

光ピンセット技術とその応用

立命館大学理工学部 浮田宏生

1. はじめに

光ピンセット技術を用いると、水中にある寸法数十 nm ~ 数十 μm の微小物体を捕捉・操作でき、物体形状によっては数百 rpm で回転できる。回転体には軸受けが不要である。本講演では、このような光ピンセットの応用技術を紹介する。また、回折限界を打破した近接場観測プローブ^{(1),(2)}や最近注目されている集積化学分析チップ用の光ミキサ⁽³⁾を詳説する。

2. 光ピンセット技術

ベル研究所のアシキン (A. Ashkin) は、光を物体に斜め入射することで吸引力を発生し、透明な誘電体微小球を光トラップすることに成功した⁽⁴⁾。具体的には光ビームを高 NA の対物レンズで集光照射する。この光ピンセット技術は、さっそく、生物学や医療の分野で生体細胞の非接触操作や細胞融合に用いられるようになった。その後、マイクロ化学の分野では微小反応物質の輸送⁽⁵⁾、機械の分野では微粒子の配列、微小物体の回転駆動⁽⁶⁾などに用いられ、応用範囲が急速に広がっている。

光ピンセットの対象となる微小物体は、固体でも液体でも生きた細胞でもよい。小型の半導体レーザーも光源として使用でき、光ファイバーによる光操作も可能である。1 mW のレーザーのトラップ力は pN 程度になり、熱運動と同程度である。重力や浮力は粒径の 3 乗に比例して増大し、小粒子は熱運動が大きいので、その中間に光ピンセットしやすい寸法がある (数 μm 程度)。以下に、基礎科学分野と産業分野の代表的応用例を示す。

2.1 基礎科学分野

初期には生物応用が多く、べん毛モータの回転トルクの測定がよく知られている。べん毛の直径が非常に小さく (20 nm) 光捕捉がむつかしいので、べん毛をガラスに化学固定し、本体の方を回転する。この本体を光ピンセットして釣り合わせ、そのときの光パワーに対応する

光圧から、逆にべん毛モータのトルクを測定している⁽⁷⁾。また、ミオシン 1 分子のステッピング運動を、光ピンセットしたビーズ (微小球) の動きとしてとらえた測定からは、8 nm ごとのステッピング運動と 5~6 pN の作用力が実験的に明らかにされた。

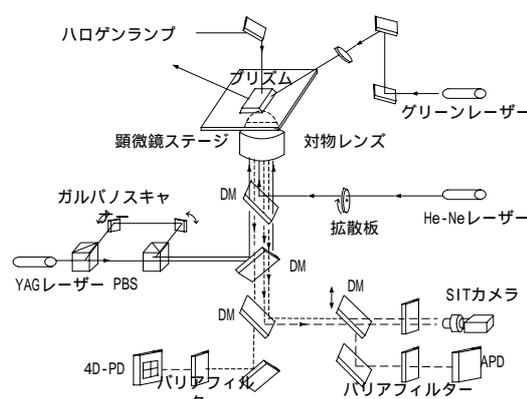


図1 ミオシン 1 分子観測 (化学反応と力学応答の同時測定)⁽⁸⁾

最近、光ピンセットを用いた 1 分子計測装置が開発された。図 1 に示す装置により、生体分子モータであるミオシン 1 分子の化学反応と力学反応の同時計測が可能になった。そして、ATP (アデノシン三リン酸) ADP (アデノシン二リン酸) の化学反応より数百 ms 遅れて力が発生していることが明らかになった⁽⁸⁾。同図で、近赤外レーザーは光ピンセット、赤レーザーは斜光暗視野照明、緑レーザーはミオシンにラベルした蛍光色素の励起に用いられている。緑レーザーは全反射角でプリズムに入射するので、この励起は深さ数十 nm のエバネセント領域にのみ発生する。そのため、エバネセント領域中にある 1 分子のみを分離して観測できる。このほか、

1. 物理学：光圧測定
2. 生物学：バクテリアの移動速度、鞭毛モータのトルク、ミオシン分子のステッピング運動、ミオシン分子のエネルギー変換
3. 化学：微小反応物質の輸送、反応制御

