

フェムト秒レーザーによる光ファイバへの 微小空間形成と生体センシングへの応用

電気通信大学 情報理工学研究科

特任研究員 白石 正彦

(2018 年度 奨励研究助成 (若手研究者) AF-2018226-C2)

キーワード：超短パルスレーザー加工，光ファイバセンシング，局在型表面プラズモン共鳴

1. 研究の目的と背景

超短パルス光を発振するフェムト秒レーザーによる材料への加工は，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，微小領域材料改質・除去などを可能とし，ナノ・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広く認知されている¹⁾。特に，材料改質・材料除去（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レーザーを利用することにより実現可能である²⁾。その中で，細径・軽量の透明材料である光ファイバに対してもフェムト秒レーザーによる加工が適用され，光ファイバ内の局所的な空間に新たな機能を付与する試みがなされている。代表的なものとしては，Fiber Bragg Grating (FBG) をフェムト秒レーザーによる光ファイバ内部の改質加工で形成する事例がある。近年では，光ファイバクラッド層への光導波路形成に加えて，そこに FBG を上書きすることが実現できている³⁾。その他の事例としては，光ファイバへの非破壊のアブレーション加工が挙げられる。石英系シングルモード光ファイバに波長 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形成できている⁴⁾。パルスエネルギー 11 μ J，繰返し周波数 1 kHz のパルス光を照射し，光ファイバコア直径と同程度（8.2 μ m）の太さを有する微小空間をコア領域に設け，そこ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伝搬光強度を取得することで試料の屈折率を計測できている。上記のように構築した穴あけファイバを用いて，屈折率 1.37-1.42 の範囲で 6.70×10^{-5} RIU の分解能に到達している。また，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た報告もある⁵⁾。

一方，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。ナノスケールの金属粒子に光が照射されると，入射光電場によって金属粒子内の自由電子集団に分極が生じる。金属ナノ粒子内の分極は入射光によって振動し，金属の特性に依存して入射光の一部と共鳴現象が生じる。この共鳴現象を局在型表面プラズモン共鳴（Localized surface plasmon resonance: LSPR）と呼び，共鳴現象による熱エネルギー変

換によって入射光の特定波長は減光する。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。光センシングのための金ナノ粒子の扱い方に，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⁶⁾。生体分子の添加によって金ナノ粒子に凝集が生じると光特性が変化するため，それに応じて変化する消光スペクトルを捉えることで生体分子をセンシングすることが可能となる。金ナノ粒子周囲にセンシング対象が付着した際に生じる微小な凝集現象は消光スペクトルの変化として検出できるため，その変化を捉えるためのセンシング対象は微量でも計測できる。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の容積は微小でよいといえる。前述した光ファイバ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を破断させることなく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（ 10^{-12} L）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型ピコリットル分光セルとみなし，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まわる分光計測構成を提供することができる。

本報告では，上記のような新たな光学計測手法の実現に向けた，石英系光ファイバに貫通する穴あけ構造を形成するためのレーザー照射条件について述べる。また，構築した光ファイバ型分光セルを用いた，金ナノ粒子分散溶液による微量試料測定の実験的な活用例について報告する。

2. 実験方法

2. 1 光ファイバ型ピコリットル分光セルの作成

図 1 に，光ファイバ型ピコリットル分光セルの概要について示す。フェムト秒レーザーによる高アスペクト比を有する穴あけ加工によって，石英系光ファイバに貫通する微小空間を形成し，液体試料に対する UV-vis 分光計測可能なセルを形成する。計測には，光ファイバ専用の光源や分光器を用いるため，分光セル形成のみで計測系を構成する

