

光ファイバー μ TAS の実現

創価大学 理工学部 共生創造理工学科
教授 窪寺 昌一

(平成 28 年度 一般研究開発助成 AF-2016205)

キーワード： μ TAS, フェムト秒レーザー, 光ファイバーセンサ

1. 研究の目的と背景

本研究では、通常チップ上に作製する生化学分析デバイスである μ TAS (micro Total Analysis Systems) をレーザー微細加工技術を用いて光ファイバー内に実現することを目的としている。光ファイバー内に μ TAS を作製することで光ファイバーの物理的特性を生かしつつ、光を用いた分光計測が可能となる点が特徴である。最終的には独自のアイデアを反映させた“Lab-inside-Fiber”の実現を目標としている。本研究期間では、フェムト秒レーザーを用いて光ファイバー内に微細穿孔を行い、内部に金ナノ粒子ならびに生体分子を導入することで金ナノ粒子の凝集を誘起し、生体分子をセンシングすることに成功したので報告する。

分光計測の分野は、計測実現のための構成要素である光源・導波路・試料セル・分光器・検出器のそれぞれが技術の進歩に伴い発展を遂げ、工業・医療・環境領域内において様々な測定対象を捉える手法として展開している。近年、分光計測におけるセンシング対象を捉える新しい材料として金属ナノ粒子が注目され、金属ナノ粒子を応用した生体分子検出手法の事例が数多く報告されている[1-3]。計測原理としては、金属ナノ粒子に光が照射された際に生じる局在型表面プラズモン共鳴 (Localized surface plasmon resonance : LSPR) を利用している[4]。ナノメートル程度の直径の金属粒子への入射光電場によって粒子内自由電子集団には分極が生じる。その分極は入射光によって振動し、金属の特性に依存した入射光との共鳴現象による熱エネルギー変換によって特定波長に減衰をもたらす。光センシングに多用される金ナノ粒子は、LSPR による光吸収波長帯を可視領域にもち、その利便性から生体分子検出手法にも多用されている。検出手法のなかで、溶液中に分散している金ナノ粒子とセンシング対象の結合によって生じる凝集を追跡する手法がある[1-3]。生体分子の添加によって金ナノ粒子に凝集が生じ、それに応じて変化する金ナノ粒子による光吸収スペクトルを捉えることで生体分子をセンシングできる。主な事例として、K. Ai らによるシアヌル酸表面修飾金ナノ粒子によるメラミンの検出がある[1]。シアヌル酸が表面修飾された金ナノ粒子にメラミンが添加されることで、各種官能基が結合し金ナノ粒子に凝集が生じる。金ナノ粒子の凝集によって分散溶液の色は赤色から青紫に変色し、変色の度合いを分光計測することでメラミンの含有量を検出した。モル濃度 20 nM の低濃度のメラミンによる金ナノ粒子分散溶液の変色を確認し、高いセンシング感度を示している。上記事例

の他にも、分散溶液中の金ナノ粒子凝集を応用した検出手法を用いて、DNA の同定[2]やがん細胞の検出[3]などが実現されている。以上のような金ナノ粒子凝集を用いた生体分子計測・検出手法は、ナノメートルスケールの粒子のサイズ・形状変化の集合が最終的な出力として現れており、計測構成の組み合わせによってはセンシング対象が微量でも実現できる。したがって、分光計測に必要なセンシング対象を保持する容器は微小でよいといえる。