4. 光学：微小球レーザーの発振制御，光ピンセットプロブによる表面観察
5. マイクロ理工学：微粒子の回転速度測定，微粒子の抗力係数測定
などがある．

2.2 産業分野

図2は対向させた先球型シングルモード光ファイバーからの出射光による，直径 5 μm のガラス球の光ピンセット特性で，光ファイバーの収束位置は先端から 38 μm である(波長 1.31 μm)．実験では，対向中心を原点とし，右側の出射パワーを固定(15 mW)して左側の光パワーを変化している(0~40mW)．

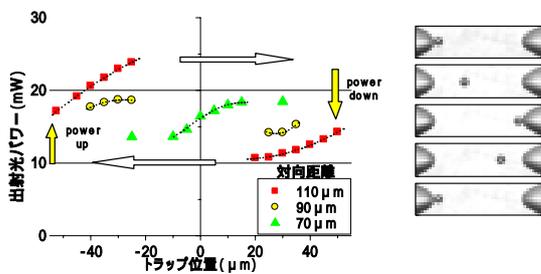


図2 対向型光ファイバーの光ピンセット特性

同図から，左の光パワーの増加により微粒子は右に連続移動し，光軸上の任意の位置で光トラップが可能なこと，対向距離が短い場合は，トラップ位置のパワー依存性が少なくなり光操作が不安定になることなどがわかる．いずれにしても，光ファイバーによるピンセットは，小型，低価格で操作環境の自由度が大きいので，今後の応用が期待できる^{(9),(10)}．このほか，

1. 宇宙工学：宇宙帆掛け船
2. 応用光学：微粒子の移動，微粒子の配列・接着，光ファイバートラップ
3. 生物学：細胞融合
4. 機械工学：羽根型光圧回転体，円柱型光圧回転体，光配向子，光ミキサー，ギア型光圧回転体
などがある．

また，複数の光ビームを使用すれば，複数の微小構造物を接合しマイクロマシンの組立てに利用できる．捕捉用のアルゴン(Ar)レーザー(波長 514.5 nm)は，ハーフミ

ラーで2つに分けられ，それぞれが2次元に動くミラーで自在に走査され，これらのビームは，再び光軸をそろえ，対物レンズでサンプルに照射され，微粒子をトラップするとともに任意の位置へ移動する．接着加工用のレーザー光には，YAG レーザーの第3高調波(紫外光で波長は 355 nm)を用い，捕捉用レーザー光と同軸にしてサンプルに照射・接着硬化する．このようなシステムを利用し複雑な形状のマイクロ構造物を作製できる⁽¹¹⁾．

3. 光ピンセット金微粒子による近接場観察

走査型近接場光学顕微鏡“Scanning Near field Optical Microscope (SNOM)”は，サンプル表面に局在するエバネッセント光を利用し，回折限界を超える分解能を実現している⁽¹⁾．

観測用のプローブとしてはフォトカンチレバー⁽¹²⁾，光ファイバー⁽¹³⁾，金属探針⁽¹⁴⁾，金属球^{(15),(16)}などが試みられている．水中で光トラップした金微粒子によるプローブは，(1)寸法や形状が一定なので実験の再現性が高い，(2)サンプルとの衝突で試料やプローブを破損しない(距離制御不要)などの特徴があり，将来の SNOM 装置として期待されている．

ここでは，光ピンセット金微粒子プローブで，まず平坦表面に作製された屈折率格子，次に光ディスクの凹凸溝を観測できることを示す．前者はいわゆる Artifact 問題⁽¹⁷⁾の生じないサンプルである．なお，測定の分解能は，金微粒子直径，熱揺らぎ，散乱光強度(信号 S N 比)などに影響される．本実験では金微粒子の直径を 100 nm とし安定な光トラップ走査と再現性を実現した．