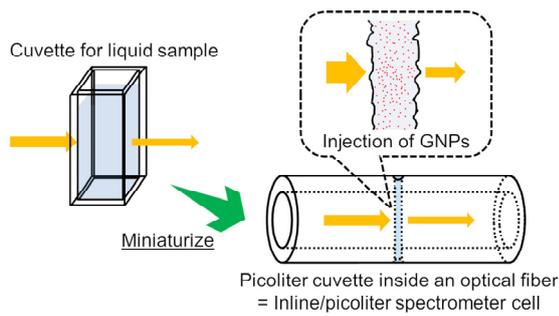


図 1 フェムト秒レーザーで形成された光ファイバ貫通孔を利用した微量分光計測の概要。

ことが可能である。

図 2 にフェムト秒レーザーによる光ファイバ型分光セル構築のための概要図を示す。分光セルを構築するために、コア径 $62.5 \mu\text{m}$ 、クラッド径 $125 \mu\text{m}$ の石英系マルチモードグレーデッドインデックス (MMGI) ファイバを材料として選定した。Ti:Sapphire レーザー (IFRIT, Cyber Laser Inc.) の第二高調波 400 nm を使用し、開口数 0.65 の近紫外用対物レンズを用いて光ファイバへ集光した。加工実験時のパルス幅、繰り返し周波数、パルスエネルギーは、それぞれ 350 fs 、 1 kHz 、 $30 \mu\text{J}$ とした。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、光ファイバを固定するクランプにはステップ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、光ファイバ表面から内部へ $50 \mu\text{m}$ の位置となるように調整した。パルス照射数は 150 回として穴あけ構造を形成した。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⁷⁾。上記条件では、光ファイバ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回転クランプにて光ファイバを 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の

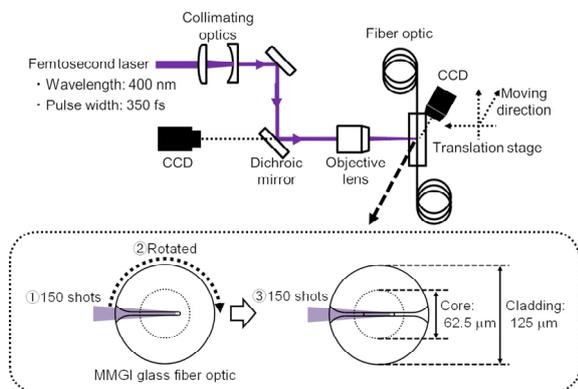


図 2 近紫外フェムト秒レーザーによる光ファイバへの貫通孔形成

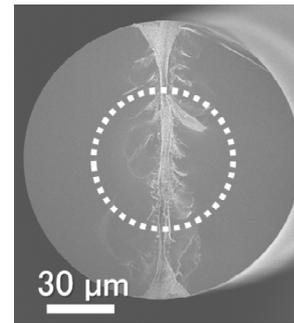


図 3 光ファイバに形成した高アスペクト比貫通孔の SEM 観察結果

断面 SEM 写真を図 3 に示す。図 3 は光ファイバ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コア層とクラッド層の境界を示している。SEM 観察から、分光セルが光ファイバを貫通していることがわかる。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はおよそ $3\text{--}5 \mu\text{m}$ であり、伝搬光と相互作用する容積はおよそ $0.4\text{--}1.2 \text{ pL}$ と見積もることができる⁸⁾。分光セルとして用いる際の穴あけ構造の内部表面粗さや周辺のクラックによる影響は、試料の光強度スペクトルと基準となる光強度スペクトルの差分を取得することで低減できる。

3. 実験結果および考察

3. 1 金ナノ粒子による消光スペクトル取得

光ファイバ型分光セルを用いて、金ナノ粒子の局在型表面プラズモン共鳴 (LSPR) 現象により生じる消光スペクトルを取得した。図 3 に示した光ファイバ型分光セルは石英系光ファイバを貫通しているため、液体試料を比較的スムーズに導入させることができる。分光セルに金ナノ粒子分散溶液を注入し、消光スペクトルを取得する手法についての概要を図 4 に示す。構築した光ファイバ型分光セルの光ファイバ導波路片端にハロゲン光源を接続した。別の片端に、PC 制御にて光強度スペクトルを取得できる市販小型分光器を接続し、分光セルを透過する光強度スペクトル

