

エバネセント波を利用する導波路化学・バイオセンサー

角 田 欣 一

Waveguide Chemical- and Bio-Sensors Using Evanescent Wave

Kin-ichi TSUNODA

The present status of waveguide chemical- and bio-sensors using evanescent wave is briefly reviewed. There are two types of waveguide sensors in terms of their forms, i.e., optical fiber sensors and planar waveguide sensors. The latter is further classified into two types, i.e., channel waveguides and slab waveguides. Their principles and recent applications as chemical- and bio-sensors are introduced. The waveguide sensors using evanescent wave can be highly sensitive and reliable, because the use of evanescent wave minimizes the disturbance from sample matrices.

Key words: waveguide sensor, chemical-sensor, bio-sensor, evanescent wave

本稿では、温度などの物理パラメーターを検出する以外の、化学および生物に関するエバネセント波を用いる光導波路センサーについて概観する。通常、「センサー」は、いわゆるガスセンサーのように、分析種の濃度の時間変化をリアルタイムでモニターするものを意味するが、本稿ではもうすこし広義に、さまざまな分析化学的応用も含むと解釈したい。そのほうが物質センシングにおける光導波路の意義をより広い立場で紹介できるのではないかと考えたからである。本稿では、まず、光導波路センサーの分類を簡単に論じた後、本題のエバネセント波を利用するセンサーのプラットフォームとその応用について、他の記事との重複をさけつつ紹介したい。なお、表面プラズモン共鳴 (SPR) センサーについては、すでに多くの解説もあり、本特集の他の記事でも取り上げられているので、ここでは比較のための最小限の記述にとどめた。また、この分野の最新の状況を知るには文献1) が最適と思われる。

1. 光導波路化学センサーの分類

表1に光導波路化学センサーの分類を示す。光導波路センサーはまず、1. 導波路を光の伝送路のみに用いるもの、2. 導波路を(広義の)分光セルに用いるもの、の2つに大

別される。1.の代表例は、いわゆる光ファイバーセンサーであり、現在では、酸素の蛍光センサーなどが実用化している。もちろん、本稿の主題は2.である。2.のアプローチの分析化学的な利点は、a) 長光路分光法(多重反射も含まれる)が容易に達成できる、b) エバネセント波を利用すると界面選択的で低バックグラウンドの分光セルとなりうる、という2点に集約されると思われる。この観点から、2.の光導波路センサーは、さらに2種類のタイプに分類される。すなわち、2.1 コア(導波層)を分光セルとして用いるもの、2.2 エバネセント波(クラッド)を利用するもの、の2つである。2.2が本稿の主題であることはいうまでもない。

2.1の代表的な例は、光ファイバー型キャピラリーセル(最近英語では、液体コア導波路(liquid core waveguide: LCW)という用語が定着している)である。すなわち、キャピラリーチューブの中に、チューブ材質の屈折率よりも高い屈折率をもつ溶液を満たすと、液体がコアの光ファイバーとなる。これを分光セルに用いる試みである。この場合、光ファイバーの原理を用いて、セルの長さを、場合によって数mまで延長できるので、ランベルト・ベールの法則により、吸光分光法の(のみならず蛍光法やラマン分

表1 光導波路化学センサーの分類。

1. 光導波路を光の伝送路のみに利用する
1.1 光ファイバーセンサー
2. 光導波路を分光セルとして用いる
2.1 コアを分光セルとして用いる
1) 光ファイバー型キャピラリーセル
2) コアをセンシング層とするプレーナー型光導波路センサー
2.2 エバネセント波（クラッド）を利用するセンサー
1) 光ファイバーセンサー
a) 屈折率センサー, b) 吸光センサー, c) 蛍光センサー
2) プレーナー型光導波路センサー
① スラブ光導波路センサー
a) 屈折率センサー, b) 吸光センサー, c) 蛍光センサー
② チャンネル型光導波路センサー
a) 屈折率センサー, b) 吸光センサー, c) 蛍光センサー

