

動的光散乱法:原理と最近の進歩



技術解説

寺尾 憲*

Dynamic Light Scattering: Principles and Recent Advances

Key Words : Autocorrelation spectroscopy, Polymers, Nanoparticles, Biological imaging

はじめに

晴れた日の空が青く見えるのは、太陽光のレイリー散乱を観測しており、可視光の散乱強度が波長の $^{-4}$ 乗に比例するためである。この光の散乱現象は、粒子当たりの散乱強度が質量の2乗（粒径の6乗）に比例するため、ちょうど光散乱法に適した粒径の脂肪球が多く分散した牛乳を水に少し加えて、自然光で観察すると、青白い散乱光が観測される。また、例えば高分子やコロイド溶液の場合、図1に示すように、溶液を通過するレーザー光の一部が散乱されたものが観測される。したがって、高分子やナノマイクロ粒子など、可視光の回折限界のため直接観測できないが、低分子よりもはるかに大きな物体を溶液中でそのまま非破壊・非侵襲的に観測するための手法として広く利用されている。回折格子からの回折現象からもわかるように、溶液からの光散乱現象にも干渉効果が重要となるため、光散乱測定は様々な散乱角 θ で行うことが基本となり、図2のような円筒型の光学セルが用いられることが多い。得られる散乱光強度から、微粒子のモル質量、粒径（および形状）、さらに粒子間相互作用の情報を得ることができる。なお、干渉効果の解析には θ より次式で定義される散乱ベクトルの絶対値 q が利用される。

$$q = \frac{4\pi n_0}{\lambda_0} \sin \frac{\theta}{2} \quad (1)$$



図1. コロイド溶液からの光散乱

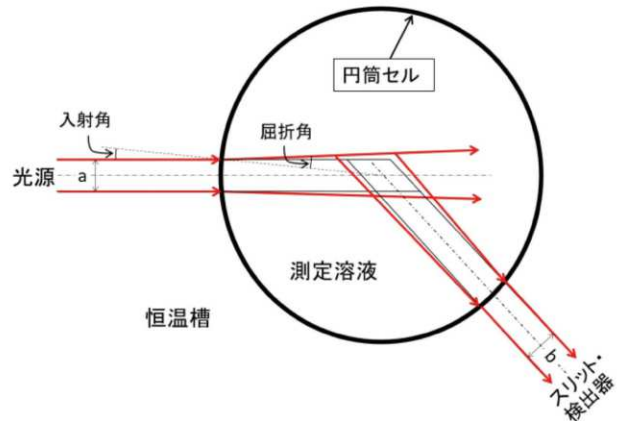


図2. 光散乱用円筒セルの模式図

式中、 n_0 は溶媒の屈折率、 λ_0 は入射光の真空中における波長である。この手法は静的光散乱法と呼ばれ、類似した原理による小角X線散乱法や中性子小角散乱法と並び、溶液中の高分子などのサブマイクロンサイズの浮遊体のキャラクタリゼーションに広く用いられている。本稿では、まず動的光散乱法について簡単に紹介したのち、当研究室での研究事例をいくつか紹介する。さらに、動的光散乱法をはじめとした自己相関分光の最近の進歩についても紹介する。



* Ken TERAO

1971年5月生まれ
 大阪大学大学院 理学研究科 高分子科学専攻博士後期課程 (1999年)
 現在、大阪大学大学院 理学研究科 高分子科学専攻 教授 博士(理学)
 専門/高分子溶液学
 TEL : 06-6850-5461
 E-mail : terao.ken.sci@osaka-u.ac.jp
 URL : <https://researchmap.jp/kenterao>