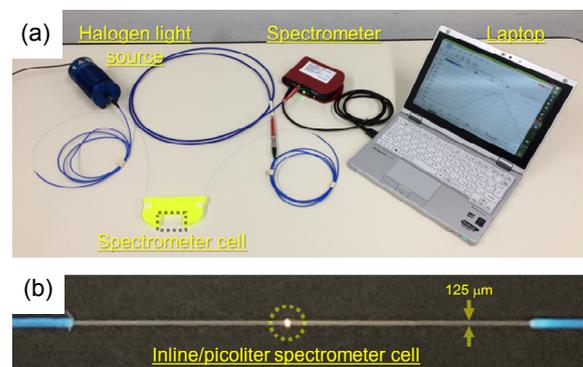


図 4 (a) 光ファイバ型ピコリットル分光セルによる計測構成外観。(b) 光ファイバ型分光セルの拡大写真。

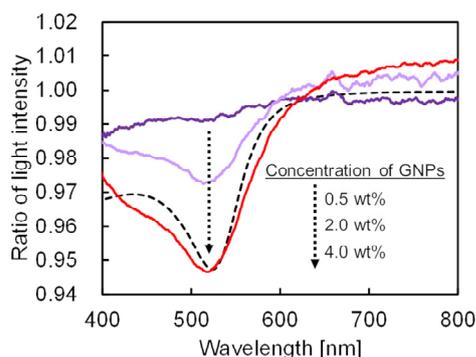


図 5 光ファイバ分光セルへの金ナノ粒子注入による消光スペクトル取得

を取得した。小型分光器の設定は、集積時間を 3 ms、平均化回数を 200 回とした。金ナノ粒子を含まない純水を分光セルに注入し、分光セルを透過した光強度スペクトルを取得した。純水の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際の光強度スペクトルとの比から、金ナノ粒子分散溶液を注入したことによる消光スペクトルを算出した。金ナノ粒子分散溶液のナノ粒子粒径は 5–10 nm の平均 8.1 nm であり、質量濃度は 0.5 から 4.0 wt% の範囲のものを用意した。金ナノ粒子分散溶液を光ファイバ型分光セル内に注入した際の消光スペクトルを図 5 に示す。金ナノ粒子の濃度の増加に伴い波長 520 nm 近傍を中心とした消光値のディップは増加し、4.0 wt% では 5.5% の光減衰を示した⁸⁾。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消光スペクトルが 1.0 より大きな値となった。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った。従って、光強度比の値が 1.0 よりも大きくなり、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。また、図 5 内の破線は光路長を 3 μm、分光

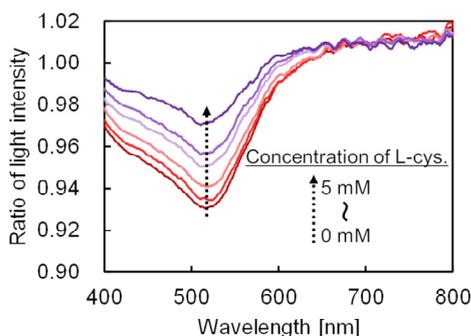


図 6 光ファイバ型分光セルを用いた L-システイン添加による金ナノ粒子凝集による消光スペクトル変化の追跡

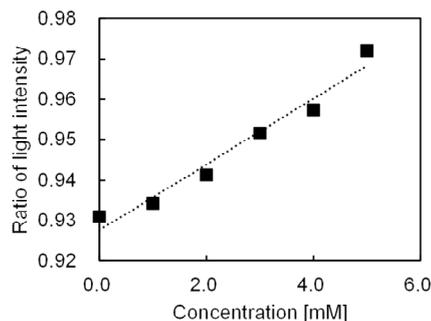


図 7 波長 520 nm の消光値の L-システイン濃度増加に伴う推移

セル内部の粒子数を 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消光スペクトルである。波長 520 nm 近傍にて消光ディップを有し、実験結果との大きな差がみられないことから得られた消光スペクトルは金ナノ粒子に基づくことを示した。

