
Yoichiroh Hosokawa, Seriya Iguchi, **Ryohei Yasukuni**, Yuji Hiraki, Chisa Shukunami, Hiroshi Masuhara  
*Applied Surface Science* Accepted

## 総説・解説等

1. “Single Cell Processing in Water Using Focused Femtosecond Laser-Induced Shockwave and Cavitation Bubble”  
Yoichiroh Hosokawa, **Ryohei Yasukuni**, Jean-Alexis Spitz, Takuji Tada, Takayuki Negishi, Atsushi Yamaguchi, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Tsuyoshi Asahi, Rachel Meallet-Renault, Hiroshi Masuhara  
*Handai Nanophotonics* Vol. 3, Elsevier, pp. 245-254, (2007)
2. 「集光フェムト秒レーザーが誘起する諸現象を利用した細胞制御技術」  
細川陽一郎、安国良平、梶貴博、山口敦、井口世利也、朝日剛、増原宏  
*レーザー研究* Vol. 35, No. 7, pp. 430-435, (2007)
3. 「フェムト秒レーザーが可能とする細胞内加工とそのイメージング」  
細川陽一郎、安国良平、増原宏  
*バイオプロセスハンドブック* 第3編 第2章、NTS, pp. 368-376, (2007)

国際学会発表

1. "Nondestructive processing of cultured animal cells by femtosecond laser induced shockwave,"  
Yoichiroh Hosokawa, Takabayashi Jyun-ichi, Shigenori Miura, Ryohei Yasukuni, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
The 5th International Symposium on Laser Precision Microfabrication (LPM 2004), 11 - 14 May 2004, Nara, Japan.
2. "Nondestructive processing of single biological cells by femtosecond laser induced shockwave"  
Yoichiroh Hosokawa, Ryohei Yasukuni, Tsuyoshi Omoto, Hiroshi Masuhara  
Gordon Research Conference on Laser Interactions with Materials, 1 - 6 Aug 2004, Andover, New Hampshire, USA
3. "Femtosecond laser-induced ablation and contraction dynamics of actin filaments in mouse NIH3T3 fibroblast cells"  
Ryohei Yasukuni, Yoichiroh Hosokawa, Tsuyoshi Asahi, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
XIst IUPAC Symposium on Photochemistry, 2 - 7 April 2006, Kyoto, Japan
4. "Dissection of biological filaments by femtosecond laser irradiation"  
Ryohei Yasukuni, Yoichiroh Hosokawa, Tsuyoshi Asahi, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
The 4th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP2006), 16 - 19 May 2006, Kyoto, Japan
5. "Biomaterial injection to single animal cell by focused femtosecond laser"  
Seriya Iguchi, Ryohei Yasukuni, Yoichiroh Hosokawa, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
The 4th International Congress on Laser Advanced Materials Processing (LAMP2006), 16 - 19 May 2006, Kyoto, Japan
6. "Laser Micro-injection of Sugar Chain into Single Animal Cell: Application of Femtosecond Laser Ablation in Solution"  
Yoichiroh Hosokawa, Seriya Iguchi, Ryohei Yasukuni, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
XIst IUPAC Symposium on Photochemistry, 2 - 7 April 2006, Kyoto, Japan



7. "Contraction and regeneration dynamics of actin filament in a fibroblast cell by focused femtosecond laser"  
Ryohei Yasukuni, Jean-Alexis Spitz, Rachel Meallet-Renault, Yoichiro Hosokawa, Tsuyoshi Asahi, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
 The 3rd International Nanophotonics Symposium Handai (INPS3), 6-8 July 2006, Osaka, Japan.
  
8. "Three-dimensional distribution of sugar chain injected into single animal cells by focused femtosecond laser"  
 Seriya Iguchi, Ryohei Yasukuni, Yoichiro Hosokawa, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
 The 3rd International Nanophotonics Symposium Handai (INPS3), 6-8 July 2006, Osaka, Japan.
  
9. "Realignment Process of Actin Stress Fiber Dissected by Focused Femtosecond Laser"  
Ryohei Yasukuni, Jean-Alexis Spitz, Rachel Meallet-Renault, Yoichiro Hosokawa, Tsuyoshi Asahi, Chisa Shukunami, Yuji Hiraki, Hiroshi Masuhara  
 5th International Conference on Photo-Excited Processes and Applications (5th ICPEPA), 3-7 September 2006, Virginia, USA
  
10. "Perylene diimide multichromophores as single-photon sources"  
M. Sliwa, C. Flors, J. Hotta, E. Fron, F.C. De Schryver, J. Hofkens, R. Yasukuni, T. Asahi, H. Masuhara, I. Oesterling, T. Schnitzler, K. Müller, K. Müllen  
 EUROCORES Workshop on Self-Organized Nanostructures (SONS), 31 May-1 June 2007, Strasbourg, France
  