光法も) 高感度化が容易に達成できる。この方法では、コアとなる溶媒の屈折率がセル材質の屈折率よりも高くないと必要ではない。水の屈折率は1.33ときわめて低く、水試料が適用可能なセルの開発が望まれていたが、近年、デュポン社が、テフロン AF (AF はアモルファスフルオロポリマーの略) を開発し、きわめて低屈折率のチューブ (屈折率 1.29~1.31) が使用可能となったので、その応用範囲は大いに広がっている²⁾。一方、いわゆるプレーナー型の導波路センサー (後述) においても、導波層 (すなわちコア) をセンシング層として用いる試みもなされている³⁾。この場合、当然光路長は長くなるので高感度が得られることになるが、センサー作製上の種々の問題も生じて、必ずしも一般的でない。また、センシング層への光エネルギーの分布を考慮すると、センシング層をコアと考えるべきか、またエバネセント波 (クラッド) を利用するものとも考えるべきか、明確に区別のつかないものもある。これに関する理論的考察は本稿では扱わず、今回の主題である 2.2 エバネセント波の利用、に含めて考える。

さて、本題の 2.2 エバネセント波を用いる光導波路センサーについて論じる。光センサーには、一般に、① 電磁的な雑音の影響を受けにくい、② 有害な溶媒等を使用せずに測定ができる、③ 小型の可搬の装置ができる、④ (特に光の伝送路に光ファイバーを用いれば) リモートセンシングなどにも対応できる、などの利点がある。これに加えて、エバネセント波を用いる化学センサーには、非常に界面選択的であるので、バルクの試料溶液や気体試料のマトリックスの影響を受けにくいという、際立った特徴がある。すなわち、界面に吸着した分析種は高感度に検出されるが、一方、試料溶液中に溶解しているマトリックスに対しては、ほとんど感度をもたないというすぐれた性質をもっている (後述)。この特徴が、エバネセント波を化学センシングに利用する最大の利点と考えられる。このエバネセント

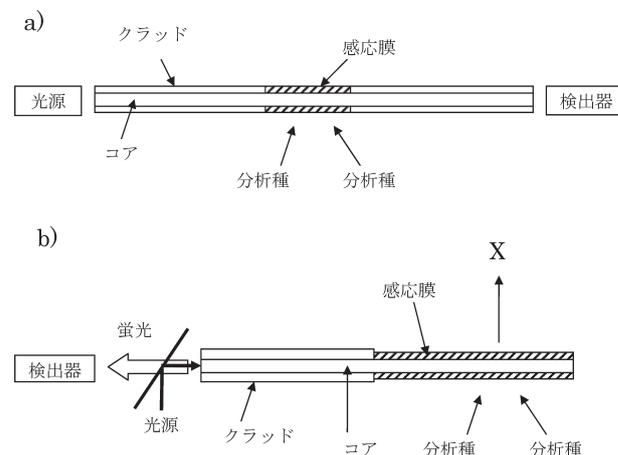


図1 光ファイバーセンサーの概念図。a) 屈折率センサーと吸光センサーの光学配置, b) 蛍光センサーの光学配置。

波センサーには、原理的な差ではないが、光導波路の種類の違いから、さらに大きく2つに分類することができる。すなわち、1) 光ファイバーを用いるもの、2) プレーナー型光導波路 (平面のガラスやプラスチック基板の表面や内部に導波路が構成されているもの) を用いるもの、の2つである。この場合、1) の光ファイバーは、光の伝送路のみならず分光セルの役目も同時に果たすことになる。一方、何を検出するかによっても分類することができる。すなわち、a) 屈折率変化, b) 吸収, c) 蛍光, などの検出に基づくセンサーがおもなものである。本稿では、1) 光ファイバー、2) プレーナー型光導波路に分けて、その現状を紹介する。

2. エバネセント波を利用する光導波路センサー

2.1 光ファイバーセンサー

光ファイバーセンサーは、通常、光ファイバーのクラッドの一部を剥ぎ取り、コアをむき出しにして、その表面にいわゆるセンシング層を形成させることにより、センシングを行う。図1に概念図を示す。センシング層 (クラッド) の屈折率が変化すれば、導波される光量が変化するので、屈折率変化を検出するセンサーにもなる (図1-a)⁴⁾。また、センシング層による光吸収の変化を観測する吸光度センサーも同様な光学配置で作製可能である (図1-a)⁵⁾。こうしたセンサーに関しても多くの論文が報告されているが、なかでも重要なのは蛍光センサーである。図1-bは、その代表的な光学配置である。導波光で励起して、蛍光は光ファイバーの外側 (図1-b中の X) に置かれた検出器で検出するというのが、最も単純な方式と考えられるが、初期を除いて実際はほとんど応用例がなく、蛍光もやはり光ファイバーの先端で観測する方式が主流である。これは、信号以外の余分な光を取り除くことができ、また、同時に多チャネ

