

■原 著■ 2021 年度神奈川大学総合理学研究所共同研究助成論文

ノンプラズモニックナノ構造を用いた光マニピュレーション法の探 求

吉田匡志¹ 坪井泰之² 東海林竜也^{1,3,4}

Development of Optical Tweezers based
on Non-plasmonic Nanostructures

Masashi Yoshida¹, Yasuyuki Tsuboi² and Tatsuya Shoji^{1,3,4}

¹ Department of Chemistry, Faculty of Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

² Division of Molecular Materials Science, Graduate School of Science, Osaka City University, Sumiyoshi, Osaka 558-8585, Japan

³ Research Institute for Integrated Science, Kanagawa University, Hiratsuka City, Kanagawa 259-1293, Japan

⁴ To whom correspondence should be addressed. E-mail: t-shoji@kanagawa-u.ac.jp

Abstract: A plasmon-enhanced electric field exerts a strong optical force on nanomaterials, leading to their optical trapping on plasmonic nanostructures. Such nanostructure-assisted optical manipulation techniques may become a promising tool for manipulation of nanomaterials. Recently, we demonstrated stable optical trapping of polymeric nanobeads on a nanostructured titanium surface (B-Ti). Irradiation of an incoherent weak UV light source resulted in optical trapping of numerous nanobeads on an irradiated black-Ti surface area: nanostructured Ti-assisted optical tweezers (NASTiA-OT). Such laser-free optical trapping behavior would be caused by an electric-field enhancement effect of nanostructured TiO₂ as a passive layer of black-Ti surfaces. However, the precise trapping mechanism is still under debate. In the present study, we demonstrate optical trapping of polystyrene nanospheres on black-Ti surfaces fabricated by an acid-etching process. Acid treatment resulted in wrinkle-like nanostructures on titanium surfaces. Irradiation of nanostructures with near-infrared laser light led to optical trapping of polystyrene nanospheres. We discuss the formation mechanism of B-Ti based on the redox reaction, and trapping mechanism based on calculation of the local electric field with the finite element method.

Keywords: optical tweezers, optical force, polystyrene nanospheres, fluorescence microscopy

序論

高分子微小球や油滴、乳酸菌などのマイクロメートルサイズの微粒子が分散した溶液中にレーザー光を強く集光すると、光電場内の微粒子には光の力学作用である光圧が作用する。溶媒よりも屈折率の高い透明誘電体のマイクロ粒子の場合、光圧は焦点方向に作用するため、レーザー光出力が十分に大きければ微粒子を集光位置にて捕捉できる。この光圧によるマイクロ粒子捕捉・操作法は、1970年代にベル研究所の Arthur Ashkin が実現した¹⁾。さらに1986年には、現在市販化されている光ピンセット装置の原

型も開発した²⁾。

この光ピンセットは比較的簡便敏な装置（光学顕微鏡に備えられた高開口数の対物レンズで1本のレーザー光を集光する）で使用できることも相まって、光学・物理学・生物学を含む様々な分野にて発展した。例えば、光ピンセットの生物学分野への応用は1980年代後半から取り組まれている。タバコモザイクウイルスや³⁾、赤血球や緑藻、酵母菌、さらにアメーバのような原生生物などの光捕捉も実現している⁴⁾。このような光捕捉・操作に加えて、特

に生物物理学では細胞や細胞小器官、生体分子などの力学特性解析のツールとして光ピンセットは重宝されている。例えば、1本のDNAの両末端に高分子マイクロ粒子を化学結合させ、マイクロ粒子を2本の集光レーザー光でそれぞれ光捕捉し、伸縮させることによりDNAの引っ張り応力を非破壊・非接触で分析できる⁵⁾。このほかにも、液液相分離⁶⁾や感熱応答性ゲルの体積相転移⁷⁾などの誘導、気液界面近傍におけるタンパク質⁸⁾や有機分子^{9,10)}の結晶化や凝集誘起発光の制御¹¹⁾、顕微分光学的手法を組み合わせた捕捉粒子の構造解析¹²⁾など、様々な応用が挙げられる。