動的光散乱法の測定原理

ここで述べる光散乱法は、入射光と散乱光の波長がほぼ等しい、弾性散乱についてである。弾性散乱では、散乱光電場の位相が保存されているため、溶液中の異なる2点で散乱された光は干渉を起こす(図3)。粒子のブラウン運動により、粒子間距離が変化するのに伴い、その干渉挙動も変化するため、散乱光強度は時間とともに変化する。図4に示すようにブラウン運動に伴う微粒子の拡散は粒径の減少とともに顕著となるため、散乱光強度の時間変化もより高速になる。この時間スケールはマイクロ秒からミリ秒の領域であるため、時間の関数として散乱光の光子を計数することにより、時刻 t の関数とした散乱光強度 $I(t)$ が計測される。この $I(t)$ の揺らぎを定量化するために次式で定義される時間相関関数 $g^{(2)}(t)$ が用いられる。

$$g^{(2)}(t) = \frac{\langle I(0)I(t) \rangle}{\langle I(0) \rangle^2} \quad (2)$$

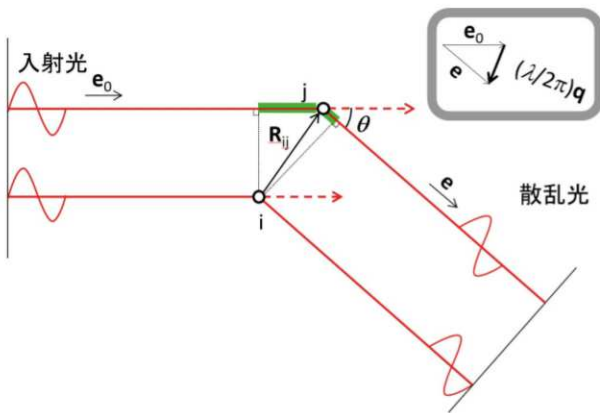


図3. 散乱光の干渉効果

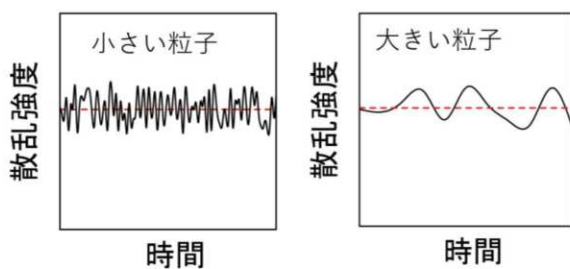


図4. 散乱光強度の時間変化

式中、 $I(0)$ 、 $I(t)$ は時間 0、 t における散乱光強度であり、 $\langle \dots \rangle$ は統計平均を表す。 $g^{(2)}(t)$ は t の増

加とともに指数関数的に 1 に近づく関数である。この減少関数は、単分散ナノ粒子の場合、以下の式で緩和速度 Γ と関係づけられる

$$g^{(2)}(t) = 1 + \beta e^{-2\Gamma t} \quad (3)$$

式中、 β は装置に依存する定数である。この Γ は溶媒中における粒子の拡散係数 D のほか、粒子間の流体力学的相互作用や粒子の形状の影響も受けるが、質量濃度 c と q をゼロに外挿することにより D が決定される。

$$D = \lim_{\substack{q \rightarrow 0 \\ c \rightarrow 0}} \frac{\Gamma}{q^2} \quad (4)$$

一般に、 D は形状、サイズのほか、溶媒の粘性率 η と温度 T によって決まる値であるが、より直感的な物理量として、次式に示す球状粒子に対する Einstein-Stokes の式より計算される流体力学的半径 R_H がよく用いられる。

$$R_H = k_B T / 6\pi\eta D \quad (5)$$

ここで、 k_B は Boltzmann 定数である。この式は球状粒子以外にも適用される。 R_H と実際の粒子のサイズ、形状との関係式は理論的に導出されている。また、 R_H と前述の静的光散乱より求められる回転半径との比は、粒子の形状により大きく変わるため、粒子の形状を推定する一つの手段となっている。

異なる粒径の微粒子が溶媒中に分散している場合、 $g^{(2)}(t)$ はそれぞれの粒子のブラウン運動から生じる時間相関関数の重ね合わせとなる。したがって $g^{(2)}(t)$ を解析することによって粒径分布を知ることができる。

$$g^{(2)}(t) - 1 = \beta \left[\int_0^\infty H(\Gamma) \exp(-\Gamma t) d\Gamma \right]^2 \quad (6)$$