3.1 装置の構成

試作した SNOM 装置の概略を図3に示す．装置では，光トラップ用の Nd:YAG レーザー(波長 1064 nm)をビームエキスパンダーで拡大し(直径 8.2 mm)，油浸対物レンズ(NA=1.3)で集光する．トラップ効率の高い下方から金微粒子(直径 100 nm)に照射し，焦点位置に捕捉する．このとき熱による金微粒子のブラウン運動を抑圧するため，光トラップ走査に必要な最小限度の照射パワーに弱める必要がある．

また，観測用 Ar⁺レーザー(波長 488 nm)を同じ対物

レンズを用いて集光・照射する。

金微粒子からの散乱光 (Ar⁺レーザー) は、レンズ (f=180 mm) でピンホール (直径 5 μm) の位置に結像され、迷光成分が除去されフォトマルチプライヤー (PMT) で検出される。同時に走査状態を CCD カメラで観察する。PMT からの出力電圧を 10 bit A/D コンバータでデジタル化し、信号を PC に取り込み、画像化処理 (8 bit 化) およびフィルタリングを行って近接場を可視化する。

図 4 はサンプルチェンバー (図 3 右上部に相当) である。直径 100 nm の金微粒子プローブが純水の層を介してスライドガラス (屈折率グレーティング) 表面に押しつけられるように 2 次元走査される。

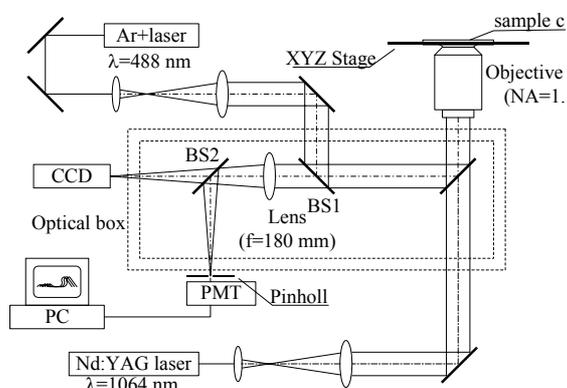


図 3 光ピンセット金微粒子による近接場顕微鏡

なお、光学系は除震台の上に配置され、Nd:YAG レーザー (図下方)、Ar⁺レーザー (図上方) を導くミラーなどの光学部品以外はすべて XYZ ステージ下の光学系ボックスに納められている。

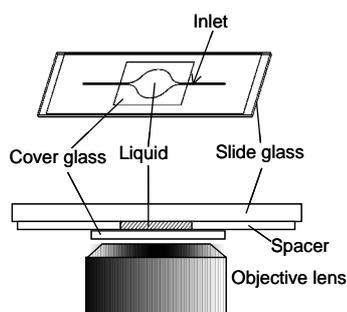


図 4 サンプルチェンバー

3.2 金微粒子の光トラップ特性

波長に比べて十分小さい微粒子を光トラップするには、焦点付近のレーザー強度分布 (勾配力) を利用する⁽¹⁸⁾。このため、光トラップ特性は光ビームのエネルギー分布のプロファイルに強く依存する。ビームプロファイルは、対物レンズの色収差 (可視域は補正済み)、金微粒子を分散している媒質 (水) による球面収差 (油浸対物レンズのマッチングオイルとの屈折率差に起因)、光学系の不均一性などに影響される。また、光軸方向の光トラップ力は光軸に垂直方向 (横方向) の数分の 1 程度と弱いので、金微粒子を散乱力で下からサンプルに押しつけて走査した。

なお、金微粒子の光トラップ特性は測定 (走査) 時間にも影響する。走査時間が長いと、トラップ脱落や分散された微粒子との衝突確率が増加する。これらの条件を考慮し、本近接場観測では、光パワー 25 mW で金微粒子を捕捉し、速度 1.6 μm /s で走査した。

なお、グリセリンなどを添加して媒質の粘度を増して熱運動を抑えることにより、より小さい光パワーでトラップが可能になる。

3.3 屈折率グレーティングの観測

グレーティングは石英系導波路 (PLC : Planar Light waveguide Circuit) のコア (幅 6 μm, 厚 6 μm) の上のクラッド (厚 30 μm) に、フェイズマスク法⁽¹⁹⁾により表 2 の条件で作製されている。0 次光によるグレーティングはピッチ 1.06 μm, 屈折率差 1.0 ~ 2.0 × 10⁻³ (推定) である。また、その間にとぎれとぎれではあるが 1 次光によるグレーティングが認められる (ピッチ 0.53 μm)。なお、これらのグレーティングはクラッド表面から深さ 30 μm のコア表面まで形成されている。