この光ピンセット技術をさらに応用展開するには、ナノメートルサイズの捕捉・操作法の確立が必要不可欠である。これまでにDNA、タンパク質、鎖状高分子、ケイ素や金などの無機ナノ粒子などの光捕捉が実現されている^{13,14)}。しかしながら、すべからくナノ物質を光圧によって捕捉できるかと言うと、いまだ超えなければならない問題がいくつか残っている。その内のひとつが、捕捉対象物のサイズが小さくなると光圧は極めて弱くなることである。光の波長よりも小さなナノ粒子に働く光圧 F は、近似的に次の式で与えられる

$$F = \frac{1}{2} \alpha V E^2 \quad (1)$$

ここで α は捕捉対象物の分極率、 E は光電場である。分極率はClausius-Mossottiの関係式より

$$\alpha = 3V\epsilon_0 \frac{\epsilon_r - 1}{\epsilon_r + 2} \quad (2)$$

で与えられる。 V は捕捉対象物の体積、 ϵ_0 は真空の誘電率、 ϵ_r は比誘電率である。(1)、(2)式よりたとえば捕捉対象物が球体の場合($V=4\pi a^3/3$, a は粒子半径)、粒径が10分の1小さくなると(例100 nm \rightarrow 10 nm)光圧は1000分の1まで弱くなることを示している。光圧によりナノ粒子を安定的に捕捉するためには、光圧のポテンシャルエネルギー($U = \alpha E^2/2$)が熱揺らぎのエネルギー $k_B T$ (k_B : ボルツマン定数、 T : 温度)よりも上回らなければならない。

このようなナノ粒子に働く光圧を増幅させる方法として、ナノ構造体の電場増強効果が注目されている。金ナノ構造体の局在型表面プラズモンを用いた光ピンセット(プラズモン光ピンセット)は、その代表的な方法論のひとつである¹⁵⁻¹⁷⁾。このプラズモン光ピンセットを用いると、従来の集光レーザー型光ピンセットよりも効率的にDNAや高分子鎖などのナノ粒子を捕捉できる。さらに近年、我々は新しい学理に基づくナノ増強型光ピンセットを

開発した。それが、ナノチタン増強光ピンセット(Nanostructured titanium-assisted optical tweezers; NASTiA-OT)である¹⁸⁾。チタン単結晶基板をプラズマドライエッチングすることで黒色化したブラックチタン(black titanium; B-Ti)の表面には、無数のナノニードル構造が付与されている。このB-Ti表面に紫外線光を照射すると、溶液中のポリスチレンナノ粒子が捕集されることを見出した。注目すべきは、このとき使用した光源であり、これまでの光ピンセットではレーザー光(コヒーレント光)が用いられるが、本研究では高圧水銀灯を用いた。インコヒーレント光にも関わらず、粒子の光捕捉を達成したことが極めて興味深い。しかしながら、その捕集メカニズムについては十分に理解できていないのが現状である。具体的には、なぜこのような現象が引き起こされたのか、どのようなナノチタン構造体が最も光捕捉に適しているか、レーザー光を用いると捕捉効率は向上するのか、といった基礎的知見はいまだ明らかではない。

そこで本研究では、B-Ti構造体の作製法から検討し、NASTiA光ピンセットの機能と特徴の解明を目指す。先行研究で作製したB-Tiはプラズマドライエッチングにより得ているが、本研究では酸腐食によるB-Ti作製を新たに試みた。酸腐食で得られたB-TiによるNASTiA光ピンセットが実現できれば、ナノ構造体作製のコスト削減と大面積化が期待できる。

材料と方法

B-Tiの作製

純チタンは耐食性に優れた金属として有名であるが、これはチタン表面に極めて安定な不動態の酸化膜が形成されることに起因する。一方で、高温高濃度塩化物溶液やHCl/H₂SO₄水溶液中では腐食が発生することが知られている。本研究では既報を参考にB-Tiの作製を試みた¹⁹⁾。具体的には、まず工業用純チタン箔(JIS 1種, Ti > 99.5%, 厚み: 0.015 mm)をアセトンおよび純水で超音波洗浄し乾燥させた。このチタン箔を加熱した混酸(HCl/H₂SO₄)水溶液に所定時間浸漬させた。浸漬後、純水で洗浄、乾燥させ試料とした。走査型電子顕微鏡(scanning electron microscope; SEM)(日本電子社製、JCM-6000 Neo ScopeTM)にて形態観察を行った。

