

# 生体センシング実現に向けたピコリットル容積の 局在型表面プラズモン共鳴ファイバセンサに関する研究

## Studies on a localized surface plasmon resonance optical fiber sensor with picoliter volume for biological sensing

15D5201 白石正彦

指導教授 窪寺昌一

### SYNOPSIS

In this thesis, a spectrometer cell with a sensing volume of sub-picoliter has been fabricated inside a glass optical fiber by use of near ultraviolet (NUV) femtosecond laser pulses. By use of the cell with a small sensing volume, spectroscopic measurements using localized surface plasmon resonance (LSPR) were demonstrated. The parameters of the laser system in order to make a micro through-hole inside a glass optical fiber were optimized. The microhole worked as an inline/picoliter spectrometer cell, which had capability of measuring refractive indices of liquid samples by using a combination of a halogen white light source and a compact CCD spectrometer. The spectrometer cell was fabricated into an optical glass fiber by focusing the NUV femtosecond laser pulses at a wavelength of 400 nm with an energy of 30  $\mu\text{J}$ . The laser beam was focused from two directions opposite to each other to fabricate a micro through-hole spectrometer cell. A diameter of the cell was approximately 3  $\mu\text{m}$ , and the length was approximately 62.5  $\mu\text{m}$ , which was nearly equal to the core diameter of the optical fiber. Absorption spectra using LSPR were obtained with the spectrometer cell. Liquid solution of gold nanoparticles (GNPs) with a diameter of 5 to 10 nm was injected into the spectrometer cell with the volume of 0.4 pL. The absorption peak centered at 518 nm was observed. An increase of the absorption associated with the increase of the number of nanoparticles was in agreement with the numerical calculation based on the Lambert-Beer law. An aggregation of GNPs caused by biomolecules of L-cysteine was monitored by the change in the absorption spectra. The absorption peak of LSPR disappeared due to an injection of 7.5 mM of L-cysteine. The detection sensitivity of L-cysteine was calculated to be  $3.0 \times 10^{-15}$  mol ( $3.6 \times 10^{-13}$  g) in the spectrometer cell due to the interaction volume of 0.4 pL with the 7.5 mM L-cysteine. A novel spectroscopic measurement method has been established that enables biomolecules to be detected in a simple measurement configuration with a small absolute amount of sensing targets.

**Keywords :** Femtosecond laser drilling, optical fiber sensor, localized surface plasmon resonance, gold nanoparticles, biological sensing

## 1. 研究背景

近年、分光計測の分野はセンシングに使用される材料がナノスケールにまで発展し、特に金属ナノ粒子を用いた生体分子検出手法が様々な形で提案されている[1]。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吸収される[2]。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。形状が球であり、直径が5–10 nmの金ナノ粒子が溶液内に単分散しているとき、最も吸収される光波長は515–520 nmである。金ナノ粒子近傍にセンシング対象が固定された際の光学特性の変化はLSPRによる光吸収スペクトルの変化として現れ、結果としてセンシング対象は認識されることになる。光センシングのための金ナノ粒子の扱い方には大きく二つある。ひとつは、透明基板表面に自己組織化単分子膜(Self-assembled monolayer; SAM)を形成し金ナノ粒子を固定化する手法である[3]。固定化された金ナノ粒子表面にセンシング対象を捕捉する生体分子を修飾し、センシング対象の吸着に伴うナノ粒子近傍の屈折率変化によって検出する手法である。この手法は、光ファイバに構築されたセンサ部にも適用され、実際にセンシング機能の付与に成功している[4]。もう一つは、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である[5]。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

ングすることが可能となる。金ナノ粒子の微小な凝集現象を光吸収スペクトルの変化として検出できるため、センシング対象が微量でも計測することができる。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(キューベットなど)の容積は微小でよい。細径な光ファイバ導波路途中に穴あけ構造(穿孔構造)を構築し、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。光ファイバを破断させることなく直径数マイクロメートル程度の穿孔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。細径な光ファイバに再現性よく穿孔構造を構築するためには、ナノメートル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として認知されている超短パルスレーザーによる穴あけ加工(穿孔加工)を利用することで実現可能である。