一方、超短パルス光を発振するフェムト秒レーザーによる加工は、微小領域の材料改質・除去加工、微小体積の三次元光造形、材料表面への微細周期構造形成などを可能とし、ナノからマイクロメートルスケールの非接触加工に有力な技術であると認知されて久しい[5-9]。特に、微小材料への除去加工 (アブレーション加工) に関しては、様々な材料でフェムト秒パルス光を利用することで実現可能である[10-14]。その中で、細径・軽量な透明材料である光ファイバーに対してもフェムト秒レーザーによる加工が適用され、光ファイバーの局所的な空間に新たな光学的機能を付与する試みがされている。光ファイバーへのアブレーション加工の事例として、Y. Wang らは石英系シングルモード光ファイバーに波長 800 nm, パルス幅 120 fs のフェムト秒パルス光を照射し、コア層に到達する穴あけ構造を構築した[15]。パルスエネルギー 11 μ J, 繰返し周波数 1 kHz のパルス列を照射し、光ファイバーコア直径と同程度 (8.2 μ m) の太さを有する微小空間をコア領域に設けた。構築した穴あけ構造に液体試料を導入し、試料が満たされた微小空間を透過した光ファイバー伝搬光強度を取得することで試料の屈折率を検知した。上記のように構築した穴あけファイバーを用いて、屈折率 1.37 - 1.42 の範囲で 6.70×10^{-5} RIU の分解能を示した。また、我々の研究グループでは波長 400 nm の近紫外フェムト秒レーザーを用いて石英系光ファイバーに貫通する穴あけ構造を構築し、ローダミン 6G などの蛍光色素を注入して色素固有の光吸収の取得に成功している[16]。光ファイバー導波路途中に設けた穴あけ構造を微小な分光セルとして応用することで、金ナノ粒子分散溶液を直接光ファイバー伝搬光と相互作用させることができる。被膜を除去した直径百数十マイクロメートルの石英系光ファイバーを破断させることなく直径数マイクロメートル程度の穴あけ構造を構築できれば、容積数ピコリットル程度の分光セルを形成できたことになる。上記の構造を

光ファイバー内分光セルとみなし、金ナノ粒子分散溶液を利用した生体センシングが実現できれば、現在市販されている微量分光計測器の最小ボリュームであるサブマイクロリットルを下回る分光計測構成を提供することができる。本報告では、新しい光学計測手法実現のために、石英系光ファイバーに貫通する穴あけ構造を構築するためのフェムト秒レーザー加工条件について明らかにし、構築した光ファイバー分光セルを用いた、金ナノ粒子分散溶液の光吸収スペクトル取得について述べる。さらに、光ファイバー分光セルと分散溶液中の金ナノ粒子凝集現象を組み合わせた生体分子検出について説明し、微量試料測定の実用例について報告する。

2. 実験方法, 結果

図1にフェムト秒レーザーを用いた石英系光ファイバーへのアブレーション加工のための実験装置概要を示す。Ti:Sapphire レーザー (IFRIT, Cyber Laser Inc.) から発振される基本波 (波長: 800 nm) を波長変換器を用いて第二高調波 400 nm に変換し、開口数 0.65 の近紫外用対物レンズを用いて光ファイバーへ集光した。加工実験時のパルス幅、繰返し周波数、パルスエネルギー、パルス照射数は、それぞれ 350 fs, 1 kHz, 30 μ J, 150 回とした。分光セルを構築するための材料は、コア径 62.5 μ m, クラッド径 125 μ m の石英系マルチモードグレーデッドインデックス (MMGI) ファイバーを選定した。集光位置は、2 台の CCD カメラと 3 軸稼働ステージを用いて調整した。また、光ファイバーを固定するクランプにはステッピングモーターによる回転機構が備え付けられており、光ファイバーの側面に対して任意の方向からパルス光を照射できるようにした。パルス光の集光位置は、光ファイバー表面から内部へ 50 μ m の位置となるように調整した。