NASTiA光ピンセット

本研究で用いた光学系を図1に示す。光捕捉光源として808 nm近赤外レーザー光を、蛍光励起光源として473 nm青色レーザー光を使用し、2本の

レーザー光を同軸で自作の正立型光学顕微鏡に導入し、100倍油浸対物レンズ (Nikon, 開口数 1.3) により B-Ti 表面に集光した。捕捉挙動を顕微蛍光法により観察した。捕捉試料として、市販品の直径 500 nm の蛍光色素含有ポリスチレン粒子 (蛍光極大波長 515 nm) の分散水溶液を使用した。独自の試料セルに試料溶液と B-Ti 基板を封入し、NASTiA 光ピンセットを試みた。

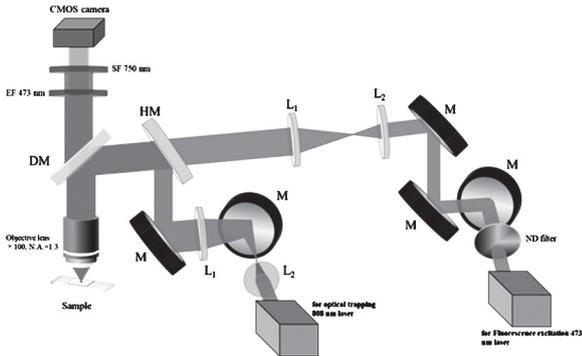


図 1. NASTiA 光ピンセットの光学系概要図.

結果

作製した B-Ti の評価

酸処理後のチタン箔を図 2 (a) に示す。酸処理前では、特有の金属光沢を観察できた。混酸水溶液への浸漬時間の増加に伴い、表面の黒色化が進行した。

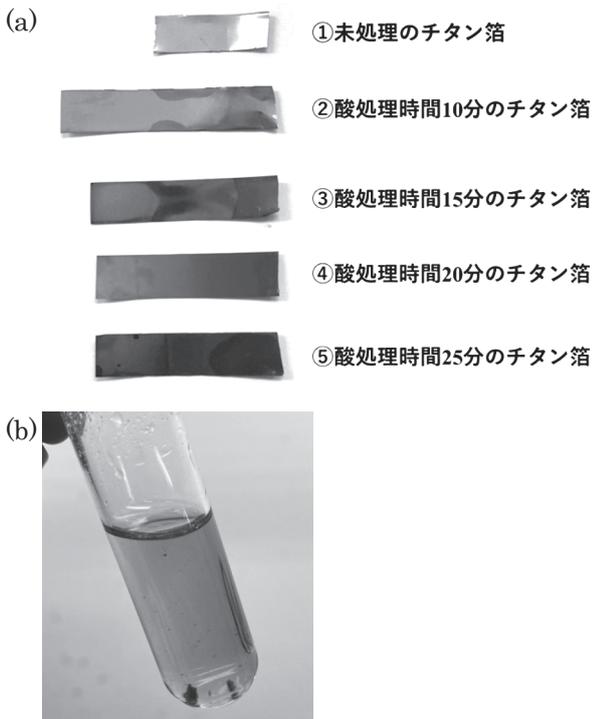


図 2. (a) 酸処理後のチタン箔の形態像. (b) 浸漬時間 25 分後の混酸溶液と崩壊したチタン箔.

浸漬時間 10, 15 分では、金属光沢がまだ残っているが、25 分経過すると表面が均一に黒色化した。25 分以上浸漬すると、図 2 (b) に示すように腐食がさらに進行しチタン箔が崩壊した。チタン箔の浸漬時間の増加に伴い、気泡が発生するとともに混酸溶液が青色を呈した。これは後述するように水素発生と三価のチタンイオン (Ti^{3+}) の生成に起因する。このように作製した B-Ti は、未処理のチタン箔に比べ親水性が向上した。親水性を評価するために接触角測定を試みたが、図 2 (a) に示すように薄膜 (厚さ 0.015 mm) のチタン箔が湾曲しているため定量的評価は困難であった。今後はより剛直性の高い十分な膜厚のチタン箔を用いる必要がある。

図 3 および図 4 に B-Ti の SEM 像を示す。浸漬時間の増加とともに腐食が進行し、チタン表面に凹凸が形成されることがわかった。金属光沢の残る浸漬時間 10, 15 分では、腐食により島状構造の凹凸が見られた。金属光沢が消失する浸漬時間 20 分以降では、表面の島状構造は消失し、先端がナノメートルサイズに先鋭化したシワ状模様の微細な構造が現れた。我々はこの構造をナノリンクル (nano-wrinkle) 構造と名付けた。このナノリンクル構造により、入射した光が反射せず、結果として黒色に見えるようになったと考えられる。ナノリンクル構造を定量的に評価するため、この構造の深さを計測したところ、浸漬時間 20 分で約 $2.9 \mu m$ 、25 分で約 $4.0 \mu m$ であった。