3. 2 生体分子添加による金ナノ粒子凝集の追跡

提案した光ファイバ型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-システイン (Cys) 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。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、Cys 添加による消光スペクトルのディップの消光値変化量や極小値波長シフトを追跡することで、Cys に対する濃度の定量が期待できる。構築した光ファイバ型分光セルを用いて、金ナノ粒子分散溶液に Cys を添加したことによる消光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 Cys の濃度は 0–5.0 mM の範囲のものを用意した。消光スペクトル取得の際、Cys の濃度は変化させたが、金の質量濃度はすべての条件で 4.0 wt% と一定に保った。金ナノ粒子については、3.1 節と同様に平均 8.1 nm の粒径のものを使用した。分光セル内部に Cys 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取得し、純水を用いた場合の光強度スペクトルを基準として消光スペクトルを算出した。

金ナノ粒子分散溶液内に Cys を添加したことによる消光スペクトル特性を取得した⁹⁾。図 6 の結果から、Cys の濃度 5.0 mM へ増加するにつれて 520 nm 近傍の消光ディップの深さが減少する傾向を得た。これは、Cys 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、初期粒径である 8.1 nm のナノ粒子の単位 mL 当たりの数が減少したこと起因している。Cys 添加に伴う消光スペクトルの消光極小値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

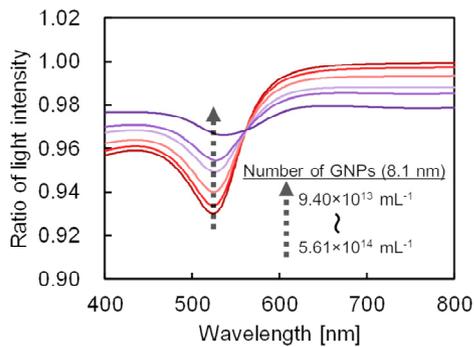


図8 金ナノ粒子凝集による初期粒子（8.1 nm）減少を考慮した消光スペクトルの算出結果

考えられる。図7に520 nmの消光ディップに対するCysの濃度特性を示す。計測用小型分光器の光強度分解能を0.001とした場合、感度は 0.008 mM^{-1} と算出でき、Cysの測定分解能は 0.125 mM を示した。金ナノ粒子と銅イオンを用いた比色法によるCysの感度は現在10 nM程度まで達成されていることから、今回の計測構成でも金属イオン適用などによる分解能向上が期待できる。また、以上の結果から波長520 nmの単色光源を使用し、金ナノ粒子凝集現象を光強度変化として取得できることが予想される。単色LED光源と光パワーメータの組み合わせによる、金ナノ粒子の凝集過程の経時変化を追跡できることが期待できる。

図8は、質量濃度4 wt%の場合の粒径8.1 nmの金ナノ粒子の粒子数を想定した消光スペクトル計算結果を示している。Cysの添加によって粒径8.1 nmの初期粒子の数が減少し、それに伴うスペクトル変化を算出している。凝集後の粒径は200 nmと想定し、消光スペクトルに反映している。濃度0 mMとした場合の消光ディップ値から、計算された8.1 nmの粒子数は 5.61×10^{14} 個数/mLであった。金ナノ粒子の凝集による初期粒子数の減少により、波長520 nm近傍の消光ディップが減少した。光ファイバ型分光セルの容量を0.4 pLとすると、光ファイバ内の光と相互作用する金ナノ粒子の数は 2.24×10^5 個と推定された。その他の濃度については、実験結果の消光ディップ値から単位ミリリットルあたりの粒子数を推定したため、計算されたスペクトルは実験結果を再現している。数値計算では、凝集後の金ナノ粒子の直径を200 nmの代表値とした。Cysが5.0 mMの濃度に達すると、粒径8.1 nmのGNPは 9.40×10^{13} 個数/mLに減少し、200 nmの粒子数は 3.10×10^{10} 個数/mLに増加した。計算結果の5.0 mMの場合は、粒径200 nmの金ナノ粒子の増加によりディップ波長が長波長シフトしていることが確認された。図6に示した実験結果には、図8のような565 nmのディップが確認できなかった。これは、実際の実験では凝集後の金ナノ粒子の直径は、特定のサイズで固定されていないからである。不均一に凝集した粒子は特定の大きさを持たず、かつ数値計算で算出した程度の粒子数に達していないため、長波長シフトした