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材料への加工技術は、微小三次元光造形、表面微細周期構造形成、ナノ粒子精製や微小領域材料改質・除去などを可能にし、その応用例は多岐にわたる[6-10]。特に、材料除去加工に関しては、様々な材料でフェムト秒パルス光を利用することにより実現可能である[11, 12]。フェムト秒パルス光を透明材料に集光した際、集光部では多光子吸収やトンネルイオン化などの非線形光学現象が顕著に現れ、パルスエネルギーを吸収した集光部は蒸散(アブレーション)される[13]。また、透明材料への集光時間はフェムト秒時間領域で終了するため、加工部周辺の熱影響を可能な限り抑えることができる。本研究室では、近紫外フェムト秒レーザーによる石英系光ファイバへのアブレーション加工により、容積数ピコリットル単位の

微小な穿孔構造の構築に成功している。微小穿孔構造は光ファイバ型ピコリットル分光セルとみなすことができ、セル内部へ浸入する液体試料の屈折率変化は光ファイバ伝搬光を利用して測定することができる[14]。そして、前述した金ナノ粒子凝集過程を光ファイバセンシングに応用した例は提案されておらず、光ファイバ型ピコリットル分光セルを用いて溶液中に分散する金ナノ粒子の光吸収スペクトルを取得できれば、新たな光学計測手法を提供することができる。

本論文では、近紫外フェムト秒レーザーによる加工で構築された光ファイバ型ピコリットル分光セルと金ナノ粒子分散溶液を用いて新たな光センシング手法を提案する。はじめに、光ファイバ内を伝搬する光と相互作用する体積がピコリットル程度の微小な分光セルを構築するために、穿孔径が小さくなる加工条件を明らかにした。その後、液体試料を導入させやすい分光セルとするために貫通した分光セルを構築するための加工条件を前述の条件をもとに最適化した。次に、構築した光ファイバ型ピコリットル分光セル内部に金ナノ粒子分散溶液を注入し、LSPRによる光吸収スペクトルの取得条件を明らかにした。その後、LSPRによる光吸収スペクトルを利用した、生体分子添加によるスペクトル変化を確認した。

## 2. 光ファイバ型ピコリットル分光セルの構築

ピコリットル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 MMGI ファイバを材料として選定した。近紫外フェムト秒レーザーによる光ファイバ型ピコリットル分光セル構築のための概要図を Fig. 1 に示す。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, 20  $\mu\text{J}$  とした。集光位置は、2 台の CCD カメラと 4 軸稼働ステージを用いて調整した。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。Fig. 2 に、上記条件で加工を施した後の穿孔構造部を含む光ファイバ端面の走査型電子顕微鏡(SEM)観察結果を示す。結果は、照射パルス数 100 回のものであり、フェムト秒パルス光は SEM 写真に対して左から右に照射した。光ファイバ表面から 23  $\mu\text{m}$  の深さから穿孔径が広がらない細い穿孔構造が形成されてい

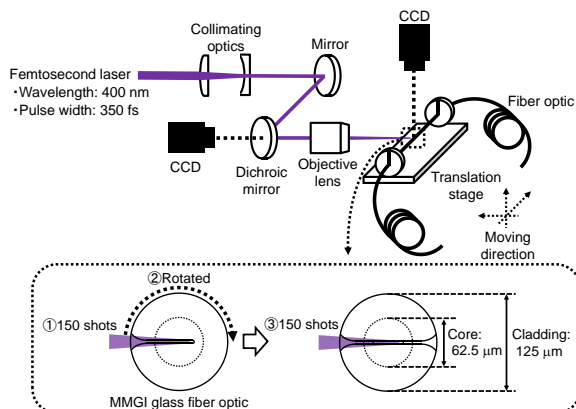


Fig. 1 The experimental apparatus of the laser system to fabricate an inline/picoliter spectrometer cell. Inset represents a schematic diagram of two-directional irradiation to make a micro through-hole for the spectrometer cell.

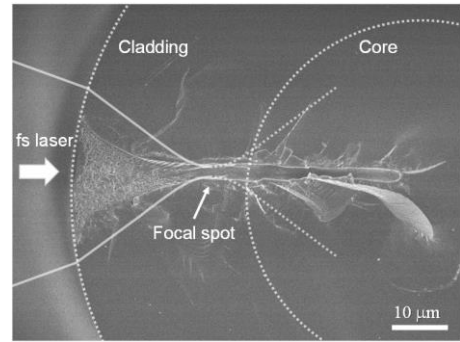


Fig. 2 Calculated ray trace of the focused femtosecond laser beam overlapped with an experimentally observed microhole shape. A Kerr lens as a result of self-focusing was also considered.