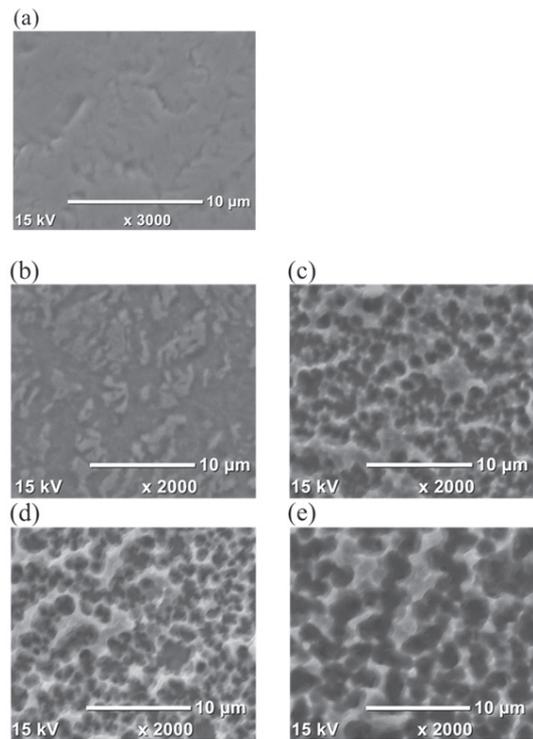


図 3. チタン箔の SEM 像: (a) 酸処理前, 浸漬時間 (b) 10 分, (c) 15 分, (d) 20 分, (e) 25 分.

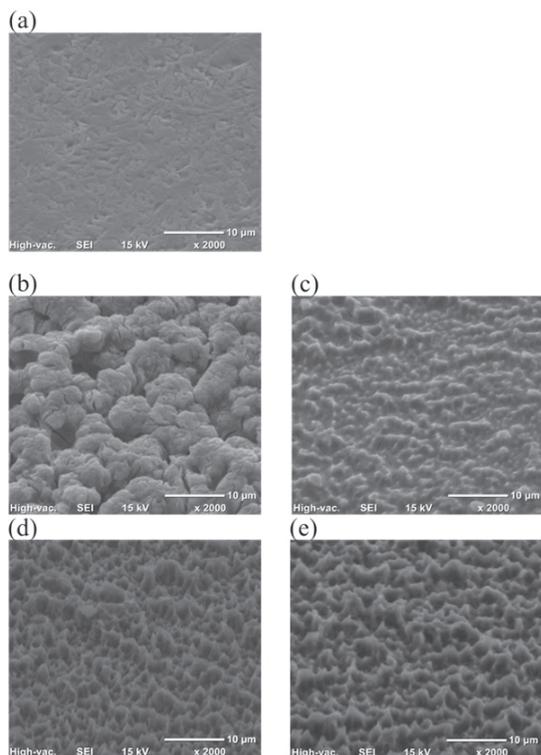


図 4. チタン箔の SEM 像 (傾斜 45 度) : (a) 酸処理前, 浸漬時間 (b) 10 分, (c) 15 分, (d) 20 分, (e) 25 分.

NASTiA 光ピンセットの実験的評価

以上のように作製した B-Ti の光捕捉能を評価すべく、直径 500 nm の蛍光性ポリスチレンナノ粒子 (PS 粒子) を捕捉対象に選び検討した。図 5 に浸漬時間 20 分の B-Ti を用いたときの蛍光顕微鏡像を示す。図内の白色円内が近赤外レーザー光の照射範囲である。近赤外レーザー光を 17 kW/cm² で照射したところ、照射開始 40 秒以内に PS 粒子由来の蛍光像を観察できた。さらに照射を続けると徐々に蛍光像の明るさが増大し、多数の粒子が集合している様子を観察できた。近赤外レーザー光の照射をやめると直ちに捕集された PS 粒子が拡散し溶液内に散逸した。これは近赤外レーザー光の On/Off に対応して繰り返し観察できた。