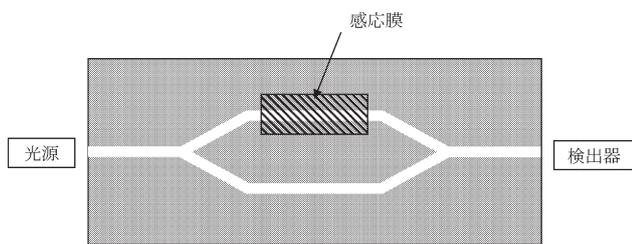


図2 マッハ・ツェンダー型干渉計を用いるプレーナ型光導波路屈折率センサー。

ルのセンサーを構成しやすいためである。しかし、この方式のセンサーでは、センシング層における蛍光を効率よく集めコア内を導波させるためには、センサー部の設計に注意を払う必要がある。一般にシングルモード (SM) などモード数の少ない光ファイバーのほうが、クラッドへの光の漏れが大きく、効率よく目的物質を励起できる。一方、多モードファイバーのほうが、より効率よく蛍光を集めることができる。また、多モードファイバーのほうが太いので、感応試薬の担持量を増やすことができる。SM 光ファイバーをセンサーに用いた例も、もちろん報告されているが、SM 光ファイバーは細すぎて扱いにくいこともあり、一般的には多モードのシリカ製やプラスチック製の光ファイバーが用いられている。また、センシング部とクラッドの屈折率が異なるとき、センシング部でコアを導波される光がクラッドのある部分でも導波されるためには、以下の式を満たす必要がある⁶⁾。

$$r_{aq} \leq r_{cl} \sqrt{\frac{n_{co}^2 - n_{cl}^2}{n_{co}^2 - n_{aq}^2}} \quad (1)$$

n_{co} : コアの屈折率, n_{cl} : クラッドの屈折率, n_{aq} : 水相 (センシング層) の屈折率, r_{aq} : センシング層の半径, r_{cl} : クラッド層の半径

こうした式に基づき、さらに、センシング部の先を尖らすなどの工夫をして、励起光強度および蛍光の集光効率を最大にするような工夫がなされている。

この光ファイバーセンサーは、免疫センサーへの応用が熱心になされている。その検出方式には、競争的免疫分析法、あるいはサンドイッチ免疫分析法などいわゆる一般的な蛍光免疫分析法の手法が応用されており、さまざまな応用が報告されている。特に米国では、たとえば Research International 社から、Analyte 2000 と Raptor という商品名の、検出部に光ファイバーセンサーを用いる可搬型の蛍光免疫分析装置が市販されている⁶⁾。これらは4チャンネルのセンサーを同時に装着することができ、ポリスチレン製の円柱状の導波路の表面に受容体を単分子層に修飾し、サンドイッチ式の蛍光免疫分析法を用いて目的物質の検出を

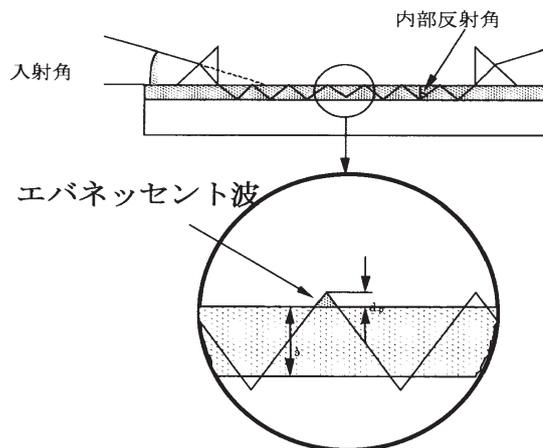


図3 スラブ光導波路の概念図。

行っている⁷⁾。これらの装置は、生物・化学兵器や感染性の病原菌などから社会を守るために、化学物質や病原菌をその場で検出するためのスクリーニング手段として開発されている。たとえば、Raptor は、コカイン (検出限界は尿中で 50 ng/ml), TNT (火薬) (水中で 440 ng/ml), 種々の毒素, 病原菌の検出などに応用されている⁶⁾。

2.2 プレーナ型光導波路センサー

板状の光導波路 (プレーナ型光導波路) を用いる研究例も多い。プレーナ型光導波路には、二次元方向にのみ光を閉じ込めるスラブ光導波路と、チャンネルを作製し、三次元方向に光を閉じ込めるチャンネル光導波路に大別される (表 1)。チャンネル導波路は、マッハ・ツェンダー型干渉計を利用した屈折率計 (図 2, 後述)^{8,9)} や、近年急速に開発が進んでいるマイクロフレイディクスを利用したマイクロチップへの応用¹⁰⁾ など、さまざまな高度な応用が期待できる半面、その作製にはマイクロ加工の設備と装置が必要である。一方、スラブ型光導波路 (図 3) は、通常の化学実験室でも簡単に作製可能であるため、実験室レベルでのセンサーへの応用および界面現象理解のための光導波路分光法への応用が盛んに行われている。