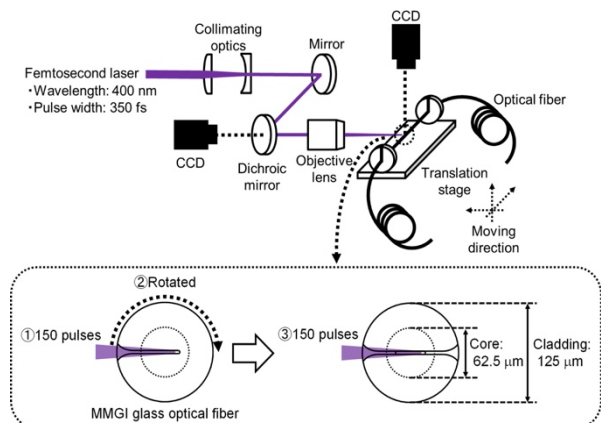


図1 光ファイバー分光セル作製のための実験装置概略図。

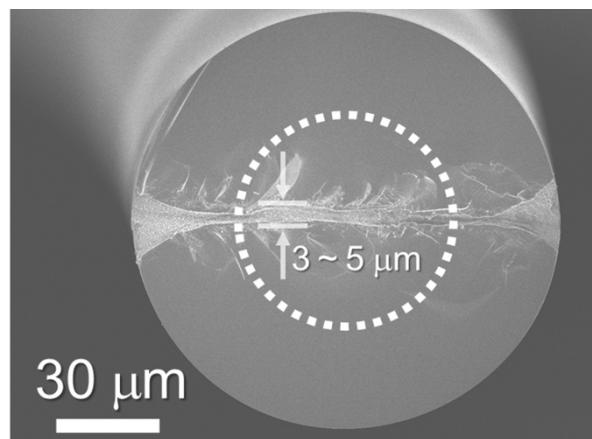


図2 外径 125 μ m の光ファイバー内に穿孔加工した分光セルの断面図。白点線はコアとクラッドの境界を表している。

これまでの加工実験で、材料表面に集光する場合より、集光位置を材料内部に固定した方がアスペクト比の高い穴あけ構造を形成できることがわかっている[17]。上記条件では、光ファイバーを貫通する分光セルは構築されないため、150 回のパルス照射後に光ファイバーを 180 度回転させ、同様の条件でパルス光を照射した。構築した分光セルを含む光ファイバーの断面 SEM 写真を図2に示す。

図2は光ファイバー端面全体を撮影した SEM 写真であり、白い点線の円は光ファイバーコア層とクラッド層の境界を示している。SEM 写真から分光セルが光ファイバーを貫通していることがわかる。貫通する穴あけ構造は、液体試料が入り込んだ際に、貫通していない場合と比較して内部に存在する空気が抜けやすくなるため、結果として液体試料を導入し易いものとなる。そして、コア層まで到達した液体試料は光ファイバー伝搬光と相互作用させることができ、光ファイバー専用の光源・受光器を組み合わせることで光ファイバー内分光セルとして応用することができる。SEM 写真から分光セルは複雑な形状をしていることがわかるが、コア部の分光セルの直径を 3 - 5 μ m としたとき、伝搬光と相互作用する容積はおおよそ 0.4 - 1.2 pL と見積もることができる[18]。

光ファイバー内分光セルを用いて、金ナノ粒子の局在型表面プラズモン共鳴 (LSPR) 現象により生じる光吸収スペクトルを取得した。図3に、分光セルに金ナノ粒子分散溶液を注入し光吸収スペクトルを取得する際の実験装置図を示す。構築した光ファイバー型分光セルの光ファイバー導波路片端に小型ハロゲン光源 (HL-2000, Ocean Optics, Inc.) を接続した。別の片端に、PC 制御にて光強度スペクトルを取得できる小型分光器 (CCS200/M, Thorlabs, Inc.) を接続し、分光セルを透過する光強度スペクトルを取得した。小型分光器の設定は、平均化回数を 200 回とした。

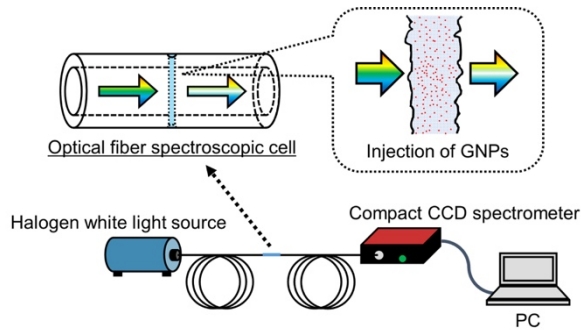


図3 光ファイバー分光セルを用いる分光測定装置概略図

光吸収スペクトル取得実験では、純水を分光セルに注入した際に取得した光強度スペクトルを基準とし、金ナノ粒子分散溶液を注入したことによる光強度スペクトルを用いて吸収スペクトルを得た。金ナノ粒子分散溶液の金の質量濃度は 0.5 wt% から 4.0 wt% に変化させた。