図 6 に浸漬時間 25 分の B-Ti を用いて、近赤外レーザー光を 17 kW/cm² で照射したときの蛍光顕微鏡像を示す。浸漬時間 20 分のときに比べてより短い時間 (約 30 秒) で粒子が光捕捉された。さらに照射を続けると蛍光像の明るさと面積が図 5 と比べ拡大していることから、より多くの PS 粒子が捕捉されたと考えられる。このときも近赤外レーザー光照射の停止とともに、捕捉粒子が散逸していく様子が観察された。これはすなわち光捕捉にともなう B-Ti 表面への吸着は起こらないことを示している。なお、蛍光像が白色円内の中心位置とずれている様に見えるが、これは蛍光励起光源の青色レーザー光と近赤外

レーザー光の集光位置がずれていることに起因する。より精細な捕捉挙動を追跡するためには、このようなずれの補正だけでなく、抜本的な自作顕微鏡の改善が必要である。本実験より作製した B-Ti を用いた PS 粒子の光捕捉に成功したと結論づけられる。今後、本手法の優位性や特徴を明らかにするためには、未処理の Ti 基板や先行研究の B-Ti 基板を用いた対照実験を綿密に実施する必要がある。

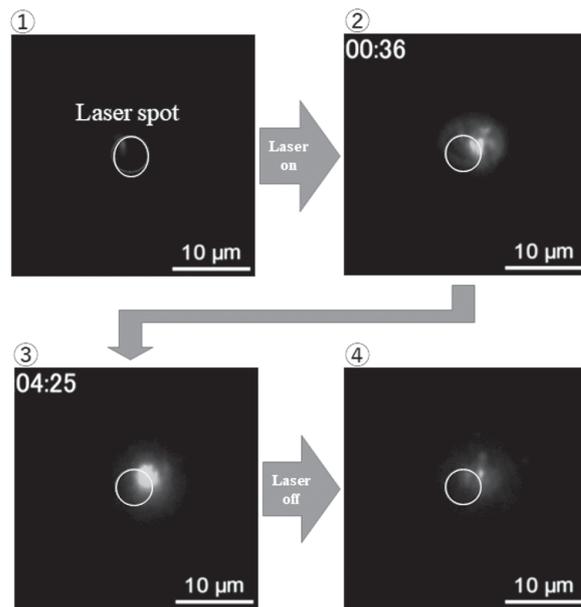


図 5. 浸漬時間 20 分で作製した B-Ti を用いたポリスチレンナノ粒子の光捕捉の蛍光顕微鏡像 (近赤外レーザー光強度 17 kW/cm²).

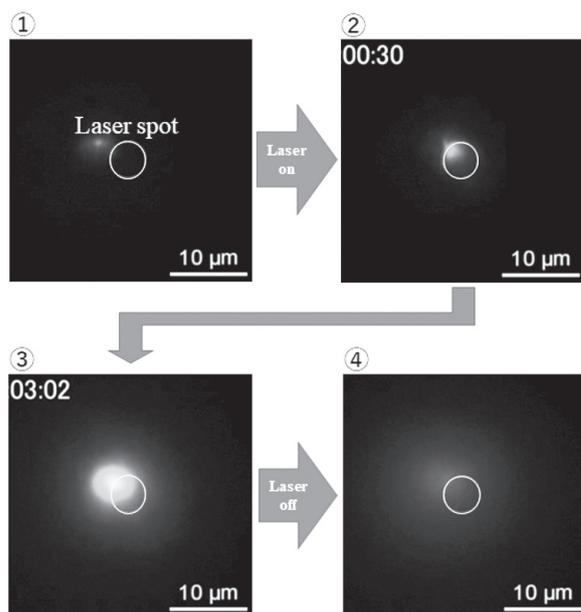


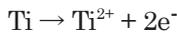
図 6. 浸漬時間 25 分で作製した B-Ti を用いたポリスチレンナノ粒子の光捕捉の蛍光顕微鏡像 (近赤外レーザー光強度 17 kW/cm²).