式中、 $H(\Gamma)$ は粒径分布関数である。あらかじめ粒径分布がわかっているならば $g^{(2)}(t)$ を計算できるのに

対し、 $g^{(2)}(t)$ から粒径分布を求めるにはラプラス逆変換法 (CONTIN 法) などを用いることが一般的である。多くの場合、粒径分布を調べる場合には、サイズ排除クロマトグラフィーやフィールド・フロー・フラクショネーションなどの手法で分級してから分析するが、動的光散乱法は溶液中の微粒子を分級することなく、その粒径分布を知ることができる数少ない手法である。類似の手法として蛍光相関分光法より拡散係数およびその分布を調べる手法や、沈降速度を調べることにより粒径分布を見積もる超遠心法 (沈降速度法) が知られている。前者は対象物に対し蛍光標識が必要になるのに対し、後者は溶液を強い遠心場に置く必要がある。動的光散乱法は、用いるレーザーの波長で溶液からの蛍光などの発光がほとんどないことが求められるが、上述のような制限がないためその適用範囲は広い。

動的光散乱法を利用した高分子やナノ微粒子の解析例

①高分子ナノ微粒子の測定例 [1]

高分子のうち、2種のモノマーを重合してできるものを共重合体というが、その中でもモノマーAの連鎖とモノマーBの連鎖を1点で結合したものを2元ブロック共重合体という。高分子は一般的に溶解エントロピーが低分子に比べ著しく小さく、溶媒に限られる。連鎖Aのみを溶解する選択溶媒に分散させた場合、球状の集合体を形成する。ここではこの球状集合体にガンマ線を照射して高分子鎖を架橋した場合の微粒子の測定例を紹介する。図5に示すように、両親媒性のポリイソブレン-ポリアクリル酸ブロックコポリマーを水に分散させると、水に溶解しないポリイソブレンをコアとする球状ナノ粒子を形成する。ここに、ガンマ線を照射すると水の電離に伴い、主にコロナ部分のポリアクリル酸が架橋する。図6に得られた乾燥ナノ微粒子の原子間力顕微鏡像とそこから計算される平均半径 R_a 、そして水分散溶液の動的光散乱より測定される R_H を照射したガンマ線の吸収線量率に対してプロットしたものを示す。 R_a 、 R_H はほとんど同じ値であり、ともにガンマ線の照射に伴い、直線的に減少していることがわかる。参考までに、同様の水溶液について、コアのポリアクリル酸が強調されて観測される小角X線散乱測定を行ったところ、得られた値は R_a 、 R_H よりも小さく、またガンマ線の照射によってほ

とんど変化しなかった。これらのことから、ガンマ線架橋に伴い、コロナ鎖部分の収縮が起きていることが確認された。

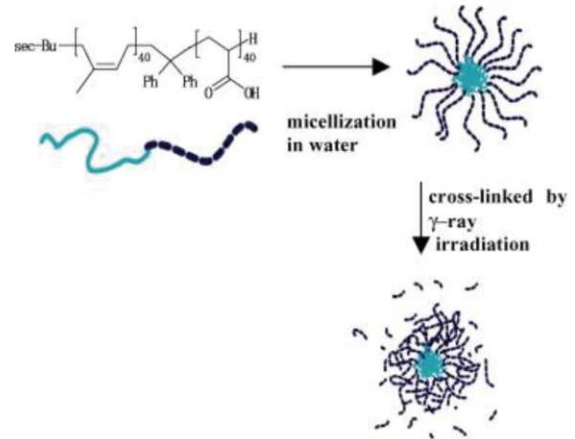


図5. 両親媒性ブロック共重合体が形成する高分子ナノ微粒子の模式図。Reprinted from Ref. [1], with permission from Elsevier.