観測では、直径 100 nm の金微粒子を Nd:YAG レーザー

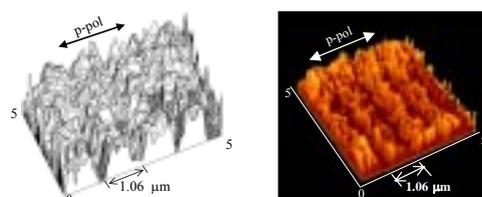


図 5 屈折率グレーティングの観測

で光トラップし, Ar⁺レーザーを照射しながらサンプル表面を走査し, 金微粒子からの散乱光をPMTで検出した. 走査速度 1.6 μm/s, ピッチ 50 nm で, 5 × 5 μm²の範囲を 2 次元走査した場合の測定時間は約 5 分である.

図 5 左は観測用 Ar⁺レーザーが p 偏光 (格子に垂直) の場合の散乱光観測結果である. 同図右は, 散乱光強度を濃淡画像化したもので, いずれの観測画像にも, 金微粒子の揺らぎによる散乱光の変動が認められる. 同図より, グレーティング周期 (1.06 μm) に対応した散乱光量の変化が明らかである.

これら 10 ライン分の散乱光データを平均し, サンプル表面の屈折率変化と比較すると, p 偏光, s 偏光ともグレーティングの屈折率周期 (1.06 μm) に対応した散乱光強度が観測されている. また, グレーティングの高次の縞に対応する微小変化がディップとなって観測される (周期 0.53 μm), 高分解能の観測が可能ながわかる. この結果は理論解析から予測される結果と傾向が一致している. つまり, Ar⁺レーザーの照射で金微粒子に誘起された表面プラズモンが, サンプル表面の屈折率変化に応じて散乱された結果と考えられる.

3.4 トラック案内溝

ここでは, 熱運動やサンプルの凹凸に伴う金微粒子の脱落を防止するため, 純水にグリセリンを添加し (13%), 高粘度の媒質中で観測した. 図 6 は, p 偏光 (電界方向がトラックに垂直) の場合の金微粒子の有無による光ディスク基板表面の観測結果である. 表面の凹凸にともなう金微粒子の上下動に基づく擬似信号 (Artifact) は, 金微粒子のない場合 (同図上部) の信号を減じることによりある程度除去されることが考えられる. 金微粒子があるとトラックエッジに対応した急激な変動が見られる. また, 波長よりも小さい金微粒子をブロー

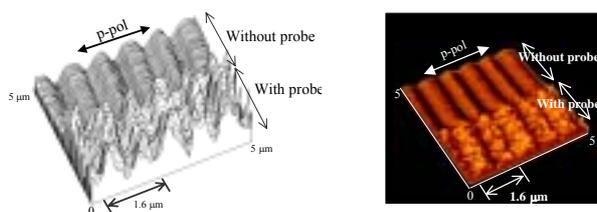


図 6 凹凸溝の観測

ブとすることにより, 高分解の凹凸構造の観測が可能になっている.

4. 光ミキサーとしての応用技術

光による回転体は, 軸受けが不要で遠隔操作が可能なので, 他の手段ではアクセスが困難な分野を中心に応用範囲が広がると思われる. ここでは図 7 のような集積化学分析チップの微小流路の混合部で, 試液と試薬の混合を促進する光ミキサーとしての応用を想定する^{(20), (21)}.

微小流路では流れが層流となるので, 混合は, 2 液が接する界面で拡散によって行われる. 現在, カオティックな流れを発生するマイクロ混合システムが複数提案されているが^{(22), (23)}, 混合効率をより向上するには, より能動的な攪拌システムが望まれる⁽²⁴⁾.