金ナノ粒子分散溶液を光ファイバー内分光セル内に注入した際の光吸収スペクトルを図4に示す。濃度の増加に伴い波長 518 nm 近傍を中心とした吸収ピークは増加した。金ナノ粒子分散溶液 4.0 wt% の場合では、およそ 5.5% の吸収ピークが現れた[18]。また、用いた試料濃度が高い場合、650 nm 近傍よりも長波長側で光吸収スペクトルがゼロより小さな値となった。

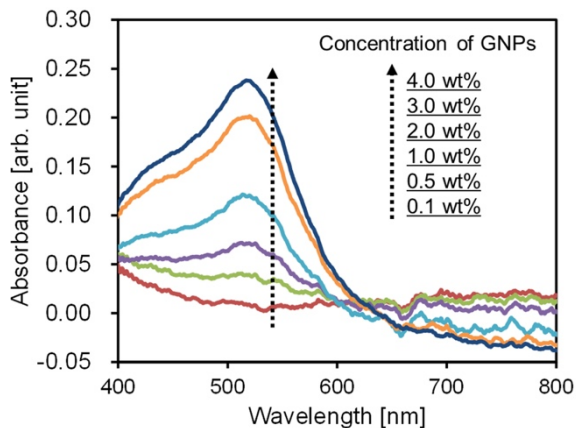


図4 光ファイバー分光セルを用いて測定した金ナノ粒子分散溶液の吸収スペクトル

金ナノ粒子分散溶液には凝集を防ぐ保護剤として Polyvinylpyrrolidone (PVP) が含まれており、分散を保つため金ナノ粒子質量濃度増加に伴い PVP の濃度も高くなっている。つまり、金ナノ粒子分散溶液の実行屈折率は、純水よりもわずかに高くなっている。それにより純水の場合

と比較してセル内部の実効屈折率が伝送路の屈折率に近づき、分光セルを通過する伝搬光が純水の場合より強くなる。従って、光強度比の値がゼロよりも小さくなり、金ナノ粒子質量濃度増加に伴い顕著に現れたと考えられる。

図5は光路長を 3 μm 、分光セル内部の単位 mL あたりの粒子数を 0.1×10^{14} から 4.0×10^{14} 個/mL と想定したランベルト・ベールに基づく数値計算から取得した光吸収スペクトルである。数値計算における吸収断面積は直径 5 nm の金ナノ粒子に光が入射したことを想定しており、波長 520 nm 近傍にて粒子数の増加に伴う吸収ピーク増加を取得した。上記実験結果と数値計算の比較から、得られた光吸収スペクトルは金ナノ粒子に基づく検証した[18]。