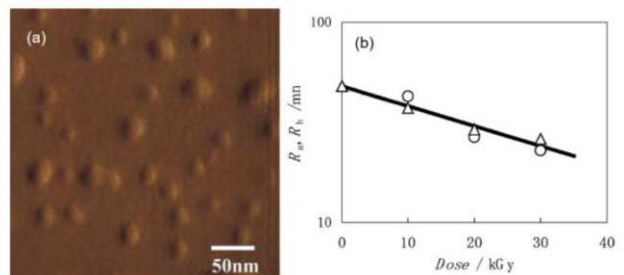


図6. 水溶液中で30 kGyのガンマ線を照射したポリイソブレン-ポリアクリル酸ブロックコポリマーのAFM像(a)、そして R_H と R_a の照射ガンマ線量依存性(b)。Reprinted from Ref. [1], with permission from Elsevier.

②ゼラチン水溶液の放射線架橋によるナノ微粒子形成 [2]

一般にタンパク質はX線を含む電離放射線の照射により、水溶液中で会合しやすくなることが知られている。細胞外蛋白のひとつであるコラーゲンの分解抽出物であるゼラチンの濃厚水溶液にガンマ線を照射すると架橋反応を生じハイドロゲルになるという知見より、ゼラチン希薄水溶液にガンマ線を照射して生じる会合体はゼラチン分子間の架橋反応によると推定された。そこで、低濃度のゼラチン水溶液にガンマ線を照射してナノ粒子を生成する試み、および得られたナノ粒子の動的光散乱測定結果について述べる。濃厚なゼラチン溶液は温度可逆的にゾル-ゲル転移を起こすが、低濃度の場合でも室温付近

で会合が認められる。図7に、異なる濃度のゼラチン水溶液について、動的光散乱の相関関数 $g^{(2)}(t)$ を CONTIN 法で解析した結果として得られた各成分の R_H と散乱強度の関係を示す。ガンマ線を照射していない試料 (0 kGy) では、 R_H が 100 nm を超える領域に大きなピーク、10 nm 以下の領域に小さなピークが見られる。同一濃度では、散乱強度は粒径の3乗 (粒子密度が等しい場合) に比例するため、質量濃度が高いのは 10 nm 以下の成分であると考えられる。ガンマ線照射後には、 $R_H = 10$ nm 付近のピークが最大となり、効率的にナノ粒子が生成されたことが示唆される。さらに、円二色性測定の結果、未照射試料では温度依存性が見られるのに対し、照射試料では温度による変化がほとんどなく、高温の未照射試料と同様の挙動を示した。このことから、架橋点間のゼラチン鎖はコイル状であると考えられる。また、ピーク波形に基づき静的光散乱強度データを2つの成分に分離解析した結果、大きな会合体の成分が、分子量 170 万で大きな回転半径を持つのに対し、 $R_H \sim 10$ nm の成分の回転半径が 20 nm 以下であることも確認された。高分子溶液の場合、少量の大きな会合体の存在が、静的光散乱データの解析

を困難にすることがよくある。特に水溶液系では、大きな会合体が微小な電荷をもつことによって、その会合体が安定に浮遊してしまうことも少なくなく、完全に取り除くことは困難である。動的光散乱法を用いて、粒径の小さな散乱体由来の散乱強度を評価することにより、以前は困難であった高分子水溶液系についても正確な分子量や分子形態の決定が可能になってきている。

③温度応答性高分子の相転移温度付近での分散状態 [3]

ポリ (N-イソプロピルアクリルアミド) (PNIPAM) の水溶液は、温度が上昇すると白濁し、この高分子のハイドロゲルが急速に収縮することから、温度応答性高分子として広く注目を集めている。生体応用を視野に入れる場合には、白濁温度 (曇点) の調節が可能であることが重要である。そこで、本研究では PNIPAM とアクリルアミド (AAm)、2-ヒドロキシエチルメタクリレート (HEMA)、およびジメチルアクリルアミド (DMAA) の共重合体を用いて曇点の測定を行った。また、共重合体における曇点以下の高分子分散状態について十分な知見がなかったため、動的光散乱法を用いて曇点温度付近での R_H の変化を観測し、その分散挙動を解析した。