光ミキサーによる混合方法は, 2 液が接する界面に能動的な攪拌を誘起するので, 従来の受動的方法より効率的な混合が期待できる. 以下, 混合の基本特性として, 光ミキサーが誘起するマイクロ攪拌を実験解析する.

4.1 実験装置

流動の観測には, 図 9 の装置を用いた. まず, YAG レーザー (波長 1064nm) を直径 8.2mm に拡大して光学ボックスに導き, NA=1.4 の油浸対物レンズで集光し, 下からサンプルに照射する. これにより光ミキサーをトラップし回転させる. 次に, サンプル上から照明し, 光圧回転, 周辺媒質の流動を同一の対物レンズを通して高速度カメラで観測する.

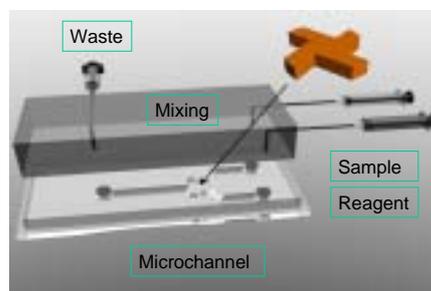


図 7 化学分析チップ混合部での光ミキサー応用モデル

このサンプル (光ミキサー: 直径 20 μm, 厚さ 12 μm) はフォトリソグラフィ法によりレジスト (SU-8) を用いて作製, スライドガラスとカバーガラスの間 (88 μm) の水中に分散されている. YAG レーザーに

より光ミキサーを光トラップし、レーザーパワーを変化させ、80、170、260rpmで反時計回りに回転させる。そして、光ミキサー下面を基準とし、20 μm 下の観測面までフレーム速度120FPSで観測する。観測画面の寸法は54 μm ×40 μm である。

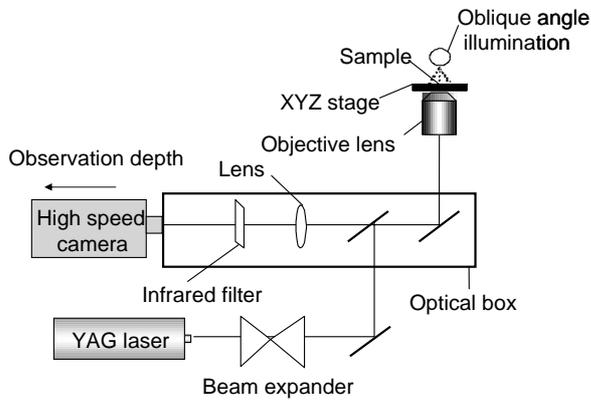


図8 マイクロ流動観測装置外略図

4.2 可視化方法と流動解析方法

流動の可視化には媒質の濃度を観測する光学法を用い、水中に乳脂肪コロイドを分散した。乳脂肪コロイドはレーザーや熱運動の影響を受けにくい。

記録された連続動画を、流体解析ソフト「Flow-vec32」により解析する。解析手順として、画像内に縦横0.5 μm 間隔で計測点を配置し、各フレーム画像間で計測点を中心とした一辺3.5 μm の正方形内に存在する濃淡パターンの類似性を追跡し、移動距離と時間から速度ベクトルを算出する(図9)。得られた速度ベクトルから誤ベクトルを削除した後、全フレームにおいて平均する。また、濃淡むらの類似度が信頼度(%)として算出される。

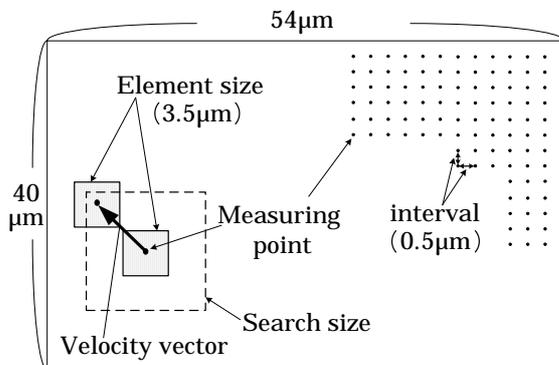


図9 濃淡パターン追跡による速度ベクトルの解析

流動解析において、濃淡パターンの中心である計測点の探索範囲を「追跡サイズ」で指定する。なお、探索範囲が画像領域を少しでも越えた場合は、計測点自体がキャンセルされ、速度ベクトルは出力されない。