る。これは、石英系光ファイバのクラッド径 125  $\mu\text{m}$  によるシリンダカルレンズ効果とパルス光の高いピーク強度によるカーレンズ効果が反映され、材料内部集光点の位置が変化したためと考えられる。カーレンズ効果による焦点距離  $f$  は以下のように表される。

$$f = \frac{w^4}{4ln_2P} \quad (1)$$

$w$  は光ファイバ入射時のビーム半径、 $l$  は媒質中を伝搬する距離、 $n_2$  はレーザー波長 400 nm に対する媒質の非線形屈折率、 $P$  はレーザーのピークパワーである。波長 400 nm のレーザー光による熔融石英の非線形屈折率  $(3.42 \pm 0.37) \times 10^{-16} \text{ cm}^2/\text{W}$  [15] と石英系光ファイバのクラッド径 125  $\mu\text{m}$  によるレンズ効果を考慮すると、材料表面から 23  $\mu\text{m}$  の地点が集光点となり実験結果と一致する。材料内部でレーザー光が集光された後は、プラズマの発生によるレーザー光の Defocusing 現象と高いレーザー強度による Self-focusing 現象が繰り返されるプラズマチャネリングが発生したと考えられる。材料内部の集光点以降のプラズマチャネリングにより、穿孔構造の深部は穿孔径が小さい穿孔構造が形成されたと考えられる。また、Fig. 3 はパルス光照射 100 回と 1,000 回の場合の内表面の粗さに関する結果である。照射数 100 回の Fig. 3 (a) のときは、穿孔構造深部に内表面が滑らかな穿孔が形成されているのを確認した。Fig. 3 (b) のように照射数を 1,000 回としたときは、穿孔構造の深さを増加させることに成功したが、内表面は熔融またはアブレーション時に生じた熔融石英のナノ粒子が付着する表面を得た。上記現象は、フェムト秒レーザーによる加工でも材料内部に蓄熱の効果が発生していることを示している[16]。

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、パルスエネルギーを 30  $\mu\text{J}$  として穿孔加工を施した。Fig. 1 下段のように 150 回のパルス照射後に回転ステージにて光ファイバを 180 度回転させ、同様の条

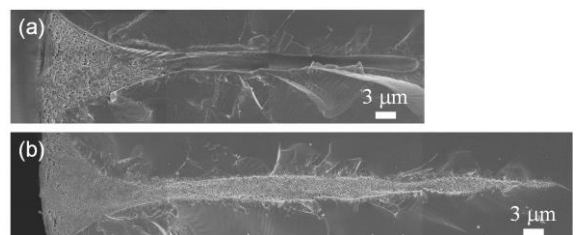


Fig. 3 Observation of a microhole with (a) a hundred and (b) a thousand femtosecond laser pulse irradiation inside a glass optical fiber.

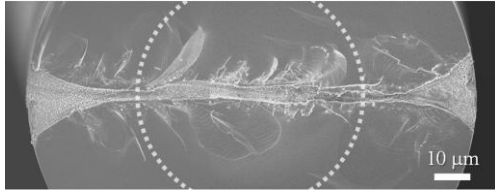


Fig. 4 A cross sectional SEM photograph of the inline/picoliter spectrometer cell inside a glass optical fiber. The white dotted circle indicates the boundary between core and cladding layer.

件でパルス光を照射した。Fig. 4は、光ファイバ端面を撮影した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。穿孔構造が光ファイバを貫通しており、液体を導入しやすい光ファイバ型分光セルを構築できていることがわかる。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 μmとしたとき、伝搬光と相互作用する容積はおよそ0.4 pLと見積もることができる。

### 3. LSPR 光吸収スペクトルの取得

ピコリットル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手法についての概要をFig. 5に示す[17]。構築したピコリットル分光セルの光ファイバ導波路片端にハロゲン光源(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、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 $I_0$ として取得した。次に、金ナノ粒子分散溶液を注入し、光強度スペクトルを $I_1$ として取得した。取得した光強度スペクトルの比から、金ナノ粒子分散溶液を注入したことによる光吸収スペクトルを算出した。金ナノ粒子分散溶液の金の濃度は0.1 wt%から4.0 wt%に変化させた。