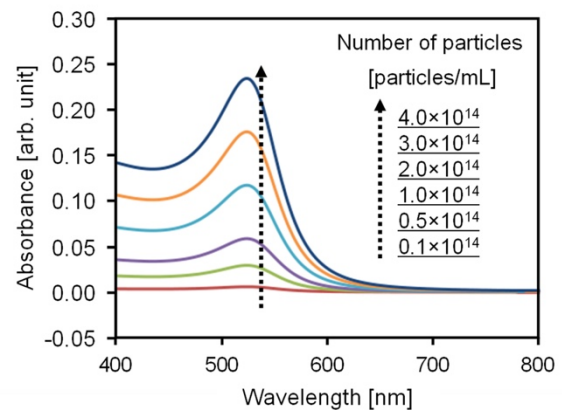


図5 図4の実験結果に基づく計算結果

提案した光ファイバー内分光セルを用いた分光計測構成でアミノ酸添加による金ナノ粒子凝集過程を検出可能か検証した。分散溶液内の金ナノ粒子を凝集させる生体分子は多く存在する。親水性の非必須アミノ酸である L-cysteine も金ナノ粒子分散溶液に添加することで金ナノ粒子を凝集させることができる[19-21]。L-cysteine の生体内へ及ぼす影響については様々議論がなされており[22-23]、採取した試料内に含有する L-cysteine を検出する手法がいくつか提案されている[21]。金ナノ粒子分散溶液の金ナノ粒子の濃度（粒子数）を一定にし、L-cysteine 添加による光吸収スペクトルの吸収ピークの吸収量減衰・ピーク波長シフトを追跡することで、L-cysteine 自体の検出が期待できる。構築した光ファイバー内分光セルを用いて、金ナノ粒子分散溶液に L-cysteine を添加したことによる光吸収スペクトルの変化を追跡した。金ナノ粒子分散溶液に添加する L-cysteine の濃度は 0.0 - 7.5 mM とした。光吸収スペクトルの取得の際、L-cysteine の濃度は変化させたが、金の質量濃度はすべての条件で 3.2 wt% と一定に保った。分光セル内部を L-cysteine を含む金ナノ粒子分散溶液で満たした際の光強度スペクトルを用いて純水を用いた場合を基準として光吸収スペクトルを算出した。金ナノ粒子分

散溶液内に L-cysteine を添加したことによる光吸収スペクトル特性を図 6 に示す. 結果から, L-cysteine の濃度の増加に伴い光吸収スペクトルのピークが徐々に消滅し, 濃度 7.5 mM では 518 nm 近傍の吸収ピークが見られなくなった. L-cysteine の添加によって金ナノ粒子に凝集が生じると分散溶液中のナノ粒子の粒径は増加し, 単位 mL 当たりの粒子数は減少する.

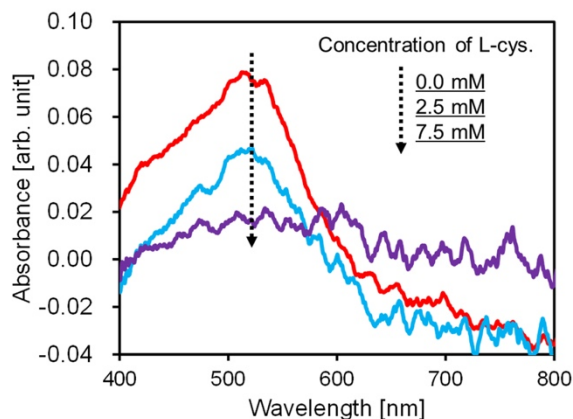


図 6 光ファイバー分光セル内に L-cysteine を導入した際の吸収スペクトル

L-cysteine 添加に伴う光吸収スペクトルの吸収ピークの長波長側へのシフトは確認できなかった. これは, 凝集した金ナノ粒子のサイズ・形状が分散溶液中に一定にならなかったためと考えられる. 金ナノ粒子と銅イオンを用いた比色法による L-cysteine の感度は現在 10 nM 程度まで達成されていることから, 今回の計測感度はそれに到達していないことが分かる[24]. 光吸収スペクトルの変化を取得するために使用された L-cysteine の量は最大 7.5 mM の濃度であるが, 実際に光ファイバー伝搬光と相互作用した容積は 0.4 pL とすると, 3.0×10^{-15} mol (3.6×10^{-13} g) と非常に微小な量で検出できたことがわかる. 微小容積の分光セルを用いても金ナノ粒子が凝集したことによる LSPR に基づく光吸収スペクトルの変化を取得できることが明らかとなった.

これらのことから, 本研究で作製した光ファイバー分光セルを用いることで, 生体分子と金ナノ粒子の相互作用を 10^{-15} mol 程度の微小量でも感度よく検出できることがわかった.

3. 結論

本研究では, 光ファイバーを利用する μ TAS の開発を念頭におき, フェムト秒レーザーを用いて光ファイバーへのアブレーション穿孔加工を行った. この穿孔加工部を分光セルとして使い, 金ナノ粒子凝集現象を観測することで生体センシングを行い, 光ファイバー内分光セルを用いて生

体分子検出が可能であることを実証した. 光ファイバーを貫通する穴あけ構造形成についてのフェムト秒レーザーの照射パラメータを明らかにし, 金ナノ粒子分散溶液の注入によるナノ粒子固有の光吸収スペクトルが取得可能であることを示し, さらに, 金ナノ粒子分散溶液に L-cysteine を添加することで, 金ナノ粒子が凝集し, 光吸収スペクトルの変化を追跡することで分光セル内に生体分子が含まれることを検出した. 本研究により, 微小体積で検出可能な分光計測手法が実現し, μ TAS として展開できる可能性が見いだされた.