光ミキサー円形部分以外の全計測点の速度ベクトルの絶対値を合計することにより、「総流量」を定義する。追跡サイズが濃淡むらの移動速度に対し小さすぎると、探索範囲内に移動した濃淡むらが存在しないために正確に流動を追跡できず、大きすぎると探索範囲が画像領域を越える計測点の増加により、いずれの場合も総流量は減少する。そこで、総流量が最大で、高信頼度を得られる追跡サイズを最適値と考える。

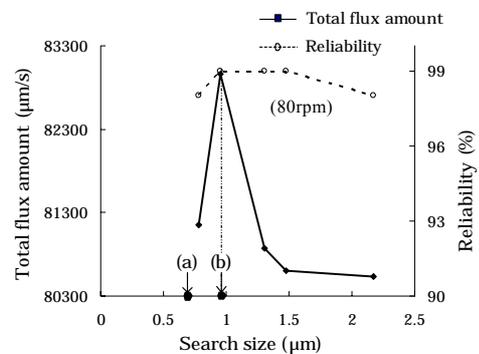


図10 最適追跡サイズと総流量、信頼度の関係

図10に各回転速度での最適追跡サイズの検討結果を示す。80rpmの場合は、1フレーム時間内での羽根先端部の移動距離が約0.7 μm であるのに対し、最適追跡サイズは約1.0 μm と、約1.4倍になる。170、260rpmの場合も同様であった。これらより、各回転速度での最適追跡サイズは1フレーム時間内での羽根先端部の移動距離の約1.4倍になることがわかった。

4.3 水平回転による攪拌の実験解析

各観測面で得られた速度ベクトルを図11に示す。80、170、260rpmと回転速度が増加するにつれ、光ミキサー周辺の流動が広がり半径方向に大きくなっている。特に260rpmでは、光ミキサー直径の2倍付近まで広がっている。また、各回転速度において観測面を下降させると、徐々に流動の広がりが小さくなる。

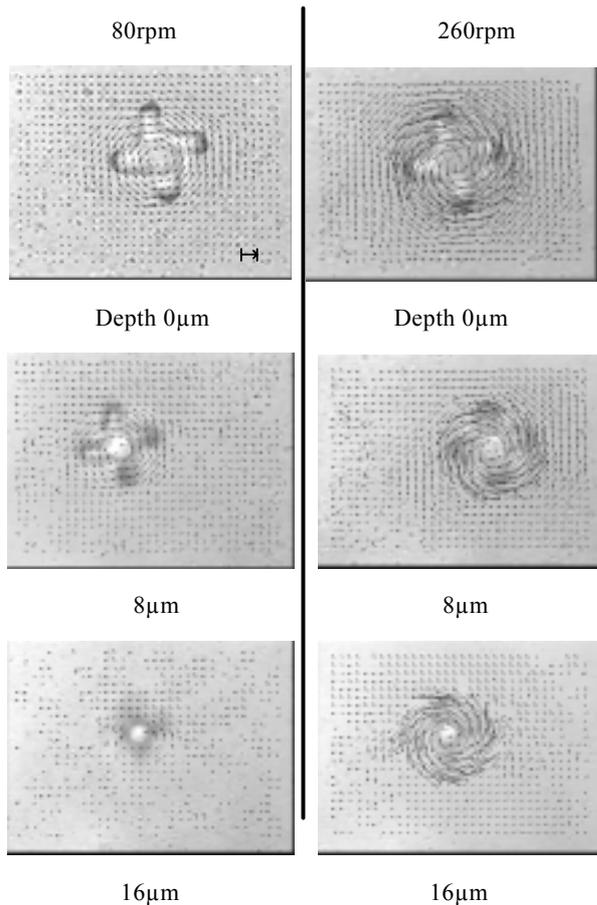


図 11 深さによる速度ベクトルの変化（水平回転）

4.4 水平回転による攪拌の理論解析の比較

理論解析の平均流量の算出方法を実験解析と同条件にするため、総流量を計測点数で割って面内流量を定義する。そして、図 12 の観測画面において、光ミキサー外側の流量を実験・理論比較する。