討論

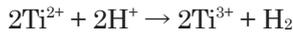
B-Ti を用いた光捕捉メカニズム

本研究の光ピンセット法はいまだ検討段階ではあるが、B-Ti の構造および B-Ti を用いたナノ粒子の捕捉メカニズムについて考察する。

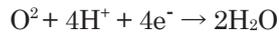
B-Ti 作製に高温混酸 (HCl/H₂SO₄) 水溶液による酸腐食を採用した。塩化物イオンが高濃度で存在する pH が低い高温水溶液では、チタンの不動態膜を破壊し、酸化還元反応による腐食 (孔食) が起こる²⁰⁾。図 7 に示すように、まず不動態膜に Cl⁻ が吸着すると、Cl⁻ とチタンの錯体が形成することで、不動態膜が溶解し微小欠陥が形成される。次に、露出した純チタン表面では、次のアノード反応が進行する。



チタンのイオン化傾向は非常に大きいため (Ti/Ti²⁺ の標準電極電位 $E^{\circ} = -1.63$ [V])、酸性水溶液中では H⁺ が酸化剤としてすみやかに働き、水素ガス H₂ の発生とともに Ti²⁺ は青紫色の Ti³⁺ になる。



アノード反応により生成した電子は不動態膜表面で溶存酸素とともに以下のカソード反応で消費される。



この酸化還元反応により、腐食が進行する。腐食反応後、水溶液中で厚さ数 nm 程度の不動態膜が生成し、チタン側から TiO、Ti₂O₃、TiO₂ となる層構造を形成するとともに内部に結合水を含む²¹⁾。そのため、B-Ti は純チタンに比べ親水性が増加したと考えられる。

このように得られた B-Ti 表面は不動態膜 (TiO₂) を有するナノリンクル構造を形成しており、この構造が入射光の電場増強の役割を果たしていると考えられる。図 8 に有限要素法により求めた増強電場プロファイルを示す。二次元平面でナノリンクル構造を模倣し、厚さ 10 nm の酸化チタン (TiO₂) 層をチタン素地に形成し、入射光 808 nm を照射したときをシミュレーションした。計算条件の最適化はいまだ検討段階ではあるが、基板表面で電場増強効果

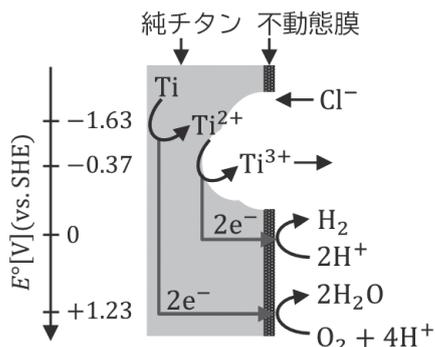


図 7. 高温混酸 (HCl/H₂SO₄) 水溶液中の腐食機構。

(enhancement factor; $EF = E^2/E_0^2$, E ; 応答電場、 E_0 ; 入射光電場) が 5 倍にまで増強することがわかった。これは、先行研究¹⁸⁾ のプラズマドライエッチングで得た B-Ti の増強電場プロファイルともおよそ一致している。緒言で述べたプラズモン光ピンセットとは異なり、B-Ti にはプラズモンの効果は働かない。この増強電場の有力な起源のひとつとして、半導体の Mie 共鳴が挙げられる。例えば Saitow らは、酸化チタンのナノ粒子を数 nm まで近接すると、ナノ粒子近傍で光アンテナ効果により入射光が 2000 倍まで増幅することを見出した²²⁾。本研究で得られた B-Ti にも同様の効果が発現するものと期待できる。今後、NASTiA 光ピンセットとしての機能と特徴を明らかにする。