11. "Fabrication of fluorescent nanoparticles of dendronized perylenediimide by laser ablation in water"  
Ryohei Yasukuni, Teruki Sugiyama, Tsuyoshi Asahi, Hiroshi Masuhara, Michel Sliwa, Johan Hofkens, Frans C. De Schryver, Mark Van der Auweraer, Klaus Mullen  
 The 9th annual Conference on Laser Ablation, 24-28 September 2007, Tenerife, Spain
  
12. "Perylene diimide multichromophores as single-photon sources"  
M. Sliwa, C. Flors, J. Hotta, E. Fron, F.C. De Schryver, J. Hofkens, R. Yasukuni, T. Asahi, H. Masuhara, I. Oesterling, T. Schnitzler, K. Müller, K. Müllen  
 Leuven Nano Conference, 5-6 June 2007, Leuven (Belgique)

13. "Perylenediimide containing dendrimers and nano-particles as single-photon sources and highly fluorescent nano-emitters"

M. Sliwa, J. Hotta, H. Ujii, F. C. De Schryver, J. Hofkens, **R. Yasukuni**, T. Asahi, K. Müller, M. Klapper, K. Müllen

E-MRS Spring meeting, Functional supramolecular architectures for organic electronics and nanotechnology, 26-30 May 2008, Strasbourg

14. "Fluorescent nanoparticles of Perylenediimide compounds Fabricated by laser ablation in water"

**Ryohei Yasukuni**, Tsuyoshi Asahi, Hiroshi Masuhara, Michel Sliwa, Johan Hofkens, Frans C. De Schryver, Mark Van der Auweraer, Andreas Herrmann, Klaus Müllen

X X II IUPAC Symposium on Photochemistry, 28 July – 1 August, 2008, Gothenburg, Sweden

国内学会発表

1. 「フェムト秒レーザー誘起衝撃波による動物細胞への遺伝子導入」  
安國良平、高林淳一、細川陽一郎、三浦重徳、西崎有利子、宿南知佐、開祐司、増原宏  
第 51 回 春季応用物理学関係連合講演会、東京工科大学、2004 年 3 月 28-31 日
  
2. 「集光フェムト秒レーザー誘起衝撃波を用いた単一細胞加工」  
細川陽一郎、大本剛、安國良平、増原宏  
第 65 回 秋季応用物理学学会学術講演会、東北学院大学、2004 年 9 月 1 日-9 月 4 日
  
3. 「アクチンフィラメントの蛍光寿命・偏光度イメージング」  
安國良平、細川陽一郎、朝日剛、増原宏  
Jean-Alexis Spitz, Sophie Badre, Minako Takano, Catherine Baratti-Elbaz, Rachel Meallet-Renault, Jean-Jacques Vachon, Robert Pansu, Christian Auclair  
第 66 回 秋季応用物理学学会学術講演会、徳島大学、2005 年 9 月 7-11 日
  
4. 「集光フェムト秒レーザーによる単一動物細胞への異物質導入」  
井口世利也、安國良平、細川陽一郎、開祐司、増原宏  
第 66 回 秋季応用物理学学会学術講演会、徳島大学、2005 年 9 月 7-11 日
  
5. 「マウス線維芽細胞内アクチンフィラメントのフェムト秒レーザー切断と収縮ダイナミクス」  
安國良平、朝日剛、細川陽一郎、開祐司、増原宏  
日本化学会第 86 春季年会、日本大学船橋キャンパス、2006 年 3 月 27 日-30 日
  
6. 「細胞内アクチンフィラメントのフェムト秒レーザー切断と再生ダイナミクス」  
安國良平、Jean-Alexis SPITZ、Rachel Meallet-RENAULT、細川陽一郎、朝日剛、宿南知佐、開祐司、増原宏
  
7. 「単一生細胞と蛋白質固体の水中フェムト秒レーザープロセッシング」  
細川陽一郎、安國良平、梶貴博、開祐司、森肇、増原宏  
レーザー学会 27 回年次大会、宮崎市フェニックスシーガイアリゾート、2007 年 1 月 17-18 日

8. 「液中レーザーアブレーションによる高輝度蛍光性有機ナノ粒子の作製」  
安國良平、杉山輝樹、朝日剛、増原宏、Michel Sliwa、Johan Hofkens、Frans C. De Schryver、  
Mark Van der Auweraer、Klaus Mullen  
第 68 回 秋季応用物理学会学術講演会、北海道工業大学、2007 年 9 月 4-8 日
9. 「レーザーアブレーション法により作製した PDI デンドリマーナノ粒子の単一粒子分光」  
安國良平、杉山輝樹、朝日剛、増原宏、Michel Sliwa、Johan Hofkens、Frans C. De Schryver、  
Mark Van der Auweraer、Klaus Mullen  
第 55 回 春季応用物理学会学術講演会、日本大学船橋キャンパス、2008 年 3 月 27-30 日
10. 「レーザーアブレーションを用いた疎水性生理活性物質の水中分散法の検討」  
深田洋介、梶山慎一郎、朝日剛、安國良平、福井希一  
第 60 回 日本生物工学会 2008 年大会、東北学院大学土樋キャンパス、2008 年 8 月 27-29  
日