図8には、温度上昇に伴う水溶液の透過率変化を示している。PNIPAM 水溶液では、透過率が約 32 °C で急激に減少するが、共重合体の PNIPAM-AAm および PNIPAM-DMAA においても類似の急激な透過率変化が確認された。ただし、この変化が生じる温度 (曇点) は、PNIPAM の組成が減少するにつれて上昇する。一方で、PNIPAM-HEMA の曇点は、HEMA の組成が増加すると低下する傾向が観察された。PNIPAM のモル分率と曇点温度の関係はほぼ直線的であることから、共重合体の組成を調整することで曇点温度を比較的容易に制御できることが示唆された。

さらに、図9では動的光散乱法により測定された R_H の温度依存性が示されている。使用した装置は温度精度が高い一方で散乱強度に対する感度は低いため、低温域では R_H が 20 nm 以下の比較的小さな値であることのみが検出された。しかし、曇点温度付近では R_H が急激に増加することが確認された。この現象は、PNIPAM および共重合体のいずれに

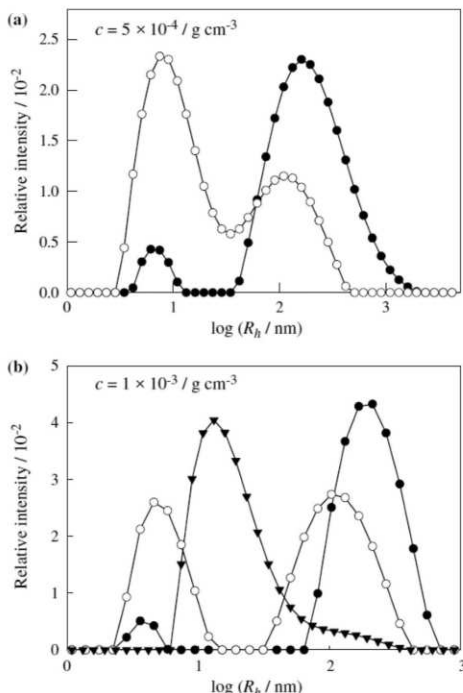


図7. 散乱角 $\theta = 60^\circ$ で観測したガンマ線照射ゼラチン水溶液の CONTIN 解析結果。●: 0 kGy, ○: 10 kGy, ▼: 20 kGy. (a) $c = 5 \times 10^{-4} \text{ g cm}^{-3}$, (b) $c = 1 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$. Reprinted by permission from Springer Nature: Ref. [2].