プレーナ型光導波路と光ファイバーの応用性の違いは現在のところそれほど大きくなく、どちらかでなければならぬといった応用はそれほど多くはないと思われる。しかし、プレーナ型導波路には、① 将来的には高度な光集積回路技術 (光スイッチング, 光の分波, 合波, 分光など, さらには電気光学, 音響光学, 磁気光学制御デバイスなどの利用) を利用するセンサーの開発, さらにセンサーの集積化がチップ上で可能, ② チャンネル光導波路を利用したマッハ・ツェンダー型干渉計を利用する屈折率計やマイクロフレイディクスを利用したマイクロチップへの応用がしやすい (前述), ③ 導波路の設計が簡単 (特にスラブ光導

波路)で高感度な導波路(導波路自体の性能,たとえば後述の相対感度や実行光路長について)が比較的簡単に作製可能であり,さらに感応試薬の担持量も多くできる,といった利点があるように思われる。

プレーナー型光導波路センサーのうち,屈折率変化を物質の検出に用いる光導波路センサーに関しては,岡本による大変すぐれた解説があり,興味ある方にはぜひ一読を薦める¹¹⁾。その内容を概説すれば,エバネセント波を利用する屈折率センサーには3種類ある。すなわち,1)表面プラズモン共鳴(SPR)センサー,2)光導波路センサー,3)漏洩モードセンサー,である(漏洩モードセンサーも広義の光導波路センサーといってもよいだろう)。また,これらのセンサーの感度は,まず,全体の電場の強度分布に占める試料層部分の場の強度の割合が大きいほど高感度になるが,その点ではSPRセンサーが最もその割合が大きい。また,感度を決めるもう1つの要素として試料との相互作用長(光路長)があるが,導波路センサーで数mm~10mm,漏洩モードセンサーで数十~数百 μm ,SPRセンサーで数十 μm である¹¹⁾。すなわち,絶対感度ではSPRが勝っているが,濃度感度などに関しては,導波路センサーや漏洩モードセンサーでも相互作用長が長いという利点を生かして,太刀打ちできる場合も多いと思われる。光導波路屈折率センサーの代表例は,1)マッハ・ツェンダー干渉計を利用したセンサー(図2),と2)モード間干渉を用いるセンサーである。1)は原理的にすぐれ,免疫センサーなど実用化に向けての研究も盛んに行われている^{8,9)}。一方,2)は,2つの偏光導波モード(TE, TMモード)間の干渉(複屈折と同じ現象)を利用するもので,感度は1)に比べてやや落ちるものの,スラブ型光導波路でも簡単に構成できる。また,岡本の総説では,端面結合法しか採用できないと紹介されているが,筆者らの研究では,プリズム結合法でも十分に2つの偏光導波モードを同時に励起できることが示されており,実験室レベルで簡単に作製できる便利なセンサーである^{12,13)}。また,漏洩モードセンサーの代表例は,タンパク質の相互作用解析用のセンサーとして実用化しているResonant Mirrorという商品である¹⁴⁾。

一方,プレーナー光導波路の吸光センサーや蛍光センサーとしての利用も活発である。なかでも,多重反射(長光路)という特徴を生かした吸光センサーは,最も典型的な応用と考えられる。吸光センサーの感度を示す指標として,相対感度 $S(\text{cm})$ と実効光路長 L_{eff} (物理長1cm)などが挙げられる。相対感度は,図3に示すように,導波路表面に吸着した分析種を導波路法(光路長1cm)と通常の表面から光をあてる透過法で測定した場合の感度比として

定義され,以下の式で表される。

$$S = \frac{n_{21} E_0}{\cos \theta} \times N_{\text{refl}} = \frac{n_{21} E_0}{\cos \theta} \times \frac{1}{2 T_{\text{eff}} \sin \theta} \quad (2)$$

θ : 内部反射角, n_{21} : 導波層(コア) n_1 と外界(クラッド) n_2 の屈折率比 ($n_{21} = n_2/n_1$), E_0 : 入射光の電場の振幅を1としたときの導波層表面での電場の強さ, N_{refl} : 単位長さあたりの導波光の反射回数, T_{eff} : グース・ヘンシェン偏移を考慮したときの実効の導波層の厚さ