#### 助成金・奨学金

1. 「魚本インターナショナルスカラーシップ」助成 財団法人 魚本国際奨学基金  
(2004 年 11 月-2005 年 4 月)
2. 「International Scholarship Programme of the Ecole Normale Supérieure de Cachan」 Ecole  
Normale Supérieure de Cachan (カシヤン高等師範大学校) (2006年10月-2007年10月)
3. 「大阪大学工業会海外交流助成金」 社団法人 大阪大学工業会 (2008年7月)

## 謝辞

本研究は大阪大学大学院工学研究科精密科学・応用物理学専攻においておこなわれたものである。

長きに渡る日々の御指導と御助言を賜りました本学大学院工学研究科准教授 朝日剛 先生に心より深く感謝致します。

本研究室に配属されて以来、常に温かく御指導を賜りました奈良先端科学技術大学大学院物質創生科学研究科特任教授 増原宏 先生に心より厚く御礼申し上げます。

本学位論文の作成にあたり、数々の御意見、御教示を賜りました、本学大学院工学研究科教授 民谷栄一 教授、本学大学院生命機能研究科 井上康志 教授、近畿大学生物工学部准教授 梶山慎一郎 先生に謹んで御礼申し上げます。

研究生活全般に渡り御指導いただきました奈良先端科学技術大学大学院物質創生科学研究科特任准教授 細川陽一郎 先生に心より感謝致します。

日々の研究生活において多くの御助言をいただきました本学大学院工学研究科助教 吉川裕之 先生に深く感謝致します。

ペリレンジイミド誘導体をご提供して頂きました Max Planck Institute for Polymer Research の Klaus Müllen 教授に厚く御礼申し上げます。

液中レーザーアブレーションに関する研究に着手するにあたり実験技術及び解析手法に関して御指導いただきました奈良先端科学技術大学大学院物質創生科学研究科特任准教授 杉山輝樹 先生、株式会社 Absize 研究員 梁千一 氏、信州大学博士研究員 全現九 氏に深く御礼申し上げます。

カシャン高等師範大学校 Robert B Pansu 教授及び同大学研究室 PPSM の皆様には留学中に大変お世話になりました。心から御礼申し上げます。

ルーバンカトリック大学 Johan Hofkens 教授、Michel Sliwa 博士（現リール大学）、堀田純一博士には単一粒子分光に関する共同研究のために大変お世話になりました。心から感謝致します。

日々の研究にあたり多くの御意見をいただきました 伊都将司 助教、松根英樹 助教、松原千恵 博士、大本剛 博士、根岸貴幸 博士、山口敦 博士、Anwar Usman 博士、Guillaume Louit 博士、Guillaume Laurent 博士、王勇 博士に心より御礼申し上げます。

先輩として多くの助言を下さいました宇和田貴之 博士、吉川洋史 博士、鍋谷悠 博士、

中村和彦 博士、細川千絵 博士、多田拓司 博士に深く感謝いたします。

研究において切磋琢磨し、日々の生活におきましても大変お世話になりました、田中嘉人氏、梶貴博 氏、柚山健一 氏、山下健 氏、井浜高志 氏に深く感謝いたします。

日々の生活において様々な形で御協力、ご援助いただきました斎藤真人 博士、山中啓一郎 博士、近藤兼司 博士、Sathuluri Ramachandra Rao 博士、Minhaz Uddin Ahmed 博士、Mohammad Mosharraf Hossain 氏、Hiep Minh HA 氏、菅野康仁 氏、後輩の皆様にも深く感謝いたします。

研究室秘書 笹部昌子 様、栗栖真美 様、藤原裕美子 様、阿井千賀子 様、信岡美穂 様、合田真紀子 様、藤原泰子 様には日々の研究生活をおくる上で様々な御援助を賜りました。心より感謝申し上げます。

最後に進学のお機会を与えて頂くとともに、終始応援してくれた家族に深く感謝いたします。

2009 年 3 月

安國 良平

Une partie de ce travail de thèse a été réalisé en cotutelle avec l'Ecole Normale Supérieure de Cachan, au laboratoire de Photophysique et Photochimie Supramoléculaires et Macromoléculaires (PPSM-UMR 8531). Mon séjour en France m'a donné la possibilité de faire des rencontres fortes tant sur le plan personnel que sur le plan professionnel. Je tiens donc tout d'abord à remercier le directeur du PPSM, le Professeur Jacques DELAIRE.

Je voudrais remercier pour sa gentillesse Robert PANSU, mon directeur de thèse en France.

Je voudrais maintenant remercier mes amis et confrères qui m'ont aidé. Parmi eux, Je voudrais citer Rachel MEALLET-RENAULT, Carine JULIEN, Keitaro NAKATANI, Jean-Alexis SPITZ, Arnaud BROSSEAU, Arnaud SPANGENBERG, Rémi METIVIER, Jean-Jacques VACHON, Sophie BADRE, Elena ISHOW.

Mars 2009, Ryohei YASUKUNI