謝辞

創価大学理工学部 白石正彦助教には研究の多くの部分で多大な貢献をいただいた. この場を借りて感謝申し上げます.

参考文献

- 1) K. Ai, Y. Liu, and L. Lu, *J. Am. Chem. Soc.* 131, (2009) 9496.
- 2) K. Sato, K. Hosokawa, and M. Maeda, *J. Am. Chem. Soc.* 125, (2003) 8102.
- 3) C. D. Medley, J. E. Smith, Z. Tang, Y. Wu, S. Bamrungsap, and W. Tan, *Anal. Chem.* 80, (2008) 1067.
- 4) K. M. Mayer and J. H. Hafner, *Chem. Rev.* 111, (2011) 3828.
- 5) D. Wu, J. Xu, L. G. Niu, S. Z. Wu, K. Midorikawa, and K. Sugioka, *Light-Sci. Appl.* 4, (2015) e228.
- 6) S. Höhm, A. Rosenfeld, J. Krüger, and J. Bonse, *J. Appl. Phys.* 112, (2012) 014901.
- 7) Y. Herhani, T. Nakamura, and S. Sato, *J. Phys. Chem. C* 115, (2011) 21592.
- 8) S. M. Eaton, H. Zhang, P. R. Herman, F. Yoshino, L. Shah, J. Bovatsek, and A. Y. Arai, *Opt. Express* 13, (2005) 4708.
- 9) J. R. Vázquez de Aldana, C. Méndez, and L. Roso, *Opt. Express* 14, (2006) 1329.
- 10) C. B. Schaffer, A. O. Jamison, and E. Mazur, *Appl. Phys. Lett.* 84, (2004) 1441.
- 11) L. N. D. Kallepalli, V. R. Soma, and N. R. Desai, *Opt. Eng.* 51, (2012) 073402.
- 12) A. Weck, T. H. R. Crawford, D. S. Wilkinson, H. K. Haugen, and J. S. Preston, *Appl. Phys. A* 89, (2007) 1001.
- 13) W. W. Gong, Z. H. Zheng, J. J. Zheng, H. F. Zhao, X. G. Ren, and S. Z. Lu, *Appl. Surf. Sci.* 255, (2009) 4351.
- 14) R. Vilar, S. P. Sharma, A. Almeida, L. T. Canguero, and V. Oliveira, *Appl. Surf. Sci.* 288, (2014) 313.
- 15) Y. Wang, D. N. Wang, M. Yang, W. Hong, and P. Lu, *Opt. Lett.* 34, (2009) 3328.
- 16) K. Goya, T. Itoh, A. Seki, and K. Watanabe, *Sensor. Actuat. B-Chem.* 210, (2015) 685.
- 17) M. Shiraishi, K. Goya, M. Nishiyama, S. Kubodera, and K. Watanabe, *Appl. Phys. A* 122, (2016) 825.
- 18) M. Shiraishi, M. Nishiyama, K. Watanabe, and S. Kubodera, *Opt. Commun.* 410, (2018) 8.
- 19) L. Shang, C. Qin, T. Wang, M. Wang, L. Wang, and S. Dong, *J. Phys. Chem. C* 111, (2007) 13414.

- 20) A. Mocanu, I. Cernica, G. Tomoaia, L. D. Bobos, O. Horovitz, and M. Tomoaia-Cotisel, *Colloids. Surf. A* 338, (2009) 93.
- 21) F. Chai, C. Wang, T. Wang, Z. Ma, and Z. Su, *Nanotechnology* 21, (2010) 025501.
- 22) X. F. Wang and M. S. Cynader, *J. Neurosci.* 21, (2001) 3322.
- 23) V. Gazit, R. Ben-Abraham, R. Coleman, A. Weizman, and Y. Katz, *Amino Acids* 26, (2004) 163.
- 24) L. Li and B. Li, *Analyst* 134, (2009) 1361.