消光ディップが確認できなかったといえる。つまり、520 nm近傍の消光スペクトルディップの減少は凝集を免れた初期粒子の粒子数の減少を反映しており、これを追跡することでCysの濃度を計測できることが明らかとなった。5.0 mMのCysを検出値とし、0.4 pLの検出量を想定した場合、ピコリットル分光セル内部のCysは $2.0 \times 10^{-15} \text{ mol}$ ($2.4 \times 10^{-13} \text{ g}$)であった。また、Cysの添加濃度に対する消光ディップ値の減衰には、線形性を有することが確認された。以上の結果から、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に基づく消光スペクトルの変化を取得できることが明らかとなった。

4. 結論

本報告では、フェムト秒レーザーによる光ファイバへの加工とその応用について述べ、特に穴あけ構造を採用した光ファイバ（光ファイバ型分光セル）に着目し、後半では試験的な計測の応用についての検証結果を示した。また、金ナノ粒子の生体センシング手法の特にナノ粒子凝集を利用した例を紹介し、光ファイバ型分光セルとの組み合わせによる生体分子検出・計測の可能性を明らかにした。光ファイバを貫通する穴あけ構造の形成についてのフェムト秒レーザーの照射パラメータが明らかになり、金ナノ粒子分散溶液の注入によるナノ粒子固有の消光スペクトルが取得可能であることを示した。さらに、金ナノ粒子分散溶液にL-システインを添加することで、金ナノ粒子が凝集し、それによる光学特性の変化を消光スペクトルの変化として取得できることを明らかにした。本研究課題によって、微小体積で検出可能な分光計測手法が提案され、新たな光学手法が実現された。

謝辞

本研究は公益財団法人天田財団からの2018年度奨励研究助成（若手研究者）（AF-2018226-C2）によって実施されました。ここに深く感謝の意を表します。

参考文献

- 1) K. Sugioka, *Nanophotonics* **6**(2), 393 (2017).
- 2) R. Vilar, S.P. Sharma, A. Almeida, L.T. Canguero, and V. Oliveira, *Appl. Surf. Sci.* **288**, 313 (2014).
- 3) A. Theodosiou, A. Ioannou, K. Kalli, *J. Lightwave Technol.* **37**(18), 4864 (2019).
- 4) Y. Wang, D. N. Wang, M. Yang, W. Hong, and P. Lu, *Opt. Lett.* **34**, 3328 (2009).
- 5) K. Goya, T. Itoh, A. Seki, and K. Watanabe, *Sensor. Actuat. B-Chem.* **210**, 685 (2015).
- 6) K. Ai, Y. Liu, and L. Lu: *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 9496 (2009).
- 7) M. Shiraiishi, K. Goya, M. Nishiyama, S. Kubodera, K. Watanabe, *Appl. Phys. A* **122**, 825 (2016).
- 8) M. Shiraiishi, M. Nishiyama, K. Watanabe, S. Kubodera, *Opt. Commn.* **410**, 8 (2018).
- 9) M. Shiraiishi, K. Watanabe, S. Kubodera, *Sensors* **19**, 2859 (2019).