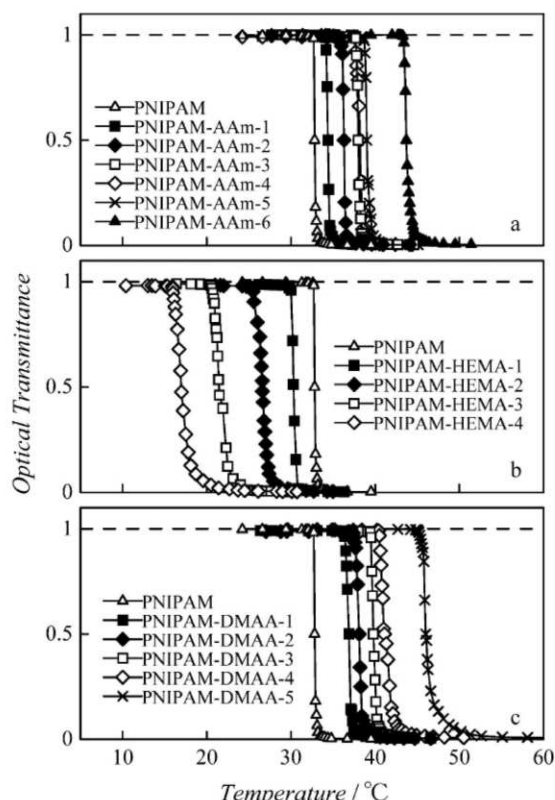


図8. 温度応答性共重合体3種の水溶液についての透過率対温度のプロット ($c = 5.00 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$)。 (a) PNIPAM-AAm, AAmのモル分率: 0.022 ~ 0.144。 (b) PNIPAM-HEMA, HEMAのモル分率: 0.084 ~ 0.349; (c) PNIPAM-DMAA, DMAAのモル分率: 0.107 ~ 0.314。 試料名中の数値は共重合組成の違いに対応し、数値の上昇とともにNIPAMのモル分率が減少する。 Reprinted by permission from Springer Nature: Ref. [3].

も共通して観察され、共重合体でも低温側では分子分散に近い粒径で分散しているが、曇点温度付近で急激に会合体が成長し、相分離する挙動が明らかとなった。

動的光散乱法をはじめとした各種測定法

①電気泳動光散乱法 [4]

式2では、散乱光のみを検出し、その自己相関を得ていた (ホモダイナ法)。粒子の移動方向がばらばらな系ではこの手法が最も用いられるが、複数の粒子が同一方向に異動している場合その方向に関する情報は得られない。これに対し、散乱光に入射光の一部 (参照光という) を混合したものの自己相関関数からは移動方向の情報も得られる (ヘテロダイナ法)。コロイド溶液に電場を印可した際に生じる電気泳動現象を観測する手段として光散乱法を用

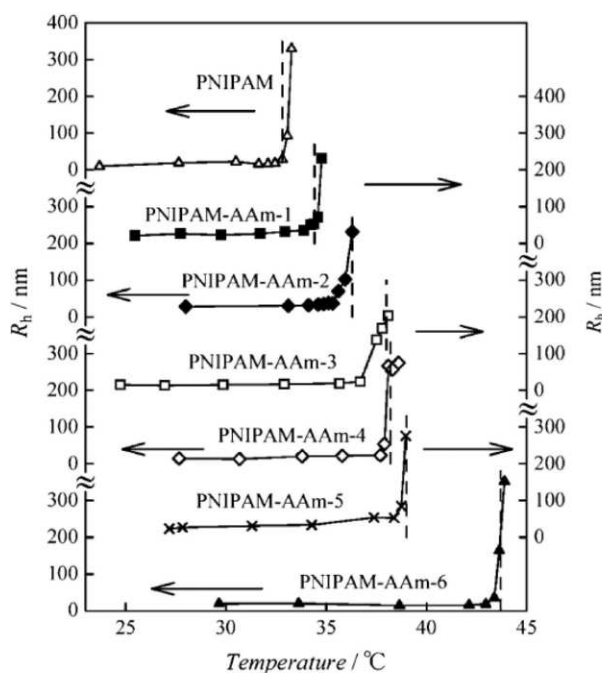


図9. 温度応答性共重合体試料 PNIPAM-AAm の水溶液中における R_H の温度依存性 ($c = 5.00 \times 10^{-3} \text{ g cm}^{-3}$)。破線は図9のデータより決めた曇点温度。Reprinted by permission from Springer Nature: Ref. [3].

いる場合、この手法が主に用いられる (電気泳動光散乱法)。溶液に電場を印可する必要があるため、動的散乱法とは形状の異なるセルを使用するため、散乱角一定の条件で測定を行うことになるが、原理的には拡散係数と電気泳動移動度の双方が決まる手法である。後者の電気泳動移動度からはコロイド粒子の表面電荷を知るうえで重要なゼータ電位を決定することができる。

②顕微動的散乱法による懸濁試料の測定 [5]