金ナノ粒子分散溶液をピコリットル分光セル内に注入した際の光吸収スペクトルをFig. 6に示す。濃度1.0 wt%注入時に、波長518 nm付近で光の吸収を得た。また、濃度の増加に伴い吸収ピークは増加し、4.0 wt%では5.5%の吸収ピークが現れた。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1.0より大きな値となった。金ナノ粒子分散溶液には純水に金ナノ粒子とPVPが含まれている。よって、水よりもわずかに実効屈折率が高くなっていると予想できる。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

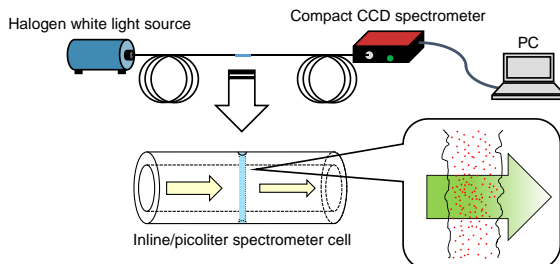


Fig. 5 Schematic of the absorption measurement by use of the inline/picoliter spectrometer cell.

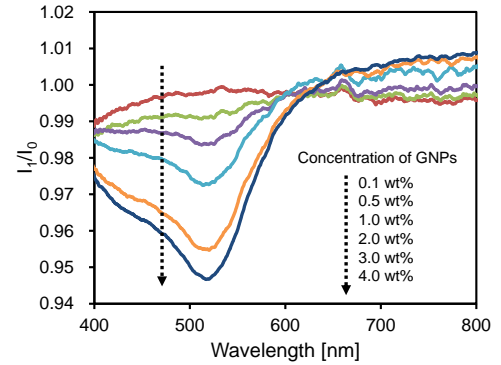


Fig. 6 Absorption spectra with different concentrations of GNPs. The absorption peak at the wavelength of 518 nm was observed.

水の場合より強くなる。よって、光吸収スペクトルの値が1.0よりも大きくなったと考えられる。金ナノ粒子に光が入射した際の吸収断面積は、以下のように表される[2]。

$$\sigma_{ext} = \frac{18\pi\epsilon_m^{3/2}V}{\lambda} \frac{\epsilon_2(\lambda)}{[\epsilon_1(\lambda)+2\epsilon_m]^2+\epsilon_2(\lambda)^2} \quad (2)$$

$$\sigma_{sca} = \frac{32\pi^4\epsilon_m^2V^2}{\lambda^4} \frac{(\epsilon_1-\epsilon_m)^2+(\epsilon_2)^2}{(\epsilon_1+2\epsilon_m)^2+(\epsilon_2)^2} \quad (3)$$

$$\sigma_{abs} = \sigma_{ext} - \sigma_{sca} \quad (4)$$

$\sigma_{ext}$  は減光断面積、 $\sigma_{sca}$  は散乱断面積を表している。 $\epsilon_m$  はナノ粒子近傍の誘電率を示し、 $1.333^2 (=n^2)$ と表される。 $V$ は粒子の体積を表している。 $\epsilon_1$ と $\epsilon_2$ は金の誘電率の実部と虚部を表し、以下のように近似的に表現できる[18]。

$$\begin{aligned} \epsilon_{Au}(\lambda) &= \epsilon_\infty - \frac{1}{\lambda_p^2(1/\lambda^2+i/\gamma_p\lambda)} \\ &+ \sum_{i=1,2} \frac{A_i}{\lambda_i} \left[ \frac{e^{i\phi_i}}{(1/\lambda_i-1/\lambda-i/\gamma_i)} + \frac{e^{-i\phi_i}}{(1/\lambda_i+1/\lambda+i/\gamma_i)} \right] \\ &= \epsilon_1 + i\epsilon_2 \end{aligned} \quad (5)$$