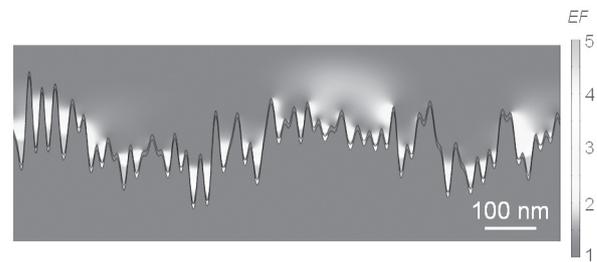


図 8. B-Ti 表面近傍の増強電場プロファイル。

謝辞

本研究の一部は、2021 年度神奈川大学総合理学研究共同研究助成 (RIIS202103)、科研費 (20K05558) を受けて実施した。

文献

- 1) Ashkin A (1970) Acceleration and trapping of particles by radiation pressure. *Phys. Rev. Lett.* **24**: 156-159.
- 2) Ashkin A, Dziedzic JM, Bjorkholm JE and Chu S, (1986) Observation of a single-beam gradient force optical trap for dielectric particles. *Opt. Lett.* **11**: 288.
- 3) Ashkin A and Dziedzic JM (1987) Optical trapping and manipulation of viruses and bacteria. *Science.* **235**: 1517-1520.
- 4) Ashkin A (2000) History of optical trapping and manipulation of small-neutral particle, atoms, and molecules. *IEEE J. Sel. Top. Quantum Electron.* **6**: 841-856.
- 5) Perkins TT, Quake SR, Smith DE and Chu S (1994) Relaxation of a single DNA molecule observed by optical microscopy. *Science.* **264**: 822-826.
- 6) Ushiro K, Shoji T, Matsumoto M, Asoh TA, Horibe H, Katsumoto Y and Tsuboi Y (2020) Microanalysis of single poly(N-isopropylacrylamide) droplet produced by an optical tweezer in water: Isotacticity dependence of growth and chemical structure of the Droplet. *J. Phys. Chem.* **124**: 8454-8463.
- 7) Juodkazis S, Mukai N, Wakaki R, Yamaguchi A, Matsuo S and Misawa H (2000) Reversible phase transitions in polymer gels induced by radiation

- forces. *Nature*. **408**: 178-181.
- 8) Yuyama K, Chang KD, Tu JR, Masuhara H and Sugiyama T (2018) Rapid localized crystallization of lysozyme by laser trapping. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **20**: 6034-6039.
 - 9) Yuyama K, Chiu DS, Liu YE, Sugiyama T and Masuhara H (2018) Crystal growth and dissolution dynamics of L-phenylalanine controlled by solution surface laser trapping. *Cryst. Growth Des.* **18**: 7079-7087.
 - 10) Yuyama K, Islam MJ, Takahashi K, Nakamura T and Biju V (2018) Crystallization of methylammonium lead halide perovskites by optical trapping. *Angew. Chem. Int. Ed.* **57**: 13424-13428.
 - 11) Wang S, Lin J, Ishiwari F, Fukushima T, Masuhara H and Sugiyama T (2020) Spatiotemporal dynamics of aggregation - induced emission enhancement controlled by optical manipulation. *Angew. Chem. Int. Ed.* **59**: 7063-7068.
 - 12) Yang J, Zhang RN, Liu DJ, Zhou X, Shoji T, Tsuboi Y and Yan H (2018) Laser trapping/confocal raman spectroscopic characterization of PLGA-PEG nanoparticles. *Soft Matter*. **14**: 8090-8094.
 - 13) Dienerowitz M, Mazilu M and Dholakia K (2008) Optical manipulation of nanoparticles: A Review. *J. Nanophotonics*. **2**: 021875.
 - 14) Sugiyama T, Yuyama K and Masuhara H (2012) Laser trapping chemistry: from polymer assembly to amino acid crystallization. *Acc. Chem. Res.* **45**: 1946-1954.
 - 15) Yuan Y, Gu C, Huang S, Song L and Fang F (2020) Advances on studying optical forces: optical manipulation, optical cooling and light induced dynamics. *J. Phys. D. Appl. Phys.* **53**: 283001.
 - 16) Shoji T and Tsuboi Y (2015) Plasmonic optical trapping of soft nanomaterials such as polymer chains and DNA: Micro-patterning formation. *Opt. Rev.* **22**: 137-142.
 - 17) Corsetti S and Dholakia K (2021) Optical manipulation: advances for biophotonics in the 21st century. *J. Biomed. Opt.* **26**: 1-23.
 - 18) Hashimoto S, Uenobo Y, Takao R, Yuyama K, Shoji T, Linklater DP, Ivanova E, Juodkazis S, Kameyama T, Torimoto T and Tsuboi Y (2021) Incoherent optical tweezers on black titanium. *ACS Appl. Mater.* **13**: 27586-27593.
 - 19) Okada M, Hara ES, Yabe A, Okada K, Shibata Y, Torii Y, Nakano T and Matsumoto T (2020) Titanium as an instant adhesive for biological soft tissue. *Adv. Mater.* **7**: 1902089.
 - 20) 木村雄二 (2010) 溶接接合教室—基礎を学ぶ—. *溶接学会誌*. **79**: 39-48.
 - 21) Shibata T and Zhu Y (1993) X-ray photoelectron spectroscopy analysis of anodic oxide film on titanium. *電気化学および工業物理化学*. **61**: 853-856.
 - 22) Hanatani K, Yoshihara K, Sakamoto M and Saitow K (2020) Nanogap-rich TiO₂ film for 2000-fold field enhancement with high reproducibility. *J. Phys. Chem. Lett.* **11**: 8799-8809.