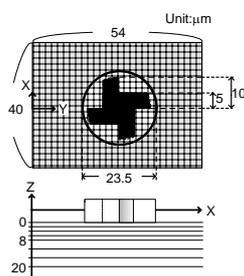


図 12 観測画面

具体的には、観測面内の各点で流速ベクトルの面内成分を求め、その絶対値を観測範囲(54 μm \times 40 μm)で積算し、回転軸方向の深さ依存性を解析する。回転速度 100, 200 rpm において、各深さの水平面で面内流量を平均し

た結果を、実験結果とともに図 13 に示す。

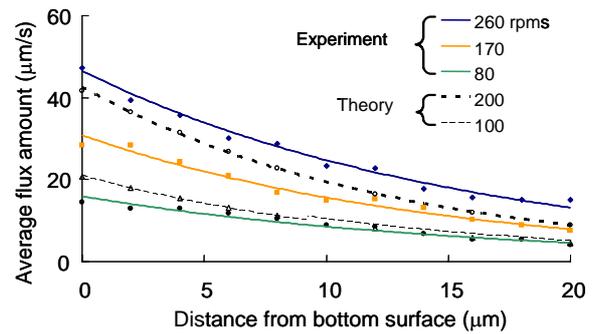


図 13 水平回転における平均流量の実験値と理論値

実験、理論とも平均流量は回転速度の上昇に比例して増加し、深さに対して指数関数的に減少した。またこの傾向は、各回転速度での実験値とかなりよく一致した。

4.5 垂直回転による攪拌の実験解析

アスペクト比が1/2程度の光ミキサーを光トラップすると、観測面に対して光ミキサーが垂直に回転する現象が見られる。直径 20 μm 、厚さ 10 μm の羽根型の光ミキサー

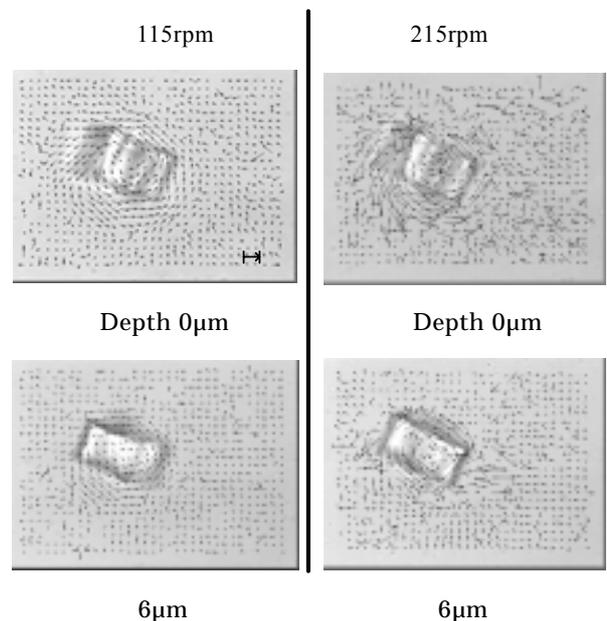


図 14 深さによる速度ベクトルの変化（垂直回転）

を回転速度 115, 155, 215rpm で回転させ、フレーム速度 120FPS にて記録する。観測面はレーザー焦点面を基準とし、12 μm 下までである。各観測面の速度ベクトルを

図 14 に示す．同図より，レーザー焦点付近の観測面では3次元的な大きな流れの流入と流出が発生しているのに対し，観測面が下降するにつれ流動の変化が小さくなる．また，回転速度が上昇するにつれ，流動の変化が大きくなっている．

以上，光ミキサーによるマイクロ攪拌を理論解析するとともに，異なる回転速度と観測面で可視化・実験解析し，攪拌流量の回転速度，深さ依存性を明らかにした．今後は，周辺媒質の粘性の影響や微小流路における2液混合実験を進める．