$\epsilon_\infty$ は金の高周波上限誘電率、 $\lambda_p$ はプラズマ波長、 $\gamma_p$ は減衰係数を表している。総和項内の $A_i$ は無次元量の臨界振幅、 $\lambda_i$ はバンド間遷移波長、 $\gamma_i$ は遷移幅を示している。 $\phi_i$ は位相値であり、単純化して $-\pi/4$ としている。上記(2)から(5)式を用いて算出した入射光波長に対する吸収断面積をFig. 7(a)に示す。金ナノ粒子の粒径は10 nm、分光セルの光路長は3 μmと想定して算出した。算出結果から、波長518 nm付近にピークが生じ、 $4.4 \times 10^{-13} \text{ cm}^2$ であった。以上の吸収断面積の算出結果とランベルト・ベールの法則を用いた金ナノ粒子分散溶液による光吸収スペクトルの算出結果をFig. 7(b)に示す。分光セル内に入り込む単位 mLあたりの金ナノ粒子数が増加するにつれて、波長518 nm付近の吸収ピークを中心に、光強度減衰が大きくなる傾向を得た。数値計算では、質量濃度4.0 wt%のとき、溶液中の金ナノ粒子数は $4.0 \times 10^{14}$  個/mLと見積もることができた。金の質量濃度4.0 wt%の金ナノ粒子分散溶液は、金ナノ粒子の粒径を5–10 nmとしたとき、 $4.0 \times 10^{15}$ から $3.6 \times 10^{16}$  個/mLの粒子数が溶液中に存在する。数値計算による粒子数は、実験で使用した金ナノ粒子数よりも低い数値であることが明らかとなった。光ファイバ型ピコリットル分光セル内に注入した際の光ファイバ伝搬光と相互作用する金ナノ粒子の粒子数の定量的な決定手法の確立が今後の課題として残る。

### 4. 微量分光計測の応用例

アミノ酸の一種であるL-システインはチオール基(-SH)をもち、金ナノ粒子表面と強く結合する。金ナノ粒子と結合したL-システインは先端にアミノ基(-NH<sub>2</sub>)やカルボキシ基(-COOH)をもち、他のL-システインの各官能基と



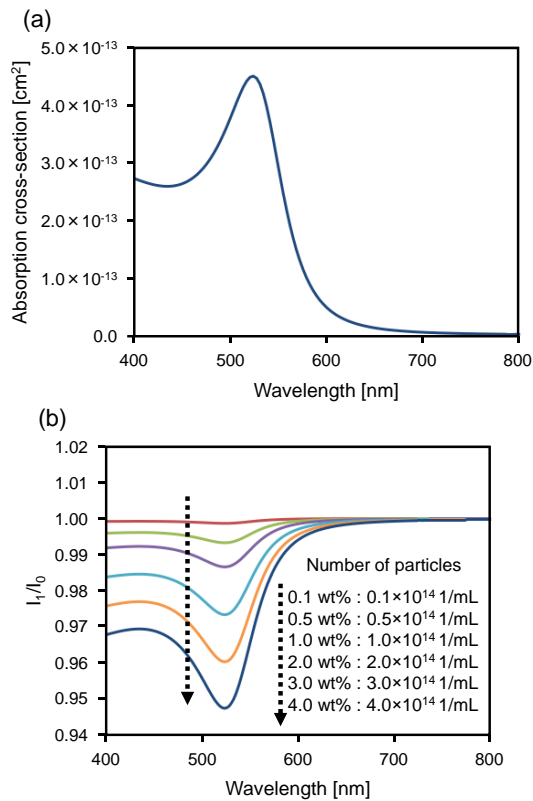


Fig. 7 (a) Numerically calculated absorption cross-section of GNPs with a diameter of 10 nm. (b) Calculated absorption spectra based on Lambert-Beer law.

結合する。結果として L-システイン同士の結合によって金ナノ粒子は凝集する。前述の結果から、容積ピコリットルの微量な分光セルを用いて、光吸収スペクトルの変化からアミノ酸を検出する手法を提案できることが予想できる。前述した条件で構築された容積がおよそ 0.4 pL の光ファイバ型ピコリットル分光セルを用いて、金ナノ粒子分散溶液に L-システイン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-システインの濃度は 0.0 – 7.5 mM と変化させた。光吸収スペクトル取得の際、L-システイン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-システイン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  $I_2$  とし、純水を用いた場合の光強度スペクトル  $I_0$  を基準として光吸収スペクトルを取得した。

金ナノ粒子分散溶液内に L-システインを添加したことによる光吸収スペクトルを Fig. 8 に示す。結果から、L-システインの濃度 2.5 mM から光吸収スペクトルの変化が生じ、7.5 mM では 518 nm 近傍の吸収ピークが見られなくなった。金ナノ粒子と銅イオンを用いた比色法による L-システインの感度は現在 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[19]。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-システインの量は 7.5 mM の濃度であるが、実際に光ファイバ伝搬光と相互作用した容積は 0.4 pL であるため、 $3.0 \times 10^{-15}$  mol ( $3.6 \times 10^{-13}$  g) と非常に微量な量で検出できたことがわかる。本論文によって、簡便な計測構成かつセンシング対象の絶対量が非常に少ない条件で、生体分子を検出できる新しい分光計測手法が確立された。