また,実効光路長(nm)は,導波路表面にたとえば溶液が接している,その溶液に分析種が均一に分布しているとき,その分析種を導波路法で吸光測定する場合の実効のセル長(光路長)で,以下の式で表される。

$$L_{\text{eff}} = \frac{S \times d_p}{2} \quad (3)$$

ここで, d_p はエバネセント波のクラッドへのしみこみ深さを表し,頻出する式であるが,以下の式で表される。

$$d_p = \frac{\lambda_0}{2\pi n_1 \sqrt{\sin^2 \theta - n_{21}^2}} \quad (4)$$

λ_0 : 導波光の真空中での波長(nm)

相対感度 S は,たとえば導波層にガラスの薄板(厚さ50~200 μm)を用いる場合は,数十~数百のオーダーであるが,スパッター法により,導波層に高屈折率のガラスなどを用い,さらにシングルモード条件を用いることにより10000にも及ぶ値が得られる。一方,実効光路長のほうはせいぜいマイクロメートルのオーダーである。すなわち,導波路表面に吸着した物質に関してはきわめて高感度であるが,溶液試料中のマトリックスに関しては,ほとんど感度をもたないことになる。この特徴はすでに述べていることでもあるが,光導波路センサーの最もすぐれた特徴である。吸光センサーは,化学センサーへの応用が盛んである。Itohらは,スラブ光導波路を用いたpptレベルのきわめて高感度な大気中アンモニアセンサーを提案している。吸着現象を利用しているため,分析種濃度に対して直線的な応答は得られないが,逆に,非常に広い濃度領域にわたって応答が得られている¹⁵⁾。また,筆者らのグループでは,スラブ光導波路をパッシブセンサー(感応膜に感応分子を担持させないで,分析種の吸着現象のみをセンシングに利用する方式)に用いて,きわめて高感度な純水中のシリカ,あるいは環境水中の陰イオン界面活性剤の定量法を提案している。これは,シリル化剤で表面処理した導波路表面に分析種を含む発色したイオン対を吸着させることにより定量を行う方法である^{16,17)}。これ以外にも,ガス,イオン,有機塩素化合物など,応用例は多い。また,吸光センサーのも

う1つの応用として、透明伝導性酸化物のSnO₂やITOを導波層とし、同時に電極として用いる電極導波路の応用も重要な分野と思われる^{18,19}。現在、この方法はむしろ基礎的な分光電気化学測定に用いられることが多いが、将来的には、すぐれた化学センサーのプラットフォームになりうると思われる。

蛍光センサーに関しても応用が進んでおり、免疫センサーおよびDNAセンサーなどのバイオセンサーへの応用が中心である。導波路を分析種の励起に用いるアレイセンサーへの応用もなされており、今後、応用が広がると思われる²⁰。

以上のように、光導波路化学センサーは、現在、さまざまな応用が提案されており、その一部は実用化されつつある。光導波路は、物質センシングにさまざまな可能性を提供しうるが、実用化しているのはそのうちのほんの一部であり、今後の発展が期待される。光導波路センサーの好敵手としてSPRセンサーがあるが、前述のように、屈折率変化の絶対感度に関してはSPRセンサーのほうが有利な場合も多い。光導波路センサーにおいては、1)作用長が長いことを利用する、2)さまざまな透明誘電体を導波層に用いることができ表面の化学修飾に関しても多様性が大きい、3)さまざまな分光法(吸収、蛍光、ラマンなど)が適用できる、などの特徴があり、棲み分けが進んでいくと思われる。現在、全反射光学系を利用した蛍光顕微鏡などによって、生体分子の一分子計測が盛んに行われている。こうした測定は、バルク(試料マトリックス)の影響を最小限にできるエバネセント波分光法の利点を最大限に生かすことによって実現されている。この特徴は、本テーマの光導波路化学センサーにも直接あてはまることである。すなわち、本法は、試料マトリックスの影響を除き、実試料においても誤判定の少ない実質的な高感度センシングが可能な手法として注目に値すると考えられる。