ここまでで紹介した研究例はすべて、レイリー散乱の近似が成立し、多重散乱が問題にならない系であったが、実際には高度に懸濁した溶液や透過率の低い分散液の測定需要も多い。このような場合には、溶液に入射された光がセル入射面近傍で散乱された光を検出する後方散乱を用いた光散乱装置や、共焦点顕微鏡の原理を応用し、溶液内のある特定の部分からの散乱光を選択的に検出し、自己相関関数を得る顕微動的散乱法が開発されている (図10)。この手法ではヘテロダイナ法が採用されている。特に前者は市販されており、塗料などの高濃度のコロイド分散液の動的散乱測定に活用されている。また、

後者では溶液中の任意の箇所の DLS 測定も可能になる。特に後者では高濃度カーボンナノチューブ分散液中における凝集構造についても研究されている [6]。

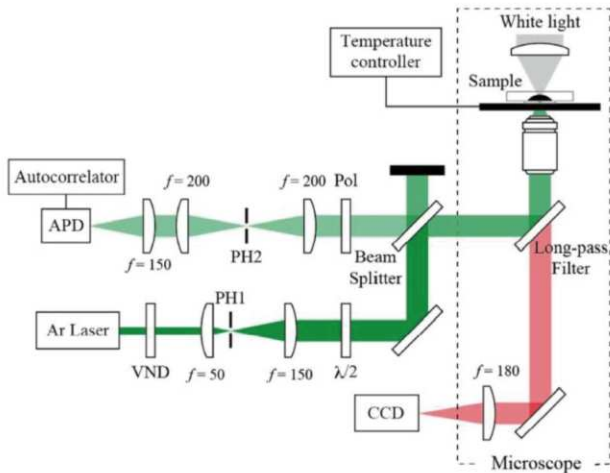


図 10. 顕微動的な光散乱装置の概略図。Reproduced with permission from ref. [6]. Copyright 2016, American Chemical Society.

③動的な光散乱イメージング [7]

ここでは、動的な光散乱法の生体医療分野における応用例を紹介する。動的な光散乱イメージング (DLSI) は、高速カメラを用いて毎秒 20,000 フレーム以上の速度で後方散乱レーザー光を記録し、散乱強度の時間的変動を直接測定する手法である。この技術を用いた研究では、生体組織における血流や散乱特性の解析が進展している (図 11、12)。

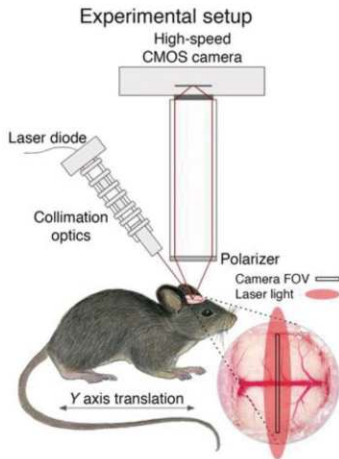


図 11. 動的な光散乱イメージングシステムの模式図 [7]

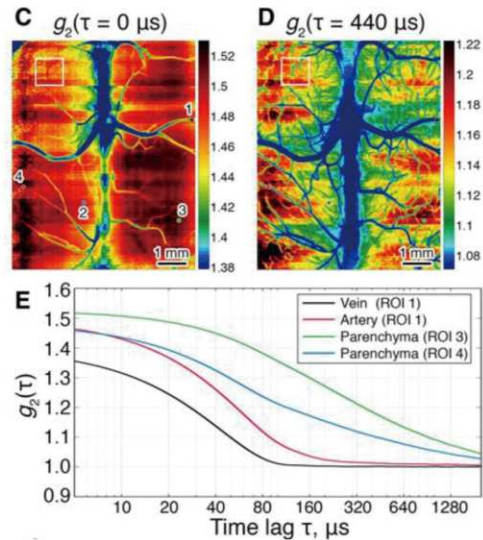


図 12. 動的な光散乱イメージングの解析例 (C および D) 特定の時間遅延 $\tau = 0$ および $440 \mu s$ における $g_2(\tau)$ の空間マップ。(E) 静脈と動脈に属する 3×3 領域、および (C) で示される実質組織内の 2 つの領域における $g_2(\tau)$ の値 [7]