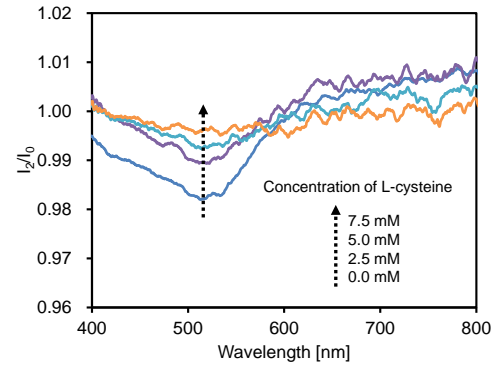


Fig. 8 Optical absorption spectra to recognize L-cysteine inside the spectrometer cell. The peak wavelength disappeared with increasing the concentration of L-cysteine because of an aggregation of GNPs.

## 5. 結論

本研究では、近紫外フェムト秒レーザーによるアブレーション加工を用いて、石英系光ファイバに貫通するピコリットル分光セルを構築した。本論文におけるレーザーの照射条件では、石英系光ファイバ内部の集光点が光ファイバのシリンジカルレンズ効果とパルス光の高いピーク強度によるカーレンズ効果に伴い、材料の浅部に移動することが分かった。また、材料内部集光点以降はプラズマチャネリングが発生していると推測した。プラズマチャネリングの発生により穿孔構造深部の穿孔径は細くなり、結果として光ファイバ伝搬光と相互作用させる分光セルの容積を数ピコリットル程度に抑えることができた。また、金ナノ粒子分散溶液を構築した光ファイバ型ピコリットル分光セルに注入することによって、金ナノ粒子固有の光吸収スペクトルを取得することに成功した。ランベルト・ベールの法則に基づいた数値計算で、単位ミリリットルあたりの金ナノ粒子数が増加するにつれて吸収ピークが増加することを明らかにした。さらに、金ナノ粒子分散溶液に生体分子である 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光吸収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。本論文によって、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。

## 参考文献

- [1] C. Guo, et al., *Biosens. Bioelectron.* 22, 1830-1834, (2007).
- [2] K. M. Mayer and J. H. Hafner, *Chem. Rev.* 111, 3828-3857, (2011).
- [3] N. Nath and A. Chilkoti, *Anal. Chem.* 74(3), 504-509, (2002).
- [4] S. K. Srivastava, et al., *Plasmonics* 7, 261-268, (2012).
- [5] K. Ai, et al., *J. Am. Chem. Soc.* 131, 9496-9497, (2009).
- [6] D. Wu, et al., *Light: Science & Applications* 4, e228-1-8, (2015).
- [7] S. Höhm, et al., *J. Appl. Phys.* 112, 014901-1-9, (2012).
- [8] Y. Herhani, et al., *J. Phys. Chem. C* 115, 21592-21598, (2011).
- [9] C. B. Schaffer, et al., *Meas. Sci. Technol.* 12, 1784-1794, (2001).
- [10] J. R. V. Aldana, et al., *Opt. Exp.* 14(3), 1329-1338, (2006).
- [11] A. Weck, et al., *Appl. Phys. A* 89, 1001-1003, (2007).
- [12] W. W. Gong, et al., *Appl. Surf. Sci.* 255, 4351-4354, (2009).
- [13] Y. Liu, et al., *Appl. Phys. Lett.* 102, 251103-1-4, (2013).
- [14] K. Goya, et al., *Sens. Actuat. B Chem.* 210, 685-691, (2015).
- [15] D. Milam, *Appl. Opt.* 37(3), 546-550, (1998).
- [16] M. Shiraishi, et al., *Appl. Phys. A* 122, 825-1-4, (2016).
- [17] M. Shiraishi, et al., *Opt. Commun.* 410, 8-12, (2018).
- [18] P. G. Etchegoin, et al., *J. Chem. Phys.* 125, 164705-1-3, (2006), and 127, 189901-1, (2007).
- [19] L. Li and B. Li, *Analyst* 134, 1361-1365, (2009).