参考文献

1. 大津元一，小林潔：近接場光の基礎，オーム社，2002，
2. S. Kawata ed: Near-field optics and surface plasmon polaritons, Springer, 2001.
3. 浮田宏生：マイクロメカニカルフォトリクス—光情報システムの応用—，森北出版，2002.
4. Ashkin : Forces of a single-beam gradient laser trap on a dielectric sphere in the ray optics regime, Biophysical Journal, **61**, pp.569-582. 1992.
5. 増原極微変換プロジェクト編：マイクロ化学で可能になったこと，マイクロ化学-微小空間の反応を操る-，(株)化学同人，pp.165-231, 1993 .
6. E. Higurashi, H. Ukita, H. Tanaka and O. Ohguchi: Optically induced rotation of micro-objects fabricated by surface micromachining, Appl. Phys. Lett., **64**, 2209-2210, 1994.
7. S. M. Block, et al.: Compliance of bacterial flagella measured with optical tweezers, Nature, **338**, 514-518, 1989.
8. 石島秋彦，小嶋寛明，田中裕人：ナノ領域の光の生物への応用，応用物理，**68**，5，556-560, 1999
9. E. R. Lyons and G. J. Sonck : Demonstration and modeling of a tapered lensed optical fiber trap, SPIE **2383**, 186-198, 1995.
10. K. Taguchi, H. Ueno and M. Ikeda: Rotational manipulation of a yeast cell using optical fibers, Electronics Lett., **33**, 14, 1249-1250, 1997
11. 池野純一：光放射光を利用したマイクロファブリケーション，光技術コンタクト，**40**，11，99.22-27, 2002.
12. K. Fukuzawa et al.: "Imaging of optical and topographical distributions by simultaneous near field scanning optical/atomic force microscopy with a microfabricated photcantilever", J. Appl. Phys., **78** (1995) 7376-7381.
13. D. W. Pohl, W. Denk and M. Lanz : "Optical stethoscopy: Image recording with resolution $\lambda/20$ ", Appl. Phys. Lett., **44** (1984) 651-653.
14. Y. Inoue and S. Kawata: "Near-field scanning optical microscope with a metallic probe tip, Opt. Lett., **19** (1994) 159-161.
15. T. Sugiura et al. : "Gold-bead scanning near-field optical microscope with laser-force position control", Opt. Lett., **22**, 22 (1997) 1663-1665.
16. H. Ukita, H. Uemi and A. Hirata: Near Field Observation of a Refractive Index Grating and a Topographical Grating by an Optically Trapped Gold Particle, Optical Review **11**, 6, pp.365 - 369, 2004
17. B. Hecht, H. Bielefeldt, Y. Inoue and D. W. Pohl: "Facts and artifacts in near-field optical microscopy", J. Appl. Phys. **81** (1997) 2492-2498.
18. H. Furukawa and I. Yamaguchi : "Optical trapping of metallic particle by a fixed Gaussian beam", Opt. Lett., **23** (1998) 216-218.
19. K.O.Hill, B.Malo, F.Bilodeau, D.C. Johnson, and J. Albert : "Bragg gratings fabricated in monomode photosensitive optical fiber by UV exposure through a phase mask", Appl. Phys. Lett. **62**, 8 (1993) 1035-1037.
20. M. A. Burns et al.: An integrated nanoliter DNA analysis device, Science, vol. **282**, pp. 484-487, Oct.1998.
21. 金幸夫，北森武彦："集積化マイクロ化学システム"，マテリアルインテグレーション，**15**，2，pp. 38-43, 2002.
22. Y. K. Lee, J. Deval, P. Tabeling, and C. M. Ho: Chaotic mixing in electrokinetically and pressure driven micro flows. in Technical Digest of the MEMS, Interlaken, Switzerland, Jan. 2001, pp. 483-486.
23. A. D. Stroock et al: "Chaotic mixer for Microchannels", Science, **295**, pp. 647-651, 2002.
24. H. Ukita, K. Takada and Y. Itoh: Experimental and theoretical analyses of three dimensional micro-flows generated by an optical mixer, Proc. SPIE **5514**, pp.704-711, 2004.