生体内では、コロイド濃厚溶液と同様に、多重散乱現象が顕著に見られる。この現象では、入射光が 2 回以上散乱された光子も検出されるため、解析は単純ではない。しかし、DLSI を用いることで、大血管、小血管、さらには脳実質における血流特性を詳細に把握できることが明らかとなっている。この手法は、脳卒中モデルを用いたマウスの研究にも応用されており、通常の組織とは異なる血流挙動を正確に検出することが示されている。

④蛍光相関分光法 [4]

動的な光散乱法ではないが、類似の原理でコロイド粒子の運動を検出する方法として蛍光相関分光法があげられる。共焦点光学系で蛍光の時間変化を観測するという意味で、顕微動的な光散乱法と類似した手法ではあるが、蛍光のみを検出することによって弾性散乱光の寄与を除去できる。また蛍光には干渉効果は無いので、強度の時間変化は注目した蛍光分子の数の時間変化に対応する。適切な解析を行うことで、拡散係数を抽出することができる。さらには複数の蛍光色素を含む系についての測定法も開発されている、2 種類の分子の運動状態の時間・空間相関に関する物理量が得られる。すなわち、2 種類の分子の相互作用を決めることができる。弾性散乱光の寄与が無視できることからわかるように、生態系

への適用が容易であり、多くの測定例が報告されている。

まとめ

動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering, DLS) は、溶液中のナノ粒子や高分子の動的挙動を解析するための重要な手法である。この手法では、粒子のブラウン運動に伴う散乱光の強度変化を時間相関関数を通じて解析し、粒子の拡散係数や流体力学的半径 (R_H)、粒径分布などの情報を得ることができる。また、ガンマ線架橋による粒子形成の研究や、温度応答性高分子の挙動解析など、幅広い応用が可能であることを示した。さらに、高濃度分散液や濁った溶液への対応として、後方散乱法や顕微動的散乱法などの新技術も開発されている。今後、動的散乱法はナノテクノロジー、生体医療、材料科学など、多様な分野でますます重要な役割を果たすことが期待される。なお、今回紹介した手法の多くは成書 [4] に詳しくまとめられている。ご興味をお持ちの方はぜひ手に取っていただきたい。

参考文献

- [1] T. Narita, K. Terao, T. Dobashi, N. Nagasawa, F. Yoshii, Preparation and characterization of core-shell nanoparticles hardened by gamma-ray, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 38 (2004) 187-90.
- [2] K. Furusawa, K. Terao, N. Nagasawa, F. Yoshii, K. Kubota, T. Dobashi, Nanometer-sized gelatin particles prepared by means of gamma-ray irradiation, *Colloid. Polym. Sci.* 283 (2004) 229-233.
- [3] Z.Y. Shen, K. Terao, Y. Maki, T. Dobashi, G.H. Ma, T. Yamamoto, Synthesis and phase behavior of aqueous poly(N-isopropylacrylamide-co-acrylamide), poly(N-isopropylacrylamide-co-N,N-dimethylacrylamide) and poly(N-isopropylacrylamide-co-2-hydroxyethyl methacrylate), *Colloid. Polym. Sci.* 284 (2006) 1001-1007.
- [4] 柴山充弘, 佐藤尚弘, 岩井俊昭, 木村康之, 光散乱法の基礎と応用, 講談社サイエンティフィック 2014.
- [5] T. Hiroi, M. Shibayama, Dynamic light scattering microscope: accessing opaque samples with high spatial resolution, *Opt. Express* 21 (2013) 20260-7.
- [6] T. Hiroi, S. Ata, M. Shibayama, Transitions of Aggregation States for Concentrated Carbon Nanotube Dispersion, *J Phys Chem C* 120 (2016) 5776-5782.
- [7] D.D. Postnov, J. Tang, S.E. Erdener, K. Kilic, D.A. Boas, Dynamic light scattering imaging, *Sci Adv* 6 (2020) eabc4628.