文 献

- 1) O. S. Wolfbeis: "Fiber-optic chemical sensors and biosensors," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 3269-3284.
- 2) 角田欣一, 梅村知也: "光ファイバー型キャピラリーセルの分光分析への応用", *ぶんせき* (2001) 668-673.
- 3) H. Hisamoto, K.-H. Kim, Y. Manabe, K. Sasaki, H. Minamitani and K. Suzuki: "Ion-sensitive and selective active waveguide optodes," *Anal. Chim. Acta*, **342** (1997) 31-39.
- 4) (例として) M. D. Foster and R. E. Synovec: "Liquid chromatographic sensing in water on a thin-clad optical fiber by mode filtered light detection," *Anal. Chem.*, **68** (1996) 1456-1463.
- 5) (例として) J. Buerck, S. Roth, K. Kraemer, M. Scholz and

- N. Klaas: "Application of a fiber-optic NIR-EFA sensor system for *in situ* monitoring of aromatic hydrocarbons in contaminated ground water," *J. Hazard. Mater.*, **83** (2001) 11-28.
- 6) C. A. Rowe Taitt and F. S. Ligler: "Evanescent wave fiber optic biosensors," *Optical Biosensors: Present and Future*, eds. F. S. Ligler and C. Rowe Taitt (Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002) pp. 57-93.
- 7) F. S. Ligler, G. P. Anderson, P. T. Davidson, R. J. Foch, J. T. Ives, K. D. King, G. Page, D. A. Stenger and J. P. Whelan: "Remote sensing using an airborne biosensor," *Environ. Sci. Technol.*, **32** (1998) 2461-2466.
- 8) E. F. Schipper, A. M. Brugman, C. Dominguez, L. M. Lechuga, R. P. H. Kooyman and J. Greve: "The realization of an integrated Mach-Zehnder waveguide immunosensor in silicon technology," *Sens. Actuators B*, **40** (1997) 147-153.
- 9) P. Hua, B. J. Luff, G. R. Quigley, J. S. Wilkinson and K. Kawaguchi: "Integrated optical dual Mach-Zehnder interferometer sensor," *Sens. Actuators B*, **87** (2002) 250-257.
- 10) O. Hofmann, G. Voirin, P. Niedermann and A. Manz: "3D-flow confinement for efficient sample delivery-application to immunoassays on planar optical waveguides," *Proceedings of Micro Total Analysis Systems 2001 Symposium*, 5th (Monterey, U.S.A., 2001) pp. 133-134.
- 11) 岡本隆之: "エバネセント波を用いた表層屈折率測定センサー: 原理と実装", *分光研究*, **47** (1998) 19-28.
- 12) K. Tsunoda, S. Kikuchi, K. Nomura, K. Aizawa, K. Okamoto and H. Akaiwa: "Characteristics of sensor response of a difference interferometric slab optical waveguide refractive index sensor with a prism coupling method," *Anal. Sci.*, **15** (1999) 241-247.
- 13) K. Tsunoda, T. Umemura, K. Aizawa, Y. Takahashi and T. Otake: "Lock-in modulation detection for a difference interferometric slab optical-waveguide refractive-index sensor," *Anal. Sci.*, **16** (2000) 771-773.
- 14) T. Kinning and P. Edwards: "The resonant mirror optical biosensor," *Optical Biosensors: Present and Future*, eds. F. S. Ligler and C. Rowe Taitt (Elsevier Science B.V., Amsterdam, 2002) pp. 253-275.
- 15) Y. Abliz, K. Itoh and M. Murabayashi: "Detection of ammonia in the ppt range based on a composite optical waveguide pH sensor," *Sens. Actuators B*, **88** (2003) 239-245.
- 16) K. Tsunoda, E. Yamamoto and H. Akaiwa: "Sensitive spectrophotometric detection of silicic acid in pure water with slab optical waveguide absorption detector," *Chem. Lett.* (1996) 919-920.
- 17) T. Umemura, Y. Kasuya, T. Otake and K. Tsunoda: "Sensitive measurement of methylene blue active substances by attenuated total reflection spectrometry with a trimethylsilane-modified glass slab optical waveguide," *Analyst*, **127** (2002) 149-152.
- 18) K. Ito and A. Fujishima: "An application of optical waveguides to electrochemistry: Construction of optical waveguide electrodes," *J. Phys. Chem.*, **92** (1988) 7043-7045.
- 19) S. E. Ross, Y. Shi, C. J. Seliskar and W. R. Heineman: "Spectroelectrochemical sensing: Planar waveguides," *Electrochim. Acta*, **48** (2003) 3313-3323.
- 20) (例として) K. E. Sapsford, A. Rasooly, C. R. Taitt and F. S. Ligler: "Detection of *Campylobacter* and *Shigella* species in food samples using an array biosensor," *Anal. Chem.*, **76** (2004) 433-440.

(2005年6月6日受理)